

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第6998866号

(P6998866)

(45)発行日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日 令和3年12月23日(2021.12.23)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/64 (2017.01)

A 6 1 K 47/64

Z N A

A 6 1 K 31/70 (2006.01)

A 6 1 K 31/70

A 6 1 K 31/715 (2006.01)

A 6 1 K 31/715

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00

H

請求項の数 27 (全59頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-520162(P2018-520162)

(86)(22)出願日 平成28年10月19日(2016.10.19)

(65)公表番号 特表2018-535207(P2018-535207
A)

(43)公表日 平成30年11月29日(2018.11.29)

(86)国際出願番号 PCT/EP2016/075048

(87)国際公開番号 WO2017/067964

(87)国際公開日 平成29年4月27日(2017.4.27)

審査請求日 令和1年8月7日(2019.8.7)

(31)優先権主張番号 1518668.7

(32)優先日 平成27年10月21日(2015.10.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(73)特許権者 305060279

グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサー
ル リュ ドランスティテュ 8 9

(74)代理人 110002572

特許業務法人平木国際特許事務所

(72)発明者 フェロン, クリスティアーヌ マリー -
ポール シモーン ジャンヌベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサー
ル, リュ ドランスティテュ 8 9, グラ
クソスミスクライン バイオロジカルズ
ソシエテ アノニム

(72)発明者 ケムラー, ステファン ヨッヘン

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, グラ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 緑膿菌 P c r V 連結型抗原ワクチン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1～4の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含有する緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa) PcrVキャリアタンパク質に共有結合している抗原を含有するかまたは前記PcrVキャリアタンパク質に共有結合している前記抗原からなるコンジュゲートであって、前記抗原が緑膿菌PcrVキャリアタンパク質のアスパラギンアミノ酸残基に(直接またはリンカーを介して)連結しており、ここで前記アスパラギン残基は配列番号1～4の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列中に導入されたD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部であり、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、前記アスパラギン残基は配列番号3のアミノ酸24～166もしくはアミノ酸281～317内もしくはアミノ酸317に相当する位置か、または配列番号4のアミノ酸1～143もしくはアミノ酸258～294内もしくはアミノ酸294に相当する位置にある、前記コンジュゲート。

【請求項 2】

前記アスパラギン残基が、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部であり、ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、ここで前記アスパラギン残基は配列番号5の配列または配列番号5と少なくとも90%の同一性を有する配列中に変異により導入されていない、請求項1に記載のコンジュゲート。

【請求項 3】

PcrVペプチド配列を除去しこれをD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドに置換することにより、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドがアミノ酸

配列中に導入されている、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートであって、好ましくは PcrV ペプチド配列が 1 ~ 7 個のアミノ酸を含有し、好ましくは PcrV ペプチド配列が 1 個のアミノ酸を含有する、前記コンジュゲート。

【請求項 4】

D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列を含有するペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸残基 24 ~ 143 または配列番号 4 のアミノ酸残基 1 ~ 120 内の位置でアミノ酸配列中に導入されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートであって、好ましくは D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列を含有するペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸残基 24 ~ 48 または配列番号 4 のアミノ酸残基 1 ~ 24 内の位置でアミノ酸配列中に導入されている、前記コンジュゲート。

10

【請求項 5】

少なくとも 2、3 または 4 個の D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列が、配列番号 1 ~ 4 のいずれか 1 つの配列またはそれと少なくとも 90 % 同一である配列中に導入されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

PcrV キャリアタンパク質が配列番号 6 ~ 62 のうち少なくとも 1 つを含有する配列を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートであって、好ましくは PcrV キャリアタンパク質が配列番号 6 ~ 12 および 33 のうち少なくとも 1 つを含有する配列を有し、好ましくは PcrV キャリアタンパク質が配列番号 6 ~ 12 および 33 のうち少なくとも 3 つを含有する配列を有し、好ましくは PcrV キャリアタンパク質が配列番号 6 および / または配列番号 9 および / または配列番号 11 および / または配列番号 33 を含有する配列を有する、前記コンジュゲート。

20

【請求項 7】

抗原が糖である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートであって、好ましくは抗原が細菌莢膜糖、または細菌性のリポ多糖もしくはリポオリゴ糖、好ましくは緑膿菌由来のリポ多糖であり、また好ましくは抗原が、緑膿菌由来の O 抗原であり、場合により O1、O2、O3、O4、O5、O6、O7、O8、O9、O10、O11、O12、O13、O14、O15、O16、O17、O18、O19 または O20 であり、例えば O6 または O11 である、前記コンジュゲート。

【請求項 8】

30

配列番号 1 ~ 4 の配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する PcrV タンパク質であって、前記アミノ酸配列は D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列を含有し、ここで X はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、前記 PcrV タンパク質は PcrV に対して中和免疫応答を生じるか、又は前記 PcrV タンパク質はキャリアタンパク質である、前記 PcrV タンパク質。

【請求項 9】

X がプロリン以外の任意のアミノ酸である D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列が、配列番号 3 のアミノ酸 23 ~ 166 もしくはアミノ酸 281 ~ 317 内またはアミノ酸 317 の位置にあるか、または、X がプロリン以外の任意のアミノ酸である D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列が、配列番号 4 のアミノ酸 1 ~ 143 もしくはアミノ酸 258 ~ 294 内またはアミノ酸 294 にある、請求項 8 に記載の PcrV タンパク質。

40

【請求項 10】

PcrV ペプチド配列を除去しこれを D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列を含有するペプチドに置換することにより、D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列を含有するペプチドがアミノ酸配列中に導入されている、請求項 8 または 9 に記載の PcrV タンパク質であって、好ましくは、除去される PcrV ペプチド配列が 1 ~ 7 個のアミノ酸を含有し、好ましくは、除去される PcrV ペプチド配列が 1 個のアミノ酸を含有する、前記 PcrV タンパク質。

【請求項 11】

D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列を含有するペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸残基 24 ~ 143 または配列番号 4 のアミノ酸残基 1 ~ 120 内の位置でアミノ酸配列中に導入されている

50

、請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の PcrV タンパク質。

【請求項 12】

D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列を含有するペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸残基 24 ～ 48 または配列番号 4 のアミノ酸残基 1 ～ 24 内の位置でアミノ酸配列中に導入されている、請求項 11 に記載の PcrV タンパク質。

【請求項 13】

少なくとも 2、3 または 4 個の D/E-X-N-X-S/T コンセンサス配列が、配列番号 1 ～ 4 のいずれか 1 つの配列またはそれと少なくとも 90 % 同一な配列中に導入されている、請求項 8 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の PcrV タンパク質。

【請求項 14】

配列番号 6 ～ 62 のうち少なくとも 1 つを含有するアミノ酸配列を有する、請求項 8 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の PcrV タンパク質であって、好ましくは配列番号 6 ～ 12 および 33 のうち少なくとも 1 つを含有するアミノ酸配列を有し、好ましくは配列番号 6 ～ 12 および 33 のうち少なくとも 3 つを含有するアミノ酸配列を有し、好ましくは配列番号 6 および / または配列番号 9 および / または配列番号 11 および / または配列番号 33 を含有するアミノ酸配列を有する、前記 PcrV タンパク質。

【請求項 15】

前記アミノ酸配列が PcrV タンパク質の精製に有用なペプチドタグを含有する、請求項 8 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の PcrV タンパク質であって、好ましくはペプチドタグがアミノ酸配列の C 末端に位置しており、好ましくはペプチドタグが 6 ヒスチジン残基を含有する、前記 PcrV タンパク質。

【請求項 16】

前記アミノ酸配列が、PcrV タンパク質を細菌のペリプラズムへ指向させることが可能なリーダー配列を含む、請求項 8 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の PcrV タンパク質であって、好ましくは、リーダー配列が、配列番号 63 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を有する、前記 PcrV タンパク質。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートまたは請求項 8 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の PcrV タンパク質、および薬学的に許容可能な賦形剤を含有する、免疫原性組成物。

【請求項 18】

追加的な抗原をさらに含む、請求項 17 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

追加的な抗原が、O 抗原とキャリアタンパク質のコンジュゲート、細菌莢膜多糖とキャリアタンパク質のコンジュゲート、LOS とキャリアタンパク質のコンジュゲート、およびタンパク質からなる群から選択される、請求項 18 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

コンジュゲートまたは PcrV タンパク質を薬学的に許容可能な賦形剤と混合するステップを含む、請求項 17 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物を作製する方法。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートまたは PcrV タンパク質を含む、感染症の治療用の組成物。

【請求項 22】

請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートまたは PcrV タンパク質を含む、緑膿菌感染の治療用の組成物。

【請求項 23】

前記治療がそれを必要とするヒト被験体の治療である、請求項 21 または 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

請求項 8 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の PcrV タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

請求項 24 に記載のポリヌクレオチドを含有するベクター。

【請求項 26】

- i) グリコシルトランスフェラーゼをコードする核酸；
- ii) オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸；および
- iii) 請求項 8 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の緑膿菌 PcrV タンパク質をコードする核酸を含有する宿主細胞。

【請求項 27】

糖に連結している緑膿菌 PcrV タンパク質を含有するバイオコンジュゲートを生産する方法であって、タンパク質の産生に好適な条件下で請求項 26 に記載の宿主細胞を培養することを含む前記方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コンジュゲートに基づく免疫原性組成物およびワクチン、その製造ならびに医薬におけるそのような組成物の使用の分野に関する。より具体的には、本発明は緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に由来する新規キャリアタンパク質としての PcrV の使用に関する。PcrV は、他の抗原、特に T 細胞エпитープを有しない糖抗原または他の抗原のためのキャリアタンパク質として使用され得る。PcrV キャリアタンパク質は、キャリアタンパク質として、かつそれ自体で抗原として、その両方で機能し得る。

20

【背景技術】

【0002】

T 非依存性抗原のキャリアタンパク質へのコンジュゲートは、T 細胞が通常では T 非依存性の抗原に対する免疫応答の一部になるのを助けることを可能にする方法として長らく確立されてきた。この方法で、免疫応答はその応答の免疫記憶およびブースト能を確立させることにより強化することができる。細菌莢膜糖をキャリアタンパク質にコンジュゲートさせることにより開発された成功したコンジュゲートワクチンは当技術分野において公知であり、ここでキャリアタンパク質は T 非依存性多糖抗原を免疫記憶応答を引き起こすことができる T 依存性抗原に変化させる公知の効果をも有する。例えば、国際公開番号 WO02/58737 はキャリアタンパク質にコンジュゲートされた髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清型 A、C、W135 および Y 由来の精製莢膜多糖を含有するワクチンを開示する。

30

【0003】

数種類のキャリアタンパク質が当技術分野において公知であり、破傷風トキソイド、ジフテリトキソイド、CRM197 およびインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 由来のプロテイン D が市販ワクチンにおけるキャリアタンパク質として使用されている。ジフテリア毒素および CRM197 を含む変異型はまた糖のための安全かつ有効な T 細胞依存性キャリアとしてワクチンにおいて使用されてきた。CRM197 は現在インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) b 型オリゴ糖 CRM197 コンジュゲートワクチン (HibTitre (登録商標) ; Lederle Praxis Biologicals, Rochester, N.Y.) において使用されている。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

シュードモナス属 (例えば、緑膿菌) の菌株による感染によって引き起こされる疾患は、世界的に重大な脅威を示す。そのような感染に対するワクチンの開発が進行中であるが、安全かつ大量に製造できる、シュードモナス属感染に対する効果的なワクチンについての大きなニーズが残っている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は新規キャリアタンパク質を提供する。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PcrV タンパク質は従来キャリアタンパク質として使用されていなかった。本明細書では、Pc

50

rVに対して中和免疫応答が生じ、LPSに対してオプソニン反応が生じるように、PcrVタンパク質が糖抗原のためのキャリアタンパク質として、また追加的にそれ自体で抗原として、その両方で機能するコンジュゲートが開示される。

【0006】

したがって、本発明の一態様では、配列番号1～4の配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含有する緑膿菌PcrVキャリアタンパク質に共有結合している抗原を含有するコンジュゲートであって、前記抗原は緑膿菌PcrVキャリアタンパク質のアミノ酸残基に（直接またはリンカーを介して）連結している、前記コンジュゲートが提供される。

【0007】

本発明の第2態様によれば、配列番号1～4の配列と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を有するPcrVタンパク質であって、前記アミノ酸配列はD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有し、ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸である、前記PcrVタンパク質が提供される。

10

【0008】

本発明のさらなる態様によれば、本発明のコンジュゲートまたはPcrVタンパク質および薬学的に許容可能な賦形剤を含有する、免疫原性組成物が提供される。

【0009】

本発明のさらなる態様によれば、本発明のコンジュゲートまたはPcrVタンパク質を薬学的に許容可能な賦形剤と混合するステップを含む、本発明の免疫原性組成物を作製する方法が提供される。

20

【0010】

本発明のさらなる態様によれば、感染症の治療における使用のための本発明によるコンジュゲートまたはPcrVタンパク質が提供され、本発明によるPcrVタンパク質のコンジュゲートを使用する治療方法は本発明のさらなる態様である。

【0011】

本発明のさらなる態様によれば、本発明による緑膿菌PcrVタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも80%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有するPcrVタンパク質をコードするポリヌクレオチドが提供される。

【0012】

本発明のさらなる態様によれば、本発明のポリヌクレオチドを含有するベクターが提供される。

30

【0013】

本発明のさらなる態様によれば、

- i) グリコシルトランスフェラーゼをコードする核酸；
 - ii) オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸；および
 - iii) 本発明による緑膿菌PcrVタンパク質をコードする核酸
- を含有する宿主細胞が提供される。

【0014】

本発明のさらなる態様によれば、糖に連結している緑膿菌PcrVタンパク質を含有するバイオコンジュゲートを生産する方法であって、タンパク質の産生に好適な条件下で本発明の宿主細胞を培養することを含む前記方法が提供される。

40

【0015】

本発明のさらなる態様によれば、本発明の過程により生産されるバイオコンジュゲートであって、緑膿菌PcrVタンパク質に連結している糖を含有する前記バイオコンジュゲートが提供される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【文献】国際公開第02/58737号

50

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1】 バイオコンジュゲートを産生する改変型宿主細胞由来のペリプラズム抽出物のウエスタンブロット。実施例に記載された菌株を示す。「int」は、組み込まれた構成要素を意味する。「*」は、トランスポゾン媒介アプローチを用いた組み込みを意味する。

【図 2】 緑膿菌の O6 O 抗原の反復単位構造を示す。* は、亜血清型がどれであるかに応じてそれらの化学組成が変化し得る位置を示す。可変性は、C6 にある GaINAcA 残基の酸官能基をアミドへと変換して、GaINAcAN を生じさせる（または GaINFmA から GaINFmAN への変換；一部の亜血清型では、アセチル基が GaINAcAN* 残基の C3 を置換する）アミダーゼの活性により導入される。反復単位（wzy）の重合、アセチル化、ホルミル化、および GaINX 残基のうちの 1 つのアミド化のための遺伝子は、不明である。L-Rha、L-ラムノース；D-GaINAcAN、6-アミド-2-N-アセチル-D-ガラクトサミノロン酸；D-GaINFmAN、2-N-ホルミル-D-ガラクトサミノロン酸（2-N-formyl-D-galactosaminuronic）；D-QuINAc、N-アセチル-D-キノサミン。

【図 3】 緑膿菌 O6 ホルミルトランスフェラーゼの機能性試験。3A：ウエスタンブロットニングによる、リピド A コアに結合したホルミル化単一 O6 反復単位の検出。大腸菌 W3110 *wec* を、（不完全）*rfbO6* クラスターをコードするコスミドおよび O6 ホルミルトランスフェラーゼ（*fmtO6*；配列番号 2）をコードする発現プラスミドを用いて形質転換した。LB 培地中にて 37 °C での増殖中の一晚の誘導後に、細胞抽出物を回収し、プロテイナーゼ K を用いて消化し、SDS-PAGE により分離し、ニトロセルロースメンブレン上に電気ブロットした。O6 特異的抗血清を用いた免疫検出は、*fmtO6* の存在下ではシグナルを生じたが、空ベクター対照では生じなかった。この結果は、ホルミル化が、緑膿菌細胞上の関連する抗原であり、この抗血清を用いた検出のための必須条件であることを強く示す。3B：ウンデカプレニルピロリン酸から放出された単一 O6 反復単位上のホルミル化の確認。大腸菌 W3110 *wec waaL* を、上記と同じプラスミドを用いて形質転換し、O6 O 抗原の単一反復単位（wzy ポリメラーゼは、これらの菌株では欠損している）を産生させるために振盪フラスコにて増殖させ、糖脂質を分析した。簡潔には、反復単位を、乾燥細胞から糖脂質として抽出し、C18 カートリッジに対する親和性により精製し、加水分解し（O6 O 抗原反復単位からウンデカプレニルピロリン酸を除去するため）、還元的アミノ化を用いて 2-アミノベンズアミドによって標識し、順相 HPLC により分析した。*fmtO6* の共発現は、61 分の溶出時間での追加のシグナルを生じさせ、これは標識されたホルミル化 O6 反復単位に対応するオリゴ糖を含有したが、一方で、その遺伝子の非存在下では、主シグナルは 58 分に見出され、標識された N-アセチル化 O6 反復単位を含んでいた。

【図 4】 緑膿菌 O6 候補 wzy ポリメラーゼの機能性試験。（不完全）*rfb* クラスター（*fmtO6* 遺伝子および wzy 遺伝子を欠失している）をコードするコスミドを含有する大腸菌 W3110 *wec* 細胞を、*fmtO6* および wzy 候補遺伝子 PAK_01823（配列番号 3）をコードするプラスミドまたは対応する空ベクターを用いて形質転換した。細胞抽出物を、プロテイナーゼ K を用いて処理し、SDS-PAGE およびニトロセルロースメンブレンへの電気トランスファー後に、免疫検出により LPS を分析した。

【図 5】 人工的緑膿菌 O6 O 抗原発現クラスターのクローニング。まず、緑膿菌 O6 株 stGV XN4017（緑膿菌 O6「PAK」株）の *rfb* クラスターを、標準的技術を用いる PCR クローニングによりコスミドベクターへとクローニングした。バイオインフォマティクス支援相同性検索により、ホルミルトランスフェラーゼ（FT）および O 抗原ポリメラーゼ（wzy）を特定し、続いて、段階的方法で *rfb* クラスターの下流に挿入した。得られた遺伝子クラスターは、大腸菌 W3110 誘导体での完全な緑膿菌 O6 O 抗原反復単位生合成（*rfbO6+*、ポリマーなし）および多糖（*rfbO6++*、wzy が含まれる）生合成を行なうことができる。

【図 6 A】 図 6 は バイオコンジュゲートを産生する改変型宿主細胞由来のペリプラズム抽出物のウエスタンブロットを示す図である。実施例に記載された菌株を示す。6A：組み込まれた *pglB* および緑膿菌 O6 由来の組み込まれた *rfb* クラスターを含むように改変された「St7343」大腸菌株に関する結果。

10

20

30

40

50

【図 6 B】図 6 はバイオコンジュゲートを産生する改変型宿主細胞由来のペリプラズム抽出物のウエスタンブロットを示す図である。実施例に記載された菌株を示す。6B：プラスミド担持pglBおよび緑膿菌O6由来の組み込まれたrfbクラスターを含むように改変された「St7209」大腸菌株に関する結果。

【図 6 C】図 6 はバイオコンジュゲートを産生する改変型宿主細胞由来のペリプラズム抽出物のウエスタンブロットを示す図である。実施例に記載された菌株を示す。6C：プラスミド担持pglBおよび緑膿菌O6由来のプラスミド担持rfbクラスターを含むように改変された「St2182」大腸菌株に関する結果。

【図 7】精製されたEPA-O6糖コンジュゲート。EPA-O6は、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いて、改変型宿主細胞のペリプラズム抽出物から精製した。最終的なSEC溶出物を、SDS-PAGEとそれに続くクマシーブルー染色または示された抗体を用いるウエスタンブロットにより特性決定した。

【図 8】抗生物質選択圧の存在下および非存在下での1プラスミドおよび3プラスミド系のプラスミド保持率（PR）。PRは、それぞれのプラスミドを含む細胞の％で表わされる。図8Aおよび8Bは、カナマイシンの存在下（A）および非存在下（B）での組み込まれたrfbクラスターおよびpglBを含む改変型宿主細胞でのEPAプラスミド（カナマイシン、黒色）のPRを示す。図8Cおよび8Dは、3種類すべての抗生物質の存在下（C）および非存在下（D）での改変型宿主細胞でのEPAプラスミド（カナマイシン、黒色）、pglBプラスミド（スペクチノマイシン、白色）およびrfbクラスタープラスミド（テトラサイクリン、ドット）のPRを示す。3種類すべてのプラスミドが保持されている細胞の割合（％）を、灰色で示す。Inoc = 接種物；U = 非誘導細胞；I4 = 誘導6時間後の細胞；I6 = 一晚誘導後の細胞。

【図 9】ワクチンにより誘導された抗O6抗血清の生物学的活性。9A：3回目の注入後の異なるワクチン接種群由来のプールされたマウス血清のELISA中間点力価。non ads = 非アジュバント化；O/W：水中油型エマルジョンアジュバントである、用いたアジュバントを示す。O/W単独は、糖コンジュゲートを含有しなかった対照群である。9B：オプソニン食作用殺菌中間点力価（対照と比較してcfuの50％の低下を引き起こす）が示される。プールpIIおよびプールpIIIは、2回目および3回目の注入後に収集されたプールされた血清である。

【図 10】PIII 14日目（42日目）に由来するプールされた血清におけるPcrV溶血阻害力価を示す図である。

【図 11】II後14日目（42日目）に由来する個別の血清における抗O6 IgG ELISA力価を示す図である。

【図 12】PIII 14日目（24日目）の個別の血清における抗O6オプソニン食作用力価を示す図である。

【図 13】PII 14日目（28日目）およびIII後14（42日目）のラット血清における抗PcrV IgG ELISA力価を示す図である。

【図 14】III後14日目（42日目）のプールされたラット血清における抗O6 IgG ELISA力価を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、配列番号1～4の配列と少なくとも70％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％または100％同一なアミノ酸配列を含有する緑膿菌PcrVキャリアタンパク質に共有結合している抗原を含有するコンジュゲートであって、前記抗原は緑膿菌PcrVキャリアタンパク質のアミノ酸残基に（直接またはリンカーを介して）連結している、前記コンジュゲートを開示する。

【0019】

一実施形態では、抗原が連結しているアミノ酸残基はアスパラギン残基ではなく、この場合コンジュゲートは通常は、多くの過程が当技術分野において周知である化学コンジュゲートにより生産される。例えば、該アミノ酸はAla、Arg、Asp、Cys、Gly、Glu、Gln、

10

20

30

40

50

His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrおよびValからなる群から選択される。場合により、該アミノ酸は末端アミン基を含有するアミノ酸、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、アルギニンまたはトリプトファンである。

【0020】

一実施形態では、抗原は、化学コンジュゲーション法を使用して得られる化学結合により緑膿菌PcrVキャリアタンパク質に共有結合される。

【0021】

一実施形態では、化学コンジュゲーション法は、カルボジイミド化学、還元アミノ化 (reductive animation)、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、エステル化学およびN-ヒドロキシコハク酸イミド化学からなる群から選択される。場合により、抗原は緑膿菌PcrVキャリアタンパク質上のアスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、システイン、チロシン、ヒスチジン、アルギニンまたはトリプトファンのアミノ酸に共有結合される。

【0022】

一実施形態では、抗原は緑膿菌PcrVキャリアタンパク質に直接連結している。

【0023】

一実施形態では、抗原はリンカーを介して緑膿菌PcrVキャリアタンパク質に結合している。場合により、リンカーは、4~12個の炭素原子を有するリンカー、二官能性リンカー、末端に1または2個の反応性アミノ基を含有するリンカー、B-プロピオンアミド (B-propionamido)、ニトロフェニルエチルアミン、ハロアシルハライド、6-アミノカプロン酸およびADHからなる群から選択される。

【0024】

一般的にタンパク質キャリア上の以下のタイプの化学基がカップリング/コンジュゲーションに使用され得る：

A) カルボキシル基 (例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸を用いる)。一実施形態では、この基は、カルボジイミド化学を用いて、例えばEDACを用いて、糖上のアミノ基に直接連結しているか、またはリンカー上のアミノ基に連結される。

B) アミノ基 (例えばリシンを用いる)。一実施形態では、この基は、糖上のカルボキシル基に直接連結しているか、またはカルボジイミド化学を用いて、例えばEDACを用いて、リンカー上のカルボキシル基に連結される。別の実施形態では、この基は、糖上のCDAPまたはCNBrで活性化されたヒドロキシル基に直接連結されるか、またはリンカー上のそのような基に連結され；アルデヒド基を有する糖またはリンカーに連結され；コハク酸イミドエステル基を有する糖またはリンカーに連結される。

