(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-540479
(P2024-540479A)
(43)公表日　令和6年10月31日(2024.10.31)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*9/52*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/52		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*39/09*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/09		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*39/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｂ	
Ｃ１２Ｎ	*15/57*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/57		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全14頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-529329(P2024-529329)
(86)(22)出願日　令和4年11月17日(2022.11.17)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月10日(2024.7.10)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/082177
(87)国際公開番号　WO2023/088988
(87)国際公開日　令和5年5月25日(2023.5.25)
(31)優先権主張番号　21208911.4
(32)優先日　令和3年11月18日(2021.11.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　510000976
インターベット インターナショナル ベー． フェー．
オランダ国、５８３１・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・３５
(74)代理人　100114188
弁理士　小野 誠
(74)代理人　100119253
弁理士　金山 賢教
(74)代理人　100124855
弁理士　坪倉 道明
(74)代理人　100129713
弁理士　重森 一輝
(74)代理人　100137213
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ストレプトコッカス・スイスに対するワクチンの製造方法およびそのワクチン

(57)【要約】
本発明は、ストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｕｉｓ）による病原性感染に対してブタを防御するためのワクチンの製造方法に関する。該製造方法は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）においてＩｇＭプロテアーゼ抗原を組換え発現させ、大腸菌を少なくとも５００バールの圧力の高圧均質化操作に付して、大腸菌の細胞溶解と、ライセートの上清中へのＩｇＭプロテアーゼ抗原の遊離とを誘発し、ペレットから上清を分離し、ＩｇＭプロテアーゼ抗原を含む上清を薬学的に許容される担体と混合してワクチンを生成させることを含む。本発明はまた、この製造方法によって製造されるワクチンに関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｕｉｓ）による病原性感染に対してブタを防御するためのワクチンの製造方法であって、
・大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）においてストレプトコッカス・スイスのＩｇＭプロテアーゼ抗原を組換え発現させ；
・大腸菌を少なくとも５００バールの圧力の高圧均質化操作に付して、大腸菌の細胞溶解と、ライセートの上清中へのＩｇＭプロテアーゼ抗原の遊離とを誘発し；
・ライセートのペレットから上清を分離し；
・ＩｇＭプロテアーゼ抗原を含む上清を薬学的に許容される担体と混合してワクチンを生成させる；
ことを含む、前記製造方法。
【請求項２】
高圧均質化操作中の圧力が少なくとも１０００バールである、請求項１記載の製造方法。
【請求項３】
高圧均質化操作中の圧力が少なくとも１３００バールである、請求項１または２記載の製造方法。
【請求項４】
高圧均質化操作中の圧力が少なくとも２０００バールである、請求項１～３のいずれか１項記載の製造方法。
【請求項５】
高圧均質化操作を行うために使用される装置が、フレンチ・プレッシャー・セル・プレスまたは顕微溶液化装置である、請求項１～４のいずれか１項記載の製造方法。
【請求項６】
ＩｇＭプロテアーゼ抗原が完全ＩｇＭプロテアーゼ抗原である、請求項１～５のいずれか１項記載の製造方法。
【請求項７】
完全ＩｇＭプロテアーゼ抗原が、血清型１、２または７のストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｕｉｓ）細菌のものである、請求項６記載の製造方法。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか１項記載の製造方法を使用して得られるストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｕｉｓ）のＩｇＭプロテアーゼ抗原を含むワクチン。
【請求項９】
ワクチンが、ＩｇＭプロテアーゼ抗原に対して少なくとも５％の天然大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）タンパク質を含む、請求項８記載のワクチン。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の全般的分野
本発明は、全般的には、ストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｕｉｓ）細菌による病原性感染に対してブタを防御するためのワクチンの製造方法に関するものであり、該ワクチンは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）において組換え発現された、ストレプトコッカス・スイスのＩｇＭプロテアーゼ抗原に基づく。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
ストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｕｉｓ）（Ｓ．ｓｕｉｓ）はブタにおける伝染性細菌性疾患の主要病原体の１つである。該病原体は、髄膜炎、

