

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6632974号
(P6632974)

(45) 発行日 令和2年1月22日(2020.1.22)

(24) 登録日 令和1年12月20日(2019.12.20)

| | |
|---------------|-----------|
| (51) Int.Cl. | F 1 |
| C 07 K 14/195 | (2006.01) |
| C 07 K 19/00 | (2006.01) |
| C 12 N 15/31 | (2006.01) |
| C 12 N 1/21 | (2006.01) |
| C 12 N 5/10 | (2006.01) |
| C 07 K | 14/195 |
| C 07 K | 19/00 |
| C 12 N | 15/31 |
| C 12 N | 1/21 |
| C 12 N | 5/10 |

請求項の数 24 (全 55 頁) 最終頁に続く

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2016-521549 (P2016-521549) |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年6月18日(2014.6.18) |
| (65) 公表番号 | 特表2016-522259 (P2016-522259A) |
| (43) 公表日 | 平成28年7月28日(2016.7.28) |
| (86) 國際出願番号 | PCT/US2014/042999 |
| (87) 國際公開番号 | W02014/205111 |
| (87) 國際公開日 | 平成26年12月24日(2014.12.24) |
| 審査請求日 | 平成29年6月16日(2017.6.16) |
| (31) 優先権主張番号 | 61/836,959 |
| (32) 優先日 | 平成25年6月19日(2013.6.19) |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) |

| | |
|-----------|--|
| (73) 特許権者 | 513200047 インテグレイティッド バイオセラピューティクス, インコーポレイティッド アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, リサーチ コート 4, スイート 300 |
| (74) 代理人 | 100102978 弁理士 清水 初志 |
| (74) 代理人 | 100102118 弁理士 春名 雅夫 |
| (74) 代理人 | 100160923 弁理士 山口 裕孝 |
| (74) 代理人 | 100119507 弁理士 刑部 俊 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】フェノール可溶性モジュリン、 δ 毒素、スーパー抗原に由来するトキソイドペプチド、およびその融合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

任意の順序で並べられた、3つ以上の黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)由来スーパー抗原(SAg)ポリペプチドの融合物を含む、多価オリゴペプチドであって、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、およびSEQ ID NO: 51を含む、多価オリゴペプチド。

【請求項2】

スーパー抗原(SAg)ポリペプチドが、リンカーを介して結合されている、請求項1に記載の多価オリゴペプチド。

【請求項3】

リンカーが、グリシン、セリン、アラニン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1個であるが50個以下のアミノ酸を含む、請求項2に記載の多価オリゴペプチド。

【請求項4】

リンカーが(GGGS)_nまたは(GGGGS)_nを含み、nが1~10の整数である、請求項3に記載の多価オリゴペプチド。

【請求項5】

アミノ酸配列SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項1に記載の多価オリゴペプチド。

【請求項6】

10

20

異種ペプチドまたはポリペプチドをさらに含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の多価オリゴペプチド。

【請求項7】

異種ペプチドまたはポリペプチドが、Hisタグ、ユビキチンタグ、NusAタグ、キチン結合ドメイン、Bタグ、HSBタグ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、カルモジュリン結合タンパク質(CBP)、ガラクトース結合タンパク質、マルトース結合タンパク質(MBP)、セルロース結合ドメイン(CBD)、アビジン/ストレプトアビジン/Strepタグ、trpE、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、lacZ(β-ガラクトシダーゼ)、FLAG(商標)ペプチド、Sタグ、T7タグ、異種ペプチドのいずれかの断片、または異種ペプチドの2つ以上の組み合わせを含む、請求項6に記載の多価オリゴペプチド。

10

【請求項8】

異種ペプチドまたはポリペプチドが免疫原、T細胞エピトープ、B細胞エピトープ、それらの断片、またはそれらの組み合わせを含む、請求項6または請求項7に記載の多価オリゴペプチド。

【請求項9】

免疫原性炭水化物をさらに含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の多価オリゴペプチド。

【請求項10】

請求項1～9のいずれか一項に記載の多価オリゴペプチドをコードする核酸を含む、単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項11】

請求項10に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項12】

請求項11に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項13】

請求項1～9のいずれか一項に記載の多価オリゴペプチドを產生する方法であって、請求項12に記載の宿主細胞を培養する工程および多価オリゴペプチドを回収する工程を含む、方法。

【請求項14】

請求項1～9のいずれか一項に記載の多価オリゴペプチド、またはそれらの任意の組み合わせと、担体とを含む、組成物。

30

【請求項15】

アジュバントをさらに含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

免疫原をさらに含む、請求項14または15に記載の組成物。

【請求項17】

黄色ブドウ球菌に対する宿主免疫応答を対象において誘導する際の使用のための、請求項14～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項18】

対象におけるブドウ球菌の疾患または感染症を予防または処置する際の使用のための、請求項14～17のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項19】

感染症が、皮膚、軟部組織、血液、もしくは臓器の限局性感染症もしくは全身感染症であるか、または性質上、自己免疫性である、請求項18に記載の使用のための組成物。

【請求項20】

疾患が呼吸器疾患である、請求項18に記載の使用のための組成物。

【請求項21】

呼吸器疾患が肺炎である、請求項20に記載の使用のための組成物。

【請求項22】

疾患が敗血症である、請求項18に記載の使用のための組成物。

50

【請求項 2 3】

対象がヒトである、請求項17～22のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 2 4】

以下の工程を含む、黄色ブドウ球菌感染症に対するワクチンを作製する方法：

請求項1～9のいずれか一項に記載の多価オリゴペプチド、またはそれらの任意の組み合わせを単離する工程；および

該多価オリゴペプチド、またはそれらの任意の組み合わせをアジュバントと組み合わせる工程。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】**

10

【0 0 0 1】

電子的に提出した配列表への言及

本願と共に提出された、ASCIIテキストファイルで電子的に提出した配列表(名称:57783_132959_SEQ_LST_ST25.txt; サイズ:88,443バイト; および作成日:2014年6月18日)の内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0 0 0 2】**背景**

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)(SA)は、皮膚・軟部組織感染症(SSTI)から命にかかわる敗血症および肺炎まで広範囲の感染症を引き起こすグラム陽性ヒト病原体である。SAは、世界中の院内感染型感染症および市中感染型感染症の主な原因の一つである(Barrio, et al., 2006, *Microbes Infect*, 8 (8):2068-2074; Brown, et al., 2009 *Clin Microbiol Infect*, 15 (2):156-164; Colin, et al., 1994, *Infect Immun*, 62 (8):3184-3188)。病態の範囲は、SAが多くの病原因子: スーパー抗原性およびポア形成性の毒素、コアグラーーゼ、莢膜多糖、アドヘシン、プロテアーゼ、補体不活性化キソプロテイン、ならびに他の自然応答調節物質(*innate response modifier*)を用いて免疫応答から逃れる多様な能力を反映している(Barrio, et al., 2006, *Microbes Infect*, 8 (8):2068-2074; Deurenberg and Stobberingh, 2008, *Infect Genet Evol*, 8 (6):747-763)。

20

【0 0 0 3】

メチシリン耐性SA(MRSA)は1960年代に初めて出現してから、世界中の医療現場に蔓延した(Diep, et al., 2006, *J Infect Dis*, 193 (11):1495-1503)。1990年代から、市中感染型MRSA株(CA-MRSA)が出現し、大きな世界的難題を投げかけている(Bassetti, et al., 2009, *Int J Antimicrob Agents*, 34 Suppl 1:S15-19; Bradley, 2005, *Semin Respir Crit Care Med*, 26 (6):643-649; Chambers, 2005, *N. Engl J Med*, 352 (14):1485-1487.)。

30

ヘモリジン(　毒素、Hla)はSA肺炎およびSSTIにおける主な病原因子である(Bubeck Wardenburg and Schneewind, 2008, *J Exp Med*, 205 (2):287-294; Kennedy, et al., 2010, *J Infect Dis*, 202 (7):1050-1058)。最近、フェノール可溶性モジュリン(PSM)として知られる短い細胞溶解性ペプチドが、黄色ブドウ球菌に対する主な防御ラインである好中球を溶解する重要な病原因子として特定された(Wang, et al., 2007, *Nat Med*, 13 (12):1510-1514)。ブドウ球菌の別の関連する短い細胞溶解性ペプチドは、黄色ブドウ球菌クオラムセンシング系(agr)の重要なマーカーであるデルタヘモリジンまたはデルタ毒素(　毒素)として知られている(Novick, et al., 1993, *EMBO J*, 12 (10):3967-3975)。SA菌血症患者コホートにおける最近の疫学研究から、敗血症の確率とHla、PSM-3、ならびに　毒素に対する既存の抗体との間には逆相関があることが分かっている(Adhikari, et al., 2012, *J Infect Dis*, 206 (6):915-923)。

40

【0 0 0 4】

ブドウ球菌スーパー抗原(SAg)はサイトカインおよびケモカインの大量放出、接着分子の発現および活性の強化、T細胞増殖の増加を誘導し、最終的に、T細胞アポトーシス/アネルギーを誘導する。この一連の事象は、発疹、低血圧、発熱、および多系統機能不全を特徴とする命にかかわる状態である毒素性ショック症候群(TSS)(Todd, et al., 1978, *Lancet*, 2 (8100):1116-1118)となり得る(Bohach, et al., 1990, *Crit Rev Microbiol*, 17

50

(4):251-272)。スーパー抗原を含む多価黄色ブドウ球菌ワクチンの開発における大きな難題は、20種を超える異なるSAgがあり、ほとんどのSEがプラスミドもしくは病原性アイランド(ブドウ球菌エンテロトキシンK(sek)、(ブドウ球菌エンテロトキシンQ seq)、溶原性ファージ(ブドウ球菌エンテロトキシンA(sea)、またはSCCmecのような抗生物質耐性力セット(ブドウ球菌エンテロトキシンH(seh)などの可動遺伝因子上にあるので、臨床分離株におけるSAgの存在に広範囲のばらつきがあるということである(Omoe, et al., 2002, *J Clin Microbiol*, 40 (3):857-862)。6000を超える臨床分離株を含む大規模な文献レビューに基づいて、最も広範囲に現れるスーパー抗原(Sag)は、毒素性ショック症候群毒素1(TSST-1)および(ブドウ球菌エンテロトキシンC(SEC)、これに続いて(ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)、(ブドウ球菌エンテロトキシンD(SED)、および(ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)のように思われる。つい最近の研究から、主としてUSA300クローニングが広まったために、(ブドウ球菌エンテロトキシンK(SEK)および(ブドウ球菌エンテロトキシンQ(SEQ)が出現したことが分かっている。(ブドウ球菌エンテロトキシン(SEA)、(ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)、およびTSST-1の弱毒化スーパー抗原トキソイドがデザインされており、毒素ショック動物モデルにおいて試験されている。これらの変異体はMHCクラスIIタンパク質との結合が欠損しており、従って、スーパー抗原活性が無い(特許6,713,284; 6,399,332; 7,087,235; 7,750,132; 7,378,257、および8,067,202の対象)。従って、広範囲の中和抗体を誘導可能な単純化されたスーパー抗原トキソイドワクチンを、多価黄色ブドウ球菌ワクチンに入れることができることがかなり必要とされている。

【0005】

10

フェノール可溶性モジュリン(PSM)および -ヘモリジン(毒素):

黄色ブドウ球菌は、フェノール可溶性モジュリン(PSM)として知られる、4種の短い(約20アミノ酸、I型)細胞溶解性ペプチドと2種の長い(約40アミノ酸、II型)細胞溶解性ペプチドを分泌する(Wang, et al., 2007, *Nat Med*, 13 (12):1510-1514)。さらに、SAは、I型PSMに似た 毒素を產生する。これらの遺伝子は全ての黄色ブドウ球菌株においてagr系の制御下で発現される(Wang, et al., 2007, *Nat. Med*, 13 (12): 1510-1514)。最近、ブドウ球菌メチシリン耐性可動遺伝要素であるSCCmecの中に新規のPSM(PSM-mec)も同定された(Chatterjee, et al., 2011, *PLoS One*, 6 (12):e28781; Kaito, et al., 2011, *PLoS Pathog*, 7 (2):e1001267)。このことから、これらの毒素の水平伝播がMRSAビルレンスの一因となり得ることが示唆される。PSMは、SAに対する第1の宿主防御ラインである好中球に対して溶解性を示す(Wang, et al., 2007, *Nat Med*, 13 (12):1510-1514)。さらに、最近の研究から、 -ヘモリジンの溶血活性に対する相乗効果が示されている(Cheung, et al., 2012, *Microbes Infect*, 14 (4):380-386)。発病におけるPSMの重要な役割が、欠失変異体を用いて菌血症およびSSTIのマウスモデルにおいて示されている(Wang, et al., 2007, *Nat. Med*, 13 (12):1510-1514)。さらに、最近の報告から、バイオフィルム形成におけるPSMの重要な役割が示唆されている(Periasamy, et al., 2012, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (4):1281-1286)。PSMのうち、PSM-3は黄色ブドウ球菌の発病において最も顕著な役割を果たしている(Wang, et al., 2007, *Nat. Med*, 13 (12):1510-1514)。

【0006】

30

毒素は、agr遺伝子座のRNAIII転写物内にあるhld遺伝子によってコードされる。RNAIIIは調節RNAであり、様々な病原遺伝子を発現するためのSAクオラムセンシング系の調節において主な役割を果たしている(Novick, 2003, *Mol Microbiol*, 48 (6):1429-1449; Novick, et al., 1993, *EMBO J*, 12 (10):3967-3975)。RNAIII発現の増加と共に、細胞外毒素レベルは増加し、定常期の全エキソプロテイン量のほぼ半分に達する(Kreger, et al., 1971, *Infect Immun*, 3 (3):449-465)。CA-MRSA MW2株のhld^{-/-}変異体はマウス菌血症モデルにおいてビルレンス減少を示した(Wang, et al., 2007, *Nat. Med*, 13 (12):1510-1514)。最近の研究から、 毒素は、コロニースプレッディングを阻害することによってコロニーの細胞数/単位面積を増やし、その結果、厚みのある巨大コロニーを生じさせ、SAコロニーの区画化を促進してコロニーを効率的に形成することも明らかになった(Omae, et al., 2012, *J Biol Chem*, 287 (19):15570-15579)。従って、 毒素はSAコロニーの物

40

50

理的状態を調節するようにも見える。毒素はまた、ヒト好中球酸化バーストの共刺激分子として働くことで、黄色ブドウ球菌が毒素の存在下でヒト上皮細胞および内皮細胞のファゴエンドソームから回避するのに重要な役割も果たしている。

【0007】

黄色ブドウ球菌 ヘモリジン(Hla):

このポア形成毒素は原形質膜にオリゴマー バレルポアを形成し、細菌の蔓延および生存、免疫回避、ならびに組織破壊に重要な役割を果たしている。SA 毒素(Hla)(Bhakdi and Tranum-Jensen, 1991, *Microbiol Rev*, 55 (4):733-751)は、リンパ球、マクロファージ、肺上皮細胞および内皮、ならびに赤血球などの多くの細胞を標的とする(Bhakdi and Tranum-Jensen, 1991, *Microbiol Rev*, 55 (4):733-751; McElroy, et al., 1999, *Infect Immun*, 67 (10):5541-5544)。いくつかの方面的証拠: i)hlaが染色体決定因子によってコードされ(Brown and Pattee, 1980, *Infect Immun*, 30 (1):36-42)、ほとんどのSA分離株において発現していること(Aarestrup, et al., 1999, *APMIS*, 107 (4):425-430; Bhakdi and Tranum-Jensen, 1991, *Microbiol Rev*, 55 (4):733-751; Husmann, et al., 2009, *FEBS Lett*, 583 (2):337-344; Shukla, et al., 2010, *J Clin Microbiol*, 48 (10):3582-3592); ii)部分的に弱毒化されたHla(H35L)およびHlaに対する抗体によってマウスがSA肺炎および皮膚感染症から保護されること(Kennedy, et al., 2010, *J Infect Dis*, 202 (7):1050-1058; Bubeck Wardenburg and Schneewind, 2008, *J Exp Med*, 205 (2):287-294; Ragle and Bubeck Wardenburg, 2009, *J Infect Dis*, 176 (6):1531-1537); iii)H35Lに対する抗体によってマウスが毒素から保護され、細菌攻撃から部分的に保護されること(Menzies and Kernodle, 1996; *Infect Immun*, 64 (5):1839-1841)から、Hlaは黄色ブドウ球菌の感染症または合併症を予防するための最も重要なワクチン標的だと確認されている。H35変異はHla溶解活性を大きく抑制するが、1個の点変異だけでは、ヒトに使用するためのワクチンとして開発するのに十分に安全だとはみなされない。

【0008】

WO2012/109167A1は、AT62と呼ぶ、Hlaの合理的にデザインされた変異体ワクチンについて説明する。AT62でマウスを免疫化することで、黄色ブドウ球菌の致死性敗血症および肺炎から動物が保護された(Adhikari, et al., 2012, *PLoS One*, 7 (6):e38567)。さらに、AT62に対して産生された抗体によって、黄色ブドウ球菌によって誘導される致死性敗血症からマウスが保護された(Adhikari, et al., 2012, *PLoS One*, 7 (6):e38567)。

【0009】

パントン-バレンタイン(Panton-Valentine)ロイコシジン(PVL):

PVLは、いくつかのCA-MRSA系統が産生するロイコトキシンとして知られる二成分細胞溶解性毒素ファミリーのメンバーである(Diep and Otto, 2008, *Trends Microbiol*, 16 (8):361-369)。二成分ヘモリジンおよびロイコトキシンはブドウ球菌の免疫回避において重要な役割を果たす。これらの毒素は重要な免疫細胞を死滅させ、組織破壊を引き起こし、それによって、最初の感染段階の間に宿主を衰弱させ、細菌播種および遠隔臓器における転移性増殖を促進することが多い。2つのPVL成分であるLukS-PVおよびLukF-PVは別々に分泌され、LukS-PVがその受容体に結合し、その後にLukF-PVとLukS-PVが結合するとポア形成性八量体複合体を形成する(Miles, et al., 2002, *Protein Sci*, 11 (4):894-902; Pedelacq, et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (4):1281-1286)。PVLの標的は多形核食細胞(PMN)、単球、およびマクロファージである。疫学的に、PVLは、フルンケル症などの一次皮膚感染症、および急性呼吸窮迫症候群へと急速に進行する重症壞死性肺炎と関連する。皮膚、骨、および肺感染におけるPVLの役割が動物モデルにおいて示されている(Brown, et al., 2009 *Clin Microbiol Infect*, 15 (2):156-164; Cremieux, et al., 2009, *PLoS ONE*, 4 (9):e7204; Diep, et al., 2010, *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (12):5587-5592; Tseng, et al., 2009 *PLoS ONE*, 4 (7):e6387; Varshney, et al., 2010, *J Infect Dis* 1;201(1):92-6)。PVL陽性CA-MRSAは、医療施設とも、どの危険因子とも最近接触していない健常な小児または若年成人が罹患し、死亡率は最大75%である(Gillet, et al., 2002, *Lancet*, 359 (9308):753-759; Lina, et al., 1999, *Clin Infect Dis*, 29 (Suppl 1):S11-S16)。

29 (5):1128-1132)。

【 0 0 1 0 】

PCT出願番号PCT/US12/67483は、LukS-PVおよびLukF-PVに対する合理的にデザインされた変異体ワクチンを開示する。これらの変異体でマウスを免疫化することによって黄色ブドウ球菌の致死性敗血症から動物が保護された(Karauzum, et al., 2013, PLoS ONE, 8 (6):e65384)。さらに、LukS-PV変異体に対して產生された抗体によって、黄色ブドウ球菌によって誘導される致死性敗血症からマウスが保護された(Karauzum, et al., 2013, PLoS ONE, 8 (6):e65384)。

【 0 0 1 1 】

黄色ブドウ球菌エンテロトキシン:

10

スーパー抗原(SAg)は、ブドウ球菌エンテロトキシン(SE)および毒素性ショック症候群毒素1(TSST-1)で構成される発熱性毒素の大きなファミリーを構成する(Johns and Khan, 1988, J Bacteriol, 170 (9):4033-4039)。抗原提示細胞によるタンパク質分解処理を受け、T細胞にMHC/ペプチド複合体として提示される従来の抗原とは対照的に、SAgはMHCクラスIIと共にTCRを架橋し、最大30%のT細胞を活性化して(Choi, et al., 1989, Proc Natl Acad Sci US A, 86 (22):8941-8; Marrack and Kappler, 1990, Science, 248 (4959):1)、サイトカインおよびケモカインを大量に放出させ、細胞接着分子の発現ならびに活性化を強化し、T細胞増殖を増やし、最終的に、T細胞アポトーシス/アネルギーを引き起こす。この一連の事象は、発疹、低血圧、発熱、および多系統機能不全を特徴とする命にかかる状態である毒素性ショック症候群(TSS)(Todd, et al., 1978, Lancet, 2 (8100):1116-1118)となり得る(Bohach, et al., 1990, Crit Rev Microbiol, 17 (4):251-272)。抗体はTSSからの保護において重要な役割を果たしている(Bonventre, et al., 1984, J Infect Dis, 150 (5):662-666; Notermans, et al., 1983, J Clin Microbiol, 18 (5):1055-1060)。従って、低応答性T細胞(Mahlknecht, et al., 1996, Hum Immunol, 45 (1):42-4)および/またはT細胞依存性B細胞アポトーシス(Hofer, et al., 1996, Proc Natl Acad Sci U S A, 93 (11):5425-5430)のために、問題を起こしている毒素に対して血清転換しない個体は再発性の発作を経験する可能性が高い。さらに、CD4 T細胞のクローニング除去が他の黄色ブドウ球菌抗原に対する有効な抗体応答を損なう場合がある。さらに、低い非TSS誘導濃度では、SAgは局所的で過剰な炎症応答の誘導によって黄色ブドウ球菌株のビルレンスに影響を及ぼす。MHCクラスII分子との結合が欠損している、弱毒化されたSE変異体およびTSST-1変異体が開発されている。これらの変異体は、スーパー抗原に対する中和抗体を誘導することによって黄色ブドウ球菌感染症ならびに毒素性ショック症候群のワクチンとして働くことができる。

20

30

【発明の概要】

【 0 0 1 2 】

概要

一局面において、本開示は、黄色ブドウ球菌　毒素ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体 (DT);黄色ブドウ球菌フェノール可溶性モジュリンペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体 (PSM);あるいはDTとPSMの融合物を含み得る、組換えペプチドを提供し、ここで、前記ペプチドは、野生型DT、PSM、またはその両方と比べて弱毒化されており、かつ前記ペプチドは、対象に投与された時に抗黄色ブドウ球菌免疫応答を誘発することができる。ある特定の局面において、免疫原性を維持しながら、DT、PSM、またはその両方の界面活性特性が低減されている。ある特定の局面において、ペプチドの -ヘリックス構造を維持しながら、疎水性が低減されている。ある特定の局面において、少なくとも1個の疎水性アミノ酸が、疎水性がさらに低いアミノ酸と交換されている。例えば、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、フェニルアラニン(F)、またはメチオニン(M)がグリシンまたはアラニンと交換されていてもよい。

40

【 0 0 1 3 】

本開示は、アミノ酸配列

MAQDX₅X₆STX₉GDX₁₂X₁₃KWX₁₆X₁₇DTX₂₀NKFTKK (SEQ ID NO: 39)

