

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-504871
(P2025-504871A)

(43)公表日 令和7年2月19日(2025.2.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全65頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-543199(P2024-543199)			(71)出願人	524271944
(86)(22)出願日	令和5年1月20日(2023.1.20)				デントリック ピーティーワイ エルティ
(85)翻訳文提出日	令和6年9月17日(2024.9.17)				ーディー
(86)国際出願番号	PCT/AU2023/050031				オーストラリア国 3 0 0 0 ヴィクトリ
(87)国際公開番号	WO2023/137522				ア州,メルボルン,クイーン ストリート
(87)国際公開日	令和5年7月27日(2023.7.27)				3 1, レベル 9
(31)優先権主張番号	2022900102			(74)代理人	100092783
(32)優先日	令和4年1月20日(2022.1.20)				弁理士 小林 浩
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)			(74)代理人	100120134
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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				弁理士 大森 規雄
	最終頁に続く			(74)代理人	100153693
					弁理士 岩田 耕一
				(72)発明者	レイノルズ, エリック チャールズ
					オーストラリア国 3 0 0 0 ヴィクトリ
					ア州,メルボルン,クイーン ストリート
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キメラポリペプチド

(57)【要約】

P. g i n g i v a l i sに対する免疫応答を誘導するためのキメラ又は融合タンパク質であって、タンパク質が、第2のポリペプチドに連結された第1のポリペプチドを含み、A) 第1のポリペプチドが、P. g i n g i v a l i sのA r g－若しくはL y s－ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも8 0 %同一である配列を含むか、又はそれらからなり、B) 第2のポリペプチドが、P. g i n g i v a l i sのA r g－又はL y s－ジンジパインの付着因子ドメインのアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなり、第2のポリペプチドが、a) 好ましくは、切断された付着因子ドメイン(C A D)の配列の一部分又は全部を含まず、かつ／あるいはb) A r g－若しくはL y s－ジンジパインのD U F 2 4 3 6ドメインの全長に実質的に対応するアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも8 0 %同一の配列を含む、キメラ又は融合タンパク質。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P. gingivalis に対する免疫応答を誘導するためのキメラ又は融合タンパク質であって、前記タンパク質が、第 1 のポリペプチド及び第 2 のポリペプチドを含み、

A) 前記第 1 のポリペプチドが、P. gingivalis の Arg-若しくは Lys-ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 80 % 同一である配列を含むか、又はそれらからなり、

B) 前記第 2 のポリペプチドが、P. gingivalis の Arg-又は Lys-ジンジパインの付着因子ドメインのアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなり、

前記第 2 のポリペプチドが、1 つ以上の付着因子結合モチーフ (ABM) の配列を含み、

10

前記第 2 のポリペプチドが、

a) 切断された付着因子ドメイン (CAD) の配列を含まず、かつ／あるいは

b) Arg-若しくは Lys-ジンジパインの DUF2436 ドメインの全長に実質的に対応するアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 80 % 同一の配列を含む、前記キメラ又は融合タンパク質。

【請求項 2】

前記 1 つ以上の ABM が、配列番号 15 若しくは 21、配列番号 14 若しくは 20、及び／又は配列番号 17 若しくは 22 に記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも 80 % 同一の配列を含む、請求項 1 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

20

【請求項 3】

前記 1 つ以上の ABM が、配列番号 16 又は配列番号 18、19、若しくは 23 のうちのいずれかに記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも 80 % 同一の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 4】

前記キメラ又は融合タンパク質が、配列番号 12 若しくは 13 に記載のアミノ酸配列又はそれらに対して少なくとも 80 % 同一の配列を有する CAD の配列又はその一部分を含まない、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 5】

Arg-又は Lys-ジンジパインの前記 DUF2436 ドメインの前記全長に実質的に対応するアミノ酸配列が、Arg-又は Lys-ジンジパインの DUF2436 ドメインの長さの少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % である配列である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

30

【請求項 6】

Arg-又は Lys-ジンジパインの前記 DUF2436 ドメインの前記アミノ酸配列が、配列番号 24 に記載の配列であるか、又はそれに対して少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % 同一の配列である、請求項 5 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

40

【請求項 7】

前記第 2 のポリペプチドが、配列番号 26、27、28 のうちのいずれか 1 つに記載の配列、又はそれに対して少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % 同一の配列を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 8】

前記第 1 のポリペプチドが、前記第 2 のポリペプチドに連結されている、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 9】

50

前記第 1 のポリペプチドが、前記第 2 のポリペプチドの N 末端に位置する、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 10】

前記第 1 のポリペプチドが、前記第 2 のポリペプチドに直接接続されている、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 11】

前記第 1 のポリペプチドが、リンカーを介して前記第 2 のポリペプチドに連結されている、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 12】

前記リンカーが、ペプチドリinkerである、請求項 11 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 13】

前記ペプチドリinkerが、少なくとも 2 アミノ酸、少なくとも 5 アミノ酸、少なくとも 10 アミノ酸、少なくとも 15 アミノ酸、少なくとも 20 アミノ酸を含み、好ましくは前記リンカーが、50 アミノ酸以下を含む、請求項 12 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 14】

前記ペプチドリinkerが、25 アミノ酸以下、20 アミノ酸以下、15 アミノ酸以下、又は 10 アミノ酸以下である、請求項 12 又は 13 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 15】

前記第 1 のポリペプチドが、配列番号 1 ～ 11 のうちのいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % 同一の配列を含むか、又はそれらからなる、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 16】

前記第 1 のポリペプチドが、配列番号 1 若しくは 2 に記載のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % 同一の配列を含むか、又はそれらからなる、請求項 15 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 17】

前記キメラ又は融合タンパク質が、*P. gingivalis* の Argー若しくは Lysージンジパインの前記活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 80 % 同一である配列を含むか、又はそれらからなる 1 つ以上の更なるポリペプチドを含む、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 18】

P. gingivalis の Argー又は Lysージンジパインの前記活性部位を含むか、又はそれらからなる前記 1 つ以上の更なるポリペプチドが、前記第 1 のポリペプチドの N 末端、前記第 1 のポリペプチドの C 末端、前記第 2 のポリペプチドの C 末端の前記第 2 のポリペプチドの N 末端に位置する、請求項 17 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 19】

前記 1 つ以上の更なるポリペプチドが、前記キメラ又は融合タンパク質の前記第 1 又は第 2 のポリペプチドに直接連結されている、請求項 18 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 20】

前記 1 つ以上の更なるポリペプチドが、ペプチドリinkerによって前記第 1 又は第 2 のポリペプチドに連結されている、請求項 19 に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項 21】

前記ペプチドリinkerが、少なくとも 2 アミノ酸、少なくとも 5 アミノ酸、少なくとも

10

20

30

40

50

10 アミノ酸、少なくとも15 アミノ酸、少なくとも20 アミノ酸を含み、好ましくは前記リンカーが、50 アミノ酸以下を含む、請求項20に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項22】

前記ペプチドリンカーが、25 アミノ酸以下、20 アミノ酸以下、15 アミノ酸以下、又は10 アミノ酸以下である、請求項20又は21に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項23】

前記1つ以上の更なるポリペプチドが、好ましくは、配列番号1～11、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一の配列の群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる、請求項17～22のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

10

【請求項24】

前記第1のポリペプチド及び前記1つ以上の更なるポリペプチドが、互いに同一であるか、又は少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一である、請求項22に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項25】

前記第1のポリペプチド及び前記1つ以上の更なるポリペプチドが、P. gingivalisの異種ジンジパインの前記活性部位のアミノ酸配列を含む、請求項23に記載のキメラ又は融合タンパク質。

20

【請求項26】

前記第1のポリペプチド及び前記1つ以上の更なるポリペプチドが、Lys-ジンジパインの前記活性部位の前記アミノ酸配列を含む、請求項23に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項27】

前記第1のポリペプチドが、Lys-ジンジパインの前記活性部位のアミノ酸配列を含み、前記1つ以上の更なるポリペプチドが、Arg-ジンジパインの前記活性部位の前記アミノ酸配列を含む、請求項23に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項28】

前記キメラ又は融合タンパク質が、配列番号29、30、31、32、33、34、41、若しくは42のうちのいずれか1つに記載のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列を含むか、又はそれらからなる、請求項1～27のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

30

【請求項29】

前記タンパク質が、組換え発現系における発現を促進するため、かつ／又は前記タンパク質の精製を促進するために、追加のアミノ酸残基を含む、請求項1～28のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質。

40

【請求項30】

前記追加のアミノ酸が、任意選択でN末端メチオニン及び／又はアラニン残基を含む、N末端領域に1、2、3、4、又は5アミノ酸を含む、請求項29に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項31】

前記追加のアミノ酸が、C末端領域に1、2、3、4、又は5アミノ酸を含む、請求項29又は30に記載のキメラ又は融合タンパク質。

【請求項32】

請求項1～31のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質をコードする、核酸。

50

【請求項 33】

請求項 32 に記載の核酸を含む、ベクター又は構築物。

【請求項 34】

請求項 32 に記載の核酸、又は請求項 33 に記載のベクター若しくは構築物を含む、宿主細胞。

【請求項 35】

請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質を含む、組成物。

【請求項 36】

前記組成物が、ワクチン組成物であり、前記キメラ又は融合タンパク質に対する免疫応答を増強するための 1 つ以上のアジュバントを含む、請求項 35 に記載の組成物。

10

【請求項 37】

請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質と、任意選択で、前記キメラ又は融合タンパク質に対する免疫応答を増強するためのアジュバントと、を含む、ワクチン又は免疫刺激組成物。

【請求項 38】

対象における *P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導するための方法であって、前記方法が、それを必要とする対象に、請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載のキメラ若しくは融合タンパク質、請求項 35 若しくは 36 に記載の組成物、又は請求項 37 に記載のワクチン若しくは免疫刺激組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 39】

対象における *P. gingivalis* に対する体液性免疫応答を誘導する方法であって、前記方法が、前記対象に、請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載のキメラ若しくは融合タンパク質、請求項 35 若しくは 36 に記載の組成物、又は請求項 37 に記載のワクチン若しくは免疫刺激組成物を投与することを含む、前記方法。

20

【請求項 40】

誘導される前記免疫応答が、*Th1* 免疫応答から *Th2* 免疫応答への切り替えを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

P. gingivalis 感染に対して対象を免疫化する方法であって、前記方法が、前記対象に、請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載のキメラ若しくは融合タンパク質、請求項 35 若しくは 36 に記載の組成物、又は請求項 37 に記載のワクチン若しくは免疫刺激組成物を投与することを含む、前記方法。

30

【請求項 42】

対象における *P. gingivalis* 感染を治療する方法であって、前記方法が、それを必要とする対象に、請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載のキメラ若しくは融合タンパク質、請求項 35 若しくは 36 に記載の組成物、又は請求項 37 に記載のワクチン若しくは免疫刺激組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 43】

P. gingivalis による感染に関連する症状の重症度を低減するか、又は最小限に抑えるための方法であって、それを必要とする個体に、請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載のキメラ若しくは融合タンパク質、請求項 35 若しくは 36 に記載の組成物、又は請求項 37 8 に記載のワクチン若しくは免疫刺激組成物を投与することを含み、

40

前記症状が、腫れた (*swollen*) 又は腫れた (*puffy*) 歯茎、出血しやすい歯茎、後退した歯茎、歯周りの歯周ポケット、歯の支持組織 (歯周靱帯、セメント質、及び／又は歯槽骨) の喪失、歯茎と歯との間の膿、並びに歯肉炎からなる群から選択される、前記方法。

【請求項 44】

前記方法が、抗菌化合物、抗炎症剤のうちの 1 つ以上の投与を更に含む、請求項 42 又は 34 に記載の方法。

【請求項 45】

50

- 対象における *P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導するか、
- P. gingivalis* 感染に対して対象を免疫化するか、
- 前記対象における前記 *P. gingivalis* 感染を治療するか、又は
- P. gingivalis* 感染の1つ以上の症状の重症度を最小限に抑えるか、若しくは低減するための医薬の製造における、請求項1～31のいずれか一項に記載のキメラ又は融合タンパク質の、使用。

【請求項46】

- 対象における *P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導するか、
- P. gingivalis* 感染に対して対象を免疫化するか、
- 前記対象における前記 *P. gingivalis* 感染を治療するか、又は
- P. gingivalis* 感染の1つ以上の症状の重症度を最小限に抑えるか、若しくは低減する際の使用のための、請求項1～31のいずれか一項に記載のキメラ若しくは融合タンパク質、請求項35若しくは36に記載の組成物、又は請求項37に記載のワクチン若しくは免疫刺激組成物。

【請求項47】

P. gingivalis に指向された抗体を得るための方法であって、前記方法が、非ヒト動物に、請求項1～31のいずれか一項に記載のキメラ若しくは融合タンパク質、請求項35若しくは36に記載の組成物、又は請求項37に記載のワクチン若しくは免疫刺激組成物を投与し、それによって、前記動物において、*P. gingivalis* に指向された抗体を生成することを含む、前記方法。

【請求項48】

前記方法が、前記動物又は前記動物の卵から、前記抗体を単離することを更に含む、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

P. gingivalis に指向された抗体を含む抗体調製物であって、前記抗体調製物が、非ヒト動物に、請求項1～31のいずれか一項に記載のキメラ若しくは融合タンパク質、請求項35若しくは36に記載の組成物、又は請求項37に記載のワクチン若しくは免疫刺激組成物を投与し、それによって、前記動物において、*P. gingivalis* に指向された抗体を生成すること、及び前記動物又はその卵から前記抗体を単離することによって得られる、前記抗体調製物。

【請求項50】

請求項1～31のいずれか一項に記載のキメラ若しくは融合タンパク質を含む組成物、請求項35若しくは36に記載の組成物、又は請求項37に記載のワクチン若しくは免疫刺激組成物を含むキットであって、任意選択で、前記キットが、1つ以上のサイトカイン及び／又はアジュバントを密封された容器中に含み、好ましくは、前記キットが、前記組成物が、個体を免疫化するために使用されることを示すラベル又は添付文書を含み、任意選択で、前記ラベル又は添付文書が、使用説明書を含む、前記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、*P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導するのに有用であるキメラポリペプチド、それを含む組成物、並びに *P. gingivalis* 関連の状態及び疾患の予防及び治療のためのそれらの使用に関する。

【0002】

関連出願

本出願は、豪国仮出願第2022／900102号からの優先権を主張し、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

歯垢が歯肉（歯茎）の縁で歯の周りに蓄積したまましていると、歯肉の炎症（歯肉炎）を

10

20

30

40

50

引き起こす。慢性歯肉炎により、歯周ポケットの基部に歯周病原体 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が発生し、慢性感染症及び重度の疾患の発症をもたらす可能性がある。この重度形態の歯周病は歯周炎と呼ばれ、感染を排除する免疫系によるアプローチで歯の喪失をもたらす可能性がある。

【0004】

慢性歯周炎は、歯の支持組織の炎症性疾患であり、歯槽骨の吸収及び最終的な歯の喪失をもたらす。この疾患は、全ての社会で主要な公衆衛生上の問題であり、成人人口の最大30%が罹患しており、成人人口の12~15%が重度形態に罹患していると推定されている。

【0005】

成人の3人に1人は中等度から重度の歯周炎を有している。疫学調査から、歯周炎は、心臓血管疾患、ある特定のがん、早産、関節リウマチ、及び認知症を含む炎症性疾患のリスクの増加に関連している。より最近の研究では、*P. gingivalis* による慢性感染症を認知症及び関節リウマチと関連付けている。例えば、一研究では、アルツハイマー病 (AD) 脳試料の96%が、*P. gingivalis* の存在を示した。別の研究は、*P. gingivalis* を有するマウスの慢性経口感染がヒトにおけるADに関連する脳プラークをもたらし、*P. gingivalis* プロテアーゼがアミロイド前駆体及びタウタンパク質を切断して、ADに関連するプラーク及びタングル (tangle) を形成することができることを示す。

【0006】

LPS、線毛、血球凝集素、溶血素、及び細胞外加水分解酵素 (特に、Arg-X 及び Lys-X 特異的プロテイナーゼ)、別名「*P. gingivalis* ジンジpain (gingipain)」を含む、*P. gingivalis* の病原性に寄与するいくつかの病原性因子が報告されている。

【0007】

公衆衛生問題の大きさは、*P. gingivalis* 感染に対する強力な保護応答を提供するワクチン及びそれを提供する手段が必要とされるようである。

【0008】

1つの問題は、選択する病原性因子が過多である *P. gingivalis* 感染に対する強力な保護応答を得る方法が不明であることであった。

【0009】

現在、*P. gingivalis* 感染の発生率及び／若しくは重症度を予防若しくは低減する際の使用のため、又は対象における *P. gingivalis* 感染及び疾患を治療するための商業的に承認されたワクチンは存在しない。

【0010】

したがって、*P. gingivalis* ワクチンの設計及び製造のための代替の、かつ／又は改善されたアプローチ、及び *P. gingivalis* から産生される代替の、かつ／又は改善されたワクチンが必要である。

【0011】

本明細書における任意の従来技術への言及は、この従来技術が任意の法域における共通の一般的な知識の一部を形成すること、又はこの従来技術が当業者によって理解され、関連するとみなされ、かつ／若しくは他の従来技術と組み合わせられることが合理的に予想され得ることを、認めるか、又は示唆するものではない。

【発明の概要】

【0012】

本発明は、*P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導するためのキメラ又は融合タンパク質を提供し、そのタンパク質が、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドを含み、

A) 第1のポリペプチドが、*P. gingivalis* の Arg-若しくは Lys-ジンジpainの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一である

10

20

30

40

50

配列を含むか、又はそれらからなり、

B) 第2のポリペプチドが、P. gingivalisのArgー又はLysージンジパインの付着因子ドメインのアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなり、

第2のポリペプチドが、1つ以上の付着因子結合モチーフ(ABM)の配列を含み、好ましくは、ABMが、DUF2436ドメインと、P. gingivalisジンジパインの切断された付着因子ドメイン(CAD)との間のABMの一部又は全てに対応し、

好ましくは、1つ以上のABMが、配列番号15若しくは21(ABM2)、及び／又は配列番号17若しくは22(ABM3)に記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも80%同一の配列を含み、

より好ましくは、1つ以上のABMが、配列番号15若しくは21(ABM2)、配列番号14若しくは20(ABM1)、及び／又は配列番号17若しくは22(ABM3)に記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも80%同一の配列を含み、

最も好ましくは、1つ以上のABMが、配列番号16又は配列番号18又は配列番号19又は配列番号23若しくは26、27、28、43、44、若しくは45のうちのいずれかに記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも80%同一の配列を含み、

第2のポリペプチドが、

a) 切断された付着因子ドメイン(CAD)若しくはその一部分の配列、好ましくは、配列番号12若しくは13に記載の配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一の配列を有するCADの配列を含まず、かつ／あるいは

b) Argー若しくはLysージンジパインのDUF2436ドメインの全長に実質的に対応する、好ましくは配列番号24に記載のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一の配列を含む。

【0013】

好ましくは、キメラ又は融合タンパク質は、P. gingivalisのArgー若しくはLysージンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一である配列を含むか、又はそれらからなる1つ以上の更なるポリペプチドを含む。P. gingivalisのArgー又はLysージンジパインの活性部位を含むか、又はそれらからなる1つ以上の更なるポリペプチドは、第1のポリペプチドのN末端、第1のポリペプチドのC末端、第2のポリペプチドのN末端、又は第2のポリペプチドのC末端に位置し得る。ある特定の実施形態では、P. gingivalisのArgー若しくはLysージンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一である配列を含むか、又はそれらからなる少なくとも2つの更なるポリペプチドが存在し得る。そのような実施形態では、2つの更なるポリペプチドは、第2のポリペプチドのN末端、第2のポリペプチドのC末端、又は第2のポリペプチドのN末端及びC末端に位置し得る。

【0014】

1つ以上の更なるポリペプチドは、キメラ若しくは融合タンパク質の第1若しくは第2のポリペプチドに、好ましくは50アミノ酸以下のリンカーを介して連結され得るか、又は第1若しくは第2のポリペプチドに直接に連結され得る。

【0015】

任意の実施形態では、第1のポリペプチドは、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる：配列番号1～11、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一の配列。

【0016】

1つ以上の更なるポリペプチドは、好ましくは、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる：配列番号1～11、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一の

10

20

30

40

50

配列。

【0017】

任意の実施形態では、*P. gingivalis*のArgー又はLysージンジパインの活性部位のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる第1のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であるアミノ酸配列を含むか、若しくはそれからなるか、又はアミノ酸配列が同一である。第1のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、異種ジンジパインの活性部位に（例えば、*P. gingivalis*の異なる株のジンジパインに）由来し得る。第1のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、異なるジンジパインに由来するアミノ酸配列を有し得る（例えば、ポリペプチドのうちの1つは、Kgp由来の活性部位のアミノ酸配列を有し、他のポリペプチドは、Rgp由来の活性部位のアミノ酸配列を有するか、又は代替的にポリペプチドのうちの1つは、RgpA由来の活性部位のアミノ酸配列を有し、他のポリペプチドは、RgpB由来の活性部位のアミノ酸配列を有する）。

10

【0018】

第1の態様では、本発明は、*P. gingivalis*に対する免疫応答を誘導するためのキメラ又は融合タンパク質を提供し、そのタンパク質が、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドを含み、

A) 第1のポリペプチドが、*P. gingivalis*のArgー若しくはLysージンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一である配列を含むか、又はそれからなり、

20

B) 第2のポリペプチドが、*P. gingivalis*のArgー又はLysージンジパインの付着因子ドメインのアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなり、

第2のポリペプチドが、1つ以上の付着因子結合モチーフ（ABM）の配列を含み、好ましくは、ABMが、DUF2436ドメインと、*P. gingivalis*ジンジパインの切断された付着因子ドメイン（CAD）との間のABMの一部又は全てに対応し、

好ましくは、1つ以上のABMが、配列番号15若しくは21（ABM2）、及び／又は配列番号17若しくは22（ABM3）に記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一の配列を含み、

30

より好ましくは、1つ以上のABMが、配列番号15若しくは21（ABM2）、配列番号14若しくは20（ABM1）、及び／又は配列番号17若しくは22（ABM3）に記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一の配列を含み、

最も好ましくは、1つ以上のABMが、配列番号16又は配列番号18又は配列番号19又は配列番号23若しくは26、27、28、43、44、若しくは45のうちのいずれかに記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一の配列を含み、

