

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4516748号  
(P4516748)

(45) 発行日 平成22年8月4日(2010.8.4)

(24) 登録日 平成22年5月21日(2010.5.21)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 39/39	(2006.01)	A 61 K 39/39
A 61 K 39/00	(2006.01)	A 61 K 39/00
A 61 K 39/385	(2006.01)	A 61 K 39/385
A 61 K 39/29	(2006.01)	A 61 K 39/29
A 61 K 39/12	(2006.01)	A 61 K 39/12

Z

請求項の数 18 (全 110 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-528575 (P2003-528575)
(86) (22) 出願日	平成14年9月16日 (2002.9.16)
(65) 公表番号	特表2005-517632 (P2005-517632A)
(43) 公表日	平成17年6月16日 (2005.6.16)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2002/004132
(87) 國際公開番号	W02003/024481
(87) 國際公開日	平成15年3月27日 (2003.3.27)
審査請求日	平成17年9月7日 (2005.9.7)
(31) 優先権主張番号	60/318,994
(32) 優先日	平成13年9月14日 (2001.9.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/374,145
(32) 優先日	平成14年4月22日 (2002.4.22)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	503261085 サイトスバイオテクノロジー アーゲー スイス国 シーエイチ-8952 チューリッヒ-シュリーレン, ヴァギシュトラッセ 25
(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(72) 発明者	マオラー, パトリック スイス国 シーエイチ-8400 ヴィンタートゥール, リヒエンベルクシュトラッセ 38

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ウイルス様粒子中の免疫賦活物質のパッケージ化：調製法および使用法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 組換えウイルス様粒子であって、RNA バクテリオファージ Q コートタンパク質のウイルス様粒子である組換えウイルス様粒子；及び

(b) T C C A T G A C G T T C C T G A A T A A T, T C C A T G A C G T T C C T G A C G T T, G G G G T C A A C G T T G A G G G G G G, 及び

G G G G G G G G G G A C G A T C G T C G G G G G G G G G G, からなる群から選択される配列を含む非メチル化 CpG 含有オリゴヌクレオチドであって

、前記組換えウイルス様粒子内にパッケージ化されている非メチル化 CpG 含有オリゴヌクレオチド

を含む、動物の免疫応答を高めるための組成物。

## 【請求項 2】

前記ウイルス様粒子が RNA バクテリオファージ Q コートタンパク質のウイルス様粒子であり、前記 RNA バクテリオファージ Q コートタンパク質が配列番号 10 のアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記非メチル化 CpG 含有オリゴヌクレオチドが配列 G G G G G G G G G G A C G A T C G T C G G G G G G G G G G からなる、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

10

20

前記非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドがリン酸骨格の 1 つまたは複数のホスホロチオエート修飾体を含むか、あるいは該オリゴヌクレオチドの該リン酸骨格のそれぞれのリン酸部分がホスホロチオエート修飾体である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

少なくとも 1 つの抗原を更に含んでなる請求項 1 に記載の組成物であって、当該少なくとも一つの抗原が少なくとも 1 つの共有結合によって前記ウイルス様粒子と結合しており、前記少なくとも 1 つの抗原がウイルスのまたは腫瘍の細胞傷害性 T 細胞エピトープである、組成物。

【請求項 6】

前記共有結合が非ペプチド結合である、請求項 5 に記載の組成物。

10

【請求項 7】

前記抗原が腫瘍の抗原である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記腫瘍の抗原が、

- ( a ) H e r 2 、
- ( b ) G D 2 、
- ( c ) E G F - R 、
- ( d ) C E A 、
- ( e ) C D 5 2 、
- ( f ) C D 2 1 、
- ( g ) ヒト・メラノーマ・タンパク質 g p 1 0 0 、
- ( h ) ヒト・メラノーマ・タンパク質 メラン A / M A R T - 1 、
- ( i ) チロシナーゼ、
- ( j ) N A 1 7 - A n t タンパク質、
- ( k ) M A G E - 3 タンパク質、
- ( l ) p 5 3 タンパク質、および
- ( m ) H P V 1 6 E 7 タンパク質

20

からなる群から選択される、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記抗原が連結配列によって前記ウイルス様粒子と結合している、請求項 5 に記載の組成物。

30

【請求項 10】

請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の組成物の、動物の免疫応答を高めるための医薬の製造における使用。

【請求項 11】

( i ) 組換えウイルス様粒子であって、H B c A g 又は R N A バクテリオファージ Q コートタンパク質のウイルス様粒子である組換えウイルス様粒子；及び

- ( i i ) T C C A T G A C G T T C C T G A A T A A T 、
- T C C A T G A C G T T C C T G A C G T T 、
- G G G G T C A A C G T T G A G G G G G 、及び
- G G G G G G G G G G A C G A T C G T C G G G G G G G G G G G G 、

40

からなる群から選択される配列を含む非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドであって、前記組換えウイルス様粒子内にパッケージ化されている非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチド

を含んでなる動物の免疫応答を高めるための組成物を製造する方法であって、

- ( a ) 前記ウイルス様粒子を前記非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドと共にインキュベートし、
  - ( b ) R N a s e を加え、及び
  - ( c ) 前記組成物を精製する
- ことを含む方法。

50



応答を高めるための、組成物および方法を提供する。本発明を使用して、腫瘍および慢性のウィルス性疾患、およびアレルギーおよび他の慢性疾患を治療するのに特に有用な、強力で持続的なT細胞応答を誘導することができる。

【背景技術】

【0002】

免疫系の本質は、2つの別個の基礎杭上に成り立っている：1つは、特異的又は適応免疫であり、これは比較的遅い応答動態および記憶能力によって特徴付けられる；もう1つは、迅速な応答動態を示すが記憶が欠けている、非特異的又は先天性免疫である。リンパ球は、適応免疫系の重要な役割を果たすものである。それぞれのリンパ球は、独特の特異性の抗原-受容体を発現する。エフェクターによって抗原を認識することにより、リンパ球は増殖し、エフェクター機能が進行する。少数のリンパ球が所与の抗原又は病原体に関する特異性を示し、エフェクター応答、したがって適応免疫系の遅い動態を測定することができる前に、膨大な増殖が通常必要とされる。広がるリンパ球の大部分は生き延び、抗原の除去の後にある程度のエフェクター機能を維持することができるので、適応免疫系は、2度目に抗原に遭遇すると素早く反応する。これが、その記憶能力の基盤である。

10

【0003】

リンパ球に関する状況とは対照的に、病原体に関する特異性が、機能を獲得するために広がらなければならないいくつかの細胞に限られる場合、先天性免疫系の細胞および分子は、通常多数存在し、病原体と関連がある限られた数の不变の特徴を認識する (Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr., Cell 91: 295 ~ 298 (1997))。このような型の例には、リポ多糖 (LPS)、非メチル化状態のCGが豊富なDNA (CpG) 又は二本鎖RNAがあり、これらはそれぞれ細菌およびウィルス感染に特異的である。

20

【0004】

免疫学における大部分の研究は、適応免疫系に焦点が当てられてきており、ごく最近、先天性免疫系が興味の焦点に入ってきてている。歴史的には、適応免疫系と先天性免疫系を、ほとんど共通点がない2つの別個のものとして、処理および分析した。なぜ抗原が、先天性免疫を刺激するアジュバントと共に施用すると、特定の免疫系に関してより一層免疫原性があったのか、数人の研究者が不思議に思ったのは、この差異であった (Sotomayor, E. M. 他, Nat. Med. 5: 780 (1999); Diehl, L. 他、Nat. Med. 5: 774 (1999); Weigle, W. O. 他, Adv. Immunol. 30: 159 (1980))。しかしながら、この質問に出される答えは、免疫系を理解するため、および防御免疫と自己免疫の間のバランスを把握するために重要である。

30

【0005】

先天性免疫系、特に自己特異的なT細胞応答を故意に誘導する、T細胞に関するAPCの活性化の合理的な操作によって、T細胞系腫瘍を治療するための手段が与えられる。したがって、最新の療法の焦点は、持続的なT細胞応答を誘導するための、抗原担体としての活性化樹状細胞 (DC) の使用に基づくものである (Nestle 他, Nat. Med. 4: 328 (1998))。同様に、先天性免疫系のインビボの活性化物質、CpG又は抗CD40抗体などを、腫瘍細胞と共に施して、その免疫原性を高める (Sotomayor, E. M. 他, Nat. Med. 5: 780 (1999); Diehl, L. 他、Nat. Med. 5: 774 (1999))。

40

【0006】

先天性免疫を刺激する因子によるAPCの全身活性化は、自己特異的リンパ球および自己免疫性を誘発する原因となる可能性がしばしばある。活性化は、共賦活分子又はサイトカイン、IL-12又はIFNなどの、増大した発現をもたらす可能性がある。この考えは、LPSおよび甲状腺エキスを投与することによって、免疫寛容を圧倒し自己免疫甲状腺炎を誘発することができるという観察と、適合性がある (Weigle, W. O. 他, Adv. Immunol. 30: 159 (1980))。さらに、トランスジェニック・

50

マウスのモデルにおいて、自己ペプチド単独の投与によって、別の経路によって A P C を活性化させない限りは、自己免疫を引き起こすことはできないことが最近示された (Garza, K. M. 他、J. Exp. Med. 191: 2021 (2000))。先天性免疫と自己免疫疾患の間の関連は、L P S、ウィルス感染又はA P C の全身活性化は、末梢の免疫寛容の確立を遅らせるかあるいは妨げるという観察によって、さらに強調される (Vella, A. T. 他、Immunity 2: 261 (1995); Ehl, S. 他、J. Exp. Med. 187: 763 (1998); Maxwell, J. R. 他、J. Immunol. 162: 2024 (1999))。このようにして、先天性免疫は自己特異的リンパ球の活性化を高めるだけでなく、それらのその後の排除も阻害する。これらの発見は、腫瘍生物学および慢性のウィルス性疾患の制御に広がることができる。 10

#### 【0007】

副組織適合抗原、H Y - 抗原などを用いた免疫化の後の、細胞傷害性 T リンパ球 (C T L ) 応答の誘導には、T ヘルパー細胞 (T h 細胞) の存在が必要である (Husmann, L. A., and M. J. Bevan, Ann. NY. Acad. Sci. 532: 158 (1988); Guerder, S., and P. Matzinger, J. Exp. Med. 176: 553 (1992))。クロス・プライミングによって、すなわちクラス I 経路に達する外来性の抗原で初回抗原刺激を与えることによって、誘導される C T L 応答も、T h 細胞の存在を必要とすることが示されてきている (Bennett, S. R. M. 他、J. Exp. Med. 186: 65 (1997))。これらの観察は、腫瘍療法に関する重要な結果を有しており、この場合 T ヘルパー細胞は、腫瘍細胞による防御 C T L 応答を誘導するために重要である可能性がある (Ossendorp, F. 他、J. Exp. Med. 187: 693 (1998))。 20

#### 【0008】

活性化 T h 細胞上の 1 つの重要なエフェクター分子は、B 細胞、マクロファージ、および樹状細胞 (D C ) 上の C D 4 0 と相互作用する、C D 4 0 リガンド (C D 4 0 L ) である (Foy, T. M. 他、Annu. Rev. Immunol. 14: 591 (1996))。B 細胞上の C D 4 0 の誘発は、イソ型を変えるため、および B 細胞の記憶を生み出すために必須である (Foy, T. M. 他、Annu. Rev. Immunol. 14: 591 (1996))。さらに最近、マクロファージおよび D C 上の C D 4 0 を刺激することによって、それらの活性化および成熟がもたらされることが示された (Cella, M. 他、Curr. Opin. Immunol. 9: 10 (1997); Banchereau, J., and R. M. Steinman, Nature 392: 245 (1998))。具体的には D C は、共賦活分子を上方制御し、活性化によって I L - 1 2 などのサイトカインを生成する。興味深いことに、この C D 4 0 L 仲介型の D C の成熟は、C T L 応答に対するヘルパーの影響の原因であるようである。実際、T h 細胞による C D 4 0 の誘発によって、D C が C T L - 応答を開始することができることが最近示されていている (Ridge, J. P. 他、Nature 393: 474 (1998); Bennett, S. R. M. 他、Nature 393: 478 (1998); Schoenberger, S. P. 他、Nature 393: 480 (1998))。このことは、T h 細胞が C T L と同じ A P C 上のリガンドを認識しなければならないという初期の観察と一致し、同族の相互作用が必要とされることが示される (Bennett, S. R. M. 他、J. Exp. Med. 186: 65 (1997))。したがって、T h 細胞による C D 4 0 L 仲介型の刺激は、D C の活性化をもたらし、これは後に C T L - 応答を初回抗原により刺激することができる。ヒトでは、I 型インターフェロン、特にインターフェロン α および β が、I L - 1 2 と同じくらい重要である可能性がある。 40

#### 【0009】

これらの T h 依存性 C T L 応答とは対照的に、ウィルスは、T 細胞の助けなしで防御 C T L 応答を誘導することができることが多い (概説に関しては、(Bachmann, M. F. 他、J. Immunol. 161: 5791 (1998) を参照のこと)。具体的には、リンパ球性脈絡髄膜炎ウィルス (L C M V) (Leisst, T. P. 他、J. Im 50

munol. 138: 2278 (1987); Ahmed, R. 他、J. Virol. 62: 2102 (1988); Battagay, M. 他、Cell Immunol. 167: 115 (1996); Borrow, P. 他、J. Exp. Med. 183: 2129 (1996); Whitmire, J. K. 他、J. Virol. 70: 8375 (1996))、水疱性口内炎ウイルス(VSV)(Kundig, T. M. 他、Immunity 5: 41 (1996))、インフルエンザ・ウイルス(Trapp, R. A. 他、J. Immunol. 155: 2955 (1995))、ワクシニア・ウイルス(Lewis, T. P. 他、Scand. J. Immunol. 30: 679 (1989))、およびエクトロメリア・ウイルス(Buller, R. 他、Nature 328: 77 (1987))は、CD4<sup>+</sup> T細胞を欠いているか、あるいはクラスII又はCD40の発現に欠陥があるマウスにおいて、CTL応答を誘導することができた。ウイルスによるこのTh細胞依存性CTL誘発に関する機構は、現在理解されていない。さらに、大部分のウイルスはTh細胞依存性CTL応答を完全に刺激するわけではないが、ウイルス特異的CTL活性は、Th細胞欠陥マウスでは低下する。したがって、Th細胞は抗ウイルスCTL応答を高める可能性があるが、この助けの機構は今だに完全には理解されていない。DCは、クロス・プライミングによりインフルエンザ由来の抗原をディスプレイすることが、最近示されてきている(Albert, M. L. 他、J. Exp. Med. 188: 1359 (1998); Albert, M. L. 他、Nature 392: 86 (1998))。したがって、副組織適合抗原および腫瘍抗原に関して示されるのと同様に(Ridge, J. P. 他、Nature 393: 474 (1998); Bennett, S. R. M. 他、Nature 393: 478 (1998); Schoenenger, S. P. 他、Nature 393: 480 (1998))、Th細胞が、DC上でのCD40誘発によって、CTLの誘導を助長する可能性があることが考えられる。したがって、CD40L又は抗CD40抗体を使用してCD40を刺激することによって、ウイルス又は腫瘍細胞による刺激後に、CTL誘導を高めることができる。

## 【0010】

しかしながら、CD40LはDCの重要な活性化物質であるが、免疫応答中にDCの成熟および活性化を刺激することができる、他の分子が存在するようである。実際CD40は、LCMV又はVSVに特異的なCTLの誘導に関して測定できるほど関連があるわけではない(Ruedl, C. 他、J. Exp. Med. 189: 1875 (1999))。したがって、VSV特異的CTL応答は、CD4<sup>+</sup> T細胞の存在に部分的に依存し(Kuinding, T. M. 他、Immunity 5: 41 (1996))、このヘルパー効果はCD40Lによって仲介されるわけではない。免疫応答中のDCの成熟を誘発する、エフェクター分子に関する候補には、TranceおよびTNF<sup>+</sup>がある(Bachmann, M. F. 他、J. Exp. Med. 189: 1025 (1999); Sallusto, F., and A. Lanzavecchia, J. Exp. Med. 179: 1109 (1994))。

## 【0011】

精製タンパク質のみを投与することは、強力な免疫応答を誘導するのに通常は十分ではなく、単離抗原は一般に、アジュvantと呼ばれる補助物質と一緒に与えなければならないことは十分に認められている。これらのアジュvant中には、急速な分解に対して投与される抗原が保護されており、アジュvantによって、低レベルの抗原の長期の放出がもたらされる。

## 【0012】

単離タンパク質とは異なり、ウイルスは、T細胞の助力によってかつ助力なしで、任意のアジュvantの不在下において迅速で有効な免疫応答を誘導する(Bachmann & Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15: 235~270 (1997))。ウイルスはいくつかのタンパク質からなることが多いが、それらはその単離要素よりも一層強力な免疫応答を誘導することができる。B細胞応答に関しては、ウイルスの免疫原性に関する1つの重要な要因は、表面エピトープの反復性および配列であ

ることが知られている。多くのウィルスは、B細胞上でエピトープ特異的免疫グロブリンを効率よく架橋させるエピトープの通常の配列を示す、準結晶表面を示す (Bachmann & Zinkernagel, Immunol Today 17: 553~558 (1996))。B細胞上での表面免疫グロブリンのこの架橋は、細胞周期の進行およびIgM抗体の生成を直接誘導する、強力な活性化シグナルである。さらに、このような誘発B細胞はTヘルパー細胞を活性化させることができ、次にB細胞におけるIgMからIgG抗体生成の変化、および長命B細胞記憶の発生を誘導し、これらは任意のワクチン接種の目的である (Bachmann & Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15: 235~270 (1997))。ウィルスの構造は、自己免疫疾患における、かつ病原体に対する本来の応答の一部分として、抗-抗体の生成とも関連がある (Fehr, T. 他, J. Exp. Med. 185: 1785~1792 (1997) を参照のこと)。したがって、整然とした反復配列で編成されたウィルス粒子上の抗原は、非常に免疫原性がある。なぜならこれらは、B細胞を直接活性化させることができるからである。

#### 【0013】

強力なB細胞応答に加えて、ウィルス粒子は、細胞傷害性T細胞応答、免疫系の他の重要な部門の発生を誘導することもできる。これらの細胞傷害性T細胞は、HIV又はB型肝炎ウィルスなどの非細胞変性ウィルスを排除するため、および腫瘍を根絶するために特に重要である。細胞傷害性T細胞は、元の抗原は認識しないが、MHCクラスI分子と結合するそれらの分解生成物は認識する (Townsend & Bodmer, Ann. Rev. Immunol. 7: 601~624 (1989))。マクロファージおよび樹状細胞は、外来性ウィルス粒子を取り込み加工することができ（ただし、その可溶性、単離要素はできない）、生じた分解生成物を細胞傷害性T細胞に掲示することができ、それらの活性化および増殖をもたらす (Kovacsics-Bankowski 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4942~4946 (1993); Bachmann 他, Eur. J. Immunol. 26: 2595~2600 (1996))。

#### 【0014】

抗原としてのウィルス粒子は、その単離要素に優る2つの利点を示す：（1）それらの非常に反復的な表面構造のために、ウィルス粒子は、B細胞を直接活性化させることができ、高い抗体力値および長時間続くB細胞の記憶をもたらす；および（2）可溶性タンパク質ではなく、ウィルス粒子は、ウィルスが非感染性であり、アジュvantが存在しない場合でも、細胞傷害性T細胞応答を誘導するための能力を有している。

#### 【0015】

いくつかの新しいワクチン戦略は、ウィルスの固有の免疫原性を利用するものである。これらの手法のいくつかは、ウィルス粒子の粒子的性質に焦点を当てている；たとえば、ラテックス・ビーズおよび抗原からなるワクチンを開示する、Harding, C. V. and Song, R. (J. Immunology 153: 4925 (1994))；酸化鉄ビーズおよび抗原からなるワクチンを開示する、Kovacsics-Bankowski, M. 他 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4942~4946 (1993))；抗原でコーティングされたコア粒子を開示する、Kossovsky, N. 他への米国特許第5,334,394号；共有結合した1つ又は複数のタンパク質を表面上に有する合成ポリマー粒子を開示する、米国特許第5,871,747号；および前記コア粒子の表面を少なくとも部分的に覆う非共有結合コーティングを有するコア粒子、および前記コーティングされたコア粒子と接触する、少なくとも1つの生物学的に活性がある物質（たとえば、WO 94/15585を参照のこと）を参照のこと。

#### 【0016】

他の開発では、ウィルス様粒子 (VLP) を、粒子の構造的性質および非感染性のために、ワクチン生成の分野で利用する。VLPは、多くのタンパク質分子と対称な形式で構

10

20

30

40

50

築された、1つ又は複数の型の超分子構造体である。VLPはウィルス・ゲノムが欠けており、したがって非感染性である。VLPはヘテロ発現によって多量に生成できることが多く、容易に精製することができる。

【0017】

さらに、非メチル化CGモチーフ(CpG)が豊富なDNAは、細菌および大部分の非脊椎動物中に存在すると、インビトロおよびインビボにおいてB細胞、樹状細胞、および他のAPC上で、強力な刺激活性を示す。細菌DNAは多くの脊椎動物種で免疫賦活であるが、個々のCpGモチーフは異なる可能性がある。実際、マウスの免疫細胞を刺激するCpGモチーフが、ヒトの免疫細胞を必ずしも刺激することができるわけではなく、逆も同様である。

10

【0018】

CpGモチーフが豊富なDNAオリゴマーは、免疫賦活能力を示すことができるが、その有効性は制限されることが多い。なぜならそれらは、インビトロおよびインビボにおいて不安定であるからである。したがってそれらは、好ましくない薬物動態を示す。CpG-オリゴヌクレオチドをより強力にするためには、したがって、リン酸骨格をホスホロチオエートで修飾することによって、オリゴマーを安定化させることが通常は必要である。

【0019】

免疫応答を刺激するためのCpG-オリゴヌクレオチドの使用に関する第2の制限は、CpG-オリゴヌクレオチドと接触したすべてのAPCおよびB細胞が刺激されるために、それらが特異性を欠いていることである。したがって、CpG-オリゴヌクレオチドの有効性および特異性は、それらを安定化させること、あるいは関連抗原も提示する細胞への細胞の活性化を制限するような方法で、それらをパッケージ化することによって向上させることができる。

20

【0020】

さらに、免疫賦活CpG-オリゴヌクレオチドは、マウスにおいて巨脾症およびリンパ節症を伴う髄外造血を引き起こすことによって、強い副作用を誘導する(Sparwass et al., J. Immunol. (1999), 162: 2368~74および実施例18)。

【0021】

VLPは、MHCクラスI分子上で効率よく掲示されることが示されてきている。なぜなら、おそらくVLPは、マクロピノサイトーシスによって取り込まれた後に、効率よく加工され、MHCクラスI上でクロス・プライミングされるからである。クロス・プライミングの機構は今日まで明らかではないが、TAP依存性およびTAP非依存性の経路が提案されてきている。

30

【0022】

近年ワクチン戦略において著しい進展がなされてきているが、既存の戦略の改善に関する必要性が依然として存在する。特に、APCおよび他の細胞の全身活性化がない状態で元の病原体と同等に効率よく、強力なCTL免疫応答および抗病原性防御を助長する、新しい改良型のワクチンの開発の分野における必要性が存在する。

【発明の開示】

40

【0023】

本発明は、DNAオリゴヌクレオチドなどの免疫賦活物質を、VLPにパッケージ化し、それらをさらに免疫原性にすることができるという驚くべき発見に基づくものである。予想外に、VLP中に存在する核酸およびオリゴヌクレオチドはそれぞれ、具体的には免疫賦活物質およびCpGモチーフを含むDNAオリゴヌクレオチドでそれぞれ置換することができる。驚くことに、これらのパッケージ化された免疫賦活物質、特に免疫賦活性核酸、非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドは、先天性免疫の広範囲の活性化なしで、免疫賦活能力を保持していた。本発明のVLPおよび免疫賦活物質を含む組成物、特にCpG-VLPは、それらのCpGを含まない相当物よりも著しく免疫原性があり、高いBおよびT細胞応答を誘導する。VLPに場合によっては連結、融合、又は他の方式で付着

50

した抗原に対する免疫応答は、VLPそのものに対する免疫応答と同様に高められる。VLPおよび抗原に対するT細胞応答は、Th1型を特に対象とする。したがって、CpG担持VLPに付着した抗原は、アレルギー、腫瘍および他の自己分子、および慢性のウィルス性疾患に対する予防的又は治療的ワクチン接種用の、理想的なワクチンである可能性がある。

【0024】

第1の実施形態では、本発明は、動物の免疫応答を高めるための組成物であって、ウィルス様粒子および免疫賦活物質、好ましくは免疫賦活性核酸、さらに好ましくは非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドを含み、その物質、核酸又はオリゴヌクレオチドが、ウィルス様粒子に連結、融合、又は他の方式で付着、あるいは封入している、すなわち結合している、組成物を提供する。他の実施形態では、本発明の組成物は、ウィルス様粒子に結合した抗原をさらに含む。

【0025】

本発明の好ましい実施形態では、免疫賦活性核酸、特に非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドを、リン酸骨格のホスホロチオエート修飾体によって安定化させる。他の好ましい実施形態では、免疫賦活性核酸、特に非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドを、VLP中のRNAの消化、および選択したCpGを含むDNAオリゴヌクレオチドの同時の添加によって、VLP中にパッケージ化する。同等に好ましい実施形態では、CpGの存在下でVLPを再構築する前に、VLPを分解することができる。

【0026】

他の好ましい実施形態では、免疫賦活性核酸はCpGモチーフを含まず、免疫賦活性を決して示さない。このような核酸は、WO01/22972中に記載されている。その中に記載されたすべての配列は、参照によりここに組み込まれている。

【0027】

他の好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、組み換えウィルス様粒子である。ウィルス様粒子がリポタンパク質のエンベロープを含まないことも好ましい。組み換えウィルス様粒子は、B型肝炎ウィルス、BKウィルス又は他のヒトポリオーマ・ウィルス、はしかウィルス、シンビス・ウィルス、ロタ・ウィルス、口蹄疫ウィルス、レトロ・ウィルス、ノーウォーク・ウィルス、又はヒト・パピローマ・ウィルス、RNAファージ、Q-ファージ、GA-ファージ、fr-ファージおよびTyの組み換えタンパク質を含むか、あるいはこれらからなることが好ましい。特定の実施形態では、ウィルス様粒子は、1つ又は複数の異なるB型肝炎ウィルスのコア(キャプシド)タンパク質(HBcAg)を含むか、あるいはこれらからなることが好ましい。

【0028】

他の好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、RNAファージの組み換えタンパク質、又はその断片を含む。好ましいRNAファージは、QR-ファージ、AP205-ファージ、GA-ファージ、fr-ファージである。

【0029】

他の実施形態では、抗原は組み換え抗原である。他の実施形態では、抗原を(1)癌細胞に対する免疫応答を誘導するように適合させたポリペプチド；(2)感染病に対する免疫応答を誘導するように適合させたポリペプチド；(3)アレルゲンに対する免疫応答を誘導するように適合させたポリペプチド；(4)自己抗原に対する免疫応答を誘導するように適合させたポリペプチド；および(5)家畜又はペットの免疫応答を誘導するように適合させたポリペプチドからなる群から選択することができる。

【0030】

他の実施形態では、抗原を(1)癌細胞に対する免疫応答を誘導するように適合させた有機分子；(2)感染病に対する免疫応答を誘導するように適合させた有機分子；(3)アレルゲンに対する免疫応答を誘導するように適合させた有機分子；(4)自己抗原に対する免疫応答を誘導するように適合させた有機分子；(5)家畜又はペットの免疫応答を誘導するように適合させた有機分子；および(6)薬剤、ホルモン又は毒性化合物に対する

10

20

30

40

50

る免疫応答を誘導するように適合させた有機分子からなる群から選択することができる。

【0031】

特定の実施形態では、抗原は、細胞傷害性T細胞エピトープを含むか、あるいはこれからなる。関連実施形態では、ウィルス様粒子はB型肝炎ウィルスのコア・タンパク質を含み、細胞傷害性T細胞エピトープは、前記B型肝炎ウィルスのコア・タンパク質のC末端に融合している。一実施形態では、それらはロイシン連結配列によって融合している。

【0032】

本発明の他の実施形態では、ヒト又は他の動物種の免疫応答を高めるための方法であつて、ウィルス様粒子および免疫賦活物質、好ましくは免疫賦活性核酸、さらに好ましくは非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドを含み、組成物を動物に導入することを含む方法を提供する。その物質、好ましくは核酸、およびさらに好ましくはオリゴヌクレオチドが、ウィルス様粒子に結び付いている（すなわち結合、付着、あるいは封入）。他の実施形態では、本発明の組成物は、ウィルス様粒子に結合した抗原をさらに含む。

10

【0033】

本発明の他の実施形態では、組成物を、動物の皮下、筋肉内、鼻腔内、皮内、静脈内、あるいはリンパ節に直接に導入する。同様に好ましい実施形態では、免疫増強組成物を、それに対するワクチン接種が望まれる腫瘍又は局所のウィルスの病原巣の近くに、局所的に施す。

【0034】

本発明の好ましい態様では、免疫応答はT細胞応答であり、抗原に対するT細胞応答が高まる。特定の実施形態では、T細胞応答は細胞傷害性T細胞応答であり、抗原に対する細胞傷害性T細胞応答が高まる。

20

【0035】

本発明は、免疫学的に有効量の本発明の免疫増強組成物、および薬剤として許容可能な希釈剤、担体又は賦形剤を含むワクチンにも関する。好ましい実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのアジュバント、不完全フロイント・アジュバントなどをさらに含む。本発明は、動物を免疫化及び/又は治療する方法であつて、免疫学的に有効量の開示するワクチンを動物に投与することを含む方法も提供する。

【0036】

本発明の好ましい実施形態では、免疫賦活物質含有VLP、好ましくは免疫賦活性核酸含有VLP、さらに好ましくは非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドVLPを、VLPそのものに対する、あるいは結合、融合、あるいはそれ以外の場合はVLPに付着した抗原に対する、動物又はヒトのワクチン接種用に使用する。改変型VLPを使用して、たとえば、それぞれ腫瘍、ウィルス性疾患、自己分子および自己抗原、あるいは非ペプチド小分子に対してワクチン接種することができる。ワクチン接種は、予防又は治療目的、あるいはその両方であつてよい。さらに、改変型VLPを使用して、アレルギーに対するワクチン接種をして、免疫偏向を誘導することができる。

30

【0037】

大抵の場合、所望の免疫応答は、免疫賦活物質含有VLP、好ましくは免疫賦活性核酸含有VLP、さらに好ましくは非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドVLPに、連結、融合、又は他の方式で付着した、抗原を対象とするものである。抗原は、ペプチド、タンパク質、ドメイン、炭水化物又は小分子、たとえばステロイド・ホルモン又は薬剤など、ニコチンなどであつてよい。いくつかの条件下では、所望の免疫応答は、VLPそのものを対象とすることができる。この後者の適用例は、それに対するワクチン接種が望まれるウィルスに、VLPが由来する場合に使用される。

40

【0038】

注射の経路は皮下又は筋肉内であることが好ましいが、CpG含有VLPを皮内、鼻腔内、静脈内、あるいはリンパ節に直接施用することも可能であると思われる。同様に好ましい実施形態では、CpG含有抗原結合又はそれを含まないVLPを、それに対するワクチン接種が望まれる腫瘍又は局所のウィルスの病原巣の近くに、局所的に施す。

50

## 【0039】

前述の一般的記載と以下の詳細な記載の両方は、単なる例示的かつ説明的なものであり、特許請求する本発明のさらなる説明を与えることを目的とすることを理解されたい。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0040】

他に定義しない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されているのと、同じ意味を有する。本明細書に記載するものと同等あるいは均等である任意の方法および物質を、本発明を実施又は試験する際に使用することができ、好ましい方法および物質は、本明細書で以下に記載する。

10

## 【0041】

## 1. 定義

アミノ酸リンカー：本明細書で使用する「アミノ酸リンカー」、又は本明細書中で単に「リンカー」と呼ばれるものは、抗原又は抗原決定基を第2の付着部位と会合させるか、あるいは、必ずしもではないが典型的には、1つのアミノ酸残基として、より好ましくはシステイン残基として、既に第2の付着部位からなっているか、あるいはそれを含むことがより好ましい。しかしながら、本明細書で使用する「アミノ酸リンカー」という用語は、アミノ酸残基からなるアミノ酸リンカーが本発明の好ましい実施形態である場合でも、このようなアミノ酸リンカーがアミノ酸残基のみからなることを、示すことを目的とするものではない。アミノ酸リンカーのアミノ酸残基は、当分野で知られている天然に存在するアミノ酸又は非天然アミノ酸、すべてのL型又はすべてのD型、あるいはこれらの混合物から構成されることが好ましい。しかしながら、スルフヒドリル基又はシステイン残基を有する分子を含むアミノ酸リンカーも、本発明内に含まれる。このような分子は、C1～C6アルキル-、シクロアルキル(C5、C6)、アリール、又はヘテロアリール部分を含むことが好ましい。しかしながら、アミノ酸リンカーに加えて、C1～C6アルキル-、シクロアルキル(C5、C6)、アリール、又はヘテロアリール部分を好ましくは含み、任意のアミノ酸を欠いているリンカーも、本発明内に含まれるものとする。抗原又は抗原決定基、又は場合によっては第2の付着部位と、アミノ酸リンカーの間の会合は、少なくとも1つの共有結合によるものであることが好ましく、少なくとも1つのペプチド結合によるものであることがより好ましい。

20

## 【0042】

動物：本明細書で使用するように、「動物」という用語は、たとえばヒト、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、哺乳動物、鳥類、爬虫類、魚類、昆虫、および蛛形綱を含むことを意味する。

## 【0043】

抗体：本明細書で使用するように、「抗体」という用語は、エピトープ又は抗原決定基と結合することができる分子を指す。この用語は、単鎖抗体を含めた、すべての抗体およびそれらの抗原結合断片を含むことを意味する。抗体はヒト抗原結合抗体断片であることが最も好ましく、Fab、Fab'およびF(ab')2、Fd、単鎖Fvs(scfv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs(sdfv)、およびVL又はVHドメインを含む断片だけには限られないが、これらを含む。抗体は、鳥類および哺乳動物を含めた、任意の動物起源のものであってよい。抗体は、ヒト、ネズミ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ又はニワトリであることが好ましい。本明細書で使用する「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンのライブライマーから、あるいは、たとえばKucherlapati他による米国特許第5,939,598号中に記載されたような、1つ又は複数の免疫グロブリンの遺伝子が導入され、内因性の免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体を含む。

40

## 【0044】

抗原：本明細書で使用するように、「抗原」という用語は、MHC分子によって提示される場合、抗体又はT細胞受容体(TCR)によって結合することができる分子を指す。

50

「抗原」という用語は、本明細書で使用するように、T細胞エピトープも含む。さらに抗原は、免疫系によって認識することができ、かつ／あるいは、体液性免疫応答及び／又は細胞性免疫応答を誘導することができ、B及び／又はTリンパ球の活性化がもたらされる。しかしながら、このことは、少なくともいくつかの場合、抗原がTh細胞エピトープを含むかあるいはこれと連結し、アジュバント中に与えられることを必要とする可能性がある。抗原は、1つ又は複数のエピトープ（BおよびTエピトープ）を有することができる。前述の特異的反応は、抗原は、典型的には非常に選択的な方式で、その対応する抗体又はTCRと反応し、他の抗原によって誘発される可能性がある多数の他の抗体又はTCRとは反応しないことが好ましいことが、示されることを意味する。

## 【0045】

10

本明細書で使用する「微生物抗原」という用語は、微生物の抗原であり、感染ウィルス、感染細菌、寄生虫および感染真菌だけには限られないが、これらを含む。このような抗原には、無傷微生物、および天然単離体およびその断片、さらに、天然微生物抗原と同一であるか類似しており、その微生物に特異的な免疫応答を誘導する、合成又は組み換え化合物がある。化合物は、それが免疫応答（体液性及び／又は細胞性）を誘導する場合、天然微生物抗原と類似している。このような抗原は当分野では日常的に使用され、当業者によく知られている。

## 【0046】

ヒト中で発見されてきている感染ウィルスの例には、Retroviridae（たとえば、ヒト免疫不全ウィルス、HIV-1など（HTLV-III、LAV又はHTLV-III/LAV、又はHIV-IIIとも呼ばれる）；および他の単離体、HIV-LPなど）；Picornaviridae（たとえば、ポリオ・ウィルス、A型肝炎ウィルス；エンテロ・ウィルス、ヒト・コクサッキー・ウィルス、ライノ・ウィルス、エコー・ウィルス）；Caliciviridae（たとえば、胃腸炎を引き起こす菌株）；Togaviridae（たとえば、ウマ脳炎ウィルス、風疹ウィルス）；Flaviviridae（たとえば、デング・ウィルス、脳炎ウィルス、黄熱病ウィルス）；Coronaviridae（たとえば、コロナ・ウィルス）；Rhabdoviridae（たとえば、水泡性口炎ウィルス、狂犬病ウィルス）；Filoviridae（たとえば、エボラ・ウィルス）；Paramyxoviridae（たとえば、パラインフルエンザ・ウィルス、おたふくかぜウィルス、はしかウィルス、呼吸器多様体ウィルス）；Orthomyxoviridae（たとえば、インフルエンザ・ウィルス）；Bunyaviridae（たとえば、ハンタ・ウィルス、ブンガ・ウィルス、フレボ・ウィルスおよびナイロ・ウィルス）；Arena viridae（出血熱ウィルス）；Reoviridae（たとえば、レオ・ウィルス、オルビ・ウィルス、およびロタ・ウィルス）；Birnaviridae；Hepadnaviridae（B型肝炎ウィルス）；Parvoviridae（パラボ・ウィルス）；Papovaviridae（パピローマ・ウィルス、ポリオーマ・ウィルス）；Adenoviridae（大部分はアデノ・ウィルス）；Herpesviridae（単純ヘルペス・ウィルス（HSV）1および2、帯状疱疹ウイルス、サイトメガロ・ウィルス（CMV）、ヘルペス・ウィルス）；Poxviroidea（天然痘ウイルス、ワクシニア・ウィルス、ポックス・ウィルス）；およびIridoviridae（たとえば、アフリカブタ熱ウィルス）；および未分類ウィルス（たとえば、海綿状脳症の病原体、デルタ肝炎の病原体（B型肝炎ウィルスの欠陥付随体であると考えられる）、非A型、非B型肝炎の病原体（クラス1=内部に伝播、；クラス2=非経口的に伝播（すなわち、C型肝炎）；ノーウォークおよび関連ウィルス、およびアストロ・ウィルス）があるが、これらだけには限られない。

20

30

30

40

## 【0047】

グラム陰性菌およびグラム陽性菌は、脊椎動物中で抗原として働く。このようなグラム陽性菌には、Pasteurellla種、Staphylococci種、およびStreptococcus種があるが、これらだけには限られない。グラム陰性菌には、大腸菌、Pseudomonas種、およびSalmonella種があるが、これらだけに

40

50

は限られない。感染細菌の具体例には、*Helicobacter pyloris*、*Borelia burgdorferi*、*Legionella pneumophilia*、*Mycobacteria ssp.*（たとえば、*M. tuberculosis*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. kansaii*、*M. gordonaiae*）、*Staphylococcus aureus*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Listeria monocytogerae*、*Streptococcus pyogenes*（*Streptococcus*のA群）、*Streptococcus agalactiae*（*Streptococcus*のB群）、*Streptococcus viridans*群）、*Streptococcus faecalis*、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus*（嫌気性種）、*Streptococcus pneumoniae*、病原性*Campylobacter* sp、*Enterococcus* sp、*Haemophilus influenzae*、*Bacillus antracis*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Corynebacterium sp*、*Erysipelothonrix rhusiopathiae*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Enterobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pasturella multocida*、*Bacteroides sp*、*Fusobacterium nucleatum*、*Streptobacillus moniliformis*、*Treponema pallidum*、*Treponema pertenue*、*Leptospira*、*Rickettsia*、*Actinomyces israelii*および*Chlamydia*があるが、これらだけには限らない。

#### 【0048】

感染真菌の例には、*Cryptococcus neoformans*、*Histoplasma capsulatum*、*Coccidioides immitis*、*Blastomyces dermatitidis*、*Chlamydia trachomatis*および*Candida albicans*がある。他の真菌生物（すなわち、原生生物）には、*Plasmodium*、たとえば*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium malariae*、*Plasmodium ovale*、*Plasmodium vivax*など、*Toxoplasma gondii*および*Giardia lamblia*がある。

#### 【0049】

他の医学的に関連がある微生物は、文献中に広く記載されており、たとえばその全容が参考により本明細書に組み込まれている、C. G. A. Thomas、「Medical Microbiology」、Bailliere Tindall、Great Britain 1983を参照のこと。

#### 【0050】

本発明の組成物および方法は、癌抗原に対する抗原特異的な免疫応答を刺激することによって、癌を治療するためにも有用である。本明細書で使用する「腫瘍抗原」は、腫瘍又は癌と関係があり免疫応答を誘発することができる、ペプチドなどの化合物である。特に、MHC分子の概念で提示されるとき、化合物は免疫応答を誘発することができる。腫瘍抗原は、たとえばCohen他、Cancer Research, 54:1055 (1994)中に記載されたのと同様に、癌細胞の粗製抽出物を調製することによって、抗原を部分的に精製することによって、組み換え技術によって、あるいは知られている抗原の新規合成によって、癌細胞から作製することができる。腫瘍抗原は、腫瘍又は癌ポリペプチド全体であるあるいはその抗原部分である、抗原を含む。このような抗原は、組み換えによって、あるいは当分野で知られている任意の他の手段によって、単離又は作製することができる。癌又は腫瘍には、胆管癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、絨毛上皮腫、結腸癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、上皮内新生物、リンパ腫、肝臓癌、肺癌、（たとえば、小細

胞および非小細胞) ; メラノーマ、神経芽腫、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、肉腫、皮膚癌、精巣癌、甲状腺癌、および腎臓癌、および他の癌腫および肉腫があるが、これらだけには限られない。

【0051】

抗原決定基：本明細書で使用するように、「抗原決定基」という用語は、B及び/又はTリンパ球によって特異的に認識される抗原の、その一部分を指すことを意味する。Bリンパ球は抗体生成により外来性の抗原決定基に応答し、一方Tリンパ球は細胞性免疫の仲介物質である。したがって、抗原決定基又はエピトープは、抗体によって、あるいはMHCの概念ではT細胞受容体によって認識される抗原の、その部分である。

【0052】

抗原提示細胞：本明細書で使用するように、「抗原提示細胞」という用語は、免疫賦活能力を有する異種群の白血球、又は骨髄由来細胞を指すことを意味する。たとえば、これらの細胞は、T細胞によって認識することができるMHC分子と結合するペプチドを、生成することができる。この用語は、用語「補助細胞」と同義であり、たとえばランゲルハンス細胞、指状突起細胞、B細胞、マクロファージ、および樹状細胞を含む。いくつかの条件下では、上皮細胞、内皮細胞、および他の非骨髄由来細胞も、抗原提示細胞として働くことができる。

【0053】

会合 (association)：本明細書で使用するように、「会合」という用語は、第1および第2の付着部位に適用すると、第1の付着部位と第2の付着部位の結合を指し、これは少なくとも1つの非ペプチド結合によるものであることが好ましい。会合の性質は共有性、イオン性、疎水性、極性、又はこれらの任意の組合せであってよく、会合の性質は共有性であることが好ましい。

【0054】

第1の付着部位：本明細書で使用するように、「第1の付着部位」という用語は、抗原又は抗原決定基上に位置する第2の付着部位が会合することができる、非天然又は天然起源の要素を指す。第1の付着部位は、タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、ペプチド、糖、ポリ核酸、天然又は合成ポリマー、二次的代謝産物又は化合物(ビオチン、フルオレセイン、レンチノール、ジゴキシゲニン、金属イオン、フェニルメチルスルホニルフルオリド)、又はこれらの組合せ、又は化学反応性があるこれらの群であってよい。第1の付着部位は、典型的かつ好ましくは、ウィルス様粒子の表面上に位置する。多数の第1の付着部位が、典型的には反復形状で、ウィルス様粒子の表面上に存在する。

【0055】

第2の付着部位：本明細書で使用するように、「第2の付着部位」という用語は、ウィルス様粒子の表面上に位置する第1の付着部位が会合することができる、抗原又は抗原決定基と関係がある要素を指す。第2の付着部位は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖、ポリヌクレオチド、天然又は合成ポリマー、二次的代謝産物又は化合物(ビオチン、フルオレセイン、レンチノール、ジゴキシゲニン、金属イオン、フェニルメチルスルホニルフルオリド)、又はこれらの組合せ、又は化学反応性があるこれらの群であってよい。少なくとも1つの第2の付着部位が、抗原又は抗原決定基上に存在する。したがって、少なくとも1つの第2の付着部位を有する「抗原又は抗原決定基」という用語は、少なくとも1つの抗原又は抗原決定基および第2の付着部位を含む、抗原又は抗原構築体を指す。しかしながら、特に、非天然起源である、すなわち抗原又は抗原決定基中に本来存在しない第2の付着部位に関しては、これらの抗原又は抗原構築体は、「アミノ酸リンカー」を含む。

【0056】

結合 (bound)：本明細書で使用するように、「結合」という用語は、共有、たとえば化学的結合による、又は非共有、たとえばイオン性相互作用、疎水性相互作用、水素結合などであってよい結合を指す。共有結合は、たとえばエステル、エーテル、リン酸エステル、アミド、ペプチド、イミド、炭素-イオウ結合、炭素-リン結合などであってよ

10

20

30

40

50

い。この用語は、物質の封入、又は部分的封入も含む。「結合」という用語は、「連結( coupled )」、「融合( fused )」、「封入」、「パッケージ化」、および「付着( attached )」などより広義であり、これらを含む。たとえば、非メチル化 CpG 含有オリゴヌクレオチドなどの免疫賦活物質を、実際の結合の存在なしで、共有的でも非共有的でもなく、VLP によって封入することができる。

#### 【0057】

コート・タンパク質：本明細書で使用するように、「コート・タンパク質」という用語は、バクテリオファージ又はRNAファージのキャプシド集合体内に取り込むことができる、バクテリオファージ又はRNAファージのタンパク質を指す。しかしながら、RNAファージのコート・タンパク質遺伝子の特異的遺伝子産物を指すときは、用語「CP」を使用する。たとえば、RNAファージQのコート・タンパク質遺伝子の特異的遺伝子産物は「Q CP」と呼び、一方でバクテリオファージQの「コート・タンパク質」は、「Q CP」およびA1タンパク質を含む。バクテリオファージQのキャプシドは、主にQ CP、および少ない含量のA1タンパク質で構成される。同様に、VLPQのコート・タンパク質は、主にQ CP、および少ない含量のA1タンパク質を含む。

#### 【0058】

連結：本明細書で使用するように、「連結」という用語は、共有結合による、あるいは強力な非共有的相互作用による付着を指す。生物学的に活性がある物質を連結させるために、当業者により通常使用されている任意の方法を、本発明において使用することができる。

10

#### 【0059】

融合：本明細書で使用するように、「融合」という用語は、アミノ酸配列のコードヌクレオチド配列をイン・フレームで組み合わせることによる、1本のポリペプチド鎖中の異なる起源のアミノ酸配列の組合せを指す。「融合」という用語は、内部融合、すなわちポリペプチド鎖中への異なる起源の配列の挿入、さらに鎖の両端の一端への融合を明確に含む。

20

#### 【0060】

CpG：本明細書で使用するように、「CpG」という用語は、非メチル化シトシン、グアニンジヌクレオチド配列（たとえば、シトシン次にグアノシンを含み、リン酸結合によって連結している「CpG DNA」又はDNA）を含み、脊椎動物細胞によるサイトカイン発現を刺激する／活性化する、たとえばそれに対する促進効果を有する、あるいはそれを誘導するか増大させる、オリゴヌクレオチドを指す。たとえばCpGは、B細胞、NK細胞および抗原提示細胞、たとえば、単球、樹状細胞およびマクロファージ、およびT細胞などの活性化において、有用であることができる。CpGは、ヌクレオチド類似体、たとえば、ホスホロチオエステル結合を含む類似体などを含むことができ、二本鎖又は一本鎖であってよい。一般に、二本鎖分子はインビボにおいてより安定性があり、一方で一本鎖分子は高い免疫活性を有する。

