

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-521605  
(P2014-521605A)

(43) 公表日 平成26年8月28日(2014.8.28)

(51) Int.Cl.

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**C07K 14/40** (2006.01)

F 1

A 61 K 39/00  
A 61 P 31/04  
A 61 K 39/00  
C 07 K 14/40

H  
K  
Z N A

テーマコード(参考)

4 C 085  
4 H 045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2014-521610 (P2014-521610)  
(86) (22) 出願日 平成24年7月20日 (2012.7.20)  
(85) 翻訳文提出日 平成26年3月12日 (2014.3.12)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2012/000328  
(87) 国際公開番号 WO2013/015831  
(87) 国際公開日 平成25年1月31日 (2013.1.31)  
(31) 優先権主張番号 61/510,896  
(32) 優先日 平成23年7月22日 (2011.7.22)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 514017909  
ノバダイム セラピューティクス, イン  
コーポレイテッド  
アメリカ合衆国 ノース ダコタ 582  
02, グランド フォークス, ジェイ  
ムズ レイ ドライブ 4201, アー  
ルイエーシー 1 ビルディング, ス  
イート 2200

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Staphylococcus aureus* に対してワクチン接種するための方法および組成物

## (57) 【要約】

本発明は、*Staphylococcus aureus* に対して哺乳動物をワクチン接種する方法を特徴とし、この方法は、以下：a) *Staphylococcus aureus* 皮膚または軟部組織感染を発症するリスクのある哺乳動物を同定する工程；およびb) 当該哺乳動物に、薬学的に受容可能な媒体中、単離したアグルチニン様配列 (Als) 3タンパク質 (Als3p)、またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを含む、免疫原性量のワクチンを投与する工程を含む。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

*Staphylococcus aureus*に対して哺乳動物をワクチン接種する方法であって、該方法は：

a) *Staphylococcus aureus*皮膚または軟部組織感染を発症するリスクがある哺乳動物を同定する工程；ならびに

b) 該哺乳動物に、薬学的に受容可能な媒体中、単離したアグルチニン様配列（A1s）3タンパク質（A1s3p）、またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを含む、免疫原性量のワクチンを投与する工程を包含する、方法。

10

**【請求項 2】**

前記A1s3タンパク質が、*Candida albicans*、*Candida krusei*、*Candida tropicalis*、*Candida glabrata*および*Candida parapsilosis*からなる群より選択される*Candida*株に由来するA1sタンパク質を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記ポリペプチドが、*Candida albicans*のA1s3pを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記ポリペプチドが、*Candida albicans*のA1s3pのN末端ドメインまたはその免疫原性断片を含む、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記ポリペプチドがA1s3pであり、該A1s3pのアミノ酸配列は、配列番号1または配列番号2からなる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記ポリペプチドが、A1s3pの免疫原性断片であり、該A1s3pのアミノ酸配列は、配列番号1または配列番号2からなる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記*Staphylococcus aureus*が、*Staphylococcus aureus*のMRSA株である、請求項1に記載の方法。

30

**【請求項 8】**

前記*Staphylococcus aureus*が、*Staphylococcus aureus*のMSSA株である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記*Staphylococcus aureus*が、*Staphylococcus aureus*のパンコマイシン耐性（VRSA）株またはダブトマイシン耐性（DRSA）株である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記ポリペプチドが、担体に結合体化されている、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記担体が、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、CRM197、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、エンテロトキシンB断片または*N. meningitidis*外膜タンパク質複合体を含む、請求項10に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

前記担体が、ファージ、酵母、ウイルス、ビロソームまたは組換えウイルス様粒子である、請求項10に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記ワクチンが、筋肉内、皮下、皮内、経口、または舌下投与によって投与されるか、あるいは微粒子処方物での吸入のために投与される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 14】**

50

前記投与する工程が、追加抗原量を投与することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記ワクチンが、免疫刺激アジュバントを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 16】**

抗生物質を投与する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記抗生物質が、前記ワクチンと共に処方されるか、または該ワクチンと共に投与される、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記ワクチンが薬学的組成物として投与される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 19】**

哺乳動物における *Staphylococcus aureus* 皮膚または軟部組織感染を処置または予防する方法で使用するための、単離した Al s 3 タンパク質またはその免疫原性断片を含むワクチン。

**【請求項 20】**

前記 Al s 3 タンパク質が、*Candida albicans*、*Candida krusei*、*Candida tropicalis*、*Candida glabrata* および *Candida parapsilosis* からなる群より選択される *Candida* 株に由来する Al s 3 タンパク質を含む、請求項 19 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 21】**

前記ポリペプチドが、*Candida albicans* の Al s 3 p を含む、請求項 19 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 22】**

前記ポリペプチドが、*Candida albicans* の Al s 3 p の N 末端ドメインまたはその免疫原性断片を含む、請求項 19 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 23】**

前記ポリペプチドが Al s 3 p であり、該 Al s 3 p のアミノ酸配列は、配列番号 1 または配列番号 2 からなる、請求項 19 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 24】**

前記ポリペプチドが、Al s 3 p の免疫原性断片であり、該 Al s 3 p のアミノ酸配列は、配列番号 1 または配列番号 2 からなる、請求項 19 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 25】**

前記 *Staphylococcus aureus* が、*Staphylococcus aureus* の MRSA 株である、請求項 19 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 26】**

前記 *Staphylococcus aureus* が、*Staphylococcus aureus* の MSSA 株である、請求項 19 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 27】**

前記 *Staphylococcus aureus* が、*Staphylococcus aureus* のバンコマイシン耐性 (VRSA) 株またはダブトマイシン耐性 (DRSA) 株である、請求項 19 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 28】**

前記ポリペプチドが、担体に結合体化されている、請求項 19 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 29】**

前記担体が、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、CRM197、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、エンテロトキシンB断片または *N. meningitidis* 外膜タンパク質複合体を含む、請求項 28 に記載の使用のためのワクチン。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 0】**

前記担体が、ファージ、酵母、ウイルス、ビロソームまたは組換えウイルス様粒子である、請求項 2 8 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 3 1】**

前記ワクチンが、筋肉内、皮下、皮内、経口、または舌下投与によって投与されるか、あるいは微粒子処方物での吸入のために投与される、請求項 1 9 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 3 2】**

前記投与することが、追加抗原量を投与することをさらに含む、請求項 1 9 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 3 3】**

前記ワクチンが、免疫刺激アジュvantを含む、請求項 1 9 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 3 4】**

抗生物質を投与することをさらに含む、請求項 1 9 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 3 5】**

前記抗生物質が、前記ワクチンと共に処方されるか、または該ワクチンと共に投与される、請求項 3 4 に記載の使用のためのワクチン。

**【請求項 3 6】**

前記ワクチンが薬学的組成物として投与される、請求項 1 9 に記載の使用のためのワクチン。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

関連出願への相互参照

この出願は、2011年7月22日に出願された米国仮出願第 61 / 510,896 号（これは、参考として本明細書に援用される）に対する優先権の利益を主張する。

**【0 0 0 2】**

連邦政府によって資金提供された研究についての声明

本発明は、管理獲得部門としても働く The U. S. Army Medical Research Acquisition Activity、820 Chandler Street、Fort Detrick MD 21702-5014 によって付与された the Department of the Army Award 第 W81XWH-10-2-0035 号によって資金提供された。本明細書に開示された情報の内容は、政府の立場または方針を必ずしも反映するものではなく、また正式の公認が推察されるべきものでもない。政府は、本発明に一定の権利を有する。

**【背景技術】****【0 0 0 3】**

本発明は、*Staphylococcus aureus* に対するワクチンに関する。

**【0 0 0 4】**

*Staphylococcus aureus* は、蜂巣炎およびフルンケル症を含む、皮膚および皮膚構造感染の主な原因であり、そして菌血症の最もよくある原因の 1 つである。メチシリン耐性表現型を示す *S. aureus* (MRSA) 株は、免疫適格性宿主における侵襲性疾患、免疫抑制（例えば好中球減少症、固体臓器または骨髄移植）における、および再発する皮膚感染を示す遺伝性免疫機能不全（例えばヨブ症候群、慢性肉芽腫性疾患）におけるものを含む、医療および市中感染の主な原因である。適当な抗菌薬治療によっても、侵襲性 *S. aureus* 疾患に関連する死亡率が高いことを考慮すると（例えば、菌血症および心内膜炎において 15 ~ 40 %）、公衆衛生に対する MRSA の有意な影響は、特別に重要である。生命を脅かす感染の率の増大および抗生物質に対する感受性

の低下が、*Staphylococcus aureus*を標的とした有効なワクチンの開発を必要とする。本発明は、このニーズを満たす。

**【発明の概要】**

**【課題を解決するための手段】**

**【0005】**

本発明は一般的に、以下の工程を含む、*Staphylococcus aureus*に対して哺乳動物をワクチン接種する方法に関する：a) *Staphylococcus aureus*皮膚または軟部組織感染を発症するリスクがある哺乳動物（例えば、ヒト、または家畜、例えばウシ種、ウマ種、ブタ種またはヒツジ種、または飼育哺乳動物、例えばイヌまたはネコのような、非ヒト哺乳動物）を同定する工程；およびb) 当該哺乳動物に、薬学的に受容可能な媒体中、単離したアグルチニン様配列（A1s）3タンパク質（A1s3p）、またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを含む、免疫原性量のワクチンを投与する工程。代表的なポリペプチドは、*Candida albicans* A1s3p（例えば、図1Aに示すA1s3p、例えば配列番号1または配列番号2、またはその免疫原性断片）を含む。他の実施態様において、そのポリペプチドは、*Candida albicans* A1s3pのN末端ドメインまたはその免疫原性断片を含む。本明細書中で開示される方法は、*S. aureus*のメチシリン耐性*Staphylococcus aureus*（MRSA）株に対するワクチン接種のために特に有用である。本明細書中で開示される方法はまた、*S. aureus*の他の薬剤耐性*S. aureus*（例えばバンコマイシン耐性、ダプトマイシン耐性等）、またはメチシリン感受性*S. aureus*（MSSA）株に対するワクチン接種のために有用である。他の実施態様において、そのポリペプチドを、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、CRM197、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、エンテロトキシンB断片、*N. meningitidis*外膜タンパク質複合体、または当該分野において結合体ワクチンに使用されるあらゆる他の担体タンパク質のような担体に結合体化させる。そのような担体はまた、ファージ、酵母、ウイルス、ビロソーム、または組換えウイルス様粒子を含み得る。そのワクチンを、一般的に、筋肉内、皮下、皮内、経口、または舌下投与によって投与する、または微粒子処方物において吸入のために投与する。もし望ましいなら、そのワクチンを、追加抗原量として投与し得る。そのワクチンは任意で、免疫刺激アジュバントを含み得る。さらに他の実施態様において、その方法は、ワクチンと組み合わせて、*S. aureus*に対する抗生物質を投与することを含み、例えばここで、その抗生物質を、ワクチンと共に（co-formulate）または共投与（co-administer）する。

**【0006】**

別の局面において、本発明は、以下の工程を含む、*Staphylococcus aureus*に対して哺乳動物（例えばヒト、または家畜、例えばウシ種、ウマ種、ブタ種またはヒツジ種、または飼育哺乳動物、例えばイヌまたはネコのような、非ヒト哺乳動物）をワクチン接種する方法を特徴とする：a) *Staphylococcus aureus*皮膚または軟部組織感染を発症するリスクのある哺乳動物を同定する工程；およびb) 当該哺乳動物に、薬学的に受容可能な媒体中、1本鎖または2本鎖DNAまたはRNA、2本鎖DNAプラスミドまたはウイルスベクターを含み得る、適当な送達ビヒクルに組込まれた、A1s3p、またはその免疫原性断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば単離ポリヌクレオチド）を含む、有効な量のワクチンを投与する工程であって、ここでそのポリヌクレオチドは、インビボで発現し、そしてその哺乳動物は免疫反応を生じる、工程。そのポリヌクレオチドを含むワクチンは、哺乳動物において、免疫反応、例えばA1s3pに対する特異性を示す抗A1s3p抗体の産生を誘発する。

**【0007】**

さらに別の局面において、本発明は、哺乳動物において*Staphylococcus aureus*皮膚または軟部組織感染を処置または予防する方法において使用するための、単離A1s3タンパク質、またはその免疫原性断片を特徴とする。

10

20

30

40

50

## 【0008】

別の局面において、本発明は、哺乳動物において *Staphylococcus aureus* 皮膚または軟部組織感染を処置または予防する方法において使用するための、単離 *A1s3* タンパク質、またはその免疫原性断片を含むワクチンを特徴とする。

## 【0009】

単離タンパク質またはワクチンを調製するために有用なそのような *A1s3p* は、*Candida albicans*、*Candida krusei*、*Candida tropicalis*、*Candida glabrata*、および *Candida parapsilosis* において同定されたもの、および公的に利用可能なデータベースの検索によって同定された *A1s3* タンパク質を含む。

10

## 【0010】

さらに別の局面において、本発明は、単離 *A1s3* タンパク質を特徴とし、ここでその単離 *A1s3* タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 2 から成る。

## 【0011】

さらに別の局面において、本発明は、単離 *A1s3* タンパク質、および薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を特徴とし、ここでその単離 *A1s3* タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 2 から成る。

