

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-523908
(P2021-523908A)

(43) 公表日 令和3年9月9日(2021.9.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12	4C084
A61P 31/04 (2006.01)	A61P 31/04	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	4C086
A61K 39/39 (2006.01)	A61K 39/39	4C087
A61K 38/17 (2006.01)	A61K 38/17	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-564062 (P2020-564062)
 (86) (22) 出願日 令和1年5月16日 (2019.5.16)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年12月10日 (2020.12.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2019/050469
 (87) 国際公開番号 WO2019/218022
 (87) 国際公開日 令和1年11月21日 (2019.11.21)
 (31) 優先権主張番号 2018901709
 (32) 優先日 平成30年5月16日 (2018.5.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 オーストラリア (AU)
 (31) 優先権主張番号 2018904377
 (32) 優先日 平成30年11月16日 (2018.11.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 509075181
 グリフィス・ユニバーシティ
 GRIFFITH UNIVERSITY
 オーストラリア、クイーンズランド州ネー
 サン、ケッセルズ・ロード
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74) 代理人 100141977
 弁理士 中島 勝
 (74) 代理人 100150810
 弁理士 武居 良太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 連鎖球菌毒素性ショック症候群

(57) 【要約】

【課題】本明細書では、A群連鎖球菌Mタンパク質（その断片、多様体、または誘導体を含む）、あるいは前記Mタンパク質に結合するかそれに対して産生された抗体と、必要に応じて、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質（その断片、多様体、または誘導体を含む）、あるいは前記スーパー抗原タンパク質に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片とを投与することによって、対象で連鎖球菌毒素性ショック症候群に対して免疫を付与する、治療する、または予防する方法を提供する。

【選択図】 図 1 3

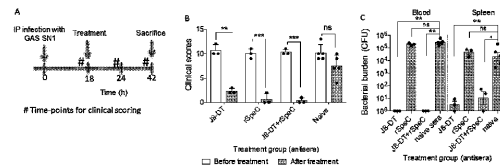


FIG. 13

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の A 群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態、好ましくは連鎖球菌毒素性ショック症候群 (STSS) などの侵襲性 A 群連鎖球菌疾患 (IGAS) に対する受動免疫付与、治療、または予防に使用するための、A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するか、それに対して産生された抗体または抗体断片、ならびに / あるいは A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片。

【請求項 2】

哺乳動物の A 群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態、好ましくは連鎖球菌毒素性ショック症候群 (STSS) などの侵襲性 A 群連鎖球菌疾患 (IGAS) に対する免疫付与、治療、または予防に使用するための、A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体、ならびに / あるいは A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体。

10

【請求項 3】

哺乳動物に連鎖球菌毒素性ショック症候群に対する受動免疫を付与する方法であって、前記哺乳動物に A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を投与することによって、前記哺乳動物の連鎖球菌毒素性ショック症候群に対する受動免疫を前記哺乳動物に付与する工程を含む、方法。

20

【請求項 4】

A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を投与する工程をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

哺乳動物の連鎖球菌毒素性ショック症候群を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体、ならびに / あるいは A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を投与することによって、前記哺乳動物の連鎖球菌毒素性ショック症候群を治療または予防する工程を含む、方法。

30

【請求項 6】

A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体、ならびに / あるいは A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を投与する工程をさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を含む、哺乳動物への投与に適した組成物。

【請求項 8】

A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片をさらに含む、請求項 7 に記載の組成物。

40

【請求項 9】

A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体と、A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体とを含む、哺乳動物への投与に適した組成物。

【請求項 10】

前記 M タンパク質断片は、前記 M タンパク質の保存領域であるかそれを含む、請求項 1 または 2 に記載の使用、請求項 2 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法、あるいは請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

50

前記 M タンパク質断片は、p 1 4 5 ペプチドであるか、それを含むか、それに含まれる、請求項 1 0 に記載の使用、方法、または組成物。

【請求項 1 2】

前記 M タンパク質断片は、J 8 ペプチド、その断片、多様体、または誘導体であるか、それを含むか、それに含まれる、請求項 1 1 に記載の使用、方法、または組成物。

【請求項 1 3】

前記 M タンパク質断片は、p 1 7 ペプチド、その断片、多様体、または誘導体であるか、それを含むか、それに含まれる、請求項 1 1 に記載の使用、方法、または組成物。

【請求項 1 4】

前記スーパー抗原は、連鎖球菌発熱性外毒素 (S p e) A または S p e C である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

10

【請求項 1 5】

A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された前記抗体または抗体断片；ならびに / あるいは A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された前記抗体または抗体断片は、モノクローナル抗体または抗体断片である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

【請求項 1 6】

A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された前記抗体または抗体断片；ならびに / あるいは A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された前記抗体または抗体断片は、ヒト化モノクローナル抗体または抗体断片である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

20

【請求項 1 7】

前記哺乳動物はヒトである、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

【請求項 1 8】

A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生されたモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項 1 9】

A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された、モノクローナル抗体またはその断片；あるいは抗体または抗体断片。

30

【請求項 2 0】

組み換え抗体または抗体断片である、請求項 1 8 または請求項 1 9 に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項 2 1】

ヒト化されている、請求項 2 0 に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項 2 2】

請求項 1 8 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の組み換えモノクローナル抗体またはその断片をコードする単離核酸。

40

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の単離核酸を含む遺伝子構築物。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の遺伝子構築物を含む宿主細胞。

【請求項 2 5】

(i) 請求項 1 8 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体または抗体断片；(i i) 請求項 2 2 に記載の単離核酸；(i i i) 請求項 2 3 に記載の遺伝子構築物；ならびに / あるいは (i v) 請求項 2 4 に記載の宿主細胞を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、A群連鎖球菌によって引き起こされる疾患の予防および治療に関する。より詳細には、本発明は、A群連鎖球菌に関連する毒素性ショック症候群を治療または予防するための抗体または抗体断片に関する。

【背景技術】

【0002】

A群連鎖球菌（化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）、GAS）感染症は、社会の全区域で非常に蔓延しており、6億件を超える連鎖球菌咽頭炎の発症症例、および1億6千万件を超える連鎖球菌膿皮症の有病症例があると推定される。症例のうちの大多数は良性であり、抗生物質および基本的な健康管理によってうまく治療することができる。しかし、連鎖球菌疾患は、喉や皮膚を通り抜けて進行し、連鎖球菌毒素性ショック症候群（STSS）などの侵襲性GAS（「iGAS」）疾患を引き起こす可能性がある。さらに、感染症を治療しなければ、リウマチ性心臓疾患や糸球体腎炎など、その後の連鎖球菌続発症を引き起こす可能性がある。iGAS疾患および連鎖球菌続発症は、アボリジニおよびトレス海峡諸島民の集団の間、さらには世界中の社会的に不利な集団の間で特に蔓延している。

10

【0003】

世界で、これらの病気は年間50万人を超える命が失われる原因となっている。控えめな見積もりで、現在、GASは世界で（HIV、結核、肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）に次いで）4番目に多い感染症関連死の原因と位置付けられている。これらの数は「氷山の一角」と考えられており、現在、先進国でも発展途上国でもiGAS疾患が流行している。

20

【0004】

STSSは主に、ヒトMHC（主要組織適合性複合体）II分子（ペプチド結合溝の外側）およびT細胞受容体可変鎖に非特異的に結合するスーパー抗原毒素によって引き起こされ、ポリクローナルT細胞の活性化をもたらす（多くの場合、20%を超えるCD4陽性T細胞が活性化される）。これは、低血圧および（肝臓、腎臓、凝固系および呼吸器系を含む）多臓器不全の原因として提案された因果関係である、Th1サイトカインストームをもたらす。

30

【0005】

マウスモデルでは、T細胞がスーパー抗原による死亡に必要であることが示されている。ブドウ球菌スーパー抗原（SEB）を使用したモデルでは、抗TNF（腫瘍壊死因子）前治療が毒素性ショックの致死性を阻害できることも示された[2]。STSSは、高所得の国でも非常に高い（50%を超える可能性がある）死亡率を有している。この病気は、どのような連鎖球菌感染後にも発生する可能性があるが、最も一般的には皮膚の感染後に発生する。これは通常、壊死性筋膜炎、筋炎、または深部の皮下出血に関連している。水痘、蜂巣炎、および直接的な皮膚穿刺が重要な補助要因になり得る。

【0006】

スーパー抗原（SAg）は、すべての病原性GASおよび黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）株によって分泌される低分子量の細胞外タンパク質である。GASには11種の血清学的に異なるスーパー抗原がある。11種のうち9種は、バクテリオファージに存在する遺伝子に位置する。それらは初代T細胞を活性化することができ、抗原処理を必要としない。スーパー抗原は、ヒトMHCII鎖と高い親和性結合、TCR（T細胞受容体）鎖と相対的に低い親和性結合を示す。マウスMHCに対するスーパー抗原の親和性は、ヒトMHCに対してよりも数桁の規模で低い[3]ため、健常なマウスはスーパー抗原による疾患を研究するのに適したモデルではない。GASに存在し得る11種のスーパー抗原のうち、STTSのほとんどの症例は、連鎖球菌発熱性外毒素（Spe）AまたはSpeCのいずれかによって引き起こされる[4]。

40

【0007】

50

S T S Sを予防するためのワクチンを開発する取り組みはわずかである。ある研究集団は、S p e AおよびS p e Cに対する類毒素を開発し、ウサギへのワクチン接種によって、毒素を中和し、ミニ浸透圧ポンプを介して投与された天然毒素からウサギを防御する抗体を導くことができることを示している。ウサギは、連鎖球菌感染症にさらされていなかった[4、5]。このワクチン手法には、連鎖球菌疾患の一側面のみから防御するために複数の類毒素をワクチン接種する必要があるという弱点がある。

【0008】

H L A (ヒト白血球抗原)形質転換マウスをモデルとして用いて、黄色ブドウ球菌由来のスーパー抗原の既知の非毒性断片を使用して候補ワクチンが開発されている[3]。これらのマウスは、その生物ではなく組換えスーパー抗原で攻撃された。

10

【0009】

S T S Sを治療する手段として、受動免疫療法が検討されている。免疫グロブリン静注(I V I G)は、S T S Sの致死率を有意に低下させることが分かっている[6]。この研究では歴史的対照(過去の試験成績を比較の対象とすること)を使用したが、これより最近の67人の患者を対象としたスウェーデンの前向き対照研究では、死亡率は、抗生物質のみで治療された44人の患者のうち22人(50%)であったのに対し、I V I Gと抗生物質で治療された群では23人中3人(13%)であった($P < 0.01$) [7]。ただし、臨床的利益のためには、I V I Gで40を超えるスーパー抗原抗体価が必要であると推定されている。これは、I V I Gに見られる特異的抗体の量に近いため、I V I Gの複数回投与が推奨される。I V I Gはコストが高く、バッチ間のばらつきがあり[8]

20

【発明の概要】

【0010】

意外なことに、本発明者らは、A群連鎖球菌Mタンパク質断片またはその多様体に結合する抗体または抗体断片が、A群連鎖球菌スーパー抗原断片またはその多様体に結合する抗体または抗体断片との併用または単独使用で、意外にも連鎖球菌毒素性ショック症候群などのA群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態に対して有効であることを発見した。

【0011】

したがって、包括的な形態で、本発明は、連鎖球菌毒素性ショック症候群(S T S S)を含む侵襲性G A S (i G A S)疾患などのA群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態に対する受動免疫付与、治療、または予防のための、A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合する抗体または抗体断片、ならびに必要に応じて、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合する抗体または抗体断片の使用に関する。

30

【0012】

別の包括的な形態で、本発明は、連鎖球菌毒素性ショック症候群(S T S S)を含む侵襲性G A S (i G A S)疾患などのA群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態に対するワクチン接種または免疫付与、治療または予防のための、A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、その多様体、または誘導体、ならびに必要に応じて、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体の使用に関する。

40

【0013】

本発明の一側面は、哺乳動物に連鎖球菌毒素性ショック症候群に対する受動免疫を付与する方法であって、前記哺乳動物にA群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を投与することによって、前記哺乳動物の連鎖球菌毒素性ショック症候群に対する受動免疫を前記哺乳動物に付与する工程を含む、方法を提供する。

【0014】

上記側面の特定の一態様では、前記方法は、A群連鎖球菌スーパー抗原に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を前記哺乳動物に投与する工程をさらに含む。

【0015】

50

本発明の別の側面は、哺乳動物の連鎖球菌毒素性ショック症候群を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物にA群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体、ならびに/あるいはA群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を投与することによって、前記哺乳動物の連鎖球菌毒素性ショック症候群を治療または予防する工程を含む、方法を提供する。

【0016】

上記側面の特定の一態様では、前記方法は、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体、ならびに/あるいはA群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を前記哺乳動物に投与する工程をさらに含む。

10

【0017】

本発明のさらなる側面は、A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を含む、哺乳動物への投与に適した組成物を提供する。

【0018】

本側面の一態様では、前記組成物は、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片をさらに含む。

【0019】

上記側面について、前記抗体または抗体断片は、好適にはモノクローナル抗体または抗体断片である。上記側面の特定の一態様では、前記モノクローナル抗体または抗体断片は、組み換えヒト化モノクローナル抗体またはその断片である。

20

【0020】

関連の側面では、本発明は、A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体と、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体とを含む、哺乳動物への投与に適した組成物に属する。

【0021】

本発明のさらなる関連の側面は、A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生されたモノクローナル抗体またはその断片；ならびに/あるいはA群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を提供する。

30

【0022】

好ましくは、前記モノクローナル抗体または断片は、組換えヒト化モノクローナル抗体またはその断片である。

【0023】

この側面はさらに、前記組換えヒト化モノクローナル抗体またはその断片をコードする単離核酸、前記単離核酸を含む遺伝子構築物、ならびに/あるいは前記遺伝子構築物を含む宿主細胞を提供する。

【0024】

上記側面の特定の一態様では、前記Mタンパク質断片は、前記Mタンパク質の保存領域であるかそれを含む。一態様では、前記Mタンパク質断片は、p145ペプチドであるか、それを含むか、それに含まれる。

40

【0025】

特定の一態様では、前記Mタンパク質断片は、J8ペプチド、その断片、多様体、または誘導体であるか、それに含まれるか、それを含む。

【0026】

別の特定の一態様では、前記断片は、p17ペプチド、その断片、多様体、または誘導体であるか、それに含まれるか、それを含む。

【0027】

50

上記側面の別の特定の態様では、前記スーパー抗原は、連鎖球菌発熱性外毒素 (Spe A) または Spe C である。

好適には、上記側面によれば、前記哺乳動物はヒトである。

【0028】

本明細書で使用される不定冠詞「a」および「an」は、ここでは単数または複数の構成要素または特徴を指すか包含するように使用されており、「1つの」または「単一の」構成要素または特徴を意味または定義すると解釈されるべきではない。

【0029】

特に文脈から求められない限り、「含む (comprise、comprises、comprising)」という用語または類似の用語は非排他的に含むことを意味するよう意図されており、したがって、列挙された構成要素または特徴の一覧は、記載または列挙された構成要素のみを含むのではなく、列挙または記載されていない他の構成要素または特徴を含んでもよい。

10

【0030】

アミノ酸配列に関する「本質的からなる (consisting essentially of)」という用語は、記載されたアミノ酸配列のN末端またはC末端にさらに1個、2個、または3個のアミノ酸を有することを意味される。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1：(A~B) HLA-B6マウスにおけるGAS SN1の感染力。無感作のHLA-B6およびB6マウス (n = 10 / 群) を経皮的にGAS SN1に感染させた。感染後6日目にマウスを選別し、皮膚の細菌負荷を評価した (A)。感染後3日目、4日目、5日目、および6日目に血液試料を蔭くことで、全身感染の存在を評価した (B) (***) (***は $p < 0.001$ を示す)。(C~D) SN1感染マウスの血清のウェスタンブロット分析。SN1に感染させたBALB/cマウス (C)、ならびにSN1およびNS33 (スーパー抗原を発現しないC群連鎖球菌) に感染させたHLA-B6およびB6マウス (D) から採取した血清試料を分析して、それらの血清中のSpe Cの存在を検出した。試料を4~15% SDS-PAGEゲルで泳動した。ゲルからタンパク質を転写した後、膜を一次抗体であるウサギ抗Spe C免疫グロブリンG (IgG) で調べ、続いてヒツジ抗ウサギIgG-APで検出し、BCIP/NBT基質を用いて発色させた。SN1感染マウスの血清試料における約26kDaのバンドは、陽性対照試料中のrSpe Cに対応する。

20

30

【0032】

【図2】図2：(A) マウスモデルにおけるSpe Cの分裂促進活性。SN1のSpe Cに应答した脾細胞の増殖。HLA-B6およびB6マウスの脾細胞を、SN1 GAS感染マウスのSpe Cを含む滅菌濾過済み血清またはrSpe Cのいずれかを用いてインビトロで刺激した。対照として、スーパー抗原陰性GAS株 (NS33) およびConAに感染したマウスの滅菌濾過済み血清も含めた。脾細胞の増殖を72時間後に評価した。データを刺激指数 (SI) で表す。应答の特異性を、血清およびrSpe Cに应答した脾細胞の増殖を阻害する抗rSpe C抗体を添加することによって確認した。(B~C) 脾細胞増殖後のサイトカイン应答特性。HLA-B6およびB6マウスの脾細胞におけるサイトカイン应答を、様々な刺激物質と共にインキュベートした72時間後に測定した。培養上清中のTNF (B) およびIFN- (C) の濃度をCBAキットで測定した。应答の特異性を、抗rSpe C抗体を添加することによって確認した。チューキーの事後検定法を用いた一元配置分散分析を利用して、様々な群の間の有意性を計算した。* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を示す。SIは、抗原の存在下での1分間のカウント / 抗原の非存在下での1分間のカウントと定義された。

40

【0033】

【図3】図3：(A) GAS SN1感染に対するJ8-DTの防御効果。HLA-B6マウスにJ8-DTまたはPBSを0日目、21日目、および28日目に接種した。免疫付与の2週間後、マウスを経皮的にGAS SN1に感染させた。感染後6日目にマウスを選別し、皮

50

膚の細菌負荷 (CFU/病変)、血液の細菌負荷 (cfu/mL)、および脾臓の細菌負荷 (CFU/脾臓) を示す。(B) 血清中の毒素を検出するウェスタンブロット分析。SN1 感染後 6 日目に採取した接種および対照コホートの貯蔵血清試料を 4 ~ 15% SDS-PAGE ゲルで泳動した。ゲルからタンパク質を転写した後、膜をウサギ抗 SpeC IgG で調べ、続いてヒツジ抗ウサギ IgG-AP で検出し、BCIP/NBT 基質を用いて発色させた。PBS マウスの血清試料における 26 kDa のバンドは、陽性対照試料中の rSpeC に対応する。(C ~ D) 接種を受けた感染マウスの血清によって誘導された増殖の評価。2 人の異なる個体の PBMC (末梢血単核球) を、SN1 に感染した接種 (J8-DT + SN1) または非接種対照 (PBS + SN1) マウスの事前に最適化された濃度の血清で刺激した。PHA および rSpeC を刺激に関する対照として使用した。応答の特異性を、様々な量の rSpeC 抗血清を添加することによって評価した。無感作血清の存在下での PBMC を中和の特異性に関する対照として使用した。増殖を 72 時間後の [³H] チミジン取り込みによって測定した。データは、実験を 2 回繰り返し、各実験につき 3 回反復測定した平均値 ± SEM (平均値の標準誤差) である。2 人の個体の代表的なデータを示す。チューキーの事後検定法を用いた一元配置分散分析を利用して、有意性を計算した。* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ 、*** は $p < 0.001$ を示す。

【0034】

【図 4】図 4 : (A ~ C) rSpeC 抗血清による rSpeC の中和。3 人の異なる個体の PBMC を、様々な量の rSpeC 抗血清の存在下または血清の非存在下で、異なる濃度の rSpeC で刺激した。PHA を対照として使用した。増殖を 72 時間後の [³H] チミジン取り込みによって測定した。データは、実験を 2 回繰り返し、各実験につき 3 回反復測定した平均値 ± SEM である。刺激指数 (SI) は、抗原の存在下での 1 分間のカウント / 抗原の非存在下での 1 分間のカウントと定義された。チューキーの事後検定法を用いた一元配置分散分析を利用して、有意性を計算した。* は $p < 0.05$ 、*** は $p < 0.001$ を示す。

【0035】

【図 5】図 5 : (A) J8-DT 抗血清と共にインキュベートした GAS を用いた攻撃試験。GAS 2031 (emm1) 株を、J8-DT 抗血清の 1 : 50 希釈液と共に 4 で 1 時間回転させながらインキュベートした。洗浄後、接種菌液を SCID マウスに腹腔内注射した。48 時間後、マウスを選別し、血液を採取した。個々のマウスの細菌負荷を示す。(B) rSpeC 抗血清による SpeC のインビボでの中和。SN1 に感染した BALB/c マウスに、感染後 5 日目に抗 rSpeC または無感作血清を腹腔内投与した。インビボでの SpeC 中和を評価するために、抗血清投与の前 (0 時間) と、次いで投与の 6 時間後および 24 時間後に血清試料を採取した。様々な時点でのマウス血清中の SpeC の存在を示す。(C) 皮膚の細菌負荷に対する rSpeC 抗血清治療の効果。SN1 に感染させた BALB/c マウスに、感染後 5 日目に抗 rSpeC または無感作血清を腹腔内投与した。治療の 24 時間後、マウスを選別し、細菌負荷を評価した。治療を受けたマウスと未治療のマウスの皮膚の細菌負荷を示す。ノンパラメトリックな独立性検定であるマン・ホイットニーの U 検定を用いて統計分析を行い、2 つの群を比較した。** は $p < 0.01$ を示す。