C) スルフヒドリル (例えばシステインを用いる)。一実施形態では、この基はマレイミド化学を用いて、プロモ酢酸化もしくはクロロ酢酸化された糖またはリンカーに連結される。一実施形態では、この基はビスジアゾベンジジンで活性化/修飾される。

D) ヒドロキシル基 (例えばチロシンを用いる)。一実施形態では、この基はビスジアゾベンジジンで活性化/修飾される。

E) イミダゾリル基 (例えばヒスチジンを用いる)。一実施形態では、この基はビスジアゾベンジジンで活性化/修飾される。

F) グアニジル基 (例えばアルギニンを用いる)。

G) インドリル基 (例えばトリプトファンを用いる)。

【0025】

糖上では、一般には以下の基：OH、COOHまたはNH₂がカップリングに使用され得る。アルデヒド基は過ヨウ素酸、酸加水分解、過酸化水素などの当技術分野で公知の様々な処理後に生成され得る。

【0026】

直接的なカップリングアプローチ：

糖-OH + CNBrまたはCDAP シアン酸エステル + NH₂-Prot コンジュゲート

10

20

30

40

50

糖-アルデヒド + NH₂-Prot シッフ塩基 + NaCNBH₃ コンジュゲート

糖-COOH + NH₂-Prot + EDAC コンジュゲート

糖-NH₂ + COOH-Prot + EDAC コンジュゲート

【0027】

スペーサー（リンカー）アプローチによる間接的カップリング：

糖-OH + CNBrまたはCDAP シアン酸エステル + NH₂----NH₂ 糖----NH₂ + COO
H-Prot + EDAC コンジュゲート

糖-OH + CNBrまたはCDAP シアン酸エステル + NH₂-----SH 糖----SH + SH-Prot
（露出したシステインを有する未処理のタンパク質、または例えばSPDPによってタンパ
ク質のアミノ基を修飾した後に得られる） 糖-S-S-Prot

糖-OH + CNBrまたはCDAP シアン酸エステル + NH₂----SH 糖----SH + マレイミ
ド-Prot（アミノ基の修飾） コンジュゲート

糖-COOH + EDAC + NH₂-----NH₂ 糖-----NH₂ + EDAC + COOH-Prot コンジュ
ゲート

糖-COOH + EDAC + NH₂----SH 糖----SH + SH-Prot（露出したシステインを有する
未処理のタンパク質、または例えばSPDPによってタンパク質のアミノ基を修飾した後に
得られる） 糖-S-S-Prot

糖-COOH + EDAC + NH₂----SH 糖----SH + マレイミド-Prot（アミノ基の修飾）
コンジュゲート

糖-アルデヒド + NH₂-----NH₂ 糖---NH₂ + EDAC + COOH-Prot コンジュゲート

注記：上記のEDACの代わりに任意の好適なカルボジイミドを使用してもよい。

【0028】

一実施形態では、本発明のコンジュゲートは、抗原が連結しているアミノ酸残基であって、
、アスパラギン残基である前記アミノ酸残基を含有する。

【0029】

一実施形態では、該アスパラギン残基は、配列番号1～4の配列と少なくとも50%、60%
、70%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同
一なアミノ酸配列中に導入されたD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部ではなく、こ
こでXはプロリン以外の任意のアミノ酸である。

【0030】

しかし、さらなる実施形態では、該アスパラギン残基は配列番号1～4の配列と少なくとも
50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%ま
たは100%同一なアミノ酸配列中に導入されたD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部で
あり、ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、ここで該アスパラギン残基は配
列番号3のアミノ酸23～166もしくはアミノ酸281～317またはアミノ酸317に相当する
位置にある。例えば、アミノ酸24～100、アミノ酸24～50、アミノ酸310～317である
。

【0031】

一実施形態では、該アスパラギン残基は配列番号1～4の配列と少なくとも50%、60%、
70%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同
一なアミノ酸配列中に導入されたD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部であり、ここでX
はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、ここで該アスパラギン残基は配列番号4のアミ
ノ酸1～143もしくはアミノ酸258～294内またはアミノ酸294にある。例えば、配列番
号4のアミノ酸1～100またはアミノ酸1-50またはアミノ酸1～25またはアミノ酸290～2
94である。

【0032】

一実施形態では、該アスパラギン残基はD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部であり、
ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、ここで該アスパラギン残基は、配列番
号5の配列または配列番号5と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92
%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列に変異によ

10

20

30

40

50

って導入されたものではない。

【0033】

一実施形態では、PcrVペプチド配列を除去しこれをD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドに置換することにより、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドがアミノ酸配列中に導入されている。一実施形態では、除去されるPcrVペプチド配列は1～7個のアミノ酸または7、6、5、4、3、2もしくは1個のアミノ酸を含有する。

【0034】

一実施形態では、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドは、配列番号3のアミノ酸残基23～166もしくは配列番号4のアミノ酸残基1～143内の位置、または配列番号3のアミノ酸残基23～100、23～50もしくは配列番号4のアミノ酸残基1～100、1～50もしくは1～24内の位置でアミノ酸配列中に導入されている。

10

【0035】

一実施形態では、少なくとも1、2、3、4または5個のD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列が、配列番号1～4のいずれか1つの配列またはそれと50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一な配列中に導入されている。

【0036】

一実施形態では、PcrVキャリアタンパク質は配列番号6～62、例えば配列番号6～12および33のうち少なくとも1つを含有する配列を有する。

【0037】

一実施形態では、PcrVキャリアタンパク質は、配列番号6～12および33のうち少なくとも1、2、3、4または5つ、場合により配列番号6～12および33のうち少なくとも3つを含有する配列を有する。

20

【0038】

一実施形態では、PcrVキャリアタンパク質は配列番号6および/または配列番号9および/または配列番号11および/または配列番号33を含有する配列を有する。

【0039】

一実施形態では、抗原は細菌莢膜糖、細菌のリポ多糖またはリポオリゴ糖などの糖である。

【0040】

当該糖は、髄膜炎菌血清型A莢膜糖(MenA)、髄膜炎菌血清型C莢膜糖(MenC)、髄膜炎菌血清型Y莢膜糖(MenY)、髄膜炎菌血清型W莢膜糖(MenW)、インフルエンザ菌b型莢膜糖(Hib)、B群連鎖球菌I群莢膜糖、B群連鎖球菌II群莢膜糖、B群連鎖球菌III群莢膜糖、B群連鎖球菌IV群莢膜糖、B群連鎖球菌V群莢膜糖、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*) 5型莢膜糖、黄色ブドウ球菌8型莢膜糖、チフス菌(*Salmonella typhi*)由来Vi糖、(L3および/またはL2などの)髄膜炎菌LPS、モラクセラ・カタラーリス(*M. catarrhalis*) LPS、インフルエンザ菌LPS、赤痢菌(*Shigella*) O抗原、緑膿菌O抗原、大腸菌O抗原からなる群から選択されてもよく、ならびに血清型: 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23Fまたは33Fに由来するものなどの肺炎球菌莢膜糖のいずれから選択されてもよい。

30

【0041】

一実施形態では、抗原は緑膿菌由来のリポ多糖である。場合により抗原は緑膿菌由来のO抗原であり、場合によりO1、O2、O3、O4、O5、O6、O7、O8、O9、O10、O11、O12、O13、O14、O15、O16、O17、O18、O19またはO20、例えばO6またはO11である。一実施形態では、Knirel et al., 2006, Journal of Endotoxin Research 12(6):324-336に記載される血清型の1つである緑膿菌O抗原に連結しているPcrVキャリアタンパク質を含むバイオコンジュゲートが提供され、該文献の開示は参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。特定の実施形態では、緑膿菌O抗原はO6またはO11由来である。

40

【0042】

本発明のさらなる態様は、配列番号1～4の配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一なアミノ酸

50

配列を有するPcrVタンパク質であって、前記アミノ酸配列はD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有し、ここでXがプロリン以外の任意のアミノ酸である、前記PcrVタンパク質である。

【0043】

一実施形態では、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であるD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列は、配列番号3のアミノ酸23～166もしくはアミノ酸281～317内の位置またはアミノ酸317にある。

【0044】

一実施形態では、Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であるD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列は、配列番号4のアミノ酸1～143もしくはアミノ酸258～294内またはアミノ酸294にある。

10

【0045】

一実施形態では、PcrVペプチド配列を除去しこれをD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドに置換することにより、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドがアミノ酸配列中に導入されている。一実施形態では、PcrVペプチド配列は1～7個のアミノ酸、場合により7、6、5、4、3、2または1個のアミノ酸を含有する。

【0046】

一実施形態では、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドは、配列番号4のアミノ酸残基23～166か、または配列番号4のアミノ酸残基1～143内の位置でアミノ酸配列中に導入されている。

20

【0047】

一実施形態では、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドは、配列番号3のアミノ酸残基23～100もしくは23～48、または配列番号4のアミノ酸残基1～75もしくは1～24内の位置でアミノ酸配列中に導入されている。

【0048】

一実施形態では、少なくとも2、3もしくは4個のD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列か、またはまさに1、2、3、4、5もしくは6個のD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列が、配列番号1～4のいずれか1つの配列か、またはそれと少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一な配列中に導入されている。

30

【0049】

一実施形態では、PcrVタンパク質は配列番号6～62のうち少なくとも1つ、場合により配列番号6～12および33のうち少なくとも1つ、場合により配列番号6～12および33のうち少なくとも3つを含むアミノ酸配列を有する。

【0050】

一実施形態では、本発明のPcrVタンパク質は配列番号6および/または配列番号9および/または配列番号11および/または配列番号33を含有するアミノ酸配列を有する。

【0051】

一実施形態では、本明細書中に記載されるバイオコンジュゲートの生成において使用されるPcrVキャリアタンパク質は「タグ」、すなわちキャリアタンパク質の単離および/または同定を可能にするアミノ酸配列を含む。例えば、本明細書中に記載されるキャリアタンパク質へのタグの付加は、そのタンパク質の精製ひいてはタグが付加されたキャリアタンパク質を含有するコンジュゲートワクチンの精製に有用であり得る。本明細書で使用される例示的タグとしては、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すなわち6XHisタグ)、FLAGタグ、およびHAタグが挙げられる。ある実施形態では、本明細書で使用されるタグは、例えばタンパク質が精製された後などタグがもはや必要でなくなれば、例えば化学薬剤によるかまたは酵素的手段による除去などにより除去可能である。

40

【0052】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるキャリアタンパク質は、キャリアタンパク質

50

を発現する宿主細胞のペリプラズム腔へとキャリアタンパク質をターゲッティングするシグナル配列を含有する。具体的な実施形態では、シグナル配列は、大腸菌DsbA、大腸菌外膜ポーリンA (porin A) (OmpA)、大腸菌マルトース結合タンパク質 (MalE)、エルウィニア・カロトボラ (Erwinia carotovora) のペクテートリアーゼ (pectate lyase) (PelB)、FlgI、NikA、またはバチルス属種 (Bacillus sp.) のエンドキシラーゼ (XynA)、大腸菌易熱性エンテロトキシンLTIIb、バチルス属 (Bacillus) エンドキシラーゼXynAまたは大腸菌フラジェリン (FlgI) に由来する。一実施形態では、本発明のPcrVタンパク質はPcrVタンパク質を細菌のペリプラズムに指向させることができるリーダー配列を含有する。場合により、リーダー配列は配列番号63と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を有する。一実施形態では、アラニン残基がリーダー配列と成熟タンパク質の配列の開始との間に追加される。そのようなアラニン残基はリーダー配列のより効率的な切断につながる利点を有する。

10

【0053】

一実施形態では、本発明のPcrVタンパク質はPcrVタンパク質の精製に有用なペプチドタグを含有するアミノ酸配列を有する。場合によりペプチドタグはアミノ酸配列のC末端に位置する。場合によりペプチドタグは6ヒスチジン残基を含有する。

【0054】

本発明のさらなる態様は、コンジュゲートまたはPcrVタンパク質を薬学的に許容可能な賦形剤と混合するステップを含む、本発明の免疫原性組成物を作製する方法である。

20

【0055】

本発明のPcrVタンパク質およびコンジュゲートは免疫原性組成物およびワクチンに含めるのに特に好適である。故に本発明の過程は、PcrVタンパク質またはコンジュゲートを免疫原性組成物またはワクチンとして製剤化するステップを含んでもよい。本発明のさらなる態様は本発明のコンジュゲートまたは本発明のPcrVタンパク質および薬学的に許容可能な賦形剤を含有する免疫原性組成物である。本発明の免疫原性組成物は場合によりさらに追加の抗原を含有する。そのような追加の抗原の例は、O抗原とキャリアタンパク質のコンジュゲート、細菌莢膜多糖とキャリアタンパク質のコンジュゲート、LOSとキャリアタンパク質のコンジュゲート、ならびにタンパク質である。好適には、コンジュゲートは緑膿菌O1、O2、O3、O4、O5、O6 O7、O8、O9、O10、O11、O12、O13、O14、O15、O16、O17、O18、O19またはO20のうち1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個を含有する。好適なタンパク質は、国際公開番号WO13/36574に記載されるものなどの緑膿菌エキソプロテインAもしくはそのバリエーション、緑膿菌OmpIもしくはOmpFもしくはPopB (YpoB、YopD、FlhC)、またはOprF-OmpIのハイブリッドタンパク質 (米国特許第5955090号または米国特許第6300102号を参照のこと) などのさらなる緑膿菌タンパク質を含む。

30

【0056】

本発明の免疫原性組成物およびワクチンは通常、それ自体では組成物が投与される個体に有害な抗体の産生を誘導しない任意の賦形剤を含む「薬学的に許容可能な賦形剤」を含有する。組成物はまた通常、水、生理食塩水、グリセロールなどの希釈剤をも含有する。加えて、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質、ポリオールなどの補助物質が存在してもよい。

40

【0057】

本明細書において記載されるコンジュゲートまたはPcrVタンパク質を含む組成物は、医薬投与において使用するのに適した任意のさらなる構成成分を含み得る。ある実施形態では、本明細書において記載される組成物は、一価製剤である。その他の実施形態では、本明細書において記載される組成物は、多価製剤、例えば二価、三価および四価製剤である。例えば、多価製剤は、2種以上の抗原、例えば2種以上のコンジュゲートを含む。

【0058】

ある実施形態では、本明細書において記載される組成物は、保存剤、例えば、水銀誘導体チメロサルをさらに含む。ある実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物

50

は、0.001%～0.01%のチメロサルを含む。他の実施形態では、本明細書において記載される医薬組成物は、保存剤を含まない。

【0059】

ある実施形態では、本明細書において記載される組成物(例えば、免疫原性組成物)は、アジュバントを含むか、またはそれと組み合わせて投与される。本明細書において記載される組成物と組み合わせて投与するためのアジュバントは、前記組成物の投与の前、それと同時にまたはその後に投与され得る。いくつかの実施形態では、用語「アジュバント」とは、本明細書において記載される組成物と併用して、またはその一部として投与される場合、バイオコンジュゲートに対する免疫応答を増大、増強および/またはブーストするが、化合物が単独で投与される場合には、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。いくつかの実施形態では、アジュバントは、コンジュゲートまたはPc rVタンパク質に対する免疫応答を生じ、アレルギーまたは他の有害反応をもたらさない。アジュバントは、例えば、リンパ球動員、Bおよび/またはT細胞の刺激ならびにマクロファージの刺激を含めたいくつかの機序によって免疫応答を増強し得る。

10

【0060】

アジュバントの具体例として、それだけに限らないが、アルミニウム塩(ミョウバン)(水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよび硫酸アルミニウムなど)、3デ-O-アシル化モノホスホリルリピドA(MPL)(英国特許GB2220211を参照のこと)、MF59(Novartis)、AS03(GlaxoSmithKline)、AS04(GlaxoSmithKline)、ポリソルベート80(Tween 80、ICL Americas、Inc.)、イミダゾピリジン化合物(国際公開番号WO2007/109812として公開された国際出願番号PCT/US2007/064857を参照のこと)、イミダゾキノキサリン化合物(国際公開番号WO2007/109813として公開された国際出願番号PCT/US2007/064858を参照のこと)およびQS21(Kensilら、in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach(Powell & Newman編、Plenum Press、NY、1995)、米国特許第5,057,540号を参照のこと)などのサポニンが挙げられる。いくつかの実施形態では、アジュバントは、フロイントのアジュバント(完全または不完全)である。その他のアジュバントとして、任意選択で、モノホスホリルリピドA(Stouteら、N. Engl. J. Med. 336、86～91頁(1997)参照のこと)などの免疫刺激剤と組み合わせた、水中油型エマルジョン(スクアレンまたはピーナッツオイルなど)がある。別のアジュバントとして、CpG(Bioworld Today、1998年11月15日)がある。

20

30

【0061】

ある実施形態では、本明細書において記載される組成物は、被験体への意図する投与経路に好適なように製剤化される。例えば、本明細書に記載の組成物は、皮下、非経口、経口、皮内、経皮、直腸内、腹腔内および直腸投与に適するように製剤化することができる。特定の実施形態において、医薬組成物は、静脈内、経口、腹腔内、鼻内、気管内、皮下、筋内、局所、皮内、経皮または肺内投与のために製剤化し得る。

【0062】

ある実施形態では、本明細書において記載される組成物は、1種以上のバッファー、例えばリン酸バッファーおよびスクロースリン酸グルタミン酸バッファーをさらに含む。他の実施形態において、本明細書に記載の組成物はバッファーを含まない。

40

【0063】

ある実施形態では、本明細書において記載される組成物は、1種以上の塩、例えば塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム、およびアルミニウム塩(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ミョウバン(硫酸カリウムアルミニウム)、またはこのようなアルミニウム塩の混合物)をさらに含む。他の実施形態において、本明細書に記載の組成物は塩を含まない。

【0064】

本明細書において記載される組成物は、投与のための説明書と共に、容器、パック又はディスプレイに含めることができる。

【0065】

50

本明細書において記載される組成物は、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 もしくは約-70 ）、冷蔵庫条件での保存（例えば約4 ）、または室温での保存をすることができる。

【0066】

ワクチンとして使用される免疫学的組成物は、本発明の免疫学的に有効な量のPcrVタンパク質またはコンジュゲート、ならびに任意の他の成分を含有する。「免疫学的に有効な量」とは、その量の個体への投与が、単一用量または一連のものの一部として治療または予防に有効であることを意味する。この量は、治療される個体の健康および身体の状態、年齢、望ましい保護の度合、ワクチンの製剤ならびに他の関連因子に依存して変化する。その量は日常的な試験を通じて決定され得る比較的幅広い範囲内にあると思われる。

10

【0067】

本発明のワクチンは好ましくはアジュバント化されている。好適なアジュバントとしては水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩が挙げられるが、カルシウム、マグネシウム、鉄または亜鉛の塩であってもよく、アシル化チロシンもしくはアシル化糖の不溶性懸濁液、カチオンもしくはアニオン誘導体化多糖、またはポリホスファゼンであってもよい。

【0068】

アジュバントはTH1またはTH2型のいずれかの応答の優先的誘導因子が選ばれることが好ましい。高レベルのTh1型サイトカインは所与の抗原に対する細胞性免疫応答を誘導しやすい傾向があるが、一方で高レベルのTh2型サイトカインは抗原に対する体液性免疫応答を誘導しやすい傾向がある。

20

【0069】

Th1およびTh2型免疫応答の区別は絶対的なものではないことを思い起こすことは重要である。実際には、個体はTh1優位またはTh2優位と記述される免疫応答を示す。しかし、サイトカインのファミリーを、Mosmann and Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173) によりマウスCD4 +ve T細胞クローンで説明されるものに関して考えることはしばしば便利である。従来から、Th1型応答はTリンパ球によるINF- およびIL-2サイトカインの産生に関連づけられている。IL-12などのように、Th1型免疫応答の誘導にしばしば直接的に関連づけられる他のサイトカインは、T細胞によって産生されない。対照的に、Th2型応答はIL-4、IL-5、IL-6、IL-10の分泌に関連している。Th1型優位応答を促進する好適なアジュバントシステムとしては、モノホスホリルリピドAまたはその誘導体、特に3デ-O-アシル化モノホスホリルリピドA（3D-MPL）（その調製は英国特許GB2220211Aを参照のこと）；ならびに、モノホスホリルリピドA、好ましくは3デ-O-アシル化モノホスホリルリピドAと、アルミニウム塩（例えばリン酸化アルミニウムもしくは水酸化アルミニウム）または水中油型エマルジョンのいずれかとの組み合わせが挙げられる。この組み合わせでは、抗原と3D-MPLは同じ粒子構造体中に含有され、抗原シグナルと免疫刺激シグナルのより効率的な送達を可能にする。研究は、3D-MPLがミョウバン吸着抗原の免疫原性をさらに増強できることを示している（Thoelen et al. Vaccine (1998) 16: 708-14；欧州特許EP689454-B1）。

30

40

【0070】

増強されたシステムは、モノホスホリルリピドAとサポニン誘導体の組み合わせ、特に国際公開番号WO94/00153に開示されるようなQS21と3D-MPLの組み合わせ、または国際公開番号96/33739に開示されるようなQS21がコレステロールでクエンチされている反応原性が低い組成物を含む。水中油型エマルジョンにおいてQS21、3D-MPLおよびトコフェロールを含有する特に強力なアジュバント製剤は国際出願番号WO95/17210に記載され、好ましい製剤である。好ましくは、ワクチンはサポニン、より好ましくはQS21を追加的に含む。製剤はまた、水中油型エマルジョンおよびトコフェロール（国際出願番号WO95/17210）を含有してもよい。本発明はまた、本発明のタンパク質を3D-MPLな

50

どの薬学的に許容可能な賦形剤とともに混合することを含むワクチン製剤を製造する方法を提供する。非メチル化CpGを含むオリゴヌクレオチド（国際出願番号WO96/02555）もまたTH1応答の優先的誘導因子であり、本発明における使用のために好適である。

【0071】

本発明の組成物は水中油型エマルジョンを含有してもよい。というのも、そのような組成物はアジュバント組成物として有用であることが示唆されているからである（欧州特許EP 399843；国際出願番号WO95/17210）。国際出願番号WO95/17210（2～10%スクアレン、2～10%アルファトコフェロールおよび0.3～3% tween80を含む水中油型エマルジョン、ならびに単独またはQS21および/もしくは3D-MPLと組み合わせたその使用を開示する）、国際出願番号WO99/12565（代謝可能な油、サポニン、およびステロールならびにMPLを含有する水中油型エマルジョン組成物を開示する）または国際出願番号WO99/11241に記載されるものなどの水中油型エマルジョンを使用してもよい。国際出願番号WO09/127676および国際出願番号WO09/127677に開示されるものなどのさらなる水中油型エマルジョンもまた好適である。

【0072】

本発明のワクチン調製物は、前記ワクチンを全身性経路または粘膜経路を介して投与することにより、感染しやすい哺乳動物を防御または治療するために使用され得る。これらの投与には、筋内、腹腔内、皮内もしくは皮下の経路を介するか；または経口/消化管、気道、尿生殖路への粘膜投与を介する注入が含まれてもよい。肺炎または中耳炎の治療のためのワクチンの鼻内投与は好ましい（肺炎球菌の鼻咽頭保菌がより効果的に防止されることで最も早い段階で感染を少なくすることができるため）。本発明のワクチンは単回投与で投与されてもよく、その成分は同時または別の時に一緒に共投与されてもよい（例えば肺炎球菌多糖は、免疫応答を互いに最適に調整するために、ワクチンの任意の細菌タンパク質成分の投与と同時にまたはその1～2週間後に、別々に投与されてもよい）。共投与のためには、任意選択のTh1アジュバントは異なる投与のいずれかまたはすべてに存在してもよいが、ワクチンの細菌タンパク質成分と組み合わせて存在する場合にはそれは好ましい。単一の投与経路に加えて、2つの異なる投与経路が使用されてもよい。例えば、多糖は筋内（IM）（または皮内（ID））で投与されてもよく、細菌タンパク質は鼻内（IN）（または皮内（ID））で投与されてもよい。さらに、本発明のワクチンは初回投与では筋内（IM）で、追加投与では鼻内（IN）で投与されてもよい。

【0073】

各ワクチン投与量におけるコンジュゲート抗原の量は、通常のワクチンにおいて顕著な有害副作用を引き起こさずに免疫防御反応を誘導する量として選択される。この量は、具体的にどの免疫原が用いられ、それがどのように提示されるかに依存して変わる。一般的には、各投与量は0.1～100 µgの多糖、多糖コンジュゲートであれば好ましくは0.1～50 µg、好ましくは0.1～10 µg、より好ましくは1～10 µg、さらに好ましい範囲としては1～5 µgの多糖を含有することが期待される。

【0074】

ワクチンにおけるタンパク質抗原の含有量は典型的には1～100 µgの範囲内、好ましくは5～50 µg、最も典型的には5～25 µgの範囲内である。初回ワクチン接種に続いて、被験体は適切に間を空けて1または数回の追加免疫を受けてもよい。

【0075】

ワクチンの調製は、Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (Powell & Newman編) (1995) Plenum Press New York)に一般的に記載される。リボソーム中へのカプセル封入はFullertonの米国特許第4,235,877号に記載されている。