50

を含むDTであって、 X_5 、 X_6 、 X_9 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{16} 、 X_{17} 、または X_{20} の少なくとも1つがSEQ ID NO:1と比べてアミノ酸置換を含み、 X_5 がイソロイシン(I)、グリシン(G)、またはアラニン(A)であり、 X_6 がI、G、またはAであり、 X_9 がI、G、またはAであり、 X_{12} がロイシン(L)、G、またはVであり、 X_{13} がバリン(V)、G、またはAであり、 X_{16} がI、G、またはAであり、 X_{17} が、I、G、またはAであり、かつ X_{20} がV、G、またはAである、DTを提供する。ある特定の局面において、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:2を含む。ある特定の局面において、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:4を含む。ある特定の局面において、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:3を含む。ある特定の局面において、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:5を含む。

【0014】

10

さらに、本開示は、PSM 1、PSM 2、PSM 3、PSM 4、PSM 1、PSM 2、PSM-mec、または2種以上のPSMの任意の組み合わせでもよいPSMを提供する。

【0015】

本開示は、アミノ酸配列

$X_1GX_3X_4AGX_7X_8KX_{10}X_{11}KSX_{14}X_{15}EQX_{18}TGK$ (SEQ ID NO: 40)

を含むPSM 1変異体であって、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、または X_{18} の少なくとも1つがSEQ ID NO:38と比べてアミノ酸置換を含み、 X_1 がメチオニン(M)、G、またはAであり、 X_3 がI、G、またはAであり、 X_4 がI、G、またはAであり、 X_7 がI、G、またはAであり、 X_8 がI、G、またはAであり、 X_{10} がV、G、またはAであり、 X_{11} がI、G、またはAであり、 X_{14} がL、G、またはAであり、 X_{15} がI、G、またはAであり、かつ X_{18} がF、G、またはAである、PSM 1変異体を提供する。本開示は、アミノ酸配列

$X_1GX_3X_4AGX_7X_8KX_{10}X_{11}KGX_{14}X_{15}EKX_{18}TGK$ (SEQ ID NO: 41)

を含むPSM 2変異体であって、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、または X_{18} の少なくとも1つがSEQ ID NO:12と比べてアミノ酸置換を含み、 X_1 がM、G、またはAであり、 X_3 がI、G、またはAであり、 X_4 がI、G、またはAであり、 X_7 がI、G、またはAであり、 X_8 がI、G、またはAであり、 X_{10} がF、G、またはAであり、 X_{11} がI、G、またはAであり、 X_{14} がL、G、またはAであり、 X_{15} がI、G、またはAであり、かつ X_{18} がF、G、またはAである、PSM 2変異体を提供する。本開示は、アミノ酸配列

$X_1EX_3X_4AKX_7X_8KX_{10}X_{11}KDX_{14}X_{15}GKX_{18}X_{19}GNN$ (SEQ ID NO: 42)

を含むPSM 3変異体であって、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、または X_{19} の少なくとも1つがSEQ ID NO:6と比べてアミノ酸置換を含み、 X_1 がM、G、またはAであり、 X_3 がF、G、またはAであり、 X_4 がV、G、またはAであり、 X_7 がL、G、またはAであり、 X_8 がF、G、またはAであり、 X_{10} がF、G、またはAであり、 X_{11} がF、G、またはAであり、 X_{14} がL、G、またはAであり、 X_{15} がL、G、またはAであり、 X_{18} がF、G、またはAであり、かつ X_{19} がL、G、またはAである、PSM 3変異体を提供する。ある特定の局面において、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:7を含む。ある特定の局面において、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:9を含む。ある特定の局面において、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:8を含む。ある特定の局面において、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:10を含む。ある特定の局面において、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:11を含む。本開示は、アミノ酸配列

$X_1AX_3X_4GTX_7X_8KX_{10}X_{11}KAX_{14}X_{15}DX_{17}X_{18}AK$ (SEQ ID NO: 43)

を含むPSM 4変異体であって、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{17} 、または X_{18} の少なくとも1つがSEQ ID NO:14と比べてアミノ酸置換を含み、 X_1 がM、G、またはAであり、 X_3 がI、G、またはAであり、 X_4 がV、G、またはAであり、 X_7 がI、G、またはAであり、 X_8 がI、G、またはAであり、 X_{10} がI、G、またはAであり、 X_{11} がI、G、またはAであり、 X_{14} がI、G、またはAであり、 X_{15} がI、G、またはAであり、 X_{17} がI、G、またはAであり、かつ X_{18} がF、G、またはAである、PSM 4変異体を提供する。本開示は、アミノ酸配列

MEGX₄X₅NAX₈KDTX₁₂TAAX₁₆NNDGAKLGTSIVNIVENGVGLLSKLF₁₆GF (SEQ ID NO: 44)

を含むPSM 1変異体であって、X₄、X₅、X₈、X₁₂、またはX₁₆の少なくとも1つがSEQ ID NO:15と比べてアミノ酸置換を含み、X₄がL、G、またはAであり、X₅がF、G、またはAであり、X₈がI、G、またはAであり、X₁₂がV、G、またはAであり、かつX₁₆がI、G、またはAである、PSM 1変異体を提供する。本開示は、アミノ酸配列

MTGX₄AEAX₈ANTX₁₂QAAQQHDSVKX₂₃GTSIVDIVANGVGLLGKLF₁₆GF

(SEQ ID NO: 45)

10

を含むPSM 2変異体であって、X₄、X₈、X₁₂、またはX₂₃の少なくとも1つがSEQ ID NO:16と比べてアミノ酸置換を含み、X₄がL、G、またはAであり、X₈がI、G、またはAであり、X₁₂がV、G、またはAであり、かつX₂₃がL、G、またはAである、PSM 2変異体を提供する。

【0016】

さらに、本開示は、任意の順序で並べられた2つ以上の黄色ブドウ球菌由来ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体の融合物を含む多価オリゴペプチドを提供し、ここで、2つ以上の黄色ブドウ球菌由来ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体は、同じでもまたは異なっていてもよく、かつ多価オリゴペプチドは、以下のうちの2つ以上を含む：野生型DT、または変異体DT、例えば、本明細書に記載の変異体DT；野生型PSM、または変異体PSM、例えば、本明細書に記載の変異体PSM；ヘモリジンポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体；ロイコシジンポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体；あるいはスーパー抗原(SAg)ポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体。

【0017】

本明細書において提供される多価オリゴペプチドは、ヘモリジンポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体、例えば、アミノ酸配列SEQ ID NO:46(AT-62)を含んでもよい。本明細書において提供される多価オリゴペプチドは、パントン-バレンタインロイコシジン(PVL)LukS-PVサブユニット、例えば、SEQ ID NO:47と少なくとも90%同一のアミノ酸配列、LukS-Mut9(SEQ ID NO:54)、パントン-バレンタインロイコシジン(PVL)LukF-PVサブユニット、例えば、SEQ ID NO:48と少なくとも90%同一のアミノ酸配列、LukF-Mut-1(SEQ ID NO:55)、あるいはそれらの組み合わせを含んでもよい。本明細書において提供される多価オリゴペプチドは、ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)またはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体、例えば、SEQ ID NO:49と少なくとも90%同一のアミノ酸配列、ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)またはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体、例えば、SEQ ID NO:50と少なくとも90%同一のアミノ酸配列、ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素-1またはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体、例えば、SEQ ID NO:51と少なくとも90%同一のアミノ酸配列、あるいはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。

20

【0018】

本明細書において提供される多価オリゴペプチドは、リンカーを介して結合される2つ以上の黄色ブドウ球菌由来ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体を接続するリンカーを含んでもよい。リンカーは、例えば、グリシン、セリン、アラニン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1個であるが50個以下のアミノ酸を含んでもよい。ある特定の局面において、リンカーは(GGGS)_nまたは(GGGGS)_nを含み、式中、nは1～10の整数である。本開示によって提供される例示的な多価オリゴペプチドには、アミノ酸配列SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、それに限定されるわけではない。

30

【0019】

40

50

本開示によって提供されるペプチドまたはオリゴペプチドはいずれも、Hisタグ、ユビキチンタグ、NusAタグ、キチン結合ドメイン、Bタグ、HSBタグ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、カルモジュリン結合タンパク質(CBP)、ガラクトース結合タンパク質、マルトース結合タンパク質(MBP)、セルロース結合ドメイン(CBD)、アビジン/ストレプトアビジン/Strepタグ、trpE、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、lacZ(-ガラクトシダーゼ)、FLAG(商標)ペプチド、Sタグ、T7タグ、異種ペプチドのいずれかの断片、または異種ペプチドの2つ以上の組み合わせを含むが、これに限定されない異種ペプチドまたはポリペプチドをさらに含んでもよい。ある特定の局面において、異種ペプチドまたはポリペプチドは免疫原、T細胞エピトープ、B細胞エピトープ、それらの断片、またはそれらの組み合わせを含む。

10

【0020】

本開示によって提供されるペプチドまたはオリゴペプチドはいずれも、免疫原性炭水化物、例えば、糖をさらに含んでもよい。免疫原性炭水化物は莢膜多糖でもよく表面多糖でもよい。免疫原性炭水化物は、莢膜多糖(CP)血清型5(CP5)、CP8、ポリ-N-アセチルグルコサミン(PNAG)、ポリ-N-スクシニルグルコサミン(PNSG)、壁テイコ酸(WTA)、リポテイコ酸(LTA)、免疫原性炭水化物のいずれかの断片、および免疫原性炭水化物の2つ以上の組み合わせを含んでもよいが、それに限定されるわけではない。ある特定の局面において、免疫原性炭水化物はオリゴペプチドとコンジュゲートされている。

【0021】

さらに、本開示は、核酸、本明細書において提供される任意のペプチドまたはオリゴペプチド、およびそれらの任意の組み合わせを含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。ある特定の局面において、前記ポリヌクレオチドは、異種核酸、例えば、多価オリゴペプチド、DT、PSM、またはそれらの任意の組み合わせをコードする核酸と機能的に結合したプロモーターをさらに含んでもよい。本開示は、本開示によって提供されるポリヌクレオチドを含むベクター、例えば、プラスミドを提供する。本開示は、本開示によって提供されるベクターを含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は、例えば、細菌、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)、昆虫細胞、哺乳動物細胞、または植物細胞でもよい。

20

【0022】

さらに、本開示は、本明細書において提供される多価オリゴペプチド、DT、PSM、またはそれらの任意の組み合わせを産生する方法であって、請求項61～63のいずれか一項記載の宿主細胞を培養する工程およびオリゴペプチド、DT、PSM、またはそれらの任意の組み合わせを回収する工程を含む方法を提供する。

30

【0023】

さらに、本開示は、本開示によって提供される任意のペプチド、オリゴペプチド、またはそれらの組み合わせ、および担体を含む組成物を提供する。ある特定の局面において、前記組成物は、アラム、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、またはグルコピラノシリルリピドAベースのアジュバントでもよいが、それに限定されるわけではないアジュバントをさらに含む。ある特定の局面において、前記組成物は、細菌抗原、例えば、ポア形成毒素、スーパー抗原、細胞表面タンパク質、細菌抗原のいずれかの断片、または細菌抗原の2つ以上の組み合わせでもよいが、それに限定されるわけではない免疫原をさらに含む。

40

【0024】

さらに、本開示は、黄色ブドウ球菌に対する宿主免疫応答を誘導する方法であって、免疫応答を必要とする対象に、有効量の本開示の組成物を投与する工程を含む方法を提供する。ある特定の局面において、免疫応答は、抗体応答、自然応答、体液性応答、細胞性応答、および免疫応答の2つ以上の組み合わせである。さらに、本開示は、対象におけるブドウ球菌、連鎖球菌、または腸球菌の疾患または感染症を予防または処置する方法であって、ブドウ球菌、連鎖球菌、または腸球菌の疾患または感染症の予防または処置を必要とする対象に本開示の組成物を投与する工程を含む方法を提供する。感染症は、例えば、皮膚、軟部組織、血液、もしくは臓器の限局性感染症もしくは全身感染症でもよく、性質上

50

、自己免疫性でもよい。ある特定の局面において、疾患は呼吸器疾患、例えば、肺炎である。ある特定の局面において、疾患は敗血症である。

[0025]

本開示の方法によって処置される対象は、哺乳動物、例えば、ヒト、ウシ、またはイヌでもよい。前記組成物は、筋肉内注射、皮内注射、腹腔内注射、皮下注射、静脈内注射、経口投与、粘膜投与、鼻腔内投与、または経肺投与によって対象に投与されてもよい。

[0026]

さらに、本開示は、黄色ブドウ球菌感染症に対するワクチンを作製する方法であって、本開示によって提供されるペプチドもしくはオリゴペプチド、またはそれらの任意の組み合わせを単離する工程；およびペプチド、オリゴペプチド、またはそれらの任意の組み合わせをアジュバントと組み合わせる工程を含む方法を提供する。

[本発明1001]

黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) 毒素ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体 (DT)；黄色ブドウ球菌フェノール可溶性モジュリンペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体 (PSM)；あるいはDTとPSMの融合物を含み、野生型DT、PSM、またはその両方と比べて弱毒化されており、かつ対象に投与された時に抗黄色ブドウ球菌免疫応答を誘発することができる、組換えペプチド。

[本発明1002]

免疫原性を維持しながら、DT、PSM、またはその両方の界面活性特性を低減する変異を含む、本発明1001のペプチド。

[本発明1003]

ペプチドの -ヘリックス構造を維持しながら、疎水性が低減されている、本発明1002のペプチド。

[本発明1004]

少なくとも1個の疎水性アミノ酸が、疎水性がさらに低いアミノ酸と交換されている、本発明1001～1003のいずれかのペプチド。

[本発明1005]

疎水性アミノ酸がバリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、フェニルアラニン(F)、またはメチオニン(M)を含む、本発明1004のペプチド。

[本発明1006]

疎水性がさらに低いアミノ酸が、グリシンまたはアラニンを含む、本発明1004または本発明1005のペプチド。

[本発明1007]

DTが、アミノ酸配列
MAQDX₅X₆STX₉GDX₁₂X₁₃KWX₁₆X₁₇DTX₂₀NKFTKK (SEQ ID NO: 39)

を含み、X X₅、X₆、X₉、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、またはX₂₀の少なくとも1つがSEQ ID NO:1と比べてアミノ酸置換を含み、X₅がイソロイシン(I)、グリシン(G)、またはアラニン(A)であり、X₆がI、G、またはAであり、X₉がI、G、またはAであり、X₁₂がロイシン(L)、G、またはVであり、X₁₃がバリン(V)、G、またはAであり、X₁₆がI、G、またはAであり、X₁₇がI、G、またはAであり、かつX₂₀がV、G、またはAである、本発明1001～1006のいずれかのペプチド。

[本発明1008]

X₅、X₆、X₉、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、またはX₂₀からなる群より選択される1個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1007のペプチド。

[本発明1009]

X₁₂がGであるか、またはX₁₂がAである、本発明1008のペプチド。

[本発明1010]

アミノ酸配列SEQ ID NO:2を含む、本発明1008のペプチド。

[本発明1011]

10

20

30

40

50

アミノ酸配列SEQ ID NO:4を含む、本発明1008のペプチド。

[本発明1012]

X₅、X₆、X₉、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、またはX₂₀からなる群より選択される2個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1007のペプチド。

[本発明1013]

X₁₂がGまたはAであり、かつX₂₀がGまたはAである、本発明1012のペプチド。

[本発明1014]

アミノ酸配列SEQ ID NO:3を含む、本発明1012のペプチド。

[本発明1015]

アミノ酸配列SEQ ID NO:5を含む、本発明1012のペプチド。

10

[本発明1016]

PSMがPSM 1、PSM 2、PSM 3、PSM 4、PSM 1、PSM 2、PSM-mec、または2種以上のPSMの任意の組み合わせを含む、本発明1001～1006のいずれかのペプチド。

[本発明1017]

アミノ酸配列

X₁GX₃X₄AGX₇X₈KX₁₀X₁₁KSX₁₄X₁₅EQX₁₈TGK (SEQ ID NO: 40)

を含むPSM 1変異体を含むペプチドであって、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、またはX₁₈の少なくとも1つがSEQ ID NO:38と比べてアミノ酸置換を含み、X₁がメチオニン(M)、G、またはAであり、X₃がI、G、またはAであり、X₄がI、G、またはAであり、X₇がI、G、またはAであり、X₈がI、G、またはAであり、X₁₀がV、G、またはAであり、X₁₁がI、G、またはAであり、X₁₄がL、G、またはAであり、X₁₅がI、G、またはAであり、かつX₁₈がF、G、またはAである、本発明1016のペプチド。

20

[本発明1018]

X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、およびX₁₈からなる群より選択される1個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1017のペプチド。

[本発明1019]

X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、およびX₁₈からなる群より選択される2個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1017のペプチド。

[本発明1020]

アミノ酸配列

30

X₁GX₃X₄AGX₇X₈KX₁₀X₁₁KGX₁₄X₁₅EKX₁₈TGK (SEQ ID NO: 41)

を含むPSM 2変異体を含むペプチドであって、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、またはX₁₈の少なくとも1つがSEQ ID NO:12と比べてアミノ酸置換を含み、X₁がM、G、またはAであり、X₃がI、G、またはAであり、X₄がI、G、またはAであり、X₇がI、G、またはAであり、X₈がI、G、またはAであり、X₁₀がF、G、またはAであり、X₁₁がI、G、またはAであり、X₁₄がL、G、またはAであり、X₁₅がI、G、またはAであり、かつX₁₈がF、G、またはAである、本発明1016のペプチド。

[本発明1021]

X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、およびX₁₈からなる群より選択される1個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1017のペプチド。

40

[本発明1022]

X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、およびX₁₈からなる群より選択される2個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1017のペプチド。

[本発明1023]

アミノ酸配列

X₁EX₃X₄AKX₇X₈KX₁₀X₁₁KDX₁₄X₁₅GKX₁₈X₁₉GNN (SEQ ID NO: 42)

を含むPSM 3変異体を含むペプチドであって、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、X₁₈、またはX₁₉の少なくとも1つがSEQ ID NO:6と比べてアミノ酸置換を含み、X₁がM、G、またはAであり、X₃がF、G、またはAであり、X₄がV、G、またはAであり、X₇がL、G、またはAであり、X₈がF、G、またはAであり、X₁₀がF、G、またはAであり、X₁₁がF、G、また

50

はAであり、 X_{14} がL、G、またはAであり、 X_{15} がL、G、またはAであり、 X_{18} がF、G、またはAであり、かつ X_{19} がL、G、またはAである、本発明1016のペプチド。

[本発明1024]

X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、および X_{19} からなる群より選択される1個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1023のペプチド。

[本発明1025]

アミノ酸配列SEQ ID NO:7を含む、本発明1024のペプチド。

[本発明1026]

アミノ酸配列SEQ ID NO:9を含む、本発明1024のペプチド。

[本発明1027]

X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、および X_{19} からなる群より選択される2個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1023のペプチド。

10

[本発明1028]

アミノ酸配列SEQ ID NO:8を含む、本発明1027のペプチド。

[本発明1029]

アミノ酸配列SEQ ID NO:10を含む、本発明1027のペプチド。

[本発明1030]

アミノ酸配列SEQ ID NO:11を含む、本発明1027のペプチド。

[本発明1031]

アミノ酸配列

$X_1AX_3X_4GTX_7X_8KX_{10}X_{11}KAX_{14}X_{15}DX_{17}X_{18}AK$ (SEQ ID NO: 43)

20

を含むPSM 4変異体を含むペプチドであって、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{17} 、または X_{18} の少なくとも1つがSEQ ID NO:14と比べてアミノ酸置換を含み、 X_1 がM、G、またはAであり、 X_3 がI、G、またはAであり、 X_4 がV、G、またはAであり、 X_7 がI、G、またはAであり、 X_8 がI、G、またはAであり、 X_{10} がI、G、またはAであり、 X_{11} がI、G、またはAであり、 X_{14} がI、G、またはAであり、 X_{15} がI、G、またはAであり、 X_{17} がI、G、またはAであり、かつ X_{18} がF、G、またはAである、本発明1016のペプチド。

[本発明1032]

X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{17} 、および X_{19} からなる群より選択される1個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1031のペプチド。

30

[本発明1033]

X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{17} 、および X_{19} からなる群より選択される2個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1031のペプチド。

[本発明1034]

アミノ酸配列

$MEGX_4X_5NAX_8KDTX_{12}TAAAX_{16}NNDGAKLGTSIVNIVENGVGLLSKLF$ (SEQ ID NO: 44)を含むPSM 1変異体を含むペプチドであって、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{12} 、または X_{16} の少なくとも1つがSEQ ID NO:15と比べてアミノ酸置換を含み、 X_4 がL、G、またはAであり、 X_5 がF、G、またはAであり、 X_8 がI、G、またはAであり、 X_{12} がV、G、またはAであり、かつ X_{16} がI、G、またはAである、本発明1016のペプチド。

40

[本発明1035]

X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{16} からなる群より選択される1個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1034のペプチド。

[本発明1036]

X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{16} からなる群より選択される2個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1034のペプチド。

[本発明1037]

アミノ酸配列

$MTGX_4AEAX_8ANTX_{12}QAAQQHDSVKX_{23}GTSIVDIVANGVGLLGKLF$ (SEQ ID NO: 45)

50

を含むPSM 2変異体を含むペプチドであって、 X_4 、 X_8 、 X_{12} 、または X_{23} の少なくとも1つがSEQ ID NO:16と比べてアミノ酸置換を含み、 X_4 がL、G、またはAであり、 X_8 がI、G、またはAであり、 X_{12} がV、G、またはAであり、かつ X_{23} がL、G、またはAである、本発明1016のペプチド。

[本発明1038]

X_4 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{23} からなる群より選択される1個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1037のペプチド。

[本発明1039]

X_4 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{23} からなる群より選択される2個のアミノ酸がGまたはAである、本発明1037のペプチド。

10

[本発明1040]

任意の順序で並べられた、同じでもまたは異なっていてもよい2つ以上の黄色ブドウ球菌由来ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体の融合物を含み、かつ以下のうちの2つ以上を含む、多価オリゴペプチド：

野生型DT、または本発明1007～1015のいずれかのDT；

野生型PSM、または本発明1016～1039のいずれかのPSM；

ヘモリジンポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体；

ロイコシジンポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体；あるいは

スーパー抗原(SAg)ポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体。

[本発明1041]

20

ヘモリジンポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体が、アミノ酸配列SEQ ID NO:46(AT-62)を含む、本発明1040のオリゴペプチド。

[本発明1042]

ロイコシジンポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体が、SEQ ID NO:47と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むパントン・バレンタインロイコシジン(PVL)LukS-PVサブユニット、LukS-Mut9(SEQ ID NO:54)、SEQ ID NO:48と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むパントン・バレンタインロイコシジン(PVL)LukF-PVサブユニット、LukF-Mut-1(SEQ ID NO:55)、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1040のオリゴペプチド。

[本発明1043]

30

SAgポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体が、ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)、またはSEQ ID NO:49と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むその変異体、断片、変種、もしくは誘導体、ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)、またはSEQ ID NO:50と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むその変異体、断片、変種、もしくは誘導体、ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素-1、またはSEQ ID NO:51と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むその変異体、断片、変種、もしくは誘導体、あるいはそれらの任意の組み合わせを含む、本発明1040のオリゴペプチド。

