

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-514332
(P2023-514332A)

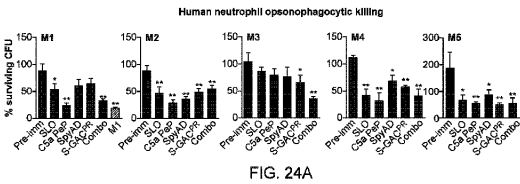
(43)公表日 令和5年4月5日(2023.4.5)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/09 (2006.01)	A 6 1 K	39/09		4 C 0 7 6
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04		4 H 0 4 5
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64		
C 0 7 K	14/315(2006.01)	C 0 7 K	14/315		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全127頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-549495(P2022-549495)	(71)出願人	519234567		
(86)(22)出願日	令和3年2月17日(2021.2.17)		ボックスサイト・インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和4年10月14日(2022.10.14)		V A X C Y T E , I N C .		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/018402		アメリカ合衆国9 4 0 7 0カリフォルニ		
(87)国際公開番号	WO2021/167996		ア州サン・カルロス、インダストリアル		
(87)国際公開日	令和3年8月26日(2021.8.26)		・ロード8 2 5、スウィート3 0 0		
(31)優先権主張番号	62/977,886	(74)代理人	100145403		
(32)優先日	令和2年2月18日(2020.2.18)		弁理士 山尾 憲人		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100156144		
(31)優先権主張番号	63/013,924		弁理士 落合 康		
(32)優先日	令和2年4月22日(2020.4.22)	(72)発明者	フェアマン, ジェファリー シー		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国9 4 0 7 0カリフォルニ		
(31)優先権主張番号	63/090,069		ア州サン・カルロス、インダストリアル		
			・ロード8 2 5、スウィート3 0 0、バ		
			ックスサイト・インコーポレイテッド内		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 多糖ータンパク質コンジュゲートを含むA群S T R E P免疫原性組成物

(57)【要約】

本開示は、A群レンサ球菌(GAS)ポリペプチド抗原および少なくとも1つのポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供するものである。本開示は、さらに、対象におけるGAS感染に対する免疫応答を誘導する前記組成物を使用する方法も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a. 第一のA群レンサ球菌(GAS)ポリペプチド抗原；
- b. 第二のGASポリペプチド抗原；および
- c. 少なくとも1つのポリペプチド-多糖コンジュゲート

を含む免疫原性組成物であって、該コンジュゲートのポリペプチドは、第三のGASポリペプチド抗原または非GASキャリアポリペプチドであり、かつ少なくとも1つの非天然アミノ酸を含んでおり、該コンジュゲートの多糖は、免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖が欠失しているGAS多糖またはそのバリエーションである、
免疫原性組成物。

10

【請求項 2】

第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼ、ストレプトリジンO(SLO)、Sib35、Sfb1およびSpyADから独立して選択される、請求項1記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOである、請求項1記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであり、該C5aペプチダーゼポリペプチド抗原は、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 5】

第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであり、該C5aペプチダーゼポリペプチド抗原は、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列から成る、請求項1～3のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

SLOポリペプチド抗原が、配列番号31または配列番号32と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであり、該SLOポリペプチド抗原は、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 8】

SLOポリペプチド抗原が、配列番号31または配列番号32のアミノ酸配列を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

SLOポリペプチド抗原が、配列番号31または配列番号32のアミノ酸配列から成る、請求項3記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 10】

第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであり、該SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであり、該SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号

50

52または配列番号53のアミノ酸配列から成る、請求項1～4のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項12】

第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSpyADである、請求項1または4記載の免疫原性組成物。

【請求項13】

C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1～3、8～9または12のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項14】

C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含む、請求項1～3、8～9または12のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項15】

C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号20または配列番号30のアミノ酸配列から成る、請求項1～3、8～9、12または14のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項16】

第三のGASポリペプチド抗原または非GASポリペプチド抗原が、化膿レンサ球菌接着/分裂(SpyAD)ポリペプチド、アルギニンデイミナーゼ(ADI)、配列番号25およびプロテインDから選択される、請求項1～15のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項17】

第三のGASポリペプチド抗原または非GASポリペプチド抗原が、化膿レンサ球菌接着/分裂(SpyAD)ポリペプチド、アルギニンデイミナーゼ(ADI)、配列番号25、プロテインDおよびSLOから選択される、請求項1～15のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項18】

nnAAが、クリックケミストリー反応基を含む、請求項1～17のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項19】

nnAAが、2-アミノ-3-(4-アジドフェニル)プロパン酸(pAF)、2-アミノ-4-アジドブタン酸、2-アジド-3-フェニルプロパン酸、2-アミノ-3-アジドプロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)フェニル)プロパン酸(pAMF)、2-アミノ-3-(5-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(6-(アジドメチル)ピリジン-3-イル)プロパン酸および2-アミノ-5-アジドペンタン酸から選択される、請求項1～18のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項20】

nnAAが、pAMFである、請求項18または19記載の免疫原性組成物。

【請求項21】

コンジュゲートポリペプチドが、第三のGASタンパク質であって、第三のGASタンパク質は、SpyADポリペプチドであり、かつ配列番号33と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項16～20のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項22】

SpyADポリペプチドが、配列番号33の位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、請求項16～21のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項23】

SpyADポリペプチドが、配列番号33または配列番号34のアミノ酸配列を含む、請求項16～22のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項24】

SpyADポリペプチドが、配列番号33または配列番号34のアミノ酸配列から成る、請求項22記載の免疫原性組成物。

【請求項25】

コンジュゲートポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、第三のGASポリ

10

20

30

40

50

ペプチドは、ADIポリペプチドであり、かつ配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項16~20のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項26】

ADIポリペプチドが、配列番号27、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列を含む、請求項16~20または25のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項27】

ADIポリペプチドが、配列番号27、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列から成る、請求項16~20または25のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項28】

コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、第三のGASポリペプチドは、SLOポリペプチドであり、かつ配列番号31、配列番号32または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項17~20のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項29】

SLOポリペプチドが、K98、K112、R151、K189、K272、K323、K357、K375、K407またはK464から選択される位置で3または4つのpAMF置換を含む、請求項28記載の免疫原性組成物。

【請求項30】

SLOポリペプチドが、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63または配列番号64のアミノ酸配列を含む、請求項29記載の免疫原性組成物。

【請求項31】

SLOポリペプチドが、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63または配列番号64のアミノ酸配列から成る、請求項29記載の免疫原性組成物。

【請求項32】

SLOポリペプチドが、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75または配列番号76のアミノ酸配列を含む、請求項28記載の免疫原性組成物。

【請求項33】

SLOポリペプチドが、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75または配列番号76のアミノ酸配列から成る、請求項28記載の免疫原性組成物。

【請求項34】

コンジュゲートのポリペプチドが、フェリチンポリペプチドであり、配列番号21と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項18~20のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項35】

フェリチンポリペプチドが、配列番号21の位置15でpAMF置換を含む、請求項34記載の免疫原性組成物。

【請求項36】

コンジュゲートの多糖が、免疫優性GlcNAc側鎖を欠失している、請求項1~35のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項37】

コンジュゲートの多糖が、約10 kDa~約45 kDaの平均分子量である、請求項1~36のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項38】

- a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；
- b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに

10

20

30

40

50

c. 化膿レンサ球菌の付着/分裂(SpyAD)コンジュゲートポリペプチド、および免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

【請求項39】

SpyADタンパク質が、配列番号33と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、請求項38記載の免疫原性組成物。

【請求項40】

SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含む、請求項38または39記載の免疫原性組成物。

【請求項41】

配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、請求項1または38記載の免疫原性組成物。

【請求項42】

配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号52のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、請求項1または38記載の免疫原性組成物。

【請求項43】

配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号32のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、請求項1または38記載の免疫原性組成物。

【請求項44】

配列番号29のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、請求項1または38記載の免疫原性組成物。

【請求項45】

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；
b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに
c. アルギニンデイミナーゼ(ADI)コンジュゲートポリペプチド、および免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

【請求項46】

ADIポリペプチドが、配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であり、位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、請求項45記載の免疫原性組成物。

【請求項47】

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；
b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに
c. フェリチンポリペプチド、および免疫優性N-アセチルグルコサミン側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲート

10

20

30

40

50

を含む、免疫原性組成物。

【請求項 48】

フェリチンタンパク質が、配列番号21と少なくとも95%同一であり、かつ位置15でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、請求項47記載の免疫原性組成物。

【請求項 49】

ポリペプチド-多糖コンジュゲートが、約10 kDa～約5000 kDaの平均分子量である、請求項1～48のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 50】

請求項1～49のいずれか一項記載の免疫原性組成物を対象に投与することを特徴とする、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する防御免疫応答を誘導する方法。

10

【請求項 51】

免疫原性組成物が、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する抗体応答を誘導し、対象におけるヒト組織に対する抗体応答は誘導しない、請求項50記載の方法。

【請求項 52】

免疫原性組成物が、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導し、該赤痢菌が、ポリラムノース・バックボーンを有する多糖を含む、請求項50または51記載の方法。

【請求項 53】

請求項1～49のいずれか一項記載の免疫原性組成物を投与することを特徴とする、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導する方法。

【請求項 54】

対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための、請求項1～49のいずれか一項記載の免疫原性組成物の使用。

20

【請求項 55】

対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための医薬品の製造における、請求項1～49のいずれか一項記載の免疫原性組成物の使用。

【請求項 56】

対象におけるGAS細菌に対する防御免疫応答を誘導するための医薬品の製造における、請求項1～49のいずれか一項記載の免疫原性組成物の使用。

【請求項 57】

対象におけるGAS細菌に対する防御免疫応答を誘導するための、請求項1～82のいずれか一項記載の免疫原性組成物の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2020年2月18日出願の米国仮出願番号第62/977,886号；2020年4月22日出願の米国仮出願番号第63/013,924号；2020年10月9日出願の米国仮出願番号第63/090,069号；および2020年12月9日出願の米国仮出願番号第63/123,293号に対する優先権を主張するものであって、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

(政府の助成金に関する説明)

本発明は、CARB-Xパススルー・エンティティの下、米国保健福祉省の事前準備・対応担当次官補局(HHS/ASPR)が授与する助成金番号93.360；サブアワード4500003905として米国政府の支援を受けて行われたものである。政府は、本発明について一定の権利を有している。

【0003】

(電子的に提出されたテキストファイルの説明)

本出願に関連する配列表は、紙のコピーに代えてテキスト形式で提供され、参照により本明細書中に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は、STRO_011_04

50

WO_ST25.txtである。このテキストファイルは、321kbであり、2020年2月12日に作成され、EFS-Webを介して提出されたものである。

【0004】

(本発明の分野)

本発明は、微生物およびワクチン開発の分野に関するものである。

【背景技術】

【0005】

(背景)

A群レンサ球菌(GAS)は、世界中で年間7億件の咽頭炎(「レンサ球菌咽頭炎」)を引き起こし、重篤な侵襲性感染、敗血症、壊死性筋膜炎、中耳炎および毒性ショック症候群の症例を増加させている重大なヒト病原体である。咽頭炎は、学童期に非常に多く、世界中で抗生物質が処方される主要な病因となっているため、ヒトの微生物叢全体に耐性の選択圧がかかっている。GASは、発展途上国における主要な死亡原因である免疫介在性リウマチ性心疾患(RHD)の原因でもある。現在、約3000万人がRHDに罹患しており、年間30万人以上が死亡し(60%が70才未満)、1150万人の障害調整生存年数が失われている。

10

【0006】

(発明の要約)

ある実施態様において、本開示は、第一のA群レンサ球菌(GAS)ポリペプチド抗原；第二のGASポリペプチド抗原；および少なくとも1つのポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供するものであって、該コンジュゲートのポリペプチドは、第三のGASポリペプチド抗原または非GASキャリアポリペプチドであって、少なくとも1つの非天然アミノ酸(nnAA)を含んでおり、前記コンジュゲートの多糖は、免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖が欠失しているGAS多糖またはそのバリエーションである。

20

【0007】

ある実施態様において、GASポリペプチド抗原の少なくとも1つは、全長GAS抗原である。ある実施態様において、GASポリペプチド抗原の少なくとも1つは、全長GAS抗原のペプチドフラグメントである。ある実施態様において、第一および第二のGASポリペプチド抗原は、C5aペプチダーゼ、ストレプトリジンO(SLO)、Sib35およびSfb1から独立して選択される。ある実施態様において、第一および第二のGASポリペプチド抗原は、C5aペプチダーゼおよびSLOである。

30

【0008】

ある実施態様において、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原は、配列番号1または配列番号3と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原は、配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原は、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含む。

【0009】

ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号5または配列番号7と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号5または配列番号7のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63または配列番号64と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、

40

50

配列番号61、配列番号62、配列番号63または配列番号64のアミノ酸配列を含む。

【0010】

ある実施態様において、非GASキャリアポリペプチドは、フェリチンである。ある実施態様において、第三のGASポリペプチド抗原または非GASキャリアポリペプチドは、化膿レンサ球菌の接着/分裂(SpyAD)ポリペプチド、アルギニンデイミナーゼ(ADI)、配列番号25およびプロテインDから選択される。ある実施態様において、第三のGASポリペプチド抗原はSLOである。

【0011】

ある実施態様において、少なくとも1つのnnAAは、コンジュゲートのポリペプチド中のリジン、ロイシンまたはイソロイシンに代えて置換される。ある実施態様において、少なくとも1つのnnAAは、コンジュゲートのポリペプチド中のリジン、ロイシン、アルギニンまたはイソロイシンに代えて置換される。ある実施態様において、nnAAは、クリックケミストリー反応基である。ある実施態様において、nnAAは、2-アミノ-3-(4-アジドフェニル)プロパン酸(pAF)、2-アミノ-4-アジドブタン酸、2-アミノ-3-(4-アジドフェニル)プロパン酸(pAF)、2-アミノ-4-アジドブタン酸、2-アジド-3-フェニルプロパン酸、2-アミノ-3-アジドプロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)フェニル)プロパン酸(pAMF)、2-アミノ-3-(5-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(6-(アジドメチル)ピリジン-3-イル)プロパン酸および2-アミノ-5-アジドペンタン酸から選択される。ある実施態様において、nnAAはpAMFである。

【0012】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、第三のGASタンパク質であって、これはSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号9と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SpyADポリペプチドは、配列番号9の位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む。ある実施態様において、SpyADポリペプチドは、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、コンジュゲートポリペプチドは、第三のGASタンパク質であって、これはSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号33と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SpyADポリペプチドは、配列番号33の位置K64、K287、K386およびK657にpAMF置換を含む。ある実施態様において、SpyADポリペプチドは、配列番号33または配列番号34のアミノ酸配列を含む。

【0013】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、第三のGASポリペプチドであって、これはADIポリペプチドであり、かつ配列番号13または配列番号15と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号13または配列番号15の位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、コンジュゲートポリペプチドは、第三のGASポリペプチドであり、これはADIポリペプチドであり、かつ配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号35または配列番号36の位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号35または配列番号36のアミノ酸配列を含む。

【0014】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、フェリチンポリペプチドであり、かつ配列番号21と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、フェリチンポリペプチドは、配列番号21の位置I5でpAMF置換を含む。ある実施態様において、フェリチンポリペプチドは、配列番号23のアミノ酸配列を含む。

【0015】

ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、ポリラムノースコアを含む。ある実

10

20

30

40

50

施態様において、コンジュゲートの多糖は、約5 kDa～約7 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、テトラマー、ヘキサマー、オクタマーまたはデカマーの多糖である。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、約10 kDa～40 kDaの平均分子量を有する。

【0016】

ある実施態様において、本開示は、A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに化膿レンサ球菌の付着/分裂(SpyAD)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号9と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号33と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号33または配列番号34のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号9または配列番号34のアミノ酸配列を含む。

10

【0017】

ある実施態様において、本開示は、A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびにアルギニンデヒミナーゼ(ADI)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号13または配列番号15と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0018】

ある実施態様において、本開示は、A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびにフェリチンポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、フェリチンタンパク質は、配列番号21と少なくとも95%同一であり、かつ位置I5でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、フェリチンタンパク質は、配列番号23のアミノ酸配列を含む。

40

【0019】

ある実施態様において、組成物は、約10%～約50%の第一のGAS抗原、約10%～約50%の第二のGAS抗原および約10%～約50%のポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む。ある実施態様において、組成物は、水酸化アルミニウムゲル(alum)、サポニン、モノホスホリルリピドA(MPL)またはその組み合わせから選択される1または1以上のアジュバントを更に含む。ある実施態様において、組成物は、水酸化アルミニウムゲル(Alhydrogel)を含む。

【0020】

ある実施態様において、本開示は、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する防御免疫応答を誘導する方法を提供するものであり、本明細書に記載した免疫原性組成

50

物を対象に投与することを特徴とする。

【0021】

ある実施態様において、対象は、18才またはそれ以上である。ある実施態様において、対象は、18才未満である。ある実施態様において、対象は、5才～17才の間、6ヶ月～9才または5才～9才の間である。

【0022】

ある実施態様において、GAS細菌は、M1、M2、M3、M4、M6、M11、M12、M22、M28、M75およびM89から選択される血清型である。ある実施態様において、GAS細菌は、M1、M3、M5、M9、M12、M18、M22、M25、M28、M71、M72およびM74から選択される血清型である。ある実施態様において、GAS細菌は、M1、M4、M6、M11、M12、M22、M44、M75、M77、M77およびM81から選択される血清型である。ある実施態様において、GAS細菌は、M1、M2、M3、M4、M6、M9、M12、M18、M22、M75、M77、M89およびM92から選択される血清型である。ある実施態様において、GAS細菌は、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M11、M12、M13、M28、M62およびM89から選択される血清型である。ある実施態様において、GAS細菌は、M1、M2、M3、M4、M6、M12、M22、M28、M49、M53、M68、M77、M80、M83、M87、M89およびM92から選択される血清型である。

10

【0023】

ある実施態様において、免疫原性組成物は、A群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対して対象における抗体応答を誘導し、対象におけるヒト組織に対する抗体応答を誘導しない。ある実施態様において、免疫原性組成物は、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導し、該赤痢菌はポリラムノース・バックボーンを有する多糖を含む。

20

【0024】

ある実施態様において、本開示は、対象に本明細書に記載した免疫原性組成物を投与することを特徴とする、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導する方法を提供する。ある実施態様において、本開示は、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための本明細書に記載した免疫原性組成物の使用を提供する。ある実施態様において、本開示は、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための、医薬品の製造における本明細書に記載した免疫原性組成物の使用を提供する。ある実施態様において、対象は、18才またはそれ以上である。ある実施態様において、対象は、18才未満である。ある実施態様において、対象は、5才～17才、6ヶ月～9才または5才～9才の間である。

30

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1Aおよび図1Bは、ネイティブポリペプチド抗原およびGAS多糖を有するコンジュゲートを作成する為に使用されるポリペプチド抗原を含む非天然アミノ酸の発現レベルを示す。

【図2】図2は、採血前のコントロールと比較した、ポリペプチド抗原-およびポリペプチド-多糖コンジュゲートによる免疫化血清の力価を示す。

【図3-1】図3A、図3B、図3C、図3Dおよび図3Eは、免疫前の血清コントロールと比較した、免疫血清の抗体力価およびIgG結合変化を示す。

40

【図3-2】図3Fは、SpyADノックアウトGASに結合するウサギIgGを示し、ネイティブGACへの結合を確認するものである。

【図4】図4は、免疫血清vs.免疫前血清コントロールの殺傷能力の上昇を示す。

【図5】図5A、図5B、図5C、図5D、図5Eおよび図5Fは、抗体価、病変サイズおよび細菌担持量ならびに生存%を含めた能動免疫化試験の結果を示す図である。

【図6】図6Aおよび図6Bは、IPチャレンジを受けたマウスの受動免疫化後の生存率%データを示す。

【図7】図7は、皮下チャレンジを受けたマウスの受動免疫後の病変サイズおよび細菌担持量データを示す図である。

50

【図 8】図 8 は、*S. flexneri* 2a OPS に対する免疫血清の ELISA 力価分析を示す。

【図 9】図 9 は、GAC の DBCO-PEG₄-NH₂ による誘導体化、その後 pAMF 修飾された SpyAD へのコンジュゲーションに関する一般的な反応スキームを示す。

【図 10】図 10 は、精製ネイティブ GAC、精製ネイティブ SpyAD [4pAMF] および精製ポリペプチド-多糖類コンジュゲートの SEC-MALS 分析を示している。

【図 11】図 11 は、ヒト心臓分解物に対する交差反応性について、抗原特異的抗血清を評価するウェスタンブロット分析を示す。

【図 12】図 12 は、選択抗原に対するフラグメント配列をグラフ表示したものである。

【図 13】図 13 は、選択抗原の比較発現データを示す。

【図 14】図 14 は、選択されたシングルおよびダブル SLO バリエーションの発現データを GFP と比較したものである。

【図 15】図 15 は、切断型 SLO 配列を非切断型 SLO 配列と比較したグラフである。

【図 16】図 16 は、切断型 SLO バリエーションについての発現レベル(全量および可溶性の量)を示す図である。

【図 17】図 17 は、HisTrap カラムクロマトグラフィーにより捕捉されたペプチドフラグメントの純度を示す図である。

【図 18】図 18 は、TEV 切断および HisTrap 精製後の選択発現ペプチドの純度を示す。

【図 19】図 19 は、サイズ排除クロマトグラフィーによる発現ペプチドの精製結果を示す。

【図 20】図 20 は、ウサギにおける選択された SLO 断片の免疫原性のインビボ評価を示す。

【図 21】図 21 は、OPK アッセイにおいて GAS をオプソニン化するために、モック(mock)免疫化およびペプチドの組合せで免疫化したマウスからの血清の使用を示す図である。

【図 22】図 22A、図 22B、および図 22C は、病変サイズおよび GAS 担持量データを含む、モック免疫化またはペプチド組合せで免疫化した野生型 CD-1 マウスの皮内チャレンジ(M1 89155 GAS で)の結果を示している。

【図 23】図 23 は、SLO バリエーションに対する機能抗体の存在を評価するための赤血球溶血アッセイの結果を示す。

【図 24】図 24A、図 24B および図 24C は、免疫化したウサギから得た免疫血清の存在下での、様々なヒト好中球血清型の GAS のオプソニン作用の殺傷、抗血清による溶解の阻止、および SLO を含む GAS 上清に曝露されたヒト好中球の酸化的バースト能の結果を示している。

【図 25】図 25A および図 25B は、別の GAS 血清型表面抗原に対する免疫血清の示差 IgG 結合を示す。

【図 26】図 26 は、10 個の pAMF 含有 SLO ポリペプチドバリエーションの発現を示す。

【図 27】図 27A および 27B は、精製の 2 つのステップの間の SLO バリエーションについての SDS-PAGE 分析を示す。

【図 28】図 28 は、SLO バリエーションの DBCO-GAC へのコンジュゲーションのための条件を示す。

【図 29】図 29 は、3-および 4-pAMF バリエーション SLO バリエーションコンジュゲートの SDS-PAGE 分析を示す。

【図 30】図 30 は、3-および 4-pAMF バリエーション SLO バリエーションコンジュゲートの SEC-MALS データを示す。

【図 31】図 31A および図 31B は、キャリアタンパク質として選択された SLO (Δ C101) バリエーションで作製したコンジュゲートを用いた免疫後のマウスの抗体価、およびそれら同じバリエーションで作製したコンジュゲートでワクチン接種したマウスから生じた抗血清を用いた溶血アッセイの結果である。図 31C は、選択された SLO (Δ C101) バリエーションで作られたコンジュゲートを用い、ELISA における被覆抗原として長鎖多糖を用いた、免疫後のマウスの抗体力価を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 3 2】図 3 2 は、SpyAD[4pAMF]と長鎖多糖のコンジュゲートについての SEC-MALS データを示す図である。

【図 3 3】図 3 3 A および図 3 3 B は、3~8pAMF を有する 22 の SLO バリエーションの発現レベルおよび精製した 5~8pAMF 含有バリエーションについての対応するゲルを示す。

【図 3 4】図 3 4 は、長鎖 GAC を有する 5-および 6-pAMF バリエーション SLO コンジュゲートの SDS-PAGE 分析を示している。

【図 3 5】図 3 5 は、長鎖 GAC を有する 5-および 6-pAMF バリエーション SLO コンジュゲートについての SEC-MALS データを示している。

【図 3 6】図 3 6 A、図 3 6 B および図 3 6 C は、GlcNAc を欠失している PS を発現する GAS 細菌株から得た精製多糖の NMR 分析を示す。

【図 3 7】図 3 7 は、実施例 19 に記載のように精製した場合に、M-タンパク質が多糖類から排除されることを示すウェスタンブロットを示す。

【発明の詳細な説明】

【0026】

(概要)

世界的に高い需要があるにも拘らず、GAS に対する安全で有効な市販ワクチンは存在しない。この病原体の特徴は、結合組織に遍在する免疫学的に不活性な炭水化物であるヒアルロン酸の一定の莢膜を含むワクチンチャレンジに特別な難点をもたらす。さらに、免疫優性の表面アンカー型 GAS M タンパク質は、非常に多くの型があり(200 以上の emm タイプ)、その二量体コイルドコイル構造の領域は、リウマチ性心臓病(RHD)の心臓組織に対して自己免疫応答を誘発する可能性がある。世界保健機関、国際ワクチン研究所、ウェルカム財団、ゲイツ財団などは、これらの重要な科学的課題に取り組んでおり、最も重要なグローバルヘルスのニーズを満たすために、最近、GAS ワクチン開発に関する諮問委員会を開催している。

【0027】

A 群レンサ球菌属

A 群レンサ球菌(GAS)は、グラム陽性、β 溶血性球菌のレンサ球菌である。それは、ヒトにおける様々な疾患に関与している。これらの疾患には、レンサ球菌咽頭炎(急性咽頭炎)、中耳炎および膿痂疹および蜂巣炎などの皮膚および軟組織感染症が挙げられる。また、まれに、壊死性筋膜炎(肉食病)や毒素性ショック症候群(TSS)などの侵襲性疾患(重篤な)疾患もまた含まれ得る。GAS の病原性には、M タンパク質、溶血毒素および細胞外酵素などのいくつかの病原因子が関与している。

【0028】

GAS ワクチンの研究は、主に、細胞壁に固定された M タンパク質に焦点が当てられてきた。過去の研究では、粗製全 M タンパク質製剤を、ヒトのボランティアに投与した後、咽頭において GAS 生菌によりチャレンジさせた。これらの製剤は、GAS のコロニー形成を減少させたが、一部の免疫されたボランティアでは急性リウマチ熱(ARF)の発症率が増加したことが報告された。現在までに、2 種類の N 末端 M タンパク質ワクチン製剤が、ヒトの臨床試験に及んでいる：6 価の製剤(Dale JB, 1999. Vaccine, 17:193-200; Kotloff et al, 2004. JAMA 292:709-715; Hall et al. Infect. Immun. 72:2507-2512)および 26 価の製剤(Hu et al., 2002. Infect. Immun. 70:2171-2177; McNeil et al., 2005. Clin. Infect. Dis. 41:1114-1122)。これらの製剤は、成人ボランティアにおいて良好な耐容性を示した。より最近では、30 種の GAS 血清型を提示する N 末端ペプチドを含む、同様の多価ワクチンが開発された(Dale et al., 2011. Vaccine 29:8175-8178.)。この実験的なワクチンに対して生じた血清は、30 種全てのワクチン血清型と 24 種(試験した 40 種中)の非ワクチン血清型に対して殺菌活性を示した。このような製剤は、選択された非ワクチン血清型から保護する能力を有することが示されているが、世界的に蔓延している全ての血清型から保護することはできない(Abdissa et al., 2006. Clin. Infect. Dis. 42:1362-1367; Ikebe et al., Working Group for Beta-Haemolytic Streptococci in Japan, 2007. 2001-2005. Epide

10

20

30

40

50

miol. Infect. 135:1227-1229; Nir-Paz et al., 2010. Epidemiol. Infect. 138:53-60; Steer et al., 2009. Lancet Infect. Dis. 9:611-616; O'Loughlin et al., 2007. Clin. Infect. Dis. 45:853-862)。30種類の血清型に含まれるものは、北米およびヨーロッパで流行している血清型に基づいており(Dale JB et al. Vaccine 29:8175-8178.)、流行地域で分離される多様な血清型とは異なることが多い。GASタンパク質およびタンパク質-GACコンジュゲートをワクチンとして使用することが、最近報告されているが(Di Benedetto, R. et al., 2020. J. Mol. Sci. no 22: 8558)、これらは、キャリアタンパク質およびPSバックボーンのB/T細胞エピトープの両方を破壊する可能性がある非特異的なコンジュゲーション法を用いている。さらに、これらのコンジュゲートもまた、交差反応が起こり得るGlcNAc免疫優性エピトープを保持するネイティブなGACを用いて作られたものである。

10

【0029】

従って、当分野においてGASに対して改良されたワクチンに対する必要性が存在している。

【0030】

組み合わせワクチン

ある実施態様において、本開示は、2またはそれ以上のGASポリペプチド抗原およびポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。明確化のために、本明細書に記載した組成物において、各ポリペプチドは異なる。例えば、第一、第二および第三のポリペプチド抗原またはポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む組成物においては、第一、第二および第三のポリペプチドは、異なる配列である。

20

【0031】

GAS抗原

ある実施態様において、本開示の免疫原性組成物は、2またはそれ以上のGASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、GASポリペプチド抗原は、C5aペプチダーゼ、ストレプトリジンO(SLO)、レンサ球菌免疫グロブリン結合タンパク質35(Sib35)およびフィブロンネクチン結合タンパク質F1(Sfb1)から選択される。ある実施態様において、GASポリペプチド抗原は、C5aペプチダーゼ、ストレプトリジンO(SLO)、レンサ球菌免疫グロブリン結合タンパク質35(Sib35)、フィブロンネクチン結合タンパク質F1(Sfb1)および付着/分裂ポリペプチド(SpyAD)から選択される。これらのGAS抗原各々についてのUniProt参照識別名は、以下の表1に示される。

30

【0032】

【表1】

表 1: GAS 抗原の例示のための UniProt リファレンス

抗原	UniProt Ref
C5a	P15926
SLO	P0C0I3
Sib35	Q1XG74
Sfb1	Q48VN7

40

【0033】

ある実施態様において、GASポリペプチド抗原は、全長ポリペプチド抗原配列を含む。ある実施態様において、GASポリペプチド抗原は、全長ポリペプチド抗原配列のフラグメントを含む。例えば、ある実施態様において、免疫原性組成物は、C5a GASポリペプチド抗原を含んでおり、前記C5aポリペプチドは、全長C5aポリペプチドのフラグメントである。ある実施態様において、C5aフラグメントは、アミノ酸90~1035の全長タンパク質を含む(例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号29または配列番号30を含

50

む)。ある実施態様において、免疫原性組成物は、SLO GASポリペプチド抗原を含んでおり、前記SLOポリペプチドは、全長SLOポリペプチドのフラグメントである。ある実施態様において、SLOフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸79～571を含む(例えば、配列番号5、配列番号6、配列番号31または配列番号32を含む)。

【0034】

ある実施態様において、GASポリペプチド抗原は、野性型アミノ酸配列において1または1以上のアミノ酸の変異を含む。例えば、ある実施態様において、免疫原性組成物は、C5a GASポリペプチド抗原を含んでおり、前記C5aポリペプチドは、1または1以上のアミノ酸の変異を含む。ある実施態様において、アミノ酸の変異は、D131AおよびS513A(例えば、配列番号3、配列番号4または配列番号30)を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、SLO GASポリペプチド抗原を含んでおり、前記SLOポリペプチドは、1または1以上のアミノ酸の変異を含む。ある実施態様において、アミノ酸の変異は、W535A(例えば、配列番号7、配列番号8または配列番号32)である。

【0035】

例示したGAS抗原のアミノ酸配列は、以下の表2に示される。変異アミノ酸は、太字にて示される。ある実施態様において、下線およびイタリックで示したアミノ酸は、成熟GAS抗原から切断される。

【表2】

表2：GAS抗原の例示

抗原	アミノ酸配列	配列番号
SLO [79-571 フラグメント] WT w/ His tag および TEV 配列	<i>MHHHHHHGSGENLYFQG</i> APKEMPLESAEKEEEKKSEDDKKKSEEDHTEEEINDKI YSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIIDLPGMGDKATVEV NDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNV NSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVT FKELQRKGVSNAPPLFVSNVAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAAFSAALKGTD VKTNGKYSIDILENSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRK NPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGINLSHQGAYVAQY EILWDEINYDDKGKEVITKRWDNNWYSKTSFPSTVIPLGANSRNIRIMARE CTGLAEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK	5
SLO [79-571 フラグメント] W535A w/ リーダー	<i>MHHHHHHGSGENLYFQG</i> APKEMPLESAEKEEEKKSEDDKKKSEEDHTEEEINDKI YSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIIDLPGMGDKATVEV NDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNV NSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVT FKELQRKGVSNAPPLFVSNVAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAAFSAALKGTD VKTNGKYSIDILENSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRK NPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGINLSHQGAYVAQY EILWDEINYDDKGKEVITKRWDNNWYSKTSFPSTVIPLGANSRNIRIMARE CTGLA AE WWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK	7
SLO(ΔC101) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来のGオーバーハングを有する	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDDKKKSEEDHTEEEINDKIYSLNYNELEVL AKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISIIDSVTDR TYPALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQKIHIIDLPGMGDKATVEVN DPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEA ALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNP ADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSNVAYGRTVFVKLETSSKSN DVEAAAFSAALKGTDVKTNGKYSIDILENSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYV ETTSTEYTSKGINLSHQ	53

10

20

30

40

50

【表 3】

C5a [90-1035 フラグメント] WT w/リーダー	MHHHHHHGSGENLYFQGKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGT VVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVA YYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMR VEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETKKAFD YAKSKGVSIVTSAGNDSSFQGGKTRLPLADHPDYGVVGTAAADSTLTVASYS PDKQLTETATVKTADKQDKEMPVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDV KGKIALIERGDIDFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAA FISRKDGLLKDNPKKTITFNATPKVLPTASGTKLSRFSSWGLTADGNIKPD IAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMASPLVAGIMGLLQKQYETQYPDMTPSE RLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSPRQQGAGAVDAKKASAATMYVTDKDN TSSKVHLNNVSDTFEVTVTVHNKSDKPQELYYQATVQTDKVDGKHFAALAPKA LYETSWQKITIPANSSKQVTVPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEGFVRFKQDP TKEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDG LQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITETIFAGTFAK QDDDSHYIIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLDK EGNVVWTSEVTEQVVKNNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYT YRVRYTPISSGAKEQHTDFDVIDNTTPEVATSATFSTEDRRRLTLASKPKTS QPVYRERIAITYMDEDLPTTEYISPNEGDTFTLPEEAETMEGATVPLKMSDF TYVVEDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK	1
C5a [90-1035 フラグメント] D131A/S513A w/リーダー	MHHHHHHGSGENLYFQGKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGT VVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVA YYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMR VEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETKKAFD YAKSKGVSIVTSAGNDSSFQGGKTRLPLADHPDYGVVGTAAADSTLTVASYS PDKQLTETATVKTADKQDKEMPVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDV KGKIALIERGDIDFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAA FISRKDGLLKDNPKKTITFNATPKVLPTASGTKLSRFSSWGLTADGNIKPD IAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMASPLVAGIMGLLQKQYETQYPDMTPSE RLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSPRQQGAGAVDAKKASAATMYVTDKDN TSSKVHLNNVSDTFEVTVTVHNKSDKPQELYYQATVQTDKVDGKHFAALAPKA LYETSWQKITIPANSSKQVTVPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEGFVRFKQDP TKEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDG LQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITETIFAGTFAK QDDDSHYIIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLDK EGNVVWTSEVTEQVVKNNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYT YRVRYTPISSGAKEQHTDFDVIDNTTPEVATSATFSTEDRRRLTLASKPKTS QPVYRERIAITYMDEDLPTTEYISPNEGDTFTLPEEAETMEGATVPLKMSDF TYVVEDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK	3

