

【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】平成28年4月21日(2016.4.21)

【公表番号】特表2015-510883(P2015-510883A)

【公表日】平成27年4月13日(2015.4.13)

【年通号数】公開・登録公報2015-024

【出願番号】特願2014-561022(P2014-561022)

【国際特許分類】

A 6 1 K 39/085 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/31 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 39/085

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 31/04

A 6 1 K 45/00

C 0 7 K 14/31 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成28年3月1日(2016.3.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 7】

C P 5 / C P 8 ワクチンによる所見と同様に (2 0)、クランピング因子 A (C 1 f A) (2、2 7)、クランピング因子 B (C 1 f B) (5 7)、フィブロネクチン結合タンパク質 (F n B P) (6 5)、溶血素 (9、2 9)、パントンバレンタイン型ロイコシジン (P V L) (8) 及び鉄調節表面決定因子 (I s d B) (3 0、3 3) に対して開発されたサブユニットワクチンは実験動物モデルにおける部分的保護を仲立ちする。これらのサブユニットワクチンは、候補タンパク質が *in vivo* で高度に免疫原性であり (2 5、3 3、5 7)、得られる抗体が黄色ブドウ球菌のオプソニン殺菌 (opsonic killing) を促進する (6 5) にもかかわらず、完全な保護をもたらさなかった。これらのアプローチの欠陥の 1 つは、病原体に対する保護の促進が一価ワクチンに依存することであった。黄色ブドウ球菌は 7 0 個近くの毒性因子を有し、これらの因子間の機能的冗長性は或る因子を中和する効果を打ち消す可能性がある。ほぼ間違いなく、黄色ブドウ球菌は複数の鉄獲得系を発現する：受容体 H t s A 及び S i r A に対する シデロフォアスタフィロフェリン A 及びスタフィロフェリン B 輸送トランスフェリン (1 4、4 3)、 Fe^{3+} ヒドロキサメートを輸送する A B C 輸送体 F h u (5 8)、並びにヘモグロビン / ハプトグロビン複合体と結合する鉄調節表面決定因子 (I s d) B 及び I s d H 受容体 (1 8、6 2)。したがって I s d B 媒介性ヘモグロビン結合を阻止する抗 I s d B 抗体の全体的有効性は、鉄取込み及び生物病原性に対して僅かな効果でしかない可能性がある (3 0)。この議論の妥当性は、有望な免疫原性及び第二相試験によるオプソニン殺菌データ (2 5、5 2) にもかかわらず、完全な保護をもたらすことができなかった Merck の I s d B ワク

チン（V710）の第ⅠⅠⅠ相臨床試験の中止によって裏付けられる（16）。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

関連の実施の形態では、黄色ブドウ球菌感染症を治療又は阻害する方法は、1つ又は複数の抗菌剤を、黄色ブドウ球菌感染症を有するか又は黄色ブドウ球菌感染症を発症するリスクを有する被験体に投与し、該抗菌剤をワクチン配合物に先だって、それと同時、又はその後に投与ことを更に含んでいてもよい。これらの実施の形態において、抗菌剤（複数の場合もあり）は、アミノグリコシド、例えば、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン又はパロモマイシン；カルバセフェム、例えば、ロラカルベフ；カルバペネム、例えば、エルタペネム、ドリペネム、イミペネム/シラスタチン又はメロペネム；セファロsporin、例えば、セファドロキシル、セファゾリン、セファロチン、セファレキシン、セファクロル、セファマンドール、セホキシチン、セフプロジル、セフロキシム、セフィキシム、セフジニル、セフジトレン、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフボドキシム、セフトジジム、セフチブテン、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフェピム又はセフトピブロール；グリコペプチド、例えば、テイコブラニン又はバンコマイシン；マクロライド、例えば、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、エリスロペド、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン、テリスロマイシン又はスペクチノマイシン；モノバクタム、例えば、アズトレオナム；ペニシリン、例えば、アモキシシリン、アンピシリン、アズロシリン、カルベニシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、メズロシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリン、ピペラシリン又はチカルシリン；ポリペプチド、例えば、バシトラシン、コリスチン又はポリミキシンB；キノロン、例えば、シプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン又はトロバフロキサシン；スルホンアミド、例えば、マフェニド、プロントジル（初期型）、スルファセタミド、スルファメチゾール、スルファニルアミド（初期型）、スルファサラジン、スルフィソキサゾール、トリメトプリム又はトリメトプリム-スルファメトキサゾール（コトリモキサゾール）（TMP-SMX）；テトラサイクリン、例えば、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン又はテトラサイクリン；及びクロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、フシジン酸、フラゾリドン、リネゾリド、メトロニダゾール、ムピロシン、ニトロフラントイン、マクロビッド、プラテンシマイシン、キヌプリスチン/ダルホプリスチン、リファンピン又はリファンピシンを含む群から選択され得るが、これらに限定されない。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0053】

