

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-528059

(P2021-528059A)

(43) 公表日 令和3年10月21日(2021.10.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/62 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 4
<b>A 6 1 K 39/39 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/39 Z N A	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-569986 (P2020-569986)  
 (86) (22) 出願日 令和1年6月14日 (2019.6.14)  
 (85) 翻訳文提出日 令和3年2月10日 (2021.2.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/037251  
 (87) 国際公開番号 W02019/241672  
 (87) 国際公開日 令和1年12月19日 (2019.12.19)  
 (31) 優先権主張番号 62/685,970  
 (32) 優先日 平成30年6月16日 (2018.6.16)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/783,971  
 (32) 優先日 平成30年12月21日 (2018.12.21)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(71) 出願人 517297382  
 ヴァックスニューモ エルエルシー  
 VAXNEWMO LLC  
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス  
 ダンカン アヴェニュー 4340  
 スイート 202  
 4340 Duncan Ave, Suite 202, St. Louis, Missouri, U. S. A.  
 (74) 代理人 100114890  
 弁理士 アイゼル・フェリックス＝ラインハルト  
 (74) 代理人 100098501  
 弁理士 森田 拓

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリコシル化されたC o m P ピリンバリエント、製造方法及びその使用

(57) 【要約】

本明細書で提供されるのは、グリコシル化されたC o m P タンパク質、それらのフラグメント及び融合タンパク質、ならびに例えば、コンジュゲートワクチンの製造に使用するための製造方法である。細菌性疾患を含む疾患に対する複合ワクチンも本明細書で提供される。

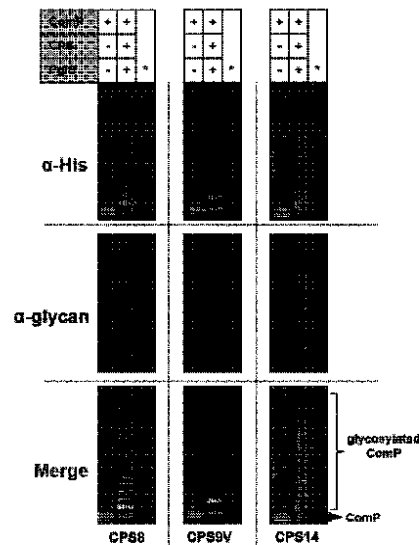


Figure 2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

融合タンパク質に共有結合したオリゴ糖または多糖を含み、前記融合タンパク質が、C o m P タンパク質 ( C o m P ) またはそのグリコシル化タグフラグメントを含む、バイオコンジュゲート。

## 【請求項 2】

前記融合タンパク質が、配列番号 1 ( C o m P <sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基において、前記 C o m P タンパク質上のオリゴ糖もしくは多糖、またはそのグリコシル化タグフラグメントでグリコシル化される、請求項 1 に記載のバイオコンジュゲート。

10

## 【請求項 3】

前記 C o m P タンパク質が、配列番号 7 ( C o m P <sub>2 8 A D P 1</sub> ) に対して、少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号 1 ( C o m P <sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み；任意選択で、

前記 C o m P タンパク質が、配列番号 7 ( C o m P <sub>2 8 A D P 1</sub> )、配列番号 8 ( C o m P <sub>2 8 1 1 0 2 6 4</sub> )、配列番号 9 ( C o m P <sub>2 8 G F J - 2</sub> )、配列番号 1 0 ( C o m P <sub>2 8 P 5 0 v 1</sub> )、配列番号 1 1 ( C o m P <sub>2 8 4 4 6 6</sub> )、または配列番号 1 2 ( C o m P <sub>2 8 S F C</sub> ) を含む、請求項 1 または 2 に記載のバイオコンジュゲート。

20

## 【請求項 4】

前記 C o m P タンパク質が、配列番号 1 ( C o m P <sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) に対して、少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号 1 ( C o m P <sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 5】

前記 C o m P タンパク質が、配列番号 1 ( C o m P <sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1 )、配列番号 2 ( C o m P <sub>1 1 0 2 6 4</sub> : E N V 5 8 4 0 2 . 1 )、配列番号 3 ( C o m P <sub>G F J - 2</sub> : A P V 3 6 6 3 8 . 1 )、配列番号 4 ( C o m P <sub>5 0 v 1</sub> : P K D 8 2 8 2 . 1 )、配列番号 5 ( C o m P <sub>4 4 6 6</sub> : S N X 4 4 5 3 7 . 1 )、または配列番号 6 ( C o m P <sub>S F C</sub> : O A L 7 5 9 5 5 . 1 ) を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

30

## 【請求項 6】

前記 C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントが、配列番号 1 ( C o m P <sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) のアミノ酸残基 1 から 2 8 に対応するアミノ酸残基を欠く C o m P <sub>2 8</sub> ポリペプチドである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

40

## 【請求項 7】

前記 C o m P <sub>2 8</sub> ポリペプチドが、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、及び配列番号 1 2 からなる群から選択される、請求項 6 に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 8】

前記 C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントが、アルファベータループをベータストランド領域に接続するジスルフィド結合に隣接する、配列番号 2 ( C o m P <sub>1 1 0 2 6 4</sub> : E N V 5 8 4 0 2 . 1 ) の 8 2 位のセリン残基を含む、配列番号 2 ( C o m P <sub>1 1 0 2 6 4</sub> : E N V 5 8 4 0 2 . 1 ) の領域に対応する領域を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

50

## 【請求項 9】

前記 C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントが、V G V Q E I S A S N A T T N V A T A T (配列番号 39)、T G V T Q I A S G A S A A T T N V A S A Q (配列番号 40)、V G V Q E I N A S S S T S N V A T A T (配列番号 41)、A G V E T I G A S N K T K N V E S A A (配列番号 42)、V G V Q T I A A S N A T K N V A T A T (配列番号 43)、及び N G V I S A S A T T N V A S S A (配列番号 44) からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含み、前記グリコシル化タグフラグメントが、配列番号 1 (C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1) の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、任意選択で、

10

前記 C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントが、V G V Q E I S A S N A T T N V A T A T (配列番号 39)、T G V T Q I A S G A S A A T T N V A S A Q (配列番号 40)、V G V Q E I N A S S S T S N V A T A T (配列番号 41)、A G V E T I G A S N K T K N V E S A A (配列番号 42)、V G V Q T I A A S N A T K N V A T A T (配列番号 43)、及び N G V I S A S A T T N V A S S A (配列番号 44)、または 1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記バリエーションが配列番号 1 (C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1) の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

20

## 【請求項 10】

前記 C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントが、配列番号 37 のアミノ酸コンセンサス配列、または少なくとも 5、10、15、20、30、35、または 40 個の連続的なアミノ酸のそのフラグメントを含み、前記グリコシル化タグフラグメントが、配列番号 1 (C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1) の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、または前記グリコシル化タグが、1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションを含み、前記バリエーションが配列番号 1 (C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1) の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

30

## 【請求項 11】

前記 C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントが、配列番号 38、もしくは配列番号 45 のアミノ酸コンセンサス配列、または少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の連続的なアミノ酸のそのフラグメントを含み、前記グリコシル化タグフラグメントが、配列番号 1 (C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1) の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、または前記グリコシル化タグが、1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションを含み、前記バリエーションが配列番号 1 (C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1) の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

40

## 【請求項 12】

前記オリゴ糖または多糖が、ストレプトコッカス属の細菌によって産生され、任意選択で、

前記多糖が、S . p n e u m o n i a e、S . a g a l a c t i a e、または S . s u i s のきょう膜多糖である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

## 【請求項 13】

前記きょう膜多糖が、C P S 1 4、C P S 8、C P S 9 V、または C P S 1 5 b である

50

、請求項 12 に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 14】

前記オリゴ糖または多糖が、クレブシエラ属の細菌によって産生され、任意選択で、  
前記オリゴ糖または多糖が、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella varriicola*、*Klebsiella michinganensis*、または *Klebsiella oxytoca* のきょう膜多糖である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 15】

前記多糖が、*Klebsiella pneumoniae* のきょう膜多糖である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

10

【請求項 16】

前記多糖が、*Klebsiella pneumoniae* の血清型 K1 または血清型 K2 のきょう膜多糖である、請求項 15 に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 17】

前記オリゴ糖または多糖が、その還元末端にグルコースを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 18】

前記バイオコンジュゲートが、*in vivo* で産生され、任意選択で、  
細菌細胞で産生される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート

20

【請求項 19】

前記融合タンパク質が、ジフテリアトキソイド CRM197、破傷風トキソイド、*Pseudomonas aeruginosa* 外毒素 A (EPA)、破傷風毒素 C フラグメント、コレラ毒素 B サブユニット、及び *Haemophilus influenzae* タンパク質 D、またはそれらのフラグメントからなる群から選択される担体タンパク質を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 20】

前記 ComP タンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントが前記融合タンパク質の N 末端、前記融合タンパク質の C 末端、及び / または前記融合タンパク質の内部に位置し、任意選択で、

30

前記担体タンパク質またはそのフラグメントが、アミノ酸リンカーを介して、前記 ComP タンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントに連結する、請求項 19 に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 21】

前記融合タンパク質が、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、8 以上、10 以上、15 以上、または 20 以上の ComP タンパク質のグリコシル化タグフラグメントを含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 22】

前記融合タンパク質が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または 20 のうちのいずれかから 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、または 25 のうちのいずれかまでの ComP タンパク質のグリコシル化タグフラグメントを含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

40

【請求項 23】

前記バイオコンジュゲートが、コンジュゲートワクチンであり、任意選択で、  
前記コンジュゲートワクチンが、*Streptococcus pneumoniae* 血清型 8 に対するワクチンである、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 24】

前記コンジュゲートワクチンが対象に投与され、それは免疫応答を誘導する、請求項 2

50

3に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項25】

前記免疫応答が、長期記憶（メモリーB細胞及びメモリーT細胞）を誘発し、抗体応答であり、任意選択で、血清型特異的免疫応答である、請求項23または24に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項26】

前記抗体応答がIgGまたはIgM応答である、請求項25に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項27】

前記抗体応答がIgG応答であり、任意選択でIgG1応答である、請求項26に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項28】

前記コンジュゲートワクチンが、ワクチンを投与された対象において免疫学的記憶を生成する、請求項23～27のいずれか1項に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項29】

Compグリコシル化タグであって、Compタンパク質の単離されたフラグメントを含み、前記フラグメントが、配列番号1（Comp<sub>ADP1</sub>：AAC45886.1）の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む、前記グリコシル化タグ。

【請求項30】

前記フラグメントが、Compタンパク質の少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27を含む、28、29、30、35、または40のアミノ酸を含む、請求項29に記載のグリコシル化タグ。

【請求項31】

前記Compタンパク質が、請求項3～5のいずれか1項に記載のCompタンパク質である、請求項29または30に記載のグリコシル化タグ。

【請求項32】

異種担体タンパク質に結合している請求項29～31のいずれか1項に記載のグリコシル化タグ。

【請求項33】

前記異種担体タンパク質が、ジフテリアトキソイドCRM197、破傷風トキソイド、Pseudomonas aeruginosa外毒素A（EPA）、破傷風毒素Cフラグメント、コレラ毒素Bサブユニット、及びHaemophilus influenzaタンパク質D、またはそれらのフラグメントからなる群から選択される、請求項32に記載のグリコシル化タグ。

【請求項34】

前記グリコシル化タグが、配列番号1（Comp<sub>ADP1</sub>：AAC45886.1）のアミノ酸残基1から28に対応するアミノ酸残基を欠くComp<sub>28</sub>ポリペプチドである、請求項29～33のいずれか1項に記載のグリコシル化タグ。

【請求項35】

前記Comp<sub>28</sub>ポリペプチドが、配列番号7（Comp<sub>28ADP1</sub>）、配列番号8（Comp<sub>28110264</sub>）、配列番号9（Comp<sub>28GFJ-2</sub>）、配列番号10（Comp<sub>28P50v1</sub>）、配列番号11（Comp<sub>284466</sub>）、及び配列番号12（Comp<sub>28SFC</sub>）からなる群から選択される、請求項34に記載のグリコシル化タグ。

【請求項36】

前記グリコシル化タグが、アルファベータループをベータストランド領域に接続するジスルフィド結合に隣接する、配列番号2（Comp<sub>110264</sub>：ENV58402.1）の82位のセリン残基を含む、配列番号2（Comp<sub>110264</sub>：ENV58402.1）の領域に対応する領域を含む、請求項29～35のいずれか1項に記載のグリコシ

10

20

30

40

50

ル化タグ。

【請求項 37】

前記グリコシル化タグが、VGVQEISASNATTNVATAT（配列番号 39）、TGV TQ I A S G A S A A T T N V A S A Q（配列番号 40）、VGVQEINASSSTSNVATAT（配列番号 41）、AGVETIGASNKTKNVESAA（配列番号 42）、VGVQTIAASNATKNVATAT（配列番号 43）、及びNGV I S A S A T T N V A S S A（配列番号 44）からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含み、前記グリコシル化タグが、配列番号 1（COMP<sub>ADP</sub><sub>1</sub> : AAC45886.1）の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、任意選択で、

前記グリコシル化タグが、VGVQEISASNATTNVATAT（配列番号 39）、TGV TQ I A S G A S A A T T N V A S A Q（配列番号 40）、VGVQEINASSSTSNVATAT（配列番号 41）、AGVETIGASNKTKNVESAA（配列番号 42）、VGVQTIAASNATKNVATAT（配列番号 43）、及びNGV I S A S A T T N V A S S A（配列番号 44）、または 1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記バリエーションが配列番号 1（COMP<sub>ADP</sub><sub>1</sub> : AAC45886.1）の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する、請求項 29～36 のいずれか 1 項に記載のバイオコンジュゲート。

【請求項 38】

前記グリコシル化タグが、配列番号 37 のアミノ酸コンセンサス配列、または少なくとも 5、10、15、20、30、35、または 40 個の連続的なアミノ酸のそのフラグメントを含み、前記グリコシル化タグフラグメントが、配列番号 1（COMP<sub>ADP</sub><sub>1</sub> : AAC45886.1）の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、または前記グリコシル化タグが、1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションを含み、前記バリエーションが配列番号 1（COMP<sub>ADP</sub><sub>1</sub> : AAC45886.1）の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する、請求項 29～36 のいずれか 1 項に記載のグリコシル化タグ。

【請求項 39】

前記グリコシル化タグが、配列番号 38、もしくは配列番号 45 のアミノ酸コンセンサス配列、または少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の連続的なアミノ酸のそのフラグメントを含み、前記グリコシル化タグフラグメントが、配列番号 1（COMP<sub>ADP</sub><sub>1</sub> : AAC45886.1）の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、または前記グリコシル化タグが、1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションを含み、前記バリエーションが配列番号 1（COMP<sub>ADP</sub><sub>1</sub> : AAC45886.1）の 84 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する、請求項 29～36 のいずれか 1 項に記載のグリコシル化タグ。

【請求項 40】

前記グリコシル化タグが、配列番号 1（COMP<sub>ADP</sub><sub>1</sub> : AAC45886.1）のアミノ酸残基 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、または 82 のうちのいずれかから、配列番号 1（COMP<sub>ADP</sub><sub>1</sub> : AAC45886.1）のアミノ酸残基 86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、1

10

20

30

40

50

2 2、1 2 3、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1 3 5、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 4、1 4 5、1 4 6、または1 4 7のうちのいずれかまでに対応する C o m P タンパク質アミノ酸配列を含み、任意選択で、

前記グリコシル化タグが、配列番号1 ( C o m P <sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) のアミノ酸残基2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、または8 2のうちのいずれかから、配列番号1 ( C o m P <sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) のアミノ酸残基8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1 3 5、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 4、1 4 5、1 4 6、または1 4 7のうちのいずれかまでを含むアミノ酸配列を含む、請求項2 9に記載のグリコシル化タグ。

10

【請求項4 1】

前記グリコシル化タグが、1 2 4、1 2 0、1 1 5、1 1 0、1 0 0、9 0、8 0、7 5、7 0、6 0、5 0、4 0、3 0、2 5、2 0、1 5、1 0、または5アミノ酸以下の長さである、請求項2 8～4 0のいずれか1項に記載のグリコシル化タグ。

20

【請求項4 2】

前記グリコシル化タグが、配列番号1 ( C o m P <sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の8 4位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基でオリゴ糖または多糖に共有結合している、請求項2 8～4 1のいずれか1項に記載のグリコシル化タグ。

【請求項4 3】

前記オリゴ糖または多糖が、ストレプトコッカス属の細菌によって産生され、任意選択で、

前記多糖が、*S . p n e u m o n i a e*、*S . a g a l a c t i a e*、または*S . s u i s*のきょう膜多糖である、請求項4 2に記載のグリコシル化タグ。

30

【請求項4 4】

前記きょう膜多糖が、C P S 1 4、C P S 8、C P S 9 V、またはC P S 1 5 bである、請求項4 3に記載のグリコシル化タグ。

【請求項4 5】

前記オリゴ糖または多糖が、クレブシエラ属の細菌によって産生され、任意選択で、

前記オリゴ糖または多糖が、*K l e b s i e l l a p n e u m o n i a e*、*K l e b s i e l l a v a r r i c o l a*、*K l e b s i e l l a m i c h i n g a n e n i s*、または*K l e b s i e l l a o x y t o c a*のきょう膜多糖である、請求項4 2に記載のグリコシル化タグ。

40

【請求項4 6】

前記多糖が、*K l e b s i e l l a p n e u m o n i a e*のきょう膜多糖である、請求項4 5に記載のグリコシル化タグ。

【請求項4 7】

前記多糖が、*K l e b s i e l l a p n e u m o n i a e*の血清型K 1または血清型K 2のきょう膜多糖である、請求項4 6に記載のグリコシル化タグ。

【請求項4 8】

前記オリゴ糖または多糖が、その還元末端にグルコースを含む、請求項4 2～4 7のいずれか1項に記載のグリコシル化タグ。

【請求項4 9】

50

請求項 29 ~ 48 のいずれか 1 項に記載の ComP グリコシル化タグを含む融合タンパク質であって、任意選択で、

配列番号 1 ( ComP<sub>ADP1</sub> : AAC45886 . 1 ) の 84 位の保存されたセリン残基に対応するグリコシル化タグのセリン残基でグリコシル化されている、前記融合タンパク質。

【請求項 50】

ジフテリアトキソイド CRM197、破傷風トキソイド、Pseudomonas aeruginosa 外毒素 A (EPA)、破傷風毒素 C フラグメント、コレラ毒素 B サブユニット、及び Haemophilus influenzae タンパク質 D、またはそれらのフラグメントからなる群から選択される担体タンパク質を含む、請求項 49 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 51】

アミノ酸リンカー配列を含む、請求項 49 または 50 に記載の融合タンパク質。

【請求項 52】

オリゴ糖または多糖をアクセプターポリペプチドに *in vivo* で結合する方法であって、PglS オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (OTase) によって、前記オリゴ糖または多糖を前記アクセプターポリペプチドに共有結合させることを含み、前記アクセプターポリペプチドが ComP タンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントを含み、任意選択で、

前記 ComP タンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントが、異種担体タンパク質に連結されている、前記方法。

20

【請求項 53】

前記 PglS OTase が、PglS<sub>110264</sub>、PglS<sub>ADP1</sub>、PglS<sub>G<sub>FJ-2</sub></sub>、PglS<sub>50v1</sub>、PglS<sub>4466</sub>、または PglS<sub>SFC</sub> であり、任意選択で、

前記 ComP タンパク質が、ComP<sub>110264</sub>、ComP<sub>ADP1</sub>、ComP<sub>G<sub>FJ-2</sub></sub>、ComP<sub>50v1</sub>、ComP<sub>4466</sub>、または ComP<sub>SFC</sub> であり、任意選択で、

前記 PglS OTase が、PglS<sub>ADP1</sub> である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

30

前記 PglS OTase が PglS<sub>ADP1</sub> であるが、前記 ComP タンパク質が ComP<sub>ADP1</sub> ではなく、任意選択で、

前記 ComP タンパク質が ComP<sub>110264</sub> である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記オリゴ糖または多糖が、配列番号 1 ( ComP<sub>ADP1</sub> : AAC45886 . 1 ) の 84 位のセリン残基に対応するセリン残基において、前記 ComP タンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントに連結している、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記 *in vivo* のコンジュゲーションが宿主細胞内で起こる、請求項 52 ~ 54 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 57】

前記細胞が細菌細胞である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記細菌宿主細胞が E. coli である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

以下を含む宿主細胞を培養することを含む、請求項 54 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の方法：(a) 前記オリゴ糖または多糖を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子クラスター；(b) PglS OTase；及び(3) 前記アクセプターポリペプチド。

【請求項 60】

50

前記オリゴ糖または多糖の産生が、*K. pneumoniae*の転写活性化因子 *rmpA* (*K. pneumoniae* NTUH K-2044)、または *K. pneumoniae*の転写活性化因子 *rmpA* (*K. pneumoniae* NTUH K-2044)の相同体によって増強される、請求項52～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項61】

前記担体タンパク質が、ジフテリアトキソイドCRM197、破傷風トキソイド、*Pseudomonas aeruginosa*外毒素A (EPA)、破傷風毒素Cフラグメント、コレラ毒素Bサブユニット、及び*Haemophilus influenzae*タンパク質D、またはそれらのフラグメントからなる群から選択される、請求項52～60のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項62】

前記方法がコンジュゲートワクチンを産生する、請求項52～61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】

宿主細胞であって、(a)オリゴ糖または多糖を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子クラスター；(b) *PglS* *OTase*；及び(3) *ComP*タンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントを含むアクセプターポリペプチドを含む、前記宿主細胞。

【請求項64】

前記アクセプターポリペプチドが融合タンパク質である、請求項63に記載の宿主細胞。

20

【請求項65】

前記宿主細胞が *PglS* *OTase*をコードする核酸を含む、請求項63または64に記載の宿主細胞。

【請求項66】

前記宿主細胞が、前記アクセプターポリペプチドをコードする核酸を含む、請求項63～65のいずれか1項に記載の宿主細胞。

【請求項67】

請求項29～48のいずれか1項に記載の *ComP*グリコシル化タグ、及び/または請求項49～51のいずれか1項に記載の融合タンパク質をコードし、任意選択でベクターである、単離された核酸。

30

【請求項68】

請求項67に記載の単離された核酸を含む、宿主細胞。

【請求項69】

請求項23～28のいずれか1項に記載のコンジュゲートワクチンまたは請求項48～51のいずれか1項に記載の融合タンパク質、及びアジュバントを含む組成物。

【請求項70】

細菌性病原体に対する宿主免疫応答を誘導する方法であって、免疫応答を必要とする対象に、請求項23～28のいずれか1項に記載のコンジュゲートワクチン、請求項49～51のいずれか1項に記載の融合タンパク質、または請求項69に記載の組成物の有効量を投与することを含む、前記方法。

40

【請求項71】

前記免疫応答が抗体応答である、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記免疫応答が、先天性応答、適応応答、体液性応答、抗体応答、細胞媒介性応答、B細胞応答、T細胞応答、サイトカインの上方制御または下方制御、免疫系クロストーク、及び前記免疫応答の2つ以上の組み合わせからなる群から選択される、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

前記免疫応答が、先天性応答、体液性応答、抗体応答、T細胞応答、及び前記免疫応答

50

の2つ以上の組み合わせからなる群から選択される、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

対象における細菌性疾患及び/または感染症を予防または治療する方法であって、それを必要とする対象に、請求項23～28のいずれか1項に記載のコンジュゲートワクチン、請求項49～51のいずれか1項に記載の融合タンパク質、または請求項69に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項75】

前記感染症が、皮膚、軟部組織、血液、または臓器の局所的または全身的な感染症であるか、または本質的に自己免疫性である、請求項73に記載の方法。

【請求項76】

前記疾患が肺炎である、請求項74に記載の方法。

【請求項77】

前記感染症が、全身感染症及び/または血液の感染症である、請求項75に記載の方法。

【請求項78】

前記対象がヒトである、請求項70～77のいずれか1項に記載の方法。

【請求項79】

前記組成物が、筋肉内注射、皮内注射、腹腔内注射、皮下注射、静脈内注射、経口投与、粘膜投与、鼻腔内投与、または肺投与を介して投与される、請求項70～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項80】

肺炎球菌感染症に対する肺炎球菌コンジュゲートワクチンを製造する方法であって、

(a) 請求項23～28のいずれか1項に記載のバイオコンジュゲートまたは請求項49～51のいずれか1項に記載のグリコシル化融合タンパク質を単離することと、

(b) 前記単離されたコンジュゲートワクチンまたは単離されたグリコシル化融合タンパク質をアジュバントと組み合わせることと、を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この国際出願は、2018年6月16日に提出された米国仮出願第62/685,970号及び2018年12月21日に提出された米国仮出願第62/783,971号の権利を主張しており、これらは両方ともその全体が本明細書に組み込まれている。

【0002】

本出願は、2015年2月26日に提出された米国仮出願第62/121,439号の権利を主張する、2016年2月16日に提出されたPCT/CA2016/050208の米国国内段階出願である2017年8月25日に提出された米国仮出願第15/553,733号に関連する。No. 62/121,439, filed on February 26, 2015.

【0003】

政府の資金提供声明

本発明は、国立アレルギー感染症研究所(NIAID)によって授与されたR41 AI131742助成金の下で政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) は、世界的に肺炎の主な原因であり、特に5歳以下の子供を苦しめている(O'Brien, K.L. et al. *Lancet* 374, 893-902 (2009))。推定によると、*S. pneumoniae* 感染の結果として毎年約150万人が死亡し

10

20

30

40

50

ており、そのうちのほぼ100万人が子供である(Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization - WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 82, 93-104 (2007))。推奨される予防的治療には、複数の商業的に認可されたワクチンが含まれる(ワールドワイドウェブの、[cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/index.html](http://cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/index.html)のPrevention, C.f. D.C.a. Pneumococcal Vaccination)。23価の多糖ワクチンであるPNEUMOVAX23(登録商標)は、多糖ワクチンが通常T細胞非依存性抗原として作用し、高親和性IgG応答またはB細胞記憶を誘発せず、子供には効果がないため、高齢者に使用される(Pace, D. Expert Opin Biol Ther 13, 11-33 (2013); Vella, M. & Pace, D. Expert Opin Biol Ther 15, 529-546 (2015))。一方、担体タンパク質に共有結合した肺炎球菌きょう膜多糖で構成される肺炎球菌コンジュゲートワクチンは、T細胞依存性抗原として作用する能力があるため、全ての年齢層で効果的であり、免疫記憶を生成することが示されている(Pollard, A.J., Perrett, K.P. & Beverley, P.C. Nat Rev Immunol 9, 213-220 (2009); Avci, F.Y., Li, X., Tsuji, M. & Kasper, D.L. Nat Med 17, 1602-1609 (2011))。

#### 【0005】

2000年以降、3つの肺炎球菌コンジュゲートワクチンが商業的に認可されている。PREVNAR(登録商標); SYNFLORIX; 及びPREVNAR 13(登録商標)は、最も広く保護する肺炎球菌コンジュゲートワクチンであり、肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、及び23Fからなる13のタンパク質-多糖コンジュゲートで構成され、それぞれが遺伝的に不活化されたジフテリアトキソイドCRM<sub>197</sub>に個別に結合している(ワールドワイドウェブの、[fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM201669.pdf](http://fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM201669.pdf)の添付文書、PREVNAR 13(登録商標)-FDA)。Prevnar 13は、3回の初回投与スケジュールでは高度に保護されるが、製造プロセスが複雑なため、最も高価なワクチンの1つであり、初回予防接種と追加予防接種の価格は約600米ドルになる(ワールドワイドウェブの、[cdc.gov/vaccines/programs/vfc/awardees/vaccine-management/price-list/index.html](http://cdc.gov/vaccines/programs/vfc/awardees/vaccine-management/price-list/index.html))のPrevention, C.f. D.C.a. Vaccines for Children Program (VFC)(2018))。実際、PREVNAR 13(登録商標)は、2015年から2017年にかけてPfizerの主要な収益創出製品であり、総収益は175億米ドルを超えている(ワールドワイドウェブの、[sec.gov/Archives/edgar/data/78003/000007800318000027/pfe-exhibit13x12312017x10k.htm](http://sec.gov/Archives/edgar/data/78003/000007800318000027/pfe-exhibit13x12312017x10k.htm)(2018)のPfizer Inc. 2017 Financial Report)。肺炎球菌コンジュゲートワクチン、すなわちPREVNAR 13(登録商標)及びSYNFLORIXは、侵襲性肺炎球菌感染症の負担を大幅に軽減したが、世界的な血清型分布の変動、ならびに血清型の交換及び転置の事象は、脆弱な患者集団に対する追加の保護を提供するより広範なPCVの導入を必要とする。

#### 【0006】

現在認可されている肺炎球菌コンジュゲートワクチンは化学的に合成されるが、これは技術的な課題、低収量、バッチ間のばらつきに悩まされている退屈なプロセスであり、改良されたコンジュゲートワクチン合成方法論の必要性を強調する(Frasch, C. E. Vaccine 27, 6468-6470 (2009))。過去15年間で、細菌タンパク質のグリコシル化システムを使用したin vivoコンジュゲーションは、

化学的コンジュゲーションの実行可能な代替手段として浮上しており、複数のバイオコンジュゲートワクチン候補が現在、開発及び臨床試験の様々な段階にある (Huttner, A. & Gambillara, V. Clin Microbiol Infect (2018); Huttner, A. et al. Lancet Infect Dis 17, 528 - 537 (2017); Riddle, M.S. et al. Clin Vaccine Immunol 23, 908 - 917 (2016))。タンパク質のグリコシル化は、糖またはグリカンとしても知られる炭水化物がタンパク質 (別名ポリペプチド) に共有結合している、遍在する翻訳後修飾である (Apweiler, R., Hermjakob, H. & Sharon, N. Biochim Biophys Acta 1473, 4 - 8 (1999))。細菌では、グリカンは通常、アスパラギン及びセリン/トレオニン残基のそれぞれの N - または O - 結合を介してタンパク質に結合する (Nothhaft, H. & Szymanski, C.M. Nat Rev Microbiol 8, 765 - 778 (2010))。細菌のグリコシル化のいくつかの経路が特徴づけられており、最もよく説明されているものの一つは、グラム陰性菌におけるオリゴサッカリルトランスフェラーゼ (OTase) 依存性のグリコシル化経路である (Iwashkiw, J.A., Voza, N.F., Kinsella, R.L. & Feldman, M.F. Mol Microbiol 89 (2013))。この系では、一般に脂質結合型オリゴ糖が内膜の細胞質リーフレットで逐次的に組み立てられ、ペリプラズムリーフレットに反転され、次いでグリカン付着部位に応じて N - または O - OTase のいずれかによってアクセプタータンパク質に転移され、様々な糖タンパク質を生成する (Iwashkiw, J.A., Voza, N.F., Kinsella, R.L. & Feldman, M.F. Mol Microbiol 89, 14 - 28 (2013))。

#### 【0007】

糖タンパク質は、以下の3つの成分を共発現させることにより、ワクチン及び/または診断薬としての使用のために、*Escherichia coli* (*E. coli*) で組換え合成されている：(1) 目的のグリカンを合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子クラスター；(2) OTase；及び(3) アクセプタータンパク質 (Ciocchini, A.E. et al. Vet Microbiol 172, 455 - 465 (2014); Garcia-Quintanilla, F., Iwashkiw, J.A., Price, N.L., Stratilo, C. & Feldman, M.F. Front Microbiol 5, 381 (2014); Iwashkiw, J.A. et al. Microb Cell Fact 11, 13 (2012))。このプロセスの1つの欠点は、還元末端糖 (すなわち成長している多糖鎖の最初の単糖) によって調節されることが示唆されている既知の OTase の見かけの基質特異性である (Wacker, M. et al. Proc Natl Acad Sci USA 103, 7088 - 7093 (2006))。OTase は多くの異なるオリゴ糖及び多糖構造を転移することができるが、一部の糖は既知の OTase によってアクセプタータンパク質に効率的にコンジュゲートされない。したがって、新規 OTase の特性評価は、次世代のコンジュゲートワクチンを開発するために最も重要である。