関節炎、心膜炎、多発性漿膜炎、敗血症、肺炎および突然死を含む種々の臨床症候群を引き起こしうる。ストレプトコッカス・スイスは、最初はランスフィールド（Ｌａｎｃｅｆｉｅｌｄ）群Ｒ、Ｓ、Ｒ／ＳまたはＴとして定義されていたグラム陽性通性嫌気性球菌である。その後、細胞壁に存在する型特異的莢膜多糖抗原に基づく新たな分類系が提示された。これは、３５個の血清型を含む系をもたらし（ＲａｓｍｕｓｓｅｎおよびＡｎｄｒｅｓｅｎ，１９９８，“１６Ｓ ｒＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｖａｒｉａｔｉｏｎｓ ｏｆ ｓｏｍｅ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｉｓ ｓｅｒｏｔｙｐｅｓ”，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｓｙｓｔ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．４８，１０６３－１０６５）、これらのうち、血清型１、２、７および９が現在、特に欧州において、最も多く見られる。しかし、莢膜血清型は、不十分な病原性マーカーであることが認識されている。したがって、ストレプトコッカス・スイス感染の疫学と血清型決定アプローチの生物学的関連性とを理解するのを助ける代替的な系が開発された。それは、いわゆる多座配列型決定（ｍｕｌｔｉｌｏｃｕｓ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｔｙｐｉｎｇ）（ＭＬＳＴ）であり、Ｋｉｎｇら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ｏｃｔ．２００２，ｐ．３６７１－３６８０（Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ａ Ｍｕｌｔｉｌｏｃｕｓ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｔｙｐｉｎｇ Ｓｃｈｅｍｅ ｆｏｒ ｔｈｅ ｐｉｇ ｐａｔｈｏｇｅｎ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｉｓ：Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｖｉｒｕｌｅｎｔ ｃｌｏｎｅｓ ａｎｄ ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｃａｐｓｕｌａｒ ｓｅｒｏｔｙｐｅ ｅｘｃｈａｎｇｅ”）に記載されている。その研究においては、９２個の配列型が特定された。それらのうち、複数の配列型をそれぞれが含有するＳＴ複合体ＳＴ１、ＳＴ２７およびＳＴ８７が集団において優勢である。また、オックスフォード大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｏｘｆｏｒｄ）におけるストレプトコッカス・スイスＭＬＳＴウェブサイト（ｈｔｔｐｓ：／／ｐｕｂｍｌｓｔ．ｏｒｇ／ｓｓｕｉｓ／）（Ｊｏｌｌｅｙら，Ｗｅｌｌｃｏｍｅ Ｏｐｅｎ Ｒｅｓ ２０１８，３：１２４）（Ｗｅｌｌｃｏｍｅ Ｔｒｕｓｔによる資金提供を受けたサイト）も参照されたい。これはＫｉｎｇらの論文を参照しており、任意のストレプトコッカス・スイス株の配列型の容易な特定を可能にする。

【０００３】

ブタの集団におけるストレプトコッカス・スイスの制御（防除）は困難なようである。ストレプトコッカス・スイスはブタの常在性日和見病原体である。免疫系は感染のあらゆる機会に始動されるわけではないようである。更に、ストレプトコッカス・スイスは、十分に被包された病原体であり、病原性因子の攻防手段を用いて宿主免疫系を逃れる。これらの特性は、一緒になってこの重要な病原体と戦うための有効なワクチンの開発を困難にしている。ストレプトコッカス・スイスに対する既存のおよび試験的なワクチンをレビューしている概説論文が数年前に公開された（Ｍａｒｉｅｌａ Ｓｅｇｕｒａ：“Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｉｓ ｖａｃｃｉｎｅｓ：ｃａｎｄｉｄａｔｅ ａｎｔｉｇｅｎｓ ａｎｄ ｐｒｏｇｒｅｓｓ，ｉｎ Ｅｘｐｅｒｔ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｖａｃｃｉｎｅｓ，Ｖｏｌｕｍｅ １４，２０１５，Ｉｓｓｕｅ １２，ｐｐ．１５８７－１６０８）。このレビューにおいては、臨床現場の情報および実験データがまとめられ、比較されていて、ストレプトコッカス・スイスに対するワクチン開発の現状の概要が記載されている。

【０００４】

過去数年間で、抗原性または免疫原性ストレプトコッカス・スイス分子の網羅的なリストが報告されており、これらのほとんどは、感染したブタもしくはヒトからの回復期血清および／または実験室で生成された免疫血清を使用する免疫プロテオミクスによって見出された。ＷＯ２０１５／１８１３５６（ＩＤＴ Ｂｉｏｌｏｇｉｋａ ＧｍｂＨ）は、ＩｇＭプロテアーゼ抗原（該タンパク質全体、または該タンパク質全体の約３５％のみに相当する高度に保存されたＭａｃ－１ドメインのいずれか）が、バクテリンを含む初回ワクチン接種と所望により組合されてもよいＩｇＭプロテアーゼ抗原でのワクチン接種によって、子ブタにおいて防御免疫応答を誘発しうることを示している。’３５６特許出願にお

