

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-526274

(P2019-526274A)

(43) 公表日 令和1年9月19日 (2019.9.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	4 B 0 6 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-524114 (P2019-524114)	(71) 出願人	519022171
(86) (22) 出願日	平成29年7月21日 (2017.7.21)		ヴァック4オール・ピーティーイー・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成31年3月20日 (2019.3.20)		V A C 4 A L L P T E . L T D .
(86) 国際出願番号	PCT/SG2017/050369		シンガポール国、シンガポール 5 8 8 1
(87) 国際公開番号	W02018/017020		7 7、アッパー・ブキッ・ティマ・ロード
(87) 国際公開日	平成30年1月25日 (2018.1.25)		1 4 4、ピーダブリューシー・ビルディング、ユニット O 3-ケー1
(31) 優先権主張番号	16180544.5	(74) 代理人	110001508
(32) 優先日	平成28年7月21日 (2016.7.21)		特許業務法人 津国
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ドリュイル, ピエール
			フランス国、7 5 0 1 5 パリ、リュ・ルクルブ 2 6
		Fターム (参考)	4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 DA01
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗マラリアワクチンとしてのバイオ融合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、担体異種タンパク質配列に融合された少なくとも1つの抗原性アミノ酸配列を含む融合タンパク質であって、該抗原性配列がPlasmodiumタンパク質のエピトープ配列を含み、該担体異種タンパク質配列がヒトにおいて免疫原性の配列である融合タンパク質に関する。前記タンパク質は、抗マラリアワクチンとして有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

担体異種タンパク質配列の N 末端及び / 又は C 末端に融合された少なくとも 1 つの抗原性アミノ酸配列を含む融合タンパク質であって、該抗原性配列が Plasmodium タンパク質のエピトープ配列を含み、該担体異種タンパク質配列がヒトにおいて免疫原性の配列である、融合タンパク質。

【請求項 2】

担体異種タンパク質配列が、ジフテリアトキシソイドの交差反応物質 (CRM)、ジフテリアトキシソイド (D)、非毒性突然変異体リコンビナント *Pseudomonas aeruginosa* エキソプロテイン A (repA)、髄膜炎菌外膜タンパク質複合体 (OMP)、破傷風トキシソイド (T)、*H. influenza* プロテイン D (hID) 及びそれらの免疫原性フラグメントからなる群より選択され、担体異種タンパク質配列が、好ましくは、CRM197 又はその免疫原性フラグメントであり、このフラグメントが、好ましくは、フラグメント A、膜貫通ドメイン T、CRM197 のレセプター結合ドメイン R、CRM197 のアミノ酸配列 1 ~ 190 及び CRM197 のアミノ酸配列 1 ~ 389 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

抗原性配列が、赤血球期において Plasmodium によって発現される抗原性タンパク質又はそのエピトープフラグメントである、請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

抗原性配列が、MSP3、LSA5 (PEBS 又は 11-1 のサブ領域とも称される)、Glurp R0 及び R2、SERP、P27 及び P27A、P45、P90 及び P77、P14、P181、MSP1-Block 2、MSP2、GBP130、タンパク質 332、タンパク質 11-1、MSP4 又はそれらの任意のエピトープフラグメントからなる群より選択され、抗原性配列が、好ましくは、MSP3 又はそのエピトープフラグメントであり、このフラグメントが、好ましくは、MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 及び MSP3-8 の中から選択される Plasmodium MSP3 タンパク質、好ましくは MSP3-1 の C 末端領域のモチーフ a、b、c、d、e 及び / 又は f を包含する、請求項 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

抗原性配列が、前赤血球期において Plasmodium によって発現される抗原性タンパク質又はそのエピトープフラグメントである、請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

抗原性配列が、LSA3、LSA5 (PEBS 又は 11-1 のサブ領域と称される)、CS、Trap 及び Sals 並びにそれらの任意のエピトープフラグメントからなる群より選択される、請求項 5 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

抗原性配列が、Pf25、Pf45/48、Rh5、AMA1、MSP1-19、MSP1-42、MSP2、MSP4-5、Var CSA 及びそれらの任意のエピトープフラグメントからなる群より選択される、請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

担体配列としての CRM197 又はその免疫原性フラグメントに融合された MSP3、好ましくは MSP3-1、LSA3、LSA5 又はそのエピトープフラグメントを抗原性配列として含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

担体タンパク質配列の C 末端及び N 末端にそれぞれ位置するか、又は同じ末端に両方とも位置する 2 つの抗原性配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

少なくとも1つのアミノ酸配列が、ペプチドリinkerによって担体異種タンパク質配列のN末端及び/又はC末端に連結されており、該ペプチドリinkerが、好ましくは、1～35アミノ酸、好ましくは5～20アミノ酸の配列である、請求項1～8のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

ペプチドリinkerが、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n、(Gly)_n又は(EAAAK)_n(nは、1～4、好ましくは1～3である)である、請求項10に記載の融合タンパク質。

【請求項 12】

請求項1～11のいずれかで定義される融合タンパク質をコードする、核酸構築物。

【請求項 13】

発現カセットにおいて請求項12に記載の核酸構築物を含む、ベクター。

【請求項 14】

請求項13に記載のベクターが挿入されている、宿主細胞。

【請求項 15】

請求項1～11のいずれかで定義される融合タンパク質を調製するためのin vitro方法であって、請求項12で定義される核酸構築物の発現を誘導する条件下で請求項14に記載の宿主細胞の複製を可能にすること、及びこのようにして発現された該融合タンパク質を収集することを含む、in vitro方法。

【請求項 16】

ワクチンであって、生理学的に許容し得るビヒクルと共に、請求項1～11のいずれかで定義される融合タンパク質、又は少なくとも2つの異なる抗原性アミノ酸配列をそれぞれ含む少なくとも2つの請求項1～11のいずれかで定義される融合タンパク質の組み合わせ、又は請求項12で定義される前記融合タンパク質をコードする核酸構築物を含む、ワクチン。

【請求項 17】

マラリアに対するヒト被験体のワクチン接種において使用するための、請求項16に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マラリアに対する保護、より具体的には融合タンパク質を含むマラリアワクチンに関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ヒトにおけるマラリアの原因となる寄生虫(特に、*Plasmodium falciparum*を含む)は、ヒト宿主において異なる形態を示し、感染宿主の生物におけるそれらの局在に応じて異なる抗原を発現する。ヒトにおけるそれらの生活環におけるこれらの寄生虫の形態的及び抗原的な差異により、少なくとも4つの区別可能な発達段階が可能になる。ヒトにおける寄生虫の非常に初期の発達段階は、寄生虫の昆虫ベクターの咬傷によって宿主の血中に導入されるスポロゾイト形態に対応する。第2の段階は、肝臓への寄生虫の通過及び肝細胞の感染に対応し、この段階では、寄生虫は発達して肝臓シizontを形成し、これらは成熟すると(例えば、*P. falciparum*の場合にはスポロゾイトの浸透後6日目に)、破裂によって肝臓メロゾイトを放出する。第3の段階は、無性形態(血液期シizont)の寄生虫が赤血球に感染し、それらが成熟すると、遊離メロゾイトが放出されることを特徴とする; この赤血球期の発達は、疾患の病原相に対応する。第4の段階は、生殖能力を有する形態(又は生殖母体)の形成に対応し、これは、蚊における細胞外生殖形態又は配偶子になるであろう。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

臨床診療に導入された実用的又は有効なワクチンはない。

【 0 0 0 4 】

これまで、マラリアサブユニットワクチンは、免疫原性の大規模な欠如を示している。観察される免疫応答は、低力価で短期間のものである。この欠如に対処するために、アジュバントの選択、複合ベクター、例えばウイルス様粒子（VLP）、アデノウイルスベクターにおける発現、及び複合プライムブーストプロトコルの設定を含む様々なアプローチが検証されている。AS01などの高性能アジュバントと共に、*Plasmodium falciparum* マラリア原虫の前赤血球スポロゾイト周囲タンパク質（CSP）の反復及びT細胞エピトープ並びにB型肝炎ウイルスのウイルスエンベロープタンパク質（HBsAg）由来の遺伝子を使用して操作されたRTS, S / AS01 ワクチン（Mosquirix（登録商標））でさえ、マラリア特異的免疫応答が非常に短期間であるという問題を抱えている（B型肝炎免疫応答は長期にわたり高い）。

【 0 0 0 5 】

担体タンパク質への*Plasmodium*抗原の化学的コンジュゲーションも開示されている。例えば、解毒化形態の*Pseudomonas aeruginosa*エキソプロテインA（repA）にコンジュゲートされた*Plasmodium*タンパク質Pf525Hを含むワクチンが評価中である。

【 0 0 0 6 】

しかしながら、化学的コンジュゲーションは、いくつかの欠点を有する。それは、技術的な要求が厳しく、ほとんど再現性がなく、極めて高価である。

【 0 0 0 7 】

再現容易かつ廉価でありながら、優れた免疫原性及びマラリアに対する保護を示すワクチン製品に対する大きな必要性が依然としてある。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、CRM197などの担体タンパク質と融合された*Plasmodium*ポリペプチドからなる新規構築物によって、改善された免疫原性の利点を提供する。*Plasmodium*分子を担体タンパク質に化学的にカップリングするのではなく、本発明者らは、融合タンパク質として寄生虫タンパク質を担体タンパク質と一緒にコードして、例えば*E. coli*においてリコンビナントに生産可能な「バイオコンジュゲート融合産物」（本明細書では「バイオ融合分子」ともさらに表記される）を作製する新規アプローチを開発した。

【 0 0 0 9 】

より具体的には、本発明は、担体異種タンパク質配列のN末端及び／又はC末端に融合された少なくとも1つの抗原性アミノ酸配列を含む融合タンパク質であって、該抗原性配列が*Plasmodium*タンパク質のエピトープ配列を含み、該担体異種タンパク質配列がヒトにおいて免疫原性の配列である融合タンパク質を提供する。

【 0 0 1 0 】

抗原性配列は、赤血球期において*Plasmodium*によって発現される抗原性タンパク質又はそのエピトープフラグメントであり得る。

【 0 0 1 1 】

あるいは、抗原性配列は、前赤血球期において*Plasmodium*によって発現される抗原性タンパク質又はそのエピトープフラグメントであり得る。

【 0 0 1 2 】

本発明のさらなる目的は、本明細書で定義される融合タンパク質をコードする核酸構築物である。

【 0 0 1 3 】

発現カセットにおいて核酸構築物を含むベクター、及びベクターが挿入されている宿主細胞も提供される。

【 0 0 1 4 】

融合タンパク質を調製するためのin vitro方法であって、核酸構築物の発現を誘導する

10

20

30

40

50

条件下で宿主細胞の複製を可能にすること、及びこのようにして発現された該融合タンパク質を収集することを含むin vitro方法がさらに記載される。

【0015】

本発明によれば、ワクチンであって、生理学的に許容し得るビヒクルと共に、前記融合タンパク質、又は少なくとも2つの異なる抗原性アミノ酸配列をそれぞれ含む少なくとも2つの融合タンパク質の組み合わせ、又は前記融合タンパク質をコードする核酸構築物を含むワクチンが提供される。

【0016】

このようなワクチンは、マラリアに対するヒト被験体のワクチン接種において有用である。

10

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、PP21(「バイオ融合MSP3-1」とも称される)のコード配列の図示である。塩基対のスケールは、NcoI部位から開始して下に示されている。

【図2】図2は、pET26a-PP21プラスミドマップ(A)、SmaI(B)又はEcoRI(C)を用いた制限酵素消化によるミニプレレーション分析を示す。

【図3】IMACによって精製したリコンビナントタンパク質PP21。(A)変性条件下における電気泳動及びクマシーブルー染色による分析。(B)1:1000希釈のマウス抗MSP3免疫血清を用いたウエスタンブロッティングによって評価した抗原性。観察された上のバンドは、84kDaの全長PP21の理論分子量と一致する。抗MSP3免疫血清によってあまり認識されなかった37kDaの別のバンドは、PP21の分解フラグメントに対応し得る。

20

【図4】1:1000希釈の抗MSP3-1 mAb RAM1を用いたウエスタンブロッティングによって評価した、異なる保存温度におけるPP21安定性のタイムスケール。

【図5】ポジティブコントロールMSP3-LSPと比較した、PP21の抗原含有量の決定。ヒトリコンビナント抗体を含むヒト及び動物抗MSP3血清の大規模パネルとの反応性によって、前臨床PP21の抗原性を決定した。抗原含有量は、反応性エピトープの量のより正確な測定を提供する。抗原の系列希釈によってそれを実施し、Eliisaアッセイにおいてコーティングに使用し、十分に定義されたポジティブコントロール(ここでは、MSP3のC末端領域によって免疫化したラットのプール)によって明らかにする。PP21の反応性は、MSP3合成及びリコンビナント構築物のものと同一であった

30

【図6】現行MSP3-1-LSPと比較した、バイオ融合MSP3-1コンジュゲートによる2回の免疫化後のマウスにおいて誘導された特異的抗体応答の有意な改善。0日目、14日目及び28日目に、Montanide ISA720中バイオ融合MSP3-1 1µgのみ又はMSP3-1 LSP 10µgのいずれかを使用して、マウス5匹(BALB/c)又は4匹(C57BL/6)の群を免疫化した。2回目の注射の1週間後(21日目)(A)及び3回目の免疫化の1週間後(35日目)に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3-1 LSP抗体力価を決定した。各マウス(1~5)の結果は、別個に示されている(ここでは、2回のみの免疫化後)。

40

【図7】現行MSP3-1-LSPと比較した、バイオ融合MSP3-1による2回対3回の免疫化後のマウスにおいて誘導された抗体応答の比較。3回目の注射は抗体応答を増強し、C57BL/6マウス及びBALB/cマウスにおけるバイオ融合MSP3-1のより優れた免疫原性を裏付けた。バイオ融合MSP3-1 1µgの3回の注射によって誘導されたMSP3-1-LSP特異的抗体の平均力価は、それぞれC57BL/6及びBALB/cにおいて 3×10^5 及び 2×10^5 に到達したのに対して、MSP3-1-LSP 10µgの3回の注射は、それぞれC57BL/6及びBALB/cマウスにおいて最大で平均力価 10^5 及び 2.5×10^4 を誘導した。

【図8-1】現行MSP3-1-LSPと比較した、バイオ融合MSP3-1によってマウスにおいて誘導されたMSP3-1特異的抗体の持続期間の大きな改善。A及びB:バ

50

イオ融合MSP3 - CRMとMSP3 - 1 - LSPとの比較：0日目、14日目及び28日目に、Montanide ISA720中バイオ融合MSP3 - 1 1 µgのみ又はMSP3 - 1 LSP 10 µgのいずれかを使用して、BALB/c (A - 左上パネル) 及びC57BL/6 (B - 右上パネル) マウスを免疫化した。経過観察全体の異なる日に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3 - 1 LSP抗体力価を決定した。示されている結果は、異なる日に各群のマウスにおいて得られた抗MSP3 - 1 LSP抗体力価の幾何平均に対応する。160日間の経過観察後、バイオ融合MSP3 - 1 コンjugate免疫化マウスにおける平均抗体力価は、それぞれC57BL/6及びBALB/cにおいて 1.5×10^5 及び 10^5 であったが、これは、初回免疫化後160日目に測定した、MSP3 - 1 - LSPによって誘導された抗体の平均力価よりも少なくとも10倍高い。C及びD：MSP3 - CRMによって誘発された免疫応答の長期持続：0日目、14日目及び103日目に、Montanide ISA 720アジュバント (v/v) をアジュバント添加したバイオ融合MSP3 - CRM 1 µgの皮下注射によって、BALB/c及びC57BL/6マウスの群 (マウス 4 ~ 5 匹 / 群) を免疫化した。異なる日に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3抗体力価を決定した。結果は、2回の免疫化後に力価が顕著に増加し、49日目に最大に到達するのに対して、103日目に実施した3回目の抗原注射は、抗体応答の規模に関するいかなる検出可能な増加も誘導しなかったことを示している。これらの特異的抗体は、時間と共にごくわずかに減少したが、免疫化の540日後においてさえ、高い力価で依然として検出可能であった。E：2回のみの免疫化後にMSP3 - CRMによって誘発された免疫応答の長期持続。2回のみの免疫化後に観察された十分な応答を考慮して、Montanide ISA 720アジュバント (v/v) をアジュバント添加したバイオ融合MSP3 - CRM 2 µgを使用して0日目及び14日目のみに皮下注射によって免疫化したさらなるBALB/cマウス 17匹において、この免疫化スキームを分析した。異なる日に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3 - 1 - LSP抗体力価を決定した。結果は、2回の抗原注射後にMSP3抗体力価が増加し、全てのマウスにおいて42 ~ 72日目に最大に到達することを示しており、実験の380日間の経過観察全体で、免疫応答がごくわずかに減少したことを示している。