10

20

30

【0036】

上記の表2および本開示のその他の箇所における残基位置は、nnAAにより改変されたフラグメントおよび／またはリジン残基(例えば、特定のリジン残基のpAMF置換)を識別するために、全長配列(例えば、UniProt配列データベースを参照して表1および3において同定された通り)の残基位置に従った残基のナンバリングを示す。

【0037】

ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号1～4のいずれか一つと少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成るC5a GASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号29～30のいずれか一つと少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成るC5a GASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号1～4のいずれか一つのアミノ酸配列を含むか、またはから成るC5a GASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号29～30のいずれか一つのアミノ酸配列を含むか、またはから成るC5a GASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号5～8のいずれか一つと少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成るSLO GASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、

40

50

配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のいずれか一つと少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成るSLO GASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号5～8のいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、またはから成るSLO GASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含むか、またはから成るSLO GASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号10または33と少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成るSpyAD GASポリペプチド抗原を含む。ある実施態様において、免疫原性組成物は、配列番号10または33のアミノ酸配列を含むか、またはから成るSpyAD GASポリペプチド抗原を含む。

10

【0038】

ポリペプチド-多糖コンジュゲート

ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、少なくとも1つのポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む。ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、コンジュゲートポリペプチド(キャリアタンパク質とも呼ばれる)ならびに1または1以上のアミノ酸位置でコンジュゲートのポリペプチドに結合した多糖を含む。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SpyAD、ADI、配列番号25、フェリチンおよびプロテインDから選択される。例示のコンジュゲートのポリペプチドについてのUniProt参照による識別名が、以下の表3に示される。

20

【表4】

表3:コンジュゲートポリペプチドの例示のためのUniProtおよびCASリファレンス

抗原	UniProt (または CAS) Ref
SpyAD	Q9A1H3
ADI	P0C0B3
プロテイン D	R4R7Q5
フェリチン	P02792
CRM197	(CAS: 1272033-67-6)

30

【0039】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、全長ポリペプチド抗原配列を含む。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、全長ポリペプチド配列のフラグメントを含む。例えば、ある実施態様において、免疫原性組成物は、ポリペプチド-多糖コンジュゲートを含んでおり、前記コンジュゲートポリペプチドは、SpyADであり、かつ全長SpyADポリペプチドフラグメント(例えば、配列番号9または配列番号10)である。ある実施態様において、SpyADフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸33～849のフラグメントを含む(例えば、配列番号9または配列番号10を含む)。ある実施態様において、免疫原性組成物は、ポリペプチド-多糖コンジュゲートを含んでおり、前記コンジュゲートのポリペプチドは、ADIであり、かつ全長ADIポリペプチドのフラグメント(例えば、配列番号13または配列番号14を含む)である。ある実施態様において、免疫原性組成物は、ポリペプチド-多糖コンジュゲートを含んでおり、前記コンジュゲートのポリペプチドは、フェリチンであり、かつ全長フェリチンポリペプチドのフラグメントである(例えば、配列番号21または配列番号22)。

40

【0040】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、野性型アミノ酸配列において1または1以上のアミノ酸の変異を含む。例えば、ある実施態様において、コンジュゲ

50

ートのポリペプチドは、SpyADであり、前記SpyADポリペプチドは、1または1以上のアミノ酸突然変異を含む。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、ADIであり、前記ADIポリペプチドは、1または1以上のアミノ酸の変異を含む。ある実施態様において、アミノ酸の変異は、D277A(例えば、配列番号15または配列番号16)である。

【0041】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、1つまたは複数の非天然アミノ酸(nnAA)を含む。ある実施態様において、1つ以上のnnAAは、クリックケミストリー反応基を含む。ここで「クリックケミストリー反応基」とは、第2のクリックケミストリー反応基と、クリックケミストリー反応を起こすことができる基(例えば、アジドまたはアルキンなど)をいう。ある実施態様において、1つのクリックケミストリー反応基が、第2のクリックケミストリー反応基と反応して、置換トリアゾールを形成する。このタイプのクリック反応の例は、例えば、PCT国際公開WO2018/126229に見出すことができる。生物医学的用途で使用する金属を含まないクリック反応の一般的な例は、例えば、Kim, et al., Chemical Science, 2019, 10, 7835-7851に見出すことができる。クリックケミストリー反応基を含むnnAAの例としては、2-アミノ-3-(4-アジドフェニル)プロパン酸(pAF)、2-アミノ-4-アジドブタン酸、2-アジド-3-フェニルプロパン酸、2-アミノ-3-アジドプロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)フェニル)プロパン酸(pAMF)、2-アミノ-3-(5-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(6-(アジドメチル)ピリジン-3-イル)プロパン酸および2-アミノ-5-アジドペンタン酸を挙げることができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートのポリペプチドは、1つ以上のnnAAを含んでおり、前記nnAAの各々はpAMFである。

【0042】

例示のコンジュゲートのポリペプチドのアミノ酸配列は、下記の表4に示される。nnAAでの置換に適した部位は、太字および下線で示される。ある実施態様において、下線およびイタリックで記載されたアミノ酸は、産生中に成熟タンパク質から切断される。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4: キャリアタンパク質の例示

タンパク質	アミノ酸配列	配列番号:
ADI [完全長] WT w/ リーダー	MHHHHHHGSGENLYFQGTATPIHVYSEIGKLKKVLLHRPGKE IENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLA AESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEK TMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPPAIDPMPNLYFTRDPFATI GTGVSLSNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPYGGGKVPVMVYDRNETTRI EGGDELVLKDVLAAGISQRTDAASIEKLLVNIQKQNLGFKKVLAFEF ANNRKFHMLDVTFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEE KGDLAELLAANLGVKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDGSNTLTIAPGV VVVYNRNTITNAILESGLKLKLIHSELVGRGGPRCMSGMPFEREDI	13
ADI [完全長] D277A w/ リーダー	MHHHHHHGSGENLYFQGTATPIHVYSEIGKLKKVLLHRPGKE IENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLA AESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEK TMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPPAIDPMPNLYFTRDPFATI GTGVSLSNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPYGGGKVPVMVYDRNETTRI EGGDELVLKDVLAAGISQRTDAASIEKLLVNIQKQNLGFKKVLAFEF ANNRKFHMLATVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEE KGDLAELLAANLGVKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDGSNTLTIAPGV VVVYNRNTITNAILESGLKLKLIHSELVGRGGPRCMSGMPFEREDI	15
SpyAD [33-849 フラグメント] WT w/ リーダー	MHHHHHHGSGENLYFQGVKADDRASGETKASNTDSDLPKPE TIQEA K ATIDAVEKTLSSQQAELTELATALTKTAEINHLKEQQDNEQ KALTSAQEIYTNLTASSEETLLAQGAHQRELATETELHNAQADQHS KETALSEQKASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLNAISNPDAITK AAQTANDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEELAAQKAALAEK EAEISRLKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELK K LEASGYIGSAS YNNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQYQDIPADNRNFVDPDNLTPVQNE LAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFARLLSTS K THGNTRPS FVYGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASGLIRNDDNMYENIGAFNDV HTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTYGHAINFLRVDKHNPNAPVYL GFSTSNVGSLSNEHFVMFPESNIANHQRFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGT VSDTIAAIKGVSSLENRLSAIHQEADIMAAQAKVSQLOQKLASTLKQ SDSLNLQVRQLNDTKGSLRTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLASLKA ALHQTEALAEQAAARVTALVAK K AHLQYLRFKLNPNRLQVIRERIDN TKQDLAKTTSSLLNAQEALAAALQAKQSSLEATIATTEHQTLTLKTLAN EKEYRHLDEDIATVPDLQVAPPLTGKPLSYSKIDTTPLVQEMVKETK QLLEASARLAAENTSLVAEALVGQTSSEMVASNAIVSKITSSITQPSSK TSYGSGSSSTSNLISDVDESTQR	9
hFL [完全長] WT w/ リーダー	MHHHHHHGSGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSL GFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDI KKPAEDEWGTTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFL ETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD	21

【表 6】

eCRM-pAMF6 変異体	MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQXGIQKPKSGT QGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTK VLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSL PFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKQDAMYEYMAQAC AGNRVRNSVGSSLSCLNDWDVIRDXTTKIESLKEHGPIKNKMSSE NKTVSEKAXQYLEEFHQTALEHPSELSELXTVTGTNPVFAGANYA VNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIV QSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRP AYSPGHXTQPFLLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTP LPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMCRAIDGDVTFCRPK SPVYVGNGVHANLHVAFHRSSEKIHSEISSDSIGVLGYQKTVDHTK VNSXLSLFFFEIKS	25
-------------------	---	----

10

20

30

40

50

【0043】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SpyADであり、配列番号9の位置K64、K287、K396およびK657で置換された4つのnnAAを含む。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SpyADであり、配列番号33の位置K64、K287、K396およびK657で置換された4つのnnAAsを含む。ある実施態様において、4つのnnAAは、各々pAMFである。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SpyADであり、配列番号11または配列番号12と少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、4つのnnAAは、各々pAMFである。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SpyADであり、配列番号34と少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SpyADであり、配列番号11または配列番号12のアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SpyADであり、配列番号34のアミノ酸配列を含むか、またはから成る。

10

【0044】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、ADIであり、配列番号13の位置K15、K193およびK316で置換された3つのnnAAを含む。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、ADIであり、配列番号35の位置K15、K193およびK316で置換された3つのnnAAを含む。ある実施態様において、3つのnnAAは、各々pAMFである。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、ADIであり、配列番号17、18、19または20のいずれか1つと少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、3つのnnAAは、各々pAMFである。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SpyADであり、配列番号26、27、37または38のいずれか1つと少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、ADIであり、配列番号17、18、19または20のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、またはから成る。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、ADIであり、配列番号26、27、37、38のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、またはから成る。

20

【0045】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLOポリペプチドである。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLO(Δ C101)であり、配列番号53のK98、K112、R151、K189、K272、K323、K357、K375、K407およびK464から選択される位置で置換された3または4つのnnAAを含む。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLO(Δ C101)であって、位置K98、R151、K272およびK357；位置K112、K189、K323およびK375；位置R151、K272、K357およびK407；位置R151、K272、K375およびK464；位置K112、K272、K357およびK464；位置K98、K189およびK357；位置K112、K189およびK323；位置K98、R151およびK272；位置K112、K272およびK375；または位置K112、K323およびK407で置換されたnnAAを含むか、またはから成る。ある実施態様において、3または4つのnnAAsは、各々pAMFである。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLOポリペプチドであり、配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63または64のいずれか1つと少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLOポリペプチドであり、配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63または64のいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、またはから成る。

30

40

【0046】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLOポリペプチドである。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLO(Δ C101)であり、配列番号53のK98、K112、R151、K189、K272、K323、K357、K375、K407およ

50

びK464から選択される位置で置換された5、6、7または8つのnnAAを含む。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLO(Δ C101)であり、位置K98、R151、K272、K357およびK407；位置K112、K189、K323、K375およびK464；位置K112、R151、K272、K357およびK407；位置K98、R151、K272、K357、K407およびK464；位置K112、R151、K189、K323、K375およびK464；位置K98、K112、K189、K323、K375およびK464；位置K112、R151、K189、K272、K357、K407およびK464；位置K98、R151、K189、K323、K375、K407およびK464；位置K112、K189、K272、K357、K375、K407およびK464；位置K98、K112、R151、K189、K272、K323、K357およびK375；位置K98、R151、K189、K272、K323、K357、K407およびK464；または位置K112、K189、K272、K323、K357、K375、K407およびK464で置換されたnnAAを含むか、またはから成る。ある実施態様において、5、6、7または8つのnnAAは、各々pAMFである。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLOポリペプチドであり、配列番号65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75または76のいずれか1つと少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、SLOポリペプチドであり、配列番号65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75または76のいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、またはから成る。

10

【0047】

ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、フェリチンであり、配列番号21の位置15で置換された1つのnnAAを含む。ある実施態様において、nnAAはpAMFである。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、フェリチンであり、配列番号23または配列番号24と少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、コンジュゲートのポリペプチドは、ADIであり、配列番号23または配列番号24を含むか、またはから成る。

20

【0048】

多糖

ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、GAS多糖、例えば、A群レンサ球菌炭水化物(GAC)である。GACは、免疫優性GlcNAc側鎖を有するポリラムノース・バックボーンを含んでなり、M型に関係なく全てのGAS血清型の菌株の表面に存在し、GASワクチン候補として検討されてきた。コンジュゲートの多糖とは、コンジュゲートを構成する多糖体成分として規定され得る。アフニティー精製した抗GAC抗体は、試験した3種類のGAS血清型のオプソニン化に成功し(Salvadori et al., 1995. J. Infect. Dis. 171:593-600.)、GACで免疫したマウスは、腹腔内および鼻腔内のGASチャレンジに対して保護された(Sabharwal et al., 2006. J. Infect. Dis. 193:129-135)。しかし、抗GAC抗体と、宿主心臓弁タンパク質(Goldstein et al., 1967, Nature 213:44-47)およびアクチン、ケラチン、ミオシンおよびビメンチンなどの細胞骨格タンパク質との間の免疫学的交差反応により、GASワクチン成分としてのGACの使用に関して重大な安全性についての懸念が提起される。

30

40

【0049】

ある実施態様において、化膿レンサ球菌の細菌細胞は、免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失している多糖またはそのバリエーションを産生するように遺伝子操作されてもよい。従って、ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、免疫優性GlcNAc側鎖を欠失するGACのバリエーションである(例えば、International PCT Publication No. WO 2013/020090 US Patent No. 10,780,155およびGao, N. J. et al., December 29, 2020. Infectious Microbes and Diseases, doi: 10.1097/IM9.0000000000000044を参照されたい)。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、ポリラムノースコアを含むGACである。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、約3 kDa~約10 kDa、約5 kDa~約10 kDa、約9 kDa~約10 k

50

Da、約9 kDa～約10 kDa、約3 kDa～約9 kDa、約3 kDa～約7 kDa、約3 kDa～約5 kDa、約5 kDa～約9 kDaまたは約5 kDa～約7 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、約3 kDa、4 kDa、5 kDa、6 kDa、7 kDa、8 kDa、9 kDaまたは約10 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、テトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマーまたはデカマー多糖である。

【0050】

ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、約10 kDa～約45 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、約10 kDa～約15 kDa、約15 kDa～約20 kDa、約20 kDa～約25 kDa、約25 kDa～約30 kDa、約30 kDa～約35 kDaまたは約35 kDa～約40 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、約15 kDa～約40 kDa、約15 kDa～約35 kDa、約15 kDa～約30 kDa、約15 kDa～約25 kDaまたは約15 kDa～約45 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、約20 kDa～約40 kDa、約20 kDa～約35 kDa、約20 kDa～約30 kDaまたは約20 kDa～約45 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、約10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDaまたは約45 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、少なくとも約10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDaまたは約35 kDaの平均分子量を有する。

【0051】

ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、GAS細菌培養物または細菌ストックから精製される。そのような精製方法は、当技術分野では既知であり、例えば、WO 2010/049806、国際PCT公開番号WO 2013/020090およびvan Sorge, et al., Cell Host Microbe., 2014, 15(6), 729-740を参照されたい。実施例1もまた参照されたい。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、合成多糖である。多糖の合成方法は、当技術分野では既知であり、例えば、Zhao, et al., Org. Chem. Front., 2019, 6, 3589-3596を参照されたい。実施例3もまた参照されたい。ある実施態様において、コンジュゲートの多糖は、コンジュゲートタンパク質へのコンジュゲーションを促進するために、クリックケミストリー反応基で修飾される。クリックケミストリー反応基の例は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際PCT公開番号WO 2018/126229に見出すことができる。例えば、ある実施形態では、コンジュゲートの多糖は、DBCOまたはDBCO-PEG(例えば、DBCO-PEG-NH₂)で修飾されている。いくつかの実施形態において、コンジュゲートの多糖は、DBCO-(PEG)₄-NH₂で修飾される。

【0052】

ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約10 kDa～約5000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約10 kDa～約50 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約10 kDa～約100 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約10 kDa～約200 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約10 kDa～約500 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約10 kDa～約1000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約100 kDa～約200 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約100 kDa～約300 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約100 kDa～約400 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約100 kDa～約500 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約100 kDa～約5000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、

約500 kDa～約5000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約1000 kDa～約5000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約2000 kDa～約5000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約3000 kDa～約5000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約4000 kDa～約5000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約1000 kDa～約3000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約2000 kDa～約3000 kDaの平均分子量を有する。ある実施態様において、ポリペプチド-多糖コンジュゲートは、約5000 kDa以上の平均分子量を有する。

10

【0053】

組合せワクチンの例示

ある実施態様において、本開示は、GAS C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびにSpyADコンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性GlcNAc側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖類またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖体コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号9または配列番号10と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号11または配列番号12のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号33と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号34のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号11または配列番号12のアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号34のアミノ酸配列を含むか、またはから成る。

20

【0054】

ある実施態様において、本開示は、GAS C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびにSpyADコンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性GlcNAc側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号31と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号32と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号44と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号45と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号46と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号47と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号48と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号49と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号50と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。あ

30

40

50

る実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号51と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号52と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、SLOポリペプチド抗原は、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含むか、またはから成る。

【0055】

ある実施態様において、本開示は、GAS C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびにSpyADコンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性GlcNAc側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原は、配列番号29または配列番号30と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る；SLOポリペプチド抗原は、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはから成る；およびSpyADコンジュゲートタンパク質は、配列番号33と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含有または構成し、位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号34のアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原は、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含むか、またはから成る；SLOポリペプチド抗原は、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含むか、またはから成る；およびSpyADコンジュゲートのタンパク質は、配列番号33のアミノ酸配列を含むか、またはから成り、位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む。ある実施態様において、SpyADタンパク質は、配列番号34のアミノ酸配列を含むか、またはから成る。

【0056】

ある実施態様において、本開示は、配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、本開示は、配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号52のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、本開示は、配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、本開示は、配列番号30のアミノ酸配列を含むか、またはから成るC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のアミノ酸配列を含むか、またはから成るSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のアミノ酸配列を含むか、またはから成るSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含むポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、本開示は、配列番号30のアミノ酸配列を含むか、またはから成るC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号52の

アミノ酸配列を含むか、またはから成るSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のアミノ酸配列を含むか、またはから成るSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、本開示は、配列番号30のアミノ酸配列を含むか、またはから成るC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号32のアミノ酸配列を含むか、またはから成るSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のアミノ酸配列を含むか、またはから成るSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、本開示は、配列番号29のアミノ酸配列を含むか、またはから成るC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のアミノ酸配列を含むか、またはから成るSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のアミノ酸配列を含むか、またはから成るSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0057】

ある実施態様において、本開示は、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；GAS SLOポリペプチド抗原；ならびにADIコンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性GlcNAc側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号13～16のいずれか1つと少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号17～20のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号35～36のいずれか1つと少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号17～20のいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号35～36のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、ADIポリペプチドは、配列番号37～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、またはから成る。

【0058】

ある実施態様において、本開示は、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；GAS SLOポリペプチド抗原；ならびにフェリチンポリペプチドおよび免疫優性GlcNAc側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。ある実施態様において、フェリチンポリペプチドは、配列番号21または配列番号22と少なくとも95%同一であり、かつ位置I5でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含むか、またはから成る。ある実施態様において、フェリチンポリペプチドは、配列番号23または配列番号24のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、フェリチンポリペプチドは、配列番号23または配列番号24のアミノ酸配列を含むか、またはから成る。

【0059】

治療方法

ある実施態様において、本開示は、本明細書に記載した免疫原性組成物を対象に投与することを特徴とする、対象におけるGAS細菌に対して防御免疫応答を誘導する方法を提供する。ある実施態様において、対象におけるGAS細菌に対して防御免疫応答を誘導するための、本明細書に記載した免疫原性組成物の使用も提供される。ある実施態様において、対象におけるGAS細菌に対する防御免疫応答を誘導するための医薬品製造における本明細書に記載した免疫原性組成物の使用を提供する。

【0060】

本明細書において「対象」という用語は、哺乳動物を指す。ある実施態様において、対象は、マウス、ラット、イヌ、モルモット、ヒツジ、非ヒト霊長類またはヒトである。ある実施態様において、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、ヒト対象は、18才以上である。ある実施態様において、ヒト対象は、18才未満である。

【0061】

ある実施態様において、ヒト対象は、生後6ヶ月～17才である。ある実施態様において、ヒト対象は、6ヶ月～9才、6ヶ月～8才、6ヶ月～7才、6ヶ月～6才、6ヶ月～5才、6ヶ月～4才、6ヶ月～3才、6ヶ月～2才または6ヶ月～1才である。いくつかの実施形態では、ヒト対象は、5才～17才、7才～17才、9才～17才、11才～17才、13才～17才、または15才～17才である。いくつかの実施形態では、ヒト対象は、6ヶ月、1才、2才、3才、4才、5才、6才、7才、8才、9才、10才、11才、12才、13才、14才、15才、16才、17才または18才の年齢である。

10

【0062】

本明細書において「保護的免疫応答」という用語は、対象において抗GAS抗体応答を誘発することを包含する。本明細書に記載の免疫原性組成物の投与後に生じる抗体価は、当技術分野では既知の手段、例えば、免疫化された対象由来の血清サンプルのELISAアッセイによって決定することができる(実施例6を参照されたい)。ある実施態様において、本明細書に記載の免疫原性組成物は、治療された対象において抗体応答を誘起し、この生成した抗体は、複数の(すなわち、2つ以上の)GAS血清型に結合する。ある実施態様において、本明細書に記載される免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起し、生成した抗体は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35またはそれら以上のGAS血清型に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の免疫原性組成物は、ヒトタンパク質または組織に対する抗体応答を誘起しない。

20

【0063】

ある実施態様において、本明細書に記載の免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M11、M12、M13、M18、M22、M25、M28、M62、M71、M72、M74、M75、M77、M80、M81、M83、M87、M89およびM92から選択された少なくとも1つのGAS血清型に結合する。ある実施態様において、本明細書に記載の免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M11、M12、M13、M18、M22、M25、M28、M62、M71、M72、M74、M75、M77、M80、M81、M83、M87、M89およびM92から選択される2つ以上のGAS血清型に結合する。

30

【0064】

ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M6、M11、M12、M22、M28、M75およびM89から選択される少なくとも1つのGAS血清型に結合する。ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M6、M11、M12、M22、M28、M75およびM89から選択される2またはそれ以上のGAS血清型に結合する。

40

【0065】

ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M3、M5、M9、M12、M18、M22、M25、M28、M71、M72およびM74から選択される少なくとも1つのGAS血清型に結合する。ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M3、M5、M9、M12、M18、M22、M25、M28、M71、M72およびM74から選択される2またはそれ以上のGAS血清型に結合する。

50

【0066】

ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M4、M6、M11、M12、M22、M44、M75、M77、M77およびM81から選択される少なくとも1つのGAS血清型に結合する。ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M4、M6、M11、M12、M22、M44、M75、M77、M77およびM81から選択される2またはそれ以上のGAS血清型に結合する。

【0067】

ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M6、M9、M12、M18、M22、M75、M77、M89およびM92から選択される少なくとも1つのGAS血清型に結合する。ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M6、M9、M12、M18、M22、M75、M77、M89およびM92から選択される2またはそれ以上のGAS血清型に結合する。

10

【0068】

ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M11、M12、M13、M28、M62およびM89から選択される少なくとも1つのGAS血清型に結合する。ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M11、M12、M13、M28、M62およびM89から選択される2またはそれ以上のGAS血清型に結合する。

20

【0069】

ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M6、M12、M22、M28、M49、M53、M68、M77、M80、M83、M87、M89およびM92から選択される少なくとも1つのGAS血清型に結合する。ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、M1、M2、M3、M4、M6、M12、M22、M28、M49、M53、M68、M77、M80、M83、M87、M89およびM92から選択される2またはそれ以上のGAS血清型に結合する。

30

【0070】

ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、1または1以上の赤痢菌血清型に結合する。ある実施態様において、本明細書に記載した免疫原性組成物は、治療される対象において抗体応答を誘起させ、生成した抗体は、1または1以上のGAS血清型に結合し、かつ1または1以上の赤痢菌血清型にも結合する。ある実施態様において、赤痢菌血清型は、ポリラムノース・バックボーン含んでいる多糖を含む。前記多糖を含んでいる赤痢菌血清型の例には、*S. flexneri*、例えば*S. flexneri* 2Aおよび3Aおよび*S. flexneri* 6が挙げられる。

40

【0071】

本発明の更なる実施態様は、以下の番号の実施態様において提供される：

実施態様1：第一のA群レンサ球菌(GAS)ポリペプチド抗原；第二のGASポリペプチド抗原；および少なくとも1つのポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物であって、前記コンジュゲートのポリペプチドは、第三のGASポリペプチド抗原または非GASキャリアポリペプチドであって、少なくとも1つの非天然アミノ酸を含んでおり、前記コンジュゲートの多糖は、免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖が欠失しているGAS多糖またはそのバリエーションである、免疫原性組成物。

実施態様2：GASポリペプチド抗原の少なくとも1つが、全長GAS抗原である、実施態

50

様1の免疫原性組成物。

実施態様3：GASポリペプチド抗原の少なくとも1つが、全長GAS抗原のペプチドフラグメントである、実施態様1の免疫原性組成物。

実施態様4：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼ、ストレプトリジンO(SLO)、Sib35およびSfb1から独立して選択される、実施態様1～3のいずれか一態様の免疫原性組成物。

実施態様5：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOである、実施態様1～3のいずれか一態様の免疫原性組成物。

実施態様6：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号1または配列番号3と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様5の免疫原性組成物。

10

実施態様7：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む、実施態様5の免疫原性組成物。

実施態様8：SLOポリペプチド抗原が、配列番号5または配列番号7と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様5の免疫原性組成物。

実施態様9：SLOポリペプチド抗原が、配列番号5または配列番号7のアミノ酸配列を含む、実施態様5の免疫原性組成物。

実施態様10：非GASキャリアポリペプチドが、フェリチンである、実施態様1～9のいずれか一態様の免疫原性組成物。

実施態様11：第三のGASポリペプチド抗原が、化膿レンサ球菌付着/分裂(SpyAD)ポリペプチド、アルギニンデヒミナーゼ(ADI)、eCRMおよびプロテインDから選択される、実施態様1～10のいずれか一態様の免疫原性組成物。

20

実施態様12：少なくとも1つのnnAAが、コンジュゲートのポリペプチド中のリジン、ロイシンまたはイソロイシンに代えて置換される、実施態様1～11のいずれか一態様の免疫原性組成物。

実施態様13：nnAAが、クリックケミストリー反応基を含む、実施態様1～11のいずれか一態様の免疫原性組成物。

実施態様14：nnAAが、2-アミノ-3-(4-アジドフェニル)プロパン酸、(4-アジドフェニル)プロパン酸(pAF)、2-アミノ-4-アジドブタン酸、2-アジド-3-フェニルプロパン酸、2-アミノ-3-アジドプロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)フェニル)プロパン酸(pAMF)、2-アミノ-3-(5-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(6-(アジドメチル)ピリジン-3-イル)プロパン酸および2-アミノ-5-アジドペンタン酸から選択される、実施態様13の免疫原性組成物。

30

実施態様15：nnAAが、pAMFである、実施態様13の免疫原性組成物。

実施態様16：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASタンパク質であって、これはSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号9と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様12～15のいずれか一態様の免疫原性組成物。

実施態様17：SpyADポリペプチドが、配列番号9の位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、実施態様16の免疫原性組成物。

実施態様18：SpyADポリペプチドが、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列を含む、実施態様17の免疫原性組成物。

40

実施態様19：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはADIポリペプチドであり、配列番号13または配列番号15と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様12～15のいずれか一態様の免疫原性組成物。

実施態様20：ADIポリペプチドが、配列番号13または配列番号15の位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様19の免疫原性組成物。

実施態様21：ADIポリペプチドが、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列を含む、実施態様20の免疫原性組成物。

実施態様22：コンジュゲートのポリペプチドが、フェリチンポリペプチドであり、配列番号21と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様12～15のいずれか

50

一態様の免疫原性組成物。

実施態様23:フェリチンポリペプチドが、配列番号21の位置15でpAMF置換を含む、実施態様22の免疫原性組成物。

実施態様24:フェリチンポリペプチドが、配列番号23のアミノ酸配列を含む、実施態様23の免疫原性組成物。

実施態様25:コンジュゲートの多糖が、ポリラムノースコアを含む、実施態様1~23のいずれか一態様の免疫原性組成物。

実施態様26:コンジュゲートの多糖が、約5 KDa~約7 KDの平均分子量を有する、実施態様1~23のいずれか一態様の免疫原性組成物。

実施態様27:コンジュゲートの多糖が、テトラマー、ヘキサマー、オクタマーまたはデカマー多糖である、実施態様1~26のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様28:A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原; GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原; ならびに化膿レンサ球菌の付着/分裂(SpyAD)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様29:SpyADタンパク質が、配列番号9と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様28の免疫原性組成物。

実施態様30:SpyADタンパク質が、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列を含む、実施態様28の免疫原性組成物。

実施態様31:A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原; GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原; ならびにアルギニンデヒミナーゼ(ADI)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様32:ADIポリペプチドが、配列番号13または配列番号15と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様31の免疫原性組成物。

実施態様33:ADIポリペプチドが、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列を含む、実施態様31の免疫原性組成物。

実施態様34:A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原; GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原; ならびにフェリチンポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様35:フェリチンタンパク質が、配列番号21と少なくとも95%同一であり、かつ位置15でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様34の免疫原性組成物。

実施態様35A:フェリチンタンパク質が、配列番号23のアミノ酸配列を含む、実施態様34の免疫原性組成物。

実施態様36:組成物が、約10%~約50%の第一のGAS抗原、約10%~約50%の第二のGAS抗原および約10%~約50%のポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様1~35のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様37:水酸化アルミニウムゲル、サポニン、モノホスホリルリポドA(MPL)またはその組み合わせから選択される1以上のアジュバンドを更に含む、実施態様1~36のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

実施態様38:対象に実施態様1~37のいずれか1つに記載の免疫原性組成物を投与することを特徴とする、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する防御免疫応答を誘導する方法。

10

20

30

40

50

実施態様38A：対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する防御免疫応答を誘導するための、実施態様1～37のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様38B：対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する防御免疫応答を誘導するための医薬品の製造における、実施態様1～37のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様39：対象が、18才またはそれ以上である、実施態様38～38Bのいずれか1つに記載の方法。

実施態様40：対象が、18才未満である、実施態様38～38Bのいずれか1つに記載の方法。

実施態様41：対象が、5才～17才、6ヶ月～9才または5才～9才である、実施態様38～38Bのいずれか1つに記載の方法。

実施態様42：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M11、M12、M22、M28、M75およびM89から選択される血清型である、実施態様38～41のいずれか1つに記載の方法。

実施態様43：GAS細菌が、M1、M3、M5、M9、M12、M18、M22、M25、M28、M71、M72およびM74から選択される血清型である、実施態様38～41のいずれか1つに記載の方法。

実施態様44：GAS細菌が、M1、M4、M6、M11、M12、M22、M44、M75、M77、M77およびM81から選択される血清型である、実施態様38～41のいずれか1つに記載の方法。

実施態様45：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M9、M12、M18、M22、M75、M77、M89およびM92から選択される血清型である、実施態様38～41のいずれか1つに記載の方法。

実施態様46：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M11、M12、M13、M28、M62およびM89から選択される血清型である、実施態様38～41のいずれか1つに記載の方法。

実施態様47：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M12、M22、M28、M49、M53、M68、M77、M80、M83、M87、M89およびM92から選択される血清型である、実施態様38～41のいずれか1つに記載の方法。

実施態様48：免疫原性組成物が、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する抗体応答を誘導させ、ヒト組織に対して対象における抗体応答を誘導しない、実施態様38～47のいずれか1つに記載の方法。

実施態様49：免疫原性組成物が、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導させ、前記赤痢菌が、ポリラムノース・バックボーンを有する多糖を含む、実施態様38～48のいずれかに記載の方法。

実施態様50：実施態様1～37のいずれか1つに記載の免疫原性組成物を対象に投与することを特徴とする、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導する方法。

実施態様51：対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための実施態様1～37のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様52：対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための医薬品の製造における、実施態様1～37のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様53：対象が、18才またはそれ以上である、実施態様50～52のいずれか1つに記載の方法または使用。

実施態様54：対象が、18才未満である、実施態様53の方法または使用。

実施態様55：対象が、5才～17才、6ヶ月～9才または5才～9才である、実施態様54の方法または使用。

実施態様II-1：

- a. 第一のA群レンサ球菌(GAS)ポリペプチド抗原；
- b. 第二のGASポリペプチド抗原；ならびに
- c. 少なくとも1つのポリペプチド-多糖コンジュゲート

10

20

30

40

50

を含む免疫原性組成物であって、前記コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチド抗原または非GASキャリアポリペプチドであり、かつ少なくとも1つの非天然アミノ酸を含んでおり、前記コンジュゲートの多糖が、免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖が欠失しているGAS多糖またはそのバリエーションを含んでいる、免疫原性組成物。

実施態様II-2：GASポリペプチド抗原の少なくとも1つが、全長GAS抗原である、実施態様II-1の免疫原性組成物。

実施態様II-3：GASポリペプチド抗原の少なくとも1つが、全長GAS抗原のペプチドフラグメントである、実施態様II-1の免疫原性組成物。

実施態様II-4：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼ、ストレプトリジンO (SLO)、Sib35およびSfb1から独立して選択される、実施態様II-1～II-3のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

実施態様II-5：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOである、実施態様II-1～II-3のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-6：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号1または配列番号3と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様II-5の免疫原性組成物。

実施態様II-7：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む、実施態様II-5の免疫原性組成物。

実施態様II-8：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであり、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含む、実施態様II-1～II-6のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

実施態様II-9：SLOポリペプチド抗原が、配列番号5または配列番号7と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様II-5の免疫原性組成物。

実施態様II-10：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであり、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様II-1～II-6またはII-9のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-11：SLOポリペプチド抗原が、配列番号5または配列番号7のアミノ酸配列を含む、実施態様II-5の免疫原性組成物。

実施態様II-12：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであり、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含む、実施態様II-1～II-6のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-13：非GASキャリアポリペプチドがフェリチンである、実施態様II-1～II-12のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-14：第三のGASポリペプチド抗原が、レンサ球菌属pyo遺伝子の付着/分裂(SpyAD)ポリペプチド、アルギニンデヒミナーゼ(ADI)、eCRMおよびプロテインDから選択される、実施態様II-1～II-13のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-15：少なくとも1つのnnAAが、コンジュゲートのポリペプチド中のリジン、ロイシンまたはイソロイシンに代えて置換されている、実施態様II-1～II-14のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-16：nnAAが、クリックケミストリー反応基を含む、実施態様II-1～II-14のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-17：nnAAが、2-アミノ-3-(4-アジドフェニル)プロパン酸(pAF)、2-アミノ-4-アジドブタン酸、2-アジド-3-フェニルプロパン酸、2-アミノ-3-アジドプロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)フェニル)プロパン酸(pAMF)、2-アミノ-3-(5-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(6-(アジドメチル)ピリジン-3-イル)プロパン酸および2