いては、ＩｇＭプロテアーゼ抗原は、全てではないとしてもほとんどのストレプトコッカス・スイス血清型、特に、最も優勢である血清型１、２、７および９にわたって高度に保存されているため、それは、ストレプトコッカス・スイス血清型、特に血清型１、２、７および９の間で広範な交差防御を達成するために使用されうると示唆されている。ＷＯ２０１７／００５９１３（Ｉｎｔｅｒｖａｃｃ　ＡＢ）は、ＩｇＭプロテアーゼが種々のストレプトコッカス・スイス血清型にわたって高度に保存されていることを確認している。

【０００５】

当技術分野においては、ＩｇＭプロテアーゼ抗原は、Ｓｅｅｌｅら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ ｐ．９３０－９４０，Ｍａｒｃｈ ２０１３，Ｖｏｌｕｍｅ １９５，Ｎｕｍｂｅｒ ５（“Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｎｏｖｅｌ Ｈｏｓｔ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＭ Ｐｒｏｔｅａｓｅ ｉｎ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ Ｓｕｉｓ”）において公開された技術を用いて製造されている。この技術においては、ＩｇＭプロテアーゼ抗原を大腸菌において組換え発現させ、天然条件下でNi^{2+}－ニトリロ三酢酸アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。この方法では、ＩｇＭプロテアーゼ抗原が高精製形態で得られうるが、収率は比較的低い。精製された抗原を薬学的に許容される担体と混合して、ストレプトコッカス・スイスによる病原性感染に対して防御するワクチンを得ることが可能である。

【発明の概要】

【０００６】

発明の目的

ＩｇＭプロテアーゼ抗原を含むワクチンの代替的な製造方法を提供することが本発明の目的である。

【０００７】

発明の概括

本発明の目的を達成するために、前記の「発明の全般的分野」の節に記載されているワクチンの製造方法を本発明において案出した。該製造方法は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）においてストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｉｓ）のＩｇＭプロテアーゼ抗原を組換え発現させ、大腸菌を少なくとも５００バールの圧力の高圧均質化操作に付して、大腸菌の細胞溶解と、得られたライセートの上清中へのＩｇＭプロテアーゼ抗原の遊離とを誘発し、ライセートのペレットから上清を分離し、ＩｇＭプロテアーゼ抗原を含む上清を薬学的に許容される担体と混合してワクチンを生成させることを含む。

【０００８】

大量のＩｇＭプロテアーゼを得るためには、大腸菌の細胞溶解が必要であることが判明した。どうやら、ＩｇＭプロテアーゼ抗原は該細菌によって上清中に遊離されないようである。しかし、十分な量の抗原が、大腸菌細胞の残屑に結合したままではなく実際に上清中に遊離されるためには、細胞を少なくとも５００バールの圧力の高圧均質化操作に付す必要があることも判明した。大量の抗原を上清中に遊離させることは、（相当量の）細胞残屑を含まないこの上清を、カラムによる高アフィニティー精製を要することなく、必要に応じて濾過、更なる清澄化、不活性化、濃縮などを行った後、抗原源として直接使用することによって、ワクチンが非常に簡便に製剤化されうる、という重要な利点を有する。そのような（または他の）精製は行われうるが、大腸菌自体に由来する他のタンパク質および小分子の存在はワクチンの安全性および有効性にとって主要な問題ではないことが判明した。したがって、本発明の方法を使用する場合には、精製工程が省略されうる。

【０００９】

本発明の方法は、実施が容易であり、高収量で適切なワクチンを生成する。本発明は、この方法を使用して得られるストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｉｓ）のＩｇＭプロテアーゼ抗原を含むワクチンにおいても具体化されている。このワクチンは、相当量の大腸菌タンパク質（特に、タンパク質の総量、すなわち総重量の５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、５０％以上または更にはそれ以上の割合

）および他の大腸菌化合物（例えば、多糖）がワクチン中に存在しうる点で、公知ワクチンとは異なる。

【００１０】

定義

ワクチンは、典型的には薬学的に許容される担体と組合されている、免疫学的に有効な量（すなわち、野生型微生物のチャレンジの負の効果を少なくとも低減するのに十分な程度に標的対象者の免疫系を刺激しうる量）の１以上の抗原を含む、対象への適用に適した組成物であり、これは、対象への投与に際して、感染を治療するための免疫応答を誘導し、すなわち、感染またはその感染に起因する疾患もしくは障害の予防、改善または治癒を助ける。

