

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-538672

(P2017-538672A)

(43) 公表日 平成29年12月28日 (2017. 12. 28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 14/08 (2006.01)	C O 7 K 14/08 Z N A	4 B O 6 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C O 8 5
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 C O 8 7
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 H O 4 5
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-522532 (P2017-522532)	(71) 出願人	517140974
(86) (22) 出願日	平成27年10月20日 (2015. 10. 20)		サイバ ゲーエムベーパー
(85) 翻訳文提出日	平成29年6月2日 (2017. 6. 2)		スイス国 ツェーハー 8487 レーミ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/074269		スミューレ, アルテ テスタールシュト
(87) 国際公開番号	W02016/062720		ラーセ 20
(87) 国際公開日	平成28年4月28日 (2016. 4. 28)	(74) 代理人	110002077
(31) 優先権主張番号	14189897.3		園田・小林特許業務法人
(32) 優先日	平成26年10月22日 (2014. 10. 22)	(72) 発明者	バッハマン, マルティン
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		スイス国 ツェーハー 8487 レーミ
(31) 優先権主張番号	15184192.1		スミューレ, アルテ テスタールシュト
(32) 優先日	平成27年9月8日 (2015. 9. 8)		ラーセ 20
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ツェルティンス, アンドリス
			ラトビア国 エルヴィー 1067 リガ
			, クライスト ストリート 69-2
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CMV由来改変ウイルス様粒子

(57) 【要約】

本発明は、植物ウイルスのキュウリモザイクウイルス (CMV) 由来のウイルス様粒子、特に T h 細胞エピトープ、特にユニバーサル T h 細胞エピトープを含む CMV 由来改変 V L P に関する。さらに、これらの改変 V L P は、前記改変 V L P に結合した抗原に対する免疫反応、特に抗体応答を引き起こすためのワクチンプラットホームとして機能するのが好ましい。T h 細胞エピトープ、特にユニバーサル T h 細胞エピトープの存在は、引き起こされる免疫反応のさらなる増加に繋がる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

「キュウリモザイクウイルス（CMV）由来の改変ウイルス様粒子（VLP）」であって、前記 CMV 由来の改変 VLP は、少なくとも 1 種の改変 CMV ポリペプチドを含み、またはそれから本質的になり、あるいはそれからなり、前記改変 CMV ポリペプチドは、

（a）CMV ポリペプチド、および

（b）ヘルパー T 細胞エпитープを含み、または好ましくはそれらからなり、前記 CMV ポリペプチドは、

（i）CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列；または

（ii）変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列が、CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記 CMV のコートタンパク質とが、少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、さらに好ましくは少なくとも 98 % およびまたより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を示す変異アミノ酸配列を含む、もしくは好ましくはそれらからなる、CMV 由来の改変 VLP。

10

【請求項 2】

前記 CMV ポリペプチドが、CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれらからなる、請求項 1 に記載の CMV 由来の改変 VLP。

【請求項 3】

前記 CMV ポリペプチドが変異アミノ酸配列を含み、好ましくはそれらからなり、前記変異を受けるアミノ酸配列が CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記 CMV のコートタンパク質とが、少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、さらに好ましくは少なくとも 98 % およびまたより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を示す、請求項 1 に記載の CMV 由来の改変 VLP。

20

【請求項 4】

前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも 1 個のおよび最大で 11、10、9、8、7、6、5、4、3、または 2 個のアミノ酸残基が異なり、好ましくは、これらの差異は、（i）挿入、（ii）欠失、（iii）アミノ酸置換、および（iv）（i）～（iii）の任意の組み合わせから選択される、請求項 3 に記載の CMV 由来の改変 VLP。

【請求項 5】

前記 CMV ポリペプチドが、

（i）（a）CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列が配列番号 1 を含む、または好ましくはそれらからなるアミノ酸配列、または（b）少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列；または

30

（ii）変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列がこの請求項の（i）で定められた前記アミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列とが、少なくとも 95 %、好ましくは少なくとも 98 %、およびより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を示す変異アミノ酸配列を含む、もしくは好ましくはそれらからなる、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の CMV 由来の改変 VLP。

40

【請求項 6】

前記 CMV ポリペプチドが、（a）CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列が配列番号 1 を含む、または好ましくはそれらからなるアミノ酸配列、または（b）少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列、を含む、もしくは好ましくはそれらからなる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の CMV 由来の改変 VLP。

50

【請求項 7】

前記 C M V ポリペプチドが、

(i) (a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列が配列番号 2 1 を含むアミノ酸配列、または (b) アミノ酸配列領域を含む C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列領域が、少なくとも 7 5 %、好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、またさらに好ましくは少なくとも 9 0 %、またより好ましくは少なくとも 9 5 %、なおさらに好ましくは少なくとも 9 8 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列番号 2 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列；または

(i i) 変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列がこの請求項の (i) で定められた前記アミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列とが、少なくとも 9 5 %、好ましくは少なくとも 9 8 %、およびより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を示す変異アミノ酸配列を含む、もしくは好ましくはそれからなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

10

【請求項 8】

前記 C M V ポリペプチドが、(a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列が、配列番号 2 1 を含むアミノ酸配列、または (b) アミノ酸配列領域を含む C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列領域が、少なくとも 7 5 %、好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、またさらに好ましくは少なくとも 9 0 %、またより好ましくは少なくとも 9 5 %、なおさら

20

【請求項 9】

前記 C M V ポリペプチドが、

(i) (a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列が配列番号 1 を含む、または好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) 少なくとも 7 5 %、好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、またさらに好ましくは少なくとも 9 0 %、またより好ましくは少なくとも 9 5 %、なおさらに好ましくは少なくとも 9 8 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列番号

30

1 との配列同一性を有するアミノ酸配列であって、
この請求項の (a) または (b) で定められた前記アミノ酸配列が配列番号 2 1 を含み；またはこの請求項の (a) または (b) で定められた前記アミノ酸配列がアミノ酸配列領域を含み、前記アミノ酸配列領域が、少なくとも 7 5 %、好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、またさらに好ましくは少なくとも 9 0 %、またより好ましくは少なくとも 9 5 %、なおさらに好ましくは少なくとも 9 8 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列番号 2 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列；または

(i i) 変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列がこの請求項の (i) で定められた前記アミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列とが、少なくとも 9 8 %、好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を示す変異アミノ酸配列を含む、もしくは好ましくはそれからなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

40

【請求項 10】

前記 C M V ポリペプチドが、

(a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列が配列番号 1 を含む、または好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または

(b) 少なくとも 9 0 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列であって、
この請求項の (a) または (b) で定められた前記アミノ酸配列が配列番号 2 1 を含み、または

50

この請求項の (a) または (b) で定められた前記アミノ酸配列がアミノ酸配列アミノ酸配列領域を含み、前記アミノ酸配列領域が少なくとも 90 % の配列番号 21 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、もしくは好ましくはそれからなる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 11】

前記ヘルパー T 細胞エピトープが前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 12】

置換される前記 N 末端領域のアミノ酸の数が、前記ヘルパー T 細胞エピトープを構成するアミノ酸の数以下である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

10

【請求項 13】

前記 C M V ポリペプチドの前記置換された N 末端領域が、5 ~ 15 個の連続アミノ酸、好ましくは 9 ~ 14 個の連続アミノ酸、より好ましくは 11 ~ 13 個の連続アミノ酸からなる、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 14】

前記 C M V ポリペプチドの前記 N 末端領域が配列番号 1 のアミノ酸 2 ~ 12 に相当する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 15】

前記ヘルパー T 細胞エピトープがユニバーサルヘルパー T 細胞エピトープである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

20

【請求項 16】

前記ヘルパー T 細胞エピトープが最大で 20 アミノ酸からなる、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 17】

前記 T h 細胞エピトープが P A D R E 配列である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 18】

前記 T h 細胞エピトープが配列番号 5 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

30

【請求項 19】

前記ヘルパー T 細胞エピトープがヒトワクチン由来である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 20】

前記 T h 細胞エピトープが破傷風毒素由来である、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 21】

前記 T h 細胞エピトープが配列番号 4 のアミノ酸配列を有する、好ましくはそれからなる、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 22】

前記 C M V ポリペプチドが、C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列を含み、または好ましくはそれからなり、前記アミノ酸配列が、配列番号 1、または少なくとも 95 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列であり、また、前記アミノ酸配列が、配列番号 21 を含み、前記ヘルパー T 細胞エピトープが、前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換し、前記 C M V ポリペプチドの前記置換された N 末端領域が、11 ~ 13 個の連続アミノ酸、好ましくは 11 個の連続アミノ酸からなり、さらに好ましくは前記 C M V ポリペプチドの前記 N 末端領域が、配列番号 1 のアミノ酸 2 ~ 12 に相当する、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の C M V 由来の改変 V L P。

40

【請求項 23】

前記改変 C M V ポリペプチドが、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれか

50

らなる、請求項 1 に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 2 4】

前記改変 C M V ポリペプチドが、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる、請求項 1 に記載の C M V 由来の改変 V L P。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変ウイルス様粒子を含む組成物。

【請求項 2 6】

前記組成物が、

(a) 請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変ウイルス様粒子であって、少なくとも 1 つの第 1 結合部位を含む改変ウイルス様粒子と、

(b) 少なくとも 1 つの抗原であって、少なくとも 1 つの第 2 結合部位を含む抗原と、を含み、

(a) および (b) が、前記少なくとも 1 つの第 1 結合部位および前記少なくとも 1 つの第 2 結合部位を介して結合される、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記第 1 結合部位および前記第 2 結合部位が、少なくとも 1 つの共有結合性ペプチド結合を介して結合される、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記第 1 結合部位および前記第 2 結合部位が、少なくとも 1 つの共有結合性非ペプチド結合を介して結合される、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記第 1 結合部位が、アミノ基、好ましくはリジン残基のアミノ基である、請求項 2 6 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記第 2 結合部位が、スルフヒドリル基、好ましくはシステイン残基のスルフヒドリル基である、請求項 2 6 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記第 1 結合部位が、スルフヒドリル基ではない、請求項 2 6 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記第 2 結合部位の内の 1 個のみが少なくとも 1 つの非ペプチド共有結合を介して前記第 1 結合部位に会合し、前記抗原の前記改変ウイルス様粒子への単一で均一なタイプの結合もたらし、前記第 1 結合部位と会合する前記 1 個のみの第 2 結合部位が、スルフヒドリル基であり、前記抗原と前記改変ウイルス様粒子が、前記会合を介して相互作用し、秩序化および反復抗原配列を形成する、請求項 2 6 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記第 2 結合部位が、化学的カップリングにより結合されるスルフヒドリル基である、請求項 2 6 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 4】

リンカーをさらに含み、前記リンカーが、前記第 2 結合部位を有する前記抗原と会合し、好ましくは前記リンカーが、前記第 2 結合部位を含むか、あるいはそれからなる、請求項 2 6 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 5】

少なくとも 1 つの免疫賦活物質をさらに含み、好ましくは前記免疫賦活物質が、前記ウイルス様に結合される、それと混合されるまたはそれにパッケージ化される、および好ましくは前記免疫賦活物質が前記改変ウイルス様粒子にパッケージ化される、請求項 2 5 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記免疫賦活物質が、非真核生物起源の D N A または R N A からなる、請求項 3 5 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 37】

前記免疫賦活物質が、非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドであり、好ましくは、前記非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドが回文配列を含み、さらに好ましくは、前記非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドの C p G モチーフが回文配列の一部であり、およびまたさらに好ましくは、前記回文配列が G A C G A T C G T C (配列番号 31) である、請求項 35 または請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記回文配列が、少なくとも 3 個、最大で 15 個のグアノシン実体により、その 5' - 末端に隣接され、前記回文配列が、少なくとも 3 個、最大で 15 個のグアノシン実体により、その 3' - 末端に隣接される、請求項 37 に記載の組成物。

10

【請求項 39】

前記抗原が、腫瘍抗原、自己抗原、病原体のポリペプチド、アレルゲンまたはハプテンである、請求項 26 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 40】

前記抗原が IL - 17 であり、好ましくは、前記抗原が配列番号 42 を含む、または好ましくはそれからなる、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 41】

前記抗原が IL - 5 であり、好ましくは、前記抗原が配列番号 41 を含む、または好ましくはそれからなる、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 42】

前記抗原が TNF α である、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 43】

前記抗原が IL - 1 α である、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 44】

前記抗原が IL - 13 であり、好ましくは、前記抗原が配列番号 46 を含む、または好ましくはそれからなる、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 45】

前記抗原が A β - 1 - 42 由来ペプチドである、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 46】

前記抗原が Ig E または Ig E に含まれるペプチドもしくはドメインである、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 47】

前記抗原が、 α - シヌクレインまたは α - シヌクレイン由来ペプチドであり、好ましくは前記ペプチドが、6 ~ 14 アミノ酸からなり、さらに好ましくは前記抗原が、配列番号 32、配列番号 33 および配列番号 34 のいずれか 1 つから選択される、 α - シヌクレイン由来ペプチドである、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 48】

前記抗原が IL - 4 であり、好ましくは、前記抗原が配列番号 45 を含む、または好ましくはそれからなる、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 49】

前記抗原が GnRH である、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 50】

前記抗原がエオタキシンである、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 51】

前記抗原が、インフルエンザ A ウイルス M2 タンパク質の細胞外ドメイン、またはその抗原性フラグメントである、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 52】

前記抗原が IL - 31 であり、好ましくは、前記抗原が配列番号 43 もしくは配列番号 44 を含む、または好ましくはそれからなる、請求項 26 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の

50

組成物。

【請求項 5 3】

前記抗原が、熱帯熱マラリア原虫もしくは三日熱マラリア原虫、または前記抗原が R S V 由来である、請求項 2 6 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5 4】

前記抗原が、ネコアレルゲン F e l d 1 または組換え型 F e l d 1 (r F e l d 1) であり、好ましくは前記抗原が組換え型 F e l d 1 (r F e l d 1) である、請求項 2 6 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5 5】

前記抗原が、配列番号 1 7 または配列番号 1 8 を含み、もしくは好ましくはそれからなり、好ましくは、前記抗原が、配列番号 1 8 を含む、もしくは好ましくはそれからなる、請求項 2 6 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 5 6】

前記抗原が、イヌアレルゲン C a n f 1 または C a n f 2 である、請求項 2 6 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5 7】

前記抗原が、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (C G R P) である、請求項 2 6 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5 8】

前記抗原が A m y l i n である、請求項 2 6 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 5 9】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変ウイルス様粒子または請求項 2 5 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む、あるいはそれからなるワクチン。

【請求項 6 0】

(a) 請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変ウイルス様粒子、請求項 2 5 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の組成物、または請求項 5 9 に記載のワクチンと、

(b) 薬学的に許容可能なキャリア、希釈剤および / または賦形剤と、を含む医薬組成物。

【請求項 6 1】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変ウイルス様粒子、請求項 2 5 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の組成物、請求項 5 9 に記載のワクチン、または請求項 6 0 に記載の医薬組成物を、動物、もしくはヒトに投与することを含む免疫化方法。

30

【請求項 6 2】

前記改変ウイルス様粒子、ウイルス様粒子、前記組成物、前記ワクチン、または前記医薬組成物が、皮下に、静脈内に、皮内に、鼻腔内に、経口で、結節内に、または経皮で、前記動物もしくは前記ヒトに投与される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

薬物として使用するための、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変ウイルス様粒子、請求項 2 5 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の組成物、請求項 5 9 に記載のワクチン、または請求項 6 0 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 6 4】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変ウイルス様粒子、請求項 2 5 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の組成物、請求項 5 9 に記載のワクチン、または請求項 6 0 に記載の医薬組成物の、動物またはヒトの疾患、障害もしくは状態の処置のための薬物の製造における使用。

【請求項 6 5】

動物またはヒトの疾患、障害もしくは状態の処置方法に使用するための、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変ウイルス様粒子、請求項 2 5 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の組成物、請求項 5 9 に記載のワクチン、または請求項 6 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 6】

50

動物またはヒトの炎症性疾患の処置方法に使用するための、請求項 40 ~ 44 および 48 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 67】

前記炎症性疾患が、RA、MS、乾癬、喘息、クローン病、大腸炎、COPD、糖尿病、神経皮膚炎（アレルギー性皮膚炎）から選択される、請求項 66 に記載の組成物。

【請求項 68】

動物またはヒトのアルツハイマー病の処置方法に使用するための、請求項 45 に記載の組成物。

【請求項 69】

動物またはヒトのアレルギーの処置方法に使用するための、請求項 46 に記載の組成物 10

【請求項 70】

動物またはヒトのパーキンソン病の処置方法に使用するための、請求項 47 に記載の組成物。

【請求項 71】

動物またはヒトのテストステロンレベルを下げるための、請求項 49 に記載の組成物。

【請求項 72】

動物またはヒトのインフルエンザ A ウイルス感染症の処置または予防方法に使用するための、請求項 51 または請求項 52 に記載の組成物。

【請求項 73】

マラリアの予防または処置方法に使用するための、請求項 53 に記載の組成物。 20

【請求項 74】

RSV 感染症の予防または処置方法に使用するための、請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 75】

ヒトのネコアレルギーの予防または処置方法に使用するための、請求項 55 に記載の組成物。

【請求項 76】

ヒトのイヌアレルギーの予防または処置方法に使用するための、請求項 56 に記載の組成物。

【請求項 77】

動物またはヒトの片頭痛の処置方法に使用するための、請求項 57 に記載の組成物。 30

【請求項 78】

動物またはヒトの 2 型糖尿病の処置方法に使用するための、請求項 58 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物ウイルスのキュウリモザイクウイルス（CMV）由来のウイルス様粒子、特に Th 細胞エпитープ、特にユニバーサル Th 細胞エピトープを含む CMV 由来改変 VLP に関する。さらに、これらの改変 VLP は、前記改変 VLP に結合した抗原に対する免疫反応、特に抗体応答を引き起こすためのワクチンプラットフォームとして機能するのが好ましい。Th 細胞エピトープ、特にユニバーサル Th 細胞エピトープの存在は、引き起こされる免疫反応のさらなる増加に繋がる。 40

【背景技術】

【0002】

関連技術

過去 30 年間にわたり、ウイルス様粒子（VLP）は発展し、特にワクチン開発の分野で受け入れられる技術になってきた（Zeltins A, Mol Biotechnol (2013) 53:92-107）。ますます大きくなるこれらの VLP への関心は、特に、それぞれ B 型肝炎およびヒトパピローマウイルス（HPV）誘発子宮頸癌に対する 50

B型肝炎ウイルス(HBV)表面抗原およびHPVカプシドタンパク質L1の市販ワクチンとしての開発と導入の成功により、高められた。さらに、ウイルス様粒子は、複合抗原に対して強力な免疫反応を誘発できる免疫キャリアとして特徴付けられてきた(Jennings GT and Bachmann MF, Annu Rev Pharmacol Toxicol (2009) 49:303-26、Jennings GT and Bachmann MF, Biol Chem (2008) 389:521-536、国際公開第2002/056905号、同第2003/024481号)。後者は、近い将来に、医学的および獣医学的目的のためのVLP系ワクチンを開発することを目的とした別の臨床的検討段階に入っている、いくつかのVLP系ワクチン候補をもたらした(Liu F, et al., Research in Veterinary Science (2012) 93:553-559; Roldao A., et al., Expert Review of Vaccines (2010) 9:1149-1176)。

10

【0003】

これまで、微生物、植物、昆虫または哺乳動物ウイルス由来のVLPが発展してきた。最近、主に、特有の翻訳後修飾をもたらす能力、対費用効果、産生速度および規模拡大性の観点から、植物がVLPワクチンを産生するための経済的かつ迅速な代替プラットフォームとなることを主な理由として、上記で参照したVLP系に加えて植物ウイルス由来のVLPが注目を集めている(Chen Q and Lai H, Human Vaccines & Immunotherapeutics (2013) 9:26-49; Zeltins A, Mol Biotechnol (2013) 53:92-107)。

20

【0004】

キュウリモザイクウイルス(CMV、プロモウイルス科、ククモウイルス属)は、極めて広範囲の宿主を有する線形プラスセンス等軸植物ウイルスである。ウイルスゲノムは、3つの一本鎖RNA(RNA1、RNAおよびRNA3)からなり、コートタンパク質(CP)遺伝子は、ゲノムRNA3(約2200nt)およびサブゲノムRNA4(約nt)の両方中に存在する。カプシドは、約26kDaの単一タンパク質種の180コピーを含む。宿主植物に関連する種々の症状に関連付けられるCMV由来の系統、例えば、CMV-B系統、CMV-C系統、CMV-D系統、CMV-L系統、CMV-S系統、CMV-T系統、CMV-WL-系統、CMV-V系統、CMV-Fny系統、CMV-Ix系統、CMV-Q系統、CMV-R系統などの複数の異なる既知の系統が存在する(Carrere I, et al., Arch Virol (1999) 144:1846-1857; Edwards MC, et al., Phytopathology 81 983, 73:1117-1120; www.dpvweb.net)。

30

【0005】

近年、キメラ型のCMVが提示系として機能するように、およびC型肝炎ウイルス(HCV)由来のエピトープを外表面上に発現するように設計された。詳細に説明すると、CMV疑似組換え型CMV-D/SがCMV-S系統由来のゲノムRNA3ならびにCMV-D系統由来のRNA1およびRNA2を保持するように設計された。この系は、Xanthiタバコ植物での接種後に軽度のモザイクおよび葉脈透化などのウイルス症状を発症した。その後、CP遺伝子は、C型肝炎ウイルス(HCV)エピトープをコードするように異なる位置に設計された。選択したペプチドはいわゆるR9ミモトープ、すなわち、HCVエンベロープタンパク質E2の多くの高頻度可変領域1(HVR1)配列由来の合成ペプチドであった。慢性C型肝炎の患者由来の血清試料は、選択した遺伝子操作疑似組換え体キメラ型CMVの1つに感染した粗製植物抽出物に対し大きな免疫反応性を示した。したがって、このような系が、有望な経口免疫戦略の開発を可能とする好適なキャリアとなり得るということが示唆された。セロリ、レタス、キュウリ、トマト、ニンジン、胡椒およびバナナはCMVの宿主であるので、それらが能動的に植物中で複製し、したがって、食用ワクチンとして使用されることが想定できることから、後者は、いわゆる栄養補助食品の実現可能なバイオリアクタとしての植物の概念と一致するであろう。(Nat ill

40

50

a A, et al., Arch Virol (2004) 149:137-154; Piazzolla G, et al., J Clin Immunol (2005) 25:142-152; Nuzzaci M, et al., Arch Virol (2007) 152:915-928; Nuzzaci M, et al., Journal of Virological Methods (2009) 155:118-121; Nuzzaci M, et al., Journal of Virological Methods (2010) 165:211-215; Piazzolla G, et al., J Clin Immunol (2012) 32:866-876)。

【0006】

R9ミモトープの挿入は、CMV-S RNA3のCP遺伝子内の種々の位置で実施されている (AF063610, www.dpvweb.net)。1つの単一R9ミモトープの前記CP遺伝子内への挿入のために、R9ミモトープヌクレオチド配列を前記CP遺伝子の253、475、529位に挿入し、一方、2つのR9ミモトープの挿入のために、R9ミモトープヌクレオチド配列を392および529位に挿入した。最終生成物は、それぞれのウイルス粒子に対し、外表面に180または360個のR9ミモトープのコピーを保持するCMVキメラ粒子であった。(Natilla A, et al., Arch Virol (2004) 149:137-154; Piazzolla G, et al., J Clin Immunol (2005) 25:142-152; Nuzzaci M, et al., Arch Virol (2007) 152:915-928; Nuzzaci M, et al., Journal of Virological Methods (2009) 155:118-121; Nuzzaci M, et al., Journal of Virological Methods (2010) 165:211-215; Piazzolla G, et al., J Clin Immunol (2012) 32:866-876)。

【0007】

R9ミモトープのCMV-S RNA3への挿入位置の選択は、次のいくつかの不可欠な因子:i)カプシド中での追加の安定化の役割を有する通常とは異なるN末端らせん体の特徴とするCMVコートタンパク質(CMVを安定化するタンパク質-RNA相互作用に關与する、内部R-ドメインとして知られる高濃度の塩基性アミノ酸を含む(Wikoff WR, et al., Virology (1997) 232:91-97))のN末端領域を保護する必要性(Smith TJ, et al., J Virol (2000) 74:7578-7686);ii)推定される免疫原性を発揮する機会を高めるための、外来性エピトープの表面位置;iii)改変クローンを産生することができる変異誘発経路の利用可能性、を考慮することに基づいているといわれてきた。これらの考慮すべき点を基準にして、上で示したaa領域70~192および対応するヌクレオチド領域での作業に的を絞った。そのようにして調製したキメラCMVは、宿主植物中全体に広がる能力を保持していたが、これは、植物中の外来性遺伝子発現のための、実現可能な植物ウイルスキャリアの構築における不可欠の目標である。ELISAおよびIEM試験は、計画したように正しい位置でR9ミモトープが暴露されたことを実証した(Natilla A, et al., Arch Virol (2004) 149:137-154)。

【0008】

さらに、ブタサーコウイルス特異的ワクチンの産生のためのキュウリモザイクウイルス系の発現系が最近報告された(Gellert A, et al., PLoS ONE (2012) 7(12):e52688)。詳細には、ブタサーコウイルス2型(PCV2)カプシドタンパク質エピトープが、アミノ酸位置131の後ろのキュウリモザイクウイルス(CMV)-R系統の植物ウイルスコートタンパク質中に組み込まれた。異なるニコチアナ種で、組換え体の感染性および安定性を試験し、安定な組換えウイルス粒子を精製した。粒子のPCV誘発ブタ抗体に結合する能力を試験し、マウスおよびブタにおいて特異的抗体の誘発のために使用した。結果は、CMV表面上に発現したPCVエピトープが

ブタ抗体により認識され、それらは、PCV特異的抗体応答を誘発することができた。免疫されたブタで行ったPCV2による刺激実験は、感染に対する部分的保護を示した。

【0009】

現在まで報告されたCMVの3つの安定なエピトープ挿入位置で、PCV2カプシドタンパク質エピトープをキュウリモザイクウイルス(CMV)のコートタンパク質中に組み込んだ(Nuzzaci M, et al., Arch Virol (2007) 152: 915 - 928; Vittti A, et al., J Virol Methods (2010) 169: 332 - 340)。これらの位置での組み込みエピトープは、植物中でのCMVの増殖および長距離移動を邪魔しなかった。それらの内の2つは、ビリオンの外面上に提示され、一方、3つ目は、ビリオンの内側に向けて突出している。CMVカプシドの内表面のRNA結合と干渉しない正電荷を有するエピトープの発現のみをうまく試みることができるので、エピトープをビリオンの内側に向けて発現するには、静電的制約がある。詳細には、第1の挿入位置は、aa83~84位で、CMV CPのβBβCループの末端にある。組み込みエピトープは、CMVビリオンの表面上に発現される。第2の挿入位置は、aa131~132位で、CMV CPのβE-αEFLープの中央にある。組み込みエピトープは同様に、CMVビリオンの表面上に発現される。第3の挿入位置は、aa176~177位で、βG-βHループの中央にある。この後者の場合には、挿入エピトープは、CMVビリオンの内表面上に発現される。

【0010】

さらに、CMVに基づくキメラウイルス様粒子(VLP)の生成が報告されており、動物ワクチンとしてのその使用が示唆されている(Natilla A, et al., Arch Virol (2006) 151: 1373 - 1386; Natilla A, et al., Protein Expression and Purification (2008) 59: 117 - 121)。しかし、広く使用されている従来の大腸菌発現系によるCMVのウイルスカプシドタンパク質(CP)の発現は、不溶性の封入体または極めて低量の可溶性タンパク質をもたらしたに過ぎなかった(Xu Y, et al., Chem Commun (2008) 49 - 51)。他方では、CMV-FnyのジャガイモウイルスX(PVX)発現コートタンパク質(CP)はVLPを形成し、これは、経済的に重要な家禽の病原体である、ニューカッスル病ウイルス(NDV)の異なる中和エピトープの表面提示用のキャリアとして機能する。この目的のために、融合体(F)由来のエピトープ、赤血球凝集素-ノイラミニダーゼ(NH)タンパク質およびタンデム型F-NHペプチドを、Fny-CMV CP(そのアミノ酸194~199に対応する)の内部βH-βI(モチーフ5)中に遺伝的に融合し、ニコチアナベンサミアナ(Nicotiana benthamiana)植物中のPVXベクターを介して発現させた。得られたキメラCMV VLPは、野生型CMV粒子とは形態学的に識別不能である。さらに、精製NH-CMV VLPで免疫したニワトリは、抗原特異的抗体応答を発生させたが、しかし、このように免疫したニワトリは、NDVによる実験的刺激に対し保護を示さなかった(Natilla A, et al., Arch Virol (2006) 151: 1373 - 1386; Natilla A, et al., Protein Expression and Purification (2008) 59: 117 - 121; Chen Q and Lai H, Human Vaccines & Immunotherapeutics (2013) 9: 26 - 49)。

【0011】

上述のように、大腸菌中のCMVのウイルスカプシドタンパク質(CP)の発現は、不溶性の封入体または極めて低量の可溶性タンパク質をもたらしたに過ぎなかった(Xu Y, et al., Chem Commun (2008) 49 - 51)。他方では、Xuらは、種々の長さの二本鎖DNAが誘引となって、遺伝的に組換えたCMVのCPをインビトロで生物学的ナノチューブに組み上げることができた(Xu Y, et al., Chem Commun (2008) 49 - 51)。しかし、この目的のために、Xuらは、純粋な可溶性CMV CPを産生する必要があった。これは、大腸菌中でCPの発現後

、組換え操作を行うことにより実現された。この手順は、218個のアミノ酸残基の完全長CP(ID AB008777、www.dpvweb.net)の発現後の封入体の分離および精製、続けて、変性を介した封入体の可溶化、および最後に、変性タンパク質に対するリフォールディング手順の適用を含む。

【0012】

たとえばVLP系ワクチンの開発の過程で進展がなされたとしても、さらに異なったVLP系に対する要求がまだ存在する。特に、ワクチンは、免疫された対象および個体の種々の抗体応答を誘発し、抗体応答は、100倍の変化を超える範囲に及ぶことが多い。さらに、B型肝炎に対するワクチンなどのいくつかのワクチンは、一定数の非応答者が発生する。非応答性は、特定のMHCクラスII分子と関連することが知られており、良好なヘルパーT(Th)細胞応答を誘発できないことが、これらの個体で認められる不十分な抗体応答の原因であると考えられている(Goncalves L, et al., Virology(2004)326:20-28)。さらに、年配者および高齢者は、一般的に不十分な抗体応答を開始し、不十分なTh細胞応答は、この場合も、非効率的な抗体応答の原因であると考えられる。したがって、実質的に全ての対象および個体において良好なTh細胞応答を誘発するワクチンは、ワクチン開発の分野での重要な目標である。