30

#### 【0061】

エピトープ：本明細書で使用するように、「エピトープ」という用語は、動物、好ましくは哺乳動物、および最も好ましくはヒト中で、抗原又は免疫活性を有するポリペプチドの一部分を指す。本明細書で使用する「免疫エピトープ」は、当分野で知られている任意の方法によって決定される（たとえば、Geysen他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998~4002 (1983) を参照のこと）、動物中で抗体応答を誘発するかあるいはT細胞応答を誘導する、ポリペプチドの一部分として定義する。本明細書で使用する「抗原エピトープ」は、当分野でよく知られている任意の方法によって決定される、タンパク質の一部分として定義し、抗体はその抗原に免疫特異的に結合することができる。免疫特異的結合は非特異的結合を除外するが、他の抗原との交差反応性は必ずしも除外しない。抗原エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。抗原エピトープはT細胞エピトープであってもよく、この場合抗原エピトープを、MHC分子の概念でT細胞受容体によって免疫特異的に結合させることができる。

40

50

## 【0062】

エピトープは、空間構造中に3個のアミノ酸を含むことができ、これはエピトープに特有である。一般にエピトープは、少なくとも約5個のこのようなアミノ酸からなり、少なくとも約8～10個のこのようなアミノ酸からなることがより普通である。エピトープが有機分子である場合、それはニトロフェニルと同じくらい小さくてよい。

## 【0063】

免疫応答：本明細書で使用するように、「免疫応答」という用語は、B及び/又はTリンパ球の活性化又は増殖をもたらす、体液性免疫応答及び/又は細胞性免疫応答を指す。しかしながら、いくつかの場合、免疫応答は強度が低い可能性があり、本発明の少なくとも1つの物質を使用するときのみ、検出可能となる可能性がある。「免疫原」は、免疫系の1つ又は複数の機能が高まり、免疫原物質を対象とするように、生物の免疫系を刺激するために使用される物質を指す。「免疫原ポリペプチド」は、アジュバントの存在下又は不在下で、単独あるいは担体と結び付いて、細胞及び/又は体液性免疫応答を誘導するポリペプチドである。

10

## 【0064】

免疫化：本明細書で使用するように、「免疫化する」又は「免疫化」という用語、又は関連用語は、標的抗原又はエピトープに対する、十分な免疫応答（抗体又は細胞免疫、エフェクターCTLなどを含む）を備えるための能力を与えることを指す。これらの用語は、完全な免疫が生み出されることは必要としないが、基底状態より大幅に免疫応答の増強が生じることを必要とする。たとえば哺乳動物は、本発明の方法の適用後に、標的抗原に対する細胞及び/又は体液性免疫応答が起こる場合、標的抗原に対して免疫化することができると考えられる。

20

## 【0065】

免疫賦活性核酸：本明細書で使用するように、免疫賦活性核酸という用語は、免疫応答を誘導する、かつ/あるいは高めることができる核酸を指す。本明細書で使用するように、免疫賦活性核酸は、リボ核酸、特にデオキシリボ核酸を含む。免疫賦活性核酸は、少なくとも1つのCpGモチーフ、たとえばCが非メチル化状態であるCGジヌクレオチドを含むことが好ましい。CGジヌクレオチドはパリンドローム配列の一部であってよく、あるいは非パリンドローム配列中に含まれてよい。前に記載したCpGモチーフを含まない免疫賦活性核酸は、たとえばCpGジヌクレオチドを欠いた核酸、ならびにメチル化CGジヌクレオチドを有するCGモチーフを含む核酸を包含する。本明細書で使用するように、「免疫賦活性核酸」という用語は、4-ブロモ-シトシンなどの修飾体を含む核酸も指すはずである。

30

## 【0066】

免疫賦活物質：本明細書で使用するように、「免疫賦活物質」という用語は、免疫応答を誘導する、かつ/あるいは高めることができる物質を指す。本明細書で使用するように、免疫賦活物質は、toll様レセプター(toll-like receptor)活性化物質およびサイトカイン分泌誘導物質だけには限られないが、これらを含む。Toll様レセプター活性化物質は、免疫賦活性核酸、ペプチドグリカン、リポ多糖、リポテイコ酸、イミダゾキノリン化合物、フラジェリン、リポタンパク質、および免疫賦活有機分子、たとえばタクソールなどだけには限られないが、これらを含む。

40

## 【0067】

天然起源：本明細書で使用するように、「天然起源」という用語は、その全体又は一部分が合成ではなく、自然に存在するか生成することを意味する。

## 【0068】

非天然：本明細書で使用するように、この用語は一般に自然からのものではないことを意味し、この用語は人間の手からのものであることを意味する。

## 【0069】

非天然起源：本明細書で使用するように、「非天然起源」という用語は、一般に合成であり自然からのものではないことを意味し、より詳細には、この用語は人間の手からのも

50

のであることを意味する。

【0070】

整然とした繰り返し抗原又は抗原決定基配列：本明細書で使用するように、「整然とした繰り返し抗原又は抗原決定基配列」という用語は、典型的かつ好ましくは、それぞれコア粒子およびウィルス様粒子に関する、抗原又は抗原決定基の均一な空間配置によって特徴付けられる、繰り返し型の抗原又は抗原決定基を一般に指す。本発明の一実施形態では、繰り返し型はゲノムの型であってよい。適切である整然とした繰り返し抗原又は抗原決定基配列の、典型的かつ好ましい例は、好ましくは0.5～30ナノメートル、より好ましくは5～15ナノメートルの空間で、厳密に繰り返される準結晶状態の抗原又は抗原決定基を有するものである。

10

【0071】

オリゴヌクレオチド：本明細書で使用するように、「オリゴヌクレオチド」又は「オリゴマー」という用語は、2個以上のヌクレオチド、一般に少なくとも約6～約100,000個のヌクレオチド、好ましくは約6～約2000個のヌクレオチド、より好ましくは約6～約300個のヌクレオチド、より好ましくは約20～約300個のヌクレオチド、より好ましくは約20～約100個のヌクレオチドを含む核酸配列を指す。「オリゴヌクレオチド」又は「オリゴマー」という用語は、100超～約2000個のヌクレオチド、好ましくは100超～約1000個のヌクレオチド、より好ましくは100超～約500個のヌクレオチドを含む核酸配列も指す。「オリゴヌクレオチド」は一般に、任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドも指し、これは非修飾RNA又はDNA、あるいは修飾RNA又はDNAであってよい。「オリゴヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、および一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、又はより典型的には、二本鎖又は一本鎖および二本鎖領域の混合物であってよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を、非制限的に含む。さらに「オリゴヌクレオチド」は、RNA又はDNA、あるいはRNAおよびDNAを含む三本鎖領域を指す。さらにオリゴヌクレオチドは、合成、ゲノム又は組み換え、たとえば- DNA、コスミドDNA、人工細菌染色体、酵母菌人工染色体、および糸状ファージ、たとえばM13などであってよい。

20

【0072】

用語「オリゴヌクレオチド」は、1つ又は複数の修飾体を含むDNA又はRNA、および安定性又は他の理由で修飾された骨格を有するDNA又はRNAも含む。たとえば、適切なヌクレオチド修飾体／類似体には、ペプチド核酸、イノシン、トリチル化塩基、ホスホロチオエート、アルキルホスホロチオエート、5-ニトロインドールデオキシリボフルノシリル、5-メチルデオキシシトシン、および5,6-ジヒドロ-5,6-ジヒドロキシデオキシチミジンがある。さまざまな修飾がDNAおよびRNAになされてきており、したがって、「オリゴヌクレオチド」は、化学的に、酵素によって、あるいは代謝によって修飾された形のポリヌクレオチド、自然界に典型的に見られるもの、およびウィルスおよび細胞に特有の化学形のDNAおよびRNAを含む。他のヌクレオチド類似体／修飾体は、当業者に明らかであろう。

30

【0073】

パッケージ化：本明細書で使用するように、「パッケージ化」という用語は、VLPと関係がある免疫賦活物質、特に免疫賦活性核酸の状態を指す。本明細書で使用するように、「パッケージ化」という用語は、共有、たとえば化学的連結による、又は非共有、たとえばイオン性相互作用、疎水性相互作用、水素結合などであってよい結合を含む。共有結合は、たとえばエステル、エーテル、リン酸エステル、アミド、ペプチド、イミド、炭素-イオウ結合、炭素-リン結合などであってよい。この用語は、物質の封入、又は部分的封入も含む。「パッケージ化」という用語は、「連結」、「封入」および「付着」などの用語を含む。たとえば、非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドなどの免疫賦活物質を、実際の結合の存在なしで、共有的でも非共有的でもなく、VLPによって封入することができる。好ましい実施形態では、特に、免疫賦活性核酸が免疫賦活物質である場合、「

40

50

「パッケージ化」という用語は、パッケージ化された状態の核酸が、DNAse又はRNAseによる加水分解に曝されないことを示す。好ましい実施形態では、免疫賦活性核酸は、VLPキャプシド中に、最も好ましくは非共有方式でパッケージ化されている。

【0074】

本発明の組成物は、場合によっては薬剤として許容可能な担体と組み合わせができる。本明細書で使用するように、「薬剤として許容可能な担体」という用語は、ヒト又は他の動物に投与するのに適した、1つ又は複数の適合性のある固体又は液体充填剤、希釈剤又は被包性物質を意味する。「担体」という用語は、活性成分と組み合わせて施用を容易にする、有機又は無機成分、天然又は合成物を示す。

【0075】

有機分子：本明細書で使用するように、「有機分子」という用語は、天然又は合成起源の任意の化学的実体を指す。特に、本明細書で使用するように、「有機分子」という用語は、たとえば、天然又は合成起源の、ヌクレオチド、脂質、炭水化物、多糖、リポ多糖、ステロイド、アルカノイド、テルペン、および脂肪酸の群のメンバーである、任意の分子を含む。特に、「有機分子」という用語は、乱用される薬物中に含まれる、ニコチン、コカイン、ヘロイン、又は他の薬物として活性がある分子などの分子を含む。一般に有機分子は、化学官能基を含むか、あるいは含むように改変されており、本発明に従った、有機分子のウィルス様粒子中の連結、結合、又は他の結合法が可能となる。

【0076】

ポリペプチド：本明細書で使用するように、「ポリペプチド」という用語は、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって直線的に連結したモノマー（アミノ酸）から構成される分子を指す。これはアミノ酸の分子鎖を示し、特定の長さの生成物を指すわけではない。したがって、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質は、ポリペプチドの定義中に含まれる。この用語は、たとえば、グリコシル化、アシル化、リン酸化など、発現後に修飾されたポリペプチドも指すことを目的とする。組み換え体又は誘導ポリペプチドは、必ずしも指定の核酸配列から翻訳されるわけではない。それらは、化学合成を含めた任意の方法で生成させることができる。

【0077】

免疫応答を「高める」物質は、その物質を加えることによって、その物質を加えずに測定した同じ免疫応答と比較して、より高まった、あるいは増大した、あるいは任意の方向に偏向した免疫応答が観察される物質を指す。たとえば、細胞傷害性T細胞の溶菌活性は、たとえばこの物質ありおよびなしで<sup>5</sup> <sup>1</sup>Cr放出アッセイを使用して、測定することができる。この物質なしのCTL溶菌活性と比較して、CTL溶菌活性が高まる物質の量が、抗原に対する動物の免疫応答を高めるのに十分量であると言える。好ましい実施形態では、免疫応答は、少なくとも約2倍、より好ましくは約3倍以上高まる。分泌するサイトカインの量も、変わることもある。

【0078】

有効量：本明細書で使用するように、「有効量」という用語は、所望の生物学的效果を実現するのに必要あるいは十分量を指す。組成物の有効量は、この選択した結果を得る量であると思われ、このような量は当業者により慣例として決定することができると思われる。たとえば、免疫系不全を治療するのに有効量は、免疫系の活性化を引き起こし、抗原への暴露により抗原特異的な免疫応答の進行をもたらすのに必要な量であると思われる。この用語は、「十分量」とも同義である。

【0079】

任意の個々の適用例に関する有効量は、治療する疾患又は状態、投与される個々の組成物、被験体の大きさ、及び/又は疾患又は状態の重度などの要因に応じて変わる可能性がある。当業者は、過度の実験を必要とせずに、本発明の個々の組成物の有効量を経験的に決定することができる。

【0080】

自己抗原：本明細書で使用するように、「自己抗原」という用語は、宿主のDNAによ

10

20

30

40

50

ってコードされたタンパク質を指し、宿主のDNAによってコードされたタンパク質又はRNAによって生成される生成物を、自己として定義する。さらに、2つ又は数個の分子の組合せから生じるタンパク質、又は自己分子の画分であるタンパク質、および前に定義した2つの自己分子と高い相同性(>95%、好ましくは>97%、より好ましくは>99%)を有するタンパク質も、自己とみなすことができる。本発明の他の好ましい実施形態では、抗原は自己抗原である。本発明に関して有用な、自己抗原の非常に好ましい実施形態は、WO 02/056905に記載されており、その開示は参照によりその全容がここに組み込まれている。

#### 【0081】

治療：本明細書で使用するように、「治療」、「治療する」、「治療した」、又は「治療している」という用語は、予防及び/又は療法を指す。感染病に関して使用するとき、たとえば、この用語は、病原体による感染に対する被験者の耐性を増大させる、あるいは言い換えると、被験者が病原体によって感染するか、あるいは感染に起因する病気の徴候を示す可能性を低下させる予防的治療、および感染と戦うため、たとえば感染を低下させるか除外するため、あるいは感染が悪化するのを防ぐための、被験者が感染した後の治療を指す。

10

#### 【0082】

ワクチン：本明細書で使用するように、「ワクチン」という用語は、本発明の組成物を含み、動物に投与することができる形である調合物を指す。典型的にはワクチンは、通常の生理食塩水又は緩衝水溶液媒体を含み、本発明の組成物がその中に懸濁又は溶解している。この形で、本発明の組成物を都合よく使用して、疾患を予防、改善、あるいはそれ以外の場合は治療することができる。宿主に導入することによって、ワクチンは、抗体の生成、サイトカイン及び/又は他の細胞応答だけには限られないが、これらを含めた免疫応答を誘発することができる。

20

#### 【0083】

場合によっては、本発明のワクチンは、本発明の化合物に対して少量又は大量で存在することができる、アジュバントをさらに含む。本明細書で使用するように、「アジュバント」という用語は、免疫応答の非特異的刺激物質、又は宿主中でデポー作用を生み出すことができる物質を指し、これを本発明のワクチンと組み合わせると、より一層免疫応答の増強が与えられる。さまざまなアジュバントを使用することができる。その例には、不完全フロイント・アジュバント、水酸化アルミニウム、および改変型ムラミルジペプチドがある。本明細書で使用するように、「アジュバント」という用語は、典型的には免疫応答の特異的刺激物質も指し、これを本発明のワクチンと組み合わせると、より一層高く典型的には特異的な免疫応答が与えられる。その例には、GM-CSF、IL-2、IL-12、IFNだけには限られないが、これらがある。他の例は、当業者の知識の範囲内である。

30

#### 【0084】

ウィルス様粒子：本明細書で使用するように、「ウィルス様粒子」という用語は、ウィルス粒子に似ているが、病原性であることは証明されていない構造を指す。典型的には、本発明のウィルス様粒子は、ウィルス様粒子のタンパク質をコードする遺伝情報を保有していない。一般に、ウィルス様粒子はウィルス・ゲノムを欠いており、したがって非感染性である。さらにウィルス様粒子は、異種の発現によって多量に生成できることが多く、容易に精製することができる。いくつかのウィルス様粒子は、それらのゲノムと異なる核酸を含むことができる。示したように、本発明のウィルス様粒子は、非反復性かつ非感染性である。なぜならそれは、ウィルス・ゲノムのすべて又は一部、特にウィルス・ゲノムの反復性かつ感染性要素を欠いているからである。本発明のウィルス様粒子は、それらのゲノムと異なる核酸を含むことができる。本発明のウィルス様粒子の典型的かつ好ましい実施形態は、対応するウィルス、バクテリオファージ、又はRNAファージのウィルス・キャップシドなどの、ウィルス・キャップシドである。本明細書で互換的に使用する、用語「ウィルス・キャップシド」又は「キャップシド」は、ウィルス・タンパク質のサブユニットか

40

50

ら構成されるマクロ分子の集合体を指す。典型的かつ好ましくは、ウィルス・タンパク質のサブユニットは、固有の反復編成である構造を有する、ウィルス・キャプシドおよびキャプシド中にそれぞれ集合し、前記構造は典型的には球状又は管状である。たとえば、R N A ファージ又はH B c A g のキャプシドは、正二十面体様対称性の球状形を有する。本明細書で使用するように、用語「キャプシド様構造」は、前に定義した意味でキャプシドの形態に似ているが十分な程度の状態および反復性を保ちながらも、典型的な対称集合体からは逸脱する、ウィルス・タンパク質のサブユニットから構成されるマクロ分子の集合体を指す。

## 【0085】

バクテリオファージのウィルス様粒子：本明細書で使用するように、用語「バクテリオファージのウィルス様粒子」は、バクテリオファージの構造に似ており、非反復性かつ非感染性であり、バクテリオファージの複製機構をコードする1つ又は複数の遺伝子を少なくとも欠いており、典型的には宿主へのウィルスの付着又は侵入を担う、1つ又は複数のタンパク質をコードする1つ又は複数の遺伝子も欠いている、ウィルス様粒子を指す。しかしながらこの定義は、前述の1つ又は複数の遺伝子が依然として存在するが不活性であり、したがって非反復性かつ非感染性であるバクテリオファージのウィルス様粒子をもたらす、バクテリオファージのウィルス様粒子も含むはずである。

## 【0086】

R N A ファージ・コート・タンパク質のV L P：R N A ファージ・コート・タンパク質の180サブユニットの自己組織化体から形成され、場合によっては宿主のR N A を含むキャプシド構造を、「R N A ファージ・コート・タンパク質のV L P」と呼ぶ。1つの具体例は、Q コート・タンパク質のV L Pである。この特定の場合、Q コート・タンパク質のV L Pは、Q C Pサブユニット（たとえば、抑制によって大きなA 1タンパク質の任意の発現を邪魔するT A A 停止コドンを含む、Q C P遺伝子の発現によって生じる、K o z l o v s k a , T . M . 他、I n t e r v i r o l o g y 3 9 : 9 ~ 1 5 ( 1 9 9 6 ) を参照のこと）のみから集合することができるか、あるいはキャプシド集合体中にA 1タンパク質サブユニットをさらに含むことができる。

## 【0087】

本明細書で使用するように、用語「ウィルス粒子」は、ウィルスの形態を指す。いくつかのウィルス型では、ウィルスはタンパク質キャプシドに囲まれたゲノムを含み、他のウィルスは追加的な構造（たとえば、エンベロープ、尾部など）を有する。

## 【0088】

非エンベロープ・ウィルス粒子は、ウィルス・ゲノムを囲み保護するタンパク質キャプシドでできている。エンベロープで覆われたウィルスは、ウィルスの遺伝物質を囲むキャプシド構造も有するが、さらに、キャプシドを囲む脂質二重層エンベロープを有する。本発明の好ましい実施形態では、V L Pは、リポタンパク質エンベロープ又はリポタンパク質含有エンベロープを含まない。他の好ましい実施形態では、V L Pはエンベロープをまったく含まない。

## 【0089】

One、a、又はa n：用語「o n e」、「a」、又は「a n」を本開示中で使用するとき、それらは、特に示さない限りは、「少なくとも1つ」、又は「1つ又は複数」を意味する。

## 【0090】

当業者には明らかであろうが、本発明のいくつかの実施形態は、クローニング、ポリメラーゼ連鎖反応、D N A およびR N A の精製、原核および真核細胞などにおける組み換えタンパク質の発現などの、核酸組み換え技術の使用に関するものである。このような方法は当業者によく知られており、公開されている研究室の方法マニュアル中で都合よく発見することができる（たとえば、S a m b r o o k , J . 他、e d s . 、M O L E C U L A R C L O N I N G , A L A B O R A T O R Y M A N U A L 、2 n d . e d i t i o n 、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s 、C o

10

20

30

40

50

1 d Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubel, F. 他、  
 eds.、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)。組織培養細胞系を用いた作業に関する、基礎的な研究室の技法(Cells, J., ed.、CELL BIOLOGY、Academic Press、2nd edition、(1998))、および抗体系の技術(Harlow, E. and Lane, D.、「Antibodies: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988); Deutscher, M. P.、「Guide to Protein Purification」Meth. Enzymol. 128、Academic Press San Diego (1990); Scopes, R. K.、「Protein Purification Principles and Practice」3rd ed.、Springer Verlag、New York (1994))も文献中に十分に記載されており、これらはすべて参考により本明細書に組み込まれている。  
 10

【0091】

2. 免疫応答を高めるための組成物および方法

開示する本発明は、動物中の1つ又は複数の抗原に対する、免疫応答を高めるための組成物および方法を提供する。本発明の組成物は、ウィルス様粒子および免疫賦活物質、好ましくは免疫賦活性核酸、さらに好ましくは非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドを含むか、あるいはこれらからなり、免疫賦活物質、免疫賦活性核酸、又はオリゴヌクレオチドはウィルス様粒子と結合している。さらに好都合には、本発明によって実践者は、感染病、および慢性感染病の予防及び/又は治療、たとえば癌の予防及び/又は治療を含めた、さまざまな治療及び/又は予防防止目的の、このような組成物を構築することができる。  
 20

【0092】

本出願に述べるウィルス様粒子は、ウィルス粒子に似ているが病原性ではない構造を指す。一般にウィルス様粒子は、ウィルス・ゲノムが欠けており、したがって非感染性である。さらにウィルス様粒子は、異種発現によって大量に生成することができ、容易に精製することができる。  
 30

【0093】

好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、組み換えウィルス様粒子である。当業者は、組み換えDNA技術、および公に容易に入手可能であるウィルス・コード配列を使用して、VLPを生成することができる。たとえば、ウィルス・エンベロープ又はコア・タンパク質のコード配列を、ウィルス・プロモーター、およびコード配列と制御配列の機能的連結を可能にする配列の適切な修飾体の制御調節下において、市販のバキュロ・ウィルス・ベクターを使用してバキュロ・ウィルス発現ベクター中で発現させるために、設計することができる。ウィルス・エンベロープ又はコア・タンパク質のコード配列を、たとえば細菌発現ベクター中で発現させるために、設計することもできる。  
 40

【0094】

VLPの例には、B型肝炎ウィルス(Ulrich他、Virus Res. 50: 141~182 (1998))、はしかウィルス(Warnes他、Gene 160: 173~178 (1995))、シンビス・ウィルス、ロタ・ウィルス(米国特許第5,071,651号および5,374,426号)、口蹄疫ウィルス(Twomey他、Vaccine 13: 1603~1610、(1995))、ノーウォーク・ウィルス(Jiang, X. 他、Science 250: 1580~1583 (1990); Matsui, S. M. 他、J. Clin. Invest. 87: 1456~1461 (1991))のキャプシド・タンパク質、レトロ・ウィルスGAGタンパク質(PCT特許出願No. WO 96/30523)、レトロトランスポゾンTyタンパク質p1、B型肝炎ウィルス(WO 92/11291)、ヒト・パピローマ・ウィルス(WO 98/15650)

31)、ヒトポリオーマ・ウィルス (Sasnauskas K. 他、Biol. Chem. 380 (3) : 381~386 (1999) ; Sasnauskas K. 他、Generation of recombinant virus-like particles of different polyomaviruses in yeast. 3rd International Workshop 「Virus-like particles as vaccines」 Berlin, September 26~29 (2001) )、RNAファージ、Ty、fr-ファージ、GA-ファージ、AP 205-ファージ、および特にQ-ファージの表面タンパク質があるが、これらだけには限られない。

## 【0095】

当業者には容易に理解されるように、本発明のVLPは任意の特定の形に限られない。粒子は化学的に、あるいは生物学的プロセスによって合成することができ、天然又は非天然のものであってよい。たとえば、この型の実施形態は、ウィルス様粒子又はそれに由来する組み換え体を含む。より具体的な実施形態では、VLPは、ロタ・ウィルスの組み換えポリペプチド；ノーウォーク・ウィルスの組み換えポリペプチド；アルファ・ウィルスの組み換えポリペプチド；細菌の纖毛又は纖毛様構造を形成する組み換えタンパク質；口蹄疫ウィルスの組み換えポリペプチド；はしかウィルスの組み換えポリペプチド、シンビス・ウィルスの組み換えポリペプチド、レトロ・ウィルスの組み換えポリペプチド；B型肝炎ウィルス(たとえば、HBcAg)の組み換えポリペプチド；タバコモザイク・ウィルスの組み換えポリペプチド；フロックハウス・ウィルスの組み換えポリペプチド；ヒト・パピローマ・ウィルスの組み換えポリペプチド；ポリオーマ・ウィルスの組み換えポリペプチド、および特にヒトポリオーマ・ウィルスの組み換えポリペプチド、および特にBKウィルスの組み換えポリペプチド；バクテリオファージの組み換えポリペプチド、RNAファージの組み換えポリペプチド；Tyの組み換えポリペプチド；fr-ファージの組み換えポリペプチド、GA-ファージの組み換えポリペプチド、AP 205-ファージの組み換えポリペプチド、および特にQ-ファージの組み換えポリペプチドを含むか、あるいはこれらからなってよい。ウィルス様粒子は、このようなポリペプチドの1つ又は複数の断片、およびこのようなポリペプチドの変異体をさらに含むか、あるいはこれらからなってよい。ポリペプチドの変異体は、たとえば、アミノ酸レベルで野生型の相当物と、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は99%の同一性を共有することができる。

## 【0096】

好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、RNAファージの組み換えタンパク質、又はその断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。RNAファージは、a) バクテリオファージQ；b) バクテリオファージR17；c) バクテリオファージfr；d) バクテリオファージGA；e) バクテリオファージSP；f) バクテリオファージMS2；g) バクテリオファージM11；h) バクテリオファージMX1；i) バクテリオファージNL95；k) バクテリオファージf2；およびl) バクテリオファージPP7からなる群から選択されることが好ましい。

## 【0097】

本発明の他の実施形態では、ウィルス様粒子は、RNAバクテリオファージQの、あるいはRNAバクテリオファージfrの組み換えタンパク質、又はその断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。

## 【0098】

本発明の他の好ましい実施形態では、組み換えタンパク質は、RNAファージのコート・タンパク質を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。

## 【0099】

キャプシド又はVLPを形成するRNAファージのコート・タンパク質、又はキャプシド又はVLPへの自己組織化と適合性があるバクテリオファージのコート・タンパク質の断片は、したがって本発明の他の好ましい実施形態である。バクテリオファージQコート

10

20

30

40

50

ト・タンパク質は、たとえば大腸菌中で組み換えによって発現させることができる。さらに、このような発現によって、これらのタンパク質はキャプシドを自然に形成する。さらに、これらのキャプシドは、固有の繰り返し編成である構造を形成する。

#### 【0100】

本発明の組成物を調製するために使用することができる、バクテリオファージのコート・タンパク質の具体的な好ましい例には、バクテリオファージQ (配列番号10; PIR Database、受託番号VCBHQ) はQ CPを指し、および配列番号11; 受託番号AAA16663はQ A1タンパク質を指す)、バクテリオファージR17 (配列番号12; PIR受託番号VCBPR7)、バクテリオファージfr (配列番号13; PIR受託番号VCBPF)、バクテリオファージGA (配列番号14; GenBank受託番号NP-040754)、バクテリオファージSP (配列番号15; GenBank受託番号CAA30374はSPCPを指し、および配列番号16; 受託番号SP A1タンパク質を指す)、バクテリオファージMS2 (配列番号17; PIR受託番号VCBPM2)、バクテリオファージM11 (配列番号18; GenBank受託番号AAC06250)、バクテリオファージMX1 (配列番号19; GenBank受託番号AAC14699)、バクテリオファージNL95 (配列番号20; GenBank受託番号AAC14704)、バクテリオファージf2 (配列番号21; GenBank受託番号P03611)、バクテリオファージPP7 (配列番号22)などのRNAバクテリオファージのコート・タンパク質がある。さらに、バクテリオファージQ のA1タンパク質、又はそのC末端から100、150又は180個ものアミノ酸を失っているC末端切断形を、Q コート・タンパク質のキャプシド集合体中に取り込ませることができる。一般に、キャプシド集合体中のQ CPに対するQ のA1タンパク質の割合は、キャプシド形成を確実にするために制限される。

#### 【0101】

Q コート・タンパク質は、大腸菌中で発現すると、キャプシドに自己組織化することも発見されてきている (Kozlovska TM. 他, GENE 137: 133~137 (1993))。得られたキャプシド又はウィルス様粒子は、直径25nm、およびT = 3、準対称である正二十面体形ファージ様キャプシド構造を示した。さらに、ファージQ の結晶構造は解明されてきている。キャプシドはコート・タンパク質の180のコピーを含み、これらはジスルフィド結合によって共有ペントマーおよびヘキサマー中で連結しており (Golmohammadi, R. 他, Structure 4: 543~555 (1996))、Q コート・タンパク質のキャプシドの著しい安定性をもたらす。しかしながら、組み換えQ コート・タンパク質から作製されたキャプシド又はVLPは、キャプシド中でジスルフィド結合によって他のサブユニットに連結していないか、あるいは不完全に連結したサブユニットを含むことができる。したがって、非還元SDS-PAGEにおいて組み換えQ キャプシドを担持することによって、モノマーQ コート・タンパク質に対応するバンド、およびQ コート・タンパク質のヘキサマー又はペントマーに対応するバンドが、目に見える状態になる。不完全にジスルフィド結合したサブユニットは、非還元SDS-PAGEにおいてジマー、トリマー、又はさらにテトラマーのバンドとして現れると思われる。Q キャプシド・タンパク質は、有機溶媒および変性剤に対して、普通ではない耐性も示す。驚くことに我々は、30%ものDMSOおよびアセトニトリル濃度、および1Mものグアニジニウム濃度が、キャプシドの安定性に影響を与えないことを観察している。Q コート・タンパク質のキャプシドの高い安定性は、特に本発明に従って、哺乳動物およびヒトの免疫化およびワクチン接種においてそれを使用するために、有利な特徴である。

#### 【0102】

大腸菌中で発現することによって、Stoll, E. 他, J. Biol. Chem. 252: 990~993 (1977) 中に記載されたのと同様に、N末端をエドマンの配列決定により我々が観察したように、Q コート・タンパク質のN末端メチオニンは通常除去される。N末端メチオニンが除去されていないQ コート・タンパク質から構成される

VLP、又はN末端メチオニンが切断されているか存在するQコート・タンパク質の混合物を含むVLPも、本発明の範囲内のものである。

【0103】

他のRNAファージのコート・タンパク質も、細菌宿主中で発現することによって自己組織化することが示されてきている(Kastelein, RA.他、Gene 23: 245~254 (1983)、Kozlovskaia, TM.他、Dokl. Akad. Nauk SSSR 287: 452~455 (1986)、Adhin, MR.他、Virology 170: 238~242 (1989)、Ni, CZ.他、Protein Sci. 5: 2485~2493 (1996)、Priano, C.他、J. Mol. Biol. 249: 283~297 (1995))。Qファージ・キャプシドは、コート・タンパク質に加えて、いわゆる読み過ぎタンパク質A1、および成熟タンパク質A2を含む。A1はUGA停止コドンにおける抑制によって生成し、329aaの長さを有する。本発明で使用するファージQの組み換えコート・タンパク質のキャプシドは、A2溶解タンパク質を欠いており、宿主からのRNAを含む。RNAファージのコート・タンパク質は、RNA結合タンパク質であり、ウィルスのライフ・サイクル中に翻訳抑制物質として作用するレプリカーゼ遺伝子の、リボソーム結合部位のステム・ループとする。相互作用の配列および構造要素は知られている(Witthorell, GW. & Uhlenbeck, OC. Biochemistry 28: 71~76 (1989); Lim, F.他、J. Biol. Chem. 271: 31839~31845 (1996))。一般にステム・ループおよびRNAは、中に含まれることが知られているウィルス集合体(Golmohammadi, R.他、Structure 4: 543~5554 (1996))。

10

【0104】

本発明の他の好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、RNAファージの組み換えタンパク質、又はその断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなり、その組み換えタンパク質は、RNAファージの変異体コート・タンパク質、好ましくは前述したRNAファージの変異体コート・タンパク質を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。他の好ましい実施形態では、RNAファージの変異体コート・タンパク質は、置換により少なくとも1個のリシン残基を除去することによって、あるいは置換により少なくとも1個のリシン残基を添加することによって改変されているか；あるいは、RNAファージの変異体コート・タンパク質は、少なくとも1個のリシン残基を欠失させることによって、あるいは、挿入により少なくとも1個のリシン残基を添加することによって改変されている。

20

【0105】

他の好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、RNAバクテリオファージQの組み換えタンパク質、又はその断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなり、その組み換えタンパク質は、配列番号10のアミノ酸配列を有するコート・タンパク質、又は配列番号10および配列番号11又は配列番号11の変異体のアミノ酸配列を有するコート・タンパク質の混合物を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなり、N末端メチオニンは切断されていることが好ましい。

30

【0106】

本発明の他の好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、Qの組み換えタンパク質、又はその断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなり、その組み換えタンパク質は、変異体Qコート・タンパク質を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。他の好ましい実施形態では、これらの変異体コート・タンパク質は、置換により少なくとも1個のリシン残基を除去することによって、あるいは置換により少なくとも1個のリシン残基を添加することによって改変されている。あるいは、これらの変異体コート・タンパク質は、少なくとも1個のリシン残基を欠失させることによって、あるいは、挿入により少なくとも1個のリシン残基を添加することによって改変されている。

40

50

## 【0107】

4個のリシン残基が、Q コート・タンパク質のキャプシドの表面上で露出している。露出したリシン残基がアルギニンによって置換されている、Q 変異体も、本発明用に使用することができる。したがって、以下のQ コート・タンパク質変異体、および変異体Q VLPを、本発明を実施する際に使用することができる。「Q - 240」(Lys13-Arg; 配列番号23)、「Q - 243」(Asn10-Lys; 配列番号24)、「Q - 250」(Lys2-Arg, Lys13-Arg; 配列番号25)、「Q - 251」(配列番号26)および「Q - 259」(Lys2-Arg, Lys16-Arg; 配列番号27)。したがって、本発明の他の好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、変異体Q コート・タンパク質の組み換えタンパク質を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなり、ウイルス様粒子は、a)配列番号23のアミノ酸配列；b)配列番号24のアミノ酸配列；c)配列番号25のアミノ酸配列；d)配列番号26のアミノ酸配列；およびe)配列番号27のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。前に示したQ コート・タンパク質、変異体Q コート・タンパク質VLPおよびキャプシドそれぞれの構築、発現および精製は、2002年1月18日に出願された係属中の米国出願No.10/050,902中に開示されている。詳細には、前述の出願の実施例18をここで参照する。

## 【0108】

本発明の他の好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、Q の組み換えタンパク質、又はその断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなり、その組み換えタンパク質は、前述のQ 変異体のいずれか1個と対応するA1タンパク質の混合物を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。

## 【0109】

本発明の他の好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、RNAファージAP205の組み換えタンパク質、又はその断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。

## 【0110】

AP205のゲノムは、関連ファージ中に存在しない、成熟タンパク質、コート・タンパク質、レプリカーゼおよび2個のオープンリーディング・フレームからなり；溶解遺伝子およびオープンリーディング・フレームは、成熟遺伝子の翻訳において役割を果たしている(Klovin, J.他、J. Gen. Virol. 83:1523~33(2002))。AP205のコート・タンパク質は、プラスミドpAP283-58(配列番号79)から発現される可能性があり、このプラスミドはpQb10の誘導体であり(Kozlowska, T. M.他、Gene 137:133~37(1993))、AP205リボソーム結合部位を含む。あるいは、AP205のコート・タンパク質を、ベクター中に存在するリボソーム結合部位の下流で、pQb185にクローニングすることができる。その全容が参照により組み込まれている、表題「Molecular Antigen Arrays」を有し2002年7月17日に出願されている、同時係属の米国仮特許出願(出願第60/396,126号)中に記載されたように、いずれの手法も、タンパク質の発現およびキャプシドの形成をもたらす。ベクターpQb10およびpQb185は、pGEMベクター由来のベクターであり、これらのベクター中のクローニングされた遺伝子の発現は、trpプロモーターによって制御されている(Kozlowska, T. M.他、Gene 137:133~37(1993))。プラスミドpAP283-58(配列番号79)は、以下の配列中に推定AP205リボソーム結合部位を含み、これはXbaI部位の下流、およびAP205コート・タンパク質のATG開始コドンのすぐ上流である：tctagaATTCTCTGCGCACCCAT CCCGG GTGGCGCCAAAGTGAGGAAATCAGtg。ベクターpQb185は、XbaI部位の下流、および開始コドンのすぐ上流に、シャイン・ダルガノ配列を含む(tctagaTTAACCCAACGCGTAGGAGTCAGGCCatg、シャイン・ダルガノ配列は下線部)。

10

20

30

40

50

## 【0111】

本発明の他の好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、RNAファージAP205の組み換えコート・タンパク質、又はその断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。

## 【0112】

したがって、本発明のこの好ましい実施形態は、キャプシドを形成するAP205コート・タンパク質を含む。このようなタンパク質は組み換えによって発現されるか、あるいは天然源から作製される。細菌中で生成されたAP205コート・タンパク質は、電子顕微鏡法(EM)および免疫拡散法によって実証されるように、キャプシドを自然に形成する。AP205コート・タンパク質によって形成されたキャプシド(配列番号80)と、AP205 RNAファージのコート・タンパク質によって形成されたキャプシドの構造的性質は、EMで見るとほとんど区別がつかない。AP205 VLPは免疫原性が高く、抗原及び/又は抗原決定基と連結して、反復方式で配向した抗原及び/又は抗原決定基を示す、ワクチン構築体を生成させることができる。このように示された抗原に対する高い力価が誘導され、結合した抗原及び/又は抗原決定基は、抗体分子との相互作用のために利用可能であり、免疫原性があることが示される。

10

## 【0113】

本発明の他の好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、RNAファージAP205の組み換え変異体のコート・タンパク質、又はその断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。

20

## 【0114】

AP205コート・タンパク質を含む、組織化能のある変異形のプロリンがアミノ酸5においてトレオニンに置換されたAP205 VLP(配列番号81)も、本発明を実施する際に使用することができ、本発明の他の好ましい実施形態をもたらす。これらのVLP、天然源に由来するAP205 VLP、又はAP205ウィルス粒子は、本発明に従って、抗原に結合して、抗原の整然とした繰り返し配列を生成させることができる。

## 【0115】

AP205 P5-T変異体のコート・タンパク質は、プラスミドpAP281-32(配列番号82)から発現される可能性があり、これはpQb185に直接由来し、変異体AP205コート・タンパク質の遺伝子を、Qコート・タンパク質の遺伝子の代わりに含む。AP205コート・タンパク質の発現用のベクターを、AP205コート・タンパク質の発現用の大腸菌にトランスフェクトする。

30

## 【0116】

コート・タンパク質および変異体コート・タンパク質をそれぞれ発現させ、VLPへの自己組織化をもたらす方法は、その全容が参考により組み込まれている、表題「Molecular Antigen Arrays」を有し2002年7月17日に出願されている、同時係属の米国仮特許出願(出願第60/396,126号)中に記載されている。適切な大腸菌の菌株は、大腸菌K802、JM109、RR1だけには限られないが、これらを含む。適切なベクターおよび菌株、およびそれらの組合せは、コート・タンパク質および変異体コート・タンパク質の発現をそれぞれ、SDS-PAGEにより試験することによって確認することができ、キャプシド形成および集合は、場合によっては最初にキャプシドをゲル濾過により精製し、免疫拡散アッセイ(オクタロニー試験)又は電子顕微鏡法でその後キャプシドを試験することによって確認することができる(Kozlovska, T.M.他、Gene 137:133~37(1993))。

40

## 【0117】

ベクターpAP283-58およびpAP281-32から発現されるAP205コート・タンパク質は、大腸菌の細胞質中でのプロセッシングのために、開始メチオニン・アミノ酸を欠いている可能性がある。切断、非切断形のAP205 VLP、又はこれらの混合物は、本発明の他の好ましい実施形態である。

## 【0118】

50

本発明の他の好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、RNAファージAP205の組み換えコート・タンパク質、又はその断片と、RNAファージAP205の組み換え変異体のコート・タンパク質、又はその断片の混合物を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。

【0119】

本発明の他の好ましい実施形態では、ウィルス様粒子は、RNAファージAP205の組み換えコート・タンパク質又は組み換え変異体のコート・タンパク質の断片を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる。

【0120】

VLPおよびキャプシドにそれぞれ集合することができる組み換えAP205コート・タンパク質断片も、本発明を実施する際に有用である。これらの断片は、それぞれコート・タンパク質および変異体コート・タンパク質の内部又は末端での、欠失によって生成させることができる。VLPへの集合と適合性がある、コート・タンパク質および変異体コート・タンパク質の配列の挿入、又は抗原配列とコート・タンパク質および変異体コート・タンパク質の配列の融合は、本発明の他の実施形態であり、キメラAP205コート・タンパク質、および粒子をそれぞれもたらす。コート・タンパク質配列の挿入、欠失および融合の結果、およびそれがVLPへの集合と適合性があるかどうかは、電子顕微鏡法によって判定することができる。

【0121】

前に記載したAP205コート・タンパク質、コート・タンパク質断片およびキメラ・コート・タンパク質によって形成される粒子は、その全容が参照により組み込まれている、表題「Molecular Antigen Arrays」を有し2002年7月17日に出願されている、同時係属の米国仮特許出願（出願第60/396,126号）中に記載されたように、たとえばSephadose CL-4B、Sephadose CL-2B、Sephadose CL6Bカラム、およびこれらの組合せを使用して、沈殿による画分ステップとゲルfiltrationによる精製ステップの組合せによって、純粋な形で単離することができる。ウィルス様粒子を単離する他の方法は当分野で知られており、これを使用して、バクテリオファージAP205のウィルス様粒子（VLP）を単離することができる。たとえば、超遠心分離を使用して酵母のレトロトランスポゾンTyのVLPを単離することは、その全容が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第4,918,166号中に記載されている。

【0122】

いくつかのRNAバクテリオファージの結晶構造が決定されている（Goldmohamadi, R. 他、Structure 4: 543~554 (1996)）。このような情報を使用して、表面に露出した残基を確認することができ、したがって、RNAファージのコート・タンパク質を、1つ又は複数の反応性アミノ酸残基を挿入又は置換によって挿入することができるように、改変することができる。結果として、これらの改変形のバクテリオファージのコート・タンパク質も、本発明用に使用することができる。したがって、キャプシド又はキャプシド様構造を形成するタンパク質の変異体（たとえば、バクテリオファージQ、バクテリオファージR17、バクテリオファージfr、バクテリオファージGA、バクテリオファージSP、およびバクテリオファージMS2、バクテリオファージAP205のコート・タンパク質）を使用して、本発明の組成物を調製することもできる。

【0123】

前に論じた変異体タンパク質の配列は、その野生型の相当物とは異なるであろうが、これらの変異体タンパク質は、キャプシド又はキャプシド様構造を形成する能力を一般に保持しているであろう。したがって本発明は、キャプシド又はキャプシド様構造を形成するタンパク質の変異体をさらに含む、それぞれ組成物およびワクチン組成物、およびこのような組成物およびワクチン組成物をそれぞれ調製するための方法をさらに含み、個々のタンパク質サブユニットを使用して、このような組成物、およびこれらのタンパク質サブユ

10

20

30

40

50

ニットをコードする核酸分子を調製する。したがって、本発明の範囲内に含まれるのは、キャプシド又はキャプシド様構造を形成し、キャプシド又はキャプシド様構造と会合しこれを形成する能力を保持している、変異体形の野生型タンパク質である。

【0124】

結果として、本発明は、野生型タンパク質と少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、又は 99% 同一であるアミノ酸配列を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなり、整然とした配列を形成しそれぞれ固有の反復構造を有するタンパク質を含む、それぞれ組成物およびワクチン組成物をさらに含む。

【0125】

他に本発明の範囲内に含まれるのは、本発明の組成物を調製するために使用するタンパク質をコードする、核酸分子である。 10

【0126】

他の実施形態では本発明は、配列番号 10 ~ 27 の任意のアミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、又は 99% 同一であるアミノ酸配列を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなるタンパク質を含む、組成物をさらに含む。

【0127】

本発明で使用するのに適したタンパク質には、キャプシド又はキャプシド様構造、又は VLP を形成する、C 末端切斷型変異体のタンパク質もある。このような切斷型変異体の具体例には、1、2、5、7、9、10、12、14、15、又は 17 個のアミノ酸が C 末端から除去されている、配列番号 10 ~ 27 のいずれかに示すアミノ酸配列を有するタンパク質がある。典型的には、これらの C 末端切斷型変異体は、キャプシド又はキャプシド様構造を形成する能力を保持している。 20

【0128】

本発明で使用するのに適した他のタンパク質には、キャプシド又はキャプシド様構造を形成する、N 末端切斷型変異体のタンパク質もある。このような切斷型変異体の具体例には、1、2、5、7、9、10、12、14、15、又は 17 個のアミノ酸が N 末端から除去されている、配列番号 10 ~ 27 のいずれかに示すアミノ酸配列を有するタンパク質がある。典型的には、これらの N 末端切斷型変異体は、キャプシド又はキャプシド様構造を形成する能力を保持している。 30

【0129】

本発明で使用するのに適した他のタンパク質には、キャプシド又はキャプシド様構造を形成する、N および C 末端切斷型変異体がある。適切な切斷型変異体には、1、2、5、7、9、10、12、14、15、又は 17 個のアミノ酸が N 末端から除去されており、1、2、5、7、9、10、12、14、15、又は 17 個のアミノ酸が C 末端から除去されている、配列番号 10 ~ 27 のいずれかに示すアミノ酸配列を有するタンパク質がある。典型的には、これらの N 末端および C 末端切斷型変異体は、キャプシド又はキャプシド様構造を形成する能力を保持している。

【0130】

本発明は、前に記載した切斷型変異体と少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、又は 99% 同一であるアミノ酸配列を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなるタンパク質を含む、組成物をさらに含む。 40

【0131】

したがって本発明は、キャプシド又は VLP を形成するタンパク質から調製した組成物およびワクチン組成物、個々のタンパク質サブユニットおよび VLP 又はキャプシドからこれらの組成物を調製するための方法、これらの個々のタンパク質サブユニット、これらのサブユニットをコードする核酸分子を調製するための方法、および本発明のこれらの組成物を使用して、ワクチン接種および / また個体の免疫応答を誘導するための方法を含む。 50

【0132】

免疫応答を誘導する能力を保持しているVLPの断片は、約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450又は500個のアミノ酸長のポリペプチドであるが、VLPを含むサブユニットの配列の長さに明らかに依存するポリペプチドを含むか、あるいはこれらからなっていてよい。このような断片の例は、免疫応答促進組成物を調製するのに適した、本明細書で論じるタンパク質の断片を含む。

【0133】

本発明の他の好ましい実施形態では、VLPは、リポタンパク質エンベロープ又はリポタンパク質含有エンベロープを含まない。他の好ましい実施形態では、VLPはエンベロープをまったく含まない。 10

【0134】

リポタンパク質エンベロープ又はリポタンパク質含有エンベロープの欠如、および特に、エンベロープの完全な欠如は、その構造および組成がより明確なウィルス様粒子をもたらす。したがって、このようなより明確なウィルス様粒子は、副作用を最少にすることができる。さらに、リポタンパク質含有エンベロープの欠如、および特に、エンベロープの完全な欠如によって、おそらく毒性である分子および発熱物質のウィルス様粒子中への取り込みが、回避されるかあるいは最少になる。

