

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-528172
(P2024-528172A)

(43)公表日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/02	4 B 0 6 5	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	4 C 0 8 5	
C 1 2 N	9/52 (2006.01)	C 1 2 N	9/52	Z N A	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	E	
C 0 7 K	14/315 (2006.01)	C 0 7 K	14/315		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全24頁)					
(21)出願番号 特願2024-506491(P2024-506491)			(71)出願人 510000976		
(86)(22)出願日 令和4年6月29日(2022.6.29)			インターベット インターナショナル ベー・フェー・		
(85)翻訳文提出日 令和6年3月29日(2024.3.29)			オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベル		
(86)国際出願番号 PCT/EP2022/067891			ストラート・3 5		
(87)国際公開番号 WO2023/011811			(74)代理人 100114188		
(87)国際公開日 令和5年2月9日(2023.2.9)			弁理士 小野 誠		
(31)優先権主張番号 21189282.3			(74)代理人 100119253		
(32)優先日 令和3年8月3日(2021.8.3)			弁理士 金山 賢教		
(33)優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)			(74)代理人 100124855		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			(74)代理人 100129713		
			弁理士 坪倉 道明		
			(74)代理人 100137213		
			弁理士 重森 一輝		
最終頁に続く			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 様々な血清型のストレプトコッカス・スイスに対する防御のためのワクチン

(57)【要約】

本発明は、ストレプトコッカス・スイス血清型1のI g Mプロテアーゼ抗原と、ストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型1 6 と、薬学的に許容される担体とを組み合わせる含むワクチンに関する。本発明はまた、ストレプトコッカス・スイスによる病原性感染からブタを防御する方法において使用するための、ストレプトコッカス・スイス血清型1のI g Mプロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型1 6 との組合せ、及び、ストレプトコッカス・スイス血清型1のI g Mプロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型1 6 とをブタに投与することによって、ストレプトコッカス・スイスによる病原性感染から前記ブタを防御するための方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原と、ストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型 9、配列型 16 と、薬学的に許容される担体とを組み合わせるワクチン。

【請求項 2】

前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原が、前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の細菌の対応する天然起源の I g M プロテアーゼと少なくとも 90% の配列同一性を有する全 I g M プロテアーゼ抗原であることを特徴とする、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 3】

前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原が、前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の細菌の対応する天然起源の I g M プロテアーゼと少なくとも 95% の配列同一性を有する全 I g M プロテアーゼ抗原であることを特徴とする、請求項 1 及び 2 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 4】

前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原が、そのアミノ酸配列に 4 つ未満の反復配列を含むことを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 5】

前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原が、そのアミノ酸配列に 3 つ未満の反復配列を含むことを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 6】

前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原が、そのアミノ酸配列に 2 つの反復配列を含むことを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 7】

前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原が、配列型 13 のものであることを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 8】

前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原及び前記ストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型 9、配列型 16 以外の他のストレプトコッカス・スイス抗原を含まないか、又は、せいぜいストレプトコッカス・スイス血清型 7 の I g M プロテアーゼ抗原のみを含むことを特徴とする、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 9】

ストレプトコッカス・スイスによる病原性感染からブタを防御する方法において使用するための、ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型 9、配列型 16 との組合せ。

【請求項 10】

前記防御が、血清型 1、2、7 及び 9 のいずれかのストレプトコッカス・スイスによる病原性感染に対するものであることを特徴とする、請求項 9 に記載の使用のための組合せ。

【請求項 11】

前記方法が、前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原と前記ストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型 9、配列型 16 との、最長で 35 日齢の前記ブタへの投与を含むことを特徴とする、請求項 9 及び 10 のいずれかに記載の使用のための組合せ。

【請求項 12】

前記方法が、雌ブタの初乳の摂取を通じてブタを防御するための、前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原と前記ストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型 9、配列型 16 との前記雌ブタへの投与を含むことを特徴とする、請求項 9 及び 10 のいずれかに記載の使用のための組合せ。

【請求項 13】

前記ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原と前記ストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型 9、配列型 16 とが、前記ブタが前記初乳を摂取する前に、前記雌ブタに 2 回投与されることを特徴とする、請求項 12 に記載の使用のための組合せ。

【請求項 14】

ストレプトコッカス・スイスによる病原性感染に対するブタの防御用ワクチンの製造のための、ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型 9、配列型 16 との使用。

【請求項 15】

ストレプトコッカス・スイス血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型 9、配列型 16 とをブタに投与することによって、ストレプトコッカス・スイスによる病原性感染から前記ブタを防御するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、様々な血清型、特に最も一般的な血清型 1、2、7 及び 9 のストレプトコッカス・スイス細菌による病原性感染に対するブタの防御に関する。

【背景技術】

【0002】

ストレプトコッカス・スイス (*Streptococcus suis*: *S. suis*) は、ブタの伝染性細菌疾患の主要な病原因子の 1 つである。この病原体は、髄膜炎、関節炎、心膜炎、多発性漿膜炎、敗血症、肺炎及び突然死などの様々な臨床症候群を引き起こし得る。*S. suis* は、元々はランスフィールド群 R、S、R/S 又は T として定義されたグラム陽性の通性嫌気性球菌である。後に、細胞壁に位置する型特異的莢膜多糖類抗原に基づく新しいタイピング系が提案された。これにより、35 の血清型を含む系が導かれ (Rasmussen 及び Andresen、1998 年、「16S rDNA sequence variations of some *Streptococcus suis* serotypes」、*Int. J. Syst. Bacteriol.* 48、1063~1065)、そのうち血清型 1、2、7 及び 9 が現在、特にヨーロッパで最も一般的になっている。しかし、莢膜血清型は、毒性のマーカーとしては不十分であると認識されている。そこで、*S. suis* 感染の疫学、及び血清型判定アプローチの生物学的関連性を理解するのを助ける代替系、すなわち、King らにより、*Journal of Clinical Microbiology*、2002 年 10 月、3671~3680 頁 (Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange) に記載の、いわゆる多座位配列タイピング (multilocus sequence typing: MLST) が開発された。その研究では 92 の配列型が同定され、そのうちの配列型 (sequence type: ST) 複合体 ST1、ST27 及び ST87 は、それぞれ複数の配列型を含み、集団を支配している。オックスフォード大学 (Jolley ら、*Wellcome Open Res* 2018 年、3: 124 (ウェルカム・トラストが資金提供するサイト) にあり、King らの論文を参照し、任意のストレプトコッカス・スイス株について配列型の同定が容易にできるストレプトコッカス・スイス MLST ウェブサイト (<https://pubmlst.org>

10

20

30

40

50

／ s s u i s ／) も参照されたい。

【0003】

ブタ群におけるストレプトコッカス・スイスの制御は困難なようである。ストレプトコッカス・スイスは、共生的かつ日和見的なブタの病原体である。明らかに、免疫系は感染のたびに引き起こされるわけではない。また、ストレプトコッカス・スイスは、十分に被包された病原体であり、広範な毒性因子を用いて宿主免疫系を回避する。合わせて、これらの特徴が、この重要な病原体と戦うための有効なワクチン開発の課題となってきた。数年前に概要論文が発表されており、この論文では、ストレプトコッカス・スイスに対する既存のワクチン及び探索的ワクチンについて総括されている (Mariela Segura: 「Streptococcus suis vaccines: candidate antigens and progress」、Expert Review of Vaccines、第14巻、2015年、第12号、1587～1608頁)。この総説では、臨床現場の情報及び実験データをまとめ、比較して、以下に概説するストレプトコッカスに対するワクチン開発状況の概要が提供されている。

