

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-513634

(P2007-513634A)

(43) 公表日 平成19年5月31日(2007.5.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	4 B O 6 5
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	4 C O 8 5
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 9/107	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-544104 (P2006-544104)
 (86) (22) 出願日 平成16年12月9日 (2004.12.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年8月9日 (2006.8.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/041879
 (87) 国際公開番号 W02005/055957
 (87) 国際公開日 平成17年6月23日 (2005.6.23)
 (31) 優先権主張番号 10/732,862
 (32) 優先日 平成15年12月10日 (2003.12.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/787,734
 (32) 優先日 平成16年2月26日 (2004.2.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503061083
 アボヴィア インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 065 ラモナ ハイランド トレイルズ
 ドライブ 16575
 (71) 出願人 506198757
 グラームス インターユニヴェルシテル
 インスティテュート ヴォール バイオテ
 クノロジー
 ベルギー ベー9052 ツウィナールド
 リーヴィスシストラート 118 ビ
 ユス 1
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザ免疫原及びワクチン

(57) 【要約】

インフルエンザM2タンパク質に対する抗体の産生を誘発する免疫原を含む、カリボキシ-末端が切り縮められたキメラB型肝炎ウイルスヌクレオキャプシド (Hbc) タンパク質が開示される。2つから4つのコピーとして存在する免疫原性インフルエンザ配列は、好ましくはN-末端近傍又はHbc免疫原性ループ配列内で発現される。前記Hbcキメラは、好ましくはインフルエンザ特異的T細胞エпитープを含み、好ましくは、自己会合粒子の安定性強化及びそのようなキメラ粒子の収量増加の両目的のために操作される。前記キメラの製造方法及び使用方法もまた開示される。

A
 Ground Squirrel syflhlcilvf acvpcptvga sklcglwld
 1
 Hbc AYW mdldpykefg atvellefip edffpsvrdl ldtasalyre
 Hbc ADW mdldpykefg atvellefip edffpsvrdl ldtasalyre
 Hbc ADW2 mdldpykefg atvellefip edffpsvrdl ldtasalyre
 Hbc ADYW mdldpykefg atvellefip edffpsvrdl ldtasalyrd
 Woodchuck mdldpykefg sayglinfip ldfpdlinal vdtatalyee
 Ground Squirrel mdldpykefg sayglinfip ldfpdlinal vdtatalyee
 41
 Hbc AYW alespehcep hhtalrgail cweelmtlat wvgmledga
 Hbc ADW alespehcep hhtalrgail cweelmtlat wvgmledga
 Hbc ADW2 alespehcep hhtalrgail cweelmtlat wvgmledga
 Hbc ADYW alespehcep hhtalrgail cweelmtlat wvgmledga
 Woodchuck eltgrehcep hhtalrgail cweelmtlat wvgmledga
 Ground Squirrel eltgrehcep hhtalrgail cweelmtlat wvgmledga
 B
 61
 Hbc AYW srdlvveyvn tmglkfrgl lwfhiscitf gretvleylv
 Hbc ADW srdlvveyvn tmglkfrgl lwfhiscitf gretvleylv
 Hbc ADW2 srdlvveyvn tmglkfrgl lwfhiscitf gretvleylv
 Hbc ADYW srdlvveyvn tmglkfrgl lwfhiscitf gretvleylv
 Woodchuck vrtliivnvn dwglkvrge lwfhiscitf gretvleylv
 Ground Squirrel xrlivdvvn dwglkvrge lwfhiscitf gretvleylv
 121
 Hbc AYW sfgvwrtpp syrpnapil stlpettvz rrgrepxrrt
 Hbc ADW sfgvwrtpp syrpnapil stlpettvz rrgrepxrrt
 Hbc ADW2 sfgvwrtpp syrpnapil stlpettvz rrgrepxrrt
 Hbc ADYW sfgvwrtpp syrpnapil stlpettvz rrgrepxrrt
 Woodchuck sfgvwrtpp syrpnapil stlpettvz rrgrepxrrt
 Ground Squirrel sfgvwrtpp syrpnapil stlpettvz rrgrepxrrt
 161
 Hbc AYW lmpkzrzaga prrrzsqaze sqc
 Hbc ADW lmpkzrzaga prrrzsqaze sqc
 Hbc ADW2 lmpkzrzaga prrrzsqaze sqc
 Hbc ADYW lmpkzrzaga prrrzsqaze sqc
 Woodchuck prrrzsqaze prrrzsqaze sqc
 Ground Squirrel prrrzsqaze prrrzsqaze sqc

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えB型肝炎ウイルスコア（HBc）タンパク質キメラ分子であって、約150から約375アミノ酸残基の長さを有し、ドメインI、II、III及びIVと称される、ペプチド結合した4つのアミノ酸残基配列ドメインをN-末端から含み、ここで、

（a）ドメインIは、（i）その配列が少なくともHBcの4位から約75位の残基配列を含む約75から約160アミノ酸残基、（ii）配列番号：1のHBcのN-末端に対して約1から約-55のキメラ分子内の位置に存在する1つから3つのシステイン残基（N-末端システイン残基）であって、前記1つ又は2つ以上のN-末端システイン残基は、HBcのプレコア配列以外の配列内に存在する前記N-末端システイン残基、及び（iii）HBc配列のN-末端又は前記N-末端の約15残基内でペプチド結合した、配列番号：9のインフルエンザA M2ポリペプチドの約6から約24残基の2つから4つの配列を含み；

（b）ドメインIIは、約残基75とペプチド結合した約0から約60のアミノ酸残基を含み、ここで（i）前記のHBc配列の0から全部が76位から85位に存在し、さらに（ii）配列番号：9のインフルエンザA M2ポリペプチドの6から約24残基の1つ又は2つ以上のリピートを構成する6から約48残基の随意配列を含み；

（c）ドメインIIIは、約残基85とペプチド結合した約86位から約135位のHBc配列であり；さらに

（d）ドメインIVは、（i）ドメインIIIの約135位の残基とペプチド結合した、約136位から140位の残基 + 141位から156位のHBcアミノ酸残基配列の16残基まで、（ii）0から3つのシステイン残基、及び（iii）HBcの156位からHBcのC-末端に対して異種である配列内の約100までのアミノ酸残基を含み、

前記キメラ分子は、（i）HBc配列にわずか10%の保存的置換アミノ酸残基を含み、（ii）自己会合して宿主細胞内での発現時に核酸と実質的に結合しない粒子を形成し、さらに前記粒子は、前記N-末端システイン残基を欠くがその他の点では同一であるHBcキメラから形成される粒子、又はキメラ分子内に存在するN-末端システイン残基が別の残基によって置き換えられている粒子よりも形成時により安定である、前記組換えB型肝炎ウイルスコア（HBc）タンパク質キメラ分子。

【請求項 2】

配列番号：9の前記M2ポリペプチドの1つの前記残基 X_{17} 及び X_{19} の1つがシステインである、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項 3】

配列番号：9の前記M2ポリペプチドの1つの前記残基 X_{17} 及び X_{19} がセリン又はアラニンである、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項 4】

配列番号：9の前記M2ポリペプチドが残基 X_2 から X_{24} を含む、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項 5】

配列番号：9の前記M2ポリペプチドの1つの前記残基 X_{17} 及び X_{19} の2つがシステインである、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項 6】

ドメインIが本質的に2位から75位のHBc配列から成る、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項 7】

ドメインIVがシステイン残基を含まない、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項 8】

ドメインIVが、HBcの156位からC-末端に対して異種である前記配列を含まない、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

ドメインIVが、残基140とペプチド結合した、残基141位から約149位のHBc配列の約9アミノ酸残基の配列を含む、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項10】

ドメインIが1つのN-末端システイン残基を含む、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項11】

ドメインIVが1つのC-末端システイン残基を含む、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項12】

ドメインIが、3つの前記M2ポリペプチド配列を含む、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。 10

【請求項13】

ドメインIが、2つの前記M2ポリペプチドを含む、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項14】

ドメインIIが、76位から85位のHBc配列のアミノ酸残基を含む、請求項1に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項15】

配列番号:9の前記M2ポリペプチドの1つの前記残基 X_{17} 及び X_{19} の1つがシステインである、請求項9に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。 20

【請求項16】

約170から約215残基の長さを有する、請求項9に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項17】

ドメインI、II、III及びIVと称される4つのペプチド結合ドメインをN-末端から含む、約150から約235アミノ酸残基の配列を有する、組換えB型肝炎ウイルスコア(HBc)タンパク質キメラ分子であって、ここで、

(a) ドメインIは、(i) その配列が少なくともHBcの4位から約75位の残基配列を含む約95から約140アミノ酸残基、(ii) 配列番号:1のHBcのN-末端に対して約1から約-55のキメラ分子内の位置に存在する1つから3つのシステイン残基(N-末端システイン残基)であって、前記1つ又は2つ以上のN-末端システイン残基はHBcのプレコア配列以外の配列内に存在する前記N-末端システイン残基、及び(iii) HBc配列のN-末端又は前記N-末端の約15残基内でペプチド結合した、配列番号:9のインフルエンザA M2ポリペプチドの約6から約24残基の2つから4つの配列を含み； 30

(b) ドメインIIは、約残基75とペプチド結合した約0から約60のアミノ酸残基を含み、ここで(i) 前記のHBc配列の0から全部が76位から85位に存在し、さらに(ii) 配列番号:9のインフルエンザA M2ポリペプチドの6から約24残基の1つ又は2つ以上のリピートを構成する6から約48残基の随意配列を含み；

(c) ドメインIIIは、本質的に約86位から約135位のHBc配列から成り；さらに

(d) ドメインIVは、(i) ドメインIIIの135位の残基とペプチド結合した、約136位から140位の残基+141位から156位のHBcアミノ酸残基配列の16残基まで、(ii) 0又は1つのシステイン残基、及び(iii) HBcの156位からHBcのC-末端に対して異種である配列内の約50までのアミノ酸残基を含み、 40

前記キメラ分子は、(i) HBc配列にわずか10%の保存的置換アミノ酸残基を含み、(ii) 自己会合して宿主細胞内での発現時に核酸と実質的に結合しない粒子を形成し、さらに前記粒子は、前記N-末端システイン残基を欠くがその他の点では同一であるHBcキメラから形成される粒子、又はキメラ分子内に存在するN-末端システイン残基が別の残基によって置き換えられている粒子よりも形成時により安定である、前記組換えB型肝炎ウイルスコア(HBc)タンパク質キメラ分子。

【請求項18】

ドメインIVが、残基140とペプチド結合した、残基141位から約149位のHBc配列の約9アミノ酸残基の配列を含む、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項19】

ドメインIが1つのN-末端システイン残基を含む、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項20】

ドメインIVが1つのC-末端システイン残基を含む、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項21】

ドメインIが、3つの前記M2ポリペプチド配列を含む、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項22】

ドメインIが、2つの前記M2ポリペプチドを含む、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項23】

配列番号:9の前記M2ポリペプチドが残基 X_6 から X_{24} を含む、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項24】

ドメインIIが、76位から85位のHBc配列のアミノ酸残基を含む、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項25】

ドメインIIが、配列番号:9のインフルエンザA M2ポリペプチドの6から約23残基をさらに含む、76位から85位のHBc配列のアミノ酸残基を含む、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項26】

配列番号:9の前記M2ポリペプチドの前記残基 X_{17} 及び X_{19} の1つがシステインである、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項27】

約170から約215残基の長さを有する、請求項17に記載の組換えHBcキメラタンパク質分子。

【請求項28】

請求項1に記載の組換えB型肝炎ウイルスコア(HBc)タンパク質キメラ分子で構成された粒子。

【請求項29】

配列番号:9のインフルエンザA M2ポリペプチドのC-末端19残基を含む、請求項28に記載の組換えB型肝炎ウイルスコア(HBc)タンパク質キメラ分子で構成された粒子。

【請求項30】

請求項17に記載の組換えB型肝炎ウイルスコア(HBc)タンパク質キメラ分子で構成された粒子。

【請求項31】

配列番号:9のインフルエンザA M2ポリペプチドのC-末端19残基を含む、請求項30に記載の組換えB型肝炎ウイルスコア(HBc)タンパク質キメラ分子で構成された粒子。

【請求項32】

医薬的に許容できる希釈剤に溶解又は分散した、請求項28に記載の免疫原性粒子の免疫原的有効量を含むワクチン又は接種物。

【請求項33】

医薬的に許容できる希釈剤に溶解又は分散した、請求項30に記載の免疫原性粒子の免疫原的有効量を含むワクチン又は接種物。

【請求項34】

前記組換えキメラHBcタンパク質分子粒子が植物組織に存在する、請求項33に記載のワ

10

20

30

40

50

クチン又は接種物。

【請求項 35】

さらにアジュバントを含む、請求項33に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 36】

前記アジュバントがミョウバンである、請求項33に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 37】