【図8 - 2】現行MSP3 - 1 - LSPと比較した、バイオ融合MSP3 - 1によってマウスにおいて誘導されたMSP3 - 1特異的抗体の持続期間の大きな改善。A及びB：バイオ融合MSP3 - CRMとMSP3 - 1 - LSPとの比較：0日目、14日目及び28日目に、Montanide ISA720中バイオ融合MSP3 - 1 1 µgのみ又はMSP3 - 1 LSP 10 µgのいずれかを使用して、BALB/c (A - 左上パネル) 及びC57BL/6 (B - 右上パネル) マウスを免疫化した。経過観察全体の異なる日に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3 - 1 LSP抗体力価を決定した。示されている結果は、異なる日に各群のマウスにおいて得られた抗MSP3 - 1 LSP抗体力価の幾何平均に対応する。160日間の経過観察後、バイオ融合MSP3 - 1 コンjugate免疫化マウスにおける平均抗体力価は、それぞれC57BL/6及びBALB/cにおいて 1.5×10^5 及び 10^5 であったが、これは、初回免疫化後160日目に測定した、MSP3 - 1 - LSPによって誘導された抗体の平均力価よりも少なくとも10倍高い。C及びD：MSP3 - CRMによって誘発された免疫応答の長期持続：0日目、14日目及び103日目に、Montanide ISA 720アジュバント (v/v) をアジュバント添加したバイオ融合MSP3 - CRM 1 µgの皮下注射によって、BALB/c及びC57BL/6マウスの群 (マウス 4 ~ 5 匹 / 群) を免疫化した。異なる日に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3抗体力価を決定した。結果は、2回の免疫化後に力価が顕著に増加し、49日目に最大に到達するのに対して、103日目に実施した3回目の抗原注射は、抗体応答の規模に関するいかなる検出可能な増加も誘導しなかったことを示している。これらの特異的抗体は、時間と共にごくわずかに減少したが、免疫化の540日後においてさえ、高い力価で依然として検出可能であった。E：2回のみの免疫化後にMSP3 - CRMによって誘発された免疫応答の長期持続。2回のみの免疫化後に観察された十分な応答を考慮して、Montanide ISA 720アジュバント (v/v) をアジュバン

ト添加したバイオ融合MSP3-CRM 2 µgを使用して0日目及び14日目のみに皮下注射によって免疫化したさらなるBALB/cマウス 17匹において、この免疫化スキームを分析した。異なる日に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3-1-LSP抗体力価を決定した。結果は、2回の抗原注射後にMSP3抗体力価が増加し、全てのマウスにおいて42～72日目に最大に到達することを示しており、実験の380日間の経過観察全体で、免疫応答がごくわずかに減少したことを示している。

【図8-3】現行MSP3-1-LSPと比較した、バイオ融合MSP3-1によってマウスにおいて誘導されたMSP3-1特異的抗体の持続期間の大きな改善。A及びB：バイオ融合MSP3-CRMとMSP3-1-LSPとの比較：0日目、14日目及び28日目に、Montanide ISA720中バイオ融合MSP3-1 1 µgのみ又はMSP3-1 LSP 10 µgのいずれかを使用して、BALB/c (A - 左上パネル) 及びC57BL/6 (B - 右上パネル) マウスを免疫化した。経過観察全体の異なる日に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3-1 LSP抗体力価を決定した。示されている結果は、異なる日に各群のマウスにおいて得られた抗MSP3-1 LSP抗体力価の幾何平均に対応する。160日間の経過観察後、バイオ融合MSP3-1コンジュゲート免疫化マウスにおける平均抗体力価は、それぞれC57BL/6及びBALB/cにおいて 1.5×10^5 及び 10^5 であったが、これは、初回免疫化後160日目に測定した、MSP3-1-LSPによって誘導された抗体の平均力価よりも少なくとも10倍高い。C及びD：MSP3-CRMによって誘発された免疫応答の長期持続：0日目、14日目及び103日目に、Montanide ISA 720アジュバント (v/v) をアジュバント添加したバイオ融合MSP3-CRM 1 µgの皮下注射によって、BALB/c 及びC57BL/6 マウスの群 (マウス 4～5匹/群) を免疫化した。異なる日に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3抗体力価を決定した。結果は、2回の免疫化後に力価が顕著に増加し、49日目に最大に到達するのに対して、103日目に実施した3回目の抗原注射は、抗体応答の規模に関するいかなる検出可能な増加も誘導しなかったことを示している。これらの特異的抗体は、時間と共にごくわずかに減少したが、免疫化の540日後においてさえ、高い力価で依然として検出可能であった。E：2回のみ免疫化後にMSP3-CRMによって誘発された免疫応答の長期持続。2回のみ免疫化後に観察された十分な応答を考慮して、Montanide ISA 720アジュバント (v/v) をアジュバント添加したバイオ融合MSP3-CRM 2 µgを使用して0日目及び14日目のみに皮下注射によって免疫化したさらなるBALB/cマウス 17匹において、この免疫化スキームを分析した。異なる日に、血液サンプルを収集した。ELISAによって、特異的MSP3-1-LSP抗体力価を決定した。結果は、2回の抗原注射後にMSP3抗体力価が増加し、全てのマウスにおいて42～72日目に最大に到達することを示しており、実験の380日間の経過観察全体で、免疫応答がごくわずかに減少したことを示している。

【図9】MSP3-1-LSPと比較した、バイオ融合MSP3-1で免疫化したマウスにおいて誘導された抗体によるMSP3-1 ADCI (Ab依存性細胞障害) ターゲットエピトープの認識の改善。MSP3-1-LSPでは、ペプチド「b」、「c」及び「d」は、抗MSP3-1抗体の保護効果と相関するADCIアッセイにおいて有効な抗体によってターゲティングされる区別可能なB細胞エピトープを規定する。バイオ融合MSP3-1がこれらのエピトープに対する抗体を誘導する能力を評価するために、本発明者らは、ELISAによって、血清中のペプチドa、b、c及びdに対する抗体の力価を決定した。したがって、新規製剤によって認識されるADCIターゲットの数はかなり広範であり、力価はより高い。0日目、14日目及び28日目に、Montanide ISA720中バイオ融合MSP3-1 1 µgのみ又はMSP3-1 LSP 10 µgのいずれかを使用して、BALB/c 及びC57BL/6 マウスを免疫化した。3回目の免疫化の1週間後 (35日目) に、血液サンプルを収集した。マウス血清を1/400希釈し、ELISAによって、異なるMSP3-1ペプチド (a、b、c及びd) の特異的抗体の力価を決定した。示されている結果は、試験した各マウスの血清を用いて得られた光学濃度に対応する。

【図10】バイオ融合MSP3-1 1 µg、現行MSP3-1 LSP 10 µg又はMS

10

20

30

40

50

P 3 - 1 C末端リコンビナントタンパク質 10 μ gのいずれかで免疫化したH I M Mモデル（ヒト免疫原性マウスモデル）におけるヒト抗体応答。1 μ g/ml 抗原を用いてin vitroで刺激した又は刺激していないヒト脾臓細胞をN O D . C g - P r k d c ^{s c i d} - I L 2 r g ^{t m 1 W j I} / S z J (N S G)マウスに移植した（マウス 4匹/群）。各N S Gマウスに、抗原ブライミング又は非ブライミング脾臓細胞 30 \times 10⁶個の腹腔内注射（i p）を投与した。7日目及び21日目に、バイオ融合M S P 3 - 1 1 μ g又はM S P 3 - 1 - L S P 10 μ g又はM S P 3 - 1 C末端リコンビナントタンパク質 10 μ gで再構成マウスを追加免疫化した。Montanide ISA 720 (v/v)を全ての抗原にアジュバント添加し、腹腔内注射（i p）した。非ブライミング脾臓細胞で再構成したマウスにアジュバントのみを投与した。各免疫化の1週間後に、血液サンプルを収集した。全I g G E L I S A及び特異的I g G E L I S Aによって、特異的抗体を分析した。以下の式：（抗原特異的抗体力価/全ヒトI g G濃度） \times 10を使用して、調整特異的抗体力価を計算した（10 mg/mlを平均ヒト全I g G濃度とみなす）。E L I S A力価の幾何平均値（95% C I）が表されている。

【図11】バイオ融合M S P 3 - 1 1 μ g、現行M S P 3 - 1 L S P 10 μ g又はM S P 3 - 1 C末端リコンビナントタンパク質 10 μ gのいずれかで免疫化したH I M Mモデル（HuリンパN S Gマウス）におけるヒトI F N - γ 細胞応答。上記と同じ免疫化条件。I F N - γ E L I S P O Tによって、細胞応答を評価した。28日目に、各群のマウスの脾臓細胞を回収し、プールし、抗原刺激ありで又は抗原刺激なしでin vitro培養した。示されている結果は、各群のマウスを用いて得られた特定のスポット形成細胞（S F C）に対応する。

【図12】H I M MにおけるT細胞応答：バイオコンジュゲートP P 2 1 1 μ g又はM S P 3 - L S P 10 μ gのいずれかによって免疫化したマウスに移植したヒトリンパ球におけるC D 4 - T h 1 応答の顕著な改善。

【図13】バイオ融合M S P 3 - 1で免疫化したH I M Mモデルにおいて誘発されたヒト抗体による寄生虫ネイティブタンパク質の認識の改善。ヒト脾臓細胞をN S Gマウスに移植し、（図6に記載されているように）バイオ融合M S P 3 - 1 1 μ g、現行M S P 3 - 1 L S P 10 μ g又はM S P 3 - 1 C末端リコンビナントタンパク質 10 μ gのいずれかで免疫化した。3 D 7 Plasmodium falciparum (P f) 感染赤血球に対する免疫蛍光抗体検査（I F A T）によって、28日目のマウス血清中のヒト抗体と寄生虫タンパク質との反応性（これは、マラリア発作中にA D C I 防御機構を活性化するための重要な特徴である）を評価した。示されている結果は、各群のマウスを用いて得られた力価の範囲に対応する。

【図14】バイオ融合M S P 3 - 1 1 μ gで免疫化したH I M Mモデルにおいて誘発されたヒト抗体応答は、ワクチン調製に使用したアジュバントに依存しない。（A）（図6に記載されているように）Montanide ISA 720をアジュバント添加したバイオ融合M S P 3 - 1 1 μ gで刺激した又は刺激していない2人の異なるドナー由来のヒト脾臓細胞をN S Gマウスに移植した（マウス 4匹/群/ドナー）。（B）（区別可能なドナー由来のヒトリンパ球である以外は図6に記載されているように）Montanide ISA 720に代えてMF59をアジュバント添加したバイオ融合M S P 3 - 1 1 μ gで刺激した（マウス 9匹）又は刺激していない（マウス 8匹）ヒト脾臓細胞をN S Gマウスに移植した。両方の場合において、28日目に、E L I S Aによって、特異的M S P 3 - 1 L S P抗体力価を決定した。示されている結果は、各群のマウスを用いて得られたE L I S A力価の平均 \pm S Dに対応する。

【図15】Montanide ISA 720をアジュバント添加したバイオ融合M S P 3 - 1で免疫化したH I M Mモデルにおけるヒトリンパ球において誘発されたヒトI g G抗体の抗体サブクラス。（図10に記載されているように）M S P 3 バイオ融合物 1 μ gで刺激した又は刺激していないヒト脾臓細胞をN S Gマウスに移植した。28日目に収集したマウス血清を1/20希釈した。サブクラスI g G E L I S Aによって、特異的M S P 3 - 1 L S P抗体力価を決定した。示されている結果は、免疫化及び非免疫化マウスを用いて得ら

10

20

30

40

50

れた光学密度の平均 \pm S D に対応する。

【図 1 6】MF59 をアジュバント添加したバイオ融合 M S P 3 - 1 で免疫化した H I M M モデルにおいて誘発されたヒト I g G 抗体のサブクラス。(図 1 4 に記載されているように) MF59 をアジュバント添加したバイオ融合 M S P 3 - 1 1 μ g で刺激した又は刺激していないヒト脾臓細胞を N S G マウスに移植した。28 日目に収集したマウス血清を 1 / 20 希釈した。応答マウスの血清においてサブクラス I g G E L I S A によって、特異的 M S P 3 - 1 L S P 抗体力価を決定した。示されている結果は、免疫化及び非免疫化マウスを用いて得られた光学密度の平均 \pm S D に対応する。両アジュバントは、細胞親和性サブクラス I g G 1 の優位を確立させた。

【図 1 7】B a l b c マウスにおける P P 2 1 / P P 2 1 - montanide 0 . 2 若しくは 1 μ g (左上及び右上パネル)又は C 5 7 b l マウスにおける同じ用量(左下及び右下パネル)の免疫原性。図 6 ~ 8 のように決定した抗 M S P 3 - 1 - L S P 抗体力価の推移。

【図 1 8】他の M S P 3 ファミリーメンバータンパク質を用いて P P 2 1 によって誘発された抗 M S P 3 - 1 抗体の交差反応性 (E l i s a による O D 値)。C 5 7 B l / 6 (C) 及び B a l b / c (B) マウスに、P P 2 1 4 μ g の 2 回の注射 (J 0、J 1 4) を投与した。63 日目に、サンプルを収集した。

【図 1 9】C 5 7 B L (C) 及び B A L B / c マウス (B) における、水酸化ミョウバンをアジュバント添加した P P 2 1 の免疫原性 (用量 1 μ g / 免疫化)。2 回の免疫化又は 3 回の免疫化後に、C 5 7 B L (C) 及び B a l b / C マウス (B) において E l i s a によって決定した抗体力価が示されている。25 : 600 よりも高い希釈度は試験しなかった。対照的に、ミョウバン O H (これは、ヒトでは強力なアジュバントであり、高い T h 1 応答をもたらす) は、通常、齧歯類では不十分なアジュバントであるが、P P 2 1 による強い応答を依然として誘導したことに留意すべきである。

【図 2 0】南米 Saimiri sciureus サルにおけるバイオ融合コンジュゲート P P 2 1 の高い免疫原性。0 日目、28 日目及び 112 日目に、Primate Center of Belem, Brasil の動物舎において飼育下で生まれた Saimiri sciureus 南米サルを、Montanide Isa 720 をアジュバント添加した P P 2 1 1 μ g の皮下投与によって免疫化した (Montanide のみを投与したコントロール (平線) と比較した点線)。M S P 3 - L S P 抗原に対する E l i s a によって、並びに I F A T 及び W B によって、抗体を決定した (示さず)。免疫化 1 回当たり抗原 0 . 1 μ g のみを使用した場合であっても、免疫応答は約 5 倍低かった (すなわち、依然として非常に有意であった) (示さず)。

【図 2 1】Montanide ISA720 中 P P 2 5 1 μ g 又は Montanide ISA720 中 L S A 3 - 7 2 9 10 μ g のいずれかを投与した B a l b / C マウスにおいて L S A 3 - C R M (P P 2 5) 対 L S A 3 - 7 2 9 によって誘発された抗体応答。0 日目、7 日目、28 日目に免疫化し、45 日目に血清収集した。

【図 2 2】D G 7 2 9 によって in vitro でチャレンジした L S A 3 - C R M (P P 2 5) 対 L S A 3 - 7 2 9 免疫化 B a l b / C マウスにおいて誘発された I F N (E L I S P O T)。

