

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-513920
(P2025-513920A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	7/04 (2006.01)	C 1 2 N	7/04	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/18 (2006.01)	C 0 7 K	14/18		4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47		4 C 0 8 7
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全36頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-561984(P2024-561984)			(71)出願人	524383085
(86)(22)出願日	令和5年4月14日(2023.4.14)				C y n - Kバイオ株式会社
(85)翻訳文提出日	令和6年12月13日(2024.12.13)				京都府京都市左京区吉田橋町3 2 番地
(86)国際出願番号	PCT/JP2023/015132			(71)出願人	504132272
(87)国際公開番号	WO2023/204148				国立大学法人京都大学
(87)国際公開日	令和5年10月26日(2023.10.26)				京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1
(31)優先権主張番号	63/332,037			(74)代理人	100106518
(32)優先日	令和4年4月18日(2022.4.18)				弁理士 松谷 道子
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100138911
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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				弁理士 櫻井 陽子
	最終頁に続く			(72)発明者	上野 隆司
					アメリカ合衆国2 1 6 0 1 メリーランド州イーストン、マラード・ドライブ2 8 3 0 7
				(72)発明者	赤畑 渉
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 炎症性疾患の処置

(57)【要約】

本開示は、それを必要とする哺乳動物対象における炎症性疾患、とりわけ加齢に関連した炎症性疾患を処置するための方法であって、ウイルス構造タンパク質およびガレクチンー3抗原を含むウイルス様粒子の有効量を含む方法、その目的に向けてそれを含む組成物またはワクチンを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

炎症性疾患の処置における使用のための、ウイルス構造タンパク質およびガレクチン-3 抗原を含むウイルス様粒子（VLP）。

【請求項 2】

前記炎症性疾患が加齢に関連した炎症性疾患である、請求項 1 に記載の VLP。

【請求項 3】

前記炎症性疾患が中枢神経系（CNS）における炎症である、請求項 1 に記載の VLP。

【請求項 4】

前記 CNS における前記炎症が神経変性疾患である、請求項 3 に記載の VLP。

【請求項 5】

前記神経変性疾患が、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS、「ルー・ゲーリック病」）、ハンチントン病、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病または一般の神経変性疾患である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ウイルス構造タンパク質がアルファウイルスまたはフラビウイルス由来である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の VLP。

【請求項 7】

前記ウイルス構造タンパク質がチクングニアウイルスまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス由来である、請求項 6 に記載の VLP。

【請求項 8】

前記ウイルス構造タンパク質が、チクングニアウイルス株 37997 もしくは株 OPY-1、またはベネズエラウマ脳炎ウイルス株 TC-83 に由来する、請求項 7 に記載の VLP。

【請求項 9】

少なくとも 1 つのガレクチン-3 抗原が前記ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質 E3 に挿入されている、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の VLP。

【請求項 10】

前記ガレクチン-3 抗原が、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 のペプチドから選択される、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の VLP。

【請求項 11】

前記ガレクチン-3 抗原が配列番号 12 のペプチドである、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の VLP。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つのガレクチン-3 抗原が、配列番号 6 の 321 位および 326 位、配列番号 7 の 321 位と 326 位または配列番号 8 の 330 位と 335 位に相当する残基の間に挿入されている、請求項 7 に記載の VLP。

【請求項 13】

ウイルス構造タンパク質およびガレクチン-3 抗原を含むウイルス様粒子の有効量を含む、哺乳動物対象における炎症性疾患の処置向けの医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 14】

哺乳動物対象における炎症性疾患の処置向けの医薬品を製造するための、ウイルス構造タンパク質およびガレクチン-3 抗原を含むウイルス様粒子の使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本開示は、対象における炎症性疾患、とりわけ加齢に関連した炎症性疾患の処置に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

加齢は、アルツハイマー病やパーキンソン病などのほとんどの神経変性疾患にとって主たるリスク因子である。最も一般的な種類の神経変性疾患は高齢個体において主として発生する。実際、65歳を超える10人に1人が神経変性疾患を患うと予想され、その可能性は加齢に伴い指数関数的に増大しつつあるという状況である。

【0003】

中枢神経系（CNS）の神経変性疾患は、神経細胞の進行性かつ不可逆的な喪失によって定義され、運動機能および／または認知機能の喪失を含めて、行動障害を伴う。神経変性疾患と老化の間の強い関連を考慮すると、神経変性は、多くの場合、脳の老化プロセスの一部と考察される。

10

【0004】

神経変性疾患に利用可能である効果的な処置法はほとんどないかまったくなく、ほとんどが、その疾患の根源を標的にすることよりはむしろ、症状を緩和することに焦点を合わせている。したがって、脳の老化プロセスに対処して直接的にその進行を遅らせることで、神経変性疾患の発症および負担を軽減するためのより優れた戦略を提供する可能性がある。

【0005】

神経変性疾患は、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS、「ルー・ゲーリック病」）、ハンチントン病、アルツハイマー病等を始めとする多種多様な重度の衰弱症状を包含する。これらの疾患は、時間とともに患者の症状が徐々にしかし容赦なく悪化することによって特徴付けられる。

20

【0006】

アルツハイマー病（AD）およびパーキンソン病（PD）は最も普通の神経変性疾患である。アルツハイマー病（AD）は、記憶喪失および認知障害によって特徴付けられる多因子性の進行性神経変性疾患である。目下、アルツハイマー病（AD）の利用可能な療法によって限られた有効性が示されてきたが、今日まで真の治療はまったく存在しないという状況である。

【0007】

パーキンソン病（PD）は、黒質緻密部（SNpc）から背側線条体へと突出するドーパミン（DA）ニューロンの進行性変性によって特徴付けられる。線条体における結果として生じるドーパミンの喪失により、筋固縮、安静時振戦、姿勢反射障害および動作緩徐を含めて、衰弱性の運動機能障害にいたる。現在、パーキンソン病（PD）に利用可能な療法は、運動症状の緩和をもたらすが、ドーパミン（DA）ニューロンの進行性変性を防ぐのに必要な神経保護効果を提示するには不十分である。さらに、PDの、衰弱性である、複数の非運動性症状を同時に標的とする療法はまったくない。

30

【0008】

神経変性疾患は慢性の異常な炎症を示す。

【0009】

ガレクチンは、β-ガラクトシドに対して高親和性を示すレクチンファミリーのメンバーである。哺乳動物では、LGALS遺伝子によってコードされる約15のガレクチンが発見されてきたが、これらは連続的に付番されている。現在のところ、ヒトでは、ガレクチン-1、-2、-3、-4、-7、-7B、-8、-9、-9B、-9C、-10、-12、-13、-14および-16のみが特定されている。

40

【0010】

ガレクチン-3（Gal-3）は、β-ガラクトシド含有複合糖質（糖タンパク質または糖脂質）に結合する、動物レクチンの高度に保存されたファミリーのメンバーである（非特許文献1：Henderson NC 2006、非特許文献2：Mourad-Zeidan AA 2008）。Gal-3は、他のガレクチンファミリータンパク質の内で2つのドメインから構成される構造においてユニークである：炭水化物結合領域を含有するカルボキシル末端ドメインおよび炭水化物と非炭水化物リガンドを架橋する9個のアミノ酸のタンデムリピートから

50

主に構成されるアミノ末端ドメインである（非特許文献3：Barondes SH 1994）。Gal-3は、単球、マクロファージおよび上皮細胞を始めとする種々のタイプの細胞によって、しかし主にマクロファージによって分泌される（非特許文献4：Reynolds 2005、非特許文献5：MacKinnon AC 2008）。分泌された細胞外Gal-3はホモ二量体または五量体を形成し、これは生物学的機能にとって重要である。ガレクチン-3のN末端ドメインは、タンパク質オリゴマーの形成に重要であることが実証されている（非特許文献6：Dumic J 2006、非特許文献7：Kuklinski S 1998、非特許文献8：Lepur A 2012）。放出されたタンパク質は細胞外分子として機能して、細胞を活性化し、細胞-細胞および細胞-ECMの相互作用を媒介し、種々のタイプの細胞の遊走を誘導し、T細胞受容体シグナル伝達を負に調節することができる（非特許文献9：Yang RY 1996）。Gal-3は、肺線維症、肝線維症、全身性硬化症および心筋線維症を始めとする線維性疾患および患者の種々のモデルで増加することが示された（非特許文献10：Henderson NC 2008、非特許文献11：Barman, et al. 2019、非特許文献12：Nishi Y 2007、非特許文献13：De Boer 2010）。このことが示唆するところは、Gal-3が組織線維症の重要なメディエーターであるとともに組織線維症の効果的な治療標的である可能性があること、である。現在のところ、治験的なガレクチン-3阻害剤の前臨床および臨床研究により、線維性障害に対する保護作用が示された（非特許文献14：Nikhil Hirani 2017、非特許文献15：Yu L 2013）。

10

【0011】

特発性パーキンソン病（IPD）などの神経変性疾患、神経保護および神経修復処置の選択肢において、血漿ガレクチン-3レベルがバイオマーカーおよび治療薬として重要になることが報告されている（非特許文献16：Yazar HO, et al., J Clinical Neuroscience 2019）。ガレクチン-3は、AD患者および5xFAD（家族性アルツハイマー病）マウスの脳において高度に上方制御されており、Aβプラークに関連するミクログリアで特異的に発現していることが見出された（非特許文献17：Boza-Serrano A et al. Acta Neuropathology, 2019）。血清およびCSF試料中のガレクチン-3レベルは、対照群と比較してADおよびALSの患者においてより高く、このことによって可能性として示唆されるところは、ADおよびALSの患者と健常者（対照群）におけるガレクチン-3の血清レベルおよびCSFレベルと認知状態との間の決定的な関連性、である（非特許文献18：Ashraf GM et.al. Front Neuroscience, 2018）。

20

30

【0012】

過去100～150年間の医学における主たる成功例の1つは、種々の感染症を標的とするワクチンである。ワクチンは、抗生物質と一緒に、ヒトの他のどの部分よりもヒトの健康にとってより重要であった可能性が高い。ワクチンが成功したことから、アレルギー、自己免疫、およびがんなどの非感染性疾患の処置にワクチン技術を使用することへの関心が高まっている。しかし、こういった疾患の標的は一般に自己抗原であり、このことが有効性に問題を引き起こす場合がある。非自己抗原の細菌、ウイルス、または寄生虫のタンパク質と比較して、自己抗原に対して強力な抗体応答を誘導することは、耐性機構のために相当に困難である（非特許文献19：Hellman 2008、非特許文献20：Falk Saupé 2015）。

40

【0013】

アルファウイルスは、トガウイルス（Togaviridae）科の遺伝的、構造的、および血清学的に関連した蚊が媒介する一連のウイルスを含む。アルファウイルスには、東部ウマ脳炎ウイルス（EEEV）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）、エバングレーズウイルス、ムカンボウイルス、ピクスナウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス（WEEV）、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ミドルバーグウイルス、チクングニアウイルス（CHIKV）、オニオンニオンウイルス、ロスリバーウイルス、バーマ森林ウイルス、ゲタウイルス、サギヤマウイルス、ベバルウイルス、マヤロウイルス、ウナウイルス、アウラウイルス、ワタロアウイルス、ババンキウイルス、キジラガチウイルス、ハイランドJウイルス、フォートモーガンウイルス、ヌドゥムウイルス、およびバギー

50

クリークウイルスが含まれる。単一のウイルスタンパク質を含有する構造サブユニットであるカプシドは、正20面体ヌクレオカプシドでRNAゲノムと会合する。ビリオン中ではカプシドは、膜貫通タンパク質スパイクの規則的なアレイで覆われた脂質エンベロープに囲まれており、このスパイクのそれぞれが、2つの糖タンパク質E1とE2のヘテロダイマー複合体からなる。

【0014】

ウイルス様粒子（VLP）は、標準の天然ウイルスの組織化および立体構造を模倣するが、ウイルスゲノムを欠損している多タンパク質構造であり、したがって、より安全かつより安価なワクチン候補をもたらす可能性がある。ひと握りのVLPベースの予防ワクチンが現在のところ世界的には市販されている：GlaxoSmithKlineのEngerix（登録商標）（B型肝炎ウイルス）およびCervarix（登録商標）（ヒトパピローマウイルス）、ならびにMerck and Co., Inc.のRecombivax HB（登録商標）（B型肝炎ウイルス）およびGardasil（登録商標）（ヒトパピローマウイルス）が、いくつかの例である。他のVLPベースのワクチンの候補は、臨床試験中であるかまたは前臨床評価が行われており、例えば、インフルエンザウイルス、パルボウイルス、ノーウォークウイルスおよび種々のキメラVLPである。前臨床試験でのそれらの成功にも関わらず、ほかの多数が小規模の基盤研究になおも限定されている。大規模なVLP生産の意義が、プロセス制御、監視化および最適化に関連して議論されている。主たる上流および下流の技術的課題が特定され、それに応じて議論されている。VLPベースのワクチンの成功した画期的新薬が、臨床試験の最新の結果および治療用または予防用ワクチン接種のいずれかに向けられたキメラVLPベースの技術における近年の発展と同時に簡潔に発表されている。