[本発明1044]

2つ以上の黄色ブドウ球菌由来ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体が、リンカーを介して結合されている、本発明1040～1043のいずれかのオリゴペプチド。

40

[本発明1045]

リンカーが、グリシン、セリン、アラニン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1個であるが50個以下のアミノ酸を含む、本発明1044のオリゴペプチド。

[本発明1046]

リンカーが $(GGGS)_n$ または $(GGGGS)_n$ を含み、nが1～10の整数である、本発明1045のオリゴペプチド。

[本発明1047]

アミノ酸配列SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:

50

26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、またはそれらの任意の組み合わせを含む、本発明1040～1046のいずれかのオリゴペプチド。

[本発明1048]

異種ペプチドまたはポリペプチドをさらに含む、本発明1001～1039のいずれかのペプチドまたは本発明1040～1047のいずれかのオリゴペプチド。

[本発明1049]

異種ペプチドまたはポリペプチドが、Hisタグ、ユビキチンタグ、NusAタグ、キチン結合ドメイン、Bタグ、HSBタグ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、カルモジュリン結合タンパク質(CBP)、ガラクトース結合タンパク質、マルトース結合タンパク質(MBP)、セルロース結合ドメイン(CBD)、アビジン/ストレプトアビジン/Strepタグ、trpE、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、lacZ(-ガラクトシダーゼ)、FLAG(商標)ペプチド、Sタグ、T7タグ、異種ペプチドのいずれかの断片、または異種ペプチドの2つ以上の組み合わせを含む、本発明1048のペプチドまたはオリゴペプチド。

10

[本発明1050]

異種ペプチドまたはポリペプチドが免疫原、T細胞エピトープ、B細胞エピトープ、それらの断片、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1048または本発明1049のペプチドまたはオリゴペプチド。

20

[本発明1051]

免疫原性炭水化物をさらに含む、本発明1001～1039もしくは1048～1050のいずれかのペプチドまたは本発明1040～1047もしくは1048～1050のいずれかのオリゴペプチド。

[本発明1052]

免疫原性炭水化物が糖である、本発明1051のペプチドまたはオリゴペプチド。

[本発明1053]

免疫原性炭水化物が莢膜多糖または表面多糖である、本発明1051または1052のペプチドまたはオリゴペプチド。

30

[本発明1054]

免疫原性炭水化物が、莢膜多糖(CP)血清型5(CP5)、CP8、ポリ-N-アセチルグルコサミン(PNAG)、ポリ-N-スクシニルグルコサミン(PNSG)、壁テイコ酸(WTA)、リポテイコ酸(LTA)、免疫原性炭水化物のいずれかの断片、および免疫原性炭水化物の2つ以上の組み合わせからなる群より選択される、本発明1053のペプチドまたはオリゴペプチド。

[本発明1055]

免疫原性炭水化物がオリゴペプチドとコンジュゲートされている、本発明1051～1054のいずれかのペプチドまたはオリゴペプチド。

[本発明1056]

本発明1001～1039もしくは1048～1055のいずれかのペプチド、本発明1040～1047もしくは1048～1055のいずれかのオリゴペプチド、またはそれらの任意の組み合わせをコードする核酸を含む、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1057]

異種核酸をさらに含む、本発明1056のポリヌクレオチド。

40

[本発明1058]

異種核酸が、多価オリゴペプチド、DT、PSM、またはそれらの任意の組み合わせをコードする核酸と機能的に結合したプロモーターを含む、本発明1057のポリヌクレオチド。

[本発明1059]

本発明1056～1058のいずれかのポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[本発明1060]

プラスミドである、本発明1059のベクター。

[本発明1061]

本発明1059または本発明1060のベクターを含む、宿主細胞。

[本発明1062]

50

細菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞、または植物細胞である、本発明1061の宿主細胞。

[本発明1063]

細菌が大腸菌(Escherichia coli)である、本発明1062の宿主細胞。

[本発明1064]

多価オリゴペプチド、DT、PSM、またはそれらの任意の組み合わせを產生する方法であって、本発明1061～1063のいずれかの宿主細胞を培養する工程およびオリゴペプチド、DT、PSM、またはそれらの任意の組み合わせを回収する工程を含む、方法。

[本発明1065]

本発明1001～1039もしくは1048～1055のいずれかのペプチド、本発明1040～1047もしくは1048～1055のいずれかのオリゴペプチド、またはそれらの任意の組み合わせと、担体とを含む、組成物。

10

[本発明1066]

アジュvantをさらに含む、本発明1065の組成物。

[本発明1067]

アジュvantがアラム、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、またはグルコピラノシリピドAベースのアジュvantである、本発明1066の組成物。

[本発明1068]

免疫原をさらに含む、本発明1065～1067のいずれかの組成物。

[本発明1069]

免疫原が細菌抗原である、本発明1068の組成物。

20

[本発明1070]

細菌抗原が、ポア形成毒素、スーパー抗原、細胞表面タンパク質、細菌抗原のいずれかの断片、および細菌抗原の2つ以上の組み合わせからなる群より選択される、本発明1069の組成物。

[本発明1071]

黄色ブドウ球菌に対する宿主免疫応答を誘導する方法であって、免疫応答を必要とする対象に、有効量の本発明1065～1070のいずれかの組成物を投与する工程を含む、方法。

[本発明1072]

免疫応答が抗体応答である、本発明1071の方法。

30

[本発明1073]

免疫応答が、自然応答、体液性応答、抗体応答、細胞性応答、および免疫応答の2つ以上の組み合わせからなる群より選択される、本発明1071の方法。

[本発明1074]

対象におけるブドウ球菌、連鎖球菌、または腸球菌の疾患または感染症を予防または処置する方法であって、それを必要とする対象に、本発明1065～1070のいずれかの組成物を投与する工程を含む、方法。

[本発明1075]

感染症が、皮膚、軟部組織、血液、もしくは臓器の限局性感染症もしくは全身感染症であるか、または性質上、自己免疫性である、本発明1074の方法。

[本発明1076]

40

疾患が呼吸器疾患である、本発明1074の方法。

[本発明1077]

呼吸器疾患が肺炎である、本発明1076の方法。

[本発明1078]

疾患が敗血症である、本発明1074の方法。

[本発明1079]

対象が動物である、本発明1071～1078のいずれかの方法。

[本発明1080]

対象が脊椎動物である、本発明1079の方法。

[本発明1081]

50

脊椎動物が哺乳動物である、本発明1080の方法。

[本発明1082]

哺乳動物がヒトである、本発明1081の方法。

[本発明1083]

哺乳動物がウシまたはイヌである、本発明1081の方法。

[本発明1084]

筋肉内注射、皮内注射、腹腔内注射、皮下注射、静脈内注射、経口投与、粘膜投与、鼻腔内投与、または経肺投与によって組成物が投与される、本発明1071～1083のいずれかの方法。

[本発明1085]

以下の工程を含む、黄色ブドウ球菌感染症に対するワクチンを作製する方法:

本発明1001～1039もしくは1048～1055のいずれかのペプチド、本発明1040～1047もしくは1048～1055のいずれかのオリゴペプチド、またはそれらの任意の組み合わせを単離する工程; および

ペプチド、オリゴペプチド、またはそれらの任意の組み合わせをアジュバントと組み合わせる工程。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】 A)疎水性表面および親水性表面を示した、PSM-1-4、PSM-1および2、ならびに 毒素のヘリカルホイール図。B) 毒素およびPSM-3の変異戦略。疎水面に保存されているアミノ酸LおよびVをala(A)もしくはGly(G)のいずれかと個々に、または組み合わせて(gly-ala)交換した。各変異体について疎水性および疎水モーメントの予測された減少を示した。極性アミノ酸を赤色(D、E:-電荷)および青色(R、K:+電荷)で表した。極性アミノ酸をピンク色/紫色(Q、N、T)で示した。疎水性アミノ酸を黄色(F、L、I)で示した。疎水性を妨げないアミノ酸を灰色(A)で、またはその芳香族側鎖については緑色(P)で示した。C)疎水性表面および親水性表面を示したPSM-mecのヘリカルホイール図。

【図2】 毒素変異体の毒性アッセイ。12.5 μg/mlの濃度のWTおよび変異体を異なる%のウマRBCの中で試験した。溶血ODを416nmで測定した。

【図3】 DT-ala2変異体はヒト中和抗体に対する結合を保持しながら著しく弱毒化されている(3番目および7番目のバーを比較せよ)。

【図4】 PSM変異体の毒性アッセイ。異なる濃度のWTおよび変異体を異なる5%のウマRBCの中で試験した。溶血ODを416nmで測定した。

【図5】 A)可動性リンカー(G4S、Lと表記した)および6×Hisタグを用いて作製した3種の融合タンパク質の図。B)AT62-DT-PSM構築物の二次構造の図。C)候補ペプチドを大腸菌において発現させ、AT62特異的mAbを用いてウエスタンプロットによって試験した。レーン1および2:AT62_DT_PSM;3および4:AT62_PSM;5および6:AT62_DT(各構築物につき2つのクローリングを示した)。

【図6】 野生型ペプチドまたは完全長 ヘモリジン(HIa)に対する、AT62-PSMおよびAT62-DTで免疫されたマウスの抗体応答。

【図7】 A)可動性リンカー(G4S、Lと表記した)を用いて作製した3種の融合タンパク質:AT-62、rSEB、およびDTの図。

【図8】 SEA、SEB、およびTSST-1に対するヒト抗体をヒトIVIGからアフィニティ精製し、X軸に示したSAgに対する、ヒトPBMCを用いた毒素中和アッセイにおいて使用した。y軸は、X軸上にあるそれぞれのSAgのスーパー抗原活性を50%阻害するのに必要な抗体と毒素のモル比を示す。カクテルという表題のパネルは3種の抗体の組み合わせの活性を示す。モル比が低いほど、それぞれの毒素に対する中和活性が高いことに注意のこと。

【発明を実施するための形態】

【0028】

詳細な説明

I. 定義

10

20

30

40

50

「1つの(a)」または「1つの(an)」実体という用語はその実体の1つまたは複数を指すことに注意しなければならない。例えば、「ポリヌクレオチド」は1つまたは複数のポリヌクレオチドを表していると理解される。従って、「1つの(a)」(または「1つの(an)」)、「1つもしくは複数の」、および「少なくとも1つの」という用語は本明細書において同義に用いることができる。

【0029】

さらに、「および/または」は、本明細書において使用する場合、2つの指定された特徴または成分をそれぞれ、他方と共に、または他方を伴わずに明確に開示すると解釈される。従って、「および/または」という用語は、本明細書において「Aおよび/またはB」などの句において用いられる時、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」(のみ)、および「B」(のみ)を含むことが意図される。同様に、「および/または」という用語は、「A、B、および/またはC」などの句において用いられる時、以下の態様:A、B、およびC;A、B、またはC;AまたはC;AまたはB;BまたはC;AおよびB;BおよびC;A(のみ);B(のみ);ならびにC(のみ)をそれぞれ包含することが意図される。

10

【0030】

特に定義のない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は全て、本開示が関連する当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press;およびOxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressは、本開示で使用する用語の多くの総合的な辞書を当業者に提供する。

20

【0031】

単位、接頭辞、および記号は国際単位系(SI)に認められている形式で表される。数の範囲は、その範囲を規定している数字を含む。特に定めのない限り、アミノ酸配列は左から右にアミノからカルボキシ方向に書かれる。本明細書において提供される標題は、本明細書全体を参照することによって持つことができる本開示の様々な局面または態様の限定ではない。従って、すぐ下で定義される用語は、本明細書全体を参照することによってさらに詳細に定義される。

【0032】

30

態様が「を含む(comprising)」という言葉を用いて説明されている場合は必ず、「からなる(consisting of)」および/または「から本質的になる(consisting essentially of)」で説明される類似の態様も提供される。

【0033】

アミノ酸は、IUPAC-IUB生化学命名法委員会(Biochemical Nomenclature Commission)により勧告された一般に知られている三文字記号または一文字記号によって本明細書で言及される。同様に、ヌクレオチドは、一般に認められている一文字暗号によって言及される。

【0034】

「核酸」または「核酸断片」という用語は、ポリヌクレオチドまたは構築物に存在する、いずれか1種または複数種の核酸セグメント、例えば、DNA断片またはRNA断片を指す。本開示の2種以上の核酸が单一のポリヌクレオチド構築物、例えば、单一のプラスミドに存在してもよく、別々の(非同一の)ポリヌクレオチド構築物、例えば、別々のプラスミドに存在してもよい。さらに、任意の核酸または核酸断片が单一のポリペプチド、例えば、单一の抗原、サイトカイン、または調節ポリペプチドをコードしてもよく、複数種のポリペプチドをコードしてもよい。例えば、核酸が2種以上のポリペプチドをコードしてもよい。さらに、核酸が調節エレメント、例えば、プロモーターまたは転写ターミネーターをコードしてもよく、ポリペプチドまたはタンパク質の特殊なエレメントまたはモチーフ、例えば、分泌シグナルペプチドまたは機能ドメインをコードしてもよい。

40

【0035】

50

「ポリヌクレオチド」という用語は、単数の核酸または核酸断片ならびに複数の核酸または核酸断片を包含することが意図され、ポリヌクレオチドを含む、単離された分子または構築物、例えば、ウイルスゲノム(例えば、非感染性ウイルスゲノム)、メッセンジャーRNA(mRNA)、プラスミドDNA(pDNA)、またはpDNA誘導体(例えば、(Darquet, A-M et al., Gene Therapy 4:1341-1349, 1997)に記載のミニサークル)を指す。ポリヌクレオチドは、直鎖型(例えば、mRNA)、環状型(例えば、プラスミド)、または分岐型、ならびに二本鎖型または一本鎖型で提供されてもよい。ポリヌクレオチドは従来型のホスホジエステル結合を含んでもよく、非従来型の結合(例えば、アミド結合、例えば、ペプチド核酸(PNA)に見られるアミド結合)を含んでもよい。

【0036】

10

本明細書で使用する「ポリペプチド」という用語は、単数の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することが意図され、2つ以上のアミノ酸からなる任意の鎖を含む。したがって、本明細書で使用する「ペプチド」、「オリゴペプチド」、「ジペプチド」、「トリペプチド」、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、「アミノ酸配列」、「ペプチドサブユニット」、または2つ以上のアミノ酸からなる鎖をいうために用いられる他の任意の用語は、(この用語がそれぞれ、さらに具体的な意味を有する場合があっても)「ポリペプチド」の定義に含まれる。「ポリペプチド」という用語は、これらの任意の用語の代わりに、またはこれらの任意の用語と同義に使用することができる。これらの用語は、翻訳後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ロック基による誘導体化、タンパク質切断、または非天然アミノ酸による修飾を受けたポリペプチドをさらに含む。

【0037】

20

「毒素」または「DT」という用語は、本明細書で使用する時、かつ特に定めのない限り、野生型毒素ペプチド、ならびにその変異体、断片、変種、または誘導体を包含する。「フェノール可溶性モジュリン」、「PSM」、PSM 1、PSM 2、PSM 3、PSM 4、PSM 1、PSM 2、およびPSM-mecという用語は、本明細書で使用する時、かつ特に定めのない限り、野生型フェノール可溶性モジュリンペプチド、ならびにその変異体、断片、変種、または誘導体を包含する。「対応する野生型DT」または「対応する野生型PSM」とは、変異体ペプチドサブユニットが得られた天然のDTまたはPSMペプチドを意味する。

【0038】

30

本明細書で使用する「多価オリゴペプチド」という用語は、任意の順序で1本のポリペプチドとして一緒に融合した2つ以上のブドウ球菌タンパク質、例えば、DT、PSM、ヘモリジン、ロイコシジン、スーパー抗原、またはそれらの任意の断片、変種、誘導体、もしくは変異体を含む融合タンパク質を指す。オリゴペプチドは、本明細書の他の場所に記載の他の異種ペプチドを含んでもよい。本明細書において提供される多価オリゴペプチドに含めるための他のペプチドには、本明細書の他の場所またはPCT公開番号WO2012/109167A1およびWO2013/082558A1に記載の様々な他のブドウ球菌毒素またはその変異体断片、変種、もしくは誘導体が含まれる。WO2012/109167A1およびWO2013/082558A1はどちらもその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0039】

40

本開示は、野生型または変異体のDT、PSM、またはそれらの任意の組み合わせを含み得るが、しかし必ずしも含むとは限らない、特定のDTおよびPSMペプチドならびに多価オリゴペプチドを提供する。本開示によって提供されるペプチドおよびオリゴペプチドを集めたものは、本明細書において、ひとまとめに「多価オリゴペプチド、DT、および/もしくはPSM」、または「多価オリゴペプチド、DT、PSM、もしくはそれらの任意の組み合わせ」と呼ばれる。これらの集合的な言及は、本明細書において提供されるいづれか1つのペプチドもしくはオリゴペプチド、または本明細書において提供される2つ、3つ、4つ、もしくはそれより多いペプチドもしくはオリゴペプチドを含むが、それに限定されるわけではないことを意味する。

【0040】

50

「断片」、「変異体」、「誘導体」、または「変種」という用語は本開示の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMについて言及している時、供給源タンパク質の免疫原性または抗原性の少なくとも一部を保持している任意のポリペプチドを含む。本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMの断片には、タンパク質分解断片、欠失断片、または発現、精製、および/もしくは動物への投与の間に高溶解性を示す断片が含まれる。本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMの断片には、対象に送達された時に低い病原性または毒性を示すタンパク質分解断片または欠失断片がさらに含まれる。ポリペプチド断片には、直鎖エピトープならびに三次元エピトープを含む供給源ポリペプチドの抗原性エピトープまたは免疫原性エピトープを含む任意のポリペプチド部分がさらに含まれる。

10

【0041】

ポリペプチドの「エピトープ断片」は、エピトープを含有するポリペプチド部分である。「エピトープ断片」は1つまたは複数のエピトープの他にアミノ酸配列を含有してもよいが、1つまたは複数のエピトープの他にアミノ酸配列を含有する必要はない。

【0042】

本明細書で使用する「変種」という用語は、アミノ酸の置換、欠失、挿入、および/または改変により、列挙されたポリペプチドと異なるポリペプチドを指す。非天然変種は、当技術分野において公知の変異誘発法を用いて产生することができる。一部の態様において、変種ポリペプチドは特定された配列と3個のアミノ酸またはそれより少ないアミノ酸の置換、欠失、または付加だけ異なる。このような変種は、一般的に、ポリペプチド配列を改変し、例えば、本明細書に記載の代表的な手順を用いて、改変されたポリペプチドの抗原性または病原性を評価することによって特定することができる。一部の態様において、多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMの変種は野生型複合体より毒性の低いタンパク質複合体を形成する。

20

【0043】

本明細書において開示されるポリペプチド変種は、特定されたポリペプチドと少なくとも約85%、90%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.9%の配列同一性を示す。変種ポリペプチドは保存的または非保存的なアミノ酸の置換、欠失、または挿入を含んでもよい。変種は、本明細書の他の場所に記載の特定の変異を含む、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、またはそれより多いアミノ酸置換を除いて様々な野生型ブドウ球菌タンパク質と同一の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを含んでもよい。ここで、置換は複合体の毒性を対応する野生型タンパク質複合体より低くする。本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMの誘導体は、天然ポリペプチドに見られない、さらなる特徴を示すように変えられているポリペプチドである。例には融合タンパク質が含まれる。類似体は、別の型の本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMである。一例は、プロタンパク質の切断によって活性化されて、活性のある成熟ポリペプチドを生じることができるプロタンパク質である。

30

【0044】

変種はまた、もしくは代わりに他の改変を含有してもよい。例えば、この改変によって、ポリペプチドを、異種アミノ酸配列に、例えば、翻訳と同時に、または翻訳後にタンパク質移行を誘導する、タンパク質のN末端にあるシグナル(またはリーダー)配列に、コンジュゲートまたは結合、例えば融合することができる。また、ポリペプチドを、ポリペプチドの合成、精製、もしくは特定を容易にするために(例えば、6-His)、またはポリペプチドと固体支持体との結合を強化するためにリンカーもしくは他の配列にコンジュゲートすることができる、またはリンカーもしくは他の配列と結合した状態で产生することができる。例えば、ポリペプチドを免疫グロブリンFc領域にコンジュゲートまたは結合することができる。また、ポリペプチドを、ポリペプチドに対する免疫応答を付与または調節する配列(例えば、T細胞エピトープ、B細胞エピトープ、サイトカイン、ケモカインなど)ならびに/または抗原提示細胞もしくは他の免疫系細胞によるポリペプチドの取り込みおよ

40

50

び/もしくは処理を強化する配列にコンジュゲートまたは結合することができる。また、ポリペプチドを、ブドウ球菌属(*Staphylococcus*)の種ならびに/または他の細菌および/もしくは他のウイルスに由来する他のポリペプチド/エピトープにコンジュゲートまたは結合して、単独で、または様々なアジュバントと組み合わせて他の病原性生物に対する防御免疫を誘発することができるハイブリッド免疫原性タンパク質を生成することができる。また、ポリペプチドは、アルブミン、免疫グロブリンFc領域、ポリエチレングリコール(PEG)などがあるが、これに限定されない、さらに大きな安定性を付与する、または半減期を改善する部分にコンジュゲートまたは結合することができる。また、ポリペプチドを、ブドウ球菌属の種ならびに/または他の細菌および/もしくは他のウイルスに由来する部分(例えば、免疫原性炭水化物、例えば、莢膜多糖または表面多糖)にコンジュゲートまたは結合して、単独で、または1種もしくは複数種のアジュバントと組み合わせて防御免疫を強化する、および/または防御免疫の作用を助けることができる改変された免疫原性タンパク質を生成することができる。ある特定の態様において、本明細書に記載のポリペプチドは免疫原性炭水化物をさらに含む。1つの態様において、免疫原性炭水化物は糖である。

【 0 0 4 5 】

本明細書全体を通して「糖」という用語は多糖またはオリゴ糖を示してもよく、その両方を含む。本開示の多糖は細菌から単離されてもよく、公知の方法によってサイズ変更されてもよい。例えば、完全長多糖は「サイズ変更」されてもよい(例えば、完全長多糖のサイズは、例えば、酸加水分解処理、過酸化水素処理、EMULSIFLEX(登録商標)によるサイズ変更の後に過酸化水素処理を行ってオリゴ糖断片または顯微溶液化をもたらすなどの様々な方法によって小さくされてもよい)。多糖試料中での粘度を小さくするために、および/またはコンジュゲートされた生成物の濾過性を改善するために多糖をサイズ変更することができる。オリゴ糖は少数の反復単位(例えば、5~30反復単位)を有し、典型的には、加水分解多糖である。本開示の多糖は組換えにより產生されてもよい。