【図 2 3】H I M M における抗 L S A 3 - 7 2 9 ヒト抗体応答及び結果の改善の再現性 : 2 人のヒトドナー A 及び B 由来のリンパ球を使用した、H I M M における L S A 3 - C R M 構築物 P P 2 5 に対する抗 L S A 3 - 7 2 9 ヒト抗体応答

【図 2 4】P P 2 5 によって誘発された免疫応答の持続期間の改善。

【図 2 5】H u H 7 . 5 における P. falciparum 肝臓期発達のための新規宿主細胞を開発し、ヒト初代肝細胞 (H P H) と比較した。図は、マウスポリクローナル抗 P f H s p - 70 で免疫染色した、スポロゾイト感染の 4 日後、5 日後及び 7 日後における肝臓シゾントの代表的なサンプルを示す。倍率 400 倍、スケールバー 10 μ m。7 日目に、H P H において十分な L S を見出すことは困難であった。その後、機能的アッセイにおいてこのヘパトーマモデルを用いて、肝細胞へのスポロゾイトの侵入を阻害することができる抗体を測定した。

【図 2 6】抗 P f L S A 3 抗体による、H u 7 . 5 ヘパトーマ細胞 (I L S D A) におけ

10

20

30

40

50

るスポロゾイト侵入の阻害。ネイティブなタンパク質に対する抗 L S A 3 反応性 (I F A T アッセイによる) と、肝臓期発達阻害アッセイ (I L S D A) における機能的阻害効果との間の相関が示されている。より小さなグラフは、抗スポロゾイト周囲 m A b 2 A 1 0 を使用した同じアッセイを示す。

【図 2 7】H I M M モデルに移植したヒトリンパ球では、構築物 P P 2 3 (M S P 3 - 2 - C R M P 9 7 - M S P 3 - 3) によって、強い B 細胞応答及び T 細胞応答が誘発された。上パネル (A) は抗体応答を示し、中央パネル (B) はアイソタイプ分布 (これは、A D C I 機構において単球と協調して作用することができる主要な細胞親和性クラスである I g G 1 クラスが優位である) を示す。下パネル (C) は、M S P 3 - 2 又は M S P 3 - 3 のいずれかによって *in vitro* で再刺激した I F N - 分泌によって評価した T 細胞応答を示す。

10

【図 2 8】B A L b / c マウス (n = 5) におけるバイオ融合 L S A 5 - C R M / Montanide ISA 720 用量 1 0 µg と比較した 1 µg の免疫原性。実験条件は、図 8 に記載されているものと同様である。0 日目、1 4 日目及び 2 8 日目に、バイオ融合 L S A 5 - C R M / Montanide ISA 720 による免疫化を実施した (矢印)。0 日目、7 日目、2 1 日目、4 2 日目に収集した血清を使用して、抗原としての L S A 5 - L S P に対する E L I S A 力価測定によって、血清抗体検出を実施した。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 8】

発明の詳細な説明
定義

20

「ワクチン」は、疾患の予防及び / 又は治療のために免疫を発生させるための組成物を意味すると理解すべきである。したがって、ワクチンは、抗原を含む医薬であり、ワクチン接種によって特定の防御及び保護物質を生成するために、ヒト又は動物において使用されることを目的とする。本明細書で使用される場合、「ワクチン」は、マラリアに対する部分的又は完全な保護を誘発することができる免疫原性組成物を意味する。ワクチンは、感染に対して予防的であり得、及び / 又は感染個体において治療的であり得る。

【0 0 1 9】

「免疫原性」という用語は、それが指す組成物又はタンパク質が、投与により免疫応答を誘導することができることを意味する。被験体における「免疫応答」は、抗原に対する体液性免疫応答、細胞性免疫応答、又は体液性及び細胞性免疫応答を含む、適応免疫応答及び / 又は先天性免疫応答の発生を指す。「体液性免疫応答」は、抗体によって媒介されるものを指す。

30

【0 0 2 0】

この文書で使用される場合、「保護」又は「予防」という用語は、Plasmodium 寄生虫との接触後における疾患の症候の非存在又は軽減した症候の存在を指す。特に、「マラリアの予防」という用語は、マラリアの原因となる Plasmodium との接触後の処置被験体における症候の非存在又は軽減した症候の存在を指す。

【0 0 2 1】

「患者」又は「被験体」は、典型的には、哺乳動物被験体、好ましくはヒト被験体である。被験体は、男性又は女性、子供又は成人であり得る。被験体は、マラリアを有すると以前に診断又は同定されているものであり得る。あるいは、被験体はまた、マラリアを有すると以前に診断されていないが、例えば感染により、又はマラリア流行地域内への旅行により、このような症状を発症するリスクがあるものであり得る。例えば、被験体は、マラリアの 1 つ以上の症候を示すものであり得る。

40

【0 0 2 2】

例えば、被験体は、Plasmodium falciparum 又は Plasmodium vivax に感染し得る。

【0 0 2 3】

元のポリペプチドと「相同な」又は「実質的に相同な」配列は、典型的には、元のポリペプチド又は元のポリペプチドの免疫原性若しくはエピトープフラグメントの配列と少な

50

くとも約 80 パーセントの同一性を有するものであって、元のポリペプチドの目的のターゲットに対する所望の効果を実質的に保持する（すなわち、免疫原性応答を誘発するか、又は抗体によって認識される）ものである。一層好ましい実施態様では、相同配列は、元のポリペプチド又はその免疫原性若しくはエピトープフラグメントの配列と少なくとも約 85 パーセント、90 パーセント、95 パーセント、97 パーセント又は 99 パーセントの同一性を有する。

【0024】

「免疫原性フラグメント」は、一般に、少なくとも 5 アミノ酸の長さを有する。一層好ましくは、免疫原性フラグメントの長さは、少なくとも 7、9、11、13、15、17 及び 19 アミノ酸である。「エピトープ」は、一般に、少なくとも 5 アミノ酸、好ましくは少なくとも 7 ~ 14 アミノ酸の長さを有する。「エピトープフラグメント」はこのようなエピトープを含むので、より長いものであり得る。

10

【0025】

本発明との関連では、「融合又はバイオ融合」という用語は、リコンビナントタンパク質において、担体タンパク質が抗原性 Plasmodium 配列に直接連結されているか、又はペプチドリinkerによって抗原性 Plasmodium 配列に連結されていることを意味する。ペプチドリinkerは、1 ~ 35 アミノ酸、好ましくは 5 ~ 20 アミノ酸、さらに好ましくは 5 ~ 10 アミノ酸の配列であり得る。好ましい実施態様では、リンカーペプチドは、(Gly - Gly - Gly - Ser)_n、(Gly)_n 又は (EAAK)_n (n は、1 ~ 4、好ましくは 1 ~ 3 である) である。いずれの実施態様でも、単一ポリペプチドが形成される。

20

【0026】

担体タンパク質

担体異種タンパク質配列は、有利には、ジフテリアトキシソイドの交差反応物質 (CRM)、ジフテリアトキシソイド (D)、非毒性突然変異体リコンビナント *Pseudomonas aeruginosa* エキソプロテイン A (repA)、髄膜炎菌外膜タンパク質複合体 (OMP)、破傷風トキシソイド (T)、H. influenza プロテイン D (hiD) 及びそれらの免疫原性フラグメントからなる群より選択され得る。

【0027】

好ましい実施態様では、担体異種タンパク質配列は、CRM197 又はその免疫原性フラグメントであり得、このフラグメントは、好ましくは、フラグメント A、膜貫通ドメイン T、CRM197 のレセプター結合ドメイン R、CRM197 のアミノ酸配列 1 ~ 190 及び CRM197 のアミノ酸配列 1 ~ 389 からなる群より選択される。

30

【0028】

ジフテリア毒素のフラグメント A は、アミノ酸 1 ~ 201 に及ぶ。CRM197 は、酵素的に不活性なフラグメント A を有し、グルタミン酸によるグリシン 52 の置換を示す。

【0029】

ジフテリア毒素のフラグメント B は、アミノ酸 202 ~ 535 に及ぶ。

【0030】

【表 1】

以下の表1は、特定の担体に関するさらなる情報を示す。

担体	名称	NCB:	配列番号
ジフテリア毒素	DIP_RS12515 毒素 [<i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC 13129]	NC_002935.2	配列番号:81
CRM197			配列番号:82
破傷風トキソイド	破傷風毒素 [<i>Clostridium tetani</i>]	X04436.1	配列番号:83
Hib プロテイン D	プロテイン D の <i>H.influenzae</i> (3639) 遺伝子	Z35656	配列番号:84

10

【0031】

実質的に相同な配列も使用され得る。

【0032】

抗原性Plasmodium配列

本発明の融合タンパク質構築物は、Plasmodiumタンパク質のエピトープ配列を含む少なくとも1つの抗原性配列を含む。

【0033】

前記抗原性配列は、任意のPlasmodium種由来の任意のPlasmodium抗原のものであり得る。

20

【0034】

ヒトに感染する寄生虫の「Plasmodium」属としては、限定されないが、*P. falciparum*、*P. vivax*、*P. knowles*、*P. ovale*及び*P. malariae*が挙げられる。以下に列挙されている抗原は、主に*P. falciparum*由来の抗原である。しかしながら、他のPlasmodium種におけるオルソログも同様に包含される。特に、*P. vivax*抗原は、*P. falciparum*抗原と同じ低い免疫原性を示した。

【0035】

前記抗原は、赤血球期（「血液期」とも表記される）又は前赤血球期（スポロゾイト及び肝臓期）において発現され得る。

30

【0036】

使用され得る抗原性配列の例は、以下の表2に列挙されている。実質的に相同な配列も使用され得る。

【0037】

赤血球期において発現される抗原であって、Ab依存性細胞阻害（ADCI）防御機構のターゲットである抗原としては、MSP3（例えば、MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7、MSP3-8）、11-1のPEBSサブ領域（LSA5とも称される）、Glurp R0及びR2、SERP、P27及びP27A、P45、P90及びP77、P14、P181（これはP77の組み合わせである）、MSP1-Block 2、MSP2（2つの3D7及びFC27アレル、二形性領域及び定常領域の両方）、GBP 130（特に、N部分及びC部分の両方）、タンパク質332、タンパク質11-1、MSP4又はそれらの任意のエピトープフラグメントが挙げられる。

40

【0038】

好ましくは、融合タンパク質における抗原性配列は、MSP3又はそのエピトープフラグメントである。

【0039】

別の好ましい実施態様では、融合タンパク質における抗原性配列は、LSA5又はそのエピトープフラグメントである。

【0040】

50

*Plasmodium falciparum*メロゾイト表面タンパク質3 (MSP-3) は、公知の無性血液期マラリアワクチン候補抗原である(Sirima et al, N Engl J Med 2011, 365(11):1062-1064; Demanga et al, Infect Immun 2010, 78(1):486-494; Daher et al, Infect Immun 2010, 78(1):477-485; Rousillon et al, Roussilhon, et al, PLoS Medicine, November 2007, 4, Issue 11, e320)。

【0041】

特に、6つのMSP3タンパク質のいずれか、好ましくはMSP3-1が使用され得るが、ペプチドa、b、c、d、e、f(リコンビナントC末端)だけではなく、タンパク質の全長及びN末端も使用され得る。好ましい実施態様では、抗原性配列は、MSP3又はそのエピトープフラグメントであり、このフラグメントは、MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7、MSP3-8の中から選択される*Plasmodium* MSP3タンパク質のC末端領域のモチーフa、b、c、d、e及び/又はfを包含する。

10

【0042】

メロゾイト表面由来の他の抗原、特に、緩く付着又は切断されるのでメロゾイト表面から放出され得るものが包含される。

【0043】

前赤血球期において発現される抗原としては、LSA3、PEBS、CS、Trap及びSals並びにそれらの任意のエピトープフラグメントが挙げられる。*P. falciparum*では、肝臓期抗原-3(LSA-3)は、前赤血球期において発現される抗原である(Toure-Balde et al: Infect Immun 2009, 77(3):1189-1196; Daubersies et al: Nat Med 2000, 6(11):1258-1263)。

20

【0044】

他の段階又は他の機構に關与する抗原も包含される。それらとしては、有性期に關与する抗原、例えばPf25若しくはPf45/48、及び赤血球におけるメロゾイト侵入阻害のGIA機構に關与する血液期の抗原、例えばRh5、AMA1、MSP1-19、MSP1-42、MSP2若しくはMSP4-5、又は細胞接着に關与する抗原、例えばVarCSAが挙げられる。

【表 2】

表2: 抗原性配列 (P falciparum)

抗原	名称	PlasmodB		アミノ酸配列
Ag27	トロホゾイト輸送タンパク質 1 (TEX1)	PFF0165C	PF3D7_0603400	配列番号:1
Ag27 (P27A)	# ペプチド 27A	#	#	配列番号:2
Ag27 (P27)	# ペプチド 27	#	#	配列番号:3
MSP1	メロゾイト表面タンパク質 1 (MSP1) ペプチドブロック II	PFI1475w	PFI1475w	配列番号:4
MSP1-42	メロゾイト表面タンパク質 1 42kDa フラグメント [合成構築物]	#		配列番号:5
MSP2	メロゾイト表面タンパク質 2 (MSP2)	PFB0300c	PF3D7_0206800	配列番号:6
MSP3-1	メロゾイト表面タンパク質 3-1	PF10_0345	PF3D7_1035400	配列番号:7
MSP3-1CT	C 末端	#	#	配列番号:8
MSP3-1a	# ペプチド a	#	#	配列番号:9
MSP3-1b	# ペプチド b	#	#	配列番号:10
MSP3-1c	# ペプチド c	#	#	配列番号:11
MSP3-1d	# ペプチド d	#	#	配列番号:12
MSP3-1e	# ペプチド e	#	#	配列番号:13
MSP3-1f	# ペプチド f	#	#	配列番号:14
MSP3-2	メロゾイト表面タンパク質 3-2	PF10_0346	PF3D7_1035500	配列番号:15
MSP3-2CT	C 末端	#	#	配列番号:16
MSP3-2a	# ペプチド a	#	#	配列番号:17
MSP3-2b	# ペプチド b	#	#	配列番号:18
MSP3-2c	# ペプチド c	#	#	配列番号:19
MSP3-2d	# ペプチド d	#	#	配列番号:20
MSP3-2e	# ペプチド e	#	#	配列番号:21
MSP3-2f	# ペプチド f	#	#	配列番号:22
MSP3-3	メロゾイト表面タンパク質 3-3	PF10_0347	PF3D7_1035600	配列番号:23
MSP3-3CT	C 末端	#	#	配列番号:24
MSP3-3a	# ペプチド a	#	#	配列番号:25
MSP3-3b	# ペプチド b	#	#	配列番号:26
MSP3-3c	# ペプチド c	#	#	配列番号:27
MSP3-3d	# ペプチド d	#	#	配列番号:28
MSP3-3e	# ペプチド e	#	#	配列番号:29
MSP3-3f	# ペプチド f	#	#	配列番号:30
MSP3-4	メロゾイト表面タンパク質 3-4	PF10_0348	PF3D7_1035700	配列番号:31
MSP3-4CT	C 末端	#	#	配列番号:32
MSP3-4a	# ペプチド a	#	#	配列番号:33
MSP3-4b	# ペプチド b	#	#	配列番号:34
MSP3-4c	# ペプチド c	#	#	配列番号:35