【0135】

前述したように、本発明は、ウィルス様粒子又はそれに由来する組み換え体を含む。当業者は、このような粒子を生成させ抗原をそれに付着させる知識を有している。他の例を与えることによって、本明細書において本発明は、ウィルス様粒子としてのB型肝炎ウィルス様粒子の生成を与える（実施例1）。 20

【0136】

一実施形態では、本発明の組成物中に使用する粒子は、B型肝炎キャプシド（コア）タンパク質（HBcAg）、又はHBcAgの断片から構成されており、これが改変されて、遊離システイン残基の数がなくなっているかあるいは減少している。Zhou他（JVirology. 66: 5393~5398 (1992)）は、改変されて本来存在するシステイン残基が除去されたHBcAgは、会合しマルチマー構造を形成する能力を保持していることを実証した。したがって、本発明の組成物中で使用するのに適したコア粒子には、改変型HBcAg又はその断片を含む粒子があり、その中では、1つ又は複数の本来存在するシステイン残基が欠失しているか、あるいは他のアミノ酸残基（たとえば、セリン残基）で置換されている。 30

【0137】

HBcAgは、B型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のプロセッシングによって生じるタンパク質である。いくつかのイソ型のHBcAgが同定されてきており、それらのアミノ酸配列は当業者には容易に利用可能である。たとえば、図1に示すアミノ酸配列を有するHBcAgタンパク質は、185個のアミノ酸長であり、アミノ酸212個のB型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のプロセッシングによって生じる。このプロセッシングによって、B型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のN末端から、29個のアミノ酸の除去がもたらされる。同様に、185個のアミノ酸長であるHBcAgタンパク質は、アミノ酸214個のB型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のプロセッシングによって生じる。 40

【0138】

好ましい実施形態では、本発明のワクチン組成物を、プロセッシングされた形のHBcAg（すなわち、そこからB型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のN末端リーダー配列が除去されたHBcAg）を使用して調製する。

【0139】

さらに、プロセッシングが後で起こらない条件下でHBcAgが生成されるときは、HBcAgは一般に「プロセッシング済みの」形で発現されよう。たとえば、大腸菌などの細菌系は一般に、「シグナル・ペプチド」とも呼ばれる、真核細胞中で通常発現するタン

10

20

30

40

50

パク質のリーダー配列を除去しない。したがって、タンパク質の細胞質への発現を指示する大腸菌の発現系を使用して、本発明のHBcAgを生成させるとき、これらのタンパク質は一般に、B型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のN末端リーダー配列が存在しないよう10に発現されるであろう。

【0140】

本発明用に使用することができるB型肝炎ウィルス様粒子の作製は、たとえば、WO 00/32227、ここでは特に実施例17～19および21～24中、およびWO 01/85208、ここでは特に実施例17～19、21～24、31および41中、および2002年1月18日に出願された係属中の米国出願No. 10/050,902中に開示されている。後者の出願に関しては、実施例23、24、31および51に特に言及する。3つの文書はすべて、参照により本明細書に明確に組み込まれている。

【0141】

本発明は、改変されて1つ又は複数の追加的システイン残基が欠失しているか、あるいは置換されているHBcAg変異体も含む。したがって、本発明のワクチン組成物は、HBcAgを含む組成物を含み、その中では、図1に示すアミノ酸配列中に存在しないシステイン残基が欠失している。

【0142】

遊離システイン残基が、いくつかの化学的副反応と関連がある可能性があることは、当分野ではよく知られている。これらの副反応には、ジスルフィド交換、たとえば、組合せ療法において他の物質と共に注射又は形成される、化学物質又は代謝産物との反応、又は直接的酸化、およびUV光への暴露によるヌクレオチドとの反応がある。HBcAgには核酸と結合する著しい性質がある事実を特に考慮すると、毒性の付加物が生成されると思われる。したがって毒性の付加物は、多様な種の間に分配すると思われ、これらは低濃度で個別にそれぞれ存在する可能性があるが、一緒になると毒性レベルに達する。

【0143】

前述の事項を鑑みると、改変されて本来存在するシステイン残基が除去されたワクチン組成物中に、HBcAgを使用する1つの利点は、抗原又は抗原決定基が付着すると毒性種が結合することができる部位は、数が減少するかあるいは完全になくなると思われることである。

【0144】

本発明を実施する際に使用するのに適した、いくつかの天然に存在するHBcAg変異体が同定されてきている。たとえば、Yuan他(J. Virol. 73: 10122～10128 (1999))は、配列番号28中の位置97に対応する位置のイソロイシン残基が、ロイシン残基又はフェニルアラニン残基に置換されている、変異体を記載している。いくつかのHBcAg変異体、およびいくつかのB型肝炎コア抗原前駆体の変異体のアミノ酸配列が、GenBankの報告中に開示されている。AAF121240(配列番号29)、AF121239(配列番号30)、X85297(配列番号31)、X02496(配列番号32)、X85305(配列番号33)、X85303(配列番号34)、AF151735(配列番号35)、X85259(配列番号36)、X85286(配列番号37)、X85260(配列番号38)、X85317(配列番号39)、X85298(配列番号40)、AF043593(配列番号41)、M20706(配列番号42)、X85295(配列番号43)、X80925(配列番号44)、X85284(配列番号45)、X85275(配列番号46)、X72702(配列番号47)、X85291(配列番号48)、X65258(配列番号49)、X85302(配列番号50)、M32138(配列番号51)、X85293(配列番号52)、X85315(配列番号53)、U95551(配列番号54)、X85256(配列番号55)、X85316(配列番号56)、X85296(配列番号57)、AB033559(配列番号58)、X59795(配列番号59)、X85299(配列番号60)、X85307(配列番号61)、X65257(配列番号62)、X85311(配列番号63)、X85301(配列番号64)、X85314(配列番号65)、X85287(配列番号66)。

配列番号 6 6 )、 X 8 5 2 7 2 (配列番号 6 7 )、 X 8 5 3 1 9 (配列番号 6 8 )、 A B 0 1 0 2 8 9 (配列番号 6 9 )、 X 8 5 2 8 5 (配列番号 7 0 )、 A B 0 1 0 2 8 9 (配列番号 7 1 )、 A F 1 2 1 2 4 2 (配列番号 7 2 )、 M 9 0 5 2 0 (配列番号 7 3 )、 P 0 3 1 5 3 (配列番号 7 4 )、 A F 1 1 0 9 9 9 (配列番号 7 5 )、 および M 9 5 5 8 9 (配列番号 7 6 )。これらのそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれている。これらの H B c A g 変異体は、配列番号 7 7 中の位置 1 2 、 1 3 、 2 1 、 2 2 、 2 4 、 2 9 、 3 2 、 3 3 、 3 5 、 3 8 、 4 0 、 4 2 、 4 4 、 4 5 、 4 9 、 5 1 、 5 7 、 5 8 、 5 9 、 6 4 、 6 6 、 6 7 、 6 9 、 7 4 、 7 7 、 8 0 、 8 1 、 8 7 、 9 2 、 9 3 、 9 7 、 9 8 、 1 0 0 、 1 0 3 、 1 0 5 、 1 0 6 、 1 0 9 、 1 1 3 、 1 1 6 、 1 2 1 、 1 2 6 、 1 3 0 、 1 3 3 、 1 3 5 、 1 4 1 、 1 4 7 、 1 4 9 、 1 5 7 、 1 7 6 、 1 7 8 、 1 8 2 および 1 8 3 に位置するアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を含めた、いくつかの位置でアミノ酸配列が異なる。本発明の組成物中で使用するのに適しており、本出願の開示に従ってさらに改変することができる他の H B c A g 変異体は、 W O 0 0 / 1 9 8 3 3 3 、 W O 0 0 / 1 7 7 1 5 8 および W O 0 0 / 2 1 4 4 7 8 中に記載されている。  
10

#### 【 0 1 4 5 】

本発明で使用するのに適した H B c A g は、それらが封入、又は結合、あるいはそれ以外の場合は付着できる限り、特にそれらが非メチル化 C p G 含有オリゴヌクレオチドをパッケージ化し、免疫応答を誘導することができる限りは、任意の生物に由来するものであつてよい。

#### 【 0 1 4 6 】

前に示したように、一般的にプロセッシングされた H B c A g (すなわち、リーダー配列が欠けている H B c A g )を、本発明のワクチン組成物中に使用することができるであろう。本発明はワクチン組成物、および前に記載した変異体 H B c A g を使用する、これらの組成物を使用するための方法を含む。  
20

#### 【 0 1 4 7 】

他に本発明の範囲内に含まれるのは、会合してジマー又はマルチマー構造を形成することができる、他の H B c A g 変異体である。したがって本発明は、任意の野生型アミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 7 % 、又は 9 9 % 同一であり、プロセッシングされており、適切な場合は N 末端リーダー配列が除去されているこれらのタンパク質を形成する、アミノ酸配列を含むか、あるいはこれらからなる H B c A g ポリペプチドを含む、ワクチン組成物をさらに含む。  
30

#### 【 0 1 4 8 】

ポリペプチドのアミノ酸配列が、野生型アミノ酸配列、又はそのサブ部分の 1 つと少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 7 % 、又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を有するかどうかは、 B e s t f i t プログラムなどの知られているコンピュータ・プログラムを使用して、従来決定することができる。 B e s t f i t 又は他の配列アラインメント・プログラムを使用して、特定の配列が、たとえば参照アミノ酸配列と 9 5 % 同一であるかどうかを判定するとき、そのパラメータは、同一性のパーセンテージを完全長の参照アミノ酸配列に関して計算し、参照配列中のアミノ酸残基の合計数の 5 % までの相同性のギャップが許容されるように設定する。  
40

#### 【 0 1 4 9 】

配列番号 2 9 ~ 7 2 および 7 3 ~ 7 6 で述べるアミノ酸配列を有する、 H B c A g 変異体と前駆体は、互いに比較的類似している。したがって、配列番号 7 7 中の特定の位置に対応する位置に位置する、 H B c A g 変異体のアミノ酸残基を言及することは、配列番号 7 7 で示すアミノ酸配列中のその位置に存在する、アミノ酸残基を指す。これらの H B c A g 変異体間の相同性は、哺乳動物に感染する B 型肝炎ウィルスではほとんどの部分で十分高いので、当業者には、それぞれ配列番号 7 7 および図 1 に示すアミノ酸配列、および特定の H B c A g 変異体のアミノ酸配列を概説し、「対応する」アミノ酸残基を同定する際に、困難がほとんどないと思われる。さらに、ウッドチャックに感染するウィルスに由来する H B c A g のアミノ酸配列を示す、配列番号 7 3 の H B c A g のアミノ酸配列は、  
50

配列番号 77 で示すアミノ酸配列を有する H B c A g と十分な相同性を有するので、3 個のアミノ酸残基の挿入物が、配列番号 73 中、配列番号 77 のアミノ酸残基 155 と 156 の間に存在することは、容易に明らかである。

【 0150 】

本発明は、鳥類に感染する B 型肝炎ウィルスの H B c A g 変異体を含むワクチン組成物、およびこれらの H B c A g 変異体の断片を含むワクチン組成物も含む。当業者によって理解されるように、これらのポリペプチド中に本来存在する、1 個、2 個、3 個、あるいはそれより多くのシステイン残基は、それらを本発明のワクチン組成物に封入する前に、他のアミノ酸残基で置換又は欠失させることができると思われる。

【 0151 】

前に論じたように、遊離システイン残基を排除することによって、毒性成分が H B c A g に結合することができる部位の数が減少し、同じ又は近隣の H B c A g 分子のリシンとシステイン残基の架橋が起こる可能性がある部位も排除される。したがって、本発明の他の実施形態では、B 型肝炎ウィルスのキャプシド・タンパク質の 1 つ又は複数のシステイン残基は、欠失しているか、あるいは他のアミノ酸残基で置換されている。

【 0152 】

他の実施形態では、本発明の組成物およびワクチン組成物はそれぞれ、C 末端領域（たとえば、配列番号 77 のアミノ酸残基 145 ~ 185 又は 150 ~ 185）が除去されている、H B c A g を含む。したがって、本発明を実施する際に使用するのに適した他の改変型 H B c A g には、C 末端切断型変異体がある。適切な切断型変異体には、1、5、10、15、20、25、30、34、35 個のアミノ酸が C 末端から除去された H B c A g がある。

【 0153 】

本発明を実施する際に使用するのに適した H B c A g には、N 末端切断型変異体もある。適切な切断型変異体には、1、2、5、7、9、10、12、14、15、又は 17 個のアミノ酸が N 末端から除去された改変型 H B c A g がある。

【 0154 】

本発明を実施する際に使用するのに適した他の H B c A g には、N および C 末端切断型変異体がある。適切な切断型変異体には、1、2、5、7、9、10、12、14、15、又は 17 個のアミノ酸が N 末端から除去され、1、5、10、15、20、25、30、34、35 個のアミノ酸が C 末端から除去された H B c A g がある。

【 0155 】

本発明は、前に記載した切断型変異体と少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、又は 99% 同一であるアミノ酸配列を含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれらからなる H B c A g ポリペプチドを含む、それぞれ組成物およびワクチン組成物をさらに含む。

【 0156 】

本発明のいくつかの実施形態では、リシン残基を H B c A g ポリペプチドに導入して、抗原又は抗原決定基と H B c A g の V L P の結合を仲介させる。好ましい実施形態では、本発明の組成物を、配列番号 77 のアミノ酸 1 ~ 144、又は 1 ~ 149、1 ~ 185 を含むか、あるいはこれらからなり、改変されて、位置 79 および 80 に対応するアミノ酸が、G1y - G1y - Lys - G1y - G1y のアミノ酸配列（配列番号 78）を有するペプチドで置換されている、H B c A g を使用して調製する。これらの組成物は、抗原決定基が H B c A g の V L P と結合する場合、これらの実施形態において特に有用である。他の好ましい実施形態では、配列番号 77 の位置 48 および 107 におけるシステイン残基が、セリンに変異する。本発明は、配列番号 29 ~ 74 のいずれかで示すアミノ酸配列を有し、前に示したアミノ酸の変更もある、対応するポリペプチドを含む組成物をさらに含む。他に本発明の範囲内に含まれるのは、会合しキャプシド又は V L P を形成することができ、前に示したアミノ酸の変更がある、他の H B c A g 変異体である。したがって、本発明は、任意の野生型アミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、9

10

20

30

40

50

7 %、又は99 %同一であり、プロセッシングされており、適切な場合はN末端リーダー配列が除去されており、前に示した変更によって改変されている、これらのタンパク質を形成するアミノ酸配列を含むか、あるいはこれらからなる、H B c A g ポリペプチドを含む、それぞれ組成物およびワクチン組成物をさらに含む。

【0157】

本発明の組成物又はワクチン組成物は、異なるH B c A g の混合物を含むことができる。したがって、これらのワクチン組成物は、アミノ酸配列が異なるH B c A g から構成されていてよい。たとえば、「野生型」H B c A g 、および1つ又は複数のアミノ酸残基が変わっている(たとえば、欠失、挿入又は置換)改変型H B c A g を含む、ワクチン組成物を調製することができると思われる。さらに、本発明の好ましいワクチン組成物は、非常に整然とした反復抗原配列を示す組成物である。

【0158】

前に開示したように、本発明は、免疫賦活物質、好ましくは免疫賦活性核酸、およびさらに好ましくはDNAオリゴヌクレオチドを、VLPにパッケージ化することができるという、驚くべき発見に基づくものである。予想外に、VLP中に存在する核酸は、具体的には免疫賦活物質、好ましくは免疫賦活性核酸、およびさらに好ましくはCpGモチーフを含むDNAオリゴヌクレオチドで置換することができる。一例として、CpG-VLPは、それらのCpGを含まない相当物よりも著しく免疫原性があり、より特異的な効果を引き起こし、高いBおよびT細胞応答を誘導する。VLPに連結、融合、又は他の方式で付着した抗原に対する免疫応答は、VLPそのものに対する免疫応答と同様に高められる。さらに、VLPおよび抗原に対するT細胞応答は、Th1型を特に対象とする。パッケージ化された核酸およびCpGはそれぞれ、分解から保護される、すなわち、それらはより安定性がある。さらに、先天性免疫系からの細胞の非特異的活性化は、著しく低下する。

【0159】

先天性免疫系は、微生物病原体によって共有される不变の分子型を認識する能力を有する。最近の研究によって、この認識が効果的な免疫応答を誘導する際の重要なステップであることが、明らかになってきている。微生物体が免疫応答を高める主な機構は、APC、特に樹状細胞を刺激して、前炎症性サイトカインを生成させ、高レベルのT細胞の共賦活分子を発現させることである。これらの活性化された樹状細胞は、後に主要なT細胞応答を開始させ、T細胞仲介のエフェクター機能の型を指示する。

【0160】

2クラスの核酸、すなわち1)免疫賦活配列を含む細菌DNA、特に特定の隣接塩基中の非メチル化CpGジヌクレオチド(CpGモチーフと呼ばれる)、および2)さまざまな型のウィルスによって合成される二本鎖RNAが、免疫応答を高める細菌要素中の重要な構成要素である。ポリイノシン-ポリシチジル酸(ポリI:C)などの合成二本鎖(ds)RNAは、樹状細胞に前炎症性サイトカインの生成を誘導させ、高レベルの共賦活分子を発現させることができる。

【0161】

TokunagaおよびYamamoto他による一連の研究によって、細菌DNA又は合成オリゴデオキシヌクレオチドが、ヒトPBM Cおよびマウス脾臓細胞を誘発して、I型インターフェロン(IFN)を生成させることができることが示されている(Yamamoto他、Springer Semin Immunopathol. 22: 11~19中に概説されている)。Poly(I:C)は、本来はI型IFNの強力な誘導物質として合成されたが、IL-12などの他のサイトカインも誘導する。

【0162】

好ましいリボ核酸は、ポリイノシン-ポリシチジル酸の二本鎖RNA(ポリI:C)を含む。リボ核酸およびその修飾体、およびそれらを生成するための方法は、Levy、H.B(Methods Enzymol. 1981, 78: 242~251)、Declercq, E(Methods Enzymol. 1981, 78: 227~236)、

10

20

30

40

50

およびTorrence, P. F. (Methods Enzymol 1981; 78: 326~331)、およびその中の参照によって記載されてきている。リボ核酸は、生物から単離することができる。リボ核酸は、他の合成リボ核酸、特に合成ポリ(I:C)オリゴヌクレオチドも含み、これらはリン酸ジエステル骨格の修飾によって、特にホスホロチオエートの修飾によって、ヌクレアーゼ耐性になっている。他の好ましい実施形態では、ポリ(I:C)のリボース骨格が、デオキシリボースによって置換されている。当業者は、合成オリゴヌクレオチドの合成の仕方の手順を知っている。

#### 【0163】

本発明の他の好ましい実施形態では、t o l 1 様レセプターを活性化させる分子が含まれる。10個のヒトのt o l 1 様レセプターが、今日までに知られている。これらは、さまざまなりガンドによって活性化される。TLR2はペプチドグリカン、リポタンパク質、リポテイコ酸、およびザイモサンによって活性化され、TLR3は二本鎖RNA、ポリ(I:C)などによって活性化され、TLR4はリボ多糖、リポテイコ酸、およびタクソールによって活性化され、TLR5は、細菌フラジェラ、特にフラジェリン・タンパク質によって活性化され、TLR6はペプチドグリカンによって活性化され、TLR7はイミクイモイドおよびR418などのイミダゾキノリン化合物によって活性化され、TLR9は細菌DNA、特にCpGのDNAによって活性化される。TLR1、TLR8およびTLR10のリガンドは、これまで知られていない。しかしながら、近年の報告によって、同じ受容体が異なるリガンドと反応することができ、他の受容体が存在することが示されている。前述のリガンドの列举は網羅的なものではなく、他のリガンドは当業者の知識の範囲内にある。

#### 【0164】

好ましくは、前記非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドは、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>が任意のヌクレオチドである配列

5' X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> C G X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> 3'

を含む。さらにオリゴヌクレオチドは、約6~約100,000個のヌクレオチド、好ましくは約6~約2000個のヌクレオチド、より好ましくは約20~約2000個のヌクレオチド、より好ましくは約20~約300個のヌクレオチドを含むことができる。さらにオリゴヌクレオチドは、100超~約2000個のヌクレオチド、好ましくは100超~約1000個のヌクレオチド、より好ましくは100超~約500個のヌクレオチドを含むことができる。

#### 【0165】

好ましい実施形態では、CpG含有オリゴヌクレオチドは、リン酸骨格の1つ又は複数のホスホロチオエート修飾体を含む。たとえば、リン酸骨格の1つ又は複数のリン酸の修飾体を有するか、あるいは修飾されたリン酸骨格のすべてを有するCpG含有オリゴヌクレオチド、および1個、数個、あるいはすべてのヌクレオチドのリン酸骨格の修飾体が、ホスホロチオエート修飾体であるCpG含有オリゴヌクレオチドは、本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0166】

CpG含有オリゴヌクレオチドは、組み換え体、ゲノム、合成、cDNA、プラスミド由来、および一本又は二本鎖であってもよい。本発明において使用するために、当分野でよく知られているいくつかの手順のいずれかを使用して、核酸を新たに合成することができる。たとえば、b-シアノエチル・ホスホアミダイト法(Beaucage, S. L., and Caruthers, M. H., Tet. Let. 22: 1859 (1981))；ヌクレオシドH-リン酸法(Garegg他、Tet. Let. 27: 4051~4054 (1986))；Froehler他、Nucl. Acid. Res. 14: 5399~5407 (1986)；Garegg他、Tet. Let. 27: 4055~4058 (1986)、Gaffney他、Tet. Let. 29: 2619~2622 (1988))。これらの化学的方法は、市場で入手可能なさまざまな自動式オリゴヌクレオチド合成装置によって、実施することができる。あるいは、CpGをプラスミド中において

10

20

30

40

50

大規模で生成させることができ (Sambrook, T. 他、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989を参照のこと)、これは被験者に投与された後にオリゴヌクレオチドに分解される。オリゴヌクレオチドは、知られている技法、制限酵素、エクソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼを利用する技法を使用して、既存の核酸配列 (たとえば、ゲノム又はcDNA) から作製することができる。

【0167】

免疫賦活物質、免疫賦活性核酸、および非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドは、当分野で知られている任意の方法によってVLPに結合することができ、その組成物は動物の免疫応答を高めるものとする。たとえば、オリゴヌクレオチドは、共有的又は非共有的に結合することができる。さらに、VLPは、完全あるいは部分的に、免疫賦活物質、免疫賦活性核酸、および非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドを封入することができる。免疫賦活性核酸、および非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド結合部位 (本来存在するもの又は本来存在しないもの)、DNA結合部位、又はRNA結合部位などのVLP部位に結合することができる。他の実施形態では、VLP部位はアルギニンリッチリピートを含む。

【0168】

本発明の組成物の1つの具体的な使用は、抗原に対する特定の免疫応答を高める目的で、樹状細胞を活性化させることである。免疫応答は、エキソビボ又はインビボの技法を使用して、高めることができる。エキソビボの手順を、自己又は異種細胞に使用することができるが、自己細胞に使用することが好ましい。好ましい実施形態では、樹状細胞を末梢血液又は骨髄から単離するが、これは樹状細胞の任意の源から単離することができる。癌の免疫療法の目的での、樹状細胞のエキソビボでの操作は、Engleman, E. G.、Cytotechnology 25:1 (1997); Van Schooten, W. 他、Molecular Medicine Today, June, 255 (1997); Steinman, R. M.、Experimental Hematology 24:849 (1996); およびGluckman, J. C.、Cytokines, Cellular and Molecular Therapy 3:187 (1997)を含めた、当分野のいくつかの参考文献に記載されてきている。

【0169】

樹状細胞を、インビボでの方法を使用して、本発明の組成物と接触させることもできる。これを実施するために、CpGを、VLPに場合によっては連結、融合、又は他の方式で付着した抗原と組み合わせて、免疫療法を必要とする被験者に直接投与する。いくつかの実施形態では、VLP/CpGを腫瘍の局所領域に投与することができる。当分野で知られている任意の方法、たとえば腫瘍への直接的な注射によって、これを実施することができる。

【0170】

本発明の組成物は、ウィルス様粒子と結合した抗原又は抗原決定基をさらに含むことができる。本発明は、所望の治療効果を考慮して選択した抗原又は抗原決定基に従って変わる、組成物を提供する。本発明で使用するのに適した非常に好ましい抗原又は抗原決定基は、WO 00/32227、WO 01/85208 およびWO 02/056905中に開示されており、その開示は参考によりその全容がここに組み込まれている。

【0171】

抗原は、知られているかあるいは今だに起源が知られていない、任意の抗原であってよい。抗原は細菌、ウィルス又は他の病原体から単離することができ、あるいはコードされている適切な核酸の発現から得られる、組み換え抗原であってよい。抗原は、プリオン、腫瘍、自己分子、非ペプチド・ハプテン分子、アレルゲンおよびホルモンから単離することができる。好ましい実施形態では、抗原は組み換え抗原であってよい。当然ながら、抗原の選択は、所望の免疫応答および宿主に依存する。

10

20

30

40

50

## 【0172】

本発明の免疫増強組成物の一実施形態では、VLPそのものに対する免疫応答を誘導する。本発明の他の実施形態では、ウィルス様粒子を、それに対する免疫応答の増強が望まれる、抗原／免疫原に連結、融合、又は他の方式で付着させる。

## 【0173】

本発明の他の好ましい実施形態では、少なくとも1つの抗原又は抗原決定基を、ウィルス様粒子に融合させる。前に略述したように、VLPは、VLPに集合する少なくとも1つのサブユニットから典型的には構成される。したがってここでも、本発明の他の好ましい実施形態では、抗原又は抗原決定基は、VLP中に取り込まれ、キメラVLP-サブユニット-抗原融合体を生成させることができる、ウィルス様粒子又はタンパク質の、少なくとも1つのサブユニットと融合する。

10

## 【0174】

抗原又は抗原決定基の融合は、VLPサブユニット配列中への挿入によって、あるいはVLP中に取り込ませることができるVLPサブユニット又はタンパク質のN又はC末端との融合によって、行うことができる。本明細書では以後、ペプチドとVLPサブユニットの融合タンパク質を指すとき、サブユニット配列の末端との融合、又はサブユニット配列中でのペプチドの内部挿入が含まれる。

## 【0175】

抗原又は抗原決定基配列を、サブユニット配列中の一部分が欠けており切断型変異体とも呼ばれる、VLPサブユニットの変異体に挿入することによって、融合を行うこともできる。切断型変異体には、VLPサブユニットの配列の一部の、N又はC末端、又は内部欠失がある可能性がある。たとえば、たとえばアミノ酸残基79～81が欠失している特定のVLP-HBcAgは、内部欠失している切断型変異体である。切断型変異体VLPサブユニットのN又はC末端との、抗原又は抗原決定基の融合も、本発明の実施形態となる。同様に、エピトープのVLPサブユニットの配列への融合を、置換によって行うこともでき、たとえば、特定のVLP-HBcAgに関しては、アミノ酸79～81を外来性のエピトープで置換する。したがって、以後本明細書で指す融合は、抗原又は抗原決定基配列をVLPサブユニットの配列に挿入することによって、又はVLPサブユニットの配列の一部を抗原又は抗原決定基で置換することによって、又は欠失、置換又は挿入を組み合わせることによって、行うことができる。

20

## 【0176】

キメラ抗原又は抗原決定基-VLPサブユニットは、VLPに自己組織化することができる一般にできるであろう。それらのサブユニットと融合したエピトープをディスプレイするVLPも、本明細書ではキメラVLPと呼ぶ。示したように、ウィルス様粒子は、少なくとも1つのVLPサブユニットを含むか、あるいはこれらから構成される。本発明の他の実施形態では、ウィルス様粒子は、キメラVLPサブユニットと非キメラVLPサブユニット、すなわち、融合した抗原を有しておらず、いわゆるモザイク粒子をもたらすVLPサブユニットの混合物を含むか、あるいはこれらから構成される。VLPの形成、VLPへの集合を確実にするために、これが有利である可能性がある。これらの実施形態では、キメラVLPサブユニットの比率は1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、95%以上であってよい。

30

## 【0177】

側面アミノ酸残基に、VLPのサブユニットの配列のいずれかの端と融合した、ペプチド又はエピトープの配列のいずれかの端に、あるいはこのようペプチド配列をVLPのサブユニットの配列に内部挿入するために、加えることができる。グリシンおよびセリン残基は、融合させるペプチドに加える側面配列中に使用するための、特に好ましいアミノ酸である。グリシン残基によって、追加的な柔軟性が与えられ、これによって外来性配列のVLPサブユニットの配列への融合の、潜在的な不安定化効果を低下させることができる。

40

## 【0178】

50

本発明の特定実施形態では、VLPはB型肝炎コア抗原VLPである。抗原又は抗原決定基と、HBcAgのN末端(Neyrinck, S.他、Nature Med. 5: 1157~1163(1999))、又はいわゆる主要免疫優性領域(MIR)への挿入物の融合タンパク質は、記載されてきており(Pumpens, P. and Grens, E.、Intervirology 44: 98~114(2001))、WO 01/98333)、本発明の好ましい実施形態である。本来存在するMIRが欠失したHBcAgの変異体も、記載されてきており(Pumpens, P. and Grens, E.、Intervirology 44: 98~114(2001))、参照によりその全容が明確に組み込まれている)、N又はC末端との融合、およびwt HBcAgと比較した欠失部位に対応するMIRの位置における挿入は、本発明の他の実施形態である。C末端との融合も記載されてきている(Pumpens, P. and Grens, E.、Intervirology 44: 98~114(2001))。当業者は、古典的な分子生物学の技法(Sambrook, J.他、eds.、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd.edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)、Ho他、Gene 77: 51(1989))を使用して、融合タンパク質の構築法に関する指針を容易に発見するであろう。HBcAggおよびHBcAgg融合タンパク質をコードし、HBcAggおよびHBcAgg融合タンパク質を発現させるために有用である、ベクターおよびプラスミドが記載されており(Pumpens, P. and Grens, E.、Intervirology 44: 98~114(2001))、Neyrinck, S.他、Nature Med. 5: 1157~1163(1999))、本発明を実施する際に使用することができる。HBcAgのMIR中に挿入されるエピトープの自己組織化およびディスプレイの効率を最適にするための、1つの重要な要因は、挿入部位、および挿入によってMIR中のHBcAg配列から欠失するアミノ酸の数(Pumpens, P. and Grens, E.、Intervirology 44: 98~114(2001))；EP 0421635；米国特許第6,231,864号)、あるいは言い換えれば、HBcAgを形成するどのアミノ酸が新しいエピトープで置換されるかの選択である。たとえば、HBcAgアミノ酸76~80、79~81、79~80、75~85又は80~81を外来性エピトープで置換することは、記載されてきている(Pumpens, P. and Grens, E.、Intervirology 44: 98~114(2001))；EP 0421635；米国特許第6,231,864号)。HBcAgは長いアルギニン尾部を含み(Pumpens, P. and Grens, E.、Intervirology 44: 98~114(2001))、これはキャプシドの集合には必須ではなく核酸を結合させることができる(Pumpens, P. and Grens, E.、Intervirology 44: 98~114(2001))。このアルギニン尾部を含むHBcAg、およびこれが欠けているHBcAgはいずれも、本発明の実施形態である。

### 【0179】

本発明の他の好ましい実施形態では、VLPはRNAファージのVLPである。RNAファージの主なコート・タンパク質は、細菌、特に大腸菌中での発現によって、VLP中に自然に集合する。本発明の組成物を調製するために使用することができる、バクテリオファージのコート・タンパク質の具体例には、RNAバクテリオファージ、バクテリオファージQ(配列番号10；PIR Database、受託番号VCBHQはQCPを指し、および配列番号11；受託番号AAA16663はQ A1タンパク質を指す)、およびバクテリオファージfr(配列番号13；PIR受託番号VCBPF)などのコート・タンパク質がある。

### 【0180】

より好ましい実施形態では、少なくとも1つの抗原又は抗原決定基は、Qコート・タンパク質と融合している。エピトープが切断形であるQのA1タンパク質のC末端と融

合したか、あるいはA 1タンパク質に挿入された融合タンパク質構築体は記載されてきている (Kozlovska, T. M. 他, *Intervirology*, 39: 9 ~ 15 (1996))。A 1タンパク質はUGA停止コドンにおける抑制によって生じ、329aa、又はN末端メチオニンの切断を考慮する場合、328aaの長さを有する。アラニン (Q C P 遺伝子によってコードされた第2のアミノ酸) の前のN末端メチオニンの切断は、通常は大腸菌において起こり、Q コート・タンパク質のN末端の場合も同様である。A 1遺伝子の一部分、UGAアンバー・コドンの3'はCP伸長部をコードし、これはアミノ酸195個の長さを有する。CP伸長部の位置72と73の間に、少なくとも1つの抗原又は抗原決定基を挿入することによって、本発明の他の実施形態がもたらされる (Kozlovska, T. M. 他, *Intervirology* 39: 9 ~ 15 (1996))。C末端が切断されたQ のA 1タンパク質のC末端における、抗原又は抗原決定基の融合によって、本発明の他の好ましい実施形態がもたらされる。たとえば、Kozlovska他 (*Intervirology*, 39: 9 ~ 15 (1996)) は、エピトープが位置19で切断されたQ C P伸長部のC末端で融合している、Q のA 1タンパク質融合体を記載している。

## 【0181】

Kozlovska他 (*Intervirology*, 39: 9 ~ 15 (1996)) によって記載されたように、融合エピトープをディスプレイする粒子の集合には、A 1タンパク質 - 抗原融合体、およびモザイク粒子を形成するためのwt CPの存在が典型的には必要である。しかしながら、ウィルス様粒子、ここでは特に、そこに融合した少なくとも1つの抗原又は抗原決定基を有するVLPサブユニットのみから構成される、RNAファージQ コート・タンパク質のVLPを含む実施形態も、本発明の範囲内にある。

## 【0182】

モザイク粒子の生成は、いくつかの方法によって行うことができる。Kozlovska他 *Intervirology*, 39: 9 ~ 15 (1996) は、3つの方法を記載しており、これらはいずれも本発明を実施する際に使用することができる。第1の手法では、VLP上の融合エピトープの有効なディスプレイを、CPとCP伸長部の間にUGA停止コドンを有する、Q のA 1タンパク質融合体をコードするプラスミドの発現によって、UGAコドンのTrpへの翻訳をもたらすクローニングされたUGA抑制tRNAをコードするプラスミド (pISM3001プラスミド (Smiley B. K. 他, Gene 134: 33 ~ 40 (1993))) を収用する、大腸菌菌株中において仲介する。他の手法では、CP遺伝子の停止コドンをUAAに改変し、A 1タンパク質 - 抗原融合体を発現する第2のプラスミドを同時形質転換する。この第2のプラスミドは異なる抗生物質耐性をコードしており、その複製起点は第1のプラスミドと適合性がある (Kozlovska, T. M. 他, *Intervirology* 39: 9 ~ 15 (1996))。第3の手法では、Kozlovska, T. M. 他, *Intervirology* 39: 9 ~ 15 (1996) の図1に記載されたように、CPとA 1タンパク質 - 抗原融合体が2シストロン方式でコードされており、Trpプロモーターなどのプロモーターに動作可能に連結している。

## 【0183】

他の実施形態では、抗原又は抗原決定基を、fr CPのアミノ酸2と3 (切断されるCP、すなわちN末端メチオニンが切断される番号) の間に挿入し、したがって抗原又は抗原決定基 - fr CP融合タンパク質がもたらされる。VLPに自己組織化するfr CP融合タンパク質を構築し発現させるための、本発明を実施する際に有用なベクターおよび発現系は記載されてきている (Pushko P. 他, *Prot. Eng.* 6: 883 ~ 891 (1993))。特定の実施形態では、抗原又は抗原決定基の配列を、fr CPの残基3および4が欠失している、アミノ酸2の後ろのfr CPの欠失変異体に挿入する (Pushko P. 他, *Prot. Eng.* 6: 883 ~ 891 (1993))。

## 【0184】

10

20

30

40

50

R N A ファージ M S - 2 のコート・タンパク質の N 末端の隆起状 R - ヘパリンにおけるエピトープの融合、およびその後の R N A ファージ M S - 2 の自己組織化 V L P 上での融合エピトープのディスプレイも、記載されてきており ( WO 92 / 13081 ) 、 M S - 2 R N A ファージのコート・タンパク質の挿入又は置換による、抗原又は抗原決定基の融合も、本発明の範囲内に入るものである。

【 0185 】

本発明の他の実施形態では、抗原又は抗原決定基を、パピローマ・ウィルスのキャプシド・タンパク質と融合させる。より具体的な実施形態では、抗原又は抗原決定基を、ウシ乳頭腫ウィルス 1 型 ( B P V - 1 ) の主要なキャプシド・タンパク L 1 と融合させる。バキュロ・ウィルス / 昆虫細胞系において B P V - 1 融合タンパク質を構築し発現させるための、ベクターおよび発現系は記載されてきている ( Chackerian, B. 他、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 2373 ~ 2378 ( 1999 ) 、 WO 00 / 23955 ) 。 B P V - 1 L 1 のアミノ酸 130 ~ 136 を抗原又は抗原決定基で置換することによって、 B P V - 1 L 1 - 抗原融合タンパク質がもたらされ、これは本発明の好ましい実施形態である。バキュロ・ウィルス・ベクター中のクローニング、およびバキュロ・ウィルス感染した S f 9 細胞中の発現は記載されてきており、本発明を実施する際に使用することができる ( Chackerian, B. 他、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 2373 ~ 2378 ( 1999 ) 、 WO 00 / 23955 ) 。融合した抗原又は抗原決定基をディスプレイする集合粒子の精製は、たとえばゲル濾過、又はスクロース勾配超遠心分離などの、いくつかの方法によって行うことができる。 ( Chackerian, B. 他、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 2373 ~ 2378 ( 1999 ) 、 WO 00 / 23955 ) 。

【 0186 】

本発明の他の実施形態では、抗原又は抗原決定基を、 T y V L P 中に取り込ませることができる T y タンパク質と融合させる。より具体的な実施形態では、抗原又は抗原決定基を、 T Y A 遺伝子によってコードされた、 p 1 又はキャプシド・タンパク質と融合させる ( Roth, J. F. 、 Yeast 16 : 785 ~ 795 ( 2000 ) ) 。酵母のレトロトранスポゾン T y 1 、 2 、 3 および 4 は、 *Saccharomyces cerevisiae* から単離されており、一方レトロトранスポゾン T f 1 は *Schizosaccharomyces pombe* から単離されている ( Boeke, J. D. and Sandmeyer, S. B. 、「 Yeast Transposable elements 」、 in The molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces* : Genome dynamics, Protein Synthesis, and Energetics 、 p. 193 、 Cold Spring Harbor Laboratory Press ( 1991 ) ) 。レトロトранスポゾン T y 1 および 2 は、植物および動物要素のコピア類と関連があり、一方 T y 3 は、レトロトранスポゾンのジプシー科に属し、植物および動物のレトロ・ウィルスと関連がある。 T y 1 レトロトранスポゾンでは、 Gag 又はキャプシド・タンパク質とも呼ばれる p 1 タンパク質は、アミノ酸 440 個の長さを有している。 P 1 は V L P の成熟中に位置 408 で切断し、 V L P の必須要素である p 2 タンパク質がもたらされる。

【 0187 】

p 1 との融合タンパク質、および酵母菌中で前記融合タンパク質を発現させるためのベクターは、記載されてきている ( Adams, S. E. 他、 Nature 329 : 68 ~ 70 ( 1987 ) ) 。したがって、たとえば、抗原又は抗原決定基を、抗原又は抗原決定基をコードする配列を p M A 5620 プラスミドの B a m H 1 部位に挿入することによって、 p 1 と融合させることができる ( Adams, S. E. 他、 Nature 329 : 68 ~ 70 ( 1987 ) ) 。外来性エピトープをコードする配列を p M A 5620 ベクターにクローニングによって、 T y 1 - 15 の p 1 のアミノ酸 1 ~ 381 を含み、 C 末端

10

20

30

40

50

が外来性エピトープのN末端と融合した融合タンパク質の発現がもたらされる。同様に、抗原又は抗原決定基のN末端融合、又はp1配列への内部挿入、又はp1配列の一部分の置換も、本発明の範囲内にあることを意味する。特に、抗原又は抗原決定基の、Tyタンパク質p1 (EP0677111)のTy配列、アミノ酸30~31、67~68、113~114および132~133の間への挿入によって、本発明の好ましい実施形態がもたらされる。

【0188】

抗原又は抗原決定基の融合に適した他のVLPは、たとえば、レトロ・ウィルス様粒子 (WO9630523)、HIV2 Gag (Kang, Y. C. 他、Biol. Chem. 380: 353~364 (1999))、ササゲ・モザイク・ウィルス (Taylo, K. M. 他、Biol. Chem. 380: 387~392 (1999))、パルボ・ウィルスVP2 VLP (Rueda, P. 他、Virology 263: 89~99 (1999))、HBsAg (米国特許第4,722,840号、EP0020416B1) である。

【0189】

本発明を実施するのに適したキメラVLPの例には、Intervirology 39: 1 (1996) 中に記載されたものもある。本発明において使用するために企図されるVLPの他の例は: HPV-1、HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-33、HPV-45、CRPV、COPV、HIV GAG、タバコモザイク・ウィルスである。SV-40、ポリオーマ・ウィルス、アデノ・ウィルス、単純疱疹ウィルス、ロタ・ウィルスおよびノーウォーク・ウィルスのウィルス様粒子も作製されており、抗原又は抗原決定基を含むこれらのVLPのキメラVLPも、本発明の範囲内にある。

【0190】

示したように、ウィルス様粒子構成モノマーの配列中の挿入によって、ウィルス様粒子と融合した抗原を含む実施形態も、本発明の範囲内にある。いくつかの場合、欠失を含むウィルス様粒子構成モノマーの形で、抗原を挿入することができる。これらの場合、ウィルス様粒子構成モノマーは、挿入抗原の不在下では、ウィルス様構造を形成することができない。

【0191】

いくつかの場合、組み換えDNA技術を使用して、異種タンパク質とVLPタンパク質を融合させることができる (Kratz, P. A. 他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1915 (1999))。たとえば、本発明は、本発明の抗原(又はその一部分、好ましくは少なくとも10、20又は50個のアミノ酸)と、組み換えによって融合するか、あるいは化学的に複合して(共有的および非共有的複合)、融合タンパク質又は複合体を生成させるVLPを含む。融合は必ずしも直接的である必要はなく、連結配列を介して生じる可能性がある。より一般的には、ウィルス様粒子と融合、複合、あるいはそれ以外の場合は付着したエピトープを、本発明に従って抗原として使用する場合、スペーサー又は連結配列を、典型的にはエピトープの一端又は両端に加える。このような連結配列は、プロテアーゼ、プロテアーゼによって認識される、細胞のエンドソーム又は他の小胞区画の配列を含むことが好ましい。

【0192】

結合の1つの方法はペプチド結合によるものであり、その中で複合体は連続的ポリペプチド、すなわち融合タンパク質であってよい。本発明の融合タンパク質中では、異なるペプチド又はポリペプチドが、イン・フレームで互いに連結して、連続的ポリペプチドを形成する。したがって、融合タンパク質の第1の部分は抗原又は免疫原を含み、融合タンパク質の第2の部分、第1の部分に対するN末端又はC末端は、VLPを含む。あるいは、抗原の両端上でのVLPへの任意選択の連結配列の内部挿入も、本発明に従って行うことができる。

【0193】

10

20

30

40

50

H B c A g を V L P として使用するとき、抗原を H B c A g 粒子の C 末端と連結させることが好ましい。リンパ球性脈絡膜炎ウィルス ( L C M V ) 糖タンパク質由来の M H C クラス I 拘束ペプチド p 3 3 の C 末端融合体である、 B 型肝炎コア抗原 ( H B c A g ) を、モデル抗原 ( H B c A g - p 3 3 ) として使用した。アミノ酸 1 8 5 個の長さの野生型 M B c タンパク質を、正二十面体構造をとる 1 8 0 個のサブユニットから構成される十分に構造化された粒子に集合させる。構造化キャプシドを形成する能力を保ちながら、異なる位置での外来性配列の比較的大きな挿入物を認める際の、 H B c A g および他の V L P の柔軟性は、文献中に十分に記載されている。これによって H B c V L P が、非複製型ワクチンを設計するための魅力的な候補となっている。

## 【 0 1 9 4 】

10

柔軟性のある連結配列 ( たとえば、ポリグリシン / ポリセリン含有配列、 [ G l y <sub>4</sub> S e r ] <sub>2</sub> など ( H u s t o n 他、 M e t h . E n z y m o l . 2 0 3 : 4 6 ~ 8 8 ( 1 9 9 1 ) ) を、融合タンパク質、抗原とリガンドの間に挿入することができる。さらに、融合タンパク質を構築して「エピトープ・タグ」を含ませることができ、たとえば標識又は精製目的で、融合タンパク質を抗体 ( たとえば、モノクローナル抗体 ) と結合させることができる。エピトープ・タグの一例は、モノクローナル抗体 Y L 1 / 2 によって認識される、 G l u - G l u - P h e トリペプチドである。

## 【 0 1 9 5 】

本発明は、 V L P をコードする配列および抗原 / 免疫原をコードする配列を含む、キメラ D N A にも関する。 D N A は、たとえばバキュロ・ウィルスによって形質転換された昆虫細胞中で、酵母菌中で、あるいは細菌中で発現することができる。発現系に関する制限はなく、その大部分の選択品が通常の使用に利用可能である。多量のタンパク質の発現を可能にする系を、使用することが好ましい。一般に、細菌の発現系が、その有効性を考慮して好ましい。本発明の範囲内で使用するのに適した細菌の発現系の一例は、 C l a r k e 他、 J . G e n . V i r o l . 7 1 : 1 1 0 9 ~ 1 1 1 7 ( 1 9 9 0 ) ; B o r i s o v a 他、 J . V i r o l . 6 7 : 3 6 9 6 ~ 3 7 0 1 ( 1 9 9 3 ) ; および S t u d i e r 他、 M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 5 : 6 0 ~ 8 9 ( 1 9 9 0 ) によって記載されたものである。適切な酵母菌の発現系の一例は、 E m r , M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 5 : 2 3 1 ~ 3 ( 1 9 9 0 ) によって記載されたものであり；キャプシド・タンパク質を作製するために以前から使用されている、バキュロ・ウィルス系も適切である。構造的又は誘導的発現系を使用することができる。利用可能な発現系の選択および可能な改変によって、タンパク質が得られる形を調節することができる。

20

## 【 0 1 9 6 】

30

本発明の特定の実施形態では、それに対する免疫応答の増強が望まれる抗原を、 B 型肝炎ウィルス・キャプシド ( コア ) タンパク質 ( H B c A g ) に、イン・フレームで連結、融合、又は他の方式で付着させる。しかしながら、本発明の融合タンパク質構築体中に、他のウィルス様粒子を使用することは、すべての当業者に明らかであろう。

## 【 0 1 9 7 】

40

本発明の他の好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの抗原又は抗原決定基を、少なくとも 1 つの共有結合によってウィルス様粒子と結合させる。少なくとも 1 つの抗原又は抗原決定基は、少なくとも 1 つの共有結合によってウィルス様粒子と結合し、前記共有結合が非ペプチド結合であり、抗原又は抗原決定基の配列、および抗原又は抗原決定基 - V L P 複合体をそれぞれもたらすことが好ましい。この抗原又は抗原決定基の配列および複合体はそれぞれ、典型的かつ好ましくは、繰り返し型の整然とした構造を有する。なぜなら、少なくとも 1 つの抗原又は抗原決定基は、配向方式で V L P と結合するからである。以下で明らかになるように、繰り返し型の整然とした、抗原又は抗原決定基 - V L P 配列および複合体の形成はそれぞれ、少なくとも 1 つの抗原又は抗原決定基と V L P の、配向および指定され、かつ明確なそれぞれ結合および付着によって確実になる。さらに、 V L P の典型的な固有の十分に繰り返され編成された構造は、非常に整然とした繰り返し方式で抗原又は抗原決定基のディスプレイに有利に貢献し、十分に編成された繰り返し型の抗原