【発明の概要】

【0013】

我々は、意外にも、キュウリモザイクウイルス(CMV)のコートタンパク質を、ヘルパーT(Th)細胞エピトープを組み込むように、好ましくはユニバーサルTh細胞エピトープを組み込むように、改変できることを見出した。これらの強力なTh細胞エピトープは、凝集を起こすことが知られており、したがって、VLPを生じる発現時に自己集合を妨害するであろうと予測されるので、後者は特に意外である。さらに、本発明は、Th細胞エピトープ、好ましくはユニバーサルTh細胞エピトープを含む改変CMV VLPを提供するのみでなく、さらに、本発明の改変CMV VLPならびに野性型CMV VLPは、大腸菌中での発現により得られ、大腸菌中でCMV VLPを産生する以前の試みでは、VLPではなく凝集体を生じたので、これもまた以外である。さらに、本発明のVLPは、キャリアプラットフォーム、特にワクチンプラットフォームとして機能し、それに対して免疫反応が引き起こされることが望まれる抗原が本発明のVLPに結合される。本発明のCMVの改変VLP中に組み込まれた導入Th細胞エピトープは、VLPの免疫原性をさらに高め、本発明の組成物により引き起こされる全体的免疫反応の増加、特に、抗体応答の増加をもたらす。

【0014】

したがって、第1の態様では、本発明は、キュウリモザイクウイルス(CMV)由来の改変ウイルス様粒子(VLP)を提供し、前記CMVの改変VLPは、少なくとも1種の改変CMVポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、前記改変CMVポリペプチドは、(a)CMVポリペプチド、および(b)ヘルパーT細胞エピトープを含み、好ましくはそれらからなり；かつ、前記CMVポリペプチドは、(i)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列、または(ii)変異アミノ酸配列を含み、好ましくはそれからなり、変異を受けるアミノ酸配列は、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列および前記CMVのコートタンパク質は、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%およびまたより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示す。

【0015】

別の態様では、本発明は、キュウリモザイクウイルス(CMV)由来の改変ウイルス様粒子(VLP)を提供し、前記CMVの改変VLPは、少なくとも1種の改変CMVポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、前記改変CMVポリペプチドは、(a)CMVポリペプチド、および(b)ヘルパーT細胞エピトープを含み、好ましくはそれらからなり；かつ、前記CMVポリペプチドは、(i)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列、または(ii)変異アミノ酸配列を含み、好ましくはそれから

なり、変異を受けるアミノ酸配列は、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列および前記CMVのコートタンパク質は、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%およびまたより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示し；前記ヘルパーT細胞エピトープは、(i)前記CMVポリペプチドのN末端に融合されるか；(ii)前記CMVポリペプチドのC末端に融合されるか；(iii)前記CMVポリペプチドの連続アミノ酸の領域を置換し、前記CMVポリペプチドの前記連続したアミノ酸の置換された領域と、ヘルパーT細胞エピトープとの間の配列同一性が少なくとも15%、好ましくは少なくとも20%であるか；または(iv)前記CMVポリペプチドのN末端領域を置換し、前記CMVポリペプチドの前記置換されたN末端領域は、5～15連続アミノ酸からなる。

10

【0016】

別の態様では、本発明は、キュウリモザイクウイルス(CMV)由来のウイルス様粒子(VLP)を提供し、前記CMV由来のVLPは、(i)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列、または(ii)変異アミノ酸配列を含むまたは好ましくはそれからなる、少なくとも1種のCMVポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、変異を受けるアミノ酸配列は、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列および前記CMVのコートタンパク質は、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%およびまたより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示し、前記CMV由来のVLPは前記CMVポリペプチドの大腸菌中での発現により得られ、好ましくは前記発現は、10～25の温度、好ましくは20の温度で行われる。

20

【0017】

別の態様では、本発明は改変ウイルス様粒子を含む組成物を提供する。さらに、これらの改変VLPは、前記改変VLPに結合した抗原に対する特定の抗体応答における免疫反応を引き起こすためのワクチンプラットホームとして機能するのが好ましい。Th細胞エピトープ、特にユニバーサルTh細胞エピトープの存在は、引き起こされる免疫反応のさらなる増加に繋がる。

【0018】

さらなる態様およびその好ましい実施形態は、本明細書でさらに詳細に記載される。

【0019】

図4は、精製CMV由来VLPの質量分析のチャートである。Autoflex MS (Bruker Daltonik, Germany)を使ってマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)-TOF MS分析を行った。質量の決定には、タンパク質分子量(MM)校正標準II(22.3-66.5 kDa; Bruker Daltonik)を使用した。

30

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】pET-CMVwtプラスミドマップ図である。全ての関連遺伝子および制限酵素部位の相対位置が示されている。

【図2】CMVwtタンパク質の発現およびショ糖勾配精製のSDS/PAGE分析の図である。M-タンパク質サイズマーカー；S-超音波処理後の可溶性タンパク質；P-超音波処理後の不溶性のタンパク質；Ps-硫酸アンモニウムペレット中の可溶性タンパク質(ショ糖勾配超遠心分離用の試料)；Pp-硫酸アンモニウムペレット中の不溶性のタンパク質；1、2、3、4、5、6-35ml勾配管の底部からのショ糖勾配画分。

40

【図3A】精製CMVwt VLPの動的光散乱の図である。粒子のサイズは、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom)を使って検出した。

【図3B】精製CMVwt VLPの電子顕微鏡分析の写真である。VLPの形態学的分析に関しては、JEM-1230電子顕微鏡(Jeol Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。

50

【図4A】CMV野生型(「wt」;理論MM=24069;検出MM=24058)

【図4B】CMV-Npadr;理論MM=24161(第1メチオニン不含);検出MM=24160

【図4C】CMV-Ntt830;理論MM=24483(第1メチオニン不含);検出MM=24477

【図5A】精製CMV-Ntt830 VLPの動的光散乱の図である。粒子のサイズは、Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd., United Kingdom)を使って検出した。

【図5B】精製CMV-Ntt830 VLPの電子顕微鏡分析の写真である。VLPの形態学的分析に関しては、JEM-1230電子顕微鏡(Jeol Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。

【図6A】精製CMV-Npadr VLPの動的光散乱の図である。粒子のサイズは、Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd., United Kingdom)を使って検出した。

【図6B】精製CMV-Npadr VLPの電子顕微鏡分析の写真である。VLPの形態学的分析に関しては、JEM-1230電子顕微鏡(Jeol Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。

【図7A】CMV野生型VLPの免疫後の抗体応答を測定した。マウス群に対し、10 μ g、1 μ gまたは0.1 μ gのCMV-wt VLPで、0日目および7日目に免疫した。0日目(免疫前)、7日目、14および28日目に特異的全IgG力価を測定した。群当たりのマウス=4匹。

【図7B】CMV-Npadr VLPの免疫後の抗体応答を測定した。マウス群を、10 μ g、1 μ gまたは0.1 μ gのCMV-Npadr VLPで、0日目および7日目に免疫した。0日目(免疫前)、7日目、14および28日目に特異的全IgG力価を測定した。群当たりのマウス=4匹。

【図7C】CMV-Ntt830 VLPの免疫後の抗体応答を測定した。マウス群を、10 μ g、1 μ gまたは0.1 μ gのCMV-Ntt830 VLPで、0日目および7日目に免疫した。0日目(免疫前)、7日目、14および28日目に特異的全IgG力価を測定した。群当たりのマウス=4匹。

【図8A】マウスのアレルゲンFel D1に対する体液性応答を検出した。主要ネコアレルゲンFel D1をCMV-Npadrに結合させた。マウスを、5 μ gのFel D1-VLPで0日目および7日目に免疫した。示した時点でのFel D1特異的抗体を測定した。群当たりのマウス=5匹。

【図8B】マウスのアレルゲンFel D1に対する体液性応答を検出した。主要ネコアレルゲンFel D1をCMV-Ntt830に結合させた。マウスを、5 μ gのFel D1-VLPで0日目および7日目に免疫した。示した時点でのFel D1特異的抗体を測定した。群当たりのマウス=5匹。

【図9】ペプチド由来 α -シヌクレインに対する体液性応答の検出結果を示す。0日目および14日目に20 μ gの、CMV-Ntt830に結合したペプチド由来の α -シヌクレインでマウスを免疫した。示した時点でのペプチド特異的抗体力価を測定した。マウス数=4匹。

【図10】マウスの自己タンパク質IL17に対する抗体応答を検出した。サイトカインIL17をCMV-Ntt830に結合させた。0日目および14日目に20 μ gのIL17-CMV-Ntt830でマウスを免疫した。示した時点でのIL17特異的抗体を測定した。マウス数=3匹。

【図11A】大腸菌C2566細胞由来のF12H6GGCタンパク質の発現および精製のSDS/PAGE分析を示す図である。M-タンパク質サイズマーカー;S-可溶性タンパク質画分;P-壊死組織画分;F-Ni-IDAカラムからの通過画分(非結合タンパク質);W1、W2-洗浄画分(2 $\times$ 2ml 1 $\times$ LEW緩衝液)W3、W4洗浄画分(2 $\times$ 2ml 1 $\times$ LEW+10mMイミダゾール);E1、E2-溶出画分(2 $\times$ 1.5

10

20

30

40

50

m l E 緩衝液 250 mM イミダゾール)。

【図 11B】精製 F12H6GGC の質量分析のチャートである。F12H6GGC の計算平均質量は、20089.8 Da に相当する。20105.3 の観察質量は、メチオニンの 1 個の硫黄がスルフォキシド基に酸化された場合の F12H6GGC に相当する。

【図 11C】F12GGC のクーマシーブルー染色した SDS-PAGE 分析の図である。(A) AmS-50% (NH₄)₂SO₄ 後の溶解沈殿物。DEAE カラム処理およびその後のモノ Q による精製由来の種々の画分：FT-通過画分、A4~A7-増加 NaCl 勾配による溶出画分、(B) プチル HP カラム (HIC) による最終精製。

【図 12】Indoor Biotechnologies から提供された、天然の Fel d1 に対して産生された mAb を使ったサンドイッチ ELISA の結果を示す。mAb は F12H6GGC および天然の Fel d1 を等しく良好に認識する。

【図 13A】天然の Fel d1 に対する好塩基球活性化テスト (BAT) の結果を示すグラフである。

【図 13B】F12H6GGC に対する好塩基球活性化テスト (BAT) の結果を示すグラフである。F12H6GGC および天然の Fel d1 は、CCR3⁺ 好塩基球上の CD63 の発現上昇により示されるネコアレルギー患者由来の血液中の類似の好塩基球活性化レベルを誘発する。

【図 14】Fel d1 融合タンパク質 F12H6GGC と単純に混合された 10 μg の Fel d1-CMV VLP (Fel d1-CMV-Ntt830-VLP または Fel d1-CMV-Npadr-VLP) または CMV-VLP (CMV-Ntt830-VLP または CMV-Npadr-VLP) の投与を 0 日目および 14 日目に受けたマウスの抗体応答を示すグラフである。0、14 および 21 日目に血清を集め、天然の Fel d1 特異的 IgG 抗体を ELISA で分析した。N = 3。

【発明を実施するための形態】

【0021】

特に断らなければ、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者により一般に理解されているものと同じ意味を有する。

【0022】

ウイルス様粒子 (VLP)：本明細書で使用される場合、「ウイルス様粒子 (VLP)」という用語は、非複製性もしくは非感染性の、好ましくは非複製性および感染性ウイルス粒子を意味し、または非複製的または非感染性の、好ましくは非複製性および非感染性の、ウイルス粒子、好ましくはウイルスのカプシドに類似している構造体を意味する。本明細書で使用される場合、「非複製性」という用語は、VLP により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。本明細書で使用される場合、「非感染性」という用語は、宿主細胞に入ることができないことを意味する。本発明では、ウイルス様粒子は、それがウイルスゲノムまたはゲノム機能の全部または一部を欠いているために、非複製性および非感染性である。本発明では、ウイルス様粒子は、それらのゲノムとは別の核酸を含んでよい。組換えで産生されたウイルス様粒子は通常、宿主細胞由来 RNA を含む。本発明におけるウイルス様粒子の典型的かつ好ましい実施形態は、本発明のポリペプチドから構成されるウイルスカプシドである。ウイルス様粒子は通常、典型的には、ウイルス様粒子当たり、60、120、180、240、300、360、または 360 個を超えるタンパク質サブユニットを含むコートタンパク質から構成される巨大分子集合体である。通常、好ましくは、これらのサブユニットの相互作用により、固有の反復組織を有するウイルスカプシドまたはウイルスカプシド様構造体がもたらされる。ウイルス様粒子の 1 つの特徴は、高度秩序化および反復配置のそのサブユニットである。

【0023】

CMV 由来のウイルス様粒子：「CMV 由来のウイルス様粒子」または CMV VLP という用語は、少なくとも 1 種の CMV ポリペプチドを含む、または好ましくはそれから本質的になる、または好ましくはそれからなるウイルス様粒子を意味する。好ましくは、CMV 由来のウイルス様粒子は、前記 CMV ポリペプチドを、主タンパク質成分として、

10

20

30

40

50

さらにより好ましくは、カプシド構造の唯一のタンパク質成分として含む。通常、好ましくは、CMV由来のウイルス様粒子は、CMVのカプシドの構造に類似している。CMV由来のウイルス様粒子は、非複製性および/または非感染性であり、CMVの複製機構をコードする少なくとも1種の遺伝子または複数の遺伝子を欠いており、また通常、ウイルスの宿主への結合または宿主への侵入の原因となるタンパク質(単一または複数)をコードする遺伝子(単一または複数)を欠いている。この定義はまた、上述の遺伝子(単一または複数)がまだ存在するが不活性であるウイルス様粒子も含む。CMV由来のウイルス様粒子を非複製性および/または非感染性にする好ましい方法は、紫外線照射、ホルムアルデヒド処理などの物理的または化学的不活性化によるものである。好ましくは、CMV由来のVLPは、CMVの複製機構をコードする遺伝子(単一または複数)を欠いており、また、ウイルスの宿主への結合または宿主への侵入の原因となる、またはタンパク質(単一または複数)をコードする遺伝子(単一または複数)も欠いている。またより好ましくは、非複製性および/または非感染性ウイルス様粒子は、組み換え遺伝子技術により得られる。組換えにより産生した本発明によるCMV由来のウイルス様粒子は、通常、好ましくは、ウイルスゲノムを含まない。2つ以上のポリペプチド種を含むウイルス様粒子は、多くの場合モザイクVLPと呼ばれるが、これも本発明に包含される。したがって、一実施形態では、本発明によるウイルス様粒子は、少なくとも2つの異なるポリペプチド種を含み、前記ポリペプチド種の少なくとも1つは、CMVポリペプチドである。好ましくは、CMV由来のVLPは、典型的にはVLP当たり180個のコートタンパク質サブユニットを含むCMVコートタンパク質から構成される巨大分子集合体である。通常、好ましくは、本明細書で使用される場合、CMV由来のVLPは、(i)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列、または(ii)変異アミノ酸配列を含む、または好ましくはそれからなる、少なくとも1種のCMVポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、変異を受けるアミノ酸配列は、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%およびまたより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示す。

【0024】

ペプチド：本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合により直線的に結合したアミノ酸モノマーから構成されるポリマーを意味する。ポリペプチドという用語は、アミノ酸の連続鎖を意味し、特定の長さの産物を意味しない。したがって、ペプチドおよびタンパク質は、ポリペプチドの定義に含まれる。

【0025】

キュウリモザイクウイルス(CMV)ポリペプチド：本明細書で使用される場合、「キュウリモザイクウイルス(CMV)」という用語は、(i)キュウリモザイクウイルス(CMV)のコートタンパク質のアミノ酸配列、または(ii)変異アミノ酸配列を含む、または好ましくはそれからなる、ポリペプチドを意味し、変異を受けるアミノ酸配列は、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列、すなわち、前記CMVのコートタンパク質は、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%およびまたより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示す。通常、好ましくは、CMVポリペプチドは、発現時に自己集合によりCMV由来のウイルス様粒子を形成することができる。

【0026】

キュウリモザイクウイルス(CMV)コートタンパク質(CP)：本明細書で使用される場合、「キュウリモザイクウイルス(CMV)のコートタンパク質(CP)」という用語は、天然のキュウリモザイクウイルスのコートタンパク質を意味する。キュウリモザイクウイルスの極めて広い宿主範囲に起因して、多くの異なるCMVの系統および分離株が知られており、前記系統および分離株のコートタンパク質の配列が決定されてきており、そのため、当業者には既知である。前記CMVのコートタンパク質(CP)の配列は、ジェンバンク、www.dpvweb.net、またはwww.ncbi.nlm.nih

10

20

30

40

50

. gov / p r o t e i n / などの既知のデータベースに記載されており、それらから検索可能である。記載されているCMVのCPの例は、CAD92034.1、CDO33961.2、AHZ89404.1、CDO33963.1、ACN60036.1、CAC18660.1、CAC18661.1、CAC18658.1、CAC18657.1、CAC18659.1、AFS64321.1、AFS64320.1、ABG76792.1、CAI68015.1、AAQ22992.1、AEM36051.1、AEM36048.1、ADA77134.1、AIS22690.1、AGT15706.1、AFR44555.1、AHY22574.1、ACM89097.1、AAB07137.1、AAD17927.1、AAM81371.1、AAM81365.1、AAM81374.1、AAM81372.1、AAM81368.1、ABC18318.1、AAX70966.1、AAU14864.1、AHJ11230.1、AHJ11229.1、AHJ11228.1、O40980.1、CAB43510.1、Q66143.1、CAA77065.1、CAB77390.1、CAC18666.1、NP__040777.1、P16489.1、AGV39216.1、AGW51600.1、AGN56074.1、AGN56050.1、AGG16159.1、AGG16145.1、AGG16143.1、AFZ99011.1、1407131A、CAA71834.1、CAA07411.1、CAC18665.1、Q66135.1、1F15__A、O40983.1、Q00259.1、AER25350.1、AER25348.1、ADN84922.1、ABU95611.1、BAF93916.1、BAF93914.1、AAY46239.1、AAY46233.1、AAY46235.1、AAY46231.1、AAY46230.1、AAY46237.1、BAF45130.1、ABM46611.1、ABC00925.1、AAY42625.1、CAH25533.1、CAH25541.1、CAH25539.1、AAV63980.1、AAQ89596.1、AAQ89571.1、AAQ89570.1、AAQ83697.1、AAQ83689.1、AAK52423.1、CCN27449.1、CEF39516.1、CAE51926.1、CAC13146.1、BAM15840.1、AEK33396.1、ABY21417.1、ABM89156.1、CAI84629.1、AGA20617.1、AAO17725.1、CAD42338.1、ABO18585.1、CDF77337.1、CAG25710.1、CAG25430.1、CAE30336.1、BAF45378.1、AAD17925.1、AGV39211.1、BAA07858.1、Q66141.1、O40981.1、ACB87210.1、CAI77626.1、CAH25521.1、ABG89138.1、AGT15712.1、AGT15703.1、AII01134.1、AIC76579.1、AIC76576.1、AIC76574.1、AIC76573.1、AIB09173.1、AIB09172.1、ADF81043.1、ACQ99349.1、ACQ99348.1、CBF03403.1、CBF03405.1、CAX45872.1、CAX45871.1、ACH48048.1、AAG01451.1、AAA46409.1、AAD45249.1、AAG25053.1、AAA46410.1、AAA46411.1、AAA46412.1、ABB89052.1、AAY19285.1、AAW21981.1、AAW21983.1、AAA74483.1、AHL30195.1、BAA95601.1、Q00261.1、CAB89799.1、AGZ63887.1、BAN67666.1、AFZ62498.1、AFZ62495.1、AFZ62494.1、AGN56098.1、AGN56028.1、AGG16155.1、AGG16151.1、ACS83814.1、ACS83810.1、ACS83800.1、ACS83791.1、CCM80413.1、CCM80411.1、CCM80409.1、AFX68432.1、AFX68428.1、CAI39235.1、CAJ20021.1、CAE51924.1、AAS57946.1、Q66154.1、Q00260.1、CAA61802.1、P21368.1、BAB11693.1、AFV99523.1、AFV99515.1、AER25351.1、AFM56037.1、AFJ92022.1、AFH8868

7 . 1、AFC40207 . 1、BAL63166 . 1、AFA53169 . 1、AFA
 53167 . 1、BAL61194 . 1、AEU12505 . 1、AER35119 . 1
 、AEK86513 . 1、AEK69525 . 1、AEK69524 . 1、AEK333
 95 . 1、AEK33393 . 1、AEG79911 . 1、ADZ54767 . 1、AD
 Z54111 . 1、ADX86746 . 1、ADN84923 . 1、ACR14828 .
 1、ACR14827 . 1、ABU62578 . 1、ACA13281 . 1、ABZ80
 826 . 1、ABY47903 . 1、ABY21424 . 1、ABY21420 . 1、A
 BY21419 . 1、ABY21418 . 1、ABY21413 . 1、ABX38992
 . 1、ABV55389 . 1、ABV49618 . 1、ABO18588 . 1、ABO1
 8589 . 1、ABN72590 . 1、ABN72591 . 1、ABN12319 . 1、
 ABN12316 . 1、BAF44939 . 1、ABM46612 . 1、CAJ1515
 8 . 1、ABC00922 . 1、ABC00921 . 1、ABC00928 . 1、ABC
 00923 . 1、ABI94145 . 1、ABI94151 . 1、ABI94129 . 1
 、ABI94150 . 1、BAF33384 . 1、ABI93181 . 1、ABE689
 05 . 1、ABC00927 . 1、AAS48545 . 1、AAR89470 . 1、AA
 R23529 . 1、AAQ82698 . 1、AAM95241 . 1、AAM97677 .
 1、AAK52977 . 1、AAW71967 . 1、ABJ55780 . 1、CAH17
 693 . 1、CAH17700 . 1、CAH17692 . 1、Q66140 . 1、ABM
 63376 . 1、AGT15704 . 1、CAB41491 . 1、AAR89478 . 1
 、CCJ09634 . 1、AEK69527 . 1、ACS83801 . 1、AIC765
 82 . 1、AHJ58884 . 1、AHJ11231 . 1、AGJ94707 . 1、AC
 S83798 . 1、ACS83793 . 1、ABK81652 . 1、AAS57945 .
 1、AAN04483 . 1、ADO66659 . 1、AAN17777 . 1、ADG26
 754 . 1、AFV99520 . 1、ABD73006 . 1、ACE07024 . 1、A
 BD64220 . 1、ABD72575 . 1、ABP87978 . 1、ABN13961
 . 1、AAV85627 . 1、AGG16139 . 1、ACS83811 . 1、CAH1
 7699 . 1、CAH17694 . 1、AFV69240 . 1、ACB56602 . 1、
 ADJ10637 . 1、ABM46614 . 1、AAV45749 . 1、AAA7448
 4 . 1、CAH17697 . 1、ADA63484 . 1、ADA63482 . 1、ADA
 63480 . 1、Q83251 . 1、AIC76584 . 1、AIC76583 . 1、A
 AK27169 . 1、ABC00924 . 1、ACD62520 . 1、ABO18591
 . 1、AAO62575 . 1、AAL48223 . 1、AIA99525 . 1、CAH1
 7698 . 1、AAZ38725 . 1、AAF09246 . 2、CAH17701 . 1、
 ACB58305 . 1、AGG16158 . 1、CAH17695 . 1、AHJ5888
 3 . 1、AEZ03836 . 1、BAB63959 . 1、ACD62519 . 1、BAF
 93912 . 1、AAZ78354 . 1、ACN38326 . 1、AFV99522 . 1
 、ADZ54109 . 1、CAA46151 . 1、AGV39213 . 1である。CMV
 コートタンパク質のさらなる例は、配列番号1～3に示されている。

10

20

30

40

50

【0027】

これらの系統および分離株が、コートタンパク質のN末端を含む異なるタンパク質ドメインで極めて類似したコートタンパク質配列を有することは注目に値する。特に、完全に配列決定された全てのCMV分離株の98.1%は、それらのコートタンパク質配列中の最初の28個のアミノ酸内に85%を超える配列同一性を共有している。さらに、完全に配列決定された全てのCMV分離株の79.5%は、それらのコートタンパク質配列中の最初の28個のアミノ酸内に90%を超える配列同一性を共有している。

【0028】

通常、好ましくは、本発明で使われるCMVのコートタンパク質は、発現時に自己集合によりCMV由来のウイルス様粒子を形成することができる。好ましくは、本発明で使われるCMVのコートタンパク質は、大腸菌中での発現時に自己集合によりCMV由来のウイルス様粒子を形成することができる。

【 0 0 2 9 】

配列番号 1 は、ラトビアのリガの個人庭園から収集された C M V 感染ユリの葉から単離され、クローン化された C P のアミノ酸配列に相当する。したがって、好ましくは、本明細書で使用される場合、「キュウリモザイクウイルス (C M V) のコートタンパク質」という用語は、C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列を意味し、前記アミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列、または少なくとも 7 5 %、好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、またさらに好ましくは少なくとも 9 0 %、またより好ましくは少なくとも 9 5 %、なおさらに好ましくは少なくとも 9 8 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列、を含む、または好ましくはそれからなる。

10

【 0 0 3 0 】

さらなる極めて好ましい実施形態では、前記 C M V のコートタンパク質は、C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記アミノ酸配列は、配列番号 1 の連続アミノ酸 2 ~ 2 7 である配列番号 2 1 を含むか、またはアミノ酸配列領域を含む C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列領域は、少なくとも 7 5 %、好ましくは少なくとも 8 0 %、さらに好ましくは少なくとも 8 5 %、またさらに好ましくは少なくとも 9 0 %、またより好ましくは少なくとも 9 5 %、なおさらに好ましくは少なくとも 9 8 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列番号 2 1 との配列同一性を有する。T h 細胞エピトープが、本発明の C M V ポリペプチドの N 末端領域に置き換わるのが好ましいので、このことは特に好ましい。C M V の C P の N 末端は実施例で好ましいものとして使用されている配列に対して配列同一性が高いことにより、凝集を生じさせることが多い T h 細胞エピトープによる前記 N 末端領域の置換に関係なく、C P の発現時に適切に集合させることが確実に可能となる。

20

【 0 0 3 1 】

またさらなる極めて好ましい実施形態では、前記 C M V のコートタンパク質は、(a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記アミノ酸配列は、配列番号 1、または (b) 少なくとも 7 5 %、好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、またさらに好ましくは少なくとも 9 0 %、またより好ましくは少なくとも 9 5 %、なおさらに好ましくは少なくとも 9 8 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくはそれからなり；(a) もしくは (b) で定められた前記アミノ酸配列は、配列番号 1 の連続アミノ酸 2 ~ 2 7 である配列番号 2 1 を含むか、または (a) もしくは (b) で定められた前記アミノ酸配列は、アミノ酸配列領域を含み、前記アミノ酸配列領域は、少なくとも 7 5 %、好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、またさらに好ましくは少なくとも 9 0 %、またより好ましくは少なくとも 9 5 %、なおさらに好ましくは少なくとも 9 8 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列番号 2 1 との配列同一性を有する。

30

【 0 0 3 2 】

キュウリモザイクウイルス (C M V) 由来の改変ウイルス様粒子 (V L P) : 本明細書で使用される場合、「キュウリモザイクウイルス (C M V) 由来の改変ウイルス様粒子 (V L P) 」という用語は、少なくとも 1 種の改変 C M V ポリペプチドを含む、または好ましくはそれから本質的になる、または好ましくはそれからなるように改変された C M V 由来の V L P を意味し、前記改変 C M V ポリペプチドは、C M V ポリペプチド、およびヘルパー T 細胞エピトープを含む、または好ましくはそれらからなる。通常好ましくは、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、(i) 前記 C M V ポリペプチドの N 末端に融合されるか、(i i) 前記 C M V ポリペプチドの C 末端に融合されるか、(i i i) 前記 C M V ポリペプチドの連続アミノ酸の領域を置換し、この場合、前記 C M V ポリペプチドの前記連続アミノ酸の置換された領域と、ヘルパー T 細胞エピトープとの間の配列同一性が少なくとも 1 5 %、好ましくは少なくとも 2 0 % であるか、または (i v) 前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換し、前記 C M V ポリペプチドの前記置換された N 末端領域は、5 ~ 1

40

50

5 個の連続アミノ酸からなる。好ましくは、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換し、前記 C M V ポリペプチドの前記置換された N 末端領域は、5 ~ 15 個の連続アミノ酸、好ましくは 9 ~ 14 個の連続アミノ酸、より好ましくは 11 ~ 13 個の連続アミノ酸、および最も好ましくは 11、12 または 13 個の連続アミノ酸、からなる。好ましくは本発明の前記 C M V 由来の改変 V L P は、C M V 由来の組換え型改変 V L P である。

【0033】

改変 C M V ポリペプチド：本明細書で使用される場合、「改変 C M V ポリペプチド」という用語は、前記改変 C M V ポリペプチドが、C M V ポリペプチド、およびヘルパー T 細胞エピトープを含む、または好ましくはそれらからなるように改変された C M V ポリペプチドを意味する。通常、改変 C M V ポリペプチドは、発現時に自己集合により C M V 由来のウイルス様粒子を形成することができる。好ましくは、改変 C M V ポリペプチドは、組換え型改変 C M V ポリペプチドであり、大腸菌中で発現時に自己集合により C M V 由来のウイルス様粒子を形成することができる。

10

【0034】

C M V ポリペプチドの N 末端領域：本明細書で使用される場合、「C M V ポリペプチドの N 末端領域」という用語は、前記 C M V ポリペプチドの N 末端、特に前記 C M V のコートタンパク質の N 末端、または前記 C M V ポリペプチドまたは前記 C M V のコートタンパク質が N 末端メチオニン残基を含む場合は、前記 C M V ポリペプチドもしくは前記 C M V のコートタンパク質の N 末端の領域であるが、前記 C M V ポリペプチドもしくは前記 C M V のコートタンパク質の N 末端の 2 つ目のアミノ酸から始まる N 末端の領域を意味する。好ましくは、前記 C M V ポリペプチドまたは前記コートタンパク質が N 末端メチオニン残基を含む場合には、実用的な観点から、メチオニンをコードする開始コドンが通常、除去され、T h 細胞エピトープの N 末端に付加されるであろう。さらに、好ましくは、1 つ、2 つまたは 3 つの追加のアミノ酸、好ましくは 1 つのアミノ酸が、必要に応じて、クローニングを目的として、最初のメチオニンと T h 細胞エピトープの間に挿入されてよい。本明細書で使用される場合、「C M V ポリペプチドまたは C M V コートタンパク質の変異アミノ酸配列の N 末端領域」という用語は、前記 C M V ポリペプチドもしくは前記 C M V のコートタンパク質の前記変異アミノ酸配列、または前記変異アミノ酸配列が N 末端メチオニン残基を含む場合は、前記 C M V ポリペプチドもしくは前記 C M V のコートタンパク質の前記変異アミノ酸配列の N 末端の領域であるが、前記 C M V ポリペプチドもしくは前記 C M V のコートタンパク質の前記変異アミノ酸配列の N 末端の 2 つ目のアミノ酸から始まる N 末端の領域を意味する。好ましくは、前記 C M V ポリペプチドまたは前記コートタンパク質が N 末端メチオニン残基を含む場合には、実用的な観点から、メチオニンをコードする開始コドンが通常、除去され、T h 細胞エピトープの N 末端に付加されるであろう。さらに、好ましくは、1 つ、2 つまたは 3 つの追加のアミノ酸、好ましくは 1 つのアミノ酸が、必要に応じて、クローニングを目的として、最初のメチオニンと T h 細胞エピトープの間に挿入されてよい。