10

20

30

40

MSP3-4d	# ペプチド d	#	#	配列番号:36	
MSP3-4e	# ペプチド e	#	#	配列番号:37	
MSP3-4f	# ペプチド f	#	#	配列番号:38	
MSP3-7	メロゾイト表面タンパク質 3-7	PF10_0352	PF3D7_1 036000	配列番号:39	
MSP3-7CT	C 末端	#	#	配列番号:40	
MSP3-7a	# ペプチド a	#	#	配列番号:41	
MSP3-7b	# ペプチド b	#	#	配列番号:42	
MSP3-7c	# ペプチド c	#	#	配列番号:43	
MSP3-7d	# ペプチド d	#	#	配列番号:44	10
MSP3-7e	# ペプチド e	#	#	配列番号:45	
MSP3-7f	# ペプチド f	#	#	配列番号:46	
MSP3-8	メロゾイト表面タンパク質 3-8	PF10_0355	PF3D7_1 036300	配列番号:47	
MSP3-8CT	C 末端	#	#	配列番号:48	
MSP3-8a	# ペプチド a	#	#	配列番号:49	
MSP3-8b	# ペプチド b	#	#	配列番号:50	
MSP3-8c	# ペプチド c	#	#	配列番号:51	
MSP3-8d	# ペプチド d	#	#	配列番号:52	
MSP3-8e	# ペプチド e	#	#	配列番号:53	20
MSP3-8f	# ペプチド f	#	#	配列番号:54	
MSP4 (SALSA)	メロゾイト表面タンパク質 4 (MSP4)	PFB0310c	PF3D7_0 207000	配列番号:55	
Pf11.1	生殖母体特異的タンパク質 (Pf11-1)	PF10_0374	PF3D7_1 038400	配列番号:56	
Pf11.1 (PEBS)	Pf11.1 のサブ領域(LSA5 と称される)	#	#	配列番号:57	
Ag332	抗原 332, DBL 様タンパク質 (Pf332)	PF11_0356	PF3D7_1 149000	配列番号:58	
SERP	セリンリピート抗原 1 (SERA1)	PFB0360c	PF3D7_0 208000	配列番号:59	30
	セリンリピート抗原 2 (SERA2)	PFB0355c	PF3D7_0 207900	配列番号:60	
#	セリンリピート抗原 3 (SERA3)	PFB0350c	PF3D7_0 207800	配列番号:61	
#	セリンリピート抗原 4 (SERA4)	PFB0345c	PF3D7_0 207700	配列番号:62	
#	セリンリピート抗原 5 (SERA5)	PFB0340c	PF3D7_0 207600	配列番号:63	
GLURP	グルタミン酸リッチタンパク質(GLURP)	PF10_0344	PF3D7_1 035300	配列番号:64	
GLURP- R0	ペプチド R0	#	#	配列番号:65	40
GLURP- R2	ペプチド R2	#	#	配列番号:66	
Gbp130	グリコホリン結合タンパク質(GBP)	PF10_0159	PF3D7_1 016300	配列番号:67	
P14	保存的 Plasmodium タンパク質, 機能不明ペプチド 14	PFC0245c	PF3D7_0 305500	配列番号:68	
P45	保存的 Plasmodium タンパク質, 機能不明ペプチド 45	PF11_0207	PF3D7_1 120000	配列番号:69	

P77	Snf2 関連 CBP アクチベーター, 推定 (SRCAP) ペプチド 77	PF08_0048	PF3D7_0 820000	配列番号:70
P90	保存的 Plasmodium タンパク質, 機能不明ペプチド 90	PFD0520c	PF3D7_0 410500	配列番号:71
RH5	網状赤血球結合タンパク質ホモログ 5 (RH5)	PFD1145c	PF3D7_0 424100	配列番号:72
AMA1	頂端膜抗原 1 (AMA1)	PF11_0344	PF3D7_1 133400	配列番号:73
Pfs25	25 kDa オーキネート表面抗原前駆体 (Pfs25)	PF10_0303	PF3D7_1 031000	配列番号:74
VAR	赤血球膜タンパク質 1, PfEMP1 (VAR)	PFA0005w	PF3D7_0 100100	配列番号:75
LSA3	肝臓期抗原 3	PFB0915w	PF3D7_0 220000	配列番号:76
LSA3 (DG729)	ペプチド DG729	#	#	配列番号:77
CS	スポロゾイト周囲(CS)タンパク質	PFC0210c	PF3D7_0 304600	配列番号:78
TRAP	トロンボスポンジン関連匿名タンパク質 (TRAP)	PF13_0201	PF3D7_1 335900	配列番号:79
SALSA	メロゾイト表面タンパク質 4 (MSP4)	PFB0310c	PF3D7_0 207000	配列番号:80

#は、上の行と同じ参照を指す。

【 0 0 4 5 】

融合構築物

特定の実施態様では、融合タンパク質は、担体配列としての CRM 1 9 7 又はその免疫原性フラグメントに融合された MSP 3 (好ましくは、MSP 3 - 1)、LSA 3、LSA 5 (PEBS と称される) 又はそのエピトープフラグメントを抗原性配列として含むか、又はそれからなる。

【 0 0 4 6 】

好ましい態様では、融合タンパク質は、担体タンパク質配列の C 末端及び N 末端にそれぞれ位置するか、又は同じ末端に両方とも位置する 2 つの抗原性配列を含み、2 つの抗原性配列は、同じものであるか、又は互いに異なるものである。

【 0 0 4 7 】

好ましい実施態様では、抗原性配列と担体配列との間の融合は、直接融合である。

【 0 0 4 8 】

別の実施態様では、少なくとも 1 つのアミノ酸配列は、ペプチドリinker によって担体異種タンパク質配列の N 末端及び / 又は C 末端に連結され得、ペプチドリinker は、好ましくは、1 ~ 35 アミノ酸、好ましくは 5 ~ 20 アミノ酸の配列である。好ましい態様では、ペプチドリinker は、(G l y - G l y - G l y - G l y - S e r)_n、(G l y)_n 又は (E A A A K)_n (n は、1 ~ 4、好ましくは 1 ~ 3 である) である。

【 0 0 4 9 】

核酸、ベクター及び宿主細胞

本発明の融合タンパク質は、任意のリコンビナント技術によって作製され得る。したがって、本発明の別の態様は、前記融合タンパク質をコードする核酸を含有するベクター、好ましくは発現ベクターに関する。

【 0 0 5 0 】

本発明において使用される発現ベクターは、in vitro 及び / 又は in vivo における (例えば、適切な宿主細胞、宿主生物及び / 又は発現系における) 発現を提供し得る。それらは、典型的には、上記で定義されるポリヌクレオチド配列と、宿主細胞又は生物におけるタンパク質産物の発現 (例えば、転写及び翻訳) を可能にする調節配列 (例えば、適切な

10

20

30

40

50

プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど)とを含む。

【0051】

本発明のベクターは、ベクターの形態、例えばプラスミド、コスミド、YAC、ウイルスベクター又はトランスポゾンなどであり得る。

【0052】

好ましいが非限定的な態様では、本発明のベクターは、i i) 1つ以上の調節エレメント、例えばプロモーター及び場合により適切なターミネーター；並びに場合によりさらにi i i) 遺伝子構築物の1つ以上のさらなるエレメント、例えば3' - 若しくは5' - UTR配列、リーダー配列、選択マーカー、発現マーカー/レポーター遺伝子、及び/又はトランスフォーメーション若しくは統合(の効率)を促進し若しくは増加させ得るエレメントに作動可能に接続されたi) 少なくとも1つの上記核酸を含む。

10

【0053】

好ましい宿主細胞は、E.coliである。しかしながら、細菌、酵母、糸状菌、昆虫、植物細胞及び哺乳動物細胞などの任意の原核生物又は真核生物発現系が使用され得る。

【0054】

好ましいベクター、プロモーター及び宿主細胞は、グリコシル化又は非グリコシル化リコンビナントタンパク質を発現させることができる全てのベクター、プロモーター及び宿主細胞、例えば原核生物発現用のpET26a(T7プロモーターを含む)若しくはpTrcHis2(trp lacプロモーターを含む)プラスミド、移入用のpUC19、pUC57若しくはpCR4 TOPOプラスミド及びタンパク質発現用のE. coli BL21(DE3)若しくはE. coli NiCo21宿主細胞、又はプラスミド増幅専用のE. coli Top10である。

20

【0055】

ワクチン製剤

融合タンパク質は、場合によりアジュバントと組み合わせて、生理学的に許容し得るビヒクルと併せて医薬組成物に製剤化される。

【0056】

したがって、ワクチンであって、生理学的に許容し得るビヒクルと共に、融合タンパク質、又は少なくとも2つの異なる抗原性アミノ酸配列をそれぞれ含む少なくとも2つの融合タンパク質の組み合わせを含むワクチンが提供される。

30

【0057】

別の実施態様では、前記融合タンパク質をコードする核酸構築物を含むワクチン組成物が提供される。

【0058】

いくつかの実施態様では、ワクチンは、1つ以上の薬学的に許容し得るビヒクル又は賦形剤を含み得る。賦形剤は、それ自体が抗体の産生を誘導しない任意の成分であって、組成物を投与される被験体にとって有害ではない任意の成分を含む。適切な賦形剤は、典型的には、大きな徐々に代謝される大型高分子、例えば糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、スクロース、トレハロース、ラクトース及び脂質凝集物(例えば、油滴又はリポソーム)である。適切な薬学的ビヒクルは当業者に周知であり、限定されないが、希釈剤、例えば水、生理食塩水などが挙げられる。適切には、滅菌パイロジェンフリーリン酸緩衝生理食塩水が、薬学的ビヒクルである。加えて、添加剤、例えば湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝物質などが存在し得る。

40

【0059】

医薬組成物、免疫原性組成物又はワクチンは、アジュバントをさらに含み得る。「アジュバント」は、組成物の有効性を増強するために使用され、限定されないが、水酸化アルミニウム(ミョウバン)、リン酸アルミニウム、水中油型又は油中水型エマルジョン、Toll様レセプターのアゴニスト、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(the-MDP)、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン(nor-MDP)、PEI; AS01又はAS02(GlaxoSmith

50

K l i n e)、G L A - S E (I D R I) 及び類似製剤；並びに当技術分野で公知の同様のアジュバントが挙げられる。ISA 51及び720を含むMontanide（登録商標）アジュバント（これは、高精製マンニドモノオレートで乳化された精製スクアレン及びスクアランをベースとする）も同様に使用され得る。MF59（登録商標）はアジュバントの別の例であり、スクアレン、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート（Tween（登録商標）80）及びソルビタントリオレートの水中油型エマルジョンである。

【0060】

ワクチンは、それを投与すべき被験体に適切な投与量に製剤化される。投与される投与量は、個体の症状、性別、体重及び年齢；投与経路；並びに使用されるアジュバントによって変動し得る。ワクチンは、懸濁液又は液体溶液などの剤形で使用され得る。ワクチンは、上記薬学的に許容し得るビヒクルと共に製剤化され得る。適切な投与量としては、限定されないが、本明細書に記載される融合タンパク質 約0.1～約100マイクログラム、好ましくは約1～約50マイクログラム、さらに好ましくは1～20、1～15又はさらに1～10マイクログラムが挙げられる。

10

【0061】

ワクチン接種

免疫原性組成物又はワクチンは、多成分/多抗原免疫原性組成物又はワクチンであり得る。

【0062】

免疫原性組成物又はワクチンが、複数回投与レジーム、例えばプライムブーストレジームを目的とする場合、プライム組成物は、ブースト組成物と同じ又は異なる組成物を含み得る。しかしながら、本発明との関連では、プライムブーストレジームは全く必須ではない。

20

【0063】

免疫原性組成物又はワクチンは、任意の好都合な経路によって、好ましくは非経口、筋肉内、皮内、皮下、粘膜又は静脈内で投与され得る。

【0064】

DNAワクチン接種のために、エレクトロポレーション、ニードルフリーアプローチ、例えば粒子衝突及び高圧送達、皮膚パッチ、微粒子又はリボソーム中へのDNAワクチンの製剤化などの様々な技術が利用可能である。

30

【0065】

被験体において免疫応答を惹起するための方法であって、有効量の本発明のワクチンを投与する工程を含む方法が記載される。ワクチンは、予防的に（すなわち、感染を予防するために）、又は保護を提供するために投与され得、好ましくは、抗体及び/又はT細胞免疫の誘導を伴う。前記方法は、一次免疫応答、二次免疫応答、ブースター応答又は免疫応答の組み合わせを惹起し得る。

【0066】

ワクチンは、前赤血球期、例えば肝臓期及び/又は有性若しくは無性血液期を含む任意の段階において、マラリアから被験体を保護することを意味する。

【0067】

本発明によれば、Plasmodium抗原に対する免疫応答の規模及び/又は記憶が増加する。

40

【0068】

特に、本発明のMSP3融合構築物は、抗MSP3細胞親和性抗体、例えばIgG1及びIgG3抗体の産生をトリガーする。保護のレベルは、前記抗体の力価を測定することによって決定され得る。

【0069】

図面及び実施例は本発明を例証するものであり、その範囲を限定しない。

【実施例】

【0070】

以前の研究では、頻繁なマラリア曝露は、成人の免疫の発達をもたらし、これが疾患を

50

予防又は緩和することが示されている。この免疫は、マラリア免疫成人由来の免疫グロブリン (IgG) を投与することによって受動伝達され得る。

【0071】

抗体依存性細胞性障害 (ADCI) と称される寄生虫殺傷機構が同定された。ADCI によるゲノムワイド DNA ライブラリーのスクリーニングにより、メロゾイト表面タンパク質 3 (MSP3) が同定され、その後、PEBS を含む他のいくつかの抗原が同定された。

【0072】

細胞親和性抗体は、保護代用物として同定された：ADCI を媒介する細胞親和性 (白血球結合) 抗 MSP3 抗体 IgG1 及び IgG3 は、多くの異なる状況の疫学的研究においてマラリアのリスクの減少に一貫して関連することが見出された。これらの抗体はまた、感染動物における *P. falciparum* に対する保護を媒介する。

【0073】

これらの研究は、効率的な免疫応答が有する特徴を示しており、改善されたワクチン製剤の開発につながる。

【0074】

これに基づいて、今回、本発明者らは、融合タンパク質 CRM97-MSP3 が、MSP3-LSPI (MSP3-1 の 186~271 領域をカバーする長い合成ペプチド) と比較して、B 細胞レベル及び T 細胞レベルで免疫原性を 20~100 倍増加させることを示した。実施例 1 を参照のこと。10 倍少ない免疫化用量を使用したところ、ヒト、マウス及びリスザル由来のリンパ球に対する免疫原性が大きく改善し、抗体の持続期間が大きく改善した。

【0075】

前赤血球期において、以前の研究では、LSA3 によってチンパンジーにおいて、大規模なスポロゾイトチャレンジに対する保護効果を誘発することができるが、この効果は、LS 発達を阻害する可能性がある IFN- γ と、スポロゾイト侵入を防止する抗体とに依存することがさらに示されている。

【0076】

実施例 2 では、本発明者らは、バイオ融合 CRM-LSA3 構築物が T 細胞応答及び B 細胞応答を強く増加させることを示した。

【0077】

実施例 1 及び 2 において得られた結果は、CRM を有する構築物において、赤血球期由来の他の抗原、例えば MSP3-2 及び MSP3-3 を使用して再現可能であることを証明した (実施例 3 を参照のこと)。

【0078】

実施例 4 は、LSA5-CRM 構築物を用いた結果を提供する。

【0079】

材料及び方法

発現構築物の生成及び *Escherichia coli* におけるバイオ融合タンパク質の産生

その N 末端及び C 末端の両方においてマラリアペプチド抗原に共有結合的に連結された解毒化ジフテリア毒素 CRM197 から構成されるキメラ免疫原をコードする遺伝子配列 (図 1) を化学合成し (GenScript)、*E. coli* における産生のためにコドン最適化した。発現プラスミド pET-26a (Novagen) におけるクローニングのために、NcoI 及び XhoI の制限部位を 5' 末端及び 3' 末端にそれぞれ付加した。配列決定によってシャトルプラスミド pUC57 に挿入された配列をチェックし、迅速に凍結乾燥した (4 μ g)。

【0080】

PP21 における MSP3-1 ペプチド (plasmodBacc.Nbr PF3D7_1035400) は、MSP3-1 におけるアミノ酸 (AA) 155~249 に対応する。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

他のハイブリッド免疫原（表 3）は、CRM197 周囲に設計されている。PP22 では、MSP3-2 ペプチド（MSP3-2 の AA 178 ~ 257、Plasmod B acc. Nbr PF3D7_1035500）で MSP3-1 ペプチドを置き換えた。PP23 では、MSP3-3 ペプチド（MSP3-3 の AA 246 ~ 307、Plasmod B acc. Nbr PF3D7_1035600）で C 末端の MSP3-2 ペプチドを置き換えた。PP25 は、両方の CRM197 末端に同じ LSA3 ペプチド（AA 176 ~ 325、Plasmod B acc. Nbr PF3D7_0220000）を含有する。