【0076】

本発明のワクチンは溶液中または凍結乾燥下で保存されてもよい。好ましくは溶液はショ糖、トレハロースまたは乳糖などの糖の存在下で凍結乾燥される。それを凍結乾燥し即席で再構成することがその上さらに好ましい。

【0077】

10

20

30

40

50

一実施形態では、本発明のコンジュゲートまたはPcrVタンパク質は、感染症の治療、特に例えば治療が必要なヒト被験体等の緑膿菌感染の治療における使用のためのものである。

【0078】

本発明のさらなる態様は、本発明のPcrVタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。例えば、配列番号1～4のいずれか1つと少なくともとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する、PcrVタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。そのようなポリヌクレオチドを含むベクターが本発明のさらなる態様である。

【0079】

本発明のさらなる態様は、

- i) グリコシルトランスフェラーゼをコードする核酸；
 - ii) オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸；および
 - iii) 本発明の緑膿菌PcrVタンパク質をコードする核酸
- を含有する宿主細胞である。

【0080】

そのような改変型原核生物宿主細胞は、抗原、例えばPcrVタンパク質に結合した糖抗原を含むバイオコンジュゲートを生成することが可能な酵素をコードする核酸を含む。そのような宿主細胞は、糖抗原の産生に特異的な核酸を天然に発現することができるか、または宿主細胞がそのような核酸を発現するようにすることができ、すなわち、ある実施形態では、該核酸は、宿主細胞に対して異種である。ある実施形態では、糖抗原の産生に特異的な該核酸のうちの1種以上が宿主細胞に対して異種であり、かつ宿主細胞のゲノムに組み込まれている。ある実施形態では、本明細書中に提供される宿主細胞は、タンパク質のN-グリコシル化において活性を有する追加の酵素をコードする核酸を含み、例えば、本明細書中に提供される宿主細胞は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸および/または他のグリコシルトランスフェラーゼをコードする1種以上の核酸をさらに含む。ある実施形態では、本明細書中に提供される宿主細胞は、キャリアタンパク質、例えば、オリゴ糖および/または多糖が結合してバイオコンジュゲートを形成できるタンパク質をコードする核酸を含む。特定の実施形態では、宿主細胞は大腸菌である。

【0081】

本明細書中に記載される宿主細胞中に挿入され得るrfb遺伝子クラスターを含有する核酸配列は当技術分野において公知である。特定の実施形態では、本明細書中に記載される宿主細胞中に挿入されるrfb遺伝子クラスターは、大腸菌由来rfb遺伝子クラスター、例えば、当技術分野で公知の任意のO血清型/O抗原、例えば、O1、O2、O3、O4、O5、O6、O7、O8、O9、O10、O11、O12、O13、O14、O15、O16、O17、O18、O19、O20、O21、O22、O23、O24、O25、O26、O27、O28、O29、O30、O32、O33、O34、O35、O36、O37、O38、O39、O40、O41、O42、O43、O44、O45、O46、O48、O49、O50、O51、O52、O53、O54、O55、O56、O57、O58、O59、O60、O61、O62、O63、O64、O65、O66、O68、O69、O70、O71、O73、O74、O75、O76、O77、O78、O79、O80、O81、O82、O83、O84、O85、O86、O87、O88、O89、O90、O91、O92、O93、O95、O96、O97、O98、O99、O100、O101、O102、O103、O104、O105、O106、O107、O108、O109、O110、O111、O112、O113、O114、O115、O116、O117、O118、O119、O120、O121、O123、O124、O125、O126、O127、O128、O129、O130、O131、O132、O133、O134、O135、O136、O137、O138、O139、O140、O141、O142、O143、O144、O145、O146、O147、O148、O149、O150、O151、O152、O153、O154、O155、O156、O157、O158、O159、O160、O161、O162、O163、O164、O165、O166、O167、O168、O169、O170、O171、O172、O173、O174、O175、O176、O177、O178、O179、O180、O181、O182、O183、O184、O185、O186またはO187、およびそれらの亜血清型に由来する大腸菌rfbクラスターである。別の特定の実施形態では、本明細

10

20

30

40

50

書中に記載される宿主細胞中に挿入されるrfb遺伝子クラスターは、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 菌株 (例えば、緑膿菌株)、サルモネラ属 (*Salmonella*) 菌株 (例えば、サルモネラ・エンテリカ (*S. enterica*) 菌株)、エルシニア属 (*Yersinia*) 菌株、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 菌株、フランシセラ属 (*Francisella*) 菌株 (例えば、野兔病菌 (*F. tularensis*))、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) 菌株、バークホルデリア属 (*Burkholderia*) 菌株、またはシゲラ属 (*Shigella*) 菌株に由来するrfb遺伝子クラスターである。

【0082】

本明細書中に記載される宿主細胞中に挿入され得る莢膜多糖遺伝子クラスターを含有する核酸配列は当技術分野において公知である。特定の実施形態では、本明細書中に記載される宿主細胞中に挿入される莢膜多糖遺伝子クラスターは、大腸菌株、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 菌株 (例えば、肺炎レンサ球菌 (*S. pneumoniae*))、ストレプトコッカス・ピロゲネス (*S. pyrogenes*)、ストレプトコッカス・アガラクチア (*S. agalacticae*)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*) 菌株 (例えば、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*))、またはバークホルデリア属 (*Burkholderia*) 菌株 (例えば鼻疽菌 (*B. mallei*))、類鼻疽菌 (*B. pseudomallei*)、バークホルデリア・サイランデンシス (*B. thailandensis*)) に由来する莢膜多糖遺伝子クラスターである。コンジュゲートを生成することが可能なこうした宿主細胞の作製方法の開示は、国際出願番号WO06/119987、国際出願番号WO09/104074、国際出願番号WO11/62615、国際出願番号WO11/138361、国際出願番号WO14/57109、国際出願番号WO14/72405に見出される。

【0083】

特定の実施形態では、糖抗原を含むバイオコンジュゲートを生成することが可能な酵素をコードする核酸を含む改変型原核生物宿主細胞が本明細書中に提供され、該宿主細胞は、シュードモナス属由来のrfbクラスターまたはシュードモナス属由来のrfbクラスターに由来するグリコシルトランスフェラーゼを含む。特定の実施形態では、前記のシュードモナス属由来のrfbクラスターまたはシュードモナス属由来のrfbクラスターに由来するグリコシルトランスフェラーゼは、該宿主細胞のゲノムに組み込まれている。別の特定の実施形態では、前記のシュードモナス属由来のrfbクラスターまたはシュードモナス属由来のrfbクラスターに由来するグリコシルトランスフェラーゼは、緑膿菌由来のrfbクラスターである。別の特定の実施形態では、該宿主細胞は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (例えば、カンピロバクター・ジェジュニ由来のpglB) をコードする核酸を含む。別の特定の実施形態では、オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする該核酸 (例えば、カンピロバクター・ジェジュニ由来のpglB) は、宿主細胞のゲノムに組み込まれる。特定の実施形態では、該宿主細胞は、キャリアタンパク質をコードする核酸を含む。別の特定の実施形態では、宿主細胞は大腸菌である。

【0084】

別の特定の実施形態では、以下を含む改変型原核生物宿主細胞が、本明細書中に提供される：(i) 該宿主細胞のゲノムに組み込まれている、シュードモナス属由来のrfbクラスター；(ii) 該宿主細胞のゲノムに組み込まれている、オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸 (例えば、カンピロバクター・ジェジュニ由来のpglB)；および(iii) プラスミド担持であるかまたは宿主細胞のゲノムに組み込まれている、キャリアタンパク質。別の特定の実施形態では、シュードモナス属由来の該rfbクラスターは、緑膿菌由来のrfbクラスターである。別の特定の実施形態では、宿主細胞は大腸菌である。

【0085】

別の特定の実施形態では、以下を含む改変型原核生物宿主細胞が、本明細書中に提供される：(i) 該宿主細胞のゲノムに組み込まれている、シュードモナス属由来のrfbクラスターに由来するグリコシルトランスフェラーゼ；(ii) 該宿主細胞のゲノムに組み込まれている、オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸 (例えば、カンピロバクター・ジェジュニ由来のpglB)；および(iii) プラスミド担持であるかまたは宿主細胞のゲノムに組み込まれている、キャリアタンパク質。別の特定の実施形態では、シュードモナス属

由来のrfbクラスターに由来する該グリコシルトランスフェラーゼは、緑膿菌由来のrfbクラスターである。別の特定の実施形態では、宿主細胞は大腸菌である。

【0086】

特定の実施形態では、シュードモナス属由来のrfbクラスターまたはシュードモナス属由来のrfbクラスターに由来するグリコシルトランスフェラーゼは、緑膿菌由来のrfbクラスターまたはグリコシルトランスフェラーゼである。別の特定の実施形態では、シュードモナス属由来の該rfbクラスターまたはシュードモナス属由来のrfbクラスターに由来するグリコシルトランスフェラーゼは、緑膿菌血清型O1、O2、O3、O4、O5、O6、O7、O8、O9、O10、O11、O12、O13、O14、O15、O16、O17、O18、O19、またはO20由来のrfbクラスターまたはグリコシルトランスフェラーゼである。別の特定の実施形態では、緑膿菌由来の該rfbクラスターは、Knirel et al., 2006, Journal of Endotoxin Research 12(6):324-336 (その開示は全体が参照により本明細書中に組み入れられる)に記載される血清型のうちのいずれか1種由来のrfbクラスターである。特定の実施形態では、シュードモナス属由来の該rfbクラスターまたはシュードモナス属由来のrfbクラスターに由来するグリコシルトランスフェラーゼは、緑膿菌血清型O6 PAK株由来のrfbクラスターまたはグリコシルトランスフェラーゼである。特定の実施形態では、シュードモナス属由来の該rfbクラスターまたはシュードモナス属由来のrfbクラスターに由来するグリコシルトランスフェラーゼは、緑膿菌血清型O11、例えば、緑膿菌PA103株 (例えば、Genbankアクセッション番号KF364633.1を参照されたい) 由来のrfbクラスターまたはグリコシルトランスフェラーゼである。特定の実施形態では、機能的に拡張するために、緑膿菌血清型O6 PAK株由来の該rfbクラスターに加えて、ホルミルトランスフェラーゼ酵素 (GenBank: EOT23134.1; NCBI protein ID: PAK_01412; 配列番号2) およびwzyポリメラーゼ (GenBank: EOT19368.1; NCBI protein ID: PAK_01823; 配列番号3) をコードする遺伝子が導入される (例えば、プラスミドまたは組み入れを介して)。

【0087】

特定の実施形態では、本明細書中に提供される改変型原核生物宿主細胞は、ホルミルトランスフェラーゼをコードする核酸を含む。別の特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼは、配列番号65に示されるホルミルトランスフェラーゼ、またはそのホモログである。別の特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼは、シュードモナス属のrfbクラスターの一部分として該宿主細胞に組み込まれ (例えば、宿主細胞のゲノムまたは宿主細胞により発現されるプラスミドに挿入され)、このとき、該シュードモナス属のrfbクラスターは、ホルミルトランスフェラーゼを含むように改変されている。別の特定の実施形態では、該シュードモナス属のrfbクラスターは、緑膿菌血清型O6 rfbクラスターである。

【0088】

別の特定の実施形態では、本明細書中に提供される改変型原核生物宿主細胞は、wzyポリメラーゼをコードする核酸を含む。別の特定の実施形態では、該wzyポリメラーゼは、配列番号66に示されるwzyポリメラーゼ、またはそのホモログである。別の特定の実施形態では、該wzyポリメラーゼは、シュードモナス属のrfbクラスターの一部分として該宿主細胞に組み込まれ (例えば、宿主細胞のゲノムまたは宿主細胞により発現されるプラスミドに挿入され)、このとき、該シュードモナス属のrfbクラスターは、wzyポリメラーゼを含むように改変されている。別の特定の実施形態では、該シュードモナス属のrfbクラスターは、緑膿菌血清型O6 rfbクラスターである。

【0089】

別の特定の実施形態では、本明細書中に提供される改変型原核生物宿主細胞は、以下を含む: (i) ホルミルトランスフェラーゼをコードする核酸および(ii) wzyポリメラーゼをコードする核酸。特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼは、配列番号65に示されるホルミルトランスフェラーゼ、または配列番号65に対して少なくとも85%、90%または95%の同一性を有するそのホモログである。別の特定の実施形態では、該wzyポリメラーゼは、配列番号66に示されるwzyポリメラーゼ、または配列番号66に対して少なくと

も85%、90%または95%の同一性を有するそのホモログである。特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼおよび該wzyポリメラーゼは、シュードモナス属のrfbクラスターの一部として該宿主細胞に組み込まれ（例えば、宿主細胞のゲノムまたは宿主細胞により発現されるプラスミドに挿入され）、このとき、該シュードモナス属のrfbクラスターは、ホルミルトランスフェラーゼおよびwzyポリメラーゼを含むように改変されている。別の特定の実施形態では、該シュードモナス属のrfbクラスターは、緑膿菌血清型O6 rfbクラスターである。

【0090】

改変型シュードモナス属のrfbクラスター、例えば、改変型緑膿菌血清型O6 rfbクラスターを作製するために用いられるホルミルトランスフェラーゼをコードする核酸、およびwzyポリメラーゼをコードする核酸は、複数の位置および複数の方向でrfbクラスターへと挿入することができる。

10

【0091】

特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/または該wzyポリメラーゼをコードする遺伝子は、シュードモナス属のrfbクラスター、例えば、緑膿菌血清型O6 rfbクラスターの遺伝子の下流に挿入される。特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/または該wzyポリメラーゼをコードする遺伝子は、緑膿菌血清型O6 rfbクラスターのwbpM遺伝子の下流に挿入される。

【0092】

特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/または該wzyポリメラーゼをコードする遺伝子は、シュードモナス属のrfbクラスター、例えば、緑膿菌血清型O6 rfbクラスターの遺伝子の下流に挿入される。特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/または該wzyポリメラーゼをコードする遺伝子は、緑膿菌血清型O6 rfbクラスターのwzz遺伝子の下流に挿入される。

20

【0093】

特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/または該wzyポリメラーゼをコードする遺伝子は、シュードモナス属のrfbクラスター、例えば、緑膿菌血清型O6 rfbクラスターの遺伝子に対して時計回りの方向で挿入される。

【0094】

特定の実施形態では、該ホルミルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/または該wzyポリメラーゼをコードする遺伝子は、シュードモナス属のrfbクラスター、例えば、緑膿菌血清型O6 rfbクラスターの遺伝子に対して反時計回りの方向で挿入される。

30

【0095】

特定の実施形態では、シュードモナス属O6抗原を含むバイオコンジュゲートを生成することが可能な酵素をコードする核酸を含む改変型原核生物宿主細胞が、本明細書中に提供される。特定の実施形態では、該宿主細胞は、緑膿菌血清型O6 rfbクラスター、wzyポリメラーゼをコードする核酸、およびホルミルトランスフェラーゼを含む。特定の実施形態では、wzyポリメラーゼは、緑膿菌O6 wzyポリメラーゼ（配列番号66）、またはそのホモログ（例えば、緑膿菌のPAK株またはLESB58株由来のwzyポリメラーゼ）である。別の特定の実施形態では、ホルミルトランスフェラーゼは、緑膿菌O6ホルミルトランスフェラーゼ（配列番号65）、またはそのホモログ（例えば、緑膿菌のPAK株またはLESB58株由来のホルミルトランスフェラーゼ）である。ある実施形態では、rfbクラスター、wzyポリメラーゼ、および/またはホルミルトランスフェラーゼをコードする核酸のうちの1つ以上が、例えば、本明細書中に記載される方法を用いて、宿主細胞のゲノムに挿入される。特定の実施形態では、rfbクラスター、wzyポリメラーゼ、およびホルミルトランスフェラーゼをコードする核酸のそれぞれが、例えば、本明細書中に記載される方法を用いて、宿主細胞のゲノムに挿入される。ある実施形態では、宿主細胞は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸（例えば、カンピロバクター・ジェジュニ由来のpglB）であって、プラスミド担持であるかまたは宿主細胞のゲノムに組み込まれている、上記オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸；およびキャリアタンパク質をコードす

40

50

る核酸であって、プラスミド担持であるかまたは宿主細胞のゲノムに組み込まれている、上記キャリアタンパク質をコードする核酸をさらに含む。特定の実施形態では、該オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする該核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれている。

【0096】

遺伝的バックグラウンド

本明細書中に記載される改変型宿主細胞を作製するために用いることができる例示的な宿主細胞としては、限定するものではないが、エシェリキア属 (*Escherichia*) 種、シゲラ属 (*Shigella*) 種、クレブシエラ属 (*Klebsiella*) 種、キサントモナス属 (*Xanthomonas*) 種、サルモネラ属 (*Salmonella*) 種、エルシニア属 (*Yersinia*) 種、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*) 種、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) 種、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 種、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) 種、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*) 種、バチルス属 (*Bacillus*) 種、およびクロストリジウム属 (*Clostridium*) 種が挙げられる。特定の実施形態では、本明細書中で用いられる宿主細胞は大腸菌である。

【0097】

ある実施形態では、宿主細胞の遺伝的バックグラウンドは、例えば、1種以上の遺伝子の欠失により、改変される。宿主細胞で欠失（いくつかの場合には、その他の所望の核酸配列と置換）され得る例示的な遺伝子としては、*waaL*（例えば、Feldman et al., 2005, PNAS USA 102:3016-3021を参照されたい）、O抗原クラスター（*rfb*または*wb*）、腸内細菌共通抗原クラスター（*wec*）、リピドAコア生合成クラスター（*waa*）、および*gtrABS*クラスターなどのプロフェージO抗原修飾クラスターなどの、糖脂質生合成に關与する宿主細胞の遺伝子が挙げられる。特定の実施形態では、本明細書中に記載される宿主細胞は、例えば、O抗原シュードモナス属由来の、所望のO抗原以外のいずれのO抗原も産生しないように改変される。特定の実施形態では、*waaL*遺伝子、*gtrA*遺伝子、*gtrB*遺伝子、*gtrS*遺伝子、または*wec*クラスター由来の遺伝子（1種または複数）または*rfb*遺伝子クラスター由来の遺伝子（1種または複数）のうちの1種以上が、本明細書中に提供される原核生物宿主細胞のゲノムから欠失されるかまたは機能的に不活性化される。一実施形態では、本明細書中で用いられる宿主細胞は、*waaL*遺伝子、*gtrA*遺伝子、*gtrB*遺伝子、*gtrS*遺伝子が宿主細胞のゲノムから欠失されているかまたは機能的に不活性化されている、大腸菌である。別の実施形態では、本明細書中で用いられる宿主細胞は、*waaL*遺伝子および*gtrS*遺伝子が宿主細胞のゲノムから欠失されているかまたは機能的に不活性化されている、大腸菌である。別の実施形態では、本明細書中で用いられる宿主細胞は、*waaL*遺伝子および*wec*クラスター由来の遺伝子が宿主細胞のゲノムから欠失されているかまたは機能的に不活性化されている、大腸菌である。

【0098】

キャリアタンパク質

コンジュゲートワクチン（例えば、ワクチンとしての使用のためのバイオコンジュゲート）の製造における使用に好適ないずれかのキャリアタンパク質を本明細書中で用いることができ、例えば、キャリアタンパク質をコードする核酸を、シュードモナス属抗原と連結されたキャリアタンパク質を含むバイオコンジュゲートの生成のために本明細書中に提供される宿主へと導入することができる。例示的なキャリアタンパク質としては、限定するものではないが、緑膿菌の無毒化エキソトキシンA（EPA；例えば、Ihssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61を参照されたい）、CRM197、マルトース結合性タンパク質（MBP）、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）の無毒化溶血素A、クランピング因子A、クランピング因子B、大腸菌FimH、大腸菌FimHC、大腸菌易熱性エンテロトキシン、大腸菌易熱性エンテロトキシンの無毒化変異体、コレラトキシンBサブユニット（CTB）、コレラトキシン、コレラトキシンの無毒化変異体、大腸菌Satタンパク質、大腸菌Satタンパク質のパッセンジャードメイン、肺炎レン

サ球菌ニューモリシン (Pneumolysin) およびその無毒化変異体、C.ジェジュニ (C.jejuni) AcrA、シュードモナス属PcrVタンパク質、およびC.ジェジュニ天然糖タンパク質が挙げられる。PcrVタンパク質は本発明の多くの実施形態において使用される。

【0099】

特定の実施形態では、本明細書中に提供される改変型宿主細胞により発現されるキャリアタンパク質は、改変型宿主細胞のゲノムに組み込まれている核酸から発現される。つまり、キャリアタンパク質をコードする核酸は、宿主細胞ゲノムに組み込まれている。ある実施形態では、本明細書中に提供される改変型宿主細胞により発現されるキャリアタンパク質は、改変型宿主細胞に導入されているプラスミドから発現される。

【0100】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるバイオコンジュゲートの生成で用いられるキャリアタンパク質は改変され、例えば、該タンパク質の毒性が低く、かつ/またはグリコシル化をより受けやすくなるように改変される。特定の実施形態では、本明細書中に記載されるバイオコンジュゲートの生成で用いられるキャリアタンパク質が、そのバイオコンジュゲート形態での、例えば免疫原性組成物中の、投与対象のタンパク質の比較的低い濃度を可能にする様式で、キャリアタンパク質中のグリコシル化部位の数が最大化されるように、改変される。

【0101】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるキャリアタンパク質は、該キャリアタンパク質に通常伴うであろうよりも（例えば、その未改変/天然（例えば、「野生型」）状態でキャリアタンパク質に伴うグリコシル化部位の数と比較して）、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10箇所、またはそれ以上のグリコシル化部位を含むように改変されている。特定の実施形態では、グリコシル化部位の導入は、タンパク質の一次構造のどこかでの、グリコシル化コンセンサス配列（例えば、Asn-X-Ser(Thr)、ここで、XはPro以外の任意のアミノ酸であり得る；またはAsp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr)、ここで、XおよびZは独立して、Pro以外のいずれかの天然アミノ酸から選択される（国際公開第2006/119987号を参照されたい））の挿入により達成される。そのようなグリコシル化部位の導入は、例えば、タンパク質の一次構造へと新規アミノ酸を付加する（すなわち、完全にまたは部分的に、グリコシル化部位が追加される）ことにより、またはグリコシル化部位を作製するためにタンパク質中の既存のアミノ酸を突然変異させる（すなわち、アミノ酸はタンパク質に追加されないが、タンパク質の選択されたアミノ酸が突然変異されて、グリコシル化部位を形成する）ことにより、達成できる。当業者は、タンパク質のアミノ酸配列が、当技術分野で公知のアプローチ（例えば、タンパク質をコードする核酸配列の改変を含む組み換えアプローチ）を用いて容易に改変できることを認識するであろう。特定の実施形態では、グリコシル化コンセンサス配列は、キャリアタンパク質の特定の領域、例えば、タンパク質の表面構造中、タンパク質のNもしくはC末端で、および/またはタンパク質の底部でジスルフィド架橋によって安定化されているループ中に導入される。ある実施形態では、古典的な5アミノ酸のグリコシル化コンセンサス配列が、より効率的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もよく、したがって、挿入されるコンセンサス配列は、挿入されるべき、もしくはアクセプタータンパク質アミノ酸と置き換わる5、6または7個のアミノ酸をコードしてもよい。

【0102】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるバイオコンジュゲートの生成で用いられるキャリアタンパク質は、「タグ」、すなわち、キャリアタンパク質の単離および/または同定を可能にするアミノ酸の配列を含む。例えば、本明細書中に記載されるキャリアタンパク質へタグを付加することは、そのタンパク質の精製、ひいては、タグのついたキャリアタンパク質を含むコンジュゲートワクチンの精製にて有用であり得る。本明細書中で用いられ得る例示的タグとしては、限定するものではないが、ヒスチジン (HIS) タグ（例えば、ヘキサヒスチジntagまたは6×His-タグ）、FLAG-タグ、およびHAタグが挙げられる。ある実施形態では、本明細書中で用いられるタグは、除去可能であり、例えば、それらが

10

20

30

40

50

もはや必要でなくなれば、例えば、タンパク質が精製された後に、化学薬剤によるか、または酵素的手段による除去で除去可能である。

【0103】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるキャリアタンパク質は、キャリアタンパク質を発現する宿主細胞のペリプラズム腔へとキャリアタンパク質をターゲティングするシグナル配列を含む。特定の実施形態では、シグナル配列は、大腸菌DsbA、大腸菌外膜ポリンA (porin A ; OmpA)、大腸菌マルトース結合性タンパク質 (MalE)、エルウィニア・コロトボランス (*Erwinia carotovora*) ペクテートリアーゼ (pectate lyase) (PelB)、FlgI、NikA、またはバチルス属sp.エンドキシラナーゼ (XynA)、易熱性大腸菌エンテロトキシシンLTIIb、バチルス属エンドキシラナーゼXynA、または大腸菌フラゲリン (flagellin) (FlgI) 由来のものである。