40

第2のポリペプチドが、

a) 切断された付着因子ドメイン（CAD）、好ましくは、配列番号12若しくは13に記載の配列、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一の配列を有するCADの配列を含まず、

任意選択で、キメラ又は融合タンパク質が、*P. gingivalis*のArgー若し

50

くは *Lys* - ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 80 % 同一である配列を含むか、又はそれからなる 1 つ以上の更なるポリペプチドを含む。

【0019】

P. gingivalis の *Arg* - 又は *Lys* - ジンジパインの活性部位を含むか、又はそれらからなる 1 つ以上の更なるポリペプチドは、第 1 のポリペプチドの N 末端、第 1 のポリペプチドの C 末端、第 2 のポリペプチドの C 末端の第 2 のポリペプチドの N 末端に位置し得る。1 つ以上の更なるポリペプチドは、キメラ若しくは融合タンパク質の第 1 若しくは第 2 のポリペプチドに、好ましくは 50 アミノ酸以下のリンカーを介して連結され得るか、又は第 1 若しくは第 2 のポリペプチドに直接に連結され得る。

【0020】

任意の実施形態では、第 1 のポリペプチドは、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる：配列番号 1 ~ 11、又はそれらに対して少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % 同一の配列。

【0021】

1 つ以上の更なるポリペプチドは、好ましくは、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる：配列番号 1 ~ 11、又はそれらに対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % 同一の配列。

【0022】

本発明の第 1 の態様の任意の実施形態では、*P. gingivalis* の *Arg* - 又は *Lys* - ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる第 1 のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % 同一であるアミノ酸配列を含むか、若しくはそれからなるか、又はアミノ酸配列が同一である。第 1 のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、異種ジンジパインの活性部位に（例えば、*P. gingivalis* の異なる株のジンジパインに）由来し得る。第 1 のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、異なるジンジパインに由来するアミノ酸配列を有し得る（例えば、ポリペプチドのうちの 1 つは、*Kgp* 由来の活性部位のアミノ酸配列を有し、他のポリペプチドは、*Rgp* 由来の活性部位のアミノ酸配列を有するか、又は代替的にポリペプチドのうちの 1 つは、*RgpA* 由来の活性部位のアミノ酸配列を有し、他のポリペプチドは、*RgpB* 由来の活性部位のアミノ酸配列を有する）。

【0023】

本発明の第 1 の態様の特に好ましい実施形態では、キメラ又は融合タンパク質は、41 若しくは 42 のうちのいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列を含むか、又はそれらからなる。

【0024】

第 2 の態様では、本発明は、*P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導するためのキメラ又は融合タンパク質を提供し、そのタンパク質が、第 2 のポリペプチドに連結された第 1 のポリペプチドを含み、

A) 第 1 のポリペプチドが、*P. gingivalis* の *Arg* - 若しくは *Lys* - ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 80 % 同一である配列を含むか、又はそれらからなり、

B) 第 2 のポリペプチドが、*P. gingivalis* の *Arg* - 又は *Lys* - ジンジパインの付着因子ドメインのアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなり、

第 2 のポリペプチドが、1 つ以上の付着因子結合モチーフ (ABM) の配列を含み、好

10

20

30

40

50

ましくは、A B Mが、D U F 2 4 3 6ドメインと、P . g i n g i v a l i sジンジパインの切断された付着因子ドメイン（C A D）との間のA B Mの一部又は全てに対応し、

好ましくは、1つ以上のA B Mが、配列番号15若しくは21（A B M 2）、及び／又は配列番号17若しくは22（A B M 3）に記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも80%同一の配列を含み、

より好ましくは、1つ以上のA B Mが、配列番号15若しくは21（A B M 2）、配列番号14若しくは20（A B M 1）、及び／又は配列番号17若しくは22（A B M 3）に記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも80%同一の配列を含み、

最も好ましくは、1つ以上のA B Mが、配列番号16、又は配列番号18、19、若しくは23、又は配列番号26、27、28のうちのいずれかに記載の配列、あるいはそれらに対して少なくとも80%同一の配列を含み、

第2のポリペプチドが、

a) 切断された付着因子ドメイン（C A D）又はその一部分、好ましくは、配列番号12若しくは13に記載の配列又はそれらに対して少なくとも80%同一の配列を有するC A Dの配列を含まず、かつ

b) A r g－若しくはL y s－ジンジパインのD U F 2 4 3 6ドメインの全長に実質的に対応する、好ましくは配列番号24に記載のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一の配列を含む。

【0025】

本明細書で使用される場合、D U F 2 4 3 6ドメインの全長に実質的に対応するアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも80%同一の配列は、A r g－又はL y s－ジンジパインのD U F 2 4 3 6ドメインの長さの少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である配列を指す。

【0026】

好ましい実施形態では、A r g－又はL y s－ジンジパインのD U F 2 4 3 6ドメインのアミノ酸配列は、配列番号24に記載の配列であるか、又はそれに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一の配列である。

【0027】

最も好ましくは、第2のポリペプチドは、配列番号26、27、若しくは28に記載の配列、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一の配列を含むか、又はそれらからなる。

【0028】

好ましくは、キメラ又は融合タンパク質は、P . g i n g i v a l i sのA r g－若しくはL y s－ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一である配列を含むか、又はそれらからなる1つ以上の更なるポリペプチドを含む。P . g i n g i v a l i sのA r g－又はL y s－ジンジパインの活性部位を含むか、又はそれらからなる1つ以上の更なるポリペプチドは、第1のポリペプチドのN末端、第1のポリペプチドのC末端、第2のポリペプチドのC末端の第2のポリペプチドのN末端に位置し得る。1つ以上の更なるポリペプチドは、キメラ若しくは融合タンパク質の第1若しくは第2のポリペプチドに、好ましくは50アミノ酸以下のリンカーを介して連結され得るか、又は第1のポリペプチドに直接に連結され得る。

【0029】

任意の実施形態では、第1のポリペプチドは、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる：配列番号1～11、又はそれらに対して80%、81%、

10

20

30

40

50

82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一の配列。

【0030】

1つ以上の更なるポリペプチドは、好ましくは、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる：配列番号1～11、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一の配列。

【0031】

任意の実施形態では、*P. gingivalis*のArgー又はLysージンジパインの活性部位のアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる第1のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であるアミノ酸配列を含むか、若しくはそれらからなるか、又はアミノ酸配列が同一である。第1のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、異種ジンジパインの活性部位に（例えば、*P. gingivalis*の異なる株のジンジパインに）由来し得る。第1のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、異なるジンジパインに由来するアミノ酸配列を有し得る（例えば、ポリペプチドのうちの1つは、Kgp由来の活性部位のアミノ酸配列を有し、他のポリペプチドは、Rgp由来の活性部位のアミノ酸配列を有するか、又は代替的にポリペプチドのうちの1つは、RgpA由来の活性部位のアミノ酸配列を有し、他のポリペプチドは、RgpB由来の活性部位のアミノ酸配列を有する）。

【0032】

本発明の第2の態様の特に好ましい実施形態では、キメラ又は融合タンパク質は、配列番号29、30、31、32、33、34のうちのいずれか1つに記載のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列を含むか、又はそれらからなる。

【0033】

本発明の任意の態様の任意の実施形態では、キメラ又は融合タンパク質は、本明細書に定義される第1及び第2のポリペプチドの配列からなるか、又はそれらから本質的になる。したがって、キメラ又は融合タンパク質は、天然に存在するジンジパインポリタンパク質配列におけるそれらのドメインの構成とは異なるドメインの配置又は構成を含むことが理解されるであろう。換言すれば、第1及び第2のポリペプチド及びそれにおけるドメインは、天然に存在するジンジパインポリタンパク質と異なる空間構成を有する。

【0034】

本発明の任意の態様の任意の実施形態では、第1及び第2のポリペプチドは連結されている。第1及び第2のポリペプチドは、直接、リンカーを介して、又は100アミノ酸以下、好ましくは50アミノ酸以下のポリペプチド配列を介して連結され得る。好ましくは、第1及び第2のポリペプチドは、直接連結されているか、又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15アミノ酸以下によって連結されている。最も好ましくは、第1及び第2のポリペプチドは、直接結合されている。

【0035】

本発明の任意の態様の任意の実施形態では、第1のポリペプチドのC末端残基は、直接、リンカーを介して、又は50アミノ酸以下のポリペプチド配列を介して、第2のポリペプチドのN末端残基に連結され得る。代替的には、第1のポリペプチドのN末端残基は、直接、リンカーを介して、又は50アミノ酸以下のポリペプチド配列を介して、第2のポリペプチドのC末端残基に連結され得る。

【0036】

本発明の任意の態様では、Argー又はLysージンジパインに由来するDUF243

6ドメイン（存在する場合）及びABMDドメインは、直接連結され得るか、又はリンカーを介して若しくはポリペプチド配列を介して接続され得る。好ましくは、DUF2436及びABMDドメインは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15アミノ酸を含む短いリンカー配列を介して連結されている。特に好ましい実施形態では、DUFドメイン及びABMDドメインは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15アミノ酸以下の短いリンカー配列を介して連結されている。

【0037】

好ましい実施形態では、DUF2436及びABMDドメイン（それぞれ、配列番号24又は25及び18の代表的なアミノ酸配列を有するは、アミノ酸配列EVDDSPを有するペプチド配列を介して連結され得る。

10

【0038】

任意の実施形態では、更なるポリペプチドは、第1及び第2のポリペプチドを含むキメラ又は融合タンパク質に直接又はリンカーを介して接続され得る。更なるポリペプチドが、第2のポリペプチドを介して融合タンパク質のC末端領域に接続されている実施形態では、好ましくは、第2のポリペプチドのC末端は、更なるポリペプチドのN末端に直接接続されている。（例えば、付着因子ドメインのC末端は、好ましくは、活性部位アミノ酸配列のN末端に直接接続されている）。

【0039】

本発明の任意の態様の任意の実施形態では、リンカー領域は、15アミノ酸以下、好ましくは2アミノ酸超のアミノ酸配列である。溶解性に最小限の影響を及ぼすものを含む、タンパク質構築物における使用のための好適なリンカーは、当該技術分野で既知である。有用なリンカーとしては、当該技術分野で周知であり、様々な順序で組み合わせられたグリシン及びセリン単位を含む、グリシン-セリン（GlySer）リンカーが挙げられる。例として、（GS）、（GSGGS）_n、（GGGS）_n、及び（GGGGS）_nが挙げられるが、これらに限定されず、_nは少なくとも1の整数、典型的には1～約10、例えば1～約8、1～約6、又は1～約5の整数である。他の有用なリンカーとしては、DSSG、DSSGAS、KLDSG、又は本明細書に記載の他のものが挙げられる。ある特定の実施形態では、リンカー領域は、天然ジンジパイン（gingipain）タンパク質配列に由来し得る。

20

30

【0040】

本発明はまた、本明細書に定義されるキメラ又は融合タンパク質をコードする核酸も提供する。

【0041】

好ましくは、核酸は、本明細書の表1に定義されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ以上をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0042】

任意の実施形態では、そのような核酸は、核酸がプロモーターに作動可能に連結されている発現構築物に含まれる。そのような発現構築物は、ベクター、例えば、プラスミド、又はウイルスベクターにあり得る。

40

【0043】

本発明はまた、本明細書に記載の核酸又は核酸ベクターを含む細胞を提供する。本発明の細胞の例としては、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、又は哺乳動物細胞が挙げられる。好ましくは、細胞は、単離されているか、実質的に精製されているか、又は組換えられている。

【0044】

本発明はまた、任意選択で薬学的に許容される担体と組み合わせて、本明細書に記載のキメラ又は融合タンパク質を含む組成物を提供する。

【0045】

組成物はまた、キメラ又は融合タンパク質に対する免疫応答を増強するためのアジュバ

50

ントを含み得る。

【0046】

したがって、本発明は、対象における *P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導するためのワクチン又は免疫刺激組成物であって、組成物が、

i) 本明細書に記載のキメラ又は融合タンパク質の形態の免疫原と、

ii) 対象における免疫原に対する免疫応答を増強するためのアジュバントと、を含む、ワクチン又は免疫刺激組成物を更に提供する。

【0047】

好ましくは、本発明の組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物に提供される唯一の免疫原は、本明細書に記載のキメラ又は融合タンパク質である。

【0048】

本発明はまた、対象における *P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導するための方法であって、方法が、それを必要とする対象に、本明細書に記載のキメラ若しくは融合タンパク質、ワクチン、又は免疫刺激組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【0049】

本発明はまた、対象における *P. gingivalis* に対する体液性免疫応答を誘導する方法であって、方法が、対象に、本明細書で定義されるキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【0050】

好ましくは、誘導される免疫応答は、*Th1* 免疫応答から *Th2* 免疫応答への切り替えを含む。

【0051】

任意の実施形態では、本明細書に記載のキメラ若しくは融合タンパク質（又はそれらを含むワクチン若しくは他の組成物）の投与によって誘発される免疫応答は、好ましくは、抗原特異的であることが理解されるであろう。したがって、好ましい実施形態では、本明細書に記載の方法並びに組成物及びキメラタンパク質は、*P. gingivalis* ジンジン抗原に対する免疫応答、好ましくは防御免疫応答を誘導するためのものである。

【0052】

任意の実施形態では、本発明の組成物、キメラタンパク質、及び方法は、*P. gingivalis* に対する対象の免疫応答（例えば、防御免疫応答）を強化するためのものであり得る。

【0053】

本発明はまた、対象に、本明細書で定義されるキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物を投与することを含む、*P. gingivalis* 感染に対して対象を免疫化する方法を提供する。

【0054】

任意の実施形態では、本発明のキメラ若しくは融合タンパク質、又はそれらを含む組成物若しくはワクチンを受けたか、若しくは投与された対象は、タンパク質、組成物、又はワクチンを受けていない対象と比較して、*P. gingivalis* による感染に対する保護レベル、又は *P. gingivalis* 感染の1つ以上の症状の重症度の増加を有する。

【0055】

なお更に、本発明は、対象における *P. gingivalis* 感染を治療する方法であって、方法が、それを必要とする対象に、本明細書で定義されるキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物を投与し、それによって、対象における *P. gingivalis* 感染を治療することを含む、方法を提供する。

【0056】

本発明は、*P. gingivalis* による感染に関連する症状の重症度を低減するか、又は最小限に抑えるための方法であって、それを必要とする個体に、本明細書に定義さ

10

20

30

40

50

れるキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物を投与することを含み、症状が、腫れた（swollen）又は腫れた（puffy）歯茎、出血しやすい歯茎、後退した歯茎、歯周りの歯周ポケット、歯の支持組織（歯周靱帯、セメント質、及び／又は歯槽骨）の喪失、歯茎と歯との間の膿、並びに歯肉炎からなる群から選択される、方法を提供する。

【0057】

本発明はまた、対象におけるP. gingivalis 関連疾患を治療するための方法であって、方法が、それを必要とする個体に、本明細書で定義されるキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物を投与することを含む、方法を提供する。好ましくは、P. gingivalis 関連疾患は、歯周病を含む。

10

【0058】

本発明は、本発明のキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物の投与を含む治療方法はまた、抗菌化合物、抗炎症剤のうちの1つ以上の投与を含み得ることを提供する。

【0059】

本発明はまた、

●対象におけるP. gingivalis に対する免疫応答（好ましくは、防御免疫応答）を誘導するか、

●P. gingivalis 感染に対して対象を免疫化するか、

●対象におけるP. gingivalis 感染を治療するか、

20

●P. gingivalis 感染の1つ以上の症状の重症度を最小限に抑えるか、若しくは低減するか、又は

●対象におけるP. gingivalis 関連疾患を治療する際の使用のための医薬品の製造における、本明細書で定義されるキメラ又は融合タンパク質の使用を提供する。

【0060】

本発明はまた、

●対象におけるP. gingivalis に対する免疫応答（好ましくは、防御免疫応答）を誘導するか、

●P. gingivalis 感染に対して対象を免疫化するか、

●対象におけるP. gingivalis 感染を治療するか、

30

●P. gingivalis 感染の1つ以上の症状の重症度を最小限に抑えるか、若しくは低減するか、又は

●対象におけるP. gingivalis 関連疾患を治療する際の使用のための、本明細書で定義されるキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン又は免疫刺激組成物を提供する。

【0061】

本発明による使用のための任意の方法、使用、又はタンパク質、組成物、若しくはワクチンでは、対象は、P. gingivalis に感染しているか、又は感染するリスクがある任意の対象であり得る。対象は、ヒトであり得る。対象は、P. gingivalis に感染しているか、又は感染するリスクがあるペットなどの獣医学的対象であり得る。

40

【0062】

本発明はまた、P. gingivalis に指向された抗体を得るための方法であって、方法が、非ヒト動物に、本発明のキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物を投与し、それによって、動物において、P. gingivalis に指向された抗体を生成することを含む、方法を提供する。好ましくは、本方法は、抗体を動物から（例えば、動物の血液から抽出する）、又はその卵から（動物が鳥類種、好ましくはニワトリである場合）単離することを更に含む。

【0063】

本発明はまた、P. gingivalis に指向された抗体を含む抗体調製物であって、抗体調製物が、非ヒト動物に、本発明のキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワク

50

チン、又は免疫刺激組成物を投与し、それによって、動物において、*P. gingivalis*に指向された抗体を生成すること、及び動物又はその卵から抗体を単離することによって得られる、抗体調製物を提供する。

【0064】

*P. gingivalis*に指向された抗体は、*P. gingivalis*感染を排除若しくは低減するために治療的に、又は*P. gingivalis*感染の重症度を予防又は低減するために予防的に、使用され得る。

【0065】

本発明はまた、本明細書で定義されるキメラ又は融合タンパク質を含む組成物を含むキットであって、任意選択で、キットが、1つ以上のサイトカイン及び／又はアジュバントを密封された容器中に含む、キットも提供する。

【0066】

好ましくは、キットは、組成物が個体を免疫化するために使用されることを示すラベル又は添付文書を含み、任意選択で、ラベル又は添付文書は、使用説明書を含む。

【0067】

本明細書全体にわたって、別途文脈が要求しない限り、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、及び「含む (comprising)」という語句は、記載されたステップ若しくは要素又はステップ若しくは要素の群を包含するが、任意の他のステップ若しくは要素又はステップ若しくは要素の群を除外しないことを意味することが理解されるであろう。したがって、「含む」などの用語の使用は、列挙された要素が必要又は必須であるが、他の要素が任意選択であり、存在しても存在しなくてもよいことを示す。「からなる」とは、「からなる」という句に続くもの全てを含み、それらに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という句は、列挙された要素が必要又は必須であり、他の要素が存在していなくてもよいことを示す。「から本質的になる」とは、句の後に列挙された任意の要素を含み、列挙された要素について本開示で特定された活性又は作用を妨げないか、又はそれに寄与しない他の要素に限定されることを意味する。したがって、「から本質的になる」という句は、列挙された要素が必要又は必須であるが、他の要素（例えば、ポリペプチド配列のN末端又はC末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又は20個超の追加のアミノ酸残基）が任意選択であり、それらが列挙された要素の活性又は作用に影響を与えるかどうかに応じて、存在してもしなくてもよいことを示す。

【0068】

本発明の更なる態様及び前述の段落に記載の態様の更なる実施形態は、例として与えられ、添付の図面を参照した以下の説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1-1】 A. マウス歯周炎モデル-治療用ワクチン接種。B. 本発明のキメラ又は融合タンパク質を生成するための、Kgpジンジパインポリタンパク質及びそれに由来する構成要素のドメイン構造を示す概略図。

【図1-2】 (上記の通り。)

【図2】 A. K1ドメインの有するか、又は有しない、全長又は切断されたDUFドメインのいずれかを含有する組換えバリエーションを発現する*E. coli*画分のSDS-PAGE。低温及び低IPTG条件を使用した。全長DUFは、溶解性に重要である。全長K1は、溶解性に悪影響を及ぼす。B. DTTの非存在の存在下でのキメラ構造KDA及びKD K1のネイティブPAGE。KDAへのK1ドメインの付加は、溶解性を低減させる。

【図3】 骨損失研究。統計分析—一元配置ANOVA及び事後DunnettのT3。#は対照負荷群とは有意に異なる。

【図4】 熱殺傷された*P. gingivalis*全細胞に対する抗原の抗体アイソタイプ応答 (個々の血清)。ナীব=対照非負荷。Gingivalis=*P. gingiv*

10

20

30

40

50

a l i sでの対照負荷。キメラ＝K D c A K 1 n 抗原。A m o x＝アモキシシリン。

【図5】骨損失研究の統計分析－一元配置A N O V A及び事後D u n n e tのT 3。# p < 0 . 0 1、## p < 0 . 0 5 (T検定)は、対照負荷群とは有意に異なる。

【図6】骨損失研究。S＝可溶性画分、尿素＝精製に使用された尿素、A C＝親和性カラム精製、I B＝封入体、バッチ＝バッチ精製方法。統計分析：一元配置A N O V A及び事後D u n n e tのT 3。# p < 0 . 0 1は、対照負荷群とは有意に異なる。

【図7】様々な融合タンパク質構築物を用いた動物の免疫化後の骨損失研究研究。統計分析：一元配置A N O V A及び事後D u n n e tのT 3 対照負荷群とは有意に異なる# p < 0 . 0 5 ## p < 0 . 0 1 ### p < 0 . 0 0 1 #### p < 0 . 0 0 0 1。