10

【0004】

現在市販されているワクチンは、主に全細胞バクテリンである。しかし、現場報告には、疾患の制御及び管理の困難さが記載されており、バクテリンワクチンを使用する場合、特に異種防御作用が非常に弱いと、特に「ワクチン不全」が通常となっている。保菌ブタが主要な感染源であり、垂直伝播及び水平伝播の両方が群れ内での疾患の拡散に参与している。離乳及び輸送などのストレスの多い条件下で、保菌動物と感受性動物とを混合すると、たいていの場合で臨床疾患が生じる。早期に投薬して離乳したり、隔離して早期離乳を実践したりしても、ストレプトコッカス・スイス感染は排除されない。したがって、疾患を予防するための有効な制御対策は、(可能な場合の) 予防／集団的予防処置及びワクチン接種にかかっている。現在、現場での免疫処置の取り組みは、市販又は自家バクテリンの使用に焦点が当てられている。これらのワクチン戦略は、子ブタ又は雌ブタのいずれかに適用されている。離乳期以降の子ブタは、離乳や、その後に通常行われる輸送に伴うストレスによって、ストレプトコッカス・スイス感染症に罹りやすい。したがって、子ブタに受動免疫を試み、伝達し、生後早期にこれらのストレスの多い状況下でストレプトコッカス・スイスに対する防御作用を提供するために、多くの場合、雌ブタでの分娩前免疫処置が用いられる。さらに、雌ブタのワクチン接種は費用がかからず、労働集約的であるため、子ブタのワクチン接種に代わる経済的な方法となっている。しかし、得られた結果は、バクテリンでの雌ブタのワクチン接種も議論の的であることを示しているように思われる。多くの場合、ワクチン接種された雌ブタは、分娩前に2回ワクチン接種された場合でさえ、ワクチン接種に対する応答が不十分であるか又は全く応答せず、その結果、同腹仔に移行する母子免疫が低くなる。また、母子免疫が十分なレベルで移行されたとしても、多くの場合、母体抗体は、4～7週齢の最も重要な期間における防御作用を提供するには低すぎる。

20

30

【0005】

子ブタには、特にヨーロッパにおいて、自家バクテリンが現場で頻繁に使用されている。自家バクテリンは、臨床上の問題がある飼養場で単離された毒性株から調製され、同じ飼養場に適用される。自家バクテリンの欠点の1つは、ワクチンの安全性データが不足しており、重度の有害反応が起こり得ることである。サンプリングミス(1～2頭のみのブタ又はサンプルを使用することによる)は、最近の大流行に関連する株又は血清型の同定に失敗する可能性がある。この失敗は、風土病群では特に問題となる可能性がある。最後に、自家バクテリンの最も重要なジレンマは、その実際の有効性がほとんど研究されていないことである。自家ワクチンは経験的に適用されているため、このワクチンで得られた結果が一貫せず、多くの場合に期待外れであることは驚くにあたらない。

40

【0006】

他の実験的ワクチンについても、文献に記載されている。Kai-Jen Hsuehらは、サブユニット添加バクテリンが、成功した雌ブタのワクチン接種の基礎となって、

50

その子ブタに防御免疫を付与し得ることを示している（「Immunization with Streptococcus suis bacterin plus recombinant Ssa protein in sows conveys passive immunity to their piglets」: BMC Veterinary Research, BMC series-open, inclusive and trusted、13:15、2017年1月7日）。

【0007】

文献では、弱毒化生ワクチンも企図されている。ストレプトコッカス・スイス血清型2の非被包性の同質遺伝子変異体は、無毒性であることが明確に示されている。しかし、非被包性の血清型2変異体に基づく生ワクチン製剤は、死亡に対して部分的な防御作用しか誘発せず、野生株で攻撃を与えたブタでの臨床徴候の発生を予防することができなかった（Wisselink HJ、Stockhofe-Zurwieden N、Hilgers LAら、「Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of Streptococcus suis serotype 2.」、Vet Microbiol.、2002年、84:155~168）。

【0008】

ここ数年間に、抗原性又は免疫原性のストレプトコッカス・スイス分子の広範なリストが報告されており、これらのほとんどは、感染したブタ又はヒトからの回復期血清、及び／又は実験室で産生された免疫血清のいずれかを使用した免疫プロテオミクスによって発見されている。国際公開第2015/181356号（IDTバイオロジカ社）では、IgMプロテアーゼ抗原（全タンパク質、又は完全タンパク質の約35%のみを表す高度に保存されたMac-1ドメインのいずれか）を、バクテリンを含有するプライムワクチン接種と組み合わせてもよく、IgMプロテアーゼ抗原を2回投与するワクチン接種スキームにおいて、子ブタで防御免疫応答を引き起こし得ることが示されている。'356特許出願では、IgMプロテアーゼ抗原は、全てではないにしてもほとんどのストレプトコッカス・スイス血清型、特に最も一般的な血清型1、2、7及び9全体にわたって高度に保存されているという事実により、IgMプロテアーゼ抗原を使用して、ストレプトコッカス・スイス血清型、特に血清型1、2、7及び9の間の広範な交差防御作用に到達し得ることが示唆されている。

【0009】

国際公開第2017/005913号（インターバック アーバー（Intervac AB）社）では、IgMプロテアーゼが様々なストレプトコッカス・スイス血清型全体にわたって高度に保存されており、そのため、この抗原を使用して到達することが可能で予想された広範な防御作用が確認されている。

【0010】

最近、他の血清型に対する防御のためのIgMプロテアーゼ抗原、特に血清型2のIgMプロテアーゼ抗原の使用に関する特許出願が公開されている。これらの出願で、IgMプロテアーゼ抗原の交差防御性が確認されている。

【0011】

特に、国際公開第2020/094762号には、血清型14による攻撃に対する血清型2のIgMプロテアーゼ抗原の使用について記載されている。非常に妥当な防御作用を得ることができるようである。

【0012】

国際公開第2019/115741号では、IgMプロテアーゼ抗原が血清型9のストレプトコッカス・スイスによる病原性感染を防御するのに有効であることが示されている。しかし、防御作用はそれほど高くなく、せいぜい通常のバクテリンワクチンで得られるレベルであり、すなわち（実際には、たいていはあまり激しくない攻撃に直面して、防御作用がより高いレベルになることを排除しない）人為的攻撃実験での死亡及び陽性血液単

10

20

30

40

50

離において、約50%の低減のようである。一見すると、このやや期待外れの防御作用は、RieckmannらによってVaccine, 3 (2019年) 100046 (「Vaccination with the immunoglobulin M-degrading enzyme of Streptococcus suis, Ides suis, leads to protection against a highly virulent serotype 9 strain」)に報告されている、血清型9のストレプトコッカス・スイスによる感染に対するIgMプロテアーゼ抗原で得られる高レベルの防御作用、また人為的攻撃実験における高レベルの防御作用、及び国際公開第2020/094762号に示されている血清型14のストレプトコッカス・スイスに対する防御作用と矛盾しているように思われる。文献に基づけば、通常の血清型9の細菌に対する比較的低いレベルの防御作用を理解することはできない。

10

【0013】

少なくとも多少の防御作用が予想されるが、文献では、血清型1及び7のストレプトコッカス・スイスによる攻撃に対するIgMプロテアーゼ血清型2の防御作用については、得られたデータがない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】国際公開第2015/181356号

