

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4644488号
(P4644488)

(45) 発行日 平成23年3月2日(2011.3.2)

(24) 登録日 平成22年12月10日(2010.12.10)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 39/385 (2006.01) A 6 1 K 39/385 Z N A
A 6 1 K 39/00 (2006.01) A 6 1 K 39/00 G
A 6 1 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28

請求項の数 33 (全 79 頁)

(21) 出願番号	特願2004-528447 (P2004-528447)	(73) 特許権者	501087515
(86) (22) 出願日	平成15年7月18日 (2003.7.18)		サイトス・バイオテクノロジー・アクチェンゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2005-539025 (P2005-539025A)		CYTOS BIOTECHNOLOGY AG
(43) 公表日	平成17年12月22日 (2005.12.22)		スイス、ツューハー-8952シュリーレン、ヴァギシュトラ-セ25番
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/007864	(73) 特許権者	505022116
(87) 国際公開番号	W02004/016282		ノバルティス・ファルマ・アクチェンゲゼルシャフト
(87) 国際公開日	平成16年2月26日 (2004.2.26)		Novartis Pharma AG
審査請求日	平成18年7月14日 (2006.7.14)		スイス国、4056 バーゼル、リヒトシュトラ-セ35
(31) 優先権主張番号	60/396, 639	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成14年7月19日 (2002.7.19)		弁理士 青山 稜
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/470, 432		
(32) 優先日	平成15年5月15日 (2003.5.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドベータ1-6抗原アレイを含むワクチン組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 少なくとも1個の第一付着部位を有するコア粒子であって、バクテリオファージQ またはバクテリオファージAP205の組換えタンパク質またはそのフラグメントを含むウイルス様粒子であるコア粒子、および

(b) 少なくとも1個の第二付着部位を有する少なくとも1個の抗原または抗原決定基を含むワクチン組成物であって、

抗原または抗原決定基がA 1-6ペプチドであり、そして第二付着部位が、

(i) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもたない付着部位、および

(ii) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもつ付着部位

から成る群から選択されるものであり、

第二付着部位が第一付着部位と会合し得、そしてA 1-6ペプチドおよびコア粒子がその会合を通して相互作用することにより、規則正しい反復性抗原アレイを形成する組成物。

【請求項2】

バクテリオファージが、RNAバクテリオファージQ である、請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項3】

バクテリオファージが、RNAバクテリオファージAP205である、請求項1記載の

ワクチン組成物。

【請求項 4】

組換えタンパク質が、バクテリオファージ Q またはバクテリオファージ A P 2 0 5 のコートタンパク質を含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成される、請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 5】

コートタンパク質が、

- (a) 配列番号 4、
- (b) 配列番号 4 および配列番号 5 の混合物、および
- (c) 配列番号 2 8

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 4 記載の組成物。

10

【請求項 6】

組換えタンパク質が、バクテリオファージ Q またはバクテリオファージ A P 2 0 5 の突然変異コートタンパク質を含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成される、請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 7】

第二付着部位が第一付着部位と少なくとも 1 個の共有結合を介して会合し得る、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

第二付着部位が第一付着部位と少なくとも 1 個の非ペプチド結合を介して会合し得る、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載のワクチン組成物。

20

【請求項 9】

A 1 - 6 ペプチドがコア粒子と融合している、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のワクチン組成物。

【請求項 10】

A 1 - 6 ペプチドが、

- (a) 配列番号 7 5 のアミノ酸配列を有するヒト A 1 - 6 ペプチド、
- (b) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を有するマウス A 1 - 6 ペプチド、
- (c) 配列番号 8 4 のアミノ酸配列を有する霊長類 A 1 - 6 ペプチド、
- (d) 配列番号 8 5 のアミノ酸配列を有するウサギ A 1 - 6 ペプチド、
- (e) 配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有するアフリカツメガエル A 1 - 6 ペプチド、
- (f) 配列番号 8 7 のアミノ酸配列を有するラット A 1 - 6 ペプチド、および
- (g) 配列番号 8 8 のアミノ酸配列を有するモルモット A 1 - 6 ペプチド

からなる群から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載のワクチン組成物。

30

【請求項 11】

A 1 - 6 ペプチドが配列番号 7 5 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載のワクチン組成物。

【請求項 12】

さらにアミノ酸リンカーを含み、そのアミノ酸リンカーが第二付着部位を含むか、またはそれにより構成される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項記載のワクチン組成物。

40

【請求項 13】

第二付着部位または第二付着部位を有するアミノ酸リンカーが、その C - 末端で A 1 - 6 ペプチドに結合している、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項記載のワクチン組成物。

【請求項 14】

第二付着部位または第二付着部位を有するアミノ酸リンカーが、

- (a) G G C、
- (b) G G C - C O N H 2、
- (c) G C、
- (d) G C - C O N H 2、
- (e) C、および

50

(f) C - C O N H 2

からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項記載のワクチン組成物。

【請求項 1 5】

少なくとも 1 個の第二付着部位を有する A 1 - 6 ペプチドが、NH 2 - D A E F R H G G C - C O N H 2 (配列番号 7 7) である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項記載のワクチン組成物。

【請求項 1 6】

ウイルス様粒子が、RNA バクテリオファージ Q コートタンパク質のウイルス様粒子である、請求項 1 5 記載のワクチン組成物。

【請求項 1 7】

(a) 請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項記載のワクチン組成物、および
(b) 許容される医薬用担体
を含むワクチン用医薬組成物。

【請求項 1 8】

さらにアジュバントを含む、請求項 1 7 記載のワクチン用医薬組成物。

【請求項 1 9】

ワクチン用医薬組成物がアジュバントを欠く、請求項 1 7 記載のワクチン用医薬組成物。

【請求項 2 0】

(a) 少なくとも 1 個の第一付着部位を有するコア粒子であって、バクテリオファージ Q またはバクテリオファージ A P 2 0 5 の組換えタンパク質またはそのフラグメントを含むウイルス様粒子であるコア粒子を提供し、

(b) 少なくとも 1 個の第二付着部位を有する少なくとも 1 個の抗原または抗原決定基を提供し、

ただし、該抗原または抗原決定基は A 1 - 6 ペプチドであり、そして第二付着部位が、

(i) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもたない付着部位、および

(ii) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもつ付着部位

からなる群から選択されるものであり、そして

第二付着部位が第一付着部位と会合し得、そして

(c) コア粒子および少なくとも 1 個の抗原または抗原決定基を合わせ、抗原または抗原決定基およびコア粒子がその会合を通して相互作用することにより、規則正しい反復性抗原アレイを形成する

ことを含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項記載の組成物の製造方法。

【請求項 2 1】

医薬として使用される、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項記載の組成物を必須成分として含む、アルツハイマーおよび関連疾患処置用医薬。

【請求項 2 3】

ウイルス様粒子が、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する組換え RNA バクテリオファージ Q コートタンパク質を含み、第二付着部位が、第一付着部位と少なくとも 1 個の非ペプチド結合を介して結合可能であり、そして該 A 1 - 6 ペプチドが配列番号 7 5 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 記載のワクチン組成物であって、

さらにアミノ酸リンカーを含み、該アミノ酸リンカーが、

(a) 少なくとも 1 個の第二付着部位がリンカーを含み、少なくとも 1 個の第二付着部位を有する A 1 - 6 ペプチドが、配列 D A E F R H G G C を有する、G G C ; または、

(b) 少なくとも 1 個の第二付着部位がリンカーを含み、少なくとも 1 個の第二付着部位を有する A 1 - 6 ペプチドが、配列 NH 2 - D A E F R H G G C - C O N H 2 を有する、

G G C - C O N H 2

10

20

30

40

50

から選択される1個を含む、ワクチン組成物。

【請求項24】

さらに、第一付着部位と反応し得る官能基および第二付着部位と反応し得る官能基を含むヘテロ-二官能架橋剤を含む、請求項1または23記載のワクチン組成物。

【請求項25】

第一付着部位と反応し得る官能基が、ウイルス様粒子または少なくとも1個のウイルス様粒子サブユニットのリシン残基の側鎖アミノ基と反応し得る官能基である、請求項24記載のワクチン組成物。

【請求項26】

第二付着部位と反応し得る官能基が、A 1-6ペプチドに融合したシステイン残基と反応し得る官能基である、請求項24記載のワクチン組成物。

10

【請求項27】

ヘテロ-二官能架橋剤が、SMPH、スルホ-MBS、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-SIAB、スルホ-SMPB、スルホ-SMCC、SVSB、SIA、およびアミノ基に向かって反応性を示す一官能基およびシステイン残基に向かって反応性を示す一官能基を有する他の架橋剤から選択される、請求項24記載のワクチン組成物。

【請求項28】

ヘテロ-二官能架橋剤が、SPDPまたはスルホ-LC-SPDPである、請求項24記載のワクチン組成物。

【請求項29】

さらにアジュバントを含む、請求項23記載のワクチン組成物。

20

【請求項30】

請求項23~29のいずれか一項記載のワクチン組成物および薬学的に許容される担体を含む、ワクチン用医薬組成物。

【請求項31】

さらにアジュバントを含む、請求項30記載のワクチン用医薬組成物。

【請求項32】

請求項23~29のいずれか一項記載のワクチン組成物または請求項30もしくは31記載のワクチン用医薬組成物を必須成分として含む、動物またはヒトの免疫化のための医薬。

30

【請求項33】

請求項23~29のいずれか一項記載のワクチン組成物または請求項30もしくは31記載のワクチン用医薬組成物を必須成分として含む、アルツハイマーおよび関連疾患処置用医薬。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

発明の分野

本発明は、分子生物学、ウイルス学、免疫学および医学の分野に関するものである。本発明は、規則正しい反復性抗原または抗原決定基アレイを含む組成物、および特にA 1-6ペプチド-VLP組成物を提供する。さらに具体的には、本発明は、ウイルス様粒子およびそこに結合している少なくとも1個のA 1-6ペプチドを含む組成物を提供する。本発明はまた、コンジュゲートおよび規則正しい反復性アレイの各製造方法を提供する。本発明組成物は、アルツハイマー病処置用ワクチンの製造に、そしてアルツハイマー病を予防または治療し、免疫応答、特に抗体応答を効果的に誘導する治療ワクチン(pharmaccine)として有用である。さらに、本発明組成物は、示された状況の中で自己特異的免疫応答を効果的に誘導するのに特に有用である。

40

【0002】

関連技術

50

アルツハイマー病 (AD) は、高齢者 (65歳以上) における痴呆の最も一般的な原因であり、公衆衛生にとって深刻な負担である。たとえば、アメリカ合衆国では400万人の人々がこの病気に罹患していると報告されている。病気の発生は集団の老化とともに増加すると予測される。

【0003】

アルツハイマー病の主たる病理学的徴候は、年齢に関連した行動上の変化、老人斑またはAD斑と呼ばれる不溶性斑への - アミロイド沈着、ニューロン内におけるタウタンパク質により構成される神経原線維錯綜、および前脳全体におよぶニューロンの消失である。高齢 (65歳およびそれ以上) で発生する晩期発症型ADに加えて、35~60歳間で発生する早期発症型AD、家族性AD (FAD) がある。ADの病理学的異常は、晩期発症型または孤発性ADよりもFADの方が広範囲におよび、重症であり、早期に発現する。APP遺伝子、プレセニリン1およびプレセニリン2遺伝子における突然変異はFADと相関関係を示している。

10

【0004】

指摘されている通り、アルツハイマー病 (AD) における重要な事象の一つは、細胞外の老人斑および脳血管壁周囲の沈着をもたらす不溶性線維塊としてのアミロイドの沈着 (アミロイド産生) である (概説についてはSelkoe, D. J. (1999) Nature. 399, A23-31) 参照)。老人斑およびコンゴ好染血管障害の主成分はアミロイド (A_β) であるが、これらの沈着はまた他のタンパク質、たとえばグリコサミノグリカンおよびアポリポタンパク質も含んでいる。A_β は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) として知られる大型糖タンパク質からタンパク質分解的に開裂されるもので、疎水性の一回膜貫通領域を有する695~770アミノ酸のイソ型を含む。A_β は、かなりのアミノ - およびカルボキシ - 末端不均一性 (先端切除) および修飾を示す長さ43アミノ酸以下のペプチドの一群を形成する (Roher, A. E., Palmer, K. C., Chau, V., & Ball, M. J. (1988) J. Cell Biol. 107, 2703-2716. Roher, A. E., Palmer, K. C., Yurewicz, E. C., Ball, M. J., & Greenberg, B. D. (1993) J. Neurochem. 61, 1916-1926)。顕著なイソ形態はA_β 1-40および1-42である。それは、原線維に凝集し、最終的にはアミロイド形成に至るシート形成の高い傾向を有する。

20

【0005】

A_β ペプチドは、アルツハイマー病の神経病理学において中心的な役割を有する。A_β ペプチドの領域特異的な細胞外蓄積は、小膠細胞症、細胞骨格変化、ジストロフィー神経炎、およびシナプス消失を伴う。これらの病理学的改変は、この病気を定義する認知低下に結びつくと考えられる。

30

【0006】

アルツハイマー病の処置を目的とする、いかなるアジュバントも存在せず、担体へのアミロイドベータタンパク質またはA_β 1-28の結合も存在しない場合の10⁻² mg / 用量以下の量でのアミロイドベータタンパク質または特にA_β 1-28の投与については欧州特許第526511号に記載されている。

【0007】

他に、アジュバントと組み合わせたA_β ペプチド投与の使用により、A_β 1-42に対する細胞性または体液性免疫応答を誘導する方法もある。アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデルにおいて、動物は、突然変異APP (717) V-Fを含むヒトアミロイド前駆体タンパク質を過剰発現する (PDAPP-マウス; Johnson-Wood, K. et al., Proc. Natl. Acad. USA 94: 1550-1555, Games, D. et al., Nature 373: 523-527 (1995a)) ことによって、A_β 1-42が過剰産生され、斑、ジストロフィー神経炎、シナプス前部末端の消失、星状細胞増加症および小膠細胞症を発現する。最近の研究において、Schenk, D. et al., (Nature 400:173-77 (1999) および国際公開第99/27944号) は、6週令のPDAPP-マウスに対する、最初の4免疫化における、ヒトでは使用されない強いアジュバント (CFA / IFA) と混合した凝集A_β 1-42の投与、次いで後続免疫化におけるPBS中の凝集A_β 1-42の投与により、斑形成および付随するジス

40

50

トロフィー神経炎が本質的に阻止されたことを報告している。同著者らは、同じ戦略を用いた年長マウス(11ヶ月齢)の免疫化は、アルツハイマー病(AD)様神経病状の程度および進行を著しく低減化させることを報告した。上記戦略を用いて免疫化されたマウスからの脾臓細胞の増殖は、国際公開第99/27944号の実施例III(確立されたADに対する治療効力についてのスクリーン)で報告されており、A₁₋₄₂特異的T細胞がワクチン接種手順により誘導されることが示されていた。ヒツジ抗マウスIgGへのA₁₋₄₂フラグメントのカップリング、およびアジュバントCFA/IFAの存在下におけるカップリングされたフラグメントの免疫化については、国際公開第99/27944号に報告されている。A₁₋₄₂に対する免疫応答促進を目的とするポリペプチド、たとえばジフテリア毒素に結合されたA₁₋₄₂フラグメントを含む組成物の使用はまた、国際公開第99/27944号に開示されている。しかしながら、免疫化のデータは全く提供されていない。

10

【0008】

A₁₋₄₂のN-末端(1-16)内のエピトープを認識するモノクローナル抗体(抗体6C6)は、原線維-アミロイドの神経毒性からPC12細胞を防御し、インビトロで-アミロイドを脱凝集することが示された(Solomon B. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1997))。A₁₋₂₈に対して産生したモノクローナル抗体はまた、インビトロで-アミロイド凝集を抑制することが示された(Solomon B. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1996))。Frenkel et al., (J. Neuroimmunol. 88: 85-90 (1998))は、エピトープ「EFRH」であるものとして、後に2種の抗凝集性抗体、10D5および6C6のエピトープを同定した(すなわちA₃₋₆)。対照的に、A₁₋₇に特異的な抗体は、-アミロイド凝集を阻止できなかった(Frenkel D. et al., J. Neuroimmunol. 95: 136-142 (1999))。

20

【0009】

A₁₋₄₂は原線維を発生するものであり、事実、国際公開第99/27944号に記載されたワクチン組成物は、凝集体を形成し得るように処理されたA₁₋₄₂を使用するものであった。上記原線維は神経細胞培養物に対し毒性を呈すること(Yankner et al., Science 245: 417-420 (1989))、および動物の脳に注射したとき毒性効果が観察されることが示された(Sigurdson et al., Neurobiol. Aging 17: 893-901 (1996); Sigurdson et al., Neurobiol. Aging 18: 591-608 (1997))。Walsh et al., (Nature 416:535-539 (2002))。Walsh et al., (Nature 416:535-539 (2002))は、A₁₋₄₂の天然オリゴマーが細胞内小胞内で形成されることを報告している。上記オリゴマーは、インビボでラットにおける長期相乗作用を阻害し、ヒト脳および脳脊髄液で見出される濃度でシナプス可塑性を破壊した。

30

【0010】

別の試験において、Bard, F. et al. (Nature Medicine 6:916-19 (2000))は、A₁₋₄₂に対して産生した抗体の末梢投与により、相対的に中程度の血清レベルにもかかわらず、アミロイド荷重が低減化され得ることを報告した。この試験では、A₁₋₄₂に対して産生したポリクローナル抗体またはA₁₋₄₂の異なる領域から誘導された合成フラグメントに対して産生したモノクローナル抗体を使用した。すなわち、A₁₋₄₂ペプチドに対する抗体の誘導は、アルツハイマー病についての可能性のある治療的処置として有望な手段である。

40

【0011】

-アミロイド斑に随伴する抗原、たとえば-アミロイドペプチドおよびA₁₋₄₂の粘膜投与については、国際公開第99/27949号に記載されている。粘膜投与は、アルツハイマー病に伴うある種のサイトカイン応答を抑制し、そして病気に結びついた炎症応答の抑制に伴うある種の他のサイトカイン応答を高めると言われている。炎症応答の抑制は、「抗炎症性サイトカインプロファイルを特徴とするT細胞の誘導」によりもたらされると考えられている。国際公開第99/27949号に記載されている適切な抗原には、ADに特異的であり、ヒトまたは動物宿主の免疫T細胞により認識される抗原が含まれる。

50

【 0 0 1 2 】

線維状ファージのコートタンパク質への A₁ を認識するモノクローナル抗体のエピトープの融合については、国際公開第 0 1 / 1 8 1 6 9 号に記載されている。コートタンパク質 VIII において 1 5 量体エピトープ VHEPHEFRHVALNPV (配列番号 8 9) を表す線維状ファージによるマウスの免疫化により、A₁ - 1 6 および A₁ - 4 0 を認識する抗体が産生した。これは A₁ ペプチドを用いる阻害 E L I S A において立証されており、A₁ - 4 0 を伴う A₁ - 1 6 への血清の結合阻害について 1 μ M の I C 5 0 が見出された。しかしながら、Solomon (国際公開第 0 1 / 1 8 1 6 9 号) は、VHEPHEFRHVALNPV エピトープ (配列番号 8 9) をもつ線維状ファージに対して誘導された血清が A D のアミロイド斑または老人斑に結合するという指摘を全くしていない。

10

【 0 0 1 3 】

免疫化について、免疫応答が誘導される抗原とは異なる配列を用いる場合には若干の欠点がある。第一に、抗原または抗原決定基にとって異質である配列の一部に対する抗体が誘導され得る。第二に、外来フランキング配列エレメントの状況における抗原の立体配座は、完全長抗原の状況における場合とは異なり得る。すなわち、抗原と交差反応する抗体は誘導され得るが、抗原へのそれらの結合は最適状態におよび得ない。また、完全長 A₁ に存在する残基とは異なる追加の側鎖がエピトープに存在するため、誘導された抗体の微細な特異性は抗原自体に対して誘導された抗体の特異性と対応し得ない。最後に、1 5 量体アミノ酸配列は、T 細胞エピトープを含み得る。また、各ファージには通常 3 ~ 5 コピーしか存在しない、線維状ファージコートタンパク質 III におけるエピトープ Y Y E F R H (配列番号 9 0) の呈示についても国際公開第 0 1 / 1 8 1 6 9 号に開示されている。免疫用担体として感染性ファージを使用する場合、幾つかの問題が生じる。第一に、大規模で大型免疫化キャンペーンにとって十分な量での感染源の製造は問題がある。第二に、ワクチン中における抗生物質耐性遺伝子を含むファージの D N A の存在はそれほど問題ではなく、安全性の争点である。最後に、非感染性ファージがワクチンとして使用される場合における、ファージの大量照射の実行可能性および効力は未解決である。

20

【 0 0 1 4 】

A₁ が T ヘルパーエピトープを含むように修飾された A₁ 類似体についても報告されている (国際公開第 0 1 / 6 2 2 8 4 号)。A₁ 類似体によるヒト A P P についてのトランスジェニックである T g R N D 8 + マウスの免疫化により、アジュバントの非存在下での A₁ - 4 2 による免疫化全体において 4 ~ 7. 5 倍高い抗体力価が得られた。

30

【 0 0 1 5 】

最近の研究は、ワクチン接種誘導による脳アミロイド沈着の縮小が、認知機能改善の可能性を有することを立証した (Schenk, D., et al. Nature 400: 173-177 (1999); Janus, C. et al., Nature 408: 979-982 (2000); Morgan, D. et al., Nature 408: 982-985 (2000))。

【 0 0 1 6 】

アジュバント Q S 2 1 中の凝集 A₁ - 4 2 により免疫化された患者の剖検は、T リンパ球髄膜脳炎およびマクロファージによる脳白質の浸潤の存在を表した (Nicoll, J.A. et al., Nature Med. 9: 448-452 (2003))。

40

【 0 0 1 7 】

最近の発表で、A N 1 7 9 2、すなわち凝集 A₁ - 4 2 およびアジュバント Q S 2 1 から成るワクチンにより免疫化された患者における髄膜脳炎の 1 8 症例が報告された (Orgogozo J.-M. et al., Neurology 61: 46-54 (2003))。T 細胞活性化は、病気に関与する可能性のある機構として報告されているが、病気と血清中の抗 A₁ - 4 2 力価の間に明白な関連は無かった。

【 0 0 1 8 】

精製タンパク質単独投与では、通常、強い免疫応答を誘導するのに充分ではないことは、十分に確立されている。単離抗原は、一般的にアジュバントと呼ばれる補助物質と一緒に与えられなければならない。これらのアジュバント内で、投与された抗原は、急速な分

50

解に対して防御されており、アジュバントは、低レベルの抗原の放出を長く持続させる。本発明では、A ペプチドは、VLPへの結合を通して免疫原性にされており、アジュバントを必要とはしない。

【0019】

すなわち、ワクチン接種の有効性を改良する一方法は、適用抗原の反復性の割合を増すことである。単離タンパク質とは異なり、ウイルスは、T細胞の助けがある場合も無い場合も共にアジュバントの非存在下において迅速で有効な免疫応答を誘導する (Bachmann and Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol.: 15:235-270 (1997))。ウイルスは僅かのタンパク質により構成されることが多いが、それらは、それらの単離成分よりもかなり強い免疫応答を誘発することができる。B細胞応答については、ウイルスの免疫原性にとっての非常に重大な一因子は表面エピトープの反復性および秩序であることが知られている。多くのウイルスは、B細胞上のエピトープ特異的免疫グロブリンと有効に架橋するエピトープの規則正しいアレイを呈示する準結晶表面を呈する (Bachmann and Zinkernagel, Immunol. Today 17:553-558 (1996))。B細胞における表面免疫グロブリンのこの架橋は、直接細胞周期進行およびIgM抗体の産生を誘導する強い活性化シグナルである。さらに、上記の誘発されたB細胞は、Tヘルパー細胞を活性化することができ、次いでそれは、ワクチン接種の目標である、B細胞におけるIgMからIgG抗体産生へのスイッチおよび長く持続するB細胞記憶の形成を誘導する (Bachmann and Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15:235-270 (1997))。ウイルス構造は、自己免疫疾患における、そして病原体に対する自然応答の一部として抗抗体の産生と結びついている (Fehr, T., et al., J Exp. Med. 185:1785-1792 (1997) 参照)。すなわち、高度に組織されたウイルス表面により提示された抗体は、強い抗抗体応答を誘導することができる。

【0020】

しかしながら、指摘されたように、免疫系は、通常、自己由来の構造に対して抗体を産生し得ない。低濃度で存在する可溶性抗原の場合、これはTh細胞レベルでの寛容性に起因する。これらの条件下では、Tヘルパーを送達し得る担体に自己抗原をカップリングさせると、寛容性は破壊され得る。高濃度で存在する可溶性タンパク質または低濃度での膜タンパク質の場合、BおよびTh細胞は寛容性であり得る。しかしながら、B細胞寛容性は、可逆性(アレルギー)であり得、外来担体に結合されている高度に組織されたやり方での抗原の投与により破壊され得る (Bachmann and Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15:235-270 (1997))。2002年1月18日付けで係属中の米国出願第10/050902号で示されている通り、強い免疫応答は、VLPに結合されたAペプチド(A1-15、A1-27およびA33-42、これはマウスにおける自己抗原である)を含む組成物により誘導され得る。特に、RNAファージQのVLPに結合された上記ヒトAペプチドは、自己抗原Aに対する寛容性が、VLPに結合させたAペプチドによる免疫化により克服され得ることを立証しているヒトAPPトランスジェニックマウスにおいて高いA特異力価を誘導した(実施例に記載)。

【0021】

すなわち、特に、副作用を誘発し得るT細胞エピトープおよびアジュバントをそれぞれ欠く免疫原を用い、依然として高い抗体力価を誘導し得、抗体がさらにアミロイド斑に結合し得る、アルツハイマー病を処置するための高免疫原性の安全な組成物およびワクチンがそれぞれ要望されている。

【0022】

発明の簡単な要約

我々は、固有の反復構成をもつ構造を有するコア粒子に、特にウイルス様粒子(VLP)およびVLPのサブユニットにそれぞれ結合されており、高度に秩序だった反復性コンジュゲートに至るA1-6ペプチドが、A1-6に特異的な抗体を誘導する強力な免疫原となることを見出した。したがって、本発明は、秩序正しい反復性A1-6コア粒子アレイ、および特にVLP-A1-6ペプチドコンジュゲートおよびアレイにそれぞれに基づいた、アルツハイマー病を処置するための予防および治療手段を提供する。この

10

20

30

40

50

予防および治療手段は、可溶性 A と交差反応性であり、ヒト A P P トランスジェニックマウスモデルのヒトアミロイド斑および A D アミロイド斑に結合し得る、抗 A 1 - 6 ペプチド抗体の高い力価を誘導し得る。さらに、誘発された抗体は、脳薄片における A P P には結合しない。

【 0 0 2 3 】

さらに、本発明は、A D 処置の新規組成物、ワクチンおよび方法を提供する。A 1 - 6 ペプチドを含む組成物およびワクチンは、T細胞エピトープを欠いており、A D 斑および可溶性 A と結合する抗体を誘導する。A 1 - 6 ペプチドは、コア粒子、好ましくは V L P、さらに好ましくは R N A フェージの V L P への A ペプチドの結合による高度反復性で秩序だった形で患者の免疫系に呈示される。

10

【 0 0 2 4 】

好ましい実施態様において、抗原または抗原決定基は、A のフラグメント (D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A ; 配列番号 9 1) であるヒトアミロイドベータペプチド A 1 - 6 (D A E F R H ; 配列番号 7 5) であり、ヒトアミロイドベータペプチド A 1 - 6 はコア粒子および V L P にそれぞれ結合されている。アミロイドベータタンパクは、配列番号 9 2 で提供されている。アミロイドベータ前駆体タンパク質は、配列番号 9 3 で提供されている。

【 0 0 2 5 】

すなわち本発明は、(a) 少なくとも 1 個の第一付着部位を有するコア粒子、および (b) 少なくとも 1 個の第二付着部位を有する少なくとも 1 個の抗原または抗原決定基を含む組成物であって、抗原または抗原決定基が A 1 - 6 ペプチドであり、そして第二付着部位が、(i) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもたない付着部位、および (ii) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもつ付着部位から成る群から選択されるものであり、第二付着部位が第一付着部位と会合し得、そして抗原または抗原決定基およびコア粒子がその会合を通して相互作用することにより、規則正しい反復性抗原アレイを形成する組成物を提供する。本発明での使用に適切なコア粒子の好ましい実施態様は、ウイルス、ウイルス様粒子、バクテリオファージ、R N A フェージのウイルス様粒子、細菌線毛または鞭毛または本発明による規則正しい反復性抗原アレイを形成し得る固有の反復構造を有する他のコア粒子である。

20

【 0 0 2 6 】

本発明の A フラグメントは、可溶性であり、一般的には凝集体を形成しない。さらに、それらはコア粒子および V L P にそれぞれ結合、好ましくは共有結合している。したがって、本発明組成物には、傷害作用、たとえばアミロイド沈着の播種を誘導する危険性が無い。

30

【 0 0 2 7 】

この発明の予想外の発見は、可溶性 A および A D アミロイド斑と交差反応性を示す高い力価の抗体が、コア粒子および V L P にそれぞれ結合した A 1 - 6 ペプチドを含む組成物により得られるということである。特に、V L P は、自己抗原に対する抗体の誘導を伝達し、自己寛容性を破壊することが示された (国際公開第 0 2 / 0 5 6 9 0 5 号、これについては出典明示で援用する) 。さらに、このエピトープのサイズが小さいことから、T細胞エピトープの存在が除外されるため、A 特異的 T 細胞応答を誘導しない新規組成物が提供される。さらに、誘発された抗体は、脳薄片における A P P とは結合しない。すなわち、本発明は、A D の予防および処置用の安全なワクチンを提供する。

40

【 0 0 2 8 】

さらに具体的には、本発明は、規則正しい反復性抗原または抗原決定基アレイ、および特に A 1 - 6 ペプチド V L P コンジュゲートを含む組成物を提供する。さらに具体的には、本発明は、ウイルス様粒子およびそれに結合した少なくとも 1 つの A 1 - 6 ペプチドを含む組成物を提供する。本発明はまた、コンジュゲートおよび規則正しい反復性アレイの各製造方法を提供する。本発明組成物は、アルツハイマー病処置用ワクチンおよびアルツハイマー病を予防または治療し、免疫応答、特に抗体応答を効果的に誘導するための

50

治療用ワクチンの製造において有用である。さらに、本発明組成物は、示された状況内で自己特異的免疫応答を効果的に誘導するのに特に有用である。

【0029】

本発明において、A 1 - 6 ペプチドは、典型的には特定方向に指向した形で、コア粒子およびVLPにそれぞれ結合されており、規則正しい反復性A 1 - 6 ペプチド抗原アレイを生成する。さらに、コア粒子およびVLPの各構造は、高度に規則正しい反復性で組織されており、高度に組織された反復性抗原アレイに至る高度に規則正しい反復的な形でA ペプチドの呈示を仲介する。さらに、コア粒子およびVLPは、コア粒子 - A 1 - 6 ペプチドアレイおよびVLP - A 1 - 6 ペプチドアレイにより個々に免疫化された宿主にとっては異質であるため、コア粒子およびVLPへのA 1 - 6 の個々の結合によりTヘルパー細胞エピトープが提供される。上記アレイは、特にそれらの高度に組織化された構造、寸法およびアレイ表面における抗原の反復性の点で先行技術のコンジュゲートとは異なる。

10

【0030】

本発明の一面では、A 1 - 6 ペプチドは化学的に合成され、コア粒子およびVLPはそれぞれコア粒子およびVLPの個々の折りたたみおよび組立に適切な発現宿主から発現および精製される。次いで、A 1 - 6 ペプチドアレイは、A 1 - 6 ペプチドをコア粒子およびVLPにそれぞれ結合させることにより組立てられる。

【0031】

別の局面において、本発明は、(a) ウイルス様粒子、および(b) 少なくとも1個の抗原または抗原決定基を含む組成物を提供し、その場合抗原または抗原決定基はA 1 - 6 ペプチドであり、少なくとも1個の抗原または抗原決定基はウイルス様粒子に結合されている。

20

【0032】

さらなる局面において、本発明は、(a) 本発明組成物、および(b) 許容される医薬用担体を含む医薬組成物を提供する。

【0033】

さらに別の局面において、本発明は、(a) ウイルス様粒子、および(b) 少なくとも1個の抗原または抗原決定基を含む組成物であって、抗原または抗原決定基がA 1 - 6 ペプチドであり、少なくとも1個の抗原または抗原決定基はウイルス様粒子に結合されている組成物を含むワクチン組成物を提供する。

30

【0034】

別の局面において、本発明は、動物に本発明組成物、本発明医薬組成物または本発明ワクチンを投与することを含む免疫化方法を提供する。

【0035】

さらに別の局面において、本発明は、本発明組成物の製造方法であって、(a) ウイルス様粒子を準備し、(b) 少なくとも一抗原または抗原決定基(ただし、抗原または抗原決定基はA 1 - 6 ペプチドである)を準備し、(c) 少なくとも一抗原または抗原決定基がウイルス様粒子に結合するようにウイルス様粒子および少なくとも一抗原または抗原決定基を合わせる工程を含む方法を提供する。

40

【0036】

同様に、本発明は、(a) 少なくとも1個の第一付着部位を有するコア粒子を準備し、(b) 少なくとも1個の第二付着部位を有する少なくとも1個の抗原または抗原決定基を準備し(ただし、抗原または抗原決定基はA 1 - 6 ペプチドであり、第二付着部位が、(i) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもたない付着部位、および(ii) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもつ付着部位から成る群から選択されるものであり、第二付着部位が第一付着部位と会合し得る)、そして(c) コア粒子および少なくとも一抗原または抗原決定基を合わせる(ただし、抗原または抗原決定基およびコア粒子は、その会合を通して相互作用することにより、規則正しい反復性抗原アレイを形成する)工程を含む、請求項1記載の組成物の製造方法を提供する。

50

【 0 0 3 7 】

さらなる局面において、本発明は、アルツハイマー病処置用医薬の製造についての請求項 1 記載の組成物の使用に関するものである。

【 0 0 3 8 】

さらに別の局面において、本発明は、アルツハイマー病の治療または予防処置用医薬の製造についての請求項 1 記載の組成物の使用に関するものである。さらに、さらなる局面において、本発明は、アルツハイマー病を治療または予防し、および/または哺乳類免疫系を刺激するための組成物、医薬組成物、ワクチン、薬剤または医薬の製造を目的とする、単独または他の薬剤と組み合わせた、または特異物質、たとえばアジュバントの明確な非存在下における請求項 1 記載の組成物の使用に関するものである。