【0036】

【図 6 - 1】図 6 - 1 : (A ~ B) マウス皮膚感染モデルにおけるヒト分離株の病原性。BALB/c マウスのコホートを、皮膚感染経路を介して GAS SN1 または GAS NS33 株に感染させた。攻撃の 3 日後、6 日後、または 9 日後にマウスを選別し、皮膚生検 (A) および脾臓 (B) 試料を採取して細菌負荷を決定した。結果を箱ひげ図で示す。箱内の線は中央値を示し、箱の両端は上下の四分位数を示し、ひげは最小値から最大値を示す。

【図 6 - 2】図 6 - 2 : (C) 6 日目に採取した個々のマウス血清試料での SpeC 検出。記載のとおり、SN1 / NS33 感染後 6 日目の個々のマウスの血清試料における SpeC の存在についても評価した。代表的な画像を示す。「*」は陽性の脾臓培養物を有していたマウスを示す。ノンパラメトリックな独立性検定であるマン・ホイットニーの U 検

10

20

30

40

50

定を用いて統計分析を行い、2つの群を各時点で比較した。* * は $p < 0.01$ 、* * * は $p < 0.001$ を示す。

【0037】

【図7】図7：(A) マウスモデルにおけるSpeCの分裂促進活性。SN1のSpeCに
 応答した脾細胞の増殖。HLA-B6およびB6マウスの脾細胞を、SN1 GASに感染し
 たマウスのSpeCを含む滅菌濾過済み血清またはrSpeCのいずれかでインビトロで
 刺激した。対照として、スーパー抗原陰性GAS株(NS33)およびConAに感染し
 たマウスの滅菌濾過済み血清も含めた。脾細胞の増殖を72時間後に評価した。デー
 タを刺激指数(SI)で表す。応答の特異性を、血清およびrSpeCに
 応答した脾細胞の増殖を阻害する抗rSpeC抗体を添加することによって確認した。
 (B~C) 脾細胞増殖後のサイトカイン応答特性。HLA-B6およびB6マウスの脾細胞にお
 けるサイトカイン応答を、様々な刺激物質と共にインキュベートした72時間後に測
 定した。培養上清中のTNF(B)およびIFN-(C)の濃度をCBAキット(BD Biosciences)で測
 定した。応答の特異性を、抗rSpeC抗体を添加することによって確認した。テュー
 キーの事後検定法を用いた一元配置分散分析を利用して、様々な群の間で有意性を
 計算した。* は $p < 0.05$ 、* * は $p < 0.01$ を示す。SIは、抗原の存在下での1分
 間のカウント/抗原の非存在下での1分間のカウントと定義された。(D~F) GAS
 SN1またはGAS NS33に感染したマウスの血清による刺激に応答した、ヒトPBMCの
 増殖。3人の異なる個体のPBMCを、GAS SN1またはGAS NS33の感染後の様々
 な時点で採取した血清の存在下で培養した。増殖を72時間後の $[^3H]$ チミジン
 取り込みによって測定した。データは、実験を2回繰り返し、各実験につき3回
 反復測定した平均値 \pm SEMである。

10

20

【0038】

【図8】図8：(A~B) HLA-B6マウスにおけるGAS SN1のインビボでの感染力。
 無感作のHLA-B6およびB6マウス($n = 10$ /群)をGAS感染の腹腔内経路で
 GAS SN1に感染させた。マウスは、 10^6 、 10^7 、または 10^8 CFUのSN1を受
 けた。感染の24時間後、マウスの臨床症状を成績にして疾患の重症度を評価した。
 HLA-B6マウスとB6マウスの両方の臨床成績を示す。(B) 成績評価の後、マウス
 を選別し、血液および脾臓の細菌負荷を評価した。結果を箱ひげ図で示す。箱内
 の線は中央値を示し、箱の両端は上下の四分位数を示し、ひげは最小値から最大
 値を示す。テューキーの事後検定法を用いた一元配置分散分析を利用して、対
 照群と試験群との間で有意性を計算した。(C) SN1に感染したHLA-B6およ
 びB6マウスの血清のウェスタンブロット分析。SN1感染マウスから採取した血
 清試料を分析して、それらの血清中の毒素を検出した。試料を4~15% SDS-
 PAGEゲルで泳動した。ゲルからタンパク質を転写した後、膜を一次抗体であるウ
 サギ抗SpeC IgGで調べ、続いてヒツジ抗ウサギIgG-APで検出し、BCIP/NBT
 基質を用いて発色させた。rSpeCタンパク質も陽性対照として泳動した。(D~
 F) SN1の腹腔内感染後のHLA-B6マウスの血清サイトカイン応答特性。SN1感
 染マウスを感染の24時間後に選別した。CBAキットを使用して、最高用量(1×10^8
 CFU)のSN1を受けたコホートから採取した血液試料で血中サイトカイン濃度を測
 定した。TNF、IFN-、およびIL-2応答を示す。テューキーの事後検定法を用
 いた一元配置分散分析を利用して、様々な群の間で有意性を計算した。* は $p < 0.05$ 、
 * * は $p < 0.01$ を示す。SIは、抗原の存在下での1分間のカウント/抗原の非存
 在下での1分間のカウントと定義された。

30

40

【0039】

【図9-1】図9-1：(A~B) HLA-B6マウスにおけるGAS SN1の感染力。無感作
 のHLA-B6およびB6マウス($n = 10$ /群)を経皮的にGAS SN1またはGAS
 NS33に感染させた。感染後6日目にマウスを選別し、皮膚の細菌負荷を評価した
 (A)。感染後3日目、4日目、5日目、および6日目に血液試料を蒔くことによ
 って、全身感染の存在を評価した(B)。結果を箱ひげ図で示す。箱内の線は中央
 値を示し、箱の両端は上下の四分位数を示し、ひげは最小値から最大値を示す。
 (C) SN1またはNS33感染マウスの血清のウェスタンブロット分析。SN1
 またはNS33に感染させたHLA-B6お

50

よび B 6 マウスから採取した血清試料を分析して、それらの血清中の S p e C の存在を検出した。試料を 4 ~ 1 5 % S D S - P A G E ゲルで泳動した。ゲルからタンパク質を転写した後、膜を一次抗体であるウサギ抗 SpeC IgG で調べ、続いてヒツジ抗ウサギ Ig G - A P で検出し、B C I P / N B T 基質を用いて発色させた。S N 1 感染したマウスの血清試料における 2 6 K D a のバンドは、陽性対照試料中の r S p e C に対応する。

【図 9 - 2】図 9 - 2 : (D ~ F) 皮膚感染後の H L A - B 6 および B 6 マウスの血清におけるサイトカイン応答。S N 1 または N S 3 3 に感染させた 6 日後、H L A - B 6 および B 6 マウスの血清におけるサイトカイン応答を測定した。T N F (C)、I F N - (D)、および I L - 2 の濃度を C B A キットで測定した。テューキーの事後検定法を用いた一元配置分散分析を利用して、様々な群の間で有意性を計算した。*** は $p < 0 . 0 0 1$ を示す。

【 0 0 4 0 】

【図 1 0 - 1】図 1 0 - 1 : (A) GAS SN1 感染に対する J 8 - D T の防御効果。H L A - B 6 マウスに J 8 - D T または P B S を 0 日目、2 1 日目、および 2 8 日目に接種した。免疫付与の 2 週間後、マウスを経皮的に GAS SN1 に感染させた。感染後 6 日目にマウスを選別し、皮膚の細菌負荷 (C F U / 病変)、血中の細菌負荷 (c f u / m L)、および脾臓の細菌負荷 (C F U / 脾臓) を示す。(B) 血清中の毒素を検出するウェスタンブロット分析。S N 1 感染後 6 日目に採取した接種および対照コホートの貯蔵血清試料を 4 ~ 1 5 % S D S - P A G E ゲルで泳動した。ゲルからタンパク質を転写した後、膜をウサギ抗 SpeC IgG で調べ、続いてヒツジ抗ウサギ Ig G - A P で検出し、B C I P / N B T 基質を用いて発色させた。P B S マウスの血清試料における 2 6 K D a のバンドは、陽性対照試料中の r S p e C に対応する。

【図 1 0 - 2】図 1 0 - 2 : (C ~ D) 皮膚感染後の H L A - B 6 マウスの血清におけるサイトカイン応答。S N 1 による感染の 6 日後、接種および対照 H L A - B 6 マウスの血清におけるサイトカイン応答を測定した。I L - 4 および I L - 1 0 (C)、ならびに T N F および I F N - (D) の濃度を C B A キットで測定した。テューキーの事後検定法を用いた一元配置分散分析を利用して、様々な群の間で有意性を計算した。*** は $p < 0 . 0 0 1$ を示す。(E ~ G) 接種を受けた / 対照の感染マウスの血清によって誘導された増殖の評価。3 人の異なる個体の P B M C を、接種を受けた S N 1 感染マウス (J 8 - D T + S N 1) または接種を受けていない S N 1 感染マウス (P B S + S N 1) の事前に最適化された濃度の血清で刺激した。P H A および r S p e C を刺激に関する対照として使用した。応答の特異性を、様々な量の r S p e C 抗血清を添加することによって評価した。無感作血清の存在下での P B M C を中和の特異性に関する対照として使用した。増殖を 7 2 時間後の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みによって測定した。データは、実験を 2 回繰り返し、各実験につき 3 回反復測定した平均値 \pm S E M である。2 人の個体の代表的なデータを示す。テューキーの事後検定法を用いた一元配置分散分析を利用して、有意性を計算した。* は $p < 0 . 0 5$ 、** は $p < 0 . 0 1$ 、*** は $p < 0 . 0 0 1$ を示す。

【 0 0 4 1 】

【図 1 1 - 1】図 1 1 - 1 : 接種を受けた血清および対照血清による刺激後の P B M C のサイトカイン応答。3 人の異なる個体の P B M C を、接種を受けた S N 1 感染マウスまたは対照の S N 1 感染マウスの事前に最適化された濃度の血清で刺激した。最適濃度の r S p e C および P H A を刺激に関する陽性対照として使用した。接種を受けた S N 1 感染血清または対照の S N 1 感染血清または r S p e C を含む選択されたウェルに、事前に最適化された量 (2 0 μ L) の r S p e C 抗血清を添加することによって、r S p e C 抗血清の阻害効果を評価した。培地のみウェルを陰性対照として使用した。インビトロでの培養の 7 2 時間後、サイトカイン応答を C B A キットで測定した。データは、実験を 2 回繰り返し、各実験につき 3 回反復測定した平均値 \pm S E M である。ノンパラメトリックな独立性検定であるマン・ホイットニーの U 検定を用いて統計分析を行い、2 つの群を比較した。* は $p < 0 . 0 5$ 、** は $p < 0 . 0 1$ 、*** は $p < 0 . 0 0 1$ を示す。

【図 1 1 - 2】図 1 1 - 2 : 接種を受けた血清および対照血清による刺激後の P B M C の

サイトカイン応答。3人の異なる個体のP B M Cを、接種を受けたS N 1感染マウスまたは対照のS N 1感染マウスの事前に最適化された濃度の血清で刺激した。最適濃度のr S p e CおよびP H Aを刺激に関する陽性対照として使用した。接種を受けたS N 1感染血清または対照のS N 1感染血清またはr S p e Cを含む選択されたウェルに、事前に最適化された量(20 μ L)のr S p e C抗血清を添加することによって、r S p e C抗血清の阻害効果を評価した。培地のみウェルを陰性対照として使用した。インビトロでの培養の72時間後、サイトカイン応答をC B Aキットで測定した。データは、実験を2回繰り返し、各実験につき3回反復測定した平均値 \pm S E Mである。ノンパラメトリックな独立性検定であるマン・ホイットニーのU検定を用いて統計分析を行い、2つの群を比較した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ を示す。

10

【図11-3】図11-3：接種を受けた血清および対照血清による刺激後のP B M Cのサイトカイン応答。3人の異なる個体のP B M Cを、接種を受けたS N 1感染マウスまたは対照のS N 1感染マウスの事前に最適化された濃度の血清で刺激した。最適濃度のr S p e CおよびP H Aを刺激に関する陽性対照として使用した。接種を受けたS N 1感染血清または対照のS N 1感染血清またはr S p e Cを含む選択されたウェルに、事前に最適化された量(20 μ L)のr S p e C抗血清を添加することによって、r S p e C抗血清の阻害効果を評価した。培地のみウェルを陰性対照として使用した。インビトロでの培養の72時間後、サイトカイン応答をC B Aキットで測定した。データは、実験を2回繰り返し、各実験につき3回反復測定した平均値 \pm S E Mである。ノンパラメトリックな独立性検定であるマン・ホイットニーのU検定を用いて統計分析を行い、2つの群を比較した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ を示す。

20

【0042】

【図12】図12：(A) r S p e C抗血清によるS p e Cのインビボでの中和。H L A - B 6マウスを経皮的にGAS SN1に感染させた。感染後5日目にマウスに抗r S p e Cまたは無感作血清を腹腔内投与した。インビボでのS p e C中和を評価するために、抗血清投与前(0時間)と、次いで投与の6時間後および24時間後に血清試料を採取した。様々な時点での治療および未治療H L A - B 6マウス血清中のS p e Cの存在を示す。(B) r S p e C抗血清の治療可能性。r S p e C抗血清の治療可能性を評価するために、血清投与の6時間後および24時間後、指定数のマウスを選別した。治療を受けたマウスと未治療のマウスの皮膚および血液の細菌負荷を示す。結果を箱ひげ図で示す。箱内の線は中央値を示し、箱の両端は上下の四分位数を示し、ひげは最小値から最大値を示す。N S (有意差なし)は $p > 0.05$ を示す。

30

【0043】

【図13-1】図13-1：併用免疫療法の治療可能性。(A) 感染のタイムラインおよび治療手順(B) H L A - B 6マウスの4つのコホート($n = 3 \sim 5$ /群)を、事前に最適化された用量のGAS SN1で腹腔内感染させた。感染の18時間後のマウスの臨床症状を成績評価し、抗J 8 - D T、抗r S p e C、抗J 8 - D Tと抗r S p e Cの組み合わせ、または無感作血清を200 μ L静脈内投与した。治療の24時間後(感染の42時間後)にマウスの臨床成績を評価した後、選別した。細菌の定量化のために血液および脾臓の試料を採取、処理し、蒔いた。マウスの血液および脾臓の細菌負荷を示す。(C) 治療の前後にすべてのマウスの臨床症状を成績評価して疾患の重症度を評価した。抗血清治療前(0時間)および後(24時間)のすべてのコホートの臨床成績を示す。

40

【図13-2】図13-2：(D~G) インビボでのS p e C中和を評価するために、抗血清投与前(0時間)と、次いで投与の24時間後にすべてのコホートから血清試料を採取した。J 8 - D T抗血清(D)、r S p e C抗血清(E)、J 8 - D T + r S p e C抗血清(F)、またはP B S抗血清(G)で治療したH L A - Bマウスの血清における治療前後のS p e Cの存在を示す。マン・ホイットニーの検定を行い、各群を対照P B S治療群と比較した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ 、N Sは $p > 0.05$ を示す。

【0044】

50

【図14】図14：(A) A群連鎖球菌抗原に应答した脾細胞の増殖と抗血清による阻害。(A) SN1に感染した血清に应答した増殖と抗血清によるその阻害の評価。J8-DT、rSpeC、J8-DT+rSpeC、またはPBS抗血清の存在下または非存在下で、SN1 GAS感染マウスのSpeCを含む血清に应答した脾細胞の増殖を評価した。(B) rSpeC、rM1、またはrSpeC+rM1で刺激した脾細胞も対照として含めた。阻害剤としてJ8-DT、rSpeC、またはJ8-DT+rSpeC抗血清を用いた。脾細胞の増殖を72時間後に評価した。データを刺激指数(SI)で表す。**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ 、NSは $p > 0.05$ を示す。

【0045】

【図15-1】図15-1：SigmaのGenElute細菌gDNA抽出キットを用いて、一晚培養した定常期培養液からゲノムDNAを抽出した。Nanodrop1000を用いてgDNAを認定し、次いで2 μ gのgDNAをスーパー抗原の増幅に使用した。次に、画像の凡例に従ってゲルを通過させた。

10

【図15-2】図15-2：SigmaのGenElute細菌gDNA抽出キットを用いて、一晚培養した定常期培養液からゲノムDNAを抽出した。Nanodrop1000を用いてgDNAを認定し、次いで2 μ gのgDNAをスーパー抗原の増幅に使用した。次に、画像の凡例に従ってゲルを通過させた。

【0046】

【図16】図16：マウス血液中のGASヒト分離株のインビトロでの増殖。GAS分離株を1%ネオペプトンを含むTHBで一晩増殖させた。各分離株を 10^{-6} まで段階希釈し、ヘパリン処理した新鮮なマウス血液と1:3の比率でインキュベートした。37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした後、マウスの血液中の細菌増殖を測定し、開始培養液のCFUカウントと比較した。CFUの20倍を超える増加を示す分離株を、マウスモデルで全身の連鎖球菌感染症を引き起こす可能性が高い分離株として定義した。示されているデータは各分離株の平均 \pm SEMである。

20

【0047】

【図17】図17：GAS NS1またはGAS NS33に感染したマウスの血清による刺激に应答したヒトPBMCの増殖应答。3人の異なる個体のPBMCを、異なる容量のGAS SN1またはGAS NS33感染マウスから採取した血清で刺激した。PHAを対照として使用した。増殖を72時間後の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みによって測定した。データは、実験を2回繰り返し、各実験につき3回反復測定した平均値 \pm SEMである。テューキーの事後検定法を用いた一元配置分散分析を利用して、様々な群の間で有意性を計算した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明は、A群連鎖球菌(GAS)Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合する抗体または抗体断片が、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合する抗体または抗体断片との併用または単独使用で意外にも連鎖球菌毒素性ショック症候群(STSS)を含む侵襲性GAS疾患などのA群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態に対して有効であるという発見に少なくとも部分的に基づいている。

40

【0049】

したがって、包括的な形態で、本発明は、連鎖球菌毒素性ショック症候群(STSS)を含む侵襲性GAS疾患などのA群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態に対する受動免疫付与、治療、または予防のための、A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片または多様体に結合する抗体または抗体断片、ならびに必要に応じて、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片または多様体に結合する抗体または抗体断片の使用に関する。

【0050】

別の包括的な形態で、本発明は、連鎖球菌毒素性ショック症候群(STSS)を含む侵襲性GAS(iGAS)疾患などのA群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態に対するワ

50

クチン接種または免疫付与、治療または予防のための、A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導體、ならびに必要に応じて、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導體の使用に関する。

【0051】

本明細書で用いられる場合、「A群連鎖球菌 (group A streptococcus, Group A Streptococci, Group A Streptococcal, Group A Strep)」という用語および「GAS」という略語は、ランズフィールドの血清型Aの連鎖球菌のうち化膿連鎖球菌種のグラム陽性溶結菌を指す。GASの重要な病原性因子はMタンパク質であり、これは強い抗食作用性をもち、血清中のH因子に結合し、C3転換酵素を破壊し、C3bによるオプソニン作用を防ぐ。これらには、Graham et al., 2002, PNAS USA 99 13855に記載されているCovR/SまたはCovRS変異体などの毒性のある「変異体」も含まれるが、これらに限定されない。

10

【0052】

A群連鎖球菌によって引き起こされる疾患、障害、および状態としては、蜂巣炎、丹毒、膿痂疹、猩紅熱、咽頭炎（「連鎖球菌性咽頭炎」）などの咽頭感染、菌血症、連鎖球菌毒素性ショック症候群 (STSS) などの侵襲性GAS疾患、壊死性筋膜炎、急性リウマチ熱、および急性糸球体腎炎が挙げられるが、これらに限定されない。特定の態様では、前記疾患または状態は、連鎖球菌毒素性ショック症候群 (STSS) であるか、それを含む。

20

【0053】

「タンパク質」という用語はアミノ酸重合体を意味する。アミノ酸は、当技術分野でよく理解されているように、天然または非天然アミノ酸、D-またはL-アミノ酸であってもよい。

【0054】

「タンパク質」という用語は、一般に50個以下のアミノ酸を有するタンパク質を表すのに使用される「ペプチド」と、一般に50個を超えるアミノ酸を有するタンパク質を表すのに使用される「ポリペプチド」を包含する。

【0055】

「断片」は、タンパク質 (Mタンパク質、p145、p17、J8、またはJ14、あるいはスーパー抗原、またはこれらに対して産生されたか、これらを対象とする抗体など) のセグメント、ドメイン、部分、または領域であり、タンパク質のアミノ酸配列の100%未満を構成する。認識されているように、断片は、単一の断片であってもよいし、単独でまたは他の断片と共に反復されていてもよい。

30

【0056】

一般に、断片は、全長タンパク質のうちの最大で5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、または1600個のアミノ酸を含む、本質的にそれらからなる、あるいはそれらからなってもよい。

40

【0057】

好適には、断片は「免疫原性」であり、すなわち、哺乳動物に投与されると抗体反応を誘発することができる。

【0058】

本明細書で一般的に使用される場合、「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子複合体のタンパク質産物であるか、それに由来し、IgG、IgM、IgD、IgA、およびIgEなどのアイソタイプ、ならびにIgG₁、IgG_{2a}などのサブタイプを含むが、これらに限定されない。抗体および抗体断片は、ポリクローナルまたはモノクローナル、天然または組換え型であってもよい。抗体断片は、Fc、Fab、またはF(ab)₂断片を含み、