#### 【0008】

複合糖質の商業的合成に現在使用されている OTase は、*Campylobacter jejuni* N-OTase PglB と *Neisseria meningitidis* O-OTase PglL であり、その両方ともグリカン基質に対してかなりの無差別性を示す (Feldman, M.F. et al. Proc Natl Acad Sci USA 102, 3016 - 3021 (2005); Faridmoayer, A., Fentabil, M.A., Mills, D.C., Klassen, J.S. & Feldman, M.F. J Bacteri

ol 189, 8088-8098 (2007))。しかしながら、どちらの酵素も、タンパク質に対する還元末端糖としてグルコースを含む *Streptococcus pneumoniae* きょう膜多糖 (CPS) をタンパク質にコンジュゲートさせることが実験的に実証されていない (Geno, K. A. et al. Clin Microbiol Rev 28, 871-899 (2015))。90を超えるCPS血清型が肺炎球菌について特徴づけられており、それぞれが構造的に異なるきょう膜多糖構造を有している。しかしながら、*S. pneumoniae* のCPSの70%を超えるものには、還元末端糖としてグルコースが含まれている (Geno, K. A. et al. Clin Microbiol Rev 28, 871-899 (2015))。したがって、次世代の肺炎球菌コンジュゲートワクチンをより迅速に生成するために既存の製造パイプラインを補完及び/または置き換えるには、肺炎球菌ワクチン合成の新しい方法が必要である。

10

20

30

40

50

#### 【0009】

##### 発明の概要

本明細書で提供されるのは、バイオコンジュゲートであり、例えば、その特定の態様及び特徴がこの段落に記載されており、融合タンパク質に共有結合したオリゴ糖または多糖を含み、ここで融合タンパク質は、Compタンパク質 (Comp) またはそのグリコシル化タグフラグメントを含む。特定の態様では、融合タンパク質は、配列番号1 (Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基において、Compタンパク質上のオリゴ糖もしくは多糖、またはそのグリコシル化タグフラグメントでグリコシル化される。特定の態様では、Compタンパク質は、配列番号7 (Comp<sub>28ADP1</sub>) に対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号1 (Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。特定の態様では、Compタンパク質は、配列番号7 (Comp<sub>28ADP1</sub>)、配列番号8 (Comp<sub>28110264</sub>)、配列番号9 (Comp<sub>28GFJ-2</sub>)、配列番号10 (Comp<sub>28P50v1</sub>)、配列番号11 (Comp<sub>284466</sub>)、または配列番号12 (Comp<sub>28SFC</sub>) を含む。特定の態様では、Compタンパク質は、配列番号1 (Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) に対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号1 (Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。特定の態様では、Compタンパク質は、配列番号1 (Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1)、配列番号2 (Comp<sub>110264</sub>: ENV58402.1)、配列番号3 (Comp<sub>GFJ-2</sub>: APV36638.1)、配列番号4 (Comp<sub>P50v1</sub>: PKD82822.1)、配列番号5 (Comp<sub>4466</sub>: SNX44537.1)、または配列番号6 (Comp<sub>SFC</sub>: OAL75955.1) を含む。特定の態様では、Compタンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、配列番号1 (Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) のアミノ酸残基1から28に対応するアミノ酸残基を欠くComp<sub>28</sub>ポリペプチドである。特定の実施形態では、Comp<sub>28</sub>ポリペプチドは、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12からなる群から選択される。特定の態様では、Compタンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、アルファペーパーブをベータストランド領域に接続するジスルフィド結合に隣接する、配列番号2 (Comp<sub>110264</sub>: ENV58402.1) の82位のセリン残基を含む、配列番号2 (Comp<sub>110264</sub>: ENV58402.1) の領域に対応する領域を含む。特定の態様では、Compタンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、VGVQEISASNAATTNVATAAT (配列番号39)、TGVVTQIASGASAAATTNVASAQ (配列番号40)、VGVQEINASSSTSNVATAAT (配列番号41)、AGVETIGASNKTKNVESSAA (配列番号42)、VGVQTI A A

S N A T K N V A T A T ( 配列番号 4 3 )、及び N G V I S A S A T T N V A S S A ( 配列番号 4 4 ) からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含み、上記グリコシル化タグフラグメントは、配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。特定の態様では、C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、V G V Q E I S A S N A T T N V A T A T ( 配列番号 3 9 )、T G V T Q I A S G A S A A T T N V A S A Q ( 配列番号 4 0 )、V G V Q E I N A S S S T S N V A T A T ( 配列番号 4 1 )、A G V E T I G A S N K T K N V E S A A ( 配列番号 4 2 )、V G V Q T I A A S N A T K N V A T A T ( 配列番号 4 3 )、及び N G V I S A S A T T N V A S S A ( 配列番号 4 4 )、または 1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここでバリエーションは配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、配列番号 3 7 のアミノ酸コンセンサス配列、または少なくとも 5、1 0、1 5、2 0、3 0、3 5、または 4 0 個の連続的なアミノ酸のそのフラグメントを含み、上記グリコシル化タグフラグメントは、配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、または C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションを含み、ここでバリエーションは配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、配列番号 3 8 または 4 5 のアミノ酸コンセンサス配列、または少なくとも 5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、または 2 0 個の連続的なアミノ酸のそのフラグメントを含み、ここで上記グリコシル化タグフラグメントは、配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、または C o m P タンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションを含み、ここでバリエーションは配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、ストレプトコッカス属からの細菌によって産生される。特定の態様では、多糖は、*S. pneumoniae*、*S. agalactiae*、または *S. suis* のきょう膜多糖である。特定の態様では、きょう膜多糖は、C P S 1 4、C P S 8、C P S 9 V、または C P S 1 5 b である。特定の態様では、きょう膜多糖は、C P S 8 である。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、クレブシエラ属からの細菌によって産生される。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella varriicola*、*Klebsiella michiganensis*、または *Klebsiella oxytoca* のきょう膜多糖である。特定の態様では、多糖は、*Klebsiella pneumoniae* のきょう膜多糖である。特定の態様では、多糖は、*Klebsiella pneumoniae* の血清型 K 1 または血清型 K 2 のきょう膜多糖である。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、その還元末端にグルコースを含む。特定の態様では、バイオコンジュゲートは *in vivo* で産生される。特定の態様では、バイオコンジュゲートは、細菌細胞において産生される。特定の態様では、融合タンパク質は、ジフテリアトキソイド CRM 1 9 7、破傷風トキソイド、*Pseudomonas aeruginosa* 外毒素 A ( E P A )、破傷風毒素 C フラグメント、コレラ毒素 B サブユニット、及び *Haemophilus influenzae* タンパク質 D、またはそれらのフラグメントからなる群から選択される担体タンパク質を含む。特定の態様では、C o m P タンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントは、融合タンパク質の N 末端、融合タンバ

ク質のC末端、及び/または融合タンパク質の内部に位置する。特定の態様では、担体タンパク質またはそのフラグメントは、アミノ酸リンカーを介してCOMPタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントに連結されている。特定の態様では、融合タンパク質は、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、8以上、10以上、15以上、または20以上のCOMPタンパク質のグリコシル化タグフラグメントを含む。特定の態様では、融合タンパク質は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または20のうちのいずれかから3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、または25のうちのいずれかまでのCOMPタンパク質のグリコシル化タグフラグメントを含む。特定の態様では、バイオコンジュゲートはコンジュゲートワクチンである。特定の態様では、コンジュゲートワクチンは、Streptococcus pneumoniae血清型8に対するワクチンである。特定の態様では、コンジュゲートワクチンは対象に投与され、それは免疫応答を誘導する。特定の態様では、免疫応答は長期記憶（記憶B及びT細胞）を誘発し、抗体応答である。特定の態様では、抗体反応は、血清型特異的抗体応答である。特定の態様では、抗体応答はIgGまたはIgM応答である。特定の態様では、抗体応答はIgG応答である。特定の態様では、IgG応答はIgG1応答である。特定の態様では、コンジュゲートワクチンは、ワクチンを投与された対象において免疫学的記憶を生成する。

#### 【0010】

本明細書で提供されるのは、COMPグリコシル化タグであり、例えば、その特定の態様及び特徴がこの段落に記載されており、COMPタンパク質の単離されたフラグメントを含み、そのフラグメントは、配列番号1 (COMP<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。特定の態様では、フラグメントは、COMPタンパク質の少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27を含む、28、29、30、35、または40のアミノ酸を含む。特定の態様では、COMPタンパク質は上述のCOMPタンパク質である。特定の態様では、グリコシル化タグは異種担体タンパク質に結合している。特定の態様では、異種担体タンパク質は、ジフテリアトキソイドCRM197、破傷風トキソイド、Pseudomonas aeruginosa外毒素A (EPA)、破傷風毒素Cフラグメント、コレラ毒素Bサブユニット、及びHaemophilus influenzaeタンパク質D、またはそれらのフラグメントからなる群から選択される。特定の態様では、グリコシル化タグは、配列番号1 (COMP<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) のアミノ酸残基1から28に対応するアミノ酸残基を欠くCOMP<sub>28</sub>ポリペプチドである。特定の態様では、COMP<sub>28</sub>ポリペプチドは、配列番号7 (COMP<sub>28ADP1</sub>)、配列番号8 (COMP<sub>28110264</sub>)、配列番号9 (COMP<sub>28GFJ-2</sub>)、配列番号10 (COMP<sub>28P50V1</sub>)、配列番号11 (COMP<sub>284466</sub>)、及び配列番号12 (COMP<sub>28SFC</sub>) からなる群から選択される。特定の態様では、グリコシル化タグは、アルファペーテループをベータストランド領域に接続するジスルフィド結合に隣接する、配列番号2 (COMP<sub>110264</sub>: ENV58402.1) の82位のセリン残基を含む、配列番号2 (COMP<sub>110264</sub>: ENV58402.1) の領域に対応する領域を含む。特定の態様では、グリコシル化タグは、VGVQEISASNAATTNVATAAT (配列番号39)、TGVVTQIASGASAAATTNVASAAQ (配列番号40)、VGVQEINASSSTSNVATAAT (配列番号41)、AGVETIGASNKTKNVESSAA (配列番号42)、VGVQTIAASNAATKNVATAAT (配列番号43)、及びNGVISASAAATTNVASSA (配列番号44) からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み、上記グリコシル化タグは、配列番号1 (COMP<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。特定の態様では、グリコシル化タグは、VGVQEISASNAATTNVATAAT (配列番号39)、TGVVTQIASGASAA

10

20

30

40

50

T T N V A S A Q ( 配列番号 40 )、V G V Q E I N A S S S T S N V A T A T ( 配列番号 41 )、A G V E T I G A S N K T K N V E S A A ( 配列番号 42 )、V G V Q T I A A S N A T K N V A T A T ( 配列番号 43 )、及び N G V I S A S A T T N V A S S A ( 配列番号 44 )、または 1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここでバリエーションは配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、グリコシル化タグは、配列番号 37 のアミノ酸コンセンサス配列、または少なくとも 5、10、15、20、30、35、または 40 個の連続的なアミノ酸のそのフラグメントを含み、上記グリコシル化タグフラグメントは、配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、またはグリコシル化タグは、1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションを含み、ここでバリエーションは配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、グリコシル化タグは、配列番号 38 または 45 のアミノ酸コンセンサス配列、または少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の連続的なアミノ酸のそのフラグメントを含み、ここで上記グリコシル化タグフラグメントは、配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、またはグリコシル化タグは、1、2、3、4、5、6、または 7 個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションを含み、ここでバリエーションは配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) の 8 4 位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、グリコシル化タグは、配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) のアミノ酸残基 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、または 82 のうちのいずれかから、配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) のアミノ酸残基 86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、または 147 のうちのいずれかまでに対応する C o m P タンパク質のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、グリコシル化タグは、配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) のアミノ酸残基 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、または 82 のうちのいずれかから、配列番号 1 ( C o m P A D P 1 : A A C 4 5 8 8 6 . 1 ) のアミノ酸残基 86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、または 147 のうちのいずれかまでを含むアミノ酸配列を含む。特定の態様では、グリコシル化タグは、124、120、115、1

10、100、90、80、75、70、60、50、40、30、25、20、15、10、または5アミノ酸以下の長さである。特定の態様では、グリコシル化タグは、配列番号1 (Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基でオリゴ糖または多糖に共有結合している。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、ストレプトコッカス属からの細菌によって産生される。特定の態様では、多糖は、*S. pneumoniae*、*S. agalactiae*、または*S. suis*のきょう膜多糖である。特定の態様では、きょう膜多糖は、CPS14、CPS8、CPS9V、またはCPS15bである。特定の態様では、きょう膜多糖は、CPS8である。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、クレブシエラ属からの細菌によって産生される。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella varriicola*、*Klebsiella michiganensis*、または*Klebsiella oxytoca*のきょう膜多糖である。特定の態様では、多糖は、*Klebsiella pneumoniae*のきょう膜多糖である。特定の態様では、多糖は、*Klebsiella pneumoniae*の血清型K1または血清型K2のきょう膜多糖である。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、その還元末端にグルコースを含む。

#### 【0011】

本明細書で提供されるのは、融合タンパク質であり、例えば、その特定の態様及び特徴がこの段落に記載されており、上述のCompグリコシル化タグを含む。特定の態様では、融合タンパク質は、配列番号1 (Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するグリコシル化タグのセリン残基でグリコシル化されている。特定の態様では、融合タンパク質は、ジフテリアトキソイドCRM197、破傷風トキソイド、*Pseudomonas aeruginosa*外毒素A (EPA)、破傷風毒素Cフラグメント、コレラ毒素Bサブユニット、及び*Haemophilus influenzae*タンパク質D、またはそれらのフラグメントからなる群から選択される担体タンパク質を含む。特定の態様では、融合タンパク質はアミノ酸リンカー配列を含む。

#### 【0012】

本明細書で提供されるのは、オリゴ糖または多糖をアクセプターポリペプチドに*in vivo*で結合する方法であり、例えば、その特定の態様及び特徴がこの段落に記載されており、この方法は、PglSオリゴサッカリルトランスフェラーゼ (OTase) によって、オリゴ糖または多糖をアクセプターポリペプチドに共有結合させることを含み、ここでアクセプターポリペプチドはCompタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントを含む。特定の態様では、Compタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントは、異種担体タンパク質に連結されている。特定の態様では、PglS OTaseは、PglS<sub>110264</sub>、PglS<sub>ADP1</sub>、PglS<sub>GfJ-2</sub>、PglS<sub>50v1</sub>、PglS<sub>4466</sub>、またはPglS<sub>SFC</sub>である。特定の態様では、Compタンパク質は、Comp<sub>110264</sub>、Comp<sub>ADP1</sub>、Comp<sub>GfJ-2</sub>、Comp<sub>50v1</sub>、Comp<sub>4466</sub>、またはComp<sub>SFC</sub>である。特定の態様では、PglS OTaseは、PglS<sub>ADP1</sub>である。特定の態様では、PglS OTaseは、PglS<sub>ADP1</sub>であるが、Compタンパク質は、Comp<sub>ADP1</sub>ではない。特定の態様では、PglS OTaseは、PglS<sub>ADP1</sub>であり、Compタンパク質は、Comp<sub>110264</sub>である。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、配列番号1 (Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1) の84位のセリン残基に対応するセリン残基において、Compタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントに連結している。特定の態様では、*in vivo*でのコンジュゲーションは、宿主細胞において起きる。特定の態様では、宿主細胞は細菌細胞である。特定の態様では、宿主細胞は*E. coli*である。特定の態様では、方法は以下を含む宿主細胞を培養することを含む：(a) オリゴ糖または多糖を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子クラスター；(b) PglS OTase；及び(3) アクセプターポリペプチド。特定の態様では、オリゴ糖または多糖の生成は、*K. pneumoniae*の転写活性化因子rmpA (*K. p*

neumoniae NTUH K-2044)、またはK. pneumoniaeの転写活性化因子rmpA(K. pneumoniae NTUH K-2044)の相同体によって増強される。特定の態様では、担体タンパク質は、ジフテリアトキソイドCRM197、破傷風トキソイド、Pseudomonas aeruginosa外毒素A(EPA)、破傷風毒素Cフラグメント、コレラ毒素Bサブユニット、及びHaemophilus influenzaeタンパク質D、またはそれらのフラグメントからなる群から選択される。特定の態様では、方法はコンジュゲートワクチンを生成する。

【0013】

本明細書で提供されるのは宿主細胞であり、例えば、その特定の態様及び特徴がこの段落に記載されており、(a)オリゴ糖または多糖を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子クラスター；(b)PglS Oase；及び(3)Compタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントを含むアクセプターポリペプチドを含む。特定の態様では、アクセプターポリペプチドは融合タンパク質である。特定の態様では、宿主細胞は、PglS Oaseをコードする核酸を含む。特定の態様では、宿主細胞は、アクセプターポリペプチドをコードする核酸を含む。

10

【0014】

本明細書で提供されるのは、単離された核酸であり、例えば、その特定の態様及び特徴がこの段落に記載されており、上述のCompグリコシル化タグ及び/または上述の融合タンパク質をコードしている。特定の態様では、核酸はベクターである。単離された核酸を含む宿主細胞も提供される。

20

【0015】

本明細書で提供されるのは、上述のコンジュゲートワクチンまたは上述の融合タンパク質と、アジュバントとを含む組成物である。

【0016】

本明細書で提供されるのは、細菌性病原体に対する宿主免疫応答を誘導する方法であり、例えば、その特定の態様及び特徴がこの段落に記載されており、この方法は、免疫応答を必要とする対象に有効量の上述のコンジュゲートワクチン、上述の融合タンパク質、または上述の組成物を投与することを含む。特定の態様では、免疫応答は抗体応答である。特定の態様では、免疫応答は、先天性応答、適応応答、体液性応答、抗体応答、細胞媒介性応答、B細胞応答、T細胞応答、サイトカインの上方制御または下方制御、免疫系クロストーク、及び上記免疫応答の2つ以上の組み合わせからなる群から選択される。特定の態様では、免疫応答は、先天性応答、体液性応答、抗体応答、T細胞応答、及び上記免疫応答の2つ以上の組み合わせからなる群から選択される。

30

【0017】

本明細書で提供されるのは、対象における細菌性疾患及び/または感染症を予防または治療する方法であり、例えば、その特定の態様及び特徴がこの段落に記載されており、それを必要とする対象に上述のコンジュゲートワクチン、上述の融合タンパク質、または上述の組成物を投与することを含む。特定の態様では、感染症は、皮膚、軟部組織、血液、または臓器の局所的または全身的な感染症であるか、または本質的に自己免疫性である。特定の態様では、疾患は肺炎である。特定の態様では、感染症は、全身感染症及び/または血液の感染症である。特定の態様では、対象はヒトである。特定の態様では、組成物は、筋肉内注射、皮内注射、腹腔内注射、皮下注射、静脈内注射、経口投与、粘膜投与、鼻腔内投与、または肺投与を介して投与される。

40

【0018】

本明細書で提供されるのは、肺炎球菌感染症に対する肺炎球菌コンジュゲートワクチンを製造する方法であり、方法は以下を含む：(a)上述のバイオコンジュゲートまたは上述のグリコシル化融合タンパク質を単離すること；(b)単離されたコンジュゲートワクチンまたは単離されたグリコシル化融合タンパク質をアジュバントと組み合わせる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

50

【図1】A、B、及びCは、Pg1B (B)でもPg1L (A)でもなく、Pg1S (C)が、肺炎球菌CPS14をその同族のアクセプター/担体タンパク質に結合させることができることを示す。ヘキサヒスチジンタグ付きアクセプタータンパク質バリエーションを探索する*E. coli*全細胞溶解物のウエスタンブロット分析。

【図2】*A. baylyi* ADP1 (Pg1S<sub>ADP1</sub>)由来のPg1Sが複数の肺炎球菌きょう膜多糖を*A. baylyi* ADP1 (Comp<sub>ADP1</sub>)からCompに転移することができることを示す。ヘキサヒスチジンタグ付きComp<sub>ADP1</sub>バリエーション及び肺炎球菌CPS8 (左)、CPS9V (中央)、またはCPS14 (右)のいずれかを探索する精製Comp<sub>ADP1</sub>バリエーションのウエスタンブロット分析。抗Hisシグナルと抗グリカンシグナルの共局在は、Comp<sub>ADP1</sub>が正しい肺炎球菌多糖でグリコシル化されたことを示す。アスタリスクは、プロテイナーゼKで2時間処理された試料を示す。

10

【図3】A及びBは、Pg1S<sub>ADP1</sub>が*K. pneumoniae*のK1及びK2のきょう膜多糖をComp<sub>ADP1</sub>に転移することができることを示す。ヘキサヒスチジンタグ付きComp<sub>ADP1</sub>バリエーション及びRNAポリメラーゼを探索する*E. coli*全細胞溶解物のウエスタンブロット分析。RNAポリメラーゼをローディング対照として使用した。

【図4A】単一のグリコシル化ペプチドが同定されたCPS14 - Comp<sub>ADP1</sub>の質量分析を示す。ISASNATTNVATAT (配列番号22)。

【図4B】単一のグリコシル化ペプチドが同定されたCPS14 - Comp<sub>ADP1</sub>の質量分析を示す。ISASNATTNVATAT (配列番号22)。

20

【図5】Comp<sub>ADP1</sub>のセリン84がPg1S依存性グリコシル化部位であることを示す。ヘキサヒスチジンタグ付きComp<sub>ADP1</sub>バリエーション及び*Campylobacter jejuni*七糖を探索する*E. coli*全細胞溶解物のウエスタンブロット分析。Comp[S84A]<sub>ADP1</sub>バリエーションが発現したが、抗hR6七糖抗血清で探索する反応性バンドが非存在であることで示されるように、グリコシル化されていなかった。

【図6】Compオーソログのアミノ酸配列を列挙する。予測されるアルファベータループをベータストランド領域に連結する予測されるジスルフィド結合 (下線付き) が隣接する予測されるグリコシル化の部位が太字で示される。

30

【図7】Pg1S<sub>110264</sub>ではなく、Pg1S<sub>ADP1</sub>が、同族のComp<sub>ADP1</sub>と*A. solis*のCIP110264由来のComp<sub>110264</sub>の両方を効率的にグリコシル化することを示す。ヘキサヒスチジンタグ付きCompバリエーション及びRNAポリメラーゼを探索する*E. coli*全細胞溶解物のウエスタンブロット分析。RNAポリメラーゼをローディング対照として使用した。

【図8】Pg1S<sub>ADP1</sub>がDsbA - Comp<sub>28110264</sub>融合体を効率的にグリコシル化するが、DsbA - Comp<sub>28ADP1</sub>融合体をグリコシル化しないことを示す。全ての融合物は、トリプルアラニンペプチド (AAA; 配列番号24) またはグリシン - グリシン - グリシン - セリンペプチド (GGGS; 配列番号23) のいずれかを有し、DsbAをヘキサヒスチジンタグ付きComp<sub>28110264</sub>またはComp<sub>28ADP1</sub>のいずれかに連結していた。ヘキサヒスチジンタグ付きCompバリエーション及びRNAポリメラーゼを探索する*E. coli*全細胞溶解物のウエスタンブロット分析。RNAポリメラーゼをローディング対照として使用した。

40

【図9】Pg1S<sub>ADP1</sub>がMBP - Comp<sub>28110264</sub>融合体を効率的にグリコシル化するが、MBP - Comp<sub>28ADP1</sub>融合体をグリコシル化しないことを示す。全ての融合物は、トリプルアラニンペプチド (AAA; 配列番号24) またはグリシン - グリシン - グリシン - セリンペプチド (GGGS; 配列番号23) のいずれかを有し、マルトース結合タンパク質 (MBP) をヘキサヒスチジンタグ付きComp<sub>28110264</sub>またはComp<sub>28ADP1</sub>のいずれかに連結していた。ヘキサヒスチジンタグ付きCompバリエーション及びRNAポリメラーゼを探索する*E. coli*全細胞溶解

50

物のウエスタンブロット分析。RNAポリメラーゼをローディング対照として使用した。

【図10】PglS<sub>110264</sub>ではなく、PglS<sub>ADP1</sub>がEPA-GGS-Comp<sub>28110264</sub>融合体を効率的にグリコシル化する。ヘキサヒスチジンタグ付きCompバリエーションを探索するE. coli全細胞溶解物またはペリプラズム抽出物のウエスタンブロット分析。EPA-GGS-ヘキサヒスチジンタグ付きComp<sub>28110264</sub>バリエーションを連結するグリシン-グリシン-グリシン-セリンペプチド(GGS; 配列番号23)を伴う外毒素A。

【図11】代表的なComp<sub>28110264</sub>融合タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【図12A】一価のCPS14-Comp<sub>ADP1</sub>バイオコンジュゲートワクチンが血清型特異的IgG抗体を誘導することを示す。

【図12B】一価のCPS14-Comp<sub>ADP1</sub>バイオコンジュゲートワクチンが血清型特異的IgG抗体を誘導することを示す。

【図12C】一価のCPS14-Comp<sub>ADP1</sub>バイオコンジュゲートワクチンが血清型特異的IgG抗体を誘導することを示す。

【図13】血清型8、9V、及び14に対する3価のバイオコンジュゲートワクチンが、Prevnar13と同等のレベルで血清型特異的IgG力価を誘導することを示す。

【図14】Comp<sub>28</sub>オーソログアミノ酸配列を列挙し、ここで、配列番号1(Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1)の28のN末端アミノ酸に対応するアミノ酸が除去されている。予測されるアルファベータループをベータストランド領域に連結する予測されるジスルフィド結合(下線付き)が隣接する予測されるグリコシル化の部位が太字で示される。

【図15】配列番号1(Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1)の84位のセリン残基に対応するセリン(S)残基(四角の囲み)を含むComp配列の領域のアライメントを示す。

【図16】GluCで消化されたCPS14-Compバイオコンジュゲートの高エネルギー衝突解離(HCD)フラグメンテーションスペクトルを示す。GluCで消化されたCPS14-CompをHCDフラグメンテーションにかけ、CPS14繰り返しサブユニットでグリカンに結合したsemi-GluC由来の単一ペプチドの確認を可能にした。最大4つの四糖繰り返し単位に対応する拡張グリカンで装飾された追加の糖ペプチドも観察された。

【図17】C. jejuniの七糖(Comp-グリカン<sub>cj</sub>)でグリコシル化されたGluC消化Compの高エネルギー衝突解離(HCD)フラグメンテーションスペクトルを示す。GluCで消化されたComp-グリカン<sub>cj</sub>をHCDフラグメンテーションにかけ、CPS14繰り返しサブユニットでグリカンに結合した単一ペプチドの確認を可能にした。6\*HexNAc、1\*Hexoseに対応する1380.53DaグリカンによるペプチドISASNATTNVATAT(配列番号22)のグリコシル化を確認するために、低衝突エネルギーレジームが実施された。

【図18】C. jejuniの七糖(Comp-グリカン<sub>cj</sub>)でグリコシル化されたGluC消化Compの高エネルギー衝突解離(HCD)フラグメンテーションスペクトルを示す。GluCで消化されたComp-グリカン<sub>cj</sub>をHCDフラグメンテーションにかけ、CPS14繰り返しサブユニットでグリカンに結合した単一ペプチドの確認を可能にした。6\*HexNAc、1\*Hexoseに対応する1380.53DaグリカンによるペプチドISASNATTNVATAT(配列番号22)のグリコシル化を確認するために、高衝突エネルギーレジームが実施された。

【図19】A~Iは、オリゴサッカリルトランスフェラーゼPglSがアクセプタータンパク質Compを肺炎球菌CPS14多糖でグリコシル化できることを示す。アクセプタータンパク質(DsbA、AcrA、またはComp)、OTase(PglL、PglB、またはPglS)、及びCPS14多糖を共発現するE. coliのSDB1細胞を、アフィニティー精製されたアクセプタータンパク質のウエスタンブロット分析によってタンパク質のグリコシル化について分析した。(A~C): PglLの存在下または非

10

20

30

40

50

存在下でSDB1細胞から精製されたDsbA。(A):ヘキサヒスチジンタグ付きDsbAの抗Hisチャンネルでの探索。(B):CPS14の抗グリカンチャンネルでの探索。(C):パネルAとBをマージした画像。(D~F):PglBの存在下または非存在下でSDB1細胞から精製されたAcrA。(D):ヘキサヒスチジンタグ付きAcrAの抗Hisチャンネルでの探索。(E):CPS14の抗グリカンチャンネルでの探索。(F):パネルDとEをマージした画像。(G~I):PglSの存在下または非存在下でSDB1細胞から精製されたComp。(G):ヘキサヒスチジンタグ付きCompの抗Hisチャンネルでの探索。(H):CPS14の抗グリカンチャンネルでの探索。(I):パネルGとHをマージした画像。アスタリスクは、55で1時間プロテイナーゼK処理された試料を示す。

10

【図20A】GluCで消化されたCPS14-Compバイオコンジュゲートの高エネルギー衝突解離(HCD)フラグメンテーションスペクトルを示す。GluCで消化されたCPS14-CompをHCDフラグメンテーションにかけ、CPS14繰り返しサブユニットでグリカンに結合した単一ペプチドの確認を可能にした。HexNAc2Hexose6に対応する1378.47DaグリカンによるペプチドISASNAATTNVATAT(配列番号22)のグリコシル化を確認するために、高衝突エネルギーレジーム(A)及び高衝突エネルギーレジーム(B)が実施された。

【図20B】GluCで消化されたCPS14-Compバイオコンジュゲートの高エネルギー衝突解離(HCD)フラグメンテーションスペクトルを示す。GluCで消化されたCPS14-CompをHCDフラグメンテーションにかけ、CPS14繰り返しサブユニットでグリカンに結合した単一ペプチドの確認を可能にした。HexNAc2Hexose6に対応する1378.47DaグリカンによるペプチドISASNAATTNVATAT(配列番号22)のグリコシル化を確認するために、高衝突エネルギーレジーム(A)及び高衝突エネルギーレジーム(B)が実施された。

20

【図21】A~Fは、CPS8-Comp及びCPS9V-Comp糖タンパク質のウエスタンブロット分析を示す。Comp、PglS、及び肺炎球菌CPS8またはCPS9Vのいずれかを共発現するE.coliのSDB1細胞が調製された。各菌株からアフィニティー精製されたグリコシル化Compを、ウエスタンブロット分析によってタンパク質のグリコシル化について分析した。(A~C):Comp単独と比較したCPS8-Compバイオコンジュゲートのウエスタンブロット分析(A):PglSの存在下または非存在下でCPS8を発現するSDB1から精製されたヘキサヒスチジンタグ付きCompの抗Hisチャンネルでの探索。(B):CPS8の抗グリカンチャンネルでの探索。(C):パネルAとBをマージした画像。(D~F):Comp単独と比較したCPS9V-Compバイオコンジュゲートのウエスタンブロット分析(D):PglSの存在下または非存在下でCPS9Vを発現するSDB1から精製されたヘキサヒスチジンタグ付きCompの抗Hisチャンネルでの探索。(E):CPS9Vの抗グリカンチャンネルでの探索。(F):パネルDとEをマージした画像。アスタリスクは、55で1時間プロテイナーゼK処理された試料を示す。

30

【図22】A~Fは、Comp、PREVNAR13(登録商標)、一価のCPS14-Compバイオコンジュゲート、及び3価のCPS8-/CPS9V-/CPS14-Compバイオコンジュゲートをワクチン接種したマウスのIgG応答を示す。マウスの群に、Comp単独、PREVNAR13(登録商標)、一価のCPS14-Compバイオコンジュゲートワクチン、またはCPS8-/CPS9V-/CPS14-Compバイオコンジュゲートワクチンをワクチン接種した。血清は49日目に採取され、0日目に採取された血清と比較するELISAによって血清型特異的IgG応答について分析された。(A~C):血清型8(A)、9V(B)、または14(C)のプラセボワクチン接種マウスでは、IgG応答の検出可能な増加は検出されなかった。(D~F):PREVNAR13(登録商標)ワクチン接種マウスでは、血清型8(D)に対するIgG応答力価の増加は検出されなかったが、血清型9V(E)及び14(F)に特異的なIgG応答の増加があった。独立t検定(Mann-Whitney)を実行して、49日目の血