10

【 0 0 3 9 】

したがって、本発明は、特に、アルツハイマー病またはそれに関連した状態の予防および/または弱毒化に適切なワクチン組成物を提供する。さらに本発明は、ヒトにおけるアルツハイマー病またはそれに関連した状態の予防および/または弱毒化をそれぞれ目的とする、免疫化およびワクチン接種方法を提供する。本発明組成物は、予防的または治療的に使用され得る。

【 0 0 4 0 】

実施態様において、本発明は、「自己」遺伝子産物、すなわち本明細書で使用されている「自己抗原」により誘発または増悪されるアルツハイマー病またはそれに関連した状態の予防および/または弱毒化方法を提供する。関連態様において、本発明は、動物および個体における各免疫学的応答の誘導方法であって、「自己」遺伝子産物により誘発または増悪されるアルツハイマー病またはそれに関連した状態を予防および/または弱毒化する抗体産生を誘導する方法を提供する。

20

【 0 0 4 1 】

当業者には容易に理解できるように、本発明組成物を動物またはヒトに投与したとき、それらは塩類、緩衝液、アジュバント、または組成物の効力を改良するのに望ましい他の物質を含む組成物中に含まれ得る。医薬組成物製造での使用に適切な材料の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A編、マック・パブリッシング・カンパニー(1990))を含む多数の供給源で提供されている。

【 0 0 4 2 】

本発明組成物は、それらの投与が受容個体による耐容性がある場合、「医薬上許容される」ものであると言われる。さらに、本発明組成物は、「治療有効量」(すなわち、所望の生理学的効果を生じる量)で投与される。

30

【 0 0 4 3 】

本発明組成物は、当業界で公知の様々な方法により投与され得るが、通常、注射、注入、吸入、経口投与、または他の適切な物理的方法により投与される。別法として、組成物は、筋肉内、静脈内または皮下的に投与され得る。投与用組成物の成分には、滅菌水性(例、生理食塩水)または非水性溶液および懸濁液がある。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、たとえばオリーブ油、および注射可能有機エステル、たとえばエチルオレートである。担体または閉鎖密封法(occlusive dressing)は、皮膚浸透性を増し、抗原吸収を高めるのに使用され得る。

40

【 0 0 4 4 】

本発明の他の態様は、当業界で公知のこと、以下の図面および発明の記載および請求の範囲に照らし合わせると当業者にとって容易に理解できるものである。

【 0 0 4 5 】

図面の簡単な説明

図 1 は、Q コートタンパク質の V L P への A 1 - 6 ペプチド (NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (配列番号 77) のカップリングの結果を示す、還元条件下で実施された、S D S - P A G E ゲルを示す。

【 0 0 4 6 】

50

図2は、Q コートタンパク質のVLPにカップリングされたA 1 - 6ペプチドにより免疫化されたマウスの血清中のA 1 - 6に特異的な抗体のELISA分析を示す。

【0047】

図3は、Q コートタンパク質のVLPにカップリングされたA 1 - 6ペプチドにより免疫化されたマウスの血清中のA 1 - 40に特異的な抗体のELISA分析を示す。

【0048】

図4A - Bは、Q コートタンパク質のVLPにカップリングされたA 1 - 6ペプチドにより免疫化されたマウスの血清で染色されたAPP23マウスの脳薄片(A)およびAD患者からの内嗅野薄片(B)を示す。

【0049】

図5A - Eは、Q コートタンパク質のVLPにカップリングされたA 1 - 6ペプチドにより免疫化されたマウスの血清、またはヒトまたはマウスAPPのC - 末端に特異的なポリクローナルウサギ抗血清で染色されたAPP23マウスの脳薄片を示す。

【0050】

図6は、ELISA検定法において測定されたQ VLPにカップリングされたヒトA 1 - 6によるアカゲザルの免疫化の結果を示す。

【0051】

図7は、ヒトADおよびトランスジェニックマウス斑に関する組織学により測定された、Q VLPにカップリングされたヒトA 1 - 6により免疫化されたサル血清の斑への結合の結果を示す。

【0052】

図8は、APP205VLPへのマウスA 1 - 6のカップリングのSDS - PAGE分析を示す。

【0053】

図9は、ELISA検定法で測定されたAPP205にカップリングされたマウスA 1 - 6によるマウス免疫化の結果を示す。

【0054】

図10は、9.5 ~ 19ヶ月齢のQ hA 1 - 6により免疫化された「スウェーデン/ロンドン」トランスジェニックマウスの血清における抗A 40および抗A 42力価のELISAによる分析を示す。

【0055】

図11は、Q hA 1 - 6またはPBSにより免疫化された「スウェーデン/ロンドン」トランスジェニックマウスの脳薄片の免疫組織化学的染色を示す。

【0056】

図12は、9.5 ~ 19ヶ月齢のQ hA 1 - 6、Q またはPBSにより免疫化された「スウェーデン/ロンドン」トランスジェニックマウスにおける斑沈着の定量化を示す。

【0057】

図13は、13.5 ~ 19ヶ月齢のQ hA 1 - 6またはPBSにより免疫化された「スウェーデン/ロンドン」トランスジェニックマウスにおける斑沈着の定量化を示す。

【0058】

図14は、Q hA 1 - 6により免疫化された「スウェーデン」トランスジェニックマウスの血清における抗A 40および抗A 42力価のELISAによる分析を示す。

【0059】

図15は、Q hA 1 - 6またはPBSにより免疫化された「スウェーデン」トランスジェニックマウスからの脳薄片の免疫組織化学的染色を示す。

【0060】

図16は、Q hA 1 - 6またはPBSにより免疫化された「スウェーデン」トランスジェニックマウスにおける斑沈着の定量化を示す。

【0061】

10

20

30

40

50

発明の詳細な記載

特に定義しない場合、本明細書で使用されている技術および科学用語は全て、本発明が属する分野における当該業者が通常理解しているのと同じ意味を有するものとする。本明細書記載のものと同様または均等内容の方法および材料であれば使用され得るが、好ましい方法および材料を以後記載する。

【0062】

1. 定義

A 1 - 6 ペプチド：本明細書で使用されている A 1 - 6 ペプチドは、ヒト A 1 - 6 配列に対応するかまたはヒト A 1 - 6 配列と相同的な配列を有するペプチドをいう。ヒト A 1 - 6 配列と相同的な配列には、限定はされないが、他種の A 1 - 6 配列、たとえば限定されるわけではないが、霊長類、ウサギ、モルモット、アフリカツメガエル、カエル、マウスおよびラット A 1 - 6 がある。アフリカツメガエルまたはカエルからの A 1 - 6 配列は、ヒト A 1 - 6 とは2位置が異なるが、同類突然変異 (Ala - Ser、Phe - Tyr) を有し、この定義によると依然として A 1 - 6 と相同的であると考えられる。しかしながら、本発明によると、A 1 - 6 ペプチドは、典型的には第二付着部位がそこに付着するように修飾されている。好ましくは、第二付着部位は、コア粒子および VLP にそれぞれ結合するための第二付着部位を含むリンカーまたはアミノ酸リンカーにより修飾されている。ここでは A 1 - 6 ペプチドについて述べているが、上記で示した修飾 A 1 - 6 ペプチド、すなわち第二付着部位がそこに付着している A 1 - 6 ペプチドも包含されるべきである。しかしながら、一般的に、修飾は、本明細書では明確に表示されている。本発明による抗原または抗原決定基である A 1 - 6 ペプチドのさらなる好ましい態様は、この明細書で明確に後述されている。

【0063】

アジュバント：本明細書で使用されている「アジュバント」の語は、本発明のワクチンおよび医薬組成物とそれぞれ組合わされたとき、さらに高い免疫応答を提供させ得る免疫応答の非特異的刺激因子または宿主においてデポーを生じさせ得る物質をいう。様々なアジュバントが使用され得る。例としては、完全および不完全フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムおよび修飾ムラミルジペプチドがある。さらなるアジュバントは、鉱物ゲル、たとえば水酸化アルミニウム、表面活性物質、たとえばリゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、および潜在的に有用なヒトアジュバント、たとえば BCG (カルメット - ゲラン杆菌、*bacille Calmette - Guerin*) およびコリネバクテリウム・パルブム (*Corynebacterium parvum*) である。上記アジュバントもまた当業界ではよく知られている。本発明組成物と共に投与され得るさらなるアジュバントには、モノホスホリル脂質免疫調節剤、Adj u V a x、100a、QS - 21、QS - 18、CRL1005、アルミニウム塩類 (Alum)、MF - 59、OM - 174、OM - 197、OM - 294、およびウイロソームアジュバント技術があるが、これらに限定されるわけではない。アジュバントはまた、これらの物質の混合物を含み得る。

【0064】

南アメリカ原産の木キラジャ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の樹皮から誘導されたアジュバント活性を有する免疫学的活性サポニンフラクションは、当業界では公知である。たとえば、QA21としても知られているQS21は、キラジャ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の木からの Hplc 精製フラクションであり、その製造方法は米国特許第 5057540 号に (QA21として) 開示されている。キラジャサポニンはまた、Scott et al, *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 1985, 77, 409によりアジュバントとして開示されている。モノホスホリル脂質 A およびその誘導体は当業界では公知である。好ましい誘導体は、3脱 - o - アシル化モノホスホリル脂質 A であり、英国特許第 2220211 号により知られている。さらなる好ましいアジュバントは、国際公開第 00/00462 号に開示されており、出典明示で援用する。

【0065】

しかしながら、本発明の有利な特徴は、本発明組成物の高い免疫原性である。既に本明細書で概説されているかまたは本明細書の後記部分で明らかになるように、アジュバントを欠くワクチンおよび医薬組成物が提供されており、さらに別のまたは好ましい態様では、アジュバントを欠き、すなわちアジュバントは副作用を誘発し得ることから優れた安全性プロフィールを有するAD処置用ワクチンおよび医薬組成物が提供されている。AD処置用ワクチンおよび医薬組成物に関連して本明細書で使用されている「欠く」の語は、アジュバントを用いずに使用されるワクチンおよび医薬組成物を指す。

【0066】

アミノ酸リンカー：本明細書で使用されている「アミノ酸リンカー」または本明細書内の単なる「リンカー」の語は、抗原または抗原決定基を第二付着部位と会合させるか、またはさらに好ましくは、既に第二付着部位から成るかまたはそれを典型的には - 必ずという訳ではないが - アミノ酸残基として、好ましくはシステイン残基として含む。しかしながら、本明細書で使用されている「アミノ酸リンカー」の語は、アミノ酸残基から成るアミノ酸リンカーが本発明の好ましい態様であるにしても、上記アミノ酸リンカーが、アミノ酸残基によってのみ構成されることを意味する訳ではないものとする。アミノ酸リンカーのアミノ酸残基は、好ましくは、当業界で公知の天然アミノ酸または非天然アミノ酸の全Lまたは全Dまたは混合物により構成される。しかしながら、スルフヒドリル基またはシステイン残基をもつ分子を含むアミノ酸リンカーもまた本発明の範囲内に包含される。かかる分子は、好ましくはC1 - C6アルキル - 、シクロアルキル(C5、C6)、アリールまたはヘテロアリール部分を含む。しかしながら、アミノ酸リンカーに加えて、好ましくはC1 - C6アルキル - 、シクロアルキル - (C5、C6)、アリール - またはヘテロアリール部分を含み、アミノ酸(複数も可)を欠くリンカーもまた、本発明の範囲内に包含されるべきである。抗原または抗原決定基または所望による第二付着部位およびアミノ酸リンカー間の会合は、好ましくは少なくとも1個の共有結合、さらに好ましくは少なくとも1個のペプチド結合を介するものである。

【0067】

動物：本明細書で使用されている「動物」の語は、たとえばヒト、ヒツジ、ヘラジカ、シカ、ミュールジカ、ミンク、哺乳類、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、鳥類、ニワトリ、爬虫類、魚類、昆虫および蜘蛛形類を包含するものとする。

【0068】

抗体：本明細書で使用されている「抗体」の語は、エピトープまたは抗原決定基と結合し得る分子をいう。この語は、1本鎖抗体を含む、全抗体およびその抗原結合性フラグメントを包含するものとする。最も好ましくは、抗体は、ヒト抗原結合性抗体フラグメントであり、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、1本鎖Fvs(scFv)、1本鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)およびV_LまたはV_Hドメインを含むフラグメントを包含するが、これらに限定されるわけではない。抗体は、鳥類および哺乳類を含むあらゆる動物に由来するものであり得る。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ブタ、ラクダ、ウマまたはニワトリに由来するものである。本明細書で使用されている「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を包含し、たとえば、Kucherlapati et alによる米国特許第5939598号に記載されている通り、ヒト免疫グロブリンライブラリーまたは一またはそれ以上のヒト免疫グロブリンについてのトランスジェニック動物から単離され、内在性免疫グロブリンを発現することのない抗体を包含する。

【0069】

抗原：本明細書で使用されている「抗原」の語は、MHC分子により提示された場合抗体またはT細胞受容体(TCR)により結合され得る分子をいう。また、本明細書で使用されている「抗原」の語は、T細胞エピトープを包含する。抗原は、さらに免疫系により認識され得、および/または体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答を誘導することにより、Bおよび/またはTリンパ球の活性化をまねき得る。しかしながら、これは、

10

20

30

40

50

少なくともある種の場合において、抗原がT_h細胞エピトープを含むかまたはそれに結合しており、アジュバント中で与えられることを必要とし得る。抗原は、1個またはそれ以上のエピトープ（BおよびTエピトープ）を有し得る。上記の特異的反応は、好ましくは抗原が、典型的には高度選択的な形で、他の抗原により誘導され得る多数の他の抗体またはTCRではなく、その対応する抗体またはTCRと反応することを意味する。本明細書で使用されている抗原はまた、幾つかの個々の抗原の混合物でもあり得る。

【0070】

抗原決定基：本明細書で使用されている「抗原決定基」の語は、BまたはTリンパ球により特異的に認識される抗原の部分の部分を指すものとする。抗原決定基に反応しているBリンパ球は抗体を産生し、Tリンパ球は、増殖および細胞性および/または体液性免疫の伝達

10

【0071】

会合：本明細書で使用されている「会合」の語は、それが第一および第二付着部位に適用されているとき、好ましくは少なくとも1個の非ペプチド結合による第一および第二付着部位の結合をいう。会合の性質は、共有結合性、イオン結合性、疎水性、極性またはそれらの組合せであり得、好ましくは会合の性質は共有結合である。

【0072】

付着部位、第一：本明細書で使用されている「第一付着部位」の語は、抗原または抗原決定基上に位置する第二付着部位が会合し得る非天然または天然由来のエレメントをいう。第一付着部位は、タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、ペプチド、糖、ポリヌクレオチド、天然または合成ポリマー、二次代謝物または化合物（ピオチン、フルオレセイン、レチノール、ジゴキシゲニン、金属イオン、フェニルメチルスルホニルフルオリド）またはそれらの組合せ、またはその化学反応基であり得る。第一付着部位は、典型的には、そして好ましくはコア粒子、たとえば好ましくはウイルス様粒子の表面上に位置する。多重第一付着部位は、コアおよびウイルス様粒子のそれぞれ表面に、典型的には反復立体配座で存在する。

20

【0073】

付着部位、第二：本明細書で使用されている「第二付着部位」の語は、コア粒子およびウイルス様粒子のそれぞれ表面上に位置する第一付着部位が会合し得る抗原または抗原決定基に伴うエレメントをいう。抗原または抗原決定基の第二付着部位は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖、ポリヌクレオチド、天然または合成ポリマー、二次代謝物または化合物（ピオチン、フルオレセイン、レチノール、ジゴキシゲニン、金属イオン、フェニルメチルスルホニルフルオリド）、またはその組合せ、またはその化学反応基であり得る。少なくとも1個の第二付着部位は、抗原または抗原決定基に存在する。したがって、「少なくとも1個の第二付着部位をもつ抗原または抗原決定基」の語は、少なくとも抗原または抗原決定基および第二付着部位を含む抗原性構築物をいう。しかしながら、特に非天然由来である、すなわち抗原または抗原決定基内に天然には存在しない第二付着部位の場合、これらの抗原または抗原性構築物は「アミノ酸リンカー」を含む。

30

【0074】

結合：本明細書で使用されている「結合（された）」の語は、たとえば化学的カップリングによる共有結合、または非共有結合、たとえばイオン相互作用、疎水性相互作用、水素結合などであり得る結合または付着をいう。共有結合は、たとえばエステル、エーテル、ホスホエステル、アミド、ペプチド、イミド、炭素-硫黄結合、炭素-リン結合などであり得る。「結合（された）」の語は、たとえば「カップリング（された）」、「融合（された）」および「付着（した）」の語より広義であり、それらを包含する。

40

【0075】

コートタンパク質（複数も可）：本明細書で使用されている「コートタンパク質（複数も可）」の語は、バクテリオファージまたはRNAファージのキャプシド集合内に組込まれ得るバクテリオファージまたはRNAファージのタンパク質（複数も可）をいう。しかしながら、RNA-ファージのコートタンパク質遺伝子の特異的遺伝子産物をいうとき、

50

「C P」の語が使用される。たとえば、RNA - フェージQ のコートタンパク質遺伝子の特異的遺伝子産物は「Q C P」と称され、バクテリオフェージQ の「コートタンパク質」は、「Q C P」およびA 1タンパク質を含む。バクテリオフェージQ のキャプシドは、主としてQ C Pにより構成され、A 1タンパク質の含有量は僅かである。同様に、V L P Q コートタンパク質は、主としてQ C Pを含み、A 1タンパク質の含有量は僅かである。

【0076】

コア粒子：本明細書で使用されている「コア粒子」の語は、固有の反復構成をもつ固定した構造をいう。本明細書で使用されているコア粒子は、合成方法の生成物または生物学的過程の生成物であり得る。

10

【0077】

カップリング(された)：本明細書で使用されている「カップリング(された)」の語は、共有結合または強い非共有結合的相互作用による結合、典型的には、そして好ましくは共有結合による結合をいう。生物学的活性材料のカップリングについて当業者により常用される方法であれば全て、本発明で使用され得る。

【0078】

有効量：本明細書で使用されている「有効量」の語は、所望の生物学的効果を実現するのに必要または充分な量をいう。組成物の有効量は、この選択された結果を達成する量であり、かかる量は、当業者により慣例的な事柄として決定され得る。たとえば、免疫系欠損症の処置に有効な量は、免疫系の活性化を誘発することにより、抗原への曝露時に抗原特異的免疫応答を発生させるのに必要な量であり得る。この語はまた、「充分量」と同意語である。

20

【0079】

特定適用のための有効量は、処置されている病気または状態、投与されている特定組成物、対象の大きさ、および/または病気または状態の重症度といった因子により変化し得る。通常当業者であれば、過度の実験を必要とせずに、本発明の特定組成物の有効量を経験的に決定できるはずである。

【0080】

エピトープ：本明細書で使用されている「エピトープ」の語は、動物、好ましくは哺乳類、および最も好ましくはヒトにおける抗原性または免疫原活性を有するポリペプチドの連続または非連続部分をいう。エピトープは、抗体またはM H C分子の状況ではT細胞受容体を通してT細胞により認識される。本明細書で使用されている「免疫原性エピトープ」の語は、当業界でよく知られている方法により測定されたところによると、動物において抗体応答を誘発するかまたはT細胞応答を誘導するポリペプチドの一部として定義される。(たとえば、Geysen et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:3998-4002(1983)参照)。本明細書で使用されている「抗原性エピトープ」の語は、当業界でよく知られている方法により測定される、抗体が免疫特異的にその抗原と結合し得るタンパク質の一部として定義される。免疫特異的結合は、非特異的結合を排除するが、必ずしも他抗原との交差反応性を排除するわけではない。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。抗原性エピトープはまた、T細胞エピトープであり得、その場合、それらはM H C分子の状況内においてT細胞受容体により免疫特異的に結合され得る。

30

40

【0081】

エピトープは、エピトープに特有である空間立体配座で3個のアミノ酸を含み得る。一般的に、エピトープは、少なくとも約5個の上記アミノ酸により構成され、さらに通常は、少なくとも約8~10個の上記アミノ酸により構成される。エピトープが有機分子である場合、それはニトロフェニル程度の小ささであり得る。

【0082】

融合：本明細書で使用されている「融合」の語は、一ポリペプチド鎖における起源が異なるアミノ酸配列の組合せであって、それらのコーディングヌクレオチド配列の枠内組合せによるものをいう。「融合」の語は、明確に、内部融合、すなわち、一ポリペプチド鎖

50

内における起源が異なる配列の挿入を、その末端の一つへの融合に加えて包含する。

【0083】

免疫応答：本明細書で使用されている「免疫応答」の語は、Bおよび/またはTリンパ球および/または抗原提示細胞の活性化または増殖をまねく体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答をいう。しかしながら、免疫応答が低強度であり得、本発明による少なくとも1種の物質を用いるときしか検出され得ない場合もある。「免疫原性」とは、生きている生物体の免疫系を刺激することにより、免疫系の一つまたはそれ以上の機能を増強させ、免疫原性薬剤に指向させるのに使用される薬剤を指す。「免疫原性ポリペプチド」は、単独であろうと、アジュバントの存在または非存在下で担体に結合されておると、いずれにしても細胞性および/または体液性免疫応答を誘発するポリペプチドである。好ましくは、抗原提示細胞は活性化され得る。

10

【0084】

免疫応答を「高める」物質とは、物質を加えずに測定される免疫応答と比べたとき、物質の添加により大きいまたは強化されたかまたは何らかの意味で偏向した同免疫応答が観察される物質をいう。たとえば、細胞傷害性T細胞の溶解活性は、免疫化中に物質を使用し、および使用せずに得られた試料において、たとえば⁵¹Cr放出検定法を用いることにより測定され得る。物質を加えない場合のCTL溶解活性と比べて、CTL溶解活性が高められる物質の量は、抗原に対する動物の免疫応答を高めるのに十分な量であるといわれている。好ましい態様では、免疫応答は、少なくとも約2の係数、さらに好ましくは約3またはそれ以上の係数により高められる。分泌されるサイトカインの量またはタイプも改変され得る。別法として、誘導される抗体またはそれらのサブクラスの量が改変され得る。

20

【0085】

免疫化：本明細書で使用されている「免疫化する」または「免疫化」の語またはその関連語は、標的抗原またはエピトープに対する実質的免疫応答（抗体および/または細胞性免疫、たとえばエフェクターCTLを含む）を展開させる能力を付与することをいう。これらの語は、完全な免疫性を生じさせることを要求しているのではなく、実質的に基準より大きい免疫応答を生じさせることを要求している。たとえば、本発明方法の適用後に標的抗原に対する細胞性および/または体液性免疫応答が生じた場合、哺乳類は標的抗原に対して免疫化されていると考えられ得る。

30

【0086】

天然由来：本明細書で使用されている「天然由来」の語は、全体またはその一部が合成的ではなく、自然に存在するか生成されることを意味する。

【0087】

非天然由来の：本明細書で使用されているこの語は、一般的に自然から生じたものではないことを意味し、さらに具体的には、この語は人の手を経ていることをいう。

【0088】

非天然由来：本明細書で使用されている「非天然由来」の語は、一般的に合成的であるかまたは自然から生じたものではないことを意味し、さらに具体的には、この語は人の手を経ていることを意味する。

40

【0089】

規則正しい反復性抗原または抗原決定基アレイ：本明細書で使用されている「規則正しい反復性抗原または抗原決定基アレイ」の語は、一般的に、典型的にそして好ましくはコア粒子およびウイルス様粒子のそれぞれに関して抗原または抗原決定基の均一な空間配置を特徴とする、抗原または抗原決定基の反復パターンをいう。本発明の一態様において、反復パターンは、幾何学的パターンであり得る。適切な規則正しい反復性抗原または抗原決定基アレイの典型的で好ましい例は、好ましくは0.5~30ナノメートル、さらに好ましくは5~15ナノメートルのスペーシングを伴う、厳密に反復的な準結晶性秩序の抗原または抗原決定基を有するものである。

【0090】

50

線毛：本明細書で使用されている「線毛」(pili、単数形は「pilus」)の語は、規則正しい反復性パターンへ組織化されているタンパク質モノマー(例、ピリンモノマー)により構成される細菌細胞の細胞外構造をいう。さらに、線毛は、たとえば宿主細胞表面受容体への細菌細胞の付着、細胞間遺伝子交換および細胞-細胞認識といったプロセスに関与する構造である。線毛の例には、1型線毛、P-線毛、F1C線毛、S-線毛および987P-線毛がある。線毛の追加例は下記に示されている。

【0091】

線毛様構造：本明細書で使用されている「線毛様構造」の語は、線毛構造と類似した特徴を有し、タンパク質モノマーにより構成される構造をいう。「線毛様構造」の一例は、天然線毛の構造と同一である規則正しい反復性アレイを形成しない修飾ピリンタンパク質を発現する細菌細胞により形成される構造である。

10

【0092】

ポリペプチド：本明細書で使用されている「ポリペプチド」の語は、アミド結合(ペプチド結合としても知られている)により線状に結合されたモノマー(アミノ酸)から成る分子をいう。それは、アミノ酸の分子鎖を示すもので、生成物の具体的な長さをいうのではない。すなわち、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質は、ポリペプチドの定義の範囲内に含まれる。この語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、たとえば糖化(glycosylation)、アセチル化、リン酸化などを包含するものとする。組換え体または誘導ポリペプチドは、必ずしも指示された核酸配列から翻訳されるわけではない。それはまた、化学合成を含む何らかの方法で生成され得る。

20

【0093】

残基：本明細書で使用されている「残基」の語は、ポリペプチドバックボーンまたは側鎖における特異的なアミノ酸を意味するものとする。

【0094】

自己抗原：本明細書で使用されている「自己抗原」の語は、宿主DNAによりコード化されるタンパク質をいい、宿主DNAによりコード化されるタンパク質またはRNAにより産生される生成物は自己として定義される。さらに、2個または幾つかの自己分子の組合せから生じるかまたは自己分子のフラクションを表すタンパク質および上記の2個の自己分子と高い相同性(>95%、好ましくは>97%、さらに好ましくは>99%)を有するタンパク質もまた、自己としてみなされ得る。

30

【0095】

処置：本明細書で使用されている「処置」、「処置する」、「処置された」または「処置している」の語は、予防および/または治療をいう。たとえば、感染性疾患に関して使用されているとき、この語は、病原体による感染に対する対象の抵抗力を増強させるか、または言い換えれば、対象が病原体に感染するかまたは感染症に起因する病気の徴候を示す尤度を減らす予防的処置、ならびに対象が感染した後に感染症と闘う、たとえば感染を低減化または排除するかまたはそれが悪化するのを防ぐための処置をいう。

【0096】

ワクチン：本明細書で使用されている「ワクチン」の語は、本発明組成物を含み、動物に投与され得る形態をしている処方物をいう。典型的には、ワクチンは、本発明組成物が懸濁または溶解される慣用的食塩水または緩衝水溶液媒質を含む。この形態では、本発明組成物は、病状を阻止、軽減または他の方法で処置するのに使用され得る。宿主へ導入されると、ワクチンは、限定するわけではないが、抗体および/またはサイトカインの産生および/または細胞傷害性T細胞、抗原提示細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞の活性化、および/または他の細胞性応答を含む免疫応答を誘発することができる。

40

【0097】

所望により、本発明ワクチンは、さらに、本発明化合物に対して小さな比率または大きな比率で存在し得るアジュバントを含んでいてもよい。

【0098】

ウイルス様粒子(VLP)：本明細書で使用されている「ウイルス様粒子」の語は、ウ

50

ウイルス粒子に似た構造をいう。さらに、本発明によるウイルス様粒子は、ウイルスゲノムの全部または一部、特にウイルスゲノムの複製性および感染性成分を欠くため、非複製性および非感染性である。本発明によるウイルス様粒子は、それらのゲノムとは区別される核酸を含み得る。本発明によるウイルス様粒子の典型的で好ましい態様は、ウイルスキャプシド、たとえば対応するウイルス、バクテリオファージまたはRNAファージのウイルスキャプシドである。本明細書で互換的に使用されている「ウイルスキャプシド」または「キャプシド」の語は、ウイルスタンパク質サブユニットにより構成される巨大分子集合をいう。典型的に、そして好ましくは、ウイルスタンパク質サブユニットは、固有の反復構成をもつ構造を有するウイルスキャプシドおよびキャプシドにそれぞれ集合し、その場合上記構造は典型的には球状または管状である。たとえば、RNAファージまたはHBcAgのキャプシドは、二十面体シンメトリーの球状形態を有する。本明細書で使用されている「キャプシド様構造」の語は、上記定義の意味でキャプシド形態と似ているが、典型的球状集合から偏向しており、十分な程度の秩序および反復性を維持しているウイルスタンパク質サブユニットで構成される巨大分子集合をいう。

10

【0099】

バクテリオファージのウイルス様粒子：本明細書で使用されている「バクテリオファージのウイルス様粒子」の語は、バクテリオファージの構造と類似し、非反復性および非感染性であり、バクテリオファージの複製機構についてコード化する少なくとも一遺伝子または複数遺伝子を欠き、典型的には同じく宿主へのウイルス付着または侵入に関与するタンパク質または複数タンパク質をコード化する一遺伝子または複数遺伝子を欠くウイルス様粒子をいう。しかしながら、この定義はまた、前記一遺伝子または複数遺伝子が依然として存在はするが、不活性であることにより、バクテリオファージの非複製性および非感染性ウイルス様粒子となる、バクテリオファージのウイルス様粒子も包含すべきである。

20

【0100】

RNAファージコートタンパク質のVLP：RNAファージコートタンパク質の180サブユニットの自己集合から形成され、所望により宿主RNAを含んでいてもよいキャプシド構造は、「RNAファージコートタンパク質のVLP」と称される。具体例はQコートタンパク質のVLPである。この特定の場合では、Qコートタンパク質のVLPは、排他的にQCPサブユニットから構築されるか（たとえば、サブプレッションを通して長いA1タンパク質の発現を予め排除するTAA停止コドンを含むQCP遺伝子の発現により生成される、Kozlovskaya, T.M., et al., Intervirology 39: 9-15 (1996) 参照）、または追加的にキャプシド集合においてA1タンパク質サブユニットを含み得る。

30

【0101】

ウイルス粒子：本明細書で使用されている「ウイルス粒子」の語は、ウイルスの形態学的形態をいう。ウイルスのタイプによっては、タンパク質キャプシドにより囲まれたゲノムを含む場合もあれば、追加構造（例、エンベロープ、テイルなど）を有する場合もある。

【0102】

One、aまたはan：「one」、「a」または「an」の語が、この開示の英文テキストにおいて使用されているとき、特に示していない場合、それらは「少なくとも一つ（1個）」または「一つ（1個）またはそれ以上」を意味する。

40

【0103】

当業者には明らかなことであるように、本発明のある種の態様は、組換え核酸技術、たとえばクローニング、ポリメラーゼ連鎖反応、DNAおよびRNAの精製、原核生物および真核生物細胞における組換えタンパク質の発現などの使用を含む。上記方法は当業者には熟知されており、好都合には出版された実験方法のマニュアルから見出され得る（例、Sambrook, J. et al. 編, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス, コールドスプリングハーバー, ニューヨーク (1989); Ausubel, F. et al. 編, Current Protocols in Molecular Biology, John H

50

Wiley & Sons, Inc. (1997))。組織培養セルラインによる作業についての根本的実験技術 (Celis, J. 編、Cell Biology、アカデミック・プレス、第2版(1998)) および抗体に基く技術 (Harlow, E. and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク (1988); Deutscher, M.P., "Guide to Protein Purification," Meth. Enzymol. 128、アカデミック・プレス、サンディエゴ (1990); Scopes, R.K., Protein Purification Principles and Practice、第3版、スプリングー・フェルラーク、ニューヨーク (1994)) もまた十分に文献に記載されており、これらを全て、出典明示で援用する。

【0104】

2. 免疫応答を高める組成物および方法

開示されている発明は、動物において A₁-6 ペプチドに対する免疫応答を誘導し、A₁ アミロイド斑および可溶性 A₁ に結合し得る抗体を誘導する組成物および方法を提供する。本発明組成物は、(a) 少なくとも1個の第一付着部位を有するコア粒子、および (b) 少なくとも1個の第二付着部位を有する少なくとも1個の抗原または抗原決定基を含むか、またはそれらにより構成され、その場合、抗原または抗原決定基は A₁-6 ペプチドであり、そして第二付着部位は、(i) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもたない付着部位、および (ii) 自然の状態では抗原または抗原決定基をもつ付着部位から成る群から選択されるものであり、第二付着部位は第一付着部位と会合し得、そして抗原または抗原決定基およびコア粒子はその会合を通して相互作用することにより、規則正しい反復性抗原アレイを形成する。さらに具体的には、本発明組成物は、ウイルス様粒子および少なくとも1個の抗原または抗原決定基を含むかまたはそれらにより構成され、その場合、抗原または抗原決定基は A₁-6 ペプチドであり、少なくとも1個の抗原または抗原決定基は、規則正しい反復性抗原-VLPアレイを形成するようにウイルス様粒子に結合されている。さらに、本発明は、好都合なことに実施者が、特にアルツハイマー病の処置および/または予防的阻止用の上記組成物を構築することを可能にする。本願明細書におけるウイルス様粒子は、ウイルス粒子と類似してはいるが、病原性ではない構造をいう。一般に、ウイルス様粒子は、ウイルスゲノムを欠くため、非感染性である。また、ウイルス様粒子は、異種発現により大量に製造され得、容易に精製され得る。