50

かつ/または単鎖 Fv 抗体 (s c F v) を包含してもよい。このような s c F v を、たとえば、米国特許第 5,091,513 号、欧州特許第 239,400 号、または Winter および Milstein による記事 (1991 年、Nature 349: 293) にそれぞれ記載されている方法に従って調製してもよい。抗体はさらに、複数の s c F v を含む二重特異性抗体、三重特異性抗体、および/または四重特異性抗体などの多価組換え抗体断片、さらには二量体化によって活性化されたデミボディ (demibody) (たとえば、国際公開第 2007/062466 号) も含み得る。たとえば、このような抗体を、Holliger et al., 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90 6444 または Kipriyanov, 2009 Methods Mol Biol 562 177 に記載されている方法に従って調製してもよい。抗体の作製、精製、および使用に利用可能な周知の手順は、たとえば、Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1991-1994) の第 2 章、および Harlow, E. & Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 に記載されている。

10

【 0 0 5 9 】

ポリクローナル抗体を作製する方法は当業者に周知である。使用可能な模範の手順は、たとえば Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (上記)、および Harlow & Lane, 1988 (上記) に記載されている。特定の態様では、ポリクローナル抗体は、A 群連鎖球菌に曝露されたか感染した個体のヒト血清から入手または精製されてもよい。あるいは、ポリクローナル抗体は、精製、化学合成、または組換え M タンパク質、スーパー抗原、あるいはその免疫原性断片または多様体に対してウマなどの産生種で産生された後、投与前に精製されてもよい。

20

【 0 0 6 0 】

モノクローナル抗体は、たとえば、Kohler および Milstein による記事 (1975 年、Nature 256, 495) に最初に記載された標準の方法を用いて、あるいは、たとえば Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (上記) に記載された、それより新しいその改良方法によって、本発明の単離されたタンパク質、断片、多様体、または誘導体のうちの 1 つ以上を接種した産生種に由来の脾臓または他の抗体産生細胞を不死化することによって、作製されてもよい。モノクローナル抗体またはその断片は、組換え型であってもよい。これは、モノクローナル抗体がヒト以外の哺乳動物の脾臓細胞によって最初に産生される場合に、そのモノクローナル抗体または断片を「ヒト化」するのに特に有利である可能性がある。

30

【 0 0 6 1 】

一態様では、前記抗体または抗体断片は、M タンパク質、その断片または多様体に結合し、かつ/またはそれに対して産生される。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用される場合、「M タンパク質断片」は、免疫原性であり、かつ/あるいは抗体または抗体断片が結合することができる G A S の M タンパク質の任意の断片である。典型的には、断片は、G A S の M タンパク質の C 反復領域のアミノ酸配列またはその断片であるか、それを含むか、あるいはそれに含まれる。非限定的な例としては p 1 4 5 が挙げられ、これはアミノ酸配列 LRRDLASREAKKQVEKALE (配列番号 1) を有する 20 量体である。最小の p 1 4 5 エピトープ配列は SREAKKQVEKAL (配列番号 5) である。

40

【 0 0 6 3 】

特定の態様では、M タンパク質断片は、配列番号 5 の最小 p 1 4 5 断片、その多様体または誘導体であるか、それを含む。

【 0 0 6 4 】

この点に関して、p 1 4 5 アミノ酸配列の断片は、p 1 7、J 1 4、または J 8 ペプチドに存在してもよい。したがって、特定の態様では、M タンパク質、その断片、多様体、または誘導体は、p 1 7 ペプチド、J 1 4 ペプチド、または J 8 ペプチドからなるか、本質的にそれからなるか、それを含む。

【 0 0 6 5 】

本発明の前に行われた研究では、p 1 4 5 ペプチドへの特定の修飾が A 群連鎖球菌に対

50

する免疫原性を大幅に改善する可能性がある。一態様では、p 1 7 ペプチドは、配列番号 1 の残基 1 3 に対応する N 残基と配列番号 1 の残基 1 7 の R アミノ酸とを含む修飾 p 1 4 5 ペプチドである。

【 0 0 6 6 】

好ましくは、p 1 7 は、配列番号 5 の残基 6 に対応する N 残基と配列番号 1 の残基 1 0 の R アミノ酸とを含む修飾 p 1 4 5 最小エピトープを含む。

【 0 0 6 7 】

一態様では、p 1 7 ペプチドは、アミノ酸配列 LRRDLASREAKNQVERALE (配列番号 2) を含む。

【 0 0 6 8 】

一態様では、p 1 7 ペプチドは、アミノ酸配列 SREAKNQVERAL (配列番号 6) を含む修飾 p 1 4 5 最小エピトープ断片を含む。

【 0 0 6 9 】

さらなる p 1 4 5 ペプチド多様体については、PCT/AU2018/050893号に概説されている。同文献は参照によって本明細書に組み込まれる。模範的な p 1 4 5 多様体を以下に示す。

p145 LRRDLDA SREAKKQVEKAL E (配列番号 1)

p*1. LRRDLDA ENEAKKQVEKAL E (配列番号 1 3)

p*2. LRRDLDA EDEAKKQVEKAL E (配列番号 1 4)

p*3. LRRDLDA EREAKNQVEKAL E (配列番号 1 5)

p*4. LRRDLDA EREAKKQVERAL E (配列番号 1 6)

p*5. LRRDLDA EREAKKQVEMAL E (配列番号 1 7)

p*6. LRRDLDA VNEAKKQVEKAL E (配列番号 1 8)

p*7. LRRDLDA VDEAKKQVEKAL E (配列番号 1 9)

p*8. LRRDLDA VREAKNQVEKAL E (配列番号 2 0)

p*9. LRRDLDA VREAKKQVERAL E (配列番号 2 1)

p*10. LRRDLDA VREAKKQVEMAL E (配列番号 2 2)

p*11. LRRDLDA SNEAKNQVEKAL E (配列番号 2 3)

p*12. LRRDLDA SNEAKKQVERAL E (配列番号 2 4)

p*13. LRRDLDA SNEAKKQVEMAL E (配列番号 2 5)

p*14. LRRDLDA SDEAKNQVEKAL E (配列番号 2 6)

p*15. LRRDLDA SDEAKKQVERAL E (配列番号 2 7)

p*16. LRRDLDA SDEAKKQVEMAL E (配列番号 2 8)

p*17. LRRDLDA SREAKNQVERAL E (配列番号 6)

p*18. LRRDLDA SREAKNQVEMAL E (配列番号 2 9)

本明細書で使用される場合、「J 1 4 ペプチド」は、アミノ酸配列 KQAEDKVKASREAKKQVE KALEQLEDKVK (配列番号 3)、その断片または多様体を含んでもよい。この配列は、p 1 4 5 内に最小の B および T 細胞エピトープを有するペプチドである。このペプチドは、有害である可能性のある T 細胞自己エピトープを含まないが、オプソニン作用のある B 細胞エピトープを含む G A S の M タンパク質 C 領域ペプチドであると特定された。J 1 4 は、M タンパク質 C 領域 (太字) の 1 4 アミノ酸を含み、ペプチドの正しいらせん折り畳みと立体構造を維持するのに必要な酵母由来の G C N 4 配列に隣接している、キメラペプチドである。

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用される場合、「J 8 ペプチド」は、G A S の M タンパク質 C 領域ペプチドに少なくとも部分的に由来するかそれに対応するアミノ酸配列を含むペプチドである。J 8 ペプチドは、好適には立体構造 B 細胞エピトープを含み、有害である可能性のある T 細胞自己エピトープを含まない。好ましい J 8 ペプチドアミノ酸配列は、QAEDKVKQSREAKK QVEKALKQLEDKQV (配列番号 4)、その断片、または多様体である。太字で示された残基は、G A S の M タンパク質の残基 3 4 4 ~ 3 5 5 に対応する。この態様では、J 8 は、これ

10

20

30

40

50

に隣接して J 8 ペプチドの正しいらせん折り畳みと立体構造の維持に役立つ GCN4 DNA 結合タンパク質配列をさらに含むキメラペプチドである。

【0071】

他の態様では、抗体または抗体断片は、GAS スーパー抗原に結合し、かつ/またはそれに対して産生される。

【0072】

本明細書で使用される場合、「スーパー抗原」は、すべてまたは大部分の病原性 GAS 株によって分泌される低分子量の細胞外タンパク質である。GAS には、Spe A、Spe C、Spe G、Spe H、Spe I、Spe J、Spe K、Spe L、Spe M、SSA、および SMEZ と名付けられた 11 種の血清学的に異なるスーパー抗原がある。連鎖球菌のスーパー抗原は、ヒト MHC II 鎖とは高い親和性結合、TCR 鎖とは相対的に低い親和性結合を示す。連鎖球菌のスーパー抗原タンパク質構造は、2つのドメインからなる保存された構造と、分子の中心にまたがる長くて溶媒露出性のヘリックスの存在を示している。N 末端ドメインは、オリゴヌクレオチド/オリゴ糖結合(OB)折り畳み構造を有する混合型のバレルである。大きい方の C 末端ドメインは把持(-grasp)折り畳み構造であり、ねじれ構造のシートで構成されており、シートは、ねじれた 4 本鎖逆平行シートに接して詰まっている中央の 4 ヘリックスで覆われている。連鎖球菌のスーパー抗原は、熱および酸による変性に抵抗する非常に安定したタンパク質であり、これは、N 末端ドメインと C 末端ドメインが緊密に詰まっていることによって実現される。構造は、C 末端ドメインの上部に N 末端の部分が伸びていることによってさらに安定する。特に、すべての連鎖球菌のスーパー抗原の中で最も保存されている部分は、4 ヘリックスと N 末端の OB 折り畳みドメインの内側との間の境界をなす領域である。GAS に存在し得る 11 種のスーパー抗原のうち、ほとんどの症例の STTS は連鎖球菌発熱性外毒素(Spe)A または Spe C のいずれかによって引き起こされる。

【0073】

本明細書で使用される場合、タンパク質「多様体」は、限定可能なアミノ酸配列関係を基準アミノ酸配列と共有する。基準アミノ酸配列は、前述の M タンパク質、スーパー抗原、またはこれらの断片のアミノ酸配列であってもよい。「多様体」タンパク質は、基準アミノ酸配列の 1 つ以上のアミノ酸が欠失しているか、異なるアミノ酸で置換されていてもよい。当技術分野でよく理解されているように、免疫原性断片および/またはタンパク質の活性を変化させることなく、いくつかのアミノ酸を置換または削除することができる(保存的置換)。好ましくは、タンパク質多様体は、基準アミノ酸配列と少なくとも 70% または 75%、好ましくは少なくとも 80% または 85%、あるいは、より好ましくは少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する。

【0074】

p 17 および/または p 145 ペプチド多様体の非限定的な例は、米国特許出願公開第 2009/0162369 号に記載されている。同文献は参照によって本明細書に組み込まれる。

J 8 ペプチド多様体の非限定的な例としては、以下が挙げられる：

S R E A K K Q S R E A K K Q V E K A L K Q V E K A L C (配列番号 7)

S R E A K K Q S R E A K K Q V E K A L K Q S R E A K C (配列番号 8)

S R E A K K Q V E K A L K Q S R E A K K Q V E K A L C (配列番号 9)

S R E A K K Q V E K A L D A S R E A K K Q V E K A L C (配列番号 10)。

【0075】

他の多様体は、Cooper et al., 1997 に記載されているような七連子 (heptad) に基づいていてもよい。同文献は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0076】

たとえば、あるエピトープがヘリックスタンパク質立体構造内に存在することが分かっている場合、この立体構造に折り畳むようにモデルペプチドを合成することができる。発明者らは、GCN4 のロイシンジッパーの構造に基づき、ヘリックス撚り合わせコイ

10

20

30

40

50

ルペプチドモデルを設計した (O'Shea et al., 1991)。最初の七連子は、配列MKQLEDK (配列番号11)を含み、これは安定な撚り合わせコイルの七連子の反復モチーフ (a - b - c - d - e - f - g) nに見られる特徴のうちのいくつかを含んでいる (Cohen & Parry, 1990)。これらは、aおよびd位置に大きな無極性残基、eおよびg位置に酸/塩基対 (Glu/Lys) (通常は鎖間イオン相互作用に有利である)、およびb、c、f位置に極性基を含んでいる (Lupas et al. (1991)の予測と一致)。GCN4ペプチドはさらに、a位置に共通のバリンを含んでいる。aおよびd位置をVおよびLが占めている場合、撚り合わせコイル二量体が好ましいことも指摘されている (Harbury et al., 1994)。ヘリックス撚り合わせコイルを形成する可能性のある、GCN4ロイシンジッパーペプチド (VKQLEDK; 配列番号12)のこれらの共通する特徴から、モデルの七連子反復を導き出した。このペプチドをフレームワークペプチドとした。研究対象の立体構造エピソードの重複断片を、撚り合わせコイルペプチドモデルに埋め込むことでキメラペプチドを得た。らせんモデルペプチドとエピソード配列の両方に同一の残基が見られた場合は常に、正しいらせん撚り合わせコイル立体構造 (Cohen&Parry, 1990)を保証するように設計したアミノ酸置換をキメラペプチドに組み込んだ。典型的には以下の置換: a位置でVからI、b位置でKからR、c位置でQからN、d位置でLからA、e位置でEからQ、f位置でDからE、g位置でKからRの置換を使用した。これらの置換残基はすべて、撚り合わせコイルタンパク質の各位置に共通して見られる (Lupas et al., 1991)。

【0077】

それぞれのタンパク質および核酸の配列関係を説明するために本明細書で一般に使用される用語として、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセンテージ」、および「実質的同一性」が挙げられる。各核酸/タンパク質はそれぞれ、(1)核酸/タンパク質によって共有される完全な核酸/タンパク質配列のうち1つ以上の部分と、(2)核酸/タンパク質間で異なる1つ以上の部分を含み得るため、配列比較は、典型的には「比較ウィンドウ」で配列を比較して配列が類似している局所領域を特定、比較することで行われる。「比較ウィンドウ」は、基準配列と比較される、通常6、9、または12個の連続する残基の概念上の部分を指す。比較ウィンドウは、それぞれの配列を最適に位置合わせするために、基準配列と比較して約20%以下の付加または削除(すなわち空白)を含み得る。比較ウィンドウを位置合わせするための最適な配列の整列は、コンピュータ化されたアルゴリズム実行によって実施されてもよい (IntelligeneticsによるGeneworksプログラム; GAP, BESTFIT, FASTA, TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) (参照によって本明細書に組み込まれる)し、検査や選択された様々な方法のいずれかによって得られる最良の位置合わせ(すなわち、比較ウィンドウに対して最も高いパーセント相溶性になる)によって実施されてもよい。たとえば、Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25 3389 (参照によって本明細書に組み込まれる)に開示されているBLASTプログラムの類も参照してもよい。配列解析の詳細な記述は、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999)のユニット19.3で見ることができる。

【0078】

「配列同一性」という用語は、本明細書において最も広い意味で、標準のアルゴリズムを用いた適切な位置合わせを考慮し配列が比較ウィンドウ上で同一である程度を考慮した正確なヌクレオチドまたはアミノ酸の一致の数を包含するように使用される。したがって、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウ上で2つの最適に位置合わせした配列を比較し、両方の配列で同一の核酸塩基(たとえば、A、T、C、G、I)が発生する位置の数を決定して一致する位置数を求め、一致する位置数を比較ウィンドウ内の全位置数(すなわちウィンドウの大きさ)で割り、その結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを出すことで計算される。たとえば、「配列同一性」は、DNASISコンピュータプログラム (Version 2.5 for windows; Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USAから利用可能)によって計算された「一致パーセ

10

20

30

40

50

ンテージ」を意味すると理解されてもよい。

【0079】

本明細書で使用される場合、「誘導体」は、たとえば、他の化学部分との結合または複合体形成によって、翻訳後修飾（たとえば、リン酸化、アセチル化など）、グリコシル化の修飾（たとえば、グリコシル化の付加、除去、または変更）、脂質化、および/または当技術分野で理解されるような付加アミノ酸配列を含ませることによって変化したタンパク質、その断片または多様体などの分子である。特定の一態様では、付加アミノ酸配列は、N末端および/またはC末端に1個以上のリジン残基を含んでもよい。複数のリジン残基（たとえばポリリジン）は、リジン残基の直鎖配列であってもよいし、リジン残基の分岐鎖配列であってもよい。これらの付加リジン残基によって、ペプチドの溶解度の増加が促される可能性がある。別の特定の誘導体は、ペプチドをジフテリア毒素（DT）に結合させることによって得られる。C末端にシステイン残基を付加することでこれを促してもよい。

10

【0080】

付加アミノ酸配列としては、融合タンパク質を形成する融合パートナーアミノ酸配列を挙げることができる。たとえば、融合パートナーアミノ酸配列は、単離された融合タンパク質の検出および/または精製に役立つ可能性がある。非限定的な例としては、金属結合性（たとえばポリヒスチジン）融合パートナー、マルトース結合性タンパク質（MBP）、タンパク質A、グルタチオンS-転移酵素（GST）、蛍光タンパク質配列（たとえばGFP）、myc、FLAG、および赤血球凝集素タグなどのエピトープタグなどが挙げられる。

20

【0081】

他の付加アミノ酸配列は、ジフテリア類毒素（DT）またはその断片などの担体タンパク質、あるいは国際公開第2017/070735号に記載されているようなCRMタンパク質断片の配列であってもよい。

【0082】

本発明によって企図される他の誘導体としては、側鎖への修飾、ペプチドまたはタンパク質合成時の非天然アミノ酸および/またはそれらの誘導体の組み込み、ならびに本発明の免疫原性タンパク質、その断片および多様体に立体構造制約を課す架橋剤および他の方法の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0083】

これに関して、タンパク質の化学的修飾に関するさらに広範な方法については、当業者はCURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2008)の第15章を参照するとよい。

【0084】

単離されたMタンパク質、スーパー抗原タンパク質、断片および/または誘導体を当技術分野で公知の任意の手段で作製してもよく、その例としては化学合成、組換えDNA技術、およびペプチド断片を産生するためのタンパク質分解切断などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0085】

化学合成としては、固相合成と液相合成が挙げられる。このような方法は当技術分野で周知であるが、SYNTHETIC VACCINES Ed. Nicholson (Blackwell Scientific Publications)の第9章およびCURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)の第15章に示されているような化学合成技術の例を参照するとよい。これに関しては国際公開第99/02550号および第97/45444号も参照するとよい。

【0086】

組換えタンパク質は、たとえばSambrook et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989)の特に第16章および17章、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 19

50

95-2008)の特に第10章および16章、ならびにCURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)の特に第1章、5章、および6章に記載の標準の手順を用いて当業者は好都合に調製可能である。典型的には、組換えタンパク質の調製は、タンパク質をコードする核酸の好適な宿主細胞での発現を含む。

【0087】

本発明の特定の側面および態様は、STSなどのA群連鎖球菌関連疾患または状態に対する受動免疫のために哺乳動物に投与するための、Mタンパク質、スーパー抗原タンパク質、断片、および/または誘導体に結合する、あるいはそれに対して産生された組換え抗体および抗体断片に関する。特定の態様では、組換え抗体および抗体断片は、前述のように、「ヒト化」されている。したがって、側面によっては本発明は、Mタンパク質、スーパー抗原タンパク質、断片、および/または誘導体に結合する、あるいはそれらに対して産生された組換え抗体および抗体断片をコードする1つ以上の単離核酸を提供する。

10

【0088】

本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖のDNAおよびRNAを示す。DNAはゲノムDNAおよびcDNAを包含する。RNAは、mRNA、RNAi、siRNA、cRNA、および自己触媒RNAを包含する。核酸はさらに、DNA-RNA複合体であってもよい。核酸は、ヌクレオチド(典型的にはA、G、C、T、またはU塩基を包含する)を含むヌクレオチド配列を包含する。しかし、ヌクレオチド配列は、修飾プリン(たとえば、イノシン、メチルイノシン、およびメチルアデノシン)および修飾ピリミジン(たとえば、チオウリジンおよびメチルシトシン)など、他の塩基を含んでいてもよい。

20

【0089】

好ましい形態では、Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体をコードする1つ以上の単離核酸、および好中球活性の回復または増強を促す物質は、遺伝子構築物の形態である。

【0090】

好適には、遺伝子構築物は、当技術分野でよく理解されているように、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、酵母または細菌人工染色体の形態であるか、またはそれらの遺伝子成分を含む。遺伝子構築物はさらに、組換えDNA技術による操作のために、細菌または他の宿主細胞での単離核酸の維持および増殖に適したものであってもよい。

30

【0091】

タンパク質発現の目的のために、遺伝子構築物は発現構築物である。好適には、発現構築物は発現ベクター内に、異種配列などの1つ以上の付加配列と作動可能に連結された前記1つ以上の核酸を含む。「発現ベクター」は、プラスミドなどの自己複製する染色体外ベクターであってもよいし、宿主ゲノムに組み込まれるベクターであってもよい。

【0092】

「作動可能に連結された」という用語は、前記の付加ヌクレオチド配列が、好ましくは転写を開始、調節、または他の方法で制御するために、本発明の核酸に対して配置されていることを意味する。

40

【0093】

調節ヌクレオチド配列は、一般に、発現が必要とされる宿主細胞または組織に適切な配列である。多くの種類の適切な発現ベクターおよび好適な調節配列が、様々な宿主細胞について当技術分野で公知である。

