

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7511188号
(P7511188)

(45)発行日 令和6年7月5日(2024.7.5)

(24)登録日 令和6年6月27日(2024.6.27)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	39/09 (2006.01)	A 6 1 K	39/09	
A 6 1 K	38/14 (2006.01)	A 6 1 K	38/14	
C 0 8 B	37/00 (2006.01)	C 0 8 B	37/00	P
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
請求項の数 12 (全34頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-510540(P2021-510540)	(73)特許権者	510144742	
(86)(22)出願日	令和1年5月2日(2019.5.2)		ロンドン スクール オブ ハイジーン ア	
(65)公表番号	特表2021-526547(P2021-526547		ンド トロピカル メディシン	
	A)		LONDON SCHOOL OF HY	
(43)公表日	令和3年10月7日(2021.10.7)		GIENE & TROPICAL ME	
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/061266		DICINE	
(87)国際公開番号	WO2019/211386		イギリス国, ロンドン ダブリュシー	
(87)国際公開日	令和1年11月7日(2019.11.7)		1イー 7エイチディー, ケッペル スト	
審査請求日	令和4年4月18日(2022.4.18)		リート	
(31)優先権主張番号	1807303.1	(73)特許権者	507299817	
(32)優先日	平成30年5月3日(2018.5.3)		ユーシーエル ビジネス リミテッド	
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		イギリス国 ダブリュシー1イー 6ビー	
前置審査		(74)代理人	100103034	
			ユニバーシティ カレッジ ロンドン	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 複合糖質ワクチン

(57)【特許請求の範囲】

- 【請求項1】
- S. ニューモニエ英膜多糖でグリコシル化されたS. ニューモニエタンパク質抗原を含む複合糖質であって、前記タンパク質抗原がPiuAであり、前記PiuAタンパク質抗原が、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含む、複合糖質。
- 【請求項2】
- 前記タンパク質抗原が異種グリコシル化シークオンを含む、請求項1に記載の複合糖質。
- 【請求項3】
- 前記異種グリコシル化シークオンが配列D/E-Y-N-X-S/Tを含み、前記Y及びXが、Pを除く任意のアミノ酸である、請求項2に記載の複合糖質。
- 【請求項4】
- 前記タンパク質抗原が、2種以上の前記異種グリコシル化シークオンを含む、請求項2又は3に記載の複合糖質。
- 【請求項5】
- 前記タンパク質抗原が、配列番号2、5又は8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、請求項2～4のいずれか1項に記載の複合糖質。
- 【請求項6】
- 前記英膜多糖が血清型4の英膜多糖である、請求項1～5のいずれか1項に記載の複合糖質。
- 【請求項7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の 1 種以上の複合糖質及び薬学的に許容される賦形剤を含む、ワクチン組成物。

【請求項 8】

アジュバントをさらに含む、請求項 7 に記載のワクチン組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の 1 種以上の複合糖質と、薬学的に許容される賦形剤と、任意にアジュバントとを混合することを含む、ワクチン組成物の製造方法。

【請求項 10】

個体の S. ニューモニエ感染症の処置への使用のための、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の複合糖質又は請求項 7 若しくは 8 に記載のワクチン組成物。

【請求項 11】

前記 S. ニューモニエ感染症が、細菌性髄膜炎、敗血症、肺炎又は中耳炎である、請求項 10 に記載の使用のための複合糖質又はワクチン組成物。

【請求項 12】

前記処置が予防的処置である、請求項 10 又は 11 に記載の使用のための複合糖質若しくはワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複合糖質ワクチン及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ストレプトコッカス ニューモニエ(肺炎球菌)は肺炎、敗血症、髄膜炎の最も一般的な原因の一つである偏性のヒト病原菌であり、その結果、世界的な罹患率及び死亡率の大きな原因となっている。S. ニューモニエ髄膜炎は、その高い致死率と、特に小児や高齢者の間での神経学的後遺症に伴う生活の質の低下により、特に懸念されている。

【0003】

肺炎球菌複合ワクチン(PCV)の導入は、ワクチン血清型による髄膜炎を含む S. ニューモニエの感染症の発生率を減らすのに非常に効果的である(1-8)。例えば、PCVは、ワクチン接種した小児や集団免疫によりワクチン接種していない成人集団において、ワクチン血清型に起因する S. ニューモニエ感染症の大幅な減少をもたらした(1, 2, 4, 13)。しかし、現在のPCVには3つの大きな欠点がある。第一に、血清型(STs)の原因となる優性な疾患は、地理的及び年齢層によって異なるが、既存のPCV製剤は定められており、容易に変更することができない。そのため、現在のPCVは、異なる集団及び／又は疾患の間で S. ニューモニエの発生率にさまざまな影響を与えている(9)。例えば、S. ニューモニエ髄膜炎は世界的にかなりの罹患率と死亡率を引き起こし続けており、特にサハラ以南のアフリカでは、S. ニューモニエ髄膜炎は毎年1歳未満の小児10万人あたり98人もの罹患患者を出している(38)。第二に、90以上の S. ニューモニエの莢膜血清型が存在し、PCVはこれらのうち13種だけ鼻咽頭でのコロニー化(細菌の通常の生態学的ニッチ)を防ぐため、PCVの導入は、髄膜炎の症例を含む非ワクチン血清型の大きな拡大と関連している(5, 7, 8)。この細菌の自然な能力は、S. ニューモニエの莢膜血清型の数はさらに増加する可能性が高く、非ワクチン血清型の有病率の拡大に伴い疾病発生率も同時に増加することが導かれることを示す(10-13)。第三に、PCVワクチンは高価であるため、病気の負担が最も大きい低・中所得国(LMICs)での使用が制限され、成人のワクチンの費用対効果を妨げている(14, 15)。したがって、小児期及び成人の疾病を予防し、S. ニューモニエの生態の変化に合わせて抗原の含有量を柔軟に調整し、何らかの形態の交差血清防御を提供する低コストの S. ニューモニエワクチンは、世界的に必須である。

【0004】

現在のPCVの製造は、個々の莢膜多糖の精製及びタンパク質担体への化学結合という多段階の工程を必要とし、高価で時間がかかる。レン(Wren)のグループは、大腸菌(Escher

10

20

30

40

50

ichia coli)で組換えタンパク質/グリカン構造を製造するために、カンピロバクター・オリゴサッカリル・トランスフェラーゼ、CjPglBを使用する、タンパク質グリカンカップリング技術(PGCT)と呼ばれる代替的なアプローチを開拓した(16、17)。PGCTは、E. コリにおいて、標的グリカン遺伝子、タンパク質/グリカン結合を確実にするための追加の「グリコタグ」配列を持つ担体タンパク質抗原をコードする遺伝子、及びカップリング酵素CjPglBの共発現を必要とする(18)。ワクチン製造物は、製造のために容易にスケールアップし得るE. コリバッチ培養からのシングルステップNi²⁺アフィニティークロマトグラフィー手順によって製造される。さらに、PGCTは、PCV内に含まれる血清型の柔軟性を高め、異なる標的集団や地理的な場所での主要な血清型に合わせてワクチンを調整することができ、S. ニューモニエの生態の変化に対応して迅速に再調合し得る。

【0005】

PGCTのもう一つの利点は、異なるタンパク質抗原を容易に莢膜抗原と結合させ得ることである。化学結合ワクチンの基礎科学は、1990年にヘモフィルス インフルエンザ b型に対する最初の商業化が行われて以来、ほとんど進歩していない。現在までに、複合糖質ワクチン製剤で認可されているのは、クロストリジウム テタニヤコリネバクテリウム ジフテリア由来の不活性化毒素(CRM₁₉₇)、H. インフルエンザの表面発現タンパク質(プロテインD)及びN. メニンギチディス・血清型Bの4つの主要な担体タンパク質のみである(19、20)。タンパク質の広範囲の免疫学的可能性はまだ試験されていないが、複合糖質のグリカン成分に対する抗体応答の効率は、異なるペプチド間で変化する(21、22)。グリカン抗原に融合されたときに良好な抗体応答を刺激する追加のタンパク質を特定することで、複合糖質ワクチンの開発を支援し得る。担体タンパク質としてS. ニューモニエタンパク質抗原を使用することにより、タンパク質への適応応答を誘導するという追加の利点を提供し得る。複数のS. ニューモニエタンパク質抗原は、ワクチンとして使用すると、抗体を介したオプソニン食作用(23)、細菌タンパク質機能の阻害(24、25)及びTh17細胞応答の刺激(26-28)を介して、動物モデルで防御免疫を形成し得ることが記載されており、そのうちのいくつかは、ヒトでのフェーズ1試験に進められている。防御S. ニューモニエタンパク質抗原は、タンパク質成分に対する適応免疫を介した血清型非依存性免疫をもたらし得るPCVを製造するためのPGCTアプローチの担体タンパク質として使用し得る。このようなワクチンは、また、選択された表面タンパク質抗原に対する抗体が血液脳関門への侵入を防ぐ可能性があるため、髄膜炎の予防にも理論的な利点を有するかもしれない(29-31)。

【0006】

PGCTは、フランシセラ ツラレンシスに対する有効なワクチンの試作に用いられており(32)、シゲラ フレクシネリPGCTワクチンが最近フェーズ1試験を完了した(33)。最近、PGCTを用いて、血清型4を含む4種の異なる型のS. ニューモニエ莢膜血清型との複合糖質を製造し得ることが確認された(17)。しかし、PGCTを用いて作製したPCVが、防御的な抗莢膜応答を誘導し、既存の市販PCVと同等の有効性を有するかどうかは確立されていない。さらに、S. ニューモニエタンパク質抗原が莢膜抗原の有効な担体タンパク質として作用し、防御応答を刺激し得るかどうかについてのデータはない。

【発明の概要】

【0007】

概要

本発明者らは、S. ニューモニエタンパク質抗原が、複数の莢膜血清型に対する防御免疫応答を生じ得る複合糖質ワクチンの免疫原性S. ニューモニエ莢膜多糖の担体として使用し得ることを見出した。

【0008】

本発明の第1の形態は、S. ニューモニエ莢膜多糖でグリコシル化されたS. ニューモニエタンパク質抗原を含む糖タンパク質を提供する。

【0009】

S. ニューモニエタンパク質抗原は、好ましくは、NanA、PiuA及びSp0148を含み、最も好ましくはPiuAである。

10

20

30

40

50

【0010】

本発明の第2の形態は、第1の形態の1種以上の糖タンパク質を含むワクチン組成物を提供する。

【0011】

本発明の第3の形態は、第1の形態の糖タンパク質又は第2の形態のワクチン組成物を、それを必要とする個体に投与することを含むS. ニューモニエ感染症の治療方法を提供する。

【0012】

本発明の第4の形態は、個体におけるS. ニューモニエ感染症の治療方法で使用するための、第1の形態の糖タンパク質又は第2の形態のワクチン組成物を提供する。

【0013】

第3及び第4の形態によるS. ニューモニエ感染症の治療は、予防的治療又は防御的治療を含み得る。

【0014】

本発明の他の形態及び実施形態を以下にさらに詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

図面の簡単な説明

【図1】図1は、組換え糖タンパク質を用いたワクチン接種が、肺炎球菌莢膜及び担体タンパク質に対する抗体を生成することを示す。組換え糖タンパク質(黒丸)又は同系の非グリコシル化抗原(白四角)をワクチン接種したマウス(n=8)から、ELISAにより測定した抗血清中の抗体レベル。図1A～Eは、抗莢膜多糖抗体が、精製4型莢膜多糖で被覆されたプレートを用いて測定されたことを示す。プレバナー13(Prevnar-13)(黒丸)及び偽ワクチンを接種した動物(白四角)由来の抗血清をコントロールとして使用した。図1F～Hは、抗担体タンパク質抗体が、モノクローナル抗His捕捉抗体及び組換え非グリコシル化担体タンパク質を用いたサンドイッチELISAにより、組み合わせ(Combo)(Sp4)(黒丸)又は組み合わせ(白四角)をワクチン接種したマウスを用いて測定されたことを示す。データは、テクニカルレプリケートからの平均±SEMとして表示される。

【図2】図2は、組換え糖タンパク質を用いたワクチン接種が、同種及び異種の肺炎球菌単離株を認識する抗体を生成することを示す。抗ST4抗体(図2A)及び抗ST2抗体(図2B)は、グリコシル化ワクチン及び非グリコシル化ワクチン群からプールされた抗血清を用いた全細胞ELISAによって測定された。データは、3つの別々の培養物からの平均±SEMとして表示される。*P<0.05 vs PBS #P<0.05 タンパク質 vs 糖タンパク質 ボンフェローニの事後検定を用いた一元配置ANOVA。図2Cは、グリコシル化及び非グリコシル化ワクチン群からプールされた抗血清を用いた、ST4及びST2を一晩培養した培養液由来の濃縮溶解液の免疫ブロット分析を示す。分子量マーカーはキロダルトン単位で示される。

【図3】図3は、溶連菌種に対する抗体沈着のフローサイトメトリー分析を示す。図3Aは、グリコシル化(赤の網掛け)及び非グリコシル化(灰色の網掛け)ワクチン群の10%抗血清中のS. ミティス(Sp4)と呼ばれるS. ニューモニエ血清型4莢膜を発現するS. ミティス株の抗体沈着についてのフローサイトメトリーヒストグラム(例)を示す。偽ワクチン接種血清(破線)をコントロールとして含めた。図3Bは、グリコシル化(黒丸)及び非グリコシル化(白四角)ワクチン群の10%マウス抗血清(n=8)中のS. ミティス(Sp4)についてフローサイトメトリー分析を用いて測定した抗体沈着を示す。赤い点は、高力価サンプルの抗血清濃度が低下している反応(5% vs 10%)を示す。* p<0.05 クラスカル-ウォリスとダンの事後検定(vs PBS)。図3Cは、グリコシル化ワクチン群の2%(赤の網掛け)、0.2%(灰色の網掛け)、及び0.02%(破線)の抗血清のTIGR4 S. ニューモニエ株に対する抗体沈着のフローサイトメトリーヒストグラム(例)を示す。図3Dは、グリコシル化又は非グリコシル化ワクチンを接種したマウスからプールした抗血清中のTIGR4の抗体沈着を示す。沈着力価は、標準曲線を生成するために、プレバナー13抗血清濃度を減少させつつインキュベートした細菌を用いて決めた。結果は、テクニカルレプリケートから平均±SEMとして表示

10

20

30

40

50

される。

【図4】図4は、非血清型4肺炎球菌に対する抗体沈着を示す。図4A～Dは、グリコシル化NanA(灰色の網掛け)、Sp0148(赤色の網掛け)、PiuA(青色の網掛け)、又は正常マウス血清(破線)でワクチン接種したマウス由来の、1%プールした抗血清中の同種及び異種肺炎球菌単離株の代表的なヒストグラム及び抗体沈着を示す。黒いバーはPE+菌の割合を表し、灰色のバーは陽性集団のgMFIを表す。ゲートは、自家蛍光における菌株固有の違いを評価するために、NMS応答においてイベントの5～10%がPE+となるように設定した。データは、テクニカルレプリケートからの平均±SEMとして表示される。図4Eは、組み合わせワクチン(緑色のチャンネル)及び肺炎球菌オムニ血清(赤色のチャンネル)のワクチンを接種したマウス由来の抗血清を用いた、同種及び異種の肺炎球菌単離株の免疫蛍光染色を示す。