黄色ブドウ球菌感染症を治療又は阻害する方法は、1つ又は複数の抗菌剤を、黄色ブドウ球菌感染症を有する被験体又は黄色ブドウ球菌感染症を発症するリスクを有する被験体に投与することを更に含み得る。抗菌剤が本発明の方法に含まれる場合、抗菌剤はワクチン配合物を被験体に投与することに先だって、それと同時又はその後に投与することができる。抗菌剤をワクチン配合物に先だって又は後に投与する場合、抗菌剤及びワクチン配合物を投与する間隔は、数時間（例えば6時間、12時間、18時間又は24時間）、数

日間（例えば 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日又は 7 日）、数週間（例えば 1 週間、2 週間、3 週間又は 4 週間）又は数ヶ月間（例えば 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、5 ヶ月、6 ヶ月又はそれ以上）であり得る。抗菌剤は、黄色ブドウ球菌感染症の治療に有効ないずれの抗菌剤でもよく、例としては、アミノグリコシド、例えば、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン又はパロモマイシン；カルバセフェム、例えば、ロラカルベフ；カルバペネム、例えば、エルタベネム、ドリベネム、イミベネム/シラスタチン又はメロベネム；セファロsporin、例えば、セファドロキシム、セファゾリン、セファロチン、セファレキシン、セファクロル、セファマンドール、セホキシチン、セフプロジル、セフロキシム、セフィキシム、セフジニル、セフジトレン、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフボドキシム、セフトジジム、セフチブテン、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフェピム又はセフトピブロール；グリコペプチド、例えば、テイコブラニン又はバンコマイシン；マクロライド、例えば、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、エリスロペド、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン、テリスロマイシン又はスペクチノマイシン；モノバクタム、例えば、アズトレオナム；ペニシリン、例えば、アモキシシリン、アンピシリン、アズロシリン、カルベニシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、メズロシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリン、ピペラシリン又はチカルシリン；ポリペプチド、例えば、バシトラシン、コリスチン又はポリミキシン B；キノロン、例えば、シプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン又はトロバフロキサシン；スルホンアミド、例えば、マフェニド、プロントジル（初期型）、スルファセタミド、スルファメチゾール、スルファニルアミド（初期型）、スルファサラジン、スルフィソキサゾール、トリメトプリム又はトリメトプリム - スルファメトキサゾール（コトリモキサゾール）（TMP - SMX）；テトラサイクリン、例えば、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン又はテトラサイクリン；及びクロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、フシジン酸、フラゾリドン、リネゾリド、メトロニダゾール、ムピロシン、ニトロフラントイン、マクロビッド、プラテンシマイシン、キヌプリスチン/ダルホプリスチン、リファンピン又はリファンピシンを挙げることができるが、これらに限定されない。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0069

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0069】

次いで、アラビノース誘導（SACOL0037 及び SACOL0119）又はアンヒドロテトラサイクリン誘導（他の全て）を用いてクローンを発現させた。SACOL0037 及び SACOL0119 を、ProBond コバルト親和性クロマトグラフィー（Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA）によって精製し、Strept-Tactin Superflow カラム（IBA, Goettingen, Germany）を用いて他の全ての抗原を精製した。各タンパク質を 10% - 20% SDS - PAGE で分離し純度を確認し、BCA（Pierce, Rockford IL）によって量を決定した。SACOL0486、SACOL0688 及び グルコサミニダーゼ については、脱塩及びリン酸緩衝生理食塩水（PBS）への緩衝液交換を、30 kDa 分子量カットオフ（MWCO）Amicon 濾過ユニット（Millipore, Billerica, MA）を用いて製造仕様書に従って行った。SACOL0119 については、脱塩及び PBS への緩衝液交換を 10 kDa MWCO Amicon 濾過ユニット（Millipore, Billerica, MA）を用いて行った。SACOL0037 の Nano-pure 水への脱塩は、脱塩 PD - 10 カラム（GE Healthcare, Waukesha, WI）を用いて製造仕様書に従って達成した。続いて、Virtis 凍結乾燥機（SP Scientific, W

arminster, PA) を用いて S A C O L 0 0 3 7 を凍結乾燥し、タンパク質微粒子を P B S 中で再構成した。タンパク質量を B C A (Pierce, Rockland, IL) によって決定し、タンパク質を 1 0 % - 2 0 % S D S - P A G E で分離することによって確認した。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 5】