10

【0104】

グリコシル化機構

オリゴサッカリル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は、脂質連結型オリゴ糖を、N-グリコシル化コンセンサスモチーフ、例えば、Asn-X-Ser(Thr) (ここで、XはPro以外の任意のアミノ酸であり得る) ; またはAsp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr) (ここで、XおよびZは独立に、Pro以外の任意の天然アミノ酸から選択される) (国際公開第2006/119987号を参照されたい) を含む新生ポリペプチド鎖のアスパラギン残基に転移させる。例えば、国際公開第2003/074687号および同第2006/119987号を参照されたい (これらの開示は、全体が参照により本明細書中に組み入れられる)。

20

【0105】

ある実施形態では、本明細書中に提供される宿主細胞は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸を含む。オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸は、宿主細胞に対して天然 (native) であり得るか、または上記の通りの遺伝学的アプローチを用いて宿主細胞に導入することができる。オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、当技術分野で公知のいずれかの供給源からのものであり得る。特定の実施形態では、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では、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・ジェジュニ由来のオリゴサッカリルトランスフェラーゼ (すなわち、pglB ; 例えば、Wacker et al., 2002, Science 298:1790-1793を参照されたい ; また、例えば、NCBI Gene ID: 3231775、UniProtアクセッション番号O86154も参照されたい) である。別の特定の実施形態では、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・ラリ (*Campylobacter lari*) 由来のオリゴサッカリルトランスフェラーゼ (例えば、NCBI Gene ID: 7410986を参照されたい) である。

30

【0106】

特定の実施形態では、本明細書中に提供される改変型宿主細胞は、宿主細胞のゲノムに組み込まれている、オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸配列を含む。

【0107】

補助的酵素 (accessory enzyme)

ある実施形態では、1種以上の補助的酵素をコードする核酸が、本明細書中に記載される改変型宿主細胞に導入される。1種以上の補助的酵素をコードするそのような核酸は、プラスミド担持であるか、または本明細書中に記載される宿主細胞のゲノムに組み込まれることができる。例示的な補助的酵素としては、限定するものではないが、エピメラーゼ、分岐酵素、修飾酵素、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。

40

【0108】

本明細書中に記載される宿主細胞に挿入できるエピメラーゼをコードする核酸配列は、当技術分野で公知である。ある実施形態では、本明細書中に記載される宿主細胞に挿入されるエピメラーゼは、国際公開第2011/062615号 (その開示は全体が参照により本明細書

50

中に組み入れられる)に記載されるエピメラーゼである。特定の実施形態では、エピメラーゼは、大腸菌O157株のZ3206遺伝子によりコードされるエピメラーゼである。例えば、国際公開第2011/062615号およびRush et al., 2009, The Journal of Biological Chemistry 285:1671-1680 (これらの開示は全体が参照により本明細書中に組み入れられる)を参照されたい。特定の実施形態では、本明細書中に提供される改変型宿主細胞は、宿主細胞のゲノムに組み込まれている、エピメラーゼをコードする核酸配列を含む。

【0109】

ある実施形態では、ホルミルトランスフェラーゼをコードする核酸配列が、本明細書中に記載される宿主細胞に挿入されるか、または該宿主細胞により発現される。ホルミルトランスフェラーゼは、アクセプター分子へのホルミル基の転移を触媒する酵素である。特定の実施形態では、緑膿菌O6ホルミルトランスフェラーゼfmtO6 (配列番号65)、またはそのホモログをコードする核酸配列が、本明細書中に記載される宿主細胞に挿入されるか、または該宿主細胞により発現される。別の特定の実施形態では、配列番号65に対して約または少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性または相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列が、本明細書中に記載される宿主細胞に挿入されるか、または該宿主細胞により発現される。

【0110】

多糖生合成に関与するある種のホルミルトランスフェラーゼが公知であり、かつ本明細書中に記載される宿主細胞に挿入されるか、または該宿主細胞により発現されることができる。例えば、vioFは、P.アルカリファシエンス (P. alcalifaciens) 血清型O30由来の酵素であり、これは、野兔病菌 (Francisella tularensis) 由来のホルミルトランスフェラーゼに対して48%同一である (Nagaraja et al. 2005)。これは、dTDP-D-Qui4NをdTDP-D-Qui4NFoへと変換し、かつO抗原生合成に関与する (Liu et al. 2012, Glycobiology 22(9):1236-1244)。多糖生合成に関与する別のホルミルトランスフェラーゼはarnA (例えば、大腸菌由来)であり、これは、二重機能性酵素であり、N末端ドメインがUDP-Ara4NをUDP-AraNFoへと変換し、C末端ドメインがUDP-グルクロン酸の酸化脱カルボキシル化に関与する。両方の酵素的活性が、リピドAのL-Ara4N修飾およびポリミキシン (polymyxin) 耐性に必要である (Breazeale et al., 2005, The Journal of Biological Chemistry 280(14):14154-14167)。多糖生合成に関与する別のホルミルトランスフェラーゼはwekDであり、これは大腸菌血清型O119由来の酵素であり、TDP-DRhaNAc3NFoの生合成に関与する (Anderson et al., 1992, Carbohydr Res. 237:249-62)。

【0111】

さらに、ホルミルトランスフェラーゼ活性に関連するドメインが特徴付けられている。いわゆるFMT_コアドメインは、ホルミルトランスフェラーゼのうちの大部分に存在する。例としては、メチオニル-tRNA-ホルミルトランスフェラーゼ、ホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ1、UDP-グルクロン酸デカルボキシラーゼ/UDP-4-アミノ-4-デオキシ-L-アラビノースホルミルトランスフェラーゼ、プロビデンシア・アルカリファシエンス (Providencia alcalifaciens) O30由来のvioF、および大腸菌由来のarnAが挙げられる。上述のホルミルトランスフェラーゼは、ホルミル供与体としてFTHF (N-10-ホルミルテトラヒドロフォレート)を用いる。基質としてFTHF (10-ホルミルテトラヒドロフォレート)を用いてホルメートを生成する酵素もまた、このドメインを含む。また、AICARFTが、ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキサミドホルミルトランスフェラーゼ/IMPシクロヒドロラーゼ (phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase) に存在し、FDH_GDHはホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ2 (phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2) に存在する。

【0112】

ある実施形態では、O抗原ポリメラーゼ (wzy遺伝子) をコードする核酸配列が、本明細書中に記載される宿主細胞に挿入されるか、または該宿主細胞により発現される。O抗原

10

20

30

40

50

ポリメラーゼは、複数回膜貫通型タンパク質である。それらは、ウンデカプレニルピロリン酸結合型O抗原反復単位を基質として用いて、該反復単位からなる直鎖状ポリマーを生成する。O抗原ポリメラーゼ(wzy)は、wzy依存的機構を介してO抗原ポリマーを合成するグラム陰性細菌に存在する。

【0113】

特定の実施形態では、緑膿菌wzyポリメラーゼ(配列番号66)、またはそのホモログ(例えば、緑膿菌のPAK株またはLESB58株由来のwzyポリメラーゼ)をコードする核酸配列が、本明細書中に記載される宿主細胞に挿入されるか、または該宿主細胞により発現される。wzyポリメラーゼを含むことが公知である細菌の例としては、大腸菌、緑膿菌、シゲラ・フレックスネリ(*Shigella flexneri*)およびネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)が挙げられる。別の特定の実施形態では、配列番号66に対して約または少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性または相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列が、本明細書中に記載される宿主細胞に挿入されるか、または該宿主細胞により発現される。

【0114】

遺伝子コピー数

ある実施形態では、本明細書中に提供される改変型宿主細胞に組み込まれる遺伝子のコピー数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。特定の実施形態では、本明細書中に提供される改変型宿主細胞に組み込まれる遺伝子のコピー数は、1または2である。

【0115】

利点

本明細書中に記載される改変型宿主細胞は、染色体に挿入されたDNAの安定性の増大、ひいては、発酵中での目的のDNAの発現のために、より少ないリスクで、治療剤として(例えば、免疫原性組成物中、ワクチン中で)使用できる糖、例えばシュードモナス属抗原を含むバイオコンジュゲートの大規模発酵を可能にするので、特に商業上重要であり、関連がある。本明細書中に記載される改変型宿主細胞は、とりわけ、ひとたび異種DNAが宿主細胞ゲノム中に挿入されると、発酵の間の抗生物質選択は必要ではないので、本明細書中に記載されるバイオコンジュゲートの生成に必要とされる核酸のプラスミド担持性の発現に頼る宿主細胞を上回って有利である。すなわち、挿入DNAが染色体中に挿入される場合には、宿主ゲノムの複製と共に増殖するので、選択される必要がない。さらに、世代(すなわち、宿主細胞複製のサイクル)毎に、プラスミドを失うリスクが増大することが、プラスミド担持の系における公知の不利点である。このプラスミドの喪失は、細胞分裂の際の細胞分離の段階での娘細胞へのプラスミドの不適當な分布によることもある。大きな規模では、細菌細胞培養物は、より小さい発酵規模におけるよりも多く複製して、高細胞密度に達する。したがって、より高い細胞安定性および挿入DNA発現が、より高い生産収率につながり、明白な利点を提供する。細胞安定性は、さらに、規制当局による承認のためのプロセス合否基準であり、また、抗生物質選択は、一般に、種々の理由のために、例えば、抗生物質が、最終医薬品中に不純物として存在し、アレルギー反応を引き起こすリスクを有し、かつ、抗生物質は、抗生物質耐性を促進し得る(例えば、遺伝子導入または耐性病原体の選択によって)ために、発酵の間は望ましくない。

【0116】

本出願は、治療剤として(例えば、免疫原性組成物中、ワクチン中で)使用できる糖抗原を含むバイオコンジュゲートの製造での使用のための改変型宿主細胞を提供し、このとき、バイオコンジュゲートの生成を行なわせるために必要とされるある種の遺伝的エレメントが、宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれている。結果として、宿主細胞は、少ない数のプラスミドを含むか、ただ1つのプラスミドを含むか、またはプラスミドを全く含まないことができる。一部の実施形態では、単一のプラスミドの存在は、産生株の柔軟性の増大、および産生株の柔軟性の増大に容易につながるコンジュゲート化の性質を変化させる(その糖またはキャリアタンパク質含有量に関して)能力をもたらし得る。

【0117】

一般的に、プラスミドの使用の低減は、医薬品の製造での使用のためにより適した産生株をもたらす。プラスミド上に存在する必須の遺伝材料の欠点は、宿主細胞中のエピソーム要素を維持するための選択圧に対する要求性である。選択圧は抗生物質の使用を必要とし、抗生物質の使用は、例えば、抗生物質に対するアレルギー反応の危険性および追加の製造コストのために、医薬品の製造に対して望ましくない。さらに、選択圧は多くの場合に完全ではなく、一部のクローンがプラスミドを失い、つまりバイオコンジュゲートを産生していない、不均一な細菌培養物を生じさせる。したがって、本明細書中に記載される宿主細胞は、高収率で取得できる、より安全な製品を製造することができる。

【0118】

バイオコンジュゲート

本明細書に記載の改変型宿主細胞を使用して、糖抗原、例えばキャリアタンパク質に連結された糖抗原を含む、バイオコンジュゲートを生産することができる。宿主細胞を使用したバイオコンジュゲートの製造方法は当技術分野で公知である。例えば、国際出願番号WO2003/074687および国際出願番号WO2006/119987を参照のこと。本明細書に記載されるようなバイオコンジュゲートは、抗原 - キャリアタンパク質の化学コンジュゲートと比べて有利な特性を有し、それは製造において必要な化学物質がより少ないこと、生成される最終生成物の点でより一貫性があることである。

【0119】

ある実施形態において、シュードモナス属抗原に連結されたキャリアタンパク質を含むバイオコンジュゲートを本明細書において提供する。ある実施形態において、シュードモナス属抗原は緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のO抗原である。ある実施形態において、緑膿菌O抗原とキャリアタンパク質を含むバイオコンジュゲートを本明細書において提供し、ここで該キャリアタンパク質は、EPA、PcrV (LcrV、EspA、SseBとしても知られる)、PopB (YopB、YopD、FliC)、またはOprF、OprIである。実施例の実施形態ではキャリアタンパク質としてEPAおよびPcrVを用いる。

【0120】

ある実施形態において、緑膿菌O抗原に連結されたキャリアタンパク質を含むバイオコンジュゲートを本明細書において提供し、ここで緑膿菌O抗原は、緑膿菌血清型O1、O2、O3、O4、O5、O6、O7、O8、O9、O10、O11、O12、O13、O14、O15、O16、O17、O18、O19またはO20由来のO抗原である。

【0121】

ある実施形態において、緑膿菌O抗原に連結されたキャリアタンパク質を含むバイオコンジュゲートを本明細書において提供し、ここで緑膿菌O抗原は、Knirel et al., 2006, Journal of Endotoxin Research 12(6):324-336 (この開示内容は、参照によりその全体を本明細書に組み入れる) に記載された血清型の1つである。

【0122】

ある実施形態において、緑膿菌O抗原に連結されたキャリアタンパク質を含むバイオコンジュゲートを本明細書において提供し、ここで緑膿菌O抗原は、緑膿菌血清型O6に由来するO抗原である。

【0123】

ある実施形態において、緑膿菌O抗原に連結されたキャリアタンパク質を含むバイオコンジュゲートを本明細書において提供し、ここで緑膿菌O抗原は、緑膿菌血清型O11に由来するO抗原である。ある実施形態において、緑膿菌血清型O11由来のO抗原は、緑膿菌PA103株 (例えばGenbankアクセッション番号KF364633.1参照) に由来するものである。

【0124】

本明細書に記載のバイオコンジュゲートは、タンパク質の精製のための当技術分野で公知の任意の方法により、例えばクロマトグラフィ (例として、イオン交換、アニオン交換、アフィニティおよびサイズカラムクロマトグラフィ)、遠心分離、溶解度の差、またはタンパク質の精製のための他の標準的技術のいずれかにより、精製することができる。例えばSaraswat et al., 2013, Biomed. Res. Int. ID#312709 (p. 1-18)を参照のこと。

10

20

30

40

50

また国際出願番号WO2009/104074に記載の方法も参照のこと。さらに、バイオコンジュゲートを、本明細書に記載のまたはそうでない場合には精製を容易にするために当技術分野で公知の異種ポリペプチドと融合してもよい。あるバイオコンジュゲートを精製するために使用する実際の条件は、部分的には、合成技法、ならびにバイオコンジュゲートの正味荷電、疎水性および/または親水性などの因子に応じて決まり、これは当業者には明らかであろう。

【0125】

分析方法

本明細書に記載のバイオコンジュゲートの構造組成および糖鎖の長さを分析するために、種々の方法を使用することができる。

【0126】

一実施形態では、グリカン进行分析のためにヒドラジン分解が使用され得る。最初に、製造業者の説明書(Ludger Liberateヒドラジン分解グリカン放出キット、Oxfordshire、UK)に従ってヒドラジンとともにインキュベートすることによって、そのタンパク質キャリアから多糖が放出される。求核試薬ヒドラジンは、多糖とキャリアタンパク質間のグリコシド結合を攻撃し、結合しているグリカンの放出を可能にする。この処理の間にN-アセチル基は失われ、再N-アセチル化によって再構成されなくてはならない。遊離グリカンは、炭素カラムで精製され、その後、フルオロフォア(fluorophor)2-アミノベンズアミドを用いて還元末端で標識される。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, 230(2):229-238を参照のこと。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)で分離される。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, 304(1):70-90を参照のこと。得られる蛍光クロマトグラムは、多糖の長さおよび反復単位の数を示す。構造情報は、個々のピークを集めること、続いて、MS/MS分析を実施することによって収集され得る。それによって、単糖組成および反復単位の配列を確認でき、さらに、多糖組成の均一性を同定できる。

【0127】

別の実施形態では、グリカンおよびバイオコンジュゲートを評価するためにSDS-PAGEまたはキャピラリーゲル電気泳動が使用され得る。O抗原グリカンのポリマーの長さは、直鎖状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、通常のラダー様パターンは、グリカンを構成する異なる反復単位の数々の結果であるということを意味する。したがって、SDS PAGEまたはサイズによって分離するその他の技術において互いに隣接する2つのバンドは、単一の反復単位のみで異なる。これらの離散的な差異は、グリカンの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。非グリコシル化キャリアタンパク質および異なるポリマー鎖長を有するバイオコンジュゲートは、その電気泳動移動度に従って分離する。バイオコンジュゲートに存在する第1の検出可能な反復単位の数(n_1)および平均反復単位の数($n_{average}$)が測定される。これらのパラメータは、バッチ間一貫性または多糖安定性を実証するために使用され得る。

【0128】

別の実施形態では、完全バイオコンジュゲートのサイズを測定するために、高質量MSおよびサイズ排除HPLCが適用され得る。

【0129】

別の実施形態では、多糖収量を測定するためにアンスロン-硫酸アッセイを使用することができる。Leyva A, Quintana A, Sanchez M, Rodriguez EN, Cremata J, Sanchez JC: Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: method development and v

10

20

30

40

50

validation. Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization 2008, 36(2):134-141を参照のこと。別の実施形態では、多糖収量を測定するためにメチルペントースアッセイを使用することができる。例えば、Dische et al., J Biol Chem. 1948 Sep;175(2):595-603を参照のこと。

【 0 1 3 0 】

グリコシル化部位利用の変化

挿入される系とは対照的に、多プラスミド系において、特定のタンパク質中の部位利用が変更されることを示すために、グリコシル化部位利用を定量する必要がある。そうする方法を以下に列挙する。

【 0 1 3 1 】

グリコペプチドLC-MS/MS: バイオコンジュゲートをプロテアーゼを用いて消化し、ペプチドを、適したクロマトグラフィー法(C18、親水性相互作用HPLC HILIC、GlycoSepNカラム、SE HPLC、AE HPLC)によって分離し、MS/MSを使用して種々のペプチドを同定する。この方法は、化学(スミス分解)もしくは酵素的方法によるこれまでの糖鎖短縮とともに、またはそれを伴わずに使用され得る。215 ~ 280nmでのUV検出を使用するグリコペプチドピークの定量化によって、グリコシル化部位利用の相対的測定が可能となる。

【 0 1 3 2 】

サイズ排除HPLC: より高いグリコシル化部位利用は、SE HPLCカラムからの早い溶出時間によって反映される。

【 0 1 3 3 】

均一性

バイオコンジュゲート均一性(すなわち、結合している糖残基の均一性)は、グリカンの長さおよび流体力学半径を測定する方法を使用して評価され得る。

【 0 1 3 4 】

その他の可能性ある臨床/実際の適用

【 0 1 3 5 】

組み込まれた株は、3プラスミド系と比較して低減された抗生物質選択負荷によって、より高い収量のバイオコンジュゲートを作製し得る。さらに、細胞に対する低減された代謝負荷のために、より少ないタンパク質分解が起こる。

【 0 1 3 6 】

組み込まれた株は、より短い、あまり広がっていない多糖の長さの分布を有するバイオコンジュゲートを作製する。したがって、バイオコンジュゲートは、特性決定しやすく、良好に定義される。さらに、挿入は、細胞に対するペリプラズムストレスの程度を低減し得るが、これは、3プラスミド系と比較して、低減された抗生物質選択負荷による、発酵プロセスの間の産物の少ないタンパク質分解につながり得る。

【 0 1 3 7 】

タンパク質グリコシル化系は、産生宿主中に3つの組換えエレメント、すなわちキャリアタンパク質発現DNA、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ発現DNAおよび多糖発現DNAを必要とする。先行技術の細菌産生系は、これら3種のエレメントをプラスミド上に含有する。したがって、特に、プラスミドの維持のために使用される抗生物質は、GMP材料の発酵の間に存在してはならないので、プラスミド喪失による製造の間の不安定性に対するリスクがある。挿入された株は1プラスミド少なく含有するので、多くの世代にわたってより安定である。これは、より大規模の発酵およびより長いインキュベーション時間(より多い世代数)が、より実現可能であることを意味する。さらに、選択のための抗生物質がないことは、感受性の被験体においてアレルギー反応を引き起こし得る微量の抗生物質がないために、より安全な産物を作製する。COMMITTEE WE, BIOLOGICAL O, STANDAR DIZATION: WHO Technical Report Series 941. In: Fifty-sixth Report. Edited by Organization WH. Geneva: World Health Organization; 2007を参照のこと。

【 0 1 3 8 】

挿入された株は、固定された染色体挿入のために、より遺伝的に安定であり、したがって

、産生プロセスの間、例えば、挿入された異種DNAを含む宿主細胞の培養の間の、所望のタンパク質産物のより高い再現性につながる。

【0139】

利益を調べるための分析方法

収量。収量は、制御され、最適化された条件下、バイオリアクター中で増殖された1リットルの細菌産生培養物に由来する炭水化物量として測定される。バイオコンジュゲートを精製した後、炭水化物収量は、アンスロンアッセイまたは炭水化物特異的抗血清を使用するELISAのいずれかによって直接的に測定され得る。間接的測定は、タンパク質量(周知のBCA、ローリーまたはブラッドフォード(bardford)アッセイによって測定された)ならびにグリカンの長さおよび構造を使用してタンパク質1グラム当たりの理論上の炭水化物量を算出することによって可能である。さらに、収量はまた、揮発性バッファーから糖タンパク質調製物を乾燥させることおよび重量を測定するために天秤を使用することによって測定され得る。

10

【0140】

均一性。均一性とは、グリカンの長さ、およびおそらくは、グリコシル化部位の数の可変性を意味する。上記で列挙された方法は、この目的のために使用され得る。SE-HPLCは、流体力学半径の測定を可能にする。キャリア中のより多い数のグリコシル化部位が、より少ないグリコシル化部位を有するキャリアと比較して、流体力学半径のより多い変動につながる。しかし、単一グリカン鎖が分析される場合には、それらは、より制御された長さのために、より均質であり得る。グリカンの長さは、ヒドラジン分解、SDS PAGEおよびCGEによって測定される。さらに、均一性はまた、特定のグリコシル化部位利用パターンが、より広い/より狭い範囲に変化することを意味し得る。これらの因子は、グリコペプチドLC-MS/MSによって測定され得る。

20

【0141】

株安定性および再現性。選択圧の不在下での細菌発酵の間の株安定性は、産生培養細胞における組換えDNAの存在または不在を確認する直接および間接法によって測定される。培養容量の影響は、世代時間の増大を意味する培養時間の延長によってシミュレートされ得る。発酵において世代がより多いほど、組換えエレメントが失われる可能性がより高い。組換えエレメントの喪失は、不安定性と考えられる。間接法は、組換えDNAとの選択カセットの関連、例えば、プラスミド中の抗生物質耐性カセットを利用する。産生培養細胞を、選択培地、例えば、抗生物質または選択系と関連しているその他の化学物質を補充したLBプレート上にプレーティングし、耐性コロニーは、それぞれの選択化学物質と関連している組換えDNAについて陽性と考えられる。多プラスミド系の場合には、複数の抗生物質に対する耐性コロニーがカウントされ、3種すべての耐性を含有する細胞の割合が安定集団と考えられる。あるいは、選択の存在、不在下で、発酵の種々の時点での3種の組換えエレメントの組換えDNAの量を測定するために、定量的PCRが使用され得る。したがって、組換えDNAの相対量および絶対量が測定および比較される。産生プロセスの再現性は、本出願において記載された方法による一貫性パッチの完全分析によって測定される。

30

【0142】

一実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼをコードする核酸がシュドモナス属のrfbクラスターに由来する宿主細胞が提供され、ここで前記の核酸は場合により宿主細胞のゲノム中に安定的に挿入されている。rfbクラスターは場合により緑膿菌に由来し、場合により血清型O6またはO11に由来する。

40

【0143】

一実施形態では、宿主細胞はカンピロバクター属(Campylobacter)に由来するオリゴサッカリルトランスフェラーゼを含み、例えば、ここでオリゴサッカリルトランスフェラーゼはC.ジェジュニのPglBである。

【0144】

一実施形態では、宿主細胞は、宿主細胞中のプラスミド中に緑膿菌PcrVタンパク質をコードする核酸を含有する。

50

【0145】

一実施形態では、宿主細胞はさらにホルミルトランスフェラーゼ酵素を含有し、ここで該核酸は配列番号65に対して約もしくは少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性もしくは相同性を有するタンパク質をコードするか、または該核酸は配列番号65をコードする。

【0146】

一実施形態では、本発明の宿主細胞は、wzyポリメラーゼをコードする核酸をさらに含有し、ここで該核酸は配列番号66に対して約もしくは少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性もしくは相同性を有するタンパク質をコードするか、または該核酸は配列番号66をコードする。

10

【0147】

一実施形態では、宿主細胞は、宿主細胞のゲノム中に安定的に挿入されたホルミルトランスフェラーゼ酵素をコードする核酸および/またはwzyポリメラーゼをコードする核酸を含有する。場合により、ホルミルトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子および/またはwzyポリメラーゼをコードする遺伝子は宿主細胞中のプラスミド上に存在する。

【0148】

一実施形態では、宿主細胞は大腸菌である。

【0149】

本発明のさらなる態様は、糖に連結された緑膿菌PcrVタンパク質を含有するバイオコンジュゲートを生産する方法であり、該方法はタンパク質の産生に好適な条件下で本発明の宿主細胞を培養することを含む。

