

【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PfC1TOS、PfCSPおよびPfTRA-Pを含み、

b) 血液段階抗原(单数または複数)が、頂端膜抗原1(PfAMA1)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(单数または複数)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. Ausube I, 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, Pimpuni 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, Ubaldi 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 falci*

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):e2015

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, Kiaira JK, Mulaa 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, Temperton 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, Zhou 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 AS 02. 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 Vaccin Immunol

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, Kilpeläinen 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PfC1TOS、PfCSPおよびPfTRA-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(PfAMA1)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Pfs25および/もしくは生殖体/ガメトサイト表面タンパク質Pf230C0またはその変異体もしくは断片を含む、混合物。

(2) 前記PfCSPのドメインが、PfCSPのTSR-ドメインである、上記(1)に記載の混合物。

(3) 前記PfTRAPのドメインが、PfTRAPのTSR-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る、上記(5)に記載の混合物。

(7) 前記頂端膜抗原1(PfAMA1)の変異体が、任意の野生型PfAMA1、PfAMA1-DICO1、PfAMA1-DICO2、PfAMA1-DICO3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(PfAMA1)の変異体が、野生型PfAMA1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(PfAMA1)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る、上記(1)から(7)のいずれか一項に記載の混合物。

(10) 前記頂端膜抗原1(PfAMA1)の変異体が、発現宿主特異的N-グリカンを保持する、上記(1)から(9)のいずれか一項に記載の混合物。

(11) 前記さらなる熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)血液段階抗原が、PfMsp1、PfRIPR、PfRh2、PfMsp4、PfMsp8、PfRh5およびPfMsp3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(10)のいずれか一項に記載の混合物。

(12) 前記さらなる熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)血液段階抗原が、PfMsp1-19、PfRIPR\_EGF7/8、PfRh2、PfMsp4\_EGF、PfMsp8\_EGF1、PfMsp8\_EGF2、PfRh5a(ペプチド)、PfRh5b(ペプチド)およびPfMsp3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(11)のいずれか一項に記載の混合物。

(13) 前記さらなる熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)血液段階抗原が、PfMsp1-19(配列番号37)、PfRIPR\_EGF7/8(配列番号39)およびPfRh2(配列番号38)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(11)のいずれか一項に記載の混合物。

(14) 前記さらなる熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)血液段階抗原が、PfMsp1-19\_EGF1(配列番号32)、PfMsp4\_EGF(配列番号33)、PfMsp8\_EGF1(配列番号34)、PfMsp8\_EGF2(配列番号35)およびPfMsp3のN末端断片(配列番号36)またはその変異体もしくは断片を含む、上記(2)から(11)のいずれか一項に記載の混合物。

(15) 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(14)のいずれか一項に記載の混合物。

(16) 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(15)に記載の混合物。

(17) 前記血液段階抗原が、PfAMA1-DICO1、PfAMA1-DICO2およびPfAMA1-DICO3またはその変異体もしくは断片を含む、上記(1)から(16)のいずれか一項に記載の混合物。

(18) 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14)として、PfAMA1-DICO1(配列番号11)およびPfMsp1-19(配列番号37)を、またはその変異体もしくは断片を含む、上記(1)から(17)のいずれか一項に記載の混合物。

(19) 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15)として、PfAMA1-DICO2(配列番号12)およびPfRh2(配列番号38)を、またはその変異体もしくは断片を含む、上記(1)から(18)のいずれか一項に記載の混合物。

(20) 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16)として、PfAMA1-DICO3(配列番号13)、PfRIPR\_EGF7/8(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 ) P f A M A 1 - D I C O 1 および P f M s p 1 - 1 9 、

i i ) P f A M A 1 - D I C O 2 および P f R h 2 、ならびに

i i i ) P f A M A 1 - D I C O 3 、 P f R I P R \_ E G F 7 / 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 P f A M A 1 - D I C O 1 および P f M s p 1 - 1 9 が、第1の組換え融合タンパク質中に含まれ、 P f A M A 1 - D I C O 2 および P f R h 2 が、第2の組換え融合タンパク質中に含まれ、 P f A M A 1 - D I C O 3 および P f R I P R \_ E G F 7 / 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 P f s 2 5 および P f s 2 3 0 C 0 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、 P f s 2 5 および P f s 2 3 0 C 0 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：P f C e 1 T O S 、 P f C S P の T S R - ドメインおよび P f T R A P の T S R - ドメイン、

b ) ポリペプチド2：P f g A M A 1 、

c ) ポリペプチド3：P f M s p 1 - 1 9 \_ E G F 1 、 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 および P f M s p 3 のN末端断片、

d ) ポリペプチド4：P f s 2 5 および P f s 2 3 0 C 0 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：PfCe1TOS、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：PfCe1TOS、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：PfCe1TOS、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 ) ストリンジエントな条件下で 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 ) ストリンジエントな条件下で 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vant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、单子葉植物および / 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 (*Capsicum*) 、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(49)に記載の方法。

(52) 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(49)に記載の方法。

(53) 前記宿主細胞が、酵母細胞である、上記(48)に記載の方法。

(54) 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・セレビシエ (*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(53)に記載の方法。

(55) 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(38)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(46)もしくは(47)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。

(56) 上記(1)から(38)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。

(57) 上記(56)に記載の抗体組成物を含む診断アッセイ。

(58) 上記(56)に記載の抗体組成物または上記(55)に記載の診断アッセイを含む診断キット。