

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-531242

(P2023-531242A)

(43)公表日 令和5年7月21日(2023.7.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/21 (2006.01)	C 0 7 K	14/21	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 7 6
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 C 0 8 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全81頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-579677(P2022-579677)	(71)出願人	305060279		
(86)(22)出願日	令和3年6月17日(2021.6.17)		グラクソスミスクライン バイオロジカ		
(85)翻訳文提出日	令和5年2月7日(2023.2.7)		ルズ ソシエテ アノニム		
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/066336		ベルギー ベー—1 3 3 0 リクセンサー		
(87)国際公開番号	WO2021/259742		ル リュ ドランスティテュ 8 9		
(87)国際公開日	令和3年12月30日(2021.12.30)	(74)代理人	110002572		
(31)優先権主張番号	20182138.6		弁理士法人平木国際特許事務所		
(32)優先日	令和2年6月25日(2020.6.25)	(72)発明者	ケムラー, シュテファン ヨッヘン		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		スイス国 8 9 5 2 シュリーレン チュ		
(31)優先権主張番号	20182139.4		ーリッヒ, グラーベンシュトラーセ 3		
(32)優先日	令和2年6月25日(2020.6.25)	(72)発明者	リザク, クリスティアン		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		スイス国 8 9 5 2 シュリーレン チュ		
(31)優先権主張番号	63/043,883		ーリッヒ, グラーベンシュトラーセ 3		
			リマテッヒ ビオロギクス アーゲー		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 改変Exotoxin Aタンパク質

(57)【要約】

本発明は、改変タンパク質、免疫原性組成物、及び改変タンパク質を含むワクチン、それらの製造、及び医薬におけるそのような組成物の使用の分野に関する。より詳細には、改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質に関する。改変EPAは、他の抗原、特に単糖抗原、又はT細胞エпитープを欠いている他の抗原用の担体タンパク質として用いることができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質であって、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZが独立して、プロリン以外の任意のアミノ酸であり、1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列が各々:配列番号1の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、及び(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)から独立して選択される、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、改変EPAタンパク質。

10

【請求項2】

配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有し、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZが独立して、プロリン以外の任意のアミノ酸であり、2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列が各々:配列番号1の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択される、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、請求項1に記載の改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質。

20

30

【請求項3】

配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有し、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される3つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZが独立して、プロリン以外の任意のアミノ酸であり、3つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列が各々:配列番号1の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ

40

50

酸残基K240)から独立して選択される、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、請求項1に記載の改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質。

【請求項4】

D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択されるコンセンサス配列が、各々独立して、配列番号1のアミノ酸配列の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸を置換している(例えば、各コンセンサス配列が、単一のアミノ酸残基、例えばY208、R274、S318、及びA519から選択される単一のアミノ酸残基を置換している)、請求項1~3のいずれか一項に記載の改変EPAタンパク質。

10

【請求項5】

D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択される更なるコンセンサス配列(X及びZが独立して、プロリン以外の任意のアミノ酸であり、J及びUが独立して、1~5つの天然に存在するアミノ酸残基である)が、配列番号1のN末端、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、請求項1~4のいずれか一項に記載の改変EPAタンパク質。

20

【請求項6】

D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択される更なるコンセンサス配列(X及びZが独立して、プロリン以外の任意のアミノ酸であり、J及びUが独立して、1~5つの天然に存在するアミノ酸残基である)が、配列番号1のC末端、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、請求項1~5のいずれか一項に記載の改変EPAタンパク質。

30

【請求項7】

D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される少なくとも1つのコンセンサス配列(X及びZが独立して、プロリン以外の任意のアミノ酸である)が、配列番号1の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、又は(iii)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の隣に付加されているか、又はこれを置換している、請求項1~6のいずれか一項に記載の改変EPAタンパク質。

40

【請求項8】

アミノ酸配列が、ロイシン552の(又は配列番号1のL552に等しい位置での)、バリンへの置換(L552V)、及びグルタミン553の(又は配列番号1のE553に等しい位置での)欠失(ΔE553)を含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の改変EPAタンパク質。

【請求項9】

抗原(例えば糖抗原、場合により細菌多糖抗原)に共有結合的に連結されている、請求項1~8のいずれか一項に記載の改変EPAタンパク質を含むコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)。

【請求項10】

抗原が、糖、場合により細菌多糖(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌由来)である、請求項9に記載のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)。

50

【請求項 1 1】

i) 場合により、細菌多糖抗原(例えば、グラム陰性菌由来の、場合により志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソルネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌由来のO抗原、又はグラム陽性菌由来の、場合により肺炎連鎖球菌若しくは黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖)又は酵母多糖抗原又は哺乳動物多糖抗原を生成するための、場合により宿主細胞ゲノム中に組み込まれた多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列;

ii) 異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼを、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列;

iii) 請求項1~8のいずれか一項に記載の改変EPAタンパク質を、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

10

【請求項 1 2】

多糖に連結された改変EPAタンパク質を含むバイオコンジュゲートを生成する方法であって、(i)糖タンパク質の生成に適した条件の下で請求項11に記載の宿主細胞を培養すること、及び(ii)バイオコンジュゲートを単離すること、場合により宿主細胞由来の周辺質抽出物からバイオコンジュゲートを単離することを含む方法。

【請求項 1 3】

請求項9又は10に記載のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、並びに場合により薬学的に許容される賦形剤及び/又は担体を含む免疫原性組成物。

【請求項 1 4】

請求項13に記載の免疫原性組成物、及び場合によりアジュバントを含むワクチン。

20

【請求項 1 5】

対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導する方法であって、請求項9又は10に記載のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、請求項13に記載の免疫原性組成物、又は請求項14に記載のワクチンの治療的に、又は予防的に有効な量を、それを必要とする対象(例えばヒト)に投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改変タンパク質、免疫原性組成物、及び改変タンパク質を含むワクチン、それらの製造、及び医薬におけるそのような組成物の使用の分野に関する。より詳細には、改変EPA(緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)のExotoxin A)タンパク質に関する。改変EPAは、他の抗原、特に単糖抗原、又はT細胞エピトープを欠いている他の抗原用の担体タンパク質として用いることができる。

30

【背景技術】

【0002】

タンパク質グリコシル化は、例えば、表面タンパク質、鞭毛、又は線毛にグリカンが共有結合する、細菌において普通にみられる翻訳後改変である。糖タンパク質は、付着、タンパク質分解に対するタンパク質の安定化、及び宿主免疫応答の回避において役割を果たす。2つのタンパク質グリコシル化機構が、グリカンがタンパク質に移行されるモードによって区別される:一機構は、ヌクレオチド活性化糖からアクセプタタンパク質への直接的な炭水化物の移行(例えば、真核細胞のゴルジ体におけるタンパク質Oグリコシル化、及び一部の細菌におけるフラジェリンOグリコシル化に用いられている)を包含する。第2の機構は、多糖の、脂質-担体上へのブリアセンブリ(糖トランスフェラーゼによる)に続く、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ(OTase)によるタンパク質アクセプタへの移行を包含する(Faridmoayerら、J. Bacteriology、8088~8098頁、2007年)。この第2の機構は、例えば、真核細胞の小胞体におけるNグリコシル化、カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)の十分に特徴付けられたN-結合グリコシル化システム、並びに髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、淋菌(*Neisseria gonococcus*)、及び緑膿菌の、より最近に特徴付けられたO-結合グリコシル化システムにおいて用い

40

50

られている。O-結合グリコシル化(Oグリコシル化)について、グリカン通常、タンパク質アクセプタ上のセリン残基又はトレオニン残基に結合する。N-結合グリコシル化(Nグリコシル化)について、グリカン通常、タンパク質アクセプタ上のアスパラギン残基に結合する。大腸菌(*E. coli*)においてpgl遺伝子座及びアクセプタ糖タンパク質を組換えにより同時に発現することによって、C.ジェジュニタンパク質のNグリコシル化を再構成することが可能である(Wackerら(2002年) *Science* 298巻、1790~1793頁)。

【0003】

国際公開第2006/119987号パンフレット(Aebiら)は、タンパク質、並びに原核生物におけるインビボNグリコシル化が効率的なタンパク質生成手段及び方法を記載している。これはさらに、組換えタンパク質中への、前記タンパク質の免疫原性、安定性、生物学的活性、予防活性、及び/又は治療活性を改変するためのN-グリカンの導入、並びに本発明の組換えNグリコシル化タンパク質を表面上に提示する宿主細胞の供給を記載している。加えて、これは、以下の最適化されたアミノ酸配列:D/E-X-N-Z-S/Tの1つ以上を含む組換えNグリコシル化タンパク質を記載しており、式中、X及びZは、Pro以外の任意の天然アミノ酸であってよい。そのような最適化されたアミノ酸配列をタンパク質中に導入することで、タンパク質はオリゴサッカリルトランスフェラーゼによって、導入された位置においてNグリコシル化される。

【0004】

コンジュゲートワクチン(免疫原性抗原に共有結合する担体タンパク質を含むワクチン)は、種々の細菌性感染に対するワクチン接種の成功したアプローチであった。T細胞が、一般にT非依存性の抗原について免疫応答の一部となる一助とすることを可能にする一手段として、担体タンパク質へのT非依存性抗原、例えば単糖のコンジュゲーションが長く確立されている。このように、免疫応答は、免疫記憶、及び応答のブースト能(boostability)の発達を可能にすることによって増強することができる。コンジュゲートワクチン生成効率を増大させるために、(「バイオコンジュゲートワクチン」を生成するための)インビボ方法が開発されている。インビボ方法は、上述のNグリコシル化システム及びOグリコシル化システムを導入している。例えば、国際公開第2009/104074号パンフレットは、少なくとも1つのコンセンサス配列D/E-X-N-Z-S/Tを含有するように改変されている緑膿菌の外毒素(EPA)を含むタンパク質担体を含む赤痢菌(*Shigella*)属バイオコンジュゲートワクチンを記載しており、国際公開第2017/035181号パンフレットは、緑膿菌担体タンパク質の無毒化された外毒素A(EPA)に共有結合する大腸菌O抗原を記載している。しかしながら、特定の抗原は、EPA担体タンパク質にコンジュゲートした場合に、他の抗原よりも免疫原性でないことが見出された。

【0005】

緑膿菌のExotoxin A(「EPA」又は「ETA」としても公知である)は、ADPリボシルトランスフェラーゼ毒素ファミリーのメンバーである、分泌される細菌毒素である。天然のタンパク質は、613個のアミノ酸(67kDa)の単一のポリペプチド鎖である。タンパク質は、3つの主要ドメイン、ドメインIa及びb(受容体結合ドメイン)、ドメインII(膜貫通ドメイン)、並びにドメインIII(触媒NAD-リボシルトランスフェラーゼドメイン)からなる(Alluredら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83巻、1320~1324頁、1986年3月)。ドメインIIの最後の4つの残基(400~404)は、ドメインIII(405~613)と一緒に、ADPリボシルトランスフェラーゼ活性を有する毒素の触媒サブユニットを形成する(Siegalら、1989年 *J. Biol. Chem.* 264巻、14256~14261頁)。重要な活性部位残基であるグルタミン酸-553の欠失を有する緑膿菌外毒素A(ETA)の突然変異形態が、緑膿菌のETA-ネガティブ系統において発現されて、野生型ETAと同程度に効率的に細胞からエクスポートされることが示された。培養培地から精製された突然変異タンパク質は、ADPリボシルトランスフェラーゼ活性がなかった(Kileenら *Biochimica et Biophysica Acta*、1138巻(1992年) 162~166頁)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【0006】

インビボコンジュゲーションでの使用に適した更なるEPA担体タンパク質が必要とされている。様々な(単)糖抗原についてEPA担体タンパク質が選択されるように、更なるEPA担体タンパク質が必要とされている。また、少なくとも1つのコンセンサス配列D/E-X-N-Z-S/Tを含み、且つ有望な、又は向上した特性、例えばグリコシル化効率の増大を示す更なるEPA担体タンパク質も必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、抗原(例えば細菌多糖)へのコンジュゲーションに用いられる、グリコシル化のための少なくとも1つのコンセンサス配列(例えばD/E-X-N-Z-S/T)を含む改変EPAタンパク質を提供する。本発明の改変EPAタンパク質において、グリコシル化コンセンサス配列は、EPA担体タンパク質の特定の領域中に導入されている。本発明者らは、EPAアミノ酸配列内のコンセンサス配列の位置が、グリコシル化効率を増大させること、及び/又はNグリコシル化部位の操作を最適化することができることを見出した。本発明の改変EPAタンパク質は、より高い部位占有率、より高い糖:タンパク質比、及び/又はより高い収率を示す。また、タンパク質グリコシル化の差異は、タンパク質の生体活性、抗原性、安定性、及び/又は半減期に影響し得る。加えて、グリコシル化の増大は、クロマトグラフィによるタンパク質の精製を補助することができる。特定の実施形態において、本明細書中に記載される改変EPAタンパク質は、担体タンパク質内のグリコシル化部位の数が最適化されるように改変されている。これにより、より低い濃度のEPAタンパク質を、そのコンジュゲート形態で、例えば免疫原性組成物又はワクチンにより投与することが可能となり得る。また、本発明は、様々な単糖抗原についてコンセンサス配列部位の数が異なるEPA担体タンパク質を選択するので、更なるEPA担体タンパク質を提供する。グリコサイトの数は、糖:タンパク質比を最適化するように選択されてよい。例えば、より短い単糖抗原(グリカン)について、(本明細書中に記載される本発明の改変EPA担体タンパク質を用いて)より多くの数のグリコサイトを用いて、糖:タンパク質比を増大させてよい。

【0008】

したがって、本発明の一態様において提供されるのは、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質であり、これは、アミノ酸配列がD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、及び(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。

【0009】

また、提供されるのは、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質であり、これは、アミノ酸配列がD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して

10

20

30

40

50

、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸;又は205~211間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基D218;例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基271~277間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R279、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基315~321間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基G323、例えばアミノ酸残基S318)、及び(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基516~522間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基G525、例えばアミノ酸残基A519)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。

10

【0010】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは、抗原(例えば単糖抗原、場合により細菌多糖抗原)に連結された本発明の改変EPAタンパク質を含むコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)である。

【0011】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは、本発明の改変EPAタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

20

【0012】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは、本発明の改変EPAタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターである。

【0013】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは:

i)場合により、細菌多糖抗原(例えば、グラム陰性菌由来の、場合により志賀赤痢菌(*Shigella dysenteriae*)、フレクスナー赤痢菌(*Shigella flexneri*)、ソンネ赤痢菌(*Shigella sonnei*)、緑膿菌、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)由来のO抗原、又はグラム陽性菌由来の、場合により肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)若しくは黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)由来の莢膜多糖)又は酵母多糖抗原又は哺乳動物多糖抗原を生成するための、場合により宿主細胞ゲノム中に組み込まれた多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列;

30

ii)異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼを、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列;

iii)本発明の改変EPAタンパク質を、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列

を含む宿主細胞である。

【0014】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは、多糖に連結された改変EPAタンパク質を含む(又はこれからなる)バイオコンジュゲートを生成するプロセス(方法)であり、前記プロセスは、(i)糖タンパク質の生成に適した条件の下で本発明の宿主細胞を培養すること、及び(ii)前記宿主細胞によって生成されるバイオコンジュゲートを、場合により宿主細胞由来の周辺質抽出物からバイオコンジュゲートを単離することを含む。

40

【0015】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、並びに場合により薬学的に許容される賦形剤及び/又は担体を含む免疫原性組成物である。

【0016】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは、本発明の免疫原性組成物、及び場合に

50

よりアジュバントを含むワクチンである。

【0017】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは、対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導する方法であって、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンの治療的に、又は予防的に有効な量を、誘導を必要とする対象(例えばヒト)に投与すること含む方法である。

【0018】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは、対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導するのに用いられる、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンである。

10

【0019】

本発明の更なる態様に従えば、提供されるのは、対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導する薬剤の製造に用いられる、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンである。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】イラストで表現されるEPA、並びに球体で表現されるグリコサイトの挿入のために選択された位置Y208、R274、S318、及びA519の3D構造を示す図である。

【図2-1】グリコサイトのないEPAと比較して、位置Y208、R274、S318、及びA519にて単一のグリコサイトを含有するEPA変異型の配列アラインメントを示す図である。EPA_detox(配列番号1)、EPA_mut_Y208(配列番号34)、EPA_mutR274(配列番号35)、EPA_mut_S318(配列番号36)、及びEPA_mut_A519(配列番号37)。

20

【図2-2】図2-1の続きである。

【図2-3】図2-2の続きである。

【図2-4】図2-3の続きである。

【図3】KpO抗原(肺炎桿菌O抗原)多糖を生成し、且つPglB、並びにグリコサイトKDQ NATK(配列番号4)を以下の位置:Y208(レーン1)、K240(レーン2)、R274(レーン3)、S318(レーン4)、A376(レーン5)、A519(レーン6)、並びにK240及びA376(レーン7)に導入したEPA変異型を発現する大腸菌系統のIMAC(固定金属アフィニティクロマトグラフィ)富化周辺質抽出物のSDS-PAGE分析を示す図である。非グリコシル化EPA担体に、そして1つの、そして2つのグリコサイトが占有されているKpO抗原-EPAバイオコンジュゲートに対応するバンドを標識している。

30

【図4】KpO抗原多糖を生成し、且つPglB、並びにグリコサイトKDQ NATK(配列番号4)を以下の位置:K240及びA376(レーン1)、Y208及びR274(レーン2)、Y208及びS318(レーン3)、Y208及びA519(レーン4)、R274及びS318(レーン5)、R274及びA519(レーン6)、S318及びA519(レーン7)、並びにY208、R274、及びA519(レーン8)に導入したEPA変異型を発現する大腸菌系統のIMAC富化周辺質抽出物のSDS-PAGE分析を示す図である。非グリコシル化EPA担体に、そして1つの、2つの、そして3つのグリコサイトが占有されているKpO抗原-EPAバイオコンジュゲートに対応するバンドを標識している。

40

【図5-1】KpO抗原多糖を生成し、且つPglB、並びに1~7つのグリコサイトを以下の位置:Y208(レーン1)、K240(レーン2)、R274(レーン3)、S318(レーン4)、A376(レーン5)、A519(レーン6)、K240及びA376(レーン7)、Y208及びR274(レーン8)、Y208及びS318(レーン9)、Y208及びA519(レーン10)、R274及びS318(レーン11)、R274及びA519(レーン12)、S318及びA519(レーン13)、Y208、R274、及びA519(レーン14)、N末端グリコタグ、並びにK240及びA376、並びにC末端グリコタグ(レーン15)、N末端グリコタグ、並びにY208、R274、及びA519(レーン16)、N末端グリコタグ、並びにY208、R274、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン17)、N末端グリコタグ、並びにY208、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン18)、N末端グリコタグ、並びにR274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レ

50

ーン19)、N末端グリコタグ、並びにY208、R274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン20)、N末端グリコタグ、並びにY208、K240、R274、S318、及びA519(レーン21)、並びにN末端グリコタグ、並びにY208、K240、R274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン22)に導入したEPA変異型を発現する大腸菌系統の周辺質抽出物のイムノブロット分析を示す図である。上部のパネルは、抗KpO抗原抗血清でプロービングしたイムノブロットを示す一方、下部のパネルは、抗EPA抗体でプロービングしたイムノブロットを示す。非グリコシル化EPA担体に、そして1~7つのグリコサイトが占有されているKpO抗原-EPAバイオコンジュゲートに対応するバンドを標識している。

【図5-2】図5-1の続きである。

【図5-3】図5-2の続きである。

【図6】KpO抗原多糖を生成し、且つPglB、並びにグリコサイトKDQNA TK(配列番号4)を以下の位置:N末端グリコタグ、並びにY208、R274、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン1)、N末端グリコタグ、並びにY208、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン2)、N末端グリコタグ、並びにR274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン3)、N末端グリコタグ、並びにY208、R274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン4)、N末端グリコタグ、並びにY208、K240、R274、S318、及びA519(レーン5)、N末端グリコタグ、並びにY208、K240、R274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン6)、並びにN末端グリコタグ、並びにY208、R274、及びA519(レーン7)に導入したEPA変異型を発現する大腸菌系統の周辺質抽出物のSDS-PAGE分析を示す図である。KpO抗原-EPAバイオコンジュゲートに対応するバンドを、矢印で標識している。表の1行目は、グリコサイトの数を示す。

【図7】Sf2aフレクスナー赤痢菌2a(左)又はSp11A肺炎連鎖球菌11A(右)多糖を生成し、且つPglB、並びにK240にグリコサイトが、A376に第2のグリコサイトが(レーン1)、又は位置Y208、R274、及びA519に3つのグリコサイト(レーン2)が導入されたEPA変異型を発現する大腸菌系統のIMAC富化周辺質抽出物のSDS-PAGE分析を示す図である。

【図8】2つの異なる肺炎桿菌O抗原多糖(左及び右)を生成し、且つPglB、並びに位置Y208、R274、及びA519にてグリコサイトを有し(レーン1)、又はN末端グリコタグ、並びに位置Y208、R274、及びA519にてグリコサイトを有する(レーン2)EPA変異型を発現する大腸菌系統のIMAC富化周辺質抽出物のSDS-PAGE分析を示す図である。

【図9】Sf2a、Sp33F、Pa06、又はPa011抗原多糖を生成し(下部パネル)、且つPglB、並びに1つのグリコサイトKDQNA TK(配列番号4)を以下の位置:Y208(レーン1)、D218(レーン2)、R274(レーン3)、R279(レーン4)、S318(レーン5)、G323(レーン6)、A376(レーン7)、A519(レーン8)、及びG525(レーン9)に導入したEPA変異型を発現する大腸菌系統の周辺質抽出物のイムノブロット分析を示す図である。EPAバイオコンジュゲートに、そして非グリコシル化EPA担体タンパク質に対応するバンドを、矢印で標識している。

【発明を実施するための形態】

【0021】

定義

担体タンパク質:抗原(例えば単糖抗原、例えば細菌多糖抗原)に共有結合して、コンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)を創出し得るタンパク質。担体タンパク質は、コンジュゲートされている抗原に関するT細胞媒介性免疫を活性化する。

【0022】

EPA:緑膿菌のExotoxin A(「緑膿菌のExotoxin」、「EPA」、又は「ETA」としても公知である)

【0023】

プロリン(pro、P)以外のあらゆるアミノ酸:アラニン(ala、A)、アルギニン(arg、R)、アスパラギン(asn、N)、アスパラギン酸(asp、D)、システイン(cys、C)、グルタミ

10

20

30

40

50

ン(gln、Q)、グルタミン酸(glu、E)、グリシン(gly、G)、ヒスチジン(his、H)、イソロイシン(ile、I)、ロイシン(leu、L)、リシン(lys、K)、メチオニン(met、M)、フェニルアラニン(phe、F)、セリン(ser、S)、トレオニン(thr、T)、トリプトファン(trp、W)、チロシン(tyr、Y)、及びバリン(val、V)からなる群から選択されるアミノ酸を指す。

【0024】

天然に存在するアミノ酸残基:ポリペプチド中に自然に組み込まれるアミノ酸。特に、ユニバーサル遺伝コードによってコードされる20個のアミノ酸:アラニン(ala、A)、アルギニン(arg、R)、アスパラギン(asn、N)、アスパラギン酸(asp、D)、システイン(cys、C)、グルタミン(gln、Q)、グルタミン酸(glu、E)、グリシン(gly、G)、ヒスチジン(his、H)、イソロイシン(ile、I)、ロイシン(leu、L)、リシン(lys、K)、メチオニン(met、M)、フェニルアラニン(phe、F)、プロリン(pro、P)、セリン(ser、S)、トレオニン(thr、T)、トリプトファン(trp、W)、チロシン(tyr、Y)、及びバリン(val、V)。

10

【0025】

糖転移酵素(グリコシルトランスフェラーゼ)(GTF、Gtf):グリコシド結合を確立する酵素。糖トランスフェラーゼは、グリコシド結合の形成を触媒してグリコシドを形成する酵素である。例えば、活性化ヌクレオチド糖(「グリコシルドナー」としても公知である)から求核グリコシルアクセプタ分子への単糖部分の移行を触媒する。この求核分子は、酸素-、炭素-、窒素-、又は硫黄ベースであり得る。

20

【0026】

O抗原(O特異的多糖又はO側鎖としても公知である):グラム陰性菌の表面リポ多糖(LPS)の構成要素。例として、緑膿菌及び肺炎桿菌由来のO抗原が挙げられる。

【0027】

リポ多糖(LPS):共有結合によって結合して構成される脂質及び多糖からなる巨大分子。

【0028】

莢膜多糖(CP):細菌の細胞壁に見出される多糖。例として、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、髄膜炎菌、及び黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖が挙げられる。

【0029】

wzy:多糖重合を触媒する酵素をコードする多糖ポリメラーゼ遺伝子。コードされる酵素は、オリゴ糖単位を非還元末端に移行させて、グリコシド結合を形成する。

30

【0030】

waaL:膜結合酵素をコードするO抗原リガーゼ遺伝子。コードされる酵素は、ウンデカブレニルニリン酸(UPP)結合O抗原を脂質Aコアオリゴ糖に移行させて、リポ多糖を形成する。

【0031】

本明細書中で用いられる用語「コンジュゲート」は、抗原に共有結合する担体タンパク質を指す。

【0032】

本明細書中で用いられる用語「バイオコンジュゲート」は、宿主細胞バックグラウンドにおいて調製される、タンパク質(例えば担体タンパク質)と抗原(例えば単糖抗原、例えば細菌多糖抗原)間のコンジュゲートを指し、宿主細胞機構は、抗原をタンパク質に結合させる(例えばN-結合グリコシル化)。

