

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第3部門第2区分
 【発行日】令和6年6月20日(2024.6.20)

【国際公開番号】WO2021/255684
 【公表番号】特表2023-530154(P2023-530154A)
 【公表日】令和5年7月13日(2023.7.13)
 【年通号数】公開公報(特許)2023-131
 【出願番号】特願2022-577503(P2022-577503)

【国際特許分類】

10

- A 6 1 K 39/112(2006.01)
- C 1 2 N 1/21(2006.01)
- C 1 2 P 21/02(2006.01)
- C 1 2 P 19/44(2006.01)
- A 6 1 K 39/104(2006.01)
- A 6 1 P 37/04(2006.01)
- A 6 1 K 47/64(2017.01)
- A 6 1 K 39/08(2006.01)
- A 6 1 K 39/02(2006.01)
- A 6 1 K 39/095(2006.01)
- A 6 1 K 47/02(2006.01)
- A 6 1 K 47/12(2006.01)
- A 6 1 K 47/18(2017.01)
- A 6 1 K 39/39(2006.01)
- C 0 7 K 14/21(2006.01)
- C 1 2 N 15/31(2006.01)
- C 1 2 N 15/54(2006.01)
- C 1 2 N 9/10(2006.01)

20

【F I】

- A 6 1 K 39/112
- C 1 2 N 1/21
- C 1 2 P 21/02 Z
- C 1 2 P 19/44
- A 6 1 K 39/104
- A 6 1 P 37/04
- A 6 1 K 47/64
- A 6 1 K 39/08
- A 6 1 K 39/02
- A 6 1 K 39/095
- A 6 1 K 47/02
- A 6 1 K 47/12
- A 6 1 K 47/18
- A 6 1 K 39/39
- C 0 7 K 14/21 Z N A
- C 1 2 N 15/31
- C 1 2 N 15/54
- C 1 2 N 9/10

30

40

【手続補正書】

【提出日】令和6年6月12日(2024.6.12)

50

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

S.フレックスネリ (*S. flexneri*) 2a (Sf2E)、S.フレックスネリ3a (Sf3E)、S.フレックスネリ6 (Sf6E)、およびS.ソンネイ (*S. sonnei*) (SsE)のそれぞれに由来するO-抗原多糖鎖を含む免疫原性組成物であって、ここで、S.フレックスネリ (*S. flexneri*) 2a (Sf2E)、S.フレックスネリ3a (Sf3E)、S.フレックスネリ6 (Sf6E)からのO-抗原多糖鎖が、別々に、N-グリコシル化コンセンサス配列を含むように改変されたタンパク質キャリアに共有結合されている、前記免疫原性組成物。

10

【請求項2】

N-グリコシル化コンセンサス配列がD/E-X-N-Z-S/T (配列番号31)であって、このXおよびZはプロリンを除く任意のアミノ酸とすることができるが、場合によりPgIBを用いて多糖がN-グリコシル化コンセンサス配列D/E-X-N-Z-S/T (配列番号31)に転移されており、ここでXおよびZはプロリンを除く任意のアミノ酸とすることができる、請求項1に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項3】

SsEが、PgILによってグリコシル化されうるO-グリコシル化コンセンサス配列を含有するタンパク質キャリアに共有結合されており、場合により、PgILを用いてSsEのコンセンサス配列TWPKDNTSAGVASSPTDIK (配列番号29)に多糖が転移される、請求項1または2に記載の免疫原性組成物。

【請求項4】

タンパク質キャリアが、コレラ毒素bサブユニット (CTB)、破傷風トキソイド (TT)、破傷風毒素Cフラグメント (TTc)、ジフテリアトキソイド (DT)、CRM197、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) エキソトキシゲンA (EPA)、*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) アクリフラビン耐性タンパク質A (CjAcrA)、大腸菌 (*E. coli*) アクリフラビン耐性タンパク質A (EcAcrA)、および緑膿菌PcrV (PcrV) からなる一群から選択される、請求項1~3のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