10

【図5】図5は、S. ニューモニエとヒト好中球との相互作用に対する抗血清サンプルの効果を示す。図5Aは、グリコシル化(赤の網掛け)又は非グリコシル化(灰色の網掛け)ワクチン群からの20%の抗血清及び5%の幼令ウサギ補体由来の抗血清でオプソニン化したときの、FAM-SE標識TIGR4でインキュベートした新鮮なヒト好中球のフローサイトメトリーヒストグラムの例を示している。偽ワクチン接種血清(破線)をコントロールとして含めた。図5Bは、グリコシル化(黒丸)又は非グリコシル化(白四角)ワクチン群からの20%の抗血清(n=8)及び5%の幼令ウサギ補体でオプソニン化したときの、TIGR4と新鮮なヒト好中球との会合の割合を示している。プレベナー13(黒丸)と偽ワクチン(白四角)を接種した動物由来の抗血清を、コントロールとして含めた。* p<0.05 クラスカル-ウォリスとダンの事後検定(vs PBS)。図5Eは、グリコシル化(黒丸)又は非グリコシル化(白四角)ワクチン群からの20%の抗血清(n=6)及び5%の幼令ウサギ補体でオプソニン化したときの新鮮なヒト好中球と非4型肺炎球菌との会合の割合を示している。プレベナー13(黒丸)及び偽ワクチン接種動物(白四角)からの抗血清をコントロールとして含めた。

20

【図6】図6は、組換え複合糖質とワクチン接種することで、肺炎球菌による肺炎に対して相同ではあるが異種ではない防御を提供することを示す。マウスに、グリコシル化及び非グリコシル化混合ワクチンをワクチン接種し、48時間後 1×10^7 CFUのTUGR4(7A～B)又は血清型4(7C～E)を鼻腔内に投与した。細菌負荷は、連続希釈と植え付けによって決定した。* p<0.05 クラスカル-ウォリスとダンの事後検定(vs PBS)。

【発明を実施するための形態】

30

【0016】

詳細な説明

本発明は、ワクチン組成物に使用するための組換え糖タンパク質、特に、S. ニューモニエ莢膜多糖でグリコシル化されたS. ニューモニエタンパク質抗原を含む糖タンパク質に関する。これらの糖タンパク質は、複数のS. ニューモニエ血清型に対する防御免疫応答を生じ、髄膜炎などのS. ニューモニエ感染症の予防又は治療に有用であり得る。

【0017】

本明細書に記載の糖タンパク質は、S. ニューモニエタンパク質抗原と、1種以上のN結合型S. ニューモニエ莢膜多糖とを含んでもよく、すなわち莢膜多糖は、タンパク質抗原のAsn残基に共有結合されていてもよい(N-グリコシル化)。莢膜多糖とS. ニューモニエタンパク質抗原とは異種であってもよく、すなわち、S. ニューモニエタンパク質抗原は、天然系において莢膜多糖とグリコシル化されていなくてもよい。

40

【0018】

S. ニューモニエのような病原菌は、一般的に、細胞の周囲に防御外層を形成する多糖莢膜によって包まれている。莢膜多糖は、宿主B細胞と直接相互作用し、T細胞の非存在下でも抗体合成を誘導し得る。S. ニューモニエ莢膜多糖は、1種以上のB細胞エпитープを含み得る。莢膜内の多糖は、グリコシド結合によって結合された単糖サブユニットのホモ又はヘテロポリマーである。莢膜多糖中の単糖サブユニットの構成は、病原菌の血清型の違いによって細胞間で異なる。例えば、S. ニューモニエの90以上の異なる莢膜血清型が今日までに同定されている。

50

【0019】

本明細書中に記載された糖タンパク質において使用するためのS. ニューモニエ英膜多糖は、一般的なS. ニューモニエ血清型、例えば、1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F及び23Fを含み得る。S. ニューモニエ血清型由来の英膜多糖の構造は、当技術分野でよく知られている (Bentley and Spratt PLoS Genet. 2006 Mar; 2(3):e31 . Epub 2006 Mar 10)。

【0020】

いくつかの好ましい実施形態では、英膜多糖は、血清型4の英膜多糖である。

【0021】

本明細書に記載された糖タンパク質は、1種以上の英膜多糖部分、例えば2種、3種、4種、5種以上の英膜多糖部分を含み得る。いくつかの実施形態では、糖タンパク質は、2種の英膜多糖部分を含み得る。例えば、英膜多糖部分は、糖タンパク質内のグリコシル化シークオン、例えばタンパク質抗原のN末端及びC末端に結合し得る。

【0022】

糖タンパク質に結合した複数の英膜多糖部分は、同じ多糖又は異なる多糖であり得る。

【0023】

S. ニューモニエタンパク質抗原は、宿主内で免疫応答、好ましくはT細胞の応答を誘発し得る、S. ニューモニエで発現する任意のタンパク質であり得る。例えば、S. ニューモニエタンパク質は、1種以上のT細胞エпитープを含み得る。好ましいS. ニューモニエタンパク質抗原は、S. ニューモニエの複数株に対して交差防御免疫を誘導し、それに結合した英膜多糖に対する強力な抗体応答を支持する。

【0024】

好適なS. ニューモニエタンパク質は、当技術分野で知られており、ノイラミニダーゼA(NanA; spr1536; EC3.2.1.18)、PiuA(Sp1872)、及びSp0148を含む。最も好ましくは、PiuA(Sp1872)である。

【0025】

好適なPiuAタンパク質抗原は、データベースアクセス番号KGI34864.1、AOG58833.1、ANO37655.1、KGI33012.1、又は配列番号3のアミノ酸配列、又はこれらのいずれか1つのフラグメント又はバリエーションを含み得る。

【0026】

好適なNanAタンパク質抗原は、データベースアクセス番号NP_359129.1又は配列番号6のアミノ酸配列、又はこれらのいずれかのフラグメント又はバリエーションを含み得る。例えば、タンパク質抗原は、NanAのN末端レクチン様ドメインを含み得る。

【0027】

好適なSp0148タンパク質抗原は、データベースアクセス番号ABJ55394.1又はWP_000724951.1又は配列番号9のアミノ酸配列、又はこれらのいずれかのフラグメント又はバリエーションを含み得る。

【0028】

参照ポリペプチド配列のバリエーション、例えば、配列番号3、6又は9のうちの1つは、参照ポリペプチド配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0029】

ヌクレオチド及びアミノ酸配列同一性は、一般に、GAPアルゴリズム(GCG Wisconsin Package™, Accelrys, San Diego CA)を参照して定義される。GAPは、ニードルマン&ブンシュ アルゴリズムを使用して、一致する配列の数を最大化し、ギャップの数を最小化するように2つの完全な配列を並べる。一般的には、デフォルトのパラメータが使用される(ギャップ生成ペナルティ=12、ギャップ伸長ペナルティ=4)。GAPの使用が好ましいが、他のアルゴリズム、例えばBLAST、BLASTP又はBLASTN(アルツシュールらの方法を使用する)、FASTA(ピアソン及びリップマンの方法を使用する)、又はPSI-Search(スミ

10

20

30

40

50

ス-ウォーターマンアルゴリズムを使用する)などを使用してもよく、一般的にはデフォルトのパラメータを用いる[54-56, 75]。

【0030】

タンパク質抗原は、例えば、1アミノ酸、2アミノ酸、3アミノ酸、4アミノ酸、5～10アミノ酸、10～20アミノ酸、20～30アミノ酸、又は30～40アミノ酸又はそれ以上のアミノ酸の挿入、付加、置換又は欠失によって、例えば配列番号3、6又は9のいずれかの参照ポリペプチド配列とは異なるアミノ酸配列を含み得る。

【0031】

タンパク質抗原は、例えば、配列番号3、6又は9のいずれかの参照ポリペプチド配列のフラグメント、又は参照ポリペプチド配列のバリエーションであり得る。フラグメントは、全長配列の少なくとも1つの免疫原性決定因子を含み、免疫原性を保持する、全長配列よりも少ないアミノ酸からなる切断されたポリペプチドである。好適なフラグメントは、全長配列の少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250又は少なくとも300のアミノ酸を含み得る。

【0032】

全長タンパク質抗原のフラグメントは、タンパク質抗原が由来するS. ニューモニエ血清型又は株、好ましくは他の血清型又は株と同様に全長抗原を認識する免疫応答を(必要に応じて、適切にアジュバントされた場合に)亢進させ得る。好適なフラグメントは、例えば、フラグメントのパネルの生成に続く潜在的な免疫原性部位のインシリコモデリング及び哺乳動物防御モデルにおけるインビボ試験によって同定され得る。

【0033】

ワクチン組成物中で使用するための好適なタンパク質抗原は、シグナルペプチド配列を欠き得る。

【0034】

S. ニューモニエタンパク質抗原は、グリコシル化シークオンを含み得る。グリコシル化シークオンは、タンパク質内の連続したアミノ酸の短い配列であり、多糖部分の結合部位を形成する。莢膜多糖は、タンパク質抗原のグリコシル化シークオン内のAsn残基に共有結合し得る。

【0035】

グリコシル化シークオンの選択は、糖タンパク質を製造するために使用するオリゴサッカリル・トランスフェラーゼに依存し得る。カンピロバクター・ジェジュニPglBによって認識される好適なグリコシル化シークオンは、配列D/E-Y-N-X-S/T (配列中、Y及びXはPを除く任意のアミノ酸である)を含み得る。例えば、グリコシル化シークオンは、DQNAT配列を含み得る。他のオリゴサッカリル・トランスフェラーゼとの使用に適した他のグリコシル化シークオンは容易に決定し得る。

【0036】

グリコシル化シークオンは異種、すなわち、シークオンはタンパク質抗原の配列中に天然に存在しないものであり得、組換え技術によって組み込まれ得る。タンパク質抗原の配列にグリコシル化シークオンを組み込むための好適な方法は、当技術分野でよく知られている。いくつかの実施形態では、異種グリコシル化シークオンは、1つ以上のG残基、例えばG、又はGGなどのリンカー残基の側に位置し得る。

【0037】

タンパク質抗原は、1つのグリコシル化シークオン又は複数のグリコシル化シークオンを含み得る。例えば、タンパク質抗原は、2種のグリコシル化シークオンを含み得る。好ましくは、グリコシル化シークオンは、タンパク質抗原のN末端に位置し得るか(又はN末端リーダー配列に隣接するか)又はタンパク質抗原のC末端に位置し得る(又はC末端精製タグに隣接する)。

【0038】

いくつかの実施形態では、前駆体として糖タンパク質を細胞から培地中に直接分泌させるために、タンパク質抗原は、リーダーペプチドと結合され得る。好適なリーダーペプチ

10

20

30

40

50

ドの範囲は、当技術分野で知られており、DsbAリーダ配列MKKIWLALAGLVLAFSASA AQ又はそのバリエーションを含む。リーダペプチドは、タンパク質抗原に対して異種であってもよく、すなわち、タンパク質抗原と天然では連結しないリーダ配列であり得る。リーダペプチドは、前駆体糖タンパク質のN末端に位置してもよい。リーダペプチドは、前駆体の発現後に翻訳後プロセスによって除去されて、糖タンパク質が生成される。

【0039】

糖タンパク質は、精製タグをさらに含み得る。精製タグは、特定の結合対の一方を形成する異種アミノ酸配列である。精製タグを含むポリペプチドは、特定の結合対の他方がポリペプチドに結合することを介して、検出、単離及び／又は精製され得る。例えば、精製タグは、抗体分子によって結合されるエピトープを形成し得る。

【0040】

様々な好適な精製タグが当技術分野で知られており、例えば、MRGS(H)₆、DYKDDDD K(F)、(FLAGTM)、T7-、S-(KETAAAKFERQHMDs)、ポリ-Arg(R₅₋₆)、ポリ-His(H₆₋₁₀)、ポリ-Cys(C₄)、ポリ-Phe(F₁₁)、ポリ-Asp(D₅₋₁₆)、Strept-tag II(WSHPQFEK)、c-myc(EQKLISEEDL)、インフルエンザ-HAタグ[66]、Glu-Glu-Phe tag[67]、Tag. 100 (Qiagen ; 哺乳類MAPキナーゼ2由来の12aaタグ)、Cruz tag 09TM(MKAEFRRQESDR、Santa Cruz Biotechnology社)、及びCruz tag 2TM(MRDALDRLDRLA、Santa Cruz Biotechnology社)などが挙げられる。

【0041】

いくつかの好ましい実施形態では、例えばC末端(His)₁₀配列などのポリ-His精製タグが採用され得る。発現後、ポリ-Hisタグを含む糖タンパク質は、二価ニッケル又はコバルトイオンとの結合を含むアフィニティー樹脂を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって単離され得る。アフィニティー樹脂を用いるポリ-Hisタグ付加糖タンパク質の精製は、当技術分野でよく知られている。任意に、ポリ-Hisタグは、精製後にタンパク質分解切断によって除去されて、タンパク質抗原が製造され得る。

【0042】

グリコシル化シークオン、Hisタグ及びリーダペプチドを含む、好適なS. ニューモニエタンパク質抗原は、配列番号2、5又は7のいずれか1つのアミノ酸配列、又はこれらのいずれか1つのフラグメント又はバリエーションを含み得る。また、本明細書に開示されているのは、リーダペプチド及び任意にHisタグのない配列番号2、5又は7である。

【0043】

上述の糖タンパク質は、任意の好適な方法で製造し得る。好ましくは、糖タンパク質は、タンパク質グリカンカップリング技術(PGCT)によって製造される(例えば、16~18、41、42を参照)。例えば、本明細書に記載された糖タンパク質を生産する方法は、以下の(i)~(iii) ;

(i) オリゴサッカリル・トランスフェラーゼ ;

(ii) S. ニューモニエの莢膜多糖 ; 及び

(iii) S. ニューモニエタンパク質抗原

を微生物細胞内で発現させることを含んでもよく、例えば、オリゴサッカリル・トランスフェラーゼが、病原菌の莢膜多糖を有する病原菌タンパク質抗原をグリコシル化して糖タンパク質を製造する。

【0044】

微生物細胞は、原核細胞、好ましくはE コリ細胞であり得る。

【0045】

糖タンパク質を生産するための微生物細胞は、(i) オリゴサッカリル・トランスフェラーゼをコードする異種核酸、(ii) 異種の莢膜多糖合成遺伝子座、及び(iii) 病原菌タンパク質抗原をコードする異種核酸を含み得る。異種の核酸及び遺伝子座は、微生物細胞内の染色体外のプラスミド上に存在し得るか、又は微生物細胞のゲノムに組み込まれ得る。

【0046】

本発明の微生物細胞は、

10

20

30

40

50

- (i) オリゴサッカリル・トランスフェラーゼをコードする異種核酸
- (ii) 異種*S. ニューモニエ*の莢膜多糖生合成遺伝子座；及び
- (iii) *S. ニューモニエ*タンパク質抗原をコードする異種核酸

で微生物細胞を形質転換することを含む方法によって製造し得る。

【0047】

微生物細胞を形質転換する好適な方法は、当技術分野でよく知られている。異種核酸及び遺伝子座は、1種以上のベクター、例えばプラスミドに含まれ得る。いくつかの実施形態では、異種核酸及び遺伝子座は、すべて別のベクターに含まれ得る。他の実施形態では、2種以上の異種核酸及び異種遺伝子座が同じベクターに含まれ得る。

【0048】

微生物細胞は、オリゴサッカリル・トランスフェラーゼ、タンパク質抗原、及び莢膜多糖を発現させるために、例えばバイオリクター又は発酵槽などの細胞培養容器中で、標準的な条件で培養し得る。

【0049】

オリゴサッカリル・トランスフェラーゼ(EC 2.4.1.119)は、莢膜多糖を有するタンパク質抗原のグリコシル化シークオンのAsn残基のグリコシル化を触媒する。特定の莢膜多糖基質の結合に適したオリゴサッカリル・トランスフェラーゼは、標準的な技術を用いて容易に同定され得る。いくつかの好ましい実施形態において、オリゴサッカリル・トランスフェラーゼは、PglB、好ましくは細菌性PglB、例えば、ヘリコバクター・プルオルムPglB、デスルフォビブリオ・デスルフリカンスPglB、カンピロバクター・ラリPglB、及びカンピロバクター・ジェジュニPglBであり得る。好ましいPglBは、データベースアクセッション番号A87642.1又はYP_002344519.1又は配列番号10のアミノ酸配列、又はそのバリエーション又はフラグメントを含み得る。

