

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-151501
(P2013-151501A)

(43) 公開日 平成25年8月8日(2013.8.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/31 (2006.01)	C07K 14/31 ZNA	4C076
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00 H	4C085
A61K 47/42 (2006.01)	A61K 47/42	4C090
A61P 31/04 (2006.01)	A61P 31/04	4H045
C08B 37/00 (2006.01)	C08B 37/00 P	

審査請求 有 請求項の数 23 O L (全 101 頁)

(21) 出願番号 特願2013-30434 (P2013-30434)
 (22) 出願日 平成25年2月19日 (2013. 2. 19)
 (62) 分割の表示 特願2012-517657 (P2012-517657) の分割
 原出願日 平成22年6月22日 (2010. 6. 22)
 (31) 優先権主張番号 61/219, 134
 (32) 優先日 平成21年6月22日 (2009. 6. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 309040701
 ワイス・エルエルシー
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州
 7940. マジソン, ファイブ ジラルダ
 ファームズ
 (74) 代理人 100133927
 弁理士 四本 能尚
 (74) 代理人 100137040
 弁理士 宮澤 純子
 (74) 代理人 100147186
 弁理士 佐藤 真紀
 (74) 代理人 100174447
 弁理士 龍田 美幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 黄色ブドウ球菌 (STAPHYLOCOCCUS AUREUS) 抗原の免疫原性組成物

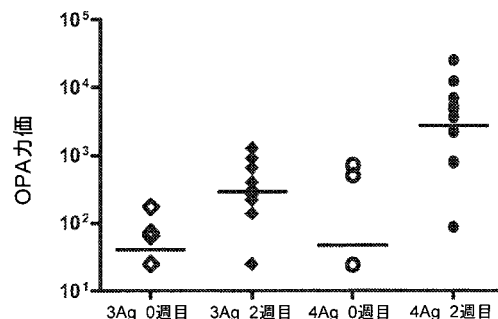
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ワクチンにおいて用いるため、またはブドウ球菌感染および関連疾患を予防もしくは治療するための手段として、受動免疫をもたらすためのポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を誘導するために必要な免疫原性組成物の取得。

【解決手段】 黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) から得られるポリペプチドおよび多糖を含む免疫原性組成物の単離に関する。担体タンパク質にコンジュゲートした黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) 被膜多糖を含む免疫原性組成物に関する。さらに、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) のポリペプチドおよび被膜多糖の免疫原性組成物を用いて、対象において黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) に対する免疫応答を誘発する方法に関する。

【選択図】 図 2 0

図20



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型からなる群から選択される少なくとも 3 つの成分を含む、免疫原性組成物。

【請求項 2】

単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型を含む、免疫原性組成物。

【請求項 3】

単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) ポリペプチドをさらに含む、請求項 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質をさらに含む、請求項 2 または請求項 3 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

ClfA ポリペプチドまたは ClfB ポリペプチドが、ClfA または ClfB のフィブリノーゲン結合ドメインを含むポリペプチド断片である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

ClfA ポリペプチド断片または ClfB ポリペプチド断片が、ClfA または ClfB の N1 ドメイン、N2 ドメイン、および N3 ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインである、請求項 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

ClfA ポリペプチド断片または ClfB ポリペプチド断片が、ClfA または ClfB の N2 ドメインおよび N3 ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインである、請求項 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

ClfA のフィブリノーゲン結合ドメインが、フィブリノーゲンと ClfA の天然のフィブリノーゲン結合ドメインとで観察される結合と比較して低減したレベルでフィブリノーゲンに結合する、請求項 5、6、または 7 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

ClfA のフィブリノーゲン結合ドメインが、Tyr338、Tyr256、Pro336、Lys389、Ala254、および Ile387 の 1 つまたは複数におけるアミノ酸置換を有することを介して、フィブリノーゲンと ClfA の天然のフィブリノーゲン結合ドメインとで観察される結合と比較して低減したレベルでフィブリノーゲンに結合する、請求項 8 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

Tyr338、Tyr256、Pro336、Lys389、Ala254、および Ile387 の 1 つまたは複数におけるアミノ酸置換が、Ala または Ser へのものである、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

Tyr338 が Ala に置換されている、請求項 10 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

ClfA、ClfB、または MntC が組換えによって生産される、請求項 1 から 11

10

20

30

40

50

のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

莢膜多糖 5 型が、20 から 1000 kDa の間の高分子量莢膜多糖である、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

高分子量莢膜多糖 5 型が、70 から 300 kDa の間の分子量を有する、請求項 13 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

莢膜多糖 5 型が、10% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 16】

莢膜多糖 5 型が、50% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

莢膜多糖 5 型が、75% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

莢膜多糖 8 型が、20 から 1000 kDa の間の高分子量莢膜多糖である、請求項 1 から 17 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

高分子量莢膜多糖 8 型が、70 から 300 kDa の間の分子量を有する、請求項 18 に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 20】

莢膜多糖 8 型が、10% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 1 から 19 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 21】

莢膜多糖 8 型が、50% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 1 から 19 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 22】

莢膜多糖 8 型が、75% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 1 から 19 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 23】

担体タンパク質が、ジフテリア菌 (*C. diphtheriae*) 毒素 CRM₁₉₇ である、請求項 1 から 22 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 24】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質が、脂質化されたタンパク質である、請求項 1 または 4 から 23 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 25】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質が、脂質化されたタンパク質ではない、請求項 1 または 4 から 23 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 26】

単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型を含む、免疫原性組成物。

【請求項 27】

単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質をさらに含む、請求項 23 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 28】

ClfB ポリペプチドが、ClfB のフィブリノーゲン結合ドメインを含むポリペプチ

50

ド断片である、請求項 26 または 27 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 29】

C1fB ポリペプチド断片が、C1fB の N1 ドメイン、N2 ドメイン、および N3 ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインである、請求項 28 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 30】

C1fB ポリペプチド断片が、C1fB の N2 ドメインおよび N3 ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインである、請求項 28 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 31】

C1fB のフィブリノーゲン結合ドメインが、フィブリノーゲンと C1fB の天然のフィブリノーゲン結合ドメインとで観察される結合と比較して低減したレベルでフィブリノーゲンに結合する、請求項 28、29 および 30 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 32】

C1fB タンパク質または MntC タンパク質が組換えによって生産される、請求項 26 から 31 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 33】

莢膜多糖 5 型が、20 から 1000 kDa の間の高分子量莢膜多糖である、請求項 26 から 32 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 34】

高分子量莢膜多糖 5 型が、70 から 300 kDa の間の分子量を有する、請求項 26 から 32 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 35】

莢膜多糖 5 型が、10% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 26 から 34 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 36】

莢膜多糖 5 型が、50% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 26 から 34 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 37】

莢膜多糖 5 型が、75% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 26 から 34 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 38】

莢膜多糖 8 型が、20 から 1000 kDa の間の分子量を有する、請求項 26 から 37 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 39】

莢膜多糖 8 型が、70 から 300 kDa の間の分子量を有する、請求項 26 から 37 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 40】

莢膜多糖 8 型が、10% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 26 から 39 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 41】

莢膜多糖 8 型が、50% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 26 から 39 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 42】

莢膜多糖 8 型が、75% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 26 から 39 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 43】

黄色ブドウ球菌 (S. aureus) MntC が、脂質化されたタンパク質である、請求項 27 から 42 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 44】

黄色ブドウ球菌 (S. aureus) MntC が、脂質化されたタンパク質ではない、

50

請求項 27 から 42 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 45】

担体タンパク質が、ジフテリア菌 (*C. diphtheriae*) 毒素 CRM197 である、請求項 26 から 44 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 46】

単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) ポリペプチド、および単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質を含む、免疫原性組成物。

【請求項 47】

ClfA ポリペプチドが、ClfA のフィブリノーゲン結合ドメインを含むポリペプチド断片である、請求項 46 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 48】

ClfA ポリペプチド断片が、ClfA の N1 ドメイン、N2 ドメイン、および N3 ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインである、請求項 47 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 49】

ClfA ポリペプチド断片が、ClfA の N2 ドメインおよび N3 ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインである、請求項 47 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 50】

ClfA のフィブリノーゲン結合ドメインが、フィブリノーゲンと ClfA の天然のフィブリノーゲン結合ドメインとで観察される結合と比較して低減したレベルでフィブリノーゲンに結合する、請求項 47 から 49 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 51】

フィブリノーゲン結合ドメインが、Tyr338、Tyr256、Pro336、Lys389、Ala254、および Ile387 の 1 つまたは複数におけるアミノ酸置換を有することを介して、フィブリノーゲンへの低減した結合を示す、請求項 50 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 52】

Tyr338、Tyr256、Pro336、Lys389、Ala254、および Ile387 の 1 つまたは複数におけるアミノ酸置換が、Ala または Ser へのものである、請求項 51 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 53】

Tyr338 が Ala に置換されている、請求項 52 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 54】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) ClfB ポリペプチドが、ClfB のフィブリノーゲン結合ドメインを含むポリペプチド断片である、請求項 46 から 53 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 55】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) ClfB ポリペプチド断片が、ClfB の N1 ドメイン、N2 ドメイン、および N3 ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインである、請求項 54 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 56】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) ClfB ポリペプチド断片が、ClfB の N2 ドメインおよび N3 ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインである、請求項 54 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 57】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC が、脂質化されたタンパク質である、請求項 46 から 56 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 58】

10

20

30

40

50

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) Mnt C が、脂質化されたタンパク質ではない、請求項 46 から 56 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 59】

単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) Mnt C タンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型を含む、免疫原性組成物。

【請求項 60】

Mnt C タンパク質が組換えによって生産される、請求項 59 に記載の組成物。

【請求項 61】

莢膜多糖 5 型が、20 から 1000 kDa の間の高分子量莢膜多糖である、請求項 59 または 60 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 62】

高分子量莢膜多糖 5 型が、70 から 300 kDa の間の分子量を有する、請求項 59 から 61 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 63】

莢膜多糖 5 型が、10% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 59 から 62 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 64】

莢膜多糖 5 型が、50% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 59 から 62 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 65】

莢膜多糖 5 型が、75% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 59 から 62 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 66】

莢膜多糖 8 型が、20 から 1000 kDa の間の分子量を有する、請求項 59 から 65 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 67】

莢膜多糖 8 型が、70 から 300 kDa の間の分子量を有する、請求項 59 から 65 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 68】

莢膜多糖 8 型が、10% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 59 から 67 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 69】

莢膜多糖 8 型が、50% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 59 から 67 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 70】

莢膜多糖 8 型が、75% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 59 から 67 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 71】

Sdr C、Sdr D、および Sdr E からなる群から選択されるセリン - アスパラギン酸反復 (Sdr) タンパク質ファミリーの少なくとも 1 つのタンパク質をさらに含む、請求項 1 から 70 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 72】

鉄表面決定基 B (IsdB) タンパク質をさらに含む、請求項 1 から 71 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 73】

アジュバントをさらに含む、請求項 1 から 72 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 74】

薬学的に許容できる担体をさらに含む、請求項 1 から 73 のいずれかに記載の免疫原性

10

20

30

40

50

組成物。

【請求項 75】

以下の抗原、Opp3a、DltD、HtsA、LtaS、IsdA、IsdC、SdrF、SdrG、SdrH、SrtA、SpA、Sbi FmtB、溶血素(hla)、溶血素、フィブロネクチン結合タンパク質A(fnbA)、フィブロネクチン結合タンパク質B(fnbB)、コアグラーゼ、Fig、map、パントン・バレンタイン型ロイコシジン(pvl)、毒素およびその変型、毒素(hlg)および変型、ica、免疫優性ABC輸送体、Mg²⁺輸送体、Ni ABC輸送体、RAP、自己溶解酵素、ラミニン受容体、IsaA/PisA、IsaB/PisB、SPOIIIE、SsaA、EbpS、SasA、SasF、SasH、EFB(FIB)、SBI、Npase、EBP、骨シアロ結合タンパク質II、アウレオリシン前駆体(AUR)/Seppl、Cna、ならびにそれらの断片、例えば、M55、TSST-1、mecA、ポリ-N-アセチルグルコサミン(PNAG/dPNAG)エキソ多糖、GehD、EbhA、EbhB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、HarA、EsxA、EsxB、エンテロトキシンA、エンテロトキシンB、エンテロトキシンC1、および新規な自己溶解酵素のいずれか1つをさらに含む、請求項1から74のいずれかに記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 76】

免疫学的に効果的な量の請求項1から75のいずれかに記載の免疫原性組成物を対象に投与することを含む、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)に対する免疫応答を誘発する方法。

20

【請求項 77】

免疫応答が、対象におけるブドウ球菌生物に関連する疾患もしくは症状を予防するかもしれないか、または、対象におけるブドウ球菌生物に関連する1つもしくは複数の症候を予防するかもしれないか、または、対象におけるブドウ球菌生物に関連する1つもしくは複数の症候を低減させるか、または、対象におけるブドウ球菌生物に関連する1つもしくは複数の症候を低減させる、請求項76に記載の方法。

【請求項 78】

疾患が、侵襲性の黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)疾患、敗血症、および保菌からなる群から選択される、請求項77に記載の方法。

【請求項 79】

対象が外科手術を受けている、請求項76に記載の方法。

30

【請求項 80】

外科手術が、待機的手術または非待機的手術である、請求項79に記載の方法。

【請求項 81】

外科手術が、心胸郭の外科手術である、請求項79に記載の方法。

【請求項 82】

誘発される免疫応答が、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)に対するオプソニン性貪食活性(OPA)を有する抗体の生成を含む、請求項76に記載の方法。

【請求項 83】

誘発される免疫応答が、免疫化されていない対象において観察されるものと比較して有意に高い力価の、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)に特異的なオプソニン性貪食抗体の生成を含む、請求項76に記載の方法。

40

【請求項 84】

オプソニン性貪食の力価が少なくとも1:20である、請求項83に記載の方法。

【請求項 85】

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)がMSSAである、請求項76から84のいずれかに記載の方法。

【請求項 86】

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)がVRSAである、請求項76から84のいずれかに記載の方法。

【請求項 87】

50

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) が VISA である、請求項 76 から 84 のいずれかに記載の方法。

【請求項 88】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) が MRSA である、請求項 76 から 84 のいずれかに記載の方法。

【請求項 89】

対象が、ヒト、ペット、または家畜動物である、請求項 76 から 88 のいずれかに記載の方法。

【請求項 90】

(1) 請求項 1 から 75 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を用いて抗体調製物を生成するステップ、および (2) 対象に抗体調製物を投与して受動免疫をもたらすステップを含む、対象に受動免疫をもたらす方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2009年6月22日に提出された米国仮特許出願第61/219,134号の優先権を主張するものであり、該出願の全体は、参照することによって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) から単離されたポリペプチドおよび荚膜多糖を含む免疫原性組成物に関する。さらに、本発明は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) ポリペプチドおよび荚膜多糖の免疫原性組成物を用いる、対象において黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に対する免疫応答を誘発する方法に関する。得られた抗体はまた、受動免疫療法を介して黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染を治療または予防するために用いることができる。

【背景技術】

【0003】

ヒトは、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) (*S. aureus*) の自然宿主である。健康な個体は、持続的に (10~35%)、断続的に (20~75%)、皮膚上、鼻孔内および喉内に、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) によってコロニー形成されている可能性があるか、または関連疾患を有さない非保菌状態 (5~70%) である可能性がある。Vandenberghら、*J. Clin. Micro.* 37:3133~3140 (1999) を参照されたい。手術の間、留置カテーテルもしくは他の装置の設置、外傷、または創傷など、個体が免疫バリアの破損に起因して免疫不全となると、疾患が続いて生じる。その結果生じた黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 感染は、軽度の皮膚感染から心内膜炎、骨髄炎、菌血症、敗血症、および高死亡率を伴う他の形態の疾患にわたる、広範な異なる疾患を生じさせ得る。大型のヒト宿主は、適合型の病原性クローン型の進化および蔓延の機会を増強させる。

【0004】

グラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) および表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*) からの侵襲性のブドウ球菌感染は、世界中で増大している公衆衛生問題であるため、特に懸念されている。具体的には、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は、ほとんどの院内 (院内で起こる) 感染の原因であり、公衆発生型感染におけるその有病率は増大している。例えば、侵襲性のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) (MRSA) の発生は、2005年の米国における18650人の死亡を含めて、10万人当たり31.8人と推定された。Kllevens R.M.ら、*JAMA*、298:1763~71 (2007) を参照されたい。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

ブドウ球菌疾患は、ここ20年間で劇的に増大しており、この増大は、静脈内装置および侵襲的手段の使用と並行する形である。疾患の発生のこの上昇は、抗生物質耐性が並行して生じるため、より厄介となり、したがって、ワクチンにおいて用いるための、またはブドウ球菌感染および関連疾患を予防もしくは治療するための手段として受動免疫をもたらすためのポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を誘導するための、免疫原性組成物が緊急に必要である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、ブドウ球菌細菌から単離された少なくとも3つの抗原を含む、多抗原免疫原性組成物または多成分免疫原性組成物を対象とする。抗原は、ポリペプチドおよび多糖であるが、とりわけ、当業者に知られている単離手順を用いて細菌から直接的に得られ得るか、またはこれらの抗原は、合成プロトコルを用いて生産され得るか、またはこれらの抗原は、同様に当業者に知られている遺伝子操作手順を用いて組換えによって生産され得るか、または、前述のいずれかの組み合わせを介して生産され得る。特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖5型 (CP5)、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖8型 (CP8)、および単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntCタンパク質から選択される、3つ以上の抗原を含む。さらに、本発明は、ブドウ球菌細菌に対する免疫応答を誘発するための方法、ブドウ球菌細菌により生じる疾患を予防するため、疾患の重症度を低減させるため、または疾患の発生を遅延させるための方法、およびブドウ球菌細菌での感染によって生じる疾患の少なくとも1つの症候を予防するため、症候の重症度を低減させるため、または症候の発生を遅延させるための方法を提供する。

【0007】

したがって、1つの実施形態において、本発明は、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖5型 (CP5)、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖8型 (CP8) を含む、免疫原性組成物を提供する。

【0008】

1つの実施形態において、本発明は、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子B (ClfB)、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖5型 (CP5)、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖8型 (CP8) を含む、免疫原性組成物を提供する。

【0009】

1つの実施形態において、本発明は、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntCタンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖5型 (CP5)、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖8型 (CP8) を含む、免疫原性組成物を提供する。

【0010】

1つの実施形態において、本発明は、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)

10

20

30

40

50

クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) MntCタンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖5型 (CP5)、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖8型 (CP8) を含む、免疫原性組成物を提供する。

【0011】

1つの実施形態において、本発明は、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖5型 (CP5)、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖8型 (CP8) を含む、免疫原性組成物を提供する。

10

【0012】

1つの実施形態において、本発明は、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) MntCタンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖5型 (CP5)、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖8型 (CP8) を含む、免疫原性組成物を提供する。

【0013】

1つの実施形態において、本発明は、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、および単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) MntCタンパク質を含む、免疫原性組成物を提供する。

20

【0014】

1つの実施形態において、本発明は、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) MntCタンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖5型 (CP5)、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖8型 (CP8) を含む、免疫原性組成物を提供する。

【0015】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、単離されたClfAポリペプチド断片を包含し、ClfAポリペプチド断片は、ClfAのフィブリノーゲン結合ドメインを含む。1つの実施形態において、ClfAポリペプチド断片は、ClfAのN1ドメイン、N2ドメイン、およびN3ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインを含む。1つの実施形態において、ClfAポリペプチド断片は、ClfAのN2ドメインおよびN3ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインを含む。1つの実施形態において、ClfAフィブリノーゲン結合ドメインを含有する組成物は、フィブリノーゲンに対する低減した結合を示す。1つの実施形態において、ClfAのフィブリノーゲン結合ドメインは、フィブリノーゲンとClfAの天然のフィブリノーゲン結合ドメインとで観察される結合と比較して低減したレベルで、フィブリノーゲンに結合する。1つの実施形態において、ClfAフィブリノーゲン結合ドメインを含有する組成物は、フィブリノーゲンに対する低減した結合を示し、シグナル配列を含有する完全長タンパク質のTyr338、Tyr256、Pro336、Lys389、Ala254、およびIle387の1つまたは複数におけるアミノ酸置換を有する。1つの実施形態において、ClfAフィブリノーゲン結合ドメインを含有する組成物は、Tyr338、Tyr256、Pro336、Lys389、Ala254、およびIle387の1つまたは複数におけるアミノ酸置換を示し、これらの位置のいずれか1つまたは複数にあるアミノ酸は、AlaまたはSerに変化している。1つの実施形態において、組成物は、338位のTyrがAlaに変化している、ClfAフィブリノーゲン結合ドメインを含む。

30

40

【0016】

50

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、単離されたC1fBポリペプチド断片を包含し、C1fBポリペプチド断片は、C1fBのフィブリノーゲン結合ドメインを含む。1つの実施形態において、C1fBポリペプチド断片は、C1fBのN1ドメイン、N2ドメイン、およびN3ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインを含む。1つの実施形態において、C1fBポリペプチド断片は、C1fBのN2ドメインおよびN3ドメインを含むフィブリノーゲン結合ドメインを含む。1つの実施形態において、C1fBフィブリノーゲン結合ドメインを含有する組成物は、フィブリノーゲンに対する低減した結合を示す。1つの実施形態において、C1fBのフィブリノーゲン結合ドメインは、フィブリノーゲンとC1fBの天然のフィブリノーゲン結合ドメインとで観察される結合と比較して低減したレベルで、フィブリノーゲンに結合する。

10

【0017】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、20から1000kDaの間の高分子量多糖である、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)莢膜多糖5型(CP5)を含む。1つの実施形態において、5型の高分子量多糖は、50から300kDaの間の分子量を有する。1つの実施形態において、5型の高分子量多糖は、70から150kDaの間の分子量を有する。

【0018】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、10%から100%の間でO-アセチル化されている、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)莢膜多糖5型を含む。1つの実施形態において、免疫原性組成物は、50%から100%の間でO-アセチル化されている、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)莢膜多糖5型を含む。1つの実施形態において、免疫原性組成物は、75%から100%の間でO-アセチル化されている、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)莢膜多糖5型を含む。

20

【0019】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、20から1000kDaの間の高分子量多糖である、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)莢膜多糖8型を含む。1つの実施形態において、8型の高分子量多糖は、50から300kDaの間の分子量を有する。1つの実施形態において、8型の高分子量多糖は、70から150kDaの間の分子量を有する。

【0020】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、10%から100%の間でO-アセチル化されている、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)莢膜多糖8型を含む。1つの実施形態において、免疫原性組成物は、50%から100%の間でO-アセチル化されている、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)莢膜多糖8型を含む。1つの実施形態において、免疫原性組成物は、75%から100%の間でO-アセチル化されている、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)莢膜多糖8型を含む。

30

【0021】

1つの実施形態において、免疫原性組成物内に存在する莢膜多糖5および/または8は、担体タンパク質にコンジュゲートしている。1つの実施形態において、担体タンパク質は、ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)(*C. diphtheriae*)毒素CRM₁₉₇である。

40

【0022】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、脂質化されたタンパク質である、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)MntCを含む。1つの実施形態において、免疫原性組成物は、脂質化されたタンパク質ではない、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)MntCを含む。

【0023】

1つの実施形態において、本発明は、SdrC、SdrD、およびSdrEからなる群から選択されるセリン-アスパラギン酸反復(Sdr)タンパク質ファミリーの少なくとも1つのタンパク質をさらに含む、本明細書において記載される免疫原性組成物を提供す

50

る。

【0024】

1つの実施形態において、本発明は、鉄表面決定基B (IsdB) タンパク質をさらに含む、本明細書において記載される免疫原性組成物を提供する。

【0025】

免疫原性組成物が3つ以上の列挙された抗原を含む、本明細書において記載される実施形態のそれぞれにおいて、該組成物はさらに、他の免疫原性物質および/または非免疫原性物質を含み得る。特定の実施形態において、各免疫原性組成物は、本明細書においてさらに詳細に記載されるように、二者択一的に、3つ以上の列挙された抗原から「原則的に構成され」得るかまたは「構成され」得、1つまたは複数の非免疫原性物質をさらに含む。

10

【0026】

1つの実施形態において、本発明は、Opp3a、DltD、HtsA、LtaS、IsdA、IsdC、SdrF、SdrG、SdrH、SrtA、SpA、Sbi Fmt B、溶血素(hla)、溶血素、フィブロネクチン結合タンパク質A (fnbA)、フィブロネクチン結合タンパク質B (fnbB)、コアグラーゼ、Fig、map、パントン・バレンタイン型ロイコシジン(pvl)、毒素およびその変型、毒素(hlg)および変型、ica、免疫優性ABC輸送体、Mg2+輸送体、Ni ABC輸送体、RAP、自己溶解酵素、ラミニン受容体、IsaA/PisA、IsaB/PisB、SPOIIIE、SsaA、EbpS、SasA、SasF、SasH、EFB(FIB) 20、SBI、Npase、EBP、骨シアロ結合タンパク質II、アウレオリシン前駆体(AUR)/Sepp1、Cna、ならびにそれらの断片、例えば、M55、TSST-1、mecA、ポリ-N-アセチルグルコサミン(PNAG/dPNAG) エキソ多糖、GehD、EbhA、EbhB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、HarA、EsxA、EsxB、エンテロトキシンA、エンテロトキシンB、エンテロトキシンC1、および新規な自己溶解酵素という抗原のいずれか1つをさらに含む、本明細書において記載される免疫原性組成物を提供する。本発明の特定の実施形態において、免疫原性組成物が特定の形態のCP5および/またはCP8を含む場合、これはPNAGをさらに含まない可能性がある。

20

【0027】

1つの実施形態において、免疫原性組成物はさらにアジュバントを含む。1つの実施形態において、免疫原性組成物はさらに薬学的に許容できる担体を含む。

30

【0028】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、ワクチンを製剤するために用いられる。1つの実施形態において、ワクチンは、対象において黄色ブドウ球菌(S. aureus)に対する免疫応答を誘発するために用いられる。1つの実施形態において、免疫原性組成物は、対象に受動免疫をもたらすための抗体製剤を生成するために用いられる。

【0029】

1つの実施形態において、本発明は、免疫原性量の本明細書において記載される免疫原性組成物のいずれかおよび薬学的に許容できる担体を対象に投与することを含む、黄色ブドウ球菌(S. aureus)に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。

40

【0030】

1つの実施形態において、本発明は、黄色ブドウ球菌(S. aureus)での感染を予防するかもしくは低減させる方法、または黄色ブドウ球菌(S. aureus)により生じる感染に関連する少なくとも1つの症候の重症度を予防するかもしくは低減させる方法を提供し、この方法は、免疫原性量の本明細書において記載される免疫原性組成物のいずれかおよび薬学的に許容できる担体を対象に投与することを含む。

【0031】

1つの実施形態において、黄色ブドウ球菌(S. aureus)に対する免疫応答を誘発するための方法は、免疫原性組成物をアジュバントと共に送達することを含む。1つの

50

実施形態において、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）に対する免疫応答を誘発するための方法は、免疫原性組成物を薬学的に許容できる担体と共に送達することを提供する。

【0032】

1つの実施形態において、本明細書において記載される免疫原性組成物によって誘発される免疫応答は、対象におけるブドウ球菌生物に関連する疾患もしくは症状を予防するかもしくは低減させるか、または、対象におけるブドウ球菌生物に関連する1つもしくは複数の症候を予防するかもしくは低減させる。1つの実施形態において、疾患は、侵襲性の黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）疾患、敗血症、および保菌からなる群から選択される。

【0033】

1つの実施形態において、誘発される免疫応答は、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）に対するオプソニン性貪食活性（OPA）を有する抗体の生成を含む。1つの実施形態において、誘発される免疫応答は、免疫化されていない対象において観察されるものと比較して高力価の、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）に特異的なオプソニン性貪食抗体の生成を含む。1つの実施形態において、オプソニン性貪食の力価は少なくとも1:20である。

【0034】

1つの実施形態において、免疫応答が誘発される対象である黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）は、MRSAである。1つの実施形態において、免疫応答が誘発される対象である黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）は、MSSAである。1つの実施形態において、免疫応答が誘発される対象である黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）は、VISAである。1つの実施形態において、免疫応答が誘発される対象である黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）は、VISAである。

【0035】

1つの実施形態において、本発明は、外科手術を受けている対象におけるブドウ球菌感染を予防する方法を提供し、この方法は、免疫学的に効果的な量の本明細書において記載される免疫原性組成物のいずれかを外科手術の前に対象に投与することを含む。外科手術は、待機的手術または非待機的手術であり得る。1つの実施形態において、外科手術は、心胸郭の外科手術である。1つの実施形態において、対象はヒト、伴侶動物、または家畜動物である。

【0036】

1つの実施形態において、本発明は、(1)本発明の免疫原性組成物を用いて抗体調製物を生成するステップ、および(2)対象に抗体調製物を投与して受動免疫をもたらすステップを含む、対象に受動免疫をもたらす方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】様々な形態の組換えClfAを示し、示されている順にそれぞれ配列番号125および127~129を開示する図である。

【図2】ClfAを発現させるためのpLP1179の構築に用いられるクローニングステップを示す図である。

【図3】T7ClfA(N₁₂₃)Y338A発現ベクター、pLP1179を示す図である。

【図4】CP5多糖およびCP8多糖の反復構造を示す図である。

【図5A】異なる培養液pHで生産されたCP5(A)の分子量プロファイルを示す図である。

【図5B】異なる培養液pHで生産されたCP8(B)の分子量プロファイルを示す図である。

【図6A】異なる温度で生産されたCP5(A)の分子量プロファイルを示す図である。

【図6B】異なる温度で生産されたCP8(B)の分子量プロファイルを示す図である。

【図7】精製されたCP5およびCP8の分子量と弱酸加水分解の処理時間との相関を示

10

20

30

40

50

す図である。

【図8A】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfA のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 62、64、68、84、70、104、66、78、86、88、90、72、74、76、80、94、82、92、96、98、100、102、106、および 108)。

【図8B】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfA のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 62、64、68、84、70、104、66、78、86、88、90、72、74、76、80、94、82、92、96、98、100、102、106、および 108)。

【図8C】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfA のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 62、64、68、84、70、104、66、78、86、88、90、72、74、76、80、94、82、92、96、98、100、102、106、および 108)。

【図8D】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfA のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 62、64、68、84、70、104、66、78、86、88、90、72、74、76、80、94、82、92、96、98、100、102、106、および 108)。

【図8E】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfA のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 62、64、68、84、70、104、66、78、86、88、90、72、74、76、80、94、82、92、96、98、100、102、106、および 108)。

【図9】ClfA の系統樹を示す図である。

【図10A】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfB のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 26、28、32、18、54、34、36、30、16、20、22、24、38、40、42、44、46、48、50、52、56、58、および 60)。

【図10B】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfB のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 26、28、32、18、54、34、36、30、16、20、22、24、38、40、42、44、46、48、50、52、56、58、および 60)。

【図10C】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfB のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 26、28、32、18、54、34、36、30、16、20、22、24、38、40、42、44、46、48、50、52、56、58、および 60)。

【図10D】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfB のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 26、28、32、18、54、34、36、30、16、20、22、24、38、40、42、44、46、48、50、52、56、58、および 60)。

【図10E】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の ClfB のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 26、28、32、18、54、34、36、30、16、20、22、24、38、40、42、44、46、48、50、52、56、58、および 60)。

【図11】ClfB の系統樹を示す図である。

【図12】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の MntC のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 2、8、10、4、6、14、および 12)。

【図13】ウサギ抗 ClfA ポリクローナル抗体がマウス敗血症モデルにおいて黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 659-018 のコロニー数を低減させることを示す図である。

【図14】ClfA での能動免疫化がウサギ感染性心内膜炎モデルにおいて黄色ブドウ球

10

20

30

40

50

菌 (*S. aureus*) P F E S A 0 0 0 3 による心臓のコロニー形成を低減させることを示す図である。

【図 1 5 A】M n t Cでの免疫化が血液中の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を低減させることを示す図である。A : 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) P F E S A 0 2 3 7 株。

【図 1 5 B】M n t Cでの免疫化が血液中の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を低減させることを示す図である。B : 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) P F E S A 0 2 6 6 株。

【図 1 6】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) C P 5 - C R M _{1,9,7} コンジュゲート免疫原性製剤がマウス腎盂腎炎モデルにおいて防御を一貫して示すことを示す図である。

【図 1 7】C P 8 - C R M _{1,9,7} コンジュゲート免疫原性製剤でのワクチン接種が敗血症モデルにおいて死亡を低減させることを示す図である。

【図 1 8】高分子量 (H M W) の C P 5 - C R M、低分子量 (L M W) の C P 5 - C R M、または P P 5 - C R M 対照でワクチン接種されたマウスにおける、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) P F E S A 0 2 6 6 でチャレンジした後の腎臓において回収されたコロニー形成単位 (C F U) を示す図である。

【図 1 9】多糖コンジュゲート (高分子量 (H M W) の C P 5 - C R M、低分子量 (L M W) の C P 5 - C R M) の異なる製剤でワクチン接種されたマウスから得られる血清の O P A 力価 (g e o m e a n) の比較を示す図である。

【図 2 0】異なる組み合わせの黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 抗原でのワクチン接種の前 (0 週目、白抜きの記号) および 2 週間後 (2 週目、黒い記号) の、ヒトではない霊長類の血清についての O P A 力価を示す図である。3 抗原 (3 A g) ワクチンは 3 つの抗原から構成され、4 抗原 (4 A g) ワクチンは 4 つの抗原から構成された。各製剤は 2 つの C P コンジュゲートおよび 1 つまたは 2 つのペプチドを有する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 8 】

本方法および本治療法を記載する前に、本発明が、記載される特定の方法および実験条件に限定されるわけではないことを理解されたく、それは、このような方法および条件が変化し得るためである。また、本明細書において用いられる用語は特定の実施形態のみを記載することを目的としており、限定することを意図したものではないことも理解されたい。

【 0 0 3 9 】

本明細書において記載されるものに類似の、または等しいあらゆる方法および材料が、本発明の実施または試験において用いられ得るが、好ましい方法および材料が以下に記載される。本明細書において述べられる全ての刊行物は、参照することによってその全体が組み込まれる。

【 0 0 4 0 】

本明細書において用いられる用語は、当業者に認められ知られている意味を有するが、利便性および完全性のために、特定の用語およびそれらの意味を以下に説明する。

【 0 0 4 1 】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる場合、単一形「 1 つの (a) 」、「 1 つの (a n) 」、および「その (t h e) 」は、文脈からそうでないことが明らかに示されない限り、複数形の言及を含む。したがって、例えば、「その方法」への言及は、本明細書において記載されるタイプの、および / またはこの開示を読むことなどで当業者に明らかとなる、 1 つまたは複数の方法および / またはステップを含む。

【 0 0 4 2 】

「約」または「およそ」という用語は、値の統計的に有意な範囲内を意味する。このような範囲は 1 桁以内であり得、所与の値または範囲の典型的には 2 0 % 以内、より典型的にはさらに 1 0 % 以内、さらに典型的には 5 % 以内であり得る。「約」または「およそ」という用語によって包含される許容可能な変化量は、研究下の特定の系に依存し、当業者

10

20

30

40

50

によって容易に理解され得る。本出願内で範囲が列举される場合は常に、その範囲内の全ての整数もまた、本発明の実施形態として検討される。

【0043】

「抗体」は、少なくとも1つの抗原認識部位を介して、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどの標的に特異的に結合し得る、免疫グロブリン分子であり、該抗原認識部位は、該免疫グロブリン分子の可変領域内に位置する。本明細書において用いられる場合、文脈からそうではないことが示されない限り、この用語は、無傷のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体だけではなく、操作された抗体（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ならびに/またはエフェクター機能、安定性、および他の生物学的活性を改変するように誘導体化された抗体）およびその断片（Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvなど）、一本鎖抗体（ScFv）およびドメイン抗体（サメ抗体およびラクダ抗体を含む）、ならびに、抗体部分を含む融合タンパク質、多価抗体、多特異的抗体（例えば、それらが所望の生物学的活性を示す限り、二重特異性抗体）、ならびに本明細書において記載される抗体断片、ならびに抗原認識部位を含む、免疫グロブリン分子のあらゆる他の修飾立体形状を含むことを意図するものである。抗体は、IgG、IgA、またはIgM（または、そのサブクラス）などの、あらゆるクラスの抗体を含み、抗体は、何らかの特定のクラスのものである必要はない。抗体の重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てられ得る。免疫グロブリンには、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMという5つの主要なクラスがあり、これらのうちのいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）に分けられ得、該サブクラスは例えば、ヒトではIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2である。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する、重鎖の定常ドメインは、それぞれ、
、
、およびμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体形状は周知である。

10

20

【0044】

「抗体断片」は、無傷の抗体の1つの部分のみを含み、該部分は、好ましくは、無傷の抗体内に存在する場合にその部分に通常は関連する機能の少なくとも1つ、好ましくはほとんどまたは全てを保持している。

【0045】

「抗原」という用語は通常、生物学的分子、通常は、同族抗体が選択的に結合し得る対象である少なくとも1つのエピトープを含有するタンパク質、ペプチド、多糖、脂質、もしくはコンジュゲートを言うか、または、一部の場合には、動物に注射されるかもしくは吸収される組成物を含む、動物において抗体もしくはT細胞応答もしくはその両方の生産を刺激し得る免疫原性物質を言う。免疫応答は、分子全体に対して生じ得るか、または、分子の1つもしくは複数の様々な部分（例えば、エピトープまたはハプテン）に対して生じ得る。この用語は、個別の分子を言うため、または抗原分子の同種集団もしくは異種集団を言うために用いられ得る。抗原は、抗体、T細胞受容体、または特異的な液性免疫および/もしくは細胞性免疫の他の要素によって認識される。「抗原」という用語は、全ての関連する抗原エピトープを含む。所与の抗原のエピトープは、当技術分野において周知のあらゆる数のエピトープマッピング技術を用いて同定され得る。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris 編, 1996) Humana Press, Totowa, N. J. を参照されたい。例えば、線形エピトープは、例えば、タンパク質分子の部分に相当する多数のペプチドを固体担体上に同時に合成し、ペプチドを担体に付着させたままペプチドを抗体と反応させることによって決定され得る。このような技術は、当技術分野において知られており、例えば米国特許第4,708,871号、Geysenら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998~4002、Geysenら(1986) Molec. Immunol. 23:709~715において記載されており、これらは全て、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる。同様に、立体配座エピトープは、例えば

30

40

50

x線結晶学および二次元核磁気共鳴により、アミノ酸の空間立体配座を決定することによって同定され得る。例えば、上記の Epitope Mapping Protocols を参照されたい。さらに、本発明の目的では、「抗原」はまた、そのタンパク質が免疫学的応答を誘導する能力を維持している限り、天然配列に対する欠失、付加、および置換などの修飾（通常は本質的には保存的であるが、非保存的であり得る）を含むタンパク質を言うためにも用いられ得る。これらの修飾は、部位特異的突然変異生成を介する、もしくは特定の合成手順を介する、もしくは遺伝子操作アプローチを介するように、意図的なものであり得るか、または、抗原を生産する、宿主の突然変異を介するような、偶発的なものであり得る。さらに、抗原は、微生物、例えば細菌に由来し得るか、これらから得られ得るか、もしくはこれらから単離され得るか、または生物全体であり得る。同様に、核酸免疫化用途におけるような、抗原を発現するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドもまた、定義に含まれる。合成抗原、例えばポリエピトープ、隣接エピトープ、および他の組換え抗原または合成に由来する抗原もまた含まれる（Bergmannら（1993）*Eur. J. Immunol.* 23: 2777-2781; Bergmannら（1996）*J. Immunol.* 157: 3242-3249; Suhrbier, A.（1997）*Immunol. and Cell Biol.* 75: 402-408; Gardnerら（1998）12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28~Jul. 3, 1998）。

10

【0046】

「アジュバント」という用語は、本明細書においてさらに記載され例証されるように、抗原に対する免疫応答を増強させる化合物または混合物を言う。

20

【0047】

「菌血症」は、血液中における細菌の一次的な存在を言う。菌血症は、感染と考えられ臨床的兆候/症候に関連する血液中の細菌の持続的な存在である、腐敗症または敗血症に進行し得る。全ての細菌が血液中で生存し得るわけではない。特別な遺伝的形質を有するものが、その能力をもたらす。また、宿主の因子が、同様に重要な役割を有する。

【0048】

「莢膜多糖」または「被膜多糖」は、ブドウ球菌のほとんどの単離体の細胞壁の外側にある多糖被膜を言う。例えば、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）は、ペプチドグリカン複合体から構成される細胞壁成分を含み、これは、好ましくない浸透圧条件下でのこの生物の生存を可能にし、また、ペプチドグリカンに結合した固有のテイコ酸を含む。細胞壁の外側で、薄い多糖被膜は、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）のほとんどの単離体を被覆する。この血清学的に異なる被膜は、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）の様々な単離体を血清型決定するために用いることができる。臨床的に重要な単離体の多くは、血清型5（CP5）および血清型8（CP8）という2つの莢膜型を含むことが示されている。CP5およびCP8の構造を、図4に概略的に示す。