【0105】

一態様において、コア粒子は、ウイルス、細菌線毛、細菌性ピリンから形成された構造、バクテリオファージ、ウイルス様粒子、RNAファージのウイルス様粒子、ウイルスキャプシド粒子またはそれらの組換え形態を包含するか、またはそれらから成る群から選択される。規則正しい反復性コートおよび/またはコアタンパク質構造を有する当業界で公知のウイルスであれば、本発明のコア粒子として選択され得る。適切なウイルスの例としては、シンドビスおよび他のアルファウイルス、ラウドウイルス (例、水疱性口内炎ウイルス)、ピコルナウイルス (例、ヒトリノウイルス、愛知ウイルス)、トガウイルス (例、風疹ウイルス)、オルソミクソウイルス (例、トゴトウイルス、バトケンウイルス (Bakken virus)、家禽ペストウイルス)、ポリオーマウイルス (例、ポリオーマウイルス BK、ポリオーマウイルス JC、鳥ポリオーマウイルス BFDV)、パルボウイルス、ロタウイルス、ノーウォークウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、タバコモザイクウイルス、フロックハウスウイルス、およびヒトパピローマウイルス、および好ましくは RNAファージ、バクテリオファージ Q、バクテリオファージ R17、バクテリオファージ M11、バクテリオファージ MX1、バクテリオファージ NL95、バクテリオファージ fr、バクテリオファージ GA、バクテリオファージ SP、バクテリオファージ MS2、バクテリオファージ f2、バクテリオファージ PP7 がある (たとえば、Bachmann, M.F. および Zinkernagel, R.M., Immunol. Today 17:553-558 (1996)) における表1参照)。

【0106】

さらなる態様において、本発明は、ウイルスの遺伝子工学技術を使用することにより、規則正しい反復性ウイルスエンベロープタンパク質および異種タンパク質、ペプチド、抗

10

20

30

40

50

原決定基または選抜された反応性アミノ酸残基により構成されるか、または択一的にまたは好ましくはそれらである第一付着部位間に融合を形成させる。当業者に公知の他の遺伝子操作も本発明組成物の構築に含まれ得る。たとえば、遺伝子突然変異誘発を通じて組換えウイルスの複製能力を制限することが望ましいことであり得る。さらに、本発明に使用されるウイルスは、化学的または物理的不活化故に、または指摘されている通り、複製適格ゲノムの欠如故に複製不適格である。第一付着部位への融合に選択されるウイルスタンパク質は、組織化された反復構造を有するべきである。かかる組織化された反復性構造は、ウイルス表面上に5~30nm、好ましくは5~15nmのスペーシングをもつ準結晶性構成を含む。このタイプの融合タンパク質の作製により、ウイルス表面上に多数の規則正しい反復性第一付着部位がもたらされ、天然ウイルスタンパク質の通常の構成が反映される。当業者には容易に理解できるように、第一付着部位は、抗原または抗原決定基を特異的に付着させる機能を果たし得る適切なタンパク質、ポリペプチド、糖、ポリヌクレオチド、ペプチド(アミノ酸)、天然または合成ポリマー、二次代謝物またはそれらの組合せであるか、またはそれらの一部であることにより、規則正しい反復性抗原アレイを誘導し得る。

10

【0107】

本発明の別の態様において、コア粒子は、組換えアルファウイルス、さらに特定すれば組換えシンドビスウイルスである。アルファウイルスは、感染細胞の細胞質において、DNA中間体を伴わずにそれらのゲノムRNAを完全に複製するプラス鎖RNAウイルスである(Strauss, J. および Strauss, E., *Microbiol. Rev.* 58:491-562 (1994))。アルファウイルスファミリーの幾つかの要員、シンドビス(Xiong, C. et al., *Science* 243:1188-1191 (1989); Schlesinger, S., *Trends Biotechnol.* 11:18-22 (1993))、セムリキ森林熱ウイルス(SFV)(Liljestrom, P. & Garoff, H., *Bio/Technology* 9:1356-1361 (1991))およびその他(Davis, N.L. et al., *Virology* 171:189-204 (1989))は、様々な異なるタンパク質についてのウイルスに基く発現ベクターとして(Lundstrom, K., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:578-582 (1997); Liljestrom, P., *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:495-500 (1994))、およびワクチン開発候補としての使用に関してかなりの注目を受けている。最近では、若干の特許が、異種タンパク質の発現についてのアルファウイルスの使用およびワクチン開発に関して出ている(米国特許第5,766,602; 5,792,462; 5,739,026; 5,789,245 および 5,814,482号参照)。本発明アルファウイルスコア粒子の構築は、上記文献により記載されているように、組換えDNA技術分野で公知の手段により為され得、それらについては出典明示で援用する。

20

30

【0108】

様々な異なる組換え宿主細胞が、抗原または抗原決定基付着のためのウイルスに基くコア粒子の製造に使用され得る。たとえば、アルファウイルスは、広い宿主範囲を有することが知られている。シンドビスウイルスは、培養哺乳類、爬虫類、および両生類細胞、ならびに若干の昆虫細胞に感染する(Clark, H., *J. Natl. Cancer Inst.* 51:645 (1973); Leake, C., *J. Gen. Virol.* 35:335 (1977); Stollar, V., *The Togaviruses*, R.W. Schlesinger編、アカデミック・プレス(1980), 583-621頁)。すなわち、非常に多くの組換え宿主細胞が本発明の実践に際し使用され得る。BHK、COS、ペロ、ヒーラおよびCHO細胞は、ヒト細胞と類似した方法で異種タンパク質をグリコシル化する可能性を有するため、それらは異種タンパク質の製造に特に適切であり(Watson, E. et al., *Glycobiology* 4:227, (1994))、血清不含有培地および懸濁液中で増殖させるのに選択されるか(Zang, M. et al., *Bio/Technology* 13:389 (1995))または遺伝子操作され得る(Renner W. et al., *Biotech. Bioeng.* 4:476 (1995); Lee K. et al. *Biotech. Bioeng.* 50:336 (1996))。

40

【0109】

宿主細胞へのポリヌクレオチドベクターの導入は、標準実験マニュアル(例、Sambrook, J. et al.編、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*、第2版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク(1989

50

)、9章; Ausubel, F. et al.編、Current Protocols in Molecular Biology, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)、16章参照)記載の方法、たとえば電気穿孔、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、トランスフェクション、顕微注入、カチオン性脂質介在トランスフェクション、形質導入、スクレープローディング、衝撃導入および感染といった方法により実施され得る。宿主細胞への外生DNA配列の導入方法は、Felgner, P. et al., 米国特許第5580859号で検討されている。

【0110】

パッケージされたRNA配列もまた宿主細胞の感染に使用され得る。これらのパッケージRNA配列は、それらを培養培地へ加えることにより導入され得る。たとえば、非感染性アルファウイルス粒子の製造は、"Sindbis Expression System", バージョンC (Invitrogen カタログ番号 K750-1) を含む、若干の出典に記載されている。

10

【0111】

哺乳類細胞をウイルスに基くコア粒子製造用の組換え宿主細胞として使用するとき、これらの細胞は、一般的に組織培養で増殖される。培養細胞の増殖方法は、当業界では公知である(たとえば、Celis, J.編、Cell Biology, アカデミック・プレス、第2版(1998); Sambrook, J. et al.編、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク(1989); Ausubel, F. et al.編、Current Protocols in Molecular Biology, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997); Freshney, R., Culture of Animal Cells, Alan R. Liss, Inc. (1983)参照)。

20

【0112】

本発明におけるコア粒子としての使用に適切なRNAウイルスのさらなる例には、限定はされないが、以下のものが含まれる: レオウイルス科、たとえばオルトレオウイルス属(哺乳類および鳥レトロウイルスの両方の多血清型)、オービウイルス属(ブルータングウイルス、エウゲナンギー(Eugeneangee)ウイルス、ケメロボ(Kemerovo)ウイルス、アフリカウマ病ウイルス、およびコロラドダニ熱ウイルス)、ロタウイルス属(ヒトロタウイルス、ネブラスカ子牛下痢ウイルス、ネズミロタウイルス、シミアンロタウイルス、ウシまたはヒツジロタウイルス、鳥ロタウイルス)、ピコマウイルス科、たとえばエンテロウイルス属(ポリオウイルス、コクサッキーウイルスAおよびB、エコー(エンテリック・サイトパシク・ヒューマン・オーファン、ECHO)ウイルス、A、C、D、EおよびG型肝炎ウイルス、シミアンエンテロウイルス、ネズミ脳脊髄炎(ME)ウイルス、ポリオウイルス・ムリス(muris)、ウシエンテロウイルス、ブタエンテロウイルス)、カーディオウイルス属(脳心筋炎ウイルス(EMC)、メンゴウイルス)、リノウイルス属(少なくとも113のサブタイプを含むヒトリノウイルス; 他のリノウイルス)、アプトウイルス(Aphthovirus)属(口蹄疫ウイルス(EMDV))、カルシウイルス科、たとえばブタ水疱性発疹ウイルス、サンミグエルアザラシウイルス、ネコピコルナウイルスおよびノーウォークウイルス、トガウイルス科、たとえばアルファウイルス属(東部ウマ脳脊髄炎ウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、シンドビスウイルス、チクングニヤウイルス、オニョング-ニョング(O'Nyong-Nyong)ウイルス、ロス川ウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス、西部ウマ脳脊髄炎ウイルス)、フラビウイルス属(カ媒介黄熱病ウイルス、デング熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マリーバレー脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、クンジン(Kunjin)ウイルス、中央ヨーロッパダニ媒介脳炎ウイルス、極東ダニ媒介脳炎ウイルス、キャサヌール森林病ウイルス、跳躍病ウイルス、ポーワッサンウイルス、オムスク出血熱ウイルス)、ルビウイルス属(風疹ウイルス)、ベスチウイルス属(粘膜病ウイルス、ブタコレラウイルス、ポーター病ウイルス)、ブンヤウイルス科、たとえばブンヤウイルス属(ブンヤムウェラ(Bunyamwera)および関連ウイルス、カリフォルニア脳炎群ウイルス)、フレボウイルス属(サシチョウバエ熱シチリアウイルス、リフトバレー熱ウイルス)、ナイロウイルス属(クリミア-コンゴ出血熱ウイルス、ナイロビヒツジ病ウイルス)およびウクウイルス(Uukuvirus)属(ウクニエミ(Uukuniemi)および関連ウイルス)、オルトミクソウイルス科、たとえばインフル

30

40

50

エンザウイルス属（インフルエンザA型ウイルス、多くのヒトサブタイプ）、ブタインフルエンザウイルスおよび鳥およびウマインフルエンザウイルス、インフルエンザB型（多くのヒトサブタイプ）、およびインフルエンザC型（可能な独立属）、パラミクソウイルス科、たとえばパラミクソウイルス属（パラインフルエンザ1型ウイルス、センダイウイルス、パラインフルエンザ（血球吸着）ウイルス、パラインフルエンザ2～5型ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス）、麻疹ウイルス属（麻疹ウイルス、亜急性硬化性汎脳炎ウイルス、ジステンパーウイルス、牛痘ウイルス）、肺炎ウイルス属（呼吸器性シンシチアルウイルス（RSV）、ウシの呼吸器性シンシチアルウイルスおよびマウス肺炎ウイルス）、森林病ウイルス、シンドピスウイルス、チクングニヤウイルス、オニョング - ニョング（O'Nyong-Nyong）ウイルス、ロス川ウイルス、ベネズエラ
 ウマ脳脊髄炎ウイルス、西部ウマ脳脊髄炎ウイルス）、フラビウイルス属カ媒介黄熱病ウイルス、デング熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マリーバレー脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、クンジン（Kunjin）ウイルス、中央ヨーロッパダニ媒介脳炎ウイルス、極東ダニ媒介脳炎ウイルス、キャサヌール森林病ウイルス、跳躍病ウイルス、ポーワッサンウイルス、オムスク出血熱ウイルス）、ルビウイルス属（風疹ウイルス）、ペスチウイルス属（粘膜病ウイルス、ブタコレラウイルス、ボーダー病ウイルス）、ブンヤウイルス科、たとえばブンヤウイルス属（ブンヤムウェラ（Bunyamwera）および関連ウイルス、カリフォルニア脳炎群ウイルス）、フレボウイルス属（サシチョウバエ熱シチリアウイルス、リフトバレー熱ウイルス）、ナイロウイルス属（クリミア - コンゴ出血熱ウイルス、ナイロビヒツジ病ウイルス）およびウクウイルス（Uukuvirus）属（ウクニエミ（Uukuniemi）および関連ウイルス）、オルトミクソウイルス科、たとえばインフルエンザウイルス属（インフルエンザA型ウイルス、多くのヒトサブタイプ）、ブタインフルエンザウイルスおよび鳥およびウマインフルエンザウイルス、インフルエンザB型（多くのヒトサブタイプ）、およびインフルエンザC型（可能な独立属）、パラミクソウイルス科、たとえばパラミクソウイルス属（パラインフルエンザ1型ウイルス、センダイウイルス、パラインフルエンザ（血球吸着）ウイルス、パラインフルエンザ2～5型ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス）、麻疹ウイルス属（麻疹ウイルス、亜急性硬化性汎脳炎ウイルス、ジステンパーウイルス、牛痘ウイルス）、肺炎ウイルス属（呼吸器性シンシチアルウイルス（RSV）、ウシの呼吸器性シンシチアルウイルスおよびマウス肺炎ウイルス）、ラプトウイルス科、たとえばベシクロウイルス（VSV）属、チャンディプラ（Chandipura）ウイルス、フランダース - ハートパーク（Flanders-Hart Park）ウイルス）、リッサウイルス属（狂犬病ウイルス）、魚類ラプトウイルスおよび、フィロウイルス（マルブルクウイルスおよびエボラウイルス）、アレナウイルス科、たとえばリンパ球脈絡髄膜炎ウイルス（LCM）、タカリベウイルス群、およびラッサウイルス、コロナウイルス科、たとえば伝染性気管支炎ウイルス（IBV）、マウス肝炎ウイルス、ヒトエンテリックコロナウイルス、およびネコ伝染性腹膜炎ウイルス（ネココロナウイルス）。

【0113】

コア粒子として使用され得るDNAウイルスの実例としては、限定される訳ではないが、以下のものが挙げられる：ボックスウイルス科、たとえばオルトボックスウイルス属（大痘瘡、小痘瘡、サルボックスワクシニア、牛痘、水牛痘、家兔痘、エクトロメリア）、レポリボックスウイルス属（粘液腫、線維腫）、鳥類ボックスウイルス属（鶏痘、他の鳥ボックスウイルス）、カプリボックスウイルス属（ヒツジ痘、ヤギ痘）、スイボックスウイルス属（豚痘）、パラボックスウイルス属（伝染性膿疱性皮膚炎ウイルス、偽牛痘、ウシ丘疹性口内炎ウイルス）、イリドウイルス科（アフリカブタコレラウイルス、カエルウイルス2および3、魚類のリムフォキスティスウイルス）、ヘルペスウイルス科、たとえばアルファ - ヘルペスウイルス（単純疱疹1および2型、水痘 - 帯状疱疹、ウマ流産ウイルス、ウマヘルペスウイルス2および3、仮性狂犬病ウイルス、ウシ伝染性角結膜炎ウイルス、ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、伝染性咽頭気管炎ウイルス）、ベータ - ヘルペスウイルス（ヒトサイトメガロウイルスならびにブタ、サルおよびげ

10

20

30

40

50

哺乳動物のサイトメガロウイルス)、ガンマ-ヘルペスウイルス(エプスタイン-バールウイルス(EBV)、マレク病ウイルス、ヘルペスサイミリ(Herpes saimiri)、ヘルペスウイルスアテレス(ateles)、ヘルペスウイルスシルビラグス(sylvilagus)、モルモットヘルペスウイルス、リュッケ腫瘍ウイルス)、アデノウイルス科、たとえばマストアデノウイルス属(ヒトサブグループA、B、C、DおよびEおよびグループ化されていないもの、シミアンアデノウイルス(少なくとも23血清型)、感染性イヌ肝炎、ならびにウシ、ブタ、ヒツジ、カエルおよび多くの他の種のアデノウイルス)、鳥類アデノウイルス属(鳥アデノウイルス)、および非培養可能アデノウイルス、パポバウイルス科、たとえば乳頭腫ウイルス属(ヒト乳頭腫ウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、ショーブウサギ乳頭腫ウイルス、および他の種の様々な病原性乳頭腫ウイルス)、ポリオーマウイルス属(ポリオーマウイルス、サル空胞形成ウイルス(SV-40)、ウサギ空胞形成ウイルス(RKV)、Kウイルス、BKウイルス、JCウイルス、および他の霊長類ポリオーマウイルス、たとえばリンパ向行乳頭腫ウイルス)、パルボウイルス科、たとえばアデノ関連ウイルス属、パルボウイルス属(ネコ汎白血球減少症ウイルス、ウシパルボウイルス、イヌパルボウイルス、アリュージャンミンク病ウイルス等)。最後に、DNAウイルスには、たとえば慢性感染性ニューロ端因子(CHINAウイルス)といったウイルスも含まれる。

10

【0114】

他の態様において、細菌性ピリン、細菌性ピリンの小部分(subportion)、または細菌性ピリンまたはその小部分を含む融合タンパク質が、本発明の組成物およびワクチン組成物をそれぞれ製造するのに使用される。ピリントタンパク質の例には、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)、ヘモフィルス・インフルエンゼ(Haemophilus influenzae)、ネイッセリア・メニンギチデイス(Neisseria meningitides)、ネイッセリア・ゴノロエアエ(Neisseria gonorrhoeae)、カウロバクター・クレセンタス(Caulobacter crescentus)、シュードモナス・スツツェリ(Pseudomonas stutzeri)、およびシュードモナス・アエルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)により産生されるピリンがある。本発明による使用に適切なピリントタンパク質のアミノ酸配列は、GenBank報告AJ000636、AJ132364、AF229646、AF051814、AF051815およびX00981に示されたものを含み、それらについては出典明示で援用する。

20

【0115】

細菌性ピリントタンパク質は、一般に、プロセッシングにより、細菌ペリプラズムへのタンパク質輸送に先行してN-末端先端配列が除去される。さらに、当業者が認識しているように、本発明の組成物およびワクチン組成物をそれぞれ製造するのに使用される細菌性ピリントタンパク質は、一般的に天然に存在する先端配列を有しない。

30

【0116】

本発明での使用に適切なピリントタンパク質の一具体例は、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)のP-ピリン(GenBank報告AF237482(配列番号1))である。本発明での使用に適切な1型エシェリキア・コリ(Escherichia coli)ピリンの一例は、GenBank報告P04128(配列番号2)に示されたアミノ酸配列を有するピリンであり、これはGenBank報告M27603(配列番号3)に示されたヌクレオチド配列を有する核酸によりコード化される。これらのGenBank報告の全開示については、出典明示で援用する。また、上記参照タンパク質の成熟形態は、一般的に本発明の組成物およびワクチン組成物をそれぞれ製造するのに使用される。

40

【0117】

本発明の実践における使用に適切な細菌性ピリンまたはピリン小部分は、一般に会合することにより規則正しい反復性抗原アレイを形成することができる。

【0118】

線毛および線毛様構造のインビトロ製造方法は、当業界では公知である。たとえば、Bullitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12890-12895 (1996)は、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)P-線毛サブユニットのインビトロ再構成について報告し

50

ている。さらに、Eshdat et al., J. Bacteriol. 148:308 - 314 (1981) は、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) の 1 型線毛の適切な解離方法および線毛の再構成について記載している。簡単に述べると、これらの方法は以下の通りである：飽和グアニジン塩酸塩中 37 でインキュベーションすることにより線毛を解離させる。次いで、ピリントタンパク質をクロマトグラフィーにより精製した後、5 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩 (pH 8.0) に対する透析によりピリン二量体が形成される。Eshdat et al. はまた、5 mM の $MgCl_2$ を含む 5 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (pH 8.0) に対して透析すると、ピリン二量体が再集合して線毛を形成することを見出した。

【0119】

10

さらに、たとえば、慣用的遺伝子工学およびタンパク質修飾方法を用いることにより、ピリントタンパク質は、抗原または抗原決定基が第二付着部位を介して結合する第一付着部位を含むように修飾され得る。別法として、抗原または抗原決定基は、第二付着部位を通じてこれらのタンパク質に天然に内在するアミノ酸残基に直接結合され得る。次いで、これらの修飾ピリントタンパク質は、本発明のワクチン組成物で使用され得る。

【0120】

本発明の組成物およびワクチン組成物をそれぞれ製造するのに使用される細菌性ピリントタンパク質は、HBcAg について本明細書に記載したのと同様の方法で修飾され得る。たとえば、システインおよびリシン残基は、欠失または他のアミノ酸残基により置換され得、第一付着部位がこれらのタンパク質に付加され得る。さらに、ピリントタンパク質は、修飾形態で発現されるかまたは発現後化学的に修飾され得る。同様に、無傷の線毛は、細菌から採取され、次いで化学的に修飾され得る。

20

【0121】

別の実施態様では、線毛または線毛様構造を細菌 (例、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)) から採取し、本発明の組成物およびワクチン組成物の形成に使用する。組成物およびワクチン組成物の製造に適切な線毛の一例は、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) の 1 型線毛であり、これは配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有するピリンモノマーから形成される。

【0122】

若干の細菌性線毛の採取方法が当業界では公知である。たとえば、Bullitt および Makowski (Biophys. J. 74:623 - 632 (1998)) は、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) から P - 線毛を採取するための線毛精製方法について報告している。この方法によると、P - 線毛プラスミドを含む過剰線毛エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) から線毛をせん断し、可溶化および $MgCl_2$ (1.0 M) 沈澱のサイクルにより精製する。

30

【0123】

一旦採取されると、線毛または線毛様構造は、様々な方法で修飾され得る。たとえば、第一付着部位は、抗原または抗原決定基が第二付着部位を通じて付着され得る線毛に付加され得る。言い換えれば、細菌性線毛または線毛構造を採取し、修飾することにより、規則正しい反復性抗原アレイが誘導され得る。

【0124】

40

抗原または抗原決定基は、線毛または線毛構造に天然に存するシステイン残基またはリシン残基に結合され得る。かかる場合、天然アミノ酸残基の高度に規則正しい反復性により、線毛または線毛様構造への抗原または抗原決定基のカップリングが誘導される。たとえば、線毛または線毛様構造は、ヘテロ二官能性架橋剤を用いることにより、抗原または抗原決定基の第二付着部位に結合され得る。

【0125】

生物体により自然に合成される構造 (例、線毛) を用いて本発明の組成物およびワクチン組成物を製造するとき、これらの生物体が望ましい特徴を有する構造を生じるようにそれらに遺伝子操作を加えるのが有利な場合が多い。たとえば、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) の 1 型線毛を使用するとき、これらの線毛が採取されるエシェリキア・コ

50

リ (Escherichia coli) に修飾を加えることにより、特定の特徴をもつ構造が生成され得る。ピリントタンパク質の可能な修飾の例には、1個またはそれ以上のリシン残基の挿入、1個またはそれ以上の天然に存するリシン残基の欠失または置換、および1個またはそれ以上の天然に存するシステイン残基の欠失または置換 (例、配列番号2における44および84位のシステイン残基) がある。

【0126】

さらに、ピリン遺伝子に追加修飾を加えることにより、リシン残基以外の第一付着部位 (例、FOSまたはJUNドメイン) を含む発現産物が生成され得る。勿論、適切な第一付着部位は、一般的に、ピリントタンパク質が、本発明ワクチン組成物での使用に適切な線毛または線毛様構造を形成するのを妨げるものではないものに限られている。

10

【0127】

細菌細胞に天然に内在するピリン遺伝子は、インピボで修飾され得る (例、相同的組換えによる) かまたは特定の特徴をもつピリン遺伝子がこれらの細胞に挿入され得る。たとえば、ピリン遺伝子は、複製可能なクローニングベクターまたは細菌染色体へ挿入されるベクターの成分として細菌細胞へ導入され得る。挿入されたピリン遺伝子はまた、発現調節制御配列 (例、lacオペレーター) に結合され得る。

【0128】

たいていの場合、本発明の組成物およびワクチン組成物においてそれぞれ使用される線毛または線毛様構造は、単一型のピリンサブユニットにより構成される。同一サブユニットにより構成される線毛または線毛様構造は、高度に規則正しい反復性抗原アレイを呈する構造を形成することが予測されることから、一般的に使用される。

20

【0129】

しかしながら、本発明組成物はまた、異種ピリンサブユニットから形成された線毛または線毛様構造を含む組成物およびワクチンを含む。これらの線毛または線毛様構造を形成するピリンサブユニットは、細菌細胞に天然に内在する遺伝子から発現され得るかまたは細胞へ導入され得る。天然に内在するピリン遺伝子および導入された遺伝子が両方とも、線毛または線毛様構造を形成する細胞で発現されるとき、一般的にこれらのピリントタンパク質の混合物から形成される構造となる。さらに、2種またはそれ以上のピリン遺伝子が細菌細胞で発現されるとき、各ピリン遺伝子の相対的発現性が、典型的には線毛または線毛様構造における種々のピリンサブユニットの比率を決定する因子である。

30

【0130】

混合ピリンサブユニットの特定組成を有する線毛または線毛様構造が所望されるとき、ピリン遺伝子の少なくとも1種の発現は、異種誘導性プロモーターにより調節され得る。上記プロモーター、ならびに他の遺伝子エレメントは、細菌細胞で製造される種々のピリンサブユニットの相対量、すなわち線毛または線毛様構造の組成を調節するのに使用され得る。

【0131】

さらに、抗原または抗原決定基は、ペプチド結合ではない結合により細菌線毛または線毛様構造に結合され得、本発明組成物で使用される線毛または線毛様構造を生成する細菌細胞は、遺伝子操作を加えられることにより、抗原または抗原決定基に融合されるピリントタンパク質を生成し得る。線毛または線毛様構造を形成する上記融合タンパク質は、本発明のワクチン組成物での使用に適切である。

40

【0132】

好ましい実施態様において、コア粒子は、ウイルス様粒子であり、ウイルス様粒子は組換え体ウイルス様粒子である。当業者であれば、組換えDNA技術および公的に容易に入手できるウイルスコーディング配列を用いてVLPを製造することは可能である。たとえば、ウイルスエンベロープまたはコアタンパク質のコーディング配列は、市販されているバキュロウイルス発現ベクターを用いて、ウイルスプロモーターの調節制御下、コーディング配列を調節配列に機能し得るように結合させ得る適切な修飾を配列に加えることにより、バキュロウイルス発現ベクターでの発現用に遺伝子操作され得る。ウイルスエンベロ

50

ープまたはコアタンパク質のコーディング配列はまた、たとえば細菌発現ベクターでの発現用に遺伝子操作され得る。

【0133】

VLPの例には、B型肝炎ウイルス(Ulrich, et al., Virus Res. 50:141-182 (1998))、麻疹ウイルス(Warnes, et al., Gene 160:173-178 (1995))、シンドビスウイルス、ロタウイルス(米国特許第5071651号および米国特許第5374426号)、口蹄疫ウイルス(Twomey, et al., Vaccine 13:1603-1610, (1995))、ノーウォークウイルス(Jiang, X., et al., Science 250:1580-1583 (1990); Matsui, S.M., et al., J. Clin. Invest. 87:1456-1461 (1991))のキャプシドタンパク質、レトロウイルスGAGタンパク質(国際公開第96/30523号)、レトロトランスポゾンTyタンパク質p1、B型肝炎ウイルスの表面タンパク質(国際公開第92/11291号)、ヒト乳頭腫ウイルス(国際公開第98/15631号)、RNAファージ、Ty、fr-ファージ、GA-ファージ、AP205-ファージおよびQ-ファージがあるが、これらに限定されるわけではない。

10

【0134】

当業者には容易に理解できることであるが、本発明のVLPが特定形態に限定されることはない。粒子は化学的に、または生物学的過程を通して合成され得、天然の場合も非天然の場合もあり得る。例として、このタイプの具体例にはウイルス様粒子またはその組換え形態がある。

【0135】

さらなる実施態様において、VLPは、組換えポリペプチド、またはそのフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成され得、それらはロタウイルスの組換えポリペプチド、ノーウォークウイルスの組換えポリペプチド、アルファルイスの組換えポリペプチド、口蹄疫ウイルスの組換えポリペプチド、麻疹ウイルスの組換えポリペプチド、シンドビスウイルスの組換えポリペプチド、ポリオマウイルスの組換えポリペプチド、レトロウイルスの組換えポリペプチド、B型肝炎ウイルスの組換えポリペプチド(例、HBcAg)、タバコモザイクウイルスの組換えポリペプチド、フロックハウスウイルスの組換えポリペプチド、ヒト乳頭腫ウイルスの組換えポリペプチド、バクテリオファージの組換えポリペプチド、RNAファージの組換えポリペプチド、Tyの組換えポリペプチド、fr-ファージの組換えポリペプチド、GA-ファージの組換えポリペプチドおよびQ-ファージの組換えポリペプチドから選択される。さらに、ウイルス様粒子は、上記ポリペプチドおよび上記ポリペプチドの変異型の1個またはそれ以上のフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成され得る。ポリペプチドの変異型は、それらの野生型対応物と、たとえば、アミノ酸レベルで少なくとも80%、85%、90%、95%、97%または99%の同一性を共有し得る。

20

30

【0136】

好ましい態様において、ウイルス様粒子は、RNA-ファージの組換えタンパク質またはそのフラグメントを含むか、本質的にそれらにより構成されるか、またはそれらにより構成される。好ましくは、RNA-ファージは、a)バクテリオファージQ、b)バクテリオファージR17、c)バクテリオファージfr、d)バクテリオファージGA、e)バクテリオファージSP、f)バクテリオファージMS2、g)バクテリオファージM11、h)バクテリオファージMX1、i)バクテリオファージNL95、k)バクテリオファージf2、l)バクテリオファージPP7、およびm)バクテリオファージAP205から成る群から選択される。

40

【0137】

本発明の別の好ましい実施態様では、ウイルス様粒子は、RNA-バクテリオファージQまたはRNA-バクテリオファージfrまたはRNA-バクテリオファージAP205の組換えタンパク質またはそのフラグメントを含むか、それらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成される。

50

【 0 1 3 8 】

本発明のさらに好ましい実施態様では、組換えタンパク質は、RNAファージのコートタンパク質を含むか、それらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成される。

【 0 1 3 9 】

したがって、キャプシドまたはVLPを形成するRNA-ファージコートタンパク質、またはキャプシドまたはVLPへの自己集合と適合し得るバクテリオファージコートタンパク質のフラグメントは、本発明のさらに好ましい実施態様である。たとえば、バクテリオファージQ コートタンパク質は、エシェリキア・コリ(E.coli)において組換え技法により発現され得る。さらに、上記発現時、これらのタンパク質は自発的にキャプシドを形成する。さらに、これらのキャプシドは、固有の反復構成をもつ構造を形成する。

【 0 1 4 0 】

本発明組成物の製造に使用され得るバクテリオファージコートタンパク質の特に好ましい例には、RNAバクテリオファージ、たとえばバクテリオファージQ (配列番号4; PIRデータベース、Q CPと称される受入番号VCBPQ および配列番号5; Q A1タンパク質と称される受入番号AAA16663)、バクテリオファージR17 (配列番号6; PIR受入番号VCBPR7)、バクテリオファージfr (配列番号7; PIR受入番号VCBPR7)、バクテリオファージGA (配列番号8; GenBank受入番号NP-040754)、バクテリオファージSP (配列番号9; SP CPと称されるGenBank受入番号CAA30374、および配列番号10; SPA1タンパク質と称される受入番号NP695026)、バクテリオファージMS2 (配列番号11; PIR受入番号VCBPM2)、バクテリオファージM11 (配列番号12; GenBank受入番号AAC06250)、バクテリオファージMX1 (配列番号13; GenBank受入番号AAC14699)、バクテリオファージNL95 (配列番号14; GenBank受入番号AAC14704)、バクテリオファージf2 (配列番号15; GenBank受入番号P03611)、バクテリオファージPP7 (配列番号16)、およびバクテリオファージAP205 (配列番号28)のコートタンパク質がある。さらに、バクテリオファージQ (配列番号5)のA1タンパク質またはそのC-末端から100、150または180ものアミノ酸を失ったC末端切頭化(truncated)も、Q コートタンパク質のキャプシド集合に組込まれ得る。一般的に、キャプシド集合におけるQ CPに対するQ A1タンパク質のパーセントは、キャプシド形成を確実にするために制限される。

【 0 1 4 1 】

Q コートタンパク質はまた、エシェリキア・コリ(E.coli)で発現されたときキャプシドに自己集合することが見出された(Kozlovskaya et al., GENE 137: 133-137 (1993))。得られたキャプシドまたはウイルス様粒子は、直径25nmおよびT=3準対称である二十面体ファージ様キャプシド構造を示した。さらに、ファージQ の結晶構造が解明された。キャプシドは180コピーのコートタンパク質を含み、それらはジスルフィド架橋により共有結合五量体および六量体で結合されており(Golmohammadi, R. et al., Structure 4: 543-5554 (1996))、Q コートタンパク質のキャプシドの著しい安定性が導かれる。しかしながら、組換えQ コートタンパク質から生成されたキャプシドまたはVLPは、キャプシド内の他のサブユニットへジスルフィド結合によって結合されていないかまたは結合が不完全であるサブユニットを含み得る。しかしながら、典型的には、約80%を越えるサブユニットは、VLP内でジスルフィド架橋により互いに結合されている。すなわち、Q キャプシドを非還元的SDS-PAGEにローディングすると、モノマーQ コートタンパク質に対応する帯およびQ コートタンパク質の六量体または五量体に対応する帯が見られる。不完全ジスルフィド結合サブユニットは、非還元的SDS-PAGEにおいて二量体、三量体または場合によっては四量体の帯として現われ得る。Q キャプシドタンパク質はまた、有機溶媒および変性剤に対して異常な抵抗性を示す。驚くべきことに、我々は、30%もの高いDMSOおよびアセトニトリル濃度ならびに

10

20

30

40

50

1 Mもの高いグアニジニウム濃度でもキャプシドの安定性は影響されないことを観察した。Q コートタンパク質のキャプシドの高い安定性は、特に、本発明による哺乳類およびヒトの免疫化およびワクチン接種での使用にとって有利な特徴である。

【0142】

我々が、Stoll, E. et al. J. Biol. Chem. 252:990-993 (1977)に記載されたN - 末端エドマン配列決定法により観察したところによると、エシェリキア・コリ (E.coli) での発現時、Q コートタンパク質のN - 末端メチオニンは通常除去される。N - 末端メチオニンが除去されていないQ コートタンパク質から構成されるVLP、またはN - 末端メチオニンが開裂されているかまたは存在するQ コートタンパク質の混合物を含むVLPもまた、本発明の範囲内に含まれる。