40

50

清からの免疫前の血清を統計的に分析した。試験された各ケースのP値は\*\*\*\* $p = 0.0001$ であった。各点は単一のワクチン接種されたマウスを表す。エラーバーは平均値の標準偏差を示す。G~Lは、Comp、PREVNAR 13（登録商標）、一価のCPS14-Compバイオコンジュゲート、及び3価のCPS8-/CPS9V-/CPS14-Compバイオコンジュゲートをワクチン接種したマウスのIgG応答を示す。マウスの群に、Comp単独、PREVNAR 13（登録商標）、一価のCPS14-Compバイオコンジュゲートワクチン、またはCPS8-/CPS9V-/CPS14-Compバイオコンジュゲートワクチンをワクチン接種した。血清は49日目に採取され、0日目に採取された血清と比較するELISAによって血清型特異的IgG応答について分析された。（G~I）：CPS14-Compバイオコンジュゲートワクチンをワクチン接種したマウスでは、血清型8（G）または9V（H）に特異的なIgG力価の検出可能な増加はなかったが、血清型14（I）に対するIgG応答の統計的に有意な増加があった。（J~L）：三価のCPS8-/CPS9V-/CPS14-Compバイオコンジュゲートをワクチン接種したマウスは全て、血清型8（J）、9V（K）、及び14（L）に対するIgG力価の統計的に有意なIgG応答の増加を示した。独立t検定（Mann-Whitney）を実行して、49日目の血清からの免疫前の血清を統計的に分析した。試験された各ケースのP値は\*\*\*\* $p = 0.0001$ であった。各点は単一のワクチン接種されたマウスを表す。エラーバーは平均値の標準偏差を示す。

10

【図23】A、Bは、S. pneumoniaeの血清型8及び14に対するワクチン接種されたマウス由来の血清の殺菌活性を示す。S. pneumoniaeの血清型8（A）と14（B）の両方に対して、緩衝液対照、PREVNAR 13（登録商標）、またはバイオコンジュゲートワクチンのいずれかでワクチン接種されたマウス由来の血清のオプソニン化貪食作用アッセイ（OPA）。血清型特異的な市販のウサギ抗S. pneumoniae血清を陽性対照として使用した。ナイーブマウスの新鮮な全血に5%（v/v）試料血清と0.01の細菌MOIを添加して、アッセイを実施した。4時間のインキュベーション後に生菌計数を実施した。細菌の殺傷を決定するために、試料血清とインキュベートしたチューブからの生菌数を、対照のナイーブマウス血清とインキュベートしたものと比較した。結果は、個々のマウスの殺菌パーセントとして表され、横棒は平均の標準偏差を表す。

20

【図24A】CPS8きょう膜多糖によるEPAグリコシル化の分析を示す。EPA単独と比較したEPA-CPS8バイオコンジュゲートのウエスタンプロット分析。（A-左パネル）Pg1Sの存在下または非存在下でCPS8を発現するSDB1から精製されたヘキサヒスチジンタグ付きEPAの抗Hisチャンネルでの探索。（A-真ん中のパネル）CPS8の抗グリカンチャンネルでの探索。（A-右）左パネルと真ん中のパネルのマージした画像。

30

【図24B】CPS8きょう膜多糖によるEPAグリコシル化の分析を示す。（B）：クーマシーで染色したSDSポリアクリルアミドゲルで分離したEPA-CPS8。

【図24C】精製されたEPA-CPS8のMS1質量スペクトルを示すインタクトタンパク質質量分析を示す。EPA融合タンパク質の理論質量は79,526.15ダルトンであり、79,514.76のピークとして観察できる。EPA融合タンパク質は、理論質量662ダルトンのCPS8繰り返しサブユニットに対応する質量増加の複数の状態でも観察された。EPA-CPS8の様々なグリコフォームが観察され、「g<sup>数</sup>」で表され、ここで「g」はグリコフォームを表し、「数」は繰り返しCPS8サブユニットの数に対応する。EPA融合タンパク質は、CPS8グリカンの最大11の繰り返しサブユニットで修飾された。パネルDは、様々なEPA-CPS8グリコフォームの拡大表示を提示する。

40

【図24D】図24Cの様々なEPA-CPS8グリコフォームの拡大表示を提示する。

【図25】A、Bは、マウスにおけるComp-CPS8及びEPA-CPS8のバイオコンジュゲートに対する免疫応答の分析を示す。（A）：CPS8バイオコンジュゲートワクチンで免疫したマウスのCPS8IgG抗体の力価。マウス群は以下のとおりであっ

50

た：E P A ( n = 9、5  $\mu$  g の総タンパク質をワクチン接種したマウス)、C o m P - C P S 8 ( n = 10、5  $\mu$  g の総多糖をワクチン接種したマウス)、及びE P A - C P S 8 ( n = 10、100 ng の総多糖をワクチン接種したマウス)。1、14、及び28日目に、全てのマウスをI m j e c t A l u m A d j u v a n t で1 : 1 に希釈した100  $\mu$  L のワクチンで免疫した。血清は4日目に採取した。力価測定のために、E L I S A プレート成全細胞の血清型8の肺炎球菌でコーティングし、血清の2倍段階希釈液とインキュベートした。個々のマウスの力価が示され、水平バーは平均の標準誤差を表す。E P A プラセボ群と比較して統計的に有意な力価はアスタリスクで示され、K r u s k a l - W a l l i s 一元配置分散分析を使用して決定された。\* \*、P = 0 . 0 2 2 3 及び\* \* \* \*、P < 0 . 0 0 0 1。分析と表現の目的で、負の力価 (< 100) には10の任意値が与えられた。(B) : C o m P - C P S 8 及びE P A - C P S 8 のバイオコンジュゲートワクチンで免疫したマウス由来の42日目の血清によるS . p n e u m o n i a e 血清型8のオプソニン化貪食作用による殺傷。I g G 力価について記載したのと同じマウス群をO P A に使用した。血清の40% ( v o l / v o l ) 試料と0 . 0 1 の細菌M O I を、ナイーブマウス由来の新鮮な全血に加えてアッセイを実施した。結果は、個々のマウスの殺菌パーセントとして表され、横棒は平均の標準偏差を表す。E P A プラセボ群と比較して統計的に有意な殺傷はアスタリスクで示され、K r u s k a l - W a l l i s 一元配置分散分析を使用して決定された。\* \*、P = 0 . 0 0 1 5。

10

【図26A】保存された相同セリンがA . b a y l l y i のA D P 1 及びA . s o l i の110264由来のC o m P タンパク質のグリコシル化部位であると考えられていることを示す。C o m P <sub>A D P 1</sub> のセリン82及び84とC o m P <sub>110264</sub> の相同セリン79及び82をアラニンに変異させ、P g l S 及び血清型8のきょう膜多糖の存在下でのグリコシル化を探索した。P g l S 及びC P S 8 の存在下でC o m P バリエーションを発現するS D B 1細胞を、タンパク質のグリコシル化についてウエスタンブロッティングによって探索した。C o m P 発現及びグリコシル化のための抗H i s チャンネルでの探索。

20

【図26B】保存された相同セリンがA . b a y l l y i のA D P 1 及びA . s o l i の11026由来のC o m P タンパク質のグリコシル化部位であると考えられていることを示す。C o m P <sub>A D P 1</sub> のセリン82及び84とC o m P <sub>110264</sub> の相同セリン79及び82をアラニンに変異させ、P g l S 及び血清型8のきょう膜多糖の存在下でのグリコシル化を探索した。P g l S 及びC P S 8 の存在下でC o m P バリエーションを発現するS D B 1細胞を、タンパク質のグリコシル化についてウエスタンブロッティングによって探索した。C P S 8 の抗グリカンチャンネルでの探索。

30

【図26C】保存された相同セリンがA . b a y l l y i のA D P 1 及びA . s o l i の11026由来のC o m P タンパク質のグリコシル化部位であると考えられていることを示す。C o m P <sub>A D P 1</sub> のセリン82及び84とC o m P <sub>110264</sub> の相同セリン79及び82をアラニンに変異させ、P g l S 及び血清型8のきょう膜多糖の存在下でのグリコシル化を探索した。P g l S 及びC P S 8 の存在下でC o m P バリエーションを発現するS D B 1細胞を、タンパク質のグリコシル化についてウエスタンブロッティングによって探索した。パネルAとBをマージした画像。

【図27】A、B、Cは、K l e b s i e l l a p n e u m o n i a e のK 1 及びK 2 きょう膜多糖によるE P A グリコシル化の分析を示す。精製された、(A)グリコシル化されていないE P A、(B)K . p n e u m o n i a e のK 1 きょう膜多糖によりグリコシル化されたE P A、または(C)K . p n e u m o n i a e のK 2 きょう膜多糖によりグリコシル化されたE P A のウエスタンブロット分析。「g<sup>0</sup>」は、グリコシル化されていないE P A 融合体を示し、「g<sup>n</sup>」は、それぞれパネルBまたはCに示されているように、異なるサイズのK 1 またはK 2 繰り返しサブユニットでグリコシル化されたE P A 融合体を示す。

40

【図28A】精製されたE P A - K 2 のM S 1 質量スペクトルを示すインタクトタンパク質質量分析を示す。E P A 融合タンパク質の理論質量は79,526.15ダルトンであり、79,518.73のピークとして観察できる。E P A 融合タンパク質は、理論質量

50

662ダルトンのK. pneumoniaeのK2きょう膜多糖の繰り返しサブユニットに対応する質量増加の複数の状態でも観察された。EPA-K2の様々なグリコフォームが観察され、「g<sup>数</sup>」で表され、ここで「g」はグリコフォームを表し、「数」は繰り返しK2サブユニットの数に対応する。EPA融合タンパク質は、K2きょう膜の最大11の繰り返しサブユニットで修飾された。

【図28B】精製されたEPA-K2のMS1質量スペクトルを示すインタクトタンパク質質量分析を示す。EPA融合タンパク質の理論質量は79,526.15ダルトンであり、79,518.73のピークとして観察できる。EPA融合タンパク質は、理論質量662ダルトンのK. pneumoniaeのK2きょう膜多糖の繰り返しサブユニットに対応する質量増加の複数の状態でも観察された。Aの拡大図も提供される。

10

【発明を実施するための形態】

【0020】

説明的なサポートを提供するために必要な範囲で、添付の特許請求の範囲の主題及び/または文書は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0021】

本明細書に記載及び請求される例示的な態様及び実施形態は、本明細書に具体的に開示されている、または具体的に開示されていない列挙された特徴、要素またはステップがない場合に適切に実施され得ることが、この書面による説明の全ての読者によって理解される。

【0022】

用語「a」または「an」の実体は、その実体の1つまたは複数を指し、例えば、「多糖」は、1つまたは複数の多糖を表すと理解されることに留意されたい。そのようなとき、用語「a」（または「an」）、「1つまたは複数」、及び「少なくとも1つ」は、本明細書において互換的に使用され得る。

20

【0023】

さらに、「及び/または」は、本明細書で使用される場合、他のものを伴ってまたは伴わずに、特定の特徴または構成要素のそれぞれの具体的な開示として受け取られるべきである。したがって、本明細書で「A及び/またはB」等の語句で使用されるとき、「及び/または」という用語は、「A及びB」、「AまたはB」、「A」（単独）、及び「B」（単独）を含むことを意図する。同様に、「A、B、及び/またはC」のような語句で使用されるとき、「及び/または」という用語は、以下の実施形態の各々を包含することを意図する：A、B、及びC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；A及びC；A及びB；B及びC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）。

30

【0024】

本明細書で「含むこと（comprising）」または「含む（comprises）」という言葉で態様が記載されている場合は常に、「からなる（consisting of）」、「からなる（consists of）」、「から本質的になる（consisting essentially of）」及び/または「から本質的になる（consists essentially of）」などの用語で記載されている類似の態様も提供されることを理解されたい。

40

【0025】

別途定義されない限り、本明細書において使用される技術用語及び科学用語は、本開示の関連する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。数値範囲は範囲を定義する数を含む。「及びその間の任意の範囲」などによって明示的に識別されていない場合、または例えば、1, 2, 3または4のように値の列挙が記載されている場合でも、特に明記しない限り、本開示は、値の間の任意の範囲、例えば、1~3、1~4、2~から4などを具体的に含む。

【0026】

本明細書で提供される見出しは、単に参照を容易にするためのものであり、本明細書全体を参照することによって得られることができる本開示の様々な態様または態様の限定で

50

はない。

【0027】

本明細書で使用される場合、「天然に存在しない」状態、物質、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド、組成物、実体、生物、個体、及び/またはそれらの任意の組み合わせ、またはそれらの任意の文法的異形という用語は、当業者によって「天然に存在する」と十分に理解されている、または「天然に存在する」と裁判官または行政または司法機関によっていつでも判定または解釈される可能性のある形式を明示的に除外するが除外するだけである条件付き用語である。

【0028】

本明細書で使用される時、「バイオコンジュゲート」という用語は、糖（糖、オリゴ糖、多糖など）に共有結合したペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドなどを含む分子である。

【0029】

本明細書で使用される時、「オリゴ糖または多糖」は、一緒に結合された1つを超える単糖単位からなる炭水化物を指す。

【0030】

本明細書で使用される時、「脂質結合オリゴ糖または多糖」という用語は、ピロリン酸によってオリゴ糖または多糖に結合された任意のイソプレノイド部分を指す。

【0031】

本明細書で使用される時、「融合タンパク質」という用語は、それらが天然には生じない配置で共有結合している2つ以上のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。そのようなアミノ酸配列は、異種タンパク質からの配列、同じタンパク質の異なる領域からの配列、及び/または同じタンパク質からの繰り返し配列を含み得る。

【0032】

本明細書で使用される時、「同一性」または「同一」という用語、例えば、本明細書に開示されるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列に対して「同一性パーセント(%)」または「パーセント(%)同一である」は、2つ以上のヌクレオチド配列間または2つ以上のアミノ酸配列間の関係を指す。ある配列の位置が、比較配列の対応する位置の同じ核酸塩基またはアミノ酸によって占められている場合、その配列はその位置で「同一である」と言われる。「配列同一性」のパーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸が両方の配列に存在する位置の数を決定して、「同一である」位置の数を得ることによって計算される。次に、「同一である」位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、100を掛けて、「配列同一性」のパーセンテージを得る。「配列同一性」のパーセンテージは、参照配列の全長の比較ウィンドウにわたって2つの最適に整列された配列を比較することによって決定される。比較のために配列を最適に整列させるために、比較ウィンドウ内のヌクレオチドまたはアミノ酸配列の部分は、参照配列が一定に保たれている間、ギャップと呼ばれる付加または欠失を含み得る。最適なアライメントは、ギャップがあっても、参照配列と比較配列の間に可能な限り多くの「同一である」位置を生成するアライメントです。2つの配列間の「配列同一性」のパーセンテージは、例えば、国立バイオテクノロジー情報センターから入手可能であり、プログラムBLASTN（ヌクレオチド配列比較用）及びBLASTP（アミノ酸配列比較）を組み込んだプログラム「BLAST」を使用して決定することができ、このプログラムは、KarlinとAltschulのアルゴリズムに基づいている（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12): 5873-5877, 1993）。

【0033】

本明細書において使用される時、「ポリペプチド」という用語は、単数形の「ポリペプチド」及び複数形の「ポリペプチド」を包含し、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって線状に連結した単量体（アミノ酸）からなる分子を指すことを意図する。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖または複数の鎖を指し、特定の長さの生成物を指すものではない。したがって、2つ以上のアミノ酸の鎖または

10

20

30

40

50

複数の鎖を指すのに使用されるペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義に含まれ、用語「ポリペプチド」は、任意のこれらの用語の代わりに、または互換的に使用され得る。「ポリペプチド」という用語はまた、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/遮断基による誘導体化、タンパク質分解的切断、または非標準アミノ酸による修飾を含むがこれらに限定されないポリペプチドの発現後修飾の生成物を指すことを意図する。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来するか、または組換え技術によって生成され得るが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳されるわけではない。それは化学合成によることを含む任意の方法で生成することができる。

**【0034】**

本明細書で使用されるとき、「タンパク質」は、単一のポリペプチド、すなわち上述で定義された単一のアミノ酸鎖を指すことができるが、例えば、ジスルフィド結合、水素結合、または疎水性相互作用によって結合されて多量体タンパク質を生成する2つ以上のポリペプチドを指すこともできる。

**【0035】**

「単離された」ポリペプチドまたはそのフラグメント、バリエーション、もしくは誘導体とは、その天然の環境にはないポリペプチドを意図する。特定の精製レベルが求められるわけではない。例えば、単離されたポリペプチドはその天然のまたは自然な環境から取り出され得る。いずれかの適切な技法によって、分離、分画または部分的もしくは実質的に精製された天然のポリペプチドまたは組み換えポリペプチドと同様に、宿主細胞で発現させた組み換え産生ポリペプチドとタンパク質は、本発明の目的において、単離されているものとみなす。単離されたポリペプチドまたはフラグメント、バリエーション、またはそれらの誘導体などは、補因子と会合、結合などすることができる。同様に、精製されたか、または精製及び単離されたポリペプチドまたはフラグメント、バリエーション、またはそれらの誘導体などは、補因子と会合、結合などすることができる。

**【0036】**

本明細書で開示される他のポリペプチドは、本明細書で開示されるポリペプチドのフラグメント、誘導体、アナログ、またはバリエーション、及びそれらの任意の組み合わせである。本明細書に開示されるポリペプチドサブユニットまたは多量体タンパク質を指す場合の「フラグメント」、「バリエーション」、「誘導体」、及び「類似体」という用語は、完全なポリペプチドまたはタンパク質の活性の少なくとも一部を保持する（例えば、グリコシル化される能力を保持する）が、構造的に異なる任意のポリペプチドまたはタンパク質を含み得る。ポリペプチドのフラグメントとしては、例えば、タンパク質分解フラグメント、及び欠失フラグメントが挙げられる。バリエーションとしては、上述のようなフラグメント、及びアミノ酸の置換、欠失、または挿入に起因して改変されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも含む。バリエーションは、自発的に発生しても、意図的に作成してもよい。意図的に構築されたバリエーションは、当該技術分野で知られている変異導入技法を使用して生成することができる。バリエーションポリペプチドは、保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失または付加を含み得る（当業者は、「保存的アミノ酸置換」が「保存的アミノ酸残基/位置」と同じではないことを理解するであろう）。バリエーションポリペプチドは、本明細書では「ポリペプチド類似体」と呼ぶこともできる。誘導体は、天然のポリペプチドには見られないさらなる特徴を示すように改変されているポリペプチドのバリエーションである。例としては、融合タンパク質が挙げられる。本明細書中で使用されるとき、「誘導体」とは、官能性側基の反応によって化学的に誘導体化された1つまたは複数の残基を有する本発明のポリペプチドを指す。「誘導体」としても含まれるのはまた、20個の標準アミノ酸のうち1つまたは複数の標準の、または合成のアミノ酸誘導体を含むペプチドである。例えば、4-ヒドロキシプロリンは、プロリンの代わりになり得；5-ヒドロキシリジンはリジンの代わりになり得；3-メチルヒスチジンはヒスチジンの代わりになり得；ホモセリンはセリンの代わりになり得；オルニチンはリジンの代わりになり得る。

**【0037】**

10

20

30

40

50

本明細書で使用されるとき、「単一アミノ酸置換」は、別段の定めがない限り、ポリペプチド配列のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えることを意味する（例えば、野生型配列の天然残基を非天然アミノ酸で置き換える）。「単一アミノ酸の欠失」及び/または「単一アミノ酸の挿入」も本開示に包含される。

**【0038】**

「保存的アミノ酸置換」は、1つのアミノ酸が類似の側鎖を有する別のアミノ酸で置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義され、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。例えば、チロシンをフェニルアラニンに置換することは、保存的置換である。タンパク質の活性または機能性を排除しないヌクレオチド及びアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当該技術分野でよく知られている（see, e.g., Brummell et al. *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12 (10): 879-884 (1999); Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)）。

10

20

**【0039】**

「ポリヌクレオチド」という用語は、単一の核酸及び複数の核酸を包含することを意図し、単離された核酸分子またはコンストラクト、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA) またはプラスミドDNA (pDNA) を指す。ポリヌクレオチドは、従来のホスホジエステル結合または非従来の結合（例えば、ペプチド核酸 (PNA) に見られるようなアミド結合）を含み得る。「核酸」という用語は、ポリヌクレオチド中に存在する任意の1つまたは複数の核酸セグメント、例えば、DNA または RNA フラグメントを指す。「単離された」核酸またはポリヌクレオチドは、その本来の環境から回収された核酸分子、DNA または RNA を意図している。例えば、ベクターに含まれるポリペプチドサブユニットをコードする組換えポリヌクレオチドは、本明細書に開示されるように単離されたとみなされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例には、異種宿主細胞で維持される組換えポリヌクレオチドまたは溶液中の精製された（部分的または実質的に）ポリヌクレオチドが含まれる。単離されたRNA 分子には、*in vivo* または *in vitro* のポリヌクレオチドのRNA 転写物が含まれる。単離されたポリヌクレオチドまたは核酸には、合成的に生成されたそのような分子がさらに含まれる。さらに、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターなどの調節エレメントであり得るか、またはそれらを含み得る。

30

**【0040】**

本明細書で使用されるとき、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンを含む核酸の一部である。「終止コドン」(TAG、TGA、またはTAA) はアミノ酸に翻訳されず、コード領域の一部とみなすことができるが、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどの隣接配列は、コーディング領域の一部ではない。2つ以上のコード領域は、単一のポリヌクレオチドコンストラクト、例えば、単一のベクター上、または別個のポリヌクレオチドコンストラクト、例えば、別個の（異なる）ベクター上に存在し得る。さらに、任意のベクターは、単一のコード領域を含むことができ、または2つ以上のコード領域を含むことができ、例えば、単一のベクターは、選択マーカー遺伝子及び目的の遺伝子を別々にコードすることができる。さらに、ベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、本明細書で提供されるポリペプチドサブユニットまたは融合タンパク質をコードする核酸に融合または非融合のいずれかの異種コード領域をコードすることができる。異種コード領域には、分泌シグナルペプチドまたは異種機能ド

40

50

メインなどの特化した要素またはモチーフが含まれるが、これらに限定されない。

【0041】

特定の態様では、ポリヌクレオチドまたは核酸はDNAである。DNAの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、1つまたは複数のコード領域に作動可能に結合するプロモーター及び/または他の転写または翻訳調節エレメントを含むことができる。作動可能な結合または連鎖は、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドのコード領域が、遺伝子産物の発現を調節配列（複数可）の影響または制御下に置くような方法で、1つまたは複数の調節配列と結合し得る場合であり得る。プロモーター機能の誘導が所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、及び2つのDNA断片間の結合の性質が、発現調節配列が遺伝子産物の発現を誘導する能力を妨害しないか、または転写されるDNAテンプレートの能力を妨害しない場合、2つのDNAフラグメント（ポリペプチドコード領域及びそれに関連するプロモーターなど）は「作動可能に結合した」または「作動可能に連結した」ものとして行うことができる。したがって、プロモーターがポリペプチドをコードする核酸と作動可能に結合しているのは、プロモーターがその核酸の転写をもたらすことができる場合である。プロモーターは、所定の細胞においてのみDNAの実質的な転写を誘導する細胞特異的プロモーターであり得る。プロモーターに加えて、他の転写調節エレメント、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、及び転写終結シグナルは、細胞特異的転写を誘導するためにポリヌクレオチドと作動可能に連結させることができる。

10

【0042】

当業者には、様々な転写調節領域が知られている。これらには、サイトメガロウイルス（イントロンAと組み合わせた最初期プロモーター）、シミアンウイルス40（初期プロモーター）、及びレトロウイルス（ラウス肉腫ウイルスなど）由来のプロモーター及びエンハンサーセグメントなどであるがこれらに限定されない、脊椎動物細胞で機能する転写調節領域が含まれるが、これらに限定されない。他の転写調節領域には、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、ウサギ グロビンなどの脊椎動物遺伝子に由来する領域、及び真核細胞での遺伝子発現を制御できる他の配列が含まれる。追加の適切な転写調節領域には、組織特異的プロモーター及びエンハンサーが含まれる。

20

【0043】

同様に、様々な翻訳調節エレメントが当業者に知られている。これらには、リボソーム結合部位、翻訳開始及び終止コドン、及びピコルナウイルスに由来するエレメント（特に、CITE配列とも呼ばれる配列内リボソーム進入部位またはIRES）が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0044】

他の態様では、ポリヌクレオチドは、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）の形態のRNAであり得る。

【0045】

ポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、分泌ペプチドまたはシグナルペプチドをコードする追加のコード領域と結合することができ、これは、本明細書に開示されるように、ポリヌクレオチドによってコードされるポリヌクレオチドの分泌を指示する。

40

【0046】

「ベクター」は、宿主細胞に導入される核酸分子であり、それにより、形質転換された宿主細胞を生成する。ベクターは、複製起点などの宿主細胞内での複製を可能にする核酸配列を含むことができる。ベクターはまた、当該技術分野で知られている、1つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子及び他の遺伝子エレメントを含んでもよい。例示的なタイプのベクターには、プラスミド、ファージ、ウイルス、及びレトロウイルスが含まれる。

【0047】

「形質転換された」細胞、または「宿主」細胞は、分子生物学技法によって核酸分子が導入された細胞である。本明細書で使用されるとき、形質転換という用語は、ウイルスベクターによるトランスフェクション、プラスミドベクターによる形質転換、及びエレクト

50

ロポレーション、リポフェクション、及びパーティクルガン加速によるネイキッドDNAの導入を含む、核酸分子をそのような細胞に導入することができる技法を包含する。形質転換された細胞または宿主細胞は、原核細胞（例えば、細菌）または真核細胞（例えば、哺乳動物）であり得る。

【0048】

本明細書で使用されるとき、「発現」という用語は、遺伝子が生化学物質、例えばポリペプチドを生成するプロセスを指す。このプロセスには、遺伝子ノックダウン、ならびに一過性発現と安定発現の両方を含むがこれらに限定されない、細胞内の遺伝子の機能的存在の任意の発現が含まれる。これには、遺伝子のメッセンジャーRNA（mRNA）への転写、及びそのようなmRNAのポリペプチド（複数可）への翻訳が含まれるが、これらに限定されない。最終的な所望の製品が生化学物質である場合、発現にはその生化学物質及び任意の前駆体の作成が含まれる。遺伝子の発現は「遺伝子産物」を生成する。本明細書で使用されるとき、遺伝子産物は、核酸、例えば、遺伝子の転写によって生成されるメッセンジャーRNA、または転写物から翻訳されるポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載の遺伝子産物は、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化を有する核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、タンパク質分解切断などを有するポリペプチドをさらに含む。

10

【0049】

「医薬組成物」という用語は、活性成分の生物学的活性を有効にさせる形態であり、組成物が投与される対象にとって許容しがたい程度に毒性であるさらなる成分を含まない製剤を指す。そのような組成物は無菌であり得る。

20

【0050】

概要。タンパク質に連結した多糖からなるコンジュゲートワクチンは、命を救う予防薬である。伝統的に、コンジュゲートワクチンは化学的方法論を使用して製造されている。しかしながら、*in vivo*細菌コンジュゲーションは、製造の代替手段として浮上している。*In vivo*コンジュゲーション（バイオコンジュゲーション）は、多糖をタンパク質に結合するためにオリゴサッカリルトランスフェラーゼに依存している。現在、バイオコンジュゲーションに使用されるオリゴサッカリルトランスフェラーゼは、多糖が還元末端にグルコースを含む場合、コンジュゲートワクチンの生成には適さない。*Streptococcus pneumoniae* きのょう膜の約75%に還元末端糖としてグルコースが含まれているため、この制限には大きな影響がある。本明細書に開示されるのは、それらの還元末端にグルコースを含む多糖を有する初めての多価肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンを生成するためのO-結合型オリゴ糖トランスフェラーゼの使用である。肺炎球菌バイオコンジュゲートは免疫原性、防御性があり、組換え技法で迅速に生成された。本明細書に開示される特定の態様は、ワクチン担体として天然アクセプタータンパク質ComPを使用する多価肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチン、ならびに従来のワクチン担体、例えば、特定の態様では、*Pseudomonas aeruginosa* 外毒素Aタンパク質を含むものを使用する一価肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンの工学的、特性評価、及び免疫学的応答を提供する。これにより、他のコンジュゲート酵素の制限を克服するためのプラットフォームが確立され、多くの重要なヒト及び動物の病原体に対するバイオコンジュゲートワクチンの開発が可能になる。

30

40

【0051】

過去20年間に肺炎球菌コンジュゲートワクチンが導入及び実施されたとしても、毎年約150万人の死が*S. pneumoniae*に起因している。これは、*S. pneumoniae*の90を超える血清型と、肺炎球菌コンジュゲートワクチンの合成に必要な複雑な製造方法の一部起因する。これらの要因が合わさって、ワクチンのより広く、より保護的なバリエーションの世界的な流通と開発を妨げている。開発を促進し、製造コストを下げるために、本明細書に開示されるのは、*in vivo*コンジュゲーションを使用して、コンジュゲートワクチン、例えば肺炎球菌コンジュゲートワクチンを開発するためのプラットフォームである。この合理化されたプロセスは、既存の製造パイプラインを

50

補完するか、化学コンジュゲーション方法論への依存を完全に回避する可能性があり、より包括的なコンジュゲートワクチンの製造を可能にする。

【0052】

従来の化学コンジュゲートワクチン合成は、複雑で、費用がかかり、面倒であると考えられている (Frasch, C. E. Vaccine 27, 6468 - 6470 (2009))。しかしながら、in vivoコンジュゲーションは、実行可能な生成の代替手段として徹底的に進歩している (Huttner, A. et al. Lancet Infect Dis 17, 528 - 537 (2017))。これらの進歩は、GlycoVaxyn (現在はGlaxoSmithKlineと直接関係のある独立企業であるLimmaTech Biologics AG)の成功によって最もよく強調されている。これは、臨床試験の様々なフェーズで複数のバイオコンジュゲートワクチンを使用する臨床段階のバイオ医薬品企業であり、そのうちの1つ (Flexyn 2a) はフェーズ2bチャレンジ研究を完了した。GlycoVaxynはin vivoコンジュゲーション革命の最前線にあるが、還元末端糖としてグルコース (Glc) を含む多糖で担体/アクセプタータンパク質をグリコシル化する能力はとらえどころのないものであり、予想通り、肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンの開発を妨げてきた。

10

【0053】

Schulz et al. (PMID23658772) によってPglLと、及び Harding et al. 2015 (PMID 26727908) によってPglL Compと以前は呼ばれていたオリゴサッカリルトランスフェラーゼは、機能的なOTaseとして最近特徴付けられた (Schulz, B. L. et al. PLoS One 8, e62768 (2013))。総糖ペプチドに関するその後の質量分析研究は、PglSが一般的なPglL様OTaseとして作用せず、複数のペリプラズム及び外膜タンパク質をグリコシル化することを示した (Harding, C. M. et al. Mol Microbiol 96, 1023 - 1041 (2015))。実際、A. baylyi ADP1のゲノムは、2つのOTase、PglL様オーソログ (UniProtKB/Swiss-Prot: Q6FFS6.1) をコードし、これは一般的なOTase及びPglS (UniProtKB/Swiss-Prot: Q6F7F9.1) として作用し、単一タンパク質Compをグリコシル化する (Harding, C. M. et al. Mol Microbiol 96, 1023 - 1041 (2015))。

20

30

【0054】

Compは、Pseudomonas aeruginosa由来のPilA及びNeisseria meningitidis由来のPileなどのIV型ピリントタンパク質とオルソログであり、そのどちらもそれぞれ、OTases TfpO (Castric, P. Microbiology 141 (Pt 5), 1247 - 1254 (1995)) 及びPglL (Power, P. M. et al. Mol Microbiol 49, 833 - 847 (2003)) によってグリコシル化される。TfpOとPglLもセリン残基で同族のピリンをグリコシル化するが、グリコシル化の部位は各システム間で異なる。TfpOは、Compには存在しないC末端のセリン残基で同族のピリンをグリコシル化する (Comer, J. E., Marshall, M. A., Blanch, V. J., Deal, C. D. & Castric, P. Infect Immun 70, 2837 - 2845 (2002))。PglLは63位にある内部セリンでPileをグリコシル化する (Stimson, E. et al. Mol Microbiol 17, 1201 - 1214 (1995))。Compは63位付近にセリン残基も含み、周囲の残基はN. meningitidis由来のPileに対して中程度の保存を示している。しかし、包括的な糖ペプチド分析により、このセリンと周囲の残基はCompのグリコシル化部位ではないことが明らかになった。ここで、PglSが、Comp<sub>ADP1</sub>: AAC4588631 (配列番号1) (Comp<sub>110264</sub>: ENV58402.1 (配列番号2) の82位

40

50

の保存されたセリンにも対応する)の84位の保存されたセリンに対応する位置に位置する単一のセリン残基でCOMPをグリコシル化することが開示され、これは、IV型ピリンスーパーファミリー内ではこれまで見られなかった新規のグリコシル化部位である。ピリンスーパーファミリー内のグリコシル化の新規部位の同定と組み合わせられ、還元末端糖としてグルコースを含む多糖を転移するPglSの能力は、PglSがPglL及びTfpOとは機能的に異なるOTaseであることを実証する。