【0050】

*S. ニューモニエ*タンパク質抗原及び*S. ニューモニエ*莢膜多糖については、上記でより詳細に説明したとおりである。PGCTを用いて結合させるための*S. ニューモニエ*莢膜多糖は、ウンデカプレノールピロリン酸脂質アンカーに結合し得る。いくつかの実施形態では、例えばオリゴサッカリル・トランスフェラーゼがカンピロバクター・ジェジュニPglBである場合、莢膜多糖は、C2の位置にアセトアミド基を含む還元末端糖を含み得る。

【0051】

*S. ニューモニエ*莢膜多糖は、異種莢膜多糖生合成遺伝子座又はオペロンから微生物細胞内で産生され得る。多糖生合成遺伝子座とは、微生物細胞内で莢膜多糖を生成するために必要な遺伝子を含む*S. ニューモニエ*ゲノムの領域を指す。多糖生合成遺伝子座は、*S. ニューモニエ*ゲノムのAliA遺伝子とDexB遺伝子との間に位置し、そのN末端に4つの保存遺伝子を有する。異なる*S. ニューモニエ*血清型の多糖類生合成遺伝子座が、当技術分野において報告され(例えば、Bentley and Spratt PLoS Genet. 2006 Mar;2(3):e31. Epub 2006 Mar 10を参照)、標準的な遺伝子解析技術を用いて、任意の*S. ニューモニエ*ゲノム中で同定され得る。

【0052】

*S. ニューモニエ*莢膜多糖の生合成遺伝子座は、*S. ニューモニエ*血清型の細胞から得られ、微生物細胞内で発現させるためのベクターにクローニングして、莢膜多糖を生成し得る。細胞内の異種生合成座からの莢膜多糖の生成は、当技術分野において十分に確立されている(16~18, 41, 42)。

【0053】

糖タンパク質は、微生物細胞内で製造した後、単離及び／又は精製し得る。これは、当技術分野において知られている任意の都合のよい方法を用いて達成し得る。組換え糖タンパク質の精製のための技術は、当技術分野においてよく知られており、例えば、HPLC、FPLC又はアフィニティークロマトグラフィーを含む。いくつかの実施形態では、精製は、上述のように、糖タンパク質上のアフィニティタグを使用して行われ得る。

【0054】

糖タンパク質は、本明細書に記載されているように、薬学的に許容される賦形剤及び任意にアジュバント及び／又は1種以上の異なる糖タンパク質と共に製剤化され、例えば、免疫原性製剤又は治療に用いるワクチン組成物を製造し得る。ワクチン組成物は、上記に詳細に記載されている。

【0055】

莢膜多糖及びタンパク質抗原はともに免疫原性であり、莢膜多糖及びタンパク質抗原の両方に対する適応的免疫応答が、糖タンパク質が投与された個体において誘発され得る。免疫応答は、抗体産生などのT細胞依存性免疫応答及びT細胞非依存性免疫応答を含み得る。いくつかの好ましい実施形態では、糖タンパク質は、T細胞依存性免疫応答及びT細胞非依存性免疫応答の両方を誘発し得る。

10

【0056】

糖タンパク質は、S. ニューモニエに対する防御免疫応答を提供し得る。例えば、糖タンパク質は、個体がその後S. ニューモニエに曝露されたときに、防御免疫応答を刺激、促進、又は増強し得る。糖タンパク質は、莢膜多糖及び／又はタンパク質抗原が得られるS. ニューモニエ血清型、又は莢膜多糖類及び／又はタンパク質抗原が得られるS. ニューモニエ血清型以外のS. ニューモニエ血清型に対する防御免疫応答を刺激し得る。例えば、糖タンパク質は、複数のS. ニューモニエ血清型に対する防御免疫応答を刺激し得る。いくつかの実施形態では、防御免疫応答は、血清型に依存しないものであり得る。

【0057】

上述の1種以上の糖タンパク質は、ワクチン組成物に製剤化され得る。

20

【0058】

ワクチン組成物は、1種以上の免疫原性成分を含み、1種以上の免疫原性成分に対する防御免疫応答を個体内で生じ得る免疫原性製剤である。本明細書に記載のワクチン組成物の免疫原性成分は、1種以上の糖タンパク質のS. ニューモニエタンパク質抗原及びS. ニューモニエ莢膜多糖を含み得る。

【0059】

本明細書に記載のワクチン組成物は、個体におけるS. ニューモニエに対する免疫応答を誘導し得るS. ニューモニエ由来のタンパク質及び多糖抗原を含み得る。タンパク質及び多糖抗原は、例えば、S. ニューモニエに曝露された血清、例えばS. ニューモニエに曝露されたヒト血清に対して免疫応答性であり得る。

30

【0060】

ワクチン組成物は、上述の1種の糖タンパク質、より好ましくは複数の糖タンパク質、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10種又はそれ以上の異なる糖タンパク質を含み得る。組成物中の複数の糖タンパク質は、複数の異なるタンパク質抗原及び／又は複数の異なる莢膜多糖を含み得る。例えば、ワクチン組成物は、複数の異なるS. ニューモニエ莢膜多糖及び同一のS. ニューモニエタンパク質抗原；複数の異なるS. ニューモニエタンパク質抗原及び同一のS. ニューモニエ莢膜多糖；又は複数の異なるS. ニューモニエタンパク質抗原と複数の異なるS. ニューモニエ莢膜多糖を有する糖タンパク質を含み得る。

【0061】

ワクチン組成物は、アジュバントをさらに含み得る。アジュバントは、個体における抗原に対する免疫応答を増加又は増強する非免疫原性物質である(レビューについては、例えば、Vaccine Adjuvants: adjuvants: preparation methods and research protocols Ed O'Hagan (2000) Springerを参照)。

40

【0062】

好適なアジュバントの例としては、例えば、水酸化アルミニウム及び／又はリン酸アルミニウムのようなアルミニウム及びアルミニウム塩；emulsigen(商標:MVP Technologies Inc)、Addavax(商標)及びMF59(商標)(例えば、WO 90/14837を参照)のようなスクワレン水エマルジョンを含むオイルエマルジョン組成物(又はオイル-イン-ウォーター組成物)；QS21及び免疫刺激複合体(ISCOMS)(例えば、U.S. Pat. No. 5,057,540；WO 90/03184、WO 96/11711、WO 2004/004762、WO 2005/002620を参照)のような

50

サポニン製剤；TLR7アゴニスト（例えばWO 2012/117377を参照）のようなToll様受容体（TLR）アゴニスト及び任意にアルミニウム塩との組み合わせ；モノホスホリル脂質A（MPL）、3-O-脱アシル化MPL（3dMPL）、フラジェリン、CpGモチーフ含有オリゴヌクレオチド、ムラミルジペプチド（MDP）及び／又はE. コリ易熱性エンテロトキシンLT及びコレラ毒素CT及びそれらの非酵素的結合サブユニットのようなトレハロースジコリン酸（TDM）ADP-リボシル化細菌毒素、ポリI:Cのような細菌又は微生物の誘導体、ポリメチルメタクリレートなどのアクリル酸ポリマーを含むアニオン性ポリマー、アリルスクロースで架橋されたアクリル酸（例えば、Carbopol（商標）、Lubrizol及びポリエチレンイミン（PEI））、GMCSF、インターフェロン γ 、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターロイキン12、インターロイキン23、インターロイキン17、インターロイキン2、インターロイキン1、TGF β 、TNF α 、及びTNF β からなる群から選択されるサイトカインを含む。

10

【0063】

ワクチン組成物を製造する方法は、上記の1種以上の糖タンパク質を、薬学的に又は獣医学的に許容される賦形剤及び任意にアジュバントと混合することを含み得る。

【0064】

本明細書で使用される「薬学的に許容される」又は「獣医学的に許容される」という用語は、健全な獣医学的又は医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激性、アレルギー反応、又は他の問題又は合併症を伴わず、合理的な利益／リスク比に見合う、被験体（例えば、ヒト又は他の哺乳動物）の組織と接触して使用するのに好適な化合物、材料、組成物、及び／又は投与形態に関する。各担体、賦形剤等はまた、製剤の他の成分と適合するという意味で「許容し得る」ものでなければならない。

20

【0065】

好適な賦形剤及び担体は特に限定されないが、水、生理食塩水、緩衝生理食塩水、リン酸緩衝液、アルコール/水溶液、エマルジョン又は懸濁液が含まれる。従来採用されている他の希釈剤、アジュバント、及び賦形剤は、従来技術に従って添加し得る。そのような担体は、エタノール、ポリオール及びそれらの好適な混合物、植物油、及び注入可能な有機エステルを含み得る。緩衝剤及びpH調整剤もまた採用されてもよく、有機酸又は塩基から調製された塩を含むがこれらに限定されない。代表的な緩衝剤には、有機酸塩、例えば、クエン酸（例えば、クエン酸塩）、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸、フタル酸、トリス、トリメチルアミン塩酸塩、又はリン酸緩衝液の塩が含まれるがこれらに限定されない。非経口担体としては、塩化ナトリウム水溶液、リンゲルブドウ糖、ブドウ糖、トレハロース、スクロース、乳酸リンゲル、又は固定油などを含み得る。静脈内担体としては、例えばリンゲルブドウ糖をベースにした流動栄養補給剤、電解質補給剤などを含み得る。防腐剤及び他の添加剤、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤（例えば、EGTA；EDTA）、不活性ガスなどもまた、薬学的担体中に提供され得る。本明細書に記載のワクチン組成物は、担体の選択によって限定されない。上述の成分から、適切なpH、等張性、安定性及び他の従来の特性を有するこれらの薬学的に許容される組成物を調製することは、当技術分野の範囲内である。

30

【0066】

好適な担体、賦形剤等は、標準的な薬学の教科書、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences [71]及びThe Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th edit. R. C. Rowe et al, APhA Publications, 2003から見いだし得る。

40

【0067】

ワクチン組成物は、単位剤形で簡便に提供され得、薬学の技術分野でよく知られている任意の方法によって調製され得る。そのような方法は、1種以上の単離された免疫原性ポリペプチドを、1種以上の副成分を構成し得る上記の担体又は賦形剤と会合させるステップを含む。一般に、製剤は、活物質を、液体担体又は細かく分割した固体担体又はその両方と均一かつ均質に会合させることによって調製される。

【0068】

本明細書に記載のワクチン組成物は、投与経路に応じて、様々な形態で製造し得る。例

50

例えば、ワクチン組成物は、注射可能な使用に適した無菌水溶液又は分散液の形態で製造するか、又は凍結乾燥技術を用いて凍結乾燥形態で製造し得る。凍結乾燥ワクチン組成物は、典型的には約4℃に維持され、アジュバントの有無にかかわらず、安定化溶液、例えば生理食塩水又はHEPESで再構成し得る。ワクチン組成物はまた、懸濁液又はエマルジョンの形態で製造し得る。

【0069】

これらのワクチン組成物は、任意の従来の投与経路による投与に適した添加剤を含み得る。ワクチン組成物は、例えば、液体、粉末、エアロゾル、錠剤、カプセル、腸溶性コーティング錠剤又はカプセル、又は坐薬の形態で被験体に投与するために調製し得る。したがって、ワクチン組成物はまた、懸濁液、溶液、油性又は水性ビヒクル中のエマルジョン、ペースト、及び移植可能な徐放性又は生分解性製剤の形態であり得るが、これらに限定されない。徐放又は移植のための組成物は、例えば、エマルジョン、イオン交換樹脂、難溶性ポリマー又は難溶性塩などの薬学的に許容されるポリマー又は疎水性材料を含み得る。

【0070】

非経口投与(例えば、筋肉内注射を含む注射による)に適した製剤は、抗酸化剤、緩衝剤、防腐剤、安定化剤、静菌剤、及び、製剤を対象の受容者の血液と等張にする溶質を含み得る水性及び非水性の等張、パイロジェンフリーの無菌注射液；及び懸濁剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性の無菌懸濁液を含む。このような製剤の使用に適した等張性ビヒクルの例は、塩化ナトリウム注射、リンゲル溶液、又は乳化リンゲル注射を含む。典型的には、溶液中の有効化合物の濃度は、約1 µg/mlから約100 mg/ml、例えば、約10 µg/mlから約50 mg/mlである。非経口投与用のいくつかの製剤では、有効成分は、再構成された組成物の非経口投与の前に、好適なビヒクル(例えば、無菌パイロジェンフリー水)で再構成するために、乾燥した(すなわち、粉末又は顆粒状の)形態で提供されてもよい。他の有用な非経口投与可能な製剤は、微結晶形態、リポソーム調剤、又は生分解性ポリマー系の成分として有効成分を含むものが含まれる。

【0071】

ワクチン組成物は、単位投与又は複数回投与の密封容器、例えばアンプル及びバイアルで提供され得、滅菌液体担体、例えば使用直前の注射用水の添加のみを必要とする凍結乾燥(凍結乾燥)状態で保存され得る。

【0072】

ワクチン組成物は、任意の便利な投与経路によって被験体に投与し得る。いくつかの実施形態では、投与は、筋肉内、鼻腔内、経皮又は皮下経路などの非経口経路である。例えば、ワクチン組成物は、注射、好ましくは筋肉内注射によって投与し得る。

【0073】

ワクチン組成物の適切な投与量は、状況に応じて、個体によって、又は集団によって異なり得ることが理解し得る。最適な投与量を決定することは、一般的に、投与によるいずれかのリスク又は有害な副作用に対する治療効果のレベルのバランスをとることを含む。選択された投与量のレベルは、投与経路、投与時間、ワクチン組成物の排泄率、他の薬物、化合物、及び／又は組み合わせて使用される材料、及び種、品種、成熟度、性別、体重、状態及び個体の一般的な健康状態を含む様々な要因に依存するが、これらに限定されない。ワクチン組成物の量及び投与経路は、最終的には獣医又は医師の裁量に委ねられるが、一般的には、実質的に有害又は有害な副作用を引き起こすことなく有益な効果をもたらすのに十分なワクチン組成物の血清濃度を達成するための投与量である。

【0074】

治療は、ワクチン組成物の治療上の有効量を個体に投与することを含み得る。「治療上の有効量」とは、妥当な利益/リスク比に見合った、いくつかの所望の治療効果をもたらすのに効果的なワクチン組成物の量に関する。例えば、個体への投与のためのワクチン組成物の好適な量は、個体中の組成物中に存在する各多糖又はタンパク質抗原に対する防御免疫応答を生じる量であり得る。

【0075】

本明細書に記載されたワクチン組成物を投与された個体は、その後S. ニューモニエに曝露されたときに、S. ニューモニエに対する獲得及び/又は適応免疫応答を示し得る。これらの応答は、S. ニューモニエの感染によって引き起こされる罹患率又は死亡率に対する防御を付与し得る。ワクチン組成物は、例えば、S. ニューモニエの感染の可能性を減少させ、個体の感染の臨床的症状の重症度又は持続時間を減少させ、感染の臨床的症状の発現を予防又は遅延させ、又はS. ニューモニエへの感染に続く個体の死亡のリスクを予防又は減少させ得る。