【表 3】

10

表3:免疫原PP21、PP22、PP23、PP25及びLSA5－CRMの物理化学的特徴

キメラリコンビナント免疫原 (<i>E. coli</i>)			アミノ酸 Nbr.	Mol.Wt. (kDa)	pHi
PP21	MSP3-1 p_6His	lsp*_CRM197_MSP3-1	757	84	5,4
PP22	MSP3-2 lsp_6His	lsp_CRM197_MSP3-2	727	80	4,6
PP23	MSP3-2 lsp_6His	lsp_CRM197_MSP3-3	709	78	4,9
PP25	LSA3 lsp_6His	lsp_CRM197_LSA3 lsp_6His	845	93	4,3
LSA5-CRM タンパク質	PEBS-CRM197_PEBS_6His		807	90	4.07

20

*lsp:長い合成ペプチド

30

【 0 0 8 2 】

クローニング分子手順及びプラスミド増殖のために、*E. coli* transfer strain Top 10 (Invitrogen) [F - mcr A (mrr - hsdRMS - mcr BC) 80 lac Z M15 lacX74 recA1 araD139 (ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG] をを使用した。

【 0 0 8 3 】

株 BL21 (DE3) [F - ompT hsdSB (rB - mB) gal dcm (DE3)] (NEB) において、リコンビナントの発現を実施した。

40

【 0 0 8 4 】

ハイブリッド配列を含有するシャトルプラスミド pUC57 (Genscript) 及び発現プラスミド pET26a を NcoI 及び XhoI で消化した。電気泳動後、ゲル抽出 (QIAGEN) によって、インサート及び線状化 pET26a のバンドを回収した。インサート対プラスミド比 3 で、ゲル精製インサートを pET26a 内にライゲーションした。ライゲーション反応を使用して、化学的にコンピテントな *E. coli* Top 10 をトランスフォーメーションし、ペトリ皿中、50 µg/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地上にプレーティングした。

【 0 0 8 5 】

シリカカラム (QIAGEN) のプラスミドミニプレパレーションのために、カナマイシンを含

50

む液体培地中で、細菌コロニー 6 個をピッキングした。インフォマティブな制限酵素による消化によって、p E T 2 6 a へのインサートの正しい挿入をチェックした (図 2)。

【 0 0 8 6 】

正しい制限プロファイルを有するプラスミドを選択して、B L 2 1 (D E 3) 細菌をトランスフォーメーションした。

【 0 0 8 7 】

上記のように制限酵素消化によって分析した B L 2 1 (D E 3) クローン 6 個において、正しいプラスミドによるトランスフォーメーションを確認した。

【 0 0 8 8 】

小容量細菌培養におけるリコンビナントタンパク質生産の最適化

10

三角フラスコ中、小規模培養スケール (1 L) で、リコンビナントタンパク質生産の持続期間、インデューサー (I P T G) の濃度及び温度などのパラメータを分析した。定常状態一晚培養物 5 ml を 1 L (1 : 2 0 0) で希釈し、6 0 0 nm の光学密度 0 , 7 ~ 0 , 8 まで 3 0 でさらに培養した。2 つの I P T G インデューサー濃度 0 . 1 及び 1 mM を用いて、3 つの温度 2 2、3 0 及び 3 7 で、リコンビナントタンパク質発現の誘導をアッセイした。2 2 で一晚培養し、0 . 1 mM I P T G によって誘導した後、最良のリコンビナント収量が得られた。

【 0 0 8 9 】

固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) による精製後、細菌培養液 1 リットル当たりリコンビナント産物 1 ~ 2 mg の収量が得られた。

20

【 0 0 9 0 】

P P 2 1 の生産及び精製

実験室スケール (1 ~ 2 リットル) の生産を行って、マウス及び霊長類モデルにおいて前臨床免疫原性研究を行うために十分な P P 2 1 リコンビナントタンパク質を得た。

【 0 0 9 1 】

細菌培養及びリコンビナントタンパク質生産のためのプロトコールは、小規模培養で以前に確立されている。

【 0 0 9 2 】

N i - N T A 樹脂 (Q I A G E N) によるアフィニティーによって、C 末端ヘキサヒスチジンタグ付リコンビナントタンパク質 P P 2 1 を精製した。

30

【 0 0 9 3 】

ネイティブ条件下又は変性条件下で、2 つの精製手順を調査した。

【 0 0 9 4 】

実際、ネイティブ条件下では、細菌溶解物不溶性画分においてリコンビナントタンパク質は見られなかったが、変性条件下における精製もアッセイして、N i - N T A 樹脂上の固定化 N i ²⁺ 金属について、ヒスチジンタグのアベイラビリティに対する P P 2 1 の三次元構造の推定コンフォメーション効果の影響を評価した。

【 0 0 9 5 】

ネイティブ条件下における精製

40

- 遠心分離 (4 0 0 0 g、3 0 分間、4) によって、細菌細胞を回収した。
- 細菌ペレットをバイオマス 1 グラム当たり溶解バッファー (5 0 mM N a H ₂ P O ₄、3 0 0 mM N a C l、1 0 mM イミダゾール、p H 8 . 0) 5 mL に懸濁した。
- 溶解物を 1 mg/mL リゾチームと共に氷上で 3 0 分間振盪した。
- 冷却間隔を 3 0 秒間とし、1 5 0 W、5 3 0 秒間のバーストによって、細菌を溶解した。
- 一式のプロテアーゼ阻害剤 (Roche) を加えた 5 µ g/mL D N A s e I 及び 1 0 µ g/mL R N A s e A と共に、溶解物を氷上で 3 0 分間振盪した。
- 1 0 0 0 0 g、4 で 3 0 分間遠心分離することによって、溶解物を清澄化した。
- 溶解物を 0 , 2 2 µ m 篩でろ過し、4 のロッキングトレイ上、容量 2 0 mL で、N i N T A 樹脂 2 0 0 µ L と共に一晚インキュベーションした。

50

- 溶解バッファー 容量 40 mLで樹脂を十分に5回洗浄した。分析のために、第1段階の上清（樹脂インキュベーション後の溶解物）のアリコートを保存した。遠心分離工程は、200 gで5分間以下であった。
- 250 mM イミダゾールを5倍含有する溶解バッファー 500 μ L中で樹脂をインキュベーションすることによって、リコンビナントタンパク質を回収した。
- 溶出画分をプールし、30 kDa篩による限外ろ過によってPBS pH 7.3に対して透析した。

【0096】

280 nMで分光光度法によってタンパク質濃度を測定し、PP21について図3に示されているように、電気泳動（SDS-PAGE 10%）及びイムノブロットングによってさらに特性評価した。

10

【0097】

変性条件下における精製

遠心分離（4000 g、30分間、4℃）によって、細菌細胞を回収した。

細菌ペレットをバイオマス 1グラム当たり変性溶解バッファー（100 mM NaH₂PO₄、10 mM トリス-C1、8 M 尿素、NaOH pH 8.0）5 mLに懸濁した。

溶解物を氷上で30分間振盪した。

冷却間隔を30秒間とし、150 W、530秒間のバーストによって、細菌をさらに溶解した。

10000 g、4℃で30分間遠心分離することによって、溶解物を清澄化した。

20

溶解物を0.22 μ m篩でろ過し、4℃のロッキングトレイ上、容量 20 mLで、NiNTA樹脂 200 μ Lと共に一晚インキュベーションした。

変性溶解バッファー 容量 40 mLで樹脂を十分に5回洗浄した。分析のために、第1段階の上清（樹脂インキュベーション後の溶解物）のアリコートを保存した。遠心分離工程は、200 gで5分間以下であった。

250 mM イミダゾールを5倍含有する溶解バッファー 500 μ L中で樹脂をインキュベーションすることによって、リコンビナントタンパク質を回収した。

溶出画分をプールし、30 kDa篩による限外ろ過によってPBS pH 7.3に対して透析した。

30

【0098】

2つの方法による精製収量は同様であったが、これは、ネイティブ形態のPP21において、アフィニティーヒスチジンタグが機能的であることを示唆している。

【0099】

三角フラスコ中、1リットルスケールの10回を超える生産/精製試験において、細菌培養液 1リットル当たりリコンビナントタンパク質PP21 0.7～1 mgの精製収量が再現性よく得られた。

【0100】

図3は、IMACによって精製したリコンビナントタンパク質PP21を示す。

【0101】

PP21の温度安定性

40

ウエスタンブロットングによって評価した貯蔵温度に応じたPP21の安定性は、図4に示されている。温度 6℃の冷蔵庫における21日間の貯蔵期間後、分解の兆候は観察されなかった。室温では、PP21は、同じ期間で分解の兆候を示し始めたのに対して、37℃では8日後に完全に分解された。しかしながら、それはGMP製造製品ではなく、微量のプロテアーゼを含有し得るので、この不安定性は推定内因性分子の不安定性に帰することはできない。

【0102】

pET26aによってE. coliにおいて発現されたリコンビナントタンパク質のアミノ酸配列は、以下に示されている。括弧内の配列は発現プラスミドに由来するものであり、太字はCRM197ジフテリア毒素に由来するものである。

50

【 0 1 0 3 】

固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（ I M A C ）による精製に使用した C 末端のヘキサヒスチジントグは、下線が付されている。

【 0 1 0 4 】

P P 2 1 M S P 3 - 1 の配列（斜体下線）（ P l a s m o d B I D : P F 3 D 7 _ 1 0 3 5 4 0 0 ）、残基 1 5 5 ~ 2 4 9 （ 9 5 a a ）

【 化 1 】

[MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMG]KTKEYAEKAKNAYEKAKNAYOKANOAVLKAKE
ASSYDYILGWEFGGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKDKENISKENDDVLDEKEEEEAEETEEEE
LEGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKE
FYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKE
LGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALS
VELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKT
KTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTG
TNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVH
HNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRP
AYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLL
PTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLH
VAFHRSSSEKIHNSNEISSDSIGVLGYQKTVDHKTVNSKLSLFFFEIKSKKTKEYAEKAKN
AYEKAKNAYOKANOAVLKAKEASSYDYILGWEFGGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKDKENI
SKENDDVLDEKEEEEAEETEEEELE/LEHHHHHHHH (配列番号 : 85).

10

20

P P 2 2 ; M S P 3 - 2 の配列（斜体下線）（ P l a s m o d B I D : P F 3 D 7 _ 1 0 3 5 5 0 0 ）、残基 1 7 8 ~ 2 5 7 （ 7 9 a a ）

30

【化 2】

[MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMG]LNNNILGWEFGGGAPONGAAEDKKTEYLLEQI
KIPSWDRNNIPDENEQVIEDPQEDNKDEDEDEETETENLETEDDNNEEGADDVVDSSKS
 FVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNVDDDWEKFYSTDNKYDAAG
 YSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQV
 GTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSV EYINNWEQAKALSVELEINFETRGRK
 GQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIK
 NKMSESPNKT VSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAW
 AVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIQAQSIALLSSL
 MVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLLHDGY
 AVSWNTVEDSIIRTFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHIS
 VNGRKIRMRCRAIDGDVTF CRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISS
 DSIGVLGYQKTV DHTKVN SKLSLFFEIKSLNNNILGWEFGGGAPONGAAEDKKTEY
LLEQIKIPSWDRNNIPDENEQVIEDPQEDNKDEDEDEETETENLETEDDNNEELEHH
HHHHH(配列番号: 86).

10

20

P P 2 3 ; M S P 3 - 2 の配列 (C R M 1 9 7 の前の斜体下線) (P l a s m o d B I
 D : P F 3 D 7 _ 1 0 3 5 5 0 0) 、残基 1 7 8 ~ 2 5 7 (7 9 a a) 及び M S P 3 - 3
 (C R M 1 9 7 の後の斜体) (P l a s m o d B a c c . N b r P F 3 D 7 _ 1 0 3
 5 6 0 0) 、残基 2 4 6 ~ 3 0 7 (6 1 a a)

【化 3】

[MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMG]LNNNILGWEFGGGAPONGAAEDKKTEYLLEQI
KIPSWDRNNIPDENEQVIEDPQEDNKDEDEDEETETENLETEDDNNEEGADDVVDSSKS
 FVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNVDDDWEKFYSTDNKYDAAG
 YSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQV
 GTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSV EYINNWEQAKALSVELEINFETRGRK
 GQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIK
 NKMSESPNKT VSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAW
 AVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIQAQSIALLSSL
 MVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLLHDGY
 AVSWNTVEDSIIRTFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHIS
 VNGRKIRMRCRAIDGDVTF CRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISS
 DSIGVLGYQKTV DHTKVN SKLSLFFEIKSSNEKGRPPTYSPILDDGIEFSGGLYFNEKK
STEENKQKNVLESVNLT SWDKEDIVKENEDVKLEHHHHHHH(配列番号: 87).

30

40

P P 2 5 ; L S A - 3 の配列 (斜体下線) (P l a s m o d B I D : P F 3 D 7 _ 0 2
 2 0 0 0 0) 、残基 1 7 6 ~ 3 2 5 (1 5 0 a a)

【化 4】

[MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMG]SDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVND
DIFFNSLVKSVQOEQOHNVEEKVEESVEENDEESVEENVEENVEENDD
DESVASSVEESIASSVDES
IDSSIEENVAPTVEEIVAPTVEEIVAPSVVESVAPSVEESVEENVEESVAENVEE
GADDVVDS
 SKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDWKEFYSTDN
 KYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLME
 QVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETR
 G10KRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHG
 PIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANY
 AAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSI
 ALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF
 LHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDV
 NKS10KTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIH
 SNEISSDSIGVLGYQKTVDH10TKVNSKLSLFFEIKSSDELFNELLNSVDVNGEVKENILE
ESQVNDDIFFNSLVKSVQOEQOHNVEEKVEESVEENDEESVEENVEENVEENDD
DESVASSVEESIASSVDESIDSSIEENVAPTVEEIVAPTVEEIVAPSVVESVAPSVEESVEENVEESVAENVEE
I
 LEHHHHHHH(配列番号：88).