20

30

【0035】

組換え型ポリペプチド：本発明においては、「組換え型ポリペプチド」という用語は、組換え D N A 技術の少なくとも 1 つのステップを含むプロセスにより得られるポリペプチドを意味する。通常好ましくは、組換え型ポリペプチドは、原核生物発現系で産生される。当業者なら、大腸菌などの原核生物発現系で発現される組換えにより産生されたポリペプチドは、N 末端メチオニン残基を含み得ることは明らかである。N 末端メチオニン残基は通常、組換え型ポリペプチドの成熟中に、発現宿主中で組換え型ポリペプチドから切断される。しかし、N 末端メチオニンの切断は、不完全な場合が多い。したがって、組換え型ポリペプチドの調製物は、N 末端メチオニン残基を有するポリペプチドまたは有さないポリペプチド（この点以外は同一）の混合物を含んでよい。通常好ましくは、組換え型ポリペプチドの調製物は、10 % 未満、より好ましくは 5 % 未満、およびさらにより好ましくは 1 % 未満の N 末端メチオニン残基を有する組換え型ポリペプチドを含む。

40

50

【0036】

組換え型CMVポリペプチド：「組換え型CMVポリペプチド」という用語は、組換えDNA技術の少なくとも1つのステップを含むプロセスにより得られる上記で定義のCMVポリペプチドを意味する。通常好ましくは、組換え型CMVポリペプチドの調製物は、10%未満、より好ましくは5%未満、およびさらにより好ましくは1%未満のN末端メチオニン残基を有する組換え型CMVポリペプチドを含む。したがって、本発明の組換え型ウイルス様粒子は、N末端メチオニン残基を有するポリペプチドまたは有さないポリペプチド（この点以外は同一）を含んでよい。

【0037】

組換え型改変CMVポリペプチド：「組換え型改変CMVポリペプチド」という用語は、組換えDNA技術の少なくとも1つのステップを含むプロセスにより得られる上記で定義の改変CMVポリペプチドを意味する。通常好ましくは、組換え型改変CMVポリペプチドの調製物は、10%未満、より好ましくは5%未満、およびさらにより好ましくは1%未満のN末端メチオニン残基を有する組換え型改変CMVポリペプチドを含む。したがって、本発明の組換え型ウイルス様粒子は、N末端メチオニン残基を有するポリペプチドまたは有さないポリペプチド（この点以外は同一）を含んでよい。

【0038】

組換え型ウイルス様粒子：本発明においては、「組換え型ウイルス様粒子」という用語は、組換えDNA技術の少なくとも1つのステップを含むプロセスにより得られるウイルス様粒子（VLP）を意味する。通常好ましくは、組換え型ウイルス様粒子は、少なくとも1種の組換え型ポリペプチド、好ましくは組換え型CMVポリペプチドまたは組換え型改変CMVポリペプチドを含む。最も好ましくは、組換え型ウイルス様粒子は、組換え型CMVポリペプチドまたは組換え型改変CMVポリペプチドから構成されるまたはそれらからなる。結果として、本発明において、本発明の組換え型VLPの定義が、N末端メチオニン残基を含む特定のアミノ酸配列に関連して影響を受ける場合には、これらの本発明の組換え型VLPの範囲は、前記N末端メチオニン残基を有さない前記特定のアミノ酸配列により形成されたVLPを包含するが、加えて、通常本明細書で示すように少量であるが、前記N末端メチオニンを有する前記特定のアミノ酸配列により形成されたVLPも包含する。さらに、本発明の組換え型VLPの定義が、N末端メチオニン残基を含む特定のアミノ酸配列に関連して影響を受ける場合には、依然として前記N末端メチオニン残基を含むアミノ酸配列と、N末端メチオニン残基を欠いているアミノ酸配列との両方を含むVLPが包含される場合も本発明の範囲内にある。

【0039】

変異アミノ酸配列：「変異アミノ酸配列」という用語は、所定組み合わせの変異を、変異を受けるアミノ酸配列中に導入することにより得られるアミノ酸配列を意味する。本発明においては、前記変異を受けるアミノ酸配列は、通常好ましくは、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列である。したがって、変異アミノ酸配列は、少なくとも1個のアミノ酸残基において、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列とは異なり、前記変異アミノ酸配列および前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも90%の配列同一性を示す。通常好ましくは、前記変異アミノ酸配列および前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示す。好ましくは前記変異アミノ酸配列および前記変異を受ける配列は、最大で11、10、9、8、7、6、4、3、2または1個のアミノ酸残基において異なり、さらに好ましくは、前記差異は、挿入、欠失およびアミノ酸置換から選択される。好ましくは、変異アミノ酸配列は、少なくとも1個のアミノ酸において、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列とは異なり、好ましくは前記差異はアミノ酸置換である。

【0040】

残基に対応する位置：別のアミノ酸配列の所定の残基に対応するアミノ酸配列の位置は、通常好ましくは、BLASTPアルゴリズムを使って、最も好ましくは標準的設定を使って、配列アラインメントにより特定することができる。典型的で、好ましい標準的設定

は、期待値の閾値 (expect threshold) : 10 ; ワードサイズ (word size) : 3 ; クエリ幅内でマッチする数の制限 (max matches in a query range) : 0 ; マトリックス (matrix) : BLOSUM62 ; ギャップコスト (gap costs) : existence11、extension1 ; compositional adjustments : Conditional compositional score matrix adjustment、である。

【0041】

配列同一性：2つの所与のアミノ酸配列の配列同一性は、両方の配列のアラインメントに基づいて決定される。配列同一性の決定用アルゴリズムは当業者なら利用可能である。好ましくは、2つのアミノ酸配列の配列同一性は、公的に入手可能なコンピューター相同性プログラム「BLAST」プログラム (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) または「CLUSTALW」(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) を使って決定されるのが好ましく、また、ここでは、NCBIホームページ、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> で提供される「BLAST」プログラムにより、そこに提供されるデフォルト設定を使って決定されるのが好ましい。典型的で、好ましい標準的設定は、期待値の閾値 (expect threshold) : 10 ; ワードサイズ (word size) : 3 ; クエリ幅内でマッチする数の制限 (max matches in a query range) : 0 ; マトリックス (matrix) : BLOSUM62 ; ギャップコスト (gap costs) : existence11、extension1 ; compositional adjustments : Conditional compositional score matrix adjustment、である。

【0042】

アミノ酸置換：アミノ酸置換という用語は、アミノ酸配列中の所定のアミノ酸残基の、異なる化学構造を有する任意の他のアミノ酸残基による置換、好ましくは別のタンパク質を構成するアミノ酸残基による置換を意味する。したがって、アミノ酸の挿入または欠失と対照的に、アミノ酸置換は、前記アミノ酸配列のアミノ酸の合計数を変えない。本発明において、極めて好ましいのは、リジン残基またはシステイン残基による、変異を受ける前記アミノ酸配列のアミノ酸残基の置換である。

【0043】

エピトープ：「エピトープ」という用語は、抗原、好ましくはポリペプチドの連続したまたは不連続な部分を意味し、前記部分は、MHC分子の枠組みの中で、抗体により、またはT細胞受容体により特異的に結合され得る。抗体に関しては、特異的結合に非特異的結合は含まれないが、交差反応性も排除されとは限らない。エピトープは通常、抗原性部位に特有の空間的配置の5～20個のアミノ酸を含む。

【0044】

ヘルパーT (Th) 細胞エピトープ：本明細書で使用される場合、「ヘルパーT (Th) 細胞エピトープ」という用語は、ヘルパーTh細胞により認識できるエピトープを意味する。

【0045】

ユニバーサルTh細胞エピトープ：本明細書で使用される場合、「ユニバーサルTh細胞エピトープ」という用語は、少なくとも1種の、好ましくは2種以上のMHCクラスII分子に結合できるTh細胞エピトープを意味する。ペプチド配列がユニバーサルTh細胞エピトープであるかどうかを判定する最も簡単な方法は、ペプチドの個々のMHCクラスII分子に結合する能力を測定することである。これは、既知のTh細胞エピトープペプチドのMHCクラスII分子に対する結合と、競合するペプチドの能力により測定し得る。HLA-DR分子の代表的選択は、例えば、Alexander J, et al., Immunity (1994) 1: 751 - 761 に記載されている。Th細胞エピト

10

20

30

40

50

ープのMHCクラスII分子に対する親和性は、少なくとも 10^{-5} Mである必要がある。Th細胞エピトープの「普遍性」を測定する、別の、より長時間を要するがより適切な方法は、より多くの比率の人(>30%)が、IFA中に配合されるTh細胞エピトープを含むタンパク質で、免疫時および1ヶ月後の追加免疫時に、測定できるほどのT細胞応答を引き起こすことを実証することである。異なる個体に存在するMHCクラスII分子の代表的収集は、Panina-Bordignon P, et al., Eur J Immunol (1989) 19:2237-2242に示されている。結果として、本明細書で使用される場合、「ユニバーサルTh細胞エピトープ」という用語は、Panina-Bordignon P, et al., Eur J Immunol (1989) 19:2237-2242に記載のように、免疫および追加免疫時に(1ヶ月後に、IFA中に配合したTh細胞エピトープを含むタンパク質で)、選択した集団の30%を超えるメンバーが、測定できるほどのT細胞応答を引き起こすTh細胞エピトープを意味する。さらに、またさらに好ましい表現方法では、本明細書で使用される場合、「ユニバーサルTh細胞エピトープ」という用語は、少なくとも500 nMの親和性を有する、DR1、DR2w2b、DR3、DR4w4、DR4w14、DR5、DR7、DR52a、DRw53、DR2w2aから選択され；好ましくは、DR1、DR2w2b、DR4w4、DR4w14、DR5、DR7、DRw53、DR2w2aから選択される、少なくとも1種、好ましくは少なくとも2種、およびさらにより好ましくは少なくとも3種のDRアレルに結合することができるTh細胞エピトープを意味する(Alexander J, et al., Immunity (1994) 1:751-761および本明細書で引用した文献に記載のように)；前記親和性を評価するための好ましい結合アッセイは、Sette A, et al., J Immunol (1989) 142:35-40に記載されるアッセイである。またさらにより好ましくは、本明細書で使用される場合、「ユニバーサルTh細胞エピトープ」という用語は、少なくとも500 nMの親和性を有する、DR1、DR2w2b、DR4w4、DR4w14、DR5、DR7、DRw53、DR2w2aから選択される、少なくとも1種、好ましくは少なくとも2種、およびさらにより好ましくは少なくとも3種のDRアレルに結合することができるTh細胞エピトープを意味する(Alexander J, et al., Immunity (1994) 1:751-761および本明細書で引用した文献に記載のように)；前記親和性を評価するための好ましい結合アッセイは、Sette A, et al., J Immunol (1989) 142:35-40により記載されるアッセイである。

【0046】

ユニバーサルTh細胞エピトープは、Alexander J, et al., Immunity (1994) 1:751-761, Panina-Bordignon P, et al., Eur J Immunol (1989) 19:2237-2242, Calvo-Calle JM, et al., J Immunol (1997) 159:1362-1373, and Valmori D, et al., J Immunol (1992) 149:717-721による文献などに記載され、当業者に知られている。

【0047】

本発明の好ましい実施形態では、Th細胞エピトープは、HA307-319(配列番号26)、HBVnc50-69(配列番号27)、TT830-843(配列番号4)、CS378-398(配列番号28)、MT17-31(配列番号29)、TT947-967(配列番号30)およびPADRE(配列番号5)から選択される。本発明の別の好ましい実施形態では、ユニバーサルTh細胞エピトープは、HA307-319(配列番号26)、HBVnc50-69(配列番号27)、TT830-843(配列番号4)、CS378-398(配列番号28)、MT17-31(配列番号29)、TT947-967(配列番号30)およびPADRE(配列番号5)から選択される。本発明の極めて好ましい実施形態では、Th細胞エピトープは、TT830-843(配列番号4)またはPADRE(配列番号5)である。本発明の別の極めて好ましい実施形態では、ユニバーサルTh細胞エピトープは、TT830-843(配列番号4)またはPAD

RE (配列番号5)である。したがって、極めて好ましい実施形態では、前記Th細胞エピトープは、TT830-843 (配列番号4)である。本発明の別の極めて好ましい実施形態では、前記Th細胞エピトープは、PADRE (配列番号5)である。別の極めて好ましい実施形態では、前記ユニバーサルTh細胞エピトープは、TT830-843 (配列番号4)である。本発明の別の極めて好ましい実施形態では、前記ユニバーサルTh細胞エピトープは、PADRE (配列番号5)である。配列番号4および配列番号5のエピトープは既知であり、その用途についても記載されてきた。(Alexander J, et al., Immunity (1994) 1: 751-761; Panina-Bordignon P, et al., Eur J Immunol (1989) 19: 2237-2242; Valmori D, et al., J Immunol (1992) 149: 717-721; Lanzavecchia A, et al., Eur J Immunol (1983) 13: 733-738; Jemon K, et al., PLoS ONE (2013) 8(6): e66866; Jagu S, et al., PLoS ONE (2012) 8(1): e55538)。

【0048】

カップリング効率：ウイルス様粒子の特異的抗原とのカップリング効率をカップリング反応のSDS-PAGEにより測定した。カップリング反応の成分に対応するクーマシーブルー染色バンドの強度をデンストメトリーにより測定し、カップリング効率の計算に使用した。カップリング効率は、前記抗原に結合したVLPポリペプチドの、VLPポリペプチドの合計量に対する比率として定義される。

【0049】

アジュバント：本明細書で使用される場合、「アジュバント」という用語は、免疫反応または物質の非特異的刺激剤を意味し、アジュバントは、宿主中に貯蔵庫の生成を可能とし、それぞれ、本発明のワクチンおよび医薬組成物と組み合わせた場合にさらに向上した免疫反応をもたらす得る。好ましいアジュバントは、完全フロインドアジュバントおよび不完全フロインドアジュバント、アルミニウム含有アジュバント、好ましくは水酸化アルミニウム、ならびに修飾ムラミルジペプチドである。さらに、好ましいアジュバントは、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロン酸ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、スカシ貝ヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびヒトアジュバント、例えば、BCG (カルメット・ゲランウシ型結核菌)およびコリネバクテリウムパルブムである。このようなアジュバントも当該技術分野において周知である。本発明の組成物と一緒に投与可能なさらなるアジュバントとしては、モノホスホリル脂質免疫調節剤、Adjvax 100a、QS-21、QS-18、CRL1005、アルミニウム塩 (ミョウバン)、MF-59、OM-174、OM-197、OM-294、およびピロソームアジュバント技術が挙げられるが、これらに限定されない。アジュバントはまた、これらの物質の混合物を含んでもよい。ウイルス様粒子は一般に、アジュバントと呼ばれてきた。しかし、本出願の枠組みで使用される「アジュバント」という用語は、本発明のウイルス様粒子ではないアジュバントを意味する。むしろ、「アジュバント」は、本発明の組成物、ワクチンまたは医薬組成物に対する付加的な、別の成分に関連する。

【0050】

抗原：本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、MHC分子により提示される場合、抗体またはT細胞受容体 (TCR) により結合され得る分子を意味する。本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、T細胞エピトープも同様に意味する。抗原は、さらに免疫系により認識されることができ、および/またはBリンパ球および/またはTリンパ球の活性化に繋がる液性免疫反応および/または細胞免疫反応を誘発することができる。しかし、これは、少なくとも、場合に応じて、抗原がTh細胞エピトープを含むかまたはそれに結合し、アジュバント中に送られることを必要とすることがある。抗原は、1種または複数のエピトープ (B-およびT-エピトープ) を持つことができる。上記で言及した特異的反応は、抗原が、好ましくは、典型的には極めて選択的方式で、

その対応する抗体またはTCRと反応し、その他の抗原により誘発され得る数多くのその他の抗体またはTCRと反応しないことを意味する。本明細書で使用される場合、抗原はまた、いくつかの個別抗原の混合物であってもよい。本発明のウイルス様粒子を形成する本発明のポリペプチドは、抗原を含んでよい。特に、本発明のポリペプチドは、抗原を含む融合生成物であってよい。しかし、抗原という用語は、前記ポリペプチドに含まれる前記変異アミノ酸配列を包含しない。通常好ましくは、本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、本発明によるウイルス様粒子を包含しない。通常好ましくは、「抗原」という用語は、むしろ、抗原特性を有する本発明の組成物のワクチンおよび医薬組成物の追加の成分を意味し、抗原は、本明細書で記載の任意の手段により、ウイルス様粒子と会合、結合、混合または連結されてよい。

10

【0051】

会合した：本明細書で使用される場合、「会合した」または「会合」という用語は、2つの分子が一緒につなぎ合わされる全ての可能な方法、好ましくは化学的相互作用を意味する。化学的相互作用には、共有結合および非共有結合相互作用が含まれる。非共有結合相互作用の典型的な例は、イオン相互作用、疎水性相互作用または水素結合であり、一方、共有結合相互作用は、例えば、共有結合に基づく、例えば、エステル、エーテル、リン酸エステル、炭素-リン結合、チオエーテルなどの炭素-イオウ結合、またはイミド結合である。

【0052】

結合部位、第1：本明細書で使用される場合、「第1結合部位」という語句は、ウイルス様粒子と一緒に天然に生じるエレメントまたはウイルス様粒子に人為的に付加されるエレメントを意味し、このエレメントに対し第2結合部位が結合し得る。第1結合部位は、好ましくは、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（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、フッ化フェニルメチルスルホニル）、またはアミノ基、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、ヒスチジニル基などの化学的反応性基、またはこれらの組み合わせである。第1結合部位である化学的反応性基の好ましい実施形態は、アミノ酸残基、好ましくはリジン残基のアミノ基である。第1結合部位は通常、表面上、好ましくはVLPの外表面上に位置する。複数の第1結合部位が、表面上に存在し、好ましくはVLPの外表面上の、通常は反復配置中に存在する。好ましい実施形態では、第1結合部位は、少なくとも1つの共有結合を介して、好ましくは少なくとも1つのペプチド結合を介して、VLPに会合する。さらなる好ましい実施形態では、第1結合部位は、VLPと一緒に天然で生じる。あるいは、好ましい実施形態では、第1結合部位は、人為的にVLPに付加される。極めて好ましい実施形態では、前記第1結合部位は、前記VLPポリペプチドのアミノ酸配列のリジン残基のアミノ基である。

20

30

【0053】

結合部位、第2：本明細書で使用される場合、「第2結合部位」という語句は、抗原と一緒に天然で生じるエレメントまたは抗原に人為的に付加されるエレメントを意味し、このエレメントに対し第1結合部位が結合し得る。抗原の第2結合部位は、好ましくは、タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、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（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、フッ化フェニルメチルスルホニル）、またはアミノ基、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、ヒスチジニル基などの化学的反応性基、またはこれらの組み合わせである。第2結合部位である化学的反応性基の好ましい実施形態は、スルフヒドリル基、好ましくはアミノ酸システインのスルフヒドリル基、最も好ましくはシステイン残基のスルフヒドリル基である。したがって、「少なくとも1つの第2結合部位を有する抗原」という用語は、抗原および少なくとも1つの第2結合部位を含むコンストラクトを意味する。しかし、特に抗原内で天然に生じない第2結合部位に対しては、このようなコンストラクトは、通常好ましくは、「リンカー」をさらに含む。別の好

40

50

ましい実施形態では、第2結合部位は、少なくとも1つの共有結合を介して、好ましくは少なくとも1つのペプチド結合を介して、抗原に会合する。さらなる実施形態では、第2結合部位は、抗原内に天然に生じる。別のさらに好ましい実施形態では、第2結合部位は、リンカーを介して抗原に人為的に付加され、前記リンカーは、システインを含むか、あるいはシステインからなる。好ましくは、リンカーはペプチド結合により抗原に融合される。

【0054】

結合した：本明細書で使用される場合、「結合した」または「結合」という用語は、少なくとも1つの第1結合部位と、少なくとも1つの第2結合部位と一緒に結合される全ての可能な方法、好ましくは化学的相互作用を意味する。化学的相互作用には、共有結合相互10
作用および非共有結合相互作用が含まれる。非共有結合相互作用の典型的な例は、イオン相互作用、疎水性相互作用または水素結合であり、一方、共有結合相互作用は、例えば、共有結合に基づく、例えば、エステル、エーテル、リン酸エステル、炭素-リン結合、チオエーテルなどの炭素-イオウ結合、またはイミド結合である。特定の好ましい実施形態では、第1結合部位と第2結合部位は、少なくとも1つの共有結合を介して、好ましくは少なくとも1つの非ペプチド結合を介して、さらにより好ましくは非ペプチド結合（単一または複数）のみを介して、結合される。しかし、本明細書で使用される場合、「結合した」という用語は、少なくとも1つの第1結合部位および少なくとも1つの第2結合部位の直接結合のみを意味しないで、代わりにおよび好ましくは、少なくとも1つの第1結合部位および少なくとも1つの第2結合部位の介在分子（単一または複数）を介した、およびこれによる、通常好ましくは、少なくとも1つの、好ましくは1つのヘテロ二機能性架橋剤の使用による間接的結合も同様に意味するものとする。その他の好ましい実施形態では、第1結合部位と第2結合部位は、少なくとも1つの共有結合を介して、好ましくは少なくとも1つのペプチド結合を介して、さらにより好ましくはペプチド結合（単一または複数）のみを介して、結合される。20

【0055】

リンカー：本明細書で使用される場合、「リンカー」は、第2結合部位を抗原と会合させるか、または第2結合部位を既を含む、本質的に第2結合部位からなる、もしくは第2結合部位からなる。本明細書で使用される場合、「リンカー」は、通常好ましくは、必須ではないが、1つのアミノ酸残基、好ましくはシステイン残基として、既に第2結合部位30
を含むのが好ましい。好ましいリンカーは、アミノ酸リンカー、すなわち、少なくとも1つのアミノ酸残基を含むリンカーである。アミノ酸リンカーという用語は、アミノ酸残基のみからなるリンカーを意味するものではない。しかし、アミノ酸残基のみからなるリンカーは、本発明の好ましい実施形態である。リンカーのアミノ酸残基は、天然アミノ酸または当該技術分野において既知の非天然アミノ酸、全Lまたは全Dもしくはこれらの混合物から構成されるのが好ましい。本発明によるリンカーのさらに好ましい実施形態は、スルフヒドリル基またはシステイン残基を含む分子であり、したがって、このような分子も本発明に包含される。本発明に有用なさらなるリンカーは、C1-C6アルキル部分、シクロペンチルもしくはシクロヘキシルなどのシクロアルキル、シクロアルケニル、アリー3
ルまたはヘテロアリール部分を含む分子である。さらに、好ましくはC1-C6アルキル部分、シクロアルキル部分、(C5、C6)部分、アリールまたはヘテロアリール部分および追加のアミノ酸（単一または複数）を含むリンカーはまた、本発明用のリンカーとして使用でき、本発明の範囲内に包含されるものとする。リンカーの抗原との会合は、好ましくは、1つの共有結合を介して、より好ましくは、少なくとも1つのペプチド結合を介して行われる。40

【0056】

秩序化反復抗原配列：本明細書で使用される場合、「秩序化反復抗原配列」という用語は、通常好ましくは、VLPに対する抗原の空間配置の高次均一性により特徴付けられる抗原の反復パターンを意味する。本発明の一実施形態では、反復パターンは、幾何学的パターンであってよい。本発明のVLPと結合した抗原などの本発明の特定の実施形態は、50

1 ~ 30 ナノメートル、好ましくは2 ~ 15 ナノメートル、さらにより好ましくは2 ~ 10 ナノメートル、さらにまたより好ましくは2 ~ 8 ナノメートル、およびさらにより好ましくは1.6 ~ 7 ナノメートルの間隔を有するのが好ましい、厳密に反復性の準結晶秩序の抗原をさらに有する、通常、好適な秩序化および反復抗原配列の好ましい例である。

【0057】

F e l d 1 タンパク質：本明細書で使用される場合、「F e l d 1 タンパク質」という用語は、F e l d 1 の鎖1およびF e l d 1 の鎖2を含むあるいはそれからなるタンパク質を意味する。好ましくは、F e l d 1 の鎖1およびF e l d 1 の鎖2は、共有結合される。好ましい一実施形態では、F e l d 1 の鎖1およびF e l d 1 の鎖2は、少なくとも1つのジスルフィド結合により結合される。別の好ましい実施形態では、鎖1および鎖2は、直接にまたはスペーサーを介して融合され、この場合、前記F e l d 1 タンパク質は、スペーサーをさらに含むか、あるいはスペーサーからなる。本明細書中に定義されているように、好ましくはF e l d 1 タンパク質は、全体で、最大300個、さらにより好ましくは、最大200個のアミノ酸からなる。通常好ましくは、本発明によるF e l d 1 タンパク質は、本発明の実施例8により産生されるように、天然F e l d 1 または組換え型F e l d 1 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。

【0058】

F e l d 1 の鎖1：本明細書で使用される場合、「F e l d 1 の鎖1」という用語は、配列番号37またはその相同配列のアミノ酸配列を含む、あるいはそれからなるポリペプチドを意味する。本明細書で使用される場合、「配列番号37の相同配列」という用語は、配列番号37に対する80%を超える、より好ましくは90%を超える、およびさらにより好ましくは95%を超える同一性を有するポリペプチドを意味する。本明細書で使用される場合、「F e l d 1 の鎖1」という用語は、限定されないが、F e l d 1 の鎖1の、本明細書中に定義されているような、少なくとも1つのグリコシル化を含む、少なくとも1つの翻訳後修飾を含むポリペプチドも同様に意味すべきである。本明細書中に定義されているように、F e l d 1 の鎖1は、全体で、最大130個、さらにより好ましくは、最大100個のアミノ酸からなるのが好ましい。

【0059】

F e l d 1 の鎖2：本明細書で使用される場合、「F e l d 1 の鎖2」という用語は、配列番号38、配列番号39もしくは配列番号40またはその相同配列のアミノ酸配列を含む、あるいはそれからなるポリペプチドを意味する。本明細書で使用される場合、「配列番号38、配列番号39または配列番号40の相同配列」という用語は、配列番号38、配列番号39または配列番号40に対する80%を超える、より好ましくは90%を超える、およびさらにより好ましくは95%を超える同一性を有するポリペプチドを意味する。本明細書で使用される場合、「F e l d 1 の鎖2」という用語は、限定されないが、F e l d 1 の鎖2の、本明細書中に定義されているような、少なくとも1つのグリコシル化を含む、少なくとも1つの翻訳後修飾を含むポリペプチドも同様に意味すべきである。本明細書中に定義されているように、F e l d 1 の鎖2は、全体で、最大150、さらにより好ましくは、最大130個、さらにより好ましくは最大100個のアミノ酸からなるのが好ましい。

【0060】

免疫賦活物質：本明細書で使用される場合、「免疫賦活物質」という用語は、免疫反応を誘導および/または促進することができる物質を意味する。本明細書で使用される場合、免疫賦活物質としては、トール様受容体活性化物質およびサイトカイン分泌を誘導する物質が挙げられるが、これらに限定されない。トール様受容体活性化物質としては、免疫賦活核酸、ペプチドグリカン、リポ多糖類、リポテイコ酸、イミダゾキノリン配合物、フラゲリン、リボタンパク質、およびタキソールなどの免疫賦活有機物質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0061】

10

20

30

40

50

免疫賦活核酸：本明細書で使用される場合、免疫賦活核酸という用語は、免疫反応を誘導および／または促進することができる核酸を意味する。免疫賦活核酸は、リボ核酸および特に、デオキシリボ核酸を含み、リボ核酸およびデオキシリボ核酸の両方は、二本鎖または一本鎖であってよい。好ましいISS-NA（免疫賦活核酸）は、デオキシリボ核酸であり、さらに好ましくは、前記デオキシリボ核酸は一本鎖である。好ましくは免疫賦活核酸は非メチル化Cを含む少なくとも1つのCpGモチーフを含む。極めて好ましい免疫賦活核酸は、少なくとも1つのCpGモチーフを含み、前記少なくとも1つのCpGモチーフは、少なくとも1つのCGジヌクレオチド、好ましくは1つのCGジヌクレオチドを含む、または好ましくはそれからなる（Cはメチル化されていない）。必須ではないが、好ましくは、前記CGジヌクレオチドは、回文配列の一部である。免疫賦活核酸という用語はまた、修飾塩基、好ましくは4-プロモシトシンを含む核酸を意味する。本発明において特に好ましいのは、樹状細胞中でIFN α 産生を刺激することができるISS-NAである。本発明の目的に有用な免疫賦活核酸は、例えば、国際公開第2007/068747A1号に記載されている。

【0062】

オリゴヌクレオチド：本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、2つ以上のヌクレオチド、好ましくは約6～約200ヌクレオチド、より好ましくは20～約100ヌクレオチド、および最も好ましくは20～40ヌクレオチドを含む核酸配列を意味する。極めて好ましくはオリゴヌクレオチドは約30ヌクレオチド、より好ましくは正確に30ヌクレオチドを含み、最も好ましくはオリゴヌクレオチドは正確に30ヌクレオチドからなる。オリゴヌクレオチドは、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドであり、好ましくは（a）非修飾RNAまたはDNA、および（b）修飾RNAまたはDNAから選択される。修飾は、主鎖またはヌクレオチド類似体を含めてよい。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、（a）一本鎖および二本鎖DNA、（b）一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、（c）一本鎖および二本鎖RNA、（d）一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、および（e）一本鎖または、より好ましくは二本鎖または一本鎖と二本鎖領域の混合物であるDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子、からなる群より選択される。好ましいヌクレオチド修飾体／類似体は、（a）ペプチド核酸、（b）イノシン、（c）トリチル化塩基、（d）ホスホロチオエート、（e）アルキルホスホロチオエート、（f）5-ニトロインドールデオキシリボフラノシル、（g）5-メチルデオキシシトシン、および（h）5,6-ジヒドロ-5,6-ジヒドロキシデオキシチミジン、からなる群より選択される。ホスホチオエート化ヌクレオチドは、細胞中または生物中での分解から保護されるため、好ましいヌクレオチド修飾である。リン酸ジエステル結合ヌクレオチドのみからなる非修飾オリゴヌクレオチドは通常、修飾ヌクレオチドより活性であり、したがって、本発明においては、一般に好ましい。最も好ましいのは、リン酸ジエステル結合デオキシヌクレオチドのみからなるオリゴヌクレオチドであり、さらに好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは一本鎖である。さらに、細胞中、好ましくは樹状細胞中でIFN α 産生を刺激することができるオリゴヌクレオチドが好ましい。細胞中でIFN α の産生を刺激することができる極めて好ましいオリゴヌクレオチドは、A型CpGおよびC型CpGから選択される。さらに好ましいのは、キャップを含まないRNA分子である。