40

【0033】

本明細書中で用いられる用語「改変タンパク質」は、野生型と比較して、(1つ以上の手段で)変更されているタンパク質を意味する(例えば、「改変EPAタンパク質」は野生型EPAタンパク質を除外している)。

【0034】

本明細書中で用いられる用語「免疫原性断片」は、その断片に特異的な、動物宿主、例

50

例えばヒトにおける体液性免疫応答及び/又は細胞性免疫応答を誘発することができる、全体よりも小さな抗原の部分の意味する。タンパク質の断片は、当該技術において公知の技術を用いて、例えば、組換えにより、タンパク質分解消化によって、又は化学合成によって生成することができる。ポリペプチドの内部断片又は末端断片は、ポリペプチドをコードする核酸の一方の端部(末端断片について)又は双方の端部(内部断片について)から1つ以上のヌクレオチドを除去することによって生成することができる。典型的には、断片は、全長配列の少なくとも10、20、30、40、又は50個の連続アミノ酸を含む。断片は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、又は50個のアミノ酸を付加するか、又はN末端及びC末端のいずれか、若しくは双方から除去することによって、容易に改変され得る。改変EPAタンパク質の断片は依然として、EPAタンパク質にされる記載の改変を含む。

10

【0035】

本明細書中で用いられる用語「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基のサイズ、極性、電荷、疎水性、又は親水性に及ぼす影響がほとんど、又は全くないような、そして免疫原性を低下させることのない、天然のアミノ酸残基の、非天然の残基との置換を包含する。例えば、これは、以下の群内での置換であり得る:バリン、グリシン;グリシン、アラニン;バリン、イソロイシン、ロイシン;アスパラギン酸、グルタミン酸;アスパラギン、グルタミン;セリン、トレオニン;リシン、アルギニン;及びフェニルアラニン、チロシン。ポリペプチドの配列への保存的アミノ酸改変(及びコードヌクレオチドへの対応する改変)は、親ポリペプチドのものに類似の機能特性及び化学特性を有するポリペプチドを生成し得る。

20

【0036】

本明細書中で用いられる用語「欠失」は、タンパク質配列からの1つ以上のアミノ酸残基の除去である。典型的には、約1〜6つ以下の残基(例えば1〜4つの残基)が、タンパク質分子内のいずれか1つの部位にて欠失している。

【0037】

本明細書中で用いられる用語「挿入」又は「付加」(その他の時制、例えば「挿入された」を含む)は、タンパク質配列内での1つ以上の非天然のアミノ酸残基の付加、又は文脈の必要に応じて、ポリヌクレオチド配列内での1つ以上の非天然のヌクレオチドの付加を意味する。典型的には、約1〜10個以下の残基(例えば、1〜7つの残基、1〜6つの残基、又は1〜4つの残基)が、タンパク質分子内のいずれか1つの部位に挿入されている。

30

【0038】

本明細書中で用いられる用語「の隣に付加されている」は、基準アミノ酸又はアミノ酸領域に隣接した位置でのタンパク質配列における1つ以上の非天然のアミノ酸残基の付加である。例えば、「アミノ酸残基198〜218間の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されている」は、アミノ酸残基198〜218のいずれか1つに隣接する(アミノ酸残基198又は218への隣接を含む)位置での付加を意味する。

【0039】

本明細書中で用いられる用語「グリコサイト」は、細菌オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、例えばC.ジェジュニのPglBによって認識されるアミノ酸配列を指す。

40

【0040】

「コンセンサス配列」は、特定の構造及び/又は機能を有する配列である。本明細書中で用いられる用語「コンセンサス配列」は、グリコサイトを含む配列である。コンセンサス配列は:5アミノ酸コンセンサス配列D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、7アミノ酸コンセンサス配列K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)、又は伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択されてよい。

【0041】

本明細書中で用いられる用語「に導入された」は、アミノ酸配列中にコンセンサス配列を挿入する位置及び様式に言及するのに本明細書中で用いられる。タンパク質のN末端又はC末端位置に導入されるグリコサイトは、N末端又はC末端のアミノ酸配列の隣に付加

50

されてよいが、タンパク質、例えばY208内の特定のアミノ酸残基に導入されるコンセンサス配列(又はグリコサイト)は、アミノ酸を置換してもよい。

【0042】

特に指定のない限り、数字の範囲(例えば「25～30」)の記載は、エンドポイントを含む(すなわち、値25及び30を含む)。例えば、「配列番号1の...アミノ酸198～218間」は、配列番号1の、アミノ酸198及び218の双方を含むアミノ酸198～アミノ酸218間のアミノ酸配列内の位置を指す。

【0043】

用語「同一の」又は「同一性」パーセントは、例えば、配列比較アルゴリズムを用いて、又はマニュアルのアラインメント及び視覚による精査によって、最大の一致について比較且つアラインされた場合に、同じであるか、又は同じであるヌクレオチド残基若しくはアミノ酸残基の指定されたパーセンテージ(例えば、指定された領域にわたって80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性)を有するヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を指す。ポリペプチド間の同一性は、種々のアルゴリズムによって算出され得る。一般に、同一性パーセンテージを算出する場合、比較されることとなる2つの配列が、配列間の最大の相関を与えるようにアラインされる。これは、「ギャップ」を一方又は双方の配列内に挿入して、アラインメントの程度を増強することを含んでもよい。例えば、グローバルアラインメントのためのNeedleman Wunschアルゴリズム(Needleman及びWunsch 1970年、J. Mol. Biol. 48巻: 443～453頁)又はローカルアラインメントのためのSmith Watermanアルゴリズム(Smith及びWaterman 1981年、J. Mol. Biol. 147巻: 195～197頁)が、例えばデフォルトパラメータを用いて使用されてもよい(Smith Watermanは、Gapオープニングペナルティ10及びGapエクステンションペナルティ1のBLOSUM 62スコアリングマトリックスを用いている)。好ましいアルゴリズムが、Dufresneら(Nature Biotechnology、2002年、20巻、1269～71頁)によって記載されており、ソフトウェアGenePAST(Genome Quest Life Sciences、Inc.、Boston、MA)に用いられている。GenePAST「同一性パーセント」アルゴリズムは、クエリ配列とサブジェクト配列のベストフィットを見出して、アラインメントを正確なパーセンテージとして表す。GenePASTは、クエリ配列とサブジェクト配列間の生物学的関連性を考慮したアラインメントスコアリング調整をしない。2つの配列間の同一性は、双方の配列の全長にわたって算出されて、基準配列(例えば本発明の配列番号1)のパーセンテージとして表される。

【0044】

本明細書中で用いられる用語「組換え」は、人工的又は合成的であることを意味する。特定の実施形態において、「組換えタンパク質」は、組換えヌクレオチド配列(宿主細胞中に導入されるヌクレオチド配列)を用いて製造されたタンパク質を指す。特定の実施形態において、「組換えタンパク質」をコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞と異種である。

【0045】

本明細書中で用いられる用語「単離された」又は「精製された」は、自然界で見出されない形態のタンパク質、コンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、ポリヌクレオチド、又はベクターを意味する。これとして、例えば、宿主細胞若しくは生物(粗抽出物を含む)から分離された、又はその自然環境から取り出されたタンパク質、コンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、ポリヌクレオチド、又はベクターが挙げられる。特定の実施形態において、単離又は精製されたタンパク質は、タンパク質が生来結合している(又は生来接触している)他の全てのポリペプチドから本質的に遊離しているタンパク質である。

【0046】

本明細書中で用いられる用語「対象」は、動物、特に哺乳動物、例えば霊長類(例えばヒト)を指す。

【0047】

10

20

30

40

50

本明細書中で用いられる用語「有効な量」は、対象に治療(例えば本発明の免疫原性組成物又はワクチン)を施す文脈において、予防効果及び/又は治療効果を有する治療の量を指す。特定の実施形態において、「有効な量」は、1、2、3、4つ、又はそれを超える以下の効果を達成するのに十分な治療の量を指す:(i)細菌感染症若しくはそれと関連する病徴の重症度を引き下げるか、若しくは寛解させる;(ii)細菌感染症若しくはそれと関連する病徴の持続期間を短くする;(iii)細菌感染症若しくはそれと関連する病徴の進行を予防する;(iv)細菌感染症若しくはそれと関連する病徴の退行を引き起こす;(v)細菌感染症若しくはそれと関連する病徴の発展若しくは発症を予防する;(vi)細菌感染症若しくはそれと関連する病徴の再発を予防する;(vii)細菌感染症と関連する臓器不全を減らす;(viii)細菌感染症を有する対象の入院を減らす;(ix)細菌感染症を有する対象の入院の長さを短くする;(x)細菌感染症を有する対象の生存を上昇させる;(xi)対象において細菌感染症を排除する;(xii)対象において細菌の複製を阻害するか、若しくは引き下げる;及び/又は(xiii)別の治療の予防効果若しくは治療効果を増強するか、若しくは向上させる。

10

20

30

40

50

【0048】

用語「含む(comprises)」は、オープンエンドであり、「含む(includes)」を意味する。ゆえに、文脈上別段の解釈を要する場合を除き、文言「含む(comprises)」又は「有する(has)」、及びそれらのバリエーション(それぞれ「含む(comprise)」及び「含むこと(comprising)」)、又は「有する(have)」及び「有すること(having)」を含むは、明示される化合物、分子、組成物、又は工程の包含を意味するが、他のあらゆる化合物、分子、組成物、又は工程を除外しないと理解されるであろう。本明細書中で移行句として用いられる場合の用語「含む」及び「有する」はオープンエンドであるが、本明細書中で移行句として用いられる場合の用語「からなる」はクローズである(すなわち、一覧に示されるものに限定され、それ以上はない)。特定の実施形態において、そして読み易くするために、文言「である」は、「からなる」又は「からなること」の代わりとして用いられ得る。略語「例えば(e.g.)」は、ラテン語例えば(exempli gratia)に由来し、本明細書中で非限定的な例を示すのに用いられる。ゆえに、略語「例えば」は、用語「例えば(for example)」と同義である。

【0049】

EPAタンパク質

緑膿菌のExotoxin A(「EPA」又は「ETA」としても公知である)は、ADPリボシルトランスフェラーゼ毒素ファミリーのメンバーである、分泌される細菌毒素である。本発明において有用なEPAタンパク質は、本開示を考慮して、当該技術において公知の方法によって生成することができる。例えば、Ihssenら(2010年) Microbial Cell Factories 9巻:61頁、国際公開第2006/119987号パンフレット、国際公開第2009/104074号パンフレット、及び国際公開第2015/124769A1号パンフレット参照。Grayら(1984年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81巻、2645~2649頁によって、緑膿菌系統PA103由来のExotoxin Aがクローニングされて、配列決定されている。導き出されたNH₂-末端アミノ酸配列の、分泌されるタンパク質の配列分析によって決定されたものとの比較は、EPAが638個のアミノ酸前駆体として製造され、そこから25個のアミノ酸の高度に疎水性のリーダーペプチドが分泌プロセス中に除去されていることを示した(Grayら(1984年)の図1参照)。EPA構造遺伝子内の配列は、系統毎に十分に保存されているようである(Vasilら(1986年) Infection and Immunity、1986年5月 538~548頁)。

【0050】

EPAは毒素であるので、インビボ投与され得る前に無毒化されている(すなわち、保護に適した投薬量にて提供された場合に、哺乳動物、例えばヒトに対して非毒性にされている)必要がある。本発明の改変EPAタンパク質は、遺伝的に(すなわち突然変異によって)無毒化されていてよい。遺伝的に無毒化された配列は、不所望の活性、例えばADPリボシルトランスフェラーゼ活性を除去している一方、毒性を引き下げながら、ヒトへの投与後に抗EPA保護抗体及び/又は中和抗体を誘導する能力を保持していてよい。遺伝的に無

毒化された配列は、その免疫原性エピトープを維持してよい。改変EPAタンパク質は、1つ以上の点突然変異によって遺伝的に無毒化されていてよい。例えば、無毒化は、Lukacら (1988年)、Infect Immun、56巻: 3095~3098頁、及びHoら (2006年)、Hum Vaccin、2巻:89~98頁に従って、触媒的に必須の残基を突然変異且つ欠失させることによって、例えばロイシン552の、バリンへの置換(L552V)、及びグルタミン酸553の欠失(Δ E553)によって達成することができる。無毒化は、クイックチェンジ突然変異誘発(Stratagene)、並びにリン酸化されたオリゴヌクレオチド5'-GAAGGCGGGCGCGTGACCATTCCTCGGC(配列番号38)及び5'-GCCGAGAATGGTCACGCGCCCGCCTTC(配列番号39)を用いて、触媒的に必須の残基L552V Δ E553を突然変異/欠失させることによって達成することができ、構築体pGVXN70が生じる。無毒化は、Lukacら (1988年)、Infect Immun、56巻: 3095~3098頁、並びに本明細書中で引用される参考文献、すなわちDouglasら (1987年) J. Bacteriol 169巻: 4962~4966頁及びDouglasら (1987年)に記載される方法論に従って、ADPリボシルトランスフェラーゼ及び細胞毒性活性の阻害を判定することによって測定することができる。無毒化されたEPAは、ADPリボシルトランスフェラーゼ活性及び細胞毒性活性が野生型EPAよりも低く、適切にはLukacら (1988年)に記載される改変EPA、すなわち Δ E553 EPA(グルタミン酸533の欠失を有するEPA)のものと同じであるか、又はこれよりも低い。したがって、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列(又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列)であってよい。改変EPAタンパク質は、配列番号1(又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置)のアミノ酸配列に関して、ロイシン552の、バリンへの置換(L552V)、及びグルタミン553の欠失(Δ E553)を含み得る。本発明の改変EPAタンパク質は、ロイシン552の、バリンへの置換(L552V)を含む、配列番号1のアミノ酸配列(又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列)であってよい。本発明の改変EPAタンパク質は、グルタミン553の欠失(Δ E553)を含む、配列番号1のアミノ酸配列(又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列)であってよい。好ましくは、本発明の改変EPAタンパク質は、ロイシン552の、バリンへの置換(L552V)、及びグルタミン553の欠失(Δ E553)によって改変されている。好ましくは、本発明の改変EPAタンパク質は、ロイシン552の、バリンへの置換(L552V)、及びグルタミン553の欠失(Δ E553)を含む、配列番号1(又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置)のアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【0051】

本発明の一態様において、EPAタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有する:

配列番号1 EPA配列

AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSRMSVDPAPAIADTNGQGV LHYSMVLEGGNDAL
KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVP IGHKPSNIK
VFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAG
VSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYR
VLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTRHRQPRGWE
QLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARL
ALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYP
TGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VF
GGVRARSQDLDAIWGRFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSL
PGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRTILGWPLAERTVVI
PSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

配列番号1 EPA配列(ナンバリング付きアミノ酸1~612)

10

20

30

40

50

60

AEEAFDLWNE CAKACVLDLK DGVRSSRMSV DPAIADTNGQ GVLHYSMVLE GGN
 DALKLAI
 70 80 90 100 110 120
 DNALSITSDG LTIRLEGGVE PNKPVRYST RQARGSWSLN WLVPIGHEKP SNIK
 VFIHEL
 130 140 150 160 170 180
 NAGNQLSHMS PIYTIEMGDE LLAKLARDAT FFVRAHESNE MQPTLAISHA GSVV
 VMAQAQ
 190 200 210 220 230 240
 PRREKRWSEW ASGKVLCLLD PLDGVYNYLA QQRCLDDTW EGKIYRVLAG NP
 AKHDLDIK
 250 260 270 280 290 300
 PTVISHRLHF PEGGSLAALT AHQACHLPLE AFTRHRQPRG WEQLEQCGYP VQR
 LVALYLA
 310 320 330 340 350 360
 ARLSWNQVDQ VIRNALASPG SGGDLGEAIR EQPEQARLAL TLAAAESERF VRQG
 TGNDEA
 370 380 390 400 410 420
 GAASADVSL TCPVAAGECA GPADSGDALL ERNYPTGAEF LGDGGDVSFS TRGT
 QNWTVE
 430 440 450 460 470 480
 RLLQAHRQLE ERGYVFGYH GTFLEAAQSI VFGGVRARSQ DLDAIWRGFY IAGD
 PALAYG
 490 500 510 520 530 540
 YAQDQEPDAR GRIRNGALLR VYVPRWSLPG FYRTGLTLAA PEAAGEVERL IGHP
 LPLRLD
 550 560 570 580 590 600
 AITGPEEEGG RVTILGWPLA ERTVVIPSAI PTDPRNVGGD LDPSSIPDKE QAISA
 LPDYA
 610
 SQPGKPPRED LK
 【0052】

用語「改変EPAタンパク質」は、EPAアミノ酸配列(例えば、配列番号1のアミノ酸配
 列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%
 、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する)を指し、EPAアミノ
 酸配列は、1つ以上のアミノ酸の付加、置換、又は欠失によって(例えば、D/E-X-N-Z-S
 /T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)、及び/若しくは伸長コンセンサ
 ス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択されるコンセンサス配列の付加;
 並びに/又はD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選
 択されるコンセンサス配列による1つ以上のアミノ酸の置換によって)改変されている。
 例えば、改変EPAタンパク質は、配列番号1のEPAアミノ酸配列であってよく、これは、
 アミノ酸配列が、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)、
 及び/又は伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択さ
 れる1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されている。本明細書
 中で用いられる、本発明のコンセンサス配列内のX及びZは独立して、プロリン以外のあ
 らゆるアミノ酸である;好ましくは、XはQ(グルタミン)であり、ZはA(アラニン)である
 。また、改変EPAタンパク質はさらに、改変(付加、置換、欠失)を含んでもよい。好まし
 くは、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1(又は配列番号1と少なくとも80%、8
 5%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等
 しい位置)のアミノ酸配列に関して、ロイシン552の、バリンへの置換(L552V)、及びグ

ルタミン553の欠失($\Delta E553$)を含む。一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、天然に存在しないEPAタンパク質である(すなわち天然でない)。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも91%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも92%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも93%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも94%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも96%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも98%同一のアミノ酸配列を有してよい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有してよい。

10

【0053】

本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質を提供し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々、EPAタンパク質(コンセンサス配列部位)内の特定のアミノ酸残基から選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。これらのコンセンサス配列部位は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、及び(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)から独立して選択される。ゆえに、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質を提供し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、及び(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。本明細書中で、例えば先の(i)~(iv)において指定されるア

20

30

40

50

ミノ酸残基のナンバリングは、配列番号1(又は、アミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸配列と揃えられて、2つの配列間で配列同一性を最大にするならば、この配列は、配列番号1のものに等しい位置に対して配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一である)内のアミノ酸位置を指す。

【0054】

また、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質を提供し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸;又は205~211間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基D218;例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基271~277間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R279、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基315~321間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基G323、例えばアミノ酸残基S318)、及び(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基516~522間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基G525、例えばアミノ酸残基A519)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。本明細書中で、例えば先の(i)~(iv)において指定されるアミノ酸残基のナンバリングは、配列番号1(又は、アミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸配列と揃えられて、2つの配列間で配列同一性を最大にするならば、この配列は、配列番号1のものに等しい位置に対して配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一である)内のアミノ酸位置を指す。

【0055】

また、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質を提供し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々、EPAタンパク質(コンセンサス配列部位)内の特定のアミノ酸残基から選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。これらのコンセンサス配列部位は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択される。ゆえに、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)を提供

し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。また、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)を提供し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、及び(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。

【0056】

また、2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は:配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸;又は205~211間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基D218;例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基271~277間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R279、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基315~321間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基G323、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基516~522間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基G525、例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択され得る。

【0057】

また、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質を提供し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される3つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、3つ(又はそれ以上)のコ

ンセンサス配列は各々、EPAタンパク質(コンセンサス配列部位)内の特定のアミノ酸残基から選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。これらのコンセンサス配列部位は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択される。ゆえに、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)を提供し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される3つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、3つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。

10

20

30

【0058】

また、3つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は:配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸;又は205~211間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基D218;例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基271~277間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R279、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基315~321間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基G323、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基516~522間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基G525、例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択され得る。

40

【0059】

また、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質を提供し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される4つ(又はそ

50

れ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、4つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々、EPAタンパク質(コンセンサス配列部位)内の特定のアミノ酸残基から選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。これらのコンセンサス配列部位は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択される。ゆえに、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)を提供し、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される4つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、4つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。

10

20

30

【0060】

また、4つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は:配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸;又は205~211間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基D218;例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基271~277間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R279、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基315~321間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基G323、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基516~522間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基G525、例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択され得る。

40

【0061】

アミノ酸Y208、K240、R274、S318、及びA519に下線を引いた、配列番号1 EPA配列(ナンバリング付き)

50

10	20	30	40	50	60
AEEAFDLWNE	CAKACVLDLK	DGVRSSRMSV	DPAIADTNGQ	GVLHYSMVLE	GGNDALKLAI
70	80	90	100	110	120
DNALSITS DG	LTIRLEGGVE	PNKPVRYST	RQARGSWSLN	WLVPIGHEKP	SNIKVFIHEL
130	140	150	160	170	180
NAGNQLSHMS	PIYTIEMGDE	LLAKLARDAT	FFVRAHESNE	MQPTLAISHA	GVSVMQAQAQ
190	200	210	220	230	240
PRREKRWSEW	ASGKVLCLLD	PLDGVYNYLA	QQRCNLDDTW	EGKIYRVLAG	NPAKHDLDIK
250	260	270	280	290	300
PTVISHRLHF	PEGGSLAALT	AHQACHLPLE	AFTRRHRQPRG	WEQLEQCGYP	VQRLVALYLA
310	320	330	340	350	360
ARLSWNQVDQ	VIRNALASPG	SGGDLGEAIR	EQPEQARLAL	TLAAAESERF	VRQGTGNDEA
370	380	390	400	410	420
GAASADVVS L	TCPVAAGECA	GPADSGDALL	ERNYPTGAEF	LGDGGDV SFS	TRGTQNW TVE
430	440	450	460	470	480
RLLQAHRLQLE	ERGVV FVG YH	GTFLEAAQSI	VFGGV RARSQ	DLDAIW RGFY	IAGDPALAYG
490	500	510	520	530	540
YAQDQEPDAR	GRIRNGALLR	VYVPRWSLPG	FYRTGLTLAA	PEAAGEVERL	IGHPLPLRLD
550	560	570	580	590	600
AITGP EEEGG	RVTILGWPLA	ERTVVIPS AI	PTDPRNVGGD	LDPSSIPDKE	QAISALPDYA
610					
SQPGKPPRED	LK				

10

20

【0062】

一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列から誘導されてよく、これは配列番号1の免疫原性断片及び/又は変異型である。

【0063】

一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1の少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、又は少なくとも約60個の連続アミノ酸残基を含む配列番号1の免疫原性断片に由来してよく、前記ポリペプチドは、配列番号1に結合する抗体を誘発することができる。

30

【0064】

天然のEPAは、3つの異なる構造ドメインからなることが公知である(Alluredら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83巻、1320~1324頁、1986年3月)：

- ドメインIは、逆平行β構造である。これは、残基1~252及び残基365~404を含む。これは、17本のβ鎖を有する。最初の13本の鎖は、長寸βバレルの構造コアを形成する。ドメインIの鎖13の後に、ペプチド鎖は、バレルの一面を横断して、第2のドメインに通じる。

- ドメインII(残基253~364)は、ヘリックスA及びヘリックスBを連結する1つのジスルフィドと共に、6つの連続αヘリックスで構成される。ヘリックスB及びEは、およそ30 Å長である；ヘリックスC及びDは、およそ15 Å長である。

40

- ドメインIIIは、分子のカルボキシル末端の3分の1、残基405~613で構成される。ドメインIIIの最も顕著な構造の特徴は、その伸長された割れ目(cleft)である。ドメインは、ドメインI及びIIよりも規則的でない二次構造を有する。

本発明のEPAタンパク質の免疫原性断片は、これらのドメインの1つ以上の除去及び/又は改変によって生成されてよい。一実施形態において、配列番号1の免疫原性断片は、配列番号1のドメインIのアミノ酸残基(残基1~252及び残基365~404)を含んでよい。別の実施形態において、配列番号1の免疫原性断片は、配列番号1のドメインIIのアミノ酸残基(残基253~364)を含んでよい。別の実施形態において、配列番号1の免疫原性断片は少なくとも、配列番号1のドメインIIIのアミノ酸残基(残基405~612)を含んでよい。別の実施形態において、配列番号1の免疫原性断片は、配列番号1のドメインIのア

50

ミノ酸残基(残基1~252及び残基365~404)及び配列番号1のドメインIIのアミノ酸残基(残基253~364)を含んでよい。別の実施形態において、配列番号1の免疫原性断片は少なくとも、配列番号1のドメインIIのアミノ酸残基(残基253~364)及び配列番号1のドメインIIIのアミノ酸残基(残基405~612)を含んでよい。

【0065】

EPAにおいて、ジスルフィドを連続的な順番で形成している8つのシステイン形態が存在する:Cys-11はCys-15とジスルフィドを形成し、Cys-197はCys-214とジスルフィドを形成し、Cys-265はCys-287とジスルフィドを形成し、Cys-372はCys-379とジスルフィドを形成している。適切には、配列番号1の免疫原性断片は、配列番号1の8つのシステイン:Cys-11、Cys-15、Cys-197、Cys-214、Cys-265、Cys-287、Cys-372、及びCys-379を含む(すなわち、これらの残基は改変されていない)。ゆえに、適切には、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1の8つのシステイン:Cys-11、Cys-15、Cys-197、Cys-214、Cys-265、Cys-287、Cys-372、及びCys-379、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しいシステインを含む。

