

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成30年4月26日(2018.4.26)

【公表番号】特表2017-512498(P2017-512498A)

【公表日】平成29年5月25日(2017.5.25)

【年通号数】公開・登録公報2017-019

【出願番号】特願2017-501492(P2017-501492)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 C 0 7 K 14/445 (2006.01)  
 C 0 7 K 19/00 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/015 (2006.01)  
 A 6 1 P 33/06 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/39 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/569 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A  
 C 0 7 K 14/445 Z N A  
 C 0 7 K 19/00  
 C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 P 21/02 C  
 A 6 1 K 39/015  
 A 6 1 P 33/06  
 A 6 1 K 37/02  
 A 6 1 K 39/39  
 G 0 1 N 33/569 A

【手続補正書】

【提出日】平成30年3月16日(2018.3.16)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

寄生生物熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)に対するヒトワクチンとして適した組換えタンパク質の混合物であって、寄生生物生活環の前赤内期、血液および有性段階の熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)表面タンパク質に由来する抗原を含み、

a) 前赤内期抗原が、少なくとも抗原 P f C e l T O S、P f C S P および P f T R A P を含み、

b) 血液段階抗原(単数または複数)が、頂端膜抗原 1 (P f A M A 1) の少なくとも 1 種もしくは複数の変異体を含み、

c) 有性段階抗原 (単数または複数) が、オーキネート抗原 P f s 2 5 および / もしくは生殖体 / ガメトサイト表面タンパク質 P f 2 3 0 C 0 を含む、混合物。

【請求項 2】

前記前赤内期 (pre-erythrocytic) 抗原が、組換え融合タンパク質中に含まれ、前記組換え融合タンパク質が、配列番号 1、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 および配列番号 10 または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドまたはその断片からなる群から選択され、前記相同ポリペプチドは、少なくとも 85 % の配列同一性を有する、請求項 1 に記載の混合物。

【請求項 3】

前記頂端膜抗原 1 ( P f A M A 1 ) の変異体が、配列番号 2、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 17、配列番号 18 および配列番号 19 または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドまたはその断片からなる群から選択され、前記相同ポリペプチドは、少なくとも 85 % の配列同一性を有する、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載の混合物。

【請求項 4】

前記頂端膜抗原 1 ( P f A M A 1 ) の変異体が、発現宿主特異的 N - グリカンを保持する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の混合物。

【請求項 5】

前記さらなる熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) 血液段階抗原が、組換え融合タンパク質中に含まれ、前記組換え融合タンパク質が、配列番号 3、または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含み、前記相同ポリペプチドは、少なくとも 85 % の配列同一性を有する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の混合物。

【請求項 6】

前記有性段階抗原が、組換え融合タンパク質中に含まれ、前記組換え融合タンパク質が、配列番号 4、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28、または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドからなる群から選択され、前記相同ポリペプチドは、少なくとも 85 % の配列同一性を有する、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の混合物。

【請求項 7】

- a) ポリペプチド 1 : 配列番号 1、
- b) ポリペプチド 2 : 配列番号 2、
- c) ポリペプチド 3 : 配列番号 3、および
- d) ポリペプチド 4 : 配列番号 4

の アミノ酸配列を有する 4 種の組換えポリペプチド、または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含み、前記相同ポリペプチドは、少なくとも 85 % の配列同一性を有する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の混合物。

【請求項 8】

- a) ポリペプチド 1 : 配列番号 11、
- b) ポリペプチド 2 : 配列番号 12、
- c) ポリペプチド 3 : 配列番号 13、
- d) ポリペプチド 4 : 配列番号 8 および
- e) ポリペプチド 5 : 配列番号 26

の アミノ酸配列を有する 5 種の組換えポリペプチド、

または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含み、前記相同ポリペプチドは、少なくとも 85 % の配列同一性を有する請求項 1 から 6 に記載の混合物。

【請求項 9】

- a) ポリペプチド 1 : 配列番号 11、
- b) ポリペプチド 2 : 配列番号 12、
- c) ポリペプチド 3 : 配列番号 13、
- d) ポリペプチド 4 : 配列番号 9、および
- e) ポリペプチド 5 : 配列番号 28

のアミノ酸配列を有する 5 種の組換えポリペプチド

または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含み、前記相同ポリペプチドは、少なくとも 85 % の配列同一性を有する請求項 1 から 6 に記載の混合物。