【0063】

CpGモチーフ：本明細書で使用される場合、「CpGモチーフ」という用語は、非メチル化中心CpG、すなわち非メチル化CpGジヌクレオチドで、Cがメチル化されておらず、少なくとも1つの塩基、好ましくは1つまたは2つの、中心CpGに隣接する（中心CpGの3'および5'側に）ヌクレオチドを含むヌクレオチドのパターンを意味する。通常好ましくは、本明細書で使用される場合、CpGモチーフは、非メチル化メチル化CpGジヌクレオチドおよびその5'および3'末端に2つのヌクレオチドを含む、あるいはそれからなる。理論に束縛されるものではないが、CpGに隣接する塩基は、活性のかなりの部分をCpGオリゴヌクレオチドにもたらす。

10

20

30

40

50

【0064】

非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチド：本明細書で使用される場合、「非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチド」または「CpG」という用語は、少なくとも1つのCpGモチーフを含むオリゴヌクレオチド、好ましくはオリゴデオキシヌクレオチドを意味する。したがって、CpGは、少なくとも1つの非メチル化シトシン、グアニンジヌクレオチドを含む。好ましいCpGは、脊椎動物骨髄由来細胞を、刺激する/活性化する、例えば、その細胞に分裂促進的作用を及ぼす、またはそれによりサイトカイン発現を誘導するもしくは増加させる。例えば、CpGは、B細胞、NK細胞および樹状細胞、単球およびマクロファージなどの抗原提示細胞の活性化に有用となり得る。好ましくは、CpGは、非メチル化シトシン、その3'側に続けて、グアニシンを含むオリゴデオキシヌクレオチド、好ましくは一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドに関連し、前記非メチル化シトシンおよび前記グアニシンは、リン酸結合により結合され、好ましくは前記リン酸結合は、リン酸ジエステル結合またはホスホチオエート結合であり、さらに、好ましくは前記リン酸結合は、リン酸ジエステル結合である。CpGは、ホスホロチオエステル結合を含む類似体などのヌクレオチド類似体を含めることができ、二本鎖または一本鎖とすることができる。通常、二本鎖分子は、インピボでより安定であるが、一本鎖分子は高められた免疫活性を有する。本明細書で使用される場合、好ましくは、CpGは、少なくとも約10ヌクレオチドの長さで、少なくとも1つのCpGモチーフを含むオリゴヌクレオチドであり、さらに好ましくは前記CpGは、10~60、より好ましくは15~50、さらにより好ましくは20~40、さらにより好ましくは約30、および最も好ましくは正確に30ヌクレオチドの長さである。CpGはメチル化および/または非メチル化ヌクレオチドをからなるものでもよく、前記少なくとも1つのCpGモチーフは、少なくとも1つのCGジヌクレオチドを含み、Cはメチル化されていない。CpGはまた、メチル化および非メチル化配列を含んでよく、前記少なくとも1つのCpGモチーフは、少なくとも1つのCGジヌクレオチドを含み、Cはメチル化されていない。極めて好ましくは、CpGは、非メチル化シトシン、その3'側に続けて、グアニシンを含む一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドに関連し、前記非メチル化シトシンおよび前記グアニシンは、リン酸ジエステル結合により結合される。CpGには、ホスホロチオエステル結合を含む類似体などのヌクレオチド類似体を含めることができ、二本鎖または一本鎖とすることができる。一般に、リン酸ジエステルCpGは、下記に示すようなA型CpGであるが、ホスホチオエステル安定化CpGは、B型CpGである。本発明において好ましいCpGオリゴヌクレオチドは、A型CpGである。

【0065】

A型CpG：本明細書で使用される場合、「A型CpG」または「D型CpG」という用語は、少なくとも1つのCpGモチーフを含むオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)を意味する。A型CpGは、選択的にT細胞の活性化および樹状細胞の成熟化を刺激し、また、IFN α 産生を刺激することができる。A型CpGでは、少なくとも1つのCpGモチーフのヌクレオチドが少なくとも1つのリン酸ジエステル結合により結合される。A型CpGは、少なくとも1つのリン酸ジエステル結合CpGモチーフを含み、これは、ホスホロチオエート結合ヌクレオチドにより、その5'末端、および/または好ましくはその3'末端に隣接してよい。好ましくは、CpGモチーフ、およびそれによる、好ましくはCGジヌクレオチドおよびそのすぐ近くの少なくとも1つの、好ましくは2つのヌクレオチドを含むフランキング領域は、リン酸ジエステルヌクレオチドから構成される。好ましいA型CpGは、リン酸ジエステル(PO)結合ヌクレオチドのみからなる。通常好ましくは、ポリGモチーフは、少なくとも1個の、好ましくは少なくとも3個の、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のG(グアニシン)、最も好ましくは少なくとも10個のGを含む、あるいはそれらからなる。好ましくは、本発明のA型CpGは、回文配列を含む、あるいは回文配列からなる。

【0066】

ウイルス様粒子(VLP)：本明細書で使用される場合、ウイルス様粒子という用語は

10

20

30

40

50

、非複製性もしくは非感染性の、好ましくは非複製性かつ感染性ウイルス粒子を意味し、または非複製的または非感染性の、好ましくは非複製性かつ非感染性の、ウイルス粒子（好ましくはウイルスのカプシド）に類似している構造体を意味する。本明細書で使用される場合、「非複製性」という用語は、VLPにより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。本明細書で使用される場合、「非感染性」という用語は、宿主細胞に入ることができないことを意味する。本発明によるウイルス様粒子は、それがウイルスゲノムまたはゲノム機能の全部または一部を欠いているために、非複製性かつ非感染性である。本発明によるウイルス様粒子は、それらのゲノムとは別の核酸を含んでよい。組換えで産生されたウイルス様粒子は通常、宿主細胞由来RNAを含む。本発明におけるウイルス様粒子の典型的かつ好ましい実施形態は、本発明のポリペプチドから構成されるウイルスカプシドである。ウイルス様粒子は、典型的には、ウイルス様粒子当たり、60、120、180、240、300、360、または360個を超えるタンパク質サブユニットを含むウイルスコートタンパク質から構成される巨大分子集合体である。通常、好ましくは、これらのサブユニットの相互作用により、固有の反復組織を有するウイルスカプシドまたはウイルスカプシド様構造体が形成される。ウイルス様粒子の1つの特徴は、高度秩序化および反復配置のそのサブユニットである。2つ以上のポリペプチド種のウイルス様粒子は、多くの場合モザイクVLPと呼ばれるが、これも本発明に包含される。したがって、一実施形態では、本発明によるウイルス様粒子は、少なくとも2つの異なるポリペプチド種を含み、前記ポリペプチド種の少なくとも1つは、pan Th細胞エпитープを含むVLPポリペプチドである。

10

20

30

40

50

【0067】

パッケージ化：本明細書で使用される場合、「パッケージ化」という用語は、VLPとの関係における、ポリアニオン性高分子または免疫賦活物質の状態を意味する。本明細書で使用される場合、「パッケージ化」という用語は、共有結合、例えば、化学的カップリングによる、または非共有結合、例えば、イオン相互作用、疎水性相互作用、水素結合などによるものであってよい結合を含む。この用語はまた、ポリアニオン性高分子の封入、または部分的封入を含む。したがって、ポリアニオン性高分子または免疫賦活物質を、実際の結合、特に共有結合による結合を行うことなく、VLPにより封入することができる。好ましい実施態様では、少なくとも1つのポリアニオン性高分子または免疫賦活物質がVLP内に、最も好ましくは非共有結合方式で、パッケージ化される。前記免疫賦活物質が核酸、好ましくはDNAである場合には、パッケージ化という用語は、前記核酸がヌクレアーゼ加水分解にアクセスできない、好ましくはDNAアーゼ加水分解（例えば、DNAアーゼIまたはベンゾナーゼ）にアクセスできないことを意味し、好ましくは前記アクセシビリティは、国際公開第2003/024481A2号の実施例11～17に記載のようにしてアッセイされる。

【0068】

本発明は、植物ウイルスのキュウリモザイクウイルス（CMV）由来のウイルス様粒子、特にTh細胞エпитープ、特にユニバーサルTh細胞エпитープを含むCMV由来改変VLPを提供する。

【0069】

したがって、第1の態様では、本発明は、キュウリモザイクウイルス（CMV）由来の改変ウイルス様粒子（VLP）を提供し、前記CMVの改変VLPは、少なくとも1種の改変CMVポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、前記改変CMVポリペプチドは、（a）CMVポリペプチド、および（b）ヘルパーT細胞エпитープを含み、好ましくはそれらからなり；かつ前記CMVポリペプチドは、（i）CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列、または（ii）変異アミノ酸配列を含み、好ましくはそれからなり、変異を受けるアミノ酸配列は、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列および前記CMVのコートタンパク質は、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%およびまたより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示す。

【0070】

好ましい実施形態では、前記CMVポリペプチドは、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる。代替的实施形態では、前記CMVポリペプチドは、変異アミノ酸配列を含み、好ましくはそれからなり、変異を受けるアミノ酸配列は、CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記CMVのコートタンパク質は、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%およびまたより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示し、好ましくは前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも1個、最大で11、10、9、8、7、6、5、4、3、または2個のアミノ酸残基が異なり、さらに好ましくは、これらの差異は、(i)挿入、(ii)欠失、(iii)アミノ酸置換、および(iv)(i)~(iii)の任意の組み合わせ、から選択される。変異は、ウイルス様粒子の安定性および/またはカップリング効率などの特定の特徴を改変するために、変異を受けるアミノ酸配列中に導入してよい。システイン残基の導入は、サブユニット間で形成されるシステイン架橋の安定性を高め得る。また、VLPの表面へのリシンの導入は、カップリング効率を高め得る。

10

【0071】

別の好ましい実施形態では、前記CMVポリペプチドは、(i)(a)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号1を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または(b)少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、またさらに好ましくは少なくとも90%、またより好ましくは少なくとも95%、なおさらに好ましくは少なくとも98%およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも99%の配列番号1との配列同一性を有するアミノ酸配列；または(ii)変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列は、この請求項の(i)で定められた前記アミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも95%、好ましくは少なくとも98%、およびより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、もしくは好ましくはそれからなる。

20

【0072】

極めて好ましい実施形態では、前記CMVポリペプチドは、(a)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は配列番号1を含む、または好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または(b)少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、またさらに好ましくは少なくとも90%、またより好ましくは少なくとも95%、なおさらに好ましくは少なくとも98%およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも99%の配列番号1との配列同一性を有するアミノ酸配列、を含む、または好ましくはそれからなる。

30

【0073】

別の好ましい実施形態では、前記CMVポリペプチドは、(i)(a)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号21を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または(b)アミノ酸配列領域を含むCMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列領域は、少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、またさらに好ましくは少なくとも90%、またより好ましくは少なくとも95%、なおさらに好ましくは少なくとも98%およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも99%の配列番号21との配列同一性を有するアミノ酸配列；または(ii)変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列は、この請求項の(i)で定められた前記アミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも95%、好ましくは少なくとも98%、およびより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、もしくは好ましくはそれからなる。

40

【0074】

別の極めて好ましい実施形態では、前記CMVポリペプチドは、(a)CMVのコート

50

タンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列が、配列番号 21 を含むアミノ酸配列、または (b) アミノ酸配列領域を含む C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列領域が、少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 21 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、もしくは好ましくはそれからなる。

【0075】

また別の好ましい実施形態では、前記 C M V ポリペプチドは、(i) (a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号 1 を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) 少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、かつこの請求項の (a) もしくは (b) で定められた前記アミノ酸配列が、配列番号 21 を含み、またはこの請求項の (a) もしくは (b) で定められた前記アミノ酸は、アミノ酸配列領域を含み、前記アミノ酸配列領域は、少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 21 との配列同一性を有し；または (ii) 変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列はこの請求項の (i) で定められた前記アミノ酸配列であって、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも 98 %、好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、もしくは好ましくはそれからなる。

【0076】

また別の極めて好ましい実施形態では、前記 C M V ポリペプチドは、(a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号 1 を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) 少なくとも 90 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、かつこの請求項の (a) もしくは (b) で定められた前記アミノ酸配列は、配列番号 21 を含み、またはこの請求項の (a) もしくは (b) で定められた前記アミノ酸は、アミノ酸配列領域を含み、前記アミノ酸配列領域は、少なくとも 90 % の配列番号 21 との配列同一性を有する。

【0077】

通常好ましくは、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、(i) 前記 C M V ポリペプチドの N 末端に融合されるか、(ii) 前記 C M V ポリペプチドの C 末端に融合されるか、(iii) 前記 C M V ポリペプチドの連続アミノ酸の領域を置換し、この場合、前記 C M V ポリペプチドの前記連続アミノ酸の置換された領域と、ヘルパー T 細胞エピトープとの間の配列同一性は少なくとも 15 %、好ましくは少なくとも 20 % であるか、または (iv) 前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換し、前記 C M V ポリペプチドの前記置換された N 末端領域は、5 ~ 15 個の連続アミノ酸からなる。

【0078】

好ましい実施形態では、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換し、好ましくは、置換された前記 N 末端領域のアミノ酸の数は、前記ヘルパー T 細胞エピトープを構成するアミノ酸の数以下である。換言すれば、前記 C M V ポリペプチドの前記 N 末端領域は、アミノ酸の第 1 の数からなり、T h 細胞エピトープは第 2 の数のアミノ酸からなり、好ましい実施形態では、前記アミノ酸の第 1 の数は、アミノ酸の第 2 の数以下である。

【0079】

10

20

30

40

50

さらに好ましい実施形態では、前記 C M V ポリペプチドの前記置換された N 末端領域は、5 ~ 15 個の連続アミノ酸、好ましくは 9 ~ 14 個の連続アミノ酸、より好ましくは 11 ~ 13 個の連続アミノ酸からなる。極めて好ましい実施形態では、前記 C M V ポリペプチドの前記 N 末端領域は、配列番号 1 のアミノ酸 2 ~ 12 に相当する。

【0080】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記 C M V ポリペプチドは、(i)(a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号 1 を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) 少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列；または (ii) 変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列は、この請求項の (i) で定められた前記アミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも 95 %、好ましくは少なくとも 98 %、およびより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を示すアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換し、好ましくは前記置換された N 末端領域のアミノ酸の数は、前記ヘルパー T 細胞エピトープを構成するアミノ酸の数以下である。

10

【0081】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記 C M V ポリペプチドは、(i)(a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号 1 を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) 少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列；または (ii) 変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列は、この請求項の (i) で定められた前記アミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも 95 %、好ましくは少なくとも 98 %、およびより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を示すアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換し、前記 C M V ポリペプチドの前記置換された N 末端領域は、5 ~ 15 個の連続アミノ酸、好ましくは 9 ~ 14 個の連続アミノ酸、より好ましくは 11 ~ 13 個の連続アミノ酸からなる。

20

30

【0082】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記 C M V ポリペプチドは、(i)(a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号 1 を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) 少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列；または (ii) 変異アミノ酸配列であって、前記変異を受けるアミノ酸配列は、この請求項の (i) で定められた前記アミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列と、前記変異を受けるアミノ酸配列は、少なくとも 95 %、好ましくは少なくとも 98 %、およびより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を示すアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換し、前記 C M V ポリペプチドの前記 N 末端領域は、配列番号 1 のアミノ酸 2 ~ 12 に相当する。

40

【0083】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記 C M V ポリペプチドは、(a) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列が配列番号 1 を含む、ま

50

たは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) 少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列、を含み、または好ましくはそれからなり、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 CMV ポリペプチドの N 末端領域を置換し、好ましくは前記置換された N 末端領域のアミノ酸の数は、前記ヘルパー T 細胞エピトープを構成するアミノ酸の数以下である。

【0084】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記 CMV ポリペプチドは、(a) CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号 1 を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) 少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくはそれからなり、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 CMV ポリペプチドの N 末端領域を置換し、前記 CMV ポリペプチドの前記置換された N 末端領域は、5 ~ 15 個の連続アミノ酸、好ましくは 9 ~ 14 個の連続アミノ酸、より好ましくは 11 ~ 13 個の連続アミノ酸からなる。

10

【0085】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記 CMV ポリペプチドは、(a) CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号 1 を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) 少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくはそれからなり、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 CMV ポリペプチドの N 末端領域を置換し、前記 CMV ポリペプチドの前記 N 末端領域は、配列番号 1 のアミノ酸 2 ~ 12 に相当する。

20

【0086】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記 CMV ポリペプチドは、(a) CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列が配列番号 21 を含む、または好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または (b) アミノ酸配列領域を含む CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 %、なおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 21 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 CMV ポリペプチドの N 末端領域を置換し、好ましくは前記置換された N 末端領域のアミノ酸の数は、前記ヘルパー T 細胞エピトープを構成するアミノ酸の数以下である。

30

40

【0087】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記 CMV ポリペプチドは、(a) CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号 21 を含むアミノ酸配列、または (b) アミノ酸配列領域を含む CMV のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、またさらに好ましくは少なくとも 90 %、またより好ましくは少なくとも 95 %、なおさらに好ましくは少なくとも 98 % およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列番号 21 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくはそれからなり、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 CMV ポリペ

50

プチドのN末端領域を置換し、前記CMVポリペプチドの前記置換されたN末端領域は、5～15個の連続アミノ酸、好ましくは9～14個の連続アミノ酸、より好ましくは11～13個の連続アミノ酸からなる。

【0088】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記CMVポリペプチドは、(a)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号21を含むアミノ酸配列、または(b)アミノ酸配列領域を含むCMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、またさらに好ましくは少なくとも90%、またより好ましくは少なくとも95%、なおさらに好ましくは少なくとも98%およびなおまたさらにより好ましくは少なくとも99%の配列番号21との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくはそれからなり、前記ヘルパーT細胞エピトープは、前記CMVポリペプチドのN末端領域を置換し、前記CMVポリペプチドの前記N末端領域は、配列番号1のアミノ酸2～12に相当する。

【0089】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記CMVポリペプチドは、(a)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号1を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または(b)少なくとも90%の配列番号1との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、かつこの請求項の(a)もしくは(b)で定められた前記アミノ酸配列は、配列番号21を含み、またはこの請求項の(a)もしくは(b)で定められた前記アミノ酸は、アミノ酸配列領域を含み、前記アミノ酸配列領域は、少なくとも90%の配列番号21との配列同一性を有し、前記ヘルパーT細胞エピトープは、前記CMVポリペプチドのN末端領域を置換し、好ましくは前記置換されたN末端領域のアミノ酸の数は、前記ヘルパーT細胞を構成するアミノ酸の数以下である。

【0090】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記CMVポリペプチドは、(a)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号1を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または(b)少なくとも90%の配列番号1との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、かつこの請求項の(a)もしくは(b)で定められた前記アミノ酸配列は、配列番号21を含み、またはこの請求項の(a)もしくは(b)で定められた前記アミノ酸は、アミノ酸配列領域を含み、前記アミノ酸配列領域は、少なくとも90%の配列番号21との配列同一性を有し、前記ヘルパーT細胞エピトープは、前記CMVポリペプチドのN末端領域を置換し、前記CMVポリペプチドの前記置換されたN末端領域は、5～15個の連続アミノ酸、好ましくは9～14個の連続アミノ酸、より好ましくは11～13個の連続アミノ酸からなる。

【0091】

したがって、極めて好ましい実施形態では、前記CMVポリペプチドは、(a)CMVのコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号1を含む、もしくは好ましくはそれからなるアミノ酸配列、または(b)少なくとも90%の配列番号1との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、かつこの請求項の(a)もしくは(b)で定められた前記アミノ酸配列は、配列番号21を含み、またはこの請求項の(a)もしくは(b)で定められた前記アミノ酸は、アミノ酸配列領域を含み、前記アミノ酸配列領域は、少なくとも90%の配列番号21との配列同一性を有し、前記ヘルパーT細胞エピトープは、前記CMVポリペプチドのN末端領域を置換し、前記CMVポリペプチドの前記N末端領域は、配列番号1のアミノ酸2～12に相当する。

【0092】

極めて好ましくは、前記ヘルパーT細胞エピトープは、ユニバーサルヘルパーT細胞エ

10

20

30

40

50

ピトープであり、好ましくは、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、最大で 20 個のアミノ酸からなる。

【0093】

さらに好ましい実施形態では、前記 T h 細胞エピトープは、P A D R E 配列である。またさらに好ましい実施形態では、前記 T h 細胞エピトープは、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる。

【0094】

別の好ましい実施形態では、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、ヒトワクチン由来である。好ましくは前記 T h 細胞エピトープは、破傷風毒素由来である。また好ましくは、前記 T h 細胞エピトープは、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する、好ましくはそれからなる。

10

【0095】

本発明の極めて好ましい実施形態では、前記 C M V ポリペプチドは、C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列は、配列番号 1、または少なくとも 95 % の配列番号 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、もしくは好ましくはそれからなり、また、前記アミノ酸配列は、配列番号 21 を含み、前記ヘルパー T 細胞エピトープは、前記 C M V ポリペプチドの N 末端領域を置換し、前記 C M V ポリペプチドの前記置換された N 末端領域は、11 ~ 13 個の連続アミノ酸、好ましくは 11 個の連続アミノ酸からなり、さらに好ましくは前記 C M V ポリペプチドの前記 N 末端領域は、配列番号 1 のアミノ酸 2 ~ 12 に相当する。

20

【0096】

別の極めて好ましい実施形態では、前記改変 C M V ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる。さらに極めて好ましい実施形態では、前記改変 C M V ポリペプチドは、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる。

【0097】

本発明の V L P は、原核生物または真核生物の発現系で発現されてよい。好ましい系は、大腸菌、酵母、昆虫細胞ならびに哺乳動物細胞株である。極めて好ましい前記 C M V 由来の改変 V L P または前記 C M V 由来の V L P は、大腸菌中での前記改変 C M V ポリペプチドまたは前記 C M V ポリペプチドの発現により得られ、好ましくは前記発現は、10 ~ 25 の温度、好ましくは 20 の温度で行われる。上記で示したように、組換えにより产生されたポリペプチドは、N 末端メチオニン残基を含んでよい。したがって、一実施形態では、前記 C M V ポリペプチドまたは改変 C M V ポリペプチドは、N 末端メチオニン残基を含む。しかし、通常好ましくは、前記 N 末端メチオニン残基は、前記 C M V ポリペプチドまたは前記改変 C M V ポリペプチドから切断される。

30

【0098】

したがって、別の態様では、本発明は、キュウリモザイクウイルス (C M V) 由来のウイルス様粒子 (V L P) を提供し、前記 C M V 由来の V L P は、(i) C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列、または (i i) 変異アミノ酸配列を含むまたは好ましくはそれからなる、少なくとも 1 種の C M V ポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、変異を受けるアミノ酸配列は、C M V のコートタンパク質のアミノ酸配列であり、前記変異アミノ酸配列および前記 C M V のコートタンパク質は、少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、さらに好ましくは少なくとも 98 % およびまたより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を示し、前記 C M V 由来の V L P が前記 C M V ポリペプチドの大腸菌中での発現により得られ、好ましくは前記発現は、10 ~ 25 の温度、好ましくは 20 の温度で行われる。

40

【0099】

本発明は、前記本発明の V L P が、いずれか 1 つの本明細書に記載の技術的特徴を単独でまたはいずれかの可能な組み合わせで含む組成物を包含する。

【0100】

さらなる態様では、本発明は改変ウイルス様粒子を含む組成物を提供する。さらに、こ

50

これらの改変VLPは、前記改変VLPに結合した抗原に対する特定の抗体応答における免疫反応を引き起こすためのワクチンプラットホームとして機能するのが好ましい。Th細胞エピトープ、特にユニバーサルTh細胞エピトープの存在は、引き起こされる免疫反応のさらなる増加に繋がる。

【0101】

したがって、さらに好ましい実施形態では、前記組成物は、(a)少なくとも1つの本発明の改変ウイルス様粒子であって、少なくとも1つの第1結合部位を含む改変ウイルス様粒子；および(b)少なくとも1種の抗原であって、少なくとも1つの第2結合部位を含む抗原を含み、(a)および(b)は前記少なくとも1つの第1の結合部位および前記少なくとも1つの第2結合部位を介して結合される。前記改変ウイルス様粒子および前記抗原を前記第1および前記第2結合部位を介して結合する方法は、例えば、国際公開第2002/056905A2号および同第2004/084940A1号に記載されている。

10

【0102】

さらに好ましい実施形態では、前記第1結合部位は、少なくとも1つの共有結合を介して前記第2結合部位に結合される。さらに好ましい実施形態では、前記第1結合部位および前記第2結合部位は、少なくとも1つの共有結合性ペプチド結合を介して結合される。さらに好ましい実施形態では、前記共有結合は、非ペプチド結合である。したがって、また別の好ましい実施形態では、前記第1結合部位および前記第2結合部位は、少なくとも1つの共有結合性非ペプチド結合を介して結合される。さらに好ましい実施形態では、前記第1結合部位はアミノ基、好ましくはリシンのアミノ基である。

20

【0103】

改変ウイルス様粒子と抗原との間のジスルフィド結合を介した結合は、特にスルフヒドリル部分含有分子に対して不安定であり、さらに、血清中では、例えば、チオエーテル結合より安定性が低い(Martin F J, and Papahadjopoulos D, (1982) J. Biol. Chem. 257: 286 - 288)。したがって、さらに極めて好ましい本発明の実施形態では、改変VLPと少なくとも1種の抗原との会合または結合は、ジスルフィド結合を含まない。これによりさらに好ましくは、少なくとも1つの第2の結合は、スルフヒドリル基を含む、または好ましくはスルフヒドリル基である。さらに、改変VLPと少なくとも1種の抗原との会合または結合は、好ましくは、硫黄-硫黄結合を含まない。これによりさらに好ましくは、少なくとも1つの第2の結合は、スルフヒドリル基を含む、または好ましくはスルフヒドリル基である。さらに極めて好ましい実施形態では、前記少なくとも1つの第1結合部位は、スルフヒドリル基ではないか、またはスルフヒドリル基を含まない。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記少なくとも1つの第1結合部位は、システインのスルフヒドリル基でないか、システインのスルフヒドリル基を含まない。さらに好ましい実施形態では、前記第2結合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。

30

【0104】

極めて好ましい実施形態では、少なくとも1つの第1結合部位は、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1つの第2結合部位は、スルフヒドリル基、好ましくはシステイン残基のスルフヒドリル基であるか、または抗原に化学的に結合したスルフヒドリル基である。さらに好ましい実施形態では、前記第2結合部位の内の1個のみが非ペプチド共有結合を介して前記第1結合部位に会合し、前記抗原の前記改変ウイルス様粒子への単一で均一なタイプの結合をもたらし、前記第1結合部位と会合する前記1個のみの第2結合部位が、スルフヒドリル基であり、前記抗原と前記改変ウイルス様粒子が、前記会合を介して相互作用し、秩序化および反復抗原配列を形成する。

40

【0105】

本発明の好ましい一実施形態では、抗原は、通常好ましくは、ヘテロ二機能性架橋剤を使って化学架橋により改変VLPに結合される。好ましい実施形態では、ヘテロ二機能性架橋剤は、好ましい第1結合部位、好ましくはアミノ基、より好ましくは改変VLPのR

50

ジン残基（単一または複数）のアミノ基と反応できる官能基、ならびに好ましい第2結合部位、すなわち、スルフヒドリル基、好ましくは抗原固有のまたは抗原に人為的に付加され、さらに必要に応じて還元による反応に利用可能にされたシステイン（単一または複数）残基のスルフヒドリル基と反応できるさらなる官能基を含む。ヘテロ二機能性架橋剤は当該技術分野で既知である。これらには、好ましい架橋剤のSMPH（Pierce）、Sulfo-MBS、Sulfo-EMCS、Sulfo-GMBS、Sulfo-SIAB、Sulfo-SMPB、Sulfo-SMCC、Sulfo-KMUS、SVSB、SIA、およびその他の例えば、Pierce Chemical Companyから市販されている架橋剤、ならびにアミノ基に対して反応性の1つの官能基およびスルフヒドリル基に対して反応性の1つの官能基を有する架橋剤が挙げられる。上述の架橋剤は全て、アミノ基と反応後にアミド結合を形成し、スルフヒドリル基と反応後にチオエーテル結合を形成する。本発明の実施に好適な別のクラスの架橋剤は、カップリング時に抗原と改変VLPとの間にジスルフィド結合を導入することの特徴とする。このクラスに属する好ましい架橋剤には、例えば、SPDPおよびSulfo-LC-SPDP（Pierce）が挙げられる。

10

【0106】

上記の好ましい方法によるヘテロ二機能性架橋剤を使った抗原の改変VLPへの結合により、抗原の改変VLPへの優先的カップリングが可能となる。抗原を改変VLPに結合する他の方法には、カルボジイミドEDC、およびNHSを使って、抗原が改変VLPに架橋される方法が挙げられる。抗原はまた、例えば、SATA、SATPまたはイミノチオランとの反応を介して、最初にチオール化してもよい。必要に応じ脱保護後に、抗原と改変VLPとを次のように結合してもよい。過剰チオール化試薬の分離後、抗原を改変VLPと反応させる。この改変VLPは、システイン反応性部分を含むヘテロ二機能性架橋剤であらかじめ活性化されており、したがって、システイン残基と反応する少なくとも1つのまたはいくつかの官能基を提示しており、これに対し、上記のようなチオール化抗原が反応できる。必要に応じて、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、グルタルアルデヒド、DSG、BM[PEO]4、BS3、（Pierce）または改変VLPのアミン基もしくはカルボキシル基と反応する官能基を有する既知のホモ二官能性架橋剤などのホモ二官能性架橋剤を使って、抗原が改変VLPに結合される。

20

【0107】

本発明の極めて好ましい実施形態では、抗原は、N末端またはC末端に付加されているシステイン残基、または抗原内の天然システイン残基を介して、改変ウイルス様粒子のリジン残基に結合される。好ましい実施形態では、本発明の組成物は、リンカーをさらに含み、前記リンカーは、前記第2結合部位を有する前記抗原と会合し、好ましくは前記リンカーは前記第2結合部位を含むか、あるいはそれからなる。

30

【0108】

第2結合部位の抗原上への導入は、リンカー、好ましくは、本発明の開示に従って第2結合部位として好適な少なくとも1つのアミノ酸を含むリンカーの会合により実現される。したがって、本発明の好ましい実施形態では、リンカーが、少なくとも1つの共有結合、好ましくは、少なくとも1つの、好ましくは1つの、ペプチド結合により抗原に会合される。好ましくは、リンカーは、第2結合部位を含む、あるいはそれからなる。さらに好ましい実施形態では、リンカーは、スルフヒドリル基、好ましくはシステイン残基のスルフヒドリル基を含む。別の好ましい実施形態では、アミノ酸リンカーはシステイン残基である。

40

【0109】

リンカーの選択は、抗原の性質、等電点、電荷分布およびグリコシル化などのその生化学的特性に依存するであろう。一般に、フレキシブルなアミノ酸リンカーが好ましい。本発明のさらに好ましい実施形態では、リンカーはアミノ酸からなり、さらに好ましくは、リンカーは少なくとも1個および最大で25個の、好ましくは最大で20個、より好ましくは最大で15個のアミノ酸からなる。本発明のまた好ましい実施形態では、アミノ酸リ