【0076】

インビボでの投与は、1つの容量で、連続的又は断続的に(例えば、適切な間隔で分割された投与で)実施し得る。いくつかの実施形態では、ワクチン組成物は、個体におけるブースター効果を得るのに十分な時間間隔、例えば、少なくとも1週間、2週間、3週間又は4週間の投与間隔、好ましくは約2週間の投与間隔で、同一個体に2回以上投与し得る。個体へのワクチン組成物の初回用量の投与に続いて、追加用量を投与し得る。例えば、1~4週齢でレット(let)に初回用量を投与し、3~6週齢で追加用量を投与し得る。最も効果的な投与手段及び投与量を決定する方法は、当技術分野においてよく知られており、製剤及び治療される被検体によって異なる。例えば、いくつかの実施形態では、レット中の母体由来抗体のレベルが低下したとき(例えば、2~4週間後)、ワクチン組成物の初回容量を投与され得、次いで2週間後に追加容量を投与され得る。単回又は複数回の投与は、獣医又は医師によって選択された投与量のレベルとパターンで実施し得る。

【0077】

本明細書に記載された糖タンパク質又はワクチン組成物は、動物又は人体の治療方法における使用のためのものであり得る。本発明の別の態様は、個体又は個体の集団におけるS. ニューモニエ感染症の治療への使用のための本明細書に記載の糖タンパク質又はワクチン組成物；
個体又は個体の集団におけるS. ニューモニエ感染症の治療への使用のための医薬品の製造のための本明細書に記載の糖タンパク質又はワクチン組成物の使用；及び
それを必要とする個体又は個体の集団に本明細書に記載の糖タンパク質又はワクチン組成物を投与することを含むS. ニューモニエ感染症の治療方法を提供する。

【0078】

S. ニューモニエ感染症は、任意の血清型又は株のS. ニューモニエ、例えばS. ニューモニエ血清型4の感染、並びにS. ニューモニエ感染症の臨床的症状、及び細菌性髄膜炎、敗血症、肺炎、中耳炎、心臓感染症、心膜炎、敗血性関節炎及び突発性腹膜炎を含むS. ニューモニエ感染症に関連した状態を含む。

【0079】

S. ニューモニエ感染症は、標準的な診断基準を用いて同定又は診断され得る。

【0080】

本明細書に記載された治療は、S. ニューモニエへの曝露時に免疫応答を生成するために、個体又は集団の免疫系を感作し得る。これは、所望の治療効果、例えば、S. ニューモニエ感染によって引き起こされる罹患率又は死亡率に対する防御又は抵抗の向上を達成し得る。

【0081】

より好ましくは、本明細書に記載されるような治療は、予防的又は防止的治療であってもよい。すなわち、個体又は集団は、S. ニューモニエ感染症に罹患していなくてもよく、及び/又は治療の時点でS. ニューモニエ感染症の臨床的症状を示していなくてもよい。いくつかの実施形態では、個体又は集団は、S. ニューモニエ感染症に罹患しやすいか、又は罹患の危険性があり得る。

【0082】

例えば、糖タンパク質又はワクチン組成物は、S. ニューモニエに対する個体又は集団のワクチン接種又は免疫化において有用であり得る。本明細書に記載されるようなS. ニューモニエ感染症の治療は、個体又は集団におけるその後のS. ニューモニエ感染症を予防する

10

20

30

40

50

か、又はその効果を改善し得る。予防的又は防止的治療は、個体又は集団のS. ニューモニエ感染症に対する感受性を減少させ、S. ニューモニエによる鼻咽頭コロニー化を予防又は抑制させ、S. ニューモニエ感染症のリスク又は感染の可能性を減少させ、S. ニューモニエ感染症の重症化又は病変の持続危険又は他の臨床的症状を遅延又は減少させ、又は個体又は集団におけるS. ニューモニエ感染症の臨床的症状の始まりを抑止又は遅延させ、及び／又はS. ニューモニエ感染症によって引き起こされる罹患率又は死亡率を軽減又は抑止させ得る。

【0083】

本明細書に記載の糖タンパク質又はワクチン組成物による治療に適した個体又は集団は、ヒト又は非ヒト哺乳動物、例えば、馬などのウマ科の哺乳動物を含む、S. ニューモニエ感染に感受性のある非ヒト哺乳動物であってもよい。

10

【0084】

本明細書に記載の糖タンパク質又はワクチン組成物は、免疫化されていない集団と比較して、集団におけるS. ニューモニエ関連の罹患率又は死亡率を減少させ得る。例えば、S. ニューモニエへの曝露に続くS. ニューモニエ感染症の病変又は他の臨床的症状の発生率は、免疫化された集団において、未免疫化集団と比較して減少し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されたワクチン組成物で集団を免疫化することで、未処理の集団と比較して、S. ニューモニエ感染の臨床的症状を示す集団内の個体数を、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、又はより好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも80%減少させ得る。

20

【0085】

本発明の他の態様及び実施形態は、「含む(comprising)」という用語を「からなる(consisting of)」という用語に置き換えた上述の態様及び実施形態、及び「含む(comprising)」という用語を「から実質的にからなる(consisting essentially of)」という用語に置き換えた上述の態様及び実施形態を提供する。

【0086】

本出願は、文脈が他の方法を要求しない限り、上記態様及び上記実施形態のいずれかのすべての組み合わせを互いに開示していることが理解される。同様に、文脈が他の方法を要求しない限り、本出願は、好ましい及び／又は任意の特徴のすべての組み合わせを、単独で又は他の態様のいずれかと一緒に開示する。

30

【0087】

上記の実施形態の改変、さらなる実施形態及びその改変は、本開示を読むと当業者には明らかであろうし、そのようなものとして、これらは本発明の範囲内である。

【0088】

本明細書で言及されたすべての文書及び配列データベースの記載は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0089】

本明細書で使用される「及び／又は」は、指定された2つの特徴又は構成要素のそれぞれについて、他を有する又は有さずに、具体的に開示されているとしてとられるべきである。例えば、「A及び／又はB」は、それぞれが個別に本明細書に記載されている場合と同様に、(i)A、(ii)B、及び(iii)A及びBのそれぞれが具体的に開示されているとしてとられるべきである。

40

【実施例】

【0090】

実験

以下の実験では、PGCTを用いて、脳内皮細胞インバシンNanA(29)、Th17刺激抗原Sp0148(24)、及びABCトランスポーターPiuA(34)のN末端断片を荚膜血清型4抗原に結合させ、ワクチン接種及びS. ニューモニエ感染モデルマウスを用いて、これらの複合糖質の有効性を検証する。

50

【0091】

1. 材料と方法

1.1 細菌株と生育条件

本研究で使用した細菌株を表1に示す。大腸菌単離株は、通常、改変超至適培地(modified super optimal broth : SSOB)又は寒天培地で、28℃で培養された。必要に応じて、100 µg/ml アンピシリン、20 µg/ml テトラサイクリン及び/又は80 µg/ml スペクチノマイシンを添加した。S. ニューモニエ はコロンビア寒天基礎培地(Columbia horse blood agar plates)(E&O laboratories)又はブレインハートインフュージョン(brain heart infusion : BHI)培地で37℃、5% CO₂の条件で培養した。必要に応じて、5 µg/mlのゲンタマイシン又は75 µg/mlのストレプトマイシンを添加した。ストレプトコッカス・ミティスは、0.5%の酵母エキスを添加したトッド ヘヴィット ブロス(Todd-Hewitt broth)で37℃、5% CO₂の条件で培養した。S. ニューモニエ及びS. ミティスは、OD₆₀₀が約0.4~0.8になるまで培養され、20%グリセロール中の-80℃で使い切りの1mlアリコート中に保存した。保存密度は、連続希釈及び植え付けにより決定した。

【0092】

1.2 担体タンパク質遺伝子の合成と遺伝子改変

E. コリでの発現に最適化されたコドン、ノイラミニダーゼA (NanA, Spd1504)、ABCトランスポータータンパク質PiuA (Sp1872)及びSp0148をコードするDNA配列は市販のpUC57で合成され、pEXT21にサブクローニングした。実験初期には、全長NanAの大きさのため、高収率での組換え体の生産が困難であったため、タンパク質の機能に不可欠なN末端レクチン様ドメインは、補足の方法(29)で概説したようにpEXT21(nanA)にサブクローニングされた。PglBのグリコシル化を促進するために、合成担体タンパク質配列は、成熟タンパク質のN末端とC末端で、2つのスペーサーグリシン残基を挟んだDQNATシークオンを用いて修飾された。ペリプラズムターゲティングは、ネイティブシグナルペプチドをDsbAリーダー配列MKKIWLALAGLVLAFSASAAQと交換することによって促進された。C末端のデカ-His配列が、Ni-NTA精製を促進するために含まれた。NanAでは、内部EcoRI及びXbaI部位が同義変異によって置換された。市販のプラスミド構築物は、製造業者の指示に従い、ライブラリ効率の高いDH5α細胞(Life Technologies)にクローニングされ、20%グリセロール中に-80℃で保存された。合成担体タンパク質配列は、制限酵素EcoRI及びXbaI(New England Biolabs)を用いて、発現ベクターpEXT21にサブクローニングされた。

【0093】

1.3 発現株の調製

E. コリW3110及びW311B pB4-4細胞培養物は、一晚培養液から1:100量で接種され、OD₆₀₀が0.3~0.6となるまで培養された。培養物は氷上で冷却され、4000×gで10分間で遠心してペレット化され、0.5体積及び0.25体積の氷冷10%グリセロールで連続して洗浄された。コンピテントセルは1/250th容量の氷冷10%グリセロールで再懸濁され、50 µlのアリコートは、0.2cmのギャップキュベット中、2.5kV、200 Ω及び25 µFで、pEXT21(nanA)、pEXT21(piuA)又はpEXT21(sp0148)を有するように形質転換された。抗英膜免疫の発生中の脂質結合Sp4の役割を調べるために、W3110 pB4-4細胞は、pEXT21(piuA)を有するように形質転換された。発現が確認された単離株は、20%グリセロール中に-80℃で保存された。

【0094】

1.4 組換えタンパク質の調製

W3110 pEXT21 (nanA/piuA/sp0148)及びW311B pB4-4 pEXT20 pEXT21 (nanA/piuA/sp0148)単離株は、28℃で一晩培養され、1:100量でSSOB中に前培養された。細菌は、28℃、1mM IPTG及び4mM MnCl₂で一晩誘導する前に、2~3時間培養された。細胞は、14,000×gで遠心してペレット化され、圧力細胞ホモジナイザー(Stanstead)を用いて溶解された。溶解物は、25 U/mlのBenzonase Nuclease (Sigma-Aldrich)を用いてRTで20分間処理され、0.2 µmのMillex-GPシリンジフィルター(Millipore)を用

いて濾過された。初期の研究では、組換え(糖)タンパク質は、製造業者の指示に従い、Ni-NTA精製システム(Thermo Fisher Scientific)を用いて精製された。ワクチン接種研究のために、組換え(糖)タンパク質が、GE Healthcare社のHis-trap FFカラム及びAKTA精製機を使用した25~250 mMの線形イミダゾール勾配を用いて単離された。組換え(糖)タンパク質のみを含むフラクションが、SDS-PAGE及びクーマシー染色によって同定され、プールされ、Vivaspin 20遠心濃縮器(10,000 MWCO)を使用してPBSにバッファー交換された。タンパク質濃度は、Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Fisher)を用いて決定された。組換え(糖)タンパク質はフィルター滅菌され、PBS中で200 µg/mlに標準化され、-80℃で保存された。サンプルの純度はSDS-PAGEで確認された。

10

【0095】

1.5 SDS-PAGE及び免疫ブロッティング

組換えタンパク質(10 µl)は、4x LDSサンプルバッファー(Thermo fisher)4 µl及び0.5Mジチオスレイトール(Sigma-Aldrich) 2 µlと混合され、70℃で10分間加熱された。サンプルは、MOPSバッファー中のNuPAGE 12% bis-trisタンパク質ゲル上で分離され、製造業者の指示に従い、iblot2転写システムを使用してニトロセルロースメンブレンに転写された。メンブレンは、2.5%スキムミルク粉末(Marvel)及び0.1%正常ヤギ血清(Thermo Fisher)を添加したPBSTでブロックされた。血清型4ウサギ抗莢膜抗体(Statens Serum Institut, Denmark)及びモノクローナルマウス抗His IgG(Abcam)がそれぞれ1:1000及び1:5000の希釈倍率で一次抗体として使用された。1時間のインキュベーション後、メンブレンはPBSTで3回洗浄され、ヤギ抗ウサギIgG(IRDye800)及びヤギ抗マウスIgG (IRDye680)二次結合抗体を1:10000の希釈倍率で用い、45分間インキュベートされた。メンブレンは、LI-COR odyssey蛍光イメージングシステム(LI-COR Biosciences UK Ltd)で検出する前に、PBSTでさらに3回洗浄された。

20

【0096】

TIGR4及びD39溶解物は、一晚培養した培養液を加圧溶解することにより調製された。溶解物は0.2 µmフィルターでろ過され、Vivaspin 20遠心濃縮器(10,000 MWCO)を用いて10倍濃縮された。濃縮溶解物の10 µlアリコートは、上記のように、1:1000希釈マウス抗血清と1:10,000希釈ヤギ抗マウスIgG (IRDye800)を使用して、免疫ブロッティングによって分析された。密度測定は、LI-COR odyssey蛍光イメージングシステムを用いて行われた。

30

【0097】

1.6 ワクチン接種研究

雌の5-6週齢のCD1マウスがCharles Riverから購入され、4のケージに収容された。抗血清の生成及び肺炎惹起研究のために、マウスは、0日目に、Sigma adjuvant (Sigma-Aldrich)で1:1の割合で乳化された組換え(糖)タンパク質10 µgを腹腔内にワクチン接種された。追加免疫は21日目と35日目に皮下接種された。ポジティブコントロール群は、20 µlのPBSで1:5に希釈されたプレベナー13(Wyeth)を接種し、ブーストした。ネガティブコントロール群は、PBS及びSigma adjuvant単独で偽ワクチン接種された。コロニー化研究は、上記の腹腔内でワクチン接種されたマウスを使用し、2 µgの組換えタンパク質(アジュバントなし)、又は20 µlの希釈プレベナー13又はPBSを軽いイソフルラン麻酔下で経鼻的にブーストして実施された。肺炎研究のために、マウスを、イソフルラン麻酔下で50 µlのPBS中の 1×10^7 CFUのTIGR4に感染させた。マウスは感染後24時間で殺処理され、肺と血液中の細菌の負荷が評価された。

40

【0098】

1.7 抗莢膜及び抗タンパク質ELISA

抗莢膜応答を測定するために、Nunc Maxisorp 96ウェルプレートは、PBS中の0.5 µg/well精製4型肺炎球菌多糖(Statens Serum Institut, Denmark)で、4℃で一晩コーティングされた。ウェルは、2.5%スキムミルク粉末及び0.1%正常ヤギ血清を添加したPBSTでブロッキングされ、0.1%BSAと0.01%アジ化ナトリウムを添加したPBS中のマウス抗血

50

清の10倍希釈液とともに28℃で1時間インキュベートされた。ウェルはPBSTで3回洗浄され、HRP標識ヤギ抗マウスIgG(Abcam)の1:20,000希釈液で28℃で1時間、インキュベートされた。さらに3回洗浄した後、結合抗体は50 µlのテトラメチルベンジジンを用いて検出された。反応は50 µlの1M H₂SO₄を用いて停止され、OD₄₅₀がEL800マイクロプレートリーダー(BioTek Instruments)及び参照波長A₆₃₀を用いて測定された。適切な抗炎症膜抗体力価は、1:10000の任意の力価を有する抗プレバナー抗血清を用いて作成した標準曲線と比較して決定された。抗タンパク質応答は、4℃で一晩、PBS中の0.1 µgのモノクローナルウサギ抗his IgG(Abcam)でコートしたプレートを用いるサンドイッチELISAにより測定された。ウェルはPBSTで3回洗浄され、PBS中の1 µg/wellの組換えタンパク質を添加して28℃で2時間インキュベートされた。さらに3回洗浄した後、プレートはブロックされ、上記のようにマウス抗血清及びHRP標識ヤギ抗マウスIgGの10倍希釈液によってインキュベートされた。