【0015】

これまでに、ヒトおよび他の動物に感染する30種を超える様々なウイルスに対するVLPベースのワクチンが生産されてきた。例としては、AAV（アデノ随伴ウイルス）、H5N3（トリインフルエンザ）、BFDV（セキセイインコ雛病ウイルス）、BTV（ブルータングウイルス）、エボラ、エンテロウイルス71、GHPV（ガチョウ出血性ポリオーマウイルス）、HBV（B型肝炎ウイルス）、HCV（C型肝炎ウイルス）、HDV（δ型肝炎ウイルス）、HEV（E型肝炎ウイルス）、HIV、HPV（ヒトパピローマウイルス）、IBDV（伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス）、インフルエンザA型、インフルエンザA H1N1型、インフルエンザA H3N2型、JCポリオーマウイルス、マールブルグ（Margurg）、MS2、IPCV（インドラッカセイクランプウイルス）、NDV（ニューカッスル病ウイルス）、No（ノロウイルス）、Nv（ノーウォークウイルス）、PhMV（ホオズキモットルウイルス）、ポリオーマウイルス、PPV（ブタパルボウイルス）、RHDV（ウサギ出血病ウイルス）、ロタウイルス、SARS、SIV（サル免疫不全ウイルス）、SV40（サルウイルス40）、SVDV（ブタ水疱病ウイルス）等が挙げられる。（非特許文献21：Expert Rev. Vaccines 9(10), 1149-1176, 2010）。

【0016】

米国特許第9,353,353号には、感染またはその少なくとも1つの症状に対して免疫を誘導する、チクングニアに対するワクチンまたは抗原性組成物を製剤化するのに有用である、1つまたは複数のチクングニアウイルス構造タンパク質を含む、ウイルス様粒子（VLP）が開示されている。米国特許第9,487,563号には、アルファウイルスまたはフラビウイルスの改変ウイルス様粒子（VLP）とアルファウイルスおよびフラビウイルス媒介性疾患の予防または処置に使用するための、改変VLPの生産を増強する方法が開示されている。米国特許第9,249,191号には、チクングニアウイルス（CHIKV）またはベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）のウイルス様粒子が開示されており、この場合、前記ウイルス様粒子は、E2エンベロープタンパク質に挿入されて融合タンパク質を形成する、少なくとも1つの抗原を含有する。米国特許第9,969,986号には、アルファウイルスのウイルス様粒子が開示されており、この場合、前記ウ

イルス様粒子は、エンベロープタンパク質 E 3 を含むアルファウイルスのウイルス構造タンパク質を含み、前記エンベロープタンパク質 E 3 は、そのフーリン切断部位に挿入された少なくとも 1 つの外来抗原を含有するように改変されている（引用されたこれらの参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献 1】米国特許第 9, 353, 353 号

【特許文献 2】米国特許第 9, 487, 563 号

【特許文献 3】米国特許第 9, 249, 191 号

【特許文献 4】米国特許第 9, 969, 986 号

【特許文献 5】米国特許出願公開第 2005 / 0118191 号

【特許文献 6】WO 2022 / 225057

【非特許文献】

【0018】

【非特許文献 1】Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. 2006. "Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13):5060-5.

【非特許文献 2】Mourad-Zeidan AA, Melnikova VO, Wang H, Raz A, and Bar-Eli M. 2008. "Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry." *Am J Pathol* 173:1839-1852.

【非特許文献 3】Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. 1994. "Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins." *J Biol Chem* 269:20807-20810.

【非特許文献 4】Herbert Y. Reynolds, "Lung Inflammation and Fibrosis, An Alveolar Macrophage-centered Perspective from the 1970s to 1980s" *Am J Respir Crit Care Med* Vol 171. pp 98-102, 2005

【非特許文献 5】MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson N C, Atkinson KM, Leffler H, Nilsson UJ, Haslett C, Forbes SJ, and Sethi T. 2008. "Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3." *J Immunol* 180:2650-2658.

【非特許文献 6】Dumic J, Dabelic S, Flougel M. 2006. "Galectin-3: An open-ended story." *BBA-Gen Subjects* 1760:616-635.

【非特許文献 7】Kuklinski S, Probstmeier R. 1998. "Homophilic binding properties of galectin-3: Involvement of the carbohydrate recognition domain." *J Neurochem* 70:814-823.

【非特許文献 8】Lepur A, Salomonsson E, Nilsson UJ, Leffler H. 2012. "Ligand induced galectin-3 protein self-association." *J Biol Chem* 287:21751-21756.

【非特許文献 9】Yang RY, Hsu DK, and Liu FT. 1996. "Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis." *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6737-6742.

【非特許文献 10】Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T. 2008. "Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis." *Am J Pathol*. 172(2):288-98.

【非特許文献 11】Barman, Scott A, Xueyi Li, Stephen Haigh, Dmitry Kondrikov, Keyvan Mahboubi, Zsuzsanna Bordan, and Stepp W David. 2019. "G

10

20

30

40

50

galectin-3 is Expressed in Vascular Smooth Muscle Cells and Promotes Pulmonary Hypertension through changes in Proliferation, Apoptosis and Fibrosis." Epub ahead of print.

【非特許文献12】Nishi Y, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikawa K, Kawashima S, Tanabe M, Goto T, Matsuzawa Y, Matsumura R, Tomioka H, Liu FT, Shirai K. 2007. "Role of Galectin-3 in Human Pulmonary Fibrosis" *Allergol Int.* 56(1):57-65.

【非特許文献13】De Boer, R. A., Yu, L., and van Veldhuisen, D. J. 2010. "Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure." *Curr. Heart Fail. Rep.* 7, 1-8.

【非特許文献14】Nikhil Hirani, Alison Mackinnon, Lisa Nicol, Jeremy Walker, Paul Ford, Hans Schambye, Anders Pederson, Ulf Nilsson, Håkan Leffler, Tracy Thomas, Danielle Francombe, John Simpson, Michael Gibbons, Toby M. Maher. 2017. "TD139, A Novel Inhaled Galectin-3 Inhibitor for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). Results from the First in (IPF) Patients Study." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 195:A7560.

【非特許文献15】Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, Bos EM, van Goor H, Sanjabi B, van der Harst P, Pitt B, Goldstein IJ, Koerts JA, et al. 2013. "Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis." *Circ Heart Fail* 6: 107-117.

【非特許文献16】H.O. Yazar et al. "A preliminary data: Evaluation of serum Galectin-3 levels in patients with Idiopathic Parkinson's Disease" *Journal of Clinical Neuroscience* 70 (2019) 164-168

【非特許文献17】Boza-Serrano A et al. "Galectin-3, a novel endogenous TREM2 ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease" *Acta Neuropathologica* (2019) 138:251-273

【非特許文献18】Ghulam Md Ashraf and Saleh S Baeesa "Investigation of Gal-3 Expression Pattern in Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients Suffering From Neurodegenerative Disorders" *Frontiers in Neuroscience* 2018 vol 12, Article 430

【非特許文献19】Hellman, L. 2008. "Therapeutic vaccines against IgE-mediated allergies." *Expert Rev Vaccines* 7(2):193-208.

【非特許文献20】Falk Saupe, Elisabeth J. M. Huijbers, Tobias Hein, Julia Femel, Jessica Cedervall, Anna-Karin Olsson, and Lars Hellman. 2015. "Vaccines targeting self-antigens: mechanisms and efficacy-determining parameters." *FASEB J* 29(8):3253-62.

【非特許文献21】Antônio Roldão, Maria Candida M, Mellado, Leda R, Castilho, Manuel JT Carrondo and Paula M Alves "Virus-like particles in vaccine development" *Expert Rev. Vaccines* 9(10), 1149-1176, 2010

【非特許文献22】Goldfarb, D., and N. Michaud (1991) "Pathways for the nuclear transport of proteins and RNAs" *Trends Cell Biol.* 1, 20-24

【非特許文献23】Gorlich, D., and I. W. Mattaj (1996) "Nucleocytoplasmic Transport" *Science* 271, 1513-1518

【非特許文献24】Schneider, J. et al. (1988) "A Mutant SV40 Large T Antigen Interferes with Nuclear Localization of a Heterologous Protein" *Cell* 54,117-125

【非特許文献25】Dingwall et al. (1988) "The Nucleoplasmin Nuclear Loc

10

20

30

40

50

ation Sequence Is Larger and More Complex than That of SV-40 Large T Antigen" Cell Biol. 107 (3): 841-9

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本開示は、炎症性疾患の処置に関する。特に、本開示は、哺乳動物対象における炎症性疾患、とりわけ加齢に関連した炎症性疾患を処置するための方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本方法は、ウイルス構造タンパク質およびガレクチン-3抗原を含むウイルス様粒子の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、炎症性疾患、とりわけ加齢に関連した炎症性疾患を処置するための方法である。

【0021】

本開示はまた、哺乳動物対象における炎症性疾患、とりわけ加齢に関連した炎症性疾患の処置における使用のための、ウイルス構造タンパク質およびガレクチン-3抗原を含むウイルス様粒子も提供する。

【0022】

本開示はまた、哺乳動物対象における炎症性疾患、とりわけ加齢に関連した炎症性疾患の処置向けの医薬組成物であって、ウイルス構造タンパク質およびガレクチン-3抗原を含むウイルス様粒子を含む、医薬組成物も提供する。

【0023】

本開示はまた、哺乳動物対象における炎症性疾患、とりわけ加齢に関連した炎症性疾患の処置向けの医薬品の製造のための、ウイルス構造タンパク質およびガレクチン-3抗原を含むウイルス様粒子の使用も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】VEEV-Gal-3-VLPで免疫したマウス血清中の抗マウスガレクチン-3 (Gal-3) 抗体。VEEV-Gal-3 VLPを一方の群のマウス (群2) に、生理食塩水を他方の群 (群1) に、筋肉内投与した。マウスに、実験開始時、第1の投与の2週間後および4週間後に投与した。実験開始の6週間後、血液試料を各マウスから得、血清中のGal-3をELISAを使用することによって検出した。

【図2】5×FADマウスにおけるステップスルー型受動的回避試験の結果。実験開始の5か月後に、ステップスルー型受動的回避試験を実施し、電気刺激の24時間後の潜時 (latency) を測定した。

【図3】VEEV-Gal-3-VLPで免疫した5×FADマウスの海馬中Gal-3の量。図2に示す試験の後、マウスの脳を採取し、脳溶解物においてβ-アクチンと比較したGal-3およびβ-アミロイドの量を測定した。

【図4】高齢C57BL/6Jマウスの生存に及ぼすVEEV-Gal-3-VLPの効果。C57BL/6Jマウスを2つの群に分けた。VEEV-Gal-3 VLPを一方の群のマウス (群B6-V) に、生理食塩水を他方の群 (群B6-N) に、筋肉内投与した。

【図5】5×FADマウスの生存に及ぼすVEEV-Gal-3-VLPの効果。5×FADマウスを2つの群に分けた。VEEV-Gal-3 VLPを一方の群のマウス (群F-V) に、生理食塩水を他方の群 (群F-N) に、筋肉内投与した。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本明細書で使用される場合、「ガレクチン-3抗原」という用語は、免疫系によって認識され得る、ならびに／または細胞性免疫応答を賦活するかつ／または抗原に特異的な抗体の産生を賦活する、ガレクチン-3タンパク質に由来する任意の抗原構造を指す。ガレクチン-3エピトープペプチドは、天然に存在するガレクチン-3タンパク質の断片であ

10

20

30

40

50

ってもよく、一部の改変を有する天然に存在するガレクチンタンパク質の断片であってもよい。天然に存在するガレクチンタンパク質としては、ヒトガレクチンタンパク質であることが好ましく、とりわけヒトガレクチン-3タンパク質であることが好ましい。一実施形態では、改変断片は、天然に存在するガレクチン-3タンパク質の断片と少なくとも80%、85%、90%、95%、または98%のアミノ酸配列同一性を有する。一実施形態では、改変ペプチド断片は、天然に存在するガレクチン-3タンパク質の断片に対して、アミノ酸のうちの多くても10%が欠失、置換および／または付加されている突然変異型である。

【0026】

ガレクチン-3 [ヒト (Homo sapiens)] (GenBank 受託番号: AAB86584.1)

MADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPAGAWGNQPAAGAGGYPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGAPAGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYPATGPYGA
GPLIVPYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENNR
RVIVCNTKLDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHR
VKKLNEISKLGISGDIDLTASYSYTM (配列番号1)

【0027】

ガレクチン-3 抗原、すなわちガレクチン-3 エピトープペプチドの例としては以下を挙げることができる:

ADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPAGAWGNQPA (配列番号2)

YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGA (配列番号3)

YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGAPAGVYPGPPSGPGAYPS
SGQPSATGAYPATGPYGA (配列番号4)

ADSFSLNDALAGSGNPNPQGYPGAWGNQPA (配列番号5)