【特許文献2】国際公開第2017/005913号

【特許文献3】国際公開第2020/094762号

【特許文献4】国際公開第2019/115741号

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Rasmussen及びAndresen、1998年、「16S rDNA sequence variations of some Streptococcus suis serotypes」、Int. J. Syst. Bacteriol. 48、1063~1065

【非特許文献2】Kingら、Journal of Clinical Microbiology、2002年10月、3671~3680頁 (Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the pig pathogen Streptococcus suis: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange)

30

【非特許文献3】Mariela Segura:「Streptococcus suis vaccines: candidate antigens and progress」、Expert Review of Vaccines、第14巻、2015年、第12号、1587~1608頁

【非特許文献4】Kai-Jen Hsuehら、「Immunization with Streptococcus suis bacterin plus recombinant Sao protein in sows conveys passive immunity to their piglets」: BMC Veterinary Research, BMC series-open, inclusive and trusted、13:15、2017年1月7日

40

【非特許文献5】Wisselink HJ、Stockhofe-Zurwieden N、Hilgers LAら、「Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of Streptococcus suis serotype 2.」、Vet Microbiol.、2002年、84:155~168

50

【非特許文献6】R i e c k m a n n ら、V a c c i n e、3 (2019年) 100046、「V a c c i n a t i o n w i t h t h e i m m u n o g l o b u l i n M - d e g r a d i n g e n z y m e o f S t r e p t o c o c c u s s u i s , I d e s s u i s , l e a d s t o p r o t e c t i o n a g a i n s t a h i g h l y v i r u l e n t s e r o t y p e 9 s t r a i n」

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明の目的は、ストレプトコッカス・スイスに対する、特に、血清型1、2、7及び9を含む様々な血清型のストレプトコッカス・スイスに対する、ブタについての（交差）防御作用を提供するための改良ワクチンを見出すことである。好ましくは、本ワクチンは、4つ未満のこれら血清型に由来する抗原を含み、4つ未満の血清型であっても、少なくともこれら4つの血清型の全てに対して、少なくとも現場に存在するこれらの血清型の代表的な株に対して、妥当な防御作用を提供することができる。

10

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明の目的を果たすために、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原と、ストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型16と、薬学的に許容される担体とを組み合わせる含むワクチンを考案した。

【0018】

20

本発明は、2つの予想外の発見に基づいたものである。第1に、血清型2のIgMプロテアーゼによって与えられる異種防御作用は、特に、異なる血清型のストレプトコッカス・スイスの間でIgMプロテアーゼが高度に保存されているので、先行技術の教示に基づいて予想されるほど良好ではないようであった。特に、最もよく理解されているように、Mac-1ドメインは、今日知られている全てのストレプトコッカス・スイス血清型において非常に高い同一性レベルで存在する。血清型2の攻撃に対する血清型のIgMプロテアーゼ抗原によって与えられる同種防御作用は優れているが、それでもなお、ストレプトコッカス血清型1及び7に対する防御作用は、まだ著しく改良される可能性がある。別の予想外の発見は、血清型1のIgMプロテアーゼ抗原によって与えられる異種防御についても、特に血清型2及び7に対して非常に良好なことであった。特に、血清型2に対して与えられる異種防御のレベルが、血清型1に対して血清型2によって与えられる異種防御よりも著しく良好であるという事実は、全く予想外である。

30

【0019】

非常に予想外のさらなる発見は、血清型2、又は実際には任意の血清型のIgMプロテアーゼ抗原が、最も一般的な型のストレプトコッカス血清型9、すなわちストレプトコッカス血清型9、配列型16に対する妥当な防御作用をほとんど提供しないことであった（多少の防御作用は得られるが、そのレベルは商業的に成功するワクチンには十分ではない）。一見すると、この発見は、R i e c k m a n n に報告されている結果と矛盾しているように思われる。しかし、詳細に検討すると、R i e c k m a n n の研究では、血清型9、配列型94のストレプトコッカス・スイス株が使用されているようである。国際公開第2019/115741号では、示されていないが、配列型16のストレプトコッカス・スイス株が使用されている。これは、K i n g らが記載した（上記を参照されたい）多座位配列タイピングに従って、使用した攻撃株をタイピングすることによって後に見出された。明らかに、後者の型（血清型9、配列型16のS. suis）に対しては、IgMプロテアーゼ抗原により、実質的により低いレベルで防御作用が提供される。この理由は完全には明らかではないが、非常に不利であり、それは、多くの国、特にオランダなどの欧州諸国では、配列型16のストレプトコッカス・スイスが、ストレプトコッカス・スイス血清型9の細菌の最も一般的な（約95%までの）病原型であるからである（W i l l e m s e ら、S c i e n t i f i c R e p o r t s、2019年、9:15429、「C l o n a l e x p a n s i o n o f a v i r u l e n t S t r e p t o c o

40

50

ccus suis serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulation」)。このように、IgMプロテアーゼが全血清型にわたって防御作用をもたらし得るが、特にストレプトコッカス・スイス血清型9、配列型16に関しては、有効な防御作用にギャップのあることがわかった。

【0020】

上記発見の全てを認識した後で初めて、血清型1、2、7及び9のストレプトコッカス・スイスから（したがって、最も一般的な株型から）、現場で適切に防御する改良ワクチン、本発明のワクチンを考案することができたと結論付けることができた。血清型1のIgMプロテアーゼ抗原を使用する場合、当技術分野で使用される血清型2のIgMプロテアーゼで得られるよりも良好なレベルで、血清型1、2及び7に対する妥当な防御作用が得られ得ることがわかった。また、血清型9、配列型16に対する防御作用のギャップは、血清型9、配列型16のストレプトコッカス・スイスのバクテリンを使用して、ストレプトコッカス・スイス血清型9、配列型16による病原性感染からブタを防御することによって埋め得ることがわかった。この組合せに存在するIgMプロテアーゼは、それ自体、血清型9、配列型16のストレプトコッカス・スイスに対する妥当な防御作用を提供するのに適してはいないが、バクテリンの防御作用をさらに改良する可能性がある。

10

【0021】

本発明により、2つの異なる血清型（1及び9）の2つのストレプトコッカス・スイス抗原のみを使用することによって、最も一般的なストレプトコッカス・スイス細菌に対する妥当な防御作用を得、血清型2の細菌のIgMプロテアーゼを使用する場合、ストレプトコッカス・スイス細菌に対する防御作用におけるいかなるギャップ又は不足も埋めることができる。本発明により、重要な代表種である配列型16を含む血清型9のストレプトコッカス・スイスに対する可能な最良の防御作用に到達することだけでなく、一般的な全ての血清型、特に血清型1、2、7及び9にわたって、非常に広範で高レベルの防御作用に到達する方法に到達することも可能である。

20

【0022】

本発明はまた、ストレプトコッカス・スイスによる病原性感染からブタを防御する方法において使用するための、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型16との組合せに関する。

30

【0023】

また、本発明は、ストレプトコッカス・スイスによる病原性感染に対するブタの防御用ワクチンを製造するための、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型16との使用、並びに、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型16とをブタに投与することによって、ストレプトコッカス・スイスによる病原性感染からブタを防御するための方法に関する。