#### 【0055】

PglBまたはPglLではなく、PglSは、還元末端にグルコースを含む多糖をアクセプタータンパク質COMPに転移した。2つのクラスのOTase、PglB、及びPglLは、以前は*in vivo*コンジュゲーションに使用されていた(Feldman, M. F. et al. Proc Natl Acad Sci USA 102, 3016-3021 (2005); Faridmoayer, A., Fentabil, M. A., Mills, D. C., Klassen, J. S. & Feldman, M. F. J Bacteriol 189, 8088-8098 (2007))。記載された最初のOTaseであるPglBは、基質認識に役割を果たすと考えられているため、還元末端のC-2位置にアセトアミド基を含むグリカン(すなわちN-アセチルグルコサミン)を優先的に転移する(Wacker, M. et al. Proc Natl Acad Sci USA 103, 7088-7093 (2006))。しかしながら、*S. enterica* Typhimurium O抗原など、還元末端にガラクトース(Gal)を含む多糖は、操作されたPglBバリアントによって転移できる(Ihsen, J. et al. Open Biol 5, 140227 (2015))。2番目に記載されたOTaseであるN. meningitidis由来のPglLは、PglBよりも基質特異性が緩和されており、C-2位にアセトアミド基を持つ多糖と還元末端にガラクトース(Gal)を含む多糖を自然に転移する(Faridmoayer, A., Fentabil, M. A., Mills, D. C., Klassen, J. S. & Feldman, M. F. J Bacteriol 189, 8088-8098 (2007); Pan, C. et al. MBio 7 (2016))。しかしながら、還元末端にグルコース(Glc)を含む多糖のPglBまたはPglLを介した転移について利用できる証拠はなく、これは、肺炎球菌CPSの大部分が還元末端にグルコースを含むことを考えると特に興味深い(Geno, K. A. et al. Clin Microbiol Rev 28, 871-899 (2015))。肺炎球菌血清型14きょう膜多糖(CPS14)をそれらの同族のグリコシル化標的であるAcrA(Wacker, M. et al. Science 298, 1790-1793 (2002))及びDsbA(Vik, A. et al. Proc Natl Acad Sci USA 106, 4447-4452 (2009))に転移するPglB及びPglLの能力がそれぞれ試験された。図1A及び図1Bに見られるように、両方のアクセプタータンパク質が発現したが、いずれかのアクセプタータンパク質へのCPS14グリコシル化の証拠は観察されなかった。

#### 【0056】

アシネトバクター種は、3つのO-結合型;複数のタンパク質のグリコシル化に関与する一般的なPglL OTase、及び2つのピリン特異的OTase OTaseを含むと記載されている(Harding, C. M. Mol Microbiol 96, 1023-1041 (2015))。最初のピリン特異的OTaseはTfpO(PilOとしても知られる)のオーソログであり、1つを超える繰り返し単位を持つ多糖を転移できないため、*in vivo*コンジュゲーションシステムには使用されない(Faridmoayer, A., Fentabil, M. A., Mills, D. C., Klassen J. S. & Feldman, M. F. J Bacteriol 189, 8088-8098 (2007))。2番目のピリン特異的OTaseであるPglSは、単一のタンパク質であるIV型ピリンCom<sup>28</sup>をグリコシル化する。

バイオインフォマティクス分析は、Pg1SがOTaseの異なるファミリーの原型であることを示した。Pg1Sが新しいクラスのO-OTaseであることを考え、肺炎球菌CPS14をその同族のアクセプタータンパク質であるCompに転移する能力(Harding, C. M. et al. Mol Microbiol 96, 1023-1041 (2015))を試験した。図1Cに見られるように、Pg1S及びCompのヘキサヒスタグ付きバリエーションと組み合わせたCPS14生合成遺伝子座の共発現は、ウエスタンブロッティングで分析した場合、タンパク質のグリコシル化と互換性のある典型的なはしご状のバンドパターンをもたらした(図1B)。シグナルの高分子量のモダ分布は、分子量が増加するグリカンサブユニットの繰り返しによるタンパク質のグリコシル化を示す。まとめると、これらの結果は、以前に特徴付けられたOTaseとは異なり、Pg1Sが還元末端にグルコースを含む多糖を転移できることを示す。

10

#### 【0057】

S. pneumoniaeには90を超える血清型がある(Geno, K. A. et al. Clin Microbiol Rev 28, 871-899 (2015))。血清型8、22F、及び33Fなど、ますます流行している多くの血清型は、現在認可されているワクチンには含まれていない。したがって、Pg1Sの汎用性を試験して、Prevnar 13に含まれる2つの血清型(血清型9V及び14)と含まれない1つの血清型(血清型8)に対する多価肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンを生成した(添付文書-Prevnar 13-FDA、ワールドワイドウェブの(fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM201669.pdf))。重要なことに、これらの3つのきょう膜多糖は全て、還元末端糖としてグルコースを含む(Geno, K. A. et al. Clin Microbiol Rev 28, 871-899 (2015))。図2に見られるように、Pg1S、ヘキサヒスタグ付きCompバリエーション、及びCPS8、CPS9V、またはCPS14のいずれかを共発現する全細胞からのアフィニティー精製タンパク質のウエスタンブロット分析により、CPS特異的バイオコンジュゲートが生成された。さらに、CPS8、CPS9V、またはCPS14抗原のいずれかに特異的な抗血清も、抗His反応性バンドに反応し、Comp-Hisが正しい多糖でグリコシル化されたことを示す。精製された材料が脂質結合多糖で汚染されていないことを確認するために、試料をプロテイナーゼKで処理し、ウエスタンブロッティングで分析したときにシグナルの喪失を観察し、バイオコンジュゲートがタンパク質性であることを確認した。

20

30

#### 【0058】

したがって、Pg1SはS. pneumoniaeの多糖をCompに転移することができるが、Pg1BとPg1Lは転移することができないことが実証された。具体的には、Pg1Sは、還元末端にグルコースを含む多糖を転移することができる、世界で知られている中の唯一のOTaseである。特定の態様では、Pg1Sは、還元末端にグルコースを含む脂質結合型オリゴ糖または多糖(本明細書では総称して「オリゴ糖または多糖」と呼ぶ)をCompまたはCompのフラグメントを含む融合タンパク質に転移するために使用できる。

40

#### 【0059】

Pg1Sは、クレブシエラの子ょう膜多糖をCompに転移することができる。グラム陰性の日和見ヒト病原菌であるKlebsiella pneumoniae(K. pneumoniae)は、病原性に重要であることが知られている子ょう膜多糖を生成する。現在までに、クレブシエラ種について少なくとも79の抗原的に異なる子ょう膜多糖が報告されている(Pan, Y. J. et al. Sci Rep 5, 15573 (2015))。さらに、K. pneumoniaeは、77の子ょう膜多糖のうち少なくとも59を生成することが知られており、その半分以上が還元末端糖としてグルコースを含む(Pan, Y. J. et al. Sci Rep 5, 15573 (2015))。Pg1SがK. pneumoniae子ょう膜多糖をCompに転移でき

50

るかどうかを判断するために、K1またはK2莢膜多糖の合成に必要なタンパク質をコードする遺伝子をIPTG誘導性pBBR1MCS-2ベクターにクローニングした(Kovach, M. E. et al. Gene 166, 175-176 (1995))。K1きょう膜遺伝子座は、以前に特徴付けられたK1きょう膜産生株であるK. pneumoniae NTUHK-2044からクローン化された(Wu, K. M. et al. J Bacteriol 191, 4492-4501 (2009))。K2きょう膜遺伝子座は、以前に特徴付けられたK2きょう膜産生株であるK. pneumoniae 52.145からクローン化された(Lery, L. M. et al. BMC Biol 12, 41 (2014))。次いで、K1またはK2きょう膜多糖発現プラスミドを、別のプラスミドベクターからPglS OTaseとアクセプタータンパク質Compを共発現するE. coliに個別に導入した。K1及びK2特異的多糖の発現を増強するために、K. pneumoniae NTUHK-2044由来のK. pneumoniae 転写活性化因子rmpAを続いてpACT3 (Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R. & Linn, T. Gene 177, 133-136 (1996))低コピー、IPTG誘導性ベクターにクローニングしたが、それが以前にK. pneumoniaeのきょう膜の調節因子として特徴づけられていたためである(Arakawa, Y. et al. Infect Immun 59, 2043-2050 (1991)); Yeh, K. M. et al. J Clin Microbiol 45, 466-471 (2007))。PglSとヘキサヒスタグ付きCompバリエーション、及びK. pneumoniae由来のK1またはK2きょう膜多糖のいずれかを共発現するE. coli株にrmpA遺伝子を導入すると、ウエスタンブロッティングで分析した場合、タンパク質のグリコシル化と互換性のある、バンドの典型的なラダーようなパターンで示されるように、高分子Compバイオコンジュゲートの強力な発現と検出が得られた(図3B)。シグナルのモダル分布は、分子量が増加するグリカンサブユニットの繰り返しによるタンパク質のグリコシル化を示す。したがって、まとめると、PglSはCompをK. pneumoniae由来のK1及びK2きょう膜多糖でグリコシル化することができた。K. pneumoniae由来の転写活性化因子rmpAの共発現により、コンジュゲーション効率の増加が観察された。

10

20

30

#### 【0060】

PglSは、K. pneumoniae多糖をCompに転移することができる。ほとんどのK. pneumoniaeきょう膜多糖が還元末端糖としてグルコースを含んでいることを考えると、他の商業的に認可されたOTase (PglB及びPglL)のみがこれらの多糖を使用してコンジュゲートワクチンを生成できないはずである。さらに、転写活性化因子であるRmpAときょう膜遺伝子クラスターの共発現により、きょう膜の発現が検出可能なレベルまで増強された。特定の態様では、クレブシエラコンジュゲートの製造方法を使用してK. varriicola、K. michiganensis、及びK. oxytocaなどの他の種を含む全ての血清型を包含する汎クレブシエラコンジュゲートワクチンを生成できる。

40

#### 【0061】

質量分析及び部位特異的変異導入により、PglSがO-結合型OTaseであることが確認され、CompがComp<sub>ADP1</sub>の84位に対応するセリン残基でグリコシル化されていることが確認された。細菌のN-グリコシル化は、一般に、シークオンD-X-N-S-T(配列番号21)内で発生し、ここで、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である(Kowarik, M. et al. EMBO J 25, 1957-1966 (2006))。これに対して、O-グリコシル化は定義されたシークオンに従わないように見える。細菌タンパク質のほとんどのO-グリコシル化イベントは、セリン、アラニン、及びプロリンが豊富な低複雑度(LCR)の領域で発生する(Vik, A. et al. Proc Natl Acad Sci USA 106, 4447-4452 (2009))。代替的に、いくつかのピリンは、C末端のセリン残基でO-

50

グリコシル化される (Comer, J. E., Marshall, M. A., Blanch, V. J., Deal, C. D. & Castric, P. Infect Immun 70, 2837-2845 (2002)). Compは、他のピリン様タンパク質に見られるものと相同な明らかなLCRまたはC末端セリン残基を持っていないようであるため、質量分析を使用してグリコシル化の部位(複数可)を決定した。精製されたCPS14-Compバイオコンジュゲートは、タンパク質分解消化、ZIC-HILIC糖ペプチド濃縮、及び複数のMS分析にかけられた。図4A及び図4Bに見られるように、ペプチドISASNATTNVATAT(配列番号22)からなる単一の糖ペプチドが、公開されているCPS14組成に一致するグリカンに結合していることが同定された(Geno, K. A. et al. Clin Microbiol Rev 28, 871-899 (2015))。ペプチドと結合したグリカン配列の両方を確認できるようにするために、複数の衝突エネルギーレジームを実行して、HexNAc<sub>2</sub>Hexose<sub>6</sub>に対応する1378.47Daグリカンによるsemi-GluC由来ペプチドISASNATTNVATAT(配列番号22)のグリコシル化を確認した(図4B)。最大4つの四糖繰り返し単位に対応する拡張グリカンで装飾された追加の糖ペプチドも観察された(図16)。

#### 【0062】

アシネトバクター種は主にセリン残基でタンパク質をグリコシル化することが以前に示されており、したがって、配列番号1で番号が付けられているセリン(S)82または84のいずれかがグリコシル化の部位であると仮定された(Scott, N. E. et al. Mol Cell Proteomics 13, 2354-2370 (2014))。どのセリン残基がグリコシル化の部位であるかを決定するために、これらのセリン残基を個別にアラニン(A)に変異させ、両方の変異タンパク質のグリコシル化状態を分析した。この実験では、C. jejuni 七糖の生合成遺伝子座をドナーグリカンとして使用した。これは、hR6抗グリカン抗血清で、また電気泳動移動度の増加によって、グリコシル化が容易に検出できるためである(Schwarz, F. et al. Nat Chem Biol 6, 264-266 (2010))。図5に示すように、野生型ヘキサヒスタグ付きCompは、Pg1Sと共発現した場合の電気泳動移動度の増加と、hR6抗血清シグナルとの共局在によって示されるように、C. jejuni 七糖でグリコシル化された。MS分析では、CPS14で修飾された同一のsemi-GluC由来ペプチドISASNATTNVATAT(配列番号22)にC. jejuni 七糖が存在することも確認された(図17及び図18)。陰性対照として、触媒的に不活性なPg1S変異体(H324A)が生成され、C. jejuni 七糖グリカンと共発現すると、野生型Compをグリコシル化できなかった。部位特異的変異導入が行われ、C. jejuni 七糖によるCompのグリコシル化がComp[S84A]変異体で廃止されたのに対し、Comp[S82A]は野生型レベルでグリコシル化されたことが観察された。まとめると、これらの結果は、Compがセリン84(配列番号1で番号付け)でPg1Sによって単独でグリコシル化されていることを示し、これは、以前に特徴付けられた他のピリン様タンパク質とは異なる固有の部位である。これは、配列番号2で番号付けされたセリン82に対応する。

#### 【0063】

Compピリンオーソログのバイオインフォマティクス特徴。Compは、Acinetobacter baylyi ADP1の自然形質転換に必要な因子として最初に記載された(Porstendorfer, D., Drotschmann, U. & Averhoff, B. Appl Environ Microbiol 63, 4150-4157 (1997))。その後の研究では、A. baylyi ADP1(本明細書ではComp<sub>ADP1</sub>と呼ぶ)由来のCompが、染色体上の他の場所にある一般的なOTase Pg1Lではなく、Compのすぐ下流にある新しいOTase、Pg1Sによってグリコシル化されることが示された(Harding, C. M. et al. Mol Microbiol 96, 1023-1041 (2015))

)。Comp<sub>ADP1</sub>タンパク質(NCBI識別子AAC45886.1)は、IV型ピリンと呼ばれるタンパク質ファミリーに属している。具体的には、CompはIVa型の主要なピリンと相同性を共有している(Giltner, C.L., Nguyen, Y. & Burrows, L.L. Microbiol Mol Biol Rev 76, 740-772 (2012))。IVa型ピリンは、高度に保存されたリーダー配列とN末端アルファヘリックスをコードするN末端で高い配列相同性を共有しているが、C末端は属間及び種内でさえ顕著な相違を示す(Giltner, C.L., Nguyen, Y. & Burrows, L.L. Microbiol Mol Biol Rev 76, 740-772 (2012))。Compオーソログを他のIVa型ピリンタンパク質、例えば、A. baumannii、P. aeruginosa、及びHaemophilus influenzae由来のPilaならびにナイセリア種由来のPileなど(Pelicic, V. Mol Microbiol 68, 827-837 (2008))と区別するために、BLASTp分析を実行して、Comp<sub>ADP1</sub>の一次アミノ酸配列をアシネトバクター属の細菌由来の全てのタンパク質と比較した。予想通り、Comp<sub>ADP1</sub>を含む多くのアシネトバクターIVa型ピリンオーソログは、N末端で高い相同性を共有している。しかしながら、Compのアミノ酸配列全体で高い配列保存を示すタンパク質はほとんどない。少なくとも6つのCompオーソログ(図6)は、Comp<sub>ADP1</sub>に対して84位の保存されたセリンの存在と、予測されるアルファベータループをベータストランド領域に接続する予測されるグリコシル化の部位に隣接する保存されたジスルフィド結合に基づいて同定された(Giltner, C.L., Nguyen, Y. & Burrows, L.L. Microbiol Mol Biol Rev 76, 740-772 (2012))。さらに、6つのCompオーソログは全て、comp遺伝子のすぐ下流にあるpglSホモログと、染色体上のいずこかにあるpglLホモログの両方を有する。まとめると、少なくとも84位の保存されたセリンの存在、グリコシル化の部位に隣接するジスルフィドループ、compのすぐ下流のpglS遺伝子の存在、及び染色体上のいずこかにあるpglLホモログの存在は、Compピリンバリエントを他のIVa型ピリンバリエントと区別する。

#### 【0064】

したがって、異なるアシネトバクター種のCompオーソログを同定するCompタンパク質に共通の特徴が本明細書に開示されている。Compタンパク質は、ADP1 Compタンパク質に対して84位に位置する保存されたグリコシル化セリンの存在と、グリコシル化部位に隣接するジスルフィドループの存在によって、他のピリンと区別することができる。さらに、Compのすぐ下流にpglSホモログが存在することはCompの指標である。さらに、PglL OTaseタンパク質ではなくPglS OTaseタンパク質として分類されるために、Compの下流のOTaseは、A. baylyi ADP1のPglL(ACIAD0103)と比較した場合、PglS(ACIAD3337)でより高い配列保存を示す必要がある。

#### 【0065】

本明細書に開示される特定の態様では、Compタンパク質は、配列番号1(Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1)、配列番号2(Comp<sub>110264</sub>: ENV58402.1)、配列番号3(Comp<sub>GfJ-2</sub>: APV36638.1)、配列番号4(Comp<sub>50v1</sub>: PKD82822.1)、配列番号5(Comp<sub>4466</sub>: SNX44537.1)、または配列番号6(Comp<sub>SFC</sub>: OAL75955.1)に対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号1(Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1)の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。本明細書に開示される特定の態様では、Compタンパク質は、配列番号1(Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1)に対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、

99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号1 (CompADP1 : AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。これらの態様のいくつかでは、Compタンパク質は、アルファベータループをベータストランド領域に接続するジスルフィド結合に隣接する、配列番号2 (Comp110264 : ENV58402.1) の82位のセリン残基を含む、配列番号2 (Comp110264 : ENV58402.1) の領域に対応する領域を含む。特定の態様では、Compタンパク質は、配列番号37、配列番号38、または配列番号45 (以下の表3) のコンセンサス配列を含む。特定の態様では、Compタンパク質は、ADP1 VGVQEISASNATTNVATAT (配列番号39)、110264 TGVQTQIASGASAATTNVASAQ (配列番号40)、GFJ-2 VGVQEINASSSTSNVATAT (配列番号41)、SFC AGVETIGASNKTKNVESAA (配列番号42)、P50v1 VGVQTIAASNATKNVATAT (配列番号43)、及び4466 NGVISASATTNVASSA (配列番号44)、または1、2、3、4、5、6、または7個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有する配列番号39、40、41、42、43、または44のバリエーションのアミノ酸配列を有し、バリエーションが配列番号1 (CompADP1 : AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。本明細書に開示される任意の態様において、Compタンパク質が、配列番号1 (CompADP1 : AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基上でグリコシル化され得ることも当業者には明らかである。

10

20

#### 【0066】

A. soli CIP 110264由来のCompは、A. baylyi ADP1由来のPglSによってグリコシル化される。複数のCompオーソログの存在を考慮して、A. baylyi ADP1由来のPglSが多様なCompタンパク質をグリコシル化できるかどうかを調べた。A. soli CIP 110264由来のCompタンパク質 (Comp110264) は、CompADP1と比較した場合、アミノ酸レベルで71%同一である。しかしながら、上述の特徴と一致して、Comp110264には、予測されるアルファベータループと第2のベータストランドの間の予測されるジスルフィド架橋と、CompADP1に対して84位の保存されたセリンが含まれている。さらに、PglSオーソログはComp110264のすぐ下流にあり得る。A. baylyi ADP1由来のPglS (PglSADP1) がComp110264をグリコシル化できるかどうかを判断するために、PglSADP1をpACT3に、Comp110264をpEXT20にクローニングし (Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R. & Linn, T. Gene 177, 133-136 (1996))、これらのプラスミドを、S. pneumoniae由来の血清型8きょう膜多糖 (CPS8) を発現するE. coliに導入された。さらに、A. soli CIP 110264由来のPglS (PglS110264) をCompADP1と共にクローニングして発現することにより、逆の実験を実施した。図7に示すように、PglS110264は、PglS110264を欠く全細胞溶解物と比較した場合、高分子量のCompピリン変異体によって示されるように、同族のアクセプターピリンComp110264を最小限にグリコシル化した。ウエスタンブロット分析に基づく、PglS110264はCompADP1をグリコシル化しないように見える。一方、PglSADP1は、電気泳動移動度の増加によるHis反応性シグナルの強力な増加によって示されるように、CompADP1とComp110264の両方を効率的にグリコシル化した。まとめると、PglSADP1は、複数のComp基質を交差グリコシル化する独自の能力を備えた、E. coliにおける異種グリコシル化の最適なOTaseであるように見える。したがって、異なるアシネトバクター種からのPglSタンパク質は、多様な非ネイティブのComp配列をグリコシル化できることが実証された。

30

40

#### 【0067】

PglSによってグリコシル化されることができると可溶性のペリプラズム融合タンパク

50

質の生成。I V a型ピリンファミリーの全てのメンバーは、それらのN末端のアルファヘリックスの一部が内膜に埋め込まれているため、膜タンパク質とみなされる (Giltner, C. L., Nguyen, Y. & Burrows, L. L. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 740-772 (2012))。したがって、PglSによってグリコシル化できるCompの可溶性バリエーションを生成するために、3つの異なる担体タンパク質上にトランケートされたCompフラグメントタンパク質の翻訳融合を構築した。E. coli由来の担体タンパク質であるDsbA及びMalE (マルトース結合タンパク質 - MBPとしても知られる) は、ペリプラズムの局在化とそれらのC末端で融合したアクセプタータンパク質の溶解性を促進することが以前に示されているため、適切な担体として選択された (Malik, A. *Biotech* 6, 44 (2016))。Pseudomonas aeruginosa (EPA) 由来の外毒素Aも、他のコンジュゲートワクチン製剤で免疫原性担体タンパク質として作用することが以前に示されているため、選択された (Ravenscroft, N. *et al. Glycobiology* 26, 51-62 (2016))。融合タンパク質は、リーダー配列、担体タンパク質、短いリンカーペプチド、最初の28アミノ酸を含まないCompバリエーション、及びヘキサヒスチジンタグからなった。Comp<sub>ADP1</sub>とComp<sub>110264</sub>の最初の28アミノ酸は、リーダー配列と、内膜に埋め込まれると予測されるN末端アルファヘリックスの疎水性領域を含むため、削除された。次いで、融合コンストラクトを、肺炎球菌血清型8きょう膜多糖 (CPS8) 及びpACT3単独、またはpglS<sub>110264</sub>もしくはpglS<sub>ADP1</sub>を保有するpACT3のいずれかを発現するE. coliに導入した。図8に示すように、DsbA - AAA - Comp<sub>28110264</sub>またはDsbA - GGG - Comp<sub>28110264</sub>のいずれかをPglS<sub>ADP1</sub>と組み合わせて発現するE. coli細胞は、電気泳動移動度の増加という反応性シグナルのモーダル分布によって示されるように、検出可能なレベルのグリコシル化を示した。Comp<sub>28ADP1</sub>を含む融合体を発現するE. coli細胞は、検出可能なグリコシル化を示さなかった。マルトース結合タンパク質 (MBP) 融合体を発現するE. coli細胞でも同じグリコシル化パターンが観察された。特に、図9に示すように、MBP - AAA - Comp<sub>28110264</sub>またはMBP - GGG - Comp<sub>28110264</sub>のいずれかをPglS<sub>ADP1</sub>と組み合わせて発現するE. coli細胞は、抗His反応性シグナルのモーダル分布によって示されるように、検出可能なレベルのグリコシル化を示したが；一方で、Comp<sub>28ADP1</sub>との融合は最小限のグリコシル化にすぎなかった。最後に、コンジュゲートワクチン製剤に使用される以前に確立された担体タンパク質が肺炎球菌CPS8でPglSによってグリコシル化できることを実証するために、EPAに融合したDsbAシグナルペプチド配列を含む融合タンパク質を改変した。次いで、Comp<sub>28110264</sub>ペプチドをEPAのC末端へのグリシン - グリシン - グリシン - セリン (GGG; 配列番号23) リンカーと融合し、全細胞抽出物とペリプラズム抽出物の両方でPglS<sub>ADP1</sub>の存在下及び非存在下でのグリコシル化を試験した。図10に示すように、EPA - GGG - Comp<sub>28110264</sub>コンストラクトは、抗His反応性シグナルのモーダル分布によって示されるように、CPS8グリカンとPglS<sub>ADP1</sub>を共発現する細胞の全細胞抽出物とペリプラズム抽出物の両方でグリコシル化されていることが判明した。PglSオーソログを欠く試料またはPglS<sub>110264</sub>を発現する試料では、検出可能なグリコシル化は観察されなかった。まとめると、PglS<sub>ADP1</sub>は、還元末端にグルコースを含む多糖を短縮型Comp融合タンパク質に転移するための最適なOTaseである。各融合コンストラクトの具体的なアミノ酸配列を図11に示す。

#### 【0068】

グリコシル化されたCompバイオコンジュゲートによる免疫は免疫応答を誘発する。コンジュゲートワクチンに対するT細胞依存性免疫応答は、高親和性IgG1抗体の分泌を特徴とする (Avci, F. Y., Li, X., Tsuji, M. & Kasper, D. L. *Nat Med* 17, 1602-1609 (2011))。

マウスワクチン接種モデルにおけるCPS14-Compバイオコンジュゲートの免疫原性を評価した。図12Aに見られるように、CPS14-Compバイオコンジュゲートでワクチン接種されたマウスから採取された血清は、CPS14特異的IgG力価が有意に増加しましたが、IgM力価は増加しなかった。さらに、二次HRPタグ付き抗IgGサブタイプ抗体を使用して、どのIgGサブタイプが力価を上昇させたかを決定した。図12Bに見られるように、IgG1力価は他のサブタイプよりも高いように見えた。

【0069】

次に、3価のCPS8-、CPS9V-、及びCPS14-Compバイオコンジュゲートの免疫原性を現在の標準治療であるPREVNAR 13（登録商標）と比較する2回目のワクチン接種試験を実施した。血清型9V及び14はPREVNAR 13（登録商標）に含まれ、これら2つの血清型に対してPREVNAR 13（登録商標）免疫マウスでIgG力価の上昇が見られた（図13）。血清型14に対する一価免疫も、予備免疫と同様の血清型特異的IgG力価の有意な誘導を示した（図12及び図13）。三価バイオコンジュゲートを投与されたマウスは、予想通り、対照と比較した場合、全て血清型特異的IgG力価が上昇し、49日目の血清は血清型9Vと比較して血清型8及び14のIgG力価の上昇を示した。それにもかかわらず、9Vに対するIgG力価は、プラセボよりも有意に高かった（図13）。

【0070】

バイオコンジュゲート。本明細書に提供されるのは、融合タンパク質に共有結合されたオリゴ糖または多糖を含むバイオコンジュゲートである。特定の態様では、融合タンパク質は、Compタンパク質（Comp）を含む。特定の態様では、融合タンパク質は、（本明細書のいづこかで詳細に説明されているように）Compタンパク質のグリコシル化タグまたはグリコシル化タグフラグメントを含む。

【0071】

本明細書に記載されるように、Compがセリン（S）残基上でグリコシル化されることが発見された。このセリン残基はCompで保存されており、配列番号1（Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1）の84位に対応する。このセリン残基はまた、配列番号2（Comp<sub>110264</sub>: ENV58402.1）の82位に対応する（図26A、B、及びC）。したがって、特定の態様では、融合タンパク質は、配列番号1（Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1）の84位のセリン残基に対応するセリン残基において、Compタンパク質上のオリゴ糖もしくは多糖、またはそのグリコシル化タグフラグメントでグリコシル化される。図15は、Comp配列間で保存されている、配列番号1（Comp<sub>ADP1</sub>: AAC45886.1）の84位のセリン残基に対応するセリン（S）残基（四角の囲み）を含むComp配列の領域のアライメントを示す。

【0072】

当業者は、Comp配列を配列番号1と（例えば、全長配列または部分配列と）整列させることによって、配列番号1の84位のセリン残基に対応する本明細書に開示される配列番号1ではないCompタンパク質の保存された残基を同定することができることを認識するであろう。さらに、当業者は、Comp配列を配列番号1と整列させることにより、本明細書で言及される配列番号1の残基、領域、及び/または特徴に対応する他の残基、領域、及び/または特徴を、配列番号1ではないComp配列で同定され、配列番号1に関して参照され得ることを理解するであろう。そして、ここでは一般的に配列番号1が参照されるが、類推により、本明細書に開示される任意のComp配列の任意の残基、領域、特徴などを同様に参照することができる。

【0073】

Compタンパク質は、本明細書で提供される記載と一致するCompタンパク質として同定されたタンパク質である。例えば、Compタンパク質の代表的な例には、AAC45886.1 Comp [Acinetobacter sp. ADP1]; ENV58402.1 仮想タンパク質 F951\_\_00736 [Acinetobacter soli CIP 110264]; APV36638.1 コンピテンスタンパク質

10

20

30

40

50

[ *Acinetobacter soli* GFJ-2 ] ; PKD82822.1 コンピテンスタンパク質 [ *Acinetobacter radioresistens* 50v1 ] ; SNX44537.1 IV型線毛集合タンパク質 PilA [ *Acinetobacter puyangensis* ANC 4466 ] ; 及び OAL75955.1 コンピテンスタンパク質 [ *Acinetobacter* sp. SFC ] が含まれるが、これらに限定されない。特定の態様では、COMPタンパク質は、配列番号1 ( COMP<sub>ADP1</sub> : AAC45886.1 ) に対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号1 ( COMP<sub>ADP1</sub> : AAC45886.1 ) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。配列番号1は、28アミノ酸のリーダー配列を含む。特定の態様では、COMPタンパク質は、28アミノ酸のリーダー配列を含まないが、配列番号1 ( COMP<sub>ADP1</sub> : AAC45886.1 ) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む、配列番号7 ( COMP<sub>28ADP1</sub> )、配列番号8 ( COMP<sub>28110264</sub> )、配列番号9 ( COMP<sub>28GFJ-2</sub> )、配列番号10 ( COMP<sub>28P50v1</sub> )、配列番号11 ( COMP<sub>284466</sub> )、または配列番号12 ( COMP<sub>28SFC</sub> ) に対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。特定の態様では、COMPタンパク質は、28アミノ酸のリーダー配列を含まないが、配列番号1 ( COMP<sub>ADP1</sub> : AAC45886.1 ) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む、配列番号7 ( COMP<sub>28ADP1</sub> ) に対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。特定の態様では、COMPタンパク質は、配列番号7 ( COMP<sub>28ADP1</sub> )、配列番号8 ( COMP<sub>28110264</sub> )、配列番号9 ( COMP<sub>28GFJ-2</sub> )、配列番号10 ( COMP<sub>28P50v1</sub> )、配列番号11 ( COMP<sub>284466</sub> )、または配列番号12 ( COMP<sub>28SFC</sub> ) を含む。特定の態様では、COMPタンパク質は、配列番号1 ( COMP<sub>ADP1</sub> : AAC45886.1 )、配列番号2 ( COMP<sub>110264</sub> : ENV58402.1 )、配列番号3 ( COMP<sub>GFJ-2</sub> : APV36638.1 )、配列番号4 ( COMP<sub>50v1</sub> : PKD82822.1 )、配列番号5 ( COMP<sub>4466</sub> : SNX44537.1 )、または配列番号6 ( COMP<sub>SFC</sub> : OAL75955.1 ) である。

#### 【0074】

特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、細菌または哺乳動物の細胞によって産生される。特定の態様では、細菌はグラム陰性菌である。特定の態様では、細菌はストレプトコッカス属由来である。特定の態様では、細菌はクレブシエラ属由来である。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、*S. pneumoniae*、*S. agalactiae*、または *S. suis* のきょう膜多糖であり、例えば、きょう膜多糖は、*S. pneumoniae* の CPS14、CPS8、CPS9V、または CPS15b である。特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella varriicola*、*Klebsiella michiganensis*、または *Klebsiella oxytoca* のきょう膜多糖である。特定の態様では、多糖は、*Klebsiella pneumoniae* のきょう膜多糖である。例えば、特定の態様では、多糖は、*Klebsiella pneumoniae* の血清型 K1 または血清型 K2 のきょう膜多糖である。

