(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2013-155176
(P2013-155176A)
(43)公開日　平成25年8月15日(2013.8.15)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 39/00	(2006.01)	A61K 39/00	ZNAH	4B065
C07K 14/47	(2006.01)	C07K 14/47		4C085
C07K 19/00	(2006.01)	C07K 19/00		4C087
A61K 35/76	(2006.01)	A61K 35/76		4H045
A61P 37/04	(2006.01)	A61P 37/04		

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 39 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-48847(P2013-48847)
(22)出願日　平成25年3月12日(2013.3.12)
(62)分割の表示　特願2008-501331(P2008-501331)の分割
原出願日　平成18年3月17日(2006.3.17)
(31)優先権主張番号　60/662,918
(32)優先日　平成17年3月18日(2005.3.18)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　304042375
サイトス　バイオテクノロジー　アーゲー
スイス国　シーエイチ－８９５２　シュリーレン，　ヴァギシュトラッセ　２５
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　バッハマン，　マルチン
スイス国　シーエイチ－８４７２　ゾイツァッハ，　ゴールダッカーヴェーク　８
(72)発明者　バウアー，　モニカ
スイス国　シーエイチ－８０４８　チューリッヒ，　アルトステッテルシュトラッセ　２２０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ネコアレルゲンコンジュゲートとその使用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ネコ鱗屑及び他のネコ抗原とアレルゲンに対するアレルギーを治療及び／又は予防するためのワクチンの提供。
【解決手段】高度の抗原性と免疫原性を維持しながら、アナフィラキシー活性を劇的に低減するために、少なくとも一の抗原、特に少なくとも一のネコ抗原、より特別には少なくとも一のヒトアレルゲンであるネコ抗原とウイルス様粒子(ＶＬＰ)ないしウイルス粒子とが共有結合している組成物で、主要アレルゲンはＦｅｌ　ｄ１(すなわちFelis domesticusアレルゲン１、以前はＣａｔ１、すなわちネコアレルゲン１)である組成物及び組成物を産生するための方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a) 少なくとも一の第一付着部位を有するコア粒子であって、ウイルス様粒子(ＶＬＰ)又はウイルス粒子であるコア粒子；と
(b) 少なくとも一の第二付着部位を有する少なくとも一の抗原；
とを含んでなる組成物であって、該少なくとも一の抗原がＦｅｌ ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ ｄ１断片であり、(a)と(b)が該少なくとも一の第一付着部位と該少なくとも一の第二付着部位を介して共有結合している、組成物。
【請求項２】
前記Ｆｅｌ ｄ１タンパク質がＦｅｌ ｄ１の鎖１とＦｅｌ ｄ１の鎖２とを含んでなり、少なくとも一の共有結合を介して該Ｆｅｌ ｄ１の鎖１が該Ｆｅｌ ｄ１の鎖２に結合している、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記Ｆｅｌ ｄ１のタンパク質がＦｅｌ ｄ１の鎖１とＦｅｌ ｄ１の鎖２とを含んでなる融合タンパク質であり、該Ｆｅｌ ｄ１の鎖１と該Ｆｅｌ ｄ１の鎖２が一ペプチド結合を介して直接又はスペーサーを介して融合して、一方の鎖のＮ末端が他方の鎖のＣ末端と結合している、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項４】
前記Ｆｅｌ ｄ１の鎖２がそのＣ末端を経由して、直接又はスペーサーを介してＦｅｌ ｄ１の鎖１のＮ末端に融合している、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
前記Ｆｅｌ ｄ１の鎖１がそのＣ末端を経由して、直接又はスペーサーを介してＦｅｌ ｄ１の鎖２のＮ末端に融合している、請求項３に記載の組成物。
【請求項６】
前記スペーサーが１～２０のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列からなる、請求項３ないし５の何れか一に記載の組成物。
【請求項７】
前記融合タンパク質が、
(a) 配列番号２４；
(b) 配列番号５４；
(c) 配列番号５５；
(d) 配列番号５６；及び
(e) 配列番号５７
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する、請求項３ないし６の何れか一に記載の組成物。
【請求項８】
前記Ｆｅｌ ｄ１の鎖１が、配列番号２２の配列ないしはそのホモログ配列を含んでなり、該ホモログ配列が配列番号２２に８０％以上、好ましくは９０％以上、さらにより好ましくは９５％以上の同一性を有する、請求項３ないし６の何れか一に記載の組成物。
【請求項９】
前記Ｆｅｌ ｄ１の鎖２が、配列番号２３、配列番号２５又は配列番号２６の配列ないしはそのホモログ配列を含んでなり、該ホモログ配列が配列番号２３、配列番号２５又は配列番号２６に８０％以上、好ましくは９０％以上、さらにより好ましくは９５％以上の同一性を有する、請求項３ないし６の何れか一に記載の組成物。
【請求項１０】
前記コア粒子がウイルス粒子であり、好ましくは該ウイルス粒子がＲＮＡバクテリオファージのウイルス粒子である、請求項１ないし９の何れか一に記載の組成物。
【請求項１１】
前記ウイルス粒子がウイルス様粒子であり、好ましくは該ウイルス様粒子がＲＮＡバクテリオファージのウイルス様粒子である、請求項１ないし９の何れか一に記載の組成物。

【請求項１２】
前記ＲＮＡバクテリオファージがＱβ、ｆｒ、ＧＡ又はＡＰ２０５である、請求項１０又は１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記第一付着部位が、アミノ基、好ましくはリジンのアミノ基を含有するか又は好ましくはそのものである、請求項１ないし１２の何れか一に記載の組成物。
【請求項１４】
前記第二付着部位が、スルフヒドリル基、好ましくはシステインのスルフヒドリル基を含有するか又は好ましくはそのものである、請求項１ないし１３の何れか一に記載の組成物。
【請求項１５】
さらにリンカーを含有する、請求項１ないし１４の何れか一に記載の組成物。
【請求項１６】
前記リンカーが、前記Ｆｅｌ　ｄ１タンパク質のＣ末端又は前記Ｆｅｌ　ｄ１断片のＣ末端に融合する、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
請求項１ないし１６の何れか一に記載の組成物を含有してなるワクチン。
【請求項１８】
さらに少なくとも一のアジュバントを含有する、請求項１７に記載のワクチン。
【請求項１９】
(a) 請求項１ないし１６の何れか一に記載の組成物、と
(b) 受容可能な薬剤的担体
とを含んでなる薬剤組成物。
【請求項２０】
(a) 少なくとも一の第一付着部位を有するコア粒子であって、ウイルス様粒子(ＶＬＰ)又はウイルス粒子であるコア粒子を供給する、
(b) 少なくとも一の第二付着部位を有する少なくとも一の抗原であって、Ｆｅｌ　ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ　ｄ１断片である抗原を供給する、
(c) 該コア粒子と該少なくとも一の抗原を結合させて、該少なくとも一の第一付着部位と該少なくとも一の第二付着部位を介して該少なくとも一の抗原と該コア粒子が結合している組成物を産生する
ことを含む、請求項１ないし１６の何れか一に記載の組成物の産生方法。
【請求項２１】
ネコアレルギーの治療のための医薬の製造方法のための、請求項１ないし１６の何れか一に記載の組成物の使用。
【請求項２２】
請求項１ないし１６の何れか一に記載の組成物又は請求項１７又は１８に記載のワクチンがヒト又は非ヒト動物に投与されることを含み、好ましくは該非ヒト動物がイヌ又はネコである、ネコアレルギーの治療方法。
【請求項２３】
請求項１ないし１６の何れか一に記載の組成物又は請求項１７ないし１８の何れか一に記載のワクチンがヒト又は非ヒト動物に投与されることを含み、好ましくは該非ヒト動物がイヌ又はネコである、ネコアレルギーの治療方法における使用のための、請求項１ないし１６の何れか一に記載の組成物又は請求項１７ないし１８の何れか一に記載のワクチン。
【請求項２４】
Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１とアミノ酸スペーサーを介して融合したＦｅｌ　ｄ１の鎖２を含んでなるＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質であって、該アミノ酸スペーサーは一方の鎖のＮ末端と他方の鎖のＣ末端とを結合させ、該アミノ酸スペーサーは１０～３０のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列からなるものであり、該融合タンパク質は$(GGGGS)_3$を介して配列番号２

３、２５又は２６の鎖２のＮ末端に融合した配列番号２２の鎖１を含んでなる融合タンパク質を除くものであり、かつ除かれた融合タンパク質はバキュロウイルス発現系において発現されたものである、Ｆｅｌ　ｄ１融合タンパク質。

【請求項２５】

前記スペーサーが２、３又は４回のGGGGSリピートを有するアミノ酸配列からなる、請求項２４に記載のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質。

【請求項２６】

前記Ｆｅｌ　ｄ１融合タンパク質が大腸菌で産生される、請求項２４又は２５に記載のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質。

【請求項２７】

Ｆｅｌ　ｄ１の鎖２が融合タンパク質のＮ末端にある、請求項２４ないし２６の何れか一に記載のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質。

【請求項２８】

Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１が融合タンパク質のＮ末端にある、請求項２４ないし２６の何れか一に記載のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質。

【請求項２９】

(a) 配列番号５４

(b) 配列番号５５、及び

(c) 配列番号５７

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項２４ないし２８の何れか一に記載のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質。

【請求項３０】

大腸菌で産生され、配列番号５７のアミノ酸配列を含んでなる、Ｆｅｌ　ｄ１融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【０００１】

(発明の背景)

発明の分野

本発明は、医学、公衆衛生、免疫学、分子生物学及びウイルス学の分野に関連する。本発明は、ウイルス様粒子(ＶＬＰ)ないしウイルス粒子と、少なくとも一の抗原、特に少なくとも一のネコ抗原、より特別には少なくとも一のヒトアレルゲンであるネコ抗原を含有してなる組成物を提供する。ある実施態様では、前記抗原は、ＶＬＰと共有結合したＦｅｌ　ｄ１抗原ないしはその断片である。また、本発明は、組成物を産生するための方法を提供する。本発明の組成物は、哺乳動物、特にヒトにおいて、効果的な免疫応答、特に抗体応答を誘導する。本発明の組成物及び方法は、特にネコ鱗屑及び他のネコ抗原とアレルゲンに対するアレルギーを治療及び／又は予防するためのワクチンの産生に有用である。

【０００２】

関連技術

家ネコ(Felis domesticus)は室内アレルゲンの重大な供与源である(Lau, S., 等 (2000) Lancet 356, 1392-1397)。実際、ネコは西欧諸国のおよそ２５％の家庭に見られ、ネコに対するアレルギーは多くの集団見られる。相対的に軽度な鼻炎及び結膜炎から致命的になりうる喘息悪化まで、症状の重症度は様々である。

患者はネコ鱗屑及び皮膚のいくつかの異なる分子に感受性が高いことが多いにもかかわらず、主要アレルゲンはＦｅｌ　ｄ１(すなわちFelis domesticusアレルゲン１、以前はＣａｔ１、すなわちネコアレルゲン１)である。このアレルゲンの重大性は、多数の研究において強調されている。実際に、８０％以上のネコアレルギー患者はこの強力なアレルゲンに対してＩｇＥ抗体を表す(van Ree, R., 等 (1999) J. Allergy Clin Immunol 104, 1223-1230)。

【０００３】

Ｆｅｌ ｄ１は、１０～２０％のＮ結合炭水化物を含有してなる３５～３９ｋＤａの酸性糖タンパク質であって、ネコの皮膚、唾液及び涙腺に見られる。それは、２つの非共有結合で連結されたヘテロ二量体により形成される。各ヘテロ二量体は、異なる遺伝子によって、コードされる一つの７０残基のペプチド(「鎖１」という)と一つの７８、８５、９０又は９２残基のペプチド(「鎖２」という)からなる(Duffort, O. A., 等 (1991) Mol Immunol 28, 301-309、Morgenstern, J. P., 等、 (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88, 9690-9694及びGriffith, I. J., 等 (1992) Gene 113, 263-268を参照)。

【０００４】

現在のところ、ネコアレルギー患者の治療は、自然のネコ鱗屑抽出物ないしはＦｅｌ ｄ１由来の短いペプチドの何れかを漸増しながら繰り返し投与することを伴う脱感作療法によってなされる。Lilja 等 及び Hedlin 等は、自然のネコ鱗屑抽出物がネコアレルギー患者に与えられる過程における脱感作プログラムを開示している(Lilja, Q, 等 (1989) J Allergy Clin Immunol 83, 37-44及びHedlin, 等 (1991) J Allergy Clin Immunol 87, 955-964)。このプログラムには少なくとも２～３年を要し、３年の治療の後の患者にはまだ全身性症状があった。脱感作のためにＦｅｌ ｄ１由来の短いペプチドを用いると、ペプチド群とプラセボ群の間で有意な差異が生じない(Oldfield, W. L., 等 (2002) Lancet 360, 47-53)。短いペプチドを大量(７５０μｇ)に患者に与えた場合に有用性が見られるだけであった(Norman, P. S., 等 (1996) Am J Respir Crit Care Med 154, 1623-1628)。

【０００５】

遅発型喘息反応などのアレルギー性副作用は、自然のネコ鱗屑抽出物治療と短いペプチド治療の両方において報告されている。したがって、アレルゲンを注入したことによるアナフィラキシーショックは、任意の脱感作プログラムに関する大きな安全性懸念の一つである。しかしながら、アレルゲンの注射量を減量することによって、このような影響を回避すると、治療の有効性が減弱するか、治療が長引く。したがって、ネコアレルギー治療の分野において、代替的脱感作療法、及びこれによる特にアレルギー性症状を軽減できるがアレルギー性副作用を誘発しない脱感作療法が非常に求められている。

【０００６】

(発明の概要)

我々は、驚くべきことに、本発明の少なくとも一のＦｅｌ ｄ１抗原ないしはその断片を含有してなる本発明の組成物及びワクチンのそれぞれが、Ｆｅｌ ｄ１に対して免疫応答、それによる特に抗体応答を誘導することができるだけでなく、更には、ネコアレルギー患者を脱感作して、特に短期間以内に本発明の組成物及びワクチンそれぞれの高い有用性を示すことができることを発見した。さらに、我々は、驚くべきことに、本発明のＦｅｌ ｄ１が、本発明によるＶＬＰに共有結合した場合に、高度の抗原性と免疫原性を維持しながら、ＶＬＰに共有結合していない本発明のＦｅｌ ｄ１と比較して、アナフィラキシー活性を劇的に低減したことを発見した。これは、本発明の組成物及びワクチンのそれぞれが、免疫される動物及びヒトにおいてアナフィラキシーショックを生じるリスクを劇的に低減するので、従来分野におけるネコアレルギー治療よりも非常に有用である。さらに、本発明の組成物及びワクチンのそれぞれが、従来のネコアレルギー治療と比較してより高用量で抗原を投与することを可能にする。これは言い換えると、有効性を改善し、及び／又は全体の脱感作プログラムを短縮しうる。したがって、本発明の組成物及びワクチンのそれぞれは、強力な抗Ｆｅｌ ｄ１免疫応答を誘導するが、アレルギー反応を引き起こさない。

【０００７】

したがって、第一の態様では、本発明は、(a) 少なくとも一の第一付着部位を有するコア粒子であって、ウイルス様粒子(ＶＬＰ)又はウイルス粒子であるコア粒子；と(b) 少なくとも一の第二付着部位を有する少なくとも一の抗原；とを含んでなり、該少なくとも一の抗原がＦｅｌ ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ ｄ１断片であり、(a)と(b)が該少なくとも一の第一付着部位と該少なくとも一の第二付着部位を介して共有結合して、好ましくは

規則的で反復性の抗原アレイを形成する組成物を提供する。
他の態様では、本発明はワクチン組成物を提供する。さらに、本発明は、ワクチン組成物のヒト又はイヌなどの非ヒト動物への投与方法であって、該ヒト又は非ヒト動物がネコ、好ましくはネコのＦｅｌ ｄ１に対してアレルギー性である投与方法を提供する。ある好適な実施態様では、ワクチン組成物はさらに、少なくとも一のアジュバントを含有してなる。しかしながら、本発明のワクチン組成物は、少なくとも一のアジュバントの存在なしで、強力な免疫応答、特に抗体応答を誘導することができる。したがって、ある好適な実施態様では、ワクチンはアジュバントを欠いている。アジュバントの使用を回避すると、アジュバントの使用に関連する副作用の発生の可能性が低減しうる。

【０００８】

ある好適な実施態様では、組成物及びワクチン組成物のそれぞれに含まれる本発明のＶＬＰは、宿主内で組み換えて産生されるものであり、ＶＬＰは基本的に宿主のＲＮＡ、好ましくは宿主の核酸を含まない。これは、宿主の量を減らすか、好ましくは除去して宿主の核酸を無くして、望ましくないＴ細胞応答並びに発熱などの他の望ましくない副作用を避けるという利点がある。
ある好適な実施態様では、本発明の組成物はさらに、少なくとも一の免疫賦活性物質、好ましくは少なくとも一の免疫賦活性核酸を含有してなる。更なる好適な一実施態様では、免疫賦活性核酸は、本発明のＶＬＰ内にパッケージ化される。本発明の組成物内への免疫賦活性物質、好ましくは免疫賦活性核酸の封入は、Ｔｈ１応答に対する免疫応答を作動して、それによってＴｈ２応答を抑制してＩｇＥの産生を抑制しうる。

【０００９】

一態様では、本発明は、ネコアレルギー対象体、好ましくはヒトに本発明の組成物又はワクチンのそれぞれを投与することによるネコアレルギーの治療方法を提供する。
更なる態様では、本発明は、本発明の組成物及び受容可能な薬剤的な担体を含有してなる薬剤組成物を提供する。
更なる態様では、本発明は、(a) 少なくとも一の第一付着部位を有するコア粒子であって、ウイルス様粒子(ＶＬＰ)又はウイルス粒子であるコア粒子を供給する；(b) 少なくとも一の第二付着部位を有する少なくとも一の抗原であって、Ｆｅｌ ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ ｄ１断片である抗原を供給する；そして(c) 該コア粒子と該少なくとも一の抗原を結合させて、該少なくとも一の第一付着部位と該少なくとも一の第二付着部位を介して該少なくとも一の抗原と該コア粒子が結合している組成物を産生する
ことを含む、本発明の組成物の産生方法を提供する。
一態様では、本発明は、Ｆｅｌ ｄ１の鎖１とアミノ酸スペーサーを介して融合したＦｅｌ ｄ１の鎖２を含んでなるＦｅｌ ｄ１融合タンパク質であって、該アミノ酸スペーサーは一方の鎖のＮ末端と他方の鎖のＣ末端とを結合させ、該アミノ酸スペーサーは１０～３０のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列からなるものであり、該融合タンパク質が大腸菌で産生され、該融合タンパク質がグリコシル化されていない、Ｆｅｌ ｄ１融合タンパクを提供する。