10

【0099】

全細胞ELISAのために、TIGR4及びD39培養液は、OD₆₀₀が約0.4-0.8になるまで増殖され、洗浄され、10%グリセロール中でOD₆₀₀が0.4になるように再懸濁された。プレートは、100 µl/wellの標準化細菌で、RTで2時間インキュベートされ、細菌は4%ホルムアルデヒドで20分間固定された。プレートは洗浄され、上記のように、28℃で2時間、マウス抗血清の1:1000希釈液及びHRP標識ヤギ抗マウスIgGとともにインキュベートされた。

【0100】

1.8 抗体沈着分析

抗体沈着分析は、S. ニューモニエ及びS. ミティスの凍結株を用いて、前述のように実施された。簡潔に言うと、2x10⁶ CFU/ウェルの細菌が、終容量50 µlの希釈したマウス抗血清とともに、225 rpmで攪拌しながら37℃で30分間インキュベートされた。細菌を3000rpmで遠心してペレット化され、PBSで2回洗浄され、PE標識ヤギ抗マウスIgG(25 µl/well)の1:100希釈液とともにさらに30分間インキュベートされた。さらに2回洗浄した後、細菌は200 µl/wellの4%パラホルムアルデヒドで固定され、細菌集団の蛍光強度がFACSVerseシステムを使用するフローサイトメトリーによって測定された。TIGR4沈着力価は、1:10,000の任意の力価の抗プレバナー抗血清を用いて生成された標準曲線との比較によって決定された。

20

【0101】

1.9 オプソニン食細胞の取り込み分析

オプソニン食細胞の取り込み分析は、製造業者の指示に従い、MACSexpress磁気精製システムを使用し、健康なヒトドナーから精製された好中球を使用して行われた。S. ニューモニエの凍結株は1mlの0.1M炭酸水素ナトリウムに再懸濁され、FAM-SEを用いて37℃で30分間インキュベートされた。細菌はPBSで3回洗浄され、2x10⁶ CFU/ウェルの細菌は50 µlの終容量で希釈したマウス抗血清とともに、225 rpmで攪拌しながら37℃で30分間インキュベートされた。1ウェルあたり2x10⁴個の好中球を、50 µlのPBSに添加し、反応液はさらに30分間インキュベートされた。反応液は100 µl/ウェルの4%パラホルムアルデヒドで固定され、好中球集団の蛍光強度は、FACSVerseシステムを使用するフローサイトメトリーで測定された。

30

【0102】

1.10 統計解析

群の大きさと比較の数のための適切な統計解析は、GraphPad Prismを用いて行われた。フローサイトメトリーデータの解析は、FlowJoソフトウェアを用いて行われた。

【0103】

1.11 組換えタンパク質の製造

NanAのN末端レクチン様ドメインは、表S2に記載されたプライマーを用いて、pEXT2 1(nanA)からサブクローニングされた。商業的に合成されたNanA構築物の2つの断片は、Q5 High-Fidelity 2X Master Mix(New England Biolabs)及びpEXT-F/nanA-RとpEXT-R/nanA-Fのプライマー対を用い、98℃ 10秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒を30サイク

40

50

ル行う条件を用いてpEXT21(nanA)から増幅された。断片はPCR精製(QIAquick PCR Purification Kit、Qiagen)され、AvrII(New England Biolabs)で消化された。消化された断片はPCR精製され、T3 DNA ligase(New England Biolabs)を用いてライゲーションされた。再結合された応答混合物は、上述のように、pEXT-F/pEXT-Rプライマー対を用いたNanA(N末端)増幅のための鋳型として使用された。得られたインサートはPCR精製され、制限酵素EcoRI及びXbaIを用いてpEXT21にクローニングされた。NanAのレクチン様ドメイン、PglBのグリコシル化及びNi-NTA精製のために必要な遺伝的成分を含むpEXT21(NanA)プラスミドをDH5α細胞に形質転換し、-80℃で20%グリセロール中に保存した。

【0104】

2. 結果

2.1 組換え複合糖質を用いたワクチン接種は、莢膜及び担体タンパク質に対する抗体を生成する

NanA(Sp4)、PiuA(Sp4)及びSp0148(Sp4)が単離株から調製され、上記のように8匹のF CD1マウスの群に別々に(10 µg/マウス/注射)又は組み合わせて(各タンパク質4 µg/マウス/ワクチン接種)ワクチン接種するために使用された。同族のグリコシル化抗原、プレベナー13及びPBS単体(偽)ワクチン群が、抗タンパク質及び抗莢膜応答のためのコントロールとして含まれた。最後のワクチン接種から7日後にマウスから回収された血清において、血中抗莢膜抗体は、すべてのグリコシル化抗原群において検出限界を超え、タンパク質のみでワクチン接種した群では反応性は検出されなかった(図1A～図1E)。抗莢膜抗体のレベルは群間で顕著な差があったが、異なる製剤内に存在する糖タンパク質の相対的なレベルとは相関していないように見えた。グリコシル化の最高レベルはNanAサンプルで発生したが、PiuA複合糖質は最も強い抗莢膜免疫応答を刺激した(図1A)。3つの全ての複合糖質を組み合わせたワクチン接種は、プレベナー13で生成された応答と同様の強力な抗莢膜応答を生成した。抗担体タンパク質応答はサンドイッチELISAによって評価され、すべてのワクチン群が、選択された担体タンパク質に抗体陽転したことを確認した(図1F～図1H)。タンパク質抗原が血清型4のグリカンを持するか否かにかかわらず、強い体液性免疫応答が生成されたことから、グリコシル化がタンパク質抗原性に識別可能な影響を与えなかったことが示された。

【0105】

2.2 組換え複合糖質を有するワクチンを接種したマウスの血清中のS. ニューモニエの抗体認識

ワクチン接種したマウス由来の血清中のS. ニューモニエの抗体認識は、全細胞ELISA及び同種のS. ニューモニエ血清型4 TIGR4及び異種の血清型2 D39株でコーティングされたプレートを用いて評価された(図2A～B)。複合糖質をワクチン接種したマウス由来の血清は、プレベナー13をワクチン接種したマウス由来の血清と同様に、Sp0148群については同様のELISA力価、PiuA又は3つの複合糖質タンパク質を組み合わせたものではより高い力価でTIGR4を認識した(図2A)。NanA複合糖質をワクチン接種したマウスは、抗TIGR4抗体力価の有意でない増加が生じた。非グリコシル化PiuA及び3つのタンパク質のすべての組み合わせでワクチン接種されたマウス由来の血清中で、TIGR4に対する有意な抗体価もまた生成された。予想されたように、複合糖質又は対応するタンパク質をワクチン接種したマウスから回収された血清では、D39全細胞ELISAの力価に差がなく、Sp0148又は3つのタンパク質のすべての組み合わせをワクチン接種したマウスでは、抗体力価での有意な増加が見られた(図2B)。天然の肺炎球菌抗原の認識は、異なるPGCT複合糖質及びそれらの認識タンパク質でワクチン接種したマウス由来の血清を用いたS. ニューモニエ溶解物の免疫ブロッティングにより確認された(図2C)。研究のために選択された3つのタンパク質の認識は、複合糖質抗血清にプローブされたサンプル中の4型肺炎球菌莢膜の認識と同様に、TIGR4溶解物で確認された。抗莢膜ELISAの結果(図2A)と一致するように、異なるタンパク質-グリカン複合体は、血清型4型莢膜に対する反応性のレベルが変化し、最も強いシグナルは、PiuA(Sp4)及び組み合わせ(Sp4)複合糖質をワクチン接種したマウ

10

20

30

40

50

ス由来の血清で発生した。全細胞ELISAの結果と一致して、D39溶解液をワクチン接種したマウスの血清でプローブしたとき、Sp0148及びPiuAリポタンパク質もまた同定されたが、PiuAのシグナルは検出限界に近かった。これらのデータから、複合糖質分子のワクチン接種により、抗莢膜抗原と抗タンパク質抗原の両方を認識する抗体が生成され同種及び異種S. ニューモニエが単離されることが示された。

【0106】

2.3 組換え複合糖質のワクチン接種は、生きたS. ニューモニエをオプソニン化し得る抗体の産生を刺激する。

PGCT複合糖質を用いたワクチン接種が、生きた全S. ニューモニエの抗体認識を誘導するかどうかを評価するためにフローサイトメトリー分析が用いられた。具体的には、抗莢膜認識を調べるために、ワクチン接種群由来の血清を用いて、S. ニューモニエ血清型4莢膜(S. ミティス(SpT4))を発現するストレプトコッカス・ミティスの変異体へのIgG結合を評価した(36)。野生型S. ミティスの認識は検出されなかったが、S. ミティス(SpT4)は、本研究のために選択されたすべての群由来の個々の血清より認識された(図3A～図3B)。IgG結合の程度はワクチン群間で異なり、Sp0148及びNanA(Sp4)ワクチン接種群では、それぞれ4匹及び6匹のマウス由来の血清のみがS. ミティス(SpT4)を認識したのに対し、PiuA複合糖質又は3種のタンパク質複合糖質すべてをワクチン接種した8匹のマウス由来の血清は、S. ミティス(SpT4)への有意なIG結合を引き起こした(図3B)。これらの2つの群の抗体結合のレベルは、プレベナー13ワクチン接種群で達成されたものと同等であった。非グリコシル化タンパク質抗原のいずれかをワクチン接種したマウス由来の血清には、S. ミティス(SpT4)株に対する抗体沈着は見られず、肺炎球菌担体タンパク質及びS. ミティス細胞表面との間の交差応答性の欠如が確認された。これらのデータは、本研究のために選択された新規複合糖質のそれぞれが抗Sp4莢膜免疫応答を刺激し得るが、NanA及びSp0148複合糖質よりもPiuA複合糖質によってより強い反応が刺激されたというELISAの結果を裏付けるものである。

【0107】

フローサイトメトリーIgG結合分析は、TIGR株を用いて繰り返された。複合糖質ワクチン接種マウス群からプールしたマウス抗血清の段階希釈物とTIGRとのインキュベーションは、用量依存的なIgG結合を示した(図3C)。gMFIの読み取り値と、プレベナー13をワクチン接種したマウスの抗血清を用いて作成した標準曲線とを比較すると、4つの複合糖質ワクチンを接種したマウス由来の血清をインキュベートした反応で、高い表面抗体力価が示された(図3D)。加えて、グリコシル化されていないSp0148又はすべての3つのタンパク質の組み合わせでワクチン接種したマウス由来の血清では、表面IgG結合のレベルは検出可能であった(図3D)。IgGの表面沈着は、NanA又はPiuAの非グリコシル化抗原から得られた血清のネガティブコントロールと違いはなかった。莢膜の抗体認識とは独立して個々のタンパク質抗原を評価するために、他の莢膜血清型を有するS. ニューモニエへのIgG結合は、各複合糖質をワクチン接種したマウス由来のプールされた抗血清の固定濃度を用いて評価された。ワクチン接種したマウス由来の血清中の非血清型4株のIgG認識は、およそTIGR株よりも弱く、株間で異なった(図4A～D)。血清型23F株へのIgG結合のレベルは良好であり、血清型2株への結合のレベルは妥当であったが、6B株への結合はほとんどなかった。IgG結合を促進するための異なる抗原の能力は、株間で異なり、例えば、NanA株は血清型23F株で、Sp0148はTIGR株で最も弱い反応を誘導し、これはおそらく、個々のタンパク質抗原の発現レベルと、表面への接近性の違いを反映している。

【0108】

2.4 PGCT複合糖質をワクチン接種したマウス由来の血清中のS. ニューモニエに対する抗体結合の可視化

相同及び異種肺炎球菌単離株の認識は、組み合わせワクチン群由来の抗血清及び蛍光標識された抗マウス二次抗体を用いて、蛍光顕微鏡によってさらに調べられた(図4E)。全ての3つのPGCT複合糖質をワクチン接種したマウス由来の血清中のTIGR4株のインキュベーションは、プレベナー13をワクチン接種したマウス由来の血清に見られる結果と同様に

、細菌細胞全体で明るく、均一な表面染色をもたらし、相同血清型への高レベルのIgG結合を確認した。対照的に、そしてフローサイトメトリーのデータと一致して、PGCT複合糖質をワクチン接種したマウス由来の血清中の非血清株の蛍光染色は、より弱く、まばらで、株間でより変動した。しかし、3種すべてのタンパク質抗原をグリコシル化又は非グリコシル化した混合物のいずれかでワクチン接種したマウス由来の血清では、プレベナー13をワクチン接種したマウス由来の血清では認識されない血清型2株を含む、すべての血清型で染色された球菌が確認された。ELISAとともに、フローサイトメトリー及び免疫蛍光データは、PGCT複合糖質が、担体タンパク質間で強さが異なるが、プレベナー13でワクチン接種後に達成されたのと似た強さ(例えばPiuA複合糖質)であり得る抗莢膜IgG応答を誘導し得ることを示している。さらに、PGCT複合糖質は、異種S. ニューモニエ血清型をオプソニン化し得るタンパク質抗原に対する有意な抗体応答を刺激し、複数のS. ニューモニエ株に対する防御を提供する可能性がある。

【0109】

2.5 PGCTによって製造した組換え複合糖質によるマウスへのワクチン接種の防御効果
TIGR4上の抗体沈着の密度がオプソニン食作用を促進するのに十分かどうかを決定するために、新鮮に単離されたヒト好中球を用いて好中球取り込み分析が行われた(37)。PiuA (Sp4)複合糖質又は3つのすべてのタンパク質の複合糖質の組み合わせでワクチン接種したマウス由来の血清中でのインキュベーションは、ともにTIGR4 S. ニューモニエ株の好中球への取り込みを促進し、機能的な抗莢膜体免疫応答が、PGCTを用いて作られた組換え4型莢膜抗原に応答して生成されたことを示している(図5A)。しかし、Sp0148(Sp4)、NanA(Sp4)又はそれらの非グリコシル化タンパク質(単独又は組み合わせ)をワクチン接種したマウス由来の血清は、この分析において好中球食作用を促進することができなかった(図5B)。複合の組合せもまた、試験した非血清型4株について好中球食作用を促進することができなかった(図5C～図5E)。

【0110】

感染マウスモデルは、PGCTを用いて作られた複合糖質の防御効果を評価するために使用された。マウスは、プレベナー、又はすべての3種のPGCT複合糖質又は非グリコシル化タンパク質の組み合わせをワクチン接種され、そしてTIGR4株(敗血症を伴う肺炎モデル)又は髄膜炎の原因として知られる血清型4株を経鼻接種して惹起された。48時間後、マウスは殺処理され、標的臓器のCFUを用いて感染のレベルが評価された。TIGR4惹起モデルでは、3つのPGCT複合糖質の組み合わせのワクチン接種は、ほぼ完全に敗血症を防ぎ、結果として、プレベナー13のワクチン接種によって提供される防御のレベルと非常に類似した、肺CFUの約 $1 \log_{10}$ の減少をもたらした(図6A～図6B)。統計的に有意ではないが、非グリコシル化タンパク質のみの組み合わせでワクチンを接種したマウスの血液から回収されたCFU/mlの中央値は減少した。髄膜炎モデルでは、3つのPGCT複合糖質の組み合わせのワクチン接種は、完全に敗血症と髄膜炎を防止し、肺CFUの約 $3 \log_{10}$ の減少をもたらした(図6C～図6E)。先と同様に、これはプレベナー13のワクチン接種によって提供された防御のレベルと非常に類似した。非グリコシル化タンパク質のみの組み合わせでワクチン接種したマウスでは、血液データのみが統計的に有意だったが、血液、肺及び脳のCFUの中央値はすべてネガティブコントロールの結果よりも低かった。これらのマウスモデルからのデータは、PGCTを用いて製造したS. ニューモニエ莢膜及びタンパク質抗原が、同種のS. ニューモニエ血清型への感染に対して高い防御効果を発揮し得、既存の市販のPCV製剤によるワクチン接種と同等の防御効果が得られることを示す。さらに、タンパク質成分は、莢膜抗原とは独立した防御応答を産み出し、PGCTワクチンが交差血清防御を提供し得ることを示唆する。