【0024】

定義

40

ストレプトコッカス・スイスのIgMプロテアーゼ抗原は、ブタIgMを特異的に分解する酵素であり（ブタIgG又はブタIgAは分解しない。SeeleらによるJournal of Bacteriology、2013年、195、930～940、及びVaccine 33:2207～2212、2015年5月5日）、IdeS suisと表されるタンパク質、又はその免疫原性部分である（概して、長さが、全長酵素の少なくとも約30～35%である）。全酵素は、約1000～1150個のアミノ酸に対応する約100～125kDaの重量を有し、サイズはS. suisの血清型に依存する。国際公開第2015/181356号には、ストレプトコッカス・スイスのIgMプロテアーゼ抗原を表すいくつかの配列が示されている。すなわち、配列番号1（本出願にも組み込まれる）、配列番号2、配列番号6、配列番号7及び配列番号5（これらの4つの配列

50

2、6、7及び5は、本出願に組み込まれない）であり、後者は全長酵素の免疫原性部分である（Mac-1ドメインとして示され、すなわち配列番号7のアミノ酸80～414である）。全長酵素の免疫原性部分の他の例は、国際公開第2017/005913号に示されている。IgMプロテアーゼの特定の例は、国際公開第2015/1818356号の配列番号1によるプロテアーゼ、又は、重複領域において少なくとも90%、さらには91、92、93、94、95、96、97、98、99%から100%までの配列同一性を有するタンパク質である。アミノ酸配列同一性は、デフォルトパラメータでblastpアルゴリズムを用いてBLASTプログラムで確立され得る。様々な血清型のストレプトコッカス・スイスのIgMプロテアーゼは、配列同一性が75%より高いと予想され、特に、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、90、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%から100%までであると予想される。例えば抗原の組換え産生系において収量を最適化するように作製された人工タンパク質は、必要とされる免疫原性機能を維持する一方で、全酵素と比較したアミノ酸配列同一性は、85%、80%、75%、70%、65、60、55又はさらには50%などと低くなる場合があり、本発明の意味において、ストレプトコッカス・スイスのIgMプロテアーゼ抗原であると理解される。

10

【0025】

ストレプトコッカス・スイスの全IgMプロテアーゼ抗原は、少なくともMac-1ドメイン、構造的機能に関連する領域、CNV領域を含み、細胞接着領域を含んでもよい抗原である（ストレプトコッカス・スイスのゲノムにおけるこれらの領域の同定については実施例1を参照されたい）。これは全IgMプロテアーゼ抗原と見なすことができ、それは、シグナルペプチドがいずれにしても天然起源（すなわち野生型）の分泌酵素には欠けていると考えられ、細胞接着領域はプロテアーゼとしての機能に必須ではないと考えられるためである。

20

【0026】

ワクチンは、対象への適用に適した構成物であり、免疫学的有効量（すなわち、標的対象の免疫系を、野生型微生物の攻撃の悪影響を少なくとも低減するのに十分な程度に刺激することができる）の1つ又は複数の抗原を、概して、薬学的に許容される担体と組み合わせ含み、対象に投与すると、感染症を治療する、すなわち感染症又はその感染症から生じる何らかの疾患若しくは障害を予防し、寛解させ、又は治療するのを助ける免疫応答を誘発する。

30

【0027】

ゲノム又は対応するアミノ酸配列における反復配列は、生物のゲノム又は対応するアミノ酸配列において、1回又は複数回繰り返されるコピー（全く同じであるか又は非常に類似している、例えば相同体）である。これは、ゲノムの部分が繰り返されるコピー数多型の現象の一部である。概して、反復配列の数は、同じ生物の異なる株の間で異なる。コピー数多型は、構造的多型の一種である。これは、かなりの数の塩基対、例えば、10～130個の間のアミノ酸に対応する30～400塩基対の間のどこかに、概して影響を及ぼす重複事象の一種である。

【0028】

微生物による病原性感染に対する防御は、防御免疫に到達すること、すなわち、例えば実際の感染、又は病原体による病原性感染に起因する1つ又は複数の臨床徴候を予防又は軽減するために、その微生物による病原性感染又はその感染から生じる障害の予防、寛解又は治療を助けることと同じである。

40

【0029】

バクテリアは、ワクチンとして使用するための死菌の懸濁液である。

【0030】

抗原を組み合わせるとは、1つのワクチン製剤に異なる抗原を加えるによって、又は別々の製剤を同時投与するために別々の抗原製剤を使用することによって、1つのワクチン接種計画においてこれらの（個々に異なる）抗原と一緒に使用することである。

50

【0031】

混合ワクチン（すなわち、抗原の組合せを含むワクチン）は、様々な抗原を同時に含む1つの（単一の）製剤である。これらの様々な抗原は、それら抗原が同じ製剤になる限り、いわゆる使用準備済の混合ワクチンを提供するために工場で混合するか、又は投与直前若しくは投与中に混合することができる（例えば、別々の抗原のための2つの別々のチャンバを有する装置を使用し、投与のために装置を使用する時にこれらのチャンバの内容物が混合される）。

【0032】

ブタは、イノシシ科に属する動物のいずれかである。

【0033】

薬学的に許容される担体は、生体適合性媒体であり、すなわち、処置された対象において投与後に顕著な有害反応を誘発せず、該担体を含む組成物を投与した後に、対象の免疫系に抗原を提示することができる媒体である。そのような薬学的に許容される担体は、例えば、水及び／又は任意の他の生体適合性溶媒を含有する液体、又は固体担体であってもよく、例えば、（糖及び／又はタンパク質に基づく）凍結乾燥ワクチンを得るために通常使用されるものであり、免疫賦活剤（アジュバントとも呼ばれる）を含んでもよい。対応するワクチンの意図される用途又は必要とされる特性に応じて、他の物質、例えば安定剤、粘度調整剤、又は他の成分が添加されてもよい。

【発明を実施するための形態】

【0034】

本発明によるワクチンのさらなる実施形態では、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原は、ストレプトコッカス・スイス血清型1の細菌の対応する天然起源（すなわち野生型）のIgMプロテアーゼと少なくとも90%の配列同一性を有する全IgMプロテアーゼ抗原である。文献から、IgMプロテアーゼのMac-1ドメイン（約35%）だけでも防御作用を提供するのに十分であることが知られているが、全抗原は、より有効な免疫応答を提供すると考えられる。特に、天然起源のIgMプロテアーゼと90%以上、例えば91、92、93、94、95、96、97、98、99又はさらには100%の配列同一性が、妥当な同種及び異種の防御作用に到達するために好ましい。

【0035】

本発明によるワクチンのまたさらなる実施形態では、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原は、そのアミノ酸配列に4つ未満の反復配列を含む。ストレプトコッカス・スイスのゲノムの構造解析により、この細菌のゲノムは、ゲノムの部分が繰り返されるコピー数多型（Copy Number Variation: CNV）の現象を生じやすいことが明らかになっている。特に、その反復配列は、加水分解酵素活性を有する既知のタンパク質配列と類似性を有している。血清型2のIgMプロテアーゼは、血清型2が4つの反復配列を含有するという点で、より良好な異種防御作用を提供するもの（血清型1及び7など）とは大きく異なることがわかった。したがって、反復配列の数が4つ未満、又はさらには3つ未満、例えば2つであれば、可能な限り最良の（異種）防御作用に到達するには有利であると考えられる。

【0036】

最も好ましいのは、2つの反復配列を含有する配列型13のストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原である。