## 【0012】

さらに別の局面において、本発明は、単離 *A1s3* タンパク質を含むワクチンを特徴とし、ここでその単離 *A1s3* タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 2 から成る。いくつかの実施態様において、そのタンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、CRM197、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、エンテロトキシン B 断片、*N. meningitidis* 外膜タンパク質複合体、または当該分野において結合型ワクチンに使用されるあらゆる他の担体タンパク質のような担体に結合体化させる。そのような担体はまた、ファージ、酵母、ウイルス、ビロソーム、または組換えウイルス様粒子を含み得る。そのワクチンを、一般的に、筋肉内、皮下、皮内、経口、または舌下投与によって投与する、または微粒子処方物において吸入のために投与する。もし望ましいなら、そのワクチンを、追加抗原量として投与し得る。そのワクチンは任意で、免疫刺激アジュバントを含み得る。他の実施態様において、そのワクチンは、単離 *A1s3* タンパク質と、例えば *Candida albicans*、*Candida krusei*、*Candida tropicalis*、*Candida glabrata*、および *Candida parapsilosis* からなる群より選択される *Candida* 株由来の、1つまたはそれより多い他の単離 *A1s3* タンパク質との組み合わせを含み得る。

20

## 【0013】

別の局面において、本発明は、薬学的に受容可能な媒体中、1本鎖または2本鎖DNAまたはRNA、2本鎖DNAプラスミドまたはウイルスベクターを含み得る、適当な送達ビヒクルに組込まれた、*A1s3p*、またはその免疫原性断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば単離ポリヌクレオチド）を含むワクチンを特徴とする。例えば、免疫原性 *A1s3* ポリヌクレオチドワクチン、例えば部分的にまたはその全体として、配列番号第3番を含むか、またはそれからなり、かつワクチンとして使用するために適当な核酸配列を、例えば *A1s3* 遺伝子またはその断片、例えば *A1s3p* の免疫原性断片をコードする断片から調製し得る。そのワクチンはさらに、*A1s3p* またはその免疫原性断片と同時発現する、免疫刺激ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る。そのようなポリヌクレオチドワクチンを、例えばポリヌクレオチド投与のための生理学的に受容可能な液体溶液またはエマルジョン中で、注射剤として調製し得る。核酸リポソーム（例えば、国際公開第WO93/24640において記載されたような）またはポリヌクレオチドは、アジュバントと結合し得るので、そのポリヌクレオチドは、レシチンリポソームまたは当該分野で公知の他のリポソームのようなリポソームに結合し得る。陽イオン性脂質を含むリポソームは、DNAおよびRNAのようなポリアニオンと自発的にかつ迅速に相互作用し、100%までのポリヌクレオチドを捕捉するリポソーム／核

30

40

50

酸複合体を生じる。それに加えて、ポリカチオン性複合体は、細胞膜と融合し、リソソーム区画の分解酵素を回避する、ポリヌクレオチドの細胞内送達をもたらす。国際公開第W094/27435は、陽イオン性脂質およびポリヌクレオチドを含む、遺伝子免疫化のための組成物を記載する。カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、エレクトロポレーション、および他のトランスフェクション促進剤のような、ポリヌクレオチドの細胞取り込みを補助する薬剤を、有利に使用し得る。液体形態および再構築される凍結乾燥形態はどちらも、好ましくは緩衝液を、注射溶液のpHを適切に調節するために必要な量で含む。

## 【0014】

「*Staphylococcus aureus* 皮膚または軟部組織感染」、「*Staphylococcus aureus* SSTI」、「*Staphylococcus aureus* 皮膚／皮膚構造感染」、および「*Staphylococcus aureus* SSSI」は、本明細書中で交換可能に使用され、そして切り傷、すり傷、刺し傷、または他の創傷が皮膚を破壊した部位で、*S. aureus* が身体に入ることから起こる、皮膚または軟部組織感染（例えば蜂巣炎、軟部組織膿瘍、皮膚壞死、筋炎、または他の感染）を指す。いくつかの場合において、*S. aureus* SSSIは、身体上に生存する*S. aureus* の結果であり、そして皮膚損傷または創傷の目に見える部位が無く自然に起こり得る。そのような感染は、皮膚の層、または筋肉および結合組織（靭帯、腱、および身体の他の支持構造を形成する組織の組み合わさったフレームワーク）のような、より深い組織に影響を与える。皮膚膿瘍はまた、身体が*S. aureus* 感染と戦った皮膚の領域で起こり得る。皮膚または軟部組織感染の原因となる、より重要な*S. aureus* の株は、メチシリン耐性*Staphylococcus aureus* (MRSA)として公知である、抗生物質耐性*Staphylococcus*である；*S. aureus* のバンコマイシン耐性およびダブトマイシン耐性株も、SSSIを引き起こし得る。MRSAは、普通の抗生物質に対して耐性である。*Staphylococcus aureus* SSSIは、メチシリン感受性*Staphylococcus aureus* (MSSA)によっても引き起こされ得る。

## 【0015】

*S. aureus* 皮膚または軟部組織感染を発症するリスクのある哺乳動物を、予防的様式で処置し得る。あるいは、哺乳動物を、*S. aureus* 皮膚または軟部組織感染の症状を示す場合に処置し得る。本明細書中で記載されるワクチン接種は、症状の重症度を低減する、その発症を遅延または予防する。哺乳動物は、入院している、または施設コミュニティーに住んでいる、抗生物質処置している、またはHIV/AIDSまたは免疫機能を損なう他の疾患を有する小児を含んで免疫抑制されている、医療システムと頻繁に接触する個体である、糖尿病、癌、HIV/AIDSのような慢性疾患を有する、非常に若年または非常に高齢である、頻繁に抗生物質を使用する、開放創、皮膚炎または皮膚病変を有する、栄養不足または不衛生であるなら、感染のリスクは上昇する。他のリスクのある哺乳動物は、過密な生活状態で住む人々、軍人、特に配備された部隊、アスリート、および刑務所の囚人を含む。*S. aureus* 皮膚または軟部組織感染を発症するリスクのあるさらに他の人は、以前にそのような感染を有していた個体、または外科的または侵襲的医療手順を予定している、またはそれを受けた個体である。

## 【0016】

「Als3p」によって、図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列と、またはGenBank : XP\_710431.1、XP\_710435.1、AAO72959.1、XP\_712646.1、XP\_712666.1、EAK91173.1、EAK91169.1、AAO72958.1、EAK93494.1、EAK93472.1、O74623.1、AAD02580.1、EAK90704.1、XP\_709985.1で同定される、Candida ALS3タンパク質と実質的に同一であるポリペプチドを意味する。望ましくは、Als3pは、図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配列番号2と、少なくとも70、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性さえ有する。

10

20

30

40

50

## 【0017】

「A1s3p断片」または「A1s3pの断片」によって、1050、1025、1000、975、950、または945より少ないアミノ酸を含む、A1s3pポリペプチドの部分を意味する。いくつかの実施態様において、A1s3p断片は、300および350の間、または250から500アミノ酸の長さである。いくつかの実施態様において、その断片は、1050、1025、1000、975、950、または945、940、937、936、935、934、933、932、931、または930、920、910、900、890、880、870、860、850、840、830、820、810、800、790、780、770、760、750、740、730、720、710、700、690、680、670、660、650、640、630、620、610、600、590、580、570、560、550、540、530、520、510、500、490、480、470、460、450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15、または10アミノ酸より少なく、そしていくつかの場合、免疫原性である。

## 【0018】

代表的なA1s3p断片は、図1Aに示すような、配列番号2、またはその断片である。いくつかの場合、A1s3p断片は、長さが14および20アミノ酸の間である。一般的に、その断片は、例えば325、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、または11アミノ酸より少なくあり得、そして望ましくは、免疫原性である。いくつかの場合、A1s3p断片は、14および20アミノ酸の間である。

## 【0019】

それに加えて、例えば、A1s3p断片は、図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配列番号2に、1つまたはそれより多い保存的アミノ酸置換を含み得る。さらなる望ましいA1s3p断片は、図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配列番号2に、1つまたはそれより多い保存的アミノ酸置換、および/または図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配列番号2のNおよび/またはC末端に、少なくとも1つの隣接アミノ酸（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の隣接アミノ酸）を含む。他の好ましいA1s3p断片は、図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配列番号2の、7つまたはそれより多い連続的アミノ酸を含む。

## 【0020】

A1s3p断片の制限しない例は、図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配列番号2の、アミノ酸1-40、10-50、20-60、30-70、40-80、50-90、60-100、70-110、80-120、90-130、100-140、110-150、120-160、130-170、140-180、150-190、160-200、170-210、180-220、190-230、200-240、210-250、220-260、230-270、240-280、250-290、および260-300、270-310、280-320、および290-331アミノ酸；および以下の特徴のうちの1つまたはそれより多くを有するこれらの断片を含む：図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配列番号2における、1つまたはそれより多い保存的アミノ酸置換（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16個の保存的アミノ酸置換）；図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配列番号2のNおよび/またはC末端からの、1つまたはそれより多いアミノ酸（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16アミノ酸）の短縮；および図1Aに示す配列、例えば配列番号1または配

列番号 2 の N および / または C 末端における、少なくとも 1 つの隣接アミノ酸（例えば 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、または 10 個の隣接アミノ酸）。

【 0021 】

「実質的に同一」によって、参照配列と少なくとも 50 % の同一性を示すアミノ酸配列または核酸配列を意味する。そのような配列は一般的に、参照配列に対して、アミノ酸レベルまたは核酸レベルにおいて、少なくとも、例えば 50 % 、 60 % 、 70 % 、 75 % 、 80 % 、 85 % 、 90 % 、 95 % 、 96 % 、 97 % 、 98 % 、または 99 % 同一である。一般的に、ポリペプチドに関して、比較配列の長さは、少なくとも 5 アミノ酸、例えば 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 125 、 150 、 175 、 200 、 250 、 300 、またはそれより長いアミノ酸、そのポリペプチドの全長まであり得る。核酸に関して、比較配列の長さは一般的に、少なくとも 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 125 、 150 、 175 、 200 、 250 、 300 、 400 、 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、またはそれより長いヌクレオチド、その核酸分子の全長まであり得る。DNA 配列を RNA 配列に対して比較する場合、配列同一性を決定する目的のために、チミンヌクレオチドは、ウラシルヌクレオチドと同等であることが理解される。

【 0022 】

本明細書中で列挙したあらゆる Alanyl ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸配列も企図される。

【 0023 】

本明細書中で使用する場合、ポリペプチドまたは核酸配列が、参照配列に対して「少なくとも X % の配列同一性」を有すると言われるなら、配列を最適に整列した場合に、そのポリペプチドまたは核酸中の少なくとも X パーセントのアミノ酸またはヌクレオチドが、参照配列のものと同一であることを意味する。配列の最適な整列を、当該分野の技術の範囲内である、様々な方法で、例えば Smith Waterman 整列アルゴリズム (Smithら、 J. Mol. Biol. 147 : 195 - 7 、 1981 ) および BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altshulら、 J. Mol. Biol. 215 : 403 - 10 、 1990 ) で決定し得る。これらのおよび他の整列アルゴリズムは、 Gene Matcher Plus TM (Schwarz や Dayhoff 、 Atlas of Protein Sequence and Structure 、 Dayhoff , M. O. 編、 353 - 358 頁、 1979 ) に組込まれた、「 Best Fit 」 (Smith や Waterman 、 Advances in Applied Mathematics 、 482 - 489 、 1981 ) 、 BLAST 、 BLAST - 2 、 BLAST - P 、 BLAST - N 、 BLAST - X 、 WU - BLAST - 2 、 ALIGN 、 ALIGN - 2 、 CLUSTAL 、または Megalign (DNASTAR) のような、公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを用いて利用可能である。それに加えて、当業者は、比較する配列の長さにわたって最適な整列を達成するために必要なあらゆるアルゴリズムを含む、整列を測定するための適当なパラメーターを決定し得る。

【 0024 】

「アジュvant」によって、免疫系の刺激を引き起こす、 1 つまたはそれより多い物質を意味する。この文脈において、アジュvantを、 1 つまたはそれより多いワクチン抗原または抗体に対する免疫反応を増強するために使用する。アジュvantを、ワクチンまたは抗体の投与の前に、それと組み合わせて、またはその後に、被験体に投与し得る。アジュvantとして使用される化学的化合物の例は、アルミニウム化合物（例えばミョウバン、アルハイドロゲル）、油、ブロックポリマー、免疫刺激複合体、ビタミンおよびミネラル（例えばビタミン E 、ビタミン A 、セレン、およびビタミン B12 ）、 QuilA ( サポニン ) 、細菌および真菌細胞壁成分（例えば、リボ多糖、リポタンパク質、および糖タンパク質）、ホルモン、サイトカイン、および共起刺激因子を含むがこれに限らない。

【 0025 】

10

20

30

40

50

結合体の文脈において、「担体」によって、本明細書中で記載したようなポリペプチドに連結される、またはそれを提示するために適當な部分または粒子、例えばK L H、C R M 1 9 7、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、エンテロトキシンB断片、N . m e n i n g i t i d e s外膜タンパク質複合体、あらゆる他の担体タンパク質、ファージ、酵母、ウイルス、ビロソーム、または組換えウイルス様粒子を意味する。

