

日本医療研究開発機構 ワクチン・新規モダリティ研究開発事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 糖ペプチドワクチン: 逃避変化しない糖鎖修飾領域を標的とする革新的なワクチンモダリティに関する研究開発

(英語) Glycopeptide vaccine: Study of an innovative vaccine modality targeting invariant glycosylation sites

研究開発実施期間: 令和5年11月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 西村 紳一郎

(英語) Shin-Ichiro Nishimura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

(英語) Hokkaido University, Faculty of Advanced Life Science, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の目的: 我々は、未知の標的タンパク質内に存在する特定の「糖ペプチド領域」を特異的に認識する抗体の効率的な産生を可能とする革新的で画期的な「抗原提示法」を開発した。この新技術により、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質 (SP) のレセプター結合ドメイン (RBD) の糖鎖修飾部位 (Asn343) を含む周辺領域を「糖ペプチドエピトープ」として特異的に認識・結合する複数のモノクローナル抗体 (IgG) の取得に成功した (PCT/JP2024/17786 ; 論文投稿準備中)。

ウイルス表面にある糖タンパク質の遺伝子に生じる変異は、ウイルス膜タンパク質を標的とするワクチンの開発を困難にしている。そこで、我々はこの課題解決のため、ウイルス膜タンパク質の立体構造の安定化に関わり、かつ変異 (逃避変化) しにくいとされる糖ペプチド領域を標的とする革新的なワクチンモダリティの有効性と汎用性を実証することを第一の目的とした。本研究開発課題においては、SARS-CoV-2 の感染予防を目標とする新たな糖ペプチドワクチン候補を設計・合成 (製造) し、マウス等の実験系での中和抗体産生能や感染阻止効果を最大化するアジュバント・キャリアの最適化を検討する。また、非臨床薬効試験支援ユニットとアジュバント・キャリア技術支援ユニットとの連携により、非臨床 POC の研究開発期間内での早期取得をマイルストーンとした。具体的には、新たに設計・合成した糖ペプチドワクチンをマウス等に免疫することにより、誘導される抗体の産生能および中和能を評価するとともに、動物の攻撃試験での有効性の確認までを初期マイルストーンの達成目標 (非臨床 POC の取得) とした。

研究開発の成果及びその意義: 「糖ペプチドワクチンの標的候補として有望な糖鎖修飾ペプチド領域の特定」 (令

和 5 年 11 月～令和 6 年 8 月) : SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質には Asn343 残基のように糖鎖修飾によってスパイクタンパク質の機能構造の形成に深く関与する領域やスパイクタンパク質のフォールディングや安定性において重要な役割を果たす糖鎖修飾部位などが存在すると考えられる。実際に、このような糖鎖修飾部位の近傍で保存性を有する領域が、Asn343 残基の他に複数所存在することが確認された。既に当グループでの研究開発が先行している Asn343 残基を含む標的候補に加えて、これらの最新情報をもとに SARS-CoV-2 / スパイクタンパク質の糖ペプチドワクチンの標的候補として有望な糖鎖修飾ペプチド領域を探索・構造解析を進めた。HEK293T 細胞で発現したリコンビナントスパイクタンパク質のトップダウングライコペプチドミクスによって、最終的に SARS-CoV-2 / スパイクタンパク質の RBD 内にいずれも含まれる①Asn331、②Asn343、および③Thr323 と Ser325 を含む 3 つの糖鎖修飾ペプチド領域を本プロジェクトで開発する糖ペプチドワクチン (multi-epitope display 型ワクチン) に搭載する最終標的候補ペプチド領域に決定した (令和 6 年 8 月、この新しい構造解析の方法論は、がんの進行度決定マーカー探索に応用して糖鎖修飾部位の同定と糖鎖構造を決定・定量する汎用的な新手法であることが証明されており、令和 7 年 3 月 25 日に公表した ; Site-specific O-glycosylation in oncofetal fibronectin IIICS domain creates cancer stage-specific biomarkers. *J. Am. Chem. Soc.* **2025**, doi.org/10.1021/jacs.Sc00333)。

「糖ペプチドワクチンのデザインと合成技術の確立」(令和 5 年 11 月～令和 6 年 11 月) : 構造が確定したこれら 3 つの最終標的候補ペプチド領域 (3 種類の糖ペプチドエピトープ) について糖鎖修飾部位と周辺領域の効率的な合成プロセスを最適化することで自動化が可能な合成技術を確認した。具体的には、構造が複雑な糖鎖修飾ペプチド化合物の合成法は研究代表者らがこれまでに確立した固相マイクロ波合成法と水溶液中での糖転移酵素反応を併用するグリーンケミストリーを基本とする高速・高効率な合成技術を基本とすることで大量合成プロセスへの展開も可能な方法論の構築が実現した。またこれら 3 種類の糖ペプチドエピトープと種々のキャリア分子との簡単で汎用性のある複合法も新たに確立してそれぞれのワクチン候補化合物についての実験室レベル (小規模) での合成プロセスの最適化を完了した (2024 年 8 月)。