【００１０】

(発明の詳細な説明)
特に定義しない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語はすべて、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されているのと、同じ意味を有する。
アジュバント：本明細書中で用いられる「アジュバント」なる用語は、本発明のワクチン及び薬剤組成物のそれぞれと組み合わせると、より亢進した免疫応答を供給しうる、宿主内の貯蔵所となる物質ないしは免疫応答の非特異的刺激因子を意味する。様々なアジュバントが用いられうる。例として、完全及び不完全なフロイントアジュバント、アルミニウム水酸化物及び修飾ムラミルジペプチドなどがある。更なるアジュバントは、ミネラルゲル、例えば酸化アルミニウム三水和物、界面活性物質、例えばリゾレシチン、プルロニックポリオル、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、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及び潜在的に有用なヒトアジュバント、例えばＢＣＧ（ウシ型弱毒

結核菌ワクチン)及びコリネバクテリウムパルバムである。このようなアジュバントも当分野で公知である。本発明の組成物とともに投与されうる更なるアジュバントには、モノホスホリル脂質免疫修飾物質、ＡｄｊｕＶａｘ １００ａ、ＱＳ-２１、ＱＳ-１８、ＣＲＬ１００５、アルミニウム塩類(ミョウバン)、ＭＦ-５９、ＯＭ-１７４、ＯＭ-１９７、ＯＭ-２９４及びＶｉｒｏｓｏｍａｌアジュバント技術が含まれるが、これらに限定するものではない。また、アジュバントは、これらの物質の混合物を含んでもよい。

【００１１】

抗原：本明細書で使用するように、「抗原」という用語は、ＭＨＣ分子によって提示された場合に、抗体又はＴ細胞レセプター(ＴＣＲ)に結合されうる分子を指す。「抗原」という用語は、本明細書で使用するようにＴ細胞エピトープも含む。さらに抗原は、免疫系に認識されることができ、及び／又は、Ｂリンパ球及び／又はＴリンパ球の活性化がもたらされる体液性免疫応答及び／又は細胞性免疫応答を誘導することができる。しかしながら、このことは、少なくともいくつかの場合において、抗原がＴｈ細胞エピトープを含むかあるいはこれと連結し、アジュバント中に存在することが必要でありうる。抗原は、１つ又は複数のエピトープ(Ｂ及びＴエピトープ)を有しうる。上記の特異的な反応とは、抗原が、好ましくは典型的には非常に選択的な方式で、その対応する抗体又はＴＣＲと反応し、他の抗原によって誘発される可能性がある多数の他の抗体又はＴＣＲとは反応しないことを示すことを意図する。また、ここで用いた抗原はいくつかの別々の抗原の混合でもよい。

【００１２】

抗原性部位：本明細書中において相互に交換可能に用いられる「抗原性部位」なる用語及び「抗原性エピトープ」なる用語は、ＭＨＣ分子の環境におけるＴ細胞レセプター又は抗体によって免疫特異的に結合されるポリペプチドの連続的な又は非連続的な部位を意味する。免疫特異的な結合は、非特異的な結合が除外されるが必ずしも交差反応が除外されない。典型的に、抗原性部位は、抗原性部位に特有の空間的な立体構造内に５～１０のアミノ酸を含有する。

結合(以下、会合ともいう) (associated)：本明細書中で用いられる「結合(会合) (associated)」なる用語は、２つの分子がともに結合するすべての可能な方法、好ましくは化学的な相互作用を指す。化学的な相互作用には共有的相互作用及び非共有的相互作用が含まれる。非共有的相互作用の典型的な例は、イオン性相互作用、疎水性相互作用、又は水素結合であり、一方、共有的相互作用は、例として共有結合、例えばエステル、エーテル、リン酸エステル、アミド、ペプチド、炭素－リン結合、炭素－イオウ結合、例えばチオエーテル、又はイミド結合ベースである。

【００１３】

第一付着部位：ここで用いる「第一付着部位」なる用語は、ＶＬＰに天然に生じる又はＶＬＰに人工的に付加される成分であり、第二付着部位が結合する部位を指す。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、天然又は合成ポリマー、二次的代謝産物又は化合物(ビオチン、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)、又は化学反応基、例えばアミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基、グアニジル基、ヒスチジル基、又はこれらの組合せであってよい。第一付着部位である化学反応基の好適な実施態様は、リジンなどのアミノ酸のアミノ基である。第一付着部位は、典型的にはＶＬＰの表面上、好ましくはＶＬＰの外表面上に位置する。多数の第一付着部位が、典型的には反復形状で、ウイルス様粒子の表面上、好ましくは外表面上に存在する。好適な実施態様では、第一付着部位は、少なくとも一の共有結合を介して、好ましくは少なくとも一のペプチド結合を介してＶＬＰと会合(以下、結合ともいう)する。さらに好適な実施態様では、第一付着部位はＶＬＰに天然に生じる。あるいは、好適な実施態様では、第一付着部位はＶＬＰに人工的に付加されている。

【００１４】

第二付着部位：ここで用いる「第二付着部位」なる用語は、本発明のＦｅｌ ｄ１に天

然に生じる又は本発明のＦｅｌ　ｄ１に人工的に付加される成分であり、第一付着部位が結合する部位を指す。本発明のＦｅｌ　ｄ１の第二付着部位は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸、糖、ポリヌクレオチド、天然又は合成ポリマー、二次的代謝産物又は化合物(ビオチン、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)、又は化学反応基、例えばアミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基、グアニジル基、ヒスチジル基、又はこれらの組合せであってよい。第二付着部位である化学反応基の好適な実施態様は、好ましくはシステインなどのアミノ酸のスルフヒドリル基である。したがって、「少なくとも一の第二付着部位を有する本発明のＦｅｌ　ｄ１」なる用語は、本発明のＦｅｌ　ｄ１と少なくとも一の第二付着部位を含むコンストラクトを指す。しかしながら、特に、本発明のＦｅｌ　ｄ１に天然に生じない第二付着部位の場合、典型的かつ好ましくは、そのようなコンストラクトはさらに「リンカー」を含む。他の好適な実施態様では、第二付着部位は、少なくとも一の共有結合を介して、好ましくは少なくとも一のペプチド結合を介して本発明のＦｅｌ　ｄ１と会合(結合)する。更なる実施態様では、第二付着部位は本発明のＦｅｌ　ｄ１に天然に生じる。さらに他の好適な実施態様では、第二付着部位はリンカーを介して本発明のＦｅｌ　ｄ１に人工的に付加され、該リンカーがシステインを含むかあるいはシステインからなるものである。好ましくは、リンカーはペプチド結合により本発明のＦｅｌ　ｄ１に融合される。

【００１５】

コートタンパク質：本出願において、「コートタンパク質」なる用語と交換可能に用いられる「キャプシドタンパク質」なる用語は、ウイルスタンパク質、好ましくはウイルス、好ましくはＲＮＡファージの天然のキャプシドのサブユニットを指し、ウイルスキャプシド又はＶＬＰ内に内包されうるものである。

本発明のＦｅｌ　ｄ１：本明細書中で用いる「本発明のＦｅｌ　ｄ１」なる用語は、少なくとも一のＦｅｌ　ｄ１タンパク質ないしは少なくとも一のＦｅｌ　ｄ１断片を指す。

Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１：本明細書中で用いる「Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１」なる用語は、配列番号：２２のアミノ酸配列ないしはその相同配列を含む、あるいは好ましくはそれからなるポリペプチドを包含する。本明細書中で用いる「配列番号：２２の相同配列」なる用語は、７０％以上、好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、さらにより好ましくは９５％以上である配列番号：２２に同一性を有するポリペプチドを指す。また、本明細書中で用いる「Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１」なる用語は、限定するものではないが、本明細書中で定義するような、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１の少なくとも一のグリコシル化を含む、少なくとも一の翻訳後修飾を含むポリペプチドを指すであろう。好ましくは、本明細書中で定義するように、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１は、全部で最大１３０、さらにより好ましくは最大１００のアミノ酸からなる。

【００１６】

Ｆｅｌ　ｄ１の鎖２：本明細書中で用いる「Ｆｅｌ　ｄ１の鎖２」なる用語は、配列番号：２３、配列番号：２５又は配列番号：２６のアミノ酸配列ないしはその相同配列を含む、あるいは好ましくはそれからなるポリペプチドを包含する。本明細書中で用いる「配列番号：２３、配列番号：２５又は配列番号：２６の相同配列」なる用語は、７０％以上、好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、さらにより好ましくは９５％以上である配列番号：２３、配列番号：２５又は配列番号：２６に同一性を有するポリペプチドを指す。また、本明細書中で用いる「Ｆｅｌ　ｄ１の鎖２」なる用語は、限定するものではないが、本明細書中で定義するような、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖２の少なくとも一のグリコシル化を含む、少なくとも一の翻訳後修飾を含むポリペプチドを指すであろう。好ましくは、本明細書中で定義するように、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖２は、全部で最大１５０、さらにより好ましくは最大１３０、さらにより好ましくは最大１００のアミノ酸からなる。

【００１７】

Ｆｅｌ　ｄ１タンパク質：本明細書中で用いる「Ｆｅｌ　ｄ１タンパク質」なる用語は、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１とＦｅｌ　ｄ１の鎖２を含有するか、あるいはこれらからなるタンパク

質を指す。好ましくは、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１とＦｅｌ　ｄ１の鎖２は共有結合している。ある好適な実施態様では、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１とＦｅｌ　ｄ１の鎖２は少なくとも一のジスルフィド結合を介して結合している。他の好適な実施態様では、鎖１と鎖２は直接あるいはスペーサーを介して融合しており、このときの該Ｆｅｌ　ｄ１タンパク質はスペーサーを更に含有するかあるいはスペーサーからなるものである。好ましくは、本明細書中で定義されるＦｅｌ　ｄ１タンパク質は、全部で最大３００、さらにより好ましくは最大２００のアミノ酸からなる。典型的かつ好ましくは、本発明のＦｅｌ　ｄ１タンパク質は、本発明の実施例５にしたがって産生されるような組み換えＦｅｌ　ｄ１又は天然に生じるＦｅｌ　ｄ１の何れかに特異的に結合する抗体のインビボ産生を誘導することができる。

【００１８】

Ｆｅｌ　ｄ１断片：本明細書中で用いる「Ｆｅｌ　ｄ１断片」なる用語は、Ｆｅｌ　ｄ１の少なくとも一の抗原性部位を含有するか、あるいはこれらからなるポリペプチドを指す。典型的かつ好ましくは、本明細書中で用いる「Ｆｅｌ　ｄ１断片」なる用語は、Ｆｅｌ　ｄ１の少なくとも２つの抗原性部位を含有するか、あるいはこれらからなるポリペプチドを指す。好ましくは、抗原性部位は共有結合しており、更に好ましくは、抗原性部位は少なくとも一のペプチド結合によって結合しており、この場合、抗原性部位間にスペーサーが必要とされうる。好ましくは、少なくとも２つの抗原性部位は、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１とＦｅｌ　ｄ１の鎖２の療法に由来する。好ましくは、本明細書中で定義されるＦｅｌ　ｄ１断片は、全部で最大１３０、さらにより好ましくは最大１００、さらにより好ましくは６０のアミノ酸からなる。典型的かつ好ましくは、Ｆｅｌ　ｄ１断片は、本発明の実施例５にしたがって産生されるような組み換えＦｅｌ　ｄ１又は天然に生じるＦｅｌ　ｄ１の何れかに特異的に結合する抗体のインビボ産生を誘導することができる。

【００１９】

結合(linked)：ここで用いられる「結合された(以下、連結されたともいう)(その名詞：結合)」なる用語は、可能であれば、好ましくは少なくとも第一付着部位と少なくとも一の第二付着部位がともに連結する化学的な相互作用を意味する。化学的な相互作用には共有的相互作用や非共有的相互作用が含まれる。非共有的相互作用の典型的な例は、イオン性相互作用、疎水性相互作用又は水素結合であるのに対して、共有的相互作用は、共有結合、例えばエステル、エーテル、リン酸エステル、アミド、ペプチド、炭素-リン結合、炭素-イオウ結合、例えばチオエーテル、又はイミド結合ベースのものである。ある好適な実施態様では、第一付着部位と第二付着部位は、少なくとも一の共有結合、好ましくは少なくとも一の非ペプチド結合、よりさらに好ましくは、非ペプチド結合のみを介して結合される。しかしながら、ここで用いられる「結合」なる用語は、少なくとも一の第一付着部位と少なくとも一の第二付着部位の直接結合を包含するだけでなく、選択的に好ましくは、中間分子、及びこれによって典型的かつ好ましくは、少なくとも一の、好ましくは一のヘテロ二官能性架橋剤を介して、少なくとも一の第一付着部位と少なくとも一の第二付着部位との間接的な結合も包含する。

【００２０】

リンカー：本明細書で使用する「リンカー」は、第二付着部位と本発明のＦｅｌ　ｄ１を結合させるか、あるいは第二付着部位を既に含むか、実質的に第二付着部位からなるか、第二付着部位からなる。好ましくは、本明細書中で用いる「リンカー」は第二付着部位を、典型的かつ好ましくは、限定するものではないが、一アミノ酸残基として、好ましくはシステイン残基として既に含む。また、本明細書中で用いる「リンカー」は、特に本発明のリンカーが少なくとも一のアミノ酸残基を含有する場合、「アミノ酸リンカー」と称する。したがって、「リンカー」と「アミノ酸リンカー」なる用語は、本明細書中において相互に交換可能に用いられる。しかしながら、この用語は、アミノ酸残基からなるアミノ酸リンカーが本発明の好適な実施態様である場合でも、このようなアミノ酸リンカーがアミノ酸残基のみからなることを示すことを意味するものではない。リンカーのアミノ酸残基は、当分野で知られている天然に存在するアミノ酸又は非天然アミノ酸、すべてのＬ型又はすべてのＤ型、あるいはこれらの混合物から構成されることが好ましい。したがっ

て、スルフヒドリル基又はシステイン残基を含有する分子は本発明のリンカーの好適な実施態様であり、このような分子も本発明内に含まれる。さらに、本発明に有用なリンカーは、Ｃ１～Ｃ６アルキル－、シクロアルキル、例えばシクロペンチル又はシクロヘキシル、シクロアルケニル、アリール又はヘテロアリール分子を含有する分子である。さらに好ましくは、Ｃ１～Ｃ６アルキル－、シクロアルキル(Ｃ５、Ｃ６)、アリール、又はヘテロアリール部分と付加的なアミノ酸を含んでなるリンカーも本発明のためのリンカーとして使用可能であり、本発明の範囲内である。本発明のＦｅｌ　ｄ１とリンカーの間の会合(結合)は、少なくとも１つの共有結合によるものであることが好ましく、少なくとも１つのペプチド結合によるものであることがより好ましい。

【００２１】

規則的で反復性の抗原アレイ：本明細書で用いる「規則的で反復性の抗原アレイ」なる用語は、一般的に、それぞれウイルス様粒子との関係で抗原中に、典型的に好ましくは非常に規則的に均一に空間的に配置していることに特徴がある、抗原の反復パターンを指す。本発明の一実施態様では、反復パターンは幾何学的パターンである。ＲＮＡファージのＶＬＰにカップリングされる抗原などの本発明の特定の実施態様では、好ましくは１から３０ナノメーターの間隔、好ましくは２から１５ナノメーターの間隔、より好ましくは２から１０ナノメーターの間隔、さらにより好ましくは２から８ナノメーターの間隔、さらにより好ましくは１．６から７ナノメーターの間隔を有する、抗原の準結晶性の、厳密に反復的な順序配列を持つ、好適に規則的で反復性の抗原の典型的かつ好ましい例である。

パッケージ化(packaged)(以下、封入ともいう)：本明細書で使用するように、「パッケージ化」という用語は、ＶＬＰとの関係でのポリ陰イオン性高分子又は免疫賦活性物質の状態を指す。本明細書中で用いる「パッケージ化」という用語は、共有、たとえば化学的カップリング、又は非共有、たとえばイオン性相互作用、疎水性相互作用、水素結合などでありうる結合を含む。また、この用語にはポリ陰イオン性高分子の封入ないしは部分的な封入が含まれる。したがって、ポリ陰イオン性高分子又は免疫賦活性物質を、実際に結合、特に共有結合しなくても、ＶＬＰによって封入することができる。好適な実施態様では、少なくとも一のポリ陰イオン性高分子又は免疫賦活性物質はＶＬＰ内に、最も好ましくは非共有的様式にてパッケージ化される。

【００２２】

スペーサー：「スペーサー」なる用語並びに同等に用いられる「アミノ酸スペーサー」なる用語はアミノ酸配列の広がりを指し、３０以下のアミノ酸であり、Ｆｅｌ　ｄ１の一方の鎖のＮ末端とＦｅｌ　ｄ１の他方の鎖のＣ末端を結合するものである。

ウイルス粒子：本明細書中で用いられる「ウイルス粒子」なる用語は、ウイルスの形態学的形状を意味する。いくつかのウイルス型には、タンパク質キャプシドに囲まれるゲノムを含むものがあり、他のものは付加的な構造(例えばエンベロープ、テイルなど)を有する。

【００２３】

ここで用いられるウイルス様粒子(ＶＬＰ)は、非複製性又は非感染性、好ましくは非複製性かつ非感染性のウイルス粒子を指し、又はウイルス粒子、好ましくはウイルスのキャプシドに類似する非複製性又は非感染性、好ましくは非複製性かつ非感染性の構造を指す。本明細書中で用いる「非複製性」なる用語は、ＶＬＰに含まれるゲノムを複製することができないことを意味する。本明細書中で用いる「非感染性」なる用語は、宿主細胞に侵入できないことを意味する。好ましくは、本発明のウイルス様粒子は、ウイルスゲノムないしはウイルスゲノム機能の全て又は一部を欠いているため、非複製性及び／又は非感染性である。一実施態様では、ウイルス様粒子はウイルス粒子であり、このウイルスゲノムは物理的又は化学的に不活性化されている。典型的かつより好ましくは、ウイルス様粒子はウイルスゲノムの複製性及び感染性の相等物のすべて又は一部を欠いている。本発明のウイルス様粒子は、それらのゲノムと異なる核酸を含みうる。本発明のウイルス様粒子の典型的かつ好適な実施態様では、対応するウイルス、バクテリオファージ、好ましくはＲＮＡファージのウイルスキャプシド等の、ウイルスキャプシドである。「ウイルスキャプ

シド」又は「キャプシド」なる用語は、ウイルスタンパク質のサブユニットから構成される巨大分子の集合体を指す。典型的には、６０、１２０、１８０、２４０、３００、３６０及び３６０以上のウイルスタンパク質サブユニットである。典型的かつ好ましくは、これらのサブユニットの相互作用により、固有の反復して組織化される、ウイルスキャプシド又はウイルスキャプシド様構造が形成される。前記構造は典型的には球状又は管状である。例えば、ＲＮＡファージのキャプシド又はＨＢｃＡｇは正二十面体の左右対称の球状形態を有する。本明細書中で用いる「キャプシド様構造」なる用語は、十分な程度の規則的かつ反復性を維持しながら、前述の定義した文脈におけるキャプシド形態に類似しているが典型的な左右対称の集合化から偏向しているウイルスタンパク質サブユニットからなる高分子集合体化を指す。