10

20

L S A 5 - C R M タンパク質配列 (配列番号：89)

【化 5】

IPEEQIEEVIOEEHIEQVVPEELIEEVPEEIHIEEVIPEEIVEEVIYEEVIPEELVEEVIAEKL
LVKEIVPEQVREEVTLEEIVEEMIPEEFVVEEVAPEVEIEEIHPEELIEEVIPEVLVEEAVPEELIEK
VIP
 GADDVVDSKSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDWKEFYST
 DNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTE
 PLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETR
 GKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPI
 KNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWA
 VNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMV
 AQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF10LHDGYAVSW
 NTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDV10NKS
 KTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIH
 SNEISSDSIGVLGYQKTVDH10TKVNSKLSLFFEIKSIPEEQIEEVIOEEHIEQVVPEELIEEVPEEIHIEEVIPEEIVEEVI
YEEVIPEELVEEVIAEKL
LVKEIVPEQVREEVTLEEIVEEMIPEEFVVEEVAPEVEIEEIHPEELIE
VIPEVLVEEAVPEELIEKVTPHHHHHHH

30

40

【0105】

ヒト免疫原性マウスモデル (HIMM) : このモデルは、免疫不全 NOD - SCID -

50

I L - 2 r ヌル (N S G) マウスへのヒト脾臓リンパ球の移植 (H u - S P L - N S G) に基づくものであり、通常の実験用マウス、例えば B a l b / C 及び C 5 7 B L を使用して得られた情報を補完する。

【 0 1 0 6 】

B a l b / c 又は C 5 7 B 1 / 6 マウスの免疫化及び血液サンプリング

B a l b / c 又は C 5 7 B 1 / 6 マウス 4 ~ 5 匹の群は、リン酸緩衝生理食塩液 p H 7 . 2 (P B S) 1 0 0 μ l で希釈してアジュバント Montanide ISA 720 1 0 0 μ l で乳化した M S P 3 - 1 - L S P 1 0 μ g 又は P P 2 1 1 μ g の 2 回又は 3 回の注射を受けた。皮下注射によって免疫化を実施し、15 日間おいて 1 回又は 2 回反復した。2 回目の注射の 2 週間後から開始して尾を出血させることによって、血液収集を実施し、初回抗原注射の 1 6 0 日後まで 1 5 日間隔で反復した。血清を分離し、使用まで - 2 0 で貯蔵した。並行して同時に処理した他の群は、P P 2 1 1 μ g 又は 0 . 2 μ g のいずれかを投与した。

10

【 0 1 0 7 】

マウス血清中の抗 M S P 3 - L S P 抗体力価の決定

酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) によって、マウス血清中の M S P 3 - L S P 特異的抗体力価を決定した。P B S で希釈した 2 μ g / m l M S P 3 - 1 - L S P 又は M S P 3 - 1 - L S P ペプチド a、b、c 若しくは d の 1 つで平底マイクロタイトレーションプレート (Nunc-Thermo Scientific, USA) を 4 で一晩コーティングした。洗浄 (P B S、p H 7 . 2) 及び飽和 (P B S、3 % 脱脂乳) 後、(P B S、3 % 脱脂乳、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 で希釈した) 試験血清の系列希釈物を追加し、1 時間インキュベーションした。ネガティブコントロールは、免疫前マウス血清からなる。続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウス I g G (H + L) (Invitrogen, USA) を 1 時間追加し、続いて、ペルオキシダーゼ基質テトラメチルベンジジン (Amresco, USA) を追加することによって、特異的抗体を明らかにした。特異的抗体力価は、最後の陽性希釈の逆数に対応する。

20

【 0 1 0 8 】

ヒト脾臓提供及び倫理規定

ヒト脾臓は、レバノンの National Organization for Organ & Tissues Donation & Transplantation (NOOTDT) との倫理的合意にしたがって、死亡した臓器移植ドナーから入手した。存命中に患者自身が、又はその死亡後に患者の両親が、移植又は科学研究のための臓器提供に関するインフォームドコンセントに署名した。

30

【 0 1 0 9 】

ヒト脾臓細胞調製

以前に記載されているように (Brams P, 1998)、外科的切除後 2 4 時間以内に、ヒト脾臓を加工した。簡潔に言えば、脾臓組織を解剖し、細胞懸濁液を調製した。ゲイ溶液を使用して、赤血球を 2 5 で 5 ~ 1 0 分間溶解した。洗浄後、3 7 % ウシ胎仔血清 (F C S) (Sigma, USA)、1 0 % ジメチルスルホキシド (D M S O) (Sigma, USA) 及び 5 3 % R P M I 1 6 4 0 (Sigma, USA) からなる培地に白血球を再懸濁し、次いで、使用まで液体窒素中で凍結保存した。各脾臓ドナーから単離した細胞の平均数は、1 0 0 \pm 4 0 億個であった。

40

【 0 1 1 0 】

N S G マウスにおけるヒト脾臓細胞の移植及び免疫化

N O D . C g - P r k d c s c i d - I L 2 r t m 1 W j I / S z J (N S G) マウスは、The Jackson Laboratories (USA) から入手し、無菌マイクロアイソレーター中で飼育した。食物、水、ケージ及び寝具は全て、使用前にオートクレーブ処理した。6 ~ 8 週齢の N S G マウスを実験に入れた。

【 0 1 1 1 】

0 日目に、1 0 % ウシ胎仔血清、1 % 非必須アミノ酸 (N E A A 1 0 0 x)、2 m M グルタミン、2 m M ピルビン酸ナトリウム及び 5 0 μ g / m l ゲンタマイシンを補充した R P

50

M I 1 6 4 0 培地 (完全培地) 中で、 $1 \mu\text{g/ml}$ 抗原と共に又は抗原なしで、ヒト脾臓細胞を細胞 4×10^6 個/mlで培養した。培養試薬は全て、Sigma, USAから購入した。1日目に、リコンビナントヒトIL-2 (Gibco Invitrogen)を 25 IU/ml で追加した。3日目に、脾臓細胞を回収し、洗浄し、ハンス平衡塩類溶液 (H B S S) に再懸濁した。各NSGマウスは、抗原プライミング又は非プライミング脾臓細胞 30×10^6 個の腹腔内注射 (i p) を受けた。7日目及び21日目に、H B S S - Montanide ISA 720又はMF59アジュバント (v/v) $200 \mu\text{l}$ 中の抗原 $10 \mu\text{g}$ の腹腔内注射 (i p) によって、再構成マウス (H u - S P L - N S G) を追加免疫化した。非プライミング脾臓細胞で再構成したマウスは、アジュバントのみを投与した。各追加免疫化の1週間後に、血液サンプルを収集した。

10

【0112】

H u - S P L - N S Gマウス血清中のヒトM S P 3 - 1 - L S P 特異的抗体の決定

E L I S A によって、これらの決定を実施した。簡潔に言えば、マウス血清中の総ヒトI g Gの検出のために、 0.1 M 炭酸バッファー、 $\text{pH} 9.5$ 中の $2.5 \mu\text{g/ml}$ 精製ヤギ抗ヒトI g G (H + L) (Invitrogen, USA)で平底マイクロタイトレーションプレート (Nunc-Thermo Scientific, USA)を4で一晚コーティングした。洗浄 (P B S、 $\text{pH} 7.2$) 及び飽和 (P B S、3%脱脂乳) 後、(P B S、3%脱脂乳、 0.05% Tween20で希釈した) 試験血清を追加し、1時間インキュベーションした。ネガティブコントロールは、同じ動物の免疫前マウス血清からなっていた。続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトI g G (H + L) (Invitrogen, USA)を1時間追加し、続いて、ペルオキシダーゼ基質テトラメチルベンジジン (Amresco, USA)を追加することによって、ヒトI g Gを明らかにした。標準的なヒトI g G溶液 (Zymed, USA)と比較して、H u - S P L - N S Gマウス血清中の総ヒトI g G濃度を計算した。P B S中 $2.5 \mu\text{g/ml}$ M S P 3 - 1 - L S Pでプレートをコーティングしたことを除いて、抗原特異的抗体の検出について同じ試験を実施した。この場合、ネガティブコントロールは、Plasmodiumに感染したことがない個体の血清からなっており、ポジティブコントロールは、過免疫アフリカ人成人由来の血清のプールからなっていた。両方の場合において、抗体力価を決定するために、各血清の系列希釈物を試験した。特異的抗体力価決定のために、カットオフ (ネガティブコントロール $\text{OD} \times 2$) を超える吸光度が得られた場合、試験を陽性とみなした。ヒトI g Gサブクラスに特異的な二次マウスモノクローナル抗体 (それぞれ最終希釈 $1/4, 000, 1/10, 000, 1/10, 000$ 及び $1/60, 000$ でクローンN L 1 6 [I g G 1; Skybio, UK]、H P 6 0 0 2 [I g G 2; Sigma-Aldrich, Germany] 並びにZ g 4 及びG B 7 B [それぞれI g G 3 及びI g G 4; Skybio, UK] を使用した)、続いて、P B Sで $1/4000$ 希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウスI g G (Invitrogen)を使用して、I g Gサブクラスの検出を実施した。

20

30

【0113】

リアルタイム逆転写P C R (R T q P C R) による異なるサイトカイン、ケモカイン及び転写因子の遺伝子発現の定量

完全R P M I 1 6 4 0 培地中、免疫化抗原での刺激あり又はなしで、免疫化及び非免疫化マウスの脾臓細胞を細胞 2×10^6 個/mlで培養した。24時間の培養後、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany)を使用して、全細胞R N Aを抽出した。反応混合物 $20 \mu\text{l}$ 中で、RevertAid M-MuLV enzyme (RevertAid kit First Strand Synthesis kit, Thermo Scientific Fermentas)を使用して、逆転写を行った。簡潔に言えば、オリゴd T 1 8 プライマー $1 \mu\text{l}$ を全R N A 約 400 ng に追加し、混合し、 65°C で5分間インキュベーションした。製造業者が推奨するように、チューブを氷上に数分間置き、短時間遠心分離してから、 $5 \times$ 反応バッファー、R i b o l o c k R n a s e 阻害剤 ($20 \text{ u}/\mu\text{l}$)、d N T P (10 mM) 及び逆転写酵素 ($200 \text{ u}/\mu\text{l}$) を追加した。反応混合物を 42°C で60分間インキュベーションした。70で5分間加熱することによって、酵素を不活性化した。定量的P C Rを使用して、T h 1 又はT r e g 細胞に特徴的であると考えられる異なるヒトサイトカイン、ケモカイン及び転写因子の相対的発現を測定した。製造業者が

40

50

推奨するように、LightCycler 480 SYBR Green Master, La Rocheを使用して、P C R 混合を実施した。P C R 増幅をLightCycler 480 machine (La Roche)において95 で5分間(1サイクル)実施し、続いて、95 で10秒間及び55~57 で10秒間のインキュベーションを45サイクル行った。各サンプルを3回反復でランした。内部標準として使用したハウスキーピング遺伝子は、ベータアクチン(アクチン)及びヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(H P R T 1)(geNorm analysis)であった。作成したP C R 曲線に基づいて、サイクル閾値(C t)を計算した。2 C t 法によって、相対的発現量を計算した。

【0114】

免疫蛍光アッセイ。

10

主にP. falciparum(3D7)の成熟シizontを含有する赤血球培養物由来の風乾したアセトン固定薄層塗抹標本を使用して、免疫蛍光アッセイを実施した。P B S - 1%ウシ血清アルブミンで希釈したH u - S P L - N S G血清を加湿チャンバー中、37 で1時間インキュベーションした。P B Sで洗浄した後、エバンスブルー対比染色(1/200)と共にP B Sで1/400希釈したA l e x a F l u o r コンジュゲートヤギ抗マウスI g G(Molecular Probes及びInvitrogen)を使用することによって、抗体を検出した。

【0115】

結果

実施例1: P P 2 1 (C R M P 9 7 - M S 3 融合構築物)の免疫原性

20

以下の動物モデル:

- ・B A L B - C マウス
- ・C 5 7 B L マウス
- ・Saimiri sciureusサル
- ・ヒト免疫原性マウスモデル(H I M M)

において、P P 2 1によって誘導された免疫応答を評価した(免疫不全N S Gマウスに移植したヒト脾臓組織由来の細胞をin vivoで免疫化し、免疫化動物由来の血清及び細胞を免疫アッセイに使用する)。

【0116】

通常、実験用マウスはミョウバンに対して応答不良であり、H I M Mへの注射経路ではミョウバンが使用不可能であるので、そして何よりも、本発明者らは、ヒトでは、M S P 3 L S Pとしての(髄膜炎菌又は肺炎球菌ワクチン中の)ミョウバンアジュバント添加したC R Mが非常に良好な応答を提供することを知っており、アジュバントではなく構築物の比較を目的としていたので、Montanide ISA 720を使用して、臨床実験において使用されたベンチマーク抗原M S P 3 - L S P(M S P 3 - 1の186~271領域をカバーする長い合成ペプチド)と比較して、全ての実験を実施した。

30

【0117】

それでもなお、実験用マウスにおいて、ミョウバンによる良好な免疫化も実施したところ、B a l b / Cでは2回の免疫化後であっても>25600の力価が得られ、C 5 7 b lでは3200~25600の力価が得られた(図19)。

【0118】

40

マウスにおいて本発明のP P 2 1 バイオ融合M S P 3 - 1 構築物を使用した場合、M S P 3 - L S Pと比較して、免疫原性の大きな改善が観察された。

使用した全てのモデルにおいて、P P 2 1は、ベンチマーク抗原M S P 3 - L S Pよりも高い血清学的応答のターゲット細胞親和性サブクラスを誘導する。

【0119】

1. 低用量は非常に効率的である: 他のC R M コンジュゲートワクチンのように、免疫原性の大きな増加が得られたが、これは、融合手順により、化学的コンジュゲーションと同じくらい効率的に生成物が生産されたことを示している。本発明者らは、極めて低い投与量をすぐに用いて、P P 2 1 1 µgのみと参照M S P 3 - L S P 10 µgとを比較した(過去、実験用マウスでは、10 µgは、臨床において用いられる15 µgと有意差がない

50

ことが見出された)。異なる手段によって、これらの差異を決定した。図6～9を参照のこと。結果は、4つ群のB a l b / C 及びC 5 7 b l マウスにおいて、4つの区別可能なバッチのP P 2 1 で再現可能であった。さらに、マウス及びリスザルにおいて、1 µgと比較して低い投与量、例えば0.2 µgに着目したP P 2 1 用量設定を検討した。免疫原性が高いので、本発明者らはまた、3回の免疫化と比較した2回のみの免疫化を検討した。

【0120】

2. A D C I ターゲットのより広範囲の認識：ワクチン構築物に含まれるペプチド「b」、「c」及び「d」は、A D C I において有効な抗体によってターゲティングされる区別可能なB細胞エпитープを規定する。図9に示されているように、P P 2 1 (右側パネル)をワクチン接種したマウスの血清では、現行M S P 3 - 1 - L S P (左側パネル)と比較して、それぞれ1及び10 µgにおいてこれらのペプチドとの反応性が高かったが、これは、P P 2 1 では、A D C I ターゲットの認識の規模及び範囲がより高度かつより広範であることを示唆している。この知見と一致して、P P 2 1 では、主にペプチ b 及び c - d を介して交差反応性を示すM S P 3 ファミリーのメンバー 6 個の認識パターンがより広範であった。これはまた、P P 2 1 によって誘発された抗体が、1個だけではなくメロゾイト表面上のタンパク質 6 個への抗体架橋によるトリガーを介してA D C I をトリガーすることを意味する。

10

【0121】

3. ヒトリンパ球における非常に高度なB細胞応答：より重要なことに、H I M M モデルにおいて評価したヒトB細胞応答は、同様の大きな改善を示し、免疫原性が40～100倍増加した(図10)。並行実験では、96アミノ酸の現行M S P 3 - L S P と対比してP P 2 1 を使用したところ、抗体力価は、P P 2 1 1 µgでは、M S P 3 - L S P 10 µgよりも20～100倍高かった。結果は、3つのH L A クラスに属する動物 5 匹の3つの群において再現可能であった。

20

【0122】

4. アジュバントとしてMontanide ISA720又はMF59のいずれかを使用した場合にも、結果は再現可能である(図14)。

【0123】

5. 寄生虫成分M S P 3 - L S P でヒトリンパ球をin vitroでチャレンジしたところ、高いI F N - 分泌が得られた(図11)。この重要な結果は、C R M T h エピトープが、plasmodium特異的M S R 3 T細胞エピトープを無効化しなかったので、寄生虫によるチャレンジの際にワクチン接種個体からT細胞ヘルプを期待することができ、必要な場合には迅速な既往抗体上昇の可能性が高くなることを示している。

30

【0124】

サイトカインプロファイルの詳細な分析は、応答細胞はTヘルパー1型タイプが優位であることを示している(図12は、C X C L 10及びT b e t を用いて得られた結果の例を示す)。

【0125】

6. 細胞親和性I g G 1 の優位：アイソタイプの研究により、強いT h 1 応答では予想どおり、ほぼ全てがI g G 1 から構成される細胞親和性アイソタイプ(これは、M S P 3 - L S P 免疫化個体においても優位なアイソタイプである)が非常に優位であることが明らかになった。これは、アジュバントとしてMontanide又はMF59のいずれかを使用した場合に当てはまった(図15及び16)。これらの結果は、ヒトモデルにおいて得られたが、それらは、志願者において誘発され得る将来の応答を非常によく表すものである。

40

【0126】

7. ネイティブな寄生虫タンパク質との反応性：I F A T (図13)及びウエスタンブロットにおいて、P P 2 1 ワクチン接種によって誘発された抗体は、寄生虫ネイティブタンパク質と反応した。合成抗原だけではなく、何よりも寄生虫タンパク質との抗体の反応性が、マラリア発作中にA D C I 保護機構を活性化するために、及び天然寄生虫チャレン