10

【0066】

一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列から誘導されてよく、これは、配列番号1の変異型であり、配列番号1と、1つ以上のアミノ酸(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12個のアミノ酸)の欠失及び/又は付加及び/又は置換だけ異なる。アミノ酸置換は保存的であっても非保存的であってもよい。一態様において、アミノ酸置換は保存的である。置換、欠失、付加、又はそれらのあらゆる組合せは、変異型が免疫原性ポリペプチドである限り、単一の変異型内で組み合わされてよい。一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1の1~10、5~10、1~5、1~3、1~2、又は1つのアミノ酸が置換されているか、又は欠失されている、配列番号1の変異型に由来してよい。

20

【0067】

適切には、配列番号1の免疫原性断片及び/又は変異型は、B細胞又はT細胞エпитープを含む。そのようなエピトープは、例えばPSIPREDプログラム(David Jones、Brunel Bioinformatics Group、Dept. Biological Sciences、Brunel University、Uxbridge UB8 3PH、UK)を用いる2D-構造予測、並びにJameson及びWolf(CABIOS 4巻:181~186頁[1988年])によって記載される方法に基づいて算出される抗原性指数の組合せを用いて予測されてよい。

30

【0068】

本発明の改変EPAタンパク質において、1つ以上のコンセンサス配列は各々、配列番号1の1つ以上のアミノ酸、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のEPAアミノ酸配列の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している。本発明の一実施形態において、EPAアミノ酸配列(例えば、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のEPAアミノ酸配列を有する)の1つ以上のアミノ酸(例えば1~7つのアミノ酸、例えば1つのアミノ酸)が、5つのアミノ酸D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)によって、又は7つのアミノ酸K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えば、「KDQNKATK」とも称されるK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列によって置換されている。例えば、EPAアミノ酸配列(例えば配列番号1)内の単一のアミノ酸が、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列により置換されていて(すなわち置き換えられていて)よい。これ以外にも、EPAアミノ酸配列(例えば、配列番号1、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のEPAアミノ酸配列)内の2、3、4、5、6、又は7つのアミノ酸が、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(

40

50

配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列により置換されていて(すなわち置き換えられていて)よい。好ましくは、内部のコンセンサス配列部位(すなわち、N末端又はC末端アミノ酸の隣に付加されるのではなく、EPAアミノ酸配列内にあるコンセンサス配列部位)にて、EPAアミノ酸配列(例えば配列番号1)内の単一のアミノ酸が、K-D-Q-N-A-T-K(配列番号4)コンセンサス配列により置換されている(すなわち置き換えられている)。また、古典的な5つのアミノ酸グリコシル化コンセンサス配列(D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2))は、より有効なグリコシル化のために、1~5個の他のアミノ酸残基によって、コンセンサス配列のいずれかの側に伸長されていてもよい。例えば、伸長コンセンサス配列は、J-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)であってよい。本明細書中で用いられるJ及びUは独立して、1~5つの天然に存在するアミノ酸残基であり、好ましくはJ及びUは独立して、グリシン及び/又はセリンから独立して選択される1~5つのアミノ酸残基であり、例えば、BはG-S-G-G-Gであってよく、UはG-S-G-G-Gであってよい。例えば、伸長コンセンサス配列は、G-S-G-G-G-D/E-X-N-Z-S/T-G-S-G-G(配列番号25)であってよい。好ましくは、伸長コンセンサス配列、例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)又はG-S-G-G-G-D/E-X-N-Z-S/T-G-S-G-G(配列番号25)が用いられ、ここでコンセンサス配列は、EPAタンパク質のN末端又はC末端のアミノ酸の隣に付加される。

10

【0069】

5アミノ酸コンセンサス配列D/E-X-N-Z-S/T(配列番号1)、7アミノ酸コンセンサス配列K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)、及び伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択されるコンセンサス配列の組合せが用いられてもよい。例えば、担体タンパク質アミノ酸配列内の1、2、3、4、又は5つのアミノ酸が、各々独立して、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列(X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸である(好ましくは、XはQ(グルタミン)であり、ZはA(アラニン)である))(例えば、K-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))により置換されていて(すなわち置き換えられていて)よく、1つ又は2つのコンセンサス配列J-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)(J及びUは独立して、1~5つの天然に存在するアミノ酸残基である(好ましくは、J及びUは独立して、グリシン及び/又はセリンから独立して選択される1~5つのアミノ酸残基、例えばG-S-G-G-G-D/E-X-N-Z-S/T-G-S-G-G(配列番号25)である))は、担体タンパク質のN末端又はC末端アミノ酸の隣に付加されてよい。ゆえに、担体タンパク質は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される1、2、3、4、又は5つのコンセンサス配列を含んでよく、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり(好ましくは、XはQ(グルタミン)であり、ZはA(アラニン)である)、担体タンパク質はさらに、1つ又は2つの伸長コンセンサス配列J-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)を含んでよく、J及びUは独立して、1~5つの天然に存在するアミノ酸残基である(好ましくは、J及びUは独立して、グリシン及び/又はセリンから独立して選択される1~5つのアミノ酸残基、例えばG-S-G-G-G-D/E-X-N-Z-S/T-G-S-G-G(配列番号25)である)。本発明に従う、5アミノ酸コンセンサス配列D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、7アミノ酸コンセンサス配列K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)、及び/又は伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択される1つ以上のコンセンサス配列の導入により、改変EPAタンパク質をグリコシル化することが可能となる。ゆえに、本発明はまた、本発明の改変EPAタンパク質を提供し、改変EPAタンパク質はグリコシル化されている。

20

30

40

【0070】

コンセンサス配列の位置

先に記載されるように、本発明者らは、EPAアミノ酸配列内の特定の領域/アミノ酸にあるコンセンサス配列の位置が、グリコシル化効率の増大、及び/又はNグリコシル化部位の操作の最適化を可能にすることを見出した。

【0071】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセン

50

サス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸198~218間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。より詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸203~213間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。例えば、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸205~211間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。好ましくは、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基Y208を置換していてもよい。

10

20

【0072】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸264~284間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。より詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸269~279間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。例えば、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基R274又はR279を置換していてもよい。さらに詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸271~277間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。好ましくは、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基R274を置換していてもよい。

30

40

【0073】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸30

50

8～328間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。より詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸313～323間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。例えば、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基S318又はG323を置換していてもよい。さらにより詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸313～323間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。好ましくは、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基S318を置換していてもよい。

10

【0074】

20

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸509～529間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。より詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸514～524間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。例えば、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基A519又はG525を置換していてもよい。さらにより詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸516～522間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。好ましくは、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基A519を置換していてもよい。

30

40

【0075】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸230～250間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。より詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E

50

-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸235~245間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。さらにより詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸237~243間の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。好ましくは、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))コンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基K240を置換していてもよい。

10

【0076】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))、又は伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のN末端10アミノ酸内の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。より詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))、又は伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のN末端5アミノ酸内の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。好ましくは、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))、又は伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のN末端アミノ酸の隣に付加されていてもよい。

20

30

【0077】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))、又は伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端10アミノ酸内の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。より詳細には、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))、又は伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端5アミノ酸内の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。好ましくは、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))、又は伸長コンセンサス配列(例えばJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端アミノ酸の隣に付加されていてもよい。

40

【0078】

50

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択されるコンセンサス配列は、各々独立して、配列番号1のアミノ酸配列の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸を置換していてもよい(例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、D218、R274、R279、S318、G323、A519、及びG525から選択される単一のアミノ酸残基を置換している;例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、R274、S318、及びA519から選択される単一のアミノ酸残基を置換している)。本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される2つ以上のコンセンサス配列は、各々独立して、配列番号1のアミノ酸配列の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸を置換していてもよい(例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、D218、R274、R279、S318、G323、A519、G525、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している;例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、R274、S318、A519、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している)。本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される3つ以上のコンセンサス配列は、各々独立して、配列番号1のアミノ酸配列の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸を置換していてもよい(例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、D218、R274、R279、S318、G323、A519、G525、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している;例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、R274、S318、A519、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している)。本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される4つ以上のコンセンサス配列は、各々独立して、配列番号1のアミノ酸配列の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸を置換していてもよい(例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、D218、R274、R279、S318、G323、A519、G525、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している;例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、R274、S318、A519、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換していてもよい)。本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される5つ以上のコンセンサス配列は、各々独立して、配列番号1のアミノ酸配列の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸を置換していてもよい(例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、D218、R274、R279、S318、G323、A519、G525、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している;例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、R274、S318、A519、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している)。

【0079】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))、又は伸長コンセンサス配列J-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)(例えばG-S-G-G-G-D/E-X-N-Z-S/T-G-S-G-G(配列番号25))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のN末端の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。ゆえに、本発明の改変EPAタンパク質は:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択される

更なるコンセンサス配列を含んでよく(X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、J及びUは独立して、1～5つの天然に存在するアミノ酸残基である)、これは、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のN末端の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸残基を置換している。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択される更なるコンセンサス配列を含んでよく(X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、J及びUは独立して、1～5つの天然に存在するアミノ酸残基である)、これは、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のN末端アミノ酸残基の隣に付加されている。

10

【0080】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))、又は伸長コンセンサス配列J-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)(例えばG-S-G-G-G-D/E-X-N-Z-S/T-G-S-G-G(配列番号25))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい。ゆえに、本発明の改変EPAタンパク質は:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択される更なるコンセンサス配列を含んでよく(X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、J及びUは独立して、1～5つの天然に存在するアミノ酸残基である)、これは、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸残基を置換している。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択される更なるコンセンサス配列を含んでよく(X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、J及びUは独立して、1～5つの天然に存在するアミノ酸残基である)、これは、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端アミノ酸の隣に付加されている。

20

30

【0081】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される3つ以上のコンセンサス配列は、各々独立して、1つ以上のアミノ酸を置換していてもよく(例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、R274、S318、A519、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している)、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、N末端の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよく(例えばN末端アミノ酸の隣に付加されている)、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい(例えばC末端アミノ酸の隣に付加されている)。

40

【0082】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される4つ以上のコンセンサス配列は、各々独立して、1つ以上のアミノ酸を置換していてもよく(例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミ

50

ノ酸残基、例えばY208、R274、S318、A519、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している)、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、N末端の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよく(例えばN末端アミノ酸の隣に付加されている)、及び/又はD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい(例えばC末端アミノ酸の隣に付加されている)。

10

【0083】

本発明の改変EPAタンパク質において、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される5つ以上のコンセンサス配列は、1つ以上のアミノ酸を置換していてもよく(例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、R274、S318、A519、及びK240から選択される単一のアミノ酸残基を置換している)、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、N末端の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよく(例えばN末端アミノ酸の隣に付加されている)、及び/又はD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端の1つ以上のアミノ酸残基の隣に付加されていてもよいし、1つ以上のアミノ酸残基を置換していてもよい(例えばC末端アミノ酸の隣に付加されている)。

20

【0084】

本発明の改変EPAタンパク質は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される少なくとも1つのコンセンサス配列を含んでよく(X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸である)、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、又は(iii)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)の隣に付加されているか、又はこれを置換している。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択されるコンセンサス配列を含有してよく、これは、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)の隣に付加されているか、又はこれを置換している。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択されるコンセンサス配列を含有してよく、これは、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)の隣に付加されているか、又はこれを置換している。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択されるコンセンサス配列を含有してよく、これは、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85

30

40

50

%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のアミノ酸残基509～529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514～524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)の隣に付加されているか、又はこれを置換している。

【0085】

本発明の改変EPAタンパク質は、2つのコンセンサス配列を含有してよい。改変EPAタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有してよく、これは、アミノ酸配列が2つのコンセンサス配列を含むという点で改変されており、例えば、2つのコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の2つのアミノ酸残基の隣に付加されているか、又はこれを置換している。ゆえに、本発明の改変EPAタンパク質は、2つのコンセンサス配列を含有してよく、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の(i)Y208及びR274、(ii)Y208及びS318、(iii)Y208及びA519、(iv)R274及びS318、(v)R274及びA519、又は(vi)S318及びA519から選択されるアミノ酸残基を置換している。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208及びR274を置換している2つのコンセンサス配列を含有してよい。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号6と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208及びS318を置換している2つのコンセンサス配列を含有してよい。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号28と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208及びA519を置換している2つのコンセンサス配列を含有してよい。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号29と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基R274及びS318を置換している2つのコンセンサス配列を含有してよい。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号30と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基R274及びA519を置換している2つのコンセンサス配列を含有してよい。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号31と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基S318及びA519を置換している2つのコンセンサス配列を含有してよい。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号7と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。

【0086】

本発明の改変EPAタンパク質は、3つのコンセンサス配列を含有してよい。改変EPAタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有してよく、こ

10

20

30

40

50

れは、アミノ酸配列が3つのコンセンサス配列を含むという点で改変されており、例えば、3つのコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の3つの独立して選択されるアミノ酸残基の隣に付加されているか、又はこれを置換している。ゆえに、本発明の改変EPAタンパク質は、3つのコンセンサス配列を含有してよく、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208、R274、及びA519を置換している。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号7と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。

10

【0087】

本発明の改変EPAタンパク質は、4つのコンセンサス配列を含有してよい。改変EPAタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有してよく、これは、アミノ酸配列が4つのコンセンサス配列を含むという点で改変されており、例えば、4つのコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の4つの独立して選択されるアミノ酸残基の隣に付加されているか、又はこれを置換している。ゆえに、本発明の改変EPAタンパク質は、4つのコンセンサス配列を含有してよく、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208、R274、A519を置換しており、そしてこのN末端アミノ酸の隣に付加されている。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号8と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。

20

【0088】

本発明の改変EPAタンパク質は、5つのコンセンサス配列を含有してよい。改変EPAタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有してよく、これは、アミノ酸配列が5つのコンセンサス配列を含むという点で改変されており、例えば、5つのコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の5つの独立して選択されるアミノ酸残基の隣に付加されているか、又はこれを置換している。ゆえに、本発明の改変EPAタンパク質は、5つのコンセンサス配列を含有してよく、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208の置換、アミノ酸残基R274の置換、アミノ酸残基S318の置換、アミノ酸残基A519の置換、N末端での付加(すなわちN末端に付加されている)、及びC末端での付加(すなわちC末端に付加されている)から選択される。例えば、改変EPAタンパク質は、(i)配列番号9と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%同一のアミノ酸配列、(ii)配列番号10と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%同一のアミノ酸配列、又は(iii)配列番号11と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%同一のアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。

30

40

【0089】

本発明の改変EPAタンパク質は、6つのコンセンサス配列を含有してよい。改変EPAタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有してよく、これは、アミノ酸配列が6つのコンセンサス配列を含むという点で改変されており、例えば、6つのコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の6つの独立して選択されるアミノ酸残基の隣に付加されているか、又はこれを置換している。ゆえに

50

、本発明の改変EPAタンパク質は、6つのコンセンサス配列を含有してよく、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208の置換、アミノ酸残基K240の置換、アミノ酸残基R274の置換、アミノ酸残基S318の置換、アミノ酸残基A519の置換、N末端での付加(すなわちN末端に付加されている)、及びC末端での付加(すなわちC末端に付加されている)から選択される。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、(i)配列番号12と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%同一のアミノ酸配列、又は(ii)配列番号13と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%同一のアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。

【0090】

本発明の改変EPAタンパク質は、7つのコンセンサス配列を含有してよい。改変EPAタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有してよく、これは、アミノ酸配列が7つのコンセンサス配列を含むという点で改変されており、例えば、7つのコンセンサス配列は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の7つの独立して選択されるアミノ酸残基の隣に付加されているか、又はこれを置換している。ゆえに、本発明の改変EPAタンパク質は、7つのコンセンサス配列を含有してよく、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208、K240、R274、S318、A519を置換しており、N末端にて付加されており(すなわちN末端に付加されている)、そしてC末端にて付加されている(すなわちC末端に付加されている)。例えば、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号14と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%同一のアミノ酸配列を含んで(又はこれからなって)よい。

【0091】

「アミノ酸...間の」(例えばアミノ酸198~218間の)への言及は、アミノ酸配列のN末端から連続的に数えたアミノ酸番号を指し、例えば「配列番号1のアミノ酸198~218間の」は、配列番号1のアミノ酸198~アミノ酸218間(アミノ酸198及び218の双方を含む)のアミノ酸配列内の位置を指すことが当業者によって理解されるであろう。ゆえに、「D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(例えばK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4))から選択されるコンセンサス配列が、アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又はこれを置換している」実施形態において、コンセンサス配列は、配列番号1内のアミノ酸番号198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218のいずれか1つ(又はそれ以上)の隣に付加されていてもよいし、これを置換していてもよい。当業者であれば、EPAアミノ酸配列が配列番号1のアミノ酸配列の変異型及び/又は断片、例えば配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列である場合、「アミノ酸...間の」への言及は、この配列が配列番号1のアミノ酸配列と揃えられて、2つの配列間の配列同一性を最大にするならば、定義される位置に等しい位置を指すことを理解するであろう(配列アラインメントツールは、Clustal Omega ([www\(.\)ebi\(.\)ac\(.\)ac\(.\)uk](http://www.ebi.ac.uk)) MUSCLE ([www\(.\)ebi\(.\)ac\(.\)ac\(.\)uk](http://www.ebi.ac.uk))又はT-coffee ([www\(.\)tcoffee\(.\)org](http://www.tcoffee.org))に限定されない)。一態様において、用いられる配列アラインメントツールは、Clustal Omega ([www\(.\)ebi\(.\)ac\(.\)ac\(.\)uk](http://www.ebi.ac.uk))である。

【0092】

本明細書中で言及されるアミノ酸番号は、配列番号1におけるアミノ酸に相当し、そして先に記載されるように、当業者であれば、配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列内の等しいアミノ酸位置をアラインメントによって決定することができる。配列番号1の変異型及び/又は断片へのアミノ酸の付加又はそこからのアミノ酸の欠失により、突然変異した配列内のコンセ

10

20

30

40

50

ンサス配列の実際のアミノ酸位置が異なり得る。しかしながら、突然変異した配列を基準配列と揃えることによって、基準配列内の対応するアミノ酸に等しい位置においてアミノ酸を同定することができるので、コンセンサス配列の付加又は置換に適した位置を確立することができる。

【0093】

本発明の改変EPAタンパク質は、単離された改変EPAタンパク質であってもよい。本発明の改変EPAタンパク質は、組換え改変EPAタンパク質であってもよい。本発明の改変EPAタンパク質は、単離された組換え改変EPAタンパク質であってもよい。

【0094】

コンセンサス配列

本発明の改変EPAタンパク質は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)、又はJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)コンセンサス配列を含み、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、J及びUは独立して、1～5つの天然に存在するアミノ酸残基である。古典的な5つのアミノ酸グリコシル化コンセンサス配列(D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2))は、1～5個の他のアミノ酸残基によって、より有効なグリコシル化のために、コンセンサス配列J-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)のいずれかの側に伸長されていてもよい(例えばG-S-G-G-G-D/E-X-N-Z-S/T-G-S-G-G(配列番号25))。古典的な5つのアミノ酸グリコシル化コンセンサス配列(D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2))は、より有効なグリコシル化のために、リシン残基によって伸長されていてもよい(例えばK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3))。ゆえに、本発明の改変EPAタンパク質内のコンセンサス配列は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)コンセンサス配列を含んで(又はこれからなって)よい。

【0095】

本発明の改変EPAタンパク質において、コンセンサス配列は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)、又はJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択されてよく、XはQ(グルタミン)であり、ZはA(アラニン)である。本発明の改変EPAタンパク質において、コンセンサス配列は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択されてよく、XはQ(グルタミン)であり、ZはA(アラニン)である。一実施形態において、コンセンサス配列は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)(XはQ(グルタミン)であり、ZはA(アラニン)である)、例えば「DQ NAT」とも称されるD-Q-N-A-T(配列番号25)である。一実施形態において、コンセンサス配列は、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)(XはQ(グルタミン)であり、ZはA(アラニン)である)、例えば「KDQ NAT K」とも称されるK-D-Q-N-A-T-K(配列番号4)である。本発明の改変EPAタンパク質において、コンセンサス配列は、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)、又はJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択されてよく、XはQ(グルタミン)であり、ZはA(アラニン)であり、J及びUは独立して、グリシン及び/又はセリンから独立して選択される1～5つのアミノ酸残基である。

【0096】

一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、少なくとも2つのD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列を含む。一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、少なくとも3つのD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列を含む。一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、少なくとも4つのD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列を含む。一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、少なくとも5つのD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列を含む。一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、少なくとも6つのD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列を含む。一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、少なくとも7つのD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列を含む。一実施形態において、本発明の改変EPA

Aタンパク質は、3～7つのD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列を含有する。一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、4～7つのD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列を含有する。一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、5～7つのD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)又はK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)コンセンサス配列を含有する。

【0097】

そのようなグリコシル化部位の導入は、例えば、新しいアミノ酸をタンパク質の一次構造に付加する(すなわち、グリコシル化部位を完全に、又は部分的に付加することによって、又はタンパク質内の既存のアミノ酸を突然変異させて、グリコシル化部位を生成する(すなわち、アミノ酸をタンパク質に付加するのではないが、タンパク質の選択されたアミノ酸を突然変異させて、グリコシル化部位を形成する)ことによって達成することができる。一実施形態において、コンセンサス配列は、配列番号1のEPAアミノ酸配列中に、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のEPAアミノ酸配列中に組換えにより導入される。

【0098】

本発明の改変EPAタンパク質はさらに、「ペプチドタグ」又は「タグ」、すなわち、改変EPAタンパク質の単離及び/又は同定を可能にするアミノ酸の配列を含んでよい。例えば、タグを本発明の改変EPAタンパク質に付加することは、当該タンパク質の精製に、そしてそれ故にタグ付けされた改変EPAタンパク質を含むコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)ワクチンの精製に有用であり得る。本明細書において用いることができる例示的なタグとして、以下に限定されないが、ヒスチジン(HIS)タグ(例えばヘキサヒスチジンタグ又は6XHis-タグ)、FLAG-TAG、及びHAタグが挙げられる。一実施形態において、タグはヘキサヒスチジンタグである。本明細書中で用いられるタグは、必要とされなくなると、例えばタンパク質が精製された後に、例えば化学剤によって、又は酵素的手段によって除去可能である。ゆえに、本発明の改変EPAタンパク質はさらに、ペプチドタグを含んでよい。場合により、ペプチドタグは、アミノ酸配列のC末端に位置決めされる。場合により、ペプチドタグは、アミノ酸配列のC末端に6つのヒスチジン残基を含む。一態様において、本発明の改変EPAタンパク質は、配列番号6～14の配列のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%又は100%同一のアミノ酸配列、及びペプチドタグ(例えばアミノ酸配列のC末端の6つのヒスチジン残基)を含む(又はこれからなる)。

【0099】

一実施形態において、本発明の改変EPAタンパク質は、EPAタンパク質を宿主細胞(例えば細菌)の周辺質に向けることができるシグナル配列を含む。周辺質シグナル配列が挙げられるシグナル配列は、通常、タンパク質の、例えば周辺質中への転位の間に、シグナルペプチダーゼによって除去される(すなわち、成熟タンパク質は、少なくともシグナル配列が除去されたタンパク質である)。シグナル配列は、大腸菌フラジェリン(FlgI)[MKFLSALILLVTTAAQA(配列番号15)]、大腸菌外膜ポーリンA(OmpA)[MKKTAIAIAVALAGFATVAQA(配列番号16)]、大腸菌マルトース結合タンパク質(MalE)[MKIKTGARILALSALTMMFSASALA(配列番号17)]、軟腐病菌(Erwinia carotovora)ペクチン酸リアーゼ(PelB)[MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA(配列番号18)]、易熱性大腸菌エンテロトキシンLTIIb[MSFKKIIKAFVIMAALVSVQAHA(配列番号19)]、枯草菌(Bacillus subtilis)エンドキシラナーゼXynA[MFKFKKKFLVGLTAAFMFSMSATASA(配列番号20)]、大腸菌DsbA[MKKIWLALAGLVLAIFSASA(配列番号21)]、TolB[MKQALRVAFGFLILWASVLHA(配列番号22)]、又はSipA[MKMNKKVLLTSTMAASLLSVASVQAS(配列番号23)]に由来してよい。特定の実施形態において、シグナル配列は大腸菌DsbA[MKKIWLALAGLVLAIFSASA(配列番号21)]に由来する。

【0100】

ゆえに、本発明は、改変EPAタンパク質を提供し、アミノ酸配列はさらに、EPAタン

10

20

30

40

50

コンジュゲート

一実施形態において、コンジュゲートは、抗原(例えば単糖抗原、場合により細菌多糖抗原)に共有結合的に連結された本発明の改変EPAタンパク質を含む(又はこれからなる)コンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)を含み、抗原は(直接、又はリンカーを介して)連結されている。一実施形態において、抗原は、本発明の改変EPAタンパク質に直接連結されている。一実施形態において、抗原は、改変EPAタンパク質のアミノ酸残基に直接連結されている。

一実施形態において、改変EPAタンパク質は、化学コンジュゲーション法を用いて入手可能な化学結合を介して抗原に共有結合的に連結されている(すなわち、コンジュゲートは、化学コンジュゲーションによって生成される)。化学コンジュゲーション法は、カ