前記アジュバントが、ムラミルジペプチド、7-置換-8-オキソ-又は8-スルホ-グアノシン誘導体、モノホスホリル脂質A、アルミニウム又はカルシウム塩から成る群から選択される小分子である、請求項35に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 38】

前記アジュバントが、前記免疫原性粒子及び前記医薬的に許容できる希釈剤とともに乳化される油である、請求項35に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 39】

前記エマルジョンが水相及び油相を有する油中水型エマルジョンである、請求項38に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 40】

前記エマルジョンが水相及び油相を有する水中油型エマルジョンである、請求項38に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 41】

前記エマルジョンの油相がスクアレンを含む、請求項40に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 42】

前記エマルジョンの油相がスクアレンを含む、請求項38に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 43】

前記エマルジョンの水相及び油相が、ソルビタン又はマンニド $C_{12} - C_{24}$ 脂肪酸エステルである乳化剤によって乳化される、請求項38に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 44】

前記乳化剤がマンニド $C_{12} - C_{24}$ 脂肪酸エステルである、請求項38に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 45】

前記マンニド $C_{12} - C_{24}$ 脂肪酸エステルの $C_{12} - C_{24}$ 脂肪酸がオレイン酸である、請求項44に記載のワクチン又は接種物。

【請求項 46】

請求項1に記載の組換えHBcタンパク質分子をコードする核酸、又はその変種、類似体若しくは相補物。

【請求項 47】

請求項17に記載の組換えHBcタンパク質分子をコードする核酸、又はその変種、類似体若しくは相補物。

【請求項 48】

請求項1に記載の組換えHBcタンパク質分子をコードする遺伝子、又はその変種、類似体若しくは相補物を規定する核酸セグメントに機能的に連結されたベクター、及び適合宿主細胞内で前記遺伝子の発現を駆動するために適したプロモーターを含む組換え核酸分子。

【請求項 49】

請求項17に記載の組換えHBcタンパク質分子をコードする遺伝子、又はその変種、類似体若しくは相補物を規定する核酸セグメントに機能的に連結されたベクター、及び適合宿主細胞内で前記遺伝子の発現を駆動するために適したプロモーターを含む組換え核酸分子。

【請求項 50】

請求項49に記載の組換え核酸分子で形質転換された宿主細胞。

【請求項 51】

10

20

30

40

50

前記宿主細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、腸チフス菌 (*S. typhi*)、ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) 及びネズミチフス菌-大腸菌ハイブリッドから成る群から選択される、請求項50に記載の形質転換宿主細胞。

【請求項52】

請求項48に記載の組換え核酸分子で形質転換された宿主細胞。

【請求項53】

前記宿主細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、腸チフス菌 (*S. typhi*)、ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) 及びネズミチフス菌-大腸菌ハイブリッドから成る群から選択される、請求項52に記載の形質転換宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互引用

本出願は、出願番号10/732,862号(2003年12月10日出願)の部分継続出願であり、前記出願はPCT/US03/05196(2003年2月21日出願)に対し優先権を主張し、前記出願は、出願番号10/274,616号(2002年10月21日出願)に対し、出願番号10/082,014号(2002年2月21日出願)の部分継続出願として、及び出願番号10/080,299号(2002年2月21日出願)の部分継続出願として優先権を主張し、後者2つの出願は各々出願番号09/930,915号(2001年8月15日出願)の部分継続出願である。

【0002】

20

技術分野

本発明は、免疫学及びタンパク質工学の学際分野に関し、特にインフルエンザAウイルスによるインフルエンザ感染の予防に有用な免疫原及びワクチンに関する。

【0003】

背景技術

ヘパドナウイルス科(hepadonaviridae)はエンベロープをもつDNA含有動物ウイルスであり、ヒトでB型肝炎を惹起することができる(HBV)。ヘパドナウイルス科には他の哺乳動物のB型肝炎ウイルス、例えばウッドチャック(WHV)及び地上性リス(GSHV)並びにアヒル(DHV)及びサギ(HeHV)で見出されるトリ型ウイルスが含まれる。本明細書で用いられるB型肝炎ウイルス(HBV)は、特別な例として非哺乳動物のウイルスに言及する場合の除き、鳥類宿主に感染するウイルスと対比される、哺乳動物に感染するヘパドナウイルス科のメンバーを指す。

30

哺乳動物のB型肝炎ウイルス(HBV又はヘパドナウイルス)のヌクレオキャプシド又はコアは、ウイルスのサブタイプにより183又は185のアミノ酸残基配列を含むが、一方、アヒルのウイルスキャプシドは262のアミノ酸残基を含む。いくつかのヘパドナウイルス科のB型肝炎コアタンパク質モノマーは、感染細胞内で自己会合して、肝炎Bコアタンパク質粒子(HBc粒子)として知られる安定な凝集物を形成する。C-末端が切り縮められたHBc粒子について2つの三次元構造が報告されている。小集団を構成する第一の構造は、ダイマーとして90コピーのHBcサブユニットタンパク質、又は180の個々のモノマータンパク質を含み、第二の構造は主要集団であり、ダイマーとして120コピーのHBcサブユニットタンパク質、又は240の個々のモノマータンパク質を含む。これらの粒子はそれぞれT=3又はT=4粒子と称され、この場合“T”は三角形の形成数である。ヒトに感染するウイルス(ヒトウイルス)のこれらHBc粒子は、直径がそれぞれ約30又は34nmである(Pumpens et al. (1995) Intervirology 38:63-74; Metzger et al. (1998) J. Gen. Virol. 79:587-590)。

40

【0004】

Conwayら(Nature 386:91-94 (1997))は、9 Åの解像度で凍結電子顕微鏡写真から決定したヒトHBc粒子の構造を記載している。Bottcherら(Nature 386:88-91 (1997))はヒトHBcモノマーのポリペプチド折り畳みを記載し、アルファヘリックス領域およびそれらの連結ループ領域を形成するアミノ酸残基の凡その番号を付与したスキームを提供した。Zhengら(J. Biol. Chem. (1992) 267(13):9422-9429)は、1つ又は2つ以上のシステインを

50

欠く変異タンパク質に関する彼らの研究、および他の研究者のC-末端切端タンパク質に関する研究 (Birnbaum et al, (1990) J. Virol. 64:3319-3330) から、コア粒子形成は、アルギニン富裕C-末端ドメイン、核酸の結合、又はジスルフィド結合形成には左右されないことを報告している。Conwayら (1997) お呼びBottcherら (1997) が報告したHBc粒子の低解像構造は、Wynneら (Mol. Cell, 3(6):70-80, 1999) が報告したT=4粒子の3.3解像結晶構造によって確認された。

肝炎Bヌクレオキャプシド又はウイルスコアタンパク質 (HBc) は、免疫された宿主動物のT細胞応答を刺激する免疫原性担体成分として開示された。例えば米国特許4,818,527号、同4,882,145号および同5,143,726号を参照されたい。この担体の特に有用な応用は、そのイムノドミナントループ部位に外来又は異種B細胞エピトープを提示する能力である。前記ループは約70-90残基部位に存在し、より一般的には前記タンパク質のアミノ末端 (N-末端) から約75から85位であると記載されている (Clarke et al. (1991) F. Brown et al. eds., Vaccines 91, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 313-318)。

10

【0005】

ウイルスの複製中に、HBVのヌクレオキャプシドは、前記ウイルスのRNAプレゲノム、ウイルス逆転写酵素 (Pol) および末端タンパク質 (Polに由来する) と結合して複製能力を有するコアを形成する。ヌクレオキャプシドとウイルスRNAプレゲノム間の結合は、カルボキシル-末端 (C-末端) に存在するアルギニン富裕ドメインによって仲介される。ウイルスプレゲノムが存在しない異種発現系 (例えば大腸菌) で発現される場合、プロタミン様C-末端 (すなわち150位から183位の残基) が大腸菌RNAと結合することができる (Zheng et al. (1992) JBC 267(13):9422-9429)。

20

HBcAgは、異種エピトープの担体として提唱されているB型肝炎ウイルス由来の粒子状タンパク質である。HBsAg (HBs) の相対的免疫原性がHBcAg (HBc) と比較され、種々の遺伝的背景において免疫応答を惹起するそれぞれの能力が比較された (Milich et al. Science 234(4782):1398-1401 (1986))。これらのデータは、HBsよりもHBcの免疫原性が高く、さらに遺伝的背景に関係なくHBcに対して普遍的な応答性存在することを強調した。

例えば、HBcは、BALB/cマウスでHBsよりも300倍高い免疫原性を有し、さらに、B10.SおよびB10.MはともにHBsに対して無反応マウスであるが、調べた全ての株がHBcに対して反応する。これらの結果はワクチン担体としてのHBcの適切性、特にHBsよりも優れていること、したがって異種エピトープの担体としてHBsではなくHBcを選択することの適切性を再確認させる。

30

【0006】

HBc担体のまた別の利点は、前記は有効性のために複雑なアジュバントを必要としないであろうという事実である。これは、前記粒子の固有の高い免疫原性によるものである。HBc-P. ベルゲイ (*P. berghei*) 粒子の免疫原性の比較によって、ミョウバン (人間に使用することが承認されている) がIFA又はCFAよりも有効であることが示された (Schdel et al. (1994) J. Exp. Med. 180(3):1037-46)。前記の観察の重要性は、SKBのマラリア候補ワクチンの臨床試験で最近観察された新参のより複雑なアジュバントに付随する毒性の問題のために強調される (Stoute et al. (1997) N. Engl. J. Med. 336(2):86-91)。

40

ワクチンの担体成分として応用する場合、HBVヌクレオキャプシドは宿主由来の核酸と結合しないことが好ましい。Birnbaumら (J. Virol. 64:3319-3330 (1990)) は、HBVヌクレオキャプシドのプロタミン様C-末端ドメインは、ウイルス様粒子に会合するタンパク質の能力を損なうことなく欠落させることができることを示した。したがって、約144位に短縮されたタンパク質 (すなわち1位から約144位のHBc配列を含む) は自己会合することができるが、残基139を超える欠落はキャプシドの会合を停止させる (Birnbaum et al. (1990) J. Virol. 64:3319-30)。

【0007】

Zlotnickら (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94:9556-9561 (1997)) は、完全長および切端HBcタンパク質の粒子への会合を調べた。完全長分子の考察の他に、前記著者らは1位

50

から149位のHBc配列を含む切端タンパク質の調製を報告した（前記切端形では、48、61および107位のシステインが各々アラニンで置き換えられ、さらに1つのシステイン残基がC-末端（150位）に付加されていた）。前記のC-末端のメルカプタンは電子顕微鏡検査での標識のための金原子クラスターとの結合に用いられた。

さらに最近、Metzgerら（J. Gen. Virol. 79:587-590（1998））は、ヒトのウイルス配列の138位のプロリン（Pro-138又はP138）が粒子形成に必要であることを報告した。前記の著者らはまた、カルボキシ末端において142残基および140残基の長さに短縮した粒子の会合能力は影響を受けるが、139および137残基の長さを生じる短縮では会合能力は完全に失われることを報告した。

切端粒子は標準的なB型肝炎コア粒子と比べて安定性の低下を示すことをいくつかのグループが示した（Galena et al.（1998）J. Virol. 63:4645-4652；Inada et al.（1989）Virus Res. 14:27-48）。前記は、粒子サイズの変動性、および精製調製物中に粒子フラグメントが存在することによって立証された（Massen et al.（1994）Arch. Virol. 135:131-142）。したがって、上記のMetzgerらの報告の前に、Pumpensら（Intervirology 38:63-74（1995））は、自己会合に必要なHBc配列のためのカルボキシ末端の境界はアミノ酸残基130および144の間に位置し、最初の2つ又は3つのアミノ末端残基を他の配列に置き換えることができるが4つ又は11のアミノ末端残基の排除は、形質転換した大腸菌細胞でのキメラタンパク質の完全な消失をもたらすことを記載して文献の報告を要約した。

【0008】

種々の挿入ポリペプチド配列を含む内部挿入物を保有する、組換えによって作製されたハイブリッドHBc粒子（当業界ではHBcキメラ粒子又はHBcキメラと称される）は、多様な生物（大腸菌、枯草菌（*B. subtilis*）、ワクシニア、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）を含む）での異種発現によって作製されてきた。例えば文献 - Pumpens et al.（1995）Intervirology 38:63-74 - 及び前記文献中の引用文献を参照されたい（前記引用文献にはいくつかの研究グループの研究が記されている）。天然のHBc粒子はまた植物においても産生されている（T suda et al., 1998, Vox Sang, 74(3):148-155）。