30

【0049】

本明細書において用いられる場合、「コンジュゲート」は、通常は所望の範囲の分子量の被膜多糖と担体タンパク質とを含み、被膜多糖は、担体タンパク質にコンジュゲートしている。コンジュゲートは、ある程度の量の遊離被膜多糖を含んでいてもいなくてもよい。本明細書において用いられる場合、「遊離被膜多糖」は、コンジュゲートした莢膜多糖-担体タンパク質と非共有結合的に関連している（すなわち、これに非共有結合しているか、これに吸着しているか、またはこの内部に捕捉されているかもしくはこれで捕捉されている）被膜多糖を言う。「遊離被膜多糖」、「遊離多糖」、および「遊離糖」はほぼ同じ意味で用いられ得、同一の意味を伝えることが意図されている。担体分子の性質に関係なく、担体分子は、直接的に、またはリンカーを介して、莢膜多糖にコンジュゲートし得る。本明細書において用いられる場合、「コンジュゲートする」、「コンジュゲートした」、「および「コンジュゲートしている」は、細菌莢膜多糖を担体分子に共有結合によって付着させるプロセスを言う。コンジュゲーションは、細菌莢膜多糖の免疫原性を増強させる。コンジュゲーションは、以下に記載される方法に従って、または当技術分野において

40

50

知られているプロセスによって行われ得る。

【0050】

上記のように、本発明は、担体タンパク質にコンジュゲートした黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 血清型 5 莢膜多糖 (CP5) を含むコンジュゲート、および担体タンパク質にコンジュゲートした黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 血清型 8 莢膜多糖 (CP8) を含むコンジュゲートに関する。本発明の 1 つの実施形態は、担体タンパク質にコンジュゲートした黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 血清型 5 莢膜多糖および担体タンパク質にコンジュゲートした黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 血清型 8 莢膜多糖を含むコンジュゲートを提供し、ここで、5 型莢膜多糖は 50 kDa から 800 kDa の間の分子量を有し、8 型莢膜多糖は 50 kDa から 700 kDa の間の分子量を有し、免疫原性コンジュゲートは約 1000 kDa から約 5000 kDa の間の分子量を有し、かつコンジュゲートは全多糖に対して約 30% 未満の遊離多糖を含む。1 つの実施形態において、コンジュゲートは、全多糖に対して約 25% 未満、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10% 未満、または約 5% 未満の遊離多糖を含む。1 つの実施形態において、5 型多糖または 8 型多糖は、20 kDa から 1000 kDa の間の分子量を有する。

10

【0051】

1 つの実施形態において、コンジュゲートは、約 50 kDa から約 5000 kDa の間の分子量を有する。1 つの実施形態において、コンジュゲートは、約 200 kDa から約 5000 kDa の間の分子量を有する。1 つの実施形態において、免疫原性コンジュゲートは、約 400 kDa から約 2500 kDa の間の分子量を有する。1 つの実施形態において、免疫原性コンジュゲートは、約 500 kDa から約 2500 kDa の間の分子量を有する。1 つの実施形態において、免疫原性コンジュゲートは、約 600 kDa から約 2800 kDa の間の分子量を有する。1 つの実施形態において、免疫原性コンジュゲートは、約 700 kDa から約 2700 kDa の間の分子量を有する。1 つの実施形態において、免疫原性コンジュゲートは、約 1000 kDa から約 2000 kDa の間、約 1800 kDa から約 2500 kDa の間、約 1100 kDa から約 2200 kDa の間、約 1900 kDa から約 2700 kDa の間、約 1200 kDa から約 2400 kDa の間、約 1700 kDa から約 2600 kDa の間、約 1300 kDa から約 2600 kDa の間、約 1600 kDa から約 3000 kDa の間の分子量を有する。

20

30

【0052】

したがって、1 つの実施形態において、本発明の免疫原性コンジュゲート内の担体タンパク質は CRM₁₉₇ であり、CRM₁₉₇ は、カルバメート結合、アミド結合、または両方を介して、莢膜多糖に共有結合している。莢膜多糖にコンジュゲートする担体タンパク質におけるリジン残基の数は、コンジュゲートしたリジンの範囲として特徴付けされ得る。例えば、所与の免疫原性組成物において、CRM₁₉₇ は、莢膜多糖に共有結合している 39 個のリジンのうち 5 から 15 個のリジンを含み得る。このパラメータを表すための別の手段は、CRM₁₉₇ リジンの 12% から 40% が莢膜多糖に共有結合しているというものである。いくつかの実施形態において、CRM₁₉₇ に共有結合している多糖の CRM₁₉₇ 部分は、多糖に共有結合している 5 から 22 個のリジンを含む。いくつかの実施形態において、CRM₁₉₇ に共有結合している多糖の CRM₁₉₇ 部分は、多糖に共有結合している 5 から 23 個のリジンを含む。いくつかの実施形態において、担体タンパク質に共有結合している多糖の CRM₁₉₇ 部分は、多糖に共有結合している 8 から 15 個のリジンを含む。いくつかの実施形態において、担体タンパク質に共有結合している多糖の CRM₁₉₇ 部分は、多糖に共有結合している 8 から 12 個のリジンを含む。例えば、所与の免疫原性組成物において、CRM₁₉₇ は、莢膜多糖に共有結合している 39 個のリジンのうち 18 から 22 個のリジンを含み得る。このパラメータを表すための別の手段は、CRM₁₉₇ リジンの 40% から 60% が莢膜多糖に共有結合しているというものである。いくつかの実施形態において、CRM₁₉₇ は、CP8 に共有結合している 39 個のリジンのうち 5 から 15 個のリジンを含む。このパラメータを表すための別の手段

40

50

は、CRM₁₉₇ リジンの12%から40%がCP8に共有結合しているというものである。いくつかの実施形態において、CRM₁₉₇は、CP5に共有結合している39個のリジンのうち18から22個のリジンを含む。このパラメータを表すための別の手段は、CRM₁₉₇ リジンの40%から60%がCP5に共有結合しているというものである。
【0053】

上記で論じたように、莢膜多糖にコンジュゲートした担体タンパク質におけるリジン残基の数は、コンジュゲートしたリジンの範囲として特徴付けされ得、これはモル濃度比として表され得る。例えば、CP8免疫原性コンジュゲートにおける、CRM₁₉₇に対するコンジュゲートしたリジンのモル濃度比は、約18:1から約22:1の間であり得る。1つの実施形態において、CP8免疫原性コンジュゲートにおける、CRM₁₉₇に対するコンジュゲートしたリジンのモル濃度比率の範囲は、約15:1から約25:1の間であり得る。いくつかの実施形態において、CP8免疫原性コンジュゲートにおける、CRM₁₉₇に対するコンジュゲートしたリジンのモル濃度比の範囲は、約14:1から約20:1の間、約12:1から約18:1の間、約10:1から約16:1の間、約8:1から約14:1の間、約6:1から約12:1の間、約4:1から約10:1の間、約20:1から約26:1の間、約22:1から約28:1の間、約24:1から約30:1の間、約26:1から約32:1の間、約28:1から約34:1の間、約30:1から約36:1の間、約5:1から約10:1の間、約5:1から約20:1の間、約10:1から約20:1の間、または約10:1から約30:1の間であり得る。また、CP5免疫原性コンジュゲートにおける、CRM₁₉₇に対するコンジュゲートしたリジンのモル濃度比は、約3:1から25:1の間であり得る。1つの実施形態において、CP5免疫原性コンジュゲートにおける、CRM₁₉₇に対するコンジュゲートしたリジンのモル濃度比の範囲は、約5:1から約20:1の間であり得る。1つの実施形態において、CP5免疫原性コンジュゲートにおける、CRM₁₉₇に対するコンジュゲートしたリジンのモル濃度比の範囲は、約4:1から約20:1の間、約6:1から約20:1の間、約7:1から約20:1の間、約8:1から約20:1の間、約10:1から約20:1の間、約11:1から約20:1の間、約12:1から約20:1の間、約13:1から約20:1の間、約14:1から約20:1の間、約15:1から約20:1の間、約16:1から約20:1の間、約17:1から約20:1の間、約18:1から約20:1の間、約5:1から約18:1の間、約7:1から約16:1の間、または約9:1から約14:1の間であり得る。

【0054】

莢膜多糖にコンジュゲートした担体タンパク質におけるリジン残基の数を表すための別の手段は、コンジュゲートしたリジンの範囲としてというものであり得る。例えば、所与のCP8免疫原性コンジュゲートにおいて、CRM₁₉₇は、莢膜多糖に共有結合している39個のリジンのうち5から15個のリジンを含み得る。あるいは、このパラメータは、パーセンテージとして表され得る。例えば、所与のCP8免疫原性コンジュゲートにおいて、コンジュゲートしたリジンのパーセンテージは、10%から50%の間であり得る。いくつかの実施形態において、リジンの20%から50%がCP8に共有結合している。あるいは、さらに、CRM₁₉₇ リジンの30%から50%がCP8に共有結合している。あるいは、CRM₁₉₇ リジンの10%から40%、CRM₁₉₇ リジンの10%から30%、CRM₁₉₇ リジンの20%から40%、CRM₁₉₇ リジンの25%から40%、CRM₁₉₇ リジンの30%から40%、CRM₁₉₇ リジンの10%から30%、CRM₁₉₇ リジンの15%から30%、CRM₁₉₇ リジンの20%から30%、CRM₁₉₇ リジンの25%から30%、CRM₁₉₇ リジンの10%から15%、またはCRM₁₉₇ リジンの10%から12%がCP8に共有結合している。また、所与のCP5免疫原性コンジュゲートにおいて、CRM₁₉₇は、莢膜多糖に共有結合している39個のリジンのうち18から22個のリジンを含み得る。あるいは、このパラメータは、パーセンテージとして表され得る。例えば、所与のCP5免疫原性コンジュゲートにおいて、コンジュゲートしたリジンのパーセンテージは、40%から60%の間であり得る。いく

つかの実施形態において、リジンの40%から60%がCP5に共有結合してよい。あるいは、さらに、CRM₁₉₇リジンの30%から50%がCP5に共有結合してよく、CRM₁₉₇リジンの20%から40%、CRM₁₉₇リジンの10%から30%、CRM₁₉₇リジンの50%から70%、CRM₁₉₇リジンの35%から65%、CRM₁₉₇リジンの30%から60%、CRM₁₉₇リジンの25%から55%、CRM₁₉₇リジンの20%から50%、CRM₁₉₇リジンの15%から45%、CRM₁₉₇リジンの10%から40%、CRM₁₉₇リジンの40%から70%、またはCRM₁₉₇リジンの45%から75%がCP5に共有結合している。

【0055】

莢膜多糖鎖が担体分子上のリジンに付着している頻度は、被膜多糖のコンジュゲートの特徴付けするための別のパラメータである。例えば、1つの実施形態において、CRM₁₉₇と多糖との間の少なくとも1つの共有結合が、莢膜多糖の少なくとも5から10個の糖反復単位ごとに生じる。別の実施形態において、CRM₁₉₇と莢膜多糖の間には、莢膜多糖の5から10個の糖反復単位ごと、2から7個の糖反復単位ごと、3から8個の糖反復単位ごと、4から9個の糖反復単位ごと、6から11個の糖反復単位ごと、7から12個の糖反復単位ごと、8から13個の糖反復単位ごと、9から14個の糖反復単位ごと、10から15個の糖反復単位ごと、2から6個の糖反復単位ごと、3から7個の糖反復単位ごと、4から8個の糖反復単位ごと、6から10個の糖反復単位ごと、7から11個の糖反復単位ごと、8から12個の糖反復単位ごと、9から13個の糖反復単位ごと、10から14個の糖反復単位ごと、10から20個の糖反復単位ごと、5から10個の糖反復単位ごとに、少なくとも1つの共有結合が存在する。別の実施形態において、CRM₁₉₇と莢膜多糖との間の少なくとも1つの結合は、莢膜多糖の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個の糖反復単位ごとに生じる。

【0056】

多糖の化学的活性化およびその後の担体タンパク質へのコンジュゲーションは、従来の手段によって達成され得る。例えば、米国特許第4,673,574号および米国特許第4,902,506号を参照されたい。他の活性化方法およびコンジュゲーション方法を代替的に用いることができる。

【0057】

本明細書において用いられる「担体タンパク質」または「タンパク質担体」は、免疫応答が望まれる対象である抗原（莢膜多糖など）にコンジュゲートし得る、あらゆるタンパク質分子を言う。担体タンパク質への、多糖などの抗原のコンジュゲーションによって、抗原の免疫原性がもたらされ得る。担体タンパク質は、好ましくは、無毒性および非反応性であり十分な量および純度で得られ得るタンパク質である。担体タンパク質の例は、破傷風、ジフテリア、百日咳、シュードモナス（*Pseudomonas*）種、大腸菌（*E. coli*）、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）種、および連鎖球菌（*Streptococcus*）種の毒素、トキシド、または毒素のあらゆる突然変異交差反応性物質（CRM₁₉₇）である。担体タンパク質は、標準的なコンジュゲーション手順に適しているべきである。本発明の特定の実施形態において、CRM₁₉₇が担体タンパク質として用いられる。

【0058】

CRM₁₉₇（Wyeth/Pfizer, Sanford, NC）は、カザミノ酸および酵母抽出物に基づいた培地内で成長したジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheria*）株C7（₁₉₇）の培養物から単離されたジフテリア毒素の無毒性の変型（すなわちトキシド）である。CRM₁₉₇は、限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿、およびイオン交換クロマトグラフィーを介して精製される。CRM₁₉₇タンパク質を生産するジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheria*）株C7（₁₉₇）の培養物は、メリーランド州、ロックビルにあるAmerican Type Culture Collectionに寄託されており、ATCC5

10

20

30

40

50

3281という受託番号を付与されている。他のジフテリア毒素もまた、担体タンパク質としての使用に適している。

【0059】

他の適切な担体タンパク質は、不活化された、破傷風毒素、百日咳毒素、コレラ毒素（例えば、国際特許出願WO2004/083251において記載されているもの）、大腸菌（*E. coli*）LT、大腸菌（*E. coli*）ST、および緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）の外毒素Aなどの細菌毒素を含む。外膜タンパク質複合体c（OMPc）、ポーリン、トランスフェリン結合タンパク質、ニューモリシン、肺炎球菌表面タンパク質A（PspA）、肺炎球菌アドヘシンタンパク質（PsaA）、クロストリジウム・ディフィシル（*C. difficile*）のエンテロトキシン（毒素A）および細胞毒素（毒素B）、またはインフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）タンパク質Dなどの、細菌の外膜タンパク質もまた用いることができる。オポアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）、またはツベルクリンの精製タンパク質誘導体（PPD）などの他のタンパク質もまた、担体タンパク質として用いることができる。

10

【0060】

莢膜多糖が担体タンパク質にコンジュゲートした後、多糖 - タンパク質コンジュゲートは、様々な技術によって精製される（多糖 - タンパク質コンジュゲートの量に関して強化される）。これらの技術には、例えば、濃縮 / ダイアフィルトレーション操作、沈殿 / 溶出、カラムクロマトグラフィー、および深層濾過が含まれる。以下の実施例を参照されたい。

20

【0061】

個別のコンジュゲートが精製された後、これらは、例えばワクチンにおいて用いられ得る、本発明の免疫原性組成物を製剤するために組み合わせられる。本発明の免疫原性組成物の製剤は、当技術分野において認識されている方法を用いて達成され得る。

【0062】

この開示において、「含む（comprises）」、「含まれる（comprise d）」、「含んでいる（comprising）」、「含有する（contains）」、「含有している（containing）」などの用語は、米国特許法においてそれらが有する意味を有し得、例えば、それらは、「含む（includes）」、「含まれる（included）」、「含んでいる（including）」などを意味し得る。このような用語は、あらゆる他の構成要素を排除することなく特定の構成要素または構成要素の組を含むことを意味する。「から本質的になる（consisting essentially of）」および「から本質的になる（consists essentially of）」などの用語は、米国特許法においてそれらが有する意味を有し、例えば、それらは、本発明の新規なまたは基本的な特徴を損ねることのないさらなる構成要素またはステップが含まれることを認め、すなわち、それらは、本発明の新規なまたは基本的な特徴を損ねる、さらなる列挙されていない構成要素またはステップを排除し、また、特に、特許性のある実施形態、例えば、先行技術に対して、例えば本明細書において引用されるかまたは参照することによって本明細書に組み込まれる文献に対して新規性のある、自明ではない、進歩性のある実施形態を定義することが本明細書の目的であるため、上記用語は、本明細書において引用されるかまたは参照することによって本明細書に組み込まれる当技術分野における文献などの先行技術の構成要素またはステップを排除する。さらに、「からなる（consists of）」および「からなる（consisting of）」という用語は、米国特許法においてそれらが有する意味を有し、すなわち、これらの用語はクローズエンド型である。したがって、これらの用語は、特定の構成要素または構成要素の組が含まれること、および全ての他の構成要素が排除されることを言う。

30

40

【0063】

「保存的なアミノ酸置換」は、タンパク質のアミノ酸残基の1つまたは複数の、類似の

50

物理的特性および/または化学的特性を有する他のアミノ酸残基での置換を言う。配列内のアミノ酸のための置換基は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれる。芳香環構造を含有するアミノ酸は、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンである。極性の中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。正に荷電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが含まれる。負に荷電した（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。このような改変は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって決定される見かけの分子量、または等電点には影響しないと予想される。特に好ましい置換は、正の荷電が維持され得るような L y s による A r g の置換およびその逆、負の荷電が維持され得るような G l u による A s p の置換およびその逆、遊離 - O H が維持され得るような S e r による T h r の置換、および遊離 N H ₂ が維持され得るような G l n による A s n の置換である。

10

20

30

40

50

【0064】

「断片」は、より大きなタンパク質の特異的ドメインのみが含まれるタンパク質を言う。例えば、C l f A タンパク質および C l f B タンパク質は、シグナル配列が含まれる場合、それぞれ 8 個ものドメインを含有する。N 1 N 2 N 3 ドメイン、N 2 N 3 ドメイン、N 1 N 2 ドメイン、N 1 ドメイン、N 2 ドメイン、または N 3 ドメインに対応するポリペプチドは、それぞれ C l f A または C l f B の断片であると考えられる。「断片」はまた、親タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも 4 個のアミノ酸残基（好ましくは、少なくとも 10 個のアミノ酸残基、少なくとも 15 個のアミノ酸残基、少なくとも 20 個のアミノ酸残基、少なくとも 25 個のアミノ酸残基、少なくとも 40 個のアミノ酸残基、少なくとも 50 個のアミノ酸残基、少なくとも 60 個のアミノ酸残基、少なくとも 70 個のアミノ酸残基、少なくとも 80 個のアミノ酸残基、少なくとも 90 個のアミノ酸残基、少なくとも 100 個のアミノ酸残基、少なくとも 125 個のアミノ酸残基、または少なくとも 150 個のアミノ酸残基）からなるアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはポリペプチド、または、親核酸のヌクレオチド配列の少なくとも 10 塩基対（好ましくは、少なくとも 20 塩基対、少なくとも 30 塩基対、少なくとも 40 塩基対、少なくとも 50 塩基対、少なくとも 50 塩基対、少なくとも 100 塩基対、少なくとも 200 塩基対）からなるヌクレオチド配列を含むポリペプチドもしくは核酸を言う。

【0065】

本明細書において用いられる抗体の「機能的活性」または「機能的抗体」は、最低でも抗原に特異的に結合し得る抗体を言う。さらなる機能は、当技術分野において知られており、オプソニン化、A D C C、または補体介在性細胞毒性を介するような病原体のクリアランスまたは死滅に影響する、免疫系のさらなる成分を含み得る。抗原の結合の後、あらゆるその後の抗体機能が、抗体の F c 領域を介して伸介され得る。抗体のオプソニン性貪食アッセイ（O P A）は、インビトロでのエフェクター細胞（白血球）による細菌の I g 補体補助型の死滅を測定するために設計された、インビトロでのアッセイであり、したがって、生物学的プロセスを模倣する。抗体の結合はまた、それが結合する抗原の生物学的機能を直接的に阻害し得、例えば、C l f A を結合する抗体は、C l f A の酵素機能を中和することができる。いくつかの実施形態において、「機能的抗体」は、動物効力モデルまたは抗体が細菌を死滅させることを実証するオプソニン性貪食死滅アッセイにおける細菌の死滅によって測定されるように機能的である抗体を言う。

【0066】

黄色ブドウ球菌（S . a u r e u s）の被膜多糖の分子量は、免疫原性組成物における使用のための考慮事項である。例えば、高分子量の被膜多糖は、抗原表面上に存在するエピトープの価数が高いことに起因して、特定の抗体免疫応答を誘発し得る場合がある。「高分子量被膜多糖」の単離は、本発明の組成物および方法における使用のために検討される。例えば、本発明の 1 つの実施形態において、サイズが分子量で約 50 から約 800 k

D aにわたる5型高分子量多糖の単離が検討される。本発明の1つの実施形態において、サイズが分子量で約20から約1000kDaにわたる5型高分子量多糖の単離が検討される。本発明の1つの実施形態において、サイズが分子量で約50から約300kDaにわたる5型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が70から300kDaにわたる5型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が90kDaから250kDaにわたる5型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が90kDaから150kDaにわたる5型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が90kDaから140kDaにわたる5型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が80kDaから120kDaにわたる5型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。本発明の方法によって単離および精製され得る、他の範囲の高分子量血清型5莢膜多糖は、分子量で約70kDaから約100kDa、分子量で70kDaから110kDa、分子量で70kDaから120kDa、分子量で70kDaから130kDa、分子量で70kDaから140kDa、分子量で70kDaから150kDa、分子量で70kDaから160kDa、分子量で80kDaから110kDa、分子量で80kDaから120kDa、分子量で80kDaから130kDa、分子量で80kDaから140kDa、分子量で80kDaから150kDa、分子量で80kDaから160kDa、分子量で90kDaから110kDa、分子量で90kDaから120kDa、分子量で90kDaから130kDa、分子量で90kDaから140kDa、分子量で90kDaから150kDa、分子量で90kDaから160kDa、分子量で100kDaから120kDa、分子量で100kDaから130kDa、分子量で100kDaから140kDa、分子量で100kDaから150kDa、分子量で100kDaから160kDaのサイズ範囲、および類似の所望の分子量範囲を含む。

10

20

30

40

50

【0067】

上記で論じたように、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の被膜多糖の分子量は、免疫原性組成物における使用のための考慮事項である。例えば、高分子量の被膜多糖は、抗原表面上に存在するエピトープの価数が高いことに起因して、特定の抗体免疫応答を誘発し得る場合がある。本発明の1つの実施形態において、分子量が約20kDaから約1000kDaにわたる8型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。本発明の1つの実施形態において、分子量が約50kDaから約700kDaにわたる8型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。本発明の1つの実施形態において、分子量が50kDaから300kDaにわたる8型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が70から300kDaにわたる8型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が90kDaから250kDaにわたる8型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が90kDaから150kDaにわたる8型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が90kDaから120kDaにわたる8型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。1つの実施形態において、分子量が80kDaから120kDaにわたる8型高分子量莢膜多糖の単離および精製が検討される。本発明の方法によって単離および精製され得る、他の範囲の高分子量血清型8莢膜多糖は、分子量で約70kDaから約100kDa、分子量で70kDaから110kDa、分子量で70kDaから120kDa、分子量で70kDaから130kDa、分子量で70kDaから140kDa、分子量で70kDaから150kDa、分子量で70kDaから160kDa、分子量で80kDaから110kDa、分子量で80kDaから120kDa、分子量で80kDaから130kDa、分子量で80kDaから140kDa、分子量で80kDaから150kDa、分子量で80kDaから160kDa、分子量で90kDaから110kDa、分子量で90kDaから120kDa、分子量で90kDaから130kDa、分子量で90kDaから140kDa、分子量で90kDaから150kDa、分子量で90kDaから160kDa、分子量で100kDaから120kDa、分子量で100kDaから130kDa、分子量で100kDaから140kDa、分子量で100kDaから150kDa、分子量で100kDaから160kDaのサイズ範囲、および類似の所望の分子量範囲を含む。

D a から 1 2 0 k D a、分子量で 1 0 0 k D a から 1 3 0 k D a、分子量で 1 0 0 k D a から 1 4 0 k D a、分子量で 1 0 0 k D a から 1 5 0 k D a、分子量で 1 0 0 k D a から 1 6 0 k D a のサイズ範囲、および類似の所望の分子量範囲を含む。

【 0 0 6 8 】

免疫原性組成物に対する「免疫応答」は、対象における、目的の組成物内に存在する分子（例えば、タンパク質または多糖などの抗原）に対する液性免疫応答および/または細胞介在性免疫応答の発達である。本発明の目的では、「液性免疫応答」は、抗体介在性の免疫応答であり、本発明の免疫原性組成物内に存在する抗原に対する親和性を有する抗体の生成を伴うが、「細胞介在性免疫応答」は、Tリンパ球および/または他の白血球によって仲介されるものである。「細胞介在性免疫応答」は、主要組織適合複合体（MHC）のクラスI分子またはクラスII分子に伴う抗原エピトープの提示によって誘導される。これは、抗原特異的CD4+ヘルパーT細胞またはCD8+細胞傷害性Tリンパ球（「CTL」）を活性化する。CTLは、主要組織適合複合体（MHC）またはCD1によってコードされるタンパク質に伴って提示され、細胞の表面上に発現する、ペプチド抗原または脂質抗原に対する特異性を有する。CTLは、細胞内微生物の細胞内破壊の誘発および促進、またはこのような微生物に感染した細胞の溶解を促す。細胞性免疫の別の態様は、ヘルパーT細胞による抗原特異的応答を伴う。ヘルパーT細胞は、古典的MHC分子または非古典的MHC分子に伴うペプチド抗原を表面上に提示している細胞に対する非特異的エフェクター細胞の機能の刺激に役立つように作用し、該エフェクター細胞の活性に焦点を置くものである。「細胞介在性免疫応答」はまた、サイトカイン、ケモカイン、ならびに、CD4+T細胞およびCD8+T細胞に由来するものを含む活性化されたT細胞および/または他の白血球によって生産される他のこのような分子の生産を言う。特定の抗原または組成物の、細胞介在性の免疫学的性応答を刺激する能力は、多くのアッセイによって、例えば、リンパ増殖（リンパ球活性化）アッセイ、CTL細胞傷害性細胞アッセイによって、感作された対象における抗原に特異的なTリンパ球についてのアッセイによって、または抗原での再刺激に応じたT細胞によるサイトカイン生産の測定によって、決定され得る。このようなアッセイは、当技術分野において周知である。例えば、Ericssonら、J. Immunol. (1993) 151: 4189~4199; Doeら、Eur. J. Immunol. (1994) 24: 2369~2376を参照されたい。

10

20

30

【 0 0 6 9 】

「免疫原性」という用語は、抗原またはワクチンの、液性または細胞介在性または両方の免疫応答を誘導する能力を言う。

【 0 0 7 0 】

それぞれ本明細書においてほぼ同じ意味で用いられる「免疫原性量」または「免疫学的に効果的な量」または「用量」は、全体として、当業者に知られている標準的なアッセイによって測定されるように、細胞性（T細胞）応答または液性（B細胞または抗体）応答または両方の免疫応答を誘導するために十分な抗原または免疫原性組成物の量を言う。

【 0 0 7 1 】

組成物内の特定のコンジュゲートの量は、通常、そのコンジュゲートについてコンジュゲートしているおよびコンジュゲートしていない全多糖に基づいて計算される。例えば、20%の遊離多糖を有するCP5コンジュゲートは、100mcgのCP5多糖用量中に、約80mcgのコンジュゲートしたCP5多糖および約20mcgのコンジュゲートしていないCP5多糖を有することになる。コンジュゲートに対するタンパク質の寄与は、コンジュゲートの用量を計算する場合には通常は考慮されない。コンジュゲートの量は、ブドウ球菌の血清型に応じて変化し得る。通常、各用量は、0.01から100mcg、特徴的には0.1から10mcg、さらに特徴的には1から10mcgの多糖を含む。免疫原性組成物内の異なる多糖成分の「免疫原性量」は相違し得、それぞれ、0.01mcg、0.1mcg、0.25mcg、0.5mcg、1mcg、2mcg、3mcg、4mcg、5mcg、6mcg、7mcg、8mcg、9mcg、10mcg、15mcg、20mcg、30mcg、40mcg、50mcg、60mcg、70mcg、80m

40

50

cg、90mcg、または約100mcgのあらゆる特定の多糖抗原を含み得る。

【0072】

別の実施形態において、免疫原性組成物内の「免疫原性量」のタンパク質成分は、約10mcgから約300mcgの各タンパク質抗原にわたり得る。特定の実施形態において、免疫原性組成物内の「免疫原性量」のタンパク質成分は、約20mcgから約200mcgの各タンパク質抗原にわたり得る。免疫原性組成物内の異なるタンパク質成分の「免疫原性量」は相違し得、それぞれ、10mcg、20mcg、30mcg、40mcg、50mcg、60mcg、70mcg、80mcg、90mcg、100mcg、125mcg、150mcg、175mcg、または約200mcgのあらゆる特定のタンパク質抗原を含む。

10

【0073】

免疫原としての抗原の有効性は、免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、機能的抗体アッセイ、例えばインビトロでのオプソニンアッセイ、および当技術分野において知られている多くの他のアッセイを用いて血清中の抗原に特異的な循環抗体のレベルを測定することによってB細胞活性のレベルを測定することによって測定することができる。T細胞免疫原としての抗原の有効性の別の尺度は、増殖アッセイによって、または、細胞溶解アッセイ、例えば、特異的標的細胞を溶解するT細胞の能力を測定するためのクロム放出アッセイによって、測定することができる。さらに、本発明において、「免疫原性量」はまた、本明細書において記載されるように、抗原投与後に誘発される抗原特異的抗体の血清レベルを測定することによって、またはそのように誘発された抗体の、特定の白血球のオプソニン性貪食能力を増強させる能力を測定することによって、規定され得る。免疫応答の防御レベルは、注射されている抗原で、免疫化された宿主をチャレンジすることによって測定することができる。例えば、免疫応答が望まれる対象である抗原が細菌である場合、「免疫原性量」の抗原によって誘発される防御レベルは、細菌細胞で動物をチャレンジした後の生存率のパーセンテージまたは死亡率のパーセンテージを検出することによって測定することができる。1つの実施形態において、防御の量は、細菌感染に関連する少なくとも1つの症候、例えば、感染に関連する発熱を測定することによって測定され得る。多抗原または多成分のワクチンまたは免疫原性組成物における各抗原の量は、他の成分に応じて変化し、当業者に知られている方法によって決定することができる。このような方法には、例えば、免疫原性および/またはインビボでの効力を測定するための手順が含まれる。

20

30

【0074】

「免疫原性組成物」という用語は、抗原、例えば微生物、またはその成分を含有するあらゆる医薬組成物に関するものであり、該組成物は、対象において免疫応答を誘導するために用いられ得る。本発明の免疫原性組成物は、全身的な経皮経路または粘膜経路を介して免疫原性組成物を投与することによって、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) に感染しやすいヒトを治療するために用いることができる。これらの投与には、筋肉内 (*i.m.*) 経路、腹腔内 (*i.p.*) 経路、皮内 (*i.d.*) 経路、もしくは皮下経路を介する注射、パッチもしくは他の経皮送達装置による塗布、または経口/消化管、気管、もしくは尿生殖路への粘膜投与を介するものが含まれ得る。1つの実施形態において、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の鼻咽頭保菌を治療または予防するために鼻腔内投与が用いられ、したがって、その最も早い段階で感染が弱められる。1つの実施形態において、免疫原性組成物は、ワクチンの製造において、または動物を受動的に防御もしくは治療するために用いられ得るポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体の誘導において用いられ得る。

40

【0075】

特定の免疫原性組成物にとっての最適な分量は、対象における適切な免疫応答の観察を伴う標準的な研究によって確定することができる。初回ワクチン接種の後、対象に、適切に間隔をあけた1回または数回のブースター免疫化を行うことができる。

【0076】

本発明の1つの実施形態において、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の免疫原性組

50

成物は、組換え黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) 断片 (N1N2N3 またはその組み合わせ)、CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 5 型、および CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 8 型を含む。別の実施形態において、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の免疫原性組成物は、組換え黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 (ClfA) 断片 (N1N2N3 またはその組み合わせ)、組換え黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) 断片 (N1N2N3 またはその組み合わせ)、CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 5 型、および CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 8 型の無菌製剤 (液体製剤、凍結乾燥製剤、DNA ワクチン、皮内調製物) である。本発明の 1 つの実施形態において、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の免疫原性組成物は、組換え黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) 断片 (N1N2N3 またはその組み合わせ)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 鉄結合タンパク質 MntC、CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 5 型、および CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 8 型を含む。1 つの実施形態において、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の免疫原性組成物は、組換え黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 (ClfA) 断片 (N1N2N3 またはその組み合わせ)、組換え黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) 断片 (N1N2N3 またはその組み合わせ)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 鉄結合タンパク質 MntC、CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 5 型、および CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 8 型の無菌製剤 (液体製剤、凍結乾燥製剤、DNA ワクチン、皮内調製物) である。本発明の 1 つの実施形態において、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の免疫原性組成物は、組換え黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) 断片 (N1N2N3 またはその組み合わせ)、CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 5 型、および CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 8 型を含む。本発明の 1 つの実施形態において、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の免疫原性組成物は、組換え黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) 断片 (N1N2N3 またはその組み合わせ)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 鉄結合タンパク質 MntC、CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 5 型、および CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 8 型を含む。本発明の 1 つの実施形態において、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の免疫原性組成物は、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 鉄結合タンパク質 MntC、CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 5 型、および CRM₁₉₇ にコンジュゲートした単離された莢膜多糖 8 型を含む。

【0077】

本発明の免疫原性組成物はさらに、免疫系を混乱させるかまたは改変する作用物質である、1 つまたは複数のさらなる「免疫調節物質」を含み得、その結果、液性免疫および/または細胞介在性免疫の上方調節または下方調節が観察される。1 つの特定の実施形態において、免疫系の液性部門および/または細胞介在性部門の上方調節が好ましい。特定の免疫調節物質の例には、例えば、アジュバントまたはサイトカイン、または、とりわけ米国特許第 5,254,339 号において記載されている、ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia) が含まれる。本発明のワクチンにおいて用いられ得るアジュバントの非限定的な例には、RIBI アジュバント系 (Ribi Inc., Hamilton, Mont.)、アルム、水酸化アルミニウムゲルなどの無機ゲル、水中油型エマルジョン、例えば完全フロイントアジュバントおよび不完全フロイントアジュバントなどの油中水型エマルジョン、ブロックコポリマー (CytRx, Atlanta Ga.)、QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.)、SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.)、AMPHIGEN (登録商標) アジュバント、サポニン、Quil A または他のサポニン画分、モノホスホリル脂質 A、ならびにアブリジン脂質 - アミンアジュバントが含まれる。本発明のワクチンにおいて有用な水中油型エマルジ

ヨンの非限定的な例には、修飾型 S E A M 6 2 製剤および S E A M 1 / 2 製剤が含まれる。修飾型 S E A M 6 2 は、5 % (v / v) スクアレン (S i g m a)、1 % (v / v) S P A N (登録商標) 8 5 洗淨剤 (I C I S u r f a c t a n t s)、0 . 7 % (v / v) ポリソルベート (登録商標) 8 0 洗淨剤 (I C I S u r f a c t a n t s)、2 . 5 % (v / v) エタノール、2 0 0 μ g / m l の Q u i l A、1 0 0 μ g / m l のコレステロール、および 0 . 5 % (v / v) レシチンを含有する水中油型エマルジョンである。修飾型 S E A M 1 / 2 は、5 % (v / v) スクアレン、1 % (v / v) S P A N (登録商標) 8 5 洗淨剤、0 . 7 % (v / v) ポリソルベート 8 0 洗淨剤、2 . 5 % (v / v) エタノール、1 0 0 μ g / m l の Q u i l A、および 5 0 μ g / m l のコレステロールを含む水中油型エマルジョンである。ワクチン内に含まれ得る他の「免疫調節物質」には、例えば、1 つまたは複数のインターロイキン、インターフェロン、または他の既知のサイトカインもしくはケモカインが含まれる。1 つの実施形態において、アジュバントは、例えばそれぞれ米国特許第 6 , 1 6 5 , 9 9 5 号および米国特許第 6 , 6 1 0 , 3 1 0 号において記載されているような、シクロデキストリン誘導体またはポリアニオンポリマーであり得る。用いるべき免疫調節物質および / またはアジュバントは、ワクチンまたは免疫原性組成物を投与する対象、注射経路、および行う注射の数に応じることを理解されたい。

10

【 0 0 7 8 】

黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) の「侵襲性疾患」は、疾患の関連する臨床的兆候 / 症候が存在する、通常は無菌の部位からの、細菌の単離である。通常は無菌の身体部位には、血液、C S F、胸水、心膜液、腹水、関節液 / 滑液、骨、体内部位 (リンパ節、脳、心臓、肝臓、脾臓、ガラス体液、腎臓、膵臓、卵巣)、または他の通常は無菌の部位が含まれる。侵襲的疾患を特徴付けする臨床的症状には、菌血症、肺炎、蜂巣炎、骨髄炎、心内膜炎、敗血症性ショックなどが含まれる。

20

【 0 0 7 9 】

「単離された」という用語は、物質がその元の環境 (例えば、それが天然のものである場合には天然環境、または、それが組換え体である場合もしくは 1 つの環境から異なる環境へ移された場合にはその宿主生物) から取り出されたことを意味する。例えば、「単離された」被膜多糖、タンパク質、またはペプチドは、そのタンパク質の由来源である細胞もしくは組織の細胞物質もしくは他の汚染タンパク質を実質的に有さないか、または化学的に合成された場合には化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に有さないか、さもなければ、化学反応の一環として混合物内に存在する。本発明において、タンパク質または多糖は、免疫原性組成物の製造において有用な形態で提供されるように、細菌細胞または細胞残屑から単離され得る。「単離された (i s o l a t e d)」または「単離する (i s o l a t i n g)」という用語には、例えば、本明細書において記載されるような、タンパク質または被膜多糖の精製方法を含む、精製工程または精製が含まれ得る。「細胞物質を実質的に有さない」という表現は、ポリペプチド / タンパク質が、それが単離されるかまたは組換えによって生産される元である細胞の細胞成分から分離されている、ポリペプチド / タンパク質の調製物を含む。したがって、細胞物質を実質的に有さない被膜多糖、タンパク質、またはペプチドには、約 3 0 %、2 0 %、1 0 %、5 %、2 . 5 %、または 1 % (乾燥重量で) 未満の汚染タンパク質または多糖または他の細胞物質を有する、被膜多糖、タンパク質、またはペプチドの調製物が含まれる。ポリペプチド / タンパク質が組換えによって生産される場合には、これはまた好ましくは培地を実質的に有さず、すなわち、培地がタンパク質調製物の容積の約 2 0 %、1 0 %、または 5 % 未満に相当する。ポリペプチド / タンパク質または多糖が化学合成によって生産される場合には、これは好ましくは化学的前駆体または他の化学物質を実質的に有さず、すなわち、これは、化学的前駆体、またはタンパク質もしくは多糖の合成に關与する他の化学物質から分離されている。したがって、ポリペプチド / タンパク質または多糖のこのような調製物は、約 3 0 %、2 0 %、1 0 %、5 % (乾燥重量で) 未満の、目的のポリペプチド / タンパク質または多糖の断片以外の化学的前駆体または化合物を有する。

30

40

50

【0080】

「非保存的なアミノ酸置換」は、上記に定義される特徴を用いる、タンパク質のアミノ酸残基の1つまたは複数の、類似していない物理的特性および/または化学的特性を有する他のアミノ酸残基での置換を言う。

【0081】

「薬学的に許容できる担体」という用語は、連邦政府の管理機関、州政府、もしくは他の管理機関によって認可されている担体、または米国薬局方もしくは他の一般に認められている薬局方において、ヒトおよびヒトではない哺乳動物を含む動物における使用について列挙されている担体を意味する。「担体」という用語は、医薬組成物と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、または媒体を言う。このような薬学的担体は、水および油などの無菌液体であり得、油には、石油、動物、植物、または合成由来のものが含まれる。水、生理食塩水および水性デキストロース、ならびにグリセロール溶液を、液体担体として採用することができ、特に注射用溶液のための液体担体として採用することができる。適切な薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤、充填剤、乳化剤、またはpH緩衝剤を含有し得る。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、持続放出製剤などの形態を取り得る。適切な薬学的担体の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」において記載されている。製剤は、投与態様に適しているべきである。

【0082】

「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを言い、最短の生成物に限定されるわけではない。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体などが、定義に含まれる。完全長タンパク質およびその断片の両方が定義に包含される。この用語はまた、天然配列に対する欠失、付加、および置換などの修飾（通常は天然に保存的であるが、非保存的であり得る）、好ましくは、タンパク質が、そのタンパク質が投与される動物内で免疫学的応答を誘導する能力を維持するような修飾を含む。また、発現後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、脂質化、リン酸化なども含まれる。