30

【請求項5】

タンパク質キャリアが少なくとも2つのN-グリコシル化コンセンサス配列を含む、請求項4に記載の免疫原性組成物。

【請求項6】

タンパク質キャリアが、1つのN-グリコシル化部位で (モノ-グリコシル化)、2つのN-グリコシル化部位で (ジ-グリコシル化)、または3つすべてのN-グリコシル化部位でグリコシル化 (トリ-グリコシル化) されている、請求項5に記載の免疫原性組成物。

【請求項7】

Sf2E、Sf3E、およびSf6Eの多糖が、O-抗原の還元末端を介してアスパラギン残基の側鎖窒素原子に共有結合している、請求項1~6のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

40

【請求項8】

アスパラギン残基が、D/E-X-N-Z-S/T (配列番号31) N-グリコシル化コンセンサス配列中に存在する、請求項7に記載の免疫原性組成物。

【請求項9】

SsEの多糖が、O-抗原の還元末端を介して共有結合している、請求項1~8のいずれか1つに記載の免疫原性組成物であって；この糖鎖が、下記の還元末端構造

(i) グルコース、ガラクトース、ガラクトフラノース、ラムノース、GlcNAc、GalNAc、FucNAc、DATDH、GATDH、HexNAc、デオキシHexNAc、diNAcBac、またはPseの還元末端構造；(ii) DATDH、GlcNAc、GalNAc、FucNAc、ガラクトース、また

50

はGlucoseの還元末端構造；(iii) GlcNAc、GalNAc、FucNAc、またはグルコースの還元末端構造；または

(iv) ガラクトース- 1,4-グルコース；グルクロン酸- 1,4-グルコース；N-アセチル-フコサミン- 1,3-N-アセチル-ガラクトサミン；ガラクトース- 1,4-グルコース；ラムノース- 1,4-グルコース；ガラクトフラノース- 1,3-グルコース；N-アセチル-アルトルロン酸- 1,3-4-アミノ-N-アセチル-フコサミン；またはラムノース- 1,4-N-アセチルガラクトサミンのS-2～S-1還元末端構造、

を有する、前記免疫原性組成物。

【請求項10】

S.フレックスネリ (*S. flexneri*) 2a、S.フレックスネリ3a、S.フレックスネリ6抗原が、D-GlcNAc還元末端を介して、N-グリコシル化コンセンサス部位のうち1部位のアスパラギン残基の窒素原子に連結されている、請求項1～9のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

10

【請求項11】

S.ソンネイ (*S. sonnei*) 由来のO-抗原多糖鎖を含む (SsE)、S.ソンネイではないグラム陰性宿主細胞。

【請求項12】

ナイセリア属 (*Neisseria*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、大腸菌属 (*Escherichia*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、またはエルシニア属 (*Yersinia*) の細胞である、請求項11に記載の宿主細胞。

20

【請求項13】

キャリアタンパク質EPAをコードするプラスミドであって、場合によりPgILによるグリコシル化に適した少なくとも1つのO-グリコシル化コンセンサス配列を含み、場合によりアミノ酸配列TWPKDNTSAGVASSPTDIK (配列29) を含む、前記プラスミドを含む、請求項11又は12に記載の宿主細胞。

【請求項14】

Tris (trimethamine)、リン酸塩 (たとえば、リン酸ナトリウム、ショ糖リン酸グルタミン酸塩)、酢酸塩、ホウ酸塩 (たとえば、ホウ酸ナトリウム)、クエン酸塩、グリシン、ヒスチジンおよびコハク酸塩 (たとえば、コハク酸ナトリウム) などのバッファーであって、好適には、塩化ナトリウム、ヒスチジン、リン酸ナトリウムまたはコハク酸ナトリウムなどの前記バッファーをさらに含む、請求項1～10のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

30

【請求項15】

哺乳動物において抗体反応の誘導に使用するための、請求項1～10のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