#### 【0075】

特定の態様では、オリゴ糖または多糖は、その還元末端にグルコース ( Glc ) を含み、その重要性は本明細書のいづこかで論じられている。

#### 【0076】

特定の態様では、バイオコンジュゲートは、本明細書に開示される生産方法のいづれかによってなど、宿主細胞において *in vivo* で産生される。特定の態様では、バイオ

コンジュゲートは、細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、鳥類細胞、藻類細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞で産生される。特定の態様では、バイオコンジュゲートは無細胞系で産生される。Pg1S以外のOTaseを利用する無細胞システムの使用例は、参照により本明細書に組み込まれるWO2013/067523A1に見出すことができる。

【0077】

本明細書のいづこかで論じられるように、特定の用途では、担体タンパク質またはそのフラグメントと融合タンパク質を形成することが有利であり得る。特定の用途において、担体タンパク質は、コンジュゲートワクチンの産生に有用であると当該技術分野で認識されているものである。特定の態様では、COMPグリコシル化タグフラグメントが担体タンパク質またはそのフラグメントに融合される場合、グリコシル化タグフラグメント、したがって融合タンパク質は、本明細書のいづこかに記載されている保存されたセリン残基でグリコシル化され得る。特定の態様では、融合タンパク質は、ジフテリアトキソイドCRM197、破傷風トキソイド、Pseudomonas aeruginosa外毒素A(EPA)、破傷風毒素Cフラグメント、コレラ毒素Bサブユニット、Haemophilus influenzaタンパク質D、またはそれらのフラグメントからなる群から選択される担体タンパク質を含む。特定の態様では、前記担体タンパク質またはそのフラグメントは、アミノ酸リンカー、例えば、(GGGS)<sub>n</sub> (配列番号23)〔式中、nは少なくとも1〕、またはAAA (配列番号24)を介して、COMPタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントに連結する。COMP融合タンパク質の潜在的な免疫原性を高めるために、1つを超えるグリコシル化タグを含めることが有利であり得る。したがって、特定の態様では、融合タンパク質は、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、8以上、10以上、15以上、または20以上のCOMPタンパク質のグリコシル化タグフラグメントを含む。特定の態様では、融合タンパク質は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または20のうちのいずれかから3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、または25のうちのいずれかまでのCOMPタンパク質のグリコシル化タグフラグメントを含む。特定の態様では、複数のグリコシル化タグフラグメントは、融合タンパク質内で互いにタンデムに配置される。特定の態様では、複数のグリコシル化タグフラグメントは、融合タンパク質内で互いに離れて配置され、例えば、担体タンパク質の配列によって分離されている。特定の態様では、グリコシル化タグフラグメント(複数可)は、例えば、担体タンパク質及び/または融合タンパク質のN末端に位置してもよい。特定の態様では、グリコシル化タグフラグメント(複数可)は、例えば、担体タンパク質及び/または融合タンパク質のC末端に位置してもよい。特定の態様では、グリコシル化タグフラグメント(複数可)は、例えば、担体タンパク質及び/または融合タンパク質の内部に位置することができ、ここで、グリコシル化タグフラグメントは、融合タンパク質中の複数の担体タンパク質の間に位置する。特定の態様では、複数の担体タンパク質は、タイプが同じでもタイプが異なってもよい。

【0078】

グリコシル化タグフラグメント。本明細書に記載の態様のいづれかなどの特定の用途では、リーダー配列を除去するか、またはまだグリコシル化できるCOMPのさらに小さなフラグメントを使用するなど、全長未満のCOMPタンパク質を使用することに利点がある場合がある。COMPのグリコシル化部位は、配列番号1の残基84のセリン、または他のCOMP配列の対応するセリン残基として本明細書に開示されているので、COMPタンパク質のフラグメントは、COMPグリコシル化部位を含むと同定することができる。本明細書で使用されるとき、配列番号1の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含み、融合タンパク質に組み込まれるとPg1S OTaseによってグリコシル化され得る、COMPタンパク質のフラグメントは、本明細書では、COMPタンパク質のグリコシル化タグまたはグリコシル化タグフラグメントと呼ばれる。

【0079】

特定の態様では、COMPグリコシル化タグは、COMPの単離されたフラグメントを

含み、フラグメントは、C o m Pタンパク質の少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27を含む、28、29、30、35、40、45、または50のアミノ酸を含み、配列番号1 (C o m P<sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1) の84位のセリン残基に対応するセリン残基を含む。特定の態様では、グリコシル化タグは、配列番号1 (C o m P<sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1) のアミノ酸残基24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、  
10  
または82のうちのいずれかから、配列番号1 (C o m P<sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1) のアミノ酸残基86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、または147のうちのいずれかまでに対応するC o m Pタンパク質アミノ酸配列を含む。特定の態様では、グリコシル化タグは、配列番号1 (C o m P<sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1) のアミノ酸残基24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、  
20  
34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、または82のうちのいずれかから、配列番号1 (C o m P<sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1) のアミノ酸残基86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、または147のうちのいずれかまでを含むC o m Pタンパク質アミノ酸配列を含む。特定の態様では、グリコシル化タグは、124、120、119、118、117、116、115、100、90、80、75、70、60、50、40、30、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5以下のアミノ酸の長さである。

#### 【0080】

特定の態様では、C o m Pタンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、配列番号1 (C o m P<sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1) のアミノ酸残基1から28に対応するアミノ酸残基を欠くC o m P 28ポリペプチドである。例えば、C o m P 28ポリペプチドの代表的な例には、配列番号7~12が含まれるが、これらに限定されない特定の態様では、C o m Pタンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、予測されるアルファベータループをベータストランド領域に接続するジスルフィド結合に隣接する、84位のセリン残基を含む、配列番号1 (C o m P<sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1) の領域に対応する領域を含む。例えば、予測されるアルファベータループをベータストランド領域に接続するジスルフィド結合に隣接する、84位のセリン残基を含む、配列番号1 (C o m P<sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1) の領域に対応する領域の代表的な例は、A D P 1 V G V Q E I S A S N A T T N V A T A T (配列番号39)、110264 T G V T Q I A S G A S A A T T N V A S A Q (配列番号40)、G F J - 2 V G V Q E I N A S S S T S N V A T A T (配列番号41)、S F C A G V E T I G A S N K T K N V E S A A  
40  
50

(配列番号42)、P50v1 VGVQTI AASNATKNVATAT (配列番号43)、及び4466 NGVISASATTNVASSA (配列番号44)を含むが、これらに限定されない。

#### 【0081】

本明細書に開示される特定の態様では、Compのグリコシル化タグフラグメントは、VGVQEISASNATTNVATAT (配列番号39)、TGV TQIASGASAAATTNVASAQ (配列番号40)、VGVQEINASSSTSNVATAT (配列番号41)、AGVETIGASNKTKNVESAA (配列番号42)、VGVQTI AASNATKNVATAT (配列番号43)、及びNGVISASATTNVASSA (配列番号44)からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み、グリコシル化タグが、配列番号1 (CompADP1: AAC45886.1)の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。特定の態様では、Compのグリコシル化タグフラグメントは、VGVQEISASNATTNVATAT (配列番号39)、TGV TQIASGASAAATTNVASAQ (配列番号40)、VGVQEINASSSTSNVATAT (配列番号41)、AGVETIGASNKTKNVESAA (配列番号42)、VGVQTI AASNATKNVATAT (配列番号43)、及びNGVISASATTNVASSA (配列番号44)、または1、2、3、4、5、6、または7個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、バリエーションが配列番号1 (CompADP1: AAC45886.1)の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。特定の態様では、Compのグリコシル化タグフラグメントは、VGVQEISASNATTNVATAT (配列番号39)に対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み、グリコシル化タグが、配列番号1 (CompADP1: AAC45886.1)の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。特定の態様では、Compのグリコシル化タグフラグメントは、アミノ酸配列VGVQEISASNATTNVATAT (配列番号39)、または1、2、3、4、5、6、または7個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有するそれらのバリエーションを含み、バリエーションが配列番号1 (CompADP1: AAC45886.1)の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

#### 【0082】

特定の態様では、Compタンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、配列番号37 (以下の表3)のアミノ酸コンセンサス配列のうち少なくとも5、10、15、20、30、35、または40の連続的なアミノ酸のアミノ酸配列を含み、グリコシル化タグフラグメントが、配列番号1 (CompADP1: AAC45886.1)の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を含む。特定の態様では、Compタンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、配列番号37のアミノ酸コンセンサス配列、またはまたは1、2、3、4、5、6、または7個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有する配列番号37のバリエーションを含み、バリエーションが配列番号1 (CompADP1: AAC45886.1)の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

#### 【0083】

特定の態様では、Compタンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、配列番号38または45 (以下の表3)のアミノ酸コンセンサス配列のうち少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20の連続的なアミノ酸のアミノ酸配列を含み、上記グリコシル化タグフラグメントが、配列番号1 (CompADP1: AAC45886.1)の84位の保存されたセリン残基に

10

20

30

40

50

対応するセリン残基を含む。特定の態様では、ComPタンパク質のグリコシル化タグフラグメントは、配列番号38または45のアミノ酸コンセンサス配列、または1、2、3、4、5、6、または7個のアミノ酸置換、付加、及び/または欠失を有する配列番号38または45のバリエーションを含み、バリエーションが配列番号1 (CompADP1: AAC45886.1) の84位の保存されたセリン残基に対応するセリン残基を維持する。特定の態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

#### 【0084】

特定の態様では、グリコシル化タグは担体タンパク質などの異種タンパク質に結合している。したがって、特定の態様は、本明細書に開示されるComPグリコシル化タグを含む融合タンパク質を提供する。特定の態様では、融合タンパク質は担体タンパク質を含み、その代表的な例は、ジフテリアトキソイドCRM197、破傷風トキソイド、Pseudomonas aeruginosa外毒素A (EPA)、破傷風毒素Cフラグメント、コレラ毒素Bサブユニット、Haemophilus influenzaeタンパク質D、またはそれらのフラグメントを含むが、これらに限定されない。特定の態様では、融合タンパク質は、本明細書のいづこかに開示されているようなリンカー配列を含む。特定の態様では、融合タンパク質はグリコシル化され、さらに特定の態様では、融合タンパク質は、配列番号1 (CompADP1: AAC45886.1) の84位のセリン残基に対応するセリン残基のグリコシル化タグ領域でグリコシル化される。

10

#### 【0085】

コンジュゲートワクチン。本明細書に開示されるのは、従来のワクチン担体を含む肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンである。特定の態様は、グリコシル化タグ (別名「グリコタグ」) としてのComPフラグメントの使用を含む。特定の態様では、グリコタグは、担体タンパク質のC末端及び/またはN末端に付加することができる。例えば、特定の態様では、従来の担体タンパク質であるPseudomonas aeruginosa外毒素A (EPA) のC末端にグリコタグが付加されている。特定の態様では、グリコタグ/担体融合タンパク質は、CPS8多糖及びPgLSの使用と組み合わせて、その種の肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンとしては初めての担体タンパク質-CPS8バイオコンジュゲートを生成できることが実証された。例えば、特定の態様では、EPA融合物をCPS8多糖及びPgLSの使用と組み合わせて、EPA-CPS8バイオコンジュゲートを生成することができる。EPA-CPS8バイオコンジュゲートワクチンは、殺菌性殺傷によって決定されたように保護的である血清型8特異的に特異的な高いIgG力価を誘発することが実証された。重要なことに、EPA-CPS8バイオコンジュゲート中の100ngの多糖をワクチン接種することで、保護を提供することができた。したがって、特定の態様は、CPS8肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンを提供する。

20

30

#### 【0086】

コンジュゲートワクチン (EPAワクチンコンストラクトなど) は、包括的な肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンを開発するために、グリカン対タンパク質比を増加させるだけでなく、血清型の数を拡大するためのグリコシル化の追加/複数部位を含むことができると考えられる。

#### 【0087】

特定の態様では、本明細書に開示されるバイオコンジュゲートまたはグリコシル化融合タンパク質は、感染症及び/または疾患の予防及び/または治療のために対象に投与することができるコンジュゲートワクチンである。特定の態様では、コンジュゲートワクチンは、例えば、感染症及び/または疾患に対して対象を免疫するために使用することができる予防法である。特定の態様では、バイオコンジュゲートは、(治療用組成物などで) アジュバントに関連し、及び/またはアジュバントとともに投与されている。特定の態様は、本明細書に記載のコンジュゲートワクチン及びアジュバントを含む組成物 (治療用組成物など) を提供する。特定の態様では、コンジュゲートワクチンが対象に投与されるとき、それは免疫応答を誘導する。特定の態様では、免疫応答は長期記憶 (記憶B及びT細胞) を誘発する。特定の態様では、免疫は抗体応答である。特定の態様では、抗体反応は

40

50

、血清型特異的抗体応答である。特定の態様では、抗体応答はI g GまたはI g M応答である。抗体応答がI g G応答である特定の態様において、I g G応答はI g G 1応答である。さらに、特定の態様では、コンジュゲートワクチンは、ワクチンを投与された対象において免疫学的記憶を生成する。

【0088】

特定の態様は、感染症及び/または疾患に対するワクチンの製造を提供する。特定の態様では、方法は、本明細書に開示されるバイオコンジュゲートまたは融合タンパク質（コンジュゲートワクチン）を単離し、コンジュゲートワクチンをアジュバントと組み合わせることを含む。特定の態様では、ワクチンは肺炎球菌感染症に対するコンジュゲートワクチンである。特定の態様では、疾患は肺炎である。

10

【0089】

重要なことに、本明細書に開示される態様は、肺炎球菌多糖に限定されないが、実際、P g l B及びP g l Lと適合しない多くの重要なヒト及び動物の病原体に対するバイオコンジュゲートワクチンを生成するための広範な適用性を有する。注目すべき例としては、ヒトの病原体であるK l e b s i e l l a p n e u m o n i a eとB群連鎖球菌、及びブタの病原体であるS . s u i sがあり、利用可能な認可されたワクチンがない、非常に関連性の高い全ての病原体が含まれる。

【0090】

i n v i v oグリコシル化の方法と試薬。本明細書に開示されるのは、オリゴ糖または多糖のポリペプチドへのi n v i v oコンジュゲーション（i n v i v oグリコシル化）のための方法である。特定の態様では、方法は、オリゴ糖または多糖を、P g l Sオリゴサッカリルトランスフェラーゼ（O T a s e）（本明細書のいづこかに記載されている）でポリペプチドに共有結合させることを含む。特定の態様では、ポリペプチドは、C o m Pタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントを含む。特定の態様では、ポリペプチドは、担体タンパク質などのポリペプチドに異種に連結されているC o m Pタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントを含む。P g l S O T a s eの代表的な例には、P g l S<sub>110264</sub>、P g l S<sub>A D P 1</sub>、P g l S<sub>G F J - 2</sub>、P g l S<sub>50v1</sub>、P g l S<sub>4466</sub>、及びP g l S<sub>S F C</sub>が含まれるが、これらに限定されない。C o m Pタンパク質はいづこかで詳細に説明されており、代表的な例には、C o m P<sub>110264</sub>、C o m P<sub>A D P 1</sub>、C o m P<sub>G F J - 2</sub>、C o m P<sub>50v1</sub>、C o m P<sub>4466</sub>、及びC o m P<sub>S F C</sub>が含まれるが、これらに限定されない。生物由来のP g l S O T a s eは、その生物由来のC o m Pタンパク質を自然にグリコシル化し（例えば、P g l S<sub>110264</sub>は、C o m P<sub>110264</sub>グリコシル化し）、特定の態様では、ある生物由来のP g l Sは、別の生物由来のC o m Pをグリコシル化する（例えばP g l S<sub>A D P 1</sub>はC o m P<sub>110264</sub>をグリコシル化する）ことが認識されよう。例えば、特定の態様では、P g l S O T a s eは、P g l S<sub>A D P 1</sub>である。特定の態様では、P g l S O T a s eがP g l S<sub>A D P 1</sub>である場合、グリコシル化されたC o m Pタンパク質は、C o m P<sub>A D P 1</sub>ではない。例えば、特定の態様では、P g l S O T a s eがP g l S<sub>A D P 1</sub>である場合、C o m Pタンパク質は、C o m P<sub>110264</sub>である。当然に、C o m Pタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントが異種担体タンパク質に連結されている場合、P g l S O t a s eと同じ生物由来であっても、P g l S O T a s eはC o m Pタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントを自然にグリコシル化しないことが認識されるであろう。

20

30

40

【0091】

P g l SとC o m Pの任意の組み合わせの特定の態様では、C o m Pタンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントは、配列番号1（C o m P<sub>A D P 1</sub> : A A C 4 5 8 8 6 . 1）の84位のセリン残基に対応するセリン残基でグリコシル化される。

【0092】

本明細書に開示される特定の態様では、i n v i v oでのグリコシル化は、宿主細胞において起きる。特定の態様では、宿主細胞は、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆

50

虫細胞、鳥類細胞、藻類細胞、または細菌細胞であり得る。特定の態様では、宿主細胞は細菌細胞、例えば、*E. coli*である。

【0093】

特定の態様では、方法は、オリゴ糖または多糖のポリペプチドへのコンジュゲーションに必要な成分を含む宿主細胞を培養することを含む。一般に、これらの成分は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、グリコシル化されるアクセプターポリペプチド、及びオリゴ糖または多糖である。特定の態様では、方法は以下を含む宿主細胞を培養することを含む：(a) 前記オリゴ糖または多糖を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子クラスター；(b) *PglS* *OTase*；及び(3) 前記アクセプターポリペプチド。さらに、オリゴ糖または多糖の生成は、転写活性化因子によって増強され得ることが発見された。特定の態様では、オリゴ糖または多糖の産生は、*K. pneumoniae* の転写活性化因子 *rmpA* (*K. pneumoniae* NTUH K-2044)、または *K. pneumoniae* の転写活性化因子 *rmpA* (*K. pneumoniae* NTUH K-2044) の相同体によって増強される。特定の態様では、方法は、他の成分とともに宿主細胞においてそのような転写活性化因子を発現及び/または提供することをさらに含む。

10

【0094】

特定の態様では、*ComP* タンパク質に連結された担体タンパク質、またはそのグリコシル化タグフラグメントは、例えば、融合タンパク質は、ジフテリアトキシイド CRM197、破傷風トキシイド、*Pseudomonas aeruginosa* 外毒素 A (*EP A*)、破傷風毒素 C フラグメント、コレラ毒素 B サブユニット、*Haemophilus influenzae* タンパク質 D、またはそれらのフラグメントである。

20

【0095】

特定の態様では、方法は本明細書に記載のコンジュゲートワクチンを生成する。

【0096】

特定の態様はまた、アクセプター *ComP* タンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントの *in vivo* グリコシル化のための成分を含む宿主細胞を提供する。特定の態様では、宿主細胞は以下を含む：(a) オリゴ糖または多糖を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子クラスター；(b) *PglS* *OTase*；及び(3) *ComP* タンパク質またはそのグリコシル化タグフラグメントを含むアクセプターポリペプチド。特定の態様では、アクセプターポリペプチドは融合タンパク質である。特定の態様では、宿主細胞は、他の成分とともに、上述のような転写活性化因子をさらに含む。

30

【0097】

特定の態様では、宿主細胞は、*PglS* *OTase* をコードする単離された核酸を含む。特定の態様では、宿主細胞は、*ComP* アクセプターポリペプチドをコードする単離された核酸を含む。特定の態様では、宿主細胞は、オリゴ糖または多糖を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子クラスターを含む。特定の態様では、宿主細胞は、*PglS* *OTase* をコードする単離された核酸、*ComP* アクセプターポリペプチドをコードする単離された核酸、及びオリゴ糖または多糖を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子クラスターのうちの少なくとも2つを含む。特定の態様では、宿主細胞は、ある生物の *PglS* *OTase* をコードする核酸と、別の生物の *ComP* アクセプターポリペプチドをコードする核酸を含む。

40

【0098】

特定の態様は、本明細書のいづこかに記載されている、*ComP* タンパク質、*ComP* グリコシル化タグフラグメント、及び/または *ComP* 融合タンパク質をコードする単離された核酸を提供する。特定の態様では、本明細書で言及される単離された核酸は、ベクターであるか、またはベクター内に含まれる。特定の態様では、本明細書で言及される単離された核酸は、異種ゲノムまたはゲノムの異種領域に挿入及び/または組み込まれている。

【0099】

50

投与。本明細書で提供されるのは、病原体に対する宿主免疫応答を誘導する方法である。特定の態様では、病原体は細菌性病原体である。特定の態様では、宿主は病原体に対して免疫されている。特定の態様では、方法は、免疫応答を必要とする対象に、有効量のC o m Pコンジュゲートワクチン、グリコシル化融合タンパク質、または本明細書に開示される任意の他の治療/免疫原性組成物を投与することを含む。特定の態様は、細菌性病原体に対する宿主免疫応答の誘導及び細菌性病原体に対する免疫に使用するための、本明細書に開示されるコンジュゲートワクチン、グリコシル化融合タンパク質、または他の治療/免疫原性組成物を提供する。免疫応答の例としては、先天性応答、適応応答、体液性応答、抗体応答、細胞媒介性応答、B細胞応答、T細胞応答、サイトカインの上方制御または下方制御、免疫系クロストーク、及び上記免疫応答の2つ以上の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。特定の態様では、免疫応答は抗体応答である。特定の態様では、免疫応答は、先天性応答、体液性応答、抗体応答、T細胞応答、または上記免疫応答の2つ以上の組み合わせである。

10

**【0100】**

また、本明細書に開示されるコンジュゲートワクチン、融合タンパク質、または組成物を必要とする対象に投与することを含む、対象における細菌性疾患及び/または感染症を予防または治療する方法も本明細書に提供される。特定の態様では、感染症は、皮膚、軟部組織、血液、または臓器の局所的または全身的な感染症であるか、または本質的に自己免疫性である。特定の態様では、疾患は肺炎である。特定の態様では、感染症は、全身感染症及び/または血液の感染症である。本明細書に開示される特定の態様では、対象は脊椎動物である。特定の態様では、対象は、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、モルモット、サル、類人猿などの哺乳動物である。そして、例えば、特定の態様では、哺乳動物はヒトである。

20

**【0101】**

本明細書に開示される投与の任意の態様では、組成物は、筋肉内注射、皮内注射、腹腔内注射、皮下注射、静脈内注射、経口投与、粘膜投与、鼻腔内投与、または肺投与を介して投与される。

**【実施例】****【0102】**

菌株、プラスミド、及び増殖条件 この研究で使用した菌株とプラスミドを表1に示す。

30

【表 1 - 1】

表 1 本研究で使用された株及びプラスミド。

株 プラスミド	説明
株	
E. coli SDB1	W3110、 $\Delta$ waaLリガーゼ、 $\Delta$ wecA グリコシルトランスフェラーゼ
E. coli DH5 $\alpha$	一般的なクローニング株
K. pneumoniae 血清型 8、9V、及び 14	血清型 8、9V、または 14 のきょう膜多糖のいずれかを発現する野生型肺炎球菌株
K. pneumoniae の 血清型 K1 と K2	血清型 K1 または K2 のきょう膜多糖のいずれかを発現する野生型 K. pneumoniae 株
プラスミド	
pEXT20	クローニングベクター、Amp <sup>R</sup> 、IPTG 誘導性
pACT3	クローニングベクター、Cm <sup>R</sup> 、IPTG 誘導性
pMN1	C-6 $\times$ His タグ付き Comp、pEXT20 の BamHI と SalI 部位にクローニングされた、Amp <sup>R</sup> 、IPTG 誘導性
pMN2	pMN1 の SalI と PstI 部位にクローニングされた日コード領域及び PglS、Amp <sup>R</sup> 、IPTG 誘導性
pMN4	pMN2 バックグラウンド中の PglS [H324A]
pMN8	pEXT20 の SalI と PstI 部位にクローニングされた日コード領域及び PglS、Amp <sup>R</sup> 、IPTG 誘導性
pMN9	pMN2 の Comp [S82A] 変異体
pMN10	pMN2 の Comp [S84A] 変異体
pMAF10	pMLBAD にクローニングされた HA タグ付き PglB、TpR、アラビノース誘導性
pAMF10	pEXT20 にクローニングされた C-10 $\times$ His タグ付き NmPglL、Amp <sup>R</sup> 、IPTG 誘導性
pIH18	pEXT21 にクローニングされた C-6 $\times$ His タグ付きの C. jejuni 由来の AcrA、SpR、IPTG 誘導性

10

20

30

40

【表 1 - 2】

pAMF22	pMLBADにクローニングされたC-6×Hisタグ付きのN. meningitidis由来のdsbA1、Tp <sup>R</sup> 、アラビノース誘導性	
pACYCpglBmut	PglB中のW458A及びD459A変異を有するC. jejuniのpgl遺伝子座をコードするpACYC184ベースのプラスミドCm <sup>R</sup> 、IPTG誘導性	
pNLP80	pWSK129上のS. pneumoniaeのCPS14クラスター、Kan <sup>R</sup>	10
pB-8	pBBR1MCS-3上のS. pneumoniaeのCPS8クラスター、Tc <sup>R</sup>	
pWKS130-9V	pWKS130上のS. pneumoniaeのCPS9vクラスター、Kan <sup>R</sup>	
pBBR1MCS-K1	pBBR1MCS2中のK. pneumoniaeのK1クラスター	
pBBR1MCS-K2	pBBR1MCS2中のK. pneumoniaeのK2クラスター	20
pACT3-rmpA	pACT3にクローニングされたrmpA	
pEXT20-Comp-PglIS_110264	pEXT20にクローニングされたA. solis CIP 110264由来のComp及びPglIS	
pEXT20-Comp <sub>110264</sub> <sup>4</sup>	pEXT20にクローニングされた、c末端へキサヒスタグ付きのA. solis CIP 110264由来のComp <sub>110264</sub>	
pACT3-PglIS <sub>110264</sub>	pEXT20にクローニングされたA. solis CIP 110264由来のPglIS <sub>110264W</sub>	30
pACT3-PglIS <sub>ADP1</sub>	pEXT20にクローニングされたA. baylyi ADP1由来のPglIS <sub>110264W</sub>	
pACT3-rmpA-pglS <sub>ADP1</sub>	pACT3にクローニングされたrmpA及びpglS <sub>ADP1</sub>	
pEXT20-DsbA-AA A-CompΔ23 <sub>110264</sub>	c末端へキサヒスタグを有するCompΔ23 <sub>110264</sub> に連結するトリプルアラニンペプチドに融合したDsbA	
pEXT20-DsbA-GG GS-CompΔ23 <sub>110264</sub>	c末端へキサヒスタグを有するCompΔ23 <sub>110264</sub> に連結するgly-gly-gly-serペプチドに融合したDsbA	40
pEXT20-DsbA-AA A-CompΔ23 <sub>ADP1</sub>	c末端へキサヒスタグを有するCompΔ23 <sub>ADP1</sub> に連結するトリプルアラニンペプチドに融合したDsbA	
pEXT20-DsbA-GG GS-CompΔ23 <sub>ADP1</sub>	c末端へキサヒスタグを有するCompΔ23 <sub>ADP1</sub> に連結するgly-gly-gly-serペプチドに融合したDsbA	

【表 1 - 3】

p E X T 2 0 - M B P - A A A - C o m P Δ 2 3 <sub>110264</sub>	c 末端ヘキサヒスタグを有する C o m P Δ 2 3 <sub>110264</sub> に連結するトリプルアラニンペプチドに融合した M B P
p E X T 2 0 - M B P - G G G S - C o m P Δ 2 3 <sub>110264</sub>	c 末端ヘキサヒスタグを有する C o m P Δ 2 3 <sub>110264</sub> に連結する g l y - g l y - g l y - s e r ペプチドに 融合した M B P
p E X T 2 0 - M B P - A A A - C o m P Δ 2 3 <sub>ADP1</sub>	c 末端ヘキサヒスタグを有する C o m P Δ 2 3 <sub>ADP1</sub> に連 結するトリプルアラニンペプチドに融合した M B P
p E X T 2 0 - M B P - G G G S - C o m P Δ 2 3 <sub>ADP1</sub>	c 末端ヘキサヒスタグを有する C o m P Δ 2 3 <sub>ADP1</sub> に連 結する g l y - g l y - g l y - s e r ペプチドに融合 した M B P
p E X T 2 0 - E P A - G G G S - C o m P Δ 2 3 <sub>110264</sub>	c 末端ヘキサヒスタグを有する C o m P Δ 2 3 <sub>110264</sub> に連結する g l y - g l y - g l y - s e r ペプチドに 融合した E P A に融合した D s b A シグナルペプチド

10

## 【 0 1 0 3 】

特に明記しない限り、E. coli 株は Terrific Broth (TB) で 37 で一晩増殖させた。S. pneumoniae 菌株は、脳心臓浸出物 (BHI) プロスまたはヒツジ血液寒天プレートで 37、5% CO<sub>2</sub> で増殖させた。プラスミドの選択には、抗生物質を次の濃度で使用した：アンピシリン (100 μg/mL)、テトラサイクリン (20 μg/mL)、クロラムフェニコール (12.5 μg/mL)、カナマイシン (20 μg/mL)、スペクチノマイシン (80 μg/mL)。これらは必要に応じて追加された。

20

## 【 0 1 0 4 】

大腸菌における異種グリコシル化。全ての異種グリコシル化実験では、E. coli SDB1 細胞株を使用した。これは、糖鎖工学に適した株として以前に確立されているためである。エレクトロコンピテント E. coli SDB1 は、Dower らの岸あに従って調製した。細胞は、グリカン合成遺伝子座、アクセプタータンパク質、及び O T a s e をコードするプラスミドでエレクトロポレーションされた。コロニーを採取し、適切な抗生物質を選択して TB 中で 37 で増殖させ、必要に応じて 0.05 ~ 0.1 mM の IPTG または 0.2% アラビノースで直ちに誘導し、37 で一晩放置した。アラビノース誘導を必要とする培養物は、4 時間後に 2 回目のアラビノース投与を受けた。細胞ペレットは固定相で得られ、ウエスタンブロット分析のために調製された。

30

## 【 0 1 0 5 】

ウエスタンブロットティング。OD<sub>600</sub> = 0.1 ユニットの相当物を含む細胞溶解物を 12.5% の社内で調製した SDS - P A G E ゲルにロードし、ニトロセルロースメンブレン (Bio-rad) に転写した。以前に公開されたプロトコールに従ってウエスタンブロットティングを行った。次いで、ニトロセルロースメンブレンを Odyssey Infrared Imaging System (LiCor Biosciences, USA) を使用して視覚化した。

40

## 【 0 1 0 6 】

タンパク質及び糖タンパク質の精製。C 末端ヘキサヒスタグ付きの C o m P 及び C o m P バイオコンジュゲートは、E. coli の全膜調製物から精製された。細胞を 37 の 2 L の terrific broth で一晩増殖させ、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 緩衝液で洗浄し、60 mL の同じ緩衝液に再懸濁した。フレンチプレス (Aminco) を使用して約 20 k P S I で 2 ラウンドの細胞破壊を行い、続いてプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を添加して、細胞を溶解した。溶解物を 20,000 × g で 30 分間 2 回遠心分離し、細胞残屑をペレット化した。上清を 100,000 × g で 6

50

0 分間超遠心分離し、全膜をペレット化した。ペレットを 0.5% n-ドデシル - D - マルトシド (DDM) を含む PBS 緩衝液に再懸濁し、膜タンパク質を 48 時間タンプリングして可溶化した。等量の PBS を懸濁液に加えて界面活性剤濃度を 0.25% に下げ、懸濁液を 100,000 × g で 60 分間超遠心分離しました。可溶化した膜を 0.45 μm 及び 0.22 μm フィルターで濾過し、AKTA 精製器 (Amersham Biosciences, スウェーデン) に取り付けられた His-Trap HP カラム (GE Healthcare) にロードした。試料をロードする前に、カラムを 20 mM イミダゾールを含む PBS/DDM 緩衝液で平衡化した。PBS に 20 mM 及び 30 mM のイミダゾールを含む 7 カラム容量の緩衝液でカラムを段階的に洗浄することにより、未結合のタンパク質を除去した。カラムに結合したタンパク質を溶出するために、イミダゾール濃度を徐々に増加する勾配溶出を使用した。非コンジュゲート及びコンジュゲートした Comp の大部分は、180 mM から 250 mM のイミダゾールで溶出した。イミダゾールは、0.25% w/v DDM を含む PBS で構成される 250 mL 透析緩衝液中で 3.5 kDa 透析膜 (Spectrum Labs) を通して、一晚ラウンドの透析とそれに続く 2 回の 2 時間ラウンドの透析によって除去された。透析後のイミダゾールの最終理論濃度は約 0.007 mM であった。DC キット (biorad) を使用してタンパク質を定量した後、試料をマウス免疫に適した濃度に希釈した。