【0083】

「防御的」免疫応答は、免疫原性組成物の、感染から対象を防御するために役立つ、液性または細胞介在性の免疫応答を誘導する能力を言う。もたらされる防御は完全なものである必要はなく、すなわち、対象の対照集団、例えばワクチンまたは免疫原性組成物を投与されていない感染動物と比較して、統計的に有意な改善があれば、感染は完全に予防または根絶される必要はない。防御は、感染の症候の発生の重症度または迅速性の軽減に限定されない場合がある。通常、「防御免疫応答」は、対象の少なくとも50%における、各抗原に対するある程度のレベルの測定可能な機能的抗体応答を含む、特定の抗原に特異的な抗体レベルの増大の誘発を含む。特定の状況において、「防御免疫応答」は、対象の少なくとも50%における、各抗原に対するある程度のレベルの測定可能な機能的抗体応答を含む、特定の抗原に特異的な抗体レベルの2倍の増大または抗体レベルの4倍の増大を誘発することを含み得る。特定の実施形態において、オプソニン化抗体は、防御免疫応答と相関する。したがって、防御免疫応答は、例えば以下に記載されるようなオプソニン性貪食アッセイにおける細菌数の減少のパーセンテージを測定することによってアッセイすることができる。好ましくは、細菌数は、少なくとも10%、25%、50%、65%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上減少する。

【0084】

本明細書において用いられる「組換え」という用語は、単に、遺伝子操作方法によって生産されるあらゆるタンパク質、ポリペプチド、または目的の遺伝子を発現する細胞について言う。タンパク質またはポリペプチドに関して用いられる「組換え」という用語は、

組換えポリヌクレオチドの発現によって生産されるポリペプチドを意味する。本発明の免疫原性組成物において用いられるタンパク質は、天然源から単離され得るか、または例えば組換えC1fA、組換えC1fB、もしくは組換えMntCなどのように、遺伝子操作方法によって生産され得る。本明細書において用いられる「組換え」はさらに、核酸分子の由来源または操作に起因して、それが天然で伴うポリヌクレオチドの全てまたは一部を伴わない核酸分子を説明するものである。宿主細胞に関して用いられる「組換え」という用語は、組換えポリヌクレオチドが導入されている宿主細胞を意味する。

【0085】

本明細書において用いられる組換えC1fA (rC1fA) および組換えC1fB (rC1fB) は、本発明の免疫原性組成物において用いるためのC1fAまたはC1fBの形態を言う。1つの実施形態において、rC1fAは、NDメインの1つまたは複数、例えばN1N2N3、N2N3、N2、またはN3を含む、C1fAの断片であり、本明細書において「組換えC1fA」または「rC1fA」と呼ばれる。1つの実施形態において、rC1fBは、C1fBのNDメインの1つまたは複数、例えばN1N2N3、N2N3、N2、またはN3を含む、C1fBの断片であり、本明細書において「組換えC1fB」または「rC1fB」と呼ばれる。

10

【0086】

「対象」という用語は、哺乳動物、鳥、魚、爬虫類動物、またはあらゆる他の動物を言う。「対象」という用語にはまた、ヒトも含まれる。「対象」という用語にはまた、ペットも含まれる。ペットの非限定的な例には、犬、猫、豚、ウサギ、ラット、マウス、スナネズミ、ハムスター、モルモット、フェレット、鳥、ヘビ、トカゲ、魚、カメ、およびカエルが含まれる。「対象」という用語にはまた、家畜動物が含まれる。家畜動物の非限定的な例には、アルパカ、パイソン、ラクダ、牛、鹿、豚、馬、ラマ、ラバ、ロバ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、トナカイ、ヤク、ニワトリ、ガチョウ、および七面鳥が含まれる。

20

【0087】

本明細書において用いられる場合、「治療 (treatment)」（その変型、例えば「治療する (treat) 」または「治療される (treated) 」を含む) は、(i) 従来ワクチンにおけるような、感染または再感染の予防、(ii) 症候の重症度または除去の低減、および(iii) 問題の病原体または障害の実質的なまたは完全な除去のいずれか1つまたは複数を含む。したがって、治療は、予防的に(感染の前に)または治療的に(感染の後に)達成され得る。本発明において、予防的治療または治療的治療が用いられ得る。本発明の特定の実施形態に従うと、微生物感染(例えば、ブドウ球菌 (Staphylococcus) 種などの細菌) に対して宿主動物を治療する組成物および方法が提供され、該治療は、予防的および/または治療的な免疫化を含む。本発明の方法は、予防的免疫および/または治療的免疫を対象にもたすために有用である。本発明の方法はまた、生物医学的な調査の用途で、対象に対して実施され得る。

30

【0088】

「ワクチン」または「ワクチン組成物」という用語は、ほぼ同じ意味で用いられるものであり、動物における免疫応答を誘発する少なくとも1つの免疫原性組成物を含む医薬組成物を言う。

40

【0089】

概要

本発明は、ブドウ球菌生物、例えば黄色ブドウ球菌 (S. aureus) から得られる少なくとも3つの抗原を含む免疫原性組成物に関する。抗原は、生化学的単離手順を用いて生物から単離され得るか、または、合成もしくは組換え手段によって生産され得る。抗原は、ポリペプチドまたは多糖またはそれらの組み合わせであり得る。これらの免疫原性組成物は、ブドウ球菌生物によって生じる感染に対して対象を免疫化するためのワクチンの製造において用いることができる。これらの組成物における使用に適した成分は、以下でさらに詳細に記載される。

【0090】

50

ブドウ球菌免疫原性組成物

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は、表在性の皮膚感染から、肺炎、敗血症、および心内膜炎などの生命に関わる症状にわたる、広範なヒト疾患の原因物質である。Lowy N. Eng. J. Med. 339: 580~532 (1998) を参照されたい。侵襲性の疾患のケースでは、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は、血液、脳脊髄液 CSF、胸水、心膜液、腹水、関節液/滑液、骨、体内部位 (リンパ節、脳、心臓、肝臓、脾臓、ガラス体液、腎臓、膵臓、卵巣)、または他の通常は無菌の部位を含む、通常は無菌の身体部位から単離され得る。これは、菌血症、肺炎、蜂巣炎、骨髄炎、心内膜炎、および敗血症性ショックなどの生命に関わる臨床的症状をもたらし得る。成人、高齢者、および小児の患者が、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の感染について最もリスクがある。

10

【0091】

本発明の実施形態は、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB)、および組換え黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質を含む、免疫原性組成物内の選択された抗原を記載する。次に、抗原は、一連の組み合わせとして免疫原性組成物内において特徴付けされ、具体的な組み合わせが、免疫原性組成物のための個別の成分を用いて生じるものよりも優れている可能性がある免疫応答をもたらすことを実証した。したがって、1つの組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型を含む免疫原性組成物を提供する。第 2 の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB)、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型を含む免疫原性組成物を提供する。第 3 の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型を含む免疫原性組成物を提供する。第 4 の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型を含む免疫原性組成物を提供する。第 5 の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型を含む免疫原性組成物を提供する。第 6 の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子 B (ClfB) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 5 型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖 8 型を含む免疫原性組成物を提供する。第 7 の組み

20

30

40

50

合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntCタンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖5型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖8型を含む免疫原性組成物を提供する。第8の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、および単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntCタンパク質を含む免疫原性組成物を提供する。いくつかの実施形態において、上記の組み合わせはさらに、EkeS、DsqA、KesK、KrkN、KrkN2、RkaS、RrkN、KnkA、SdrC、SdrD、SdrE、Opp3a、DltD、HtsA、LtaS、IsdA、IsdB、IsdC、SdrF、SdrG、SdrH、SrtA、SpA、Sbi溶血素 (hla)、溶血素、フィブロネクチン結合タンパク質A (fnbA)、フィブロネクチン結合タンパク質B (fnbB)、コアグララーゼ、Fig、map、パントン・バレンタイン型ロイコシジン (pvl)、毒素およびその変型、毒素 (hlg) および変型、ica、免疫優性ABC輸送体、Mg²⁺輸送体、NiABC輸送体、RAP、自己溶解酵素、ラミニン受容体、IsaA/PisA、IsaB/PisB、SPOIIIE、SsaA、EbpS、SasA、SasF、SasH、EFB (FIB)、SBI、Npase、EBP、骨シアロ結合タンパク質II、アウレオリシン前駆体 (AUR) / Sepp1、Cna、ならびにそれらの断片、例えば、M55、TSST-1、mecA、ポリ-N-アセチルグルコサミン (PNAG/dPNAG) エキソ多糖、GehD、EbhA、EbhB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、HarA、EsxA、EsxB、エンテロトキシンA、エンテロトキシンB、エンテロトキシンC1、および新規な自己溶解酵素という抗原の少なくとも1つを含む。

【0092】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の発生の疫学的研究は、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の進化が天然ではクローン性であり、成功裏の遺伝子型を獲得した単一のクローンが迅速に拡大し、感染の多くを引き起こしたことを示す。したがって、進化はクローン性であると考えられる。細菌のゲノムは、より広くより安定した種の核ゲノムと、より多様なアクセサリ-遺伝子の組とからなる。Feilら、Nature Reviews : Microbiology 2 : 483 ~ 495 (2004) を参照されたい。核遺伝子は、その種の全てのクローン内に遍在し、アクセサリ-遺伝子は、あらゆる所与のクローン内に必ずしも存在するわけではない。黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を考慮すると、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) ゲノムの90%超に相当するDNAマイクロアレイを用いる1つの研究によって、ゲノム内の遺伝子の78%が全ての黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) において共通であり、したがって「種の核」に相当し、残りの22%が「アクセサリ-遺伝子」であることが見出された。アクセサリ-遺伝子は、不可欠でない遺伝物質を含み、該遺伝物質のほとんどは、病原性因子、抗生物質耐性を仲介するタンパク質、および特定の宿主環境との相互作用に特異的なタンパク質をコードする遺伝子をコードする。Fitzgeraldら、PNAS 98 : 8821 ~ 8826 (2001) ; Feilら、Nature Reviews : Microbiology 2 : 483 ~ 495 (2004) を参照されたい。通常、核遺伝子は、よりゆっくりと進化し、アクセサリ-遺伝子は多型性である。Kuhnら、J. Bact. 188 : 169 ~ 178 (2006) を参照されたい。したがって、適切に選択された核遺伝子は、感染を予防するための免疫原性組成物において用いるための、より良好な標的抗原を提供する。

【0093】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の疾患原因単離体またはクローン型から得られる、表面に発現した抗原は、免疫および機能的抗体を誘発し得る抗原の由来源を提供する。高分子レベル (アミノ酸配列または多糖配列) では、ワクチン標的の抗原的変型を有し得る株に対する抗体の広範な交差反応性を可能にするために、異なる疾患単離体により発現される抗原の保存された形態が選択され得る。

10

20

30

40

50

【0094】

本明細書において記載される多抗原免疫原性組成物において抗原を誘発するための1つの重要な考慮事項は、抗原が、免疫原性組成物として投与された場合に、細菌感染の1つまたは複数の動物モデルにおいて防御を提供することによって実証される効力を有するかどうかである。様々な黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 疾患には、多くの動物モデルが存在する。これらのモデルのそれぞれは、長所および短所を有する。

【0095】

ヒトによる細菌感染のクリアランスは、貪食細胞の取り込み後に仲介されるオプソニン性死滅を介して進行し得る。肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 莢膜多糖および黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖などのグラム陽性多糖抗原を用いる研究から得られる、これについての多くの有力な例がある。Leeら、*Crit. Rev. Micro.* 29: 333~349 (2003) を参照されたい。グラム陽性タンパク質抗原によって誘発されるオプソニン活性についてはあまり証拠がない。貪食細胞による取り込みは観察されているが、直接的な死滅は実証することが難しい。タンパク質に対するモノクローナル抗体は、感染の動物モデルにおいて黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) チャレンジに対する防御をもたらすことが示されており、オプソニン性貪食性死滅以外のメカニズムは、観察される防御を説明し得る。

10

【0096】

オプソニン性貪食活性 (OPA) などの測定可能な機能的活性を有する抗体の誘発は、特定の抗原が本発明の免疫原性組成物内への内包に有用であるかどうかの1つの指標である。他の指標には、限定はしないが、抗原特異的抗体を用いて測定される、インビボでの発現の際の細胞表面上での抗原の発現、または、抗体の、抗原機能を阻害/中和する能力が含まれる。

20

【0097】

種/株

あらゆる特定の院内株または疾患株が、由来源、クローンの関連性を決定するため、および発生の疫学をモニタリングするために有用である。多くの方法が、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株の分類に利用可能である。細菌種の従来の実用的な定義は、70%を超えるゲノムハイブリダイゼーション (DDHのDNA-DNAゲノムハイブリダイゼーション) および97%を超える16SリボソームRNA遺伝子配列同一性によって特徴付けされる、株の1群である。Vandammeら、*Microbiol. Rev.* 60: 407~438 (1996) を参照されたい。バクテリオファージ分類 (BT) は、特定のファージ型による溶解に対する感受性に基づいて黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株を分類する方法である。Blairら、*Bull. W. H. O.* 24: 771~784 (1961) を参照されたい。この古い方法は、実験室間での再現性を欠き、単離体の15~20%を分類できない。

30

【0098】

単一抗原免疫原性組成物と多抗原免疫原性組成物

主要な黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株の感染に対して防御するための最適な免疫原性組成物が単一成分から構成されるべきかまたは多成分から構成されるべきかということについて、問題が生じる。多数の研究によって、単一のタンパク質成分または炭水化物成分に基づく免疫原性組成物が、特定の動物モデルにおいて、その成分を発現する黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株でのチャレンジからのある程度の防御をもたらすことが示されている。重要なことに、単一抗原からの防御が、選択される株に依存し得ることも実証されている。

40

【0099】

アドヘシンなどの表面タンパク質は、単一成分ワクチンとして研究されている。例えば、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) ClfAで免疫化されたマウスは、対照タンパク質で免疫化されたマウスよりも、発症した関節炎が重症ではなかった。Josefssonら、*J. Infect. Dis.* 184: 1572~1580 (2001) を参照され

50

たい。コラーゲン結合アドヘシン (cna) の断片は、マウス敗血症モデルにおいて防御をもたらした。Nilssonら、J. Clin. Invest.、101:2640~2649 (1998) を参照されたい。ClfB のAドメインでマウスを免疫化すると、マウスモデルにおける鼻腔でのコロニー形成が低減し得た。Schaffnerら、Infect. Immun. 74:2145~2153 (2006) を参照されたい。

【0100】

IsdBとして知られている、14個の黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 鉄封鎖タンパク質のうちの一つが、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 感染からの防御のための一価免疫原性製剤において研究されている。このタンパク質は、マウスにおいて良好な防御効果を示しており、ヒトではない霊長類において良好な免疫原性を示している。Kuklinら、Infect. Immun. 74:2215~2223 (2006) を参照されたい。

10

【0101】

黄色ブドウ球菌 (S. aureus) は、同一のまたは類似の機能を行うために、異なるタンパク質を進化させるかまたは置換するという広大な能力を有するため、ほとんどの黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 疾患からほとんどの人々を防御するための最適な免疫原性製剤は、適切に選択され免疫原性製剤内に存在する2つ以上 (例えば、3つ、4つ、5つなど) の抗原を含む多抗原製剤である。特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖5型 (CP5)、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖8型 (CP8)、および単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) MntCタンパク質から選択される3つ以上の抗原を含む。特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖5型 (CP5)、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖8型 (CP8)、および単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) MntCタンパク質から選択される4つ以上の抗原を含む。特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、抗原として、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖5型 (CP5)、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 莢膜多糖8型 (CP8)、および単離された黄色ブドウ球菌 (S. aureus) MntCタンパク質を含む。

20

30

【0102】

アジュバント

本明細書において記載される免疫原性組成物はまた、特定の実施形態において、1つまたは複数のアジュバントを含む。アジュバントは、免疫原または抗原と共に投与されると免疫応答を増強させる物質である。限定はしないがインターロイキン1-、1-、2-、4-、5-、6-、7-、8-、10-、12 (例えば、米国特許第5,723,127号を参照されたい)、13-、14-、15-、16-、17-、および18 (およびその突然変異形態)、インターフェロン-、および-、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) (例えば、米国特許第5,078,996号およびATCC受託番号39900を参照されたい)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、ならびに腫瘍壊死因子 および を含む、多くのサイトカインまたはリンホカインが、免疫調節活性を有し、したがってアジュバントとして有用であることが

40

50

示されている。本明細書において記載される免疫原性組成物と共に有用であるさらに他のアジュバントには、限定はしないがMCP-1、MIP-1、MIP-1、およびRANTESを含むケモカイン；セレクトイン、例えばL-セレクトイン、P-セレクトイン、およびE-セレクトインなどの接着分子；ムチン様分子、例えば、CD34、GlyCAM-1、およびMadCAM-1；LFA-1、VLA-1、Mac-1、およびp150.95などのインテグリンファミリーのメンバー；PECAM、ICAM（例えばICAM-1、ICAM-2、およびICAM-3）、CD2、およびLFA-3などの免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバー；B7-1、B7-2、CD40、およびCD40Lなどの共刺激分子；血管成長因子、神経成長因子、線維芽細胞成長因子、上皮成長因子、PDGF、BL-1、および血管内皮成長因子を含む成長因子；Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、およびDR6を含む受容体分子；ならびにカスパーゼ（ICE）が含まれる。

10

【0103】

免疫応答を増強させるために用いられる適切なアジュバントにはさらに、限定はしないが、MPL（商標）（3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A、Corixa、Hamilton、MT）が含まれ、これは、米国特許第4,912,094号において記載されている。アジュバントとしての使用に同様に適しているものは、合成脂質A類似体もしくはリン酸アミノアルキルグルコサミン化合物（AGP）、またはその誘導体もしくは類似体であり、これは、Corixa（Hamilton、MT）から入手可能であり、米国特許第6,113,918号において記載されている。1つのこのようなAGPは、2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]エチル-2-デオキシ-4-O-ホスホノ-3-O-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル]-2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-b-D-グルコピラノシドであり、これはまた529としても知られている（以前はRC529として知られていた）。この529アジュバントは、水性形態（AF）または安定なエマルジョン（SE）として製剤される。

20

【0104】

さらに他のアジュバントには、N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）、N-アセチルノルムラミル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)エチルアミン（MTP-PE）などのムラミルペプチド；MF59（米国特許第6,299,884号）（Model 110Yマイクロフルイダイザー（Microfluidics、Newton、MA）などのマイクロフルイダイザーを用いてサブミクロン粒子内に製剤された、5%スクアレン、0.5%ポリソルベート80、および0.5%Span85を含有する（様々な量のMTP-PEを含有してよい））およびSAF（サブミクロンエマルジョン内にマイクロ流体化されたか、またはより大きな粒子サイズのエマルジョンが生じるようにボルテックスされた、10%スクアレン、0.4%ポリソルベート80、5%プルロニックブロック型ポリマーL121、およびthr-MDPを含有する）などの水中油型エマルジョン；不完全フロイントアジュバント（IFA）；水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなどのアルミニウム塩（アルム）；Amphigen；アブリジン；L121/スクアレン；D-ラクチド-ポリラクチド/グリコシド；プルロニックポリオール；死滅ボルデテラ（Bordetella）；米国特許第5,057,540号において記載されているStimulon（商標）QS-21（Antigenics、Framingham、MA.）、米国特許第5,254,339号において記載されているISCOMATRIX（CSL Limited、Parkville、Australia）、および免疫刺激複合体（ISCOMATRIX）などのサポニン；結核菌（Mycobacterium tuberculosis）；細菌リポ多糖；CpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチドなどの合成ポリヌクレオチド（例えば、米国特許第6,207,646号）；欧州特許第1,296,713号および欧州特許

30

40

50

第1,326,634号において記載されているIC-31 (Intercell AG、Vienna、Austria)；百日咳毒素(PT)もしくはその突然変異体、コレラ毒素もしくはその突然変異体(例えば、米国特許第7,285,281号、米国特許第7,332,174号、米国特許第7,361,355号、および米国特許第7,384,640号)；または大腸菌(E.coli)易熱性毒素(LT)もしくはその突然変異体、特にLT-K63、LT-R72(例えば、米国特許第6,149,919号、米国特許第7,115,730号、および米国特許第7,291,588号)が含まれる。

【0105】

候補抗原：

ClfA：ドメインの構成

クランピング因子A (ClfA)は、フィブリノーゲン結合部位を介する宿主マトリクスタンパク質への結合に関連する、黄色ブドウ球菌(S.aureus)の表面タンパク質である。ClfAは、カルボキシル末端のLPXTG(配列番号125)モチーフを含有するタンパク質ファミリーのメンバーであり、該モチーフによって、該タンパク質が細胞表面に共有結合することが可能になる。ClfAはまた、フィブリノーゲン(ClfAによって結合される)、フィブロネクチン結合タンパク質(FnbAおよびFnbB)、コラーゲン結合タンパク質(Cna)などの宿主タンパク質の結合に関連する、別のタンパク質ファミリー(微生物表面成分認識接着マトリクス分子、またはMSCRAMM)にも属する。これらのタンパク質は全て、細胞表面への輸送を仲介するアミノ末端シグナル配列を共有する。MSCRAMMはまた、リガンドの結合(例えば、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、エラスチン、ケラチン)のための活性部位を含有する機能的領域であるAドメインを含む。Aドメインの後には、セリンアスパラギン酸反復(SD反復)から構成される領域があり、これはペプチドグリカン層に広がると考えられる。SD反復の後には、ペプチドグリカンへのタンパク質の共有結合のためのLPXTG(配列番号125)モチーフを含む膜貫通領域がある。ClfAは、米国特許第6,008,341号において記載されている。

【0106】

AドメインのN1N2N3を含むClfAのリガンド結合領域(図1)は、アミノ酸40~559に広がる。ClfAのNドメインは、以下のように割り当てられている：N1は残基45~220を包含し、N2は残基229~369を包含し、N3は残基370~559を包含する。Deivanayagamら、EMBO J. 21:6660~6672(2002)を参照されたい。参照を容易にするため、N1N2N3ドメインはN123と呼ぶことができ、同様に、N2N3はN23と呼ぶことができる。組換えN1N2N3の調製において、N1ドメインはプロテアーゼ感受性であることが明らかにされており、容易に切断または加水分解されて、安定なリガンド結合組換え断片としてN2N3を残す。Deivanayagamら、EMBO J. 21:6660~6672(2002)を参照されたい。ClfAのAドメインのフィブリノーゲン結合N2N3断片の結晶構造によって、N2およびN3の両方が逆平行鎖によって占められていることが明らかになった。逆平行鎖に加え、N2ドメインは、1回転のヘリックスおよび2つの 3_1 ヘリックスを含有し、N3ドメインは、3つの 3_1 ヘリックスを含有する。Deivanayagamら、EMBO J. 21:6660~6672(2002)を参照されたい。N2およびN3の配列アラインメントにより、それらの全長にわたり13%の配列同一性および36%の配列類似性のみが明らかになる。Deivanayagamら、EMBO J. 21:6660~6672(2002)を参照されたい。N2ドメインおよびN3ドメインのトポロジーは、従来のIgGの折り畳みに類似しており、IgGの折り畳みの新たな変型であることが提案されている。Deivanayagamら、EMBO J. 21:6660~6672(2002)を参照されたい。

【0107】

ClfAの配列

ClfAと呼ばれるクランピング因子タンパク質Aの遺伝子はクローニングされており

、配列決定されており、そして分子レベルで詳細に分析されている (McDevittら、Mol. Microbiol. 11: 237~248 (1994); McDevittら、Mol. Microbiol. 16: 895~907 (1995))。111個の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 疾患原因単離体の ClfA のアミノ酸配列についての配列識別記号を、表 10 に示す。黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株 PFESA0237 の完全長 (シグナル配列を含む) 野生型 ClfA のアミノ酸配列を、配列番号 130 に示す。この配列は、338 位にチロシンを有し、これは、ClfA の突然変異形態ではアラニンに変化する。N123 領域、反復領域、およびアンカー領域を含む、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株 PFESA0237 の野生型 ClfA をコードする完全長遺伝子を、配列番号 131 に示す。ClfA の Y338A 突然変異形態のアミノ酸配列を、配列番号 123 に示す。しかし、チロシンからアラニンへの変化は、野生型 ClfA では配列番号 130 の 338 位で生じ、Y338A と呼ばれるが、ClfA の突然変異形態では、配列番号 123 の 310 位にあることに留意されたい。さらに、配列番号 123 のアミノ酸配列に示される ClfA の突然変異形態は、シグナル配列を有さない ClfA の成熟形態であり、したがって、配列番号 130 と配列番号 123 との間のこの突然変異の位置の違いを説明するものである。

10

【0108】

ClfB : ドメインの構成

ClfB は、フィブリノーゲン結合活性を有する黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) タンパク質であり、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) に血漿の存在下で凝集塊を形成させる。ClfB は MSCRAMM タンパク質であり、リガンドの結合 (例えば、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、エラスチン、ケラチン) のための活性部位を含有する機能的領域である A ドメインを含む特徴的な MSCRAMM ドメイン構成を示す。A ドメインの後には、セリンアスパラギン酸反復 (SD 反復) から構成される領域があり、これはペプチドグリカン層に広がると考えられる。SD 反復の後には、ペプチドグリカンへのタンパク質の共有結合のための LPXTG (配列番号 125) モチーフを含む膜貫通領域がある。ClfB は、WO99/27109 および米国特許第 6,680,195 号において記載されている。

20

【0109】

ClfB の N 末端の A ドメインの内部構成は、ClfA において見られるものと非常に類似した構成である。A ドメインは 3 つのサブドメイン N1、N2、および N3 から構成される。A ドメインの N1N2N3 を含む ClfB のリガンド結合領域 (図 1) は、アミノ酸 44~585 に広がる。参照を容易にするため、N1N2N3 ドメインは N123 と呼ぶことができ、同様に、N2N3 は N23 と呼ぶことができる。ClfB の N ドメインは、以下のように割り当てられている: N1 は残基 44₋₁₉₇ を包含し、N2 は残基 198~375 を包含し、N3 は残基 375~585 を包含する。ClfA において、A ドメインの結晶構造は、免疫グロブリンの折り畳みの固有の型を有することが明らかにされ、類推によって、同一のことが ClfB のケースにも当てはまることが推測され得る。Deivanayagamら、EMBO J. 21: 6660~6672 (2002) を参照されたい。ClfB および ClfA の A ドメインの構成が類似していても、配列同一性はわずか 26% である。Ni Eidhinら、Mol. Microbiol. 30: 245~257 (2002) を参照されたい。

30

40

【0110】

ClfB の配列

ClfB をコードする遺伝子は、核アドヘシン遺伝子として分類される。複数の病状に関連する 92 の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株の ClfB の配列を、表 11 にまとめる。さらなる配列は、GenBank から得た。

【0111】

他の MSCRAMMS

他の MSCRAMMS を、本発明の免疫原性組成物における使用のために考慮すること

50

ができる。例えば、セリンアスパラギン酸反復 (Sdr) タンパク質、SdrC、SdrD、およびSdrEは、一次配列および構造的構成においてClfAタンパク質およびClfBタンパク質に関連しており、細胞表面上に位置している。SdrCタンパク質、SdrDタンパク質、およびSdrEタンパク質は、細胞壁に関連するタンパク質であり、N末端にシグナル配列を有し、C末端にLPXTG (配列番号125) モチーフ、疎水性ドメイン、および正に荷電した残基を有する。それぞれはまた、細胞表面上でのリガンド結合ドメインの領域Aの効率的な発現をBモチーフに沿って可能にするために十分な長さの領域Rを含有する、SD反復を有する。細胞表面上に位置するSdrCタンパク質、SdrDタンパク質、およびSdrEタンパク質は、これらのタンパク質のA領域で、血漿内のタンパク質、細胞外マトリクス、または宿主細胞の表面上の分子と相互作用し得る。Sdrタンパク質は、ClfAおよびClfBと、ある程度限定されたアミノ酸配列類似性を共有する。ClfAおよびClfBと同様に、SdrC、SdrD、およびSdrEもまた、細胞外マトリクスタンパク質の、陽イオン依存性のリガンド結合を示す。

10

20

30

40

50

【0112】

sdr遺伝子は、緊密に結合しており、直列に配列している。(SdrC、SdrD、SdrE、ClfA、およびClfBの) Sdrタンパク質は、A領域を含むことを特徴とし、該領域内には、コンセンサスTYTFDYVD (配列番号126) モチーフを誘導するために用いられ得る、高度に保存されたアミノ酸配列が存在する。このモチーフは、異なるタンパク質間でわずかな変化を示す。モチーフのコンセンサス配列に沿った、この変化は、米国特許第6,680,195号において記載されている。Clf-Sdrタンパク質において、このモチーフは高度に保存されている。このモチーフは、細菌感染に対する広範囲な免疫をもたらすために免疫原性組成物において用いることができ、また、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の生産において抗原として用いることができる。このような抗体は、広範囲な受動免疫をもたらすために用いることができる。

【0113】

Sdrタンパク質は、領域AとR領域との間に位置する2個から5個のさらなる110~113残基の反復配列 (Bモチーフ) を有する点で、ClfAおよびClfBと異なる。各Bモチーフは、真核生物タンパク質において通常見られるコンセンサスCa²⁺結合EFハンドループを含有する。SdrDの5つのB反復を含む組換えタンパク質の構造的完全性は、bisANS蛍光分析によってCa²⁺依存性であることが示され、このことは、EFハンドが機能的であることを示唆する。Ca²⁺を除去すると、構造は、折り畳まれていない立体配座に崩壊した。Ca²⁺を添加することによって、元の構造を回復させた。Sdrタンパク質のC末端のRドメインは、132~170個のSD残基を含有する。これらの後には、グラム陽性細菌の多くの表面タンパク質に特徴的な、保存された細胞壁固定領域がある。

【0114】

Sdrタンパク質およびClfタンパク質において、このBモチーフは高度に保存されているが、フィブロネクチン結合MSCRAMMsおよびコラーゲン結合タンパク質Cnaにおいては縮重型が生じる。R領域とコンジュゲートしたBモチーフは、細胞表面からある程度の距離でリガンド結合ドメインを提示するために必要である。反復Bモチーフは、本明細書において記載されるSD反復タンパク質のサブグループの1共通点である。これらのモチーフは、株PFESA0237の3つのSdrタンパク質において異なる数で見られる。個体のBモチーフ間には明らかな差異がある。最も保存されている単位は、R領域に隣接しているものである (SdrC B2、SdrD B5、およびSdrE B3)。これらは、いくつかの部位で、特にC末端側の半分で、残りのものと異なる。特筆すべき構造上の詳細として、隣接するB反復は、C末端領域内に存在するプロリン残基によって常に分離されているが、プロリンは最後のB反復とR領域との間には決して生じない。その代わりに、このリンカーは、短い酸性鎖によって特徴付けされる。これらの差は、末端の単位が、他のBモチーフと比較して異なる構造的または機能的役割を有することの証拠である。SdrDおよびSdrEのN末端のBモチーフは、他のものから離れており

、小さな挿入および欠失を含む多くのアミノ酸改変が存在するが、残りの内部Bモチーフは、より高度に保存されている。3つのSdrタンパク質のそれぞれが、それぞれの種類の少なくとも1つのBモチーフを有することに留意されたい。

【0115】

Sdrタンパク質のC末端のRドメインは、132～170個のSD残基を含有する。これらの後には、グラム陽性細菌の多くの表面タンパク質に特徴的な、保存された細胞壁固定領域がある。

【0116】

他の候補SdrD分子は、本発明の免疫原性組成物において用いるための様々な種の生物に由来し得、そのうちのいくつかには、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の株US A 300 FPR 3757 (タンパク質受託番号SAUSA 300 0547)、株NC TC 8325 (タンパク質受託番号SAOUHSC 00545)、株MW2 (タンパク質受託番号MW0517)、株MSSA 476 (タンパク質受託番号SAS0520、および株Mu50 (タンパク質受託番号SAV0562) のSdrDが含まれる。

10

【0117】

本発明の免疫原性組成物における使用について考慮され得る、さらなるMSCRAMMSには、EkeS、DsqA、KesK、KrkN、KrkN2、RkaS、RrkN、およびKnkAが含まれる。これらのMSCRAMMSはWO 02/102829において記載されており、これは、参照することによって本明細書に組み込まれる。GenBank受託番号によって同定されるさらなるMSCRAMMSには、NP__373261 . 1、NP__373371 . 1、NP__374246 . 1、NP__374248 . 1、NP__374841 . 1、NP__374866 . 1、NP__375140 . 1、NP__375614 . 1、NP__375615 . 1、NP__375707 . 1、NP__375765 . 1、およびNP__375773 . 1が含まれる。

20

【0118】

被膜多糖5型および8型

侵襲的な疾患を生じさせ得るブドウ球菌微生物はまた、通常、細菌を莢膜化し、宿主の本来の免疫系によるクリアランスに対するその耐性を増強させる、被膜多糖 (CP) を生産し得る。CPは、細菌細胞を、貪食作用および細胞内死滅に対する耐性を細菌にもたらず防御性被膜で覆うために役立つ。被膜を有さない細菌は、より貪食作用を受けやすい。莢膜多糖は、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、およびB群ブドウ球菌を含む多くの細菌病原体にとって重要な病原性因子であることが多い。

30

【0119】

被膜多糖は、特定の種の細菌を血清型決定するために用いることができる。分類は通常、被膜多糖に特徴的な特異的構造または固有のエピトープに対して生成された特異的な抗血清またはモノクローナル抗体との反応によって達成される。莢膜化された細菌は、平滑なコロニーに成長する傾向があるが、被膜を失った細菌のコロニーは粗い外見である。粘液状の外見をもたらすコロニーは、重度に莢膜化されたものとして知られている。黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の1型および2型は、重度に莢膜化されており、疾患にはあまり関連しない。

40

【0120】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) のほとんどの臨床的な単離体は、血清型5または8で莢膜化されている。5型 (CP5) 莢膜多糖および8型 (CP8) 莢膜多糖は、N-アセチルマンノサミン酸、N-アセチルL-フコサミン、およびN-アセチルD-フコサミンを含む、類似の三糖反復単位を有する。Fournier, J. M.ら、*Infect. Immun.* 45: 97~93 (1984) およびMoreau, M.ら、*Carbohydrate Res.* 201: 285~297 (1990) を参照されたい。同一の糖を有するが糖の結合およびOアセチル化の部位が異なる、2つのCPは、血清学的に異なるパターンの免疫反応性を生じさせる。

50

【0121】

いくつかの実施形態において、本発明の血清型5および/または8の莢膜多糖は、O-アセチル化されている。いくつかの実施形態において、5型の莢膜多糖またはオリゴ多糖のO-アセチル化の程度は、10~100%、20~100%、30~100%、40~100%、50~100%、60~100%、70~100%、80~100%、90~100%、50~90%、60~90%、70~90%、または80~90%である。いくつかの実施形態において、8型の莢膜多糖またはオリゴ多糖のO-アセチル化の程度は、10~100%、20~100%、30~100%、40~100%、50~100%、60~100%、70~100%、80~100%、90~100%、50~90%、60~90%、70~90%、または80~90%である。いくつかの実施形態において、5型および8型の莢膜多糖またはオリゴ多糖のO-アセチル化の程度は、10~100%、20~100%、30~100%、40~100%、50~100%、60~100%、70~100%、80~100%、90~100%、50~90%、60~90%、70~90%、または80~90%である。

10

【0122】

多糖またはオリゴ糖のO-アセチル化の程度は、当技術分野において知られているあらゆる方法によって、例えばプロトンNMR (LemercinierおよびJones 1996、Carbohydrate Research 296、83~96; JonesおよびLemercinier 2002、J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30、1233~1247; WO05/033148; またはWO00/56357) によって決定することができる。別に用いられる方法は、Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180、249~261によって記載されている。

20

【0123】

いくつかの実施形態において、本発明の血清型5および/または8の莢膜多糖は、動物効力モデルまたは抗体が細菌を死滅させることを実証するオブソニン性貪食死滅アッセイにおける細菌の死滅によって測定されるように機能的である抗体を生成するために用いられる。このような機能性は、効力におけるO-アセチル化の重要性の指標ではない抗体生成のみをモニタリングするアッセイを用いては観察され得ない。

30

【0124】

被膜の疫学

特定の被膜血清型と疾患との関連付けは、臨床単離体のモニタリングを通して可能である。同定された (KarakawaおよびVann (1982) 黄色ブドウ球菌 (S. aureus) の8つの異なる血清型のうち、血清型1および2のみが重度に莢膜化されており、これらはほとんど単離されない。Capsular Polysaccharides of Staphylococcus aureus、p. 285~293、In J. B. Robbins、J. C. HillおよびJ. C. Sadoff (編)、Seminars in infectious disease、vol. 4、Bacterial Vaccines. Thieme Stratton, Inc. New York) を参照されたい。調査によって、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) の臨床単離体のおよそ85~90%がCP5またはCP8を発現することが示されている (Arbeit RDら、Diagn. Microbiol. Infect. Dis. (1984) Apr、2(2): 85~91; Karakawa WWら、J. Clin. Microbiol. (1985) Sep、22(3): 445~7; Essawi Tら、Trop. Med. Int. Health. (1998) Jul、3(7): 576~83; Nawas Tら、J. Clin. Microbiol. (1998) 36(2): 414~20。CP5およびCP8の分類不可能な株のほとんどは、遺伝的に、cap5/8遺伝子座内に突然変異を含有する5型または8型である (Cocchiaro、Gomezら、(2006)、Mol. Microbiol. Feb. 59(3): 948~960)。いくつかの株の莢膜化は、インビトロでの数回の継代の間に迅速に喪失し、これは

40

50

、被膜の生産に対する臨床診断で用いられる培地における高いリン酸濃度の抑制作用に起因する。莢膜化されていない単離体が、牝牛を通った後に被膜の発現を回復することも報告された。Opdebeck, J. P.ら、*J. Med. Microbiol.* 19: 275~278 (1985)を参照されたい。いくつかの分類不可能な株は、適切な成長条件下で被膜陽性となる。

【0125】

CP5およびCP8の構造

CP5およびCP8の両方の反復単位は、2-アセトアミド-2-デオキシ-D-マンヌロン酸、2-アセトアミド-2-デオキシ-L-フコース、および2-アセトアミド-2-デオキシ-D-フコースから構成される。C. Jonesら、*Carbohydr. Res.* 340: 1097~1106 (2005)を参照されたい。CP5およびCP8は同一の糖組成を有するが、これらは、免疫学的に異なることが実証されている。これらは、グリコシド結合およびウロン酸のO-アセチル化の部位が異なる。FucNAc残基の1つの株依存性の不完全なN-アセチル化が観察された。Tzianabosら、*PNAS* 98: 9365 (2001)を参照されたい。

10

【0126】

免疫原性組成物における黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の被膜多糖

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の被膜多糖の分子量は、免疫原性組成物における使用のための重要な考慮事項である。高分子量の被膜多糖は、抗原表面上に存在するエピトープの価数が高いことに起因して、特定の抗体免疫応答を誘発し得る。本明細書において記載される方法は、これまでに入手可能であったものよりもはるかに高い分子量の被膜多糖5型および8型の単離および精製を提供する。

20

【0127】

MntC/SitC/唾液結合タンパク質

MntC/SitC/唾液結合タンパク質は、ABC輸送タンパク質であり、表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*) および黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) において相同体を有する。これは本発明において、MntCと呼ばれる。このタンパク質は、32kDaのリポタンパク質であり、細菌細胞壁内に位置する。SellmanらおよびCockayneら、*Infect. Immun.* 66: 3767 (1998)を参照されたい。表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*) において、これは、鉄調節型オペロンの成分である。これは、ストレプトコッカス・パラサングイス (*S. parasanguis*) のFimAを含むアドヘシンおよび証明されたまたは推定上の金属鉄輸送機能を有するABC輸送体ファミリーのリポタンパク質の両方に対して、顕著な相同性を示す。(黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の株および配列については表12を参照されたい。)

30

【0128】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) のMntCタンパク質

MntCの黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 相同体は、唾液結合タンパク質として知られており、米国特許第5,801,234号において開示され、本発明の免疫原性組成物内に含まれ得る。MntC/SitC/唾液結合タンパク質の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 相同体のタンパク質配列は、株Mu50では、GenBank受託番号NP_371155で見られる。(SAV0631としても知られている。) 配列識別記号は、配列番号119である。株Mu50の完全なゲノムのヌクレオチド配列についての受託番号は、NC_002758.2 (座標704988~705917) である。

40

【0129】

表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*) のSitCタンパク質

MntC/SitC/唾液結合タンパク質の表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*) 相同体は、SitCとして知られており、Sellmanら (Sellmanら、*Infect. Immun.* 2005 October, 73(10): 6591~6600) において開示された。MntC/SitC/唾液結合タンパク質の表皮ブドウ球菌

50

(*S. epidermidis*) 相同体のタンパク質配列は、GenBank 受託番号 YP_187886.1 で見られる。(SERP0290 としても知られている。) 配列識別記号は、配列番号 121 である。

【0130】

株 RP62A の完全なゲノムのヌクレオチド配列についての受託番号は、NC_002976 (座標 293030 ~ 293959) である。他の候補 SitC 分子は、本発明の免疫原性組成物において用いるための様々な種の生物に由来し得、そのうちのいくつかを、以下の表 1 に列挙する。