【0111】

上記実験では、組換え血清型4莢膜でグリコシル化された3つの表面抗原を組み込んだ低コストの多成分、複合糖質ワクチンを製造するために、タンパク質グリカンカップリング技術が用いられている。本発明には以下のものが含まれる：

(a) PGCTを用いて作製したS. ニューモニエ複合糖質は、市販のPCVと同等の免疫原性が

10

20

30

40

50

あり、肺炎や髄膜炎のマウスモデルにおいて似たレベルの防御を提供する；

(b) S. ニューモニエタンパク質抗原は、確立された複合ワクチン担体タンパク質の1つの代わりに、PCVワクチンの担体タンパク質として使用し得る；

(c) PGCTを用いて製造した複合糖質の抗莢膜免疫原性は、担体タンパク質によって顕著に異なる；

(d) 担体タンパク質は、免疫原性であり、莢膜抗体に独立して髄膜炎や敗血症に対してある程度の防御を提供し得る抗体応答を刺激する。

このデータは、PGCTが、既存の化学結合法よりも安価で、髄膜炎を含む重篤なS. ニューモニエ感染症を防ぐために開発途上国で使用し得る、似たレベルの血清型特異的防御を生成するPCVの製造のための代替方法を提供し得ることを示す。さらに、PGCTは、S. ニューモニエタンパク質担体タンパク質の範囲を含むPCVを作り得、その結果、少なくともある程度の血清型に独立した免疫を提供する。

【0112】

ワクチン開発のために大きな意味を有する我々のデータの主な発見は、莢膜抗原に対する抗体応答を促進する追加の担体タンパク質の同定である。現在のところ、複合糖質を製造するために使用されているのは4つのタンパク質のみだが、我々のデータは、PiuAが追加の選択肢になることを示している。複合糖質を製造するために用いられる他の2つのタンパク質、Sp_0148及びNanAは、PiuAよりも抗グリカン応答を生成する効果はかなり弱かった。実際、組み合わせワクチンによって生成された抗莢膜応答の大部分は、グリコシル化PiuAの存在に起因したと考えられる。抗莢膜抗体の促進における担体タンパク質の効力にこのような著しい違いがあった理由は明らかではない。免疫プロットは、これは単にPiuA複合糖質の量が多いためではなく、実際にはNanA複合糖質が最も豊富であるように思われることを示唆した。担体タンパク質とグリコシル化の部位の選択は、強い抗莢膜IgG応答を生成するために重要であり、最近のデータは、複合糖質がMHCIIに結合したグリコシル化エピトープを、T細胞受容体に直接提示することによって、グリカンに対する抗体応答を生成することを示唆している(21, 22)。抗莢膜抗体応答の強さは、担体タンパク質の選択、及びおそらく莢膜抗原への共有結合の部位によって影響を受けるといふ、この機構は、我々のデータを説明するだろう。これらのデータは、追加のS. ニューモニエタンパク質をスクリーニングすることにより、莢膜又は他のグリカン抗原に対する強い抗体応答をもたらし得る複合糖質ワクチンの追加の担体タンパク質を特定すべきであることを示唆する。

【0113】

PGCTを用いて製造されたPCVのための担体タンパク質としてS. ニューモニエタンパク質抗原を用いる主な利点は、これらのタンパク質は、防御し得る追加の免疫応答を誘導し得ることである。タンパク質抗原に対するこの免疫応答はまた、純粋な抗体応答と比較して、粘膜免疫を理論的に促進し得るTH17応答(24, 40)を含むT細胞媒介免疫を含み得る。我々は、3つの保存されたS. ニューモニエタンパク質抗原、内皮細胞インバシンNanA(29)、Th17刺激抗原Sp0148(24)及びABCトランスポーターPiuA(34)に結合した4型肺炎球菌莢膜を組み込んだPGCTを用いて製造した組み合わせ複合糖質が、S. ニューモニエに対する相同及び異種免疫を刺激し得るかどうかを調べた。我々のデータは、担体タンパク質のワクチン接種が、生きたS. ニューモニエの異なる株を認識し得る良好な抗体応答を形成し得たことを確認している。これらのタンパク質単独でのワクチン接種は、S. ニューモニエの惹起後の血中及び髄膜に存在する細菌のCFUが減少し、担体タンパク質成分に対する抗体応答の防御能力があることが確認される。しかし、既知のTh17誘導抗原(SP_0148)を選択したにもかかわらず、これらのタンパク質を単独で接種しても肺レベルでの感染を防げず、全身感染に対する防御のレベルは、抗莢膜応答によって提供されるものよりも弱かった。さらに、3種のタンパク質に対する抗体応答は、異なるS. ニューモニエ株を認識する能力が異なった。

【0114】

要約すると、ここに提示されたデータは、PGCTは、血清型特異的な感染を防ぐという

10

20

30

40

50

点で、既存の市販のPCVと同等の効果を持つS. ニューモニエ複合糖質を作り得、さらに異種血清型に対する防御免疫を刺激し得ることを示す。

【0115】

【表1】

種	株	説明
E. コリ	W3110	K12 派生
E. コリ	W311B	染色体に挿入されたオリゴサッカ リル・トランスフェラーゼ PglB を含む W3110 派生
E. コリ	W3110 pB4-4	Spn. 4 型莢膜オペロンを含む W3110
E. コリ	W311B pB4-4	Spn. 4 型莢膜オペロンを含む W311B
E. コリ	W3110 pEXT21(NanA)*	組換え NanA 産生
E. コリ	W3110 pEXT21(PiuA)*	組換え PiuA 産生
E. コリ	W3110 pEXT21(Sp0148)*	組換え Sp0148 産生
E. コリ	W311B pB4-4 pEXT21(NanA)	グリコシル化 NanA 産生
E. コリ	W311B pB4-4 pEXT21(PiuA)	グリコシル化 PiuA 産生
E. コリ	W311B pB4-4 pEXT21(Sp0148)	グリコシル化 Sp0148 産生
E. コリ	W311B pB4-4 pEXT20	Sp4 グリコシル化促進
E. コリ	W311B pB4-4 pEXT21(NanA) pEXT20	グリコシル化 NanA 産生
E. コリ	W311B pB4-4 pEXT21(PiuA) pEXT20	グリコシル化 PiuA 産生
E. コリ	W311B pB4-4 pEXT21(Sp0148) pEXT20	グリコシル化 Sp0148 産生
E. コリ	W3110 pB4-4 pEXT21(PiuA) pEXT20	組換え PiuA/LLO 産生
S. ニューモニエ	TIGR4	血清型 4
S. ニューモニエ	D39	血清型 2
S. ニューモニエ	EF3030	血清型 19F
S. ニューモニエ	6B	血清型 6B
S. ニューモニエ	23F	血清型 23F
S. ミティス		野生型莢膜発現 S. ミティス
S. ミティス		Spn. 4 型莢膜発現 S. ミティス

* ワクチン製造のために用いた

【0116】

文献

1. Jacobs DM Yung F, Hart E, Nguyen MNH, Shaver A. Trends in pneumococcal meningitis hospitalizations following the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in the United States. *Vaccine*. 2017;35(45):6160-5.
2. Polkowska A, et al *BMJ Open*. 2017;7(5):e015080.
3. Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med*. 2009;360(3):244-56.
4. Bijlsma MW, Brouwer MC, Kasanmoentalib ES, Kloek AT, Lucas MJ, Tank MW, et al. Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006-14: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(3):339-47.
5. Alari A, Chaussade H, Domenech De Celles M, Le Foulher L, Varon E, Opadowski L, et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccines on pneumococcal meningitis cases in France between 2001 and 2014: a time series analysis. *BMJ medicine*. 2016;14(1):211.

6. Pirez MC, Mota MI, Giachetto G, Sanchez Varela M, Galazka J, Gutierrez S, et al. Pneumococcal Meningitis Before and After Universal Vaccination With Pneumococcal Conjugate Vaccines 7/13, Impact on Pediatric Hospitalization in Public and Nonpublic Institutions, in Uruguay. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(10):1000-1.
7. Nhantumbo AA, Weldegebriel G, Katsande R, de Gouveia L, Come CE, Cucu AZ, et al. Surveillance of impact of PCV-10 vaccine on pneumococcal meningitis in Mozambique, 2013 - 2015. *PLoS One.* 2017;12(6):e0177746.
8. Azevedo J, Dos Anjos ES, Cordeiro SM, Dos Santos MS, Escobar EC, Lobo PR, et al. Genetic profiles and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* non-PCV10 serotype isolates recovered from meningitis cases in Salvador, Brazil. *J Med Microbiol.* 2016;65(10):1164-70.
9. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis.* 2000;30(1):100-21.
10. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):871-99.
11. Skov Sorensen UB, Yao K, Yang Y, Tettelin H, Kilian M. Capsular Polysaccharide Expression in Commensal *Streptococcus* Species: Genetic and Antigenic Similarities to *Streptococcus pneumoniae*. *MBio.* 2016;7(6).
12. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(10):760-8.
13. Waight PA, Andrews NJ, Ladhani SN, Sheppard CL, Slack MP, Miller E. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(5):535-43.
14. Bonten MJ, Huijts SM, Bolkenbaas M, Webber C, Patterson S, Gault S, et al. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. *N Engl J Med.* 2015;372(12):1114-25.
15. van Hoek AJ, Miller E. Cost-Effectiveness of Vaccinating Immunocompetent >=65 Year Olds with the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in England. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149540.
16. Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science.* 2002;298(5599):1790-3.
17. Kay EJ, Yates LE, Terra VS, Cuccui J, Wren BW. Recombinant expression of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Open Biol.* 2016;6(4):150243.
18. Linton D, Dorrell N, Hitchen PG, Amber S, Karlyshev AV, Morris HR, et al. Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* N-linked protein glycosylation pathway. *Mol Microbiol.* 2005;55(6):1695-703.
19. Donnelly JJ, Deck RR, Liu MA. Immunogenicity of a *Haemophilus influenzae* polysaccharide-*Neisseria meningitidis* outer membrane protein complex conjugate vaccine. *J Immunol.* 1990;145(9):3071-9.
20. Forsgren A, Riesbeck K, Janson H. Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective nontypeable *H. influenzae* antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis.* 2008;46(5):726-31.

10

20

30

40

50

21. Avci FY, Li X, Tsuji M, Kasper DL. A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design. *Nat Med*. 2011;17(12):1602-9.
22. Stefanetti G, Hu QY, Usera A, Robinson Z, Allan M, Singh A, et al. Sugar-Protein Connectivity Impacts on the Immunogenicity of Site-Selective Salmonella O-Antigen Glycoconjugate Vaccines. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015;54(45):13198-203.
23. Genschmer KR, Accavitti-Loper MA, Briles DE. A modified surface killing assay (MSKA) as a functional in vitro assay for identifying protective antibodies against pneumococcal surface protein A (PspA). *Vaccine*. 2013;32(1):39-47.
24. Moffitt KL, Gierahn TM, Lu YJ, Gouveia P, Alderson M, Flechtner JB, et al. T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell Host Microbe*. 2011;9(2):158-65.
25. Malley R, Trzcinski K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW, Lipsitch M. CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4848-53.
26. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1999;67(9):4720-4.
27. Cheng Q, Finkel D, Hostetter MK. Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry*. 2000;39(18):5450-7.
28. Janulczyk R, Iannelli F, Sjöholm AG, Pozzi G, Björck L. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem*. 2000;275(47):37257-63.
29. Uchiyama S, Carlin AF, Khosravi A, Weiman S, Banerjee A, Quach D, et al. The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J Exp Med*. 2009;206(9):1845-52.
30. Yamaguchi M, Nakata M, Sumioka R, Hirose Y, Wada S, Akeda Y, et al. Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems. *Virulence*. 2017;1-9.
31. Mahdi LK, Wang H, Van der Hoek MB, Paton JC, Ogunniyi AD. Identification of a novel pneumococcal vaccine antigen preferentially expressed during meningitis in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2208-20.
32. Cuccui J, Thomas RM, Moule MG, D'Elia RV, Laws TR, Mills DC, et al. Exploitation of bacterial N-linked glycosylation to develop a novel recombinant glycoconjugate vaccine against *Francisella tularensis*. *Open Biol*. 2013;3(5):130002.
33. Riddle MS, Kaminski RW, Di Paolo C, Porter CK, Gutierrez RL, Clarkson KA, et al. Safety and Immunogenicity of a Candidate Bioconjugate Vaccine against *Shigella flexneri* 2a Administered to Healthy Adults: a Single-Blind, Randomized Phase I Study. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(12):908-17.
34. Brown JS, Ogunniyi AD, Woodrow MC, Holden DW, Paton JC. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2001;69(11):6702-6.
35. Bernatchez S, Szymanski CM, Ishiyama N, Li J, Jarrell HC, Lau PC, et al. A single bifunctional UDP-GlcNAc/Glc 4-epimerase supports the synthesis of

10

20

30

40

50

three cell surface glycoconjugates in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4792-802.

36. Wilson R, Cohen JM, Reglinski M, Jose RJ, Chan WY, Marshall H, et al. Naturally Acquired Human Immunity to *Pneumococcus* Is Dependent on Antibody to Protein Antigens. *PLoS Pathog*. 2017;13(1):e1006137.

37. Reglinski M, Gierula M, Lynskey NN, Edwards RJ, Sriskandan S. Identification of the *Streptococcus pyogenes* surface antigens recognised by pooled human immunoglobulin. *Sci Rep*. 2015;5:15825.

38. Gessner BD, Mueller JE, Yaro S. African meningitis belt pneumococcal disease epidemiology indicates a need for an effective serotype 1 containing vaccine, including for older children and adults. *BMC Infect Dis*. 2010;10:22.

39. Wacker M, Feldman MF, Callewaert N, Kowarik M, Clarke BR, Pohl NL, et al. Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(18):7088-93.