【0037】

ワクチンは、例えば血清型2のIgMプロテアーゼなどの追加的なストレプトコッカス・スイス抗原を含んでもよいが、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原及びストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型16以外の他のストレプトコッカス・スイス抗原を含まなくても、又は、せいぜいストレプトコッカス・スイス血清型7のIgMプロテアーゼ抗原のみを含んでいれば十分であることがわかった。抗原が多くなるということは、原価が高くなり、かつ、抗原負荷が高くなることによる

10

20

30

40

50

副作用の危険性が高くなることを意味する。

【0038】

ストレプトコッカス・スイスに対する防御において使用するための組合せのさらなる実施形態では、その防御は、血清型1、2、7及び9のいずれかのストレプトコッカス・スイスによる病原性感染に対するものである。

【0039】

本発明による使用のための組合せのまたさらなる実施形態では、本方法は、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型16とを、最長で35日齢のブタに投与することを含む。

【0040】

代替の実施形態では、本方法は、雌ブタの初乳の摂取を通じてブタ（通常は子ブタ）を防御するために、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原とストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型16とをこの雌ブタに投与することを含む。IgMプロテアーゼ（国際公開第2019/193078号を参照されたい）は、ワクチン接種した雌ブタから子ブタが初乳を摂取した場合、その子ブタに妥当でかつ長期の防御作用を提供することが知られている。また、バクテリンによって与えられる防御作用は、初乳を介して子ブタに移行することが一般的に知られている。

【0041】

一実施形態では、ストレプトコッカス・スイス血清型1のIgMプロテアーゼ抗原、及びストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型16は、子ブタが前記初乳を摂取する前に、雌ブタに2回投与されている。

【0042】

次に、以下の具体例を用いて本発明をさらに説明する。

【0043】

[実施例]

実施例1 ストレプトコッカス・スイスのゲノムの構造解析。

【0044】

実施例2 では、血清型1 に対するIgMプロテアーゼ血清型2の交差防御作用について研究する。

【0045】

実施例3 では、血清型7 に対するIgMプロテアーゼ血清型2の交差防御作用について研究する。

【0046】

実施例4 では、血清型9、配列型16 に対するIgMプロテアーゼ血清型2の交差防御作用について研究する。

【0047】

実施例5 では、血清型1 による攻撃に対して、血清型1 及び7のIgMプロテアーゼによって与えられる防御作用について研究する。

【0048】

実施例6 では、血清型2 による攻撃に対して、血清型1 及び7のIgMプロテアーゼによって与えられる防御作用について研究する。

【0049】

実施例7 では、血清型7 による攻撃に対して、血清型1 及び7のIgMプロテアーゼによって与えられる防御作用について研究する。

【0050】

実施例8 では、血清型9、配列型16 による攻撃に対して、バクテリンによって与えられる防御作用について研究する。

【0051】

[実施例1]

この実施例では、ストレプトコッカス・スイスのゲノム、すなわちIgMプロテアーゼ

10

20

30

40

50

をコードする部分について、ゲノムのこの部分がどのように構造化されているかを示すために解析する。このために、本発明者らは、国際公開第2015/181356号から既知であり、その特許出願において配列番号1として公開されている血清型2の細菌のストレプトコッカス・スイスのゲノムを使用する。その配列は、配列番号1として本特許の配列表にも含まれている。タンパク質アノテーション (PDBSum及びInterPro) に加えて、Needleman-Wunschアライメント (Needlemanら1970年、Laskowskiら1997年、Apweilerら2000年、デフォルト設定を参照されたい) を用いた配列類似性検索により、IgMプロテアーゼゲノムについての構造が明らかになっており、5つの領域を同定することができる。

【0052】

領域1 (Met 1-Thr 34) : 位置1からのシグナル配列

領域2 (Val 35-Glu 426) : 予測される加水分解酵素活性を有するMac-1ドメイン

領域3 (Thr 427-Pro 687) : 構造的機能 (例えば、適切な折り畳みに関与する) 及び基質結合に関連する領域

領域4 (Thr 688-Ser 919) : 加水分解酵素活性を有する既知のタンパク質配列と類似性を有する4つの反復配列 (1* {Thr 688-Ser 744}、2* {Thr 745-Ser 801}、3* {Thr 802-Ser 858}、4* {Thr 859-Ser 919}) からなる領域

領域5 (Thr 920-Lys 1141) : 細胞壁アンカー機能を示す予測膜貫通領域を含有する。

【0053】

他の血清型のストレプトコッカス・スイス細菌の構造はほぼ同じであるが、血清型9、配列型16については、実質的な違いが存在する (以下に示す)。

【0054】

—シグナルペプチドは、ストレプトコッカス・スイス株間で高度に保存されている。

【0055】

—Mac-1ドメインは常に存在し、血清型9、配列型16株を含む全ての既知の株間で高度に保存されている。

【0056】

—構造的機能に関連する領域3は常に存在し、また高度に保存されているが、血清型9、配列型16の長さの約半分しかない。

【0057】

—CNV領域に関して、反復配列は異なる血清型間で非常に類似しているが、数は様々であり、概して2~6の間である。血清型9、配列型16は、他の血清型のものと比較してはるかに短い完全に異なる型の12個の反復配列を有し (すなわち、約60個に対して12個のアミノ酸)、3つの実質的に異なる反復配列に細分することができる。

【0058】

—細胞接着領域も、異なる血清型間で高度に保存されているが、血清型9、配列型16の株の領域とのアミノ酸配列同一性はほとんどない。

【0059】

要するに、ほとんどの血清型及び配列型の間で、ゲノムはほぼ同じ構造であり、最も顕著な違いは、CNV領域における反復配列の数である。血清型9、配列型16のゲノムのIgMプロテアーゼ部分は、Mac-1ドメインに関する限り非常に類似しているが、残りの部分については実質的に異なる。

【0060】

[実施例2]

研究の目的

先行技術から、ストレプトコッカス・スイス血清型2 (配列番号1) の完全IgMプロテアーゼは、同種攻撃に対する優れた防御作用を提供することが知られている。また、血

10

20

30

40

50

清型 9 及び 1 4 に対する多少の交差防御作用は、文献から既知である。この実施例では、血清型 1 の攻撃に対するこの抗原による防御作用の実際のレベルを評価する。このために、配列型 1 3 の株を使用した。これは細菌の通常の型であり、現場におけるこの血清型の良い代表例である。

【0061】

研究デザイン

まず、血清型 1 の細菌による攻撃に対する防御作用を評価するために、利用可能な唯一の攻撃モデルは、3 週齢の子ブタに攻撃を与えるモデルである。これは、IgM プロテアーゼ抗原によって誘発される防御効果を評価するためには、子ブタ自体へのワクチン接種が、その後に有効な免疫応答が発生するための時間が短すぎると予想されるため、不可能であることを意味する。したがって、ワクチンによって与えられる防御作用を評価するために、雌ブタに分娩前にワクチン接種し、これにより、誘発された抗体を初乳の摂取を介して子ブタに移行させる。IgM プロテアーゼ抗原により、ワクチン接種した動物自体に防御作用が提供されると、ワクチン接種した雌ブタの子孫にも優れた防御作用が提供されることが、文献（米国特許第 10, 751, 403 号明細書）から既知である。換言すれば、この（間接的）攻撃モデルに見られる防御作用は、当然ながら、ワクチン接種した雌ブタの初乳の摂取を介して子ブタに提供される防御作用に加えて、ワクチン接種した動物自体に提供される防御作用を示す。