【0094】

典型的には、前記の1つ以上の調節ヌクレオチド配列としては、プロモーター配列、リーダーまたはシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始および終結配列、ならびに転写促進または活性化配列を挙げることができるが、これらに限定されない。当技術分野で公知の構成的または誘導性プロモーターが本発明によって企図されている。発現構築物はさらに、本発明の組換えタンパク質が前述のように融合タンバ

50

ク質として発現されるように、融合パートナー（典型的には発現ベクターによって提供される）をコードする付加ヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

【0095】

好ましい形態では、遺伝子構築物は、本明細書に記載のMタンパク質および/またはスーパー抗原をコードすることにより、ヒトなどの哺乳動物のDNAワクチン接種に適している。これに関して、認識されているように、Mタンパク質およびスーパー抗原タンパク質は、ワクチン接種の目的で、同じまたは異なる遺伝子構築物上にコードされていてもよい。

【0096】

好適には、遺伝子構築物は、当技術分野でよく理解されているように、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、酵母または細菌人工染色体の形態であるか、またはそれらの遺伝子成分を含む。遺伝子構築物はさらに、組換えDNA技術による操作のために、細菌または他の宿主細胞での単離核酸の維持および増殖に適したものであってもよい。

10

【0097】

好適には、DNAワクチン接種は1つ以上のプラスミドDNA発現構築物によるものである。プラスミドは、典型的には、ウイルスプロモーター（SV40、RSV、またはCMVプロモーターなど）を含む。mRNAの安定性を改善することでタンパク質発現を増加させるために、イントロンAを含んでいてもよい。プラスミドはさらに、マルチクロニング部位や、ウシ成長ホルモンまたはウサギベータグロブリンポリアデニル化配列などの強力なポリアデニル化/転写終結シグナルを含んでいてもよい。プラスミドは、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）revによるエンベロープ発現の増加を伴って、または伴わずに、マソン・ファイザーサルウイルスのシス作用性転写配列（MPV-CTE）をさらに含んでいてもよい。発現を改善し得るさらなる修飾としては、ポリアデニル化および/または転写終結配列に転写促進配列、合成イントロン、アデノウイルス三連リーダー（TPL）配列、および/または修飾を挿入することが挙げられる。DNAワクチンプラスミドの非限定的な例は、Invivogenから市販されているpVACである。

20

【0098】

DNAワクチン学について記載されている有用な参照文献は、DNA Vaccines, Methods and Protocols, Second Edition (Volume 127 of Methods in Molecular Medicine series, Humana Press, 2006)である。

30

【0099】

前述のように、本発明は、哺乳動物の連鎖球菌毒素性ショック症候群（STSS）などのA群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態を予防または治療する組成物、ワクチン、および/または方法を提供する。

【0100】

本発明に関して、「A群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態」という用語は、A群連鎖球菌による感染症によって起こる任意の臨床病態を意味し、その例としては、蜂巣炎、丹毒、膿痂疹、猩紅熱、急性咽頭炎（「連鎖球菌性咽頭炎」）などの咽頭感染、菌血症、連鎖球菌毒素性ショック症候群（STSS）、壊死性筋膜炎、急性リウマチ熱、および急性糸球体腎炎が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0101】

STSSは主に、ヒトMHCII分子（ペプチド結合溝の外側）およびT細胞受容体可変鎖に非特異的に結合するスーパー抗原毒素によって引き起こされ、ポリクローナルT細胞を活性化する（多くの場合、20%を超えるCD4陽性T細胞が活性化される）。これは、低血圧および（肝臓、腎臓、凝固系および呼吸器系を含む）多臓器不全の原因となる提案された因果関係である、Th1サイトカインストームをもたらす。

【0102】

好適には、組成物および/または方法は、哺乳動物にA群連鎖球菌、より具体的にはSTSSに対する「受動免疫を付与する」。したがって、A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片または多様体に結合する抗体または抗体断片と、A群連鎖球菌スーパー抗原、その断

50

片または多様体に結合する抗体または抗体断片との組み合わせの投与は、その後の A 群連鎖球菌による感染症に対する少なくとも部分的な受動免疫を付与、提供、または促進してもよく、あるいは、存在している A 群連鎖球菌感染症に対する少なくとも部分的な受動免疫を付与、提供、または促進してもよい。さらに、認識されているように、「受動免疫」は補体カスケードの要素の誘導、マクロファージおよび他の食細胞などの自然免疫系の要素の誘導、ならびに / あるいはサイトカイン、成長因子、ケモカイン、および / または他の炎症誘発性分子の誘導といった宿主哺乳動物の免疫応答の少なくともいくつかの要素の誘発を排除しない。

【 0 1 0 3 】

好適には、受動免疫は、哺乳動物の連鎖球菌毒素性ショック症候群 (S T S S) を含む i G A S 疾患などの A 群連鎖球菌関連疾患、障害、または状態を治療または予防する。

10

【 0 1 0 4 】

本明細書で使用される場合、「治療する」または「治療」という用語は、S T S S などの A 群連鎖球菌による疾患、障害、または状態の症状または病理学的徴候を、その発症開始後に少なくとも部分的に改善、排除、または軽減する治療的介入を指す。治療は絶対に哺乳動物に有益である必要はない。有益な効果は、当業者に公知の任意の方法または基準を用いて決定可能である。

【 0 1 0 5 】

本明細書で使用される場合、「予防する」または「予防」という用語は、A 群連鎖球菌による感染またはそれに対する曝露の前、ならびに / あるいは S T S S などの A 群連鎖球菌による疾患、障害、または状態の症状または病理学的徴候の発症の前に、感染を予防かつ / あるいは症状または病理学的徴候を軽減するために開始される、一連の行動を指す。なお、このような予防は、絶対的に対象に有益である必要はない。「予防的」治療は、A 群連鎖球菌による疾患、障害または状態の徴候を示していない、あるいは初期の徴候のみを示している対象に対して、A 群連鎖球菌による疾患、障害、または状態の症状または病理学的徴候を発症するリスクを低減する目的で施される治療である。

20

【 0 1 0 6 】

特定の側面および態様では、A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片または多様体に結合する抗体または抗体断片、および A 群連鎖球菌スーパー抗原、断片または多様体に結合する抗体または抗体断片を哺乳動物に別々に投与してもよいし、併用して投与してもよい。

30

【 0 1 0 7 】

「別々に」という用語は、A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片、または多様体に結合する抗体または抗体断片、ならびに A 群連鎖球菌スーパー抗原、断片または多様体に結合する抗体または抗体断片をそれぞれ含む別の単位として同時に投与される、あるいは各抗体または抗体断片の複合または相乗効果が保たれる形で時間的に間隔を空けて投与されることを意味する。

【 0 1 0 8 】

態様によっては、A 群連鎖球菌 M タンパク質、その断片または多様体に結合する抗体または抗体断片、および A 群連鎖球菌スーパー抗原、断片または多様体に結合する抗体または抗体断片は、組成物の形態で投与されてもよい。好ましい形態では、組成物は、許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む。

40

【 0 1 0 9 】

「許容される担体、希釈剤または賦形剤」という用語は、全身投与で安全に使用可能な固体または液体の充填剤、希釈剤または被包物質を意味する。特定の投与経路に応じて、当技術分野で周知の様々な担体、希釈剤、および賦形剤を使用してもよい。これらを、糖、デンプン、セルロースおよびその誘導體、麦芽、ゼラチン、タルク、硫酸カルシウム、植物油、合成油、ポリオール、アルギン酸、リン酸緩衝液、乳化剤、等張生理食塩水、塩類 (塩酸塩、臭化物、および硫酸塩を含む鉱酸塩や、酢酸塩、プロピオン酸塩、およびマロン酸塩などの有機酸塩)、水、ならびに発熱物質を含まない水を含む群から選択してもよい。

50

【0110】

許容される担体、希釈剤、および賦形剤について記載されている有用な参考文献はRemington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)である。同文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【0111】

好適には、本明細書に記載のMタンパク質および/またはスーパー抗原タンパク質(その断片、多様体、および誘導体を含む)は免疫原性である。本発明に関して、本明細書で使用される「免疫原性」という用語は、その免疫原性タンパク質またはペプチドを哺乳動物に投与した際にA群連鎖球菌またはその分子成分(Mタンパク質またはスーパー抗原など)に対する免疫応答を発生させるまたは誘発する、能力または可能性を示す。

10

【0112】

「免疫応答を誘発する」という用語は、細胞免疫系、抗体、および/または天然の免疫系を含む免疫系の1つ以上の要素の産生または活性を発生させるまたは刺激することを意味する。好適には、免疫系の1つ以上の要素として、Bリンパ球、抗体、および好中球が挙げられる。

【0113】

好ましくは、免疫応答を誘発する目的で、特定の免疫剤を、Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体(J8ペプチドなど)、ならびに/あるいはスーパー抗原タンパク質、断片、多様体、または誘導体(SpEAおよびSpECなど)と、あるいはこれらをコードする1つ以上の遺伝子構築物と、併用してもよい。

20

【0114】

「免疫剤」という用語は、その範囲内に、当技術分野で周知の担体、送達剤、免疫刺激剤、および/または補助剤を含む。当技術分野で理解されているように、免疫刺激剤および補助剤は、組成物の免疫原性および/または有効性を増強する1種以上の物質を指す、あるいはそれらを含む。好適な免疫刺激剤および補助剤の非限定的な例としては、以下が挙げられる：スクアランおよびスクアレノール(あるいは他の植物性または動物性油)；ブロック共重合体；Tween(登録商標)80やQuil(登録商標)Aなどの界面活性剤；DrakeolまたはMarcolなどの鉱油；ピーナツ油などの植物油；コリネバクテリウム・バルブム(Corynebacterium parvum)などのコリネバクテリウム由来の補助剤；プロピオニバクテリウム・アクネ(Propionibacterium acne)などのプロピオニバクテリウム由来の補助剤；ウシ型結核菌(Mycobacterium bovis)(Bacille Calmette and GuerinすなわちBCG)；百日咳菌(Bordetella pertussis)抗原；破傷風類毒素；ジフテリア類毒素；ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、オクタデシルアミノ酸エステル、リゾレシチン、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、N,N-ジオクタデシル-N',N'-ビス(2-ヒドロキシエチル-プロパンジアミン)、メトキシヘキサデシルグリセロール、およびブルロニックポリオールなどの界面活性物質；ピランなどのポリアミン；硫酸デキストラン；ポリICカーボポール；ムラミルジペプチドおよび誘導体などのペプチド；ジメチルグリシン；タフトシン；油乳剤；リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ミョウバンなどの鉱物ゲル；インターロイキン2およびインターロイキン12などのインターロイキン；インターロイキン1などのモノカイン；腫瘍壊死因子；インターフェロンなどのインターフェロン；CpG DNAなどの免疫刺激性DNA；サポニン-水酸化アルミニウムまたはQuil A-水酸化アルミニウムなどの組み合わせ；リポソーム；ISCOM(登録商標)およびISCOMATRIX(登録商標)補助剤；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ムラミルジペプチドまたは他の誘導体などの合成糖ペプチド；アブリジン；リポドA誘導体；硫酸デキストラン；DEAEデキストラン単独またはリン酸アルミニウムとの併用；Carbopol'EMAなどのカルボキシポリメチレン；Neocryl A640などのアクリル系共重合体乳剤(たとえば、米国特許第5,047,238号)、Montanide ISA 720などの油中水型乳剤；ポリオウイルス、ワクシニア、または動物ポックスウイルスタンパク質；あるいはこれらの混合物。

30

40

【0115】

免疫剤としては、サイログロブリンなどの担体；ヒト血清アルブミンなどのアルブミン

50

；破傷風、ジフテリア、百日咳、緑膿菌（Pseudomonas）、大腸菌（E coli）、ブドウ球菌、および連鎖球菌由来の毒素、類毒素、または毒素の任意の変異型交差反応性物質（CRM）；ポリ（リジン：グルタミン酸）などのポリアミノ酸；インフルエンザ；ロタウイルスVP6；パルボウイルスVP1およびVP2；B型肝炎ウイルスコアタンパク質；B型肝炎ウイルス組換えワクチンなどを挙げることができる。あるいは、担体タンパク質または他の免疫原性タンパク質の断片またはエピトープを使用してもよい。たとえば、細菌毒素、類毒素、またはCRMのT細胞エピトープを使用してもよい。これに関して、米国特許第5,785,973号を参照してもよい。同文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【0116】

ワクチン組成物の作製には任意の好適な手順が企図されている。典型的な手順としては、たとえばNew Generation Vaccines (1997, Levine et al., Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong)に記載されている手順が挙げられる。同文献は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0117】

任意の安全な投与経路を採用してもよく、その例としては、経口、直腸、非経口、舌下、口腔、静脈内、関節内、筋肉内、皮内、皮下、吸入、眼内、腹腔内、脳室内、局所、粘膜および経皮投与が挙げられるが、これらに限定されない。

【0118】

剤形としては、錠剤、分散剤、懸濁剤、注射剤、溶液剤、シロップ剤、トローチ剤、カプセル剤、点鼻剤、坐剤、エアロゾル剤、経皮パッチ剤などが挙げられる。これらの剤形はさらに、この目的のために特別に設計された制御放出装置、あるいはこの方式で付加的に作用するように改良された他の形態の留置剤を注入または留置することを含んでもよい。アクリル樹脂、ワックス、高級脂肪族アルコール、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ならびに特定のセルロース誘導体（ヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）などの疎水性ポリマーで被覆することによって制御放出を達成してもよい。また、他の重合体母材、リポソーム、および/または微小球を用いて制御放出を達成してもよい。

20

【0119】

組成物は、それぞれ本発明の1つ以上の治療剤の所定量を含むカプセル、小袋、機能性食品/飼料または錠剤などの個別の単位として提示されてもよく、散剤または顆粒剤として、あるいは水性の液体、非水性の液体、水中油型乳剤または油中水型液体乳剤中の溶液剤または懸濁剤として提示されてもよい。このような組成物を任意の製薬方法で調製してもよいが、いずれの方法も上記のような1つ以上の薬剤を、1つ以上の必要な成分を構成する担体と結びつける工程を含む。一般には、本発明の薬剤を液体担体または細かく分割した固体担体、あるいはその両方と均一かつ緊密に混合した後、必要に応じて生成物を所望の形態に成形することで組成物を調製する。

30

【0120】

上記の組成物は、剤形に適合する方法で、有効量で投与可能である。本発明に関して、患者に投与される用量は、適切な期間にわたって患者に有益な応答をもたらすのに十分でなければならない。投与される薬剤の量は、医師の判断に依存する要因（治療を受ける対象の年齢、性別、体重、および全般的な健康状態）を含め、治療される対象に依存してもよい。

40

【0121】

本明細書で一般に使用される場合、「患者」、「個体」、および「対象」という用語は、本明細書に開示されている治療または組成物を受ける任意の哺乳動物に関して使用される。したがって、本明細書に開示されている方法および組成物は、医学的および/または獣医学的用途を有し得る。好ましい形態では、哺乳動物はヒトである。

【0122】

本発明を十分に理解し実用することができるように、以下の非限定的な実施例を示す。

【実施例1】

【0123】

50

(序論)

【0124】

抗体に基づく受動免疫療法を検討すると、表面Mタンパク質(およびスーパー抗原)に対する抗体は、侵襲性疾患を発症する個体では有意に低く[9]、母集団中の抗体が低濃度であることが1980年代に始まった侵襲性疾患の流行の一因となった可能性がある[10、11]ことが認識された。しかし、侵襲性感染前の個体で抗体が低いか、あるいは抗体異化作用の結果として感染が始まった後に抗体が低くなるかを判断することはできない。発明者らは、この問題に直接対処する方法は、動物にワクチン接種して攻撃し、すなわち感染させて治療することができるSTSモデルにあると考えた。発明者らは、Mタンパク質の高度に保存された部分に基づくGASワクチン([12]に概説)を開発した。抗原はJ8として知られており、その配列はMタンパク質のC3反復の12個のアミノ酸を模倣している。ジフテリア類毒素に結合したJ8(J8-DT)を接種すると、M型に関係なくインビトロでGASをオプソニン化する抗体を誘導し、腹腔内および皮膚の攻撃からマウスを防御することができる[13-16]。しかし、健常なマウスはスーパー抗原に感受性がない(マウスMHCII分子のスーパー抗原に対する親和性が非常に低い)ため、このワクチンがSTSを予防するかどうかは不明である。本明細書に開示される研究は、感染前の予防措置としてのJ8GASワクチン、ならびに感染後の治療選択肢としてのJ8に対する抗体とSpeAおよびSpeCに対する抗体を使用する受動免疫療法を試験するための最適なマウスモデルを提供する。

10

20

(材料および方法)

【0125】

SN1~SN4は、2015年にブリスベンでほぼ同時期にSTSを発症した4人の成人の血液(x3)または創傷の拭き取り検体(x1)から採取した臨床GAS分離株である。4人の患者のうち2人は疾患により死亡した。生物を発明者らの研究室で培養し、SN1を用いて予備データセットを開発した(下記)。組換えSpeC(rSpeC)をToxin Tech(米国)から商業的に購入し、インビトロ実験およびマウスでの抗SpeC抗体の産生に使用した。HLA形質転換B6マウス(「HLA-B6」)はHLA-DR3およびHLA-DQ2を発現する[17]。

【0126】

生物はすべてemm89型であった。GenElute細菌gDNA抽出キット(Sigma)を用いて、一晚培養した定常期培養液からゲノムDNAを抽出した。Nanodrop1000を用いてgDNAを認定し、2μgのgDNAを用いてすべての既知のスーパー抗原遺伝子を増幅した。SDS-PAGEから、SN1~4がすべてSpeC遺伝子を含むことがわかった。また、SpeGおよびSmeZについては陽性であったが、SpeS、A、L、M、H、I、J、K、およびssaについては陰性であった。

30

(結果)

【0127】

発明者らはHLA-B6マウスがマウスに非適応のGAS株による皮膚感染後にiGAS疾患を発症する可能性があることを見出した(図1A~B)。対照的に、GAS株は、健常な非ヒト化マウスでiGAS疾患を引き起こすことができるようになるまでには連続継代によって適応させる必要がある。このことは、スーパー抗原がGASに与える生存上の利点[18]、およびスーパー抗原が刺激性であるためのヒトMHCII分子の必要性に関連している可能性がある。したがって、HLA-B6マウスはSTSのモデル化に理想的であるはずである。しかし、SpeC分泌性GASによる感染後、BALB/c(非HLA形質転換)マウスは、感染後6日目に血清中にSpeC毒素の存在を示した(図1C)。この毒素を含む血清を滅菌濾過し、インビトロおよびインビボ検定の試薬として使用した。HLA-B6および野生型対照であるC57/BL6(B6)マウスを、SN1、およびスーパー抗原を発現しないC群連鎖球菌(NS33)に感染させた。感染したマウスから感染後6日目に採取した貯蔵血清試料を、4~15%勾配のSDS-PAGEゲルで泳動した。ゲルからタンパク質を転写した後、膜を一次抗体であるウサギ抗SpeC I

40

50

gG (Toxin-Tech、米国) で調べ、続いてヒツジ抗ウサギ IgG - AP (Sigma-Aldrich) で検出し、BCIP / NBT 基質 (Sigma-Aldrich) を用いて発色させた。rSpeC タンパク質も陽性対照として泳動した。SN1 感染マウスの血清で SpeC が検出されたのに対し、NS33 感染マウスの血清では毒素の存在は示されなかった (図 1 D)。

【0128】

感染した BALB / c マウスの SpeC を含む血清または rSpeC を、B6 または HLA - B6 マウスの脾細胞培養物に添加した。感染マウスの血清の存在下または rSpeC の存在下で、HLA - B6 脾臓細胞の有意な増殖が観察された (B6 マウスの脾臓細胞では観察されなかった) が、C 群連鎖球菌 (NS33) に感染したマウスの血清の存在下では観察されなかった (図 2 A)。増殖は抗 rSpeC 抗体によってほぼ完全に阻害され、SN1 に存在する他のスーパー抗原が最小限の活性しか発揮しなかったことを示している (図 2 A)。TNF および IFN - の分泌を測定しても同様の反応が観察された (図 2 B ~ C)。感染 BALB / c マウスの血清、または rSpeC を、3 人の健常な成人ボランティアの末梢血単核細胞 (PBMC) にも添加した。SN1 感染マウスの血清に対しては、すべてのドナーで用量反応的に (5 μ L / ウェルまで) リンパ球の有意な増殖が観察されたが、NS33 感染マウスの血清に対しては観察されなかった。20 μ L / ウェルの SN1 血清では、リンパ球の増殖は分裂促進因子である PHA によって誘導されたものと同様であった。増殖は抗 rSpeC 抗体によって阻害された。これらのデータは、SN1 が HLA ヒト化マウスおよびヒトのリンパ球を非特異的に活性化することができる SpeC を発現することを示しており、STSS の既知の病原性と一致している。データはさらに、HLA - B6 マウスを使用して STSS をモデル化できることを示唆している。

【0129】

J8 の接種によるマウス STSS の予防。J8 - DT の接種が STSS を予防するかどうかを判断するために、まず、皮膚で、SN1 によって引き起こされる iGAS 疾患を予防するかを調べた。J8 - DT / ミョウバンを HLA - B6 マウスに筋肉内接種 (3 回) すると、皮膚、血液、脾臓の細菌負荷が 10,000 ~ 10,000,000 倍減少した (図 3 A)。攻撃後 6 日目に採取した血清のウェスタンブロット分析は、対照 (PBS) マウスの血清では SpeC を示したが、J8 - DT を接種したマウスの血清では示さなかった (図 3 B)。