10

20

30

40

50

- アミノ-5-アジドペンタン酸から選択される、実施態様II-16の免疫原性組成物。

実施態様II-18：nnAAが、pAMFである、実施態様II-16の免疫原性組成物。

実施態様II-19：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASタンパク質であって、これはSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号9と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様II-15～II-18のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-20：SpyADポリペプチドが、配列番号9の位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、実施態様II-19の免疫原性組成物。

実施態様II-21：SpyADポリペプチドが、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列を含む、実施態様II-20の免疫原性組成物。

実施態様II-22：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASタンパク質であって、これはSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号33と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様II-15～II-18のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-23：SpyADポリペプチドが、配列番号33の位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、実施態様II-22記載の免疫原性組成物。

実施態様II-24：SpyADポリペプチドが、配列番号33または配列番号34のアミノ酸配列を含む、実施態様II-23の免疫原性組成物。

実施態様II-25：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはADIポリペプチドであり、かつ配列番号13または配列番号15と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様II-15～II-18のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-26：ADIポリペプチドが、配列番号13または配列番号15の位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様II-25の免疫原性組成物。

実施態様II-27：ADIポリペプチドが、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列を含む、実施態様II-26の免疫原性組成物。

実施態様II-28：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはADIポリペプチドであり、かつ配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様II-15～II-18のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-29：ADIポリペプチドが、配列番号35または配列番号36の位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様II-28の免疫原性組成物。

実施態様II-30：ADIポリペプチドが、配列番号26、配列番号27、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列を含む、実施態様II-29の免疫原性組成物。

実施態様II-31：コンジュゲートのポリペプチドが、フェリチンポリペプチドであり、配列番号21と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様II-15～II-18のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-32：フェリチンポリペプチドが、配列番号21の位置I5でpAMF置換を含む、実施態様II-31の免疫原性組成物。

実施態様II-33：フェリチンポリペプチドが、配列番号23のアミノ酸配列を含む、実施態様II-32の免疫原性組成物。

実施態様II-34：コンジュゲートの多糖が、ポリラムノースコアを含む、実施態様II-1～II-33のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-35：コンジュゲートの多糖が、約5 kDa～約7 kDaの平均分子量を有する、実施態様II-1～II-33のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-36：コンジュゲートの多糖が、テトラマー、ヘキサマー、オクタマーまたはデカマー多糖である、実施態様II-1～II-35のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-37：

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；

b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに

c. 化膿レンサ球菌の付着/分裂(SpyAD)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖または

10

20

30

40

50

そのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様II-38：SpyADタンパク質が、配列番号9と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様II-37の免疫原性組成物。

実施態様II-39：SpyADタンパク質が、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列を含む、実施態様II-37の免疫原性組成物。

実施態様II-40：SpyADタンパク質が、配列番号33と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様II-37の免疫原性組成物。

実施態様II-41：SpyADタンパク質が、配列番号9または配列番号34のアミノ酸配列を含む、実施態様II-37の免疫原性組成物。

実施態様II-42：SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含む、実施態様II-41の免疫原性組成物。

実施態様II-43：配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様II-1またはII-37の免疫原性組成物。

実施態様II-44：配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号52のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様II-1またはII-37の免疫原性組成物。

実施態様II-45：配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号32のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様II-1またはII-37の免疫原性組成物。

実施態様II-46：配列番号29のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様II-1またはII-37の免疫原性組成物。

実施態様II-47：

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；

b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに

c. アルギニンデヒドロラーゼ(ADI)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様II-48：ADIポリペプチドが、配列番号13または配列番号15と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様II-47の免疫原性組成物。

実施態様II-49：ADIポリペプチドが、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列を含む、実施態様II-47の免疫原性組成物。

実施態様II-50：ADIポリペプチドが、配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様II-47～II-48の免疫原性組成物。

実施態様II-51：ADIポリペプチドが、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列を含む、実施態様II-47～II-48の免疫原性組成物。

実施態様II-52：

10

20

30

40

50

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；
b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；および
c. フェリチンポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様II-53：フェリチンタンパク質が、配列番号21と少なくとも95%同一であり、かつ位置15でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様II-52の免疫原性組成物。

実施態様II-54：フェリチンタンパク質が、配列番号23のアミノ酸配列を含む、実施態様II-52の免疫原性組成物。

実施態様II-55：組成物が、約10%～約50%の第一のGAS抗原、約10%～約50%の第二のGAS抗原および約10%～約50%のポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様II-1～II-54のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-56：水酸化アルミニウムゲル、サポニン、モノホスホリルリピドA(MPL)またはその組み合わせから選択される1または1以上のアジュバンドを更に含む、実施態様II-1～II-55のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様II-57：実施態様II-1～II-56のいずれか1つの免疫原性組成物を対象に投与することを特徴とする、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する防御免疫応答を誘導する方法。

実施態様II-58：対象が、18才またはそれ以上である、実施態様II-57記載の方法。

実施態様II-59：対象が、18才未満である、実施態様II-57記載の方法。

実施態様II-60：対象が、5才～17才、6ヶ月～9才または5才～9才である、実施態様II-57記載の方法。

実施態様II-61：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M11、M12、M22、M28、M75およびM89から選択される血清型である、実施態様II-57～II-60のいずれか1つに記載の方法。

実施態様II-62：GAS細菌が、M1、M3、M5、M9、M12、M18、M22、M25、M28、M71、M72およびM74から選択される血清型である、実施態様II-57～II-60のいずれか1つに記載の方法。

実施態様II-63：GAS細菌が、M1、M4、M6、M11、M12、M22、M44、M75、M77、M77およびM81から選択される血清型である、実施態様II-57～II-60のいずれか1つに記載の方法。

実施態様II-64：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M9、M12、M18、M22、M75、M77、M89およびM92から選択される血清型である、実施態様II-57～II-60のいずれか1つに記載の方法。

実施態様II-65：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M11、M12、M13、M28、M62およびM89から選択される血清型である、実施態様II-57～II-60のいずれか1つに記載の方法。

実施態様II-66：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M12、M22、M28、M49、M53、M68、M77、M80、M83、M87、M89およびM92から選択される血清型である、実施態様II-57～II-60のいずれか1つに記載の方法。

実施態様II-67：免疫原性組成物が、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する抗体応答を誘導し、ヒト組織に対する対象における抗体応答を誘導しない、実施態様II-57～II-66のいずれか1つに記載の方法。

実施態様II-68：免疫原性組成物が、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導し、該赤痢菌が、ポリラムノース・バックボーンを有する多糖を含む、実施態様II-57～II-67のいずれか1つに記載の方法。

実施態様II-69：対象に実施態様II-1～II-56のいずれか1つに記載の免疫原性組成物を投与することを特徴とする、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導する方法

10

20

30

40

50

。

実施態様II-70：対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための、実施態様II-1～II-56のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様II-71：対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための、医薬品の製造における実施態様II-1～II-56のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様II-72：対象が、18才またはそれ以上である、実施態様II-69～II-71のいずれか1つに記載の方法または使用。

実施態様II-73：対象が、18才未満である、実施態様II-72に記載の方法または使用。

実施態様II-74：対象が、5才～17才、6ヶ月～9才または5才～9才である、実施態様II-73に記載の方法または使用。

実施態様III-1：

a. 第一のA群レンサ球菌(GAS)ポリペプチド抗原；

b. 第二のGASポリペプチド抗原；ならびに

c. 少なくとも1つのポリペプチド-多糖コンジュゲート

を含む免疫原性組成物であって、前記コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチド抗原または非GASキャリアポリペプチドで、かつ少なくとも1つの非天然アミノ酸を含んでおり、前記コンジュゲートの多糖が、免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖が欠失しているGAS多糖またはそのバリエーションである、免疫原性組成物。

実施態様III-2：GASポリペプチド抗原の少なくとも1つが、全長GAS抗原である、実施態様III-1の免疫原性組成物。

実施態様III-3：GASポリペプチド抗原の少なくとも1つが、全長GAS抗原のペプチドフラグメントである、実施態様III-1の免疫原性組成物。

実施態様III-4：実施態様III-1～III-3のいずれか1つに記載の免疫原性組成物であって、第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼ、ストレプトリジンO(SLO)、Sib35、Sfb1およびSpyADから独立して選択される、免疫原性組成物。

実施態様III-5：実施態様III-1～III-3のいずれか1つに記載の免疫原性組成物であって、第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼ、ストレプトリジンO(SLO)、Sib35およびSfb1から独立して選択される、免疫原性組成物。

実施態様III-6：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOである、実施態様III-1～III-3のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-7：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号1または配列番号3と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-6の免疫原性組成物。

実施態様III-7A：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号1または配列番号3と少なくとも95%同一である、実施態様III-6の免疫原性組成物。

実施態様III-8：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む、実施態様III-6の免疫原性組成物。

実施態様III-9：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含む、実施態様III-1～III-6のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-9A：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列から成る、実施態様III-1～III-6のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

。

実施態様III-10：SLOポリペプチド抗原が、配列番号5または配列番号7と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-6の免疫原性組成物。

実施態様III-10A：SLOポリペプチド抗原が、配列番号5または配列番号7と少なくとも95%同一である、実施態様III-6の免疫原性組成物。

実施態様III-11：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、

10

20

30

40

50

配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-1~III-7またはIII-10のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-11A：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53と少なくとも95%同一である、実施態様III-17、III-10、III-7AまたはIII-10Aのいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-12：SLOポリペプチド抗原が、配列番号5または配列番号7のアミノ酸配列を含む、実施態様III-6の免疫原性組成物。

10

実施態様III-12A：SLOポリペプチド抗原が、配列番号5または配列番号7のアミノ酸配列から成る、実施態様III-6の免疫原性組成物。

実施態様III-13：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含む、実施態様III-1~III-7のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-13A：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列から成る、実施態様III-1~III-7またはIII-7Aのいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

20

実施態様III-14：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSpyADである、実施態様III-1~III-3のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-15：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-14の免疫原性組成物。

実施態様III-15A：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号1または配列番号3と少なくとも95%同一である、実施態様III-14の免疫原性組成物。

実施態様III-16：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含む、実施態様III-14の免疫原性組成物。

30

実施態様III-16A：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列から成る、実施態様III-14の免疫原性組成物。

実施態様III-17：非GASキャリアポリペプチドが、フェリチンである、実施態様III-1~III-16のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-18：第三のGASポリペプチド抗原が、化膿レンサ球菌付着/分裂(SpyAD)ポリペプチド、アルギニンデイミナーゼ(ADI)、eCRMおよびプロテインDから選択される、実施態様III-1~III-16のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-19：第三のGASポリペプチド抗原が、化膿レンサ球菌付着/分裂(SpyAD)ポリペプチド、アルギニンデイミナーゼ(ADI)、eCRM、プロテインDおよびSLOから選択される、実施態様III-1~III-16のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

40

実施態様III-20：少なくとも1つのnnAAが、コンジュゲートのポリペプチド中のリジン、ロイシンまたはイソロイシンに代えて置換される、実施態様III-1~III-19のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-21：nnAAが、クリックケミストリー反応基を含む、実施態様III-1~III-19のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-22：nnAAが、2-アミノ-3-(4-アジドフェニル)プロパン酸(pAF)、2-アミノ-4-アジドブタン酸、2-アジド-3-フェニルプロパン酸、2-アミノ-3-アジドプロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)フェニル)プロパン酸(pAMF)、2-アミノ-3-(5-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)ピリジン-2

50

-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(6-(アジドメチル)ピリジン-3-イル)プロパン酸および2-アミノ-5-アジドペンタン酸から選択される、実施態様III-16の免疫原性組成物。

実施態様III-23：nnAAが、pAMFである、実施態様III-21の免疫原性組成物。

実施態様III-24：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASタンパク質であって、これはSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号9と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-24A：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASタンパク質であって、これはSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号9と少なくとも95%同一である、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-25：SpyADポリペプチドが、配列番号9の位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、実施態様III-24の免疫原性組成物。

実施態様III-26：SpyADポリペプチドが、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列を含む、実施態様III-25の免疫原性組成物。

実施態様III-26A：SpyADポリペプチドが、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列から成る、実施態様III-25の免疫原性組成物。

実施態様III-27：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASタンパク質であって、これはSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号33と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-27A：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASタンパク質であって、これはSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号33と少なくとも95%同一である、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-28：SpyADポリペプチドが、配列番号33の位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、実施態様III-27の免疫原性組成物。

実施態様III-29：SpyADポリペプチドが、配列番号33または配列番号34のアミノ酸配列を含む、実施態様III-28の免疫原性組成物。

実施態様III-30：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはADIポリペプチドであり、かつ配列番号13または配列番号15と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-30A：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはADIポリペプチドであり、配列番号13または配列番号15と少なくとも95%同一である、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-31：ADIポリペプチドが、配列番号13または配列番号15の位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様III-30の免疫原性組成物。

実施態様III-32：ADIポリペプチドが、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列を含む、実施態様III-31の免疫原性組成物。

実施態様III-32A：ADIポリペプチドが、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列から成る、実施態様III-31の免疫原性組成物。

実施態様III-33：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはADIポリペプチドであり、かつ配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-33A：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはADIポリペプチドであり、かつ配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一である、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-34：ADIポリペプチドが、配列番号35または配列番号36の位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様III-33の免疫原性組成物。

実施態様III-35：ADIポリペプチドが、配列番号26、配列番号27、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列を含む、実施態様III-34の免疫原性組成物。

実施態様III-35A：ADIポリペプチドが、配列番号26、配列番号27、配列番号37ま

10

20

30

40

50

たは配列番号38のアミノ酸配列から成る、実施態様III-34の免疫原性組成物。

実施態様III-36：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはSLOポリペプチドであり、かつ配列番号31、配列番号32または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-36A：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはSLOポリペプチドであり、かつ配列番号6、配列番号8または配列番号53と少なくとも95%同一である、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-37：SLOポリペプチドが、K98、K112、R151、K189、K272、K323、K357、K375、K407またはK464から選択される位置で3または4つのpAMF置換を含む、実施態様III-36の免疫原性組成物。

実施態様III-38：SLOポリペプチドが、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63または配列番号64のアミノ酸配列を含む、実施態様III-36またはIII-37の免疫原性組成物。

実施態様III-38A：SLOポリペプチドが、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63または配列番号64のアミノ酸配列から成る、実施態様III-36またはIII-37の免疫原性組成物。

実施態様III-39：コンジュゲートのポリペプチドが、フェリチンポリペプチドであり、配列番号21と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-39A：コンジュゲートのポリペプチドが、フェリチンポリペプチドであり、配列番号21と少なくとも95%同一である、実施態様III-20～III-23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-40：フェリチンポリペプチドが、配列番号21の位置15でpAMF置換を含む、実施態様III-39の免疫原性組成物。

実施態様III-41：フェリチンポリペプチドが、配列番号23のアミノ酸配列を含む、実施態様III-40の免疫原性組成物。

実施態様III-41A：フェリチンポリペプチドが、配列番号23のアミノ酸配列から成る、実施態様III-40の免疫原性組成物。

実施態様III-42：コンジュゲートの多糖が、ポリラムノースコアを含む、実施態様III-1～III-41のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-43：コンジュゲートの多糖が、約5 KDa～約7 KDaの平均分子量を有する、実施態様III-1～III-41のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-44：コンジュゲートの多糖が、テトラマー、ヘキサマー、オクタマーまたはデカマー多糖である、実施態様III-1～III-43のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-45：

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；
b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに
c. 化膿レンサ球菌の付着/分裂(SpyAD)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様III-46：SpyADタンパク質が、配列番号9と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様III-45の免疫原性組成物。

実施態様III-46A：SpyADタンパク質が、配列番号9と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、実施態様III-45の免疫

10

20

30

40

50

原性組成物。

実施態様III-47：SpyADタンパク質が、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列を含む、実施態様III-45の免疫原性組成物。

実施態様III-47A：SpyADタンパク質が、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列から成る、実施態様III-45の免疫原性組成物。

実施態様III-48：SpyADタンパク質が、配列番号33と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様III-45の免疫原性組成物。

実施態様III-48A：SpyADタンパク質が、配列番号33と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、実施態様III-45の免疫原性組成物。

10

実施態様III-49：SpyADタンパク質が、配列番号9または配列番号34のアミノ酸配列を含む、実施態様III-45の免疫原性組成物。

実施態様III-49A：SpyADタンパク質が、配列番号9または配列番号34のアミノ酸配列から成る、実施態様III-45の免疫原性組成物。

実施態様III-50：SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含む、実施態様III-49の免疫原性組成物。

実施態様III-50A：SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列から成る、実施態様III-49またはIII-49Aの免疫原性組成物。

20

実施態様III-51：配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含むポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様III-1またはIII-45の免疫原性組成物。

実施態様III-52：配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号52のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様III-1またはIII-45の免疫原性組成物。

30

実施態様III-53：配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号32のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様III-1またはIII-45の免疫原性組成物。

実施態様III-54：配列番号29のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様III-1またはIII-45の免疫原性組成物。

実施態様III-55：

40

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；

b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに

c. アルギニンデイミナーゼ(ADI)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様III-56：ADIポリペプチドが、配列番号13または配列番号15と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様III-55の免疫原性組成物。

実施態様III-56A：ADIポリペプチドが、配列番号13または配列番号15と少なくとも

50

95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様III-55の免疫原性組成物。

実施態様III-57：ADIポリペプチドが、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列を含む、実施態様III-55の免疫原性組成物。

実施態様III-57A：ADIポリペプチドが、配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列から成る、実施態様III-55の免疫原性組成物。

実施態様III-58：ADIポリペプチドが、配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含んでおり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様III-55～III-56の免疫原性組成物。

実施態様III-58A：ADIポリペプチドが、配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様III-55～III-56またはIII-56Aのいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-59：ADIポリペプチドが、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列を含む、実施態様III-55～III-56の免疫原性組成物。

実施態様III-59A：ADIポリペプチドが、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列から成る、実施態様III-55～III-56またはIII-56Aのいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-60：

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；

b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに

c. フェリチンポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲート

を含む、免疫原性組成物。

実施態様III-61：フェリチンタンパク質が、配列番号21と少なくとも95%同一であり、かつ位置I5でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様III-60の免疫原性組成物。

実施態様III-61A：フェリチンタンパク質が、配列番号21と少なくとも95%同一であり、かつ位置I5でpAMF置換を含む、実施態様III-60の免疫原性組成物。

実施態様III-62：フェリチンタンパク質が、配列番号23のアミノ酸配列を含む、実施態様III-60の免疫原性組成物。

実施態様III-62A：フェリチンタンパク質が、配列番号23のアミノ酸配列から成る、実施態様III-60の免疫原性組成物。

実施態様III-63：組成物が、約10%～約50%の第一のGAS抗原、約10%～約50%の第二のGAS抗原および約10%～約50%のポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様III-1～III-62のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様III-64：水酸化アルミニウムゲル、サポニン、モノホスホリルリピドA(MPL)またはその組み合わせから選択される1または1以上のアジュバンドを更に含む、実施態様III-1～III-63のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

実施態様III-65：対象に実施態様III-1-56のいずれか1つに記載の免疫原性組成物を投与することを特徴とする、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する防御免疫応答を誘導する方法。

実施態様III-66：対象が、18才またはそれ以上である、実施態様III-65の方法。

実施態様III-67：対象が、18才未満である、実施態様III-65の方法。

実施態様III-68：対象が、5才～17才、6ヶ月～9才または5才～9才である、実施態様III-65の方法。

実施態様III-69：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M11、M12、M22、M28、M75およびM89から選択される血清型である、実施態様III-65～III-68のいずれか1つに記載の方法。

実施態様III-70：GAS細菌が、M1、M3、M5、M9、M12、M18、M22、M25、M

10

20

30

40

50

28、M71、M72およびM74から選択される血清型である、実施態様III-65～III-68のいずれか1つに記載の方法。

実施態様III-71：GAS細菌が、M1、M4、M6、M11、M12、M22、M44、M75、M77、M77およびM81から選択される血清型である、実施態様III-65～III-68のいずれか1つに記載の方法。

実施態様III-72：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M9、M12、M18、M22、M75、M77、M89およびM92から選択される血清型である、実施態様III-65～III-68のいずれか1つに記載の方法。

実施態様III-73：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M11、M12、M13、M28、M62およびM89から選択される血清型である、実施態様III-65～III-68のいずれか1つに記載の方法。

実施態様III-74：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M12、M22、M28、M49、M53、M68、M77、M80、M83、M87、M89およびM92から選択される血清型である、実施態様III-65～III-68のいずれか1つに記載の方法。

実施態様III-75：免疫原性組成物が、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する抗体応答を誘導し、対象におけるヒト組織に対する抗体応答を誘導しない、実施態様III-65～III-74のいずれか1つに記載の方法。

実施態様III-76：免疫原性組成物が対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導し、前記赤痢菌が、ポリラムノース・バックボーンを有する多糖を含む、実施態様III-65～III-75のいずれか1つに記載の方法。

実施態様III-77：実施態様III-1-56のいずれか1つに記載の免疫原性組成物を対象に投与することを特徴とする、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導する方法。

実施態様III-78：対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための、実施態様III-1～III-54のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様III-79：対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための医薬品の製造における、実施態様III-1～III-54のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様III-80：対象が、18才またはそれ以上である、実施態様III-77～III-79のいずれか1つに記載の方法または使用。

実施態様III-81：対象が、18才未満である、実施態様III-80に記載の方法または使用。

実施態様III-82：対象が、5才～17才、6ヶ月～9才または5才～9才である、実施態様III-81に記載の方法または使用。

実施態様IV-1：

a. 第一のA群レンサ球菌(GAS)ポリペプチド抗原；

b. 第二のGASポリペプチド抗原；ならびに

c. 少なくとも1つのポリペプチド-多糖コンジュゲート

を含む免疫原性組成物であって、前記コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチド抗原または非GASキャリアポリペプチドであり、かつ少なくとも1つの非天然アミノ酸を含んでおり、前記コンジュゲートの多糖が、免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖が欠失しているGAS多糖またはそのバリエーションである、免疫原性組成物。

実施態様IV-2：GASポリペプチド抗原の少なくとも1つが、全長GAS抗原である、実施態様IV-1の免疫原性組成物。

実施態様IV-3：GASポリペプチド抗原の少なくとも1つが、全長GAS抗原のペプチドフラグメントである、実施態様IV-1の免疫原性組成物。

実施態様IV-4：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼ、ストレプトリジンO(SLO)、Sib35、Sfb1およびSpyADから独立して選択される、実施態様IV-1～IV-3のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-5：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼ、スト

10

20

30

40

50

レプトリジンO(SLO)、Sib35およびSfb1から独立して選択される、実施態様IV-1～IV-3のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-6：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOである、実施態様IV-1～IV-3のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-7：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-1～IV-6のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-8：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30と少なくとも95%同一である、実施態様IV-1～IV-5のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

10

実施態様IV-9：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-6の免疫原性組成物。

実施態様IV-10：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-1～IV-6のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-11：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-1～IV-6のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-12：SLOポリペプチド抗原が、配列番号31または配列番号32と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-1～IV-11のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

20

実施態様IV-13：SLOポリペプチド抗原が、配列番号31または配列番号32と少なくとも95%同一である、実施態様IV-1～IV-11のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-14：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-1～IV-9のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-15：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53と少なくとも95%同一である、実施態様IV-1～IV-9のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

30

実施態様IV-16：SLOポリペプチド抗原が、配列番号31または配列番号32のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-1～IV-11のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-17：SLOポリペプチド抗原が、配列番号31または配列番号32のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-6の免疫原性組成物。

実施態様IV-18：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-1～IV-9のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

40

実施態様IV-19：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSLOであって、SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-1～IV-9のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-20：第一および第二のGASポリペプチド抗原が、C5aペプチダーゼおよびSpyADである、実施態様IV-1～IV-4のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-21：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号

50

30と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-1～IV-6、16-17または20のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-22：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30と少なくとも95%同一である、実施態様IV-20またはIV-21の免疫原性組成物。

実施態様IV-23：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号29または配列番号30のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-1～IV-6、16-17または20のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-24：C5aペプチダーゼポリペプチド抗原が、配列番号20または配列番号30のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-1～IV-6、16-17、20または23のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-25：非GASキャリアポリペプチドが、フェリチンである、実施態様IV-1～IV-24いずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-26：第三のGASポリペプチド抗原または非GASポリペプチド抗原が、化膿レンサ球菌接着/分裂(SpyAD)ポリペプチド、アルギニンデイミナーゼ(ADI)、配列番号25およびプロテインDから選択される、実施態様IV-1～IV-24のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-27：第三のGASポリペプチド抗原または非GASポリペプチド抗原が、化膿レンサ球菌接着/分裂(SpyAD)ポリペプチド、アルギニンデイミナーゼ(ADI)、配列番号25およびプロテインDから選択される、実施態様IV-1～IV-24のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-28：少なくとも1つのnnAAが、コンジュゲートのポリペプチド中のリジン、ロイシン、アルギニンまたはイソロイシンに代えて置換されている、実施態様IV-1～IV-27のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-29：nnAAが、クリックケミストリー反応基を含む、実施態様IV-1～IV-27のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-30：nnAAが、2-アミノ-3-(4-アジドフェニル)プロパン酸(pAF)、2-アミノ-4-アジドブタン酸、2-アジド-3-フェニルプロパン酸、2-アミノ-3-アジドプロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)フェニル)プロパン酸(pAMF)、2-アミノ-3-(5-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(4-(アジドメチル)ピリジン-2-イル)プロパン酸、2-アミノ-3-(6-(アジドメチル)ピリジン-3-イル)プロパン酸および2-アミノ-5-アジドペンタン酸から選択される、実施態様IV-1～IV-29のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-31：nnAAが、pAMFである、実施態様IV-29またはIV-30の免疫原性組成物。

実施態様IV-32：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASタンパク質であって、これがSpyADポリペプチドであり、かつ配列番号33と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-26～IV-31のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-33：コンジュゲートのポリペプチドが、SpyADポリペプチドであり、かつ配列番号33と少なくとも95%同一である、実施態様IV-28～IV-32のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-34：SpyADポリペプチドが、配列番号33の位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、実施態様IV-26～IV-33のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-35：SpyADポリペプチドが、配列番号33または配列番号34のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-26～IV-31または34のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-36：SpyADポリペプチドが、配列番号33または配列番号34のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-34の免疫原性組成物。

実施態様IV-37：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはADIポリペプチドであり、配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-26～IV-31のいずれか1つに記載の免疫原性

10

20

30

40

50

組成物。

実施態様IV-38：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであり、これは、ADIポリペプチドであって、配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一である、実施態様IV-26～IV-31のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-39：ADIポリペプチドが、配列番号35または配列番号36の位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様IV-26～IV-31または37-38のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-40：ADIポリペプチドが、配列番号27、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-39の免疫原性組成物。

実施態様IV-41：ADIポリペプチドが、配列番号27、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-26～IV-31または39のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-42：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはSLOポリペプチドであり、かつ配列番号31、配列番号32または配列番号53と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-27～IV-31のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-43：コンジュゲートのポリペプチドが、第三のGASポリペプチドであって、これはSLOポリペプチドであり、かつ配列番号31、配列番号32または配列番号53と少なくとも95%同一である、実施態様IV-27～IV-31のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-44：前記SLOポリペプチドが、K98、K112、R151、K189、K272、K323、K357、K375、K407またはK464から選択される位置で3または4つのpAMF置換を含む、実施態様IV-42またはIV-43の免疫原性組成物。

実施態様IV-45：SLOポリペプチドが、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63または配列番号64のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-44の免疫原性組成物。

実施態様IV-46：前記SLOポリペプチドが、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63または配列番号64のアミノ酸配列から構成される、実施態様IV-44の免疫原性組成物。

実施態様IV-47：SLOポリペプチドが、K98、K112、R151、K189、K272、K323、K357、K375、K407またはK464から選択される位置で5、6、7または8つのpAMF置換を含む、実施態様IV-42またはIV-43の免疫原性組成物。

実施態様IV-48：SLOポリペプチドが、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75または配列番号76のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-47の免疫原性組成物。

実施態様IV-49：SLOポリペプチドが、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75または配列番号76のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-47の免疫原性組成物。

実施態様IV-50：コンジュゲートのポリペプチドが、フェリチンポリペプチドであり、かつ配列番号21と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-28～IV-31のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-51：コンジュゲートのポリペプチドが、フェリチンポリペプチドであり、かつ配列番号21と少なくとも95%同一である、実施態様IV-28～IV-31のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-52：フェリチンポリペプチドが、配列番号21の位置I5でpAMF置換を含む、実施態様IV-50またはIV-51の免疫原性組成物。

実施態様IV-53：フェリチンポリペプチドが、配列番号23のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-52の免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

実施態様IV-54：フェリチンポリペプチドが、配列番号23のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-52の免疫原性組成物。

実施態様IV-55：コンジュゲートの多糖が、免疫優性GlcNAc側鎖を欠失している、実施態様IV-1～IV-54のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-56：コンジュゲートの多糖が、約5 kDa～約7 kDaの平均分子量を有する、実施態様IV-1～IV-56のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-57：コンジュゲートの多糖が、約10 kDa～約45 kDaの平均分子量を有する、実施態様IV-1～IV-56のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-58：コンジュゲートの多糖が、テトラマー、ヘキサマー、オクタマーまたはデカマー多糖である、実施態様IV-1～IV-55のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

10

実施態様IV-59：

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；

b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；ならびに

c. 化膿レンサ球菌の付着/分裂(SpyAD)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様IV-60：SpyADタンパク質が、配列番号33と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-59の免疫原性組成物。

20

実施態様IV-61：SpyADタンパク質が、配列番号33と少なくとも95%同一であり、かつ位置K64、K287、K386およびK657でpAMF置換を含む、実施態様IV-59の免疫原性組成物。

実施態様IV-62：SpyADタンパク質が、配列番号34のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-59～IV-61の免疫原性組成物。

実施態様IV-63：SpyADタンパク質が、配列番号34のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-59～IV-61の免疫原性組成物。

実施態様IV-64：SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-59～IV-63のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

30

実施態様IV-65：SLOポリペプチド抗原が、配列番号31、配列番号32、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-59～IV-64のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-66：配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含むポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様IV-1またはIV-59の免疫原性組成物。

40

実施態様IV-67：配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号52のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様IV-1またはIV-59の免疫原性組成物。

実施態様IV-68：配列番号30のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号32のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよびGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様IV-1またはIV-59の免疫原性組成物。

実施態様IV-69：配列番号29のC5aペプチダーゼポリペプチド抗原；配列番号53のSLOポリペプチド抗原；ならびに配列番号34のSpyADコンジュゲートポリペプチドおよ

50

びGASコンジュゲート多糖を含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様IV-1またはIV-59の免疫原性組成物。

実施態様IV-70：

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；
b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；および
c. アルギニンデイミナーゼ(ADI)コンジュゲートポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)側鎖を欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様IV-71：ADIポリペプチドは、配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-70の免疫原性組成物。

実施態様IV-72：ADIポリペプチドが、配列番号35または配列番号36と少なくとも95%同一であり、かつ位置K15、K193およびK316でpAMF置換を含む、実施態様IV-70の免疫原性組成物。

実施態様IV-73：ADIポリペプチドが、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-72の免疫原性組成物。

実施態様IV-74：ADIポリペプチドが、配列番号37または配列番号38のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-72のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-75：

a. A群レンサ球菌(GAS)C5aペプチダーゼポリペプチド抗原；
b. GASストレプトリジンO(SLO)ポリペプチド抗原；および
c. フェリチンポリペプチドおよび免疫優性N-アセチルグルコサミンを欠失しているGASコンジュゲート多糖またはそのバリエーションを含んでいるポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

実施態様IV-76：フェリチンタンパク質が、配列番号21と少なくとも95%同一であり、かつ位置I5でpAMF置換を含んでいるアミノ酸配列を含む、実施態様IV-75の免疫原性組成物。

実施態様IV-77：フェリチンタンパク質が、配列番号21と少なくとも95%同一であり、かつ位置I5でpAMF置換を含む、実施態様IV-75の免疫原性組成物。

実施態様IV-78：フェリチンタンパク質が、配列番号23のアミノ酸配列を含む、実施態様IV-75の免疫原性組成物。

実施態様IV-79：フェリチンタンパク質が、配列番号23のアミノ酸配列から成る、実施態様IV-75の免疫原性組成物。

実施態様IV-80：組成物が、約10%～約50%の第一のGAS抗原、約10%～約50%の第二のGAS抗原および約10%～約50%のポリペプチド-多糖コンジュゲートを含む、実施態様IV-1～IV-79のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-81：水酸化アルミニウムゲル、サポニン、モノホスホリルリピドA(MPL)またはそれらの組み合わせから選択される1または1以上のアジュバンドを更に含む、実施態様IV-1～IV-80のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-82：ポリペプチド-多糖コンジュゲートが、約10 kDa～約5000 kDaの平均分子量を有する、実施態様IV-1～IV-81のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

実施態様IV-83：実施態様IV-1～IV-82のいずれかに記載の免疫原性組成物を対象に投与することの特徴とする、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する防御免疫応答を誘導する方法。

実施態様IV-84：対象が、18才またはそれ以上である、実施態様IV-83の方法。

実施態様IV-85：対象が、18才未満である、実施態様IV-65の方法。

実施態様IV-86：対象が、5才～17才、6ヶ月～9才または5才～9才である、実施態様IV-65の方法。

10

20

30

40

50

実施態様IV-87：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M11、M12、M22、M28、M75およびM89から選択される血清型である、実施態様IV-83～IV-86のいずれか1つに記載の方法。

実施態様IV-88：GAS細菌が、M1、M3、M5、M9、M12、M18、M22、M25、M28、M71、M72およびM74から選択される血清型である、実施態様IV-83～IV-86のいずれか1つに記載の方法。

実施態様IV-89：GAS細菌が、M1、M4、M6、M11、M12、M22、M44、M75、M77、M77およびM81から選択される血清型である、実施態様IV-83～IV-86のいずれか1つに記載の方法。

実施態様IV-90：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M9、M12、M18、M22、M75、M77、M89およびM92から選択される血清型である、実施態様IV-83～IV-86のいずれか1つに記載の方法。

実施態様IV-91：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M11、M12、M13、M28、M62およびM89から選択される血清型である、実施態様IV-83～IV-86のいずれか1つに記載の方法。

実施態様IV-92：GAS細菌が、M1、M2、M3、M4、M6、M12、M22、M28、M49、M53、M68、M77、M80、M83、M87、M89およびM92から選択される血清型である、実施態様IV-83～IV-86のいずれか1つに記載の方法。

実施態様IV-93：免疫原性組成物が、対象におけるA群レンサ球菌属(GAS)の細菌に対する抗体応答を誘導し、対象におけるヒト組織に対する抗体応答を誘導しない、実施態様IV-83～IV-92のいずれか1つに記載の方法。

実施態様IV-94：免疫原性組成物が、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導し、前記赤痢菌が、ポリラムノース・バックボーンを有する多糖を含む、実施態様IV-83～IV-93のいずれか1つに記載の方法。

実施態様IV-95：実施態様IV-1～IV-82のいずれか1つに記載の免疫原性組成物を対象に投与することを特徴とする、対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導する方法。

実施態様IV-96：対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための、実施態様IV-1～IV-82のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様IV-97：対象における赤痢菌に対する防御免疫応答を誘導するための、医薬品の製造における実施態様IV-1～IV-82のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様IV-98：対象におけるGAS細菌に対する防御免疫応答を誘導するための、医薬品の製造における実施態様IV-1～IV-82のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様IV-99：対象におけるGAS細菌に対する防御免疫応答を誘導するための、実施態様IV-1～IV-82のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