【請求項 10】

- f) ポリペプチド 1 : 配列番号 14、
- g) ポリペプチド 2 : 配列番号 15、
- h) ポリペプチド 3 : 配列番号 16、
- i) ポリペプチド 4 : 配列番号 9、および
- j) ポリペプチド 5 : 配列番号 28

のアミノ酸配列を有する 5 種の組換えポリペプチド、

または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含み、前記相同ポリペプチドは、少なくとも 85 % の配列同一性を有する、請求項 1 から 6 に記載の混合物。

【請求項 11】

- a) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 および配列番号 4 の配列を有するポリペプチド、
  - b) 配列番号 8、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13 および配列番号 26 の配列を有するポリペプチド、
  - c) 配列番号 9、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13 および配列番号 28 の配列を有するポリペプチド、
  - d) 配列番号 8、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 および配列番号 26 の配列を有するポリペプチド、
  - e) 配列番号 9、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 および配列番号 28 の配列を有するポリペプチド、
- をコードする単離された核酸分子または複数の核酸分子。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のヌクレオチド分子を含むベクター。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のベクターを含み、植物細胞である、宿主細胞。

【請求項 14】

生理学的に許容される媒体中に、有効成分としての請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の混合物および担体を含む、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に対してヒト個体を免疫処置するためのワクチン組成物。

【請求項 15】

組換えタンパク質の混合物を生成する方法であって、

- (a) 前記組換えタンパク質を生成するのに適した条件下、適した培養培地中で請求項 13 に記載の宿主細胞を培養するステップと、
- (b) 前記生成された組換えタンパク質を得るステップと、任意選択で、
- (c) 前記組換えタンパク質をプロセッシングするステップとを含む、方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0165

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0165】

(参考文献)

本明細書を通じて引用される文献参考文献、発行された特許および公開された特許出願を含むすべての引用された参考文献の内容は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-10 (1990).

Ausubel, F.M. et al. *Current protocols in molecular biology*, edited by M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, 1988, 165.00. *Molecular Reproduction and Development* 1, 146-146 (1989).

Beier MS, Pumpuni CB, Beier JC, Davis JR. 1994. Effects of para-aminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 31(4): 561-565

Bergmann-Leitner ES, Mease RM, De La Vega P, Savranskaya T, Polhemus M, Ockenhouse C, Angov E. 2010. Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from *Plasmodium falciparum* elicits cross-species protection against heterologous challenge with *Plasmodium berghei*. *PLoS One* 5(8):e12294.

Bishop A and Gilchrist BM. 1946. Experiments upon the feeding of *Aedes aegypti* through animal membranes with a view to applying the method to the chemotherapy of malaria. *Parasitology.* 37: 85-100

Black CG, Wang L, Wu T, Coppel RL. 2003. Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 127(1):59-68.

Black CG, Wu T, Wang L, Hibbs AR, Coppel RL. 2001. Merozoite surface protein 8 of *Plasmodium falciparum* contains two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol* 114(2):217-26.

Black, C.G., Wang, L., Wu, T. & Coppel, R.L. Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 127, 59-68 (2003).

Black CG, Wu T, Wang L, Hibbs AR, Coppel RL. Merozoite surface protein 8 of *Plasmodium falciparum* contains two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol* 2001;114:217-26.

Blackman MJ, Ling IT, Nicholls SC, Holder AA. 1991. Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol* 49(1):29-33.

Boes A, Spiegel H, Delbruck H, Fischer R, Schillberg S, Sack M. 2011. Affinity purification of a framework 1 engineered mouse/human chimeric IgA2 antibody from tobacco. *Biotechnol Bioeng* 108(12):2804-14.

Brochet, X., Lefranc, M.-P. & Giudicelli, V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic acids research* 36, W503-8 (2008).

Chen L, Lopaticki S, Riglar DT, Dekiwadia C, Uboldi AD, Tham WH, O'Neill MT, Richard D, Baum J, Ralph SA and others. 2011. An EGF-like protein forms a complex with PfRh5 and is required for invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*.

parum. PLoS Pathog 7(9):e1002199.

Dayhoff, M.O. Atlas of Protein Sequence and Structure (Vol 5, Supplement 3). 353-358 (Natl Biomedical Research: 1979).