50

ジによる抗体応答の適切な増強のために重要な特徴である。

【0127】

8．非常に低い免疫化用量は効率的である：MSP3 - LSPについて、免疫化 1 回当たり 0.2 µg 及び 1 µg を 10 µg と比較して評価した（図 17）。PP21 用量 1 µg では、2 回目の免疫化後にプラトーに到達したのに対して、用量 0.2 µg では、ほぼ同じ高レベルの抗体に到達するために、3 回目の免疫化が必要であり、動物 1 匹は応答しなかった。それでもなお、1 µg プロファイルは、2 回の免疫化が十分であり得るので、検証に値し得ることを示している。

【0128】

9．南米 *Saimiri sciureus* サルでは、同様の高い免疫原性が観察される（図 20）：Montanide 720 をアジュバント添加した PP21 1 µg 及び 0.2 µg を使用して、免疫化に対して通常は応答不良の南米霊長類を免疫化した。1 µg では、マウスにおいて見られた力価に近い高い応答が達成され（図 18 を参照のこと）、0.2 µg では、力価は約 5 倍低かった（示さず）。本発明者らのブラジル人の同僚は、同じ実験における力価の比較をまだ実施していないが、このモデルにおいて用いた場合、MSP3 - LSP は非常に低免疫原性であった。

【0129】

10．免疫応答の持続時間は、顕著に改善する（図 8 上パネル及び下パネル）：長期分析により、必須成分の顕著な改善が示された；抗体応答の持続期間：PP21 又は LSP で免疫化したマウスを免疫後 6 カ月間経過観察した。6 カ月の時点において、残存力価は、MSP3 - LSP を使用して得られたピークよりも高いように、力価の低下は漸進的であるが遅い。力価は、現行 MSP3 - LSP では約 1 / 50000 の範囲であったのと比較して、PP21 では、6 カ月間超にわたって依然として 1 / 200000 ~ 1 / 300000 の範囲内であった。

【0130】

実施例 2：PP25（CRM97 - LSA3 融合構築物）の免疫原性

LSA3 は、多くの魅力的な特徴を有する前赤血球期抗原であり、保護志願者と非保護志願者のディファレンシャルな応答の対比によって発見され、系統間で保存されており、高等霊長類及びチンパンジーを含む広範囲の動物において非常に抗原性かつ免疫原性であり、後者の場合には、スポロゾイト期のヒト寄生虫 *Plasmodium falciparum* による大規模チャレンジに対して保護的な免疫応答を誘導する。保護は、抗原特異的インターフェロンガンマ応答に関連する。コンジュゲートもいかなる融合も伴わない LSA3（DG729）を使用したコントロール構築物と PP25 の免疫原性を比較した。免疫化及び免疫分析の条件は、PP21 に関する上記のものと同一である。

【0131】

低用量で抗原を使用した場合であっても、PP21 における MSP3 の場合と同様に、LSA3 - CRM97 バイオ融合物でも同様の抗体応答の大きな増加が観察された。担体を有しない LSA3（DG729）は既に、IFN-γ 応答の非常に優れたインデューサーがあるので、IFN-γ 応答の増加も見られたがあまり顕著ではなかった。

【0132】

balb/c 及び C57bl マウスにおいて記録された増加は、ヒト免疫原性モデルにおいても確認された。

【0133】

本発明者らはさらに、抗 LSA3 抗体力価と、スポロゾイト期の *P. falciparum* 寄生虫の阻害との間の非常に強い相関を示した。

【0134】

図 21 ~ 26 に示されている結果を参照のこと。

【0135】

実施例 3：PP23（MSP3 - 2 - CRM97 - MSP3 - 3 融合構築物）の免疫原性

10

20

30

40

50

MSP3-1とCRM及びLSA3との融合に依拠するPP21を用いて得られた結果は、CRMを有する構築物（PP23と称される）において、赤血球期由来の他の抗原、例えばMSP3-2及びMSP3-3を使用して再現可能であることが証明された。実際、HIMMモデルに移植したヒトリンパ球では、構築物PP23（MSP3-2-CRMP97-MSP3-3）によって、強いB細胞応答及びT細胞応答が誘発され（図27）、力価は、Montanide中MSP3-2-CTのみで免疫化したマウスよりも平均10倍高い。抗体サブクラスは、ADCI機構において単球と協調して作用することができる主要な細胞親和性クラスであるIgG1クラスが優位であった。MSP3-2又はMSP3-3のいずれかによってin vitroで再刺激したPP23免疫化ヒトリンパ球によるIFN-分泌によって測定したところ同様に強いT細胞応答が誘導された。

10

【0136】

実施例4：LSA5-CRM

PEBS（前赤血球期及び血液期抗原）としても公知の肝臓期抗原-5（LSA-5）又はSR11.1（11.1 P.falciparum遺伝子のサブ領域）は、単一分子中にMSP3及びLSA3の両方の特徴を併せ持つ。それは、メガ遺伝子Pf11.1の残りとしてそれを区別するユニークな配列を含有し、系統間で完全に保存されている。それは、前赤血球期及び無性血液期の両方に対する保護を誘導するので、放射線弱毒化スポロゾイトで免疫化した志願者由来の血清によってそれが認識されたことはユニークである。それは、前赤血球期及び血液期の両方において発現される。前赤血球期に対するLSA5の保護的役割は、収束in vitro侵入阻害研究、抗LSA5抗体の受動伝達によるin vivo保護によって、及びリコンビナントLSA5のワクチン接種によるチャレンジから保護された霊長類における概念実証研究によって裏付けられている。血液期に対して、天然に存在するヒト抗PfLSA5抗体及び人工的に誘導された動物抗PfLSA5抗体は両方とも、寄生虫殺傷ADCI媒介性効果を発揮する。流行地域の個体では、抗原性が高く、相関免疫（すなわち、曝露によって誘導される保護）を有する個体では、IgG3抗体が優位である。多数の疫学的研究により、臨床的マラリア発作に対する保護と、薬物処置脳マラリアの予後の改善との強い関連性が見出された。最後に、LSA5は高度に免疫原性であり、マウスにおいて顕著に高い力価を達成し、MSP3免疫化マウス由来の血清よりも高いADCI活性を達成する。

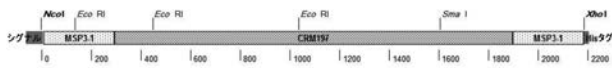
20

【0137】

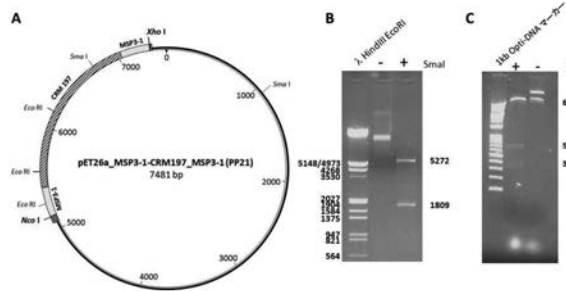
E. coliにおいて、LSA5とCRM197とのバイオ融合物（その原理は先の3つの実施例と同様である）を発現させ、その抗原性を確認し、予備的免疫原性研究を行った。CRMとの融合物を使用した場合、LSA5免疫原性は非常に高かった（図28）；BALB/cマウス（n=5）において、バイオ融合LSA5-CRM/Montanide ISA720用量10 µgと1 µgの免疫原性を、比較した。実験条件は、図8に記載されているMSP3を用いたものと同様であった。0日目、14日目及び28日目に、バイオ融合LSA5-CRM/Montanide ISA720による免疫化を実施した（矢印）。0日目、7日目、21日目、42日目に収集した血清を使用して、抗原としてのLSA5-LSPに対するELISA力価測定によって、血清抗体検出を実施した。

30

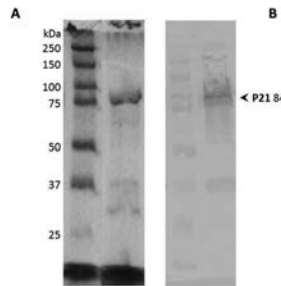
【図 1】



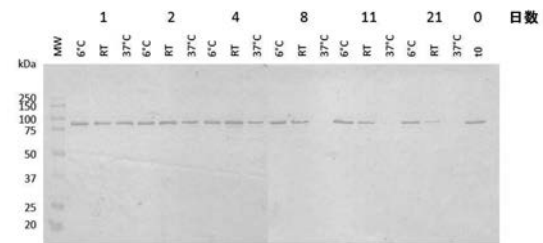
【図 2】



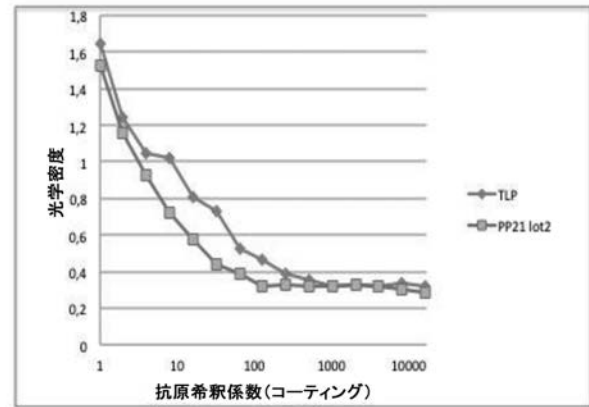
【図 3】



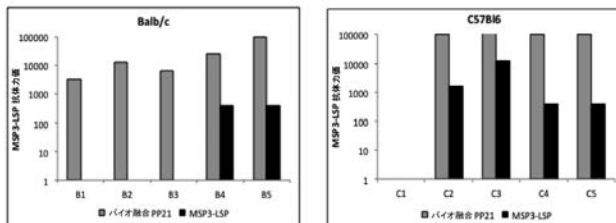
【図 4】



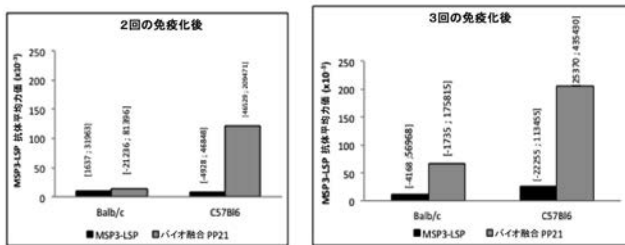
【図 5】



【図 6】

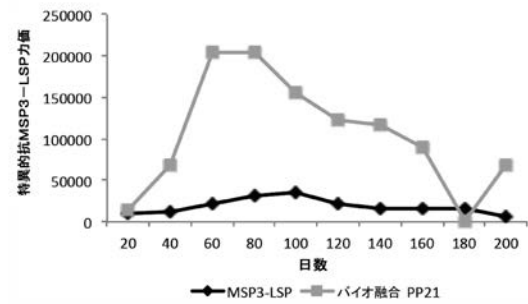


【図 7】

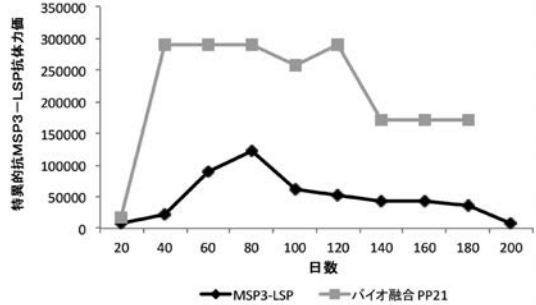


【図 8 - 1】

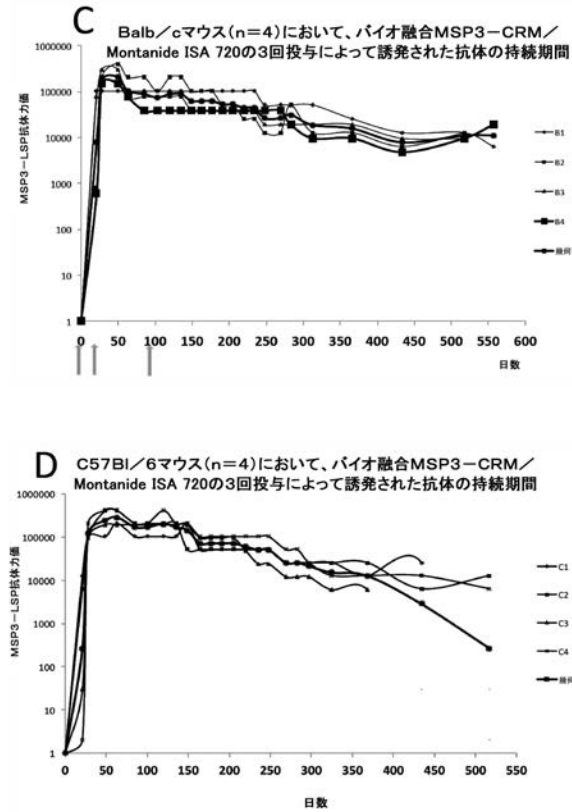
A MSP3-LSP又はバイオ融合PP21 (montanide)のいずれかで免疫化したBalb/cマウスにおけるAb応答の持続期間



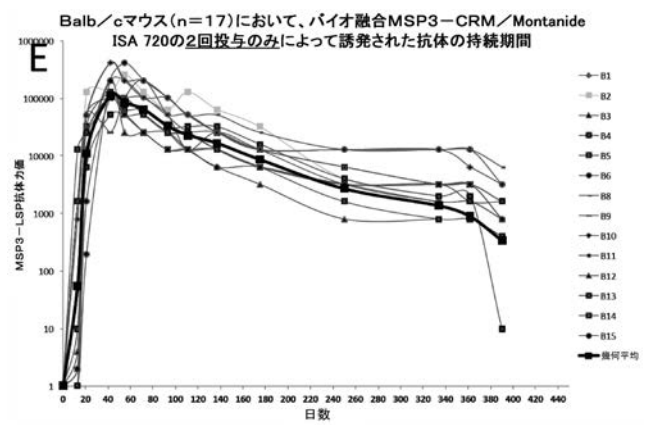
B バイオ融合PP21又はMSP3-LSP(montanide)のいずれかで免疫化したC57Bl/6マウスにおけるAb応答の持続期間



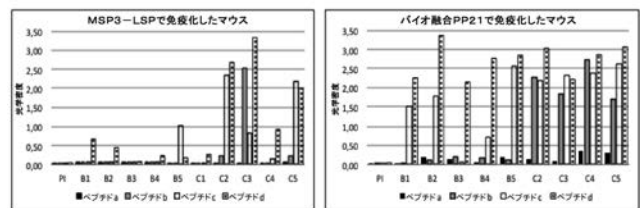
【図 8 - 2】



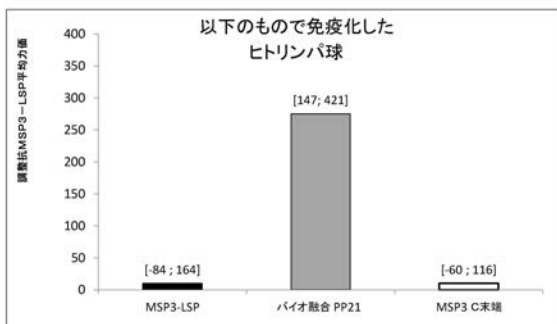
【図 8 - 3】



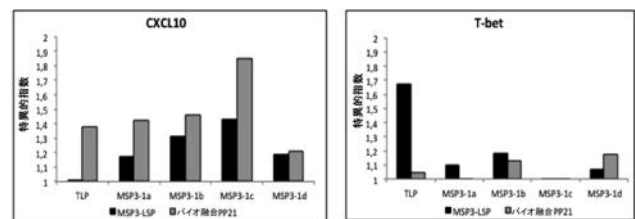
【図 9】



【図 10】

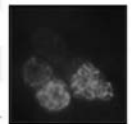


【図 12】

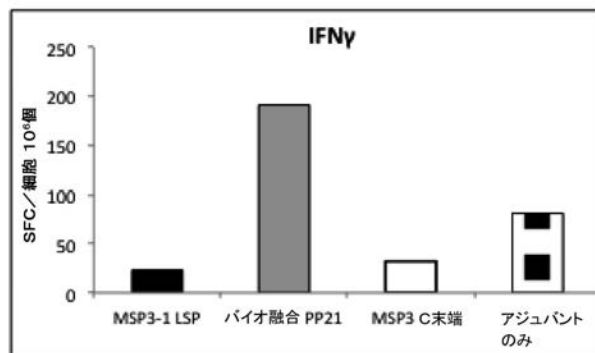


【図 13】

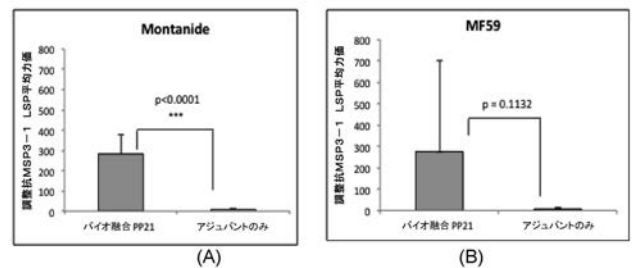
免疫化抗原	Pf 3D7成熟シゾンに対するIFAT力価
MSP3-C末端	陰性
バイオ融合MSP3-1	160 - 320
MSP3-1 LSP	0 - 20
アジュバントのみ	陰性