【0130】

次に、J8 - DT を接種した SN1 感染マウスの血清が健常なボランティアから採取した PBMC を活性化するかを試験した。接種を受けていないマウスの血清は、3 人中 3 人で強い増殖を引き起こした (PHA によって誘導されたレベルの最大 50%) が、接種を受けたマウスの血清は、それよりも有意に低い増殖をもたらした。2 人の個体の代表的なデータを示す (図 3 C ~ D)。同様に、rSpeC に対する抗血清は、SN1 感染マウスの血清によって引き起こされた増殖応答を有意に減少させた。しかし、さらに、J8 - DT を接種した HLA - B6 マウスのマウス血清に抗 rSpeC 抗血清 (10 ~ 20 μ L) を添加すると基底レベル以下の増殖につながることを観察された (SI : 約 1 ; P < 0.05 ~ 0.01)。

【0131】

受動免疫療法の開発。目的は、SpeA / C に対する抗体と J8 に対する抗体とからなる併用受動免疫療法を開発することである。発明者らの予備データは、rSpeC で免疫付与した BALB / c マウスの血清が、毒素を 0.05 μ g / ml、0.5 μ g / ml、5 μ g / ml で添加した場合にヒト PBMC に対する rSpeC の分裂促進効果を完全に阻害できることを示している (図 4)。抗血清は 5 μ L / ウェルまでの濃度では有効であった。

【0132】

本実施例では、STSS の発症を制限する J8 抗血清の能力も示したが、健常なマウスの J8 抗血清 (主に IgG1) がレシピエント動物の細菌負荷を急速に減少させることができることを示した (図 5 A)。しかし、発明者らのデータは、抗 SpeC 抗体と抗 J8

10

20

30

40

50

抗体との併用が、S p e CとMタンパク質の両方を中和し、さらには抗J8抗体を含むことによって血行路から細菌を除去するという点で、さらに優れていることを示している。また、発明者らは、感染の5日後にBALB/cマウスに抗S p e C抗血清を投与すると、投与後6時間以内にS p e Cを中和できることも見出した(図5B)。しかし、この治療は皮膚の細菌負荷の減少にはつながらなかった(図5C)。

(提案されたさらなる研究)

【0133】

発明者らは、iGAS疾患は、マウスに非適応のGAS株に感染した後にHLA-B6マウスで発症する可能性があり、HLA-B6マウスのリンパ球はSTSSの病態と一致する形でSN1 GASのS p e Cに応答することを示した。研究を進展させるために、発明者らが集めた中に含まれ、ゲノムスクリーニングからS p e Cに陽性であることがわかっている他のGAS株(表1)もHLA-B6マウスのリンパ球を活性化するかを調べる。ウェスタンブロットにより、4つのさらなるS p e C陽性GAS株に感染したHLA-B6マウスの血清中のS p e Cの存在を確認する。次に、非感染HLA-B6マウス(n=5/GAS分離株)の脾細胞を、rS p e Cまたは様々なS p e C陽性株に感染したマウスの血清と共に培養する。リンパ球の増殖と分泌されたTNFおよびIFNを上記のとおり測定する。簡単に説明すると、無感作の脾細胞を、S p e C陽性GASに感染したマウスの事前に最適化された濃度の血清で刺激する。増殖を72時間後の³Hチミジン取り込みによって測定する。無細胞培養上清を、CBAキット(BD Biosciences)で様々なサイトカインについて試験する。健全なマウス血清(NMS)およびスーパー抗原-NEG NS33(C群連鎖球菌)感染マウスの血清を陰性対照として使用する。実験を少なくとも2回繰り返す。また、GAS臨床試料を採取し、利用できるようになれば試験する。

10

20

【0134】

S p e CはGASの2つの主要なスーパー抗原のうちの一つであり、もう一つはS p e Aである。同様に、5つの異なるS p e A陽性GAS株(表1)および新たな試料(GAS分離株およびSTSS患者の血清)がHLA-B6マウスの脾臓細胞を活性化する能力を試験する。

【0135】

S p e AはHLA DR4およびDQ8に結合することが知られている[18]が、DR3およびDQ2にも結合することから、発明者らが現在所有しているHLA-B6マウスがS p e Aを有するGASを使用したSTSS研究に適していることが示されている。rS p e Aを陽性対照として使用する。米国のToxin TechからrS p e Aを購入する。

30

【0136】

発明者らは以前に皮膚攻撃モデル[14]を開発した。軽く擦った皮膚に連鎖球菌を局所接種することにより、このモデルはヒトの膿皮症を厳密に再現する。STSSのほとんどの症例が皮膚から始まることを考えると、これは理想的な攻撃モデルである。マウスを安楽死させ、均質化済み切除皮膚のコロニー数を推定することにより、細菌負荷を正確に定量化することができる。侵襲性の細菌負荷を、血液および均質化済み脾臓試料を蒔くことによって決定する。このモデルを使用して、J8-DT/ミョウバンを異なる株の健全なマウスに筋肉内接種する(3回)ことによって血清型に依存せずGAS膿皮症およびiGAS疾患から防御できることを示した。

40

【0137】

HLA-B6マウスに、0、21、および42日目にJ8-DT/ミョウバン(または対照としてPBS/ミョウバン)を接種する(筋肉内接種で3回)。接種の2週間後、マウスを5つの異なるS p e A陽性株および5つの異なるS p e C陽性GAS株で経皮的に攻撃する。15匹の規模の群を使用する。臨床疾患の徴候についてマウスを9日間観察する。皮膚、血液、および脾臓の細菌負荷を、攻撃後3、6、および9日目に指定数のマウス(n=5匹/群)を安楽死させることによって推定する。様々な時点で採取した血液から得た血清試料を用いて、ウェスタンブロットによってS p e AおよびS p e Cの存在を決定する。(肝損傷の指標である)肝酵素濃度の上昇があるかを、既に記載されている方

50

法で調査する [19]。接種を受けたマウスおよび対照マウスの血清を滅菌濾過し、それらが H L A - B 6 マウスの脾臓細胞およびヒト P B M C によるリンパ球増殖およびサイトカイン分泌を刺激する能力について試験する。 [³H] チミジン取り込み検定および C B A キットを利用して、増殖およびサイトカイン分泌をそれぞれ測定する。

【 0 1 3 8 】

したがって、S T S S からの防御に関する読み出し情報は 3 つある。(i) 接種を受けた感染マウスの臨床的および血清学的分析、(i i) 対照マウス血清と比較した、接種を受けたマウスの濾過済み血清とインキュベート後のインビトロでの H L A - B 6 マウス脾細胞の刺激の予防、(i i i) 対照マウス血清と比較した、接種を受けたマウスの濾過済み血清とインキュベート後の健常なヒトボランティアの P B M C の刺激の予防。

10

【 0 1 3 9 】

I V I G は S T S S に関する生存率を有意に改善することが示されており、これは連鎖球菌のスーパー抗原に対する抗体の存在が原因であるとされている。さらに、スーパー抗原および M タンパク質に対する自然獲得抗体は S T S S に対する防御に關与することが示唆されている。

【 0 1 4 0 】

抗 S p e A / C 抗体と抗 J 8 抗体との組み合わせを、H L A - B 6 マウスを S p e A 陽性 G A S および S p e C 陽性 G A S に感染させた後の連鎖球菌の負荷、および S p e A / C によるリンパ球刺激に対する防御について、試験する。まず、実験は抗生物質の併用療法を行わずに実施される。S p e A、S p e C、および J 8 に対するモノクローナル抗体を作製する。モノクローナル抗体を作製するために、スーパー抗原タンパク質 S p e A および S p e C を Toxin Technology Inc. (米国、フロリダ州) から商業的に入手する。発明者らの予備データは、抗 J 8 抗血清 (I g G 1 アイソタイプ) がレシピエントマウスの細菌の生体負荷を 4 8 時間以内にほぼ 1 0 0 0 分の 1 に減少させることができ (図 5 A)、感染の 6 日後に B A L B / c マウスに投与された抗 S p e C 抗血清が投与後 6 時間以内に S p e C を中和することができる (図 5 B) ことを示している。しかし、抗 S p e C 抗血清治療は皮膚の細菌負荷の減少にはつながらず、J 8 抗体のオプソニン活性の必要性を示唆している (図 5 C)。I g G 1 モノクローナル抗体を、組換えスーパー抗原に対する抗血清および J 8 に対する抗血清と共に試験する。活性を、感染したマウスの血清のウェスタンブロット分析 (W B) で 2 6 k D a のスーパー抗原バンドがないこと (スーパー抗原の M A b および J 8 の M A b の場合)、および治療の 2 4 時間後の細菌負荷の減少 (J 8 の M A b の場合) と定義する。S p e A / C の有意な阻害または生体負荷の減少に必要な抗体の最適量を決定する。最も活性の高い阻害物質を、決定した最適量の抗体を用いた併用免疫療法研究に進める。

20

30

【 0 1 4 1 】

H L A - B 6 マウス (1 0 匹 / 群) を S p e A 陽性または S p e C 陽性 G A S に感染させる。次に、マウスに、抗 J 8 抗体のみ、抗 S p e A / C 抗体のみ、両方の組み合わせ、または対照としてアイソタイプが一致する M a b、のいずれかを静脈内経路で投与する。次に、マウスの臨床症状と毎日採取した血液を観察して、血中の細菌負荷と S p e A / C の有無を推定する。治療後の様々な時点で採取した血清を、H L A - B 6 マウスおよびヒトボランティア (スーパー抗原の存在を示す) のリンパ球を活性化するかを試験するのに使用する。血清を肝酵素濃度の測定にも使用する。S T S S は肝機能障害を引き起こし、血流低下と循環毒素による黄疸および高濃度のアミノトランスフェラーゼを引き起こす可能性がある。すべてのパラメータの有意な改善が 2 4 時間以内に観察されることが期待される。有益な臨床的利益をもつ治療法を、続いて抗生物質療法 (ペニシリン) [2 0] を受ける別のマウスコホートに対して実施し、免疫療法が回復を早めることができるかを決定する。

40

【 0 1 4 2 】

上記の多くの試験を以下に概説する実施例 2 で実施した。

(要約)

50

【 0 1 4 3 】

S T S S および i G A S 疾患の有病率は毎年増加しており、社会の全区域に波及しているが、取り残されている集団は流行の矢面に立たされている。S T S S の現在の最良の治療選択肢は I V I G および抗生物質療法である。I V I G は高価で品質にばらつきがあるが、抗生物質と組み合わせて連鎖球菌に特異的な抗体が治療に必要であるという十分な証拠を示している。発明者らの予備データは、Mタンパク質および特定の毒素に対する抗体が最良の治療法であるという強力な証拠を示す。J 8 に特異的な抗体は、G A S を中和することができ、Mタンパク質の保存領域を標的とすることですべての株に対して防御できるという明確な利点をもつ。S p e C 毒素に特異的な抗体は毒素を中和することができ、もう一つの主要な毒素である S p e A に対する抗体も同様であるという原理証明を示す。これらの2つの毒素はS T S S のほとんどの症例の原因である。生物を標的とする免疫応答（抗 J 8）と主要な毒素を中和する免疫応答（抗 S p e A、抗 S p e C）との組み合わせは、これまで試験または開発されていない革新的な段階であるが、さらに発展させて最終的に臨床に進める重要な能力と経験を我々がもっていることを示す。

10

【 0 1 4 4 】

【表 1】

表1. SpeAまたはSpeC毒素を発現するGAS分離株の一覧

番号	分離株	emm型	由来源	SpeA	SpeC
1	SN1	89	血液	陰性	陽性
2	NS1	100	皮膚	陰性	陽性
3	NS7	80	血液	陰性	陽性
4	NS12	61	血液	陰性	陽性
5	NS35	53	腋窩の膿瘍の拭き取り検体	陰性	陽性
6	NS24	24	血液	陽性	陰性
7	NS25	12	血液	陽性	陰性
8	5448	1	血液	陽性	陰性
9	88/373	49	血液	陽性	陰性
10	HKU425	1	左前腕の深部の筋膜炎組織	陽性	陰性

20

30

【 0 1 4 5 】

【表 2 - 1】

REFERENCES

1. Pahlman, L.I., et al., *Streptococcal M protein: a multipotent and powerful inducer of inflammation.* J Immunol, 2006. **177**(2): p. 1221-8.
2. Faulkner, L., et al., *The mechanism of superantigen-mediated toxic shock: not a simple Th1 cytokine storm.* J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6870-7.
3. DaSilva, L., et al., *Humanlike immune response of human leukocyte antigen-DR3 transgenic mice to staphylococcal enterotoxins: a novel model for superantigen vaccines.* J Infect Dis, 2002. **185**(12): p. 1754-60. 10
4. McCormick, J.K., et al., *Development of streptococcal pyrogenic exotoxin C vaccine toxoids that are protective in the rabbit model of toxic shock syndrome.* J Immunol, 2000. **165**(4): p. 2306-12.
5. Roggiani, M., et al., *Toxoids of streptococcal pyrogenic exotoxin A are protective in rabbit models of streptococcal toxic shock syndrome.* Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5011-7.
6. Kaul, R., et al., *Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome--a comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group.* Clin Infect Dis, 1999. **28**(4): p. 800-7. 20
7. Linner, A., et al., *Clinical efficacy of polyspecific intravenous immunoglobulin therapy in patients with streptococcal toxic shock syndrome: a comparative observational study.* Clin Infect Dis, 2014. **59**(6): p. 851-7.
8. Jolles, S., W.A. Sewell, and S.A. Misbah, *Clinical uses of intravenous immunoglobulin.* Clin Exp Immunol, 2005. **142**(1): p. 1-11.
9. Basma, H., et al., *Risk factors in the pathogenesis of invasive group A streptococcal infections: role of protective humoral immunity.* Infect Immun, 1999. **67**(4): p. 1871-7.
10. Holm, S.E., et al., *Aspects of pathogenesis of serious group A streptococcal infections in Sweden, 1988-1989.* J Infect Dis, 1992. **166**(1): p. 31-7. 30
11. Stevens, D.L., *Invasive group A streptococcus infections.* Clin Infect Dis, 1992. **14**(1): p. 2-11.
12. Good, M.F., et al., *Strategic development of the conserved region of the M protein and other candidates as vaccines to prevent infection with group A streptococci.* Expert Rev Vaccines, 2015. **14**(11): p. 1459-70.
13. Batzloff, M.R., et al., *Protection against group A streptococcus by immunization with J8-diphtheria toxoid: contribution of J8- and diphtheria toxoid-specific antibodies to protection.* J Infect Dis, 2003. **187**(10): p. 1598-608. 40
14. Pandey, M., et al., *A synthetic M protein peptide synergizes with a CXC chemokine protease to induce vaccine-mediated protection against virulent streptococcal pyoderma and bacteremia.* J Immunol, 2015. **194**(12): p. 5915-25.

【 0 1 4 6 】

【表 2 - 2】

15. Pandey, M., et al., *Combinatorial Synthetic Peptide Vaccine Strategy Protects against Hypervirulent CovR/S Mutant Streptococci*. J Immunol, 2016. **196**(8): p. 3364-74.
16. Pandey, M., et al., *Physicochemical characterisation, immunogenicity and protective efficacy of a lead streptococcal vaccine: progress towards Phase I trial*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 13786.
17. Chen, Z., et al., *A 320-kilobase artificial chromosome encoding the human HLA DR3-DQ2 MHC haplotype confers HLA restriction in transgenic mice*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 3050-6.
18. Kasper, K.J., et al., *Bacterial superantigens promote acute nasopharyngeal infection by Streptococcus pyogenes in a human MHC Class II-dependent manner*. PLoS Pathog, 2014. **10**(5): p. e1004155.
19. Ukpo, G.E., O.A. Ebuehi, and A.A. Kareem, *Evaluation of Moxifloxacin-induced Biochemical Changes in Mice*. Indian J Pharm Sci, 2012. **74**(5): p. 454-7.
20. Gonczowski, L. and G. Turowski, *The effect of penicillin on skin graft survival in mice*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1984. **32**(3): p. 351-6.

10

【実施例 2】

20

【0147】

(序論)

【0148】

一見では軽症の連鎖球菌感染症が死亡率の高い重篤な侵襲性感染症に急速に悪化する可能性がある。侵襲性 A 群連鎖球菌感染症 (ISD) について報告されている全体的な発生率は、先進国では 10 万人あたり 2 ~ 4 人で変動している。ただし、これらのデータのほとんどは、1996 年 ~ 2007 年に実施された複数の調査から収集したものである [1、2]。2005 年 ~ 2012 年の期間を対象とした米国の調査では、10 万人あたり 3 . 8 人の安定した割合が示された [3]。様々な国で発生率の周期的上昇が以前から説明されているが、最新の報告では、特に 2013 年 (カナダ公衆衛生庁) から、カナダ全土の憂慮すべき持続的な発生率増加が示されている。アルバータ州では、率は 2003 年の 10 万人あたり 4 . 2 から 2017 年には 10 万人あたり 10 . 2 まで劇的に増加した [4]。若者や高齢者、特に発展途上国からも非常に高い割合が報告されている。たとえば、2007 年のフィジー先住民の発生率は、幼児では 10 万人あたり約 60 人、高齢者では 10 万人あたり 75 人であると報告されている [2]。正確な現在の世界の発生率は不明であるが、入手可能なデータは報告されたものよりも著しく高い率を示している。

30

【0149】

症例の約 20% で、ISD は連鎖球菌毒素性ショック症候群 (STSS) を伴うが、これは多臓器不全を伴い、設備の整った施設でもその致死率は 40% を超える [5]。どのような連鎖球菌感染症の後にも発生する可能性があるが、最も一般的には皮膚の感染症後に発生し、通常は壊死性筋膜炎、筋炎、または深部の皮下出血に関連している。妊娠期および産褥期は、特に発展途上国では過度に危険な期間である [6]。

40

【0150】

連鎖球菌の「スーパー抗原」(S Ag) は、STSS の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている。これらの外毒素は、すべての病原性化膿連鎖球菌および黄色ブドウ球菌株によって分泌される [7]。11 個の連鎖球菌 S Ag 遺伝子のうち 9 個はバクテリオファージに存在する。ファージにコードされた連鎖球菌発熱性外毒素 (Spe) A および Spe C は、STSS のほとんどの症例の原因である。S Ag は、ヒト MHC (HLA) クラス II 分子 (ペプチド結合溝の外側) および T 細胞受容体鎖の保存領域への非特異的結合に由来する重要な免疫学的効力を持ち、ポリクローナル T 細胞の活性化をもたらす (

50

多くの場合、25%を超えるCD4陽性T細胞が活性化される)。その結果生じるTh1サイトカインストームは、STSSを定義する低血圧および多臓器不全の原因となる提案された因果関係である。これにより、SAgの類毒素がワクチン候補として提案されている[8、9]。しかし、STSSの病態形成は完全には理解されていない。連鎖球菌のその他の病原性因子(SLO[10]、ペプチドグリカン、リボテイコ酸[11、12]、およびMタンパク質[13]など)は炎症性サイトカインの強力な誘導物質であることがインビトロで示されており、これらまたは他の因子がSTSSに重要な役割を果たし、成功するワクチンおよび免疫療法の開発の鍵となる可能性がある。

【0151】

「J8」は、Mタンパク質の高度に保存されたC3反復領域に基づくワクチン候補である。これは、抗体による好中球オプソニン食作用を介して、皮膚、粘膜、および腹腔内の連鎖球菌性敗血症からマウスを防御することができる[14~16]。ジフテリア類毒素(DT)に結合すると、ヒト以外の霊長類[17]およびヒト[18]で免疫原性であり、現在、免疫原性および有効性を研究するためにさらに臨床試験が行われている。

10

【0152】

本実施例では、HLA-DR3-DQ2形質転換マウスを使用してSTSSをモデル化し、J8の接種がSTSS様疾患を予防できるか、ならびに確立済みのSTSSをJ8特異性抗体およびSpeC特異性抗体による受動免疫療法が治療できるかを調べた。データは、SAgとMタンパク質の両方が病態形成に重要な役割を持つことを示しており、両方に対する抗体が協調して作用し、STSSで死亡した患者から単離したA群連鎖球菌生物の疾患の臨床徴候および関連する強力な分裂促進活性の両方を完全に無効にすることを示している。

20

(結果)

STSSのヒト化マウスモデルの確立

【0153】

SN1は、2015年に、STSSを経験しこの疾患で死亡したプリズベンの患者の血液から単離された化膿性連鎖球菌(A群連鎖球菌)のemm89株である。ゲノム解析により、調べた既知の11個の連鎖球菌SAg遺伝子すべてから、SN1が、ファージにコードされたSpeC遺伝子と染色体にコードされたSmeZおよびSpeG遺伝子とを発現することが明らかになった(図15)。その生物はSpeAに対して陰性であった。別のA群連鎖球菌(NS33)(足部潰瘍の患者から単離、Royal Darwin Hospitalより供給)はSAg遺伝子を発現しなかった。

30

【0154】

BALB/cマウスを皮膚の乱切によってSN1またはNS33に感染させた。これらのマウスは皮膚感染症を発症したが、全身感染症を発症せず、病気にはならなかった。しかし、SN1感染マウスから採取した血液試料は、ウェスタンブロット(WB)分析によって決定したところ、SpeC毒素に対して陽性であった。NS33感染マウスの血液ではSpeCは検出されなかった(図6A~C)。