50

ンカーは 1 ~ 10 個のアミノ酸を含む。さらに好ましい実施形態では、前記リンカーは、前記第 2 結合部位を含む、あるいはそれからなる。

【0110】

さらに好ましい実施形態では、前記リンカーはアミノ酸リンカーであり、好ましくは前記アミノ酸リンカーは、(a) C G G ; (b) N 末端 γ 1 - リンカー ; (c) N 末端 γ 3 - リンカー ; (d) I g ヒンジ部 ; (e) N 末端グリシンリンカー ; (f) (G) k C (G) n (n = 0 ~ 12 および k = 0 ~ 5) ; (g) N 末端グリシン - セリンリンカー ; (h) (G) k C (G) m (S) l (G G G G S) n (n = 0 ~ 3, n = 0 ~ 3, k = 0 ~ 5, m = 0 ~ 10, l = 0 ~ 2) ; (i) G G C ; (j) G G C - N H 2 ; (k) C 末端 γ 1 - リンカー ; (l) C 末端 γ 3 - リンカー ; (m) C 末端グリシンリンカー ; (n) (G) n C D (G) k (n = 0 ~ 12 および k = 0 ~ 2) ; (o) C 末端グリシン - セリンリンカー ; (p) (G) m (S) l (G G G G S) n (G) o C (G) k (n = 0 ~ 3, k = 0 ~ 5, m = 0 ~ 10, l = 0 ~ 2, および o = 0 ~ 8) からなる群から選択される。一般に、グリシン残基は、カップリング反応におけるより嵩高いアミノ酸の立体障害の可能性を回避するために、嵩高いアミノ酸と、第 2 結合部位として使用されるシステインとの間に挿入されることになる。

10

【0111】

さらに好ましい実施形態では、リンカーは抗原の N 末端に付加される。本発明の別の好ましい実施形態では、リンカーは抗原の C 末端に付加される。本発明のその他の実施形態では、組成物は、化学的相互作用を介して、抗原に結合したウイルス様粒子を含むか、あるいはそれから本質的になり、これらの相互作用の少なくとも 1 つは、共有結合ではない。改変 V L P の抗原への結合は、改変 V L P をビオチン化し、抗原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ことにより行うことができる。本発明のその他の実施形態では、リシンへの化学的カップリングに使用されるスルフヒドリル基は、化学的修飾により改変 V L P または抗原に結合される。

20

【0112】

さらに好ましい実施形態では、前記組成物は、少なくとも 1 つの免疫賦活物質をさらに含む。極めて好ましい実施形態では、前記免疫賦活物質は本発明の改変 V L P 中にパッケージングされる。別の好ましい実施形態では、免疫賦活物質は本発明の改変 V L P と混合される。本発明に有益な免疫賦活物質は通常、当該技術分野において既知であり、特に国際公開第 2003/024481A2 号で開示されている。

30

【0113】

本発明の別の実施形態では、前記免疫賦活物質は、非真核生物起源の DNA または RNA からなる。さらに好ましい実施形態では、前記免疫賦活物質は、(a) 免疫賦活核酸 ; (b) ペプチドグリカン ; (c) リポ多糖類 ; (d) リポテイコ酸 ; (e) イミダゾキノリン配合物 ; (f) フラゲリン ; (g) リボタンパク質 ; および (h) (a) ~ (g) の内の少なくとも 1 つの物質の任意の混合物、からなる群から選択される。さらに好ましい実施形態では、前記免疫賦活物質は、免疫賦活核酸であり、前記免疫賦活核酸は、(a) リボ核酸 ; (b) デオキシリボ核酸 ; (c) キメラ核酸 ; および (d) (a) 、(b) および / または (c) の任意の混合物、からなる群から選択される。さらに好ましい実施形態では、前記免疫賦活核酸は、リボ核酸であり、前記リボ核酸は RNA 由来細菌である。さらに好ましい実施形態では、前記免疫賦活核酸は、ポリ - (L C) またはその誘導体である。さらに好ましい実施形態では、前記免疫賦活核酸は、デオキシリボ核酸であり、前記デオキシリボ核酸は非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドである。

40

【0114】

極めて好ましい実施形態では、前記免疫賦活物質は非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドである。さらに好ましい実施形態では、前記非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドは、A 型 C p G である。さらに好ましい実施形態では、前記 A 型 C p G は、配列 G A C G A T C G T C (配列番号 31) を含む。さらに好ましい実施形態では、前記回文配列は、グアノシン実体により、その 5' - 末端およびその 3' - 末端に隣接される。さらに

50

好ましい実施形態では、前記回文配列は、少なくとも3個、最大で15個のグアノシン実体により、その5' - 末端に隣接され、前記回文配列は、少なくとも3個、最大で15個のグアノシン実体により、その3' - 末端に隣接される。

【0115】

別の好ましい実施形態では、前記免疫賦活物質は非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドであり、好ましくは、前記非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドは回文配列を含み、さらに好ましくは、前記非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドのCpGモチーフは回文配列の一部であり、またさらに好ましくは、前記回文配列はGACGATCGTC(配列番号31)である。

【0116】

さらに好ましい実施形態では、前記免疫賦活核酸は、GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG(配列番号36)からなる非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドであり、前記非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドは、リン酸ジエステル結合ヌクレオチドのみからなる。

【0117】

本発明の目的に有用な抗原は、例えば、国際公開第2002/056905A2号、同第2004/007538A2号、同第2006/037787A2号、同第2004/084940A1号、および同第2006/032674A1号に開示されている。一実施形態では、前記抗原は、(a)ウイルス；(b)細菌；(c)寄生生物；(d)腫瘍；(e)自己分子；(f)非ペプチドハプテン分子；(g)アレルゲン；(h)ホルモン；(i)サイトカイン；(k)ケモカイン；(l)生物学的に活性なペプチド、からなる群より選択される入手源から得られる。別の好ましい実施形態では、前記抗原は、腫瘍抗原、自己抗原、病原体のポリペプチド、アレルゲンまたはハプテンである。さらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)である。

【0118】

さらに好ましい実施形態では、前記抗原は腫瘍抗原であり、好ましくは前記腫瘍抗原は、(a)乳癌細胞のポリペプチド；(b)腎臓癌のポリペプチド；(c)前立腺癌細胞のポリペプチド；(d)皮膚癌細胞のポリペプチド；(e)脳癌細胞のポリペプチド；および(f)白血病細胞のポリペプチド、からなる群から選択される。

【0119】

さらに好ましい実施形態では、前記抗原は、(a)Her2；(b)ガングリオシドGD2；(c)EGF-R；(d)癌胎児抗原(CEA)；(e)CD52；(f)CD21；(g)ヒト黒色腫gp100；(h)ヒト黒色腫melanA/MART-1；(i)ヒト黒色腫melanA/MART-1類似体；(j)チロシナーゼ；(k)NA17-Ant；(l)MAGE3；(m)p53タンパク質；および(n)(a)~(m)のいずれかの腫瘍抗原の抗原フラグメント、からなる群より選択される腫瘍抗原である。

【0120】

さらに好ましい実施形態では、前記抗原は、次記からなる群より選択されるポリペプチドである。(a)IGE；(b)IL-6；(c)核内因子kB配位子の受容体活性化因子(RANKL)；(d)血管内皮細胞増殖因子(VEGF)；(e)血管内皮細胞増殖因子レセプター(VEGF-R)；肝細胞増殖因子(HGF)；(f)インターロイキン-1 α ；(g)インターロイキン-1 β ；(h)インターロイキン-5；(i)インターロイキン-8；(j)インターロイキン-13；(k)インターロイキン-15；(l)インターロイキン-17(IL-17)；(m)IL-23；(n)グレリン；(o)アンギオテンシン；(p)ケモカイン(C-Cモチーフ)(CCL21)；(q)ケモカイン(C-Xモチーフ)(CXCL12)；(r)間質細胞由来因子1(SDF-1)；(s)マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)；(t)単球走化性タンパク質1(MCP-1)；(u)エンドグリン；(v)レジスチン；(w)ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)；(x)成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)；(y)黄体ホルモン放

10

20

30

40

50

出ホルモン (LHRH) ; (z) サイレオトロピン放出ホルモン (TRH) ; (aa) マクロファージ移動阻害性因子 (MIF) ; (bb) ブドウ糖依存性インシュリン分泌ペプチド (GIP) ; (cc) エオタキシン ; (dd) ブラジキニン ; (ee) Des - Arg ブラジキニン ; (ff) B - リンパ球化学誘引物質 (BLC) ; (gg) マクロファージコロニー刺激因子 M - CSF ; (hh) 腫瘍壊死因子 α (TNF α) ; (ii) アミロイドベータペプチド (AB1 - 42) ; (jj) アミロイドペプチド (AB1 - 6) ; (kk) ヒト IgE ; (ll) CCR5 細胞外ドメイン ; (mm) CXCR4 細胞外ドメイン ; (nn) ガストリン ; (oo) CETP ; (pp) C5a ; (qq) 上皮成長因子受容体 (EGF - R) ; (rr) CGRP ; (ss) α - シヌクレイン ; (tt) カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) ; (uu) アミリンまたは (vv) ポリペプチド (a) ~ (uu) のいずれかのフラグメント ; および (xx) ポリペプチド (a) ~ (uu) のいずれか 1 つの抗原変異体またはフラグメント。

10

【0121】

さらに好ましい実施形態では、前記抗原は、自己抗原であり、前記自己抗原は、次記からなる群より選択されるポリペプチドである。(a) IgE ; (b) IL - 6 ; (c) 核内因子 kB 配位子の受容体活性化因子 (RANKL) ; (d) 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) ; (e) 血管内皮細胞増殖因子レセプター (VEGF - R) ; 肝細胞増殖因子 (HGF) (f) インターロイキン - 1 α ; (g) インターロイキン - 1 β ; (h) インターロイキン - 5 ; (i) インターロイキン - 8 ; (j) インターロイキン - 13 ; (k) インターロイキン - 15 ; (l) インターロイキン - 17 (IL - 17) ; (m) IL - 23 ; (n) グレリン ; (o) アンジオテンシン ; (p) ケモカイン (C - Cモチーフ) (CCL21) ; (q) ケモカイン (C - Xモチーフ) (CXCL12) ; (r) 間質細胞由来因子 1 (SDF - 1) ; (s) マクロファージコロニー刺激因子 (M - CSF) ; (t) 単球走化性タンパク質 1 (MCP - I) ; (u) エンドグリン ; (v) レジスチン ; (w) ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) ; (x) 成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) ; (y) 黄体ホルモン放出ホルモン (LHRH) ; (z) サイレオトロピン放出ホルモン (TRH) ; (aa) マクロファージ移動阻害性因子 (MIF) ; (bb) ブドウ糖依存性インシュリン分泌ペプチド (GIP) ; (cc) エオタキシン ; (dd) ブラジキニン ; (ee) Des - Arg ブラジキニン ; (ff) B - リンパ球化学誘引物質 (BLC) ; (gg) マクロファージコロニー刺激因子 M - CSF ; (hh) 腫瘍壊死因子 α (TNF α) ; (ii) アミロイドベータペプチド (AB1 - 42) ; (jj) アミロイドペプチド (AB1 - 6) ; (kk) ヒト IgE ; (ll) CCR5 細胞外ドメイン ; (mm) CXCR4 細胞外ドメイン ; (nn) ガストリン ; (oo) CETP ; (pp) C5a ; (qq) 上皮成長因子受容体 (EGF - R) ; (rr) CGRP ; (ss) α - シヌクレイン ; (tt) カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) ; (uu) アミリンまたは (vv) ポリペプチド (a) ~ (uu) のいずれかのフラグメント ; および (xx) ポリペプチド (a) ~ (uu) のいずれか 1 つの抗原変異体またはフラグメント。

20

30

【0122】

極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、インターロイキン 17 (IL - 17) である。インターロイキン 17 は、広範囲の細胞型で炎症性メディエータの放出を誘発する T 細胞由来サイトカインである。異常 Th 17 応答および IL - 17 の過剰発現は、関節リウマチおよび多発性硬化症を含む多くの自己免疫障害に結びつけられてきた。IL - 17 を遮断する IL - 17 特異的モノクローナル抗体などの分子は、動物モデルで、疾患を回復させるのに効果的であることがわかった。さらに、最近、組換え型 IL - 17 コンジュゲートウイルス様粒子を使った IL - 17 を標的とする能動免疫獲得が提唱されている (Rohn TA, et al., Eur J Immunol (2006) 36: 1 - 11)。IL - 17 - VLP による免疫化は、高レベルの抗 IL - 17 抗体を誘導し、それにより、アジュバントの添加がない場合でも、天然の抵抗性を克服した。IL - 17 - VLP で免疫されたマウスは、コラーゲン誘発関節炎および実験的自己免疫性脳脊髄炎の両方で、より低い疾患発生率、疾患へのより遅い進行および低い疾患重症度スコアを示した

40

50

。

【 0 1 2 3 】

したがって、さらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号 4 2 を含む、または好ましくはそれからなる。さらに、改変 V L P を含む本発明の組成物は、動物またはヒトの炎症性疾患、好ましくは慢性炎症性疾患の処置方法に使用される。好ましくは、前記炎症性疾患は、R A、M S、乾癬、喘息、クローン病、大腸炎、C O P D、糖尿病、神経皮膚炎（アレルギー性皮膚炎）から選択され、また好ましくは前記炎症性疾患は M S である。さらに好ましくは、前記本発明の組成物の前記抗原は、配列番号 4 2 を含む、または好ましくはそれからなる。

【 0 1 2 4 】

別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、I L - 5 である。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号 4 1 を含む、または好ましくはそれからなる。さらに、改変 V L P を含む本発明の組成物は、動物またはヒトの炎症性疾患、好ましくは慢性炎症性疾患の処置方法に使用される。好ましくは、前記炎症性疾患は、R A、M S、乾癬、喘息、クローン病、大腸炎、C O P D、糖尿病、神経皮膚炎（アレルギー性皮膚炎）から選択される。さらに好ましくは、前記本発明の組成物の前記抗原は、配列番号 4 1 を含む、または好ましくはそれからなる。

【 0 1 2 5 】

別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、イヌの I L - 5 である。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号 6 1 または少なくとも 9 0 %、好ましくは少なくとも 9 5 % の配列番号 6 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または好ましくはそれからなる。好ましくは、前記抗原は、配列番号 6 1 を含む、または好ましくはそれからなる。別の好ましい実施形態では、前記本発明の組成物の前記抗原は、配列番号 6 1 を含む、または好ましくはそれからなる。さらに好ましくは、本発明の組成物は、(i) キュウリモザイクウイルス (C M V) 由来の、少なくとも 1 つの第 1 結合部位を有する改変ウイルス様粒子 (V L P) であって、前記 C M V 由来の改変 V L P は、少なくとも 1 種の改変 C M V ポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、前記改変 C M V ポリペプチドは、(a) C M V ポリペプチド、および (b) ヘルパー T 細胞エпитープを含み、好ましくはそれらからなり；かつ前記改変 C M V ポリペプチドは、配列番号 6 または配列番号 7 を含む、好ましくはそれからなる、改変ウイルス様粒子 (V L P) と、(i i) 少なくとも 1 つの第 2 結合部位を有する少なくとも 1 つの抗原であって、前記抗原はイヌ I L - 5 であり；前記 C M V 由来の V L P および前記イヌ I L - 5 は、前記少なくとも 1 つの第 1 結合部位および前記少なくとも 1 つの第 2 結合部位を介して結合され、前記イヌ I L - 5 は、配列番号 6 1 または少なくとも 9 0 %、好ましくは少なくとも 9 5 % の配列番号 6 1 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、または好ましくはそれからなり、また好ましくは前記イヌ I L - 5 は、配列番号 6 1 を含む、または好ましくはそれからなる抗原、とを含む。

【 0 1 2 6 】

別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、I L - 4 である。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号 4 5 を含む、または好ましくはそれからなる。

【 0 1 2 7 】

別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、イヌの I L - 4 である。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号 6 2 または少なくとも 9 0 %、好ましくは少なくとも 9 5 % の配列番号 6 2 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または好ましくはそれからなる。好ましくは、前記抗原は、配列番号 6 2 を含む、または好ましくはそれからなる。別の好ましい実施形態では、前記本発明の組成物の前記抗原は、配列番号 6 2 を含む、または好ましくはそれからなる。さらに好ましくは、本発明の組成物は、(i) キュウリモザイクウイルス (C M V) 由来の、少なくとも 1 つの第 1 結合部位を有する改変ウイルス様粒子 (V L P) であって、前記 C M V 由来の改変 V L P は、少な

くとも1種の改変CMVポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、前記改変CMVポリペプチドは、(a)CMVポリペプチド、および(b)ヘルパーT細胞エпитープを含み、好ましくはそれらからなり；かつ前記改変CMVポリペプチドは、配列番号6または配列番号7を含む、好ましくはそれからなる、改変ウイルス様粒子(VLP)と、(ii)少なくとも1つの第2結合部位を有する少なくとも1つの抗原であって、前記抗原はイヌIL-4であり；前記CMV由来のVLPおよび前記イヌIL-4は、前記少なくとも1つの第1結合部位および前記少なくとも1つの第2結合部位を介して結合され、前記イヌIL-4は、配列番号62または少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列番号62との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、または好ましくはそれからなり、また好ましくは前記イヌIL-4は、配列番号62を含む、または好ましくはそれからなる抗原と、を含む。

10

【0128】

別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、IL-13である。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号46を含む、または好ましくはそれからなる。

【0129】

別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、イヌのIL-13である。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号63または少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列番号63との配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または好ましくはそれからなる。好ましくは、前記抗原は、配列番号63を含む、または好ましくはそれからなる。別の好ましい実施形態では、前記本発明の組成物の前記抗原は、配列番号63を含む、または好ましくはそれからなる。さらに好ましくは、本発明の組成物は、(i)キュウリモザイクウイルス(CMV)由来の、少なくとも1つの第1結合部位を有する改変ウイルス様粒子(VLP)であって、前記CMV由来の改変VLPは、少なくとも1種の改変CMVポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、前記改変CMVポリペプチドは、(a)CMVポリペプチド、および(b)ヘルパーT細胞エпитープを含み、好ましくはそれらからなり；かつ前記改変CMVポリペプチドは、配列番号6または配列番号7を含む、好ましくはそれからなる、改変ウイルス様粒子(VLP)と、(ii)少なくとも1つの第2結合部位を有する少なくとも1つの抗原であって、前記抗原はイヌIL-13であり；前記CMV由来のVLPおよび前記イヌIL-13は、前記少なくとも1つの第1結合部位および前記少なくとも1つの第2結合部位を介して結合され、前記イヌIL-13は、配列番号63または少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列番号63との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、または好ましくはそれからなり、また好ましくは前記イヌIL-13は、配列番号63を含む、または好ましくはそれからなる抗原、とを含む。

20

30

【0130】

さらなる極めて好ましい実施形態では、前記抗原はTNF α である。さらなる極めて好ましい実施形態では、前記抗原はIL-1 α である。

【0131】

またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、IL-1 β である。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号60を含む、または好ましくはそれからなる。

40

【0132】

またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、A β -1-42に由来のペプチドである。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、IgEまたはIgEに含まれるペプチドまたはドメインである。

【0133】

さらに別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、ヒト、ネコまたはイヌのIL-31である。別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号43または配列番号44を含む、または好ましくはそれからなる。別の極めて好ましい実施形態では、前記

50

抗原は、イヌの I L - 3 1 である。またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号 4 3 または少なくとも 9 0 %、好ましくは少なくとも 9 5 % の配列番号 4 3 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または好ましくはそれからなる。好ましくは、前記抗原は、配列番号 4 3 を含む、または好ましくはそれからなる。別の好ましい実施形態では、前記本発明の組成物の前記抗原は、配列番号 4 3 を含む、または好ましくはそれからなる。さらに好ましくは、本発明の組成物は、(i) キュウリモザイクウイルス (C M V) 由来の、少なくとも 1 つの第 1 結合部位を有する改変ウイルス様粒子 (V L P) であって、前記 C M V 由来の改変 V L P は、少なくとも 1 種の改変 C M V ポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、前記改変 C M V ポリペプチドは、(a) C M V ポリペプチド、および (b) ヘルパー T 細胞エпитープを含み、好ましくはそれらからなり；かつ前記改変 C M V ポリペプチドは、配列番号 6 または配列番号 7 を含む、好ましくはそれからなる、改変ウイルス様粒子 (V L P) と、(i i) 少なくとも 1 つの第 2 結合部位を有する少なくとも 1 つの抗原であって、前記抗原はイヌ I L - 3 1 であり；前記 C M V 由来の V L P および前記イヌ I L - 3 1 は、前記少なくとも 1 つの第 1 結合部位および前記少なくとも 1 つの第 2 結合部位を介して結合され、前記イヌ I L - 3 1 は、配列番号 4 3 または少なくとも 9 0 %、好ましくは少なくとも 9 5 % の配列番号 4 3 との配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、または好ましくはそれからなり、また好ましくは前記イヌ I L - 3 1 は、配列番号 4 3 を含む、または好ましくはそれからなる抗原、とを含む。

10

20

【 0 1 3 4 】

別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、 α - シヌクレインまたは α - シヌクレインに由来するペプチドであり、好ましくは前記ペプチドは、6 ~ 1 4 アミノ酸からなり、さらに好ましくは前記抗原は、配列番号 3 2、配列番号 3 3 および配列番号 3 4 のいずれか 1 つから選択される、 α - シヌクレインに由来するペプチドである。 α - シヌクレインに由来するさらに好ましいペプチドは、国際公開第 2 0 1 1 / 0 2 0 1 3 3 号に開示されている。この特許は参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 3 5 】

複数の生理学的小さいタンパク質である、 α - シヌクレイン (α - S y n) は、パーキンソン病 (P D) を含むレビー小体病の病理学的に顕著な特徴であるレビー小体で見出された主要タンパク質の 1 つである。さらに最近、 α - S y n は、血液および脳脊髄液を含む体液中に発見され、末梢組織および中枢神経系の両方により産生されている可能性がある。脳と末梢組織との間の α - S y n の置換は、重要な病態生理学的小さいおよび治療的な意味を有するであろう (G a r d a i S J e t a l . , P L o S O N E (2 0 1 3) 8 (8) : e 7 1 6 3 4) 。パーキンソン病 (P D) の病態形成において、 α - シヌクレイン (α - s y n) を関係づける証拠は、決定的である。しかし、 α - s y n が、P D および他のシヌクレイン病における病状に至る過程に関しては、明確な一致は得られていない。

30

【 0 1 3 6 】

α - シヌクレインは、レビー小体 (L B) の主要な成分であり、 α - s y n 過剰発現が凝集に繋がるという説明は多く存在する。ヒトの遺伝的データは、ミスセンス変異および α - s y n 遺伝子の多重化が家族性 P D を引き起こすことを示している。遺伝子多重化の場合には、 α - s y n タンパク質のレベルの増加により、病状に繋がる優性機能獲得を生じると推定される。 α - s y n の増加したレベルは、凝集および毒性に繋がり得るが、過去数年にわたる研究はまた、上昇した α - s y n は、小胞プールの生成、局在化、および / または維持と干渉する場合があることを明らかにした (G a r d a i S J e t a l . , P L o S O N E (2 0 1 3) 8 (8) : e 7 1 6 3 4 ; およびそこに引用された文献) 。

40

【 0 1 3 7 】

またさらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、アミリンである。極めて好ましい実施形態では、前記抗原はアンギオテンシン I またはアンギオテンシン I 由来のペプチ

50

ドである。別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原はアンギオテンシンⅠⅠまたはアンギオテンシンⅠⅠ由来のペプチドである。さらなる極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、GnRHである。さらなる極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、エオタキシンである。

【0138】

さらに好ましい実施形態では、前記抗原は寄生生物のポリペプチドであり、好ましくは前記病原体は、(a)トキソプラズマ属菌種；(b)熱帯熱マラリア原虫；(c)三日熱マラリア原虫；(d)卵形マラリア原虫；(e)四日熱マラリア原虫；(f)リーシュマニア；(g)住血吸虫および(h)線虫、からなる群から選択される。好ましくは前記抗原は、熱帯熱マラリア原虫または三日熱マラリア原虫由来である。

10

【0139】

さらに好ましい実施形態では、前記抗原は細菌のポリペプチドであり、好ましくは前記細菌は、(a)クラミジア；(b)連鎖球菌；(c)肺炎球菌；(d)ブドウ球菌；(e)サルモネラ；(f)マイコバクテリア；(g)クロストリジウム；(h)ピブリオ；(i)エルシニア；(k)髄膜炎菌；(l)ボレリア、からなる群から選択される。

【0140】

さらに好ましい実施形態では、前記抗原は、ウイルス抗原であり、好ましくは前記ウイルス抗原は、(a)HIVおよびその他のレトロウイルス；(b)インフルエンザウイルス、好ましくはインフルエンザA M2細胞外ドメインまたはHAもしくはHA球状ドメイン；(c)B型肝炎ウイルスのポリペプチド、好ましくはpreS1；(d)C型肝炎ウイルス；(e)HPV、好ましくはHPV16E7；(f)RSV；(g)SARSおよびその他のコロナウイルス；(h)デング熱およびアルファウイルス、例えば、ウエストナイルウイルスおよび手足口病ウイルス；(i)チクングンヤ熱およびその他のアルファウイルス；(k)CMVおよびその他のヘルペスウイルス；(l)ロタウイルス、からなる群より選択されるポリペプチドである。さらなる極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、RSV由来である。

20

【0141】

好ましい実施形態では、前記抗原は、インフルエンザAウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインまたはその抗原性フラグメントである。極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、インフルエンザAウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインを含む、または好ましくはそれからなり、好ましくはインフルエンザAウイルスM2タンパク質の前記細胞外ドメインは、配列番号24である。別の好ましい実施形態では、前記抗原は、インフルエンザウイルスの球状ドメインである。

30

【0142】

さらに好ましい実施形態では、前記抗原はアレルゲンであり、好ましくは前記アレルゲンは、(a)花粉エキス；(b)ダスト抽出物；(c)チリダニ抽出物；(d)真菌抽出物；(e)哺乳動物表皮抽出物；(f)羽毛抽出物；(g)昆虫抽出物；(h)食物抽出物；(i)毛髪抽出物；(j)唾液抽出物；(k)血清抽出物、からなる群から誘導される。さらに好ましい実施形態では、前記抗原はアレルゲンであり、前記アレルゲンは、(a)木；(b)草；(c)ハウスダスト；(d)チリダニ；(e)アスペルギルス；(f)動物の毛；(g)動物の羽毛；(h)ハチ毒；(i)畜産物；(j)植物性産物；(k)動物の鱗屑；(l)ピーナッツアレルゲン、からなる群から選択される。

40

【0143】

さらに好ましい実施形態では、前記抗原は組換え型アレルゲンであり、前記アレルゲンは、(a)ハチ毒ホスホリパーゼA2；(b)ブタクサ花粉Amb a 1；(c)カバノキ花粉Bet 1；(d)米国産クロスズメバチ毒液5 DoIm V；(e)チリダニDer p 1；(f)チリダニDer f 2；(g)チリダニDer p 2；(h)チリダニLe p d；(i)真菌アレルゲンAlt a 1；(j)真菌アレルゲンAsp f 1；(k)真菌アレルゲンAsp f 16；(l)ピーナッツアレルゲン；(m)ネコアレルゲンFel d 1；(n)イヌアレルゲンCan f 1、Can

50

f 2 ; (o) ピーナッツ由来アレルゲン ; または (p) スギアレルゲン C r y J 2 、 かなる群から選択される。本発明の別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、イヌアレルゲン C a n f 1 または C a n f 2 である。

【 0 1 4 4 】

さらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、ピーナッツアレルゲンである。好ましくは前記抗原は、配列番号 5 7、配列番号 6 4 または配列番号 6 5 から選択されるアミノ酸配列を含むピーナッツアレルゲンである。

【 0 1 4 5 】

さらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、スギ C r y J 2 由来のアレルゲンである。好ましくは、前記抗原は、スギ C r y J 2 由来のであり、配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む。

10

【 0 1 4 6 】

さらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、ブタクサ花粉 A m b a 1 由来アレルゲンである。好ましくは、前記抗原は、ブタクサ花粉 A m b a 1 由来であり、配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 4 7 】

本発明の極めて好ましい実施形態では、前記抗原はネコアレルゲン F e l d 1 である。イエネコ (F e l i s d o m e s t i c u s) は、室内アレルゲンの重要な入手源である (L a u , S . , e t a l . (2 0 0 0) L a n c e t 3 5 6 , 1 3 9 2 - 1 3 9 7) 。実際に、ネコは、西欧諸国の家庭の約 2 5 % で認められ、ネコに対するアレルギーは、集団の大部分で認められる。症状の重症度は、比較的軽度の鼻炎および結膜炎から命に関わる喘息性の悪化までの範囲にわたる。患者は場合により、ネコのフケおよび毛皮中のいくつかの異なる分子に感作されるが、主要なアレルゲンは F e l d 1 である。このアレルゲンの重要性は、多数の調査で強調されてきた。実際に、8 0 % を超えるネコアレルギー患者が、この強力なアレルゲンに対し I g E 抗体を提示する (v a n R e e , R . , e t a l . (1 9 9 9) J . A l l e r g y C l i n I m m u n o l 1 0 4 , 1 2 2 3 - 1 2 3 0) 。

20

【 0 1 4 8 】

F e l d 1 は、1 0 ~ 2 0 % の N 結合型炭水化物を含む 3 5 ~ 3 9 k D a の酸性糖タンパク質であり、ネコの毛皮、唾液および涙腺中で認められている。それは、2 つの非共有結合したヘテロダイマーにより形成される。それぞれのヘテロダイマーは、1 つの 7 0 残基ペプチド (「鎖 1」 として知られる) および 1 つの 7 8、8 5、9 0 または 9 2 残基ペプチド (「鎖 2」 として知られる) からなり、これらは、別々の遺伝子によりコードされる (D u f f o r t , O . A . , e t a l . (1 9 9 1) M o l I m m u n o l 2 8 , 3 0 1 - 3 0 9 ; M o r g e n s t e r n , J . P . , e t a l . (1 9 9 1) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 8 , 9 6 9 0 - 9 6 9 4 および G r i f f i t h , I . J . , e t a l . (1 9 9 2) G e n e 1 1 3 , 2 6 3 - 2 6 8 、を参照されたい) 。

30

【 0 1 4 9 】

いくつかの F e l d 1 の組換え型コンストラクトが報告されている (V a i l e s L D , e t a l . , J A l l e r g y C l i n I m m u n o l (2 0 0 2) 1 1 0 : 7 5 7 - 7 6 2 ; G r o n l u n d H , e t a l . , J B i o l C h e m (2 0 0 3) 2 7 8 : 4 0 1 4 4 - 4 0 1 5 1 ; 2 0 0 3 S c h m i t z N , e t a l . , J E x p M e d (2 0 0 9) 2 0 6 : 1 9 4 1 - 1 9 5 5 ; 国際公開第 2 0 0 6 / 0 9 7 5 3 0 号) 。

40

【 0 1 5 0 】

したがって、さらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、r F e l d 1 である。さらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、F e l d 1 タンパク質であり、前記 F e l d 1 タンパク質は、F e l d 1 の鎖 1 および F e l d 1 の鎖 2 を含む融合タンパク質であり、F e l d 1 の前記鎖 2 は、その C 末端を介して F e l d 1 の前記