20

【0150】

本発明のさらなる態様は本発明の過程により生産されたバイオコンジュゲートであり、ここで該バイオコンジュゲートは緑膿菌PcrVタンパク質に連結された糖を含有する。

【0151】

本明細書における「含む（含有する）（comprising / comprise / comprises）」という用語は、すべての例において、それぞれ、「からなる（consisting of / consist of / consists of）」という用語と場合により置換可能であることが発明者により意図される。

【0152】

「ここで前記（該）アスパラギン残基は配列番号...のアミノ酸...内に相当する位置にある」とは、参照配列および変異配列をその2つの配列間の配列同一性が最大になるように整列させた場合に規定した位置に相当する位置でアミノ酸配列中に該アスパラギン残基が導入されていることと定義される。変異配列からのアミノ酸の付加または欠失は、変異配列中の該アスパラギン残基の実際のアミノ酸の位置に違いを生じ得るが、変異配列を参照配列と整列させることで、アスパラギンアミノ酸の挿入に適した位置を定めることができる。

30

【0153】

「D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドが、配列番号...のアミノ酸...内の位置にある」とは、参照配列および変異配列をその2つの配列間の配列同一性が最大になるように整列させた場合に規定した位置に相当する位置でアミノ酸配列中にそのコンセンサス配列が導入されていることと定義される。変異配列からのアミノ酸の付加または欠失は、変異配列中のコンセンサス配列の実際のアミノ酸の位置に違いを生じ得るが、変異配列を参照配列と整列させることで、コンセンサス配列の挿入に適した位置を定めることができる。

40

【0154】

緑膿菌のO抗原（O-1～O20）は、IATS命名法に従う血清型の分類による。

【0155】

本特許明細書において引用されるすべての引用例または特許出願は本明細書中に参照により組み込まれる。

【0156】

本発明がよりよく理解されるように、以下の実施例が述べられる。これらの実施例は例示

50

する目的だけのためのものであり、いかなる様式でも本発明の範囲を制限するものとして理解されるべきではない。

【 0 1 5 7 】

タンパク質および核酸の配列

配列番号1 - PcrVタンパク質野生型配列

MEVRNLNAARELFLDELLAASAAPASAEQEELLALLRSEIRIVLAHAGQPLSEAQVLKALA
WLLAANPSAPPGQGLEVLREVLQARRQPGAQWDLREFLVSAIFYSLHGRLEDEDVIGVYKD
VLQTQDGKRKALLDELKALTAELKVYSVIQSQINAALSAKQGIRIDAGGIDLVDPTLYGYA
VGDPRWKDSPEYALLSNLDTFSGKLSIKDFLSGSPKQSGELKGLSDEYPFKDNPNVGNF
ATTVSDRSRPLNDKVNEKTTLLNDTSSRYNSAVEALNRFIQKYDSVLRDILSAI

10

【 0 1 5 8 】

配列番号2 - PcrV

AKDQNATKVRNLNAARELFKDQNATKDELLAASKDQNATKAPASAEQEELLALLRSEIRIV
LAHAGQPLSEAQVLKALAWLLAANPSAPPGQGLEVLREVLQARRQPGAQWDLREFLVSA
IFYSLHGRLEDEDVIGVYKDVLTQDGKRKALLDELKALTAELKVYSVIQSQINAALSAKQGI
RIDAGGIDLVDPTLYGYAVGDPRWKDSPEYALLSNLDTFSGKLSIKDFLSGSPKQSGELKG
LSDEYPFKDNPNVGNFATTVSDRSRPLNDKVNEKTTLLNDTSSRYNSAVEALNRFIQKY
DSVLRDILSAI

【 0 1 5 9 】

配列番号3

MSFKKIIKAFVIMAALVSVQAHAAEVRNLNAARELFLDELLAASAAPASAEQEELLALLRS
ERIVLAHAGQPLSEAQVLKALAWLLAANPSAPPGQGLEVLREVLQARRQPGAQWDLREF
LVSAIFYSLHGRLEDEDVIGVYKDVLTQDGKRKALLDELKALTAELKVYSVIQSQINAALSA
KQGIRIDAGGIDLVDPTLYGYAVGDPRWKDSPEYALLSNLDTFSGKLSIKDFLSGSPKQSG
ELKGLSDEYPFKDNPNVGNFATTVSDRSRPLNDKVNEKTTLLNDTSSRYNSAVEALNRFI
QKYDSVLRDILSAI

20

【 0 1 6 0 】

配列番号4 - 成熟

AEVRNLNAARELFLDELLAASAAPASAEQEELLALLRSEIRIVLAHAGQPLSEAQVLKALA
WLLAANPSAPPGQGLEVLREVLQARRQPGAQWDLREFLVSAIFYSLHGRLEDEDVIGVYKD
VLQTQDGKRKALLDELKALTAELKVYSVIQSQINAALSAKQGIRIDAGGIDLVDPTLYGYA
VGDPRWKDSPEYALLSNLDTFSGKLSIKDFLSGSPKQSGELKGLSDEYPFKDNPNVGNF
ATTVSDRSRPLNDKVNEKTTLLNDTSSRYNSAVEALNRFIQKYDSVLRDILSAI

30

【 0 1 6 1 】

配列番号5 - エピトープ配列

VYSVIQSQINAALSAKQGIRIDAGGIDLVDPTLYGYAVGDPRWKDSPEYALLSNLDTFSGK
LSIKDFLSGSPKQSGELKGLSDEYPFKDNPNVGNFATTVSDRSRPLNDKVNE

【 0 1 6 2 】

配列番号6

AKDQNATKVRNLNAARELF

40

【 0 1 6 3 】

配列番号7

VRNKDQNATKNAARELF

【 0 1 6 4 】

配列番号8

VRNLNAAKDQNATKELF

【 0 1 6 5 】

配列番号9

ELFKDQNATKDELLAAS

【 0 1 6 6 】

50

配列番号10	
DELKDQNATKAAS	
【 0 1 6 7 】	
配列番号11	
DELLAASKDQNATKAP	
【 0 1 6 8 】	
配列番号12	
APKDQNATKSAEQEEL	
【 0 1 6 9 】	
配列番号13	10
ALLRSEKDQNATKI	
【 0 1 7 0 】	
配列番号14	
ALLRSERIKDQNATKLAH	
【 0 1 7 1 】	
配列番号15	
LAHKDQNATKGQPL	
【 0 1 7 2 】	
配列番号16	20
GQPLKDQNATKEAQVLKA	
【 0 1 7 3 】	
配列番号17	
EAKDQNATKVLKALA	
【 0 1 7 4 】	
配列番号18	
VLKALAKDQNATKLLAA	
【 0 1 7 5 】	
配列番号19	30
VLKALAWKDQNATKLAA	
【 0 1 7 6 】	
配列番号20	
LAAKDQNATKPSA	
【 0 1 7 7 】	
配列番号21	
PSAKDQNATKPGQG	
【 0 1 7 8 】	
配列番号22	
PSAPPKDQNATKQG	
【 0 1 7 9 】	
配列番号23	40
QGKDQNATKEVLR	
【 0 1 8 0 】	
配列番号24	
QGLEKDQNATKLR	
【 0 1 8 1 】	
配列番号25	
LRKDQNATKVLQAR	
【 0 1 8 2 】	
配列番号26	50
VLGARKDQNATKQ	

【 0 1 8 3 】	
配列番号27	
VLGARRQKDQNATKGAQW	
【 0 1 8 4 】	
配列番号28	
VLQARRQPGKDQNATKQW	
【 0 1 8 5 】	
配列番号29	
QWKDQNATKLREFLVSAFY	
【 0 1 8 6 】	10
配列番号30	
LREFLVSAFYSLKDQNATKG	
【 0 1 8 7 】	
配列番号31	
GKDQNATKLDEDVIGVYKD	
【 0 1 8 8 】	
配列番号32	
KDVLQTKDQNATKDGRKAL	
【 0 1 8 9 】	
配列番号33	20
KYDSVLRDILSAKDQNATK	
【 0 1 9 0 】	
配列番号34	
MSFKKIIKAFVIMAALVSVQAHA	
【 0 1 9 1 】	
配列番号35	
AXD/EXNXS/TXVRNLNAARELF	
【 0 1 9 2 】	
配列番号36	
VRNXD/EXNXS/TXNAARELF	30
【 0 1 9 3 】	
配列番号37	
VRNLNAAXD/EXNXS/TXELF	
【 0 1 9 4 】	
配列番号38	
ELFXD/EXNXS/TXDELLAAS	
【 0 1 9 5 】	
配列番号39	
DELXD/EXNXS/TXAAS	
【 0 1 9 6 】	40
配列番号40	
DELLAASXD/EXNXS/TXAP	
【 0 1 9 7 】	
配列番号41	
APXD/EXNXS/TXSAEQEEL	
【 0 1 9 8 】	
配列番号42	
ALLRSEX/EXNXS/TXI	
【 0 1 9 9 】	
配列番号43	50

【 0 2 0 0 】	
ALLRSERIXD/EXNXS/TXLAH	
【 0 2 0 1 】	
配列番号44	
LAHXD/EXNXS/TXGQPL	
【 0 2 0 2 】	
配列番号45	
GQPLXD/EXNXS/TXEAQVLKA	
【 0 2 0 3 】	
配列番号46	10
EAXD/EXNXS/TXVLKALA	
【 0 2 0 4 】	
配列番号47	
VLKALAXD/EXNXS/TXLLAA	
【 0 2 0 5 】	
配列番号48	
VLKALAWXD/EXNXS/TXLAA	
【 0 2 0 6 】	
配列番号49	
LAAXD/EXNXS/TXPSA	20
【 0 2 0 7 】	
配列番号50	
PSAXD/EXNXS/TXPGQG	
【 0 2 0 8 】	
配列番号51	
PSAPPXD/EXNXS/TXQG	
【 0 2 0 9 】	
配列番号52	
QGXD/EXNXS/TXEVLRL	
【 0 2 1 0 】	30
配列番号53	
QGLEXD/EXNXS/TXLR	
【 0 2 1 1 】	
配列番号54	
LRXD/EXNXS/TXVLQAR	
【 0 2 1 2 】	
配列番号55	
VLGARXD/EXNXS/TXQ	
【 0 2 1 3 】	
配列番号56	40
VLGARRQXD/EXNXS/TXGAQW	
【 0 2 1 4 】	
配列番号57	
VLQARRQPGXD/EXNXS/TXQW	
【 0 2 1 5 】	
配列番号58	
QWXD/EXNXS/TXLREFLV SAYF	
【 0 2 1 6 】	
配列番号59	
LREFLV SAYFSLXD/EXNXS/TXG	50

【 0 2 1 7 】

配列番号60

GXD/EXNXS/TXLDEDVIGVYKD

【 0 2 1 8 】

配列番号61

KDVLQTXD/EXNXS/TXDGKRKAL

【 0 2 1 9 】

配列番号62

KYDSVLRDILSAKDQNATK

【 0 2 2 0 】

配列番号63

MSFKKIIKAFVIMAALVSVQAHA

【 0 2 2 1 】

配列番号64

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

【 0 2 2 2 】

配列番号65 - ホルミルトランスフェラーゼ

10

20

30

40

50

Met Ser Trp Gln Leu Phe Ser Glu Lys Cys Arg Phe Leu Gly Ala Val
Glu Ile Ser Gln His Phe Trp Gly Phe Ile Val Leu Glu Ala Ser Phe
Gly Met Lys Ile Lys Ala Ala Leu Ile Val Asp Asp Leu Ser Leu Ser
Glu Trp Gln Lys Arg Ala Ile Glu Asp Ser Ser Glu Tyr Leu Asp Ile
Gln Leu Val Leu Ser Cys Arg Asn Ser Ala Thr Lys Lys Ser Val Ile
Lys His Cys Gly Tyr Tyr Phe Leu Asn Ile Leu Ser Leu Lys Asn Asp
Met Thr Arg Arg Val Gln Leu Asp Ser Arg Gly Ser Glu Val Ile His
Phe Asp Ser Asp Tyr Glu Gly Ala Trp Gln Arg Ile Pro Glu Asp Val
Cys Ala Arg Ile Leu Asp Lys Gly Ile Lys Leu Val Ile Lys Phe Gly
Met Ser Leu Leu Arg Ile Asp Gly Gly Leu Gln Arg Leu Asp Ile Leu
Ser Tyr His His Gly Asp Pro Glu Tyr Tyr Arg Gly Arg Pro Ala Gly
Phe Tyr Glu Ile Tyr Glu Asn Ala Asp Ser Val Gly Ile Ile Val Gln
Lys Leu Ser Asn Lys Leu Asp Ala Gly Glu Val Leu Val Arg Gly Tyr
Ser Lys Val His His His Ser Tyr Lys Lys Thr Ser Arg Asn Phe Tyr
Leu Asn Ser Val Val Leu Leu Arg Lys Ala Leu Val Asn Tyr Ser Arg
Gly Glu Gln Val Val Leu Glu Lys Leu Gly Lys Asn Tyr Arg Leu Pro
Ser Asn Phe Thr Val Phe Lys Phe Phe Cys Lys Thr Ile Phe Arg Gly
Leu Ala Arg Leu Ser Tyr Gly Ala Phe Phe Glu Lys Lys Trp Asn Val
Val Ala Leu Pro Tyr Asn Asp Ile Pro Ser Leu Gln Glu Leu Ser Val
Ser Ala Gly Lys Ile Pro Lys Val Glu Lys Gly Tyr Thr Phe Tyr Ala

10

20

30

40

50

Asp Pro Phe Phe Ser Ala Asp Gly Lys Leu Ile Arg Leu Glu Ala Leu
 Asn Ala Ser Asn Gly Leu Gly Glu Ile Ile Glu Leu Lys Ala Gln Ser
 Leu Asp Phe Ser Arg Val Ile Leu Lys Gly Asn His Phe Ser Tyr Pro
 Tyr Ser Phe Glu Ala Ser Gly Val Glu Tyr Leu Ile Pro Glu Val Ala
 Ser His Ser Ala Pro Cys Leu Leu Pro Pro Pro Phe Ala Leu Glu Ser
 Lys Lys Leu Phe Gln Gly Met Glu Gly Glu Arg Ile Leu Asp Gly Thr
 Leu Phe Glu His Gly Gly Arg Tyr Tyr Leu Phe Cys Gly Gln Ala Val

10

Ser Gly Ser Asp Asn Leu Tyr Leu Tyr Val Gly Glu Ser Leu Glu Gly
 Pro Tyr Thr Ser His Pro Cys Asn Pro Val Val Met Asn Pro Gly Ser
 Ala Arg Met Gly Gly Arg Ile Phe Lys Glu Gly Gly Lys Leu Tyr Arg
 Phe Gly Gln Asn Asn Ser Tyr Gly Tyr Gly Ser Ser Leu Ala Val Asn
 Glu Ile Glu Val Leu Asp Pro Glu His Tyr Ser Glu Lys Arg Val Ala
 Asn Leu Ala Phe Gln Asp Ala Arg Gly Pro His Thr Ile Asp Ile His
 Gly Gln Thr Met Ile Leu Asp Phe Tyr Gln Asp Arg Phe Ser Leu Leu
 Ala Gly Tyr Arg Arg Leu Val Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gly

20

【 0 2 2 3 】

配列番号66 wzyポリメラーゼ

30

Met Tyr Ala Met Leu Thr Gly Ala Thr Leu Leu Ile Phe Ala Val Ala
 Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ser Ala Ile His Pro Ser Val Ala Met Pro
 Ile Thr Trp Gly Leu Gly Leu Ile Gly Val Ser Leu Ala Ser Leu Ile
 Gly Phe Tyr Arg Val Glu Ser Asp Ala Leu Leu Ile Phe Leu Phe Gly
 Val Met Ser Phe Ser Leu Ser Ala Gly Cys Phe Ser Phe Leu Tyr Asn
 Gly Tyr Phe Arg Ala Pro Ser Ser Asn Phe Leu Phe Asp Ser Glu Leu
 Arg Thr Arg Ala Leu Val Ile Phe Phe Cys Leu Ala His Ile Val Phe
 Leu Thr Val Ile Tyr Arg Asp Leu Ser Ser Ile Ala Pro Thr Leu Arg
 Glu Ala Ala Tyr Met Ala Arg Ala Gln Ser Val Ser Gly Glu Pro Val
 Leu Ser Ser Leu Ser Met Asn Tyr Leu Gln Leu Gly Gln Thr Val Ile

40

50

Pro Leu Val Val Leu Leu Tyr Leu Arg Gly Lys Cys Gly Val Leu Gly
Phe Leu Ala Ile Ser Val Pro Trp Met Gly Val Ile Leu Leu Ala Ser
Gly Arg Ala Ser Leu Met Gln Met Leu Val Gly Leu Phe Phe Ile Tyr
Ile Leu Val Lys Gly Ser Pro Ser Leu Lys Ser Leu Leu Val Ile Gly
Leu Ala Met Phe Leu Val Ile Ala Val Gly Ala Val Ala Thr Ser Lys
Ile Gln Phe His Glu Gly Asp Gly Ile Ser Thr Leu Phe Ile Glu Leu
Tyr Arg His Val Ala Gly Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Val Leu Phe Asp
Arg Tyr Tyr Gln Gly Ser Ile His Leu Glu Pro Tyr Trp Ser Pro Leu
Asn Gly Phe Cys Ser Ile Leu Ala Thr Val Gly Leu Cys Gln Lys Pro
Pro Leu His Leu Asp Phe Tyr Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Leu Gly Asn
Val Tyr Ser Met Phe Phe Ser Met Tyr Pro His Tyr Gly Ala Leu Gly
Val Ile Gly Val Met Ala Leu Tyr Gly Met Leu Cys Ser Tyr Ala Tyr
Cys Lys Ala Lys Lys Gly Ser Leu Tyr Phe Thr Val Leu Ser Ser Tyr
Leu Phe Ser Ala Ile Val Phe Ser Leu Phe Ser Asp Gln Ile Ser Thr
Ser Trp Trp Phe Tyr Val Lys Met Thr Ile Ile Leu Gly Ile Leu Cys
Phe Val Phe Arg Arg Asp Arg Met Phe Val Ile Arg Leu Pro Gln Ala
Gly

10

20

30

【 0 2 2 4 】

配列番号67 - PcrVの核酸配列

ATGGAAGTCAGAAACCTTAATGCCGCTCGCGAGCTGTTCTGACGAGCTCCTGGCCGC
GTCGGCGGCGCCTGCCAGTGCCGAGCAGGAGGAAGTCTGGCCCTGTTGCGCAGCGAGC
GGATCGTGCTGGCCACGCCGGCCAGCCGCTGAGCGAGGCGCAAGTGCTCAAGGCGCTC
GCCTGGTTGCTCGCGGCCAATCCGTCCGCGCCTCCGGGGCAGGGCCTCGAGGTAATCCG
CGAAGTCCTGCAGGCACGTCGGCAGCCCGGTGCGCAGTGGGATCTGCGCGAGTTCCTGG
TGTCGGCCTATTTTACGCCTGCACGGGCGTCTCGACGAGGATGTCATCGGTGTCTACAAG
GATGTCCTGCAGACCCAGGACGGCAAGCGCAAGGCGCTGCTCGACGAGCTCAAGGCGCT
GACCGCGGAGTTGAAGGTCTACAGCGTGATCCAGTCGCAGATCAACGCCGCGCTGTCGG
CCAAGCAGGGCATCAGGATCGACGCTGGCGGTATCGATCTGGTGCACCCACGCTATAT
GGCTATGCCGTCCGGCAGTCCCAGGTGGAAGGACAGCCCCGAGTATGCGCTGCTGAGCAA
TCTGGATACCTTCAGCGGCAAGCTGTGATCAAGGATTTTCTCAGCGGCTCGCCGAAGC
AGAGCGGGGAAGTCAAGGGCCTCAGCGATGAGTACCCCTTCGAGAAGGACAACAACCCG
GTCGGCAATTTCCGCCACCACGGTGAGCGACCGCTCGCGTCCGCTGAACGACAAGGTCAA
CGAGAAGACCACCTGCTCAACGACACAGCTCCCGCTACAACCTCGGCGGTGAGGCGC
TCAACCGCTTCATTCAGAAATACGACAGCGTCCTGCGCGACATTCTCAGCGCGATCTAG

40

【 0 2 2 5 】

配列番号68

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

50

【実施例】

【0226】

実施例1：オリゴサッカリルトランスフェラーゼおよびrfbクラスターを挿入された細菌株は安定でありかつバイオコンジュゲートを産生する

本実施例は、(i) オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸および(ii) rfbクラスターをコードする核酸の挿入により遺伝的に改変された細菌宿主株により、バイオコンジュゲートが成功裏に産生され得ることを実証する。

【0227】

改変型大腸菌宿主細胞は、以下の核酸を宿主細胞ゲノムに直接的に挿入することにより作製した：(i) C.ジェジュニオリゴサッカリルトランスフェラーゼ (PglB) をコードする核酸および(ii) 緑膿菌PA103株由来のrfbクラスターをコードする核酸。このrfbクラスターは、緑膿菌血清群O11抗原のO抗原合成に必要な遺伝子をコードする。挿入は、PCT/EP2013/071328に記載される新規挿入法（上記の5.2節を参照されたい）またはpUT mini system (Biomedal Lifescience社) を用いて行なった。PCT/EP2013/071328に記載される挿入法は部位特異的であり、相同組み換えを利用するが、pUT mini systemは、無作為なトランスポゾン媒介アプローチであり、宿主細胞ゲノムにランダムに挿入された対象となる核酸配列を生じる。大腸菌宿主細胞を、宿主細胞への、キャリアタンパク質として無毒化シュードモナス属エキソトキシンA (EPA) を発現するプラスミドの導入によりさらに改変した。つまり、本実施例に記載される改変型大腸菌宿主細胞は、以下のもの：(i) 宿主細胞ゲノムへのオリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸の組み込みによって、C.ジェジュニオリゴサッカリルトランスフェラーゼ (PglB) ；(ii) 宿主細胞ゲノムへの緑膿菌PA103株由来rfbクラスターをコードする核酸の組み込みによって、O11抗原を生成する緑膿菌rfbクラスターの遺伝子；および(iii) キャリアタンパク質をコードする核酸を含むプラスミドを用いて宿主細胞を形質転換することによって、EPAキャリアタンパク質を発現する。

【0228】

二重組み込み（オリゴサッカリルトランスフェラーゼの組み込みおよびrfbクラスターの組み込み）を含む改変型宿主細胞がバイオコンジュゲート (EPA-O11) を産生する能力と、(i) オリゴサッカリルトランスフェラーゼまたはrfbクラスターの単独組み込みしかされず、残余の構成要素（キャリアタンパク質およびオリゴサッカリルトランスフェラーゼまたはrfbクラスター）が宿主細胞によりプラスミド発現されるか；または(ii) すべての構成要素（キャリアタンパク質およびオリゴサッカリルトランスフェラーゼおよびrfbクラスター）がプラスミド発現され、組み込まれた構成要素がない宿主細胞によるバイオコンジュゲート産生との比較を可能にするために、追加の改変型大腸菌宿主細胞が作製された。

【0229】

3種類の異なる大腸菌バックグラウンド株を、分析で用いた：(i) 「St4167」 (W3110 waaL, rfbO16::rfbP.a.O11)、大腸菌waaL遺伝子の欠失、大腸菌O16 rfbクラスターの欠失、および緑膿菌O11 rfbクラスターの挿入を含む (PCT/EP2013/071328) ；(ii) 「St1128」 (W3110 waaL)、大腸菌waaL遺伝子の欠失を含む；および(iii) 「St1935」 (W3110 waaL, wzzE-wecG, wbbIJK)、示された遺伝子の欠失を含む。St4167での緑膿菌O11 rfbクラスターの挿入のために、O11 rfbクラスターをpDOCプラスミドにクローニングし、PCT/EP2013/071328に従う方法を用いた。St4167株は、二重組み込み株を表わす。

【0230】

宿主細胞株へとEPAを導入するために用いられる具体的なプラスミドは、「p1077」および「p150」と記載される。後者はHssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61に記載され、プラスミドは、p1077ではp150のAmpカセットがKanカセットで置き換えられていること以外は同じである。

【0231】

以下のSt4167変異体が作製された：(i) 宿主細胞yahL遺伝子の代わりにpglBが挿入され

10

20

30

40

50

ており (PCT/EP2013/071328の方法により)、EPAがプラスミドp1077により発現されるSt4167; (ii) 宿主細胞ompT遺伝子の代わりにpglBが挿入されており (pUT mini systemにより)、EPAがプラスミドp150により発現されるSt4167; (iii) pglBがプラスミドp1769 (pDOC中のpglB) により発現され、EPAがプラスミドp1077により発現されるSt4167; (iv) pglBがプラスミドp939 (HAタグを有し、コドン最適化されたPglBのためのpEXT21ベースの発現プラスミド) により発現され、EPAがプラスミドp1077により発現されるSt4167; および(v) pglBがプラスミドp1762 (pDOC中のpglB) により発現され、EPAがプラスミドp1077により発現されるSt4167。