10

20

30

40

50

#### 【0107】

マウスモデルの免疫。マウスワクチン接種モデルにおける CPS14-Comp バイオコンジュゲートの免疫原性を評価した。2つの群のマウス (n=10) は、3 μg の非グリコシル化 Comp または CPS14-Comp バイオコンジュゲートのいずれかを個別に投与された。14日目と28日目にマウスを追加免疫し、49日目に全血採取のために屠殺した。各ワクチンは総タンパク質に基づいて製剤化された。S. pneumoniae の血清型 14 株を各ウェルに吸着させた酵素免疫測定法 (ELISA) を使用して、CPS14 に対する IgM 及び IgG の応答を比較した。図 12 A、B に見られるように、CPS14-Comp バイオコンジュゲートでワクチン接種されたマウスから採取された血清は、CPS14 に特異的な IgG 応答が増加したが (図 12 A)、IgM 応答は増加しなかった (図 12 B)。さらに、使用される二次 HRP タグ付き抗 IgG サブタイプ抗体は、CPS14-Comp ワクチン接種マウスにどの IgG サブタイプが存在するかを決定する (図 12 C)。図 12 C に見られるように、CPS14 特異的 IgG 1 応答は他のサブタイプよりも高く、これは肺炎球菌コンジュゲートワクチンの以前の発見と一致している (Wuorimaa et al. J Infect Dis 184, 1211-1215 (2001); Soinininen, A., Seppala, I., Nieminen, T., Eskola, J. & Kayhty, H. Vaccine 17, 1889-1897 (1999))。

#### 【0108】

S. pneumoniae には 90 を超える血清型がある (Geno, K. A. et al. Clin Microbiol Rev 28, 871-899 (2015); Bentley, S. D., et al. PLoS Genet 2, e31 (2006))。血清型 8、22F、及び 33F など、ますます流行している多くの血清型は、現在認可されているワクチンには含まれていない (Pilišvili, T., et al. J Infect Dis 201, 32-41 (2010))。したがって、PREVNAR 13 (登録商標) に含まれる 2 つの血清型 (血清型 9V 及び 14) と含まれない 1 つの血清型 (血清型 8) に対する多価肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンを生成する PglS の多能性を試験した。前述の CPS は全て、還元末端糖として Glc を含んでいるため、他の商業的に利用されているコンジュゲート酵素とは互換性がない。図 21 A ~ F に見られるように、PglS、Comp、及び CPS8 または CPS9V の多糖のいずれかを共発現する全細胞からのアフィニティー精製タンパク質のウエスタンブロット分析により、それぞれ CPS 特異的 Comp バイオコンジュゲートが生成された。同様に、精製された材料が脂質結合多糖で汚染されていないことを確認

するために、試料をプロテイナーゼKで処理し、ウエスタンブロッティングで分析したときにシグナルの喪失を観察し、バイオコンジュゲートがタンパク質性であることを確認した。

#### 【0109】

次に、ワクチン接種試験を実施して、3価のCPS8-、CPS9V-、及びCPS14-Comp肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチンの免疫原性を判定した(図22A-L)。3つの対照群が含まれていた。1つの群は担体タンパク質のみを投与された(非グリコシル化Comp)。別の群は、他の血清型に対する免疫応答を分析する際にIgG特異性を説明するために一価用量のCPS14-Compバイオコンジュゲートを投与された。第3の群は陽性対照としてPREVNAR 13(登録商標)を投与された。PREVNAR 13(登録商標)を投与されたマウスを含む全ての免疫原群には、均等に混合されたフロイントのアジュバントを含んだ。各群の49日目の血清を、S. pneumoniaeの血清型8、9V、及び14でコーティングされたプレートでのELISAに使用した。上述のように、血清型9V及び14はPREVNAR 13(登録商標)に含まれ、ワクチン接種の49日後にこれら2つの血清型に対してPREVNAR 13(登録商標)免疫マウスでIgG応答の上昇が見られた(図13)。一価のCPS14-Compバイオコンジュゲートを投与されたマウスも、血清型14に特異的なIgGの有意な増加を示した(図12及び図13)。3価のCPS8/CPS9V/CPS14-Compバイオコンジュゲートを投与されたマウスでも、ワクチン接種の49日後に血清型特異的IgG応答が統計的に有意に増加した(図13)。

10

20

#### 【0110】

免疫は、Southern Alberta Cancer Research Institute(SACRI)の抗体サービスで実施された。CPS14-Comp一価免疫では、4~6週齢のメスのBALB/cマウスに、50µlのフロイントアジュバントを含む100µLの精製タンパク質/糖タンパク質(総タンパク質3µg)を注射した。マウスの2つの群(n=10)に、グリコシル化されていないComp(プラセボ)またはCPS-Compコンジュゲートのいずれかを注射した。マウスからの血清は、免疫化の前、及び免疫化の7、21、35、及び49日後に得られた。追加免疫用量は14日目と28日目に投与された。マウスの4つの群(n=10)が4つの異なる免疫群に使用されたことを除いて、3価の免疫のために同じ手順に従った。これらの群には、3µgの非コンジュゲートComp(プラセボ)とフロイントアジュバントを含む100µL、3µgのComp-CPS14コンジュゲートとフロイントアジュバントを含む100µL、9µgの糖タンパク質混合物(Comp-CPS8、Comp-CPS9V、及びComp-CPS14)とフロイントのアジュバントを含む100µL、またはPREVNAR 13(登録商標)とフロイントのアジュバントの1:3希釈ストックの100µLが注射された。CPS-Compバイオコンジュゲートは、この免疫のために総タンパク質によって製剤化された。

30

#### 【0111】

フロイントのアジュバントはヒトの臨床開発に適したアジュバントではないため、水酸化アルミニウムと水酸化マグネシウムの混合物を含む穏やかなアジュバントであるImject Alum Adjuvantを配合したワクチンを使用して別の免疫試験を実施した。ワクチン接種コホートには、緩衝液/アジュバント試験群、PREVNAR 13(登録商標)試験群、及び3価のCPS8-/CPS9V-/CPS14-Compバイオコンジュゲート試験群が含まれていた。3匹のマウスの群は1、14、及び28日目にワクチン接種された。42日目に血清を採取し、オブソニン化貪食作用アッセイ(OPA)を介してエフェクター機能を決定するために使用した。個々のマウスから採取された血清の量が限られていることを考慮して、1つの血清型がPREVNAR 13(登録商標)(血清型14)に含まれ、もう1つが含まれていない(血清型8)ため、血清は血清型8及び14に対する殺菌活性について試験された。図23A及び23Bに見られるように、3価のCPS8-/CPS9V-/CPS14-Compバイオコンジュゲートでワクチ

40

50

ン接種された代表的なマウスの血清は、モックワクチン接種マウスの血清と比較して、*S. pneumoniae* 血清型 14 株に対する殺菌活性が増加した。重要なことに、同じバイオコンジュゲートワクチン接種血清は、*S. pneumoniae* 血清型 8 株に対して高い殺菌活性を示した。これは、その製剤中にこのコンジュゲートが存在しないため、PREVNAR 13 (登録商標) ワクチン接種血清では観察されなかった。

#### 【0112】

別の三価免疫実験は、3匹の4～6週齢のメスBALB/cマウスの群で実施された。各免疫群に、100 μLの1:1免疫原(3 μgの3価バイオコンジュゲートのそれぞれのタンパク質またはPREVNAR 13 (登録商標)の1:10希釈ストック)を皮下注射して、ミョウバンアジュバントを注射した。マウスは、0、14、及び28日目にワクチン接種され、次いで、血清採取のために42日目に屠殺された。

10

#### 【0113】

別の免疫実験は、3匹の4～6週齢のメスBALB/cマウスの群で実施された(群あたり5匹のメスと5匹のオス)。0、14、及び28日目に、100 μLのEPA(5 μgの総タンパク質)、100 μLのComp-CPS8(5 μgの総多糖)、または100 μLのEPA-CPS8(0.1 μgの総多糖)でマウスを皮下免疫した。次いで、42日目に血清採取のために屠殺した。ワクチンは、Imject Alum Adjuvantと1:1で製剤化された。

#### 【0114】

従来のワクチン担体を用いた肺炎球菌バイオコンジュゲートの糖鎖工学。これまで、*A. baylyi* ADP1由来のCompの使用は、肺炎球菌バイオコンジュゲートワクチン生産の担体タンパク質として利用されてきた。しかしながら、この技術の商業的適用性を高めるために、従来のワクチン担体は、O-結合型OTaseと互換性があることが求められていた。最初の28アミノ酸を欠くCompフラグメント(Comp 28)にC末端で融合した*Pseudomonas aeruginosa* (EPA)由来の外毒素AのE553パリアントからなるキメラ融合タンパク質を生成した。*A. sol*株110264のCompオーソログは、PglSによって最も効率的にグリコシル化され、*A. baylyi* ADP1由来のCompと同じ保存されたセリンでグリコシル化されることが判明したために使用された。EPA融合は、グリシン-グリシン-グリシン-セリン(GGG S; 配列番号23)リンカーでComp 28に連結され、Dsb Aシグナル配列でペリプラズムに輸送された。

20

30

#### 【0115】

肺炎球菌コンジュゲートワクチンの現在の製剤には血清型8に対するコンジュゲートが含まれていないため、EPA-CPS8肺炎球菌バイオコンジュゲートの生成に焦点が当てられた。EPA融合体は、PglSとCPS8を共発現するSDB1細胞に導入され、続いて精製され、次いでグリコシル化について探索された。EPA融合体はCPS8で効率的にグリコシル化された。さらに、インタクト糖タンパク質質量分析により、EPA融合体が、単一のCPS8サブユニットの計算された質量である662 Daの増加する質量単位で繰り返し修飾されていることが確認された。EPA融合物は、インタクトタンパク質分析により、少なくとも11個のCPS8サブユニットでグリコシル化されていることが判明した。しかしながら、ウエスタンブロット及びクーマシー分析は、15を超えるサブユニットを転移することができたことを示した。

40

#### 【0116】

続いて、EPA-CPS8肺炎球菌バイオコンジュゲートの免疫原性をComp-CPS8肺炎球菌バイオコンジュゲートと比較するワクチン接種実験を行った。10匹のマウスの群に、5 μgのEPA単独(総タンパク質に基づく)、5 μgのComp-CPS8(アントロン硫酸によって決定される多糖に基づく)、または100 ngのEPA-CPS8(インタクトEPA-CPS8質量分析による決定される多糖に基づく)のいずれかをワクチン接種した。マウスは、42日目に採取された血清で1、14、及び28日目にワクチン接種された。全てのワクチンは、Imject Alum Adjuvantと

50

1 : 1で製剤化された。続いてELISAを実施して、CPS8に特異的なIgG力価を決定した。図25Aに見られるように、Comp-CPS8またはEPA-CPS8のいずれかでワクチン接種されたマウスは、EPAワクチン接種マウスと比較した場合、CPS8に特異的なIgG力価が統計的に有意に増加している。さらに、ワクチン接種されたマウスからの血清の保護能力は、全血白血球を用いたマウス適応オプソニン化貪食作用アッセイ(OPA)を使用して決定された。図25Bに示すように、Comp-CPS8で免疫したワクチン接種マウスの血清は、84~50%の範囲の高レベルの殺菌性殺傷を示し、1匹のマウスは殺傷活性を示さなかった。さらに、EPA-CPS8ワクチン接種マウスの血清も88%~10%の範囲の殺菌性を示し、3匹のマウスは殺傷活性を示さなかった。予想通り、EPAワクチン接種マウスからの血清は殺傷活性を示さなかった。

10

#### 【0117】

酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)。5%CO<sub>2</sub>中37℃のBHIブロスで一晩増殖させた*S. pneumoniae*株をPBSで洗浄し、光学密度をOD<sub>600</sub>=0.6単位に調整した。細胞を60℃で2~4時間熱失活させた後、50μL/ウェルを添加して高結合96ウェルプレート(Corning)に固定した。プレートをタンブラー上で4℃で一晩インキュベートした。翌日、ウェルをPBST(リン酸緩衝生理食塩水-tween)(100μL/ウェル)で3回洗浄した後、5%スキムミルク(250μL/ウェル)で2時間ブロッキングした。ウェルをPBSTで3回洗浄した。プレートを、PBST中の2.5%スキムミルクで1:500に希釈したマウス血清(100μL/ウェル)とともに室温で1時間インキュベートした。陽性対照には、CPSに対する市販のウサギポリクローナル抗体(Statens serum institute)を使用した。陰性対照ウェルは、一次抗体を含まないスキムミルクで処理した。一次抗体とのインキュベーション後、ウェルをPBSTで3回洗浄し、続いてPBST中の2.5%スキムミルクで希釈した二次HRPコンジュゲート抗体(100μL/ウェル)で1時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルをPBSTで3回洗浄し、100μLの発色基質TMB(Cell Signaling Technology)を各ウェルに添加した。プレートを室温で5分間インキュベートした後、BioTek(商標)プレートリーダーを使用して650nmでの吸光度を測定した。

20

#### 【0118】

IgG力価を測定するために、ELISAプレートを100μLの1×10<sup>8</sup>CFU/mLの、ほぼ対数増殖期中期まで増殖させた*S. pneumoniae*血清型8でコーティングした。細菌をPBSで2回洗浄し、コーティング前に水に懸濁した。ELISAプレートを生物学的フード内で24時間風乾させた。次いで、50マイクロリットルのメタノールを各ウェルに加え、風乾させた。プレートは、使用するまで光から保護された再封可能なバッグに保管された。マウス総IgG抗体の力価測定を行うために、42日目の血清をPBSTで段階希釈(2倍)し、1:4000に希釈した抗マウスHRP結合IgG(Cell Signaling Technology #7076)を使用して抗体を検出した。マウス血清力価測定では、450nmで0.2以下の光学密度をもたらした最後の血清希釈の逆数をその血清の力価とみなした。表現の目的で、負の力価(カットオフ以下)には任意の力価10を与えた。プレート間の変動は、各プレートに内部参照陽性対照を含めることによって制御された。この対照は、以前にComp-CPS8バイオコンジュゲートワクチンで免疫されたマウスからの過免疫血清であった。TMBでのELISA反応は、内部陽性対照で約1のOD<sub>450nm</sub>が得られたときに停止した。

30

40

#### 【0119】

部位特異的変異導入。以前に記載されたように(Fisher and Pei, 1997)、部位特異的変異導入を実施して、Pg1MにおけるH325ならびにCompのS82及びS84の残基を変異させた。変異プライマーは、Webベースのプライマー設計プログラムであるPrimer X(<http://www.bioinformatics.org/primerx/>)を使用して設計された。使用したプライマーを補足表1に示す。PCR反応は、Pfuポリメラーゼと2~10ngのpMN2をテンプレ

50

ートとして使用して行った。PCR反応は、95 で30秒の初期変性と、それに続く95 で30秒、55 で60秒、68 で360秒の16サイクルで構成され、最後の伸長はなかった。PCR反応を2時間DpnI消化してテンプレートプラスミドを除去し、次いでエレクトロコンピテントDH5 細胞に形質転換し、プラスミド選択のためにアンピシリン上で増殖させた。変異導入を確認するためにコロニーを配列決定した。

#### 【0120】

Comp-CPS14コンジュゲートの消化。単離されたCompバンドは、わずかな変更を加えて前述のように処理された。簡潔に述べると、ゲルで分離されたCompバンドを切り出し、50 mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> : 100%エタノールの50 : 50溶液で、750 rpmで振とうしながら室温で20分間脱色した。次いで、脱色したバンドを100%エタノールで洗浄し、20分間真空乾燥し、50 mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中の10 mM DTTで再水和した。振とうしながら56 で60分間還元を行った。次いで還元緩衝液を除去し、ゲルバンドを100%エタノールで10分間2回洗浄して、残っているDTTを確実に除去した。還元エタノールで洗浄した試料を、50 mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中の55 mMヨードアセトアミドで室温の暗所で45分間で逐次的にアルキル化した。次いで、アルキル化試料を2ラウンドのMilli-Q水と100%エタノールで洗浄し、次いで真空乾燥した。次いで、アルキル化試料を40 mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中の10 ng/μlのGluc(Promega, Madison WI)で4 で1時間再水和した。過剰なGlucを除去し、ゲル片を40 mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>で覆い、37 で24時間インキュベートした。ペプチドは、C<sub>18</sub>ステージチップを使用して濃縮及び脱塩し(Ishihama, Y., Rappsilber, J. & Mann, M. J. Proteome Res 5, 988-994 (2006); Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Nature protocols 2, 1896-1906 (2007))、4 でチップ上に保存した。ペプチドを緩衝液B(0.5%酢酸、80%MeCN)で溶出し、乾燥させてからLC-MSで分析した。

#### 【0121】

逆相LC-MS及びHCD MS-MSを使用した糖ペプチドの同定。精製したペプチドを緩衝液A\*に再懸濁し、HFエッチングされたnESIチップが組み込まれた、社内で充填した25 cm、内径75 μm、外径360 μm、1.7 μm 130 CSH C<sub>18</sub>(Waters, Manchester, UK)逆相分析カラムを使用して分離した。試料は、ACQUITY UPLC M-Class System(Waters)を使用して600 nl/分で20分間、緩衝液A(0.1%FA)を使用してカラムに直接ロードし、緩衝液B(99.9%ACN、0.1%FA)の濃度を、60分間で2%から32%Bに、次の10分間で32%から40%Bに、次いで8分間で80%Bに増加し、2分間100%Bに保持、次いでさらに10分間で2%Bに低下するように変更する勾配を使用して300 nl/分で溶出した。RPで分離されたペプチドをQ-EXACTIVE(Thermo Scientific)質量分析計に注入し、データ依存型取得を使用してデータを取得した。推定糖ペプチドを同定するために2つの方法が使用された。方法Aは、1回のフルプリカーサーキャン(解像度70,000; 350-1850 m/z、AGCターゲット1×10<sup>6</sup>)の後に10個のデータ依存型HCD MS-MSイベント(解像度35k AGCターゲット1×10<sup>5</sup>、最大注入時間110 ms、NCE 26、25%ステップング)、90秒の動的除外が有効である、ロバストなペプチド同定を可能にすることを目的とした。方法Bは、1回のフルプリカーサーキャン(解像度70,000; 350-1850 m/z、AGCターゲット1×10<sup>6</sup>)、続いて10個のデータ依存型HCD MS-MSイベント(解像度35k AGCターゲット5×10<sup>5</sup>、最大注入時間250 ms、NCE 13、25%ステップング)、90秒の動的除外が有効である、糖ペプチド内のグリカンのより完全な特性強化を可能にすることを目的とした。

#### 【0122】

10

20

30

40

50

同定された糖ペプチドのデータベース調査。生ファイルを手動で処理して、診断用オキソニウム 204.08 m/z に基づいて潜在的な糖ペプチドを同定した。ExPASy FindPept ツール ([web.expasy.org/findpept/](http://web.expasy.org/findpept/) のワールドワイドウェブ上) を使用して、10 ppm 以内で一致する、強力な脱グリコシル化 Comp 由来ペプチドイオンの存在に基づいて、推定糖ペプチド由来スキャンを手動で検査し、Gluc 由来 Comp 糖ペプチドの可能性を同定した。ペプチドの割り当てを容易にするために、得られた糖ペプチドに、Protein Prospector ツール MS-Product ([prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct](http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct) のワールドワイドウェブ上) で補助しながら、(Roepstorff, P. & Fohlman, J. Biomed Mass Spectrom 11, 601 (1984)) に従って手動で注釈を付けた。

#### 【0123】

インタクトタンパク質分析インタクト分析は、6520 Accurate 質量 Q-TOF 質量分析計 (Agilent, Santa Clara, CA) を使用して実行された。タンパク質試料を 2% アセトニトリル、0.1% TFA に再懸濁し、すぐに Agilent 1200 を使用する C5 Jupiter 5  $\mu$ m 300 50 mm  $\times$  2.1 mm カラム (Phenomenex, Torrance, CA) にロードした。試料は、緩衝液 A (2% アセトニトリル、0.1% 酢酸) で 4 分間洗浄して脱塩し、0.200 ml/分の流速で、2~100% 緩衝液 B (80% アセトニトリル、0.1% 酢酸) の 12 分間の直線勾配で分離した。MS1 マススペクトルは、1 Hz で 300~3,000 m/z の質量範囲で取得された。MassHunter B.06.00 (Agilent) を使用して、インタクト質量分析と逆重畳積分を実行した。

#### 【0124】

オプソニン化貪食作用アッセイ (OPA) アッセイは以前に記載されたように実施され ( ; ) 47, 48、以下に簡単に記載される。採血。ナイーブメスマウス (Charles River, Wilmington, MA) から心臓内穿刺により血液を採取し、ヘパリンナトリウムで処理した後、希釈して、5% 熱不活化ウシ胎児血清、10 mM HEPES、2 mM の L-グルタミン、及び 50  $\mu$ M の 2-メルカプトエタノールを補充した RPMI 1640 中の  $6.25 \times 10^6$  白血球/mL を得た。全ての試薬は Gibco (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) から入手した。細菌懸濁液の調製。S. pneumoniae 血清型 8 または 14 (Statens Serum Institut, Denmark) のいずれかの羊血液寒天プレート上の単離されたコロニーを 5 ml の Todd-Hewitt Broth (THB) (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Nepean, Canada) に接種し、5% CO<sub>2</sub> で 37 °C で 16 時間インキュベートした。0.1 mL の 16 時間培養物を 10 mL の THB に移し、5 時間インキュベートすることにより、作業培養物を調製した。細菌を 3 回洗浄し、PBS に再懸濁して、OD<sub>600</sub> 値が 0.6 になるようにした。これは、血清型 8 及び血清型 14 でそれぞれ  $1.5 \times 10^8$  コロニー形成単位 (CFU) / mL 及び  $3.5 \times 10^8$  CFU / mL に相当する。最終的な細菌懸濁液は、 $6.25 \times 10^4$  CFU / mL の濃度になるように完全な細胞培養培地で調製された。最終懸濁液中の CFU / mL の数は、試料を Todd-Hewitt Agar (THA) に播種することによって決定された。オプソニン化貪食作用アッセイ希釈した全血 ( $5 \times 10^5$  の総白血球) を、 $5 \times 10^3$  CFU の S. pneumoniae 血清型 8 または 14 (MOI 0.01) 及び対照 (プラセボ) または ワクチン接種マウスの血清 5% (v/v) と混合し、マイクロチューブ中で最終容量 0.2 mL にした。マイクロチューブを振とうしながら、5% CO<sub>2</sub> で 37 °C で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、THA で生菌計数を実施した。ナイーブマウス血清 (5% v/v) または市販のウサギ抗 S. pneumoniae 血清型 8 または 14 血清 (5% v/v) (Statens Serum Institut, Denmark) を添加したチュ

ープを、それぞれ陰性対照及び陽性対照として使用した。細菌の殺傷パーセントは、次の式を使用して決定された。細菌の殺傷パーセント = [ 1 - ( 試料チューブから回収された細菌 / ナイープ血清を含む陰性対照チューブから回収された細菌 ) ] × 100。

【 0 1 2 5 】

【 表 2 】

表 2 プライマー

プライマー	配列
i g r F	ACTGGTCGACTAGTAGTACTATATGGCTTT AAA (配列番号 25)
i g r R	ACTGCTGCAGTTAATATTCTATTGAACAAA ATTTTAAC (配列番号 26)
H325A F	GAGAATGGTTTACATACTCAGCGAATTTGT TCTTAGATTTAATG (配列番号 27)
H325A R	CATTAAATCTAAGAACAATTCGCTGAGTA TGTA AACCATTCCTC (配列番号 28)
S82A F - ADP1	GGAGTCCAAGAAATTGCGGCAAGTAATGCC A (配列番号 29)
S82A R - ADP1	GTGGCATTACTTGCCGCAATTTCTTGGACT CC (配列番号 30)
S84A F - ADP1	CAAGAAATTTTCAGCAGCGAATGCCACTACG AAC (配列番号 31)
S84A R - ADP1	GTTTCGTAGTGGCATTTCGCTGCTGAAATTTTC TTG (配列番号 32)
S82A 110254 F	ACAGATCGCGTCCGGCGCCGCAGCAGCGAC AACAAATGTAGCGT (配列番号 33)
S82A 110254 R	ACGCTACATTTGTTGTCGCTGCTGCGGCGC CGGACGCGATCTGT (配列番号 34)
S84A 110254 F	CGGGCGTCCACACAGATCGCGGCCGGCGCCT CAGCAGCGACAACA (配列番号 35)
S84A 110254 R	TGTTGTCGCTGCTGAGGCGCCGGCCGCGAT CTGTGTGACGCCCG (配列番号 36)

【 0 1 2 6 】

表 3 グリコシル化タグ配列

【 数 1 】

$X_1X_2GTX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}CX_{14}GVX_{17}X_{18}IX_{20}X_{21}X_{22}ASX_{25}X_{26}TX_{28}NVX_{31}X_{32}AX_{34}CX_{36}X_{37}$   
 $X_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$  (配列番号 37)

式中：

- X<sub>1</sub> は、V、A、またはアミノ酸不在であり；
- X<sub>2</sub> は、A、G、T、またはアミノ酸不在であり；
- X<sub>5</sub> は、P、S、またはQであり；
- X<sub>6</sub> は、S、M、またはIであり；
- X<sub>7</sub> は、T、P、またはVであり；

$X_8$  は、A、S、またはTであり；  
 $X_9$  は、G、N、S、またはTであり；  
 $X_{10}$  は、N、またはアミノ酸不在であり；  
 $X_{11}$  は、S、G、またはAであり；  
 $X_{12}$  は、SまたはNであり；  
 $X_{14}$  は、V、T、またはAであり；  
 $X_{17}$  は、Q、T、またはEであり；  
 $X_{18}$  は、E、Q、またはTであり；  
 $X_{20}$  は、S、N、A、またはGであり；  
 $X_{21}$  は、S、またはアミノ酸不在であり；  
 $X_{22}$  は、G、またはアミノ酸不在であり；  
 $X_{25}$  は、N、S、またはAであり；  
 $X_{26}$  は、A、S、またはKであり；  
 $X_{28}$  は、T、S、またはKであり；  
 $X_{31}$  は、AまたはEであり；  
 $X_{32}$  は、TまたはSであり；  
 $X_{34}$  は、T、Q、またはAであり；  
 $X_{36}$  は、G、S、またはTであり；  
 $X_{37}$  は、A、G、またはDであり；  
 $X_{38}$  は、S、L、またはAであり；  
 $X_{39}$  は、S、G、D、またはTであり；  
 $X_{40}$  は、A、V、またはGであり；  
 $X_{41}$  は、G、I、またはVであり；  
 $X_{42}$  は、Q、T、またはIであり；  
 $X_{43}$  は、I、V、T、またはLであり；  
 $X_{44}$  は、I、T、またはVであり；  
 $X_{45}$  は、M、またはアミノ酸不在であり；  
 $X_{46}$  は、D、またはアミノ酸不在である。

10

20

## 【数2】

 $CX_{14}GVX_{17}X_{18}IX_{20}X_{21}X_{22}ASX_{25}X_{26}TX_{28}NVX_{31}X_{32}AX_{34}C$ 

(配列番号45)

30

 $X_{14}GVX_{17}X_{18}IX_{20}X_{21}X_{22}ASX_{25}X_{26}TX_{28}NVX_{31}X_{32}AX_{34}$ 

(配列番号38)

式中：

$X_{14}$  は、V、T、またはA、任意選択でVであり；  
 $X_{17}$  は、Q、T、またはE、任意選択でQであり；  
 $X_{18}$  は、E、Q、またはTであり；  
 $X_{20}$  は、S、N、A、またはGであり；  
 $X_{21}$  は、S、またはアミノ酸不在であり；  
 $X_{22}$  は、G、またはアミノ酸不在であり；  
 $X_{25}$  は、N、S、またはA、任意選択でNであり；  
 $X_{26}$  は、A、S、またはK、任意選択でAであり；  
 $X_{28}$  は、T、S、またはKであり；  
 $X_{31}$  は、AまたはE、任意選択でAであり；  
 $X_{32}$  は、TまたはS、任意選択でTであり；あるいは  
 $X_{34}$  は、T、Q、またはA、任意選択でTである。

40

## 【0127】

本開示は、本開示の個々の態様の単一の例示として意図される、記載された特定の態様または先行する実施例によって範囲が限定されるべきではなく、機能的に同等である任意の組成物または方法は、本開示の範囲内である。実際、示されたそれらのもの及び本明細

50

書に記載されるものに加えて、本開示の様々な改変が、上述の説明及び添付の図面から当業者に明らかになるであろう。そのような改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。

【0128】

本明細書において言及される全ての刊行物及び特許出願は、各々個別の刊行物または特許出願が、参照により本明細書に組み入れられるように具体的かつ個別に示されているかのように、それと同程度まで、参照により本明細書に組み入れられる。

【0129】

参照文献

1. O'Brien, K. L. et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 374, 893-902, doi:10.1016/S0140-6736(09)61204-6 (2009). 10
2. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization - WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 82, 93-104 (2007).
3. Prevention, C. f. D. C. a. Pneumococcal Vaccination, <<https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/index.html>> 20
4. Pace, D. Glycoconjugate vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 13, 11-33, doi:10.1517/14712598.2012.725718 (2013).
5. Vella, M. & Pace, D. Glycoconjugate vaccines: an update. *Expert Opin Biol Ther* 15, 529-546, doi:10.1517/14712598.2015.993375 (2015).
6. Pollard, A. J., Perrett, K. P. & Beverley, P. C. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. *Nat Rev Immunol* 9, 213-220, doi:10.1038/nri2494 (2009). 30
7. Avci, F. Y., Li, X., Tsuji, M. & Kasper, D. L. A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design. *Nat Med* 17, 1602-1609, doi:10.1038/nm.2535 (2011).
8. Package Insert - Prevnar 13 - FDA, <<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM201669.pdf>> 40
9. Prevention, C. f. D. C. a. Vaccines for Children Program (VFC), <<https://www.cdc.gov/vaccines/programs/vfc/awardees/vaccine-management/price-list/index.html>> (2018).
10. Pfizer Inc. 2017 Financial Report, <<https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/> 50

- 78003/000007800318000027/pfe-exhibit13x12312017x10k.htm> (2018).
11. Frascch, C. E. Preparation of bacterial polysaccharide-protein conjugates: analytical and manufacturing challenges. *Vaccine* 27, 6468-6470, doi:10.1016/j.vaccine.2009.06.013 (2009).
12. Huttner, A. & Gambillara, V. The development and early clinical testing of the ExPEC4V conjugate vaccine against uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*, doi:10.1016/j.cmi.2018.05.009 (2018). 10
13. Huttner, A. et al. Safety, immunogenicity, and preliminary clinical efficacy of a vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in women with a history of recurrent urinary tract infection: a randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1b trial. *Lancet Infect Dis* 17, 528-537, doi:10.1016/S1473-3099(17)30108-1 (2017). 20
14. Riddle, M. S. et al. Safety and Immunogenicity of a Candidate Bioconjugate Vaccine against *Shigella flexneri* 2a Administered to Healthy Adults: a Single-Blind, Randomized Phase I Study. *Clin Vaccine Immunol* 23, 908-917, doi:10.1128/CVI.00224-16 (2016).
15. Apweiler, R., Hermjakob, H. & Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473, 4-8 (1999). 30
16. Nothhaft, H. & Szymanski, C. M. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat Rev Microbiol* 8, 765-778, doi:10.1038/nrmicro2383 (2010).
17. Iwashkiw, J. A., Vozza, N. F., KinSELLA, R. L. & Feldman, M. F. Pour some sugar on it: the expanding world of bacterial protein O-linked glycosylation. *Mol Microbiol* 89, 14-28, doi:10.1111/mmi.12265 (2013). 40
18. Ciocchini, A. E. et al. A bacterial engineered glycoprotein as a novel antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *Vet Microbiol* 172, 455-465, doi:10.1016/j.vetmic.2014.04.014 (2014).
19. Garcia-Quintanilla, F., Iwashkiw, J. 50