【0028】

Ga l-3 エピトープペプチド配列番号2は、ヒトN末端Ga l-3 エピトープペプチドからなる。Ga l-3 エピトープペプチド配列番号3および4はヒトGa l-3 N末端反復配列エピトープペプチドからなり、配列番号4は配列番号3の反復配列よりも長い反復配列を有する。配列番号5はマウスGa l-3 N末端ペプチドをコードする。

【0029】

WO2022/225057 (この文書の内容は参照により本明細書に組み込まれる)では、上記のGa l-3 エピトープペプチドを担持するVLPが調製され、それらのVLPの免疫原性が確認された。

【0030】

アルファウイルス

本明細書で使用される場合、「アルファウイルス」とは、ウイルスのトガウイルス科に属するRNA含有ウイルスを指すこととする。例示的なトガウイルス科ウイルスとして、それらに限定されないが、東部ウマ脳炎ウイルス (E E E V)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (V E E V)、エバーグレーズウイルス、ムカンボウイルス、ピクスナウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス (W E E V)、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ミドルバーグウイルス、チクングニアウイルス (C H I K V)、オニオンニオンウイルス、ロスリバーウイルス、バーマ森林ウイルス、ゲタウイルス、サギヤマウイルス、ベバルウイルス、マヤロウイルス、ウナウイルス、アウラウイルス、ワタロアウイルス、ババンキウイルス、キジラガチウイルス、ハイランドJウイルス、フォートモーガンウイルス、ヌドゥムウイルス、バギークリークウイルス、オケルボウイルスが挙げられる。

【0031】

「ウイルス構造タンパク質」とは、天然に存在するウイルスカプシドまたはエンベロープタンパク質と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有し、哺乳動物において免疫原性活性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。一部の実施形態では、アルファウイルス構造タンパク質は、上記で論議のアルファウイルスと少なくとも約85%、9

10

20

30

40

50

0 %、95 %またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する。

【0032】

ウイルス構造タンパク質およびガレクチン-3抗原は、直接に融合されても、間接に融合されてもよい。一実施形態では、1つまたは2つのリンカーが、抗原のN末端残基とウイルス構造タンパク質との間に、および／または抗原のC末端残基とウイルス構造タンパク質との間に介在してもよい。

【0033】

抗原またはウイルス構造タンパク質を切断し、短いリンカーによって置き換えることができる。一部の実施形態では、抗原またはウイルス構造タンパク質は、1つまたは複数のペプチドリンカーを含む。典型的には、リンカーは、2個から25個までのアミノ酸（例えば2個、3個、4個、5個または6個のアミノ酸）からなる。通常、リンカーは、2個から15個までのアミノ酸の長さであるが、ある特定の状況では、リンカーは、単一グリシン（G）残基などの1個だけであってもよい。

【0034】

一実施形態では、ウイルス構造タンパク質をコードするポリヌクレオチドが抗原をコードするポリヌクレオチドと遺伝子的に融合されているような核酸分子が、宿主細胞〔例えば、哺乳動物細胞（例えば、293F細胞）〕内で発現され、その結果、第1の付着部位と、第2の付着部位はペプチド結合をとおして連結される。この場合、ウイルス構造タンパク質と抗原はペプチド結合をとおして連結される。この実施形態に関して、第1の付着部位および／または第2の付着部位は、元のタンパク質または抗原から遺伝子的に改変することができる。例えば、第1の付着部位は、SG、GS、SGG、GGSおよびSGSGを始めとするリンカーペプチドをとおしてタンパク質が抗原とコンジュゲートするように、ウイルス構造タンパク質から改変される。ウイルス構造タンパク質が抗原と化学的にコンジュゲートされる場合、第1の付着部位と第2の付着部位は、化合物である化学架橋リンカーをとおして連結することができる。架橋リンカーの例として、それらに限定されないが、SMPH、スルホ-MBS、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMPB、スルホ-SMCC、SVSB、SIAおよびPierce Chemical Companyから入手可能な他の架橋リンカーが挙げられる。

【0035】

好ましくは、抗原は、遺伝子工学によって作製される融合タンパク質として、チクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質に連結することができる。

【0036】

本出願で使用されるチクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質は、チクングニアウイルスエンベロープタンパク質もしくはベネズエラウマ脳炎ウイルスエンベロープタンパク質であってもよく、カプシドであってもよく、1つまたは複数のエンベロープタンパク質の複合体であってもよく、および／またはカプシドタンパク質であってもよい。

【0037】

チクングニアウイルスの例としては、それらに限定されないが、株37997および株LR2006OPY-1が挙げられる。

ベネズエラウマ脳炎ウイルスの例としては、それらに限定されないが、株TC-83が挙げられる。

【0038】

本出願で使用されるチクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質は、天然に存在するウイルス構造タンパク質であってもその改変タンパク質であってもよい。改変タンパク質は、天然に存在するウイルス構造タンパク質の断片であってもよい。一実施形態では、改変タンパク質は、天然に存在するウイルスカプシドおよび／またはエンベロープタンパク質と少なくとも70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %または98 %のアミノ酸配列同一性を有する。一実施形態では、改変

10

20

30

40

50

タンパク質は、天然に存在するウイルスカプシドおよび／またはエンベロープタンパク質に対して、アミノ酸のうちの多くても10%が欠失、置換および／または付加されている突然変異型である。例えば、K64AまたはK64N突然変異を、本出願で使用するベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質のカプシドに導入することができる。

【0039】

チクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質は、カプシド、E3、E2、およびE1の各タンパク質からなるか、またはそれらを含むことができる。E3タンパク質およびE2タンパク質は、E2およびE3が一つのタンパク質を形成することができるように、一緒に発現させてもよい。

【0040】

チクングニアウイルス構造タンパク質の例としては、それらに限定されないが、チクングニアウイルス株37997のカプシド-E3-E2-E1、およびチクングニアウイルスLR2006OPY-1のカプシド-E3-E2-E1が挙げられる。

【0041】

ベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質の例としては、それらに限定されないが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス株TC-83のカプシド-E3-E2-E1が挙げられる。

【0042】

例示的なチクングニアウイルス構造タンパク質配列は、Genbank受託番号ABX40006.1で提供され、これを下に記載する（配列番号6）：

【0043】

【化1】

```
mefiptqtfnrryqprpwtprptiqvirprprpqrqagqlisavnkltmravpqqkpr  
rnrknkkqkqkqgqapqnnntnqkkqppkkkpaqkkkkpgrrrermcmkiendcifevkhegkvt  
gyaclvgdkvmkpahvkgtidnadlaklafkrsskydlecaqipvhmkdsaskfthekpegy  
ynwhhgavqysggrftiptgagkpgdsgprpifdnkgrvvaivlgganegartalsvvtwnkd  
ivtkitpegaeewslaipvmcllanttfpcsqppctpccyekepeetlrmlednvmrpgyyq  
llqasltcsphrqrstkdnfnykatrpylahcpdcgeghschspvalerirneatdgtlk  
iqvslqigiktddshdwtklrymdnhmpadaeraglfvrtsapctitgtmghfilarcpkge  
tlvtvgftdsrkishscthpfhhdppvigrekfhsrpqhgkelpcstyvgstaatteeievhm  
ppdtpdrtlmsqsgnvnkitvngqtvrykcneglttttdkvinckvdqchaavtnhk  
kwqynsplvprnaelgdrkgkihipfplanvtcrvpkarnptvtygknqvimllypdhptll  
syrmngeepnyqeewvmhkkevltvpteglevtwgnnépykywpqlstngtahghpheil  
yyyelyptmtvvvsvatfillsmvgmaagmcmcarrrcitpyeltpgatvpfllsliccir  
takaatyqeaaiylwneqqplfwlqaliplaalivlcnclrlpccocktlaflavmsvgaht  
vsayehvtvipntvgvpyktlvnrpgyspmvlemellsvtleptlsldytceyktvipspy  
vkccgtaeckdknlpdysckvftgvypfmwggaycfdaentqlseahveksescktefasa  
yrahtasasaklrlyqgnnitvtayangdhavtvkdakfivgpmssawtpfdnkivvykgd  
vynmdyppfgagrpgqfgdiqsrtpeskdvyantqlvlqrpavgtvhvpysqapsgfkywlk  
ergaslqhtapfgcqiatsnpvrvncavgnmpisidipeaafttrvvdapsltdmscevpact  
hssdfggvaiikyaaskkgkcavhsmtnavtireaeievegnsqqlqisfstalasaefrvqv  
cstqvhcaaechppkdhivnypashttlgvqdisatamswvqkitggvglvvavaaliliv  
lcvsfsrh
```

【0044】

別の例示的なチクングニアウイルス構造タンパク質配列は、Genbank受託番号ABX40011.1で提供され、これを下に記載する（配列番号7）：

【0045】

10

20

30

40

50

【化 2】

mefiptqtfnrryqprwaprptiqvirprprpqrqagqlaqlisavnklmrvpqqkpr
 rnrknkkqrqkkqapqndpkkqppqkpaqkkkkpgrrrermcmkiendcifevkhegkvm
 gyaclvgdkvmkpahvkgtdnadlaklafkrsskydlecaqipvhmksdaskfthekegy
 ynwhhgavqysggrftiptgagkpgdsgripfdnkgrrvvaivlgganegartalsvvtwnkd
 ivtkitpegaeewslalpvldilanttfpcsqppctpccyekepestlrmlednvmrpgyyq
 llkasltcsphrqrrstkdnfnykatrpylahcpdcgegshschspialerirneatdgtlk
 iqvslqigiktdshdwtklrymdshtpadaeragllvrtsapctitgtmghfilarcpkge
 tltvgftdsrkishtcthpfhheppvigrrerfhsrpqngkelpcstyvqstaataeeievhm
 ppdtpdrtlmtqsgnkvkitvngqtvrykcnccgsneglttdkvinckidqchaavtnhk
 nwqynsplvrnaelgdrkgkihpfplanvtcrvpkarnptvtygknqvtmlllypdhptll
 syrnngqepnyheewvthkkevltvpteglevtwgnnepykywpmstngtahghpheiil
 yyyelyptmtvvivsvasfvlsmvgtavgmvcarrcitpyeltpgatvpflisliccvt
 tkaatyeeaaaylwneqqplfwlqaliplaalivlcnclkilpcccktlaflavmsigant
 vsayehvtvipntvgvpyktlvnrpgyspmvlemelqsvtleptlsldyitceyktvipspy
 vkccgtaeckdkslpdysckvftgvypfmwggaycfcdadentqlseahveksescktofasa
 yrahtasasaklrlyvggnitvaayangdhavtvkdakfvvgpmssawtpfdnkivvykgd
 vymdyppffgagrpqgfgdiqsrtpeskdvyantqlvlqrpaagtvhvpysqapsqgfywlk
 ergaslqhtapfgcqiatnpravncaavnipisidipdaaftrvvdapsvtdmscevpa
 ctssdggvvaikytaskkgkcavhsmtnavtreadvevegnsqqlqisfstalasaefrvqv
 cstqvhcaachppkdhiwnypashttlgvqdi sttamswvqkitggvglivavaaliliv
 lcvsfsrh

10

【0046】

例示的なベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質を下に記載する（配列番号8）：

20

【0047】

【化 3】

mffpqqmymqmpyrnpfaaprpfprtdpflamqvqeltrsmantfkqrrdappegps
 aakpkkeasqkqkggggkknqgkkaaktgppnpkaqngnkkktnkpkqkrqrmvmkles
 dktfpmlegkingyacvvgklfrpmhvegkidndvlaal ktkkaskydeyadvpqnra
 dtfkythekpggyyswhhgavqyengrftvpkgvgakgdsgrpildnqgrvvaivlggneg
 srlatvsvmwnekgvtvkytpenceqwslvttmcllanvtfpcagppicydrkpaetlamls
 vndnpgydelleaavkcpgrkrsteelfneykltrpymarcircavgschspiaieavks
 dghdgyvrlqtssqygldssgnlkgrtmrydmhglikeiplhqvslytsrpchivdghgyf
 larcpagdsitmfekkdsvrhscsvpyevkfnpvgrelythppegvegacqvahdaqrng
 ayvemhpgsevdsslvsisgssvtvtpdgtalvececggtkisetinktkqfsqctkke
 qcrayrlqndkwvynsdklpkaagatlkgklhvpflladgkctvplapepmittfgfrsvslk
 ihpknptylitrqladephythelisepavrnftvtekgwefwgnhpkrfwaqetapgnp
 hglphovithyyhyrmpstlglisicaaiatvsaaastwlfcrsrvacltpyrltpnaripf
 clavlccartaraettwesldhlwnnnqgmfwlqlliplaaliivtrllrcvccvvpflvma
 gaagagayehattmpsqaqisyntivnragyaplpisittptkikliptvnrleyvtchxytgm
 dspaikccgsqectptyrpdqckvftgvypfmwggaycfcdtentqvs kayvmksddclad
 haeaykahtasvqaflnitvgehsivttvyvngctpvnfngvkitagplstawtpfdrkiq
 yageiynydfpeygagqpgafgdiqsrvtsssdlyantnlvlqrpkagaihvpytqapsqfe
 qwkckdapslkftapfgceiynpiravncavgsiplafldipdalfrvsetpftlsaaect
 necvysdfggiatvkysasksgkcavhpsgtatlkeaaavelteqgsatihfstanihpef
 rlqictsyvtckgdchppkdhiwthpqqyhaqftaavsktawtwltsllggsaviiilglvl
 ativamyvltngkhn