40

【0019】

バイオコンジュゲーション技術の利点としては以下の点が挙げられる：(1)コンジュゲーション化学による修飾がないため、ならびにPS抗原の立体配置に起因して、コンジュゲート抗原 (PSおよびタンパク質) がより高い免疫原性を有する、(2)バイオコンジュゲートの品質が再現可能である：バイオコンジュゲートは、原薬レベルで詳細構造について特性解析が行われ、いかなる品質上の問題も、高分解能の技術により検出される、(3)バイオコンジュゲートが、競合する、化学的リンカー由来の免疫反応を引き起こさない (化学的リンカーが存在しない) (化学的コンジュゲートに対する免疫反応は、抗原特異的反応に優先する抗クロスリンカー反応に悩まされることが多い)、(4)製造を簡素化することにより、再現性の高い品質の製品が得られ、バイオコンジュゲートはすべて組換え非病

50

原性大腸菌において生産されて、抗原多糖を抽出するために病原菌を増殖させる必要がなく、その結果として製品および製造の安全性に利益をもたらす、(5)構造が規定されているため、原薬レベルでも製剤レベルでも詳細な分析試験が可能であり、(必要であれば)製剤の凍結も可能である、(6)製造後に遊離の多糖類は存在せず、製剤関連不純物も微量しか存在しておらず、酵素的in vivoコンジュゲーションはタンパク質キャリアを変性させないため、重要なB細胞エピトープおよび正しいタンパク質のフォールディングが保存されていることは、同一生物由来のタンパク質ならびに糖エピトープを含有するバイオコンジュゲートを開発する可能性を開くものであって、それぞれのワクチンの防御を拡大する可能性があるが、これは、エンドキシンの除去および架橋などの化学処理を必要とせず、多糖の長さをin vivoで調節できるためである(コンジュゲートは、明確に定められた再現可能な糖パターンを含む)、ならびに(7)バイオコンジュゲーション技術は、抗原多糖が化学的に不安定であるために既存の技術では作製できない抗原の生成を可能にすることができる。

10

本発明の実施形態として例えば以下を挙げることができる。

[実施形態1]

S.フレックスネリ(S. flexneri) 2a(Sf2E)、S.フレックスネリ3a(Sf3E)、S.フレックスネリ6(Sf6E)、およびS.ソンネイ(S. sonnei)(SsE)のそれぞれに由来するO-抗原多糖鎖を含む免疫原性組成物であって、ここで、S.フレックスネリ(S. flexneri) 2a(Sf2E)、S.フレックスネリ3a(Sf3E)、S.フレックスネリ6(Sf6E)からのO-抗原多糖鎖が、別々に、N-グリコシル化コンセンサス配列を含むように改変されたタンパク質キャリアに共有結合されている、前記免疫原性組成物。

20

[実施形態2]

N-グリコシル化コンセンサス配列がD/E-X-N-Z-S/T(配列番号31)であって、このXおよびZはプロリンを除く任意のアミノ酸とすることができるが、場合によりPgIBを用いて多糖がN-グリコシル化コンセンサス配列D/E-X-N-Z-S/T(配列番号31)に転移されており、ここでXおよびZはプロリンを除く任意のアミノ酸とすることができる、実施形態1に記載の免疫原性組成物。

[実施形態3]

SsEが、PgILによってグリコシル化されうるO-グリコシル化コンセンサス配列を含有するタンパク質キャリアに共有結合されており、場合により、PgILを用いてSsEのコンセンサス配列TWPKDNTSAGVASSPTDIK(配列番号29)に多糖が転移される、実施形態1または2に記載の免疫原性組成物。

30

[実施形態4]

タンパク質キャリアが、コレラ毒素bサブユニット(CTB)、破傷風トキソイド(TT)、破傷風毒素Cフラグメント(TTc)、ジフテリアトキソイド(DT)、CRM197、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)エキソトキシンA(EPA)、C.ジェジュニ(C. jejuni)アクリフラビン耐性タンパク質A(CjAcrA)、大腸菌(E. coli)アクリフラビン耐性タンパク質A(EcAcrA)、および緑膿菌PcrV(PcrV)からなる一群から選択される、実施形態1~3のいずれかに記載の免疫原性組成物。