【００２４】

ウイルス粒子とウイルス様粒子の一つの共通した特徴は、高度に規則的かつ反復性をもって配列したサブユニットである。

ＲＮＡファージのウイルス様粒子：本明細書中で用いる「ＲＮＡファージのウイルス様粒子」なる用語は、ＲＮＡファージのコートタンパク質、その変異体ないしは断片を含んでなる、好ましくは基本的にこれからなる、あるいはこれからなるウイルス様粒子を指す。さらに、ＲＮＡファージの構造に類似するＲＮＡファージのウイルス様粒子は非複製性及び／又は非感染性であり、ＲＮＡファージの複製機構をコードする少なくとも一の遺伝子、好ましくは複数の遺伝子を欠損しており、及び典型的には、宿主にウイルスが接着するか侵入するためのタンパク質又はそれに関与するタンパク質をコードする一又は複数の遺伝子を欠損する。しかしながらまた、この定義には、前述の遺伝子又は遺伝子群が存在するが不活性であるため、ＲＮＡファージのウイルス様粒子が非複製性及び／又は非感染性となる、ＲＮＡファージのウイルス様粒子が包含される。ＲＮＡファージ由来の好適なＶＬＰは正二十面体の左右対称性を示し、１８０のサブユニットからなる。本開示の範囲内で、「サブユニット」及び「単量体」なる用語は、この文脈において、相互に交換可能に、同等に用いられる。本出願では、「ＲＮＡファージ」なる用語及び「ＲＮＡ-バクテリオファージ」なる用語は、相互に交換可能に使われる。ＲＮＡファージのウイルス様粒子に非複製性及び／又は非感染性を与える好適な方法は、物理的、化学不活性化、例えばＵＶ照射、ホルムアルデヒド処理によるもの、典型的かつ好ましくは、遺伝子操作によるものである。

【００２５】

Ｏｎｅ、ａ、又はａｎ：用語「ｏｎｅ」、「ａ」、又は「ａｎ」を本開示中で使用するとき、それらは、特に示さない限りは、「少なくとも一」、又は「一又は複数」を意味する。

ポリペプチドのアミノ酸同一性は、ベストフィット(Bestfit)プログラムなどの公知のコンピュータプログラムを用いて常套的に測定することができる。ベストフィットないしは任意の他の配列アラインメントプログラムを用いて、好ましくはベストフィットを用いて、特定の配列が例えば参照するアミノ酸配列に対して９５％の同一性があるかどうかを決定するために、参照アミノ酸配列の完全長に対する同一性の割合が算出され、参照配列中のアミノ酸残基の合計数の５％以下の相同性にギャップが挿入されるようにパラメータを設定する。ポリペプチド間の同一性の割合を測定する前述の方法は、本発明に開示するすべてのタンパク質、ポリペプチドないしはその断片に適するものである。

この出願において、抗体は、$10^6 M^{-1}$又はそれ以上、好ましくは$10^7 M^{-1}$又はそれ以上、より好ましくは$10^8 M^{-1}$又はそれ以上、最も好ましくは$10^9 M^{-1}$又はそれ以上の結合親和性(Ｋａ)で抗原と結合するならば、特異的に結合するものと定義される。抗体の親和性は、(例えばスキャッチャード分析により)通常の当業者によって容易に測定され得る。

【００２６】

本発明は、(a) 少なくとも一の第一付着部位を有するコア粒子であり、このときウイルス様粒子(ＶＬＰ)又はウイルス粒子である該コア粒子；と(b) 少なくとも一の第二付着部

位を有する少なくとも一の抗原であり、このとき該少なくとも一の抗原がＦｅｌ　ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ　ｄ１断片であり、(a)と(b)が該少なくとも一の第一付着部位と該少なくとも一の第二付着部位を介して共有結合しているものである。好ましくは、Ｆｅｌ　ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ　ｄ１断片はコア粒子に結合しており、規則的で反復性の抗原-ＶＬＰアレイを形成する。本発明の好適な実施態様では、少なくとも２０、好ましくは少なくとも３０、より好ましくは少なくとも６０、さらにより好ましくは少なくとも１２０及びさらにより好ましくは少なくとも１８０のＦｅｌ　ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ　ｄ１断片がコア粒子に結合する。

規則的で反復性の構造を有する当分野で公知の任意のウイルスは、本発明のＶＬＰ又はコア粒子として選択してもよい。ＶＬＰの調整のために使用されうる具体的なＤＮＡないしＲＮＡウイルスのコート又はキャプシドタンパク質は、国際公開公報2004/009124の25頁の10-21行目、26頁の11-28行目及び28頁の4行目から31頁の4行目に開示されている。これらの開示内容は出典明記により本明細書中に援用される。

【００２７】

ウイルスないしウイルス様粒子は産生され、ウイルス感染細胞培養物から精製することができる。ワクチンの目的のために、結果として生じるウイルスないしウイルス様粒子は非複製性又は非感染性であることが好ましい。ＵＶ照射、ホルムアルデヒドやクロロホルムなどによる化学的処理は、不活性化ウイルスへの当業者に公知の一般的な方法である。

好適な一実施態様では、コア粒子はウイルス粒子であり、好ましくは該ウイルス粒子はバクテリオファージのウイルス粒子であり、さらに好ましくは該バクテリオファージはＲＮＡファージであり、さらにより好ましくは該ＲＮＡファージは、Ｑβ、ｆｒ、ＧＡ又はＡＰ２０５から選択されるＲＮＡファージである。

ある好適な実施態様では、コア粒子はＶＬＰである。更に好適な実施態様では、ＶＬＰは組み換えＶＬＰである。ほとんどすべての一般的に公知のウイルスは配列決定されており、公的に容易に入手可能である。コートタンパク質をコードする遺伝子は当業者に容易に同定されうる。宿主内でコートタンパク質を組み換え発現させることによるＶＬＰの調製は、当業者の共通の知識の範囲内である。

【００２８】

好適な一実施態様では、ウイルス様粒子は、a) ＲＮＡファージ；b) バクテリオファージ；c) Ｂ型肝炎ウイルス、好ましくはそのキャプシドタンパク質(Ulrich, 等, Virus Res. 50: 141-182 (1998))又はその表面タンパク質(国際公開公報92/11291)；d) はしかウイルス(Warnes, 等, Gene 160:173-178 (1995))；e) シンドビスウイルス；f) ロタウイルス(米国特許第5,071,651号及び米国特許第5,374,426号)；g) 口蹄疫ウイルス(Twomey, 等, Vaccine 13:1603 1610, (1995))；h) ノーウォークウイルス(Jiang, X., 等, Science 250:1580 1583 (1990)；Matsui, S.M., 等, J. Clin. Invest. 87:1456 1461 (1991))；i) アルファウイルス属；j) レトロウイルス、好ましくはそのＧＡＧタンパク質(国際公開公報96/30523)；k) レトロトランスポゾンＴｙ、好ましくはタンパク質ｐ１；l) ヒトパピローマウイルス(国際公開公報98/15631)；m) ポリオーマウイルス；n) タバコモザイク病ウイルス；及びo) Ｆｌｏｃｋハウスウイルスからなる群から選択されるウイルスの組み換えタンパク質、その変異体ないしはその断片を含むか、あるいはこれからなる。

好適な一実施態様では、ＶＬＰは、その組み換えタンパク質、その変異体ないしはその断片の一以上のアミノ酸配列、好ましくは２つのアミノ酸配列を含むか、これらからなる。一以上のアミノ酸配列を含むかそれらからなるＶＬＰを、本出願ではモザイクＶＬＰと称する。

【００２９】

ここで使用される「組み換えタンパク質の断片」なる用語又は「コートタンパク質の断片」なる用語は、野生型組み換えタンパク質又はコートタンパク質それぞれの長さの少なくとも７０％、好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも９０％、さらにより好ましくは少なくとも９５％であり、好ましくはＶＬＰを形成する能力を保持するポリペプチドとして定義される。好ましくは、該断片は、少なくとも一の内部欠失、少なく

とも一の切断、又はそれらの少なくとも一の組合せから得られる。「組み換えタンパク質の断片」又は「コートタンパク質の断片」なる用語は、上で定義した「組み換えタンパク質の断片」又は「コートタンパク質の断片」のそれぞれと、少なくとも８０％、好ましくは９０％、さらにより好ましくは９５％のアミノ酸配列同一性を有し、好ましくはウイルス様粒子内に集合化(以下「アセンブリ」ともいう)することができるポリペプチドをさらに包含する。

【００３０】

本発明で交換可能に使用される「変異組み換えタンパク質」なる用語又は「組み換えタンパク質の変異体」なる用語、本発明で交換可能に使用される「変異コートタンパク質」なる用語又は「コートタンパク質の変異体」なる用語は、野生型組み換えタンパク質又はコートタンパク質それぞれに由来するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指し、該アミノ酸配列は野生型配列と少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％又は９９％の同一性であり、好ましくはＶＬＰ内に集合化する能力を保持している。

好適な一実施態様では、本発明のウイルス様粒子はＢ型肝炎ウイルスである。Ｂ型肝炎ウイルス様粒子の調整は、特に国際公開公報00/32227、同01/85208及び同02/056905に開示されている。これら３つすべての文書は出典明記によって本明細書中に特別に援用される。本発明の実施における使用に好適なＨＢｃＡｇの他の変異体は国際公開公報02/056905の３４－３９頁に開示されている。

【００３１】

本発明の更なる好適な一実施態様では、リジン残基はＨＢｃＡｇポリペプチドに導入され、本発明のＦｅｌ　ｄ１のＨＢｃＡｇのＶＬＰへの結合を媒介する。好適な実施態様では、本発明の組成物及びＶＬＰは、配列番号２０のアミノ酸１－１４４又は１－１４９、１－１８５を含むか、あるいはこれからなる、ＨＢｃＡｇを用いて調製される。このＨＢｃＡｇは修飾されており、７９番目と８０番目のアミノ酸がGly-Gly-Lys-Gly-Glyのアミノ酸配列を有するペプチドに置き換わっている。この修飾により配列番号２０から配列番号２１に変化する。更なる好適な実施態様では、配列番号２１又はその対応する断片、好ましくは１－１４４又は１－１４９の４８番目と１１０番目のシステイン残基がセリンに変異される。さらに、本発明は、上記の対応するアミノ酸変異を有するＢ型肝炎コアタンパク質変異を含有する組成物を包含する。さらに、本発明は、配列番号２１に少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％又は９９％の同一性であるアミノ酸配列を含むか、あるいはこれからなるＨＢｃＡｇポリペプチドを含有する組成物及びワクチンのそれぞれを包含する。

【００３２】

本発明のある好適な実施態様では、本発明のウイルス様粒子は、ＲＮＡ-ファージの組み換えコートタンパク質、その変異体ないしはその断片を含むか、又はそれらから本質的になるか、又はそれらからなる。好ましくは、ＲＮＡ-ファージは、a)バクテリオファージＱβ；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、及びm)バクテリオファージＡＰ２０５からなる群から選択される。

本発明の好適な一実施態様では、組成物は、ＲＮＡファージのコートタンパク質、その変異体ないしはその断片を含有し、該コートタンパク質は、(a) 配列番号：１(Ｑβ　ＣＰを指す)；(b) 配列番号：１と配列番号：２の混合物(Ｑβ　Ａ１タンパク質を指す)；(c) 配列番号：３；(d) 配列番号：４；(e) 配列番号：５；(f) 配列番号：６、(g) 配列番号：６と配列番号：７の混合物；(h) 配列番号：８；(i) 配列番号：９；(j) 配列番号：１０；(k) 配列番号：１１；(l) 配列番号：１２；(m) 配列番号：１３；及び(n) 配列番号：１４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【００３３】

本発明の好適な一実施態様では、ＶＬＰは、ＲＮＡファージのコートタンパク質、その変異体ないしはその断片の一以上のアミノ酸配列、好ましくは２つのアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるモザイクＶＬＰである。

とても好適な一実施態様では、ＶＬＰはＲＮＡファージの２つの異なるコートタンパク質を含むか、あるいはそれらからなるものであり、該２つのコートタンパク質は配列番号：１と配列番号：２、又は配列番号：６と配列番号：７のアミノ酸配列を有する。

本発明の好適な実施態様では、本発明のウイルス様粒子は、ＲＮＡ-バクテリオファージＱβ、ｆｒ、ＡＰ２０５又はＧＡの組み換えコートタンパク質、その変異体ないしはその断片を含むか、又はそれらから本質的になるか、又はそれらからなる。ある好適な実施態様では、ＶＬＰはＲＮＡバクテリオファージ、好ましくはＲＮＡバクテリオファージＱβ、ｆｒ、ＡＰ２０５又はＧＡのものである。

【００３４】

好適な一実施態様では、本発明のＶＬＰはＲＮＡファージＱβである。Ｑβのキャプシド又はウイルス様粒子は、直径２５ｎｍで、Ｔ＝３の疑似対称体の、正二十面体ファージ様キャプシド構造を示す。キャプシドは、ジスルフィド架橋により共有結合性の五量体及び六量体で結合して(Golmohammadi, R等, Structure 4：543-5554(1996))、際だって安定したＱβキャプシドとなる、コートタンパク質の１８０のコピーを含む。しかしながら、組み換えＱβコートタンパク質から作製されるキャプシド又はＶＬＰは、キャプシド内の他のサブユニットへ、ジスルフィド結合を介して結合していないか、又は不完全に結合するサブユニットを含んでいてもよい。Ｑβのキャプシド又はＶＬＰは、有機溶媒及び変性剤に対し、普通ではない耐性を示す。驚くべきことに、我々は、１Ｍの高さの濃度のグアニジウム、３０％の高さの濃度のアセトニトリル及びＤＭＳＯがキャプシドの安定性に影響しないことを発見した。Ｑβのキャプシド又はＶＬＰの高い安定性は、本発明の哺乳動物及びヒトの免疫化及びワクチン接種における使用に特に有用な性質である。

【００３５】

さらに好適な本発明のＲＮＡファージ、特にＱβ及びｆｒのウイルス様粒子は国際公開公報02/056905に開示されており、この開示内容は出典明記により本明細書中に援用される。特に、国際公開公報02/056905の実施例１８にＱβのＶＬＰ粒子の調製について詳しく記載されている。

他の好適な実施態様では、本発明のＶＬＰは、ＲＮＡファージＡＰ２０５のＶＬＰである。また、アミノ酸５のプロリンがスレオニンに置換しているＡＰ２０５コートタンパク質を含む、ＡＰ２０５ ＶＬＰのコンピテントアセンブリ変異体型を本発明の実施に使用してもよく、本発明の他の好適な実施態様となる。国際公開公報2004/007538の特に実施例１及び実施例２には、ＡＰ２０５コートタンパク質を含有するＶＬＰの入手方法、とりわけその発現と精製について記載されている。国際公開公報2004/007538は出典明記によって本明細書中に援用される。ＡＰ２０５ ＶＬＰは高い免疫原性があり、本発明のＦｅｌ ｄ１と結合して、典型的かつ好ましくは、反復様式で配位する本発明のＦｅｌ ｄ１を表出するワクチンコンストラクトを生成することができる。表出された本発明のＦｅｌ ｄ１に対して高い抗体力価が誘発されることから、結合した本発明のＦｅｌ ｄ１が抗体分子との相互作用のためにアクセス可能であり、免疫原性であることが示される。

【００３６】

好適な一実施態様では、本発明のＶＬＰは、ウイルス、好ましくはＲＮＡファージの変異コートタンパク質を含むかあるいはこれからなるものであり、該変異コートタンパク質は置換及び／又は欠失によって少なくとも一のリジン残基が除去されて修飾されている。他の好適な実施態様では、本発明のＶＬＰは、ウイルス、好ましくはＲＮＡファージの変異コートタンパク質を含むかあるいはこれからなるものであり、該変異コートタンパク質は置換及び／又は挿入によって少なくとも一のリジン残基が付加されて修飾されている。特にワクチンの必要性に合わせて調整するために、少なくとも一のリジン残基の欠失、置換又は付加によって、カップリングの程度、すなわち、ウイルス、好ましくはＲＮＡファージのＶＬＰのサブユニット当たりの本発明のＦｅｌ ｄ１の量を変えることができる。

好適な一実施態様では、本発明の組成物及びワクチンは、０．５～４．０の抗原密度を有する。ここで使用される「抗原密度」なる用語は、サブユニット当たり、好ましくはＶＬＰのコートタンパク質当たり、好ましくはＲＮＡファージのＶＬＰのコートタンパク質当たりに結合する本発明のＦｅｌ ｄ１の平均数を意味するものである。よって、この値は、本発明の組成物又はワクチン中での、ＶＬＰ、好ましくはＲＮＡファージのＶＬＰの単量体又はサブユニット全体の平均として算出される。

【００３７】

ＶＬＰ又はＱβコートタンパク質のキャプシドは決まった数のリジン残基をその表面上に表出して、キャプシドの内部に向かい、ＲＮＡを相互作用する３つのリジン残基と、キャプシドの外部に露出した４つの他のリジン残基を有する特徴のある形態となる。好ましくは、少なくとも一の第一付着部位がリジン残基であり、ＶＬＰの外部に向かってあるか又はＶＬＰの外部上にある。

露出されたリジン残基がアルギニンで置き換えられたＱβ変異体は、本発明のために使用することができる。よって、本発明の他の好適な実施態様では、ウイルス様粒子は変異Ｑβコートタンパク質を含む、本質的にこれからなる、あるいはこれからなるものである。好ましくは、これら変異コートタンパク質は、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含むかあるいはこれからなるものである：a) Ｑβ-２４０(配列番号：１５、配列番号：１のLys13-Arg)、b) Ｑβ-２４３(配列番号：１６、配列番号：１のAsn10-Lys)、c) Ｑβ-２５０(配列番号：１７、配列番号：１のLys2-Arg)、d) Ｑβ-２５１(配列番号：１８、配列番号：１のLys16-Arg)；及びe) Ｑβ-２５９(配列番号：１９、配列番号：１のLys2-Arg、Lys16-Arg)。上述したＱβ変異コートタンパク質、変異ＱβコートタンパクＶＬＰ及びキャプシドの構築、発現及び精製は、それぞれ国際公開第02/056905に記載されている。特に上述した出願の実施例１８が参照される。

【００３８】

本発明の他の好適な実施態様では、ウイルス様粒子は、Ｑβの変異コートタンパク質、又はその変異体ないしはその断片、及び対応するＡ１タンパク質を含むか、又はそれらから本質的になるか、又はそれらからなる。更なる好適な実施態様では、ウイルス様粒子は、アミノ酸配列 配列番号１５、１６、１７、１８又は１９を有する変異コートタンパク質及び対応するＡ１タンパク質を含むか、又はそれらから本質的になるか、又はそれらからなる。