40. Zhang Z, Clarke TB, Weiser JN. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1899-909.

41. Terra et al (2012) *J. Med. Microbiol*. 61 919-926.

42. WO2009/104074

43. WO2014/114926

【0117】

配列

【表2】

GGATCCGAATTCCATTTTAAATAAGGAGGAATAACATAATGAAAAAGATTTGGCTGGC
GCTGGCTGGTTTAGTTTAGCGTTTAGCGCATCGGCGGCGCAGGGAGGCGATCAGA
ACGCGACCGGTGGCGCCCTAGTGGCCAGCTTCTTGCTCCTACTTGGTGCATGTAGTA
CAAACCTCAAGCACTAGTCAGACAGAGACCAGTAGCTCTGCTCCAACAGAGGTAACCA
TTAAAAGTTCACTGGACGAGGTCAAACCTTTCCAAAGTTCCTGAAAAAGATTGTGACCT
TTGACCTCGGCGCTGCGGATACTATTCGCGCTTTAGGATTTGAAAAAATATCGTCGG
AATGCCTACAAAAACTGTTCCGACTTATCTAAAAGACCTAGTGGGAAGTGTCAAAAAT
GTTGGTTCTATGAAAGAACCTGATTTAGAAGCTATCGCGCCCTTGAGCCTGATTTGA
TTATCGCTTCGCCACGTACACAAAAATTCGTAGACAAATTCAAAGAAATCGCCCCAAC
CGTTCTCTTCCAAGCAAGCAAGGACGACTACTGGACTTCTACCAAGGCTAATATCGA
ATCCTTAGCAAGTGCTTCGGCGAAACTGGTACACAGAAAGCCAAGGAAGAATTGAC
CAAGCTAGACAAGAGCATCCAAGAAGTCGCTACTAAAAATGAAAGCTCTGACAAAAA
AGCCCTTGCGATCCTCCTTAATGAAGGAAAAATGGCAGCCTTTGGTGCCAAATCTCG
TTTCTCTTTCTTGTAACCAACCTTGAAATTCAAACCAACTGATACAAAATTTGAAGAC
TCACGCCACGGACAAGAAGTCAGCTTTGAAAGTGTCAAAGAAATCAACCCTGACATC
CTCTTTGTCATCAACCGTACCCTTGCCATCGGTGGGGACAACTCTAGCAACGACGGT
GTCCTAGAAAATGCCCTTATCGCTGAAACACCTGCTGCTAAAAATGGTAAGATTATCC
AACTAACACCAGACCTCTGGTATCTAAGCGGAGGCGGACTTGAATCAACAAAACTCA
TGATTGAAGACATACAAAAAGCTTTGAAAGGAGGCGATCAGAACGCGACCGGTGGC
CATCACCATCATCACCATCATCACCATCATTAATTAAGTCTAGAGGATCC

配列番号1 シークオン(破線の下線)を有する PiuA をコードする配列

【0118】

10

20

30

40

50

【表 3】

MKKIWLALAG LVLAFSASAA QGGDQ~~NATGG~~ ALVASFLLLL GACSTNSSTS
QTETSSSAPT EVTIKSSLDE VKLSKVPEKI VTFDLGAADT IRALGF~~EKNI~~
VGMPTKTVPT YLKDLVGTVK NVGSMKEPDL EAIAALEPDL IASPRTQKF
VDKFKEIAPT VLFQASKDDY WTSTKANIES LASAFGETGT QKAKEELTKL
DKSIQEVATK NESSDKKALA ILLNEGKMAA FGA~~KSRFSFL~~ YQTLKFKPTD
TKFEDSRHGQ EVSFESVKEI NPDILFVINR TLAIGGDNSS NDGVLENALI
AETPAAKNGK IIQLTPDLWY LSGGGLESTK LMIEDIQKAL KGGDQ~~NATGG~~
HHHHHHHHHH

配列番号 2 シークオン(破線の下線)、ヒスタグ(斜字体)及びリーダーペプチド(点線の下線)を
有する PiuA アミノ酸配列

10

【 0 1 1 9 】

【表 4】

ALVASFLLLL GACSTNSSTS QTETSSSAPT EVTIKSSLDE VKLSKVPEKI
VTFDLGAADT IRALGF~~EKNI~~ VGMPTKTVPT YLKDLVGTVK NVGSMKEPDL
EAIAALEPDL IASPRTQKF VDKFKEIAPT VLFQASKDDY WTSTKANIES
LASAFGETGT QKAKEELTKL DKSIQEVATK NESSDKKALA ILLNEGKMAA
FGA~~KSRFSFL~~ YQTLKFKPTD TKFEDSRHGQ EVSFESVKEI NPDILFVINR
TLAIGGDNSS NDGVLENALI AETPAAKNGK IIQLTPDLWY LSGGGLESTK
LMIEDIQKAL K

配列番号 3 PiuA アミノ酸配列

20

【 0 1 2 0 】

30

40

50

【表 5 - 1】

GGATCCGAATTCCATTTTAAATAAGGAGGAATAACATAATGAAAAAGATTTGGCTGGC
 GCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCATCGGCGGCGCAGGGAGGCGATCAGA
 ACGCGACCGGTGGCGAGCAACCTCTGGCAAATGAACTCAACTTTCGGGGGAGAGC
 TCAACCCTAACTGATACAGAAAAAGAGCCAGCCTTCTTCAGAGACTGAACTTCTGGC
 AATAAGCAAGAACAAGAAAGGAAAGATAAGCAAGAAGAAAAAATCCAAGAGATTAC
 TATGCACGAGATTTGGAAAAATGTGAAACAGTGATAGAAAAAGAAGATGTTGAAACC
 AATGCTTCAAATGGTCAGAGAGTTGATTTATCAAGTGAACTAGATAAACTAAAGAAAC
 TTGAAAACGCAACAGTTTACATGGAGTTTAAAGCCAGATGCCAAGGCCCCAGCATTCT
 ATAATCTCTTTTCTGTGTCAAGTGCTACTAAAAAGATGAGTACTTCACTATGGCAGT
 TTACAATAACTGCTACCCTAGAGGGGCGTGGTTCCGATGGGAAACAGTTTTACAAT
 AATTACAACGATGCACCCTTAAAAGTTAAACCAGGTCAGTGGAACCTCTGTGACTTTC
 ACAGTTGAAAAACCGACAGCAGAACTACCTAAAGGCCGAGTGCGCCTCTACGTAAAC
 GGGGTATTATCTCGAACAAAGTCTGAGATCTGGCAATTTCAATTAAAGATATGCCAGATG
 TAACGCATGTGCAAATCGGAGCAACCAAGCGTGCCAAACAATACGGTTTGGGGGTCAA
 ATCTACAGATTCCGAATCTCACTGTGTATAATCGTGCTTTAACACCAGAAGAGGTACA
 AAAACGTAGTCAACTTTTTTAAACGCTCAGATTTAGAAAAAACTACCTGAAGGAGC
 GGCTTTAACAGAGAAAACGGACATATTGAAAGCGGGCGTAACGGTAAACCAAATAA
 AGATGGAATCAAGAGTTATCGTATTCCAGCACTTCTCAAGACAGATAAAGGAACTTTG
 ATCGCAGGTGCAGATGAACGCCGTCTCCATTTCGAGTGACTGGGGTGATATCGGTATG
 GTCATCAGACGTAGTGAAGATAATGGTAAAACCTGGGGTGACCGAGTAACCATTACC
 AACTTACGTGACAAATCCAAAAGCTTCTGACCCATCGATCGGTTTACCAGTGAATATCG
 ATATGGTGTGTTGTTCAAGATCCTGAAACCAAACGAATCTTTTCTATCTATGACATGTT
 CCCAGAAGGGAAGGGAATCTTTGGAATGTCTTCAAAAAAGAAGAAGCCTACAAAAA
 AATCGATGAAAAAACCTATCAAATCCTCTATCGTGAAGGAGAAAAAGGAGCTTATAC
 CATTCGAGAAAAATGGTACTGTCTATACACCAGATGGTAAGGCGACAGACTATCGCGT
 TGTTGTAGATCCTGTTAAACCAGCCTATAGCGACAAGGGGGATCTATACAAGGGTAA
 CCAATTACTAGGCAATATCTACTTCACAACAAAACAAAACCTTCTCCATTTAGAATTGCC
 AAGGATAGCTATCTATGGATGTCTTACAGTGATGACGACGGGAAGACATGGTCAGCG
 CCTCAAGATATTACTCCGATGGTCAAAGCCGATTGGATGAAATTCTTGGGTGTAGGTC
 CTGGAACAGGAATTGTACTTCGGAATGGGCCTCACAAGGGACGGATTTTGATACCGG
 TTTATACGACTAATAATGTATCTCACTTAAATGGCTCGCAATCTTCTCGTATCATCTAT
 TCAGATGATCATGAAAAACCTTGGCATGCTGGAGAAGCGGTCAACGATAACCGTCAG
 GTAGACGGTCAAAGATCCACTCTTCTACGATGAACAATAGACGTGCGCAAAATACA
 GAATCAACGGTGGTACAACATAAACAATGGAGATGTTAAACTCTTTATGCGTGGTTTGA
 CTGGAGATCTTCAGGTTGCTACAAGTAAAGACGGAGGAGTGACTTGGGAGAAGGATA
 TCAAACGTTATCCACAGGTTAAAGATGTCTATGTTCAAATGTCTGCTATCCATACGAT
 GCACGAAGGAAAAGAATACATCCTCAGTAATGCAGGTGGACCGAAACGTGAAAA
 TGGGATGGTCCACTTGGCACGTGTGGAAGAAAAATGGTGAGTTGACTTGGCTCAAACA
 CAATCCAATTCAAAAAGGAGAGTTTGCCTATAATTCGCTCCAAGAATTAGGAAATGGG

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

GAGTATGGCATCTTGTATGAACATACTGAAAAAGGACAAAATGCCTATACCCTATCAT
TTAGAAAATTTAATTGGGACTTTTTGAGCAAAGATCTGATTTCTCCTACCGAAGCGAA
AGTGAAGCGAACTAGAGAGATGGGCAAAGGAGTTATTGGCTTGGAGTTCGACTCAG
AAGTATTGGTCAACAAGGCTCCAACCCCTCAATTGGCAAATGGTAAAAACAGCACGCT
TCATGACCCAGTATGATACAAAAACCCCTCCTATTTACAGTGGATTTCAGAGGATATGGG
TCAAAAAGTTACAGGTTTGGCAGAAGGTGCAATTGAAAGTATGCATAATTTACCAGTC
TCTGTGGCGGGCACTAAGCTTTCGAATGGAATGAACGGAAGTGAAGCTGCTGTTTCAT
GAAGTGCCAGAATACACAGGCCCATTAGGGACATCCGGCGAAGAGCCAGCTCCAAC
AGTCGAGAAGCCAGAATACACAGGCCCACTAGGGACATCCGGCGAAGAGCCAGCCC
CGACAGTCGAGAAGCCAGAATACACAGGCCCACTAGGGACAGCTGGTGAAGAAGCA
GCTCCAACAGTCGAGAAGCCAGAATTTACAGGGGGAGTTAATGGTACAGAGCCAGCT
GTTTCATGAAATCGCAGAGTATAAGGGATCTGATTCGCTTGTAACTCTTACTACAAAAA
AAGATTACTTACAAAGCTCCTCTTGTCTCAGCAGGCACTTCCTGAAACAGGAAACA
AGGAGAGTGACCTCCTAGCTTCACTAGGACTAACAGCTTTCTTCCTTGGTCTGTTTAC
GCTAGGGAAAAAGAGAGAACAAGGAGGCGATCAGAACGCGACCGGTGGCCATCACC
ATCATCACCATCATCACCATCATTAATTAAGTCTAGAGGATCC

配列番号 4 NanA をコードする配列

10

【 0 1 2 1】

【表 6】

MKKIWLALAG LVLAFSASAA QGGDQ^QNATGG EQPLANETQL SGESSTLTDT
EKSQPSSETE LSGNKQE^QER KDKQE^QEKIPR DYYARDLENV ETVIEKEDVE
TNASNGQRVD LSEL^QDKLKK LENATVHMEF KPDAKAPAFY NLFSVSSATK
KDEYFTMAVY NNTATLEGRG SDGKQFYNNY NDAPLKVKPG QWNSVTFTVE
KPTAELPKGR VRLYVNGVLS RTSLSRGNFI KDMPDVTHVQ IGATKRANNT
VWGSNLQIRN LTVYNRALTP EEVQKRSQ^QLF KRSDLEKKLP EGAALTEKTD
IFESGRNGK^QR NKDGIKSYRI PALLKTDKGT LIAGADERRL HSSDWGDIGM
VIRSEDNGK TWGDRVTITN LRDNPKASDP SIGSPVNIDM VLVQDPETKR
IFSIYDMFPE GKGIFGMSSQ KEEAYKKIDG KTYQILYREG EKGAYTIREN
GTVYTPDGKA TDYRVVDPV KPAYS^QDKGDL YKGNQLL^QNI YFTTNKTS^QPF
RIAKDSYLWM SYSDDD^QGKTW SAPQDITPMV KADWMKFLGV GPGTGIVLRN
GPHKGRILIP VYTTNNVSHL NGSQSSRIY SDDHGKTWHA GEAVNDNRQV
DGQKIHSS^QTM NNRRAQNTES TVVQLNNGDV KLFMRGLTGD LQVATSKDGG
VTWEKDIKRY PQVKDVYVQM SAIHTMHEGK EYIILSNAGG PKRENGMVHL
ARVEENGELT WLKHNPIQKG EFAYNSLQEL GNGEYGILYE HTEKGQNAYT
LSFRKFNWDF LSKDLIS^QPTE AKVKRTREMG KGVIGLEFDS EVLVNKAPTL
QLANGKTARF MTQYDTKTLL FTVDS^QEDMGQ KVTGLAEGAI ESMHNLPVSV
AGTKLSNGMN GSEAAVHEVP EYTGPLGTSG EEPAPTVEKP EYTGPLGTSG
EEPAPTVEKP EYTGPLGTAG EEAAPTVEKP EFTGGVNGTE PAVHEIAEYK
GSDSLVTLTT KEDYTYKAPL AQQALPETGN KESDLLASLG LTAFFLGLFT
LGKKREQGGD QNATGGHHHH HHHHHH

配列番号 5 シークオン(破線の下線)、ヒスタグ(斜字体)及びリーダーペプチド(点線の下線)を
有する NanA アミノ酸配列

20

30

40

【 0 1 2 2】

50

【表 7】

EQPLANETQL SGESSTLTDT EKSQPSSETE LSGNKQEQER KDKQEEKIPR
DYIARDLENV ETVIEKEDVE TNASNGQRVD LSELDKLKK LENATVHMEF
KPDAPAFY NLFVSSATK KDEYFTMAVY NNTATLEGRG SDGKQFYNNY
NDAPLKVPKG QWNSVTFTVE KPTAELPKGR VRLVNGVLS RTSLSRGNFI
KDMPDVTHVQ IGATKRANNT VWGSNLQIRN LTVYNRALTP EEVQKRSQLF
KRSBLEKKLP EGAALTEKTD IFESGRNGKP NKDGIKSYRI PALLKTDKGT
LIAGADERRL HSSDWGDIGM VIRSEDNGK TWGDRVITITN LRDNPKASDP
SIGSPVNIDM VLVQDPETKR IFSIYDMFPE GKGIFGMSSQ KEEAYKKIDG
KTYQILYREG EKGAYTIREN GTVYTPDGKA TDYRVVVDPV KPAYS DKGDL
YKGNQLLNI YFTTNKTSFP RIAKDSYLWM SYSDDDGKTW SAPQDITPMV
KADWMKFLGV GPGTGIVLRN GPHKGRILIP VYTNNVSHL NGSQSSRIIY
SDDHGKTHWA GEAVNDNRQV DGQKIHSSTM NNRRAQNTES TVVQLNNGDV
KLFMRGLTGD LQVATSKDGG VTWEKDIKRY PQVKDVYVQM SAIHTMHEGK
EYIILSNAGG PKRENGMVHL ARVEENGELT WLKHNPIQKG EFAYNSLQEL
GNGEYGILYE HTEKGQNAYT LSFRRFNWDF LSKDLISPTA AKVKRTREM
KGVIGLEFDS EVLVNKAPTQ LQANGKTARF MTQYDTKTLL FTVDSEDMGQ
KVTGLAEGAI ESMHNLPSV AGTKLSNGMN GSEAAVHEVP EYTGPLGTSG
EEPAPTVEKP EYTGPLGTSG EEPAPTVEKP EYTGPLGTAG EEAAPTVEKP
EFTGGVNGTE PAVHEIAEYK GSDSLVTLTT KEDYTYKAPL AQALPETGN
KESDLLASLG LTAFFLGLFT LGKKREQ