そのようなHBcキメラは、電子顕微鏡で分析したとき、異種エピトープを欠く粒子と比較してしばしば秩序の低い構造を有するようである（Schodel et al.（1994）J. Exp. Med. 180:1037-1046）。いくつかの事例では、異種エピトープのC-末端短縮HBc粒子への挿入は、異種発現後にハイブリッド粒子を回収できないほど劇的な脱安定化の影響を与える（Schodel et al.（1994）Infect. Immunol. 62:1669-1676）。したがって、多くのキメラHBc粒子は不安定で精製中に破壊され、その程度は、前記粒子が回収不能であるか又は極めて低い安定性を示すものであり、ワクチン開発を困難にしている。

上記の文献（Pumpens et al.（1995）Intervirology 38:63-74）は、挿入されたポリペプチド配列がN-末端、C-末端および末端と末端との間に存在する粒子形成キメラを列挙している。前記文献に報告されている挿入物の長さはN-末端では24から50残基、内部で7から43残基、C-末端では11から741残基である。

【0009】

最近、Kratzら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:1915-1920）は、238残基の緑色蛍光タンパク質（GFP）に内部融合させた切端HBc配列を含むキメラHBc粒子の大腸菌発現について記載した。前記キメラは、HBcのアミノ酸残基79および80と置き換えられた一対のグリシン富裕可撓性リンカーアームによってフランキングされている挿入GFP配列を含んでいた。前記粒子は、ウサギを宿主動物として天然のGFPに対して効果的に抗体を誘発すると主張された。

米国特許5,990,085号は、（i）カルボキシ末端切端HBcのイムノドミナントループに残基78と79の間で、及び（ii）カルボキシ末端切端HBcの残基144の後に融合された抗原性ウシインヒビンペプチドから形成された2つの融合タンパク質について記載している。発現された融合タンパク質は、宿主動物に投与されたとき抗インヒビン抗体の産生を誘発すると主張された。前記特許で報告された免疫後30日の力価は比較的低く、ループ挿入を有す

10

20

30

40

50

る融合タンパク質については1:3000から15000で、残基144の後に挿入されたものについては1:100から125である。

米国特許6,231,864号は、ハプテンと結合させた、戦略的に改変したB型肝炎コアタンパク質の製造および使用を教示する。前記改変コアタンパク質は、ハプテンが懸垂結合されている化学的に反応性を有するアミノ酸残基を含む長さが1から約40残基の挿入物を含む。

【0010】

最近公開されたW001/27281は、HBcに対する免疫応答は、天然の分子のC-末端システイン含有配列の存在又は欠如によってそれぞれTh1応答からTh2応答に変化させることができることを開示している。前記開示はまた、C-末端システインによるジスルフィド形成は粒子の安定化に役立つと述べている。C-末端システインの直ぐ上流の天然HBc配列のいくつかの残基の存在は好ましいが、要求されないと記載された。切端C-末端HBc配列の置換に用いることが可能なそのような選択肢には、C-末端システインおよびHBc以外のタンパク質からエピトープを区別する随意的配列が含まれると記載された。

公開されたPCT出願W001/98333は、C-末端のシステイン残基を維持しながら、天然のHBcのC-末端に存在する4つのアルギニンリピートの1つ又は2つ以上の欠落を教示している。前記出願はまた、前記欠落領域をHBc以外のタンパク質のエピトープによって置き換え、前記のようにして形成された分子のHBc部分が付加されるエピトープのための担体として機能できるようにすることを開示している。

W002/13765A2およびW002/14478A2に対応する公開されたPCT出願は、C-末端切端HBc粒子の安定化は、前記粒子が組み立てられるキメラタンパク質で1つ又は2つ以上の添加システイン残基の使用により達成できることを開示している。前記添加されるシステイン残基は、キメラタンパク質のC-末端に存在するか、又はC-末端近くに存在するべきことが教示されている。

【0011】

完全長のHBc粒子の安定性を維持しながら、完全長HBc粒子の核酸結合能力を失わせることができる構造的特徴は、ヘパドナウイルスヌクレオキャプシドデリバリー系を用いたワクチン開発で極めて有益であろう。実際、Ulrichらは、外来エピトープのための担体としてHBcキメラを使用することに関する彼らの最近の総説で、人間のワクチンで前記キメラを使用するために解決すべき潜在的な3つの問題を記載している (Ulrich et al. *Adv. Virus Res.*, 50:141-182 (1998))。第一の潜在的な問題は、キメラワクチン内の核酸の被免疫宿主への偶然による移転である。第二の潜在的な問題は以前から存在するHBcに対する免疫による干渉である。第三の可能な問題は、長期保存にも耐えることができる完全なキメラ粒子の増殖可能調製物という必要条件に関する。

上記の4つのPCT出願公開は、Ulrichらによって開示された潜在的な問題の克服に用いることができる教示を含んでいるように思われる。以下で開示されるように、本発明は、予期に反してインフルエンザに対する高力価の抗体を提供し、さらにある特徴ではまたHBcキメラの安定性に関する問題を解決するとともに実質的に核酸結合能力のない構築物を提供するまた別のHBcキメラを提供する。さらにまた、意図される組換えキメラは、既に存在する抗HBc抗体に対し抗原性の低下を示す。

N-末端切端形のHBcキメラ分子に関する上記の粒子の不安定性に関する発見にもかかわらず、Neirynckら (*Nature Med.* 5(10):1157-1163, 1999 (October)) は、完全長のHBcの残基5に融合されているインフルエンザM2タンパク質のN-末端24残基部分 (開始メチオニンを含む) を含むHBcキメラの粒子形成が大腸菌発現で生じたことを報告した。

Bachmannおよび共同研究者ら (Jegerlehner et al. (2002) *Vaccine*, 20:3104-3112) は、融合構築物 (上記のNeirynckらの構築物と実質的に同一) を、米国特許6,231,864号で開示された構築物と類似の共役構築物と比較した。前記共役構築物ではインフルエンザAのM2タンパク質の外部23残基 (メチオニン残基のin vivoでの除去後) が、C-末端切端HBc (1-149) (前記もまた48位及び107位のシステイン残基がセリン残基で置き換えられている) のループ中の操作されたリジン残基にリンカーを介して結合されていた。彼らの結

10

20

30

40

50

果は、N-末端融合タンパク質よりも共役構築物で抗M2力価の増加および生存強化（6/6に対して0/3）を示した。

【0012】

以前に考察された、C-末端切端ハイブリッドHBcタンパク質のワクチンとしての使用は、それらの完全長の対応物を使用するよりも、発現レベルの強化及び大腸菌RNA結合の欠如を含むいくつかの利点を提供する。しかしながら、異種エピトープを提示するように操作されたC-末端切端粒子はしばしば不安定で、発現後に安定な粒子構造に会合することができないか、又は精製時若しくは精製後に簡単に非粒子構造に分解する粒子を生じる。そのような安定性の欠如は、HBc149位までC-末端が切り縮められ、さらにまたインフルエンザAのM2タンパク質の上記2-24残基を含むキメラHBc分子で構成された粒子によって示される。

10

他の研究者らは、野生型ヘパドナウイルスコア抗原では、HBcAgの開始コドン上流のシステイン残基が粒子形成の防止に直接必要とされることを報告した（Schodel et al. (Jan. 15, 1993) J. Biol. Chem., 268(2):1332-1337; Wasenauer et al. (Mar. 1993) J. Virol., 67(3):1315-1322; Nassal et al. (Jul. 1993) J. Virol., 67(7):4307-4315）。前記3グループはいずれも、野生型HBcAgでは、プレコア配列の-7位のシステイン残基（コア遺伝子が-30位に在る上流の開始メチオニンから翻訳されるときに存在する）が粒子形成の防止に必要であり、したがって粒子状HBcAgから非粒子状分泌HBcAgへの変化を促進することを報告した。

上記3つの文献から、HBcの開始メチオニンより前の位置（すなわち配列番号:1の配列のN-末端に対して1未満の残基位置）に在る1つ又は2つ以上のシステイン残基を含むことによって、C-末端切端ハイブリッド粒子を安定化させるのではなく、むしろ実際には脱安定化させると予想されるであろう。下記の考察から分かるように、本発明はこれらの予想とは反対の結果を提供する。

20

【0013】

発明の要旨

本発明の目的は、インフルエンザA M2タンパク質の細胞外ドメイン（M2e）に対する抗体を誘発するためのヘパドナウイルス系免疫原、並びに生理学的に許容できる希釈剤に分散させた接種物及びワクチンである。以下では“M2”及び“M2e”の呼称は相互に用いられる。意図される免疫原は、組換えB型肝炎ウイルスコア（HBc）キメラタンパク質分子で構成された自己会合粒子である。前記分子の各々は、約150から約375アミノ酸残基の長さを有し、配列番号:9の6から約24残基の配列を含み、さらにドメインI、II、III及びIVと称される4つのペプチド結合アミノ酸残基配列ドメインをN-末端から含んでいる。

30

第一のドメイン（ドメインI）は約75から約160アミノ酸残基を含む。このドメインの配列は、少なくともHBcの4位から約75位までの残基配列を含む。1つから3つのシステイン残基がまた、配列番号:1のHBcのN-末端に対して約1から-55、好ましくは-30、より好ましくは約-20のキメラ分子内の位置に存在する（N-末端システイン残基）。前記N-末端システイン残基は、HBcのプレコア配列以外の配列内に存在する。ドメインIのシステイン残基はまた、HBc配列のN-末端にペプチド結合されてあるか、又は前記N-末端の約15残基内でペプチド結合されてある、配列番号:9のインフルエンザA M2のポリペプチド、 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$ （例えば好ましいポリペプチドは配列番号:10の $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ -TPIRNE- $X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$ ）（前記の式の下付き文字をもつX残基は以下で定義される）の約6から約24残基の2つから4つの配列内に、HBc残基1-4の1つ又は2つ以上に存在するのと同様に存在することができる。

40

【0014】

第二のドメイン、ドメインIIは、ドメインIの約残基75とペプチド結合した約0から約60のアミノ酸残基を含み、ここで（i）HBc76位から85位の配列内の0から10残基の全てが存在し、（ii）前記残基は、上記配列番号:9のインフルエンザA M2ポリペプチドの1つ又は2つ以上のリピートを構成する約6から約48残基の随意配列とペプチド結合されてある。

第三のドメイン、ドメインIIIは、約残基85とペプチド結合した約86位から約135位のHB

50

c配列である。

第四のドメイン、ドメインIVは、(i)ドメインIIIの約135位の残基とペプチド結合された、136位から140位の残基 + HBc残基配列の141位から149位の9残基まで、(ii)0から3つのシステイン残基、(iii)互いに隣接する4つ未満のアルギニン又はリジン残基又はそれらの混合物、及び(iv)HBcの146位からC-末端と異種の配列、好ましくはHBcの156位からC-末端と異種の配列内にある約100までのアミノ酸残基を含む。

意図されるキメラ分子は、(i)HBc配列においてわずか10% (no more than 10 percent) の保存的置換アミノ酸残基を含み、(ii)自己会合して宿主細胞内での発現時に核酸と実質的に結合しない粒子を形成し、さらに前記粒子は、前記N-末端システイン残基を欠くがその他の点では同一であるHBcキメラから形成される粒子、又はキメラ分子内に存在するN-末端システイン残基が別の残基によって置き換えられている粒子よりも形成時により安定である。

10

好ましくは、ドメインIのHBc配列は、4位から75位の残基のみ + 少なくとも1つのN-末端システイン残基を含む。さらに好ましくは、意図される免疫原は、ドメインIVのみ内には又はHBcの164位からC-末端の配列と異種のアミノ酸残基配列内に1つのシステイン残基を含む。特に好ましくは、異種配列はインフルエンザAのT細胞エピトープを含む。

【0015】

別の実施態様は、医薬的に許容できる希釈組成物（典型的にはまた水を含む）に溶解又は分散された上記のHBcキメラ粒子を含む接種物又はワクチンを含む。免疫原的に有効な量で動物、例えば哺乳動物又は鳥類に投与されたとき、接種物は、前記キメラ粒子と特異的に免疫反応する抗体を誘発する。そのようにして誘発された抗体はまた、M2タンパク質のN-末端部分と特異的に免疫反応（結合）する。

20

本発明はいくつかの利点及び利益を有する。

本発明の特別な利点は、ワクチンとしてのその使用によってインフルエンザAに対して他に例を見ない抗体力価が提供されるということである。

本発明の利点は、このように非常に高い抗体力価は、ヒトでの使用が承認されているアジュバントを用いて得られたということである。

本発明のまた別の利点は、この組換え免疫原は、形質転換宿主細胞の増殖に周知の細胞培養技術を用いて容易にかつ大量に製造することができるということである。

本発明のまた別の利点は、この免疫原は周知の組換え技術によって容易に製造されるということである。

30

本発明のさらに別の利点は、好ましい免疫原は、他のHBcキメラよりも上昇温度においてより高い安定性を示すということである。

本発明のさらに別の利点は、意図される免疫原は実質的に核酸を含まないということである。

本発明のさらに別の利点及び利益は、以下に続く開示から当業者には明白であろう。

【0016】

定義

HBcキメラとの関係で使用される数字は、配列番号:1のHBc aywのアミノ酸残基配列内の位置を、その位置で付加又は欠落が存在するか否かにかかわらず表示する（HBcキメラでは1つ又は2つ以上の残基が前記配列に付加され又は前記配列から欠落している）。したがって、HBc149はキメラが残基149で終了することを表示し、一方、HBc149 + C150は、当該キメラが、配列番号:1の配列内番号に対応してHBc150位にシステイン残基を含むことを示す。