【0070】

配列情報

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 : 配列情報

記述子	配列 番号	配列
KAS(活性部位 ドメイン)	1	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK
Kgp 活性部位 [432-468]	2	LNTGV[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L][L/V]T[A/T][T/S] Q[V/L]KALTNK[D/N]K
RgpA 活性部位 [426-462]	3	FNGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQ
KAS1	4	LNTGV[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L]
KAS2	5	NTGV[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L][L/V]T[A/T][T/S]Q [V/L]KALTNK[D/N]K
KAS3	6	V[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L][L/V]
PAS1K	7	LNTGVSFANYTAHGSETAWADP
RAS1	8	FNGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSH
RAS2	9	NGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQ
RAS3	10	ISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHF
PAS1R	11	FNGGISLANYTGHGSETAWGT
K1(CAD ドメイン)	12	TLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGC VYSESFGLGGIGVLTPDNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDA NYASEHYAVYASSTGNDASNFTNALLEETITAKGVRSPKAIR GRIQGTWRQKTVDLPAGTKYVAFRHFQSTDMFYIDLDEVEIK ANGKR
K1n(切断された CAD ドメイン K1)	13	TLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGC VYSESFGLGGIGVLTPDNYLITPALDLPNGG
ABM1 Kgp [942-970]	14	SNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNGT
ABM2 Kgp [885-941]	15	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKY TAGVSPKVCKDVTVEG
ABM2+1 ペプチド [885-970]	16	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKY TAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDA PNGT
ABM3 Kgp [971-983]	17	PNPNPNPNPNPGT
ABM2+1+3 ペプチド [885-983]	18	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKY TAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDA PNGTPNPNNPNPNPNPGT
ABM 2+3	19	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKY TAGVSPKVCKDVTVEGPNPNPNPNPNPNPGT
ABM1 RgpA	20	SNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT
ABM2 RgpA	21	SDYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVA(A/T)GNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEG
ABM3 Rgp [939-971]	22	PNPNPNPNPNPNPGT

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

ABM 2+1+3 Rgp	23	SDYTYTVYRDGDKIKEGLTATTFEEDGVA(A/T)GNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLK WDAPNGTPNPNPNPNPNPNPGT
DUF2436	24	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGD NTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLI PANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDM
De (切断された DUF2436)	25	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPAS GKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDG TDM
DUF2436+ABM213	26	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGD NTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLI PANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDM VEDDSPASYTYTVYRDGDKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEY CVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV TLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 + ABM2+3	27	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGD NTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLI PANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDM VEDDSPASYTYTVYRDGDKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEY CVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGPNNPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 + ABM2+1	28	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGD NTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLI PANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDM VEDDSPASYTYTVYRDGDKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEY CVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV TLKWDAPNGT
KDAK (すなわち、 K ドメイン、 完全 DUF ドメイン、 ABM2+1+3、 K ドメイン)	29	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSR EVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGY QFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANA DPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAG DGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDM VEDDSPASYTYTVYRDGDKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEY CVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV TLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPL LTTSQLKALTNKD
KDA	30	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSR EVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGY QFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANA DPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAG DGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDM VEDDSPASYTYTVYRDGDKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEY CVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV TLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPNPGT

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

KDAKK	31	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSR EVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGY QFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANA DPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAG DGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDD SPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPL LTTSQLKALTNKDKNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQ LKALTNKDK
KDAR	32	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSR EVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGY QFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANA DPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAG DGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDD SPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTNGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGT SHFGTTHVKQLTNSNQ
KKDA	33	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKKLNTG VSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSREVK RIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGG NQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTA GVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPN GTPNPNPNPNPNPGT
KKDAKK	34	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKDSSGA SNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGS REVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGY QFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANA DPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAG DGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDD SPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPL LTTSQLKALTNKDKKL DSSGNTGVSFANYTAHGSETAWADP LLTTSQLKALTNKDK
KDeAKIn (従来技術のカメラ)	35	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIP ANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMW IAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEV EDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV TLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTID ADGDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLT PDNYLITPALDLPNGG

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

KDAK1n	36	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSR EVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGY QFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANA DPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAG DGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDD SPASYTYTVYRDGTIKIEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGH GWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPNYLITPA LDLPNGG	10
KDAK1	37	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIP ANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMW IAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEV EDDSPASYTYTVYRDGTIKIEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV LKWDA PNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDAD GDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPNY LITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASSTGND SNFTNALLEETITAKGVRSPKAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGT KYVAFRHFQSTDMFYIDLDEVEIKANGKR	20
KDcAK1nK 活性部位は下線	38	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIP ANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMW IAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEV EDDSPASYTYTVYRDGTIKIEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV LKWDA PNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDAD GDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPNY LITPALDLPNGGNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKA LTNKDK	30
KDAK1nK 活性部位は下線	39	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSR EVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGY QFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANA DPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAG DGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDD SPASYTYTVYRDGTIKIEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGH GWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPNYLITPA LDLPNGGNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNK DK	40

【表 1 - 5】

KKDAKlnKK K ドメインは下線 リンカーは太字	40	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK DSSGA S NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGS REVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGY QFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANA DPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAG DGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDD SPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSFENGIPASWKTIDADGDGH GWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPNYLITPA LDLPNGGNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNK DKKLDSSG NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTN KDK
KDcA	41	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIP ANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMW IAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEV EDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVT LKWDAPNGTPNPNPNPNPNPG
KDcAK	42	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIP ANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMW IAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEV EDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVT LKWDAPNGTPNPNPNPNPNPGNTGVSFANYTAHGSETAWAD PLLTTSQLKALTNKDK
Dc+2+1+3	43	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPAS GKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDG TDMEVEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAG NHEYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSV GQKVTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
Dc+2+3	44	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPAS GKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDG TDMEVEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAG NHEYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGPNNPNPNPNPNPGT
Dc+2+1	45	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPAS GKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDG TDMEVEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAG NHEYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSV GQKVTLKWDAPNGT

【発明を実施するための形態】

【0071】

本明細書に開示及び定義された本発明は、テキスト又は図面から言及されるか、又は明らかな個々の特徴の2つ以上の選択的な組み合わせの全てに及ぶことが理解されるであろう。これらの種々の組み合わせの全ては、本発明の様々な代替の態様を構成する。

【0072】

本発明のある特定の実施形態について詳細に言及する。本発明は実施形態と併せて説明されるが、本発明をそれらの実施形態に限定する意図ではないことが理解されるであろう。逆に、本発明は、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に含まれ得る全て

の代替物、改変物、及び同等物を網羅することが意図される。

【0073】

当業者は、本発明の実施に使用され得る、本明細書に記載のものと類似又は同等の多くの方法及び材料を認識するであろう。本発明は、決して、説明される方法及び材料に限定されない。本明細書に開示及び定義された本発明は、テキスト又は図面から言及されるか、又は明らかな個々の特徴の2つ以上の選択的な組み合わせの全てに及ぶことが理解されるであろう。これらの種々の組み合わせの全ては、本発明の様々な代替の態様を構成する。

【0074】

本明細書で参照される特許及び刊行物の全ては、それらの全体が参照により組み込まれる。

10

【0075】

本明細書を解釈する目的で、単数形で使用される用語は、複数形も含み、逆もまた同様である。

【0076】

本発明に至る作業において、本発明者らは、*P. gingivalis*に対する免疫応答を誘導する際の使用のための様々なキメラ又は融合タンパク質、及びワクチン候補としての使用のためのそのようなキメラの大規模な産生のための方法を調査した。

【0077】

本発明者らは、*P. gingivalis* ジンジパインの構成要素に由来するキメラ又は融合タンパク質の大規模な製造及び産生に関連する様々な問題を特定した。第一に、従来技術に記載のキメラ又は融合タンパク質は、可溶性タンパク質として、十分に多い量で産生することが困難である。より具体的には、従来技術のキメラタンパク質は、典型的には、*E. coli* の封入体内で産生されるため、下流の臨床製品開発のために大量の可溶性タンパク質を産生することが困難である。

20

【0078】

E. coli で産生された場合の溶解性の低減はまた、製造の時間及び規模、並びに一度可溶化され、封入体から再折り畳まれたタンパク質の安定性の低下にも実質的に寄与する。

【0079】

したがって、本発明は、*P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導する際の使用のためのキメラ又は融合タンパク質の改善された設計、並びにそれを含む方法及び使用に関する。

30

【0080】

任意の実施形態では、本発明のキメラ又は融合タンパク質は、従来技術に記載のキメラ又は融合タンパク質と比較して、改善された溶解性及び／又は安定性を有する。改善された溶解性及び／又は安定性は、臨床環境における使用のための融合タンパク質の大規模な産生に関して大きな利点を提供する。

【0081】

代替の実施形態では、本発明のキメラ又は融合タンパク質は、従来技術のキメラ又は融合タンパク質と比較して、凝集する傾向の低減を有する。凝集は、治療用／予防用タンパク質の大規模な製造及び産生を妨げ得る。その結果、本発明のキメラタンパク質の凝集の傾向の低減は、*P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導する際の使用のための従来技術のキメラタンパク質よりも大きな改善をもたらす。

40

【0082】

なお更に、任意の実施形態では、本発明のキメラ又は融合タンパク質は、従来技術のキメラ又は融合タンパク質と比較して増加した免疫原性を有する。

【0083】

したがって、本発明者らは、*P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導するためのキメラ又は融合タンパク質を得るための様々な新しいアプローチを特定しており、こ

50

れにより、従来技術よりも1つ以上の利点を有するキメラ又は融合タンパク質がもたらされる。

【0084】

本発明者らは、本明細書に記載のように、*P. gingivalis*に対する免疫応答を誘導するためのキメラ又は融合タンパク質を生成するための新しいアプローチのうちの1つ以上が、*P. gingivalis*に対する免疫応答を誘導するための好適な免疫原性組成物の製造の容易さの増加、貯蔵寿命の改善、及び／又は免疫原性の改善を含む利点をもたらし得ると考えている。

【0085】

ジンジパイン

*P. gingivalis*の病原性は、とりわけ、システインプロテイナーゼ（ジンジパイン）、線毛、ヘム結合タンパク質、及び外膜輸送タンパク質を含む多数の表面関連病原性因子に起因する。特に、*P. gingivalis*の細胞外Arg及びLys特異的プロテイナーゼ「ジンジパイン」（RgpA／B及びKgp）は、コロニー形成、宿主組織への浸透、免疫応答の調節不全、生体異常、及び疾患に重要である主要な病原性因子として関与している。

【0086】

ジンジパイン、特にLys特異的プロテイナーゼKgpは、マウス歯周炎モデルにおいて歯槽骨吸収を誘導するために*P. gingivalis*にとって不可欠である。ジンジパインはまた、重度の歯周炎の部位の歯肉組織において、歯肉下プラークの近位で高濃度で、及び歯肉組織のより深い遠位の部位でより低濃度で見出されている。Lys特異的及びArg特異的プロテイナーゼは、インビトロで様々な宿主タンパク質、例えば、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、及びラミニンを分解することが示されている。血漿宿主防御及び調節プロテイナーゼ阻害剤α-トリプシン、α2-マクログロブリン、抗キモトリプシン、アンチトロンビンIII、及びアンチプラスミンもまた、*P. gingivalis*由来のLys-及びArg-プロテイナーゼによって分解される。これは、慢性歯周炎の発症において*P. gingivalis*が果たす重要な役割を説明するための説得力のある機構の開発に至った。

【0087】

RgpA、RgpB、及びKgp遺伝子は全て、約22アミノ酸長のN末端シグナルペプチド、約200アミノ酸長の異常に長いプロペプチド、及び約480アミノ酸の触媒ドメインをコードする。触媒ドメインのC末端は、付着因子結合ドメイン（ABM、又は5つの異なる配列が記載されている）、「未知の機能のドメイン」（未知の機能の保存されたPfamドメインとして定義されるDUF2436と称される、IPR018832）、及びC末端付着因子ドメイン又は切断された付着因子ドメイン（又はCAD）から構成される大きな血球凝集素付着因子（HA）ドメインである。ABM、DUF、及びCADの特定の配置は、KgpとRgpA／Bとの間で変化する。

【0088】

Kgpポリタンパク質におけるドメインの構造を図1Bに示す。例えば、Kgpは、（N末端からC末端へ）触媒ドメイン、第1のABM（ABM1）、DUF2436、ABM2、ABM1、ABM3を含むドメイン、2つのCADドメイン（K1及びK2と称される）、ABM2及びABM1を含む更なるドメイン、更なるCADドメイン（K3と称される）、ABM2、並びにC末端ドメインを含む。

【0089】

本明細書で使用される場合、ABM1、2、及び3への言及は、概して、図1Bに示されるように、KgpのDUF2436の直前のC末端の配列におけるABM2、ABM1、及びABM3の順序で見出されるABMを指すと理解されるであろう。

【0090】

RgpB及びRgpAの触媒ドメインは、高度な配列相同性を共有する。しかしながら、RgpBは、HAドメインを欠き、外膜上に単量体形態で位置する。HAドメインのう

10

20

30

40

50

ちのいくつかは、C末端付着因子ドメイン又は切断された付着因子ドメイン（CAD）として代替的に記載されており、いくつかは、DUF（「未知の機能のドメイン」）2436ドメイン（未知の機能の保存されたPfamdメイン、IPR018832）である。

【0091】

RgpA及びKgp前駆体タンパク質は、非共有結合で会合したままの複数のドメインに切断され、大きな外膜タンパク質複合体を形成する。したがって、インビボでは、Arg及びLys特異的プロテイナーゼは、非共有結合で会合したプロテイナーゼ及び付着因子の細胞関連複合体に見出される。そのような複合体の1つは、RgpA-Kgpプロテイナーゼ-付着因子複合体（以前はPrtr-PrtrKプロテイナーゼ-付着因子複合体と称されていた）と指定されている。複合体は、45kDaのArg特異的カルシウム安定化システインプロテイナーゼ及び7つの配列関連付着因子ドメインから構成されている、

10

【0092】

本明細書で使用される場合、Lys-ジンジパイン触媒ドメインはまた、KASドメイン又はPASドメインとも称され得る。本明細書で使用される場合、Arg-ジンジパイン触媒ドメインはまた、RASドメイン又はPASドメインとも称され得る。典型的には、Lys-ジンジパイン又はArg-ジンジパインの触媒ドメインは、タンパク質のN末端約480アミノ酸領域に位置する。触媒ドメイン内の活性部位は、典型的には、アミノ酸残基426～446（RgpAの場合）及び432～453（Kgpの場合）に位置する。触媒ドメイン内に見出される例示的な活性部位ペプチドは、配列番号1～11として表1に記載されている

20

【0093】

本明細書で使用される場合、P. gingivalisのArg-又はLys-ジンジパインの付着因子ドメインは、典型的には、触媒ドメイン又は活性部位ドメインのC末端であるArg-又はLys-ジンジパインの領域を指すと理解されるであろう。付着因子ドメイン（HADドメインとも称される）は、典型的には、未知の機能のドメイン（DUF）ドメイン（特に、DUF2436 未知の機能の保存されたPfamdメイン、IPR018832）、並びにいくつかの付着因子結合モチーフ（ABM）ドメイン及び切断された付着因子ドメイン（CAD）を含む。

【0094】

第1のポリペプチド

本発明のキメラ又は融合タンパク質は、P. gingivalisのArg-X又はLys-Xプロテイナーゼ（それぞれ、本明細書においてArg-又はLys-ジンジパインとも称される）の活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一である配列を含むか、又はそれらからなる第1のポリペプチドを含む。

30

【0095】

任意の実施形態では、第1のポリペプチドは、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる：配列番号1～11、又はそれらに対して80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一の配列。

40

【0096】

免疫原性の改善

好ましくは、キメラ又は融合タンパク質は、P. gingivalisのArg-若しくはLys-ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一である配列を含むか、又はそれらからなる1つ以上の更なるポリペプチドを含む。P. gingivalisのArg-又はLys-ジンジパインの活性部位を含むか、又はそれらからなる1つ以上の更なるポリペプチドは、第1のポリペプチドのN末端、第1のポリペプチドのC末端、第2のポリペプチドのN末端、又は第2のポリペプチドのC末端に位置し得る。1つ以上の更なるポリペプチドは、キメラ若しくは融合タンパク質の第1若しくは第2のポリペプチドに、好ましくは50アミノ酸以下のリンカーを介して連結

50

され得るか、又は第1のポリペプチドに直接に連結され得る。

【0097】

1つ以上の更なるポリペプチドは、好ましくは、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる：配列番号1～11、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一の配列。

【0098】

任意の実施形態では、*P. gingivalis*のArg-又はLys-ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる第1のポリペプチド及び更なるポリペプチドは、同一のアミノ酸配列、又は互いに少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一である配列を含むか、又はそれらからなる。

【0099】

好ましい実施形態では、本発明のキメラ又は融合タンパク質は、*P. gingivalis*のArg-若しくはLys-ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一である配列を含むか、又はそれらからなる2つ以下、又は3つ以下、又は4つ以下のポリペプチドを含む。好ましくは、本発明のキメラ又は融合タンパク質は、*P. gingivalis*のArg-若しくはLys-ジンジパインの活性部位のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一である配列を含むか、又はそれらからなる5つ未満、より好ましくは4つ未満、最も好ましくは3つ未満のポリペプチドを有する。

【0100】

第2のポリペプチド

本発明のキメラ又は融合タンパク質は、*P. gingivalis*のArgX又はLys-Xプロテイナーゼの付着因子ドメインのアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%同一である配列を含むか、又はそれらからなる第2のポリペプチドを含む。

【0101】

第2のポリペプチドは、典型的には、*P. gingivalis*のArgX又はLys-Xプロテイナーゼの付着因子ドメイン(Kgp及びRgpAなど)において認識されるドメイン／モチーフである付着因子結合モチーフ(ABM)のうちの1つ以上に対応する少なくとも配列を含むことが理解されるであろう。

【0102】

Kgp及びRgpAについて定義されている5つのABMが存在する(ABM1～5)。これらのABMの例示的な配列を表1に記載する。

【0103】

典型的には、第2のポリペプチドは、2つ以上のABMを含み、好ましくは、第2のポリペプチドは、少なくともABM1及びABM2、又はABM1若しくはABM2の各々に対して少なくとも80%同一の配列を含む。第2のポリペプチドはまた、ABM3の配列又はそれに対して少なくとも80%同一の配列を含み得る。

【0104】

また、第2のポリペプチドにおけるABMペプチドの配置は、天然に存在する付着因子ドメインに見られるABMペプチドの配置に対応する必要はないことが理解されるであろう。例えば、ABMペプチドは、配列(N末端からC末端へ)ABM1、ABM2、ABM3などで第2のポリペプチドに配置され得る。代替的には、ABMペプチドは、Kgpの付着因子ドメイン1に存在するように、ABM2、ABM1、及びABM3などの天然に存在する付着因子ドメインにおける配置を反映するように配置され得る。

【0105】

なお更に、第2のポリペプチドにおけるABMは、隣接して配置され得るか、又は50

10

20

30

40

50

アミノ酸以下のアミノ酸配列によって互いに分離され得る。当業者であれば、本発明のキメラ又は融合タンパク質の設計において、A B M間の間隔は重要ではないことを理解するであろう。

【0106】

任意の実施形態では、第2のポリペプチドは、配列番号16に記載のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一の配列を含む。

【0107】

任意の実施形態では、第2のポリペプチドは、配列番号19に記載のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一の配列を含む。

【0108】

任意の実施形態では、第2のポリペプチドは、配列番号18若しくは23に記載のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一の配列を含む。

【0109】

任意の実施形態では、第2のポリペプチドは、配列番号26、27若しくは28、若しくは43、44、若しくは45に記載のアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一の配列を含む。

【0110】

本発明者らは、キメラ又は融合タンパク質における使用のために天然に存在するジンジパインに見られる様々なドメインを単純に選択することを含む従来技術の方法が、典型的には、組換え系において低発現であり、不溶性タンパク質として発現する傾向を有するタンパク質（例えば、E. coliの封入体において）の生成をもたらすことを立証した。

【0111】

本明細書の実施例を参照すると、本発明者らは、配列番号13に記載の配列（すなわち、CADドメインの切断された形態）が、Kgpポリタンパク質がどのようにタンパク質分解的に処理され、細胞表面上に組み立てられるかを表すことを認識した。したがって、そのような配列の包含は、P. gingivalisに対する免疫応答の誘導に重要であると考えられた。しかしながら、本発明者らは、驚くべきことに、この配列が存在する場合、E. coliにおいて発現された場合の組換えタンパク質の溶解性の低下及び封入体の形成に寄与したことを見出した。

【0112】

発明者らは、融合タンパク質にCADの完全な配列を含めることによって、この問題を修正しようとした。驚くべきことに、これは溶解性を改善せず、実際にはより低い溶解性に寄与した。

【0113】

したがって、本発明者らは、1つ以上の切断された付着因子ドメイン（CAD）又はその一部分に対応する配列の包含は、提案されているジンジパイン配列に由来するキメラタンパク質及びワクチン組成物の溶解性の低減に寄与することを見出した。

【0114】

したがって、本発明の特に好ましい実施形態では、第2のポリペプチドは、配列番号13に記載の配列、又はそれに対して少なくとも80%同一の配列を含まない。

【0115】

代替的には、第2のポリペプチドは、配列番号12に記載の配列、若しくはそれに対し

10

20

30

40

50

て少なくとも 80% 同一の配列又はそれらの一部分を含まない。

【0116】

本発明者らはまた、本発明のキメラ又は融合タンパク質が DUF2436 ドメインの一部のみ（すなわち、N 末端が切断された DUF2436 ドメイン）を含む場合、本発明のキメラ又は融合タンパク質の溶解性が低下することを見出した。

【0117】

本明細書の実施例を参照すると、本発明者らは、P. gingivalis ワクチン設計に対する従来技術のアプローチには、N 末端が切断された形態の DUF2436 ドメインが含まれることを認識した。切断された DUF2436 ドメインは、Kgp ポリタンパク質がどのようにタンパク質分解的に処理され、細胞表面上に組み立てられるかを表すが、本発明者らは、DUF2436 ドメインの全長の配列（すなわち、DUF2436 ドメインの N 末端部分を含む）を提供することが、可溶性組換えタンパク質の産生を実質的に改善することを見出した。

10

【0118】

したがって、好ましい実施形態では、本発明のキメラ又は融合タンパク質における第 2 のポリペプチドは、DUF2436 ドメインの残基 1～37 を含み、好ましくは、キメラタンパク質は、Argー又は Lysージンジパインの DUF2436 ドメインの全長に実質的に対応するアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 80% 同一の配列を含む。

【0119】

本明細書で使用される場合、DUF2436 ドメインの全長に実質的に対応するアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 80% 同一の配列は、Argー又は Lysージンジパインの DUF2436 ドメインの長さの少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% である配列を指す。

20

【0120】

好ましくは、DUF2436 ドメインは、配列番号 24 に記載の配列、又はそれに対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99% 同一の配列を含む。

【0121】

第 1 及び第 2 のポリペプチドの連結

30

本発明のキメラ又は融合タンパク質では、第 1 のポリペプチドの C 末端残基は、第 2 のポリペプチドの N 末端残基（付着因子ドメインポリペプチドに対応する）に共有結合されてもよく、又は第 1 のペプチドの N 末端残基は、第 2 のポリペプチドの C 末端残基（付着因子ドメインポリペプチドに対応する）に共有結合されてもよい。この配置では、第 1 のペプチド及び付着因子ドメインポリペプチドは、「直接連結されている」又は「隣接している」と言われる。