【0232】

以下のSt1128変異体が作製された: (i) pglBがプラスミドp939により発現され、緑膿菌O11 rfbクラスターがプラスミドp164 (遺伝子操作されたことにより、緑膿菌O11 rfbクラスターを含むpLAFRプラスミド) により発現され、EPAがプラスミドp1077により発現されるSt1128; および(ii) 宿主細胞yahL遺伝子の代わりにpglBが挿入されており (PCT/EP2013/071328の方法により)、緑膿菌O11 rfbクラスターがプラスミドp164により発現され、EPAがプラスミドp1077により発現されるSt1128。

【0233】

以下のSt1935変異体が作製された: (i) 宿主細胞ompT遺伝子の代わりにpglBが挿入されており (PCT/EP2013/071328の方法により)、緑膿菌O11 rfbクラスターがプラスミドp164により発現され、EPAがプラスミドp1077により発現されるSt1935; (ii) 宿主細胞yahL遺伝子の代わりにpglBが挿入されており (PCT/EP2013/071328の方法により)、緑膿菌O11 rfbクラスターがプラスミドp164により発現され、EPAがプラスミドp1077により発現されるSt1935; およびpglBがプラスミドp939により発現され、緑膿菌O11 rfbクラスターがプラスミドp164により発現され、EPAがプラスミドp1077により発現されるSt1935。

【0234】

図1に示される通り、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、キャリアタンパク質およびrfbクラスターを発現するすべての菌株が、バイオコンジュゲートを産生した。EPA-O11に対応する、100kDaマーカーと130kDaマーカーとの間に示されるプロットを参照されたい。重要なことに、この知見は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼおよびrfbクラスターの二重組み込みを含む菌株を含む。特に、St4167に対して示される結果を参照されたい。つまり、本実施例は、宿主細胞ゲノムへの遺伝子/遺伝子クラスターの二重挿入後に安定的宿主細胞が作製できることのみならず、遺伝子の機能が維持されることも実証する。具体的には、挿入されたオリゴサッカリルトランスフェラーゼおよび挿入されたrfbクラスターの機能は保存され、バイオコンジュゲートの産生をもたらした。

【0235】

実施例2: 天然緑膿菌O6 O抗原オリゴ糖/多糖の合成に寄与するホルミルトランスフェラーゼ遺伝子の特定

本実施例は、緑膿菌O6ホルミルトランスフェラーゼの特定を記載する。

【0236】

そのゲノムが公知である緑膿菌O6株「LESB58」からのプロテオームデータを、原型クエリドメインである「ホルミルトランスフェラーゼ」および「FMT C末端ドメイン様」ドメインに対する相同性を含むドメインに関して、www.supfam.org/SUPERFAMILY/で提供されるアルゴリズムを用いて検索した。検索は、考えられる関連ドメインを有する9種類のタンパク質配列を特定した。

【0237】

特定された9種類の候補のうちのいずれかがO6に対して (そしてそれによりホルミル化O抗原反復単位に対して) 特異的であるか否かを評価するために、別の緑膿菌血清型 (O5、PAO1株) のプロテオームでのその非存在を、BLAST検索 (NCBIウェブサイト) を用いて解析した。緑膿菌O5 O抗原構造は、緑膿菌O6のものとは関連しない。具体的には、O5構造にはホルミル基は存在しない。9種類の候補のうちの8種類が、緑膿菌血清型O5でホモ

10

20

30

40

50

ログを有し、このことは、これらのタンパク質が、緑膿菌O6 LESB58株に対して非特異的であることを示した。残りの候補 (locus_tag = PLES_12061、GenBank : CAW25933.1 ; 配列番号2) は、緑膿菌血清型O5では明らかなホモログを有さず、したがって、LESB58/緑膿菌血清型O6に特異的であると分類された。

【0238】

O6特異性を確認するために、他の緑膿菌血清型O6株での、見出された緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼ (配列番号2) の存在を検証した。緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼ (配列番号2) に同等なタンパク質が、「PAK」株でのlocus tag : PAK_01412およびM18株でのlocus tag : PAM18_1171をはじめとする4種類の他の緑膿菌血清型O6株で特定された。

10

【0239】

緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼ (配列番号2) に対して低いアミノ酸配列同一性を有するホルミルトランスフェラーゼはまた、メチロバクテリウム属の種 (*Methylobacterium* sp.) (33%の同一性、アクセッション番号WP_020093860)、チオスリックス・ニベア (*Thiothrix nivea*) (30%の同一性、アクセッション番号WP_002707142)、アナエロファガ・テルオハロフィラ (*Anaerophaga thermohalophila*) (28%の同一性、アクセッション番号WP_010422313)、ハロルブルム・カリフォルニエンセ (*Halorubrum californiense*) (27%の同一性、アクセッション番号WP_008445073)、アゾリゾビウム・カウリノダンス (*Azorhizobium caulinodans*) (25%の同一性、アクセッション番号WP_012170036) およびブルクホルデリア・グラティ (*Burkholderia glathei*) (24%の同一性、アクセッション番号KDR39707) でも特定された。併せて考えると、これらの相同性解析は、関連遺伝子がホルミル化に関するO6特異的活性をコードすることを示した。

20

【0240】

非ホルミル化O6反復単位構造に対する緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼ (配列番号2) の機能的活性を試験するために、配列番号2をコードする遺伝子をクローニングした。遺伝子の稀なTTG開始コドン、ATGに置き換えた。緑膿菌O6 rfbクラスターへの緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼ (配列番号2) のクローニングおよび遺伝子の相対的構成の模式的表示を、図5に示す。

【0241】

特定されたら、緑膿菌O6ホルミルトランスフェラーゼの機能を評価した。緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼ (配列番号2) を、機能的ECA (wec) クラスターを欠失している大腸菌株での緑膿菌O6のrfbクラスター遺伝子との共発現により、機能性について試験した。ホルミル化を示すために、リポドAコアに結合した単一抗原反復単位を分析した (waaL陽性菌株にて)。ホルミル化されたO6 O抗原反復単位を、O6特異的抗体を用いる免疫検出により特定し (図3A)、これにより、ホルミル基が緑膿菌O6 O抗原構造の重要なエピトープであることが示された。

30

【0242】

分子レベルでホルミル化を示すために、O6反復単位を、MALDI MSMSにより分析した。精製されて2AB標識された反復単位は、緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼ (配列番号2) と緑膿菌O6のrfbクラスター遺伝子との共発現が、2~3分間シフトした主ピーク (58~61分、図3B) の蛍光シグナルを生じたことを示した。

40

【0243】

58分でのピークに含有される物質のMALDI MSMS分析は、Yイオン断片化シリーズをもたらし、これは、非ホルミル化、Nアセチル化2-AB標識O6反復単位と一致する。プロトン化前駆体イオンm/z = 905は、905 759 543 326の顕著なイオンシリーズへと断片化され、これは、146 (デオキシヘキソース)、216 (アミド化N-アセチルヘキソサミヌロン酸)、217 (N-アセチルヘキソサミヌロン酸) 単位の喪失に対応する。緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する細胞から取得された61分で回収された物質は、891の顕著な前駆体イオンを含有し、これは、891 745 529 326で断片化

50

され、146（上記の通り）、216（上記の通り）、および203（アミド化N-ホルミルヘキソサミノロン酸）の喪失に対応する。このデータは、ホルミル化が緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼの発現に依存すること、およびしたがって、遺伝子がホルミルトランスフェラーゼをコードしていることを証明した。結果として、緑膿菌血清型O6ホルミルトランスフェラーゼをコードする遺伝子は、fmtO6と命名された。アミド化N-アセチルヘキソサミノロン酸のアセチル基がホルミル基により置換されているという事実は、最初にアセチル基が除去され、その後にホルミル基を付加することができる二段階機構を示唆する。このモデルは、遊離アミン基が、中間体としてC2に存在し、その後にホルミルトランスフェラーゼドメインがホルミル基を単糖に連結させるであろうことを暗示する。つまり、脱アセチル化非ホルミル化O抗原が、実質的な、免疫学的に重要な、化学量論的な量よりも少ない量で（substochiometrically）存在する、緑膿菌血清型O6の多糖形態であり得る。

【0244】

実施例3：緑膿菌O6 O抗原の重合のためのwzy遺伝子の特定および試験

本実施例は、緑膿菌O6 wzyポリメラーゼの特定を記載する。

【0245】

O抗原多糖は、多数のグラム陰性細菌の細胞外表面を構成する。O抗原の生合成を担う酵素的機構は、多くの場合、rfbクラスターと称される単一遺伝子クラスター中にコードされる。緑膿菌血清型O6株は、ポリマーO抗原を発現する（図2）。しかしながら、個別のO抗原クラスターには、O抗原ポリメラーゼ（wzy）をコードする遺伝子が存在しない。このことは、大腸菌で緑膿菌O6 O抗原を組み換え的に発現させるためには、wzy遺伝子の特定が必要であることを意味する。O抗原ポリメラーゼ（wzy）は、LPSを形成するために、リピドAコアオリゴ糖への「一括」（en bloc）ライゲーションに先立つ、ペリプラズム腔でのO抗原反復単位の重合を触媒する、内在性内膜タンパク質である。wzyポリメラーゼは、それらの反復単位オリゴマーに対して高度に特異的であり、wzy遺伝子間での相同性は低い。

【0246】

緑膿菌O19のO抗原は、緑膿菌O6のものとの構造的類似性を有する。両方の構造を認識するwzyタンパク質は、似通った性質、例えば、構造、配列、膜貫通ドメイン数も共有し得るであろうことが推測された。緑膿菌O19のO19 Wzyタンパク質の配列（アクセッション番号AAM27560）は公知であり、相同性検索のための対象として緑膿菌O6 PAK株プロテオームを用いるBlast解析での一次クエリとして用いた。

【0247】

特定された候補が緑膿菌O6に特異的であるか否かを評価するために、別の緑膿菌血清型（O5、PAO1株）のプロテオームでのその存在を解析した。O5 O抗原構造は、O6およびO19のものとは関連しない。上位100種類の結果を、blast解析を用いて緑膿菌O5プロテオームでの存在について個別に分析した。PAKプロテオーム由来の100種類の候補のうちの97種類が、緑膿菌血清型O5プロテオーム中でホモログを有し、このことにより、これらのタンパク質が、緑膿菌株に一般的に存在し、O6 O抗原生合成にはおそらく関連しないことが示された。100種類の候補のうちの3種類は、緑膿菌O5プロテオームには明らかなホモログを有さず、したがって、緑膿菌O6に特異的であると判定された。

【0248】

3種類の特定された候補タンパク質のうちの1種類が緑膿菌O6 wzyであるか否かを調べるために、3種類のタンパク質をBlast解析でのクエリとして用いた。3種類の候補のうちの1種類であるPAK_01823（O6wzy PAK_01823；配列番号3）は、他の公知のオリゴ糖反復単位ポリメラーゼに対してアミノ酸配列同一性を有し、例えば、ストレプトコッカス・サングイニス（*Streptococcus sanguinis*）オリゴ糖反復単位ポリメラーゼ（アクセッション番号WP_004192559）に対して25%の同一性、大腸菌O139オリゴ糖反復単位ポリメラーゼ（アクセッション番号AAZ85718）に対して22%の同一性を有した。その結果、PAK_01823（O6wzy PAK_01823；配列番号3）は、緑膿菌O6 wzyとして特定され

た。

【0249】

緑膿菌O6 wzyによりコードされるタンパク質として配列番号3をさらに確認するために、タンパク質の細胞内局在を、PSORTb (www.psорт.org/psортb/) を用いてバイオインフォマティクスによって予測した。タンパク質は、O抗原ポリメラーゼに共通な特徴である11個の膜貫通ドメインを有して細胞膜中に局在することが予測された。

【0250】

PAK_01823 (O6wzy PAK_01823; 配列番号3) と同等なタンパク質が、LESB58株 (PAK株および内部で試験された菌株と比較して1アミノ酸しか異ならない緑膿菌O6 wzyタンパク質を有した) をはじめとする他のO6陽性緑膿菌株で見出された。

10

【0251】

次に、緑膿菌O6 wzyの機能性試験を行なった。緑膿菌O6 rfbクラスター、fmtO6遺伝子 (すなわち、上記の実施例2で議論された配列番号2をコードする遺伝子)、および緑膿菌O6 wzyをコードする遺伝子 (すなわち、配列番号3をコードする遺伝子) を、大腸菌W3110 wec細胞で共発現させ、形成されたり多糖を免疫ブロッティングにより分析した (図4)。抗O6抗血清は、3種類すべての導入遺伝子を含む細胞に由来するサンプルのみでラダー様シグナルを検出し、このことは、PAK_01823 (O6wzy PAK_01823; 配列番号3) が、実際に緑膿菌O6のポリメラーゼであることを示す。結果として、PAK_01823をコードする遺伝子がO6wzyと命名された。

【0252】

大腸菌が緑膿菌O6 O抗原を組み換え的に発現できるようにするために必要なすべての遺伝的エレメントを含む単一の遺伝子クラスターを作製するために、fmtO6遺伝子およびO6wzy遺伝子 (すなわち、それぞれ配列番号2および3をコードする遺伝子) を、緑膿菌O6 rfbクラスターの下流にクローニングした。コドン使用頻度が最適化された緑膿菌O6 O抗原ポリメラーゼO6wzyの、クローニングされた緑膿菌O6 rfbクラスターへのO6ホルミルトランスフェラーゼと併せたクローニングおよび遺伝子の相対的構成の模式的表示を、図5に示す。fmtO6遺伝子およびO6wzy遺伝子 (すなわち、それぞれ配列番号2および3をコードする遺伝子) を、複数の位置で緑膿菌O6 rfbクラスターへと挿入できたことがさらに決定された。具体的には、fmtO6遺伝子は、別個のプロモーターの制御下にて、rfbクラスターの下流またはrfbクラスターの上流にrfbクラスターに対して時計回りの方向で挿入することができた。また、fmtO6遺伝子は、rfbクラスターの上流または下流にrfbクラスターに対して反時計回りの方向で挿入することができた。O6wzy遺伝子は、rfbクラスターの上流もしくは下流に、または別個のプロモーターの制御下にてrfbクラスターの上流に、rfbクラスターに対して時計回りの方向で挿入することができた。上記のすべての構築物は、緑膿菌O6 O抗原生合成に関して活性があった (データは示していない)。

20

30

【0253】

実施例4：オリゴサッカリルトランスフェラーゼが挿入され、rfbが挿入され、完全なrfbO6クラスターを有する細菌株は安定でありかつバイオコンジュゲートを産生する

実施例1は、(i) オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸および(ii) rfbクラスターをコードする核酸の挿入により遺伝的に改変された細菌宿主菌株により、バイオコンジュゲートを成功裏に生成させることができることを実証する。本実施例では、キャリアタンパク質としてシュードモナス属タンパク質PcrVを用いて、実施例1に記載されるものに類似した実験が行なわれた。

40

【0254】

天然では、PcrV (例えば、UniProt O30527を参照されたい) の一次アミノ酸配列は、N-グリコシル化コンセンサス配列 (「糖化部位」 (glycosite)) を含まない。国際公開第2006/119987号に記載される方法を用いて、1、2、3、4、または5箇所の糖化部位を含むPcrVの組み換え変異体を作製した。特に、PcrVをコードする核酸配列の操作により、最適化されたN-グリコシル化コンセンサス配列 (consensus sequence) であるAsp (Glu)-X-Asn-Z-Ser (Thr) (ここで、XおよびZは独立に、Pro以外のいずれかの天然アミノ

50

酸から選択される)を1、2、3、4、または5個発現するPcrV変異体を作製した。

【0255】

改変型大腸菌宿主細胞は、以下の核酸を宿主細胞ゲノムに直接的に挿入することにより作製した：(i) C.ジェジュニオリゴサッカリルトランスフェラーゼ (PglB) をコードする核酸および(ii) 緑膿菌血清型O6 PAK株由来のrfbクラスターをコードする核酸。このrfbクラスターは、緑膿菌血清群O6抗原のO抗原合成に必要な遺伝子をコードする。挿入は、PCT/EP2013/071328に記載される新規挿入法(上記の5.2節を参照されたい)またはpUT mini system (Biomedal Lifescience社)を用いて行なった。大腸菌宿主細胞を、上記の通りの1~5箇所の糖化部位を含むPcrVを発現するプラスミドの導入によりさらに改変した。つまり、本実施例に記載される改変型大腸菌宿主細胞は、以下のものを発現する：(i) 宿主細胞ゲノムへのオリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸の組み込みによって、C.ジェジュニオリゴサッカリルトランスフェラーゼ (PglB)；(ii) 宿主細胞ゲノムへの緑膿菌PAK株由来rfbクラスターをコードする核酸の組み込みによって、O6抗原を生成する緑膿菌rfbクラスターの遺伝子；および(iii) キャリアタンパク質をコードする改変型核酸(核酸は、上記の通り、1~5箇所の糖化部位をコードするように改変されている)を含むプラスミドを用いて宿主細胞を形質転換することによって、改変型PcrVキャリアタンパク質。

10

【0256】

二重組み込み(オリゴサッカリルトランスフェラーゼの組み込みおよびrfbクラスターの組み込み)を含む改変型宿主細胞がバイオコンジュゲート(PcrV-O6)を産生する能力と、(i) オリゴサッカリルトランスフェラーゼまたはrfbクラスターの単独組み込みしかされず、残余の構成要素(キャリアタンパク質およびオリゴサッカリルトランスフェラーゼまたはrfbクラスター)が宿主細胞によりプラスミド発現されるか；または(ii) すべての構成要素(キャリアタンパク質およびオリゴサッカリルトランスフェラーゼおよびrfbクラスター)がプラスミド発現され、組み込まれた構成要素がない宿主細胞によるバイオコンジュゲート産生との比較を可能にするために、追加の改変型大腸菌宿主細胞が作製された。

20

【0257】

3種類の異なる大腸菌株が、分析で用いられ、比較された：(i)「St7343」、宿主細胞ゲノムに挿入されたpglBおよび完全なO6 rfbクラスターの両方(すなわち、二重組み込みされた菌株)およびPcrVキャリアタンパク質(1、2、3、4、または5箇所の糖化部位を含む)をコードするプラスミドを含む；(ii)「St7209」、プラスミド発現pglB、宿主細胞ゲノムに挿入されたO6 rfbクラスターおよびPcrVキャリアタンパク質(1、2、3、4、または5箇所の糖化部位を含む)をコードするプラスミドを含む；(iii)「St2182」、プラスミド発現pglB、プラスミド発現O6 rfbクラスターおよびPcrVキャリアタンパク質(1、2、3、4、または5箇所の糖化部位を含む)をコードするプラスミドを含む。図6は、各菌株の特徴を示す(図6A：St7343；図6B：St7209；図6C：St2182)。

30

【0258】

図6に示される通り、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、キャリアタンパク質およびrfbクラスターを発現するすべての菌株が、バイオコンジュゲートを産生した。PcrV-O6に対応する、40~70kDaマーカーの間(55kDaマーカー付近)に示されるプロットを参照されたい。重要なことに、実施例1に示される通り、この知見は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼおよびrfbクラスターの二重組み込みを含む菌株を含む。特に、図6Aに示される結果を参照されたい。つまり、実施例1と同様、本実施例は、宿主細胞ゲノムへの遺伝子/遺伝子クラスターの二重挿入後に安定的宿主細胞が作製できることのみならず、遺伝子の機能が維持されることも実証する。具体的には、挿入されたオリゴサッカリルトランスフェラーゼおよび挿入されたrfbクラスターの機能は保存され、バイオコンジュゲートの生成をもたらした。

40

【0259】

実施例5：EPA-O6バイオコンジュゲートの産生および精製

本実施例は、緑膿菌O6抗原を含むバイオコンジュゲートの産生を記載する。

50

【0260】

大腸菌W3110 waaL wec rfbを、緑膿菌O6 rfbクラスター、C.ジェジュニ由来オリゴサッカリルトランスフェラーゼpglB、無毒化キャリアタンパク質EPAをコードする遺伝子、およびQuiNAc生合成/トランスフェラーゼ遺伝子wbpVLM（緑膿菌O6株由来）を含むプラスミドを用いて形質転換した。プラスミド保持率分析の結果を、図8に示す。テトラサイクリン、スペクチノマイシン、カナマイシンおよびアンピシリンを添加した培地（LBプロス）に、4種類すべてのプラスミドを含む宿主細胞を接種した。前培養物を、37にて一晚増殖させた。次の日、MgCl₂、テトラサイクリン、スペクチノマイシン、カナマイシンおよびアンピシリンを添加した培地（TB）に、OD₆₀₀ 0.1まで前培養物を希釈することにより接種した。細胞を、約OD₆₀₀ 0.8～1.0に到達するまで37にて増殖させ、続いて、pglB、epaおよびwbpVLMの発現を、1mM IPTGおよび0.1%アラビノースの添加により誘導した。一晚の誘導後に、遠心分離により細胞を回収した。

10

【0261】

EPA-O6バイオコンジュゲートを、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー（IMAC）、アニオン交換クロマトグラフィー（Source Q）およびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いて、改変型宿主細胞のペリプラズム抽出物から精製した。糖コンジュゲートを含有する溶出画分をプールし、続いて、次のクロマトグラフィーステップに供した。最終的なSEC溶出物を、SDS-PAGEおよびそれに続くクマシーブルー染色または図7に示した抗体を用いるウエスタンブロットにより特性決定した。

20

【0262】

EPA-O6バイオコンジュゲートを、一連の分析法を用いて特性決定した。エンドトキシンのレベルは、LALアッセイを用いて測定した（13EU/mL）。純度は、SDS-PAGEおよびキャピラリーゲル電気泳動により決定した（CGE、86%純度）。タンパク質の量は、BCAアッセイを用いて測定した（1.75mg/mL）。多糖の量は、アンスロンアッセイを用いて測定した（Dubois et al., 1956；311.6ug/mL）。O6ポリマーの平均サイズは、高分解能「グリコシル化度」（DOG）SDS-PAGEを用いて決定した（ポリマー1個当たり平均で7.9個の反復単位）。バイオコンジュゲートの電氣的異性体（electric isoform）の決定は、等電点電気泳動（IEF）により行なった。最後に、バイオコンジュゲートの正体を、タンパク質（EPA）または多糖（O6）に対する抗体を用いる免疫ブロッティングにより確認した。

30

【0263】

実施例6：免疫化試験

本実施例は、緑膿菌O6-EPAバイオコンジュゲートが免疫原性であることを実証する。

【0264】

雌性6週齢BALB/c OIaHsdマウス（20匹の群）を、非アジュバント化またはアジュバント化（水中油型エマルジョンアジュバントを含む）製剤中で、0.2 μgまたは2 μgのO6-EPAコンジュゲート（実施例5を参照されたい）を用いて、0日目、14日目、および28日目に筋内に免疫化した。10匹のマウスの対照群には、アジュバント（O/W）のみをワクチン接種した。抗O6 ELISAを、42日目（IIIの14日後）に採取した個別の血清で決定し、オプソニン力価を、プールされたII後（Post-II）およびIII後（Post-III）血清で決定した。結果を図9に示し、以下で詳細に説明する。

40

【0265】

図9Aは、抗O6 ELISA応答を示す。精製したO6 LPS-O6（PaO6a,6c）を、4にて一晚、高結合性マイクロタイタープレート（Nunc Maxisorp社）に、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の8 μg/mLにてコーティングした。プレートを、PBS-BSA 1%を用いて、30分間、RTで振盪しながらブロッキングした。マウス抗血清を1/100または1/10に予備希釈し、続いて、さらなる2倍希釈をマイクロプレート中で作製し、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。洗浄後、結合したマウス抗体を、Jackson ImmunoLaboratories社ペルオキシダーゼコンジュゲート化AffiniPureヤギ抗マウスIgG（H+L）（ref: 115-035-003）をPBS-tween 0.05%-BSA 0.2%中で1/5000に希釈して用いて検出した

50

。検出抗体は、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。10 mLのpH4.5 0.1M クエン酸バッファー当たり4mg OPD + 5 μ L H₂O₂を用いて、室温にて暗条件で15分間、発色させた。50 μ L HClを用いて反応を停止させ、光学密度 (OD) を620nmに対して490nmで読み取った。

【0266】

血清中に存在する抗O6抗体のレベルを、中間点力価で表わした。個々の血清のGMTを、各処置群中の20サンプル (対照群に対しては10サンプル) に関して算出した。

【0267】

アジュバントと共に製剤化したバイオコンジュゲートの注入後のマウスでの免疫応答を観察した。用量間では差異は観察されなかった。同様の観察が、セロコンバージョンの割合 (%) に関して行なわれた。非アジュバント化製剤では、応答が観察されないか、非常に弱い応答が観察された。