50

又は抗原決定基 - VLP 配列および複合体をそれもたらす。

【0198】

したがって、好ましい本発明の複合体および配列はそれぞれ、配列の表面上の抗原の、その十分に編成された構造、寸法、および反復性が、従来技術の複合体と異なる。さらに、本発明の好ましい実施形態は、発現宿主中の粒子の発現を可能にし、抗原が次いでさらに結合するVLPの、正確な折りたたみおよび集合を確実にする。

【0199】

本発明は、抗原又は抗原決定基とVLPを結合させる方法を開示する。示したように、本発明の一態様では、少なくとも1つの抗原又は抗原決定基を、化学的架橋剤によって、典型的かつ好ましくはヘテロ二官能性架橋剤を使用することによって、VLPと結合させる。いくつかのヘテロ二官能性架橋剤が、当分野で知られている。好ましい実施形態では、ヘテロ二官能性架橋剤は、好ましい第1の付着部位、すなわち、VLP又は少なくとも1つのVLPサブユニットのリシン残基の側鎖アミノ基と反応することができる官能基、および好ましい第2の付着部位、すなわち、抗原又は抗原決定基と融合し、場合によっては還元による反応に利用することもできるシステイン残基と反応することができる、他の官能基を含む。典型的には誘導体化と呼ばれる手順の第1のステップは、VLPと架橋剤の反応である。この反応の生成物は、活性化担体とも呼ばれる活性化VLPである。第2のステップでは、ゲル濾過又は透析などの通常の方法を使用して、未反応架橋剤を除去する。第3のステップでは、抗原又は抗原決定基を活性化VLPと反応させ、このステップは典型的には結合ステップと呼ばれる。未反応の抗原又は抗原決定基を、たとえば透析によって、第4のステップで場合によっては除去することができる。いくつかのヘテロ二官能性架橋剤が、当分野で知られている。これらは好ましい架橋剤 SMPH ( Pierce )、Sulfo-MBS、Sulfo-EMCS、Sulfo-GMBS、Sulfo-SIAB、Sulfo-SMPB、Sulfo-SMCC、SVSB、SIA、およびたとえば Pierce Chemical Company ( Rockford, IL, USA ) から入手可能な他の架橋剤を含み、アミノ基に対して反応性がある1つの官能基、およびシステイン残基に対して反応性がある1つの官能基を有する。前述の架橋剤はいずれも、チオエーテル結合の形成をもたらす。本発明を実施するのに適した他のクラスの架橋剤は、結合時の抗原又は抗原決定基とVLPの間のジスルフィド結合の導入によって特徴付けられる。このクラスに属する好ましい架橋剤には、たとえば SPDP および Sulfo-LC-SPDP ( Pierce ) がある。架橋剤によるVLPの誘導体化の程度は、それぞれの反応パートナーの濃度、1つの試薬が他の試薬よりも過剰であること、pH、温度およびイオン強度などの実験条件を変えることによって、影響を受ける可能性がある。結合の程度、すなわちVLPのサブユニット当たりの抗原又は抗原決定基の量を、前に記載した実験条件を変えることによって調節して、ワクチンの要件を整合させることができる。

【0200】

抗原又は抗原決定基とVLPを結合させる特に好ましい方法は、VLPの表面上のリシン残基を、抗原又は抗原決定基上のシステイン残基と連結させることである。いくつかの実施形態では、VLPとの結合のために、第2の付着部位として、あるいはその一部分としての、システイン残基を含むアミノ酸リンカーの、抗原又は抗原決定基との融合が必要とされる可能性がある。

【0201】

一般に、柔軟性のあるアミノ酸リンカーが好ましい。アミノ酸リンカーの例は、(a) CGG；(b) N末端ガンマ1-リンカー；(c) N末端ガンマ3-リンカー；(d) Igヒンジ領域；(e) N末端グリシンリンカー；(f) (G)<sub>k</sub>C(G)<sub>n</sub>、n = 0 ~ 12かつk = 0 ~ 5；(g) N末端グリシン-セリンリンカー；(h) (G)<sub>k</sub>C(G)<sub>m</sub>(S)<sub>1</sub>(GGGGS)<sub>n</sub>、n = 0 ~ 3、k = 0 ~ 5、m = 0 ~ 10、l = 0 ~ 2；(i) GGC；(k) GGC-NH<sub>2</sub>；(l) C末端ガンマ1-リンカー；(m) C末端ガンマ3-リンカー；(n) C末端グリシンリンカー；(o) (G)<sub>n</sub>C(G)<sub>k</sub>、n = 0 ~ 50

12かつk = 0 ~ 5 ; (p) C末端グリシン - セリンリンカー ; (q) (G)<sub>m</sub>(S)<sub>1</sub> (GGGGS)<sub>n</sub>(G)<sub>o</sub> C(G)<sub>k</sub>、n = 0 ~ 3、k = 0 ~ 5、m = 0 ~ 10、l = 0 ~ 2、およびo = 0 ~ 8からなる群から選択される。

#### 【0202】

アミノ酸リンカーの他の例は、免疫グロブリンのヒンジ領域、グリシンセリンリンカー(GGGGS)<sub>n</sub>、およびグリシンリンカー(G)<sub>n</sub>であり、これらはいずれもシステイン残基を第2の付着部位としてさらに含み、場合によっては他のグリシン残基を含む。典型的には、前記アミノ酸リンカーの好ましい例は、N末端ガンマ1 : CGDKTHTSPP ; C末端ガンマ1 : DKTHTSPPPCG ; N末端ガンマ3 : CGGPKPSTPPGS ; C末端ガンマ3 : PKPSTPPGSSGGAPGGCG ; N末端グリシンリンカー : CGGGGG、およびC末端グリシンリンカー : GGGGCCである。 10

#### 【0203】

疎水性抗原又は抗原決定基がVLPと結合するとき、本発明を実施する際に非常に適した他のアミノ酸リンカーは、N末端リンカーに関してはCGKKGG又はCGDEGG、あるいはC末端リンカーに関してはGGKKGCおよびGGE DGCである。C末端リンカーに関しては、末端システインは、場合によってはC末端がアミド化されている。

#### 【0204】

本発明の好ましい実施形態では、ペプチドのC末端ではGGCG、GGC又はGGC-NH<sub>2</sub>（「NH<sub>2</sub>」はアミド化を表す）リンカー、又はそのN末端ではCGGが、アミノ酸リンカーとして好ましい。一般に、グリシン残基を、大きなアミノ酸と第2の付着部位として使用されるシステインの間に挿入して、結合反応における大きなアミノ酸の考えられる立体障害を回避する。本発明の最も好ましい実施形態では、アミノ酸リンカーGGC-NH<sub>2</sub>を、抗原又は抗原決定基のC末端と融合させる。 20

#### 【0205】

抗原又は抗原決定基上に存在するシステイン残基は、活性化VLP上でヘテロ二官能性架橋剤と反応するために、その還元状態でなければならない、すなわち、遊離システイン又はシステイン残基、および遊離スルフヒドリル基が利用可能でなければならない。付着部位として機能するためのシステイン残基が酸化形である場合、たとえばそれがジスルフィド架橋を形成する場合、たとえばDTT、TCEP又は-メルカプトエタノールを用いた、このジスルフィド架橋の還元が必要とされる。WO 02/05690に記載されたように、低濃度の還元剤が結合と適合性があり、当業者が知るように、高濃度は結合反応を阻害し、この場合、結合前に、たとえば透析、ゲルfiltration、又は逆相HPLCによって、還元剤を除去するか、あるいはその濃度を低下させなければならない。 30

#### 【0206】

前に記載した好ましい方法に従った、ヘテロ二官能性架橋剤を使用することによる抗原又は抗原決定基とVLPの結合によって、抗原又は抗原決定基とVLPを配向方式で結合させることができる。抗原又は抗原決定基とVLPを結合させる他の方法には、抗原又は抗原決定基を、カルボジイミドEDC、およびNHSを使用してVLPと架橋させる方法がある。他の方法では、抗原又は抗原決定基を、グルタルアルデヒド、DSG、BMP[PEO]<sub>4</sub>、BS<sup>3</sup>(Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA)などのホモ二官能性架橋剤、又はVLPのアミン基又はカルボキシル基に対して反応性がある官能基を有する、他の知られているホモ二官能性架橋剤を使用して、VLPに付着させる。 40

#### 【0207】

VLPと抗原又は抗原決定基を結合させる他の方法には、VLPをビオチン化させ、抗原又は抗原決定基をストレプトアビジン-融合タンパク質として発現させる方法、又はたとえばWO 00/23955に記載されたような、抗原又は抗原決定基とVLPの両方をビオチン化させる方法がある。この場合、抗原又は抗原決定基を、次のステップで加えられるVLPの結合用に、遊離付着部位が依然として利用可能であるように、抗原又は抗原決定基とストレプトアビジンの比を調節することによって、ストレプトアビジン又はア 50

ビジンと最初に結合させることができる。あるいは、すべての成分を「ワン・ポット」反応で混合することができる。可溶形の受容体およびリガンドが利用可能であり、VLP又は抗原又は抗原決定基と架橋することができる、他のリガンド-受容体対を、抗原又は抗原決定基とVLPを結合させるための、結合物質として使用することができる。あるいは、リガンド又は受容体を抗原又は抗原決定基と融合させることができ、したがってそれぞれ受容体又はリガンドと化学的に結合又は融合するVLPとの結合を仲介することができる。挿入又は置換によって、融合を行うこともできる。

【0208】

既に示したように、本発明の好ましい実施形態では、VLPはRNAファージのVLPであり、より好ましい実施形態では、VLPはRNAファージのQコート・タンパク質のVLPである。

10

【0209】

1個又は数個の抗原分子、すなわち1個又は数個の抗原又は抗原決定基を、立体的に許容される場合は、好ましくはRNAファージのVLPの露出したリシン残基を介して、RNAファージのコート・タンパク質のキャプシド又はVLPの1個のサブユニットに付着させることができる。RNAファージのコート・タンパク質のVLP、および特にQコート・タンパク質のVLPの特異的な特徴は、したがって、1個のサブユニット当たりに数個の抗原を結合させる可能性である。これによって、高密度の抗原配列を生成させることができる。

【0210】

20

本発明の好ましい実施形態では、少なくとも1つの抗原又は抗原決定基とウィルス様粒子の、結合および付着はそれぞれ、ウィルス様粒子の少なくとも1つの第1の付着部位と抗原又は抗原決定基の少なくとも1つの第2の付着部位の間の、それぞれ相互作用および会合によるものである。

【0211】

Qコート・タンパク質のVLP又はキャプシドは、3個のリシン残基がキャプシドの内部に向きRNAと相互作用し、4個の他のリシン残基がキャプシドの外側に露出している明確な配置の、明確な数のリシン残基をその表面上に示す。これらの明確な性質によって、リシン残基がRNAと相互作用する粒子の内側とではなく、粒子の外側との抗原の付着が助長される。他のRNAファージのコート・タンパク質のVLPも、その表面上に明確な数のリシン残基、およびこれらのリシン残基の明確な配置を有する。

30

【0212】

本発明の他の好ましい実施形態では、第1の付着部位はリシン残基であり、かつ/あるいは、第2の付着部位はスルフヒドリル基又はシステイン残基を含む。本発明の非常に好ましい実施形態では、第1の付着部位はリシン残基であり、第2の付着部位はシステイン残基である。

【0213】

本発明の非常に好ましい実施形態では、抗原又は抗原決定基を、システイン残基を介して、RNAファージのコート・タンパク質のVLPのリシン残基と、特にQコート・タンパク質のVLPと結合させる。

40

【0214】

RNAファージに由来するVLPの他の利点は、細菌中でのその高い発現収率であり、これによって多量の物質を手ごろなコストで生成させることができる。

【0215】

示したように、本発明の複合体および配列はそれぞれ、配列の表面上の抗原の、その十分に編成された構造、寸法、および反復性が、従来技術の複合体と異なる。さらに、VLPを担体として使用することによって、抗原密度がさまざまである、確固とした抗原配列および複合体をそれぞれ形成することができる。特に、RNAファージのVLPの使用、ここでは特にRNAファージのQコート・タンパク質のVLPの使用によって、非常に高いエピトープ密度を得ることができる。特に、ヒトA 1-6ペプチドとQコート・

50

タンパク質のVLPを結合させることによって、サブユニット当たり1.5のエピトープを超える密度に達すると思われる。高いエピトープ密度を有する、RNAファージのコート・タンパク質のVLPの組成物の調製は、本出願の教示を使用して行うことができる。本発明の好ましい実施形態では、抗原又は抗原決定基をQコート・タンパク質のVLPと結合させるとき、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9以上の、サブユニット当たりの抗原又は抗原決定基の平均数が好ましい。

## 【0216】

本明細書で定義する第2の付着部位は、抗原又は抗原決定基と共に本来存在するものか、あるいは本来存在しないものであってよい。抗原又は抗原決定基上に適切な本来存在する第2の付着部位が存在しない場合、したがって、このような非天然の第2の付着部位は、抗原に設計しなければならない。

## 【0217】

前に記載したように、4個のリシン残基がQコート・タンパク質のVLPの表面上で露出している。典型的には、これらの残基は、架橋剤分子との反応によって誘導体化される。露出したすべてのリシン残基が抗原と結合することができるわけではない場合、架橋剤と反応したリシン残基が、誘導体化ステップ後に-アミノ基と結合した架橋剤分子と共に残る。これが1個又は数個の正電荷の消失をもたらし、このことはVLPの溶解度および安定性に不利益である可能性がある。以下に記載した開示するQコート・タンパク質変異体中と同様に、いくつかのリシン残基をアルギニンで置換することによって、我々は正電荷の過剰な消失を妨げる。なぜなら、アルギニン残基は架橋剤とは反応しないからである。さらに、リシン残基をアルギニンで置換することによって、より明確な抗原配列をもたらすことができる。なぜなら、抗原との反応用に利用可能な部位はより少ないからである。

## 【0218】

したがって、露出したリシン残基は、本出願中に開示する以下のQコート・タンパク質変異体、および変異体Q-VLP: Q-240 (Lys13-Arg; 配列番号23)、Q-250 (Lys2-Arg, Lys13-Arg; 配列番号25) およびQ-259 (Lys2-Arg, Lys16-Arg; 配列番号27) 中において、アルギニンで置換した。構築体をクローニングし、タンパク質を発現させ、VLPを精製し、ペプチドおよびタンパク質抗原との結合用に使用した。Q-251 (配列番号26) も構築し、Q-251コート・タンパク質のVLPの発現、精製および結合の仕方の指針は、本出願を通じて見ることができる。

## 【0219】

他の実施形態では我々は、さらに高い密度配列の抗原を得るのに適した、1個の追加的なリシン残基を有するQ変異体コート・タンパク質を開示する。この変異体Qコート・タンパク質、Q-243 (Asn10-Lys; 配列番号24) をクローニングし、タンパク質を発現させ、キャプシド又はVLPを単離および精製し、追加的なリシン残基を導入することは、キャプシド又はVLPへのサブユニットの自己組織化と適合性があることを示す。したがって、抗原又は抗原決定基の配列および複合体はそれぞれ、Qコート・タンパク質変異体のVLPを使用して作製することができる。抗原とVLP、特にRNAファージのコート・タンパク質のVLPを結合させる、特に好ましい方法は、RNAファージのコート・タンパク質のVLPの表面上に存在するリシン残基と、抗原に加えられたシステイン残基を連結させることである。システイン残基が第2の付着部位として有効であるためには、スルフヒドリル基が結合用に利用可能でなければならない。したがって、システイン残基はその還元状態でなければならない、すなわち、遊離システイン又はシステイン残基、および遊離スルフヒドリル基が利用可能でなければならない。第2の付着部位として機能するためのシステイン残基が酸化形である場合、たとえばそれがジスルフィド架橋を形成する場合、DTT、TCEP又は-メルカプトエタノールを用いた

10

20

30

40

50

、このジスルフィド架橋の還元が必要とされる。還元剤の濃度、および抗原に対する還元剤のモル過剰は、それぞれの抗原に関して調節しなければならない。10 μM以下の低い濃度から始まり、10 ~ 20 mM以上の還元剤濃度までの滴定範囲を、必要な場合は試験し、抗原と担体の結合を評価する。WO 02/056905に記載されたように、低濃度の還元剤が結合反応と適合性があるが、当業者が知るように、高濃度は結合反応を阻害し、この場合、たとえば透析、ゲルfiltration、又は逆相HPLCによって、還元剤を除去するか、あるいはその濃度を低下させなければならない。透析又は平衡化バッファーのpHは7未満、好ましくは6未満であることが有利である。低pHバッファーと抗原の活性又は安定性の適合性を、試験しなければならない。

## 【0220】

10

RNAファージのコート・タンパク質のVLP上のエピトープ密度は、架橋剤および他の反応条件を選択することによって調節することができる。たとえば、架橋剤Sulfosuccinimidyl-4-maleimidobutyrate (SMPH)によって、高いエピトープ密度に達することが典型的には可能である。誘導体化は高濃度の還元剤によって確かに影響を受け、反応条件の操作を使用して、RNAファージのコート・タンパク質のVLP、および特にQコート・タンパク質のVLPと結合する、抗原の数を調節することができる。

## 【0221】

非天然の第2の付着部位を設計する前に、それが融合、挿入、又は一般には設計されるべき位置を選択しなければならない。第2の付着部位の位置の選択は、たとえば抗原の結晶構造に基づくものであってよい。抗原のこのような結晶構造によって、分子のC又はN末端の利用性（たとえば溶媒に対するそれらの影響の受けやすさから決定する）に関する、あるいは第2の付着部位として使用するのに適した残基、システイン残基などの溶媒への暴露に関する、情報が与えられる可能性がある。Fab断片の場合と同様に、露出したジスルフィド架橋も第2の付着部位の源である可能性がある。なぜなら、それらは一般に、たとえば2-メルカプトエチルアミン、TCEP、-メルカプトエタノール又はDTTを用いた穏かな還元によって、1種のシステイン残基に転換することができるからである。抗原の免疫原性に影響を与えない、穏かな還元条件を選択する。一般に、自己抗原による免疫化が、この自己抗原とその本来のリガンドの相互作用の阻害を目的とする場合、第2の付着部位を、それが本来のリガンドと相互作用する部位に対する抗体を生成させることができるように加える。したがって、第2の付着部位の位置は、第2の付着部位又はそれを含む任意のアミノ酸リンカーからの立体障害が回避されるように選択する。他の実施形態では、自己抗原とその本来のリガンドの相互作用部位とは異なる部位で指示される、抗体応答が望まれる。このような実施形態では、第2の付着部位は、それが自己抗原とその本来のリガンドの相互作用部位に対する抗体の生成を妨げるように、選択することができる。

## 【0222】

20

第2の付着部位の位置を選択する際の他の基準には、抗原のオリゴマー化状態、オリゴマー化の部位、補助因子の存在、および抗原構造および配列中の部位を示す実験の証拠の有用性があり、抗原の改変は自己抗原の機能、又は自己抗原を認識する抗体の生成と適合性がある。

## 【0223】

40

非常に好ましい実施形態では、抗原又は抗原決定基は、それぞれコア粒子およびVLP又はVLPサブユニット上の第1の付着部位と会合することができる、1つの第2の付着部位、又は1つの反応付着部位を含む。これによって、少なくとも1個、ただし典型的には2個以上、好ましくは10、20、40、80、120個を超える抗原とコア粒子およびVLPそれぞれの、明確で均一な結合および会合がそれぞれさらに確実になる。したがって、1つの第2の付着部位又は1つの反応付着部位を抗原上に与えることによって、1つの均一な型の結合および会合がそれぞれ確実になり、非常に整然とした繰り返し配列がもたらされる。たとえば、結合および会合がそれぞれ、リシン（第1の付着部位として）とシステイン（第2の付着部位として）の相互作用によって行われる場合、本発明のこの

50

好ましい実施形態に従って、抗原当たり1個のシステイン残基のみが、このシステイン残基が抗原上に本来存在するかあるいは存在しないかどうかとは無関係に、それぞれVLPおよびコア粒子の第1の付着部位と、それぞれ結合および会合することができる事が確実になる。

【0224】

いくつかの実施形態では、抗原上での第2の付着部位の設計には、本発明の開示に従つた、第2の付着部位として適切なアミノ酸を含むアミノ酸リンカーの融合が必要である。したがって、本発明の好ましい実施形態では、アミノ酸リンカーを、少なくとも1つの共有結合によって、抗原又は抗原決定基と結合させる。アミノ酸リンカーは第2の付着部位を含むか、あるいはこれらからなることが好ましい。他の好ましい実施形態では、アミノ酸リンカーは、スルフヒドリル基又はシステイン残基を含む。他の好ましい実施形態では、アミノ酸リンカーはシステインである。アミノ酸リンカーを選択するいくつかの基準、および本発明のアミノ酸リンカーの他の好ましい実施形態は、前で既に述べてきている。

【0225】

本発明の他の特定の実施形態では、付着部位がHBcAgとイン・フレームで融合したリシン又はシステイン残基であるように選択する。好ましい実施形態では、3個のロイシンリンカーによって、抗原をHBcAgのC末端と融合させる。

【0226】

抗原又は抗原決定基が、リシン残基によってVLPと連結しているとき、1個又は複数個の本来存在するリシン残基、およびHBcAg変異体中に存在する他のリシン残基を置換するかあるいは欠失させることが、有利である可能性がある。

【0227】

多くの場合、本来存在するリシン残基が排除されると、抗原又は抗原決定基用の付着部位として、他のリシンがHBcAg中に導入される。このようなリシン残基を挿入するための方法は、当分野で知られている。既存のリシン残基を除去せずに、リシン残基を加えることもできる。

【0228】

HBcAgのC末端は、このタンパク質の核の局在を指示する事が示されてきている(Eckhardt他、J. Virol. 65: 575~582 (1991))。さらに、タンパク質のこの領域は、核酸と結合する能力をHBcAgに与えるとも考えられている。

【0229】

示したように、本発明を実施する際に使用するのに適したHBcAgは、N末端切断型変異体も含む。適切な切断型変異体は、1、2、5、7、9、10、12、14、15、又は17個のアミノ酸がN末端から除去されている、改変型HBcAgを含む。しかしながら、ウィルス様粒子を構成するサブユニットの配列内に内部欠失を含む、ウィルス様粒子の変異体も、本発明に従つて適切である。ただし、それらはウィルス様粒子の整然とした、あるいは粒子状の構造と適合性があるものとする。たとえば、HBcAgの配列内の内部欠失が適切である(Preikschat, P.他、J. Gen. Virol. 80: 1777~1788 (1999))。

【0230】

本発明を実施する際に使用するのに適した他のHBcAgには、NおよびC末端切断型変異体がある。適切な切断型変異体には、1、2、5、7、9、10、12、14、15、および17個のアミノ酸がN末端から除去されており、1、5、10、15、20、25、30、34、35、36、37、38、39、40、41、42又は48個のアミノ酸がC末端から除去されている、HBcAgがある。

【0231】

本発明のワクチン組成物は、異なるHBcAgの混合物を含むことができる。したがって、これらのワクチン組成物は、アミノ酸配列が異なるHBcAgから構成されていてよい。たとえば、1つ又は複数のアミノ酸残基が変わっている(たとえば、欠失、挿入、あ

10

20

30

40

50

るいは置換されている)、「野生型」H B c A g および改変型H B c A g を含む、ワクチン組成物を調製することができると思われる。しかしながら、大部分の適用例では、ただ1つの型のH B c A g が使用される。

【0232】

本発明は、広くさまざまな抗原に適用することができる。好ましい実施形態では、抗原はタンパク質、ポリペプチド又はペプチドである。他の実施形態では、抗原はD N A である。抗原は脂質、炭水化物、又は有機分子、特にニコチンなどの小さな有機分子であってもよい。

【0233】

本発明の抗原は、以下の：(a)癌細胞に対する免疫応答を誘導するように適合させたポリペプチド；(b)感染病に対する免疫応答を誘導するように適合させたポリペプチド；(c)アレルゲンに対する免疫応答を誘導するように適合させたポリペプチド；(d)家畜又はペットの免疫応答を誘導するように適合させたポリペプチド；および(e)(a)～(d)で述べた任意のポリペプチドの断片(たとえば、ドメイン)からなる群から選択することができる。

【0234】

好ましい抗原には、病原体(たとえば、ウィルス、細菌、寄生虫、真菌)由来の抗原、および腫瘍由来の抗原(特に腫瘍関連抗原、すなわち「腫瘍マーカー」)がある。他の好ましい抗原は、自己抗原である。

【0235】

実施例中に記載した特定の実施形態では、抗原は、リンパ球性脈絡膜炎ウィルス(L C M V)由来のペプチドp 33である。p 33ペプチドは、最もよく研究されているC T Lエピトープの1つである(Pircher他、「Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen」、Nature 342:559(1989)；Tissot他、「Characterizing the functionality of recombinant T-cell receptors in vitro: a pMHC tetramer based approach」、J Immunol Methods 236:147(2000)；Bachmann他、「Four types of Ca<sup>2+</sup>-signals after stimulation of naive T cells with T cell agonists, partial agonists and antagonists」、Eur. J. Immunol. 27:3414(1997)；Bachmann他、「Functional maturation of an anti-viral cytotoxic T cell response」、J. Virol. 71:5764(1997)；Bachmann他、「Peptide induced TCR-down regulation on naive T cell predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation」、Eur. J. Immunol. 27:2195(1997)；Bachmann他、「Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation」、Immunity 7:549(1997)」。p 33特異的T細胞は、トランスジェニック・マウスにおいて致命的糖尿病を誘導し(Ohashi他、「Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice」、Cell 65:305(1991)）、かつ、p 33を発現する腫瘍細胞の増殖を妨げることができることが示されてきている(Kundig他、「Fibroblasts act as efficient antigen-presenting ce

10

20

30

40

50

l l s i n l y m p h o i d o r g a n s 」、S c i e n c e 2 6 8 : 1 3 4 3 ( 1 9 9 5 ) ; S p e i s e r 他、「C T L t u m o r t h e r a p y s p e c i f i c f o r a n e n d o g e n o u s a n t i g e n d o e s n o t c a u s e a u t o i m m u n e d i s e a s e 」、J . E x p . M e d . 1 8 6 : 6 4 5 ( 1 9 9 7 ) ) 。したがって、この特異的なエピトープは、自己免疫、腫瘍免疫学、およびウィルス性疾患の研究に非常によく適合する。

#### 【 0 2 3 6 】

本発明の1つの特定の実施形態では、抗原又は抗原決定基は、感染症を予防するのに有用なものである。このような治療は、広範囲の宿主、たとえばヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、他の哺乳動物種および非哺乳動物種に影響を与える、広くさまざまな感染症を治療するために有用であろう。治療可能な感染症は、当業者によく知られており、たとえばH I V、インフルエンザ、ヘルペス、ウィルス肝炎、エプスタインバー、ポリオ、ウィルス脳炎群、はしか、水痘、パピローマ・ウィルスなどのウィルスが病因の感染；又は細菌が病因の感染、肺炎、結核、梅毒など；又は寄生虫が病因の感染、マラリア症、トリパノソーマ症、リーシュマニア症、トリコモナス症、アメーバ症などがある。したがって、本発明の組成物用に選択される抗原又は抗原決定基は、医学分野の当業者によく知られており、抗原又は抗原決定基の例には以下のものがある：H I V 抗原 g p 1 4 0 および g p 1 6 0 ；インフルエンザ抗原ヘマグルチニン、M 2 タンパク質およびノイラミニダーゼ、B 型肝炎表面抗原、又はマラリアのコアおよび周辺胞子のタンパク質、又はその断片。

10

20

#### 【 0 2 3 7 】

前に論じたように、抗原は、天然源に由来するかあるいは合成的な、ウィルス、細菌および真菌、およびこれらの断片などの、感染性微生物を含む。ヒトおよびヒト以外の脊椎動物の感染性ウィルスは、レトロ・ウィルス、R N A ウィルスおよびD N A ウィルスを含む。レトロ・ウィルスの群は、単純レトロ・ウィルスおよび複合レトロ・ウィルスを含む。単純レトロ・ウィルスは、B 型レトロ・ウィルス、C 型レトロ・ウィルスおよびD 型レトロ・ウィルスの亜群を含む。B 型レトロ・ウィルスの一例は、マウス乳癌ウィルス ( M M T V ) である。C 型レトロ・ウィルスは、C 型群 A ( ラウス肉腫ウィルス ( R S V ) 、鳥類白血病ウィルス ( A L V ) 、および鳥類骨髄芽球病ウィルス ( A M V ) を含む ) 、およびC 型群 B ( ネズミ白血病ウィルス ( M L V ) 、ネコ白血病ウィルス ( F e L V ) 、ネズミ肉腫ウィルス ( M S V ) 、テナガザル白血病ウィルス ( G A L V ) 、脾臓壊死ウィルス ( S N V ) 、細網内皮症ウィルス ( R V ) およびサル肉腫ウィルス ( S S V ) を含む ) の亜群を含む。D 型レトロ・ウィルスは、M a s o n - P f i z e r サル・ウィルス ( M P M V ) およびサルの1型レトロ・ウィルス ( S R V - 1 ) を含む。複合レトロ・ウィルスは、レンチ・ウィルス、T 細胞白血病ウィルス、および泡沢状ウィルスの亜群を含む。レンチ・ウィルスはH I V - 1 を含むが、H I V - 2 、S I N 、ビスナ・ウィルス、ネコ免疫不全ウィルス ( F I N ) 、およびウマ伝染性貧血ウィルス ( E I A V ) も含む。T 細胞白血病ウィルスは、H T L V - 1 、H T L V - I I 、サルT 細胞白血病ウィルス ( S T L V ) 、およびウシ白血病ウィルス ( B L V ) を含む。泡沢状ウィルスは、ヒト泡沢状ウイルス ( H F V ) 、サル泡沢状ウィルス ( S F V ) 、およびウシ泡沢状ウィルス ( B F V ) を含む。

30

40

#### 【 0 2 3 8 】

脊椎動物における抗原であるR N A ウィルスの例には、以下のものがあるが、これらだけには限られない：オルトレオ・ウィルス属（多数の血清型の哺乳動物および鳥類レトロ・ウィルス）、オルビ・ウィルス属（ブルータング・ウィルス、ユージェニア・ウィルス、ケメロボ・ウィルス、アフリカ馬疫ウィルス、およびコロラド・ダニ熱ウィルス）、ロタ・ウィルス属（ヒト・ロタ・ウィルス、ネプラスカ子ウシ下痢ウィルス、ネズミ・ロタ・ウィルス、サル・ロタ・ウィルス、ウシ又はヒツジ・ロタ・ウィルス、鳥類ロタ・ウィルス）を含むレオ・ウィルス科のメンバー；腸内ウィルス属（ポリオ・ウィルス、コクサッキー・ウィルスAおよびB、E C H O ( e n t e r i c c y t o p a t h i c h u

50

man orphan) ウィルス、A、C、D、E および G 型肝炎ウィルス、サル腸内ウイルス、ネズミ脳脊髄炎(ME) ウィルス、ポリオウィルス・ムリス、ウシ腸内ウイルス、ブタ腸内ウイルス、カルジオ・ウィルス属(脳心筋炎ウィルス(EMC)、メンゴ・ウイルス)、ライノ・ウィルス属(少なくとも 113 の亜型を含むヒト・ライノウィルス；他のライノ・ウィルス)、アフト・ウィルス属(口蹄病(FMDV)を含むピコルナ・ウイルス科；ブタ小水泡性発疹ウィルス、サンミゲル・アシカウィルス、ネコ・ピコルナウイルスおよびノーウォーク・ウィルスを含むカルシ・ウイルス科；アルファ・ウィルス属(東部ウマ脳脊髄炎ウィルス、セムリキ森林ウィルス、シンビス・ウィルス、チクングンヤ・ウィルス、O' Nyong-Nyong ウィルス、ロスリバー・ウィルス、ベネズエラ・ウマ脳脊髄炎ウィルス、西部ウマ脳脊髄炎ウィルス)、フラビ・ウィルス属(蚊媒介 10 黃熱病ウィルス、デング熱ウィルス、日本脳炎ウィルス、セントルイス脳炎ウィルス、マレーバレー脳炎ウィルス、西ナイル・ウィルス、クンジン・ウィルス、中央ヨーロッパ・ダニ媒介ウィルス、極東ダニ媒介ウィルス、キャサヌール森林ウィルス、跳躍病(10upping 111) ウィルス、ポワッサン・ウィルス、オムスク出血性熱ウィルス)、ルビ・ウィルス属(風疹ウィルス)、ペスチ・ウィルス属(粘膜病ウィルス、豚コレラ・ウイルス、ボルダ・病ウィルス)を含むトガ・ウイルス科；ブンヤ・ウィルス属(ブンヤムウェラおよび関連ウィルス、カリフォルニア脳炎群ウィルス)、フレボ・ウィルス属(シシリアサシチョウバエ・ウィルス、リフトバレー熱ウィルス)、ナイロ・ウィルス属(クリミア・コンゴ出血性熱ウィルス、ナイロビ・ヒツジ病ウィルス)、およびユーク・ウイルス属(ユークニエミおよび関連ウィルス)を含むブンヤ・ウイルス科；インフルエンザ・ウィルス属(インフルエンザ・ウィルス A 型、多くのヒト亜型)；ブタ・インフルエンザ・ウィルス、および鳥類およびウマ・インフルエンザ・ウィルス；インフルエンザ B 型(多くのヒト亜型)、およびインフルエンザ C 型(考えられる別の属)を含むオルトミクソ・ウイルス科；パラミクソ・ウイルス属(パラインフルエンザ・ウィルス 1 型、センダイ・ウイルス、赤血球吸着ウィルス、パラインフルエンザ・ウィルス 2 ~ 5 型、ニューキャッスル病ウィルス、おたふくかぜウィルス)、麻疹ウィルス属(はしかウィルス、亜急性硬化性全脳炎ウィルス、ジステンパー・ウィルス、牛痘ウィルス)、ニューモ・ウィルス属(RS ウィルス(RSV)、ウシ RS ウィルス、およびマウスの肺炎ウィルス)森林 20 ウィルス、シンビス・ウィルス、チクングンヤ・ウィルス、O' Nyong-Nyong ウィルス、ロスリバー・ウィルス、ベネズエラ・ウマ脳脊髄炎ウィルス、西部ウマ脳脊髄炎ウィルス)、フラビ・ウィルス属(蚊媒介黄熱病ウィルス、デング熱ウィルス、日本脳炎ウィルス、セントルイス脳炎ウィルス、マレーバレー脳炎ウィルス、西ナイル・ウィルス、クンジン・ウィルス、中央ヨーロッパ・ダニ媒介ウィルス、極東ダニ媒介ウィルス、キャサヌール森林ウィルス、跳躍病ウィルス、ポワッサン・ウィルス、オムスク出血性熱 30 ウィルス)、ルビ・ウィルス属(風疹ウィルス)、ペスチ・ウィルス属(粘膜病ウィルス、豚コレラ・ウイルス、ボルダ・病ウィルス)を含むパラミクソ・ウイルス科；ブンヤ・ウイルス属(ブンヤムウェラおよび関連ウィルス、カリフォルニア脳炎群ウィルス)、フレボ・ウイルス属(シシリアサシチョウバエ・ウィルス、リフトバレー熱ウィルス)、ナイロ・ウイルス属(クリミア・コンゴ出血性熱ウィルス、ナイロビ・ヒツジ病ウィルス)、およびユーク・ウイルス属(ユークニエミおよび関連ウィルス)を含むブンヤ・ウイルス科；インフルエンザ・ウィルス属(インフルエンザ・ウィルス A 型、多くのヒト亜型)；ブタ・インフルエンザ・ウィルス、および鳥類およびウマ・インフルエンザ・ウィルス；インフルエンザ B 型(多くのヒト亜型)、およびインフルエンザ C 型(考えられる別の属)を含むオルトミクソ・ウイルス科；パラミクソ・ウイルス属(パラインフルエンザ・ウィルス 1 型、センダイ・ウイルス、赤血球吸着ウィルス、パラインフルエンザ・ウィルス 2 ~ 5 型、ニューキャッスル病ウィルス、おたふくかぜウィルス)、麻疹ウィルス属(はしかウィルス、亜急性硬化性全脳炎ウィルス、ジステンパー・ウィルス、牛痘ウィルス)、ニューモ・ウィルス属(RS ウィルス(RSV)、ウシ RS ウィルス、およびマウスの肺炎ウィルス)を含むパラミクソ・ウイルス科；ベシクロ・ウィルス属(VSV)、キヤンディピュラ・ウィルス、フランダース・ハートパーク・ウィルス)、リッサ・ウイル 40 50

ス属（狂犬病ウィルス）、魚類ラブド・ウィルスおよびフィロ・ウィルス（マールブルグ・ウィルスおよびエボラ・ウィルス）を含むラブド・ウィルス科；リンパ球性脈絡髄膜炎ウィルス（L C M）、タカリベ・ウィルス複合体、およびラッサ・ウィルスを含む；コロナ・ウィルス科、伝染性気管支炎ウィルス（I B V）、マウス肝炎ウィルス、ヒト腸内コロナ・ウィルス、およびネコ伝染性腹膜炎（ネコ・コロナ・ウィルス）を含むアレナ・ウィルス科。

【0239】

脊椎動物における抗原である例示的なDNAウィルスの例には、以下のものがあるが、これらだけには限られない：オルトポックス・ウィルス属（大痘そう、小痘そう、サル痘ポックス・ワクシニア、牛痘、野牛痘、ウサギ痘、エクトロメリア）、レポリポックス・ウィルス属（ミキソーマ、纖維腫）、アビポックス・ウィルス属（鶏痘、他の鳥類ポックス・ウィルス）、カプリポックス・ウィルス属（ヒツジ痘、ヤギ痘）、スイポックス・ウィルス属（豚痘）、パラポックス・ウィルス属（接触伝染性推定皮膚炎ウィルス、偽牛痘、ウシ丘疹性口内炎ウィルス）を含むポックス・ウィルス科；イリド・ウィルス科（アフリカ豚コレラ・ウィルス、カエル・ウィルス2および3、魚類のリンホシスチス・ウィルス）；アルファ-ヘルペス・ウィルス（単純ヘルペス1および2型、水痘-帯状疱疹、ウマ流産ウィルス、ウマ・ヘルペス・ウィルス2および3、仮性狂犬病ウィルス、伝染性ウシ角結膜炎ウィルス、伝染性ウシ鼻氣管炎ウィルス、ネコ鼻氣管炎ウィルス、伝染性咽頭氣管炎ウィルス）、ベータ-ヘルペス・ウィルス（ヒト・サイトメガロ・ウィルス、およびブタ、サルおよびげっ歯類のサイトメガロ・ウィルス）；ガンマ-ヘルペス・ウィルス（エスタイン-バー・ウィルス（E B V）、マレック病ウィルス、リスザル・ヘルペス・ウィルス、クモザル・ヘルペス・ウィルス、ワタオウサギ・ヘルペス・ウィルス、モルモット・ヘルペス・ウィルス、リュッケ腫瘍ウィルス）を含むヘルペス・ウィルス科；マスト・アデノウィルス属（ヒト亜群A、B、C、DおよびE、および非分類種；サル・アデノウィルス（少なくとも23の血清型）、伝染性イヌ肝炎、およびウシ、ブタ、ヒツジ、カエル、および多くの他の種のアデノ・ウィルス、アビアデノ・ウィルス属（鳥類アデノ・ウィルス）；および非培養性アデノ・ウィルスを含むアデノ・ウィルス科；パピローマ・ウィルス属（ヒト・パピローマ・ウィルス、ウシ・パピローマ・ウィルス、ショーブラビット・パピローマ・ウィルス、および他の種のさまざまな病原性パピローマ・ウィルス）、ポリオーマ・ウィルス属（ポリオーマ・ウィルス、S V - 4 0 (simian vacuolating agent)、R K V (rat vacuolating agent)、Kウィルス、B Kウィルス、J Cウィルス、および他の靈長類のポリオーマ・ウィルス、リンパ親和性パピローマ・ウィルスなど）を含むパポ・ウィルス科；パルボ・ウィルス科、アデノ関連ウィルス属、パルボ・ウィルス属（ネコ汎白血球減少症ウィルス、ウシ・パルボ・ウィルス、イヌ・パルボ・ウィルス、アリューシャンミンク病ウィルスなど）を含む。最後に、DNAウィルスは、前述の科と一致しないウィルス、クルおよびクロイツフェルト-ヤコブ病ウィルス、および慢性的な伝染性神経障害物質（C H I N A ウィルス）などを含むことができる。

【0240】

それぞれの前述の例は例示的なものであり、制限を目的とするものではない。

【0241】

本発明の特定の実施形態では、抗原は1つ又は複数の細胞傷害性T細胞エピトープ、T<sub>h</sub>細胞エピトープ、又はこの2つのエピトープの組合せを含む。

【0242】

ヒトの抗原特異的な免疫応答を高めることに加えて、好ましい実施形態の方法は、他の哺乳動物又は動物、たとえば、鳥類、メンドリ、ニワトリ、七面鳥、アヒル、ガチョウ、ウズラおよびキジなどを治療するのに非常によく適している。鳥類は、多くの型の感染の主な標的である。

【0243】

ニワトリにおける一般的な感染の一例は、ニワトリ伝染性貧血ウィルス（C I A V）で

10

20

30

40

50

ある。CIAVは、マレック病ワクチン接種の中断の調査中に、1979年に日本で最初に単離された(Yuasa他、Avian Dis. 23: 366~385(1979))。そのとき以来CIAVは、あらゆる主要な家禽類製造国で、商業用の家禽類において検出されてきている(van Buulow他、pp. 690~699「Diseases of Poultry」中、9th edition、Iowa State University Press 1991)。

#### 【0244】

鳥類のワクチン接種は、他の脊椎動物と同様に、任意の年齢で行うことができる。通常ワクチン接種は、生きている微生物に関しては12週齢までで、不活性微生物又は他の型のワクチンに関しては14~18週の間で行う。卵内ワクチン接種に関しては、ワクチン接種は、胚分化の最後の4分の1で行うことができる。ワクチンは、皮下に、スプレーによって、経口的に、眼内に、気管内に、鼻に、卵内に、あるいは本明細書に記載した他の方法によって、投与することができる。

#### 【0245】

畜牛および家畜も、感染を受けやすい。これらの動物に影響を与える疾患によって、重大な経済的損失が、特に畜牛において生じる可能性がある。本発明の方法を使用して、家畜、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジおよびヤギなどの感染に対して保護することができる。

#### 【0246】

ウシは、ウシ・ウィルスによって感染される可能性がある。ウシ・ウィルス性下痢ウィルス(BVDV)は、小さな被包されたプラス鎖RNAウィルスであり、豚コレラ・ウィルス(HOCV)およびヒツジ・ボルダ-病ウィルス(BDV)と共にペスト・ウィルス属に分類される。ペスト・ウィルスは以前はトガ・ウィルス科に分類されていたが、いくつかの研究によって、ラビ・ウィルスおよびC型肝炎ウィルス(HCV)属と共にラビ・ウィルス科へのそれらの再分類が示唆されてきている。

#### 【0247】

ウマ・ヘルペス・ウィルス(EHV)は、無症状から致死的疾患まで、ウマ中でさまざまな感染を引き起こす、抗原性が異なる生物学的物質の群を含む。これらは、ウマの偏在的な病原体である、ウマ・ヘルペス・ウィルス-1(EHV-1)を含む。EHV-1は、流産、呼吸管疾患、および中枢神経系障害の多発と関連がある。他のEHVには、EHV-2、又はウマ・サイトメガロ・ウィルス、EHV-3、ウマ交疹ウィルス、および以前はEHV-1の亜型2として分類されたEHV-4がある。

#### 【0248】

ヒツジおよびヤギは、ビスナ・マエディを含めた、さまざまな危険な微生物によって感染される可能性がある。

#### 【0249】

サル、類人猿およびマカーカなどの霊長類は、サル免疫不全ウィルスによって感染される可能性がある。細胞・ウィルスおよび無細胞の全サル免疫不全不活化ワクチンは、マカーカを保護することが報告されてきている(Stott他、Lancet 36: 1538~1541(1990); Desrosiers他、PNAS USA 86: 6353~6357(1989); Murphey-Corb他、Science 246: 1293~1297(1989); およびCarlson他AIDS Res. Human Retroviruses 6: 1239~1246(1990))。組み換えHIV gp120ワクチンは、チンパンジーを保護することが報告されてきている(Bertram他、Nature 345: 622~625(1990))。

#### 【0250】

飼育用および野生型のネコは、さまざまな微生物の感染を受けやすい。たとえば、ネコ伝染性腹膜炎は、飼育用および野生型のネコ科動物、ライオン、ヒョウ、チーター、およびジャガーなどにおいて発生する疾患である。ネコ科動物においてこの型および他の型の病原性微生物による、感染を予防することが望ましいときは、本発明の方法を使用してネコ科動物をワクチン接種して、それらを感染に対して予防することができる。

10

20

30

40

50

## 【0251】

飼育用ネコ科動物は、ネコ白血病ウィルス（F e L V）、ネコ肉腫ウィルス（F e S V）、内因性C型腫瘍ウィルス（R D - 1 1 4）、およびネコ融合細胞形成ウィルス（F e S F V）だけには限られないが、これらを含めた、いくつかのレトロ・ウィルスによって感染状態になる可能性がある。ネコTリンパ親和性レンチ・ウィルス（ネコ免疫不全ウィルスとも呼ばれる）の発見は、Pedersen他、Science 235: 790~793 (1987) 中で最初に報告された。ネコ伝染性腹膜炎（F I P）は、飼育用および野生型ネコ科動物において、予測外に生じる散在性疾患である。F I Pは主に飼育用ネコ科動物の疾患であるが、それがライオン、クーガー、ヒョウ、チーター、およびジャガーにおいて診断されてきている。F I Pに苦しめられているより小さな野生型のネコ科動物には、オオヤマネコおよびカラカル、サバクネコおよびマヌルネコがある。

10

## 【0252】

魚類、甲殻類、又は他の水生生命体のウィルス性および細菌性疾患は、水産養殖産業の重大な問題となる。孵化用タンク又は閉じられた海洋養殖領域中の動物の密度が高いために、感染症が、たとえば魚類、甲殻類、又は他の水生生命体の設備中の、多量の在庫を根絶する可能性がある。疾患の予防は、ひとたび疾患が進行した後の介入よりも、魚類へのこれらの脅威に対する望ましい救済策である。魚類をワクチン接種することが唯一の予防法であり、これによって免疫性による長期の保護を与えることができる。核酸系の魚類のワクチン接種は、たとえば米国特許第5,780,448号中に記載されている。

20

## 【0253】

魚類の免疫系は、B細胞、T細胞、リンパ球、補体、および免疫グロブリンの存在などの、哺乳動物の免疫系と類似した多くの特徴を有する。魚類は、哺乳動物のBおよびT細胞のそれと多くの点で類似していると思われる役割がある、リンパ球亜群を有する。ワクチンは経口的に、あるいは液浸又は注射によって、投与することができる。

## 【0254】

水生種には、魚類、甲殻類、又は他の水生動物があるが、これらだけには限られない。魚類はあらゆる脊椎動物魚類を含み、これらは硬骨魚又は軟骨魚、たとえばサケ、コイ、ナマズ、イエロー・テイル、タイおよびハタ科の魚などであってよい。サケ科は、マス（ニジマスを含む）、サケおよびアルプスイワナを含む、魚類の科である。甲殻類の例には、クラム、ロブスター、小エビ、カニおよびカキがあるが、これらだけには限られない。他の養殖水生動物には、ウナギ、イカおよびタコがあるが、これらだけには限られない。

30

## 【0255】

ウィルス性の水産養殖病原体のポリペプチドには、ウィルス出血性敗血症ウィルス（V H S V）の糖タンパク質又は核タンパク質；伝染性造血壊死ウィルス（I H N V）のG又はNタンパク質；伝染性膵臓壊死ウィルス（I P N V）のV P 1、V P 2、V P 3又はN構造タンパク質；コイ・スプリング・ウィルス血症（S V C）のGタンパク質；およびアメリカナマズ・ウィルス（C C V）の膜関連タンパク質、外被又はキャプシド・タンパク質又は糖タンパク質があるが、これらだけには限られない。