40

“抗体”という用語は、免疫グロブリンと称されるグリコシル化タンパク質類のメンバーである分子（前記は特異的に抗原と結合することができる）を指す。

“抗原”という語は、歴史的に抗体または受容体と結合する物質を意味するために、さらに抗体の産生を誘発する物質を意味するために用いられてきた。より最近の使用は、抗原の意味を抗体又は受容体と結合する物質に限定し、一方、“免疫原”という語が抗体産生を誘発するか、又は受容体と結合する物質に用いられる。本明細書で考察される物質が

50

免疫原性であり、さらに抗原性を有する 場合は、免疫原または抗原のいずれとして言及するかは、その意図される使用にしたがって行われる。

“ 抗原決定基 ” は、抗体結合部位又はT細胞受容体が免疫学的に結合する抗原の実際の構造部分を指す。前記用語はまた“ エピトープ ” と互換的に用いられる。

本明細書で用いられる“ 共役物 ” という用語は、アミノ酸残基側鎖を介して担体タンパク質に機能的に連結されたハプテンを指す。

本明細書で用いられる“ 保存的置換 ” という用語は、あるアミノ酸残基が別の生物学的に類似の残基によって置き換えられたことを意味する。保存的置換の例には、1つの疎水性残基（例えばイソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニン）によるもう1つの疎水性残基の置換、または1つの極性残基によるもう1つの極性残基の置換（例えばアルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸又はグルタミンとアスパラギンなど）が含まれる。

10

ペプチド配列に関して用いられる“ 対応する（一致する） ” という用語は、記載のペプチド配列に約3つまでのアミノ酸残基がアミノ末端又はカルボキシ末端の一方又は両方に付加され又は前記から削除されたもので、さらに前記ポリペプチド配列の個々のアミノ酸残基に保存的置換のみを含む前記ペプチド配列を意味する。

【 0 0 1 7 】

本明細書では“ ドメイン ” という用語は、Galibertら（Nature 281:646-650 (1979)）が報告したHBcAg サブタイプ ayw（配列番号:1）の位置番号に対応する残基位置番号付与によって特定される、組換えHBcキメラ分子の部分の部分を指すために用いられる。少なくともキメラドメインI、IIおよびIIIのポリペプチド部分は、天然に存在するHBcAgの対応する配列と類似の三次構造で存在すると考えられる。

20

本明細書で用いられる“ 融合タンパク質 ” という用語は、ペプチド結合によってそれらの対応するカルボキシ末端およびアミノ末端のアミノ酸残基間で機能的に末端対末端（頭部対尾部）結合された、自然界では通常は一緒に結合した状態で見出されない少なくとも2つのアミノ酸残基配列を含むポリペプチドを指す。本発明の融合ペプチドは、アミノ酸残基配列中の融合タンパク質のポリペプチドと一致する前記ポリペプチドと免疫反応する抗体の産生を誘発するHBcキメラ分子である。

本明細書で用いられる“ 肝炎B ” という語句は、上記で考察されたようにそのもっとも広い意味で哺乳類のヘパドナウイルス科の任意のメンバーを指す。

30

“ ポリペプチド ” および“ ペプチド ” という語は本明細書では互換的に用いられ、隣接するアミノ酸の -アミノ基とカルボキシ基との間でペプチド結合によって一方が他方に連結された一連の直鎖状アミノ酸残基を指す。ポリペプチドは種々の長さを有することができ、それらの天然の形態（荷電をもたない）でも、塩の形態でもよい。アミノ酸残基配列は酸性基および塩基性基を含むこと、および、ペプチドが示す個々のイオン化状態は、前記ペプチドが溶液の場合は周囲の媒体のpH値に、または前記ペプチドが固体の場合は前記ペプチドが得られた媒体のpH値に左右されることは当業者にはよく理解されている。したがって、“ ポリペプチド ” またはそれに匹敵する用語には、関連する適切なアミノ酸残基配列が含まれる。ペプチドまたはポリペプチドは、本明細書では常に左から右に、アミノ末端（N-末端）からカルボキシ末端（C-末端）の方向で示される。

40

【 0 0 1 8 】

“ 残基 ” という用語は、アミノ酸残基という語句と互換的に用いられる。本明細書で特定される全てのアミノ酸残基は天然型またはL型立体配置である。標準的なポリペプチドの命名法にしたがって（J. Biol. Chem. 243:3557-59 (1969)）、アミノ酸残基の略語は以下の対応表に示されているとおりである。

対応表		
一文字	三文字	アミノ酸
Y	Tyr	L-チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	L-フェニルアラニン
M	Met	L-メチオニン
A	Ala	L-アラニン
S	Ser	L-セリン
I	Ile	L-セリン
L	Leu	L-ロイシン
T	Thr	L-スレオニン
V	Val	L-バリン
P	Pro	L-プロリン
K	Lys	L-リジン
H	His	L-ヒスチジン
Q	Gln	L-グルタミン
E	Glu	L-グルタミン酸
Z	Glx	L-グルタミン酸又はL-グルタミン
W	Trp	L-トリプトファン
R	Arg	L-アルギニン
D	Asp	L-アスパラギン酸
N	Asn	L-アスパラギン
B	Asx	L-アスパラギン酸又はL-アスパラギン
C	Cys	L-システイン

10

20

【 0 0 1 9 】

発明の詳細な説明

本発明は、インフルエンザAウイルスに対する免疫原及び前記を含むワクチン又は接種物を目的とする。目的とされる免疫原は、組換えB型肝炎ウイルスコア（HBc）タンパク質キメラ分子で構成される（comprised of）粒子である。前記分子は、約150から約375、好ましくは約150から235アミノ酸残基の長さを有し、ドメインI、II、III及びIVと称される、4つのペプチド結合アミノ酸残基配列をN-末端から含んでいる。1つから3つのシステイン残基がキメラのN-末端又はN-末端近傍に存在し、さらに、以下で規定される、配列番号:9のインフルエンザA M2細胞外ドメイン（又はM2e）（例えば配列番号:10の配列）の6から約24残基を含む2つから4つのポリペプチドが、キメラ分子とペプチド結合（融合）して存在する。

30

ヒト、トリ及びブタインフルエンザAウイルスのM2e配列は非常に類似するということは注目されるべきである。したがって、ヒト及びトリのウイルスの残基1 - 9は同一であり、ヒト及びブタの残基1 - 7及び9 - 10も同様である。3つのウイルスは全て2つのシステインの位置を共有し（17及び19）、22 - 24位に同一の残基を有する。他の位置がM2eの他の位置で異なる残基を含んでいたとしても、ヒト配列の残基は別個の単離株に存在することが判明し、その結果ヒト配列は3つのウイルス全てに対してコンセンサス配列を示す。

40

【 0 0 2 0 】

意図される免疫原性キメラ粒子では、（a）ドメインIは約75から約160アミノ酸残基を含み、その配列は、少なくともHBcの4位から約75位までの残基配列を含む。1つから3つのシステイン残基がまた、配列番号:1のHBcのN-末端に対して約1から-55、好ましくは約-30、より好ましくは約-20のキメラ分子内の位置に存在する（N-末端システイン残基）。前記N-末端システイン残基は、HBcのプレコア配列以外の配列内に存在する。

ドメインIのシステイン残基はまた、場合によって（しかしながら好ましくは）（i）HB

50

c配列のN-末端にペプチド結合されてあるか、又は前記N-末端の約15残基内でペプチド結合されてある、上記のインフルエンザA M2ポリペプチドの6から24残基、例えば配列番号:9の $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$ 、又は好ましくは例えば配列番号:10の $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ -TPIRNE- $X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$ の2つから4つの配列内に存在することができ、(ii) HBc残基1-4の1つ又は2つ以上にも同様に存在することができる。

そのような、インフルエンザA M2ポリペプチドにおいては、

残基 X_1 から X_8 は存在しないか又は存在し、存在するときは、前記はM2eタンパク質配列に天然に存在する残基であり、それぞれメチオニン、セリン、ロイシン、ロイシン、スレオニン又はプロリン、グルタミン酸、バリン及び、グルタミン酸又はアスパラギン酸であるが、ただし下付き文字をもつ1つのX残基が存在するときは、より大きな8までの下付き文字をもつ残りの一切のXもまた存在するということを条件とし；

X_{10} は存在し、プロリン、ロイシン又はヒスチジンであり；

X_{11} は存在し、イソロイシン又はスレオニンであり；

X_{12} は存在し、アルギニン又はリジンであり；

X_{13} は存在し、アスパラギン又はセリンであり；

X_{14} は存在し、グルタミン酸又はグリシンであり；

残基 X_{15} 及び X_{16} は存在するか又は存在せず、存在するときは、それぞれトリプトファン及びグリシン又はグルタミン酸であり；

残基 X_{17} 及び X_{19} は存在するか又は存在せず、存在するときは、それぞれ別個にシステイン、セリン又はアラニンであり；

残基 X_{18} は存在するか又は存在せず、存在するときは、アルギニン又はリジンであり；さらに、

残基 X_{20} から X_{24} は存在するか又は存在せず、存在するときは、M2タンパク質配列に天然に存在する残基であり、それぞれアスパラギン、グリシン又はセリン、アスパラギン酸又はグリシン、セリン、セリン及びアスパラギン酸であるが、ただし下付き文字をもつ1つのX残基が存在するときは、より小さな15までの下付き文字をもつ残りの一切のXもまた存在することを条件とする。

【0021】

(b) ドメインIIは、約残基75にペプチド結合した、約0から約60アミノ酸残基を含む。この配列は、(i) HBc76位から85位の配列の0から10個の全ての残基であって以下の(ii)にペプチド結合されたもの、(ii) 上記の配列番号:9のインフルエンザA M2ポリペプチドの6から約24残基の1つ又は2つ以上のリピートを構成する約6から約48残基の随意配列を含む。

(c) ドメインIIIは、約残基85とペプチド結合した約86位から約135位のHBc配列である。

(d) ドメインIVは、(i) ドメインIIIの135位の残基とペプチド結合した、136位から140位の残基 + HBcアミノ酸残基配列の141位から156位の16残基まで、(ii) 0から3つのシステイン残基、(iii) 互いに隣接する4つ未満のアルギニン又はリジン残基又はそれらの混合物、及び(iv) HBcの156位からC-末端に対して異種の配列内にある約100までのアミノ酸残基を含む。したがって、ドメインIVは、少なくとも136 - 140位の5残基を含む。

意図されるキメラ分子は、(i) HBc配列において約10%までの保存的に置換されたアミノ酸残基を含み、(ii) 自己会合して宿主細胞内での発現時に核酸と実質的に結合しない粒子を形成し、さらに前記粒子は、前記N-末端システイン残基を欠くがその他の点では同一であるHBcキメラから形成される粒子、又はキメラ分子内に存在するN-末端システイン残基が別の残基によって置き換えられている粒子よりも形成時により安定である。

好ましいキメラ分子は、図1及び配列番号:1に示されているように、HBcのN-末端に対して約-50位から約+1位の位置に存在するシステイン残基を含む。マイナスのアミノ酸位という概念は、リーダー配列(例えばHBcのプレコア配列)と通常密接に関係している。前記概念は本明細書でも同様に用いられている。すなわち、あるキメラ分子の配列を配列番

10

20

30

40

50

号:1の配列とアラインメントを実施して、HBcの+1位の開始メチオニン残基の位置に対応するキメラの位置を決定することができる。アミノ酸残基配列が通常のように左から右に、及びN-末端からC-末端の方向で示されるかぎり、HBcの開始メチオニンによって占有される位置の左側にアラインメントされたキメラ分子残基はいずれもマイナスの位置を有する。意図されるシステイン残基は、HBcの開始メチオニンの位置と一致する位置に、前記HBcのアラインメントされた開始メチオニンの左側へ約20残基の位置に存在することができる。

【0022】

意図されるHBcキメラの長さの測定では、そのような組換えタンパク質は約150から約325アミノ酸残基の長さを有することができる。好ましくは、その長さは、約150から約235残基である。より好ましくは、長さは約170から約215残基である。これらの長さの相違は、ドメインI、II及びIVの長さの相違から生じ、特に、存在するM2ポリペプチドの数及びHBcにとって異種のC-末端配列の有無から生じる。