30

40

一実施形態では、第1の付着部位はアミノ基、好ましくはリジン残基のアミノ基を含む。

一実施形態では、第2の付着部位は、スルフヒドリル基、好ましくはシステインのスルフヒドリル基を含む。

【0048】

本出願によれば、チクングニアウイルス様粒子またはベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子を提供することができ、このウイルス様粒子は、チクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質および少なくとも1つのガレクチン-3抗原を含み、この場合、少なくとも1つのガレクチン-3抗原はウイルス構造タンパク質のE3に挿入され、かつ、チクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質とガレクチン-3抗原とが、融合タンパク質として発現する

50

。ガレクチン-3 抗原は、ウイルス構造タンパク質の E 3 に直接に挿入されても間接に挿入されてよい。

【0049】

チクングニアウイルスならびにベネズエラウマ脳炎のウイルス構造タンパク質は、E 1、E 2、6 K、および E 3 からなる。6 K はアセンブルのプロセスの過程で自然に切断され、VLP から除かれる。成熟 VLP は、カプシド、E 1 および E 2 からなる。本明細書および特許請求の範囲において、「ウイルス構造タンパク質」とは、6 K を有するもののみならず、6 K が除かれた後のものも指す。

【0050】

実用的な例で使用される CHIKV および VEEV の 6 K 配列は以下のとおりである：

CHIKV OPY-1 株、6 K：配列番号 6 の 749～809 aa

atyqeaaiylwneqqplfwlqalipaalivlcncrlpcccktlafavmsvgahtvsa（配列番号 9）

CHIKV 37997 株、6 K：配列番号 7 の 749～809 aa

atyyeaaaylwneqqplfwlqalipaalivlcncklpcccktlafavmsigahtvsa（配列番号 10）

VEEV TC-83 株、6 K：配列番号 8 の 758～813 aa

ettwesldhlwnnnqmqmfwlqalipaalivtrllrcvccvvpflvmagaagaga

（配列番号 11）

【0051】

チクングニアウイルス構造タンパク質に関して、配列番号 6 または 7 の 322 R から 325 R までのフーリン部位（RKRR）の代わりに、少なくとも 1 つのガレクチン-3 抗原を挿入することができる。例えば、チクングニアウイルス構造タンパク質に関して、配列番号 6 もしくは 7 の 321 位の残基 H と 326 位の残基 S との間に；配列番号 6 もしくは 7 の 320 位の P と 326 位の S の間に；または配列番号 6 もしくは 7 の 319 位の S と 326 位の S の間に、少なくとも 1 つのガレクチン-3 抗原が挿入される。VLP-CHIKV 0.56 ベクターを、ガレクチン-3 抗原が配列番号 6 または 7 の残基 321 と残基 326 の間に挿入されているチクングニアウイルス様粒子を調製するために使用することができる。ガレクチン-3 抗原が、配列番号 6 または 7 の残基 321 と残基 326 の間に挿入される場合、本出願によって提供されるウイルス様粒子は、E 2 と E 3 の複合体、カプシドおよび E 1 からなるチクングニアウイルス様粒子とすることができるが、この場合、少なくとも 1 つのガレクチン-3 抗原が E 3 領域に挿入される。

【0052】

ベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質に関して、配列番号 8 の 331 R から 334 R までのフーリン部位（RKRR）の代わりに、少なくとも 1 つのガレクチン-3 抗原を挿入することができる。例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質に関して、配列番号 8 の 330 位の G と 335 位の S との間に；配列番号 8 の 329 位の P と 335 位の S の間に；または配列番号 8 の 328 位の C と 335 位の S の間に、少なくとも 1 つのガレクチン-3 抗原が挿入される。VLP-VEEV 0.66 ベクターを、抗原が配列番号 8 の残基 330 と残基 335 の間に挿入されているベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子を調製するために使用することができる。抗原が、配列番号 8 の残基 330 と残基 335 の間に挿入される場合、本出願によって提供されるウイルス様粒子は、E 2 と E 3 の複合体、カプシドおよび E 1 からなるベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子とすることができるが、この場合、少なくとも 1 つのガレクチン-3 抗原は E 3 領域に挿入される。

【0053】

「変更」とは、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列に関して特定の位置のアミノ酸またはヌクレオチドの変化を意味する。本明細書で使用される場合、変更には、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの特定の位置のアミノ酸またはヌクレオチドの置換、欠失、または挿入が含まれる。一部の実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質核局在化シグナルの変更には、非荷電アミノ酸（例えば、アラニンもしくはアスパラギン

10

20

30

40

50

ン、またはリジンもしくはアルギニンなどの塩基性荷電アミノ酸を除く任意のアミノ酸) による荷電アミノ酸 (例えば、リジンまたはアルギニン) の置換が含まれる。

【0054】

「アナログ」とは、同一ではないが、類似の機能的または構造的特性を有する分子を意味する。例えば、ポリペプチドアナログは、相当する天然に存在するポリペプチドの生物活性を保持するが、一方、天然に存在するポリペプチドと比べてアナログの機能を増強するある特定の生化学的改変を有する。このような生化学的改変は、例えば、リガンド結合を変更することなく、アナログのプロテアーゼ耐性、膜透過性、または半減期を高める可能性がある。アナログは非天然アミノ酸を含んでもよい。

【0055】

本開示では、「含む (comprises)」、「含むこと (comprising)」、「含有すること (containing)」および「有すること (having)」等は、米国特許法のそれらに帰する意味を有することができ、かつ、「含む (includes)」、「含むこと／含めて (including)」等を意味することができ；「から本質的になる (consisting essentially of)」または「本質的になる (consists essentially)」も同様に米国特許法に帰する意味を有するが、その用語はオープンエンドであり、したがって、記載されているものの基本的または新規な特徴が記載されているものを超える存在によって変更されない限り、記載されているものを超える存在を許容するが、先行技術の実施形態を除外する。

【0056】

「検出する」とは、検出されるべき検体の存在、不在または量を特定することを指す。

【0057】

「疾患」とは、細胞、組織、または臓器の正常な機能を損傷するかまたは妨げるあらゆる状態または障害を意味する。

【0058】

「作用剤」とは、任意の小分子化合物、抗体、核酸分子、もしくはポリペプチド、またはそれらの断片を意味する。

【0059】

「有効量」とは、未処置の患者と比べて疾患の症状を寛解させるのに必要とされる作用剤の量を意味する。疾患の予防または処置のために本明細書に開示の方法を実践するのに使用される活性化合物の有効量は、投与様式、対象の年齢、体重、および全体的な健康に応じて変化する。最終的に、主治医または獣医が適当な量および投薬レジメンを決定することになる。かかる量を「有効」量と称する。

【0060】

「寛解させる」とは、疾患またはその症状の発生または進行を低下させる、抑制する、弱める、軽減する、阻止するまたは安定化させることを意味する。

【0061】

本開示は、本明細書に記載の疾患を処置または予防するための高度に特異的な薬物の開発にとって有用であるいくつかの標的を提供する。加えて、本明細書に開示の方法は、対象において使用するのに安全である療法を特定するための容易な手段を提供する。加えて、本発明の方法は、大容量スループット、高感度および低複雑性をもって、本明細書に記載の疾患に対する効果について実質的に任意個数の化合物を解析するためのルートを提供する。

【0062】

「断片」とは、ポリペプチドまたは核酸分子の一部を意味する。この一部分は、好ましくは、参照の核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を含有する。断片は、10個、20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、または100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、または1000個のヌクレオチドまたはアミノ酸を含有することができる。

10

20

30

40

50

【0063】

「単離されたポリヌクレオチド」とは、核酸分子が由来する生命体の天然に存在するゲノムにおいてその遺伝子に隣接する遺伝子を含まない核酸分子（例えばDNA）を意味する。したがってこの用語には、例えば、ベクターに組み入れられている組換えDNA；自律的複製をするプラスミドもしくはウイルスに組み入れられている組換えDNA；または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み入れられている組換えDNA；または、他の配列から独立して分離された分子（例えば、cDNA、または、PCRや制限酵素消化により産生されたゲノムもしくはcDNAの断片）として存在する組換えDNAが含まれる。加えて、この用語には、DNA分子から転写されるRNA分子、ならびに追加のポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAが含まれる。

10

【0064】

「単離されたポリペプチド」とは、天然で当該ポリペプチドに付随する成分から分離されたポリペプチドを意味する。通常には、天然で当該ポリペプチドに付随するタンパク質および天然に存在する有機分子が重量で少なくとも60%無い場合に、そのポリペプチドは単離されていることになる。好ましくは、調製物とは、重量で少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも99%が、本発明のポリペプチドである。単離されたポリペプチドは、例えば、天然資源からの抽出によって、そのようなポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって、またはタンパク質を化学合成することによって、取得することができる。純度は、適当な任意の方法、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、またはHPLC分析によって測定することができる。

20

【0065】

「マーカー」とは、疾患または障害に関連する発現レベルまたは活性の変更を有する任意のタンパク質またはポリヌクレオチドを意味する。

【0066】

本明細書で使用される場合、「核局在化シグナル」または「NLS」とは、ポリペプチドの表面に存在する場合、ポリペプチドを標的である細胞の核に送り込むアミノ酸配列である。NLS配列は当技術分野で知られている。例えば、非特許文献22：Goldfarb, D., and N. Michaud (1991) Trends Cell Biol. 1, 20-24；非特許文献23：Gorlich, D., and I. W. Mattaj (1996) Science 271, 1513-1518)を参照されたい。一実施形態では、NLSは、リジンまたはアルギニンなどの、正に荷電したアミノ酸の1つまたは複数の短い配列を含む。NLSについてのコンセンサス配列は、K-K/R-X-K/R（非特許文献24：Schneider, J. et al. (1988) Cell 54, 117-125）および約10個のアミノ酸のスペーサーによって隔てられた塩基性アミノ酸の2つのクラスター、例えば、KR[PAATKKAGQA]KKKK（非特許文献25：Dingwall et al., Cell Biol. 107 (3): 841-9）を含む。本明細書に開示のアルファウイルスアミノ酸配列に関して、NLSは、EEEVカプシドタンパク質のアミノ酸67～70（KKKK）に；WE EVカプシドタンパク質のアミノ酸67～70（KKKK）に；VEEVカプシドタンパク質のアミノ酸64～68（KKPKK）に；CHIKVカプシドタンパク質のアミノ酸62～69（RRNRKNKK）に；ロスリバーウイルスカプシドタンパク質のアミノ酸71～74（RRNRKNKK）に；およびバーマ森林ウイルスカプシドタンパク質のアミノ酸64～68（KKPKK）に存在する。

30

40

【0067】

本明細書で使用される場合、「作用剤を得ること」のように「得ること」には、当該作用剤を合成すること、購入すること、またはその他の方法で取得することが含まれる。

【0068】

「減少させる」とは、少なくとも10%、25%、50%、75%、または100%の負の変更を意味する。

【0069】

「参照」とは、標準または対照の状態を意味する。

50

【0070】

「参照配列」とは、配列比較用の基準として使用される規定された配列である。参照配列は、特定の配列のサブセットであっても全体であってもよい；例えば、完全長cDNA配列もしくは遺伝子配列のセグメントであってもよく、または完全なcDNA配列もしくは遺伝子配列であってもよい。ポリペプチドに関して、参照ポリペプチド配列の長さは概して、少なくとも約16個のアミノ酸、好ましくは少なくとも約20個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約25個のアミノ酸、さらにより好ましくは約35個のアミノ酸、約50個のアミノ酸、または約100個のアミノ酸であろう。核酸に関して、参照核酸配列の長さは概して、少なくとも約50個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約60個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約75個のヌクレオチド、さらにより好ましくは約100個のヌクレオチドもしくは約300個のヌクレオチドまたはそれら付近もしくはそれらの間の任意の整数であろう。

10

【0071】

「特異的に結合する」とは、本発明のポリペプチドを認識し結合するが、本発明のポリペプチドを天然に含む試料、例えば、生体試料中の他の分子を実質的に認識および結合しない、化合物または抗体を意味する。

【0072】

本明細書の方法において有用な核酸分子には、本発明のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子が含まれる。このような核酸分子は、内因性核酸配列と100%同一である必要はないが、通常には実質的な同一性を呈することになる。内因性配列と「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは二本鎖核酸分子の少なくとも1つの鎖とハイブリダイズすることが通常にはできる。本発明の方法において有用な核酸分子には、本発明のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子が含まれる。このような核酸分子は、内因性核酸配列と100%同一である必要はないが、通常には実質的な同一性を呈することになる。内因性配列と「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは二本鎖核酸分子の少なくとも1つの鎖とハイブリダイズすることが通常にはできる。「ハイブリダイズする」とは、種々のストリンジェンシー条件下で、相補性ポリヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載の遺伝子）どうしの間またはその一部どうしの間で二本鎖分子を形成する対を意味する。