【0131】

【表 1】

10

表1

タンパク質	種	例となる株	タンパク質受託番号
SitC	スタフィロコッカス・ヘモリチカス(<i>S. haemolyticus</i>)	JCSC1435	BAE03450.1
SitC	表皮ブドウ球菌(<i>S. epidermidis</i>)	ATCC 12228	AAO04002.1
SitC	腐性ブドウ球菌(<i>S. saprophyticus</i>)	ATCC 15305	BAE19233.1
SitC	スタフィロコッカス・キシローサス(<i>S. xylosus</i>)	DSM20267	ABR57162.1
SitC	スタフィロコッカス・カルノーサス(<i>S. carnosus</i>)	TM300	CAL27186.1

20

【0132】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の鉄結合タンパク質

本発明の免疫原性組成物における使用のために考慮される別の考えられる候補抗原には、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 表面タンパク質鉄表面決定基 B (IsdB) が含まれる。この MSCRAMM は、Mazmanian ら (Mazmanian, SK ら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:2293~2298 (2002)) によって記載されており、これはその後試験されて、感染のマウスモデルおよび Kukuljin ら (Kukuljin, NA ら、Infection and Immunity、Vol. 74、No. 4、2215~2223 (2006)) によるアカゲザルの免疫原性研究において、ワクチン候補として効果的であることが示されている。この IsdB 分子は、株 MRSA252 (タンパク質受託番号 CAG40104.1)、株 Newman (タンパク質受託番号 BAF67312.1)、株 MSSA476 (タンパク質受託番号 CAG42837.1)、株 Mu3 (タンパク質受託番号 BAF78003.1)、株 RF122 (タンパク質受託番号 CAI80681.1) を含む、様々な株の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) において存在する。

30

【0133】

候補抗原：

40

本発明の免疫原性組成物はまた、Opp3a、DltD、HtsA、LtaS、IsdA、IsdC、SdrF、SdrG、SdrH、SrtA、SpA、Sbi 溶血素 (hla)、溶血素、フィブロンекチン結合タンパク質 A (fnbA)、フィブロンекチン結合タンパク質 B (fnbB)、コアグラーゼ、Fig、map、パントン・バレンティン型ロイコシジン (pvl)、毒素およびその変型、毒素 (hlg) および変型、ica、免疫優性 ABC 輸送体、Mg²⁺ 輸送体、Ni ABC 輸送体、RAP、自己溶解酵素、ラミニン受容体、IsaA/PisA、IsaB/PisB、SPOIIIE、SsaA、EbpS、SasA、SasF、SasH、EFB (FIB)、SBI、Npase、EBP、骨シアロ結合タンパク質 II、アウレオリシン前駆体 (AUR) / SepP1、Cna、ならびにそれらの断片、例えば、M55、TSST-1、mecA、ポ

50

リ - N - アセチルグルコサミン (P N A G / d P N A G) エキソ多糖、G e h D、E b h A、E b h B、S S P - 1、S S P - 2、H B P、ビトロネクチン結合タンパク質、H a r A、E s x A、E s x B、エンテロトキシン A、エンテロトキシン B、エンテロトキシン C 1、および新規な自己溶解酵素という抗原の 1 つまたは複数を含み得る。本発明の特定の実施形態において、免疫原性組成物が特定の形態の C P 5 および / または C P 8 を含む場合、これは P N A G をさらに含まない可能性がある。

【 0 1 3 4 】

免疫原性組成物製剤

1 つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物はさらに、アジュバント、緩衝剤、抗凍結剤、塩、二価陽イオン、非イオン性洗浄剤、遊離ラジカル酸化の阻害剤、希釈剤、または担体の、少なくとも 1 つを含む。

10

【 0 1 3 5 】

本発明の免疫原性組成物はさらに、複数のブドウ球菌タンパク質抗原および莢膜多糖 - タンパク質コンジュゲートに加え、1 つまたは複数の防腐剤を含み得る。F D A は、わずかな例外のみを除いて、複数回用量 (複数用量) 用バイアル内の生物学的製品が防腐剤を含有することを要求している。防腐剤を含有するワクチン製品には、塩化ベンゼトニウム (炭疽菌)、2 - フェノキシエタノール (D T a P、H e p A、ライム、ポリオ (非経口))、フェノール (肺炎球菌、チフス (非経口)、ワクシニア)、およびチメロサル (D T a P、D T、T d、H e p B、H i b、インフルエンザ、J E、髄膜炎菌、肺炎球菌、狂犬病) を含有するワクチンが含まれる。注射可能な薬剤における使用が認可された防腐剤には、例えば、クロロブタノール、m - クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、2 - フェノキシエタノール、塩化ベンゼトニウム、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、ベンジルアルコール、フェノール、チメロサル、および硝酸フェニル水銀が含まれる。

20

【 0 1 3 6 】

本発明の製剤はさらに、緩衝液、塩、二価陽イオン、非イオン性洗浄剤、糖などの抗凍結剤、および遊離ラジカルスカベンジャーもしくはキレート化剤などの抗酸化剤、またはそれらのあらゆる複数の組み合わせの 1 つまたは複数を含み得る。いずれか 1 つの成分、例えばキレート剤の選択により、別の成分 (例えばスカベンジャー) が所望であるかどうか決定され得る。投与のために製剤された最終組成物は、無菌であり、かつ / または発熱性物質を有さないものである。当業者は、所要の特定の保管条件および投与条件などの様々な因子に応じて、これらの成分および他の成分のどの組み合わせが、防腐剤を含有する本発明の免疫原性組成物内に含めるために最適であるかを経験的に決定し得る。

30

【 0 1 3 7 】

特定の実施形態において、非経口投与に適合した本発明の製剤は、限定はしないが T r i s (トリメタミン)、リン酸エステル、酢酸エステル、ホウ酸塩、クエン酸エステル、グリシン、ヒスチジン、およびコハク酸エステルから選択される、1 つまたは複数の生理学的に許容できる緩衝液を含む。特定の実施形態において、製剤は、約 6 . 0 から約 9 . 0、好ましくは約 6 . 4 から約 7 . 4 の p H 範囲内に緩衝される。

【 0 1 3 8 】

特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物または免疫原性製剤の p H を調節することが望ましい場合がある。本発明の製剤の p H は、当技術分野における標準的な技術を用いて調節され得る。製剤の p H は、3 . 0 から 8 . 0 の間に調節され得る。特定の実施形態において、製剤の p H は、3 . 0 から 6 . 0 の間、4 . 0 から 6 . 0 の間、または 5 . 0 から 8 . 0 の間であり得るか、またはそれに調節され得る。他の実施形態において、製剤の p H は、約 3 . 0、約 3 . 5、約 4 . 0、約 4 . 5、約 5 . 0、約 5 . 5、約 5 . 8、約 6 . 0、約 6 . 5、約 7 . 0、約 7 . 5、または約 8 . 0 であり得るか、またはそれに調節され得る。特定の実施形態において、p H は、4 . 5 から 7 . 5、または 4 . 5 から 6 . 5、5 . 0 から 5 . 4、5 . 4 から 5 . 5、5 . 5 から 5 . 6、5 . 6 から 5 . 7、5 . 7 から 5 . 8、5 . 8 から 5 . 9、5 . 9 から 6 . 0、6 . 0 から 6 . 1、6

40

50

． 1 から 6 ． 2、 6 ． 2 から 6 ． 3、 6 ． 3 から 6 ． 5、 6 ． 5 から 7 ． 0、 7 ． 0 から 7 ． 5、 または 7 ． 5 から 8 ． 0 の範囲であり得るか、またはそれに調節され得る。具体的な実施形態において、製剤の pH は、約 5 ． 8 である。

【 0 1 3 9 】

特定の実施形態において、非経口投与に適合した本発明の製剤は、限定はしないが $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、および $MnCl_2$ を含む、1 つまたは複数の二価陽イオンを、約 0 ． 1 m M から約 1 0 m M にわたる濃度で含み、最大約 5 m M が好ましい。

【 0 1 4 0 】

特定の実施形態において、非経口投与に適合した本発明の製剤は、限定はしないが塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウム、および硫酸カリウムを含む、1 つまたは複数の塩を含み、これは、非経口投与の際に対象に生理学的に許容できるイオン強度で存在し、かつ最終製剤における選択されたイオン強度または浸透圧をもたらすような最終濃度で含まれる。製剤の最終的なイオン強度または浸透圧は、複数の成分（例えば、（1 つまたは複数の）緩衝化合物および他の非緩衝塩に由来するイオンによって決定される。好ましい塩である $NaCl$ は、最大約 2 5 0 m M の範囲で存在し、塩濃度は、製剤の最終的な全浸透圧が非経口投与（例えば、筋肉内注射または皮下注射）に適合するように、他の成分（例えば糖）を補うように選択され、様々な温度範囲にわたり、免疫原性組成物製剤の免疫原性成分の長期にわたる安定性を促進する。塩を有さない製剤は、1 つまたは複数の選択された抗凍結剤の増大する範囲に耐えて、所望の最終浸透圧レベルを維持する。

10

【 0 1 4 1 】

特定の実施形態において、非経口投与に適合した本発明の製剤は、限定はしないが二糖（例えば、ラクトース、マルトース、ショ糖、またはトレハロース）およびポリヒドロキシ炭化水素（例えば、ズルシトール、グリセロール、マンニトール、およびソルビトール）から選択される、1 つまたは複数の抗凍結剤を含む。

20

【 0 1 4 2 】

特定の実施形態において、製剤の浸透圧は、約 2 0 0 m O s / L から約 8 0 0 m O s / L の範囲であり、約 2 5 0 m O s / L から約 5 0 0 m O s / L または約 3 0 0 m O s / L から約 4 0 0 m O s / L の範囲が好ましい。塩を有さない製剤は、例えば、約 5 % から約 2 5 % のショ糖、好ましくは約 7 % から約 1 5 % または約 1 0 % から約 1 2 % のショ糖を含有し得る。あるいは、塩を有さない製剤は、例えば、約 3 % から約 1 2 % のソルビトール、好ましくは約 4 % から 7 % または約 5 % から約 6 % のソルビトールを含有し得る。塩化ナトリウムなどの塩が添加されると、効果的な範囲のショ糖またはソルビトールが比較的減少する。これらの浸透圧および他のこのような浸透圧ならびに浸透圧についての考慮事項は、当業者の技術範囲内である。

30

【 0 1 4 3 】

特定の実施形態において、非経口投与に適合した本発明の製剤は、1 つまたは複数の遊離ラジカル酸化阻害剤および / またはキレート化剤を含む。様々な遊離ラジカルスカベンジャーおよびキレート剤が当技術分野において知られており、本明細書において記載される製剤および使用方法に適用される。例としては、限定はしないが、エタノール、EDTA、EDTA / エタノールの組み合わせ、トリエタノールアミン、マンニトール、ヒスチジン、グリセロール、クエン酸ナトリウム、イノシトール六リン酸、トリポリリン酸エステル、アスコルビン酸 / アスコルビン酸エステル、コハク酸 / コハク酸エステル、リンゴ酸 / リンゴ酸エステル、デスフェラル、EDDHA および DTPA、ならびに上記の 2 つ以上の様々な組み合わせが挙げられる。特定の実施形態において、少なくとも 1 つの非還元性遊離ラジカルスカベンジャーを、製剤の長期にわたる安定性を効果的に増強させる濃度で添加することができる。スカベンジャーおよび二価陽イオンなどの 1 つまたは複数の遊離ラジカル酸化阻害剤 / キレート剤もまた、様々な組み合わせで添加することができる。キレート剤の選択によって、スカベンジャーの添加が必要であるかどうか決定される。

40

【 0 1 4 4 】

50

特定の実施形態において、非経口投与に適合した本発明の製剤は、限定はしないが、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリソルベート - 80 (Tween 80)、ポリソルベート - 60 (Tween 60)、ポリソルベート - 40 (Tween 40)、およびポリソルベート - 20 (Tween 20)、限定はしないが Brij 58、Brij 35、および Triton X - 100 などの他のものを含むポリオキシエチレンアルキルエーテル、Triton X - 114、NP40、Span 85、ならびにプルロニック系の非イオン性界面活性剤 (例えばプルロニック 121) を含めた、1つまたは複数の非イオン性界面活性剤を含み、好ましい成分は、約 0.001% から約 2% (最大約 0.25% が好ましい) の濃度のポリソルベート - 80 または約 0.001% から 1% (最大 0.5% が好ましい) の濃度のポリソルベート - 40 である。

10

【0145】

特定の実施形態において、本発明の製剤は、非経口投与に適した1つまたは複数のさらなる安定剤、例えば、少なくとも1つのチオール (-SH) 基を含む還元剤 (例えば、システイン、N-アセチルシステイン、還元型グルタチオン、チオグリコール酸ナトリウム、チオ硫酸エステル、モノチオグリセロール、またはそれらの混合物) を含む。あるいは、または場合によって、本発明の防腐剤を含有する免疫原性組成物製剤はさらに、保管容器から酸素を除去すること、光から製剤を保護することによって (例えば、琥珀色のガラス容器を用いることによって) 安定化され得る。

【0146】

本発明の防腐剤を含有する免疫原性組成物製剤は、1つまたは複数の薬学的に許容できる担体または賦形剤を含み得、これは、それ自体は免疫応答を誘発しないあらゆる賦形剤を含む。適切な賦形剤には、限定はしないが、タンパク質、糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸共重合体、ショ糖 (Paollettiら、2001、Vaccine、19:2118)、トレハロース、ラクトース、および脂質凝集体 (油滴またはリポソームなど) などの高分子が含まれる。このような担体は、当業者に周知である。薬学的に許容できる賦形剤は、例えば、Gennaro、2000、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、ISBN: 0683306472において議論されている。

20

【0147】

本発明の組成物は、凍結乾燥されているか、または水性形態、すなわち溶液もしくは懸濁液であってよい。液体製剤は、有利には、それらの包装形態から直接的に投与され得、したがって、そうでなければ本発明の凍結乾燥組成物に必要な、水性媒質内での再構成の必要性を伴うことなく、注射に理想的である。

30

【0148】

対象への本発明の免疫原性組成物の直接的な送達は、非経口投与 (筋肉内、腹腔内、皮内、皮下、静脈内、または組織の間質腔へ) によって、または直腸投与、経口投与、膣投与、局所投与、経皮投与、鼻腔内投与、眼球投与、耳投与、肺投与、もしくは他の粘膜投与によって達成され得る。好ましい実施形態において、非経口投与は、筋肉内注射、例えば対象の大腿部または上腕部への筋肉内注射による。注射は、針 (例えば、皮下注射用針) を介するものであり得るが、代わりに無針注射を用いることができる。典型的な筋肉内用量は、0.5 mL である。本発明の組成物は、様々な形態、例えば、液体溶液または懸濁液として注射するための様々な形態で調製することができる。特定の実施形態において、組成物は、肺投与のための粉末またはスプレーとして、例えば吸入器内に調製することができる。他の実施形態において、組成物は、坐剤もしくはペッサリーとして、または経鼻投与、耳投与、または眼球投与のために、例えばスプレー、ドロップ、ゲル、もしくは粉末として調製することができる。

40

【0149】

特定の免疫原性組成物にとっての最適な分量は、対象における適切な免疫応答の観察を伴う標準的な研究によって確定することができる。初回ワクチン接種の後、対象に、適切に間隔をあけた1回または数回のブースター免疫化を行うことができる。

50

【0150】

包装および投薬形態

本発明の免疫原性組成物は、単位用量形態または複数用量形態（例えば、2回用量、4回用量、またはそれ以上）に包装され得る。複数用量形態では、バイアルが典型的であるが、必ずしも充填前のシリンジより好ましいというわけではない。適切な複数用量形態には、限定はしないが、用量あたり0.1から2mLでの容器当たり2から10回用量が含まれる。特定の実施形態において、用量は、0.5mL用量である。例えば、参照することによって本明細書に組み込まれる国際特許出願WO2007/127668を参照されたい。

【0151】

組成物は、バイアルもしくは他の適切な保管容器内に存在され得るか、または、充填前の送達装置、例えば針を有するかもしくは有さない場合がある、単一成分もしくは複数成分用のシリンジ内に存在し得る。シリンジは典型的には、防腐剤を含有する単回用量の本発明の免疫原性組成物を含有するが、必ずしもその必要があるわけではなく、複数用量用の充填前のシリンジもまた想定される。同様に、バイアルは、単回用量を含み得るが、代替的に複数回用量を含む場合もある。

【0152】

効果的な投薬容積は、習慣的に確立され得るが、注射のための組成物の典型的な用量は、0.5mLの容積を有する。特定の実施形態において、用量は、ヒト対象に投与するために製剤される。特定の実施形態において、容量は、成人、十代、青年、幼児、または乳児（すなわち、わずか1歳）のヒト対象に投与するために製剤され、好ましい実施形態においては注射によって投与され得る。

【0153】

本発明の液体免疫原性組成物はまた、凍結乾燥形態で存在する他の免疫原性組成物を再構成するために適している。免疫原性組成物をこのような即時の再構成に用いる場合、本発明は、2つ以上のバイアル、2つ以上の充填済みのシリンジ、またはそれぞれの1つもしくは複数を含むキットを提供し、シリンジの内容物は、注射の前にバイアルの内容物を再構成するために用いられるか、またはその逆も同様である。

【0154】

あるいは、本発明の免疫原性組成物は、例えば当技術分野において周知の複数のフリーズドライ方法の1つを用いて、凍結乾燥および再構成されて、マイクロペレットまたはミクロスフェアなどの、乾燥した規則正しい形状の（例えば球状の）粒子を形成し得、該粒子は、これらを調製するために用いられる的確な方法を変化させることによって選択および制御され得る平均直径サイズなどの粒子特徴を有するものである。免疫原性組成物はさらにアジュバントを含み得、アジュバントは、マイクロペレットまたはミクロスフェアなどの個別の乾燥した規則正しい形状の（例えば球状の）粒子と共に調製されてもよいし、または該粒子内に含有されてもよい。このような実施形態において、本発明はさらに、本発明の1つまたは複数の防腐剤をさらに含んでもよい、安定化された乾燥免疫原性組成物を含む第1の成分と、第1の成分を再構成するための無菌の水性溶液を含む、第2の成分とを含む、免疫原性組成物キットを提供する。特定の実施形態において、水性溶液は、1つまたは複数の防腐剤を包含し、少なくとも1つのアジュバントを含んでもよい（例えば、WO2009/109550を参照されたい（参照することによって本明細書に組み込まれる））。

【0155】

さらに別の実施形態において、複数用量形式の容器は、限定はしないが通常の実験用ガラス製品、フラスコ、ピーカー、メスシリンダー、発酵槽、バイオリアクター、管類、ピペット、袋、瓶、バイアル、バイアルの蓋（例えば、ゴム製のストッパー、キャップ上のねじ）、アンプル、シリンジ、二腔シリンジまたは多腔シリンジ、シリンジストッパー、シリンジプランジャー、ゴム製の蓋、プラスチック製の蓋、ガラス製の蓋、カートリッジ、および使い捨てペンなどからなる群の1つまたは複数から選択される。本発明の容器は

10

20

30

40

50

、製造の材料によっては限定されず、ガラス、金属（例えば、スチール、ステンレススチール、アルミニウムなど）およびポリマー（例えば、熱可塑性物質、エラストマー、熱可塑性エラストマー）などの材料を含む。特定の実施形態において、この形式の容器は、ブチル製のストッパーを有する5 mLのSchott Type 1ガラスバイアルである。当業者には、上記に説明された形式が決して網羅的な列挙ではなく、本発明に利用可能な形式の種類に関する当業者への案内として役立つのみであることが理解されよう。本発明における使用について検討されるさらなる形式は、United States Plastics Corp. (Lima, OH)、VWRなどの実験器具の供給メーカーおよび製造者から発行されているカタログで見ることができる。

【0156】

免疫原性組成物の評価

1つの実施形態において、本発明は、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 生物の少なくとも3つの抗原を含む免疫原性組成物を提供する。

【0157】

本発明の免疫原性組成物の免疫原性を評価するために、様々なインビトロでの試験が用いられる。例えば、インビトロでのオプソニンアッセイは、ブドウ球菌細胞、問題の抗原に対する特異的抗体を含有する熱不活化血清、および外因性の補体源の混合物を共にインキュベートすることによって行われる。オプソニン性貪食は、新たに単離された多形核細胞 (PMN) または分化したエフェクター細胞、例えばHL60と、抗体/補体/ブドウ球菌細胞混合物とをインキュベートする間に進行する。抗体および補体で被覆された細菌細胞は、オプソニン性貪食で死滅する。オプソニン性貪食から回収される生存細菌のコロニー形成単位 (cfu) は、アッセイ混合物を平板培養することによって決定される。力価は、アッセイ対照との比較によって決定される50%の細菌死滅をもたらす最大希釈の逆数として報告される。

【0158】

全細胞ELISAアッセイもまた、抗原のインビトロでの免疫原性および表面での曝露を評価するために用いられ、ここでは、目的の細菌株 (黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)) を96ウェルプレートなどのプレート上に被覆し、免疫化された動物から得られた試験血清を細菌細胞と反応させる。試験抗原に特異的ないずれかの抗体が、抗原の、表面に曝露されたエピトープと反応性である場合、これは当業者に知られている標準的な方法によって検出され得る。

【0159】

所望のインビトロでの活性を示すいずれかの抗原は、次に、インビボでの動物チャレンジモデルにおいて試験される。特定の実施形態において、免疫原性組成物は、当業者に知られている免疫化方法および免疫化経路 (例えば、鼻腔内、非経口、経口、直腸、膣、経皮、腹腔内、静脈内、皮下など) による動物 (例えばマウス) の免疫化において用いられる。特定のブドウ球菌属 (*Staphylococcus* sp.) の免疫原性組成物で動物を免疫化した後、動物をブドウ球菌属 (*Staphylococcus* sp.) でチャレンジし、ブドウ球菌感染に対する耐性についてアッセイする。

【0160】

1つの実施形態において、病原体を有さないマウスを黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) で免疫化し、チャレンジする。例えば、マウスは、免疫原性組成物内の所望の抗原の1つまたは複数の用量で免疫化される。その後、マウスを黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) でチャレンジし、チャレンジ後、経時的に生存をモニタリングする。

【0161】

免疫化の方法

ブドウ球菌感染を予防するために宿主を免疫化するための方法も提供される。好ましい実施形態において、宿主はヒトである。したがって、宿主または対象は、免疫学的量の、本明細書において記載される免疫原性組成物を投与される。免疫原性組成物の免疫学的量は、徐々に増加する量の免疫原性組成物で対象を免疫化し、そして免疫応答を分析して最

10

20

30

40

50

適な投薬量を決定する、用量応答研究を行うことによって決定され得る。研究の開始点は、動物モデルにおける免疫化データから推論することができる。投薬量は、個体の具体的な状態に応じて変化し得る。量は、当業者に知られている手段を用いる習慣的な試験で決定され得る。いくつかの実施形態において、ブドウ球菌感染、疾患、または症状を予防するために宿主を免疫化する方法は、ヒトの、獣医的な、動物の、または農業的な治療を含む。別の実施形態は、対象におけるブドウ球菌属 (*Staphylococcus* sp.) に関連するブドウ球菌感染、疾患、または症状を予防するために宿主を免疫化する方法を提供し、この方法は、本明細書において記載される免疫原性組成物からポリクローナル抗体調製物またはモノクローナル抗体調製物を生成すること、および前記抗体調製物を用いて対象に受動免疫をもたらすことを含む。

10

【0162】

適切な数の用量の、免疫学的に効果的な量の免疫原性組成物が、免疫応答を誘導するために対象に投与される。治療される個体は、より重症な、ブドウ球菌感染の臨床的所見を示さない。投薬量は、年齢および体重などの個体の具体的な状態に応じて変化し得る。量は、当業者に知られている手段を用いる習慣的な試験において決定され得る。

【0163】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物を投与される患者は、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の保菌率の低減を示す。免疫原性組成物を投与した後の、このような保菌の低減または非保菌者として過ごす期間の間隔の延長は、医学的必要性の観点から重要である。例えば、保菌者における全体的な黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の保菌の低減は、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の多抗原ワクチンを1回投与した後に評価され得る。例えば、免疫原性組成物を投与する1日前、18~50歳の成人群を、鼻および喉のスワブによって保菌についてスクリーニングし、その後、彼らの保菌状態を決定するために培養することができる。次に、その群に本発明の免疫原性組成物を投与し、1つの群には対照を投与する。鼻および喉のスワブ採取を、12週間にわたり毎週、および免疫原性組成物の投与後には最大6ヶ月間毎月行い、プラセボと比較する。1つの主要評価項目は、免疫化後、3ヶ月の間隔で、免疫原性組成物の投与後の患者における保菌率とプラセボでの保菌率とを比較することである。

20

【0164】

ブドウ球菌感染の動物モデル

本明細書において記載される免疫原性組成物のいずれか1つの効力の評価において用いるためのいくつかの動物モデルを、以下に記載する。

30

【0165】

マウス敗血症モデル (受動または能動)

受動免疫化モデル

マウスを、免疫性のIgGまたはモノクローナル抗体で、腹腔内 (i.p.) で受動免疫化する。マウスをその後、24時間後に、致死用量の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) でチャレンジする。細菌チャレンジは静脈内 (i.v.) または i.p. で投与して、あらゆる生存が確実に抗体と細菌との特異的なインビボでの相互作用に起因し得るようにする。細菌チャレンジ用量は、免疫化されていない対照マウスのおよそ20%が致死的な敗血症となるために必要な用量となるよう決定される。生存研究の統計的評価は、カプランマイヤー分析によって実施され得る。

40

【0166】

能動免疫化モデル

このモデルにおいて、マウス (例えば、*Swiss Webster* マウス) を、0週目、3週目、および6週目に (または他の類似の適切に間隔の開いたワクチン接種スケジュールで) 標的抗原で腹腔内 (i.p.) または皮下 (s.c.) で能動免疫化し、その後、8週目に、静脈内経路で黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) でチャレンジする。細菌チャレンジ用量は、10~14日間の期間にわたり対照群のおよそ20%が生存するように調整される。生存研究の統計的評価は、カプランマイヤー分析によって実施され得る

50

。

【0167】

感染性心内膜炎モデル（受動または能動）

黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）により生じる感染性心内膜炎（IE）の受動免疫化モデルは、これまでに用いられており、ClfAが防御免疫を誘発し得ることを示している。Vernachioら、Antmicro. Agents & Chemo. 50 : 511 ~ 518 (2006)を参照されたい。IEのこのモデルにおいて、ウサギまたはラットを用いて、中心静脈カテーテル、菌血症、および遠位の器官への血行性播種を含む臨床的感染を刺激する。無菌性大動脈弁疣腫を有する、カテーテル挿入されたウサギまたはラットに、標的抗原に特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の単回または複数回の静脈内注射を投与する。その後、動物を、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）株または表皮ブドウ球菌（*S. epidermidis*）株で、i.v.でチャレンジする。チャレンジ後、心臓、心臓疣腫、および腎臓を含むさらなる組織、および血液を採取し、培養する。次に、心臓組織、腎臓、および血液におけるブドウ球菌感染の頻度を測定する。1つの研究において、動物をMRSE ATCC 35984またはMRS A 67-0でチャレンジした場合、ClfAに対するポリクローナル抗体調製物またはモノクローナル抗体を用いて、感染率の有意な低減が示された。Vernachioら、Antmicro. Agents & Chemo. 50 : 511 ~ 518 (2006)を参照されたい。

10

【0168】

感染性心内膜炎モデルはまた、ウサギおよびラットの両方における活性免疫化研究に適合させられている。ウサギまたはラットを、標的抗原で、筋肉内または皮下で免疫化し、静脈内経路を介して2週間後に黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）でチャレンジする。

20

【0169】

腎盂腎炎モデル

腎盂腎炎モデルにおいて、マウスを、0週目、3週目、および6週目に（または他の類似の適切に間隔の開いたワクチン接種スケジュールで）標的抗原で免疫化する。その後、動物を、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）PFESA0266でi.p.またはi.v.でチャレンジする。48時間後、腎臓を採取し、細菌CFUを数える。

30

【0170】

抗体および抗体組成物

本発明はさらに、本発明の免疫原性組成物の1つまたは複数の抗原に特異的および選択的に結合する抗体および抗体組成物を提供する。いくつかの実施形態において、抗体は、本発明の免疫原性組成物を対象に投与すると生成する。いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の免疫原性組成物の抗原の1つまたは複数に対する精製または単離された抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、動物効力モデルにおける細菌の死滅またはオプソニン性貪食死滅アッセイを介する細菌の死滅によって測定されるように機能的である。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、対象に受動免疫をもたらす。本発明はさらに、当業者に周知の技術を用いて、本発明の抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド分子、ならびに本発明の抗体または抗体組成物を生産する細胞または細胞系（ハイブリドーマ細胞または抗体の組換え生産のための他の操作された細胞系）およびトランスジェニック動物を提供する。

40

【0171】

本発明の抗体または抗体組成物は、対象におけるブドウ球菌属（*Staphylococcus* sp.）に関連するブドウ球菌感染、疾患、または症状を治療または予防するための方法において用いることができ、該方法は、ポリクローナル抗体調製物またはモノクローナル抗体調製物を生成すること、および前記抗体または抗体組成物を用いて対象に受動免疫をもたらすことを含む。本発明の抗体はまた、診断方法、例えば、本発明の免疫原性組成物の1つまたは複数の抗原の存在の検出、または該抗原のレベルの定量に有用であり得る。

50

【実施例】

【0172】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態を実証するものである。しかし、これらの実施例は例示のみを目的とするものであり、本発明の条件および範囲に関して完全に限定的である趣旨のものではないことを理解されたい。当然のことながら、典型的な反応条件（例えば、温度、反応時間など）が与えられている場合、特定された範囲の上下両方の条件もまた用いられ得るが、通常はあまり好都合ではない。本明細書において言及される全ての部またはパーセントは重量に基づくものであり、全ての温度は、別段の特定がない限り、摂氏で表される。

【0173】

さらに、以下の実施例は、別段の詳細な記載がない限り、当業者に周知であり習慣的な、標準的な技術を用いて実施した。上記に述べたように、以下の実施例は、例示的な目的のためにあるものであり、本発明の範囲を限定すると決して解釈されるべきではない。

【0174】

(実施例1) 抗原 C1fA および C1fB の防御

クランピング因子 A (C1fA) および B (C1fB) は、フィブリノーゲン (C1fA、C1fB) およびサイトケラチン10 (C1fB) を含む宿主タンパク質への結合に寄与する、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の表面タンパク質である。C1fA および C1fB は、カルボキシ末端の LPXTG (配列番号: 125) モチーフを含有するタンパク質ファミリーのメンバーであり、該モチーフによって、該タンパク質が細胞表面に共有結合することが可能になる。C1fA および C1fB の両方は、フィブリノーゲン (C1fA、C1fB)、フィブロネクチン (FnBA および FnBB)、コラーゲン (Cna) などの宿主の細胞外マトリクスタンパク質を認識し結合するタンパク質 (微生物表面成分認識接着マトリクス分子、または MSCRAMM) ファミリーに属する。これらのタンパク質は全て、細胞表面への輸送を仲介するアミノ末端シグナル配列を共有する。MSCRAMM はまた、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、エラスチン、およびケラチンのためのリガンド結合部位を含有する機能的領域である A ドメインを含む。A ドメインの後には、セリン-アスパラギン酸反復 (SD 反復) から構成される領域があり得、これはペプチドグリカン層に広がると考えられる。SD 反復の後には、ペプチドグリカンへのタンパク質の共有結合のための LPXTG (配列番号 125) モチーフを含む膜貫通領域がある。

【0175】

A ドメインの N1N2N3 を含む C1fA および C1fB のリガンド結合領域は、アミノ酸 40 ~ 559 に広がる。C1fA / C1fB の N ドメインは、以下のように割り当てられている: N1 は残基 45 ~ 220 を包含し、N2 は残基 229 ~ 369 を包含し、N3 は残基 370 ~ 559 を包含する。Deivanayagamら、EMBO J. 21: 6660 ~ 6672 (2002) を参照されたい。組換え C1fA N1N2N3 の調製において、N1 ドメインはプロテアーゼ感受性であることが明らかにされており、容易に切断または加水分解されて、安定なリガンド結合組換え断片として N23 を残す。Deivanayagamら、EMBO J. 21: 6660 ~ 6672 (2002) を参照されたい。同様に、C1fB の N1 ドメインもまたプロテアーゼ感受性であり、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) のメタロプロテアーゼによって容易に切断され得ることが実証された (McAleese, F.M.ら、J. Biol. Chem. 2001, 276, pp. 29969 ~ 29978)。C1fA の A ドメインのフィブリノーゲン結合 N23 断片の結晶構造によって、N2 および N3 の両方が逆平行鎖によって占められていることが明らかになった。逆平行鎖に加え、N2 ドメインは、1 回転のヘリックスおよび 2 つの 3_1_0 ヘリックスを含有し、N3 ドメインは、3 つの 3_1_0 ヘリックスを含有する。Deivanayagamら、EMBO J. 21: 6660 ~ 6672 (2002) を参照されたい。

【0176】

10

20

30

40

50

N 2 および N 3 の配列アラインメントにより、それらの全長にわたり 1 3 % の配列同一性および 3 6 % の配列類似性のみが明らかになる。Dei van a y a g a m ら、EMBO J . 2 1 : 6 6 6 0 ~ 6 6 7 2 (2 0 0 2) を参照されたい。N 2 ドメインおよび N 3 ドメインのトポロジーは、従来の I g G の折り畳みに類似しており、I g G の折り畳みの新たな変型であることが提案されている。Dei van a y a g a m ら、EMBO J . 2 1 : 6 6 6 0 ~ 6 6 7 2 (2 0 0 2) を参照されたい。

【 0 1 7 7 】

本明細書において記載される免疫原性組成物において用いられる C l f A の組換え形態は、N ドメインの 1 つまたは複数を含む C l f A の断片、例えば N 1 N 2 N 3、N 2 N 3 であり、本明細書において「組換え C l f A」または「r C l f A」と呼ばれる。さらに、あらゆる r C l f A は、個別の N ドメインの天然構造および重大なエピトープを維持するが、投与の後に、免疫化された個体の正常なプロセスには干渉しない（すなわち、フィブリノーゲンを結合しない）ものである。突然変異の研究によって、Y 3 3 8 A (N 2) の突然変異によって、フィブリノーゲンへの N 2 3 断片の結合が完全に排除されたことが示されている。（この Y 3 3 8 A 位は、リーダー配列が依然として付着している未熟な形態のポリペプチド配列における 3 3 8 位でのチロシンからアラニンへの変化を言う。この変化は、フィブリノーゲンへの結合の欠如を示す、配列番号 1 2 3 の突然変異型 C l f A ポリペプチドの成熟形態における 3 1 0 位で見ることができる。）Dei van a y a g a m ら、EMBO J . 2 1 : 6 6 6 0 ~ 6 6 7 2 (2 0 0 2) を参照されたい。したがって、Y 3 3 8 A 突然変異を、以下の研究において、C l f A の全ての断片に採用した。

10

20

【 0 1 7 8 】

同様に、本明細書において記載される免疫原性組成物において用いられる C l f B の組換え形態は、N ドメインの 1 つまたは複数を含む C l f B の断片、例えば N 1 N 2 N 3、N 2 N 3 であり、本明細書において「組換え C l f B」または「r C l f B」と呼ばれる。さらに、あらゆる r C l f B は、個別の N ドメインの天然構造および重大なエピトープを維持するが、投与の後に、免疫化された個体の正常なプロセスには干渉しない（すなわち、フィブリノーゲンを結合しない）ものである。（例えば、Walsh, E. J. ら、Microbiology (2 0 0 8)、1 5 4、5 5 0 ~ 5 5 8 を参照されたい）。

【 0 1 7 9 】

C l f A および C l f B : クローニング戦略の概説

前臨床効力データを生成するために用いられる異なる形態の r C l f A タンパク質には、His C l f A (N 1 2 3)、T 7 C l f A (N 1 2 3)、T 7 C l f A (N 1 2 3)、Y 3 3 8 A、C l f A (N 2 3)、および C l f A (N 2 3) Y 3 3 8 A が含まれる。図 1 を参照されたい。C l f A 遺伝子は、残基 4 0 ~ 5 5 9 に対応する黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) P F E S A 0 2 3 7 の A 領域コード配列を含有する。黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) からクローニングされたリーディングフレームを、ベクター (M R G S H H H H H G S 配列番号 1 2 7) の N 末端 His T a g およびリンカー配列に融合し、それとともに、C 末端に 3 つのさらなるコード配列 (K L N) を導入した。（詳細な手順については以下を参照されたい。）このベクターから発現されたタンパク質を全ての実験に使い、その際、これは His C l f A (N 1 2 3) と呼ばれる。

30

40

【 0 1 8 0 】

異なる形態の r C l f A は、A 領域に由来するものであった（黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) P F E S A 0 2 3 7 により発現される C l f A の残基 4 0 ~ 5 5 9 (最上の行)。His C l f A (N 1 2 3) は、p Q E 3 0 に含有される T 5 プロモーターを用いて発現させ、全ての他の形態は、T 7 に基づく p E T 発現系を用いて発現させる。

【 0 1 8 1 】

2 つの形態の C l f B (T 7 C l f B の N 1 N 2 N 3 および C l f B の N 2 3) を、前臨床の動物研究に利用した。

【 0 1 8 2 】

C l f A クローニングの手順

50

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株 PFESA0237 のアミノ酸残基 40 ~ 59 に対応する ClfA のコード配列をクローニングし、突然変異 Y338A を導入して、フィブリノーゲンの結合を排除した。突然変異型 ClfA 遺伝子を T7 RNA ポリメラーゼ発現ベクター pET9a (Novagen) 内に導入して、プラスミド pLP1179 を得た。pLP1179 内の T7 プロモーターおよびコード領域を含む領域の DNA 配列は、配列番号 124 である。発現ベクターを大腸菌 (*E. coli*) BLR (DE3) (Novagen) 内に形質転換し、組換え ClfA を生産した。

【0183】

T7 ClfA_(N123) Y338A の構築は、いくつかのステップを伴うものであった。最終的な発現プラスミド pLP1179 を構築するために用いられるクローニングステップの概要を、図 2 に示す。

10

【0184】

pQEC1f40 内に存在する clfA DNA 配列は、pQE30 の BamHI / HindIII クローニング部位内に当初クローニングされた ClfA のアミノ酸残基 40 ~ 559 に対応する。これは、ClfA の N 末端で HisTag 融合を生じさせ、C 末端に 3 つの残基を添加する。(Amp^R) pQEC1f40 内に存在する ClfA コード領域を、Kan^R pET27b ベクター (Novagen) 内にサブクローニングして、pLP1137 を生じさせた。さらに、アミノ酸残基 221 ~ 559 に対応する clfA DNA 配列を、pET27b の NdeI - HindIII クローニング部位内にクローニングして、pLP1134 を生じさせた。ClfA の N 末端の HisTag を、pQEC1f40 の BamHI - BlnI DNA 断片を pET9a (Novagen) 内にサブクローニングすることによって、N 末端の T7 で置き換えて、pLP1153 を生じさせた。pLP1153 内に存在する T7 ClfA_(N123) のコード配列は、pET9a の T7 タグの 11 個の N 末端アミノ酸残基を含有し、その後には、リンカー配列の 3 つのアミノ酸残基と pQE30 Clf40 内に元々存在する 3 つの C 末端リンカー由来残基とがある。Y338A 突然変異をまず、pLP1134 の ClfA_(N23) コード配列内に導入して、pLP1168 を生じさせた。その後、pLP1168 の ClfA_(N23) の Y338 突然変異を含有する PstI - SnaBI DNA 断片を、pLP1153 の T7 ClfA_(N123) コード配列の PstI - SnaBI に置き換えて、pLP1171 を生じさせた。pLP1171 の T7 ClfA_(N123) Y338A のコード配列内に存在する内部リボソーム結合部位を、T7 rClfA Y338A ORF の DNA 339 位および 342 位でのサイレント突然変異によって改変し、それぞれ G から T に、および G から A に変化させた。得られたプラスミド pLP1176 を次に、T7 タグと ClfA コード領域の開始との間の、pQE30 Clf40 に元々由来する 3 つの外來残基を除去するために用いた。リンカーに由来する 3 つの C 末端残基もまた、この時点で除去された。

20

30

【0185】

得られたプラスミド pLP1179 (図 2 および 3) によって発現される rClfA は、ClfA_(N123) Y338A の残基 40 ~ 559 に融合された 11 個の N 末端アミノ酸のみを含有する。pLP1179 の T7 プロモーターおよび T7 rClfA_(N123) Y338A のコード配列を含む領域の DNA 配列は、配列番号 124 である。

40

【0186】

細菌株およびプラスミド

プラスミド骨格 pET9a (Novagen から得た) を用いて、T7 プロモーターの T7 ClfA_(N123) Y338A を発現する pLP1179 を構築した。このプラスミドは、正の選択のためのカナマイシン耐性遺伝子 (Kan^R) を含有する。当初、BL21 (DE3) 大腸菌 (*E. coli*) 宿主株 [F-ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)] (Novagen) を用いて、T7 ClfA_(N123) Y338A の発現を得た。DE3 という記号は、T7 RNA ポリメラーゼの発現の誘発とその後の pLP1179 内に存在する ClfA_(N123) Y338A コード配列