Epping RJ, Goldstone SD, Ingram LT et al. An epitope recognized by inhibitory monoclonal antibodies that react with a 51 kilodalton merozoite surface antigen in *Plasmodium falciparum*. Exp Parasitol 1988;81:90-6.

Garcia-Basteiro AL, Bassat Q and Alonso PL. 2012. Approaching the Target: the Path Towards an Effective Malaria Vaccine. Mediterr J Hematol Infect Dis. 4(1):e2012015

Geysen, H.M., Meloen, R.H. & Barteling, S.J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81, 3998-4002 (1984).

Gosselin, E. J., K. Wardwell, D. R. Gosselin, N. Alter, J. L. Fisher, and P. M. Guyre. 1992. Enhanced antigen presentation using human Fc gamma receptor (monocyte/macrophage)-specific immunogens. J.Immunol. 149:3477-3481.

Hugel FU, Pradel G and Frevert U. 1996. Release of malaria circumsporozoite protein into the host cell cytoplasm and interaction with ribosomes. Mol Biochem Parasitol. 81(2): 151-170

Ifediba T, Vanderberg JP. 1981. Complete in vitro maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. Nature. 294(5839): 364-366

Kariuki MM, Kiara JK, Mula FK, Mwangi JK, Wasunna MK and Martin SK. 1998. *Plasmodium falciparum*: Purification of the various gametocyte developmental stages from in vitro-cultivated parasites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59(4): 505-508

Kaslow DC, Quakyi IA, Syin C, Raum MG, Keister DB, Coligan JE, McCutchan TF, Miller LH. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. Nature 333(6168):74-6.

Kusi, K.A. et al. Immunization with different PfAMA1 alleles in sequence induces clonal imprint humoral responses that are similar to responses induced by the same alleles as a vaccine cocktail in rabbits. Malaria journal 10, 40 (2011).

Livingstone, C.D. & Barton, G.J. Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. Computer applications in the bio sciences: CABIOS 9, 745-56 (1993).

Mahajan, B., J. A. Berzofsky, et al. (2010). "Multiple antigen peptide vaccines against *Plasmodium falciparum* malaria." Infect Immun 78(11): 4613-4624.

Makler, M.T. et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. The American journal of tropical medicine and hygiene 48, 739-41 (1993).

Marshall VM, Silva A, Foley M, Cranmer S, Wang L, McColl DJ, Kemp DJ, Coppel RL. 1997. A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain. Infect Immun 65(11):4460-7.

Marshall VM, Tieqiao W, Coppel RL. 1998. Close linkage of three merozoite surface protein genes on chromosome 2 of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 94(1):13-25.

Pelham HR. 1990. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. Trends Biochem Sci 15(12):483-6.

Marshall VM, Silva A, Foley M et al. A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain. Infect Immun 1997;65:4460-7.

McCormick CJ, Hollingdale MR and Taylor R. 2008. Sporozoite invasion assay. In:

- Methods in Malaria Research 5th Edition. K. Moll, I. Ljungstrom, H. Perlmann, A. Scherf and M. Wahlgren (Eds.). MR4/ATCC Manassas, Virginia. BioMalPar Paris, France. pp 138-140
- Pachebat JA, Ling IT, Grainger M et al. The 22 kDa component of the protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites is derived from a larger precursor, merozoite surface protein 7. *Mol Biochem Parasitol* 2001;117: 83-9.
- Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 1988;332(6160):158-61
- Pradel G, Hayton K, Aravind L, Iyer LM, Abrahamsen MS, Bonawitz A, Mejia C, Templeton TJ. 2004. A multidomain adhesion protein family expressed in *Plasmodium falciparum* is essential for transmission to the mosquito. *J. Exp. Med.* 199(11): 1533-1544
- Pradel G and Frevert U. 2001. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology*. 33(5): 1154-11654.
- Chothia, C. et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-83
- Plassmeyer ML, Reiter K, Shimp RL, Jr., Kotova S, Smith PD, Hurt DE, House B, Zou X, Zhang Y, Hickman M and others. 2009. Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *J Biol Chem* 284(39):26951-63.
- Rathore D, Hrstka SC, Sacci JB Jr, De la Vega P, Linhardt RJ, Kumar S and McCutchan TF. 2003. Molecular mechanism of host specificity in *Plasmodium falciparum* infection: role of circumsporozoite protein. *J Biol Chem*. 278(42): 40905-40910
- Richards, J. S. and J. G. Beeson (2009). "The future for blood-stage vaccines against malaria." *Immunol Cell Biol* 87(5): 377-390.
- Roestenberg, M. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1 malaria vaccine adjuvanted with Alhydrogel, Montanide ISA 720 or AS02. *PloS one* 3, e3960 (2008).
- Sack M, Paetz A, Kunert R, Bomble M, Hesse F, Stiegler G, Fischer R, Katinger H, Stoeger E, Rademacher T. 2007. Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HIV-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. *FASEB J* 21(8):1655-64.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 1 to 3, 2nd edition. Sambrook J E F Fritsch and T Maniatis *Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition Vols 1 2 and 3* Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor New York USA Illus Paper (1989).
- Schwartz, L., G. V. Brown, et al. (2012). "A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table." *Malar J* 11: 11.
- Smith, T.F. & Waterman, M.S. Comparison of biosequences. *Advances in Applied Mathematics* 2, 482-489 (1981).
- Srinivasan P, Beatty WL, Diouf A, Herrera R, Ambroggio X, Moch JK, Tyler JS, Narum DL, Pierce SK, Boothroyd JC and others. 2011. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(32):13275-80.
- Tachibana M, Wu Y, Iriko H, Muratova O, MacDonald NJ, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. 2011. N-terminal prodomain of Pfs230 synthesized using a cell-free system is sufficient to induce complement-dependent malaria transmission-blocking activity. *Clin Vacc*
- Tan K., Duquette M., Liu J., Dong Y., Zhang R., Joachimiak A., Lawler J., Wang J