【0122】

他の実施形態では、キメラ又は融合タンパク質は、第 1 のペプチドを付着因子ドメインポリペプチドに連結するためのリンカーを含む。リンカーは、アミノ酸及び非アミノ酸リンカーの両方を含む、ペプチドをポリペプチドに接続することができる任意のリンカーであり得る。

40

【0123】

好ましくは、リンカーは、非免疫原性である。典型的には、リンカーは、アミノ酸から構成され、したがって、ペプチドリリンカーと称され得る。

【0124】

リンカーは、通常、最大 20 アミノ酸の長さを有するペプチドであるが、より長くてもよい。「に連結された」又は「に融合された」という用語は、2 つの部分の間に形成された共有結合、例えば、ペプチド結合を指す。したがって、本発明の文脈において、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、又は 22 アミノ酸以上の長さを有し得る。例えば、

50

本明細書に提供されるキメラ又は融合タンパク質は、第2のポリペプチドのN末端と第1のポリペプチドのC末端との間のような、P. gingivalis ジンジパイン活性ドメインのアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる第1のポリペプチドと、P. gingivalis ジンジパインの付着因子ドメインに対応する第2のポリペプチドとの間にリンカーを含み得る。そのようなリンカーは、融合タンパク質の異なるポリペプチドが独立して折り畳まれ、予想どおりに作用する可能性を高めることができるという利点を有する。好適なリンカーは、最大50アミノ酸長であり得るが、20アミノ酸未満、15アミノ酸未満、又は5アミノ酸未満が好ましい。リンカーは、第1のペプチド及び付着因子ドメインポリペプチドを、P. gingivalis トリプシン様酵素において通常観察されるよりもより近い空間配置にするように機能し得る。代替的には、それは、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチド（付着因子ドメインポリペプチドに対応する）に間隔を空け得る。

10

【0125】

溶解性に最小限の影響を及ぼすものを含む、タンパク質構築物における使用のための好適なリンカーは、当該技術分野で既知である。リンカーは、当業者に既知の任意のリンカーであり得、柔軟性リンカー（グリシン及びセリン残基の反復を含むものなど）、剛性リンカー（グルタミン酸及びリジン残基、隣接するアラニンの反復を含むものなど）、及び／又は切断可能なリンカー（プロテアーゼ切断による感受性である配列など）であり得る。そのようなリンカーの例は、当業者に既知であり、例えば、Chen et al., (2013) Advanced Drug Delivery Reviews, 65: 1357-1369に記載されている。

20

【0126】

有用なリンカーとしては、当該技術分野で周知であり、様々な順序で組み合わせられたグリシン及びセリン単位を含む、グリシン-セリン (GlySer) リンカーが挙げられる。例として、(GS)、(GS_n)、(GGGS)_n、及び(GGGGS)_nが挙げられるが、これらに限定されず、nは少なくとも1の整数、典型的には1～約10、例えば1～約8、1～約6、又は1～約5の整数である。

【0127】

いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、様々な長さ及び組み合わせのアミノ酸グリシン及びセリンを含み得る。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは、配列 Gly-Gly-Ser (GGS)、Gly-Gly-Gly-Ser (GGGS)、又は Gly-Gly-Gly-Ser (GGGGS) 及びそれらのバリエーション又は反復を含み得る。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは、アミノ酸配列 GGGGS (6アミノ酸長のリンカー) 又はそれ以上を含み得る。リンカーは、異なる長さのグリシン及びセリン残基 (GS) の一連の反復、すなわち、(GS)_n であり、nは、1～15以上の任意の数であり得る。例えば、リンカーは、(GS)₃ (すなわち、GS₃GS₃GS₃) 又はより長い (GS)₁₁ 又はそれ以上であり得る。nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11以上を含む任意の数であり得ることが理解されるであろう。そのような長さのリンカーを有する融合タンパク質は、本発明の範囲内に含まれる。同様に、リンカーは、セリン残基によって分離された一連の反復のグリシン残基であり得る。例えば、(GGGGS)₃ (すなわち、リンカーは、アミノ酸配列 GGGGS₃GGGGS₃GGGGS₃ (G4S)₃ を含み得る。) 及びそのバリエーションである。

30

40

【0128】

一実施形態では、ペプチドリンカーは、アミノ酸配列 GGGGS (6アミノ酸長のリンカー) 又はそれ以上を含み得る。リンカーは、異なる長さのグリシン及びセリン残基 (GS) の一連の反復、すなわち、(GS)_n であり、nは、1～15以上の任意の数であり得る。例えば、リンカーは、(GS)₃ (すなわち、GS₃GS₃GS₃) 又はより長い (GS)₁₁ 又はそれ以上であり得る。nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11以上を含む任意の数であり得ることが理解されるであろう。

【0129】

50

他の有用なリンカーとしては、DSSG、DSSGAS、KLDSSG、及びそれらのバリエーションが挙げられる。他の好適なリンカーの例は、Chen et al., (2013) Advanced Drug Delivery Reviews, 65:1357-1369に記載されている。

【0130】

キメラ又は融合タンパク質及び組換えタンパク質

本発明のキメラ又は融合タンパク質は、多くの従来の技術のうちのいずれかによって調製され得るが、典型的には、ポリペプチドは、組換え技術を使用して作製される。

【0131】

組換えポリペプチドの場合、所望のペプチドをコードするDNA断片を、周知の分子遺伝子技術を使用して適切なベクターにサブクロニングすることができる（例えば、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)、Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)を参照されたい）。断片は、インビトロで転写され得、続いて、ポリペプチドが翻訳され得る。市販のキットもまた用いられ得る（例えば、Clontech、Palo Alto, Calif.、Amersham Pharmacia Biotech Inc.、Piscataway, N. J.、Invitrogen、Carlsbad, Calif. などによって製造されたものなど）。ポリメラーゼ連鎖反応は、任意選択で、核酸の操作において用いられ得る。

【0132】

「断片」は、本明細書に記載のアッセイを使用して決定され得る、ポリペプチドと実質的に同様の機能的活性又は実質的に同じ生物学的機能若しくは活性を保持する本発明のポリペプチドの一部である。

【0133】

ポリペプチド配列、すなわち、本明細書で定義される本発明のポリペプチドに関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」又は「同一性パーセント(%)」は、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大配列同一性パーセントを達成した後、配列同一性の一部分として任意の保存的置換を考慮しない、本発明の特定のポリペプチドにおけるアミノ酸残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。本明細書における、列挙される配列に対する「少なくともx%の配列同一性」を有するバリエーションへの言及は、バリエーションが、列挙される配列に対して少なくともx%同一であることを意味する。

【0134】

本発明の様々な態様及び実施形態では、定義されたポリペプチドは、参照配列に対して少なくとも80%の相同性又はそれ以上を有するバリエーションを参照することによって記載される。相同性パーセンテージ(%)は、概して、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大配列同一性パーセントを達成した後、配列同一性の一部分として任意の保存的置換を考慮しない、本発明の特定のポリペプチドにおけるアミノ酸残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される、本明細書で定義される本発明のポリペプチドを指す。

【0135】

アミノ酸のグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンは、多くの場合互いに置換され得る（脂肪族側鎖を有するアミノ酸）。これらの可能な置換のうち、グリシン及びアラニンが互いに置換するために使用され（それらが比較的短い側鎖を有するため）、バリン、ロイシン、及びイソロイシンが互いに置換するために使用される（それらが疎水性であるより大きな脂肪族側鎖を有するため）ことが好ましい。多くの場合、互いに置換され得る他のアミノ酸としては、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン

ン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）；リジン、アルギニン、及びヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；アスパラギン酸及びグルタミン酸（酸性側鎖を有するアミノ酸）；アスパラギン及びグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）；並びにシステイン及びメチオニン（硫黄含有側鎖を有するアミノ酸）が挙げられる。

【0136】

この性質の置換は、多くの場合「保存的」又は「半保存的」アミノ酸置換と称される。

【0137】

アミノ酸の欠失又は挿入はまた、*P. gingivalis* タンパク質の天然配列に対して行われ得る。したがって、例えば、ポリペプチドの活性に実質的な影響を及ぼさない、又は少なくともそのような活性を排除しないアミノ酸が欠失され得る。そのような欠失は、ポリペプチドの全長及び分子量を低減しながらも依然として活性を保持することができるため、特に長いポリペプチドでは有利であり得る。これにより、特定の目的に必要なポリペプチドの量が低減され得、例えば、投薬量レベルが低減され得る。

【0138】

天然ポリペプチドの配列に対するアミノ酸挿入も行われ得る。これは、本発明における使用のためのポリペプチドの特性を変化させるために行われ得る（例えば、抗原性を向上させるために）。

【0139】

アミノ酸の変化は、任意の好適な技術を使用して、例えば、部位特異的変異誘発又は固相合成を使用して行われ得る。

【0140】

本発明の範囲内のアミノ酸置換又は挿入は、天然に存在する又は非天然のアミノ酸を使用して行われ得ることを理解されたい。天然又は合成アミノ酸が使用されるか否かにかかわらず、L-アミノ酸のみが存在することが好ましい。

【0141】

当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズム（以下に記載の非限定的な例）を含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定し得る。アミノ酸配列がアラインメントされる場合、所与のアミノ酸配列Bに対する（to）、それとの（with）、又はそれに対する（against）所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性パーセント（代替的には、所与のアミノ酸配列Bに対して（to）、それと（with）、又はそれに対して（against）、ある特定のアミノ酸配列同一性パーセントを有するか、又は含む所与のアミノ酸配列Aとして表現され得る）は、以下のように計算され得る：アミノ酸配列同一性パーセント = $X / Y \times 100$ 、式中、Xは、配列アラインメントプログラムの又はアルゴリズムのA及びBのアラインメントによって同一の一致としてスコア化されるアミノ酸残基の数であり、Yは、Bにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さが、アミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性パーセントは、Aに対するBのアミノ酸配列同一性パーセントと等しくない。

【0142】

同一性パーセントを計算する際、典型的には正確な一致が計数される。2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの非限定的な例は、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877にあるように改変されたKarlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403のBLASTN及びBLASTXプログラムに組み込まれている。比較目的でギャップアラインメントを得るためには、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389に記載のように、Gapped BLAST (BLAST 2.0における)を利用することができる。

代替的には、P S I-B l a s tを使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施することができる。A l t s c h u l e t a l . (1 9 9 7) 上記を参照されたい。B L A S T、G a p p e d B L A S T、及びP S I-B l a s tプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、B L A S T X及びB L A S T N）の既定パラメータが使用され得る。アラインメントは、調査によって手動で実施されてもよい。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の非限定的な例は、C l u s t a l Wアルゴリズムである（H i g g i n s e t a l . (1 9 9 4) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 2 : 4 6 7 3 - 4 6 8 0）。C l u s t a l Wは、配列を比較し、アミノ酸又はDNA配列の全体をアラインメントさせ、したがって、全アミノ酸配列の配列保存についてのデータを提供することができる。C l u s t a l Wアルゴリズムは、ベクターNTIプログラムスイートのA L I G N Xモジュール（I n v i t r o g e n C o r p o r a t i o n、C a r l s b a d, C A）などのいくつかの市販のDNA／アミノ酸分析ソフトウェアパッケージにおいて使用される。C l u s t a l Wでのアミノ酸配列のアラインメント後、アミノ酸同一性パーセントが評価され得る。C l u s t a l Wアラインメントの分析に有用なソフトウェアプログラムの非限定的な例は、G E N E D O C（商標）又はJ a l V i e w（<http://www.jalview.org/>）である。G E N E D O C（商標）は、複数のタンパク質間のアミノ酸（又はDNA）類似性及び同一性の評価を可能にする。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の非限定的な例は、M y e r s a n d M i l l e r (1 9 8 8) C A B I O S 4 : 1 1 - 1 7 のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、G C G W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e、バージョン10（A c c e l r y s, I n c .、9 6 8 5 S c r a n t o n R d., S a n D i e g o, C A, U S A）の一部であるA L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにA L I G Nプログラムを利用する場合、P A M 1 2 0重み残基表、12のギャップ長さペナルティ、及び4のギャップペナルティが使用され得る。

10

20

【0143】

ポリペプチドは、所望により、アミノ末端及びカルボキシル末端を含む。ポリペプチドは、D-アミノ酸、L-アミノ酸、又はD-アミノ酸とL-アミノ酸との混合物を含み得る。しかしながら、アミノ酸のD型は、D-アミノ酸から構成されたポリペプチドがインビボでその生物学的活性をより大きく保持すると予想されるため、特に好ましい。

30

【0144】

本明細書で使用される「保存的置換」という用語は、ペプチド中の天然配列に存在するアミノ酸を、類似の立体特性を有する天然に存在する若しくは非天然のアミノ酸又はペプチド模倣物に置き換えることを指す。置換される天然アミノ酸の側鎖が極性又は疎水性のいずれかである場合、保存的置換は、（置換されたアミノ酸の側鎖と同じ立体特性を有することに加えて）極性若しくは疎水性でもある天然に存在するアミノ酸、非天然のアミノ酸、又はペプチド模倣部分である必要がある。

【0145】

機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換表は、当業者に周知である。以下の6つの群は、互いに保存的置換であると考えられ得るアミノ酸の例である：

40

- 1) アラニン（A）、セリン（S）、スレオニン（T）、
- 2) アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、
- 3) アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、
- 4) アルギニン（R）、リジン（K）、
- 5) イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）、及び
- 6) フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）。

【0146】

天然に存在するアミノ酸は、典型的には、それらの特性に従って群化されるため、立体的に類似した非荷電アミノ酸による荷電アミノ酸の置換が保存的置換とみなされるという事実留意して、天然に存在するアミノ酸による保存的置換が決定され得る。非天然アミ

50

ノ酸による保存的置換を作製するために、当該技術分野で周知のアミノ酸類似体（合成アミノ酸）を使用することも可能である。天然に存在するアミノ酸のペプチド模倣物は、当業者に既知の文献に十分に記載されており、非天然（non-natural）又は非天然（unnatural）アミノ酸については、以下に更に記載される。保存的置換に影響を及ぼす場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸と同じ又は類似の官能基を側鎖に有する必要がある。

【0147】

本明細書で使用される「非保存的置換」又は「非保存的残基」という句は、親配列に存在するアミノ酸を、異なる電気化学的特性及び／又は立体特性を有する別の天然に存在する又は非天然のアミノ酸によって置き換えることを指す。したがって、置換するアミノ酸の側鎖は、置換されている天然アミノ酸の側鎖よりも顕著に大きく（又は小さく）あり得、かつ／又は置換されているアミノ酸とは顕著に異なる電子特性を有する官能基を有し得る。この種類の非保存的置換の例には、フェニルアラニン又はシクロヘキシルメチルグリシンのアラニンへの置換、イソロイシンのグリシンへの置換、又は $\text{—NH—CH}[(\text{—CH}_2)_5\text{—COOH}]\text{—CO—}$ のアスパラギン酸への置換が含まれる。非保存的置換は、保存的とはみなされない任意の変異を含む。

【0148】

非保存的アミノ酸置換は、以下における変化から生じ得る：（a）置換領域におけるアミノ酸骨格の構造、（b）アミノ酸の電荷若しくは疎水性、又は（c）アミノ酸側鎖の容積。概して、タンパク質特性に最大の変化をもたらすと予想される置換は、以下におけるものである：（a）親水性残基が疎水性残基に（若しくはそれによって）置換されているか、（b）プロリンが、任意の他の残基に（若しくはそれによって）置換されているか、（c）かさばる側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖を有しない残基、例えば、グリシンに（若しくはそれによって）置換されているか、又は（d）正電荷の側鎖を有する残基、例えば、リシル、アルギニル、若しくはヒスタジルが、負電荷残基、例えば、グルタミル若しくはアスパルチルに（若しくはそれによって）置換されている。

【0149】

挿入、欠失、及び／又は置換などによる、変異体ポリペプチドを産生するための天然アミノ酸配列の改変は、当業者に既知の様々な手段によって行われ得る。例えば、部位特異的変異は、修飾部位を含む合成オリゴヌクレオチドを発現ベクターにライゲーションすることによって導入され得る。代替的には、Walder et al., Gene 42:133 (1986)、Bauer et al., Gene 37:73 (1985)、Craig, Biotechniques, 12-19 (January 1995)、並びに米国特許第4,518,584号及び同第4,737,462号に開示されているものなど、オリゴヌクレオチド誘導部位特異的変異誘発手順が使用され得る。変異を導入するための好ましい手段は、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, Calif.) である。

【0150】

任意の適切な発現ベクター（例えば、Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual (Elsevier, N.Y.: 1985) に記載のもの）及び対応する好適な宿主は、組換えポリペプチドの産生に用いられ得る。発現宿主には、Escherichia、Bacillus、Pseudomonas、Salmonella 属内の細菌種、バキュロウイルス系を含む哺乳動物又は昆虫細胞系（例えば、Luckow et al., Bio/Technology 6:47 (1988) による記載のもの）、及びCOS-7、C127、3T3、CHO、HeLa、及びBHK細胞株などの確立された細胞株が含まれるがこれらに限定されない。当業者は、発現宿主の選択が、産生されるポリペプチドの種類に派生する効果を有することを認識している。例えば、酵母細胞又は哺乳動物細胞（例えば、COS-7細胞）で産生されるポリペプチドのグリコシル化は、Escherichia coli などの

細菌細胞で産生されるポリペプチドのグリコシル化とは異なる。

【0151】

代替的に、本発明のポリペプチドは、当業者に周知の標準的なペプチド合成技術を使用して合成され得る（例えば、Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Heidelberg: 1984) に要約される）。具体的には、ポリペプチドは、固相合成の手順を使用して合成され得る（例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-54 (1963)、Barany et al., Int. J. Peptide Protein Res. 30: 705-739 (1987)、及び米国特許第5,424,398号を参照されたい）。必要に応じて、これは、自動ペプチド合成器を使用して行われ得る。t-ブチルオキシカルボニル (t-BOC) 又は9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) アミノ酸ブロッキング基の除去及びポリペプチドの樹脂からの分離は、例えば、低温での酸処理によって達成され得る。次いで、ポリペプチド含有混合物を、例えば、ジメチルエーテルで抽出して非ペプチド性有機化合物を除去することができ、合成されたポリペプチドを（例えば、約25% w/vの酢酸で）樹脂粉末から抽出することができる。ポリペプチドの合成後、任意の不完全なポリペプチド又は遊離アミノ酸を排除するために、更なる精製（例えば、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用して）を任意選択で行うことができる。アミノ酸及び／又はHPLC分析は、その同一性を検証するために、合成されたポリペプチドに対して行われ得る。本発明による他の用途については、本明細書に記載の方法又は他の遺伝子手段などによってより大きな融合タンパク質の一部として、又は当業者に既知であり、本明細書に記載の物理的又は化学的コンジュゲーションなどを介したより大きなコンジュゲートの一部として、ポリペプチドを産生することが好ましい場合がある。

10

20

【0152】

本発明の任意の実施形態では、本発明のキメラ又は融合タンパク質は、組換え発現系の発現を促進するため、及び／又はタンパク質の精製を促進するために、追加のアミノ酸残基を含み得る。したがって、本明細書に定義されるタンパク質は、N末端領域に1、2、3、4、又は5個のアミノ酸などの追加のアミノ酸を含み得る。典型的には、追加のアミノ酸は、組換え発現系における発現を促進するためのN末端メチオニンを含むが、典型的には、そのようなN末端残基は、タンパク質の翻訳後に切断されることが理解されるであろう。ある特定の実施形態では、N末端アミノ酸は、少なくともメチオニン及びアラニン残基を含む。

30

【0153】

更に、本発明によるキメラ又は融合タンパク質は、好ましくは精製を容易にするために、N末端又はC末端領域に1、2、3、4、又は5個のアミノ酸などの追加のアミノ酸を含み得る。そのようなアミノ酸残基は、タンパク質における精製タグ（ヒスチジンタグなど）の包含を促進し得ることが理解されるであろう。そのような残基は、タンパク質のタグ付けされていないバージョンが産生される場合には含まなくてもよい。

【0154】

本発明のポリペプチドはまた、精製を容易にするために、又はポリペプチドのインビボ半減期を増加させるために、又は当該技術分野で既知の方法を使用するイムノアッセイにおける使用のために、別の部分にコンジュゲート又は融合させることによって修飾され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護／ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への連結などによって修飾され得る。

40

【0155】

核酸

本発明のキメラ又は融合タンパク質又はポリペプチドのうちのいずれかをコードする核酸分子もまた、本発明の範囲内である。核酸は、例えば、本発明のポリペプチドを作製する際、及び治療薬として有用である。それらは、培養物中又はインビボで細胞に投与され

50

得、細胞からの本発明のポリペプチドの分泌を指向又は促進する分泌シグナルを含み得る。また、本発明の核酸を含有する、又は含む発現ベクター及び宿主細胞もまた、本発明の範囲内である（以下に更に記載される）。本発明の核酸は、「単離された」と称され得るが、定義上、本発明のポリペプチドは、野生型ポリペプチドではなく、したがって、天然に存在する核酸によってコードされないであろう。したがって、本発明のポリペプチド及び核酸は、「精製された」、「実質的に精製された」、「単離された」、「組換え」、「又は「合成された」ものであり得るが、天然に存在する物質と区別されるために必ずしもそのようなものである必要はない。

【0156】

「単離された」核酸分子は、それが通常、核酸の天然源に関連する少なくとも1つの混入物質の核酸分子から特定及び分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、それが自然界に見出される形態又は状況以外のものである。したがって、単離された核酸分子は、天然の細胞に存在する核酸分子と区別される。しかしながら、単離された核酸分子は、通常、K g pを発現する細胞に含有された核酸分子を含み、例えば、核酸分子は、天然の細胞のものとは異なる染色体位置にある。