【0062】

この研究では、妊娠中の雌ブタ 10 匹を使用し、それぞれ雌ブタ 5 匹の 2 つの群に分けた。予定の出産の 6 週間前及び 2 週間前に、水中油型アジュバント（ μ ディルバックフォルテ（ μ Diluvac Forte）、MSD アニマルヘルス社）中に 1 用量当たり 80 μ g で血清型 2 の組換え rIdesSuis IgM プロテアーゼ抗原（Seeleら、Vaccine 33: 2207~2212、2015 年 5 月 5 日、項目 2.2.）を含むサブユニットワクチンを 1 つの群にワクチン接種し、もう 1 つの群は非ワクチン接種対照群として残した。出産後、3 週齢で、ワクチン接種した雌ブタからの子ブタ 10 匹、及び対照雌ブタからの子ブタ 10 匹（各群は雌ブタ 1 匹あたり子ブタ 2 匹を含んでいた）を攻撃のために選択した。子ブタ（2 $\times$ 10、ワクチン接種及び対照）に、カテーテルを使用し、（5.0 $\times$ 10¹⁰ CFU / ml を目標とした）10 ml の攻撃接種菌液で気管内攻撃を与えるか、あるいは（それが不可能であれば）、経気管注射を用いて攻撃を与えた。攻撃後、子ブタを、うつ状態、運動障害及び／又は神経性徴候などの S. suis 感染の臨床徴候について毎日観察し、0（徴候なし）から、重篤な症例の場合の 3 までの、系統立った採点システムを用いて採点した。人道的エンドポイントに達した動物は安楽死させた。ワクチン接種の前後の定期的な時間（雌ブタ 10 匹）及び攻撃の直前（子ブタ 20 匹）に、抗体決定のために血清血液を採取した。攻撃（子ブタ 20 匹）の前後の定期的な時間に、攻撃株の再単離のためにヘパリン血液を採取した。研究終了時（すなわち攻撃 11 日後）に、生存している全ての子ブタを安楽死させた。

【0063】

結果

いずれのワクチンも、許容できないいかなる部位（すなわち局所的）反応又は全身反応も誘発しなかったため、安全であると見なすことができた。安楽死前の期間についての攻撃後のデータを表 1 に示す。

【表 1】

表 1: 攻撃後のデータ

群	平均臨床スコア	攻撃後死亡	生存期間(日)	陽性血液単離
1	50.8	7/10	5.2	10/10
2	30.6	5/10	7.5	9/10

【0064】

結論

血清型 2 の I g M プロテアーゼでは、血清型 1 のストレプトコッカス・スイス細菌による攻撃に対する防御作用は与えられていない。

【0065】

[実施例 3]

研究の目的

この実施例では、血清型 7 の攻撃に対する、実施例 2 で使用したのと同じ抗原（血清型 2 の I g M プロテアーゼ）による防御作用の実際のレベルを評価する。このために、配列型 29 の株を使用した。これは細菌の通常の型であり、現場におけるこの血清型の代表例である。

【0066】

研究デザイン

血清型 1 と同様に、血清型 7 の細菌による攻撃に対する防御作用を評価するために、利用可能な唯一の攻撃モデルは、3.5 週齢の子ブタに攻撃を与えるモデルである。したがって、この研究においても、雌ブタに分娩前にワクチン接種し、これにより、誘発された抗体を初乳の摂取を介して子ブタに移行させる。

【0067】

この研究では、妊娠中の雌ブタ 10 匹を使用し、それぞれ雌ブタ 5 匹の 2 つの群に分けた。予定の出産の 6 週間前及び 2 週間前に、水中油型アジュバント（ μ ディルバックフォルテ（ μ Di luvac Forte）、MSD アニマルヘルス社）中に 1 用量当たり 80 μ g で血清型 2 の組換え rIdeS suis I g M プロテアーゼ抗原（Seeleら、Vaccine 33: 2207~2212、2015 年 5 月 5 日、項目 2.2.）を含むサブユニットワクチンを 1 つの群にワクチン接種し、もう 1 つの群は非ワクチン接種対照群として残した。出産後、3.5 週齢で、ワクチン接種した雌ブタからの子ブタ 10 匹、及び対照雌ブタからの子ブタ 10 匹（各群は雌ブタ 1 匹あたり子ブタ 2 匹を含んでいた）を攻撃のために選択した。子ブタ（2×10、ワクチン接種及び対照）に、（ 1.0×10^9 CFU/ml を目標とした）10 ml の攻撃接種菌液で気管内攻撃を与えた。攻撃後、子ブタを、うつ状態、運動障害及び／又は神経性徴候などの S. suis 感染の臨床徴候について毎日観察し、0（徴候なし）から、重篤な症例の場合の 3 までの、系統立った採点システムを用いて採点した。人道的エンドポイントに達した動物は安楽死させた。ワクチン接種の前後の定期的な時間（雌ブタ 10 匹）及び攻撃の直前（子ブタ 20 匹）に、抗体決定のために血清血液を採取した。攻撃の前後の定期的な時間に（子ブタ 20 匹）、攻撃株の再単離のためにヘパリン血液を採取した。研究終了時（すなわち攻撃 11 日後）に、生存している全ての子ブタを安楽死させた。

【0068】

結果

いずれのワクチンも、許容できないいかなる部位反応又は全身反応も誘発しなかったため、安全であると思ふことができた。安楽死前の期間についての攻撃後のデータを表 2 に示す。

【表 2】

表 2: 攻撃後のデータ

群	平均臨床スコア	攻撃後死亡	生存期間(日)	陽性血液単離
1	13.2	7/10	7.2	3/10
2	11.4	5/10	7.4	4/10

【0069】

結論

血清型 2 の I g M プロテアーゼでは、血清型 7 のストレプトコッカス・スイス細菌による攻撃に対する防御作用は与えられていない。

【 0 0 7 0 】

[実施例 4]

研究の目的

この研究の目的は、血清型 9 の攻撃、特に血清型 9、配列型 1 6 の細菌による攻撃に対する、実施例 2 及び 3 で使用したのと同じ抗原（すなわち血清型 2 の I g M プロテアーゼ）による防御作用の実際のレベルを試験することであった。

【 0 0 7 1 】

研究デザイン

血清陰性の特定病原体がない（specific pathogen-free：SPF）3 週齢の子ブタ 2 4 匹を使用した。子ブタを、1 0 匹ずつの 2 つの群（異なる同腹仔について均等に分配）に割り当てた。第 1 群は、実施例 2 及び 3 に記載したように、3 週齢及び 5 週齢で 2 回、筋肉内にワクチン接種し、第 2 群は、非ワクチン接種攻撃対照群として残した。7 週齢で、上記の S . s u i s 血清型 9 の毒性培養物で、ブタに気管内攻撃を与えた。攻撃後、ブタを、うつ状態、運動障害及び／又は神経性徴候などの S . s u i s 感染の臨床徴候について、1 0 日間毎日観察した。特定の臨床徴候（すなわち、運動性又は神経性）徴候を示した後に人道的エンドポイントに達した動物は、剖検せずに安楽死させた。特定の臨床徴候を示さずに人道的エンドポイントに達した動物は安楽死させ、S . s u i s 感染を確認するために、細菌学的検査を含めて剖検した。攻撃の前後の定期的な時間に、攻撃株の再単離のためにヘパリン血液を採取した。ブタは、最初のワクチン接種の日（5 週齢）に、血清型 2 由来 I g M プロテアーゼに対して血清陰性であった。