【００１１】

微生物による病原性感染に対する防御は、防御免疫を達成することとと同じであり、すなわち、その微生物による病原性感染またはその感染に起因する障害の予防、改善または治癒を助けて、例えば、実際の感染、または病原体による病原感染から生じる１以上の臨床徴候を予防または軽減することである。

【００１２】

ストレプトコッカス・スイスのＩｇＭプロテアーゼ抗原は、ブタＩｇＭ（ブタＩｇＧまたはブタＩｇＡではない；Ｓｅｅｌｅｒら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ，２０１３，１９５ ９３０－９４０；およびＶａｃｃｉｎｅ ３３：２２０７－２２１２；５ Ｍａｙ ２０１５）、ＩｄｅＳｓｕｉｓとして示されるタンパク質、またはそれらの免疫原性部分（典型的には、全長酵素の少なくとも約３０～３５％の長さを有する）を特異的に分解する酵素である。酵素全体は約１００～１２５ｋＤａの重量を有し、これは約１０００～１１５０アミノ酸に相当し、サイズはストレプトコッカス・スイスの血清型に左右される。ＷＯ２０１５／１８１３５６には、ストレプトコッカス・スイスのＩｇＭプロテアーゼ抗原を表す幾つかの配列、すなわち、配列番号１、配列番号２、配列番号６、配列番号７および配列番号５が示されており、後者は全長酵素の免疫原性部分（Ｍａｃ－１ドメインとして示されるもの、すなわち、配列番号７のアミノ酸８０～４１４）である。全長酵素の免疫原性部分の他の例はＷＯ２０１７／００５９１３に記載されている。特に、ＩｇＭプロテアーゼは、ＷＯ２０１５／１８１８３５６の配列番号１によるプロテアーゼ、または重複領域において少なくとも７０％、特に７５、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９％から１００％までの配列同一性を有するタンパク質でありうる。アミノ酸配列同一性は、ｂｌａｓｔｐアルゴリズムをデフォルトパラメータで使用するＢＬＡＳＴプログラムによって確認されうる。種々の血清型のストレプトコッカス・スイスのＩｇＭプロテアーゼは、７０％を超える配列同一性、特に７５、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９％から１００％までの配列同一性を有すると予想される。例えば、該抗原の組換え産生系における収量を最適化するように製造された人工タンパク質は、必要な免疫原性機能を維持しながら、全酵素と比較してより低いアミノ酸配列同一性、例えば８５％、８０％、７５％、７０％または更には６０％のアミノ酸配列同一性を有する可能性があり、本発明の意味でのストレプトコッカス・スイスのＩｇＭプロテアーゼ抗原であると理解される。

【００１３】

薬学的に許容される担体は、生体適合性媒体、すなわち、担体を含む組成物の投与の後に対象の免疫系に抗原を提示しうる、治療対象において投与後に有意な有害反応を誘発しない媒体である。そのような薬学的に許容される担体は、例えば、水および／または任意の他の生体適合性溶媒を含む液体、あるいは固体担体、例えば、凍結乾燥ワクチン（糖および／またはタンパク質に基づくもの）を得るために一般的に使用される固体担体であって、所望により免疫刺激剤（アジュバント）を含んでいてもよいものでありうる。所望により、安定剤、粘度調整剤、アジュバントまたは他の成分のような他の物質が、対応ワク

チンの意図される用途または必要な特性に応じて添加される。

【００１４】

上清は、結晶化、沈殿、遠心分離または他の処理の後に固体残渣の上に存在する液体である。

【００１５】

ペレットは、例えば遠心分離または他の沈殿方法の後の、不溶性沈殿物である。

【００１６】

高圧均質化は、液体を高圧で狭い隙間（典型的にはマイクロメートルの範囲）に押し込む機械操作であり、これによって非常に短い距離にわたって該液体の加速が生じ、それによって高いせん断応力が生じて、例えば粒子サイズが減少し、または細胞が細胞溶解する。用いられる典型的な圧力は１００～２０００バールである（Ｄｕｍｏｎｔら，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ ５４１（２０１８）１１７－１３５）。均質化プロセス中に適用されるエネルギーの量が多いほど、粒子サイズは小さくなり、細胞溶解がより完全になる。