【0157】

「核酸分子」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチドのいずれか、又はその類似体の、任意の長さの重合形態のヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子、遺伝子断片、メッセンジャーRNA (mRNA)、cDNA、組換えポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、及びプライマーが挙げられる。本発明のポリヌクレオチドは、単離された形態又は精製された形態で提供され得る。選択されたポリペプチドを「コードする」核酸配列は、適切な調節配列の制御下に配置された場合、インビボで転写され（DNAの場合）、ポリペプチドに翻訳される（mRNAの場合）核酸分子である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドン及び3'（カルボキシ）末端の翻訳停止コドンによって決定される。本発明の目的のために、そのような核酸配列には、ウイルス、原核生物、又は真核生物のmRNA由来のcDNA、ウイルス又は原核生物のDNA又はRNA由来のゲノム配列、更には合成DNA配列が含まれるが、これらに限定されない。転写終止配列は、コード配列の3'側に位置し得る。

【0158】

本発明のポリヌクレオチドは、Sambrook et al (1989, Molecular Cloning—a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press) に例として記載のように、当該技術分野で周知の方法に従って合成され得る。

【0159】

本発明のポリヌクレオチド分子は、挿入された配列に作動可能に連結された制御配列を含む発現カセットの形態で提供され得、したがって、標的対象における本発明のポリペプチドのインビボでの発現を可能にする。これらの発現カセットは、次いで、典型的には、核酸免疫化の試薬としての使用に好適なベクター（例えば、プラスミド又は組換えウイルスベクター）内に提供される。そのような発現カセットは、宿主対象に直接投与され得る。代替的には、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが宿主対象に投与され得る。好ましくは、ポリヌクレオチドは、遺伝子ベクターを使用して調製及び／又は投与される。好適なベクターは、十分な量の遺伝情報を運び、本発明のポリペプチドの発現を可能にすることができる任意のベクターであり得る。

【0160】

したがって、本発明は、そのようなポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。したがって、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、任意選択で、本明細書に定義される異なるポリペプチドをコードする1つ以上の更なるポリヌクレオチド配列とを含む、炎症性疾患又は状態の予防又は治療における使用のためのベ

10

20

30

40

50

クターを提供する。

【0161】

更に、本発明の組成物及び産物は、ポリペプチド及びポリヌクレオチドの混合物を含み得ることが理解されるであろう。したがって、本発明は、ポリペプチドのうちのいずれか1つの代わりに、該ポリペプチドを発現することができるポリヌクレオチドである、本明細書に定義される組成物又は産物を提供する。

【0162】

発現ベクターは、分子生物学の分野で日常的に構築され、例えば、本発明のペプチドの発現を可能にするために、プラスミドDNA、並びに適切なイニシエーター、プロモーター、エンハンサー、並びに例えば、必要である場合があり、正しい方向に配置されるポリ

10

【0163】

したがって、本発明のポリペプチドは、そのようなベクターを細胞に送達し、ベクターからの転写が起こることを可能にすることによって提供され得る。好ましくは、本発明の、又はベクターにおける本発明における使用のためのポリヌクレオチドは、宿主細胞によるコード配列の発現を提供することができる制御配列に作動可能に連結されており、すなわち、ベクターは発現ベクターである。

【0164】

「作動可能に連結された」とは、そのように記載された構成要素がそれらの通常の機能を実施するように構成されている要素の配置を指す。したがって、核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターなどの所与の調節配列は、適切な酵素が存在する場合にその配列の発現を達成することができる。プロモーターは、その発現を指向するように機能する限り、配列と隣接している必要はない。したがって、例えば、介在する未翻訳であるが転写される配列は、プロモーター配列と核酸配列との間に存在することができ、プロモーター配列は、依然としてコード配列に「作動可能に連結されている」とみなされ得る。

20

【0165】

当該技術分野では多くの発現系が記載されており、その各々は典型的には、発現制御配列に作動可能に連結された目的の遺伝子又はヌクレオチド配列を含有するベクターからなる。これらの制御配列は、転写プロモーター配列並びに転写開始及び終止配列を含む。本発明のベクターは、例えば、複製起点、任意選択で該ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター、及び任意選択でプロモーターの調節因子を有するプラスミド、ウイルス又はファージベクターであり得る。「プラスミド」は、染色体外遺伝子要素の形態のベクターである。ベクターは、1つ以上の選択可能なマーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドの場合はアンピシリン耐性遺伝子、又は真菌ベクターについては耐性遺伝子を含有し得る。ベクターは、例えば、DNA又はRNAの産生のためにインビトロで使用されてもよく、又は宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞をトランスフェクション又は形質転換するために使用されてもよい。ベクターはまた、例えば、ポリペプチドのインビボ発現を可能にするために、インビボで使用されるように適合され得る。

30

40

【0166】

「プロモーター」は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの転写を開始及び調節するヌクレオチド配列である。プロモーターは、誘導性プロモーター（プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現が、分析物、補因子、調節タンパク質などによって誘導される）、抑制性プロモーター（プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現が、分析物、補因子、調節タンパク質などによって抑制される）、及び構成的プロモーターを含み得る。「プロモーター」又は「制御要素」という用語は、完全長プロモーター領域及びこれらの領域の機能的（例えば、転写又は翻訳を制御する）セグメントを含むことが意図される。

【0167】

50

本発明によるポリヌクレオチド、発現カセット又はベクターは、シグナルペプチド配列を更に含み得る。シグナルペプチド配列は、概して、シグナルペプチドが発現され、プロモーターとの作動可能な連結でも配列をコードすることによってコードされるポリペプチドの分泌を促進するように、プロモーターとの作動可能な連結で挿入される。

【0168】

典型的には、シグナルペプチド配列は、10～30アミノ酸、例えば、15～20アミノ酸のペプチドをコードする。多くの場合、アミノ酸は、主に疎水性である。典型的な状況では、シグナルペプチドは、シグナルペプチドを有する成長ポリペプチド鎖を、発現細胞の小胞体に標的とする。シグナルペプチドは小胞体内で切り離され、ゴルジ体を介したポリペプチドの分泌を可能にする。

10

【0169】

免疫原性及びワクチン組成物

本発明は更に、本明細書に定義されるキメラ又は融合タンパク質を含む組成物、並びに P. gingivalis 感染の治療又は予防における免疫原性又はワクチン組成物におけるそのようなキメラ又は融合タンパク質の使用を提供する。

【0170】

本明細書で使用される「ワクチン組成物」という用語は、疾患に対して生物を保護又は治療するために、組成物内の抗原（免疫原）に対する免疫応答を誘発するために使用される組成物として定義される。

【0171】

20

本明細書で使用される場合、「免疫刺激組成物」、「ワクチン組成物」、及び「免疫原性組成物」という用語は、概して、互換的に使用され得る。

【0172】

本発明の免疫刺激組成物又はワクチンは、治療的又は予防的活性成分としての本発明の1つ以上のペプチドに加えて、薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤、アジュバント、ビヒクル、緩衝液、又は安定剤を好適に含み得る。そのような担体には、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、リボソーム、水、グリセロール、ポリエチレングリコール、エタノール、及びそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0173】

免疫刺激組成物又はワクチン組成物は、任意の適切な経路、例えば、非経口（皮下、筋肉内、静脈内、又は皮内、又は脳脊髄液への注射を含む）、経口（頬若しくは舌下を含む）、鼻、局所（頬、舌下、若しくは経皮を含む）、膺、又は直腸経路による投与に適合され得る。そのような組成物は、薬学の分野で既知の任意の方法によって、例えば、ペプチドを無菌条件下で担体又は賦形剤と混合することによって調製され得る。典型的には、ワクチン組成物は、皮下、筋肉内、静脈内、又は皮内経路によって、典型的には注射による投与に適合される。代替的には、ワクチン組成物は、経口又は経鼻投与に適合され得る。

30

【0174】

非経口投与に適合した免疫刺激組成物又はワクチン組成物は、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び製剤を対象レシビエントの血液と実質的に等張にする溶質を含有し得る水性及び非水性滅菌注射液、並びに懸濁化剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性滅菌懸濁液であり得る。注射可能な溶液に使用され得る賦形剤には、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセリン、及び植物油が含まれる。組成物は、単位用量又は複数回用量容器、例えば、密封されたアンプル及びバイアル中で提供され得、使用の直前に、運ばれる滅菌液体、例えば、注射用水の添加のみを必要とする凍結乾燥（freeze-dried）（凍結乾燥（lyophilized））状態で保存され得る。即席の注射溶液及び懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製され得る。

40

【0175】

経口投与に適合した免疫刺激又はワクチン組成物は、カプセル又は錠剤又はロゼンジなどの別個の単位として、粉末又は顆粒として、溶液、シロップ又は懸濁液として（水性若しくは非水性液体中、又は食用泡若しくはホイップとして、又はエマルジョンとして）提

50

供され得る。

【0176】

錠剤又は硬質ゼラチンカプセルに好適な賦形剤としては、ラクトース、トウモロコシデンプン又はその誘導体、ステアリン酸又はその塩が挙げられる。軟質ゼラチンカプセルとの使用に適した賦形剤としては、例えば、植物油、ワックス、脂肪、半固体又は液体ポリオールなどが挙げられる。

【0177】

溶液及びシロップの調製のために、使用することができる賦形剤には、例えば、水、ポリオール、及び糖が含まれる。懸濁液の調製のために、油（例えば、植物油）を使用して、水中油型又は油中水型の懸濁液を提供し得る。

10

【0178】

担体が固体である鼻投与に適合された免疫刺激又はワクチン組成物は、鼻からの吸引の様式、すなわち、鼻の近くに保持される粉末の容器から鼻腔を通して急速に吸入することによって投与される、例えば、20～500ミクロンの範囲の粒径を有する粗い粉末を含む。担体が、経鼻スプレー又は経鼻液滴としての投与のための液体である好適な組成物は、活性成分の水性又は油性溶液を含み得る。

【0179】

吸入による投与に適合された組成物には、様々な種類の定量加圧エアロゾル、ネブライザー、又は吸入器によって生成され得る微粒子ダスト又はミストが含まれる。

【0180】

経皮投与に適合された免疫刺激又はワクチン組成物は、長期間にわたってレシピエントの表皮と密接に接触し続けることを意図した別個のパッチとして提供され得る。例えば、活性成分は、概してPharmaceutical Research, 3(6):318(1986)に記載されているように、イオン泳動によってパッチから送達され得る。

20

【0181】

局所投与に適合された組成物は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション、粉末、溶液（例えば、口腔洗浄液）ペースト、ゲル、スプレー、エアロゾル、又は油として製剤化され得る。眼又は他の外部組織、例えば、口及び皮膚の感染症の場合、組成物は、局所軟膏又はクリームとして適用され得る。軟膏中に製剤化される場合、活性成分は、パラフィン性又は水混和性の軟膏基剤のいずれかとともに用いられ得る。代替的には、活性成分は、水中油型クリーム基材又は油中水型基材を有するクリーム中に製剤化され得る。眼への局所投与に適合された医薬組成物は、点眼剤を含み得、活性成分は、好適な担体、特に水性溶媒に溶解又は懸濁される。口における局所投与に適合された医薬組成物は、トローチ剤、ペースト剤、又は口腔洗浄液を含み得る。

30

【0182】

免疫刺激又はワクチン組成物は、保存剤、可溶化剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、甘味剤、着色剤、付臭剤、塩（本発明の物質自体は、薬学的に許容される塩の形態で提供され得る）、緩衝液、コーティング剤、又は抗酸化剤を含有し得る。

【0183】

本発明のワクチン組成物はまた、本明細書に定義されるキメラ又は融合タンパク質に加えて、1つ以上の他の予防的又は治療的に活性な薬剤を含有し得る。

40

【0184】

本発明のワクチン組成物における使用のためのキメラ又は融合タンパク質は、凍結乾燥されていてもよく、されていなくてもよい。

【0185】

本発明のワクチン組成物はまた、本明細書に定義されるペプチドに加えて、薬学的に許容されるアジュバントを含み得る。ワクチン組成物の免疫原性を増強するために、アジュバントが添加される。

【0186】

ワクチン組成物に含まれるのに好適なアジュバントは、当該技術分野において既知であ

50

り、不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント、MDP（ムラミルジペプチド）を有するフロイントアジュバント、ミョウバン（水酸化アルミニウム）、ミョウバン+Bordetella pertussis及び免疫刺激複合体（ISCOM、典型的には、ウイルスタンパク質を含有するQuil Aのマトリックス）、QS-21、Detox-PC、MPL-SE、MoGM-CSF、TiterMax-G、CRL-1005、GERBU、TERamide、PSC97B、Adjumer、PG-026、GSK-I、GcMAF、B-アレチン、MPC-026、Adjuvax、CpG ODN、Betafectin、及びMF59が含まれる。

【0187】

本発明のワクチン組成物はまた、1つ以上の共刺激分子を含むか、又はそれとともに投与され得る。

10

【0188】

本発明のワクチン組成物の投薬量は、治療などされる個体の年齢及び状態などに応じて、広い範囲で変化することができ、医師が最終的に使用される適切な投薬量を決定する。

【0189】

この投薬量は、必要に応じて頻繁に反復され得る。例えば、ワクチンの初回用量が投与され、次いでブースターが後日投与され得る。

【0190】

哺乳動物、特にヒトへの投与の場合、活性剤の1日投薬量は、 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、典型的には約 $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 1\text{mg}/\text{kg}$ 体重であることが予想される。いずれにせよ、医師が、個体の年齢、体重、性別、及び応答を含む要因に依存する個体に最も好適な実際の投薬量を決定する。上記投薬量は、平均症例の例示である。もちろん、より高い投薬量又はより低い投薬量が必要とされる事例がある可能性があり、そのような事例は、本発明の範囲内にある。

20

【0191】

本発明のワクチン組成物は、筋肉内、静脈内を介して、吸入によって、腹腔内又は経口経路、又は脳脊髄液への注射によってなど本明細書に記載の任意の好都合な経路によって投与され得る。

【0192】

本発明のワクチン組成物は、単位剤形で提供され得、概して密封された容器で提供され、キットの一部として提供され得る。そのようなキットは、通常（必ずしもそうとは限らないが）使用説明書を含む。複数の該単位剤形を含み得る。

30

【0193】

したがって、更に別の態様では、本発明は、密封された容器に本発明のワクチン組成物並びに1つ以上のサイトカイン及び／又はアジュバントを含むキットオブパーツを提供する。

【0194】

主題のキメラ又は融合タンパク質を使用して対象を免疫化するための方法

本発明は、感染を治療若しくは予防するか、又はP. gingivalisによる感染の可能性を最小限に抑えることが必要な個体において、それを行うための方法及び組成物を提供し、その方法は、本発明の融合又はキメラタンパク質を投与することを含む。

40

【0195】

本発明は、対象におけるP. gingivalisに対する体液性免疫応答を誘導するための方法及び組成物を更に提供する。体液性応答は、保護／治療を必要とする個体において、保護／治療的抗P. gingivalis抗体を直接得る目的のためであり得る。代替的には、体液性応答は、したがって抗体が抗体での治療／保護を必要とする個体に直接投与され得るように、したがって対象（又はその卵）から単離される抗体を生成する目的のためであり得る。

【0196】

したがって、本発明は、個体におけるP. gingivalisでの感染を予防し、感

50

染の可能性を最小限に抑え、かつ／又は *P. gingivalis* 感染の重症度及び期間を低減するための方法及び組成物を含む。

【0197】

本発明はまた、*P. gingivalis* に指向された抗体を得るための方法であって、方法が、非ヒト動物に、本発明のキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物を投与し、それによって、動物において、*P. gingivalis* に指向された抗体を生成することを含む、方法を提供する。好ましくは、本方法は、抗体を動物から（例えば、動物の血液から）、又は動物の卵から（例えば、ニワトリから IgY 抗体を生成する場合）単離することを更に含む。

【0198】

本発明はまた、*P. gingivalis* に指向された抗体を含む抗体調製物であって、抗体調製物が、非ヒト動物に、本発明のキメラ若しくは融合タンパク質、組成物、ワクチン、又は免疫刺激組成物を投与し、それによって、動物において、*P. gingivalis* に指向された抗体を生成すること、及び動物又はその卵から抗体を単離することによって得られる、抗体調製物を提供する。

【0199】

P. gingivalis に指向された抗体は、*P. gingivalis* 感染を排除若しくは低減するために治療的に、又は *P. gingivalis* 感染の重症度を予防又は低減するために予防的に、使用され得る。更なる実施形態では、抗体は、診断用試薬又は分析用試薬として使用され得る。

【0200】

本明細書で使用される場合、対象の「治療 (treatment)」又は「治療 (treating)」という用語は、疾患若しくは状態、疾患若しくは状態の症状、又は疾患若しくは状態のリスク（若しくは感受性）を遅延させるか、減速させるか、安定化させるか、癒すか、治癒するか、緩和するか、軽減するか、変更するか、改善するか (remedying)、悪化を減少させるか、改善するか (ameliorating)、改善するか (improving)、又は影響を与えることを目的とした、対象への本発明の組成物の適用若しくは投与（又は対象由来の細胞若しくは組織への本発明の化合物の適用若しくは投与）を含む。「治療する」という用語は、減退；寛解；悪化率の減少；疾患の重症度の減少；症状の安定化、軽減、又は傷害、病理学若しくは状態を対象にとってより忍容性のあるものにすること；悪化若しくは衰弱の速度を減速させること；悪化の最終的なポイントを衰弱させないようにすること；あるいは対象の身体的又は精神的健康を改善することなどの客観的又は主観的パラメータを含む、損傷、病理学、又は状態の治療又は改善の成功の任意の指標を指す。

【0201】

本明細書で使用される場合、「予防すること」又は「予防」は、疾患又は障害を獲得するリスク（又はその受けやすさ）の可能性の少なくとも低減を指すことを意図している（すなわち、疾患に曝露し得るか、又はその素因を有するが、疾患の症状をまだ経験していない、又は呈していない対象において、疾患の臨床症状のうちの少なくとも1つを発症させないようにする）。そのような対象を特定するための生物学的及び生理学的パラメータは、本明細書で提供され、医師によっても周知である。

【0202】

本発明のワクチン組成物は、それを最も必要としていると思われる対象に、例えば、ヒト患者の文脈で、小児又は高齢者又は *P. gingivalis* に曝露するリスクがある個体に投与され得る。本発明のワクチン組成物はまた、*P. gingivalis* に感染している疑いがあるか、又は *P. gingivalis* に感染していると診断された対象に投与され得る。

【0203】

本発明の組成物及び方法は、ヒト及び／又は獣医学の両方における使用、診断薬の生成、又は他の治療試薬の生成に等しく拡張される。

10

20

30

40

50

【0204】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒト、例えば、哺乳動物を含む任意の動物を意味するものとする。例示的な対象として、ヒト及び非ヒト霊長類が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、対象は、ヒトであり得る。更なる例では、対象は、獣医学的対象、例えば、ペット（ネコ、イヌ、モルモットなど）であり得る。本明細書で使用される場合、「対象」、「個体」、及び「患者」という用語は、互換的に使用され得る。

【0205】

当業者は、本明細書に記載のキメラ若しくは融合タンパク質又は組成物による成功裏のワクチン接種／免疫化を決定するための方法に精通しているであろう。例えば、当業者は、免疫化後に生成された抗体を定量するための方法、及び／又は免疫化後に誘導された体液性（Th2）応答の程度を定量するための方法に精通しているであろう。

【0206】

キット

別の実施形態では、本発明の1つ以上のタンパク質、ポリペプチド若しくはポリヌクレオチド、及び／又は上記の免疫原性組成物を含むキット又は製品が提供される。

【0207】

更に別の態様では、本発明は、本発明のワクチン組成物と、対象に別個に、続けて、又は同時投与するための1つ以上のアジュバントとを含むキットオブパーツを提供する。

【0208】

他の実施形態では、上記の治療的又は予防的適用における使用のためのキットが提供され、そのキットは、

- －本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、又は免疫原性組成物を保持する容器と、
- －使用説明書を有するラベル又は添付文書と、を含む。

【0209】

任意の実施形態では、このキットは、対象におけるP. gingivalisに対する免疫応答を誘発するための1つ以上の更なる活性成分（active principle）又は活性成分（active ingredient）を含有し得る。

【0210】

キット又は「製品」は、容器、及び容器上又は容器に関連付けられたラベル又は添付文書を含み得る。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、注射器、ブリストアパックなどが挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器は、状態を治療するのに有効である治療組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであり得る）。ラベル又は添付文書は、選択した状態を治療するために治療用組成物が使用されることを示す。一実施形態では、ラベル又は添付文書は、使用説明書を含み、治療組成物又は予防組成物を使用して、本明細書に記載の炎症性疾患又は状態を治療し得ることを示す。

【0211】

キットは、（a）治療用又は予防用組成物と、（b）その中に含有される第2の活性成分を有する第2の容器と、を含み得る。本発明のこの実施形態におけるキットは、組成物を示す添付文書を更に含み得、他の活性成分は、本明細書に記載の炎症性疾患又は状態に起因する障害を治療するか、又は合併症を予防するために使用され得る。代替的に、又は追加的に、キットは、注射用静菌水（BWFI）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液などの、薬学的に許容される緩衝液を含む第2の（又は第3の）容器を更に含み得る。これには、商業及び使用者の観点から、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む望ましい他の材料が更に含まれ得る。

【0212】

任意の実施形態では、治療用組成物は、治療用、予防用、又は免疫原性組成物を保持す

10

20

30

40

50

るための容器を含む、使い捨て又は再利用可能なデバイスの形態で提供され得る。一実施形態では、デバイスは、注射器、自動注射器、又はナノパッチである。デバイスは、0.1～2 mLの治療用又は免疫原性組成物を保持し得る。治療用又は予防用組成物は、使用の準備ができている状態、又は更なる構成要素の混合、溶解、若しくは再懸濁、又は添加を必要とする状態でデバイス内に提供され得る。

【0213】

本明細書に開示及び定義された本発明は、テキスト又は図面から言及されるか、又は明らかな個々の特徴の2つ以上の選択的な組み合わせの全てに及ぶことが理解されるであろう。これらの種々の組み合わせの全ては、本発明の様々な代替の態様を構成する。

【0214】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態をより完全に例示するために提示される。しかしながら、それらは、決して、本発明の広範な範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示される原理の多くの変形及び修正を容易に考案することができる。

【実施例】

【0215】

以下の実施例は、本発明のキメラ又は融合タンパク質に関連する一連のインビトロ及びインビボ研究について説明する。実施例1は、実施例2及び3に記載の研究で使用された材料及び方法を説明する。実施例2は、インビトロ研究の結果を説明し、実施例3は、インビボ研究の結果を説明する。