## 【0026】

「結合体」によって、別の部分または粒子、例えばK L H、C R M 1 9 7、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、エンテロトキシンB断片、N . m e n i n g i t i d e s外膜タンパク質複合体、あらゆる他の担体タンパク質、ファージ、酵母、ウイルス、ビロソーム、または組換えウイルス様粒子に連結した本発明のポリペプチドを含む化合物を意味する。10

## 【0027】

「免疫原性」によって、被験体において免疫反応を誘発し得るあらゆる物質を意味する。。

## 【0028】

ワクチンの文脈において、「免疫原性量」によって、臨床的に関連のある様式で、被験体において免疫反応を誘発するために必要なワクチンの量を意味する。本明細書中で記載したようなワクチン接種の方法を実施するために使用するワクチンの免疫原性量は、投与の様式、被験体の年齢、体重、および一般的な健康に依存して変動する。最終的に、処方者が適當な量および投与レジメンを決定する。20

## 【0029】

「単離した」または「精製した」によって、他の天然に付隨する成分から分離していることを意味する。典型的には、化合物（例えば核酸、ポリペプチド、抗体、または小分子）は、重量で少なくとも60%、それが天然に結合しているタンパク質および/または天然に存在する有機分子を含まないなら、それは實質的に単離されている。その定義はまた、例えばその隣接配列から分離されたポリペプチドまたは核酸分子にも拡大される（例えば、アミノ酸配列に関して、単離されていることは、その配列がポリペプチド中で天然に結合している隣接アミノ酸を含まない配列を指す）。いくつかの例において、その化合物は、重量で少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%単離されている。単離された化合物、例えばポリペプチドを、標準的な技術、例えば天然の供給源からの抽出によって（例えばC a n d i d aが感染した細胞からの精製）；E . c o l iまたはS a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a eを含むがこれに限らないあらゆる標準的な発現システムにおける、A l s 3 p、A l s 3 p断片または改变体、またはその融合タンパク質をコードする組換え核酸の発現によって；またはポリペプチドを化学的に合成することによって、得ることができる。純度を、あらゆる適當な方法によって、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはH P L C分析によって測定し得る。30

## 【0030】

結合体の文脈において、「連結した」または「結合体化した」によって、ポリペプチドおよび担体または融合パートナーの間の、共有結合または非共有結合相互作用を意味する。非共有結合相互作用は、水素結合、荷電した基間のイオン性相互作用、静電性の結合、ファンデルワールス相互作用、非極性基間の疎水性相互作用、疎油性相互作用、およびL o g Pに基づく引力を含むがこれに限らない。40

## 【0031】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は、交換可能に使用され、そして翻訳後修飾（例えばグリコシル化またはリン酸化）に関わらず、本明細書中で記載するような、天然に存在する、または天然に存在しないポリペプチドまたはペプチドの全てまたは一部を構成する、2つまたはそれより多い天然または非天然アミノ酸のあらゆる鎖を指す。

## 【0032】

1020304050

「薬学的に受容可能な担体」および「薬学的に受容可能な賦形剤」という用語は、交換可能に使用され、そしてそれと一緒に投与される化合物の治療的性質を保持しながら、処置される哺乳動物にとって生理学的に受容可能な担体または賦形剤を意味する。1つの代表的な薬学的に受容可能な担体物質は、生理食塩水である。他の生理学的に受容可能な担体およびその処方は、当業者に公知であり、そして例えば Remington's Pharmaceutical Sciences (第21版)、A. Gennaro編、2005、Lippincott、Williams & Wilkins、Philadelphia、PAにおいて記載されている。

#### 【0033】

「薬学的組成物」によって、薬学的に受容可能な賦形剤と共に処方され、そして哺乳動物における疾患または事象の処置または予防のための治療レジメンの一部として、政府規制当局の認可によって製造または販売される、本発明のポリペプチド、結合体、ワクチン、または抗体を含む組成物を意味する。薬学的組成物を、例えば静脈内投与のために（例えば粒子性塞栓を含まない滅菌溶液として、および静脈内で使用するために適当な溶媒システムで）、経口投与のために（例えば錠剤、カプセル、カプレット（caplet）、ジェルカプセル（gelcap）、またはシロップ）、または本明細書中で記載されるあらゆる他の処方物、例えば単位剤形で処方し得る。

#### 【0034】

「処置すること」または「処置」によって、薬学的組成物を投与することによって、疾患、病理学的状態、障害、または事象を、治癒する、寛解させる、安定化させる、可能性を低減する、または予防する意図による、哺乳動物、例えばヒトまたは非ヒト哺乳動物の医学的管理を意味する。この用語は、積極的処置、すなわち、疾患、病理学的状態、障害、または事象の改善を明確に目指した、またはその治癒に関連する処置を含み、そしてまた原因療法、すなわち関連する疾患、病理学的状態、障害、または事象の原因の除去へ向けた処置を含む。それに加えて、この用語は、緩和処置、すなわち疾患、病理学的状態、障害、または事象の治癒よりも症状の軽減のためにデザインされた処置；症候性処置、すなわち関連する疾患、病理学的状態、障害、または事象の体质的な症状に対する処置；予防的処置、すなわち例えばまだ病気ではないが、特定の疾患、病理学的状態、障害、または事象にかかりやすい、さもなければそのリスクのある哺乳動物において、関連する疾患、病理学的状態、障害、または事象の発症を最小限にする、または部分的にまたは完全に阻害するための処置；および支持療法、すなわち関連する疾患、病理学的状態、障害、または事象の改善に向けた別の特定の治療を補助するために採用される処置を含む。

#### 【0035】

本明細書中で使用される「ワクチン」によって、それが投与される被験体において免疫反応を誘発する組成物を意味する。投与の様式、用量、および投与の回数を、当業者が公知の方法で最適化し得る。

#### 【0036】

本明細書中で使用される「ワクチン接種する」または「ワクチン接種」によって、例えば疾患、病理学的状態、障害、または事象を予防または寛解させるために、ワクチンを投与することによって哺乳動物を処置することを意味する。

#### 【0037】

本発明の他の特徴および利点が、以下の詳細な説明、図面、および特許請求の範囲から明らかになる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0038】

【図1A】図1Aは、2つのAl-s3pアミノ酸配列、配列番号1および配列番号2の一覧である。

#### 【図1B】図1Bは、1つのAl-s3核酸配列、配列番号第3番の一覧である。

【図2】図2は、インビボイメージングによって評価された、NDV-3の比較有効性動態を示す写真のセットである。その写真は、感染後2、4、および7日目の各投与量群の

10

20

30

40

50

マウスを示す。

【図3】図3は、NDV-3がマウスSSSIにおいてMRSA膿瘍体積を制限することを示す表である。その表は、コントロール群および3μg、10μg、30μg、および100μgのNDV-3投与量群の平均体積(cm<sup>3</sup>) / 膿瘍を示す。

【図4】図4は、NDV-3がマウスSSSIにおいてMRSA膿瘍体積を制限することを示す、1対の写真である。左、コントロール群のマウス、右、100μgのNDV-3投与量群のマウス。

【図5】図5は、NDV-3がマウスSSSIにおいてMRSAの増殖を抑制することを示す表である。その表は、コントロール群、および3μg、10μg、30μg、および100μgのNDV-3投与量群の、平均フラックス(f lux) / 膿瘍を示す。

【図6】図6は、NDV-3が、MRSAの増殖を制限し、そして好中球をリクルートすることを示す画像のセットである。示したデータは、感染後7日目の、100μg NDV-3投与量群に由来する。

【図7】図7は、NDV-3が、CD3+T細胞をリクルートし、そしてIL-17の発現を誘発することを示す画像のセットである。示したデータは、感染後7日目の、100μgのNDV-3投与量群に由来する。

【図8】図8は、NDV-3が、IL-22発現および - デフェンシン反応を刺激することを示す画像のセットである。示したデータは、感染後7日目の100μgのNDV-3投与量群に由来する。

【図9】図9は、コントロールマウスおよびワクチン接種マウスのメジアン側腹部膿瘍面積を示す図表である。

【図10】図10は、コントロールマウスおよびワクチン接種マウスのメジアン側腹部膿瘍体積を示す図表である。

【図11】図11は、感染後7日目のコントロールマウスおよびワクチン接種マウスにおけるMRSA株による平均膿瘍体積を示す図表である。アスタリスクは、それぞれのコントロールと比較して有意な低減を示す。

【図12】図12は、NDV-3(100μg)ワクチン接種マウス由来の、MRSA膿瘍の合成免疫蛍光画像である。

【図13】図13は、コントロールマウス由来の、MRSA膿瘍の合成免疫蛍光画像である。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0039】

特許または出願ファイルは、カラーの図面(図2、4、6-8、12、および13)を含む。カラーの図面を有するこの特許または特許出願公開のコピーが、リクエストおよび必要な料金の支払い時に受理官庁によって提供される。

##### 【0040】

下記で記載されるように、アグルチニン様配列3タンパク質(A1s3p)は、S. aureus皮膚または軟部組織感染を発症するリスクがあると同定された哺乳動物において、S. aureusに対するワクチン接種を可能にする。

##### 【0041】

MRSA皮膚/皮膚構造感染(SSSI)のマウスマルクにおいて、S. aureusに起因する皮膚または軟部組織感染の発症に対する、A1s3pワクチンの有効性を評価するためにデザインされた以下の分析において(特に、実施例1の予備研究および実施例2の最適化研究)、生物および方法をまず説明する。

##### 【0042】

生物

MRSA株

MRSA Xe n 3 0 ( lux + ) R o c h e - 1 6

MRSA L A C - U S A 3 0 0 U S A 3 0 0

MRSA M W 2 U S A 4 0 0 。

10

20

30

40

50

## 【0043】

*S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s* 株 X e n 3 0 を、これらのインビオ研究において使用した。それは親株 *S . a u r e u s* M R S A - 1 6 ( R o c h e ) 由来であり、そして単一の染色体組み込み部位に *l u x A - E* オペロンを含む。この M R S A 株は、ルシフェラーゼ酵素およびアルデヒド基質を产生し、そして代謝的に活性な場合、構成的に生物発光シグナルを発する。そのビルレンスは、予備研究において証明されたように、使用した S S S I マウスモデルにおいて他の M R S A 株と同等であり、そして試験した全ての株は、他は同様の表現型および増殖の特徴を有する。対数期の細胞 ( B H I ; 3 7 ) を、望ましい C F U まで、定量的およびビルレンス確認マスター細胞バンクから培養し、回収および P B S に懸濁し、超音波処理し、そして分光測定によって定量した。

10

## 【0044】

## 方法

N D V - 3 ワクチンの有効性を、マウス S S S I モデルにおいて、メチシリソ耐性 S A ( M R S A ) : X e n 3 0 ( *l u x +* ) ; L A C U S A 3 0 0 ; または M W 2 ( U S A 4 0 0 ) に対して評価した。N D V - 3 は、リン酸緩衝化食塩水、p H 7 中、C a n d i d a 表面タンパク質 A 1 s 3 タンパク質 ( 図 1 A ; 配列番号 2 ) の組換え N 末端およびアジュバントであるアルハイドロゲル ( 登録商標 ) の処方物であり、例えば 0 . 5 m L の用量は例えば 3 0 - 3 0 0  $\mu$  g の A 1 s 3 タンパク質を含み、そして任意でさらに水酸化アルミニウムを 1 . 0 m g A 1 / m L で含む。0 日目にアルハイドロゲルアジュバント ( I M ) と共に投与し、そして 2 1 日目に追加刺激した N D V - 3 レジメン間で、有効性を比較した。コントロールにはアジュバントのみを投与した。2 ケ所の側腹部の皮下接種 ( 2  $\times$  1 0 <sup>7</sup> C F U ) による感染を、追加刺激の 1 4 日後に行った。膿瘍面積、体積、および C F U を、チャレンジ後の複数の日に定量した。膿瘍のフラックスのインビオイメージング ( I V I S ) を、X e n 3 0 によって感染したマウスにおいて行った。血清 I g G ( E L I S A ) 、 I F N - および I L - 1 7 A ( E L I S p o t ) 反応を、並行したワクチンレジメンで定量した。組織 I L - 1 7 A 、 I L - 2 2 、 m D - 3 、 C D 3 + 細胞および好中球シグナルを、免疫組織化学によって、感染後 7 日目に評価した。

20

## 【0045】

ワクチン。N D V - 3 ワクチン接種を、アルハイドロゲルアジュバントの同じレジメンを用いて、用量範囲にわたって評価した。3 、 1 0 、 3 0 、 1 0 0 、 または 3 0 0  $\mu$  g ( I M ) の用量を、並行して試験した。一次ワクチン接種 ( 0 日目 ) に続いて、研究 2 1 日目に同じ追加刺激を行った。マウスを、追加刺激後 1 4 日目 ( 試験 3 5 日目 ) に感染させた。