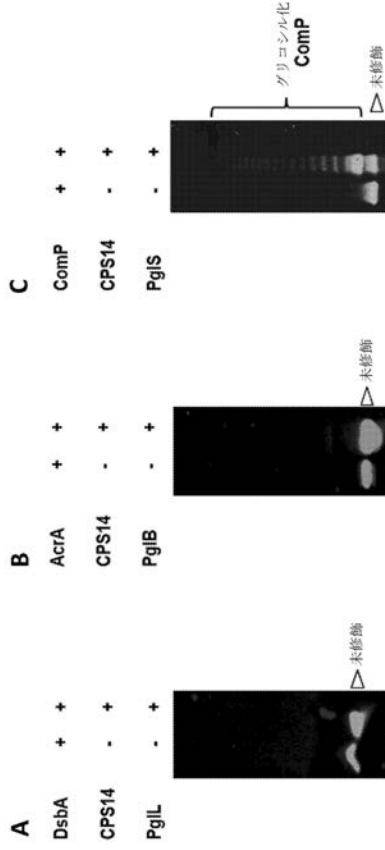
- A., Price, N. L., Stratilo, C. & Feldman, M. F. Production of a recombinant vaccine candidate against *Burkholderia pseudomallei* exploiting the bacterial N-glycosylation machinery. *Front Microbiol* 5, 381, doi:10.3389/fmicb.2014.00381 (2014).
20. Iwashkiw, J. A. et al. Exploiting the *Campylobacter jejuni* protein glycosylation system for glycoengineering vaccines and diagnostic tools directed against brucellosis. *Microb Cell Fact* 11, 13, doi:10.1186/1475-2859-11-13 (2012). 10
21. Wacker, M. et al. Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7088-7093, doi:10.1073/pnas.0509207103 (2006).
22. Feldman, M. F. et al. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3016-3021, doi:10.1073/pnas.0500044102 (2005). 20
23. Faridmoayer, A., Fentabil, M. A., Mills, D. C., Klassen, J. S. & Feldman, M. F. Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in O-linked protein glycosylation. *J Bacteriol* 189, 8088-8098, doi:10.1128/JB.01318-07 (2007). 30
24. Geno, K. A. et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev* 28, 871-899, doi:10.1128/CMR.00024-15 (2015).
25. Ihssen, J. et al. Increased efficiency of *Campylobacter jejuni* N-oligosaccharyltransferase PglB by structure-guided engineering. *Open Biol* 5, 140227, doi:10.1098/rsob.140227 (2015). 40
26. Pan, C. et al. Biosynthesis of Conjugate Vaccines Using an O-Linked Glycosylation System. *MBio* 7, e00443-00416, doi:10.1128/mBio.00443-16 (2016).
27. Wacker, M. et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 298, 1790-1793, doi:10.1126/science.298.5599.1790 (2002). 50

28. Vik, A. et al. Broad spectrum O-linked protein glycosylation in the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4447-4452, doi:10.1073/pnas.0809504106 (2009).
29. Harding, C. M. et al. *Acinetobacter* strains carry two functional oligosaccharyltransferases, one devoted exclusively to type IV pilin, and the other one dedicated to O-glycosylation of multiple proteins. *Mol Microbiol* 96, 1023-1041, doi:10.1111/mmi.12986 (2015). 10
30. Pan, Y. J. et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep* 5, 15573, doi:10.1038/srep15573 (2015).
31. Kovach, M. E. et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175-176 (1995). 20
32. Wu, K. M. et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J Bacteriol* 191, 4492-4501, doi:10.1128/JB.00315-09 (2009).
33. Lery, L. M. et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biol* 12, 41, doi:10.1186/1741-7007-12-41 (2014). 30
34. Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R. & Linn, T. A set of compatible tac promoter expression vectors. *Gene* 177, 133-136 (1996).
35. Arakawa, Y. et al. Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *rmpA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2). *Infect Immun* 59, 2043-2050 (1991). 40
36. Yeh, K. M. et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J Clin Microbiol* 45, 466- 50

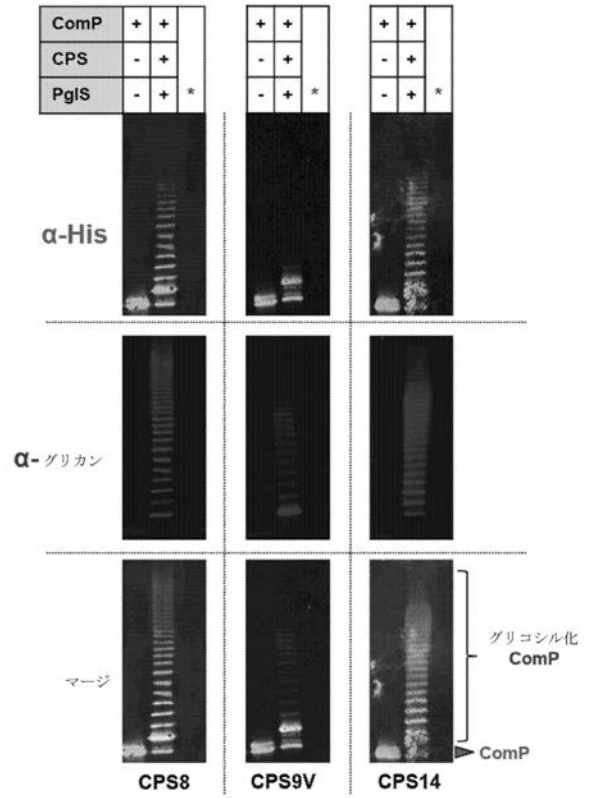
- 471, doi:10.1128/JCM.01150-06 (2007).
37. Kowarik, M. et al. Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *EMBO J* 25, 1957-1966, doi:10.1038/sj.emboj.7601087 (2006).
38. Comer, J. E., Marshall, M. A., Blanch, V. J., Deal, C. D. & Castric, P. Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycosylation site. *Infect Immun* 70, 2837-2845 (2002). 10
39. Scott, N. E. et al. Diversity within the O-linked protein glycosylation systems of acinetobacter species. *Mol Cell Proteomics* 13, 2354-2370, doi:10.1074/mcp.M114.038315 (2014).
40. Schwarz, F. et al. A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nat Chem Biol* 6, 264-266, doi:10.1038/nchembio.314 (2010). 20
41. Porstendorfer, D., Drotschmann, U. & Averhoff, B. A novel competence gene, *compP*, is essential for natural transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413. *Appl Environ Microbiol* 63, 4150-4157 (1997).
42. Giltner, C. L., Nguyen, Y. & Burrows, L. L. Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 740-772, doi:10.1128/MMBR.00035-12 (2012). 30
43. Pelicic, V. Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* 68, 827-837, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06197.x (2008).
44. Malik, A. Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of *E. coli*. *3 Biotech* 6, 44, doi:10.1007/s13205-016-0397-7 (2016).
45. Ravenscroft, N. et al. Purification and characterization of a *Shigella* conjugate vaccine, produced by glycoengineering *Escherichia coli*. *Glycobiology* 26, 51-62, doi:10.1093/glycob/cwv077 (2016). 40
46. Schulz, B. L. et al. Identification of bacterial protein O-oligosaccharyltransferases and their glycoprotein substrates. *PLoS One* 8, e62768, doi:10.1371/journal.pone.0062768 (2013).
47. Castric, P. *pilO*, a gene required fo 50

- r glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin. *Microbiology* 141 ( Pt 5 ), 1247-1254, doi:10.1099/13500872-141-5-1247 (1995).
48. Power, P. M. et al. Genetic characterization of pilin glycosylation and phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 49, 833-847 (2003).
49. Stimson, E. et al. Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol Microbiol* 17, 1201-1214 (1995).
50. Ishihama, Y., Rappsilber, J. & Mann, M. Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional Peptide fractionation in proteomics. *J Proteome Res* 5, 988-994, doi:10.1021/pr050385q (2006).
51. Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature protocols* 2, 1896-1906, doi:10.1038/nprot.2007.261 (2007).
52. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 11, 601, doi:10.1002/bms.1200111109 (1984).
53. Haurat, M. F. et al. Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *J Biol Chem* 286, 1269-1276, doi:10.1074/jbc.M110.185744 (2011).
54. Price, N. L. et al. Glycoengineered Outer Membrane Vesicles: A Novel Platform for Bacterial Vaccines. *Sci Rep* 6, 24931, doi:10.1038/srep24931 (2016).
55. Kay, E. J., Yates, L. E., Terra, V. S., Cuccui, J. & Wren, B. W. Recombinant expression of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Open Biol* 6, 150243, doi:10.1098/rsob.150243 (2016).

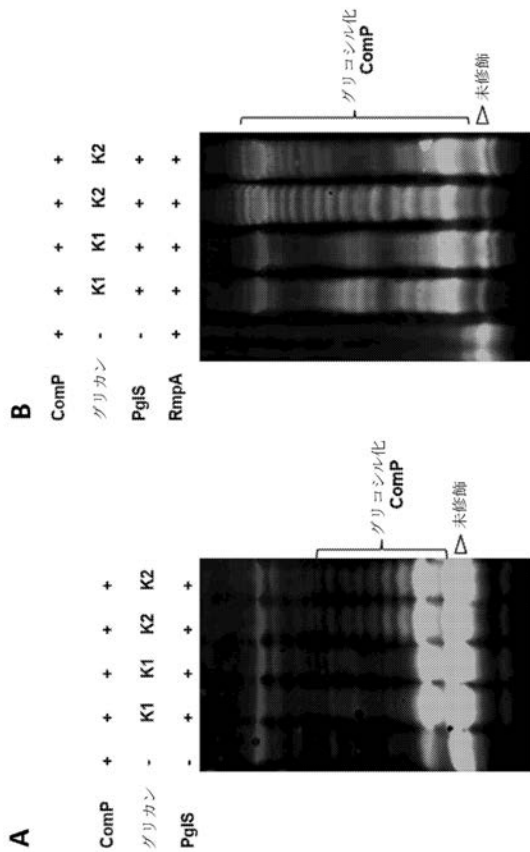
【 図 1 】



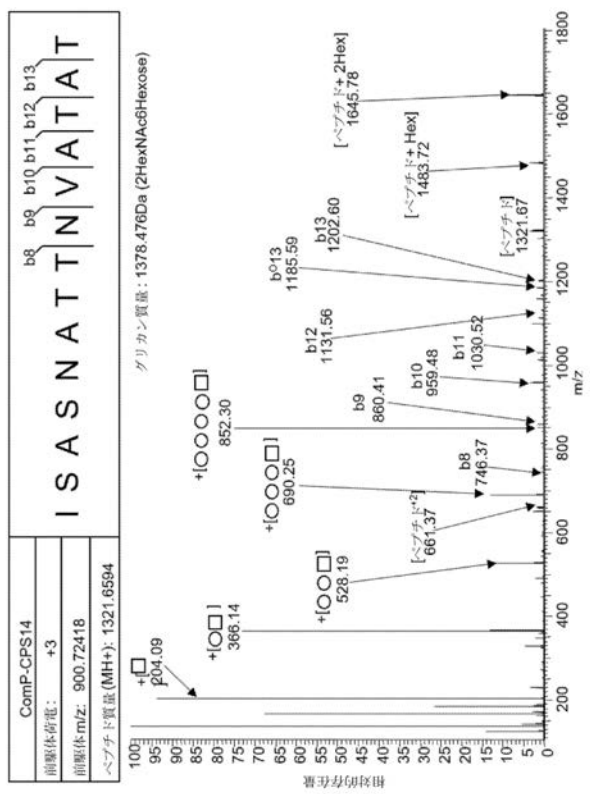
【 図 2 】



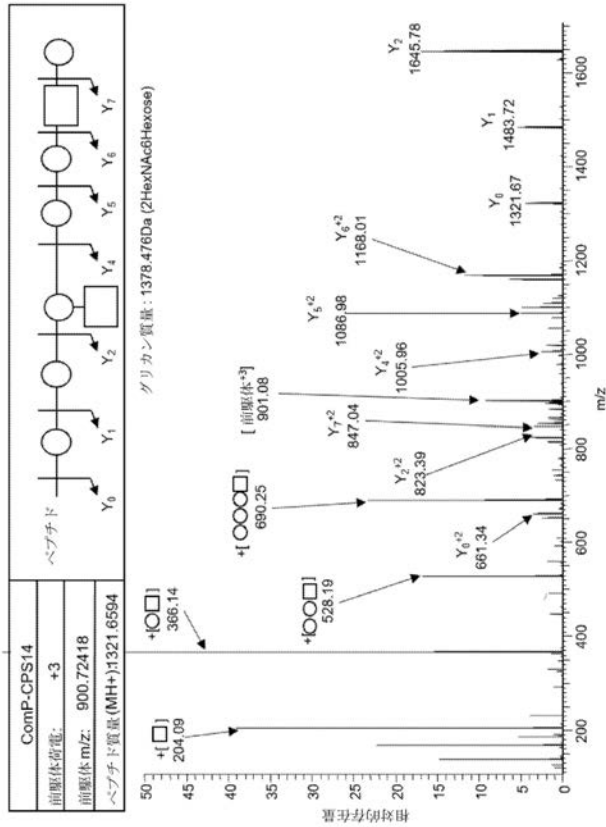
【 図 3 】



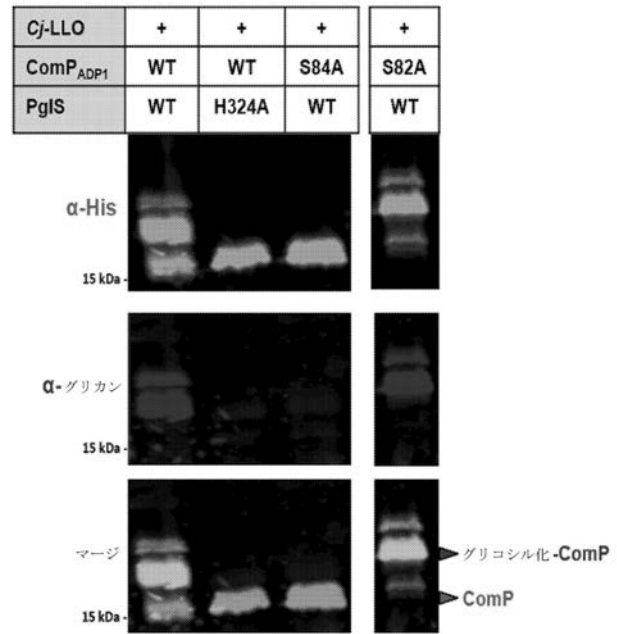
【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 図 5 】



【 図 6 - 1 】

>AAC45886.1 ComP [*Acinetobacter* sp. ADP1]  
MNAQKGFTLIELMIVIAIIGILAAIAIPAYTDYTVRR  
VSEGLTAASSMKTTVSENILNAGALVAGTGPSTAG  
SSCVGVQEISASNATTNVATATCGASSAGQIIVTM  
DTTKAKGANITLPTPYASGAVTWKCTTTSDKKYV  
PSECRG (配列番号1)

>ENV58402.1 仮想タンパク質 F951\_00736  
[*Acinetobacter soli* CIP 110264]  
MNAQKGFTLIELMIVIAIIGILAAIAIPAYTDYTVRSR  
VTEGLTTASAMKATVSENIMNAGGTSMPSSGNC  
TGVTQIASGASAATTNVASAQCSDSDGVITVTMT  
DKAKGVSIKLTSPFSSTGSVWGWKCTTSSDKKYV  
PSECRGT (配列番号2)

>APV36638.1 コンピテンスタンパク質 [*Acinetobacter soli* GFJ-2]  
MNAQKGFTLIELMIVIAIIGILAAIAIPAYTDYTVRR  
VSEGLTTASAMKATVSENILSAGQIVTGPSTANS  
SCVGVQEINASSSTSNVATATCSGLGVITVTMDS  
TKAKGVNLTPTTYTTSNAVTWKCTTTSDKKYV  
SECRN (配列番号3)

【 図 6 - 2 】

>PKD82822.1 コンピテンスタンパク質 [*Acinetobacter radioresistens* 50v1]  
MNTQKGFTLIELMIVIAIIGILAAIAIPAYTDYTVRR  
VTEAVSTASSMKATVSENIMNAGGTQIPTSGNCV  
GVQTIAASNAKKNVATATCTDSTGVIVVTTTPAAK  
SVPLTLPTTYTGGNVKWACSTTANFKNYVPSEC  
RS (配列番号4)

>SNX44537.1 IV型線毛集合タンパク質 PilA  
[*Acinetobacter puyangensis* ANC 4466]  
MNAQKGFTLIELMIVIAIIGILAAIAIPAYTDYTVRR  
VTEALTTASAMKATVSENIMSAGGTTIASSACNG  
VISASATTNVASSACSGSGVISVTTTAAAKGIVLTL  
TPKYTGGNVAWQCTTTSGDAQKYVPSECRRTS  
(配列番号5)

>OAL75955.1 コンピテンスタンパク質 [*Acinetobacter* sp. SFC]  
MNTQKGFTLIELMIVIAIIGILAAIAIPAYTDYTVRAK  
VTEAISTASAMKATVSENILMSAGGTSIVSTNANC  
AGVETIGASNKTKNVESAACATAATGVILVTTTAAEA  
KSVPLTLKPTTYTGSNVQWKCGTTAAAFKYVPSE  
CRNDSSGTGF (配列番号6)



【 図 1 1 - 1 】



>DsbA-GGGS-ComP $\Delta$ 28<sup>110264</sup>-His  
 MKKIWLALAGLVLAFAASAAQYEDGKQYTTLEKQV  
 GAPQVLEFFSFFCPHCYQFEEVLHISDNVKKLPEGV  
 KMTKYHVNFMGGDLGKDLTQAWAVAMALGVEDKVT  
 VPLFEGVQKTQTIRSASDIRDVFINAGIKGEEYDAAWN  
 SFVVKSLVAQKEAAAADVQLRGVPAMFVNGKYQLNP  
 QGMDTSMNDVVFQQYADTVKYLSEKKGGGSAYTDY  
 TVRSRVTEGLTTASAMKATVSENIMNAGGTSMPSSG  
 NCTGVTQIASGASAATTNVAQAQSDSDGVITVTMTD  
 KAKGVSIKLTPSFSSTGSVGWKCTTSSDKKYVPSECR  
 GTHHHHHH (配列番号18)

レジェンド

- DsbA – チオールジスルフィドオキシドレダクターゼタンパク質 (*dsbA* 遺伝子)
- MBP – マルトース結合タンパク質 (*malE* 遺伝子)
- DsbA<sub>sp</sub> – DsbA のシグナル配列 (最初の 19 アミノ酸)
- EPA – *Pseudomonas aeruginosa* 由来の外毒素 A
- AAA – トリプルアラニンリンカー
- GGGS – グリシン-グリシン-グリシン-セリンリンカー
- ComP $\Delta$ 28<sup>110264</sup> – 最初の 28 アミノ酸を有さない *A. soli* CIP 110264 由来の ComP
- His – ヘキサヒスチジンタグ

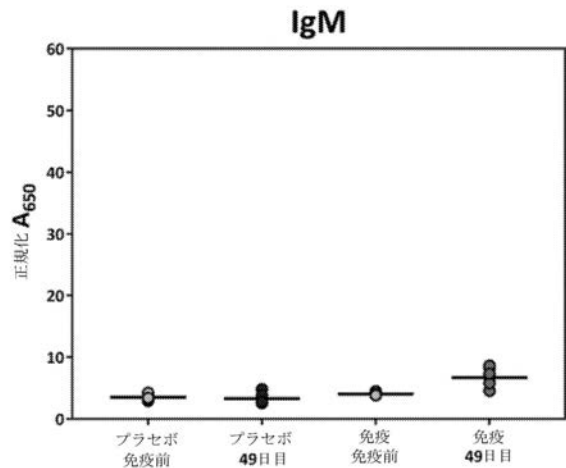
【 図 1 1 - 2 】

>MBP-AAA-ComP $\Delta$ 28<sup>110264</sup>-His  
 MKIKTGARILALSALTMMFSAALAKIEEGKLIWIWING  
 DKGYNGLAEVGGKFEKDTGKIVTVEHPDKLEEKFPQV  
 AATGDGPDIIFWAHDHFRGGYAQSGLLAEITPKAFQD  
 KLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPP  
 KTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAA  
 DGGYAFKYENGGYDIKDVGVNDAGAKGLTFLVDLIK  
 NKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDT  
 SKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKE  
 LAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYYEEL  
 AKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVIN  
 AASGRQTVDEALKDAQTNAAAAYTDYTVRSRVTEGL  
 TTASAMKATVSENIMNAGGTSMPSSGCTGVTQIASG  
 ASAATTNVAQAQSDSDGVITVTMTDKAKGVSIKLTPS  
 FSSTGSVGWKCTTSSDKKYVPSECRGTHHHHHH  
 (配列番号19)

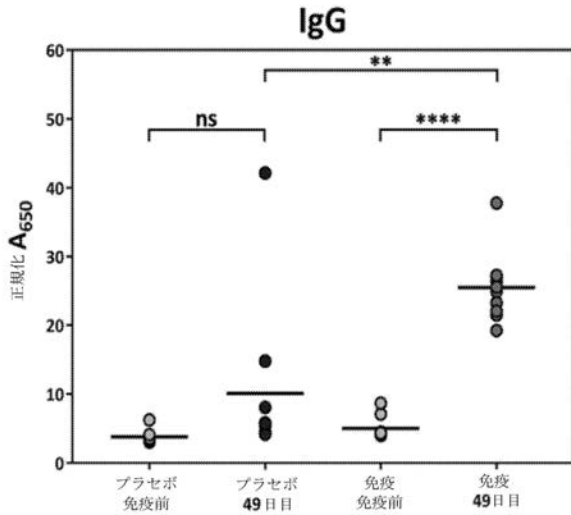
【 図 1 1 - 3 】

>DsbA<sub>sp</sub>-EPA-GGGS-ComP $\Delta$ 28<sup>110264</sup>-His  
 MKKIWLALAGLVLAFAASAAEEAFDLWNECAKACVL  
 DLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQGVLYHYSMVLEGGN  
 DALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTR  
 QARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSH  
 MSPYIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTL  
 AISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLD  
 PLDGVYNYLAQQRCLNDDTWEGKIYRVLAGNPAKH  
 LDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTR  
 HRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVD  
 QVIRNALASPGSGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAE  
 SERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGP  
 ADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDISFSTRGTQNW  
 VERLLQAHRQLEERGYVVFVGYHGTFLEAAQSIVFGG  
 RARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARG  
 RIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTGLTLAAPEAAAGEVE  
 RLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLTILGWPLAERTVIP  
 SAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGK  
 PPREDLKGGSAYTDYTVRSRVTEGLTTASAMKATVS  
 ENIMNAGGTSMPSSGCTGVTQIASGASAATTNVAQA  
 QSDSDGVITVTMTDKAKGVSIKLTPSFSSTGSVGWK  
 CTTSSDKKYVPSECRGTHHHHHH (配列番号20)

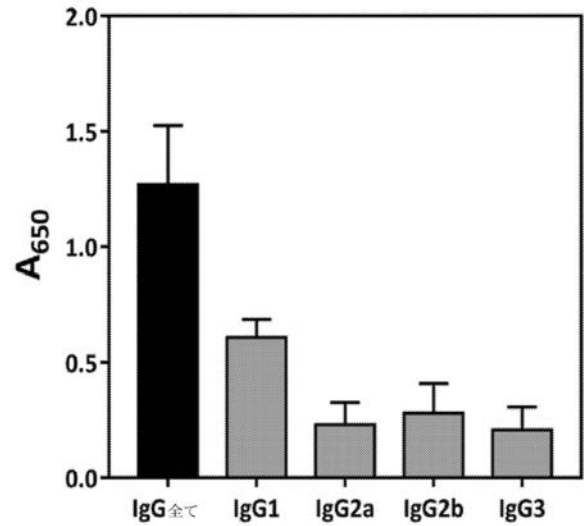
【 図 1 2 A 】



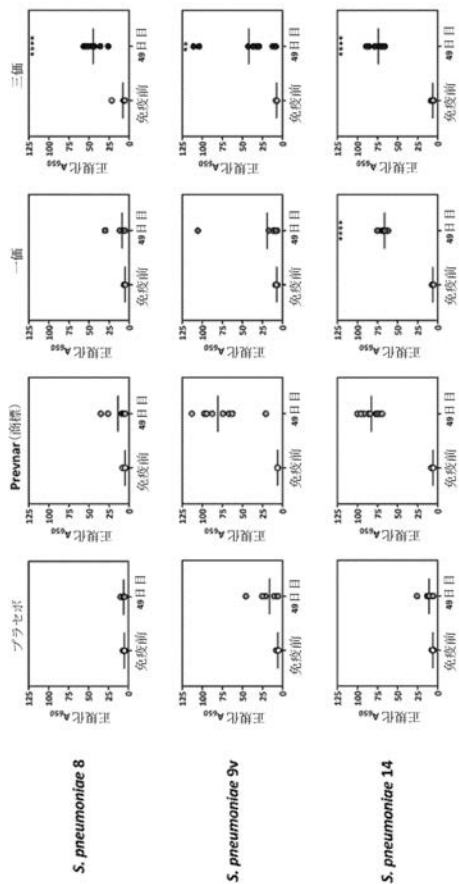
【 図 1 2 B 】



【 図 1 2 C 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 - 1 】

>AAC45886.1 ComPΔ28 [*Acinetobacter* sp. ADP1]  
 AYTDYTVR~~ARV~~SEGLTAASSMKTTVSENILNAGA  
 LVAGT~~P~~STAGSSCVGVQ~~E~~ISAS~~N~~ATTNVATATCG  
 ASSAGQIIIVTMDTTKAKGANITLPT~~Y~~ASGAVTWK  
 CTTTSDKKYVPSECRG (配列番号7)

>ENV58402.1 仮想タンパク質 F951\_00736  
 Δ28 [*Acinetobacter* *sol*i CIP 110264]  
 AYTDYTVR~~SRV~~TEGLTTASAMKATVSENIMNAGG  
 TSM~~P~~SSGNCTGVTQIASGASAATTNVASAQCSD  
 SDGVITVTMTDKAKGVSIKLT~~P~~SFSSSTG~~S~~VGWKC  
 TTSSDKKYVPSECRGT (配列番号8)

>APV36638.1 コンピテンスタンパク質 Δ28  
 [*Acinetobacter* *sol*i GFJ-2]  
 AYTDYTVR~~ARV~~SEGLTTASAMKATVSENILSAGQI  
 VTG~~T~~PSTANSSCVGVQ~~E~~INASSSTSNVATATCSG  
 LGVITVTMDSTKAKGVNLT~~L~~TPT~~Y~~TTSNAVTWKC  
 TTTSDKKYVPSECRN (配列番号9)

【 図 1 4 - 2 】

>PKD82822.1 コンピテンスタンパク質 Δ28  
 [Acinetobacter radioresistens 50v1]  
 AYTDYTVRARVTEAVSTASSMKATVSENIMNAGG  
 TQIPTSGNCGVGVQTTIAASNATKNVATATCTDSTG  
 VIVVTTTTPAAKSVPLTLTPTYTGGNVKWACSTTA  
 NFKNYVPSECRS (配列番号10)

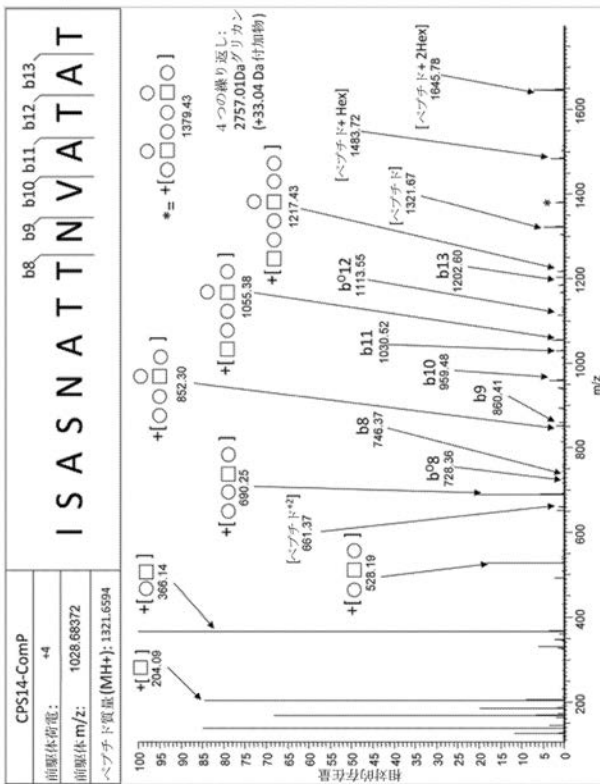
>SNX44537.1 IV型線毛集合タンパク質 PilA  
 Δ28 [Acinetobacter puyangensis ANC 4466]  
 AYTDYTVRARVTEALTTASAMKATVSENIMSAGG  
 TTIASSACNGVISASATTNVASSACSGSGVISVTT  
 TAAAKGIVLTLTPKYTGGNVAWQCCTTSGDAQKY  
 VPSECRSTS (配列番号 11)

>OAL75955.1 コンピテンスタンパク質 Δ28  
 [Acinetobacter sp. SFC]  
 AYTDYTVRAKVTEAISTASAMKATVSENILMSAGG  
 TSIVSTNANCAGVETIGASNKTKNVESAATAAT  
 GVILVTTTAEAKSVPLTLKPTYTGSNVQWKCGTT  
 AAFAKYVPSECRNDSSSGTGF (配列番号 12)

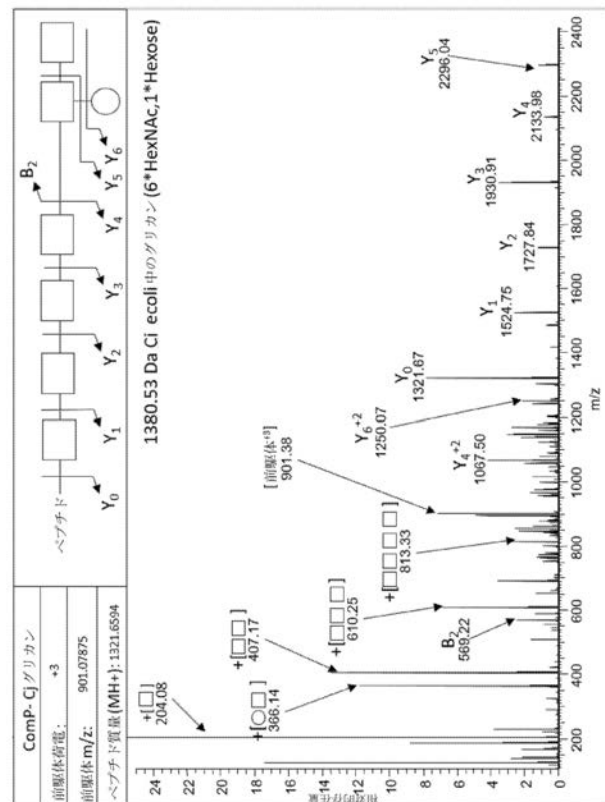
【 図 1 5 】

ADP1 CVGVQVEIS--ASNATTNVATATC (配列番号 13)  
 110264 CTGVTQIASGASAAATNVASAQC (配列番号 14)  
 GFJ\_2 CVGVQVEIN--ASSSTSNVATATC (配列番号 15)  
 SFC CAGVETIG--ASNKTKNYESAAC (配列番号 16)  
 P50v1 CVGVQVTIA--ASNATKNVATATC (配列番号 17)