抗生物質療法と組み合わせたバイオフィルムで上方制御される抗原のワクチン接種は、黄色ブドウ球菌骨髄炎感染の排除を促進する

以前の研究では、Brady et al. が、バイオフィルム型の生育において上方制御され、ウサギにおいて高免疫原性の候補タンパク質を同定し、黄色ブドウ球菌バイオフィルム媒介性感染症に対する多価ワクチンを配合した (4)。最初のワクチン接種試験において、S A C O L 0 4 8 6、S A C O L 0 6 8 8、S A C O L 0 0 3 7 及び グルコサミニダーゼ (1つの組換えタンパク質当たり 1 0 μ g) から構成される四価ワクチンを、黄色ブドウ球菌脛骨骨髄炎感染を用いた病原体接種の 2 0 日前及び 1 0 日前にウサギに注射した。ワクチン接種したウサギは、感染の 1 4 日後に対照動物と比較して細菌容量の僅かな低減を有していたが、細菌排除は達成されなかった (データ非提示 / Brady 2011)。四価ワクチンは黄色ブドウ球菌バイオフィルムを標的とするが、その成分は黄色ブドウ球菌プランクトン型細胞に対する効果的な液性応答を活性化せず、これらの細菌は免疫回避因子の発現のために感染の 1 4 日後に残存する。したがって、ワクチン接種戦略を、病原体接種の 1 4 日後に開始する 1 0 日間のバンコマイシン処理過程を加えることによって改変させ、バイオフィルムから分散した抗生物質感受性のプランクトン型細菌を根絶させた。二重療法の有効性を評価するために、二重療法群のウサギにおける黄色ブドウ球菌計数 (図 2 A) 及び排除率 (図 2 B) を、ワクチン未接種の未処理群、ワクチン未接種の処理群及びワクチン接種した未処理群と比較した。細菌数及び感染率の両方の有意な低減が二重療法によって観察され (カラム 4)、黄色ブドウ球菌のプランクトン型表現型の標的化がバイオフィルム介在性感染症の根絶にとって不可欠であることが立証された。全体としては、対照動物と比較して細菌集団の 9 9 . 9 % の低減がワクチン接種した動物において観察された。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 6】

バイオフィルムによって上方制御される抗原、及びプランクトン型特異的な抗原から構成される五価ワクチンのワクチン接種は、黄色ブドウ球菌脛骨インプラント感染症の排除を促進する

ウサギ脛骨骨髄炎モデルにおけるワクチン研究の延長として、プランクトン型特異的な抗原 S A C O L 0 1 1 9 をバイオフィルム指向性四価ワクチン (S A C O L 0 4 8 6、S A C O L 0 6 8 8、S A C O L 0 0 3 7 及び グルコサミニダーゼ) に加えることによって、プランクトン型表現型の黄色ブドウ球菌感染症を標的とした。黄色ブドウ球菌感染症に対するこの五価ワクチンの有効性を、骨髄炎に加えて別のバイオフィルム介在性感染症に対するワクチンの決定的な評価であるマウス脛骨インプラントモデルを用いて評価した。1 2 . 5 μ g の各々の組換え抗原から構成される五価ワクチンを、脛骨インプラントモデルを用いた黄色ブドウ球菌病原体接種の 2 8 日前及び 1 4 日前に投与した。病原体接種の 2 1 日後に、五価ワクチンでワクチン接種したマウスの脛骨における C F U を計数し、四価ワクチン又は一価 S A C O L 0 1 1 9 ワクチンでワクチン接種したマウス及びワクチ

ン未接種マウスによる計数値と比較した。腎臓ホモジネートも細菌数について検査した。任意の対照又は実験動物の腎臓においては黄色ブドウ球菌は観察されず、感染症が局所的であり、脛骨から播種しないことが確認された。ワクチン未接種マウスにおいては、100%の感染率が観察され(図3)、インプラント挿入部位の周辺に被膜の発生が観察された(データは示さない)。四価ワクチン及びSACOL0119ワクチンは、黄色ブドウ球菌感染症に対する部分的保護をもたらし、それぞれ50%及び40%の動物において細菌排除が観察された(図3)。四価ワクチン及びSACOL0119ワクチンを接種したマウスにおいて、脛骨上の被膜の存在はインプラント部位の黄色ブドウ球菌の存在に対応していた。バイオフィルムによって上方制御される抗原又はプランクトン型特異的な抗原単独によるワクチン接種は、ほぼ同等の保護をもたらすことから、抗原の組合せが相乗効果を有し、脛骨インプラントモデルにおける黄色ブドウ球菌の完全な排除をもたらす得ることが推測された。本発明者らの研究室によって以前に実証されたように、このプランクトン型抗原の追加は、残留する黄色ブドウ球菌を根絶する補助抗生物質療法の使用の代わりとなり得る。実際に、五価ワクチンは、このワクチン部分群の全てのマウスにおける100%の排除という黄色ブドウ球菌に対する完全な保護をもたらした(図3)。加えて、五価ワクチンを接種したマウスの脛骨は、感染の兆候を有しない非感染脛骨と同様であった。したがって、多価バイオフィルム指向性ワクチンへの単一プランクトン型抗原の組み入れは、ワクチンの有効性をC57BL/6Jマウスにおけるバイオフィルム媒介性インプラント感染症の予防を50%から100%にまで増大させた。ここに、本発明者らは、プランクトン型表現型及びバイオフィルム表現型の両方の病原体を標的とするワクチン接種戦略を用いて、臨床試験にまで進められたものを含む他のワクチン配合物では達し得なかった業績である黄色ブドウ球菌の完全な細菌排除を達成した。