【００１７】

顕微溶液化（マイクロフルイダイゼーション）は高圧均質化の一形態であり、これは、典型的には２０００バールまでの高圧の、互いに直角に配向した２つの微細ジェットが生成するように、液体をマイクロチャネルを介して相互作用チャンバー内に送ることによって働く。それらの２つの微小流（マイクロストリーム）が衝突すると、突然の圧力低下が生じ、衝突時に生じる乱流、空洞形成（キャビテーション）およびせん断効果の結果として均質化が生じる。マイクロフルイダイザー（ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚｅｒ）を通過する回数の増加は均質化を改善するが、通過が３回を超えると効果はほとんどない。顕微溶液化用の装置は、Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ（商標），Ｗｅｓｔｗｏｏｄ，ＭＡ，ＵＳＡから入手されうる。

【００１８】

フレンチ・プレッシャー・セル・プレス（「フレンチプレス」とも称される）は、高圧下で細胞を狭いバルブに通すことによって細胞の細胞膜を破壊するために生物学的実験で使用される装置である。それは、細胞核を乱さずに細胞壁を破壊しうる。フレンチプレスは、ワシントンのカーネギー研究所（Ｃａｒｎｅｇｉｅ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ）のチャールズ・ステイシー・フレンチ（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｓｔａｃｙ Ｆｒｅｎｃｈ）によって発明された。該プレスは外部の油圧ポンプを使用して、液体サンプルを含有する、より大きなシリンダー内のピストンを駆動する。次いで高加圧サンプルがニードルバルブを通過して搾り出される。サンプルがバルブを通過すると、流体は、せん断応力およびデコンプレッション（減圧）を受けて細胞破壊が生じる。

【００１９】

ストレプトコッカス・スイスの完全ＩｇＭプロテアーゼ抗原は、少なくとも、Ｍａｃ－１ドメイン、構造機能に関連する領域、ＣＮＶ領域および所望により細胞接着領域を含む抗原である（ストレプトコッカス・スイスのゲノムにおけるこれらの領域の特定に関しては、実施例１を参照されたい）。これが完全ＩｇＭプロテアーゼ抗原とみなされうるのは、シグナルペプチドは、天然に存在する（すなわち、野生型）分泌酵素にも存在しないと考えられており、細胞接着領域はプロテアーゼとしてのその機能に必須でないと考えられているからである。

【００２０】

本発明の追加的な実施形態

本発明の方法の第１の追加的な実施形態においては、高圧均質化操作中の圧力は少なくとも１０００バールである。このようにして、より多くのＩｇＭプロテアーゼ抗原が上清中に遊離される。好ましくは、高圧均質化操作中の圧力は少なくとも１３００バール、例えば１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００または更には少なくとも２０００バールである。

【００２１】

本発明による方法のもう１つの実施形態においては、高圧均質化操作を行うために使用される装置はフレンチ・プレッシャー・セル・プレスまたは顕微溶液化装置である。これらの装置は、本発明による方法を実施するのに特に適していることが判明した。好ましくは、顕微溶液化装置が使用される。

【００２２】

本発明による方法の更にもう１つの実施形態においては、ＩｇＭプロテアーゼ抗原は完全ＩｇＭプロテアーゼ抗原である。少なくともＭａｃ－１ドメイン、構造機能に関連した領域、ＣＮＶ領域および所望により細胞接着領域（ストレプトコッカス・スイスのゲノムにおけるこれらの領域の特定に関しては実施例１を参照されたい）を含むこのタイプの抗原は高レベルで発現可能であり、上清中に容易に遊離され、ワクチン抗原として非常に適していることが判明した。好ましくは、完全ＩｇＭプロテアーゼ抗原は血清型１、２または７のストレプトコッカス・スイス細菌のものである。抗原の組換え発現自体は血清型に左右されないが、これらの３つの血清型の抗原はストレプトコッカス・スイスの種々の血清型にわたって適度な防御をもたらすことが判明した。これに関しては、Ｉｎｔｅｒｖｅｔ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＢＶの名義で欧州特許庁に優先権出願として２０２１年８月３日付で出願された欧州特許出願ＥＰ２１１８９２８３．１（発明の名称：“Ａ ｖａｃｃｉｎｅ ｆｏｒ ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ａｇａｉｎｓｔ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｉｓ ｏｆ ｖａｒｉｏｕｓ ｓｅｒｏｔｙｐｅｓ”）を参照されたい。