実施態様IV-100：対象が18才またはそれ以上である、実施態様IV-93～IV-99のいずれか1つに記載の方法または使用。

実施態様IV-101：対象が18才未満である、実施態様IV-100のいずれか1つに記載の方法または使用。

実施態様IV-102：対象が、5才～17才、6ヶ月～9才または5才～9才である、実施態様IV-100のいずれか1つに記載の方法または使用。

【0072】

(引用文献の参照)

本書に引用されたすべての文献、記事、出版物、特許、特許文献および特許出願は、すべての目的のために参照によりその全体が組み込まれる。しかし、本明細書で引用した文献、記事、出版物、特許、特許文献および特許出願に言及することは、それらが有効な先行技術であること、世界各国において広く一般知識の一部を形成していることを認めるものではなく、またそのような示唆を与えるものでもないと理解されるべきである。

【実施例】

【0073】

実施例1：GAS多糖類の発現および精製

GAS多糖類を、GAS細菌培養物から発現させて、精製するために実験を行った。

適切な組換えGASコロニーから出発培養物(500 mL)を調製し、細菌を数時間増殖させた後に、1.25 Lの大型培地に接種して、振盪せずに37℃で一晩増殖させた。細菌をペレット化し、PBSで1回洗浄した。コニカルチューブ中(50 mL)の細胞ペレットに、48%フッ化水素酸の冷水溶液(5 mL)を、ポリスチレンチップを用いて加え、血清ピペットを用いて慎重に上下にピペッティングしてペレットを崩壊させた。小型のマグネチックスターバーを用いて、混合物を、4℃で48時間攪拌した。ヒュームフード内で、コニカルチューブを氷上に置き、45 mL(48% HFの10倍量)の氷冷Milli-Q(登録商標)(超純水)を、透析用調製物として細菌懸濁液に加えた。

10

【0074】

透析用に、脱イオン水を4 Lプラスチックビーカーに満たした。スターバーを、各々ビーカーに加えて、封をして、冷蔵庫で置いて冷却した。1000 MWCOの再生セルロース製透析チューブを、各菌培養物毎にカットした(4 Lビーカーで最大約17 cm)。1.25 Lの培養物6本に対して、3本のチューブが必要である。チューブを純水で洗浄し、Milli-Q(登録商標)(超純水)でリンスした後、冷Milli-Q(登録商標)(超純水)の入ったビーカーに入れた。ヒュームフード内で、チューブをビーカーに入れ、希釈した菌体懸濁液を慎重に注入して、クリップで密封した。サンプルは、以下の通りに透析した：1日目：攪拌しながら4℃で透析、2日目：水を交換して4℃で攪拌しながら透析、3日目：水を交換して、室温で攪拌しながら透析。

20

【0075】

透析チューブの内容物を遠心管に移し、14,000 rpm、4℃で20分間回転させた。50 mLコニカルチューブを、Milli-Q(登録商標)(超純水)で3回リンスし、全ての可溶性プラスチック残渣を除去した。多糖類を含む上清を、各チューブに30 mLまで分注し、ドライアイスで1時間凍結させた。凍結したサンプルを凍結乾燥し、残留物を冷水(8 mL)に再懸濁した(必要に応じて、超音波処理を穏やかに行った)。10x プロテイナーゼK緩衝液(500 mM Tris HCl, 10 mM CaCl₂)(1 mL)と多糖類調製物あたり12.5 mgのプロテイナーゼKを添加した。時々攪拌しながら、ハイブリダイゼーションオープン内で、56℃で一晩インキュベートした。100 μLの100 mM PMSF(終濃度5 mM)/エタノールを用いて反応を停止させ、37℃で1~2時間、定期的に攪拌しながらインキュベートした。この混合物を、0.05%アジ化ナトリウムを含む純水中で24時間攪拌しながら透析し、塩類を除去した。得られた粗多糖類溶液を凍結して、凍結乾燥した。

30

【0076】

粗製多糖を、7%エタノールで事前に平衡化済みの100 cm x 1.5 cm Biogel P4カラムを用いて、20.0分/サンプルに設定したスパイラルコレクターを備えたサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。粗製原料を7%エタノール(500 μL)に再懸濁し、4000 rpmで5分間遠心分離して不溶性の微粒子を除去した。サンプルをカラムにロードし、ロード前の量と4つの後続する画分を7%エタノール(500 μL)で溶出した。カラムを7%エタノールで溶出し、約20時間かけて回収した。分画物を、フェノール-硫酸法で分析し、多糖の存在を検出し、サンプルを490 nmで読み取り、定量した。フェノール-硫酸試験で陽性となった画分をプールし、凍結乾燥して、最終の精製PS生成物を得た。

40

【0077】

実施例2：pAMF修飾コンジュゲートポリペプチドの発現および精製

無細胞タンパク質合成抽出物から、pAMF修飾コンジュゲートポリペプチドを発現させて、精製する実験を行った。

nnAA(例えば、pAMF)を含むコンジュゲートポリペプチド、例えば、SpyAD(配列番号11または配列番号34)を、アンバーストップコドンでnnAAを挿入するための直交tRNAを産生するように遺伝子操作した大腸菌から得た抽出物(XtractCF+)を用いて、無細胞タンパク質合成(CFPS)反応にて発現させた。これらの修飾コンジュゲートポリペプチ

50

ドのクローニング、発現および精製に使用されるサンプルプロトコルは、例えば、Kapor et al., Biochemistry, 2018, 57(5), 516-519に見出すことができる。

【0078】

例としては、DASboxミニバイオリアクターシステムを用いる(25℃で650rpmの一定攪拌にて; pH7.2; 溶存酸素30%; 10時間)制御下で大規模な抗原発現を行うことができる。10時間後に、反応生成物を回収して、4℃で30分間15,000×gで遠心分離を行い、0.45 μmフィルターに通した濾液を、平衡化済のHisTrap excelカラム(Cytiva)(5ml)にロードし、吸光度がベースラインに戻るまで、緩衝液A[50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM イミダゾール]を用いて広範囲に洗浄した(図17は、選択したSLOバリエーションの精製サンプルゲルを示している)。緩衝液B[50mM Tris, 150mM M NaCl, 500mM イミダゾール]の50%段階的グラジエントを用いてタンパク質を溶出し、溶出画分をプールして濃縮して、緩衝液Aに透析しながら過剰量の精製his6タグ付きTEVプロテアーゼと共に一晚インキュベートした(図18は、SLOペプチドのTEV切断後のサンプルゲルを示している)。透析後の切断反応物を、事前に平衡化済のHisTrap excelカラム(Cytiva)(5ml)に再度ロードして、タグなしタンパク質をフロースルー(FT)画分に回収した。その後、FTを濃縮し、緩衝液S[50mMトリスpH8.0, 150mM NaCl]を用いて事前に平衡化したSuperdex 200 26/60サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)カラムにロードし、SDS-PAGEゲル分析により溶出画分の純度を評価した(図19は、サイズ排除クロマトグラフィー後の選択したSLOバリエーションの純度を示している)。精製SpyAD[4pAMF]を、過剰量のジベンゾシクロオクチン-PEG4-テトラメチルローダミン(DBCO-TAMRA)色素と共に室温で1時間インキュベートして、SDS-PAGEゲルでpAMFサイトを確認し、蛍光による画像検出をSyngen G-box gel imagerを使用して記録した。

【0079】

nnAAによって修飾されていないポリペプチドは、上記のものと同様の方法に従ってCFPSを使用して調製された。図12は、CFPSで発現されたGASタンパク質抗原および選択された免疫原性コアフラグメントのモジュラーアーキテクチャーを示す。

【0080】

シングルサイト部位変異誘発試験を、pAMFによるシングルサイトのアミノ酸残基の置換が、発現にどのように影響するかを理解するために、SpyAD(配列番号9)で行い、全タンパク質および可溶性タンパク質の両方で測定した。図1Aは、リジンスキャニング変異誘発試験から得られた発現レベルを示す。示される通り、SpyADタンパク質中の単一点におけるpAMF残基の導入は、全タンパク質および可溶性タンパク質の発現に様々な影響を及ぼした。図1Bは、nnAAを含む抗原および抗原コンジュゲートについての発現レベルを示す。図13は、セーフブルー(Safe Blue)染色によって測定された通り、SLOバリエーション、C5aペプチダーゼおよびSpyADの95%を超える純度を示し、さらにDBCO-TAMRA標識によって確認された通り、SpyADバリエーションのSpyAD[4pAMF]へのpAMFの取り込みを示す。

【0081】

実施例3: クリックケミストリー反応基で修飾されたラムノース多糖の合成および精製

DBCO修飾多糖を、段階的なアプローチを用いて合成して、オリゴマー長の調整を行った。

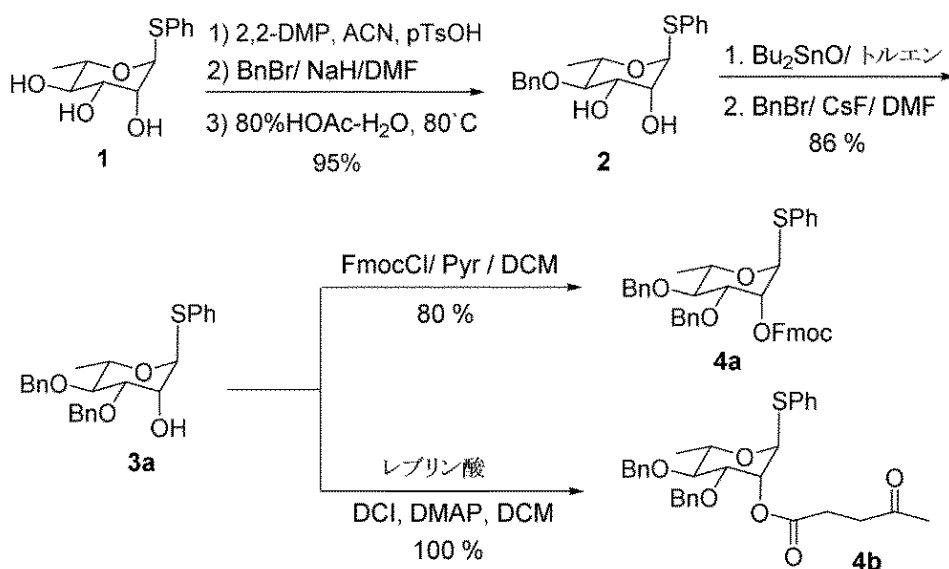
10

20

30

40

【化 1】



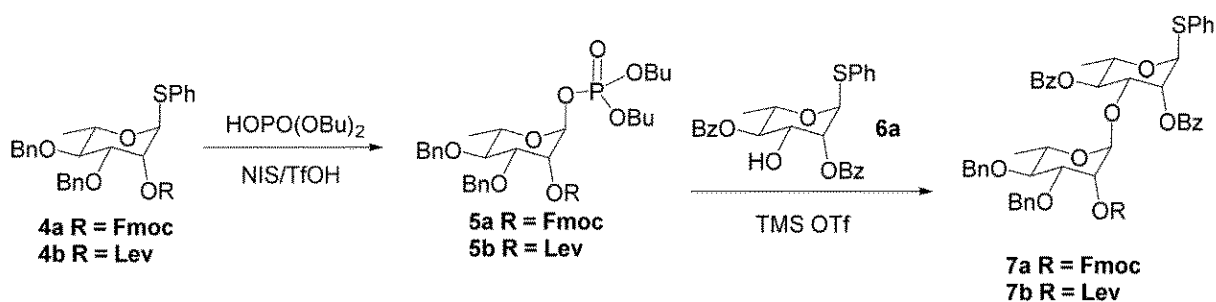
10

【0082】

20

単糖類中間体4aおよび4bの合成：モノマー1をモノベンジル化して2を得て、これをさらにベンジル保護し、中間体3aを得た。3aをエステル化条件下でレブリン酸との処理により、レブリン酸(Lev)エステルモノマー4aを得る。あるいは、3aをFmocで保護して、モノマー4bを得る。

【化 2】



30

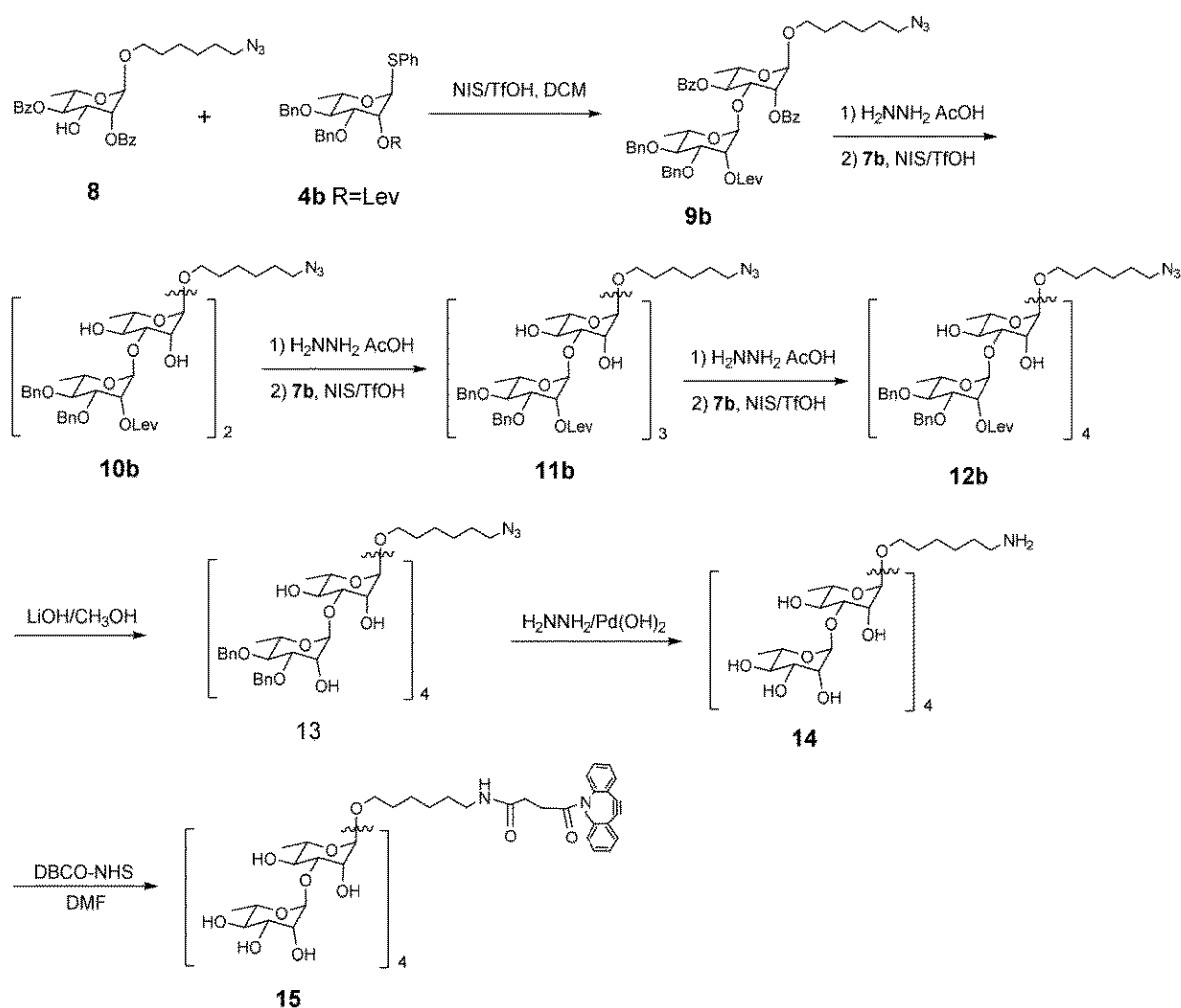
【0083】

二糖類供与体7aおよび7bの合成：単糖類中間体4a/bを、リン酸エステル5a/bに変換した後、これをTMSOTfおよび6aで処理して、二糖供与体7a/bを得た。

40

50

【化 3】



10

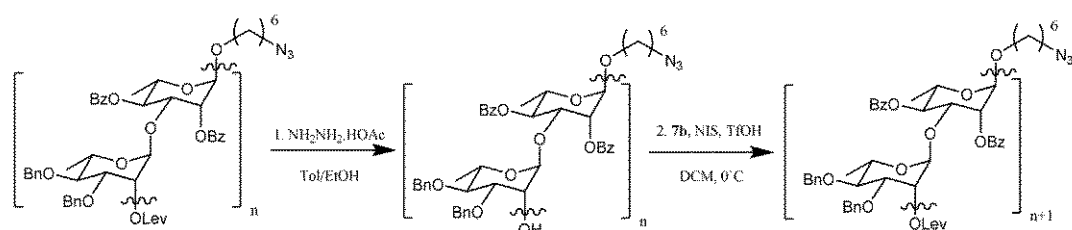
20

30

【0084】

クリックケミストリー反応基を有するラムノース八糖類の合成：アジド中間体8を、NIS/TfOHの存在下で単糖類中間体4bとカップリングさせて、ダイマー9bを得て、二糖供与体7bを用いて、3回連続して脱保護／カップリング反応を行い、部分保護されたオクタマー中間体12bを得る。12bをLiOH/メタノールで処理することにより、レブリン酸エステルが加水分解されて13が得られ、さらにH₂NNH₂/Pd(OH)₂で処理して、ペンドアントアジドが同時に還元されて、残りのベンジルエーテルが還元切断され、14が得られる。14を、DBCO-NHSとカップリングさせて、最終的に八糖類15を得た。

【化 4】



40

【0085】

50

長さの異なる多糖類、例えば十二糖類や六糖類は、上記の一般的な反応スキームに示した通り、ドナー7bとの脱保護/カップリングの回数を変えることによって製造することができる。

【0086】

本発明の多糖類は、モノマー4aを起源とする上記中間体のFmoc保護誘導体を用いた固相合成により合成することも可能である。

【0087】

実施例4：精製PSのDBCO-PEGリンカーとの結合

精製された多糖、例えば、実施例1の方法により製造されたものは、DBCO-PEGリンカーを用いて官能化することができる。

【0088】

一般的に、多糖類水溶液(全ての試薬を加えた後に最終濃度5.5 mM)に、最終濃度が最終容量にて100 mM ホウ酸塩となるようにホウ酸塩緩衝液(1 M, pH 8.5)を加えた。その後、残りの反応容積を満たすために水を加えた。2.5 当量(多糖の反復単位に対して)の1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート(CDAP; アセトニトリル中で100 mg/mL 溶液)を、激しく攪拌しながら添加した。CDAPは、-20℃で保存されており、使用直前に溶液を調製する必要がある。CDAPの添加5分後(このタイミングが重要であり、5分以上経過するとDBCO-PEG-アミンの取り込みが低下する)に、0.5 モル当量のジベンゾシクロオクチン-アミンのリンカー(DMSOストック溶液、DMSOの最終濃度は5% v/v)を添加した。DBCO-PEG4-アミンリンカーは、-20℃で保存されており、使用直前に調製する必要がある。さらに1時間反応させた後、体積比1:10にてグリシン(2 M, pH 8.35)を添加して、最終濃度200 mMのグリシンとし、未反応のシアン酸エステルを、クエンチした。1時間のクエンチした後、誘導体化された多糖類を、Zeba スピンカラムで精製した。各Zebaカラム(10 mL)に2~3 mLずつ溶液を加えた。精製された多糖類を、結合/遊離DBCO HPLC法で分析し、残留するDBCO-PEG4-アミンリンカーとDMAPが、カラム精製により完全に除去されているかどうかを判断した。必要であれば、さらに精製することも可能である。多糖類濃度を、アンスロンアッセイを用いて測定し、ジベンゾシクロオクチン濃度を、309 nmの吸光度を用いて測定した。これら2つの値axcyte:を合わせて、ジベンゾシクロオクチンの官能基により誘導体化された多糖のパーセンテージを推定できる。DBCOのパーセントは、CDAP反応では5~10%であるべきである。

【0089】

GACのDBCO-PEG4誘導体化：100 mMホウ酸緩衝液(pH 8.5)中の6 mM GAC溶液に、反応性水酸基によるシアン化を促進するために、3 当量(多糖反復単位に対して)の1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート(CDAP; アセトニトリル中で100 mg/mL 溶液から)を、激しく攪拌しながら添加した。CDAP添加5分後に、DMSO中の2モル当量のジベンゾシクロオクチルアミンリンカーのストック溶液を、最終DMSO濃度が5% (v/v)になるように添加した。DBCO誘導体化後、未反応のシアン酸エステルをクエンチするために200 mMグリシンを反応溶液に添加した。DBCO誘導体化した多糖類を、Zeba スピン脱塩カラムで精製して、回収物の純度を逆相によりアッセイした。HPLCにて309 nmで吸光度をモニターしたときに単一のピークが見られたことから、過剰量のDBCOリンカーおよびその他の反応副生成物が完全に除去されていることが確認された。最後に、多糖の濃度を、アントロンアッセイ(下記参照)を用いて測定し、ジベンゾシクロオクチンの濃度を、309 nmの吸光度を用いて測定した。これら2つの値を合わせて、ジベンゾシクロオクチンの官能基で誘導体化された多糖の割合を推定した。コンジュゲーションのための、GACのDBCO誘導体化率は、5~10%を維持していた。

【0090】

全多糖濃度についてのアントロンアッセイ：アントロン試薬(Sigma-Aldrich, CAS# 90-44-8) 2 mg/mlを、冷硫酸中で調製し、2xラムノースを含む多糖類反復単位(PSRU)の1 mMストック溶液を標準として水で調製した。3連のウェルに、100 µlのPSRUス

10

20

30

40

50

トック(標準品を連続希釈)または未知サンプル(1:3希釈)を播種した後(96ウェルプレート)、200 μ l/ウェルのアントロン試薬を添加した。全ての反応溶液を十分に混合し、プレートカバーで密封して、95℃で10分間インキュベートした。プレートを、短時間氷上に置き、室温まで冷却した後、UV/VISプレートリーダーを用いて620 nmで吸光度を測定した。未知サンプルの濃度を決定するために、PSRU標準濃度および吸光度を用いて、最小二乗法による適合回帰を作成した。

【0091】

実施例5: DBCO誘導体化された多糖に対するキャリアタンパク質のコンジュゲーション
一般的に、キャリアタンパク質フェリチン(配列番号23)、SpyAD(配列番号34)、ADI(配列番号27および配列番号38)、配列番号25およびnnAA(例えば、pAMF)を含有する
10
プロテインDは、DBCO基のシクロオクチン基を、キャリアタンパク質に組み込まれたnnAA側鎖のアジド基と反応させることにより、実施例3および実施例4の精製されたDBCO誘導体化された多糖とコンジュゲートさせた。DBCO基とアジド基とのコンジュゲーション反応についてのサンプルプロトコルは、例えば、Zimmerman et al., Bioconjugate Chemistry, 2014, 25(2), 351-361 and Kapoor et al., Biochemistry, 2018, 57(5), 516-519に記載されている場合がある。

【0092】

pAMF誘導体化GACのSpyADへのコンジュゲーション: SpyAD[4pAMF](配列番号34)を、DBCO誘導体化GACと1:1の割合で混合して[各0.5mg/ml]、クリックケミストリーによるコンジュゲーションを進めた。コンジュゲーション後、反応混合物を、50
20
kDaカットオフ膜にて透析し、過剰量の未反応の遊離多糖を除去した。回収したコンジュゲートは、SEC(多角度光散乱)MALSによって分析し、アントロンアッセイを用いて濃度を推定した。図9は、DBCO-(PEG)4-NH₂によるGACの誘導体化、その後のpAMF-誘導体化SpyADへのコンジュゲーションの概要を示すスキームである。図10は、精製ネイティブGAC、精製ネイティブSpyAD[4pAMF]および精製コンジュゲートのSEC MALS分析を示す。精製されたネイティブGACのSEC-MALS分析により、平均分子量7.2kDaと推定される。精製されたネイティブSpyAD[4pAMF]のSEC-MALS分析により、平均分子量87.3kDaと推定される。クリックケミストリー後の精製コンジュゲートのSEC-MALS分析により、平均分子量153.4 kDaと推定される。挿入図は、SpyAD[4pAMF]のコンジュゲーション前後のSafe Blue SDS-PAGE分析により、未反応タンパク質がコンジュゲーション後に残っていないことを示している。
30

【0093】

SEC MALS-UV-RIは、Agilent HPLC 1100デガッサー、温度制御オートサンプラー(4℃)、カラムコンパートメント(25℃)およびUV-VISダイオードアレイ検出器(Agilent, Santa Clara, CA)とならんでDAWN-HELEOS多角度レーザー光散乱検出器および3つのTOSOHカラム: TSKgel Guard PWXL 6.0 mm ID x 4.0 cm long, 12 μ m
粒子; TOSOH TSKgel 6000 PWXL 7.8 mm ID x 30 cm long, 13 μ m粒子; およびTSKgel 3000 PWXL 7.8 mm ID x 30 cm long, 7 μ m粒子が結合したOptilab T-rEX示差屈折干渉計(Wyatt Technology, Santa Barbara, CA)を用いて行った。
0.2 μ mでろ過した1x PBSに5% (v/v)アセトニトリルを加えた移動相を、0.5 mL/
分の流速で使用し、50~100 μ gのサンプルを注入して分析した。HPLCの制御にはAgilent Open Labソフトウェアを使用し、データ収集および分子量の解析にWyatt Astra 7ソフトウェアを使用した。
40

【0094】

実施例6: GAS抗原および抗原-多糖コンジュゲートにより誘導された抗体応答

精製GAS抗原およびそのコンジュゲートによる抗体反応を評価するために実験を行った。簡単に言うと、ウサギを、各々50 μ gの所定抗原またはコンジュゲートあるいはビヒクルコントロールにより、0、14、28日目に筋肉内免疫を行った。動物を、免疫化前(採血前: pre-bleed)ならびに免疫化後7日目、21日目および35日目(最終採血: terminal bleed)に採血した。血清を、各血液サンプルから回収し、免疫抗原に対する抗体力
50

価をELISAで評価した。

【0095】

抗体力価のELISA分析について、所定の組換えタンパク質抗原を、3 μg /ウェルの濃度で、滅菌PBSに播種した。高結合平底96ウェルプレートを用いて被覆して、攪拌せずに室温で終夜インキュベートした。プレートを、Aquamax Microplate Washerを用いて、100 μL PBS+0.05% Tween 20で3回洗った後にブロッキングし、ペーパータオル上で乾かした。ウェルを、100 μL の試薬希釈液2を用いて、2時間ブロッキングした。1% BSAを含むPBS(100 μL)も使用できる。プレートは蓋をして密封し、ブロッキング液中にて4°Cで3日間保存できる。その後前記と同様に、100 μL PBS + 0.05% Tween 20でプレートを3回洗浄した。

10

【0096】

血清サンプルは、1x試薬希釈液2を用いて希釈して調製した(標準希釈度は、1:400~1:106である)。次いで、調製した血清100 μL を、プレートに添加した後、2時間インキュベートした。プールした免疫前のウサギ血清を、ネガティブコントロールとして使用し、ウサギ血清を含まないウェルをバックグラウンドコントロールとして使用した。プレートを、前記と同様に、PBS=0.05% Tween 20(100 μL)で3回洗浄した。その後、HRP標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)二次抗体(1x 試薬希釈液2に1:4000で希釈)(100 μL)と共に、2時間インキュベートした。その後、プレートを100 μL のPBS+0.05% Tween 20で3回洗浄した。TMB基質を、製造元の説明書に従って調製し、試薬Aおよび試薬Bを等量ずつ室温で添加した。各ウェルに100 μL の調製済TMB基質を添加して、遮光して30分以内でインキュベートした。2N 硫酸を、1ウェルあたり50 μL 添加し、反応を停止させた。ELISAプレートは、450 nmおよび540 nmで読み取り、450 nmの値から540 nmの値を引いてバックグラウンドを補正する。力価は、カットオフ：バックグラウンドコントロールの吸光度値+3×バックグラウンドコントロールの標準偏差に基づいて決定された。

20

【0097】

図2に示すように、ADI(配列番号38)、SLO(配列番号32)、C5a(配列番号30)、Spy CEP、Sib35、SpyAD(配列番号33)およびSpyAD-PSコンジュゲート(pAMF置換された配列番号34のコンジュゲート)を用いた免疫化により、免疫前のコントロールと比較して、強力な抗体反応を惹起した。Sfb1も試験されたが、弱い抗体価を生じた。異なるパネルにおける個々の抗原表記(識別子)は、実験において異なるウサギを示す。

30

【0098】

実施例7：GAS抗原が誘発するGAS血清型に結合する抗体

GAS抗原誘発性抗体応答に関する様々なGAS血清型への結合能力を評価するために、実験を行った。簡単に言えば、ウサギを、0、14および28日目に20 μg のSpyAD-PSコンジュゲートまたは50 μg のC5aペプチダーゼで免疫化した。動物は、免疫前(免疫前血清)、免疫後(免疫血清)の7日目、21日目、35日目に採血した。血清は、各血液サンプルから採取した。

【0099】

全ての血清サンプルは、30分間55°Cで熱不活性化した。各種血清型のGASを、OD600=0.4まで増殖させ、洗浄し、 2×10^8 cfu/mLで凍結保存した。凍結したGASストックを解凍し、10%ヤギ血清を加えて、混合物を、室温で1時間インキュベートした。結合アッセイでは、100 μL のブロッキングしたGAS(ヤギ血清と共に)を、微量遠心管(1.5 mL)に添加した。2 μL の免疫前血清または免疫血清を、各チューブに添加した。サンプルをよく混合し、室温で1時間インキュベートした。サンプルを、3500Gで5分間遠沈させて、500 μL のPBSで1回洗浄した。次に、サンプルを蛍光二次抗ラビット二次抗体でインキュベートした。その後、サンプルを500 μL PBS中でFACSチューブに移した。蛍光シグナル強度をフローサイトメトリーで測定し、FlowJo softwareを用いて計算し、免疫血清と免疫前血清のシグナル強度を比較した。

40

【0100】

50

図3Aは、SpyAD-コンジュゲート(配列番号34のコンジュゲート)による免疫後の血清のIgG結合と、M1の株(1-21)に対する免疫前の血清のものとの比較を示す図である。図3Bは、C5aペプチダーゼ(配列番号30)で免疫した後の血清のIgG結合と種々のM1株(1-21)に対する免疫前の血清のものとの比較を示す。全ての臨床的に関連するGAS株に対するSpyADコンジュゲートおよびC5aペプチダーゼに結合するIgGの程度は、図3Cに示され、両方とも臨床的に関連するGASの>95%に強い結合を示す。

【0101】

免疫原性についてのGASワクチン抗原の追加的評価：上記のプロトコルに従って、動物を、Adju-phos(Invivogen)でアジュバントした240μL総容量のスクシネートバッファ中のSLO、C5aペプチダーゼまたはSpyAD-GACコンジュゲートいずれかの5μgで免疫化した。接種により、即ち最終採血(35日目)のウサギ抗血清により惹起された免疫グロブリン(IgG)力価の決定を、ELISAによって評価した。全ての3つのタンパク質抗原(SpyAD、C5aペプチダーゼおよびSLO)について、組換えタンパク質で免疫したウサギの1群は、免疫前のウサギから集めた血清(「免疫前(プール)」)または別の免疫したウサギの1群のいずれかと比較して、標的抗原に対する抗体力価の有意な増加(3~4-log₁₀倍)を示し(図3D、各ポイントは、1匹の動物から得た血清を表し、1群あたり2~3匹で行った)、それぞれの各抗原に対する反応特異性を確認した。SpyAD-GACコンジュゲートによって生じた抗SpyADタンパク質力価は、SpyAD組換えタンパク質単独の力価に劣らず、重要なB細胞エпитープがpAMF部位によって影響を受けないことが示唆された。Mタンパク質の血清型が異なる8種類の生存野生型GAS株(m1-6、M12、M28)の表面に対するウサギ由来のIgGの結合親和性をフローサイトメトリーを用いて評価した。大多数の株について、それぞれの免疫血清は、免疫前血清のベースラインIgG結合に比べて1000~400%の結合の増加をもたらした(図3E、各ヒストグラムの右上の数字は、免疫前血清シグナルに対する免疫ウサギ血清のシグナル増加の平均パーセントを示す)。8株のうち6株については、SpyAD-GACコンジュゲートに対して生じた抗血清のGAS表面の結合は、SpyAD単独に対して生じた抗血清で見られるIgG結合レベルのおよそ2倍であった。図3Fは、SpyADノックアウトGASに対するウサギIgGの結合を示し、ネイティブGACへの結合が確認された。

【0102】

実施例8：好中球の殺傷アッセイ

GASのM1、M3およびM3株の好中球殺傷を惹起する抗原およびコンジュゲートで免疫化されたウサギから得た免疫血清の能力を決定するために実験を行った。ウサギは、実施例7に記載されたプロトコルに従って、所定の抗原で免疫された。単一抗原の場合、ウサギは50μgの抗原で免疫された。コンジュゲート抗原については、ウサギは、20μgのコンジュゲートで免疫された。

【0103】

好中球の分離：健康なボランティアから得た血液(25 mL)を、21Gのバタフライ針を用いて、バキュティナー・ヘパリンチューブに入れた。好中球は、製造業者のプロトコルに従って、Polymorphprepを使用して新鮮な血液から単離した。免疫前血清、免疫血清およびFBSなどの全ての血清を、アッセイに使用する前に、時々混合しながら65℃で30分間加熱した。

【0104】

好中球殺傷アッセイプロトコル：GAS株の一晩培養物を、トッド・ヒューウィット培地(THB)中に1:10の割合で植菌した。培養物がOD₆₀₀=0.4になった時点で、培養物を遠心分離し、10%の免疫前血清または免疫血清を含むHBSS中に5x10⁵コロニー形成単位(CFU)/mLにて再懸濁させた。GAS株は、30分間室温でRPMI+血清中で保持した。準備した好中球を、HBSS+4% FBS+4% 子ウサギ補体(BRC)に5x10⁶細胞/mLの濃度で再懸濁した。100 μLの好中球(5x10⁵細胞)を96ウェル平底プレートに播種し、各条件を3連で実行した。100 μLの調製済細菌(5x10⁴ cfu/ウェル)を、好中球の各ウェルに添加した。植菌した細菌は、後で植菌のcfuを計測するために、連続希釈して血液寒天

培地プレートに播種した。96ウェルプレートを500Gで5分間遠心分離し、37℃+5% CO₂で30分間インキュベートした。30分間の培養後、サンプルをよく混合し、連続希釈した血液寒天培地プレートに播種し、37℃で一晩静置培養した。GASコロニー数を計測し、植菌CFU vs 回収CFUの%比を、%生存率として算出した。免疫血清前群と比較した殺傷力の増加率は、まず免疫血清前群と免疫血清群の両方における殺傷力(100%生存率)を計算することによって算出した。次に、免疫血清群の殺傷力の%増加を、免疫血清前の群の殺傷力の%と比較して計算した。

【0105】

図4は、抗原ADI 1625(配列番号36)、ADIコンジュゲート変異体1807(pAMF置換された配列番号38のコンジュゲート)、ADIコンジュゲート変異体1809(配列番号38のコンジュゲート)、SLO 1627(配列番号32)、C5aペプチダーゼ1630(配列番号30)、SpyAD 1642(配列番号33)、SpyADコンジュゲート1644、1630+1627+1644、1630+1627+1809、1630+1627、M1による免疫化により生じた血清の能力を示し、GAS血清型M1、M2、M3の殺傷を免疫前血清よりも増加させたことを示す。pAMF置換SpyADコンジュゲートは、配列番号12のペプチドを用いて作製され、ADIコンジュゲートは、配列番号20のペプチドを用いて作製された。