【0216】

実施例1：材料及び方法

1.1 インビトロ研究のための材料及び方法

組換えタンパク質の発現

組換えタンパク質（すなわち、本明細書に記載の種々のキメラ又は融合タンパク質）は、本質的に以下のとおり、イソプロピルβ-D-チオガラクトシダーゼ（IPTG）での誘導によって、pET28ベクター（又は1つのベクターからのrABM1+rABM2共発現のためのpDUE1-1）から発現された。

【0217】

キメラ及び融合タンパク質（活性部位及び付着因子ドメインを含む）の種々のキメラ及び構成要素をコードする核酸は、P. gingivalis W50ゲノムDNA鋳型及び特異的に設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、標準のPCR又は重複拡張（「SOEing」）PCRを介したDNAスプライシングによって生成された。PCR断片又はSOEing PCR断片を精製し、クローニングベクターpGEMTeasy又はpBHAにライゲーションし、化学的に有能なE. coli α-Gold細胞（BioLine, New South Wales, Australia）に形質転換した。

【0218】

「DSSG」アミノ酸リンカー領域を含有するか又はリンカーなしのいずれかの単一の追加のKAS（すなわち、活性部位）残基をコードするDNA配列を、本質的に以下のように、組換えキメラ及びKgp付着因子ドメインに一度に1つずつ順次付加した：制限酵素部位を、制限酵素に特異的なヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCRによって、キメラ及び付着因子バリエーションマザークローンにおけるDNA挿入断片の末端に導入した。対応する制限配列を有する個々のKAS配列をコードする合成DNA断片を、マザークローンからのDNA構築物の挿入末端にライゲーションし、組換えクローンを精製した。続いて、第2又は第3の追加のKASを添加した場合、更なる制限配列をこれらのクローニングされた挿入物の末端に導入し、異なる制限部位を有するKAS配列をコードする追加のDNA断片を一度に1つずつライゲーションした。単一、二重、又は四重の線形KASコード配列を有するマザークローン構築物を特異的制限消化に供し、次いで垂断片をライゲーションを介して交換して、多数のバリエーション（表1に例示されるものを含む）を産生することができた。

【0219】

ABM1及びABM2内の残基を、製造業者の指示に従って、QuickChange II Site Directed Mutagenesisキット(Stratagene、La Jolla, CA)を使用して変異させた。

【0220】

クローニングベクターpGEMTeasy及びpBH1における全ての挿入物の完全性を、DNA配列決定(Applied Genetics and Diagnostics Facility, The University of Melbourne)によって確認した。変異は、挿入物全体のDNA配列決定によって更に検証された。次いで、検証された構築物を選択された酵素での制限消化に供し、挿入物をE. coli α-select 化学的有能の細胞における関連するpET発現ベクターにクローニングし、続いてE. coli発現宿主、BL21-CodonPlus(DE3)RIPL(Stratagene、Australia)にクローニングした。

【0221】

組換えタンパク質の溶解性に影響を与えるキメラの特徴の調査、小規模

単一コロニー形質転換体を使用して、オービタルシェーカーで、37℃で一晩、30 µg/mlのカナマイシンを含有する2 mLのLuria Bertani (LB) ブロスに接種した。次いで、この接種物を使用して、30 µg/mlのカナマイシンを含有する2 mLのLBを接種した(1:100)。OD₆₀₀ = 0.6~1.0の細胞培養物を、37℃で2時間、1 mMのIPTGで誘導した。細胞培養物を遠心分離し、ペレットを250 µlのPBS中に再懸濁し、CPX750超音波処理器(Cole Parmer Instrument Company, USA)を使用して短時間超音波処理し、遠心分離した。

【0222】

全溶解物、可溶性(上清)及び不溶性(ペレット)画分をSDS-PAGEによって分析して、組換えタンパク質の溶解性を評価した。これらの初期パイロット発現条件下で不溶性のままであるか、又は低い溶解性を示した組換えタンパク質を、より低い温度(16℃~30℃)及びより低いIPTG(0.01~0.5 mM)を有する様々な条件下で発現させて、溶解性の増強のための最適な条件を確認した。全ての組換えタンパク質誘導を、最適な条件下で規模を拡大(20~200 mL)して、中~大規模で溶解性を試験した。培養物(200 mL)を、様々な温度(例えば、30℃で5時間又は16℃で16時間)でIPTG誘導に供した。

【0223】

細胞を採取し、溶解緩衝液(20 mMのリン酸ナトリウム、500 mMのNaCl、0.5% v/vのTriton X-100、5 mg/mlのDNase I、1×プロテイナーゼ阻害剤カクテル、1 mg/mlのリゾチーム、10 mMのイミダゾール、pH 8)中に再懸濁した。細胞再懸濁液を4℃で1時間インキュベーションし、次いで、清澄化された溶解物を遠心分離(8,000 g、30分、4℃)して、上清(可溶性)及びペレット(不溶性)画分を採取し、SDS-PAGE及びネイティブPAGEによって分析した。

【0224】

組換えタンパク質のゲル内HIS染色

SDS PAGEに供した組換えタンパク質を、製造業者の指示に従ってInvisi on In Gel His Stainキット(Invitrogen)を使用して染色した。この染色は、Hisタグ付きタンパク質に非常に特異的である。この手順は、全ての候補がC末端Hisタグを含有するため、組換えタンパク質のN末端分解を特定するために使用された。

【0225】

動物モデルにおける研究のためのキメラの大規模な精製

各組換えタンパク質の精製条件については、以下のセクションに詳述する。

【0226】

タンパク質発現及び細胞溶解

動物モデルのワクチン候補としての使用のために特定された全ての組換えタンパク質を、前述のように、*E. coli* BL21 (DE3) において、組換えC末端Hisタグ付き融合タンパク質として、又は「タグなし」タンパク質として発現させた。細胞を、LB培地、TB培地、又は50 µg/mLのカナマイシンを補充した改変M9最小培地中で37℃で増殖させた。OD600 = 0.8~1.0の培養物を、37℃又は34℃で2~4時間、25℃で12時間、又は16℃で16~20時間、0.4 mMのIPTGで誘導した。4℃で、8000 gでの遠心分離によって採取した後、細胞を、別段の指示がない限り、溶解緩衝液 [0.35 mg/mLのリゾチーム、TBS 150 (50 mMのTris・Cl、150 mMのNaCl、pH 7.5 中の40 µg/mLのDNase I) + 1%のTriton X-100及びEDTAを含まないプロテアーゼ阻害剤 (完全ULTRA錠、Sigma-Aldrich) 中で1.5時間氷上で溶解した。細胞溶解物を、4℃で23,500 gで40分間遠心分離することによって清澄化した。

10

【0227】

翻訳された配列MAから始まる、表1に示される全ての組換えタンパク質上の開始Met残基 (aa1) は、最後から2番目の残基が小さい残基である場合、メチオニンを切断する*E. coli* N末端メチオニン処理酵素によってインビボで除去される。これは、KDAK及びKDAKバリエーション組換えタンパク質の質量分析によって確認された。

20

【0228】

非変性条件下での可溶性画分からのHisタグ付きタンパク質の精製

1. Ni-親和性クロマトグラフィー

細胞溶解物を4℃で、20,000 gで遠心分離することによって清澄化し、細胞破片を除去した。0.22 µmフィルターを通して濾過した後、溶解物を、ローディング緩衝液TBS 300 (50 mMのTris・Cl、300 mMのNaCl、pH 7.5) + 10 mMのイミダゾール及び1%のTriton X-100中のHisTrap Ni-親和性カラム (GE Healthcare) にロードした。カラムを、ローディング緩衝液、次いでTBS 300中の20 mMのイミダゾールで十分に洗浄した。結合されたタンパク質を、吸光度を280 nmで監視しながら、TBS 300中の20~350 mMのイミダゾールの勾配で溶出した。ピーク画分をSDS-PAGE及び/又はネイティブPAGEで分析した。溶出された標的タンパク質を、タンパク質サイズに応じて3 kDa又は10 kDaの分子量カットオフを有するAmiconフィルターユニットを使用して濃縮した。得られたタンパク質溶液を、更なる精製のために-70℃で保存した。

30

【0229】

2. 陰イオン交換クロマトグラフィー

全ての候補タンパク質の等電点 (pI) は、オンライン分析ProteinParamツール-ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) を使用して酸性範囲にあると予測されたため、必要に応じて更に精製するために陰イオン交換クロマトグラフィーを適用した。簡潔に述べると、Ni-親和性精製からの濃縮タンパク質を緩衝液A (50 mMのTris・Cl、20 mMのNaCl、pH 7.5) に希釈してイオン強度を低減させ、次いで、緩衝液A中の陰イオン交換HiTrap Qカラム (GE Healthcare) にロードした。タンパク質を、280 nmでの吸光度を監視しながら、Tris緩衝液中で20~400 mMのNaCl勾配で溶出した。ピーク画分中の標的タンパク質をSDS-PAGE及び/又はネイティブPAGEで検証し、適切な分子量カットオフのAmiconフィルターユニットを使用して濃縮した。タンパク質溶液を、サイズ排除クロマトグラフィー又は透析を使用して、更なる精製又は緩衝液交換のために-70℃で保存した。

40

【0230】

3. サイズ排除クロマトグラフィー

サイズ排除クロマトグラフィーを、HiLoad Superdex 200又はHi

50

Load Superdex 75カラム (GE Healthcare) で4℃で実施した。Ni親和性精製又は陰イオン交換クロマトグラフィーの更なるステップからのタンパク質を適切なカラムにロードし、280nmでの吸光度を監視しながら、TBS150又はTBS100 (50mMのTris・Cl中100mMのNaCl、pH7.5)の緩衝液中で溶出した。ピーク画分中の標的タンパク質をSDS-PAGE及び／又はネイティブPAGEで検証した。二量体などの単一のオリゴマー種の単離のために、第2又は更なるラウンドのサイズ排除精製を実施した。最良のタンパク質純度を含有する画分をプールし、濃縮した。タンパク質ホモ多量体の混合物を調製するために、標的タンパク質画分を単純にプールして濃縮した。タンパク質同一性は、必要に応じて、液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化分光法 (LC-MS、Agilent) を使用して無傷のタンパク質モル質量を決定することによって、又は液体クロマトグラフィー-Orbitrapタンデム質量分析 (LC-MS/MS、Agilent) を使用して配列分析によって確認した。タンパク質濃度を、動物モデル実験に提出する前に、計算された減衰係数を使用して、280nmでの吸光度を決定することによって定量した。

10

【0231】

封入体からのHisタグ付きタンパク質の精製

1. 酸化条件下

細胞の溶解後 (可溶性画分からの精製について記載されているように)、不溶性ペレットをTBS150で2回洗浄した。封入体として発現されたタンパク質を、TBS300又は20mMのNaPi、500mMのNaCl、pH7.4 (PBS500) 中で1時間、ローリングプラットフォームで、室温で8Mの尿素で可溶化した。タンパク質抽出物を20,000gで遠心分離し、0.22µmフィルターユニットを通して濾過し、次いで、緩衝液TBSU (TBS300中の8Mの尿素+20mMのイミダゾール) 又はPBSU (8Mの尿素、20mMのNaPi pH7.8、500mMのNaCl+20mMのイミダゾール) を含有する尿素中のHisTrap親和性カラムにロードした。カラムを同じ8Mの尿素緩衝液で十分に洗浄した。pH6.5のPBSUでの更なる洗浄を、PBSU中のロードされたタンパク質を有するカラムに適用した。尿素的除去のために、標的タンパク質を、PBSU中の20~500mMのイミダゾールの勾配で溶出した。緩いNi-NTA樹脂 (ThermoFisher) を使用した場合、尿素抽出物をPBSU中で穏やかに攪拌しながら2時間樹脂と混合した。PBSU (pH7.8、次いでpH6.5) での十分な洗浄後、結合したタンパク質を、同じ緩衝液中の500mMのイミダゾールで樹脂から溶出させた。溶出されたタンパク質を、分子量カットオフが3.5kDaの透析チューブ (Fisher Biotec、Australia) 中で、6M、4M、次いで2Mの尿素リン酸緩衝液中に段階的に透析した。2Mの尿素緩衝液中のタンパク質を更に生理食塩水の中に透析し、動物モデル実験に提出する前に4℃で維持したか、又はそうでなければ、更なる透析なしに2Mの尿素緩衝液中で提出した。

20

30

【0232】

2. 還元条件下

タンパク質を、5mMのTCEPの存在下で6Mの尿素緩衝液を用いて封入体から抽出し、同じ緩衝液中のHisTrapカラムにロードした。カラムを2MのTCEPを含有する4Mの尿素緩衝液で洗浄した後、標的タンパク質を、2MのTCEPの存在下で、4から0Mへの尿素的濃度勾配を減少させながらカラムで再折り畳みを行った。次いで、タンパク質を、TBS300+2mMのTCEP中、20~350mMのイミダゾールの濃度勾配を増加させながら溶出した。次いで、溶出されたタンパク質を、非変性条件下で可溶性画分からタンパク質二量体又は多量体を精製するためのセクションに記載のものと同一方法で、還元緩衝液 (TBS150中の2mMのTCEP) 中のサイズ排除クロマトグラフィーのために濃縮した。SDS-PAGE及びネイティブPAGE、質量分析及び定量を用いて分析した後、試料を還元緩衝液中で-70℃で保存するか、又は動物モデル実験のために提出した。

40

【0233】

50

酸化及び変性条件下での可溶性画分からのHisタグ付きタンパク質の精製

細胞溶解物を20,000gで遠心分離することによって清澄化して、残渣及び不溶性物質を除去し、次いで、溶解物を、室温で1時間攪拌しながら、尿素溶液をPBS500中8Mの最終濃度まで添加することによって直ちに变性させた。次いで、得られた溶解物を室温で20,000gで40分間遠心分離した。標的タンパク質を、HisTrap Ni-親和性カラム又は緩いNi-NTA樹脂を使用して、上記の酸化条件下での封入体からの精製のセクションに記載のものと同一アプローチで精製した。生理食塩水中で精製された抗原を4℃で保存した後、動物モデル実験に提出した。

【0234】

可溶性画分からのタグのない候補の精製

陰イオン交換クロマトグラフィー これは、タグのないタンパク質を精製するための最初のクロマトグラフィー工程である。Hisタグ付きの対応物と同様に、タグのない候補のpIも、オンライン分析ProtParamツール-ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) を使用して酸性範囲内にあると予測された。したがって、陰イオン交換クロマトグラフィーを適用し、2ラウンドを行った。第1のラウンドでは、清澄化された細胞溶解物を0.22µmフィルターディスクを通して濾過し、緩衝液AA (0.05×プロテアーゼ阻害剤カクテルで補充された20mMのNaPi、pH6.5) 中の陰イオン交換HiTrap Qカラム (GE Healthcare) にロードした。10カラム体積の緩衝液AAでの洗浄後、結合したタンパク質を0~100%の緩衝液BAのNaCl勾配 (20mMのNaPi pH6.5中の1MのNaCl) で溶出し、280nmでの吸光度を監視した。ピーク画分中の標的タンパク質をSDS-PAGE及び/又はネイティブPAGEで検証した。第2のラウンドでは、陰イオン交換ステップの第1のラウンドからの最良の画分をプールし、緩衝液AAで6倍に希釈し、次いで同じ緩衝液中の陰イオン交換HiTrap Qカラム (GE Healthcare) に再ロードした。結合したタンパク質を0~50%緩衝液BAのNaCl勾配で溶出し、280nmでの吸光度を監視した。ピーク画分中の標的タンパク質を、SDS-PAGE及び/又はネイティブPAGEで検証し、最良の画分を、10kDaの分子量カットオフのAmiconフィルターユニットを使用して濃縮した。タンパク質溶液を-20℃で保存し、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて更に精製した。

【0235】

第1のラウンドのサイズ排除クロマトグラフィー サイズ排除クロマトグラフィーを室温で、HiLoad Superdex 200カラム (GE Healthcare) で実施した。陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製からのタンパク質をサイズ排除カラムにロードし、280nmでの吸光度を監視しながらASの緩衝液中 (0.05×プロテアーゼ阻害剤カクテルが補充された1M (NH₄)₂SO₄、50mMのNaPi pH7.0) で溶出した。ピーク画分中の標的タンパク質をSDS-PAGE及び/又はネイティブPAGEで検証した。最良のタンパク質純度の画分を、疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いた更なる精製のためにプールした。

【0236】

疎水性相互作用クロマトグラフィー 第1のラウンドのサイズ排除クロマトグラフィーからの緩衝液AS中の標的タンパク質のプールされた画分を、0.22µmの膜を通して濾過し、4℃で緩衝液AH (1M (NH₄)₂SO₄、50mMのNaPi pH7) 中で予め平衡化されたHiTrap フェニルHPカラムにロードした。結合したタンパク質を、280nmでの吸光度を監視しながら、緩衝液BH (50mMのNaPi、pH7) 中の800mMから200mMへの (NH₄)₂SO₄のイオン強度の減少させる勾配で溶出した。ピーク画分中の標的タンパク質をSDS-PAGE及び/又はネイティブPAGEで検証し、最良の画分を、第2のラウンドのサイズ排除クロマトグラフィーの次の精製又は緩衝液交換ステップのためにプールし、Amiconフィルターユニットを使用して濃縮した。

【0237】

第2のラウンドのサイズ排除クロマトグラフィー 疎水性相互作用を伴う精製工程からの濃縮された試料を、第1のラウンドのサイズ排除クロマトグラフィーで使用されたサイズ排除カラムにロードし、BTS (20 mMのBis-Tris、150 mMのNaCl、pH 6.5) の緩衝液中で溶出した。ピーク画分をSDS-PAGE及び／又はネイティブPAGEで分析した。最高純度の画分をプールし、濃縮した。液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化質量分析 (LC-MS、Agilent) 及び定量による特定後、抗原を等分し、将来の使用のために-80℃で保存した。

【0238】

タンパク質の特定及びタグのない候補の定量

SDS-PAGE又はネイティブPAGEの検証に加えて、必要に応じて、LC-MSを使用した無傷なタンパク質モル質量の決定によって、又は液体クロマトグラフィー-Orbitrapタンデム質量分析 (LC-MS/MS、Agilent) を使用した配列分析によって、タンパク質同一性を確認した。計算された減衰係数を使用して、280 nmでの吸光度を決定することによってタンパク質濃度を定量した (表3)。動物モデル実験に提出する前に緩衝液交換が必要であった場合、Superdex 200サイズ除外カラム (GE Healthcare) 又はZeba (商標) スピン脱塩カラム (ThermoFisher Scientific) を使用した。

【0239】

1.2 インビボ研究のための材料及び方法

歯周炎のマウスモデルのための細菌の培養

P. gingivalis 株、W50 (血清型C) を、Oral Health Co-operative Research Centre, The Melbourne Dental School, University of Melbourne, Australiaの培養コレクションから入手した。*P. gingivalis* W50を、MK3嫌気性ワークステーション (Don Whitley Scientific Ltd., Adelaide, Australia) 中で、5% CO₂ を含有する嫌気性N₂雰囲気中で、10% v/vの溶解ウマ血液 (37℃) を補充したウマ血液寒天 (HBA) (20 g/LのHBA、Oxoid Ltd., Hampshire, UK) 上で増殖させた。コロニーを、5 mg/Lのヘミン及び0.5 mg/Lのシステインを補充した20 mLの滅菌された脳心臓注入 (37 g/LのBHI、Oxoid Ltd., Hampshire, UK) 培地から構成されたスターター培地に接種し [McKee et al. (1986) *Infect Immun* 52: 349-355] 及び嫌氣的にインキュベーションした (24時間、37℃)。分光光度計 (モデル295E、Perkin-Elmer, Germany) を使用して、バッチ培養物の吸光度をOD_{650 nm}で監視した。細菌細胞を、遠心分離 (7,000 g、20分、4℃) によって後期指数関数的増殖中に採取した。細菌の純度は、グラム染色によって日常的に確認された [Slots (1982). In: *Host-Parasite Interaction in Periodontal Disease*, Genco, R. J. and Merigan, S. E. (eds). Washington D. C.: American Society for Microbiology. pp. 27-45.]。

【0240】

熱殺傷細菌の調製

P. gingivalis W50培養物を採取し (6,500 g、4℃)、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (0.01 MのNa₂HPO₄、1.5 mMのKH₂PO₄及び0.15 MのNaCl、pH 7.4) で一度洗浄し、次いで遠心分離 (7,000 g、20分4℃) によってペレット化した。細菌細胞をPBS中に再懸濁し、65℃に15分間加熱した。懸濁液を遠心分離し (7,000 g、20分4℃)、滅菌PBS中で再懸濁し、これを1回繰り返した。2回目の洗浄後、上清を廃棄し、細胞ペレットを滅菌PBS中に再懸濁して、 2×10^{10} 細胞/mLの細胞密度を得、Biorad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Life Scien

ce, NSW, Australia) を使用してタンパク質濃度を決定した。

【0241】

マウス歯周炎モデル

マウス歯周炎の実験を、Baker et al. 's mode (1994). Arch Oral Biol 39:1035-1040) から修正し、O'Brien-Simpson et al. により以前に記載されたように実施した (2005 J Immunol 175:3980-3989)。0日目、マウス (雌BALB/c、6~8週齢、10匹のマウス/群) に、2日間隔で4用量のP. gingivalis W50 [2%w/vのカルボキシメチルセルロース (CMC、Sigma、New South Wales, Australia) を含有する20μLのPG緩衝液 (50mMのTris-HCL、150mMのNaCl、10mMのMgSO₄、及び14.3mMのメルカプトエタノール、pH7.4) に懸濁した 1×10^{10} 個の生存P. gingivalis W50細胞] からなるP. gingivalisを経口内接種した。接種物を嫌氣的に調製し、次いで、直ちに上顎大臼歯の歯肉縁に適用した。各接種物における生菌数をフローサイトメトリーによって検証し、血液寒天上でCFU計数した。動物の群は、P. gingivalis W50経口接種 (感染対照)、非細菌接種対照、及び免疫群からなった。治療用ワクチン接種のために、歯周炎モデル (図1) マウスに、生理食塩水/ミョウバン (アルヒドロゲル、2%の水酸化アルミニウム湿潤ゲル懸濁液、Invivogen) 中の50μgのワクチン候補で最初に経口接種した後、19日目に腹腔内経路を介して免疫化した。マウスは、40日目に皮下経路を介して第2の免疫化 (生理食塩水/ミョウバン中50μg) を受けた。62日目に、マウスを心臓穿刺によって出血させ、殺した。上顎を除去し、正中線と通って半分にし、10分割して歯槽骨損失を決定した。血清を使用して、ELISAを使用して抗体プロファイルを決定した。