50

鎖 1 の N 末端に、1 つのペプチド結合を介して直接にまたはスペーサーを介して融合され、前記スペーサーは 1 ～ 20 個のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列からなり、好ましくは前記スペーサーは 10 ～ 20 個のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列からなる。極めて好ましくは、前記スペーサーは、15 個のアミノ酸残基のアミノ酸配列からなり、さらに好ましくは前記スペーサーは、配列番号 47 のアミノ酸配列を有する。さらに極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、F e l d 1 タンパク質であり、前記 F e l d 1 タンパク質は、F e l d 1 の鎖 1 および F e l d 1 の鎖 2 を含む融合タンパク質であり、F e l d 1 の前記鎖 1 は、その C 末端を介して F e l d 1 の前記鎖 2 の N 末端に、1 つのペプチド結合を介して直接にまたはスペーサーを介して融合され、前記スペーサーは 1 ～ 20 個のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列からなり、好ましくは前記スペーサーは 10 ～ 20 個のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列からなる。好ましくは、F e l d 1 の前記鎖 1 は、配列番号 37 の配列またはその相同配列を含み、前記相同配列は、配列番号 37 に対し 90 % を超える、またはさらにより好ましくは 95 % を超える同一性を有する。さらに好ましくは、F e l d 1 の前記鎖 2 は、配列番号 38、配列番号 39 もしくは配列番号 40 の配列、またはその相同配列を含み、前記相同配列は、配列番号 38、配列番号 39 または配列番号 40 に対し 90 % を超える、さらにより好ましくは 95 % を超える同一性を有する。

10

【0151】

極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号 17 を含む、または好ましくはそれからなる。別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号 18 を含む、または好ましくはそれからなる。別の極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、配列番号 52 を含む、または好ましくはそれからなる。極めて好ましい実施形態では、前記抗原は、F e l d 1 であり、(a) 配列番号 17 ; (b) 配列番号 18 ; (c) 配列番号 50 ; (d) 配列番号 56 ; (e) 配列番号 59 ; または配列番号 52、から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0152】

さらに極めて好ましい実施形態では、前記 F e l d 1 タンパク質は、(a) 配列番号 50 ; (b) 配列番号 56 ; (c) 配列番号 59 ; または (d) 配列番号 52、から選択されるアミノ酸配列を含む。さらに極めて好ましい実施形態では、前記 F e l d 1 タンパク質は、(a) 配列番号 50 ; (b) 配列番号 56 ; または (c) 配列番号 59、から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0153】

別の極めて好ましい実施形態では、前記 F e l d 1 タンパク質は、配列番号 52 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる。別の極めて好ましい実施形態では、前記 F e l d 1 タンパク質は、配列番号 59 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる。別の極めて好ましい実施形態では、前記 F e l d 1 タンパク質は、配列番号 50 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる。別の極めて好ましい実施形態では、前記 F e l d 1 タンパク質は、配列番号 56 のアミノ酸配列を含む、好ましくはそれからなる。

40

【0154】

極めて好ましい実施形態では、本発明の組成物は、(i) キュウリモザイクウイルス (C M V) 由来の、少なくとも 1 つの第 1 結合部位を有する改変ウイルス様粒子 (V L P) であって、前記 C M V 由来の改変 V L P は、少なくとも 1 種の改変 C M V ポリペプチドを含み、本質的にそれからなり、あるいはそれからなり、前記改変 C M V ポリペプチドは、(a) C M V ポリペプチド、および (b) ヘルパー T 細胞エпитープを含み、好ましくはそれらからなり ; かつ前記改変 C M V ポリペプチドは、配列番号 6 または配列番号 7 を含む、好ましくはそれからなる、改変ウイルス様粒子 (V L P) と、(i i) 少なくとも 1 つの第 2 結合部位を有する少なくとも 1 つの抗原であって、前記抗原は F e l d 1 タンパク質であり ; 前記 C M V 由来の V L P および前記 F e l d 1 タンパク質は、前記少なくとも 1 つの第 1 結合部位および前記少なくとも 1 つの第 2 結合部位を介して結合され、

50

前記 F e l d 1 タンパク質は、(a) 配列番号 5 0 ; (b) 配列番号 5 6 ; (c) 配列番号 5 9 ; または (d) 配列番号 5 2 から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ好ましくは前記 F e l d 1 タンパク質は、(a) 配列番号 5 0 ; (b) 配列番号 5 6 または (c) 配列番号 5 9 から選択されるアミノ酸配列を含む抗原、とを含む。

【 0 1 5 5 】

さらなる好ましい実施形態では、前記抗原は、動物毒素である。好ましい実施形態では、抗原は不活化ヘビ毒である。さらなる好ましい実施形態では、前記抗原は、ハブテンである。さらに好ましい実施形態では、前記ハブテンは薬物であり、好ましくは前記薬物は、(a) コデイン ; (b) フェンタニール ; (c) ヘロイン ; (d) モルヒネ ; (e) アンフェタミン ; (f) コカイン ; (g) メチレンジオキシメタンフェタミン ; (h) メタンフェタミン ; (i) メチルフェニデート ; (j) ニコチン ; (k) L S D ; (l) メスカリン ; (m) シロシビン ; (n) テトラヒドロカンナビノール ; および (o) ニコチン、からなる群から選択される。

10

【 0 1 5 6 】

さらに好ましい実施形態では、前記ハブテンはホルモンであり、好ましくは前記ホルモンは、(a) プロゲステロン ; (b) エストロゲン ; (c) テストステロン ; (d) 卵巣刺激ホルモン ; (e) メラニン色素刺激ホルモン ; (f) アドレナリン ; および (g) ノルアドレナリン、からなる群から選択される。さらに好ましい実施形態では、前記ハブテンは毒素であり、好ましくは前記毒素は、(a) アフラトキシン ; (b) シガテラ毒 ; (c) テトロドトキシン ; および (d) 抗生物質、からなる群から選択される。さらなる好ましい実施形態では、前記ハブテンは病原体由来炭水化物である。

20

【 0 1 5 7 】

さらなる態様では、本発明は、本発明の改変ウイルス様粒子または本発明の組成物を含む、あるいはそれからなるワクチンを提供する。包含されるのは、前記改変 V L P、および / または前記組成物が本明細書で開示の技術的特徴のいずれか 1 つを、単独で、または任意の可能な組み合わせで含むワクチンである。一実施形態では、ワクチンはアジュバントをさらに含む。さらなる実施形態では、ワクチンはアジュバントを欠いている。好ましい実施形態では、前記ワクチンは、有効量の本発明の組成物を含む。「有効量」は、検出可能な生理学的効果を達成するために対象に投与が必要な量を意味する。

30

【 0 1 5 8 】

さらなる態様では、本発明は、(a) 本発明の改変 V L P、本発明の組成物、または本発明のワクチン、および (b) 薬学的に許容可能なキャリア、希釈剤および / または賦形剤を含む医薬組成物に関する。前記希釈剤には、無菌水性 (例えば、生理食塩水) または水溶液および懸濁液が含まれる。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、オリーブ等の植物油、およびオレイン酸エチル等の注入可能な有機エステルである。キャリアまたは密封包帯を使って皮膚透過性を高め、抗原吸収を向上させることができる。本発明の医薬組成物は、コンジュゲートの効力を向上させるのに望ましい、塩、緩衝液、アジュバント、またはその他の物質を含む形態にしてよい。医薬組成物の調製での使用に好適する材料の例に関しては、Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A, ed., Mack Publishing Co., (1990)) を含む多くの情報源が提供されている。一実施形態では、前記医薬組成物は、有効量の本発明のワクチンを含む。「有効量」は、検出可能な生理学的効果を達成するために対象に投与が必要な量を意味する。

40

【 0 1 5 9 】

さらなる本発明の態様は、本発明の改変 V L P、本発明の組成物、本発明のワクチン、または本発明の医薬組成物を動物またはヒトに投与することを含む免疫方法である。好ましい実施形態では、前記方法は、本発明の組成物、本発明のワクチン、または本発明の医薬組成物を動物もしくはヒトに投与することを含む。

【 0 1 6 0 】

さらなる本発明の態様は、動物の疾患、障害もしくは生理的状态の処置または予防方法

50

であり、前記方法は、本発明の改変VLP、本発明の組成物、本発明のワクチン、または本発明の医薬組成物を動物に投与することを含み、好ましくは前記動物はヒトとすることができる。さらに好ましい実施形態では、前記改変VLP、前記組成物、前記ワクチン、または前記医薬組成物は、皮下に、静脈内に、皮内に、鼻腔内に、経口で、結節内に、または経皮で、前記動物に投与される。

【0161】

実施例

実施例 1

キュウリモザイクウイルス(CMV)のコートタンパク質(CP)の単離とクローニング

ラトビアのリガの個人庭園から収集したCMV感染ユリ葉由来の総RNAをTRI試薬(Sigma, Saint Louis, USA)を使い、製造業者の推奨条件に従って単離した。cDNA合成のために、One Step RT-PCRキット(Qiagen, Venlo, Netherlands)を使用した。CMV CP遺伝子の増幅のために、ジェンバンク由来のCMV配列の解析後、次のプライマー配列を選択した。CMcpF(CACCCATGGACAAATCTGAA TCAACCAAGTGCTGGT)(配列番号8)およびCMcpR(CAAGAAGCTTATCAAACTGGGAGCA CCCCAGATGTGGGA)(配列番号9); NcoIおよびHindIII部位にアンダーラインをした。対応するPCR産物をpTZ57R/Tベクター(Fermentas, Vilnius, Lithuania)に挿入した。大腸菌XL1-Blue細胞をクローニングおよびプラスミド増幅用の宿主として使用した。RT-PCRエラーを避けるために、BigDyeサイクルシーケンシングキットおよびABI Prism3100 Genetic analyzer(Applied Biosystems, Carlsbad, USA)を使って、いくつかのCP遺伝子含有pTZA57プラスミドクローンの配列を決定した。配列決定後、配列番号1のCMVコートタンパク質をコードする、配列エラーのないCMV CP遺伝子のcDNA(配列番号10)をpET28a(+)発現ベクター(Novagen, San Diego, USA)のNcoI/HindIII部位中にサブクローニングし、発現プラスミドpET-CMVwt(図1)を生成した。

【0162】

実施例 2

CMV由来のVLPをもたらす大腸菌中の配列番号1のCPの発現

CMV VLPを得るために、大腸菌C2566細胞(New England Biolabs, Ipswich, USA)をCMV CP遺伝子含有プラスミドpET-CMVwtで形質転換した。最高の発現レベルの標的タンパク質を有するクローンを選択した後、大腸菌培養液を回転振盪機(200回転/分; Infors, Bottmingen, Switzerland)を使って、カナマイシン(25mg/l)含有2xTY培地中、30℃で0.8~1.0のOD600まで増殖させたその後、細胞を0.2mMのIPTGで誘導し、培地を5mMのMgCl₂で補充した。回転振盪機を使って、20℃で18時間、インキュベーションを継続した。得られたバイオマスを低速遠心分離により集め、-20℃で凍結した。氷上で解凍後、細胞を50mMのクエン酸ナトリウム、5mMのホウ酸ナトリウム、5mMのEDTA、5mMのメルカプトエタノール含有緩衝液(pH9.0、緩衝液A)中に懸濁し、超音波処置により粉碎した。不溶性タンパク質および壊死組織片を遠心分離(13,000rpm、5℃で30分)により除去した。透明化したライセート中の可溶性CMV CPタンパク質を、飽和硫酸アンモニウム(1:1、vol/vol)を+4で一晩使用してペレット化した。沈殿したタンパク質を同じ緩衝液A(メルカプトエタノール不含)中、+4で4時間可溶化した。不溶性タンパク質を低速遠心分離(13,000rpm、4℃で15分)により除去した。ショ糖勾配(緩衝液A中の20~60%のショ糖、メルカプトエタノール不含、0.5%トリトンX-100を補充)中の超遠心分離(SW28ローター、Beckman, Palo Alto

10

20

30

40

50

、U S A ; 2 5 , 0 0 0 r p m、6 時間、5) により可溶性 C M V C P 含有タンパク質溶液を細胞タンパク質から分離した。勾配液の底部から開始して、勾配液を 6 つの画分に分割し、画分を S D S - P A G E により分析した (図 2) 。組換え型 C M V C P を含む画分 N o . 2 および N o . 3 を合わせて、2 0 0 倍量の緩衝液 (5 m M のホウ酸ナトリウム、2 m M の E D T A、p H 9 . 0) に対して透析し、ショ糖およびトリトン X - 1 0 0 を除去した。透析後、0 . 2 μ m フィルタを通した濾過により C M V C P 溶液を滅菌した。次に、無菌条件下で 2 0 % ショ糖「クッション」を通す T y p e 7 0 ローター (B e c k m a n , P a l o A l t o , U S A) 超遠心分離 (5 0 , 0 0 0 r p m、+ 5、4 時間) を使って、C M V C P を濃縮した。精製された C M V w t の濃度は、製造業者推奨条件 (I n v i t r o g e n , E u g e n e , U S A) に従って Q u B i t 蛍光度計を使って推定した。濃縮 V L P 溶液 (約 3 m g / m l) を 4 で 5 m M のホウ酸ナトリウム、2 m M の E D T A 緩衝液 (p H 9 . 0) 中に貯蔵した。V L P の発現および精製に関する全ステップを 1 2 . 5 % ゲルを使った S D S - P A G E によりモニターした。

【 0 1 6 3 】

図 2 に示すように、C M V コートタンパク質は、大腸菌細胞中で成功裏に発現させることができ、得られたかなりの部分を可溶性画分とすることができる。さらに、ショ糖勾配分析 (図 3 A)、動的光散乱および電子顕微鏡解析 (図 3 B) により示されるように、これらのタンパク質は、大腸菌細胞抽出物中で等軸 V L P の形態で直接見つけ出せる。

【 0 1 6 4 】

実施例 3

破傷風トキソイドエピトープ含有 C M V (C M V - N t t 8 3 0) の改変コートタンパク質のクローニング

配列番号 1 の C M V C P の N 末端の元のアミノ酸を外來性エピトープ配列で置き換えるために、P C R 増幅および変異誘発のテンプレートとして、p E T - C M V w t プラスミドを使用した。C M V w t 遺伝子の内部に位置する S a l I 部位 (図 1) を P C R 産物に対応するクローニングのために使用した。

【 0 1 6 5 】

C M V w t 遺伝子に破傷風トキソイドエピトープコード配列を導入するために、2 ステップ P C R 変異誘発が必要であった。第 1 ステップ増幅のために、次のプライマーを P C R に使用した：p E T - 2 2 0 (a g c a c c g c c g c c g c a a g g a a (配列番号 1 1) - ポリリンカーの上流、増幅領域は B g l I I 部位を含む) および C M V - t t 8 3 - 1 R (A T T T G G A G T T G G C C T T A A T A T A C T G G C C C A T G G T A T A T C T C C T T C T T A A A G T) (配列番号 1 2) 。第 2 ラウンドのために、第 1 ラウンド由来の P C R 産物を 1 : 5 0 に希釈し、プライマー p E T - 2 2 0 (配列番号 1 1) および C M V - t t 8 3 S a l - R 2 (G A C G T C G A C G C T C G G T A A T C C C G A T A A A T T T G G A G T T G G C C T T A A T A T A C T G (配列番号 1 3)) で再増幅した。得られた P C R 産物 (配列番号 6 の C M V - N t t 8 3 0 をコードする配列番号 1 4 の c D N A) を p E T - C M V w t の B g l I I / S a l I 部位中にサブクローン化した。正確なクローンを配列決定により特定し、p E T - C M V - N t t 8 3 0 と表記した。

【 0 1 6 6 】

実施例 4

C M V 由来改変 V L P をもたらす大腸菌中での C M V - N t t 8 3 0 の発現

C M V - N t t 8 3 0 の発現および精製の手順は、実質的に C M V w t に対する物と同じとし、これは実施例 2 に記載されている。C M V V L P 中の破傷風エピトープの存在を示すために、精製された C M V - N t t 8 3 0 V L P の質量分析を使用した。図 4 C に示すように、第 1 メチオニンが大腸菌細胞でのタンパク質合成中に除去される場合には、得られる主ピークは、タンパク質の理論的分子量に相当する。動的光散乱および電子顕微鏡分析により、C M V w t V L P に類似の等軸粒子形態が確認される (図 5) 。

【 0 1 6 7 】

実施例 5

PADRE エピトープ含有 CMV (CMV - Npadr) の改変コートタンパク質のクローニング

CMVwt 遺伝子中に PADRE エピトープコード配列を導入するために、増幅およびサブクローニングのテンプレートとして pET - CMVwt プラスミドを使用して PCR 変異誘発を実施した (実施例 3 も参照されたい)。増幅用として、次のプライマーを使用した: pET - 220 (配列番号 11) および CMV - padrSal - R (GACGT CGACGCGCGGCGCGCTTGAGGGTCCACGCGGCGCCACAAATT TCGCCCATGGT) (配列番号 15)。得られた PCR 産物 (配列番号 7 の CMV - Npadr をコードする配列番号 16 の cDNA) を pET - CMVwt の BglII / SalI 部位中に再度サブクローン化した。正確なクローンを配列決定により特定し、pET - CMV - Npadr と表記した。

10

【0168】

実施例 6

CMV 由来改変 VLP をもたらす大腸菌中での CMV - Npadr の発現

CMV - Npadr の発現および精製の手順は、実質的に CMVwt に対するものと同じとし、これは実施例 2 に記載されている。CMV VLP 中の PADRE エピトープの存在を示すために、精製された CMV - Npadr VLP の質量分析を使用した。図 4 B に示すように、第 1 メチオニンが大腸菌細胞でのタンパク質合成中に除去される場合には、得られる主ピークは、タンパク質の理論的分子量に相当する。動的光散乱および電子顕微鏡分析により、CMVwt および CMV - Ntt830 VLP とは少し異なる等軸粒子形態が確認される (図 6)。

20

【0169】

実施例 7

CMVwt、CMV - Ntt830 および CMV - Npadr によるマウスの免疫化

4 匹の雌 BALB / c マウスからなる群を、CMVwt、CMV - Npadr VLP および CMV - Ntt830 VLP のいずれかで免疫化した。VLP を 150 mM の PBS (pH 7.4) 中に配合し、150 μ l を 0 日目および 7 日目に i.v. 注射した。CMVwt、CMV - Npadr VLP および CMV - Ntt830 VLP を次の 3 種の量: 10、1 または 0.1 μ g で注射した。マウスから、0 日目 (免疫前)、7 日目、14 日目、および 25 日目に採血し、CMVwt VLP、CMV - Npadr VLP および CMV - Ntt830 VLP 特異的 ELISA を使って、血清を分析した。全ての免疫血清を、免疫化に使用したそれぞれの VLP に対して試験した。

30

【0170】

ELISA

示した時間でのマウス血清の抗体応答を分析した。CMVwt、CMV - Npadr VLP および CMV - Ntt830 VLP 特異的抗体力価の決定のために、ELISA プレート (Nunc Immuno MaxiSorp, Rochester, NY) をコーティング緩衝液 (0.1 M の炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH 9.6) 中の 100 μ l の対応する VLP (1 μ g / mL) を使って、4 で一晩コーティングした。非特異的結合を回避するために、ELISA プレートを 200 μ l の PBST 中 2% BSA でブロッキングし、室温で 2 時間インキュベートした。血清試料を 2% BSA / PBST で希釈した。予め希釈された血清をコーティングしたプレートに移し、さらに系列希釈して、OD 50 の計算による抗体力価を得た。室温で 2 時間のインキュベーション後、ELISA プレートを 200 μ l の PBST で 5 回洗浄した。血清抗体の結合を西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG (Jackson ImmunoResearch) により検出した。検出抗体を 2% BSA / PBST で 1:1000 に希釈し、試料当たり 100 μ l の体積を移した。プレートを室温で 1 時間インキュベートした。ELISA プレートを以前に述べたように洗浄した。洗浄前に、基質溶液を調製した。この目的のために、1 錠 (10 mg) の OPD (1, 2 - フェニレンジアミンジヒドロクロリド) および 9

40

50

μl の30% H_2O_2 を25mlのクエン酸緩衝液(0.066Mの Na_2HPO_4 、0.035Mのクエン酸、 pH 5.0)に溶解した。100 μl の体積の基質溶液をプレートにピペットで採取し、室温で7分間正確にインキュベートした。反応を停止させるために、50 μl の停止液(H_2O 中の5% H_2SO_4)をプレートにピペットで直接加えた。1, 2 - フェニレンジアミンジヒドロクロリドカラー反応の450nmでの吸光度読み値を解析した。図7は、CMVwt(図7A)、CMV-Npadr(図7B)およびCMV-Ntt880(図7C)特異的抗体を用量依存的様式で示す。

【0171】

実施例8

組換え型Fel d1コンストラクトのVLP CMV-NpadrおよびVLP CMV-Ntt830へのカップリングおよび免疫反応 10

rFel d1(配列番号17)の共有結合融合を以前記載したように生成した(Schmitz N, et al., J Exp Med(2009)206:1941-1955)。手短に言えば、鎖2および鎖1の共有結合ダイマーをコードした相補的なDNAであって、Fel d1の鎖2がそのC末端を介して、15aaリンカー(GGGGS)₃の間隔を置いて、Fel d1の鎖1のN末端に融合される相補的なDNAが、一連のオーバーラップしているDNAプライマーを使って、PCR増幅により得られた(このコンストラクトを「rFel-2-G3-1-コンストラクト」と命名する)。この相補的DNAをインフレームで改変バージョンのpET-42a(+)(EMD)中に挿入し、rFel-2-G3-1-コンストラクトのC末端に、LEHHHHHHGGC(配列番号35)のコード配列を付加した。付加配列は、精製用のヒスチジンタグ、続けて、このFel d1融合タンパク質のCMV-NpadrおよびCMV-Ntt830へのカップリングに使用されるGGCリンカーを含む。 20

【0172】

同様にして、Fel d1の鎖1およびFel d1の鎖2を含むrFel d1融合タンパク質に対応する、rFel d1(配列番号18)の別の共有結合の融合体を、以前記載(国際公開第2006/097530号)したように生成し、この場合、Fel d1の鎖1がそのC末端を介して、15aaリンカー(GGGGS)₃により、Fel d1の鎖2のN末端に融合される(「rFel-1-G3-2-コンストラクト」)。 30

【0173】

2mg/ml(71 μM)の濃度の2.5mlの体積のウイルス様粒子VLP CMV-NpadrおよびVLP CMV-Ntt830を、27 μl の50mMのヘテロ二機能性化学架橋剤スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート(SMPH)と室温(RT)で1時間反応させた。リンカーはNHSエステルを含み、これは、VLPの表面上のリシンと反応する。SMPHの量は、1つのVLPモノマー、すなわち1つのCMVポリペプチドについて、7.5倍モル過剰を意味する。未反応架橋剤は、150mMのPBS、 pH 7.4対して、透析により除去された。rFel d1-CMV-NpadrおよびrFel d1-CMV-Ntt830組成物を産生するために、2.7mg/ml(150 μM)の濃度のrFel d1のタンパク質溶液の200 μl を、5倍モル過剰の還元剤トリス-2-カルボキシエチルホスフィン(TCEP)と混合し、室温で5分間インキュベートした。モル過剰は、タンパク質Fel d1の量に関連した。TCEPは、VLPを誘導体化するカップリング反応への2つのタンパク質分子の2つのシステイン残基の利用可能性を保証するために、システイン残基の間のジスルフィド架橋を還元する。前処理したタンパク質Fel d1を、1:1のモル比で、7.5xのSMPH誘導体化VLP CMV-NpadrおよびVLP CMV-Ntt830と、振盪しながら室温で3時間反応させる。還元されたタンパク質のシステインは、VLPに結合した架橋剤SMPHのマレイミドと反応した。共有結合カップリング後、非カップリングrFel d1を、150mMのPBS(pH 7.4)中でのゲル濾過により除去した。前記組成物をSDS-PAGEおよびイムノブロットイングにより分析し、カップリングバンドを観察し、確認した。この目的のために、SMPH誘導体化VLP 40 50

CMV - NpadrおよびCMV - Ntt830の試料、組成物rFel d1 - CMV - NpadrおよびrFel d1 - CMV - Ntt830およびFel d1タンパク質を同時にゲルにアプライした。タンパク質Fel d1のヒスチジンタグに結合した抗ペンタHisタグ抗体を使ったイムノブロッティングによりカップリングを観察した。可視バンドは、Fel d1タンパク質ならびにSMPH誘導体化VLP CMV - Npadr、VLP CMV - Ntt830、および組成物rFel d1 - CMV - NpadrおよびrFel d1 - CMV - Ntt830の全てが容易にそれらのサイズで区別されることを示した。さらに、SDS - PAGEゲルをクーマシーブルーで染色し、カップリングを観察し、確認した。

【0174】

CMV - NpadrおよびCMV - Ntt830に結合したrFel d1によるマウスの免疫化

5匹の雌Balb/cマウスからなる群を、SMPHを介してrFel d1に結合したCMV - Npadr VLPおよびCMV - Ntt830 VLPのいずれかで免疫化した。5 μ gの量のrFel d1 - CMV - NpadrおよびrFel d1 - CMV - Ntt830を、それぞれ150mMのPBS、pH7.4中で150 μ lに希釈し、0日目および7日目に静脈内に注射した。マウスから、0日目（免疫前）、7日目、14日目、および25日目に採血し、Fel d1特異的ELISAを使って、血清を分析した。

【0175】

ELISA

示した時間でのマウス血清の抗体応答を分析した。ELISAプレート（pH7.2）中の1 μ g/mLの濃度の100 μ lを使って、4下、一晚コーティングすることにより、Fel d1に特異的な抗体を分析した。0.05%のツイーン20を含む200 μ lのPBS（pH7.2、PBST）でELISAプレートを5回洗浄した。非特異的結合を回避するために、ELISAプレートを200 μ lのPBST中2%BSAでブロッキングし、室温で2時間インキュベートした。血清試料を2%BSA/PBSTで希釈した。予め希釈された血清をコーティングしたプレートに移し、さらに系列希釈して、OD50の計算による抗体力価を得た。室温で2時間のインキュベーション後、ELISAプレートを200 μ lのPBSTで5回洗浄した。血清抗体の結合を西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG（Jackson ImmunoResearch）により検出した。検出抗体を2%BSA/PBSTで1:1000に希釈し、試料当たり100 μ lの体積を移した。プレートを室温で1時間インキュベートした。ELISAプレートを以前に述べたように洗浄した。洗浄前に、基質溶液を調製した。この目的のために、1錠（10mg）のOPD（1,2-フェニレンジアミンジヒドロクロリド）および9 μ lの30% H_2O_2 を25mlのクエン酸緩衝液（0.066Mの Na_2HPO_4 、0.035Mのクエン酸、pH5.0）に溶解した。100 μ lの体積の基質溶液をプレートにピペットで採取し、室温で7分間正確にインキュベートした。反応を停止させるために、50 μ lの停止液（ H_2O 中の5% H_2SO_4 ）をプレートにピペットで直接加えた。1,2-フェニレンジアミンジヒドロクロリドカラー反応の450nmでの吸光度読み値を解析した。図8は、本発明の組成物rFel d1 - CMV - Npadr（図8A）およびrFel d1 - CMV - Ntt830（図8B）により、Fel d1特異的抗体がマウス中で誘導されたことを示す。

【0176】

実施例9

α - シヌクレインのCMV - Ntt830へのカップリングおよび免疫反応の誘導

配列番号22の α - シヌクレインペプチドの、CMV - Ntt830（配列番号6）から形成されたVLPへのカップリングを次のように行った。20mMのヘプス、50mMのNaCl、pH7.3中の1mg/mLのCMV - Ntt830の1mLの溶液を、室温で、79.3mLのSMPH溶液（DMSO中の10mM）と60分間反応させた。同

10

20

30

40

50

様に、20 mMのヘペス、50 mMのNaCl (pH 7.3) 中の1 mg/mlのCMV - Ntt830の1 mlの溶液を、室温で、79.3 mlのSulfo-KMUS溶液 (20 mMのヘペス中の10 mM、pH 7.4) と60分間反応させた。反応物を3倍の2 Lの20 mMのヘペス、50 mMのNaCl、pH 7.3に対し、2時間、14時間および10 kDaのMWCOを有するSlide-A-Lyzer透析カセット中で2時間、4で透析を行った。800 μ lの誘導体化および透析CMV - Ntt830溶液を、21.5 μ lの α -シヌクレインペプチド (22.32 mg/ml) と混合し、化学架橋のために、500 rpmの振盪Eppendorf Thermomixerを使って、室温で3時間インキュベートした。カップリング反応物を4、20000 x gで10分間の遠心分離により清澄化した。誘導体化CMV - Ntt830コートタンパク質およびカップリング生成物を、還元条件下、NuPAGE (登録商標) 4~12%ビス-トリスゲルを使ったSDS-PAGE分析により分析した。その後、クマシー染色したゲル剤の濃度分析を実施した。CMV - Ntt830コーティングモノマーに比較して、増加した分子量を示すいくつかのバンドが認められ、 α -シヌクレインペプチドのCMV - Ntt830への架橋に成功したことを明確に示している (クマシー染色したNuPAGE (登録商標)、図示せず)。結合密度は、1.0を超え、カップリング効率は約60%であった。誘導体化およびカップリング後のCMV - Ntt830 VLPの健全性を試験するために、誘導体化CMV - Ntt830およびカップリング生成物を、1x TAEを使って、続けて、クマシー染色および臭化エチジウム染色を使って、1%アガロースゲル電気泳動により分析した。誘導体化およびカップリングCMV - Ntt830 VLPのタンパク質バンドおよび核酸バンドは、それぞれ、同時移動し、非誘導体化および非カップリングCMV - Ntt830と類似の移動挙動を示す。コートタンパク質と核酸との同時移動は、CMV - Ntt830 VLPがまだ無傷であり、核酸がCMV - Ntt830 VLPから放出されなかったことを明確に示した。

【0177】

CMV - Ntt830コートタンパク質に結合した α -シヌクレイン由来ペプチドによるマウスの免疫化

4匹の雌C57B/6マウスの群を、SMPHを介して α -シヌクレインペプチド (配列番号22) に結合したCMV - Ntt830 VLPで免疫化した。250 μ gの量の総タンパク質を、150 mMのPBS、pH 7.4中で150 μ lに希釈し、0日目および14日目にi.v.注射した。マウスから、0日目 (免疫前)、7日目、14日目、21日目、28日目、および34日目に採血し、 α -シヌクレイン特異的ELISAを使って、血清を分析した。

【0178】

ELISA

化学架橋剤sulfo-SPDPを使って、 α -シヌクレインペプチドをウシRNアーゼAに結合した。ELISAプレートを5 μ g/mlの濃度の α -シヌクレインペプチド結合RNアーゼ配合物でコーティングした。プレートをブロッキングした後、系列希釈マウス血清と共にインキュベートした。結合抗体を酵素標識抗マウスIgGで検出した。対照として、同じマウスの免疫前血清を同様に試験した。全マウスは、図9に見られるように、 α -シヌクレイン由来ペプチドに対し明確で強力なIgG応答をした。