ルボジイミド化学、還元アニメーション、シアニル化化学(例えばCDAP化学)、マレイミド化学、ヒドラジド化学、エステル化学、及びN-ヒドロキシスクシンイミド化学からなる群から選択されてよい。コンジュゲートは、米国特許出願公開第2007/10184072号明細書(Hausdorff)、米国特許第4,365,170号明細書(Jennings)、及び米国特許第4,673,574号明細書(Anderson)に記載されるような直接還元アミノ化法によって調製することができる。他の方法は、EP-0-161-188号明細書、EP-208375号明細書、及びEP-0-477508号明細書に記載されている。コンジュゲーション法は、これ以外にも、シアン酸エステルを形成するような、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボラート(CDAP)による単糖の活性化に依存してよい。そのようなコンジュゲートは、Uniformed Services Universityの国際公開第93/15760号パンフレット、並びに国際公開第95/08348号パンフレット及び国際公開第96/29094号パンフレットに記載されている。また、Chu C.ら Infect. Immunity、1983年 245 256頁参照。

10

【0106】

一般に、改変EPAタンパク質上の以下のタイプの化学基を、カップリング/コンジュゲーションに用いることができる:

A)カルボキシル(例えばアスパラギン酸又はグルタミン酸を介して)。一実施形態において、この基は、単糖上のアミノ基に直接、又はカルボジイミド化学を有する、例えばEDACを有するリンカー上のアミノ基に連結されている。

B)アミノ基(例えばリシンを介して)。一実施形態において、この基は、単糖上のカルボキシル基に直接、又はカルボジイミド化学を有する、例えばEDACを有するリンカー上のカルボキシル基に連結されている。別の実施形態において、この基は、単糖上のCDAP若しくはCNBrにより活性化されるヒドロキシル基に直接、又はリンカー上のそのような基に;アルデヒド基を有する単糖又はリンカーに;スクシンイミドエステル基を有する単糖又はリンカーに連結されている。

20

C)スルフヒドリル(例えばシステインを介して)。一実施形態において、この基は、マレイミド化学によりプロモ又はクロロアセチル化された単糖又はリンカーに連結されている。一実施形態において、この基は、ビスジアゾベンジジンにより活性化/改変される。

D)ヒドロキシル基(例えばチロシンを介して)。一実施形態において、この基は、ビスジアゾベンジジンにより活性化/改変される。

E)イミダゾリル基(例えばヒスチジンを介して)。一実施形態において、この基は、ビスジアゾベンジジンにより活性化/改変される。

30

F)グアニジル基(例えばアルギニンを介して)。

G)インドリル基(例えばトリプトファンを介して)。

【0107】

一般に、単糖上の以下の基をカップリングに用いることができる:OH、COOH、又はNH₂。アルデヒド基が、様々な処理、例えば:過ヨウ素酸塩、酸加水分解、過酸化水素その他の後に生成され得る。

【0108】

コンジュゲートは、タンパク質の精製のための当該技術において公知のあらゆる方法によって、例えばクロマトグラフィ(例えば、イオン交換、陰イオン交換、アフィニティ、及びサイジングカラムクロマトグラフィ)、遠心分離、溶解度差によって、又はタンパク質の精製のための他の標準的なあらゆる技術によって精製することができる。例えば、Saraswatら、2013年、Biomed. Res. Int. ID0312709 (1~18頁)参照;また、国際公開第2009/104074号パンフレットに記載される方法参照。特定のコンジュゲートを精製するのに用いられる実際の条件は、これまでの、合成戦略(例えば合成生成対組換え生成)によって、そしてバイオコンジュゲートの要因、例えば正味電荷、疎水性、及び/又は親水性によって決まることとなる。

40

【0109】

一実施形態において、抗原が連結される改変EPAタンパク質上のアミノ酸残基は、Ala、Arg、Asp、Cys、Gly、Glu、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser

50

、Thr、Trp、Tyr、及びValからなる群から選択される。場合により、アミノ酸は、末端アミン基であるリシン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、チロシン、ヒスチジン、又はトリプトファンを含有するアミノ酸である。一実施形態において、抗原が連結される改変EPAタンパク質上のアミノ酸残基は、アスパラギン残基でなく、この場合、コンジュゲートは典型的に、化学コンジュゲーションによって生成される。これ以外にも、抗原は、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、システイン、チロシン、ヒスチジン、アルギニン、又はトリプトファンから選択される改変EPAタンパク質上のアミノ酸(例えばアスパラギン)に連結され、アスパラギンの場合、コンジュゲートは、バイオコンジュゲート(例えば、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、例えばPglBを用いる酵素的コンジュゲーション)であってよい。一実施形態において、抗原が連結される改変EPAタンパク質上のアミノ酸残基は、アスパラギン残基である。好ましくは、抗原が連結される改変EPAタンパク質上のアミノ酸残基は、コンセンサス配列の一部、例えばD/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)、K-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)、又はJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)コンセンサス配列内のアスパラギンである。
【0110】

10

本発明のコンジュゲートは、組換え改変EPAタンパク質(例えば化学コンジュゲート又はバイオコンジュゲート)のコンジュゲートであってよい。本発明のコンジュゲートは、単離された組換え改変EPAタンパク質及び組換え抗原、例えば組換え単糖(すなわちバイオコンジュゲート)のコンジュゲートであってよい。

20

【0111】

抗原

抗原は、単糖抗原、例えば細菌多糖、例えばO抗原又は莢膜多糖、酵母多糖、又は哺乳動物多糖であってよい。多糖は、2つ以上の単糖、典型的には10個を超える単糖を含む。一実施形態において、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)内の抗原は、赤痢菌属種、シュードモナス(*Pseudomonas*)属種、クレブシエラ属種、連鎖球菌(*Streptococcus*)属種、又はブドウ球菌(*Staphylococcus*)属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌)から選択される細菌多糖である。一実施形態において、抗原は、細菌多糖抗原(例えばグラム陰性菌由来の、場合により志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌由来のO抗原、又はグラム陽性菌、場合により肺炎連鎖球菌又は黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖)である。一実施形態において、抗原は、グラム陰性菌由来のO抗原である。一実施形態において、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)内の抗原は、赤痢菌属種、クレブシエラ属種、又は連鎖球菌種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、肺炎桿菌、又は肺炎連鎖球菌)から選択される細菌多糖である。一実施形態において、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)内の抗原は、フレクスナー赤痢菌、肺炎桿菌、及び肺炎連鎖球菌から選択される細菌多糖である。一実施形態において、抗原は肺炎桿菌由来の細菌多糖である。ゆえに、本発明は、抗原に連結された本発明の改変EPAタンパク質を含むコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)を提供し、抗原は、単糖、場合によっては細菌多糖(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌由来)である。一実施形態において、抗原はO抗原である。別の実施形態において、抗原は莢膜多糖である。

30

40

【0112】

特定の実施形態において、抗原は、例えばグラム陰性細菌由来のO抗原である。特定の実施形態において、抗原は、サルモネラ属種、赤痢菌属種、シュードモナス属種、又はクレブシエラ属種由来のO抗原である。特定の実施形態において、抗原は、赤痢菌属種、シュードモナス属種、又はクレブシエラ属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、又は肺炎桿菌)由来のO抗原である。一実施形態において、抗原は、志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、又はソンネ赤痢菌由来のO抗原である。例えば、抗原は、志賀赤痢菌1型、ソンネ赤痢菌、及びフレクスナー赤痢菌6型、並びにフレクスナ

50

一赤痢菌2a及び3a 0 (Dmitriev, B.A.ら Somatic Antigens of Shigella Eur J. Biochem、1979年、98巻: 8頁; Liuら Structure and genetics of Shigella O antigens FEMS Microbiology Review、2008年、32巻: 27頁)由来のO抗原であってよい。一実施形態において、抗原は緑膿菌由来のO抗原である。例えば、抗原は、緑膿菌血清型1~20由来のO抗原であってよい(Raymondら、J Bacteriol. 2002年 184巻(13号): 3614~22頁)。一実施形態において、抗原は肺炎桿菌由来のO抗原である。

【0113】

特定の実施形態において、抗原は、髄膜炎菌血清群A(MenA)、髄膜炎菌血清群C(MenC)、髄膜炎菌血清群Y(MenY)、髄膜炎菌血清群W(MenW)、インフルエンザ菌b型(Hib)、B群連鎖球菌(GBS)、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖である。特定の実施形態において、抗原は、連鎖球菌属種又はブドウ球菌属種(例えば肺炎連鎖球菌又は黄色ブドウ球菌)由来の莢膜多糖である。一実施形態において、抗原は、黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖である。例えば、抗原は、黄色ブドウ球菌5型及び8型由来の莢膜多糖であってよい。一実施形態において、抗原は、肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖である。

10

【0114】

宿主細胞

また、本発明は:

i) 場合により、細菌多糖抗原(例えば、グラム陰性菌由来の、場合により志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌由来のO抗原、又はグラム陽性菌由来の、場合により肺炎連鎖球菌若しくは黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖)又は酵母多糖抗原又は哺乳動物多糖抗原を生成するための、場合により宿主細胞ゲノム中に組み込まれた多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列;

20

ii) 異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼを、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列;

iii) 本発明の改変EPAタンパク質を、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列

を含む宿主細胞を提供する。

【0115】

バイオコンジュゲートを生成することができる宿主細胞を製造する方法の開示が、国際公開第06/119987号パンフレット、国際公開第09/104074号パンフレット、国際公開第11/62615号パンフレット、国際公開第11/138361号パンフレット、国際公開第14/57109号パンフレット、国際公開第14/72405号パンフレット、及び国際公開第16/20499号パンフレットにおいて見出される。

30

【0116】

本発明のバイオコンジュゲートを生成するのに用いることができる宿主細胞として、古細菌、原核宿主細胞、及び真核宿主細胞が挙げられる。特定の実施形態において、宿主細胞は非ヒト宿主細胞である。本発明のバイオコンジュゲートの生成に用いられる例示的な原核宿主細胞として、エシェリキア(Escherichia)属種、赤痢菌属種、クレブシエラ属種、キサントモナス(Xanthomonas)属種、サルモネラ(Salmonella)属種、エルシニア(Yersinia)属種、ラクトコッカス(Lactococcus)属種、ラクトバチルス(Lactobacillus)属種、シュードモナス属種、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属種、ストレプトマイセス(Streptomyces)属種、連鎖球菌属種、ブドウ球菌属種、バチルス属種、及びクロストリジウム(Clostridium)属種が挙げられる。好ましくは、宿主細胞は大腸菌(例えば大腸菌K12 W3110)である。

40

【0117】

宿主細胞は、注目する多糖の合成と競合するか、又はこれに干渉する(例えば、宿主細胞中に組換えにより導入される1つ以上の異種多糖合成遺伝子と競合するか、又はこれに干渉する)宿主細胞遺伝的バックグラウンド(ゲノム)内の遺伝子を欠失させるか、又は改変するように改変されていてよい。これらの遺伝子は、不活性に/機能不全になるように宿主細胞バックグラウンド(ゲノム)において欠失し得、又は改変され得る(すなわち、欠

50

失している/改変されている宿主細胞ヌクレオチド配列は、全く機能タンパク質をコードしていないし、タンパク質をコードしていない)。一実施形態において、ヌクレオチド配列は、本発明の宿主細胞のゲノムから欠失している場合、所望の配列、例えば糖タンパク質生成に有用である配列によって置き換えられている。宿主細胞内で欠失する(そして、一部の例では、他の所望のヌクレオチド配列と置き換えられる)ことができる例示的な遺伝子として、糖脂質生合成に関与する宿主細胞の遺伝子、例えばwaaL(例えば、Feldmanら 2005年、PNAS USA 102巻:3016~3021頁参照)、O抗原クラスタ(rfb又はwbl)、腸内細菌共通抗原クラスタ(wec)、脂質Aコア生合成クラスタ(waa)、ガラクトースクラスタ(gal)、アラビノースクラスタ(ara)、コロニ酸(colonic acid)クラスタ(wc)、莢膜多糖クラスタ、ウンデカプレニール-ピロリン酸生合成遺伝子(例えばuppS(ウンデカプレニルピロリン酸シンターゼ)、uppP(ウンデカプレニルジホスファターゼ))、Und-Pリサイクリング遺伝子、ヌクレオチド活性化糖生合成に関与する代謝酵素、腸内細菌共通抗原クラスタ、及びgtrABSクラスタのようなプロファージO抗原改変クラスタが挙げられる。一実施形態において、waaL遺伝子、gtrA遺伝子、gtrB遺伝子、gtrS遺伝子、wecクラスタ由来の遺伝子、コロニ酸クラスタ(wc)由来の遺伝子、又はrfb遺伝子クラスタ由来の遺伝子の1つ以上が、本発明の原核宿主細胞のゲノムから欠失しているか、又は機能的に不活化されている。別の実施形態において、waaL遺伝子、gtrA遺伝子、gtrB遺伝子、gtrS遺伝子、wecクラスタ由来の遺伝子、又はrfb遺伝子クラスタ由来の遺伝子の1つ以上が、本発明の原核宿主細胞のゲノムから欠失しているか、又は機能的に不活化されている。特定の実施形態において、本発明の宿主細胞は大腸菌であり、wecAを除く天然の腸内細菌共通抗原クラスタ(ECA、wec)、コラン酸クラスタ(wca)、及びO16抗原クラスタは欠失している。加えて、天然のリポ多糖O抗原リガーゼwaaLは、本発明の宿主細胞から欠失してよい。加えて、天然のgtrA遺伝子、gtrB遺伝子、及びgtrS遺伝子は、本発明の宿主細胞から欠失してよい。

10

20

30

40

50

【0118】

本発明の宿主細胞は、異種ヌクレオチド配列を含むように操作されている。本発明の宿主細胞は、本発明の改変EPAタンパク質を、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列を含むように操作されている。また、本発明の宿主細胞は、多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。ゆえに、本発明の宿主細胞は、抗原、例えば本発明の改変EPAタンパク質に結合する単糖抗原(例えば細菌、酵母、哺乳動物の多糖抗原)を含むバイオコンジュゲートを生成することができる。1つ以上の異種ヌクレオチド配列は、細菌多糖抗原、酵母多糖抗原、又は哺乳動物多糖抗原を生成する多糖合成タンパク質をコードしてよい。ゆえに、本発明はまた:

i)細菌多糖抗原(例えば、グラム陰性菌由来の、場合により志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌由来のO抗原、又はグラム陽性菌由来の、場合により肺炎連鎖球菌若しくは黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖)又は酵母多糖抗原又は哺乳動物多糖抗原を生成するための、場合により宿主細胞ゲノム中に組み込まれた多糖合成遺伝子を含む1つ以上の異種ヌクレオチド配列;

ii)異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼを、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列;

iii)本発明の改変EPAタンパク質を、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列

を含む宿主細胞を提供する。

【0119】

本発明の宿主細胞は、単糖抗原(例えば細菌多糖抗原)を生成するのに、特に宿主細胞と異種である単糖抗原(例えば細菌多糖抗原)を生成するのに十分な1つ以上のヌクレオチド配列を含んでよい。例えば、宿主細胞が大腸菌である場合、宿主細胞は、大腸菌多糖抗原でない細菌の細菌多糖抗原を生成するのに十分な多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含んでよい。細菌多糖抗原は、O抗原であっても莢膜多糖抗原であってもよい。ゆえに、本発明はまた:

i) 細菌多糖抗原(例えば、グラム陰性菌由来の、場合により志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌由来のO抗原、又はグラム陽性菌由来の、場合により肺炎連鎖球菌若しくは黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖)を生成するための、場合により宿主細胞ゲノム中に組み込まれた多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列;

ii) 異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼを、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列;

iii) 本発明の改変EPAタンパク質を、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列

を含む宿主細胞を提供する。

【0120】

多糖合成遺伝子は、多糖の合成に係るタンパク質(多糖合成タンパク質)をコードする。一実施形態において、宿主細胞は、志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、及び肺炎桿菌から選択されるグラム陰性菌由来のO抗原、又は肺炎連鎖球菌及び黄色ブドウ球菌から選択されるグラム陽性菌由来の莢膜多糖を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含んでよい。別の実施形態において、宿主細胞は、フレクスナー赤痢菌及び肺炎桿菌から選択されるグラム陰性菌由来のO抗原、又は肺炎連鎖球菌及び黄色ブドウ球菌から選択されるグラム陽性菌由来の莢膜多糖を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含んでよい。

【0121】

細菌多糖抗原の生成用の宿主細胞

本発明の宿主細胞は、O抗原を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含んでよい。特定の実施形態において、宿主細胞は、サルモネラ属種、赤痢菌属種、シュドモナス属種、又はクレブシエラ属種由来のO抗原を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、宿主細胞は、赤痢菌属種、シュドモナス属種、又はクレブシエラ属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、又は肺炎桿菌)由来のO抗原を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、宿主細胞は、赤痢菌属種又はクレブシエラ属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、又は肺炎桿菌)由来のO抗原を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、宿主細胞は、志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、又はソンネ赤痢菌由来のO抗原を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。例えば、宿主細胞は、志賀赤痢菌1型、ソンネ赤痢菌、及びフレクスナー赤痢菌6型、並びにフレクスナー赤痢菌2a及び3a O (Dmitriev, B. A.ら Somatic Antigens of Shigella Eur J. Biochem, 1979年, 98巻: 8頁; Liuら Structure and genetics of Shigella O antigens FEMS Microbiology Review, 2008年, 32巻: 27頁)由来のO抗原を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含んでよい。一実施形態において、宿主細胞は、緑膿菌、例えば緑膿菌血清型1~20由来のO抗原を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、宿主細胞は、肺炎桿菌由来のO抗原を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。

【0122】

本発明の宿主細胞は、莢膜多糖を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含んでよい。特定の実施形態において、宿主細胞は、髄膜炎菌血清群A(MenA)、髄膜炎菌血清群C(MenC)、髄膜炎菌血清群Y(MenY)、髄膜炎菌血清群W(MenW)、インフルエンザ菌b型(Hib)、B群連鎖球菌(GBS)、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、宿主細胞は、連鎖球菌属種又はブドウ球菌属種(例えば肺炎連鎖球菌又は黄色ブドウ球菌)由来の莢膜多糖を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、宿主細胞は、黄色ブドウ球菌由来の、例えば黄色ブドウ球菌5型及び8型由来の莢膜多糖を生成するための多糖

10

20

30

40

50

合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、宿主細胞は、肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。

【0123】

細菌多糖抗原を生成するための異種ヌクレオチド配列を含む宿主細胞

本発明の宿主細胞は、単糖抗原(例えば細菌多糖抗原)の生成のための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を天然に発現してもよいし、宿主細胞は、1つ以上のそのようなヌクレオチド配列を発現するように操作されていてもよい。例えば、本発明の宿主細胞は、サイトゾル内の、オリゴ糖の連続アセンブリのための内因性の、又は異種の糖トランスフェラーゼ(サイトゾル糖トランスフェラーゼ)を利用してよい。異種ヌクレオチド配列(例えば、担体タンパク質をコードするヌクレオチド配列、及び/又は他のタンパク質、例えばグリコシル化に関与するタンパク質をコードするヌクレオチド配列)は、本発明の宿主細胞中に、方法、例えばエレクトロポレーション、ヒートショックによる化学形質転換、天然の形質転換、ファージ形質導入、及びコンジュゲーションを用いて導入することができる。特定の実施形態において、異種ヌクレオチド配列は、プラスミドを用いて、本発明の宿主細胞中に導入され、例えば、異種ヌクレオチド配列は、宿主細胞内で、プラスミド(例えば発現ベクター)によって発現される。別の特定の実施形態において、異種ヌクレオチド配列は、国際公開第14/037585号パンフレットに記載される挿入の方法を用いて、本発明の宿主細胞中に導入される。特定の実施形態において、本発明の宿主細胞は、宿主細胞と異種である多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、宿主細胞と異種である多糖合成遺伝子を含む前記ヌクレオチド配列の1つ以上が、宿主細胞のゲノム中に組み込まれる。異種ヌクレオチド配列は、以下に限定されないが、糖トランスフェラーゼ、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、エピメラーゼ、フリッパーゼ、及び/又はポリメラーゼをコードしてよい。特定の実施形態において、本発明の宿主細胞は、糖トランスフェラーゼをコードする1つ以上の異種ヌクレオチド配列を含む。前記糖トランスフェラーゼは、例えばエシェリキア属種、赤痢菌属種、クレブシエラ属種、サルモネラ属種、シュードモナス属種、連鎖球菌属種、又はブドウ球菌属種に由来し得る。

【0124】

本発明の宿主細胞は、O抗原を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上の異種ヌクレオチド配列を含んでよい。特定の実施形態において、宿主細胞は、O抗原を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、サルモネラ属種、赤痢菌属種、シュードモナス属種、又はクレブシエラ属種由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、宿主細胞は、O抗原を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、赤痢菌属種、シュードモナス属種、又はクレブシエラ属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、又は肺炎桿菌)由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、宿主細胞は、O抗原を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、赤痢菌属種又はクレブシエラ属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、又は肺炎桿菌)由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、宿主細胞は、O抗原を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、又はソンネ赤痢菌由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含む。例えば、宿主細胞は、O抗原を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、志賀赤痢菌1型、ソンネ赤痢菌、及びフレクスナー赤痢菌6型、並びにフレクスナー赤痢菌2a及び3a由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含んでよい。一実施形態において、宿主細胞は、O抗原を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、緑膿菌、例えば緑膿菌血清型1~20由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、宿主細胞は、O抗原を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、肺炎桿菌由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含む。O抗原をコードするヌクレオチド配列は、rfbクラスタであってもよい。本明細書中で用いられるrfbクラスタは、O抗原を合成できる酵素機構をコードする遺伝子クラスタを指す。宿主細胞は、志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソ

10

20

30

40

50

ンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌由来のrfb遺伝子クラスタを含んでもよい。

【0125】

本発明の宿主細胞は、莢膜単糖を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上の異種ヌクレオチド配列を含んでよい。特定の実施形態において、宿主細胞は、莢膜単糖を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、髄膜炎菌血清群A(MenA)、髄膜炎菌血清群C(MenC)、髄膜炎菌血清群Y(MenY)、髄膜炎菌血清群W(MenW)、インフルエンザ菌b型(Hib)、B群連鎖球菌(GBS)、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、宿主細胞は、莢膜多糖を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、連鎖球菌属種又はブドウ球菌属種(例えば肺炎連鎖球菌又は黄色ブドウ球菌)由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、宿主細胞は、莢膜多糖を生成するための多糖合成タンパク質をコードする、黄色ブドウ球菌由来の、例えば黄色ブドウ球菌5型及び8型由来の1つ以上のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、宿主細胞は、肺炎連鎖球菌から莢膜多糖を生成するための多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列を含む。ヌクレオチド配列は、莢膜多糖遺伝子クラスタであってよい。宿主細胞は、連鎖球菌系統(例えば肺炎連鎖球菌、A群溶血性連鎖球菌(*S. pyogenes*)、B群溶血性連鎖球菌(*S. agalacticae*))、ブドウ球菌系統(例えば黄色ブドウ球菌)由来の莢膜多糖遺伝子クラスタを含んでよい。肺炎連鎖球菌についての莢膜多糖遺伝子クラスタは、肺炎球菌染色体内のdexBとaliA間にマップされる(Llullら、1999年、J. Exp. Med. 190巻、241~251頁)。典型的には、莢膜多糖遺伝子クラスタの5'末端に4つの比較的保存された遺伝子:(wzg)、(wzh)、(wzd)、(wze)が存在する(Jiangら、2001年、Infect. Immun. 69巻、1244~1255頁)。また、肺炎連鎖球菌の莢膜多糖遺伝子クラスタ内に含まれるのは、wzx(多糖フリッパーゼ遺伝子)及びwzy(多糖ポリメラーゼ遺伝子)である。全90種の肺炎連鎖球菌血清型のCP遺伝子クラスタが、Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pneumoniae/CPS/)によって配列決定されており、89種の血清型のwzx及びwzyが注釈且つ分析されている(Kongら、2005年、J. Med. Microbiol. 54巻、351~356頁)。肺炎連鎖球菌の莢膜生成遺伝子はさらに、Bentleyら(PLoS Genet. 2006年3月; 2巻(3号): e31頁に記載されており、配列がGenBankに提供されている。ゆえに、一実施形態において、本発明の宿主細胞はさらに、ポリメラーゼ(例えばwzy)、フリッパーゼ(例えばwzx)をコードするヌクレオチド配列、及び場合により鎖長調節因子(例えばwzz)をコードするヌクレオチド配列を含んでよい。

【0126】

特定の実施形態において、宿主細胞はまた、rfbクラスタ又は莢膜多糖クラスタの外側に位置決めされている異種ヌクレオチド配列を含んでもよい。例えば、rfbクラスタ又は莢膜多糖クラスタの外側に見出されて、組換え多糖を改変する、糖トランスフェラーゼ及びアセチルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、宿主細胞中に導入され得る。

【0127】

オリゴサッカリルトランスフェラーゼ

N結合タンパク質グリコシル化(標的タンパク質のポリペプチド鎖内のアスパラギン残基への炭水化物分子の付加)は、真核生物の小胞体内で起こる最も共通した翻訳後改変タイプである。プロセスは、酵素オリゴサッカリルトランスフェラーゼ複合体(OST)によって達成され、これは、小胞体において、保存配列Asn-X-Ser/Thr(式中、Xは、プロリン以外のあらゆるアミノ酸である)内の発生期のタンパク質の脂質担体(ドリコールリン酸)からアスパラギン残基への、プレアセンブルされるオリゴ糖の移行を担う。

【0128】

また、細菌である食物媒介性病原体カンピロバクター・ジェジュニが、それ自体のグリコシル化機構を有するという事実に起因して、タンパク質をNグリコシル化することができることが示されている(Wackerら Science. 2002年; 298巻(5599号): 1790~3頁)。この反応を担う機構は、(タンパク質グリコシル化のための)「pgl」と呼ばれるク