【 0 0 4 6 】

黄色ブドウ球菌莢膜抗原は表面に結合し、抗原特異性が限定され、臨床分離株の間で高度に保存されている。1つの態様において、本開示の免疫原性炭水化物は黄色ブドウ球菌の莢膜多糖(CP)である。1つの態様において、莢膜糖は完全長多糖でもよい。しかしながら、他の態様において、莢膜糖は1つのオリゴ糖単位でもよく、反復オリゴ糖単位からなる天然の長さより短い糖鎖でもよい。ブドウ球菌分離株の血清型検査から、いくつかの推定莢膜血清型が明らかになっている。臨床感染からの分離株の中で5型および8型(CP5およびCP8)が最も蔓延しており、それぞれ、ヒトから回収される分離株の約25%および50%を占めている(O'Riordan and Lee, Clinical Microbiology Reviews, January 2004, p.218-234, Vol.17, No.1; Poutrel and Sutra, J Clin Microbiol. 1993 Feb;31(2):467-9)。同じ分離株が家禽類、雌ウシ、ウマ、およびブタからも回収された(Tollersrud et al., J Clin Microbiol. 2000 Aug;38(8):2998-3003; Cunnion KM et al., Infect Immun. 2001 Nov;69(11):6796-803)。WuおよびPark(Wu and Park. 1971. J. Bacteriol. 108:874-884)によって以前に述べられたように、プロトタイプReynolds株から精製された5型莢膜多糖およびプロトタイプBecker株から精製された8型莢膜多糖は互いに、およびT株によって作られた莢膜と構造がよく似ている。5型は構造(4)-3-O-Ac- -D-ManNAcA-(1 4)- -L-FucNAc-(1 3)- -D-FucNAc-(1)_nを有し(Fournier, J. M., et al., 1987. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138:561-567; Moreau, M., et al., 1990. Carbohydr. Res. 201:285-297)、8型は構造(3)-4-O-Ac- -D-ManNAcA-(1 3)- -L-FucNAc-(1 3)- -D-FucNAc-(1)_nを有する(Founder, J. M., et al., 1984. Infect. Immun. 45:87-93)。5型および8型多糖の違いは糖間の結合およびマンノサミヌロン酸残基のO-アセチル化部位の点しかないが、これらは血清学的に別個のものである。

【 0 0 4 7 】

解毒した組換え緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)エキソトキシンA担体とコンジュゲートした5型CPおよび8型CPはマウスモデルにおいて免疫原性および防御性が高いことが示さ

10

20

30

40

50

れた(A Fattom et al., Infect Immun. 1993 March; 61(3):1023-1032; A Fattom et al., Infect Immun. 1996 May; 64(5):1659-1665)。免疫動物からのCP5特異的抗体の受動伝達はマウスにおいて全身感染に対する防御を誘導し(Lee et al., Infect Immun. 1997 October; 65(10):4146-4151)、血清型5黄色ブドウ球菌に曝露したラットにおいて心内膜炎に対する防御を誘導した(Shinefield H et al., N Engl J Med. 2002 Feb 14;346(7):491-6)。マウスにおいて黄色ブドウ球菌曝露に対して75%の防御を提供する二価CP5・CP8コンジュゲートワクチン(StaphVAX(登録商標), Nabi Biopharmaceutical)が開発された。このワクチンはヒトにおいて試験された(Fattom AI et al., Vaccine. 2004 Feb 17;22(7):880-7; Maira-Litran T et al., Infect Immun. 2005 Oct;73(10):6752-62)。ある特定の態様において、本開示の組換えペプチドまたは多価オリゴペプチドは免疫原性炭水化物(例えば、CP5、CP8、CP断片、またはそれらの組み合わせ)と共に、またはコンジュゲートした状態で組み合わされる。10

【 0 0 4 8 】

ポリ-N-アセチルグルコサミン(PNAG)(McKenney D. et al., Science. 1999 May 28;284(5419):1523-7)またはポリ-N-スクシニルグルコサミン(PNSG)(Tuchscherer LP. et al., Infect Immun. 2008 Dec;76(12):5738-44. Epub 2008 Sep 22)は両方とも黄色ブドウ球菌表面炭水化物であり、これらによる免疫化は、実験動物モデルにおける黄色ブドウ球菌曝露に対して少なくとも部分的な防御をもたらすことが示されている。PNSGは、生体材料へのコアグラーゼ陰性ブドウ球菌(CoNS)の付着を媒介するS.エピデルミデス(S.epidermidis)莢膜多糖/アドヘシン(PS/A)の化学型として特定され、PS/Aを発現するCoNS株の莢膜として役立ち、防御抗体の標的である。PNSGも黄色ブドウ球菌によって作られ、環境により調節され、インビボで発現する表面多糖であり、同様に防御免疫の標的として役立つ(McKenney D. et al., J. Biotechnol. 2000 Sept 29;83(1-2):37-44)。本開示のある特定の態様において、免疫原性炭水化物は、表面多糖、例えば、ポリ-N-アセチルグルコサミン(PNAG)、ポリ-N-スクシニルグルコサミン(PNSG)、表面多糖断片、またはそれらの組み合わせである。20

【 0 0 4 9 】

壁テイコ酸(WTA)は、黄色ブドウ球菌株上に広範囲に発現している、よく目につく多糖である(Neuhaus, F.C. and J. Baddiley, Microbiol Mol Biol Rev, 2003. 67(4):686-723)。WTAに対する抗血清は単独で、および補体の存在下でオプソニン作用性死滅を誘導することが示されている((Thakker, M., et al., Infect Immun, 1998. 66(11):183-9)およびFattom et al., 米国特許第7,754,225号)。WTAはペプチドグリカンと連結し、細胞壁から突き出て、無莢膜(non-encapsulated)株、例えば、米国における市中感染性MRSA(CA MRSA)の大部分の症例の原因であるUSA300に目立つように露出している(Hidron, A.I., et al., Lancet Infect Dis, 2009. 9(6):384-92)。30

【 0 0 5 0 】

リポテイコ酸(LTA)はグラム陽性細菌、例えば、黄色ブドウ球菌の細胞壁の構成要素である。LTAは、非特異的に膜リン脂質を介して標的細胞に、または特異的にCD14およびToll様受容体に結合し得る。標的に結合したLTAは循環抗体と相互作用し、補体力スケードを活性化して受動免疫死滅現象を誘導することができる。標的に結合したLTAはまた、好中球およびマクロファージからの活性酸素種および活性窒素種、酸加水分解酵素、高カチオン性プロテイナーゼ、殺菌性カチオン性ペプチド、増殖因子、ならびに細胞傷害性サイトカインの放出も誘発する。これらは相乗作用して細胞損傷を増幅し得る。40

【 0 0 5 1 】

ある特定の態様において、表面多糖は本開示のポリペプチドと組み合わされる、またはコンジュゲートされる。ある特定の態様において、表面多糖は、例えば、ポリ-N-アセチルグルコサミン(PNAG)、ポリ-N-スクシニルグルコサミン(PNSG)、壁テイコ酸(WTA)、リポテイコ酸(LPA)、前記表面多糖のいずれかの断片、または前記表面多糖の2種以上の組み合わせである。

【 0 0 5 2 】

50

本明細書で使用する「配列同一性」という用語は、2つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係または2つ以上のポリペプチド配列間の関係を指す。ある配列にある位置が比較配列の対応する位置において同じ核酸塩基またはアミノ酸で占められている場合、この配列はその位置において「同一」だと言われる。「配列同一性」のパーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸が両配列において生じた位置の数を求めて「同一の」位置の数を得ることによって計算される。次いで、「同一の」位置の数を比較ウィンドウにある位置の総数で割り、これに100を掛けて「配列同一性」のパーセンテージを得る。「配列同一性」のパーセンテージは、比較ウィンドウおよび別の分離株に由来する相同ポリペプチドにわたって2つの最適にアラインメントされた配列を比較することによって求められる。
 比較のために配列を最適にアラインメントするために、比較ウィンドウにあるポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の一部は、参照配列が一定に保たれている間に、ギャップと呼ばれる付加または欠失を含んでもよい。最適アラインメントは、ギャップがあつても、参照配列間および比較配列間で可能性のある最大数の「同一の」位置を生じるアラインメントである。2つの配列間の「配列同一性」のパーセンテージは、2004年9月1日の時点で米国立バイオテクノロジー情報センターから利用可能なプログラム「BLAST2配列」バージョンを用いて求めることができる。このプログラムは、プログラムBLASTN(ヌクレオチド配列比較用)およびBLASTP(ポリペプチド配列比較用)を組み込んでいる。これらのプログラムは、KarlinおよびAltschul(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12):5873-5877, 1993)のアルゴリズムに基づいている。「BLAST2配列」を利用した時に、ワードサイズ(word size)(3)、オープンギャップペナルティ(open gap penalty)(11)、エクステンションギャップペナルティ(extension gap penalty)(1)、ギャップドロップオフ(gap drop-off)(50)、期待値(10)、およびマトリックスオプション(matrix option)を含むが、これに限定されない他の任意の必要なパラメータには、2004年9月1日の時点でデフォルトパラメータであったパラメータを使用することができる。

【0053】

本明細書で使用する「エピトープ」という用語は、動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトにおいて抗原活性または免疫原活性を有するポリペプチド部分を指す。本明細書で使用する「免疫原性エピトープ」は、当技術分野において公知の任意の方法によって決定された時に、動物において免疫応答を誘発するタンパク質部分であると定義される。本明細書で使用する「抗原性エピトープ」という用語は、当技術分野において周知の任意の方法によって決定された時に、抗体またはT細胞受容体がその抗原に免疫特異的に結合することができるタンパク質部分であると定義される。免疫特異的結合は非特異的結合を排除するが、必ずしも、他の抗原との交差反応性を排除するとは限らない。全ての免疫原性エピトープは抗原性であるが、抗原性エピトープは免疫原性である必要はない。

【0054】

本明細書で使用する「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸部分である。「停止コドン」(TAG、TGA、またはTAA)はアミノ酸に翻訳されないが、コード領域の一部とみなされる場合がある。だが、いかなる隣接配列も、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーターなどはコード領域外にある。

【0055】

「コドン最適化」という用語は、関心対象の宿主の細胞における発現増強のために、天然配列のうちの少なくとも1つのコドン、複数のコドン、またはかなりの数のコドンを宿主遺伝子内でさらに高い頻度で、または最も高い頻度で用いられるコドンで置換することによって核酸配列を改変することと本明細書において定義される。様々な種が、ある特定のアミノ酸のある特定のコドンに特有のバイアスを示す。

【0056】

「組成物」または「薬学的組成物」という用語は、例えば、アジュvantまたは薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と共に、黄色ブドウ球菌感染症に既に罹患している個体または黄色ブドウ球菌感染に対する免疫化を必要とする個体に投与される、本開示の免疫原性ポリペプチドを含有する組成物を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0057】

「薬学的に許容される」という用語は、適切な医学的判断の範囲内にあり、過度の毒性または他の合併症を引き起こすことなくヒトおよび動物の組織と接触させるのに適し、妥当なベネフィット/リスク比に見合った組成物を指す。一部の態様において、本明細書に記載のポリペプチド、ポリヌクレオチド、組成物、およびワクチンは薬学的に許容される。

【0058】

「有効量」とは、単回投与または一連の投与の一部として個体に投与することが処置または予防に有効な量である。例えば、投与によって、例えば、感染性黄色ブドウ球菌に感染または曝露した後に確かめられた時に、未処置個体と比べて、菌血症の軽減、毒血症の軽減、敗血症の軽減、症状の軽減、免疫応答の増大、免疫応答の調節、または回復までに必要な時間の短縮を含むが、これに限定されない、黄色ブドウ球菌感染の発生率の低下が認められた時に、量は有効である。この量は、処置しようとする個体の健康状態および身体状態、処置しようとする個体の分類群(例えば、ヒト、非ヒト靈長類、靈長類など)、個体の免疫系の応答能力、望ましい処置または防御の程度、ワクチンの処方、医師による医学的状態の評価、ならびに他の関連要因に応じて変化する。有効量は、日常的な試験によって決定することができる比較的広い範囲の中に入ると予想される。典型的に、単一用量は、約10 μg ~ 10mg/kg体重の精製されたポリペプチド、または同等量の本明細書に記載の組換えにより発現された多価オリゴペプチド、DT、および/もしくはPSMを提供するのに十分な、改変されたキャリア生物もしくはウイルスまたはその断片または残遺物の量である。

10

。「ペプチドワクチン」または「サブユニットワクチン」という用語は、動物に投与された時に、ブドウ球菌(例えば、黄色ブドウ球菌)感染に対する免疫応答の刺激において有用な1種または複数種の本明細書に記載のポリペプチドを含む組成物を指す。

20

【0059】

「対象」という用語は、診断、予後、免疫化、または療法が望まれる任意の対象、特に、哺乳動物対象を意味する。哺乳動物対象には、ヒト、飼育動物、家畜、動物園の動物、例えば、クマ、スポーツ動物、ペット動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、クマ、雌ウシ;靈長類、例えば、類人猿、サル、オランウータン、およびチンパンジー;イヌ科の動物、例えば、イヌおよびオオカミ;ネコ科の動物、例えば、ネコ、ライオン、およびトラ;ウマ科の動物、例えば、ウマ、ロバ、およびシマウマ;食用動物、例えば、雌ウシ、ブタ、およびヒツジ;有蹄類、例えば、シカおよびキリン;げっ歯類、例えば、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットなどが含まれるが、これに限定されない。1つの態様において、対象はヒト対象である。

30

【0060】

本明細書で使用する「それを必要とする対象」は、ブドウ球菌(例えば、黄色ブドウ球菌)疾患の症状を処置する、すなわち、予防する、治癒させる、遅らせる、もしくはその重篤度を下げる、または特定の期間にわたってブドウ球菌によって引き起こされる疾患を悪化させないこと、あるいはその両方が望ましい個体を指す。

【0061】

本明細書で使用する「プライミング(priming)」または「プライマリ(primary)」および「ブースト(boost)」または「ブースティング(boosting)」という用語はそれぞれ、すなわち、これらの用語が免疫学において通常有する定義に従って、初回免疫化およびその後の免疫化を指す。しかしながら、ある特定の態様では、例えば、プライミング成分およびブースティング成分が1つの製剤の中にある態様では、「プライム(prime)」組成物および「ブースト(boost)」組成物が両方とも同時に投与されるので初回免疫化およびその後の免疫化は必要でない。

40

【0062】

II. 毒素およびフェノール可溶性モジュリンペプチドならびに多価オリゴペプチド

本開示は、ブドウ球菌の毒素およびスーパー抗原に由来するペプチドサブユニットで構成される組換えオリゴペプチド融合タンパク質を提供する。ある特定の態様において、本

50

明細書において提供されるオリゴペプチドは、変異体もしくは野生型の 毒素ペプチド(DT)または変異体もしくは野生型のフェノール可溶性モジュリンペプチド(PSM)を含む。野生型DTおよび6種のPSMを表1に示した。

【 0 0 6 3 】

(表1) 野生型DTおよびPSM

| | 配列 | SEQ ID NO |
|-------------------|--|-----------|
| δ 毒素 WT | MAQDIISTIGDLVKWIIDTVNKFTKK | 1 |
| PSM α 1 WT | MGIIAGIIKVIKSLIEQFTGK | 38 |
| PSM α 2 WT | MGIIAGIIKFIKGLIEKFTGK | 12 |
| PSM α 3 WT | MEFVAKLFFKDLLGKFLGNN | 13 |
| PSM α 4 WT | MAIVGTTIKIIKAIIDIFAK | 14 |
| PSM β 1 WT | MEGLFNAIKDTVTAAINNDGAKLGTSIVNIVENGVGLL SKLFGF | 15 |
| PSM β 2 WT | MTGLAEAIANTVQAAQQHDSVKLGTSIVDIVANGVGLL GKLFGF | 16 |
| PSM-mec | MDFTGVITSI IDLIKTCIQA FG | 52 |

【 0 0 6 4 】

一局面において、本開示は、ブドウ球菌属(*Staphylococcus*)の 毒素ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体 (DT); ブドウ球菌属のフェノール可溶性モジュリンペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体 (PSM); あるいはDTとPSMの融合物を含む、組換えペプチドを提供する。本明細書において提供されるDTまたはPSMは、抗原性を保持しながら、毒性、例えば、界面活性特性を低減するように変異されていてもよい。従って、本開示によって提供される組換えDT、PSM、またはその両方は、野生型DT、PSM、またはその両方と比べて弱毒化されていてもよいが、ペプチドは対象に投与された時に抗黄色ブドウ球菌免疫応答を誘発することができる。DTおよびPSMの抗原性はペプチドの -ヘリックス構造の維持に依拠する場合があり、界面活性特性は疎水面を有する毒素に依拠する場合がある。従って、ある特定の局面において、本開示は、ペプチド疎水性が野生型ペプチドと比べて低減されている、DT、PSM、またはその両方を提供する。例えば、疎水性は、毒素の疎水面を構成する少なくとも1個、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、またはそれより多い疎水性アミノ酸を、疎水性がさらに低いアミノ酸と交換することによって低減されてもよい。疎水性アミノ酸には、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、フェニルアラニン(F)、およびメチオニン(M)が含まれるが、これに限定されない。ある特定の局面において、疎水性アミノ酸は、ペプチドの ヘリックス構造を変えると予想されない小さなアミノ酸と交換される。例えば、疎水性アミノ酸はアラニン(A)またはグリシン(G)と交換されてもよい。

【 0 0 6 5 】

一局面において、本開示は、アミノ酸配列:

MAQDX₅X₆STX₉GDX₁₂X₁₃KWX₁₆X₁₇DTX₂₀NKFTKK (SEQ ID NO: 39)

を含む変異DTを含む、組換えペプチドを提供する。この局面によれば、X₅、X₆、X₉、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、またはX₂₀の少なくとも1つはSEQ ID NO:1と比べてアミノ酸置換を含む。従って、この局面によれば、DTは野生型DTでない。この局面によれば、X₅はイソロイシ

10

20

30

40

50

ン(I)、グリシン(G)、またはアラニン(A)であり得、 X_6 はI、G、またはAであり得、 X_9 はI、G、またはAであり得、 X_{12} はロイシン(L)、G、またはVであり得、 X_{13} はバリン(V)、G、またはAであり得、 X_{16} はI、G、またはAであり得、 X_{17} はI、G、またはAであり得、かつ X_{20} はV、G、またはAであり得る。ある特定の局面において、 X_5 、 X_6 、 X_9 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{16} 、 X_{17} 、または X_{20} の中から1個だけのアミノ酸がSEQ ID NO:1と比べて置換されている。従って、 X_5 、 X_6 、 X_9 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{16} 、 X_{17} 、または X_{20} のうち1つだけがGまたはAである。ある特定の局面において、 X_{12} が唯一の置換アミノ酸である。この局面によれば、 X_{12} はGであり得、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:2を含む。または、 X_{12} はAであり得、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:4を含む。別の局面において、 X_5 、 X_6 、 X_9 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{16} 、 X_{17} 、または X_{20} の中から2個のアミノ酸がSEQ ID NO:2と比べて置換されている。例えば、 X_{12} および X_{20} が置換されていてもよく、GまたはAであり得る。従って、ある特定の局面において、 X_{12} は独立してGまたはAであり得、かつ X_{20} は独立してGまたはAであり得る。例えば、DTはアミノ酸配列SEQ ID NO:3またはアミノ酸配列SEQ ID NO:5を含んでもよい。1個の置換または複数の置換である他のアミノ酸置換は、本開示に従って当業者により容易に視覚化および構築することができる。

【0066】

別の局面において、本開示は、変異PSM、例えば、変異体PSM 1、PSM 2、PSM 3、PSM 4、PSM 1、PSM 2、PSM-mec、または2種以上のPSMの任意の組み合わせを含む、組換えペプチドを提供する。

【0067】

一局面において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：

$X_1GX_3X_4AGX_7X_8KX_{10}X_{11}KSX_{14}X_{15}EQX_{18}TGK$ (SEQ ID NO: 40)

を含む、変異体PSM 1を含む。この局面によれば、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、または X_{18} の少なくとも1つはSEQ ID NO:38と比べてアミノ酸置換を含む。従って、この局面によれば、PSM 1は野生型PSM 1でない。この局面によれば、 X_1 はメチオニン(M)、G、またはAであり得、 X_3 はI、G、またはAであり得、 X_4 はI、G、またはAであり得、 X_7 はI、G、またはAであり得、 X_8 はI、G、またはAであり得、 X_{10} はV、G、またはAであり得、 X_{11} はI、G、またはAであり得、 X_{14} はL、G、またはAであり得、 X_{15} はI、G、またはAであり得、かつ X_{18} はF、G、またはAであり得る。ある特定の局面において、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、および X_{15} の中から1個だけのアミノ酸がSEQ ID NO:38と比べて置換されている。従って、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、および X_{18} のうち1つだけがGまたはAである。別の局面において、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、および X_{18} の中から2個のアミノ酸がSEQ ID NO:38と比べて置換されている。1個の置換または複数の置換であるPSM 1における様々なアミノ酸置換は、本開示に従って当業者により容易に視覚化および構築することができる。

【0068】

一局面において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：

$X_1GX_3X_4AGX_7X_8KX_{10}X_{11}KGX_{14}X_{15}EKX_{18}TGK$ (SEQ ID NO: 41)

を含む、変異体PSM 2を含む。この局面によれば、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、または X_{18} の少なくとも1つはSEQ ID NO:12と比べてアミノ酸置換を含む。従って、この局面によれば、PSM 2は野生型PSM 2でない。この局面によれば、 X_1 はM、G、またはAであり得、 X_3 はI、G、またはAであり得、 X_4 はI、G、またはAであり得、 X_7 はI、G、またはAであり得、 X_8 はI、G、またはAであり得、 X_{10} はF、G、またはAであり得、 X_{11} はI、G、またはAであり得、 X_{14} はL、G、またはAであり得、 X_{15} はI、G、またはAであり得、かつ X_{18} はF、G、またはAであり得る。ある特定の局面において、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、および X_{18} の中から1個だけのアミノ酸がSEQ ID NO:12と比べて置換されている。従って、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、および X_{18} のうち1つだけがGまたはAである。別の局面において、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、および X_{18}

10

20

30

40

50

₁₈の中から2個のアミノ酸がSEQ ID NO:12と比べて置換されている。1個の置換または複数の置換である様々なアミノ酸置換は、本開示に従って当業者により容易に視覚化および構築することができる。

【0069】

一局面において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：

X₁EX₃X₄AKX₇X₈KX₁₀X₁₁KDX₁₄X₁₅GKX₁₈X₁₉GNN (SEQ ID NO: 42)

を含む、変異体PSM 3を含む。この局面によれば、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、X₁₈、またはX₁₉の少なくとも1つはSEQ ID NO:6と比べてアミノ酸置換を含む。従って、この局面によれば、PSM 3は野生型PSM 3でない。この局面によれば、X₁はM、G、またはAであり得、X₃はF、G、またはAであり得、X₄はV、G、またはAであり得、X₇はL、G、またはAであり得、X₈はF、G、またはAであり得、X₁₀はF、G、またはAであり得、X₁₁はF、G、またはAであり得、X₁₄はL、G、またはAであり得、X₁₅はL、G、またはAであり得、X₁₈はF、G、またはAであり得、かつX₁₉はL、G、またはAであり得る。ある特定の局面において、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、X₁₈、およびX₁₉の中から1個だけのアミノ酸がSEQ ID NO:6と比べて置換されている。従って、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、X₁₈、およびX₁₉のうち1つだけがGまたはAである。ある特定の局面において、X₁が唯一の置換アミノ酸である。この局面によれば、X₁₄はGであり得、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:9を含む。または、X₁₄はAであり得、前記ペプチドはアミノ酸配列SEQ ID NO:7を含む。別の局面において、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、X₁₈、およびX₁₉の中から2個のアミノ酸がSEQ ID NO:6と比べて置換されている。例えば、X₄およびX₁₄が置換されていてもよく、GまたはAであり得る。従って、ある特定の局面において、X₄は独立してGまたはAであり得、かつX₁₄は独立してGまたはAであり得る。例えば、PSM 3は、アミノ酸配列SEQ ID NO:8、アミノ酸配列SEQ ID NO:10、またはアミノ酸配列SEQ ID NO:11を含んでもよい。1個の置換または複数の置換である他のアミノ酸置換は、本開示に従って当業者により容易に視覚化および構築することができる。