. 2002. Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats: A novel layered fold and its biological implication. J. Cell Biol. 159: 373-382.

Taylor, W.R. The classification of amino acid conservation. Journal of theoretical biology 119, 205-18 (1986).

Tossavainen H, Pihlajamaa T, Huttunen TK, Raulo E, Rauvala H, Permi P, Kilpelainen I. 2006. The layered fold of the TSR domain of P. falciparum TRAP contains a heparin binding site. Protein Sci 15(7):1760-8.

Trucco C, Fernandez-Reyes D, Howell S et al. The merozoite surface protein 6 gene codes for a 36 kDa protein associated with the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 complex. Mol Biochem Parasitol 2001;112:91-101.

Tucker R.P. 2004. The thrombospondin type 1 repeat family. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36: 969-974.

Uchime O, Herrera R, Reiter K, Kotova S, Shimp RL, Jr., Miura K, Jones D, Lebowitz J, Ambroggio X, Hurt DE and others. 2012. Analysis of the Conformation and Function of the Plasmodium falciparum Merozoite Proteins MTRAP and PTRAMP. Eukaryot Cell 11(5):615-25.

Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R. 1999. Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. Proc Natl Acad Sci U S A 96(20):11128-33.

Wasmuth, J., Daub, J., Peregrin-Alvarez, J. M., Finney, C. A., Parkinson, J. (2009). "The origins of apicomplexan sequence innovation." Genome Res 19(7): 1202-1213.

Wong C, Sridhara S, Bardwell JC, Jakob U. 2000. Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. Biotechniques 28(3):426-8, 430, 432.

本願は以下の発明に関するものである。

( 1 ) 寄生生物熱帯熱マラリア原虫 ( Plasmodium falciparum ) に対するヒトワクチンとして適した組換えタンパク質の混合物であって、寄生生物生活環の前赤内期、血液および有性段階の熱帯熱マラリア原虫 ( Plasmodium falciparum ) 表面タンパク質に由来する抗原を含み、

a ) 前赤内期抗原が、少なくとも抗原 P f C e l T O S、P f C S P および P f T R A P またはそのドメイン、変異体もしくは断片を含み、

b ) 血液段階抗原 ( 単数または複数 ) が、頂端膜抗原 1 ( P f A M A 1 ) の少なくとも 1 種もしくは複数の変異体またはその断片を含み、

c ) 有性段階抗原 ( 単数または複数 ) が、オーキネート抗原 P f s 2 5 および / もしくは生殖体 / ガメトサイト表面タンパク質 P f 2 3 0 C 0 またはその変異体もしくは断片を含む、混合物。