10

【0143】

本発明による、RNA - フェージ、特にQ のさらに好ましいウイルス様粒子は、国際公開第02/056905号に開示しており、それについては出典明示で援用する。

【0144】

また、さらなるRNAフェージコートタンパク質もまた、細菌宿主での発現時に自己集合することが示された(Kastelein, RA. et al., Gene 23: 245-254 (1983), Kozlovskaya, TM. et al., Dokl. Akad. Nauk SSSR 287: 452-455 (1986), Adhin, MR. et al., Virology 170: 238-242 (1989), Ni, CZ., et al., Protein Sci. 5: 2485-2493 (1996), Priano, C. et al., J. Mol. Biol. 249: 283-297 (1995))。Q フェージキャプシドは、コートタンパク質に加えて、いわゆるリードスルータンパク質A1および成熟タンパク質A2を含む。A1は、UGA停止コドンでの-suppressionにより生成され、329aaの長さを有する。本発明で使用されるフェージQ 組換えコートタンパク質のキャプシドは、A2溶菌タンパク質を欠き、宿主からのRNAを含む。RNAフェージのコートタンパク質は、RNA結合タンパク質であり、ウイルスのライフサイクルの間翻訳リプレッサーとして作用するレプリカーゼ遺伝子のリボソーム結合部位のステムループと相互作用する。相互作用の配列および構造エレメントは既知である(Witherell, GW. & Uhlenbeck, OC. Biochemistry 28: 71-76 (1989); Lim F. et al., J. Biol. Chem. 271: 31839-31845 (1996))。一般にステムループおよびRNAは、ウイルス集合に関与していることが知られている(Golmohammadi, R. et al., Structure 4: 543-5554 (1996))。

20

30

【0145】

本発明のさらに好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、RNA - フェージの組換えタンパク質またはそのフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されており、それらの組換えタンパク質は、RNA - フェージの突然変異コートタンパク質、好ましくは上記RNA - フェージの突然変異コートタンパク質を含むか、それらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成される。別の好ましい実施態様において、RNAフェージの突然変異コートタンパク質は、置換による少なくとも1個または少なくとも2個のリシン残基の除去により、または置換による少なくとも1個のリシン残基の付加により修飾されている。別法として、RNAフェージの突然変異コートタンパク質は、少なくとも1個または少なくとも2個のリシン残基の欠失により、または挿入による少なくとも1個のリシン残基の付加により修飾されている。少なくとも1個のリシン残基の欠失、置換または付加により、カップリングの度合、すなわちRNA - フェージのVLPのサブユニットについてのA1 - 6ペプチドの量が、特にワクチンの必要条件とマッチし、適合するように変えられ得る。

40

【0146】

別の好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、RNA - バクテリオフェージQの組換えタンパク質またはそのフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されており、それらの組換えタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列を有するコートタンパク質、または配列番号4および配列番号5のアミノ酸配列または配列番号5の突然変異体を有するコートタンパク質の混合物を含むか、そ

50

れらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されており、N - 末端メチオンは好ましくは開裂されている。

【0147】

本発明のさらに好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、Q の組換えタンパク質またはそのフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されており、それらの組換えタンパク質は、突然変異体Q コートタンパク質を含むか、それらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成される。別の好ましい実施態様において、これらの突然変異コートタンパク質は、置換による少なくとも1個のリシン残基の除去により、または置換による少なくとも1個のリシン残基の付加により修飾されている。別法として、これらの突然変異コートタンパク質は、少なくとも1個のリシン残基の欠失により、または挿入による少なくとも1個のリシン残基の付加により修飾されている。

10

【0148】

4個のリシン残基がQ コートタンパク質のキャプシド表面において露出されている。露出されたリシン残基がアルギニンにより置換されているQ 突然変異体もまた本発明に使用され得る。すなわち、以下のQ コートタンパク質突然変異体および突然変異体Q V L P が本発明の実践に際し使用され得る：「Q -240」(Lys13-Arg; 配列番号:17)、「Q -243」(Asn 10-Lys; 配列番号:18)、「Q -250」(Lys 2-Arg, Lys13-Arg; 配列番号:19)、「Q -251」(配列番号:20)および「Q -259」(Lys 2-Arg, Lys16-Arg; 配列番号:21)。すなわち、本発明のさらなる好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、突然変異体Q コートタンパク質の組換えタンパク質を含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されており、a) 配列番号17のアミノ酸配列、b) 配列番号18のアミノ酸配列、c) 配列番号19のアミノ酸配列、d) 配列番号20のアミノ酸配列、およびe) 配列番号21のアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質が含まれる。上記で示したQ コートタンパク質、突然変異体Q コートタンパク質V L P およびキャプシドのそれぞれの構築、発現および精製は、国際公開第02/056905号に記載されている。特にここでは上記出願の実施例18を引用する。

20

【0149】

本発明のさらなる好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、Q の組換えタンパク質またはそのフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されており、それらの組換えタンパク質は、前記Q 突然変異体および対応するA1タンパク質にいずれか一方の混合物を含むか、それらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成される。

30

【0150】

本発明のさらなる好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、RNA - ファージA P 2 0 5 の組換えタンパク質またはそのフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されている。

【0151】

A P 2 0 5 ゲノムは、成熟タンパク質、コートタンパク質、レプリカーゼおよび関連ファージには存在しない2つの読み枠により構成され、溶菌遺伝子および読み枠は成熟遺伝子の翻訳においてある一定の役割を演じる(Klovins, J., et al., J. Gen. Virol. 83: 1523-33 (2002))。A P 2 0 5 コートタンパク質は、p Q b 1 0 (Kozlovskaya, T. M., et al., Gene 137:133-37 (1993))の誘導体であり、A P 2 0 5 リボソーム結合部位を含む、プラスミドp A P 2 8 3 - 5 8 (配列番号27)から発現され得る。別法として、A P 2 0 5 コートタンパク質は、ベクターに存在するリボソーム結合部位の下流でp Q b 1 8 5 ヘクローン化され得る。同時係属中の「分子抗原アレイ」と題する2002年7月17日付の米国仮特許出願(代理人処理番号1700.0310000)に記載されている通り(これについては出典明示で援用する)、両方法ともタンパク質の発現およびキャプシドの形成を誘導する。ベクターp Q b 1 0 およびp Q b 1 8 5 は、p G E Mベクター

40

50

から誘導されるベクターであり、これらのベクターでクローン化された遺伝子の発現は、*trp* プロモーターにより制御される (Kozlovskaja, T. M. et al., Gene 137:133-37 (1993))。プラスミド pAP283-58 (配列番号27) は、AP205 コートタンパク質の XbaI 部位の下流であり、ATG 開始コドンの上流に近接している以下の配列において推定 AP205 リボソーム結合部位を含む: tctagaATTTTCTGCGCACCCAT CCCGGGTGGC GCCCAAAGTGAGGAAAATCACatg (配列番号57)。ベクター pQb185 は、XbaI 部位から下流および開始コドンの上流に シャイン - ダルガルノ 配列を含む (tctagaTTAACCCAACGC GTAGGAG TCAGGCCatg (配列番号58)、シャイン - ダルガルノ 配列は下線部)。

【0152】

本発明のさらなる好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、RNA - フェージ AP205 の組換えコートタンパク質またはそのフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されている。

10

【0153】

すなわち、本発明のこの好ましい実施態様は、キャプシドを形成する AP205 コートタンパク質を含む。上記タンパク質は組換え技法により発現されるか、または天然供給源から製造される。電子顕微鏡 (EM) および免疫拡散法により立証されているところによると、細菌で産生される AP205 コートタンパク質は自発的にキャプシドを形成する。AP205 コートタンパク質 (配列番号28) により形成されるキャプシドおよび AP205 RNA フェージのコートタンパク質により形成されるキャプシドの構造特性は、EM で見たときほとんど区別がつかない。AP205 VLP は、高免疫原性であり、抗原および/または抗原決定基と結合されることにより、反復的な形で配向された抗原および/または抗原決定基を呈示するワクチン構築物を生成させ得る。かくして呈示された抗原に対して高い力価が誘発されることから、結合された抗原および/または抗原決定基は抗体分子との相互作用に向けて接近し得、免疫原性であることが示されている。

20

【0154】

本発明のさらなる好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、RNA - フェージ AP205 の組換え突然変異コートタンパク質またはそのフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されている。

【0155】

5 位アミノ酸のプロリンからトレオニンへの置換を伴う AP205 コートタンパク質 (配列番号29) を含む、AP205 VLP の集合適格性突然変異形態もまた、本発明の実践に際し使用され得、本発明のさらなる好ましい態様を導く。これらの VLP、天然供給源に由来する AP205 VLP、または AP205 ウイルス粒子は、抗原に結合することにより、本発明による抗原の規則正しい反復性アレイを生成させ得る。

30

【0156】

AP205 P5 - T 突然変異コートタンパク質は、pQb185 から直接誘導され、Q コートタンパク質遺伝子の代わりに突然変異 AP205 コートタンパク質遺伝子を含む、プラスミド pAP281-32 (配列番号30) から発現され得る。AP205 コートタンパク質発現用ベクターは、エシェリキア・コリ (*E. coli*) ヘトランスフェクションされることにより、AP205 コートタンパク質を発現させる。

40

【0157】

VLP への自己集合を誘導する、コートタンパク質および突然変異コートタンパク質のそれぞれの発現方法は、実施例1に記載されている。適切なエシェリキア・コリ (*E. coli*) 株には、限定されるわけではないが、エシェリキア・コリ (*E. coli*) K802、JM109、RR1 がある。適切なベクターおよび株およびそれらの組合せは、SDS - PAGE によりコートタンパク質および突然変異コートタンパク質のそれぞれの発現を、および所望によりまずキャプシドをゲル濾過で精製することによりキャプシド形成および集合を試験し、それに続いてそれらを免疫拡散検定法 (オクタロニー試験) または電子顕微鏡で試験することにより同定され得る (Kozlovskaja, T. M. et al., Gene 137:133-37 (1993))。

50

【 0 1 5 8 】

ベクター p A P 2 8 3 - 5 8 および p A P 2 8 1 - 3 2 から発現された A P 2 0 5 コートタンパク質は、エシェリキア・コリ (E.coli) の細胞質におけるプロセッシング故に、最初のメチオニンアミノ酸を欠き得る。A P 2 0 5 V L P の開裂、非開裂形態またはそれらの混合物も、本発明のさらなる好ましい実施態様である。

【 0 1 5 9 】

本発明のさらなる好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、RNA - ファージ A P 2 0 5 の組換えコートタンパク質またはそのフラグメントおよび RNA - ファージ A P 2 0 5 の組換え突然変異コートタンパク質またはそのフラグメントの混合物を含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されている。

10

【 0 1 6 0 】

本発明のさらなる好ましい実施態様において、ウイルス様粒子は、RNA - ファージ A P 2 0 5 の組換えコートタンパク質または組換え突然変異コートタンパク質のフラグメントを含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されている。

【 0 1 6 1 】

V L P およびキャプシドへそれぞれ集合し得る組換え A P 2 0 5 コートタンパク質フラグメントもまた、本発明の実施において有用である。これらのフラグメントは、コートタンパク質および突然変異コートタンパク質のそれぞれの内部または末端での欠失により生成され得る。コートタンパク質および突然変異コートタンパク質配列における挿入または

20

【 0 1 6 2 】

A P 2 0 5 コートタンパク質、コートタンパク質フラグメントおよび上記キメラコートタンパク質により形成される粒子は、沈澱による分画工程およびたとえばセファロース C L - 4 B、セファロース C L - 2 B、セファロース C L - 6 B カラムおよびそれらの組合せを用いたゲル濾過による精製工程の組合せにより純粋形態で単離され得る。ウイルス様

30

【 0 1 6 3 】

幾つかの RNA バクテリオファージの結晶構造が決定されている (Golmohammadi, R. et al., Structure 4:543-554 (1996))。上記情報を用いることにより、表面露出残基が同定され得るため、1個またはそれ以上の反応性アミノ酸残基が挿入または置換により挿入され得るように RNA - ファージコートタンパク質が修飾され得る。その結果として、バクテリオファージコートタンパク質の上記修飾形態もまた本発明に使用され得る。すなわち、キャプシドまたはキャプシド様構造を形成するタンパク質の変異型 (例、バクテリオファージ Q、バクテリオファージ R 1 7、バクテリオファージ f r、バクテリオファージ G A、バクテリオファージ S P、バクテリオファージ A P 2 0 5 およびバクテリオファージ M S 2 のコートタンパク質) もまた、本発明組成物の製造に使用され得る。

40

【 0 1 6 4 】

上記で検討した変異型タンパク質の配列はそれらの野生型対応配列とは異なるが、これらの変異型タンパク質は、一般的にキャプシドまたはキャプシド様構造を形成する能力を保持している。すなわち、さらに本発明は、さらにキャプシドまたはキャプシド様構造を形成するタンパク質の変異型を含むそれぞれの組成物およびワクチン組成物、ならびに上記組成物およびワクチン組成物、上記組成物の製造に使用される個々のタンパク質サブユ

50

ニット、およびこれらのタンパク質サブユニットをコード化する核酸分子のそれぞれの製造方法を包含する。すなわち、キャプシドまたはキャプシド様構造を形成し、会合してキャプシドまたはキャプシド様構造を形成する能力を保持している野生型タンパク質の変異型も本発明の範囲内に含まれる。

【0165】

結果として、さらに本発明は、規則正しいアレイを形成し、固有の反復構造を有する野生型タンパク質と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されるタンパク質を含む組成物およびワクチン組成物をそれぞれ包含する。

【0166】

さらに、本発明組成物の製造に使用されるタンパク質をコード化する核酸分子も本発明の範囲内に含まれる。

【0167】

他の実施態様において、さらに本発明は、配列番号4~21に示されたアミノ酸配列のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されるタンパク質を含む組成物を包含する。

【0168】

また、本発明での使用に適切なタンパク質には、キャプシドまたはキャプシド様構造、またはVLPを形成するタンパク質のC-末端切頭化突然変異体も含まれる。上記切頭化突然変異体の具体例には、配列番号4~21のいずれかに示されたアミノ酸配列であって、1、2、5、7、9、10、12、14、15または17アミノ酸がC-末端から除去された配列を有するタンパク質が含まれる。典型的には、これらのC-末端切頭化突然変異体は、キャプシドまたはキャプシド様構造を形成する能力を保持している。

【0169】

また、本発明での使用に適切なさらなるタンパク質には、キャプシドまたはキャプシド様構造を形成するタンパク質のN-末端切頭化突然変異体も含まれる。上記切頭化突然変異体の具体例には、配列番号4~21のいずれかに示されたアミノ酸配列であって、1、2、5、7、9、10、12、14、15または17アミノ酸がN-末端から除去された配列を有するタンパク質が含まれる。典型的には、これらのN-末端切頭化突然変異体は、キャプシドまたはキャプシド様構造を形成する能力を保持している。

【0170】

本発明での使用に適切な追加的タンパク質には、キャプシドまたはキャプシド様構造を形成するN-およびC-末端切頭化突然変異体も含まれる。適切な切頭化突然変異体には、配列番号4~21のいずれかに示されたアミノ酸配列であって、1、2、5、7、9、10、12、14、15または17アミノ酸がN-末端から除去され、1、2、5、7、9、10、12、14、15または17アミノ酸がC-末端から除去された配列を有するタンパク質が含まれる。典型的には、これらのN-末端およびC-末端切頭化突然変異体は、キャプシドまたはキャプシド様構造を形成する能力を保持している。

【0171】

さらに本発明は、上記切頭化突然変異体と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されるタンパク質を含む組成物を包含する。

【0172】

すなわち本発明は、キャプシドまたはVLPを形成するタンパク質から製造された組成物およびワクチン組成物、個々のタンパク質サブユニットおよびVLPまたはキャプシドからこれらの組成物を製造する方法、これら個々のタンパク質サブユニットの製造方法、これらのサブユニットをコード化する核酸分子、およびこれらの本発明組成物を用いることによる個体におけるワクチン接種および/または免疫学的応答の誘発方法を包含する。

【0173】

10

20

30

40

50

前述の通り、本発明は、ウイルス様粒子またはその組換え形態を包含する。さらなる好ましい実施態様において、本発明組成物で使用される粒子は、B型肝炎コアタンパク質(HBcAg)またはHBcAgのフラグメントにより構成される。さらなる実施態様において、本発明組成物で使用される粒子は、遊離システイン残基を除去またはその数を減らすべく修飾された、B型肝炎コアタンパク質(HBcAg)またはHBcAgタンパク質のフラグメントにより構成される。Zhou et al. (J. Virol. 66:5393 - 5398 (1992))は、天然に内在するシステイン残基を除去すべく修飾されたHBcAgが集合およびキャプシド形成能力を保持していることを立証した。すなわち、本発明組成物での使用に適切なVLPには、修飾HBcAgまたはそのフラグメントを含むものがあり、その場合天然に内在するシステイン残基の1個またはそれ以上が欠失または別のアミノ酸残基(例、セリン残基)により置換されている。

10

【0174】

HBcAgは、B型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のプロセッシングにより生成されるタンパク質である。HBcAgの若干のイソ型は既に同定されており、それらのアミノ酸配列は当業者には容易に入手できるものである。たいていの場合、本発明の組成物およびワクチン組成物は、それぞれHBcAgのプロセッシングされた形態(すなわち、B型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のN-末端先端配列が除去されたHBcAg)を用いて製造される。

【0175】

さらに、プロセッシングが行なわれない条件下で、HBcAgが製造されるとき、HBcAgは、一般的に「プロセッシングされた」形態で発現される。たとえば、細胞質へのタンパク質の発現を指令するエシェリキア・コリ(E.coli)発現系を本発明HBcAgの製造に使用するとき、これらのタンパク質は、一般的に、B型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のN-末端先端配列が存在しないように発現される。

20

【0176】

本発明に関して使用され得るB型肝炎ウイルス様粒子の製造は、たとえば、国際公開第00/32227号、特に実施例17~19および21~24、ならびに国際公開第01/85208号、特に実施例17~19、21~24、31~41、および国際公開第02/056905号に開示されている。最後に挙げた出願については、特に実施例23、24、31および51に示されている。3文書については全て明確に出典明示で援用する。

30

【0177】

本発明はまた、1個またはそれ以上の追加システイン残基を欠失または置換すべく修飾されたHBcAg変異型を包含する。遊離システイン残基が若干の化学的副反応に關与し得ることは、当業界では知られている。これらの副反応には、ジスルフィド交換、たとえば他の物質との組合せ治療において注射または形成される化学物質または代謝物との反応、または直接酸化およびUV光線への曝露時におけるヌクレオチドとの反応がある。すなわち、特にHBcAgが核酸と結合する強い傾向を有するという事実を考慮に入れると、毒性付加物が生成され得る。すなわち毒性付加物は様々な種の間で分配され、個々には各々低濃度で存在するが、一緒になったとき毒性レベルに達し得る。

40

【0178】

上記を考慮すると、天然に内在するシステイン残基を除去すべく修飾されたワクチン組成物においてHBcAgを使用する一つの利点は、抗原または抗原決定基が付着されるとき、毒性種が結合し得る部位が、数の上で低減化されるかまたは全体的に排除されることである。

【0179】

本発明の実施における使用に適切な若干の天然HBcAg変異型は既に同定されている。たとえば、Yuan et al., (J. Virol. 73:10122 - 10128 (1999))は、配列番号22における97位に対応する位置のイソロイシン残基が、ロイシン残基またはフェニルアラニン残基により置換された変異型について報告している。若干のHBcAg変異型および

50

幾つかのB型肝炎コア抗原前駆体変異型のアミノ酸配列は、GenBank レポート AAF121240, AF121239, X85297, X02496, X85305, X85303, AF151735, X85259, X85286, X85260, X85317, X85298, AF043593, M20706, X85295, X80925, X85284, X85275, X72702, X85291, X65258, X85302, M32138, X85293, X85315, U95551, X85256, X85316, X85296, AB033559, X59795, X85299, X85307, X65257, X85311, X85301 (配列番号:23), X85314, X85287, X85272, X85319, AB010289, X85285, AB010289, AF121242, M90520 (配列番号:24), P03153, AF110999, およびM95589に開示されており、各々出典明示により援用する。上記で挙げたB型肝炎コア抗原前駆体変異型の配列は、さらに国際公開第01/85208号、配列番号89~138に開示されている。これらのHBcAg変異型は、配列番号25における12, 13, 21, 22, 24, 29, 32, 33, 35, 38, 40, 42, 44, 45, 49, 51, 57, 58, 59, 64, 66, 67, 69, 74, 77, 80, 81, 87, 92, 93, 97, 98, 100, 103, 105, 106, 109, 113, 116, 121, 126, 130, 133, 135, 141, 147, 149, 157, 176, 178, 182 および 183 位に位置するアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を含む、若干の位置におけるアミノ酸配列が異なる。本発明組成物での使用に適切であり、本明細書の開示にしたがってさらに修飾され得るさらなるHBcAg変異型は、国際公開第00/198333号、国際公開第00/177158号および国際公開第00/214478号に記載されている。

10

【0180】

上記で示した通り、総じてプロセッシングされたHBcAg (すなわち、先導配列を欠くもの) は、本発明の組成物およびワクチン組成物のそれぞれで使用される。本発明は、上記変異型HBcAgを用いたワクチン組成物およびこれらの組成物の使用方法を包含する。

20

【0181】

ポリペプチドのアミノ酸配列が、上記野生型アミノ酸配列の一つと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%または99%同一であるアミノ酸配列またはその小部分を有するか否かは、好都合には公知コンピュータプログラム、たとえばBestfitプログラムを用いて測定され得る。特定配列が、たとえば、基準アミノ酸配列と95%同一であるか否かを測定するためにBestfitまたは他のいずれかの配列アラインメントプログラムを使用するとき、同一性パーセントが基準アミノ酸配列の全長にわたって算出され、そして基準配列におけるアミノ酸残基の総数の5%以下の相同性におけるギャップが許容されるようにパラメーターを設定する。

30

【0182】

上記で挙げたHBcAg変異型および前駆体のアミノ酸配列は、互いに比較的類似している。すなわち、配列番号25における特定位置に対応する位置に位置するHBcAg変異型のアミノ酸残基にとっての基準は、配列番号25で示されたアミノ酸配列におけるその位置に存在するアミノ酸残基をいう。これらのHBcAg変異型間における相同性は、たいていの場合哺乳類に感染するB型肝炎ウイルス間では十分に高いため、当業者が、配列番号25に示されたアミノ酸配列および特定HBcAg変異型のアミノ酸配列の両方を検討し、「対応する」アミノ酸残基を同定する上でほとんど困難は無い。さらに、配列番号24に示されたHBcAgアミノ酸配列は、ウッドチャックに感染するウイルスから誘導されたHBcAgのアミノ酸配列を示すもので、配列番号25に示されたアミノ酸配列を有するHBcAgと十分な相同性を有するため、3アミノ酸残基挿入体が、配列番号25において、配列番号25のアミノ酸残基155および156間に存在することは容易に理解できることである。

40

【0183】

本発明はまた、鳥類に感染するB型肝炎ウイルスのHBcAg変異型を含むワクチン組成物、ならびにこれらのHBcAg変異型のフラグメントを含むワクチン組成物を包含する。これらのHBcAg変異型については、これらのポリペプチドに天然に存在するシステイン残基の1個、2個、3個またはそれ以上が、本発明ワクチン組成物における含有前に別のアミノ酸残基により置換されるか、または欠失され得る。

【0184】

50

上記で検討した通り、遊離システイン残基の排除により、毒性成分がHBcAgに結合し得る部位の数が低減化され、また同一または近隣HBcAg分子のリシンおよびシステイン残基の架橋が形成され得る部位が排除される。したがって、本発明の別の実施態様では、B型肝炎ウイルス capsid タンパク質の1個またはそれ以上のシステイン残基が欠失または別のアミノ酸残基により置換されている。

【0185】

他の実施態様において、本発明の組成物およびワクチン組成物は、それぞれC-末端領域(例、配列番号25のアミノ酸残基145-185または150-185)が除去されたHBcAgを含有する。すなわち、本発明の実施における使用に適切な追加的修飾HBcAgには、C-末端切頭化突然変異体が含まれる。適切な切頭化突然変異体には、1、5、10、15、20、25、30、34、35アミノ酸がC-末端から除去されたHBcAgがある。

10

【0186】

また、本発明の実施における使用に適切なHBcAgには、N-末端切頭化突然変異体が含まれる。適切な切頭化突然変異体には、1、2、5、7、9、10、12、14、15または17アミノ酸がN-末端から除去された修飾HBcAgが含まれる。

【0187】

本発明の実施における使用に適切なさらなるHBcAgには、N-およびC-末端切頭化突然変異体が含まれる。適切な切頭化突然変異体には、1、2、5、7、9、10、12、14、15または17アミノ酸がN-末端から除去され、そして1、5、10、15、20、25、30、34、35アミノ酸がC-末端から除去されたHBcAgが含まれる。

20

【0188】

さらに本発明は、上記切頭化突然変異体と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれらにより本質的に構成されるか、またはそれらにより構成されるHBcAgポリペプチドを含む、組成物およびワクチン組成物をそれぞれ含む。

【0189】

本発明のある種の実施態様では、リシン残基をHBcAgポリペプチドへ導入することにより、HBcAgのVLPへのA1-6ペプチドの結合に介在させる。好ましい実施態様では、本発明組成物は、配列番号25のアミノ酸1-144、または1-149、1-185を含むかまたはそれらにより構成されるHBcAgにより製造され、このHBcAgには、79および80位に対応するアミノ酸を、Gly-Gly-Lys-Gly-Gly(配列番号33)のアミノ酸配列を有するペプチドにより置換する修飾が加えられており、その結果、配列番号26に示された配列を有するHBcAgポリペプチドが生成される。これらの組成物は、抗原決定基がHBcAgのVLPにカップリングされているそれらの実施態様においては特に有用である。さらなる好ましい実施態様では、配列番号25の48および107位にあるシステイン残基をセリンに突然変異させている。さらに本発明は、上記で示したアミノ酸改変を有する上記で挙げたB型肝炎コア抗原前駆体変異型のいずれかで示されたアミノ酸配列を有する対応するポリペプチドを含む組成物を包含する。さらに、会合することにより、capsidまたはVLPを形成し得、上記で示したアミノ酸改変を有する追加的HBcAg変異型も本発明の範囲内に包含される。すなわち、さらに本発明は、野生型アミノ酸配列のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%または99%同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそれらにより構成されるHBcAgポリペプチド、および適切な場合プロセッシングされることにより、N-末端先端配列が除去され、上記で示した改変により修飾されたこれらのタンパク質形態を含む組成物およびワクチン組成物をそれぞれ包含する。

30

40

【0190】

本発明の組成物またはワクチン組成物は、異なるHBcAgの混合物を含み得る。すなわち、これらのワクチン組成物は、アミノ酸配列が異なるHBcAgにより構成され得る

50

。たとえば、「野生型」HBcAgおよび1個またはそれ以上のアミノ酸残基が改変（例、欠失、挿入または置換）された修飾HBcAgを含むワクチン組成物が製造され得る。さらに、本発明の好ましいワクチン組成物は、高度に規則正しい反復性抗原アレイを提示し、その抗原がA 1 - 6ペプチドであるものである。

【0191】

本発明のさらなる好ましい実施態様において、少なくとも一A 1 - 6ペプチドが、少なくとも1個の共有結合により上記ウイルス様粒子およびコア粒子にそれぞれ結合されている。好ましくは、少なくとも一A 1 - 6ペプチドは、少なくとも1個の共有結合によりウイルス様粒子およびコア粒子にそれぞれ結合されており、上記共有結合は、A 1 - 6ペプチドアレイおよびA 1 - 6ペプチド - VLPコンジュゲートをそれぞれもたらす非ペプチド結合である。少なくとも一A 1 - 6ペプチドはVLPおよびコア粒子にそれぞれ一定の配向で結合されているため、このA 1 - 6ペプチドアレイおよびコンジュゲートはそれぞれ、典型的にそして好ましくは反復性の規則正しい構造を有する。以下の記載から明らかなように、反復性の規則正しいA 1 - 6ペプチド - VLPアレイおよびコンジュゲートのそれぞれの形成は、VLPおよびコア粒子のそれぞれへ少なくとも一A 1 - 6ペプチドを一定の配向および指向で限定させた形でそれぞれ結合および付着させることにより確実にされる。さらに、VLPおよびコア粒子のそれぞれの典型的な固有の高度反復性組織化構造が、高度に規則正しい反復的な形でA 1 - 6ペプチドを提示するのに有利に働いており、それによって高度に組織化された反復性A 1 - 6ペプチド - VLPアレイおよびコンジュゲートがそれぞれ導かれる。

【0192】

したがって、好ましい本発明コンジュゲートおよびアレイはそれぞれ、それらの高度に組織化された構造、大きさ、およびアレイ表面における抗原の反復性の点で先行技術のコンジュゲートとは異なる。さらに、本発明の好ましい実施態様は、VLPの正確な折りたたみおよび集合を保証する発現宿主において粒子を発現させ、次いで抗原、すなわちA 1 - 6ペプチドをそこにさらにカップリングさせ得る。

【0193】

本発明は、VLPへのA 1 - 6ペプチドの結合方法を開示している。指摘された通り、本発明の一面では、A 1 - 6ペプチドを、化学的架橋により、典型的に、および好ましくはヘテロ二官能架橋剤を用いることによりVLPに結合させる。幾つかのヘテロ二官能架橋剤が当業界では知られている。好ましい実施態様において、ヘテロ二官能架橋剤は、好ましい第一付着部位、すなわちVLPまたは少なくとも1個のVLPサブユニットのリシン残基の側鎖アミノ基と反応し得る官能基、および好ましい第二付着部位、すなわちA 1 - 6ペプチドに融合され、また所望により還元により反応に利用可能にされていてもよいシステイン残基と反応し得るさらなる官能基を含む。典型的には誘導体化と呼ばれるこの手順の第一工程は、VLPと架橋剤との反応である。この反応の生成物は、活性化VLPであり、活性化担体とも呼ばれる。第二工程では、常法、たとえばゲル濾過または透析を用いて未反応架橋剤を除去する。第三工程では、A 1 - 6ペプチドを活性化VLPと反応させるが、この工程は一般にカップリング工程と呼ばれる。未反応A 1 - 6ペプチドは、所望によりたとえば透析による第四工程で除去され得る。幾つかのヘテロ二官能架橋剤が当業界では公知である。これらには、好ましい架橋剤SMPH（ピアス）、スルホ - MBS、スルホ - EMCS、スルホ - GMB S、スルホ - S I A B、スルホ - S M P B、スルホ - S M C C、S V S B、S I Aおよびたとえばピアス・ケミカル・カンパニー（ロックフォード、イリノイ、米国）から入手でき、アミノ基に向かって反応性を示す一官能基およびシステイン残基に向かって反応性を示す一官能基を有する他の架橋剤が含まれる。上記で挙げた架橋剤は全て、チオエーテル結合の形成を誘導する。本発明の実施において適切な別の種類の架橋剤は、カップリング時におけるA 1 - 6ペプチドおよびVLP間のジスルフィド結合の導入を特徴とする。この種類に属する好ましい架橋剤には、たとえばSPDPおよびスルホ - LC - SPDP（ピアス）がある。架橋剤によるVLPの誘導体化の程度は、実験条件、たとえば反応パートナーの各々の濃度、一試

薬の他試薬に対する過剰量、pH、温度およびイオン強度を変えることにより影響され得る。カップリングの度合、すなわちVLPのサブユニットに対するA 1 - 6ペプチドの量については、上記実験条件を変えて調節することにより、ワクチンの必要条件に適合させ得る。

【0194】

A 1 - 6ペプチドをVLPに結合させる特に好適な方法は、VLP表面にあるリシン残基とA 1 - 6ペプチド上のシステイン残基の結合である。実施態様によっては、VLPにカップリングさせるため、システイン残基を含むアミノ酸リンカーを第二付着部位またはその一部としてA 1 - 6に融合させることが要求される場合もあり得る。

【0195】

一般に、順応性のあるアミノ酸リンカーが有利である。アミノ酸リンカーの例は、(a) CGG; (b) N-末端 ガンマ 1-リンカー; (c) N-末端 ガンマ 3-リンカー; (d) Ig ヒンジ領域; (e) N-末端グリシンリンカー; (f) $(G)_kC(G)_n$ ただし $n = 0 \sim 12$ および $k = 0 \sim 5$ (配列番号34); (g) N-末端グリシン-セリンリンカー; (h) $(G)_kC(G)_m(S)_l(GGGGS)_n$ ただし $n = 0 \sim 3$, $k = 0 \sim 5$, $m = 0 \sim 10$, $l = 0 \sim 2$ (配列番号35); (i) GGC; (k) GGC-NH₂; (l) C-末端 ガンマ 1-リンカー; (m) C-末端 ガンマ 3 - リンカー; (n) C-末端グリシンリンカー; (o) $(G)_nC(G)_k$ ただし $n = 0 \sim 12$ および $k = 0 \sim 5$ (配列番号36); (p) C-末端グリシン - セリンリンカー; (q) $(G)_m(S)_l(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k$ ただし $n = 0 \sim 3$, $k = 0 \sim 5$, $m = 0 \sim 10$, $l = 0 \sim 2$, および $o = 0 \sim 8$ (配列番号37) から成る群から選択される。

【0196】

アミノ酸リンカーのさらなる例は、免疫グロブリンのヒンジ領域、グリシンセリンリンカー $(GGGGS)_n$ (配列番号38)、およびグリシンリンカー $(G)_n$ であり、それらは全てさらに第二付着部位としてのシステイン残基および所望によるさらなるグリシン残基を含む。上記アミノ酸リンカーの一般的に好ましい例は、N - 末端ガンマ1 : CGDKTHTSPP (配列番号39)、C - 末端ガンマ1 : DKTHTSPPCG (配列番号40)、N - 末端ガンマ3 : CGGPKPSTPPGSSGGAP (配列番号41)、C - 末端ガンマ3 : PKPSTPPGSSGGAPGGCG (配列番号42)、N - 末端グリシンリンカー : GCGGGG (配列番号43) および C - 末端グリシンリンカー : GGGGCG (配列番号44) である。

【0197】

本発明の実施に特に適切な他のアミノ酸リンカーは、疎水性A 1 - 6ペプチドがVLPに結合しているとき、CGKKGG (配列番号46)、またはN - 末端リンカーについてはCGDEGG (配列番号31)、またはC - 末端リンカーについてはGGKKGC (配列番号45) およびGGEDGC (配列番号32) である。C - 末端リンカーについては、末端システインは、所望によりC - 末端アミド化されていてもよい。