配列番号 6 NanA アミノ酸配列

10

20

【0 1 2 3】

【表 8】

GGATCCGAATTCCATTTTAAATAAGGAGGAATAACATAATGAAAAAGATTTGGCTGGC
GCTGGCTGGTTTAGTTTATAGCGTTTAGCGCATCGGCGGCGCAGGGAGGCGATCAGA
ACGCGACCGGTGGCGCAGCCCTTGCTCTTGTTGCTGCAGGTGTGCTTGCGGCTTGC
TCAGGGGGTGCTAAGAAAGAAAGGAGAAGCAGCTAGCAAGAAAGAAATCATCGTTGC
AACCAATGGATCACCAAAGCCATTTATCTATGAAGAAAATGGCGAATTGACTGGTTAC
GAGATTGAAGTCGTTTCGCGCTATCTTTAAAGATTCTGACAAATATGATGTCAAGTTG
AAAAGACAGAAATGGTCAGGTGTCTTTGCTGGTCTTGACGCTGATCGTTACAATATGG
CTGTCAACAATCTTAGCTACACTAAAGAACGTGCGGAGAAATACCTCTATGCCGCAC
CAATTGCCCAAAATCCTAATGTCTTGTCTGTAAGAAAGATGACTCTAGTATCAAGTC
TCTCGATGATATCGGTGGAAAATCGACGGAAGTCGTTCAAGCCACTACATCAGCTAA
GCAGTTAGAAGCATACAATGCTGAACACACGACCAACCCAACTATCCTTAACATACT
AAGGCAGACTTGCAACAAATCATGGTACGTTTGAGCGATGGACAATTTGACTATAAG
ATTTTTGATAAAATCGGTGTTGAAACAGTGATCAAGAACCAAGGTTTGGACAACCTG
AAAGTTATCGAACTTCCAAGCGACCAACAACCGTACGTTTACCCACTTCTTGCTCAG
GGTCAAGATGAGTTGAAATCGTTTGTAGACAAACGCATCAAAGAACTTTATAAAGAT
GGAACCTCTGAAAAATTGTCTAAACAATTCTTCGAGACACTTATCTACCGGCAGAA
GCTGATATTAAAGGAGGCGATCAGAACGCGACCGGTGGCCATCACCATCATCACCAT
CATCACCATCATTAATTAAGTCTAGAGGATCC

配列番号 7 Sp0148 をコードする配列

30

【0 1 2 4】

【表 9】

MKKIWLALAG LVLAFSASAA QGGDQ¹NATGG AALALVAAGV LAACSGGAKK
EGEAAASKKEI IVATNGSPKP FIYEENGELT GYEIEVVRAI FKDS²DKYDVK
FEKTEWSGVF AGLDADRYNM AVNNLSY³TKE RAEKYLYAAP IAQNP⁴NVLVV
KKDDSSIKSL DDIGGKSTEV VQATTS⁵AKQL EAYNAEHTDN PTILNYTKAD
LQQIMVRLSD GQFDYKIFDK IGVETVIK⁶NQ GLDNLKVIEL PSDQ⁷QPYVYP
LLAQGQDELK SFVDKRIKEL YKDG⁸TLEKLS KQFFGDTYLP AEADIKGG⁹DQ
NATGGHHHHH HHHHH

配列番号 8 シークオン(破線の下線)、ヒスタグ(斜字体)及びリーダーペプチド(点線の下線)を有する Sp0148 アミノ酸配列

40

50

【 0 1 2 5 】

【表 1 0】

AALALVAAGV LAACSGGAKK EGEEAASKKEI IVATNGSPKP FIYEENGELT
GYEIEVVRAI FKDSDKYDVK FEKTEWSGVF AGLDADRYNM AVNNLSYTK
RAEKYLYAAP IAQNPNVLVV KKDDSSIKSL DDIGGKSTEV VQATTSAKQL
EAYNAEHTDN PTILNYTKAD LQQIMVRLSD GQFDYKIFDK IGVETVIKNQ
GLDNLKVIEL PSDQQPYVYP LLAQGQDELK SFVDKRIKEL YKDGTTLEKLS
KQFFGDTYLP AEADIK

配列番号 9 Sp0148 アミノ酸配列

10

【 0 1 2 6 】

【表 1 1】

1 mlkkeylknpl ylvlfamiil ayvfsvferf yvwvwasefn eyffnnqlmi isndgyafae
61 gardmiagfh qpndlsyygs slstltwyly kitpfsfesi vlymstflss lvvipiilla
121 neykrplmgf vaallasian syynrtmsgy ytdmvlvvl pmfilffmvr milkkdffsl
181 ialplfigiy lwwypssytl nvaliglfl ytlifhrkek ifyiaviss ltsniawfy
241 qsaiivilfa lfaleqkrln fmiigilgsv tlifilsgg vdpilyqlkf yifrsdesan
301 ltqgfmyfnv nqtiquevenv dlsefmrris gseivflsl fgfawllrkh ksmimalpil
361 vlgflalkgg lrftiysvpv malgfgfls efkailvkky sqltsnvciv fatiltlapv
421 fihinykap tvfsqneasl lnqlknianr edyvvtwwdy gypvryysdv ktlvdggkhl
481 gkdnffpsfa lskdeqaaan marlsveyte ksfiyalqndi lktdilqamm kdynqsnvdl
541 flaslskpdf kidtpktrdi ylymparmsl ifstvasfaf inldtgvl dk pftfstaypl
601 dvkngaiyls ngvvlstdfr sfkigdnvvs vnsiveinsi kqgeykitpi ddkaqfyify
661 lkdsaiipyay filmdktmfn sayvqmfflg nydknlfdsv insrdakvfk lki

20

配列番号 10 カンピロバクター ジェジュニの PglB アミノ酸配列

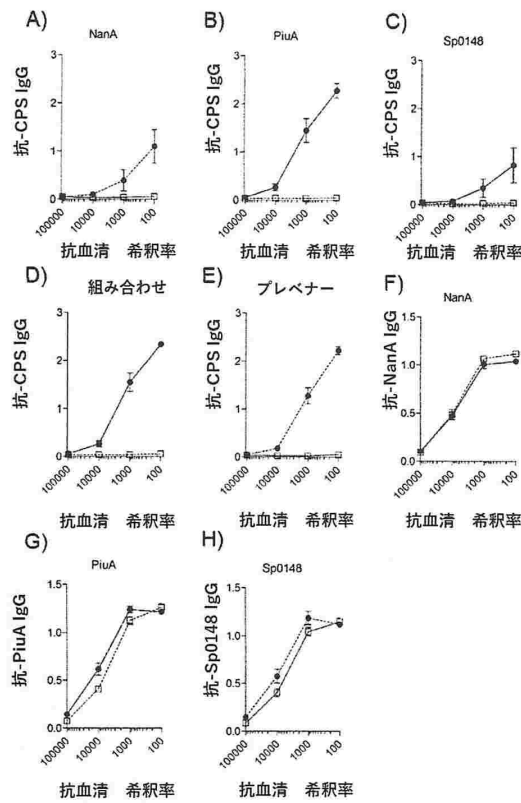
30

40

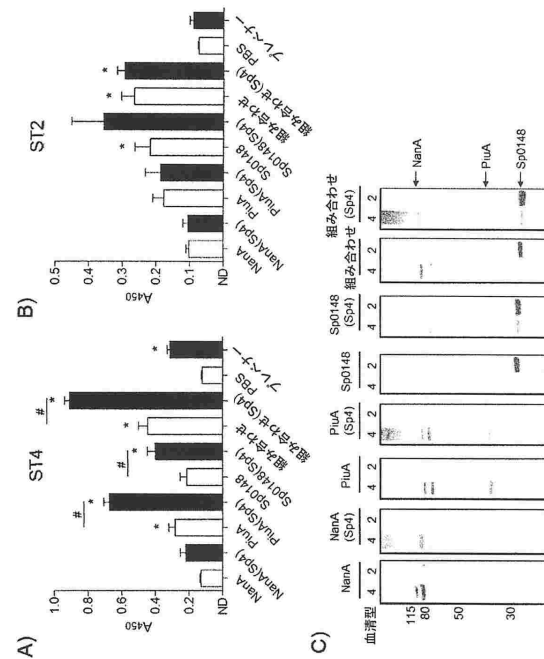
50

【図面】

【図 1】



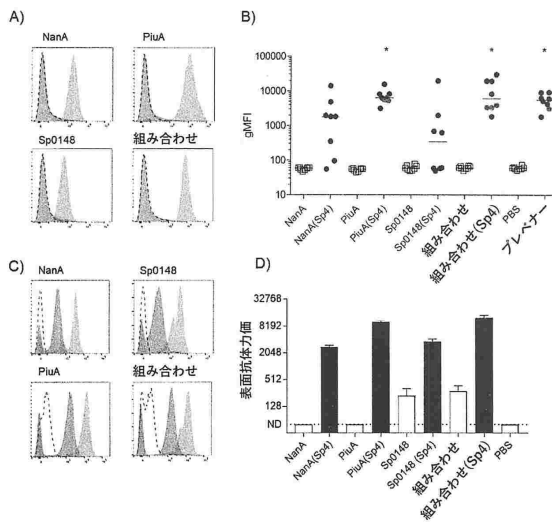
【図 2】



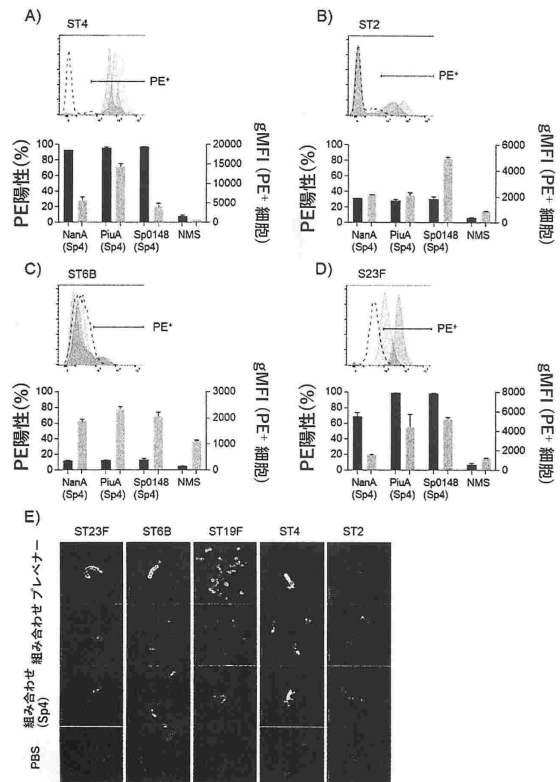
10

20

【図 3】



【図 4】

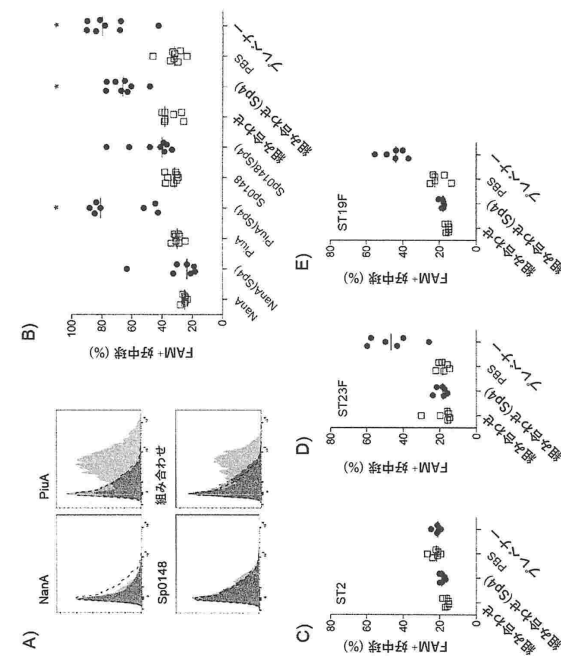


30

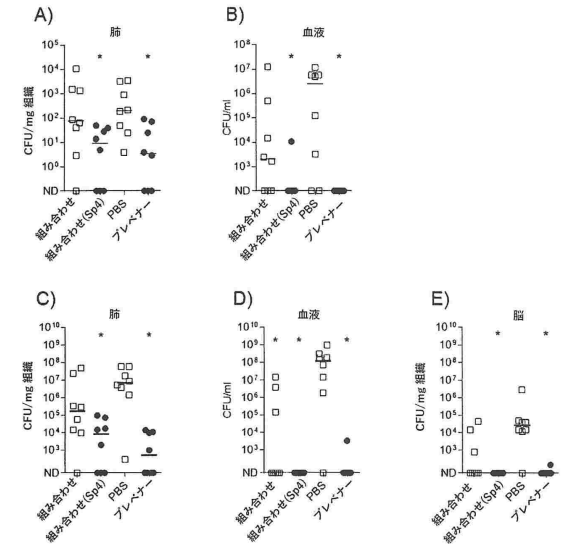
40

50

【図 5】



【図 6】



【配列表】

0007511188000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 31/04 (2006.01)
 A 6 1 P 27/16 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 C 0 7 K 14/315 (2006.01)

F I

A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 27/16
 A 6 1 P 11/00
 C 0 7 K 14/315

Z N A

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100159385

弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407

弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100189429

弁理士 保田 英樹

(74)代理人 100213849

弁理士 澄川 広司

(72)発明者 レン, ブレンダン

イギリス、ロンドン グレーター ロンドン ダブリュシー1イー 7エイチティー、ケッペル ストリート 256、ロンドン スクール オブ ハイジーン アンド トロピカル メディスン

(72)発明者 ブラウン, ジェレミー

イギリス、ロンドン グレーター ロンドン ダブリュシー1イー 6ビーティー、ガワー ストリート、ユニバーシティ カレッジ ロンドン

(72)発明者 クック, ジョン

イギリス、ロンドン グレーター ロンドン ダブリュシー1イー 7エイチティー、ケッペル ストリート 256、ロンドン スクール オブ ハイジーン アンド トロピカル メディスン

審査官 愛清 哲

(56)参考文献 国際公開第2017/216286 (WO, A1)

国際公開第2006/032499 (WO, A1)

Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic Streptococcus pneumoniae infection, Infect Immun, 2001年, 69(11), 6702-6, doi:10.1128/IAI.69.11.6702-6706.2001

Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with Streptococcus pneumoniae, Vaccine, 2006年, 24, pp.5133-5139, doi:10.1016/j.vaccine.2006.04.012

Identification of Genes That Contribute to the Pathogenesis of Invasive Pneumococcal Disease by In Vivo Transcriptomic Analysis, Infection and Immunity, 2012年, Volume 80, Number 9, pp. 3268-3278, doi:10.1128/IAI.00295-12

PiuA and PiaA, iron uptake lipoproteins of Streptococcus pneumoniae, elicit serotype independent antibody responses following human pneumococcal septicaemia, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2005年, 43, pp.73-80, doi:10.1016/j.femsim.2004.07.010

Recent developments in bacterial protein glycan coupling technology and glycoconjugate vaccine design, Journal of Medical Microbiology, 2012年, 61, pp.919-926, DOI 10.1099/jmm.0.039438-0

Recombinant expression of Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharides in Escherichia coli, Open Biol, 2016年, 6, 150243, http://dx.doi.org/10.1098/rsob.150243

Characterization of a Recombinant Pneumolysin and Its Use as a Protein Carrier for Pneumococcal Type 18C Conjugate Vaccines, INFECTION AND IMMUNITY, 1995年, Vol.63, No.7, pp.2706-2713

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 P 1 1 / 0 0 - 1 1 / 1 6

A 6 1 P 2 7 / 0 0 - 2 7 / 1 6

A 6 1 P 3 1 / 0 0 - 3 1 / 2 2

A 6 1 P 3 7 / 0 0 - 3 7 / 0 8

C 0 8 B 3 7 / 0 0

C 0 7 K 1 4 / 3 1 5

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 / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)