## 【0256】

細菌性病原体のポリペプチドには、フランケル症を引き起こすAeromonas salmonicidaの、鉄制御型外膜タンパク質、(I R O M P)、外膜タンパク質(OMP)、およびA-タンパク質、細菌性腎臓病(B K D)を引き起こすRenibacterium salmoninarumのp57タンパク質、Yersinia enteritisの主要表面結合抗原(msa)、表面発現細胞毒素(mpr)、表面発現溶血素(i sh)、およびべん毛抗原；Pasteurelllosisの細胞外タンパク質(E C P)、鉄制御型外膜タンパク質、(I R O M P)、および構造タンパク質；Vibrios anguillarumおよびV. ordaliiのOMPおよびべん毛タンパク質；Edwardsiella ictaluriおよびE. tardaのべん毛タンパク質、OMPタンパク質、アロA、およびブルA；およびIchthyophthiriusの表面抗原；およびCytophaga columnariの構造および調節タン

40

50

パク質；および *Rickettsia* の構造および調節タンパク質があるが、これらだけには限られない。

【0257】

寄生虫病原体のポリペプチドには、*Ichthyophthirius* の表面抗原があるが、これだけには限られない。

【0258】

本発明の他の態様では、「自己」遺伝子産物（たとえば、腫瘍壞死因子）によって引き起こされるか悪化させられる疾患又は状態を、予防するかつ／あるいは低下させるための方法で使用するのに適した、ワクチン組成物を提供する。したがって、本発明のワクチン組成物は、「自己」遺伝子産物によって引き起こされるか悪化させられる疾患又は状態を、予防するかつ／あるいは低下させる抗体の生成をもたらす、組成物を含む。このような疾患又は状態の例には、移植片と宿主の疾患、IgE 介型アレルギー反応、アナフィラキシー、成人呼吸障害症候群、クローン病、アレルギー性喘息、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、非ホジキン・リンパ腫（NHL）、グレーブス病、全身性エリテマトーデス（SLE）、炎症性自己免疫疾患、重症筋無力症、免疫増殖性疾患リンパ節症（IPL）、血管性免疫増殖性リンパ節症（AIL）、免疫芽細胞リンパ節症（IBL）、慢性関節リウマチ、糖尿病、プリオントン病、多発性硬化症、アルツハイマー病および骨粗しょう症がある。

10

【0259】

関連する特定の実施形態では、本発明の組成物は、アレルギー、癌又は薬物中毒を治療及び／又は予防するために使用することができる、免疫療法剤である。

20

【0260】

組成物を調製するため、およびアレルギーを治療する方法において使用するための、抗原又は抗原決定基の選択は、このような障害を治療する医学分野の当業者には知られていると思われる。このような抗原又は抗原決定基の代表的な例には、以下のもの：ハチ毒ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>、Bet v I（カバノキ花粉アレルゲン）、5DolmV（スズメバチ科のハチの毒アレルゲン）、およびDer p I（室内埃ダニ・アレルゲン）、およびそれぞれの断片があり、これらを使用して免疫応答を誘導することができる。

【0261】

癌を治療する組成物および方法に関する、抗原又は抗原決定基の選択は、このような障害を治療する医学分野の当業者には知られていると思われ（参照により組み込まれている、Renkvist 他、Cancer. Immunol. Immunother. 50: 3~15 (2001) を参照のこと）、このような抗原又は抗原決定基は本発明の範囲内に含まれる。このような型の抗原又は抗原決定基の代表的な例には、以下のもの：Her 2（乳癌）；GD 2（神経芽細胞腫）；EGF-R（悪性神経こう腫）；CEA（延髄甲状腺癌）；CD 52（白血病）；ヒト・メラノーマ・タンパク質 gp 100；ヒト・メラノーマ・タンパク質 gp 100 エピトープ、アミノ酸 154~162（配列：KTWGQYWQV）、209~217（ITDQVPFSV）、280~288（YLEPGPVTA）、457~466（LLDGTTATLRL）および 476~485（VLYRYGSFSV）など；ヒト・メラノーマ・タンパク質メラン- A / MART - 1；ヒト・メラノーマ・タンパク質メラン- A / MART - 1 エピトープ、アミノ酸 27~35（AAGIGILTV）および 32~40（ILTVILGVL）など；チロシナーゼおよびチロシナーゼ関連タンパク質（たとえば、TRP - 1 および TRP - 2）；チロシナーゼ・エピトープ、アミノ酸 1~9（MLLAVLYCL）および 369~377（YMDGTM SQV）など；NA 17 - A<sub>nt</sub> タンパク質；NA 17 - A<sub>nt</sub> タンパク質エピトープ、アミノ酸 38~64（VLPDVFIRC）など；MAGE - 3 タンパク質；MAGE - 3 タンパク質エピトープ、アミノ酸 271~279（FLWGPRALV）など；他のヒト腫瘍抗原、たとえば CEA エピトープ、アミノ酸 571~579（YLSGANLN）など；p53 タンパク質；p53 タンパク質エピトープ、アミノ酸 65~73（RMPPEAAPPV）、149~157（STPPPGTRV）および 264~272（L

30

40

50

L G R N S F E V ) など ; H e r 2 / n e u エピトープ、アミノ酸 3 6 9 ~ 3 7 7 ( K I F G S L A F L ) および 6 5 4 ~ 6 6 2 ( I I S A V V G I L ) など ; N Y - E S O - 1 ペプチド 1 5 7 ~ 1 6 5 および 1 5 7 ~ 1 6 7 、 1 5 9 ~ 1 6 7 ; H P V 1 6 E 7 タンパク質 ; H P V 1 6 E 7 タンパク質エピトープ、アミノ酸 8 6 ~ 9 3 ( T L G I V C P I ) など ; およびそれぞれの断片があり、これらを使用して免疫応答を誘導することができる。

#### 【 0 2 6 2 】

薬物中毒、特に興味半分の薬物中毒を治療する組成物および方法に関する、抗原又は抗原決定基の選択は、このような障害を治療する医学分野の当業者には知られていると思われる。このような抗原又は抗原決定基の代表的な例には、たとえばオピオイドおよびモルフィン誘導体、コデイン、フェンタニル、ヘロイン、モルフィウムおよびオピウムなど；刺激剤、アンフェタミン、コカイン、M D M A (メチレンジオキシメタンフェタミン)、メタンフェタミン、メチルフェニデートおよびニコチンなど；幻覚剤、L S D、メスカリンおよびサイロシビンなど；およびカンナビノイド、ハシシおよびマリファナなどがある。

#### 【 0 2 6 3 】

自己抗原と関連がある他の疾患又は状態を治療する組成物および方法に関する、抗原又は抗原決定基の選択も、このような障害を治療する医学分野の当業者には知られていると思われる。このような抗原又は抗原決定基の代表的な例は、たとえばリンフォトキシン(たとえば、リンフォトキシン ( L T ) 、リンフォトキシン ( L T ) 、およびリンフォトキシン受容体、核因子 kappa B リガンドの受容体活性化物質 ( R A N K L ) 、血管内皮増殖因子 ( V E G F ) および血管内皮増殖因子受容体 ( V E G F - R ) 、インターロイキン 1 7 およびアミロイド ペプチド ( A 1 - 4 2 ) 、 T N F 、 M I F 、 M C P - 1 、 S D F - 1 、 R a n k - L 、 M - C S F 、 アンギオテンシン I I 、 エンドグリン、エオタキシン、グレーリン、 B L C 、 C C L 2 1 、 I L - 1 3 、 I L - 1 7 、 I L - 5 、 I L - 8 、 I L - 1 5 、 ブラジキニン、レジスチン、 L H R H 、 G H R H 、 G I H 、 C R H 、 T R H およびガストリン、およびそれぞれの断片であり、これらを使用して免疫応答を誘導することができる。

#### 【 0 2 6 4 】

本発明の特定の実施形態では、抗原又は抗原決定基は ( a ) H I V の組み換えポリペプチド； ( b ) インフルエンザ・ウィルスの組み換えポリペプチド(たとえば、インフルエンザ・ウィルス M 2 ポリペプチド又はその断片)； ( c ) C 型肝炎ウィルスの組み換えポリペプチド； ( d ) B 型肝炎ウィルスの組み換えポリペプチド； ( e ) T o x o p l a s m a の組み換えポリペプチド； ( f ) P l a s m o d i u m f a l c i p a r u m の組み換えポリペプチド； ( g ) P l a s m o d i u m v i v a x の組み換えポリペプチド； ( h ) P l a s m o d i u m o v a l e の組み換えポリペプチド； ( i ) P l a s m o d i u m m a l a r i a e の組み換えポリペプチド； ( j ) 乳癌細胞の組み換えポリペプチド； ( k ) 腎臓癌細胞の組み換えポリペプチド； ( l ) 前立腺癌細胞の組み換えポリペプチド； ( m ) 皮膚癌細胞の組み換えポリペプチド； ( n ) 脳癌細胞の組み換えポリペプチド； ( o ) 白血病細胞の組み換えポリペプチド； ( p ) 組み換えプロファイル； ( q ) ハチ刺されアレルギーの組み換えポリペプチド； ( r ) ナツツ・アレルギーの組み換えポリペプチド； ( s ) 花粉の組み換えポリペプチド； ( t ) 室内埃の組み換えポリペプチド； ( u ) ネコ又はネコの毛アレルギーの組み換えポリペプチド； ( v ) 食物アレルギーの組み換えタンパク質； ( w ) 喘息の組み換えタンパク質； ( x ) C h l a m y d i a の組み換えタンパク質； および ( y ) ( a ) ~ ( x ) に述べた任意のタンパク質の断片からなる群から選択される。

#### 【 0 2 6 5 】

本発明の他の実施形態では、ウィルス様粒子に連結、融合、又は他の方式で付着している抗原は、T 細胞エピトープ、細胞傷害性又は T h 細胞エピトープである。他の好ましい実施形態では、抗原は少なくとも 2 つの、好ましくは異なるエピトープの組合せであり、

10

20

30

40

50

かつ少なくとも 2 つのエピトープは直接結合しているか、あるいは連結配列によって結合している。これらのエピトープは、細胞傷害性および Th 細胞エピトープからなる群から選択されることが好ましい。

【 0 2 6 6 】

モザイク型ウィルス様粒子、たとえば、それぞれ異なる抗原およびエピトープと結合したサブユニットから構成されるウィルス様粒子は、本発明の範囲内にあることも理解されるべきである。このような本発明の組成物は、たとえば、それぞれ異なる抗原およびエピトープと融合したウィルス様粒子から構成されるサブユニットをコードする 2 個の適合性のあるプラスミドで、大腸菌を形質転換することによって得ることができる。この場合、モザイク型ウィルス様粒子を、細胞中に直接、あるいは細胞溶解後に組み立てる。さらに、このような本発明の組成物は、それぞれ異なる抗原およびエピトープの混合物を、単離したウィルス様粒子と結合させることによって得ることもできる。

【 0 2 6 7 】

本発明の抗原、および特に示した 1 個又は複数個のエピトープは、組み換え DNA 技法を使用して、合成、あるいは組み換えによって発現、ウィルス様粒子と結合、あるいはウイルス様粒子と融合することができる。抗原とウィルス様粒子の結合を記載する代表的な手順は、WO 00/32227 中、WO 01/85208 中、および WO 02/056905 中に開示されており、それらの開示は、その全容が参考によりここに組み込まれている。

【 0 2 6 8 】

本発明は、動物の免疫応答を高めるための組成物を生成する方法であって、前記組成物が VLP、および VLP と結合した免疫賦活物質、好ましくは非メチル化 CpG 含有オリゴヌクレオチドを含み、前記方法が免疫賦活物質およびオリゴヌクレオチドそれとと共に VLP をインキュベートすること、 RNase を加えること、および前記組成物を精製することを含む方法も提供する。同様に好ましい実施形態では、本発明の方法は、 VLP を RNase と共にインキュベートすること、免疫賦活物質およびオリゴヌクレオチドそれぞれ加えること、および組成物を精製することを含む。一実施形態では、 VLP は細菌発現系で生成される。他の実施形態では、 RNase は RNase A である。

【 0 2 6 9 】

本発明は、動物の免疫応答を高めるための組成物を生成する方法であって、前記組成物が免疫賦活物質、好ましくは非メチル化 CpG 含有オリゴヌクレオチドと結合した VLP を含み、前記方法が VLP を分解すること、免疫賦活物質およびオリゴヌクレオチドそれぞれ加えること、および VLP を再構築することを含む方法をさらに提供する。この方法は、分解された VLP の核酸を除去すること、及び / 又は再構築後に組成物を精製することをさらに含むことができる。

【 0 2 7 0 】

本発明は、疾患又は状態を予防する、かつ / あるいは低下させるために使用することができる、ワクチン組成物も提供する。本発明のワクチン組成物は、免疫学的に有効量の本発明の免疫増強組成物、および薬剤として許容可能な希釈剤、担体又は賦形剤を含むか、あるいはこれらからなる。ワクチンは、アジュバントも場合によっては含むことができる。

【 0 2 7 1 】

本発明は、動物の疾患又は状態を予防する、かつ / あるいは低下させるための、ワクチン接種法をさらに提供する。一実施形態では、本発明は、広範囲の動物種、特に哺乳動物種、ヒト、サル、ウシ、イヌ、ネコ、ウマ、ブタなどの、感染症を予防するためのワクチンを提供する。ワクチンを設計して、ウィルスが病因の感染、 HIV、インフルエンザ、ヘルペス、ウィルス肝炎、 EB (エプスタインバー)、ポリオ、ウィルス脳炎群、はしか、水痘など；又は細菌が病因の感染、肺炎、結核、梅毒など；又は寄生虫が病因の感染、マラリア症、トリバノソーマ症、リーシュマニア症、トリコモナス症、アメーバ症などを治療することができる。

10

20

30

40

50

## 【0272】

他の実施形態では、本発明は、広範囲の種、特に哺乳動物種、ヒト、サル、ウシ、イヌ、ネコ、ウマ、ブタなどの、癌を予防するためのワクチンを提供する。ワクチンを設計して、リンパ腫、癌腫、肉腫、およびメラノーマだけには限られないが、これらを含めたあらゆる型の癌を治療することができる。

## 【0273】

当業者は理解されていると思われるが、本発明の組成物を動物に投与するとき、それらは、組成物の有効性を向上させるのに望ましい、塩、バッファー、アジュバント又は他の物質を含む、組成物の形であってよい。薬剤組成物の調製において使用するのに適した物質の例は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Osol, A, ed., Mack Publishing Co., (1990))を含めた多数の源中に与えられる。

10

## 【0274】

さまざまなアジュバントを使用して、宿主の種類に応じて免疫応答を高めることができ、アジュバントにはフロイントのアジュバント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどの鉱質ゲル、表面活性化物質、リゾレシチン、フルロニック・ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、ジニトロフェノールなど、および潜在的に有用なヒト用アジュバント、BCG（カルメット-ギランかん菌）およびCorynebacterium parvumなどがあるが、これらだけには限られない。このようなアジュバントも、当分野ではよく知られている。本発明の組成物と共に投与することができる他のアジュバントには、モノホスホリル脂質免疫調節物質、AdjuVax 100a、QS-21、QS-18、CRL 1005、アルミニウム塩、MF-59、およびViro somalアジュバント技術品があるが、これらだけには限られない。アジュバントは、これらの物質の混合物を含むこともできる。

20

## 【0275】

本発明の組成物は、その投与がレシピエント個体によって許容可能である場合、「薬理学的に許容可能である」と言える。さらに、本発明の組成物は、「治療上有効量」（すなわち、望ましい生理学的効果を生み出す量）で投与される。

## 【0276】

本発明の組成物は、当分野で知られているさまざまな方法によって投与することができる。選択される個々の形式は、選択される個々の組成物、治療される状態の重度、および治療効果のために必要とされる用量に、当然ながら依存するであろう。本発明の方法は、一般的に述べると、医学的に許容される任意の投与形式、すなわち臨床上許容されない副作用を引き起こさずに有効レベルの活性化合物を生成する、任意の形式を使用して行うことができる。このような投与形式には、経口、直腸、非経口、脳槽内（intracisternal）、腔内、腹膜内、局所（粉末、軟膏、滴下剤又は経皮パッチによって）、頸投与、あるいは経口又は鼻部スプレーとしての投与がある。本明細書で使用する、用語「非経口的」は、静脈内、筋肉内、腹膜内、胸骨内、皮下および関節内注射および注入を含む、投与形式を指す。本発明の組成物は、リンパ節に直接注射することもできる。

30

## 【0277】

投与用の組成物の成分には、滅菌水溶液（たとえば、生理食塩水）又は非水溶液および懸濁液がある。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。担体又は密封包帯を使用して、皮膚の浸透性を高め、抗原吸着を増大させることができる。

40

## 【0278】

付隨的に、たとえば混合物として、あるいは別々に、組合せを投与することができるが、一斉にすなわち同時に、あるいは順次に投与することもできる。このことは、組合せ物質が治療用混合物と共に投与されること、および組合せ物質が一斉にではなく別々に、たとえば別の静脈内経路によって同じ個体に投与される手順の表示を含む。「組合せ」投与

50

は、所与の成分又は物質の1つを最初に、次に第2のものを別々に投与することをさらに含む。

【0279】

用量レベルは、投与形式、被験者の性質、および担体／アジュvant製剤の質に依存する。典型的な量は、被験者当たり約0.1 μg～約20mgの範囲内である。好ましい量は、被験者当たり少なくとも約1 μg～約100 μgである。被験者を免疫化するために多重投与が好ましく、プロトコルは、問題の被験者に適合させた当分野の標準的なものである。

【0280】

本発明の組成物は、好都合なことに単位用量の形で存在することができ、製薬の分野でよく知られている任意の方法によって調製することができる。それらの方法は、本発明の組成物と1つ又は複数の追加成分を構成する担体を結合させるステップを含む。一般に、これらの組成物は、本発明の組成物を均一かつ完全に、液状担体、微細固形担体、又はこの両方と結合させ、次いで必要な場合は、生成物の形状を整えることによって調製する。

【0281】

経口投与に適した組成物は、カプセル、錠剤又はトローチ剤などの、分離した単位として存在することができ、それぞれが所定量の本発明の組成物を含む。他の組成物には、水性の液体又は非水性の液体に懸濁させた懸濁液、シロップ、エリキシル剤又はエマルジョンなどがある。

【0282】

他の送達系は、時間放出、遅延放出又は徐放送達系を含んでよい。このような送達系によって、前に記載した本発明の組成物の繰り返しの投与を避けることができ、被験者および医者に対する利便性が高まる。多くの型の放出送達系が利用可能であり、当業者に知られている。

【0283】

本発明の他の実施形態は、本発明の組成物を生成するための方法、および前記組成物を使用する癌およびアレルギーの医学的な治療の方法を含む。

【0284】

本発明の他の態様および実施形態は、以下の実施例および添付の特許請求の範囲で明らかになるであろう。

【0285】

以下の実施例は単なる例示的なものであり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を制限することを目的とするものではない。本発明の精神および範囲から逸脱することなく、さまざまな変形形態および変形形態を本発明の方法で作製することができることは、当業者には明らかであろう。したがって、本発明は、本発明の変形形態および変形形態を、それらが添付の特許請求の範囲およびそれらの均等物の範囲内に入るという条件で、含むことが考えられる。

【0286】

本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、その全容を参照により明確に組み込んである。

【実施例1】

【0287】

p 33 - H B c A g V L P の生成

L C M V 由来のペプチド p 33 を含む H B c A g の D N A 配列を、図 1 B 中に与える。p 33 - H B c A g V L P ( p 33 - V L P ) を、以下のように生成させた：B 型肝炎ウィルスの完全なウィルス・ゲノムを含む、B 型肝炎クローン p E c o 6 3 を、A T C C から購入した。H B c A g をコードする遺伝子を、強力な t a c プロモーターの制御下において、発現ベクター p k k 2 2 3 . 3 ( ファルマシア ) の E c o R I / H i n d I I I 制限部位に導入した。リンパ球性脈絡髄膜炎ウィルス ( L C M V ) 由来の p 33 ペプチド ( K A V Y N F A T M ) を、標準的な P C R 法によって、3 個のロイシンリンカーを介し

10

20

30

40

50

て H B c A g の C 末端 ( 1 ~ 1 8 5 ) と融合させた。良い発現用に選択した大腸菌 K 8 0 2 のクローナンをプラスミドでトランスフェクトし、細胞を増殖させ、 5 m l の溶解バッファー ( 1 0 m M の N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> 、 3 0 m M の N a C l 、 1 0 m M の E D T A 、 0 . 2 5 % の T w e e n - 2 0 、 p H 7 . 0 ) 中に再懸濁させた。 2 0 0  $\mu$  l のリゾチーム溶液 ( 2 0 m g / m l ) を加えた。超音波処理の後、 4  $\mu$  l のベンゾナーゼおよび 1 0 m M の M g C l <sub>2</sub> を加え、懸濁液を室温で 3 0 分間インキュベートし、 4 において 1 5 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離し、上澄みは保持した。

#### 【 0 2 8 8 】

次に、 2 0 % ( w / v ) ( 0 . 2 g / m l の溶解物 ) 硫酸アンモニウムを、上澄みに加えた。氷上の 3 0 分間のインキュベーション、および 4 において 2 0 , 0 0 0 r p m 10 で 1 5 分間遠心分離した後、上澄みを捨て、ペレットを 2 ~ 3 m l の P B S 中に再懸濁させた。 2 0 m l の P B S 溶液を、 S e p h a c r y l S - 4 0 0 ゲル濾過カラム ( アマシャム ファルマシア バイオテクノロジー A G ) に担持し、画分を S D S - P a g e ゲルに担持し、精製した p 3 3 - V L P キャプシドを含む画分を集めた。集めた画分は、ヒドロキシアパタイト・カラムに担持した。流動物 ( 精製した p 3 3 - V L P キャプシドを含む ) を回収した ( 図 2 B ) 。電子顕微鏡法は、標準的なプロトコルに従って行った。代表的な例を、図 2 A に示す。

#### 【 実施例 2 】

#### 【 0 2 8 9 】

C p G 含有オリゴヌクレオチドは H B c A g V L P 中にパッケージ化することができる 20

組み換え p 3 3 - V L P に、純粋なアガロース・ゲルの電気泳動 ( 1 % アガロース ) を行い、 R N A / D N A 又はタンパク質を検出するために臭化工チジウム又はクーマシーブルーで染色した ( 図 3 ) 。細菌生成 V L P は高レベルの一本鎖 R N A を含み、これはおそらく、 H B c A g タンパク質の C 末端の近くに現れ、 X 線結晶解析によって示されるように、形状的には V L P の内側に位置している、アルギニン反復配列と結合している。汚染した R N A は容易に消化し、 V L P と R N a s e A をインキュベートすることによって排除することができる。非常に活性がある R N a s e A 酵素は、約 1 4 k D a の分子量を有しており、 V L P に入り望ましくないリボ核酸を排除するほど、おそらく十分小さい。

#### 【 0 2 9 0 】

組み換え p 3 3 - V L P に、 R N a s e A による消化前に、 C p G オリゴヌクレオチド ( 図 1 A ) を補った。図 4 に示すように、 C p G - オリゴヌクレオチドの存在によって、未処理 p 3 3 - V L P と比較した同様の移動によって示されるように、キャプシド構造が保たれた。 C p G - オリゴヌクレオチド含有 V L P を、透析 ( 3 0 0 k D a の M W C O 透析膜を使用して、 2 4 時間かけて P B S に 4 5 0 0 倍希釈 ) によって、非結合オリゴヌクレオチドから精製した ( 図 5 ) 。

#### 【 実施例 3 】

#### 【 0 2 9 1 】

C p G - オリゴヌクレオチドは、 R N a s e により R N A を除去し、その後オリゴヌクレオチドを V L P にパッケージ化することによって、 V L P 中にパッケージ化することができる 40

p 3 3 - V L P ( 細菌一本鎖 R N A を含む ) を、 R N a s e A と共に最初にインキュベートして R N A を除去し、第 2 のステップでは、免疫賦活 C p G - オリゴヌクレオチド ( 通常のリン酸ジエステル結合を含むだけでなく、リン酸骨格のホスホロチオエート修飾体も含む ) を、サンプルに補った ( 図 6 ) 。この実験によって、 C p G - オリゴヌクレオチドが R N A 分解反応中に必ずしも同時に必要とされるわけではなく、後で加えることができることが明らかに示される。

#### 【 実施例 4 】

#### 【 0 2 9 2 】

10

20

30

40

50

CpG-オリゴヌクレオチド(リン酸骨格のホスホロチオエート修飾体又は通常のリン酸ジエステル結合を含む)を含むVLPは、高い抗ウィルス保護を誘導する

マウスを、100 μgのCpG-オリゴヌクレオチド含有p33-VLPで、皮下を初回抗原刺激した。免疫化の前に、p33-VLP調製物を、透析によって非結合CpG-オリゴヌクレオチドから十分に精製した(実施例2および図5を参照のこと)。コントロールとして、マウスを100 μgのp33-VLP単独で、これを20 nmolのCpG-オリゴヌクレオチドと混合して、20 nmolのCpG-オリゴヌクレオチド単独で、皮下を初回抗原刺激し、あるいは未処理のままにした。Bachmann, M. F.、「Evaluation of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T cell responses」in Immunology Methods Manual, Lefkowitz, I., ed., Academic Press Ltd., New York, NY (1997) p. 1921中に記載されたように、21日後、マウスをLCMVで感染させ(200 pfu、静脈内)、脾臓中のウィルス力値を5日後に評価した。これらの結果は、図7、8および9に示す。

#### 【実施例5】

#### 【0293】

##### BKVポリオーマ・キャプシドの生成

BKVウイルス(BKV)は、パポ・ウィルス科のポリオーマ・ウィルス亜科に属する、非エンベロープ型の二本鎖DNAウイルスである。VP1は主要なキャプシド・タンパク質である。VP1は362個のアミノ酸を有し(図10)、42 kDaの大きさである。大腸菌、昆虫細胞又は酵母菌VP1中で生成されると、キャプシド構造を自然に形成する(Salunke D. M. 他、Cell 46(6): 895~904 (1986); Sasnauskas, K. 他、Biol. Chem. 380(3): 381~6 (1999); Sasnauskas, K. 他、3rd International Workshop「Virus-like particles as vaccines」Berlin, September 26~29 (2001); Touze, A. 他、J. Gen. Virol. 82(Pt 12): 3005~9 (2001))。このキャプシドは、正二十面体構造を形成する72のVP1ペントマーで編成されている。このキャプシドは、約45 nmの直径を有する。

#### 【実施例6】

#### 【0294】

フルオレセイン標識したCpG含有オリゴヌクレオチドを、BKV VLPにパッケージ化することができる

酵母菌において生成されるVLPは、容易に消化し、したがってVLPとRNase Aをインキュベートすることによって排除することができる、少量のRNAを含む。非常に活性があるRNase A酵素は、約14 kDaの分子量を有しており、VLPに入り望ましくないリボ核酸を排除するほど、おそらく十分小さい。組み換えによって生成させたBKV VLPを、PBSバッファーpH7.2中に1 mg/mlに濃縮し、RNase A(200 μg/ml、Roche Diagnostics Ltd, Switzerland)の不在下又は存在下において37℃で3時間インキュベートし、RNase Aによる消化の後、BKV VLPに75 nmol/mlのフルオレセイン標識したホスホロチオエートCpG-FAMオリゴヌクレオチドを補い、37℃で3時間インキュベートした。その後BKV VLPには、37℃で3時間DNase Iによる消化を行ったか(40 u/mlのAMPD1、Sigma, Division of Fluka AG, Switzerland)、あるいはDNase Iによる消化は行わなかった。サンプルに6倍濃縮したDNA-ローディング・バッファー(10 mMのTris、pH 7.5、10% v/vグリセロール、0.4%オレンジG)を補い、0.8%の純粋なトリス酢酸pH7.5アガロース・ゲル中において、1時間65ボルトにした。

#### 【0295】

10

20

30

40

50

図12は、コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化、およびその後の蛍光CpG-FAMオリゴヌクレオチド(5'-フルオレセイン標識を有する図1Aからのオリゴヌクレオチド)とのインキュベーション後の、臭化工チジウムによる染色を行ったか、あるいは臭化工チジウム染色を行わなかった、純粋な0.8%アガロース・ゲルの電気泳動におけるBKV VLPを示す。臭化工チジウムの存在下では核酸が検出されるが、一方その不在下では、UV励起によってCpG-FAM中のフルオレセイン標識の蛍光がもたらされる。

## 【0296】

RNase Aによる消化によって、VLPの移動の変化がもたらされ、これはクーマシー染色したアガロース・ゲル上で見ることができ、おそらくRNAからの負電荷の欠如によるものである(図13および14)。CpG-オリゴヌクレオチドを加えることによって、BKV VLPの移動が元通りになり、未処理VLP中に存在したRNAバンドと移動が同じである、蛍光バンドがもたらされる。これによって、CpG-FAMオリゴヌクレオチドがVLPにパッケージ化されたことが明らかに示される。

## 【実施例7】

## 【0297】

大きな二本鎖オリゴヌクレオチドを、BKV VLPにパッケージ化することができる二本鎖(ds)ヌクレオチド配列を導入するために、RNase A処理した組み換えBKV VLP(実施例6)に、50 μg/ml(ds)DNA断片(長さ246bp、図11)を補い、37で3時間インキュベートした。サンプルに6倍濃縮したDNA-ローディング・バッファー(10mMのTris、pH8.0、10%v/vグリセロール、0.4%オレンジG)を補い、0.8%の純粋なトリス酢酸pH8.0アガロース・ゲル中において、1時間65ボルトにした。

## 【0298】

図13は、コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化、および臭化工チジウム又はクーマシープルーで染色した(ds)DNAとの、その後のインキュベーション後の、純粋な0.8%アガロース・ゲルの電気泳動におけるBKV VLP(15 μg)を示し、RNA/DNA又はタンパク質の存在を評価する。パッケージ化されたDNA分子は、クーマシープルーによって見ることができるVLPバンドと移動が同じであるバンドとして、臭化工チジウムの存在下で見ることができる。

## 【0299】

(ds)DNAを加えることによって、BKV VLPの移動が元通りになり、クーマシープルーで染色したVLPと移動が同じである、DNAバンドがもたらされる。これによって、(ds)DNAがBKV VLPにパッケージ化されたことが明らかに示される。

## 【実施例8】

## 【0300】

CpG含有オリゴヌクレオチドを、BKV VLPにパッケージ化することができる免疫賦活CpG-オリゴヌクレオチドを導入するために、RNase A処理した組み換えBKV VLP(実施例6)に、リン酸ジエステル骨格又はホスホロチオエートの骨格を有するCpG-オリゴヌクレオチド150nmol/mlを補い、37で3時間インキュベートした。マウス免疫化用のVLP調製物を、300kDaのMWCO透析膜(Spectrum Medical Industries Inc.、Houston、USA)を用いてPBS pH7.2(10,000倍希釈)で24時間かけて十分に透析して、RNase Aおよび過剰なCpG-オリゴヌクレオチドを排除した。サンプルに6倍濃縮したDNA-ローディング・バッファー(10mMのTris、pH7.5、10%v/vグリセロール、0.4%オレンジG)を補い、0.8%の純粋なトリス酢酸pH7.5アガロース・ゲル中において、1時間65ボルトにした。

## 【0301】

図14は、コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化、お

10

20

30

40

50

および臭化エチジウム (A) 又はクーマシーブルー (B) で染色した C p G - オリゴヌクレオチド (リン酸ジエステル骨格を有するか、あるいはホスホロチオエート骨格を有する)との、その後のインキュベーション後の、純粋な 0.8% アガロース・ゲルの電気泳動における B K V V L P (15  $\mu$ g) を示し、透析後の R N A / D N A 又はタンパク質の存在、および非結合 C p G - オリゴヌクレオチドの減少を評価する。非結合 C p G - オリゴヌクレオチドは、低分子量の臭化エチジウム染色されたバンドとして見ることができる。

【0302】

C p G - オリゴヌクレオチドを加えることによって、B K V V L P の移動が元通りになり、クーマシーブルーで染色した V L P と移動が同じである、D N A バンドがもたらされる。これによって、C p G - オリゴヌクレオチドが B K V V L P にパッケージ化されることが明らかに示される。 10

【実施例 9】

【0303】

C p G - オリゴヌクレオチド (リン酸骨格のホスホロチオエート修飾体を含む) を含む V L P は、T h 1 指向型の高められた免疫応答を誘導する

メスの B A L B / c マウス (1 群当たり 3 匹のマウス) に、ホスホロチオエート C p G - オリゴヌクレオチド (図 1 A) を含む B K V V L P 10  $\mu$ g を皮下注射した。コントロールとして、マウスに 10  $\mu$ g の R N a s e 处理した B K V V L P を単独で、又は 0.3 n m o l 又は 2 0 n m o l のホスホロチオエート C p G - オリゴヌクレオチドを 2 0 0  $\mu$ l の P B S p H 7.2 に混合した B K V V L P を皮下注射し、あるいは未処理のままにした。B K V V L P は実施例 8 に記載したように調製し、免疫化の前に、透析によって非結合 C p G - オリゴヌクレオチドから十分に精製した。免疫化後第 1 4 日に、血液を採取し、B K V V L P に対する I g G 1 および I g G 2 a 抗体の応答を決定した。 20

【0304】

図 1 5 は、免疫化後第 1 4 日の、B K V V L P に対する I g G 1 および I g G 2 a 抗体の応答を示す。ホスホロチオエート C p G - オリゴヌクレオチドを含む、R N a s e 处理した B K V V L P による免疫化によって、B K V V L P と混合した同じ量 (0.3 n m o l) の C p G - オリゴヌクレオチド、あるいは B K V V L P 単独による免疫化と比較して、低い I g G 1 および高い抗 B K V V L P I g G 2 a 力価がもたらされる。2 0 n m o l のホスホロチオエート C p G - オリゴヌクレオチドと混合した B K V V L P で免疫化したマウスは、非常に低い I g G 1 および高い I g G 2 a 力価を示す。コントロールと比較した、I g G 1 力価の低下および I g G 2 a 力価の増大によって、B K V V L P にパッケージ化されたホスホロチオエート C p G - オリゴヌクレオチドによって誘導される、T h 1 細胞指示型免疫応答が実証される。図 1 5 によって、C p G - オリゴヌクレオチドと混合しただけの B K V V L P と比較して、粒子内にパッケージ化された C p G - オリゴヌクレオチドを含む B K V V L P の高い効能が明らかに実証される。 30

【実施例 10】

【0305】

線状二本鎖 D N A (d s D N A) は、最初に R N a s e による消化、およびその後 d s D N A を加えることによって、V L P 中にパッケージ化することができる 40

p 3 3 - V L P 調製物 (細菌 R N A を含む) (実施例 1) を、R N a s e A と共に最初にインキュベートして R N A を除去し、第 2 のステップでは、線状 d s D N A (長さ 3 5 0 b p) を、サンプルに補った (図 1 6)。d s D N A をパッケージ化した p 3 3 - V L P の移動は、R N A を含む p 3 3 - V L P のそれと類似していた。この実験によって、長さが少なくとも 3 5 0 塩基対の線状 d s D N A を、ウィルス様粒子中にパッケージ化することができることが示される。

【実施例 11】

【0306】

免疫賦活性核酸は、融合タンパク質および抗原を含む H B c A g V L P 中にパッケージ化することができる 50

H B c A g - V L P は、B型肝炎コア抗原融合タンパク質 H B c 3 3 (実施例1) 又はペプチド P 1 A (H B c P 1 A)との融合タンパク質を発現することによって大腸菌中で生成されると、RNAを含み、このRNAを消化し、V L PとRNase Aをインキュベートすることによって排除することができる。

【0307】

遺伝子 P 1 A は、肥満細胞腫瘍細胞系 P 8 1 5 によって発現される、タンパク質をコードしている。P 1 A ペプチドという名称の、主要な CTLエピトープは、MHCクラスI (Ld) と結合し、その複合体は特異的な CTLクローニングによって認識される (Brand 1998, Eur. J. Immunol. 28: 4010 ~ 4019)。ペプチド P 1 A - 1 (L P Y L G W L V F) と H B c A g の C 末端 (aa 185、実施例1参照) の融合は、標準的な分子生物学の技法を使用して、適切なプライマーを使用することにより PCR によって行った。H B c A g とペプチド配列の間の 3 個のロイシンリンカーをクローニングした。発現は実施例1に記載したように行った。H B c P 1 A という名称の、H B c A g と P 1 A の融合タンパク質は、大腸菌中で発現されると、キャブシドを形成し、これは実施例1に記載した手順と同様に精製することができると思われる。

【0308】

酵素によるRNA加水分解: 1 × PBSバッファー (KCI 0.2 g / L, KH2P 0.4 0.2 g / L, NaCl 8 g / L, Na2HPO4 1.15 g / L) pH 7.4 中に 1.0 mg / ml の濃度である、組み換えによって生成させた H B c A g - p 3 3 (H B c 3 3) および H B c A g - P 1 A (H B c P 1 A) V L P を、サーモ・ミキサー 中において 650 rpm で、37 で 3 時間、300 μg / ml の RNase A (Qiagen AG, Switzerland) の存在下において、インキュベートした。

【0309】

免疫賦活性核酸のパッケージ化: RNase A により RNA を消化した後、H B c A g - p 3 3 V L P に、130 nmol / ml の C p G - オリゴヌクレオチド B - C p G 、N K C p G 、G 1 0 - P O (表I) を補った。同様に、いずれも C p G モチーフの多数のコピーを含む、150 量体一本鎖 C y 1 5 0 - 1 、および 253 量体二本鎖 d s C y C p G - 2 5 3 を、それぞれ 130 nmol / ml 又は 1.2 nmol / ml で加え、サーモ・ミキサー 中において 37 で 3 時間インキュベートした。二本鎖 C y C p G - 2 5 3

DNA は、C y C p G の二本鎖マルチマーを p B l u e s c r i p t K S - の Eco RV 部位にクローニングすることによって生成させた。大腸菌 X L 1 - b l u e において生成され、Qiagen Endofree plasmid Giga Kit を使用して単離した、生成したプラスミドを、制限エンドヌクレアーゼ X h o I および X b a I によって消化し、生成した制限酵素産物を、アガロースの電気泳動によって分離した。253 bp の挿入物を、エレクトロ - エリューションおよびエタノール沈殿によって単離した。両方の鎖の配列決定によって、配列を確認した。

【0310】

表I : 実施例中で使用した免疫賦活性核酸の配列

小文字はホスホロチオエート結合によって結合したデオキシヌクレオチドを示し、一方で大文字はリン酸ジエステル結合によって結合したデオキシヌクレオチドを示す。

10

20

30

40

表 I : 実施例中で使用した免疫賦活性核酸の配列

小文字はホスホロチオエート結合によって結合したデオキシヌクレオチドを示し、一方で大文字はリン酸ジエステル結合によって結合したデオキシヌクレオチドを示す。

CyCpGpt	tccatgacgttccctgaataat
CyCpG	TCCATGACGTTCCCTGAATAAT
B-CpGpt	tccatgacgttccctgacgtt
B-CpG	TCCATGACGTTCCCTGACGTT
NKCpGpt	ggGGTCAACGTTGAggggg
NKCpG	GGGGTCAACGTTGAGGGGG
CyCpG-rev-pt	attattcaggaacgtcatgga
g10gacga-PO (G10-PO)	GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG
g10gacga-PS (G10-PS) (CpG) 200pA	gggggggggggacgatcgtcgggggggggg CGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG CGCGAAATGCA TGTCAAAGACAGCAT
Cy (CpG) 20	TCCATGACGTTCCCTGAATAATCGCGCGCGCGCG GCGCGCGCGCG CGCGCGCGCGCGCG
Cy (CpG) 20-OpA	TCCATGACGTTCCCTGAATAATCGCGCGCGCGCG GCGCGCGCGCG CGCGCGCGCGCGAAATGCATGTCAAAGACAGC
CyOpA	TCCATGACGTTCCCTGAATAATAATGCATGTCAA ACAGCAT
CyCyCy	TCCATGACGTTCCCTGAATAATTCCATGACGTTCC AATAATTCCAT GACGTTCCCTGAATAAT
Cy150-1	TCCATGACGTTCCCTGAATAATTCCATGACGTTCC AATAATTCCAT GACGTTCCCTGAATAATTGGATGACGTTGGTGAAT TTCCATGACGT TCCTGAATAATTCCATGACGTTCCCTGAATAATTCC TGACGTTCCCTG AATAATTCC
dsCyCpG-253 (配列番号83) (相補鎖を示す)	CTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATT ATTCACTGACTT CCTGAATAATTCCATGACGTTGGTGAATAATTCC GACGTTCCCTGA ATAATTCCATGACGTTCCCTGAATAATTCCATGAC TCCTGAATAAT TCCATGACGTTCCCTGAATAATTCCATGACGTTCC AATAATTCCAT GACGTTCCCTGAATAATTCCATGACGTTCCCTGAAA TCCAATCAAGC TTATCGATACCGTCGACC

【 0 3 1 1 】

D N A s e I 溶液 : パッケージ化された H B c A g - p 3 3 V L P に、後に 3 7 で 3 時間 D N a s e I による消化 ( 5 U / m l ) を行い ( D N a s e I , R N a s e f r e e F l u k a A G 、 S w i t z e r l a n d ) 、 3 0 0 k D a の M W C O 透析膜 ( S p e c t r u m M e d i c a l I n d u s t r i e s I n c . 、 H o u s t o n 、 U S A ) を用いて P B S p H 7 . 4 ( 2 0 0 倍体積に対して 2 倍 ) で 2 4 時間かけて十分に透析して、 R N A s e A および過剰な C p G - オリゴヌクレオチドを排除した

〔 0 3 1 2 1

ベンゾナーゼ処理：いくつかの一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドは、DNAse I処理に部分的に耐性があったので、ベンゾナーゼ処理を使用して、調製物から遊離オリゴヌクレオチドを排除した。100~120U/mlのベンゾナーゼ(Merck KGaA、Darmstadt、Germany)および5mMのMgCl<sub>2</sub>を加え、透析前に37で3時間インキュベートした。

### 【0313】

透析：マウスの免疫化実験で使用する、免疫賦活性核酸をパッケージ化したVLP調製物を、300kDaのMWCO透析膜(Spectrum Medical Industries Inc.、Houston、USA)を用いてPBS pH7.4(200倍体積に対して2倍)で24時間かけて十分に透析して、加えた酵素および遊離核酸を排除した。

10

### 【0314】

パッケージ化の分析：パッケージ化された免疫賦活性核酸の放出：50μlのキャプシド溶液に、1μlのプロテイナーゼK(600U/ml、Roche、Mannheim、Germany)、3μlの10% SDS溶液、および6μlの10倍プロテイナーゼ・バッファー(0.5MのNaCl、50mMのEDTA、0.1MのTris pH7.4)を加え、その後37で一晩インキュベートした。このような条件下で、VLPを加水分解させる。プロテイナーゼKは、65で20分間加熱することによって不活性化させた。1μlのRNase A(Qiagen、100μg/ml、250倍希釈)を、25μlのキャプシドに加えた。2~30μgのキャプシドを、1体積の2×ローディング・バッファー(1×TBE、42%w/v尿素、12%w/vプロモフェノールブルー、0.01%プロモフェノールブルー)と混合し、95で3分間加熱し、10%(約20nt長のオリゴヌクレオチドの場合)又は15%(40量体より小さい核酸の場合)TBE/尿素ポリアクリルアミド・ゲル(Invitrogen)に担持した。あるいはサンプルを、6×ローディング染料(10mMのTris pH7.5、50mMのEDTA、10%v/vグリセロール、0.4%オレンジG)を含む1%アガロース・ゲルに担持した。TBE/尿素ゲルはC Y B R G o l dで染色し、アガロース・ゲルは臭化キシウムで染色した。

20

### 【0315】

図17、18および19は、B-CpG、NKCpGおよびG10-POオリゴヌクレオチドのHBc33へのパッケージ化を示す。VLP中のRNA含量はRNase A処理後に大幅に減少したが(図17A、18A、19A)、大部分のキャプシドは、おそらく負に帯電したRNAが除去されたために、緩慢な移動物質として移動した(図17B、18B、19B)。過剰のオリゴヌクレオチドと共にインキュベーションした後、これらのキャプシドは、RNase A処理したキャプシドよりも多量の核酸を含んでおり、したがって未処理キャプシドと同じ速度で移動した。DNAse I又はベンゾナーゼを用いた他の処理によって、遊離オリゴヌクレオチドが分解したが、キャプシド中にパッケージ化されたオリゴヌクレオチドは分解せず、オリゴヌクレオチドのパッケージ化が明らかに示された。いくつかの場合、オリゴヌクレオチドのパッケージ化は、DNAse I/ベンゾナーゼ処理および透析の後に、(実施例15および16に記載したように)プロテイナーゼKによる消化によって確認された。前に記載した手順によってキャプシドから放出されたオリゴヌクレオチドは、パッケージ化用に使用したオリゴヌクレオチドと同じ大きさであったという発見によって、オリゴヌクレオチドのパッケージ化が明らかに実証された(図17C、18C)。

30

### 【0316】

図20は、大きな一本鎖オリゴヌクレオチドCy150-1のHBc33へのパッケージ化を示す。Cy150-1はCpGの7.5個の反復配列を含み、標準的なオリゴヌクレオチド合成法(IBA、Göttingen、Germany)に従って合成した。キャプシド中のRNA含量はRNase A処理後に大幅に減少したが、大部分のキャプシドは緩慢な移動物質として移動した(図20A、B)。キャプシドを4倍体積の水で希

40

50

釀し、1 mg / ml に濃縮した。過剰の Cy 150 - 1 と共にインキュベーションした後、これらのキャプシドはより多量の核酸を含んでおり、したがって未処理キャプシドと同じ速度で移動した。DNAse I を用いた他の処理によって、遊離した、非パッケージ化型オリゴヌクレオチドが分解したが、キャプシド中のオリゴヌクレオチドは分解されなかった（図 20 A）。TBE / 尿素ローディング・バッファー中での 95 °で 3 分間の加熱による、パッケージ化された VLP からの DNAse I 耐性核酸の放出によって、150 量体の存在が明らかになった（図 20 C）。

### 【0317】

図 21 は、オリゴヌクレオチド NKCpGpt の HBCP1A へのパッケージ化を示す。RNAse を用いた処理によって核酸含量が減少し、キャプシドの移動が遅くなった。NKCpGpt を添加することによって、キャプシド中の核酸含量が元通りになり、移動が速くなった。

### 【0318】

図 17 は、臭化工チジウム（A）又はクーマシーブルー（B）で染色した 1% アガロース・ゲル上における、B - CpG の HBC33 VLP へのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは 50 μg の以下のサンプルである：1. HBC33 VLP、未処理；2. HBC33 VLP、RNase A で処理したもの；3. HBC33 VLP、RNase A で処理し、かつ B - CpG をパッケージ化したもの；4. HBC33 VLP、RNase A で処理し、B - CpG をパッケージ化し、かつ DNase I で処理したもの；5. HBC33 VLP、RNase A で処理し、B - CpG をパッケージ化し、DNase I で処理し、かつ透析したもの；6. 1 kb の MBI Fermentas DNA ラダー。（C）は、臭化工チジウムで染色した 1.5% アガロース・ゲル上における、VLP から抽出されたパッケージ化されたオリゴの量の分析を示す：ゲルに担持したのは以下のサンプルである：1. 0.5 nmol の B - CpG コントロール；2. 0.5 nmol の B - CpG コントロール；3. B - CpG オリゴ含有 HBC33、フェノール / クロロホルム抽出後のもの；4. B - CpG オリゴ含有 HBC33、フェノール / クロロホルム抽出後の、RNase A 処理したもの；5. B - CpG オリゴ含有 HBC33、フェノール / クロロホルム抽出後の、DNase I 処理したもの；6. 空；7. MBI Fermentas 100 bp の DNA ラダー。