【００２３】

次に、以下の特定の実施例を用いて、本発明を更に詳細に説明することとする。

【００２４】

実施例

実施例１：ストレプトコッカス・スイスのゲノムの構造分析

実施例２：全ＩｇＭプロテアーゼ抗原を含むワクチンの製造

実施例３：ワクチンの防御効果

【００２５】

実施例１

本実施例においては、ストレプトコッカス・スイスのゲノム、すなわち、ＩｇＭプロテアーゼをコードする部分の分析を記載して、該ゲノムのこの部分がどのように構造化されているかを示す。このために、ＷＯ２０１５／１８１３５６から公知であり、その特許出願において配列番号１として公開されている血清型２細菌のストレプトコッカス・スイスのゲノムを使用する。該配列は本特許の配列表に配列番号１として再度記載されている。タンパク質アノテーション（ＰＤＢＳｕｍおよびＩｎｔｅｒＰｒｏ）に加えてＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアライメント（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら，１９７０；Ｌａｓｋｏｗｓｋｉら，１９９７；Ａｐｗｅｉｌｅｒら，２０００；デフォルト設定を参照されたい）を使用する配列類似性検索は、５つの領域が特定さるるＩｇＭプロテアーゼゲノムの構造を示している。

【００２６】

領域１（Ｍｅｔ１～Ｔｈｒ３４）：１位からのシグナル配列；

領域２（Ｖａｌ３５～Ｇｌｕ４２６）：推定ヒドロラーゼ活性を有するＭａｃ－１ドメイン；

領域３（Ｔｈｒ４２７～Ｐｒｏ６８７）：構造機能（例えば、適切なフォールディングに関与するもの）および基質結合に関連する領域；

領域４（Ｔｈｒ６８８～Ｓｅｒ９１９）：ヒドロラーゼ活性を有する公知タンパク質配列に対する類似性を有する４つの反復（１＊｛Ｔｈｒ６８８～Ｓｅｒ７４４｝、２＊｛Ｔｈｒ７４５～Ｓｅｒ８０１｝、３＊｛Ｔｈｒ８０２～Ｓｅｒ８５８｝、４＊｛Ｔｈｒ８５９～Ｓｅｒ９１９｝）からなる領域；これは、ゲノムのセクションが反復される、いわゆるＣＮＶ領域（コピー数変異領域）である；

領域５（Ｔｈｒ９２０～Ｌｙｓ１１４１）：細胞壁アンカー機能を示す推定膜貫通領域（細胞接着領域）を含有する。

【００２７】
他の血清型のストレプトコッカス・スイス細菌の構造はほぼ同じであるが、最も顕著な差異はＣＮＶ領域における反復数である。
【００２８】
実施例２
本実施例においては、ＩｇＭプロテアーゼ抗原を含むワクチンの製造方法を示す。Ｓｅｅｌｅら（２０１３；前記を参照されたい）に記載されている方法を用い、ＢＬ２１－ＡＩ（ＤＥ３）プラスミドを使用して、血清型２および血清型７のストレプトコッカス・スイス株の全ＩｇＭプロテアーゼ遺伝子を大腸菌内にクローニングした。誘導因子として、ラクトースと組合されたアラビノースを使用した。
【００２９】
大腸菌細胞を、ラクトース、グルコース、グリセロール、酵母エキス、イーストラート、ＮａＣｌ、KH_2PO_4および$Na_2HPO4\times2H_2O$を含有する動物成分非含有培地内で培養した。まず、３７℃で穏やかに振とうされた振とうフラスコの前培養を使用して、細胞を指数関数増殖期の中期まで増殖させた。次に、同じ培地を使用して、１５Ｌ培養規模の実験室規模の発酵槽に、１％の接種物比率で細胞を接種した。４Ｍ　ＮａＯＨおよび４Ｍ　酢酸溶液を使用して、ｐＨを７．０に制御した。撹拌速度、気流および純酸素のカスケード制御を使用して、溶存酸素（ｐＯ２）を５０％に制御した。温度を３７℃に制御した。培地内のグルコースが枯渇（ＣＥＤＥＸ分析装置を使用して判定した）するとすぐに、誘導因子としてアラビノースを添加した。適度なＩｇＭプロテアーゼタンパク質濃度を得るために、培養を更に３時間継続した。
【００３０】
この後、大腸菌細胞を培養から回収し、培地または０．０４Ｍ　ＰＢＳ緩衝液中で、未濃縮状態で冷蔵保存し、あるいは遠心分離を用いて４倍まで濃縮した。その後、３０．０００ＰＳＩ（２０６８バール）の顕微溶液化装置（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）またはフレンチ・プレス・ホモジナイザー（６００～２０００バールの範囲）を使用して、細胞を破壊した。最後に、細胞破壊後の全画分を遠心分離し、上清およびペレットを分離し、ＢＰＬ（ベータプロピオラクトン）を使用して不活性化した。公知ＢＳＡシリーズを参照体として用い、ＳＤＳゲルを使用して、タンパク質収量を測定した。ＩｇＭプロテアーゼはそれ以上は精製しなかった。
【００３１】
細胞破壊中の圧力の影響を調べるために、顕微溶液化装置またはフレンチプレスにおいて、種々の圧力で大腸菌細胞（血清型２）を破壊する幾つかの実験を行った。表１は、細胞破壊中に適用した圧力と、細胞破壊後の遠心分離後の上清中のＩｇＭプロテアーゼタンパク質の回収率との関係を示す。回収率は、細胞破壊および遠心分離後の上清中のＩｇＭプロテアーゼタンパク質濃度を、細胞破壊後かつ遠心分離前のＩｇＭプロテアーゼタンパク質濃度（つまり、全割合）で割り算し、１００％を掛け算することによって計算する。装置のタイプの有意な影響は見られず、適用された圧力のみによる影響が見られた。