【0070】

一局面において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：

X₁AX₃X₄GTX₇X₈KX₁₀X₁₁KAX₁₄X₁₅DX₁₇X₁₈AK (SEQ ID NO: 43)

を含む、変異体PSM 4を含む。この局面によれば、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、X₁₇、またはX₁₈の少なくとも1つはSEQ ID NO:14と比べてアミノ酸置換を含む。従って、この局面によれば、PSM 4は野生型PSM 4でない。この局面によれば、X₁はM、G、またはAであり得、X₃はI、G、またはAであり得、X₄はV、G、またはAであり得、X₇はI、G、またはAであり得、X₈はI、G、またはAであり得、X₁₀はI、G、またはAであり得、X₁₁はI、G、またはAであり得、X₁₄はI、G、またはAであり得、X₁₅はI、G、またはAであり得、X₁₇はI、G、またはAであり得、かつX₁₈はF、G、またはAであり得る。ある特定の局面において、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、X₁₇、およびX₁₈の中から1個だけのアミノ酸がSEQ ID NO:14と比べて置換されている。従って、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、X₁₇、およびX₁₈のうち1つだけがGまたはAである。別の局面において、X₁、X₃、X₄、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₄、X₁₅、X₁₇、およびX₁₈の中から2個のアミノ酸がSEQ ID NO:14と比べて置換されている。1個の置換または複数の置換である他のアミノ酸置換は、本開示に従って当業者により容易に視覚化および構築することができる。

【0071】

一局面において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：

MEGX₄X₅NAX₈KDTX₁₂TAAX₁₆NNNDGAKLGTSIVNIVENGVGLLSKLFGF

(SEQ ID NO: 44)

を含む、変異体PSM 1を含む。この局面によれば、X₄、X₅、X₈、X₁₂、またはX₁₆の少なくとも1つはSEQ ID NO:15と比べてアミノ酸置換を含む。従って、この局面によれば、PSM

10

20

30

40

50

1は野生型PSM 1でない。この局面によれば、 X_4 はL、G、またはAであり得、 X_5 はF、G、またはAであり得、 X_8 はI、G、またはAであり得、 X_{12} はV、G、またはAであり得、かつ X_{16} はI、G、またはAであり得る。ある特定の局面において、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{16} の中から1個だけのアミノ酸がSEQ ID NO:15と比べて置換されている。従って、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{16} のうち1つだけがGまたはAである。別の局面において、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{16} の中から2個のアミノ酸がSEQ ID NO:15と比べて置換されている。1個の置換または複数の置換である他のアミノ酸置換は、本開示に従って当業者により容易に視覚化および構築することができる。

【0072】

一局面において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：

MTGX₄AEAX₈ANTX₁₂QAAQQHDSVKX₂₃GTSIVDIVANGVGLLGKLFGE

(SEQ ID NO: 45)

を含む、変異体PSM 2を含む。この局面によれば、 X_4 、 X_8 、 X_{12} 、または X_{23} の少なくとも1つはSEQ ID NO:16と比べてアミノ酸置換を含む。従って、この局面によれば、PSM 2は野生型PSM 2でない。この局面によれば、 X_4 はL、G、またはAであり得、 X_8 はI、G、またはAであり得、 X_{12} はV、G、またはAであり得、かつ X_{23} はL、G、またはAであり得る。ある特定の局面において、 X_4 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{23} の中から1個だけのアミノ酸がSEQ ID NO:16と比べて置換されている。従って、 X_4 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{23} のうち1つだけがGまたはAである。別の局面において、 X_4 、 X_8 、 X_{12} 、および X_{23} の中から2個のアミノ酸がSEQ ID NO:16と比べて置換されている。1個の置換または複数の置換である他のアミノ酸置換は、本開示に従って当業者により容易に視覚化および構築することができる。

【0073】

一局面において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：

MDX₃TGX₆X₇TSX₁₀X₁₁DX₁₃X₁₄KTX₁₇X₁₈QAFG (SEQ ID NO: 53)

を含む、変異体PSM-mecを含む。この局面によれば、 X_3 、 X_6 、 X_7 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{17} 、または X_{18} の少なくとも1つはSEQ ID NO:52と比べてアミノ酸置換を含む。従って、この局面によれば、PSM-mecは野生型PSM-mecでない。この局面によれば、 X_3 はF、G、またはAであり得、 X_6 はV、G、またはAであり得、 X_7 はI、G、またはAであり得、 X_{10} はI、G、またはAであり得、 X_{11} はI、G、またはAであり得、 X_{13} はL、G、またはAであり得、 X_{14} はI、G、またはAであり得、 X_{17} はC、G、またはAであり得、かつ X_{18} はI、G、またはAであり得る。ある特定の局面において、 X_3 、 X_6 、 X_7 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{17} 、または X_{18} の中から1個だけのアミノ酸がSEQ ID NO:52と比べて置換されている。従って、 X_3 、 X_6 、 X_7 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{17} 、または X_{18} のうち1つだけがGまたはAである。別の局面において、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_{15} 、および X_{18} の中から2個のアミノ酸がSEQ ID NO:52と比べて置換されている。1個の置換または複数の置換であるPSM-mecにおける様々なアミノ酸置換は、本開示に従って当業者により容易に視覚化および構築することができる。

【0074】

さらに、本開示は、任意の順序で並べられた2つ以上の、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれより多い黄色ブドウ球菌由来ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体の融合物を含む、多価オリゴペプチドを提供する。2つ以上の黄色ブドウ球菌由来ペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体は同じでもまたは異なっていてもよい。本明細書において提供される多価オリゴペプチドは、以下のうちの2つ以上を含んでもよいが、それに限定されるわけではない：

- 野生型DT、前記DTの変異体、またはそれらの任意の断片、変種、もしくは誘導体；
- 野生型PSM、前記PSMの変異体、またはそれらの任意の断片、変種、もしくは誘導体；
- AT-62(SEQ ID NO:46)、または本明細書の他の場所およびPCT公開番号WO2012/109167A1に記載の他のヘモリジンペプチドを含むが、それに限定されるわけではない、ヘモリジンポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体；

10

20

30

40

50

d. SEQ ID NO:47と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むパントン・バレンタインロイコシジン(PVL)Luks-PVサブユニット、SEQ ID NO:48と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むパントン・バレンタインロイコシジン(PVL)LukF-PVサブユニット、またはそれらの組み合わせ、あるいはLukS-Mut9(SEQ ID NO:54)および/またはLukF-Mut-1(SEQ ID NO:55)を含むが、それに限定されるわけではない本明細書の他の場所およびPCT公開番号W02013/082558に記載の他のロイコシジンペプチドを含むが、それに限定されるわけではない、ロイコシジンポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体;あるいは

e.スーパー抗原(SAg)ポリペプチドまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体。 10

【0075】

一部の態様において、多価オリゴペプチドを含むペプチドは互いに直接融合されてもよい。他の態様において、多価オリゴペプチドを含むペプチドはペプチドリンカーを介して結合されてもよい。可動性のある拡張したコンホメーションもしくはつなげられたエピトープと相互作用することができる二次構造をとる能力に基づいて、または融合ポリペプチドの全溶解度を高める能力に基づいて、またはつなげられたペプチド領域に影響を及ぼす静電効果もしくは水相互作用効果が無いことにに基づいて適切なペプチドリンカーを選択することができる。ある特定の局面において、本明細書において提供される多価オリゴペプチドにおいて使用するためのリンカーは、少なくとも1個であるが50個以下のアミノ酸、例えば、可動性の鎖をもたらす小さなアミノ酸、例えば、グリシン、セリン、アラニン、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。ある特定の局面において、本明細書において提供される多価オリゴペプチドにおいて使用するためのリンカーは $(GGGS)_n$ または $(GGGGS)_n$ を含んでもよく、式中、nは1~10の整数である。 20

【0076】

ある特定の局面において、多価オリゴペプチドはAT-62およびDTを任意の順序で含み、AT-62およびDTはリンカー配列を介して一緒に融合されてもよい。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、AT62_DT(SEQ ID NO:18)、あるいはSEQ ID NO:18と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。 30

【0077】

ある特定の局面において、多価オリゴペプチドはAT-62およびPSMを任意の順序で含み、AT-62およびPSMはリンカー配列を介して一緒に融合されてもよい。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、AT62_PSM(SEQ ID NO:20)、あるいはSEQ ID NO:20と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。

【0078】

ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、AT-62、DT、およびPSMを任意の順序で含み、AT-62、DT、およびPSMはリンカー配列を介して一緒に融合されてもよい。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、AT62_DT_PSM(SEQ ID NO:22)、あるいはSEQ ID NO:22と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。 40

【0079】

ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、AT-62および組換えSEBまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体を任意の順序で含み、AT-62およびSEBはリンカー配列を介して一緒に融合されてもよい。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、AT62_rSEB(SEQ ID NO:23)、あるいはSEQ ID NO:23と少なくとも75%、80%、85%、90%、9 50

5%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、rSEB_AT62(SEQ ID NO:26)、あるいはSEQ ID NO:26と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。

【0080】

ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、AT-62、組換えSEBまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体、およびDTを任意の順序で含み、AT-62、SEB、およびDTは10 リンカー配列を介して一緒に融合されてもよい。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、AT62_rSEB_DT(SEQ ID NO:29)、またはSEQ ID NO:29と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。

【0081】

提供されるオリゴペプチドがブドウ球菌SAgまたはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体を含む場合、SAg、は、SEB、SEC1-3、SEE、SEH、SEI、SEK、TSST-1、SpeC、SED、S20 peA、またはそれらの任意の変異体、断片、変種、もしくは誘導体、あるいはそれらの任意の組み合わせを任意の順序で含んでもよいが、それに限定されるわけではない。ある特定の局面において、前記オリゴペプチドは、ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)またはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体を含む。ある特定の局面において、SEB変異体は、弱毒化されたトキソイドSEB_{L45R/Y89A/Y94A}(SEQ ID NO:49)、またはSEQ ID NO:49と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある特定の局面において、前記オリゴペプチドは、ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)またはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体を含む。ある特定の局面において、SEA変異体は、弱毒化されたトキソイドSEA_{L48R/D70R/Y92A}(SEQ ID NO:50)、またはSEQ ID NO:50と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある特定の局面において、前記オリゴペプチドは、ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素-1(TSST-1)またはその変異体、断片、変種、もしくは誘導体を含む。ある特定の局面において、TSST-1変異体は、弱毒化されたトキソイドTSST-1_{L30R/D27A/I46A}(SEQ ID NO:51)、またはSEQ ID NO:51と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0082】

SAgトキソイドは、リンカーを用いて、またはリンカーを用いずに任意の順序で一緒に連結されてもよい。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、SEB_{L45R/Y89A/Y94A}(「B」)、SEA_{L48R/D70R/Y92A}(「A」)、およびTSST-1_{L30R/D27A/I46A}(「T」)を任意の順序で含み、トキソイドはリンカー配列を介して一緒に融合されてもよい。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、「BAT」融合物(SEQ ID NO:32)、あるいはSEQ ID NO:32と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、「BTA」融合物(SEQ ID NO:33)、あるいはSEQ ID NO:33と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、「ABT」融合物(SEQ ID NO:34)、あるいはSEQ ID NO:34と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または

10

20

30

40

50

前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、「ATB」融合物(SEQ ID NO:35)、あるいはSEQ ID NO:35と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、「TAB」融合物(SEQ ID NO:36)、あるいはSEQ ID NO:36と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、「TBA」融合物(SEQ ID NO:37)、あるいはSEQ ID NO:37と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になるオリゴペプチドを含むか、これからなるか、あるいはこれから本質的になる。

【0083】

ある特定の局面において、多価オリゴペプチドは、アミノ酸配列SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、もしくはそれらの任意の組み合わせを含むか、前記アミノ酸配列からなるか、または前記アミノ酸配列から本質的になる。

【0084】

別の態様において、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを異種ポリペプチドに接続させることができる。安定化、分泌、または簡素化された精製を付与するN末端ペプチドまたはC末端ペプチド、例えば、ヘキサヒスチジンタグ、ユビキチンタグ、NusAタグ、キチン結合ドメイン、ompT、ompA、peIIB、DsbA、DsbC、c-myc、KSI、ポリアスパラギン酸、(Ala-Trp-Trp-Pro)n、ポリフェニルアラニン、ポリシスティン、ポリアルギニン、Bタグ、HSBタグ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、インフルエンザウイルス血球凝集素(HAI)、カルモジュリン結合タンパク質(CBP)、ガラクトース結合タンパク質、マルトース結合タンパク質(MBP)、セルロース結合ドメイン(CBD)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、連鎖球菌プロテインG、ブドウ球菌プロテインA、T7gene10、アビジン/ストレプトアビジン/Strepタグ複合体、trpE、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、lacZ(ガラクトシダーゼ)、Hisパッチチオレドキシン、チオレドキシン、FLAG(商標)ペプチド(Sigma-Aldrich)、Sタグ、またはT7タグを含むが、これに限定されない様々な異種ポリペプチドを使用することができる。例えば、Stevens, R.C., Structure, 8:R177-R185 (2000)を参照されたい。異種ポリペプチドはまた、宿主細胞からの本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMの輸送、移動、処理、および/または精製を容易にする任意のプレ配列および/またはプロ配列、あるいは微生物病原体のT細胞エピトープまたは他の免疫原性タンパク質および/もしくは免疫原性エピトープをコードする配列を含むが、これに限定されない任意の有用な免疫原性配列を含んでもよい。

【0085】

一部の態様において、本明細書に記載のように、異種ポリペプチドに接続された多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMは、2つ以上のペプチド領域を含む配列をつなぐペプチドリンカー配列を含んでもよい。適切なペプチドリンカー配列は、可撓性の広がったコンホメーション、もしくはつなげられたエピトープと相互作用することができる二次構造をとる能力に基づいて、または融合ポリペプチドの全溶解度を高める能力に基づいて、またはつなげられたペプチド領域に影響を及ぼす静電相互作用もしくは水相互作用の欠如に基づいて選択することができる。

【0086】

一部の態様において、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMが

10

20

30

40

50

単離される。「単離された」ポリペプチドは、その天然環境から取り出されているポリペプチドである。「単離された」という用語は特定の精製レベルを意味しない。非天然宿主細胞内で発現され、組換えにより產生された本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMは本開示の目的では単離されたとみなされ、濾過、クロマトグラフィー、遠心分離などによる技法を含む任意の適切な技法によって分離された、分画された、または部分的もしくは実質的に精製されたポリペプチドも同様に単離されたとみなされる。

【0087】

本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMは、本開示のポリペプチドを機能的にコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養し、ポリペプチドを回収することによって產生することができる。このような宿主細胞を培養し、ポリヌクレオチドを発現させるための条件の決定は一般的に宿主細胞および発現システムに特異的であり、当業者の知識の範囲内である。同様に、本開示のポリペプチドを回収するための適切な方法は当業者に公知であり、クロマトグラフィー、濾過、沈殿、または遠心分離を含むが、これに限定されない。10

【0088】

III. ポリヌクレオチド

本明細書の他の箇所に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMをコードする核酸を含む、単離されたポリヌクレオチドも開示される。

【0089】

ある特定の態様において、本明細書に記載の単離されたポリヌクレオチドは、本明細書の他の場所において説明される、プロモーター、オペレーター、または転写ターミネーターなどの非コード領域をさらに含む。一部の態様において、本開示は本明細書に記載のポリヌクレオチドに関し、異種核酸をさらに含む。異種核酸は、一部の態様において、本明細書に記載のポリペプチドと融合した異種ポリペプチドをコードしてもよい。例えば、本明細書に記載の単離されたポリヌクレオチドは、さらなるコード領域、例えば、本明細書に記載のポリペプチドと融合した異種ポリペプチドをコードする、さらなるコード領域、または選択マーカー、さらなる免疫原、免疫エンハンサーなどがあるが、これに限定されない、本明細書に記載のポリペプチドとは別の異種ポリペプチドをコードするコード領域を含んでもよい。20

【0090】

本明細書に記載のポリヌクレオチドを含む、発現構築物、ベクター、および/または宿主細胞も提供される。単離されたポリヌクレオチドの一例は、ベクター内に含まれる組換えポリヌクレオチドである。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例には、異種宿主細胞内に維持されている組換えポリヌクレオチド、または溶解状態にある(部分的もしくは実質的に)精製されたポリヌクレオチドが含まれる。本開示のある特定の態様において、ポリヌクレオチドは「組換え」である。本開示による単離されたポリヌクレオチドまたは核酸は、合成により作製されたこのような分子をさらに含む。本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの純度の相対的な程度は周知の方法によって容易に決定される。30

【0091】

本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMをコードする遺伝子操作されたポリヌクレオチドも本開示の範囲内に開示される。本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMをコードする核酸は、当業者によって、例えば、オリゴヌクレオチド指定部位特異的変異誘発または新規核酸合成によって容易に改変することができる。40

【0092】

一部の態様は、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMをコードする核酸を含み、ポリペプチドをコードするコード領域がコドン最適化されている、単離されたポリヌクレオチドを開示する。当業者により理解されるように、様々な核酸コード領域が遺伝暗号の重複のために同じポリペプチドをコードする。任意のポリペプチド鎖の50

アミノ酸をコードするコドンを含むヌクレオチド配列に偏りがあるとコード領域の配列中にはらつきが生じる。各コドンは3つのヌクレオチドからなり、DNAを含むヌクレオチドは4つの特定の塩基に限定されるので、64通りのヌクレオチドの組み合わせが考えられ、このうち61通りがアミノ酸をコードする(残り3つのコドンはシグナル終結翻訳をコードする)。どのコドンがどのアミノ酸をコードするかを示す「遺伝暗号」は本明細書に表2として転載されている。結果として、多くのアミノ酸が複数のコドンによって指定されている。例えば、アミノ酸アラニンおよびプロリンは4種のトリプレットによってコードされ、セリンおよびアルギニンは6種のトリプレットによってコードされるのに対して、トリプトファンおよびメチオニンは1種だけのトリプレットによってコードされる。この縮重のために、DNAによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列が変化することなくDNA塩基組成が広範囲にわたって変化することが可能になる。

10

【0093】

(表2) 標準的な遺伝暗号

| | T | C | A | G |
|---|--|----------------------------------|--|--|
| T | TTT Phe (F) TTC TTA Leu (L) TTG | TCT Ser (S) TCC TCA TCG | TAT Tyr (Y) TAC TAA Ter TAG Ter | TGT Cys (C) TGC TGA Ter TGG Trp (W) |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| C | CTT Leu (L) CTC CTA CTG | CCT Pro (P) CCC CCA CCG | CAT His (H) CAC CAA Gln (Q) CAG | CGT Arg (R) CGC CGA CGG |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| A | ATT Ile (I) ATC ATA ATG Met (M) | ACT Thr (T) ACC ACA ACG | AAT Asn (N) AAC AAA Lys (K) AAG | AGT Ser (S) AGC AGA Arg (R) AGG |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| G | GTT Val (V) GTC GTA GTG | GCT Ala (A) GCC GCA GCG | GAT Asp (D) GAC GAA Glu (E) GAG | GGT Gly (G) GGC GGA GGG |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

20

【0094】

使用されるコドンに関係なく、本開示に従ってポリペプチドをコードする全てのポリヌクレオチドが本開示の範囲内にあると理解すべきである。

【0095】

多くの生物が、成長しているポリペプチド鎖の中に、特定のアミノ酸の挿入をコードする特定のコドンが用いられるバイアスを示す。生物間のコドン使用頻度の差であるコドン優先またはコドンバイアスは遺伝暗号縮重によって与えられ、多くの生物間で詳細に記録が残されている。

40

【0096】

翻訳選択、GC組成、鎖特異的変異バイアス、アミノ酸保存、タンパク質ハイドロパシー、転写選択、およびRNA安定性さえ含む様々な要因がコドン使用頻度優先に寄与すると提唱されている。コドン使用頻度を決定する要因の1つはゲノムGC組成を形作る変異バイアスである。この要因は、極端な塩基組成を有するゲノム:高GC含有量を有する種(例えば、グラム陽性細菌)において最も重要である。変異バイアスはコドン使用頻度の遺伝子間差だけでなく、同じゲノム内のコドン使用頻度バイアスも担っている(Ermolaeva M, Curr. Issues Mol. Biol. 3(4):91-97, 2001)。

50

【0097】

コドンバイアスはメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳効率と相関することが多く、その結果として、特に、翻訳されているコドンの特性および特定のトランスファーRNA(tRNA)分子の利用可能性に依存すると考えられている。細胞内における選択されたtRNAの数が圧倒的に多いことは、一般的に、ペプチド合成においてコドンが最も高い頻度で用いられるこことを反映している。したがって、ある特定の生物において遺伝子が最適に発現するようにコドン最適化に基づいて遺伝子を合わせることができる。

【0098】

本開示は、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMをコードするコドン最適化コード領域を含むポリヌクレオチドを提供する。コドン使用頻度は、ある特定の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞において最適化発現するように合わせられる。ある特定の局面において、コドン使用頻度は大腸菌において最適化発現するように合わせられる。

10

【0099】

ある特定の局面において、AT62_DTをコードし、大腸菌において発現するように最適化された核酸配列SEQ ID NO:17を含む、単離されたポリヌクレオチドが提供される。ある特定の局面において、AT62_PSMをコードし、大腸菌において発現するように最適化された核酸配列SEQ ID NO:19を含む、単離されたポリヌクレオチドが提供される。ある特定の局面において、AT62_DT_PSMをコードし、大腸菌において発現するように最適化された核酸配列SEQ ID NO:21を含む、単離されたポリヌクレオチドが提供される。ある特定の局面において、AT62_rSEBをコードし、大腸菌において発現するように最適化された核酸配列SEQ ID NO:25を含む、単離されたポリヌクレオチドが提供される。ある特定の局面において、rSEB_AT62をコードし、大腸菌において発現するように最適化された核酸配列SEQ ID NO:28を含む、単離されたポリヌクレオチドが提供される。ある特定の局面において、AT62_rSEB_DTをコードし、大腸菌において発現するように最適化された核酸配列SEQ ID NO:31を含む単離されたポリヌクレオチドが提供される。

20

【0100】

コドン最適化ポリヌクレオチドは、ある特定の種の遺伝子における使用に好ましいコドンをDNA配列に組み込むことによって調製される。本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMをコードするコドン最適化コード領域を含むポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチド発現構築物、ベクター、宿主細胞も提供される。

30

【0101】

多種多様な動物、植物、および微生物種に利用可能な多数の遺伝子配列があれば、コドン使用頻度の相対頻度を計算することが可能である。コドン使用頻度表は、例えば、<http://www.kazusa.or.jp/codon/>において入手可能な「コドン使用頻度データベース(Codon Usage Database)」において容易に入手することができる(2011年10月12日に訪れた)。これらの表をいろいろなやり方で作りかえることができる(Nakamura, Y., et al., 'Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000', Nucl. Acids Res. 28:292, 2000)。