[実施形態5]

タンパク質キャリアが緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)エキソトキシンA(EPA)である、実施形態4に記載の免疫原性組成物。

40

[実施形態6]

タンパク質キャリアが少なくとも2つのN-グリコシル化コンセンサス配列を含む、実施形態5に記載の免疫原性組成物。

[実施形態7]

タンパク質キャリアが、1つのN-グリコシル化部位で(モノ-グリコシル化)、2つのN-グリコシル化部位で(ジ-グリコシル化)、または3つすべてのN-グリコシル化部位でグリコシル化(トリ-グリコシル化)されている、実施形態6に記載の免疫原性組成物。

[実施形態8]

50

Sf2E、Sf3E、およびSf6Eの多糖が、O-抗原の還元末端を介してアスパラギン残基の側鎖窒素原子に共有結合している、実施形態1~7のいずれかに記載の免疫原性組成物。

[実施形態9]

アスパラギン残基が、D/E-X-N-Z-S/T(配列番号31)N-グリコシル化コンセンサス配列中に存在する、実施形態8に記載の免疫原性組成物。

[実施形態10]

SsEの多糖が、O-抗原の還元末端を介して共有結合している、実施形態1~9のいずれかに記載の免疫原性組成物であって；この糖鎖が、下記の還元末端構造

(i) グルコース、ガラクトース、ガラクトフラノース、ラムノース、GlcNAc、GalNAc、FucNAc、DATDH、GATDH、HexNAc、デオキシHexNAc、diNAcBac、またはPseの還元末端構造；(ii) DATDH、GlcNAc、GalNAc、FucNAc、ガラクトース、またはGlucoseの還元末端構造；(iii) GlcNAc、GalNAc、FucNAc、またはグルコースの還元末端構造；または

(iv) ガラクトース- 1,4-グルコース；グルクロン酸- 1,4-グルコース；N-アセチル-フコサミン- 1,3-N-アセチル-ガラクトサミン；ガラクトース- 1,4-グルコース；ラムノース- 1,4-グルコース；ガラクトフラノース- 1,3-グルコース；N-アセチル-アルトルロン酸- 1,3-4-アミノ-N-アセチル-フコサミン；またはラムノース- 1,4-N-アセチルガラクトサミンのS-2~S-1還元末端構造、
を有する、前記免疫原性組成物。

[実施形態11]

S.フレックスネリ(S. flexneri) 2a、S.フレックスネリ3a、S.フレックスネリ6抗原が、D-GlcNAc還元末端を介して、N-グリコシル化コンセンサス部位のうち1部位のアスパラギン残基の窒素原子に連結されている、実施形態1~10のいずれかに記載の免疫原性組成物。

[実施形態12]

S.ソンネイ(S. sonnei)由来のO-抗原多糖鎖を含む(SsE)、S.ソンネイではないグラム陰性宿主細胞。

[実施形態13]

ナイセリア属(Neisseria)、サルモネラ属(Salmonella)、赤痢菌属(Shigella)、大腸菌属(Escherichia)、シュードモナス属(Pseudomonas)、またはエルシニア属(Yersinia)の細胞である、実施形態12に記載の宿主細胞。

[実施形態14]

大腸菌(Escherichia coli(E. coli))である、実施形態13に記載の宿主細胞。

[実施形態15]

大腸菌(E. coli)が遺伝子組換えである、実施形態14に記載の宿主細胞。

[実施形態16]

キャリアタンパク質EPAをコードするプラスミドであって、場合によりPgILによるグリコシル化に適した少なくとも1つのO-グリコシル化コンセンサス配列を含み、場合によりアミノ酸配列TWPKDNTSAGVASSPTDIK(配列29)を含む、前記プラスミドを含む、実施形態12~15のいずれかに記載の宿主細胞。