30

## 【0046】

S S S I のマウスモデル。全ての動物実験を、H a r b o r - U C L A における L A B i o M e d の認可された動物使用ポリシーにしたがって行った。B a l b / C マウス ( H a r l a n ) を、上記のようにワクチン接種した。皮下皮膚 / 軟部組織膿瘍モデルを、これらの試験のために、D i n g ら ( J B a c t e r i o l 2 0 0 8 1 9 0 : 7 1 2 3 - 9 ) および / または V o y i c h ら ( J I n f e c t D i s 2 0 0 6 1 9 4 : 1 7 6 1 - 1 7 7 0 ) から修飾した。試験 3 5 日目、マウスを麻酔し、側腹部の毛を剃り、そして滅菌し、そして 2  $\times$  1 0 <sup>7</sup> C F U の接種材料 ( ビーズもマトリックスも無し ) を、注射 ( 1 0 0  $\mu$  l ) によって皮下区画に導入した。コントロール群またはワクチンレジメン群あたり最低 2 0 匹のマウスを、各試験で使用した。

40

## 【0047】

膿瘍の定量。チャレンジ後 1 4 日目までの試験期間、膿瘍の面積 / 体積を、各マウス側腹部において測定した。そのために、マウスを麻酔し、そして病変部位の長さ ( l ) および幅 ( w ) を評価して膿瘍または皮膚壞死面積を定量した ( c m <sup>2</sup> ) 。球面橢円体の式 : [ v = ( / 6 )  $\times$  l  $\times$  w <sup>2</sup> ] によって、膿瘍の体積 ( c m <sup>3</sup> ) を計算した。

## 【0048】

イメージング研究。X e n 3 0 M R S A 株は、その染色体に組込まれた自己完結型 1

50

u xオペロンを有する。その構築物は、アルデヒド基質およびルシフェラーゼ酵素自体をコードする；従って、外来性のルシフェリン基質は必要ない（Kadurugamuwala、Infect Immun 2003 71：882-890）。選択した試験において、コントロールおよびワクチン接種したマウスで、IVISシステム（Caliper Life Sciences, Inc.）を用いて、インビボイメージング（IVIS）を行った。5分間にわたって発光シグナルを捕捉し、そしてLiving Imageソフトウェアを用いて、光子／分／膿瘍として分析した。

## 【0049】

定量的培養。前もって選択した感染後の時間に、マウスを人道的に屠殺し、そして膿瘍の定量的培養のために処理した。各側腹部を無菌的に解剖し、膿瘍を除去し、そして培養のために調製した。膿瘍を個々にホモジナイズし、そしてヒツジ血液寒天プレート上の定量的培養のために、滅菌PBS中で連続的に希釈した。培養物を24時間インキュベートし（37）、そしてできたコロニーを数えた。

10

## 【0050】

免疫学的メカニズム。MRS AによるSSSIのマウスモデルにおける、NDV-3ワクチンの有効性の潜在的な関連を評価するために、複数かつ補完的なアプローチを使用した。これらの研究はXen30株に焦点を合わせ、7dエンドポイントでのIVISデータとの関連を可能にした。

## 【0051】

A. 抗体の定量。血清IgG抗体レベルを、ある範囲の希釈で、96ウェルELISAフォーマットで決定した。値は、免疫化血清対コントロール血清を比較して、三連のアッセイの幾何平均補正希釈を示す。

20

## 【0052】

B. サイトカインの定量。T細胞IFN- $\alpha$ およびIL-17A反応を、免疫化マウス対コントロールマウスから単離し、そしてNDV-3免疫原に曝露した脾細胞のELISPOT分析によって決定した。スポット形成単位（SPUまたはSFU、交換可能に使用される）の数を、IFN- $\alpha$ またはIL-17Aのいずれかを産生する、 $10^6$ 細胞ごとに定量した。細胞生存度を、確立されたプロトコールによって、ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート（PMA）およびイオノマイシンによる刺激後のIFN- $\alpha$ の産生によって確認した。

30

## 【0053】

C. 免疫組織化学。ワクチンの有効性に関する免疫学的決定要因を、標準的な方法によって、感染の7日後にワクチン接種動物およびコントロール動物から得た組織において評価した。免疫組織化学的研究のために、手短に言えば、 $3\text{ }\mu\text{m}$ の垂直パラフィン包埋切片を脱ろうし、そして再水和し、続いて標的回復溶液中で熱誘導抗原回復を行った（Dako、Carpinteria、CA）。切片を、室温で15分間、dual endogenous blocking buffer（Dako）とインキュベートして、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックし、そして非特異的抗体結合を、一次抗体に対応する5%の正常血清とインキュベートすることによってブロックした。次いで切片を、関心のある特定の抗原を標的とする一次抗体と、4度一晩インキュベートした（表1）。次いで切片を洗浄し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合体化されたかまたはビオチン化されたかのいずれかの適当な二次抗体（表1）と30分間インキュベートした（Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA）。次いで免疫組織化学的展開を、ストレプトアビシン-HRP（Dako）および3,3'-ジアミノベンジジン（DAB；Vector Laboratories、Burlingame、CA）による30分の展開によって達成し、そしてヘマトキシリソ对比染色した。画像捕捉のためにDP21デジタルカメラを採用するOlympus BX43顕微鏡を用いて、画像を視覚化した。

40

## 【0054】

D. 免疫蛍光。インビボにおける感染の状況で、NDV-3ワクチン接種の、免疫原性

50

決定要因および *S. aureus* の相互関係に対する影響を評価するために、共焦点顕微鏡法を採用する免疫蛍光研究を、確立した方法を用いて行った。簡単には、パラフィン包埋切片を上記のように調製し、そして免疫蛍光緩衝液（1%のウシ血清アルブミンおよび2%のウシ胎仔血清）と、室温で1時間インキュベートした。関心のある標的抗原に対する一次抗体（表1）を、コントロールまたはワクチン接種マウス由来の組織切片と、4で一晩インキュベートした。次に、IFF緩衝液に希釗した対応する二次抗体（表1）（2 μg/ml）を、60分間インキュベートした。次いで切片をPBSで洗浄し、そして光退色を最低限にするために、Vectashield - 1500（Vector Laboratories、Burlingame、CA）を用いてマウントした。アルゴン（488 nm）、クリプトン（568 nm）、およびヘリウム-ネオン（633 nm）レーザーを採用するLeica SP2共焦点顕微鏡、および共焦点バージョン2.0ソフトウェア（Leica Instruments、Germany）を用いて、画像を視覚化した。

#### 【0055】

表1. 免疫組織化学または免疫蛍光研究のために使用した抗体

##### 一次抗体

##### 標的抗原

Ly-6G (顆粒球)		
Ly-6C (単球 / マクロファージ)		
マウス - デフェンシン-1 (mBD-1)		20
マウス - デフェンシン-3 (mBD-3)		
マウス血小板第4因子 (PF-4)		
Staphylococcus aureus (マウス)		
Staphylococcus aureus (ウサギ)		
Staphylococcal プロテインA		
CD3 -		
CD3 -		
IL-17		
IL-22		30

##### 二次抗体

Alexa488 - 結合体化ロバ	- ウサギ
Alexa488 - 結合体化ロバ	- ラット
Alexa555 - 結合体化ヤギ	- ラット
Alexa568 - 結合体化ロバ	- ウサギ
Alexa633 - 結合体化ロバ	- ヤギ
Alexa647 - 結合体化ロバ	- ウサギ
Alexa633 - 結合体化ストレプトアビジン	。

#### 【0056】

統計学的分析。実験結果の差を、群あたり16～20匹のマウスが、組織1g、または膿瘍面積2mmあたり、CFUの110gの差を検出するために>85%の検出力（power）を生じることを示す検出力の推定値に基づいて比較した（ $\alpha = 0.05$ ；マンホイットニーのU検定）。P値を表2および表3で規定する（下記）。

#### 【実施例】

#### 【0057】

##### 実施例1

予備試験において、NDV-3によるワクチン接種は、MRSAによるSSSIパラメーターを低減し、Xen30、USA300、およびMW2株に関して、膿瘍面積、体積、およびCFUの制限において同等の有効性であった。マウス免疫反応は、NDV-3の用量関連保護有効性と相關していた。これらの結果を表2および図2に示す。これらの結

果は、N D V - 3 ワクチンが、確固としたB細胞反応およびT細胞反応を誘発したことを見出し、それはS S S IのマウスモデルにおけるM R S Aに対する保護有効性に対応する。

### 【0058】

#### 【表2】

表2. MRS A Xen30 SSSIIにおけるNDV-3の有効性およびマウスモデルにおける免疫反応

腫瘍	コントロール	3μg	10μg	30μg	100μg	300μg
面積 7d	1.88cm <sup>2</sup>	1.47cm <sup>2</sup> *	1.59cm <sup>2</sup> *	0.99cm <sup>2</sup> ††	0.77cm <sup>2</sup> ††	0.69cm <sup>2</sup> ††
体積 7d	1.29cm <sup>3</sup>	0.95cm <sup>3</sup> *	0.96cm <sup>3</sup> **	0.46cm <sup>3</sup> ††	0.34cm <sup>3</sup> ††	0.29cm <sup>3</sup> ††
フラックス 7d	1.92x10 <sup>5</sup>	1.48x10 <sup>5</sup> *	1.81x10 <sup>5</sup>	1.07x10 <sup>5</sup> *	1.65x10 <sup>5</sup> *	9.03x10 <sup>4</sup> ††
メジアン Log CFU 7d IM	7.9 (7.6/8.0) [n=36]	7.8 (7.8/7.8) [n=20]	8.1 (7.8/7.8) [n=20]	8.1 (7.9/7.9) [n=36]	7.9 (7.5/8.0) [n=36]	7.5† (7.4/7.8) [n=36]
メジアン Log CFU 14d IM	1.70 (1.0/2.8) [n=48]	0.05△†† (0.05/1.3) [n=39]	ND	ND	0.05△†† (0.05/1.7) [n=39]	1.48 (0.05/2.6) [n=17]
メジアン Log CFU 14d SubQ	3.54 (2.6/6.9) [n=20]	3.92 (3.2/5.5) [n=20]	ND	ND	2.26** (1.8/3.6) [n=20]	2.40** (1.4/3.8) [n=20]
分析物						
IgG	1.0 GCU	44.8 GCU††	ND	97.8 GCU††	81.8 GCU††	ND
IFN-γ	9.5 SPU	12.8 SPU	ND	21.9 SPU	34.3 SPU*	ND
IL-17	18.9 SPU	132.6 SPU††	ND	62.2 SPU	161.2 SPU**	ND

(25%／75%四分位数); \*P<0.5; \*\*P<0.1; †P<0.05; ††P<0.01; GCU、幾何平均(geomean)／希釈補正単位; SPU、平均スポット形成単位／10<sup>6</sup>脾臓細胞; △検出限界。

### 【0059】

#### 分析

N D V - 3 ワクチンは、このM R S A S S S Iのマウスモデルにおいて、腫瘍面積、体積、発光シグナル、およびC F U密度を有意に低減した。N D V - 3 の有効性は、この研究において評価したM R S A株のそれぞれに関して同等であった。感染でチャレンジしたものと同一にワクチン接種したマウス由来の免疫学的データは、N D V - 3 ワクチンが、確固としたB細胞反応およびT細胞反応を誘発したことを示し、それは用量-反応関係を反映しているようである。感染でチャレンジしたものと同一にワクチン接種したマウス由来の免疫学的データは、N D V - 3 ワクチンが、確固としたB細胞反応およびT細胞反応を誘発したことを示し、それは用量-反応関係を反映する。全体として、これらの結果は、N D V - 3 が、主に保護有効性と関連するようである、混合T h 1 / T h 1 7反応を誘発するという証拠を提供する。抗体反応が、N D V - 3 の保護メカニズムに寄与し得る。これらの結果は、N D V - 3 ワクチンが、哺乳動物においてM R S A皮膚感染もしくは腫瘍またはそれらの両方を、予防または軽減するための手段として有用であることを示す。

### 【0060】

#### 実施例 2

さらなる最適化した分析を行い、そして結果を表3および図3-8にまとめる。実施例1と同様、この研究は、メチシリノ耐性S A (M R S A)による皮膚/皮膚構造感染のマウスモデルにおいて、N D V - 3 ワクチンの有効性および免疫学的メカニズムを評価した。腫瘍サイズ、M R S A密度およびC F Uを、N D V - 3 免疫化群およびコントロール群で時間をわたって比較した。I g G、I F N 、I L - 1 7 Aの血清濃度、組織I L - 1 7 A、I L - 2 2 、およびm D - 3 の誘導、およびN D V - 3 によって媒介されるC D 3 + T細胞または好中球の浸潤を、並行して決定した。N D V - 3 免疫化は、アジュバント単独と比較して、腫瘍面積、体積、細菌密度およびC F Uに関して、M R S Aに対する保護有効性を達成した。N D V - 3 の保護有効性は、血清I g G、T h 1 - T h 1 7 極性化の血清および組織バイオマーカー、および腫瘍の状況における対応する好中球の浸潤お

10

20

30

40

50

より宿主防御ペプチド誘発の増大に対応した。これらのデータはさらに、N D V - 3 免疫化は、皮膚および粘膜の状況において、M R S A に対する保護有効性の確固としたB細胞メカニズムおよびT細胞メカニズムを誘発することを示した。