50

に近接する T7 プロモーターからの転写とに用いられる lacUV5 (IPTG 誘発性) プロモーターの制御化にある T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を含むラムダ溶原菌を意味する。宿主株は、BL21 (DE3) 溶原性宿主株が大規模な発酵の際に溶解性ファージを誘発し得るという情報を受けると、recA BLR (DE3) 宿主株 [F-ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (sri-recA) 306::Tn10 (TcR) (DE3)] (Novagen) に変化した。

【0187】

C1fA の生産および精製

C1fA の生産のために、大腸菌 (E. coli) BLR (DE3) / pLP1179 を、バイオリクターにおいてグルコースフェドバッチモードで、規定の培地内で成長させた。培養物が 30 ~ 50 の間の光学密度 (OD₆₀₀) に達すると、IPTG を添加することによって C1fA の発現を誘発した。培養物を、誘発後 3 ~ 16 時間の間に採取した。

10

【0188】

細胞を分離させ、澄明化した可溶性画分を回収した。硫酸アンモニウムを添加した後、フェニル-セファロス樹脂を含むカラムに材料をアプライし、溶出した。C1fA を含む画分を同定し、透析し、陰イオン交換カラム (Q-Sepharose) にロードした。塩勾配で溶出した後、C1fA を含む画分を同定し、限外濾過によって濃縮し、サイズ排除カラム (Superdex-75) にロードした。C1fA を含む画分を同定し、プールした。この時点での C1fA の純度は、SDS-PAGE によって測定すると約 98% であった。

20

【0189】

C1fB N1N2N3 のクローニングおよび精製

アミノ酸残基 44 ~ 542 に対応する C1fB コード配列を T7 RNA ポリメラーゼ発現ベクター pET28a (Novagen) 内にクローニングして、プラスミド pPX1189 を得た。発現ベクターを大腸菌 (E. coli) BLR (DE3) (Novagen) 内に形質転換し、組換え C1fB を生産した。(Walshら、Microbiology 154:550~558 (2008) を参照されたい。)

【0190】

C1fB の生産のために、大腸菌 (E. coli) BLR (DE3) / pLP1179 を、バイオリクターにおいてグルコースフェドバッチモードで、規定の培地内で成長させた。培養物が 30 ~ 50 の間の光学密度 (OD₆₀₀) に達すると、IPTG を添加することによって C1fB の発現を誘発した。培養物を、誘発後 3 ~ 16 時間の間に採取した。

30

【0191】

細胞を分離させ、澄明化した可溶性画分を回収した。可溶性画分の pH を約 pH 3.2 に調節し、沈殿した不純物を除去した。C1fB を含む可溶性画分の pH を約 pH 8.0 に調節し、透析して塩を除去した。硫酸アンモニウムを添加した後、フェニル-セファロス樹脂を含むカラムに材料をアプライし、溶出した。C1fB を含む画分を同定し、透析し、陰イオン交換カラム (Q-Sepharose) にロードした。塩勾配で溶出した後、C1fB を含む画分を同定し、限外濾過によって濃縮し、サイズ排除カラム (Superdex-75) にロードした。C1fB を含む画分を同定し、プールした。この時点での C1fB の純度は、SDS-PAGE によって測定すると約 94% であった。

40

【0192】

(実施例 2) 抗原: 黄色ブドウ球菌 (Staph Aureus) MntC の生産

黄色ブドウ球菌 (S. aureus) の脂質化された MntC のクローニング

組換え MntC を、当初、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 株 Mu50 からクローニングした。rMntC コード配列を、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) Mu50 のゲノム DNA から、PCR によって増幅した。2 対のネステッドプライマーを増幅に用い

50

た(表2)。最初のプライマー対である上流側5' SA926-MntCおよび下流側3' SA926-MntCは、rMntCのオープンリーディングフレームの上流および下流の配列にアラインする。第2のプライマー組はrMntCのコード配列にアラインし、アミノ酸残基19~309に対応する配列の増幅を可能にする。制限酵素部位をこれらのプライマーの5'末端に組み込んで、方向性クローニングを容易にした。Takara PrimeSTAR HS DNA Polymerase Premix (Takara Bio USA, Madison, WI)を用いて、Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc, Waltham, MA)内でPCRを実施した。QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA)によってPCR産物を精製し、適切な制限エンドヌクレアーゼ(New England Biolabs, Ipswich, MA)で切断し、araBADプロモーター駆動型の発現ベクターpBAD18Cm内にサブクローニングした。このベクターはまた、インフルエンザ菌(*H. influenza*)のリポタンパク質P4のシグナルペプチドを含有する。MntC PCR産物をインフレームでP4シグナルペプチドから下流においてサブクローニングして、pLP1194を生じさせた。pLP1194のMntCコード領域のDNA配列を、配列番号120に示す。pLP1194から発現されるMntCは、リポタンパク質である。組換えプラスミドDNAを、ABI PRISM BigDye (商標) Terminator V.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA)によって配列決定し、組換えタンパク質を大腸菌(*E. coli*) BLR (NOVAGEN)において発現させて、脂質化されたrMntCを生産した。

【0193】

脂質化されたMntCの生産および精製

脂質化されたMntCの生産のために、大腸菌(*E. coli*) BLR/pLP1194を、バイオリクターにおいてグルコースフェドバッチモードで、規定の培地内で成長させた。培養物が約60の光学密度(OD₆₀₀)に達すると、栄養をグルコースとアラビノースとの混合物に切り替えることによって、rMntCの発現を誘発した。培養物を、誘発の約24時間後に採取した。

【0194】

細胞を分離させ、不溶性画分を回収した。脂質化したMntCは、脂質の修飾に起因して、細胞膜に付随していることが明らかになった。洗浄剤(Zwittergent ZW-312)を用いて、MntCを膜画分から抽出した。不溶性の残屑を除去した後、脂質化されたMntCは可溶性画分内に見られた。可溶性画分を、混合された態様の樹脂を含有するカラムにアプライし、塩およびpHの線形勾配で溶出した。MntCを含有する画分を同定し、プールした。硫酸アンモニウムをプールに添加し、ブチル-セファロースを含有するカラムに材料をアプライし、溶出した。MntCを含有する画分を同定し、脱塩し、陽イオン交換カラム(SP-Sepharose)にロードした。塩勾配で溶出した後、rMntCを含有する画分を同定し、プールした。

【0195】

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)の脂質化されていないMntCのクローニング

脂質化されていないrMntCを発現させるために採用されたDNA配列を、プラスミドpLP1194からPCR増幅によって単離した。得られた配列はアミノ酸残基19~309に対応し、分泌および脂質化を指示するシグナル配列は含有していない。pLP1215のrMntCコード領域のDNA配列は、DNAの配列番号120において見られる。

【0196】

pLP1215を生じさせるために、MntCを、pLP1194からPCRによって増幅した。pLP1215内に存在するMntCのDNA配列は、アミノ酸残基19~309に対応し、この構築物の最初のコドン、遺伝子の増幅において用いられるフォワードプライマー内に導入した。PCRに用いられるプライマーはまた、5'末端に制限酵素部位を含有しており、そのため、方向性クローニングが容易である(表2)。増幅された

遺伝子のPCRおよび精製は、上記のように実施した。精製されたPCR産物を適切な制限エンドヌクレアーゼ (New England Biolabs、Ipswich、MA) で切断し、T7プロモーター駆動型の発現ベクターpET28a (Novagen、Madison、WI) 内にサブクローニングした。組換えプラスミドDNA pLP1215を、ABI PRISM BigDye (商標) Terminator V.3.1 (Applied Biosystems、Foster City、CA) によって配列決定し、組み換えタンパク質を大腸菌 (E. coli) BLR (DE3) において発現させた。pLP1215のプラスミドDNAを精製し、大腸菌 (E. coli) HMS174 (DE3) を形質転換するために用いて、タンパク質の発現を評価した。

【0197】

【表2】

表2: MntCプライマー

発現構築物	プライマー名	配列(5'-3')
脂質化された MntC(pLP1194)	5'SA926-MntCups	CAC AAA ATT TAC GAA TAG AAA GAA ACG AG (配列番号 109)
	3'SA926-MntCdown	AAA ATA TTG GAG ATA CCA ATA TTT TAG GTT G (配列番号 110)
	5'BamHISA926_MntC	TTT CTT <u>GGA TCC</u> GGT ACT GGT GGT AAA CAA AGC AGT G (配列番号 111)
	3'SphISA926_MntC	TTT CTT <u>GCA TGC</u> TTA TTT CAT GCT TCC GTG TAC AGT TTC (配列番号 112)
脂質化されていない MntC(pLP1215)	5'NcoIMntC	TTT CTT <u>CCA TGG</u> GTA CTG GTG GTA AAC AAA GCA G (配列番号 113)
	3'BlpIMntC	TTT CTT <u>GCT CAG CAT</u> TAT TTC ATG CTT CCG TGT ACA G (配列番号 114)

【0198】

rMntC構築物を生成するために用いられる合成オリゴヌクレオチド。制限エンドヌクレアーゼ部位に下線が引かれている。太字のヌクレオチドは、脂質化されていないrMntC構築物の最初のコドンを示す。

【0199】

脂質化されていないrMntCの生産および精製

脂質化されていないrMntCの生産のために、大腸菌 (E. coli) HMS174 (DE3) / pLP1215を、バイオリクターにおいてグルコースフェドバッチモードで、規定の培地内で成長させた。培養物が約60から80の光学密度 (OD₆₀₀) に達すると、IPTGを添加することによってrMntCの発現を誘発した。培養物を、誘発の約24時間後に採取した。細胞を分離させ、澄清化した可溶性画分を回収した。陽イオン交換樹脂 (SP-Sephrose) を含有するカラムに溶解物をアプライし、塩の線形勾配で溶出した。MntCを含有する画分を同定した。硫酸アンモニウムを添加した後、フェニル-セファロース樹脂を含有するカラムに材料をアプライし、溶出した。溶出した後、rMntCを含有する画分を同定し、プールし、脱塩した。この時点でのrMntCの純度は、SDS-PAGEによって測定すると>95%であった。

【0200】

(実施例3) 被膜多糖CP5およびCP8の生産

この実施例において、様々なサイズの黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 被膜多糖5型および8型の生産が記載される。CP5多糖およびCP8多糖の構造を図4に示す。本

10

20

30

40

50

明細書において記載される方法は、約 50 kDa から 800 kDa にわたる分子量の CP5 および CP8 の生産において効果的である。成長の特徴および生産される被膜の量に基づいて、CP5 の生産には株 PFESA0266 が選択され、一方、CP8 の生産には株 PFESA0005 または PFESA0286 が用いられた。株 PFESA0005 および PFESA0286 から単離された被膜は同一であることが示された。

【0201】

莢膜多糖の生産のために、主に炭素源（ラクトースまたはショ糖）、窒素源としての加水分解黄な粉、および微量の金属からなる複合培地において株を成長させた。株は、バイオリクターにおいて 2 から 5 日間にわたり成長させた。

【0202】

コンジュゲートの調製に用いられる CP5 および CP8 の精製を、細胞から被膜を放出させ、多糖の分子量を低減させるための、高温および低い pH に基づく、2 つの異なる方法によって行った。得られた分子量は、加水分解ステップの時間、温度、および pH に依存している。

【0203】

CP5 および CP8 の特徴付けを、表 3 に特定する技術を用いて行った。この手順によって生産される被膜多糖によって、低レベルのタンパク質汚染物質、NA 汚染物質、ペプチドグリカン汚染物質、および TA 汚染物質を伴う、純粋な多糖が生じる。表 4 および 5 を参照されたい。

【0204】

【表 3】

表3: 精製された黄色ブドウ球菌(S.aureus)CP5およびCP8についての特徴付けアッセイ

特異性	アッセイ
残留タンパク質	Lowry 比色アッセイ
残留核酸	260nm でのスキャン
残留テイコ酸	リン酸比色アッセイ
残留ペプチドグリカン	HPAEC-PAD
サイズ	SEC-MALLS
組成	HPAEC-PAD
同一性	1H-NMR または特異的 mAb との反応
O-アセチル化	1H-NMR
濃度	MALLS-RI または HPAEC-PAD

【0205】

第 1 の方法において、細胞からの被膜の放出および分子量の低減の後、被膜調製物を酵素カクテル（リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、リゾチーム、およびプロテアーゼ）で処理して不純物を消化する。インキュベーションの後、エタノール（約 25 % の最終濃度）を添加することによって、残りの不純物を沈殿させる。残りのエタノールを除去した後、被膜を含有する溶液を陰イオン交換カラム（Q-Sepharose）にロードし、塩の線形勾配で溶出した。被膜を含有する画分をプールし、メタ過ヨウ素酸ナトリウムで処理した。この処理によって、残りのテイコ酸汚染物質が酸化的加水分解されたが、CP5 または CP8 は影響されなかった。エチレングリコールを添加することによって反応を抑えた。材料を濃縮し、dH20 に対してダイアフィルトレーションして、あらゆる残りの試薬および副産物を除去した。

【0206】

被膜を生産するために用いられた第2の方法は、様々な細胞由来不純物を消化するための酵素の使用を伴わなかった。この方法において、細胞からの被膜の放出および分子量の低減の後、加水分解された発酵培養液を、精密濾過し、その後に限外濾過およびダイアフィльтраーションすることによって、澄明化した。活性化された炭素で溶液を処理して、不純物を除去した。炭素処理の後、材料をメタ過ヨウ素酸ナトリウムで処理して、残りのテイコ酸を酸化し、その後、プロピレングリコールで抑えた。材料を濃縮し、dH₂Oに対してダイアフィльтраーションして、あらゆる残りの試薬および副産物を除去した。

【0207】

いずれかの方法を用いて生産された被膜によって、低レベルのタンパク質汚染物質、核酸汚染物質、およびテイコ酸汚染物質を伴う、純粋な多糖が生じる。記載される方法を用いて、加水分解の条件を単に変えるだけで、特定された範囲の所望の高分子量多糖を生産することができる。70から150kDaにわたる特に有利な範囲の高分子量多糖は、多糖を担体タンパク質にコンジュゲートさせることによる免疫原性組成物の作製において有用である。

10

【0208】

本明細書において記載される方法によって得られ得る高分子量被膜多糖の例を、以下の表4に示す。精製された高めのMWのCP5のバッチはまた、TA、ペプチドグリカンが存在しないこと、および残りのタンパク質が少ないことにより示されるように、高い純度を有していた。表4を参照されたい。これらの例における分子量の範囲は、132.7kDaから800kDaにわたり、精製された多糖は、90~100%にわたり高度にO-アセチル化されていて、100%N-アセチル化されていた。表4を参照されたい。

20

【0209】

本明細書において記載される方法によって得られ得る低めの分子量の被膜多糖の例を、以下の表5に示す。精製された低めのMWのCP8のバッチは、テイコ酸(TA)、ペプチドグリカンが存在しないこと、および残りのタンパク質が少ないことにより示されるように、高い純度を有していた。表5を参照されたい。低めの分子量の範囲は、20.4kDaから65.1kDaにわたり、精製された多糖は、75~96%にわたり高度にO-アセチル化されていた。核酸汚染のレベルは低く、0.5%~2.45%であった。表5を参照されたい。

30

【0210】

【表4】

表4: CP5調製物の特徴付け

SA CP-5	MW (kDa)	CP (mg/ml)	O-アセチル (%) NMR	同一性 NMR	N-アセチル (%) NMR
1	800.1	3.164	100	パス	100
2	132.7	1.172	90	パス	100
3	335.4	0.975	90	パス	100
4	366.8	0.865	90	パス	ND

40

【0211】

【表5】

表5: CP8調製物の特徴付け

SA CP-8	精製された 全 CP mg	MW (kDa) (g/mol)	タンパク質 (Lowry) % (w/w)	NA (260nm スキャン) % (w/w)	O-アセチル NMR %
5	310	27.0	1.2	0.94	100
6	438	29.0	2.4	2	100
7	179	20.4	0.37	0.12	108
8	101	46.9	検出未満	0.5	94
9	91	65.1	1.15	2.45	96
10	578	35.5	2.47	0.65	75

10

【0212】

莢膜多糖の分子量の選択

この動態分析によって、広範な分子量の被膜多糖が本明細書において記載される方法によって生成され得ることが実証される。まず、大き目の多糖を細菌細胞によって生産し、その後、所望の分子量範囲を選択することができ、次に、加熱および加水分解のステップのpHおよび熱の条件を操作することによって精製することができる。

【0213】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 発酵培養液の熱処理は、発酵とCPの回収との間のプロセスステップであった。このプロセスステップは、熱を用いて、特定の期間にわたり、pH調節された培養液を処理する。低いpHでの熱処理の目的は、細胞を死滅させること、エンテロトキシンを不活化させること、細胞に結合した多糖を放出させること、および分子量を所望のサイズに低減させることであった。これらの目的のうち、分子量の低減は、このステップにおいて必要なプロセス時間の観点から、最も遅いものであった。したがって、他の目的は、考慮される処理時間内に必ず達成された。

20

【0214】

熱処理

様々な分子量範囲の被膜多糖を選択するための温度およびpHの条件が決定された。培養液のpHを、濃硫酸で調節した。次に、培養液の温度を設定値まで上昇させた。熱処理時間は、温度が設定値に達するとすぐに開始した。所望の処理時間に達すると、培養液を室温まで冷却した。プロセス中の試料を採取して、それぞれHPLC系およびSEC-MALLS系によって多糖の濃度および分子量を決定した。MWデータを動態分析において用いた。MWのプロフィールは、CP5ではpH4.0、4.5、および5.0で、CP8ではpH3.5、4.0、および5.0で、経時的に決定した。図5Aおよび5Bを参照されたい。

30

【0215】

多糖の弱酸加水分解の動態を、プロセスから得られた精製されたCP-5およびCP-8を用いて行った。精製された多糖の溶液を、実験のために、硫酸を用いて所望のpHに調節した。試料を、精密温度制御系を備えた油浴内に置いた。各試料を所定の時間間隔で取り出し、アイスケット内で急冷した。実験の最後に、1MのTris緩衝液(pH7.5)のアリコートを試料に添加して、pHを再び約7に調節した。試料をSEC-MALLS系によって分析した。MWデータを動態分析において用いた。MWのプロフィールに対する温度の効果を、CP5ではpH4.5で、CP8ではpH3.5で、経時的に決定した。図6Aおよび6Bを参照されたい。この酸加水分解手順は、発酵槽での培養を用いて、または精製の間段階で、または本明細書において示されるように、精製された多糖を用いて、実行することができる。超音波処理またはせん断などの他の分子量低減ステップが、同様に実行され得る。

40

【0216】

50

結果

熱処理におけるMWの低減に対するpHの効果、CP-5およびCP-8についてそれぞれ図5Aおよび5Bに示す。低いpHが多糖のサイズの低減においてより効果的であったことを見ることができる。データはまた、CP-5が同一のpHでCP-8よりも加水分解しにくかったことを示唆する。CP8のプロフィールを考慮すると、300kDaから600kDaの間の分子量範囲が、15分間から120分間の間にわたり95でpH5を用いることにより生じ得る。同様に、15分間から120分間の間にわたり95でpH4を選択することにより、250kDaから450kDaの間のCP8多糖の分子量範囲が得られ得る。さらに、15分間から120分間の間にわたり95でpH3.5を選択することにより、120kDaから450kDaの間のCP8多糖の分子量範囲が得られ得る。

10

【0217】

MWの低減に対する温度の効果、回収プロセスから回収された精製された多糖を用いて行った。結果を図6Aおよび6Bに示す。示されるように、温度が高いほど、加水分解の速度が速く、経時的に生産される多糖の分子量の範囲が広い。同一のpHで、95に対して、低い温度である55を用いると、狭い範囲の多糖分子量が生じる。

【0218】

さらに、図7は、精製されたCP5およびCP8の分子量と弱酸加水分解の処理時間との間の相関を実証している。精製された多糖は、先に詳述した回収プロセスから得られる最終生成物である。図7に示すように、pH4.5での黄色ブドウ球菌(*S. aureus*) PFESA0266株の熱処理の時間を増大させることにより、より小さい分子量のCP5多糖が生成し、一方、pH4.5で熱処理時間を短くすると、より大きな分子量のCP5多糖が生成する。CP5多糖のサイズは、低いpH(4.5)では、熱処理時間の長さに応じて、約90kDaから約220kDaにわたった。同様に、pH3.5での黄色ブドウ球菌(*S. aureus*) PFESA0005株の熱処理の時間を増大させることにより、より小さい分子量のCP8多糖が生成し、一方、pH3.5で熱処理時間を短くすると、より大きな分子量のCP8多糖が生成する。CP8多糖のサイズは、低いpH(3.5)では、熱処理時間の長さに応じて、約80kDaから約220kDaにわたった。この研究において示されるように、低いpHでの熱処理の時間と精製されたCP5多糖およびCP8多糖のサイズとの間の相関によって、特定の範囲の分子量を有する精製された多糖を生産するために必要な処理時間の推定が可能になる。

20

30

【0219】

上記で実証されるように、CP5およびCP8の両方で、20kDaから800kDa超の被膜多糖の全範囲の分子量が生産、放出、および精製され得ることに留意することが重要である。記載される方法は、特定の範囲の所望の高分子量被膜多糖を生産するために用いることができる。70から150kDaにわたる分子量を有する、得に有利な範囲の高分子量被膜多糖5型および8型を、これらの方法から生成することができる。表6を参照されたい。被膜多糖のこの範囲の分子量は、多糖を担体タンパク質にコンジュゲートさせることによる免疫原性組成物の作製において有用である。あるいは、高分子量被膜多糖のこの有利な範囲は、80から140kDaのCP5およびCP8にわたる。表6を参照されたい。高分子量被膜多糖CP5およびCP8の別の有利な範囲は、90から130kDa、または90から120kDaのCP5およびCP8である。表6を参照されたい。約100から140kDaの分子量範囲を有するCP5被膜多糖を生産するために用いられる条件は、95、pH4.5で135分間というものである。約80から120kDaの分子量範囲を有するCP8被膜多糖を生産するために用いられる条件は、95、pH3.5で300分間というものである。

40

【0220】

【表 6】

表6: 特定の範囲の高分子量CP5およびCP8の生産

実行	CP8 MW (kDa)	CP5 MW (kDa)
1	98	142
2	89	108
3	108	142
4	108	108
5	89	ND
6	100	ND
7	99	63
8	113	72
9	105	74
10	100	63
11	87	ND

ND=実行せず

【0221】

(実施例4) CRM₁₉₇への被膜多糖CP5およびCP8のコンジュゲーション

この実施例は、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) CP5 - CRM₁₉₇ コンジュゲートおよびCP8 - CRM₁₉₇ コンジュゲートの生産において用いられるプロセスおよび特徴付けアッセイを記載する。いくつかのコンジュゲーション化学を、担体タンパク質への黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 被膜多糖CP5およびCP8のコンジュゲーションについて評価した。PDPH (3 - 2 - ピリジルジチオ) プロピオニルヒドラジン) を用いるコンジュゲーションによって、チオエーテル共有結合が生じ、CDI / CDT (1, 1 - カルボイルジイミダゾール / 1, 1 - カルボイル - ジ - 1, 2, 4 - トリアゾール) によって、CPと担体タンパク質との間の1つの炭素または0個の炭素のリンカーが生じる。

【0222】

PDPHコンジュゲーション化学によるCRM₁₉₇へのCPのコンジュゲーション

PDPHコンジュゲーション化学は、多糖の活性化、チオール保護基の除去、活性化された多糖中間体の精製、CRM₁₉₇タンパク質の活性化および精製、ならびに活性化された成分のコンジュゲーションおよびその後の精製を伴う、多段階プロセスである。リンカーを含有するチオール基を多糖に導入し、ハロアセチル基をCRM₁₉₇タンパク質担体に導入した後、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) のCP5多糖およびCP8多糖を、チオエーテル結合を介してタンパク質担体に結合させた。プロモ酢酸のN - ヒドロキシスクシンイミドエステルとアミン基とを反応させることによって、プロモアセチル基をCRM₁₉₇タンパク質内に導入した。チオール化されたCPを生成するために、CP内のN - アセチルマンノサミノウロン酸の、カルボジイミドで活性化されたカルボキシレート基を、スルフィドリル反応性のヒドラジンヘテロ二機能性のリンカーである3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピニルヒドラジド (PDPH) にカップリングさせた。DTTでの還元によって生成し、Sephadex G25カラムでのSECによって精製した、PDPHでチオール化されたCPのチオールを、活性化されたタンパク質のプロモアセチル基と反応させることによって、CPとタンパク質との間の臭素の転移によって形成されたチオエーテル共有結合が生じた。未反応のプロモアセチル基を、システアミン塩酸塩 (2 - アミノエタンチオールヒドロクロリド) で「キャップ」した。反応混合物を次に濃縮し、ダイアフィルトレーションした。残りのコンジュゲートしていないプロモアセチル基を、システアミン塩酸塩でキャップし、それによって、確実に、反応性のプロモアセチル基がコンジュゲーション後に残らないようにした。これによって、臭素の転移の後に、システアミンのチオール末端とリジン残基上のアセチル基との間の共有結合が形成された。

【0223】

PDPHでの黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 被膜多糖のチオール化

多糖をまず、PDPHでのチオール化によって活性化した。多糖を新たに調製したPDPHストック溶液(DMSO内に250mg/mL)、EDACストック溶液(diH_2O 内に90mg/mL)、およびMES緩衝液ストック溶液(0.5M、pH4.85)と混合して、0.1MのMESならびに1mL当たり2mgおよび4mgのCPという最終濃度とし、一方で、CP:PDPH:EDACの重量比をCP5では1:5:3に、CP8では1:0.6:1.25に維持した。この混合物を室温で1時間にわたりインキュベートし、次に、4から8の間で3500MWCOT透析装置を用いて1000倍の容積の蒸留 H_2O に対して4回透析して、未反応のPDPHを除去した。0.2MのDTTで、PDPHに結合した多糖を作製し、室温で3時間にわたり、または4から8の間で一晩、インキュベートした。過剰なDTTおよび反応副産物を、Sephadex G 25樹脂および移動相としての蒸留水を用いるSECによって、活性化された多糖から分離した。DTDPアッセイによって、チオール基について画分をアッセイし、カラムの空隙容積の近辺に溶出されたチオール陽性画分をプールした。画分のプールをPAHBAHアッセイおよびO-アセチルアッセイによってアッセイして、活性の程度を決定し、これは、チオール基を含有する反復単位のリモル濃度パーセント(チオールのリモル濃度/反復単位のリモル濃度)として表される。活性化された多糖を凍結乾燥し、コンジュゲーションに必要となるまで-25で保管した。

10

【0224】

担体タンパク質の活性化

個別に、担体タンパク質をプロモアセチル化によって活性化した。CRM₁₉₇を、10mMのリン酸緩衝した0.9%NaCl(pH7)(PBS)で5mg/mLに希釈し、次に、1Mのストック溶液を用いて、0.1M NaHCO₃(pH7.0)を作製した。プロモ酢酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(BAANS)を、20mg/mLのDMSOのBAANSストック溶液を用いて、1:0.25(w:w)のCRM₁₉₇:BAANS比で添加した。この反応混合物を、4から8の間で1時間にわたりインキュベートし、次に、Sephadex G-25上でのSECを用いて精製した。精製された、活性化されたCRM₁₉₇を、Lowryアッセイによってアッセイして、タンパク質濃度を決定し、次にPBSで5mg/mLに希釈した。抗凍結剤としてショ糖を5%wt/容積まで添加し、活性化されたタンパク質を凍結し、コンジュゲーションに必要となるまで-25で保管した。

20

30

【0225】

カップリング反応

活性化された被膜多糖および活性化された担体タンパク質を調製すると、2つをコンジュゲーション反応において組み合わせた。凍結乾燥およびチオール化された多糖を、0.16Mのホウ酸(pH8.95)内に溶解し、解凍したプロモアセチル化されたCRM₁₉₇および蒸留水と混合して、0.1Mのホウ酸塩、1:1wt/wt比のCRM₁₉₇:CP、ならびにCP8では1mg/mLの多糖およびCP5では2mg/mLの多糖という最終濃度とした。この混合物を室温で16から24時間の間にわたりインキュベートした。タンパク質上の未反応のプロモアセチル基を、0.1Mのホウ酸塩(pH8.95)内に溶解したシステアミンストック溶液135mg/mLを用いて、1:2(wt/wt)のCRM₁₉₇:システアミン比でシステアミン塩酸塩を添加することによって、キップし、室温で4時間にわたりインキュベートした。被膜多糖-CRM₁₉₇コンジュゲート(コンジュゲート)を、100Kポリエーテルスルホン限外濾過装置を用いて、0.9%NaClに対して50倍ダイアフィルトレーションすることによって精製した。

40

【0226】

PDPHでのCP5およびCP8のチオール化研究の再現性の結果は、CP5の活性化の程度が11から19%の範囲であることを実証し、前記範囲は、10個のCP反復単位当たりおよそ1つのリンカー分子から、5個の反復単位当たり1つのリンカー分子に相当する。CP8の活性化は12から16%の範囲であり、これは、CP5の活性化に非常に類似していた。

50

【0227】

CRM₁₉₇のリジン残基のプロモアセチル化は非常に一貫しており、39個の利用可能なリジンのうち19から25個のリジンの活性化をもたらした。この反応は、高収量の活性化されたタンパク質を生産した。

【0228】

CDI/CDTコンジュゲーション化学によるCRM₁₉₇へのCPのコンジュゲーション

CDIおよびCDTは、多糖が無水環境(DMSO)内で活性化されて、利用可能なヒドロキシルを有するカルバミン酸イミダゾール部分またはカルバミン酸トリアゾール部分、およびカルボン酸を有するアシルイミダゾール部分またはアシルトリアゾール部分を形成する、1段階のコンジュゲーションプロセスを提供する。タンパク質担体(DMSO内)を添加すると、リジンによるイミダゾールまたはトリアゾールの求核置換、ならびにカルバメート結合(活性化されたヒドロキシルで)およびアミド結合(活性化されたカルボン酸で)が生じる。反応溶液は、水性溶液内に10倍希釈されて、未反応の活性化基が除去され、その後、ダイアフィルトレーションによって精製される。

【0229】

両コンジュゲーション化学は、担体タンパク質に共有結合したCPを生産し、これは、サイズ排除クロマトグラフィーから得られる画分における糖およびタンパク質の存在によって、ならびにグリコールアルデヒドによりキャップされたコンジュゲートまたはシステアミン塩酸塩によりキャップされたコンジュゲートのアミノ酸分析によって示された。

【0230】

20から40kDaの範囲の多糖サイズを有する両莢膜血清型についての、PDPH化学およびCDI/CDT化学の両方によって調製されたコンジュゲートのいくつかのロットの調製物から得られる結果の概要を、以下の表7に示す。遊離被膜多糖、CP:タンパク質の比、およびこれらの2つのコンジュゲーション方法によって生成されるコンジュゲートの収量に有意な差はなかった。コンジュゲートしたCPの抗原性は、コンジュゲートと天然CPとの間の同一性沈降素システムにより示されるように、コンジュゲーションによって変化しなかった。

【0231】

【表7】

表7: 2つのコンジュゲーション化学によって調製されたSA CP5-CRM₁₉₇およびCP8-CRM₁₉₇の特徴付け

コンジュゲート	化学	CP収量(%)	タンパク質収量(%)	産出比	遊離糖(%)	遊離タンパク質(%)	修飾されたリジン	サイズ(分子量またはKd(0.3多糖/タンパク質未満の%))
SA CP5-CRM ₁₉₇	CDT	19-27	35	0.5-0.8	10-40	<1	18-22	38/61から76/74
	PDPH	26-52	40-99	0.4-1.0	23-50	ND	ND	7.5×10 ⁵ から2.3×10 ⁶
SA CP8-CRM ₁₉₇	CDI	46-62	54-55	0.8-0.9	22-25	<1	7-8	34/57から60/57
	PDPH	34-70	61-83	0.6-0.9	15-41	ND	11-16	74-92%

【0232】

上記に示されるように、本明細書において記載される方法は、特定の範囲の所望の高分子量被膜多糖を生産するために用いることができる。この研究の目的は、高分子量の事前に選択された範囲から、免疫原性組成物において用いるための濾過および精製されたCPであり得るコンジュゲートを調製することであった。この実施例において、CP5被膜多

糖の分子量が約90 kDaから約120 kDaにわたる8つのバッチが選択され、チアゾール(CDT)での活性化を用いてコンジュゲーションが行われた。表8を参照されたい。得られたコンジュゲートの分子量は、1533 kDaから2656 kDaにわたった。CRM₁₉₇当たりのコンジュゲートしたリジンの数は、高く22から低く15にわたった。遊離被膜多糖は、高く18%から低く11%にわたった。表8を参照されたい。

【0233】

【表8】

表8: 事前に選択されたMW範囲のCP5を有するコンジュゲート

実行	ポリ MW(kDa)	糖収量(%)	遊離糖(%)	SEC-MALLSによる MW(kDa)	修飾されたリジン
1	121	63	11	2130	19
2	92	72	16	1533	22
3	119	74	14	2656	15
4	115	63	18	1911	15

10

【0234】

表9は、CP8被膜多糖の分子量が約87 kDaから113 kDaにわたり、イミダゾールコンジュゲーション化学を用いた、CP8コンジュゲートの分析をまとめたものである。得られたコンジュゲートの分子量は、595 kDaから943 kDaにわたった。CRM₁₉₇当たりのコンジュゲートしたリジンの数は、高く9から低く3にわたった。遊離被膜多糖は、高く6%から低く2%にわたった。表9を参照されたい。

20

【0235】

【表9】

表9: 事前に選択されたMW範囲のCP8でのコンジュゲート

実行	ポリ MW(kDa)	糖収量(%)	遊離糖(%)	SEC-MALLSによる MW(kDa)	修飾されたリジン
1	99	88	6	943	4
2	113	73	5	841	3
3	105	79	3	719	7
4	100	86	2	630	9
5	87	90	3	595	6

30

【0236】

両コンジュゲーション化学は、担体タンパク質に共有結合したCPを生産する。遊離被膜多糖、CP:タンパク質の比、およびこれらの2つの方法によって生成されるコンジュゲートの収量に有意な差はなかった。

40

【0237】

(実施例5) ClfAのポリペプチド断片N1、N2、およびN3の配列多様性

この実施例において、様々な由来源から得られる疾患原因単離体から得られるClfAポリペプチド断片N1、N2、およびN3のタンパク質配列の不均一性を評価した。ClfA遺伝子を、複数の病状に関連する黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)株から配列決定した。さらなる株から得られる配列情報を、GenBankから得て、関連する株から配列を生成した。表10は、異なるClfA配列を列挙する。

【0238】

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)の異なる疾患原因株から得られるClfAタンパク質の配列アラインメントを、図8A~8Eに示す。MUSCLEを用いてタンパク質配

50

列をアラインした。Edgar, R. C. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792~1797 (2004)を参照されたい。SHOWALIGNを用いてアラインメントを表示した。Rice, P.ら、「EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite」*Trends in Genetics*, 16(6): 276~277 (2000)を参照されたい。配列の多くは、変化を伴わずに複数回再発した。明瞭性のために、それぞれの固有の配列は、アラインメントにおいて1回のみ示した。図8A~8Eを参照されたい。固有の配列のみを配列表に含めた。例えば、ClfA__001のタンパク質配列は、変化を全く伴わずに、複数の異なる株から得られた。図8A~8Eを参照されたい。あらゆる配列について、配列表番号はまた、表10: ClfA株および配列表からも得ることができる。表10は、この同一のClfA__001タンパク質配列を含有していた1つの例となる株を列挙する。この配列は、図8A~8Eのアラインメントの最初の行において示される。ClfA抗原の固有の配列のこのアラインメントは、多型がClfAのA領域全体(N1-N2-N3)に分布していたことを示す。いくつかのケースにおいて、ClfAのあらゆる所与の固有のタンパク質配列で、同一のタンパク質をコードする2つ以上のヌクレオチド配列が発見された。最も頻繁に生じるDNA配列のみを、配列表および表10に含めた。ClfAでは、ClfA__003、ClfA__005、ClfA__008、ClfA__009、ClfA__013、ClfA__014、ClfA__015、ClfA__016、ClfA__017、ClfA__018、ClfA__019、ClfA__020、ClfA__021、ClfA__022、ClfA__023、およびClfA__024という配列が本明細書において開示され、GenBankにおいては見られない。

10

20

【0239】

【表 10】

表10: ClfA株および配列表

例となる株	DNA-ClfA	ヌクレオチド配列番号	タンパク質-ClfA	アミノ酸配列番号	抗原に対する同一性%
PFESA0131	clfA_001-1	61	clfA_001	62	99
PFESA0074	clfA_002-1	63	clfA_002	64	92
PFESA0072	clfA_003-1	65	clfA_003	66	99
PFESA0159	clfA_004-1	67	clfA_004	68	94
PFESA0154	clfA_005-1	69	clfA_005	70	91
PFESA0096	clfA_006-1	71	clfA_006	72	91
PFESA0269	clfA_007-1	73	clfA_007	74	91
PFESA0081	clfA_008-1	75	clfA_008	76	97
PFESA0005	clfA_009-1	77	clfA_009	78	95
PFESA0139	clfA_010-1	79	clfA_010	80	99
PFESA0237	clfA_011-1	81	clfA_011	82	100
PFESA0157	clfA_012-1	83	clfA_012	84	96
PFESA0069	clfA_013-1	85	clfA_013	86	92
PFESA0002	clfA_014-1	87	clfA_014	88	98
PFESA0147	clfA_015-1	89	clfA_015	90	91
PFESA0094	clfA_016-1	91	clfA_016	92	98
PFESA0143	clfA_017-1	93	clfA_017	94	97
PFESA0129	clfA_018-1	95	clfA_018	96	99
PFESA0128	clfA_019-1	97	clfA_019	98	92
PFESA0148	clfA_020-1	99	clfA_020	100	91
PFESA0140	clfA_021-1	101	clfA_021	102	98
PFESA0152	clfA_022-1	103	clfA_022	104	91
PFESA0141	clfA_023-1	105	clfA_023	106	96
PFESA0160	clfA_024-1	107	clfA_024	108	94

10

20

【0240】

ClfAタンパク質配列の系統発生を試験し、系統樹を構築した。ClustalWを用いて配列をアラインした。Chenna R、Sugawara H、Koike Tら、Nucleic Acids Research、31(13):3497~3500(2003)を参照されたい。近隣結合樹を1000回ブートストラップにかけ、MEGA4.0で表示した。Tamura Kら、Molecular Biology & Evolution、24(8):1596~1599(2007)を参照されたい。枝上に示されるブートストラップ値は、その枝が1000回の試行において再現された回数である。500(50%再現性)未満の値は、あまり裏付けられていないと考えられる。

30

【0241】

ClfA配列は、2つの主要な枝を有する系統樹を形成する。図9を参照されたい。これらの2つの群の分離は、系統発生において非常によく裏付けられている。1つの枝(上部)は9個の配列を含み、これらは、互いに極めて緊密に関連している(96~99%の同一性)が、候補配列clfA_011に対してはより遠い関連を有し、91~92%の同一性である。clfA_011を含む第2の群は、より多様であり、この群における系統発生はあまり裏付けられていない。これらのタンパク質配列は、互いに93~99%同一である。

40

【0242】

(実施例6) ClfBのポリペプチド断片N1、N2、およびN3の配列多様性

この実施例において、様々な由来源から得られる92個の疾患原因単離体から得られるClfBのN1、N2、およびN3ポリペプチド断片のタンパク質配列の不均一性を評価

50

した。ClfB遺伝子を、複数の病状に関連する黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株から配列決定した。表11を参照されたい。さらなる株から得られる情報を、GenBankから得て、さらなる配列を生成した。

【0243】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の異なる疾患原因株から得られるClfBタンパク質の配列アラインメントを、図10A~10Eに示す。MUSCLEを用いてタンパク質配列をアラインした。Edgar, R. C. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792~1797 (2004)を参照されたい。SHOWALIGNを用いてアラインメントを表示した。Rice, P.ら、「EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite」*Trends in Genetics*, 16(6): 276~277 (2000)を参照されたい。図10A~10EのClfBアラインを参照されたい。ClfAのように、配列の多くは、変化を伴わずに複数回再発した。明瞭性のために、それぞれの固有の配列は、アラインメントにおいて1回のみ示した。図10A~10Eを参照されたい。固有のClfB配列のみを配列表に含めた。例えば、ClfB__006の配列は、変化を全く伴わずに、複数の異なる株から得られた。この配列は、図10A~10Eにおけるアラインメントの最初の行において示される。あらゆる配列について、配列表番号はまた、表11からも得ることができる。ClfB抗原のそれぞれの固有の配列のこのアラインメントは、多型がClfBのA領域全体(N1-N2-N3)に分布していたことを示す。ClfAと同様に、ClfBのあらゆる所与の固有のタンパク質配列で、同一のタンパク質をコードする2つ以上のヌクレオチド配列が発見された。最も頻繁に生じるDNA配列のみを、配列表および表11に含めた。ClfBでは、ClfB__001、ClfB__004、ClfB__005、ClfB__010、ClfB__011、ClfB__013、ClfB__014、ClfB__015、ClfB__016、ClfB__017、ClfB__018、ClfB__019、ClfB__020、ClfB__021、ClfB__022、ClfB__023、およびClfB__024という配列が本明細書において開示され、GenBankにおいては見られない。系統樹を図11に示す。