### 【0319】

図 18 は、臭化工チジウム（A）又はクーマシーブルー（B）で染色した 1% アガロース・ゲル上における、NKCpG の HBC33 VLP へのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは 15 μg の以下のサンプルである：1. HBC33 VLP、未処理；2. HBC33 VLP、RNase A で処理したもの；3. HBC33 VLP、RNase A で処理し、かつ NKCpG をパッケージ化したもの；4. HBC33 VLP、RNase A で処理し、NKCpG をパッケージ化し、DNase I で処理し、かつ透析したもの；5. 1 kb の MBI Fermentas DNA ラダー。（C）は、CYBR Gold で染色した 15% TBE / 尿素ゲル上における、VLP からのパッケージ化されたオリゴ抽出物の量の分析を示す：ゲルに担持したのは以下のサンプルである：1. NKCpG オリゴ含有 HBC33、プロテイナーゼ K で消化した後の、RNase A 処理したもの；2. 20 pmol の NKCpG コントロール；3. 10 pmol の NKCpG コントロール；4. 40 pmol の NKCpG コントロール。

### 【0320】

図 19 は、臭化工チジウム（A）又はクーマシーブルー（B）で染色した 1% アガロース・ゲル上における、g10gacgaa - PO の HBC33 VLP へのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは 15 μg の以下のサンプルである：1. 1 kb の MBI Fermentas DNA ラダー；2. HBC33 VLP、未処理；3. HBC33 VLP、RNase A で処理したもの；4. HBC33 VLP、RNase A で処理し、かつ g10gacgaa - PO をパッケージ化したもの；5. HBC33 VLP、RNase A で処理し、g10gacgaa - PO をパッケージ化し、ベンゾナーゼ

10

20

30

40

50

で処理し、かつ透析したもの。

【0321】

図20は、臭化エチジウム(A)又はクーマシープルー(B)で染色した1%アガロース・ゲル上における、 $\text{CyCpG-150}$ の $\text{HBc33 VLP}$ へのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは $15\text{ }\mu\text{g}$ の以下のサンプルである：1. 1 kbのMBI Fermentas DNAラダー；2.  $\text{HBc33 VLP}$ 、未処理；3.  $\text{HBc33 VLP}$ 、RNase Aで処理したもの；4.  $\text{HBc33 VLP}$ 、RNase Aで処理し、かつ $\text{CyCpG-150}$ をパッケージ化したもの；5.  $\text{HBc33 VLP}$ 、RNase Aで処理し、かつ $\text{CyCpG-150}$ をパッケージ化し、DNase Iで処理し、かつ透析したもの；6.  $\text{HBc33 VLP}$ 、RNase Aで処理し、 $\text{CyCpG-150}$ をパッケージ化し、DNase Iで処理し、かつ透析したもの。(C)は、CYBR Goldで染色した10%TBE/尿素ゲル上における、VLPから抽出されたパッケージ化されたオリゴの量の分析を示す：ゲルに担持したのは以下のサンプルである：1. 20 pmolの $\text{CyCpG-150}$ コントロール；2. 10 pmolの $\text{CyCpG-150}$ コントロール；3. 4 pmolの $\text{CyCpG-150}$ コントロール；4.  $\text{CyCpG-150}$ オリゴ含有 $4\text{ }\mu\text{g}$  $\text{HBc33}$ 、1体積のTBE/尿素サンプル・バッファーで95において3分間処理した後のもの。

【0322】

図21は、臭化エチジウム(A)又はクーマシープルー(B)で染色した1%アガロース・ゲル上における、 $\text{NKCpGpt}$ の $\text{HBcP1A VLP}$ へのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは $15\text{ }\mu\text{g}$ の以下のサンプルである：1. 1 kbのMBI Fermentas DNAラダー；2.  $\text{HBcP1A VLP}$ 、未処理；3.  $\text{HBcP1A VLP}$ 、RNase Aで処理し、かつ $\text{NKCpGpt}$ をパッケージ化したもの。

【実施例12】

【0323】

免疫賦活性核酸は、抗原と結合させた $\text{HBcAg-wt}$ 中にパッケージ化することができる

組み換えによって生成させた $\text{HBcAg-wt VLP}$ を、リンパ球性脈絡髄膜炎ウィルス(LCMV)由来の、ペプチドp33(CGG-KAVYNFATM)と結合させた後に、パッケージ化した。 $\text{HBcAg-wt}$ との結合用に、VLP(2mg/ml)を、サーモ・ミキサー中において25度1時間、25倍モル過剰のSMPH(スクシンイミジル-6-[(-マレイミド-プロピオニアミド)ヘキサノエート]、Pierce)を用いて誘導体化させた。誘導体化させたVLPを、4においてMWCO 10,000KD透析膜を使用して $2 \times 2$ 時間、Mesバッファー(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)pH 7.4に透析した。VLP(50 $\mu\text{M}$ )を、サーモ・ミキサー中の25度の2時間のインキュベーション中に、p33ペプチド(250 $\mu\text{M}$ )のN末端のシステインと次いで結合させた。サンプルを $1 \times \text{PBS}$  pH 7.4に十分に透析して(MWCO 300,000)、望ましくない遊離ペプチドを排除した。

【0324】

図22は、SMPHによる $\text{HBcAg-wt VLP}$ 誘導体化およびp33ペプチドとの結合のSDS-PAGE分析を示す。サンプルは16%SDS PAGEによって分析し、クーマシープルーで染色した。 $\text{HBcAg-wt}$ は、21KDのタンパク質バンドとして見ることができた。SMPHの分子量が小さいために、誘導体生成物はわずかに大きいだけであり、SDS-PAGEによって識別することができない。ペプチドのみは3KDのバンドとして見ることができ、 $\text{HBx33}$ と名付けた結合型生成物は、 $\text{HBcAg-wt}$ 全体の50%を超える割合を占める、約24KDの強烈な二次的バンドを示した。

【0325】

酵素によるRNA加水分解：RNase A(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Qiaagen AG、Switzerland)の存在下において、 $\text{HBx33 VLP}$ (0.5~1.0m

g / ml、1 × PBS バッファー pH 7.4)を、4倍体積の H<sub>2</sub>O で希釈して、塩濃度を最終 0.2 × PBS 濃度に低下させ、サーモ・ミキサー中において 650 rpm で、37 において 3 時間インキュベートした。

【0326】

免疫賦活性核酸のパッケージ化：RNase A による消化の後、HB × 33 VLP を、Millipore Microcon 又は Centriplus 濃縮装置を使用して濃縮し、次いで 130 nmol / ml の CpG - オリゴヌクレオチド B - CpGpt を補い、サーモ・ミキサー中で 37 において 3 時間、0.2 × PBS pH 7.4 中でインキュベートした。次に、反応混合物に DNase I (5 U / ml) による消化を 37 において 3 時間行った (DNase I, RNase free Fluka AG, Switzerland)。マウス免疫化用の VLP 調製物を、300 kDa の MWCO 透析膜 (Spectrum Medical Industries Inc.、Houston, USA) を用いて PBS pH 7.4 (200 倍体積に対して 2 倍) で 24 時間かけて十分に透析して、RNase A および過剰な CpG - オリゴヌクレオチドを排除した。図 23 は、RNase 处理によってキャップシドの核酸含量が減少し、それらの移動速度が低下したことを示す。B - CpGpt を加えることによって、核酸含量およびキャップシドの速い移動が元通りになった。DNase I は遊離オリゴヌクレオチドのみを消化し、一方パッケージ化されたオリゴヌクレオチドは、透析後も VLP 中で元の状態であった (図 23)。

【0327】

図 22 は、クーマシーブルー染色の後の、p33 と HBC VLP の結合の SDS - PAGE 分析を示す。ゲルに担持したのは以下のサンプルである：1. NEB Prestained Protein Marker, Broad Range (# 7708S)、10 μl；2. CGG - p33 ペプチド；3. HBC VLP、SMPH で誘導体化させた、透析前のもの；4. HBC VLP、SMPH で誘導体化させた、透析後のもの；5. HBC VLP、CGG - p33 と結合させたもの、上澄み；6. HBC VLP、CGG - p33 と結合させたもの、ペレット。

【0328】

図 23 は、臭化エチジウム (A) 又はクーマシーブルー (B) で染色した 1% アガロース・ゲル上における、B - CpGpt の HB × 33 VLP へのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは 50 μg の以下のサンプルである：1. HB × 33 VLP、未処理；2. HB × 33 VLP、RNase A で処理したものの；3. HB × 33 VLP、RNase A で処理し、かつ B - CpGpt をパッケージ化したものの；4. HB × 33 VLP、RNase A で処理し、B - CpGpt をパッケージ化し、かつ DNase I で処理したものの；5. HB × 33 VLP、RNase A で処理し、B - CpGpt をパッケージ化し、DNase I で処理し、かつ透析したもの；6. 1 kb の MBF Fermentas DNA ラダー。

【実施例 13】

【0329】

免疫賦活性核酸は、抗原と結合させた Q VLP 中にパッケージ化することができる p33 ペプチドと Q VLP の結合：

組み換えによって生成させた Q VLP を、N 末端 CGG 又はおよび C 末端 GGC 延長部 (CGG - KAVYNFATM および KAVYNFATM - GGC) を含む、p33 ペプチドと結合させた後に使用した。組み換えによって生成させた Q VLP を、25 で 0.5 時間、10 倍モル過剰の SMPH (Pierce) を用いて誘導体化させ、次に 20 mM の HEPES、150 mM の NaCl、pH 7.2 で 4 において透析して、未反応 SMPH を除去した。5 倍モル過剰のペプチドを加え、30% アセトニトリルの存在下で、サーモ・ミキサー中において 25 で 2 時間反応させた。図 24 は、多数の結合バンドが、Q モノマーと結合した 1 個、2 個又は 3 個のペプチドからなることを実証する、SDS - PAGE 分析を示す (矢印、図 24)。

10

20

30

40

50

## 【0330】

Q VLPは、バクテリオファージQ キャプシド・タンパク質を発現することによって大腸菌中で生成されると、RNAを含み、このRNAを消化し、VLPとRNase Aをインキュベートすることによって排除することができる。

## 【0331】

低いイオン強度および低いQ 濃度が、RNase AによるQ VLPのRNA加水分解を可能にする：

20 mMのHepes / 150 mM NaClバッファー(HBS) pH 7.4中に1.0 mg / mlの濃度のQ VLPを、RNase A(300 µg / ml、Qiagen AG、Switzerland)を加えることによって直接消化し、あるいは4倍体積のH<sub>2</sub>Oで希釈して、最終0.2 × HBS濃度にし、次いでRNase A(60 µg / ml、Qiagen AG、Switzerland)と共にインキュベートした。インキュベーションは、サーモ・ミキサー中において650 rpmで、37において3時間行った。図25は、1 × HBS中では、RNA含量の非常にわずかな減少のみが観察されたが、一方0.2 × HBS中では、大部分のRNAが加水分解されたことを実証する。これと一致して、1 × HBS中に溶かしたRNase Aを加えた後、キャプシドの移動は変化がなかったが、一方0.2 × HBS中に溶かしたRNase Aを加えた後には、移動が遅くなった(図25B、D)。

## 【0332】

低いイオン強度が、Q VLP中の核酸のパッケージ化を増加させる：

RNase Aによる消化の後、0.2 × HBS中に、Q VLPを、Millipore Microcon又はCentriplus濃縮装置を使用して1 mg / mlに濃縮し、等分試料を1 × HBS又は0.2 × HBSで透析した。Q VLPに130 nmol / mlのCpG-オリゴヌクレオチドB-CpGを補い、サーモ・ミキサー中で37において3時間インキュベートした。その後Q VLPに、ベンゾナーゼ(100 U / ml)による消化を37において3時間行った。サンプルは、臭化工チジウム又はクーマシーブルーで染色した後、1%アガロース・ゲル上で分析した。図26は、1 × HBS中では、非常に少量のオリゴヌクレオチドのみをパッケージ化することができたが、一方0.2 × HBS中では、強烈な臭化工チジウム染色バンドが検出可能であり、これがキャプシドのクーマシーブルー染色部分と同時局在していたことを示す。

## 【0333】

異なる免疫賦活性核酸を、Q VLP中にパッケージ化することができる：

RNase Aによる消化の後、0.2 × HBS中に、Q VLPを、Millipore Microcon又はCentriplus濃縮装置を使用して1 mg / mlに濃縮し、130 nmol / mlのCpG-オリゴヌクレオチドB-CpGpt、g10g acgaおよび253量体dsCpG-253(表I)を補い、サーモ・ミキサー中で37において3時間インキュベートした。その後Q VLPに、DNase Iによる消化(5 U / ml)又はベンゾナーゼ(100 U / ml)による消化を、37において3時間行った。サンプルは、臭化工チジウム又はクーマシーブルーで染色した後、1%アガロース・ゲル上で分析した。図27は、異なる核酸B-CpGpt、g10g acgaおよび253量体dsDNAを、Qb × 33中にパッケージ化することができたことを示す。パッケージ化された核酸はDNase Iによる消化に耐性があり、透析中パッケージ化されたままであった(図27)。B-CpGptのパッケージ化は、プロテイナーゼKによる消化による核酸の放出、次にアガロースの電気泳動および臭化工チジウム染色によって確認した(図27C)。

## 【0334】

図24は、クーマシーブルー染色の後の、p33とQ VLPの結合のSDS-PAGE分析を示す。担持したのは以下のサンプルである：(A) 1. N E B Prestained Protein Marker、Broad Range (# 7708S)、10 µl；2. Q VLP、14 µg；3. Q VLP、SMPHで誘導体化させ

10

20

30

40

50

た、透析後のもの；4. Q VLP、CGG-p33と結合させたもの、上澄み。(B) 1. NEB Prestained Protein Marker、Broad Range (# 7708S)、10 μl；2. Q VLP、10 μg；3. Q VLP、GGC-p33と結合させたもの、上澄み。

【0335】

図25は、臭化工チジウム(A、C)およびクーマシープルー(B、D)で染色した1%アガロース・ゲル上での、低および高イオン強度下における、RNase AによるQ VLPからのRNA加水分解の分析を示す。ゲルに担持したのは以下のサンプルである：(A、B) 1. MBI Fermentasの1kbのDNAラダー；2. Q VLP、未処理；3. Q VLP、1×HBSバッファーpH7.2に溶かしたRNase Aで処理したもの。(C、D) 1. MBI Fermentasの1kbのDNAラダー；2. Q VLP、未処理；3. Q VLP、0.2×HBSバッファーpH7.2に溶かしたRNase Aで処理したもの。

【0336】

図26は、臭化工チジウム(A)およびクーマシープルー(B)で染色した1%アガロース・ゲル上での、低および高イオン強度下における、B-CpGのQ VLPへのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは以下のサンプルである：1. Q VLP、未処理；2. Q VLP、RNase Aで処理したもの；3. Q VLP、RNase Aで処理し、0.2×HBSバッファーpH7.2に溶かしたB-CpGをパッケージ化し、かつベンゾナーゼで処理したもの；4. H B x 33 VLP、RNase Aで処理し、1×HBSバッファーpH7.2に溶かしたB-CpGをパッケージ化し、かつベンゾナーゼで処理したもの。

【0337】

図27は、臭化工チジウム(A)およびクーマシープルー(B)で染色した1%アガロース・ゲル上での、B-CpGptのQb x 33 VLPへのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは以下の50 μgのサンプルである：1. Qb x 33 VLP、未処理；2. Qb x 33 VLP、RNase Aで処理したもの；3. Qb x 33 VLP、RNase Aで処理し、かつB-CpGptをパッケージ化したもの；4. Qb x 33 VLP、RNase Aで処理し、B-CpGptをパッケージ化し、DNase Iで処理し、かつ透析したもの；5. 1kbのMBI Fermentas DNAラダー。(C)は、CYBR Goldで染色した15%TBE/尿素上における、VLPから抽出されたパッケージ化されたオリゴの量の分析を示す：ゲルに担持したのは以下のサンプルである：1. BCpGptオリゴ含有2 μg Qb x 33 VLP、プロテイナーゼKで消化した後の、RNase A処理したもの；2. 20 pmolのBCpGptコントロール；3. 10 pmolのBCpGptコントロール；4. 5 pmolのBCpGptコントロール。

【0338】

図27DおよびEは、臭化工チジウム(D)およびクーマシープルー(E)で染色した1%アガロース・ゲル上での、g10gacgaa-POのQb x 33 VLPへのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは以下の15 μgのサンプルである：1. MBI Fermentasの1kbのDNAラダー；2. Qb x 33 VLP、未処理；3. Qb x 33 VLP、RNase Aで処理したもの；4. Qb x 33 VLP、RNase Aで処理し、かつg10gacgaa-POをパッケージ化したもの；5. Qb x 33 VLP、RNase Aで処理し、g10gacgaa-POをパッケージ化し、ベンゾナーゼで処理し、かつ透析したもの。

【0339】

図27EおよびFは、臭化工チジウム(E)およびクーマシープルー(F)で染色した1%アガロース・ゲル上での、d5CycpG-253のQb x 33 VLPへのパッケージ化の分析を示す。ゲルに担持したのは以下の15 μgのサンプルである：1. MBI Fermentasの1kbのDNAラダー；2. Qb x 33 VLP、未処理；3.

Q b x 33 VLP、RNase Aで処理したもの；4. Q b x 33 VLP、RNase Aで処理し、dscyCpG-253をパッケージ化し、かつDNase Iで処理したもの；5. Q b x 33 VLP、RNase Aで処理し、dscyCpG-253をパッケージ化し、DNase Iで処理し、かつ透析したもの。

【実施例14】

【0340】

Q の分解、再構築、および免疫賦活性核酸のパッケージ化

Q VLPの分解および再構築

分解：70mgの純粋な凍結乾燥Q VLPは、以下の3つの式によって得られた平均的結果を使用する吸光光度定量法に従って、約35mgのタンパク質含量を与えた：1.  $(183 * OD^{230 nm} - 75.8 * OD^{260 nm}) * 体積 (ml) - 2. ((OD^{235 nm} - OD^{280 nm}) / 2.51) * 体積 - 3. ((OD^{228.5 nm} - OD^{234.5 nm}) * 0.37) * 体積$ 。純粋な凍結乾燥Q VLPを、7mlの6M

GuHClに溶解させ、4で一晩インキュベートした。溶液は、15分間6000rpmで浄化した(Eppendorf 5810 R、固定角ローターF34-6-38中、以下のステップすべてで使用した)。無視できるほどの沈殿物を捨て、上澄みを、200~300mlのNETバッファー(20mMのTris-HCl、pH7.8、および5mMのEDTA、および150mMのNaCl)で、3日間かけて5回透析した。あるいは上澄みを、3~4日間かけて1.5lのNETバッファーによって連続形式で透析した。生成した懸濁液を、12000rpmで20分間遠心分離にかけた。ペレットを2~3mlの8M尿素に再溶解させ、一方上澄みは、60%飽和の固体硫酸アンモニウムを用いて沈殿させた。飽和硫酸アンモニウム溶液を、尿素中に事前に再溶解させたペレットに加え60%飽和にし、その溶液を4で4日間沈殿させ、その後12000rpmで20分間遠心分離にかけた。このペレット、および最初の上澄みのペレットを再溶解させ、7M尿素、10mM DTTの合計体積3mlにした。この物質をSephadex G75カラムに充填し、2ml/hで7M尿素、10mM DTTを溶出した。2つのピーク物質を単離した。高分子量のピーク物質が、みかけの分子量が小さいピーク物質に先行した。同じ溶出バッファーの、キモトリプシンによるカラムの検量によって、第2のピーク物質のみかけの分子量が、二量体形であるQコート・タンパク質と一致することが明らかになった。この二量体物質を含む画分を集め、硫酸アンモニウムを用いて沈殿させた(2日間、4で)。ペレットを数滴の水で洗浄し、再度遠心分離にかけ、2mlの7M尿素、10mM DTTに溶解させた。次いでこの物質を、短い(1.5×27cm)Sephadose 4Bカラムで精製した。カラムから溶出した1つのピーク物質および画分を集め、体積10mlのタンパク質調製物、および280nmでの吸光度と260nmでの吸光度の0.68/0.5という比をもたらし、約450nmolのQコート・タンパク質(VLP中に180のサブユニットが存在することを考慮すると、再構築後に最大2.5nmolのVLPを与える)、および630μg/mlのタンパク質濃度(前に記載した吸光光度法を使用して計算した)を与えた。

【0341】

再構築：-メルカプトエタノールを10mlの二量体画分に加えて、最終濃度10%にし、12.3nmolのオリゴヌクレオチドを含む、(CpG)<sub>20</sub>OpAオリゴデオキシヌクレオチドの溶液300μlを加えた。再構築混合物を、10% -メルカプトエタノールを含む30mlのNETバッファーで、4で2時間最初に透析し、次いで8ml/hというNETバッファーの流速で、4で4日間かけて連続形式で透析した。次いで再構築混合物を、透析によって水で脱塩し、6回バッファー交換した(4回は100ml、2回は1リットル)。

【0342】

280nmでの吸光度と260nmでの吸光度の比は、0.167/0.24であった。タンパク質は凍結乾燥によって乾燥させた。乾燥させたタンパク質を水に再溶解させ、SW 50.1ローター22000rpm、4において17時間、Beckman L

10

20

30

40

50

8 - 80 遠心分離機中でのスクロース勾配超遠心分離によって精製した。スクロース勾配による精製は以下のように行った。以下のスクロース濃度 (w / v) の 1 m l の 5 層を遠心分離チューブに分注した: 50%、43%、36%、29% および 22%。このようにして形成した一連の層を、一晩 4 で放置した。0.5 m l のタンパク質サンプルを勾配で層状にし、前に示したように 17 時間遠心分離にかけた。勾配物を遠心分離チューブの底部から溶出し、5 m l の勾配物を約 300  $\mu$  l の 16 の画分に分けた。勾配中の画分は、SDS-PAGE (図 28) およびオクタロニー分析によって分析した。画分 6 ~ 9 は Q コート・タンパク質を含んでおり、オクタロニー分析において Q VLP に典型的な沈殿バンドを与えた。みかけの密度が低く Q タンパク質を含んでいた画分 11 ~ 15 は、オクタロニー分析においてキャップシドのバンドは与えなかった。再構築型 Q は、実験誤差内で wt Q と同じみかけの密度を有していた。スクロース勾配の画分 6 ~ 9 を集め、水で透析し、凍結乾燥させた。次いでこの物質を、電子顕微鏡写真 (EM) 分析 (図 29) およびオクタロニー分析 (図 30 A および B) 用に再溶解させた。EM 手順は以下の通りであった: タンパク質の懸濁液を、カーボン - ホルムバール被覆型グリッドに吸収させ、2% リンタングステン酸 (pH 6, 8) で染色した。グリッドは、JEM 100C (JEOL, Japan) 電子顕微鏡を用いて 80 kV の加速電圧で調べた。写真による記録 (ネガ) を Kodak 電子画像フィルム上に行い、Kodak Polymax 紙上にネガをプリントすることによって、電子顕微鏡写真を得た。両方の方法によって、再構築型 VLP は、完全な Q VLP と同じマクロ分子的性質を有することが示される。さらに、精製された再構築型 Q VLP によって示されるジスルフィド結合の型は、未処理 Q VLP によって示されるジスルフィド結合の型、ペントマーおよびヘキサマーの典型的な型と区別不能である (図 31 A)。 10 20

#### 【0343】

核酸含量の分析: 再構築型 Q VLP を、臍臓 DNase I によって以下のように消化した。( $CpG$ )<sub>20</sub>O<sub>20</sub>A オリゴデオキシヌクレオチドと再構築した Q VLP の 0.5 mg / m l 溶液 200  $\mu$  l に、DNase I (Fluka) 1 U /  $\mu$  l の溶液 20  $\mu$  l、および DNase I バッファー (20 mM の MgCl<sub>2</sub>、200 mM の Tris、pH 8.3) 22  $\mu$  l を加えた。反応混合物を 37 において 2 時間 30 分インキュベートした。サンプルの核酸含有物を、フェノール / クロロホルム抽出によってその後単離し、臭化工チジウムで染色した 2% アガロース・ゲルに担持した (図 31 B)。パッケージ化されたオリゴデオキシヌクレオチドの大きさのバンドを、ゲル上で検出した。大きな見かけの分子量で移動するバンドも見ることができた。我々は、この大きさのバンドをもたらすと思われる、( $CpG$ )<sub>20</sub>O<sub>20</sub>A オリゴデオキシヌクレオチドのマルチマーの存在を結論付けることはできない。したがってゲルによって、適切な大きさの DNase I 保護型オリゴデオキシヌクレオチドが、再構築型 Q VLP 中に存在したことが示される。なぜならオリゴデオキシヌクレオチドを、その後 DNase I によって消化することができたが、RNase A によって消化することはできなかったからである。したがってオリゴデオキシヌクレオチドは、VLP の最初の分解、核酸由来の分解したコート・タンパク質の精製、およびその後のオリゴデオキシヌクレオチドの存在下での VLP の再構築の後に、Q VLP 中に首尾よくパッケージ化されると思われる。 30 40

#### 【0344】

図 28 は、スクロース勾配遠心分離からの、画分の SDS-PAGE 分析を示す。ゲルに担持したのは以下のサンプルであった。レーン 1 ~ 10: スクロース勾配超遠心分離の画分 6 ~ 15。

#### 【0345】

図 29 は、(A) 完全な Q VLP および (B) ( $CpG$ )<sub>20</sub>O<sub>20</sub>A オリゴヌクレオチドの存在下での分解および再構築、およびその後のスクロース勾配超遠心分離による精製後の Q VLP の、EM 写真を示す。キャップシドの濃い表面層が観察され、これらのキャップシドは、完全な Q VLP と同じ構造的特徴および性質を示す。

#### 【0346】

図30は、再構築したQ VLPのオクタロニー分析（免疫拡散）を示す。図30Aでは、(CpG)<sub>20</sub>Opaオリゴヌクレオチドと再構築したQ VLPを、完全なQ VLPの隣に担持した。その2つの特徴的な沈殿バンドを、黒矢印によって示す。この2つの沈殿バンドは一致し、再構築したQ VLPは完全なQ VLPとして拡散することが示される。図30Bでは、サンプル1はリボソームRNAの存在下で再構築したQ VLPであり、一方サンプル2は、完全なQ VLPであり、サンプル3はオリゴヌクレオチド(CpG)<sub>20</sub>Opaと再構築したQ VLPである。沈殿バンドは白矢印によって示す。

## 【0347】

図31Aは、非還元SDS-PAGEによる、未処理および再構築Q VLPの分析を示す。Q VLPのペントマーおよびヘキサマーを、矢印によって示す。

## 【0348】

図31Bは、(CpG)<sub>20</sub>Opaオリゴヌクレオチドと再構築したQ VLPのDNase Iによる消化後に抽出した、ヌクレオチド含有物のアガロース・ゲルの電気泳動分析を示す。核酸含有物は未処理であったか（レーン1）、あるいはその後DNase I（レーン2）又はRNase A（レーン3）により消化したか；33μgの再構築Q VLPをそれぞれのレーンに担持した。300ngの50bpオリゴヌクレオチドをレーン4に担持し、一方10μlのGeneRuler 100bp DNAラダーおよびマーカー（MBI Fermentas）をレーン5に担持した。

## 【実施例15】

## 【0349】

異なる免疫賦活性核酸を有するQ の分解、再構築

さまざまな配列のオリゴデオキシヌクレオチドを有するQ VLPの分解および再構築

Q VLPの分解を、本質的に実施例1に記載したように行った。ただし、7M尿素ではなく8M尿素を使用して、硫酸アンモニウムのペッレトを再懸濁させた。

## 【0350】

オリゴC y Opa、C y C y C y、(CpG)20-OpaおよびC y CpGとのQ VLPの再構築を、本質的に実施例1に記載したように行った。ただし、以下のことを変えた。4で1時間の、10% - メルカプトエタノールをNETバッファー（20mMのTris-HCl、pH 7.8、および5mMのEDTAおよび150mMのNaCl）に溶かしたものでの透析ステップを、オリゴデオキシヌクレオチド溶液を透析バッグ中の二量体溶液に加える前に、手順に加えた。次いでオリゴデオキシヌクレオチドを二量体溶液に加え、前に記載したようにキャプシド（180サブユニット）に対して約10倍モル過剰のオリゴヌクレオチドを生成させた。再構築混合物を、4で1時間、10% - メルカプトエタノールを含む30mlのNETバッファーで最初に透析し、次いで8ml/hというNETバッファーの流速で、4で4日間かけて連続形式で透析した。オリゴデオキシヌクレオチドC y Opaを含むQ VLPの再構築した反応混合物のサンプルを、EM分析（図32）用に再構築反応の終期に採取した。リンタングステン酸を使用する前に記載したEM手順を使用した。次いで再構築混合物を、透析によって水で脱塩し、乾燥させた。

## 【0351】

乾燥させたタンパク質を水に再溶解させ、スクロース勾配超遠心分離によって精製した。精製した再構築型Q VLPは、EMによっても分析した（図33A～D）。電子顕微鏡写真によって、再構築型VLPは、完全なQ VLPと同じマクロ分子的性質を有することが示される。精製によって、再構築した粒子の調製物が著しくプロモフェノールブルーする。したがってQ VLPは、さまざまな長さおよび配列のオリゴデオキシヌクレオチドと首尾よく再構築した。

## 【0352】

p33ペプチドと再構築型Q VLPの結合：オリゴデオキシヌクレオチドC y Opa

10

20

30

40

50

Aと再構築したQ VLPを、1.5mg/mlの濃度で、架橋剤の最終濃度が536μMであるDMSOのストック溶液から希釈した架橋剤SMPHと、20mMのHepes pH7.4中において26で35分間反応させた。誘導体化させたQ VLPを、1000倍体積の20mM Hepes、150mM NaCl、pH7.4で2×2時間透析した。1.4mg/mlの濃度の透析した誘導体化Q VLPを、ペプチドの最終濃度が250μMであるp33GGCペプチド（配列：KAVYNFATMGGC）と、20mMのHepes、150mM NaCl、pH7.4中において15で2時間、その後反応させた。図34のゲルは、p33ペプチドとQ VLPの首尾良い結合を示す。サブユニット当たりに結合した1個、それぞれ2個のペプチドに対応する結合バンドは、図中に矢印によって示す。

10

### 【0353】

核酸含量の分析：再構築した結合型のQ VLPの核酸含量を、プロテイナーゼKによる消化、フェノール／クロロホルム抽出、および抽出したオリゴヌクレオチドをTBE／Urea PAGEゲルにその後担持することによって分析した。分析手順は以下の通りであった。25μlの再構築型のQ VLP（0.5～1mg/ml）に、0.5μlのプロテイナーゼK、1.5μlの10% SDS、および3μlの10×プロテイナーゼ・バッファー（0.5M NaCl、50mM EDTA、0.1M Tris pH7.4）を補った。37において一晩インキュベーションした後、65で20分間加熱することによってプロテイナーゼKを不活性化させ、1×フェノールおよび1×クロロホルム抽出によって、核酸含有物をサンプルから抽出させた。その後サンプルを、1μlのRNaseA（Qiagen、100μg/ml、250倍希釈）と共に、37において2時間インキュベートした。等量の2μgの出発タンパク質を、1倍体積の2×ローディング・バッファー（1mlの10×TBE、4.2gの尿素、1.2gのプロモフェノールブルー、1mlの0.1%プロモフェノールブルー、10mlまでのH<sub>2</sub>O）と共に、95で3分間加熱し、15% TBE／尿素ポリアクリルアミド・ゲル（Invitrogen）に担持した。このゲルを1.5時間180Vにし、10%酢酸／20%エタノール中に固定し、CYBR Gold（Molecular Probes、Eugene OR、USA）で染色した。定量化用に、再構築用に使用した10および20pmolのオリゴヌクレオチドを、参照としてゲルに施した。RNaseに対する核酸含有物の耐性、およびその大きさによって、パッケージ化されていた核酸が再構築用に使用したオリゴヌクレオチドであったことが証明された。パッケージ化されていたオリゴデオキシヌクレオチドの定量化は、抽出したオリゴヌクレオチドのバンド強度を、同じゲルに担持した参照量の同じオリゴヌクレオチドのバンド強度と比較することによって行った。1.75nmol CyOpA／100μg Q VLPという数字が得られ、VLP当たり平均して44個というオリゴヌクレオチドの割合であった。

20

### 【0354】

図32は、精製前のQ VLPとオリゴヌクレオチドCyOpAの再構築反応の電子顕微鏡写真を示す。倍率は200000倍であった。

### 【0355】

図33A～Dは、Q VLPとオリゴデオキシヌクレオチドCy(CpG)20(A)、CyCycy(B)、CyCpG(C)およびCyOpA(D)の、精製した再構築反応混合物の電子顕微鏡写真を示す。倍率は200000倍であった。

30

### 【0356】

図34は、オリゴデオキシヌクレオチドCyOpAと再構築したQ VLPとp33GGCペプチドの結合のSDS-PAGE分析を示す。ゲルに担持したのは以下のサンプルである：1. Prestained Protein Marker、Broad Range（#7708S）、10μl；2. Q VLP、CyOpAと再構築したものの[1.5mg/ml]10μl；3. Q VLP、CyOpAと再構築し[1.5mg/ml]、かつSMPHで誘導体化させたもの、10μl；4. Q VLP、CyOpAと再構築し[1.5mg/ml]、SMPHで誘導体化させ、かつp33-ペプチド

50

と結合させたもの、 $10\mu\text{l}$  ; 5 . Q V L P、C y O p A と再構築し [ 1 . 5 m g / m l ]、S M P H で誘導体化させ、かつ p 3 3 - ペプチドと結合させたもの、5 分の 1 体積のペレット。

【 0 3 5 7 】

図 3 5 は、C Y B R G o l d で染色した尿素ポリアクリルアミド・ゲルの電気泳動によって抽出した、パッケージ化型オリゴデオキシヌクレオチドの分析を示す。以下のサンプルをゲルに担持した： 1 . Q V L P、オリゴヌクレオチド C y O p A と再構築し、p 3 3 G G C ペプチドと結合させたもの、ゲルに担持した 2  $\mu\text{g}$  のタンパク質。 2 . Q

V L P、オリゴヌクレオチド C y O p A と再構築し、p 3 3 G G C ペプチドと結合させ、ゲルに担持する前に凍結および解凍させたもの、2  $\mu\text{g}$  のタンパク質。 3 . Q V L P、オリゴヌクレオチド C y ( C p G )<sub>20</sub> と再構築し、p 3 3 G G C ペプチドと結合させ、ゲルに担持する前に凍結および解凍させたもの； 2  $\mu\text{g}$  のタンパク質。 4 . C y O p A オリゴヌクレオチド、2 0 p m o l。 5 . C y O p A オリゴヌクレオチド、1 0 p m o l。

【 実施例 1 6 】

【 0 3 5 8 】

Q の分解、再構築およびパッケージ化

Q V L P の分解および再構築

分解： 1 0 m g の Q V L P ( B r a d f o r d 分析によって測定したもの ) を、 2 0 m M の H E P E S 、 p H 7 . 4 、 1 5 0 m M の N a C l に溶かしたものを、最終飽和度 6 0 % の固体硫酸アンモニウムを用いて沈殿させた。沈殿は 4 で一晩行い、沈殿した V L P を 4 で 6 0 分間の遠心分離によって沈殿させた ( S S - 3 4 ローター )。ペレットを、 1 0 0 m M の D T T ( 最終濃度 ) を含む 1 m l の 6 M 塩酸グアニジン ( G u H C I ) に再懸濁させ、 4 で 8 時間インキュベートした。

【 0 3 5 9 】

サイズ排除クロマトグラフィーによる Q コート・タンパク質の精製： 溶液は、 1 0 分間 1 4 0 0 0 r p m で浄化し ( E p p e n d o r f 5 4 1 7 R 、 固定角ローター F 4 5 - 3 0 - 1 1 中、以下のステップすべてで使用した ) 、 7 M 尿素、 1 0 0 m M の T r i s H C I 、 p H 8 . 0 、 1 0 m M の D T T を含むバッファー ( 2 0 0 0 m l ) で一晩透析した。透析バッファーを 1 度交換し、さらに 2 時間透析を続けた。生成した懸濁液を、 4 において 1 4 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離にかけた。無視できるほどの沈殿物を捨て、分解したコート・タンパク質および R N A を含む上澄みを、「充填用画分」として保存した。タンパク質濃度は、 B r a d f o r d 分析によって決定し、 5 m g の合計タンパク質を、 7 M 尿素、 1 0 0 m M の T r i s H C l および 1 0 m M の D T T を用いて平衡状態にした、 H i L o a d ( 商標 ) S u p e r d e X ( 商標 ) 7 5 調製用カラム ( 2 6 / 6 0 、 アマシャム バイオサイエンシズ ) に施した。サイズ排除クロマトグラフィーは、平衡化バッファー ( 7 M 尿素、 1 0 0 m M の T r i s H C l p H 8 . 0 、 1 0 m M の D T T ) を用いて 1 2 において、 0 . 5 m l / 分の流速で行った。溶出中に、 2 5 4 n m および 2 8 0 n m での吸光度を測定した。 2 つのピーク物質を単離した。高分子量のピーク物質が、みかけの分子量が小さいピーク物質に先行した。ピーク物質を 1 . 5 m l の画分で回収し、 S D S - P A G E 、 次にクーマシー染色、および S Y B R ( 登録商標 ) G o l d 染色によって、等分試料を分析した ( 図 3 6 )。

【 0 3 6 0 】

イオン交換クロマトグラフィーによる Q コート・タンパク質の精製： あるいは、浄化した上澄みを、 7 M 尿素、 2 0 m M の M E S 、 1 0 m M の D T T 、 p H 6 . 0 を含むバッファー ( 2 0 0 0 m l ) で一晩透析した。透析バッファーを 1 度交換し、さらに 2 時間透析を続けた。生成した懸濁液を、 4 において 1 4 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離にかけた。無視できるほどの沈殿物を捨て、分解したコート・タンパク質および R N A を含む上澄みを、「充填用画分」として保存した。タンパク質濃度は B r a d f o r d 分析によって決定し、合計 1 0 m g の合計タンパク質を、バッファー A ( 以下参照 ) を用いて 1 0

10

20

30

40

50

m1の最終体積に希釈し、1m1/分の流速で、7M尿素、20mMのMES、10mMのDTT、pH6.0のバッファーAを用いて平衡状態にした、1m1 HiTrap(商標)SP HPカラム(アマシャムバイオサイエンシズ、Cat. No. 17-1151-01)に施した。RNAを含んでいた流動物を、1つの画分として回収した。カラムをバッファーA(30CV)で十分に洗浄した後、結合したQコート・タンパク質を、0%~100%のバッファーBの直線勾配(勾配長は5CVであった;バッファーA:前を参照、バッファーB:7M尿素、20mMのMES、10mMのDTT、2MのNaCl、pH6.0)で溶出させた。充填、洗浄および溶出中に、254nmおよび280nmでの吸光度を測定した。1m1のピーク画分を回収し、SDS-PAGE、次にクーマシーカラム(登録商標)Gold染色によって分析した。Qコート・タンパク質を含むがRNAを含まない画分を識別し、100μlの1M TrisHCl、pH8.0を加えることによって、pHを調節した。 10

## 【0361】

Qコート・タンパク質を含むがRNAを含まないサンプルを集め、0.87M尿素、100mMのTrisHCl、10mMのDTT(2000m1)で一晩透析し、バッファーを1度交換し、さらに2時間透析を続けた。生成した懸濁液を、4において14000rpmで10分間遠心分離にかけた。無視できるほどの沈殿物を捨て、上澄みを、「分解したコート・タンパク質」として保存した。タンパク質濃度は、Bradford分析によって決定した。 20

## 【0362】

再構築: 0.5mg/m1の濃度の精製したQコート・タンパク質を、オリゴデオキシヌクレオチドの存在下においてVLPの再構築用に使用した。再構築反応用に、Q-VLPキャップシドの計算した理論上の量(180で割ったモノマー濃度)より10倍過剰な、オリゴデオキシヌクレオチドを使用した。Qコート・タンパク質を、再構築反応中に、パッケージ化するオリゴデオキシヌクレオチドと混合した後、この溶液(5m1までの体積)を、4において10% -メルカプトエタノールを含む500m1のNETバッファーで2時間最初に透析し、次いで8m1/hというNETバッファーの流速で、4で72時間かけて連続形式で透析し、最後にさらに72時間、20mMのTrisHCl pH8.0、150mMのNaClから構成されるバッファーを用いて、同じ連続形式で透析した。生成した懸濁液を、4において14000rpmで10分間遠心分離にかけた。無視できるほどの沈殿物を捨て、上澄みは、再構築しパッケージ化されたVLPを含んでいた。タンパク質濃度はBradford分析によって決定し、必要な場合は、再構築しパッケージ化されたVLPを、遠心分離濾過装置(Millipore、UFV4BCC25、5K NMWL)を用いて濃縮して、最終タンパク質濃度3mg/m1にした。 30

## 【0363】

再構築しパッケージ化されたVLPの精製: 10mgまでの合計タンパク質を、20mMのHEPES pH7.4、150mMのNaClを用いて平衡状態にした、Sephadose(商品名)CL-4Bカラム(16/70、アマシャムバイオサイエンシズ)に担持した。サイズ排除クロマトグラフィーは、平衡化バッファー(20mMのHEPES pH7.4、150mMのNaCl)を用いて室温において、0.4m1/分の流速で行った。溶出中に、254nmおよび280nmでの吸光度を測定した。2つのピーク物質を単離した。高分子量のピーク物質が、みかけの分子量が小さいピーク物質に先行した。0.5m1の画分を回収し、SDS-PAGE、次にクーマシーブルーカラム(登録商標)Gold染色によって分析した(図37)。大腸菌由来の完全な十分に精製されたQキャップシドに関する、カラムの検量によって、主要な第1のピーク物質のみかけの分子量が、Qキャップシドと一致することが明らかになった。 40

## 【0364】

オリゴデオキシヌクレオチドの存在下で再構築したQ-VLPの分析:

A) キャップシドの全体的構造: 以下のオリゴデオキシヌクレオチド(CyOpa、Cy

50

(CpG)20OpA、Cy(CpG)20、CyCyCy、(CpG)20OpA)の1つの存在下、又は大腸菌由来のtRNA(Roche Molecular Biochemicals、Cat. No. 109541)の存在下で、再構築したQ VLPを、電子顕微鏡法(酢酸ウラニルpH4.5によるネガティブ染色)によって分析し、大腸菌から精製した完全なQ VLPと比較した。ネガティブコントロールとして、核酸が除去された再構築反応混合物が働いた。再構築型キャプシドは、完全なQ VLPと同じ構造的特徴および性質を示した(図38)。

B)再構築したキャプシドの流体力学的大きさ:オリゴデオキシヌクレオチドの存在下で再構築したQ キャプシドを、動的光散乱装置(DLS)によって分析し、大腸菌から精製した完全なQ VLPと比較した。再構築したキャプシドは、完全なQ VLPと同じ流体力学的大きさ(質量および立体配座の両方に依存する)を示した。 10

C)再構築したキャプシド中のジスルフィド結合の形成:再構築したQ VLPを、純粋なポリアクリルアミド・ゲルの電気泳動によって分析し、大腸菌から精製した完全なQ VLPと比較した。再構築したキャプシドは、完全なQ VLPと同じジスルフィド結合型を示した(図39)。

D)アガロース・ゲルの電気泳動による、オリゴデオキシヌクレオチドの存在下で再構築したQ VLPの核酸含量の分析:5 μgの再構築したQ VLPを、25 μlの合計反応体積で、0.35単位のRNase A(Qiagen、Cat. No. 19101)、15単位のDNase I(Fluka、Cat. No. 31136)と共に、あるいは他の酵素は一切加えずに、37において3時間インキュベートした。大腸菌から精製した完全なQ VLPがコントロールとして働き、オリゴデオキシヌクレオチドの存在下で再構築したキャプシドに関して記載したのと同じ条件下で、これらをインキュベートした。次いで反応混合物を、最初に臭化エチジウム(図40A)、次にクーマシーブルー(図40B)で染色した0.8%アガロース・ゲルに担持した。臭化エチジウム染色によって、加えた酵素はいずれも、再構築したQ キャプシド中の核酸含有物を消化することができなかったことが示され、核酸含有物(すなわち、オリゴデオキシヌクレオチド)が保護されることが示される。この結果は、加えたオリゴデオキシヌクレオチドが、再構築反応中に新しく形成されたキャプシドにパッケージ化されたことを示す。対照的に、大腸菌から精製した完全なQ VLP中の核酸含有物は、RNase Aを加えることによって分解し、このVLP中の核酸含有物はRNAからなることが示される。さらには、アガロース・ゲルの臭化エチジウム染色およびクーマシーブルー染色によって、核酸含有Q VLP(それぞれ大腸菌から再構築および精製したもの)が、ほぼ同じ大きさで移動していることが示され、再構築反応によって、大腸菌から精製した完全なQ VLPに匹敵する大きさの、Q VLPがもたらされたことが示される。 20 30

### 【0365】

したがってゲルによって、DNase I保護型オリゴデオキシヌクレオチドが、再構築したQ VLP中に存在したことが示される。さらに、パッケージ化されたオリゴデオキシヌクレオチドを、フェノール/クロロホルムによって抽出させた後、それらはDNase Iによって消化可能であったが、RNase Aによって消化することはできなかった。したがってオリゴデオキシヌクレオチドは、VLPの最初の分解、核酸由来の分解したコート・タンパク質の精製、およびその後のオリゴデオキシヌクレオチドの存在下でのVLPの再構築の後に、Q VLP中に首尾良くパッケージ化することができた。 40

### 【0366】

E)変性ポリアクリルアミドTBE-尿素ゲルの電気泳動による、オリゴデオキシヌクレオチドの存在下で再構築したQ VLPの核酸含量の分析:40 μgの再構築したQ VLP(0.8 mg/ml)を、60 μlの合計反応体積で、0.5 mg/mlのプロテイナーゼK(PCR-grade、Roche Molecular Biochemicals、Cat. No. 1964364)、および反応バッファーと共に、製造者の指示に従って、37において3時間インキュベートした。大腸菌から精製した完全なQ VLPがコントロールとして働き、オリゴデオキシヌクレオチドの存在下で再構築 50

したキャプシドに関して記載したのと同じ条件下で、これらをプロテイナーゼKと共にインキュベートした。次いで反応混合物を、TBE-尿素のサンプル・バッファーと混合し、15%ポリアクリルアミドTBE-尿素ゲル(Novex(登録商標)、Invitrogen Cat. No. EC6885)に担持した。定性および定量標準として、1pmol、5pmolおよび10pmolの、再構築反応用に使用したオリゴデオキシヌクレオチドを、同じゲルに担持した。このゲルを10%酢酸、20%メタノールで固定し、中性pHに平衡化し、SYBR(登録商標)-Gold(Molecular Probes Cat. No. S-11494)で染色した。SYBR(登録商標)-Goldによる染色によって、再構築したQキャプシドは、再構築反応で使用したオリゴデオキシヌクレオチドと同時に移動した核酸を含んでいたことが示された(図41)。(大腸菌から精製した)完全なQVLPは、同じ大きさの核酸を含んでいなかったことに留意されたい。まとめると、オリゴデオキシヌクレオチドの存在下で再構築したQVLPの核酸含量の分析によって、オリゴデオキシヌクレオチドがDNase Iによる消化から保護されたことが示され、それらがパッケージ化され、加えたオリゴデオキシヌクレオチドが、適切な手段(たとえば、プロテイナーゼKによるQVLPの消化)によって、再び単離された可能性があることを意味している。10

#### 【0367】

図36は、サイズ排除クロマトグラフィーによる、分解されたQコート・タンパク質の精製を示す。5μlの示した画分( # )をサンプル・バッファーと混合し、16%Tris-Glycineゲル(Novex(登録商標) by Invitrogen、Cat. No. EC64952)に担持した。展開を終えた後、ゲルを最初にクーマシープルー(A)で染色し、染色が示された後、同じゲルをSYBR(登録商標)-Gold(B)で染色した。第1の高分子量ピーク物質(画分#15~#20)は、タンパク質ではなく核酸を含んでいたことに留意されたい。一方、みかけの分子量が小さい第2のピーク物質は、分解されたコート・タンパク質を含んでおり、これらはしたがって核酸から分離されたものである。20