#### 【0061】

##### 結果

N D V - 3 は、アジュバント単独に対して減少した膿瘍面積、体積、およびC F U によって測定されるように、M R S A に対して有効であった（表3）。皮膚壊死の面積および膿瘍体積によって測定した有効性は、試験した全ての株で同等であった。血清I g G、T h 1 ( I F N - ) およびT h 1 7 ( I L - 1 7 ) 極性化の血清および組織バイオマーカーの有意な増大（表3）、好中球の浸潤（L y 6 G）、I L - 2 2 の生成、およびm D - 3 の誘発が、N D V - 3 保護有効性と関連していた（図3-8）。

10

#### 【0062】

##### 【表3】

表3. マウスSSSIにおけるMRSAXen30に対するNDV-3有効性および免疫反応

膿瘍	コントロール	3μg	10μg	100μg
面積 d7	1.88cm <sup>2</sup>	1.47cm <sup>2</sup> *	1.59cm <sup>2</sup> *	0.77cm <sup>2</sup> ††
体積 d7	1.29cm <sup>3</sup>	0.95cm <sup>3</sup> *	0.96cm <sup>3</sup> **	0.38cm <sup>3</sup> ††
フラックス d7	3.22x10 <sup>5</sup>	1.48x10 <sup>5</sup> *	2.15x10 <sup>5</sup> *	1.06x10 <sup>5</sup> **
幾何平均 Log CFU d7 IM	7.50 (8.0/7.4) <sup>a</sup> [n=54]	6.23 <sup>†</sup> (6.4/6.1) [n=20]	6.68 <sup>†</sup> (6.8/6.4) [n=20]	6.05 <sup>†</sup> (6.2/5.6) [n=20]
分析物				
IgG	1.0 GCU <sup>b</sup>	44.8 GCU ††	ND	81.8 GCU ††
IFN-γ	9.5 SFU <sup>c</sup>	12.8 SFU	ND	34.3 SFU *
IL-17	18.9 SFU	132.6 SFU ††	ND	161.2 SFU **

a 平均分散

b G C U 、幾何平均／希釈補正単位

c S P U 、平均スポット形成単位／10<sup>6</sup>脾細胞

\*P<0.5 ; \*\*P<0.1 ; †P<0.05 ; ††P<0.01

20

#### 【0063】

##### 結論

N D V - 3 は、マウスSSSIにおいて、M R S A に対する保護有効性を誘発した。有効性の免疫学的メカニズムは、感染の状況において好中球および宿主防御ペプチドを標的化および調整する、T h 1 - T h 1 7 パラダイムと一致する、確固としたB細胞反応およびT細胞反応を含む。

30

#### 【0064】

##### 実施例3

X e n 3 0 M R S A およびM R S A の比較株によるSSSIのマウスマルクスモデルにおいて、N D V - 3 ワクチンの有効性を評価するために、さらなるセットの実験を行った。実験を、実施例1および2で記載したように行った。ワクチン有効性対時間のメジアンデータ動態を、図9（コントロールマウスおよびワクチン接種マウスのメジアン側腹部膿瘍面積）および図10（コントロールマウスおよびワクチン接種マウスの平均側腹部膿瘍体積）に示す。これらのデータは、N D V - 3 によるワクチン接種が、特に3 μ g より高い投与量において、膿瘍の発達を抑制することを確認する。

40

#### 【0065】

それに加えて、ワクチンの有効性を、3つの異なるM R S A 株：X e n 3 0 、U S A 3 0 0 、およびM W 2 に対して試験した。M R S A 株それぞれに関して、ネガティブコントロールおよび100 μ g の投与量群を試験した。感染後7日目の平均病変体積を、図11に示したように決定した。各株は、同じ接種材料（2 × 10<sup>7</sup>）であった。これらの実験において、M W 2 は低いビルレンスを示した。

#### 【0066】

50

そのデータは、試験したM R S A 株に関わらず、N D V - 3 ワクチンは、膿瘍体積の制限において同等の有効性（例えば約50%の低減）を有することを示す。従って、N D V - 3 の有効性は、M R S A 株特異的ではない。

#### 【0067】

##### 実施例4

さらなる実験のセットにおいて、M R S A 膿瘍の合成免疫蛍光画像を記録および分析した。図12は、N D V - 3 (100 μg) ワクチン接種マウス由来の代表的なM R S A 膿瘍の合成免疫蛍光画像であり、そして図13は、コントロールマウス由来の代表的なM R S A 膿瘍の合成免疫蛍光画像である。

#### 【0068】

上記の画像それぞれにおいて、画像の各成分は約500倍に拡大した、同じ病変のものである。免疫蛍光シグナルは、低倍率で解像するのが困難であるので、高倍率で、病変の各部分で画像を記録し、皮膚の表皮から皮下へ、そして皮下組織まで移動する。従って、成分を合成して、病変中のS. aureus（青）、好中球（赤）、およびCD3+T細胞（緑）の連続的免疫蛍光マップを図解し、そして免疫蛍光の解像に十分な倍率を維持する。その画像成分は、膿瘍免疫表現型の直接比較のために、N D V - 3 およびコントロール病変の等価な領域を体系的に捕捉するよう位置づけた高倍率視野の関数（function）を示す。

#### 【0069】

図12および13が明らかにするように、N D V - 3 ワクチン接種膿瘍において、M R S A 生物は少ししか存在せず（青）、そしてそれらは表皮に限られ、CD3+T細胞（緑）の流入によって媒介される好中球（赤）の浸潤がある。対照的に、コントロール膿瘍において、多くのM R S A 生物が存在し、そしてそれらは2つの別の領域（表皮および皮下組織）に侵襲しており、実質的により少ない好中球およびCD3+細胞浸潤と対応する。図12および13に示す画像は個々の病変由来であるが、それらは全体としてワクチン接種群およびコントロール群の病変の代表であり、そして前の実施例で記載された定量的な発見と一致している。

#### 【0070】

##### 実施例5

本明細書中で記載される組成物および方法を、例えばStaphylococcus aureusに対して、Staphylococcus aureus皮膚または軟部組織感染を発症するリスクのあるヒトをワクチン接種するために使用し得る。最初に、S. aureus SSSSIを発症するリスクのあるヒトを同定する。2番目に、そのヒトに、薬学的に受容可能な媒体中に、A1s3pまたはその免疫原性断片を含むポリペプチドを含む免疫原性量のワクチンを投与する。例えば、そのヒトに、用量あたり、3および1000 μgの間のCandida表面タンパク質A1s3（配列番号2）の組換えN末端を含む、1および3用量の間のN D V - 3 を投与し、2週間から6ヶ月の間隔で複数回用量を与える。

#### 【0071】

ワクチンの投与後に、そのヒトは1ヶ月から数年またはそれより長く続く期間、S. aureus SSSSIの発症のリスクが低下することが予測される。

#### 【0072】

同様に、S. aureus SSSSIを有すると同定されたヒトを、薬学的に受容可能な媒体中に、A1s3p、またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを含む、免疫原性量の薬学的組成物の投与によって処置し得る。例えば、そのヒトに、用量あたり3および1000 μgの間のCandida表面タンパク質A1s3（配列番号2）の組換えN末端を含む、1および3用量の間のN D V - 3 を投与し、2週間から6ヶ月の間隔で複数回用量を与える。

#### 【0073】

その薬学的組成物の投与後、ヒトのS. aureus SSSSIの重症度は減少するこ

10

20

30

40

50

とが予測される。

【0074】

実施例 6

本明細書中で記載される組成物および方法を、例えば *Staphylococcus aureus* に対して、*Staphylococcus aureus* 皮膚または軟部組織感染を発症するリスクのあるウシ種をワクチン接種するために使用し得る。特に、ウシ種は、*S. aureus* によって引き起こされるウシ乳房炎を発症するリスクがあり得る。まず、*S. aureus* SSS1、例えばウシ乳房炎を発症するリスクのあるウシ種を同定する。例えば、あらゆる乳牛は、*S. aureus* によって引き起こされるウシ乳房炎を発症するリスクがあるとみなされ得る。2番目に、そのウシ種に、薬学的に受容可能な媒体中に、A1s3p またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを含む、免疫原性量のワクチンを投与する。例えば、そのウシ種に、用量あたり 3 および 1000 μg の間の *Candida* 表面タンパク質 A1s3 (配列番号 2) の組換え N 末端を含む、1 および 3 用量の間の NDV-3 を投与し、2 週間から 6 ヶ月の間隔で複数回用量を与える。

10

【0075】

ワクチンの投与後、そのウシ種は *S. aureus* SSS1、例えばウシ乳房炎を発症するリスクが低下することが予測される。

【0076】

同様に、*S. aureus* SSS1、例えばウシ乳房炎を有すると同定されたウシ種を、薬学的に受容可能な媒体中に、A1s3p、またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを含む、免疫原性量の薬学的組成物の投与によって処置し得る。例えば、そのウシ種に、用量あたり 3 および 1000 μg の間の *Candida* 表面タンパク質 A1s3 (配列番号 2) の組換え N 末端を含む、1 および 3 用量の間の NDV-3 を投与し、2 週間から 6 ヶ月の間隔で複数回用量を与える。

20

【0077】

その薬学的組成物の投与後、ウシ種の *S. aureus* SSS1、例えばウシ乳房炎の重症度は減少することが予測される。

【0078】

他の実施態様

本明細書中で引用された全ての出版物および特許は、個々の出版物または特許それぞれが明確におよび個々に参考文献に組み込まれると示されたように、本明細書中で参考文献に組み込まれる。前述の発明は、理解の明確さの目的で、例示および実施例についていかく詳細に説明されたが、本発明の教示を考慮して、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から離れることなく、それに一定の変更および修飾を行い得ることが、当業者に容易に明らかである。

30

【図1A】

**FIGURE 1A**

配列番号：1

```

1 MLQQYTLLLI YLSVATAKTI TGVFNSFNSL TWSNAATYNY KGPCTPTWNA VLGSWLDGTS
61 ASPGDTFTLN MPCVFKFTTS QTSVDLTAHG VKYATCQFQA GEEFMTFSTL TCTVSNTLTP
121 SIKALGTVTI PLAFNVGGTG SSVDLEDSCK FTAGTNTVTF NDGGKKISIN VDFERSNVDP
181 KGYLTDSEVI PSLNKVSTLF VAPQCANGYT SGTMGFANTY GDVQIDCSNI HVGITKGLND
241 WNYPVSSESF SYTKTCSSNG IFITYKNVPA GYRPFVDAYI SATDVNSYTL SYANEYTCAG
301 GYWQRAPFTL RWTGYRNSDA GSNGIVIVAT TRTVTDSTTA VTTLPFDPNR DKTKTIEILK
361 PIPTTITTS YVGVTTSYST KTAPIOGETAT VIVDIPYHTT TTVTSKWTGT ITSTTTHTNP
421 TDSIDTVIVQ VPSPNPTVTT TEYWSQSFAV TTTITGPPGN TDVTLIREPP NHTVTTTEYW
481 SESYTTTSTF TAPPGGTDSV LIKEPPNPTV TTTEYWSSESY TTSTFTAPP GGTDSVIKE
541 PPNHTVTTTE YWSQSYYTTT TVTAPPGGTD TVLVREPPNH TVTTEYWSQ SYTTTTVIA
601 PPGGTDSVII REPPNPTVTT TEYWSQSYYAT TTTITAPPGE TDVTLIREPP NHTVTTTEYW
661 SQSYATTTTI TAPPGETDTV LIREPPNHTV TTTEYWSQSFAV ATTTTVTAPP GGTDTVIIRE
721 PPNHTVTTTE YWSQSYYATT TITAPPGETD TVLIREPPNH TVTTEYWSQ SYATTTTIIA
781 PPGETDTVLI REPPNPTVTT TEYWSQSYYT ATTVTAPPG TDVIIYDTM SSSEISSFSR
841 PHYTNHTTLW STTWVIETKT ITETSCEGDK GCSWVSVSTR IVTIPNNIET PMVNTVDST
901 TTESTSQSPS GIFSESGVSV ETESSTVTTA QTNPSPVITE SEVVFVTKGN NENGPYESEPS
961 TNVKSSMDEN SEFTTSTAAS TSTDIESETI ATTGSVEASS PISSSADET TTVTTTAEST
1021 SVIEQPTNNN GGGKAPSATS SPSTTTTANN DSVITGTTST NQSQSQSQYN SDTQQTLSQ
1081 QMTSSLVSLH MLTTFDGSGS VIQHSTWLGS LITLLSLFI

```

配列番号：2

```

1 KITITGVFNSF NSLTWSNAAT YNYKGPGPTPT WNAVLGWSLD GTSASPGDTF TLNMPCVFKF
61 TTSQTSVDLT AHGVKYATCQ FQAGEEFMTF STLTCTVSNT LTPSIKALGT VTLPLAFNVG
121 GTGSSVLDL SKCFTAGTNT VTFNDGGKKI SINVDFERSN VDPKGYLTDS RVIPSLNKVS
181 TLFVAPQCAN GYTSGTMGFA NTYGDVQIDC SNIHVGITKG LNDWNYFVSS ESFSYTKTCS
241 SNGIFITYKN VPAGYRPFVY AYISATDVNS YTLYSANEYT CAGGYWQRAP FTLRWTGYRN
301 SDAGSNGIVI VATTRTVTDS TTAVTLPFD PNRDKTCTIE ILKPIPTTI TTSYVGVTTS
361 YLTKTAPIGE TATVIVDIPY HTTTVTSKW TGTITSTTH TNPTDSIDTV IVQVPL