さらにまた、ＲＮＡファージコートタンパク質は、細菌宿主内で発現すると自己集合体化することが示されている(Kastelein, RA. 等, Gene 23:245-254 (1983)、Kozlovskaya, TM. 等, Dokl. Akad. Nauk SSSR 287:452-455 (1986)、Adhin, MR. 等, Virology 170:238-242 (1989)、Priano, C. 等, J. Mol. Biol. 249:283-297 (1995))。特に、ＧＡ (Ni, CZ., 等, Protein Sci. 5: 2485-2493 (1996)、Tars, K 等, J. Mol.Biol. 271:759-773 (1997))及び、ｆｒ (Pushko P. 等, Prot. Eng. 6: 883-891 (1993)、Liljas, L 等 J Mol. Biol. 244:279-290, (1994))の生物学的及び生化学的性質は開示されている。いくつかの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. 等, Structure 4:543-554 (1996))。そのような情報を用いて、表面に曝された残基を同定して、ＲＮＡファージコートタンパク質を修飾して、一又は複数の反応性のアミノ酸残基を挿入又は置換によって挿入することができる。ＲＮＡファージ由来のＶＬＰの他の利点は、安価で大量の物質を産生することが可能となる細菌での発現回収率が高いことである。

【００３９】

好適な一実施態様では、本発明の組成物は少なくとも一の抗原を含有するものであり、該少なくとも一の抗原はＦｅｌ ｄ１タンパク質である。

好適な実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１タンパク質は天然に生じるＦｅｌ ｄ１を含むか、あるいはこれからなる。鎖１の主要な構造は配列番号２２の配列である。鎖１の報告された変異体は、Lys29-Arg又はAsn、Val33-Ser、Val60-Leuである。鎖２の主要な構造は配列番号２３、２５又は２６の配列である。鎖２の報告された変異体は、配列番号２３、２５又は２６のCys7-Phe、Phe15-Thr、Asn19-Ser、Gly20-Leu、Ile55-Val、Arg57-Lys、Val58-P

heである。さらに、鎖２の変異体は、配列番号：２５のGlu69-Val、Tyr70-Asp、Met72-Thr、Gln77-Glu及びAsn86-Lys、配列番号：２３のMet74-Thr、Gln79-Glu及びAsn88-Lysである。(Griffith I.J. 等, Gene 113:263-268 (1992)、Morgenstern J.P. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:9690-9694 (1991)。Duffort O.A., 等 Mol. Immunol. 28:301-309 (1991)、Leitermann K., 等, J. Allergy Clin. Immunol. 74:147-153 (1984)、Kristensen, A. K, 等 (1997) Biol Chem 378, 899-908)。天然に生じるＦｅｌ ｄ１は、例えばネコ唾液、ネコ鱗屑、ネコが生活する住宅のハウスダストなどから精製して得る。

【００４０】

好適な実施態様では、本発明のＦｅｌ ｄ１は、組み換えＦｅｌ ｄ１タンパク質又は組み換えＦｅｌ ｄ１断片である。本明細書中で用いられる、組み換えＦｅｌ ｄ１タンパク質又は組み換えＦｅｌ ｄ１断片は、組み換えＤＮＡ技術の少なくとも一つの工程を含む方法によって得られるＦｅｌ ｄ１タンパク質又はＦｅｌ ｄ１断片を指す。「組み換えＦｅｌ ｄ１タンパク質又は組み換えＦｅｌ ｄ１断片」及び「組み換えて産生されるＦｅｌ ｄ１タンパク質又は組み換えて産生されるＦｅｌ ｄ１断片」なる用語は、本明細書において交換可能に用いられ、同一の意味をもつであろう。組み換えＦｅｌ ｄ１タンパク質ないし断片は、例えば大腸菌(国際公開公報2004/094639)などの原核生物発現系、又は例えばバキュロウイルス(国際公開公報00/20032)などの真核生物発現系において産生できる。Seppala 等は、バキュロウイルス(J. Biol. Chem. Nov, 2004)の２シストロン性のプロモーターにるＦｅｌ ｄ１の鎖１とＦｅｌ ｄ１の鎖２の同時発現を開示した。組み換えタンパク質を生産するために使用する宿主細胞に応じて、組み換えて産生されるＦｅｌ ｄ１タンパク質ないし断片をグリコシル化するか、非グリコシル化することができる。

【００４１】

一実施態様では、組み換えＦｅｌ ｄ１タンパク質は、Ｆｅｌ ｄ１の鎖１及びＦｅｌ ｄ１の鎖２を含むか、あるいはこれからなる。このとき、Ｆｅｌ ｄ１の前記鎖１はもっぱら非共有結合、例えば疎水的相互作用によって、Ｆｅｌ ｄ１の鎖２と結合している。

好適な一実施態様では、組み換えＦｅｌ ｄ１タンパク質は、Ｆｅｌ ｄ１の鎖１及びＦｅｌ ｄ１の鎖２を含むか、あるいはこれからなる。このとき、Ｆｅｌ ｄ１の前記鎖１は少なくとも一の非共有結合によって、Ｆｅｌ ｄ１の鎖２と結合している。好適な一実施態様では、少なくとも一の共有結合は非ペプチド結合であり、このとき該非ペプチドがジスルフィド結合であるか又は、好ましくは該非ペプチドがジスルフィド結合である。例えば、リシャッフリング法のように、Ｆｅｌ ｄ１の鎖１及びＦｅｌ ｄ１の鎖２を別々に発現させ、適切なジスルフィド結合を形成させる条件下で結合させることができる。あるいは、Ｆｅｌ ｄ１の鎖１及びＦｅｌ ｄ１の鎖２は、例えば、一プラスミド中の２つのプロモーター下で、Ｆｅｌ ｄ１の鎖１及びＦｅｌ ｄ１の鎖２をそれぞれコードする遺伝子をクローニングすることによって、一宿主内で同時に発現させることができる。真核生物発現系において、Ｆｅｌ ｄ１の鎖１及びＦｅｌ ｄ１の鎖２は、１のｍＲＮＡに転写されて、配列内リボソーム進入部位(ＩＲＥＳ)によって、別々に翻訳されうる。

【００４２】

好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１タンパク質は融合タンパク質を含むか、あるいはこれからなり、このとき該融合タンパク質がＦｅｌ ｄ１の鎖１及びＦｅｌ ｄ１の鎖２を含んでなる。好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１の前記鎖１及びＦｅｌ ｄ１の前記鎖２は一ペプチド結合を介して直接融合しており、このペプチド結合が一方の鎖のＮ末端を他方の鎖のＣ末端に連結する。他の好適な実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１の前記鎖１及びＦｅｌ ｄ１の前記鎖２はスペーサーを介して融合しており、このスペーサーは一方の鎖のＮ末端を他方の鎖のＣ末端に連結する。好ましくは前記スペーサーは、１～３０、好ましくは１～２５、好ましくは１～２０、好ましくは１～１５、好ましくは１～９、好ましくは１～５、好ましくは１～３のアミノ酸を有する。あるいは、前記スペーサーは、１０～３０、好ましくは１０～２５、好ましくは１０～２０、より好ましくは１３～２０、より好ましくは１５～２０、より好ましくは１３～１７、より好ましくは１５～１７のアミノ酸を有する。好ましくは前記スペーサーは、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、

１７、１８、１９又は２０のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列から成る。好適な一実施態様ではでは、前記スペーサーは１５のアミノ酸を有する。更なる好適な一実施態様では、前記スペーサーは$(GGGGS)_3$である。

【００４３】

好適な一実施態様では、融合タンパク質は、(a) 配列番号：２４、(b) 配列番号：５４、(c) 配列番号：５５、(d) 配列番号：５６、及び(e) 配列番号：５７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる。

好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１の前記鎖２のＣ末端は、直接又はスペーサーを介して、Ｆｅｌ ｄ１の鎖１のＮ末端に融合する。更なる好適な一実施態様では、前記Ｆｅｌ ｄ１タンパク質は、配列番号：２４のアミノ酸配列を含むか、あるいはこれからなる。

国際公開公報2004/094639は、天然の相対物に類似した分子的かつ生物学的性質を有する折りたたまれた組み換えＦｅｌ ｄ１と、具体的にはＦｅｌ ｄ１鎖２のＮ末端と鎖１の直接融合体をコードする合成遺伝子を開示した。大腸菌発現により、サイズ排除クロマトグラフィにより決定された３０ｋＤａの見かけの分子量を有する非共有結合ホモダイマーとなり、各々の１９１７７Ｄａのサブユニットは天然のＦｅｌ ｄ１において見られるものと同一のジスルフィドパターンを表し、天然のＦｅｌ ｄ１及び組み換えＦｅｌ ｄ１の同一のフォールドを有する。組み換えＦｅｌ ｄ１は、ネコアレルギー性患者の血清からのＩｇＥに対して天然のＦｅｌ ｄ１と同じように反応した。ゆえに、このＦｅｌ ｄ１融合タンパク質は天然のＦｅｌ ｄ１の抗原性を模倣する。

【００４４】

好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１の組み換え鎖１のＣ末端は、直接又はスペーサーを介してＦｅｌ ｄ１の鎖２のＮ末端に融合する。

好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１の鎖１は、配列番号：２２の配列又はそのホモログ配列を含むか、あるいはこれからなり、該ホモログ配列が８０％以上、好ましくは９０％以上又はさらに好ましくは９５％以上の配列番号：２２への同一性を有するものである。

好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１の前記鎖２は、配列番号：２３、配列番号：２５又は配列番号：２６の配列又はそのホモログ配列を含むか、あるいはこれからなり、該ホモログ配列が８０％以上、好ましくは９０％以上又はさらに好ましくは９５％以上の配列番号：２３、配列番号：２５又は配列番号：２６への同一性を有するものである。

【００４５】

好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１タンパク質は組み換えＦｅｌ ｄ１タンパク質であり、このとき少なくとも一のジスルフィド結合は、好ましくは突然変異によって、好ましくはＣｙｓからＳｅｒへなどの保存的置換により破壊されているものである。

天然のＦｅｌ ｄ１の２つのペプチドを連結している３つの鎖間ジスルフィド架橋は同定されており、すなわちCys3(1)-Cys73(2)、Cys44(1)-48Cys(2)及びCys70(1)-Cys7(2)であり、このことからＦｅｌ ｄ１ペプチドの逆平行の定位が示唆される。(Kristensen, A. K., 等 (1997) Biol Chem 378, 899-908)。好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１タンパク質のそのような一つのジスルフィド結合は破壊される。更なる好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１タンパク質のこのような２つのジスルフィド結合は破壊される。なお更なる好適な一実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１タンパク質のこのような３つすべてのジスルフィド結合は破壊される。好適な一実施態様では、鎖１のCys70は欠損させるか変異させる。他の好適な実施態様では、鎖のCys73は欠損させるか変異させる。好適な一実施態様では、前記Ｆｅｌ ｄ１タンパク質は、直接又はスペーサーを介して融合したＦｅｌ ｄ１の鎖１とＦｅｌ ｄ１の鎖２を含んでなる融合タンパク質であり、このときの３つすべてのジスルフィド結合は破壊されているものである。更なる好適な一実施態様では、前記Ｆｅｌ ｄ１タンパク質は、配列番号：２４、５５又は５７のアミノ酸配列を含むか、あるいはこれからなり、このとき、少なくとも１つ、好ましくは少なくとも３つ、さらに好ましくは少なくとも５つのシステインが置換又は欠失により取り除かれているものである。

【００４６】
好適な一実施態様では、本発明の抗原はＦｅｌ ｄ１断片を含むか、あるいはこれからなる。免疫原性の保持には通常タンパク質の完全長を必要としないことと、通常、タンパク質は複数の抗原エピトープ、すなわち抗原性部位を含有することとが知られている。断片又は短いペプチドは、抗体によって免疫特異的に結合されうるか、ＭＨＣ分子との関係でＴ細胞レセプターに結合されうる、少なくとも一つの抗原性部位を含有するために十分であるかもしれない。抗原性部位又は複数の部位は、当分野の技術者に一般に公知の多くの技術で決定されうる。それは、配列アラインメントや構造予測によってなされうる。例えば、Rasmolなどのプログラムを用いて、可能性のあるα-ヘリックス、ターン、鎖間及び鎖内ジスルフィド結合などを予測することができる。さらに、分子の表面に露出する分子又は配列内に埋没される配列を予測することができる。分子の表面に露出する配列は、おそらく、天然の抗原性部位(一又は複数)を含んでなるため、治療的抗体を誘導する際に有用である。表面ペプチド配列を決定した後、例えば網羅的な突然変異誘発方法によって、この配列の範囲内の抗原性部位を更に決定してもよい(アラニンスキャニング突然変異誘発など、Cunningham BC, Wells JA. Science 1989 Jun 2、 244(4908): 1081-5)。一時的にこの配列内のアミノ酸を順次アラニンに変異し、そのアラニン突然変異が抗体に対する結合の低減(野生型配列に対して上昇)を示すアミノ酸ないしは全く結合を失うアミノ酸が、おそらく抗原性部位の成分である。抗原性部位(一又は複数)を決定する他の方法は、Ｆｅｌ ｄ１(Geysen, PNAS Vol 81: 3998-4002, (1984) and Slootstra, J. W. 等, (1996) Mol. Divers. 1, 87-96)の完全長配列を包含するオーバーラッピングペプチドを生成することである。

【００４７】
好適な一実施態様では、本発明の抗原は、少なくとも１つ、好ましくは少なくとも２つのＦｅｌ ｄ１エピトープ、更に好ましくはＦｅｌ ｄ１の鎖１由来の少なくとも１つのエピトープとＦｅｌ ｄ１の鎖２由来の少なくとも１つのエピトープを含むか、あるいはこれからなる。
Ｆｅｌ ｄ１のＴ細胞反応性エピトープはＦｅｌ ｄ１タンパク質全体にわたってマッピングされており、米国特許第6120769号、米国特許第6025162号の14列の第4段落、130と131列などの従来文献に開示されており、これらの開示内容は出典明記によって本明細書中に援用されるものである。好適な実施態様では、Ｆｅｌ ｄ１のＴ細胞エピトープは配列番号：２７～３２からなる群から選択される。

【００４８】
本発明は、(a) 少なくとも一の第一付着部位を有するＶＬＰを供給する、(b) 少なくとも一の第二付着部位を有するＦｅｌ ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ ｄ１断片である、少なくとも一の抗原を供給する、そして(c) 該ＶＬＰと該少なくとも一の抗原を組み合わせて、該第一付着部位と該第二付着部位を介して少なくとも一の抗原と該ＶＬＰが結合していることを含む本発明の組成物の産生方法を提供する。好適な実施態様では、少なくとも一の第二付着部位を有する少なくとも一の抗原、すなわちＦｅｌ ｄ１タンパク質ないしＦｅｌ ｄ１断片の供給は、発現によるものであり、好ましくは細菌系、好ましくは大腸菌内での発現によるものである。通常、Ｈｉｓタグ、Ｍｙｃタグなどのタグは精製工程を容易にするために加えられる。他の方法では、特に５０以下のアミノ酸を有するＦｅｌ ｄ１断片は化学的に合成できる。

【００４９】
本発明の好適な一実施態様では、少なくとも一の第一付着部位を有するＶＬＰは、少なくとも一のペプチド結合を介して少なくとも一の第二付着部位を有する本発明のＦｅｌ ｄ１に結合する。本発明のＦｅｌ ｄ１、好ましくはＦｅｌ ｄ１断片、より好ましくは５０アミノ酸以下、さらにより好ましくは３０アミノ酸未満の断片をコードする遺伝子が、ＶＬＰのコートタンパク質をコードする遺伝子の内部に又は好ましくはＮ末端ないしＣ末端の何れかにインフレームでライゲーションされる。抗原タンパク質、その変異体ないしその断片をウイルスのコートタンパク質にコートするために本発明の抗原を使用する実施

態様は、国際公開公報2004/009124の62頁の第20行目から68頁の第17行目に開示されており、出典明記によって本明細書中に援用される。

好適な一実施態様では、Ｆｅｌ　ｄ１断片を、ＲＮＡファージＡＰ２０５のコートタンパク質、その変異体ないしはその断片のＮ末端又はＣ末端に融合する。更なる好適な一実施態様では、融合タンパク質は、スペーサーをさらに含有するものであり、該スペーサーはＡＰ２０５及びＦｅｌ　ｄ１断片のコートタンパク質、その断片ないしはその変異体に融合されるものである。

【００５０】

本発明の好適な一実施態様では、組成物は、少なくとも一の共有結合を介して少なくとも一の第二付着部位を有する少なくとも一の本発明のＦｅｌ　ｄ１に結合した少なくとも一の第一付着部位を有するウイルス様粒子を含有するか、あるいは本質的にこれらからなるものであり、好ましくは該共有結合は非ペプチド結合である。本発明の好適な実施態様では、第一付着部位は、アミノ基、好ましくはリジン残基のアミノ基を含むか、好ましくはそのものである。本発明の他の好適な実施態様では、第二付着部位は、スルフヒドリル基、好ましくはシステインのスルフヒドリル基を含むか、好ましくはそのものである。

本発明の非常に好適な実施態様では、少なくとも一の第一付着部位は、アミノ基、好ましくはリジン残基のアミノ基であり、少なくとも一の第二付着部位は、スルフヒドリル基、好ましくはシステインのスルフヒドリル基である。

【００５１】

本発明の好適な一実施態様では、本発明のＦｅｌ　ｄ１は、典型的にかつ好ましくはヘテロ二官能性架橋剤を使用して、化学的架橋によりＶＬＰに結合している。好適な実施態様では、ヘテロ二官能性架橋剤は、好ましくはアミノ基、より好ましくはＶＬＰのリジン残基(一又は複数)のアミノ基を有する好適な第一付着部位と反応可能な官能基と、好適な第二付着部位、すなわち本発明のＦｅｌ　ｄ１に元もとあるかないしは人工的に付加され、場合によっては還元による反応に利用される、好ましくはシステイン(一又は複数)残基のスルフヒドリル基と反応可能なさらなる官能基を含む。いくつかのヘテロ二官能性架橋剤が当該分野で知られている。これらには、好ましい架橋剤であるＳＭＰＨ(Pierce)、スルホ-ＭＢＳ、スルホ-ＥＭＣＳ、スルホ-ＧＭＢＳ、スルホ-ＳＩＡＢ、スルホ-ＳＭＰＢ、スルホ-ＳＭＣＣ、ＳＶＳＢ、ＳＩＡ、及び例えばPierce Chemical Companyから入手可能な他の架橋剤が含まれ、アミノ基に対して反応可能な一官能基とスルフヒドリル基に対して反応可能な一官能基を有する。上述した全ての架橋剤により、アミノ基との反応後にアミド結合が、またスルフヒドリル基とチオエーテル結合が形成される。本発明の実施に適した他のクラスの架橋剤は、カップリング時に本発明のＦｅｌ　ｄ１とＶＬＰとの間にジスルフィド結合を導入することにより特徴付けられる。このクラスに属する好ましい架橋剤には、例えばＳＰＤＰ及びスルホ-ＬＣ-ＳＰＤＰ(Pierce)が含まれる。

【００５２】

好適な実施態様では、本発明の組成物はリンカーをさらに含有している。本発明のＦｅｌ　ｄ１における第二の付着部位の操作は、この発明の開示に従い、好ましくは第二の付着部位として適切な少なくとも一のアミノ酸を含むリンカーとの結合により達成される。よって、本発明の好適な実施態様では、リンカーは少なくとも一の共有結合、好ましくは典型的には少なくとも一のペプチド結合により、本発明のＦｅｌ　ｄ１に結合している。好ましくは、リンカーは、第二の付着部位を含むかあるいはそれからなる。さらに好適な実施態様では、リンカーは好ましくはシステイン残基のスルフヒドリル基を含む。他の好適な実施態様では、リンカーはシステイン残基である。