#### 【0368】

図37は、サイズ排除クロマトグラフィーによる、再構築したQVLPの精製を示す。10μlの示した画分( # )をサンプル・バッファーと混合し、16%Tris-Glycineゲル(Novex(登録商標) by Invitrogen、Cat. No. EC64952)に担持した。展開を終えた後、ゲルをクーマシープルーで染色した。還元条件のために、ジスルフィド結合が還元され、再構築したVLPのタンパク質性モノマーは、14kDaのコート・タンパク質として見ることができた。30

#### 【0369】

図38は、異なるオリゴデオキシヌクレオチドの存在下において再構築した、QVLPの電子顕微鏡写真を示す。VLPは示したオリゴデオキシヌクレオチドの存在下、又はtRNAの存在下で再構築したが、サイズ排除クロマトグラフィーによって均質な懸濁液に精製したわけではなかった。ポジティブコントロールとして、大腸菌から精製した「完全な」QVLPの調製物が働いた。重要なことに、任意の示した核酸を再構築反応中に加えることによって、「ポジティブ」コントロールと比較すると、大きさおよび立体配座が適切であるVLPを形成することができた。これによって、再構築プロセスは一般に、使用するオリゴデオキシヌクレオチドのヌクレオチド配列および長さとは無関係であることが示される。核酸を再構築反応中に加えることは、QVLPを形成するために必要であることに留意されたい。なぜなら、再構築反応から核酸が除去された場合、粒子が形成されなかったからである。40

#### 【0370】

図39は、再構築および精製したQキャプシド中の、ジスルフィド結合型の分析を示す。5μlの示したキャプシドを、還元剤を含むかあるいは含まないサンプル・バッファーと混合し、16%Tris-Glycineゲルに担持した。展開を終えた後、ゲルをクーマシープルーで染色した。大腸菌から精製した「完全な」キャプシドと比較すると、50

再構築した Q V L P は同じジスルフィド結合型を示した。

【0371】

図40は、ヌクレアーゼ処理およびアガロース・ゲルの電気泳動による、再構築した Q V L P の核酸含量の分析を示す：5  $\mu$ g の再構築および精製した Q V L P 、および 5  $\mu$ g の大腸菌から精製した Q V L P をそれぞれ、示したように処理した。この処理の後、サンプルをローディング染料と混合し、0.8%アガロース・ゲルに担持した。作業の後、ゲルを最初に臭化エチジウム (A) で染色し、染色が示された後、同じゲルをクーマシーブルー (B) で染色した。再構築および精製した Q V L P の核酸含有物は、RNase A による消化に対して耐性があったが、一方大腸菌から精製した Q V L P の核酸含有物は、RNase A と共にインキュベートすると消化されたことに留意されたい。これによって、再構築した Q キャプシドの核酸含有物はデオキシヌクレオチドからなっていることが示され、このデオキシヌクレオチドは当然ながら、RNase A による消化から保護されている。したがって、オリゴデオキシヌクレオチドは、再構築反応中に Q V L P 中にパッケージ化された。

【0372】

図41は、プロテアーゼK処理およびポリアクリルアミドTBE / 尿素ゲルの電気泳動による、再構築した Q V L P の核酸含量の分析を示す：プロテアーゼK処理によって消化した等量の 1  $\mu$ g の Q V L P を、TBE - 尿素のサンプル・バッファーと混合し、15%ポリアクリルアミドTBE - 尿素ゲル (Novex (登録商標)、Invitrogen Cat. No. EC6885) に担持した。定性および定量標準として、1 pmol、5 pmol および 10 pmol の、再構築反応用に使用したオリゴデオキシヌクレオチドを、同じゲルに担持した。展開を終えた後、ゲルを固定し、中性 pH に平衡化し、SYBR (登録商標) - Gold (Molecular Probes Cat. No. S-11494) で染色した。(大腸菌から精製した) 完全な Q V L P は、再構築した Q キャプシドから抽出された V L P と、同じ大きさの核酸を含んでいなかったことに留意されたい。さらに、再構築した V L P から単離した核酸は、再構築反応で使用したオリゴデオキシヌクレオチドと同時に移動した。この結果によって、使用したオリゴデオキシヌクレオチドが、再構築した Q キャプシド中にパッケージ化されたことが確認された。

【実施例17】

【0373】

AP205の分解 - 精製 - 再構築、および免疫賦活性核酸のパッケージ化

A. オリゴヌクレオチドを加えずに再構築することができる物質由来の、AP205 V L P の分解および再構築

分解：40 mg の凍結乾燥させ精製した AP205 V L P を、4 ml の 6M GuHCl に再溶解させ、4 で一晩インキュベートした。分解混合物を、8000 rpm で遠心分離にかけた (Eppendorf 5810 R、固定角ローター F34-6-38 中、以下のステップすべてで使用した)。ペレットを 7M 尿素に再溶解させ、一方上澄みは、NETバッファー (20 mMのTris-HCl、pH 7.8、および 5 mM の EDTA、および 150 mM の NaCl) で 3 日間かけて透析し、バッファーは 3 回交換した。あるいは透析を、4 日間かけて連続形式で行った。透析した溶液を 8000 rpm で 20 分間遠心分離にかけ、ペレットを 7M 尿素に再溶解させ、一方上澄みは、硫酸アンモニウム (60% 飽和) によってペレット状にし、10 mM の DTT を含む 7M 尿素バッファーに再溶解させた。7M 尿素に再溶解させた前のペレットすべてを一緒にし、硫酸アンモニウム (60% 飽和) を用いて沈殿させ、10 mM の DTT を含む 7M 尿素バッファーに再溶解させた。10 mM の DTT を含む 7M 尿素バッファーに再溶解させた物質を一緒にし、平衡化させた Sephadex G75 カラムに充填し、2 ml/h で 10 mM の DTT を含む 7M 尿素バッファーで溶出した。1 ピークの物質がカラムから溶出した。3 ml の画分を回収した。AP205 コート・タンパク質を含むピーカ画分を集め、硫酸アンモニウム (60% 飽和) を用いて沈殿させた。8000 rpm で 20 分間の遠心分離によ

つて、ペレットを単離した。それを7M尿素、10mM DTTに再溶解させ、短いSephadose 4Bカラム(1.5×27cm、Sephadose 4B、2ml/h、7M尿素、10mM DTT、溶出バッファーとして)に充填した。ショルダー値が小さい、主に1ピークの物質が、カラムから溶出した。AP205コート・タンパク質を含む画分を、SDS-PAGEによって識別し、ショルダー値のものを除き集めた。これによって10.3mlのサンプルを生成させた。タンパク質濃度は、測定用に25倍希釈したタンパク質の等分試料を測定することにより、分光測定法によって測定した。以下の式:(1.55×OD280-0.76×OD260)×体積を使用した。平均濃度は、VLP(2.6mg/ml)1nmol/mlであった。280nmでの吸光度と260nmでの吸光度の比は、0.12/0.105であった。

10

## 【0374】

再構築: 1.1mlの-メルカプトエタノールをサンプルに加え、以下の再構築反応物を設定した:

1. 1mlのAP205コート・タンパク質、核酸含まず
2. 1mlのAP205コート・タンパク質、rRNA(約200 OD260単位、10nmol)
3. 9mlのAP205コート・タンパク質、CycPG(225pmol/ulの溶液370ul、すなわち83nmol)

## 【0375】

これらの混合物を、10% -メルカプトエタノールを含む30mlのNETバッファーで1時間透析した。核酸を含まない混合物は別に透析した。その後透析を連続形式で続け、1リットルのNETバッファーを3日間にわたって交換した。反応混合物は、水でその後十分に透析し(バッファー5回交換)、凍結乾燥させた。これらを水に再溶解させ、EMによって分析した。臭化工チジウム染色を使用したアガロース・ゲル電気泳動によって測定したように、混合物はすべて、キャプシドを含んでおり、AP205 VLPの再構築は検出可能な核酸の存在と無関係であることが示される。CycPGと再構築したAP205のEM分析は、図42Bに示す。EM手順は以下の通りであった:タンパク質の懸濁液を、カーボン-ホルムバール被覆型グリッドに吸収させ、2%リンタンゲステン酸(pH6,8)で染色した。グリッドは、JEM 100C(JEOL、Japan)電子顕微鏡を用いて80kVの加速電圧で調べた。写真による記録(ネガティブ)をKodak電子画像フィルム上に行い、Kodak Polymax紙上にネガをプリントすることによって、電子顕微鏡写真を得た。CycPGの存在下で再構築したVLPを、Sephadose 4Bカラム(1×50cm)で精製し、NETバッファーで溶出させた(1ml/h)。画分をオクタロニー分析によって分析し、VLPを含む画分を集めた。これによって8mlのサンプルを生成させ、このサンプルを透析により水で脱塩し、乾燥させた。キャプシドの収量は10mgであった。臭化工チジウムで染色した0.6%アガロース・ゲル中の、再溶解物質を分析することによって、キャプシドが核酸を含んでいなかつたことが示された。再構築ステップ後およびさらなる透析前に採取した、CycPGを含む再構築反応混合物のサンプルを、0.6%アガロース・ゲル上で分析し、これらを図43AおよびBに示す。完全なAP205 VLPと同じ高さで移動し、かつ臭化工チジウムおよびクーマシーブルー染色用に染色されたバンドを得ることができ、オリゴデオキシヌクレオチドを含むAP205 VLPが再構築したことが示された。再構築手順の後のさらなる透析ステップによって、VLPの外側へのオリゴデオキシヌクレオチドの拡散がもたらされた可能性がある。重要なことに、臭化工チジウム染色を使用したアガロース・ゲル電気泳動によって測定したように、AP205 VLPは、検出可能なオリゴデオキシヌクレオチドの不在下でも再構築することができた。したがってオリゴデオキシヌクレオチドは、VLPの最初の分解、核酸由来の分解したコート・タンパク質の精製、およびその後のオリゴデオキシヌクレオチドの存在下でのVLPの再構築の後に、AP205 VLPと首尾良く結合することができた。

20

## 【0376】

30

40

50

図42は、分解ステップ用に使用した完全な組み換えA P 2 0 5 V L P (A)、又は分解し、その後C y C p Gの存在下において再構築したA P 2 0 5 V L P (B)の、電子顕微鏡写真を示す。

【0377】

図43は、C y C p Gの存在下において再構築し、透析前の再構築ステップ後に直接採取したA P 2 0 5 V L Pサンプルの、アガロース・ゲルの電気泳動分析を示す図である。図43Aのゲルは、臭化エチジウムで染色した。C y C p Gと再構築したA P 2 0 5 V L Pをレーン1に担持し、一方未処理の純粋なA P 2 0 5 V L Pはレーン2に担持した。矢印は、再構築したA P 2 0 5 V L Pのバンドを示す。図43Bのゲルは、クーマシーブリリアントブルーで染色した。未処理A P 2 0 5 V L Pをレーン1に担持し、一方C y C p Gと再構築したA P 2 0 5 V L Pはレーン2に担持した。 10

【0378】

B. 添加オリゴヌクレオチドの不在下では再構築することができない分解した物質を使用する、A P 2 0 5 V L Pの再構築

分解：100mgの精製し、乾燥した組み換えA P 2 0 5 V L P (C y t o sの特許)を、前に記載したように分解用に使用した。すべてのステップは、本質的にA項の分解で記載したのと同様に行った。ただし、8M尿素を使用して、硫酸アンモニウム沈殿ステップのペレットを可溶化させ、再構築前のC L - 4 Bカラムを使用するゲル濾過ステップは省略した。S e p h a d e x G - 7 5カラムの集めた画分は、A項に記載した式を使用する分光測定法により測定して、21mgのタンパク質を含んでいた。サンプルの280nmでの吸光度と260nmでの吸光度の比は、0.16～0.125であった。このサンプルは、測定用に50倍希釈した。 20

【0379】

再構築：S e p h a d e x G - 7 5によるゲル濾過精製ステップから生じたタンパク質調製物を、60%飽和の硫酸アンモニウムによって沈殿させ、生成したペレットを、2mlの7M尿素、10mMのDTTに可溶化させた。10%2-メルカプトエタノールをN E Tバッファーに溶かしたもの8mlで、サンプルを希釈し、10%2-メルカプトエタノールをN E Tバッファーに溶かしたもの40mlで1時間透析した。透析バッグ中で、0.4mlのC y C p G溶液(109nmol/ml)をタンパク質サンプルに加えることによって、再構築を開始させた。連続形式の透析を設定し、N E Tバッファーを溶出バッファーとして使用した。透析は2日間続け、この透析ステップの終了後に、サンプルをEM分析用に採取した(図44B)。透析した再構築溶液を、その後N E Tバッファーに溶かした50%v/vグリセロールで透析し、濃度を得た。1回のバッファーの交換を、透析の1日後に行った。透析は合計3日間続けた。 30

【0380】

透析および濃縮した再構築溶液を、N E Tバッファー中において、流速1ml/時間でのS e p h a r o s e 4 - Bカラム(1×60cm)によるゲル濾過によって精製した。画分をオクタロニー分析において試験し、キャプシドを含む画分を乾燥させ、水に再懸濁させ、20mMのH e p e s p H 7.6中で平衡化させた4 - Bカラムにおいて、再びクロマトグラフィーにかけた。それぞれの以下の3つの式を使用した： 40

$$1. (183 * O D^{230} n m - 75.8 * O D^{260} n m) * 体積 (ml) - 2. ((O D^{235} n m - O D^{280} n m) / 2.51) * 体積 - 3. ((O D^{228.5} n m - O D^{234.5} n m) * 0.37) * 体積$$

再構築したV L Pの6～26mgのタンパク質量を測定した。

【0381】

再構築したA P 2 0 5 V L Pは、非還元条件下において、前に記載したのと同様のEM、アガロース・ゲル電気泳動およびS D S - P A G Eによって分析した。

【0382】

分解した物質のEM分析によって、A P 2 0 5 V L Pを塩酸グアニジンで処理することにより、V L Pのキャプシド集合体が本質的に破壊されることが示される。この分解し 50

た物質とオリゴヌクレオチドの再構築によってキャプシドが生じ(図44B)、これを精製し、ゲル滿過によってさらにプロモフェノールブルーさせた(図44C)。2つの大きさの粒子を得た;直径約25nmの粒子、および小さな粒子は、図44Cの電子顕微鏡写真において見ることができる。オリゴヌクレオチドの不在下では、再構築体は得られなかつた。アガロース・ゲル電気泳動で、再構築した粒子を担持することによって、再構築した粒子が核酸を含んでいたことが示された。フェノール抽出による核酸含有物の抽出、およびその後臭化工チジウムで染色したアガロース・ゲルに担持することによって、これらの粒子が、再構築用に使用したオリゴヌクレオチドを含んでいたことが明らかになった(図45A)。パッケージ化されるオリゴヌクレオチドの同一性は、このオリゴヌクレオチドのサンプルを粒子から抽出した核酸物質の傍らにに担持することによって調節した。再構築したAP205 VLPを担持し、前に臭化工チジウムで染色したアガロース・ゲルを、次にクーマシープルーで染色し、オリゴヌクレオチド含有物と粒子のタンパク質含有物が同時に移動したことが明らかになり(図45B)、オリゴヌクレオチドが粒子にパッケージ化されたことが示された。

## 【0383】

再構築したAP205 VLPをSDS-PAGEゲルに担持し、還元剤の不在下で作業することにより(図46)、再構築した粒子が、未処理AP205 VLPの場合と同様に、ジスルフィド結合を形成したことが示された。さらに、そのジスルフィド結合型は、未処理粒子と同一である。

## 【0384】

図44Aに示すのは、分解したAP205 VLPタンパク質の電子顕微鏡写真であり、一方図44Bは、精製前に再構築した粒子を示す。図3Cは、精製した再構築AP205 VLPの電子顕微鏡写真を示す。図3A~Cの倍率は、200000倍である。

## 【0385】

図45AおよびBは、アガロース・ゲル電気泳動によって分析した、再構築したAP205 VLPを示す。両方の図のゲルに担持したサンプルは、左から右に:未処理AP205 VLP、Cyclaseと再構築し精製された異なる量のAP205 VLPを含む3個のサンプル、および未処理Q VLPであった。図45Aのゲルは臭化工チジウムで染色し、一方図45Bでは、同じゲルをクーマシープルーで染色した。

## 【0386】

図46は、非還元条件下で担持した再構築AP205 VLPの、SDS-PAGE分析を示す。5つのサンプルをゲルに担持した。ゲルに担持したサンプルは、左から右に:タンパク質マーカー、未処理wt Q、再構築wt Q、未処理AP205 VLP、再構築AP205 VLPである。AP205 VLPサブユニットの分子量は14.0kDaであり、一方Qサブユニットの分子量は14.3kDaである(いずれの分子量も、N末端メチオニンで計算した)。ジスルフィド結合したマルチマーは、図面において矢印でそれぞれ示す。

## 【0387】

C.p33エピトープ(配列:H2N-KAVYNFATMGGC-COOH、遊離NおよびC末端を有する)と、Cyclaseと再構築したAP205 VLPの結合

B項に記載したように、20mMのHepes、150mMのNaCl、pH7.4中で得た再構築AP205 VLPを、1.4mg/mlの濃度で、DMSOに溶かした50mMストックから希釈した5倍過剰な架橋剤SMPHと、15において30分間反応させた。得られたいわゆる誘導体化AP205 VLPを、少なくとも1000倍体積の20mMのHepes、150mMのNaCl、pH7.4バッファーで、2×2時間透析した。誘導体化AP205は、1mg/mlの濃度で、DMSOに溶かした20mMストックから希釈した2.5倍又は5倍過剰なペプチドと、15において2時間反応させた。サンプルはその後、保存用に液体窒素中で急速凍結させた。

## 【0388】

結合反応の結果は、図6に示す。結合反応において、2.5倍過剰なペプチドよりも5

10

20

30

40

50

倍過剰なペプチドを使用することによって、より高度な結合を得ることができた。

【0389】

図47に示すのは、結合反応のSDS-PAGE分析である。以下のサンプルを(左から右に)ゲルに担持した:タンパク質マーカー;誘導体化AP205VL P(d);2.5倍過剰なペプチド、上澄み(s)と結合させたAP205VL P;2.5倍過剰なペプチド、ペレット(p)と結合させたAP205VL P;5倍過剰なペプチド、上澄み(s)と結合させたAP205VL P;5倍過剰なペプチド、ペレット(p)と結合させたAP205VL P。

【実施例18】

【0390】

VL P中にパッケージ化された免疫賦活性核酸ではなく、遊離免疫賦活性核酸が巨脾症を誘導する

マウスを未処理のままにしたか、あるいは100μgのHBc33単独、20nmolのC y C p G p t、20nmolのC y C p G p tと混合した100μgのHBc33、又はC y C p G p tがパッケージ化された100μgのHBc33を皮下に免疫化した。21日後、脾臓を単離し、脾臓重量および脾臓の細胞性を評価した。C y C p G p tは、単独で与えると、脾臓重量および細胞数の大幅な増大を誘導した(図48)。HBc33にパッケージ化されたC y C p G p tに関しては、このような効果は見たれなかったが、この組成物はウイルスの感染に対する保護を誘導することができた(実施例4を参照のこと)。

【実施例19】

【0391】

インビボでのウイルス保護アッセイ

ワクシニア保護アッセイ

3匹のメスのC57B1/6マウスの群に、p33と結合又は融合させた100μgのVL Pのみ、これを20nmolの免疫賦活性核酸と混合したもの、あるいは免疫賦活性核酸をパッケージ化したものを皮下に免疫化した。末梢組織の抗ウイルス免疫性を評価するために、7~9日後に、マウスの腹膜内に、LCMV-糖タンパク質(p33ペプチド含む)を発現する、 $1.5 \times 10^6$ pfuの組み換えワクシニア・ウイルスを感染させた。5日後、卵巣を回収し、ウイルス力価を決定した。したがって卵巣は、5%ウシ胎児血清を含み、グルタミン、Earl'sの塩および抗生物質(ペニシリン/ストレプトマイシン/アンホテリシン)を補った最小必須培地(Gibco)中において、ホモジナイザーで粉碎した。BSC40細胞の10倍希釈ステップにおいて、懸濁液を滴定した。37度一晩のインキュベーションの後、ウイルスのブラークを見るために、50%エタノール、2%クリスタルバイオレット、および150mMのNaClからなる溶液で、接着細胞層を染色した。免疫化をしていない未処置マウスを、コントロールとして使用した。

【0392】

LCMV保護アッセイ

3匹のメスのC57B1/6マウスの群に、p33と結合又は融合させた100μgのVL Pのみ、あるいはこれをアジュバント/20nmolのC p Gオリゴヌクレオチドと混合したものを皮下に免疫化した。全身の抗ウイルス免疫性を評価するために、11~13日後に、マウスの腹膜内に、200pfuのLCMV-WEを感染させた。4日後、脾臓を単離し、ウイルス力価を決定した。脾臓は、2%ウシ胎児血清を含み、グルタミン、Earl'sの塩および抗生物質(ペニシリン/ストレプトマイシン/アンホテリシン)を補った最小必須培地(Gibco)中において、ホモジナイザーで粉碎した。MC57細胞の10倍希釈ステップにおいて、懸濁液を滴定した。1時間のインキュベーションの後、5%ウシ胎児血清、1%メチルセルロース、および抗生物質(ペニシリン/ストレプトマイシン/アンホテリシン)を含むD MEMで、細胞を覆った。37度2日間のインキュベーションの後、細胞内染色手順(これによってウイルスの核タンパク質を染色する)により、LCMV感染に関して細胞を評価した。細胞を4%ホルムアルデヒドで30分間

10

20

30

40

50

固定し、次に20分間の溶解ステップを1% Triton X-100を用いて行った。10%ウシ胎児血清と共に、1時間のインキュベーションすることによって、非特異的な結合が阻害された。ラット抗LCMV抗体(VL-4)で1時間、細胞を染色した。ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ラットIgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc)を、二次抗体として使用し、次に標準的な手順に従って、ODP基質を用いた呈色反応を行った。

【実施例20】

【0393】

抗原と融合したVL P中にパッケージ化された異なる免疫賦活性核酸は、強力な抗原特異的CTL応答およびウィルス保護をもたらす

H B c A gとペプチドp33(H B c 3 3)の融合タンパク質を、実施例1に記載したように生成させ、実施例11に記載したように異なるC p G核酸をパッケージ化した。

【0394】

100 μgのワクチンをマウスに注射し、組み換えワクシニア感染の後の卵巣中のワクシニア力価を、実施例19に記載したように検出した。二本鎖C y C p G p t (d s C y C p G p t)は、0.5 mMのDNAオリゴヌクレオチドC y C p G p tとC y C p G-r e v - p t(表I)を、15 mMのTris pH 7.5中で、80 °で10分間の加熱ステップおよびその後の室温への冷却によって、アニールさせることにより生成させた。オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを、20% TBEポリアクリルアミド・ゲル(Novex)上で調べた。

【0395】

C y C p G、N K C p G、B - C p Gおよびg 1 0 g a c g a - P Sを含むH B c 3 3キャプシドは、ウィルス感染を完全に阻害することができる、CTL応答を誘導した(図49、図50)。リン酸ジエステル又はホスホロチオエート結合(p t又はP S)を含む核酸に関して、保護を観察した。二本鎖オリゴヌクレオチドd s C y C p G p tも、ワクシニア感染に対する保護を誘導していた(図49)。

【実施例21】

【0396】

H B c A gおよびQ VL P中にパッケージ化された免疫賦活性核酸は、強力な抗原特異的CTL応答およびウィルス保護をもたらす

H B c A gとペプチドp33(H B c 3 3)の融合タンパク質を、実施例1に記載したように生成させ、実施例11に記載したようにオリゴヌクレオチドB C p G p tをパッケージ化した。ペプチドp33をRNAファージQと結合させ、オリゴヌクレオチドB - C p G p tを実施例13に記載したようにパッケージ化した。それぞれ100 μg、30 μg、10 μg、又は3 μgのワクチンをマウスに注射し、組み換えワクシニア感染の後の卵巣中のワクシニア力価を、実施例19に記載したように検出した。B - C p Gをパッケージ化した100 μgおよび30 μgのH B c 3 3およびQ b x 3 3は、ウィルス感染に対する完全な保護を誘導したが、一方低濃度では、部分的な保護が観察されたか、あるいは保護は観察されなかった(図51)。

【実施例22】

【0397】

自己抗原と結合したVL P中にパッケージ化された免疫賦活性核酸は、自己抗原に対する寛容性を克服することができる

脾臓島細胞中でLCMV糖タンパク質を発現する、トランスジェニック・マウス(Ohasi他、Cell 65、305~317(1991))を、200 p f uのLCMV、20 nmolのC y C p G p tと混合した100 μgのH B c 3 3、又はC y C p G p tがパッケージ化された100 μgのH B c 3 3、あるいはコントロールとして20 nmolのC y C p G p tと混合した100 μgのp 3 3ペプチドで免疫化した。血中グルコースのレベルを、Glucotrend Plus Glucose試験用キット( ROCHE)を用いて4日毎に測定した。血中グルコースのレベルが12 mMを超えたマウ

10

20

30

40

50

スは、糖尿病であるとみなした。L C M V による免疫化によって、第12日には4匹中4匹の動物で糖尿病が誘導された。H B c 3 3 と混合したC y C p G p t は、3匹のマウス中1匹のマウスで糖尿病を引き起こしただけだった。C y C p G p t がパッケージ化されたH B c 3 3 で免疫化した、3匹のマウス中2匹は、第12日に糖尿病が進行し、第3のマウスは第16日に糖尿病が進行する。C y C p G p t と混合したペプチドp 3 3 による免疫化によって、3匹のマウスで糖尿病が誘導されることはない。これによって、抗原と融合したV L P 中にパッケージ化された免疫賦活性核酸は、強いC T L 応答を誘導する際には、核酸と抗原の混合物より、はるかに効果的であることが明らかに示される。これらは、V L P と融合した抗原、および免疫賦活性核酸と混合した抗原より、強い応答も誘導した。

10

## 【実施例23】

## 【0398】

抗原と結合したV L P 中にパッケージ化された免疫賦活性核酸は、抗原特異的C D 8<sup>+</sup> T細胞を誘導する際には、免疫賦活性核酸と混合したV L P より、はるかに効果的である。C 5 7 B L / 6 マウスに、100 μg のH B c 3 3 のみ、これをC y C p G p t と混合したもの、あるいはC y C p G p t をパッケージ化したもの皮下に免疫化した。未処理のマウスをコントロールとした。

## 【0399】

免疫化の8日後に、p 3 3 特異的C D 8<sup>+</sup> T細胞を検出するために、P E 標識p 3 3 テトラマーおよびF I T C - 結合モノクローナル抗C D 8 抗体を用いて血中リンパ球を二重染色し、C D 8<sup>+</sup> T細胞群全体に対するp 3 3 特異的細胞の割合を、F A C S 分析によって決定した。

20

## 【0400】

表II . C p G s と混合したあるいはこれをパッケージ化したp 3 3 - V L P によるワクチン接種後の、p 3 3 特異的C D 8<sup>+</sup> T細胞の誘導。数字は、頻度の平均値（パーセント）および標準偏差に対応する。

## 【0401】

C y C p G p t をパッケージ化したH B c 3 3 は、C y C p G p t と混合したH B c 3 3 より、p 3 3 特異的C D 8<sup>+</sup> T細胞の高い頻度を誘導した（表II）。パッケージ化したオリゴヌクレオチドの量は、混合設定で使用したオリゴヌクレオチドの量よりはるかに少ないので（約1/20）、これによって、免疫賦活性核酸がパッケージ化されたV L P は、多数の抗原特異的C D 8<sup>+</sup> T細胞を誘導する際には一層効果的であることが明らかに示される。

30

## 【実施例24】

## 【0402】

V L P 中にパッケージ化された免疫賦活性核酸は、C T L 応答を誘導する際には、免疫賦活性核酸と混合したV L P より、はるかに効果的である。

C 5 7 B L / 6 マウスの群に、100 μg の所与のp 3 3 - V L P のみ、これを20 n m o l のC y C p G p t と混合したもの、あるいはC y C p G p t をパッケージ化したもの皮下を初回抗原刺激した。主なエキソビオでの細胞障害性を検出するために、エフェクター細胞の懸濁液を、初回抗原刺激後の第9日にワクチン接種したマウスの脾臓から調製した。E L - 4 細胞をp 3 3 ペプチドで標識し（10<sup>-6</sup> M、2時間37℃、2% F C S M E M 培地中）、5時間の<sup>5</sup> C r 放出アッセイにおいて使用した。

40

## 【0403】

免疫処置	p 3 3 特異的 CD 8 <sup>+</sup> T 細胞の 頻度	群当たりのマウス
未処理	0.2	2
HBc33	0.3±0.1	4
HBc33+CyCpGpt (混合型)	2.1±0.9	5
HBc33/CyCpGpt (パッケージ型)	4.3±1.1	5
		10

## 【0404】

図52は、100 μgの所与のp33-VLPのみ(A)、これを20nmolのCyCpGptと混合したもの(B)、あるいはCyCpGptをパッケージ化したもの(C)で皮下を初回抗原刺激したC57BL/6マウスの群の、主なエキソビポでの細胞障害性を示す。9日後、脾臓細胞を、示したエフェクターと標的細胞の比での、p33標識した(黒丸記号)又は非標識(白丸記号)EL-4標的細胞の5時間の<sup>51</sup>Cr放出アッセイで、直接的なエキソビポでのCTL活性に関して試験した。細胞培養物の懸濁液の放射活性を、Cobra II Counter (Canberra Packard、Dowlers Groove、IL) 中で測定した。自発的な放出は常に10%未満であった。マウス当たりのエフェクター細胞の、2つの希釈系を行った。(A)では、一群当たり2匹のマウスを使用し、一方(B)および(C)では、一群当たり4匹のマウスからのデータを示す。

## 【0405】

図52によって、100 μgのHBc33のみでは主なインビポでのCTL応答は誘導されず、一方20nmolのCyCpGptと混合した同じ量のHBc33が有意な細胞障害性を誘導したことが明らかに示される。しかしながら、パッケージ化したオリゴヌクレオチドの量は、混合設定で使用したオリゴヌクレオチドの量よりはるかに少なかったが(約1/20)、CyCpGptをパッケージ化した100 μgのHBc33を免疫化に使用すると、細胞障害性が高まった(図52)。

## 【実施例25】

## 【0406】

VLPのRNA含有物の非酵素的加水分解、および免疫賦活性核酸のパッケージ化

VLPの核酸含有物のZnSO<sub>4</sub>依存性の分解

5mgのQ-VLP(Bradford分析により測定)を、20mMのHEPES、pH7.4、150mMのNaClに溶かしたものを、2000mlの50mM TrisHCl、pH8.0、50mM NaCl、5%グリセロール、10mM MgCl<sub>2</sub>、又は2000mlの4mM HEPES、pH7.4、30mM NaClで、4において2時間、SnakeSkin(商標)ひだ付き透析チューブ(Pierce、Cat. No. 68035)中で透析した。それぞれの透析バッファーを1回交換し、透析は4においてさらに16時間続けた。透析した溶液は、10分間14000rpm(Eppendorf 5417R、固定角ローターF45-30-11中、以下のステップすべてで使用した)で浄化し、タンパク質濃度をBradford分析によって再び測定した。50mM TrisHCl、pH8.0、50mM NaCl、5%グリセロール、10mM MgCl<sub>2</sub>に溶かしたQ-VLPを、対応するバッファーで希釈して最終タンパク質濃度1mg/mlにし、一方4mM HEPES、pH7.4、30mM NaClに溶かしたQ-VLPは、対応するバッファーで希釈して最終タンパク質濃度0.5mg/mlにした。このキャプシド含有溶液を、4において14000rpmで10分間再度遠心分離にかけた。次いで上澄みを、ZnSO<sub>4</sub>と共にインキュベートし、ZnSO<sub>4</sub>は、Eppendorf Thermomixer comfort中において

20

30

40

50

550 rpmで、60度24時間、最終濃度2.5 mMまで加えた。24時間後、溶液を10分間14000 rpmで浄化し、沈殿物を捨てた。核酸のZnSO<sub>4</sub>依存性の分解の有効性を、アガロース・ゲルの電気泳動によって確認した(図53)。上澄みは、5000 mlの4 mM HEPES、pH 7.4、30 mM NaClで、4において2時間透析した。5000 mlのバッファーを1回交換し、透析は4において一晩続けた。透析した溶液は、4において10分間14000 rpmで浄化し、無視できるほどの沈殿物を捨て、上澄みのタンパク質濃度をBradford分析によって決定した。

#### 【0407】

塩化銅/フェナントロリン/過酸化水素処理したキャプシドに関して、同様の結果を得た。当業者には、他の非酵素的なRNAの加水分解手順は知られている。

10

#### 【0408】

オリゴデオキシヌクレオチドのZnSO<sub>4</sub>処理したVLPへのパッケージ化:

(Bradford分析によって決定した)タンパク質濃度が0.4 mg/mlと0.9 mg/mlの間である(これは、それぞれ159 nMおよび357.5 nMというキャプシド濃度に対応する)、ZnSO<sub>4</sub>処理および透析したQキャプシドを、オリゴデオキシヌクレオチドのパッケージ化用に使用した。オリゴデオキシヌクレオチドは、300倍モル過剰でQ-VLPキャプシドに加え、Eppendorf Thermomixer comfort中において550 rpmで、37度3時間インキュベートした。3時間後、反応混合物を4において10分間14000 rpmで遠心分離にかけた。上澄みを、MWCO 300000(Spectrum, Cat. No. 135526)を有するSpectra/Por(登録商標)CE Dispodialyzer中において、5000 mlの20 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaClで、4において8時間透析した。5000 mlのバッファーを1回交換し、透析は4において一晩続けた。透析したサンプルのタンパク質濃度は、Bradford分析によって決定した。Qキャプシドおよびそれらの核酸含有量は、実施例11および13に記載したように分析した。

20

#### 【0409】

図53は、アガロース・ゲルの電気泳動による、ZnSO<sub>4</sub>処理したQ-VLPの分析を示す:大腸菌から精製し、バッファー1(50 mM Tris HCl、pH 8.0、50 mM NaCl、5%グリセロール、10 mM MgCl<sub>2</sub>)、又はバッファー2(4 mM HEPES、pH 7.4、30 mM NaCl)で透析したQ-VLPを、2.5 mMの硫酸亜鉛(ZnSO<sub>4</sub>)の有無の下で、60度において24時間インキュベートした。この処理後、等量の示したサンプル(5 μgのタンパク質)をローディング染料と混合し、0.8%アガロース・ゲルに担持した。作業終了後、ゲルを臭化工チジウムで染色した。VLPをZnSO<sub>4</sub>で処理することによって、核酸含有物の分解が起こり、一方非処理のコントロールには変化がなかったことに留意されたい。

30

#### 【0410】

図54は、オリゴデオキシヌクレオチドのZnSO<sub>4</sub>処理したVLPへのパッケージ化、およびアガロース・ゲルの電気泳動によるそれらの分析を示す。2.5 mMの硫酸亜鉛で処理した(ZnSO<sub>4</sub>を加えた)Q-VLPを、4 mM HEPES、pH 7.4、30 mM NaClで透析し、37度において3時間、過剰のオリゴデオキシヌクレオチドと共にインキュベートした(この透析によって、ZnSO<sub>4</sub>の濃度が約10<sup>6</sup>に低下したので、これは括弧内でのみ示す)。オリゴデオキシヌクレオチドの存在下での、このインキュベーションの後、等量の示したサンプル(5 μgのタンパク質)をローディング染料と混合し、0.8%アガロース・ゲルに担持した。作業終了後、ゲルを臭化工チジウムで染色した。オリゴデオキシヌクレオチドをZnSO<sub>4</sub>処理したQ-VLPに加えることによって、大腸菌から精製した未処理Qキャプシドと比較して、このように処理したキャプシドの電気泳動における挙動を元通りにすることに留意されたい。

40

#### 【0411】

図55は、ベンゾナーゼおよびプロテイナーゼKによる消化、およびポリアクリルアミ

50

ド T B E / 尿素ゲルの電気泳動による、ZnSO<sub>4</sub> およびオリゴデオキシヌクレオチド処理した Q V L P の核酸含有量の分析を示す：オリゴデオキシヌクレオチドを、前に記載したように、ZnSO<sub>4</sub> 処理した Q V L P 中にパッケージ化した。25 μg のこれらの V L P を、製造者の指示に従って、25 μl のベンゾナーゼ (Merck, Cat. No. 1.01694.0001) で消化した。ヌクレアーゼを熱により失活させた後 (80 で 30 分)、V L P を、製造者の指示に従って、プロテイナーゼ K (最終酵素濃度は 0.5 mg / ml であった) で処理した。3 時間後、ベンゾナーゼおよびプロテイナーゼ K によって消化した、等量の 2 μg の Q V L P を、T B E - 尿素のサンプル・バッファーと混合し、15% ポリアクリルアミド T B E / 尿素ゲル (Novex (登録商標) 、In Vitrogen Cat. No. EC6885) に担持した。レーン 2 に担持したキャプシドを、バッファー 1 (前を参照) の存在下において 2.5 mM の ZnSO<sub>4</sub> で処理し、一方レーン 3 に担持したキャプシドは、バッファー 2 (前を参照) の存在下において 2.5 mM の ZnSO<sub>4</sub> で処理した。定性および定量標準として、1 pmol、5 pmol および 10 pmol の、再構築反応用に使用したオリゴデオキシヌクレオチドを、同じゲルに担持した (レーン 4 ~ 6)。コントロールとして、大腸菌から精製した Q キャプシドを全く同様に処理し、同じポリアクリルアミド T B E / 尿素ゲル上で分析した (レーン 1)。展開を終えた後、ゲルを固定し、中性 pH に平衡化し、SYBR - Gold (Molecular Probes Cat. No. S-11494) で染色した。(大腸菌から精製した) 完全な Q V L P は、ZnSO<sub>4</sub> およびオリゴデオキシヌクレオチド処理した Q キャプシドから抽出された V L P と、同じ大きさの核酸を含んでいなかったことに留意されたい。さらに、後者の V L P から単離した核酸は、再構築反応で使用したオリゴデオキシヌクレオチドと同時に移動した。この結果によって、使用したオリゴデオキシヌクレオチドが、ZnSO<sub>4</sub> 処理した Q キャプシド中にパッケージ化されたことが確認された。

#### 【実施例 26】

##### 【0412】

免疫賦活性核酸を含む V L P は、ウィルス・ベクター : L C M V によって追加抗原刺激することができる、T 細胞の応答を誘導する

マウスを、免疫賦活性核酸を含む 20 μg の p33 - V L P で皮下を初回抗原刺激した。免疫化の前に、p33 - V L P の調製物を、透析によって非結合 CpG - オリゴヌクレオチドから十分に精製した (実施例 2 および図 5 を参照のこと)。12 日後、血液を採取し、p33 特異的 T 細胞の頻度をテトラマー染色によって決定した。マウスを、200 pfu の生きた L C M V 菌株 W E で追加抗原刺激し、特異的 T 細胞の頻度を 5 日後に決定した。追加抗原刺激前の頻度は 3.5% + / - 1.8% であり、追加抗原刺激後は 15.5% + / - 1.9% であった。

#### 【実施例 27】

##### 【0413】

免疫賦活性核酸を含む V L P は、ウィルス・ベクター : 組み換えワクシニア・ウィルスによって追加抗原刺激することができる、T 細胞の応答を誘導する

マウスを、免疫賦活性核酸を含む 20 μg の p33 - V L P で皮下を初回抗原刺激する。免疫化の前に、p33 - V L P の調製物を、透析によって非結合 CpG - オリゴヌクレオチドから十分に精製する (実施例 2 および図 5 を参照のこと)。12 日後、血液を採取し、p33 特異的 T 細胞の頻度をテトラマー染色によって決定する。マウスを、L C M V - GP を発現する組み換えワクシニア・ウィルス 10<sup>6</sup> pfu で追加抗原刺激し、特異的 T 細胞の頻度を 5 日後に決定する。

#### 【実施例 28】

##### 【0414】

免疫賦活性核酸を含む V L P は、ウィルス・ベクター : 組み換えカネリー痘瘡ウィルスによって追加抗原刺激することができる、T 細胞の応答を誘導する

マウスを、免疫賦活性核酸を含む 20 μg の p33 - V L P で皮下を初回抗原刺激する

10

20

30

40

50

。免疫化の前に、p 33 - VLPの調製物を、透析によって非結合 CpG - オリゴヌクレオチドから十分に精製する（実施例2および図5を参照のこと）。12日後、血液を採取し、p 33特異的T細胞の頻度をテトラマー染色によって決定する。マウスを、LCMV - GPを発現する組み換えカネリー痘瘡ウイルス10<sup>7</sup>pfuで追加抗原刺激し、特異的T細胞の頻度を5日後に決定する。

【実施例29】

【0415】

免疫賦活性核酸を含むVLPは、T細胞の応答を追加抗原刺激することができる

マウスを、腹膜内にLCMV - GPを発現する組み換えワクシニア・ウィルスを感染させる。20日後、血液を採取し、p 33特異的T細胞の頻度をテトラマー染色によって決定する。マウスは同じ日に、免疫賦活性核酸を含むp 33 - VLPの調製物（実施例2および図5を参照のこと）で追加抗原刺激し、特異的T細胞の頻度を5日後に決定する。

【実施例30】

【0416】

免疫賦活リボ核酸のVLPへのパッケージ化

免疫賦活リボ核酸として、リン酸ジエステル又はホスホロチオエート骨格を有するポリイノシン酸およびポリシチジル酸の、ポリ(I : C) (Sigma)又は合成二本鎖30merなどを、水に溶かす。あるいは、ポリデオキシイノシン酸およびポリデオキシイノシン酸を使用して、二本鎖ポリ(I : C)類似体を調製する。HBc33 VLPおよびQ VLPを、実施例11、13又は25に記載したようにRNaseで処理し、0.2×HBS中に1、10および100nmol/mlで核酸を加え、サーモ・ミキサー中において37℃で3時間インキュベートする。過剰な核酸は、実施例11、13および25に記載したように、酵素による加水分解又は透析によって除去し、分析する。

【0417】

あるいは、免疫賦活リボ核酸およびそれらの類似体を、実施例14、15、16に記載したように、Qコート・タンパク質の再構築中にパッケージ化する。再構築は、-メルカプトエタノールを10mlの二量体画分に最終濃度10%まで加えることによって行い、キャプシド濃度より1、10および100モル過剰をもたらす、300μlの核酸溶液を加える。再構築混合物は、10% -メルカプトエタノールを含む30mlのNETバッファーで、4℃において2時間かけて最初に透析し、次いで8ml/hというNETバッファーの流速で、4℃で4日間かけて連続方式で透析する。次いで再構築混合物を、透析により水で脱塩し、6回バッファーを交換する（4回は100ml、2回は1リットル）。次いで再構築したQ VLPを、実施例14に記載したようにスクロース勾配遠心分離によって、あるいは実施例16に記載したようにゲル濃過によって単離する。

【図面の簡単な説明】

【0418】

【図1】CpGオリゴヌクレオチドのDNA配列(A)、およびB型肝炎コア由来のペプチドp 33含有VLPのDNA配列(B)を示す。九量体p 33エピトープを、位置185で3個のロイシン連結配列を介して、B型肝炎コア・タンパク質のC末端と遺伝子工学により融合させる。

【図2】電子顕微鏡法(A)およびSDS-PAGE(B)によって評価した、p 33 - VLPの構造を示す。組み換えによって生成させた野生型VLP(HBcAg[aaa 1 - 185]モノマーから構成される)およびp 33 - VLPを、精製するためにSephacryl S-400ゲル濃過カラム(アマシャム フアルマシア バイオテクノロジ - AG)に担持した。集めた画分を、ヒドロキシアバタイト・カラムに担持した。流動物(精製したHBcキャプシドを含む)を回収し、モノマー分子量を分析するために還元SDS-PAGEゲルに担持した(B)。

【図3】コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化後の、純粋なアガロース・ゲルの電気泳動(1%アガロース)におけるp 33 - VLPを示す。臭化ケイ素( A)又はクーマシーブルー( B)で染色して、RNA又はタンパク質の存

10

20

30

40

50

在を評価した。組み換えによって生成させたp33-VLPを、PBSバッファー中0.5 μg/μlタンパク質の最終濃度に希釈し、RNase A(100ug/ml)(Sigma、Division of Fluka AG、Switzerland)の不在下(レーン1)又は存在下(レーン2)において、37で2時間インキュベートした。その後これらのサンプルに、6倍濃縮したDNAローディング・バッファー(MBS Fermentas GmbH、Heidelberg、Germany)を補い、1%の純粋なアガロース・ゲル中に100ボルトで30分間展開した。Gene Rulerマーク(MBS Fermentas GmbH、Heidelberg、Germany)を、p33-VLPの移動速度に関する参照として使用した(レーンM)。矢印は、p33-VLPにパッケージ化されたRNA(A)又はp33-VLPキャプシド自体(B)の存在を示している。3個の独立した実験において、同一の結果を得た。

【図4】バッファーのみ又はCpG含有DNAオリゴマーの存在下での、コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化後の、純粋なアガロース・ゲルの電気泳動(1%アガロース)におけるp33-VLPを示す。臭化工チジウム(A)又はクーマシーブルー(B)で染色して、RNA/DNA又はタンパク質の存在を評価した。組み換えp33-VLPを、PBSバッファー中0.5 μg/μlタンパク質の最終濃度に希釈し、RNase A(100ug/ml)(Sigma、Division of Fluka AG、Switzerland)の不在下(レーン1)又は存在下(レーン2および3)において、37で2時間インキュベートした。5nmolのCpG-オリゴヌクレオチド(骨格のホスホロチオエート修飾体を含む)を、RNase Aによる消化の前にサンプル3に加えた。Gene Rulerマーク(MBS Fermentas GmbH、Heidelberg、Germany)を、p33-VLPの移動速度に関する参照として使用した(レーンM)。矢印は、p33-VLP中のRNA又はCpG-オリゴヌクレオチド(A)又はp33-VLPキャプシド自体(B)の存在を示している。リン酸ジエステル結合を有するCpGオリゴヌクレオチドを、VLPとRNase Aの同時インキュベーション用に使用すると、同一の結果を得た。

【図5】CpG含有DNAオリゴマーの存在下でのRNase Aによる消化、およびその後の透析(VLP非結合CpG-DNAを排除するため)前後の、純粋なアガロース・ゲルの電気泳動(1%アガロース)におけるp33-VLPを示す。臭化工チジウム(A)又はクーマシーブルー(B)で染色して、DNA又はタンパク質の存在を評価した。組み換えp33-VLPを、PBSバッファー中0.5 μg/μlタンパク質の最終濃度に希釈し、RNase A(100ug/ml)(Sigma、Division of Fluka AG、Switzerland)の不在下(レーン1)又は存在下(レーン2~5)において、37で2時間インキュベートした。50nmolのCpG-オリゴヌクレオチド(リン酸骨格のホスホロチオエート修飾体を含む:レーン2および3、リン酸ジエステル結合を含む:レーン4および5)を、RNase Aによる消化の前にVLPに加えた。処理したサンプルを、300kDaのMWCO透析膜(Spectrum Medical Industries Inc.、Houston、USA)を用いてPBS(4500倍希釈)で24時間かけて十分に透析して、過剰なDNAを排除した(レーン3および5)。Gene Rulerマーク(MBS Fermentas GmbH、Heidelberg、Germany)を、p33-VLPの移動速度に関する参照として使用した(レーンM)。矢印は、p33-VLP中のRNA又はCpG-オリゴヌクレオチド(A)又はp33-VLPキャプシド自体(B)の存在を示している。

【図6】コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化後の、純粋なアガロース・ゲルの電気泳動(1%アガロース)におけるp33-VLPを示す。CpG含有オリゴヌクレオチドは、RNA消化が終了した後でのみ加え、臭化工チジウム(A)又はクーマシーブルー(B)で染色して、RNA/DNA又はタンパク質の存在を評価した。組み換えp33-VLPを、PBSバッファー中0.5 μg/μlタンパク質の最終濃度に希釈し、RNase A(100ug/ml)(Sigma、Division of Fluka AG、Switzerland)の不在下(レーン1)又は存在