【 0 0 7 2 】

結果

いずれのワクチンも、許容できないいかなる部位反応又は全身反応も誘発しなかったため、安全であると思なすことができた。安楽死前の期間についての攻撃後のデータを表 3 に示す。

【表 3】

表 3:攻撃後のデータ

群	臨床スコア	生存期間(日)	攻撃後死亡	陽性血液単離
1	54	3.7	9/12	8/12
2	45	4.8	8/12	9/12

【 0 0 7 3 】

結論

血清型 2 の I g M プロテアーゼでは、血清型 9、配列型 1 6 ストレプトコッカス・スuis 細菌による攻撃に対する防御作用は与えられていない。

【 0 0 7 4 】

[実施例 5]

研究の目的

この実施例では、血清型 1 の攻撃に対する防御作用を、血清型 1 及び血清型 7 のストレプトコッカス・スuis 株の I g M プロテアーゼ抗原について評価する。このために、抗原を、実施例 2、3 及び 4 で使用した血清型 2 の I g M プロテアーゼに対応させて、すなわち文献に記載（See le ら、上記を参照されたい）の大腸菌発現系を使用して作製した。血清型 7 の I g M プロテアーゼ抗原に使用される配列を添付の配列番号 2 に示し、一方、血清型 1 の I g M プロテアーゼ抗原に使用される配列を添付の配列番号 3 に示す。両方の配列は、Mac - 1 領域に加えて CNV 領域を含み、この CNV 領域に 2 つの反復配列を有する。攻撃株は、実施例 2 で使用したのと同じものとした。

【 0 0 7 5 】

研究デザイン

研究デザインは実施例 2 及び 3 と同じものとしたが、それぞれの場合で、攻撃のために

3. 5週齢の子ブタを使用し、10匹の子ブタの群を使用した。血清型のそれぞれについての攻撃は、実施例2及び3の攻撃に対応した。第1群には血清型1のIgMプロテアーゼをワクチン接種し、第2群には血清型7のIgMプロテアーゼをワクチン接種し、第3群は攻撃対照として残した。

【0076】

結果

いずれのワクチンも、許容できないいかなる部位反応又は全身反応も誘発しなかったため、安全であると見なすことができた。安楽死前の期間についての攻撃後のデータを表4に示す。

【表4】

表 4:攻撃後のデータ

群	臨床スコア	生存期間(日)	攻撃後死亡	陽性血液単離
1	17	8.0	3/10	2/10
2	27	6.8	4/10	4/10
3	52	3.9	8/10	7/10

【0077】

結論

データから、血清型1のIgMプロテアーゼ並びに血清型7のIgMプロテアーゼは、血清型1の株による毒性攻撃から防御すると結論付けることができる。血清型1の抗原によって与えられる同種防御作用は、血清型7の抗原によって与えられる異種防御作用よりもわずかに良好であるように思われる。

【0078】

〔実施例6〕

研究の目的

この実施例では、血清型2の攻撃に対する防御作用を、血清型1及び血清型7のストレプトコッカス・スイス株のIgMプロテアーゼ抗原について評価する。このために、実施例5と同じ抗原を使用した。攻撃株は、現場における株の代表例である血清型2、配列型1の株とした。

【0079】

研究デザイン

研究デザインは、実施例4とほぼ同じものにした。3週齢の子ブタ30匹を使用した。子ブタを、10匹ずつの3つの群（異なる同腹仔について均等に分配）に割り当てた。第1群及び第2群には、3週齢及び5週齢でそれぞれのサブユニットワクチンを2回筋肉内ワクチン接種したが、第3群にはワクチン接種しなかった。7週齢で、S. suis血清型2の株の毒性培養物で、ブタに気管内攻撃を与えた。攻撃後の11日間、ブタを、うつ状態、運動障害及び／又は神経性徴候などのS. suis感染の臨床徴候について、毎日観察した。人道的エンドポイント（humane endpoint：HEP）に達した動物を安楽死させた。攻撃の直前、攻撃の2日後、及び該当する場合はHEPの日（安楽死の直前）に、攻撃株の再単離のためにヘパリン血液を採取した。

【0080】

子ブタは、最初のワクチン接種の日に、血清陰性であったか、又は、特定のIgM抗体の酵素結合免疫測定法（enzyme-linked immunoassay：ELISA）において力価が非常に低かった。ワクチン接種後、第1群及び第2群はIgMプロテアーゼに対して良好な抗体応答を示したが、対照は非常に低いレベルのままであった。

【0081】

結果

いずれのワクチンも、許容できないいかなる部位反応又は全身反応も誘発しなかったため、安全であると見なすことができた。安楽死前の期間についての攻撃後のデータを表5

に示す。ストレプトコッカス・スイスではない特有の理由のために、第 1 群の 1 匹の動物を攻撃後に安楽死させなければならなかった。

【表 5】

表 5:攻撃後のデータ

群	臨床スコア	生存期間(日)	攻撃後死亡	陽性血液単離
1(血清型 1)	13.2	9.0	2/9	2/9
2(血清型 7)	3.5	10.5	1/10	1/10
3(-)	61.7	1.4	10/10	10/10

10

【 0 0 8 2 】

結論

データから、血清型 1 の I g M プロテアーゼ並びに血清型 7 の I g M プロテアーゼは、血清型 2 の株による毒性攻撃から防御すると結論付けることができる。

【 0 0 8 3 】

【実施例 7】

研究の目的

この実施例では、血清型 7 の攻撃に対する防御作用を、血清型 1 及び血清型 7 のストレプトコッカス・スイス株の I g M プロテアーゼ抗原について評価する。このために、実施例 5 及び 6 と同じ抗原を使用した。攻撃株は、現場における株の代表例である血清型 7、配列型 2 9 の株とした。

20

【 0 0 8 4 】

研究デザイン

研究デザインは、（攻撃株は別として）実施例 5 と同じものとした。血清型のそれぞれについての攻撃は、実施例 2 及び 3 の攻撃に対応した。第 1 群には血清型 1 の I g M プロテアーゼをワクチン接種し、第 2 群には血清型 7 の I g M プロテアーゼをワクチン接種し、第 3 群は攻撃対照として残した。

【 0 0 8 5 】

結果

いずれのワクチンも、許容できないいかなる部位反応又は全身反応も誘発しなかったため、安全であると思なすことができた。安楽死前の期間についての攻撃後のデータを表 6 に示す。

30

【表 6】

表 6:攻撃後のデータ

群	臨床スコア	生存期間(日)	攻撃後死亡
1(血清型 1)	0.4	11	0/10
2(血清型 7)	2.9	11	1/10
3(-)	12.6	9.2	3/10

40

【 0 0 8 6 】

結論

攻撃は以前の研究のように毒性が低いようであったが、データから、血清型 1 の I g M プロテアーゼ並びに血清型 7 の I g M プロテアーゼは、血清型 7 の株による毒性攻撃から防御すると結論付けることができる。

【 0 0 8 7 】

【実施例 8】

研究の目的

この研究の目的は、血清型 9 の攻撃、特に現場で広まっている株の代表例である血清型 9、配列型 1 6 の細菌による攻撃に対する防御抗原を見出すことであった。評価した選択

50

肢は、バクテリン単独、及びIgMプロテアーゼと組み合わせたバクテリンである。IgMプロテアーゼは、文献では、バクテリンの有効性を改良するものと理解されている（Seeleら、Journal of Bacteriology、930～940頁、2013年3月、第195巻、第5号、「Identification of Novel Host-Specific IgM Protease in Streptococcus suis」、国際公開第2015/181356号で確認）。