【表１】

表 1 上清中の IgM プロテアーゼ抗原の回収率

圧力 (bar)	回収率 (%)
100	5%*
600	30%
1300	60%
2000	100%

* 外挿によって決定

【００３２】

実施例３

この実施例３においては、実施例２の方法を使用して得られた抗原を使用して製造されたワクチンの防御効果を示す。

【００３３】

研究デザイン

実施例２に従い得られた上清を、ＭＳＤ Ａｎｉｍａｌ Ｈｅａｌｔｈから入手可能な（水中油型）アジュバントＸ－Ｓｏｌｖｅと混合して、第１ワクチンの場合には１ｍｌ当たり３５μｇのＩｇＭプロテアーゼの濃度、および第２ワクチンの場合には（油性アジュバントは同量で）１ｍｌ当たり３．５μｇのＩｇＭプロテアーゼの濃度とすることによって、ワクチンを製剤化した。この研究には、３０頭の３週齢の子ブタを使用した。これらの子ブタを、それぞれ子ブタ１０頭の３つの群に割り当てた（異なる同腹子を各群に均等に分配した）。群１および２には、３週齢および５週齢で、異なるワクチンを筋肉内に２回接種した。群１には、ワクチン接種当たり２ｍｌの第１ワクチン（すなわち、ワクチン接種当たり７０μｇの抗原）を接種し、群２には、ワクチン接種当たり２ｍｌの第２ワクチン（すなわち、用量当たり７μｇのＩｇＭプロテアーゼ抗原）を接種した。群３はワクチン未接種のチャレンジ対照として残した。７週齢で、子ブタをチャレンジ室に移動させ、直ちにチャレンジした。自然ストレスを模擬するために、移動とチャレンジとの間に順応期間を設けなかった。チャレンジ後、ストレプトコッカス・スイス感染の臨床徴候（例えば、意気消沈、運動障害および／または神経学的徴候）に関して子ブタを毎日観察し、０（徴候なし）から３（重症例）までの通常のスコア化系を用いてスコア付けした。重篤な影響を受けた動物を安楽死させ、死後検査した。研究終了時（チャレンジの１１日後）に、全ての生存したブタを安楽死させ、死後検査した。ワクチン接種およびチャレンジの直前に、抗体測定のために血清を採取した。チャレンジの前および後の定期的な時点において、チャレンジ株の再分離のためにヘパリン血を採取した。

【００３４】

結果

該ワクチンはいずれも、部位または全身の許容し得ない反応を誘発しなかったため、安全であると見なされうる。ワクチン接種の当日（３週齢）、ほとんどのブタは、低い乃至中等度の母体由来抗体価を有していた。ワクチン接種後、全てのワクチン群が抗体応答を示した（データ非表示）。チャレンジ後の種々のパラメータに関する結果を以下の表２に示す（生存期間は日数で示されている）。

【表２】

表２ チャレンジ後のデータ

群	平均生存期間	平均臨床スコア	陽性血液の数	チャレンジ後の死亡数
1	9.4	14.9	3/10	3/10
2	8.6	21.5	3/10	3/10
3	3.4	64.9	9/10	8/10