「糖ペプチドワクチンの中和抗体産生能などの評価」(令和 6 年 9 月～令和 7 年 3 月) : 変異 (逃避変化) しない糖ペプチド領域を標的とするワクチンモダリティの有効性、および種々の変異株に対する防御機能 (ユニバーサリティ) を検証して早期の非臨床 POC 取得を目指した。具体的なマイルストーンとそのクライテリア (目標値) として、①マウスを用いたオミクロン株に対する中和抗体価試験で比較対象とするコントロールワクチンに匹敵する活性が得られること、および②チャレンジ試験、非齧歯類を用いた試験に関しては適宜達成基準を設定することとした。また、本研究項目の進め方などの詳細については、SCARDA および非臨床薬効試験支援ユニット (石井班高橋グループ) との相談・議論によって適宜決定した。その結果、①マウスへの免疫により、血中の抗体価の大幅な上昇が見られる糖ペプチドワクチンが存在すること (令和 6 年 12 月) と②マウス抗体により有意な中和活性およびスパイクタンパク質 3 量体との結合能を確認できたものの (令和 7 年 1 月)、③モデルナ社製およびファイザー社製 mRNA ワクチンを比較対象とした感染防御効果の評価結果から糖ペプチドワクチンについてはいずれも感染 5～6 日目をピークとして PBS 群と同程度の体重減少がみられ、有意な感染防御能は確認できなかった (令和 7 年 3 月)。最近になり、これまで有力な中和抗体薬として広く治療に使われてきた GSK 社の Sotrovimab (Asn343 の糖鎖修飾領域を認識して結合する抗体として有名) および広範な中和抗体として知られる SA55 の両方が Lys440 と Leu441 を含む共通のエピトープを含めた領域を認識していること (H. Yang, et al., Structural basis for the evolution and antibody evasion of SARS-CoV-2 BA.2.86 and JN.1 subvariant. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 7715)、さらにオミクロン株の JN.1 と KP.1 では Thr356 の変異により新たに Asn354 での糖鎖修飾が出現していることが報告されている (J. Jiang, et al., SARS-CoV-2 antibodies recognize 23 distinct epitope sites on the receptor binding domain. *Commun. Biol.* **2023**, *6*, 953)。本研究開発において標的とした糖ペプチドワクチン候補

化合物には上記の重要なエピトープが含まれていなかったことが明らかになり、これらの新たなエピトープ領域を含めた新たな糖ペプチドワクチンの設計と合成が必要であることが明らかとなった。

I Basic information

Project title: Glycopeptide vaccine: Study of an innovative vaccine modality targeting invariant glycosylation sites

November 1, 2023～March 31, 2025

Principal investigator: Shin-Ichiro Nishimura

Affiliation, position: Hokkaido University, Faculty of Advanced Life Science, Professor

II Abstract

A major challenge to developing effective vaccine is the extensive genetic diversity in the targeted protein antigens. Our interest was focused on the presence of invariant glycosylation sites that have critical roles in protein folding and regulation/maintenance of functional three-dimensional structures, even though genetic diversity plays a major role in immune evasion and is a barrier to the development of vaccine-induced protective immunity. Recently we developed a novel method for the creation of antibodies recognizing glycopeptidic epitopes based on the specific antigen presentation mechanism without lysosomal degradation of the target glycopeptides as antigens. Our findings facilitated generation of monoclonal antibody SN-343 to SARS-CoV-2 spike protein, in which SN-343 binds tightly ($K_d = 1 \sim 10$ nM) to the spike protein of Omicron sub-variants such as BA.2.75 and XBB by interacting specifically with glycosylated peptide region involving Asn343 residue. The purpose of this study is to establish an innovative vaccine modality targeting invariant glycosylation sites distributed in the disease-relevant glycoproteins, namely glycopeptide vaccines.

In the present study, we challenged the development of novel glycopeptide vaccines for SARS-CoV-2 by targeting 3 potential peptide regions with an invariant glycosylation site at Asn331, Asn343, Thr323 and Ser325 identified in the spike protein of SARS-CoV-2. We established highly efficient processes for the chemical synthesis of complex glycopeptide epitopes in assistance with enzymatic modification and subsequent conjugation with carriers, resulting in the targeted vaccine candidates. Glycopeptide vaccines did not show significant *in vivo* anti-infectious activity of omicron variant viruses, while some of the present glycopeptide vaccines found to generate potential neutralizing antibodies in sera that interact with recombinant spike proteins. The present study demonstrated that we need much deeper insights into the structural basis and mechanism in the interaction of various antibodies with peptide epitope regions including glycosylation sites and their functional roles in the SARS-CoV-2 infection process.