【0088】

研究デザイン

研究デザインは実施例4で使用したものと同一のものとしたが、非SPFの子ブタを使用し、12匹ずつの3つの群（異なる同腹仔について均等に分配）に割り当てた。第1群には、血清型9、配列型16の不活化ストレプトコッカス・スイス細菌を2×10⁹細胞のレベルで含有するバクテリンワクチンを、3週齢及び5週齢で2回筋肉内ワクチン接種した。第2群は加えて、実施例2のIgMプロテアーゼを1用量当たり80μgで含有した。両方のワクチンを、他の実施例で使用した水中油型アジュバントにおいて製剤化した。第3群は、非ワクチン接種攻撃対照群として残した。7週齢で、上記のS. suis血清型9の毒性培養物で、ブタに気管内攻撃を与えた。攻撃後、ブタを、うつ状態、運動障害及び／又は神経性徴候などのS. suis感染の臨床徴候について、10日間毎日観察した。特定の臨床徴候（すなわち、運動性又は神経性）徴候を示した後に人道的エンドポイントに達した動物は、剖検せずに安楽死させた。特定の臨床徴候を示さずに人道的エンドポイントに達した動物は安楽死させ、S. suis感染を確認するために、細菌学的検査を含めて剖検した。攻撃の前後の定期的な時間に、攻撃株の再単離のためにヘパリン血液を採取した。ブタは、最初のワクチン接種の日（5週齢）に、血清型2由来IgMプロテアーゼに対して血清陰性であった。

【0089】

結果

いずれのワクチンも、許容できないいかなる部位反応又は全身反応も誘発しなかったため、安全であると見なすことができた。安楽死前の期間についての攻撃後のデータを表7に示す。ストレプトコッカス・スイスではない特有の理由のために、第2群の1匹の動物を攻撃後に安楽死させなければならなかった。

【表7】

表7:攻撃後のデータ

群	臨床スコア	生存期間(日)	攻撃後死亡	陽性血液単離
1	14.3	9.3	2/12	4/12
2	14.3	9.4	2/11	2/11
3	51.8	5.0	8/12	9/12

【0090】

結論

血清型9、配列型16のストレプトコッカス・スイスの毒性攻撃に対する防御作用は、その血清型のバクテリン、及びIgMプロテアーゼと組み合わせたバクテリンによって提供され得る。その2つの型の抗原は負に干渉せず、先行技術に基づいて予想されたものと一致する。

【0091】

上記の実施例に基づけば、本発明の目的は、混合ワクチン接種計画において、ストレプトコッカス・スイス血清型7又は1のIgMプロテアーゼ抗原を、ストレプトコッカス・スイスのバクテリン血清型9、配列型16と組み合わせることによって果たすことができる。また、必要に応じて、2つのIgMプロテアーゼ抗原を同様に組み合わせて、血清型1及び7の両方の攻撃に対してより良好な防御作用に到達する可能性があると考えられる。また、交差防御作用のレベルは、IgMプロテアーゼのCNV領域における反復配列の

数と関係していると考えるのが合理的であり、これは、血清型 2 と比較した場合、血清型 1 及び 7 の I g M プロテアーゼ分子との間に違いがあるためである。つまり、血清型 1 及び 7 の I g M プロテアーゼはそれぞれ 2 回の反復配列を有しているのに対し、血清型 2 は 4 回の反復配列を有している。交差防御作用に違いがある理由はクリートではないが、反復配列の数が少ないと、交差防御作用がより良好なレベルに到達するのに有利なようである。

【配列表】

2024528172000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2022/067891
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/067891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/09 C12N9/00 A61P31/04 A61K39/00 C12N9/52 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/115741 A1 (INTERVET INT BV [NL]; INTERVET INC [US]) 20 June 2019 (2019-06-20) cited in the application examples 1-3; claims 1-9	11-15
Y	WO 2017/062558 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA INC [US] ET AL.) 13 April 2017 (2017-04-13) [0013], [0031], [0036], [0046], [0056]; claims 1-20	1-7, 11-15
Y	CN 112 402 602 A (SHANDONG BINZHOU WOHUA BIOTECH CO LTD) 26 February 2021 (2021-02-26) claims 1-7	1-7, 11-15
	----- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 September 2022		Date of mailing of the international search report 09/09/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Klee, Barbara

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/067891

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/033092 A2 (BOEHRINGER INGELHEIM VETMED [DE]; NEUBAUER AXEL [US] ET AL.) 7 March 2013 (2013-03-07) [0078] -----	1-7, 11-15
Y	WO 2010/108977 A1 (INTERVET INT BV [NL]; KLAASEN HENRICUS LEO BERNARDUS MARIA [NL] ET AL.) 30 September 2010 (2010-09-30) page 9 and 10 Tables 2-5; page 5 line 16-30, last paragraph ff. (Experimental design); page 11, last paragraph; claims 1-8 -----	1-15
Y	NADINE BÜTTNER ET AL: "serotype 9 bacterin immunogenicity and protective efficacy", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 146, no. 3, 26 March 2012 (2012-03-26), pages 191-200, XP028421537, ISSN: 0165-2427, DOI: 10.1016/J.VETIMM.2012.03.012 [retrieved on 2012-03-30] abstract, pages 197-199 "Discussion", fig. 1, 3 and table 1 -----	1-15
A	RIECKMANN KAROLINE ET AL: "Streptococcus suis cps7: an emerging virulent sequence type (ST29) shows a distinct, IgM-determined pattern of bacterial survival in blood of piglets during the early adaptive immune response after weaning", VETERINARY RESEARCH , vol. 49, no. 1 15 June 2018 (2018-06-15), XP055876800, DOI: 10.1186/s13567-018-0544-8 Retrieved from the Internet: URL:http://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s13567-018-0544-8.pdf abstract and page 10, column 2, last paragraph -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No PCT/EP2022/067891	
Information on patent family members					
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2019115741	A1	20-06-2019	BR	112020011593 A2	08-12-2020
			CN	111447945 A	24-07-2020
			EP	3723795 A1	21-10-2020
			JP	2021506782 A	22-02-2021
			RU	2020119271 A	17-01-2022
			US	2021030862 A1	04-02-2021
			WO	2019115741 A1	20-06-2019

WO 2017062558	A1	13-04-2017	CA	3000201 A1	13-04-2017
			CN	108289944 A	17-07-2018
			EP	3359188 A1	15-08-2018
			US	2018271969 A1	27-09-2018
			WO	2017062558 A1	13-04-2017

CN 112402602	A	26-02-2021	NONE		

WO 2013033092	A2	07-03-2013	NONE		

WO 2010108977	A1	30-09-2010	DK	2411047 T3	10-02-2014
			EP	2411047 A1	01-02-2012
			ES	2443073 T3	17-02-2014
			JP	5651677 B2	14-01-2015
			JP	2012521391 A	13-09-2012
			TW	201043242 A	16-12-2010
			US	2012021003 A1	26-01-2012
WO	2010108977 A1	30-09-2010			

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,J
O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100216839

弁理士 大石 敏幸

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ジェイコブス、アントニウス・アーノルドゥス・クリスチャン

オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボックスメル、ウイム・ドゥ・コルベルストラート・3 5

F ターム (参考) 4B065 AA49X CA45

4C085 AA03 BA14 BB22 CC07 EE03

4H045 AA11 AA30 CA11 DA86 DA89 EA31