【0198】

本発明の好ましい実施態様では、ペプチドのC - 末端におけるGGCG (配列番号47)、GGCまたはGGC - NH₂ (「NH₂」はアミド化を表す) リンカーまたはそのN - 末端におけるCGGが、アミノ酸リンカーとしては好ましい。一般に、グリシン残基を、巨大アミノ酸および第二付着部位として使用されるシステイン間に挿入することにより、カップリング反応におけるより巨大なアミノ酸の立体障害の可能性を回避する。本発明の最も好ましい実施態様では、アミノ酸リンカーGGC - NH₂を、A 1 - 6のC - 末端に融合させる。

【0199】

A 1 - 6ペプチドに存在するシステイン残基は、その還元状態で活性化VLP上のヘテロ - 二官能架橋剤と反応しなければならず、すなわち、遊離システインまたは遊離スルフヒドリル基をもつシステイン残基が利用可能でなくてはならない。結合部位として機能すべきシステイン残基が酸化形である場合、たとえばそれがジスルフィド結合を形成している場合、たとえばDTT、TCEPまたは -メルカプトエタノールによるこのジスル

10

20

30

40

50

フィド架橋の還元が必要とされる。国際公開第02/056905号に記載されたところによると、低濃度の還元剤がカップリングと適合し得、当業者が知るところでは高い濃度はカップリング反応を阻害し、その場合、還元剤を除去するか、またはたとえば透析、ゲル濾過または逆相HPLCにより、その濃度をカップリング前に減少させなければならない。

【0200】

上記の好ましい方法にしたがってヘテロ-二官能架橋剤を用いてVLPへA₁₋₆ペプチドを結合させることにより、一定の配向でA₁₋₆ペプチドをVLPにカップリングさせ得る。VLPへのA₁₋₆ペプチドの他の結合方法には、カルボジイミドEDCおよびNHSを用いてA₁₋₆ペプチドをVLPに架橋させる方法がある。さらなる方法では、ホモ-二官能架橋剤、たとえばグルタルアルデヒド、DSG、BM[PEO]₄、BS³（ピアス・ケミカル・カンパニー、ロックフォード、イリノイ、米国）またはVLPのアミン基またはカルボキシル基に向かって反応性を示す官能基をもつ他の公知ホモ-二官能架橋剤を用いてA₁₋₆ペプチドをVLPに付着させる。

10

【0201】

A₁₋₆ペプチドへVLPを結合させる他の方法には、VLPをビオチニル化し、A₁₋₆ペプチドをストレプトアビジン融合タンパク質として発現させる方法、またはたとえば国際公開第00/23955号に記載された要領でA₁₋₆ペプチドおよびVLPの両方をビオチニル化する方法がある。この場合、まず遊離結合部位が依然として次工程で加えられるVLPの結合に利用可能であるようにA₁₋₆ペプチド対ストレプトアビジンの比率を調節することにより、A₁₋₆ペプチドを、ストレプトアビジンまたはアビジンに結合させ得る。別法として、全成分を「一ポット」反応で混合させ得る。レセプターおよびリガンドの可溶性形態が利用可能であり、VLPまたはA₁₋₆ペプチドと架橋し得る他のリガンド-レセプター対も、A₁₋₆ペプチドをVLPへ結合させるための結合剤として使用され得る。別法として、リガンドまたはレセプターをA₁₋₆ペプチドへ融合させ、レセプターまたはリガンドへそれぞれ化学的に結合または融合されたVLPへの結合について介在させ得る。融合はまた、挿入または置換により実施され得る。

20

【0202】

既に指摘した通り、本発明の好ましい実施態様では、VLPは、RNAファージのVLPであり、さらに好ましい実施態様では、VLPはRNAファージQコートタンパク質のVLPである。

30

【0203】

1個または幾つかの抗原分子、すなわちA₁₋₆ペプチドは、立体的に許容される場合、好ましくはRNAファージのVLPの露出されたリシン残基を通じてRNAファージコートタンパク質のキャプシドまたはVLPの一サブユニットに付着され得る。すなわち、RNAファージのコートタンパク質のVLPおよび特にQコートタンパク質VLPの具体的特徴は、一サブユニットについて幾つかの抗原とカップリングする可能性である。これによって、高密度の抗原アレイが作製され得る。

【0204】

本発明の好ましい実施態様では、ウイルス様粒子への少なくとも一A₁₋₆ペプチドの結合および付着は各々、ウイルス様粒子の少なくとも1個の第一付着部位および抗原または抗原決定基の少なくとも1個の第二付着部位間におけるそれぞれの相互作用および会合によるものである。

40

【0205】

Qコートタンパク質のVLPまたはキャプシドは、それらの表面上に特定数のリシン残基を有しており、キャプシド内部に向かい、RNAと相互作用する3個のリシン残基、およびキャプシド外部へ露出された4個の他のリシン残基による特定トポロジーを有する。これらの特性は、リシン残基がRNAと相互作用する粒子内部よりも粒子外部への抗原の付着に有利である。他のRNAファージコートタンパク質のVLPもまた、それらの表

50

面上における特定数のリシン残基およびこれらのリシン残基の特定トポロジーを有する。

【0206】

本発明のさらなる好ましい実施態様では、第一付着部位はリシン残基であり、および/または第二付着部位は、スルフヒドリル基またはシステイン残基を含む。本発明の非常に好ましい実施態様では、第一付着部位はリシン残基であり、第二付着部位はシステイン残基である。

【0207】

本発明の非常に好ましい実施態様では、A 1 - 6 ペプチドは、システイン残基を介してRNAファージコートタンパク質のVLP、および特にQ コートタンパク質のVLPのリシン残基に結合される。

10

【0208】

RNAファージから誘導されたVLPの別の利点は、手頃なコストでの材料の大量生産を可能にする、細菌におけるそれらの高い発現収率である。

【0209】

指摘した通り、本発明コンジュゲートおよびアレイはそれぞれ、高度に組織化された構造、大きさ、およびアレイ表面上における抗原の反復性の点で先行技術コンジュゲートとは異なる。さらに、担体としてVLPを使用することにより、可変抗原密度をもつ、強固な抗原アレイおよびコンジュゲートがそれぞれ形成され得る。特に、RNAファージのVLPの使用、および特にRNAファージQ コートタンパク質のVLPの使用により、非常に高いエピトープ密度が達成され得る。特に、一サブユニット当たり1.5エピトープを越える密度は、ヒトA 1 - 6 ペプチドをQ コートタンパク質のVLPにカップリングさせることにより達成され得る。エピトープ密度が高いRNAファージコートタンパク質のVLPの組成物の製造は、本明細書における指示にしたがって実施され得る。本発明の好ましい実施態様では、A 1 - 6 ペプチドがQ コートタンパク質のVLPにカップリングされているとき、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9またはそれより高い一サブユニット当たりのA 1 - 6 ペプチドの平均数が好ましい。

20

【0210】

本明細書で定義されている第二付着部位は、抗原または抗原決定基に伴い天然または非天然で存在し得る。抗原または抗原決定基に適切な天然第二付着部位が存在しない場合、非天然第二付着部位について抗原に対し遺伝子操作を加えなければならない。

30

【0211】

上記の通り、4個のリシン残基は、Q コートタンパク質のVLPの表面で露出されている。典型的には、これらの残基は、架橋剤分子との反応時に誘導体化される。露出されたリシン残基が必ずしも全て抗原に結合され得るわけではない場合、架橋剤と反応したリシン残基は、誘導体化工程後に - アミノ基に付着した架橋剤分子と残される。これによって、VLPの溶解性および安定性にとって有害であり得る1個または幾つかの正電荷が消失する。下記で開示されているQ コートタンパク質突然変異体の場合と同様、リシン残基の幾つかをアルギニンと置換することにより、アルギニン残基は架橋剤と反応しないことから、我々は正電荷の過度の消失を阻止し得る。さらに、アルギニンによるリシン残基の置換により、抗原への反応に利用可能な部位が少なくなるため、さらに特定された抗原アレイが誘導され得る。

40

【0212】

したがって、露出されたリシン残基は、本出願で開示されている以下のQ コートタンパク質突然変異体および突然変異体Q VLPにおけるアルギニンにより置換された：Q -240 (Lys13-Arg; 配列番号17), Q -250 (Lys 2-Arg, Lys13-Arg; 配列番号19) および Q -259 (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; 配列番号21)。構築物をクローン化し、タンパク質を発現させ、VLPを精製し、ペプチドおよびタンパク質抗原へのカップリングに使用した。またQ -251 (配列番号20)を構築し、如何にQ -251のVLP

50

Pについて発現、精製およびカップリングするかに関する指針は、本明細書全体から見出され得る。

【0213】

さらなる実施態様において、我々は、密度がさらに高い抗原アレイを得るのに適切な、1個の追加的リシン残基をもつQ 突然変異コートタンパク質を開示している。この突然変異体Q コートタンパク質、Q - 243 (Asn10 - Lys ; 配列番号18)をクローン化し、タンパク質を発現させ、そしてキャプシドおよびVLPを単離および精製したところ、追加リシン残基の導入は、キャプシドまたはVLPへのサブユニットの自己集合と両立し得ることが示された。すなわち、A 1 - 6ペプチドアレイおよびコンジュゲートは、それぞれQ コートタンパク質突然変異体のVLPを用いて製造され得る。VLP、特にRNAファージコートタンパク質のVLPへの特に有利な抗原付着方法は、抗原、すなわちA 1 - 6ペプチドに付加されたシステイン残基とRNAファージコートタンパク質のVLPの表面に存在するリシン残基の結合である。システイン残基が第二付着部位として有効であるためには、スルフヒドリル基がカップリングに利用可能でなくてはならない。すなわち、システイン残基はその還元状態であらねばならず、すなわち、遊離システインまたは遊離スルフヒドリル基をもつシステイン残基が利用可能でなくてはならない。第二付着部位として機能すべきシステイン残基が酸化形態である場合、たとえば、それがジスルフィド架橋を形成している場合、たとえばDTT、TCEPまたは -メルカプトエタノールによるこのジスルフィド架橋の還元が必要とされる。還元剤 (reductant) の濃度、および抗原に対する還元剤のモル過剰量は、各抗原について調節されなければならない。10 μM程度またはそれ未満の低濃度から出発し、10 ~ 20 mMまたはそれより高い還元剤濃度に及ぶ滴定範囲を必要ならば試験し、担体への抗原のカップリングを評価する。国際公開第02/056905号に記載されている通り、低濃度の還元剤はカップリング反応と両立し得るが、当業者の知るところによると、高濃度ではカップリング反応が阻止され、その場合、たとえば透析、ゲル濾過または逆相HPLCにより、還元剤を除去するかまたはその濃度を減少させなければならない。有利には、透析または平衡緩衝液のpHは7未満、好ましくは6である。抗原活性または安定性と低pH緩衝液の両立性について試験しなければならない。

【0214】

RNAファージコートタンパク質VLPにおけるエピトープ密度は、架橋剤および他の反応条件の選択により調節され得る。たとえば、架橋剤スルホ - GMBSおよびSMPHは、一般に高いエピトープ密度に到達させ得る。誘導体化は高濃度の還元剤により明確に影響され、反応条件の操作を用いることにより、RNAファージコートタンパク質のVLP、特にQ コートタンパク質のVLPへカップリングされる抗原の数を制御し得る。

【0215】

非天然第二付着部位の設計前に、それを融合、挿入または遺伝子操作すべき場所を選択しなければならない。第二付着部位の位置の選択は、たとえば抗原の結晶構造に基き得る。抗原の上記結晶構造は、分子のC - またはN - 末端の利用能 (たとえば溶媒へのそれらの接近可能性により決定される) について、または第二付着部位としての使用に適切な残基、たとえばシステイン残基の溶媒への露出に関する情報を提供する。露出されたジスルフィド架橋もまた、Fabフラグメントに関する場合と同様、それらが一般的にたとえば2 -メルカプトエチルアミン、TCEP、 -メルカプトエタノールまたはDTTによる緩やかな還元条件を通して単一システイン残基に変換され得ることから、同じく第二付着部位の供給源であり得る。抗原の免疫原性に影響を及ぼさない緩やかな還元条件が選択される。一般に、自己抗原による免疫化が、この自己抗原とその天然リガンドとの相互作用の阻止を目指す場合、第二付着部位は、天然リガンドとの相互作用部位に対して抗体を産生させ得るように付加される。すなわち、第二結合部位の位置は、第二付着部位または同部位を含むアミノ酸リンカーからの立体障害を回避するように選択される。さらなる実施態様において、自己抗原とその天然リガンドとの相互作用部位とは異なる部位で指向された抗体応答が望ましい。上記実施態様において、第二付着部位は、自己抗原とその天然リ

ガンドの相互作用部位に対する抗体の産生を阻止するように選択され得る。

【0216】

第二付着部位の位置選択における他の基準には、抗原のオリゴマー化状態、オリゴマー化部位、補因子の存在、および抗原の修飾が、自己抗原の機能、または自己抗原を認識する抗体の産生と両立し得る場合の抗原構造および配列における部位を示す実験的証拠の利用可能性がある。

【0217】

ほとんどの好ましい実施態様において、A 1 - 6 ペプチドは、単一第二付着部位またはコア粒子上の第一付着部位およびVLPまたはVLPサブユニットとそれぞれ会合し得る単一反応性付着部位を含む。これにより、コア粒子およびVLPのそれぞれへの少なくとも1個、ただし典型的には1個より多く、好ましくは10、20、40、80、120、150、180、210、240、270、300、360、400、450個より多くの抗原の限定された均一な結合および会合がそれぞれ確実なものとなる。すなわち、抗原において単一の第二付着部位または単一の反応性付着部位を与えることにより、単一および均一タイプの結合および会合がそれぞれ確実にされ、非常に高度に規則正しい反復性アレイがもたらされる。たとえば、結合および会合がそれぞれリシン - (第一付着部位として) およびシステイン - (第二付着部位として) 相互作用により実施される場合、本発明のこの好ましい実施態様によると、このシステイン残基が抗原上に天然に存在するのか、または非天然で存在するのかとは関係無く、1抗原当たり唯一のシステイン残基がVLPおよびコア粒子の第一付着部位とそれぞれ結合および会合し得ることが確実となる。

【0218】

実施態様の中には、抗原上への第二付着部位の遺伝子操作が、本発明の開示による第二付着部位として適切なアミノ酸を含むアミノ酸リンカーの融合を必要とする場合もある。したがって、本発明の好ましい実施態様では、少なくとも1個の共有結合を介してアミノ酸リンカーを抗原または抗原決定基に結合させる。好ましくは、アミノ酸リンカーは、第二付着部位を含むか、またはそれにより構成される。さらなる好ましい実施態様において、アミノ酸リンカーは、スルフヒドリル基またはシステイン残基を含む。別の好ましい実施態様では、アミノ酸リンカーはシステインである。アミノ酸リンカーの若干の選択基準および本発明によるアミノ酸リンカーのさらなる好ましい実施態様は、既に上記で述べられている。

【0219】

本発明のさらなる好ましい実施態様では、少なくとも一抗原または抗原決定基、すなわちA 1 - 6 ペプチドをウイルス様粒子と融合させる。上記で概説されている通り、VLPは、典型的にはVLPへ集合する少なくとも1個のサブユニットにより構成される。すなわち、本発明のさらなる好ましい実施態様でも、抗原または抗原決定基、好ましくは少なくとも1個のA 1 - 6 ペプチドを、ウイルス様粒子またはVLPへ組込まれ得るタンパク質の少なくとも1個のサブユニットに融合させることにより、キメラVLP - サブユニット - A 1 - 6 ペプチドタンパク質融合が形成される。

【0220】

A 1 - 6 ペプチドの融合は、VLPサブユニット配列への挿入により、またはVLP - サブユニットまたはVLPへ組込まれ得るタンパク質のN - またはC - 末端への融合により実施され得る。以後、VLPサブユニットへのペプチドの融合タンパク質をいう場合、サブユニット配列のいずれかの末端への融合またはサブユニット配列内におけるペプチドの内部挿入も包含されるものとする。

【0221】

融合はまた、サブユニット配列の一部が欠失されたVLPサブユニットの変異型へA 1 - 6 ペプチド配列を挿入することにより実施され得、さらにそれらは切頭化突然変異体と称される。切頭化突然変異体は、VLPサブユニットの配列のN - またはC - 末端、またはその一部の内部欠失を有し得る。たとえば、アミノ酸残基79 ~ 81の欠失を伴うたとえば特異的VLP H B c A g は、内部欠失をもつ切頭化突然変異体である。また、切

10

20

30

40

50

頭化突然変異体 V L P - サブユニットの N - または C - 末端への A 1 - 6 ペプチドの融合により、本発明の実施態様がもたらされる。同様に、V L P サブユニットの配列へのエピトープの融合はまた置換により実施され得、その場合、たとえば特異的 V L P H B c A g については、アミノ酸 79 ~ 81 が外来エピトープにより置換される。すなわち、以後称するように、融合は、V L P サブユニットの配列における A 1 - 6 ペプチド配列の挿入により、A 1 - 6 ペプチドによる V L P サブユニットの配列の一部の置換により、または欠失、置換または挿入の組合せにより実施され得る。

【 0 2 2 2 】

キメラ A 1 - 6 ペプチド - V L P サブユニットは、一般に V L P へ自己集合し得る。それらのサブユニットに融合されたエピトープを提示する V L P はまた、キメラ V L P と本明細書では称する。指摘した通り、ウイルス様粒子は、少なくとも 1 個の V L P サブユニットを含むか、またはそれにより構成される。本発明のさらなる実施態様では、ウイルス様粒子は、キメラ V L P サブユニットおよび非キメラ V L P サブユニット、すなわち抗原と融合していない V L P サブユニットの混合物を含むかまたはそれにより構成され、いわゆるモザイク粒子をもたらす。これは、V L P の形成およびそれへの集合を確実にするのに有利であり得る。それらの実施態様において、キメラ V L P - サブユニットの比率は、1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、95% またはそれより高いものであり得る。

10

【 0 2 2 3 】

フランキングアミノ酸残基をペプチドまたはエピトープの配列のいずれかの端に付加することにより、V L P のサブユニットの配列のいずれかの端に融合させるかまたは V L P のサブユニットの配列へ上記ペプチド配列を内部挿入させ得る。グリシンおよびセリン残基は、融合されるペプチドに付加されるフランキング配列で使用されるのに特に有利なアミノ酸である。グリシン残基は追加的順応性を付与し、V L P サブユニットの配列への外来配列の融合を潜在的に不安定にする効果を減少させ得る。

20

【 0 2 2 4 】

本発明の実施態様において、V L P は、B 型肝炎コア抗原 V L P である。H B c A g の N - 末端への A 1 - 6 ペプチドの融合タンパク質 (Neyrinck, S. et al., Nature Med. 5:1157-1163 (1999)) またはいわゆる主要免疫優性領域 (M I R) における挿入体については既に報告されており (Pumpens, P. および Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001)、国際公開第 01/98333 号)、本発明の好ましい実施態様である。M I R において欠失を伴う H B c A g の天然に存する変異型についても報告されており (Pumpens, P. および Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001)、出典明示で援用する)、そして N - または C - 末端への融合、ならびに野生型 H B c A g と比べた場合に欠失部位に対応する M I R の位置における挿入は、本発明のさらなる実施態様である。C - 末端への融合についても報告されている (Pumpens, P. および Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001))。当業者であれば、古典的分子生物学技術を用いることにより (Sambrook, J. et al. 編、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク (1989)、Ho et al., Gene 77:51 (1989)) 融合タンパク質を如何にして構築するかについての指針を容易に見出せるはずである。H B c A g および H B c A g 融合タンパク質をコード化し、H B c A g および H B c A g 融合タンパク質の発現に有用であるベクターおよびプラスミドについては報告されており (Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44:98-114 (2001), Neyrinck, S. et al., Nature Med. 5:1157-1163 (1999))、本発明の実施において使用され得る。我々はまた、例を挙げて (実施例 6) H B c A g の M I R へのエピトープの挿入による、キメラ自己集合性 H B c A g の生成について記載している。H B c A g の自己集合効率およびその M I R において挿入されるエピトープの提示の最適化にとって重要な因子は、挿入部位の選択、および挿入時に M I R 内の H B c A g 配列から欠失されるアミノ酸の数 (Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44:98-114 (2001)) ; 欧州特許第 0421635 号 ; 米国特許第 6231864 号)、または言い換

30

40

50

えれば、HBcAgからのどのアミノ酸を新たなエピトープにより置換すべきかということである。たとえば、外来エピトープによるHBcAgアミノ酸76~80、79~81、79~80、75~85または80~81の置換については、既に報告されている(Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44: 98-114 (2001); 欧州特許第0421635号; 米国特許第6231864号)。HBcAgは、キャプシド集合にとって重要ではなく、核酸と結合し得る長いアルギニンテイル(Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44: 98-114 (2001))を含む(Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44: 98-114 (2001))。このアルギニンテイルを含むかまたは欠くHBcAgは、両方とも本発明の実施態様である。

【0225】

本発明のさらなる好ましい実施態様では、VLPは、RNAファージのVLPである。RNAファージの主要コートタンパク質は、細菌での、特にエシェリキア・コリ(E.coli)での発現時、VLPに自発的に集合する。本発明組成物の製造に使用され得るバクテリオファージコートタンパク質の具体例には、RNAバクテリオファージ、たとえばバクテリオファージQ(配列番号4; PIRデータベース、受入番号VCBPQB、すなわちQCPOおよび配列番号5; 受入番号AAA16663、すなわちQA1タンパク質)およびバクテリオファージfr(配列番号7; PIR受入番号VCBFR)のコートタンパク質がある。

【0226】

さらに好ましい実施態様では、少なくとも1個のA1-6ペプチドをQCコートタンパク質に融合させる。エピトープがQのA1タンパク質の切頭化形態のC-末端に融合されているか、またはA1タンパク質内に挿入されている融合タンパク質構築物については既に報告されている(Kozlovska, T. M., et al., Intervirology, 39:9-15 (1996))。A1タンパク質は、UGA停止コドンでのサブプレッションにより生成され、N-末端メチオニンの開裂を考慮に入れる場合329または328アミノ酸長を有する。アラニン(QCP遺伝子によりコード化される第二アミノ酸)の前のN-末端メチオニンの開裂は、通常エシェリキア・コリ(E.coli)で行なわれ、それはQCコートタンパク質のN-末端の場合にも当てはまる。A1遺伝子の一部、UGAアンバーコードの3'は、195アミノ酸長を有するCP伸長部分をコード化する。CP伸長部分の72および73位間における少なくとも一A1-6ペプチドの挿入により、本発明のさらなる実施態様が導かれる(Kozlovska, T. M., et al., Intervirology, 39:9-15 (1996))。C-末端切頭化QA1タンパク質のC-末端におけるA1-6ペプチドの融合により、本発明のさらなる好ましい実施態様が導かれる。たとえば、Kozlovskaら(Intervirology, 39:9-15 (1996))は、エピトープが、19位で先端切除されたQC伸長部のC-末端で融合されているQA1タンパク質融合体について報告している。

【0227】

Kozlovskaら(Intervirology, 39:9-15 (1996))が報告しているところによると、融合エピトープを提示する粒子の集合は、モザイク粒子を形成するのに一般的にはA1タンパク質-A1-6ペプチド融合体および野生型CPの両方の存在を必要とする。しかしながら、ウイルス様粒子およびここでは特に、少なくとも1個のA1-6ペプチドが融合しているVLPサブユニットにより排他的に構成されている、RNAファージQCコートタンパク質のVLPを含む実施態様もまた、本発明の範囲内に含まれる。

【0228】

モザイク粒子の製造は多くの方法で実施され得る。Kozlovskaら、Intervirology, 39:9-15 (1996)は、3つの方法を記載しており、それらは全て本発明の実施において使用され得る。第一の方法では、VLPにおける融合エピトープの有効な提示を、TrpへのUGAコードの翻訳を誘導するクローン化UGAサブプレッサー-tRNAをコード化するプラスミド(pISM3001プラスミド(Smiley B.K., et al., Gene 134:33-40 (1993)))を含むエシェリキア・コリ(E.coli)株において、CPおよびCP伸長部にUGA停止コドンを含むQA1タンパク質融合体をコード化するプラスミドを発現さ

10

20

30

40

50

せることにより伝達させる。別の方法では、C P 遺伝子停止コドンに U A A へ修飾し、A 1 タンパク質 - A 1 - 6 ペプチド融合体を発現する第二プラスミドを同時形質転換させる。第二プラスミドは、異なる抗生物質耐性をコード化し、複製起点は、第一プラスミドと適合し得る (Kozlovska, T. M., et al., Intervirology, 39:9-15 (1996))。第三の方法では、Kozlovska et al., Intervirology, 39:9-15 (1996) の図 1 における記載にしたがって、C P および A 1 タンパク質 - A 1 - 6 ペプチド融合体を、プロモーター、たとえば T r p プロモーターへ機能し得るように結合させたバイシストロン方法でコード化する。

【 0 2 2 9 】

さらなる実施態様では、A 1 - 6 ペプチドを、f r C P のアミノ酸 2 および 3 (開裂 C P のナンバリング、すなわち、N - 末端メチオニンが開裂されている) 間に挿入することにより、A 1 - 6 ペプチド - f r C P 融合タンパク質が形成される。V L P へ自己集合する f r C P 融合タンパク質を構築および発現させるための、本発明の実施において有用なベクターおよび発現系については、既に報告されている (Pushko P. et al., Prot. Eng. 6:883-891 (1993))。ある実施態様では、A 1 - 6 ペプチド配列をアミノ酸 2 の後における f r C P の欠失変異型 (f r C P の残基 3 および 4 は欠失されている) へ挿入する (Pushko P. et al., Prot. Eng. 6:883-891 (1993))。

【 0 2 3 0 】

R N A フェージ M S - 2 のコートタンパク質の N - 末端突出 - ヘアピンにおけるエピトープの融合およびそれに続く R N A フェージ M S - 2 の自己集合 V L P における融合エピトープの提示についても報告されており (国際公開第 9 2 / 1 3 0 8 1 号)、M S - 2 R N A フェージのコートタンパク質への挿入または置換による A 1 - 6 ペプチドの融合体もまた、本発明の範囲内に含まれる。

【 0 2 3 1 】

本発明の別の実施態様では、A 1 - 6 ペプチドを、乳頭腫ウイルスのキャプシドタンパク質に融合させる。さらなる実施態様では、A 1 - 6 ペプチドを、ウシ乳頭腫ウイルス 1 型 (B P V - 1) の主要キャプシドタンパク質 L 1 に融合させる。バクテリオウイルス / 昆虫細胞系において B P V - 1 融合タンパク質を構築および発現させるためのベクターおよび発現系については既に報告されている (Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2373-2378 (1999)、国際公開第 0 0 / 2 3 9 5 5 号)。A 1 - 6 ペプチドによる B P V - 1 L 1 のアミノ酸 1 3 0 ~ 1 3 6 の置換により、B P V - 1 L 1 - A 1 - 6 ペプチド融合タンパク質が形成され、これも本発明の好ましい実施態様に含まれる。バクテリオウイルスベクターにおけるクローニングおよびバクテリオウイルス感染 S f 9 細胞における発現についても報告されており、本発明の実施において使用され得る (Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2373-2378 (1999)、国際公開第 0 0 / 2 3 9 5 5 号)。融合 A 1 - 6 ペプチドを呈示する集合粒子の精製は、若干の方法で、たとえばゲル濾過またはスクロース勾配超遠心分離により実施され得る (Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2373-2378 (1999)、国際公開第 0 0 / 2 3 9 5 5 号)。

【 0 2 3 2 】

本発明のさらなる実施態様では、A 1 - 6 ペプチドを、T y V L P へ組込まれ得る T y タンパク質に融合させる。さらなる実施態様では、A 1 - 6 ペプチドを、T Y A 遺伝子によりコード化される p 1 またはキャプシドタンパク質に融合させる (Roth, J.F., Yeast 16:785-795 (2000))。酵母レトロトランスポゾン T y 1、2、3 および 4 は、サッカロマイシス・セレビシエ (Saccharomyces Serevisiae) から単離され、レトロトランスポゾン T f 1 は、シゾサッカロマイシス・ポンバエ (Schizosaccharomyces Pombae) から単離されている (Boeke, J.D. および Sandmeyer, S.B., *添east Transposable elements*、The molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome dynamics, Protein Synthesis, and Energetics 中、p.193、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス (1991))。レトロトランスポゾン T y 1 および 2 は、植物およ

10

20

30

40

50

び動物因子のコピア型と関連しており、Ty 3はレトロトランスポゾンのジプシーファミリーに属しており、それは植物および動物レトロウイルスと関連している。Ty 1レトロトランスポゾンにおいて、Gagまたはキャプシドタンパク質とも称されるp 1タンパク質は、440アミノ酸長を有する。P 1は、408位におけるVLPの成熟中に開裂され、それによってVLPの必須成分であるp 2タンパク質をもたらす。

【0233】

p 1への融合タンパク質および酵母における上記融合タンパク質の発現用ベクターについては既に報告されている(Adams, S.E., et al., Nature 329:68-70 (1987))。そこで、たとえば、A 1-6ペプチドは、A 1-6ペプチドについてのコーディング配列をpMA5620プラスミドのBamH1部位へ挿入することによりp 1へ融合され得る(Adams, S.E., et al., Nature 329:68-70 (1987))。外来エピトープについてのコーディング配列をpMA5620ベクターへクローン化することにより、外来エピトープのN-末端へC-末端融合された、Ty 1-15のp 1のアミノ酸1~381を含む融合タンパク質が発現される。同様に、A 1-6ペプチドのN-末端融合、またはp 1配列への内部挿入、またはp 1配列の一部の置換もまた、本発明の範囲内に含まれるものとする。特に、Tyタンパク質p 1のアミノ酸30~31、67~68、113~114および132~133間におけるTy配列へのA 1-6ペプチドの挿入(欧州特許第0677111号)により、本発明の好ましい実施態様が導かれる。

【0234】

A 1-6ペプチドの融合に適切なさらなるVLPは、たとえばレトロウイルス様粒子(国際公開第96/30523号)、HIV2 Gag(Kang, Y.C., et al, Biol. Chem. 380:353-364 (1999))、ササゲモザイクウイルス(Taylor, K.M.et al., Biol. Chem. 380:387-392 (1999))、パルボウイルスVP2 VLP(Rueda, P. et al., Virology 263:89-99 (1999))、HBsAg(米国特許第4722840号、欧州特許第0020416B1号)である。

【0235】

また、本発明の実施に適切なキメラVLPの例は、Intervirology 39:1(1996)に記載されているものである。本発明での使用が考えられるVLPのさらなる例は、HPV-1、HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-33、HPV-45、CRPV、COPV、HIV、GAG、タバコモザイクウイルスである。SV-40、ポリオマウイルス、アデノウイルス、単純疱疹ウイルス、ロタウイルスおよびノーウォークウイルスのウイルス様粒子もまた製造されており、A 1-6ペプチドを含むそれらのVLPのキメラVLPもまた本発明の範囲内に含まれる。

【0236】

本発明の好ましい実施態様では、本発明ワクチンの製造に適切なA 1-6ペプチドは、VLPへ結合させるためアミノ酸リンカーにより修飾されている。それらのA 1-6ペプチドには、リンカーGGCにC-末端融合されたA 1-6があるが、限定はされない。A 1-6フラグメントのN-末端への融合に適切なアミノ酸リンカーには、配列CGGおよびCGHGNKSがあるが、限定はされない。A 1-6のC-末端への融合に適切なリンカーには、配列GGCがあるが、限定はされない。好ましい実施態様において、リンカーがA またはA フラグメントのC-末端に融合されているとき、C-末端システインはアミド化されている。好ましい実施態様において、A 1-6は、アミノ酸リンカーに融合されており、配列:NH2-DAEFRHGGC-CONH2を有し、この配列では、C-末端「-CONH2」により示されている、C-末端システインがアミド化され、さらに「NH2」により示されている、ペプチドのN-末端が遊離状態である。アミノ酸リンカーは、上記リンカーのアミノ酸に対する免疫応答の誘導を回避するために、好ましくは短い、可溶性A およびAD斑と交差反応性を示す抗体を誘導させ得るべきであり、抗体とA 1-6ペプチドの相互作用を容易に行わせ得る。アミノ酸リンカーの他の適切な特性は、順応性であり、好ましくはカップリングを妨げ、および/またはリンカー自体に対する免疫応答を生じさせ得る巨大アミノ酸を欠いている。さらに好ましい実施態様では、第二

10

20

30

40

50

付着部位としてシステイン残基を含むアミノ酸リンカーを、A 1 - 6 ペプチドの C - 末端に融合させる。

【 0 2 3 7 】

本発明の実施に適切な追加的 A フラグメントには、他の動物種に由来する、同じく上記要領で修飾された、前述のフラグメントに対応し、ヒトアミロイド斑および可溶性ヒト A と交差反応性を示す抗体を誘発する A フラグメントが含まれる。上記フラグメントの例は、霊長類 (D A E F R H ; 配列番号 8 4)、ウサギ (D A E F R H ; 配列番号 8 5)、モルモット (D A E F R H ; 配列番号 8 8)、マウス (D A E F G H ; 配列番号 7 6)、ラット (D A E F G H ; 配列番号 8 7) およびアフリカツメガエル (D S E Y R H ; 同 8 6) からの A 1 - 6 である。

10

【 0 2 3 8 】

ヒト A P P の突然変異形態を過剰発現するトランスジェニックマウスに基づいた多くの動物 A D モデルが報告されている (Games, D. et al., Nature 373: 523-527 (1995a); Sturchler-Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13287-13292 (1997); Hsiao, K., et al., Science 274: 99-102 (1996); Chen, G. et al., Nature 408: 975-979 (2000); Janus, C. et al., Nature 408: 979-982 (2000); Morgan, D. et al., Nature 408: 982-985 (2000))。それらのマウスモデルは、導入遺伝子の過剰発現レベル、導入遺伝子に存在する A D 突然変異および導入遺伝子の過剰発現が指令されるプロモーターの点が互いに異なる。これらの動物モデルは、特に年齢に関連した行動の変化、不溶性斑への - アミロイドの沈着、ニューロン内における神経原線維錯綜、および前脳全体に及ぶニューロン消失である、A D の病理学的徴候の全てを必ずしも示すことはできない (Chapman, P.F. Nature 408: 915-916 (2000))。しかしながら、記憶欠損およびそれらの鑑定方法は、それらのモデルにおいて確認され得、動物モデルにおける本発明組成物の効果の試験で使用され得る (Chen, G. et al., Nature 408: 975-979 (2000); Janus, C. et al., Nature 408: 979-982 (2000); Morgan, D. et al., Nature 408: 982-985 (2000))。さらに、年齢に関連したアミロイド斑への A 沈着は、星状細胞増加症および小膠細胞症をも発現する、それらのモデルで試験され得る。