下(レーン2および3)において、37で2時間インキュベートした。5nmolのCpG-オリゴヌクレオチド(リン酸骨格のホスホチオエート修飾体を含む)を、RNase Aによる消化の後でのみサンプル3に加えた。Gene Rulerマーカー(MB S Fermentas GmbH、Heidelberg、Germany)を、p33-VLPの移動速度に関する参考として使用した(レーンM)。矢印は、p33-VLP中のRNA又はCpG-オリゴヌクレオチド(A)又はp33-VLPキャプシド自体(B)の存在を示している。リン酸ジエステル結合を有するCpGオリゴヌクレオチドを、VLPを再構築するために使用すると、同一の結果を得た。

【図7】CpG-オリゴヌクレオチド(リン酸骨格のホスホチオエート修飾体を含む)をパッケージ化したp33-VLPは、ウィルス保護の誘導において有効であることを示す。マウスは、100μgのp33-VLP単独で、これを20nmolのCpG-オリゴヌクレオチドと混合したもの(p33-VLP+CpG)で、あるいはCpGを含まないオリゴヌクレオチドを透析した後にCpG-オリゴヌクレオチドをパッケージ化したp33-VLP(p33-VLP/CpG)で、皮下を初回抗原刺激した。未処理の未処置マウスを、ネガティブコントロールとした。Bachmann, M. F.、「Evaluation of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T cell responses」in Immunology Methods Manual, Lefkowitz, I., ed., Academic Press Ltd., New York, NY(1997) p. 1921中に記載されたように、21日後、マウスをLCMVで感染させ(200pfu、静脈内)、脾臓中のウィルス力値を5日後に評価した。

【図8】CpG-オリゴヌクレオチド(リン酸ジエステル結合を含む)をパッケージ化したp33-VLPは、ウィルス保護の誘導において有効であることを示す。マウスは、100μgのp33-VLP単独で、これを20nmolのCpG-オリゴヌクレオチドと混合したもの(p33-VLP+CpG)で、あるいはCpGを含まないオリゴヌクレオチドを透析した後にCpG-オリゴヌクレオチドをパッケージ化したp33-VLP(p33-VLP/CpG)で、皮下を初回抗原刺激した。未処理の未処置マウスを、ネガティブコントロールとした。Bachmann, M. F.、「Evaluation of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T cell responses」in Immunology Methods Manual, Lefkowitz, I., ed., Academic Press Ltd., New York, NY(1997) p. 1921中に記載されたように、21日後、マウスをLCMVで感染させ(200pfu、静脈内)、脾臓中のウィルス力値を5日後に評価した。

【図9】CpG-オリゴヌクレオチドのみで治療したマウスは、ウィルス感染から保護されないことを示す。マウスは20nmolのCpG-オリゴヌクレオチドで皮下を初回抗原刺激したか(CpG)、あるいはネガティブコントロールとして未処理のままにした(未処置)。Bachmann, M. F.、「Evaluation of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T cell responses」in Immunology Methods Manual, Lefkowitz, I., ed., Academic Press Ltd., New York, NY(1997) p. 1921中に記載されたように、21日後、マウスをLCMVで感染させ(200pfu、静脈内)、脾臓中のウィルス力値を5日後に評価した。

【図10】BKV(AS)VP1タンパク質(GI:332779)のアミノ酸配列を示す。この配列が酵母菌で発現して、BKVキャプシドが生成された(Sasnauskas K.他、J. Biol. Chem. 380(3):381(1999); K.他、Generation of recombinant virus-like particles of different polyomaviruses in yeast. 3rd International Workshop 「Virus-1」

10

20

30

40

50

key particles as vaccines」Berlin, (2001)。

【図11】BKV VLPのパッケージ化および安定化用に使用した、246bpの二本鎖DNA断片のDNA配列を示す。

【図12】コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化、およびその後の蛍光ホスホチオエート(pt)CpG-オリゴヌクレオチドとのインキュベーション後の、純粋な0.8%アガロース・ゲルの電気泳動におけるBKV VLP(15μg)を示す。UV励起によって、臭化エチジウム染色ゲル中のDNAの検出(A)、および臭化エチジウムの不在下でのCpG-FAMオリゴマーの蛍光がもたらされる(B)。レーン1:未処理のBKV VLP; レーン2:RNase Aで処理したBKV VLP; レーン3:RNase AおよびCpG(pt)-FAMで処理したBKV VLP; レーン4:RNase AおよびCpG(pt)-FAMおよびDNase I処理剤で処理したBKV VLP; レーンM:Gene Ruler, 1kbのDNAラダー(MBI Fermentas GmbH, Heidelberg, Germany)。矢印は、BKV VLP中のRNA又はCpG-FAMオリゴマーの存在を示している。

【図13】コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化、および臭化エチジウム(A)又はクーマシープルー(B)で染色した二本鎖(ds)DNA(246bp)との、その後のインキュベーション後の、純粋な0.8%アガロース・ゲルの電気泳動におけるBKV VLP(15μg)を示す。レーン1:未処理のBKV VLP; レーン2:RNase Aで処理したBKV VLP; レーン3:RNase Aで処理し、ds DNAとインキュベートしたBKV VLP; レーンM:Gene Ruler, 1kbのDNAラダー(MBI Fermentas GmbH, Heidelberg, Germany)。矢印は、BKV VLP中のRNA又はds DNAの存在を示している。

【図14】コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化、および臭化エチジウム(A)又はクーマシープルー(B)で染色したCpG-オリゴヌクレオチド(リン酸骨格を有するか、あるいはホスホチオエート(pt)骨格を有する)との、その後のインキュベーション後の、純粋な0.8%アガロース・ゲルの電気泳動におけるBKV VLP(15μg)を示す。レーン1:BKV VLPストック(PBS/50%グリセロール); レーン2:未処理(PBSバッファー)のBKV VLP; レーン3:RNase Aで処理したBKV VLP; レーン4:透析後にRNase Aで処理したBKV VLP; レーン5:RNase AおよびCpG-オリゴヌクレオチドで処理したBKV VLP; レーン6:RNase AおよびCpG(pt)-オリゴマーで処理したBKV VLP; レーン7:透析後にRNase AおよびCpG(pt)-オリゴマーで処理したBKV VLP; レーンM:Gene Ruler, 1kbのDNAラダー(MBI Fermentas GmbH, Heidelberg, Germany)。矢印は、BKV VLP中のRNA又はCpG-オリゴヌクレオチドの存在を示している。

【図15】BKV VLPおよびホスホチオエート(pt)CpG-オリゴヌクレオチドによる免疫化14日後の、BKV VLPに対するマウスIgG1およびIgG2aのOD50%での抗体力値を示す。レーン1:RNaseで処理したBKV VLP; レーン2:0.3nmolのCpG(pt)-オリゴマーと組み合わせてRNaseで処理したBKV VLP; レーン3:20nmolのCpG(pt)-オリゴマーと組み合わせてRNaseで処理したBKV VLP; レーン4:0.3nmolのCpG(pt)-オリゴマーを含むRNaseで処理したBKV VLP。

【図16】コントロールのインキュベーション後、又はRNase Aによる消化後の、純粋なアガロース・ゲルの電気泳動(1%アガロース)におけるp33-VLPを示す。線状二本鎖DNA(350塩基対の長さ)は、RNA消化が終了した後でのみ加え、臭化エチジウム(A)又はクーマシープルー(B)で染色して、RNA/DNA又はタンパク質の存在を評価した。組み換えp33-VLPを、PBSバッファー中0.5μg/μlタンパク質の最終濃度に希釈し、RNase A(100ug/ml)(Sigma, D

10

20

30

40

50

ivision of Fluka AG, Switzerland) の不在下 (レーン 1) 又は存在下 (レーン 2、3 および 4) において、37 で 2 時間インキュベートした。350 bp の長さの線状二本鎖 DNA を、RNase A による消化の後でのみサンプル 3 および 4 に加えて、100 ng / ml の最終濃度にし、37 で 3 時間インキュベートした。サンプル 4 は、37 においてさらに 3 時間、DNase I (50 IU / ml) (Sigma, Division of Fluka AG, Switzerland) を用いてさらに消化した。Gene Ruler マーカー (MBS Fermentas GmbH, Heidelberg, Germany) を、p33 - VLP の移動速度に関する参照として使用した (レーン M)。矢印は、p33 - VLP 中の遊離又は封入 RNA / dsDNA (A) および p33 - VLP (B) の存在を示している。

10

【図 17】B - CpG の HBc33 VLP へのパッケージ化を示す。

【図 18】NKCpG の HBc33 VLP へのパッケージ化を示す。

【図 19】g10gacgaa - PO の HBc33 VLP へのパッケージ化を示す。

【図 20】CycpG - 150 の HBc33 VLP へのパッケージ化を示す。

【図 21】NKCpGpt の HBcP1A VLP へのパッケージ化を示す。

【図 22】p33 と HBcAg VLP の連結を示す。

【図 23】B - CpGpt の HBx33 VLP へのパッケージ化を示す。

【図 24】p33 と Q VLP の連結を示す。

【図 25】イオン強度および低いタンパク質濃度が、Q VLP 中での RNase A による RNA 加水分解を可能にすることを示す。

20

【図 26】イオン強度によって、免疫賦活性核酸の Q VLP へのパッケージ化が増大することを示す。

【図 27】B - CpGpt, g10gacgaa - PO および dsCycpG の、Qbx33 VLP へのパッケージ化を示す。

【図 28】免疫賦活性核酸の存在下における Q VLP 分解および再構築の後の、スクロース勾配遠心分離からの画分の SDS - PAGE 分析を示す。

【図 29】オリゴヌクレオチド (CpG)<sub>20</sub>OpA の存在下における分解および再構築の後の、Q VLP の電子顕微鏡写真を示す。

【図 30】分解および再構築した Q VLP のオクタロニー分析 (免疫拡散) を示す。

【図 31】分解および再構築した Q VLP のゲルの電気泳動分析を示す。

30

【図 32】オリゴヌクレオチド CycOpA を有する分解および再構築した Q VLP の、電子顕微鏡写真を示す。

【図 33】異なる免疫賦活性核酸を有する、精製した分解および再構築した Q VLP の電子顕微鏡写真を示す。

【図 34】オリゴデオキシヌクレオチド CycOpA と再構築した Q VLP と p33 GGC ペプチドの連結の、SDS - PAGE 分析を示す。

【図 35】Q VLP の分解および再構築、およびその後の p33 GGC ペプチドとの連結の後に、パッケージ化されたオリゴデオキシヌクレオチドを示す。

【図 36】サイズ排除クロマトグラフィーによる、分解された Q コート・タンパク質の精製を示す。

40

【図 37】サイズ排除クロマトグラフィーによる、再構築した Q VLP の精製を示す。

【図 38】異なるオリゴデオキシヌクレオチドの存在下において、再構築した Q VLP の電子顕微鏡写真を示す。

【図 39】再構築および精製した Q キャプシド中の、ジスルフィド結合型の分析を示す。

【図 40】ヌクレアーゼ処理およびアガロース・ゲルの電気泳動による、再構築した Q VLP の核酸含量の分析を示す。

【図 41】プロテアーゼ K 処理およびポリアクリルアミド TBE / 尿素ゲルの電気泳動による、再構築した Q VLP の核酸含量の分析を示す。

50

【図42】AP205 VLPが分解し、その後CpGの存在下において再構築した、電子顕微鏡写真を示す。

【図43】AP205 VLPが分解し、CycloGの存在下において再構築した、アガロース・ゲルの電気泳動分析を示す。

【図44】分解および再構築したAP205の、電子顕微鏡写真を示す。

【図45】AP205 VLPが分解し、CycloGの存在下において再構築した、アガロース・ゲルの電気泳動分析を示す。

【図4.6】分解および再構築したAP205の、SDS-PAGE分析を示す。

【図47】分解および再構築したAP205へのペプチド結合の、SDS-PAGE分析を示す。

【図48】VLP中にパッケージ化された免疫賦活性核酸ではなく、遊離免疫賦活性核酸が巨脾症を誘導することを示す。

【図49】抗原と融合しVLP中にパッケージ化された異なる免疫賦活性核酸が、強力な抗原特異的CTL応答およびウイルス保護をもたらすことを示す。

【図50】抗原と融合したVLP中にパッケージ化された免疫賦活性核酸g10gacg a-PSが、強力な抗原特異的CTL応答およびウィルス保護をもたらすことを示す。

【図5.1】HBcAgおよびQ-VLP中にパッケージ化された免疫賦活性核酸が、強力な抗原特異的CTL応答およびウィルス保護をもたらすことを示す。

【図5.2】VLP中にパッケージ化された免疫賦活性核酸が、免疫賦活性核酸と混合した

VLPよりも、CTL応答を誘導する際により一層有効であることを示す。

【図53】Q VLP中のRNAの、非酵素的RNA加水分解の分析を示す。  
【図54】非酵素的RNA加水分解の後の、オリゴデオキシヌクレオチドのQ VLP

【図55】非酵素的RNA加水分解の後の、オリゴデオキシヌクレオチドのQ VLP

へのパッケージ化の分析を示す。

【圖2】

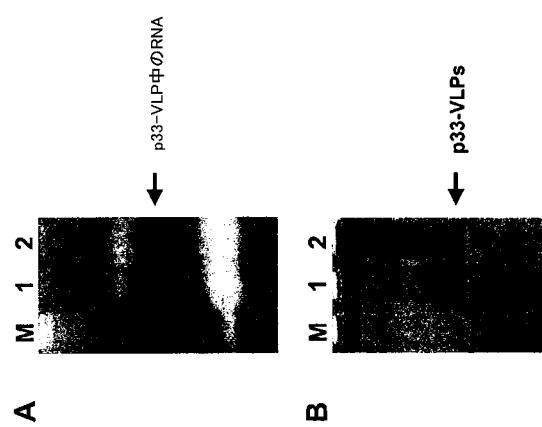
4

5' TCCATGACCGTTCTGAAT 3'

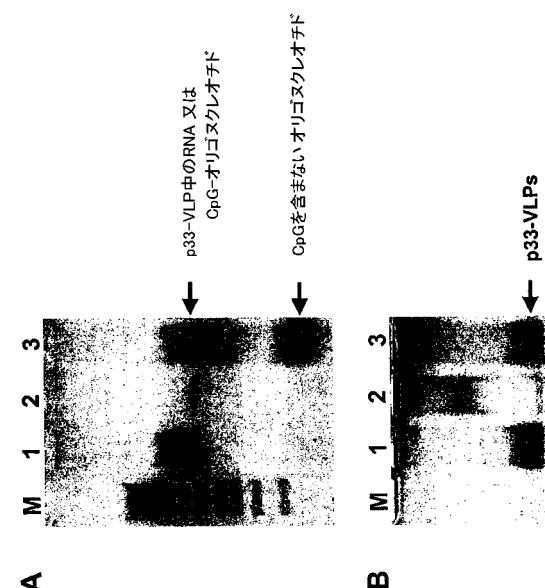
三

10

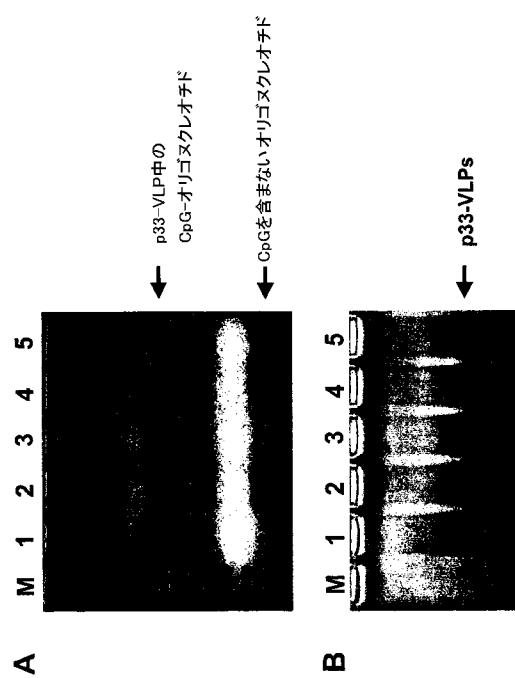
【図3】



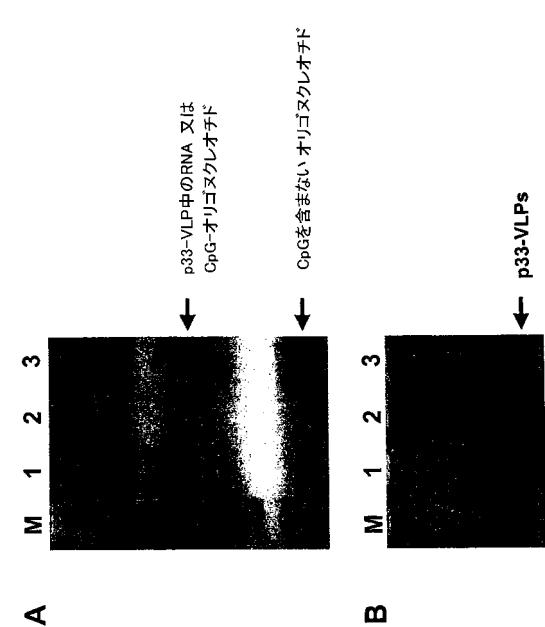
【図4】



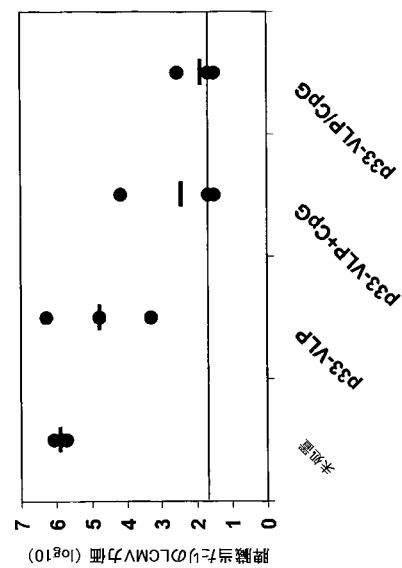
【図5】



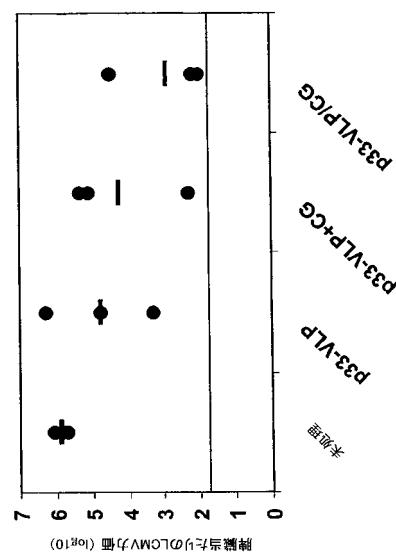
【図6】



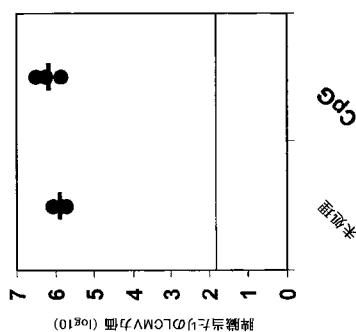
【図7】



【図8】



【 図 9 】



【 図 1 0 】

## BKV AS VP1 タンパク質(GI:332779)のアミノ酸配列

MAPTKRKGECPGAAPKPKPEPVQPKLILKGGTVELEVKTGVDAIT  
EVECFNLNPEMGDPDDNLRLGYSQHLSAENAFFESDSDRKMLPCYSTA  
RILPPLNLDLTCGNLLMWEAVTVKTEVIGITSMINLHAGSQKVHE  
NGGGKPVQGSNFHFAVGGDPLEMQGVLMLNTRKXPPQGTITPKAPT  
AQSQVMNTDHKAYLDKNNAPYVIECWIPDPSSRNENTRYFGTYTGGEN  
VVPFPVLHVTNTATTVILDEQGVGPCKADSILYVAADICGLFTNSSG  
TQQWQRGLARYFKIRLRKRSVANPYPISFLSLINRRTQVUDGQPM  
YGMESQVEEVRFVFDGETQLPGDPDMIRYDRCGQLQTKMV

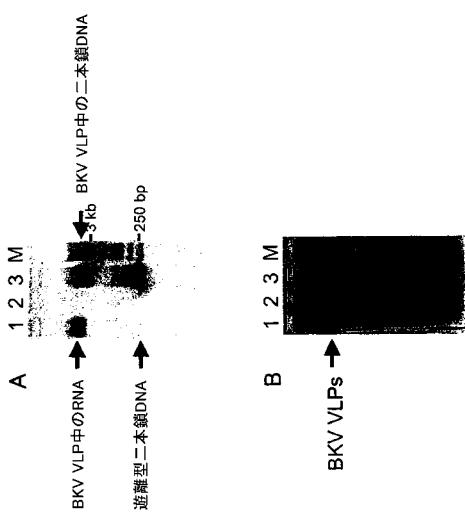
【図 1 1】



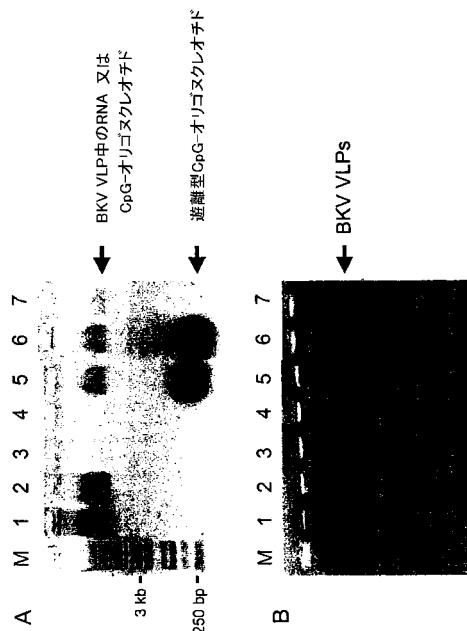
【図 1 2】



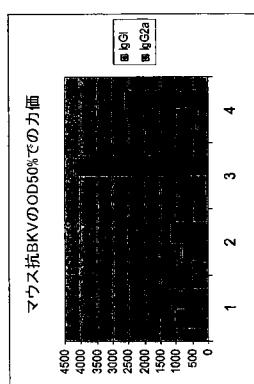
【図 1 3】



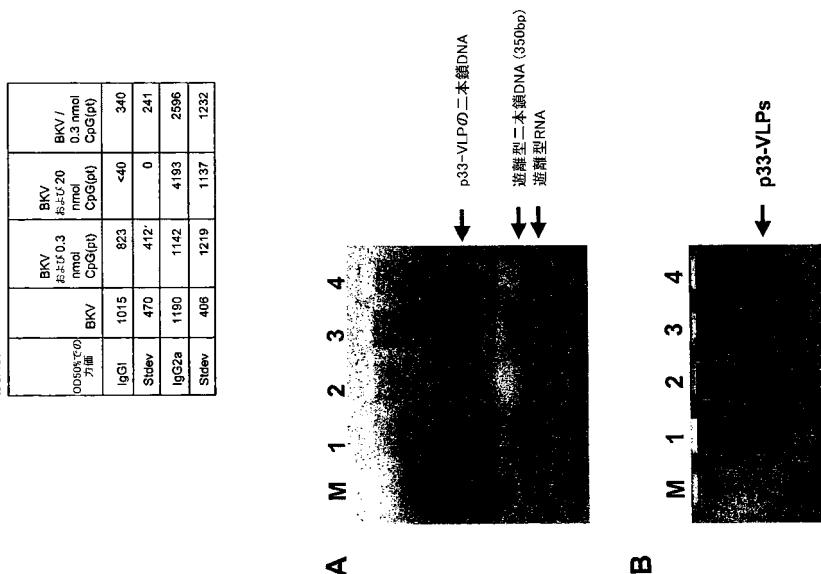
【図 1 4】



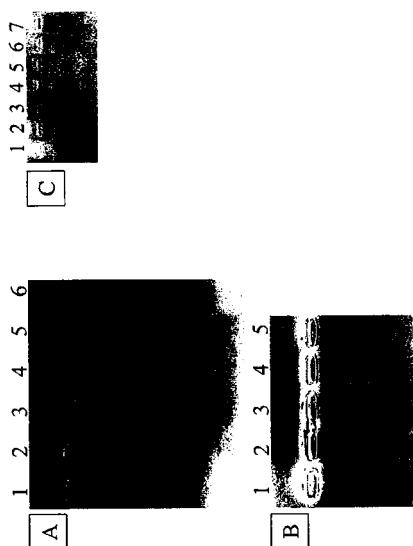
【図15】



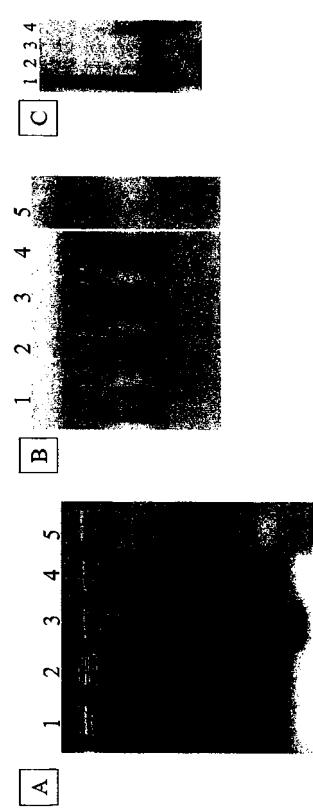
【図16】



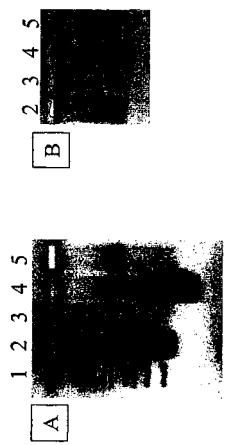
【図17】



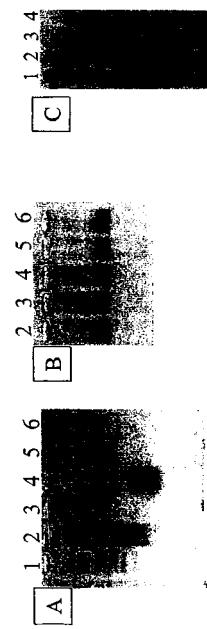
【図18】



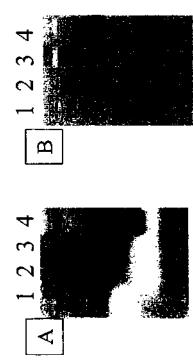
【図19】



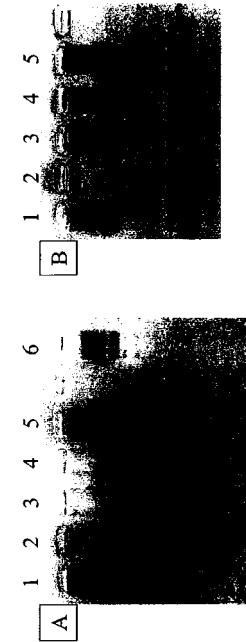
【図20】



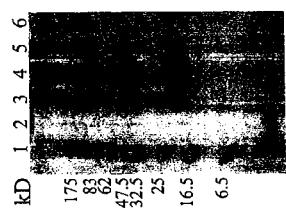
【図21】



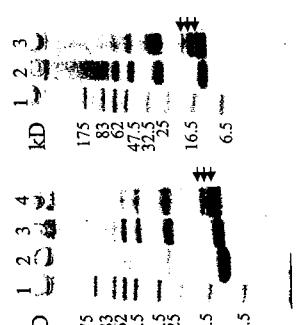
【図23】



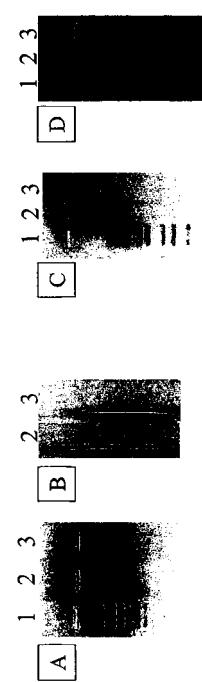
【図22】



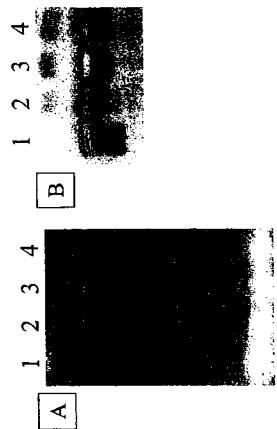
【図24】



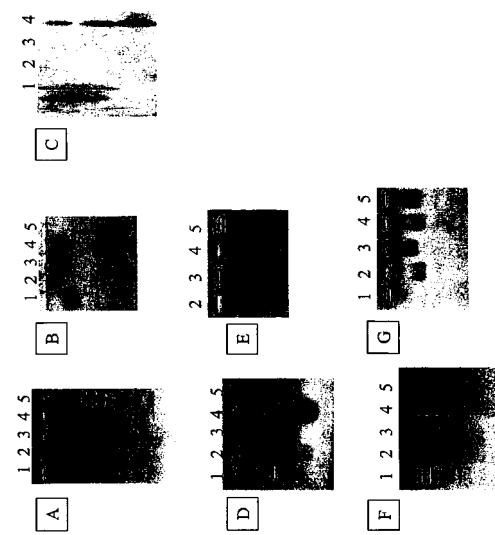
【図25】



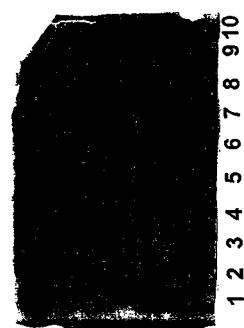
【図26】



【図27】



【図28】



【図29】

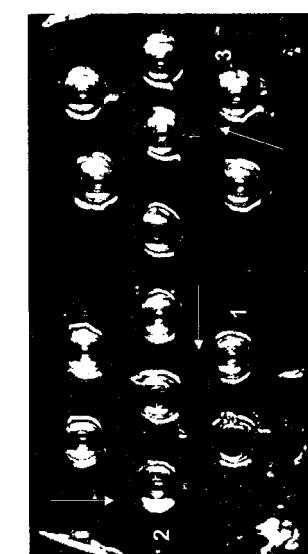


B

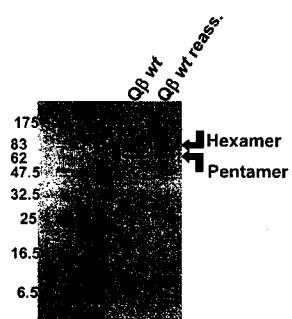
【図30A】



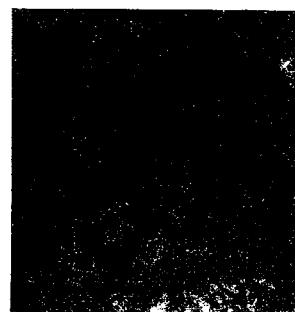
【図30B】



【図31A】



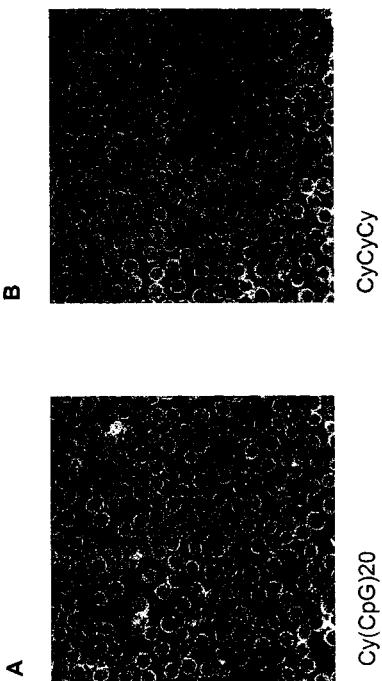
【図32】



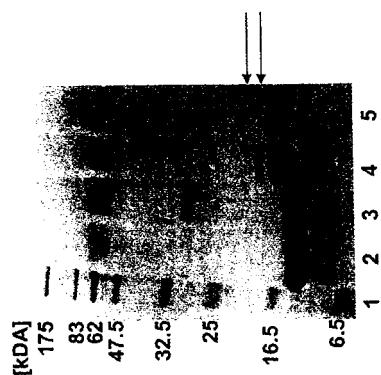
【図31B】



【図33】



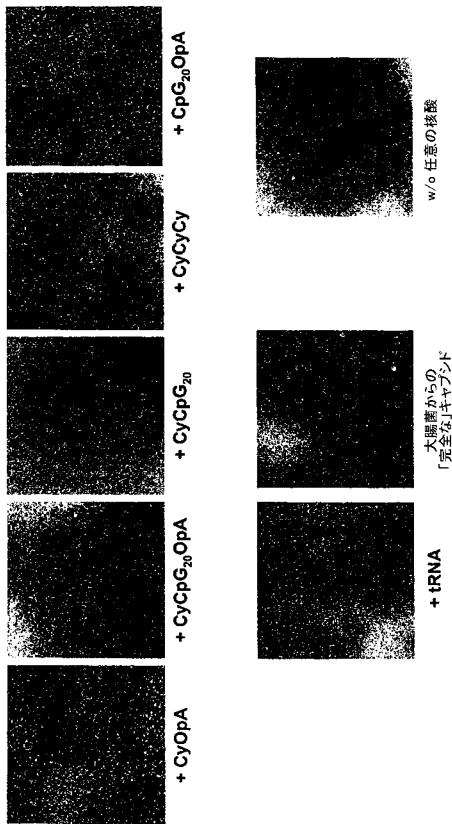
【図34】



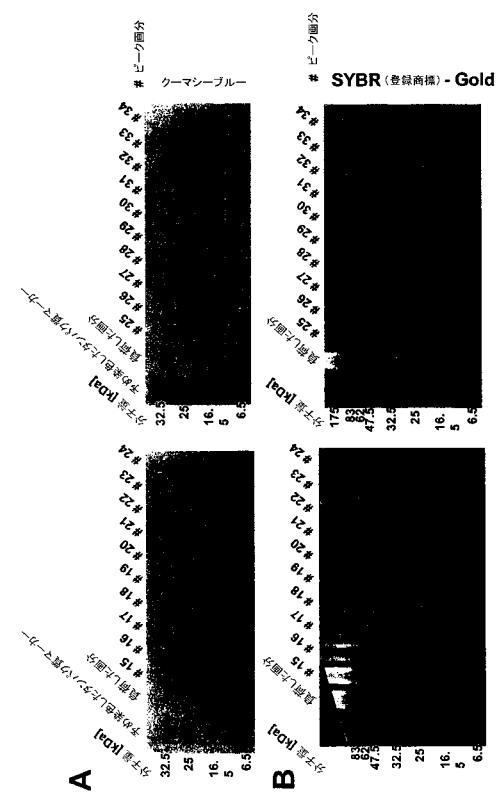
【図35】



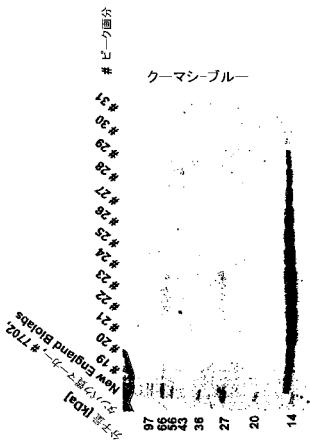
【図36】



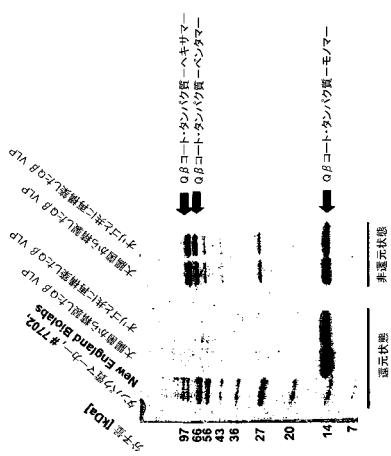
【図37】



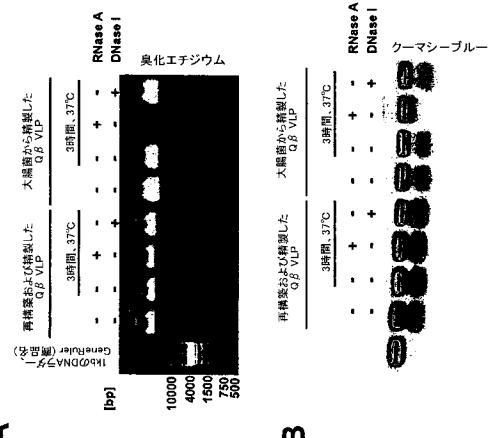
【図38】



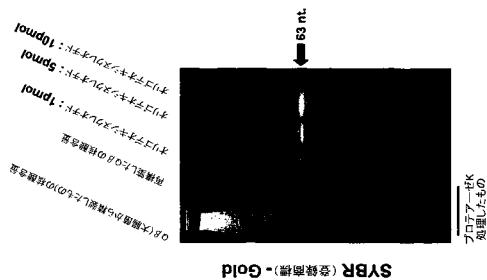
【図39】



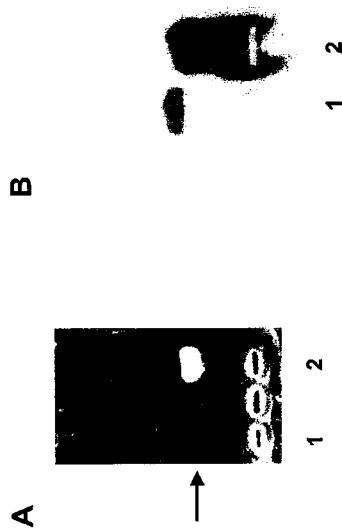
【図40】



【図41】



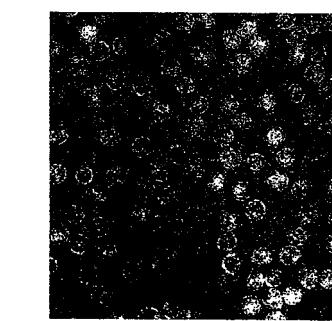
【図43】



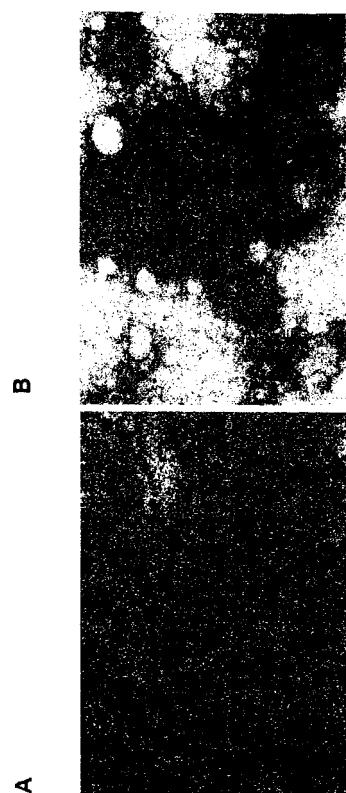
【図42】



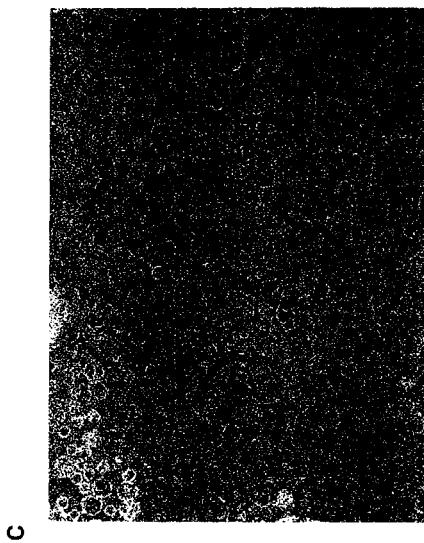
再構築したものの組み換え体



【図44 A B】

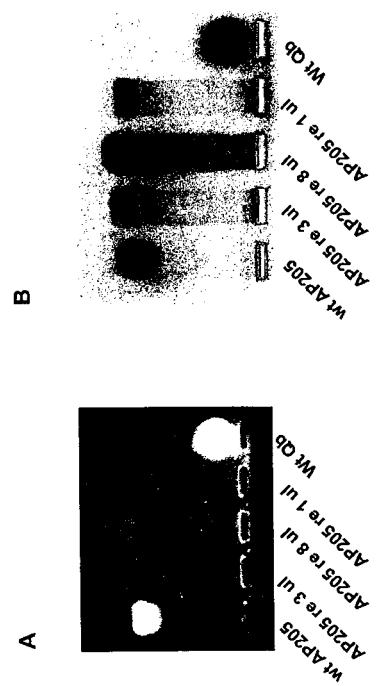


【図44C】



C

【図45】



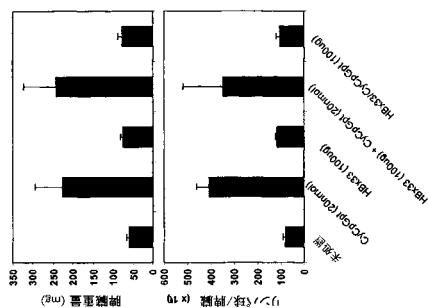
【図46】



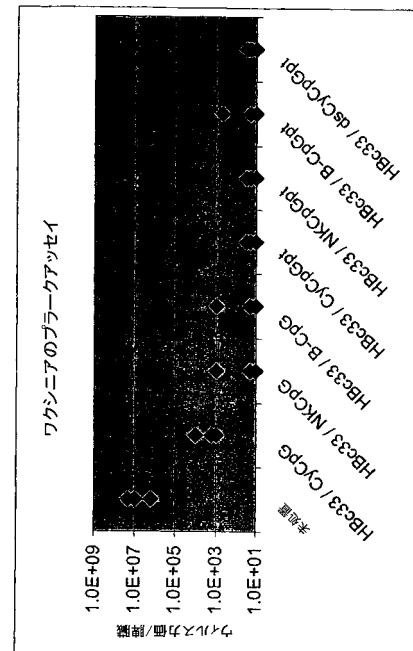
【図47】



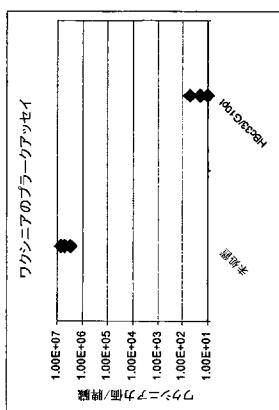
【 図 4 8 】



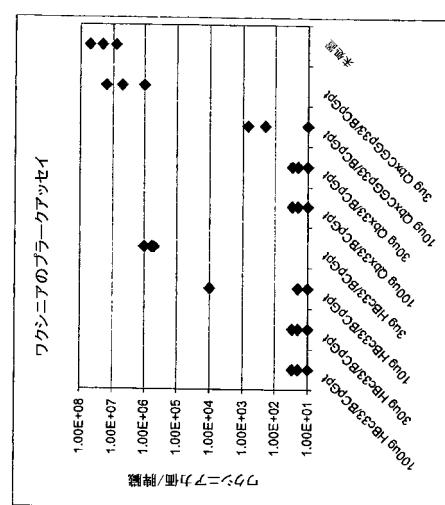
【図49】



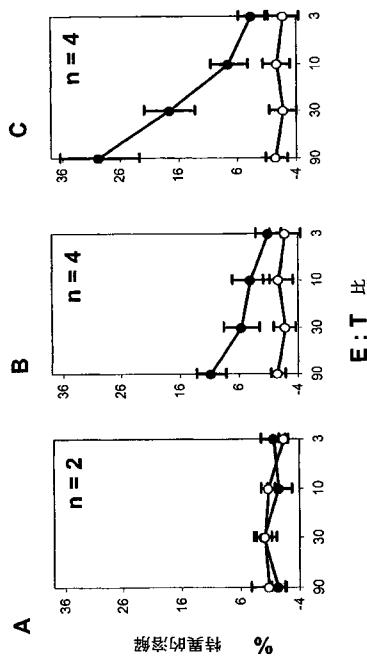
【図50】



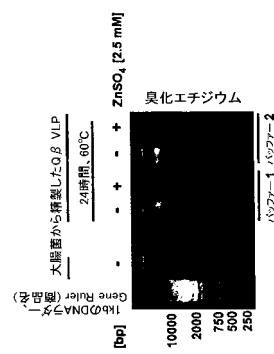
【 図 5 1 】



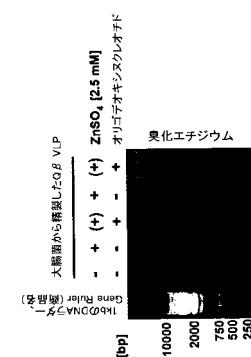
【図52】



【図53】



【図54】



【図55】



【配列表】

0004516748000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00 Z N A
 (72)発明者 ティソット, アラン スイス国 シーエイチ - 8 0 0 4 チューリッヒ, ブラオアーシュトラッセ 7 8	
(72)発明者 シュヴァルツ, カトリーン スイス国 シーエイチ - 8 9 5 2 シュリーレン, シュルシュトラッセ 1 5	
(72)発明者 メイイエリンク, エドウィン スイス国 シーエイチ - 8 0 4 9 チューリッヒ, レベルクシュトラッセ 5 0	
(72)発明者 リポウスキ, ゲルド スイス国 シーエイチ - 8 0 5 7 チューリッヒ, イム アイザーネン ツァイト 5 5	
(72)発明者 ブンペンズ, ポール ラトビア国 エルヴィー - 1 0 6 7 リガ, ラツピテス イエラ 1, ユニバーシティ オブ ラ トビア, バイオメディカル リサーチ アンド スタディ センター	
(72)発明者 シーレンズ, インジュリス ラトビア国 エルヴィー - 1 0 6 7 リガ, ラツピテス イエラ 1, ユニバーシティ オブ ラ トビア, バイオメディカル リサーチ アンド スタディ センター	
(72)発明者 レンホファ, レジナ ラトビア国 エルヴィー - 1 0 6 7 リガ, ラツピテス イエラ 1, ユニバーシティ オブ ラ トビア, バイオメディカル リサーチ アンド スタディ センター	
(72)発明者 バッハマン, マーチン, エフ. スイス国 シーエイチ - 8 4 0 0 ヴィンタートゥール, タハリスブルネンシュトラッセ 3 0	
(72)発明者 ストルニ, タツィオ スイス国 シーエイチ - 6 9 6 2 フィガネロ, フィア アルデザーゴ 1 0	

審査官 富永 保

(56)参考文献	国際公開第 0 1 / 0 5 4 7 2 0 (WO, A 1 )
	国際公開第 0 0 / 0 5 0 0 0 6 (WO, A 1 )
	国際公開第 0 1 / 0 3 8 3 5 8 (WO, A 1 )
	国際公開第 0 0 / 0 2 3 9 5 5 (WO, A 1 )
	国際公開第 0 1 / 0 2 2 9 7 2 (WO, A 1 )
	国際公開第 0 1 / 0 6 2 2 7 5 (WO, A 1 )
	特開 2 0 0 1 - 1 5 1 6 9 8 (JP, A )
	国際公開第 0 1 / 0 2 6 6 8 1 (WO, A 1 )
	国際公開第 9 8 / 0 5 0 0 7 1 (WO, A 1 )
	国際公開第 9 9 / 0 2 9 7 2 3 (WO, A 1 )
	J. Virol., 1 9 9 9 年, Vol.73, pp.4465-9
	J. Virol. Methods, 2 0 0 0 年, Vol.90, pp.85-90
	Nucleic Acids Res., 1 9 9 8 年, Vol.26, pp.1317-23
	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 7 年, Vol.94, pp.7503-8
	J. Clin. Invest., 2 0 0 1 年 8 月, Vol.108, pp.415-23
	J. Virol., 2 0 0 1 年 5 月, Vol.75, pp.4752-60
	J. Immunol., 2 0 0 1 年 5 月, Vol.166, pp.5346-55
	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 8 年, Vol.95, pp.9477-81

Virology, 1996年, Vol.220, pp.128-40

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

PubMed