( 2 ) 前記 P f C S P のドメインが、P f C S P の T S R - ドメインである、上記 ( 1 ) に記載の混合物。

( 3 ) 前記 P f T R A P のドメインが、P f T R A P の T S R - ドメインである、上記 ( 1 または 2 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 4 ) 前記血液段階抗原が、少なくともさらなる熱帯熱マラリア原虫 ( Plasmodium falciparum ) 血液段階抗原を含む、上記 ( 1 ) から ( 3 ) のいずれか一項に記載の混合物

。

( 5 ) 前記前赤内期 ( pre-erythrocytic ) 抗原が、組換え融合タンパク質中に含まれる、上記 ( 1 ) から ( 4 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 6 ) 前記組換え融合物が、配列番号 1、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 および配列番号 1 0 または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドまたはその断片からなる群から選択される、上記 ( 5 ) に記載の混合物。

( 7 ) 前記頂端膜抗原 1 ( P f A M A 1 ) の変異体が、任意の野生型 P f A M A 1 、 P f A M A 1 - D I C O 1 、 P f A M A 1 - D I C O 2 、 P f A M A 1 - D I C O 3 および除去されたまたは追加の潜在的な N - グリコシル化部位を有するその変異体からなる群から選択される、上記 ( 1 ) から ( 6 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 8 ) 前記頂端膜抗原 1 ( P f A M A 1 ) の変異体が、野生型 P f A M A 1 である、上記 ( 1 ) から ( 7 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 9 ) 前記頂端膜抗原 1 ( P f A M A 1 ) の変異体が、配列番号 2 、配列番号 1 1 、配列番号 1 2 、配列番号 1 3 、配列番号 1 7 、配列番号 1 8 および配列番号 1 9 または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドまたはその断片からなる群から選択される、上記 ( 1 ) から ( 7 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 1 0 ) 前記頂端膜抗原 1 ( P f A M A 1 ) の変異体が、発現宿主特異的 N - グリカンを持する、上記 ( 1 ) から ( 9 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 1 1 ) 前記さらなる熱帯熱マラリア原虫 ( Plasmodium falciparum ) 血液段階抗原が、 P f M s p 1 、 P f R I P R 、 P f R h 2 、 P f M s p 4 、 P f M s p 8 、 P f R h 5 および P f M s p 3 またはその変異体もしくは断片からなる群から選択される、上記 ( 2 ) から ( 1 0 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 1 2 ) 前記さらなる熱帯熱マラリア原虫 ( Plasmodium falciparum ) 血液段階抗原が、 P f M s p 1 - 1 9 、 P f R I P R \_ \_ E G F 7 / 8 、 P f R h 2 、 P f M s p 4 \_ \_ E G F 、 P f M s p 8 \_ \_ E G F 1 、 P f M s p 8 \_ \_ E G F 2 、 P f R h 5 a ( ペプチド ) 、 P f R h 5 b ( ペプチド ) および P f M s p 3 の N 末端断片またはその変異体もしくは断片からなる群から選択される、上記 ( 2 ) から ( 1 1 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 1 3 ) 前記さらなる熱帯熱マラリア原虫 ( Plasmodium falciparum ) 血液段階抗原が、 P f M s p 1 - 1 9 ( 配列番号 3 7 ) 、 P f R I P R \_ \_ E G F 7 / 8 ( 配列番号 3 9 ) および P f R h 2 ( 配列番号 3 8 ) またはその変異体もしくは断片からなる群から選択される、上記 ( 2 ) から ( 1 1 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 1 4 ) 前記さらなる熱帯熱マラリア原虫 ( Plasmodium falciparum ) 血液段階抗原が、 P f M s p 1 - 1 9 \_ \_ E G F 1 ( 配列番号 3 2 ) 、 P f M s p 4 \_ \_ E G F ( 配列番号 3 3 ) 、 P f M s p 8 \_ \_ E G F 1 ( 配列番号 3 4 ) 、 P f M s p 8 \_ \_ E G F 2 ( 配列番号 3 5 ) および P f M s p 3 の N 末端断片 ( 配列番号 3 6 ) またはその変異体もしくは断片を含む、上記 ( 2 ) から ( 1 1 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 1 5 ) 前記さらなる熱帯熱マラリア原虫 ( Plasmodium falciparum ) 血液段階抗原が、組換え融合タンパク質中に含まれる、上記 ( 1 ) から ( 1 4 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 1 6 ) 前記組換え融合タンパク質が、配列番号 3 または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドまたはその断片を含む、上記 ( 1 5 ) に記載の混合物。