```

【図1B】

**FIGURE 1B**

配列番号：3

```

1 AAGACAATCACTGGTGTTCACACAGTTT AATTCAATTGACTTGGCTAATGCTGCTACG
61 TATAATTATAAGGGACCAGGAACCCCAACT TGGAAATGCTGTTGGGTTGGCTTTAGAT
121 GGTACTAGTGCAGTCGGGGAGATACATTC ACATTGAATATGCCATGTGTGTTAAATTT
181 ACTACTTCTCAAACATCTGTTGATTTGACT GCTCATGGTGTAAATATGCTACATGTC
241 TTTCAGGGCAGGTGAAGAATTATGACCTTT TCTACATTAACATGACTGTGAGCAAAACT
301 TTGACTCCATCTATTAAGGCTTGGTACT GTCACTTACCACTGCATTCAATGTAGGT
361 GGAACCTGGTTCTCTGTTGAGAT TCTAAATGTTTACTGCTGGTACTAACACA
421 GTTACATTTAATGATGGTGGCAAGAAAATC TCAATTAAATGTTGATTTGAAAGGTCAAAT
481 GTCGATCCAAAAGGGTACTTAACGTATTCC AGAGTTATACCAAGTCTAACAAAGTGTCA
541 ACTCTTTGTTGACCCACAAATGTGCAAAT GGTACACATCTGGTACAATGGGATTGCGT
601 AACACTTATGGTGTCAAAATTGACTGT TCAAATATTCTATGGTATTACAAAAGGA
661 TTGAATGATTGGAATTATCCGGTTCATCT GAATCATTAGTTACACAAAACCTGTC
721 TCTAATGGTATCTTATCACATATAAAAAC GTCCTGCCGGTTATCGTCCATTGTTGAC
781 GCTTATATTCTGCTACAGATGTTAATTG TACACCTGTGCTATGCTAATGAATATACT
841 TGTGCTGGTGGTTATTGCAACGTGACCT TTCACATTAAGATGGACTGGATAACAGAAAT
901 AGTGATGCTGGATCTAACGGTATTGTTATT GTGGCTACTACCAGAACAGTACAGACAGT
961 ACTACCGCCGTGACCACCTTACCATTCGAT CCTAACCGCGACAAAACAAAGACAATTGAA
1021 ATTTGAAACCTATTCCAACAACTACAATC ACAACATCATATGGTGTGACTACTCC
1081 TACCTGACCAAAACTGCACCAATTGGGAA ACTGCTACTGTTATTGTTGATATTCCATAT
1141 CACACTACCAACTGTACCGTAAATGG ACAGGAACAAATTACTCCACCAACACAT
1201 ACTAATCCAACGTGACTCAATAGACACTGTC ATTGTACAAGTCCACTGTGA