40

【0102】

入手可能な表を利用することによって、当業者であれば、特定のポリペプチド配列に頻度を適用し、望ましいポリペプチドをコードするが、ある特定の種に最適なコドンを使用するコドン最適化コード領域の核酸断片を作製することができる。例えば、本開示の一部の態様において、コード領域は大腸菌における発現のためにコドン最適化されている。

【0103】

当業者に周知の標準的かつ日常的な分子生物学的操作を用いて、前記の任意の方法によって設計されたコドン最適化コード領域を合成する多数の選択肢が利用可能である。さらに、遺伝子合成は容易に商業利用することができる。

【0104】

IV. ベクターおよび発現システム

50

本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターがさらに開示される。本明細書で使用する「ベクター」という用語は、例えば、異なる遺伝子環境間で輸送するために、または宿主細胞内で発現させるために、望ましい配列を挿入することができる、例えば、望ましい配列を制限処理および連結によって挿入することができる多数の任意の核酸を指す。核酸ベクターはDNAでもよくRNAでもよい。ベクターには、プラスミド、ファージ、ファージミド、細菌ゲノム、およびウイルスゲノムが含まれるが、これに限定されない。クローニングベクターは、宿主細胞内で複製することができるベクターであって、決定可能なやり方でベクターを切断することができ、新たな組換えベクターが宿主細胞内で複製能力を保持するように望ましいDNA配列を連結することができる1つまたは複数のエンドヌクレアーゼ制限部位によってさらに特徴付けられるベクターである。プラスミドの場合、望ましい配列の複製は、プラスミドのコピー数が宿主細菌内で増える時に何回でも行われてもよく、宿主が有糸分裂により複製する前に1つの宿主あたり1回だけ行われてもよい。ファージの場合、複製は溶菌期(lytic phase)の間に能動的に行われてもよく、溶原期(lysogenic phase)の間に受動的に行われてもよい。ある特定のベクターは、ある特定のベクターが導入された宿主細胞内で自己複製することができる。他のベクターは宿主細胞に導入されたら宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって、宿主ゲノムと共に複製される。

【0105】

適切な宿主と使用することができる多種多様な任意の適切なクローニングベクターが当技術分野において公知であり、市販されている。本明細書で使用する「プラスミド」という用語は、遺伝物質が染色体外にあり、場合によっては自己複製する、遺伝物質(すなわち、核酸)で作られた環状二本鎖構築物を指す。本明細書に記載のポリヌクレオチドは環状プラスミド内にあってもよく、直線化プラスミド内にあってもよく、他の任意の種類のベクター内にあってもよい。ヌクレオチド配列をベクター、例えば、発現ベクターに挿入し、形質転換またはトランスフェクションによって適切な宿主細胞に導入し、発現に適した条件下で培養するための手順は一般的に当技術分野において公知である。

【0106】

本開示は、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMをコードする核酸配列を含むベクターをさらに提供する。ある特定の態様において、ベクターは、適切な宿主細胞内で本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを発現することができる発現ベクターである。「発現ベクター」という用語は、本明細書に記載のポリペプチドを発現することができるベクターを指す。すなわち、ベクター配列は、プロモーター、オペレーター、転写終結部位、リボソーム結合部位などを含むが、これに限定されない、ポリペプチドの転写および翻訳に必要とされる制御配列を含有する。「発現」という用語は、コード配列によってコードされる産物の生物学的生産を指す。ほとんどの場合、コード配列を含むDNA配列は転写されてメッセンジャーRNA(mRNA)を形成する。次いで、メッセンジャーRNAは翻訳されて、関連した生物学的活性を有するポリペプチド産物を形成する。また、発現プロセスは、転写RNA産物へのさらなる処理工程、例えば、イントロンを除去するスプライシング、および/またはポリペプチド産物の翻訳後処理を伴ってもよい。

【0107】

ベクター-宿主システムには、インビオ、例えば、動物におけるシステム、またはインビトロ、例えば、細菌もしくは細胞培養におけるシステムのいずれか、例えば、細菌システム、哺乳動物システム、酵母システム、昆虫システム、または植物細胞システムが含まれるが、これに限定されない。適切な宿主の選択は、本明細書における開示から当業者が行う範囲内であると考えられる。ある特定の態様において、宿主細胞は細菌、例えば、大腸菌である。

【0108】

宿主細胞には、本開示のベクターを用いて遺伝子操作(感染、形質導入、形質転換、またはトランスフェクション)が行われる。したがって、本開示の一局面は、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含有するベクターを含む宿主細胞に関する。操作された宿主細胞

10

20

30

40

50

を、プロモーターの活性化、形質転換体の選択、またはポリヌクレオチドの増幅のために適宜改変された従来の栄養培地中で培養することができる。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞と共に以前に用いられた培養条件であり、当業者に明らかであろう。本明細書で使用する「トランスフェクトする」という用語は、真核細胞がそのゲノムに、プラスミドの形をしたDNAを含むが、これに限定されない単離されたDNAを受け入れ、組み込むように誘導される任意の手順を指す。本明細書で使用する「形質転換する」という用語は、細菌細胞がそのゲノムに、プラスミドの形をしたDNAを含むが、これに限定されない単離されたDNAを受け入れ、組み込むように誘導される任意の手順を指す。

【0109】

10

細菌宿主-発現ベクターシステムには、組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNAで形質転換された原核生物(例えば、大腸菌)が含まれるが、これに限定されない。一部の様態において、大腸菌と共に用いられるプラスミドは、IPTG誘導を介してLacIタンパク質によって調節されるT7プロモーター駆動システムを使用する。多数の適切なベクターが当業者に公知であり、市販されている。例として以下の細菌ベクター:pET(Novagen)、pET28、pBAD、pTrcHIS、pBR322、pQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、phagescript、psiX174、pBluescript SK、pbsk、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK243-3、pDR540、pBR322、pPS10、RSF1010、pRIT5(Pharmacia);pCR(Invitrogen);pLex(Invitrogen)、およびpUCプラスミド誘導体が提供される。

【0110】

20

適切な発現ベクターは、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMをコードする挿入ヌクレオチド配列に機能的につなげることができる制御配列を含有する。本明細書で使用する「制御配列」という用語は、宿主細胞による、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMをコードする挿入配列の転写に必要な、または転写の助けとなるヌクレオチド配列、および/あるいは結果として生じた転写物から望ましい多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMへの宿主細胞による翻訳に必要な、または翻訳の助けとなるヌクレオチド配列を意味する。制御配列には、5'配列、例えば、オペレーター、プロモーターおよびリボソーム結合配列ならびに3'配列、例えば、ポリアデニル化シグナルまたは転写ターミネーターが含まれるが、これに限定されない。制御配列はエンハンサー配列または上流アクチベーター配列も含んでよい。

【0111】

30

一般的に、細菌ベクターは、宿主細胞の形質転換を可能にする、複製起点および選択マークー、例えば、大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、および下流構造配列の転写を誘導する高発現遺伝子由来プロモーターを含む。適切なプロモーターには、T7プロモーター、ラムダ(λ)プロモーター、T5プロモーター、およびlacプロモーター、または解糖酵素、例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)、酸性ホスファターゼ、もしくは熱ショックタンパク質、もしくは誘導性プロモーター様カドミウム(pcad)、および ラクタマーゼ(pbla)をコードするオペロンに由来するプロモーターが含まれるが、これに限定されない。

【0112】

40

発現ベクターが選択されたら、本明細書に記載のポリヌクレオチドをプロモーターの下流に、例えば、ポリリンカー領域にクローニングすることができる。ベクターで適切な細菌株を形質転換し、DNAを標準的な技法を用いて調製する。ポリヌクレオチドならびにベクターに含まれる他の全てのエレメントの方向およびDNA配列を、制限酵素マッピング、DNA配列分析、および/またはPCR分析を用いて確認する。正しいプラスミドを有する細菌細胞を細胞バンクとして保管することができる。

【0113】

V. 免疫原性組成物および薬学的組成物

有効量の本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMあるいは本開示のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する組成物、例えば、免疫原性組成

50

物および薬学的組成物がさらに開示される。本明細書に記載の組成物は、例えば、多価ワクチンとして、さらなる免疫原性成分、ならびに担体、賦形剤、またはアジュバントをさらに含んでもよい。

【0114】

本明細書に記載の組成物は公知の方法に従って処方することができる。適切な調製方法は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995)に記載されている。組成物は、水溶液、エマルジョン、ゲル、懸濁液、凍結乾燥型、または当技術分野において公知の他の任意の形を含むが、これに限定されない様々な形をとってもよい。さらに、組成物は、例えば、希釈剤、結合剤、安定剤、および防腐剤を含む、薬学的に許容される添加物を含有してもよい。本開示の組成物は処方されたら、対象に直接投与することができる。処置される対象は動物でもよい。特に、ヒト対象を処置することができる。

【0115】

本開示の組成物と共に使用することができる担体は当技術分野において周知であり、例えば、チログロブリン、アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン、破傷風トキソイド、およびポリアミノ酸、例えば、ポリL-リジン、ポリL-グルタミン酸、インフルエンザ、B型肝炎ウイルスコアタンパク質などを含むが、それに限定されるわけではない。様々な水性担体、例えば、水、緩衝水、0.8%食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などを使用することができる。組成物は従来の周知の滅菌法によって滅菌されてもよく、滅菌濾過されてもよい。結果として生じた組成物は、使用のためにそのまで包装されてもよく、凍結乾燥されて包装されてもよく、凍結乾燥された調製物は投与の前に滅菌溶液と混合される。組成物は、生理条件に近づけるのに必要とされる薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調節剤および緩衝剤、張性調節剤、湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミンなどを含有してもよい。

【0116】

本明細書に記載のある特定の組成物は、例えば、免疫原に対する免疫応答を増強するために、保持するために、局在させるために、または調節するために免疫原性組成物に添加される物質である1種または複数種のアジュバントさらに含む。「アジュバント」という用語は、(1)ある特定の抗原に対する免疫応答を変える、もしくは高める、または(2)薬理学的薬剤の効果を高める、もしくは助ける能力を有する任意の材料を指す。ポリペプチドの発現、抗原性、または免疫原性を高めることができる全ての化合物が潜在的アジュバントである。本明細書で使用する「免疫原性担体」という用語は、第2のポリペプチドまたはその断片、変種、もしくは誘導体の免疫原性を増強する、第1の部分、例えば、ポリペプチドまたはその断片、変種、もしくは誘導体を指す。

【0117】

多種多様な材料が様々な機構を介してアジュバント活性を有すると示してきた。例えば、体液性免疫の増大は、典型的に、抗原に対して産生された抗体の力価の大幅な増加によって明らかにされ、T細胞活性の増加は、典型的に、細胞増殖または細胞傷害性またはサイトカイン分泌の増大となって現れる。アジュバントはまた、例えば、主として体液性応答すなわちTh₂応答を主として細胞性応答すなわちTh₁応答に変えることによって免疫応答を変える、または調節することができる。ある特定の抗原に対する免疫応答は、当業者に周知の、および/または本明細書の他の場所に記載の様々なイムノアッセイによって試験することができる。

【0118】

多数のアジュバントが当業者によく知られており、非常に多くの参考文献に記載されている。本明細書に記載の組成物において使用することができるアジュバントには、不活性担体、例えば、アラム、ベントナイト、ラテックス、およびアクリル粒子;不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント;アルミニウムベースの塩、例えば、水

10

20

30

40

50

酸化アルミニウム;Alhydrogel(Al(OH₃));リン酸アルミニウム(AlPO₄);カルシウムベースの塩;シリカ;任意のTLR生物学的リガンド;IDC-1001(GLA-SE;グルコピラノシリル脂質アジュバント安定エマルジョンとも知られる)(Coler et al., PLoS One, 2010. 5(10): p.e13677; Coler et al., PLoS One, 2011. 6(1): p.e16333); CpG (Mullen et al., PLoS One, 2008. 3(8): p.e2940)、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これに限定されない。アジュバントの量、処方方法、および投与方法、全てのパラメータは、十分に当業者が行う範囲内にある。

【0119】

一部の態様において、本開示の組成物は、例えば、製剤を安定化する、製剤をある特定の組織、例えば、リンパ系組織に標的化する、またはポリペプチド組成物の半減期を延ばすのに役立ち得る、リポソームまたは他の粒子担体をさらに含む。このような粒子担体には、エマルジョン、発泡体、ミセル、不溶性単層、液晶、リン脂質分散液、ラメラ層、iscomなどが含まれる。これらの調製物において、本明細書に記載のポリペプチドはリポソームまたは他の粒子の一部として組み込まれてもよく、リポソームと共に送達されてもよい。本開示に従う使用のためのリポソームは、一般的に、中性リン脂質および負に荷電しているリン脂質ならびにコレステロールなどのステロールを含む標準的な小胞形成脂質から形成することができる。リポソームまたは他の粒子懸濁液ならびに本明細書に記載のポリペプチドを含む組成物は、特に、投与方法、送達されているポリペプチド、および処置されている疾患の段階に応じて変化する量で、静脈内、局所、表面などに投与することができる。

【0120】

固体組成物の場合、例えば、薬学的グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどを含む従来の無毒の固体担体を使用することができる。経口投与の場合、一般的に用いられる任意の賦形剤、例えば、以前に列挙された担体、および一般的に10～95%の活性成分、すなわち、本明細書に記載のポリペプチド、多くの場合、25%～75%の濃度の本明細書に記載のポリペプチドを組み込むことによって、薬学的に許容される無毒の組成物が形成される。

【0121】

エアロゾル投与または粘膜投与の場合、本明細書に記載のポリペプチドは、超微粒子の形で、任意で、界面活性剤ならびに噴霧剤および/または粘膜付着剤、例えば、キトサンと共に供給することができる。界面活性剤は、もちろん、薬学的に許容される界面活性剤でなければならず、一部の態様において、噴霧剤に溶けなければならない。このような薬剤を代表するものは、6～22個の炭素原子を含有する脂肪酸、例えば、カプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリン酸(olesteric acid)、およびオレイン酸と、脂肪族多価アルコールまたはその環式無水物とのエステルまたは部分エステルである。混合エステル、例えば、混合グリセリドまたは天然グリセリドを使用することができる。界面活性剤は、組成物の0.1重量%～20重量%、一部の態様において0.25～5重量%を構成してもよい。通常、組成物の残りは噴霧剤であるが、噴霧剤が必要でなく、それに応じて他のパーセンテージが調節されるアトマイザーを使用することができる。一部の態様において、免疫原性ポリペプチドを空気力学的に軽い粒子、例えば、米国特許第6,942,868号または米国特許出願公開第2005/0008633号に記載の粒子の中に組み込むことができる。担体、例えば、鼻腔内送達の場合はレシチンも含めることができる。

【0122】

本開示はまた、本開示による組成物を產生する方法に関する。一部の態様において、組成物を產生する方法は、(a)本開示によるポリペプチドを単離する工程;ならびに(b)単離されたポリペプチドにアジュバント、担体、および/または賦形剤を添加する工程を含む。一部の態様は、ポリペプチドを他のブドウ球菌抗原と組み合わせる工程をさらに開示する。

10

20

30

40

50

【0123】

一部の態様は多価ワクチンを含む。本開示の多価ワクチンは、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/もしくはPSM、または多価オリゴペプチド、DT、および/もしくはPSMをコードするポリヌクレオチド、ならびに1種または複数種のさらなる免疫原性成分を含み得る。このような成分は、同じ感染因子、例えば、黄色ブドウ球菌のさらなる免疫原でもよく、他のブドウ球菌に由来するさらなる免疫原でもよく、効果的に、都合よく、または経済的に一緒に投与することができる他の感染因子に由来する免疫原でもよい。ある特定の態様において、複数の細菌ビルレンス決定基を標的とすることができる広範囲の毒素に基づく多価ワクチンを作製するために、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを他の毒素または他の病原性成分に基づくワクチンと組み合わせることができる。他の態様において、単鎖の多価ワクチンを作製し、複数の抗原に対する免疫応答を誘導するために、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを、他の免疫原性の、生物学的に意味のある、または防御的なエピトープを含有するポリペプチドと融合することができる。さらに別の態様において、T細胞免疫を誘導するために、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを1種または複数種のT細胞エピトープに融合することができる。

10

【0124】

VI. 処置/予防の方法およびレジメン

対象におけるブドウ球菌属感染症、例えば、黄色ブドウ球菌感染症を処置もしくは予防する方法またはブドウ球菌属、例えば、黄色ブドウ球菌によって引き起こされる疾患を処置もしくは予防する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを含む本明細書に記載の組成物、あるいはそれをコードするポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞を投与する工程を含む方法も提供される。ある特定の態様において、対象は、動物、例えば、脊椎動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトである。一部の態様は、黄色ブドウ球菌株に対する免疫応答を誘導する方法であって、免疫応答を必要とする対象に、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを含む有効量の組成物、あるいはそれをコードするポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞を投与する工程を含む方法を含む。

20

【0125】

一部の態様において、予防的に、例えば、ブドウ球菌属、例えば、黄色ブドウ球菌に潜在的もしくは実際に曝露される前に、またはブドウ球菌属関連症状に罹患する前に、健常な動物においてブドウ球菌属、例えば、黄色ブドウ球菌に対する免疫を確立または増強し、したがって、疾患を予防する、症状を緩和する、症状を軽減する、または疾患症状の重篤度を下げるための予防ワクチンとして、対象には、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを含む組成物、あるいはそれをコードするポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞が投与される。1つの態様において、疾患は呼吸器疾患、例えば、肺炎である。処置または予防される他の疾患または状態には、菌血症、敗血症、皮膚感染症、創傷感染症、心内膜炎、骨感染症および関節感染症、骨髄炎、ならびに/または髄膜炎が含まれるが、これに限定されない。本明細書に記載の1つまたは複数の組成物、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞はまた、動物の免疫系をさらに刺激し、したがって、ブドウ球菌属、例えば、黄色ブドウ球菌の曝露に関連した症状を軽減または排除するように、ブドウ球菌属、例えば、黄色ブドウ球菌に既に曝露されている対象、またはブドウ球菌属関連症状に既に罹患している対象を処置するのに使用することができる。本明細書において定義されるように「動物の処置」は、動物における黄色ブドウ球菌症状を予防する、治癒させる、遅らせる、もしくは黄色ブドウ球菌症状の重篤度を下げるための、および/または特定の期間にわたってブドウ球菌属の症状を悪化させないための本開示の1つまたは複数の組成物、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞の使用を指す。本明細書に記載の任意の組成物、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞が、ブドウ球菌感染に対する完全な防御を提供すること、または全てのブドウ球菌属関連症状を完全に治癒させるもしくは排除すること

30

40

50

は、必要とされない。

【0126】

本明細書で使用する「治療的免疫および/または予防的免疫を必要とする対象」は、ブドウ球菌属関連症状を処置する、すなわち、予防する、治癒させる、遅らせる、もしくはブドウ球菌属関連症状の重篤度を下げることが望ましい、または特定の期間にわたってブドウ球菌属関連症状を悪化させないことが望ましい対象を指す。本明細書で使用する「免疫応答を必要とする対象」は、Sブドウ球菌関連疾患に対する免疫応答が望まれる対象を指す。

【0127】

本明細書に記載の免疫原性組成物、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を用いた処置は、適宜、別々に、または他の処置と併用して行うことができる。

10

【0128】

治療用途において、本開示の組成物、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドは、多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMに対して効果的な自然体液性応答および/または細胞性応答を誘発して、症状もしくは合併症を治癒させる、または症状もしくは合併症を少なくとも部分的に抑えるのに十分な量で患者に投与される。

【0129】

これを達成するのに十分な量は「治療的有効用量」または「単位用量」と定義される。この使用に有効な量は、例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの組成物、投与方法、処置されている疾患の段階および重篤度、患者の体重および全身の健康状態、ならびに処方を行う医師の判断に左右される。一部の態様において、プライミング投与の後に、ある期間にわたってブースティング投与が行われる。

20

【0130】

別の態様において、一般的に、ヒトの場合、(治療的投与または予防的投与のために)初回免疫化が投与された後に、患者血液中の抗体応答またはTリンパ球応答を測定することによって、患者の応答および状態に応じて数週間~数ヶ月にわたってブースティングレジメンに従って同じ用量範囲のブースティング投与量が投与される。

【0131】

本明細書に記載のポリペプチドおよび組成物は、一般的に、重篤な疾患状態、すなわち、命にかかる状況または潜在的に命にかかる状況において使用できる。このような場合、異物の最小化およびポリペプチドの比較的無毒な性質を考慮して、かなり過剰な量のこれらのポリペプチド組成物を投与することが可能であり、処置を行っている医師は望ましいと感じる場合がある。

30

【0132】

治療的使用の場合、投与は、最初に黄色ブドウ球菌感染または危険因子の徵候が現れた時点で開始することができる。ある特定の態様において、初回投与の後に、例えば、症状が実質的に軽減するまで、その後、ある期間にわってブースティング投与が行われる。頻繁な感染では負荷投与の後にブースティング投与が必要となる場合がある。

【0133】

ある特定の態様において、本明細書に記載の組成物は本明細書に記載の方法によって対象に送達され、それによって、効果的な免疫応答ならびに/または効果的な治療的免疫応答もしくは予防的免疫応答を実現する。ブドウ球菌属、例えば、黄色ブドウ球菌に対する免疫応答をもたらすのに十分な量で、および/またはブドウ球菌属、例えば、黄色ブドウ球菌に対して予防的もしくは治療的に有効な免疫応答を、このような応答を必要とする動物においてもたらすのに十分な量で望ましいポリペプチドを望ましい組織に送達する、および/または望ましい組織において発現させる限り、任意の投与方法を使用することができる。開示された方法によれば、本明細書に記載の組成物は、粘膜送達、経皮送達、皮下注射、静脈内注射、経口投与、経肺投与、筋肉内(i.m.)投与によって、または腹腔内注射によって投与することができる。他の適切な投与経路には、気管内投与、経皮投与、眼内投与、鼻腔内投与、吸入投与、腔内投与、管内投与(例えば、臍臓内)、および実質内投与

40

50

(すなわち、任意の組織内)投与が含まれるが、これに限定されない。経皮送達には、皮内投与(例えば、真皮もしくは表皮への投与)、経皮投与(例えば、経皮的投与)、および経粘膜投与(すなわち、皮膚もしくは粘膜組織の中への投与または皮膚もしくは粘膜組織を通過する投与)が含まれるが、これに限定されない。腔内投与には、口腔、膣腔、直腸腔、鼻腔、腹腔、または腸腔(intestinal cavity)への投与、ならびに、くも膜下腔内(すなわち、脊柱管内)投与、室内(すなわち、脳室内または心室内)投与、動脈内(すなわち、心房内)投与、およびくも膜下(すなわち、脳のくも膜下腔内)投与が含まれるが、これに限定されない。

【0134】

ブドウ球菌属、例えば、黄色ブドウ球菌に対する免疫応答、および/またはブドウ球菌属、例えば、黄色ブドウ球菌に対して予防的もしくは治療的に有効な免疫応答を、このような応答を必要とする動物においてもたらすのに十分な量で望ましいポリペプチドを送達および/または発現する限り、任意の投与方法を使用することができる。本明細書に記載の投与は、例えば、針注射(needle injection)、または当技術分野において公知の他の送達もしくは装置によるものでよい。