【0179】

実施例10

IL-17AペプチドのCMV - Ntt830へのカップリングおよび免疫反応の誘導
マウスIL17Aタンパク質 (配列番号20) のCMV - Ntt830コートタンパク質 (配列番号6) へのカップリングを行った。mIL-17タンパク質は、2ステップ法により、CMV - Ntt830に共有結合した。第1ステップでは、CMV - Ntt830 VLP (50 mMのNaH₂PO₄中2 mg/ml、10%グリセロール、pH 7.4) を、室温で、等モル量のヘテロ二機能性化学架橋剤スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド) ヘキサノエート (SMPH) と60分間反応させた。おなじ

緩衝液（50 mMの NaH_2PO_4 、10%グリセロール、 $\text{pH} 7.4$ ）を使って、PD-10脱塩カラムを備えたゲル濾過により未反応の架橋剤を除去した。コンジュゲーションステップの前に、精製mIL-17タンパク質を室温で5分間、10倍過剰のトリ（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCEP-HCl）と共にインキュベートし、リンカー中の全てのシステイン残基を還元した。その後、等モル量のmIL-17タンパク質とVLPを室温で3時間反応させることにより、mIL-17タンパク質を誘導体化VLPに共有結合させた。ワクチンをSDS-PAGE、続けて、クマシー染色および抗Hisタグ抗体とのイムノブロッティングにより分析した。カップリング反応の種々の成分に対応するクマシーブルー染色バンドの強度をデンストメトリーにより測定し、カップリング効率の計算に使用した。モノマーの誘導体化CMV-Ntt830は、離れた28 kDaバンドとして移動し、一方、CMV-Ntt830-mIL-17コンジュゲートは、45 kDa（28 kDaのCMV-Ntt830モノマー+17 kDaのmIL-17タンパク質）に移動した。SDS-PAGEおよびクマシー染色による解析により、CMV-Ntt830コートタンパク質と比較していくつかの増加した分子量のバンドが認められ、IL-17タンパク質のCMV-Ntt830 VLPへの架橋に成功したことを示している。カップリング効率は、mIL-17に結合したCMV-Ntt830モノマー（45 kDaバンド）の、総CMV-Ntt830モノマー（28と45 kDaバンドの合計）に対する比として定義される。カップリング効率は、少なくとも15.3%と決定され、6.5分子CMV-Ntt830当たり1分子のmIL-17に相当する。この方式で計算されたカップリング効率は、カップリングの程度の最小推定である。理由は、この方式が、2つ以上のmIL-17分子に結合したCMV-Ntt830モノマーを考慮していないためである。したがって、IL-17Aなどの目的のタンパク質は、効率的にCMV-Ntt830 VLPに結合できる。

10

20

30

40

50

【0180】

CMV-Ntt830 VLPに結合したマウスIL17Aタンパク質によるマウスの免疫化

3匹の雌BALB/cマウスの群を、マウスIL17Aタンパク質に結合したCMV-Ntt830コートタンパク質で免疫化した。20 μg の量の総タンパク質を、PBS、 $\text{pH} 7.4$ 中で150 μl に希釈し、0日目および14日目に静脈内に注射した。マウスから、0日目（免疫前）、7日目、14日目、21日目、および34日目に採血し、マウスIL17A特異的ELISAを使って、血清を分析した。

【0181】

ELISA

ELISAプレートを1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のマウスIL17Aでコーティングした。プレートをブロッキングした後、0日目、4日目、14日目、21日目および34日目に採取した系列希釈マウス血清と共にインキュベートした。結合抗体を酵素標識抗マウスIgG抗体で検出した。450 nmで最大半減光学密度に達するそれらの希釈液の平均として、マウス血清の抗体力価を計算した。IL17Aに結合したCMV-Ntt830 VLPで免疫化したマウスは、IL17タンパク質に対し強力な免疫反応を開始した（図10）。

【0182】

中和抗体の検出

上述のようにCMV-Ntt830に結合したマウスIL17で免疫したマウスの血清を、マウスIL17Aタンパク質のIL-17レセプターに対する結合を阻害するそれらの能力に関して試験する。したがって、ELISAプレートを1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のマウスIL-17レセプターAタンパク質でコーティングした。35日目に採取した系列希釈のマウス血清を10 ng/mLのビオチン化マウスIL-17Aと1時間ブレインキュベートした後、IL-17レセプターAをコーティングしたプレートに加えた。IL-17のレセプターへの結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで検出する。450 nmで最大半減光学密度に達するそれらの血清希釈液の平均として、中和抗体

価を計算する。

【0183】

多発性硬化症用のマウスモデルにおける実験的自己免疫脳炎の改善に基づくCMV - Ntt830 - mIL17Aの効力

雌SJLマウスを上述のようにして免疫化し、最後の免疫化の1週間後に完全フロインドアジュバントと混合した100μgのPLPペプチドを皮下に注射した。同じ日に、全マウスに400ngの百日咳毒素を腹腔内に注射した。次のスキームに従って、神経学的症状の発症に対し、毎日マウスをスコア化した。0、臨床的疾患なし；0.5、尾端のひきずり；1、尾完全ひきずり；1.5、尾ひきずりおよび後肢脱力（後肢の不安定歩行および不十分にぎり）；2、片側性部分的後肢運動麻痺；2.5、両側性部分的後肢運動麻痺；3、完全な両側性後肢運動麻痺；3.5、完全な両側性後肢運動麻痺および片側性前肢運動麻痺；4、後肢および前肢の全体運動麻痺。上述のようにCMV - Ntt830 - mIL17AまたはCMV - Ntt830で免疫化したマウスの平均臨床的スコアを評価する。CMV - Ntt830 - mIL17A免疫化マウスは、CMV - Ntt830免疫化マウスに比べて、53日目と61日目との間で臨床症状を大きく低減した。これは、CMV - Ntt830 - mIL17Aでの免疫化により生成した抗IL - 17抗体が多発性硬化症のマウスモデルの臨床症状を改善できることを示している。

10

【0184】

実施例11

マウスIL - 5のCMV - Ntt830へのカップリングおよび免疫反応の誘導

20

記載のようにIL - 5を発現させ、精製した(Zou Y, et al., Vaccine 28(2010)3192 - 3200)。mIL - 5(配列番号23)の配列番号6の改変CPを有するVLP CMV - Ntt830へのカップリングを次のように行った。IL - 5に結合させるために、CMV - Ntt830 VLPを、最初に30倍過剰のヘテロ二機能性化学架橋剤、スクシンイミジル - 6 - (β - マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート(SMPH)で誘導体化した。非結合SMPHをPBSに対する透析により除去した。PBS(pH8.0)中の等モル量のトリ(2 - カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP)を使ってrIL - 5を1時間還元した。還元したrIL - 5(80μM)を、40μMのSMPH誘導体化CMV - Ntt830と共に22で4時間インキュベートした。反応物をPBS pH8.0に対し12時間透析した。

30

【0185】

CMV - Ntt830改変コートタンパク質のVLPに結合したIL - 5由来ペプチドによるマウスの免疫化

4匹の雌Balb/cマウスの群を、SMPHを介してIL - 5(配列番号23)に結合したCMV - Ntt830 VLPのいずれかで免疫化した。50μgの総タンパク質を、20mMのヘペス、50mMのNaCl(pH7.3)中で200μlに希釈し、0日目および14日目に皮下に注射した(両腹側に2箇所100μl)。マウスから、0日目(免疫前)、14日目、および21日目に採血し、IL - 5およびCMV - Ntt830特異的ELISAを使って、血清を分析した。

40

【0186】

ELISA

ELISAプレートを10μg/mlの濃度のIL - 5または2μg/mlの濃度のCMV - Ntt830 VLPでコーティングした。プレートをブロッキングした後、系列希釈マウス血清と共にインキュベートした。結合抗体を酵素標識抗マウスIgGで検出した。対照として、同じマウスの免疫前血清を同様に試験した(データは示さず)。全マウスは、ペプチドならびにCMV - Ntt830に対し明確で強力なIgG応答をした。

【0187】

アレルギー性気道炎症のOVA系モデル

アレルギー性気道炎症を誘導するために、雌BALB/cマウス(群当たり5匹)に、2mgのミョウバン(水酸化アルミニウムゲルアジュバント、Brenntag Bio

50

sector, Denmark) と混合した $10 \mu\text{g}$ の OVA (Grade V, Sigma-Aldrich) を注射 (i.p.) した。10 日後、 $100 \mu\text{g}$ の OVA を 4 日間、マウスに鼻腔内投与した。最後の投与の 24 時間後、気管支肺胞洗浄を行い、肺を組織学検査に供した。OVA およびミョウバンを i.p. 注射したが、OVA を鼻腔内投与しなかったマウスは、これらの実験の疾患誘導のための陰性対照としての役割を持たせた。

【0188】

このモデルを使って、 $100 \mu\text{g}$ の IL-5 に結合した CMV-Ntt830 VLP または CMV-Ntt830 VLP で 2 回 (0 日目、14 日目) マウスを免疫化した。21 日目に、OVA でマウスを感作し、31 日目に OVA を鼻腔内投与した。IL-5 免疫化マウスは、気管支肺胞液中の好酸球数が劇的に低減した。

10

【0189】

実施例 12

CMV-Ntt830 ウイルス様粒子への M2 ペプチドのカップリング

PBS / 10 % グリセロール (pH 7.2) 中の $1 \text{ mg} / \text{ml}$ の配列番号 6 の改変 CP を有する CMV-Ntt830 VLP の 2 ml の溶液を、室温で、 $42.6 \mu\text{l}$ の SMPH 溶液 (DMSO 中の 150 mM) と 60 分間反応させた。反応溶液を、2 回の 21 交換の 20 mM のヘプス / 10 % グリセロール (pH 7.2) に対して、4 で、12 時間および 4 時間にわたり透析した。 0.6 ml の誘導体化および透析 CMV-Ntt830 溶液を、 $21.45 \mu\text{l}$ の 10 mM のインフルエンザペプチド M2 (配列番号 24) の DMSO 溶液と混合し、化学架橋させるために室温で 4 時間インキュベートし、CMV-Ntt830-M2 コンジュゲートワクチンを得た。 20 mM のヘプス / 10 % グリセロール、pH 7.2 に対し、12 時間および 4 時間透析することによりカップリングしていないペプチドを除去した。カップリングした生成物を還元条件下、12 % ビス-トリス-ポリアクリルアミドゲルで分析した。CMV-Ntt830 カプシドモノマーに比較して、増加した分子量のいくつかのバンドが認められ、インフルエンザ M2 ペプチドの CMV-Ntt830 カプシドへの架橋に成功したことを明確に示している。

20

【0190】

CMV-Ntt830 カプシドに結合した M2 ペプチド (CMV-Ntt830-M2) によるマウスの免疫化

30

群当たり 4 匹の雌 Balb/c マウスを $200 \mu\text{l}$ の PBS 中に配合された $40 \mu\text{g}$ の CMV-Ntt830-M2 ワクチンで免疫化するために 0 日目および 20 日目に皮下に注射した。マウスから、34 日目に採血し、M2 特異的および CMV-Ntt830 特異的 ELISA を使って、血清を分析した。

【0191】

ELISA による抗 M2 抗体の検出

ELISA プレートに $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度の M2 ペプチド (配列番号 24) または $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度の CMV-Ntt830 ウイルス様粒子でコーティングした。プレートをブロッキングした後、系列希釈マウス血清と共にインキュベートした。結合抗体を酵素標識抗マウス IgG 抗体で検出した。マウス血清の抗体力価は、飽和時測定 OD の 50 % (OD 50) になる希釈の逆数として、定義される。34 日目のマウスの平均抗 M2 抗体力価および抗 CMV-Ntt830 力価は、1 : 10000 超であった。M2 ペプチド単独では免疫原性がないことから、このデータは、M2 ペプチドの CMV-Ntt830 カプシドへのカップリングが M2 ペプチドの免疫原性を強力に高めることを示す。

40

【0192】

CMV-Ntt830-M2 免疫化の効力をインフルエンザ感染症のマウスモデルで試験した。マウスに致死用量の $4 \times \text{LD}_{50}$ のマウス順化インフルエンザ A / PR / 8 / 34 ウイルスを投与した。ウイルスを PBS 中で希釈し、イソフランによる軽い麻酔下、鼻経由で投与した ($2 \times 50 \mu\text{l}$)。30 % を超えて体重を減少させたマウス、または 30 以下の体温を示したマウスを安楽死させた。両群のマウスの生存は以下の通り：CMV

50

- N t t 8 3 0 - M 2 で免疫化した全マウスは生存したが、C M V - N t t 8 3 0 単独で免疫化した全マウスは死亡した。結果は、C M V - N t t 8 3 0 に結合したM 2 ペプチドでの免疫化は、M 2 特異的抗体を誘導し、この抗体はインフルエンザ A / P R / 8 / 3 4 ウイルスによる致死感染に対しマウスを保護することを示している。

【 0 1 9 3 】

実施例 1 3

C M V - N t t 8 3 0 ウイルス様粒子への A β 1 - 6 ペプチドのカップリング

P B S / 1 0 % グリセロール (p H 7 . 2) 中の 1 m g / m l の配列番号 6 の改変 C P を有する C M V - N t t 8 3 0 V L P の 2 m l の溶液を、室温で、4 2 . 6 μ l の S M P H 溶液 (D M S O 中の 1 5 0 m M) と 6 0 分間反応させた。反応溶液を、2 回 1 交換の 2 0 m M のヘプス / 1 0 % グリセロール (p H 7 . 2) に対して、4 で、1 2 時間および 4 時間にわたり透析した。0 . 6 m l の誘導体化および透析 C M V - N t t 8 3 0 溶液を、2 1 . 4 5 μ l の 1 0 m M の A β 1 - 6 (配列番号 2 5) の D M S O 溶液と混合し、化学架橋するために室温で 4 時間インキュベートし、C M V - N t t 8 3 0 - A β 1 - 6 コンジュゲートワクチンを得た。2 0 m M のヘプス / 1 0 % グリセロール、p H 7 . 2 に対し、1 2 時間および 4 時間透析することによりカップリングしていないペプチドを除去した。カップリングした生成物を還元条件下、1 2 % ビス - トリス - ポリアクリルアミドゲルで分析した。C M V - N t t 8 3 0 カプシドモノマーに比較して、増加した分子量のいくつかのバンドが認められ、A β 1 - 6 ペプチドの C M V - N t t 8 3 0 への架橋に成功したことを明確に示している。

【 0 1 9 4 】

C M V - N t t 8 3 0 カプシドに結合した A β 1 - 6 (C M V - N t t 8 3 0 - A β 1 - 6) によるマウスの免疫化

群当たり 4 匹の雌 B a l b / c マウスを 2 0 0 μ l の P B S 中に配合された 4 0 μ g の C M V - N t t 8 3 0 - A β 1 - 6 ワクチンで免疫化するために 0 日目および 2 0 日目に皮下に注射した。マウスから、3 4 日目に採血し、A β 1 - 6 特異的および C M V - N t t 8 3 0 特異的 E L I S A を使って、血清を分析した。

【 0 1 9 5 】

E L I S A による抗 A β 1 - 6 抗体の検出

E L I S A プレートに 1 0 μ g / m l の濃度の R N アーゼに結合した A β 1 - 6 または 2 μ g / m l の濃度の C M V - N t t 8 3 0 ウイルス様粒子でコーティングした。プレートをブロッキングした後、系列希釈マウス血清と共にインキュベートした。結合抗体を酵素標識抗マウス I g G 抗体で検出した。マウス血清の抗体力価は、飽和時測定 O D の 5 0 % (O D 5 0) になる希釈の逆数として、定義される。3 4 日目のマウスの平均抗 A β 1 - 6 抗体力価および抗 C M V - N t t 8 3 0 力価は、1 : 1 0 0 0 0 超であった。A β 1 - 6 ペプチド単独では免疫原性がないことから、このデータは、A β 1 - 6 ペプチドの C M V - N t t 8 3 0 カプシドへのカップリングが A β 1 - 6 ペプチドの免疫原性を強力に高めることを示す。ヒトアルツハイマー患者の脳切片をマウス血清で染色し、ブランクが明瞭に見えるようになった。

【 0 1 9 6 】

実施例 1 4

F e l d 1 融合タンパク質のクローニング

1 5 個のアミノ酸配列 (G G G G S) ₃ (配列番号 4 7) を介して F e l d 1 の鎖 2 の N 末端に融合した F e l d 1 鎖 1 からなり、F e l d 1 の鎖 2 の C 末端に融合した H H H H H H G G C 配列 (配列番号 4 8) を組み込んだ F e l d 1 融合タンパク質 (F 1 2 H 6 G G C と命名) を、オリゴヌクレオチド特異的遺伝子合成により産生した。対応するオリゴヌクレオチド配列は、配列番号 4 9 の配列を有し、F 1 2 H 6 G G C のタンパク質配列は、配列番号 5 0 : M E I C P A V K R D V D L F L T G T P D E Y V E Q V A Q Y K A L P V V L E N A R I L K N C V D A K M T E E D K E N A L S V L D K I Y T S P L C G G G G S G G G G S G G G G S V K M A E T C P I F Y D V F F A V A N G N

E L L L D L S L T K V N A T E P E R T A M K K I Q D C Y V E N G L I S R V L D G
L V M T T I S S S K D C M G E A V Q N T V E D L K L N T L G R H H H H H G G C
の配列を有する。

【0197】

遺伝子の解析後、そのヘルパープラスミドから切り取り、プラスミド pET42a (+)
(Novagen, USA) の NdeI / XhoI 部位にインフレームでサブクローン
化し、発現ベクター pET42 - F12H6GGC を得た。

【0198】

ヘキサヒスチジン配列 (F12GGC と命名) 不含の Fe1 d1 融合タンパク質を、
プラスミド pET42 - F12H6GGC をテンプレートとして使用して、PCR 変異誘
発により産生した。これらの融合タンパク質を産生するために PCR で使用したオリゴヌ
クレオチドプライマーは以下の通り。F12GGC に対しては、順方向プライマーは、F
e1__Bg1F (配列番号 51) および逆方向プライマーは、Fe1d - dHR (配列番
号 53) とした。

【0199】

全 PCR 産物を制限酵素 BglII / XhoI で切断し、サブクローン化によりベクタ
ー pET42 - F12H6GGC の同じ切除部位に戻した。プラスミド DNA の単離後、
BigDye サイクルシーケンシングキットおよび ABI Prism 3100 Ge
netic analyzer (Applied Biosystems, Carlsb
ad, USA) を使って、導入された変化を確認した。得られた発現ベクターを pET4
2 - F12GGC と命名した。これは、対応する Fe1 d1 融合タンパク質 F12GG
C (配列番号 56) をコードする。

M E I C P A V K R D V D L F L T G T P D E Y V E Q V A Q Y K A L P V V L E N A R
I L K N C V D A K M T E E D K E N A L S V L D K I Y T S P L C G G G G S G G G G
S G G G G S V K M A E T C P I F Y D V F F A V A N G N E L L L D L S L T K V N A
T E P E R T A M K K I Q D C Y V E N G L I S R V L D G L V M T T I S S S K D C M
G E A V Q N T V E D L K L N T L G R G G C (配列番号 56)

【0200】

ヘキサヒスチジン配列は、金属キレート親和性クロマトグラフィーによる精製を可能と
し、GGC または GCG (配列番号 58) を含む C 末端配列は、Fe1 d1 融合タン
パク質の CMV - Ntt830 および CMV - Npadr へのカップリングを可能とする
。

【0201】

実施例 15

Fe1 d1 融合タンパク質の発現と精製

大腸菌中の Fe1 d1 融合タンパク質の発現

Fe1 d1 発現ベクター pET42 - F12H6GGC および pET42 - F12G
GC を、大腸菌 C2566 細胞 (New England Biolabs, Ipswi
ch, USA) 中に形質転換した。標的タンパク質の発現が最も高レベルであるクローン
を選択し、さらに実験に使用した。種々の組換え型 Fe1 d1 融合タンパク質の発現を
次の方法により実施した。発現プラスミド含有大腸菌の培養液を回転振盪機 (200 回転
/ 分; Infors, Bottmingen, Switzerland) を使って、カナ
マイシン (25 mg / l) 含有 2 x TY 培地中、30 で 0.8 ~ 1.0 の OD600 ま
で増殖させた。次に、0.2 mM の IPTG を加えることにより、Fe1 d1 融合タン
パク質遺伝子の発現を誘導した。培地を 5 mM の MgCl₂ で補充した。回転振盪機を使
って、20 で 18 時間、インキュベーションを継続した。得られたバイオマスを低速遠
心分離により集め、精製まで -20 で凍結した。

【0202】

ヘキサヒスチジントグ Fe1 d1 融合タンパク質の精製

F12H6GGC 融合タンパク質の精製のために、製造業者のインストラクションに従

10

20

30

40

50

って、USB PrepEaseキット (Affymetrix, High Wycombe, UK) を使用した。氷上で解凍後、100 ml の培養液由来の大腸菌細胞 (約 0.75 g) を 5 mM の DTT 含有 1 x LEW 緩衝液中に懸濁させた後、超音波処理により粉碎した。不溶性タンパク質および壊死組織片を遠心分離 (13,000 rpm、5 分) により除去した。清澄化ライセートを Ni-IDA カラムにアプライし、同じ緩衝液 (DTT 不含) で 2 回洗浄し、2 x 1.5 ml のイミダゾール含有 1 x E 緩衝液で溶出した。Fe1 d1 含有画分を SDS/PAGE により特定し (図 11A)、200 倍量の緩衝液 (20 mM のリン酸ナトリウム、2 mM の EDTA、pH 7.0) に対し 2 回透析した。透析後、製造業者のインストラクション (Invitrogen, Eugene, USA) に従い QuBit 蛍光光度計を使って、または 280 nm での UV 分光光度測定によりタンパク質濃度を推定した。精製タンパク質の同定は、質量分析 (図 11B) および抗 His タグ抗体 (Novagen、カタログ番号 71840-3; データは示さず) を使ってウェスタンブロットにより確認した。

10

【0203】

ヘキサヒスチジンタグ不含 Fe1 d1 融合タンパク質の精製

F12GGC 融合タンパク質の精製のために、アニオン交換および疎水性相互作用クロマトグラフィーを使用した。3 g の IPTG 誘導大腸菌を、20 ml のリシスバッファ L B (20 mM のトリス/HCl、pH 8.0、50 mM の NaCl、5 mM の DTT) 中での超音波処理により粉碎した。超音波処理後、溶液を 15000 g で 15 分間遠心分離し、上清を集めた。一定攪拌下で硫酸アンモニウムを 30 % 飽和の達成まで添加した後、室温で 5 分間インキュベートした。遠心分離後、回収した上清に固体硫酸アンモニウムを 50 % 飽和まで加えた。遠心分離後、タンパク質ペレットを集め、2 ml の L B に溶解し、過剰塩を L B で平衡化した 5 ml の HiTrap (商標) 脱塩カラム (GE Healthcare Life Sciences) で除去した。脱塩したタンパク質溶出液を L B で平衡化した 1 ml の HiTrap (商標) Cpto (商標) DEAE カラムにロードした。結合 F12GGC を増加濃度勾配の NaCl で溶出した。Fe1 d1 融合タンパク質含有画分を集め、プールした。得られた溶液を 4 倍量の 20 mM のトリス/HCl、pH 8.0、5 mM の DTT で希釈し、Mono Q5 / 50 GL カラムの L B 中にロードし、増加 NaCl 濃度勾配で溶出した。Fe1 d1 融合タンパク質含有画分を集め、プールした。5 M の NaCl を 2.5 M の濃度になるまで加え、DTT をその溶液に添加して 5 mM の濃度を維持した。その後、1 ml HiTrap (商標) Butyl HP カラムの 2.5 M の NaCl、5 mM の DTT 中に Fe1 d1 含有溶液をロードし、連続して減少する NaCl 濃度で溶出した。Fe1 d1 融合タンパク質含有画分を集め、プールした。全精製工程をクマシー染色した SDS/PAGE ゲルでモニターした (図 11C)。精製タンパク質の同定は、組換え型 Fe1 d1 に対し産生したポリクローナル抗体を使ってウェスタンブロットにより確認した (データは示さず)。

20

30

【0204】

実施例 16

組換え型 Fe1 d1 融合タンパク質 (単一または複数) の信頼性

Fe1 d1 融合タンパク質は、Fe1 d1 特異的モノクローナル抗体により同様に認識される。Fe1 d1 融合タンパク質 F12H6GGC および天然の Fe1 d1 (nFe1 d1) の Fe1 d1 特異的モノクローナル抗体 (mAb) への結合を、Indoor Biotechnologies (Cardiff, UK) のサンドイッチ ELISA の Fe1 d1 ELISA キット (6F9 / 3E4) を使って比較した。この目的のために、Nunc ELISA プレートに抗 Fe1 d1 mAb 6F9 (1 µg/ml) で、4 下、一晚コーティングした。プレートを 0.05 % ツイーン 20 含有 PBS (PBST) で洗浄し、Superblock (Invitrogen) を使って室温 (RT) で 2 時間ブロッキングした。天然 Fe1 d1 ならびに F12H6GGC (1 µg/ml) を 1 : 3 で系列希釈し、室温で 2 時間インキュベートした。プレートを PBST で洗浄し、ビオチン化抗 Fe1 d1 mAb 3E4 (1 µg/ml) を加え、

40

50

室温で1時間インキュベートした。検出には、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P O) 標識ストレプトアビジンを利用した。この目的のために、プレートをP B S Tで洗浄後、ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ (S i g m a、1 : 1 0 0 0 希釈) をプレートに室温で30分間加えた。検出はO P D 基質溶液および停止液としての5 % H₂ S O₄ を使って実施した。吸光度は、450 nmでE L I S A リーダー (B i o R a d) を使って測定した。

【0205】

天然 F e l d 1 および F 1 2 H 6 G G C は、E L I S A による類似した力価を与え、それらが F e l d 1 特異的 m A b により同様に認識され、したがって、組換え型 F e l d 1 F 1 2 H 6 G G C の信頼性が確認されたことを示す (図 1 2)。

10

【0206】

組換え型 F e l d 1 融合タンパク質は、ネコアレルギー患者の全血中の好塩基球を活性化する。ネコアレルギー患者の血液は、F e l d 1 特異的 I g E 抗体をその表面に保持する好塩基球を含み、これがアレルギー曝露時に、F c ε R I を架橋し、脱顆粒を引き起こす。組換え型 F e l d 1 の脱顆粒を引き起こす能力を調べるために、F e l d 1 アレルギー患者から全血を収集し、組換え型 F e l d 1 融合タンパク質 F 1 2 H 6 G G C と組み合わせて、B u h l m a n n L a b o r a t o r i e s (F l o w C a s t (登録商標), F K C C R) の B a s o p h i l A c t i v a t i o n T e s t キットで使用した。このアッセイは、C C R 3⁺ 好塩基球上の専用脱顆粒マーカー C D 6 3 の発現上昇を測定する。簡単に説明すると、100 μl の刺激緩衝液を50 μl の E D T A 処理全血と混合した。さらに、50 μl の種々の希釈度の天然 F e l d 1 または組換え型 F e l d 1 融合タンパク質 F 1 2 H 6 G G C を加えた。F c ε R I に対する m A b ならびに非特異的細胞活性化剤 (f M L P) を含む陽性対照溶液も同様にこのアッセイで試験した。P E 標識抗 C C R 3 抗体および F I T C 標識抗 C D 6 3 抗体を含む染色染料 (試料当たり 20 μl) を加え、37 で25分間インキュベートした。その後、リシスバッファーを加えて赤血球を溶解した。10分のインキュベーション後、試料を500 × g で5分間遠心分離し、洗浄緩衝液 (2 % F C S 含有 P B S) で洗浄した。第2の遠心分離ステップ後に、細胞ペレットを200 μl の洗浄緩衝液中に懸濁させ、フローサイトメーター (F A C S C a l i b u r) を使って捕捉した。試料を C e l l Q u e s t P r o ソフトウェアを使って解析した。C C R 3⁺ 好塩基球上での C D 6 3 発現の割合を解析した。

20

30

【0207】

組換え型 F e l d 1 融合タンパク質は、ネコアレルギー患者由来の好塩基球の脱顆粒を容易に誘発することがわかった。さらに、F e l d 1 と比較した場合、類似のレベルの脱顆粒が得られ、したがって、組換えにより産生した F e l d 1 融合タンパク質の信頼性を示す。(図 1 3 A / 図 1 3 B)。

【0208】

実施例 17

F e l d 1 融合タンパク質の C M V - N t t 8 3 0 および C M V - V L P へのカップリング

40

ヘテロ二機能性化学架橋剤、スクシンイミジル - 6 - (β - マレイミドプロピオンアミド) ヘキサノエート (S M P H) を使って、以下の方法で、F e l d 1 融合タンパク質 F 1 2 H 6 G G C を、C M V - N t t 8 3 0 および C M V - N p a d r V L P に共有結合させた。

【0209】

5 m M のホウ酸ナトリウム、2 m M の E D T A 緩衝液 (p H 9 . 0) 中に貯蔵された C M V - N t t 8 3 0 および C M V - N p a d r ウイルス様粒子を、P D 1 0 カラム (G E H e a l t h c a r e) を使って、30 % ショ糖および 2 m M の E D T A を含む 20 m M のリン酸ナトリウムによる緩衝液交換を行った。C M V - N p a d r または C M V - N t t 8 3 0 V L P の溶液を、室温で60分間、7.5 倍モル過剰のヘテロ二機能性架橋

50

剤 S M P H と反応させた。P D 10 カラムを用いて、未反応 S M P H を 30 % のショ糖および 2 m M の E D T A を含む 20 m M のリン酸ナトリウム中に取り除いた。

【0210】

F e l d 1 融合タンパク質 F 1 2 H 6 G G C を 10 倍モル過剰の T C E P (T h e r m o F i s h e r) で処理した。誘導体化した C M V - N t t 8 3 0 および C M V - N p a d r - V L P を、1 倍または 2 倍モル過剰の組換え型 F e l d 1 融合タンパク質 F 1 2 H 6 G G C と 23 で 3 時間反応させた。クーマシーブルーで染色した還元 S D S - P A G E (N u P A G E (登録商標) 4 ~ 12 % ビス - トリスゲル) によりカップリング反応を解析した。化学的コンジュゲーション反応後、約 44 . 5 k D a および 69 k D a の質量のタンパク質バンドが明らかであった (データは示さず) 。これらのバンドは、F e l d 1 融合タンパク質 F 1 2 H 6 G G C (20 k D a) と共有結合した C M V コートタンパク質 (24 . 5 k D a) および 1 つの F e l d 1 融合タンパク質 F 1 2 H 6 G G C と共有結合した 2 つの C M V コートタンパク質分子 (49 k D a) に相当し、これらはそれぞれ、F e l d 1 - C M V V L P の形成を示している。

10

【0211】

実施例 18

マウスにおける F e l d 1 - C M V V L P に対する免疫反応

3 匹の雌 B a l b / c マウスの群を、実施例 10 に記載のように調製した、F e l d 1 - C M V - N t t 8 3 0 - V L P、または F e l d 1 融合タンパク質 F 1 2 H 6 G G C と単純に混合した C M V - N t t 8 3 0 - V L P で免疫化した。両組成物は、同じ量の F e l d 1 融合タンパク質を含む。10 μ g のそれぞれの組成物を、150 m M の P B S (p H 7 . 4) 中で調製し、150 μ l を 0 日目および 14 日目に静脈内に注射した。マウスから、0 日目 (免疫前)、14 日目、および 21 日目に採血し、天然 F e l d 1 特異的 I g G 抗体に対し、E L I S A により血清を分析した。