```

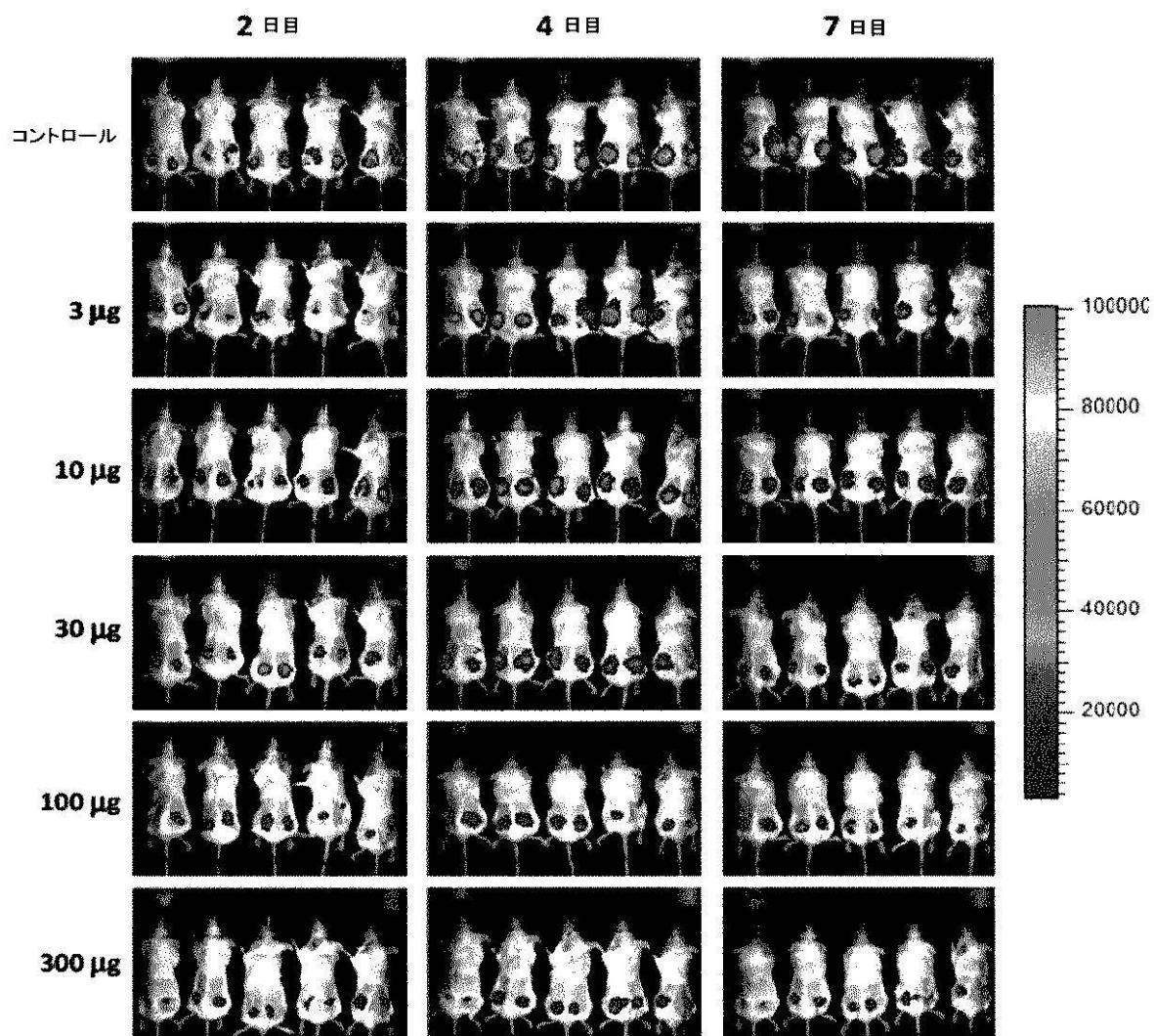
\*

\* 停止コドン

【図2】

**FIGURE 2**

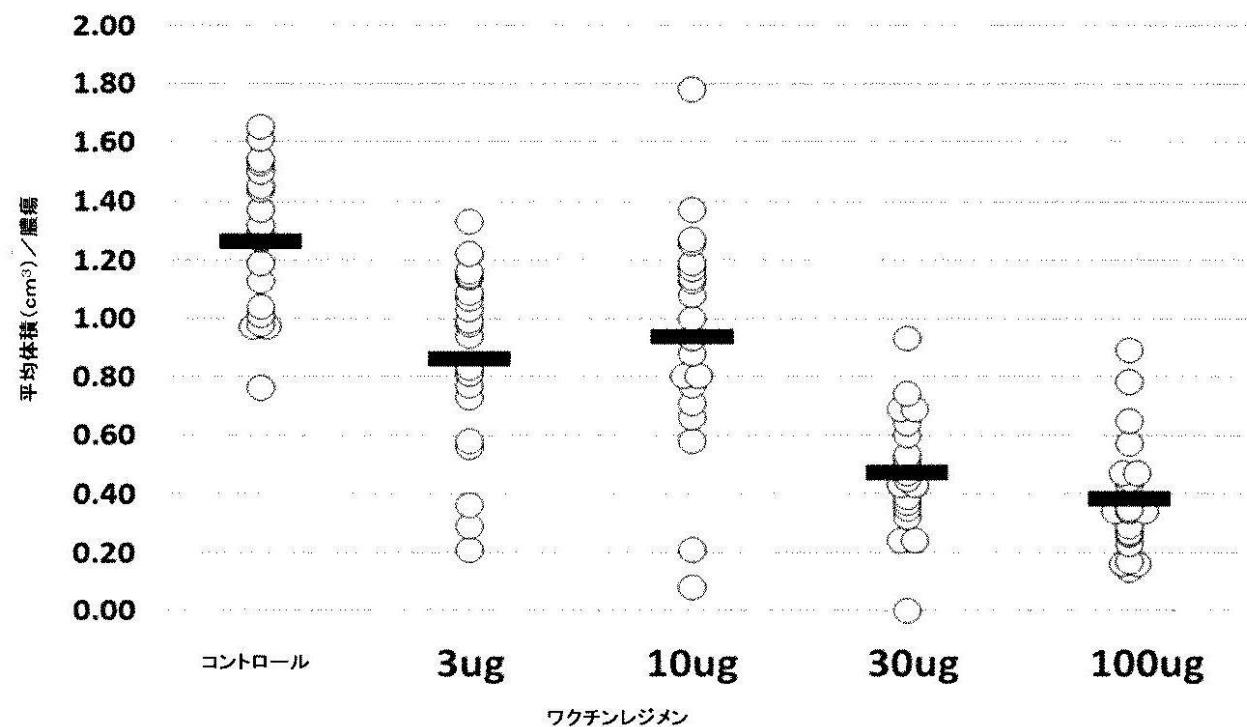
インビボイメージングによって評価したNDV-3の比較有効性動態



【図3】

**FIGURE 3**

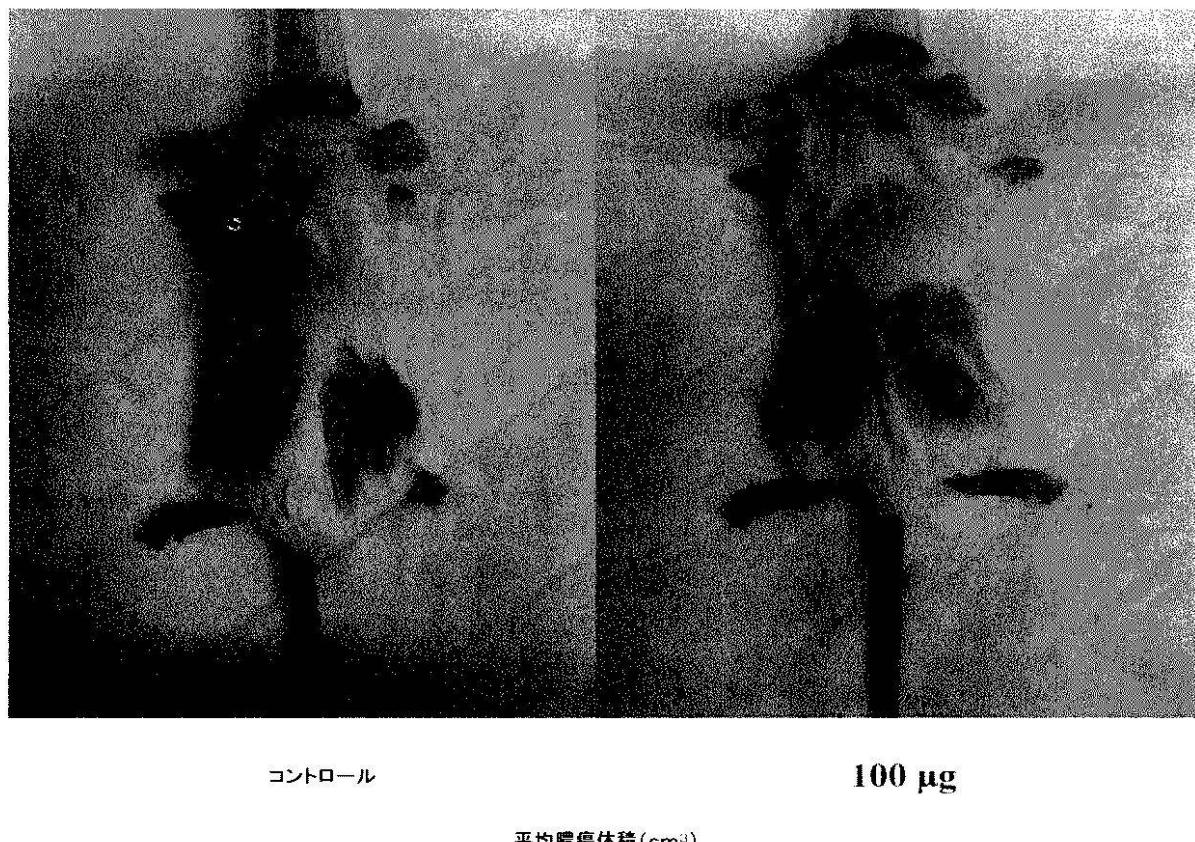
NDV-3は、マウスSSSIにおいて、MRSA膿瘍体積を制限する



【図4】

**FIGURE 4**

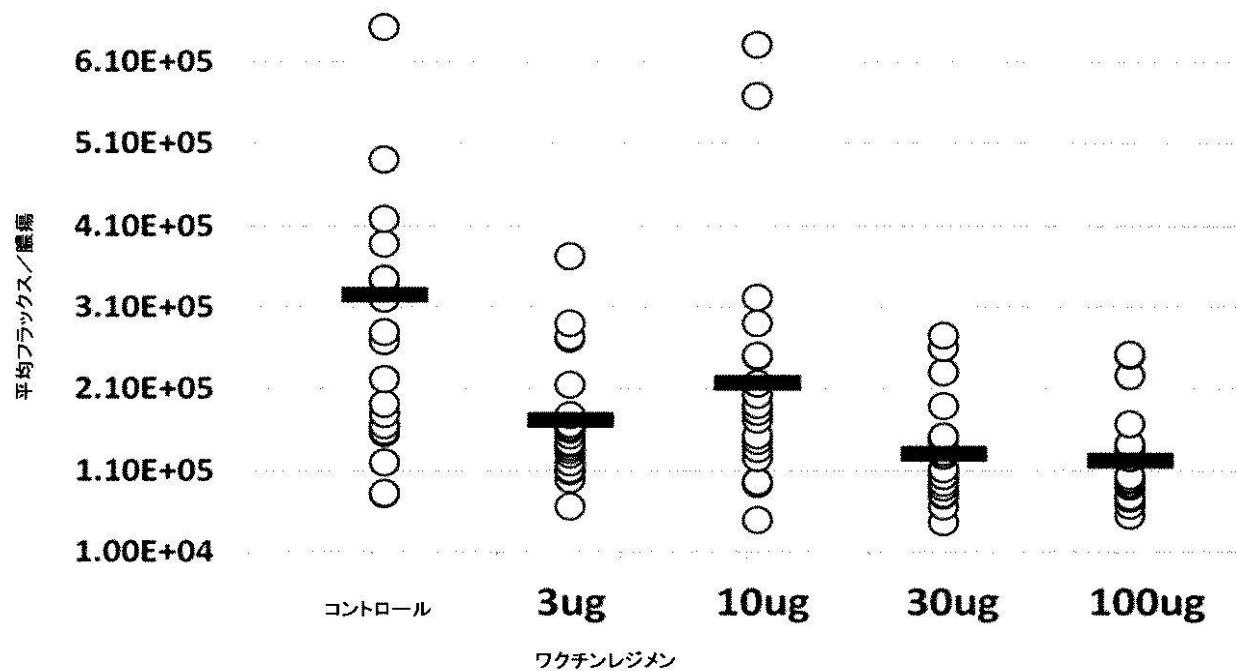
NDV-3は、マウスSSSIにおいてMRSA膿瘍体積を制限する



【図 5】

FIGURE 5

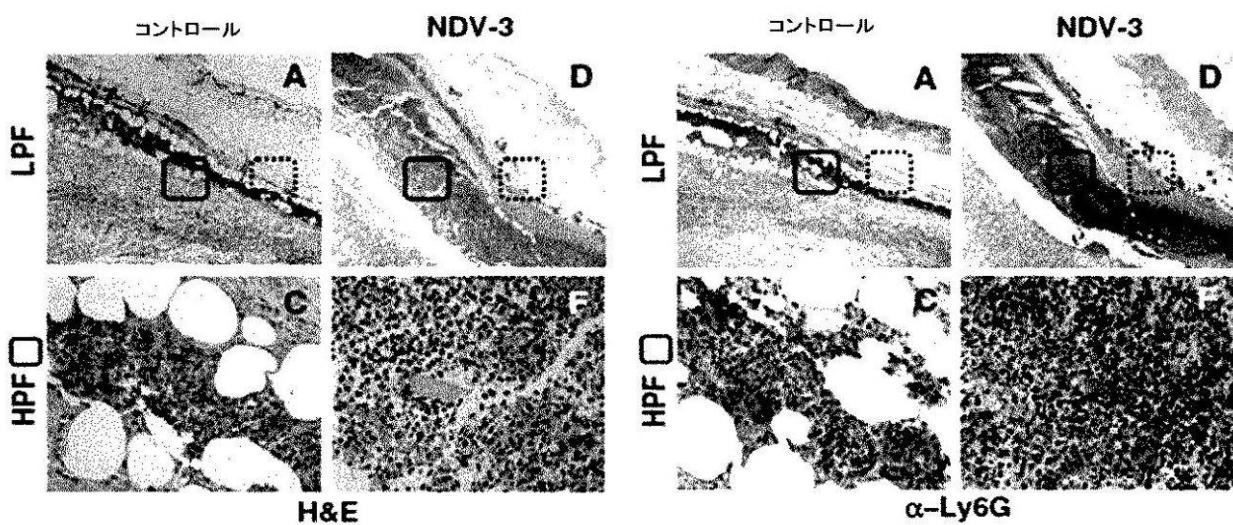
NDV-3は、マウスSSSIにおいてMRSA増殖を抑制する



【図 6】

FIGURE 6

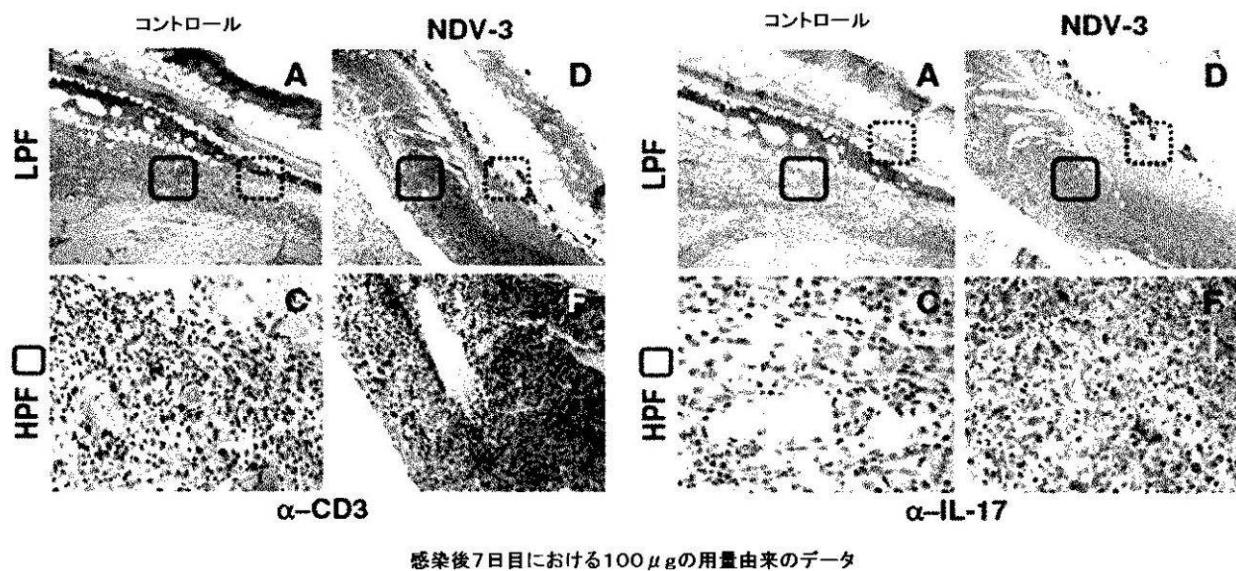
NDV-3は、MRSA増殖を抑制し、そして好中球をリクルートする

感染後7日目における $100\mu\text{g}$ の用量由来のデータ

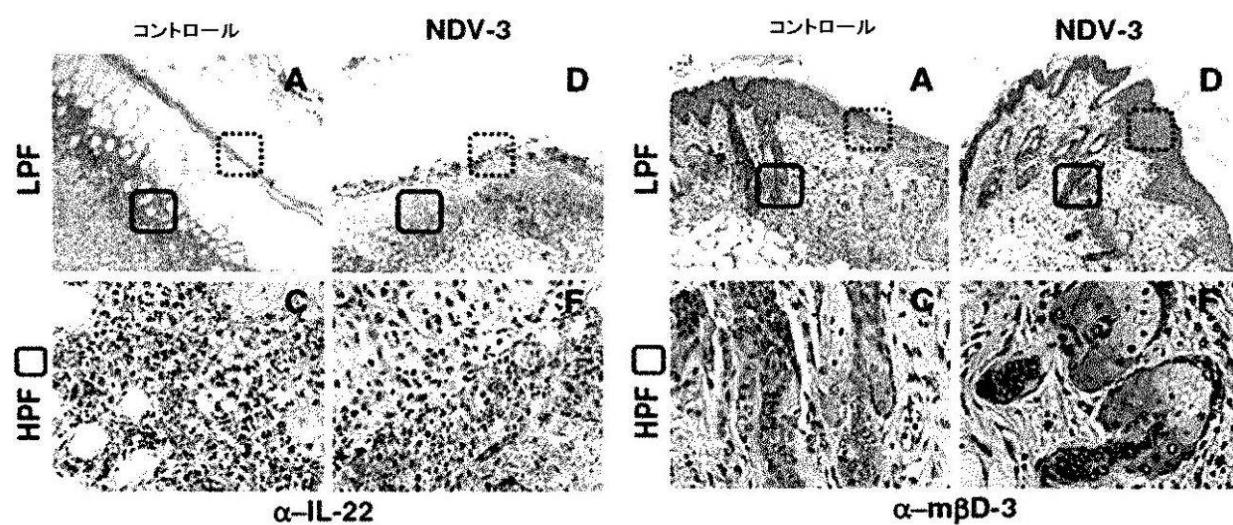
【図7】

**FIGURE 7**

NDV-3は、CD3+T細胞をリクルートし、そしてIL-17の発現を誘発する

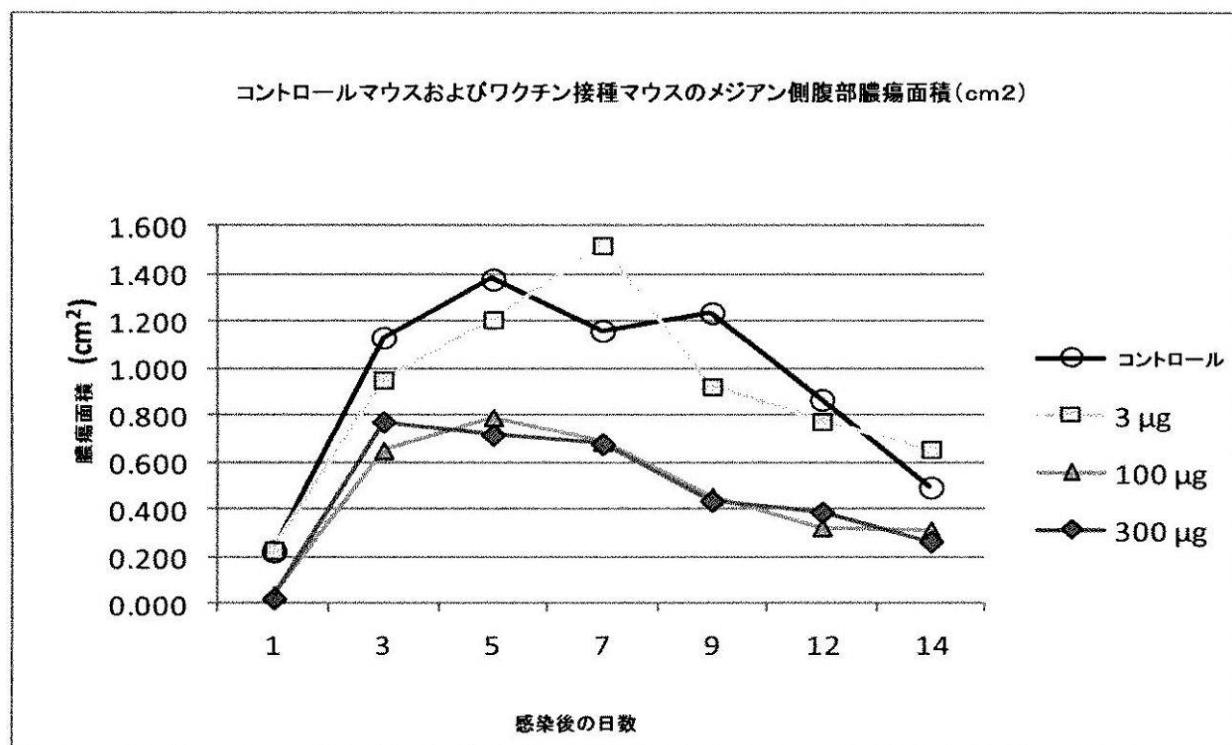
感染後7日目における $100\ \mu g$ の用量由来のデータ

【図8】

**FIGURE 8**NDV-3は、IL-22の発現および $\beta$ -デフェンシン反応を刺激する感染後7日目における $100\ \mu g$ の用量由来のデータ

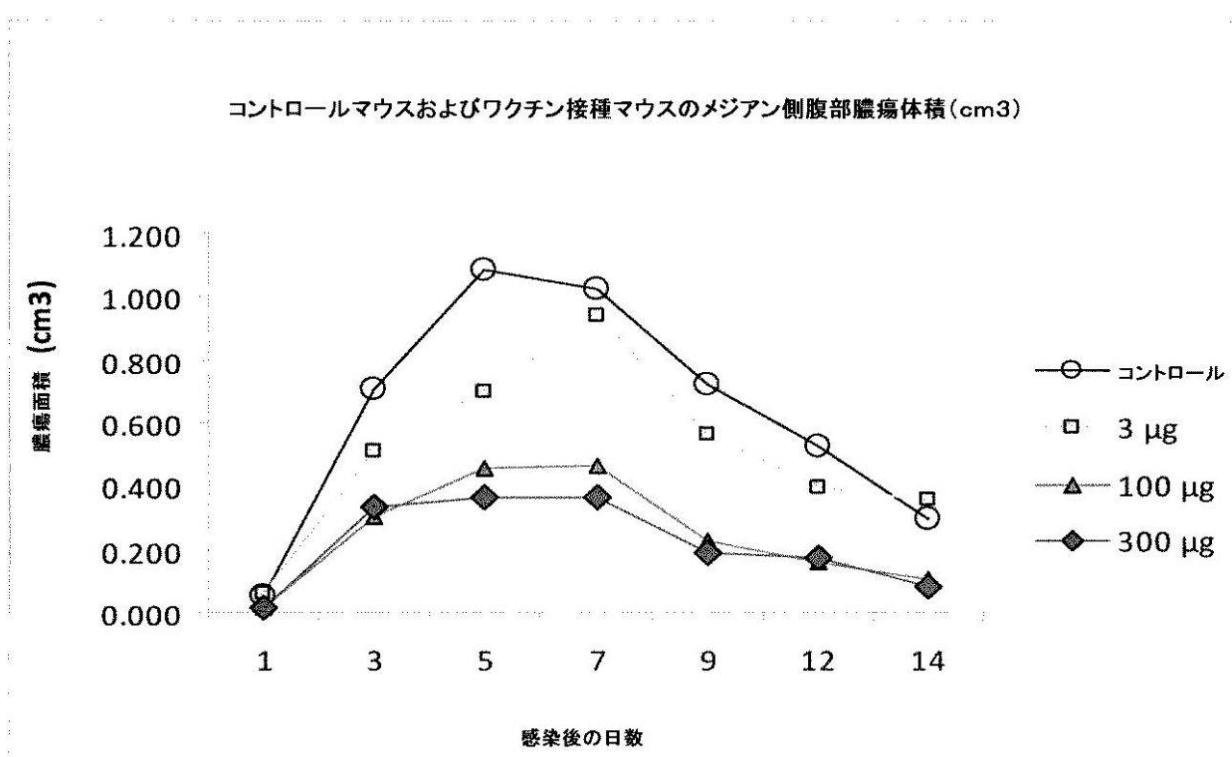
【図 9】

FIGURE 9

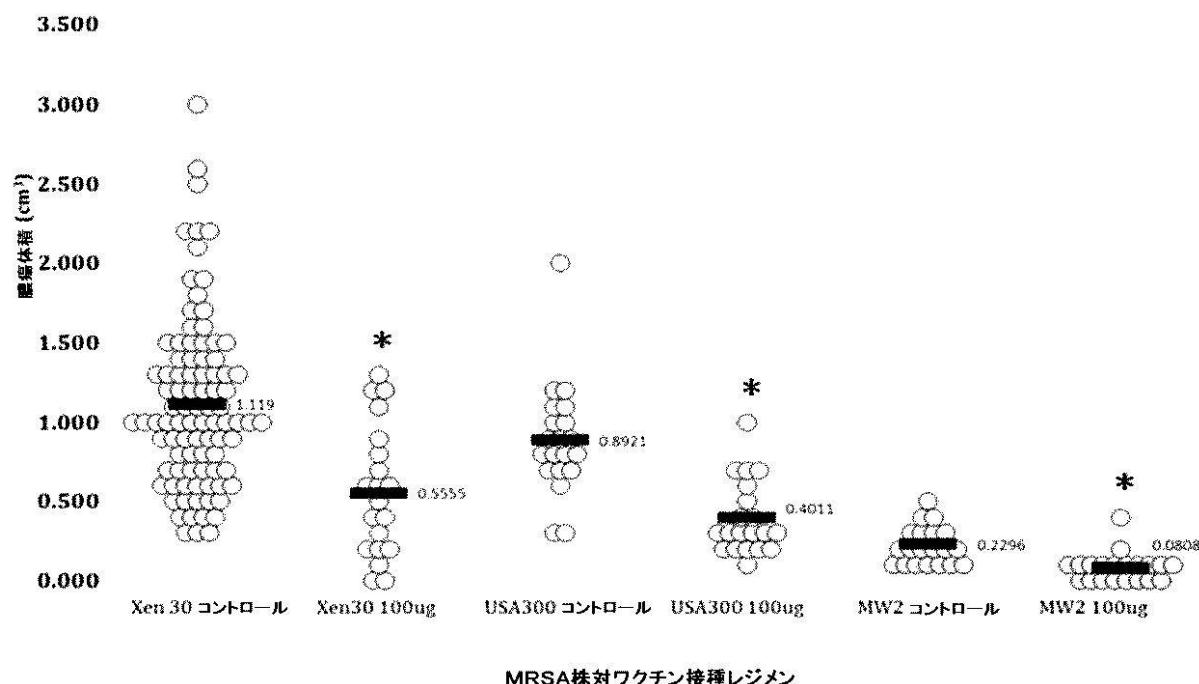


【図 10】

FIGURE 10



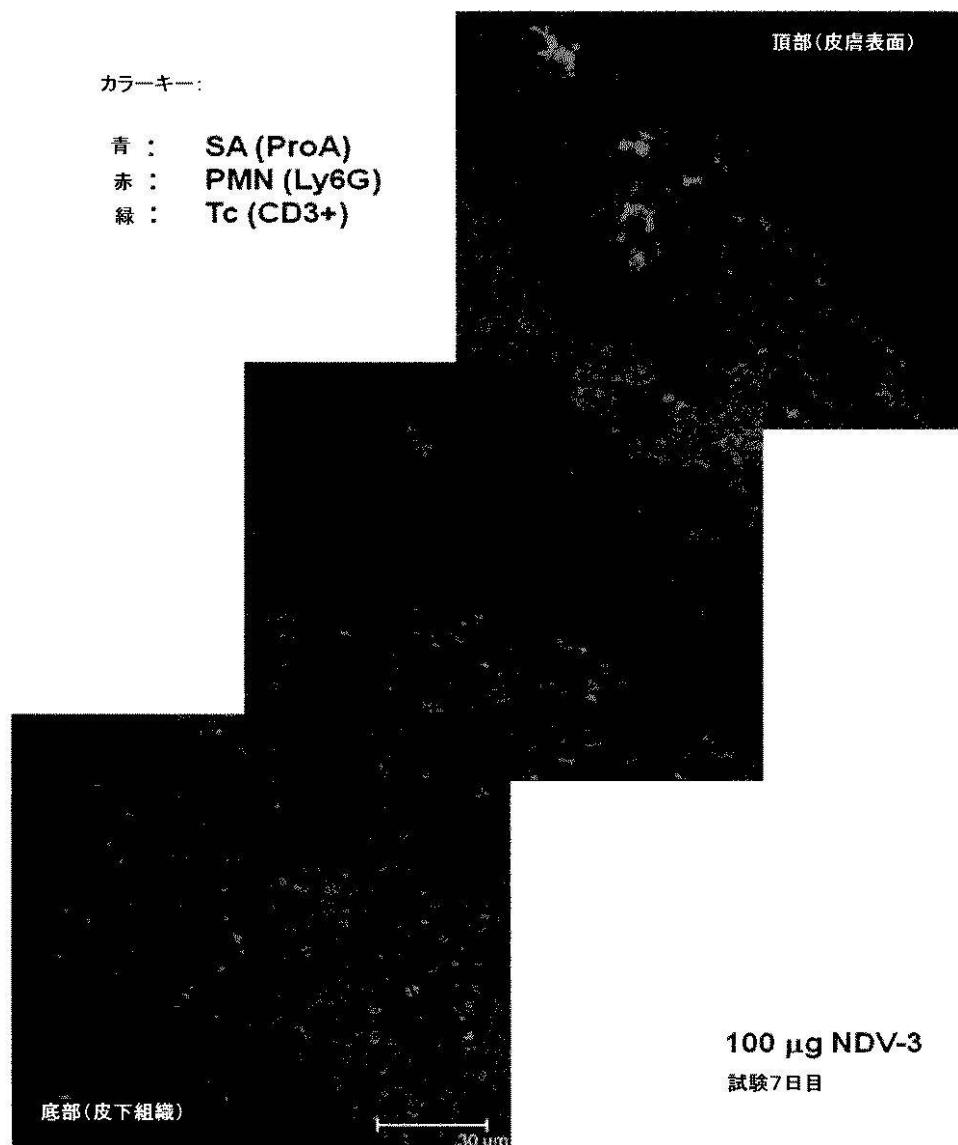
【図 11】

**FIGURE 11**コントロールマウス対ワクチン接種マウスにおける、MRSA株による平均7d腫瘍体積( $\text{cm}^3$ )

【図 12】

**FIGURE 12**

NDV-3(100 μg)ワクチン接種マウス由来のMRSA膿瘍



【図13】

**FIGURE 13**

コントロールマウス由来のMRSA膿瘍



【配列表】

2014521605000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/00328
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/00 (2012.01) USPC - 424/185.1, 274.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 424/185.1, 274.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/185.1, 274.1 (text search)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase (EP, WO, US); Google Scholar Search terms: Agglutinin-like sequence 3 protein (Als3p), N-terminal domain, immunogenic fragment, vaccine, immunogenic composition, Candida spp., Staphylococcus aureus, MRSA, vancomycin resistant S. aureus (VRSA), carrier, conjugate, adjuvant, CRM1		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/081896 A2 (EDWARDS et al.) 19 July 2007 (19.07.2007). Especially pg 1 In 25-31, pg 2 In 1-3, pg 12 In 28-31, pg 16 In 3-10, pg 17 In 14-15, pg 18 In 22, pg 28 In 5-6, pg 53 In 22, pg 59 In 10-13.	1-4, 7, 8, 10, 12-15, 18-22, 25, 26, 28, 30-33, and 36
Y		5, 6, 9, 11, 16, 17, 23, 24, 27, 29, 34, 35
Y	US 2003/0124134 A1 (EDWARDS et al.) 3 July 2003 (03.07.2003). Especially SEQ ID NO: 12	5, 6, 23, 24
Y	FINKS et al. "Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus, Michigan, USA, 2007" June 2009; [online] Available on the internet: <URL: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/6/pdfs/08-1312.pdf> [retrieved 23 October 2012]. Especially abstract.	9, 27
Y	WO 2010/151544 A1 (ANDERSON et al.) 29 December 2010 (29.12.2010). Especially para [0006], [0071].	11, 29