【００５３】

リンカーの選択は、本発明のＦｅｌ　ｄ１の性質、その生化学的特性、例えばｐＩ、電荷分布、及びグリコシル化に依存するであろう。一般的に、フレキシブルなアミノ酸リンカーが好まれる。本発明のさらに好適な実施態様では、リンカーはアミノ酸からなり、さらに好ましくは、リンカーは最大で２５、好ましくは最大で２０、より好ましくは最大で１５のアミノ酸からなる。本発明のさらに好適な実施態様では、アミノ酸リンカーは１０

末満のアミノ酸を含有する。リンカーの好適な実施態様は：(a) CGG；(b) N-末端γ１-リンカー(例えばCGDKTHTSPP、配列番号58)；(c) N-末端γ３-リンカー(例えばCGGPKPSTPPGSSGGAP、配列番号69)；(d) Ｉｇヒンジ領域；(e) N-末端グリシンリンカー(例えばGCGGGG、配列番号59)；(f) n=0-12、k=0-5である(G)kC(G)n；(g) N-末端グリシン-セリンリンカー(さらに一つのシステインを有するｎ＝1-3の(GGGGS)n(例えば配列番号60、n=1の実施態様に相当))；(h) n=0-3、k=0-5、m=0-10、l=0-2である(G)kC(G)m(S)l(GGGGS)n(例えば配列番号61、n=1、k=1、l=1及びm=1の実施態様に相当)；(i) GGC；(k) GGC-NH2；(l) C-末端γ１-リンカー(例えばDKTHTSPPCG、配列番号62)；(m) C-末端ガンマ３-リンカー(例えばPKPSTPPGSSGGAPGGCG、配列番号63)；(n) C-末端グリシンリンカー(GGGGCG、配列番号64)；(o) n=0-12及びk=0-5である(G)nC(G)k；(p) C-末端グリシン-セリンリンカー(さらに一つのシステインを有するn=1-3の(SGGGG)n(例えば配列番号65、n=1の実施態様に相当))；(q) n=0-3、k=0-5、m=0-10、l=0-2及びo=0-8である(G)m(S)l(GGGGS)n(G)oC(G)k(例えば配列番号66、n=1、k=1、l=1、o=1及びm=1の実施態様に相当)からなる群から選択される。さらに好適な実施態様では、リンカーは本発明のＦｅｌ ｄ１のN-末端に付加している。本発明の他の好適な実施態様では、リンカーは本発明のＦｅｌ ｄ１のC-末端に付加している。

【００５４】

この発明に係る好ましいリンカーは、第２付着部位としてシステイン残基をさらに含むグリシンリンカー(G)n、例えばN-末端グリシンリンカー(GCGGGG)及びC-末端グリシンリンカー(GGGGCG)である。さらに好適な実施態様は、C-末端グリシン-リジンリンカー(GGKKGC、配列番号67)及びN-末端グリシン-リジンリンカー(CGKKGG、配列番号68)、ペプチドのC-末端のGGCG、GGC又はGGC-ＮＨ２(「ＮＨ２」はアミド化を表す)リンカー、又はそのN-末端のCGGのリンカーである。一般的に、グリシン残基は、第２付着部位として使用されるシステインと大きなアミノ酸との間に挿入されて、カップリング反応中での、より大きなアミノ酸の潜在的な立体障害が回避される。

好適な一実施態様では、リンカーはＦｅｌ ｄ１タンパク質ないしＦｅｌ ｄ１断片のN末端に融合している。更に好適な一実施態様では、リンカーはGCGGである。他の好適な実施態様では、リンカーはＦｅｌ ｄ１タンパク質ないしＦｅｌ ｄ１断片のC末端に融合している。更なる好適な一実施態様では、リンカーはGGCである。２つのポリペプチド鎖からなるＦｅｌ ｄ１タンパク質ないしＦｅｌ ｄ１断片の場合には、このようなＦｅｌ ｄ１タンパク質ないしＦｅｌ ｄ１断片は２つのＮ末端と２つのＣ末端を有する。リンカーは２つのＮ末端の両方又はＣ末端の両方に融合しうる。好ましくは、リンカーは２つのＮ末端の一方のみ又は２つのＣ末端の一方のみに融合する。

【００５５】

上記の好適な方法によるヘテロ二官能性架橋剤を用いることによるＶＬＰへの本発明のＦｅｌ ｄ１の結合により、正方向の様式でＶＬＰに本発明のＦｅｌ ｄ１をカップリングさせることができる。ＶＬＰに本発明のＦｅｌ ｄ１を連結させるための他の方法には、カルボジイミドＥＤＣ、及びＮＨＳを使用し、本発明のＦｅｌ ｄ１をＶＬＰに架橋させる方法が含まれる。本発明のＦｅｌ ｄ１は、例えばＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ又はイミノチオランを用いた反応を介して、まずチオラート化されてもよい。次いで、必要であれば脱保護化した後に本発明のＦｅｌ ｄ１を以下のようにＶＬＰにカップリングしてもよい。過剰なチオラート化剤を分離した後、本発明のＦｅｌ ｄ１を、システイン反応基を含有し、システイン残基に対して反応可能な少なくとも一又はいくつかの官能基を表出するヘテロ二官能性架橋剤にて予め活性化させた、ＶＬＰと反応させる。このとき本発明のチオラート化Ｆｅｌ ｄ１は上記に記載のようにそのシステイン残基と反応させることができる。場合によっては、少量の還元剤が反応混合物中に含まれる。さらなる方法では、ホモ二官能性架橋剤、例えばグルタルアルデヒド、ＤＳＧ、ＢＭ[ＰＥＯ]４、ＢＳ３、(Pierce)、又はＶＬＰのアミノ基又はカルボキシル基に対して反応する官能基を有する他の既知のホモ二官能性架橋剤を使用して、本発明のＦｅｌ ｄ１をＶＬＰに付着させる。

【００５６】

本発明の他の実施態様では、組成物は、化学的な相互作用を介して本発明のＦｅｌ　ｄ１に結合したウイルス様粒子を含むか、ないしは本質的にそれからなるものであり、このときこの相互作用の少なくとも一は共有結合ではないものである。例えば、ＶＬＰをビオチン化してストレプトアビジン-融合タンパク質として本発明のＦｅｌ　ｄ１を発現することによって本発明のＦｅｌ　ｄ１へのＶＬＰの結合が起こる。

一又はいくつかの抗原分子、すなわち本発明のＦｅｌ　ｄ１は、立体的に可能な場合には、好ましくはＲＮＡファージ　ＶＬＰのコートタンパク質の露出したリジン残基を介して、ＶＬＰ、好ましくはＲＮＡファージコートタンパク質の一サブユニットに付着させることができる。したがって、ＲＮＡファージのＶＬＰ、特にＱβコートタンパク質ＶＬＰの特異的な特徴は、１サブユニットにつきいくつかの抗原をカップリングする可能性である。これにより高密度な抗原アレイの生成が可能となる。

【００５７】

本発明のとても好適な実施態様では、本発明のＦｅｌ　ｄ１は、本発明のＦｅｌ　ｄ１のＮ末端又はＣ末端の何れかに付加されているシステイン残基、又は本発明のＦｅｌ　ｄ１内の天然のシステイン残基を介して、ＲＮＡファージのＶＬＰのコートタンパク質、特にＱβのコートタンパク質のリジン残基に結合する。

上述の通り、４つのリジン残基はＱβコートタンパク質のＶＬＰの表面上に露出する。典型的かつ好ましくは、これらの残基は架橋剤分子との反応の際に誘導される。露出したリジン残基の全てが抗原にカップリングしていない場合、架橋剤と反応したリジン残基は、誘導工程の後にεアミノ基に付着した架橋分子とともに残る。これによって１又はいくつかの正電荷が消失し、ＶＬＰの溶解性および安定性に不利益となりうる。本発明者等は、開示されたＱβコートタンパク質変異体のように、アルギニン残基が好適な架橋剤と反応しないので、いくつかのリジン残基をアルギニンへ置換することによって正電荷の過剰な消失を予防する。さらに、抗原との反応に利用可能な部位が少ないほど、アルギニン残基によるリジン残基の置換によりより多くの特徴的な抗原配列が生じる。

【００５８】

したがって、露出したリジン残基は、以下のＱβコートタンパク質変異体においてアルギニンによって置換された：Ｑβ-２４０(Lys13-Arg；配列番号：１５)、Ｑβ-２５０(Lys2-Arg、Lys13-Arg；配列番号：１７)、Ｑβ-２５９(Lys2-Arg、Lys16-Arg；配列番号：１９)、及びＱβ-２５１(Lys16-Arg；配列番号：１８)。更なる実施態様では、本発明者等は、更に高密度の抗原アレイを得るために好適な、１つの付加的リジン残基Ｑβ-２４３を有するＱβ変異コートタンパク質(Asn10-Lys；配列番号：１６)を開示している。

本発明の好適な一実施態様では、本発明のＶＬＰは宿主内で組み換えて産生されるものであり、該ＶＬＰは宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主核酸を本質的に含まない。更なる好適な一実施態様では、組成物は、ＶＬＰに結合した、好ましくはＶＬＰ内にパッケージ化ないしは封入された少なくとも一のポリ陰イオン性高分子を更に含有する。より更なる好適な実施態様では、ポリ陰イオン性高分子はポリグルタミン酸及び／又はポリアスパラギン酸である。

【００５９】

本質的に宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主の核酸を欠く：本明細書中で用いられる「本質的に宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主の核酸を欠く」なる用語は、ＶＬＰに含有される宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主の核酸の量を意味し、その量は典型的かつ好ましくは、ＶＬＰｍｇ当たり３０μｇより少ない、好ましくは２０μｇより少ない、より好ましくは１０μｇより少ない、さらにより好ましくは８μｇより少ない、さらにより好ましくは６μｇより少ない、さらにより好ましくは４μｇより少ない、最も好ましくは２μｇより少ない。上記の範囲内で用いられる宿主は、ＶＬＰが組み換えて産生される宿主を意味する。ＲＮＡ、好ましくは核酸の量を測定する従来の方法は当業者に周知である。本発明によって、ＲＮＡ、好ましくは核酸の量を測定する典型的かつ好適な方法は、同じ指定代理人により2005年10月5日に出願したPCT/EP2005/055009の実施例１７に記載される。典型的かつ好ましくは、Ｑβ以外のＶＬＰを含んでなる本発明の組成物についてＲＮＡ、好ましくは核酸の量を

測定するためには、同一、同種又は類似の条件を用いる。最終的に必要とされる条件の変更は当業者の知識の範囲内である。典型的かつ好ましくは、決定した量の数値は、示した数値の±１０％の偏差、好ましくは±５％の偏差を有する値と比較して理解されるであろう。

【００６０】

ポリ陰イオン性高分子：本明細書中で用いる「ポリ陰イオン性高分子」なる用語は、陰性電荷の反復性基を含んでなる相対的に高い質量の分子を指すものであり、その構造は、実際のところ又は概念的には、相対的に低い質量の分子から得られるユニットの複数の繰り返しを基本的に含んでなる。ポリ陰イオン性高分子は、少なくとも２０００のダルトン、好ましくは少なくとも３０００のダルトン、そしてさらにより好ましくは少なくとも５０００のダルトンの分子量を有するものである。本明細書中で用いる「ポリ陰イオン性高分子」なる用語は、典型的かつ好ましくは、ｔｏｌｌ様レセプターを活性化することができない分子を指す。ゆえに、「ポリ陰イオン性高分子」なる用語は、典型的かつ好ましくはＴｏｌｌ様レセプターリガンドを除く、さらにより好ましくはさらに、免疫賦活性物質、例えばＴｏｌｌ様レセプターリガンド、免疫賦活性核酸およびリポポリサッカリド(ＬＰＳ)を除くものである。より好ましくは、本明細書中で用いる「ポリ陰イオン性高分子」なる用語は、サイトカイン産生を誘導することができない分子を指す。さらにより好ましくは、「ポリ陰イオン性高分子」なる用語は免疫賦活性物質を除くものである。本明細書中で用いる「免疫賦活性物質」なる用語は、本発明中に含有される抗原に対して特異的な免疫応答を誘導及び／又は亢進することができる分子を指す。

【００６１】

宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主の核酸：本明細書中で用いる「宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主の核酸」なる用語、又は「二次構造を有する宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主の核酸」なる用語は、宿主が本来合成するＲＮＡ又は好ましくは核酸を指す。しかしながら、ＲＮＡ、好ましくは核酸は、典型的かつ好ましくは、本発明の方法による、ＲＮＡ、好ましくは核酸の量を少なくするかないしは除去する工程の間に、化学的及び／又は物理的な変化が起こりうる。例えばＲＮＡ、好ましくは核酸の大きさが短くなったり、その二次構造が変化しうる。しかしながら、この結果として生じるＲＮＡ又は核酸でも、宿主ＲＮＡ又は宿主核酸とみなす。

ＲＮＡの量を決定するための方法及びＶＬＰによって包含されるＲＮＡの量を減少する方法は、同じ指定代理人により2005年10月5日に出願したPCT/EP2005/055009に開示されており、その出願全体は出典明記によって本明細書中に援用される。ＲＮＡ、好ましくは核酸の量を少なくするかないしは除去することにより、Ｆｅｌ　ｄ１に特異的な抗体応答が強いままで、炎症性Ｔ細胞応答及び障害性Ｔ細胞応答などの望ましくないＴ細胞応答や、発熱などの他の望ましくない副作用を最小限にするか、又は低減する。

【００６２】

好適な一実施態様では、本発明は、a) 宿主により、少なくとも一の第一の付着部位を有するウイルス様粒子(ＶＬＰ)を組み換えて産生し、このとき該ＶＬＰはＲＮＡ-バクテリオファージのコートタンパク質、その変異体ないし断片を含むものであり；b) 該ウイルス様粒子を、該ＲＮＡ-バクテリオファージの該コートタンパク質、その変異体ないし断片に分解し；c) 該コートタンパク質、その変異体ないし断片を精製し；d) 該ＲＮＡ-バクテリオファージの、該精製されたコートタンパク質、その変異体ないし断片を、ウイルス様粒子に再構築させ、このとき該ウイルス様粒子は、宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主核酸を本質的に含有しないものであり；及びe) 工程(d)から得た該ＶＬＰに、少なくとも一の第二の付着部位を有する少なくとも一の抗原を結合させることを含む、本発明の組成物、及びＲＮＡ-バクテリオファージのＶＬＰ－Ｆｅｌ　ｄ１の調製方法であり、このとき該ＶＬＰは宿主によって組み換えて産生され、該ＶＬＰは宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主核酸含まないものである方法を提供する。さらに好適な実施態様では、前記の精製されたコートタンパク質、その変異体ないし断片の再構築は、少なくとも一のポリアニオン系高分子の存在下で影響を受ける。

【００６３】
好適な一実施態様では、本発明の組成物はさらに、免疫応答を誘導する及び／又は亢進することができる免疫賦活性物質を少なくとも一つ含有する。好ましくは、免疫賦活性物質はＴｏｌｌ様レセプターリガンドであり、(a) 免疫賦活性核酸；(b) ペプチドグリカン；(c) リポポリサッカリド；(d) リポテイコ酸；(e) イミダゾキノリン化合物；(f) フラジェリン；(g) リポタンパク質；(h) 免疫賦活性有機分子；(i) 非メチル化ＣｐＧ-含有オリゴヌクレオチド；及び(j) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)の物質の混合物からなる群から選択されるのが好ましい。
更なる好適な実施態様では、免疫賦活性核酸は、(a) 細菌起源の核酸；(b) ウイルス起源の核酸；(c) 非メチル化ＣｐＧモチーフを含有する核酸；(d) 二本鎖ＲＮＡ；(e) 一本鎖ＲＮＡ；及び(g) 非メチル化ＣｐＧモチーフがない核酸、からなる群から選択されるのが好ましい。非メチル化ＣｐＧモチーフを含有しない免疫賦活性核酸は、例えば国際公開公報01/22972に開示されている。本明細書で用いられる「核酸」なる用語は、直線的に共有結合した単量体(ヌクレオチド)からなる分子を指す。これはヌクレオチドの分子鎖を表し、生成物の特定の長さを意味するものではない。したがって、オリゴヌクレオチドは核酸の定義の範囲内に包含される。ヌクレオチド間の結合は、典型的かつ好ましくはホスホジエステル結合である。結合の修飾を含有する核酸、例えばホスホロチオエート結合も本発明に包含されるものである。
【００６４】
好適な一実施態様では、免疫賦活性物質は組み換えＶＬＰと混合される。更なる他の好適な実施態様では、免疫賦活性物質は本発明のＶＬＰに結合するか、好ましくはＶＬＰ内にパッケージ化される。
免疫賦活性物質、特に免疫賦活性核酸、より好ましくは非メチル化ＣｐＧを含有するオリゴヌクレオチドについては、国際公開公報03/024480、国際公開公報03/024481及びPCT/EP/04/003165に詳述されている。免疫賦活性物質とＶＬＰ-抗原を混合する方法は国際公開公報03/024480に開示されている。ＶＬＰ内部に免疫賦活性物質をパッケージ化する方法は国際公開公報03/024481に開示されている。したがって、国際公開公報03/024480、国際公開公報03/024481及びPCT/EP/04/003165は出典明記によって本明細書中に援用される。一般的に、ＶＬＰは免疫系を誘導及び／又は亢進することができる。しかしながら、本明細書中の文脈で用いる「免疫賦活性物質」なる用語は、どちらかといえば前記ＶＬＰに加えて本発明の組成物に用いられるＶＬＰでない免疫賦活性物質を指す。
【００６５】
本発明の組成物内への免疫賦活性物質、好ましくは免疫賦活性核酸の包含は、Ｔｈ１応答に対する免疫応答を制御して、それによってＴｈ２応答を抑制しうる。
一態様では、本発明は本発明の組成物を含有してなるワクチンを提供する。一態様では、本発明は、本発明の組成物と好適なバッファを含有してなるワクチンを提供する。好適な一実施態様では、ワクチン組成物はさらに少なくとも一のアジュバントを含有する。少なくとも一のアジュバントの投与は、本発明の組成物の投与の前、あるいはそれと同時、あるいはその後であってもよい。本明細書中で用いられる「アジュバント」なる用語は、免疫応答の非特異的刺激因子、もしくは、本発明のワクチン及び薬剤組成物のそれぞれと組み合わせるとより亢進した免疫応答を供給しうる、貯蔵物の宿主内での生成を可能にする物質を意味する。
【００６６】
他の好適な実施態様では、ワクチン組成物はアジュバントを欠く。本発明の有利な特性は、アジュバントを含まない場合でさえ、組成物の免疫原性が高いことである。アジュバントを使用しないので、アジュバントの使用に関連する副作用の発生の頻度を減少しうる。よって、本発明のワクチンの患者への投与は、好ましくはワクチンの投与前、投与と同時、又は投与後に同じ患者に少なくとも一のアジュバントを投与することなく、なされるであろう。
さらに、本発明は、本発明のワクチンがヒト又はイヌやネコなどの非ヒト哺乳動物に投