10

【0106】

実施例9：GAS抗原およびコンジュゲートはGASチャレンジ後の生存率を増加させる能動免疫応答を惹起する

マウスを、能動免疫した後、皮下およびIP注射によってチャレンジした。

20

【表7】

表 5: 能動免疫化実験タイムライン-皮下およびIPチャレンジ

皮下チャレンジ-ステップ	IPチャレンジ-ステップ
1日目: 1 st 免疫	1日目: 1 st 免疫
14日目: 2 nd 免疫	14日目: 2 nd 免疫
28日目: 3 rd 免疫	28日目: 3 rd 免疫
42日目: 感染チャレンジ	41日目: マウスを剃毛
49日目: 実験終了	42日目: 感染チャレンジ
	45日目: マウスを安楽死させ、病変を採取

30

【0107】

第1、第2および第3回の免疫－皮下およびIPチャレンジ：抗原／アジュバント混合物を、50μLの水酸化アルミニウムゲル(Alhydrogel)を、10μgの抗原(複数可)または5μgのコンジュゲートと組み合わせて、十分混合して、抗原を水酸化アルミニウムゲルに吸着させることにより調製した。各抗原/アジュバント混合物を、26 1/2ゲージ針を付けた1 mLシリンジに入れた。各マウスを、吸入イソフルランで麻酔し、調製したワクチン100μLを後肢筋に注射した。

40

【0108】

チャレンジのためのマウスの準備－皮下チャレンジ：マウスをイソフルランで麻酔した。マウスの背中を、皮膚を傷つけないように注意しながら、電気カミソリで剃った。剃った背中に脱毛クリームを塗り、数分間放置した後、湿らせたペーパータオルで十分に拭き取った。マウスを乾かして、イソフルラン処理から回復させた。

【0109】

チャレンジのための材料の調製－皮下およびIPチャレンジ：M1 89155株 GASを、対数増殖期の半分まで増殖させた。滅菌リン酸緩衝生理食塩水で細胞濃度を調整し、連続

50

希釈して、寒天に菌体を播種して、菌体量を確認した。皮下チャレンジでは、 $10 \mu\text{L}$ /マウス1匹あたりの目標CFUは、 1×10^6 とし、26 1/2ゲージ針を付けた $500 \mu\text{L}$ ハミルトンシリンジに菌体を入れた。35日目のIPチャレンジでは、 $100 \mu\text{L}$ /マウス1匹あたりのCFUを 1×10^7 とし、26 1/2ゲージの針を付けた1 mLのシリンジに菌体を入れた。マウスを吸入用イソフルランで麻酔し、M1 89155菌($200 \mu\text{L}$)を、腹腔内へ注射した。マウスを、通常の空气中で麻酔から回復させた。マウスの生存は、1日に複数回確認しながら、1週間にわたって追跡した。

【0110】

皮下チャレンジおよび病変採取：35日目の皮下チャレンジのために、マウスを吸入イソフルランで麻酔し、ハミルトンシリンジのリピートディスペンサーを使用して、剃毛した背中にM1 89155細菌($10 \mu\text{L}$)を注入した。病変の大きさは、イソフルラン麻酔をかけたマウスを、定規と並べて撮影することにより、3日間にわたって毎日追跡した。3日目の病変採取の前に、各皮膚病変に対して、1.0 mmシリカビーズとPBS(1 mL)を入れた2 mLの滅菌スクリュウキャップ付きチューブを準備した。各チューブの重量を記録した。3日目に、病変が完全に成長した時点で、マウスを CO_2 および頸椎脱臼で安楽死させた。清潔な外科用器具を用いて、各皮膚病変を切り出し、予め秤量したチューブに入れた。チューブの重量は、組織質量の計算のために記録される。チューブを、MagnaLyserビーズビーターに入れ、6000 rpmで60秒間振動させた。その後、チューブを氷上に置き、60秒間冷却してから、振動サイクルを繰り返した。サンプルを連続希釈し、溶解物を寒天上に置いて、細菌の担持量を定量化する。

【0111】

2つのパラレル試験を行い、その中で1つの動物のセットでは、ワクチン接種後の抗原特異的抗体力価を試験するために、実験全体を通して採血した。他方のアームでは、マウスは、実験経過期間に採血しなかった。両方の動物のセットは、病変サイズおよびCFU/mg分析を行うために、最終的には同じ様にチャレンジされた。図5Aは、病変サイズおよび病変CFU/mgにより判断した採血アームの能動免疫実験の結果を示し、本開示のコンジュゲートが、多糖類単独よりも良好に機能することを実証している。同様に、図5Bは、病変サイズおよび病変CFU/mgにより判断した無採血アームの能動免疫実験の結果を示し、SpyAD(pAMF置換された配列番号34のコンジュゲート)およびADI(ADImut2コンジュゲートは、pAMF置換された配列番号27を使用し、ADImut5コンジュゲートはpAMF置換された配列番号を使用する)のGACコンジュゲートは、対応するタンパク質単独の保護よりも優れた保護を伝達させたことが示される。最良の保護は、C5aペプチダーゼ(配列番号4)によりもたらされた。図5Cは、各免疫後の第1、第2および第3回目の抗体力価を示す。図5Dは、能動免疫を受けた後、IPチャレンジに供されたマウスの生存データを示す。何らかの保護を示した唯一のグループは、 $30 \mu\text{g}$ の全タンパク質量にて6つの抗原を組み合わせて投与したグループであった。

【0112】

抗原または抗原コンジュゲートの組合せによる能動免疫化：上記のように、マウスを、IP注射によってチャレンジする前に、1つ以上の抗原または抗原コンジュゲートで能動免疫を行った。

10

20

30

40

50

【表 8】

表 6: 能動免疫化実験のタイムライン-皮下および IP チャレンジ

IP チャレンジ-ステップ
1 日目: 1 st 免疫化
14 日目: 2 nd 免疫化
28 日目: 3 rd 免疫化
42 日目: IP チャレンジ

10

【0113】

マウス(1群あたりn=10)は、次の8つの処理のうちの1つで免疫された: モック免疫(PBS+水酸化アルミニウムゲル); 5 μ g の SpyAD-GAC コンジュゲート(pAMF置換された配列番号34のコンジュゲート); 5 μ g の ADImut5-GAC コンジュゲート(pAMF置換された配列番号38のコンジュゲート); 10 μ g の C5a ペプチダーゼ(配列番号30); 10 μ g の ストレプトリジンO(配列番号32); 10 μ g の C5a ペプチダーゼ(配列番号30)および10 μ g の ストレプトリジンO(配列番号32)の組合せ; 10 μ g の C5a ペプチダーゼ(配列番号30)、10 μ g の ストレプトリジンO(配列番号32)および5 μ g の SpyAD-GAC コンジュゲート(pAMF置換された配列番号34のコンジュゲート)の組合せ; または10 μ g の C5a ペプチダーゼ(配列番号30)、10 μ g の ストレプトリジンO(配列番号32)および5 μ g の ADImut5-GAC コンジュゲート(pAMF置換された配列番号38のコンジュゲート)の組合せ。SpyAD コンジュゲートは、配列番号12のペプチドを用いて製造され、ADImut5 コンジュゲートは、配列番号20のペプチドを用いて製造された。

20

【0114】

図5Eは、IPチャレンジ後の、1つの抗原/抗原コンジュゲートまたは2つの抗原/抗原コンジュゲート(組合せ)で、能動免疫したマウスの生存を示す。SLOで免疫されたマウスは、最大の生存率を示したが、個別の抗原または2つの抗原の組合せは、チャレンジの6日後に100%の保護を提供しなかった。注目すべきは、マウスを、IPチャレンジの前に3つの組み合わせによる能動免疫を行った場合、6日後に100%の生存が観察されたことである。これらのデータは、図5Fに示される。

30

【0115】

実施例10: GAS 抗原およびコンジュゲートは、GAS チャレンジ後の生存を増加させる受動免疫応答を惹起する

【0116】

マウスを、IP注射によってチャレンジされる前に受動免疫した。

【0117】

GAS 抗原およびGAS コンジュゲートにより免疫化されたマウスから単離した抗血清が提供するGASでチャレンジされた後のマウスに移入された場合の保護を評価するために、試験を行った。簡単に述べると、ウサギに5 μ g の ADI 抗原(配列番号36)、C5a 抗原(配列番号30)、Sfb1 抗原(配列番号28)、SpyAD 抗原(配列番号33)、ADI:GAC コンジュゲート(pAMF置換された配列番号38のコンジュゲート)またはSpyAD:GAC コンジュゲート(pAMF置換された配列番号34のコンジュゲート)を0、3、6週目に接種させた。血清は、8週目に各動物から採取した。

40

【0118】

受動免疫-IPチャレンジ: 氷上に移した解凍ウサギ血清(マウス1匹あたり約200 μ L)を、30ゲージ針を着けた1mLシリンジ中に吸引した。対数増殖期の半分まで増殖したM189155株GASを、滅菌リン酸緩衝生理食塩水で希釈し、細胞濃度を調整した。マウス1匹あたりの目的とするCFUは $1 \times 10^7 / 100 \mu$ Lであり、26 1/2ゲージ針を着けた1mLシ

50

リングに菌体を吸引した。ウサギ血清を、シリンジ内で室温まで加温し、マウスをイソフルラン吸入により麻酔した。ウサギ血清(200 μ L)を、各麻酔マウスに、眼窩後方から注入した。血清注入の5分後にM1 81955菌(200 μ L)を腹腔内に注入し、通常の空気中でマウスをイソフルランから回復させた。マウスの生存率は、1日に複数回確認しながら、1週間にわたって追跡した。

【0119】

受動免疫化を受けた後にGASチャレンジに供されたマウスの生存率を、図6Aおよび図6Bに示す。SLO 1627、ADIコンジュゲートMut5 1809、SpyADコンジュゲート1644、C5aペプチダーゼ1630、SLO+C5aペプチダーゼ、SLO+C5a+ADIコンジュゲートおよびSLO+C5a+SpyADコンジュゲートの抗原および抗原コンジュゲート(pAMFコンジュゲート)で処置した全ての群は、免疫前に免疫されたコホートよりも改善した生存を示した。

10

【0120】

実施例11：GAS抗原およびコンジュゲートは、GASチャレンジ後の生存を増強させる受動免疫応答を惹起する

マウスを、皮下注射によってチャレンジされる前に受動免疫した。

【表9】

表7：受動免疫実験のタイムライン-皮下注射によるチャレンジ

皮下チャレンジステップ
1日目：マウスの準備
0日目：材料の準備、血清の移入、チャレンジ
3日目：病変部採取

20

【0121】

チャレンジのためのマウスの準備-皮下チャレンジ：マウスを、イソフルランで麻酔した。マウスの背中を電気カミソリで、皮膚に傷をつけないように注意しながら剃った。剃った背中に脱毛クリームを塗り、数分間放置した後、湿らせたペーパータオルで十分に拭き取った。マウスの水分を拭き取り、イソフルラン処理から回復させた。

【0122】

材料の調製、血清の移入およびチャレンジ-皮下チャレンジ：M1 89155株GASを、対数増殖期の半分まで増殖させた。滅菌リン酸緩衝生理食塩水で細胞濃度を調整し、寒天培地に連続希釈した菌体を播種し、菌体量を確認した。皮下チャレンジでは、10 μ L/マウス1匹あたりの目標CFUは 1×10^6 であり、26 1/2ゲージ針を着けた500 μ Lのハミルトンシリンジに菌体を吸引した。ウサギ血清を解凍し、氷上に移した後、30ゲージの針を装着した1 mLシリンジに吸引した。ウサギ血清をシリンジ内で室温まで温め、マウスをイソフルラン吸入により麻酔した。200 μ Lのウサギ血清を、各麻酔マウスの眼窩後方に注入した。血清注入から5分後、M1 81955菌(10 μ L)を、リピートディスペンサーを用いて剃毛したマウスの背中に注入し、マウスを通常の空気中でイソフルランから回復させた。イソフルラン麻酔したマウスを、定規と並べて撮影し、3日間にわたり病変サイズを毎日追跡した。

30

40

【0123】

細菌担持分析のための病変採取：3日目の病変採取の前に、各皮膚病変について、1.0 mmシリカビーズおよび1 mL PBSを入れた2 mLの滅菌スクリーキャップ付のチューブを準備した。各チューブの重量を記録した。病変が完全に成長した3日目に、マウスをCO₂および頸椎脱臼で安楽死させた。清潔な外科器具を用いて、各皮膚病変を切除し、予め秤量したチューブに入れた。チューブ重量は、組織量の計算のために記録される。チューブを、MagnaLyserのビーズビーターに置き、6000 rpmで60秒間振動させて、氷上に置いて60秒間冷却し、振動を繰り返した。サンプルは、連続希釈され、溶解物を寒天上に置いて、細菌担持量を定量化した。

50

【0124】

受動免疫を受けた後、GASの皮下チャレンジを受けたマウスの病変サイズおよび細菌負荷データを、図7に示す。抗原および抗原コンジュゲートADI(配列番号36)、ADI-コンジュゲート(配列番号38)、SLO(配列番号32)、C5aペプチダーゼ(配列番号30)、sfb1(配列番号28)、SpyAD(配列番号33)、SpyAD-コンジュゲート(pAMF置換された配列番号34のコンジュゲート)で処理したマウス(n=10)は、免疫前のコホートと比較して48時間後に病変サイズの縮小を示し、殆どのアームにおける細菌担持は、72時間後に有意に低下し、SpyADコンジュゲートは細菌担持量の減少において最も良好であった。

【0125】

実施例12：ヒトでの第I相および第IIA相臨床試験デザイン

最初の第I相臨床試験は、健康な成人18～29才(N=96)を対象とした無作為化プラセボ対照の昇順用量試験である(表3)。最初の臨床試験は、安全性、用量反応および免疫原性(IgG抗体)を目的としている。この年齢層では、多くの人が既にGASに曝露されて免疫を持っているため、既存の免疫がワクチン反応に与える影響を理解するために、ベースラインの免疫を十分に評価する。各ワクチン成分に対するIgG反応および異なるM血清型の現時点でのGAS分離株の様々なパネルに対するOPK抗体価を評価する。

【表10】

表8: 第I相臨床試験群

第I相臨床試験デザイン

群	N	処置	投与量	スケジュール
1A	24	GASワクチン	低量	0日目、28日目
1B	8	プラセボ		0日目、28日目
2A	24	GASワクチン	中程度	0日目、28日目
2B	8	プラセボ		0日目、28日目
3A	24	GASワクチン	高量	0日目、28日目
3B	8	プラセボ		0日目、28日目

【0126】

第2A相臨床試験は、10才～17才、次いで5才～9才の小児(N=96)の連続コホートを対象に、本願ワクチンを評価する無作為化プラセボ対照多施設共同試験である(表4)。本試験の目的は、安全性、免疫原性(IgG抗体反応および血清のオプソノファゴサイトーシス活性)および予備的有効性(GAS咽頭炎の発症率)の評価である。各患者は12カ月間モニターし、治療群における溶連菌感染症咽頭炎の発症率を測定する。

【表11】

表9: 第2A相臨床試験群

第2A相臨床試験デザイン

N	年齢(yr)	処置	投与量	スケジュール
36	10-17	GASワクチン	PIにより決定	0日目、28日目
12	10-17	プラセボ		0日目、28日目
36	5-9	GASワクチン	中程度	0日目、28日目
12	5-9	プラセボ		0日目、28日目

【0127】

実施例13：GASコンジュゲートは、交差反応試験における*S. flexneri* 2a OPSに結合する抗血清の生成を誘導する

精製GASコンジュゲートにより産生された抗血清と*S. flexneri* 2a O-抗原多糖体(OPS)との結合を評価する実験を行った。

【0128】

10

20

30

40

50

OPSの精製：wzzBを過剰発現させるためにpSEC10-wzzBプラスミドで形質転換した赤痢菌細胞バイオマスのリポ多糖(LPS)からOPSを直接採取し、OPS鎖長が伸長したOPSを取得し、培養(アミノ酸で補充)または振盪フラスコ(STm D65)培養物の成長培地を、氷酢酸で培養pHを3.5~3.7に下げて、熱湯浴に沈めたガラスビン内において100℃で4時間インキュベートした。加水分解後の上清を、Sorvall RC5冷却遠心分離機のGS3 Rotorを用いて10k×g、4℃で30分間遠心分離し、不溶性物質を分離した。上清画分を1M NaClに入れて、4.5 psiの膜貫通圧(TMP)で0.2 μm中空糸フィルターに通してタンジェンシャルフロー精密濾過によりろ過し、全量を通過させた後、等量の1M NaClによりフラッシュを行った。0.2 μmを通過した1M NaCl透過液を、14 psi TMPで、30 kDa Hydrosart TFF膜上で10倍に濃縮し、35ダイアフィルトレーション容量の1 M NaCl、その後10ダイアフィルトレーション容量の50 mM Tris pH 7にてダイアフィルトレーションを行った。

10

【0129】

次に、20 mM Tris(pH 7), 50 mM NaCl中の保持液の画分を、AKTA Purifierを使用して、20 mM Tris pH 7, 50 mM NaClにおいて10 mL/分で、3 x 3 mLのSartobind NanoQアニオン交換膜に直列接続にて通過させた。フロースルー画分を、25%(v/v)硫酸アンモニウムに入れて、4℃で一晩インキュベートした。沈殿した物質を、Sorvall RC5 冷蔵遠心分離機のGS3ローターを用いて10k x g/4℃で30分間遠心分離し、その後0.45 μm Stericup真空フィルターユニット(Millipore, MA)で濾過することにより除去した。次いで、濾液を、7.5 psi TMPで10 kDa Hydrosart膜を使用するSlice 200 TFF装置によるTFFによって10倍に濃縮し、10ダイアフィルトレーション容量の脱イオン水に対してダイアフィルトレーションを行った。TFF保持液を凍結乾燥し、使用時まで-20℃で保存した。

20

【0130】

免疫化：簡単に言えば、ウサギを、実施例6のプロトコルに従って、ADI-mut2、ADI-mut5およびSpyADコンジュゲートを用いて筋肉内免疫を行った。

【0131】

血清IgG ELISA：各最終採血から血清を採取し、S. flexneri 2a OPSに対する血清IgG抗体価を、ELISAで評価した。2a OPS抗原のワーキング溶液を、以下の通りに調製した：精製した2a OPS 5.0 μg/mlを、カーボネートコーティングバッファー(pH9.6)で希釈した。その後、Immulon 2HB "U"底マイクロタイタープレート(Thermo Lab systems #3655)を、プレートの各ウェルにワーキング溶液(100 μl)を添加することによりコーティングした。インキュベーション後、プレートを、PBS-Tween(0.05%)で6回洗浄し、洗浄中に2分間の浸漬時間を設けた。その後、プレートを、10%無脂肪乾燥乳(NFDM)を含む1X PBSで250 μl/ウェルで、4℃にて一晩ブロッキングした。ブロッキング後、プレートを上記と同様に再度洗浄した。

30

【0132】

試験サンプル(ウサギ血清)および採血前コントロールを、PBS-Tween 10%NFDMで希釈し、プレートに加えた。検体およびコントロールは、各プレート上で連続希釈により二回試験された。プレートを37℃で1時間インキュベートし、その後、上記のようにPBS-Tweenで洗浄した。次に、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ウサギIgG(Invitrogen #65-6120)を、PBS-Tween 10%無脂肪乾燥乳(NFDM)にて1:200に希釈した。すべてのウェルに100 μlの適切な抗体溶液を添加し、プレートを37℃で1時間インキュベートした。プレートを再度洗浄し、100 μlのTMB マイクロウェルペルオキシダーゼ基質(SeraCare #5120-0047)を各ウェルに添加した。プレートを、室温で15分間、暗所で攪拌しながらインキュベートした。すべてのウェルに100 μlの1M リン酸を加え、比色反応を停止させた。450nmにおける吸光値を、Multiskan FCTM Microplate Readerを使用して直ちに測定した。

40

【0133】

図8は、力価解析の結果を示す。注目すべきは、3つのGASコンジュゲート、ADI-mut

50

2(pAMF置換された配列番号27のコンジュゲート)、ADI-mut5(pAMF置換された配列番号38のコンジュゲート)およびSpyAD(pAMF置換された配列番号34のコンジュゲート)の全てから得られる血清は、1:10希釈にて、採血前コントロールに対して*S. flexneri* 2a OPSへの結合において最大約60倍の増加を示すという点であった。

【0134】

実施例14：GASコンジュゲートは、血清殺菌アッセイ(SBA)において*S. flexneri*株に対する殺菌活性を示す

GASコンジュゲートで免疫したウサギからの免疫血清が*S. flexneri*株の好中球の殺傷を惹起する能力を決定するために、実験を行った。殺菌アッセイを行う前に、ウサギを、実施例7に記載のプロトコルに従って、所定のコンジュゲートで免疫した。簡単に言うと、血清殺菌アッセイ(SBA)およびコロニーのデジタル画像分析を、以前に記載された方法に従って行った(Nahm, et al. mSphere, 2018, 2018 June 13;3(3), pii: e00146-18, and SBA Protocol linked to therein)。

【0135】

表9は、SpyADコンジュゲート1645(pAMF置換された配列番号34のコンジュゲート)およびADIコンジュゲート変異体1807、1808、1809および1810(pAMF置換された配列番号38のコンジュゲート)による免疫化の結果得られた血清の*S. flexneri* 2a、3aおよび6に対する殺菌能力の結果を示す。示された値は、SBA(血清殺菌活性)力価であり、5つのコンジュゲート全てが、免疫前コントロールに対して殺菌活性を示した。*S. sonnei*では殺菌が観察されなかったため、このアームでの力価は、試験した最低希釈度の半分として報告されている。ヒトのコントロール血清であるPnQC19を使用して、以前に記載された通りに赤痢菌SBA力価を正規化した(Nahm, et al. mSphere, 2018, 2018 June 13;3(3), pii: e00146-18)。*S. flexneri* 6について提示された力価は、原薬力価(2つの実験)の平均値である。*S. flexneri* 6のPnQC19値は示されていない。

【0136】

【表12】

表 10: ウサギ GAS 抗体の血清殺菌活性

コンジュゲート	<i>S. flexneri</i> 2a	<i>S. flexneri</i> 3a	<i>S. flexneri</i> 6	<i>S. sonnei</i>
免疫前の血清	nd	nd	233	nd
1645	1301	1333	980	30
1807	384	2496	553	30
1808	671	703	394	30
1809	487	1325	1401	30
1810	1654	652	532	30
PnQC19	28000	19000	6915	1100

【0137】

実施例15：SpyAD-GACによる免疫化は、ヒト心臓エピトープと交差反応する検出可能レベルの抗体を誘発しない

【0138】

SDS含有変性剤泳動用色素を含む様々な量の正常な成人ヒト心臓組織分解物(Novus Biologicals cat# NB820-59217)を、iBlot(Thermo Fisher)の製造者プロトコルを使用して、PVDF膜に転写する前に4~12%Bis-Trisゲルを使用してSDS-PAGEにより分離した。最後に、プロットを周囲温度で1時間ブロッキングした後、各GAS抗原に対して生成したウサギ抗血清(1:1000に希釈)でプローブした。30分間の洗浄を3回行った後、HRP結合抗ウサギ(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Cat # 2

11-035-109)二次抗体(希釈1:10,000)を加えて、ピコ基質(Thermo Fisher Scientific Cat # 34580)とプロットをインキュベートした後に、Syngene G-Box F3画像スキャナーで化学発光を記録した。全てのプロットのプロッキング、洗浄および抗体/血清の希釈は、TBS+5%BSAで行った。

【0139】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した正常なヒト心臓分解物に対するSLO、C5aペプチダーゼ、SpyAD-GACウサギ免疫血清のウェスタンブロット分析を行った。同じウサギ免疫化プロトコルを用いて、インタクトなGAS M1タンパク質に対して生じた抗血清をコントロールとした。図11に示すように、抗M1抗血清は、分解物の非常に高い分子量成分に反応したが、SLO(配列番号8)、C5aペプチダーゼ(配列番号4)およびSpyAD-GAC(pAMF置換された配列番号12のコンジュゲート)抗血清は、各同族GASタンパク質(またはSpyAD-GACの場合にはタンパク質キャリア)を認識するが、ヒト心臓組織に対する交差反応は見られなかった。この分析は、下記の知見と一致している:(a)SLO、C5aペプチダーゼまたはSpyADが、ヒトタンパク質と配列相同性がないこと、(b)GACが、哺乳類に共通する糖エピトープであるGlcNAc側鎖の遺伝子欠損により、ヒトには存在しない糖である反復性ラムノースのみから構成されること。

【0140】

実施例16:切断型SLOペプチドを発現させて、ウサギおよびマウスモデル双方の免疫原性について評価した

切断型SLOバリエントを、例えば、上記の方法に従って発現させた。図15は、配列番号44~配列番号53(TEV切断後)に対応する、10個の前記バリエント配列(Δ C11、 Δ C21、 Δ C31、 Δ C41、 Δ C51、 Δ C61、 Δ C71、 Δ C91および Δ C101)のグラフ表示である。図16は、これらのバリエントの発現を、全タンパク質濃度および可溶性タンパク質濃度の両方において対応するゲルを用いて示す。各バリエントについて観察された切断パターンの差異に注目されたい。 Δ C41および Δ C51のようないくつかのバリエントは、50 kDa付近で近接して溶出するいくつかのバンドを有するが、 Δ C31または Δ C81のようなバリエントは、それらの分子量に対応する識別可能ないずれのバンドも示さない。

【0141】

図17は、HisTrapクロマトグラフィーによる最初の精製後の切断型SLOバリエントを含むいくつかのペプチドの発現を比較したものである。バリエント Δ C91および Δ C101は、いくつかのより小さな切断断片とともに、タンパク質の正規分子量に対応する単一の明瞭なバンドとして発現した。図18および図19は、TEV切断およびHisTrap(図18)およびサイズ排除クロマトグラフィー(図19)による追加の精製ステップ中の、SLOならびにバリエント Δ C91および Δ C101を比較したものである。

【0142】

免疫済ウサギ血清の作製:ウサギを、alum+50 μ gのSLO、SLO Δ C91、またはSLO Δ C101を用いて、上記と同様のプロトコルにより筋肉内免疫を行った。動物から採血し、0、7、21および35日目の血清について、各々の各抗原に対するELISA力価を試験した。図20は、3つのSLOバリエント各々に対するELISA力価を示す。

【0143】

多価の糖鎖ワクチンによる免疫化により、全身および皮内GASチャレンジに対する有意な保護が得られる:CD-1マウスに、0、14、28日目の抗原を筋肉内注射して能動免疫し、SpyAD-GAC + SLO(Δ C101)+C5aペプチダーゼの3成分/4つのGAS抗原製剤に関する強力な保護効力に対して、増強された細菌クリアランスの関与を検討した。チャレンジ後42日目に、9匹の免疫化動物(および10匹のモック免疫化動物)からマウス血清を採取し、新たに単離したヒト好中球によるM1 GASのエクソ・ピボのOPK殺傷を促進するためのこれらの抗血清の有効性を試験した(図21)。GASを、免疫後のSpyAD-GAC PR290+SLO(Δ C101)+C5aペプチダーゼマウス抗血清でオプソニン化した場合、M1 GASの元々の接種量の~20%が好中球曝露後に回復したが、292でのコントロール試験

においてGASをモック免疫マウス血清でオプソニン化した場合は、～60%CFUが再発した(図21、 $P<0.01$)。また、SpyAD-GACPR+SLO($\Delta C101$)+C5aペプチダーゼで免疫したマウスまたはモック(PBSおよびアジュバントのみ)コントロールを、皮内M1 GAS感染を使ってチャレンジした。結果として生じた急性炎症反応によって生成された壊死性病変のサイズは、2群間で有意差はなかったが(図22Aおよび22B)、SpyAD-GACPR+SLO($\Delta C101$)+C5aペプチダーゼ免疫群では感染部位の剥離組織において回復した細菌CFU/gmが2倍以上減少していた(図22C、 $P=0.0012$)。

【0144】

SLOバリエーションに対する機能抗体の存在を評価するための赤血球溶血アッセイ：SLO切断型バリエーションに対する抗血清を、赤血球に添加した場合に、対応するSLOの溶血活性を阻止する能力について試験した。図23は、 $0.1\mu\text{g/mL}$ の組換えSLOを、赤血球および抗血清を含むウェルに添加したときの結果を示している。全長SLOおよびSLO($\Delta C101$)抗血清は、細胞溶解を阻止するが、SLO($\Delta C91$)抗血清は、細胞溶解を阻止しない。

【0145】

GASオプソニン化貪食作用による殺傷およびSLO活性阻害におけるワクチン抗血清の評価：

GASワクチン抗原(SLO、C5aペプチダーゼ、SpyADおよびSpyAD-GAC)に対して生じたウサギ抗血清のヒト好中球のオプソニン化貪食殺菌能(OPK)は、5種類のMタンパク質血清型(M1-M5)のGAS株を用いて評価した。このアッセイは、それぞれの熱不活性化抗血清または免疫前血清コントロールを用いて、30分間事前にオプソニン化を行った後、2%子ウサギ補体の存在下で、感染多重度(MOI)=0.1細菌/好中球にて新たに単離したヒト好中球に30分間曝露して行われた。すべての抗血清は、GASの短期OPKにおいて統計的に有意な増加を誘導した(図24A)。このアッセイは、ヒト前骨髄球性白血病HL-60細胞株を、 $\text{MOI}=0.00140$ または $\text{MOI}=0.000141$ で用いた公知のOPKアッセイよりも100～1000倍以上のGAS接種量を使用して、一次ヒト自然免疫細胞の機能をサポートするという免疫標的をより正確に再現するものである。SpyADタンパク質およびSpyAD-GACに対して生じた抗血清は同様の効果を示した。さらに、SLO、C5aペプチダーゼ、SpyAD-GACに対する抗血清を、各々1/3ずつ含んでなる血清中の全濃度を一定にした組み合わせ抗血清は、個々の各成分と同等以上の性能を示し、それぞれのOPK機能にクロス-253干渉がないことが示された。SLOは、GAS表面に固定されていない分泌型細胞毒素であるため、好中球の殺傷力強化への貢献は、食細胞の取り込みの増加からではなく、むしろSLO媒介性の膜損傷および好中球抗菌機能障害の低下から生じたものである。抗SLOウサギ免疫血清は、SLOまたはSLO($\Delta C101$)抗原により惹起されたかどうかにかかわらず、1:2,048希釈度まで、ヒト赤血球に対する精製SLOの溶血活性を有意に阻害した(図24B)。さらに、抗SLOまたは抗SLO($\Delta C101$)免疫血清は、GAS上清(SLO)媒介性の抑制に対して好中球酸化的バースト機能(スーパーオキシド生成)を同様に保存していた(図24C)。

【0146】

追加の血清型を、上記の方法と同様に行ったIgG結合アッセイで試験した。マウス血清を、3回の投与により免疫した(0、14および28日目に抗原を筋肉内注射)後の42日目に、9匹の免疫化(および10匹のモック免疫化)動物から採取し、これらの抗血清の効力を、フローサイトメトリーによりGAS生存株へのIgG結合について試験した。血清は、モックまたはSpyAD-GACPR+SLO($\Delta C101$)+C5aペプチダーゼの組み合わせのいずれかの3回の投与にて免疫化した雌CD-1マウスから採取した。図25Aおよび25Bは、フローサイトメトリーにより定量化した複数の血清型のGAS表面抗原に結合したモック抗血清(淡色のヒストグラム)または多価の組み合わせ抗血清(暗色のヒストグラム)のマウスIgGの蛍光強度を示す。平均蛍光強度は、各ポイントが個々のマウス血清を表している列の散布図にまとめた(丸はモック処理マウス、四角は処置群マウス)。IgG結合のGAS特異性を示すために、コントロールとしてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌USA300を加えた。

【0147】

実施例17：3または4つのnnAAを有する切断型SLO(Δ C101)ポリペプチドを発現させ、コンジュゲートさせた

【0148】

nnAAを含む切断型SLO(Δ C101)バリエントは、例えば、上記の方法に従って発現させた。バリエントは、配列番号55～配列番号64に対応する3または4のpAMF残基を含む。配列番号54は、全てのnnAA含有残基を含む。図26は、全タンパク質濃度および可溶性タンパク質濃度の両方において、これら10種のバリエントの発現レベルを対応するゲルを用いて示す。精製は、前記した通りに行った。つまり、CFPSを収集し、遠沈させて、濾過してから、事前に平衡化済みのhisTRAP excel 1mlカラムに0.75ml/分でロードし、6ml最終容量で250mMイミダゾールのシングルステップにて溶出させた。各工程の画分5 μ lを、SDS-PAGEを用いて分析した。図27Aは、hisTRAPによる最初の精製後のバリエントのゲルを示す。hisTRAP溶出画分を、AEXカラムにロードする前に、最終塩濃度を50mM NaClにするために50mM Tris pH8で3倍に希釈した。FTおよび溶出画分の両方を、SDS-PAGE分析を用いて分析し、各バリエントが存在することを確認した。図27Bは、第2の精製工程後のバリエントのゲルを示す。表11は、2～2.5mLの溶液から回収した後の発現バリエントの最終濃度を示す。

10

【0149】

【表13】

表 11: 精製後の最終バリエント濃度

20

タンパク質名	濃度 (mg/ml)
SLO(Δ C101)-var1	0.8
SLO(Δ C101)-var2	1.0
SLO(Δ C101)-var3	0.6
SLO(Δ C101)-var4	1.0
SLO(Δ C101)-var5	1.2
SLO(Δ C101)-var6	2.7
SLO(Δ C101)-var7	2.3
SLO(Δ C101)-var8	1.0
SLO(Δ C101)-var9	2.2
SLO(Δ C101)-var10	1.6

30

【0150】

SLO(Δ C101)バリエントは、上記のようにDBCO-誘導体化GACとコンジュゲートさせる。図28は、各バリエントに対する特定のコンジュゲーションの条件を示す。コンジュゲーション反応を、図29に示すように、SDS-PAGEによって分析した。各ゲルの最初のレーンは、タンパク質のコンジュゲーション前を示す。最終的なコンジュゲートサイズをSEC-MALSによって決定し、その結果を図30に示す。

40

【0151】

実施例18：3または4つのnnAAを含む切断型SLO(Δ C101)ポリペプチドを、マウスモデルにおけるそれらの免疫原性および溶血力価について評価した

実施例17の3-および4-pAMF SLO(Δ C101)バリエントならびにそれらの多糖類コンジュゲートを、実施例9において上記した通りの方法により、マウスモデルにおいて評価する。マウスは、0日目、7日目および14日目に免疫化した後、21日目 殺後に最終採

50

血を行った。

【0152】

実施例17のpAMF置換SLO(Δ C101)-var1、SLO(Δ C101)-var5、SLO(Δ C101)-var6およびSLO(Δ C101)-var10(配列番号55、59、60および64に相当)の多糖体コンジュゲートを、それぞれ5 μ g使用してマウスを免疫する。最終採血後に測定したSLO(Δ C101)に対する抗体価を図31Aに示す。同じバリエーションおよびそのGACコンジュゲートを、実施例16のプロトコルに従って溶血アッセイにて評価を行った。その結果は、図31Bに示している。図31Cは、最終採血後に測定された抗体力価も示しているが、このELISAは、SLO(Δ C101)ではなく、長鎖多糖類(実施例19の方法によって製造)を被覆抗原として利用した。まとめると、これらのデータは、pAMF置換バリエーションSLO(Δ C101)-var1、SLO(Δ C101)-var5、SLO(Δ C101)-var6およびSLO(Δ C101)-var10のコンジュゲートが、PSおよびペプチド成分の両方に対して、各々抗体を生成することを示す。