10

20

【0244】

【表 1 1】

表11:CIfB株および配列表

例となる株	DNA-CIfB	配列 番号	タンパク質-CIfB	配列 番号	抗原に対する同一性 %
PFESA0286	clfB_001-1	15	clfB_001	16	95
PFESA0159	clfB_002-1	17	clfB_002	18	95
RF122	clfB_003-1	19	clfB_003	20	94
PFESA0271	clfB_004-1	21	clfB_004	22	95
PFESA0081	clfB_005-1	23	clfB_005	24	95
PFESA0080	clfB_006-1	25	clfB_006	26	100
PFESA0270	clfB_007-1	27	clfB_007	28	99
PFESA0269	clfB_008-1	29	clfB_008	30	95
PFESA0145	clfB_009-1	31	clfB_009	32	94
PFESA0069	clfB_010-1	33	clfB_010	34	95
PFESA0002	clfB_011-1	35	clfB_011	36	96
PFESA0128	clfB_013-1	37	clfB_013	38	96
PFESA0129	clfB_014-1	39	clfB_014	40	95
PFESA0136	clfB_015-1	41	clfB_015	42	99
PFESA0139	clfB_016-1	43	clfB_016	44	99
PFESA0140	clfB_017-1	45	clfB_017	46	96
PFESA0141	clfB_018-1	47	clfB_018	48	94
PFESA0144	clfB_019-1	49	clfB_019	50	97
PFESA0150	clfB_020-1	51	clfB_020	52	96
PFESA0152	clfB_021-1	53	clfB_021	54	96
PFESA0156	clfB_022-1	55	clfB_022	56	96
PFESA0163	clfB_023-1	57	clfB_023	58	94
PFESA0211	clfB_024-1	59	clfB_024	60	99

10

20

【 0 2 4 5】

(実施例 7) 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の疾患原因クローンの配列多様性

この実施例において、様々な由来源から得られる 104 個の疾患原因単離体から得られる MntC 遺伝子のタンパク質配列の不均一性を評価した。MntC 遺伝子を、複数の病状に関連する黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の株から配列決定した。表 12 を参照されたい。さらなる株から得られる情報を、GenBank から得て、株の配列を生成した。

30

【 0 2 4 6】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の異なる疾患原因株から得られる MntC タンパク質の配列アラインメントを、図 12 A ~ 12 B に示す。MUSCLE を用いてタンパク質配列をアラインした。Edgar, R. C. *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792 ~ 1797 (2004) を参照されたい。SHOWALIGN を用いてアラインメントを表示した。Rice, P. ら、「EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite」*Trends in Genetics*, 16 (6): 276 ~ 277 (2000) を参照されたい。図 12 を参照されたい。CIfA のように、配列の多くは、変化を伴わずに複数回再発した。明瞭性のために、それぞれの固有の配列は、アラインメントにおいて 1 回のみ示した。図 12 を参照されたい。固有の MntC 配列のみを配列表に含めた。例えば、MntC_001 の配列は、変化を全く伴わずに、異なる株から得られた。図 12 を参照されたい。この配列は、図 12 におけるアラインメントの最初の行において示される。あらゆる配列について、配列表番号はまた、表 12 からも得ることができる。最も頻繁な対応する DNA 配列のみを、配列表に含めた。MntC では、MntC_002、MntC_006、MntC_007、MntC_008、および MntC_009 という配列が本明細書において開示され、GenBank においては見られない。

40

50

【 0 2 4 7 】

【表 1 2】

表12: MntC株および配列表

株	DNA-MntC	配列番号	タンパク質-MntC	配列番号	抗原に対する同一性%
PFESA0129	MntC_001-1	1	MntC_001	2	99
PFESA0142	MntC_002-1	3	MntC_002	4	99
PFESA0139	MntC_003-1	5	MntC_003	6	99
PFESA0286	MntC_006-1	7	MntC_006	8	99
PFESA0136	MntC_007-1	9	MntC_007	10	99
PFESA0150	MntC_008-1	11	MntC_008	12	99
PFESA0153	MntC_009-1	13	MntC_009	14	99

10

【 0 2 4 8 】

(実施例 8) 感染の際のインビボでの C l f A、C P 5、C P 8、および M n t C の表面発現

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は、様々なヒト感染の原因である。その結果、この細菌は、感染に必要な病原性因子の差次的な発現によって、異なる環境ニッチに適応するはずである。標的抗原の発現を、感染の原発部位での抗原の発現を測定するための創傷モデル、血液内での抗原の発現をモニタリングする菌血症モデル、および栄養 / 酸素限定条件での抗原発現をモニタリングする留置チャンバモデルという3つのインビボでの齧歯動物アッセイにおいて研究して、感染の際のそれらの発現を評価した。これらのモデル全てで、齧歯動物を、研究部位で細菌によってチャレンジした。感染の後、細菌を様々な時点で採取し、抗原の発現 (C l f A、C P 5、C P 8、M n t C) を、免疫蛍光顕微鏡法 (創傷および菌血症) またはフローサイトメトリー (チャンバ) を用いて評価した。

20

【 0 2 4 9 】

材料および方法

創傷モデルにおける発現

創傷感染実験は、1群あたり5頭の動物、かつ最大5群で、1実験当たり最大25頭の動物から構成される。6から8週 (w k) 齢のオスの C 5 7 B L / 6 マウスを手術して、大腿筋の切開部内に輪状の縫合糸を包埋した。これにより、細菌の付着のための外来の身体構造が提供され、ブドウ球菌による創傷感染をもたらすために必要な最少感染用量が有意に低減する。5 μ L の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) または無菌生理食塩水を、4 - 0 シルクの深部組織構造下の切開部内に導入した。皮膚を 4 - 0 P r o l e n e 構造または外科用接着剤 (例えば、シアノアクリレート) で閉じた。動物を感染後30分から10日間の間の時点で安楽死させ、大腿筋を切除し、ホモジナイズし、細菌計数した。感染部位の細菌を、免疫蛍光 (I F) 共焦点顕微鏡法によって、抗原の発現について分析した。

30

【 0 2 5 0 】

菌血症モデルにおける発現

10頭の4週齢の C D - 1 マウスまたは B a l b / C マウスからなる群を、0週目、3週目、および6週目に、皮下注射によって、1 μ g のタンパク質または C P コンジュゲートで免疫化した。動物を0週目および8週目に出血させ、その後、T S B 内の後期対数期まで成長した黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) で腹腔内チャレンジした。チャレンジの3時間後に動物を安楽死させ、I F 共焦点顕微鏡法のために血液を回収した。

40

【 0 2 5 1 】

留置透析管モデルにおける発現

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の単離体を T S A プレート上で、37 で一晩成長させた。細菌をプレートから擦り取り、無菌 P B S 内に再懸濁し、O D ₆₀₀ を 1、すなわちおよそ 1 0 ⁹ コロニー形成単位 (c f u) / m L に調節した。細菌を 1 0 ³ c f u

50

/mLの濃度まで希釈し、透析管内に接種した。懸濁液のアリコートを手板培養して、c f uの実際の数値を決定した。3.5 kDaのM W C Oを有する透析管を、70%エタノール内で30分間にわたり滅菌し、その後、滅菌水内で十分にすすぎ、次に無菌生理食塩水内で十分にすすぐことによって、移植のために調製した。細菌懸濁液の2 mLのアリコートを透析管に移し、袋を結んで閉じ、次に、滅菌生理食塩水で十分にすすいだ。オスのSprague Dawleyラット(6週齢)を麻酔し、2~3 cmの切開部を背側正中線に沿って形成した。下層の組織から皮膚を穏やかに分離することによって、切開部でポケットを生じさせた。管をポケット内に移植し、外科用ステープルを用いて皮膚を閉じた。24時間後、ラットを安楽死させ、管を取り外し、フローサイトメトリー分析のために細菌を回収した。

10

【0252】

免疫蛍光顕微鏡法(I F)

5頭のマウスの血液を、氷冷したクエン酸ナトリウム(pH7.0)内にプールした(最終濃度0.4%)。真核細胞を1%NP-40(Pierce Biotechnology)ですすいだ。細菌をPBSで洗浄し、ウサギの免疫血清または免疫前血清(1:100)と共に4で一晚インキュベートし、ALEXA488にコンジュゲートしたヤギウサギ抗体(1:250、Invitrogen)で検出した。標識された細菌を顕微鏡スライド上で乾燥させ、カバースリップをVectashield HardSet培地(Vector Laboratories, Inc.)と共に載せた。Leica TCS SLスペクトル共焦点顕微鏡(Leica Microsystems)で画像を得た。

20

【0253】

フローサイトメトリー分析

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)の単離体を、ラット透析管モデルの手順において記載したように成長させた。およそ 10^7 個の細菌細胞を、染色緩衝液(10%ヤギ血清を有するHanks平衡塩溶液)内で、氷上で1時間にわたりブロックした。細菌細胞を10000 rpmで5分間にわたり遠心分離し、上清を除去し、マウス抗体またはアイソタイプ対照抗体と共に、氷上で30分間にわたりインキュベートした。次に、細胞を洗浄し、FITCにコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgG(Jackson Immuno Research)で、氷上で30分間にわたり染色した。細菌を染色緩衝液で洗浄し、2%パラホルムアルデヒドで固定し、データを得、FACS CaliberフローサイトメーターおよびCell探求ソフトウェア(Becton, Dickinson and Co.)を用いて分析した。全部で30000の事象を各サンプルについて回収した。

30

【0254】

【表 1 3】

表13a: 黄色ブドウ球菌(S.aureus)CP5型の単離体における抗原発現プロフィール。

抗原		CP						CifA						MntC					
時間[時間]		T ₀	1	4	6	24	72	T ₀	1	4	6	24	72	T ₀	1	4	6	24	72
PFESA0266	菌血症	+	-	±	+	/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	創傷	+	-	-	-	±	+	+	-	±	+	+	+	-	±	±	±	±	±
PFESA0272	菌血症	+	+	+	+	/	/	+	-	+	+	/	/	-	-	-	-	/	/
	創傷	+	-	-	-	+	!	+	-	±	±	±	!	-	-	-	±	!	!
PFESA0094	菌血症	+	-	±	+	/	/	+	-	±	!	/	/	-	-	-	-	/	/
	創傷	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	±	±	±
PFESA0093	菌血症	+	-	±	+	/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	創傷	+	-	-	±	+	+	+	-	-	-	±	±	-	-	-	±	±	±
PFESA0028	菌血症	+	-	-	+	/	/	+	-	±	±	/	/	-	-	±	±	/	/
	創傷	+	-	-	-	-	-	+	-	-	±	±	±	-	-	-	±	±	-
PFESA0029	菌血症	-	-	±	+	/	/	+	-	-	+	/	/	-	-	-	+	/	/
	創傷	-	-	-	-	±	±	+	-	-	-	-	±	-	-	-	±	±	-

/=菌血症実験を6時間にわたり行った

!=実験中に動物が死亡した

NT=試験せず

10

20

【 0 2 5 5 】

【表 1 4】

表13b: 黄色ブドウ球菌(S.aureus)CP8型の単離体における抗原発現プロフィール。

抗原 時間[時間]	CP						CifA						MntC					
	T0	1	4	6	24	72	T0	1	4	6	24	72	T0	1	4	6	24	72
PFESA 菌血症 0003 創傷	+	±	+	+	/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA 菌血症 0286 創傷	+	-	-	+	/	/	+	-	-	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA 菌血症 0005 創傷	+	-	±	±	/	/	+	+	+	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA 菌血症 0002 創傷	+	-	-	-	/	/	+	±	-	-	/	/	-	±	±	+	/	/
PFESA 菌血症 0269 創傷	+	-	-	-	/	/	+	-	-	-	/	/	-	-	±	±	/	/
PFESA 菌血症 0268 創傷	+	+	+	+	/	/	+	+	-	-	/	/	-	±	-	+	/	/
PFESA 菌血症 0025 創傷	+	-	-	-	/	/	+	-	-	-	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA 菌血症 0283 創傷	+	-	-	-	/	/	+	+	+	-	/	/	±	±	±	±	/	/
PFESA 菌血症 0027 創傷	+	-	-	±	/	/	+	-	±	±	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA 菌血症 0001 創傷	+	-	-	-	/	/	+	-	-	-	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA 菌血症 0095 創傷	+	-	-	±	/	/	+	-	-	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA 菌血症 0271 創傷	+	-	-	-	/	/	+	+	-	-	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA 菌血症 0271 創傷	+	-	±	+	/	/	+	-	±	±	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT

/=菌血症実験を6時間にわたり行った

!=実験中に動物が死亡した

NT=試験せず

【 0 2 5 6】

【表 1 5】

表13c: 留置透析管における黄色ブドウ球菌(S.aureus)抗原の発現。

陽性細胞の頻度(全体に対する%)

黄色ブドウ球菌(S.aureus)PFESA 0266	時間(時間)	0	3	6.0	9.0	13.0	18.0	30.0
	CifA	69.8	13.7	8.5	8.0	12.5	8.8	16.4
CP5	28.0	1.9	1.8	6.1	7.1	5.2	9.6	
MntC	91.4	4.3	5.6	2.9	20.8	37.0	33.2	
黄色ブドウ球菌(S.aureus)PFESA 0005	時間(時間)	0	3	6.0	9.0	13.0	18.0	24.0
CifA	98.6	63.9	69.7	24.3	36.1	98.6	99.0	
CP8	77.3	43.0	18.0	7.5	11.8	96.4	94.0	
MntC	5.9	7.7	12.5	2.6	2.9	9.3	9.9	

【 0 2 5 7】

結果

19個の黄色ブドウ球菌(S.aureus)単離体の組み合わせを、感染の際の黄色ブドウ球菌(S.aureus)細胞表面上でのCifA、CP5、CP8、またはMntCの発現について試験した(表13a、13b、および13c)。これらの単離体は、最近の臨床的に関連する株を含み、MLSTでモニタリングすると多様であった。抗原の発現は、株、時点、および感染モデルに依存した。異なるインビボ環境(血流と創傷)に

10

20

30

40

50

おける単離体間の抗原発現における変化は、様々な異なる感染における広範なブドウ球菌単離体を誘発するための多抗原免疫原性組成物の使用を裏付けるものである。抗原は、感染の最初の24時間以内に表面に発現し、したがって、抗ブドウ球菌免疫原性組成物のための有効な成分である。タンパク質抗原ClfAおよびMntCは、被膜の発現の存在下での染色において利用しやすく、このことは、被膜の存在によって、これらのタンパク質に対する抗体から、これらのタンパク質が隠されないことを示す。

【0258】

試験された8型単離体のほとんどは、チャレンジ後のさらに遅い時点(>4時間)まで、血液内でCPを発現しなかった(表13a~cを参照されたい)。これらの結果は、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)において、CPがインビボの微小環境、すなわち感染部位に応じて差次的に調節されることを実証する。これらの結果は、動物モデルにおいてCP8コンジュゲートについて報告された、矛盾した効力結果を説明し得る。

【0259】

インビボでの発現の結果は、単一抗原免疫原性製剤が、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)感染の大部分に対して広く網羅しないことを示唆する。インビボの微小環境内の個別の株によって、発現表現型の過度の多様性が存在する。したがって、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)疾患を予防するためには、2つ以上の抗原から構成される免疫原性組成物が必要である。

【0260】

(実施例9) ClfA、CP5-CRM₁₉₇コンジュゲート、およびCP8-CRM₁₉₇コンジュゲートを含有する多抗原製剤の免疫原性

この実施例において、本発明者らは、ClfA、CP5-CRM₁₉₇、およびCP8-CRM₁₉₇の組み合わせの免疫原性を評価した。

【0261】

A. 二抗原(CP5-CRM₁₉₇/CP8-CRM₁₉₇)免疫原性組成物製剤 - ウサギにおける抗莢膜抗体応答に対する用量の効果

この実施例において、ウサギにおける組み合わせられたCP5-CRM₁₉₇およびCP8-CRM₁₉₇免疫原性製剤の免疫原性に対する用量の効果の評価した。ウサギを0週目、3週目、および6週目に、二価コンジュゲートと125μgのAlPO₄とを皮下注射によって投与して免疫化した。この研究において評価された用量は、それぞれ0.1μg、1μg、または10μgのCP5-CRM₁₉₇およびCP8-CRM₁₉₇(0.2μg、2μg、および20μgの、最終的な組み合わせられたCP-CRM₁₉₇用量)であった。コンジュゲートの用量は、タンパク質多糖コンジュゲートの全多糖成分を反映する。ウサギを0週目、3週目、6週目、および8週目に出血させた。プールされた個別の血清に対してELISAを行った。終点の抗体力価を、0.1OD₄₀₅での希釈の逆数として決定した。統計分析を個別の8週目の力価に対して行った。結果は、CP5では5×10⁵およびCP8では1×10⁶の、最大のCP5特異的抗体力価およびCP8特異的抗体力価が、各成分のCP用量が1μgので二価免疫原性製剤を用いてウサギをワクチン接種することによって誘発されたことを実証した(データは示されていない)。

【0262】

B. 三抗原製剤(CP5-CRM₁₉₇+CP8-CRM₁₉₇+rClfA) - ウサギにおける固定された用量(1μg)の各コンジュゲートを用いたrClfA用量範囲の研究

各成分に対する免疫応答に対する、rClfAおよびCP5コンジュゲートおよびCP8コンジュゲートの組み合わせの効果を試験した。3つの群を、1、10、および100μgという3つの異なる用量のT7-ClfA(N1N2N3)と組み合わせられた二価黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)CP5-CRM₁₉₇+CP8-CRM₁₉₇(1μg用量の各コンジュゲート)で免疫化した。対照群は、100μgのT7-ClfA(N1N2N3)と組み合わせられた、コンジュゲートしていないCP5およびCP8(それぞれ50μg)で免疫化した。各免疫原性組成物は、500μgのアジュバントAlPO₄

10

20

30

40

50

と共に製剤した。免疫原性組成物は、頸部に皮下注射することによって投与した。ウサギを0週目、6週目、および8週目に出血させた。プールされた個別の血清に対してELISAを行い、終点の抗体力価を、 $0.1OD_{405}$ での希釈の逆数として決定した。

【0263】

結果は、増大した量のrClAが、二価コンジュゲートと組み合わせられると、莢膜抗体応答に影響しないことを示した。両莢膜血清型に対する抗体レベルは、二価コンジュゲートのみで免疫化したウサギにおける範囲と同一の範囲であった(データは示されていない)。CP5およびCP8に対する抗体レベルは、 $1\mu\text{g}$ 用量のrClfA(273K)と比較して、 $10\mu\text{g}$ 用量(103K)および $100\mu\text{g}$ 用量(106K)で2.5倍低かった。2回目および3回目の注射の後にブースター効果があった。 $100\mu\text{g}$ のrClfAと組み合わせられた、コンジュゲートしていない二価多糖免疫原性製剤(CP5+CP8、それぞれ $50\mu\text{g}$)は、CP特異的抗体を誘発しなかった。rClfA特異的抗体応答もまた、用量によって大きくは影響されず、力価は、1、10、および $100\mu\text{g}$ 用量で、3回の投与の後に、 1×10^5 から 1×10^6 の間であった(データは示されていない)。また、コンジュゲートしたまたはコンジュゲートしていないCP5多糖およびCP8多糖を投与した場合に得られる抗ClfA応答のレベルは類似していた。

10

【0264】

(実施例10)三抗原製剤 - 高い免疫前CP5 Ab、CP8 Ab、およびClfA Abの力価を有するウサギにおける免疫原性

ブドウ球菌免疫原性組成物の標的を、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)の表面成分に対する既存の抗体を有する成体集団とした。免疫原性製剤に対する応答に対する、免疫原性製剤成分に対する既存の抗体の効果を研究するために、本発明者らは、高い力価の自然獲得された抗CP5抗体、抗CP8抗体、および抗ClfA抗体を有するウサギを選択した。2つの群のウサギ($n = 6/7$)を、0週目、3週目、および6週目に、三抗原免疫原性製剤(CP5-CRM₁₉₇($1\mu\text{g}$)およびCP8-CRM₁₉₇($1\mu\text{g}$)およびT7-ClfA(N1N2N3)Y338A($10\mu\text{g}$))で免疫化した。第1の群は、アジュバントである $500\mu\text{g}$ のAlPO₄と共に製剤された免疫原性組成物で免疫化し、第2の群は、アジュバントを含有しない免疫原性組成物製剤で免疫化した。免疫原性組成物は、皮下注射によって投与した。ウサギを0週目、3週目、6週目、および8週目に出血させた。CP5、CP8、およびrClfAに対する抗体力価を、プールされた個別の血清に対する終点の抗体力価として、ELISAによって決定した($0.1OD_{405}$ での希釈の逆数として決定した)。

20

30

【0265】

結果は、自然感染によって誘発された既存の抗体力価を有するウサギが、全ての免疫原性製剤成分CP5、CP8、およびrClfAに対する抗体のレベルの増大を伴って、三価免疫原性製剤に応答することを示した。 1×10^6 の抗体力価を有する動物においてさえも、5倍から10倍の間の各抗原に対するAbレベルの増大が示された。免疫原性製剤におけるアジュバントの存在によって、アジュバントを伴わずに免疫化された群と比較して抗体力価が高まった(データは示されていない)。

【0266】

(実施例11)被膜多糖成分に対する応答に対するアジュバントの効果

A. ウサギにおける二価CP5-CRM₁₉₇/CP8-CRM₁₉₇コンジュゲート免疫原性組成物に対する応答に対するAlPO₄の2つの異なる用量の効果

ウサギにおける抗CP5応答および抗CP8応答に対する、アジュバントAlPO₄の用量効果を研究した。ウサギを、0週目、3週目、および6週目に、二価黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)CP5-CRM₁₉₇/CP8-CRM₁₉₇($1\mu\text{g}$ 用量の各コンジュゲート)で免疫化した。第1の群($n = 5$ /群)は、アジュバントである $125\mu\text{g}$ のAlPO₄と共に製剤された免疫原性組成物で免疫化し、第2の群は、 $500\mu\text{g}$ のAlPO₄と共に製剤された免疫原性組成物製剤で免疫化した。免疫原性組成物は、頸部における皮下注射によって投与した。ウサギを0週目、6週目、および8週目に出血させ

40

50

、抗莢膜抗体を、 0.1 OD_{405} での希釈の逆数として決定される終点の抗体力価として、ELISAによって決定した。結果は、 $125 \mu\text{g}$ または $500 \mu\text{g}$ の AlPO_4 で免疫化されたウサギにおいてCP8特異的抗体応答に差がないことを示した。 $125 \mu\text{g}$ のアジュバントを有する製剤は、より高いCP5抗体応答をもたらした。また、 $125 \mu\text{g}$ の群における全てのウサギは、より高いCP5抗体応答で応答したが、 $500 \mu\text{g}$ のアジュバントの群では、2頭のウサギが製剤に対して低い応答であった。

【0267】

B. 三抗原製剤の免疫原性に対する AlPO_4 の効果

ウサギ(NZW、1群当たり $n = 6/7$ のウサギ)を、0週目、3週目、および6週目に、CP5-CRM₁₉₇($1 \mu\text{g}$)およびCP8-CRM₁₉₇($1 \mu\text{g}$)およびT7-C1fA(N1N2N3)Y338A($10 \mu\text{g}$)からなる三抗原製剤で免疫化した。第1のウサギ群は、 $500 \mu\text{g}$ の AlPO_4 を有する免疫原性製剤で免疫化し、第2の群はアジュバントを伴わずに製剤され、第3の群は、 $500 \mu\text{g}$ の AlPO_4 を有する免疫原性製剤で0週目に免疫化し、かつアジュバントを有さない免疫原性製剤で3週目および6週目に免疫化した。免疫原性製剤は皮下注射によって投与し、ウサギを0週目、3週目、6週目、および8週目に出血させ、血清を抗原特異的ELISAによって評価した。結果は、免疫原性製剤におけるアジュバントの存在が、ウサギにおける抗CP5応答または抗CP8応答に対する効果を有さないことを示した(データは示されていない)。両被膜に対するAbのGMT力価は同程度であった。しかし、3つ全てのワクチン接種において、アジュバントを伴って免疫化された群において示されるC1fA特異的抗体応答に対するアジュバントの効果が存在した。アジュバントを含有する免疫原性製剤で初回免疫されたウサギにおける、 AlPO_4 を含有しない免疫原性製剤での2回目および3回目のブーストは、アジュバントを伴わない群と比較して高いC1fA応答をもたらした。

10

20

【0268】

(実施例12~29)黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)のC1fA、MntC、CP5-CRM₁₉₇、およびCP8-CRM₁₉₇の臨床前評価

以下の実施例12から29において、CP5およびCP8コンジュゲート、C1fA、およびMntCの臨床前評価の結果が記載される。これらの実施例は、臨床前動物モデルにおけるこれらの抗原の効力を実証する。これらの実施例はまた、CPコンジュゲート、C1fA、およびMntCにより生成される抗体が、インビトロのアッセイにおいて機能的活性を有することを実証する。

30

【0269】

2つの異なる化学を用いて、CPをCRM₁₉₇にコンジュゲートさせたが、異なる方法によって調製されたコンジュゲートで、効力に差は観察されなかった。莢膜多糖のO-アセチル化は、機能的抗体の誘導に影響することが示された。CP5-CRM₁₉₇、CP8-CRM₁₉₇、およびC1fAを含む組み合わせられた免疫原性組成物の評価は、各免疫原性製剤成分に対する特異的抗体(Ab)レベルに対する干渉を示さなかった。

【0270】

材料および方法

ELISA

MaxisorpマイクロタイターELISAプレート(Nalge Nunc International, Rochester, NY)を、4で18時間、または37で90分間にわたり、PBS(pH7.5)内の $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のC1fA抗原で被覆した。プレートをPBST(1xPBS、0.1%ポリソルベート20)内で5回洗浄し、PBS内の1%(w/v)無脂肪乳および0.05%ポリソルベート20で、室温で1時間にわたりブロックした。プレートをPBSTで洗浄し、連続希釈(3倍)し、個別の0週目、3週目、6週目、および8週目にウサギ抗血清をプレートに添加し、4で一晩または37で2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、結合した一次抗体を、PBST内のホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート型ヤギ抗ウサギIgG(1:1000希釈)で検出した。プレートを37で1時間にわたりインキュベートし、次

40

50

に、洗浄し、A B T S - ペルオキシダーゼ基質溶液 (K P L , I n c . , G a i t h e r s b u r g , M D) で、室温でおよそ 20 分間にわたり発色させた。1 % (v / v) S D S 溶液を添加することによって反応を止めた。吸光度を、自動プレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s C o r p o r a t i o n , S u n n y v a l e , C A) で、405 nm で測定した。抗体力価は、吸光度値が 0.1 の最大の血清希釈の逆数として表した。J M P S o f t w a r e (S A S I n s t i t u t e , C a r y , N C) を用いるスチューデント t 検定を用いて、異なる群間の抗体力価における差を決定した。0.05 未満の確率を、統計的に有意な差を示すと考えた。

【0271】

マウス敗血症モデル

マウス敗血症モデルは、血液感染性疾患を模倣する。受動免疫化のために、15頭の S w i s s - W e b s t e r マウスからなる群を I g G で腹腔内 (i . p .) 処理した。24 時間後、マウスを、尾部静脈を介する単回の静脈内 (i . v .) 注射 (0.1 ml) によって、黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) 659 - 018 でチャレンジした。全ての動物を 14 から 15 日間にわたり追跡し、その時点で、全ての残っているマウスを屠殺した。

10

【0272】

能動免疫化のために、マウスを、黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) を用いる静脈内経路によって、0 週目、2 週目、および 4 週目に抗原で免疫化し、6 週目にチャレンジした。

20

【0273】

能動免疫化ウサギ心内膜炎モデル

成体の N e w Z e a l a n d W h i t e ウサギを、25 μ g の抗原で 4 回、筋肉内で免疫化した。手術の 1 日後、動物を、黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) のボーラスで i . v . でチャレンジし、心臓組織におけるコロニー形成単位 (c f u) の数をチャレンジの 24 時間後に決定する。

【0274】

マウス菌血症

3 時間の菌血症モデルを用いて、感染早期の細菌数に対するワクチン接種の効果を決定した。マウスを 0 週目、3 週目、および 6 週目に抗原で免疫化し、その後、8 週目に黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) で i . p . チャレンジした。動物を 3 時間後に放血させ、血液の連続希釈物を平板培養して細菌を数えた。

30

【0275】

マウス腎盂腎炎モデル

マウス腎盂腎炎モデルは、菌血症からの黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) の播種を模倣する。10頭の 4 週齢のメス C D - 1 マウスからなる群を、0 週目、3 週目、および 6 週目に抗原で免疫化した。マウスを黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) の i . p . 注射によってチャレンジした。チャレンジの 48 時間後、マウスを屠殺し、腎臓および血液における細菌を数えた。

40

【0276】

ラット心内膜炎モデル

ラット心内膜炎モデルは、血液感染性疾患が損傷した心臓組織のコロニー形成をもたらす後にコロニー形成が生じる、ヒト心内膜炎を模倣する。5頭の 5 週齢のオス S p r a g u e - D a w l e y ラット (C h a r l e s R i v e r , K i n g s t o n , N Y) を、0 週目、2 週目、および 4 週目に、100 μ g の A l P O ₄ と共に製剤された 1 μ g の C P 5 - C R M _{1,9,7} コンジュゲートで免疫化した。0 週目の、ワクチン接種する前、および 5 週目の最後に、動物を出血させた。72 時間後、カテーテル (P E - 10 管) を、頸動脈を介して左心室内に外科的に置いた。カテーテルを置くことで、ブドウ球菌が感染の際に付着し得る無菌性疣腫が形成される。外科手術から生じる感染を防ぐために、動物を、手術の時点および手術の 8 時間後に、抗生物質バイトリル (5 m g / k g) で処理

50

した。手術の48時間後、ラットをPFESA0266（およそ 4×10^8 cfu）またはSA315（およそ 1×10^9 cfu）で腹腔内注射によってチャレンジした。チャレンジの48時間後、ラットを安楽死させ、心臓および腎臓を取り出し、3mLのリン酸緩衝液（PBS）内に置いた。次に、これらの器官を組織ホモジナイザー（Kinematica AG、Luzernerstrasse、Germany）でホモジナイズし、PBSで10mLにした。次に、ホモジネートを連続希釈し、細菌を数えるために平板培養した。

【0277】

オプソニン性貪食死滅アッセイを用いる機能的抗体のモニタリング

LYMPHOLYTE（登録商標）- ポリ溶液（Cedarlane laboratories limited、Ontario、Canada）を製造者のプロトコルに従って用いてドナーヒト血液から単離される細胞系（例えばHL60）または多形核細胞（PMN）から得られる分化したエフェクター細胞を、このアッセイに用いることができる。エフェクター細胞をアッセイ緩衝液（1%ウシ血清アルブミンを含有する変法イーグル培地）内におよそ 2×10^7 個細胞/mlの濃度で再懸濁し、使用する直前まで37のインキュベーター内に置いた。黄色ブドウ球菌（S. aureus）株PFESA0266をトリプシン大豆寒天プレート上で一晩成長させた。細菌細胞を擦り取り、2回洗浄し、およそ 5×10^8 cfu/mlの濃度に等しいOD₆₀₀ = 1まで、5%グリセロールを含有するアッセイ緩衝液内に再懸濁した。細菌懸濁液の1mlのアリコートを凍結し、使用する直前まで-40で保管した。凍結した細菌懸濁液を解凍し、アッセイ緩衝液内で 10^6 cfu/mlの濃度まで調節し、氷上に置いた。無菌96ディープウェル1mlポリプロピレンプレートを用いて、アッセイを行った。抗体試料（50ml）の2倍連続希釈物を調製し、その後、300 μ lのアッセイ緩衝液を抗体混合物に添加した。細菌をプレートに添加し（50 μ l）、4で30分間にわたり回転振とう機上に置いた。50 μ lのヒト補体（1%の最終濃度）を添加して、オプソニン化ステップを生じさせた。最後に、50 μ lのエフェクター細胞（ 10^7 個細胞/mlの濃度）をプレートに添加し、懸濁液を、ピペティングを繰り返すことによって良く混合した。懸濁液の50 μ lのアリコートを無菌1%サポニン溶液内に10倍連続希釈し、ボルテックスして細菌のクラッピングを最小化し、トリプシン大豆寒天上に2回平板培養した。アッセイプレートを、回転式肉焼き機様式の振とう機を用いて連続的に混合しながら、37で1時間にわたりインキュベートした。インキュベーションの最後に、懸濁液の50 μ lのアリコートを無菌1%サポニン溶液内に10倍連続希釈し、ボルテックスすることによって混合して細菌のクラッピングを最小化し、トリプシン大豆寒天上に2回平板培養した。抗体を有さないが細菌、補体、およびエフェクター細胞を含有する試験管内で生存しているcfuの数に対する、細菌、抗体、補体、およびエフェクター細胞を有するウェルにおいて60分の時点で生存しているcfuの数の比率を決定することによって、死滅のパーセンテージを計算した。細菌、補体、および血清を含有する対照を、クラッピングに起因するcfuのあらゆる低減について調節するために含めた。

【0278】

補体の吸着

黄色ブドウ球菌（S. aureus）株PFESA0266、PFESA0286、およびPFESA0270に対して吸着したヒトドナーの血清を、アッセイにおける補体源として用いることができる。黄色ブドウ球菌（S. aureus）株を、37で、TSAプレート上で一晩成長させた。細胞をプレートから擦り取り、無菌PBS内に再懸濁した。細菌細胞を4で10分間にわたり、10000rpmで遠心分離し、細胞ペレットを、吸着のために、ヒト血清内に再懸濁した。血清を4で30分間にわたりnutator上で細菌と共にインキュベートした。細胞を遠心分離し、細菌を含有する別の試験管に血清を移し、吸着ステップを再び30分間にわたり繰り返した。最後に、細胞を遠心分離し、血清を0.2ミクロンのフィルターに通し、その後、0.5mlのアリコートを液体窒素内で凍結した。

【0279】

方法II - HL-60細胞を用いるOPA

HL-60細胞を、S. Romero-Steinerら、Clin Diagn Lab Immunol 4(4)(1997)、pp. 415~422に従って分化させた。採取したHL-60細胞をアッセイ緩衝液(1%ウシ血清アルブミンを含有する変法イーグル培地)内におよそ 10^8 個細胞/mlで再懸濁し、使用する直前まで37のインキュベーター内に置いた。黄色ブドウ球菌(S. aureus)をトリプシン大豆寒天プレート上で一晚成長させた。細菌細胞を擦り取り、2回洗浄し、およそ 5×10^8 cfu/mlに等しいOD₆₀₀ = 1まで、5%グリセロールを含有するアッセイ緩衝液内に再懸濁した。細菌懸濁液の1mlのアリコートを凍結し、使用する直前まで-40で保管した。凍結した細菌懸濁液を解凍し、アッセイ緩衝液内で 10^6 cfu/mlの濃度まで調節し、氷上に置いた。無菌96ディープウェル1mlポリプロピレンプレートを用いて、アッセイを行った。モノクローナル抗体試料(25ml)の2倍連続希釈物を調製し、その後、150 μ lのアッセイ緩衝液を抗体懸濁液に添加した。細菌をプレートに添加し(25 μ l)、4で30分間にわたり回転振とう機上に置き、その後、25 μ lのヒト補体(1%の最終濃度)を添加した。最後に、25 μ lのHL-60細胞(10^7 個細胞/ml)をプレートに添加し、懸濁液を、ピペティングを繰り返すことによって良く混合した。懸濁液の25 μ lのアリコートを無菌1%サポニン溶液内に10倍連続希釈し、ボルテックスすることによって混合して細菌のクラッピングを最小化し、トリプシン大豆寒天上に2回平板培養した。アッセイプレートを、回転式肉焼き機様式の振とう機を用いて連続的に混合しながら、37で1時間にわたりインキュベートした。インキュベーションの最後に、懸濁液の25 μ lのアリコートを無菌1%サポニン溶液内に10倍連続希釈し、ボルテックスすることによって混合して、トリプシン大豆寒天上に2回平板培養した。抗体を有さないが細菌、補体、およびHL-60細胞を含有する試験管内で生存しているcfuの数に対する、細菌、抗体、補体、およびHL-60細胞を有するウェルにおいて60分の時点で生存しているcfuの数の比率を決定することによって、死滅のパーセンテージを計算した。細菌、補体、およびmAbを含有する対照を、クラッピングに起因するcfuのあらゆる低減について調節するために含めた。

【0280】

(実施例12) インビボの動物モデルにおけるClfAによる防御効果の実証

ClfAに対して誘導されたポリクローナルウサギ抗体がマウス敗血症モデルにおいて黄色ブドウ球菌(S. aureus)のコロニー数を低減させ得るかどうかを評価するために、精製されたウサギポリクローナル抗ClfA IgGを、受動免疫化研究において2つの投薬量(0.8mgおよび1.6mg)で用いた(図13)。黄色ブドウ球菌(S. aureus)チャレンジ株は、最近の臨床単離体659-018であった。両抗体投薬量により、マウス敗血症モデルにおいて細菌コロニー数が有意に低減した(1.8mg用量では $p = 0.0134$ であり、0.8mg用量では $p = 0.0013$)。この実験は、さらなる黄色ブドウ球菌(S. aureus)単離体で繰り返され、類似の結果を示している(データは示されていない)。

【0281】

(実施例13) ClfAでの能動免疫化は黄色ブドウ球菌(S. Aureus)による心臓のコロニー形成を低減させる

ClfAでのウサギの能動免疫化によって、ウサギ心内膜炎モデルが防御された。本発明者らは、陰性対照(PBSまたは $AlPO_4$)で免疫化された動物と比較して、ClfAで免疫化された動物で、心臓疣腫から回収される黄色ブドウ球菌(S. Aureus)のcfuが3~4log低減することを見出した(図14)。

【0282】

(実施例14) インビボの動物モデルでのMntCの防御効果

MntCでの能動免疫化は、黄色ブドウ球菌(S. aureus)でのチャレンジ後の早い時点からマウスの一貫した防御を示した。i.p.での黄色ブドウ球菌(S. Aur

e u s) チャレンジを受けたマウスの血液における細菌数は、P B S で免疫化された対照と比較して有意に低減した (図 1 5 A および 1 5 B) 。 6 回の個別の研究のうち 4 回は、免疫化された動物における血液 1 m l 当たりの c f u の有意な低減を示した。M n t C での免疫化により伸介される防御は、P F E S A 0 2 3 7 (図 1 5 A) および P F E S A 0 2 6 6 (図 1 5) という 2 つの異なる黄色ブドウ球菌 (S . A u r e u s) チャレンジ株を用いて実証された。

【 0 2 8 3 】

(実施例 1 5) C P 5 コンジュゲートはマウス腎盂腎炎モデルにおいて防御する

C P 5 コンジュゲートを、能動免疫化腎盂腎炎モデルにおいてマウスを防御する能力について評価した。図 1 6 は、いくつかの研究からの結果を示す。i . p . で黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) チャレンジを受けたマウスの血液における細菌数は、p b s で免疫化された対照と比較して有意に低減した (図 1 6) 。 6 回の個別の研究のうち 6 回が、免疫化された動物における腎臓 1 m l 当たりの c f u の有意な低減を示した。データは、C P 5 コンジュゲートでの能動免疫化後の腎臓のコロニー形成の一貫した低減を示した。

10

【 0 2 8 4 】

(実施例 1 6) 異なるコンジュゲーション化学により調製される C P 5 コンジュゲートは実験的感染からマウスを防御する

マウス腎盂腎炎モデルにおける能動免疫化研究を、P D P H 化学または C D T 化学によって調製された C P 5 コンジュゲートを用いて行った。C R M ₁₉₇ に C P 5 または C P 8 をコンジュゲートさせるための方法は、上記に記載した。結果は、両コンジュゲートが、偽免疫化動物と比較して、マウスにおけるコロニー形成を有意に低減させることを示した (表 1 4) 。

20

【 0 2 8 5 】

【 表 1 6 】

表 14: 腎盂腎炎モデルにおける PDPH コンジュゲーションの効果対 CDT コンジュゲーションの効果

研究番号	抗原	株/用量	logCFU/腎臓	有意性
研究 1	生理食塩水+AIPO ₄	PFESA0266	5.53 ± 1.90	--
	1 μg CP5- CRM ₁₉₇ (PDPH) +AIPO ₄	2×10 ⁸	3.01 ± 1.83	p < 0.001
	1 μg CP5- CRM ₁₉₇ (CDT) +AIPO ₄		1.67 ± 0.23	p < 0.0001
研究 2	生理食塩水+AIPO ₄	PFESA0266	6.17 ± 1.76	--
	1 μg CP5- CRM ₁₉₇ (PDPH) +AIPO ₄	2.7×10 ⁸	3.06 ± 1.69	p < 0.0001
	1 μg CP5- CRM ₁₉₇ (CDT) +AIPO ₄		1.87 ± 0.69	p < 0.0001

30

【 0 2 8 6 】

(実施例 1 7) C P 5 コンジュゲートはラット心内膜炎モデルにおいて防御する

1 μ g 用量の C P 5 - C R M ₁₉₇ P D P H コンジュゲートおよび関連していないコンジュゲート (P P 5 - C R M ₁₉₇) を用いて、4 つの研究を行った。C P 5 コンジュゲートは、3 つの実験のうち 2 つにおいて、心臓および腎臓の両方においてコロニー形成を有意に低減させ、前記チャレンジにおいて、5 型チャレンジ株は P F E S A 0 2 6 6 であった (表 1 5) 。第 3 の研究において、幾何平均力価 (G M T) 抗 C P 5 力価は、3 つの実験のうち最も低かったが、これは、先の実験における力価よりわずかに低いのみであった (5 1 0 0 0 対 6 7 0 0 0) 。