与されることを含む免疫化方法を開示する。理論的に本発明を限定することを意図するものではないが、本発明のワクチン組成物のネコへの投与はＦｅｌ　ｄ１を中和して、それによってネコ唾液中のＦｅｌ　ｄ１の量を減少しうる。

【００６７】

ワクチンは、当分野で公知の様々な方法によって投与されてもよいが、通常、注射、注入、吸入、経口投与又は他の適切な理学的方法によって投与されうる。コンジュゲートは、選択的に、筋肉内、静脈内、粘膜経由、経皮、鼻腔内、腹膜内又は皮下投与されてもよい。投与のためのコンジュゲート成分は、滅菌水(例えば、生理食塩液)又は非水溶液及び懸濁液などである。非水溶性溶媒の例として、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、及び注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルなどがある。担体又は密封包帯を、皮膚透過性を増やして、抗原吸収を上げるために用いてもよい。

【００６８】

レシピエントの個体に投与が合っていれば、本発明のワクチンは「薬剤的に受容可能」であるといえる。さらに、本発明のワクチンは、「治療的に有効な量」(すなわち、所望の生理学的効果を示す量)で投与されうる。免疫応答の性質又は種類は本発明で開示される因子に限定するものではない。以下のメカニズムの説明によって本発明が限定されるものではなく、本発明のワクチンは、Ｆｅｌ　ｄ１に結合する抗体、おそらくＩｇＧサブタイプを低減して、肥満細胞及び好塩基球へのＩｇＥ結合によって観察されるＦｅｌ　ｄ１を阻害する。択一的又は同時に、本発明の組成物はＴｈ１応答に対する免疫応答を制御して、Ｔｈ２応答の発達とそれによるＩｇＥ抗体(アレルギー反応の主要な成分である)の産生を抑制する。

一態様では、本発明は、本発明で述べられる組成物と受容可能な製薬的担体を含有する薬剤組成物を提供する。本発明のワクチンが個体に投与される場合、コンジュゲートの有効性を改善するために望ましい他の物質、アジュバント、バッファ又は塩類を含有する形態でありうる。薬剤組成物の調整における使用に好適な材料の例は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Osol, A, 編集, Mack Publishing Co., (1990))を含む多くの情報源に示される。

【００６９】

本発明は、本発明の組成物の産生方法であって、(a) 少なくとも一の第一付着部位を有するコア粒子であり、このときウイルス様粒子(ＶＬＰ)又はウイルス粒子である該コア粒子を供給する；(b) 少なくとも一の第二付着部位を有する少なくとも一の抗原であり、このときＦｅｌ　ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ　ｄ１断片である該抗原を供給する；そして(c) 該コア粒子と該少なくとも一の抗原を結合させて、該第一付着部位と該第二付着部位を介して少なくとも一の該抗原と該コア粒子が結合している組成物を産生する、工程を含む産生方法を教示する。

更なる好適な実施態様では、少なくとも一の第一付着部位を有するコア粒子を提供する工程は、(a) 該コア粒子を該コア粒子のコートタンパク質、その変異体ないしはその断片に分解して；(b) 該コートタンパク質、その変異体ないしはその断片を精製して；(c) 該精製された該コア粒子のコートタンパク質、その変異体ないしはその断片を再集合体化させる工程をさらに含むものであり、このときの該コア粒子は宿主ＲＮＡ、好ましくは宿主核酸を本質的に欠いているものである。より更なる好適な実施態様では、前記の精製したコートタンパク質の再集合体化は、少なくとも一のポリ陰イオン性高分子又は少なくとも一の免疫賦活性核酸の存在下にて影響を受ける。

【００７０】

一態様では、本発明は、哺乳動物のネコアレルギーを予防及び／又は治療するための本発明の組成物の使用方法であって、このとき好ましくは該哺乳動物はヒト又はイヌである方法を提供する。

一態様では、本発明は、医薬としての本発明の組成物の使用を教示する。他の態様では、本発明は、哺乳動物のネコアレルギーの治療のための医薬の製造における本発明の組成

物の使用であって、このとき好ましくは該哺乳動物はヒト又はイヌである使用を提供する。

一態様では、本発明は、一方の鎖のＮ末端と他方の鎖のＣ末端を連結するアミノ酸スペーサーによって融合したＦｅｌ　ｄ１の鎖１とＦｅｌ　ｄ１の鎖２を含んでなるＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質であって、該アミノ酸スペーサーが１０～３０、好ましくは１０～２５、好ましくは１０～２０、好ましくは１３～２０、好ましくは１５～２０、好ましくは１３～１７、好ましくは１５～１７のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列からなり、該融合タンパク質が、$(GGGGS)_3$を経て配列番号：２３、２５又は２６の鎖２のＮ末端に融合した配列番号：２２の鎖１を含んでなる融合タンパク質を除くものであり、ここで除いた融合タンパク質がバキュロウイルス発現系において発現されたものであるＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質を提供する。

【００７１】

国際公開公報2004094639は、炭素-窒素結合と短ペプチド、すなわち１～９、好ましくは１～５、特に好ましくは１～３のアミノ酸から選択されるリンカーにより鎖１と鎖２を連結することによるＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質を開示している。更に、驚くべきことに、結合又は短ペプチドは有意な束縛(constrain)又はアンフォールディングを誘導しないことが述べられている。しかしながら、国際公開公報2004094639は９アミノ酸より長いリンカーを開示していない。

国際公開公報00/20032は、連続して発現され、グリシン／セリンリンカー$(GGGGS)_3$により一つに連結される鎖１と鎖２を含んでなるバキュロウイルス発現組み換えＦｅｌ　ｄ１を開示している。また、国際公開公報00/20032は、ＩｇＧとＩｇＥ抗体に対するｒＦｅｌ　ｄ１の免疫応答性がバキュロウイルス内でアレルゲンを発現させることによって、大腸菌内で発現させたアレルゲンと比較して飛躍的に改善されたことを報告した。

【００７２】

本発明のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質は、原核細胞の発現系又は真核細胞の発現系の何れか、例えばバキュロウイルス系において産生することができる。好適な一実施態様では、本発明の前記Ｆｅｌ　ｄ１融合タンパク質は大腸菌から産生される。

好適な一実施態様では、本発明のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質に含有されるスペーサーは、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列からなる。

好適な一実施態様では、Ｆｅｌ　ｄ１融合タンパク質に含有されるスペーサーは、２、３又は４回のGGGGSリピートを有するアミノ酸配列からなる。

好適な一実施態様では、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖２は本発明の融合タンパク質のＮ末端にある。

【００７３】

他の好適な実施態様では、Ｆｅｌ　ｄ１の鎖１は本発明の融合タンパク質のＮ末端にある。更に好適な一実施態様では、融合タンパク質は大腸菌から産生される。

とても好適な一実施態様では、本発明のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質は、(a) 配列番号：５４；(b) 配列番号：５５；及び(c) 配列番号：５７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる。更に、本発明は、本発明のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供する。好適な一実施態様では、本発明は、(a) 配列番号：５４；(b) 配列番号：５５；及び(c) 配列番号：５７からなる群から選択される本発明の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供する。更に好適な実施態様では、本発明のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質は大腸菌から産生される。更に好適な一実施態様では、本発明のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質は、配列番号：５７のアミノ酸配列を含むか、これからなり、本発明の該融合タンパク質が大腸菌から産生されるものである。

一態様では、本発明は、ネコアレルギーの診断と治療のための本発明のＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質の使用を提供する。

【実施例】

【００７４】

実施例１　結果として再集合体化したＱβ　ＶＬＰが生じる、異なるポリ陰イオン性高分子の存在下における分解／再集合体化による本発明のＱβ　ＶＬＰの調製

(A) 従来のＱβ　ＶＬＰの分解

大腸菌溶解物から精製した、ＰＢＳ(２０ｍＭ リン酸塩、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．５)中の４５ｍｇの従来のＱβ　ＶＬＰ(２．５ｍｇ／ｍｌ、Bradford分析によって測定)を１０ｍＭ ＤＴＴにて還元して、撹拌しながら室温に１５分間置いた。次いで、塩化マグネシウムを０．７Ｍの終濃度まで添加し、撹拌しながら室温でさらに１５分間インキュベートを続け、カプセル化された宿主細胞ＲＮＡを沈殿させた。溶液を４０００ｒｐｍ、４℃で１０分間遠心して(Eppendorf 5810 R、以下のすべての工程で固定角ローターA-4-62を用いた)、溶液から沈殿されたＲＮＡを取り除いた。放出された二量体Ｑβコートタンパク質を含有する上清をクロマトグラフィの精製工程に用いた。

【００７５】

(B) 陽イオン交換クロマトグラフィ及びサイズ排除クロマトグラフィによるＱβコートタンパク質の精製

二量体コートタンパク質、宿主細胞タンパク質及び残渣の宿主細胞ＲＮＡを含有する分解反応の上清を水で１：１５に希釈して１０ｍＳ／ｃｍ以下の伝導率に調整し、ＳＰ-セファロースＦＦカラム(xk16/20, 6 ml, Amersham Bioscience)に流した。カラムは、２０ｍＭ リン酸ナトリウムバッファ ｐＨ７にて予め平衡化した。結合したコートタンパク質は、２０ｍＭ リン酸ナトリウム／５００ｍＭ 塩化ナトリウムの勾配法により溶出させ、タンパク質は約２５ｍｌの分画容量に回収した。室温で５ｍｌ／分の流速のクロマトグラフィを行い、２６０ｎｍ及び２８０ｎｍの吸光度をモニターした。

第二工程では、単離したＱβコートタンパク質(陽イオン交換カラムから溶出された分画)をセファクリルＳ-１００ＨＲカラム(xk26/60, 320 ml, Amersham Bioscience)に流し(２列)、２０ｍＭ リン酸ナトリウム／２５０ｍｍ 塩化ナトリウム、ｐＨ６．５にて平衡化した。室温で２．５ｍｌ／分の流速のクロマトグラフィを行い、２６０ｎｍ及び２８０ｎｍの吸光度をモニターした。５ｍｌの分画を回収した。

【００７６】

(C1) 透析によるＱβ　ＶＬＰの再集合体化

精製したＱβコートタンパク質(２０ｍＭ リン酸ナトリウム ｐＨ６．５中に２．２ｍｇ／ｍｌ)、１のポリ陰イオン性高分子(水中に２ｍｇ／ｍｌ)、尿素(水中に７．２Ｍ)及びＤＴＴ(水中に０．５Ｍ)を、終濃度、コートタンパク質 １．４ｍｇ／ｍｌ、各々のポリ陰イオン性高分子 ０．１４ｍｇ／ｍｌ、尿素 １Ｍ及びＤＴＴ ２．５ｍＭに混合した。混合物(各々１ｍｌ)を、３．５ｋＤａのカットオフのメンブランを用いて２０ｍＭ トリスＨＣｌ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ ｐＨ８にて５℃で２日間透析した。ポリ陰イオン性高分子は以下の通りであった：ポリガラクツロン酸(25000-50000, Fluka)、硫酸デキストラン(MW 5000及び10000, Sigma)、ポリ-Ｌ-アスパラギン酸(MW 11000及び33400, Sigma)、ポリ-Ｌ-グルタミン酸(MW 3000、13600及び84600, Sigma)、及びパン酵母と小麦麦芽由来のｔＲＮＡ。

【００７７】

(C2) 透析濾過(ダイアフィルトレーション)によるＱβ　ＶＬＰの再集合体化

３３ｍｌの精製したＱβコートタンパク質(２０ｍＭ リン酸ナトリウム ｐＨ６．５、２５０ｍＭ ＮａＣｌ中に１．５ｍｇ／ｍｌ)を、水及び尿素(水中に７．２Ｍ)、ＮａＣｌ(水中に５Ｍ)及びポリ-Ｌ-グルタミン酸(水中に２ｍｇ／ｍｌ、MW: 84600)と混合した。混合物の容量は５０ｍｌであり、成分の終濃度はコートタンパク質 １ｍｇ／ｍｌ、ＮａＣｌ ３００ｍＭ、尿素 １．０Ｍ及びポリ-Ｌ-グルタミン酸 ０．２ｍｇ／ｍｌであった。次いで、混合物を室温で、５００ｍｌの２０ｍＭ トリスＨＣｌ ｐＨ８、５０ｍＭ ＮａＣｌにて透析濾過した。この透析濾過は、１０ｍｌ／分の交差流速と２．５ｍｌ／分の透過流速で、Pellicon XL薄膜カートリッジ(Biomax 5K, Millipore)を用いた正接流量濾過装置(tangential flow filtration apparatus)にて行った。

【００７８】

実施例２　ＡＰ２０５ ＶＬＰのインビトロ集合体化(アセンブリ)

(A) ＡＰ２０５コートタンパク質の精製

分解：２０ｍｌのＡＰ２０５ ＶＬＰ溶液(ＰＢＳ中に１．６ｍｇ／ｍｌ、大腸菌抽出物から精製)を、０．２ｍｌの０．５Ｍ ＤＴＴと混合し、室温で３０分間インキュベートした。５ｍｌの５Ｍ ＮａＣｌを添加して、次いで混合物を６０℃で１５分間インキュベートし、ＤＴＴ還元コートタンパク質を沈殿させた。混濁した混合物を遠心分離し(ローターSorvall SS34、１００００ｇ、１０分、２０℃)、上清を廃棄し、ペレットを、２０ｍｌの１Ｍ 尿素／２０ｍＭ クエン酸ナトリウム ｐＨ３．２に播種した。室温で３０分間撹拌した後、１．５Ｍ Na_2HPO_4 を加えることによって、ｐＨ６．５にばらつきを調整し、その後遠心分離して(ローターSorvall SS34、１００００ｇ、１０分、２０℃)、二量体コートタンパク質を含む上清を得た。

陽イオン交換クロマトグラフィ：上清(上記参照)を２０ｍｌの水で希釈して、約５ｍＳ／ｃｍの伝導率を調整した。結果として生じた溶液を、２０ｍＭ リン酸ナトリウム ｐＨ６．５バッファにて予め平衡化した６ｍｌのＳＰセファロースＦＦ (Amersham Bioscience)のカラムに流した。流した後、カラムを４８ｍｌの２０ｍＭ リン酸ナトリウム ｐＨ６．５のバッファにて洗浄し、その後、２０倍のカラム容量の１Ｍ ＮａＣｌに対する直線的勾配法により結合したコートタンパク質の溶出を行った。メインピークの分画をプールし、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ及びＵＶ分光法にて分析した。ＳＤＳ-ＰＡＧＥによると、単離したコートタンパク質は本質的に他のタンパク質混入がなく純粋であった。ＵＶ分光法によると、タンパク質濃度は０．６ｍｇ／ｍｌ(総量１２ｍｇ)であり、１Ａ２８０単位はＡＰ２０５コートタンパク質の１．０１ｍｇ／ｍｌを表す。さらに、Ａ２６０(０．２９１)の値に対してＡ２８０(０．５９９９)の値は２であることから、調製物は本質的に核酸を欠いていることが示唆される。

【００７９】

(B) ＡＰ２０５ ＶＬＰの集合体化

任意のポリ陰イオン性高分子のない条件下における集合体化：上記で溶出されたタンパク質分画を透析濾過し、２０ｍＭ リン酸ナトリウム ｐＨ６．５中に１ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度にまでＴＦＦによって濃縮した。その溶液の５００μｌを、５０μｌの５Ｍ ＮａＣｌ溶液と混合し、室温で４８時間インキュベートした。混合物中での再集合体化ＶＬＰの形成は、非還元ＳＤＳ-ＰＡＧＥ及びサイズ排除ＨＰＬＣにて示された。２０ｍＭ リン酸ナトリウム、１５０ｍＭ ＮａＣｌ ｐＨ７．２にて平衡化したTSKgel G5000 PWXLカラム(Tosoh Bioscience)をＨＰＬＣ分析に用いた。

ポリグルタミン酸存在下における集合体化：３７５μｌの精製したＡＰ２０５コートタンパク質(２０ｍＭ リン酸ナトリウム ｐＨ６．５中に１ｍｇ／ｍｌ)を、５０μｌのＮａＣｌ貯蔵溶液(水中に５Ｍ)、５０μｌのポリグルタミン酸貯蔵溶液(水中に２ｍｇ／ｍｌ、MW: 86400, Sigma)及び２５μｌの水と混合した。混合物を室温にて４８時間インキュベートした。混合物中における再集合体化ＶＬＰの形成は、非還元ＳＤＳ-ＰＡＧＥ及びサイズ排除ＨＰＬＣにて示された。混合物中のコートタンパク質がＶＬＰ内にほぼ完全に組み込まれたことから、任意のポリ陰イオン性高分子がない条件下で集合体化したＡＰ２０５コートタンパク質より効率よく、多く集合体化されたことが示された。

【００８０】

実施例３　Ｆｅｌ ｄ１融合タンパク質のクローニング

Ｆｅｌ ｄ１の鎖１と鎖２のそれぞれをコードする遺伝子を、以下に示す重なり合うＤＮＡプライマーを用いたＰＣＲ増幅によって作製した。フォワード(Ｆ)とリバース(Ｒ)プライマーを示す。ｐＣＲＩＩ-ＴＯＰＯベクター(Invitrogen)に断片をライゲーションして、ＸＬ１-ブルー内に形質転換させた。Ｆｅｌ ｄ１の鎖１と鎖２のインサートを配列確認した。

プライマー配列1F：配列番号34;
プライマー配列2R：配列番号35
プライマー配列3F：配列番号36

プライマー配列4R：配列番号37
プライマー配列5F：配列番号38
プライマー配列6R：配列番号39
プライマー配列7F：配列番号40
プライマー配列8R：配列番号41
プライマー配列9F：配列番号42
プライマー配列10R：配列番号43

【００８１】

Ｆｅｌ　ｄ１融合コンストラクト：

ＦＥＬＤ１は鎖２がＮ末端で鎖１に直接融合しているタンパク質を指す。ＦＥＬＤ１をコードするヌクレオチド配列は、プライマー１１リンカー(配列番号４４)を用いたスプライシングオーバーラップ伸長(ＳＯＥ)ＰＣＲによって作製した。

ＦＤ１２は鎖１がＮ末端で鎖２に直接融合しているタンパク質を指す。ＦＤ１２をコードするヌクレオチド配列は、プライマー１２-１(配列番号４５)、１２-３(配列番号４６)及び１２-２-１(配列番号４７)を用いたスプライシングオーバーラップ伸長(ＳＯＥ)ＰＣＲによって作製した。