10

【0153】

実施例19：高分子量の(長鎖)多糖の発現、精製およびコンジュゲーション

GAS細菌培養物からGAS多糖を抽出および精製するために実験を行った。

【0154】

塩基の加水分解：調製済GAS細胞ペレットを、50mM NaCl溶液に再懸濁した。セロロジカルピペットを用いて、50mLのNaClを加え、再懸濁するまでボルテックスした。10N 水酸化ナトリウムおよび1M 水素化ホウ素ナトリウムを、最終濃度が4N NaOHおよび25mM NaBH₄になるように加えた。再懸濁させたペレットを、1Lの培養容量あたり160mLの最終目標容量で、遠心分離機用ボトルに分割した。溶液を分割する際、均質性を確保するため、一定のスワリングを行った。ボトルは、65°Cに予熱されたインキュベーター内のシェーカーに2時間置いた。インキュベーション後、加水分解溶液を、25°C、14,000 x gで30分間遠心分離し、細胞破砕片をペレット化させるが、遠心分離の前に加水分解サンプルを室温まで冷却する。遠心分離が停止した時点でペレットを壊さないように上清を回収し、上清を、pH6.5 $\pm$ 0.3に中和した。中和の際、ボトルを4°Cの氷浴に置き、37% HClを用いてpHを調整し、必要に応じて1M NaOHを用いてさらに調整した。その後、4°Cで一晩インキュベートする。

20

【0155】

濾過：インキュベーション後、白色の沈殿物が形成される。この溶液を、10,000xgで30分間遠心分離した。宿主細胞タンパク質(HCP)を含有する嵩高い白色ペレットが形成された。透明な上清を回収した。37% HClを用いてpHを3.0に調整し、この溶液をRTで1時間インキュベートした。Clarisolve Filter microPod -40MSを使用して、サンプルをろ過した。例えば、プライムするまでポンプ流量23mL/minにてフィルターに水を流した後、バルブを開けて120mL容量を流し、15mM NaClを使用して平衡化した。抽出液を同じポンプ流量23 mL/minでフィルターに流して、フィルターを通して出た透明な透過液を回収した。フィルターを、60mLの15mM NaClで洗浄し、チューブとフィルター内容物を洗い流した。フィルターを廃棄した。サンプルpHを、6.5 $\pm$ 0.3に再調整した。その後、タンジェンシャルフロー濾過(TFF-10k)を行って、塩類を除去し、濃縮(限外ろ過)し、10mM NaClで緩衝液を交換(透析濾過)した。

30

40

【0156】

ムタノリシン処理：最終濃度が1mM MgCl₂になるように、1M MgCl₂を加え、最終濃度が20mM リン酸ナトリウムpH6.8になるように200mM リン酸ナトリウム(10倍)を加えて、ムタノリシン処理用溶液を調製した。120 IU/mLになるように、ムタノリシン溶液(5000 IU/mL)を添加した。サンプルを、37°Cで一晩振盪培養した。

【0157】

プロテイナーゼ-K処理：次に、サンプルに、プロテイナーゼ-K溶液を加えて、終濃度40 IU/mL(プロテイナーゼ-Kは45u/mg)になるようにプロテイナーゼ-Kで処理した。混合溶液を、穏やかに攪拌しながら50°Cで一晩インキュベートした。

50

【0158】

沈殿および濾過：サンプル中の酵素、核酸、HCPを沈殿させるため、CTAB/20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)を加えて、30℃で1時間振盪した。使用した溶液は、PSサンプル、5% CTABストック溶液、200mM リン酸ナトリウム(pH6.8)であり、すべて事前に温めておいたものである。PS溶液を、加熱しながら攪拌(マグネチックスターバー)し、溶液の温度を常時モニターするために、加熱攪拌プレートには内部温度計を設置した。200mM リン酸ナトリウム(pH 6.8)溶液を、PS溶液に加え、最終濃度が20mM リン酸ナトリウムとなるようにした。5% CTABを、PS溶液に加え、CTAB濃度が1%になるようにした。この溶液を1時間攪拌した。40MSフィルターを用いて、沈殿溶液にて深層濾過を行う。例えば、ポンプ流量23mL/minで、200 mLのMilliQ H2Oによりこの系を洗い、ベントから水が出始めたら、溶液が出口から強制的に出てくるように閉じた(プライミング)。その後、20mM リン酸ナトリウム(pH6.8)および15mM NaClの溶液(75mL)を用いて系を洗った。サンプルを、23mL/minで濾過して、20mM リン酸ナトリウム(pH6.8)および15mM NaClの溶液(60mL)を、20mL/minで洗った。気泡が溶出するまで透過液を回収した。フィルターを廃棄した。

10

【0159】

PS溶液および274mMのKIを、30℃に温めた。十分量の274mMのKIを混合PS溶液に加え、最終濃度27.4mMのKIとした。この混合物を、30℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後の溶液を、30℃で10,000xgにて30分間遠心分離した。上清を回収して、ペレットは捨てるが、ペレットは非常に脆いので注意が必要である。上清を、0.45μm フィルターで真空濾過した。

20

【0160】

サンプルを、最初にTFF-10kで濃縮し、次に350mM NaClの9DVでダイアフィルトレーションを行い、最後にMilliQ水により2DVで行った。例えば、TFFシステムの容量は約35mLであり、ポンプ流量を200 mL/minに設定し、緩衝液TMP: 7-8psiの9DV(50mL)を使用してダイアフィルトレーションを行う。

【0161】

次に、3M 塩化ナトリウムおよび50mM リン酸ナトリウム(pH6.8)で、事前に平衡化したHiPrep™ Butyl Fast Flow 16/10を用いる疎水性相互作用クロマトグラフィーにより多糖類溶液の精製を行った。多糖類溶液に、塩化ナトリウムおよびリン酸緩衝液が、3M 塩化ナトリウムおよび50mMリン酸カリウム(pH6.8)となるように添加した。多糖類溶液を、HIC樹脂に通過させ、フロースルーにて操作した。樹脂を同じ平衡化緩衝液で洗浄して、フロースルーおよび洗浄の両方を次の処理のために回収した。

30

【0162】

15mMのNaClまたはWFIの9DVに対してダイアフィルトレーションを行い、PSサンプル中の高含量NaClを除去するために、最後にTFF 10kDa/3kDaを行った。その後、精製されたPS溶液を、0.22 μmフィルターで濾過した。

【0163】

図36A、図36Bおよび図36Cは、GlcNAcを欠失しているPSを発現するGAS菌(PCT/US2012/049604参照)に由来する、合成例の実施例1により製造した精製多糖のNMR分析を示している。NMRにより、ポリラムノースの存在およびGlcNAcの非存在が確認された。サンプル調製のために、精製した多糖類溶液を凍結乾燥し、内部標準として添加したTSPを含むD₂Oに交換した。プロトンNMRスペクトルは、400MHzの装置で50℃、40スキャンの信号を平均して得た。0.2Hzの線幅拡大を適用した。この精製プロトコルは、図37のウェスタンブロットにより証明される通りに、Mタンパク質を含まない精製された多糖類を製造することも可能である。

40

【0164】

長鎖多糖の誘導体化およびコンジュゲーション：高分子量(長鎖)多糖類を、上記の方法において(実施例4)先に述べたようにDBCO-PEGで誘導体化する。次に、DBCO誘導体化されたPSは、実施例4の方法に従って、本明細書に記載のキャリアタンパク質にコンジュ

50

ゲートされる。例えば、SpyAD[4pAMF](配列番号34)を長鎖多糖にコンジュゲートし、3.5時間後および透析後に分析した。これらのコンジュゲートのSEC-MALS分析を図32に示す。3.5時間後、1M Da以上のコンジュゲートが観察された。透析後、単離されたコンジュゲートのサイズ分布は、約186 kDaにピークを示した。

【0165】

実施例20：5、6、7または8つのnnAAを有する切断型SLO(Δ C101)ポリペプチドの発現、精製およびコンジュゲート化

【0166】

nnAAを含む切断型SLO(Δ C101)バリエーションは、例えば、上記の方法に従って発現される。バリエーションは、5、6、7または8のpAMF残基を含有し、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75および配列番号76に対応する。図33Aは、これらの12のpAMFバリエーション(5pAMF-8pAMF)ならびに実施例17のバリエーションについて、総タンパク質濃縮物および可溶性タンパク質濃縮物の両方における発現レベルを示す。図33Bは、発現に対応するゲルを示す(配列番号65~76は、var1~var12に対応する)。精製は、前記のように進められた。つまり、CFPSを回収し、遠沈させて、濾過してから、事前に平衡化済みのhisTRAP excel 1ml カラムに0.75ml/分でロードし、6 mlの最終容量で250 mMイミダゾールのシングルステップで溶出させた。各ステップ画分の5 μ lを、SDS-PAGEセーフブルー染色で分析した。その後、溶出液を、3倍希釈して、CaptoQカラムにロードして、最終精製を行い、セーフブルー染色およびDBCO TAMRA標識により分析した。FT分画を濃縮して、200 μ lのアリコートとして-80°Cで保存した。

【0167】

5、6、7、または8つのnnAAを含むSLO(Δ C101)ポリペプチドのコンジュゲーション：5、6、7または8つのnnAAを含むポリペプチドは、実施例4などの上記の方法を用いてGAS多糖類にコンジュゲートされる。このようにして、配列番号65、配列番号66、配列番号68および配列番号69のpAMF含有SLO(Δ C101)バリエーションを、長鎖DBCO-誘導体化GACにコンジュゲートさせた。コンジュゲーション反応は、図34に示すように、SDS-PAGEによって分析された。各バリエーションについての最初のレーンは、コンジュゲーション前のタンパク質を示す。最終的なコンジュゲートのサイズは、SEC-MALSによって決定され、その結果は図35に示される。

【0168】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

配列同定のための説明

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
1	C5a [90-1035 フ ラグメント] WT w/リーダー	MHHHHHHGSGENLYFQGKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQE KAGKGAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAK KEHGITYGEWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGN APSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRD AVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIIVTS AGNDSSFSGGKTRLPLADHPDYGVVGTPAAADSTLTVASYSPOKQ LTETATVKTADKQDKEMPVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDD FKDVKGKIALIERGDIIDFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFP IELPNVDQMPAAFISRKDGLLKDNPKKTITFNATPKVLPTASG TKLSRFSSWGLTADGNIKPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTS MSAPLVAGIMGLLQKQYETQYPDMPSERLDLAKKVLMSATAL YDEDEKAYFSPRQQGAGAVDAKKASAATMYVTDKDNSTSSKVHLN NVSDTFEVTVTVHNKSDKPQELYQATVQTDKVDGKHFALAPKA LYETSWQKITIPANSSKQVTVPIDASRFSKDLAQMKNGYFLEG FVRFKQDPTKEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSY YHEANSDAKDQLDGDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKE GVENIEDIESSEITETIFAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAA ISPNGDGNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLDEKGNVVTSEVTE QVVKNYNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVR YTPISSGAKEQHTDFDVIDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASK PKTSQPVYRERIAAYTYMDEDLPTTEYISPNEGDTFTLPEEAETM EGATVPLKMSDFTYVVEDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK

10

20

30

40

50

【表 15】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
2	C5a [90-1035 フ ラグメント] WT w/o リーダー	KTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGTVVVAIDAGF DKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVAY YHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPE AQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNAA LAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFSGKTRLPLAD HPDYGVVGTPAAADSTLTVASYSYSPDKQLTETATVKTADKQDKEM PVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDID FKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAAFISRK DGLLLKDNPKKTIITFNATPKVLPTASGTKLSRFSSWGLTADGNI KPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKQY ETQYPDMTPSERLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSRQQGAG AVDAKKASAATMYVTDKDNNTSSKVHLNNVSDTFEVTVTVHNKSD KPQELYYYQATVQTDKVDGKHFAAPKALYETSWQKITIPANSSK QVTVPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEGFVRFKQDPTKEELMSIP YIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDGL QFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITETI FAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQGT FLRNAKNLVAEVLDKEGNVVWTSEVTEQVVKNYNNDLASTLGST RFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDV IVDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQPVYRERIAAYTYM DEDLPTTEYISPNEGDTFTLPPEEAETMEGATVPLKMSDFTYVVE DMAGNITYTPVTKLLEGHSENK

10

20

30

40

50

【表 16】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
3	C5a [90-1035 フ ラグメント] D131A/S513A w/ リーダー	MHHHHHHGSGENLYFQGKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQE KAGKGAGTVVAVIAAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAK KEHGITYGEWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGN APSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRD AVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIIVTS AGNDSSFSGKTRLPLADHPDYGVVGTPAAADSTLTVASYSYSPDKQ LTETATVKTADKQDKEMPVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDD FKDVKGKIALIERGIDFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFP IELPNVDQMPAAFISRKDGLLLKDNPKKTITFNATPKVLPTASG TKLSRFSSWGLTADGNIPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTA MSAPLVAGIMGLLQKQYETQYPDMTPSERLDLAKKVLMSATAL YDEDEKAYFSPRQQGAGAVDAKKASAATMYVTDKDNNTSSKVHLN NVSDTFEVTVTVHNKSDKPQELYYQATVQTDKVDGKHFAALPKA LYETSWQKITIPANSSKQVTVPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEG FVRFKQDPTKEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSY YHEANSDAKDQLDGDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKE GVENIEDIESSEITETIFAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAA ISPNGDGNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLKKEGNVVTSEVTE QVVKNYNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVR YTPISSGAKEQHTDFDVIDNNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASK PKTSQPVYRERIAAYTYMDEDLPTTEYISPNEGDTFTLPPEAETM EGATVPLKMSDFTYVVEDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK

10

20

30

40

50

【表 17】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
4	C5a [90-1035 フ ラグメント] D131A/S513A w/o リーダー	KTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGTVVAVIAAGF DKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVAY YHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPE AQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNAA LAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFSGGKTRLPLAD HPDYGVVGTPAAADSTLTVASYSYSPDKQLTETATVKTADKQDKEM PVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDID FKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAFISRK DGLLLKDNPKKTIITFNATPKVLPTASGTKLSRFSSWGLTADGNI KPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTAMSAPLVAGIMGLLQKQY ETQYPDMTPSERLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSPRQQGAG AVDAKKASAATMYVTDKDNNTSSKVHLNNVSDTFEVTVTVHNKSD KPQELYYYQATVQTDKVDGKHFALAPKALYETSWQKITIPANSSK QVTVPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEGFVRFKQDPTKEELMSIP YIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDGL QFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITETI FAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQGT FLRNAKNLVAEVL DKEGNVVTSEVTEQVVKNYNNDLASTLGST RFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDV IVDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQPVYRERIAYTYM DEDLPTTEYISPNEGTFTLPEEAETMEGATVPLKMSDFTYVVE DMAGNITYTPVTKLLEGHSNK

10

20

30

【0169】

40

50

【表 18】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
5	SLO [79-571 フ ラグメント] WT w/ His tag および TEV 配列	MHHHHHHGSGENLYFQGAPKEMPLSAEKEEKKSEDDKKKSEEDH TEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVI ERKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDV VTKRNPQKIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWH DNYSGGNTLTPARTQYTESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGID FKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKEL QRKGVSNAPPLFVSNVAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAFSAAAL KGTDVKTNGKYSIDILENSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIR NVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTS TEYTSKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDN NWYSKTSFPSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAWEWWRKVIDER DVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK
6	SLO [79-571 フ ラグメント] WT w/o リーダー	APKEMPLSAEKEEKKSEDDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNELE VLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISII DSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTNRNPQKIHIDLPGMG DKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLTPARTQYTES SMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYK QIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSNV AYGRTVFVKLETSSKSNDEAAFSAAALKGTDVKTNGKYSIDILEN SSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYP ISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKINLSHQGAYV AQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSFPSTVIPLGA NSRNIRIMARECTGLAWEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTL SPYGSITYK

10

20

30

40

50

【表 19】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
7	SLO [79-571 フ ラグメント] W535A w/リー ダー	MHHHHHHGSGENLYFQGAPKEMPLESAEEKKKSEDDKKKSEEDH TEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVI ERKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPD AVVTKRNPQKIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVST AIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGID FKSISKGEKKVMIAAYKQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKEL QRKGVSNAPPLFVSNVAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILENSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIR NVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTS TEYTSKGKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDN NWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAAEWWRKVIDER DVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK
8	SLO [79-571 フ ラグメント] W535A w/o リー ダー	APKEMPLESAEEKKKSEDDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNELE VLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVVTKRNPQKIHIDLPGMG DKATVEVNDPTYANVST AIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYTE SMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYK QIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSNV AYGRTVFVKLETSSKSNDEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILEN SSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYP ISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTS TEYTSKGKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDN NWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAAEWWRKVIDER DVKLSKEINVNISGSTLSPYGSITYK

10

20

30

40

50

【表 2 0】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
9	SpyAD [33-849 フラグメント] WT w/リーダー	MHHHHHHGSGENLYFQGQVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPET IQEAKATIDAVEKTLSQQKAELTELATALTKTTAEINHLKEQQD NEQKAL TSAQEIIYTNTLASSEETLLAQGAHQRELTATETELHN AQADQHSKETALSEQKASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLN AMISNPDAITKAAQTANDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQ LTEELAAQKAALAEKEAELSRKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQG YPLEELKKLEASGYIGSASYNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQY QDIPADRNRFVDPDNLTPEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPV TVTAGSQEFARLLSTSYKKTHGNTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPH DKTIIEDSAGASGLIRNDDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDS IKYMLFTDHLHGNTYGHAINFLRVDKHNPNAPVYLGFTSNVGS LNEHFVMFPESNIAHQRFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTI AAIKGKVSSLENRLSAIHQEADIMAAQAKVSQLOGKLASTLKQS DSLNLQVRQLNDTKGSLRTELLAAKAKQAQLEATRQSLAKLAS LKAALHQTEALAEQAAARVTALVAKKAHLQYLRDFKLNPNRLQV IRERIDNTKQDLAKTTSSLLNAQEALALQAKQSSLEATIATTE HQLTLLKTLANEKEYRHLDEDIATVPDLQVAPPLTGKPLSYSK IDTTPLVQEMVKETKQLLEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMV ASNAIVSKITSSITQPSSKTSYSGSGSSTTSNLISDVDESTQR

10

20

30

40

50

【表 2 1】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
10	SpyAD [33-849 フラグメント] WT w/o リーダー	QVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPETIQEAKATIDAVEKTLNQ QKAELTELATALTKTTAEINHLKEQQDNEQKALTSAQEIYTNTL ASSEETLLAQGAEHQRELTATETELHNAQADQHSKETALSEQKA SISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLNAMISNPDAITKAAQTAN DNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEELAAQKAALAEKEA ELSRLKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELKKLEASGYIGS ASYNNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQYQDIPADRNRFVDPDNL PEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFARLLSTSY KKTHGNTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASGLIRN DDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTYGH AINFLRVDPKHNPAPVYLGSTSNVGSLSNEHFVMPESNIANHQ RFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTIAAIKGVSSLENRLSAI HQEADIMAAQAKVSQLOQKLASTLKQSDSLNLQVRQLNDTKGSL RTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLASLKAALHQTEALAEQAAA RVTALVAKKAHLQYLRDFKLNPNRLQVIRERIDNTKQDLAKTTS SLLNAQEALAAALQAKQSSLEATATTEHQLTLLKTLANEKEYRH LDEDIATVPDLQVAPPLTGVKPLSYSKIDTTPLVQEMVKETKQL LEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMVASNAIVSKITSSITQPS SKTSYSGSGSSTTSNLI SDVDESTQR

10

20

30

【0 1 7 0】

40

50

【表 2 2】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
11	SpyAD [33-849 フラグメント] nnAA (e.g., pAMF)変異体 w/ リーダー X = nnAA (e.g., pAMF)位置 K64/K287/K386/ K657 – 完全長配 列に従う番号付	MHHHHHHGSGENLYFQGQVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPET IQEAXATIDAVEKTLSSQQAELTELATALTKTTAEINHLKEQQD NEQKALTSAQEIYTNNTLASSEETLLAQGAEHQRELTATETELHN AQADQHSEKETALSEQKASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLN AMISNPDAITKAAQTANDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQ LTEELAAQKAALAEKEAELSRLKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQG YPLEELKXLEASGYIGSASYNYYKEHADQIIAKASPGNQNLNQY QDIPADRNRFVDPDNLTPREVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPV TVTAGSQEFARLLSTSYKXTHGNTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPH DKTIIEDSAGASGLIRNDDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDS IKYMLFTDHLHGNTYGHAINFLRVDKHNPAPVYLGFSSTSNVGS LNEHFVMFPESNIAHQRFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTI AAIKGVSSLENRLSAIHQEADIMAAQAKVSQLOGKLASTLKQS DSLNLQVRQLNDTKGSLRTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLAS LKAALHQTEALAEQAAARVTALVAKXAHQLYLRDFKLNPNRLQV IRERIDNTKQDLAKTTSSLLNAQEALALQAKQSSLEATIAATTE HQLTLLKTLANEKEYRHLDEDIATVPDLQVAPPLTGKPLSYSK IDTTPLVQEMVKETKQLLEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMV ASNAIVSKITSSITQPSSKTSYSGSGSSTTSNLISDVDESTQR

10

20

30

40

50

【表 2 3】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
12	SpyAD [33-849 フラグメント] nnAA (e.g., pAMF) 変異体 w/o リーダー X = nnAA (e.g., pAMF) K64/K287/K386/ K657 –完全長配 列に従う番号付	QVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPETIQEAXATIDAVEKTL SQ QKAELTELATALTKTTAEINHLKEQQDNEQKALTS AQEIYTNTL ASSEETLLAQGAHQRELTATETELHNAQADQHSKETALSEQKA SISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLNAMISNPDAITKAAQTAN DNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEELAAQKAALAEKEA ELSRKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELKXLEASGYIGS ASYNNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQYQDIPADRNRVDPDNL T PEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFARLLSTSY KXTHGNTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASGLIRN DDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTYGH AINFLRVDKHNPNAVYLGSTSNVGS LNEHFVMFPESNIA NHQ RFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTIAAIKGVSSLENRLSAI HQEADIMAAQAKVSQ LQGKLASTLKQSDSLNLQVRQLNDTKGSL RTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLASLKAALHQTEALAEQAAA RVTALVAKXAH LQYLRDFKLNPNRLQVIRERIDNTKQDLAKTTS SLNNAQEALAA LQAKQSSLEATIATTEHQLTL LKTLANEKEYRH LDEDIATVPDLQVAPPLTG VKPLSYSKIDTTPLVQEMVKETKQL LEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMVASNAIVSKITSSITQPS SKTSYSGSGSSTTSNLISDVDESTQR
13	ADI [完全長] WT w/リーダー	MHHHHHHGSGENLYFQGT AQTPIHVYSEIGKLKKVLLHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIED NQELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPN LYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPIYGG GKVPMVYDRNETTRIEGGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKL LVNIFKQNLGFKKVLAFEFANNRKF MHLDTVFTMVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEKGD LAELLAANLGVEKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILESK GLKLIKIHGSELVRGRGGPRCMSMPFEREDI

10

20

30

40

50

【表 2 4】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
14	ADI [完全長] WT w/o リーダー	TAQTPIHVSSEIGKLLKVLHHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDIP FLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAFI DEYLSEANIRGRATKKAIARELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSEL PEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVSL NHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPYGGGKVPVMVYDRNETTRIEG GDELVLKSDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNIFKQNLGFKKVLAF EFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNEE LHIVEEKGDLELLAANLGVKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDG SNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILESGLKLIKIHGSELVRGRG GPRCMSMPFEREDI
15	ADI [完全長] D277A w/リーダ ー	MHHHHHHGSGENLYFQGTATQTPIHVSSEIGKLLKVLHHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIARELLMAIED NQELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPN LYFTRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPYGG GKVPVMVYDRNETTRIEGGDELVLKSDVLAVGISQRTDAASIEKL LVNIFKQNLGFKKVLAFEFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPE IEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEKGDLELLAANLGVKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILESGL KLIKIHGSELVRGRGGPRCMSMPFEREDI
16	ADI [完全長] D277A w/o リー ダー	TAQTPIHVSSEIGKLLKVLHHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDIP FLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAFI DEYLSEANIRGRATKKAIARELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSEL PEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVSL NHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPYGGGKVPVMVYDRNETTRIEG GDELVLKSDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNIFKQNLGFKKVLAF EFANNRKFMHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNEE LHIVEEKGDLELLAANLGVKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDG SNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILESGLKLIKIHGSELVRGRG GPRCMSMPFEREDI

10

20

30

40

50

【表 2 5】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
17	ADI [完全長] nnAA (e.g., pAMF) w/リーダ ー X = nnAA (e.g., pAMF)位置- K15, K193, K316	MHHHHHHGSGENLYFQGTATPIHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIED NQELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPN LYFTRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYGXYIFTHHPIYGG GKVPMVYDRNETTRIEGGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKL LVNIFKQNLGFKKVLAFEFANNRKF MHLDTVFTMVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEXGDLAELLAANLGVEKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILESK GLKLIKIHGSELVRGRGGPRCMSMPFEREDI
18	ADI [完全長] nnAA (e.g., pAMF) 変異体 w/o リーダー X = nnAA (e.g., pAMF)位置- K15, K193, K316	TAQTPIHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDIP FLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAFI DEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSEL PEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVSL NHMFSETRNRETLYGXYIFTHHPIYGGGKVPMVYDRNETTRIEG GDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNIFKQNLGFKKVLAF EFANNRKF MHLDTVFTMVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEE LHIVEEXGDLAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDG SNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILESKGLKLIKIHGSELVRGRG GPRCMSMPFEREDI
19	ADI (mut5) [完全 長] D277A nnAA (e.g., pAMF) w/リー ダー X = nnAA (e.g., pAMF)位置- K15, K193, K316	MHHHHHHGSGENLYFQGTATPIHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIED NQELIEKTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPN LYFTRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYGXYIFTHHPIYGG GKVPMVYDRNETTRIEGGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKL LVNIFKQNLGFKKVLAFEFANNRKF MHLATVFTMVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEXGDLAELLAANLGVEKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILESK GLKLIKIHGSELVRGRGGPRCMSMPFEREDI

10

20

30

40

【0 1 7 1】

【表 2 6】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
20	ADI (mut5) [完全 長] D277A nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) w/o リーダー X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置- K15, K193, K316	TAQTPIHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDIP FLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETAAESLVTPEIREAFI DEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSEL PEIPASEKGLTDLVESNYPPAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVSL NHMFSETRNRETLYGXIIFTHHPITYGGGKVPVMVYDRNETTRIEG GDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNIFKQNLGFKKVLA EFANNRKFMHLATVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNEE LHIVEEXGDLAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGREQWNDG SNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELVRGRG GPRCMSMPFEREDI
21	hFL [完全長] WT w/リーダー	MHHHHHHGSGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLG FYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALF QDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTD PHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLF ERLTLKHD
22	hFL [完全長] WT w/oリーダー	SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVAL EGVSHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDE WGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETH FLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD
23	hFL [完全長] nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) w/リーダー — X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 位置- I5	MHHHHHHGSGSSQXRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLG FYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALF QDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTD PHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLF ERLTLKHD

10

20

30

40

50

【表 27】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
24	hFL [完全長] nnAA (e.g., pAMF) w/o リー ダー X = nnAA (e.g., pAMF) 位置- I5	SSQXRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVAL EGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQRGGRALFQDIKKPAEDE WGKTPDAMKAAMALEKKLNQALDLHALGSARTDPHLCDFLETH FLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD
25	eCRM-pAMF6 変 異体	MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQXGIQKPKSGTQ GNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPG LTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGA SRVVLSPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQ DAMYEQACAGNRVRNSVGSSSLSCINLDWDVIRDXTTKKIES LKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPELSEL XTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSIL PGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALLSSLMVAQAIPLVGELV DIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPFLLHDGYA VSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPG KLDVNKSKTHISVNGRKIRMCRPIDGDVTFCRPKSPVYVGNV HANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSXL SLFFEIKS
26	ADI (mut2) [完全 長] D277A nnAA (e.g., pAMF) w/ リ ーダー X = nnAA (e.g., pAMF)位置- K123, K247, K316	MHHHHHHGSGENLYFQGTATPIHVYSEIGKLKKVLLHRPGKEI ENLMPDYLERLLFDDIPFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLE TLAAESLVTPEIREAFIDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIED NQELIEXTMAGVQKSELPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPN LYFTRDPFATIGTGVSLNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPIYGG GKVPMPVYDRNETTRIEGGDELVLSKDVLA VGISQRTDAASIEXL LVNIFKQNLGFKKVLAFEFANNRKFMLATVFTMVDYDKFTIHP EIEGDLRVYSVTYDNEELHIVEEXGDLAELLAANLGVEKVDLIR CGGDNLVAAGREQWNDGSNTLTIPGVVVVYNRNTITNAILESK GLKLIKIHGSELVRGRGGPRCMSMPFEREDI

10

20

30

40

50

【表 28】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
27	ADI (mut2) [完全 長] D277A nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) w/o リーダー, 開裂由 来の G オーバー ハングを有する X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置- K123, K247, K316	GTAQTPIHVYSEIGKLKKVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEXTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPITYGGGKVPVYDRNETTRIE GGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEXLLVNIFKQNLGFKKVLA FEFANNRKF MHLATVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEXGDLAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGREQWND GSNTLTIAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELVRGR GGPRCMSMPFEREDI
28	リーダーを含む Sfb1 繰り返し領 域	MHHHHHHGSGVETEDTKEPGVLMGGQSESVEFTKDTQTGMSGQT TPQVETEDTKEPGVLMGGQSESVEFTKDTQTGMSGQTASQVETE DTKEPGVLMGGQSESVEFTKDTQTGMSGQTTPQVETEDTKEPGV LMGGQSESVEFTKDTQTGMSGFSET

10

20

30

40

50

【表 29】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
29	C5a [90-1035 フ ラグメント] WT w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する	GKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGTVVAVIDAG FDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVA YYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMP EAQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNA ALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFGGKTRLPLA DHPDYGVVGTPAAADSTLTVASYSYSPDKQLTETATVKTADKQDKE MPVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDI DFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAFISR KDGLLLKDNPKKTITFNATPKVLPTASGTKLSRFSSWGLTADGN IKPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKQ YETQYPDMTPSERLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSPRQQGA GAVDAKKASAATMYVTDKDNNTSSKVHLNNVSDTFEVTVTVHNKS DKPQELYYYQATVQTDKVDGKHFFALAPKALYETSWQKITIPANSS KQVTVPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEGFVRFKQDPTKEELMSI PYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDG LQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITET IFAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQG TFLRNAKNLVAEVL DKEGNVVWTSEVTEQVVKNYNNDLASTLGS TRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFD VIVDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQPVYRERIAYTY MDEDLPTTEYISPNEGTFTLPEEAETMEGATVPLKMSDFTYVV EDMAGNITYTPVTKLLEGHSNK

10

20

30

【0172】

40

50

【表 30】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
30	C5a [90-1035 フ ラグメント] D131A/S513A w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する	GKTADTPVTSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGKGAGTVVAVIAAG FDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVA YYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMP EAQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNA ALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFSGGKTRLPLA DHPDYGVVGTAAADSTLTVASYSPPDKQLTETATVKTADKQDKE MPVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDI DFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAAFISR KDGLLLKDNPKKTITFNATPKVLPTASGTKLSRFSSWGLTADGN IKPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTAMSAPLVAGIMGLLQKQ YETQYPDMTPSERLDLAKKVLMSATALLYDEDEKAYFSPRQQGA GAVDAKKASAATMYVTDKDNNTSSKVHLNNVSDTFEVTVTVHNKS DKPQELYYYQATVQTDKVDGKHFFALAPKALYETSWQKITIPANSS KQVTVPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEGFVRFKQDPTKEELMSI PYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDG LQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITET IFAGTFAKQDDDSHYIIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQG TFLRNAKNLVAEVLDKEGNVVWTSEVTEQVVKNNNDLASTLGS TRFEKTRWDGKDKDGKVVANGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFD VIVDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQPVYRERIAITY MDEDLPTTEYISPNEGTFTLPEEAETMEGATVPLKMSDFTYVV EDMAGNITYTPVTKLLEGHSENK

10

20

30

40

50

【表 3 1】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
31	SLO [79-571 フ ラグメント] WT w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する	GAPKEMPLESAEEKEKKSEDDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVVFVKLETSSKSNDEAAAFSAALKGTDVKTNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPPFSTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGST LSPYGSITYK
32	SLO [79-571 フ ラグメント] W535A w/o リー ダー, 開裂由来の G オーバーハン グを有する	GAPKEMPLESAEEKEKKSEDDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVVFVKLETSSKSNDEAAAFSAALKGTDVKTNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPPFSTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGST LSPYGSITYK

10

20

30

40

50

【表 3 2】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
33	SpyAD [33-849 フラグメント] WT w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハング を有する	GQVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPETIQEAKATIDAVEKTLS QQKAELTELATALTKTTAEINHLKEQQDNEQKALTSAQEIYTNT LASSEETLLAQGAEHQRELTATETELHNAQADQHSEKETALSEQK ASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLNAMISNPDAITKAAQTA NDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEELAAQKAALAEKE AELSRLKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELKKLEASGYIG SASYNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQYQDIPADRNRFPDNL TPEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFARLLSTS YKKTHGNTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASGLIR NDDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTYG HAINFLRVDKHNPAPVYLGFTSNVGSLEHFMFPESNIANH QRFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTIAAIKGVSSLENRLSA IHQEADIMAAQAKVSQLOGKLASTLKQSDSLNLQVRQLNDTKGS LRTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLASLKAALHQTEALAEQAA ARVTALVAKKAHLQYLRDFKLNPNRLQVIRERIDNTKQDLAKTT SSLLNAQEALALQAKQSSLEATIATTEHQLTLLKTLANEKEYR HLDEDIATVPDLQVAPPLTGVKPLSYSKIDTTPLVQEMVKETKQ LLEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMVASNAIVSKITSSITQP SSKTSYSGSGSSTTSNLISDVDESTQR