( 1 7 ) 前記血液段階抗原が、 P f A M A 1 - D I C O 1 、 P f A M A 1 - D I C O 2 および P f A M A 1 - D I C O 3 またはその変異体もしくは断片を含む、上記 ( 1 ) から ( 1 6 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 1 8 ) 前記血液段階抗原が、好ましくは、組換え融合タンパク質 ( 配列番号 1 4 ) として、 P f A M A 1 - D I C O 1 ( 配列番号 1 1 ) および P f M s p 1 - 1 9 ( 配列番号 3 7 ) を、またはその変異体もしくは断片を含む、上記 ( 1 ) から ( 1 7 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 1 9 ) 前記血液段階抗原が、好ましくは、組換え融合タンパク質 ( 配列番号 1 5 ) として、 P f A M A 1 - D I C O 2 ( 配列番号 1 2 ) および P f R h 2 ( 配列番号 3 8 ) を、またはその変異体もしくは断片を含む、上記 ( 1 ) から ( 1 8 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 2 0 ) 前記血液段階抗原が、好ましくは、組換え融合タンパク質 ( 配列番号 1 6 ) として、 P f A M A 1 - D I C O 3 ( 配列番号 1 3 ) 、 P f R I P R \_ \_ E G F 7 / 8 ( 配



列番号 39) を、またはその変異体もしくは断片を含む、上記 (1) から (19) のいずれか一項に記載の混合物。

(21) 前記血液段階抗原が、

i) PfAMA1 - DICO1 および PfMsp1 - 19、

ii) PfAMA1 - DICO2 および PfRh2、ならびに

iii) PfAMA1 - DICO3、PfRIPR\_\_EGF7 / 8

を含む、上記 (1) から (20) のいずれか一項に記載の混合物。

(22) 前記 PfAMA1 - DICO1 および PfMsp1 - 19 が、第 1 の組換え融合タンパク質中に含まれ、PfAMA1 - DICO2 および PfRh2 が、第 2 の組換え融合タンパク質中に含まれ、PfAMA1 - DICO3 および PfRIPR\_\_EGF7 / 8 が、第 3 の組換え融合タンパク質中に含まれる、上記 (21) に記載の混合物。

(23) 前記第 1 の組換え融合タンパク質が、配列番号 14 または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドまたはその断片を含む、上記 (21) または (22) のいずれか一項に記載の混合物。

(24) 前記第 2 の組換え融合タンパク質が、配列番号 15 または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む、上記 (21) から (23) のいずれか一項に記載の混合物。

(25) 前記第 3 の組換え融合タンパク質が、配列番号 16 または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む、上記 (21) から (24) のいずれか一項に記載の混合物。

(26) 前記有性段階抗原 Pf s 25 および Pf s 230C0 の変異体が、野生型または除去されたもしくは追加の潜在的な N - グリコシル化部位を有する変異体または断片である、上記 (1) から (25) のいずれか一項に記載の混合物。

(27) 前記有性段階抗原が、Pf s 25 および Pf s 230C0 またはその変異体もしくは断片を含む、上記 (1) から (26) のいずれか一項に記載の混合物。

(28) 前記有性段階抗原が、組換え融合タンパク質中に含まれる、上記 (1) から (27) のいずれか一項に記載の混合物。

(29) 前記組換え融合タンパク質が、配列番号 4、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28 または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドまたはその断片からなる群から選択される、上記 (28) に記載の混合物。

(30) 4 (4) 種の組換えポリペプチドを含み、種々の組換えポリペプチドが、以下の抗原：

a) ポリペプチド 1：PfCelTOS、PfCSP の TSR - ドメインおよび PfTRAP の TSR - ドメイン、

b) ポリペプチド 2：Pf gAMA1、

c) ポリペプチド 3：PfMsp1 - 19\_\_EGF1、PfMsp4\_\_EGF、PfMsp8\_\_EGF1、PfMsp8\_\_EGF2 および PfMsp3 の N 末端断片、

d) ポリペプチド 4：Pf s 25 および Pf s 230C0 を含む、上記 (1) から (29) のいずれか一項に記載の混合物。

(31) a) ポリペプチド 1：配列番号 1、

b) ポリペプチド 2：配列番号 2、

c) ポリペプチド 3：配列番号 3、および

d) ポリペプチド 4：配列番号 4

のアミノ酸配列を有する 4 (4) 種の組換えポリペプチド、または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成さ