10

20

【0242】

マウス上顎における歯槽骨損失の測定

骨損失を検査するための上顎を脱イオン水中で沸騰させ (1分)、機械的に解体し、2%w/vの水酸化カリウム中に浸漬した (16時間、25℃)。上顎を脱イオン水 (25℃) で2回洗浄し、乾燥させ (1時間、37℃)、0.5%w/vのメチレンブルー水溶液で染色した。上顎の頬側のデジタル画像は、OLYSIA BioReportソフトウェアバージョン3.2 (Olympus Australia Pty Ltd, New South Wales, Australia) を使用して、解剖顕微鏡に取り付けられたOlympus DP12デジタルカメラで捕捉され、水平骨損失を評価した。上顎は、頬側及び舌側の大臼歯の歯尖が重ね合わされるように配置された。画像を、各画像の測定値を標準化できるように、フレーム内のマイクロメートルとともに撮像した。水平骨損失は、歯槽骨頂に垂直な水平面で発生し、頂の高さの低減をもたらす損失として定義された。各臼歯のセメント質-エナメル質接合部 (CEJ) から歯槽骨頂 (ABC) までの可視面積を、OLYSIA BioReportソフトウェアバージョン3.2イメージングソフトウェアを使用して測定して、mm²での全可視CEJ-ABC面積を得た。P. gingivalis誘導歯槽骨損失 (mm²) は、未接種 (N-C) 群の全可視CEJ-ABC面積を各実験群の全可視CEJ-ABC面積から差し引いて算出した。歯槽骨損失測定値は、ランダム及び盲検プロトコルで2回決定した。データは、平均+/-標準偏差 (mm²) として表され、一元配置ANOVA及びDunnett's T3事後検定を使用して分析された。

30

40

【0243】

酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によるワクチン候補の事前スクリーニング

P. gingivalisに対するいくつかのモノクローナル抗体を使用して、ワクチン候補を事前スクリーニングして、ワクチン構築物に存在する主要なドメイン及びエピートプが抗体にアクセス可能であるかどうかを決定し、したがって、インビボでの抗体応答の生成を可能にした。スクリーニングする抗原を、平底ポリビニルマイクロ力価プレート (Microtiter, Dynatech Laboratories, McLean

50

、VA、US）上に、0.1MのPBS（pH7.4）中で16時間、4℃でコーティングした。これらの実験では、以下の抗体希釈を使用した：ヤギ抗マウス；IgG（M8642）抗体の1/4000希釈の希釈（Sigma、New South Wales, Australia）。西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートブタ抗ヤギIgG抗体（M5420、Sigma、New South Wales, Australia）の1/4000希釈を使用して、ELISA実験を開発した。

【0244】

ELISAを使用した血清中のサブクラス抗体の決定

Pathirana et al. (2007). Infect Immun 75: 1436-1442)に記載のように、平底ポリビニルマイクロ力価プレート（Microtiter、Dynatech Laboratories、McLean, VA, US）のウェルをコーティングする（16時間、4℃）ための0.1MのPBS（pH7.4）中のHK W50細胞、ドメインサブユニット又はエピトープのいずれかの溶液（1μg/mL）を使用して、ELISAを実施して、領域のサブクラスの抗体を評価した。これらの実験では、以下の抗体希釈を使用した：ヤギ抗マウス、IgG（M8642）、IgG1（M8770）、IgG2a（M4434）抗体の1/4000希釈の希釈（Sigma、New South Wales, Australia）。西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートブタ抗ヤギIgG抗体（M5420、Sigma、New South Wales, Australia）の1/4000希釈を使用して、ELISA実験を開発した。エピトープELISAについて、ビオチン化ペプチドを、10μg/mLで、予めブロックされたストレプトアビジンコーティングされた平底プレート（Pierce、Thermo-Fisher）に結合させた。血清とのインキュベーション後、ELISAを、1/4000のヤギ抗マウスIgG及び1/4000の西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートブタ抗ヤギIgG抗体とともに開発した。全ての光学密度測定は、405nmでWallac VICTOR3 1420 Multilabel 計

10

20

【0245】

実施例2：インビトロ研究の結果

組換えタンパク質の溶解性に影響を及ぼすキメラ構成要素

以前に報告された1つのキメラ（WO2010/022463において）は、N末端を切断されたDUF2436ドメイン（Dc）にコンジュゲートされたKAS（K）ペプチド、ABM213（A）を含む付着因子ドメイン、及びC末端を切断されたCADドメイン（切断されたK1ドメイン、K1nと称される）からなる。このキメラは、「KDcAK1n」と称され（配列番号35）、本明細書では、本発明のキメラ及び融合タンパク質と比較して、「元のキメラ」又は「キメラ」とも称され得る。KDcAK1nタンパク質は、E. coliにおける封入体として産生され、可溶性が低く、安定性が低い。

30

【0246】

A1付着因子断片の切断されたDUF及びK1ドメインは、感染中にKgpポリタンパク質がどのように天然にタンパク質分解的に処理され、P. gingivalis細胞表面上で組み立てられるかを表す。したがって、切断されたDUF及びK1ドメインは、ジンジパインに対する免疫応答を生成するためのワクチン中の含有のための明白な候補となる。

40

【0247】

可溶性KDcAK1nを作製するための広範な試みが行われた。増殖培地、増殖条件、IPTG濃度、E. coli発現株、誘導温度、誘導時の細胞の増殖段階、増殖安定剤の添加、溶解緩衝液及びタンパク質保存緩衝液の広範な試験における変動を体系的に調査した。可溶性組換えタンパク質発現の増強は、低温及びIPTG誘導下での小規模発現において観察された。小規模では、KDcAK1nは、全組換えタンパク質発現の約30～50%を可溶性タンパク質として産生した。それにもかかわらず、可溶性組換え体は、10mL超の培養物に規模を変更することができず、規模の拡大を試みると、封入体形成をも

50

たらしした。

【0248】

溶解性に対するK1ドメインの影響

Kgpポリタンパク質の全ての完全なDUF、ABM213、ABM21及びDUF-ABM213ドメインを、高度に可溶性で安定した組換えタンパク質として発現させた。しかしながら、完全なK1ドメイン単独は、不溶性であり、封入体(IB)としてのみ発現した。

【0249】

ABM213ドメインにコンジュゲートされたKASモチーフ(すなわち、「KA」)又はDUF及びABM213ドメインの両方にコンジュゲートされたKASモチーフ(すなわち、「KDA」)の発現は、非常に可溶性の安定した組換えタンパク質を産生した。

【0250】

しかしながら、図2に示すように、C末端が切断されたK1ドメイン(すなわち、K1n断片)又は完全なK1ドメインの組換え体KA又はKDAへの付加(KAK1又はKDAK1)は、溶解性の損失をもたらした。

【0251】

KDAK1n(配列番号36)及びKDAK1(配列番号37)タンパク質(すなわち、Kドメイン、DUF2436、及びABMを含む付着因子ドメイン、並びに切断された又は全長のCADドメインを含む)の両方が、KDA(すなわち、切断された又は全長のCADを除く同じタンパク質)よりも顕著に低いレベルで、可溶性発現のためのより厳しい増殖条件を必要とする。

【0252】

K1ドメイン発現の結果をまとめると、K1(CAD)ドメインが、キメラベースの組換え体の不十分な溶解性に寄与することが明らかである。

【0253】

タンパク質溶解性に対するDUFドメインの影響

キメラタンパク質構築物におけるDUFドメインの切断は、可溶性タンパク質発現の排除をもたらした。この結果は、余分な38個のN末端残基を含有する完全なDUFドメインが、組換えタンパク質の可溶性発現及び効率的な安定化を最適化するために望ましいことを示す。

【0254】

したがって、伸長されたDcドメインを有するキメラバリエント(38個のN末端残基によって伸長されたDcを有するキメラ)を発現する構築物を作製した。この組換え体は、KDAK1nと指定され、結果は、キメラの溶解性が完全なDUFドメインで顕著に増強されることを示す。0.2~0.5mMのIPTGで30℃での大規模なKDAK1nの発現は、良好な収量の可溶性組換えタンパク質の発現をもたらした。

【0255】

溶解性に対するK1及び全長DUFドメインの影響

しかしながら、この規模でのこの可溶性タンパク質発現にもかかわらず、KDAK1n/KDAK1におけるK1n/K1の包含は、K1を含むこれらのバリエントが規模の拡大及び商業的開発にとってあまり望ましくない場合があるようなK1n/K1を欠くKDAバリエントよりも調製をより問題とするように思われる。

【0256】

以下のようにまとめる：

- 全長DUFドメインは、組換えバリエントの溶解性に望ましい(図2A)。
- K1ドメイン(全長又は切断されてるにかかわらず)は、バリエントの凝集及び不溶性に主に関与した。
- 全長DUFドメイン(すなわち、DUFc)の非存在下では、K1及びK1n含有バリエントは完全に不溶であった(図2A)。
- 全長DUFドメインの存在下では、K1及びK1n含有バリエントの非常に低レベル

10

20

30

40

50

の溶解性が、非常に穏やかな誘導条件下で明らかであった。それにもかかわらず、この溶解性は非常に低く、全ての組換えタンパク質の約 80～90% が封入体として発現されていた。

●可溶性 K D A K 1 組換え体の中規模精製のネイティブ P A G E ゲル分析は、組換え体の無秩序な凝集を明らかにした（すなわち、K D A バリエーションについては、整然とした均一なラダーではない）。ミニニッケルスピンカラムを使用したこれらのバリエーションの小規模精製（低タンパク質濃度）は、同様の凝集をもたらさなかったが、しかしながら、切断された D U F バリエーションの小規模精製はまた、ネイティブ P A G E 上のタンパク質の特徴的なラダーが不均一であり、無秩序な凝集を示唆することを明らかにした。

●K 1 及び K 1 n ドメイン含有バリエーションは、より高い濃度で、及び精製試料の凍結融解後の凝集の増加傾向を有した。K 1 ドメインがこの不安定性の原因であった。しかしながら、K 1 又は K 1 n を欠く全てのバリエーションは、凍結融解時及びより高い濃度（例えば、約 30 mg / ml の濃度）で非常に安定であった。

【0257】

全長又は切断された K 1 ドメインを含有するバリエーションは非常に不溶性であり、低レベルの産生された可溶性組換えタンパク質は、精製後に不安定で凝集する傾向にある。バリエーションを含有する可溶性 K 1 の効率的な規模の拡大は不可能であった。

【0258】

したがって、D U F の全長への伸長及び／又は K 1 （又は K 1 n）ドメインの除去、好ましくは両方は、組換えタンパク質の溶解性及び安定性にとって重要である。

【0259】

活性部位（K A S）モチーフ

追加の K A S モチーフを組換えキメラバリエーションに操作して、これが免疫原性に影響を及ぼすかどうかを決定した。単一の K A S 又は 2 つの連続した K A S を、それらの N 末端又は両方の末端でバリエーションに付加した。更に、各 K A S モチーフ間に D S S G リンカー配列を含有する 4 つの K A S 残基の線形配列も、選択されたバリエーションの N 末端に付加した。

【0260】

組換え体の精製プロファイル及び H i s ゲル染色分析は、追加の K A S 残基が組換えタンパク質のいくらかの不安定性及び分解を引き起こしたことを明らかにした。分解及び不安定性は、4 × 線形 K A S バリエーションで最大であり、タンパク質分解処理が追加の K A S 配列内で生じていたことを示唆している。隣接する K A S 配列間の D S S G リンカーのその後の除去は、安定性を改善しなかった。

【0261】

したがって、これらのバリエーションは連続した複数の K A S 配列が線形配列で発現された場合、タンパク質分解処理を行う傾向があると結論付けた。一方又は両方の末端に単一の K A S を有する可溶性バリエーションは、比較的安定であり、分解しにくく、精製収量が損なわれにくかった。

【0262】

大規模なタンパク質収量及び安定性

可溶性タンパク質として発現され、非変性条件下で精製されたほとんどの組換えタンパク質は、それらの最終産物の比較的高い収量を有した（> 10 mg / L 培養物及び 20 mg / L 培養物を超える）。

【0263】

これらの同じ組換えタンパク質の収量は、それらを意図的に変性させる条件（例えば、尿素）下で、封入体又は可溶性画分から精製された場合、はるかに低かった（2.1～3.6 mg / L 培養物）。変性タンパク質が、変性条件下で N i - 親和性樹脂に対して低い結合親和性を有し、最終的に非変性緩衝液中で平衡化されたときに低い溶解性を有したことに留意した。加えて、変性形態から精製されたバリエーションは、タンパク質が最初に可溶性タンパク質又は不溶性形態として発現されたかどうか、予め充填されたカラムを使用し

10

20

30

40

50

て又は緩いN i - N T A樹脂を使用して精製されたかどうかにかかわらず、緩衝されていない生理食塩水中で不安定であった。これらの結果は、変性剤が必要とされない場合、それらの使用を低減又は回避することが望ましい場合があることを示唆している。

【0264】

16℃での低発現温度は、K D A K 1（配列番号37）などの可溶性が低いタンパク質の可溶性発現を改善するのに有効であることが証明された。それにもかかわらず、陰イオン交換精製中の低イオン強度の緩衝液中のカラム上の濃縮は、4℃の低温でさえも、カラム上の凝集又は沈殿により収量を著しく損なった。これらのタンパク質について、陰イオン交換ステップをバイパスする精製は、より高い収量をもたらし、例えば、K D A K 1の収量は、このように産生された場合2倍になった。また、K D A K 1 n（配列番号36）は可溶性タンパク質として発現されたが、後の精製プロセスでは溶液中で安定していないように見え、収量はわずか2.3 mg / L 培養物であった。

10

【0265】

K 1が不溶性であり、K D A又はD AへのK 1又はK 1 nの付加が、大規模精製における組換えバリエーションの溶解性を減少させることを考慮すると、上記のように、ドメインが保護のために必要でない場合にK 1の除外が好ましいように、K 1領域が、K 1含有キメラバリエーションの不安定性に関与し得る。

【0266】

ゲルのH i s染色により、複数のK A S（K）残基を含有する領域内に分解があることが立証されたが、N i -親和性クロマトグラフィーによる収量への負の影響は観察されなかった。例えば、保護抗原、K K D A K 1 n K K（配列番号40）及びK K D A K K（配列番号34）は、最終産物中の予想される全長タンパク質種の90%超が12~21 mg / L 培養物の範囲の収量を有した。

20

【0267】

還元条件は、尿素を使用して封入体から不溶性K D c A K 1 nを抽出するのに好ましいことが見出された。非還元条件下では、還元条件下よりも高い濃度の尿素が必要であった。

【0268】

同じ条件下でタンパク質が発現された場合、C末端H i sタグはタンパク質産生及び溶解性大きな影響を及ぼさないことが分かった。

30

【0269】

タグなし候補の精製において、陰イオン交換クロマトグラフィーは標的タンパク質を濃縮したが、ほとんどのE . c o l iタンパク質が4~7のp I範囲で酸性であり、それらの多くが標的タンパク質に近いp Iを有するため、このステップは、樹脂への密接な結合親和性によって標的タンパク質をE . c o l i宿主のものから効率的に分離することができなかった。しかしながら、興味深いことに、1 Mの（N H 4）2 S O 4の緩衝液を用いた室温でのサイズ排除クロマトグラフィーは重要なステップであるようであり、E . c o l i .のものから標的タンパク質の非常に効率的な分離を提供した。疎水性相互作用及びサイズ排除クロマトグラフィーの第2のラウンドでの更なる精製の後、両方の主要なタグのない候補を、高い均質性で99%の純度に精製し、これは、S D S - P A G E / ネイティブP A G E及びS E C - M A L S分析によって証明された。

40

【表 2】

表 2 : E. coli において発現された組換え K g p キメラ及び断片の概要

名称	コメント	(20ml~200ml の溶解性)		His 染色 分解
		37°C、0.2~0.5 mM の IPTG	16°C~30°C、0.2~0.5 mM の IPTG	
K1	CAD ドメイン配列番号 12	(-)	(-)	試験されず
DUF	DUF2436 ドメイン (配列番号 24)	(+++)		試験されず
DUF-ABM213	DUF2436 ドメイン+ABM (配列 ID N): 26)	(+++)		試験されず
ABM213	ABM2+1+3(配列番号 18)	(+++)		試験されず
ABM21	配列番号 16	(+++)		試験されず
KDcAK1n	配列番号 35(切断された DUF、 切断された CAD ドメイン)	(-)	(-)	(-)
KDA	KAS ドメイン、全長 DUF、 ABM2+1+3、CAD ドメインなし	(+++)	(+++)	(+/-)
KDAK1n	完全な DUF ドメイン及び切断 された CAD ドメインを含む	(+/-)	(+++) {30°C}	(-/+)
KDAK1	完全 DUF ドメイン及び全長 CAD ドメイン	(-)	(++) {16°C}	(+/-)
KKA	リンカーなしで N 末端上に 二重 KAS	(+++)		(+++)
KKDA	“	(+++)		(++)
KKDAK1n	“	(+/-)	(+++) {30°C}	(+)
KDAK	リンカーなしで両方の 末端上に KAS	(+++)		(+)
KDcAK1nK	“	(-)	(-)	(+)
KDAK1nK	“	(+/-)	(+++) {30°C}	(+)
KKAKK	DSSG リンカーを有して N 及び C 末端上に二重 KAS	(+++)		(+++)
KKDAKK	“	(+++)		(++)
KKDcAK1nKK	“	(-)	(-)	(+)
KKDAK1nKK	“	(+/-)	(+++) {30°C}	(+)
KKDAK1KK	“	(-)	(++) {16°C}	(+)
KKKKA	DSSG リンカーを有して N 末端上に 4XKAS	(+++)		(++++)
KKKKDA	“	(+++)		(+++)
KKKKDcAK1n	“	(-)	(-)	(+++)
KKKKDAK1n	“	(+/-)	(+++) {30°C}	(+++)
KKKKDAK1	“	(-)	(++) {16°C}	(++)

【0270】

実施例 3 : 動物研究

歯周炎のマウスモデルにおける P. gingivalis 骨損失の予防

1. 実験 1

試験された抗原 : KDcAK1n 50 µg、KDcAK1n 0.5 µg、KDA 50 µg、KDA 0.5 µg、KDAK1 50 µg、KDAK1 0.5 µg。全ての抗原は、PBS (pH 7.4) 中のミョウバン上に吸収した。

【0271】

KDcAK1n : 封入体から、Ni-NTA 樹脂でバッチ精製した、続いて非還元条件

10

20

30

40

50

下で 2 M 尿素 - P B S に透析した。

【 0 2 7 2 】

K D A 及び K D A K 1 : 可溶性画分から、N i - 親和性 (予め充填されたカラム) 及び勾配溶出を伴う陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、続いて非還元条件下で P B S への透析を行った。

【 0 2 7 3 】

マウス上顎における P . g i n g i v a l i s 誘導歯槽骨損失

K D c A K 1 n 及び K D A は、動物モデルにおいて骨損失から保護した。K D c A K 1 n は、試験された両方の濃度で骨損失から保護し、一方、K D A は、5 0 μ g でのみ保護した (図 3) 。

【 0 2 7 4 】

抗体応答

歯周炎モデルにおける免疫化されたマウスの血清抗体サブクラス応答を、E L I S A によって調査した。抗血清を使用して、吸収された抗原として、熱殺傷 P . g i n g i v a l i s 株 W 5 0 を探索した。抗体応答は、得られた E L I S A 力価からバックグラウンドレベルの 3 倍を引いたものとして表され、各力価は、1 0 匹の個々のマウスの平均 $\pm$ s . d . を表す (図 4) 。K D c A K 1 n (図 4 では「キメラ」と称される) 及び K D A は、P . g i n g i v a l i s 全細胞に対して最も強力な総 I g G 及び I g G 1 応答を誘導し、続いて K D A K 1 が誘導した。試験された抗原間では、5 0 μ g での I g G 及び I g G 1 抗体応答に顕著な差はなかった。

【 0 2 7 5 】

2 . 実験 2

試験された抗原 : K D c A K 1 n 5 0 μ g 、 K D c A K 1 n 0 . 5 μ g 、 K D A 5 0 μ g 、 K D A 0 . 5 μ g 、 K D A K 1 5 0 μ g 、 K D A K 1 0 . 5 μ g 。全ての抗原は、生理食塩水 (p H 7 . 4) 中のミョウバン上に吸収した。

【 0 2 7 6 】

抗原を、実験 1 と同じ方法で精製した。

【 0 2 7 7 】

マウス上顎における P . g i n g i v a l i s 誘導歯槽骨損失

この実験では、実験 1 と同じ抗原を調査したが、それらは P B S ではなく生理食塩水を使用してミョウバンに吸収された。骨損失の結果は、実験 1 及び図 3 (データ示さず) に反映され、K D c A K 1 n 及び K D A のみが保護を示し、ミョウバン調製に P B S 又は生理食塩水を使用することは実験結果に影響を及ぼさなかったことを示した。

【 0 2 7 8 】

抗体応答

試験された全ての抗原は、全細胞 P . g i n g i v a l i s に対する同様の総 I g G 及び I g G 1 応答を誘導した。K D A 及び K D A K 1 は、K D c A K 1 n と比較してより強力な I g G 2 a 応答を誘導した (示さず) 。

【 0 2 7 9 】

3 . 実験 3

試験された抗原 : K K D A 1 n K K ; K D A K 1 n ; K K D A K K .