40

【 0 2 8 7 】

【表 17】

表15:CP5-CRM₁₉₇での免疫化はラット心内膜炎モデルにおいてcfuを低減させる

免疫原性組成物	チャレンジ株/用量	回収された CFU の log		有意性		GMT CP 力価
		心臓	腎臓	心臓	腎臓	
1 µg CP5-CRM ₁₉₇	PFESA0266	4.34±1.78	3.92±1.73			103,000
1 µg PP5-CRM ₁₉₇	2.21×10 ⁸ cfu	7.94±0.78	6.77±0.79	p<0.001	p<0.05	
1 µg CP5-CRM ₁₉₇	PFESA0266	4.43±2.30	3.109±2.33			51,000
生理食塩水	6.5×10 ⁷ cfu	5.63±2.48	4.19±2.05	なし	なし	
1 µg CP5-CRM ₁₉₇	PFESA0266	4.01±2.49	3.90±1.92			67,000
生理食塩水	4.0×10 ⁸ cfu	7.52±1.38	6.52±1.17	p<0.0002	p<0.0002	
1 µg CP5-CRM ₁₉₇	SA315	8.17±1.02	6.92±1.20			186,000
生理食塩水	1×10 ⁹ cfu	8.25±0.60	6.74±0.95	なし	なし	

10

20

【0288】

(実施例18)腎盂腎炎モデルにおけるCP5-CRM₁₉₇コンジュゲート

コンジュゲートの効力を調べる最初の研究を、25kDaのMWのCP5で行った。発酵プロセスの向上によって、高いMWの多糖が生産され、これを、タンパク質担体にコンジュゲートさせ、25kDaのCP5コンジュゲートと並行して試験した。25kDa(低いMW)および300kDa(高いMW)のMWを有するCPを含むコンジュゲートを、CDTコンジュゲーション化学を用いて調製し、マウス腎盂腎炎モデルにおいて評価した。3つの用量(0.01、0.1、および1µg)のHMWコンジュゲートを試験し、1µgの用量の、対照であるLMW CP5-CRM₁₉₇および関連していないコンジュゲート(PP5-CRM₁₉₇)と比較した。結果は、1µgの用量での、腎臓から回収された黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)PFESA0266のCFUにおける有意な低減を示した。1µgの用量では、異なるサイズのCP5で調製されたコンジュゲートの防御間に、統計的な差はなかった(表16)。低用量(0.01µgおよび0.1µg)のコンジュゲートは、感染を有意に低減させるほどには免疫応答を誘導することができなかった。同一の免疫化およびチャレンジの手順を用いて実験を繰り返した。繰り返された実験において、1µgの用量のLMW CP5-CRM₁₉₇のみが、コロニー形成を有意に低減させた(p=0.01)。1µgの用量のHMW CP5-CRM₁₉₇は、腎臓においてcfuを低下させたが、低減は統計的に有意ではなかった(p=0.056)。

30

40

【0289】

【表 18】

表16:CP5コンジュゲートはマウス腎盂腎炎モデルにおいて防御する

研究	抗原	株/用量	logCFU/腎臓	有意性 (p値)
1	1 µg PP5-CRM ₁₉₇	PFESA0266 1.7×10 ⁸	5.34	0.0048
	1µg 25kDa CP5-CRM ₁₉₇		2.94	
	1 µg 300kDa CP5-CRM ₁₉₇		2.74	0.0056
	0.1 µg 300kDa CP5-CRM ₁₉₇		5.59	
	0.01 µg 300kDaCP5-CRM ₁₉₇		4.70	
2	1 µg PP5-CRM ₁₉₇	PFESA0266 1.7×10 ⁸	5.35	
	1µg 25kDa CP5-CRM ₁₉₇		3.25	0.01
	1 µg 300kDa CP5-CRM ₁₉₇		3.78	0.06
	0.1 µg 300kDa CP5-CRM ₁₉₇		4.45	
	0.01 µg 300kDa CP5-CRM ₁₉₇		6.08	

10

20

【0290】

(実施例19)多糖のO-アセチル化は、CP5コンジュゲート免疫原性製剤に対する防御的抗体応答の誘発に重要である

CP5のO-アセチル化の重要性を評価するために、天然CP5を脱O-アセチル化(dOAc)し、PDPHコンジュゲーション化学を用いてCRM₁₉₇にコンジュゲートした(dOAc-CRM₁₉₇)。dOAcCP-CRM₁₉₇コンジュゲートの効率を、マウス腎盂腎炎モデルにおいて、CP5-CRM₁₉₇と並行して比較した。結果は、腎臓における細菌のコロニー形成において有意な変化がないことにより実証されるように、O-アセチル基を有さないコンジュゲート(dOAc-CP5-CRM₁₉₇)がこのモデルにおいて有効ではないことを示した。これらのデータ(表17)は、O-アセチル化が、CP5に対する機能的抗体の誘導に重要であったことを示す。

30

【0291】

【表19】

表17:脱O-アセチル化CP5-CRM₁₉₇での免疫化は腎臓のコロニー形成からマウスを防御しない

研究番号	抗原	株/用量	logCFU/腎臓	有意性
研究1	1 µg PP5- CRM ₁₉₇	PFESA0266	3.89 ± 2.24	
	1 µg dOAc CP5- CRM ₁₉₇	7×10 ⁸	4.20 ± 1.75	
	1 µg CP5- CRM ₁₉₇		1.75 ± 0.39	p値 < 0.008
研究2	生理食塩水	PFESA0266	5.08 ± 1.96	
	1 µg dOAc CP5- CRM ₁₉₇	2.4×10 ⁸	5.89 ± 1.29	
	1 µg CP5- CRM ₁₉₇		2.93 ± 2.11	p値 < 0.02

40

【0292】

(実施例20)CP8コンジュゲートでの免疫化は敗血症モデルにおいて死亡を低減させる

CP8-CRM₁₉₇コンジュゲートの効力を、黄色ブドウ球菌(S. aureus)PFESA0268(8型)でチャレンジした後のマウス敗血症モデルにおいて評価した

50

。Swiss Websterマウス(n=30)を、共に100µgのAlPO₄と共に製剤された、1µgのCP8-CRM₁₉₇および生理食塩水で、皮下注射によって能動免疫化した。研究は、AlPO₄のみで免疫化したマウスと比較して、敗血症の有意な低減(p=0.0308)を示した。図17を参照されたい。

【0293】

(実施例21)マウス菌血症モデルにおけるコンジュゲートした天然CP8および塩基処理されたCP8の評価

機能的抗体応答の誘発にとっての、コンジュゲーションする前の天然CP8上に存在するO-アセチル基の重要性を、CP8コンジュゲートについて評価した。CP8多糖を、弱塩基条件下で脱O-アセチル化し、NMRおよびイオンクロマトグラフィー(IC)の両方によって、CP8脱O-Ac-CRM₁₉₇におけるO-アセチル化の不存在を確認した。

10

【0294】

マウス菌血症モデルを用いて、CRM₁₉₇にコンジュゲートした天然CP8と塩基処理したCP8との効力を評価した。メスBALB/cマウス群(15頭/群)を、1µgのCP8脱O-Ac-CRM₁₉₇または1µgのCP8 O-Ac-CRM₁₉₇で、0週目、3週目、および6週目に免疫化した。免疫原性製剤を、22µgのAlPO₄と共に製剤した。動物を黄色ブドウ球菌(S.aureus)PFESA0003でチャレンジした。チャレンジの3時間後、マウスを屠殺し、細菌を血液内で数えた。データは、スチューデントt検定により決定されるように、未処理の天然CP8コンジュゲートで免疫化された動物の血液から回収された細菌cfuが統計的に有意に(p=0.0362)低減したことを示した(表18)。塩基処理されたCP8コンジュゲートで免疫化された動物において、血液から回収された細菌cfuは、生理食塩水対照群に類似していた。

20

【0295】

【表20】

表18:CP8-CRM₁₉₇コンジュゲートは、マウスにおける菌血症黄色ブドウ球菌(S.aureus)PFESA0003を低減させる。

抗原	株/用量	logCFU/血液	有意性 (p値)
生理食塩水	PFESA0003 1.14×10 ⁸	4.35	
CP8脱-O-Ac - CRM ₁₉₇		4.45	
CP8 O-Ac - CRM ₁₉₇		3.93	0.03

30

【0296】

(実施例22)既知の特異性を有するMAbを用いるOPAによるCP5の機能的エピトープとしてのO-アセチル化の重要性の確認

CP5 OAc+(CP5-7-1)、CP5 OAc+/- (CP5-5-1)、およびCP5 OAc-(CP5-6-1)に対する特異性を有するCP5モノクローナル抗体を、5型株PFESA0266に対するOP死滅活性について評価した(表19)。CP8 OAc+に特異的なMAb CP8-3-1を陰性対照として用いた。結果は、CP5-7-1 mAb (CP5 OAc+ 特異性)が、試験された両方の5型株の死滅を仲介することを示した。また、CP5 OAc+およびCP5 OAc-の両方により共有されるエピトープを認識するmAb CP5-5-1は、PFESA0266株の死滅を仲介した。CP5 OAc-多糖上に存在するエピトープに特異的なMAbは、PFESA0266株の死滅を仲介しなかった。これらの結果は、CP5上のO-アセチルエピトープがCP5特異的抗体の機能的活性に関与することを示す。

40

【0297】

【表 2 1】

表19 O-アセチル化(+)CP5ならびにO-アセチル化および脱O-アセチル化(+/-)CP5に特異的な19個のmAbは、黄色ブドウ球菌(S.aureus)PFESA0266(5型)に対してオプソニン性である。

	CP5-5-1 (O-Ac +/-) (µg)				CP5-6-1 (O-Ac -) (µg)				CP5-7-1 (O-Ac +) (µg)				CP8-3-1 (陰性対照) (µg)			
µg	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5
死滅%	28	33	30	21	-12	-5	-12	-5	31	46	49	55	-18	-3	-13	-5

データは死滅のパーセンテージとして報告され、抗体を有さないが細菌、補体、およびHL-60細胞を含有するウェルにおいて生存しているcfuの数に対する、細菌、抗体、補体、およびHL-60細胞を有するウェルにおいて60分の時点で生存しているcfuの数の比率を決定することによって計算された。

【0298】

(実施例23) マウス抗体のオプソニン活性は高MWおよび低MWのCP5コンジュゲートを誘発した

実施例18の1µgの高分子量群および低分子量群から得られる高いCP5 ELISA力価を有するマウス(n=5)の血清を、黄色ブドウ球菌(S.aureus)PFESA0266を用いてオプソニン活性について比較した。OPAの結果は、両コンジュゲートがマウスにおいてオプソニン抗体を誘導することを示した(表20)。高MWのコンジュゲートが、より高い力価のオプソニン抗体を誘導する傾向が観察された。データは、5つの個別のマウス血清についての死滅%の平均±SEMとして示される。抗体は、動物効力モデルにおける細菌の死滅または抗体が細菌を死滅させることを実証するオプソニン性貪食死滅アッセイを介する細菌の死滅によって測定されるように機能的である必要がある。機能的死滅は、効力における高分子量コンジュゲートの重要性の指標ではない抗体生成のみをモニタリングするだけのアッセイを用いては実証され得ない。

【0299】

【表 2 2】

表20:LMW CP5コンジュゲートおよびHMW CP5コンジュゲートはオプソニン抗体を誘導する

抗原:1µgのCP5-CRM ₁₉₇ (25kDa)		抗原:1µgのCP5-CRM ₁₉₇ (300kDa)	
OPA 力価 0週目	OPA 力価 8週目	OPA 力価 0週目	OPA 力価 8週目
<100	400	<100	6400
<100	<100	<100	800
<100	400	<100	3200
<100	3200	<100	3200
<100	<100	<100	3200

【0300】

(実施例24) 天然CP8コンジュゲートおよび化学的に修飾されたCP8コンジュゲートで免疫化されたマウスの血清のオプソニン活性

実施例21における研究から得られる高いCP8力価を有する選択されたマウス血清(n=5)を、PFESA0005株を用いてオプソニン活性について比較した。OPAの結果(表21)は、天然CP8のコンジュゲーションによって調製されたコンジュゲートのみがマウスにおいてオプソニン抗体を誘導したことを示す。このアッセイにおいて、脱OAc CP8コンジュゲートはマウスにおいて免疫原性であったが、誘導された抗体はオプソニン性ではなかったということは、注目に値する。OPAの力価は、40%の死滅が観察された希釈の逆数として報告される。抗体は、動物効力モデルにおける細菌の死滅

または抗体が細菌を死滅させることを実証するオプソニン性貪食死滅アッセイを介する細菌の死滅により測定されるように機能的である必要がある。機能的死滅は、効力におけるO-アセチル化の重要性の指標ではない抗体生成のみをモニタリングするだけのアッセイを用いては実証され得ない。

【0301】

【表23】

表21. 天然CP8-CRM₁₉₇のオプソニン活性対脱O-Ac CP8-CRM₁₉₇のオプソニン活性

De-O-Ac CP8- CRM ₁₉₇		CP8- CRM ₁₉₇	
OP 力価 0週目の血清	OP 力価 8週目の血清	OP 力価 0週目の血清	OP 力価 8週目の血清
<50	<50	50	150
<50	<50	<50	1350
<50	<50	<50	450
<50	<50	<50	1350
<50	<50	<50	4050

10

【0302】

(実施例25)

ヒトではない霊長類のCPコンジュゲート抗血清による8型株の死滅は天然CP8の添加によって阻害される

CP8コンジュゲートで免疫化されたヒトではない霊長類の血清における死滅活性の特異性を確認するため、天然CP8の存在下でアッセイを行った。OP方法IIを、以下の変更を伴って用いた。抗体試料(25μl)の2倍連続希釈物を調製し、その後、150μl(Pn14競合物質)または125μl(CP8競合物質)のアッセイ緩衝液を抗体懸濁液に添加した。競合物質は精製されたCP8多糖(CP8ポリ)であり、関連していない肺炎球菌多糖(Pn14ポリ)を対照として用いた。多糖を抗体懸濁液に添加し(50μg)、プレートを、転倒混合しながら、4で30分間にわたりインキュベートした。多糖とインキュベーションした後、細菌をプレートに添加し(25μl)、4で30分間にわたり回転振とう機上に置き、その後、25μlのヒト補体(1%の最終濃度)を添加した。結果(表22)は、反応混合物内における天然CP8の存在が、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)8型のオプソニン性貪食死滅を阻害することを示した。これらの結果は、免疫血清によるオプソニン性貪食死滅が被膜特異的Abによって仲介されたことを裏付けるものである。

20

30

【0303】

【表 2 4】

表22. CP8多糖の添加により、免疫血清による黄色ブドウ球菌(S.aureus)のオプソニン性貪食死滅が阻害される。

サル	血清試料	OPA力価
02D133	0週目	<50
	8週目	4050
	0週目+20μgのCP8ポリ	<50
	8週目+20μgのCP8ポリ	<50
	0週目+20μgのPh14ポリ	<50
	8週目+20μgのPh14ポリ	4050
A4N122	0週目	<50
	8週目	4050
	0週目+20μgのCP8ポリ	<50
	8週目+20μgのCP8ポリ	<50
	0週目+20μgのPh14ポリ	<50
	8週目+20μgのPh14ポリ	1350

10

【0304】

(実施例26) ClfAに対する自然獲得された抗体は黄色ブドウ球菌(S.aureus)のオプソニン性貪食死滅を仲介する

20

集団内のヒトは、黄色ブドウ球菌(S.aureus)に自然に曝露されており、したがって、それらの循環においてその細菌に対する既存の抗体を有する。本発明者らは、ヒト血清から抗ClfA抗体をアフィニティー精製し、抗体がオプソニン性死滅を仲介し得るかどうかを評価した。ClfAに対する抗体が黄色ブドウ球菌(S.aureus)莢膜多糖についてオプソニン性であることが示されている(データは示されていない)。株PFESA0266を、2%NaClを有するColumbia培養液において一晩成長させた。細菌を、ClfAアフィニティー精製されたヒトIgGまたは関係のない抗原でアフィニティー精製されたヒトIgG(陰性対照、ブドウ球菌SCPタンパク質)でオプソニン化し、オプソニン活性を試験した。分化したHL-60細胞を、100:1のエフェクター/標的比でオプソニン性貪食アッセイにおいて用いた。さらなる対照として、CP5 mAbを、表面上のCP5の存在を実証するために、実験に含めた。結果は、2つの独立した実験の平均である。ClfA特異的抗体およびCP5特異的抗体は、オプソニン性死滅を仲介し、SCP特異的(陰性対照)抗体は、このアッセイにおいて活性を有さなかった。

30

【0305】

(実施例27) CP5-CRM₁₉₇コンジュゲートは、ヒトではない霊長類(NHP)においてオプソニン抗体を誘導する

NHPにおける高分子量CP5-CRM₁₉₇コンジュゲートと低分子量CP5-CRM₁₉₇コンジュゲートとの機能性を比較するために、5頭のサルからなる群を、ALPO₄アジュバントを有するかまたは有さない、2および20μg用量のコンジュゲートで免疫化した。サルには、それぞれ0日目および28日目に、第1のワクチン接種および第2のワクチン接種を行った。0日目、14日目、28日目、および42日目の出血を、OP活性について試験した。結果を表23にまとめる。20μgのHMWコンジュゲートは、他の群と比較して最も高いOP力価を有していた。また、OP陽性サルの頻度は、対応する低MW群と比較して、両用量の高MW群で高かった。これらの結果は、NHPにおいて、HMWのCP5-CRM₁₉₇コンジュゲートが、LMWのCP5コンジュゲートよりも良好なOP応答を誘導する傾向があることを実証する。

40

【0306】

【表 2 5】

表23. CP5コンジュゲートでの免疫化の後のNHP血清におけるOPA。

群	サルID	0日目	OPA力価(40死滅%)		
			14日目	28日目	42日目
20 μ gの CP5(HMW)+ 0.5mg/mLの AIP ₄	A2N053	450	1350	4050	4050
	149N	<100	4050	4050	4050
	A4L069	<100	450	150	<100
	A1N097	<100	4050	1350	1350
	A4L014	<100	<100	<100	<100
2 μ gの CP5(HMW)+ 0.5mg/mLの AIP ₄	02D125	<100	150	150	<100
	A4L081	<100	150	150	150
	A2N055	150	450	150	150
	A4N084	<100	<100	<100	<100
	A1N085	<100	150	450	4050
2 μ gの CP5(HMW)、 AIP ₄ なし	A4L084	150	150	<100	<100
	97N004	150	450	450	450
	A4L055	<100	<100	<100	<100
	97N123	<100	<100	150	150
	225N	<100	<100	<100	<100
20 μ gの CP5(LMW)+0 .5mg/mLの AIP ₄	02D017	<100	<100	<100	<100
	A4N100	<100	150	150	4050
	257N	<100	<100	<100	<100
	A4L046	<100	<100	<100	<100
	A1N098	<100	150	<100	<100
2 μ gの CP5(LMW)+0 .5mg/mLの AIP ₄	96N022	150	150	450	150
	02D005	<100	1350	450	1350
	02D113	<100	150	150	<100
	A2N040	150	150	<100	<100
	A4L056	150	150	<100	<100

10

20

【0307】

(実施例28) 高分子量の多糖を含む被膜多糖コンジュゲートは、低分子量の多糖を含むコンジュゲートと比較して増強した免疫原性を示す。

異なる被膜コンジュゲート製剤の免疫原性を評価するために、ヒトではない霊長類(NHP)での研究を行った。2つの製剤を、2つの異なる投薬量レベル(2および20 μ g)で試験した。第1の製剤は、CRM₁₉₇にコンジュゲートした、高分子量(HMW)の多糖(およそ130kDa)から構成されるものであった。第2の製剤は、CRM₁₉₇にコンジュゲートした、低分子量(LMW)の多糖(およそ25kDa)を含有していた。5頭の霊長類からなる群を、単回用量のいずれかのワクチンでワクチン接種し、ワクチン接種の前およびワクチン接種の2週間後の免疫力価をモニタリングした。OPA力価は、OPAアッセイにおいて黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)株PFESA0266の40%を死滅させるために必要な血清の希釈として定義された。抗体力価はまた、ELISAによってもモニタリングした。LMW製剤と比較して、HMWワクチンで、増強された活性が見られ(表24)、このことは、LMWワクチンと比較してHMWワクチンで抗体力価が10倍上昇することによって証明された。HMWワクチンを投与したNHPでのOPA応答者の比率もまた、より高かった(40%に対し80%)。

30

40

【0308】

【表 2 6】

表24. LMW多糖コンジュゲートワクチンと比較して、HMW多糖コンジュゲートワクチンで、増強された免疫原性が観察される。

	動物当たりのCP5-CRM197用量レベル (mcg)	PD1の幾何学的平均*	OPA応答者の比率(%) ±
HMW (125kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25kDa)	20	3	40
	2	8	40

*ワクチン前の力価と比較した、ワクチン接種の2週間後のCP5 ELISA力価から計算された倍増。±ワクチン接種の2週間後における、単回用量ワクチン後にOPA力価の上昇を生じさせたサルから計算された応答者の比率。各群は、5頭のアカゲザルを含有し、ワクチンはAlPO₄(250mcg/用量)と共に製剤された。

10

【 0 3 0 9】

(実施例 2 9) 二抗原 (CP5 - CRM₁₉₇ および ClfA) 製剤 - ヒトではない霊長類における抗体応答

NHPにおける単回用量の二抗原免疫原性組成物 (CP5 - CRM₁₉₇ および ClfA) に対する免疫応答を評価するため、5頭のサルからなる群を、AlPO₄を添加していない異なる用量の2つの抗原で免疫化した。0日目、14日目、および28日目の出血を、オプソニン性貪食 (OP) 活性およびELISA力価について試験し、結果を表24にまとめる。結果は、OP活性が、CP5偽群と比較して、CP5で免疫化した動物で一貫して観察されることを示した。全体的に、100µgの群は、他の群と比較して、最も高いELISA力価およびOP力価を有していた。ClfAのみの群の血清ではOP死滅活性は観察されなかった。ClfAまたはCP5の用量を上昇させて投与した群において、干渉は観察されなかった。表25を参照されたい。

20

【 0 3 1 0】

【表 2 7】

表25:NHPにおける二価免疫化研究のOPAの結果

群番号	ID 番号	OPA 力価(40%の死滅)		
		0 週目	2 週目	4 週目
180µg の ClfA+20µg の 130kDa の CP5	A4R054	<100	150	<100
	A4R056	<100	150	150
	A4N087	<100	450	450
	97N152	<100	450	1350
	A4R027	<100	1350	1350
180µg の ClfA+2µg の 130kDa の CP5	A4R062	<100	150	<100
	97N149	<100	150	<100
	A4R131	<100	450	150
	97N025	<100	450	450
	A4N064	<100	450	450
60µg の ClfA+20µg の 130kDa の CP5	A4L005	<100	<100	<100
	A4R029	<100	1350	1350
	A3N015	<100	<100	<100
	98N021	150	4050	4050
	A4R137	<100	<100	<100
60µgのClfA+2µgの1 30kDaのCP5	A1N040	<100	150	150
	A2N104	<100	1350	<100
	A4L033	<100	150	<100
	96N048	<100	<100	<100
	A4R032	<100	<100	<100
2µgの130kDaのCP5	A4R135	<100	450	150
	A1N118	<100	150	150
	A4R061	<100	<100	1350
	A4R101	<100	4050	1350
	97N137	<100	1350	1350
20µgの130kDaのCP 5	A4R135	<100	<100	<100
	A4N115	<100	150	150
	95N038	<100	<100	<100
	A4N120	<100	450	450
	96N004	<100	150	150
100µgの130kDaのC P5	A4N116	<100	450	450
	A3N097	<100	450	450
	A4N108	<100	1350	1350
	98N034	<100	450	150
	99N034	<100	1350	4050
60µgのClfA	97N057	<100	<100	<100
	A4R112	150	<100	150
	A4L022	<100	<100	<100
	97N100	<100	<100	<100
	99N041	150	150	150

【 0 3 1 1】

黄色ブドウ球菌 (S. aureus) CP5 被膜多糖抗原および CP8 被膜多糖抗原の能力を実証する動物モデル

CP5 - CRM₁₉₇ コンジュゲートおよび CP8 - CRM₁₉₇ コンジュゲートの両方は、マウス、ラット、ウサギ、およびヒトではない霊長類 (NHP) において、荚膜血清型特異的抗体応答を誘発した。コンジュゲート誘発型の抗体は、インビトロでの機能的

オプソニン性貪食死滅アッセイにおいて機能的であった。O - アセチル化がCP5およびCP8の両方にとって防御抗体を誘導するために重要であること、ならびにO - アセチル基が、CP5に対するOPA⁺mAbにより認識されるエピトープの一部であることを実証するために、データを得た。O - アセチル化された天然CP5を認識するMAbは、OPAにおいて機能的であり、細菌の死滅を仲介する。CP8コンジュゲートは、マウスおよびウサギの両方において、OPAにおいて8型株の死滅を仲介する、機能的抗体を誘発した。ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体による死滅の特異性は、相同な天然多糖をアッセイに添加した後に死滅がなくなったことによって確認された。様々な活性化モデルを用いて、CP5 - CRM₁₉₇コンジュゲートおよびCP8 - CRM₁₉₇コンジュゲートの両方の臨床前効率を示した。CP5コンジュゲートは、マウス腎盂腎炎モデルおよびラット心内膜炎モデルにおいて一貫した効率を示した。CP5のO - アセチル化の重要性は、マウス腎盂腎炎モデルにおいて確認され、このモデルにおいて、CRM₁₉₇にコンジュゲートした脱O - アセチル化型CP5は、実験的感染に対して動物を防御できなかった。

10

20

30

40

50

【0312】

二抗原製剤におけるコンジュゲートの組み合わせは、被膜CP5およびCP8の両方に対して抗体を誘発し、単一抗原での免疫化と比較して、誘発される特異的抗体レベルに対する干渉はなかった。三抗原製剤におけるコンジュゲートとClfAとの組み合わせは、高レベルのCP5、CP8、およびClfAを誘発し、組み合わせ内に存在するいずれかの抗原に対して誘発された抗体応答に対する干渉はなかった。三抗原免疫原性組成物は、高い免疫前力価でウサギにおける3つ全ての成分に対してブーストされ得る抗体(Ab)応答を誘発した。

【0313】

これらの結果は、CRM₁₉₇にコンジュゲートしたCP5およびCP8が、防御性の黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)免疫原性組成物の免疫原性製剤成分として含まれるべきであることを示唆する。

【0314】

(実施例30)複数の考えられる黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)疾患から防御するための異なる抗原の要件

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)は、比較的軽度の皮膚感染から、心内膜炎、壊疽性筋膜炎、骨髄炎、敗血症性関節炎、および肺炎などの、より重症で侵襲性の感染にわたる、広範な感染の原因である。これらのインピボでの部位のそれぞれは固有であり、細菌は、それらの抗原発現プロファイルを、個別の株がコロニー形成し、成長し、最終的に疾患を生じさせるために最も適したプロファイルに改変することによって、環境刺激の差に応答する可能性がある。実施例12において例示されるように、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)株は、インピボでの抗原発現の多様性を示す。異なる抗原から構成される多成分免疫原性組成物は、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)により生じる多様な疾患所見に対して防御する可能性が高い。

【0315】

ClfAは、齧歯動物の心内膜炎モデルおよび敗血症モデルにおいて防御することが示された。ClfBは、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)の鼻腔でのコロニー形成において重要であることが報告されている。MntCは、マウス菌血症モデルにおいてマウスを防御した。CP5コンジュゲートは、腎盂腎炎および心内膜炎において防御し、CP8コンジュゲートは、齧歯動物の腎盂腎炎モデルおよび敗血症モデルにおいて防御した。これらの結果は、これらの抗原を含有する多成分ワクチンが、複数のタイプの黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)疾患に対して防御することを実証する。

【0316】

インピボでの動物モデルは、実際の感染の経過に近似し、どの抗原が特定の疾患からの防御において有用であり得るかを解明するために役立つ。表26は、様々なインピボモデルで行われた多くの実験の結果をまとめたものである。結果は、各ブロックにおいて、ス

ラッシュによって分けられた4つの数字として報告されており、例えば、敗血症モデルにおけるC1fAは、27/1/3/31という数を有する。最初の数は、C1fA免疫化が防御の統計的に有意な正の結果をもたらした実験の数である。2番目の数は、C1fA免疫化が、有意的な傾向を示すが統計的に有意ではない防御の正の結果をもたらした、実験の数である。3番目の数は、C1fA免疫化が負の結果をもたらしたが、統計的に有意ではなかった、実験の数である。4番目の数は、行われた実験の総数である。最初の3つの数は、加算されると、4番目の数に等しくなる。

【0317】

【表28】

表26. 黄色ブドウ球菌(S.aureus)抗原に対する動物モデルにおけるOP防御の概要

	C1fA	CP5	CP8	MntC ²⁰
菌血症	1/4/0/5	3/0/3/6	1/1/1/3	6/2/5/13
敗血症	27/1/3/31	1/0/0/1	NT	NT
腎盂腎炎	0/4/2/6	13/1/0/14	NT	1/0/4/5 ²⁵
心内膜炎	3/6/1/10	3/2/2/7	NT	NT

NT:試験せず

【0318】

(実施例31) インビトロおよびインビボでの様々な多抗原免疫原性組成物の試験

C1fA、C1fB、MntC、CP5、およびCP8というポリペプチドおよび/または多糖から選択される3つ、4つ、または5つの抗原を含有する様々な多抗原ブドウ球菌免疫原性製剤を、様々なインビボモデルにおいて免疫原性および効力について試験する。免疫原性組成物は以下の通りである。

【0319】

(1) 単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)クラumping因子A(C1fA)ポリペプチド、CRM₁₉₇にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)莢膜多糖5型、CRM₁₉₇にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)莢膜多糖8型を含む、免疫原性組成物。

【0320】

(2) 第2の組み合わせは、クラumping因子A(C1fA)、クラumping因子B(C1fB)、単離されたMntC、CRM₁₉₇にコンジュゲートした単離されたブドウ球菌莢膜多糖CP5、およびCRM₁₉₇にコンジュゲートした単離されたブドウ球菌莢膜多糖CP8を提供する。

【0321】

(3) 第3の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)クラumping因子A(C1fA)ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)クラumping因子B(C1fB)ポリペプチド、または単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)MntCタンパク質、CRM₁₉₇にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)莢膜多糖5型、およびCRM₁₉₇にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)莢膜多糖8型を含む免疫原性組成物を提供する。

【0322】

(4) 第4の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)クラumping因子B(C1fB)ポリペプチド、CRM₁₉₇にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)莢膜多糖5型、およびCRM₁₉₇にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌(S.aureus)莢膜多糖8型を含む免疫原性組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0323】

(5) 第5の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntCタンパク質、CRM₁₉₇にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖5型、およびCRM₁₉₇にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 莢膜多糖8型を含む免疫原性組成物を提供する。

【0324】

そして、(6) 第6の組み合わせは、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子A (ClfA) ポリペプチド、単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) クランピング因子B (ClfB) ポリペプチド、および単離された黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntCタンパク質を含む免疫原性組成物を提供する。

10

【0325】

rClfAおよびrClfBは、実施例1において記載したように調製および精製する。MntCは、実施例2において記載したように調製および精製する。単離されたCP5およびCP8は、実施例3において記載したように調製および精製し、実施例4において記載したようにCRM₁₉₇にコンジュゲートさせる。

【0326】

より具体的には、上記の先の実施例において記載された手順を用いて、免疫原性および効率を測定する。3つ、4つ、または5つの成分のそれぞれが、単独でまたは共に送達された場合に免疫応答を誘発するかどうかを決定するために研究を行う。これらの同一の研究を用いて、4つまたは5つの成分のいずれか1つの存在が、他の3つまたは4つの成分のいずれか1つの、免疫応答を誘発する能力に干渉するか否かを決定する。さらに、4つまたは5つの成分が、単独で試験された場合に、または共に試験された場合に、上記の動物モデルのいずれか1つまたは複数において防御をもたらすかどうかを決定するために研究を行う。4つまたは5つの成分は、上記の先の実施例において述べたように、単回用量または複数回用量として動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはヒトではない霊長類に投与される。動物を出血させ、血清を回収し、4つまたは5つの成分のそれぞれに対する抗体の存在について試験する。抗原特異的抗体の存在は、当業者に知られているあらゆる免疫アッセイによって測定し、例えば、ELISA (実施例11~29を参照されたい) またはウェスタンブロット (実施例1を参照されたい) を用いて、抗原特異的抗体の存在または不存在を評価する。さらに、オプソニン性貪食アッセイを用いて、抗原特異的抗体が、貪食細胞によるブドウ球菌生物の死滅の仲介において効果的であるかどうかを決定する (実施例11~29を参照されたい)。

20

30

【0327】

インピボでの効力はまた、限定はしないが、留置管モデル、マウス菌血症モデル、創傷感染モデル、マウス腎盂腎炎モデル、ラット心内膜炎モデル、およびマウス敗血症モデルなどの、上記の動物研究のいずれか1つまたは複数を用いて評価される (実施例11~30を参照されたい)。

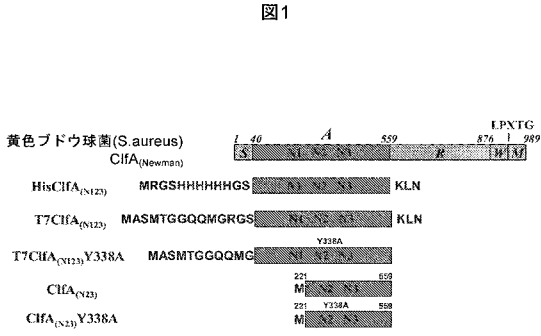
【0328】

(実施例32) 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 抗原の組み合わせは、ヒトではない霊長類において、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株Pfe5-1の死滅を増強させる抗体を生成する。

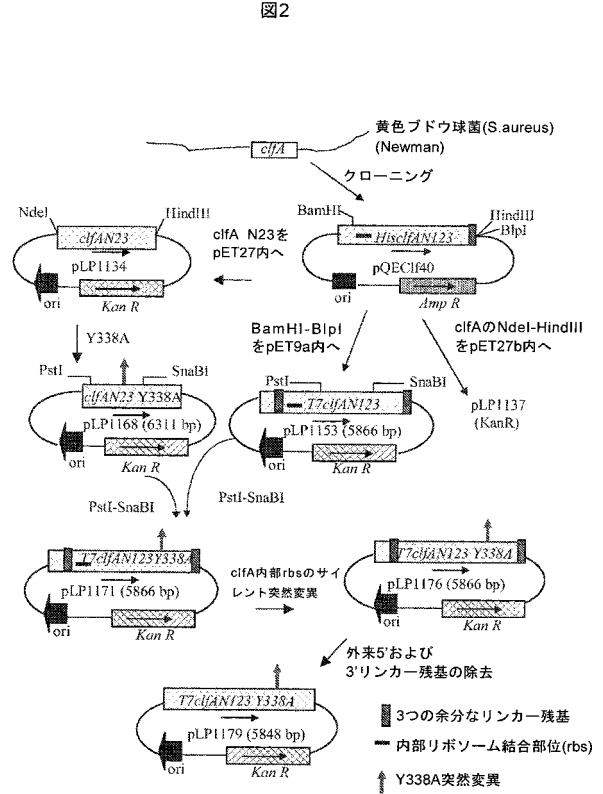
40

抗原の組み合わせを用いると、OPAアッセイを用いて測定されるように増強された効力が観察された。3~10頭のサルからなる群を多成分ワクチンで免疫化する、ヒトではない霊長類での研究を行った。単回用量のワクチンを与えた動物およびOPA力価を、0日目およびワクチン接種の2週間後にモニタリングした。OPA力価は、OPAアッセイにおいて黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 株Pfe5-1の50%を死滅させるために必要な血清の希釈として定義された。増強された活性が、3抗原ワクチン製剤と比較して、4抗原の組み合わせで見られた ($p = 0.0272$ 、図18)。

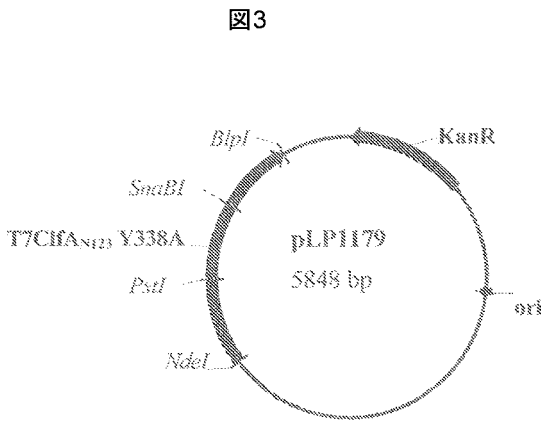
【 図 1 】



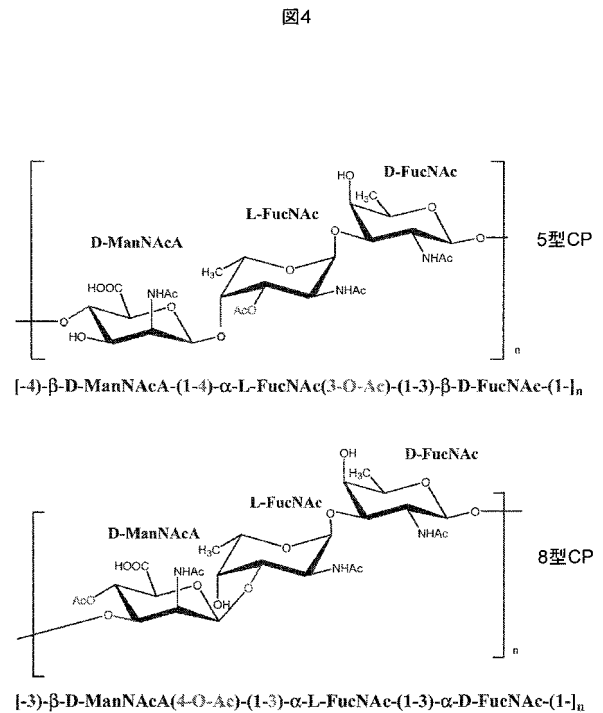
【 図 2 】



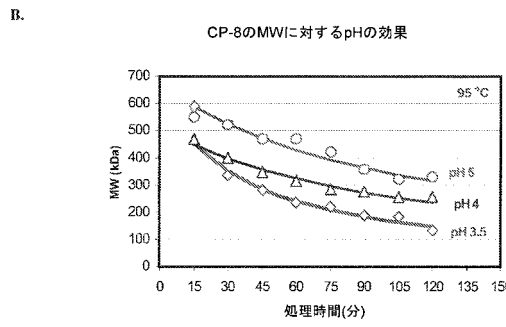
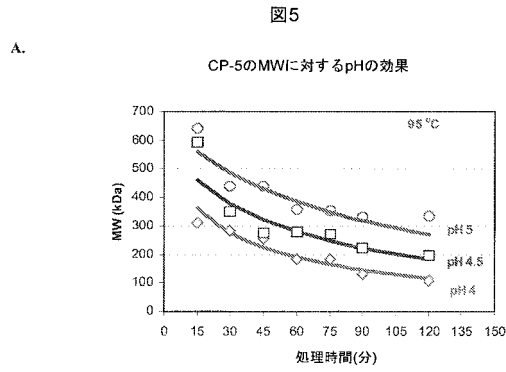
【 図 3 】



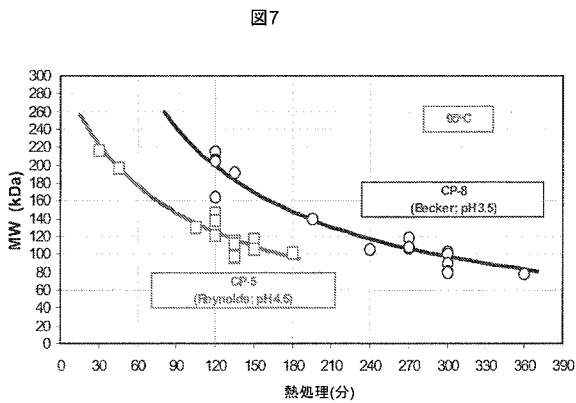
【 図 4 】



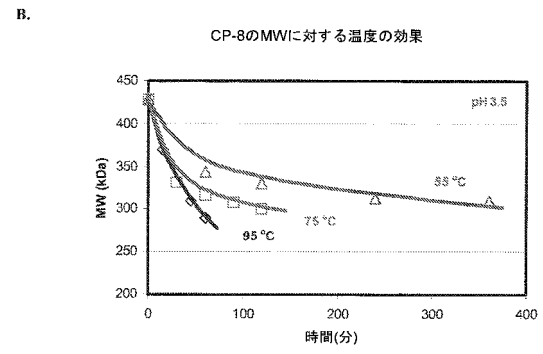
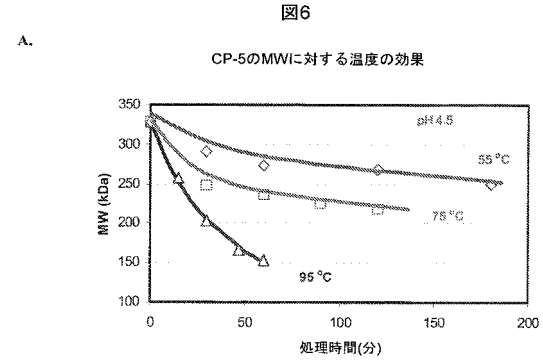
【 図 5 】



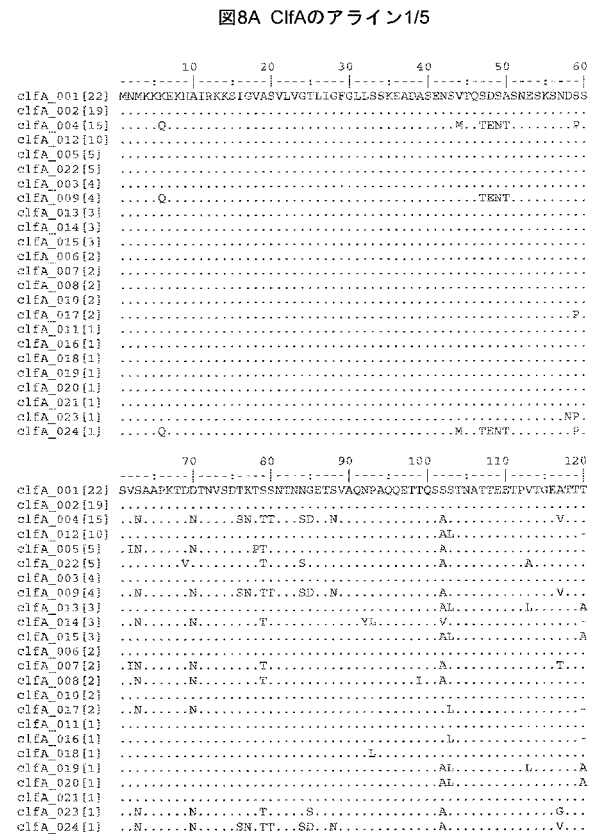
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 - 1 】



【 図 8 - 2 】

図8B CifAのアライン2/5

```

130      140      150      160      170      180
cifA_001[22] TINGANTPATQSSNTNABELVNGVTSNETTSNDTNTVSVNSPONSINAENVSTTQVST
cifA_002[19] .....
cifA_004[15] A.....S.....T.....
cifA_012[10] A.....
cifA_005[5] .....N.....
cifA_022[5] .....N.....
cifA_003[4] .....
cifA_009[4] A.....KS.....
cifA_013[3] .....
cifA_014[3] A.....
cifA_015[3] .....
cifA_006[2] .....
cifA_007[2] A.....
cifA_008[2] A.K.....
cifA_016[2] .....
cifA_017[2] A.....
cifA_021[1] .....F.....
cifA_016[1] A.....
cifA_018[1] .....
cifA_019[1] .....
cifA_020[1] .....
cifA_021[1] .....
cifA_023[1] A.....A.N.....
cifA_024[1] A.....S.....T.....

190      200      210      220      230      240
cifA_001[22] EATPSMNSAPQSSNTNABELVNGVTSNETTSNDTNTVSVNSPONSINAENVSTTQVST
cifA_002[19] .....N.....S.....P.T.....D.K
cifA_004[15] .....K.....
cifA_012[10] .....S.....K.....
cifA_005[5] .....K.....D.K
cifA_022[5] .....D.K
cifA_003[4] .....K.....D.K
cifA_009[4] .....K.....D.K
cifA_013[3] .....D.K
cifA_014[3] .....
cifA_015[3] .....N.....S.....P.T.....K.....D.K
cifA_006[2] .....N.....S.....P.T.....D.K
cifA_007[2] .....N.....D.K
cifA_008[2] .....V.....D.K
cifA_010[2] .....V.....D.K
cifA_017[2] .....D.....E.K
cifA_011[1] .....
cifA_016[1] .....D.....D.K
cifA_018[1] .....
cifA_019[1] .....D.....D.K
cifA_020[1] .....N.....R.....D.K
cifA_021[1] .....
cifA_023[1] .....S.....P.....D.....
cifA_024[1] .....K.....