【００３５】

結論

結果は、該ワクチンが、第２ワクチン接種の２週間後に、病原性ストレプトコッカス・スイスでのチャレンジに対する子ブタにおける防御を誘導したことを実証している。わずか７μｇのワクチン用量が、十分な防御効果をもたらすことが可能であった。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/082177

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/09 A61P31/04 C07K14/315
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C12R A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/181356 A1 (IDT BIOLOG GMBH [DE]) 3 December 2015 (2015-12-03) cited in the application	8,9
Y	claim 2	1-7
Y	WO 2017/134274 A1 (VON PAWEL-RAMMINGEN ULRICH [SE]; SPOERRY CHRISTIAN [SE]) 10 August 2017 (2017-08-10) page 32	1-7

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 January 2023	23/01/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Scheffzyk, Irmgard

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/082177

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEELE J ET AL: "Identification of a novel host-specific IgM protease in Streptococcus suis", JOURNAL OF BACTERIOLOGY : JB, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 195, no. 5, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 930-940, XP002729856, ISSN: 1098-5530, DOI: 10.1128/JB.01875-12 [retrieved on 2012-12-14] cited in the application	8,9
Y	the whole document	1-7
Y	Rick Mehigh: "Molecular Biology Lysis of E.coli for the Purification of Soluble Recombinant Proteins using CelLytic-B TM and CelLytic-B TM II", , 1 January 2001 (2001-01-01), XP055148428, Retrieved from the Internet: URL:https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/vol2-issue2-ecoli.pdf [retrieved on 2014-10-23] abstract	1-7

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/082177

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015181356 A1	03-12-2015	AU 2015265884 A1	08-12-2016
		BR 112016028066 A2	24-10-2017
		CA 2947798 A1	03-12-2015
		CN 106561082 A	12-04-2017
		CN 113769076 A	10-12-2021
		DE 202015009979 U1	23-05-2022
		DK 3148576 T3	18-01-2021
		EP 2949340 A1	02-12-2015
		EP 3148576 A1	05-04-2017
		EP 3795174 A1	24-03-2021
		ES 2846698 T3	28-07-2021
		HU E053084 T2	28-06-2021
		JP 6670304 B2	18-03-2020
		JP 6909268 B2	28-07-2021
		JP 2017518367 A	06-07-2017
		JP 2020019816 A	06-02-2020
		KR 20170005855 A	16-01-2017
		MY 178365 A	09-10-2020
		PL 3148576 T3	04-05-2021
		PT 3148576 T	01-02-2021
		US 2017209561 A1	27-07-2017
		US 2021015910 A1	21-01-2021
		US 2022401543 A1	22-12-2022
		WO 2015181356 A1	03-12-2015
		ZA 201607627 B	30-09-2020
WO 2017134274 A1	10-08-2017	AU 2017214441 A1	16-08-2018
		CA 3013527 A1	10-08-2017
		CN 109311951 A	05-02-2019
		DK 3411389 T3	21-06-2021
		EP 3411389 A1	12-12-2018
		ES 2877754 T3	17-11-2021
		JP 7123801 B2	23-08-2022
		JP 2019506866 A	14-03-2019
		JP 2022115853 A	09-08-2022
		KR 20180124857 A	21-11-2018
		PL 3411389 T3	25-10-2021
		PT 3411389 T	28-06-2021
		SG 11201806639V A	27-09-2018
		US 2019345533 A1	14-11-2019
		WO 2017134274 A1	10-08-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/31　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/31	
Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	1/21	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　安藤 健司
(74)代理人　100183519
弁理士　櫻田 芳恵
(74)代理人　100196483
弁理士　川嵜 洋祐
(74)代理人　100160255
弁理士　市川 祐輔
(74)代理人　100216839
弁理士　大石 敏幸
(74)代理人　100228980
弁理士　副島 由加里
(74)代理人　100151448
弁理士　青木 孝博
(74)代理人　100146318
弁理士　岩瀬 吉和
(74)代理人　100127812
弁理士　城山 康文
(72)発明者　ジェイコブス，アントニウス・アーノルドゥス・クリスチャン
オランダ国、５８３１・アー・エヌ・ボックスメール、ウイム・ドゥ・コルベルストラート・３５
(72)発明者　ブロン，レムコ
オランダ国、５８３１・アー・エヌ・ボックスメール、ウイム・ドゥ・コルベルストラート・３５

Ｆターム（参考）　4B065　AA26X AA49Y AB01 AC14 BA01 CA33 CA45
4C084　AA13 NA05 ZB091 ZB092 ZB351 ZB352
4C085　AA03 BA14 CC07 DD62 EE01