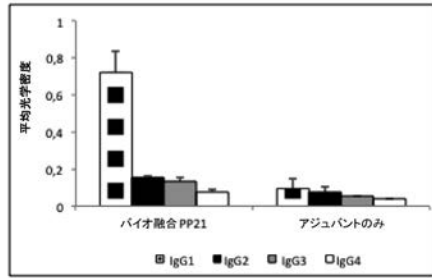
【図 11】



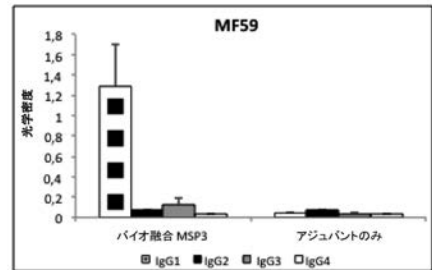
【図 14】



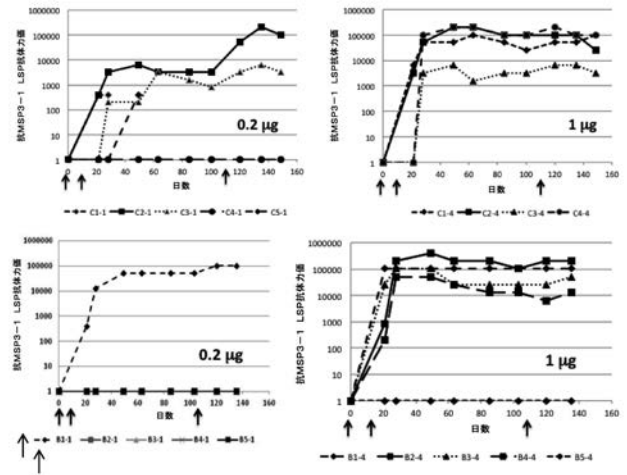
【図 15】



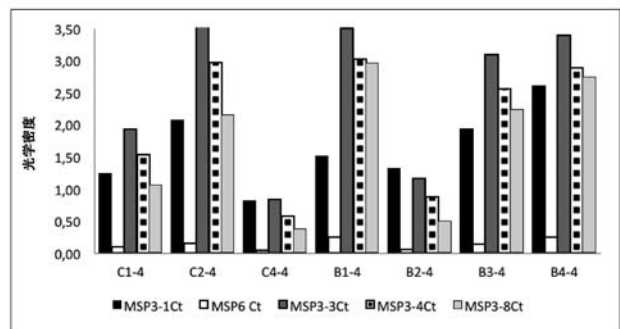
【図 16】



【図 17】



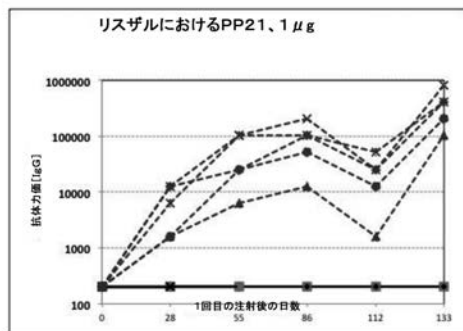
【図 18】



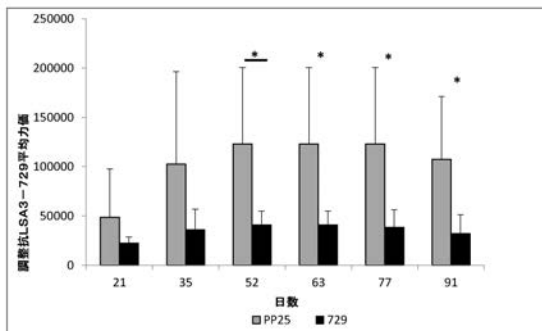
【図 19】

	C1 PP21	C2 PP21	C3 PP21	C4 PP21	B1 PP21	B2 PP21	B3 PP21	B4 PP21	B5 PP21
J21 (2回の 注射後)	400	200	0	1600	>>> 25600	>>> 25600	>>> 25600	>>> 25600	>>> 25600
J35 (3回の 注射後)	6400	25600	3200	6400	>>> 25600	>>> 25600	>>> 25600	>>> 25600	>>> 25600

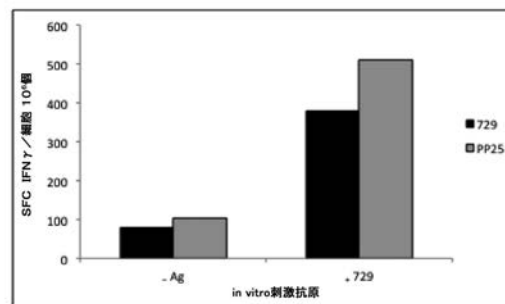
【図 20】



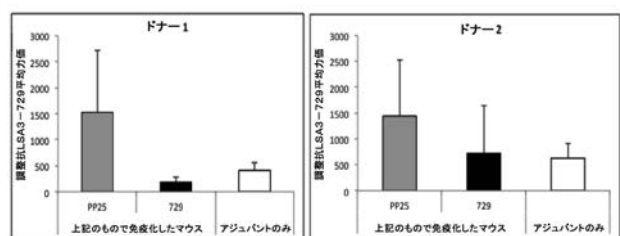
【図 21】



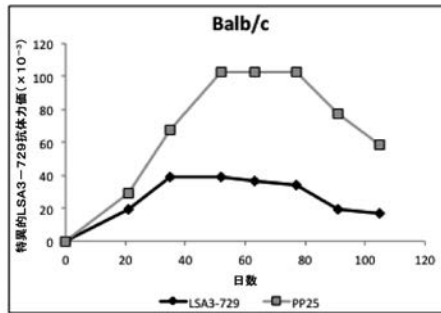
【図 22】



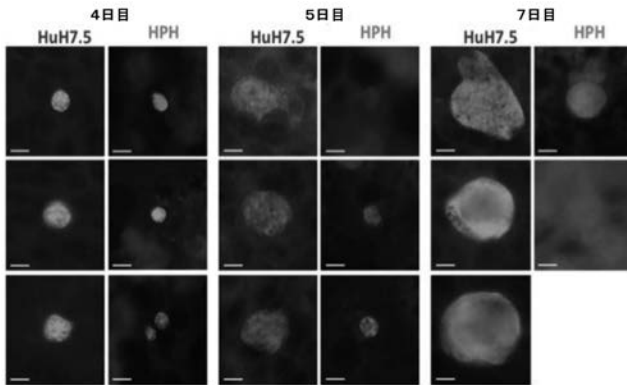
【図 23】



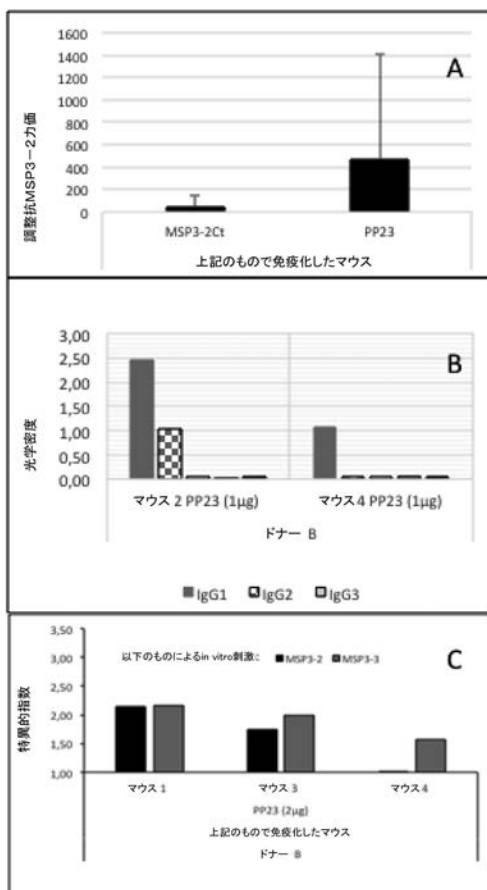
【図 24】



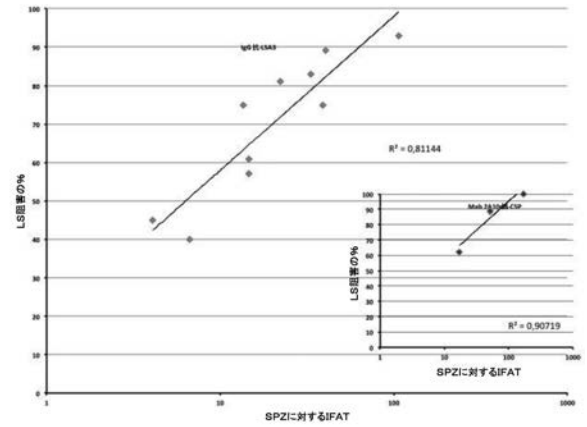
【図 25】



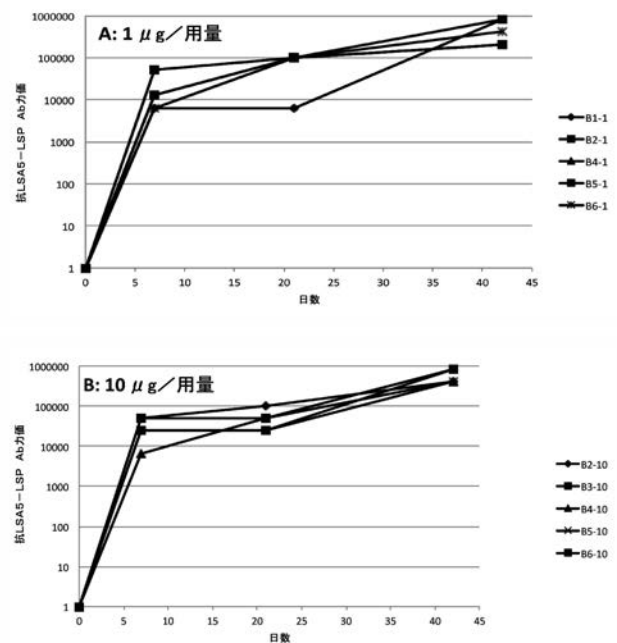
【図 27】



【図 26】



【図 28】



【配列表】

2019526274000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/SG2017/050369

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/015 A61K39/385 A61K39/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/50077 A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; COSTE MICHEL [FR]; LOBET YVES [BE]; ME) 31 August 2000 (2000-08-31)	1-9, 12-17
Y	page 1, lines 3-8 page 2, lines 3-31 page 5, lines 3-11 page 3, lines 18-21 page 5, line 16 - page 6, line 14 page 10, lines 22-28 page 11, lines 29-32 ----- -/--	10,11

☒ 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

20 September 2017

Date of mailing of the international search report

28/09/2017

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Page, Michael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/SG2017/050369

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A. TOURE-BALDE ET AL: "Evidence for Multiple B- and T-Cell Epitopes in Plasmodium falciparum Liver-Stage Antigen 3", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 77, no. 3, 12 January 2009 (2009-01-12), pages 1189-1196, XP055313334, US ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.00780-07 the whole document	5-8
A	DRAPER SIMON J ET AL: "Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines", VACCINE, vol. 33, no. 52, 11 October 2015 (2015-10-11), pages 7433-7443, XP029344008, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2015.09.093 abstract 2. Antigen Candidates, Box 1: Anticipated future developments for protein-based malaria vaccines.	1-17
A	Sirima, S: "Protection against Malaria by MSP3 Candidate Vaccine", New England Journal of Medicine, vol. 365 15 September 2011 (2011-09-15), pages 1062-1064, XP055313330, DOI: 10.1056/NEJMc1100670 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc1100670 [retrieved on 2016-10-25] the whole document	1-17
A	MOORTHY V S ET AL: "Malaria vaccine developments", THE LANCET, THE LANCET PUBLISHING GROUP, GB, vol. 363, no. 9403, 10 January 2004 (2004-01-10), pages 150-156, XP004764081, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(03)15267-1 abstract Pre-erythrocytic vaccines, Blood-stage vaccines: invasion and complication, Vaccine development in the post-genomic era; figure 1	1-17

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/SG2017/050369

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2005/058941 A2 (ELAN PHARM INC [US]; WYETH CORP [US]; ARUMUGHAM RASAPPA G [US]; PRASAD) 30 June 2005 (2005-06-30) paragraphs [0011] - [0013], [0066] - [0070], [0109]; claims 1,2,11,12,74,77,86,87 -----	10,11 1-9, 12-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/SG2017/050369

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0050077	A1	31-08-2000	AR	022758 A1	04-09-2002
			AU	3158900 A	14-09-2000
			CA	2363118 A1	31-08-2000
			EP	1156825 A2	28-11-2001
			JP	2002537354 A	05-11-2002
			WO	0050077 A1	31-08-2000

WO 2005058941	A2	30-06-2005	AR	047062 A1	04-01-2006
			AU	2004299512 A1	30-06-2005
			AU	2011200785 A1	17-03-2011
			BR	PI0417689 A	03-04-2007
			CA	2549552 A1	30-06-2005
			CN	1934127 A	21-03-2007
			CR	8445 A	20-02-2008
			DK	2336147 T3	10-06-2014
			EA	200601168 A1	29-12-2006
			EA	200702209 A1	28-02-2008
			EC	SP066646 A	20-12-2006
			EP	1699810 A2	13-09-2006
			EP	2336147 A2	22-06-2011
			EP	2460813 A1	06-06-2012
			EP	2479184 A2	25-07-2012
			ES	2474173 T3	08-07-2014
			HK	1104826 A1	18-03-2016
			HK	1157795 A1	03-06-2016
			IL	176250 A	30-11-2011
			IL	213156 A	28-05-2014
			JP	4696079 B2	08-06-2011
			JP	2007534650 A	29-11-2007
			KR	20070026363 A	08-03-2007
			KR	20110117210 A	26-10-2011
			MX	PA06006821 A	23-08-2006
			MY	144231 A	15-08-2011
			PT	2336147 E	16-07-2014
			SG	149039 A1	29-01-2009
			SG	182189 A1	30-07-2012
			SI	EP2336147 T1	29-08-2014
			TW	I357414 B	01-02-2012
			TW	201206956 A	16-02-2012
			UA	84728 C2	25-11-2008
			US	2007161088 A1	12-07-2007
			US	2008145373 A1	19-06-2008
			US	2008299074 A1	04-12-2008
			US	2011287042 A1	24-11-2011
			US	2012207706 A1	16-08-2012
			WO	2005058941 A2	30-06-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	
A 6 1 K 39/015 (2006.01)	A 6 1 K 39/015	
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 0 7 K 14/195	Z N A
C 0 7 K 14/285 (2006.01)	C 0 7 K 14/285	
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	
C 1 2 N 15/30 (2006.01)	C 1 2 N 15/30	
C 0 7 K 14/445 (2006.01)	C 0 7 K 14/445	

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

F ターム(参考) 4B065 AA01Y AA23Y AA26X AA86Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 4C085 AA03 BA06 BB11 DD23 DD62 EE01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 CA22 DA86 EA22 EA31
 FA74