ラストによってコードされている。C.ジェジュニグリコシル化機構は、大腸菌に移行されて、大腸菌細胞によって発現される組換えタンパク質のグリコシル化を可能にし得る。以前の研究は、Nグリコシル化を実行することができる大腸菌系統を生成する方法を実証している(例えば、Wackerら *Science*. 2002年; 298巻(5599号): 1790~3頁; Nita-Lazarら *Glycobiology*. 2005年; 15巻(4号): 361~7頁; Feldmanら *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005年; 102巻(8号): 3016~21頁; Kowarikら *EMBO J*. 2006年; 25巻(9号): 1957~66頁; Wackerら *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006年; 103巻(18号): 7088~93頁; 国際公開第2003/074687号パンフレット、国際公開第2006/119987号パンフレット、国際公開第2009/104074号パンフレット、国際公開第2011/06261号パンフレット、及び国際公開第2011/138361号パンフレット参照)。

10

【0129】

本発明の宿主細胞は、場合によりプラスミド内で、異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、カンピロバクター属由来のオリゴサッカリルトランスフェラーゼである。別の特定の実施形態において、オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、場合によりカンピロバクター・ジェジュニ由来のpglBである(すなわちpglB;例えばWackerら 2002年、*Science* 298巻:1790~1793頁参照;また、例えばNCBI Gene ID: 3231775、UniProt Accession No. O86154参照)配列番号24:

20

MLKKEYLKNPYLVLFAMIILAYVFSVFCRFYWVWWASEFNEYFFNNQLMIISNDGY
AFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGSSLSALTYWLYKITPFSFESIILYMSTFLSSLVVIP
TILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSSYYNRTMSGYYDTDMLVIVLPMFILFFMVRMI
LKKDFFSLIALPLFIGIYLWWYPSSYTINVALIGLFLIYTLIFHRKEKIFYIAVILSSLT
LSNIAWFYQSAIIVILFALFALEQKRLNFMIIIGILGSATLIFLILSGGVDPIYLQKFYIF
RSDSANLTQGFMYFNVNQTIQEVENVDLSEFMRRISGSEIVFLFSLFGFVWLLRKH
KSMIMALPILVLGLALKGGLRFTIYSVPMALGFGFLLSEFKAIMVKKYSQLTSNVC
IVFATILTAPVFIHIYNYKAPT VFSQNEASLLNQLKNIANREDYVVTWWDYGY PVR
YYSDVKTLVDGGKHLGKDNFFPSFALSKDEQAAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILK
TDILQAMMKDYNQSNVDLFLASLSKPDFKIDTPKTRDIYLYMPARMSLIFSTVASFS
FINLDTGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEIYLSNGVVLSDDFRSFKIGDNVSVNSIVEI
NSIKQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYDK
NLFDLVINSRDAKVFKLKI

30

【0130】

ゆえに、本発明の宿主細胞は、pglB、場合によりカンピロバクター・ジェジュニ由来のpglBをコードするヌクレオチド配列、場合により配列番号24と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一の配列を有するカンピロバクター・ジェジュニ由来のpglBをコードするヌクレオチド配列を、場合によりプラスミド内に含んでよい。

【0131】

ポリメラーゼ

また、本発明の宿主細胞は、ポリメラーゼをコードするヌクレオチド配列(例えばwzy)を含んでもよい。一実施形態において、ポリメラーゼ(例えばwzy)は、本発明の宿主細胞中に導入される(すなわち、ポリメラーゼは、宿主細胞と異種である)。一実施形態において、ポリメラーゼは細菌ポリメラーゼである。一実施形態において、ポリメラーゼは荚膜多糖ポリメラーゼ(例えばwzy)又はO抗原ポリメラーゼ(例えばwzy)である。一実施形態において、ポリメラーゼは、例えば赤痢菌属種、シュドモナス属種、又はエシェリキア属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、又は大腸菌)由来のO抗原多糖ポリメラーゼ(例えばwzy)である。一実施形態において、ポリメラーゼは、例えば髄膜炎菌血清群A(MenA)、髄膜炎菌血清群C(MenC)、髄膜炎菌血清群Y(MenY)、髄膜炎菌血清群W(MenW)、インフルエンザ菌b型(Hib)、B群連鎖球菌(GBS)、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌由来の荚膜多糖ポリメラーゼ(例えばwzy)である。一実施

40

50

形態において、ポリメラーゼは、肺炎連鎖球菌の莢膜多糖ポリメラーゼ(例えばwzy)である。前記wzyポリメラーゼは、rfbクラスタ又は莢膜多糖クラスタの一部として前記宿主細胞内に組み込まれてよい(例えば、ゲノム中に挿入されるか、又はプラスミドによって発現される)。ゆえに、本発明の宿主細胞は、異種wzyポリメラーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含んでよい。

【0132】

フリッパーゼ

また、本発明の宿主細胞は、フリッパーゼ(例えばwzx)、例えば異種フリッパーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。フリッパーゼは、野生型反復単位及び/又はその対応する操作された(ハイブリッド)反復単位を、宿主細胞(例えば大腸菌)の細胞質から周辺質中に転位させる。一実施形態において、フリッパーゼは、細菌フリッパーゼ、例えば注目する多糖生合成経路のフリッパーゼである。特定の実施形態において、本発明の宿主細胞は、連鎖球菌属種、赤痢菌属種、エシェリキア属種、シュードモナス属種、又はブドウ球菌属種(例えば肺炎連鎖球菌、志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、大腸菌、緑膿菌、又は黄色ブドウ球菌)の多糖生合成経路のフリッパーゼ(例えばwzx遺伝子)をコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、フリッパーゼは、肺炎連鎖球菌の莢膜多糖フリッパーゼ(例えばwzx)である。本発明の宿主細胞中に導入することができる他のフリッパーゼは、例えばカンピロバクター・ジェジュニ由来のもの(例えばpglK)である。

【0133】

アクセサリ酵素

一実施形態において、1つ以上のアクセサリ酵素をコードするヌクレオチド配列が、本発明の宿主細胞中に導入されている。ゆえに、本発明の宿主細胞は、これらのアクセサリ酵素の1つ以上をさらに含んでよい。1つ以上のアクセサリ酵素をコードするそのようなヌクレオチド配列は、プラスミドが保持していてもよいし、本発明の宿主細胞のゲノム中に組み込まれていてもよい。例示的なアクセサリ酵素として、エピメラーゼ(例えば国際公開第2011/062615号パンフレット)、分枝酵素、改変(例えば、コリン(cholin)、グリセロールリン酸、ピルパートを付加する)酵素、アミド化酵素、鎖長調節酵素、アセチル化酵素、ホルミル化酵素、重合酵素が挙げられるが、これらに限定されない。ゆえに、本発明の宿主細胞はまた、鎖長調節因子(例えばwzz)、例えば異種鎖長調節因子をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。一実施形態において、鎖長調節因子は、肺炎連鎖球菌の莢膜多糖鎖長調節因子(例えばwzz)である。

【0134】

バイオコンジュゲート

本発明は、抗原(例えば細菌多糖抗原又は酵母多糖抗原又は哺乳動物多糖抗原)に連結された本発明の改変EPAタンパク質を含むバイオコンジュゲートを提供し、特定の形態において、前記抗原は、O抗原又は莢膜多糖である。一実施形態において、抗原は、グラム陰性菌由来のO抗原である。一実施形態において、本発明は、抗原に連結された本発明の改変EPAタンパク質を含むバイオコンジュゲートを提供し、抗原は、単糖、場合により細菌多糖(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌由来)である。一実施形態において、本発明は、抗原に連結された本発明の改変EPAタンパク質を含むバイオコンジュゲートを提供し、抗原は、細菌多糖(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、肺炎桿菌、又は肺炎連鎖球菌由来)である。別の実施形態において、本発明は、抗原に連結された本発明の改変EPAタンパク質を含むバイオコンジュゲートを提供し、抗原は、フレクスナー赤痢菌、肺炎桿菌、又は肺炎連鎖球菌由来の細菌多糖である。抗原は、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、システイン、チロシン、ヒスチジン、アルギニン、又はトリプトファンから選択される改変EPAタンパク質上のアミノ酸(例えばアスパラギン)に連結される。本明細書中に記載されるバイオコンジュゲートは、製造においてあまり化学物質を必要とせず、そして生成される最終生成物に関してより不変である点

で、抗原-担体タンパク質の化学コンジュゲートに勝る有利な特性を有する。

【0135】

本発明の更なる態様が、単糖に連結された改変EPAタンパク質を含む(又はこれからなる)バイオコンジュゲートを生成するプロセスであり、前記プロセスは、(i)糖タンパク質の生成に適した条件の下で本発明の宿主細胞を培養すること、及び(ii)前記宿主細胞によって生成されるバイオコンジュゲートを、場合により宿主細胞由来の周辺質抽出物からバイオコンジュゲートを単離することによって、単離することを含む。

【0136】

例えば、バイオコンジュゲートは、例えばLB振盪フラスコ内で、振盪フラスコプロセスを用いてなされ得る。本発明の態様において、細菌内の組換えグリコシル化タンパク質の生成のための流加プロセスを、本発明のバイオコンジュゲートを生成するのに用いることができる。目的は、細胞あたりのグリコシル化効率及び組換えタンパク質収率を増大させながら、プロセスにおいて簡素さ及び再現性を維持することである。本発明のバイオコンジュゲートは、典型的な大腸菌生成プロセスを用いる最適化された製造方法を開発することによって商業規模で製造することができる。種々のタイプのフィード戦略、例えばバッチ、ケモスタット、及び流加を用いることができる。

【0137】

本発明のバイオコンジュゲートは、例えばクロマトグラフィ(例えば、イオン交換、陰イオン交換、アフィニティ、及びサイジングカラムクロマトグラフィ)、遠心分離、溶解度差によって、又はタンパク質の精製のための他の標準的なあらゆる技術によって精製することができる。例えば、Saraswatら 2013年、Biomed. Res. Int. ID#312709 (1~18頁)参照;また、国際公開第2009/104074号パンフレットに記載される方法参照。さらに、バイオコンジュゲートは、本明細書中に記載されているか、又は精製を促進することが当該技術において公知の異種ポリペプチド配列に融合してよい。

【0138】

分析方法

種々の方法を用いて、本発明のバイオコンジュゲートの構造組成及び糖鎖長を分析すること、そしてグリコシル化部位の使用を決定することができる。

【0139】

ヒドラジン分解を用いて、グリカン进行分析することができる。最初に、メーカーの説明書に従うヒドラジンとのインキュベーションによって、タンパク質担体から多糖が放出される(Ludger Liberate Hydrazinolysis Glycan Release Kit、Oxfordshire、UK)。求核分子ヒドラジンが、多糖と担体タンパク質間のグリコシド結合を攻撃して、結合したグリカンの放出を可能にする。N-アセチル基が、この処置の間に失われて、再-N-アセチル化によって再構成されなければならない。遊離グリカンが、炭素カラム上で精製されてから、還元末端にて、フルオロフォアである2-アミノベンズアミドにより標識される。Bigge JC、Patel TP、Bruce JA、Goulding PN、Charles SM、Parekh RB: Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. Anal Biochem 1995年、230巻(2号): 229~238頁参照。標識された多糖は、RoyleらのHPLCプロトコールに従ってGlycoSep-Nカラム(GL Sciences)により分離される。Royle L、Mattu TS、Hart E、Langridge JI、Merry AH、Murphy N、Harvey DJ、Dwek RA、Rudd PM: An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins. Anal Biochem 2002年、304巻(1号): 70~90頁参照。結果として生じる蛍光クロマトグラムは、反復単位の子糖長及び数を示す。構造情報は、個々のピークを収集してからMS/MS分析を実行することによって集めることができる。これによって、反復単位の子糖組成及び配列を確認することができ、そして加えて、多糖組成の均質性を同定することができる。これ以外にも、ハイマスMS及びサイズ排除HPLCを使用して、完全なバイオコンジュゲートのサイズを測定することができる。

10

20

30

40

50

【0140】

収率は、制御且つ最適化された条件下のバイオリアクタ内で増殖される1リットルの細菌生成培養に由来する炭水化物量として測定されてよい。バイオコンジュゲートの精製後に、炭水化物収率を、炭水化物特異的抗血清を用いるアントロンアッセイ又はELISAによって直接測定することができる。タンパク質量(BCA、Lowry、又はbardfordアッセイによって測定される)、並びにグリカン長及び構造を用いて、タンパク質1グラムあたりの理論炭水化物量を算出することによる間接的な測定が可能である。加えて、収率はまた、揮発性のバッファから糖タンパク質調製物を乾燥させて、はかりを用いて重量を測定することによって測定することができる。

【0141】

例えば、SDS-PAGE又はキャピラリゲル電気泳動が挙げられる種々の方法を、本発明のコンジュゲートを分析するのに用いることができる。ポリマー長は、直線的にアセンブルされている反復単位の数によって定義される。これは、典型的なラダー様パターンが、グリカンを構成する異なる反復単位数の結果であることを意味する。ゆえに、SDS PAGE(又はサイズによって分離する他の技術)において互いに隣合う2つのバンドは、単一の反復単位のみによって異なる。この離散的な差異が、グリカンサイズについて糖タンパク質を分析する場合に利用される:ポリマー鎖長が異なる非グリコシル化担体タンパク質及びバイオコンジュゲートは、それらの電気泳動的な機動性に従って分離する。バイオコンジュゲート上に存在する第1の検出可能な反復単位数(n_1)及び平均反復単位数($n_{average}$)が測定される。これらのパラメータを用いて、例えば、バッチ間の整合性又は多糖安定性を実証することができる。

【0142】

グリコシル化部位の使用は、例えば、グリコペプチドLC-MS/MSによって定量化されてよい:コンジュゲートはプロテアーゼにより消化され、ペプチドは、適切なクロマトグラフィ法(C18、親水性相互作用HPLC HILIC、GlycoSepNカラム、SE HPLC、AE HPLC)によって分離され、そして異なるペプチドはMS/MSを用いて同定される。この方法は、化学的方法(スミス分解)又は酵素的方法による以前の糖鎖短縮と共に用いることも、それなしに用いることもできる。215~280nmでのUV検出を用いたグリコペプチドピークの定量化は、グリコシル化部位の使用の相対的な決定を可能にする。別の実施形態において、部位の使用は、サイズ排除HPLCによって定量化されてよい:グリコシル化部位の使用が高いほど、SE HPLCカラムからのより早期の溶出時間によって反映される。さらに別の実施形態において、部位の使用は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)後に、Coomassie Brilliant Blueにより染色された精製バイオコンジュゲートの定量的濃度測定によって定量化されてよい。

【0143】

免疫原性組成物及びワクチン

本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)は、免疫原性組成物及びワクチン内での包含に特に適している。

【0144】

本発明は、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、並びに場合により薬学的に許容される賦形剤及び/又は担体を含む免疫原性組成物を提供する。

【0145】

免疫原性組成物は、免疫学的に有効な量の本発明の改変EPAタンパク質又はコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、及び他のあらゆる構成要素を含む。「免疫学的に有効な量」は、単回用量としての、又はシリーズの一部としての、その量の個体への投与が、処置又は予防に有効であることを意味する。当該量は、処置されることとなる個体の健康及び体調、年齢、所望される保護の程度、ワクチンの配合、並びに他の関連因子に応じて変化する。

【0146】

薬学的に許容される賦形剤及び担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sci

10

20

30

40

50

ences(E. W. Martin、Mack Publishing Co. Easton、PA、第5版(1975年)に記載されている。薬学的に許容される賦形剤として、バッファ、例えばリン酸バッファ(例えばリン酸ナトリウム)が挙げられ得る。薬学的に許容される賦形剤として、塩、例えば塩化ナトリウムが挙げられ得る。薬学的に許容される賦形剤として、可溶化/安定化剤、例えばポリソルバート(例えばTWEEN 80)が挙げられ得る。薬学的に許容される賦形剤として、防腐剤、例えば2-フェノキシエタノール又はチオメルサールが挙げられ得る。薬学的に許容される賦形剤として、担体、例えば水又は生理食塩水が挙げられ得る。

【0147】

また、提供されるのは、本発明の免疫原性組成物を製造する方法であって、本発明の改変EPAタンパク質又はコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)を、薬学的に許容される賦形剤及び/又は担体と混合する工程を含む方法である。

10

【0148】

また、本発明は、場合によりアジュバントを含む免疫原性組成物(例えばワクチン組成物)を提供する。

【0149】

用語「アジュバント」は、本発明のワクチンの免疫原性組成物と併せて、又はその一部として投与される場合、改変EPAタンパク質コンジュゲート/バイオコンジュゲートに対する免疫応答を増大、増強、及び/又はブーストするが、単独で投与される場合、改変EPAタンパク質コンジュゲート/バイオコンジュゲートに対する免疫応答を生じさせない化合物を指す。アジュバントは、例えばリンパ球補充、B及び/又はT細胞の刺激、並びにマクロファージの刺激が挙げられるいくつかの機構によって免疫応答を増強することができる。アジュバントの具体的な例として、以下に限定されないが、アルミニウム塩(ミョウバン)(例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、及び硫酸アルミニウム)、3つの脱O-アシル化モノホスホリル脂質A(MPL)(英国特許第2220211号明細書参照)、MF59(Novartis)、AS01(GlaxoSmithKline)、及びサポニン、例えばQS21(Kensilら、於Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell & Newman編、Plenum Press、NY、1995年);米国特許第5,057,540号明細書参照)が挙げられる。一部の実施形態において、アジュバントは、フロイントアジュバント(完全又は不完全)である。他のアジュバントは、場合により免疫刺激薬、例えばモノホスホリル脂質Aと組み合わせた水中油エマルジョン(例えばスクアレン又はピーナッツ油)である(Stout et al. N. Engl. J. Med. 336巻、86~91頁(1997年)参照)。

20

30

【0150】

また、提供されるのは、本発明の免疫原性組成物を製造する方法であって、本発明の改変EPAタンパク質又はコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)を、薬学的に許容される賦形剤及び/又は担体、並びにアジュバントと混合する工程を含む方法である。ワクチン調製物は、通常、Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (Powell M.F.及びNewman M.J.編)(1995年) Plenum Press New York)に記載されている。

【0151】

本発明の免疫原性組成物は、コンテナ、パック、又はディスペンサ内に、投与についての説明書と共に含まれ得る。

40

【0152】

本発明の免疫原性組成物又はワクチンは、使用前に保存することができ、例えば組成物は、凍結保存(例えば約-20℃又は約-70℃);冷蔵条件(例えば約4℃)で保存;又は室温にて保存することができる。本発明の免疫原性組成物又はワクチンは、溶液中に保存されてもよいし、凍結乾燥されてもよい。一実施形態において、溶液は、糖、例えばスクロース、トレハロース、又はラクトースの存在下で凍結乾燥される。別の実施形態において、本発明のワクチンは凍結乾燥されて、使用前に即座に再構成される。

【0153】

投与及び投薬量

50

本発明の免疫原性組成物又はワクチンは、前記免疫原性組成物又はワクチンを全身経路又は粘膜経路を介して投与することによって、対象(例えば哺乳動物)を保護又は処置するのに用いられてよい。これらの投与として、筋肉内(IM)、腹腔内、皮内(ID)、若しくは皮下(SC)経路を介した注射;又は口/食物、呼吸、尿生殖器管への粘膜投与を介するものが挙げられ得る。

【0154】

一態様において、本発明の免疫原性組成物又はワクチンは、筋肉内送達経路によって投与される。筋肉内投与は、腿部又は上腕部になされてよい。注射は典型的に、針(例えば皮下注射針)を介するが、これ以外にも、針のない注射が用いられてもよい。典型的な筋注投与は、0.5mlである。

【0155】

別の態様において、本発明の免疫原性組成物又はワクチンは、皮内投与によって投与される。ヒトの皮膚は、角質層と呼ばれる外側の「角質」小皮を含み、これが表皮を覆う。この表皮の下には真皮と呼ばれる層があり、これが今度は皮下組織を覆う。皮内注射の従来の技術である「マントゥー手順」は、皮膚をクリーニングしてから、一方の手でストレッチして、ゲージ数の小さい針(26〜31ゲージ)のベベルを上方に向けて、針を10〜15°の角度にて挿入する工程を含む。針のベベルを挿入し次第、針の筒を低くしてさらに進めながら、皮膚の下で持ち上げるほどの僅かな圧力を加える。続いて、液体を非常にゆっくり注入することによって、皮膚表面上にブレブ又はバンプを形成してから、針をゆっくり引き出す。

【0156】

別の態様において、本発明の免疫原性組成物又はワクチンは、鼻腔内投与によって投与される。典型的には、免疫原性組成物又はワクチンは、例えば肺に吸入されることなく、鼻咽頭領域に局所投与される。免疫原性組成物又はワクチン製剤を、肺に入れることなく、又は肺に実質的に入れることなく、鼻咽頭領域に送達する鼻腔内送達デバイスを用いることが所望される。本発明に従うワクチンの鼻腔内投与に適したデバイスはスプレーデバイスである。商業的に入手可能な適切な鼻腔用スプレーデバイスとして、ACCUSPRAY(商標)が挙げられる(Becton Dickinson)。

【0157】

各免疫原性組成物又はワクチン用量におけるコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)の量は、典型的なワクチンにおける、重大な有害副作用なく免疫保護応答を誘導する量として選択される。そのような量は、どの特異的免疫原が使用されるか、そして如何に示されるかに応じて変化する。コンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)の含有量は典型的に、範囲1〜100 µg、適切には5〜50 µgとなる。

【0158】

予防用途及び治療用途

また、本発明は、医薬に用いられる本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンを提供する。

【0159】

本発明は、対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導する方法であって、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンの治療的に、又は予防的に有効な量を、誘導を必要とする対象(例えばヒト)に投与することを含む方法を提供する。また、本発明は、対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導するのに用いられる、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンを提供する。また、本発明は、対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導するための薬剤の製造に用いられる、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンを提供する。

【0160】

また、本明細書中で提供されるのは、対象において細菌に対する免疫応答を誘導する方

10

20

30

40

50

法であって、対象に、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンを投与することを含む方法である。本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンは、細菌、例えば、赤痢菌属種、緑膿菌、肺炎桿菌、髄膜炎菌、インフルエンザ菌b型(Hib)、B群連鎖球菌(GBS)、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌に対する免疫応答を誘導するのに用いることができる。一実施形態において、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンは、細菌、例えば連鎖球菌属種、赤痢菌属種、シュードモナス属種、クレブシエラ属種、又はブドウ球菌属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌)に対する免疫応答を誘導するのに用いることができる。一実施形態において、前記対象は、投与時に細菌感染症を有する。別の実施形態において、前記対象は、投与時に細菌感染症を有していない。

10

【0161】

また、本明細書中で提供されるのは、対象において、細菌に対するオプソニン作用抗体(opsonophagocytic antibody)の生成を誘導する方法であって、対象に、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンを投与することを含む方法である。本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンは、対象において、細菌、例えば赤痢菌属種、緑膿菌、肺炎桿菌、髄膜炎菌、インフルエンザ菌b型(Hib)、B群連鎖球菌(GBS)、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌に対するオプソニン作用抗体の生成を誘導するのに用いることができる。一実施形態において、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンは、対象において、細菌、例えば連鎖球菌属種、赤痢菌属種、シュードモナス属種、クレブシエラ属種、又はブドウ球菌属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌)に対するオプソニン作用抗体の生成を誘導するのに用いることができる。

20

【0162】

また、本発明は、対象において酵母感染症又は細菌感染症を処置及び/又は予防する方法であって、対象に、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)を投与することを含む方法を提供する。コンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)は、免疫原性組成物又はワクチンの形態であってよい。ゆえに、本発明は、対象(例えばヒト)において酵母感染症又は細菌感染症を処置及び/又は予防する方法であって、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンの治療的に、又は予防的に有効な量を、処置及び/又は予防を必要とする対象(例えばヒト)に投与することを含む方法を提供する。また、本発明は、対象(例えばヒト)において酵母感染症又は細菌感染症を処置及び/又は予防するのに用いられる、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンを提供する。また、本発明は、対象(例えばヒト)において酵母感染症又は細菌感染症を処置及び/又は予防するための薬剤の製造に用いられる、本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、本発明の免疫原性組成物、又は本発明のワクチンを提供する。特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物又はワクチンは、細菌による対象の感染症の予防に用いられる。本発明のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)を用いて処置及び/又は予防することができる細菌感染症として、髄膜炎菌、インフルエンザ菌b型(Hib)、連鎖球菌属種、赤痢菌属種、シュードモナス属種、クレブシエラ属種、又はブドウ球菌属種(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌)によって引き起こされるものが挙げられる。

30

40

【0163】

本発明の実施形態が、以降の番号付けした段落においてさらに記載される：

1. 配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する改変EPA(緑膿菌の

50

Exotoxin A)タンパク質であって、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、1つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸;又は205~211間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基D218;例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基271~277間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R279、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基315~321間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基G323、例えばアミノ酸残基S318)、及び(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;又はアミノ酸残基516~522間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基G525、例えばアミノ酸残基A519)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、改変EPAタンパク質。

2.配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する段落1の改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)であって、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、2つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択される1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、改変EPA。

3.配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列を有する段落1の改変EPA(緑膿菌のExotoxin A)タンパク質であって、これは、アミノ酸配列が:D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される3つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列を含むという点で改変されており、X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、3つ(又はそれ以上)のコンセンサス配列は各々:配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基264~284間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基269~279間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基R274)、(iii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、(iv)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)、及び(v)アミノ酸残基230~250間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基235~245間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基K240)から独立して選択される1つ以上の

アミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、改変EPAタンパク質。

4.D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択されるコンセンサス配列は、各々独立して、配列番号1のアミノ酸配列の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸を置換している(例えば、各コンセンサス配列は、単一のアミノ酸残基、例えばY208、R274、S318、及びA519から選択される単一のアミノ酸残基を置換している)、段落1~3のいずれかの改変EPAタンパク質。