Y	WO 2005/049081 A1 (O'HARA et al.) 2 June 2005 (02.06.2005). Especially pg 1 In 19-23, pg 8 In 19-20.	16, 17, 34, 35
A	US 2009/0297562 A1 (EDWARDS et al.) 3 December 2009 (03.12.2009)	1-36
A	US 7,241,613 B1 (WILLINS et al.) 10 July 2007 (10.07.2007)	1-36
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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  23 October 2012 (23.10.2012)	Date of mailing of the international search report  18 DEC 2012	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer:  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 12/00328

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
  - a. (means)  
 on paper  
 in electronic form
  - b. (time)  
 in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

## 3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA

- (71)出願人 502170175  
ロサンゼルス バイオメディカル リサーチ インスティテュート アット ハーバー - ユーシーエルエー メディカル センター  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90502, トーランス, ウエスト カーソン ストリート  
1124
- (71)出願人 514017910  
イーマン,マイケル アール.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90277, リドンド ビーチ, エスプラナド アベニュー  
- 504, スイート 508
- (71)出願人 514017921  
エドワーズ, ジョン イー. ジュニア  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90274, パロス ベルデス エステイツ, ピア ラ  
セルバ 3708
- (71)出願人 514017932  
フィラー, スコット ジー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90275, ランチョ パロス ベルデス, キング アー  
サー コート 28890
- (71)出願人 514017943  
イブラヒム, アシュラフ エス.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92620, アービン, コニファー 2
- (71)出願人 514017954  
フー, ユエ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90502, トーランス, サウス バーモント アベニュー  
- 21501
- (74)代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策
- (74)代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹
- (74)代理人 100181674  
弁理士 飯田 貴敏
- (74)代理人 100181641  
弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332  
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 イーマン,マイケル アール.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90277, リドンド ビーチ, エスプラナド アベニュー  
- 504, スイート 508
- (72)発明者 エドワーズ, ジョン イー. ジュニア  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90274, パロス ベルデス エステイツ, ピア ラ  
セルバ 3708

(72)発明者 フィラー , スコット ジー .  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90275 , ランチョ パロス ベルデス , キング アー  
サー コート 28890

(72)発明者 イブラヒム , アシュラフ エス .  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92620 , アービン , コニファー 2

(72)発明者 フー , ユエ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 90502 , トーランス , サウス バーモント アベニュー  
- 21501

(72)発明者 ヘネシー , ジョン ピー . ジュニア  
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19002 , ローワー グイネド , ストーンブリッジ 口  
ード 1007

F ターム(参考) 4C085 AA03 BA49 BB11 EE01 GG01  
4H045 AA30 BA10 CA15 DA86 EA31