20

【0073】

例えば、ストリンジェントな塩濃度は、通常、約750mM未満のNaClおよび75mMクエン酸三ナトリウム、好ましくは約500mM未満のNaClおよび50mMクエン酸三ナトリウム、より好ましくは約250mM未満のNaClおよび25mMクエン酸三ナトリウムとなる。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、有機溶媒、例えばホルムアミドの非存在下で得ることができ、一方、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、少なくとも約35%ホルムアミド、より好ましくは少なくとも約50%ホルムアミドの存在下で得ることができる。ストリンジェントな温度条件には、通常、少なくとも約30℃の、より好ましくは少なくとも約37℃の、最も好ましくは少なくとも約42℃の温度が含まれることになる。ハイブリダイゼーションの時間、界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の濃度、および担体DNAの含入または排除などの種々の追加のパラメーターは、当業者であればよく知られている。必要に応じてこれら種々の条件を組み合わせることによって、種々のレベルのストリンジェンシーが達成される。好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーションは、30℃で、750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウムおよび1% SDS中で行われることになる。より好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーションは、37℃で、500mM NaCl、50mMクエン酸三ナトリウム、1% SDS、35%ホルムアミドおよび変性サケ精子DNA（ssDNA）100μg/ml中で行われることになる。最も好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーションは、42℃で、250mM NaCl、25mMクエン酸三ナトリウム、1% SDS、50%ホルムアミドおよびssDNA 200μg/ml中で行われることになる。これらの条件の有用な変形形態は、当業者であれば容易に明らかである

30

40

50

う。

【0074】

ほとんどの用途では、ハイブリダイゼーションに続く洗浄工程もまた、ストリンジェンシーが異なることになる。洗浄ストリンジェンシーの条件は、塩濃度によっておよび温度によって定義することができる。上のように、洗浄ストリンジェンシーは、塩濃度を低下させることによってまたは温度を上昇させることによって高めることができる。例えば、洗浄工程のためのストリンジェントな塩濃度は、好ましくは約30mM未満のNaClおよび3mMクエン酸三ナトリウム、最も好ましくは約15mM未満のNaClおよび1.5mMクエン酸三ナトリウムとなる。洗浄工程のためのストリンジェントな温度条件には、通常、少なくとも約25℃の、より好ましくは少なくとも約42℃の、さらにより好ましくは少なくとも約68℃の温度が含まれることになる。好ましい実施形態では、洗浄工程は、25℃で、30mM NaCl、3mMクエン酸三ナトリウム、および0.1% SDS中で行われることになる。より好ましい実施形態では、洗浄工程は、42℃で、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム、および0.1% SDS中で行われることになる。より好ましい実施形態では、洗浄工程は、68℃で、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム、および0.1% SDS中で行われることになる。

10

【0075】

これらの条件の追加の変形形態は、当業者であれば容易に明らかとなるであろう。ハイブリダイゼーション技法は、当業者であればよく知られており、例えば、Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。「実質的に同一である」とは、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか1つ）または核酸配列（例えば、本明細書に記載の核酸配列のいずれか1つ）と少なくとも50%の同一性を呈するポリペプチドまたは核酸分子を意味する。好ましくは、そのような配列は、比較のために使用される配列とアミノ酸レベルまたは核酸にて少なくとも60%、より好ましくは80%または85%、より好ましくは90%、95%または99%も同一である。

20

30

【0076】

配列同一性は通常、配列解析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705、BLAST、BESTFIT、GAP、またはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を使用して測定される。かかるソフトウェアによって、相同性の程度を種々の置換、欠失、および／または他の改変に割り当てることにより同一または類似の配列を整合させる。保存的置換には通常、以下の群内の置換が含まれる：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定する例示的なアプローチでは、BLASTプログラムを使用することができ、この場合、 $e < 3$ と $e < 100$ との間の確率スコアによって、密接に関連した配列が指示される。

40

【0077】

「対象」とは、それらに限定されないが、ヒトまたはウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、もしくはネコなどの非ヒト哺乳動物を含めて、哺乳動物を意味する。

【0078】

本明細書で提供される範囲は、当該範囲内の全ての値についての略記であると理解され

50

る。例えば、1～50という範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50からなる群からのあらゆる数、数の組合せ、または部分範囲を含むと理解される。

【0079】

本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置すること」、「処置」等の用語は、障害および／またはそれに関連する症状を軽減または寛解させることを指す。妨げられるものではないが、障害または症状を処置することは、障害、症状またはそれらに関連する症状が完全に解消されることを必要としないことが、理解されるであろう。

10

【0080】

具体的に明記されていないかまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用される場合、「または」という用語は包括的であると理解される。

【0081】

具体的に明記されていないかまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用される場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という用語は、単数または複数であると理解される。

【0082】

具体的に明記されていないかまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用される場合、「約」という用語は、本技術分野で通常許容される範囲内のものとして理解され、例えば、平均値の2標準偏差以内として理解される。約は、言及された値の10%以内、9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、1%以内、0.5%以内、0.1%以内、0.05%以内、または0.01%以内として理解することができる。文脈に明らかに反しない限り、本明細書で提供される全ての数値は約という用語によって修飾される。

20

【0083】

本明細書における可変基の任意の定義における化学基のリストの記載は、リストされた基の任意の単一の基または組合せとしてのその可変基の定義を含む。本明細書における可変基または態様に関する実施形態の記載は、任意の単一の実施形態としてのまたは任意の他の実施形態もしくはその一部と組み合わせられた、その実施形態を含む。

30

【0084】

本明細書で提供される任意の組成物または方法は、本明細書で提供される他の組成物および方法のいずれかの1つまたは複数と組み合わせることができる。

【0085】

アルファウイルスポリヌクレオチド

全体として、本開示は、哺乳動物細胞においてVLP発現を増強する、構造タンパク質の変更を有するVLPをコードする任意の核酸配列を含む。一実施形態では、アルファウイルスポリペプチドは、哺乳動物細胞においてVLP発現を高める変更を含む少なくとも1つのアルファウイルスE2タンパク質またはカプシドタンパク質NLSを含む。一実施形態では、アルファウイルスE2タンパク質は、CHIKV E2タンパク質のアミノ酸234位に相当するアミノ酸位置に非リジン残基（例えば、アスパラギン）、および／または、ウイルス出芽過程でE2タンパク質を不安定化するCHIKV E2タンパク質のアミノ酸251位に相当するアミノ酸位置に改変を有する。別の実施形態では、アルファウイルスポリペプチドは、アルファウイルスカプシドタンパク質NLSのリジン残基に相当するアミノ酸位置に非リジン残基（例えば、アラニンまたはアスパラギン）を有する、および／または、アルファウイルスカプシドタンパク質NLSのアルギニン残基に相当するアミノ酸位置に非アルギニン残基（例えば、アラニンまたはアスパラギン）を有する、少なくとも1つのアルファウイルスカプシドタンパク質を含む。特定の実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、K67N、K68N、および／またはK69Nの変更のうちの1つまたは複数を含むWE EV CBA87株カプシドタンパク質である

40

50

。特定の実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、K 6 4 N、K 6 5 A、K 6 5 N、K 6 7 A、および／またはK 6 7 Nの変更のうちの1つまたは複数を有するV E E V T C 8 3株カプシドタンパク質である。一部の実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、K 6 7 Nの変更を有するE E E V P E - 6株カプシドタンパク質である。特定の実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、R 6 2 A、R 6 3 A、R 6 5 A、K 6 6 A、K 6 8 A、および／またはK 6 9 Aの変更のうちの1つまたは複数を有するC H I K V (株3 7 9 9 7)株カプシドタンパク質である。具体的な実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、R 7 1 N、K 7 2 N、K 7 3 N、および／またはK 7 4 Nの変更のうちの1つまたは複数を有するロスリバーウイルスカプシドタンパク質である。具体的な実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、K 6 4 A、K 6 4 N、K 6 5 A、K 6 5 N、K 6 7 A、K 6 7 N、K 6 8 A、および／またはK 6 8 Nの変更のうちの1つまたは複数を有するパーマ森林ウイルスカプシドタンパク質である。単離された核酸分子は、当技術分野でよく知られている組換えDNA技法によって操作することができる。したがって、5'および3'制限部位が知られているか、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマー配列が開示されているベクターに含有されるヌクレオチド配列は、単離されていると見なされるが、その天然状態でその天然宿主中に存在する核酸配列は単離されているとは見なされない。ある特定の例示的な実施形態では、ベクターは、C H I K V 3 7 9 9 7もしくはW E E V 7 1 V - 1 6 5 8の核酸セグメント、またはそれらの断片を含む。ベクターは、C M V / Rプロモーターをさらに含むことができる。ベクターはまた、カプシドタンパク質、またはその断片も含むことができる。

10

20

【0086】

他の例示的な実施形態では、E 2タンパク質に加えて、ベクターは、E 3、6 K、およびE 1からなる群から選択される別のエンベロープタンパク質を含む。ある特定の例では、ワクチンは、カプシド、E 3、E 2、6 KおよびE 1を含むことができる。他の例では、ワクチンは、E 3、E 2、6 KおよびE 1を含むことができる。

【0087】

特定の実施形態では、本明細書に開示の配列に記載された核酸分子は、C H I K VまたはV E E Vのカプシド、E 3、E 2、6 KおよびE 1を含めて、アルファウイルスカプシド、E 3、E 2、6 KおよびE 1から選択されるタンパク質をコードする、ポリペプチドと少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%またはそれを超える同一性(例えば、アミノ酸配列の全体の長さと比較した場合)を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

30

【0088】

本発明の一部の実施形態では、タンパク質は、サイレント置換、付加または欠失を生じるがコードされたタンパク質の特性もしくは活性または当該タンパク質が作製される方法を変更しない変更を含有する突然変異を含むことができる。様々な理由のために、例えば特定の宿主に対してコドン発現を最適化するために、ヌクレオチド変異型を造り出すことができるが、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2005/0118191号を参照されたい。

40

【0089】

加えて、ヌクレオチドを配列決定して、正しいコード領域がクローニングされたがこれは不要な突然変異をまったく含有しないことを確実にすることができる。上記ヌクレオチドを、任意の細胞中で発現させるための発現ベクター(例えばバキュロウイルス)へとサブクローニングすることができる。当業者であれば、種々のサブクローニング方法が利用できかつ可能であることを理解するであろう。

【0090】

単離された核酸は実質的に精製されているとすることができるが、そうである必要はな

50

い。例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター内で単離されている核酸は、それが存在する細胞内においてわずかな割合の物質のみを含む場合があるという点で、純粋ではない。そのような核酸は、その用語が本明細書で使用される場合、単離されているが、なぜなら、当業者に知られている標準技法によって容易に操作可能であるからである。

【0091】

ポリペプチドの発現

一般に、本明細書の1つまたは複数のアルファウイルスポリペプチドを含むVLPは、適切な発現媒体中で、ポリペプチドをコードする核酸分子もしくはその断片の全部または一部で適切な宿主細胞を形質転換することによって作製することができる。

【0092】

分子生物学分野の当業者であれば、多種多様な発現系のいずれかを使用して、組換えタンパク質を提供することができることを理解するであろう。使用される正確な宿主細胞は、本発明にとって重要ではない。本発明のポリペプチドは、原核性宿主〔例えば、大腸菌 (*E. coli*)〕中または真核性宿主〔例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、昆虫細胞、例えば、Sf21細胞、または哺乳動物細胞、例えば、NIH 3T3、HeLa、COSの各細胞〕中で産生させることができる。このような細胞は、広範囲の供給源（例えば、American Type Culture Collection、Rockland、MD；また、例えば、Ausubel et al.、上掲も参照されたい）から入手可能である。昆虫細胞の非限定的な例は、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) (Sf) 細胞、例えば、Sf9、Sf21、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 細胞、例えば、High Five細胞、ならびにショウジョウバエ属 (*Drosophila*) S2細胞である。真菌（酵母を含めて）宿主細胞の例は、S. セレビシエ、クルイベロミセス・ラクティス [*Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*)]、C. アルビカンス (*C. albicans*) および C. グラブラータ (*C. glabrata*) を始めとするカンジダ属 (*Candida*) の種、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、シゾサッカロミセス・ポンベ [*Shizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*)]、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ならびにヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) である。哺乳動物細胞の例は、COS細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、マウスL細胞、LNCaP細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ヒト胚性腎臓 (HEK) 細胞、アフリカミドリザル細胞、CV1細胞、HeLa細胞、MDCK細胞、Vero細胞およびHep-2細胞である。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵巣細胞または両生類起源の他の細胞もまた、使用することができる。原核生物宿主細胞には、細菌細胞、例えば、大腸菌、枯草菌 (*B. subtilis*)、およびマイコバクテリウムが含まれる。