【0268】

図9Bは、アジュバントを用いるかまたは用いずに製剤化されたO6-EPAバイオコンジュゲートを用いて免疫化されたマウス由来のHL60細胞でのオプソニン力価を示す。

【0269】

オプソニン食作用アッセイ (OPA) を、15 μ LのHL-60貪食細胞 (5.10e6細胞/mLに調整)、15 μ Lの緑膿菌 (TSA寒天プレート上で増殖させた)、15 μ Lの試験血清希釈物、および15 μ Lの子ブタ補体を含む丸底マイクロプレート中に行なった。不活性化試験プール血清を、まずHBSS-BSA 1%中で希釈し (1/16または1/50最終希釈)、試験の最後に200 ~ 250 CFU/ウェルのカウントにするために希釈した緑膿菌O6株 (strain ID: HNC MB 170009、Hungarian National Collection of Medical Bacteriaから入手) に添加した。

【0270】

HL-60細胞 (5.10e6/mLに調整) および子ブタ補体 (最終濃度12.5%) を、続いて各ウェルに加えた。不活性化補体を用いる対照を、各試験サンプルに含めた。

【0271】

反応混合物を、37 °Cにて90分間、振盪しながらインキュベートした。1/200希釈した後、50 μ Lの体積を平底マイクロプレートに移した。50 μ LのMH寒天および続いてPBS-0.9%寒天を加えた。30 °Cにて一晩のインキュベーション後、自動化コロニー計数を行なった。

【0272】

オプソニン貪食活性を、少なくとも50%の殺菌率をもたらした血清希釈の逆数として表わす。

【0273】

データは、アジュバント化群を用いた注入後に誘導された抗体の機能性を実証する。

【0274】

結論として、本実施例は、緑膿菌O6-EPAバイオコンジュゲートが、免疫原性かつ機能的である (すなわち、in vivoで緑膿菌O6を殺菌する抗体を生じる) ことを実証する。

【0275】

実施例7

本実施例は、緑膿菌O6-PcrVバイオコンジュゲートが免疫原性であることを実証する。

【0276】

免疫化

20匹のBalb/c 6週齢のマウスの群、および20匹の雌性6週齢OFA SDラットの群を、非アジュバント化または水中油型エマルジョンアジュバント化製剤中の、0.2 μ gのO6-PcrVバイオコンジュゲートを用いて、0、14および28日目に筋内 (IM) に免疫化した。

【0277】

IgG免疫応答はELISAにより (抗O6および抗PcrV ELISAを用いて) 測定された。抗体の機能性は、O6についてはオプソニン食作用アッセイで、PcrVについては溶血アッセイで

10

20

30

40

50

評価された。免疫応答は、42日目（III後）に採取した個別の血清において、ならびにプールされたII後およびIII後血清について評価された。

【 0 2 7 8 】

試験されたコンジュゲート

3種類の緑膿菌O6-PcrVコンジュゲートが試験された。それぞれの場合に、3箇所のグリコシル化部位がPcrVに導入され、短い、中程度の、または長いO6鎖がグリコシル化部位に付加された。

【表 1】

コンジュゲート	操作されたグリコシル化部位の数	O6多量体の長さ	タンパク質濃度 Mg/ml	糖濃度 Mg/ml	s/p 比率	エンドトキシン	純度
O6-PcrV 短い	3	短い	0.849	0.169	19.9%	<5	97.2%
O6-PcrV 中程度	3	中程度	0.154	0.072	46.8%	9.425	97.7%
O6-PcrV 長い	3	長い	0.531	0.450	84.7%	<5	100%

10

20

【 0 2 7 9 】

（ラット血清に対する）抗O6 ELISA

精製したO6-LPSを、4 にて一晚、高結合性マイクロタイタープレート（Nunc Maxisorp社）に、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の8 µg/mLにてコーティングした。プレートを、PBS-BSA 1%を用いて、30 分間、RTで振盪しながらブロッキングした。ラット抗血清を1/100または1/10に予備希釈し、続いて、さらなる2倍希釈をマイクロプレート中で作製し、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。洗浄後、結合したラット抗体を、Jackson ImmunoLaboratories社ペルオキシダーゼコンジュゲート化AffiniPureヤギ抗ラットIgG（H+L）（ref: 112-035-003）をPBS-tween 0.05%中で1/2500に希釈して用いて検出した。検出抗体は、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。10 mLのpH4.5 0.1Mクエン酸バッファー当たり4mg OPD + 5 µL H₂O₂を用いて、室温にて暗条件で15分間、発色させた。50 µL HClを用いて反応を停止させ、光学密度（OD）を620nmに対して490nmで読み取った。血清中に存在する抗O6抗体のレベルを、中間点力価で表した。GMTを、各処置群中の20個の個別のサンプルに関して算出した。

30

【 0 2 8 0 】

（ラット血清に対する）抗PcrV ELISA

精製したHisタグ付きPcrVを、4 にて一晚、高結合性マイクロタイタープレート（Nunc Maxisorp社）に、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の1 µg/mLにてコーティングした。プレートを、PBS-BSA 1%を用いて、30 分間、RTで振盪しながらブロッキングした。ラット抗血清を1/400に予備希釈し、続いて、さらなる2倍希釈をマイクロプレート中で作製し、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。洗浄後、結合したラット抗体を、Jackson ImmunoLaboratories社ペルオキシダーゼコンジュゲート化AffiniPureヤギ抗ラットIgG（H+L）（ref: 112-035-003）をPBS-tween 0.05%中で1/5000に希釈して用いて検出した。検出抗体は、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。10 mLのpH4.5 0.1Mクエン酸バッファー当たり4mg OPD + 5 µL H₂O₂を用いて、室温にて暗条件で15分間、発色させた。50 µL HClを用いて反応を停止させ、光学密度（OD）を620nmに対して490nmで読み取った。

40

【 0 2 8 1 】

血清中に存在する抗PcrV抗体のレベルを、中間点力価で表わした。GMTを、各処置群中

50

の20サンプルに関して算出した。

【0282】

(マウス血清に対する)抗O6 ELISA

精製したO6-LPSを、4 にて一晚、高結合性マイクロタイタープレート (Nunc Maxisorp社) に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の8 µg/mLにてコーティングした。プレートを、PBS-BSA 1%を用いて、30 分間、RTで振盪しながらブロッキングした。マウス抗血清を1/100または1/10に予備希釈し、続いて、さらなる2倍希釈をマイクロプレート中で作製し、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。洗浄後、結合したマウス抗体を、Jackson ImmunoLaboratories社ペルオキシダーゼコンジュゲート化AffiniPureヤギ抗マウスIgG (H+L) (ref: 115-035-003) をPBS-tween 0.05%中で1/2500に希釈して用いて検出した。検出抗体は、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。10 mLのpH4.5 0.1Mクエン酸バッファー当たり4mg OPD + 5 µL H₂O₂を用いて、室温にて暗条件で15分間、発色させた。50 µL HClを用いて反応を停止させ、光学密度 (OD) を620nmに対して490nmで読み取った。血清中に存在する抗O6抗体のレベルを、中間点力価で表わした。GMTを、各処置群中の20個の個別のサンプルに関して算出した。

10

【0283】

(マウス血清に対する)抗PcrV ELISA

精製したHisタグ付きPcrVを、4 にて一晚、高結合性マイクロタイタープレート (Nunc Maxisorp社) に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の1 µg/mLにてコーティングした。プレートを、PBS-BSA 1%を用いて、30 分間、RTで振盪しながらブロッキングした。マウス抗血清を1/400に予備希釈し、続いて、さらなる2倍希釈をマイクロプレート中で作製し、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。洗浄後、結合したマウス抗体を、Jackson ImmunoLaboratories社ペルオキシダーゼコンジュゲート化AffiniPureヤギ抗マウスIgG (H+L) (ref: 115-035-003) をPBS-tween 0.05%中で1/5000に希釈して用いて検出した。検出抗体は、室温で30分間、振盪しながらインキュベートした。10 mLのpH4.5 0.1Mクエン酸バッファー当たり4mg OPD + 5 µL H₂O₂を用いて、室温にて暗条件で15分間、発色させた。50 µL HClを用いて反応を停止させ、光学密度 (OD) を620nmに対して490nmで読み取った。

20

【0284】

血清中に存在する抗PcrV抗体のレベルを、中間点力価で表わした。GMTを、各処置群中の20サンプルに関して算出した。

30

【0285】

抗O6 OPA応答

オブソニン食作用アッセイ (OPA) を、15 µLのHL-60貪食細胞 (5 × 10⁶細胞/mLに調整)、15 µLの緑膿菌 (TSA寒天プレート上で増殖させた)、15 µLの試験血清希釈物、および15 µLの子ブタ補体を含む丸底マイクロプレート中で行なった。

【0286】

不活性化試験血清を、まずHBSS-BSA 1%中で希釈し (1/4)、緑膿菌株 (試験の最後に200 ~ 250 CFU/ウェルになるように希釈したGVXN 5871) に添加した。

【0287】

HL-60細胞 (5.10e6/mLに調整) および子ブタ補体 (最終濃度12.5%) を、続いて各ウェルに加えた。不活性化補体を用いる対照もまた、各試験サンプルに含めた。

40

【0288】

反応混合物を、37 にて90分間、振盪しながらインキュベートした。1/200希釈した後、50 µLの体積を平底マイクロプレートに移した。50 µLのMH寒天および続いてPBS-0.9%寒天を加えた (安全上の理由のために50 µLを追加した)。30 にて一晚のインキュベーション後、自動化コロニー計数を行なった。

【0289】

オブソニン貪食活性を、少なくとも50%の殺菌率をもたらした血清希釈の逆数として表わした。

50

【0290】

抗PcrV溶血阻害反応

ATCC 29260 (PCR⁺) は、TSA寒天プレート上で5%CO₂にて37℃で一晩培養され、5 mlのMinS液体培地で回収された。数マイクロリットル (μl) がWyame Fioleに播種され、4時間増殖された。

【0291】

試験血清の段階2倍希釈は、96穴U字底マイクロプレートにおいて80 μlリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) 中で実施された。

【0292】

80 μlの3倍希釈ATCC 29260が次に加えられた (ウサギ赤血球を100%溶解する希釈) 。80 μlの精製希釈ウサギ赤血球が次に各ウェルに加えられた。ウサギ赤血球の希釈率は同じ溶血および標準化された溶血阻害を得るために各アッセイについて決定された。プレートは1000rpm、4℃にて10分間遠心され、37℃で2時間インキュベートされた。

【0293】

プレートは次に4℃にて1000rpmで10分間遠心された。各ウェルの150 μl (上清) を平底プレートに移し、マイクロタイタープレートリーダーを用いて405nmで読み取りを行った。

【0294】

溶血阻害活性はプールされた血清の中間点力価 (50%阻害) で表わした。

【0295】

抗O6 IgG ELISA

II後の4匹のラットの5個のプールおよびIII後の個別の血清は、本実験のすべての群に対してELISAにより評価された。結果は図14に示される。

【0296】

ブースト効果がII後からIII後のプールされた血清で観察された。非アジュバント化O6バイオコンジュゲートは、より免疫原性が強い水中油型エマルジョンアジュバント中に製剤化されたすべてのO6バイオコンジュゲートに比べて低い免疫原性を有する。

【0297】

抗PcrV免疫応答

【0298】

II後の4匹のラットの5個のプールおよびIII後の個別の血清は、本実験のすべてのPcrV群 (G5~G9) に対してELISAにより評価された。

【0299】

II後およびIII後のラット血清の両方について得られた中間点力価の幾何平均が図13に示される。

【0300】

ブースト効果がII後とIII後のプールされた血清の間で観察された。抗PcrVの全くないかまたは非常に弱い免疫応答が非アジュバント化O6-PcrVで観察された。対照的に、水中油型アジュバント中に製剤化された3種類のO6バイオコンジュゲートについて、PcrVタンパク質キャリアに対して良好な免疫応答が観察された。

【0301】

最も高い抗体反応は、20%糖 / タンパク質比率 (より高いタンパク質濃度) を含む第5群のO6-PcrVバイオコンジュゲートで観察された。

【0302】

PcrV溶血阻害アッセイ:

PcrV溶血阻害アッセイの結果は図10に示される。O6-PcrVコンジュゲートで免疫されたマウスでは、試験されたすべてのコンジュゲートについて良好なPcrV溶血阻害力価が達成された。PcrVは、マウスにおいて試験されたすべてのO6-PcrVバイオコンジュゲートについて良好なPcrV溶血阻害力価で機能的な抗体を生成することができた。20%の糖 / タンパク質比率を有するより短い糖鎖は他のコンジュゲートよりも良好な力価の傾向を示

10

20

30

40

50

したが、改善は統計学的に有意ではなかった。

【0303】

マウスおよびラットの両方において、水中油エマルジョン型の存在はPcrVに対する免疫応答を増強した。

【0304】

オブソニン食作用の結果

オブソニン食作用アッセイの結果は図12に示される。良好なオブソニン食作用反応は、コンジュゲート製剤が水中油型アジュバントを含むサンプルにおいて達成された。これは非アジュバント化サンプルにおいて試験されなかった。その後の研究は、非アジュバント化コンジュゲートで免疫されたマウスに由来する血清において非常に弱いオブソニン反応を示した。

10

【0305】

本開示は、本明細書中に記載される特定の実施形態による範囲に限定されるものではない。実際、本明細書中に提供される対象の様々な改変物が、記載されるものに加えて、上記の説明および添付の図面から当業者には明らかになるであろう。そのような改変物は、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

【0306】

様々な刊行物、特許および特許出願が本明細書中で引用され、それらの開示はその全体が参照により組み入れられる。

本発明は以下の実施形態を含む。

20

〔1〕 配列番号1～4の配列と少なくとも70%または80%同一であるアミノ酸配列を含有する緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PcrVキャリアタンパク質に共有結合している抗原を含有するコンジュゲートであって、前記抗原が緑膿菌PcrVキャリアタンパク質のアミノ酸残基に（直接またはリンカーを介して）連結している、前記コンジュゲート。

〔2〕 前記アミノ酸残基がアスパラギン残基ではない、上記〔1〕に記載のコンジュゲート。

〔3〕 前記アミノ酸残基がアスパラギン残基である、上記〔1〕に記載のコンジュゲート。

〔4〕 前記アスパラギン残基が、配列番号1～4の配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列中に導入されたD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部ではなく、ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸である、上記〔3〕に記載のコンジュゲート。

30

〔5〕 前記アスパラギン残基が、配列番号1～4の配列と少なくとも70%または80%同一であるアミノ酸配列中に導入されたD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部であり、ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、ここで前記アスパラギン残基は配列番号3のアミノ酸24～166もしくはアミノ酸281～317内またはアミノ酸317に相当する位置にある、上記〔3〕に記載のコンジュゲート。

〔6〕 前記アスパラギン残基が、配列番号1～4の配列と少なくとも70%または80%同一であるアミノ酸配列中に導入されたD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部であり、ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、ここで前記アスパラギン残基は配列番号4のアミノ酸1～143もしくはアミノ酸258～294内またはアミノ酸294に相当する位置にある、上記〔3〕に記載のコンジュゲート。

40

〔7〕 前記アスパラギン残基が、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列の一部であり、ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、ここで前記アスパラギン残基は配列番号5の配列または配列番号5と少なくとも80%の同一性を有する配列中に変異により導入されていない、上記〔3〕に記載のコンジュゲート。

〔8〕 PcrVペプチド配列を除去しこれをD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドに置換することにより、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドがアミノ酸配列中に導入されている、上記〔5〕～〔7〕のいずれかに記載のコンジュゲート。

〔9〕 PcrVペプチド配列が1～7個のアミノ酸を含有する、上記〔8〕に記載のコンジュ

50

ゲート。

[1 0] PcrVペプチド配列が1個のアミノ酸を含有する、上記[8]に記載のコンジュゲート。

[1 1] D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドが、配列番号3のアミノ酸残基24～143または配列番号4のアミノ酸残基1～120内の位置でアミノ酸配列中に導入されている、上記[5]～[1 0]のいずれかに記載のコンジュゲート。

[1 2] D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドが、配列番号3のアミノ酸残基24～48または配列番号4のアミノ酸残基1～24内の位置でアミノ酸配列中に導入されている、上記[1 1]に記載のコンジュゲート。

[1 3] 少なくとも2、3または4個のD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列が、配列番号1～4のいずれか1つの配列またはそれと少なくとも70%もしくは80%同一である配列中に導入されている、上記[1]～[1 2]のいずれかに記載のコンジュゲート。

[1 4] PcrVキャリアタンパク質が配列番号6～62のうち少なくとも1つを含有する配列を有する、上記[1]～[1 3]のいずれかに記載のコンジュゲート。

[1 5] PcrVキャリアタンパク質が配列番号6～12および33のうち少なくとも1つを含有する配列を有する、上記[1 4]に記載のコンジュゲート。

[1 6] PcrVキャリアタンパク質が配列番号6～12および33のうち少なくとも3つを含有する配列を有する、上記[1 5]に記載のコンジュゲート。

[1 7] PcrVキャリアタンパク質が配列番号6および/または配列番号9および/または配列番号11および/または配列番号33を含有する配列を有する、上記[1 5 または 1 6]に記載のコンジュゲート。

[1 8] 抗原が化学コンジュゲーション法を使用して得られる化学結合により緑膿菌PcrVキャリアタンパク質に共有結合している、上記[1]～[3]のいずれかに記載のコンジュゲート。

[1 9] 化学コンジュゲーション法が、カルボジイミド化学、還元アミノ化(reductive animation)、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、エステル化学およびN-ヒドロキシコハク酸イミド化学からなる群から選択される、上記[1 8]に記載のコンジュゲート。

[2 0] 抗原が、緑膿菌PcrVキャリアタンパク質上のアスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、システイン、チロシン、ヒスチジン、アルギニンまたはトリプトファンのアミノ酸に共有結合している、上記[1 8 または 上記[1 9]に記載のコンジュゲート。

[2 1] 抗原が緑膿菌PcrVキャリアタンパク質に直接連結している、上記[1 8]～[2 0]のいずれかに記載のコンジュゲート。

[2 2] 抗原がリンカーを介して緑膿菌PcrVキャリアタンパク質に結合している、上記[1 8]～[2 0]のいずれかに記載のコンジュゲート。

[2 3] リンカーが、4～12個の炭素原子を有するリンカー、二官能性リンカー、末端に1または2個の反応性アミノ基を含有するリンカー、B-プロピオンアミド(B-propionamido)、ニトロフェニルエチルアミン、ハロアシルハライド、6-アミノカプロン酸およびADHからなる群から選択される、上記[2 2]に記載のコンジュゲート。

[2 4] 抗原が糖である、上記[1]～[2 3]のいずれかに記載のコンジュゲート。

[2 5] 抗原が細菌莢膜糖である、上記[2 4]に記載のコンジュゲート。

[2 6] 抗原が細菌性のリポ多糖またはリポオリゴ糖である、上記[2 4]に記載のコンジュゲート。

[2 7] 抗原が緑膿菌由来のリポ多糖である、上記[2 6]に記載のコンジュゲート。

[2 8] 抗原が緑膿菌由来のO抗原であり、場合によりO1、O2、O3、O4、O5、O6、O7、O8、O9、O10、O11、O12、O13、O14、O15、O16、O17、O18、O19またはO20であり、例えばO6またはO11である、上記[2 7]に記載のコンジュゲート。

[2 9] 配列番号1～4の配列と少なくとも70%または80%同一であるアミノ酸配列を有するPcrVタンパク質であって、前記アミノ酸配列はD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有し、ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸である、前記PcrVタンパク質。

10

20

30

40

50

[3 0] Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であるD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列が、配列番号3のアミノ酸23～166もしくはアミノ酸281～317内またはアミノ酸317の位置にある、上記[2 9]に記載のPcrVタンパク質。

[3 1] Xがプロリン以外の任意のアミノ酸であるD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列が、配列番号4のアミノ酸1～143もしくはアミノ酸258～294内またはアミノ酸294にある、上記[2 9]に記載のPcrVタンパク質。

[3 2] PcrVペプチド配列を除去しこれをD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドに置換することにより、D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドがアミノ酸配列中に導入されている、上記[2 9]～[3 1]のいずれかに記載のPcrVタンパク質。

[3 3] PcrVペプチド配列が1～7個のアミノ酸を含有する、上記[3 2]に記載のPcrVタンパク質。

[3 4] PcrVペプチド配列が1個のアミノ酸を含有する、上記[3 2]に記載のPcrVタンパク質。

[3 5] D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドが、配列番号3のアミノ酸残基24～143または配列番号4のアミノ酸残基1～120内の位置でアミノ酸配列中に導入されている、上記[2 9]～[3 4]のいずれかに記載のPcrVタンパク質。

[3 6] D/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列を含有するペプチドが、配列番号3のアミノ酸残基24～48または配列番号4のアミノ酸残基1～24内の位置でアミノ酸配列中に導入されている、上記[3 5]に記載のPcrVタンパク質。

[3 7] 少なくとも2、3または4個のD/E-X-N-X-S/Tコンセンサス配列が、配列番号1～4のいずれか1つの配列またはそれと少なくとも80%同一な配列中に導入されている、上記[2 9]～[3 6]のいずれかに記載のPcrVタンパク質。

[3 8] 配列番号6～62のうち少なくとも1つを含有するアミノ酸配列を有する、上記[2 9]～[3 7]のいずれかに記載のPcrVタンパク質。

[3 9] 配列番号6～12および33のうち少なくとも1つを含有するアミノ酸配列を有する、上記[3 8]に記載のPcrVタンパク質。

[4 0] 配列番号6～12および33のうち少なくとも3つを含有するアミノ酸配列を有する、上記[3 9]に記載のPcrVタンパク質。

[4 1] 配列番号6および/または配列番号9および/または配列番号11および/または配列番号33を含有するアミノ酸配列を有する、上記[3 9 または 4 0]に記載のPcrVタンパク質。

[4 2] 前記アミノ酸配列がPcrVタンパク質の精製に有用なペプチドタグを含有する、上記[2 9]～[4 1]のいずれかに記載のPcrVタンパク質。

[4 3] ペプチドタグがアミノ酸配列のC末端に位置している、上記[4 2]に記載のPcrVタンパク質。

[4 4] ペプチドタグが6ヒスチジン残基を含有する、上記[2 9]～[4 3]のいずれかに記載のPcrVタンパク質。

[4 5] 前記アミノ酸配列が、PcrVタンパク質を細菌のペリプラズムへ指向させることが可能なリーダー配列を含む、上記[2 9]～[4 4]のいずれかに記載のPcrVタンパク質。

[4 6] リーダー配列が、配列番号63と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を有する、上記[4 5]に記載のPcrVタンパク質。

[4 7] 上記[1]～[2 8]のいずれかに記載のコンジュゲートまたは上記[2 9]～[4 6]のいずれかに記載のPcrVタンパク質、および薬学的に許容可能な賦形剤を含有する、免疫原性組成物。

[4 8] 追加的な抗原をさらに含む、上記[4 7]に記載の免疫原性組成物。

[4 9] 追加的な抗原が、O抗原とキャリアタンパク質のコンジュゲート、細菌莢膜多糖とキャリアタンパク質のコンジュゲート、LOSとキャリアタンパク質のコンジュゲートお

10

20

30

40

50

よびタンパク質からなる群から選択される、上記〔４８〕に記載の免疫原性組成物。

〔５０〕 コンジュゲートまたはPcrVタンパク質を薬学的に許容可能な賦形剤と混合するステップを含む、上記〔４７〕～〔４９〕のいずれかに記載の免疫原性組成物を作製する方法。

〔５１〕 感染症の治療における使用のための、上記〔１〕～〔４６〕のいずれかに記載のコンジュゲートまたはPcrVタンパク質。

〔５２〕 緑膿菌感染の治療における使用のための、上記〔１〕～〔４６〕のいずれかに記載のコンジュゲートまたはPcrVタンパク質。

〔５３〕 治療がそれを必要とするヒト被験体のものである、上記〔５１または５２〕に記載の使用のためのPcrVのコンジュゲート。

〔５４〕 上記〔１〕～〔４６〕のいずれかに記載のPcrVタンパク質のコンジュゲートをそれを必要とする患者に投与するステップを含む治療方法。

〔５５〕 治療が、場合によりヒト患者における、例えば緑膿菌感染などの、シュードモナス属感染のものである、上記〔５４〕に記載の方法。

〔５６〕 上記〔２９〕～〔４６〕のいずれかに記載のPcrVタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

〔５７〕 配列番号１～４のいずれか１つと少なくとも７０％または８０％同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する、PcrVタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

〔５８〕 上記〔５６または５７〕に記載のポリヌクレオチドを含有するベクター。

〔５９〕 iv) グリコシルトランスフェラーゼをコードする核酸；

v) オリゴサッカリルトランスフェラーゼをコードする核酸；および

vi) 上記〔２９〕～〔４６〕のいずれかに記載の緑膿菌PcrVタンパク質をコードする核酸を含有する宿主細胞。

〔６０〕 グリコシルトランスフェラーゼをコードする核酸がシュードモナス属のrfbクラスターに由来し、ここで前記核酸は場合により宿主細胞のゲノム中に安定的に挿入されている、上記〔５９〕に記載の宿主細胞。