5.D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択される更なるコンセンサス配列(X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、J及びUは独立して、1~5つの天然に存在するアミノ酸残基である)は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のN末端の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、段落1~4のいずれかの改変EPAタンパク質。

6.D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びJ-D/E-X-N-Z-S/T-U(配列番号5)から選択される更なるコンセンサス配列(X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、J及びUは独立して、1~5つの天然に存在するアミノ酸残基である)は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置のC末端の1つ以上のアミノ酸の隣に付加されているか、又は1つ以上のアミノ酸を置換している、段落1~5のいずれかの改変EPAタンパク質。

7.D/E-X-N-Z-S/T(配列番号2)及びK-D/E-X-N-Z-S/T-K(配列番号3)から選択される少なくとも1つのコンセンサス配列(X及びZは独立して、プロリン以外のあらゆるアミノ酸である)は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列内の等しい位置の(i)アミノ酸残基198~218間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基203~213間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基Y208)、(ii)アミノ酸残基308~328間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基313~323間の1つ以上のアミノ酸、例えばアミノ酸残基S318)、又は(iii)アミノ酸残基509~529間の1つ以上のアミノ酸(例えばアミノ酸残基514~524間の1つ以上のアミノ酸;例えばアミノ酸残基A519)の隣に付加されているか、又はこれを置換している、段落1~6のいずれかの改変EPAタンパク質。

8.改変EPAタンパク質は、2つのコンセンサス配列を含有し、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列の(i)Y208及びR274、(ii)Y208及びS318、(iii)Y208及びA519、(iv)R274及びS318、(v)R274及びA519、又は(vi)S318及びA519から選択されるアミノ酸残基を置換している、段落1~7のいずれかの改変EPAタンパク質。

9.改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208及びR274を置換している2つのコンセンサス配列を含有し、場合により、配列番号6:

AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPAPAIADTNGQGV LHYSMVLEGGNDAL
KLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSTRQARGSWSLNWLVP IGHKPSNIK
VFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAG
VSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNKDQNA TKLAQQR CNLDDT
WEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLP LEAFTKDQ
NATKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDL
GEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLT CPVAAGECAGP
ADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYV FVG

YHGTFLCAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWGRFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRN
GALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLAAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRV
TILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPRED
LK

と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む(又はこれからなる)、段落8の改変EPAタンパク質。

10.改変EPAタンパク質は、3つのコンセンサス配列を含有し、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208、R274、及びA519を置換している、段落1~7のいずれかの改変EPAタンパク質。

11.改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208、R274、及びA519を置換している3つのコンセンサス配列を含有し、場合により、配列番号7:

AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPAPAIADTNGQGV LHYSMVLEGGNDAL
KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVP IGHKPSNIK
VFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAG
VSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNKDQNA TKLAQQRCNLDDT
WEGKIYRVLAGNPAKHDL DIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLP LEAFTKDQ
NATKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDL
GEAIREQPEQARLALT LAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLT CPVAAGECAGP
ADSGDALLERNYPTGA EFLGDGGDV SFSTRGTQNWTV ERLLQAHRQLEERGYV FVG
YHGTFLCAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWGRFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRN
GALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQNA TKAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPE
EEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPG
KPPREDLK

と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む(又はこれからなる)、段落10の改変EPAタンパク質。

12.改変EPAタンパク質は、4つのコンセンサス配列を含有し、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208、R274、A519を置換しており、そしてこのN末端アミノ酸の隣に付加されている、段落1~7のいずれかの改変EPAタンパク質。

13.改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208、R274、A519を置換しており、そしてこのN末端アミノ酸の隣に付加されている4つのコンセンサス配列を含有し、場合により、配列番号8:

GSGGGDQNA TGSGGGKLAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPAPAIADTNG
QGV LHYSMVLEGGNDAL KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGS
WSLNWLVP IGHKPSNIK VFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFV
RAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNK
DQNA TKLAQQRCNLDDT WEGKIYRVLAGNPAKHDL DIKPTVISHRLHFPEGGSLAA
LTAHQACHLP LEAFTKDQNA TKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQ
VDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALT LAAAESERFVRQGTGNDEAGAAS
ADVSLT CPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGA EFLGDGGDV SFSTRGTQNWTV E
RLLQAHRQLEERGYV FVG YHGTFLCAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWGRFYIAGDPAL
AYGYAQDQEPDARGRIRN GALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQNA TKAPEAAAGEV
ERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSI
PDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を場

合により含む(又はこれからなる)、段落12の改変EPAタンパク質。

14.改変EPAタンパク質は、5つのコンセンサス配列を含有し、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208の置換、アミノ酸残基R274の置換、アミノ酸残基S318の置換、アミノ酸残基A519の置換、N末端での付加、及びC末端での付加から選択される、段落1~7のいずれかの改変EPAタンパク質。

15.改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208の置換、アミノ酸残基R274の置換、アミノ酸残基S318の置換、アミノ酸残基A519の置換、N末端での付加、及びC末端での付加から選択される5つのコンセンサス配列を含有し、これは場合により、配列番号9、10、又は11:

10

配列番号9

GSGGG**QDNAT**GSGGGAEAAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPADTNGQGVLYHSMVLEGGNDAL
KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFHILNAGNQLSHMSPI
YTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGV
YN**KDNATK**LAQQRCLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGLAALTAHQACHLPLEAF
T**KDNATK**HRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARL
ALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVFSSTR
GTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQ
EPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTL**KDNATK**APAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTI
LGWPLAERTVIPS IPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLGSGGG**QDNAT**GSGG

20

配列番号10

GSGGG**QDNAT**GSGGGAEAAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPADTNGQGVLYHSMVLEGGNDAL
KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFHILNAGNQLSHMSPI
YTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGV
YN**KDNATK**LAQQRCLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGLAALTAHQACHLPLEAF
TRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA**KDNATK**SPGSGGDLGEAIREQPEQA
RLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVFS
TRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQ
DQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTL**KDNATK**APAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGR
VTILGWPLAERTVIPS IPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLGSGGG**QDNAT**GSGG

30

配列番号11

40

GSGGG**QDNAT**GSGGGAAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPADTNGQGVLYHYSMVLEGGNDAL
KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPI
YTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGV
YNYLAQQRCLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFT**KDQNA**
TKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA**KDQNA**TKSPGSGGDLGEAIREQPEQA
RLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAFLGDGGDVFSF
TRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQ
DQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTL**KDQNA**KAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGR
VTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLGSGGG**QDNAT**GSGG

10

と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む(又はこれからなる)、段落14の改変EPAタンパク質。

16.改変EPAタンパク質は、6つのコンセンサス配列を含有し、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208の置換、アミノ酸残基K240の置換、アミノ酸残基R274の置換、アミノ酸残基S318の置換、アミノ酸残基A519の置換、N末端での付加、及びC末端での付加から選択される、段落1~7のいずれかの改変EPAタンパク質。

20

17.改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208の置換、アミノ酸残基K240の置換、アミノ酸残基R274の置換、アミノ酸残基S318の置換、アミノ酸残基A519の置換、N末端での付加、及びC末端での付加から選択される6つのコンセンサス配列を含有し、これは場合により、配列番号12又は13:

配列番号12

GSGGG**QDNAT**GSGGGAAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPADTNGQGVLYHYSMVLEGGNDAL
KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPI
YTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGV
YN**KDQNA**TKLAQQRCLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAF
TKDQNATKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA**KDQNA**TKSPGSGGDLGEAI
REQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAFLGD
GGDVFSFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPA
LAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTL**KDQNA**KAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITG
PEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLGSGGG**QDN**
ATGSGG

30

40

配列番号13

50

GSGGG**QDNAT**GSGGGAAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPAIADTNGQGV LHYSMVLEGGNDAL
 KLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNLWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPI
 YTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVMQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGV
 YN**KDQDNAT**KLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIK**DNNNST**PTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQ
 CHLPLEAFT**KDQDNAT**KHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALAK**KDQDNAT**KSPGSG
 GDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPT
 GAEFLGDGGDVFSFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGF

10

YIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTL**KDQDNAT**KAPEAAGEVERLIGHPLPL
 RLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む(又はこれからなる)、段落16の改変EPAタンパク質。

18.改変EPAタンパク質は、7つのコンセンサス配列を含有し、これは場合により、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208、K240、R274、S318、A519を置換しており、N末端にて付加されており、そしてC末端にて付加されている、段落1~7のいずれかの改変EPAタンパク質。

20

19.改変EPAタンパク質は、配列番号1の、又は配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一のアミノ酸配列のアミノ酸残基Y208、K240、R274、S318、A519を置換しており、N末端にて付加されており、そしてC末端にて付加されている7つのコンセンサス配列を含有し、これは場合により、配列番号14:

配列番号14

GSGGG**QDNAT**GSGGGAAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPAIADTNGQGV LHYSMVLEGGNDAL
 KLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNLWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPI
 YTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVMQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGV
 YN**KDQDNAT**KLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIK**DNNNST**PTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQ
 CHLPLEAFT**KDQDNAT**KHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALAK**KDQDNAT**KSPGSG
 GDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPT
 GAEFLGDGGDVFSFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGF
 YIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTL**KDQDNAT**KAPEAAGEVERLIGHPLPL
 RLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLGS
 GGG**QDNAT**GSGG

30

40

と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%同一のアミノ酸配列を含む(又はこれからなる)、段落8の改変EPAタンパク質。

20.XはQ(グルタミン)であり、ZはA(アラニン)である、段落1~19のいずれか1つの改変EPAタンパク質。

21.アミノ酸配列は、ロイシン552の(又は配列番号1のL552に等しい位置での)、バリンへの置換(L552V)、及びグルタミン553の(又は配列番号1のE553に等しい位置での)欠失(ΔE553)を含む、段落1~20のいずれかの改変EPAタンパク質。

50

22. アミノ酸配列はさらにペプチドタグを含み、場合により前記ペプチドタグは6つのヒスチジン残基を含み、場合により前記ペプチドタグは、アミノ酸配列のC末端にて位置決めされている、段落1～21のいずれかの改変EPAタンパク質。

23. アミノ酸配列はさらに、EPAタンパク質を宿主細胞(例えば細菌)の周辺質に向けることができるシグナル配列を含み、場合により前記シグナル配列はDsbA(配列番号21)である、段落1～22のいずれかの改変EPAタンパク質。

24. 抗原(例えば単糖抗原、場合により細菌多糖抗原)と連結された、段落1～23のいずれかの改変EPAタンパク質を含むコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)。

25. 改変EPAタンパク質は、化学コンジュゲーション法を用いて入手可能な化学結合を介して抗原に共有結合的に直接、又はリンカーを介して連結されている、段落24に従うコンジュゲート。

26. 抗原は、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、システイン、チロシン、ヒスチジン、アルギニン、又はトリプトファン(例えばアスパラギン)から選択される改変EPAタンパク質上のアミノ酸に共有結合的に連結されている、段落24のコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)。

27. 抗原は、単糖、場合により細菌多糖(例えば志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌、肺炎連鎖球菌、又は黄色ブドウ球菌由来)、場合によりグラム陰性菌由来のO抗原である、段落24～26のいずれかのコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)。

28. 段落1～23のいずれかの改変EPAタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

29. 段落28のポリヌクレオチドを含むベクター。

30. i) 場合により、細菌多糖抗原(例えば、グラム陰性菌由来の、場合により志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソネ赤痢菌、緑膿菌、肺炎桿菌由来のO抗原、又はグラム陽性菌由来の、場合により肺炎連鎖球菌若しくは黄色ブドウ球菌由来の莢膜多糖)又は酵母多糖抗原又は哺乳動物多糖抗原を生成するための、場合により宿主細胞ゲノム中に組み込まれた多糖合成遺伝子を含む1つ以上のヌクレオチド配列;

ii) 異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼを、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列;

iii) 段落1～23のいずれかに従う改変EPAタンパク質を、場合によりプラスミド内にコードするヌクレオチド配列

を含む宿主細胞。

31. ポリメラーゼ(例えばwzy)、フリッパーゼ(例えばwzx)をコードするヌクレオチド配列、及び場合により鎖長調節因子(例えばwzz)をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、段落30に従う宿主細胞。

32. オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、場合によりカンピロバクター・ジェジュニ由来のpglBである、段落30又は段落31に従う宿主細胞。

33. 宿主細胞は大腸菌(例えば大腸菌K12 W3110)である、段落30又は段落31に従う宿主細胞。

34. 多糖に連結された改変EPAタンパク質を含むバイオコンジュゲートを生成する方法であって、(i)糖タンパク質の生成に適した条件の下で段落30～33のいずれか1つの宿主細胞を培養すること、及び(ii)バイオコンジュゲートを単離すること、場合により宿主細胞由来の周辺質抽出物からバイオコンジュゲートを単離することを含む方法。

35. 段落24～27のいずれかのコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、並びに場合により薬学的に許容される賦形剤及び/又は担体を含む免疫原性組成物。

36. 段落35の免疫原性組成物、及び場合によりアジュバントを含むワクチン。

37. 対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導する方法であって、段落24～27のいずれかのコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、段落35の免疫原性組成物、又は段落36のワクチンの治療的に、又は予防的に有効な量を、誘導を必要とする対象(例えばヒト)に投与することを含む方法。

38. 対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導するのに用いられる、段落24～27のいず

10

20

30

40

50

れかのコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、段落35の免疫原性組成物、又は段落36のワクチン。

39.対象(例えばヒト)において免疫応答を誘導するための薬剤の製造に用いられる、段落24~27のいずれかのコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、段落35の免疫原性組成物、又は段落36のワクチン。

40.対象(例えばヒト)において酵母感染症又は細菌感染症を処置及び/又は予防する方法であって、処置及び/又は予防を必要とする対象(例えばヒト)に、段落24~27のいずれかのコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、段落35の免疫原性組成物、又は段落36のワクチンの治療的に、又は予防的に有効な量を投与することを含む方法。

41.対象(例えばヒト)において酵母感染症又は細菌感染症を処置及び/又は予防するのに用いられる、段落24~27のいずれかのコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、段落35の免疫原性組成物、又は段落36のワクチン。

42.対象(例えばヒト)において酵母感染症又は細菌感染症を処置及び/又は予防するための薬剤の製造に用いられる、段落24~27のいずれかのコンジュゲート(例えばバイオコンジュゲート)、段落35の免疫原性組成物、又は段落36のワクチン。

【0164】

本発明がより十分に理解され得るように、以下の実施例が示される。これらの例は、説明を目的とするだけのものであり、本発明の範囲をいかなる方法によっても制限するものとして解釈されるべきでない。

【0165】

[実施例]

材料及び方法

抗原性グリカンによるグリコシル化のためのEPAの工学

グリコサイトの挿入に適した位置を予測するために、EPAの結晶構造を分析した。67個の溶媒アクセス可能アミノ酸残基を、部位特異的突然変異誘発のために選択した。突然変異誘発のための鑄型として、突然変異L552VΔE553を含有する遺伝的に無毒化されたEPAを用いた(Lukacら (1988年)、Infect Immun、56巻:3095~3098頁、及びHoら (2006年)、Hum Vaccin、2巻:89~98頁)。この遺伝子を、N末端のDsbAシグナル配列及びC末端のHis₆タグと共に、pEC415由来のプラスミド中にクローニングした(Schulz, H., Hennecke, H., Thony-Meyer, L., Prototype of a heme chaperone essential for cytochrome c maturation. Science 281巻、1197~1200頁、1998年)。選択した各アミノ酸残基を、グリコシル化セクオンKDQNATK(配列番号4)により置換して、合計67個のEPA変異型をもたらした(各々、単一のグリコシル化部位(グリコサイト)を含有する)。2、3、及び4つのグリコサイトを含有するEPA変異型の生成のために、利用可能且つ選択された単一位点EPA変異型における突然変異誘発の追加のラウンドを実行した。4つを超えるグリコサイトを含有するEPA変異型の生成のために、遺伝子合成を使用した。67個の試験した変異型から、4つの位置:Y208、R274、S318、及びA519を、この研究において示す更なる組合せのために選択した。これらの突然変異は有利であることが見出された。なぜなら、(i)タンパク質発現レベルを引き下げなかった(このことは、タンパク質構造全体が影響されなかった、すなわちこれらの位置でのグリコサイトの挿入によって不安定にされなかったことを示している)から、そして(ii)選択された位置が、有効なグリコシル化、すなわち高い部位占有率を実現することが見出されたからである。また、Y208、R274、S318、及びA519の近くの領域における追加の位置を、グリコサイト挿入についての適性について調査した(D218、R279、G232、及びG525)。

【0166】

1つ以上のグリコサイトを含有する操作されたEPAによるグリコシル化試験

単一の挿入されたグリコサイトを含有する67個のEPA変異型を、種々の抗原性グリカンを用いて、インビボグリコシル化効率について試験した。そのようなグリコシル化試験のために、大腸菌系統W3110ΔwaaLを、3つのプラスミド:EPA変異型を有するpEC41

5プラスミド、PglBを発現するプラスミド、及び(以下に記載する)注目する多糖の生合成のための酵素を発現するプラスミドにより形質転換した。非病原性の大腸菌K12系統W3110を、Coli Genetic Stock Center (Yale University、New Haven (CT)、USA、product number CGSC#4474)から得た。場合によっては、EPA変異型及びPglBを発現する2つのプラスミドのみによる形質転換を可能にする、多糖生合成のための遺伝子のクラスタを大腸菌ゲノム中に組み込んだ大腸菌系統により、グリコシル化試験を実行した(組込みに関する更なる詳細について、国際公開第2014/057109号パンフレット及び国際公開第2015/052344号パンフレット参照)。

【0167】

単一のグリコサイトを有するEPA変異型についての選択基準は、総発現レベル及び生成される複合糖質のレベルを含んだ。後者は、PglBによる改変についてのグリコサイト位置の適性を示す。

【0168】

この研究において示されるデータセットについて、使用される大腸菌系統は、系統W3110の誘導体であり、これは、リポ多糖O抗原リガーゼ遺伝子waaLにおける欠失、O16O抗原クラスターfbの欠失又は置換、並びに肺炎桿菌O抗原(KpO抗原)、フレクスナー赤痢菌2a(Sf2a)、又は肺炎連鎖球菌11A(Sp11A)及び33F(Sp33F)莢膜多糖、並びに緑膿菌O抗原(PaO6及びPaO11)の所望される組換えグリカンの生合成を担うクラスタによるゲノムクラスタの置換を含む。

【0169】

図6及び図8(P018-0183)グリカンにおける肺炎桿菌O抗原の組換え生成に用いられる大腸菌系統は、加えて、潜在的に干渉する要素:腸内細菌共通抗原(ECA)wecクラスタ、コラン酸wcaクラスタに由来する遺伝子wzzE-wecG、O16生合成に関与するgtrABS及びwzzB遺伝子のゲノム欠失を含有する。

【0170】

図1~5のKpO抗原又は図8(P018_0167)グリカンのKpO抗原を生成する大腸菌系統を、EPA変異型を有するpEC415プラスミド及びPglBを発現するプラスミドにより形質転換した。前培養を調製するために、10mM MgCl₂及び適切な抗生物質を含有する5ml TB(Terrific Broth)培地に、形質転換プレート由来のコロニーのストリークを接種して、37℃にてo/n(一晚)増殖させた。前培養を用いて、振盪フラスコにおいて50mlの補充TB培地に接種して、出発OD₆₀₀=0.1を与えた。培養液を、200rpmで振盪させながら37℃にて、OD₆₀₀=0.8~1に達するまで増殖させてから、0.001%アラビノース(EPA)及び0.1mM IPTG(PglB)の付加によって誘導した。EPA変異型の発現及びグリコシル化を、37℃にてo/n続けた。

【0171】

図6及び図8(P018-0183)のKpO抗原を生成する大腸菌系統を、EPA変異型及びPglBの双方を発現するプラスミドにより形質転換した。これらの培養液を、0.1mM イソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)の付加のみによって誘導して、EPA変異型の発現及びグリコシル化を、37℃にてo/n続けた。

【0172】

周辺質(ペリプラズム)抽出物調製

OD₆₀₀=60(分光光度計を用いて測定)に相当するo/n培養液由来の細胞の量を、遠心分離によって収集した。細胞ペレットを、1.5mlの溶解バッファ(30mM トリスHCl pH 8.5、1mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸)、20%スクロース)中に再懸濁させて、リゾチームを、1mg/mlの最終濃度まで加えた。懸濁液を、僅かに振盪させながら4℃にて25分間インキュベートしてから、16'000rcfにて10分間遠心分離した。遠心分離後、周辺質抽出物(PPE)に相当する上清を、フレッシュなチューブに移した。

【0173】

固定金属アフィニティクロマトグラフィ(IMAC)による周辺質抽出物の富化

EPA変異型により周辺質抽出物を富化して、SDS-PAGEによるより直接的なリードア

10

20

30

40

50

ウトを可能にするために、Hisタグ付けしたEPA変異型を、Ni-NTA(ニトリロ三酢酸ニッケル)アガロースでのワンステップ精製を用いて精製した。1mlのPPEを、250 μ lの5×結合バッファ(150mMトリスHCl pH 8.0、50mMイミダゾール、2.5M NaCl、20mM MgCl₂)と混合してから、200 μ lのプレ平衡化されたNi-NTAスラリーを付加して、僅かに振盪させながら30分間インキュベートした。その後、樹脂を、1×結合バッファ(30mMトリス pH 8.0、10mMイミダゾール、500mM NaCl)で洗浄して、結合タンパク質を溶出バッファ(30mMトリス pH 8.0、500mMイミダゾール、200mM NaCl)で溶出した。IMAC富化したPPEをSDS-PAGEによって分析した(Laemmli、U. K. (1970年). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". Nature. 227巻(5259号): 680~685頁. Bibcode: 1970Natur.227..680L. doi: 10.1038/227680a0. ISSN 0028-0836. PMID 5432063)。非グリコシル化担体、及び1つ以上の位置にてグリコシル化したEPA複合糖質を、ゲル上でCoomassie染色によって検出した(Fazekas de St. Groth、S.; Webster、R. G.; Datwyler、A. (1963年). "Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips". Biochimica et Biophysica Acta. 71巻: 377~391頁. doi: 10.1016/0006-3002(63)91092-8. PMID 18421828)。

10

【0174】

周辺質抽出物のウェスタンブロット分析

また、周辺質抽出物を、EPA(Sigma-Aldrich、Cat. number P2318)に対する、そしてEPAに結合した多糖に対するイムノブロットによって分析した。KpO抗原の検出のために、肺炎桿菌のK莢膜突然変異体に対する抗血清を用いた。

20

【0175】

これらの実験の結果を、図3~図6に示しており、以下の実施例に記載する。

【0176】

[実施例1](図3)

KpO抗原多糖を生成し、且つPglB、並びにグリコサイトKDQNATK(配列番号4)を配列番号1中の以下の位置:Y208(レーン1)、K240(レーン2)、R274(レーン3)、S318(レーン4)、A376(レーン5)、A519(レーン6)、並びにK240及びA376(レーン7)に導入したEPA変異型を発現する大腸菌系統のIMAC富化周辺質抽出物に、SDS-PAGE分析を実行した。図3に示すバンドは、非グリコシル化EPA担体に、そして1つの、そして2つのグリコサイトが占有されているKpO抗原-EPAバイオコンジュゲートに対応する。

30

【0177】

結論:

新しい各位置でのKpO抗原によるEPAのグリコシル化は、位置K240及びA376と比較して、等しく良好であるか、又はより優れていることが確認された。特に、Y208、S318、及びA519は、位置K240及びA376と比較して、より優れているように見える。Y208は、総発現がより高く、3つ全ては、コンジュゲート量が、位置K240及びA376よりも高い。

【0178】

40

[実施例2](図4)

KpO抗原多糖を生成し、且つPglB、並びにグリコサイトKDQNATK(配列番号4)を以下の位置:K240及びA376(レーン1、配列番号26)、Y208及びR274(レーン2、配列番号6)、Y208及びS318(レーン3;配列番号28)、Y208及びA519(レーン4;配列番号29)、R274及びS318(レーン5;配列番号30)、R274及びA519(レーン6;配列番号31)、S318及びA519(レーン7、配列番号7)、並びにY208、R274、及びA519(レーン8)に導入したEPA変異型を発現する大腸菌系統のIMAC富化周辺質抽出物に、SDS-PAGE分析を実行した。図4に示すバンドは、非グリコシル化EPA担体に、そして1つの、2つの、そして3つのグリコサイトが占有されているKpO抗原-EPAバイオコンジュゲートに対応する。

50

【0179】

結論:

KpO抗原による、新しい位置にてグリコサイトを含有するEPA-2S変異型(すなわち、2つのグリコシル化部位が加えられたEPAの変異型)のグリコシル化は、位置K240及びA376にてグリコサイトを有するEPA-2Sと比較して、等しく良好であるか、又はより優れていることが確認された。図4に示すゲルから、Y208+A519及びS318+A519は、総タンパク質がより高く、2Sの組合せは全て、2倍のグリコシル化EPAの、単一のグリコシル化EPAに対する比率が高い。また、位置Y208、R274、及びA519にグリコサイトを有するEPA-3S(すなわち、3つのグリコシル化部位が加えられたEPAの変異型)は、KpO抗原により十分にグリコシル化された。

10

【0180】

[実施例3](図5)