20

【 0 2 3 9 】

本明細書記載の方法および適用例に対する他の適切な修飾および適応が容易に認められ、本発明の範囲またはその実施態様から逸脱することなく為され得ることは当業者であれば容易に理解できることである。本発明について詳細に記載したが、説明を目的として載せているに過ぎず、本発明を限定するものではない以下の実施例を参考にすると本発明に対する理解はさらに深められるはずである。

30

【 実施例 】

【 0 2 4 0 】

実施例 1

R N A フェージの好ましいコア粒子および V L P のクローニングおよび構築、発現および精製

A . 突然変異 Q コートタンパク質の構築および発現、ならびに突然変異 Q コートタンパク質 V L P またはキャプシドの精製

40

プラスミド構築および突然変異コートタンパク質のクローニング

p Q - 2 4 0 の構築 :

プラスミド p Q 1 0 (Kozlovska, TM, et al., Gene 137:133-137) を、 p Q - 2 4 0 の構築用初期プラスミドとして使用した。 L y s 1 3 から A r g への突然変異を逆 P C R により誘発した。逆プライマーを逆テイル - テイル方向で設計した :

5 ' -GGTAACATCGGTTCGAGATGGAAAACAACTCTGGTCC-3 ' (配列番号 4 8) および

5 ' -GGACCAGAGTTTGTTCATCTCGACCGATGTTACC-3 ' (配列番号 4 9) 。

【 0 2 4 1 】

初回 P C R の生成物を第二 P C R 反应用鋳型として使用し、その場合、上流プライマー 5 ' -AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3 ' (配列番号 5 0)

50

および下流プライマー

5' -CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3' (配列番号 51)

を使用した。第二PCRの生成物を、XbaIおよびMph11031により消化し、pQ10発現ベクターへクローン化し、これを同制限酵素により開裂した。PCRキット試薬により製作者プロトコール(MBIファーマテックス、ビルニウス、リトアニア)にしたがってPCR反応を実施した。

【0242】

直接標識組込方法を用いた配列決定により、所望の突然変異を証明した。pQ-240を含むエシェリキア・コリ(E.coli)細胞は、Qファージ粒子から単離された対照Qコートタンパク質とのSDS-PAGE時に共移動する14kDタンパク質の有効な合成を維持した。

10

【0243】

生成されたアミノ酸配列：(配列番号17)：

AKLETVTLGNI GRD GKQTLV LNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRK NYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSTQYSTDEERAFV RTELAALLASPLLIDAI DQLNPAY

【0244】

pQ-243の構築

プラスミドpQ10を、pQ-243の構築用初期プラスミドとして使用した。Asn10からLysへの突然変異を逆PCRにより誘発した。逆プライマーを逆テイル-テイル方向で設計した：

20

5' -GGCAAATTAGAGACTGTTACTTTAGGTAAGATCGG-3' (配列番号52)

および

5' -CCGATCTTACCTAAAGTAACAGTCTCTAATTTTGCC-3' (配列番号53)。

【0245】

初回PCRの生成物を第二PCR反应用鋳型として使用し、その場合、上流プライマー5' -AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3' (配列番号50)

および下流プライマー

5' -CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3' (配列番号51)

を使用した。第二PCRの生成物を、XbaIおよびMph11031により消化し、pQ10発現ベクターへクローン化し、これを同制限酵素により開裂した。PCRキット試薬により製作者プロトコール(MBIファーマテックス、ビルニウス、リトアニア)にしたがってPCR反応を実施した。

30

【0246】

直接標識組込方法を用いた配列決定により、所望の突然変異を証明した。pQ-243を含むエシェリキア・コリ(E.coli)細胞は、Qファージ粒子から単離された対照Qコートタンパク質とのSDS-PAGE時に共移動する14kDタンパク質の有効な合成を維持した。

【0247】

生成されたアミノ酸配列：(配列番号18)：

AKLETVTLGKIGKDGKQTLV LNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRK NYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSTQYSTDEERAFV RTELAALLASPLLIDAI DQLNPAY

40

【0248】

pQ-250の構築

プラスミドpQ-240を、pQ-250の構築用初期プラスミドとして使用した。Lys2からArgへの突然変異を位置指定突然変異導入法により誘発した。上流プライマー

5' -GGCCATGGCAGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3' (配列番号54)

および下流プライマー

50

5' -GATTTAGGTGACACTATAG-3' (配列番号 55)

を、突然変異 PCR フラグメントの合成に使用し、特有の制限部位 N c o I および H i n d III において p Q - 185 発現ベクターへ導入した。PCR キット試薬により製作者プロトコール (M B I フェーマンタス、ビルニウス、リトアニア) にしたがって PCR 反応を実施した。

【0249】

直接標識組込方法を用いた配列決定により、所望の突然変異を証明した。p Q - 250 を含むエシェリキア・コリ (E.coli) 細胞は、Q フェージ粒子から単離された対照 Q コートタンパク質との P A G E 時に共移動する 14 k D タンパク質の有効な合成を維持した。

10

【0250】

生成されたアミノ酸配列：(配列番号 19)：

ARLETVTLGNI GRD GKQTLV L N P R G V N P T N G V A S L S Q A G A V P
ALEKRVTVSVSQPSRNRK NYKVQVKI QNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSTQYSTDEERAFV RTEL AALLASPLL I D A I D Q L N P A Y

【0251】

p Q - 251 の構築

プラスミド p Q 10 を、p Q - 251 の構築用初期プラスミドとして使用した。L y s 16 から A r g への突然変異を逆 PCR により誘発した。逆プライマーを逆テイル-テイル方向で設計した：

5' -GATGGACGTCAA ACTCTGGTCTCAATCCGCGTGGGG -3' (配列番号 56)

および

5' -CCCCACGCGGATTGAGGACCAGAGTTTGACGTCCATC -3' (配列番号 57)。

20

【0252】

初回 PCR の生成物を第二 PCR 反应用鋳型として使用し、その場合、上流プライマー
5' -AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3' (配列番号 50)

および下流プライマー

5' -CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3' (配列番号 51)

を使用した。第二 PCR の生成物を、X b a I および M p h 11031 により消化し、p Q 10 発現ベクターへクローン化し、これを同制限酵素により開裂した。PCR キット試薬により製作者プロトコール (M B I フェーマンタス、ビルニウス、リトアニア) にしたがって PCR 反応を実施した。

30

【0253】

直接標識組込方法を用いた配列決定により、所望の突然変異を証明した。p Q - 251 を含むエシェリキア・コリ (E.coli) 細胞は、Q フェージ粒子から単離された対照 Q コートタンパク質との S D S - P A G E 時に共移動する 14 k D タンパク質の有効な合成を維持した。この構築物により生成されたアミノ酸配列は配列番号 20 に示されている。

【0254】

p Q - 259 の構築

プラスミド p Q - 251 を、p Q - 259 の構築用初期プラスミドとして使用した。L y s 2 から A r g への突然変異を位置指定突然変異導入法により誘発した。上流プライマー

5' -GGCCATGGCAGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3' (配列番号 54)

および下流プライマー

5' GATTTAGGTGACACTATAG-3' (配列番号 55)

を、突然変異 PCR フラグメントの合成に使用し、特有の制限部位 N c o I および H i n d III において p Q - 185 発現ベクターへ導入した。PCR キット試薬により製作者プロトコール (M B I フェーマンタス、ビルニウス、リトアニア) にしたがって PCR 反応を実施した。

40

50

【 0 2 5 5 】

直接標識組込方法を用いた配列決定により、所望の突然変異を証明した。pQ - 259を含むエシェリキア・コリ (E.coli) 細胞は、Q ファージ粒子から単離された対照Qコートタンパク質とのSDS-PAGE時に共移動する14kDタンパク質の有効な合成を維持した。

【 0 2 5 6 】

生成されたアミノ酸配列：(配列番号21)：

AKLETVTLGNI GKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

ALEKRVTVSQSPSRNRKKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

10

【 0 2 5 7 】

Q およびQ 突然変異体の一般的発現および精製手順
発現

エシェリキア・コリ (E.coli) JM109を、Q コートタンパク質発現プラスミドにより形質転換した。20 µg/mlアンピシリンを含むLB液体培地5mlに、Q コートタンパク質発現プラスミドにより形質転換されたクローンを接種した。接種された培地を振とうせずに16~24時間37 °Cでインキュベーションした。調製されたイノキュラムを、20 µg/mlアンピシリンを含む新鮮なLB培地100~300ml中で1:100に連続希釈し、37 °Cで一晩振とうせずにインキュベーションした。生成した第二イノキュラムを、フラスコにおいて1%カサミノ酸および0.2%グルコースを含むM9培地中で1:50に希釈し、振とうしながら37 °Cで一晩インキュベーションした。

20

【 0 2 5 8 】

精製

精製手順用溶液および緩衝液

1. 溶菌緩衝液LB

50mMのトリス-HCl、pH8.0、5mMのEDTA、0.1%トリトンX100および新たに調製されたPMSE、1ml当たり5マイクログラムの濃度。リゾチームおよびデオキシリボヌクレアーゼ不含有。

2. SAS

飽和硫酸アンモニウム水溶液

30

3. 緩衝液NET

20mMのトリス-HCl、pH7.8、5mMのEDTAおよび

150mMのNaCl。

4. PEG

NET中40% (w/v) ポリエチレングリコール6000

【 0 2 5 9 】

崩壊および溶菌

冷凍細胞を細胞1gにつき2mlでLBに再懸濁した。混合物を22kHzで5回15秒間超音波処理し、1分間隔で溶液を氷上で冷却した。次いで、ジャネッキ (Janecki) K60ローターを用いて、ライゼートを1時間14000rpmでの遠心分離にかけた。特記しない場合、同ローターを用いて、下記遠心分離工程を全て実施した。上清を4 °Cで貯蔵し、細胞屑をLBで2回洗浄した。遠心分離後、ライゼートおよび洗浄画分の上清をプールした。

40

【 0 2 6 0 】

分画

飽和硫酸アンモニウム溶液を、攪拌しながらプールした上記ライゼートへ滴下した。SASの量を全量の5分の1に調節して、飽和の20%とした。溶液を一晩放置し、翌日14000rpmで20分間遠心分離にかけた。ペレットを少量の20%硫酸アンモニウムで洗浄し、再び遠心分離にかけた。生じた上清をプールし、SASを滴下して、飽和の40%とした。溶液を一晩放置し、そして翌日14000rpmで20分間遠心分離した。

50

生じたペレットをNET緩衝液中で可溶化した。

【0261】

クロマトグラフィー

NET緩衝液中で可溶化されたキャプシドまたはVLPタンパク質を、セファロースCL-4Bカラムにローディングした。クロマトグラフィー中3つのピークが溶離した。第一ピークは主に膜および膜フラグメントを含んでおり、集められなかった。キャプシドは第二ピークに含まれ、第三ピークは他のエシェリキア・コリ(E.coli)タンパク質を含んでいた。

【0262】

ピーク画分をプールし、NaCl濃度を、0.65Mの最終濃度に調節した。プールされたピーク画分の半分に相当するPEG溶液の量を、攪拌しながら滴下した。溶液を攪拌せずに一晩放置した。20分間14000rpmでの遠心分離により、キャプシドタンパク質を沈降させた。次いで、それを最少量のNET中で可溶化し、再びセファロースCL-4Bカラムにローディングした。ピーク画分をプールし、飽和の60%(w/v)での硫酸アンモニウムにより沈澱させた。遠心分離およびNET緩衝液中での再可溶化後、キャプシドタンパク質を再クロマトグラフィー用にセファロースCL-6Bカラムへローディングした。

10

【0263】

透析および乾燥

上記で得られたピーク画分をプールし、滅菌水に対して十分に透析し、貯蔵用に凍結乾燥した。

20

【0264】

Q-240の発現および精製

細胞(エシェリキア・コリ(E.coli)JM109、プラスミドpQ-240により形質転換された)を、LBに再懸濁し、15秒間5回超音波処理(水氷ジャケット)し、13000rpmで1時間遠心分離にかけた。さらなる処理工程まで上清を4で貯蔵し、細胞屑を、9mlのLB、および最後にLB中の0.7M尿素9mlで2回洗浄した。全上清をプールし、セファロースCL-4Bカラムにローディングした。プールされたピーク画分を硫酸アンモニウムで沈澱させ、遠心分離にかけた。次いで、再可溶化タンパク質をセファロース2Bカラムおよび最後にセファロース6Bカラムでさらに精製した。最後に、キャプシドピークを水に対して充分透析し、上記要領で凍結乾燥した。コートタンパク質のキャプシドへの集合を電子顕微鏡により確認した。

30

【0265】

Q-243の発現および精製

細胞(エシェリキア・コリ(E.coli)RPI)を、LBに再懸濁し、一般的手順記載の要領で処理した。セファロースCL-4Bカラムおよび最後にセファロースCL-2Bカラムでの2連続ゲル濾過工程によりタンパク質を精製した。ピーク画分をプールし、上記要領で凍結乾燥した。キャプシドへのコートタンパク質の集合を電子顕微鏡により確認した。

【0266】

Q-250の発現および精製

細胞(エシェリキア・コリ(E.coli)JM109、pQ-250により形質転換)を、LBに再懸濁し、上記要領で処理した。セファロースCL-4Bおよび最後にセファロースCL-2Bカラムでのゲル濾過によりタンパク質を精製し、上記要領で凍結乾燥した。キャプシドへのコートタンパク質の集合を電子顕微鏡により確認した。

40

【0267】

Q-259の発現および精製

細胞(エシェリキア・コリ(E.coli)JM109、pQ-259により形質転換)を、LBに再懸濁し、超音波処理した。細胞屑を、10mlのLBで1回および2回目はLB中0.7Mの尿素10mlで洗浄した。セファロースCL-4Bでの2ゲル濾過クロマ

50

トグラフィー工程によりタンパク質を精製した。上記要領でタンパク質を透析および凍結乾燥した。キャプシドへのコートタンパク質の集合を電子顕微鏡により確認した。

【0268】

B. 組換えAP205VLPのクローニング、発現および精製

AP205コートタンパク質遺伝子のクローニング

AP205コートタンパク質(CP)のcDNA(配列番号28)を、ファージAP205 RNAから生成された2つのcDNAフラグメントから、逆転写-PCR技術を用い、市販の配列決定用プラスミドpCR4-TOPOでクローニングすることにより構築した。逆転写技術は当業界ではよく知られている。プラスミドp205-246に含まれる第一フラグメントは、CP配列の上流269ヌクレオチドおよびCPの最初の24N-末端アミノ酸をコードする74ヌクレオチドを含んでいた。プラスミドp205-262に含まれる第二フラグメントは、CPのアミノ酸12~131をコードする364ヌクレオチドおよびCP配列の下流の追加162ヌクレオチドを含んでいた。p205-246およびp205-262は両方ともJ.Klovinsから寛大にも寄贈されたものであった。

10

【0269】

プラスミド283-58を2段階PCRにより設計することにより、一完全長CP配列におけるプラスミドp205-246およびp205-262からの両CPフラグメントを融合させた。

【0270】

プラスミドpQb185へクローニングするためのNcoI部位を含む上流プライマーp1.44、またはプラスミドpQb10へクローニングするためのXbaI部位を含むp1.45、およびHindIII制限部位を含む下流プライマーp1.46を使用した(制限酵素の認識配列は下線部)：

20

p1.44 5'-AACC ATG GCA AAT AAG CCA ATG CAA CCG-3' (配列番号79)

p1.45 5'-AATCTAGAATTTTCTGCGCACCCATCCCGG-3' (配列番号80)

p1.46 5'-AAAAGC TTA AGC AGT AGT ATC AGA CGA TAC G-3' (配列番号81)

【0271】

2つの追加的プライマー、p205-262に含まれているフラグメントの5'末端でアニーリングしているp1.47、およびプラスミドp205-246に含まれるフラグメントの3'末端でアニーリングしているp1.48を用いることにより、初回PCRにおいてフラグメントを増幅した。プライマーp1.47およびp1.48は互いに相補的である。

30

p1.47: 5'-GAGTGATCCAACCTCGTTTATCAACTACATTT-TCAGCAAGTCTG-3' (配列番号82)

p1.48: 5'-CAGACTTGCTGAAAATGTAGTTGATAAACGA-GTTGGATCACTC-3' (配列番号83)

【0272】

最初のPCR反応で、2つのフラグメントが生成された。第一フラグメントは、プライマーp1.45およびp1.48および鑄型p205-246により生成された。第二フラグメントは、プライマーp1.47およびp1.46および鑄型p205-262により生成された。両フラグメントを、プライマー組合せp1.45およびp1.46またはp1.44およびp1.46による、第二PCR反応、スプライス-オーバーラップ伸長についての鑄型として使用した。2つの2段階PCR反応の生成物を、XbaIまたはNcoIおよびHindIIIにより消化し、エシェリキア・コリ(E.coli)トリプトファンオペロンプロモーターの制御下にある2つのpGEM誘導発現ベクター、pQb10またはpQb185へ同制限部位によりクローン化した。

40

【0273】

2種のプラスミド、pQb10における野生型AP205 CP(配列番号28)についてのコーディング遺伝子を含むpAP283-58(配列番号27)、およびpQb185における、Pro5からThrへの突然変異(配列番号29)を伴うpAP281-32(配列番号30)が得られた。DNA配列決定法によりコートタンパク質配列が証明された。PAP283-58は、XbaI部位の下流、CPのATGコドンの上流49ヌ

50

クレオチドを含み、そしてコートタンパク質 mRNA の推定的原リボソーム結合部位を含む。

【0274】

組換え AP205 VLP の発現および精製

A . 組換え AP205 VLP の発現

エシェリキア・コリ (E.coli) JM109 を、プラスミド pAP283-58 により形質転換した。20 µg/ml アンピシリン含有 LB 液体培地 5 ml に単一コロニーを接種し、37 °C で 16 ~ 24 時間振とうせずにインキュベーションした。

【0275】

調製されたイノキュラムを、100 ~ 300 ml の 10 µg/ml アンピシリン含有 LB 培地中で 1 : 100 に希釈し、振とうせずに 37 °C で一晩インキュベーションした。生成された第二イノキュラムを、0.2% グルコースおよびリン酸緩衝液を含む 2TY 培地中で 1 : 50 に希釈し、振とう器中 37 °C で一晩インキュベーションした。細胞を遠心分離により採取し、-80 °C で冷凍した。

10

【0276】

B . 組換え AP205 VLP の精製

溶液および緩衝液：

溶菌緩衝液

50 mM の トリス - HCl、pH 8.0、5 mM の EDTA、0.1% トリトン X100 および PMSF、1 ml 当たり 5 マイクログラム。

20

SAS

飽和硫酸アンモニウム水溶液

緩衝液 NET

20 mM の トリス - HCl、pH 7.8、5 mM の EDTA および 150 mM の NaCl。

PEG

NET 中 40% (w/v) ポリエチレングリコール 6000

【0277】

溶菌：

冷凍細胞を細胞 1 g につき 2 ml で溶菌緩衝液に再懸濁した。混合物を 22 kHz で 5 回 15 秒間超音波処理し、1 分間隔で溶液を氷上で冷却した。次いで、F34-6-38 ローター (エッペンドルフ) を用いて、ライゼートを 20 分間 12000 rpm で遠心分離にかけた。特記しない場合、同ローターを用いて、下記遠心分離工程を全て実施した。上清を 4 °C で貯蔵し、細胞屑を溶菌緩衝液で 2 回洗浄した。遠心分離後、ライゼートおよび洗浄画分の上清をプールした。

30

【0278】

さらに硫酸アンモニウム沈澱を用いることにより、AP205 VLP が精製され得る。第一工程では、AP205 VLP が沈澱しない硫酸アンモニウム濃度を選択する。生じたペレットを廃棄する。次工程では、AP205 VLP が大量沈澱する硫酸アンモニウム濃度を選択し、AP205 VLP をこの沈澱工程のペレットから遠心分離 (14000 rpm、20 分間) により単離する。得られたペレットを NET 緩衝液中で可溶化する。

40

【0279】

クロマトグラフィー

プールした上清からのキャプシドタンパク質を、セファロース 4B カラム (2.8 x 70 cm) にローディングし、4 ml / 時 / 画分で NET 緩衝液により溶離した。画分 28 ~ 40 を集め、飽和の 60% の硫酸アンモニウムにより沈澱させた。画分を、SDS-PAGE および AP205 に特異的な抗血清によるウエスタン・ブロットにより沈澱前に分析した。遠心分離により単離されたペレットを、NET 緩衝液中で再可溶化し、セファロース 2B カラム (2.3 x 65 cm) にローディングし、3 ml / 時 / 画分で溶離した。

50

画分を SDS-PAGE により分析し、画分 44 ~ 50 を集め、プールし、60% 飽和の硫酸アンモニウムにより沈澱させた。遠心分離により単離されたペレットを NET 緩衝液に再可溶化し、セファロース 6B カラム (2.5 x 47 cm) で精製し、3 ml / 時 / 画分で溶離した。画分を SDS-PAGE により分析した。画分 23 ~ 27 を集め、塩濃度を 0.5 M に調節し、PEG 6000 により沈澱させ、水中 40% のストックから加えて最終濃度 13.3% にした。遠心分離により単離されたペレットを NET 緩衝液中で再可溶化し、上記と同様セファロース 2B カラムにローディングし、同様に溶離した。画分 43 ~ 53 を集め、60% 飽和の硫酸アンモニウムにより沈澱させた。遠心分離により単離されたペレットを水で再可溶化し、生成されたタンパク質溶液を水に対して充分透析した。細胞 1 グラム当たり精製タンパク質約 10 mg が分離され得る。

10

【0280】

電子顕微鏡におけるウイルス様粒子の検査は、それらがファージ粒子と同一であることを示した。

【0281】

実施例 2

HBcAg (1-149) の c/e1 エピトープへのリシン残基含有ペプチドの挿入
HBcAg の c/e1 エピトープ (残基 72 ~ 88) を、B 型肝炎ウイルスキャプシド (HBcAg) の表面における先端領域に位置させる。この領域の一部 (プロリン 79 およびアラニン 80) を、ペプチド Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (配列番号 33) により遺伝学的に置換することにより、HBcAg-Lys 構築物 (配列番号 26) が生成した。導入されたリシン残基は、遊離システイン基を含む抗原と HBcAg 粒子の分子間化学的架橋に使用され得る反応性アミノ基をその側鎖に含む。

20

【0282】

配列番号 78 に示されたアミノ酸配列を有する HBcAg-Lys DNA を、PCR により生成した。HBcAg フラグメントをコード化する 2 つのフラグメント (アミノ酸残基 1 ~ 78 および 81 ~ 149) を、PCR により別々に増幅した。これらの PCR に使用したプライマーはまた、Gly-Gly-Lys-Gly-Gly ペプチド (配列番号 33) をコード化する DNA 配列を導入した。プライマー EcoRIHBcAg (s) および Lys-HBcAg (as) を用いて、HBcAg (1 ~ 78) フラグメントを pEco63 から増幅した。プライマー Lys-HBcAg (s) および HBcAg (1-149) Hind (as) を用いて、HBcAg (81 ~ 149) フラグメントを pEco63 から増幅した。プライマー Lys-HBcAg (as) および Lys-HBcAg (s) は、2 つの PCR 産物の末端に相補的 DNA 配列を導入することにより、後続のアセンブリー PCR において 2 つの PCR 産物を融合させた。プライマー EcoRIHBcAg (s) および HbcAg (1-149) Hind (as) を用いる PCR により、構築されたフラグメントを増幅した。

30

【0283】

PCR については、100 pmol の各オリゴおよび 50 ng の鋳型 DNA を、2 単位の Pwo ポリメラーゼ、0.1 mM の dNTP および 2 mM の MgSO₄ との 50 ml 反応混合物中で使用した。両反応について、以下の要領で温度サイクリングを実施した：94 で 2 分間；30 サイクルの 94 (1 分)、50 (1 分)、72 (2 分)。

40

【0284】

プライマー配列：

EcoRIHBcAg (s) :

(5'-CCGGAATTCATGGACATTGACCCCTTATAAAG-3') (配列番号 58) ;

Lys-HBcAg (as) :

(5'-CCTAGAGCCACCTTTGCCACCATCTTCTAAATTAG-TACCCACCCAGGTAGC-3') (配列番号 59) ;

);

Lys-HBcAg (s) :

(5'-GAAGATGGTGGCAAAGGTGGCTCTAGGGACC-TAGTAGTCAGTTATGTC -3') (配列番号 60) ;

50

HBcAg (1-149) Hind (as) :

(5'-CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG-3') (配列番号 61)

【0285】

PCRによる2種のPCRフラグメントの融合については、100 pmolのプライマー EcoRI HBcAg (s) および HbcAg (1-149) Hind (as) を、2単位の Pwo ポリメラーゼ、0.1 mMの dNTP および 2 mMの MgSO₄ を含む 50 ml 反応混合物中2つの精製 PCR フラグメント 100 ng と共に使用した。PCR サイクリング条件は次の通りであった：94 で2分間；30サイクルの94 (1分)、50 (1分)、72 (2分)。構築された PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、精製し、EcoRI および HindIII 制限酵素により適切な緩衝液中で19時間消化した。消化された DNA フラグメントを、EcoRI / HindIII - 消化 pKK ベクターヘライゲーションすることにより、pKK - HBcAg - Lys 発現ベクターを生成した。ベクターへの PCR 産物の挿入を、EcoRI / HindIII 制限分析および挿入体の DNA 配列決定法により分析した。

10

【0286】

実施例 3

HBcAg - Lys の発現および精製

エシェリキア・コリ (E.coli) 株 K802 または JM109 を、pKK - HBcAg - Lys により形質転換した。細菌の一晚培養物 1 ml を用いて、100 μg/ml のアンピシリンを含む LB 培地 100 ml に接種した。この培養物を、600 nm での OD が約 0.8 に達するまで 37 で4時間増殖させた。IPTG を加えて 1 mM の最終濃度にするにより、HBcAg - Lys の合成の誘導を実施した。誘導後、細菌をさらに 37 で4時間振とうした。5000 × g で15分間遠心分離にかけることにより、細菌を採取した。ペレットを -80 で冷凍した。ペレットを解凍し、200 μg/ml のリゾチームおよび 10 μl のベンゾナーゼ (メルク) を補った溶菌緩衝液 (10 mM の NaHPO₄、pH 7.0、30 mM の NaCl、0.25% のトウイーン - 20、10 mM の EDTA) に再懸濁した。細胞を室温で30分間インキュベーションし、超音波処理により崩壊させた。pKK - HBcAg - Lys 発現プラスミドまたは対照プラスミドを含むエシェリキア・コリ (E.coli) 細胞を、IPTG による HBcAg - Lys 発現の誘導に使用した。IPTG の添加前、pKK - HBcAg - Lys プラスミドを伴う細菌培養物および対照プラスミドを伴う培養物から試料を採取した。IPTG 添加の4時間後、pKK - HBcAg - Lys を含む培養物および対照培養物から再び試料を採取した。SDS - PAGE、次いでクーマシー染色によりタンパク質発現をモニターした。

20

30

【0287】

次いで、ライゼートを 12000 × g で30分間遠心分離にかけることにより、不溶性細胞屑を除去した。HBcAg に対するモノクローナル抗体 (YVS1841、米国ニューヨーク、ウエストベリー、Accurate Chemical and Scientific Corp. から購入) を用いたウエスタン・ブロッティングにより上清およびペレットを分析したところ、顕著な量の HBcAg - Lys タンパク質が可溶性であることが示された。簡単に述べると、HBcAg - Lys を発現するエシェリキア・コリ (E.coli) 細胞および対照細胞からのライゼートを、30分間 14000 × g での遠心分離にかけた。上清 (= 可溶性画分) およびペレット (= 不溶性画分) を分離し、SDS 試料緩衝液で等量に希釈した。SDS - PAGE、次いで抗 HBcAg モノクローナル抗体 YVS1841 によるウエスタン・ブロッティングにより試料を分析した。

40

【0288】

清澄化細胞ライゼートを、4 ml の 65% しょ糖溶液に 3 ml の 15% しょ糖溶液、次いで 4 ml の細菌ライゼートを載せたものから成るしょ糖密度段階勾配を用いる段階 - 密度勾配遠心分離に使用した。試料を、4、10000 × g で3時間の遠心分離にかけた。遠心分離後、勾配の上部からの 1 ml 画分を集め、SDS - PAGE、次いでクーマシー染色により分析した。HBcAg - Lys タンパク質は、クーマシー染色により検出

50

された。

【0289】

H B c A g - L y s タンパク質は、15～65%しょ糖間の界面で濃厚化しており、それがキャプシド粒子を形成したことを示していた。細菌タンパク質の大部分は勾配のしょ糖不含有上層に残存していたため、H B c A g - L y s 粒子の段階 - 勾配密度遠心分離により、粒子が濃厚化され、かつ部分的に精製された。

【0290】

H B c A g - L y s の大規模発現および精製を以下の要領で実施した。100mlのLB、100μg/mlアンピシリンに単一コロニーを接種し、37℃で一晩培養物を増殖させることにより、一晩培養物を調製した。前培養物25mlを、翌日800mlのLBアンピシリン培地中で希釈し、そして培養物を0.6～0.8の光学密度OD₆₀₀に増殖させた。次いで、培養物を1mMのIPTGにより誘導し、さらに4時間増殖させた。細胞を採取し、本質的に上記要領で溶解した。

10

【0291】

次いで、H B c A g - L y s を、まず清澄化細胞ライゼートから硫酸アンモニウム(30%飽和)によりタンパク質を沈澱させ、次いでゲル濾過カラム(セファクリルS-400、ファルマシア)に再可溶化ペレットをローディングすることにより精製した。プールした画分を硫酸アンモニウムにより再沈澱させ、ペレットを再可溶化し、再度同ゲル濾過カラムにローディングした。最後に画分をプールし、濃縮し、ブラッドフォード試験(バイオラッド)を用いて濃度を評価した。

20

【0292】

実施例4

遊離システイン残基を欠き、挿入リシン残基を含むH B c A g の構築

本明細書ではH B c A g - l y s - 2 c y s - M u t とも称される、配列番号25における48および107位に相当する位置のシステイン残基を欠き、挿入されたリシン残基を含む肝炎コア抗原(H B c A g)を、以下の方法を用いて構築した。

【0293】

まず、以下のPCRプライマーの組合せにより、上記実施例2の要領で調製されたH B c A g - L y s 遺伝子の3フラグメントを別々に増幅することにより、2種の突然変異体を導入した。PCR方法および慣用的クローニング技術を用いて、H B c A g - l y s - 2 c y s - M u t 遺伝子を調製した。

30

【0294】

簡単に述べると、以下のプライマーを用いてフラグメント1を調製した：

プライマー1：EcoRIHBcAg(s)

CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG(配列番号58)

プライマー2：48a s

GTGCAGTATGGTGAGGTGAGGAATGCTCAGGAGACTC(配列番号62)

【0295】

以下のプライマーを用いてフラグメント2を調製した：

プライマー3：48s

GSCTCTCCTGAGCATTCTCACCTCACCATACTGCAC(配列番号63)

プライマー4：107a s

CTTCCAAAAGTGAGGGAAGAAATGTGAAACCAC(配列番号64)

40

【0296】

以下のプライマーを用いてフラグメント3を調製した：

プライマー5：H B c A g 149h i n d - a s

CGCGTCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAGCGTTGATAG(配列番号65)

プライマー6：107s

GTGGTTTCACATTTCTCCCTCACTTTTGAAG(配列番号66)

【0297】

50

次いで、フラグメント1および2を、PCRプライマーEcoRIHBcAg(s)および107asと組合せることにより、フラグメント4を得た。次いで、フラグメント4およびフラグメント3を、プライマーEcoRIHBcAg(s)およびHBcAg149hind-asと合わせることで、完全長遺伝子を製造した。次いで、完全長遺伝子をEcoRI(GAATTC)およびHindIII(AAGCTT)酵素により消化し、同じ制限部位で切断したpKKベクター(ファルマシア)へクローン化した。HBcAg-lys-2cys-Mutの発現および精製を実施例3に示した要領で実施した。

【0298】

実施例5

HBcAg1-185-Lysの構築

肝炎コア抗原(HBcAg)1-185を、実施例2記載の要領で修飾した。c/e1エピトープの一部(残基72~88)領域(プロリン79およびアラニン80)を、ペプチドGly-Gly-Lys-Gly-Gly(配列番号33)により遺伝学的に置換することにより、HBcAg-Lys構築物(配列番号26)を生成した。導入されたりシン残基は、遊離システイン基を含む抗原とHBcAg粒子の分子間化学的架橋に使用され得る反応性アミノ基をその側鎖に含む。PCR方法および慣用的クローニング技術を用いて、HBcAg1-185-Lys遺伝子を調製した。

【0299】

上記実施例2の要領で、pEco63からのHBcAg遺伝子の2つの別々のフラグメントを増幅し、それに続いて2つのフラグメントをPCRにより融合することにより、Gly-Gly-Lys-Gly-Gly配列(配列番号33)を挿入し、完全長遺伝子を組立てた。以下のPCRプライマーの組合せを使用した：

フラグメント1：

プライマー1：EcoRIHBcAg(s)(配列番号58)(実施例2参照)

プライマー2：Lys-HBcAg(as)(配列番号59)(実施例2参照)

フラグメント2：

プライマー3：Lys-HBcAg(s)(配列番号60)(実施例2参照)

プライマー4：HBcAgwtHindIII

CGCGTCCCAAGCTTCTAACATTGAGATTCCTCCGAGATTG(配列番号67)

組立：

プライマー1：EcoRIHBcAg(s)(配列番号58)(実施例2参照)

プライマー2：HBcAgwtHindIII(配列番号67)

【0300】

次いで、組立てられた完全長遺伝子を、EcoRI(GAATTC)およびHindIII(AAGCTT)酵素により消化し、同じ制限部位で切断したpKKベクター(ファルマシア)へクローン化した。