【００８２】

ＦＥＬＤ１-１０ａａとＦＥＬＤ１-１５ａａは、１０$(GGGGS)_2$又は１５$(GGGGS)_3$のアミノ酸スペーサーのそれぞれを介して鎖２のＮ末端が鎖１のＣ末端に融合しているタンパク質を指す。ＦＥＬＤ１をコードするヌクレオチド配列を含有するプラスミドを鋳型として用いて、インバースＰＣＲ突然変異誘発(ＩＰＣＲＭ)により１０アミノ酸又は１５アミノ酸スペーサーを作製した。１-１５スペーサーのために、２つのプライマー(プライマー１-１０ａａ、配列番号４８とプライマー２-５ａａ、配列番号４９)を用いた。１-１０スペーサーのために、２つのプライマー(プライマー１-５ａａ、配列番号５０とプライマー２-５ａａ)を用いた。結果として得られたＰＣＲ断片をライゲーションによって環状化した。これは、メチル化したアデニンを含有する配列しか認識しないＤｐｎＩ消化に耐性があるのに対して、プラスミド鋳型はＤｐｎＩによって消化した。

ＦＤ１２-１０ａａとＦＤ１２-１５ａａは、１０$(GGGGS)_2$又は１５$(GGGGS)_3$のアミノ酸スペーサーのそれぞれを介して鎖１のＮ末端が鎖２のＣ末端に融合しているタンパク質を指す。ＦＤ１２-１０ａａとＦＤ１２-１５ａａは上記と同様に作製した。１５アミノ酸スペーサーのために、プライマーＦＤ２-１０ａａ(配列番号５１)とプライマーＦＤ１-５ａａ(配列番号５２)を用いた。１０アミノ酸スペーサーのために、プライマーＦＤ１-５ａａとプライマーＦＤ２-５ａａ(配列番号５３)を用いた。

【００８３】

実施例４　Ｈｉｓタグ付加Ｆｅｌ　ｄ１融合タンパク質の細菌性発現と精製

実施例３に記載の様々なＦｅｌ　ｄ１融合コンストラクトをコードするヌクレオチド配列を、プラスミドｐＥＴ-４２ａ(＋)(Novagen)から修飾したＴ７ベースの発現系ｐＥＴ-４２Ｔ(＋)にサブクローニングした。融合コンストラクトのＣ末端は、第二付着部位としてシステインを含有するアミノ酸リンカーであるＧＧＣが続くＨｉｓ-タグ配列に融合した。結果として得たコンストラクトは、終わりに「-ＨＣ」を付加して称した。

ＦＥＬＤ１-ＨＣ、ＦＥＬＤ１-１０ａａ-ＨＣ及びＦＥＬＤ１-１５ａａ-ＨＣ及びＦＤ１２-１５ａａ-ＨＣを以下のように発現させて、精製した。プラスミドをＢＬ２１(ＤＥ３)に形質転換した。１ｍＭのＩＰＴＧをおよそ１のＯＤ６００の培養物に加えることによって発現を誘導した。培養物を、２０℃で更に２０時間生育して、回収して、未変性溶解バッファ(５０ｍＭ NaH_2PO_4、３００ｍＭ ＮａＣｌ、１０ｍＭ イミダゾール ｐＨ８．０)中での超音波処理によって溶解した。

澄んだ細菌溶解物を、未変性溶解バッファを含む５０ｍｌに移した。５ｍｌのニッケル-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA)アガロース(Qiagen)を加え、溶解物を４℃で１時間インバートすることによって、インキュベートした。

非特異的に結合したタンパク質は、未変性溶解バッファにて４回洗浄することによって

、除去した。結合したタンパク質は、２ｍｌの溶出バッファ(５０mM NaH_2PO_4、３００mM ＮａＣｌ、２５０mM イミダゾール ｐＨ８．０)にＮｉ-ＮＴＡアガロースを再懸濁することによって溶出した。

【００８４】

実施例５　精製したＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質の酸化性フォールディングのジスルフィド結合

Ni^{2+}-親和性精製したＦＥＬＤ１-ＨＣは１５ｋＤ～２０ｋＤの様々な混合ジスルフィド架橋種からなる。１：１のモル比の酸化型グルタチオン(GSSG, Applichem)と還元型グルタチオン(GSH, Applichem)によるジスルフィド結合を分子内で改変することによって、ＦＥＬＤ１-ＨＣは自然に折りたたまれる。室温で、２．５mMのＧＳＳＧと２．５mMのＧＳＨを加えることによって、溶離バッファにてＦＥＬＤ１の溶出をした後すぐに２４時間反応させた。再び折りたたまれたＦＥＬＤ１-ＨＣは、非還元条件下で１５ｋＤの分子量の単一バンドを示す(図１、第一パネル、レーン２)。ＦＥＬＤ１-ＨＣの潜在的な遊離スルフヒドリル基を、ヨードアセトアミド(Sigma)を用いてアルキル化した。プローブは、ｐＨ８．０の２０mM 炭酸水素アンモニウム中の５mM ヨードアセトアミドにて、室温で１５分間処理した。

再フォールディングしたＦＥＬＤ１-ＨＣは、ＰＢＳにて平衡化したサイズ排除クロマトグラフィ(ＳＥＣ)(Superdex 75 pg, Amersham Pharmacia Biosciences)によって、均一になるまでさらに精製した。

【００８５】

ＦＥＬＤ１-１０ａａ-ＨＣ及びＦＥＬＤ１-１５ａａ-ＨＣは、上記と実質的に同じ方法で再生させた(図１、２つの真ん中のパネル)。

１０：１のモル比の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンによるジスルフィド結合を改変することによって、ＦＤ１２-１５ａａ-ＨＣは同様に自然にフォールディングされる。溶出の後、ＦＤ１２-１５ａａは、ＦＤ１２-１５ａａ再フォールディングバッファ(５０mM Ｔｒｉｓ-Ｃｌ ｐＨ８．５、２４０mM ＮａＣｌ、１０mM ＫＣｌ、１mM ＥＤＴＡ、０．０５％ ＰＥＧ３，５５０、１mM ＧＳＨ、０．１mM ＧＳＳＨ)にて２０倍に希釈して、４℃で２４時間インキュベートした。再フォールディングしたＦＤ１２-１５ａａは、２３ｋＤで流れる還元型と比較して２０ｋＤの分子量の単一バンドを示す(図１、最後のパネル)。

【００８６】

実施例６　エピトープ特異的モノクローナル抗体により認識されるＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質

エピトープ特異的モノクローナル抗体(ｍＡＢ)に対する天然のＦｅｌ　ｄ１(ｎＦｅｌ　ｄ１)と比較したときのＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質の結合は、Indoor biotechnologies (Cardiff, UK)のＦｅｌ　ｄ１　ＥＬＩＳＡキット(6F9/3E4)を用いたサンドイッチＥＬＩＳＡで測定した。

簡単に言うと、２ｍｇ／ｍｌの原液として調整した抗Ｆｅｌ　ｄ１　ｍＡＢ　６Ｆ９を、５０mM 炭酸-炭酸水素バッファｐＨ９．６にて1:１０００に希釈した。マイクロタイターウェルを、１ウェル当たり１００μｌの希釈したｍＡＢ　６Ｆ９にてコートした。ＰＢＳ-０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０(ＰＢＳ-Ｔ)にてプレートを3回洗浄して、１００μｌのブロッキングバッファ(ＰＢＳ-Ｔ中に１％ＢＳＡ(Sigma))にてブロックした。次いで、マイクロタイターウェルを、８０～０．１６ｎｇ／ｍｌの倍加希釈法を用いた１００μｌのＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質又はｎＦｅｌ　ｄ１標準物質(Indoors technologies、 UK)とともに1時間インキュベートした。ｎＦｅｌ　ｄ１参照物質は、１３．４７Ｕ／ｍｌのＦｅｌ　ｄ１(１単位＝４ｍｇタンパク質)を含有するＣＢＥＲネコ鱗屑参照物質Ｅ１０からサブ標準化した。

【００８７】

次いで、プレートを洗浄し、１００μｌの希釈して(１％ＢＳＡ／ＰＢＳ-Ｔにて１：１０００)ビオチン化した抗Ｆｅｌ　ｄ１　ｍＡＢ　３Ｅ４抗体を添加して、室温で1時間イン

キュベートした。プレートは、１００μｌの希釈した(１％ＢＳＡ／ＰＢＳ-Ｔにて１：１０００)ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ(Sigma S5512、１ｍｌの蒸留水にて再構成される０．２５ｍｇ)を用いたＰＢＳ-Ｔにて３回洗浄した。室温で３０分インキュベーションした後、ウェルをＰＢＳ-Ｔにて３回洗浄した。ＯＰＤ基質溶液と停止溶液として５％のH_2SO_4を用いて検出を行った。吸光度は、４５０ｎｍのＥＬＩＳＡ読み取り機(BioRad)を用いて測定し、相加平均と平均値の標準誤差(ＳＥＭ)の計算のためにＥＸＣＥＬソフトウェア(MS Office、Microsoft)を用いた。結果を表１に示す。したがって、エピトープ特異的ｍＡＢによるＦｅｌ ｄ１融合タンパク質及びｎＦｅｌ ｄ１の認識は、両方のタンパク質の抗原性の高い類似性を表すものである。

表１

試験した タンパク質	FELD1-HC	FELD1-10aa-HC	FELD1-15aa-HC	天然のFel d1
OD50%の Fel d1 (ng/ml)	8.4	6.7	7.9	7.2

【００８８】

実施例７　Ｑβ由来のＶＬＰへのＦｅｌ ｄ１融合タンパク質のカップリング

ＨＥＰＥＳバッファ(２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ ｐＨ７．２)中の１４３μＭのＱβ ＶＬＰの溶液を、５倍モル過剰(７１５μＭ)のＳＭＰＨ(Pierce)と２５℃で３０分間、振とうしながら反応させた。ＳＭＰＨは、ジメチルスルホキシドに溶解した５０ｍＭの貯蔵物から取り出した。反応生成物は、１０，０００のＤａ分子量カットオフ(Slide-A-Lyzer, Pierce)による透析ユニットを用いて２回交換したＰＢＳに対して透析した。反応混合物に対して１０００倍より多い過剰なバッファにて４℃又は室温で透析を行った。

ＳＭＰＨ誘導体化Ｑβ ＶＬＰへＦｅｌ ｄ１融合タンパク質をカップリングする前に、実施例５から得られたＦＥＬＤ１、ＦＥＬＤ１-１０ａａ、ＦＥＬＤ１-１５ａａ及びＦＤ１２-１５ａａのそれぞれを、等モル量のＴＣＥＰ(Pierce, Perbio Science)とともに室温で３０分間インキュベートした。

Ｆｅｌ ｄ１融合タンパク質を、１４３μＭのＳＭＰＨ誘導体化Ｑβ ＶＬＰに５倍モル過剰で加えた。反応容量は６５０μｌであり、複数の反応を平行して行った。反応は、振とうしながら室温で４時間インキュベートした。カップリングの後、一定量を１６０００×ｇで４℃で３分間遠心分離して、不溶性物質をペレット化した。上清を新鮮なチューブにプールした。Ｑβ ＶＬＰへのＦｅｌ ｄ１融合タンパク質のカップリングを、還元ＳＤＳ-ＰＡＧＥによって評価した。

再集合体化したＱβ ＶＬＰ(実施例１から得たもの)に対するＦｅｌ ｄ１融合タンパク質のカップリングは、上記と実質的に同様である。

【００８９】

実施例８　ＨＢｃＡｇ１-１８５-ＬｙｓへのＦＥＬＤ１、ＦＥＬＤ１-１５ａａ及びＦＤ１２-１５ａａのカップリング

ＨＢｃＡｇ１-１８５-Ｌｙｓの構築、その発現及び精製は、国際公開公報03/040164の実施例２～５に実質的に記載されている。２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ ｐＨ７．２中の１２０ｍＭのＨＢｃＡｇ１-１８５-Ｌｙｓ ＶＬＰの溶液は、原液からＤＭＳＯで希釈した２５倍モル過剰のＳＭＰＨ(Pierce)と２５℃で３０分間、振とう器を揺らしながら反応させた。次いで、反応溶液を１Ｌの２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．２に対して４℃で２時間、２回透析した。

次いで、透析したＨＢｃＡｇ１-１８５-Ｌｙｓ反応混合物は、実施例５で得た組み換えＦｅｌ ｄ１と反応させた。カップリング反応において、ＦＥＬＤ１、ＦＥＬＤ１-１５ａａ及びＦＤ１２-１５ａａは、それぞれ、誘導体化したＨＢｃＡｇ１-１８５-Ｌｙｓ ＶＬ

Ｐに対して２倍のモル過剰量とした。カップリング反応は２５℃で４時間、振とう器を揺らしながら行った。

【００９０】

実施例９　ＡＰ２０５由来のＶＬＰへのＦＥＬＤ１、ＦＥＬＤ１-１５ａａ及びＦＤ１２-１５ａａのカップリング

ＡＰ２０５ ＶＬＰの調製は、国際公開公報2004/007538の実施例１及び２に記述された。ＡＰ２０５ ＶＬＰの誘導体化はＱβ ＶＬＰについての実施例７の記載と実質的に同じである。ＳＭＰＨ誘導体化ＡＰ２０５ＶＬＰへＦｅｌ ｄ１融合タンパク質をカップリングする前に、実施例５から得られたＦＥＬＤ１、ＦＥＬＤ１-１５ａａ及びＦＤ１２-１５ａａのそれぞれを、等モル量のＴＣＥＰ(Pierce, Perbio Science)とともに室温で３０分間インキュベートした。

Ｆｅｌ ｄ１融合タンパク質を、１４３μＭのＳＭＰＨ誘導体化ＡＰ２０５ＶＬＰに５倍モル過剰で加えた。反応は、振とうしながら室温で４時間インキュベートした。

再集合体化したＡＰ２０５ＶＬＰ(実施例２から得たもの)へのＦｅｌ ｄ１融合タンパク質のカップリングは、実質的に上記したものと同様である。

【００９１】

実施例１０　発明した組成物に基づくバクテリオファージＱβの産生

大腸菌ＡＢ２５９(５×１０^{7}細胞／ｍｌ)の６０１培養物を、強いエアレーション(１容量の空気／培養単位の容量)の下で、３７℃で２～３時間生育し、およそ２～４×１０^{9}細胞／ｍｌの培養物を得た。澄んだＱβファージ溶解物を５の感染の多様性で接種し、ＣａＣｌ２を終濃度２．２ｍＭにまで加えた。５分の接着段階の後、空気飽和を強めた(１．５容量の空気／培養単位の容量)。ＯＤ６５０ｎｍが安定値に達し、培養物中に４～６×１０^{12}のファージ粒子を産生するまで、細胞を３時間さらに生育した。これらは以下の通りに精製した。大腸菌は、１培養物につきＣＨＣｌ$_{3}$　１０ｍｌ、１培養物につきライソザイム　０．１ｍｇ及び終濃度２０ｍＭのＥＤＴＡを加えることによって溶解した。溶解物は冷やしたflow-through遠心機の遠心によってクリアにし、ファージ粒子を硫酸アンモニウム沈殿(５００ｇ／ｌ、約６６％の飽和を得る)によって溶解物から沈殿させた。懸濁液をまず別の容器へ移し、W.R.ローター6×500ｍｌのJanetzki K26遠心機にて６０００回転数／分、又は、JA-10ローターのBeckman J21 C遠心機にて３０分間遠心して沈殿物を単離した。ペレットを、ＮＴバッファ(０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．１％トリプトン)に再可溶化して、遠心によりクリアにした。上清を、硫酸アンモニウム(５００ｇ／ｌ添加、約６６％の飽和)によって沈殿した。遠心によって、沈殿物を単離して、ＮＴバッファに再可溶化して、遠心によって再びクリアにした。Beckman type 35ローターを用いて、３２０００回転数／分で３．５時間超遠心分離して、結果として生じた上清からファージ粒子を単離した。沈殿したファージをＮＴバッファに再懸濁して、従来の連続的なＣｓＣｌ勾配法にあたる超遠心分離によって精製した。Beckman Ti-70(8×38.5)ローターを用いて５５０００回転数／分で２０時間遠心を行った。次いで、実施例７に記載のように、ファージ粒子を２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．４バッファに対して透析して化学的架橋処置に用いた。

【００９２】

実施例１１　発明した組成物に基づくＧＡファージの調製

２％カゼイン加水分解物、０．５％酵母抽出物、０．２％グルコースを含有するＭ９培地中の１２ｌの大腸菌Ｑ１３ＨｆｒＲＮＡＳｓｅＩ$^{-}$培養物を０．６～０．７のＯＤ$_{540nm}$まで生育した。これはおよそ２×１０^{8}細胞／ｍｌに一致し、１０～２０の感染の多重性でＧＡファージを感染させた。培養物を、全培養物中におよそ１０^{11}のファージ粒子が得られるように、３７℃でさらに２．５～３時間生育した。細胞は、１～２v/v％のＣＨＣｌ$_{3}$を加えて、１５分間培養物をインキュベートすることによって溶解した。溶解物は、Janetzi K26ローターにより５０００回転数／分で３０分間遠心することによって浄化した。硫酸アンモニウム(６０％の飽和)によって、ファージ粒子を培養物から４℃で数日間かけて沈殿した。

【００９３】
まず、懸濁液を別の容器へ移し、Janetzki K26ローターにて６０００回転数／分で３０分間遠心して、沈殿物を単離した。ペレットをＮＥＴ（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．８、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、５ｍＭ ＥＤＴＡ)バッファに再懸濁して、数回の遠心によって粒子を抽出して、わずかなＮＥＴバッファに再懸濁した。キャプシドを含有する一部をプールして、６０％の硫酸アンモニウムによって沈殿した。ＮＥＴバッファに再懸濁した粒子をセファロース４Ｂカラムにて３回精製して、その後２のショ糖勾配にて精製した。簡単に言うと、遠心チューブにＮＥＴバッファ中に７ｍｌの５０w/w%、７ｍｌの４３w/w%、７ｍｌの３６w/w%、７ｍｌの２９w/w%及び７ｍｌの２２w/w%のショ糖によって勾配を調製した。ファージ溶液(ＮＥＴバッファ中)を勾配の上に重ね、Beckman SW 28ローターを用いて２５０００回転数／分で１７時間遠心分離した。キャプシドを含有する分画をプールして、セファロース４Ｂカラムによるゲル濾過によってショ糖から分離した。その後、ファージ粒子を水に対して透析して、更なる使用のために凍結乾燥した。
バクテリオファージＱβ又はＧＡへのＦｅｌ ｄ１融合タンパク質のカップリングの条件は、実施例７で開示したように、ＱβのＶＬＰへのカップリング条件と実質的に同じである。