KpO抗原多糖を生成し、且つPglB、並びに1~7つのグリコサイトを以下の位置:Y208(レーン1)、K240(レーン2)、R274(レーン3)、S318(レーン4)、A376(レーン5)、A519(レーン6)、K240及びA376(レーン7)、Y208及びR274(レーン8、配列番号6)、Y208及びS318(レーン9)、Y208及びA519(レーン10)、R274及びS318(レーン11)、R274及びA519(レーン12)、S318及びA519(レーン13)、Y208、R274、及びA519(レーン14、配列番号7)、N末端グリコタグ、並びにK240及びA376、並びにC末端グリコタグ(レーン15)、N末端グリコタグ、並びにY208、R274、及びA519(レーン16、配列番号8)、N末端グリコタグ、並びにY208、R274、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン17;配列番号9)、N末端グリコタグ、並びにY208、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン18、配列番号10)、N末端グリコタグ、並びにR274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン19、配列番号11)、N末端グリコタグ、並びにY208、R274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン20、配列番号12)、N末端グリコタグ、並びにY208、K240、R274、S318、及びA519(レーン21、配列番号13)、並びにN末端グリコタグ、並びにY208、K240、R274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン22、配列番号14)に導入したEPA変異型を発現する大腸菌系統の周辺質抽出物に、イムノブロット分析を実行した。図5において、上部のパネルは、抗KpO抗原抗血清でプロービングしたイムノブロットを示す一方、下部のパネルは、抗EPA抗体でプロービングしたイムノブロットを示す。バンドは、非グリコシル化EPA担体に、そして1~7つのグリコサイトが占有されているKpO抗原-EPAバイオコンジュゲートに対応する。

20

30

【0181】

結論:

これは、7つのコンセンサス配列の組合せを含むEPAの変異型を用いる場合、グリコサイト位置を組み合わせることによって、最大7つのグリコサイトでのグリコシル化が可能であることを実証した。

【0182】

[実施例4](図6)

(図1~5、実施例1~3に示すものと異なる血清型の)KpO抗原多糖を生成し、且つPglB、並びにグリコサイトKDQNATK(配列番号4)を以下の位置:N末端グリコタグ、並びにY208、R274、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン1、配列番号9)、N末端グリコタグ、並びにY208、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン2、配列番号10)、N末端グリコタグ、並びにR274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン3、配列番号11)、N末端グリコタグ、並びにY208、R274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン4、配列番号12)、N末端グリコタグ、並びにY208、K240、R274、S318、及びA519(レーン5、配列番号13)、N末端グリコタグ、並びにY208、K240、R274、S318、及びA519、並びにC末端グリコタグ(レーン6、配列番号14)、並びにN末端グリコタグ、並びにY208、R274、及びA519(レーン7、配列番号8)に導入したEPA変異型を発現する大腸菌系統の周辺質抽出物に、SDS-PAGE分析

40

50

を実行した。図6において、KpO抗原-EPAバイオコンジュゲートに対応するバンドを、矢印で標識している。

【0183】

結論:

別の肺炎桿菌血清型O抗原を用いて、3つを超えるグリコサイトを有するEPAのグリコシル化効率を示すことができる。

【0184】

[実施例5](図7)

Sf2a(図7-左参照)又はSp11A(図7-右参照)多糖を生成し、且つPglB、並びにK240にグリコサイトが、A376に第2のグリコサイトが(レーン1、配列番号26)、又は位置Y208、R274、及びA519に3つのグリコサイト(レーン2、配列番号7)が導入されたEPA変異型を発現する大腸菌系統のIMAC富化周辺質抽出物に、SDS-PAGE分析を実行した。

【0185】

結果

【0186】

【表1】

表 1: 精製した Sf2a-EPA バイオコンジュゲートにおける糖定量化

パラメータ	Sf2a-EPA2S (Y208, R274, 及び A519)	Sf2a-EPA3S (K240 及び A376)
収率[mg PS/L FV]	14	90
糖/タンパク質比[%]	22	48
部位占有率[%] モノ:ジ:トリ	93:7:0	0:43:57

【0187】

結論:EPA3S(Y208、R274、及びA519)は、EPA2S(K240及びA376)と比較して、より高い部位占有率、より高い糖:タンパク質比、及びより高い糖収率をもたらす。データは、EPA2Sと比較して、EPA3Sによるジグリコシル化及びトリグリコシル化の増大を示す。

【0188】

[実施例6](図8)

2つの異なる肺炎桿菌O抗原多糖(左及び右)を生成し、且つPglB、並びに位置Y208、R274、及びA519にてグリコサイトを有し(レーン1、配列番号7)、又はN末端グリコタグ、並びに位置Y208、R274、及びA519にてグリコサイトを有する(レーン2、配列番号8)EPA変異型を発現する大腸菌系統のIMAC富化周辺質抽出物に、SDS-PAGE分析を実行した。

【0189】

結論:3-部位EPA(Y208、R274、及びA519)へのN末端グリコサイトの付加により、コンジュゲートのモダル分子量(modal molecular weight)が増大した。これは、この追加の部位の高い部位占有率を示す。

【0190】

[実施例7](図9)

Sf2a、Sp33F、PaO6、又はPaO11抗原多糖を生成し、且つPglB、並びに以下の位置:Y208(レーン1)、D218(レーン2)、R274(レーン3)、R279(レーン4)、S318(レーン5)、G323(レーン6)、A376(レーン7)、A519(レーン8)、及びG525(レーン9)に1つのグリコサイトが導入されたEPA変異型を発現する大腸菌系統の周辺質抽出物に、イムノプロット分析を実行した。図9において、Sf2aのパネルは、抗EPA抗体でプロービングしたイムノプロットを示す一方、他の3つのパネルは、抗His抗体でプロービングし

たイムノプロットを示す。バンドは、非グリコシル化EPA担体に、そして1つのグリコサイトが占有されているO抗原EPAバイオコンジュゲートに対応する。

【0191】

結論:

この比較データは、位置Y208、R274、S318、及びA519にて成功したグリコシル化の他に、配列範囲198~218(例、位置D218)、264~284(例、位置R279)、308~328(例、位置G323)、及び509~529(例、位置G525)内の追加の位置にグリコサイトを導入することが可能であることを実証した。これらの追加の位置でのグリコシル化は、ほとんどの場合有効であるが、指定される範囲内の主に選択した位置よりも優れていない。位置D218、R279、G323、及びG525でのグリコシル化を、位置A376と比較した場合、抗原多糖のタイプに依存性があると結論することができる。全体として、追加の位置D218、R279、G323、及びG525は、A376よりも常に優れているわけではなく、多くの場合、等しいグリコシル化レベルを示すと思われる。グリコシル化のためのこれらの追加の部位は、他のグリコシル化部位との組合せについて更なる可能性を提供し、これは、より高い総糖対タンパク質比、すなわちより高いグリカン収率に至り、そして最終的に、免疫化に用いられる必要があるバイオコンジュゲートの量を引き下げることができる。また、グリコシル化に適した位置が多いほど、バイオコンジュゲート設計のフレキシビリティが増大して、抗原多糖毎の最良の組合せを選択することが可能となる。

10

【0192】

配列表

20

配列番号1 緑膿菌由来のEPA配列

AEFAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSRMSVDPADTNGQGV LHYSMVLEGGNDAL
KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVP IGHKPSNIK
VFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAG
VSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYR
VLAGNPAKHDL DIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTRRHRQPRGWE
QLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARL
ALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYP
TGAEFLGDGGDV SFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYV FVGYHGT FLEAAQSIVF
GGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSL
PGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVI
PSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

30

配列番号2 コンセンサス配列(人工配列)

D/E-X-N-Z-S/T

配列番号3 コンセンサス配列(人工配列)

K-D/E-X-N-Z-S/T-K

配列番号4 コンセンサス配列(人工配列)

K-D-Q-N-A-T-K

配列番号5 コンセンサス配列(人工配列)

J-D/E-X-N-Z-S/T-U

40

配列番号6 コンセンサス配列がY208+R274に挿入された改変EPA配列(人工配列)

AEFAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSRMSVDPADTNGQGV LHYSMVLEGGNDAL
KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVP IGHKPSNIK
VFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAG
VSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYKNDQNATKLAQQRCNLDDT
WEGKIYRVLAGNPAKHDL DIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTKDQ
NATKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDL
GEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGP
ADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV SFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYV FVGY
YHGT FLEAAQSIVF GGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRN

50

GALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLAAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRV
TILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPRED
LK

配列番号7 コンセンサス配列がY208+R274+A519に挿入された改変EPA配列(人工配列)

AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPADTNGQGV LHYSMVLEGGNDAL
KL AIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVP IGH EKPSNIK
VFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAG
VSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNKDQ NATKLAQQRCNLDDT
WEGKIYRVLAGNPAKHDL DIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTKDQ
NATKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDL
GEAIREQPEQARLALT LAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGP
ADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV SFSTRGTQNWTV ERLLQ AHRQLEERGYV FVG
YHGTFLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRN
GALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQ NATKAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPE
EEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPG
KPPREDLK

10

配列番号8 コンセンサス配列がN末端+Y208+R274+A519に挿入された改変EPA配列(人工配列)

GSGGGDQ NATGSGGGKLAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPADTNG
QGV LHYSMVLEGGNDAL KL AIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARG
WSLNWLVP IGH EKPSNIK VFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFV
RAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNK
DQ NATKLAQQRCNLDDT WEGKIYRVLAGNPAKHDL DIKPTVISHRLHFPEGGSLAA
LTAHQACHLPLEAFTKDQ NATKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQ
VDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALT LAAAESERFVRQGTGNDEAGAAS
ADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV SFSTRGTQNWTV E
RLLQ AHRQLEERGYV FVG YHGTFLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPAL
AYGYAQDQEPDARGRIRN GALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQ NATKAPEAAAGEV
ERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSI
PDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

20

30

配列番号9 コンセンサス配列がN末端+Y208+R274+A519+C末端に挿入された改変EPA配列(人工配列)

GSGGGDQ NATGSGGGAEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPADTNGQG
VLHYSMVLEGGNDAL KL AIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSW
LNWLVP IGH EKPSNIK VFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRA
HESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNKDQ
NATKLAQQRCNLDDT WEGKIYRVLAGNPAKHDL DIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTA
HQACHLPLEAFTKDQ NATKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQ
VIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALT LAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADV
VSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV SFSTRGTQNWTV ERLL
Q AHRQLEERGYV FVG YHGTFLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYG
YAQDQEPDARGRIRN GALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQ NATKAPEAAAGEVERLI
GHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDK
EQAISALPDYASQPGKPPREDL GSGGGDQ NATGSGG

40

配列番号10 コンセンサス配列がN末端+Y208+S318+A519+C末端に挿入された改変EPA配列(人工配列)

GSGGGDQ NATGSGGGAEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPADTNGQG
VLHYSMVLEGGNDAL KL AIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSW
LNWLVP IGH EKPSNIK VFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRA

50

HESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNKDQ
NATKLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTA
HQACHLPLEAFTHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNAL
AKDQNA TKSPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASAD
VVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV SFSTRGTQNWTVERL
LQAH RQLEERGYV FVG YHGT FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW RGFYIAGDPALAY
GYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQNA TKAPEAAGEVER
LIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPD
KEQAISALPDYASQPGKPPREDLGSGGGDQNA TGSGG

配列番号11 コンセンサ配列がN末端+R274+S318+A519+C末端に挿入された改変
EPA配列(人工配列)

10

GSGGGDQNA TGSGGGAEAAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDP AIADTNGQG
VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSW S
LNWLVP IGH EKPSNIKVFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRA
HESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNLA
QQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACH
LPLEAFTKDQNA TKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNA
LAKDQNA TKSPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAASA
DVVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV SFSTRGTQNWTVER
LLQAHRQLEERGYV FVG YHGT FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW RGFYIAGDPALA
YGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQNA TKAPEAAGEVE
RLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIP
DKEQAISALPDYASQPGKPPREDLGSGGGDQNA TGSGG

20

配列番号12 コンセンサ配列がN末端+Y208+R274+S318+A519+C末端に挿入され
た改変EPA配列(人工配列)

GSGGGDQNA TGSGGGAEAAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDP AIADTNGQG
VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSW S
LNWLVP IGH EKPSNIKVFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRA
HESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNKDQ
NATKLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTA
HQACHLPLEAFTKDQNA TKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQ
VIRNALAKDQNA TKSPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEA
GAASADV VSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV SFSTRGTQN
WTVERLLQAHRQLEERGYV FVG YHGT FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW RGFYIAG
DPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQNA TKAPEA
AGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDL
DPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLGSGGGDQNA TGSGG

30

配列番号13 コンセンサ配列がN末端+Y208+K240+R274+S318+A519に挿入され
た改変EPA配列(人工配列)

GSGGGDQNA TGSGGGAEAAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDP AIADTNGQG
VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSW S
LNWLVP IGH EKPSNIKVFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRA
HESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNKDQ
NATKLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKDN NSTPTVISHRLHFPEGG
SLAALTAHQACHLPLEAFTKDQNA TKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLS
WNQVDQVIRNALAKDQNA TKSPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQ
GTGNDEAGAASADV VSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV SF
TRGTQNWTVERLLQAHRQLEERGYV FVG YHGT FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW
RGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQN
ATKAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDP

40

50

RNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

配列番号14 コンセンサ配列がN末端+Y208+K240+R274+S318+A519+C末端に挿入された改変EPA配列(人工配列)

GSGGGDQNGATGSGGGAEAAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPADTNGQG
VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSW
LNWLVPIGHEKPSNIKVFHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRA
HESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNKDQ
NATKLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKDNNNSTPTVISHRLHFPEGG
SLAALTAHQACHLPLEAFTKDQNA TKHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLS
WNQVDQVIRNALAKDQNA TKSPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQ
GTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVFS
TRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW
RGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLKDQ
ATKAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDP
RNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLGSGGGDQNGATGSGG

10

配列番号15 大腸菌フラジェリン(FlgI)シグナル配列

MIKFLSALILLVTTAAQA

配列番号16 大腸菌外膜ポーリンA(OmpA)シグナル配列

MKKTAAIAVALAGFATVAQA

配列番号17 大腸菌マルトース結合タンパク質(MalE)シグナル配列

20

MKIKTGARILALSALTMMFSASALA

配列番号18 軟腐病菌ペクチン酸リアーゼ(PelB)シグナル配列

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA

配列番号19 易熱性大腸菌エンテロトキシンLTIIbシグナル配列

MSFKKIIKAFVIMAALVSVQAHA

配列番号20 枯草菌エンドキシラナーゼXynAシグナル配列

MFKFKKKFLVGLTAAFMFSISMFSATASA

配列番号21 大腸菌DsbAシグナル配列

MKKIWLALAGLVLAFSASA

配列番号22 大腸菌ToIBシグナル配列

30

MKQALRVAFGFLILWASVLHA

配列番号23 ストレプトコッカス・アガラクティアエ(*Streptococcus agalactiae*)Si
pAシグナル配列

MKMNKKVLLTSTMAASLLSVASVQAS

配列番号24 カンピロバクター・ジェジュニ由来のpglB

MLKKEYLKNPYLVLFAMIILAYVFSVFCRFYWVWWASEFNEYFFNNQLMIISNDGY
AFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGSSLSALTYWLYKITPFSFESIILYMSTFLSSLVVIP
TILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSYNRTMSGYYDTDMLVIVLPMFILFFMVRMI
LKKDFFSLIALPLFIGIYLWWYPSSYTLNVALIGLFLIYTLIFHRKEKIFYIAVILSSLT
LSNIAWFYQSAIIVILFALFALEQKRLNFMIIGILGSATLIFLILSGGVDPIYQLKFYIF
RSDSANLTQGFMYFNVNQTIQEVENVDLSEFMRRISGSEIVFLFSLFGFVWLLRKH
KSMIMALPILVLGFLALKGGLRFTIYSVPVMALGFGFLLSEFKAIMVKKYSQLTSNVC
IVFATILTAPVFIHIYNYKAPT VFSQNEASLLNQLKNIANREDYVVTWWDYGYVPR
YYSDVKTLDVGKGHLGKDNFFPSFALSKDEQAAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILK
TDILQAMMKDYNQSNVDLFLASLSKPDFKIDTPKTRDIYLYMPARMSLIFSTVASFS
FINLDTGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEIYLSNGVVLSDDFRSFKIGDNVSVNSIVEI
NSIKQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYDK
NLFDLVINSRDAKVFKLKI

40

配列番号25 コンセンサ配列(人工)

G-S-G-G-G-D/E-X-N-Z-S/T-G-S-G-G

50

配列番号26 コンセンサス配列がK240+A376に挿入された改変EPA配列(人工配列)

AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDP AIADTNGQGV LHYS MVLEGGNDAL
KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPV RYSYTRQARGSWSLNWLVP IGH EKPSNIK
VFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAG
VSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVVNYLAQQRCNLDDTWEGKIYR
VLAGNPAKHDL DIKDNNNSTPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTRHRQ
PRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQP
EQARLALT LAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAKDQNR TKGECAGPA
DSGDALLERNYPTGA EFLGDGGDV SFSTRGTQNW TVERLLQAH RQLEERGYV FVG
YHGT FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW RGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNG
ALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTI
LGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

10

配列番号27 コンセンサス配列がN末端+K240+A376+C末端に挿入された改変EPA配列(人工配列)

GSGGGDQ NATGSGGGKLAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDP AIADTNG
QGV LHYS MVLEGGNDAL KLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPV RYSYTRQARG
WSLNWLVP IGH EKPSNIKVFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFV
RAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVVNY
LAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDL DIKDNNNSTPTVISHRLHFPEGGSLAAL
TAHQACHLPLEAFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRN
ALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALT LAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLT
CPVAKDQNR TKGECAGPADSGDALLERNYPTGA EFLGDGGDV SFSTRGTQNW TVER
LLQAH RQLEERGYV FVG YHGT FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW RGFYIAGDPALA
YGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPL
PLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAIS
ALPDYASQPGKPPREDLKLGSGGGDQ NAT

20

配列番号28 コンセンサス配列がY208+S318に挿入された改変EPA配列(人工配列)

AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDP AIADTNGQGV LHYS MVLEGGNDAL KLAIDNALSITS DGLTIR
LEGGVEPNKPV RYSYTRQARGSWSLNWLVP IGH EKPSNIKVFIHEL NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARD
ATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVVNY KDQ NAT KLAQQRCN
LDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDL DIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTRHRQPRGWEQLEQCGY
PVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNAL KDQ NAT KPGSGGDLGEAIREQPEQARLALT LAAAESERFVRQGTGN
DEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGA EFLGDGGDV SFSTRGTQNW TVERLLQAH RQLE
ERGYV FVG YHGT FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW RGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYV
RWSLPGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGD
LDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

30

40

配列番号29 コンセンサス配列がY208+A519に挿入された改変EPA配列(人工配列)

50

10

20

30

40

50

DNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFH
EL

NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVM
AQAQ
PRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNKDQNKATKLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLA
GNPAK
HDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCG
YPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALT
AAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAE
FLG
DGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVVFVGYHGTFLEAAQSIVFGGVRAR
SQDL
DAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRPSLPGFYRTGLTLA
APEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRN
VGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

10

配列番号36 EPA_mut_S318

AAEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSRMSVDPADTNGQGVLMHYSMVLEGGNDAL
KLAI

DNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIH
EL

NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVM
AQAQ

20

PRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAK

HDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTRHRQPRGWEQLEQCG

YPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALAKDQNKATKPGSGGDLGEAIREQPEQARL
ALT

AAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAE
FLG

DGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVVFVGYHGTFLEAAQSIVFGGVRAR
SQDL

DAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLA
APEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRN

30

VGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

配列番号37 EPA_mut_A519

AAEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSRMSVDPADTNGQGVLMHYSMVLEGGNDAL
KLAI

DNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIH
EL

NAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVM
AQAQ

PRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAK

HDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTRHRQPRGWEQLEQCG

YPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALT

AAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAE
FLG

DGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVVFVGYHGTFLEAAQSIVFGGVRAR
SQDL

DAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLK
DQN

ATKAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTD
PRN

VGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK

50

配列番号38 プライマー

GAAGGCGGGCGCGTGACCATTTCTCGGC

配列番号39 プライマー

GCCGAGAATGGTCACGCGCCCGCCTTC

配列番号40 突然変異Y208> KDQ NATKを有するヌクレオチド配列EPA

KDQ NATK

ATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCTAGCGC
CGCCGAGGAAGCCTTCGACCTCTGGAACGAATGCGCCAAGGCCTGCGTGCTCGACC
TCAAGGACGGCGTGCGTTCCAGCCGCATGAGCGTCGACCCGGCCATCGCCGACACC
AACGGCCAGGGCGTGCTGCACTACTCCATGGTCCTGGAGGGCGGCAACGACGCGCT
CAAGCTGGCCATCGACAACGCCCTCAGCATCACCAGCGACGGCCTGACCATCCGCC
TCGAAGGTGGCGTCGAGCCGAACAAGCCGGTGCGCTACAGCTACACGCGCCAGGCG
CGCGGCAGTTGGTCGCTGAACTGGCTGGTGCCGATCGGCCACGAGAAGCCTTCGAA
CATCAAGGTGTTTCATCCACGAACTGAACGCCGGTAACCAGCTCAGCCACATGTGCG
CGATCTACACCATCGAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCC
ACCTTCTTCGTCAGGGCGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAG
CCATGCCGGGGTCAGCGTGCTCATGGCCCAGGCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCT
GGAGCGAATGGGCCAGCGGCAAGGTGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTC
TACAACAAAGATCAGAACGCGACCAAACTCGCCCAGCAGCGCTGCAACCTCGACGA
TACCTGGGAAGGCAAGATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGCGAAGCATGACC
TGGACATCAAGCCCACGGTCATCAGTCATCGCCTGCATTTCCCCGAGGGCGGCAGC
CTGGCCGCGCTGACCGCGCACCAAGGCCTGCCACCTGCCGCTGGAGACCTTCACCCG
TCATCGCCAGCCGCGCGGGCTGGGAACAACTGGAGCAGTGCGGGCTATCCGGTGACG
GGCTGGTGCGCCCTCTACCTGGCGGGCGCGGGCTGTGCTGGAACCAAGGTGACCAAGGTG
ATCCGCAACGCCCTGGCCAGCCCCGGCAGCGGGCGGCGACCTGGGCGAAGCGATCCG
CGAGCAGCCGGAGCAGGCCCGTCTGGCCCTGACCCTGGCCGCGCCGAGAGCGAGC
GCTTCGTCCGGCAGGGCACCGGCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAGCGCCGACGTG
GTGAGCCTGACCTGCCCGGTGCGCCGGCGGTGAATGCGCGGGGCCGGCGGACAGCGG
CGACGCCCTGCTGGAGCGCAACTATCCCCTGGCGCGGAGTTCTCTGGCGACGGCG
GCGACGTGAGCTTCAGCACCCGCGGCACGCAAGCTGGACGGTGAGCGGGCTGCTC
CAGGCGCACCGCCAACCTGGAGGAGCGCGGGCTATGTGTTTCGTGCGGTACCAAGGCAC
CTTCCTCGAAGCGGCGCAAAGCATCGTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGG
ACCTCGACGCGATCTGGCGCGGTTTCTATATCGCCGGCGATCCGGCGCTGGCCTAC
GGCTACGCCCAGGACCAGGAACCCGACGCGCGCGGGCCGGATCCGCAACGGTGCCCT
GCTGCGGGTCTATGTGCCGCGCCCGAGTCTGCCGGGCTTCTACCGCACCGGCCTGA
CCCTGGCCGCGCCGGAGGCGGGCGGGCGAGGTGGAACGGCTGATCGGCCATCCGCTG
CCGCTGCGCCTGGACGCCATCACCGGCCCCGAGGAGGAAGGCGGGCGCGTGACCAT
TCTCGGCTGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTGTTGATTCCCTCGGCGATCCCCACCG
ACCCGCGCAACGTGCGGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCATCCCCGACAAGGAACAG
GCGATCAGCGCCCTGCCGGACTACGCCAGCCAGCCCGGCAAAACGCCGCGCGAGGA
CTTGAAGCACCAACCACCACTGA

配列番号41 突然変異R274> KDQ NATKを有するヌクレオチド配列EPA

KDQ NATK

ATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCTAGCGC
CGCCGAGGAAGCCTTCGACCTCTGGAACGAATGCGCCAAGGCCTGCGTGCTCGACC
TCAAGGACGGCGTGCGTTCCAGCCGCATGAGCGTCGACCCGGCCATCGCCGACACC
AACGGCCAGGGCGTGCTGCACTACTCCATGGTCCTGGAGGGCGGCAACGACGCGCT
CAAGCTGGCCATCGACAACGCCCTCAGCATCACCAGCGACGGCCTGACCATCCGCC
TCGAAGGCGGGCGTCGAGCCGAACAAGCCGGTGCGCTACAGCTACACGCGCCAGGCG
CGCGGCAGTTGGTCGCTGAACTGGCTGGTACCGATCGGCCACGAGAAGCCCTCGAA