【0093】

前記タンパク質をクローニングする方法は当技術分野で既知である。アルファウイルスタンパク質、例えば、特定のCHIKV、WEEV、EEEV、VEEV、ロスリバーの各ウイルス、またはバーマ森林ウイルスの構造タンパク質をコードする遺伝子は、前記ウイルスを感染させておいた細胞から抽出されたポリアデニル化mRNAからRT-PCRによって単離することができる。生成する産物の遺伝子は、DNAインサートとしてベクターにクローニングすることができる。「ベクター」という用語は、手段であって、これによって核酸を生物体間、細胞間、または細胞成分間で伝播および／または導入することができる手段を指す。ベクターには、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、プロウイルス、ファージミド、トランスポゾン、人工染色体等が含まれ、それらは自律的に複製するかまたは宿主細胞の染色体に統合することができる。ベクターはまた、ネイキッドRNAポリヌクレオチド、ネイキッドDNAポリヌクレオチド、同一鎖内のDNAとRNAの両方から構成されるポリヌクレオチド、ポリーリジンコンジュゲートDNAまたはRNA、ペプチドコンジュゲートDNAまたはRNA、リボソームコンジュゲートDNA等

10

20

30

40

50

とすることができるが、それらは自律的に複製しない。多くの、全てではないが、一般的な実施形態では、本発明のベクターはプラスミドまたはバクミドである。

【0094】

本発明は、VLPの形成をもたらす細胞において発現させることができる発現ベクターにクローニングされた、キメラ分子を含めて、タンパク質をコードするヌクレオチドをさらに提供する。「発現ベクター」とは、その中に組み込まれた核酸の発現ならびに複製を促進することができる、プラスミドなどのベクターである。

【0095】

通常には、発現される核酸分子は、プロモーターおよび／またはエンハンサーに「作動可能に連結され」ており、プロモーターおよび／またはエンハンサーによる転写調節制御の支配下にある。

【0096】

本発明のポリペプチドの生成向けに様々な発現系が存在する。かかるポリペプチドを生成するのに有用な発現ベクターとして、限定されないが、染色体、エピソーム、およびウイルス由来の各ベクター、例えば、細菌プラスミドに由来する、バクテリオファージに由来する、トランスポゾンに由来する、酵母エピソームに由来する、挿入エレメントに由来する、酵母染色体エレメントに由来する、バキュロウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルスに由来する各ベクター、ならびにそれらの組合せに由来するベクターが挙げられる。

【0097】

本明細書で提供されるコンストラクトおよび／またはベクターは、本明細書に記載のエンベロープタンパク質もしくはカプシドタンパク質またはその一部を含めて、構造ポリペプチドをコードするアルファウイルスポリヌクレオチドを含む。ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウイルス、またはレトロウイルスの各ベクターとすることができる。ヌクレオチドを含むコンストラクトおよび／またはベクターは、非限定的な例であるが、CMVプロモーター、ファージラムダPLプロモーター、大腸菌lac、phoAおよびtacプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーターなどの、適当なプロモーターに作動可能に連結されていることが求められる。他の適切なプロモーターは、宿主細胞および／または所望の発現率に応じて当業者に知られている。発現コンストラクトは、転写開始、終結のための部位、および転写領域では、翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含有する。コンストラクトによって発現される転写産物のコード部分は、好ましくは、翻訳されるポリペプチドの始めに翻訳開始コドンおよび翻訳されるポリペプチドの末端に適当に配列される終止コドンを含む。

【0098】

発現ベクターは少なくとも1つの選択マーカーを含むことが好ましいであろう。かかるマーカーには、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、G418またはネオマイシンの耐性、ならびに大腸菌および他の細菌において培養するためのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリンの各耐性遺伝子が含まれる。ベクターのうちで好ましいのは、バキュロウイルス、ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アビポックスウイルス、カナリア痘ウイルス、鶏痘ウイルス、アライグマ痘ウイルス、豚痘ウイルス等）、アデノウイルス（例えば、イヌアデノウイルス）、ヘルペスウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルスベクターである。本発明とともに使用することができる他のベクターは、細菌において使用するためのベクターを含み、これは、pQE70、pQE60およびpQE-9、pBluescriptベクター、Phagescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5を含む。好ましい真核生物ベクターのうちには、pFastBac1、pWINEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG、pSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVLがある。他の適切なベクターは当業者にとって容易に明らかになるであろう。

【0099】

組換えコンストラクトを、調製および使用して、真核細胞および／または原核細胞へとトランスフェクトする、感染させるかまたはトランスフォームすることができ、かつ、それらへと本明細書に記載のものを含めてウイルスタンパク質を発現させることができる。したがって、本発明は、宿主細胞であって、カプシド、E3、E2、6K、およびE1もしくはそれらの部分を含めて、アルファウイルス構造遺伝子、ならびに／または上記の任意のキメラ分子をコードする核酸を含有するとともに、カプシド、E3、E2、6K、およびE1もしくはそれらの部分を含めて、アルファウイルス構造遺伝子、ならびに／または上記の任意のキメラ分子の発現を、VLPの形成を行うことができる条件下で前記宿主細胞において可能とする、あるベクター（または複数のベクター）を含む、宿主細胞を提供する。

10

【0100】

一実施形態では、前記ベクターは組換えバキュロウイルスである。別の実施形態では、前記組換えバキュロウイルスを昆虫細胞にトランスフェクトする。好ましい実施形態では、前記細胞は昆虫細胞である。別の実施形態では、前記昆虫細胞はSf9細胞である。

【0101】

別の実施形態では、前記ベクターおよび／または宿主細胞は、記載されるカプシド、E3、E2、6K、およびE1、またはそれらの一部を含めて、アルファウイルス遺伝子をコードするヌクレオチドを含む。

【0102】

別の実施形態では、前記ベクターおよび／または宿主細胞は、本明細書に記載のアルファウイルスカプシド、E3、E2、6K、およびE1、またはそれらの一部から本質的になる。さらなる実施形態では、前記ベクターおよび／または宿主細胞は、本明細書に記載の、カプシド、E3、E2、6K、およびE1、またはそれらの一部を含むアルファウイルスタンパク質からなる。これらのベクターおよび／または宿主細胞は、本明細書に記載の、アルファウイルスコア、E3、E2、6K、およびE1、またはそれらの一部を含有し、cellular VLP proteins、バキュロウイルスタンパク質、脂質、炭水化物等などの追加の細胞成分を含有してもよい。

20

【0103】

ポリペプチド産生向けの特定の細菌発現系は大腸菌pET発現系（Novagen、Inc.、Madison、Wis）である。この発現系によれば、ポリペプチドをコードするDNAを、発現を可能とするように設計された方向でpETベクターに挿入する。かかるポリペプチドをコードする遺伝子はT7調節シグナルの制御下にあるので、ポリペプチドの発現は宿主細胞におけるT7 RNAポリメラーゼの発現を誘導することによって行われる。このことは通常には、IPTG誘導に応答してT7 RNAポリメラーゼを発現する宿主株を使用して行われる。いったん産生されると、組換えポリペプチドは次いで、当技術分野において既知の標準法、例えば、本明細書に記載の方法に従って単離される。

30

【0104】

ポリペプチド産生用の別の細菌発現系はpGEX発現系（Pharmacia）である。このシステムは、融合タンパク質としての遺伝子または遺伝子断片を高レベルで発現し、この場合、機能性遺伝子産物を迅速に精製および回収できるように設計されているGST遺伝子融合システムを用いる。目的のタンパク質は、日本住血吸虫（Schistosoma japonicum）由来のグルタチオンSタンパク質転移酵素のカルボキシル基末端に融合され、そして、Glutathione Sepharose 4Bを使用するアフィニティークロマトグラフィーにより細菌溶解物から容易に精製される。融合タンパク質は、穏和な条件下でグルタチオンを用いる溶出により回収することができる。融合タンパク質からのグルタチオンS転移酵素ドメインの切断は、このドメイン上流の部位特異的プロテアーゼの認識部位が存在することにより促進される。例えば、pGEX-2Tプラスミドで発現するタンパク質はトロンピンにより切断することができる；pGEX

40

50

ー 3 X で発現するものは因子 X a により切断することができる。

【0105】

アルファウイルスのポリペプチドおよびアナログ

本発明は、1つまたは複数のアルファウイルスポリペプチドを含むVLPを提供する。本発明には、免疫応答をモジュレートするそれらの能力を増強するまたは阻害しないように改変された1つまたは複数のアルファウイルスポリペプチドまたはそれらの断片を含むVLPも含まれる。一実施形態では、本発明は、変更を作製することによってアルファウイルスのアミノ酸配列または核酸配列を最適化するための方法を提供する。このような変更には、ある特定の突然変異、欠失、挿入、または翻訳後修飾が含まれ得る。本発明はさらに、本発明の天然に存在する任意のポリペプチドのアナログを含む。アナログは、アミノ酸配列の相違によって、翻訳後修飾によって、またはその両方によって本発明の天然に存在するポリペプチドと異なることができる。本発明のアナログは、全体として、本発明の天然に存在するアミノ酸配列の全部または一部と少なくとも85%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%またはさらに99%の同一性を呈することになる。配列の比較の長さは、少なくとも10、13、15個のアミノ酸残基、好ましくは少なくとも25個のアミノ酸残基、より好ましくは35個を超えるアミノ酸残基である。

【0106】

アルファウイルスポリペプチドの変更には、それらに限定されないが、部位特異的、ランダム点突然変異誘発、相同組換え(DNAシャッフリング)、ウラシル含有鑄型を使用する突然変異誘発、オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発、ホスホロチオエート修飾DNA突然変異誘発、ギャップを有する二重鎖DNAを使用する突然変異誘発等が含まれる。さらなる適切な方法には、点ミスマッチ修復、修復欠損性宿主株を使用する突然変異誘発、制限選択および制限精製、欠失突然変異誘発、全遺伝子合成による突然変異誘発、二本鎖切断修復等が含まれる。例えば、キメラコンストラクトを伴う突然変異誘発も本発明同様に含まれる。一実施形態では、突然変異誘発は、天然に存在する分子または変更もしくは突然変異された天然に存在する分子に関する既知の情報、例えば配列、配列比較、物理的特性、結晶構造等によって導くことができる。

【0107】

一実施形態では、本発明は、参照ポリペプチドとは異なるポリペプチド変異型を提供する。「変異型」という用語は、参照配列に対して1個または複数のアミノ酸によって変更されたアミノ酸配列を指す。変異型は「保存的」変化を有することができ、この場合、置換されたアミノ酸は類似の構造的または化学的特性、例えばロイシンのイソロイシンによる置き換えを有する。代替的に、変異型は、「非保存的」変化、例えば、グリシンのトリプトファンによる置き換えを有することができる。類似の軽微な変動には、アミノ酸の欠失もしくは挿入、またはその両方も含まれ得る。生物学的または免疫学的活性を排除することなく、どのアミノ酸残基を置換、挿入または欠失させることができるかを判定する上での指針は、当技術分野でよく知られるコンピュータプログラム、例えばDNASTARソフトウェアを使用して見出すことができる。望ましくは、変異型は実質的な生物学的活性を示す。一実施形態では、タンパク質変異型はVLPを形成し、対象に投与された場合に抗体応答を誘発する。

【0108】

天然の変異型は、タンパク質における突然変異に起因して生じることができる。こういった突然変異は、感染病原体の個々の群内の抗原性の変動をもたらすことができる。そのため、特定の株に感染したヒトは当該ウイルスに対する抗体を作り出し、新しいウイルス株が現れるとより古い株に対する抗体はもはや新しいウイルスを認識せず、再感染が起こるおそれがある。本発明は、VLPを作製するための感染病原体由来のタンパク質の全ての抗原性のおよび遺伝的な変動を包含する。

【0109】

完全長ポリペプチドに加えて、本発明はまた、本発明のポリペプチドのいずれか1つの断片も含む。本明細書で使用される場合、「断片」という用語は、少なくとも5、10、

10

20

30

40

50

13または15を意味する。他の実施形態では、断片は、少なくとも20個の連続するアミノ酸、少なくとも30個の連続するアミノ酸、または少なくとも50個の連続するアミノ酸、および他の実施形態では、少なくとも60～80個またはそれを超える連続するアミノ酸である。本発明の断片は、当業者であれば知られている方法によって生成してもよく、または通常のタンパク質プロセッシング（例えば、生物学的活性にとって必要とされない、新生ポリペプチドからのアミノ酸の除去または選択的mRNAスプライシングイベントもしくは選択的タンパク質プロセッシングイベントによるアミノ酸の除去）から生じててもよい。

【0110】

アルファウイルスVLPまたは1つまたは複数のアルファウイルスポリペプチドの機能活性を模倣するように設計された化学構造を有する非タンパク質アナログは、本発明の方法に従って投与することができる。アルファウイルスアナログは、天然アルファウイルスの生理学的活性を上回る場合がある。

10

【0111】

アナログ設計の方法は、当技術分野でよく知られており、アナログの合成は、生成するアナログが天然アルファウイルスポリペプチドの免疫調節性の活性を呈するように、化学的構造を改変することによって、そのような方法に従って行うことができる。こういった化学的改変には、それらに限定されないが、代替R基を置換すること、および天然アルファウイルス分子の特定の炭素原子にての飽和度を変化させること、が含まれる。