〔６１〕 シュードモナス属が緑膿菌であり、場合により血清型O6またはO11である、上記〔６０〕に記載の宿主細胞。

〔６２〕 オリゴサッカリルトランスフェラーゼがカンピロバクター属に由来する、上記〔５９〕～〔６１〕のいずれかに記載の宿主細胞。

〔６３〕 オリゴサッカリルトランスフェラーゼがC.ジェジュニ(C.jejuni)のPglBである、上記〔６２〕に記載の宿主細胞。

〔６４〕 緑膿菌PcrVタンパク質をコードする核酸が宿主細胞内のプラスミド中にある、上記〔５９〕～〔６３〕のいずれかに記載の宿主細胞。

〔６５〕 ホルミルトランスフェラーゼ酵素をさらに含み、前記核酸は配列番号65に対して約もしくは少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の同一性もしくは相同性を有するタンパク質をコードするか、または前記核酸は配列番号65をコードする、上記〔５９〕～〔６３〕のいずれかに記載の宿主細胞。

〔６６〕 wzyポリメラーゼをコードする核酸をさらに含み、前記核酸は配列番号66に対して約もしくは少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の同一性もしくは相同性を有するタンパク質をコードするか、または前記核酸が配列番号66をコードする、上記〔５９〕～〔６５〕のいずれかに記載の宿主細胞。

〔６７〕 ホルミルトランスフェラーゼ酵素をコードする核酸および／またはwzyポリメラーゼをコードする核酸が宿主細胞のゲノム中に安定的に挿入されている、上記〔６５〕～〔６６〕のいずれかに記載の宿主細胞。

〔６８〕 ホルミルトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子および／またはwzyポリメラーゼをコードする遺伝子が宿主細胞内のプラスミド上に存在する、上記〔６５〕～〔６６〕のいずれかに記載の宿主細胞。

〔６９〕 宿主細胞が大腸菌(E.coli)である、上記〔５９〕～〔６８〕のいずれかに記

10

20

30

40

50

載の宿主細胞。

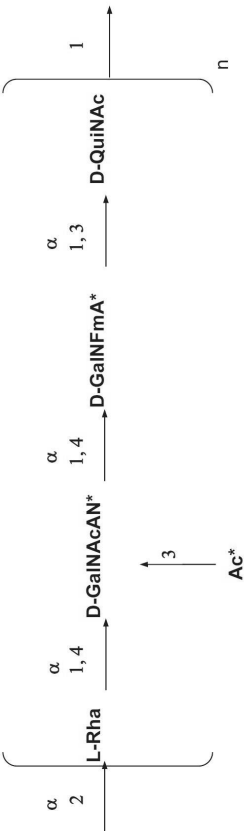
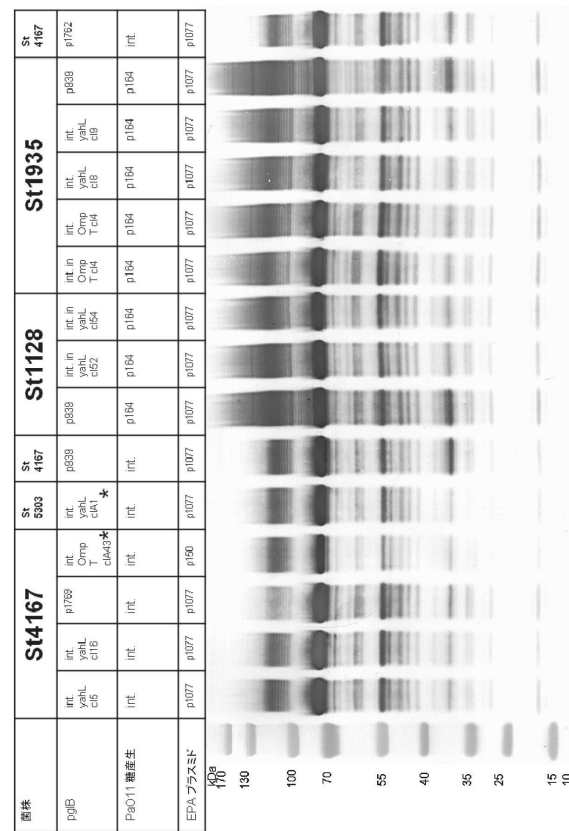
[7 0] 糖に連結している緑膿菌PcrVタンパク質を含有するバイオコンジュゲートを生産する方法であって、タンパク質の産生に好適な条件下で上記[5 9] ~ [6 9] のいずれかに記載の宿主細胞を培養することを含む前記方法。

[7 1] 上記[7 0] に記載の過程により生産されるバイオコンジュゲートであって、緑膿菌PcrVタンパク質に連結している糖を含有する、前記バイオコンジュゲート。

【図面】

【図 1 】

【図 2 】



10

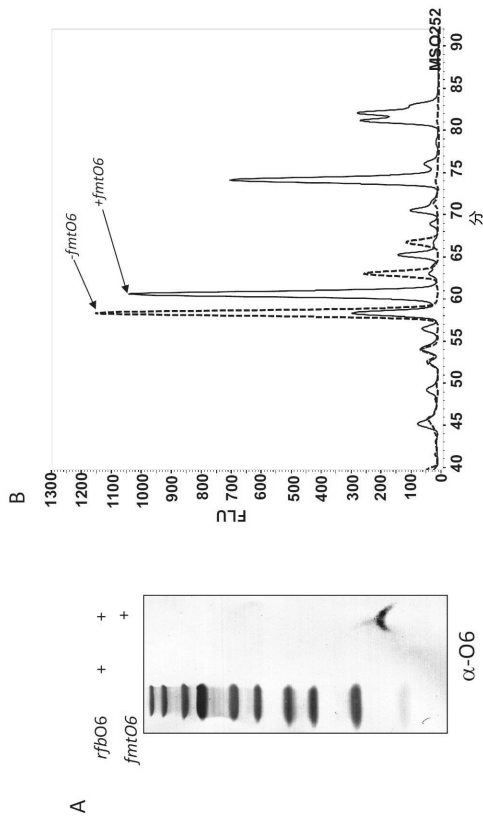
20

30

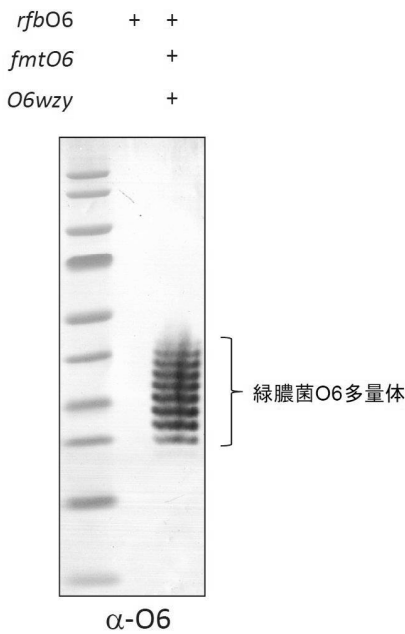
40

50

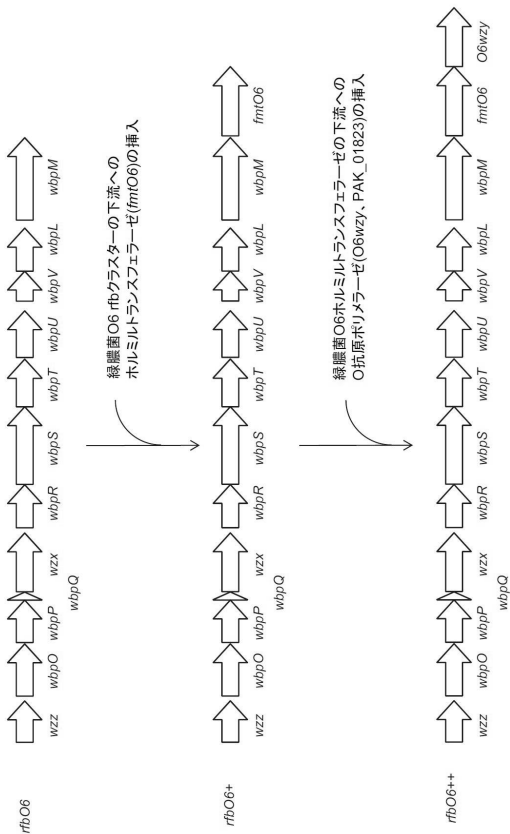
【 図 3 】



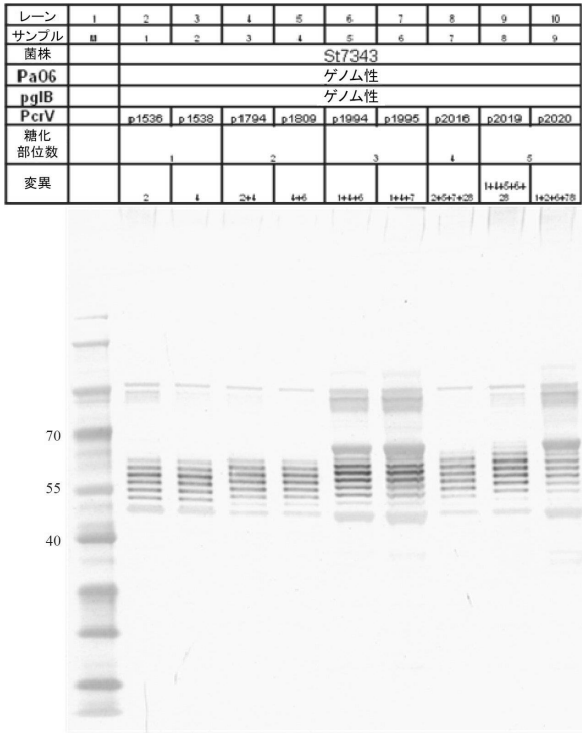
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 A 】



10

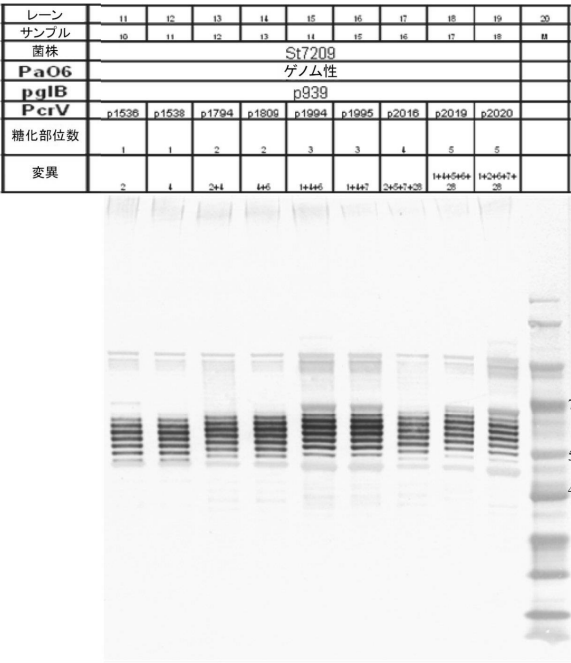
20

30

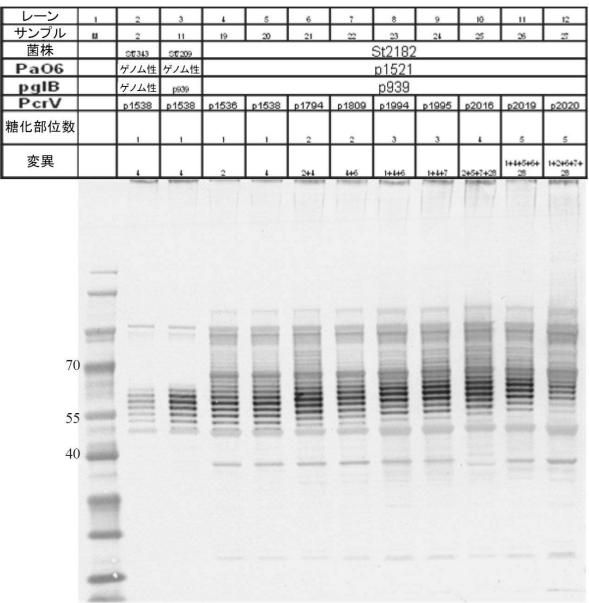
40

50

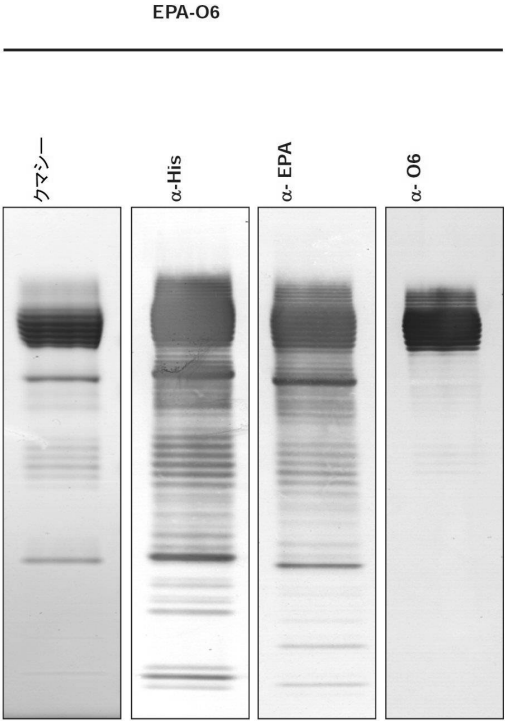
【図 6 B】



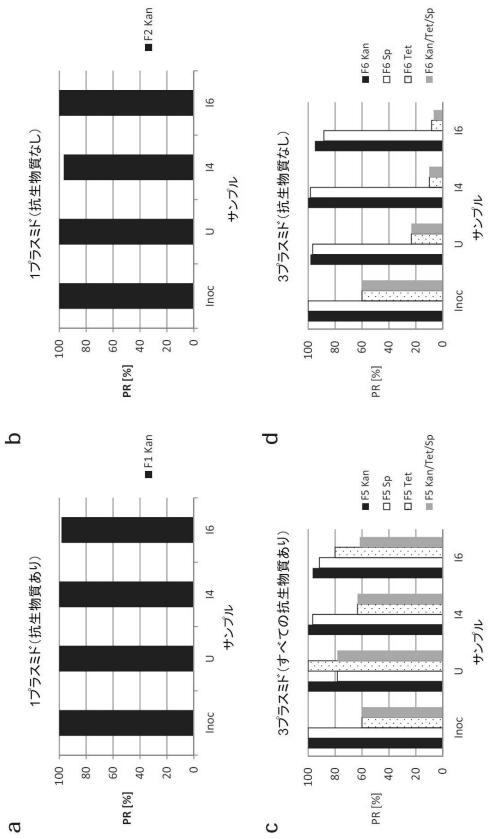
【図 6 C】



【図 7】



【図 8】



10

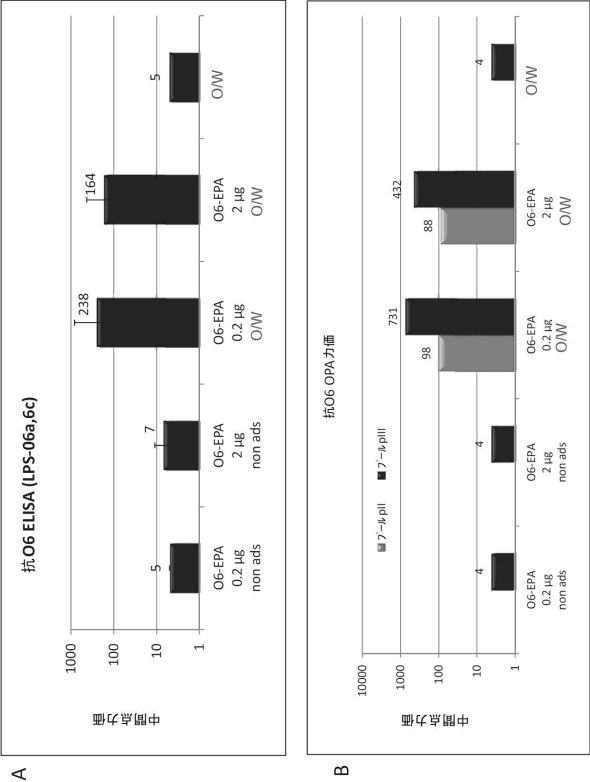
20

30

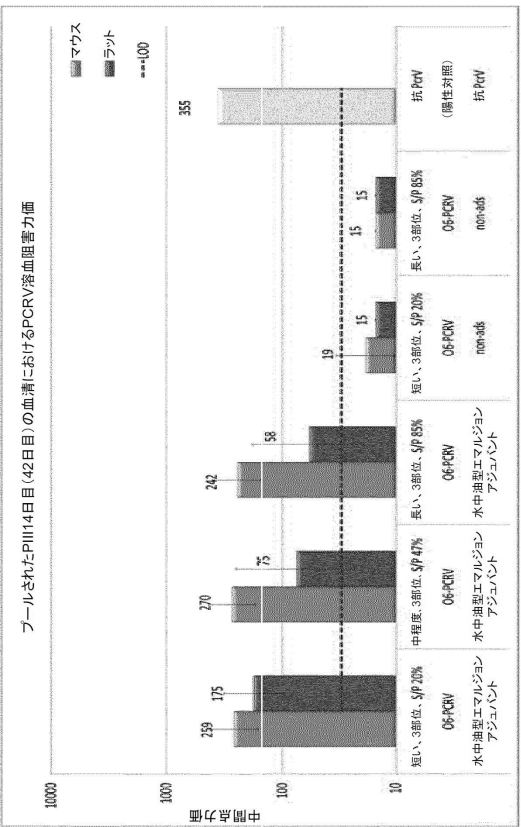
40

50

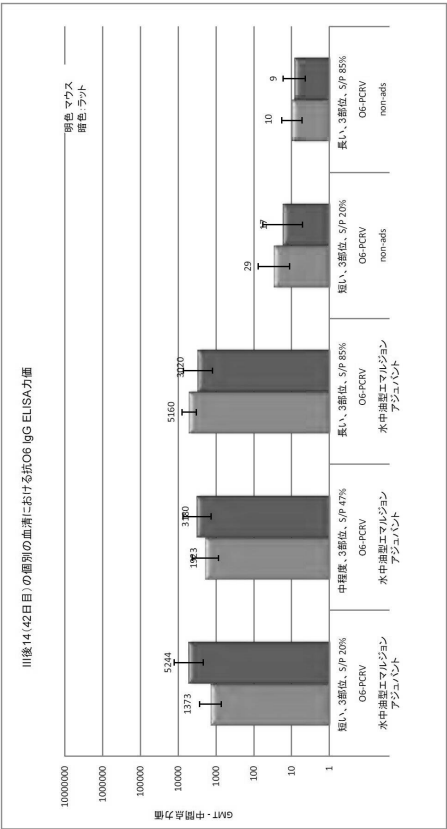
【図 9】



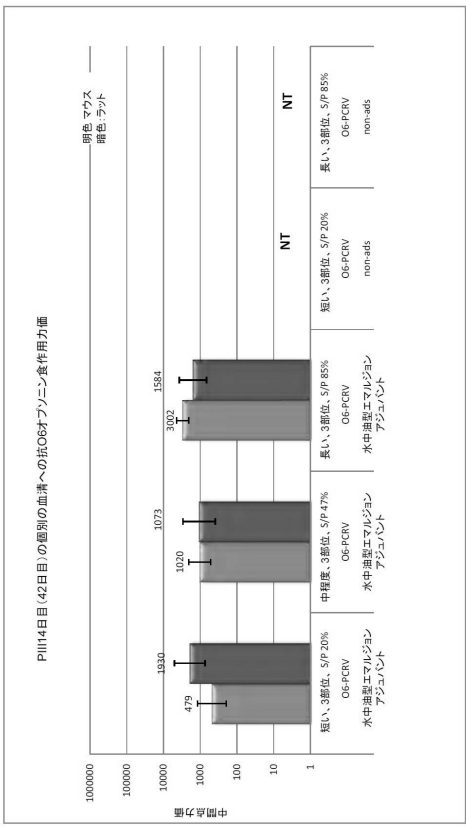
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

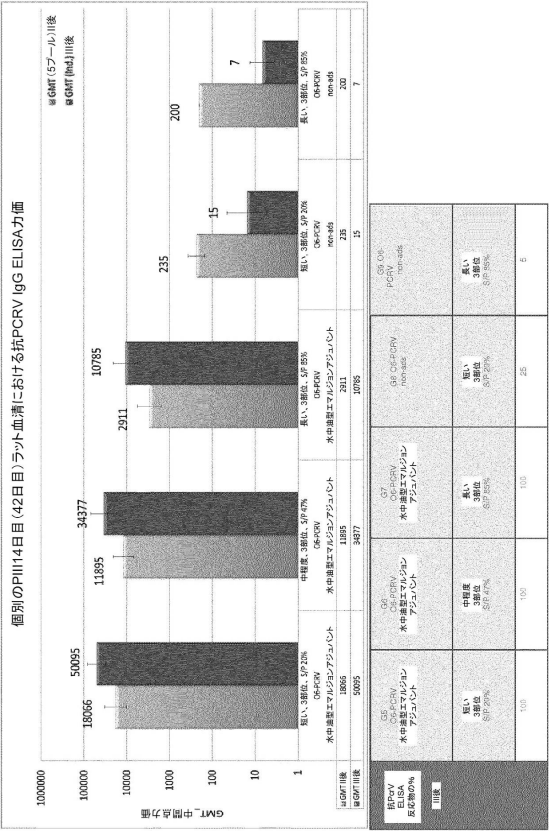
20

30

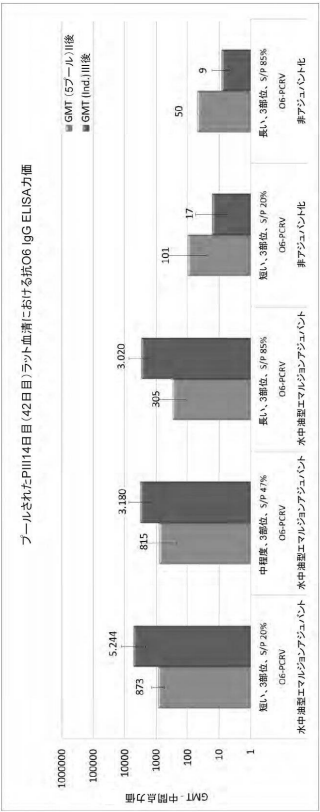
40

50

【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

0006998866000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/02	
A 6 1 K	39/385 (2006.01)	A 6 1 K	39/385	
A 6 1 K	47/62 (2017.01)	A 6 1 K	47/62	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
C 0 7 K	14/21 (2006.01)	C 0 7 K	14/21	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54	
C 1 2 N	15/70 (2006.01)	C 1 2 N	15/70	Z
C 1 2 N	15/90 (2006.01)	C 1 2 N	15/90	Z

ーベンシュトラッセ 3 , リマテッヒ ビオロギクス アーゲー

(72)発明者 コワリク , ミヒャエル トーマス

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン , グラーベンシュトラッセ 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 ローラン

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

審査官 藤代 亮

(56)参考文献 特表 2 0 1 5 - 5 3 3 5 1 1 (J P , A)

特表 2 0 1 1 - 5 1 4 1 5 5 (J P , A)

特表 2 0 0 8 - 5 3 9 7 4 3 (J P , A)

特表 2 0 1 7 - 5 1 3 4 8 0 (J P , A)

特表 2 0 1 7 - 5 2 3 7 9 4 (J P , A)

ISAR DEJBAN GOLPASHA et al , Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone -r-PcrV conjugate enhances survival of mice against lethal burn infections caused by Pseudomonas aeruginosa , BOSNIAN JOURNAL OF BASIC MEDICAL SCIENCES , 2015年03月 , Vol. 15, No.2 , p. 15-24

GREGORY P PRIEBE , VACCINES FOR PSEUDOMONAS AERUGINOSA : A LONG AND WINDING ROAD , EXPERT REVIEW OF VACCINES , 英国 , 2014年04月25日 , VOL:13, NR:4 , PAGE(S):1 - 23 (507 - 519) , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4521563/pdf/nihms710058.pdf> , <http://dx.doi.org/10.1586/14760584.2014.890053>

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

・ I P C

A 6 1 K 4 7 / 6 4

A 6 1 K 3 1 / 7 0

A 6 1 K 3 1 / 7 1 5

A 6 1 K 3 5 / 7 6

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 0 2

A 6 1 K 3 9 / 3 8 5

A 6 1 K 4 7 / 6 2

A 6 1 P 3 1 / 0 0

A 6 1 P 3 1 / 0 4

A 6 1 P 3 7 / 0 4

C 0 7 K 1 4 / 2 1
C 0 7 K 1 9 / 0 0
C 1 2 N 1 / 1 5
C 1 2 N 1 / 1 9
C 1 2 N 1 / 2 1
C 1 2 N 5 / 1 0
C 1 2 N 1 5 / 3 1
C 1 2 N 1 5 / 6 2
C 1 2 N 1 5 / 6 3
C 1 2 P 2 1 / 0 2
C 1 2 N 1 5 / 5 4
C 1 2 N 1 5 / 7 0
C 1 2 N 1 5 / 9 0

• DB

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)