【0155】

SN1に経皮感染させたBALB/cマウスの血清、または大腸菌由来の組換えSpeC(recSpeC)タンパク質を、B6またはHLA形質転換B6脾細胞培養物に添加した。血清とrecSpeCの両方について、HLA-B6マウスの脾臓細胞の有意な増殖が観察された(がB6マウスでは観察されなかった)(図7A)。増殖は抗recSpeC抗体によって完全には阻害されず、このことは、SN1に存在する他の分子がなんらかの分裂促進活性を発揮したことを示している(図7A)。増殖応答は、STSSの病態形成に関与する2つの重要なサイトカインであるTNFおよびIFN- γ の産生に反映されていた(図7B~C)。NS33感染マウスの血清は、HLA-B6またはB6マウスのいずれの脾細胞でも全く増殖を誘導しなかった。

40

【0156】

これらの応答のヒトとの関連性を、感染BALB/cマウスの血清またはrecSpe

50

Cを3人の健常な成人ボランティアの末梢血単核細胞(PBMC)に添加した場合で確認した。SN1感染マウスの血清に対して用量反応的に(5 μ l/ウェルまで)、すべてのドナーでリンパ球の有意な増殖が観察されたが、NS33感染マウスの血清については観察されなかった(図17)。また、SN1感染マウスの6日目の血清がヒトリンパ球の最大増殖を引き起こしたことも観察され(図7D~F)、このことは、その時点での血清中のSpeC毒素の存在と関連していた(図6C)。これらのデータは、SN1が、HLA-B6マウスおよびヒトのリンパ球を非特異的に活性化する能力をもつSpeCを発現することを示しており、STSSの既知の病態形成と一致している。

【0157】

次に、HLA-B6におけるSN1の臨床的毒性を評価した。マウスを様々な用量のSN1(10⁶、10⁷、または10⁸CFU)で腹腔内感染させた。感染の24時間後、SpeCは1 \times 10⁶CFU感染マウスの血清で検出された(図8A)。この時点で、マウスは臨床症状を示し(図8B)、これらを(認可されている倫理委員会の手順に従って)安楽死させた。細菌負荷を血液と脾臓で評価した(図8C)。細菌負荷に直接関連する臨床スコアを伴う用量依存的な感染結果が観察された(図8B~C)。感染マウスの血清で高濃度のTNF、IFN- γ 、およびIL-2が検出された(図9D~F)。

【0158】

HLA-B6マウスの皮膚感染もSTSS様の病状を引き起こすかを調べた。1 \times 10⁶CFUによる感染後6日目に、HLA-B6マウスはB6マウスに比べて有意に高い皮膚病変の細菌負荷を示した(図9A)。これらのマウスも敗血症を発症したが、細菌負荷は腹腔内経路で感染したマウスよりもはるかに低かった(図9B)。HLA-B6マウスとB6マウスの両方で、NS33感染は敗血症を伴わない中程度の局所感染(10³~10⁴CFU/皮膚病変)につながった(図9A~B)。SpeCはそれらの血液中で検出され(図9C)、それらの血液には高濃度のTNF、IFN- γ およびIL-2も含まれていた。NS33によるHLA-B6マウスの皮膚感染も、SN1またはNS33のいずれかによるB6マウスの皮膚感染も、サイトカイン誘導にはつながらなかった(図9D~F)。

STSSのワクチン予防

【0159】

HLA-B6マウスがSN1による表在性または全身性感染後にSTSS様の病状を発症することを示したので、ジフテリア類毒素に結合したJ8をミョウバンと共に投与する接種(J8-DT/ミョウバン)によってこれを防ぐことができるかを調べた。接種マウスは、SN1による皮膚攻撃感染後の皮膚、血液、および脾臓の細菌負荷の1,000~100万倍の減少を示した(P値はそれぞれ<0.05、<0.001、および<0.01)(図10A)。SpeCは、PBSを接種した対照マウスの血清では検出されたが、J8-DTを接種したマウスの血清では検出されなかった(図10B)。Th1サイトカインであるIFN- γ およびTNFは対照マウスの血清でも検出されたが、Th2サイトカインであるIL-4およびIL-10は防御されたマウスの血清で検出された(図10C、D)。

【0160】

J8-DT接種・感染マウスおよび対照(PBS接種/感染)マウスの濾過済み血清、またはrecSpeCを、3人の健常な個体から得たヒトPBMCの培養物に添加した。PBS接種/感染マウスの血清は、すべての個体のPBMCで強力な増殖を引き起こした(PHAによって誘発されたレベルの最大50%)。recSpeC抗血清の添加によって用量依存的にT細胞活性化のレベルが80~90%低下したため、これは主に、血清中に存在する細菌SpeCが原因であった(図10E~G)。J8-DT接種/感染マウスの血清は、PBS接種/感染マウスの血清に比べて有意に少ない細胞増殖を引き起こし(90~95%減少)、これはrecSpeC抗血清の添加によって基底濃度までさらに減少した(刺激指数:約1;p<0.05~0.01)(図10E~G)。このことは、WBの調査からは明らかではなかったがJ8-DT接種/感染マウスの血清中にまだSpe

10

20

30

40

50

Cが残っていることを示していた(図10B)。増殖データと一致して、J8-DT接種/感染マウス血清によるPBMCの炎症性サイトカイン(IFN-、TNF、IL-2、IL-6、IL-17)の誘導は、PBS接種/感染マウスの血清によるサイトカイン産生に比べて有意に減少していた(図11)。PBS接種/感染血清によって誘発された応答は、recSpeCによって誘発された応答と同等であった。したがって、これらのデータは、SN1感染後にインビトロで観察された、すべてのT細胞活性化およびサイトカイン応答の>90%に連鎖球菌SpeCが関与していること、ならびに事前のJ8-DT接種が血清中分裂促進因子の結果として起こるインビトロ応答の>90%を防ぐことができることを示している。J8-DTの接種が攻撃後の細菌負荷を有意に減少させることができることを以前に示したが、図10および11のデータは、SN1のMタンパク質に直接的な効果を持つ可能性がありMタンパク質が持ち得る任意の分裂促進効果を阻害する可能性がある抗J8抗体に関する、これとは別の役割を排除しない。

10

STSSに対する免疫療法

【0161】

recSpeC抗血清の治療効果を評価するために、HLA-B6マウスをSN1に経皮感染させ、感染後5日目に抗血清(または無感作血清)で治療した。SpeCは、治療前には感染マウスの血清中に存在していたが、6時間後に測定すると有意に減少し、24時間後には存在しなかった。これは、対照マウスには6時間後および24時間後に測定したときに存在していた(図12A)。抗SpeC抗血清による治療は、無感作血清を投与したマウスに比べて皮膚または血液中の細菌負荷を減少させなかった(図12C)。

20

【0162】

別のHLA-B6マウス群を 1×10^6 のSN1細菌に腹腔内感染させた。これらのマウスはより早く病気になる、感染の18時間後で、平均臨床スコアが10のときに[19]、マウスに200 μ LのSpeC抗血清、200 μ Lの抗J8抗血清、両方の組み合わせ、または200 μ Lの無感作血清を静脈内投与した(図13A)。J8-DTおよび/またはrSpeC抗血清を投与したすべてのマウスは24時間以内に回復し、臨床スコアが有意に減少した($P < 0.01 \sim P < 0.001$; 図13B)。しかし、血液および脾臓からの細菌排除が観察されたのは、抗J8抗体(単独でまたは抗SpeC抗体と組み合わせ)を投与したマウスのみであり($P < 0.01$; 図13C)、血中のSpeCの排除が観察された(WB検定を使用)のは抗rSpeC抗体(単独でまたは抗J8抗体と組み合わせ)を投与したマウスのみであった(図13D~G)。

30

SN1由来のMタンパク質は分裂促進効果を発揮し炎症誘発性応答に寄与する

【0163】

J8-DTおよびSpeC特異的抗血清がインビボでSTSS様の病状を治療する能力をインビトロ試験でさらに解明した。SN1感染マウスの血清のHLA-B6脾細胞に対する分裂促進効果は、抗SpeCおよび抗J8-DT抗血清によって部分的に阻害されたが、両方の抗血清の組み合わせによって完全に阻害され(図14B)、このことは、このモデルではJ8特異抗体がSTSSの治療に二重の役割を果たすことを示している。それらは細菌を排除するだけでなく、emm89のMタンパク質の分裂促進効果を阻害する。これは、抗SpeC血清との相乗効果を持つ。可能性は低いですが、SN1血清には、J8に交差反応するエピトープを含む他の分裂促進因子が含まれている可能性がある。そこで、抗J8抗体がrecM1の分裂促進効果を阻害するかどうかを調べた。図14Cは、recM1およびSpeCの両方が分裂促進活性を有し(前述のとおり)、両方の効果が相加的であることを示している。さらに、抗J8-DT抗血清は、recM1の分裂促進効果を完全に阻害する。抗J8-DTと抗SpeCとの組み合わせは、M1+SpeCの組み合わせられた分裂促進活性を完全に阻害する。これらのデータは、まとめると、抗J8抗体が2つの異なるMタンパク質の分裂促進活性を阻害できることを示している。データは、J8エピトープが分裂促進活性を持つことを示唆しているのではなく、単にJ8に対する抗体がMタンパク質を中和できることを示唆している。Mタンパク質の分裂促進決定因子がタンパク質のアミノ末端の半分に位置することを示唆している研究者もいる。

40

50

(考 察)

【 0 1 6 4 】

ここで提示したデータは、H L A ヒト化マウスモデルにおいて、S T S S 様疾患をワクチン接種によって予防すること、および確立済みの疾患を J 8 に対する抗体と S p e C に対する抗体とを含む特異的免疫療法によって迅速に治療することが可能であることを示している。J 8 に対する抗体は二重の効果を持つ。すなわち、それらは細菌を排除するだけでなく、Mタンパク質の分裂促進効果を直接阻害する。一方、S p e C に対する抗体はそのタンパク質の活性を阻害する。総合的に、効果は相乗的で、S T S S 様疾患を完全に解決することができる。

【 0 1 6 5 】

S T S S を予防するためのワクチンを開発する取り組みはわずかである。ある研究グループは、S p e A および S p e C に対する類毒素を開発し、ウサギへのワクチン接種によって、毒素を中和し、ミニ浸透圧ポンプを介して投与された天然毒素からウサギを防御する抗体を導くことができることを示している。ウサギは、連鎖球菌感染症にさらされていなかった [8、9]。このワクチン手法は有望であるが、連鎖球菌疾患の一側面のみから防御するために複数の類毒素をワクチン接種する必要があるという弱点がある。発明者らのデータは、この手法が細菌性敗血症を軽減しないことを示唆している。H L A 形質転換マウスは特定の H L A 型がより S T T S にかかりやすいことを示すのに使用されている [2 0] が、連鎖球菌 S T S S に対するワクチンまたは治療法を開発をモデル化するためには使用されていない。しかし、それらは黄色ブドウ球菌のスーパー抗原の既知の非毒性断片を用いて候補ワクチンを開発するのに使用されている [2 1]。これらのマウスを、その生物ではなく組換え S A g で攻撃した。

【 0 1 6 6 】

発明者らは、Mタンパク質の高度に保存された部分に基づく候補 A 群連鎖球菌ワクチン ([2 2] に概説) を開発した。抗原は J 8 として知られており、その配列は Mタンパク質の C 3 反復の 1 2 個のアミノ酸を模倣している。ジフテリア類毒素に結合した J 8 (J 8 - D T) を接種すると、M型に関係なくインビトロで A 群連鎖球菌をオプソニン化する抗体を誘導し、攻撃後の細菌負荷を軽減することで腹腔内、皮膚、および粘膜の攻撃からマウスを防御することができる [1 4、1 6、2 3 ~ 2 5]。H L A ヒト化マウスでは試験されていなかったが、このようなワクチンによる防御は S T S S に対する防御に発展することが想定されていた。しかし、S A g はその疾患において中心的役割を果たすと考えられているため細菌負荷はいくらか減少するとしても、抗 J 8 抗体による受動免疫療法が確立済みの疾患を解決するとは想定されず、また、J 8 に対する抗体が血清中 S A g 濃度に影響するという示唆はなかった。2 0 0 μ L の J 8 免疫血清が (単独でまたは抗 S p e C 抗血清との併用で) 血液および脾臓のすべての細菌負荷を実質的に排除し、さらには臨床スコアを解決することができたことは意外であった。発明者らのデータは、S T S S の病態形成に S p e C または S A g が重要な役割を持つことと相反していない。というのも特に抗 S p e C 抗体も臨床徴候を迅速に解決することができるからである。しかし、データは、疾患の発症には S A g だけでは不十分であることを立証している。

【 0 1 6 7 】

S A g に加え、連鎖球菌 Mタンパク質も重症の連鎖球菌感染症につながる炎症誘発性応答に関与していることが報告されている [2 6 ~ 2 9]。T L R 2 によって単球を刺激することにより、Mタンパク質は大量の炎症誘発性サイトカインを産生することができる。好中球由来のヘパリン結合タンパク質 (H B P) と相乗的に作用することにより、Mタンパク質は血管漏出を誘導し、重症の連鎖球菌感染症に見られる病態生理学的結果の一因となる [3 0]。M 1、M 3、および M 5 などのいくつかの Mタンパク質は、一貫して I S D および S T S S の発生と関連している [3 1 ~ 3 3]。M 1 および M 5 などの特定の血清型の Mタンパク質の B 反復領域も、スーパー抗原として作用して炎症反応の一因となる可能性がある [3 4]。特定の連鎖球菌血清型 (異なる表面 Mタンパク質を持つ株を区別する) が I S D と関連していると報告されているが、この関連は、当時の母集団中の最も

10

20

30

40

50

一般的な血清型を反映しているにすぎないと考えられている [2]。しかし、Mタンパク質は自然免疫と獲得免疫の両方を下方制御することができ、I S Dの病態形成の一因である可能性がある。

A群連鎖球菌 e m m 8 9 および S p e C の I S D との関連は、最近の多くの報告、さらには日本 (e m m 8 9 が S T S S 症例で 2 番目に優勢な遺伝子型であった) で指摘されている [3 5]。

【 0 1 6 8 】

表面Mタンパク質 (および S A g) に対する抗体は、侵襲性疾患を発症する個体では有意に低い [3 6] ことが知られており、母集団中の抗体が低濃度であることが 1 9 8 0 年代に始まった I S D の流行の一因となった可能性があることが示唆されていた [3 7、3 8]。しかし、感染前の個体で抗体が低いか、あるいは抗体異化作用の結果として感染が始まった後に抗体が低くなるかを判断することはできない。この問題に直接対処する方法は、動物にワクチン接種して攻撃し、すなわち感染させて治療することができる S T S S モデルを使用することである。

【 0 1 6 9 】

発明者らは、毒素の存在は全身感染とは無関係であることを見出した。検出可能な菌血症を伴わない表在性皮膚感染後のマウスの血液中で S p e C が検出された。これらのマウスは疾患の病理学的徴候を示した。これは、臨床疾患のいくつかの症例で観察されている [3 9]。発明者らは、表在性皮膚感染後、感染後 6 日目の感染血清中で毒素が検出されたことに注目した。このことは、感染の初期段階で毒素がゆっくりと放出されることを示唆していた。この所見は、感染後 7 日目に高濃度の S p e A の発現が認められたテフロン組織容器モデル [4 0] と一致している。腹腔内 (I P) 感染後の S T S S の急性発症は非常に明白であり、感染後 2 4 時間以内に感染マウスの血液中で毒素が検出され、高い臨床スコアが得られた。対照的に、表在性皮膚感染症は、進行性の感染症の発症を示していた。

【 0 1 7 0 】

発明者らは、マウスとヒトの両方で、S A g の分裂促進活性に関連する典型的な病理を実証した。感染マウスの血清中の S p e C の量は、H L A - B 6 マウスの脾細胞を C o n A または r S p e C によって引き起こされるレベルに匹敵するレベル (高くはなくても) に刺激する可能性があった。S N 1 感染血清によって引き起こされた増殖は、r S p e C のみによって引き起こされた増殖よりも高かった。したがって、このことは S N 1 感染血清に存在する他のなんらかの分裂促進因子の関与を示唆している。

【 0 1 7 1 】

感染マウスの血清に抗 S p e C 抗血清を添加すると、増殖応答を有意に阻害することができ、したがって、増殖が主に S p e C によるものであることが確認された。しかし、治療群で残存する増殖が観察されたことから、他の S A g または M タンパク質など A 群連鎖球菌のその他の病原性因子が関与していることが示された。

【 0 1 7 2 】

発明者らは、H L A - B 6 マウスのワクチン接種が S T S S 予防に有効であることに注目した。特に、防御のメカニズムには、分泌された S p e C の特異的な中和ではなく、A群連鎖球菌の排除が含まれていた。J 8 - D T のワクチン接種は局所および全身の細菌負荷を有意に減少させ (> 9 0 %)、それによって S T S S 関連の病状からマウスを防御した。さらに、ワクチン接種を受けた感染マウスの血清は健常な個体の P B M C の最小限の増殖を引き起こすことも示された。発明者らは、この効果は、血清中に S p e C だけでなく A 群連鎖球菌感染症の結果として通常は存在して全体的な疾患の結果に関与する他の因子も存在しないことに起因する可能性があると考えている。

【 0 1 7 3 】

受動免疫療法は S T S S を治療する手段として有望である。免疫グロブリン静注 (I V I G) は、S T S S の致死率を有意に低下させることが分かっている [4 1]。この研究は歴史的対照を使用した。これより最近の 6 7 人の患者を対象としたスウェーデンの前

10

20

30

40

50

向き対照研究では、死亡率は、抗生物質のみで治療された44人の患者のうち22人(50%)であったのに対し、IVI Gと抗生物質で治療された群では23人中3人(13%)であった($P < 0.01$) [42]。ただし、臨床的利益のためには、IVI Gで40を超えるスーパー抗原抗体価が必要であると推定されている。

【0174】

これは、IVI Gに見られる特異的抗体の量に近いため、IVI Gの複数回投与が推奨される。IVI Gはコストが高く、バッチ間でばらつきがあり [43]、供給が難しいことから、代替りの補助療法の必要性が強調されている。A群連鎖球菌のすべての株による感染を予防したワクチン、あるいは診断の時点で抗生物質と共に、または抗生物質なしで行われた特異性抗体免疫療法は、はるかに大きな有用性を持つと考えられる。発明者らは、rSpeC抗血清の投与は毒素を中和することはできるが、SN1感染HLA-B6マウスの細菌負荷を減少させることはできないことを見出した。この所見により、個体を治療するためには系からの完全な毒素排除が保証されるまで抗rSpeC血清を複数回投与する必要があるという事実が強調された。しかし、その個体が生きたA群連鎖球菌を有している限り、毒素および関連する病状に関する懸念は排除されない。

10

【0175】

発明者らは、毒素中和だけでなく系からのA群連鎖球菌の排除につながる併用免疫療法がより良い代替法であるかもしれないと仮定した。A群連鎖球菌の排除によって、毒素中和のための継続的な治療の必要性が低減されるだけでなく、STSSの病状の原因となる他の病原性因子の可能性が排除される。過去の報告と一致して、発明者らは、HLA-B6モデルではA群連鎖球菌のSAgがSTSSの病態生理学の唯一の決定因子ではない可能性があり、Mタンパク質など他のA群連鎖球菌病原性因子が重要な役割を果たす可能性があることを実証している。A群連鎖球菌emm89分離株を利用することにより、SAgであるSpeCとA群連鎖球菌Mタンパク質とが連携して作用し、感染後に見られる臨床疾患の原因となることを示すことができた。J8-DT抗血清によるインビボでのMタンパク質の中和は、フィブリノーゲンとの相互作用、およびその後の好中球のB2インテグリンによる認識を防ぐ。最終結果として、STSSの重要な事象である血管漏出の原因因子の活性化および放出はない。インビトロでのMタンパク質の中和は、サイトカイン誘導およびそれ以降の炎症反応の欠如を含む異なるメカニズムに従っていた可能性がある。

20

【0176】

本明細書全体を通して、目的は、本発明をいずれかの一態様または特定の特徴の集合に限定することなく、本発明の好ましい態様について説明することである。本発明の広い精神および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載かつ例示された態様に様々な変更および修正を加えてもよい。

30

【0177】

本明細書で参照するすべてのコンピュータプログラム、アルゴリズム、特許、および科学技術文献は、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0178】

【表 3 - 1】

References:

1. Lamagni, T.L., et al., Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol*, 2008. 46(7): p. 2359-67.
2. Steer, A.C., et al., Invasive group a streptococcal disease: epidemiology, pathogenesis and management. *Drugs*, 2012. 72(9): p. 1213-27.
3. Nelson, G.E., et al., Epidemiology of Invasive Group A Streptococcal Infections in the United States, 2005-2012. *Clin Infect Dis*, 2016. 63(4): p. 478-86. 10
4. Tyrrell, G.J., et al., Increasing Rates of Invasive Group A Streptococcal Disease in Alberta, Canada; 2003-2017. *Open Forum Infect Dis*, 2018. 5(8): p. ofy177.
5. Lamagni, T.L., et al., Severe *Streptococcus pyogenes* infections, United Kingdom, 2003-2004. *Emerg Infect Dis*, 2008. 14(2): p. 202-9.
6. Lamagni, E.a., Epidemiology of *Streptococcus pyogenes*". In: *Streptococcus Pyogenes. Basic biology to Clinical Manifestations*. Eds: JJ Ferretti, DL Stevens, VA Fischetti. 2017. University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343616>). , 2017: p. pp 601-627. . 20
7. Fraser, P.a., Streptococcal superantigens: Biological properties and potential role in disease", In: *Streptococcus Pyogenes. Basic biology to Clinical Manifestations*. Eds: JJ Ferretti, DL Stevens, VA Fischetti. 2017. University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343616>). 2017: p. pp 445-485. 30
8. Roggiani, M., et al., Toxoids of streptococcal pyrogenic exotoxin A are protective in rabbit models of streptococcal toxic shock syndrome. *Infect Immun*, 2000. 68(9): p. 5011-7.
9. McCormick, J.K., et al., Development of streptococcal pyrogenic exotoxin C vaccine toxoids that are protective in the rabbit model of toxic shock syndrome. *J Immunol*, 2000. 165(4): p. 2306-12.
10. Hackett S. P., S.D.L., Streptococcal toxic shock syndrome: synthesis of tumor necrosis factor and interleukin-1 by monocytes stimulated with pyrogenic exotoxin A and streptolysin O. . *The Journal of Infectious Diseases*. , 1992. 165(5): p. 879–885. 40