20

【0112】

好ましくは、アナログは、インビボ（in vivo）での分解に対して比較的耐性であり、投与すると、より長期に及ぶ治療効果をもたらす。機能的活性を測定するためのアッセイには、それらに限定されないが、下の実施例に記載されるものが含まれる。

【0113】

医薬組成物および投与

本発明は、本明細書に記載のアルファウイルスのウイルス構造タンパク質およびガレクチン-3抗原を含むVLPを含む医薬組成物を特徴とする。本明細書で有用な医薬組成物は、適切な任意の希釈剤または賦形剤を含めて、医薬的に許容される担体であって、組成物を受ける脊椎動物にとって有害な免疫応答の生成をそれ自体誘導しないあらゆる医薬品が含まれるとともに過度の毒性なしで投与することができる担体と、本発明のVLPとを含有する。本明細書で使用される場合、「医薬的に許容される」という用語は、哺乳動物での、より具体的にはヒトでの使用について、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認済みであること、または米国薬局方、欧州薬局方もしくは他の一般に認められている薬局方に収載されていることを意味する。これらの組成物は、脊椎動物において防御免疫応答を誘導するためのワクチンおよび／または抗原組成物として有用とすることができる。

30

【0114】

医薬的に許容される担体には、それらに限定されないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、滅菌等張性水性緩衝剤、およびこれらの組合せが含まれる。医薬的に許容される担体、希釈剤、およびその他の賦形剤に関する徹底した考察は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co. N. J. 現行版) に発表されている。製剤は投与の様式に適することが求められる。好ましい実施形態では、製剤は、ヒトへの投与に適するものであり、滅菌されており、非微粒子状であり、かつ／または非発熱性であることが好ましい。

40

【0115】

所望であれば、組成物は、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝化剤も含有することができる。組成物は、再構成に適した凍結乾燥粉末などの固体の形態、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、ピル、カプセル剤、持続放出製剤、または散剤とすることができる。経口用製剤は、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等などの標準の担体を

50

含んでもよい。

【0116】

ある特定の実施形態では、VLP組成物は、例えば、VLP組成物の量および濃度を表す密閉容器中で、液体形態で供給される。

【0117】

好ましくは、液体形態のVLP組成物は、密閉容器の少なくとも約 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは少なくとも約 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも $1\text{mg}/\text{ml}$ で供給される。

【0118】

代替的に、ワクチン製剤は、点滴、大粒子エアロゾル（約10ミクロン超）もしくは上気道への噴霧または小粒子エアロゾル（10ミクロン未満）もしくは下気道への噴霧のいずれかによって、鼻腔内に投与される。上記のデリバリー経路のいずれもが免疫応答をもたらすが、一方で、鼻腔内投与によれば、アルファウイルス、例えば、CHIKVまたはVEEVを含めて、多くのウイルスの侵入部位で粘膜免疫を誘発するという付加的な利点が付与される。

【0119】

したがって、本発明はまた、哺乳動物への感染またはその少なくとも1つの症状に対する免疫を誘導するワクチンまたは抗原性組成物を製剤化する方法であって、前記製剤に有効量のVLP、例えば、アルファウイルス（例えば、CHIKVまたはVEEV）を添加することを含む、方法も含む。

【0120】

ある特定の場合では、単回用量での免疫の賦活が好ましいが、しかし、追加の投薬量と同じまたは異なる経路によって投与して、所望の効果を達成することもできる。新生児および幼児では、例えば、十分なレベルの免疫を誘発するために複数回の投与が必要とされる場合がある。投与は、十分なレベルまたは防御を維持するために必要に応じて、小児期全体をとおして間隔をおいて継続してもよい。

【0121】

同様に、例えば、医療従事者、デイケア従事者、低年齢小児の家族メンバ、高齢者、および心肺機能または免疫系が損なわれた個人などの、反復性または重篤な感染に特にかかりやすい成人は、防御免疫応答を確立し、および／または維持するために複数の免疫を必要とする場合がある。誘導された免疫のレベルを、例えば、中和分泌抗体および血清抗体の量を測定することによってモニタリングし、必要に応じて、投薬量を調節してまたはワクチン接種を繰り返して、所望のレベルの防御を誘発および維持することができる。

【0122】

医薬製剤の投薬量は、例えば、予防的もしくは治療的免疫応答を誘発するのに有効な用量を最初に特定することによって、例えば、ウイルス特異的免疫グロブリンの血清力価を測定することによって、または血清試料もしくは尿試料もしくは粘膜分泌物中の抗体の阻害率を測定することによって、当業者であれば、容易に決定することができる。前記投薬量は動物試験から決定することができる。ワクチンの有効性を研究するために使用される動物の非限定的なリストには、モルモット、ハムスター、フェレット、チンチラ、マウスおよびコットラット、ならびに非ヒト霊長類が含まれる。ほとんどの動物は感染病原体に対する自然宿主ではないが、それでも疾患の種々の態様の研究に役立つことができる。例えば、上記動物のいずれかに、ワクチン候補、例えば、本発明のVLPを投薬して、誘導された免疫応答を部分的に特徴付けること、および／または任意の中和抗体が産生されているかどうかを判定することができる。例えば、マウスは小型であり、その低コストであることより研究者はラージスケールで研究を実行することができるので、多数の研究がマウスモデルにおいて実行されてきた。

【0123】

加えて、ヒト臨床研究を、ヒトのための好ましい有効用量を決定するために当業者によって実施することができる。そのような臨床研究はルーチンであり、当技術分野において

10

20

30

40

50

よく知られている。用いられるべき正確な用量はまた、投与経路に依存することになる。有効用量は、インビトロ (in vitro) または動物試験システムから導き出される用量－応答曲線から外挿することができる。

【0124】

また、当技術分野においてよく知られているように、特定の組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる、免疫応答の非特異的賦活剤の使用によって増強することができる。本明細書で使用される場合、「アジュバント」という用語は、製剤中で特定の免疫原と組み合わせて使用される場合、結果として得られる免疫応答を増強、変更または改変することになる化合物を指すこととする。アジュバントは、未知の抗原に対する免疫の全般的な高まりを促進するために経験的に使用されてきた。免疫プロトコルでは、長年にわたって応答を賦活するためにアジュバントが使用されており、したがって、アジュバントは当業者によく知られている。いくつかのアジュバントは、抗原が提示される様式に影響を及ぼす。例えば、免疫応答は、タンパク質抗原がミョウバンによって沈殿する場合、高まる。抗原の乳化もまた、抗原提示の期間を延長する。あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Vogel et al., "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)"に記載の任意のアジュバントの包含は、本発明の範囲内で想定される。

【0125】

例示的なアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント [死菌結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) を含有する免疫応答の非特異的賦活剤]、不完全フロイントアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。他のアジュバントは、GMCSP、BCG、水酸化アルミニウム、thur-MDP および nor-MDP などの MDP 化合物、CGP (MTP-PE)、リピド A、およびモノホスホリルリピド A (MPL) を含む。2% スクアレン / Tween-80 エマルジョン中の、細菌から抽出された3つの成分、MPL、トレハロースジミコール酸 (TDM) および細胞壁骨格 (CWS) を含有する RIBI もまた、企図される。MF-59、Novasomes (登録商標)、MHC 抗原もまた、使用することができる。

【0126】

本発明の VLP はまた、「免疫賦活剤」と製剤化することができる。それらは、免疫系の応答を高めるための身体自身の化学的メッセンジャー (サイトカイン) である。免疫賦活剤には、限定されないが、インターロイキン (例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13) などの、免疫賦活活性、免疫増強活性、および炎症促進活性を有する種々のサイトカイン、リンホカインおよびケモカイン；増殖因子 [例えば、顆粒球マクロファージ (GM) コロニー刺激因子 (CSF)]；およびマクロファージ炎症性因子、Flt3 リガンド、B7.1；B7.2 等などの他の免疫賦活分子が含まれる。免疫賦活分子は、VLP と同じ製剤中で投与してもよく、または別々に投与してもよい。タンパク質またはタンパク質をコードする発現ベクターのいずれかを、免疫賦活作用を生成するために投与することができる。したがって、一実施形態では、本発明は、アジュバントおよび／または免疫賦活剤を含む抗原製剤およびワクチン製剤を含む。

【0127】

アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症およびハンチントン病を始めとする神経変性疾患は、慢性の異常な炎症を示す。

【0128】

本開示によれば、組成物は脳内 Gal-3 レベルの減少ならびに認知機能の改善を示したが、このことが強力に示唆するところは、神経変性疾患に限らず、一般の炎症性疾患の処置にとっても有用であること、である。

【0129】

炎症性疾患の例としては、肺、関節、眼、腸、皮膚、心臓、腎臓および中枢神経系 (CNS) などの、様々な臓器のものが挙げられる。肺の疾患には、喘息、成人呼吸促進症候群、気管支炎および嚢胞性線維症 (これは、付加的にまたは代替的に腸またはその他の組

10

20

30

40

50

織を伴う場合がある）が含まれる。関節の疾患には、リウマチ性関節炎、リウマチ性脊椎炎、関節炎、痛風関節炎およびその他の関節の疾患が含まれる。炎症性の眼の疾患には、ブドウ膜炎（虹彩炎を含む）および結膜炎が含まれる。炎症性の腸の疾患には、クローン病、潰瘍性結腸炎および末梢直腸炎が含まれる。皮膚の疾患には、乾癬、湿疹および皮膚炎（アレルギー性の起源であろうとなかろうと）などの細胞増殖を伴うものが含まれる。心臓の疾患には、冠状動脈梗塞損傷が含まれる。腎臓の疾患には、糸球体腎炎（例えば、特発性ネフローゼ症候群または微小変化腎症を含めてネフローゼ症候群の有無にかかわらず、）などの慢性腎臓病（CKD）が含まれる。その他の炎症性疾患および免疫障害には、慢性炎症における組織壊死、内毒素ショック、平滑筋増殖不全（例えば、血管形成を受けての再狭窄）、および移植手術を受けての組織拒絶が含まれる。

10

【0130】

CNSの炎症は、神経変性疾患の病態形成の一部である。

神経変性疾患には、それらに限定されないが、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS、「ルー・ゲーリック病」）、ハンチントン病、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病および一般の神経変性疾患が含まれる。

【0131】

本開示によれば、本発明の組成物または方法は、炎症性疾患、とりわけ加齢に関連した炎症性疾患の処置向けに有用であり、それによって、全身の健康および疾患の進行に関連する生物学的機能性を増強し、長寿および健康寿命を促進し、ならびに／または対象において細胞の老化プロセスを遅延させるまたは阻害することができる。

20

【0132】

本出願は以下の実施例を参照して詳細に記載されるが、それらは本出願の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

【0133】

（1）Gal-3抗原を有するVLPの調製

ガレクチン-3（Gal-3）ワクチンエピトープを、ヒトおよびマウスのGal-3タンパク質のタンパク質アミノ酸配列および3D構造を使用することによって設計した（表1）。リンカーSGG（N末端）およびGGS（C末端）をエピトープペプチド配列番号5に付着させた。哺乳動物発現ベクター、pVEEV Gal-3プラスミドDNAベクターの生成の場合、Gal-3エピトープペプチド配列（gBlocks、IDT）の合成dsDNA断片を、pVEEVベクター内のVEEV E3エンベロープタンパク質をコードするDNAの特定の位置（330位のGと335位のSの間）に挿入して、WO 2022/225057に開示の手順に従ってVEEV-Gal-3 VLPを得た。

30

【0134】

【表1】

Gal-3 エピトープペプチド

エピトープペプチド 配列番号12	長さ(A. A.)	DNA配列 配列番号13
SGGADSFSLN DAL AGSGNPN PQGYPG AWGN QPAGGS	36	GGC GCG GAC TCT TTT TCC TTG AAT GAT GCT CTC GCT GGG TCC GGT AAT CCT AAC CCA CAA GGC TAT CCT GGAG CG TGG GGC AAT CAA CCG GCG GGC

40

【0135】

FreeStyle 293F細胞（Thermo Fisher Scientific

50

ic、#R790-07)を、振盪インキュベーターを使用して、8%CO₂で、37℃でFreeStyle 293 Expression培地(Thermo Fisher Scientific、#12338-018)を含む懸濁液中で培養した。293 F細胞に、pVEEV Gal-3 VLPプラスミドDNA発現ベクターを、PEI(ポリエチレンジアミン、Polysciences、#23966)により、DNA 0.8 μg/10⁶個の細胞、DNA:PEI=1:3(w/w)、および1.25×10⁶個の細胞/培養培地1 mLの条件で、トランスフェクトした。培養上清を、トランスフェクションの4日後に回収し、遠心分離(3,000 rpm、10分間)によって、これに続いて0.45 μm PESメンブレンフィルターシステム(VWR #10040-470)での濾過によって、清澄化した。

10

【0136】

VLP含有培養上清をOptiPrep(60%w/v)(Iodixanol、Accurate Chemical、#AN1114542)1.5 mL上へと重ね、SW-28ローター(Beckmann)で52,000×gで1.5時間遠心分離した。界面の上に1.5 mLを残すように上清を取り除いた後、2つの層を混合して50%OptiPrep溶液を作製し、NVT100ローター(Beckman)で360,000×gで2.5時間遠心分離して密度勾配を形成した。