10

20

30

40

50

【表 3 3】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
34	SpyAD [33-849 フラグメント] nnAA (e.g., pAMF) w/o リー ダー, 開裂由来の G オーバーハン グを有する X = nnAA (e.g., pAMF)位置 K64/K287/K386/ K657 – 番号付	GQVKADDRASGETKASNTHDDSLPKPETIQEAXATIDAVEKTL QQKAELTELATALTKTTAEINHLKEQQDNEQKALTSAQEIYTNT LASSEETLLAQGAHQRELATETELHNAQADQHSKETALSEQK ASISAETTRAQDLVEQVKTSEQNIAKLNAMISNPDAITKAAQTA NDNTKALSSELEKAKADLENQKAKVKKQLTEELAAQKAALAEKE AELSRLKSSAPSTQDSIVGNNTMKAPQGYPLEELKXLEASGYIG SASYNYYKEHADQIIAKASPGNQLNQYQDIPADRNRFPDNL TPEVQNELAQFAAHMINSVRRQLGLPPVTVTAGSQEFARLLSTS YKXTHGNTRPSFVYGQPGVSGHYGVGPHDKTIIEDSAGASGLIR NDDNMYENIGAFNDVHTVNGIKRGIYDSIKYMLFTDHLHGNTYG HAINFLRVDKHNPNAPVYLGFTSTSNVGSLSNEHFVMFPESNIANH QRFNKTPIKAVGSTKDYAQRVGTVSDTIAAIKGVSSLENRLSA IHQEADIMAAQAKVSQQLQGKLASTLKQSDSLNLQVRQLNDTKGS LRTELLAAKAKQAQLEATRDQSLAKLASLKAALHQTEALAEQAA ARVTALVAKXAHQLRDFKLNPNRLQVIRERIDNTKQDLAKTT SSLLNAQEALAAQAKQSSLEATITTEHQLTLLKTLANEKEYR HLDEDIATVPDLQVAPPLTGVPKPLSYSKIDTTPLVQEMVKETKQ LLEASARLAAENTSLVAEALVGQTSEMVASNAIVSKITSSITQP SSKTSYSGSGSSTTSNLI SDVDESTQR
35	ADI [完全長] WT w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する	GTAQTPIHVYSEIGKLKKVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPIYGGGKVPVMYDRNETTRIE GGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNI FKQNLGFKKVLA FEFANNRKF MHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEKGD LAELLAANLGVEKVDLIRCGDNLVAAGREQWND GSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELVRGR GGPRCMSMPFEREDI

【0 1 7 3】

10

20

30

40

50

【表 3 4】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
36	ADI [完全長] D277A w/o リー ダー, 開裂由来の G オーバーハン グを有する	GTAQTPIHVYSEIGLKKVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGKYIFTHHPIYGGGKVPVMVYDRNETTRIE GGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNIFKQNLGFKKVLA FEFANNRKF MHLATVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEKGD LAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGREQWND GSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELVRGR GGPRC MSMPFEREDI
37	ADI [完全長] nnAA (e.g., pAMF) w/o リー ダー, 開裂由来の G オーバーハン グを有する X = nnAA (e.g., pAMF)位置- K15, K193, K316	GTAQTPIHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGXYIFTHHPIYGGGKVPVMVYDRNETTRIE GGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNIFKQNLGFKKVLA FEFANNRKF MHLDTVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEXGD LAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGREQWND GSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELVRGR GGPRC MSMPFEREDI
38	ADI (mut5) [完全 長] D277A nnAA (e.g., pAMF) w/o リーダー, 開裂由 来の G オーバー ハングを有する X = nnAA (e.g., pAMF)位置- K15, K193, K316	GTAQTPIHVYSEIGXLKKVLLHRPGKEIENLMPDYLERLLFDDI PFLEDAQKEHDAFAQALRDEGIEVLYLETLAAESLVTPEIREAF IDEYLSEANIRGRATKKAIRELLMAIEDNQELIEKTMAGVQKSE LPEIPASEKGLTDLVESNYPFAIDPMPNLYFTRDPFATIGTGVS LNHMFSETRNRETLYGXYIFTHHPIYGGGKVPVMVYDRNETTRIE GGDELVL SKDVLAVGISQRTDAASIEKLLVNIFKQNLGFKKVLA FEFANNRKF MHLATVFTMVDYDKFTIHPEIEGDLRVYSVTYDNE ELHIVEEXGD LAELLAANLGVEKVDLIRCGGDNLVAAGREQWND GSNTLT IAPGVVVVYNRNTITNAILES KGLKLIKIHGSELVRGR GGPRC MSMPFEREDI

10

20

30

40

50

【表 3 5】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
39	hFL [完全長] WT w/リーダー	MHHHHHHGSGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLG FYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALF QDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTD PHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLF ERLTLKHD
40	hFL [完全長] WT w/oリーダー	SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVAL EGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDE WGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETH FLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD
41	hFL [完全長] nnAA (e.g., pAMF) w/リーダー X = nnAA (e.g., pAMF) 位置- I5	MHHHHHHGSGSSQXRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLG FYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALF QDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTD PHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLF ERLTLKHD
42	hFL [完全長] nnAA (e.g., pAMF) w/oリーダー X = nnAA (e.g., pAMF) 位置 - I5	SSQXRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVAL EGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDE WGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETH FLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD

10

20

30

40

50

【表 3 6】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
43	eCRM-pAMF6 変異体	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQXGIQKPKSGTQG NYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGL TKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGAS RVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQD AMYEYMAQACAGNRVRNSVGSSLSCINLDWDVIRDXTTKTKIESL KEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPELSELX TVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILP GIGSVMGIADGAVHHNTEEIQAQSIALLSLMVAQAIPLVGELVD IGFAAYNFVESIINLQVHNSYNRPAYSPGHXTQPFLHDGYAV SWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGK LDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVH ANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTEKVNSEXLS LFFEIKS
44	SLO(Δ C11) W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハン グを有する	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEKPDVAVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVVFVKLETSSKSNVVEAAFSALKGTDVKTNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPESTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAAEWWRKVIDERDVKLSKEINVNISGS

10

20

30

40

50

【表 37】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
45	SLO(Δ C21) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KD F DVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS PFSTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAAEWWRKVIDERDVKLS
46	SLO(Δ C31) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KD F DVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS PFSTVIPLG ANSRNIRIMARECTGLAAEWWRK

10

20

30

【0174】

40

50

【表 3 8】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
47	SLO(Δ C41) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVVFVKLETSSKSNDEAAFSALKGTDVKTNGKYSIDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPPFSTVIPLG ANSRNIRIMAREC
48	SLO(Δ C51) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSKQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVVFVKLETSSKSNDEAAFSALKGTDVKTNGKYSIDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPPFSTVIPLG ANS

10

20

30

40

50

【表 39】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
49	SLO(Δ C61) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する	GAPKEMPLESAEEKKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTNRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAAFSAALKGTDVKTNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTSPPF
50	SLO(Δ C71) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する	GAPKEMPLESAEEKKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTNRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAAFSAALKGTDVKTNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD
51	SLO(Δ C81) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する	GAPKEMPLESAEEKKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTNRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAAFSAALKGTDVKTNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQGAY VAQYEILWDEINYDDKG

10

20

30

40

50

【表 40】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
52	SLO(Δ C91) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する	GAPKEMPLSAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGF TENKPD AVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVST AIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSK SQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSNDVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KD F DVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQGAY VAQYEIL
53	SLO(Δ C101) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する	GAPKEMPLSAEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGF TENKPD AVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVST AIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSK SQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSNDVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KD F DVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS GKINLSHQ

10

20

30

40

50

【表 4 1】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
54	SLO(Δ C101) フラグメント W535A w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する X = nnAA (e.g., pAMF) または ネイティブアミノ酸 (e.g.: K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375, K407, K464; または K または R)	GAPKEMPLSAEKEEEKKSEDXKKSEEDHTEEINDXIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIEXKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGF TENXPD AVVT KRNPQKI HIDLP GM GDKATVEVNDPTYANVST AIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSXILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFXELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSXSN DVEAAFS AALKGTDVXTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTXDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSGXINLSHQ
55	SLO(Δ C101) フラグメント W535A – nnAA (e.g., pAMF) 1 – w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する (420995) X = nnAA (e.g., pAMF) 位置 – K98, R151, K272, K357	GAPKEMPLSAEKEEEKKSEDXKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIEXKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGF TENKPD AVVT KRNPQKI HIDLP GM GDKATVEVNDPTYANVST AIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSXILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSXSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGINLSHQ

【 0 1 7 5 】

10

20

30

40

50

【表 4 2】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
56	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 2 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (420996) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K112, K189, K323, K375	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDKKKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDVVTKRNPQKIHLPLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF X ELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAAFSAALKGTDV X TNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ
57	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 3 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (420997) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – R151, K272, K357, K407	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHLPLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS X SNDVEAAAFSAALKGTDVKTNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ

10

20

30

40

50

【表 4 3】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
58	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 4 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (420998) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – R151, K272, K375, K464	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDKKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDV X TNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G X INLSHQ
59	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)5 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (420999) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K112, K272, K357, K464	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDKKKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSS X SN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G X INLSHQ

10

20

30

40

50

【表 4 4】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
60	SLO(Δ C101) フラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 6 – w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する (421000) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K98, K189, K357	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDXKKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENXPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSXSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ
61	SLO(Δ C101) フラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 7 – w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する (421001) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K112, K189, K323	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDXKKSEEDHTEEINDXIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENXPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFXELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ

10

20

30

40

50

【表 4 5】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
62	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 8 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (421002) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置– K98, R151, K272	GAPKEMPLESAEEKEKKSED X KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ
63	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 9 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (421003) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置– K112, K272, K375	GAPKEMPLESAEEKEKKSEDDKKKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQLIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTV FVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDV X TNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ

10

20

30

【0176】

40

50

【表 4 6】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
64	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (421004) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置– K112, K323, K407	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDDKKKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF X ELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAFSAAALKGTDVKTNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ
65	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (426507) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置– K98, R151, K272, K357, K407	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDD X KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS X SNDEAAFSAAALKGTDVKTNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ

10

20

30

40

50

【表 47】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
66	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (426508) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K112, K189, K323, K375, K464	GAPKEMPLESAEEKEKKSEDKKKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF X ELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDVEAAFS AALKGTDV X TNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT KD F DVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G X INLSHQ
67	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (426509) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K112, R151, K272, K357, K407	GAPKEMPLESAEEKEKKSEDKKKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENK PDAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAI DNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS X SNDVEAAFS AALKGTDVK TNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G X INLSHQ

10

20

30

40

50

【表 4 8】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
68	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (426510) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置– K98, R151, K272, K357, K407, K464	GAPKEMPLESAEKEEEKKSED X KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTENKPDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFFVKLETSS X SNDVEAAFSAAALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS X INLSHQ
69	SLO(Δ C101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (426511) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置– K112, R151, K189, K323, K375, K464	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDDKKKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF X ELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFFVKLETSSKSNDVEAAFSAAALKGTDV X TNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS X INLSHQ

10

20

30

40

50

【表 4 9】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
70	SLO(Δ C101) フラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する (426512) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K98, K112, K189, K323, K375, K464	GAPKEMPLESAEEKEEKKSED X KKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF X ELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDEAAAFSAALKGTDV X TNGKYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G XINLSHQ
71	SLO(Δ C101) フラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する (426513) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K112, R151, K189, K272, K357, K407, K464	GAPKEMPLESAEEKEEKKSEDKKKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS X SNDEAAAFSAALKGTDVKTNKGYSIDLE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G XINLSHQ

【 0 1 7 7 】

10

20

30

40

50

【表 5 0】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
72	SLO(Δ C101) フラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する (426514) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K98, R151, K189, K323, K375, K407, K464	GAPKEMPLESAAEKEEKKSED X KKSEEDHTEEIINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDAVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF X ELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSSKSNDVEAAFSAAALKGTDV X TNGKYSIDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G X INLSHQ
73	SLO(Δ C101) フラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する (426515) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K112, K189, K272, K357, K375, K407, K464	GAPKEMPLESAAEKEEKKSEDDKKKSEEDHTEEIIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDAVVTKRNPQKIHIIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTFKELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS X SNDVEAAFSAAALKGTDV X TNGKYSIDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G X INLSHQ

10

20

30

40

50

【表 5 1】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
74	SLO(Δ C101) フラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する (426516) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K98, K112, R151, K189, K272, K323, K357, K375,	GAPKEMPLSAAEKEEKKSED X KKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDAVVTKRNPQKIHLPLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF X ELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS X SNDVEAAFSALKGTDV X TNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTSKGKINLSHQ
75	SLO(Δ C101) フラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開裂由来の G オーバーハングを有する (426510) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K98, R151, K189, K272, K323, K357, K407, K464	GAPKEMPLSAAEKEEKKSED X KKSEEDHTEEINDKIYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIE X KKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDAVVTKRNPQKIHLPLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF X ELQRKGVSNAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS X SNDVEAAFSALKGTDVKTNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVV T DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS G INLSHQ

10

20

30

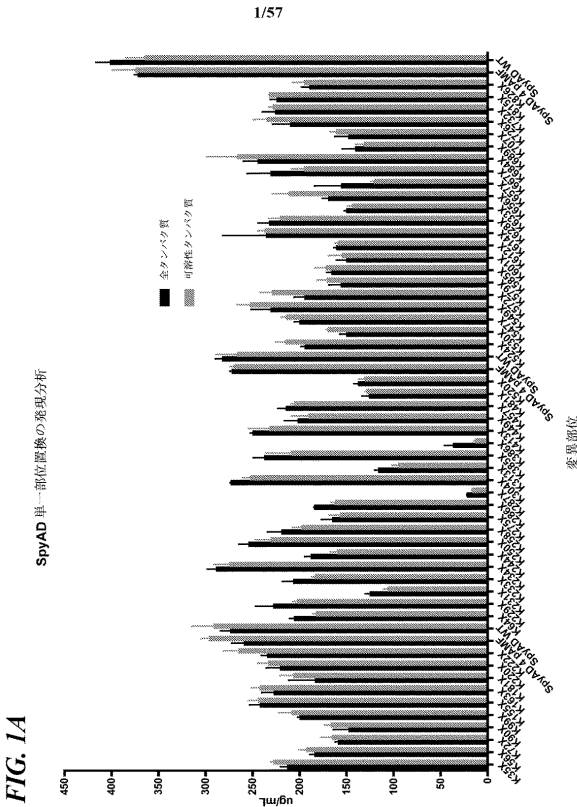
40

50

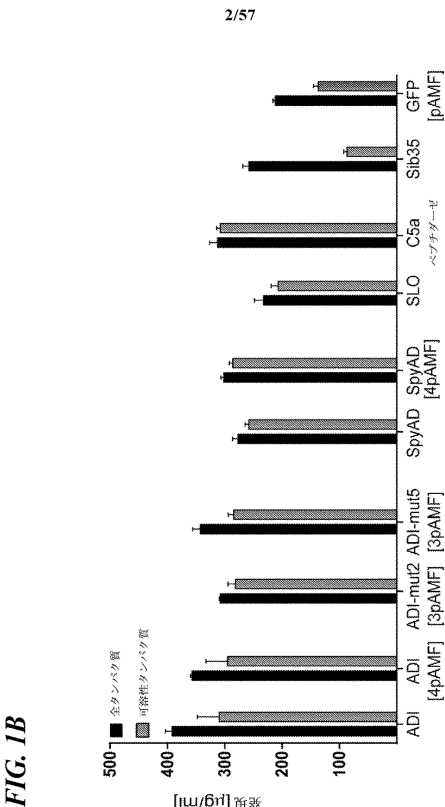
【表 5 2】

配列 番号	名称/説明	アミノ酸配列
76	SLO(ΔC101) フ ラグメント W535A – nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF) 10 – w/o リーダー, 開 裂由来の G オー バーハングを有 する (426515) X = nnAA (<i>e.g.</i> , pAMF)位置 – K112, K189, K272, K323, K357, K375, K407, K464	GAPKEMPLESAEKEEEKKSEDKKKSEEDHTEEIND X IYSLNYNEL EVLAKNGETIENFVFPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTPVDISI IDSVTDRTYPAALQLANKGFTEN X PDAVVTKRNPQKIHIDLPGM GDKATVEVNDPTYANVSTAIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYT ESMVYSKSQIEAALNVNS X ILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAY KQIFYTVSANLPNNPADVFDKSVTF X ELQRKGSNEAPPLFVSN VAYGRTVFVKLETSS X SNDVEAAFSALKGTDV X TNGKYSDILE NSSFTAVVLGGDAAEHNKVVT X DFDVIRNVIKDNATFSRKNPAY PISYTSVFLKNNKIAGVNNRTEYVETTSTEYTS X INLSHQ

【図面】
【図 1】



【図 2】



10

20

30

40

50

【図 3】

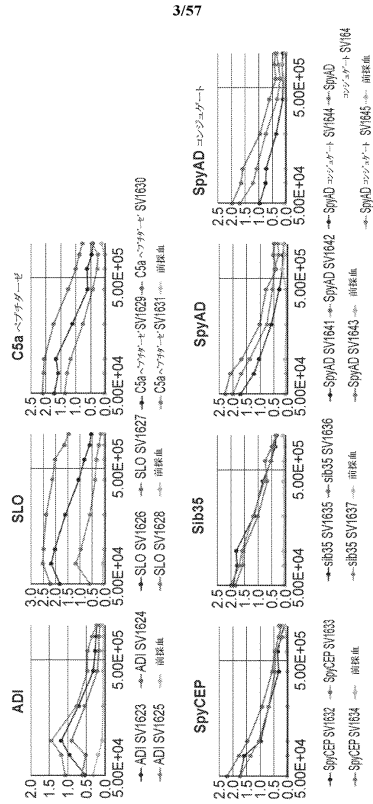


FIG. 2

【図 4】

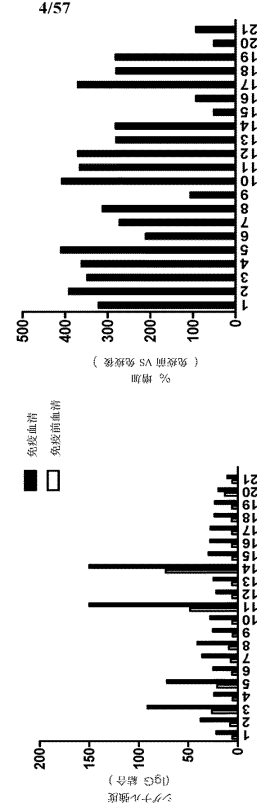


FIG. 3A

【図 5】

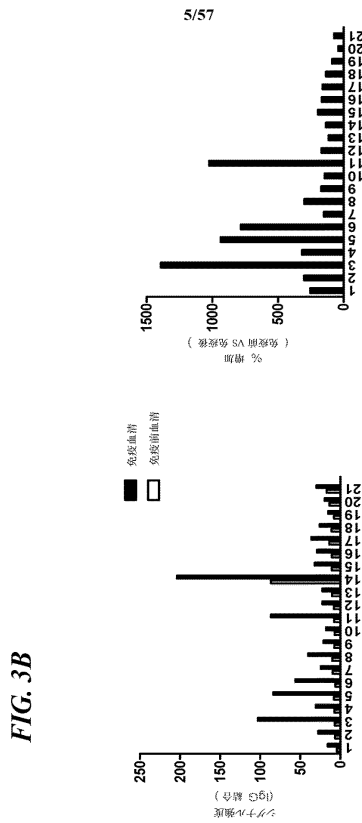


FIG. 3B

【図 6】

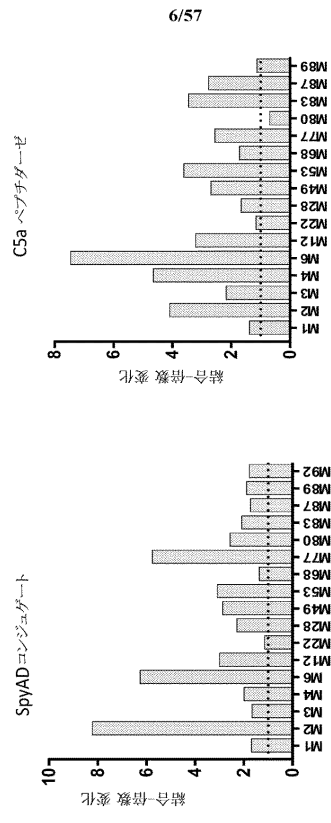


FIG. 3C

10

20

30

40

50

【図 7】

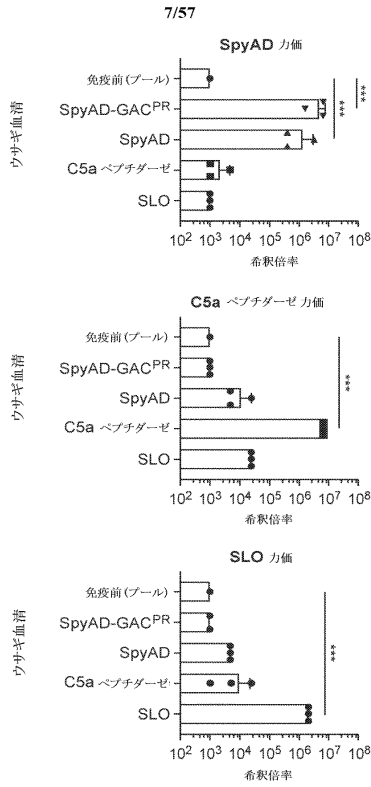


FIG. 3D

【図 8】

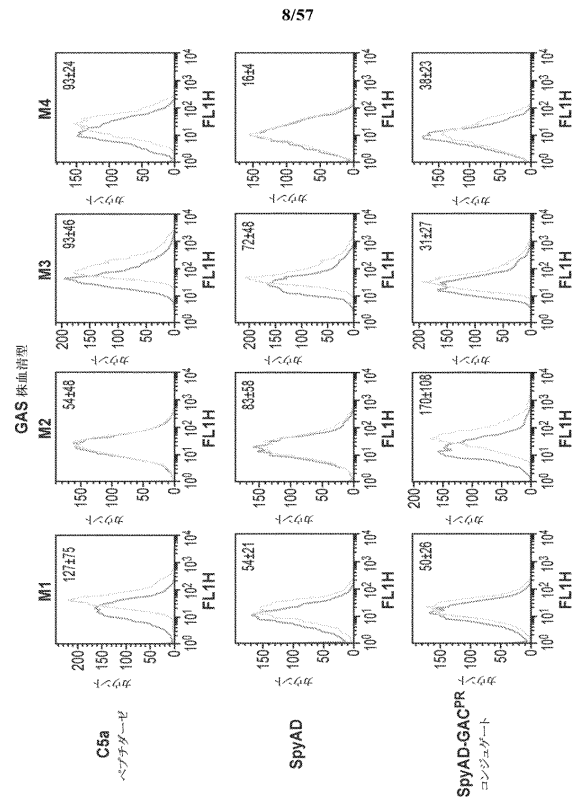


FIG. 3E

【図 9】

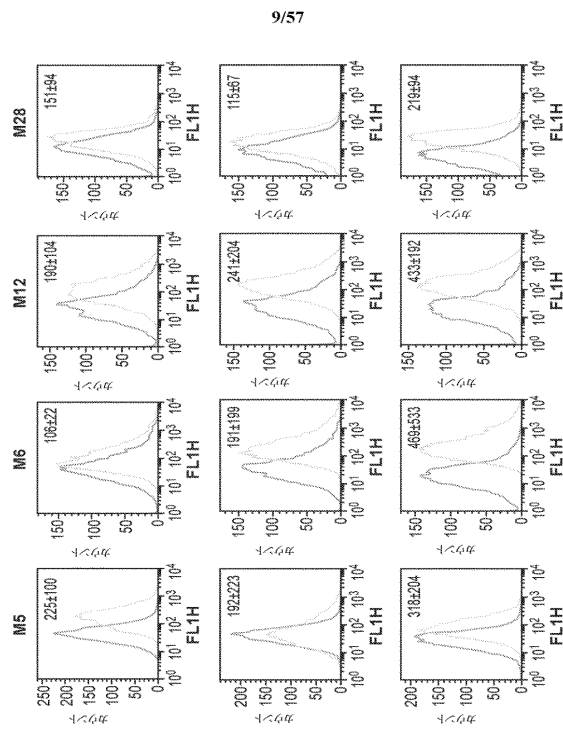


FIG. 3E (Cont.)

【図 10】

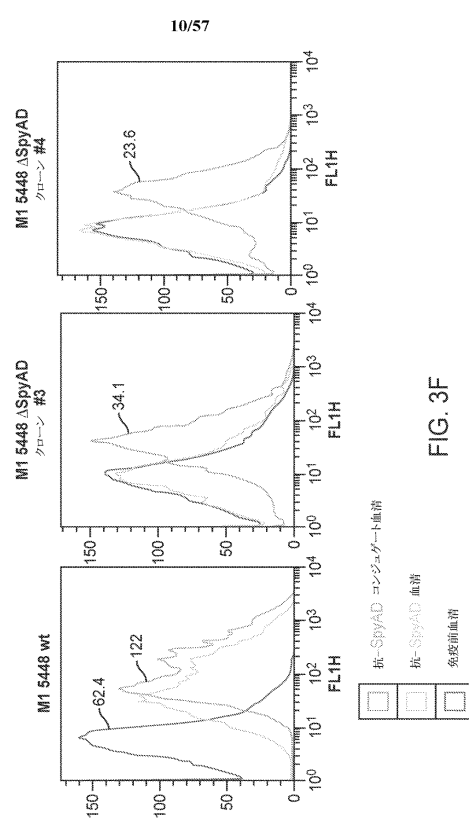


FIG. 3F

10

20

30

40

50

【図 15】

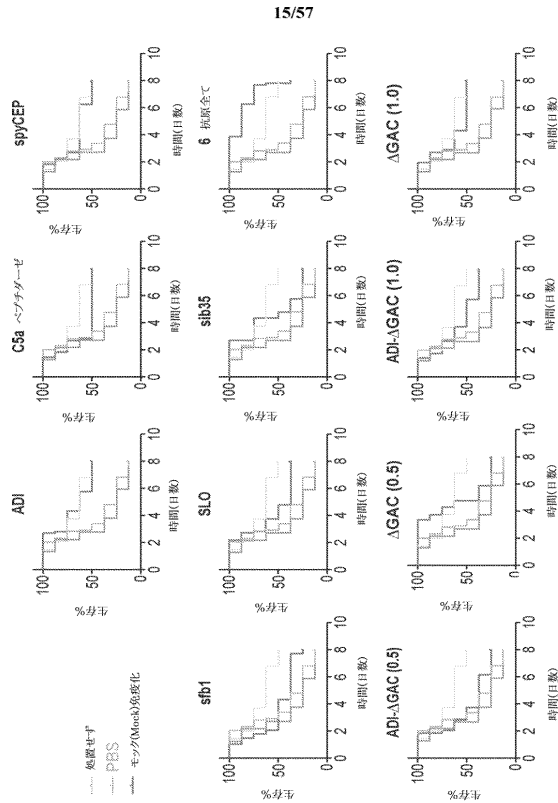


FIG. 5D

【図 16】

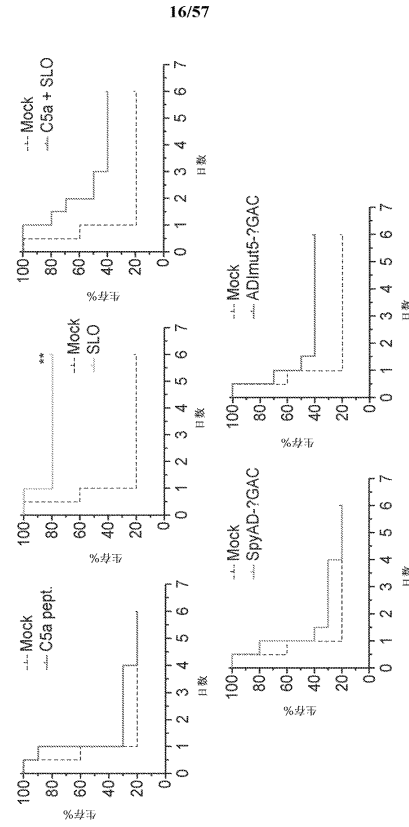


FIG. 5E

【図 17】

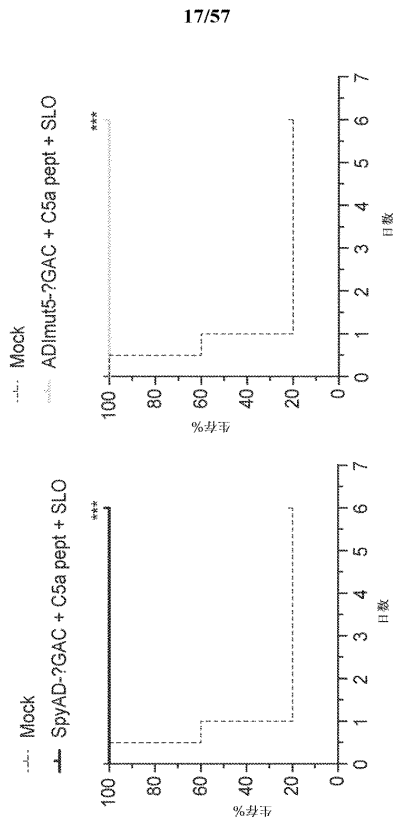


FIG. 5F

【図 18】

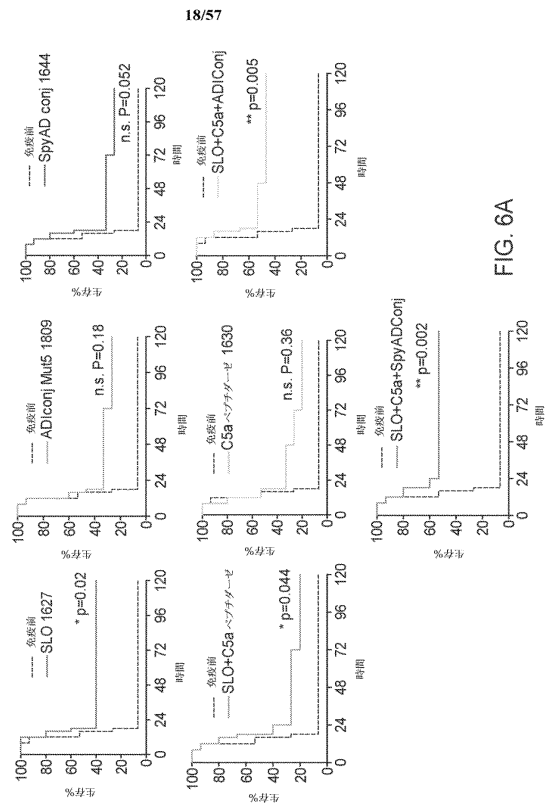


FIG. 6A

10

20

30

40

50

【図 19】

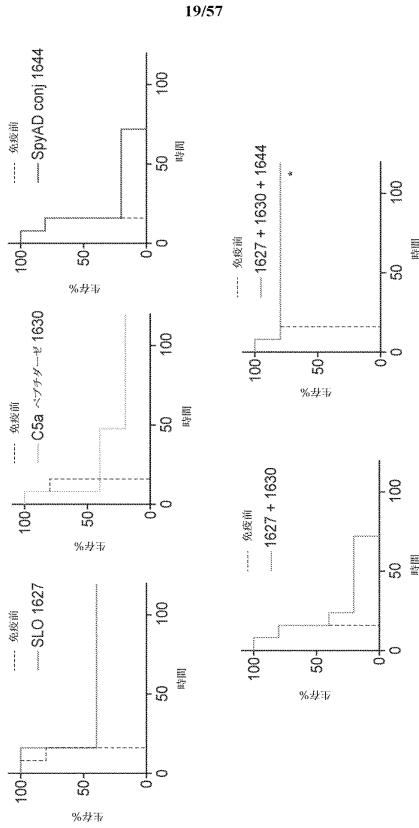


FIG. 6B

【図 20】

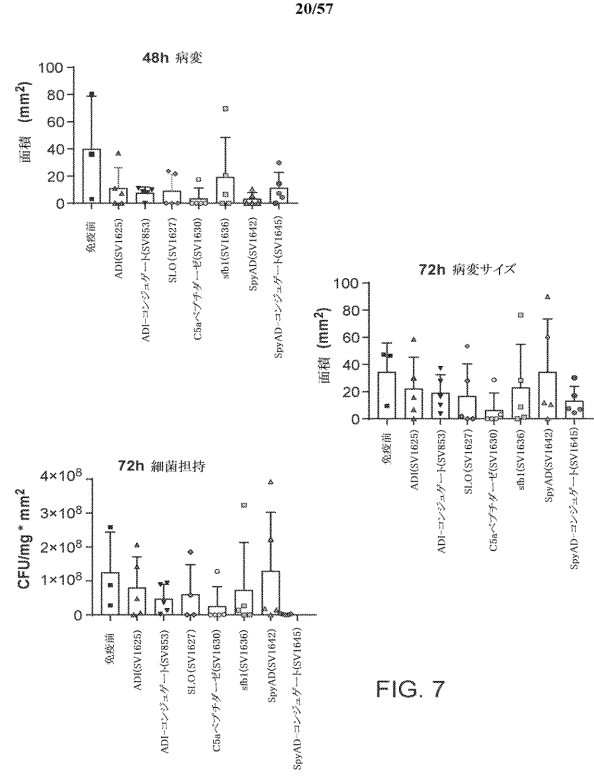


FIG. 7

【図 21】

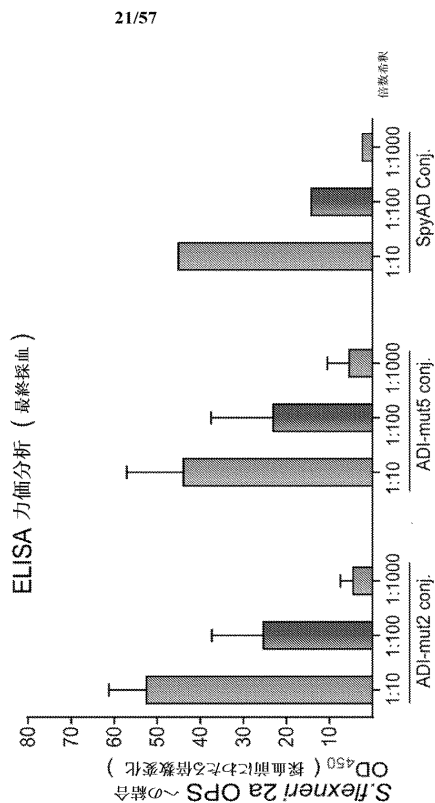


FIG. 8

【図 22】

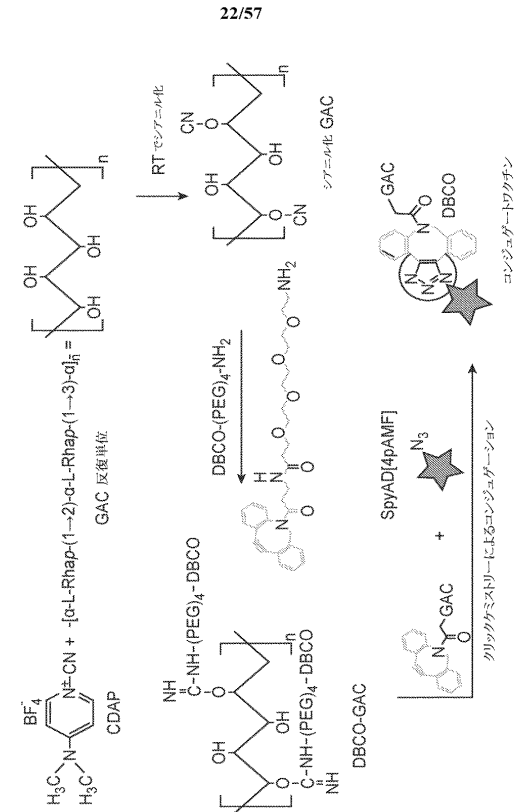


FIG. 9

10

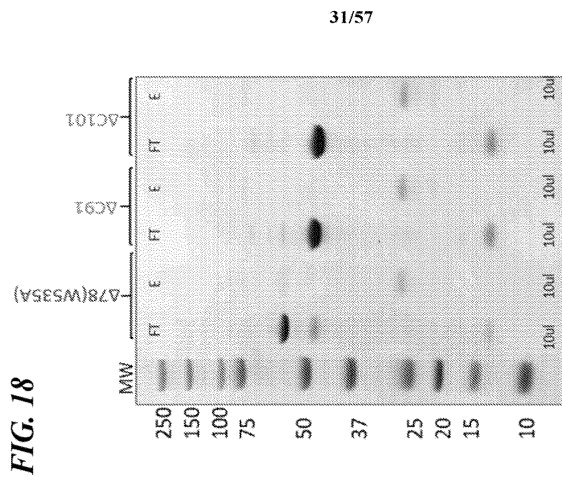
20

30

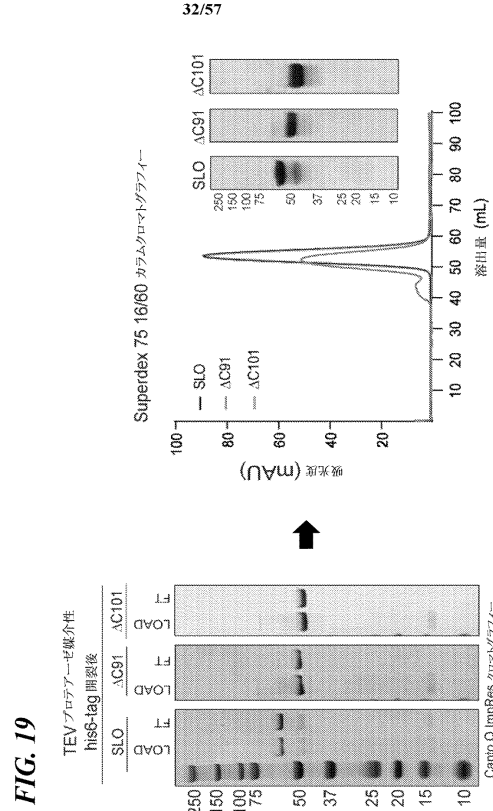
40

50

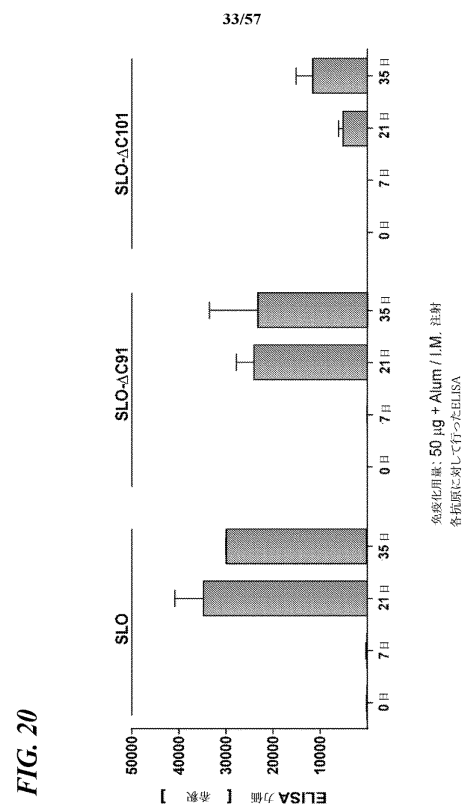
【図 3 1】



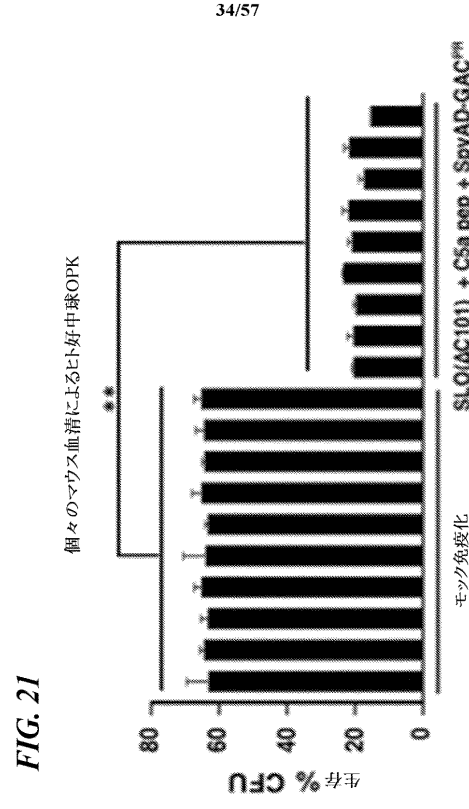
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