最初の3つのアミノ末端(N-末端)残基より大きい欠失を含むドメインIをもつHBcキメラは、大腸菌細胞でHBcキメラタンパク質の完全な消失をもたらすと報告された(Pumpens et al. (1995) Intervirology, 38:63-74)。他方で、インフルエンザM2タンパク質由来の免疫原性23量体のポリペプチドをHBcのN-末端配列と融合させた最近の実験では、生成された融合タンパク質は、天然のHBc配列の残基1-4が置き換えられたときに粒子を形成することが報告された(Neiryneck et al. (October, 1999) Nature Med., 5(10):1157-1163; 及び特許出願W09907839)。したがって、粒子は、付加アミノ酸配列がHBcの残基1-5の1つにペプチド結合されて存在するとき粒子が形成され、一方、付加配列が存在せず、かつ残基1-3より多くがHBcのN-末端から欠失するときは、粒子は形成されないことが従来技術によって示されている。

HBcの最初の5つのN-末端残基の1つとペプチド結合したN-末端配列は、HBcとは異種である約40までの残基の配列を含むことができる。すなわちプレコア配列の一部は意図されるキメラ分子に存在することができる。例示的配列は、インフルエンザAのB細胞又はT細胞エピトープ(例えば以下で考察されるもの)、また別の(異種の)タンパク質(例えば-ガラクトシダーゼ)の配列(前記は使用される発現系の結果として融合タンパク質を生じえる)を含むことができる。

【0023】

ドメインIは、好ましくはHBcの2位、3位又は4位から75位の残基配列を有する。ドメインIはまた、1つから3つ、好ましくは1つの付加システイン残基を含み、さらにまた好ましくは、下記で考察されるように、アミノ末端にペプチド結合されたインフルエンザA M2eタンパク質の細胞外領域の配列の約6から約24残基の2つから4つの配列を含む。ドメインIは、したがって典型的には、少なくともHBcの1位のメチオニン残基の欠失を含み、さらにHBc2、3及び4位の残基の欠失を含むことができる。

前記1つから3つのシステイン残基は、配列番号:1のHBcのN-末端に対して約1から-55、好ましくは-30、より好ましくは約-20のキメラ分子内の位置に存在する(N-末端システイン残基)。したがって、参照点として配列番号:1の配列を用いれば、前記N-末端システイン残基は、配列番号:1のメチオニンと一致する位置でキメラ分子内に存在するか、又は前記位置から上流に約50残基までの位置に存在する。もっとも好ましくは、N-末端システインは、配列番号:1の1位に対して約1から約-14の位置に存在する。

1つ又は2つ以上のN-末端システイン残基は、HBcのプレコア配列の配列以外の配列内に存在する。以前に記載したように、HBeAg分子は、システイン残基を含むプレコア配列を含む。前記分子は粒子を形成せず、一方、本明細書では粒子が所望される。したがって、N-末端システイン残基はプレコア配列と隣接することができるが、そのような残基はプレコア配列又は意図されるキメラ分子内には存在しない。

ドメインIは約160残基の長さを有することができる。好ましくは、ドメインIは約95から約145アミノ酸残基の長さを有し、2から4つの、好ましくは3つの配列番号:9のインフルエンザA M2ポリペプチドエピトープ配列(例えば配列番号:10の配列)を含み、前記は好

10

20

30

40

50

ましくは配列番号:9のM2ポリペプチドのC-末端19残基を含む。

【0024】

最近の研究は、最初のグルタミン酸残基（上記配列のX₅とX₆の間）から上流のN-末端残基は、これまで未知であった1つ又は2つ以上のプロテアーゼ（セリンプロテアーゼ（その活性はフェニルメタンスルホニルフルオリド（PMSF）によって阻害することができる）又はメタロプロテアーゼ（その活性はエチレンジアミン四酢酸（EDTA）によって阻害することができる）を含むと考えられる）によって、調製時及び発現時に切断されるか、又は切断することができることが示された。したがって、いくつかの好ましい実施態様は、1つ又は2つ以上の19量体又はより短いM2配列を利用し、そのN-末端残基は配列番号:9のX₆のグルタミン酸である。

10

より好ましくは、前記プロテアーゼの活性は、キメラ粒子の緩衝溶液を約50 から約70 に約1.5から約3時間加熱することによって最小限にし、おそらくは排除することができる。プロテアーゼの作用はまた、プロテアーゼ阻害量のEDTA（例えば約1 - 10mM）又は同様なシーケストラントを含む水性組成物中で粒子を維持することによって最小限するか又は排除することができる。他の有用なメタロプロテアーゼ阻害性シーケストラント（キレート剤）の例示的なグループには、2,2'-ビピリジル、ジメルカプトプロパノール、エチレングリコール-ビス-(2-アミノエチル)-N,N,N',N''-四酢酸（EGTA）、ニトリロ三酢酸（NTA）、オルト-フェナントロリン、サリチル酸、トリエタノールアミン（TEA）、ペスタチン及びホスホロアミドンが含まれる。前記シーケストラント及びプロテアーゼは、その他の点では精製されている粒子をサイズ排除カラム又は同様なカラムを通過させ、その後透析又は類似の処理を実施することによって、前記組成物から除去することができる。前記プロテアーゼはまた、キメラ粒子のシーケストラント含有水性組成物の同様な加熱によって処理することもできる。

20

【0025】

2つ又は3つのM2e配列が一緒にペプチド結合し、それによって連続的に結合している場合は、天然のM2配列の17位及び19位の一方又は両方に存在するシステイン残基は存在しなくてもよく、意図されるN-末端のシステイン残基は付加されたM2配列とHBc配列のN-末端との間に存在することができる。好ましくは、意図されるN-末端システインは、天然の配列の17位及び19位の一方又は両方のM2配列の1つ又は2つ以上に存在する。システインは、2つ又は3つのM2配列の各々に、N-末端のM2配列に（約-52位又は-54位に）、3つの配列の中央の配列に（約-30位又は-32位に）、又はHBc配列と結合した配列内に（約-6位又は-8位に）存在することができる。2つ又は3つのM2配列が存在するときは、1つ又は2つのシステイン、好ましくは2つのシステインがHBc配列とペプチド結合したM2配列（すなわち、HBcと直接結合しているM2配列又は前記分子のN-末端から遠位にあるM2配列）に存在するのが好ましい。

30

ドメインII（約残基75とペプチド結合している）は、約0から約60のアミノ酸残基を含む。このドメインは、HBc配列残基の約76位から約85位の0（存在しない）から好ましくは少なくとも4残基、より好ましくは少なくとも8つから10個全てを含む。ドメインIIはまた、場合によって、前述の配列番号:9のインフルエンザA M2ポリペプチドの1つ又は2つ以上のリピートを構成する約6から約48残基の配列を含む。前記インフルエンザA M2ポリペプチド配列は、前記が存在するときは、好ましくはHBc残基78及び79の間でペプチド結合し、さらに76位から85位のHBc配列の全てが存在する。

40

意図されるキメラ配列のドメインI又はII又はその両方に挿入される好ましいインフルエンザA M2配列は、下記の表Aに列挙されている。メチオニン残基（M）で始まる配列が、ドメインIのN-末端に挿入されるN-末端配列のために設計され、一方、N-末端のM残基を含まない配列はドメインIIへの挿入のために設計される。

【0026】

表A: インフルエンザA M2タンパク質B細胞エピトープ

配列	配列番号
SLLTEVETPIRNEWGCRNGSSD	11

50

SLLTEVETPIRNEWGCRCDSSD	12	
SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD	13	
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD	14	
SLLTEVETPIRNEWGSRCDSSD	15	
SLLTEVETPIRNEWGCRSDSSD	16	
SLLTEVETPIRNEWGCRANDSSD	17	
SLLTEVETPIRNEWGARCNDSSD	18	
MSLLTEVETPIRNEWGCRCDSSD	19	
MSLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD	20	
MGISLLTEVETPIRNEWGCRCD -		10
SSDELLGWLWG I	21	
MSLLTEVETPIRNEWGARANDSSD	22	
MSLLTEVETPIRNEWGCRANDSSD	23	
MSLLTEVETPIRNEWGARCNDSSD	24	
MSLLTEVETPIRNEWGCRSDSSD	25	
MSLLTEVETPIRNEWGSRCDSSD	26	
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGSRSDSSD	27	
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		20
TEVETPIRNEWGCRCDSSD	28	
SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGCRCDSSD	29	
SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGARANDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGCRCDSSD	30	
EVETPIRNEWGSRCDSSD	31	
EVETPIRNEWGSRCDSSDEVET -		
PIRNEWGSRCDSSD	32	
EVETPIRNEWGSRCDSSDEVET -		30
PIRNEWGSRCDSSDEVET -		
TPIRNEWGCRCDSSD	33	
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGCRCDSSD	130	
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		
TEVETPIRNEWGSRSDSSD SLL -		40
TEVETPIRNEWGCRCDSSD	131	
$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ TPIRNE $X_{15} X_{16} X_{17}$ -		
$X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$	10	
$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ TPIRNE $X_{15} X_{16} X_{17}$ -		
$X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24} X_2$ -		
$X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ TPIRNE $X_{15} X_{16}$ -		
$X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$	34	
$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ TPIRNE $X_{15} X_{16} X_{17}$ -		
$X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24} X_2$ -		
$X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ TPIRNE $X_{15} X_{16} X_{17}$ -		50

$X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_2 -$	
$X_3X_4X_5X_6X_7X_8TPIRNEX_{15}X_{16}X_{17} -$	
$X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$	35
$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$	9
$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_2 -$	
$X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$	36
$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	10
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_2 -$	
$X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_2 -$	
$X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$	37
$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_2 -$	
$X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_2 -$	
$X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	20
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_2 -$	
$X_3X_4X_5X_6X_7X_8TX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15} -$	
$X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$	132
SLLTEVETPTRNEWGCRCDSSD	134
SLLTEVETPTRNGWGCRCDSSD	135
SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD	136
SLLTEVETPTKNEWECRCNDSSD	137
SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD	138
SLLTEVDLTRNGWGCRCDSSD	139
SLLTEVETLTRNGWECKCRDSSD	140
インフルエンザBタンパク質	
NNATFNVTNVNPISHIR	38

【 0 0 2 7 】

配列番号 :9のポリペプチドでは、

残基 X_1 から X_8 は存在しないか又は存在し、存在するときは、前記残基はM2タンパク質配列に天然に存在する残基であり、それぞれメチオニン、セリン、ロイシン、ロイシン、スレオニン又はプロリン、グルタミン酸、バリン、及びグルタミン酸又はアスパラギン酸であるが、ただし下付き文字をもつ1つのX残基が存在するときは、より大きな8までの下付き文字をもつ残りの一切のXもまた存在するという条件とし；

X_{10} は存在し、プロリン、ロイシン又はヒスチジンであり；

X_{11} は存在し、イソロイシン又はスレオニンであり；

X_{12} は存在し、アルギニン又はリジンであり；

X_{13} は存在し、アスパラギン又はセリンであり；

X_{14} は存在し、グルタミン酸又はグリシンであり；

残基 X_{15} 及び X_{16} は存在するか又は存在せず、存在するときは、それぞれトリプトファン及び、グリシン又はグルタミン酸であり；

残基 X_{17} 及び X_{19} は存在するか又は存在せず、存在するときは、それぞれ別個にシステイン、セリン又はアラニンであり；

残基 X_{18} は存在するか又は存在せず、存在するときは、アルギニン又はリジンであり；さらに、

40

50

残基 X_{20} から X_{24} は存在するか又は存在せず、存在するときは、M2タンパク質配列に天然に存在する残基であり、それぞれアスパラギン、グリシン又はセリン、アスパラギン酸又はグリシン、セリン、セリン及びアスパラギン酸であるが、ただし下付き文字をもつ1つのX残基が存在するときは、より小さな15までの下付き文字をもつ残りの一切のXもまた存在することを条件とする。