【 0 1 7 9 】

【表 3 - 2】

11. Hackett, S., Ferretti, J. J., & Stevens, D. L., Cytokine induction by viable group A streptococci: suppression by streptolysin O. The 94th Annual Meeting of the American Society for Microbiology 1994. 73.
12. Muller-Alouf, H., et al., Comparative study of cytokine release by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Streptococcus pyogenes* superantigenic erythrogenic toxins, heat-killed streptococci, and lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1994. 62(11): p. 4915-21. 10
13. Kotb, M., et al., Temporal relationship of cytokine release by peripheral blood mononuclear cells stimulated by the streptococcal superantigen pep M5. *Infect Immun*, 1993. 61(4): p. 1194-201.
14. Batzloff, M.R., et al., Protection against group A streptococcus by immunization with J8-diphtheria toxoid: contribution of J8- and diphtheria toxoid-specific antibodies to protection. *J Infect Dis*, 2003. 187(10): p. 1598-608.
15. Pandey, M., M.R. Batzloff, and M.F. Good, Mechanism of protection induced by group A *Streptococcus* vaccine candidate J8-DT: contribution of B and T-cells towards protection. *PLoS One*, 2009. 4(4): p. e5147. 20
16. Pandey, M., et al., A synthetic M protein peptide synergizes with a CXC chemokine protease to induce vaccine-mediated protection against virulent streptococcal pyoderma and bacteremia. *J Immunol*, 2015. 194(12): p. 5915-25.
17. Caro-Aguilar, I., et al., Immunogenicity in mice and non-human primates of the Group A Streptococcal J8 peptide vaccine candidate conjugated to CRM197. *Hum Vaccin Immunother*, 2013. 9(3): p. 488-96. 30
18. Silvana Sekuloski ¶, M.B., Paul Griffin^{1,2,3,4}, William Parsonage⁴, Suzanne Elliott², Jon Hartas⁵, Peter O'Rourke¹, Manisha Pandey⁵, Tania...Fran Rubin⁶, Robin Mason⁶, Jonathan Carapetis⁷, James McCarthy^{1,4*¶} and Michael F Good^{5*¶}, Evaluation of safety and immunogenicity of a group A streptococcus vaccine candidate (MJ8VAX) in a randomized clinical trial *PLoSOne*, 2018.
19. Shrum, B., et al., A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes*, 2014. 7: p. 233. 40
20. Nooh, M.M., et al., HLA transgenic mice provide evidence for a direct and dominant role of HLA class II variation in modulating the severity of streptococcal sepsis. *J Immunol*, 2007. 178(5): p. 3076-83.

【 0 1 8 0 】

【表 3 - 3】

21. DaSilva, L., et al., Humanlike immune response of human leukocyte antigen-DR3 transgenic mice to staphylococcal enterotoxins: a novel model for superantigen vaccines. *J Infect Dis*, 2002. 185(12): p. 1754-60.
22. Good, M.F., et al., Strategic development of the conserved region of the M protein and other candidates as vaccines to prevent infection with group A streptococci. *Expert Rev Vaccines*, 2015. 14(11): p. 1459-70. 10
23. Pandey, M., et al., Combinatorial Synthetic Peptide Vaccine Strategy Protects against Hypervirulent CovR/S Mutant Streptococci. *J Immunol*, 2016. 196(8): p. 3364-74.
24. Pandey, M., et al., Physicochemical characterisation, immunogenicity and protective efficacy of a lead streptococcal vaccine: progress towards Phase I trial. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 13786.
25. Zaman, M., et al., Novel platform technology for modular mucosal vaccine that protects against streptococcus. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 39274. 20
26. Tomai, M.A., P.M. Schlievert, and M. Kotb, Distinct T-cell receptor V beta gene usage by human T lymphocytes stimulated with the streptococcal pyrogenic exotoxins and pep M5 protein. *Infect Immun*, 1992. 60(2): p. 701-5.
27. Watanabe-Ohnishi, R., et al., Characterization of unique human TCR V beta specificities for a family of streptococcal superantigens represented by rheumatogenic serotypes of M protein. *J Immunol*, 1994. 152(4): p. 2066-73.
28. Perez-Lorenzo, R., et al., Peripheral blood mononuclear cells proliferation and Th1/Th2 cytokine production in response to streptococcal M protein in psoriatic patients. *Int J Dermatol*, 2006. 45(5): p. 547-53. 30
29. Pahlman, L.I., et al., Streptococcal M protein: a multipotent and powerful inducer of inflammation. *J Immunol*, 2006. 177(2): p. 1221-8.
30. Herwald, H., et al., M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell*, 2004. 116(3): p. 367-79.
31. Bisno, A.L., Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *N Engl J Med*, 1991. 325(11): p. 783-93. 40
32. Robinson, J.H. and M.A. Kehoe, Group A streptococcal M proteins: virulence factors and protective antigens. *Immunol Today*, 1992. 13(9): p. 362-7.

【 0 1 8 1 】

【表 3 - 4】

33. Meisal, R., et al., Sequence type and emm type diversity in *Streptococcus pyogenes* isolates causing invasive disease in Norway between 1988 and 2003. *J Clin Microbiol*, 2008. 46(6): p. 2102-5.
34. Wang, B., et al., Localization of an immunologically functional region of the streptococcal superantigen pepsin-extracted fragment of type 5 M protein. *J Immunol*, 1993. 151(3): p. 1419-29.
35. Darenberg, J., et al., Molecular and clinical characteristics of invasive group A streptococcal infection in Sweden. *Clin Infect Dis*, 2007. 45(4): p. 450-8. 10
36. Basma, H., et al., Risk factors in the pathogenesis of invasive group A streptococcal infections: role of protective humoral immunity. *Infect Immun*, 1999. 67(4): p. 1871-7.
37. Holm, S.E., et al., Aspects of pathogenesis of serious group A streptococcal infections in Sweden, 1988-1989. *J Infect Dis*, 1992. 166(1): p. 31-7.
38. Stevens, D.L., Invasive group A streptococcus infections. *Clin Infect Dis*, 1992. 14(1): p. 2-11. 20
39. Darenberg, J., et al., Intravenous immunoglobulin G therapy in streptococcal toxic shock syndrome: a European randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis*, 2003. 37(3): p. 333-40.
40. Kazmi, S.U., et al., Reciprocal, temporal expression of SpeA and SpeB by invasive MIT1 group a streptococcal isolates in vivo. *Infect Immun*, 2001. 69(8): p. 4988-95. 30
41. Kaul, R., et al., Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome--a comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group. *Clin Infect Dis*, 1999. 28(4): p. 800-7.
42. Linner, A., et al., Clinical efficacy of polyspecific intravenous immunoglobulin therapy in patients with streptococcal toxic shock syndrome: a comparative observational study. *Clin Infect Dis*, 2014. 59(6): p. 851-7.
43. Jolles, S., W.A. Sewell, and S.A. Misbah, Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol*, 2005. 142(1): p. 1-11. 40

【 図 1 】

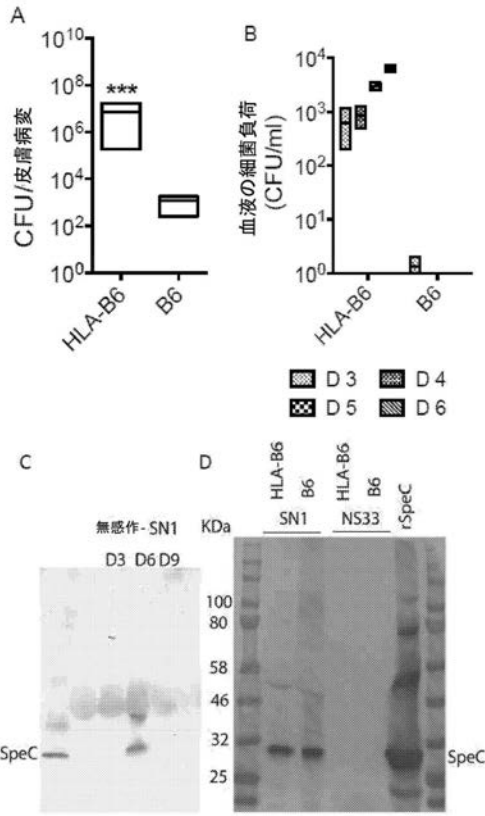


FIG. 1

【 図 2 】

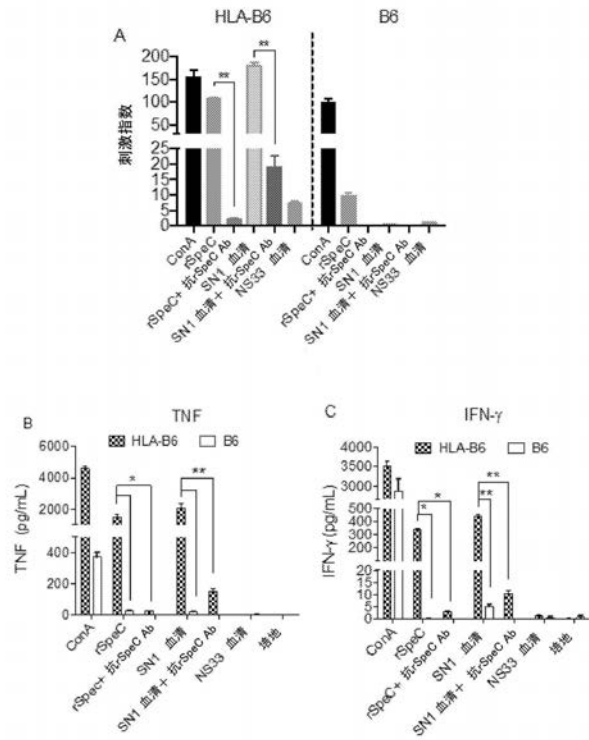


FIG. 2

【 図 3 】

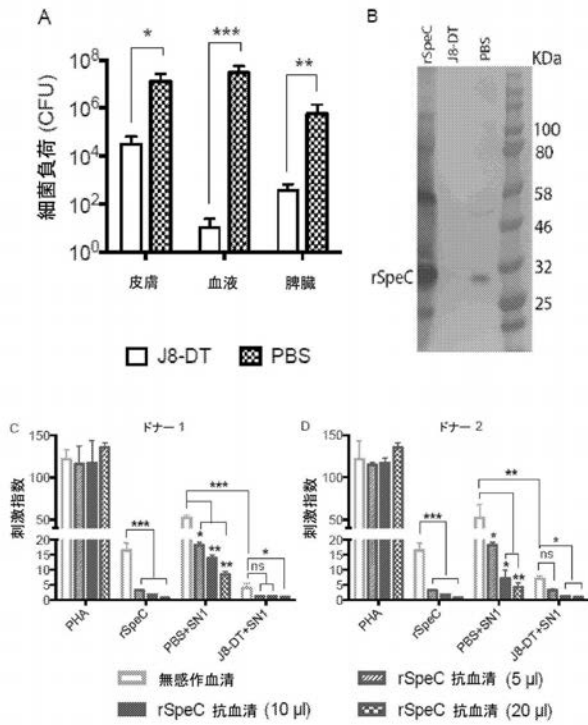


FIG. 3

【 図 4 】

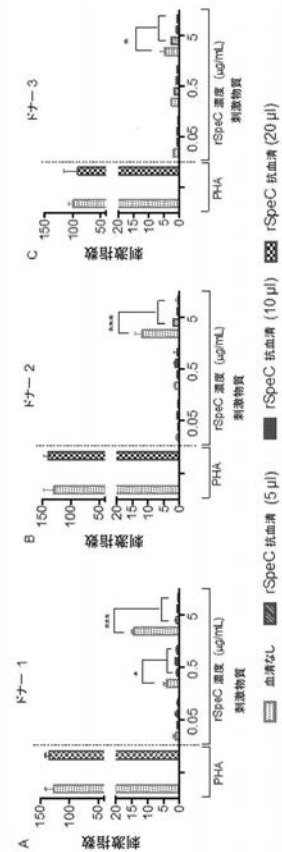


FIG. 4

【 図 5 】

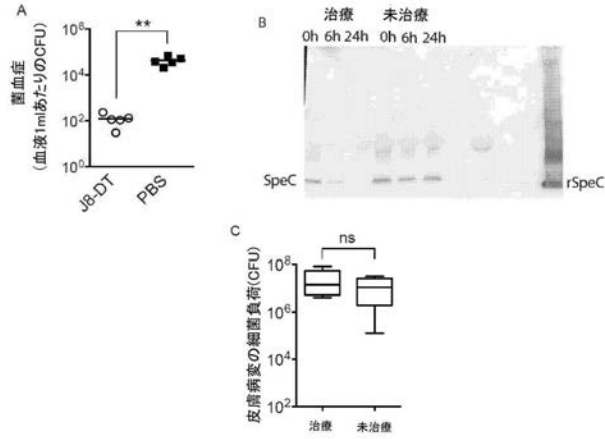


FIG. 5

【 図 6 - 1 】

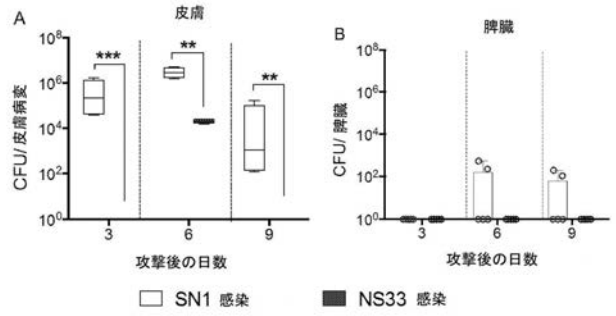


FIG. 6

【 図 6 - 2 】

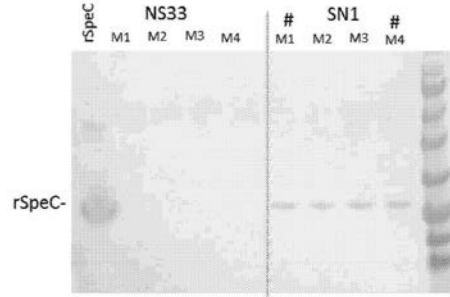


FIG. 6 (つづき)

【 図 7 】

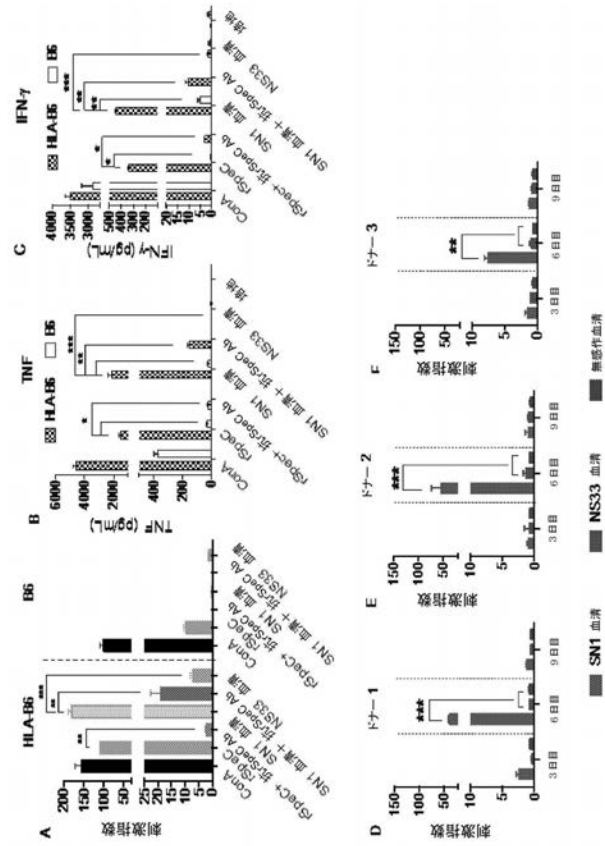


FIG. 7

【 図 8 】

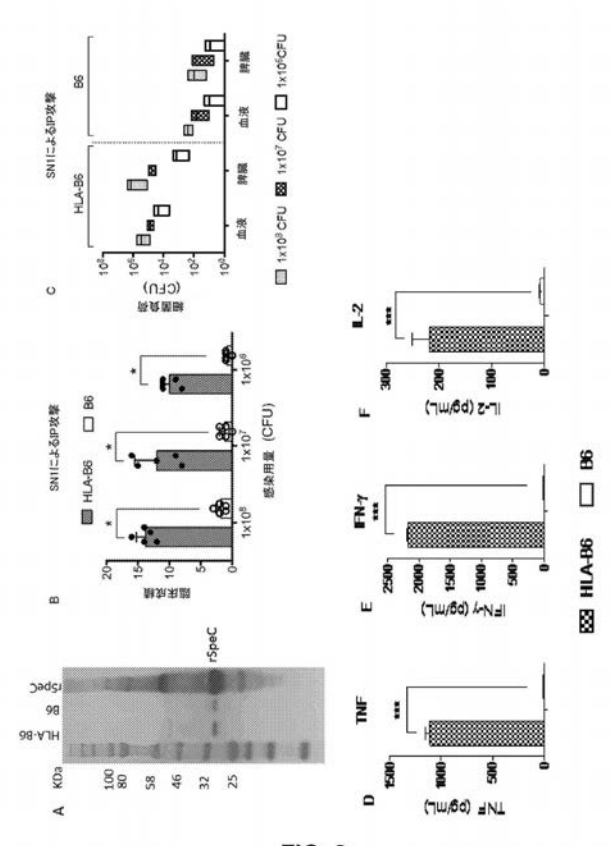
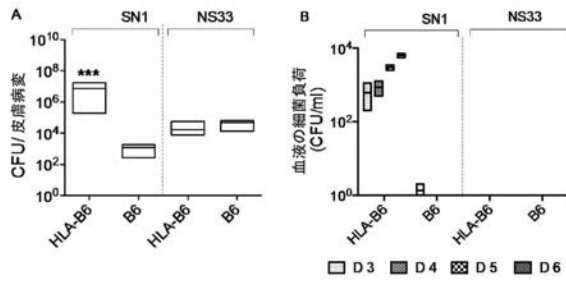


FIG. 8

【 図 9 - 1 】



【 図 9 - 2 】

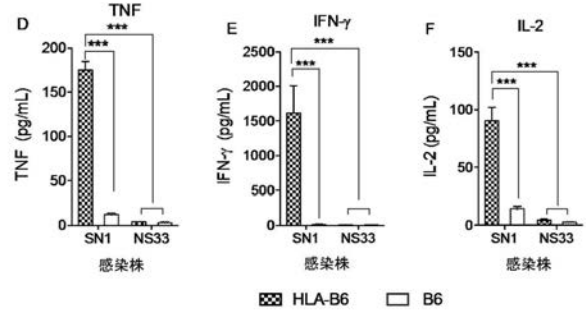


FIG. 9 (つづき)

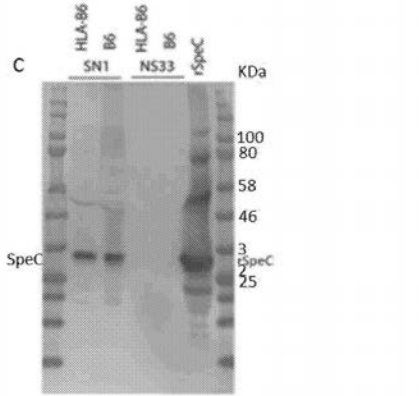


FIG. 9

【 図 10 - 1 】

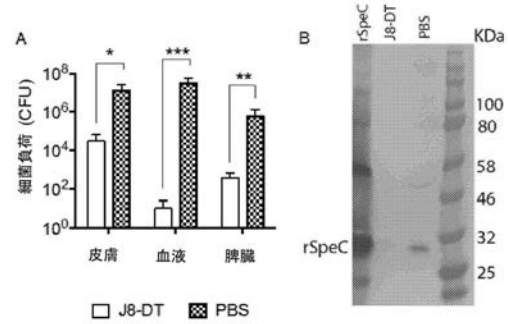


FIG. 10

【 図 10 - 2 】

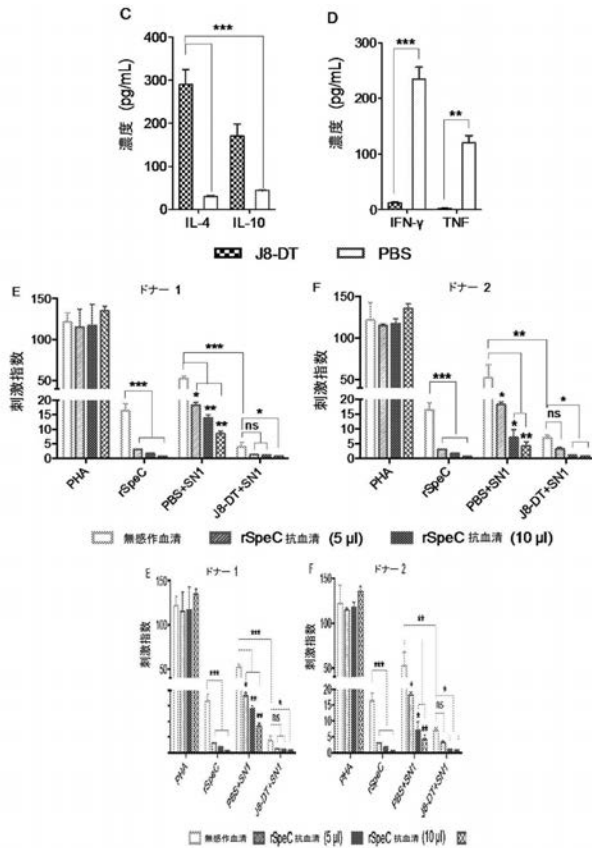


FIG. 10 (つづき)