れるその相同ポリペプチドを含む、上記(1)から(30)のいずれか一項に記載の混合物。

(32) 5(5)種の組換えポリペプチドを含み、種々の組換えポリペプチドが、以下の抗原：

- a) ポリペプチド1：PfAMA1-DICO1、
- b) ポリペプチド2：PfAMA1-DICO2、
- c) ポリペプチド3：PfAMA1-DICO3、
- d) ポリペプチド4：PfCelTOS、PfCSPのTSR-ドメインおよびPfTRAPのTSR-ドメイン、ならびに
- e) ポリペプチド5：PfS25およびPfS230C0を含む、上記(1)から(31)のいずれか一項に記載の混合物。

- (33) a) ポリペプチド1：配列番号11、
- b) ポリペプチド2：配列番号12、
- c) ポリペプチド3：配列番号13、
- d) ポリペプチド4：配列番号8および
- e) ポリペプチド5：配列番号26

のアミノ酸配列を有する5(5)種の組換えポリペプチド、または1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む、上記(1)から(32)に記載の混合物。

(34) 5(5)種の組換えポリペプチドを含み、種々の組換えポリペプチドが、以下の抗原：

- a) ポリペプチド1：PfAMA1-DICO1、
  - b) ポリペプチド2：PfAMA1-DICO2、
  - c) ポリペプチド3：PfAMA1-DICO3、
  - d) ポリペプチド4：PfCelTOS、PfCSPのTSR-ドメインおよびPfTRAPのTSR-ドメインおよびPfRh5a、ならびに
  - e) ポリペプチド5：PfS25およびPfS230C0およびPfRh5b
- を含む、上記(1)から(33)のいずれか一項に記載の混合物。

- (35) a) ポリペプチド1：配列番号11、
- b) ポリペプチド2：配列番号12、
- c) ポリペプチド3：配列番号13、
- d) ポリペプチド4：配列番号9、および
- e) ポリペプチド5：配列番号28

のアミノ酸配列を有する5(5)種の組換えポリペプチド  
または1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む、上記(1)から(34)に記載の混合物。

(36) 5(5)種の組換えポリペプチドを含み、種々の組換えポリペプチドが、以下の抗原：

- f) ポリペプチド1：PfAMA1-DiCo1-Msp1\_\_19FUP、
  - g) ポリペプチド2：PfAMA1-DiCo2-Rh2、
  - h) ポリペプチド3：PfAMA1-DiCo3-RIPR7/8、
  - i) ポリペプチド4：PfCelTOS、PfCSPのTSR-ドメインおよびPfTRAPのTSR-ドメインおよびPfRh5a、ならびに
  - j) ポリペプチド5：PfS25およびPfS230C0およびPfRh5b
- を含む、上記(1)から(35)のいずれか一項に記載の混合物。

- (37) f) ポリペプチド1：配列番号14、
- g) ポリペプチド2：配列番号15、
- h) ポリペプチド3：配列番号16、
- i) ポリペプチド4：配列番号9、および

j) ポリペプチド 5 : 配列番号 2 8

の アミノ酸配列を有する 5 ( 5 ) 種の組換えポリペプチド、  
または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えも  
しくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む、上記 ( 1 ) から ( 3 6 )  
に記載の混合物。

( 3 8 ) 前記ポリペプチドが、等モル比または任意のその他の比で混合物中に含まれ  
る、上記 ( 3 0 ) から ( 3 7 ) のいずれか一項に記載の混合物。

( 3 9 ) a) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 および配列番号 4 の配列を有する  
ポリペプチド、

b) 配列番号 8、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3 および配列番号 2 6 の配  
列を有するポリペプチド、

c) 配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3 および配列番号 2 8 の配  
列を有するポリペプチド、

d) 配列番号 8、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6 および配列番号 2 6 の配  
列を有するポリペプチド、

e) 配列番号 9、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6 および配列番号 2 8 の配  
列を有するポリペプチド、

f) 好ましくは 1 個もしくは複数のアミノ酸残基が保存的に置換されている、a) ~ e  
) のポリペプチドの修飾された形態；

g) ストリンジェントな条件下で a) ~ f) の核酸分子のいずれかとハイブリダイズ可  
能である核酸分子

h) ストリンジェントな条件下で a) ~ f) の核酸分子のいずれかの相補体とハイブリ  
ダイズ可能である核酸分子

i) a) ~ h) の核酸分子のいずれかと少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する核酸分  
子