【 0 2 8 0 】

全ての抗原を、N i - 親和性カラム、陰イオン交換、及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、非還元条件下で、可溶性画分から精製した。

【 0 2 8 1 】

ミョウバン吸収

抗原を吸収するアルヒドロゲル 2 % の能力を、抗原をミョウバンとともに 4 $^{\circ}$ C で 6 0 分間穏やかに混合しながらインキュベーションすることによって試験した。次いで、ミョウバンをペレット化し、ブラッドフォードタンパク質アッセイを抗原のミョウバン吸着前後に実施した。全ての抗原は、9 1 . 7 % ~ 9 9 . 3 % のパーセンテージでミョウバエに結

10

20

30

40

50

合した。SDS-PAGEゲルはまた、前後のミョウバン吸収前後の試料に対しても実行され、ブラッドフォードアッセイのタンパク質の決定と一致していた。

【0282】

P. gingivalis エピトープに対する mAb を有するワクチン候補の事前スクリーニング

全てのワクチン候補は、陰性対照 muBM4 mAb と比較して大きな滴定曲線によって見られるように、KAS2、ABM3、及び EP1 mAb に結合することができた。KKDA1nKK、KDAK1n、及び KKDAKK は、ABM2 mAb に結合せず、この mAb が認識するエピトープが、これらの構築物においてアクセス可能でないことを示す（示さず）。

10

【0283】

マウス上顎における P. gingivalis 誘導歯槽骨損失

KKDAK1nKK 及び KKDAKK は、P. gingivalis 誘導骨損失から保護した（図5）。

【0284】

抗体応答

歯周炎モデルにおける免疫化されたマウスの血清抗体サブクラス応答を、ELISAによって調査した。抗血清を使用して、吸着された抗原として、熱殺傷 P. gingivalis 株 W50 を探査した。試験された全ての抗原は、様々な程度の IgG 応答を生成した。保護 KKDAK1nKK 及び KKDAKK は、熱殺傷 P. gingivalis に対する堅牢な総 IgG 及び IgG1 応答を誘導した。

20

【0285】

プールされた血清試料を使用して、ELISAプレートに吸着された P. gingivalis ドメインを探索した。ABM21（多量体及び二量体）及び ABM213（多量体及び二量体）に対する総 IgG 応答は、全ての抗原によって様々な程度に生成された。DUF2436 に対する IgG 応答は、完全な DUF ドメインを含有する抗原（KKDAK1nKK、KDAK1n、及び KKDAKK）においてのみ明らかであった。プールされた血清試料は、P. gingivalis エピトープペプチドを探索するためにも使用され、保護抗血清中に高い KAS 力価の明確な傾向があったが、やはり保護と非保護の間の明確なパターンは観察されなかった。

30

【0286】

4. 実験4

試験された抗原

全ての抗原を、Ni-親和性クロマトグラフィー、続いて生理食塩水への透析を使用して、非還元条件下で精製した。

【0287】

KDcAK1n-封入体から、尿素及び親和性カラムを使用して精製した（IB、尿素、AC）；KDA-可溶性画分から、親和性カラム精製した（S、AC）；KDA-可溶性画分から、尿素及び親和性カラムを使用して精製した（S、尿素、AC）；KDA-可溶性画分から、尿素及びバッチ精製方法を使用して精製した（S、尿素、バッチ）；KDAK1-可溶性画分から、尿素及び親和性カラムを使用して精製した（S、尿素、AC）；KDAK1-封入体から、尿素及び親和性カラムを使用して精製した（IB、尿素、AC）；KDAK1-封入体から、尿素及びバッチ精製方法を使用した（IB、尿素、バッチ）。

40

【0288】

P. gingivalis エピトープに対する mAb を有するワクチン候補の事前スクリーニング。

全ての候補は、陰性対照 muBM4 mAb と比較して大きな滴定曲線によって見られるように、KAS2、ABM3、及び EP1 mAb に結合することができた。抗原のいずれも ABM2 mAb に結合せず、この mAb が認識するエピトープが、これらの構築

50

物においてアクセス可能でないことを示す（示さず）。

【0289】

マウス上顎における *P. gingivalis* 誘導歯槽骨損失

KDcAK1n (IB、尿素、AC)、KDA (S、AC)、KDAK1 (S、尿素、AC)、KDAK1 (IB、尿素、AC) KDAK1 (IB、尿素、バッチ)、及び KDA (S、尿素、バッチ) は、KDcAK1n (IB、尿素、AC)、KDA (S、AC) 及び KDAK1 (IB、尿素、バッチ) が最良の保護を提供して、骨損失に対する顕著な保護を示した。KDA (S、AC) で観察された有意な保護は、尿素での変性、例えば、KDA (S、尿素、AC) で失われたことに留意されたい (図6)。

【0290】

未分画の親和性精製された抗原が骨損失の保護を提供し、特に良好な保護が親和性精製された可溶性 KDA で観察されたが、この保護は、変性 D 及び A ドメインのジスルフィド架橋を促進するであろう酸化条件下での尿素での処理で部分的に失われたことは注目に値する。重ねて、これらの結果は、尿素を避ける必要があり、可溶性の折り畳まれたドメインの調製が好ましい必要があることを示唆している。

【0291】

5. 実験5

試験された抗原

全ての抗原を、Ni-親和性クロマトグラフィー、続いて生理食塩水への透析を使用して、非還元条件下で精製した。試験された抗原は以下のとおりである：KDcAK1n-封入体から、尿素及び親和性カラムを使用して精製した (IB、尿素、AC)、KDAK1nK、KDAK、KKDAKK、KKDAK1nKK。

【0292】

マウス上顎における *P. gingivalis* 誘導歯槽骨損失

試験された全ての抗原は、*P. gingivalis* 誘導骨損失から保護した。(図7)。

【0293】

実施例2及び3に提示された結果の要約及び考察

本報告書に記載の研究は、産生の容易さを促進し (溶解性及び安定性の改善に寄与する構成要素など)、並びに *P. gingivalis* に対する免疫応答を誘発すること、及び/又は *P. gingivalis* 誘導歯槽骨損失を低減させることにおいて最も効果的であるとするキメラワクチンの構成要素を特定するために、様々なワクチン候補の産生及び有効性を比較した。

【0294】

動物歯周炎モデルにおける歯周骨損失の予防に有効であるが、従来技術のワクチンである KDcAK1n は、*E. coli* によって封入体として発現され、可変の溶解性及び安定性を示す。

【0295】

KDcAK1n は、Lys 特異的ジンジパイン Kgp の活性部位配列 (KAS 又は K) と、Kgp ポリタンパク質の処理された付着因子断片 (A1) との間の融合に基づいた。Kgp ポリタンパク質ドメインの構造分析から、細胞表面上に見出される A1 付着因子断片が、DUF ドメイン (D)、ABM ドメイン (A)、及び K1 ドメイン (K1) の3つの別個の構造ドメインを含むことが今や明らかである。*P. gingivalis* の表面上の Kgp ポリタンパク質を処理してプロテイナーゼ触媒ドメイン及び付着因子を放出することは、38 アミノ酸残基による DUF ドメインの N 末端切断を伴う。しかしながら、これらの余分な N 末端 38 残基を構築物に付加して、切断されたドメイン (Dc) の代わりに完全な DUF ドメインを産生し、非常に可溶性の組換えタンパク質 (例えば、DUF2436、KDA、及び KKDAKK) を産生した。

【0296】

KDcAK1n はまた、Kgp ポリタンパク質の細胞表面処理に基づいて再び C 末端が

10

20

30

40

50

切断されたK1ドメイン（K1n）を含み、A1付着因子断片を産生する。K1nに欠損しているC末端配列を付加した完全K1ドメインは、タンパク質が依然としてE. coli による封入体として主に発現されていたため、溶解性の点で改善されなかった。部分的又は完全K1ドメインを有するほとんどの構築物は、いくつかの溶解性の問題を示したため、完全DUFドメインは、E. coli による可溶性タンパク質としての構築物の発現に重要であり、可能であれば、キメラバリエントにK1ドメインを含めることを避けるべきであると結論付けた。

【0297】

更に、動物実験からの歯周骨損失及びエピトープ分析データから、特に、保護抗原のいずれも、K1エピトープABM5に結合する抗血清を生成しない場合、K1ドメインが保護に顕著に付加しない可能性があるようであった。したがって、K1（又はK1n）ドメインの省略は、ワクチンの有効性に顕著に影響を及ぼすことなく、溶解性を改善する。

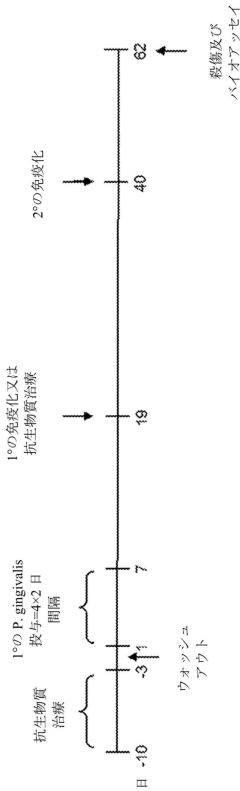
【0298】

保護及び非保護血清を使用した、キメラの種々のセグメント（K、D、A、及びK1）及び疑わしい重要なエピトープ（KAS、ABM2、ABM3、EP1）に対する抗体応答の検査は、いずれの明らかなパターンも提供しなかったが、保護されたそれらのキメラバリエントが、保護がいずれの1つのエピトープにも関連しない可能性があるが、歯周骨損失の完全な保護を確実にするために必要とされるエピトープの組み合わせに更に関連する可能性があるような、P. gingivalis 細胞全体及び既知の保護性エピトープ（KAS、DUF、ABM）に対して強力な（IgG/IgG1）応答を示す傾向があることが明らかであった。

【図面】

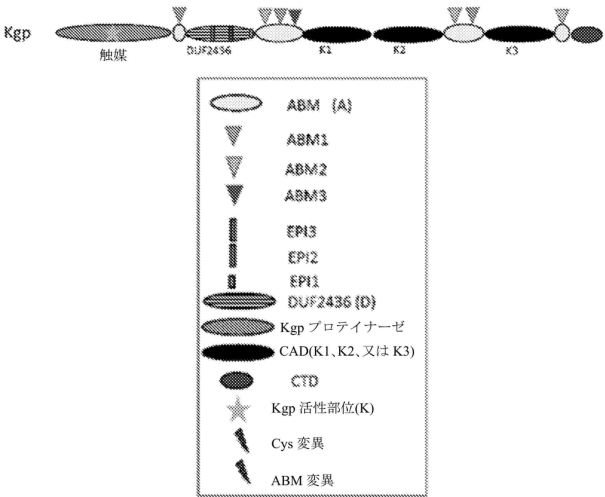
【図1-1】

A



【図1-2】

B



10

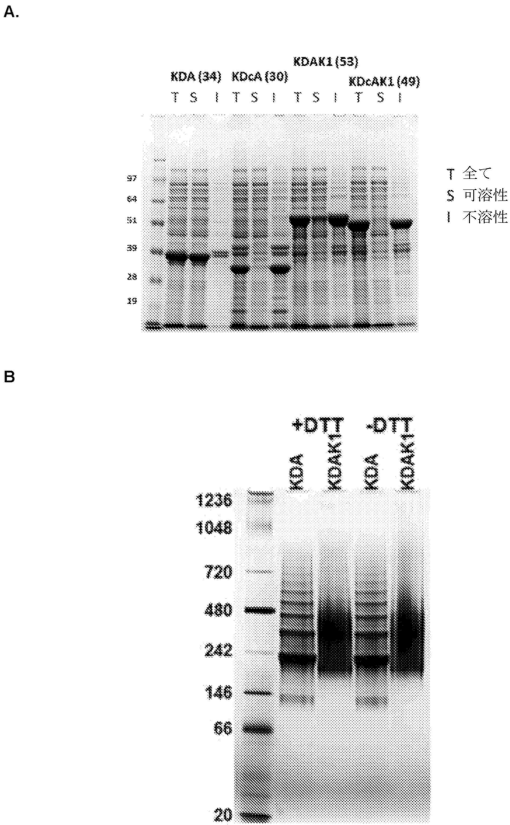
20

30

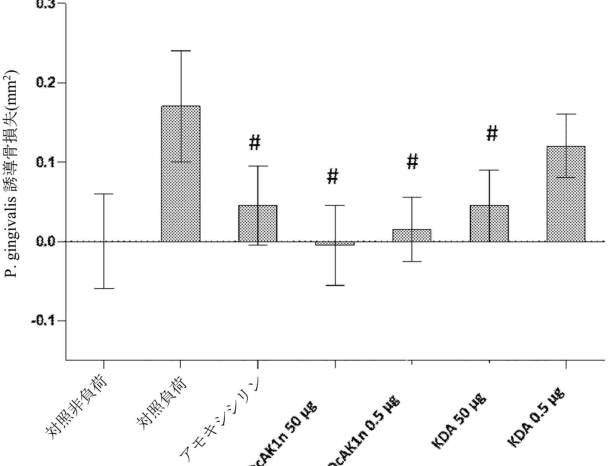
40

50

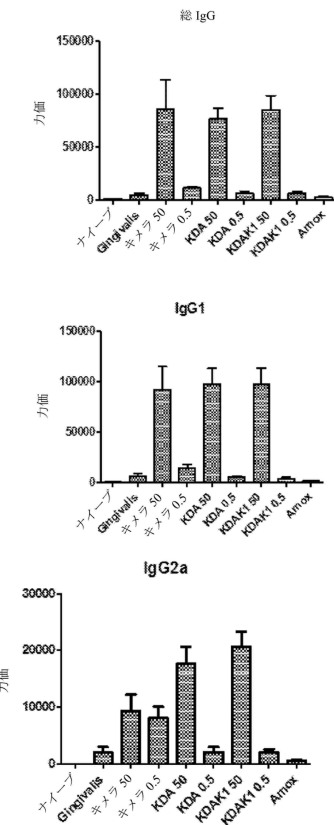
【図 2】



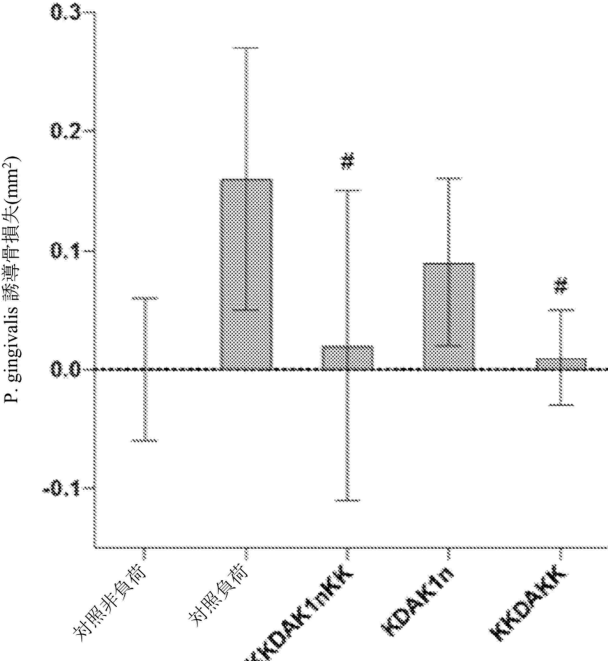
【図 3】



【図 4】



【図 5】



10

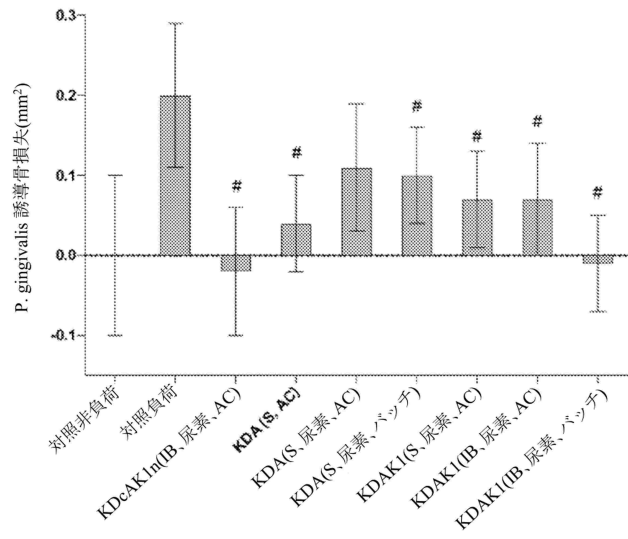
20

30

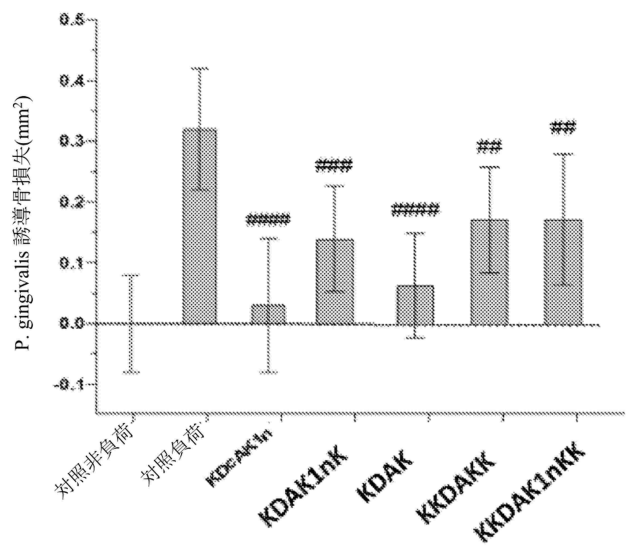
40

50

【図 6】



【図 7】



10

【配列表】

2025504871000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2023/050031
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/02 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/40 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01) C07K 5/113 (2006.01) C12N 9/52 (2006.01)		
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)		
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)		
Databases: PATENW, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
Keywords: Gingipain, DUF2436, solubility, multimerization, vaccine, mutations, and similar.		
GenomeQuest searched SEQ ID NOs: 14, 15, 19, 20, 34, 58-61, 69-75 at 80% sequence identity, SEQ ID NO: 80 and 81 at 90% identity, and SEQ ID NO: 35-49 at 100% identity.		
Applicant/Inventor search: PubMed, Espacenet and IP Australia internal databases.		
Keywords: Denteric Pty Ltd, Oral Health Australia Pty Ltd, Eric Reynolds.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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 31 March 2023		Date of mailing of the international search report 31 March 2023
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Jessica Whyte AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6210 8499

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2023/050031
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/022463 A1 (ORAL HEALTH AUSTRALIA PTY LTD) 04 March 2010 Examples 1-5, Figure 3, Table 3, Pages 17, 54-55	1-50
X	WO 2001/047961 A1 (CSL Limited) 05 July 2001 Examples 1-3, 6 and 9, Figure 3, Table 3, SEQ ID NO:3, Pages 2, 4-5, 8, 17, 28	1-50
A	WO 2014/183168 A1 (ORAL HEALTH AUSTRALIA PTY LTD) 20 November 2014 Examples, SEQ ID NO: 16, Pages 4, 67-70	1-50
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2023/050031

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.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:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13~~ter~~.1(a)).
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:
SEQ ID NOs: 14, 15, 19, 20, 34-49, 58-61, 69-75, 80-81 were searched.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2023/050031	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2010/022463 A1	04 March 2010	WO 2010022463 A1	04 Mar 2010
		AU 2009287340 A1	04 Mar 2010
		AU 2009287340 B2	19 Mar 2015
		AU 2013203249 A1	02 May 2013
		BR PI0917321 A2	17 Nov 2015
		CA 2735171 A1	04 Mar 2010
		CN 102203121 A	28 Sep 2011
		CN 107266582 A	20 Oct 2017
		CN 107266582 B	10 Sep 2021
		EP 2328914 A1	08 Jun 2011
		EP 2328914 B1	10 May 2017
		EP 3255057 A1	13 Dec 2017
		EP 3255057 B1	18 Mar 2020
		IL 211394 B	31 Jul 2018
		JP 2015212284 A	26 Nov 2015
		JP 6235533 B2	22 Nov 2017
		JP 2012500633 A	12 Jan 2012
		KR 20110061586 A	09 Jun 2011
		KR 101721904 B1	11 Apr 2017
		MX 367677 B	30 Aug 2019
		MX 2011001949 A	20 Jul 2011
		MY 178905 A	22 Oct 2020
		NZ 591612 A	31 Aug 2012
		NZ 598834 A	28 Jun 2013
		RU 2011108943 A	10 Oct 2012
		TW 201021845 A	16 Jun 2010
		TW I473626 B	21 Feb 2015
		US 2011280880 A1	17 Nov 2011
		US 8871213 B2	28 Oct 2014
		US 2015079095 A1	19 Mar 2015
		US 9518109 B2	13 Dec 2016
		US 2019194263 A1	27 Jun 2019
		US 10851138 B2	01 Dec 2020
		US 2021079047 A1	18 Mar 2021
		US 11572391 B2	07 Feb 2023
		US 2017247420 A1	31 Aug 2017
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2023/050031	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2001/047961 A1	05 July 2001	ZA 201101814 B	26 Oct 2016
		WO 0147961 A1	05 Jul 2001
		AU 2331401 A	09 Jul 2001
		AU 775228 B2	22 Jul 2004
		CA 2395423 A1	05 Jul 2001
		EP 1240191 A1	18 Sep 2002
		EP 1985626 A1	29 Oct 2008
		EP 1985626 B1	06 Jun 2012
		EP 2243789 A1	27 Oct 2010
		EP 2243789 B1	05 Dec 2012
		HK 1149938 A1	21 Oct 2011
		JP 2003518932 A	17 Jun 2003
		JP 5209163 B2	12 Jun 2013
		JP 2011120581 A	23 Jun 2011
		JP 5349448 B2	20 Nov 2013
		NZ 519365 A	30 Jun 2003
		US 2003232022 A1	18 Dec 2003
		US 7419671 B2	02 Sep 2008
		US 2008175867 A1	24 Jul 2008
		US 8282933 B2	09 Oct 2012
		US 2013164298 A1	27 Jun 2013
		US 8784831 B2	22 Jul 2014
WO 2014/183168 A1	20 November 2014	WO 2014183168 A1	20 Nov 2014
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	16/12 (2006.01)	C 0 7 K	16/12	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	39/07 (2006.01)	A 6 1 K	39/07	
A 6 1 P	1/02 (2006.01)	A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	R
		A 6 1 P	43/00	1 2 1

,MC,ME,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,C O,CR,CU,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,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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

3 1, レベル 9 シー／－

(72)発明者

スラケスキー, ナダ

オーストラリア国 3 0 0 0 ヴィクトリア州, メルボルン, クイーン ストリート 3 1, レベル 9 シー／－

(72)発明者

オブライエーン・シンプソン, ニール

オーストラリア国 3 0 0 0 ヴィクトリア州, メルボルン, クイーン ストリート 3 1, レベル 9 シー／－

F ターム (参考)

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA45
 4C084 AA13 AA19 MA02 MA57 NA14 ZA671 ZA672 ZB091 ZB092 ZB351
 ZB352 ZC751 ZC752
 4C085 AA03 AA14 BA15 BB50 CC07 DD62 DD86 EE01 EE03 EE06
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA75 DA86 EA31 FA71
 FA72 FA74