10

【0135】

一部の態様において、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを含む組成物、あるいはそれをコードするポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞はブドウ球菌属感染、例えば、黄色ブドウ球菌感染から動物を防御するのに十分な抗体応答または細胞性免疫応答を刺激する。他の態様において、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを含む組成物、あるいはそれをコードするポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞は体液性応答および細胞性応答を両方とも刺激し、これらの組み合わせはブドウ球菌属感染、例えば、黄色ブドウ球菌感染から動物を防御するのに十分である。一部の態様において、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを含む組成物、あるいはそれをコードするポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞は自然免疫応答、抗体免疫応答、および/または細胞性免疫応答をさらに刺激する。

20

【0136】

一部の態様において、本明細書に記載の多価オリゴペプチド、DT、および/またはPSMを含む組成物、あるいはそれをコードするポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞は黄色ブドウ球菌に対する抗体応答を誘導することができる。ある特定の態様において、T細胞応答(例えば、T細胞エピトープ)を誘導する成分が、主として抗体応答を誘導する本明細書に記載のポリペプチドなどの成分と組み合わされる。

30

【0137】

対象における黄色ブドウ球菌感染に対する防御的免疫応答および/または治療的免疫応答をもたらす、増強する、または調節するための方法であって、治療的免疫および/または予防的免疫を必要とする対象に本明細書に記載の組成物の1つまたは複数を投与する工程を含む方法がさらに開示される。

【0138】

本明細書に記載の組成物は、投与されている動物の生活環の間いつでも動物に投与することができる。ヒトにおいて、他のワクチンが投与されている間に、例えば、本明細書の他の場所に記載のように多価ワクチンとして投与されている間に、本明細書に記載の組成物を投与することができ、多くの場合、有利に投与することができる。

40

【0139】

さらに、本明細書に記載の組成物は、任意の望ましい免疫化または投与レジメンにおいて、例えば、単回投与において、または年1回のワクチン接種などの定期ワクチン接種制度の一環として、または同じもしくは異なるポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの投与の前後に本開示の組成物もしくはポリペプチドもしくはポリヌクレオチドが投与されるプライム-ブースト制度のように使用することができる。最近の研究から、プライム-ブーストプロトコールは、多くの場合、ワクチンを投与する適切な方法であることが分かって

50

いる。プライム-ブーストプロトコールでは、1つまたは複数の本明細書に記載の組成物を「プライム-ブースト」レジメンにおいて使用することができる。「プライム-ブースト」レジメンの一例は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Yang, Z. et al. *J. Virol.* 77:799-803, 2002に記載されている。

【0140】

処置される感染症には、皮膚、軟部組織、血液、もしくは臓器の限局性感染症もしくは全身感染症、または自己免疫疾患が含まれるが、これに限定されない。処置または予防される特定の疾患または状態には、呼吸器疾患、例えば、肺炎、敗血症、皮膚感染症、創傷感染症、心内膜炎、骨感染症および関節感染症、骨髄炎、ならびに/または髄膜炎が含まれるが、これに限定されない。

10

【0141】

黄色ブドウ球菌感染の多数の動物モデルが当技術分野において公知であり、過度の実験なく本明細書において開示される方法と共に使用することができる。例えば、抗菌剤試験のためにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)肺炎ハムスターモデルが述べられている(Verghese A. et al., *Chemotherapy*. 34:497-503 (1988), Kephart PA. et al. *J Antimicrob Chemother.* 21:33-9, (1988))。さらに、成人における黄色ブドウ球菌誘発性肺炎のモデルである免疫応答性C57BL/6Jマウスが述べられている。免疫応答性C57BL/6Jマウスはヒト患者における肺炎の臨床特徴および病理学的特徴をそっくり模倣する(Bubeck-Wadensburg J. et al., *Infect Immun.* 75: 1040-4(2007))。さらに、McElroyらに記載のように(McElroy MC. et al., *Infect Immun.* 67:5541-4(1999))、黄色ブドウ球菌肺炎ラットモデルにおいてビルレンスが試験されている。最後に、新療法を評価するための標準化された、かつ再現性のあるMRSA誘発性敗血症性肺炎モデルがヒツジにおいて確立されている(Enkhbaatar P. et al., *Shock.* 29(5):642-9(2008))。

20

【0142】

本開示の実施では、特に定めのない限り、当技術分野の技術の範囲内である細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来法が用いられる。このような技法は文献内で十分に説明されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), DNA Cloning, D. N. Glover ed., Volumes I and II (1985); Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait ed., (1984); Mullis et al. 米国特許第4,683,195号; Nucleic Acid Hybridization, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Transcription And Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Culture Of Animal Cells, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, (1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology, Academic Press, Inc., N.Y.; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology, Mayer and Walker, eds., Academic Press, London (1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., (1986); Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)を参照されたい。

30

【0143】

免疫学の一般原則を示した標準的な参考図書には、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein, J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York (1982); Roitt, I., Brostoff, J. and Male D., Immunology, 6th ed. London: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. and Lichtman, A., Cellular and Molecular Immunology, Ed. 5, Elsevier Health Sciences Divi

40

50

sion (2005); およびHarlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)が含まれる。

【実施例】

【0144】

本開示の幅および範囲は前記のどの例示的な態様によっても限定されではなく、以下の特許請求の範囲およびその均等物によってのみ定義されなければならない。

【0145】

実施例1: 毒素およびPSM 3の弱毒化変異体の作製

毒素およびPSMオリゴペプチドは、界面活性特性を示すために両親媒性 -ヘリックス構造を必要とする(Omae, et al., 2012, J Biol Chem, 287 (19):15570-15579; Wang, et al., 2007, Nat Med, 13 (12): 1510-1514)。これらのペプチドは、4種のPSM- オリゴペプチド、2種のPSM- オリゴペプチド、および 毒素オリゴペプチドについて図1Aに示したように疎水性表面および親水性表面からなる。これらのペプチドは、4種のPSM- オリゴペプチド、2種のPSM- オリゴペプチド、および 毒素オリゴペプチドについて図1Aに示したように疎水性表面および親水性表面からなる。PSM-mecの疎水面を図1Aに示した(疎水面をペプチドの円形図の下半分に示した)。ペプチドを表3に示した。疎水面残基に下線を引いた。

【0146】

(表3)オリゴペプチド配列

| ペプチド | 配列(疎水面残基に下線を引いた) | SEQ ID NO |
|----------------|--|-----------|
| δ 毒素 | MAQDI <u>I</u> STI <u>G</u> DL <u>V</u> KW <u>I</u> DT <u>V</u> NKFTKK | 1 |
| PSM α 1 | <u>M</u> G <u>I</u> AG <u>I</u> IKV <u>I</u> KSLIEQFTGK | 38 |
| PSM α 2 | MG <u>I</u> AG <u>I</u> IK <u>I</u> KGLIEKFTGK | 12 |
| PSM α 3 | MEF <u>V</u> AK <u>L</u> FKFF <u>K</u> DLL <u>G</u> K <u>F</u> LGNN | 6 または13 |
| PSM α 4 | MA <u>I</u> VG <u>T</u> I <u>I</u> K <u>I</u> KA <u>I</u> ID <u>I</u> FAK | 14 |
| PSM β 1 | ME <u>G</u> LFNA <u>I</u> KDT <u>V</u> TAA <u>I</u> NN <u>D</u> GAKL <u>G</u> TSIVNIV <u>E</u> NGV <u>G</u> LLSK <u>L</u> FGF | 15 |
| PSM β 2 | MTG <u>L</u> AE <u>A</u> IANT <u>V</u> QAA <u>QQ</u> HDSV <u>K</u> L <u>G</u> TSIV <u>D</u> IVANGV <u>G</u> LLG <u>K</u> LF <u>G</u> F | 16 |
| PSM-mec | MD <u>F</u> T <u>G</u> VIT <u>S</u> I <u>D</u> LI <u>K</u> TC <u>I</u> QAFG | 52 |

【0147】

疎水性および疎水モーメント、実効電荷(z)などの特性を規定および表示するために、Heliquestソフトウェア(heliquest.ipmc.cnrs.fr)を用いて、図1に示したヘリカルホイール構造を作成した(Gautier, et al., 2008, Bioinformatics, 24 (18):2101-2102)。ヘリックス構造を破壊する変異は界面活性特性を無くすことができるが(Omae, et al., 2012, J Biol Chem, 287 (19): 15570-15579)、変異体のワクチン効力を弱める可能性もある。従って、本発明者らは、ペプチド免疫原性を保存するために、-ヘリックスの破壊を最小限にすることによって変異体を作製した。界面活性特性を無くすために、本発明者らは、PSM 3および 毒素の疎水面にある数個のアミノ酸を、アラニンおよびグリシンのような疎水性がさらに低いアミノ酸と交換した。このモデルから、これらの小さなアミノ酸はタンパク質構造を劇的に変えないが、疎水性を大幅に弱めると予測された(図1B)。本発明者らは、PSM 3(V4およびL14)ならびに 毒素(L12およびV20)の疎水面にある2個の残基に変異を導入した。変異体を表4に示した。

【0148】

(表4)変異毒素配列

10

20

30

40

50

| δ 毒素変異体 | 配列(変異残基に下線を引いた) | SEQ ID NO |
|---------------------|---|-----------|
| Wt | MAQDIISTIGDLVKWIIDTVNKFTKK | 1 |
| ALA -1 | MAQDIISTIGDA <u>V</u> KWIIDTVNKFTKK | 2 |
| ALA -2 | MAQDIISTIGDA <u>V</u> KWIID <u>A</u> NKFTKK | 3 |
| GLY -1 | MAQDIISTIG <u>D</u> GVKWIIDTVNKFTKK | 4 |
| GLY -2 | MAQDIISTIG <u>D</u> GVKWIID <u>G</u> NKFTKK | 5 |
| PSM- α 3 変異体 | | 10 |
| WT | MEFVAKL <u>F</u> KFFKDLLGKFLGNN | 6 または 13 |
| ALA -1 | MEFVAKL <u>F</u> KFF <u>D</u> ALGKFLGNN | 7 |
| ALA -2 | MEFA <u>A</u> KLFKFF <u>D</u> ALGKFLGNN | 8 |
| GLY -1 | MEFVAKL <u>F</u> KFF <u>D</u> GLGKFLGNN | 9 |
| GLY -2 | MEFG <u>A</u> KLFKFF <u>D</u> GLGKFLGNN | 10 |
| GLY -ALA | MEFG <u>A</u> KLFKFF <u>D</u> ALGKFLGNN | 11 |

【 0 1 4 9 】

本発明者らは、これらの2個のアミノ酸をアラニンもしくはグリシンまたはその両方と交換することによって単一変異体および二重変異体を設計した。図1Bに示したように、Heliquestプログラム(Gautier, et al., 2008, Bioinformatics, 24 (18):2101-2102)で分析した時に、変異体構築物の疎水性および疎水モーメントは野生型毒素と比較して低い。さらなる潜在的な弱毒化トキソイドとして、疎水面でのさらなる変異によって同様の変異体を作製することができる。

【 0 1 5 0 】

実施例2: 毒素およびPSM-3変異体の弱毒化の評価

変異ala1、ala2、およびgly2を毒素配列に組み込み、以下の方法によってウマ赤血球(HRBC)に対する溶解活性について変異体を試験した。ウマ血液を用いた毒性アッセイ: 5mlのウマ血液を2,000RPMで20 分で10分間、遠心分離した。上清を捨て、ペレットを15ml PBSで1回洗浄した。ペレット(wt/vol)を再懸濁することで、必要なパーセントのウマRBC細胞をPBSに溶解して調製した。100 μlの様々なオリゴペプチドを、ELISA希釈プレートの中にある100 μlのウマRBC(必要に応じてパーセントが異なる)に添加し、次いで、プレートを37 °Cで45分間インキュベートした。次いで、プレートを遠心分離し、100 μlの上清を新たなNUNC ELISAプレートに移した。上清の吸光度をVersamax(商標)プレートリーダー(Molecular Devices CA)において416nmで求めた。上清の光学密度は毒素によって引き起こされた赤血球溶血の程度を反映する。

【 0 1 5 1 】

中和アッセイ: 中和のために、希釈した血清試料を50 μlの様々なオリゴペプチド(12.5 μg/ml)に添加し、室温で10分間インキュベートし、次いで、100 μlの5%ウマRBCを添加した。プレートを37 °Cで45分間インキュベートした。次いで、プレートを遠心分離し、100 μlの上清を新たなNUNC ELISAプレートに移した。上清の吸光度をVersamax(商標)プレートリーダー(Molecular Devices CA)において416nmで求めた。

【 0 1 5 2 】

図2に示したように、毒素変異体ala1(L12A)、ala2(L12A/V20A)、およびgly2(L12G/V20G)は完全に弱毒化された。変異体が中和エピトープを保持しているかどうか試験するために、本発明者らは、個々の正常血清をスクリーニングすることによって作製した高力価ヒト血清プール中にあるヒト中和抗体に結合するかどうか、毒素-ala2変異体を試験した。図3に示したように、毒素の毒性はヒト血清プールの1:450希釈液を用いて効果的に中和することができる。毒素-ala2は著しい細胞溶解を誘導せず、毒素と変異体が組み合わされた時に毒素の毒性を変えなかった。しかしながら、毒素-ala2(22.5 μg/ml)と

10

20

30

40

50

のプレインキュベーションによって、毒素(11.25 μg/ml)に対するヒト血清の中和能力は大幅に低下した(図3、3番目および7番目のバーを比較せよ)。2倍過剰の変異体が血清の中和能力を大きく約50%低減することができるので、この弱毒化変異体はヒト血清に存在する中和抗体に結合する能力を保持している。

【0153】

本発明者らまた、PSM 3の位置V4およびL15の変異体も作製した。図4に示したように、PSMのこれらの両部位にグリシン変異(PSM-gly2:V4A/L15A)があると毒素は強く弱毒化されたが、他の変異体は部分的な弱毒化を示した。

【0154】

実施例3: AT62と毒素およびPSMの融合構築物の作製

10

AT62ワクチンは様々な動物モデルにおいて試験された時に効力を示した(Adhikari, et al., 2012, PLoS One, 7 (6):e38567)。本発明者らは、可動性リンカー(GGGGS; すなわちG4S)を用いて、コアサブユニットであるAT62がPSM 3、毒素、またはその両方と融合し、C末端6×Hisが隣接している3種の融合タンパク質を作製した(図5AおよびB)。大腸菌において発現するように最適化された核酸配列コドンを調製し、3種の融合タンパク質を小規模で產生した。構築物の特異性およびサイズを、AT62特異的抗体(6C12)を用いたウエスタンプロットによって確認した(図5C)。配列を表5に示した。それぞれの場合で、AT62オリゴペプチドに一重下線をひき、毒素に二重下線をひき、PSM PSM 3に破線をひいた。AT62およびブドウ球菌エキソトキシンB(SEB)を含む、さらなる融合タンパク質も示した。

【0155】

(表5) AT62融合オリゴペプチド

20

| 融合ペプチド | アミノ酸配列 | SEQ ID NO | コドン最適化核酸配列 | SEQ ID NO |
|----------|--|-----------|---|-----------|
| AT62_DT | <u>ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKT</u> <u>GDLVTYDKENGMHKKVFYSFI</u> <u>DDKNHNKKLLVIRTKGTIAGG</u> <u>GGGGGGGSMAQDIISTIGDLVK</u> <u>WIDTVNKFTKKHHHHHH</u> | 18 | ATGGCGGATAGCGACATCAACATCA AAACGGGTACTACGGACATTGGCAG CAATACGACCGTCAAGACCGGTGAT CTGGTCACCTATGACAAAGAGAAATG GTATGCACAAAAAGGTGTTTACAG CTTCATTGATGACAAAAATCACAC AAGAAGCTGTTGGTTATTCTGTACCA AAGGCACCATTGCCGGTGGTGGCGG TTCCGGCGGTGGCGGTAGCATGGCA CAGGACATCATCTTACCATCGGG ATCTGGTGAAATGGATCATTGATAC CGTTAACAGATTCACGAAAAAGCAT CATCACCATCACCACTGATAACTCG AGCACCAACCACCAACCACACTGAGA TCAG | 17 |
| AT62_PSM | <u>MADSDINIKTGTTDIGSNTTV</u> <u>KTGDLVTYDKENGMHKKVF</u> <u>YSFDDKNHNKKLLVIRTKGT</u> <u>IAGGGGSGGGGSMEFYAKLF</u> <u>KFKDLLGKELGNHHHHHH</u> | 20 | ATGGCGGATAGCGACATCAACATCAA AACGGGTACTACGGACATTGGCAGCA ATACGACCGTCAAGACCGGTGATCTG GTCACCTATGACAAAGAGAAATGGTAT GCACAAAAAGGTGTTTACAGCTTCAG | 19 |

30

| 融合ペプチド | アミノ酸配列 | SEQ ID NO | コドン最適化核酸配列 | SEQ ID NO |
|-------------|--|-----------|---|-----------|
| | | | TTGATGACAAAAATCACACAAAGAAG CTGTTGGTTATTCTGACCAAAGGCACC ATTGCCGGTGGTGGCGCTCCGGTGG CGGTGGTTCTATGGAATTGTTGCAAA GCTGTTCAAATTCTTAAGGATCTGCT GGTAAATTCTGGCAACAACCATC ATCACCATCACCACTGATAACT | |
| AT62_DT_PSM | MADSDINIKTGTIDGSNTTV KTGDLVTYDKENGMHKKVF YSFIDDKNHNKKLLVIRTKGT <u>IAGGGGSMAQDIUSTIGDLVK</u> <u>WIDTVNKETKKGGGGSMEF</u> YAKLEKEFKDILLGKELGNHH HHHHH | 22 | ATGGCGGATAGCGACATCAACATCAA AACGGGTACTACGGACATTGGCAGCA ATACGACCGTCAAGACCGGGTATCTG GTCACCTATGACAAAGAGAATGGTAT GCACAAAAAGGTGTTTACAGCTTCA TTGATGACAAAAATCACACAAAGAAG CTGTTGGTTATTCTGACCAAAGGCACC ATTGCCGGTGGTGGTGGTCTATGGCG CAGGACATCATTCCACGATCGCGA TCTGGTTAAATGGATCATCGACACCGT GAACAAGTTACCAAGAAAGGTGGT GCGGTAGCATGGAATTGTTGCAAA CTGTTCAAATTCTTAAGGATCTGCTG GGCAAGTTCTGGCAACAATCATCA TCACCATCACCACTGATAA | 21 |
| AT62_rSEB | MADSDINIKTGTIDGSNTTVK TGDLVTYDKENGMHKKVFYS FIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAG GGGGGGGSESQPDPKPDELH KSSKFTGLMENMKVLYDDNH VSAINVKSIDQFRYFDLISIKD TKLGNYDNVRVEFKNKLAD KYKDKYVDVFGANAYYQCAF SKKTNIDSHQTDKRKTCMYG GVTEHNGNQLDKYRSITVRVF EDGKNLLSFVDVQTNKKVTAQ ELDYLTRHYLVKNKKLYEFNN SPYETGYIKFIENENSFWYDM MPAPGDKFDQSKYLMYNDN KMVDSDKDVKIEVYLTTPKKK | 23 | CATATGGCAGACTCGGACATCAACAT CAAAACGGGACGACGGACATTGGCT CAACACGACGGTGAAACGGGGGAC CTGGTGACCTACGACAAAGAAAACGG CATGCATAAAAAGTGTTTATAGCTT CATCGATGACAAAACACAAACAAAA AACTGCTGGTCATTCTGACCAAGGGT ACGATCGCAGGTGGTGGTGGTCTGG CGGTGGTGGTAGTGAATCCCAGCCG ACCCGAAACCGGACGAACCTGCATAAA AGCTCTAAATTACCGGCCTGATGGA AAATATGAAAGTGTGATGATGACA ACCACGTGTAGCCATTAAATGTTAAAT CGATCGATCAATTCCGTATTTCGACC TGATTTACTCAATCAAAGATACCAA CTGGGCAACTATGACAATGTGCGCGT TGAATTCAAAAACAAAGATCTGGCAG ACAAATACAAAGATAAATACGTGAC GTGTTGGTGCATGCTTACCGGTTGGT TGCCTTTCAGCAAGAAAACCAACGA TATCAACTCTCATCAAACCGACAAAC GTAAAACGTGTATGTATGGCGGTGT ACCGAACACAACGGCAATCAGCTGGA TAAATACCGTAGTATCACGGTTGGT CTTGAAAGATGGTAAAACCTGCTGT CCTTCGATGTCCAGACCAACAAGAAA AAAGTGACGGCACAAGAACTGGATTA TCTGACCCGCCATTACCTGGTAAAAAA CAAAACTGTACGAATTCAACAACT CACCGTATGAAACGGGCTACATCAA TTCATCGAAAACGAAAACCTCGTTCTG GTACGATATGATGCCGGCCCCGGCG ATAAATTGACCAAGTCCAAATATCTG ATGATGTACAATGATAACAAAATGGT TGACTCCAAAGATGTGAAATCGAAG TTTACCTGACGACGAAAAAAATAA GGATCC | 25 |
| rSEB_AT62 | MESQPDPKPDELHKSSKFTGL | 26 | CATATGGAAAGCCAACCGGACCCGAA | 28 |