[実施形態17]

オリゴ糖転移酵素PgILをコードするプラスミドを含む、実施形態12~16のいずれかに記載の宿主細胞。

[実施形態18]

S.フレックスネリ(S. flexneri) 2a(Sf2E)、S.フレックスネリ3a(Sf3E)、S.フレックスネリ6(Sf6E)、およびS.ソンネイ(S. sonnei)(SsE)由来のO-抗原多糖鎖を含む4価バイオコンジュゲートワクチンを製造する方法であって；a)バイオコンジュゲートの生成に適した条件下で、バイオコンジュゲートを生成するように操作された、4つの別々の宿主細胞(大腸菌宿主細胞であってもよい)を培養するステップ、b)各培養物から、Sf2E-EPA、Sf3E-EPA、Sf6E-EPAおよびSsE-EPAからなる一群から選

10

20

30

40

50

択される1つのバイオコンジュゲートを精製するステップ、ならびにc) Sf2E-EPA、Sf3E-EPA、Sf6EEPおよびSsE-EPAバイオコンジュゲートを、場合により1:1:1:1の割合で混合するステップ、を含む前記方法。

[実施形態19]

カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) の酵素 (PglB) が、バイオコンジュゲートSf2E、Sf3E、およびSf6Eについて、大腸菌 (*E. coli*) において、キャリアタンパク質である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 無毒化エンドトキシンA (EPA) 上のコンセンサス配列に多糖を転移する、実施形態18に記載の方法。

[実施形態20]

PglL (淋菌 (*Neisseria gonorrhoea*) の酵素であってよい) が、バイオコンジュゲートSsEについて、大腸菌 (*E. coli*) において、キャリアタンパク質である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 無毒化エンドトキシンA (EPA) 上のコンセンサス配列に多糖を転移する、実施形態18または19に記載の方法。

10

[実施形態21]

多糖生合成 (*rfb*) クラスターをS.フレックスネリ (*S. flexneri*) 2a O-多糖クラスターで置換し、O-抗原リガーゼ *waaL* を欠失させ、アラビノース代謝に必要な *araBAD* 遺伝子を欠失させ、さらに大腸菌 (*E. coli*) O16糖転移酵素 *gtrS* をS.フレックスネリ2a糖転移酵素 *gtrII* で置換することによって、Sf2Eを産生する宿主菌株が遺伝子改変される、実施形態18~20のいずれかに記載の方法。

[実施形態22]

多糖生合成 (*rfb*) クラスターをS.フレックスネリ (*S. flexneri*) 3a特異的O-多糖クラスターで置換し、O-抗原リガーゼ *waaL* を欠失させ、アラビノース代謝に必要な *araBAD* 遺伝子を欠失させ、さらに大腸菌 (*E. coli*) O16糖転移酵素 *gtrS* をS.フレックスネリ2a糖転移酵素 *gtrII* で置換することによって、Sf3Eの宿主菌株が遺伝子改変される、実施形態18~20のいずれかに記載の方法。

20

[実施形態23]

S.フレックスネリ (*S. flexneri*) 2a糖転移酵素 *gtrII* を、S.フレックスネリ3a糖転移酵素 *gtrX* に置換する、実施形態18~22のいずれかに記載の方法。

[実施形態24]

yeaS 遺伝子をO-アセチルトランスフェラーゼ *OAcA* 遺伝子に置換する、実施形態18~23のいずれかに記載の方法。

30

[実施形態25]

yahL 遺伝子をO-アセチルトランスフェラーゼ *OAcD* 遺伝子に置換する、実施形態18~24のいずれかに記載の方法。

[実施形態26]