10

20

30

40

50

【図 3 5】

FIG. 22C

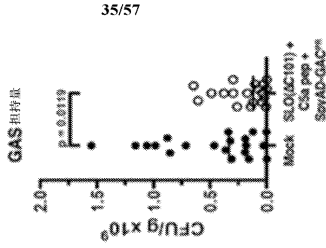


FIG. 22B

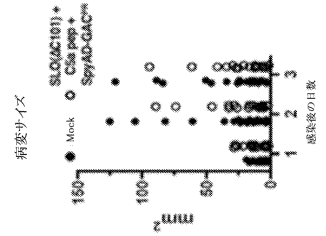
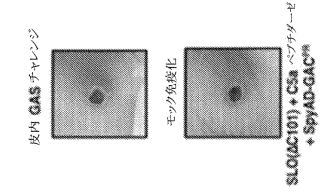


FIG. 22A



【図 3 7】

ヒト好中球オプソニン食作用による殺傷

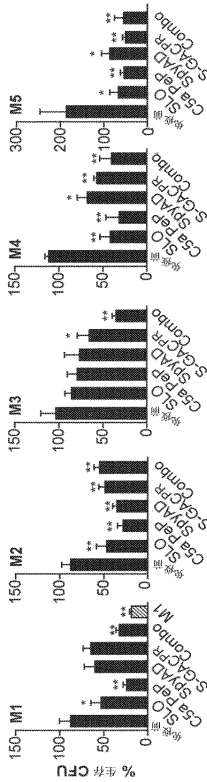


FIG. 24A

ヒト好中球免疫化剤バースト

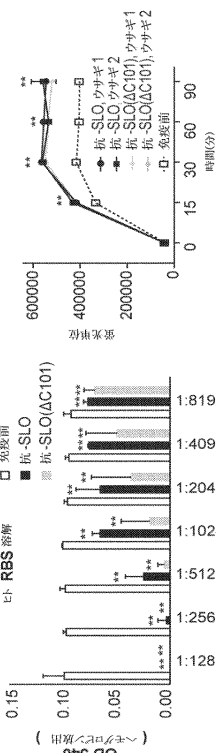


FIG. 24C

FIG. 24B

【図 3 8】

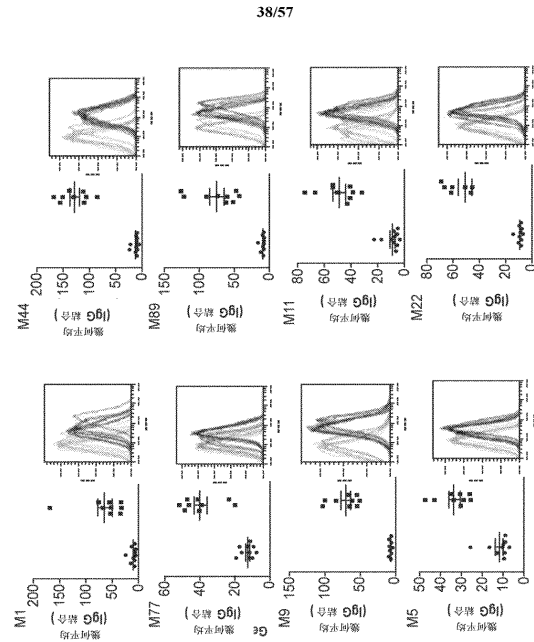
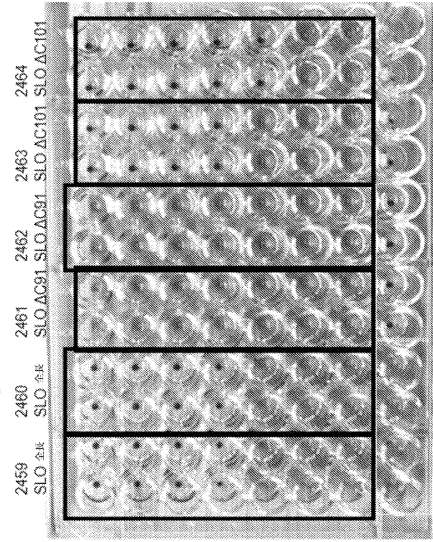


FIG. 25A

FIG. 23

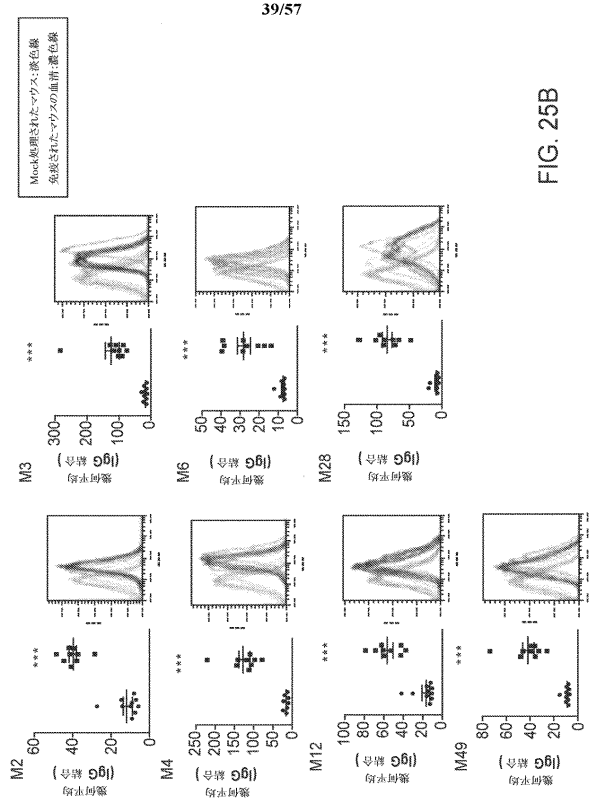
0.1ug/ml 組織全体SLOを 暗箱内で全てのウェルに加えた



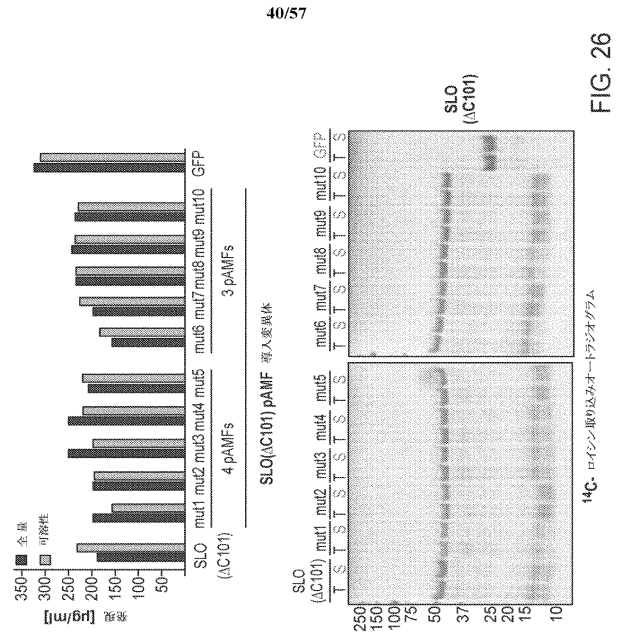
血清希釈

完全基SLOおよび
SLO-AC101 の血清希釈は
溶解を阻止するが
SLO-AC91 の血清希釈は
溶解を阻止しない

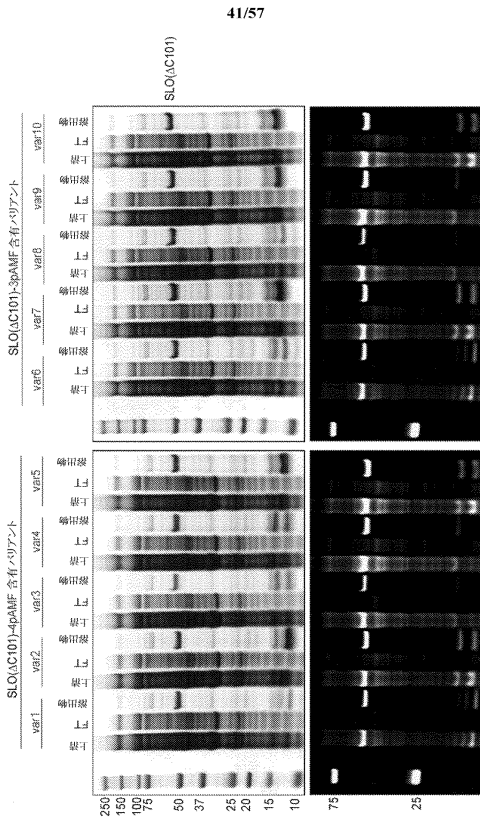
【図 3 9】



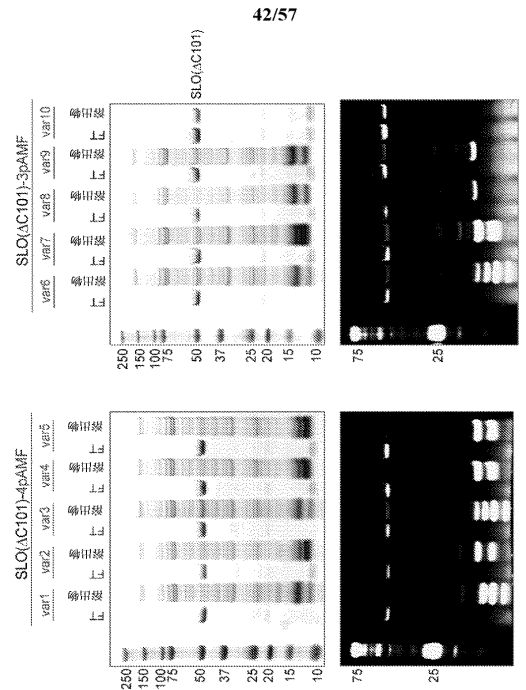
【図 4 0】



【図 4 1】



【図 4 2】



10

20

30

40

50

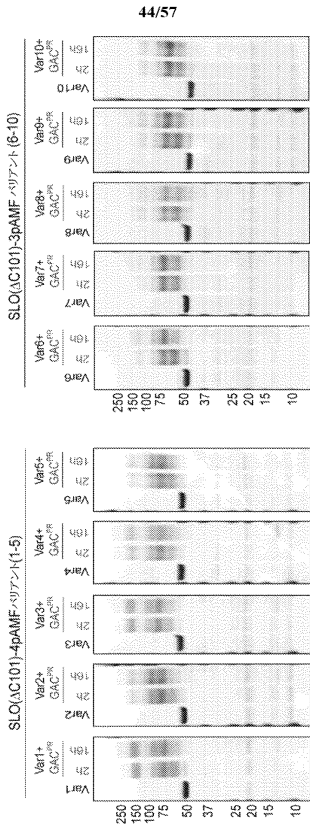
【図 4 3】

FIG. 28

コンジュゲートをさせるために 25℃で終夜 DBCO誘導型GACをSLO-バリアントとヒンキュベートする											
反応	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
タンパク質	60.0	48.0	80.0	48.0	40.0	17.8	20.9	48.0	21.8	30.0	
PS-DBCO	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	424.8
緩衝液 (10x PBS)	6.0	12.0	6.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	
水	11.5	17.5	-8.5	17.5	25.5	47.7	44.7	17.5	43.7	35.5	
合計	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	120.0	
タンパク質 ストック	var1	var2	var3	var4	var5	var6	var7	var8	var9	var10	mg/ml
	0.8	1.0	0.6	1.0	1.2	2.7	2.3	1.0	2.2	1.6	
PS-DBCO ストック	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	mg/ml

【図 4 4】

FIG. 29



【図 4 5】

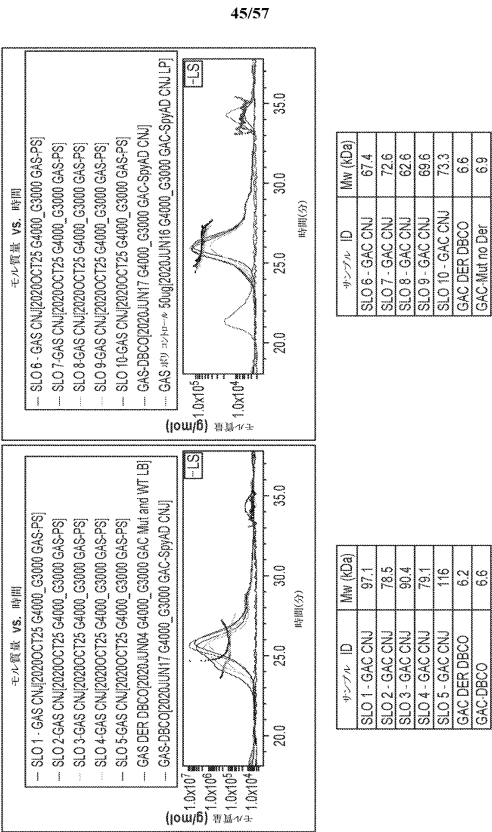
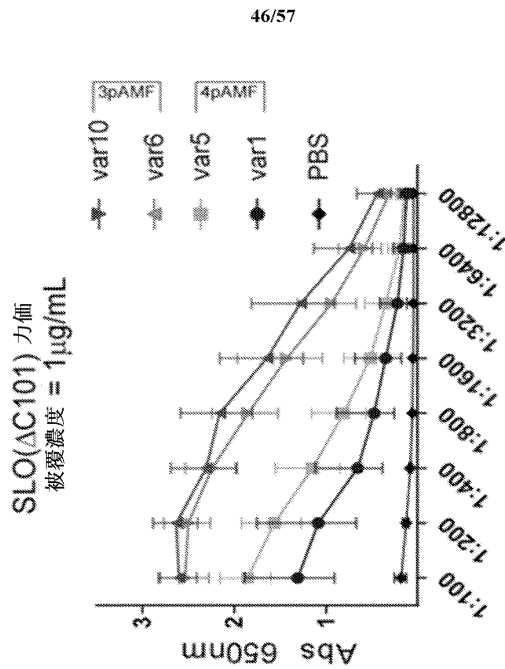


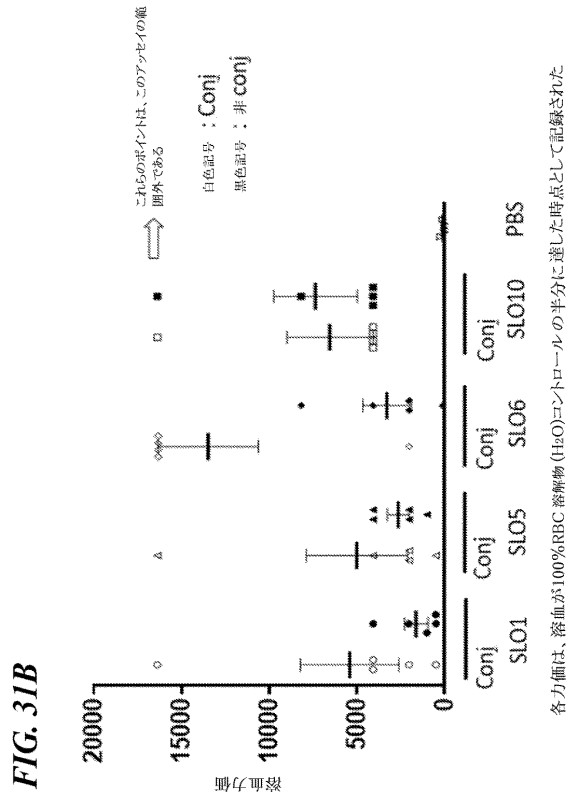
FIG. 30

【図 4 6】

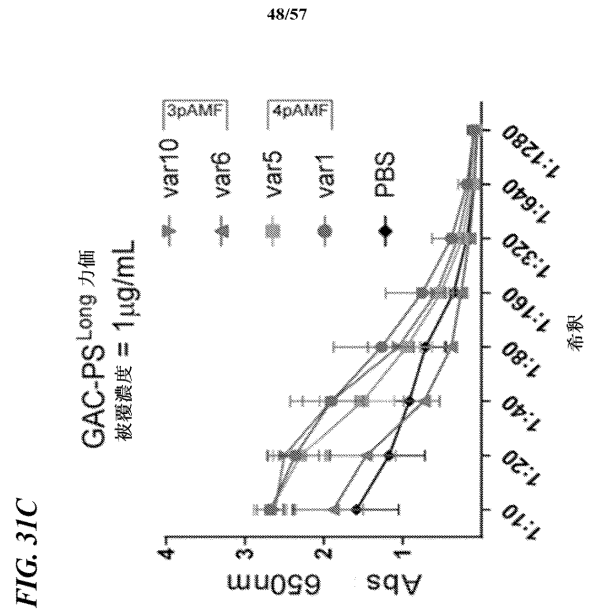
FIG. 31A



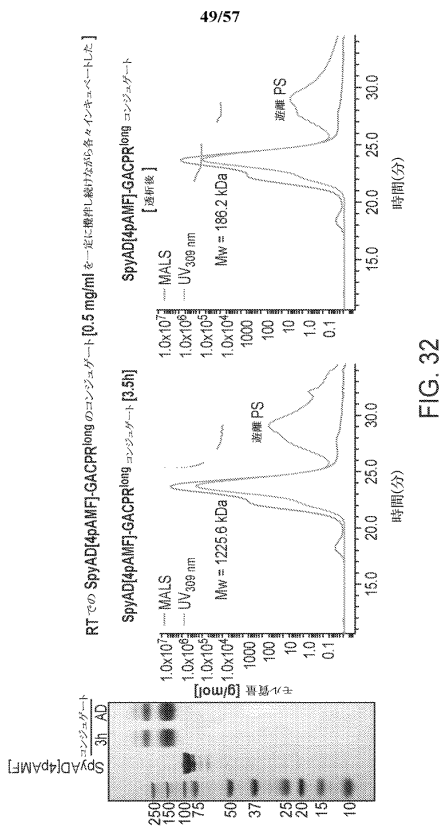
【図 47】



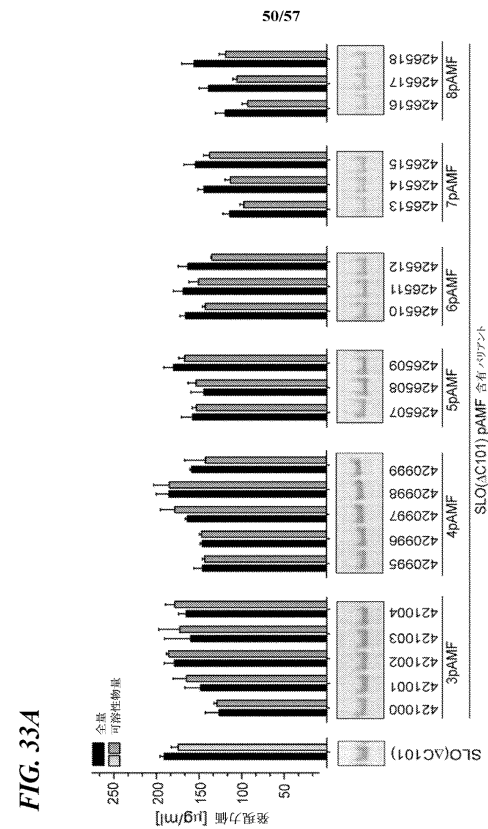
【圖 48】



【図 49】

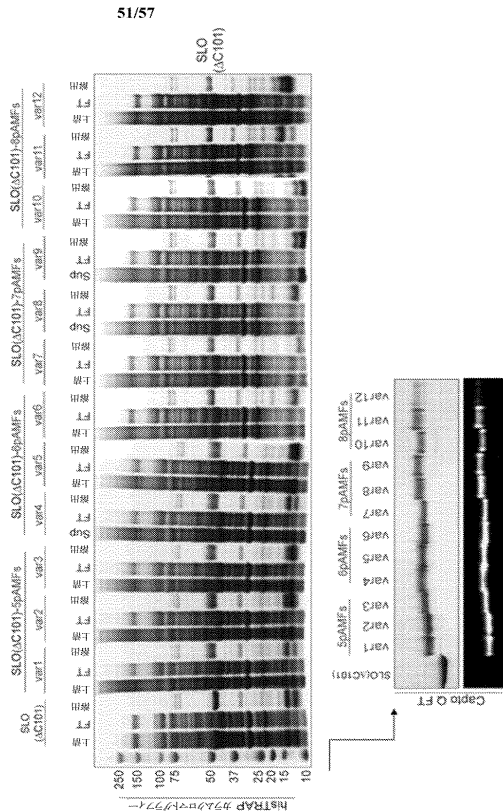


【図 50】



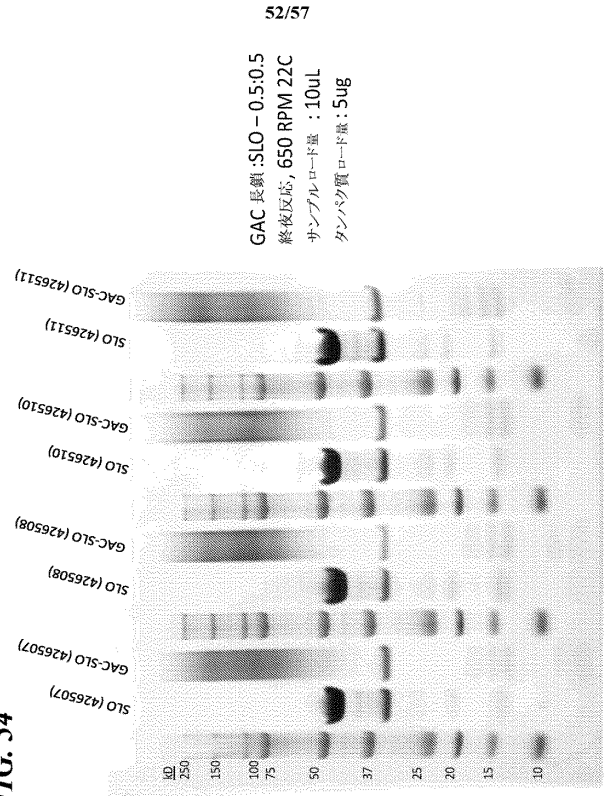
【図 5 1】

FIG. 33B



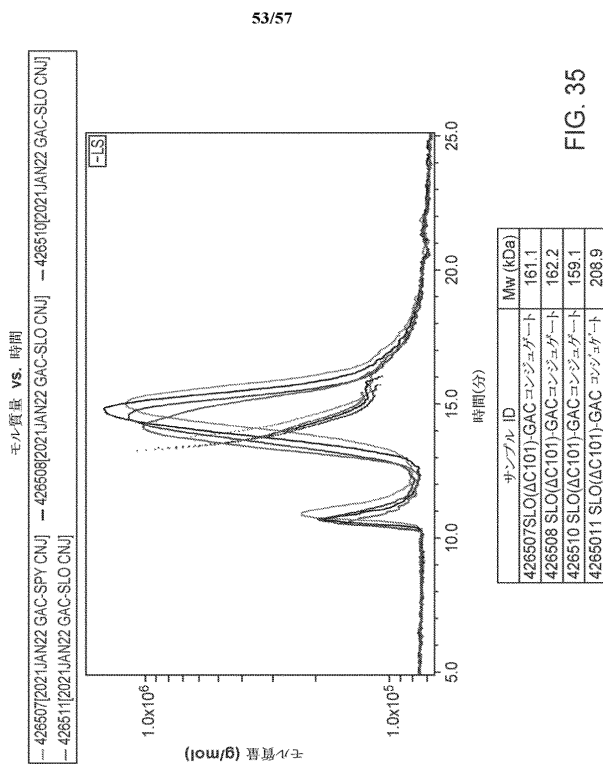
【図 5 2】

FIG. 34



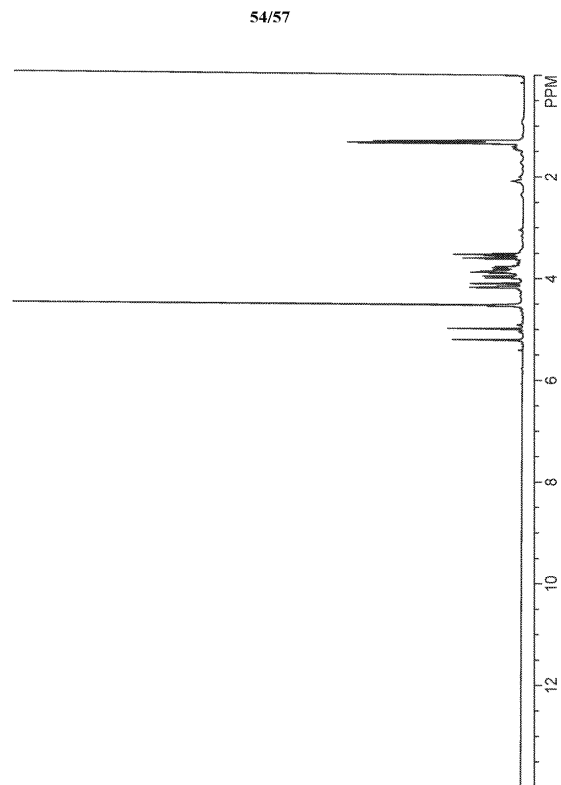
【図 5 3】

FIG. 35



【図 5 4】

FIG. 36A



10

20

30

40

50

【配列表】

2023514332000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/018402

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/112 A61K39/116 A61K39/09 A61P9/00 A61P31/04 ADD. A61K39/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RIVERA-HERNANDEZ TANIA ET AL: "An Experimental Group A Streptococcus Vaccine That Reduces Pharyngitis and Tonsillitis in a Nonhuman Primate Model", MBIO, vol. 10, no. 2, 30 April 2019 (2019-04-30), XP055807327, DOI: 10.1128/mbio.00693-19 Retrieved from the Internet: URL:https://mbio.asm.org/content/mbio/10/2/e00693-19.full.pdf> abstract; figures 1,2 ----- -/--	1-57
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 May 2021		Date of mailing of the international search report 08/06/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5518 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Renggli-Zulliger, N

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2021/018402

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BI SHUAI ET AL: "A Multicomponent Vaccine Provides Immunity against Local and Systemic Infections by Group A Streptococcus across Serotypes", MBIO, vol. 10, no. 6, 26 November 2019 (2019-11-26), pages 1-12, XP055805004, DOI: 10.1128/mbio.02600-19 Retrieved from the Internet: URL:https://mbio.asm.org/content/mbio/10/6/e02600-19.full.pdf> abstract; figures 3-6 -----	1-57
Y	G. BENSI ET AL: "Multi High-Throughput Approach for Highly Selective Identification of Vaccine Candidates: the Group A Streptococcus Case", MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 11, no. 6, 1 June 2012 (2012-06-01), XP055229043, US ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/mcp.M111.015693 page 7; figure 3; table I&II -----	1-57
Y	WANG SUBO ET AL: "Group A Streptococcus Cell Wall Oligosaccharide-Streptococcal C5a Peptidase Conjugates as Effective Antibacterial Vaccines", ACS INFECTIOUS DISEASES, vol. 6, no. 2, 24 December 2019 (2019-12-24), pages 281-290, XP55807292, US ISSN: 2373-8227, DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00347 Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsinfecdis.9b00347> page 736, right-hand column, paragraph first full - page 737, right-hand column; figure 7 conclusion ----- -/--	1-57

1

Form PCT/ISA/Z10 (continuation of second sheet) (April 2009)

page 2 of 4

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2021/018402

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VAN SORGE NINA M ET AL: "The Classical Lancefield Antigen of Group A Streptococcus Is a Virulence Determinant with Implications for Vaccine Design", CELL HOST & MICROBE, ELSEVIER, NL, vol. 15, no. 6, 11 June 2014 (2014-06-11), pages 729-740, XP029033068, ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/J.CHOM.2014.05.009 page 737, left-hand column, last paragraph - right-hand column, last paragraph; figure 7	1-57
Y	WO 2013/020090 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; NIZET VICTOR [US]; SORGE NINA VAN [US]) 7 February 2013 (2013-02-07) cited in the application page 25 - page 26; figure 58	1-57
A	BRANDT EVELYN R ET AL: "New multi-determinant strategy for a group A streptococcal vaccine designed for the Australian Aboriginal population", NATURE MEDICINE, NATURE PUB. CO, NEW YORK, vol. 6, no. 4, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 455-459, XP037135430, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/74719 page 455 - page 456; table 1	1-57
Y	WO 2018/126229 A2 (SUTROVAX INC [US]) 5 July 2018 (2018-07-05) page 142 - page 145; claims 1,13; example 1	1-57
Y	SABHARWAL HEMANT ET AL: "Group A streptococcus (GAS) carbohydrate as an immunogen for protection against GAS infection", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, US, vol. 193, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 129-135, XP002571834, ISSN: 0022-1899 cited in the application page 132 - page 133	1-57
	----- -/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2009)

page 3 of 4

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2021/018402

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dale James B ET AL: "Current Approaches to Group A Streptococcal Vaccine Development Introduction and Historical Perspectives", 10 February 2016 (2016-02-10), XP055807564, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333413/pdf/Bookshelf_NBK333413.pdf [retrieved on 2021-05-26] figure 1; tables 1,5	1-57
X,P	GAO NINA J. ET AL: "Site-Specific Conjugation of Cell Wall Polyrhamnose to Protein SpyAD Envisioning a Safe Universal Group A Streptococcal Vaccine", INFECTIOUS MICROBES AND DISEASES, vol. Publish Ahead of Print, 29 December 2020 (2020-12-29), XP055804724, ISSN: 2641-5917, DOI: 10.1097/IM9.0000000000000044 the whole document	1-57
X,P	DI BENEDETTO ROBERTA ET AL: "Rational Design of a Glycoconjugate Vaccine against Group A Streptococcus", INT. J. MOL. SCI., vol. 21, no. 22, 13 November 2020 (2020-11-13), page 8558, XP055804676, ISSN: 1661-6596, DOI: 10.3390/ijms21228558 cited in the application page 11 - page 12	1-57

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2009)

page 4 of 4

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/018402

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013020090 A2	07-02-2013	US 2014294930 A1	02-10-2014
		US 2017196962 A1	13-07-2017
		WO 2013020090 A2	07-02-2013

WO 2018126229 A2	05-07-2018	AU 2017388891 A1	04-07-2019
		BR 112019013475 A2	27-02-2020
		CA 3048981 A1	05-07-2018
		CN 110366428 A	22-10-2019
		EP 3562503 A2	06-11-2019
		JP 2020504760 A	13-02-2020
		KR 20190103256 A	04-09-2019
		PH 12019501552 A1	01-06-2020
		US 2018333484 A1	22-11-2018
		WO 2018126229 A2	05-07-2018

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/116 (2006.01)	A 6 1 K 39/116	
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	
(32)優先日 令和2年10月9日(2020.10.9)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 63/123,293		
(32)優先日 令和2年12月9日(2020.12.9)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		
(特許庁注：以下のものは登録商標)		
1. T W E E N		
(72)発明者 カプール, ニーラジ アメリカ合衆国94070カリフォルニア州サン・カルロス、インダストリアル・ロード825、スウィート300、ボックスサイト・インコーポレイテッド内		
(72)発明者 デイビー, ピーター ティ アメリカ合衆国94070カリフォルニア州サン・カルロス、インダストリアル・ロード825、スウィート300、ボックスサイト・インコーポレイテッド内		
(72)発明者 セドラ, アンジー エイ アメリカ合衆国94070カリフォルニア州サン・カルロス、インダストリアル・ロード825、スウィート300、ボックスサイト・インコーポレイテッド内		
F ターム (参考) 4C076 AA95 CC06 EE41 EE59 4C085 AA03 AA04 BA14 DD51 EE03 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA86 EA31 FA74		