20

【0212】

N U N C E L I S A プレートに P B S 中の 1 μ g / m L の濃度の天然 F e l d 1 (I n d o o r B i o t e c h n o l o g i e s) により、4 で、一晚コーティングした。プレートを S u p e r b l o c k (I n v i t r o g e n) でブロッキングした。O D 50 を検出するために、血清の系列希釈を実施した。O D 50 は、最大 O D 値の半分に達する希釈の逆数を表す。I g G 抗体に特異的な F e l d 1 を、西洋わさびペルオキシダーゼ (H R P O) (J a c k s o n) で直接標識した抗マウス I g G で検出した。H R P O による o - フェニレンジアミンジヒドロクロリド (O P D) の変換を 450 n m でのカラー反応として測定した。この反応は、7 分のインキュベーション後、5 % 硫酸 (H₂ S O₄) を添加することにより停止された。

30

【0213】

単回免疫化後にのみ、F e l d 1 特異的 I g G 抗体をマウス中で検出した (14 日目に) 。反応を第 2 回目の注射により、ブーストした。混合組成物に比べて、F e l d 1 - C M V V L P は、F e l d 1 特異的 I g G 抗体の誘導を大きく増加させた。これは、F e l d 1 融合タンパク質の V L P に対する化学的コンジュゲーションの免疫増強効果を示している (図 14) 。

40

【0214】

実施例 19

ヒト I L - 1 β の C M V - N t t 8 3 0 および C M V - V L P へのカップリング

ヘテロ二機能性化学架橋剤スクシンイミジル - 6 - (β - マレイミドプロピオンアミド) ヘキサノエート (S M P H) を使って、次の方法で、ヒト I L - 1 β 成熟タンパク質 (配列番号 60) を、C M V - N t t 8 3 0 および C M V - N p a d r V L P に共有結合させた。

【0215】

5 m M のホウ酸ナトリウム、2 m M の E D T A 緩衝液 (p H 9 . 0) 中に貯蔵された C M V - N t t 8 3 0 および C M V - N p a d r ウイルス様粒子を、P D 10 カラム (G E

50

Healthcare) を使って、30% ショ糖および 2 mM の EDTA を含む 20 mM のリン酸ナトリウムによる緩衝液交換を行った。CMV - Npdr または CMV - Ntt830 VLP の溶液を、室温で 60 分間、7.5 倍モル過剰のヘテロ二機能性架橋剤 SMPH と反応させた。PD10 カラムを用いて、未反応 SMPH を 30% のショ糖および 2 mM の EDTA を含む 20 mM のリン酸ナトリウム中に取り除いた。

【0216】

IL-1 β タンパク質を 5 倍モル過剰の TCEP (Thermo Fisher) で処理した。誘導体化した CMV - Ntt830 および CMV - Npdr - VLP を、1 倍または 2 倍モル過剰のヒト IL1 β を用いて、23 で 3 時間処理した。クーマシーブルーで染色した還元 SDS - PAGE (NuPAGE (登録商標) 4 ~ 12% ビス - トリスゲル) によりカップリング反応を解析した。化学的コンジュゲーション反応後、約 41.5 kDa および 66 kDa の質量のタンパク質バンドが明らかであった (データは示さず)。これらのバンドは、IL1 β タンパク質 (17 kDa) と共有結合した CMV コートタンパク質 (24.5 kDa) および 1 つの IL1 β タンパク質と共有結合した 2 つの CMV コートタンパク質分子 (49 kDa) に相当し、これらはそれぞれ、IL1 β - CMV VLP の形成を示している。

10

【0217】

実施例 20

イヌ IL-5 の CMV - Ntt830 へのカップリングおよび免疫反応の誘導

イヌ IL-5 (cIL-5) (配列番号 61) は、Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192 - 3200 におけるマウス IL-5 に関する記載と同様にして発現した、遊離 Cys を含むように改変される。そのように改変された cIL-5 の VLP CMV - Ntt830 へのカップリングを以下のように行った。cIL-5 に結合させるために、CMV - Ntt830 VLP が、最初に 30 倍過剰のヘテロ二機能性化学架橋剤、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート (SMPH) で誘導体化される。非結合 SMPH が PBS に対する透析により除去される。PBS (pH 8.0) 中の等モル量のトリ (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP) を使って cIL-5 を 1 時間還元した。還元した cIL-5 (80 μ M) を、40 μ M の SMPH 誘導体化 CMV - Ntt830 と共に 22 で 4 時間インキュベートした。反応物を PBS、pH 8.0 に対し 12 時間透析した。

20

30

【0218】

CMV - Ntt830 の VLP に結合した cIL-5 によるイヌの免疫化

4 匹の雌異系交配イヌ群は、上述のように、SMPH を介して cIL-5 に結合した CMV - Ntt830 VLP で免疫化される。50 μ g の組成物を、20 mM のヘプス、50 mM の NaCl (pH 7.3) 中で 500 μ l に希釈し、0 日目および 14 日目に皮下に注射する。イヌから、0 日目 (免疫前)、14 日目、および 21 日目に採血し、cIL-5 および CMV - Ntt830 特異的 ELISA を使って、血清を分析する。

【0219】

ELISA

ELISA プレートに 10 μ g/ml の濃度の cIL-5 または 2 μ g/ml の濃度の CMV - Ntt830 VLP でコーティングする。プレートをブロッキングした後、系列希釈マウス血清と共にインキュベートする。結合抗体が酵素標識抗イヌ IgG で検出される。対照として、同じイヌの免疫前血清を同様に試験する (データは示さず)。全イヌは、cIL-5 ならびに CMV - Ntt830 に対し明確で強力な IgG 応答を示す。

40

【0220】

実施例 21

イヌ IL-4 の CMV - Ntt830 へのカップリングおよび免疫反応の誘導

イヌ IL-4 (cIL-4) (配列番号 62) は、Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192 - 3200 におけるマウス IL-5 に関する記載と同様にして発現した、遊離 Cys を含むように改変される。そのように改変された cIL

50

- 4 の V L P C M V - N t t 8 3 0 へのカップリングが以下のように行われる。c I L - 4 に結合させるために、C M V - N t t 8 3 0 V L P が、最初に 3 0 倍過剰のヘテロ二機能性化学架橋剤、スクシンイミジル - 6 - (β - マレイミドプロピオンアミド) ヘキサノエート (S M P H) で誘導体化される。非結合 S M P H が P B S に対する透析により除去される。P B S (p H 8 . 0) 中の等モル量のトリ (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (T C E P) を使って c I L - 4 を 1 時間還元した。還元した c I L - 4 (8 0 μ M) を、4 0 μ M の S M P H 誘導体化 C M V - N t t 8 3 0 と共に 2 2 で 4 時間インキュベートした。反応物を P B S 、 p H 8 . 0 に対し 1 2 時間透析した。

【 0 2 2 1 】

C M V - N t t 8 3 0 の V L P に結合した c I L - 4 によるイヌの免疫化

10

4 匹の雌異系交配イヌ群は、上述のように、S M P H を介して c I L - 4 に結合した C M V - N t t 8 3 0 V L P で免疫化される。5 0 μ g の組成物を、2 0 m M のヘペス、5 0 m M の N a C l (p H 7 . 3) 中で 5 0 0 μ l に希釈し、0 日目および 1 4 日目に皮下に注射する。イヌから、0 日目 (免疫前) 、1 4 日目、および 2 1 日目に採血し、c I L - 4 および C M V - N t t 8 3 0 特異的 E L I S A を使って、血清を分析する。

【 0 2 2 2 】

E L I S A

E L I S A プレートは、1 0 μ g / m l の濃度の c I L - 4 または 2 μ g / m l の濃度の C M V - N t t 8 3 0 V L P でコーティングされる。プレートをブロッキングした後、系列希釈イヌ血清と共にインキュベートされる。結合抗体が酵素標識抗イヌ I g G で検出される。対照として、同じイヌの免疫前血清を同様に試験する (データは示さず) 。全イヌは、c I L - 4 ならびに C M V - N t t 8 3 0 に対し明確で強力な I g G 応答を示す。

20

【 0 2 2 3 】

実施例 2 2

イヌ I L - 1 3 の C M V - N t t 8 3 0 へのカップリングおよび免疫反応の誘導

イヌ I L - 1 3 (c I L - 1 3) (配列番号 6 3) は、Z o u Y , e t a l . , V a c c i n e 2 8 (2 0 1 0) 3 1 9 2 - 3 2 0 0 におけるマウス I L - 5 に関する記載と同様にして発現した、遊離 C y s を含むように改変される。そのように改変された c I L - 1 3 の V L P C M V - N t t 8 3 0 へのカップリングを以下のように行った。c I L - 1 3 に結合させるために、C M V - N t t 8 3 0 V L P が、最初に 3 0 倍過剰のヘテロ二機能性化学架橋剤、スクシンイミジル - 6 - (β - マレイミドプロピオンアミド) ヘキサノエート (S M P H) で誘導体化される。非結合 S M P H が P B S に対する透析により除去される。P B S (p H 8 . 0) 中の等モル量のトリ (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (T C E P) を使って c I L - 1 3 を 1 時間還元した。還元した c I L - 1 3 (8 0 μ M) を、4 0 μ M の S M P H 誘導体化 C M V - N t t 8 3 0 と共に 2 2 で 4 時間インキュベートした。反応物を P B S 、 p H 8 . 0 に対し 1 2 時間透析した。

30

【 0 2 2 4 】

C M V - N t t 8 3 0 の V L P に結合した c I L - 1 3 によるイヌの免疫化

4 匹の雌異系交配イヌ群が、上述のように、S M P H を介して c I L - 1 3 に結合した C M V - N t t 8 3 0 V L P で免疫化される。5 0 μ g の組成物を、2 0 m M のヘペス、5 0 m M の N a C l (p H 7 . 3) 中で 5 0 0 μ l に希釈し、0 日目および 1 1 3 日目に皮下に注射する。イヌから、0 日目 (免疫前) 、1 4 日目、および 2 1 日目に採血し、c I L - 1 3 および C M V - N t t 8 3 0 特異的 E L I S A を使って、血清を分析した。

40

【 0 2 2 5 】

E L I S A

E L I S A プレートを 1 0 μ g / m l の濃度の c I L - 1 3 または 2 μ g / m l の濃度の C M V - N t t 8 3 0 V L P でコーティングした。プレートをブロッキングした後、系列希釈イヌ血清と共にインキュベートされる。結合抗体が酵素標識抗イヌ I g G で検出される。対照として、同じイヌの免疫前血清を同様に試験する (データは示さず) 。全イヌは、c I L - 1 3 ならびに C M V - N t t 8 3 0 に対し明確で強力な I g G 応答を示す。

50

【0226】

実施例23

ヒトIL-31のCMV-Ntt830へのカップリングおよび免疫反応の誘導

ヒトIL-31(hIL-31)(配列番号43)は、Zou Y, et al., Vaccine 28(2010)3192-3200におけるマウスIL-5に関する記載と同様にして発現した、遊離Cysを含むように改変される。そのように改変されたhIL-31のVLP CMV-Ntt830へのカップリングが以下のように行われる。hIL-31に結合させるために、CMV-Ntt830 VLPが、最初に30倍過剰のヘテロ二機能性化学架橋剤、スクシンイミジル-6-(β-マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート(SMPH)で誘導体化される。非結合SMPHがPBSに対する透析により除去される。PBS(pH8.0)中の等モル量のトリ(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP)を使ってhIL-31が1時間還元される。還元したhIL-31(80 μM)が、40 μMのSMPH誘導体化CMV-Ntt830と共に22で4時間インキュベートされる。反応物をPBS、pH8.0に対し12時間透析した。

10

【0227】

CMV-Ntt830のVLPに結合したhIL-31によるマウスの免疫化

4匹の雌BALB/cマウス群が、上述のように、SMPHを介してIL-31に結合したCMV-Ntt830 VLPで免疫化される。50 μgの組成物を、20 mMのヘPes、50 mMのNaCl(pH7.3)中で500 μlに希釈し、0日目および113日目に皮下に注射する。イヌから、0日目(免疫前)、14日目、および21日目に採血し、hIL-31およびCMV-Ntt830特異的ELISAを使って、血清が分析される。

20

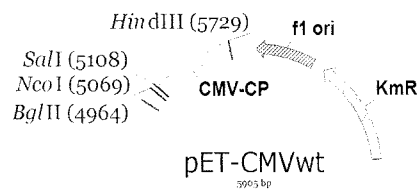
【0228】

ELISA

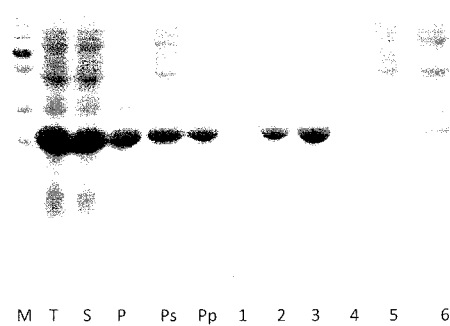
ELISAプレートを10 μg/mlの濃度のhIL-31または2 μg/mlの濃度のCMV-Ntt830 VLPでコーティングした。プレートをブロッキングした後、系列希釈マウス血清と共にインキュベートする。結合抗体が酵素標識抗マウスIgGで検出される。対照として、同じマウスの免疫前血清が同様に試験される(データは示さず)。全マウスは、hIL-31ならびにCMV-Ntt830に対し明確で強力なIgG応答を示す。

30

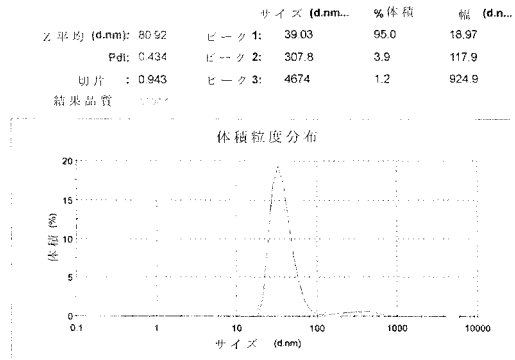
【図 1】



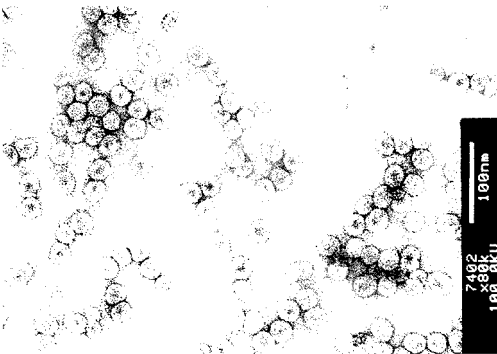
【図 2】



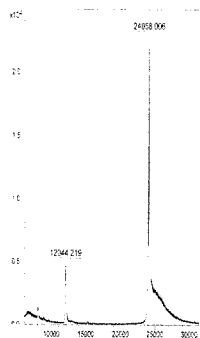
【図 3 A】



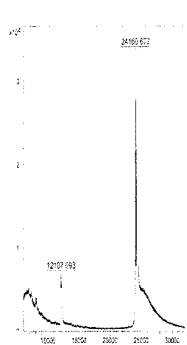
【図 3 B】



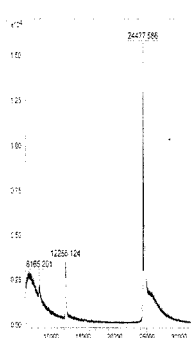
【図 4 A】



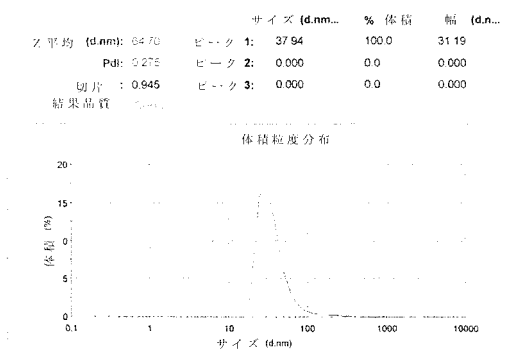
【図 4 B】



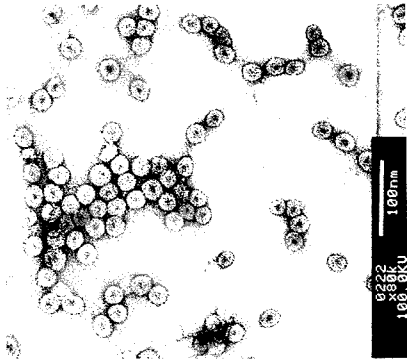
【図 4 C】



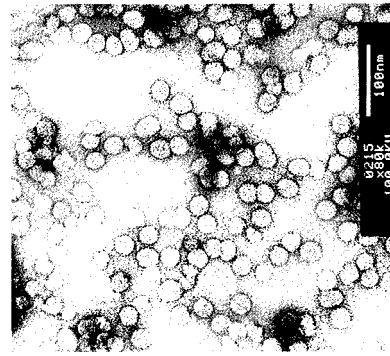
【図 5 A】



【図 5 B】

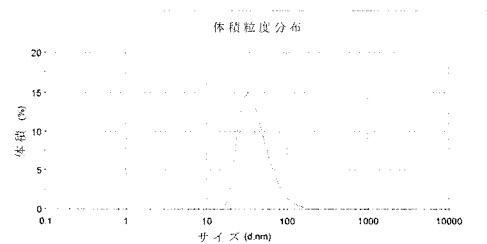


【図 6 B】

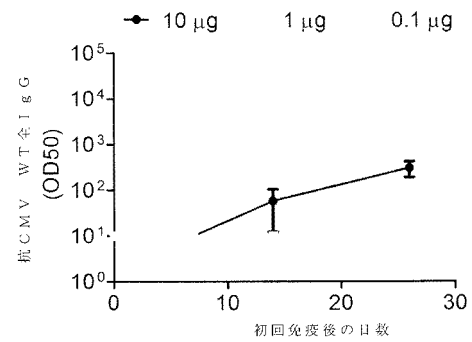


【図 6 A】

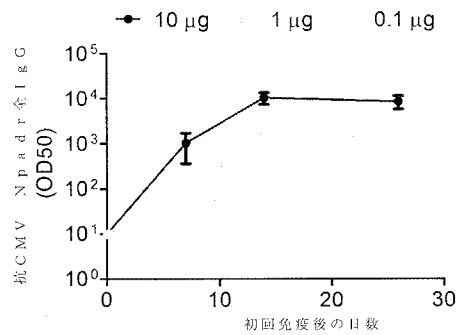
	サイズ (d.nm...	%サイズ	幅 (d.n...
Z 平均 (d.nm): 51.85	Peak 1: 45.98	99.5	20.78
Pd: 0.165	Peak 2: 44.48	0.5	992.6
切片 : 0.959	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
結果品質			



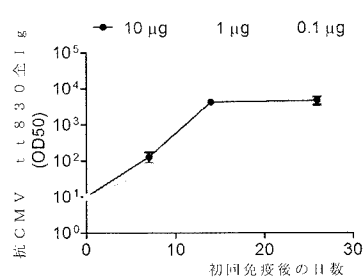
【図 7 A】



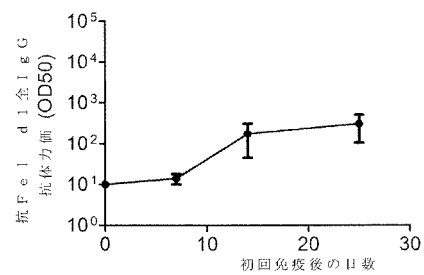
【図 7 B】



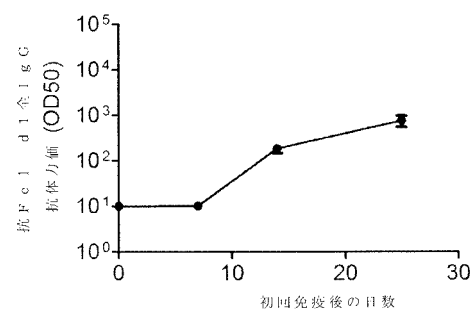
【図 7 C】



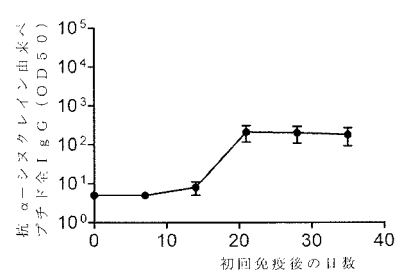
【図 8 A】



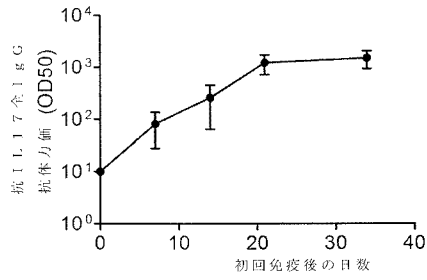
【図 8 B】



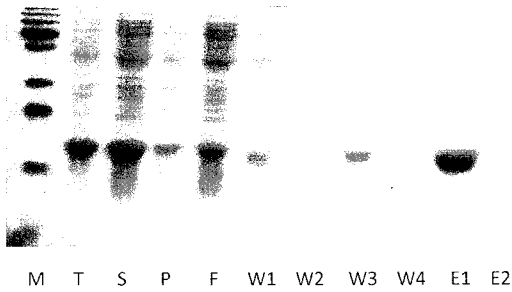
【図 9】



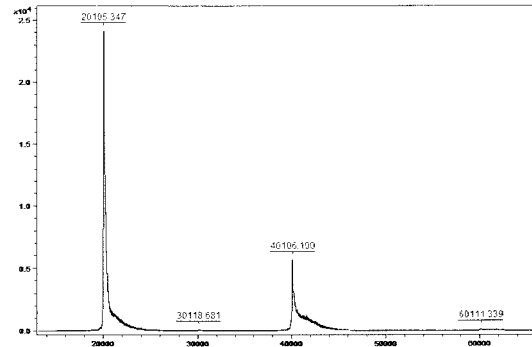
【図 1 0】



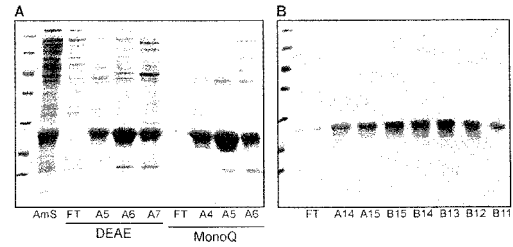
【図 1 1 A】



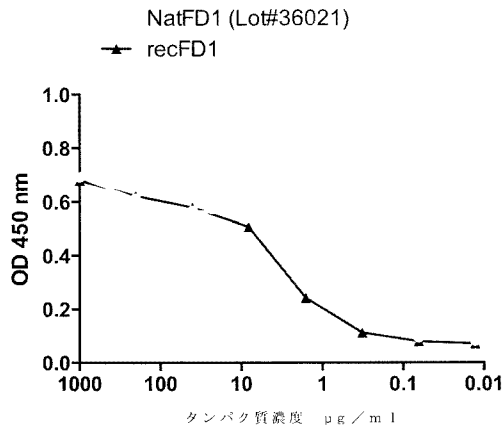
【図 1 1 B】



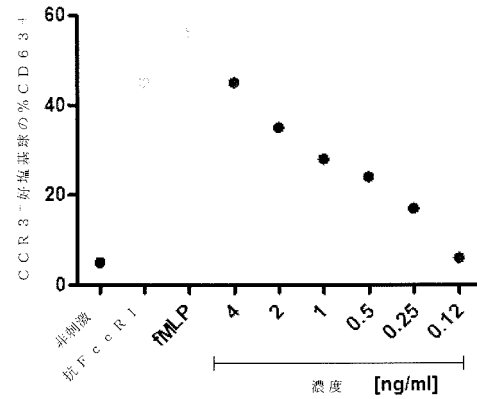
【図 1 1 C】



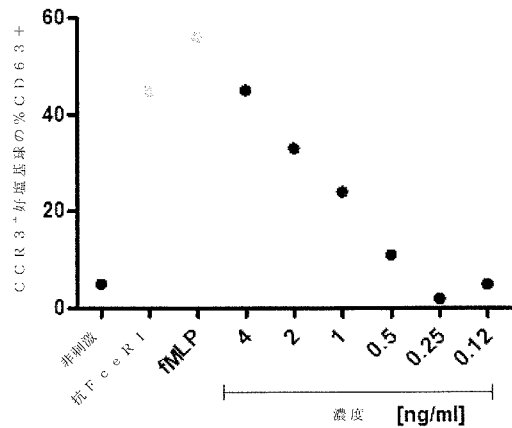
【図 1 2】



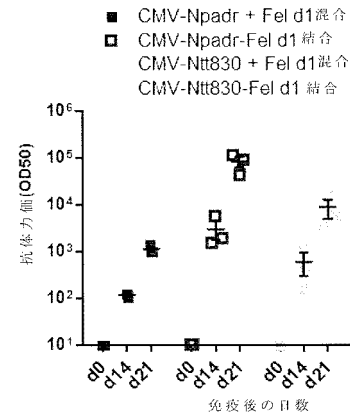
【図 1 3 B】



【図 1 3 A】



【図 1 4】



【配列表】

2017538672000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/074269

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/074269

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/12 A61K39/35 C07K14/08
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/030608 A1 (SZENT ISTVAN EGYETEM [HU]; MTA AGRARTUDOMANYI KUTATOKOZPONT [HU]; MEZ) 7 March 2013 (2013-03-07) Whole doc., in particular p.8 and examples.	1-78
Y	----- GELLERT A ET AL: "A Cucumber Mosaic Virus Based Expression System for the Production of Porcine Circovirus Specific Vaccines", PLOS ONE 20121220 PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE USA, vol. 7, no. 12, 20 December 2012 (2012-12-20), XP055221371, ISSN: 1932-6203 Results, Discussion ----- -/-	1-78

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2015

Date of mailing of the international search report

11/12/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Roscoe, Richard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/074269

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NUZZACI M ET AL: "Structural and biological properties of Cucumber mosaic virus particles carrying hepatitis C virus-derived epitopes", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 155, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 118-121, XP025837644, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2008.10.005 [retrieved on 2008-11-20] Results, Discussion -----	1-78
Y	CALDEIRA J D C ET AL: "Immunogenic display of diverse peptides, including a broadly cross-type neutralizing human papillomavirus L2 epitope, on virus-like particles of the RNA bacteriophage PP7", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 28, no. 27, 17 June 2010 (2010-06-17), pages 4384-4393, XP027064058, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2010.04.049 [retrieved on 2010-05-28] Whole doc., in particular p.4391, col.2 -----	1-78
Y	JEMON K ET AL: "An Enhanced Heterologous Virus-Like Particle for Human Papillomavirus Type 16 Tumour Immunotherapy", PLOS ONE 20130614 PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE USA, vol. 8, no. 6, 14 June 2013 (2013-06-14), XP055221454, ISSN: 1932-6203 Whole doc., especially Fig.1 -----	1-78
Y	WO 2006/032674 A1 (CYTOS BIOTECHNOLOGY AG [CH]; BACHMANN MARTIN [CH]; TISSOT ALAIN [CH];) 30 March 2006 (2006-03-30) Whole doc., especially para. [0022, 0068] -----	1-78
Y	WO 2006/097530 A2 (CYTOS BIOTECHNOLOGY AG [CH]; BACHMANN MARTIN [CH]; BAUER MONIKA [CH];) 21 September 2006 (2006-09-21) Whole doc., in particular para. [0022, 0050, 0085] -----	1-78
Y	WO 2005/091753 A2 (LARGE SCALE BIOLOGY CORP [US]; MCCORMICK ALISON A [US]; SMITH MARK L [US]) 6 October 2005 (2005-10-06) Whole doc., in particular p.9, 1.7 - p.10, 1.23; p.55, 1.6-13 -----	1-78
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/074269

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/052395 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BIEMANS RALPH [BE]; COLAU BRIGITTE DES) 24 June 2004 (2004-06-24) Whole doc., preferably p.7, bottom para. to p.9, 4th full para. -----	1-78
A	ALAIN C. TISSOT ET AL: "Versatile Virus-Like Particle Carrier for Epitope Based Vaccines", PLOS ONE, vol. 5, no. 3, 23 March 2010 (2010-03-23), page e9809, XP055155235, DOI: 10.1371/journal.pone.0009809 Whole doc., espec. Fig.1, Table 1 -----	1-78

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/074269

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013030608	A1	07-03-2013	NONE
WO 2006032674	A1	30-03-2006	AU 2005286475 A1 30-03-2006 BR P10516953 A 30-09-2008 CA 2580208 A1 30-03-2006 JP 2008513035 A 01-05-2008 KR 20070057921 A 07-06-2007 NZ 554387 A 25-09-2009 US 2008292652 A1 27-11-2008 WO 2006032674 A1 30-03-2006
WO 2006097530	A2	21-09-2006	AU 2006224529 A1 21-09-2006 BR P10608455 A2 05-01-2010 CA 2599218 A1 21-09-2006 CN 101141979 A 12-03-2008 CN 103203016 A 17-07-2013 DK 1868642 T3 24-06-2013 EP 1868642 A2 26-12-2007 ES 2424229 T3 30-09-2013 JP 5302671 B2 02-10-2013 JP 2008535800 A 04-09-2008 JP 2013155176 A 15-08-2013 KR 20070112225 A 22-11-2007 NZ 561040 A 30-04-2009 PT 1868642 E 10-07-2013 US 2009175896 A1 09-07-2009 US 2011045013 A1 24-02-2011 US 2013344098 A1 26-12-2013 WO 2006097530 A2 21-09-2006 ZA 200707413 A 28-01-2009
WO 2005091753	A2	06-10-2005	NONE
WO 2004052395	A1	24-06-2004	AU 2003290012 A1 30-06-2004 WO 2004052395 A1 24-06-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16		
A 6 1 P 5/28	(2006.01)	A 6 1 P 5/28		
A 6 1 P 31/16	(2006.01)	A 6 1 P 31/16		
A 6 1 P 33/06	(2006.01)	A 6 1 P 33/06		
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14		
A 6 1 P 25/06	(2006.01)	A 6 1 P 25/06		
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10		
A 6 1 K 39/12	(2006.01)	A 6 1 K 39/12		
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	G	
A 6 1 K 35/76	(2015.01)	A 6 1 K 35/76		
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00		
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A	
C 1 2 N 7/01	(2006.01)	C 1 2 N 7/01		

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

(72)発明者 プンベンス, ポール

ラトビア国 エルヴィー - 1 0 1 0 リガ, パジェニカス ストリート 2 7 / 2 9 - 2 2

F ターム(参考) 4B065 AA26X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45

4C085 AA03 BA51 CC07 DD23 EE01

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA52 MA55 MA59 MA63 MA66 NA05

ZA02 ZA16 ZB11 ZB13 ZB33 ZB38 ZC10 ZC35

4H045 AA30 BA10 BA41 CA01 DA86 EA22 EA28