【0028】

配列番号:10の類似のポリペプチドでは、残基 X_1 から X_8 は存在しないか又は存在し、存在するときは、M2タンパク質配列に天然に存在する残基であり、すなわち、それぞれメチオニン、セリン、ロイシン、ロイシン、スレオニン、グルタミン酸又はアスパラギン酸、バリン、及びグルタミン酸であるが、ただし下付き文字をもつ1つのX残基が存在するときは、より大きな8までの下付き文字をもつ残りの一切のXもまた存在するということを条件とする。したがって、 X_1 が存在するときは、 X_2 から X_8 の各々もまた存在する。同様に、 X_3 が存在するときは、 X_4 から X_8 の各々もまた存在し、以下同様である。他方、 X_8 はより小さな値の下付き文字をもつ残りの他のX残基が存在しなくても存在することができる。残基 X_{15} 及び X_{16} は存在するか又は存在せず、存在するときは、それぞれトリプトファン、及びグリシン又はグルタミン酸である。残基 X_{17} 及び X_{19} は存在するか又は存在せず、存在するときは、それぞれ別個にシステイン、セリン又はアラニンである。 X_{17} 及び X_{19} の少なくとも1つは、特にキメラ分子のN-末端にM2ポリペプチドエピトープが存在するときはシステインであることが好ましい。より好ましくは、複数のM2e配列が存在するときは、2つのシステインが存在し、これら2つのシステインは、HBc配列部分のN-末端残基にもっとも近いM2配列内に存在する。残基 X_{18} は存在するか又は存在せず、存在するときは、アルギニン又はリジンである。残基 X_{20} から X_{24} は存在するか又は存在せず、存在するときは、M2タンパク質配列に天然に存在する残基であり、すなわち、それぞれアスパラギン、グリシン又はセリン、アスパラギン酸又はグリシン、セリン、セリン及びアスパラギン酸であるが、ただし下付き文字をもつ1つのX残基が存在するときは、より小さな15までの下付き文字をもつ残りの一切のX残基もまた存在することを条件とする。したがって、 X_{23} が存在するときは、残基 X_{15} から X_{22} までの各々が存在する。

【0029】

ドメインIIIは、そのN-末端で約残基85とペプチド結合しているHBcの約86位から135位の配列を含む。

第四のドメイン、ドメインIVは、(i)ドメインIIIの約135位の残基とペプチド結合した、136位から140位の残基+HBcアミノ酸残基配列の141位から156位の16残基まで、及び好ましくは149位までの9残基まで、(ii)0から3つのシステイン残基、及び好ましくは1つのシステイン残基、(iii)互いに隣接する4つ未満のアルギニン又はリジン残基又はそれらの混合物、及び(iv)HBcの164位から、好ましくは156位からC-末端に対して異種の配列内にある約100までのアミノ酸残基、好ましくは50までのアミノ酸残基、より好ましくは約25残基までを含む。

ドメインIVは、残基135とペプチド結合した136位から149位のHBc配列の14残基まで(すなわち149位まで連続することができる、136位の残基で始まるHBc配列)を含むことが好ましい。したがって、148位の残基が存在するならば、136位から147位の残基配列が存在し、又は残基141が存在するならば、136位から140位の残基配列が存在する。

ドメインIVはまた0から3つのシステイン残基を含むことができ、これらのシステイン残基は、キメラ分子のカルボキシ末端(C-末端)の約30残基内に存在する。好ましくは1つのシステイン(Cys)残基が存在し、前記Cysは、インフルエンザT細胞エピトープがドメインIVの部分として存在するかぎり、好ましくはカルボキシ末端(C-末端)残基として存在する。そのようなT細胞エピトープが存在するときは、好ましいCysは、好ましくはHBcキメラのC-末端の最後の5残基内に存在する。

【0030】

上記考察のN-末端システイン残基の存在は、予期せぬキメラ分子の安定的免疫原性粒子形成能の強化を提供する(以下で考察される)。したがって、意図されるHBcキメラ免疫

10

20

30

40

50

原は、分析用サイズ排除クロマトグラフィーによって測定したとき、採集時及び初期精製時に結合したままの粒子を形成し易い（その詳細は下記で考察される）。

意図される粒子はまた、前記システイン残基を欠く同様なキメラ粒子よりもエージング後の37℃での分解に対してより安定であることができる。後者の強化安定性タイプは、サンプル緩衝液（還元性）に分散させた粒子を用い、15%SDS-PAGEゲルにより測定することができる。ゲルをクーマシーブルーで染色し、続いて分析した。このタイプの安定性は加水分解に対抗して示されると考えられ、一方サイズ排除クロマトグラフィーによって決定される安定性は初期の粒子形成の安定性である。

1つ又は2つ以上のC-末端システイン残基を付加的に含む粒子は、精製時及びエージング時の分解に対してもまた安定性強化を示し、N-末端及びC-末端の両システインを含むいくつかの粒子は、通常N-末端又はC-末端のどちらかにのみ付加システインを有する粒子よりも強い安定性をいずれの手段でも示した。

ドメインIVは、互いに隣接して4つ未満のアルギニン又はリジン残基又はそれらの混合物を含む。アルギニン及びリジンは、156位から天然分子のC-末端に広がるHBcのC-末端領域に存在する。前記領域は時に前記分子の“プロタミン”又は“アルギニン富裕”領域と称され、核酸と結合する。意図されるHBcキメラ分子及び粒子は実質的に核酸と結合しない。

【0031】

核酸結合を実質的に含まないということは、280nm及び260nmの両方で測定した水溶液中の粒子の吸収を比較することによって（すなわち280/260吸収比）容易に決定することができる。意図される粒子は核酸と実質的に結合せず、前記核酸は、前記タンパク質を発現させるために用いられる細胞に本来存在するオリゴマー及び/又はポリマーDNA及びRNA種である。そのような核酸は260nmで吸収を示し、さら280nmでは比較的弱い吸収を示すが、一方タンパク質（例えば目的のキメラ）は比較的弱い吸収を260nmで示し、より強い吸収を280nmで有する。

したがって、残基150 - 183（又は150 - 185）にアルギニン富裕配列を含む、組換え発現HBc粒子又はキメラHBc粒子は、約0.8の280nm吸収対260nm吸収比（280：260吸収比）を示し、一方、天然に存在するHBcのアルギニン富裕核酸結合領域を含まない粒子（例えば4残基未満のアルギニン又はリジン又はその混合物を互いに隣接して含む粒子、又は約HBc残基140位から149位で終わる天然又はキメラ配列を含む粒子）は、約1.2から約1.6の280：260吸収比を示す。

本発明のキメラHBc粒子は、実質的に核酸と結合せず、約1.2から約1.7、より典型的には約1.4から約1.6の280：260吸収比を示す。この変動幅は、大きくは、与えられるキメラHBc粒子のドメインII及びIVに存在する芳香族アミノ酸の数によるものである。前記の幅はまた、部分的には目的のキメラのドメインIVのCysの存在によるものであり、Cysの存在は、現時点では不明の理由により観察される比を約0.1減少させることができる。

【0032】

意図されるキメラHBc粒子は、ペプチド結合した同じドメインII、III及びIV配列を含み、1つから3つのシステイン残基（N-末端システイン残基）が存在しないか、又はただ1つの存在するN-末端残基が別の残基（例えばアラニン残基）で置き換えられていて、その他の点では同じドメインIを含むHBcキメラから形成された粒子よりも、37℃の水性緩衝液中で約2週間から約1ヶ月にわたってより安定である。

したがって、例えば、2つのシステイン残基を含むドメインIにインフルエンザA M2ポリペプチドを含む粒子（例えばICC-1590粒子）は、そのN-末端のM2変種配列がシステインの代わりにセリン残基を含むキメラ分子から会合形成されたその他の点では同一の粒子（例えばICC-1603粒子）よりも安定である。同様に、上記のセリン含有インフルエンザB細胞エピトープをドメインIに、さらにただ1つのシステインをC-末端に含む粒子（ICC-1605粒子）は、システインが存在せずその他の点では同一の粒子よりも安定であるが、2つのN-末端システインを含む粒子（ICC-1590粒子）又はN-末端とC-末端システインの両方を含む粒子（ICC-1604）より不安定である。

10

20

30

40

50

粒子及びそれらを構成するキメラ分子は、接頭辞“ ICC- ”又は“ CV- ”とそれに続く4つの数字によって、又は接頭辞無しに単に4つの数字によって相互に参照されることに留意されたい。したがって、上記のICC-1590粒子はまた、CV-1590粒子又は単に1590粒子と称される。それぞれの名称は同じ意味を有している。

【 0 0 3 3 】

N-末端システイン残基を含む目的の粒子はまた典型的には、N-末端システインを欠くキメラ分子から会合形成された粒子よりも高い収量で製造される。

HBcによってもたらされるT細胞支援は、ワクチン免疫に続く“ 運搬されてきた ”免疫原性配列に対する抗体応答（すなわちB細胞仲介）の強化に大いに効果的であるが、HBcは、B細胞エピトープ含有配列がまたT細胞エピトープを含む限定的個体を除き、インフルエンザ特異的T細胞を活性化しない。B細胞に加えて、インフルエンザ特異的Tヘルパー細胞の普遍的プライミングを担保させるために、1つ又は2つ以上のインフルエンザ特異的Tヘルパーエピトープが好ましくは目的の免疫原に取り込まれ、前記免疫原のドメインIV内に配置される。

複数の上記T細胞エピトープ又は別のT細胞エピトープがドメインIVに存在することができ、又は別のB細胞エピトープが存在することができる。好ましい例では、ドメインIVはHBcにとって異種である配列内に約50までの残基を有する。より好ましくは、前記配列は約25までの残基であり、さらにT細胞エピトープを含む。

M2は感染細胞によって豊富に発現されるので、前記は、インフルエンザ特異的CTL活性のための標的として機能する潜在能力を有する。細胞外ドメインは、治療薬アマンタジンと類似の態様で、又は抗体依存細胞性細胞障害（ADCC）及び/又は補体依存細胞障害（CDC）の活性化を介して、抗体にとって可能な結合部位である（前記はM2の機能を固定するために作用することができる）。

【 0 0 3 4 】

実際、M2の細胞外ドメインは少なくとも2つの別個のヒトCTLエピトープを含むことが示された：1つは7 - 15に（Jameson et al. (1998) J. Virol. 72(11):8682-8689）、もう1つは3 - 11に含まれる（Gianfrani et al. (2000) Hum. Immunol. 61(5):438-352）。ADCC及び/又はCDCを介するインフルエンザ感染細胞の抗M2e仲介溶解は、CTLと比較して好ましい標的細胞溶解メカニズムであろう。なぜならば、それらはMHC拘束を受けないからである。したがって、必要なIgGサブクラスのプロフィル（及びM2e特異性）を示す十分な力価の抗M2抗体を惹起する能力は、多様な集団に対する広い防御を惹起するはずである。

M2の細胞外ドメインに対する抗体の生物学的作用を示す能力は、最初Zabedee及びLambによって報告された。彼らは、抗M2モノクローナル抗体、14C2はウイルスの増殖を培養で遅らせることを示した（Zabedee et al. (1988) J. Virol., 62(8):2762-2772）。1990年に、Treanorと共同研究者らは、同じモノクローナル抗体がインフルエンザAウイルスの複製をマウスで阻害することができることを示した（Treanor et al. (1990) J. Virol. 64(3):1375-1377）。Palladinoらは、14C2はin vivoではウイルス中和抗体ではないが、in vitroで感染細胞と結合してウイルス増殖を阻害するが、しかしながら感染を治癒させることはできなかつたと決定した（Palladino et al. (1995) J. Virol. 69(4):2075-2081）。後者の論文の著者らは、14C2はIgG1サブクラス抗体であり、IgG2a及びIgG2bが補体の固定にもっとも効果的であり、それらはまたNK細胞でFc RIIIIレセプターと結合するためにIgG1よりも優れていることを適切に記載した。実際、以下で示すように、マウスの高力価のIgG2a抗体は防御と相関性を示すようにみえる（前記抗体は典型的にはTh1免疫応答である）。ADCC及び/又はCDCを介し、インフルエンザ感染細胞の抗M2e仲介溶解を提供することができる免疫応答はしたがって好ましい応答である。

【 0 0 3 5 】

記憶性（anamnestic）抗M2応答は、HBc-M2粒子で以前に免疫したマウスの攻撃後に繰返し観察され、これはM2特異的T細胞をプライミングするM2e-HBc粒子の指標である。このことを解明するために、予備実験を実施し、免疫マウス由来のリンパ球がM2eペプチドによってin vitroでリコールされるか否かを調べた。インターフェロン- 分泌細胞数の有意

10

20

30

40

50

な増加が、M2由来のペプチド、HBc p85-100及び組換えHBcAgによるリコールに続いて観察されたが、HBc由来のp100-120では観察されなかった。HBcAgによるリコールがもっとも強かったが、このことは、HBcAgはBALB/Cマウスに対して多くの機能的T細胞エピトープを含む強力なT細胞免疫原であることから予想されたことである (Saito et al. (2001) Vaccine 20(1-2):125-133)。

全ての抗原によるリコールは、ICC-1569粒子に対しICC-1604粒子で免疫したマウスから単離したリンパ球についてより強力であるようであった。この結果は、ICC-1604粒子はICC-1569粒子と比較して優れたT細胞免疫原である可能性を示している。しかしながら、これらの実験でM2リコール抗原はM2e (2 - 24) (前記は17及び19にシステイン残基を含む) であり、したがってICC-1604粒子にとってのみ相同で、ICC-1569ではそうではないことを記載することは重要である (なぜならば後者は2つのシステイン残基の代わりにセリン残基を含んでいるからである)。