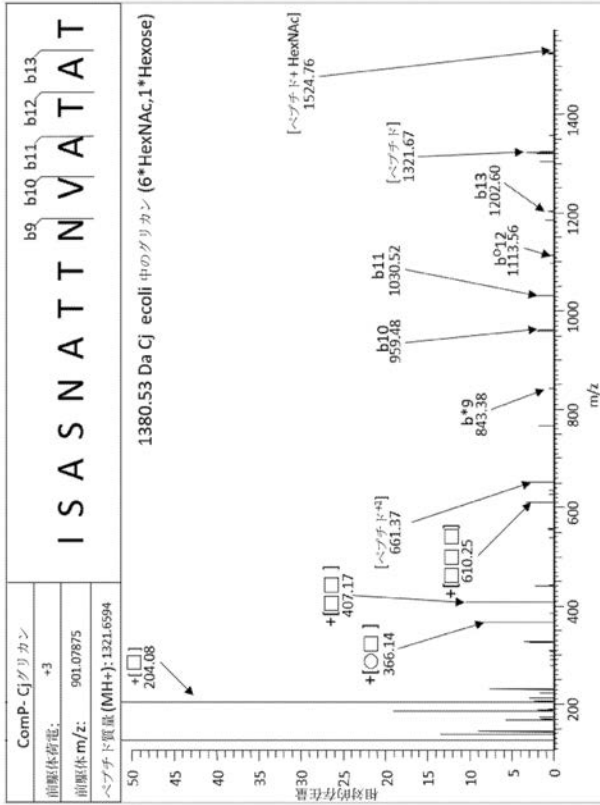
【 図 1 6 】



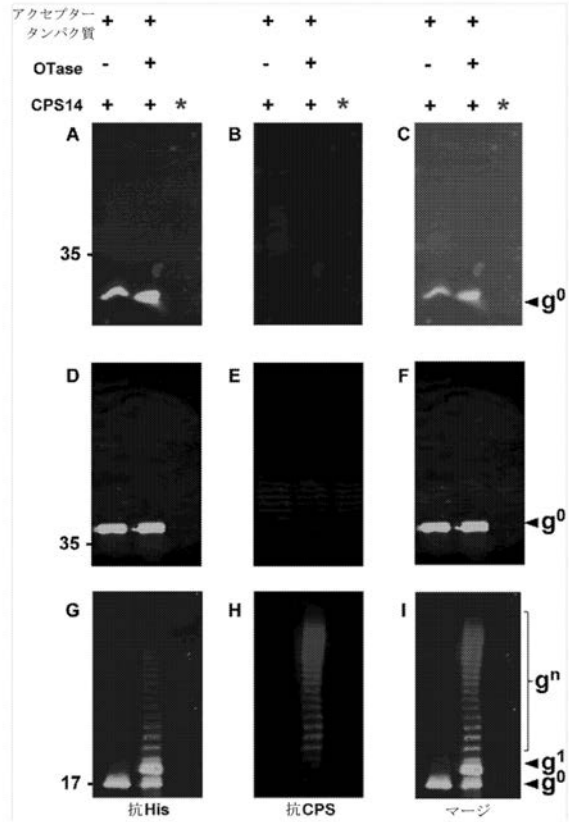
【 図 1 7 】



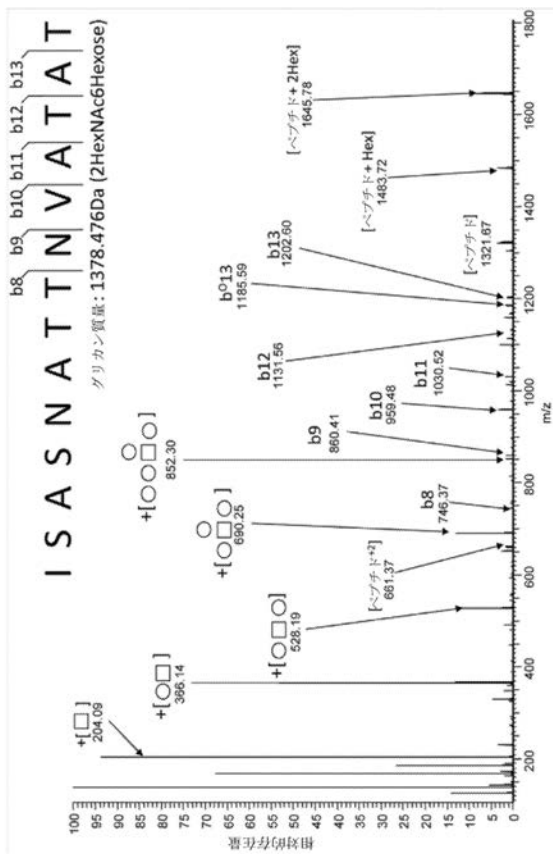
【 図 1 8 】



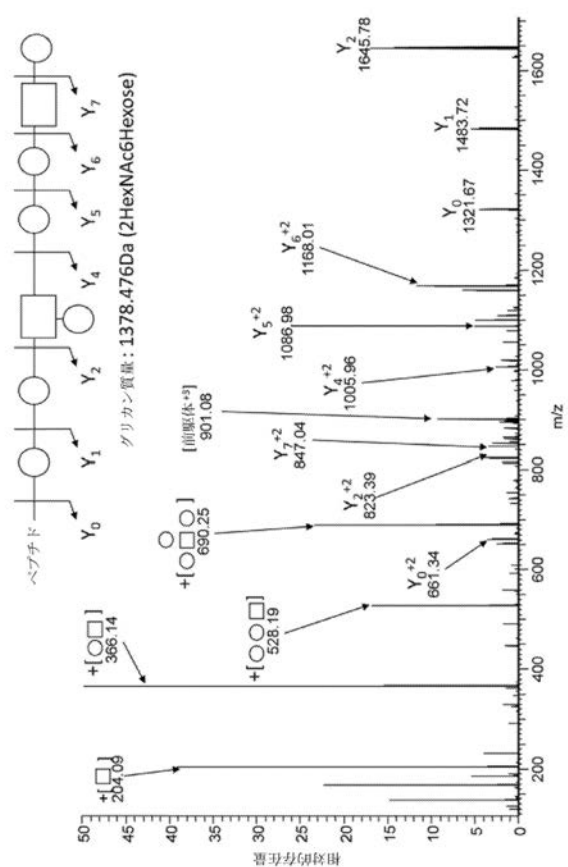
【 図 1 9 】



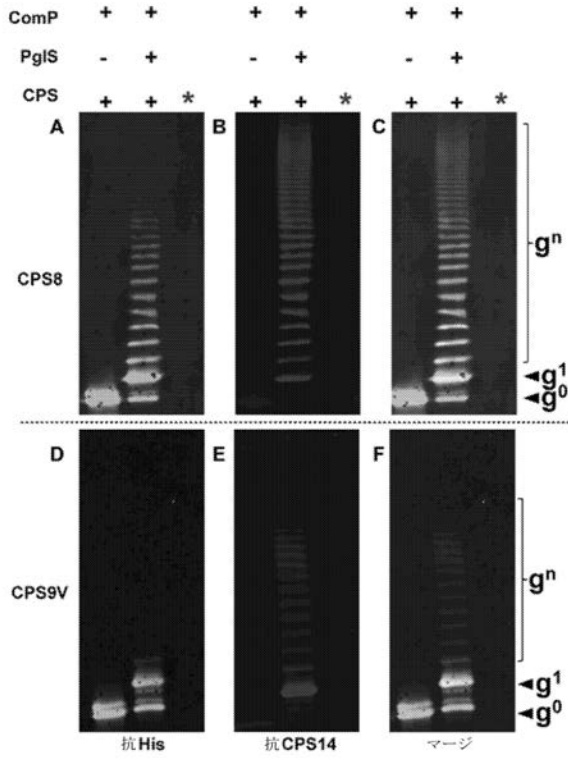
【 図 2 0 A 】



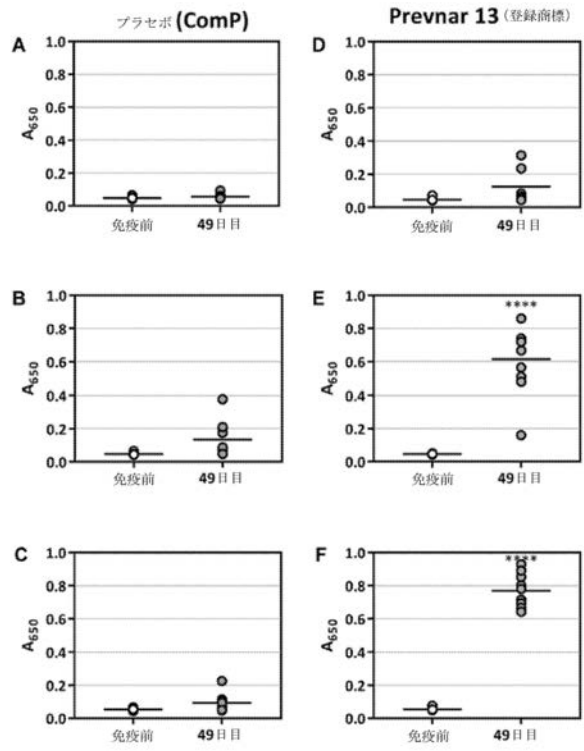
【 図 2 0 B 】



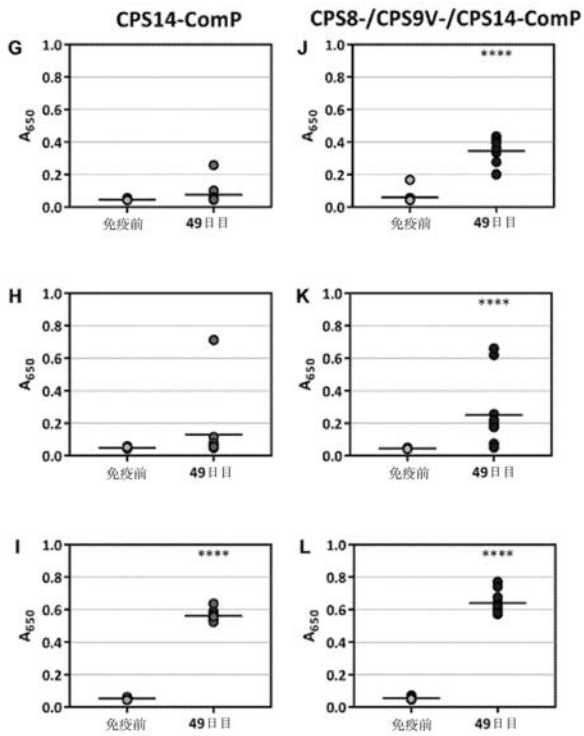
【 図 2 1 】



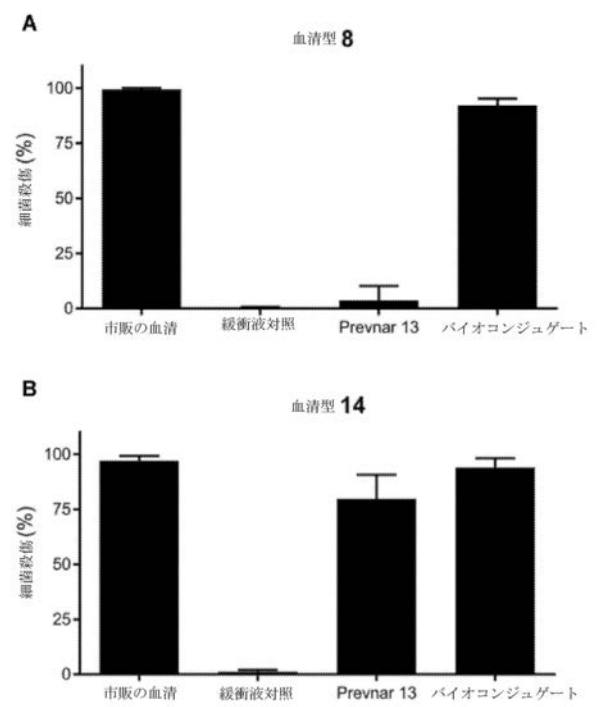
【 図 2 2 - 1 】



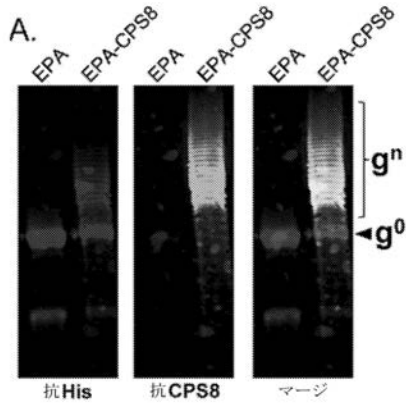
【 図 2 2 - 2 】



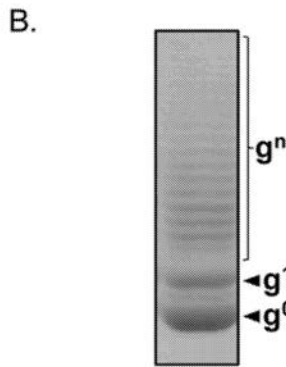
【 図 2 3 】



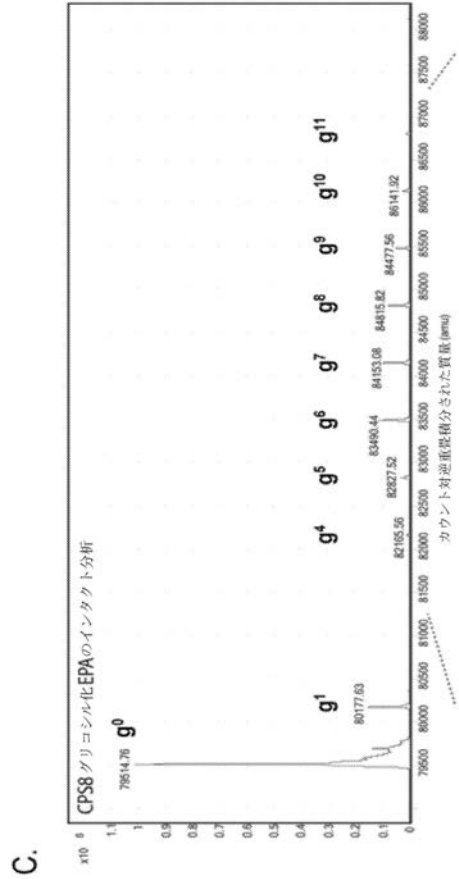
【 図 2 4 A 】



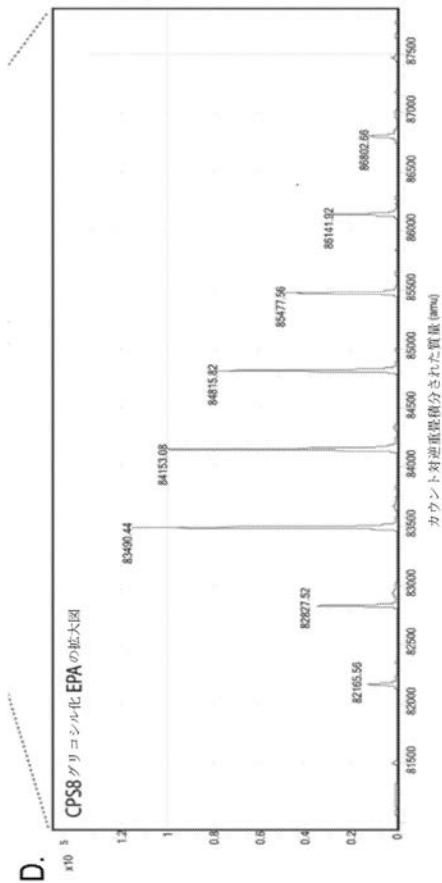
【 図 2 4 B 】



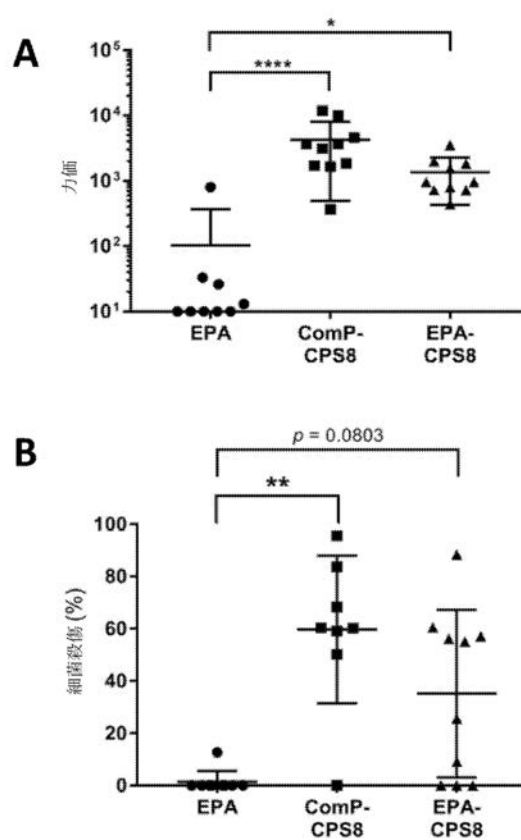
【 図 2 4 C 】



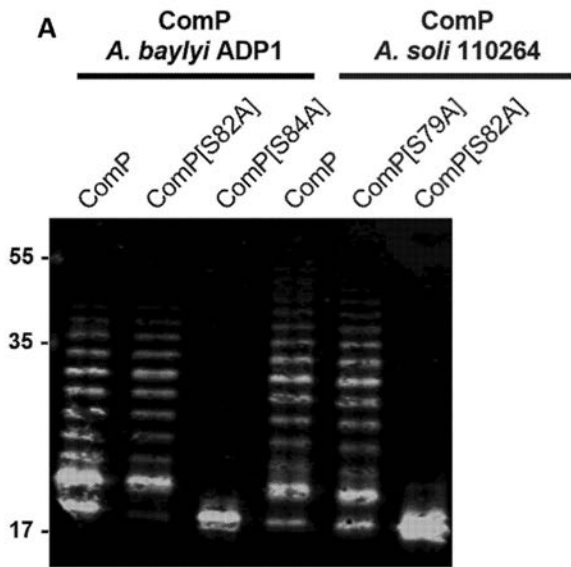
【 図 2 4 D 】



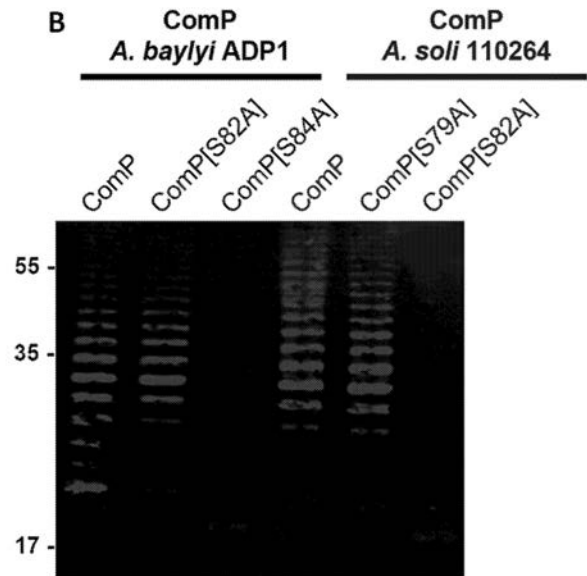
【 図 2 5 】



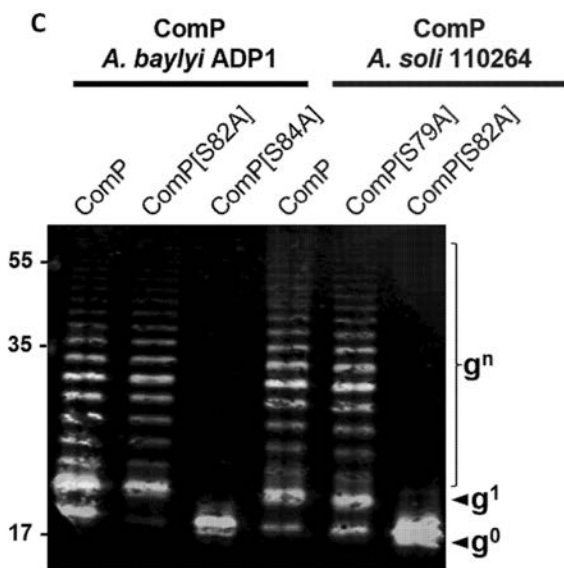
【 図 2 6 A 】



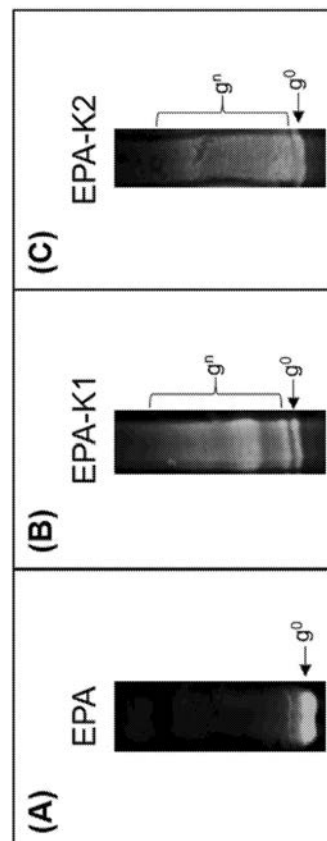
【 図 2 6 B 】



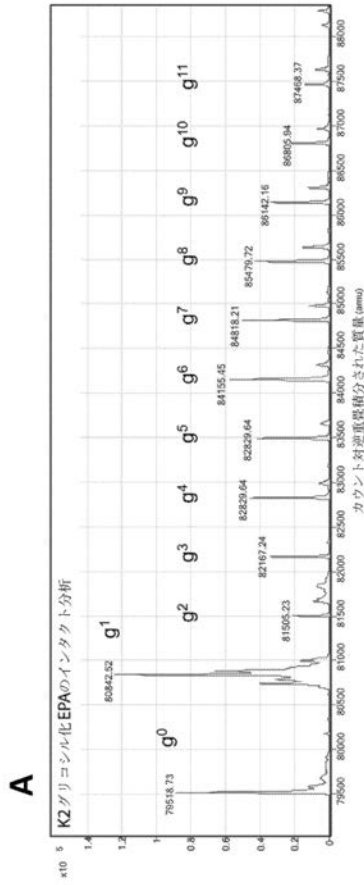
【 図 2 6 C 】



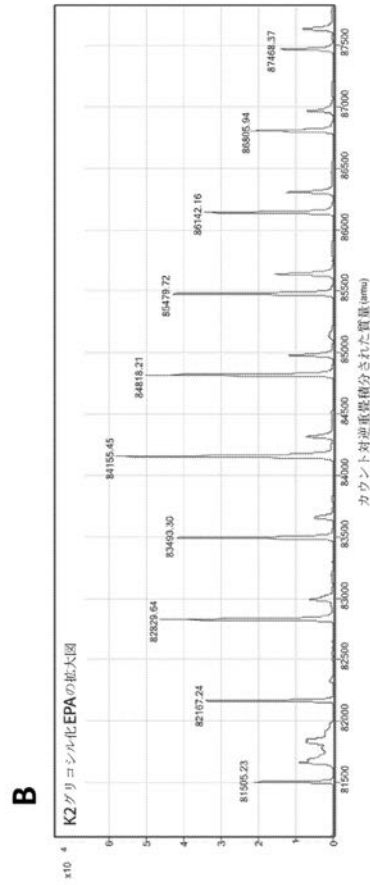
【 図 2 7 】



【 図 2 8 A 】



【 図 2 8 B 】



【 配 列 表 】

2021528059000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/37251

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - A61K 38/02, 39/02, 39/02; A61P 31/04, C07K 14/195, 19/00; C12N 9/10; C12P 21/00 (2019.01)		
CPC - A61K 38/02, 38/164, 39/02, 39/09, 39/092; A61P 31/04, 37/04; C07K 14/195, 14/212, 19/00; C12N 9/1048; C12P 21/005		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - A	WO 2016/134485 A1 (VAXALTA INC.) 1 September 2016; abstract; paragraphs [0004], [0006], [0011], [0012], [0014], [0024], [0025], [0046], [0048], [0050], [0087], [00127], [00138], [00139], [00146]; claims 1-2	1, 52, 56/52, 57/56/52, 58/57/56/52, 63-64, 65/63-64  2, 3/1-2, 29-30, 40, 53-55, 56/53-54, 57/56/53-54, 58/57/56/53-54
A	(PORSTENDOERFER, D et al.) ComP [Acinetobacter baylyi]. GenBank entry (online). National Center for Biotechnology Information. 27 September 1999 [retrieved on 25 November 2019]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC45886">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC45886</a> >; page 1	2, 3/1-2, 29-30, 40, 53-55, 56/53-54, 57/56/53-54, 58/57/56/53-54
A	(HARDING, CM et al.) Acinetobacter strains carry two functional oligosaccharyltransferases, one devoted exclusively to type IV pilin, and the other one dedicated to O-glycosylation of multiple proteins. Molecular Microbiology. June 2015, Epub6 April 2015, Vol. 96, No. 5; pages 1023-1041; DOI: 10.1111/mmi.12986	2, 3/1-2, 29-30, 40
A	(CERQUEIRA, G et al.) Hypothetical protein F951_00736 [Acinetobacter soli CIP 110264]. GenBank entry (online). National Center for Biotechnology Information. 16 April 2013 [retrieved on 25 November 2019]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ENV58402.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ENV58402.1</a> >; page 1	53-55, 56/53-54, 57/56/53-54, 58/57/56/53-54
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"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	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"D" document cited by the applicant in the international application	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"&" document member of the same patent family	
"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		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
27 November 2019 (27.11.2019)	<b>23 DEC 2019</b>	
Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer	
Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Shane Thomas	
	Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/37251

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	(SCHULZ, BL et al.) Identification of Bacterial Protein O-Oligosaccharyltransferases and Their Glycoprotein Substrates. PLoS One. 3 May 2013, Vol. 8, No. 5; pages 1-11; DOI:10.1371/journal.pone.0062768	1-2, 3/1-2, 29-30, 40, 52-55, 56/52-54, 57/56/52-54, 58/57/56/52-54, 63-64, 65/63-64
A	(PORSTENDORFER, D et al.) A Novel Competence Gene, <i>comP</i> , Is Essential for Natural Transformation of <i>Acinetobacter</i> sp. Strain BD413. Applied and Environmental Microbiology. November 1997, Vol. 63, No. 11; pages 4150-4157	1-2, 3/1-2, 29-30, 40, 52-55, 56/52-54, 57/56/52-54, 58/57/56/52-54, 63-64, 65/63-64

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/37251

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 4-28, 31-39, 41-51, 59-62, 66-80  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-3, 29-30, 40, 52-58, 63-65, SEQ ID NO: 7 (ComP protein) and PglS110264 (PglS OTase) are directed toward glycosylated ComP proteins, fragments and fusion proteins thereof, and methods of making, for example, for use in the production of conjugate vaccines.

\*\*\*-Continued on supplemental page-\*\*\*

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-3, 29-30, 40, 52-58, 63-65, SEQ ID NO: 7 (ComP protein) and PglS110264 (PglS OTase)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/37251

.-\*\*.-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking.-\*\*.

The proteins and methods will be searched to the extent that they encompass a ComP protein comprising SEQ ID NO: 7 (first exemplary ComP protein) and PglS110264 (first exemplary PglS OTase). Applicant is invited to elect additional protein(s) and/or OTase(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional protein(s) and/or OTase(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-2, 3 (In-part), 29-30, 40, 52, 53-58 (each in-part), and 63-65 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a ComP protein comprising SEQ ID NO: 7 (ComP protein) and PglS110264 (PglS OTase). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected protein(s) and/or OTase(s). Applicants must further indicate, if applicable, the searchable claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "\*" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 8 (ComP protein) and PglSADP1 (PglS OTase).

No technical features are shared between the protein(s) and/or OTase(s) of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a bioconjugate comprising an oligo- or polysaccharide covalently linked to a fusion protein, wherein the fusion protein comprises a ComP protein (ComP) or a glycosylation tag fragment thereof; a ComP glycosylation tag comprising an isolated fragment of a ComP protein, wherein the fragment comprises a serine residue corresponding to the conserved serine residue at position 84 in SEQ ID NO: 1 (ComPAoP1: AAC45886.1); a method of in vivo conjugation of an oligo- or polysaccharide to an acceptor polypeptide, the method comprising covalently linking the oligo- or polysaccharide to the acceptor polypeptide with a PglS oligosaccharyltransferase (OTase), wherein the acceptor polypeptide comprises a ComP protein or a glycosylation tag fragment thereof; optionally wherein the ComP protein or glycosylation tag fragment thereof is linked to a heterologous carrier protein; a host cell comprising (a) a genetic cluster encoding for the proteins required to synthesize an oligo- or polysaccharide; (b) a PglS OTase; and (3) an acceptor polypeptide comprising a ComP protein or a glycosylation tag fragment thereof; these shared technical features are previously disclosed by WO 2016/134485 A1 (VAXALTA INC.) (hereinafter 'Vaxalta') in view of the publication entitled 'ComP [Acinetobacter baylyi]: GenBank: AAC45886.1' by GenBank (hereinafter 'GenBank').

Vaxalta discloses a bioconjugate comprising an oligo- or polysaccharide covalently linked to a fusion protein (a bioconjugate comprising an oligo- or polysaccharide covalently linked to a fusion protein; paragraph [0014]; claims 1-2), wherein the fusion protein comprises a ComP protein (ComP) (paragraph [0011]; claims 1-2) or a glycosylation tag fragment thereof; a ComP glycosylation tag comprising an isolated fragment of a ComP protein (ComP or fragment of ComP carrying a glycosylation site (tag); paragraph [0014]; a method of in vivo conjugation of an oligo- or polysaccharide to an acceptor polypeptide (a method of in vivo conjugation of an oligo- or polysaccharide to an acceptor polypeptide; paragraphs [0011], [0050]), the method comprising covalently linking the oligo- or polysaccharide to the acceptor polypeptide with a PglS oligosaccharyltransferase (OTase) (method comprising covalently linking the oligo- or polysaccharide to the acceptor polypeptide with PglS ComP (a PglS oligosaccharyltransferase) (OTase); paragraphs [0011], [0050]), wherein the acceptor polypeptide comprises a ComP protein or a glycosylation tag fragment thereof (wherein the acceptor polypeptide comprises a ComP protein; paragraph [0011]); optionally wherein the ComP protein or glycosylation tag fragment thereof is linked to a heterologous carrier protein (optionally wherein the ComP protein is linked to a heterologous carrier protein; paragraph [0011]); a host cell (a host cell; paragraph [00148]) comprising (a) a genetic cluster encoding for the proteins required to synthesize an oligo- or polysaccharide (a genetic cluster encoding for the proteins required to synthesize an oligo- or polysaccharide; paragraphs [0045], [00148]); (b) a PglS OTase PglS ComP (a PglS OTase); paragraphs [0011], [0050], [00148]); and (3) an acceptor polypeptide comprising a ComP protein (an acceptor polypeptide comprising a ComP protein; paragraphs [0011], [00148]) or a glycosylation tag fragment thereof.

Vaxalta does not disclose wherein the fragment comprises a serine residue corresponding to the conserved serine residue at position 84 in SEQ ID NO: 1 (ComPAoP1: AAC45886.1).

GenBank discloses wherein the fragment comprises a serine residue corresponding to the conserved serine residue at position 84 in SEQ ID NO: 1 (ComPAoP1: AAC45886.1) (GenBank sequence AAC45886.1 is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 1 comprising a serine residue corresponding to the conserved serine residue at position 84 in SEQ ID NO: 1, identified as ComP [Acinetobacter baylyi]; page 1).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Vaxalta, to include wherein the fragment comprises a serine residue corresponding to the conserved serine residue at position 84 in SEQ ID NO: 1 (ComPAoP1: AAC45886.1), as disclosed by GenBank, in order to provide a superior glycosylated ComP protein for use in the production of conjugate vaccines.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Vaxalta and GenBank references, unity of invention is lacking.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
C 0 7 K 14/22 (2006.01)	C 0 7 K 14/22	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04	C
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
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 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (74) 代理人 100116403  
弁理士 前川 純一
- (74) 代理人 100134315  
弁理士 永島 秀郎
- (74) 代理人 100135633  
弁理士 二宮 浩康
- (74) 代理人 100162880  
弁理士 上島 類
- (72) 発明者 クリスチャン ハーディング  
アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス ダンカン アヴェニュー 4 3 4 0 スイート 2  
0 2 ケア・オブ ヴァックスニューモ エルエルシー
- (72) 発明者 マリオ フェルドマン  
アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス ダンカン アヴェニュー 4 3 4 0 スイート 2  
0 2 ケア・オブ ヴァックスニューモ エルエルシー

F ターム(参考) 4B064 AF04 AF11 AG31 CA02 CA19 CA21 CC06 CC12 CC24 CE02  
CE03 CE06 DA01  
4B065 AA01Y AA04Y AA26X AA49Y AB01 AC14 BA02 BA03 BB37 BC03  
BC07 BD01 BD14 BD15 BD18 BD44 CA26 CA29 CA45  
4C085 AA03 AA38 BA07 BB11 CC07 CC08 CC21 DD62 EE01 EE06  
FF13 FF14 FF19 GG01  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 BA53 CA11 DA86 EA31 FA74  
GA10 GA15 GA26