【００９４】
実施例１２　マウスにおいて免疫原性の高いＱβ-Ｆｅｌ ｄ１融合タンパク質
ＢＡＬＢ／ｃマウスを、５０μｇの実施例７から得たＱβ-ＦＥＬＤ１又は、５０μｇの組み換えＦｅｌ ｄ１(実施例５から得たもの)と混合したＱβを０日目、１４日目及び２１日目に皮下投与して免疫化し、０日目、２１日目及び２８日目に血液を採取した。Ｆｅｌ ｄ１特異的抗体は、コーティング(１０μｇ／ｍｌ)にＦＥＬＤ１を用いたＥＬＩＳＡで測定した。簡単に言えば、１０μｇ／ｍｌ ＦＥＬＤ１を含む０．１Ｍ ＮａＨＣＯ３ ｐＨ９．６にて４℃で終夜かけて予めコートした９６ウェルＦ９６を用いた。プレートをＰＢＳ-Ｔｗｅｅｎ２０にて４回洗浄し、プレートをブロッキングバッファ(２％ＢＳＡ(Sigma)を含むＰＢＳ-Ｔｗｅｅｎ２０)中で３７℃、２時間インキュベートすることによってバックグラウンドを減らした。血清を血清希釈バッファ(２％ＢＳＡ、１％ＦＣＳを含むＰＢＳ-Ｔｗｅｅｎ２０)にて希釈した。２倍の希釈工程を経て、ＥＬＩＳＡプレート振とう器上で室温で２時間インキュベートした。プレートを５回洗浄して、1:１０００に希釈した検出抗体(抗マウスＩｇＧ ＨＲＰＯカップリング(Sigma))を室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ-Ｔｗｅｅｎ２０にて５回洗浄して、ＯＰＤ基質溶液(２５ｍｌ当たり８ｍｌの３０％H_2O_2(Fluka)と１０ｍｇのＯＰＤ(Fluka)を含有する０．０３５Ｍ クエン酸ｐＨ５．０、０．０６６Ｍ Na_2HPO_4)と、停止溶液としてH_2O中の５％H_2SO_4を用いて検出を行った。吸光度は、４５０ｎｍのＥＬＩＳＡ読み取り機を用いて測定し、相加平均と平均値の標準誤差(ＳＥＭ)の計算のためにＥＸＣＥＬソフトウェア(Microsoft)を用いた。
Ｑβ-ＦＥＬＤ１免疫マウスは、２１日目及び２８日目のそれぞれで１２０，０００及び７５，０００の最大半減の吸光度を示した。交差結合しないＱβ／ＦＥＬＤ１混合物にて免疫化したマウスと比較すると、２１日目及び２８日目のそれぞれで７０００及び６０００の低力価を有した。

【００９５】
実施例１３　アジュバントとしてのミョウバンによるマウスの免疫化
７～８週齢の雌Ｂａｌｂ／ｃマウスに、５０μｇの従来のＱβＶＬＰ-ＦＥＬＤ１-ＨＣにて３回(０日目、１４日目及び２８日目)ワクチン接種した。ワクチンはそれぞれ、２００μｌの滅菌ＰＢＳ又は１００μｌのＰＢＳと１００μｌのＡｌｕＧｅｌ-Ｓ(Serva)に希釈して、左右の鼠径部に皮下注射した。
１４日目、２１日目、２８日目、４２日目、５６日目、８４日目及び１１２日目に血清を採取した。天然のＦｅｌ ｄ１、ＦＥＬＤ-ＨＣ及びＱβ ＶＬＰに対して特異的な抗体をＥＬＩＳＡで測定した。
マイクロタイタープレートを、１ｍｇ／ｍｌの天然のＦｅｌ ｄ１(ｎＦｅｌ ｄ１、Ind

oors biotechnologies)、１０ｍｇ／ｍｌのＦＥＬＤ１-ＨＣ及び１０ｍｇ／ｍｌのＱβＶＬＰそれぞれにて終夜をかけてコートした。洗浄して(０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ)２％ＢＳＡを含有するＰＢＳにてブロックした後、２％ＢＳＡ／１％ＦＣＳ／ＰＢＳで様々に希釈した血清を加えた。

その後、標準的な方法によって、ＥＬＩＳＡを行った。Ｑβ ＶＬＰ-ＦＥＬＤ１-ＨＣワクチンは、天然のＦＥＬＤ１及びＦＥＬＤ１に対して持続性のあるＦｅｌｄ１高特異的抗体応答を誘導した。抗体価は、ミョウバンがない場合よりもミョウバンがある場合により高かった(表２)。

【００９６】

表２

	ミョウバンあり		ミョウバンなし	
日数	nFel d1	FELD1-HC	nFel d1	FELD1-HC
13日目	15984	53939	3394	7871
20日目	100311	203636	38980	77323
27日目	173190	368716	38177	56836
42日目	240173	419072	88953	170377
56日目	228500	492520	65370	163093
84日目	157009	219834	59603	115049
112日目	127745	203719	62290	116132

【００９７】

実施例１４　インビトロでアレルギー誘発能を大幅に減弱するＱβにカップリングしたＦＥＬＤ１

インビトロでのアレルギー性反応を誘発するＱβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣの能力を試験するために、３人のネコアレルギー性ドナーの血液から好塩基球を単離した。ネコアレルギー個体において、これらの好塩基球はＦｅｌｄ１特異的ＩｇＥにてコートされ、アレルギー刺激に対するＣＤ６３の上方制御に応答する。ゆえに、アレルギー性個体の好塩基球は段階的な量のＱβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣ又はＦＥＬＤ１-ＨＣ単独にて刺激して、ＣＤ６３の上方制御をフローサイトメトリによって評価した。ＦＥＬＤ１-ＨＣ(実施例５から得たもの)が試験される最も低希釈のＣＤ６３(およそ０．２ｎｇ／ｍｌ)の上方制御を強く誘発したのに対して、Ｑβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣ(実施例７から得たもの)は大幅にアレルギー誘発能を減弱して、好塩基球が応答するために１００～１０００倍の量(およそ７０ｎｇ／ｍｌ)のＦＥＬＤ１-ＨＣを必要とした。

同様に、融合タンパク質ＦＥＬＤ-１５ａａ-ＨＣ及びＦＤ１２-１５ａａ-ＨＣを単独又はＱβとカップリングさせたものの何れかについてもこの試験を繰り返した。結果を図２に示す。Ｑβにカップリングさせた場合、これらのＦｅｌ ｄ１融合タンパク質はすべてアレルギー誘発能を大幅に減弱した。

【００９８】

実施例１５　アレルギー性個体において皮膚プリック反応を誘発しないＱβにカップリングしたＦＥＬＤ１

アレルゲンによりアレルギー性個体の皮膚に印(プリック)が生じた場合、皮膚に存在するマスト細胞の活性化によりおよそ２０分以内に局所の浮腫が生じる。ここで、皮膚テストを行って、Ｑβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣ(実施例７から得たもの)のアレルギー誘発能を決定した。段階的な量のＱβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣ又は対応する量のＦＥＬＤ１-ＨＣ(実施例５から得たもの)をネコアレルギー性個体の皮膚に投与して、２０分後の皮膚反応を評価した。ＦＥＬＤ１-ＨＣが１００分の１以下の濃度で活性化したのに対して、Ｑβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣは皮膚反応を誘発することができなかった(表３)。

表３　対応する量のＦＥＬＤ１-ＨＣは両方の調製物に存在した。

希釈	FELD1-HC	Qβ-FELD1-HC
原液	+++	-
1:10	++	-
1:100	+	-
1:1000	-	-

【００９９】
実施例１６　皮膚プリック試験反応を減弱するＱβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣによるアレルギー性個体の免疫化
　臨床症状を寛解するＱβ-ＦＥＬＤ-ＨＣの能力を試験するために、ネコアレルギーを患っている患者を、０日目にＱβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣ(実施例７から得たもの)１７μｇ(２、５及び１０μｇの３回注射)、７日目に４０μｇ(１０、１０及び２０μｇの３回注射)及び１４日目に５０μｇ(１０及び４０μｇの２回注射)によってワクチン接種した。０、１４及び２１日目に標準化されたネコ抽出物によって皮膚プリック試験を行い、中心の腫脹反応の直径を定量化した(図３)。３週間以内に、皮膚プリック試験において、臨床症状を誘発するためには、プリックテストの症状を誘発するために十分な初期量より１０００倍高いアレルゲン濃度が必要であった。
【０１００】
実施例１７　鼻吸入誘発試験におけるアレルギー症状を減弱するＱβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣによるアレルギー性個体の免疫化
　臨床症状を寛解するＱβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣの能力を試験するために、ネコアレルギーを患っている患者を、０日目にＱβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣ(実施例７から得たもの)１７μｇ(２、５及び１０μｇの３回注射)、７日目に４０μｇ(１０、１０及び２０μｇの３回注射)及び１４日目に５０μｇ(１０及び４０μｇの２回注射)によって、ワクチン接種した。０、１４及び２１日目に標準化されたネコ抽出物によって鼻吸入誘発試験を行い、各漸増レベルでの臨床症状を評価し(図４Ａ)、全体のアレルギー性評価を行った(図４Ｂ)。３週間以内に、臨床症状を誘発するためには１００～１０００倍高いアレルゲン濃度が必要であり、全体のアレルギー評価は非常に減弱した。
【０１０１】
実施例１８　Ｑβ　ＶＬＰへの免疫賦活性核酸の封入
　Ｑβの分解して精製したコートタンパク質は、実施例１(Ａ)及び(Ｂ)に記載のように入手した。再集合化：β-メルカプトエタノールを終濃度１０％で１０ｍｌの二量体分画に加え、１２．３ｎｍｏｌのオリゴヌクレオチドを含有する３００μｌの$(CpG)_{20}$ＯｐＡオリゴデオキシヌクレオチドの溶液を加えた。再集合化混合物は、まず、１０％のβ-メルカプトエタノールを含有する３０ｍｌのＮＥＴバッファ(５ｍＭ　ＥＤＴＡ及び１５０ｍＭ　ＮａＣｌを含む２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ-ＨＣｌ、ｐＨ７．８)に対して４℃で２時間透析し、次いで、８ｍｌ／時のＮＥＴバッファの流量で連続様式で４℃で４日間透析した。次いで、再集合化混合物は、６回のバッファ交換(４×１００ｍｌ、２×１リットル)をしながら、透析によって水に対して脱塩した。
　内部に封入したＣｐＧを有するＱβ　ＶＬＰへのＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質のカップリングは、実施例７の記載と実質的に同様に行った。
【０１０２】
実施例１９　インビトロで好塩基球の脱顆粒化を誘導するＦｅｌ　ｄ１融合タンパク質のＦｅｌ　ｄ１特異的血清による阻害
　脱顆粒化を阻害する抗Ｆｅｌ　ｄ１特異的ＩｇＧの能力を試験するために、アレルギー性個体の好塩基球を、Ｑβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣ予防接種ウサギから単離した漸減量のＩｇＧ

の段階希釈物とともに予めインキュベートした一定量のＦＥＬＤ１-ＨＣ又はＦＥＬＤ１-１５ａａ-ＨＣによって、刺激した。ＣＤ６３の上方制御はフローサイトメトリによって評価した。抗Ｆｅｌ ｄ１ ＩｇＧはすべての試験した濃度でＦｅｌ ｄ１誘導性の脱顆粒をブロックしたのに対して、コントロールＩｇＧは全く作用を示さなかった(表４)。

表４

試料	FELD1-HC 脱顆粒化の割合	FELD1-15aa-HC 脱顆粒化の割合
IgG なし	33	33
Fel d1 特異的 IgG (200ng/ml)	1.9	1.6
Fel d1 特異的 IgG (100ng/ml)	5.2	2.1
Fel d1 特異的 IgG (50ng/ml)	8.2	2.3
Fel d1 特異的 IgG (25ng/ml)	10.6	4.2
非特異的 IgG	35	29
Fel d1 刺激なし	1.2	1.2

【０１０３】

実施例２０　Ｑβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣによるＦｅｌ ｄ１アレルギー性マウスの免疫化

マウスのアレルギー性気道炎症の実験的喘息モデルを用いて、ＢＡＬＢ／ｃマウスの血清及びＢＡＬ(気管支肺胞洗浄)中のＩｇＥ抗体応答に対する天然のアレルゲンＦｅｌ ｄ１に対するワクチン接種の影響を評価する。１グループにつき５匹のマウスを、０日目に１μｇの天然のＦｅｌ ｄ１を含むAlumGel-Sによって、経腹膜的に感作した。３５日目及び４９日目に５０μｇのＱβ単独又は、５０μｇのＱβ-ＦＥＬＤ１-ＨＣの何れかをマウスの皮下にワクチン接種して、６３日目及び７０日目に２回の鼻腔内抗原投与を行った。最後の鼻腔内抗原投与の５日後に、マウスを屠殺して、ＥＬＩＳＡによる体液性免疫(ＩｇＥサブクラス力価)の分析のために血清及びＢＡＬＦ(気管支肺胞洗浄液)を採取した。

ＥＬＩＳＡプレートは、炭酸バッファで希釈したラット抗ＩｇＥ ｍＡｂ(２ｕｇ／ｍｌ)にて４℃で終夜をかけてコートした。２時間のＰＢＳ／５％ＢＳＡによって、プレートをブロックした後に、プレートは、感作してワクチン接種して抗原投与したマウスの血清(第一ウェルでは１：１００に予め希釈、次いで８工程にわたって１：３に希釈)又はＢＡＬ(第一ウェルは純粋なＢＡＬ、次いで８工程にわたって１：３に希釈)の何れかによって、さらに２時間インキュベートした。２時間の試料のインキュベーションの後、血清及びＢＡＬ-ＩｇＥが、基質ＯＰＤによる検出に先立って、ラット抗マウスＩｇＥ-ＨＲＰ標識抗体により検出された。

【０１０４】

表５

ｸﾞﾙｰﾌﾟ	血清(d75)		BAL (d75)	
	OD50 の力価	% 減少	OD50 の力価	% 減少
Qβ ﾜｸﾁﾝ接種	1036	-	15	-
Qβ-Fel d1 ﾜｸﾁﾝ接種	49	95	0	100

【図面の簡単な説明】

【０１０５】

【図１】クーマシー染色した精製して再生させたＦｅｌ ｄ１融合タンパク質をＳＤＳ-ＰＡＧＥ非還元ゲル上に表す。レーン１の試料は還元剤としてＤＴＴを含む。レーン２の試料はＤＴＴを含まない。

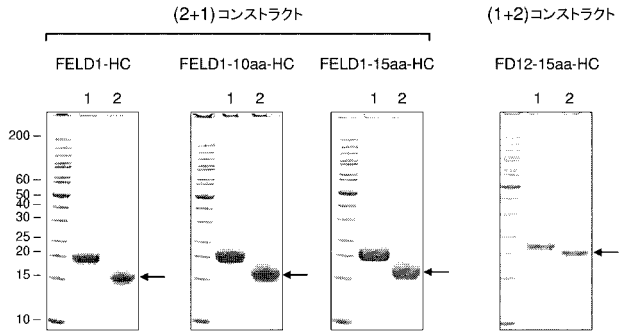
【図２】Ｆｅｌ ｄ１融合タンパク質単独又はＱβにカップリングしたＦｅｌ ｄ１融合タ

ンパク質の何れかによる好塩基球の脱顆粒化を示す。Ｘ軸は対応するＦｅｌ ｄ１タンパク質の濃度を表す。Ｙ軸は脱顆粒化している好塩基球の割合を表す。

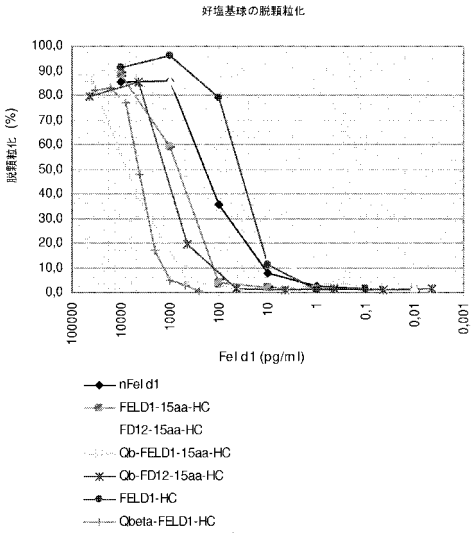
【図３】０日目、７日目及び１４日目にＱβ-ＦＥＬＤ１を投与したネコアレルギー被検者の皮膚プリック試験結果を示す。また、試験は０日目、１４日目及び２１日目に行った。

【図４】０日目、７日目及び１４日目にＱβ-ＦＥＬＤ１を投与したネコアレルギー被検者の鼻用量漸増スコア(図４Ａ)と鼻の全体的なスコア(図４Ｂ)。

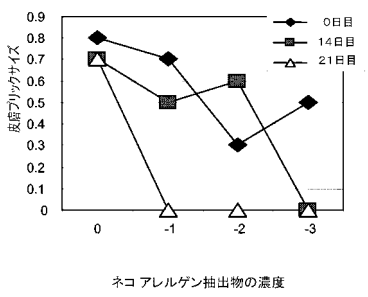
【図１】



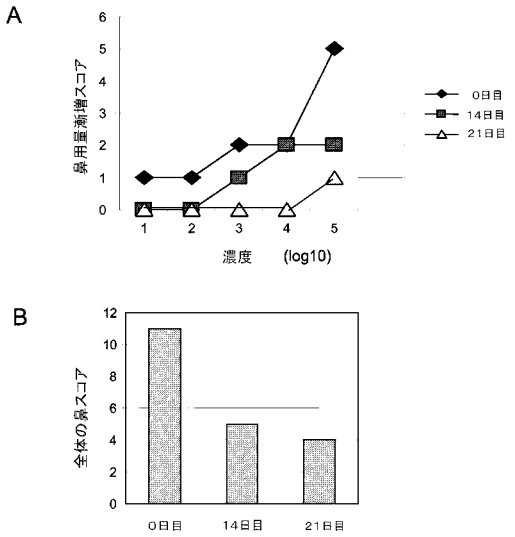
【図２】



【図３】



【図４】



【配列表】

2013155176000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年4月8日(2013.4.8)

【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】

(a) 少なくとも一の第一付着部位を有するコア粒子であって、ウイルス様粒子(ＶＬＰ)又はウイルス粒子であるコア粒子；と

(b) 少なくとも一の第二付着部位を有する少なくとも一の抗原；

とを含んでなる組成物であって、該少なくとも一の抗原がＦｅｌ　ｄ１タンパク質ないしはＦｅｌ　ｄ１断片であり、(a)と(b)が該少なくとも一の第一付着部位と該少なくとも一の第二付着部位を介して共有結合している、組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　37/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08	
Ｃ１２Ｎ　7/00	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/00	

(72)発明者　ディートマイアー，　クラウス
スイス国　シーエイチ－８０４８　チューリッヒ，　アルトステッテルシュトラッセ　２２０
(72)発明者　シュミッツ，　ニコル
スイス国　シーエイチ－８９０２　ウルドルフ，　バーンホフシュトラッセ　１０４
(72)発明者　ウトツィンガー，　シュテファン
スイス国　シーエイチ－８９５２　シュリーレン，　ウルドルフェルシュトラッセ　２５

Ｆターム(参考)　4B065 AA95X AC20 CA45 CA60
4C085 AA03 BB03 CC07 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04 GG08 GG10
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA16 MA17 MA23 MA52 MA56 MA57
MA59 MA63 MA66 NA06 ZB09 ZB13
4H045 AA11 BA10 BA50 CA40 DA86 EA22 EA31 FA10 FA74 HA05

【外国語明細書】
2013155176000001.pdf
2013155176000002.pdf
2013155176000003.pdf
2013155176000004.pdf