17位及び/又は19位のシステイン残基が1つ又は2つ以上のT細胞エピトープの成分であるとしたら、ICC-1604粒子免疫マウスよりも、ICC-1569粒子免疫マウスでM2eによる再刺激レベルが低いことは説明できよう。しかしながら、システイン残基含有T細胞エピトープの存在は、HBc由来抗原による再刺激レベルの低下を説明できない。

【 0 0 3 6 】

M2e-HBcで免疫したマウスのウイルス攻撃に続く、抗M2e力価に関する記憶性応答の観察は、M2eドメイン (2 - 24位) に少なくとも1つのTヘルパー細胞エピトープが存在することを示しているように思われる。

インフルエンザ核タンパク質 (NP206 - 229) に由来するエピトープ (前記はヒトで広範囲の反応性を示し (HLA-DR1、HLA-DR2、HLA-DRw13) (Brett et al. (1991) J. Immunol. 147(3):984-991)、さらにまたBALB/cマウスで機能的である) が、ここでのT細胞エピトープとして使用することが意図される。HBc粒子のC-末端に融合させたこのエピトープを含む粒子を発現させ精製した。付加的インフルエンザThエピトープもまた考慮した。例えばNP341-362、NP297-318及びNP182-205 (Brett et al. (1991) J. Immunol. 147(3):984-991) で、これらの配列は、最終的にM2e発現粒子のC-末端に一続きにして連結することができる。これらの例示的配列は下記に提供される。

NPの位置	配列	配列番号
206-229	FWRGENGRKTRSAYERMCNILKGK	39
341-362	LRVLSFIRGTKVSPRGKLSTRG	40
297-318	SLVGIDPFKLLQNSQVYSLIRP	41
182-205	AVKGVGTVMELIRMIKRGINDRN	42

【 0 0 3 7 】

典型的には、意図される組換えHBcキメラ分子は、自己会合粒子として免疫原又はワクチン中で用いられる。これらの粒子は180から240個のキメラ分子を含み、前記分子は、ジスルフィド還元剤 (例えば2-メルカプトエタノール) 及び変性剤 (例えばSDS) の存在下でタンパク質分子に分離する。個々の分子はタンパク質-タンパク質相互作用によって一緒に結合して粒子を形成し、これらの相互作用はジスルフィド結合の存在によって安定化される。これらの粒子は、HBV感染患者で観察される粒子と類似しているが、これらの粒子は非感染性である。種々の原核細胞及び真核細胞宿主での発現時に、個々の組換えHBcキメラ分子は宿主内で会合して、宿主細胞から容易に採集することができる粒子を形成する。

以前に考察したN-及びC-切端並びにインフルエンザM2ポリペプチドエピトープの挿入の他に、意図されるキメラ分子はまた、HBcドメインI、II、III及びIVを構成するアミノ酸残基内に保存的置換を含むことができる。保存的置換は上記に定義されたとおりである。

より稀には、“非保存的”変化、例えばグリシンのトリプトファンによる置換が意図される。同様な数少ない変動にはまたアミノ酸の欠失又は挿入、又はその両方が含まれる

。生物学的活性を失うことなくどのアミノ酸残基を置換し、挿入し又は欠失させることができるかを決定する手引きは、当業界で周知のコンピュータプログラム、例えばLASERGEN Eソフト (DNASTAR Inc. Madison, Wis.) を用いて見出すことができる。

【0038】

本発明のキメラ分子のHBc部分 (付加エピトープの配列以外または制限酵素の人工産物である異種残基以外の配列を有するHBc配列部分) は、もっとも好ましくは、存在するときは、図1 (配列番号:1) に示されているサブタイプ ayw の2位から149位のアミノ酸残基を有する。いくぶん劣るが、図1 (配列番号:2、3及び4) にまた示されているサブタイプ adw、adw1 及び adyw の対応するアミノ酸残基配列も好ましい。図1の最後の2つの配列 (配列番号:5及び6) であるウッドチャック及び地上性リスのアラインメントされた2位から149位の配列もまた好ましさは劣るがよい。別の箇所で述べたように、種々の哺乳動物のHBcタンパク質に由来する種々の配列の部分を単一のキメラ内で一緒に用いてもよい。

本発明のキメラ分子のHBc部分が、2位から156位又は149位の哺乳動物のHBc分子の配列以外の配列を有するとき、1つ又は2つ以上の保存的置換が施されてあるので、配列番号:1の2位から149位又は156位と比較してわずか10%、より好ましくはわずか5%、もっとも好ましくはわずか3%のアミノ酸残基が置換されているのが好ましい。149個のHBc残基の意図されるキメラはしたがって、配列番号:1の2位から149位の残基と異なる約15又は16残基まで、好ましくは約7又は8残基までを含むことができる。より好ましくは、約5残基までが、ayw 配列 (配列番号:1) の残基2位から149位と異なる。HBc配列がさらに一方の末端又は両端で切り縮められている場合は、置換される残基の数は比例して異なる。分子内のいずれかの箇所での欠失は計算のために保存的置換と考えられ、そこで、例えばドメインIが135位の代わりに133位でC-末端を有する場合、2つの残基 (134及び135) は計算のために存在するとみなされるであろう。

【0039】

キメラの製造

意図されるキメラ免疫原は、周知の組換えDNA技術を用いて製造される。したがって、HBVをコードする前駆体配列から特定のポリペプチド配列をコードする核酸配列が付加され欠失される。

典型的には、意図されるキメラ免疫原は、N-末端システインとしてM2配列に存在するシステイン残基を利用する。HBc分子をコードするポリヌクレオチドのin vitro変異導入によってそのようなキメラ分子を製造するためのプライマーは以下で考察される。システイン含有M2ポリペプチドエピトープがN-末端に存在しないときは、N-末端システインは、単にM2ポリペプチドのシステイン含有部分又は単純なN-末端開始配列 (例えばMet-Cys又はMet-Gly-Cys) をコードするプライマーを用いるin vitro変異導入によって提供することができる。

以前に記載したように、HBcイムノドミナントループは、完全なタンパク質のアミノ末端 (N-末端) から約75位から85位に存在すると通常記載されている。インフルエンザA M2 B細胞エピトープ含有配列は、ドメインIIのイムノドミナントループ配列内に配置させることができる。前記配置は、実質的にHBcの免疫原性及びHBcループ配列の抗原性を排除し、一方、会合キメラ粒子内の極めて免疫原性の強い位置でインフルエンザA M2 B細胞エピトープを提示する。

インフルエンザA M2 B細胞配列をループ配列の所望の位置 (例えば残基78と79の間) に配置するために、2つの周知の方法のうちの1つが特に有用である。第一の成功が難しい方法は、ループの一部をコードするDNAを切り出し、インフルエンザA M2 B細胞配列をコードするDNAと置き換える、置換と称される。第二の方法は、インフルエンザA M2 B細胞配列をループ内の隣接残基に挿入する、挿入と称される。

【0040】

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による位置特異的変異導入をある例示的置換アプローチで用いて、一対の異なる制限部位 (例えばEcoRI及びSacI) の各々をイムノドミナントループをコードするDNAの各末端でコードする、キメラHBc DNA配列を提供する。置換される

例示的残基は76から81である。ループコードセグメントを切り出し、適切なHBc配列残基が各側にフランキングしているインフルエンザA M2 B細胞エピトープのコード配列を前記制限部位に連結し、得られたDNAを用いてHBcキメラを発現させる。同様な技術の例示的使用については、例えばPumpensらの文献の表2を参照されたい(Pumpens et al. (1995) *Intervirology*, 38:63-74)。

また別には、ただ1つの制限部位又は2つの部位を前記領域内にコードし、DNAを制限酵素で切断して“粘着”末端又は“平滑”末端を提供し、適切な粘着末端又は平滑末端をもつ異種DNAセグメントを前記切断領域に連結する。このタイプのHBcへの配列置換の例は、Schodelらが報告した実験で見出すことができる(F. Brown et al. eds., *Vaccine* 91, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp.319-325, (1991); Schodel et al. *Behring Inst. Mitt.*, 1997(98):114-119; 及びSchodel et al. (1994) *J. Exp. Med.* 180(3):1037-4: 後者の2つの論文は、それぞれマラリア病原体、P.イエリ- (P. yoelii) 及びP.ベルゲイ (P. berghei) に対するワクチンの製造を考察している)。イムノドミナントループから正味の残基除去をもたらす置換手法は本明細書では通常用いられない。

10

20

30

40

50

【0041】

挿入が好ましい。挿入手法の説明的例示では、位置特異的変異導入を用いて、互いに隣接し、さらに隣接アミノ酸残基をコードするコドンの間(例えば残基78と79の間)に2つの制限部位を創出する。この技術によって、以前にはHBcループ内で隣接していた残基の間に4つのアミノ酸残基(各制限部位について2つのアミノ酸残基)をコードする12の塩基対が付加される。

制限酵素による切断、前記例示インフルエンザA M2配列をコードするDNAの連結、及び前記DNAのHBcキメラ形成へ発現に際して、HBcループアミノ酸配列は、そのN-末端側で5'制限部位によりコードされた2つの残基によって、続いてC-末端に向かってインフルエンザA M2 B細胞エピトープ配列によって、続いて3'制限部位によりコードされるさらに2つの異種非ループ残基によって中断され、それに続いて前記ループ配列の残りが認められる。この同じ手法はまた、好ましくはT細胞エピトープ又は1つ若しくは2つ以上のシステイン残基(前記はT細胞エピトープの一部ではない)のドメインIVへの挿入のために用いられる。残基82と83の間への挿入を用いる同様な手法が、Schoedelらの論文(F. Brown et al. eds., *Vaccine* 90, (1990) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp.193-198)で報告されている。

例えば、C-末端切端HBc配列(HBc149)をコードするDNA配列を操作して、隣接するEcoRI及びSacI部位を残基78と79の間に含むようにする。前記DNAを両酵素で切断して、EcoRI粘着末端を3'末端にもつHBcの1-78位をコードする1つのフラグメント、一方、5'-末端にSacIの粘着末端をもち79-149位の残基をコードする他方のフラグメントを提供する。5' AATTオーバーハングとそれに続く所望のインフルエンザA M2 B細胞エピトープをコードする配列及びAGCT3'オーバーハングを有する合成核酸の連結により、残基78と79の間で2つの異種残基(それぞれGI及びEL)が各側にフランキングしている前記B細胞エピトープをコードするHBcキメラ配列が提供され、一方EcoRI部位を破壊しSacI部位は温存する。

【0042】

同様な手法をC-末端システイン含有配列の挿入のために用いることができる。ここでは、EcoRI及びHindIII制限部位をアミノ酸残基149位の後ろのHBc DNA配列に操作して創出する。EcoRI及びHindIIIで消化した後、上記のAATT 5'オーバーハングとそれに続くT細胞エピトープコード配列、終止コドン及びAGCTオーバーハングを有する合成DNAを、前記消化配列に連結して、HBc残基1-149とそれに続く2つの異種残基(GI)、終止コドン及びHindIII部位をコードする配列を形成する。

SacI制限部位とそれに続く残基79位のHBc開始部をコードする配列を有するフォワードプライマーを用いるPCR増幅、その後のSacI及びHindIIIによる消化によって、HBcの79-149位+2つの付加残基及びC-末端にT細胞エピトープをコードする配列が提供された。前記構築物のSacIによる消化及び連結によって、そのN-末端から、HBcの1-78位の配列、2つ

の付加残基、B細胞エピトープを含むインフルエンザA M2配列、2つの付加残基、HBcの79 - 149位、2つの付加残基、及びT細胞エピトープを有する所望の組換えHBcキメラ免疫原をコードする完全な遺伝子が提供される。

特記されることは、B細胞又はT細胞エピトープを含む異種免疫原性配列のいずれかの側の（前記にフランクしている）2つの異種残基は便宜上使用されるということである。結果として、HBc配列の部分ではない0から3つ又は4つ以上の付加残基を挿入配列の片側又は両側に用いることができる。挿入物及びHBc核酸の一端又は両端は、適切なヌクレアーゼ（例えばS1ヌクレアーゼ）を用いて“平坦にならし”、一緒に結合させることができる平滑端を提供することができる。挿入されたB細胞又はT細胞エピトープの部分でもなくHBc配列の一部でもない付加された異種残基は、表示のドメインに存在する残基数には数えられない。

10

【0043】

さらにまた特記されることは、所望の組換えHBcキメラ核酸の全部又は一部分もまた、周知の合成方法を用いて合成することができるということである。前記合成方法は、ニコチアナ・タバクム（*Nicotiana tabacum*）の59残基のリブロースビスホスフェートカルボキシラーゼ-オキシゲナーゼシグナルペプチドをコードする177塩基対DNAの合成のために米国特許5,656,472で考察され例示されたようなものである。例えば、平滑端又は“粘着”端をもつドメインI及びIIを合成し、前記末端をドメインIII及びIVに連結して、B細胞エピトープのN-末端側に付加残基を含まず、さらにC-末端側又はドメインII/III結合部に、又は他のいずれかの所望の場所に0から3つの付加残基を含む目的のHBcキメラを発現する構築物を提供することができる。