【 図 11 - 1 】

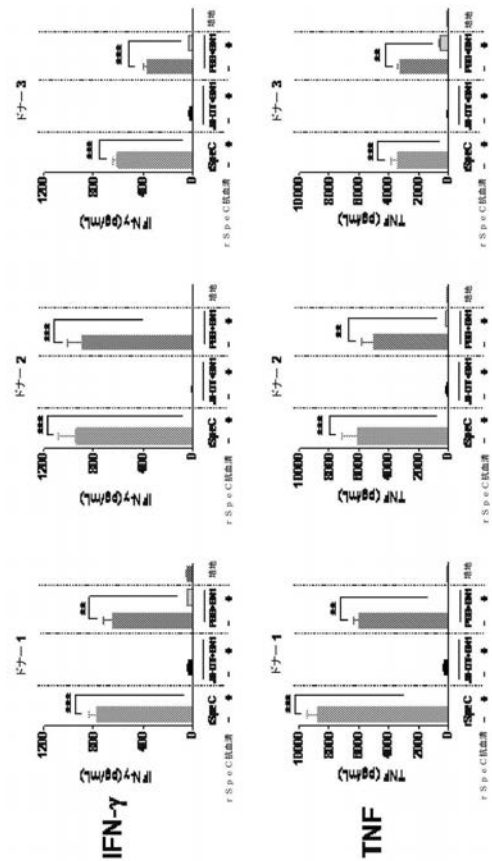


FIG. 11

【 図 1 1 - 2 】

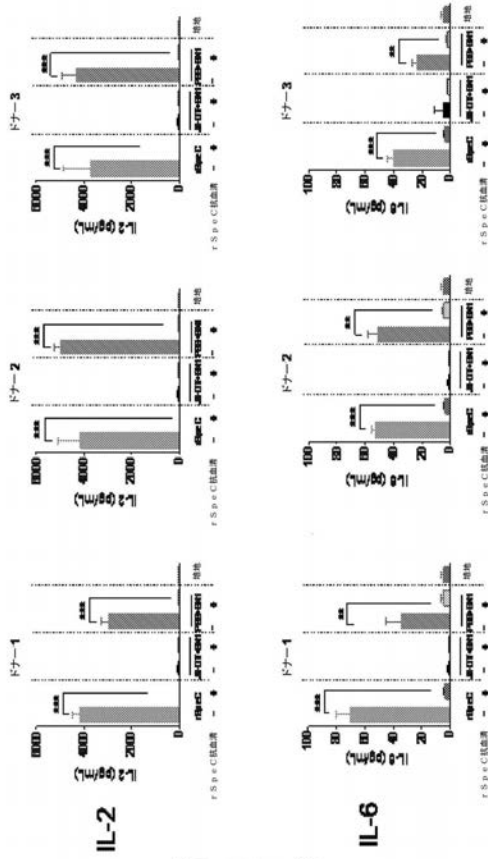


FIG. 11 (つづき)

【 図 1 1 - 3 】

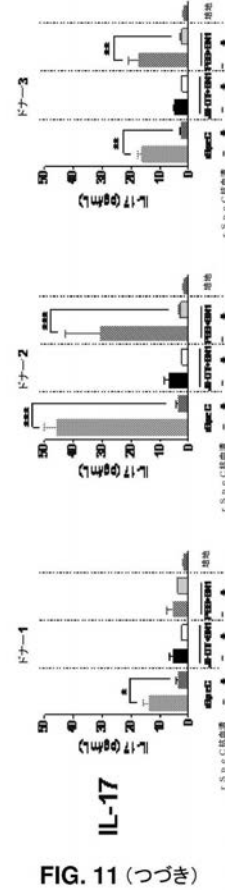


FIG. 11 (つづき)

【 図 1 2 】

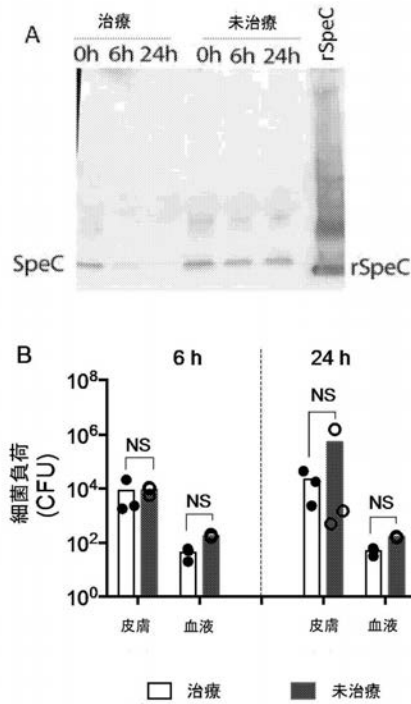


FIG. 12

【 図 1 3 - 1 】

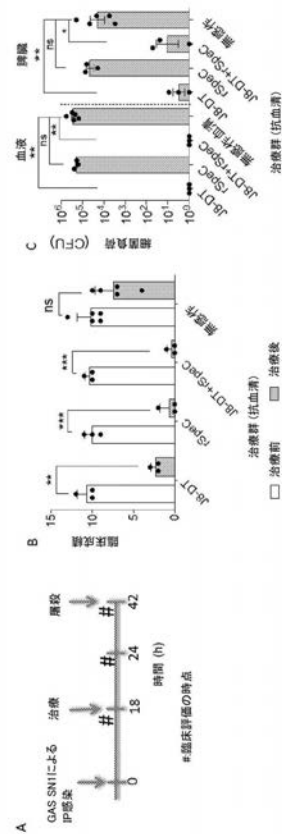


FIG. 13

【 図 13 - 2 】

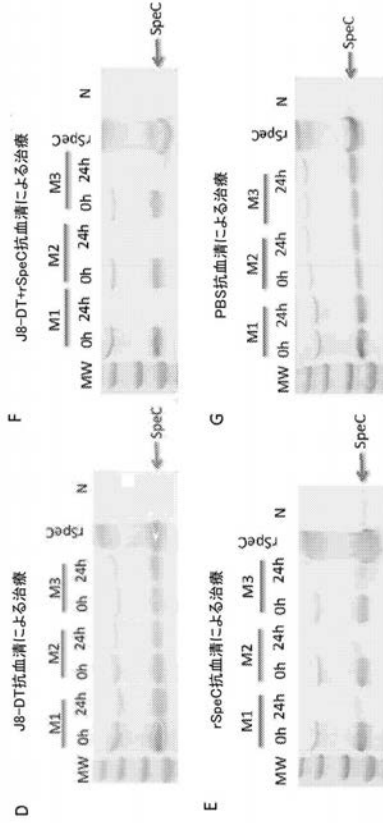


FIG. 13 (つづき)

【 図 14 】

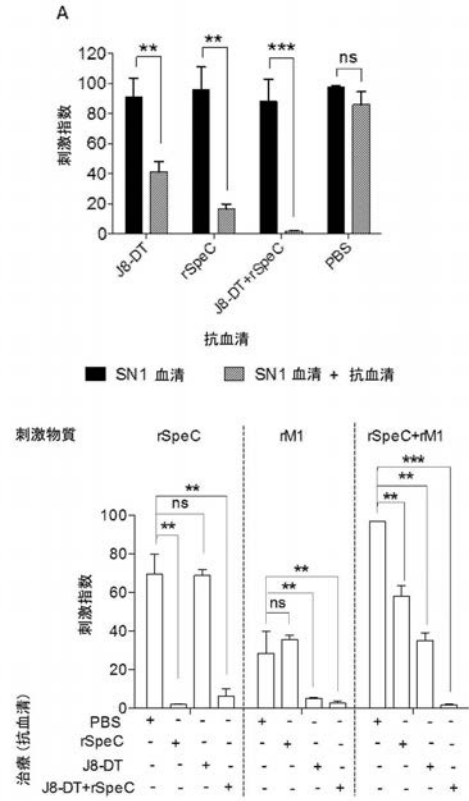


FIG. 14

【 図 15 - 1 】

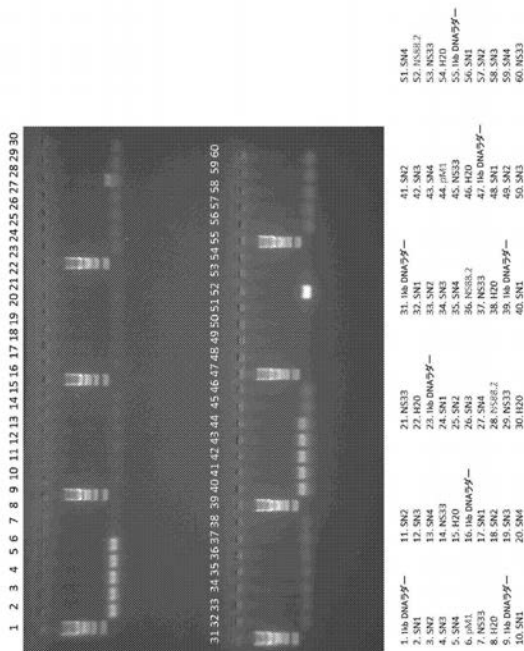


FIG. 15

【 図 15 - 2 】

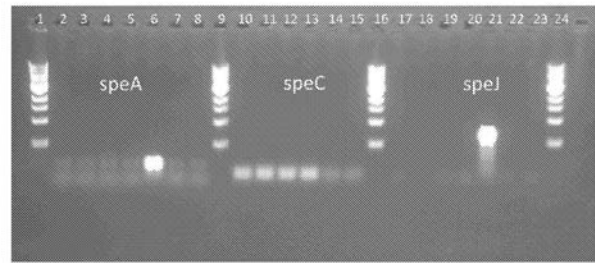


FIG. 15 (つづき)

- 1. 1kb DNALラダー
- 2. SN1
- 3. SN2
- 4. SN3
- 5. SN4
- 6. pM1
- 7. NS33
- 8. H20
- 9. 1kb DNALラダー
- 10. SN1
- 11. SN2
- 12. SN3
- 13. SN4
- 14. NS33
- 15. H20
- 16. 1kb DNALラダー
- 17. SN1
- 18. SN2
- 19. SN3
- 20. SN4
- 21. pM1
- 22. NS33
- 23. H20
- 24. 1kb DNALラダー

【 図 1 6 】

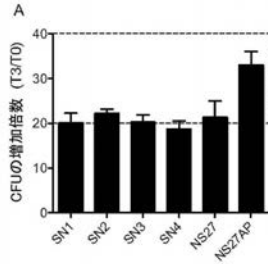


FIG. 16

【 図 1 7 】

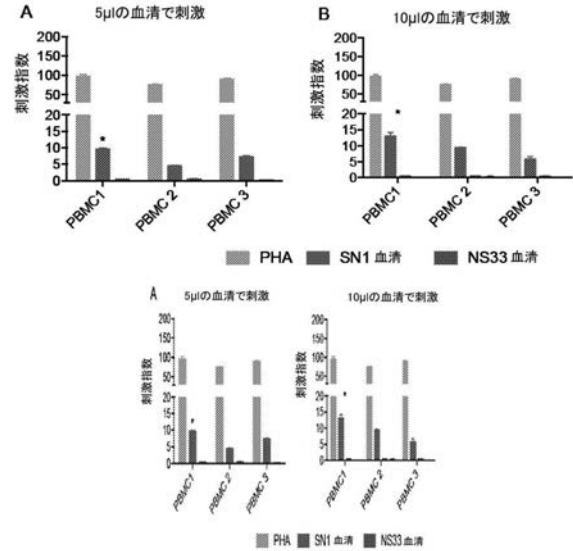


FIG. 17

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和3年1月14日 (2021.1.14)

【 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 】

連鎖球菌毒素性ショック症候群 (STSS) などの侵襲性 A 群連鎖球菌疾患 (iGAS) に対する受動免疫付与、治療、または予防に使用するための、A 群連鎖球菌 M タンパク質断片、またはその多様体、または誘導体に結合するか、それに対して産生された抗体または抗体断片、ここで、前記 M タンパク質断片は、前記 M タンパク質の保存領域であるかそれを含む、及び場合により、A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片。

【 請求項 2 】

哺乳動物に連鎖球菌毒素性ショック症候群などの侵襲性 A 群連鎖球菌疾患 (iGAS) に対する受動免疫を付与する方法であって、前記哺乳動物に A 群連鎖球菌 M タンパク質断片、またはその多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片、ここで、前記 M タンパク質断片は、前記 M タンパク質の保存領域であるかそれを含む、及び場合により、A 群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を投与することによって、前記哺乳動物の iGAS に対する受動免疫を前記哺乳動物に付与する工程を含む、方法。

【 請求項 3 】

哺乳動物の連鎖球菌毒素性ショック症候群などの侵襲性A群連鎖球菌疾患(iGAS)に治療または予防する方法であって、前記哺乳動物にA群連鎖球菌Mタンパク質断片、またはその多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片、ここで、前記Mタンパク質断片は、前記Mタンパク質の保存領域であるかそれを含む、及び場合により、A群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片を投与することによって、前記哺乳動物のiGASを治療または予防する工程を含む、方法。

【請求項4】

A群連鎖球菌Mタンパク質断片、またはその多様体、または誘導体、ここで、前記Mタンパク質断片は、前記Mタンパク質の保存領域であるかそれを含む、及びA群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された抗体または抗体断片とを含む、哺乳動物への投与に適した組成物。

【請求項5】

前記Mタンパク質断片は、p145ペプチドであるか、それを含むか、それに含まれる、前の請求項のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

【請求項6】

前記Mタンパク質断片は、J8ペプチド、その断片、多様体、または誘導体であるか、それを含むか、それに含まれる、請求項5に記載の使用、方法、または組成物。

【請求項7】

前記Mタンパク質断片は、p17ペプチド、その断片、多様体、または誘導体であるか、それを含むか、それに含まれる、請求項5に記載の使用、方法、または組成物。

【請求項8】

前記Mタンパク質断片は、配列番号1~10及び13~29からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、それに含まれる、前の請求項のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

【請求項9】

前記スーパー抗原は、連鎖球菌発熱性外毒素(Spe)AまたはSpeCである、前の請求項のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

【請求項10】

A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された前記抗体または抗体断片；ならびに/あるいはA群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された前記抗体または抗体断片は、モノクローナル抗体または抗体断片である、前の請求項のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

【請求項11】

A群連鎖球菌Mタンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された前記抗体または抗体断片；ならびに/あるいはA群連鎖球菌スーパー抗原タンパク質、その断片、多様体、または誘導体に結合するかそれに対して産生された前記抗体または抗体断片は、ヒト化モノクローナル抗体または抗体断片である、前の請求項のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

【請求項12】

前記哺乳動物はヒトである、前の請求項のいずれかに記載の使用、方法、または組成物。

【請求項13】

前記iGASは連鎖球菌毒素性ショック症候群(STSS)である、前の請求項のいずれかに記載の使用または方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2019/050469
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/09 (2006.01) A61K 39/40 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01) C07K 14/315 (2006.01)		
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)		
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)		
PATENW (M-PROTEIN, J8, P17, J8-DT, P145, J1, SUPERANTIGEN, SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-H, SPE-I, SPE-JSPE-K, SPE-L, IPC/CPC A61K39/092, IPC/CPC A61K39/40, IPC/CPC C07K16/1275, IPC/CPC C07K14/315) MEDLINE, HCA, BIOSIS, EMBASE (Streptococcus, vaccine, immunity, antibody, M-PROTEIN, J8, P17, J8-DT, P145, J1, SUPERANTIGEN, SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-H, SPE-I, SPE-JSPE-K, SPE-L, M GOOD, M PANDEY) Internal IP Australia databases (M GOOD, M PANDEY)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 5 August 2019		Date of mailing of the international search report 05 August 2019
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au		Authorised officer Neal Dalton AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262850740

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation).		PCT/AU2019/050469
Category*	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/094851 A2 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, TECHNOLOGY TRANSFER OFFICE) 28 November 2002 see Title, Abstract, page 25 line 20 to page 26 line 10.	1-3, 5, 7, 9-10, 15-18, 20-25
X	US 2009/0010929 A1 (Good et al.) 08 January 2009 see abstract, 0046, 0128-0149, 0227, examples 10, 13-14, figure 1	1-3, 5, 7, 9-13, 15-18, 20-25
X	Pandey, M. et al. "Mechanism of protection induced by group A Streptococcus vaccine candidate J8-DT: contribution of B and T-cells towards protection" 2009. PLoS One. Vol. 4, No. 4, page e5147 see whole document	1-3, 5, 7, 9-13
X	Reglinski, M. et al. "Identification of the Streptococcus pyogenes surface antigens recognised by pooled human immunoglobulin". Sci Rep. 2015 Oct. Vol. 5, page 15825. see abstract, Table 1	1-14, 17, 19
X	Darenberg, J. et al. "Differences in potency of intravenous polyspecific immunoglobulin G against streptococcal and staphylococcal superantigens: implications for therapy of toxic shock syndrome." Clin Infect Dis. 2004 Vol. 38, No. 6, pages 836-842 see abstract, Table 1	1-14, 17, 19
X	WO 1998/24911 A1 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 11 June 1998 see abstract, page 5 lines 4-21, claims 1-18	1-2, 9, 14, 17, 19
X	US 2005/0010034 A1 (Schlievert et al.) 31 January 2005 see abstract, 0019-0020, claims 1-16	1-2, 9, 14, 17, 19
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2019/050469	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2002/094851 A2	28 November 2002	WO 02094851 A2	28 Nov 2002
		AU 2008203277 A1	14 Aug 2008
		AU 2008203277 B2	07 Jul 2011
		CA 2447599 A1	28 Nov 2002
		CA 2881980 A1	28 Nov 2002
		EP 1389240 A2	18 Feb 2004
		EP 1389240 B1	18 Nov 2009
		EP 1399181 A2	24 Mar 2004
		EP 1399181 B1	09 May 2012
		US 2002177147 A1	28 Nov 2002
		US 6790621 B2	14 Sep 2004
		US 2004265896 A1	30 Dec 2004
		US 7393643 B2	01 Jul 2008
		US 2005220808 A1	06 Oct 2005
		US 7407664 B2	05 Aug 2008
		US 2008206144 A1	28 Aug 2008
		US 7776588 B2	17 Aug 2010
		US 2008279880 A1	13 Nov 2008
		US 7883710 B2	08 Feb 2011
		US 2012177685 A1	12 Jul 2012
		US 8420107 B2	16 Apr 2013
		US 2013202635 A1	08 Aug 2013
		US 8637050 B2	28 Jan 2014
		US 2011110969 A1	12 May 2011
		WO 02057499 A2	25 Jul 2002
US 2009/0010929 A1	08 January 2009	US 2009010929 A1	08 Jan 2009
		US 2011064745 A1	17 Mar 2011
WO 1998/24911 A1	11 June 1998	None	
US 2005/0010034 A1	31 January 2005	US 2005010034 A1	13 Jan 2005
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2019/050469	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		AU 7625698 A	29 Jun 1998
		AU 734597 B2	21 Jun 2001
		BR 9713679 A	17 Jul 2001
		CA 2273824 A1	11 Jun 1998
		CN 1240001 A	29 Dec 1999
		EP 0946730 A2	06 Oct 1999
		EP 0946730 B1	08 Mar 2006
		HK 1024265 A1	12 Nov 2004
		JP 2002513278 A	08 May 2002
		KR 20000069337 A	25 Nov 2000
		KR 100615836 B1	25 Aug 2006
		US 2002018781 A1	14 Feb 2002
		US 6774218 B2	10 Aug 2004
		US 2002039585 A1	04 Apr 2002
		US 6835818 B2	28 Dec 2004
		US 2005010033 A1	13 Jan 2005
		WO 9824910 A2	11 Jun 1998
End of Annex			
<p>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)</p>			

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
	A 6 1 K 48/00	

(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, 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, NE, 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, IR, IS, JO, 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, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック
2. テフロン

(74) 代理人 100196977

弁理士 上原 路子

(72) 発明者 マイケル グッド

オーストラリア国, クイーンズランド 4 1 1 1, ネイサン, ケッセルズ ロード 1 7 0

(72) 発明者 マニシャ パンディー

オーストラリア国, クイーンズランド 4 1 1 1, ネイサン, ケッセルズ ロード 1 7 0

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA18 BA19 CA04 NA14 ZB35

4C085 AA03 AA13 AA14 BA11 CC07 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB35

4C087 AA01 AA02 BB65 CA12 CA20 NA14 ZB35

4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA20 FA71