【0301】

実施例6

HBcAgのMIR領域におけるペプチドエピトープの融合

HBcAg1-185の残基79および80を、配列VNLTWSRASG(配列番号68)のエピトープC H3により置換した。C H3配列は、ヒトIgE重鎖の第三定常ドメインの配列に由来する。アセンブリーPCR方法を用いて、エピトープをHBcAg1-185配列に挿入した。第一PCR段階において、ATCCクローンpEco63から生じ、プライマーHBcAg-wtEcoRI fwdおよびHBcAg-wtHindIII revにより増幅されたHBcAg1-185遺伝子を、2つの別々の反応における鋳型として用いることにより、C H3配列をコードする配列エレメントを含む2つのフラグメントを増幅した。次いで、これら2フラグメントを、第二PCR段階、アセンブリーPCR反応で組立てた。

【0302】

第一PCR段階におけるプライマー組合せ：HBcAg-wtHindIII revとC

10

20

30

40

50

H3 fwd、および C H3 rev と H B c A g - w t E c o R I f w d。アセンブリーPCR反応において、第一PCR段階で分離された2つのフラグメントを、外側プライマーを用いずに3PCRサイクル中に組立て、その後外側プライマーを次の25サイクルの間反応混合物に加えた。外側プライマー：H B c A g - w t E c o R I f w d および H B c A g - w t H i n d I I I r e v。

【0303】

PCR産物を、エシェリキア・コリ (E.coli) で発現させるため、E c o R I および H i n d I I I 部位を用いて p K K 2 2 3 . 3 でクローン化した (実施例2参照)。実施例2記載の要領で、キメラVLPをエシェリキア・コリ (E.coli) で発現させ、精製した。H B c A g 1 - 1 8 5 - C H 3 がゲル濾過から溶離するときの溶離体積は、キメラVLPとの融合タンパク質の組立を示した。

10

【0304】

プライマー配列：

【表1】

CeH3fwd:

5' GTT AAC TTG ACC TGG TCT CGT GCT TCT GGT GCA TCC AGG GAT CTA GTA GTC 3'

(配列番号69)

V N L T W S R A S G A80 S R D L V V86

(配列番号70)

20

【表2】

CeH3rev:

5' ACC AGA AGC ACG AGA CCA GGT CAA GTT AAC ATC TTC CAA ATT ATT ACC CAC 3'

(配列番号71)

D78 E L N N G V72

(配列番号72)

H B c A g - w t E c o R I f w d :

5' ccggaattcatggacattgacccttataaag (配列番号73)

H B c A g - w t H i n d I I I r e v :

5' cgcgtcccaagcttctacattgagattcccgagattg (配列番号74)

【0305】

実施例7

H B c A g の M I R 領域における A 1 - 6 ペプチドの融合

H B c A g 1 - 1 8 5 の残基79および80を、D A E F R H (配列番号75) または D A E F G H (配列番号76) の配列の A 1 - 6 ペプチドにより置換する。実施例6の記載と同じ戦略を用いて、2種のオーバーラッププライマーを設計し、アセンブリーPCRにより融合タンパク質を構築する。PCR産物を p K K 2 2 3 . 3 ベクターでクローン化し、エシェリキア・コリ (E.coli) K 8 0 2 で発現させる。実施例3の記載と同様にキメラVLPを発現させ、精製する。

30

40

【0306】

実施例8

C P 伸長部の19位が切頭化された Q A 1 タンパク質の C - 末端への A 1 - 6 ペプチドの融合

配列 D A E F R H (配列番号75) または D A E F G H (配列番号76) を有する、Q A 1 遺伝子の5'末端にアニーリングしているプライマーおよび A 1 遺伝子の3'末端にアニーリングし、さらに A 1 - 6 ペプチドをコードする配列エレメントを含むプライマーを、鋳型として p Q 1 0 を用いる PCR 反応で使用する。PCR産物を p Q 1 0

50

(Kozlovska T.M. et al., Gene 137: 133-37 (1993)) でクローン化し、実施例 1 の記載と同様にしてキメラ V L P を発現させ、精製する。

【 0 3 0 7 】

実施例 9

f r コートタンパク質の 2 および 3 位間における A 1 - 6 ペプチドの挿入

配列 D A E F R H (配列番号 7 5) または D A E F G H (配列番号 7 6) を有する、A 1 - 6 ペプチドの配列についてコードし、B s p 1 1 9 I 適合末端および枠内挿入を可能にする追加ヌクレオチドを含む相補的プライマーを、標準分子生物学技術により p F r d 8 ベクター (Pushko, P. et al., Prot. Eng. 6: 883-91 (1993)) の B s p 1 1 9 I 部位に挿入する。別法として、p F r d 8 ベクターのオーバーハングを、B s p 1 1 9 I で消化後、クレノウ断片で満たし、A 1 - 6 ペプチドの配列をコードするオリゴヌクレオチドおよび枠内クローニング用の追加ヌクレオチドを、クレノウ処理後に p F r d 8 でライゲーションする。正しい配向で挿入体を含むクローンを、配列決定法により解析する。エシェリキア・コリ (E.coli) J M 1 0 9 またはエシェリキア・コリ (E.coli) K 8 0 2 におけるキメラ融合タンパク質の発現および精製を、Pushko, P. et al., Prot. Eng. 6: 883-91 (1993) の記載にしたがって実施するが、ただしクロマトグラフィー工程については、セファロース C L - 4 B またはセファクリル S - 4 0 0 (ファルマシア) カラムを用いて実施する。実施例 1 で Q について記載した手順と同様にして、細胞ライゼートを硫酸アンモニウムにより沈澱させ、2 連続ゲル濾過精製工程により精製する。

【 0 3 0 8 】

実施例 1 0

ベクター p O G S 8 1 1 1 における T y 1 タンパク質 p 1 の 6 7 位および 6 8 位間への A 1 - 6 ペプチドの挿入

配列 D A E F R H (配列番号 7 5) または D A E F G H (配列番号 7 6) を有し、p O G S 8 1 1 1 の N h e I 部位と適合し得る末端をもつ、A 1 - 6 ペプチドをコードする 2 つの相補的オリゴヌクレオチドを合成する。欧州特許第 6 7 7 1 1 1 号の記載にしたがって、追加ヌクレオチドを付加することにより、A 1 - 6 ペプチドをコードする配列を枠内挿入させる。挿入されたエピトープの両端に隣接するアミノ酸 A S および S S は、p O G S 8 1 1 1 の T y A (d) 遺伝子におけるオリゴヌクレオチドの挿入から生じる改変された N h e I 部位によりコード化される。

【 0 3 0 9 】

欧州特許第 0 6 7 7 1 1 1 号およびその引用文献の記載にしたがって、P O G S 8 1 1 1 を、サッカロマイシス・セレヴィシエ (S.cervisiae) 株 M C 2 へ形質転換し、キメラ T y V L P を発現させる。キメラ T y V L P を、欧州特許第 6 7 7 1 1 1 号の記載にしたがってしょ糖密度勾配超遠心分離により精製する。

【 0 3 1 0 】

実施例 1 1

乳頭腫ウイルス 1 型 (B P V - 1) の主要キャプシドタンパク質 L 1 への A 1 - 6 ペプチドの挿入

配列 D A E F R H (配列番号 7 5) または D A E F G H (配列番号 7 6) を有する A 1 - 6 ペプチドをコードする配列を、記載された要領 (Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. USA 96: 2373-2378 (1999)) で p F a s t B a c 1 (G I B C O / B R L) ベクターにおいてクローン化された B P V - 1 L 1 遺伝子のアミノ酸 1 3 0 ~ 1 3 6 をコードする配列へ置換する。構築物の配列を、ヌクレオチド配列解析により証明する。製造業者による記載にしたがって G I B C O / B R L バクテリオウイルス系を用いて、組換えバクテリオウイルスを生成させる。Kirnbauer, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:1218 0-84 (1992) および Greenstone, H.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95:1800-05 (1998) による記載にしたがって、キメラ V L P をバクテリオウイルス感染 S f 9 細胞から精製する。

【 0 3 1 1 】

実施例 1 2

V L P に融合させた A 1 - 6 ペプチドによるマウスの免疫化

実施例 7 ~ 1 1 で生成された配列 D A E F R H (配列番号 7 5) または D A E F G H (配列番号 7 6) の A 1 - 6 ペプチドを呈示するキメラ V L P を、実施例 1 3 および 1 4 の記載にしたがってヒトトランスジェニック A P P マウスまたは C 5 7 / B L 6 マウスの免疫化に使用する。免疫化マウスから採取した血清を、実施例 1 3 の記載にしたがって A 1 - 6 ペプチドまたは A 1 - 4 0 または A 1 - 4 2 特異的 E L I S A で分析する。

【 0 3 1 2 】

実施例 1 4 記載の要領で、大群のヒト A P P トランスジェニックマウスを免疫化することにより、ワクチンの防御効果を調べる。

【 0 3 1 3 】

実施例 1 3

Q V L P への A 1 - 6 ペプチドのカップリング (Q A 1 - 6)、および Q A 1 - 6 によるマウスの免疫化

A . A 1 - 6 ペプチド Q V L P のカップリング

A 1 - 6 ペプチド (配列 : NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (配列番号 7 7) を化学的に合成した。最初の N H 2 基は、ペプチドが遊離 N - 末端を有することを示し、最後の N H 2 基は、ペプチドがアミド化されたカルボキシ末端を有することを示す。実施例 1 の記載と同様に、Q V L P を発現および精製した。2 0 m M の H e p e s、1 5 0 m M の N a C l、p H 8 . 2 (H B S、p H 8 . 2) 中において Q V L P を、2 m g / m l の濃度 (ブラッドフォード検定法で測定) で、D M S O 中のストックから希釈した 1 . 4 3 m M の S M P H (ピアス、ロックフォード、イリノイ) と室温 (R T) で 3 0 分間反応させた。次いで、反応混合物を 4 で H B S、p H 8 . 2 緩衝液に対して透析し、D M S O 中の 5 0 m M ストックからの反応混合物中で希釈した、0 . 3 6 m M の A 1 - 6 ペプチドと反応させた。カップリング反応を 1 5 で 2 時間進行させ、反応混合物を 1 0 0 0 倍容量の H B S、p H 8 . 2 に対して 2 x 2 時間透析し、アリコートに分けて液体窒素中で瞬間冷凍し、さらなる使用時まで - 8 0 で貯蔵した。

【 0 3 1 4 】

アリコートを解凍し、Q V L P サブユニットへの A 1 - 6 ペプチドのカップリングを S D S - P A G E により評価し、ブラッドフォード検定法でタンパク質濃度を測定した。カップリング反応の結果を図 1 に示す。

【 0 3 1 5 】

図 1 は、A 1 - 6 ペプチドおよび Q V L P のカップリング反応の S D S - P A G E 分析を示す。試料を還元的条件下 1 6 % トリス - グリシゲルでの電気泳動にかけ、クーマシーブリリアントブルーで染色する。レーン 1 はタンパク質マーカであり、対応する分子量はゲルの左境界線上に示されている。レーン 2 は誘導体化された Q V L P タンパク質であり、レーン 3 は、A 1 - 6 ペプチドへの Q V L P タンパク質のカップリング反応の上清であり、レーン 4 は、A 1 - 6 ペプチドへの Q V L P タンパク質のカップリング反応のペレットである。モノマー当たりの 1、2 および 3 ペプチドのカップリングに対応するカップリング生成物を、図面の矢印で示す。サブユニット当たり 1 . 5 を越えるペプチドが平均してカップリングされた。カップリングされずに残されたサブユニットはほぼ無かった。

【 0 3 1 6 】

B . Q V L P にカップリングさせた A 1 - 6 ペプチドによるマウスの免疫化および免疫応答の分析

A 1 - 6 ペプチドにカップリングされた Q V L P (ここでは Q b - A b - 1 - 6 と称す) を、0 日目および 1 4 日目にマウス (3 マウス) に皮下注射した。A 1 - 6 ペプチドを上記要領で Q V L P タンパク質にカップリングした。各マウス (C 5 7 B L / 6) を、P B S 中で 2 0 0 μ l に希釈したワクチン 1 0 μ g で免疫化した。2 1 日目にマウスの眼窩後方から採血し、A 1 - 6 ペプチドに特異的な抗体の力価を A 1 - 6 に

10

20

30

40

50

対する E L I S A で測定した。化学架橋物質スルホ - S P D P を用いて A 1 - 6 ペプチドを牛リボヌクレアーゼ A にカップリングした。10 μg / ml 濃度のカップリングしたリボヌクレアーゼ調製物で、E L I S A プレートを被覆した。プレートを遮断し、次いで系列希釈マウス血清とインキュベーションした。結合抗体を酵素標識抗マウス I g G 抗体で検出した。対照として、同マウスの免疫前血清についても試験した。結果を図 2 に示す。

【0317】

図 2 は、Q V L P にカップリングさせた A 1 - 6 ペプチドに対して免疫化したマウスの血清中の A 1 - 6 ペプチドに特異的な I g G 抗体の E L I S A 分析を示す。免疫化した 3 マウス (A 1 ~ A 3) についての結果を示す。免疫前血清を図面では「pre」として示す。一免疫前血清についての結果を示す。免疫前血清と「Qb - Ab - 1 - 6」により免疫化したマウスの血清の比較結果は、ペプチド A 1 - 6 に対する強い特異的抗体応答がアジュバントの不存在下で得られることを示している。

10

【0318】

C . A 1 - 4 0 ペプチドに対する E L I S A

ヒト A 1 - 4 0 または A 1 - 4 2 ペプチドストックを D M S O 中で調製し、使用前にコーティング緩衝液で希釈した。E L I S A プレートを 0 . 1 μg / ウェルの A 1 - 4 0 ペプチドで被覆した。プレートを遮断し、次いで上記で得られた系列希釈マウス血清とインキュベーションした。結合抗体を、酵素標識抗マウス I g G 抗体で検出した。対照として、ワクチン接種前に得た血清も含ませた。基準より上の平均 3 標準偏差を示す血清希釈度を計算し、「E L I S A 力価」と定義した。特異抗体は免疫前血清からは全く検出されなかった。3 マウスについて得られた力価は 1 : 1 0 0 0 0 0 であり、A 1 - 4 0 に対する強い特異的免疫応答を示した。すなわち、Q V L P にカップリングした A 1 - 6 による免疫化は、A 1 - 4 0 との交差反応性を示す強い抗体力価を誘発する。

20

【0319】

図 3 は、E L I S A の結果を示す。上記要領で Q V L P にカップリングした A 1 - 6 ペプチドで免疫化した 3 マウス (A 1 ~ A 3) の血清について得た、4 0 5 nm での光学密度としての E L I S A シグナルを、x 軸で示した希釈度の各々についてプロットする。21 日目に採血した 3 マウスについての結果を示す。また、免疫前血清も含まれている。血清中における抗体の力価を、上記要領で測定したところ、3 マウス全てについて 1 : 1 0 0 0 0 0 であった。

30

【0320】

実施例 1 4

ヒト A P P トランスジェニックマウスの免疫化

ヒト A P P 導入遺伝子 (Sturchler-Pierrat et al., Proc.Natl. Acad.Sci. USA 94: 13287-13292 (1997)) をもつ 8 ヶ月齢雌 A P P 2 3 マウスをワクチン接種に使用する。滅菌 P B S で希釈した 2 5 μg のワクチンをマウスに皮下注射し、14 日後同量のワクチンで追加抗原を投与する。免疫化開始前およびブースター注射の 7 日後にマウスの尾部静脈から採血する。実施例 1 3 記載の要領で A 1 - 6、A 1 - 4 0 および A 1 - 4 2 に特異的な抗体の存在について血清を分析する。

40

【0321】

実施例 1 5

Q V L P へのマウス A 1 - 6 ペプチドのカップリング、マウスにおけるワクチン注射、および免疫応答の分析

ネズミ A 1 - 6 ペプチド (配列 : NH₂-DAEFGHGHC-CONH₂) (配列番号 7 8) を化学合成し、実施例 1 3 記載の要領で Q V L P へのカップリングに使用する。ワクチンを C 5 7 B L / 6 マウスに注射し、マウス A 1 - 6、マウス A 1 - 4 0 およびマウス A 1 - 4 2 に対して誘発された抗体の力価を測定する。免疫化および E L I S A 測定を実施例 1 3 と同様にして実施する。

【0322】

50

実施例 16

A 1 - 6 に対して誘導された血清のヒト A P P トランスジェニックマウス斑および A D 斑への結合

脳薄片における免疫組織化学

18ヶ月齢異型接合 A P P 23 マウスの連続的パラフィン脳薄片および A D 患者ブランク III 段階 (インスティテュート・オブ・パソロジー、ユニバーシティー・バーゼル) からの内嗅野薄片を、染色に使用した。濃蟻酸で5分間ヒト脳薄片を処理し、マウス脳薄片を3分間90 で電子レンジ加熱することにより抗原性を高めた。ヒト A 1 - 6 (実施例 13 記載の要領で得た) に対して誘導されたマウス血清を、3%ヤギ血清を含む P B S 中で 1 : 1000 に希釈し、一晚インキュベーションした。すすいだ後、薄片を、P B S 中で 1 : 200 に希釈したビオチニル化抗マウス二次抗体と1時間インキュベーションした。すすいだ後、薄片をさらにアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ技術 (A B C - エリートキット P K 6 1 0 0 ; ベクター・ラボラトリーズ) により処理した。最後に、薄片をジアミノベンジジン (D A B) 金属高感度基質 (ベーリンガー、コード 1718096) と反応させ、ヘマルムで対比染色し、脱水し、キシレン中で清澄化し、カバーガラスで覆った。

【0323】

組織学的染色の結果を図 4 A および B に示す。Q V L P にカップリングしたヒト A 1 - 6 に対して免疫化した3マウスの血清により薄片を染色した。各血清は、トランスジェニックマウスおよび A D からのアミロイド斑を明確に染色した。3血清の一つについての結果を示す。ヒト A 1 - 6 に対して誘導された血清は、トランスジェニックヒト A P P 23 マウスのアミロイド斑、および A D 患者からのアミロイド斑を明確に染色する。免疫前血清は陰性であった。細胞外アミロイド斑および摘出された血管は、抗体により染色される。

【0324】

実施例 17

マウス斑の組織学評価による、ヒト A 1 - 6 に対して誘導された血清の特異性

脳薄片における免疫組織化学

ヒト A P P を過剰発現する3ヶ月および18ヶ月齢異型接合 A P P 23 マウスの連続的パラフィン脳薄片を、実施例 16 の記載と同様にして、実施例 13 に記載されたヒト A 1 - 6 に対して誘導された代表的マウス血清、またはマウスまたはヒト A P P の最後の 20 アミノ酸に特異的であるため、A を認識しないウサギポリクローナル抗体により染色した。ウサギポリクローナル抗体とインキュベーションした薄片を実施例 16 記載の要領で処理するが、ただし、ビオチニル化抗ウサギ二次抗体 (B A 1000、ベクター・ラボラトリーズ) を使用した。

【0325】

組織染色の結果を図 5 A、B、C、D および E に示す。薄片の下方左に印された A 1 - 6 は、A 1 - 6 に対して誘導された血清が染色に使用されたことを示しており、「P a b」は、薄片が、A P P₆₉₅ における 676 ~ 695 位に相当する、マウスまたはヒト A P P の最後の 20 アミノ酸に特異的なポリクローナル抗体により染色されたことを示している。

【0326】

18ヶ月齢マウスからの薄片の染色 (図 5 A および C) 比較結果は、A 1 - 6 に対して誘導された血清は脳で発現された A P P とは交差反応しないが、薄片は対照ポリクローナル抗体により染色されることを示している。図 5 B は、アミロイド沈着がまだ見られない時点である、3ヶ月齢マウスからの脳薄片を示し、A P P に特異的なポリクローナル抗体により染色される。図 5 D および 5 E は、それぞれ図 5 A および図 5 B からの海馬の C A 1 錐体層の拡大写真を示す。

【0327】

実施例 18

10

20

30

40

50

A. frキャプシドタンパク質へのA 1-6ペプチドのカップリング

20 mMのHepes、150 mMのNaCl、pH 7.2中の120 μMのfrキャプシドタンパク質の溶液を、ロッキングシェーカーにおいて25 で、DMSO中のストック溶液から希釈した、10倍モル過剰のSMPH（ピラス）と30分間反応させる。それに続いて、反応溶液を、4 の1Lの20 mMのHepes、150 mMのNaCl、pH 7.2に対して2時間2回透析する。次いで、透析したfr反応混合物を、ロッキングシェーカーにおいて16 で2時間5倍モル過剰のA 1-6ペプチド（配列：NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂）（配列番号77）と反応させる。カップリング生成物をSDS-PAGEにより分析する。

【0328】

10

B. HBcAg-Lys-2cys-MutへのA 1-6ペプチドのカップリング

20 mMのHepes、150 mMのNaCl、pH 7.2中の120 μMのHBcAg-Lys-2cys-Mutの溶液1 mlを、ロッキングシェーカーにおいて25 で、DMSO中のストック溶液から希釈した、10倍モル過剰のSMPH（ピラス）と30分間反応させる。それに続いて、反応溶液を、4 の1Lの20 mMのHepes、150 mMのNaCl、pH 7.2に対して2時間2回透析する。次いで、透析したHBcAg-Lys-2cys-Mut反応混合物を、ロッキングシェーカーにおいて16 で2時間5倍モル過剰のA 1-6ペプチド（配列：NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂）（配列番号77）と反応させる。カップリング生成物をSDS-PAGEにより分析する。

【0329】

20

C. 線毛へのA 1-6ペプチドのカップリング

20 mMのHepes、pH 7.4中のエシェリキア・コリ（E.coli）の1型線毛125 μMの溶液を、ロッキングシェーカーにおいてRTで、DMSO中のストック溶液から希釈した、50倍モル過剰の架橋物質SMPH（ピラス）と60分間反応させる。反応混合物をPD-10カラム（アマシャム・ファルマシア・バイオテック）で脱塩する。カラムから溶離するタンパク質含有画分をプールし、脱塩誘導体化線毛タンパク質を、ロッキングシェーカーにおいて16 で2時間5倍モル過剰のA 1-6ペプチド（配列：NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂）（配列番号77）と反応させる。カップリング生成物をSDS-PAGEにより分析する。

【0330】

30

D. fr-キャプシドタンパク質、HBcAg-Lys-2cys-Mutまたは線毛にカップリングしたA 1-6ペプチドによるマウスの免疫化

上記要領でfr-キャプシドタンパク質、HBcAg-Lys-2cys-Mutまたは線毛にカップリングしたA 1-6ペプチドを、0日目および14日目にマウス（3マウス）に皮下注射する。各マウス（C57BL/6）を、PBS中で200 μlに希釈したワクチン10 μgにより免疫化する。21日目にマウスの眼窩後方から採血し、A 1-6ペプチドまたはA 1-40またはA 1-42に特異的な抗体の力価を、実施例13記載の容量でELISAにより測定する。

【0331】

実施例19

40

Q hA 1-6によるアカゲザルの免疫化

A 1-6が自己抗原である場合において、ヒトA 1-6ペプチドに基くワクチンを用いてヒトA に対する抗体の誘導を試験するため、A 配列がヒトとアカゲザルの間では同一であることから、アカゲザルをQ hA 1-6で免疫化した。Q hA 1-6ワクチンを実施例13記載の要領で製造した。年齢10～15歳のアカゲザル4匹を、0日目に50 μgのワクチンで免疫化し、28および56日目に25 μgのワクチンにより2回ブースター投与をした。アカゲザルの背中に皮下注射で免疫化した。0（採血前）、42および70日目に動物から採血した。4 mlの血液を前腕橈側皮静脈から集めた。サルIgGに特異的な二次抗体を用いて、A 1-40に特異的な抗体の力価を、本質的に実施例13記載の要領でELISAにより測定した。

50

【0332】

ヒトおよびアカゲザルは、同じA配列を共有しているため、A 1-40に特異的なアカゲザルにおいて高い抗体力価が得られたことは、QにカップリングしたhA 1-6による免疫化が自己抗原Aに対する寛容性を破壊することを示している。さらに、完全長Aを認識する抗体は、霊長類においてカップリングしたA 1-6フラグメントにより産生される。

【0333】

E L I S Aの結果を図6に示す。図表でプロットされているのは、Q h A 1-6により免疫化した4匹のサル(1~4)の血清中で測定されたA 1-40特異抗体の力価およびサル4匹力価の平均である。力価をOD50力価として表す。OD50は、シグナルがその最大値の半分に達する抗体の希釈度である。最大値(ODmax)は、Q h A 1-27で免疫化したサルに由来し、A 1-40についても認識する基準血清から得られ、同じE L I S Aプレートで測定された。

10

【0334】

97、110、117、124、138、143、152、159、166日目に2匹のサル(上記)から採血し、110日目に25μgのワクチンで3回目のブーストを投与した。血清をプールし(99ml)、A 1-6-特異抗体のアフィニティー精製に使用した。これらの抗体を、1.5μg/mlの濃度で免疫組織化学的染色に使用し、ピオチニル化二次抗サル抗体を検出に使用した。18ヶ月齢の異型接合APP23マウスおよびAD患者(ブランクIII段階)のパラフィン脳薄片を染色に使用した。APP23マウス脳薄片およびAD患者脳薄片の両方において斑特異的染色が観察された(図7)。

20

【0335】

組織学的分析結果を図7AおよびBに示す。A 1-6に特異的な上記アフィニティー精製抗血清によるヒトAPPトランスジェニックマウス斑(APP23株)の染色は、図7Aに描かれている。図7Bは、同じ精製抗血清によるヒトAD斑の染色を示す。精製抗血清を両場合とも1.5μg/mlの濃度で使用した。典型的斑は、両図面において矢印で示されている。

【0336】

実施例20

AP205 VLPへのマウスA 1-6のカップリング、マウスの免疫化および免疫応答の分析

30

A. AP205 VLPへのマウスA 1-6ペプチドのカップリング

ペプチドマウスA 1-6(mA 1-6、配列: NH₂-DAEFGHGCG-CONH₂) (配列番号78)を化学的に合成した。最初のNH₂基は、ペプチドが遊離N-末端を有することを示し、最後のNH₂基は、ペプチドがアミド化されたカルボキシ末端を有することを示す。20mMのHepes、150mMのNaCl、pH8.0(HBS、pH8.0)中のAP205 VLP(実施例1記載の要領で発現および精製された)を、2mg/mlの濃度(ブラッドフォード検定法で測定)で、室温(RT)で30分間、DMSO中100mMのストックから希釈した、2.86mMのSMPH(ピラス、ロックフォード、イリノイ)と反応させた。次いで、反応混合物を、4で2時間、1000倍容量のHBS、pH7.4に対して2回透析した。生成した透析および誘導体化AP205 VLPを液体窒素中で瞬間冷凍し、-20で貯蔵した。誘導体化AP205 VLPを、1体積の20mMのHBS、pH7.4で希釈し、DMSO中50mMのストックから反応混合物中で希釈した719μMのmA 1-6ペプチドと振とうしながら15で2時間反応させた。カップリング反応物を、2時間および一晩、1000倍体積のHBS、pH7.4に対して2回透析した。透析反応混合物をアリコートに分けて液体窒素中で瞬間冷凍し、さらなる使用時まで-80で貯蔵した。

40

【0337】

アリコートを解凍し、AP205 VLPサブユニットへのmA 1-6ペプチドのカップリングをSDS-PAGEにより評価し、タンパク質濃度をブラッドフォード検定法

50

で測定した。カップリング反応の結果を図 8 に示す。

【 0 3 3 8 】

図 8 は、m A 1 - 6 ペプチドと A P 2 0 5 V L P のカップリング反応の S D S - P A G E 分析を示す。試料を還元的条件下 1 6 % トリス - グリシンゲルでの電気泳動にかけ、クーマシーブリリアントブルーで染色する。レーン 1 はタンパク質マーカであり、対応する分子量はゲルの左境界線上に示されている。レーン 2 は A P 2 0 5 V L P タンパク質であり、レーン 3 は、誘導体化された A P 2 0 5 V L P であり、レーン 4 は、m A 1 - 6 ペプチドと A P 2 0 5 V L P のカップリング反応の上清であり、レーン 5 は、m A 1 - 6 ペプチドへの A P 2 0 5 V L P のカップリング反応のペレットである。カップリングされずに残された A P 2 0 5 V L P サブユニットは、ゲルからは全く検出され得ず、一サブユニットにつき幾つかのペプチドに対応するバンドが見られたことから、非常に高いカップリング効率が立証された。特に、1 個の A P 2 0 5 V L P サブユニットにつき 1 個よりかなり多い A 1 - 6 ペプチドが存在する。

10

【 0 3 3 9 】

B . A P 2 0 5 V L P にカップリングした m A 1 - 6 ペプチドによるマウスの免疫化および免疫応答の分析

m A 1 - 6 ペプチドにカップリングされた A P 2 0 5 V L P を、0 日目および 1 4 日目にマウス (3 マウス) に皮下注射した。m A 1 - 6 ペプチドを上記要領で A P 2 0 5 V L P にカップリングした。各マウス (C 5 7 B L / 6) を、P B S 中で 2 0 0 μ l に希釈したワクチン 2 5 μ g で免疫化した。2 1 日目にマウスの眼窩後方から採血し、m A 1 - 6 ペプチドに特異的な抗体の力価を、m A 1 - 6 に対する E L I S A で測定した。化学架橋物質スルホ - S P D P を用いて m A 1 - 6 ペプチドを牛リボヌクレアーゼ A にカップリングした。1 0 μ g / m l 濃度のリボヌクレアーゼ - m A 1 - 6 調製物で、E L I S A プレートに被覆した。プレートを遮断し、次いで系列希釈マウス血清とインキュベーションした。結合抗体を酵素標識抗マウス I g G 抗体で検出した。対照として、同マウスの免疫前血清についても試験した。結果を図 9 に示す。

20

【 0 3 4 0 】

図 9 は、A P 2 0 5 V L P にカップリングさせた m A 1 - 6 ペプチドで免疫化したマウスの血清中の m A 1 - 6 ペプチドに特異的な I g G 抗体の E L I S A 分析を示す。2 1 日目に集めた免疫化した 3 マウス (A 1 d 2 1 ~ A 3 d 2 1) の血清についての結果を示す。免疫前血清を図面では「p r e i m m」として示す。一免疫前血清についての結果を示す。免疫前血清と A P 2 0 5 V L P にカップリングした m A 1 - 6 により免疫化したマウスの血清の比較結果は、自己抗原である、ペプチド m A 1 - 6 に対する強い特異的抗体応答がアジュバントの不存在下で得られたことを示している。さらに、A P 2 0 5 V L P へ自己ペプチドをカップリングすることにより、このペプチドに対する寛容性が破壊され、非常に高い特異的免疫応答が誘導される。すなわち、A P 2 0 5 V L P は、アジュバントの不存在下で A 1 に対して高い抗体力価を生じさせるのに適切である。

30

【 0 3 4 1 】

実施例 2 1

Q h A 1 - 6 による免疫化により、「スウェーデン / ロンドン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスにおけるアミロイド斑は低減化される

40

この実施例は、アルツハイマー病様拡散性 (コンゴ - レッド陰性) アミロイド斑を発現するマウスモデルにおける Q h A 1 - 6 での免疫化により、新皮質および皮質下部脳領域における斑密度は大きく低減化されることを立証している。拡散性アミロイド斑の組織学的発生は、A D 脳病理学の目立つ特徴であり (S e l k o e , 1 9 9 4 , A n n u . R e v . N e u r o s c i . 1 7 : 4 8 9 - 5 1 7) 、したがって、この実施例は、Q h A 1 - 6 による免疫化が、アルツハイマー病の有効な処置方法を提供することを立証している。

【 0 3 4 2 】

50

Q h A 1 - 6 による免疫化の治療効力を評価するため、マウスThy - 1プロモーターの制御下で「スウェーデン/ロンドン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウス (APP24; K670N/M671L; V717I、特許番号WO980 - 36 - 4423) を使用した。このマウス系統は、18ヶ月齢で新皮質、海馬、尾状被殻および視床における多数のアミロイド斑を特徴とする。斑は、9ヶ月齢で初めて観察され得る。組織学的に、APP24マウスにおけるアミロイド斑は主として拡散型に属し、すなわちそれらはコンゴ - レッド染色において陰性である。程度は劣るが、密集したアミロイド斑 (コンゴ - レッド陽性) も見出され得る。

【0343】

Q VLPにカップリングしたヒトA 1 - 6ペプチド (Q h A 1 - 6) を実施例13記載の要領で製造した。本発明を記載または実施可能にするのに必ずしも必要ではないが、用いた実験手順に関して言えば、0日目に、APP24トランスジェニックマウス (9.5ヶ月齢) に対し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) (1マウスにつき $2 \times 100 \mu\text{l}$ として投与) 中の $25 \mu\text{g}$ の Q h A 1 - 6 ($n = 16$) または陰性対照として PBS (1マウスにつき $2 \times 100 \mu\text{l}$ として投与) ($n = 9$) またはカップリングさせた抗原を欠くQ ウイルス様粒子 ($n = 11$) を皮下注射した。その後、15、49、76、106、140、169、200、230、259および291日目に、マウスに $25 \mu\text{g}$ の Q h A 1 - 6 ワクチン、Q または PBS を注射した。動物に対し、初回免疫 (0日目) の1~2日前および56、90、118、188、214、246および272日目に尾部静脈から採血した。血清もまた305日目に集め、その時点で組織病理学用に脳も採取した (この時点でのマウスの年齢: 19.5ヶ月)。

【0344】

A 1 - 40 に特異的な抗体の力価を、本質的に実施例13の記載にしたがってELISAにより測定した。ELISAの結果を図10に示す。図表でプロットされているのは、Q h A 1 - 6 により免疫化したマウスの血清で測定されたA 1 - 40 またはA 1 - 42 特異抗体の力価である。力価をOD50%力価として表す。OD50%は、シグナルがその最大値の半分に達する抗体の希釈度である。最大値 (ODmax) は、A 1 - 40 およびAb42を認識する基準血清から得られ、同じELISAプレートで測定された。全Q h A 1 - 6 免疫化マウスは、1:8000より上のOD50% (免疫前血清力価は1:100未満であった) を示したことから、高齢APP24マウスにおいてさえもQ h A 1 - 6 に対する一定の抗体応答が立証された (図10)。免疫化群における半OD50%力価は、免疫化期間全体を通して1:20000~1:50000の範囲であった。