【0137】

粗VLPを収集し、HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HRカラム(GE、#28-9356-06)を備えたBiologic Duo-Flow FPLCシステム(Bio-Rad)およびリン酸緩衝食塩水(PBS)を使用するサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。VLPを含有する画分をAmicon Ultra-15遠心フィルターユニット(EMD Millipore、#UFC910024)によって濃縮し、0.20 μmのPESメンブレンを通して濾過した。

20

【0138】

総タンパク質濃度を、製造業者の取扱説明書に従ってBCA Protein Assay(Pierce、#23225)によって測定した。VLP試料の純度を、SDS-PAGE分析(Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gel、Bio-Rad、#456-9035)、これに続いて、QCColloidal Coomassie Stain(Bio-Rad、#1610803)を使用するクマシー色素ベースの染色によって確認した。スクロースおよびEDTAを、それぞれ最終濃度250 mMおよび5 mMへとVLP溶液に添加した。VLP試料のタンパク質濃度を0.4 mg/mLに調整し、-80℃で保存した。

30

【0139】

Gal-3エピトープペプチドを含むVEEV VLPの分子サイズと純度を、変性条件下でSDS-PAGEによって分析した。得られたVLPは理論上の分子量と一致し、純度は90%を超えていた。VEEVウイルス構造タンパク質との融合タンパク質Gal-3ペプチドに関するタンパク質バンドを確認した。

【0140】

(2) 免疫マウスにおける抗マウスガレクチン-3(Gal-3)抗体の検出

5×FADマウスをアルツハイマー病モデルマウスとして使用した。マウスを2つの群に分けた。VEEV-Gal-3 VLPをRIBIアジュバントと混合しそして一方の群のマウス(群2)に筋肉内投与し、生理食塩水を他方の群(群1)に筋肉内投与した。VLPの濃度は0.2 mg/mLであり、VLP 50マイクログラムを各マウスに投与した。マウスに、実験開始時、第1の投与の2週間後および4週間後に投与した。実験開始の6週間後、血液試料を各マウスから得、血清を調製した。産生された抗マウスGal-3抗体を、Gal-3タンパク質をELISAプレートにコーティングしてあるELISAを使用して検出した。結果が示すところは、マウスGal-3由来ポリペプチドを含むウイルス様粒子によって、群2のマウスで抗マウスGal-3抗体が誘導されたこと、である(図1を参照されたい)。

40

50

【0141】

(3) ウイルス構造ポリペプチドを含むベネズエラマ脳炎ウイルス様粒子によって、5×FADマウスのステップスルー型受動的回避試験における潜時が延長した。

【0142】

実験開始の5か月後、ステップスルー型受動的回避試験を実施した。受動的回避試験は、回避記憶保持を試験するための方法として一般には使用される。受動回避応答を「ステップスルー型」装置を使用して測定した。装置は2つの室に分かれている。初日に、マウスを明室に入れた。マウスが明領域から暗室に移動したときに、電気ショックを3秒間送った(0.3mA)。2日目に、マウスを明室に入れ、マウスが暗室に進入した時間を「保持時間」として記録した。

結果は、VLP-Gal-3注射群では潜時が延長したことを示したが、このことは、VLP-Gal-3注射群における記憶保持を示唆した(図2を参照されたい)。

【0143】

(4) VEEV-Gal-3-VLPによって5×FADマウスの海馬中Gal-3が低下した。

試験の後、マウス脳をマイクロチューブに採取し、溶解緩衝剤を用いてホモジェナイズした。溶解物を4℃で10分間遠心分離し、上清をNUPAGE 12%、Bis-Trisゲルで分離し、PVDFメンブレンに転写した。メンブレンをBullet Blocking One (nacalai tesque) でブロックし、一次抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。一次抗体は抗Gal-3(1:1000、R&D)および抗βアミロイド(1:1000、BioLegend)であった。このインキュベーションに続いて、メンブレンを抗ラット二次抗体(1:3000、Jackson Immuno Research)または抗マウス二次抗体(1:5000、Jackson Immuno Research)とともにインキュベートした。プロットを化学発光によって発色させ、画像を化学発光検出器(LAS500、GE Healthcare)を使用してスキャンした。β-アクチンをローディング対照として使用した。その結果、海馬中Gal-3発現レベルが、VLP-Gal-3注射群では、有意に低下した(図3を参照されたい)。

【0144】

(5) VEEV-Gal-3-VLPによって高齢C57BL/6Jマウスの寿命が延長した。

C57BL/6Jマウスを2つの群に分けた。VEEV-Gal-3 VLPを一方の群のマウス(群B6-V)に、生理食塩水を他方の群(群B6-N)に、筋肉内投与した。

【0145】

VLPを101~102週齢に3回投与した。約5週間の後、群B6-Nの一部のマウスが徐々に死亡した。他方で、群B6-Vのマウスはまったく死亡しなかった(図4を参照されたい)。

【0146】

(6) VEEV-Gal-3-VLPによって5×FADマウスの寿命が延長した。

5×FADマウスを2つの群に分けた。VEEV-Gal-3 VLPを一方の群のマウス(群F-V)に、生理食塩水を他方の群(群F-N)に、筋肉内投与した。

【0147】

VLPを28、30、32および42週齢で4回投与した。群F-Nの一部のマウスが50週齢後に徐々に死亡した。他方で、群B6-Vのマウスは54週齢までまったく死亡しなかった(図5を参照されたい)。

10

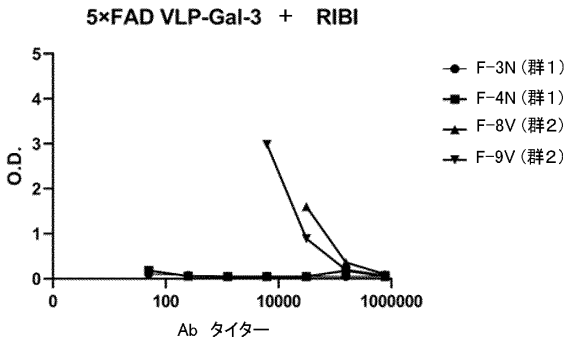
20

30

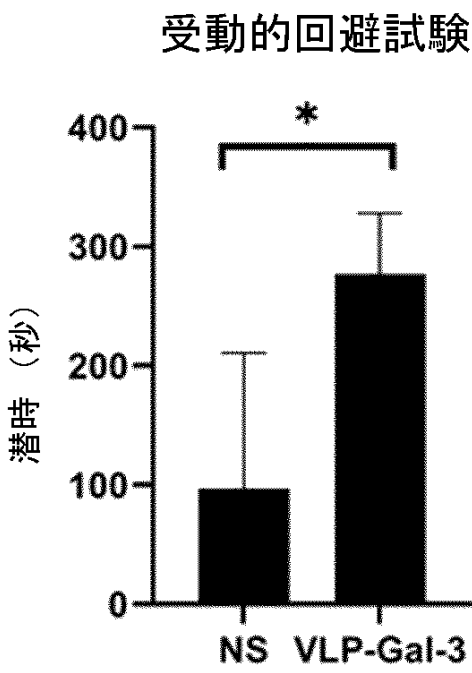
40

50

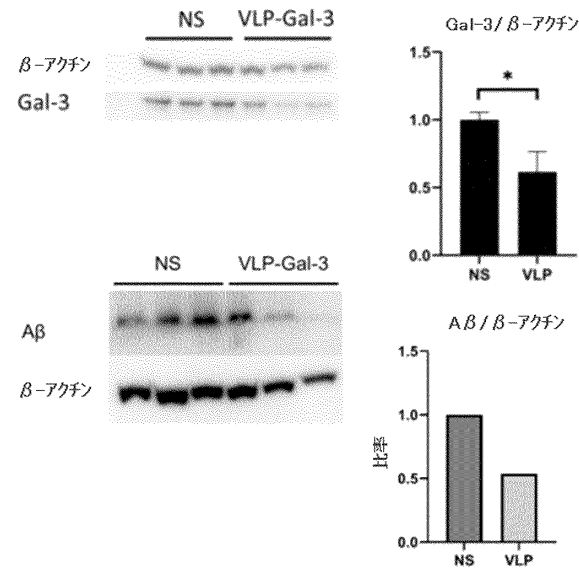
【図面】
【図 1】



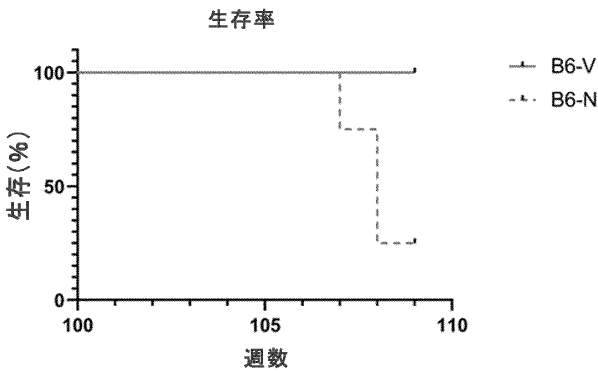
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

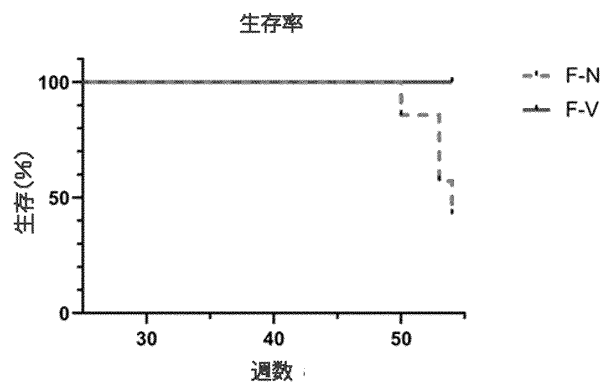
20

30

40

50

【 図 5 】



10

【 配 列 表 】

2025513920000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/015132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 7/04</i> (2006.01)i; <i>A61K 35/76</i> (2015.01)i; <i>A61K 39/385</i> (2006.01)i; <i>A61P 25/16</i> (2006.01)i; <i>A61P 25/28</i> (2006.01)i; <i>A61P 29/00</i> (2006.01)i; <i>C07K 14/18</i> (2006.01)i; <i>C07K 14/47</i> (2006.01)i; <i>C07K 19/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/12</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/40</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/62</i> (2006.01)i FI: C12N7/04; A61K35/76; A61K39/385; A61P25/16; A61P25/28; A61P29/00; C07K14/18; C07K14/47; C07K19/00; C12N15/12; C12N15/40; C12N15/62 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) C12N7/04; A61K35/76; A61K39/385; A61P25/16; A61P25/28; A61P29/00; C07K14/18; C07K14/47; C07K19/00; C12N15/12; C12N15/40; C12N15/62 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOTO, K. et al., A development of novel vaccine targeting galectin-3 for Alzheimer's disease, Clinical Neurology [online], 2021, Vol. 61, Supplement, p. S223, Abstract Number AP-01-5, [retrieved on 2023.06.06], Retrieved from the Internet : <URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/clinicalneuro/61/Supplement/61_61_supplement_S221/_pdf/-char/ja >, ISSN 0009-918X, <DOI: 10.5692/clinicalneuro.61_supplement_S221> Abstract	1-5, 13-14
Y		1-14
Y	WO 2016/021209 A1 (VLP THERAPEUTICS, LLC) 11 February 2016 (2016-02-11) Claims, examples	1-14
P, X	WO 2022/225057 A1 (VLP THERAPEUTICS, INC.) 27 October 2022 (2022-10-27) Claims, examples	1-14
☒ 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 06 June 2023		Date of mailing of the international search report 20 June 2023
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer YAMAZAKI, Mana 4B 7884 Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3488

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

International application No.

PCT/JP2023/015132

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOTO, K. et al., Development of novel vaccine to reduce galectin-3 for Alzheimer's disease, Journal of the Neurological Sciences, 2021, Vol.429, Abstracts, pp.108-109, Article number 119028 Abstract	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/015132

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:

"The form of an Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26."

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No. PCT/JP2023/015132		
Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
WO	2016/021209	A1	11 February 2016	JP	2017-523796	A
				US	2016/0040134	A1
				EP	3177720	A1
				CN	106795513	A
WO	2022/225057	A1	27 October 2022	US	2022/0347261	A1

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/40 (2006.01)	C 1 2 N 15/40	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 39/385 (2006.01)	A 6 1 K 39/385	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

アメリカ合衆国 2 0 8 9 5 メリーランド州ケンジントン、ホワイト・フrint・ドライブ 5 2 1 1

(72)発明者 後藤 和也

京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

F ターム (参考)	4B065	AA95X	AB01	BA01	CA24	CA45
	4C085	AA03	BB16	EE01		
	4C087	AA01	AA02	BC83	NA14	ZA02 ZA16 ZB09 ZB11
	4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10 BA41 CA01 CA40 DA86 EA31
						FA72 FA74