10

20

30

40

50

CATCAAGGTGTTTCATCCACGAACTGAACGCCGGTAACCAGCTCAGCCACATGTCGC
CGATCTACACCATCGAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCC
ACCTTCTTCGTCAGGGCGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAG
CCATGCCGGGGTCAAGCGTGGTTCATGGCTCAGGCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCT
GGAGCGAATGGGCCAGCGGCAAGGTGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCT
TACAACTACCTCGCCCAGCAGCGCTGCAACCTCGACGATACCTGGGAAGGCAAGAT
CTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGCGAAGCATGACCTGGACATCAAGCCCACGG
TCATCAGTCATCGCCTGCATTTCCCCGAGGGCGGCAGCCTGGCCGCGCTGACCGCG
CACCAGGCCTGCCACCTGCCGCTGGAGGCCTTCACTAAAGATCAGAACGCGACCAA
ACATCGCCAGCCGCGCGGCTGGGAACAACCTGGAGCAGTGCGGCTATCCGGTGCAGC
GGCTGGTTCGCCCTCTACCTGGCGGCGCGACTGTCTGTGAACCAGGTTCGACCAGGTG
ATCCGCAACGCCCTGGCCAGCCCCGGCAGCGGCGGCGACCTGGGCGAAGCGATCCG
CGAGCAGCCGGAGCAGGCCCGTCTGGCCCTGACCCTGGCCGCGCCGAGAGCGAGC
GCTTCGTCCGGCAGGGCACCGGCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAGCGCCGACGTG
GTGAGCCTGACCTGCCCGGTTCGCCGCGGTTGAATGCGCGGGCCCGGCGGACAGCGG
CGACGCCCTGCTGGAGCGCAACTATCCCACTGGCGCGGAGTTCTTCGGCGACGGCG
GCGACGTCAAGCTTCAGCACCCGCGGCACGCGAGAACTGGACGGTGGAGCGGCTGCTC
CAGGCGCACCGCCAACCTGGAGGAGCGCGGCTATGTGTTCTGTCGGCTACACGGCAC
CTTCCTCGAAGCGGCGCAAAGCATCGTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGG
ACCTCGACGCGATCTGGCGCGGTTTCTATATCGCCGGCGATCCGGCGCTGGCCTAC
GGCTACGCCCAGGACCAGGAACCCGACGCGCGCGGCCGGATCCGCAACGGTGCCT
GCTGCGGGTCTATGTGCCGCGCTGGAGTCTGCCGGGCTTCTACCGCACCGGCCTGA
CCCTGGCCGCGCCGGAGGCGGCGGGCGAGGTGGAACGGCTGATCGGCCATCCGCTG
CCGCTGCGCCTGGACGCCATCACCGGCCCCGAGGAGGAAGGCGGGCGCGTGACCAT
TCTCGGCTGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTGTTGATTCCCTCGGCGATCCCCACCG
ACCCGCGCAACGTCGGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCATCCCCGACAAGGAACAG
GCGATCAGCGCCCTGCCGGACTACGCCAGCCAGCCCGGCAAACCGCCGCGCGAGGA
CTTGAAGCACCAACCACCACTGA

10

20

配列番号42 突然変異S318) KDQNA TKを有するヌクレオチド配列EPA

KDQNA TK

30

ATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTATGTTTTAGCGTTTATGCGCTAGCGC
CGCCGAGGAAGCCTTCGACCTCTGGAACGAATGCGCCAAGGCCTGCGTGCTCGACC
TCAAGGACGGCGTGCGTTCCAGCCGCATGAGCGTCGACCCGGCCATCGCCGACACC
AACGGCCAGGGCGTGCTGCACTACTCCATGGTCTTGAGGGGCGGCAACGACGCGCT
CAAGCTGGCCATCGACAACGCCCTCAGCATCACCAGCGACGGCCTGACCATCCGCC
TCGAAGGCGGCGTCGAGCCGAACAAGCCGGTGCCTACAGCTACACGCGCCAGGGCG
CGCGGCAGTTGGTCGCTGAACTGGCTGGTACCGATCGGCCACGAGAAGCCCTCGAA
CATCAAGGTGTTTCATCCACGAACTGAACGCCGGTAACCAGCTCAGCCACATGTCGC
CGATCTACACCATCGAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCC
ACCTTCTTCGTCAGGGCGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAG
CCATGCCGGGGTCAAGCGTGGTTCATGGCTCAGGCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCT
GGAGCGAATGGGCCAGCGGCAAGGTGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCT
TACAACTACCTCGCCCAGCAGCGCTGCAACCTCGACGATACCTGGGAAGGCAAGAT
CTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGCGAAGCATGACCTGGACATCAAGCCCACGG
TCATCAGTCATCGCCTGCATTTCCCCGAGGGCGGCAGCCTGGCCGCGCTGACCGCG
CACCAGGCCTGCCACCTGCCGCTGGAGGCCTTCACTCGTCATCGCCAGCCGCGCGG
CTGGGAACAACCTGGAGCAGTGCGGCTATCCGGTGCAGCGGCTGGTTCGCCCTCTACC
TGGCGGCGCGACTGTCTGTGAACCAGGTTCGACCAGGTGATCCGCAACGCCCTGGCC
AAAGATCAGAACGCGACCAAACCCGGCAGCGGCGGCGACCTGGGCGAAGCGATCCG
CGAGCAGCCGGAGCAGGCCCGTCTGGCCCTGACCCTGGCCGCGCCGAGAGCGAGC

40

50

GCTTCGTCCGGCAGGGCACCGGCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAGCGCCGACGTG
GTGAGCCTGACCTGCCCGGTGCGCGCCGGTGAATGCGCGGGCCCGCGGACAGCGG
CGACGCCCTGCTGGAGCGCAACTATCCCACTGGCGCGGAGTTCCTCGGCGACGGCG
GCGACGTACGCTTCAGCACCCGCGGGCACGCAAGAACTGGACGGTGGAGCGGCTGCTC
CAGGCGCACCGCCAACCTGGAGGAGCGCGGCTATGTGTTTCGTGCGGCTACCAACGGCAC
CTTCCTCGAAGCGGCGCAAGCATCGTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGG
ACCTCGACGCGATCTGGCGCGGTTTCTATATCGCCGGCGATCCGGCGCTGGCCTAC
GGCTACGCCCAGGACCAGGAACCCGACGCGCGCGGCCGGATCCGCAACGGTGCCCT
GCTGCGGGTCTATGTGCCGCGCTGGAGTCTGCCGGGCTTCTACCGCACCGGCCCTGA
CCCTGGCCGCGCCGGAGGCGGCGGGCGAGGTGGAACGGCTGATCGGCCATCCGCTG
CCGCTGCGCCTGGACGCCATCACCGGCCCCGAGGAGGAAGGCGGGCGCGTGACCAT
TCTCGGCTGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTGTTGATTCCCTCGGCGATCCCCACCG
ACCCGCGCAACGTCGGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCATCCCCGACAAGGAACAG
GCGATCAGCGCCCTGCCGGAAGTACGCCAGCCAGCCCGGCAACCGCGCGCGAGGA
CTTGAAGCACCAACCACCACTGA

10

配列番号43 突然変異A519> KDQNATKを有するヌクレオチド配列EPA

KDQNATK

ATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCTAGCGC
CGCCGAGGAAGCCTTCGACCTCTGGAACGAATGCGCCAAGGCCTGCGTGCTCGACC
TCAAGGACGGCGTGCGTTCCAGCCGCATGAGCGTCGACCCGGCCATCGCCGACACC
AACGGCCAGGGCGTGCTGCACTACTCCATGGTCTTGAGGGCGGCAACGACGCGCT
CAAGCTGGCCATCGACAACGCCCTCAGCATCACAGCGACGGCCTGACCATCCGCC
TCGAAGGCGGGCGTCGAGCCGAACAAGCCGGTGCGCTACAGCTACAGCGCCAGGCG
CGCGGCAGTTGGTCGCTGAACTGGCTGGTACCGATCGGCCACGAGAAGCCCTCGAA
CATCAAGGTGTTTCATCCACGAAGTGAACGCCGGTAACAGCTCAGCCACATGTGCG
CGATCTACACCATCGAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCC
ACCTTCTTCGTGAGGGCGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAG
CCATGCCGGGGTCAGCGTGCTCATGGCTCAGGCCAGCCGCGCCGGGAAAGCGCT
GGAGCGAATGGGCCAGCGGCAAGGTGTTGTGCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTC
TACAACTACCTCGCCAGCAGCGCTGCAACCTCGACGATACCTGGGAAGGCAAGAT
CTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGCGAAGCATGACCTGGACATCAAGCCACGG
TCATCAGTCATCGCCTGCATTTCCCGAGGGCGGCGAGCCTGGCCGCGCTGACCGCG
CACCAAGGCCTGCCACCTGCCGCTGGAGGCCTTCACTCGTCATCGCCAGCCGCGCGG
CTGGGAACAACCTGGAGCAGTGCGGCTATCCGGTGCGAGCGGCTGGTCGCCCTCTACC
TGGCGGCGCGACTGTGCTGGAACAGGTGACCAAGGTGATCCGCAACGCCCTGGCC
AGCCCCGGCAGCGGCGGCGACCTGGGCGAAGCGATCCGCGAGCAGCCGGAGCAGGC
CCGTCTGGCCCTGACCCTGGCCGCGCCGAGAGCGAGCGCTTCGTCCGGCAGGGCA
CCGGCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAGCGCCGACGTGGTGAGCCTGACCTGCCCG
GTCGCCGCGCGGTGAATGCGCGGGCCCGGCGGACAGCGGCGACGCCCTGCTGGAGCG
CAACTATCCCACTGGCGCGGAGTTCCTCGGCGACGGCGGCGACGTCAGCTTCAGCA
CCCGCGGCACGCAAGAACTGGACGGTGGAGCGGCTGCTCCAGGCGCACCGCCAACCTG
GAGGAGCGCGGCTATGTGTTTCGTGCGGCTACCAACGGCACCTTCTCGAAGCGGCGCA
AAGCATCGTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGGACCTCGACGCGATCTGGC
GCGGTTTCTATATCGCCGGCGATCCGGCGCTGGCCTACGGCTACGCCAGGACAG
GAACCCGACGCGCGCGGCCGGATCCGCAACGGTGCCCTGCTGCGGGTCTATGTGCC
GCGCTGGAGTCTGCCGGGCTTCTACCGCACCGGCCTGACCCTGAAAGATCAGAACG
CGACCAAAGCGCCGGAGGCGGCGGGCGAGGTGGAACGGCTGATCGGCCATCCGCTG
CCGCTGCGCCTGGACGCCATCACCGGCCCCGAGGAGGAAGGCGGGCGCGTGACCAT
TCTCGGCTGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTGTTGATTCCCTCGGCGATCCCCACCG
ACCCGCGCAACGTCGGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCATCCCCGACAAGGAACAG

20

30

40

50

【図 2 - 2】

EPA detox	PRREKQSEWASGKVLCLLDPLDGVNY-----LAQQRNLDDTWEGKIYRVLAGNPAK	234
EPA_mut_Y208	PRREKQSEWASGKVLCLLDPLDGVNY-----LAQQRNLDDTWEGKIYRVLAGNPAK	240
EPA_mut_R274	PRREKQSEWASGKVLCLLDPLDGVNY-----LAQQRNLDDTWEGKIYRVLAGNPAK	234
EPA_mut_S318	PRREKQSEWASGKVLCLLDPLDGVNY-----LAQQRNLDDTWEGKIYRVLAGNPAK	234
EPA_mut_A519	PRREKQSEWASGKVLCLLDPLDGVNY-----LAQQRNLDDTWEGKIYRVLAGNPAK	234

EPA detox	HDLDIKPTVVISHRLLHFPFGGSLAALTAHQACHLPLEAFT-----RHRQPRGWEQLEQCG	288
EPA_mut_Y208	HDLDIKPTVVISHRLLHFPFGGSLAALTAHQACHLPLEAFT-----RHRQPRGWEQLEQCG	294
EPA_mut_R274	HDLDIKPTVVISHRLLHFPFGGSLAALTAHQACHLPLEAFT-----RHRQPRGWEQLEQCG	294
EPA_mut_S318	HDLDIKPTVVISHRLLHFPFGGSLAALTAHQACHLPLEAFT-----RHRQPRGWEQLEQCG	288
EPA_mut_A519	HDLDIKPTVVISHRLLHFPFGGSLAALTAHQACHLPLEAFT-----RHRQPRGWEQLEQCG	288

EPA detox	YPVQRULVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA-----SPGSGGDLGEAIREQPEQARLAILTL	342
EPA_mut_Y208	YPVQRULVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA-----SPGSGGDLGEAIREQPEQARLAILTL	348
EPA_mut_R274	YPVQRULVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA-----SPGSGGDLGEAIREQPEQARLAILTL	348
EPA_mut_S318	YPVQRULVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA-----SPGSGGDLGEAIREQPEQARLAILTL	348
EPA_mut_A519	YPVQRULVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA-----SPGSGGDLGEAIREQPEQARLAILTL	342

【図 2 - 3】

EPA detox	AAAESERFVQGTGNDGAGASADVSLITCPVAAGCAGPADSGDALLERNYPTGAETFLG	402
EPA_mut_Y208	AAAESERFVQGTGNDGAGASADVSLITCPVAAGCAGPADSGDALLERNYPTGAETFLG	408
EPA_mut_R274	AAAESERFVQGTGNDGAGASADVSLITCPVAAGCAGPADSGDALLERNYPTGAETFLG	408
EPA_mut_S318	AAAESERFVQGTGNDGAGASADVSLITCPVAAGCAGPADSGDALLERNYPTGAETFLG	408
EPA_mut_A519	AAAESERFVQGTGNDGAGASADVSLITCPVAAGCAGPADSGDALLERNYPTGAETFLG	402

EPA detox	DGGDVSFSTRGTQNTWVERLLQAHRLQLEERGYYVFGYHGHTFLEAAQSIVFGGVRARSQDL	462
EPA_mut_Y208	DGGDVSFSTRGTQNTWVERLLQAHRLQLEERGYYVFGYHGHTFLEAAQSIVFGGVRARSQDL	468
EPA_mut_R274	DGGDVSFSTRGTQNTWVERLLQAHRLQLEERGYYVFGYHGHTFLEAAQSIVFGGVRARSQDL	468
EPA_mut_S318	DGGDVSFSTRGTQNTWVERLLQAHRLQLEERGYYVFGYHGHTFLEAAQSIVFGGVRARSQDL	468
EPA_mut_A519	DGGDVSFSTRGTQNTWVERLLQAHRLQLEERGYYVFGYHGHTFLEAAQSIVFGGVRARSQDL	462

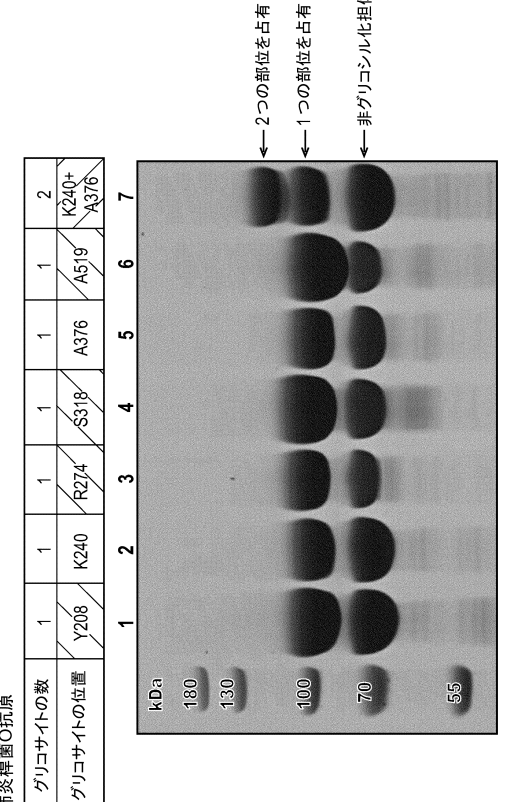
EPA detox	DAIWRGFYIAGDPALAYGVAQDQEPDARGIRNGALLRVVPRWSLPGFYTGITLTA-----	519
EPA_mut_Y208	DAIWRGFYIAGDPALAYGVAQDQEPDARGIRNGALLRVVPRWSLPGFYTGITLTA-----	525
EPA_mut_R274	DAIWRGFYIAGDPALAYGVAQDQEPDARGIRNGALLRVVPRWSLPGFYTGITLTA-----	525
EPA_mut_S318	DAIWRGFYIAGDPALAYGVAQDQEPDARGIRNGALLRVVPRWSLPGFYTGITLTA-----	525
EPA_mut_A519	DAIWRGFYIAGDPALAYGVAQDQEPDARGIRNGALLRVVPRWSLPGFYTGITLTA-----	522

【図 2 - 4】

EPA detox	---APEAAGEVERLIGHPLPIRLDALTGPEEGGRVTILGWPLAERTVWIPSAIPTDPNN	576
EPA_mut_Y208	---APEAAGEVERLIGHPLPIRLDALTGPEEGGRVTILGWPLAERTVWIPSAIPTDPNN	582
EPA_mut_R274	---APEAAGEVERLIGHPLPIRLDALTGPEEGGRVTILGWPLAERTVWIPSAIPTDPNN	582
EPA_mut_S318	---APEAAGEVERLIGHPLPIRLDALTGPEEGGRVTILGWPLAERTVWIPSAIPTDPNN	582
EPA_mut_A519	---APEAAGEVERLIGHPLPIRLDALTGPEEGGRVTILGWPLAERTVWIPSAIPTDPNN	582

EPA detox	VGGLDLPSSIPDKQQAISALPDYASQPKPPREDLK	612
EPA_mut_Y208	VGGLDLPSSIPDKQQAISALPDYASQPKPPREDLK	618
EPA_mut_R274	VGGLDLPSSIPDKQQAISALPDYASQPKPPREDLK	618
EPA_mut_S318	VGGLDLPSSIPDKQQAISALPDYASQPKPPREDLK	618
EPA_mut_A519	VGGLDLPSSIPDKQQAISALPDYASQPKPPREDLK	618

【図 3】



10

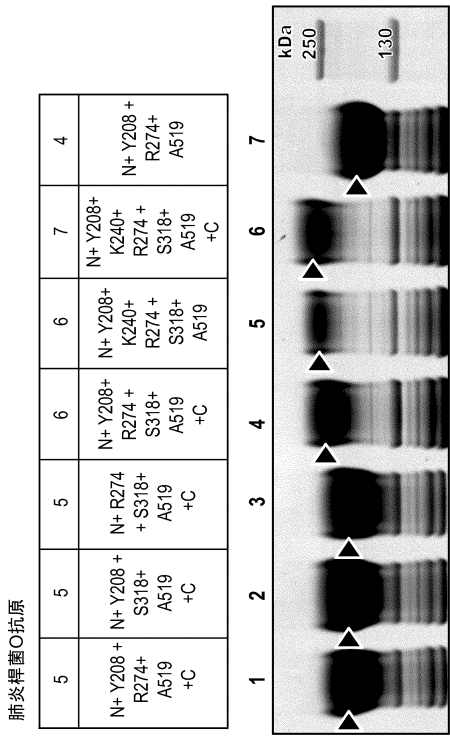
20

30

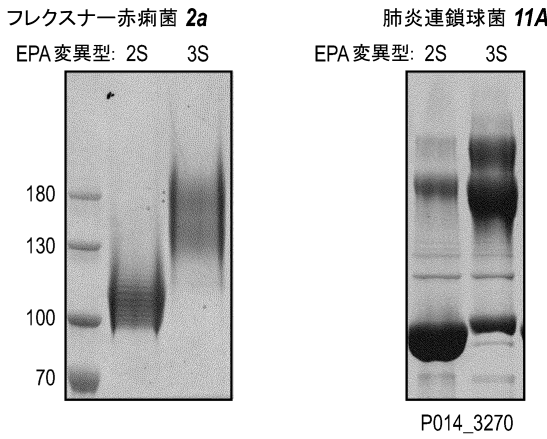
40

50

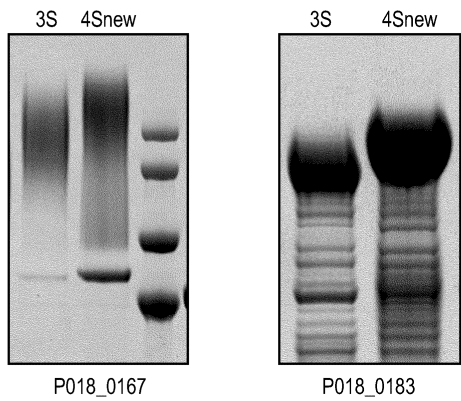
【図 6】



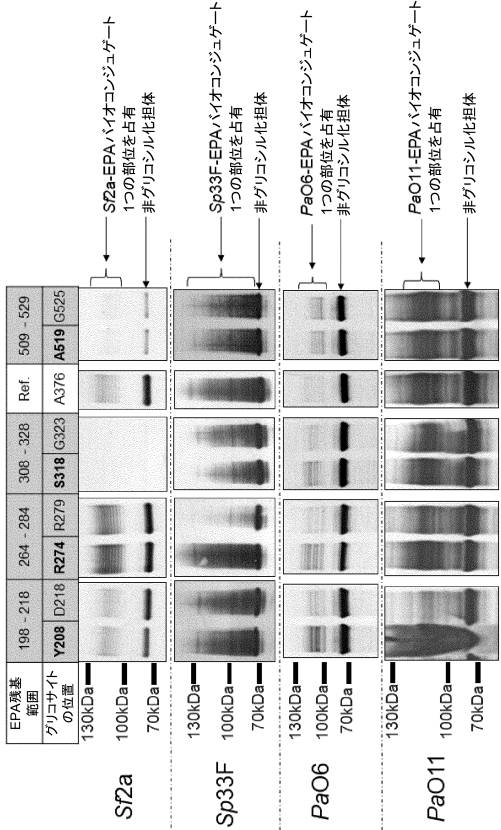
【図 7】



【図 8】



【図 9】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023531242000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/066336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K39/104 A61K47/68 C07K14/21 C12N9/10 A61K38/46	
ADD.	A61K39/108 A61K39/385 A61K47/64 C07K14/705	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12R C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Julian Ihssen ET AL: "Production of glycoprotein vaccines in Escherichia coli", 1 January 2010 (2010-01-01), XP055158778, DOI: 10.1186/1475-2859-9-61 Retrieved from the Internet: URL: http://www.microbialcellfactories.com/content/pdf/1475-2859-9-61.pdf [retrieved on 2014-12-15] abstract page 3, left-hand column, paragraph 1 page 5, right-hand column, last paragraph - page 6, left-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 22 September 2021		Date of mailing of the international search report 06/10/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Niebuhr-Ebel, K

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/066336

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/274720 A1 (WACKER MICHAEL [CH] ET AL) 10 November 2011 (2011-11-10) page 8, left-hand column, paragraph 98 - paragraph 99 sequences 13, 14 -----	1-15
X	WO 2009/104074 A2 (GLYCOVAXYN AG [CH]; FERNANDEZ FABIANA [CH] ET AL.) 27 August 2009 (2009-08-27) cited in the application page 55, last paragraph - page 56, paragraph 3 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/066336

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/066336

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011274720 A1	10-11-2011	AU 2011249839 A1	29-11-2012
		AU 2016208265 A1	11-08-2016
		CA 2798381 A1	10-11-2011
		CN 103079591 A	01-05-2013
		CY 1119895 T1	27-06-2018
		DK 2566507 T3	29-01-2018
		EP 2566507 A1	13-03-2013
		EP 3281639 A1	14-02-2018
		ES 2657588 T3	06-03-2018
		ES 2844596 T3	22-07-2021
		HR P20180064 T1	23-02-2018
		HU E037956 T2	28-09-2018
		IL 222711 A	31-10-2018
		JP 6339366 B2	06-06-2018
		JP 6435583 B2	12-12-2018
		JP 2013524844 A	20-06-2013
		JP 2017036303 A	16-02-2017
		KR 20130063510 A	14-06-2013
		KR 20180021219 A	28-02-2018
		LT 2566507 T	12-02-2018
		NO 2566507 T3	21-04-2018
		PL 2566507 T3	30-05-2018
		PT 2566507 T	06-02-2018
		SG 185433 A1	28-12-2012
		SI 2566507 T1	30-04-2018
		US 2011274720 A1	10-11-2011
		US 2015010592 A1	08-01-2015
		US 2017128559 A1	11-05-2017
		WO 2011138361 A1	10-11-2011
WO 2009104074 A2	27-08-2009	AU 2009215341 A1	27-08-2009
		CA 2716187 A1	27-08-2009
		CN 101983070 A	02-03-2011
		CY 1120512 T1	10-07-2019
		DK 2257307 T3	20-08-2018
		EP 2257307 A2	08-12-2010
		EP 3427749 A1	16-01-2019
		ES 2684129 T3	01-10-2018
		HK 1155938 A1	01-06-2012
		HR P20181259 T1	05-10-2018
		HU E039413 T2	28-12-2018
		IL 207350 A	31-10-2017
		JP 5782258 B2	24-09-2015
		JP 6122071 B2	26-04-2017
		JP 2011514155 A	06-05-2011
		JP 2015187174 A	29-10-2015
		KR 20100123730 A	24-11-2010
		LT 2257307 T	10-08-2018
		PL 2257307 T3	30-11-2018
		PT 2257307 T	22-10-2018
		SG 10201400320T A	29-05-2014
		SI 2257307 T1	28-09-2018
		US 2011097357 A1	28-04-2011
		US 2015044254 A1	12-02-2015
		US 2021085772 A1	25-03-2021
		WO 2009104074 A2	27-08-2009

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 39/07 (2006.01)	A 6 1 K 39/07	
A 6 1 K 39/104 (2006.01)	A 6 1 K 39/104	
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09	
A 6 1 K 39/085 (2006.01)	A 6 1 K 39/085	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z

(32)優先日 令和2年6月25日(2020.6.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(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,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 ポッシュ, ゲラルト ヨハン

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン チューリッヒ, グラーベンシュトラーク 3, リマテッヒ ビオロギクス アーゲー

(72)発明者 ケバッテ, ジュリアン ローレン

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン チューリッヒ, グラーベンシュトラーク 3, リマテッヒ ビオロギクス アーゲー

F ターム (参考) 4B064 AG31 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA45
 4C076 CC06 CC32 CC41 EE41 EE59 FF70
 4C085 AA03 BA13 BA14 BA19 BA21 BA24 EE01
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA53 CA11 DA86 EA31 FA72 FA74