j) または a) ~ i) の核酸分子のいずれかの相補体  
をコードする単離された核酸分子または複数の核酸分子。

( 4 0 ) 上記 ( 3 9 ) に記載のヌクレオチド分子を含むベクター。

( 4 1 ) 上記 ( 4 0 ) に記載のベクターを含む宿主細胞。

( 4 2 ) 植物細胞である、上記 ( 4 1 ) に記載の宿主細胞。

( 4 3 ) 前記植物がベンサミアナタバコ ( *Nicotiana benthamiana* ) またはタバコ ( *N*  
*icotiana tabacum* ) である、上記 ( 4 2 ) に記載の宿主細胞。

( 4 4 ) 酵母細胞である、上記 ( 4 1 ) に記載の宿主細胞。

( 4 5 ) 前記酵母が、コマガタエラ・パストリス ( *Komagataella pastoris* ) である  
、上記 ( 4 4 ) に記載の宿主細胞。

( 4 6 ) 生理学的に許容される媒体中に、有効成分としての上記 ( 1 ) から ( 3 8 )  
のいずれか一項に記載の混合物および担体を含む、熱帯熱マラリア原虫 ( *Plasmodium fal*  
*ciparum* ) に対してヒト個体を免疫処置するためのワクチン組成物。

( 4 7 ) アジュバントをさらに含む、上記 ( 4 6 ) に記載のワクチン組成物。

( 4 8 ) 組換えタンパク質の混合物を生成する方法であって、( a ) 前記組換えタン  
パク質を生成するのに適した条件下、適した培養培地中で上記 ( 4 1 ) に記載の宿主細胞  
を培養するステップと、( b ) 前記生成された組換えタンパク質を得るステップと、任意  
選択で、( c ) 前記組換えタンパク質をプロセッシングするステップとを含む、方法。

( 4 9 ) 前記宿主細胞が、植物細胞である、上記 ( 4 8 ) に記載の方法。

( 5 0 ) 前記植物が、藻類、コケ、単子葉植物および / または双子葉植物からなる群  
から選択される、上記 ( 4 9 ) に記載の方法。

( 5 1 ) 前記植物が、オランダミツバ属 ( *Apium* )、シロイヌナズナ属 ( *Arabidopsis*  
)、アブラナ属 ( *Brassica* )、トウガラシ属 ( *Capsium* )、ニンジン属 ( *Daucus* )、オオ  
ムギ属 ( *Hordeum* )、アキノノゲシ属 ( *Lactuca* )、トマト属 ( *Lycopersicon* )、タバコ属  
( *Nicotiana* )、ペチュニア属 ( *Petunia* )、シロガラシ属 ( *Sinapis* )、ナス属 ( *Solanum*

)、コムギ属 (Triticum) またはトウモロコシ属 (Zea) からなる群に由来する属から選択される、

上記 ( 4 9 ) に記載の方法。

( 5 2 ) 前記植物がベンサミアナタバコ (Nicotiana benthamiana) またはタバコ (Nicotiana tabacum) である、上記 ( 4 9 ) に記載の方法。

( 5 3 ) 前記宿主細胞が、酵母細胞である、上記 ( 4 8 ) に記載の方法。

( 5 4 ) 前記酵母が、コマガタエラ・パストリス (Komatagaella pastoris)、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae)、ハンゼヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha) またはシゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosacharomyces pombe) からなる群から選択される、上記 ( 5 3 ) に記載の方法。

( 5 5 ) 患者において熱帯性マラリアを治療および / または予防するための方法であって、治療有効量の上記 ( 1 ) から ( 3 8 ) のいずれか一項に記載の組換えタンパク質の混合物または上記 ( 4 6 ) もしくは ( 4 7 ) に記載のワクチン組成物を投与するステップを含む、方法。

( 5 6 ) 上記 ( 1 ) から ( 3 8 ) のいずれか一項に記載の混合物中の種々の組換えタンパク質と結合する、種々の単離された抗体またはその断片を含む抗体組成物。

( 5 7 ) 上記 ( 5 6 ) に記載の抗体組成物を含む診断アッセイ。

( 5 8 ) 上記 ( 5 6 ) に記載の抗体組成物または上記 ( 5 5 ) に記載の診断アッセイを含む診断キット。