```

【 図 8 - 3 】

図8C CifAのアライン3/5

```

250      260      270      280      290      300
cifA_001[22] VGLDGGTVYPHQAGYVZLNKYGFSVNSAVKGDYFKITVPEKELNNGVSTAKVFPFMAG
cifA_002[19] .....T.....
cifA_004[15] .....D.....E.Q.....
cifA_012[10] .....D.....
cifA_005[5] .....T.....D.....
cifA_022[5] .....T.....
cifA_003[4] .....D.....Q.....
cifA_009[4] .....D.....
cifA_013[3] .....T.....
cifA_014[3] .....
cifA_015[3] .....T.....
cifA_006[2] .....P.....
cifA_007[2] .....T.....
cifA_008[2] .....T.....
cifA_010[2] .....
cifA_017[2] .....T.....
cifA_021[1] .....
cifA_018[1] .....T.....
cifA_019[1] .....T.....
cifA_020[1] .....T.....A.....
cifA_021[1] .....D.....
cifA_023[1] .....E.D.....
cifA_024[1] .....D.....E.Q.....

310      320      330      340      350      360
cifA_001[22] EQVLANGVIDSDGGHVIYFFDYVWTKDQPAATLTPPAYLDPENVKKYGNTLATIGSTT
cifA_002[19] .....DN.EN.T.NI.....T.....TN
cifA_004[15] .....DN.EN.T.NI.....T.....TN
cifA_012[10] .....DN.EN.T.NI.....T.....TN
cifA_005[5] .....DN.EN.T.NI.....T.....TN
cifA_022[5] .....DN.EN.T.NI.....T.....TN
cifA_003[4] .....N.....
cifA_009[4] .....V.....Y.TH.....N.....
cifA_013[3] .....D.N.....V.....T.....K.....TN
cifA_014[3] .....N.....T.....
cifA_015[3] .....DN.EN.T.NI.....T.....TN
cifA_006[2] .....DN.EN.T.NI.....T.....TN
cifA_007[2] .....DN.EN.T.NI.....T.....TN
cifA_008[2] .....T.....
cifA_010[2] .....
cifA_017[2] .....D.EN.T.NI.....T.....
cifA_011[1] .....
cifA_016[1] .....DN.N.....T.....
cifA_018[1] .....DN.N.....T.....N.....
cifA_019[1] .....DN.N.....V.....T.....TN
cifA_020[1] .....DN.EN.T.NI.....T.....TN
cifA_021[1] .....DN.EN.T.NI.....T.....N.....
cifA_023[1] .....V.....Y.TH.....N.....
cifA_024[1] .....T.....

```

【 図 8 - 4 】

図8D CifAのアライン4/5

```

370      380      390      400      410      420
cifA_001[22] ANKTVLVDYKVKYKYLKLSIKGTLIQIDKINNYRQIYYVNSGDNVIAVPLTGNLKNPT
cifA_002[19] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_004[15] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_012[10] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_005[5] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_022[5] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_003[4] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_009[4] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_013[3] DS.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_014[3] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_015[3] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_006[2] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_007[2] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_008[2] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_010[2] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_017[2] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_011[1] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_016[1] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_018[1] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_019[1] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_020[1] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_021[1] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_023[1] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....
cifA_024[1] .....S.....I.....Q.H.....VL.A.....I.....

430      440      450      460      470      480
cifA_001[22] DSNALIDQQTSTIKVYKVNAAADLSESYVNFENFEDVNSVNIETPNQYKVEFNFTD
cifA_002[19] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_004[15] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_012[10] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_005[5] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_022[5] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_003[4] E.....
cifA_009[4] E.....
cifA_013[3] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_014[3] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_015[3] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_006[2] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_007[2] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_008[2] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_010[2] .....
cifA_017[2] .....
cifA_011[1] .....
cifA_016[1] .....
cifA_018[1] .....
cifA_019[1] N.....AN.N.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_020[1] K.....AK.D.....R.....N.....Y.....SD.....Q.R.S.....A.....P.D
cifA_021[1] .....
cifA_023[1] .....
cifA_024[1] .....A.....S.....Y.....D.....D.....

```

【 図 8 - 5 】

図8E CifAのアライン5/5

```

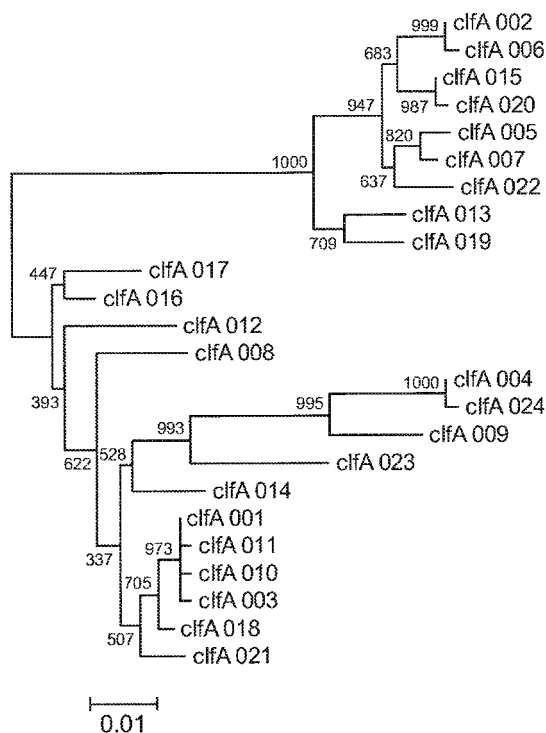
490      500      510      520      530      540
cifA_001[22] EQITTPYIVVNGHIDPNSKGLALRSTLYGYNSNTIWRSMNSDNEVAFNKGSGGSDGID
cifA_002[19] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_004[15] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_012[10] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_005[5] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_022[5] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_003[4] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_009[4] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_013[3] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_014[3] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_015[3] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_006[2] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_007[2] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_008[2] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_010[2] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_017[2] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_011[1] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_016[1] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_018[1] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_019[1] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_020[1] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_021[1] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_023[1] .....A.T.....F.....D.F.....
cifA_024[1] .....A.T.....F.....D.F.....

550      560      570      580      590      600
cifA_001[22] KPVPBQDEPGEIRIFIR
cifA_002[19] .....
cifA_004[15] .....
cifA_012[10] .....
cifA_005[5] .....
cifA_022[5] .....
cifA_003[4] .....
cifA_009[4] .....
cifA_013[3] .....
cifA_014[3] .....
cifA_015[3] .....
cifA_006[2] .....
cifA_007[2] .....
cifA_008[2] .....
cifA_010[2] .....
cifA_017[2] .....
cifA_011[1] .....
cifA_016[1] .....
cifA_018[1] .....
cifA_019[1] .....
cifA_020[1] .....
cifA_021[1] .....
cifA_023[1] .....
cifA_024[1] .....

```

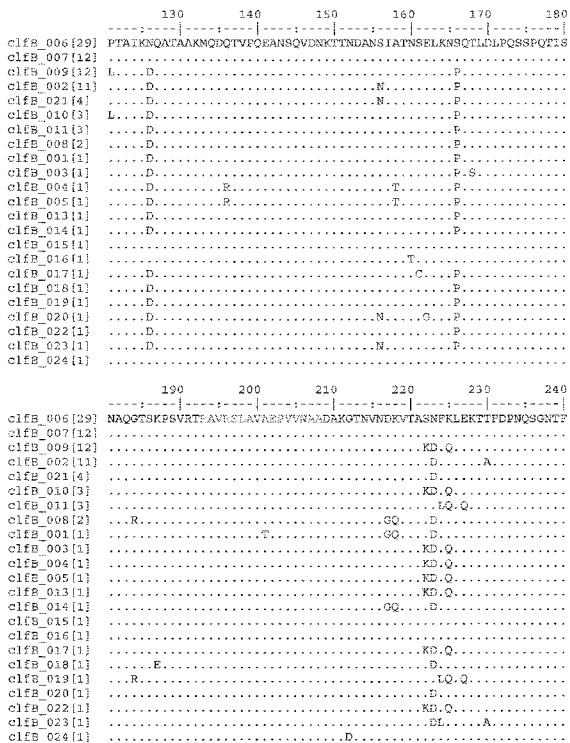
【 図 9 】

図9 CifAの系統樹



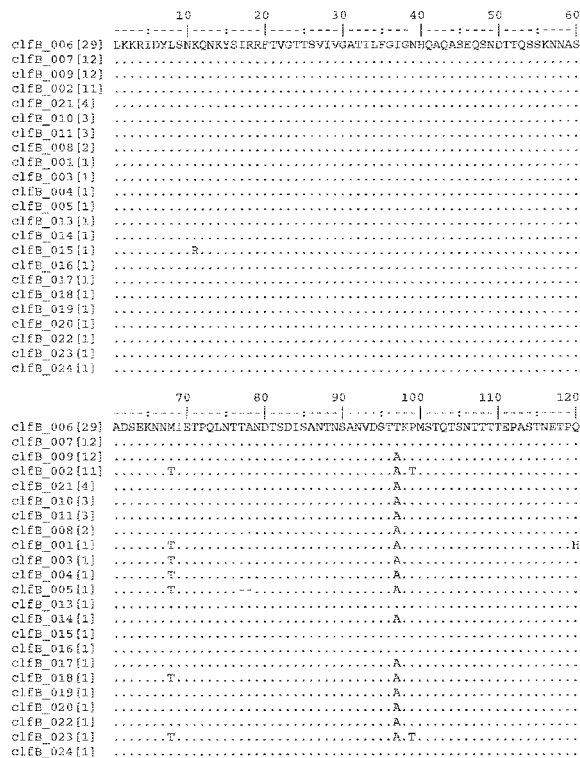
【 図 1 0 - 2 】

図10B CifBのアライン2/5



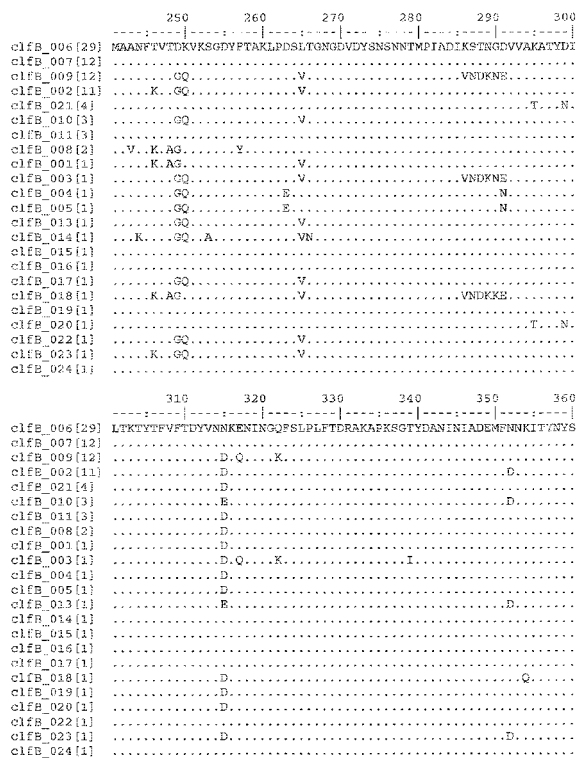
【 図 1 0 - 1 】

図10A CifBのアライン1/5



【 図 1 0 - 3 】

図10C CifBのアライン3/5



【 図 1 0 - 4 】

図10D ClfBのアライン4/5

```

          370   380   390   400   410   420
clfb_006[29] SPIAGILDKPKNGANISQIIGVDTASGGNTYKQIVFVFNPKQRLVIGNTWVYIKGYQCKIEES
clfb_007[12] .....
clfb_009[12] .....
clfb_002[11] .....
clfb_021[4] .....
clfb_010[3] .....
clfb_011[3] .....
clfb_008[2] .....
clfb_001[1] .....
clfb_003[1] .....
clfb_004[1] .....
clfb_005[1] .....
clfb_013[1] .....
clfb_014[1] .....
clfb_015[1] .....
clfb_016[1] .....
clfb_017[1] .....
clfb_018[1] .....
clfb_019[1] .....
clfb_020[1] .....
clfb_022[1] .....
clfb_023[1] .....
clfb_024[1] .....

          430   440   450   460   470   480
clfb_006[29] SSKVSATLTKLRLEFVNDSIKLSDSYADPNDSMLKEVTDQPKNRIYYEHPNVSALKFGD
clfb_007[12] .....
clfb_009[12] ..... DK.T.KYQ.....N
clfb_002[11] ..... GR.DK.S.KYD.....N
clfb_021[4] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_010[3] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_011[3] ..... DK.T.KYQ.....N
clfb_008[2] ..... NE.DK.S.KYD.....N
clfb_001[1] ..... SE.N...F.....N
clfb_003[1] ..... DK.T.KYQ.....N
clfb_004[1] ..... DK.T.KYQ.....N
clfb_005[1] ..... DK.T.KYQ.....N
clfb_013[1] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_014[1] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_015[1] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_016[1] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_017[1] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_018[1] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_019[1] ..... K.....N
clfb_020[1] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_022[1] ..... NE.DK.T.KYQ.....N
clfb_023[1] ..... SE.DK.S.KYD.....N
clfb_024[1] ..... NE.DK.T.KYQ.....N

```

【 図 1 0 - 5 】

図10E ClfBのアライン5/5

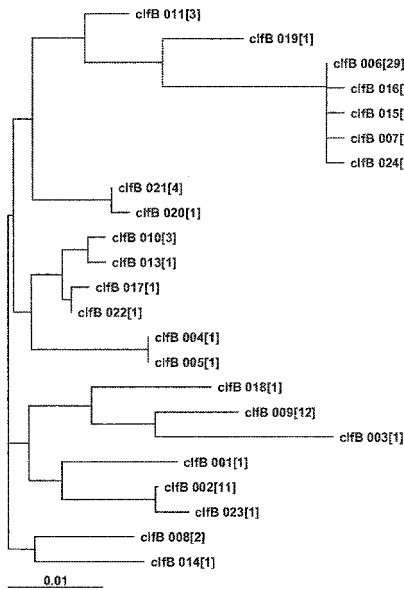
```

          490   500   510   520   530   540
clfb_006[29] IETKYVVLVSGHYDNTGKRNLRKQVIGENVDPVITNEDYSIPQWNNRNVVRVYGGSSADSDSANN
clfb_007[12] .....
clfb_009[12] ..... N.....K.....I.A.GK.....
clfb_002[11] ..... N.....I.A.GK.....
clfb_021[4] ..... I.A.GK.....
clfb_010[3] ..... I.A.GK.....
clfb_011[3] ..... I.A.GK.....
clfb_008[2] ..... I.A.GK.....
clfb_001[1] ..... N.....I.A.GK.....
clfb_003[1] ..... N.....I.A.GK.....
clfb_004[1] ..... I.A.GK.....
clfb_005[1] ..... I.A.GK.....
clfb_013[1] ..... I.A.GK.....
clfb_014[1] ..... I.A.GK.....
clfb_015[1] ..... I.A.GK.....
clfb_016[1] ..... I.A.GK.....
clfb_017[1] ..... I.A.GK.....
clfb_018[1] ..... N.....I.A.GK.....
clfb_019[1] ..... I.A.GK.....
clfb_020[1] ..... I.A.GK.....
clfb_022[1] ..... I.A.GK.....
clfb_023[1] ..... N.....I.SA.GK.....
clfb_024[1] ..... I.A.GK.....

```

【 図 1 1 】

図11 ClfBの系統樹



【 図 1 2 】

図12 MntCのアラインメント

```

          10   20   30   40   50   60
305_001[94] MKRLVPELLLALLLLVAACCTGGKQSSGKSNCKLKVVYITNSILYDMAKNNGGDNVPIHSIV
305_006[3] .....
305_007[3] ..... B.....
305_002[2] .....
305_003[2] .....
305_009[1] .....
305_008[1] .....

          70   80   90   100   110   120
305_001[94] PQQDPHRYEVKPKDKIKKIDADVILYAGHNIISTGNSGWPERALRQAGKSLGSKVITAVSK
305_006[3] .....
305_007[3] .....
305_002[2] .....
305_003[2] .....
305_009[1] .....
305_008[1] .....

          130   140   150   160   170   180
305_001[94] DVKPIYLNAGEGKNDKQDPHAWLSLNGIKYVKTQQQTFLENKPKKADYKQKQKVIYQ
305_006[3] .....
305_007[3] .....
305_002[2] .....
305_003[2] .....
305_009[1] .....
305_008[1] .....

          190   200   210   220   230   240
305_001[94] LERLNDSKD--KFNIPKCRAMITSEGAFKYPESKQYGITPGYINTEKQGTPEQM
305_006[3] .....
305_007[3] .....
305_002[2] ..... SKD.....
305_003[2] ..... X.....
305_009[1] .....
305_008[1] .....

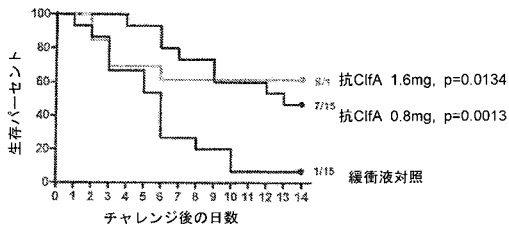
          250   260   270   280   290   300
305_001[94] RQALEFVKKHKLRKLLVETSVDKKAESLSSEKPKDIFGEVYITDSIGKKGITKQDSYKMM
305_006[3] .....
305_007[3] .....
305_002[2] .....
305_003[2] .....
305_009[1] .....
305_008[1] .....

          310   320   330   340   350   360
305_001[94] KSNIEYVHGSMK
305_006[3] ..... D.....
305_007[3] .....
305_002[2] .....
305_003[2] .....
305_009[1] ..... D.....
305_008[1] ..... D.....

```

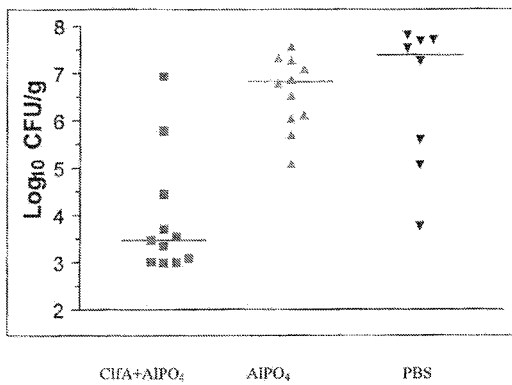
【 図 1 3 】

図13



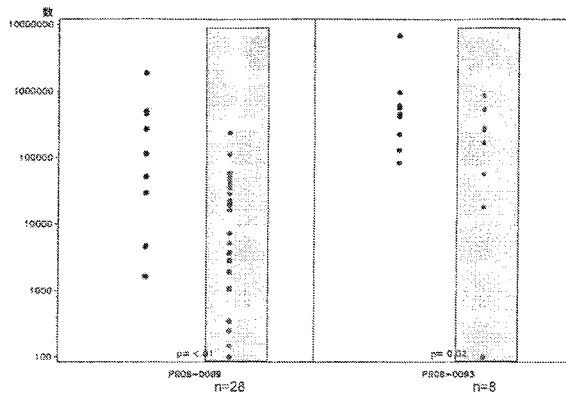
【 図 1 4 】

図14



【 図 1 5 - 2 】

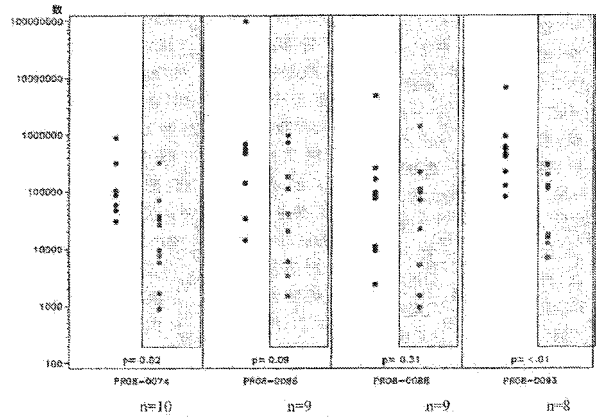
図15B



メタ分析 p<0.0001
網掛けの区域は、MntCで免疫化された群である

【 図 1 5 - 1 】

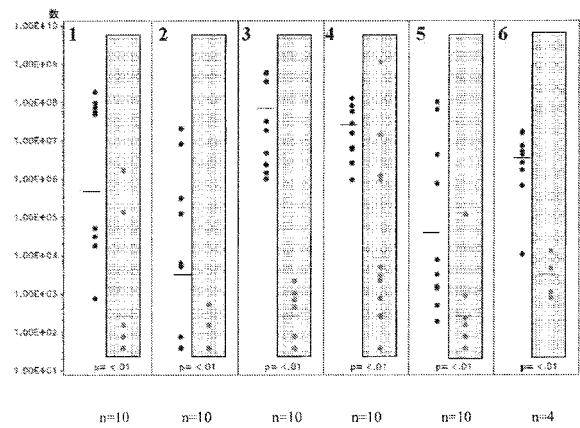
図15A



メタ分析 p=0.0001
網掛けの区域は、MntCで免疫化された群である。

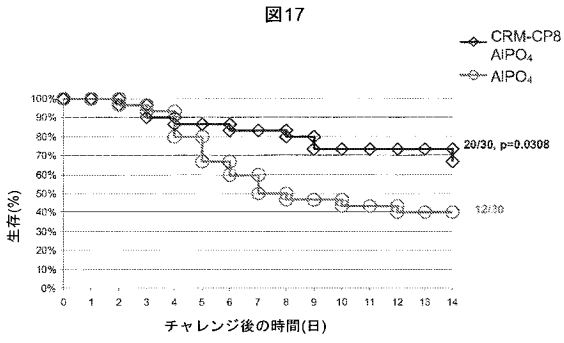
【 図 1 6 】

図16

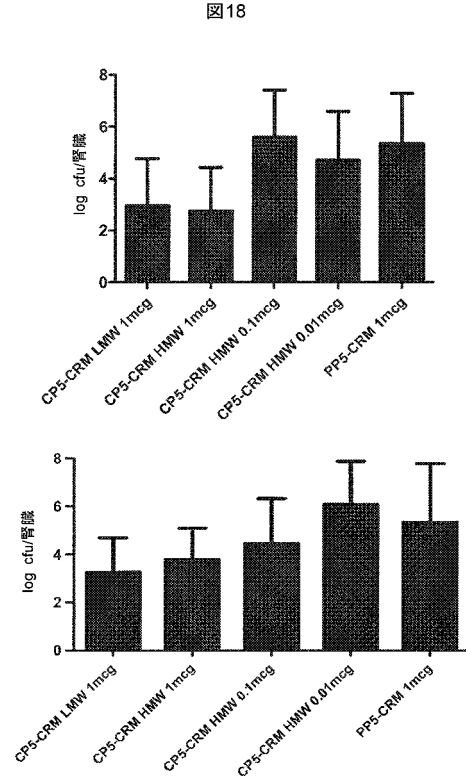


メタ分析 p<0.0001
網掛けの区域は、血清型5の多糖コンジュゲートで免疫化された群である

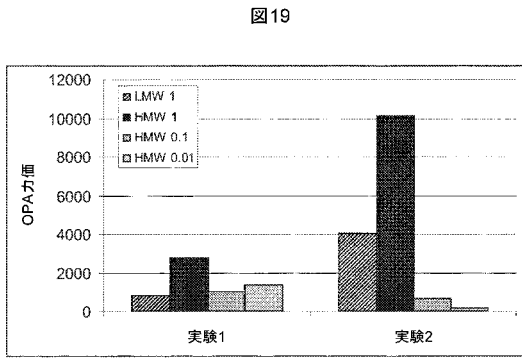
【 図 17 】



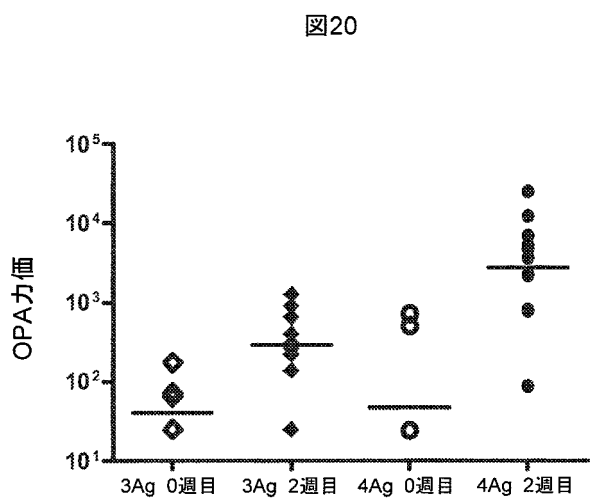
【 図 18 】



【 図 19 】



【 図 20 】



【配列表】

2013151501000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年2月20日(2013.2.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離された黄色ブドウ球菌(S. aureus) MntCタンパク質、担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌(S. aureus) 莢膜多糖5型、および担体タンパク質にコンジュゲートした単離された黄色ブドウ球菌(S. aureus) 莢膜多糖8型を含む、免疫原性組成物。

【請求項2】

単離された黄色ブドウ球菌(S. aureus) クランピング因子A(ClfA) ポリペプチドをさらに含む、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項3】

単離された黄色ブドウ球菌(S. aureus) クランピング因子B(ClfB) ポリペプチドをさらに含む、請求項1または2に記載の免疫原性組成物。

【請求項4】

ClfAポリペプチドが、ClfAの、フィブリノーゲン結合ドメイン、N1ドメイン、N2ドメイン、およびN3ドメイン、ならびにN2ドメインおよびN3ドメインからなる群から選択されるポリペプチド断片である、請求項2または3に記載の免疫原性組成物。

【請求項5】

ClfBポリペプチドが、ClfBの、フィブリノーゲン結合ドメイン、N1ドメイン、N2ドメイン、およびN3ドメイン、ならびにN2ドメインおよびN3ドメインからなる群から選択されるポリペプチド断片である、請求項3または4に記載の免疫原性組成物。

【請求項6】

ClfAポリペプチドが、フィブリノーゲンと天然ClfAとで観察される結合と比較して低減したレベルでフィブリノーゲンに結合する、請求項2から5のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項7】

ClfAポリペプチドが、Tyr338、Tyr256、Pro336、Lys389、Ala254、およびIle387の1つまたは複数におけるアミノ酸置換を有する、請求項2から6のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項8】

アミノ酸置換がAlaまたはSerへのものである、請求項7に記載の免疫原性組成物。

【請求項9】

Tyr338がAlaに置換されている、請求項8に記載の免疫原性組成物。

【請求項10】

莢膜多糖5型が、20から1000kDaの間または70から300kDaの間の高分子量莢膜多糖である、請求項1から9のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項11】

莢膜多糖5型が、10%から100%の間でO-アセチル化されている、50%から100%の間でO-アセチル化されている、または75%から100%の間でO-アセチル

化されている、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

莢膜多糖 8 型が、20 から 1000 kDa の間または 70 から 300 kDa の間の高分子量莢膜多糖である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

莢膜多糖 8 型が、10% から 100% の間で O - アセチル化されている、50% から 100% の間で O - アセチル化されている、または 75% から 100% の間で O - アセチル化されている、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

担体タンパク質が、ジフテリア菌 (*C. diphtheriae*) 毒素 CRM197 である、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) MntC タンパク質が、脂質化されたタンパク質または脂質化されていないタンパク質である、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

アジュバントをさらに含む、請求項 1 から 15 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

薬学的に許容できる担体をさらに含む、請求項 1 から 16 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

Opp3a、DltD、HtsA、LtaS、IsdA、IsdB、IsdC、SdrC、SdrD、SdrE、SdrF、SdrG、SdrH、SrtA、SpA、Sbi、FmtB、溶血素(hla)、溶血素、フィブロネクチン結合タンパク質A(fnbA)、フィブロネクチン結合タンパク質B(fnbB)、コアグラーゼ、Fig、map、パントン・バレンタイン型ロイコシジン(pvl)、毒素およびその変型、毒素(hlg)および変型、ica、免疫優性ABC輸送体、Mg²⁺輸送体、NiABC輸送体、RAP、自己溶解酵素、ラミニン受容体、IsaA/PisA、IsaB/PisB、SPOIIIE、SsaA、EbpS、SasA、SasF、SasH、EFB(FIB)、SBI、Npase、EBP、骨シアロ結合タンパク質II、アウレオリシン前駆体(AUR)/Sepp1、Cna、ならびにそれらの断片、例えば、M55、TST-1、mecA、ポリ-N-アセチルグルコサミン(PNAG/dPNAG)エキソ多糖、GehD、EbhA、EbhB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、HarA、EsxA、EsxB、エンテロトキシンA、エンテロトキシンB、エンテロトキシンC1、および新規な自己溶解酵素からなる群から選択される抗原をさらに含む、請求項 1 から 17 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に対する免疫応答を誘発する医薬の製造における、免疫学的に効果的な量の請求項 1 から 18 のいずれかに記載の免疫原性組成物の使用。

【請求項 20】

免疫応答が、対象におけるブドウ球菌生物に関連する疾患、症状、または少なくとも 1 つの症候を予防するかまたは低減させる、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

疾患が、侵襲性の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 疾患、敗血症、および保菌からなる群から選択される、請求項 20 に記載の使用。

【請求項 22】

誘発される免疫応答が、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) に対するオプソニン性貪食活性 (OPA) を有する抗体の生成を含む、請求項 19 から 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 3】

対象に受動免疫をもたらす抗体調製物の製造における、請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物の使用。

【手続補正書】

【提出日】平成25年3月4日(2013.3.4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 7】

【図 1】様々な形態の組換え C l f A を示し、示されている順にそれぞれ配列番号 1 2 5 および 1 2 7 ~ 1 2 9 を開示する図である。

【図 2】C l f A を発現させるための p L P 1 1 7 9 の構築に用いられるクローニングステップを示す図である。

【図 3】T 7 C l f A (N 1 2 3) Y 3 3 8 A 発現ベクター、p L P 1 1 7 9 を示す図である。

【図 4】C P 5 多糖および C P 8 多糖の反復構造を示す図である。

【図 5 A】異なる培養液 pH で生産された C P 5 (A) の分子量プロフィールを示す図である。

【図 5 B】異なる培養液 pH で生産された C P 8 (B) の分子量プロフィールを示す図である。

【図 6 A】異なる温度で生産された C P 5 (A) の分子量プロフィールを示す図である。

【図 6 B】異なる温度で生産された C P 8 (B) の分子量プロフィールを示す図である。

【図 7】精製された C P 5 および C P 8 の分子量と弱酸加水分解の処理時間との相関を示す図である。

【図 8 - 1】[図 8 A]黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) の様々な株間の C l f A のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 6 2、6 4、6 8、8 4、7 0、1 0 4、6 6、7 8、8 6、8 8、9 0、7 2、7 4、7 6、8 0、9 4、8 2、9 2、9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 6、および 1 0 8)。

【図 8 - 2】[図 8 B]黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) の様々な株間の C l f A のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 6 2、6 4、6 8、8 4、7 0、1 0 4、6 6、7 8、8 6、8 8、9 0、7 2、7 4、7 6、8 0、9 4、8 2、9 2、9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 6、および 1 0 8)。

【図 8 - 3】[図 8 C]黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) の様々な株間の C l f A のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 6 2、6 4、6 8、8 4、7 0、1 0 4、6 6、7 8、8 6、8 8、9 0、7 2、7 4、7 6、8 0、9 4、8 2、9 2、9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 6、および 1 0 8)。

【図 8 - 4】[図 8 D]黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) の様々な株間の C l f A のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 6 2、6 4、6 8、8 4、7 0、1 0 4、6 6、7 8、8 6、8 8、9 0、7 2、7 4、7 6、8 0、9 4、8 2、9 2、9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 6、および 1 0 8)。

【図 8 - 5】[図 8 E]黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) の様々な株間の C l f A のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 6 2、6 4、6 8、8 4、7 0、1 0 4、6 6、7 8、8 6、8 8、9 0、7 2、7 4、7 6、8 0、9 4、8 2、9 2、9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 6、および 1 0 8)。

【図 9】C l f A の系統樹を示す図である。

【図 10 - 1】[図 10 A]黄色ブドウ球菌 (S . a u r e u s) の様々な株間の C l f B のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号 2 6、2 8、3 2、1 8、5 4、3 4、3 6、3 0、1 6、2 0、2 2、2 4、3 8、4 0、4 2、4 4

、46、48、50、52、56、58、および60)。

【図10-2】[図10B]黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の Clf B のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号26、28、32、18、54、34、36、30、16、20、22、24、38、40、42、44、46、48、50、52、56、58、および60)。

【図10-3】[図10C]黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の Clf B のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号26、28、32、18、54、34、36、30、16、20、22、24、38、40、42、44、46、48、50、52、56、58、および60)。

【図10-4】[図10D]黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の Clf B のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号26、28、32、18、54、34、36、30、16、20、22、24、38、40、42、44、46、48、50、52、56、58、および60)。

【図10-5】[図10E]黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の Clf B のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号26、28、32、18、54、34、36、30、16、20、22、24、38、40、42、44、46、48、50、52、56、58、および60)。

【図11】Clf B の系統樹を示す図である。

【図12】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の様々な株間の Mnt C のアラインメントを示す図である (示されている順にそれぞれ配列番号2、8、10、4、6、14、および12)。

【図13】ウサギ抗 Clf A ポリクローナル抗体がマウス敗血症モデルにおいて黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 659-018 のコロニー数を低減させることを示す図である。

【図14】Clf A での能動免疫化がウサギ感染性心内膜炎モデルにおいて黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) PFESA0003 による心臓のコロニー形成を低減させることを示す図である。

【図15-1】[図15A] Mnt C での免疫化が血液中の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を低減させることを示す図である。A: 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) PFESA0237 株。

【図15-2】[図15B] Mnt C での免疫化が血液中の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を低減させることを示す図である。B: 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) PFESA0266 株。

【図16】黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) CP5-CRM197 コンジュゲート免疫原性製剤がマウス腎盂腎炎モデルにおいて防御を一貫して示すことを示す図である。

【図17】CP8-CRM197 コンジュゲート免疫原性製剤でのワクチン接種が敗血症モデルにおいて死亡を低減させることを示す図である。

【図18】高分子量 (HMW) の CP5-CRM、低分子量 (LMW) の CP5-CRM、または PP5-CRM 対照でワクチン接種されたマウスにおける、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) PFESA0266 でチャレンジした後の腎臓において回収されたコロニー形成単位 (CFU) を示す図である。

【図19】多糖コンジュゲート (高分子量 (HMW) の CP5-CRM、低分子量 (LMW) の CP5-CRM) の異なる製剤でワクチン接種されたマウスから得られる血清の OPA 力価 (geomean) の比較を示す図である。

【図20】異なる組み合わせの黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 抗原でのワクチン接種の前 (0週目、白抜きの記号) および2週間後 (2週目、黒い記号) の、ヒトではない霊長類の血清についての OPA 力価を示す図である。3抗原 (3Ag) ワクチンは3つの抗原から構成され、4抗原 (4Ag) ワクチンは4つの抗原から構成された。各製剤は2つの CP コンジュゲートおよび1つまたは2つのペプチドを有する。

フロントページの続き

- (72)発明者 アンナリーサ アンダーソン
アメリカ合衆国 07458 ニュージャージー州 アパー・サドル・リヴァー市 ヒルクレスト・ドライブ 49
- (72)発明者 ヴィリアム パヴリアック
アメリカ合衆国 10901 ニューヨーク州 モンテベッロ市 ケヴィン・ドライブ 17
- (72)発明者 キャサリン ウテ ジャンセン
アメリカ合衆国 07401 ニュージャージー州 アレンデル市 ヘザー・コート 57
- (72)発明者 イングリッド リー ドッジ
アメリカ合衆国 12518 ニューヨーク州 コーンウォール市 グランド・ストリート23
- (72)発明者 スティ - ヴン モーリス ベイカー
アメリカ合衆国 10930 ニューヨーク州 ハイランド・ミルズ市 サンセット・テラス 64
- (72)発明者 ジャスディーブ シング ナンラ
アメリカ合衆国 10977 ニューヨーク州 チェストナット・リッジ市 オールド・ヌヤック・ターンパイク 195
- (72)発明者 エレン マーフィー
アメリカ合衆国 10464 ニューヨーク州 シティ・アイランド市 ビーチ・ストリート 185
- (72)発明者 ブルース アーサー グリーン
アメリカ合衆国 10956 ニューヨーク州 ニューシティ市 ヴェローナ・コート 25
- (72)発明者 マーク エドワード ラッペン
アメリカ合衆国 10923 ニューヨーク州 ガーナーヴィル市 リー・コート 6
- (72)発明者 イェカテリーナティモフェーエワ
アメリカ合衆国 07340 ニュージャージー州 モーウォー市 2エヌディ・エスティ . 139

F ターム(参考) 4C076 CC41 EE41 EE41Q EE59 FF63
4C085 AA03 BA13 CC07 DD31 EE03
4C090 AA09 BA94 BC19 BD35 BD36 DA23
4H045 AA11 BA10 BA55 BA72 CA11 DA86 EA29 EA52 FA74