| 融合ペプチド | アミノ酸配列 | SEQ ID NO | コドン最適化核酸配列 | SEQ ID NO | |
|--------------|--|-----------|---|-----------|----|
| | MENMKVLYDDNHVSAINVSKI DQFRYFDLISIKDTKLGNYDN VRVEFKNKDLADKYKDKYVD VFGANAYYQCAFSSKTNINS HQTDKRKTCMYGGTEHNGN QLDKYRSITVRVFEDGKNLLSF DVQTNNKKVTAQELDYLTRH YLVKNKKLYEFNNSPYETGYI KFIENNSFWYDMMPAPGDKF DQSKYLMYNDNKMVDKSDK VKIEVYLTTKKGGGGGGGG SADSDINIKTGTTDIGSNTVKT GDLVTYDKENGMHKKVFYSFI DDKNHNKKLLVIRTKGTIA | | ACCGGACGAACCTGCATAAAAGCTCAA AATTCA CGGGCCTGATGGAAAACATG AAAGTGCTGTACGACGATAACCATGT CAGTGCATTAAATGTGAAATCCATCG ATCAGTTTCGTTATTCGACCTGATT ACTCAATCAAAGATACCAAACTGGGC AACTATGACAATGTGCGCGTTGAATT CAAAAACAAAGATCTGGCAGACAAAT ACAAAGATAAAATACGTCGACGTGTT GGTGCAGATGCCATTACCGATGCGC TTTCAGCAAGAAAACCAACGATATT ATTGCATCAAACCGACAAACGTA ACGTGTATGTATGGCGGTGTCACCGA ACACAA CGGCAATCAACTGGATAAAT ACCGTAGCATCACGGTTCGCGTCTTG AAGATGGTAAAACCTGCTGTCTTC GACGTGCAGACCAACAAGAAAAAGT TACGGCGCAAGAACTGGATTATCTGA CCCGCCATTACCTGGTTAAAACAAA AAACTGTACGAATTCAACAACTCACC GTATGAAACGGGCTACATCAAATTCA TCGAAAACGAAAACCTGTTCTGGTAC GATATGATGCGGGCCCCGGCGATAA ATTGACCAAGAGTAAATACCTGATGA TGACAACGATAACAAATGGTGGAT TCCAAGACGTGAAAATTGAAGTTA TCTGACCACCAAGAAAAAGTGGTG GTGGTAGCGGTGGTGGTAGCGCC GATTCTGACATTAACATCAAAACCGG CACCACGGATATCGGTCTAATACCA CGTTAAAACCGGCGATCTGGTCACG TATGACAAAGAAAACGGTATGCACAA AAAAGTGTTTATTCTCTATTGACGA CAAAACATCACAAACAAAAACTGCTGG TTATCCGCACAAAGGCACCATCGCA TAAGGATCC | | 10 |
| AT62_rSEB_DT | MADSDINIKTGTTDIGSNTV KTGDLVTYDKENGMHKKV YSFIDDKNHNKKLLVIRTKGT IAGGGGSESQDPDPKDELHKS SKFTGLMENMKVLYDDNHV SAINVKSIDQFRYFDLISIKD TKLGNYDNVRVEFKNKDLA DKYKDKYVDVFGANAYYQC AFSKKTNNDINSHQTDKRKTC MYGGVTEHNGNQLDKYRSIT VRVFEDGKNLLSFDVQTNNK KVTAQELDYLTRHLYLVKNKK LYEFNNSPYETGYI KFIENNS FWYDMMPAPGDKFDQSKYL MMYNDNKMVDKDVKIEVY LTTKKGGGGSMAQDIISTIG DLVKWIIDTVNKFTKK. | 29 | CATATGGCAGATAGCGACATCAACAT CAAGACGGGCACGACGGGACATTGGCT CAAACACGACGGTGAAAACGGGTGAC CTGGTTACCTACGATAAAAGAAAACGG CATGCATAAGAAGGTGTTTATTCTTT CATCGATGACAAAAACCCACAATAAAA AGCTGCTGGTTATTGTCACCAAGGGT ACGATTGCGGGCGGTGGCGGTAGTGA ATCCCAGCGGACCCGAAACCGGACG AACTGCATAAGAGCTCTAAATTAC GGCCTGATGAAAATATGAAAGTGCT GTATGATGACAACCACCGTCTCAGCCA TTAATGTGAAATCGATCGATCAATT GTTATTTCGACCTGATTACAGCATCA AGGATACCAAAACTGGGCAACTACGAC AATGTGCGCGTTGAATTAAAAACAA GGATCTGGCAGACAAATATAAGGATA AATACGTCGACGTGTTGGTGC GCCTATTACCAAGTGCCTTTCAGTAA AAGACCAACGATATCAACTCCCAC AACCGACAAGCGTAAAACGTGTATGT ATGGCGGTGTCACCGAACACAACGGC AATCAGCTGATAAATACCGTTCAAT CACGGTTCGCGTCTTGAAGAGATGGTA AAAACCTGCTGTCGTTCGATGTT CAGA | 31 | 20 |
| | | | | | 30 |
| | | | | | 40 |

| 融合ペプチド | アミノ酸配列 | SEQ ID NO | コドン最適化核酸配列 | SEQ ID NO |
|--------|--------|-----------|---|-----------|
| | | | CCAATAAAAAGAAAGTCACGGCACAA GAACGGATTATCTGACCCGCCATTAC CTGGTTAAGAACAAAGAAGCTGTACGA ATTCAACAAACAGTCGTATGAAACGG GCTACATCAAGTTCATCGAAACGAA AACAGCTTCTGGTACGATATGATGCC GGCACCCGGGTGATAAGTCGACCAGA GCAAGTACCTGATGATGTACAACGAT AACAAAGATGGTTGATTCTAAGGACGT GAAAATCGAAGTTATCTGACCACGA AGAAAAAAGGGCGGTGGCGGTAGCAG GCTCAAGATATTATCTACCATCGGT GACCTGGTGAAGTGGATTATTGACAC GGTGAACAAGTTACGAAGAAATGAG GATCC | 10 |

【0156】

実施例4: 融合構築物の免疫原性

融合構築物のうちの2つ(AT62_DTおよびAT62_PSM)と対照(AT62AA)の免疫原性を、それぞれ、SwissWebsterマウスの4匹、4匹、および8匹のマウスからなる群において試験した。マウスの皮下に、タンパク質(10 μg)とアジュバント(Sigma Adj System;MPLベースのアジュバント)(5 μg)を用いて2週間の間隔をあけて3回、免疫した(0日目、14日目、および28日目)。3回目の免疫化後に、マウスをそれぞれの 毒素またはPSM 3ペプチド(10 μg)でブーストし、前に述べたようにELISAを用いて、マウスから収集した血清試料が抗原と結合するかどうか試験した(Adhikari, et al., 2012, PLoS One, 7 (6):e38567)。簡単に述べると、96ウェルプレートを、100ng/ウェルの完全長 毒素(List Biological Laboratories, Campbell, CA)、PSM 3、または 毒素で4 で一晩コーティングした。プレートをStarting Block緩衝液(Thermo Scientific)で室温(RT)で1時間ブロックした。血清試料を、希釈剤として開始ブロック緩衝液を用いて1:100に希釈した。プレートを3回洗浄し、試料希釈液を100 μl/ウェルで加えた。プレートをRTで1時間インキュベートし、3回洗浄した後に、開始ブロック緩衝液に溶解した結合体ヤギ抗マウスIgG(H&L)-HRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)を加えた。プレートをRTで1時間インキュベートし、前記のように洗浄し、HRPを検出するためにTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)と30分間インキュベートした。650nmでの光学密度を、Versamax(商標)プレートリーダー(Molecular Devices CA)を用いて測定した。

【0157】

図6に示したように、融合構築物AT62-PSMおよびAT62-DTをワクチン接種したマウスはヘモリジンに対して強力な抗体応答を示した。これは、AT62が融合構築物の状況において免疫原性を保持したことを示している。PSM 3および 毒素ペプチドに対する応答も低レベルであるが検出することができた。これらのデータから、両成分に対する抗体応答の誘導も可能であることが示唆される。

【0158】

- 以下のさらなる構築物が構築および試験される:
- PCT/US12/67483に記載のような弱毒化LukS-PV変異体のN末端またはC末端における、1個のPSM 3もしくは 毒素またはPSM 3もしくは 毒素(野生型もしくは任意の変異体)の2個、3個、4個、5個、もしくは6個の縦列反復の融合
 - 弱毒化スーパー抗原ワクチンSEB_{L45R/Y89A/Y94A}、SEA_{L48R/D70R/Y92A}、またはTSST-1_{L30R/D27A/I46A}のN末端またはC末端における、1個のPSM 3もしくは 毒素またはPSM 3もしくは 毒素(野生型もしくは任意の変異体)の2個、3個、4個、5個、もしくは6個の縦列反復の融合
 - 1個のPSM 3もしくは 毒素またはPSM 3もしくは 毒素(野生型もしくは任意の変異体)の2個、3個、4個、5個、もしくは6個の縦列反復と、AT62と、スーパー抗原ワクチンSEB_{L45R/Y89A/Y94A}、SEA_{L48R/D70R/Y92A}、またはTSST-1_{L30R/D27A/I46A}のいずれかとの融合

【0159】

3つの潜在的な融合構築物の一例を図7に模式的に示した。

【0160】

実施例5：ブドウ球菌スーパー抗原トキソイドの三重融合変異体

最も蔓延している黄色ブドウ球菌スーパー抗原(Sag)は、SEB、SEC、SEA、およびTSST-1である。SEB、SEA、およびTSST-1に対する組換えワクチン(米国特許第6,713,284号；同第6,399,332号；同第7,087,235号；同第7,750,132号；同第7,378,257号、および同第8,067,202号の対象)が開発され、毒素性ショック症候群モデルにおいて保護効力について個別に試験された(Bavari, et al., 1996, *J Infect Dis.*,; Bavari and Ulrich, 1995, *Infect Immun.*, 63 (2):423-429; Boles, et al., 2003 *Clin Immunol.*, 108 (1):51-59; Boles, et al., 2003, *Vaccine*, 21 (21-22):2791-2796; Ulrich, et al., 1998, *Vaccine*, 16 (19):1857-1864)。SAgはSA疾患の合併症において重要な役割を果たすが、SAgに基づくワクチン開発における大きな障害は、様々なSA株に、これらの毒素の20種を超える変種があることである。

【0161】

本発明者らは、SEB、SEA、およびTSST-1に対するヒト抗体が広範囲の黄色ブドウ球菌Sagを中和する能力を以下の方法によって評価した。

【0162】

ヒト抗SAg抗体のアフィニティ精製。 SEA、SEB、およびTSST-1を、製造業者のプロトコールに従って、Aminolink(登録商標)plus固定化カラム(Thermo Scientific, Rockford, IL)のアガロースビーズ(1mLビーズ体積あたり1mg SAg)とカップリングした。IVIG(Omrix Biopharmaceuticals, Nes-Ziona, Israel)から特異的抗体を、製造業者のプロトコールに従い、わずかな変更を加えてアフィニティ精製した。穏やかに揺らしながら50mLのIVIGを毒素結合ビーズとRTで1時間30分インキュベートし、遠心分離し、上清を除去し、新鮮な50mLのIVIGをビーズともう1時間30分インキュベートした。グリシンHCl pH2.5緩衝液を用いて溶出を行った。タンパク質分解を回避するために、溶出画分を収集して、(0.1M Tris) pH9を含有する中和緩衝液に溶解して、最終pHを6~7にした。アフィニティ精製された抗体の濃度をBCAアッセイによって求めた。

【0163】

インビトロでの毒素中和アッセイ。 末梢血単核球を、非特定化された健常ヒトドナーのヘパリン添加血液から、他の場所(Berthold, 1981. *Blut*, 43 (6):367-371)に記載のようにFicoll勾配遠心分離法によって単離した。単離された末梢血単核球をPBSで2回洗浄し、熱失活胎仔ウシ血清(HI-FBS)を含む10%DMSOに入れて-80℃で一晩凍結し、さらに使用するまで液体窒素中で保管した。アッセイのために、細胞を洗浄し、5%胎仔ウシ血清(FBS)、非必須アミノ酸、ペニシリン/ストレプトマイシン、およびL-グルタミンを加えたRPMI 640培地に再懸濁した。細胞をトリバンブルー排除によって数え、 2×10^6 細胞/mlに調整した。生存率95%超の、この細胞懸濁液 $75 \mu l$ (1.5×10^5 個の細胞)を、以下の通り抗体/抗原ミックスを含有する96ウェルプレートのウェルに2つ組で添加した：半対数(semi-log)希釈(0.02~20μg/ml)のアフィニティ精製された抗SEA、抗SEB、抗TSST-1または半対数希釈(2.5~2500μg/ml)IVIG 37.5μl、およびSEB、SEC1-3、SEE、SEH、SEI、SEK、TSST-1、SpeCいづれかの1ng/ml調製物、または2ng/mlのSED、または3ng/mlのSpeA 37.5μl。精製ポリクローナルAbの相乗効果的な活性を試験するために、抗SEA、抗SEB、および抗TSST-1の組み合わせを0.02~20μg/mlの半対数希釈で使用し、前記と同量の毒素を使用した。毒素しか含まない培地を含有するウェルは正の対照として役立った。プレートを、5%CO₂-95%空気の雰囲気中で37℃で48時間インキュベートした。プレートを1600xgで10分間、遠心分離し、培養上清を収集し、IFN濃度(pg/ml)をELISA(Human IFN-gamma DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN)によって製造業者のプロトコールに従って求めた。プレートをVersamaxプレートリーダーを用いて450nmで読み取り、データをExcelに移し、分析した。正の対照ウェルはIFN阻害が0%であるとみなされ、アフィニティ精製抗体の存在下でのIFN産生阻害は正の対照と試料とのIFN濃度差と計算した。中和薬剤(精製抗体

10

20

30

40

50

またはIVIG)のIC₅₀(IFN 産生が50%阻害されるのに必要な抗体モル濃度)値を、4パラメーターロジスティックモデル(equation 205, XLfit version 5.2)を用いて求めた。

【0164】

図8に示したように、これらの3種の毒素それぞれに対するアフィニティ精製ヒト抗体(I VIGに由来)は相同な毒素に対する強力な中和と、他のいくつかのSAgに対する様々な程度の交差中和をもたらした。しかしながら、3種のヒト抗体からなるカクテルを用いると交差中和活性は著しく拡大した。

【0165】

これらの結果を考えて、3種のトキソイドスーパー抗原:SEB_{L45R/Y89A/Y94A}、SEA_{L48R/D70R/Y92A}、およびTSST-1_{L30R/D27A/I46A}変異体の新規の融合物を原核生物宿主、例えば、大腸菌において単一分子として発現させる。このような融合タンパク質は、製造が簡単なだけでなく、一緒に単一分子にまとめられた共通エピトープが免疫優性的な様式で働くことができる時に様々なスーパー抗原間の交差反応性抗体の誘発を強化することができる個別の成分よりも優れている可能性がある。以下の融合タンパク質が構築される。

【0166】

4個のグリシンおよび1個のセリンの1つまたは複数の反復からなるリンカーなどがあるが、これに限定されない一般的に用いられるリンカー(L)を用いた、以下の順序の1つをとるSEB_{L45R/Y89A/Y94A}、SEA_{L48R/D70R/Y92A}、およびTSST-1_{L30R/D27A/I46A}変異体の融合物:

BAT融合物:SEB_{L45R/Y89A/Y94A}-L-SEA_{L48R/D70R/Y92A}-L-TSST-1_{L30R/D27A/I46A}

BTA融合物:SEB_{L45R/Y89A/Y94A}-L-TSST-1_{L30R/D27A/I46A}-L-SEA_{L48R/D70R/Y92A}

ABT融合物:SEA_{L48R/D70R/Y92A}-L-SEB_{L45R/Y89A/Y94A}-L-TSST-1_{L30R/D27A/I46A}

ATB融合物:SEA_{L48R/D70R/Y92A}-L-TSST-1_{L30R/D27A/I46A}-L-SEB_{L45R/Y89A/Y94A}

TAB融合物:TSST-1_{L30R/D27A/I46A}-L-SEA_{L48R/D70R/Y92A}-L-SEB_{L45R/Y89A/Y94A}

TBA融合物:TSST-1_{L30R/D27A/I46A}-L-SEB_{L45R/Y89A/Y94A}-L-SEA_{L48R/D70R/Y92A}

【0167】

代表的な配列を表6に示した。

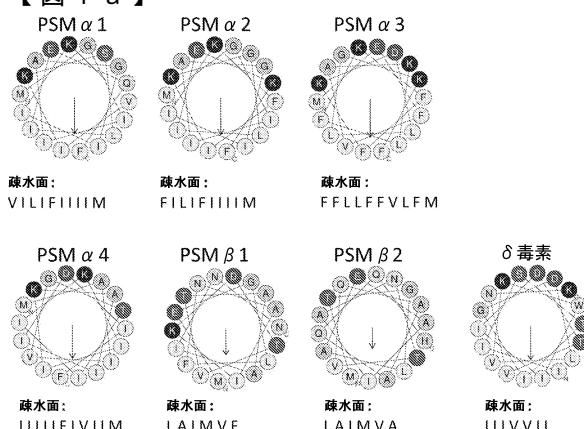
【0168】

(表6) SAG融合タンパク質

| | | SEQ ID NO |
|---|---|-----------|
| BAT融合物: SEB _{L45R/Y89A/Y94A} - L- SEA _{L48R/D70R/Y92A} - L-TSST- 1 _{L30R/D27A/I46A} | MESQPDPKPDELHKSSKFTGLMENMKVLYDDNHVSAINVKSIDQFRYFDLIYSIKDT KLGNYDNVRVEFKNKDLADKYDKYDVFGANAYYQCAFSSKKTNDINSHQTDKRKT CMYGGVTEHNGNQLDKYRSITVRVFEDGKNLSDFDVQTNKKVTAQELDYLTRHYL VKNKKLYEFNNSPYETGYIKFIENENSFWYDMMPAPGDKFDQSKYLMYNDNKM VDSKDVKIEVYLTTPKKGGGSEKSEEINEKDLRKKSSELQGTALGNLKQIYYYNEKAKTE NKEHDQFRQHTILFKGFTTDHSWYNDLLVRFDSDKDIVDKYKGKKVLDYGAQYQ CAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEKKVPINLWLDGKQNTVPLETVKTNKKNV TVQELDLQARRYLQEKNLYNSDVFDGKVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQGQYS NTLLRIYRDNKNTINSENMHIDIYLYTSGGGSSTNDNIKDLLDWYSSGSDTFTNSEVL ANSRGSMRIKNTDGSISLIAFPSPYYSPAFTKGEKVDLNTKRTKKSQHTSEGTYIHFQI SGVTNTEKLPTPIELPLKVVKHGKDSPLKYWPKFDDKQLAISTLDFEIRHQLTQIHGLY RSSDKTGGYWKITMNDGSTYQSDLSKKFEYNTEKPPINIDEIKTIEAEIN | 32 |
| BTA 融合物:SEB _{L45R/Y89A} / | MESQPDPKPDELHKSSKFTGLMENMKVLYDDNHVSAINVKSIDQFRYFDLIYSIKDT KLGNYDNVRVEFKNKDLADKYDKYDVFGANAYYQCAFSSKKTNDINSHQTDKRKT | 33 |

| | | |
|--|--|--|
| | HVSAINVKSIDQFRYFDLISIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDFGANA YYQCAF SKKTNDINSHQTDKRKTCMYGGVTEHNGNQLDKYRSITVRVFEDGKNLLS FDVQTNKKKVTAQELDYLTRHVLVKNKKLYEFNNSPYETGYIKFIENENSFWYDMM PAPGDKFDQSKYLM MYNDNKM VDSKDVKIEVYLTTKKG GGSEKSEEINEKDLRKK SELQGTALGNLKQIYYNEAKTENKESHDQFRQHTILFKGFFTDHSWYNDLLVRFD SKDIVDKYKGKKV DLYGAYAGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEKKV PIN LWLDGKQNTVPLETVKTNKKNVTQELDLQARRYLQEKNLYNSDVFDGKVQRGLI VFHTSTEPVNYDLFGAQGQYSNTLLRIYRDNK TINSEN MHIDILYTS | |
|--|--|--|

【図1a】



【図1b】

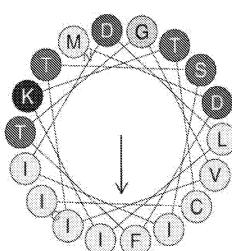
| パラメータ | ○ 毒素 | | | | | |
|-----------------------|------|------|-------|------|-------|---------|
| | WT | ala | 2 ala | gly | 2 gly | gly ala |
| 疎水性 <H> | 0.65 | 0.57 | 0.52 | 0.55 | 0.49 | 0.50 |
| 疎水モーメント < μ H> | 0.62 | 0.58 | 0.53 | 0.57 | 0.51 | 0.52 |
| ホイール ヘリックス | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

| パラメータ | ○ 毒素 | | | | | |
|-----------------------|------|------|-------|------|-------|---------|
| | WT | ala | 2 ala | gly | 2 gly | gly ala |
| 疎水性 <H> | 0.63 | 0.55 | 0.50 | 0.56 | 0.47 | 0.49 |
| 疎水モーメント < μ H> | 0.71 | 0.67 | 0.62 | 0.65 | 0.59 | 0.60 |
| ホイール ヘリックス | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

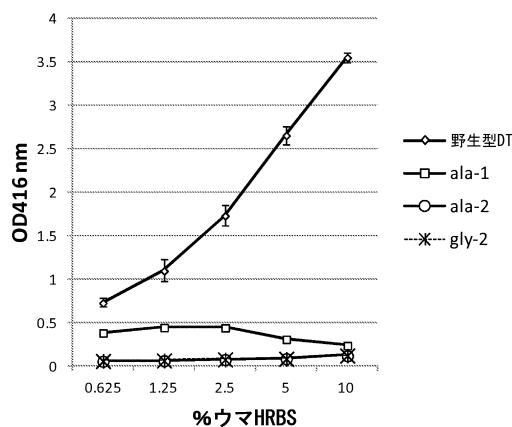
【図1c】

フェノール可溶性モジュリン-mec [黄色ブドウ球菌]

アミノ酸配列: mdftgvitsi idliktciga fg



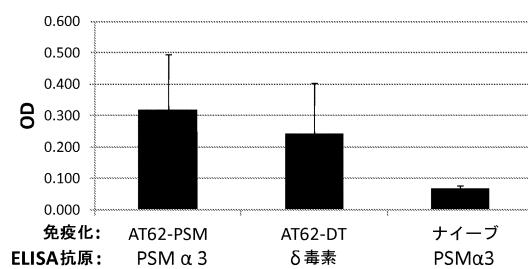
【図2】 野生型および変異体δ毒素(DT)を用いた
ウマ血液溶血



【図3】

| DT | DT-ala-2 | OD@416nm |
|----|----------|----------|
| - | - | ~0.05 |
| - | + | ~1.45 |
| + | - | ~0.45 |
| + | + | ~0.25 |

【図6】
 δ毒素およびPSMに対するAb応答



| 免疫化: | ELISA抗原: | OD |
|------|----------|-------|
| 免疫化: | AT62-PSM | ~2.5 |
| | AT62-DT | ~3.5 |
| ナイーブ | Hla (wt) | ~0.05 |

【図7】

【図4】

【配列表】

0006632974000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | |
|-------------|-------|-----------|---------------------|
| C 1 2 P | 21/02 | (2006.01) | C 1 2 P 21/02 |
| A 6 1 P | 37/04 | (2006.01) | A 6 1 P 37/04 |
| A 6 1 P | 31/04 | (2006.01) | A 6 1 P 31/04 |
| A 6 1 P | 43/00 | (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 2 1 |
| A 6 1 K | 39/00 | (2006.01) | A 6 1 K 39/00 H |
| A 6 1 K | 39/39 | (2006.01) | A 6 1 K 39/39 |
| A 6 1 P | 11/00 | (2006.01) | A 6 1 P 11/00 |
| A 6 1 K | 39/02 | (2006.01) | A 6 1 K 39/02 |

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 アマン モハマド ジャバド

アメリカ合衆国 メリーランド州 ロックビル サークル ドライブ 12809

(72)発明者 アディカリ ラジヤン プラサド

アメリカ合衆国 メリーランド州 ゲイサーズバーグ ロングドラフト ロード 16917

(72)発明者 シュレーニン セルゲイ

アメリカ合衆国 メリーランド州 ポイント オブ ロックス キボンズ ロード 1629

(72)発明者 ホルツバーグ フレデリック ウェイン

アメリカ合衆国 メリーランド州 タニータウン バフィントン レーン 4625

(72)発明者 カラウズム ハティス

アメリカ合衆国 メリーランド州 シルバー スプリング ジョージア アベニュー 8750

アパートメント# 1105ビー

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特表2002-502363 (JP, A)

国際公開第00/002523 (WO, A1)

特表2005-524381 (JP, A)

Indian. J. Microbiol. , 2012年, vol.52, no.3, p.449-55

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / W P I D S / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

SwissProt / GeneSeq