【0345】

アミロイド斑の定量については、4 の0.1MのPBS中4%のホルムアルデヒドに浸漬することにより脳を固定した。エタノールで脱水後、脳をパラフィンに埋封し、マイクロトームにより $4 \mu\text{m}$ 厚さで矢状方向に切断した。薄片を凍結 (super frost) 載物ガラス上に載せ、37 で乾燥した。薄片をPBS中で洗浄し、0.1Mクエン酸緩衝液中、90 で3分間電子レンジ加熱することにより抗原性を高めた。NT11抗血清 (抗A 1 - 40、Sturchler - Pierrat et al., 1997、Proc.Natl.Acad.Sci.94:13287 - 13292) を、3%ヤギ血清を含むPBSで1:1000に希釈し、4 で一晩インキュベーションした。すすいだ後、薄片を1時間、PBSで1:200に希釈したビオチニル化抗ウサギIgG二次抗体 (BA1000、ベクター・ラボラトリーズ) とインキュベーションした。すすいだ後、薄片をさらにアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ技術 (ABC - エリート・キット PK6100:ベクター・ラボラトリーズ) により処理した。最後に、薄片をジアミノベンジジン (DAB) 金属高感度基質 (ベーリンガー、コード1718096) と反応させ、ヘマルムで対比染色し、脱水し、キシレン中で清澄化し、カバーガラスで覆った。一動物当たり異なる3解剖面での脳薄片の系統的ランダム系列を、分析に使用した。MCID画像分析装置 (イメージング・リサーチ、ブロック・ユニバーシティー、オンタリオ - カナダ国、プログラムバージョンM5エリート) を用いて

10

20

30

40

50

アミロイド斑を定量した。顕微鏡画像を、X i l l i x 白黒 C C D T V カメラの使用によりデジタル化し、256 グレイレベルでの640 × 480 画素解像度で記憶させた。5 × 倍率のマイクロメーター（ライカ・ネオプラン・オブジェクティブ）を用いて画素サイズを測定した。隣接する対象視野を正しい場所に位置させるためモーター駆動式顕微鏡載物台を用いて、各薄片の全皮質および嗅覚核を分析した。各対象視野について、解剖（大脳皮質）野をマニュアルアウトラインにより画定した。個々の各薄片について、免疫陽性アミロイド斑および組織バックグラウンド間におけるマニュアル閾値設定（グレイレベル）によりサンプル野を画定した。摘出組織アーチファクトをマニュアルアウトラインにより除外した。未処理データを、個々のカウント（アミロイド沈着）および比例面積値（免疫陽性アミロイド / 皮質または嗅覚核）として測定する。

10

【0346】

各マウスのデータを、1 mm² 当たりの沈着（斑）の数および新皮質全体における全斑面積（%）に対して正規化した。Q h A 1 - 6 免疫化マウスは、P B S または Q 注射対照群と比べて皮質および皮質下野におけるアミロイド沈着の劇的な低減化を示した（図11）。沈着数の中央値および斑合計は両方とも、皮質、尾状被殻、海馬および視床において P B S 群と比べると非常に顕著に80 ~ 98% 低減化された（ $p < 0.001$ 対 P B S 群、マン - ホイットニー検定、図12）。

【0347】

第二の試験では、A P P 2 4 トランスジェニックマウス（13.5ヶ月齢）に対し、0 日目、リン酸緩衝食塩水（P B S）（1マウスにつき2 × 100 μ l として投与）中の25 μ g の Q h A 1 - 6（ $n = 15$ ）、または陰性対照として P B S（1マウスにつき2 × 100 μ l として投与）（ $n = 15$ ）の皮下注射をした。その後、16、46、76、109、140 および 170 日目に、マウスに25 μ g の Q h A 1 - 6 ワクチンまたは P B S を注射した。動物に対し、初回免疫（0日目）の1 ~ 2日前および31、59、128 および 154 日目に尾部静脈から採血した。血清もまた184日目に集め、その時点で組織病理学用に脳も採取した（この時点でのマウスの年齢：19.5ヶ月）。A 1 - 40 に特異的な抗体の力価を、上記と同様にして測定および表現したところ、同じく免疫化マウスは全て、少なくとも1 : 2000 より上の血清 O D 50 % 力価で Q h A 1 - 6 免疫化に応答することが見出された（示さず）。半 O D 50 % 力価は、免疫化期間全体と通して1 : 10000 ~ 1 : 50000 の範囲であった。アミロイド沈着の定量を上記と同様にして行った。免疫化を早く（すなわち9.5ヶ月齢で）開始した実験と比較すると、斑沈着数（-55%）および面積（-32%）の低減化は、新皮質ではそれほど劇的なものではなかったが、それでも非常に明白で（図13）非常に有意であった（ $p > 0.001$ 対 P B S、マン - ホイットニー検定）。皮質下領域では、斑沈着数および面積は、Q h A 1 - 6 免疫化群において60 ~ 90% 低減化されていた。皮質と比べた場合のこれらの領域におけるより明白な効果は、これらの領域における斑形成の延長された時間経過と関連していると思われる。

20

30

【0348】

これらを考え合わせると、両実験とも、「スウェーデン / ロンドン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスにおいて Q h A 1 - 6 で免疫化すると、これらのマウスにおけるアミロイド沈着の発生が劇的に低減化されることを立証している。

40

【0349】

図10：「スウェーデン / ロンドン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスにおける血清抗 A 40 / 42 抗体力価（O D 50 %）。9.5 ~ 19ヶ月齢のマウスを Q h A 1 - 6 により免疫化した。個々の値（黒点）および四角が示されており、四角の端部は100分順位の25番目および75番目を画定し、中央の線および誤差バーは100分順位の10番目および90番目を画定している（特定範囲外のはドットとして示されている）。

【0350】

50

図 1 1 : 矢状方向脳薄片におけるアミロイド斑の免疫組織化学染色。Q (A) および Q h A 1 - 6 (B) ワクチンで免疫化した「スウェーデン/ロンドン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスの矢状方向脳薄片が図に示されている。

【 0 3 5 1 】

図 1 2 : 免疫化後の「スウェーデン/ロンドン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウス (9 . 5 ~ 1 9 ヶ月齢) における斑沈着の定量。(A) 皮質斑密度。(B) 皮質斑領域。(C) 尾状被殻における斑密度。(D) 尾状被殻における斑領域。(E) 海馬における斑密度。(F) 海馬における斑領域。(G) 視床における斑密度。(H) 視床における斑領域。斑密度を斑 / mm² で表しており、斑領域を、アミロイド・ベータにより覆われた組織面積のパーセントで表している。個々の値 (黒点) および四角としてデータを示している。四角の端部は 1 0 0 分順位の 2 5 番目および 7 5 番目を画定し、中央の線および誤差バーは 1 0 0 分順位の 1 0 番目および 9 0 番目を画定している。 * * p < 0 . 0 0 1 (マン - ホイットニー検定) 。 P B S 、 n = 9 、 Q , n = 1 1 、 Q h A 1 - 6 、 n = 1 6 。

【 0 3 5 2 】

実施例 2 2

Q h A 1 - 6 での免疫化により、「スウェーデン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスにおけるアミロイド斑は低減化される。

この実施例は、Q h A 1 - 6 による免疫化が、アミロイド斑病状の非常に進行した段階で免疫化を開始した場合でも、アルツハイマー病の有効な処置方法となることを立証している。この実施例で使用した A D マウスモデルにおけるアミロイド斑沈着過程は、約 6 ヶ月齢で既に始まっている (Sturchler-Pierrat et al. , 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292) 。本明細書記載の試験では、Q h A 1 - 6 による免疫化は、1 8 ヶ月齢で開始されており、既に多数の小型斑が皮質で形成されていた。この実施例はまた、かなりの高齢動物における Q h A 1 - 6 の A 4 0 / 4 2 抗体誘導能力を立証している (1 9 免疫化マウスにおいて非応答は無し) 。

【 0 3 5 3 】

Q h A 1 - 6 による免疫化の治療効果を評価するため、「スウェーデン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウス (A P P 2 3 ; K 6 7 0 N / M 6 7 1 L 、 Sturchler-Pierrat et al. , 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292) を使用した。これらのマウスにおけるアルツハイマー病様病状は、既に十分に特性確認されている (Calhoun et al. , 1998, Nature 395: 755-756; Phinney et al. , 1999, J. Neurosci. 19: 8552-8559; Bondolfi et al. , 2002, J. Neurosci. 22: 515-522) 。

【 0 3 5 4 】

Q V L P にカップリングさせたヒト A 1 - 6 ペプチド (Q h A 1 - 6) を、実施例 1 3 記載の要領で製造した。本発明を記載または実施可能にするのに必ずしも必要ではないが、用いた実験手順に関して言えば、0 日目に、A P P 2 3 トランスジェニックマウス (1 8 ヶ月齢) に対し、リン酸緩衝食塩水 (1 マウスにつき 2 × 1 0 0 μ l とし て 投 与) に 溶 か し た 2 5 μ g の Q h A 1 - 6 (n = 1 9) または陰性対照としてリン酸緩衝食塩水 (n = 1 7) を皮下注射し、1 3、2 7 ~ 3 4、6 1 ~ 6 3、9 0 ~ 9 6、および 1 2 3 ~ 1 3 0 日目に、2 5 μ g のワクチンをブースター注射した。動物に対し、初回免疫 (0 日目) の 1 ~ 2 日前および 4 1 ~ 4 5、および 6 8 日目に尾部静脈から採血した。血清もまた 1 5 2 ~ 1 5 4 日目に集め、その時点で組織病理学用に脳も採取した (この時点でのマウスの年齢 : 2 3 ヶ月) 。

【 0 3 5 5 】

A 1 - 4 0 に特異的な抗体の力価を、本質的に実施例 1 3 の記載にしたがって E L I S A により測定し、結果を実施例 2 1 の記載と同様に表す。E L I S A の結果を図 1 4 に示す。全 Q h A 1 - 6 免疫化マウスは、1 : 2 0 0 0 より上の O D 5 0 % 力価 (免疫

10

20

30

40

50

前血清力価は1 : 100未満であった)を示したことから、非常に高齢のマウスにおいてさえもQ h A 1 - 6に対する一定の抗体応答が立証された(図14)。半OD50%力価は、免疫化期間全体を通して1 : 9000 ~ 1 : 20000の範囲であった。

【0356】

アミロイド斑の定量を実施例21記載の要領で実施した。各マウスのデータを、1mm²当たりの沈着(斑)の数および新皮質全体における全斑面積(%)に対して正規化した。Q h A 1 - 6免疫化マウスでは、ほぼ小型斑の減少故に、皮質に現われた沈着はさらに少数であった(図15、図16)。非免疫化群と比べると、中央の斑数は、Q h A 1 - 6免疫化群では33%減少していた(p < 0.01対PBS群、マン - ホイットニー検定)。主として小型斑状をとるため、全斑領域の低減化は緩やかであり、10%に達した(p < 0.01対PBS群、マン - ホイットニー検定)。

10

【0357】

図14:「スウェーデン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスにおける血清抗A 40/42抗体力価(OD50%)。18~23ヶ月齢のマウスをQ h A 1 - 6により免疫化した。個々の値(黒点)および四角が示されており、四角の端部は100分順位の25番目および75番目を画定し、中央の線および誤差バーは100分順位の10番目および90番目を画定している(特定範囲外のはドットとして示されている)。

【0358】

図15:矢状方向脳薄片におけるアミロイド斑の免疫組織化学染色。矢印は小型沈着を指す。PBS(A)またはQ - A 1 - 6(B)で免疫化した「スウェーデン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスからの矢状方向脳薄片が図に示されている。

20

【0359】

図16:免疫化後の「スウェーデン」突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウス(18~23ヶ月齢)における斑沈着の定量。(A)皮質斑密度。(B)皮質斑領域。斑密度を斑/mm²で表しており、斑領域を、アミロイド・ベータにより覆われた組織面積のパーセントで表している。個々の値(黒点)および四角としてデータを示している。四角の端部は100分順位の25番目および75番目を画定し、中央の線および誤差バーは100分順位の10番目および90番目を画定している。

30

* * p < 0.001(マン - ホイットニー順位和検定)。PBS、n = 17、Q h A 1 - 6、n = 19。

【0360】

理解を深めるために図を引用し、例を挙げて本発明を詳細に説明したが、当業者であれば、本発明の範囲またはその実施態様に影響を及ぼすことなく、条件、処方物および他のパラメーターの広範かつ均等な範囲内で本発明を修飾または変更することにより同じことが実施され得ること、および上記修飾または変更も添付の請求の範囲内に包含されるものであることは容易に理解できるはずである。

【0361】

本明細書で挙げた出版物、特許および特許出願は全て、本発明が属する分野での当業者のレベルを示すものであり、各出版物、特許および特許出願が本明細書において具体的に個々に引用されているのと同じ扱いで出典明示により援用されているものとする。

40

【図面の簡単な説明】

【0362】

【図1】図1は、Q コートタンパク質のVLPへのA 1 - 6ペプチド(NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂)(配列番号77)のカップリングの結果を示す、還元条件下で実施された、SDS - PAGEゲルを示す。

【図2】図2は、Q コートタンパク質のVLPにカップリングされたA 1 - 6ペプチドにより免疫化されたマウスの血清中のA 1 - 6に特異的な抗体のELISA分析を示す。

50

【図3】図3は、Q コートタンパク質のVLPにカップリングされたA 1-6ペプチドにより免疫化されたマウスの血清中のA 1-40に特異的な抗体のELISA分析を示す。

【図4】図4A-Bは、Q コートタンパク質のVLPにカップリングされたA 1-6ペプチドにより免疫化されたマウスの血清で染色されたAPP23マウスの脳薄片(A)およびAD患者からの内嗅野薄片(B)を示す。

【図5】図5A-Eは、Q コートタンパク質のVLPにカップリングされたA 1-6ペプチドにより免疫化されたマウスの血清、またはヒトまたはマウスAPPのC-末端に特異的なポリクローナルウサギ抗血清で染色されたAPP23マウスの脳薄片を示す。

【図6】図6は、ELISA検定法において測定されたQ VLPにカップリングされたヒトA 1-6によるアカゲザルの免疫化の結果を示す。

10

【図7】図7は、ヒトADおよびトランスジェニックマウス斑に関する組織学により測定された、Q VLPにカップリングされたヒトA 1-6により免疫化されたサル血清の斑への結合の結果を示す。

【図8】図8は、APP205VLPへのネズミA 1-6のカップリングのSDS-PAGE分析を示す。

【図9】図9は、ELISA検定法で測定されたAPP205にカップリングされたネズミA 1-6によるマウス免疫化の結果を示す。

【図10】図10は、9.5~19ヶ月令のQ hA 1-6により免疫化された「スウェーデン/ロンドン」トランスジェニックマウスの血清における抗A 40および抗A 42力価のELISAによる分析を示す。

20

【図11】図11は、Q hA 1-6またはPBSにより免疫化された「スウェーデン/ロンドン」トランスジェニックマウスの脳薄片の免疫組織化学的染色を示す。

【図12】図12は、9.5~19ヶ月令のQ hA 1-6、Q またはPBSにより免疫化された「スウェーデン/ロンドン」トランスジェニックマウスにおける斑沈着の定量化を示す。

【図13】図13は、13.5~19ヶ月令のQ hA 1-6またはPBSにより免疫化された「スウェーデン/ロンドン」トランスジェニックマウスにおける斑沈着の定量化を示す。

【図14】図14は、Q hA 1-6により免疫化された「スウェーデン」トランスジェニックマウスの血清における抗A 40および抗A 42力価のELISAによる分析を示す。

30

【図15】図15は、Q hA 1-6またはPBSにより免疫化された「スウェーデン」トランスジェニックマウスからの脳薄片の免疫組織化学的染色を示す。

【図16】図16は、Q hA 1-6またはPBSにより免疫化された「スウェーデン」トランスジェニックマウスにおける斑沈着の定量化を示す。

【 図 1 】

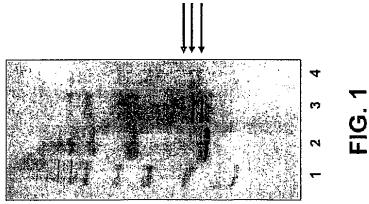


FIG. 1

【 図 2 】



FIG. 2

【 図 3 】

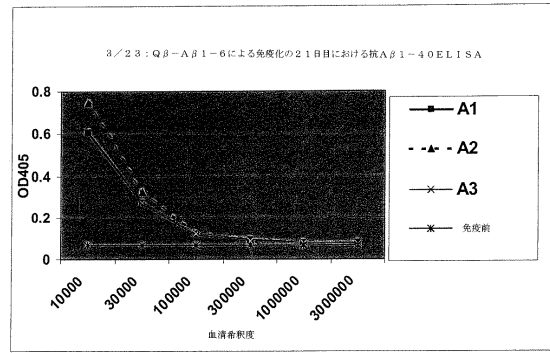


FIG. 3

【 図 4 A 】

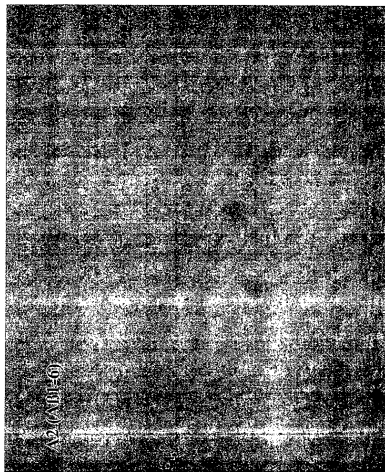


FIG. 4A

【 図 4 B 】

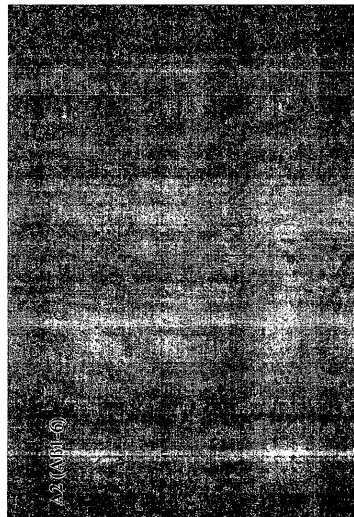
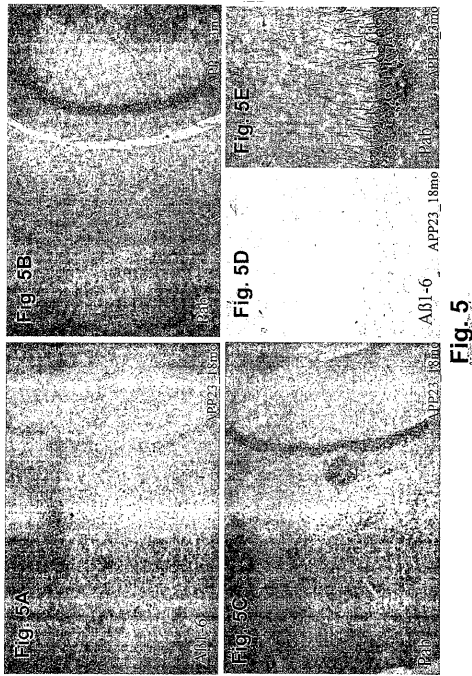


FIG. 4B

【 図 5 】



【 図 6 】

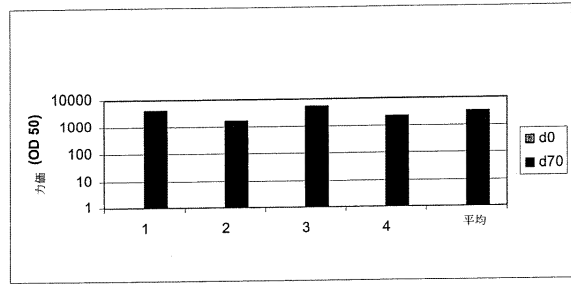


Fig. 6

【 図 7 A 】

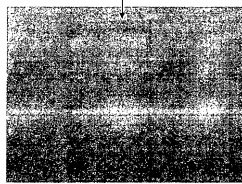


Fig. 7A

【 図 7 B 】

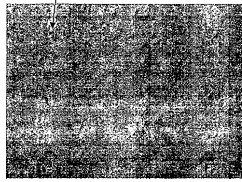


Fig. 7B

【 図 8 】

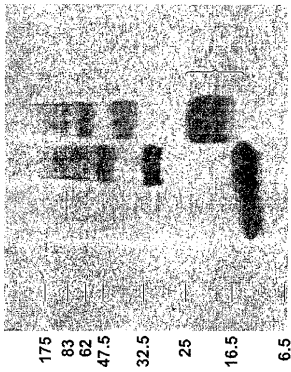


Fig. 8

【 図 10 】

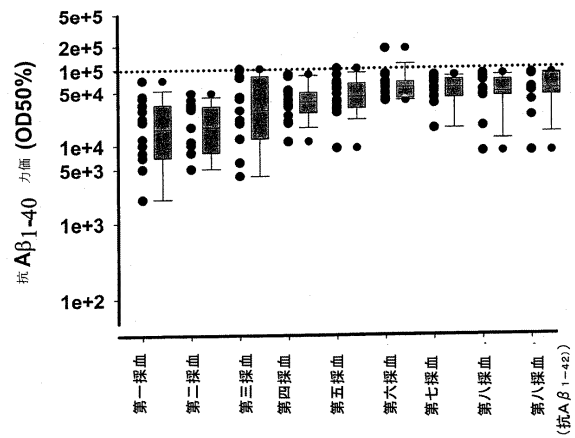


Fig. 10

【 図 9 】

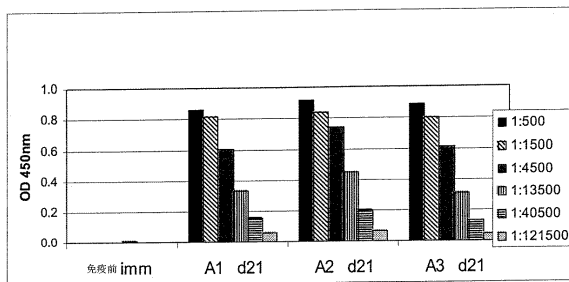


Fig. 9

【 図 1 1 A 】

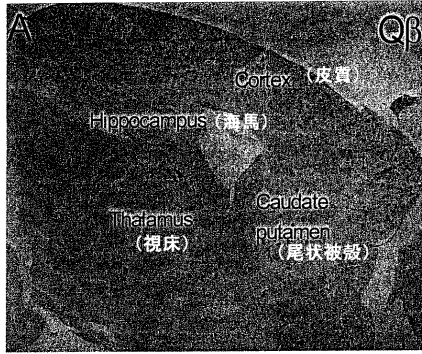


Fig. 11A

【 図 1 2 A 】

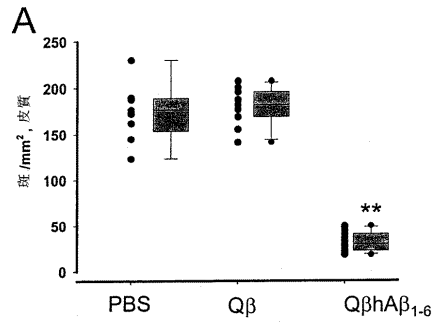


Fig. 12A

【 図 1 1 B 】

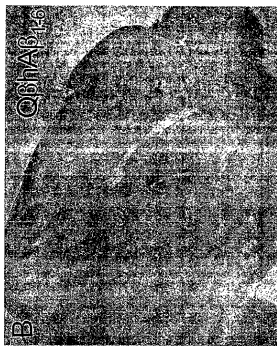


Fig. 11B

【 図 1 2 B 】

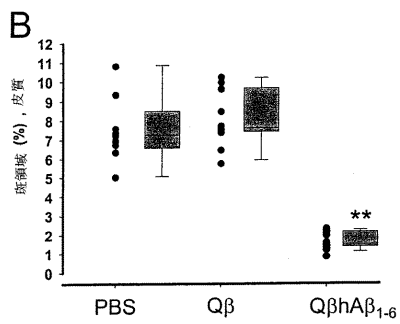


Fig. 12B

【 図 1 2 D 】

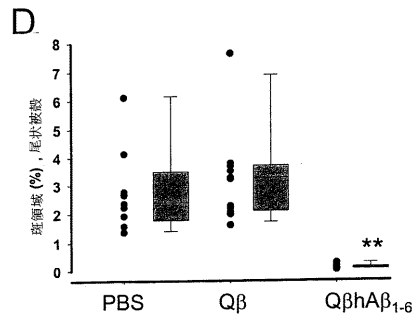


Fig. 12D

【 図 1 2 C 】

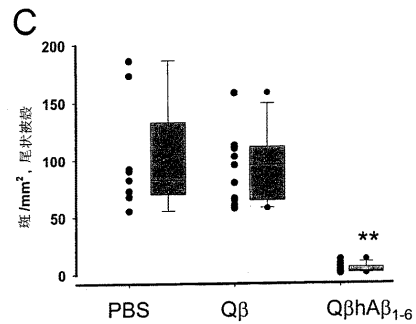


Fig. 12C

【 1 2 E 】

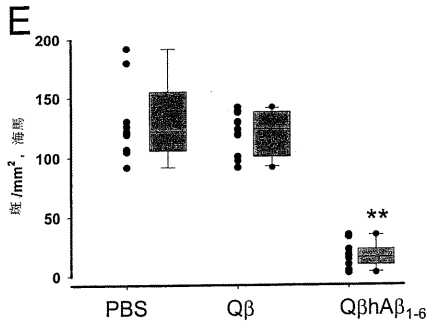


Fig. 12E

【 1 2 F 】

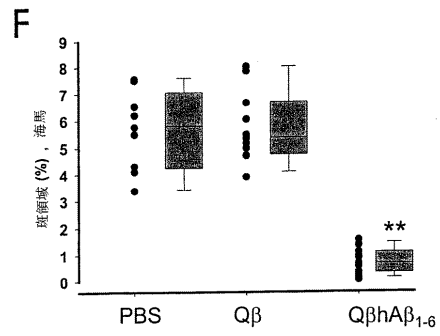


Fig. 12F

【 1 2 G 】

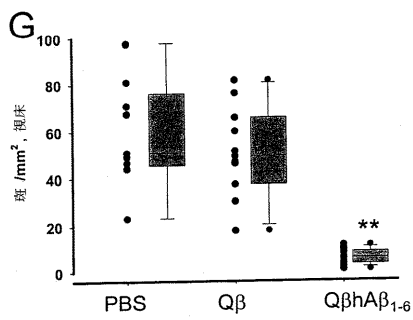


Fig. 12G

【 1 3 A 】

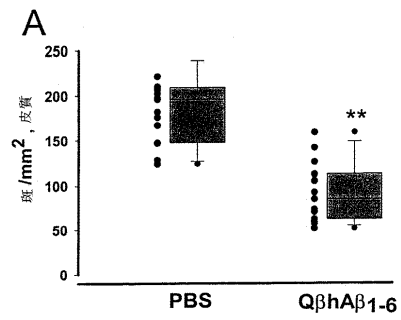


Fig. 13A

【 1 2 H 】

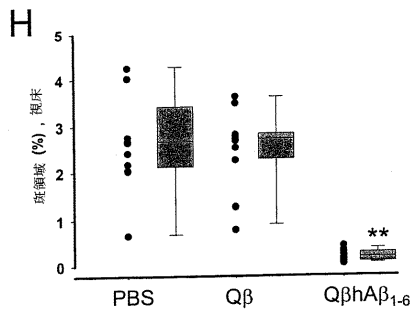


Fig. 12H

【 1 3 B】

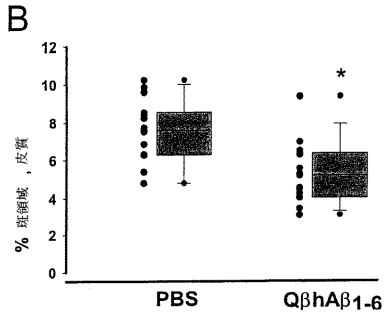


Fig. 13B

【 1 3 C】

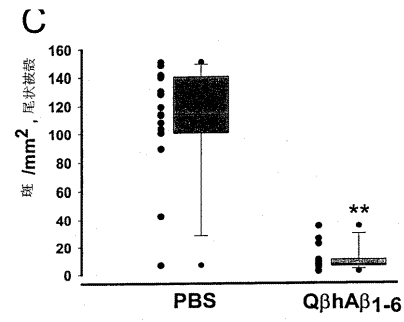


Fig. 13C

【 1 3 D】

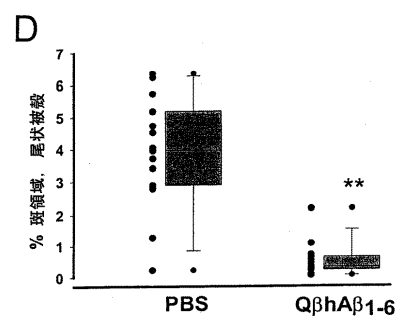


Fig. 13D

【 1 3 E】

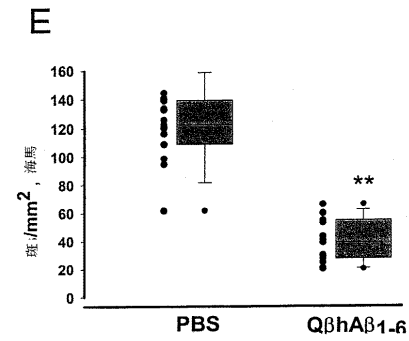


Fig. 13E

【 13 F 】

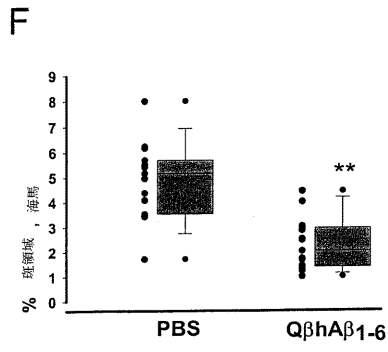


Fig. 13F

【 13 G 】

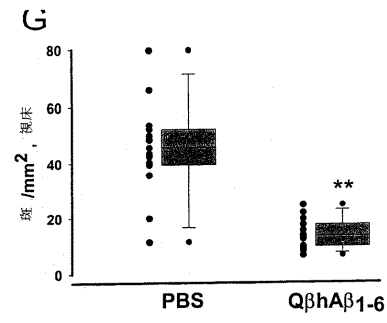


Fig. 13G

【 13 H 】

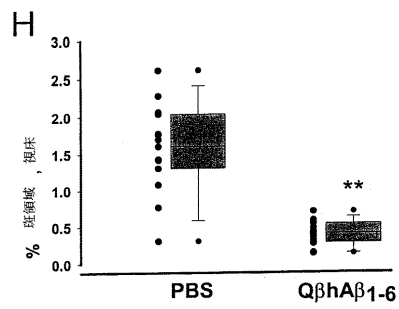


Fig. 13H

【 14 】

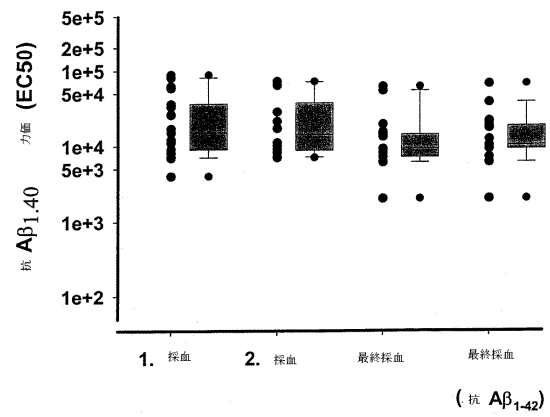


Fig. 14

【 15 A 】

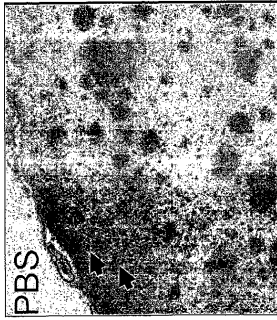


Fig. 15A

【 15 B 】

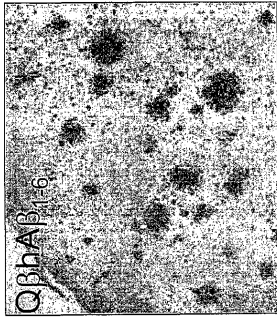


Fig. 15B

【 16 A 】

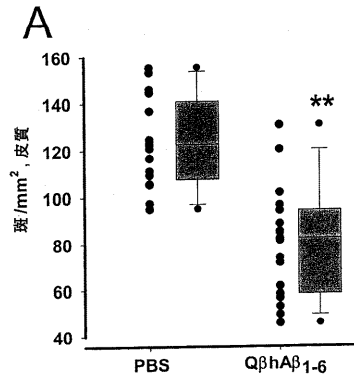


Fig. 16A

【 16 B 】

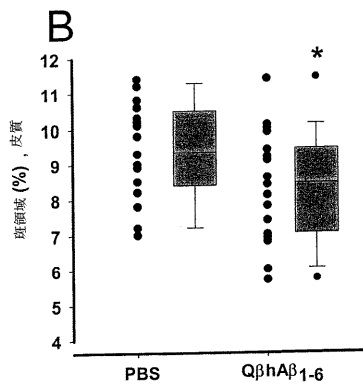


Fig. 16B

【配列表】

0004644488000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100067035
弁理士 岩崎 光隆
- (74)代理人 100064610
弁理士 中嶋 正二
- (74)代理人 100072730
弁理士 小島 一晃
- (72)発明者 マルティン・エフ・パッハマン
スイス、ツェーハー - 8 4 7 2ゾイツァッハ、ゴルトアッカーヴェーク 8 番
- (72)発明者 アラン・ティソ
スイス、ツェーハー - 8 0 4 9チューリッヒ、ゼガンティーニシュトラッセ 3 5 番
- (72)発明者 ライナー・オルトマン
フランス、エフ - 6 8 3 0 0サン・ルイ、リュ・ドゥ・ラミティエ 3 番
- (72)発明者 ライナー・リュエント
スイス、ツェーハー - 4 1 0 6テルヴィル、フェルスプラッテンシュトラッセ 3 3 番
- (72)発明者 マティアス・シュタウフェンビール
ドイツ連邦共和国デー - 7 9 5 4 1レラハ、ミュラーヴェーク 7 番
- (72)発明者 ペーター・フライ
スイス、ツェーハー - 3 0 0 7ベルン、ズルゲナウヴェーク 4 5 番

審査官 伊藤 基章

- (56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 1 8 1 6 9 (WO , A 1)
T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recomb , Proc Natl Acad Sci U S A , 1 9 9 8 年 , Vol.95, No.16 , p.9477-81

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A61K 38/00
A61K 39/00
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)