O16 O-多糖生合成 (*rfb*) クラスターをプレジオモナス・シゲロイデス (*Plesiomonas shigelloides*) O17で置換し、*wecA-wzzE* を欠失させ、O-抗原 *waaL* をのO-オリゴ糖転移酵素PglL (淋菌 (*N. gonorrhoeae*) のPglLであってよい) に置換し、さらに大腸菌 (*E. coli*) O16 *wzz* 多糖鎖長モジュレーターをネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) LT2の *wzzB* 多糖鎖長モジュレーターに置換することによって、SsEの宿主菌株が遺伝子改変される、実施形態18~25のいずれかに記載の方法。

40

[実施形態27]

Tris (trimethamine)、リン酸塩 (たとえば、リン酸ナトリウム、シヨ糖リン酸グルタミン酸塩)、酢酸塩、ホウ酸塩 (たとえば、ホウ酸ナトリウム)、クエン酸塩、グリシン、ヒスチジンおよびコハク酸塩 (たとえば、コハク酸ナトリウム) などのバッファーであって、好適には、塩化ナトリウム、ヒスチジン、リン酸ナトリウムまたはコハク酸ナトリウムなどの前記バッファーをさらに含む、実施形態1~11のいずれかに記載の免疫原性組成物。

[実施形態28]

バッファーがリン酸ナトリウムである、実施形態27に記載の免疫原性組成物。

50

[実施形態 29]pHが5.5より高い、実施形態27または28に記載の免疫原性組成物。[実施形態 30]pHが5.5～7.0である、実施形態29に記載の免疫原性組成物。[実施形態 31]pHが6.5である、実施形態29に記載の免疫原性組成物。[実施形態 32]さらに塩を含む、実施形態27に記載の免疫原性組成物。[実施形態 33]さらに非イオン性界面活性剤を含む、実施形態27～32のいずれかに記載の免疫原性組成物。 10[実施形態 34]さらにアジュバントを含む、実施形態27～33のいずれかに記載の免疫原性組成物。[実施形態 35]アジュバントが水酸化アルミニウムである、実施形態34に記載の免疫原性組成物。[実施形態 36]実施形態1～11または実施形態27～35のいずれかに記載の免疫原性組成物の用量を患者に投与するステップを含む、細菌性赤痢に対する免疫付与の方法。[実施形態 37]用量が、4つの赤痢菌 (Shigella) O-抗原のそれぞれについて0～50 μgの多糖を含む、実施形態36に記載の方法。 20[実施形態 38]用量が、4つの赤痢菌 (Shigella) O-抗原のそれぞれについて40～50 μgの多糖を含む、実施形態37に記載の方法。[実施形態 39]用量が、4つの赤痢菌 (Shigella) O-抗原のそれぞれについて0～20 μgの多糖を含む、実施形態36に記載の方法。[実施形態 40]用量が、4つの赤痢菌 (Shigella) O-抗原のそれぞれについて0～10 μgの多糖を含む、実施形態39に記載の方法。 30[実施形態 41]用量が、4つの赤痢菌 (Shigella) O-抗原のそれぞれについて0～6 μgの多糖を含む、実施形態40に記載の方法。[実施形態 42]用量が、4つの赤痢菌 (Shigella) O-抗原のそれぞれについて10～20 μgの多糖を含む、実施形態39に記載の方法。[実施形態 43]用量が、4つの赤痢菌 (Shigella) O-抗原のそれぞれについて10～15 μgの多糖を含む、実施形態39に記載の方法。[実施形態 44]実施形態1～11または実施形態27～35のいずれかに記載の免疫原性組成物の免疫学的に有効な量を、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において抗体反応を誘導する方法。 40[実施形態 45]哺乳動物において抗体反応の誘導に使用するための、実施形態1～11または実施形態27～35のいずれかに記載の免疫原性組成物。[実施形態 46]哺乳動物において抗体反応を誘導するための、実施形態1～11または実施形態27～35のいずれかに記載の免疫原性組成物の使用。[実施形態 47]

哺乳動物において抗体反応を誘導するための薬剤を製造するための、実施形態1～11または実施形態27～35のいずれかに記載の免疫原性組成物の使用。

10

20

30

40

50