20

以前に記載したHBcキメラ分子又は前記コード配列の相補物をコードする核酸配列（セグメント）もまた本発明で意図される。そのような核酸セグメントは、いくつかの好ましい実施態様では単離され精製された形態で存在する。

生きている生物では、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸残基配列は、前記タンパク質をコードする遺伝子のデオキシリボ核酸（DNA）に対する遺伝暗号を介して直接の関係を有する。したがって、遺伝暗号の周知の縮退を通して、同じキメラアミノ酸残基配列をコードするが、以前に考察した遺伝子配列とは十分に異なる、さらに別のDNA及び対応するRNA配列（核酸）（この2つの配列は高ストリンジェンシーではハイブリダイズしないが、中等度のストリンジェンシーではハイブリダイズする）を調製することができる。

30

【0044】

高ストリンジェンシー条件とは、 $6\times\text{SSC}$ で約50 - 55 の温度でのハイブリダイゼーション及び $1-3\times\text{SSC}$ で68 での最終洗浄を含むと定義される。中等度のストリンジェンシー条件は、0.2から0.3MのNaCl中で約50 から約65 の温度でのハイブリダイゼーションとそれに続く $0.2\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）中で約50 から約55 での洗浄を含む。

（1）そのもの自体がコードするか、又はその相補物がコードする核酸配列（DNA配列又はRNA配列）であって、残基1位から136位に由来する（前記が存在するとき）そのHBc部分が配列番号:1、2、3、4、5又は6の配列であるキメラ分子、及び（2）配列番号:43、44、45、46、47又は48のDNA配列と少なくとも中等度のストリンジェンシー（上記で考察）でハイブリダイズし、さらに（3）そのHBc配列が、配列番号:43、44、45、46、47又は48のDNA配列と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%、もっとも好ましくは100%の同一性を共有する、核酸分子はDNA変種配列と定義される。周知のように、核酸配列、例えば意図される核酸配列は、本明細書のまた別の場所で考察されるように、適切な発現系で適切なプロモーターに機能的に連結されたときに発現される。

40

目的のキメラ分子をコードする類似体又は類似核酸（DNA又はRNA）配列もまた本発明の部分として意図される。キメラ類似体核酸配列又はその相補性核酸配列は、配列番号:1、2、3、4、5及び6に示した残基1位から残基136位のHBc配列部分と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、もっとも好ましくは少なくとも95%同一であるHBcアミノ酸残基

50

配列をコードする。このDNA又はRNAは本明細書では、配列番号:43、44、45、46、47及び48の核酸配列の“類似体”、又は前記核酸配列と“類似する”と称され、配列番号:43、44、45、46、47及び48の核酸配列又はそれらの相補物と中等度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。類似の配列をコードする核酸はまた、適切なトランスフェクション及び発現に際して意図されるキメラを生成する。

【0045】

異なる宿主はしばしば特定のコドンに対する優先性を有し、特定のアミノ酸残基をコードするために用いられる。そのようなコドン優先性は周知であり、所望のキメラ配列をコードするDNA配列は例えばin vitro変異導入を用いて改変し、それによって前記酵素が発現されるべき特定の宿主で宿主の好むコドンを利用することができる。さらにまた、遺伝暗号の縮退を利用して、配列番号:43、44、45、46、47若しくは48のDNA又はそれらの相補物との実質的な同一性を回避した配列番号:1、2、3、4、5又は6の配列のHBc部分をコードすることができる。したがって、有用な類似DNA配列は、必ずしも配列番号:43、44、45、46、47若しくは48又は相補物と中等度のストリンジェンシーな条件下でハイブリダイズする必要はないが、なお目的のキメラ分子を提供することができる。

10

【0046】

HBc AYW DNA: 配列番号:43

atggacatcg	acccttataa	agaatttgga	gctactgtgg	agttactctc	gtttttgcct	60
tctgacttct	ttccttcagt	acgagatctt	ctagataccg	cctcagctct	gtatcgggaa	120
gccttagagt	ctcctgagca	ttgttcacct	caccatactg	cactcaggca	agcaattctt	180
tgctgggggg	aactaatgac	tctagctacc	tgggtgggtg	ttaatttgga	agatccagcg	240
tctagagacc	tagtagtcag	ttaatgtcaac	actaatatgg	gcctaaagt	caggcaactc	300
ttgtgggttc	acatttcttg	tctcactttt	ggaagagaaa	cagttataga	gtatttggtg	360
tctttcggag	tgtggattcg	cactcctcca	gcttatagac	caccaaagtc	ccctatccta	420
tcaacacttc	cggagactac	tgttggttaga	cgacgaggca	ggtcccctag	aagaagaact	480
ccctcgccct	gcagacgaag	gtctcaatcg	ccgcgtcgca	gaagatctca	atctcgggaa	540
tctcaatgt						

20

【0047】

HBc ADW DNA: 配列番号:44

atggacattg	acccttataa	agaatttgga	gctactgtgg	agttactctc	gtttttgcct	60
tctgacttct	ttccttccgt	acgagatctc	ctagacaccg	cctcagctct	gtatcgagaa	120
gccttagagt	ctcctgagca	ttgctcacct	caccatactg	cactcaggca	agccattctc	180
tgctgggggg	aattgatgac	tctagctacc	tgggtgggta	ataatttgca	agatccagca	240
tccagagatc	tagtagtcaa	ttaatgttaat	actaacatgg	gtttaaagat	caggcaacta	300
ttgtgggttc	atataatcttg	ccttactttt	ggaagagaga	ctgtacttga	atatttggtc	360
tctttcggag	tgtggattcg	cactcctcca	gcctatagac	caccaaagtc	ccctatctta	420
tcaacacttc	cggaaactac	tgttggttaga	cgacgggacc	gaggcaggtc	ccctagaaga	480
agaactccct	cgcctcgag	acgcagatct	caatcgccgc	gtcgcagaag	atctcaatct	540
cgggaaatctc	aatgt					

30

【0048】

HBc ADW2 DNA: 配列番号:45

atggacattg	acccttataa	agaatttgga	gctactgtgg	agttactctc	gtttttgcct	60
tctgacttct	ttccttccgt	cagagatctc	ctagacaccg	cctcagctct	gtatcgagaa	120
gccttagagt	ctcctgagca	ttgctcacct	caccatactg	cactcaggca	agccattctc	180
tgctgggggg	aattgatgac	tctagctacc	tgggtgggta	ataatttgga	agatccagca	240
tctagggatc	ttgtagttaa	ttaatgttaat	actaacgtgg	gtttaaagat	caggcaacta	300
ttgtgggttc	atataatcttg	ccttactttt	ggaagagaga	ctgtacttga	atatttggtc	360
tctttcggag	tgtggattcg	cactcctcca	gcctatagac	caccaaagtc	ccctatctta	420
tcaacacttc	cggaaactac	tgttggttaga	cgacgggacc	gaggcaggtc	ccctagaaga	480
agaactccct	cgcctcgag	acgcagatct	ccatcgccgc	gtcgcagaag	atctcaatct	540

40

50

cgggaaatctc aatgt

【 0 0 4 9 】

HBc ADYW DNA : 配列番号 : 46

atggacattg acccttataa agaatttggg gctactgtgg agttactctc gtttttgcct	60	
tctgacttct ttccttccgt acgagatctt ctagataccg ccgcagctct gtatcgggat	120	
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg cactcaggca agcaattctt	180	
tgctggggag acttaatgac tctagctacc tgggtgggta ctaattttaga agatccagca	240	
tctagggacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatgtgg gcctaaagt t cagacaatta	300	
ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cggttctaga gtatttgggtg	360	
tcttttggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaatgc ccctatccta	420	10
tcaacgcctc cggagactac tgttgttaga cgacgaggca ggtcccctag aagaagaact	480	
ccctcgcctc gcagacgaag atctcaatcg ccgcgtcgca gaagatctca atctcgggaa	540	
tctcaatgt		

【 0 0 5 0 】

ウッドチャックDNA : 配列番号 : 47

atggcctttgg ggcatggaca tagatcctta taaagaattt gggtcatctt atcagttgtt	60	
gaattttctt cctttggact tctttcctga tcttaatgct ttgggtggaca ctgctactgc	120	
cttgatgaa gaagaactaa caggtaggga acattgctct ccgcaccata cagctattag	180	
acaagcttta gtatgctggg atgaattaac taaattgata gcttggatga gctctaacat	240	
aacttctgaa caagtaagaa caatcattgt aaatcatgtc aatgatacct ggggacttaa	300	20
ggtgagacaa agtttatggt ttcatittgtc atgtctcact ttcggacaac atacagttca	360	
agaattttta gtaagttttg gagtatggat caggactcca gctccatata gacctcctaa	420	
tgcacccatt ctctcgactc ttccggaaca tacagtcatt aggagaagag gaggtgcaag	480	
agcttctagg tccccagaa gacgcactcc ctctcctcgc aggagaagat ctcaatcacc	540	
gcgtcgag		

【 0 0 5 1 】

地上性リスDNA

atgtatcttt ttcacctgtg ccttgttttt gcctgtgttc catgtcctac tgttcaagcc	60	
tccaagctgt gccttggatg gctttgggac atggacatag atccctataa agaatttgggt	120	
tcttcttatac agttgttgaa ttttcttcct ttggactttt ttcctgatct caatgcattg	180	30
gtggacactg ctgctgctct ttatgaagaa gaattaacag gtagggagca ttgttctcct	240	
catcatactg ctattagaca ggccttagtg tgttgggaag aattaactag attaattaca	300	
tggatgagtg aaaatacaac agaagaagtt agaagaatta ttgttgatca tgtcaataat	360	
acttgggggac ttaaagtaag acagacttta tggtttcatt tatcatgtct tacttttggg	420	
caacacacag ttcaagaatt ttgtggttagt ttggagtagt ggattagaac tccagctcct	480	
tatagaccac ctaatgcacc cattttatca actcttccgg aacatacagt cattaggaga	540	
agaggagggt caagagctgc taggtcccc cgaagacgca ctccctctcc tcgcaggaga	600	
aggcttcaat caccgcgtcg cagacgctct caatctccag cttccaactg c	651	

【 0 0 5 2 】

上記で考察したように目的のキメラをコードする遺伝子を規定する外因性核酸セグメント (例えばDNAセグメント又は配列) 及び前記遺伝子の発現を適合性宿主生物で駆動させるために適したプロモーターに機能的に連結されたベクターを含む、組換え核酸分子 (例えばDNA分子) もまた、本発明で意図される。より具体的には、キメラのHBc部分のための遺伝子、又は、配列番号: 43、44、45、46、47若しくは48のキメラ遺伝子と少なくとも90%の同一性を有し、さらに前記遺伝子と中等度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするDNA変種を規定するDNAセグメントと機能的に連結された、宿主生物細胞でキメラの発現を駆動させるためのプロモーターを含むベクターを含む組換えDNA分子もまた意図される。

さらにまた意図されるものは、配列番号: 1、2、3、4、5又は6の配列のHBc部分と少なくとも80%同一、より好ましくは90%同一、もっとも好ましくは95%同一のHBcキメラ部分のA

ミノ酸残基配列をコードする類似体核酸配列であるDNAセグメントに機能的に連結された、宿主生物の細胞でキメラの発現を駆動させるためのプロモーターを含むベクターを含む組換えDNA分子である。前記組換えDNA分子は、適切なトランスフェクション及び宿主細胞での発現に際して、目的のキメラ分子を提供する。

特記されることは、その30アミノ酸残基のために、地上性リスのHBcのN-末端配列は、他のHBc配列のいずれともアラインメントされず、前記配列及びそのコード配列並びにそれらの相補物は上記の同一性パーセンテージに含まれず、前記30残基配列又はその相補物をコードする核酸部分はハイブリダイゼーション測定に用いられなかったことである。同様に、そのHBcのN-末端及びC-末端のいずれか又は両端で切り縮められた配列も同一性の計算に含まれず、イムノドミナントループの残基が異種エピトープの挿入のために除去された配列も同様に含まれない。したがって、キメラ分子に存在するこれらHBcコード塩基又はHBc配列残基だけが、同一性パーセンテージの計算に含まれ、アラインメントされた核酸又はアミノ酸残基配列と比較される。

10

【0053】

本明細書で開示した遺伝子のコード配列が配列番号:43、44、45、46、47及び48に示されている限り、単離核酸セグメント、好ましくはDNA配列、変種及びその類似体（遺伝子のための開始ATGコドンで始まり、各遺伝子の終止コドンで又はその直ぐ下流で終わる）は、当業界で周知のようにin vitro変異導入によって調製することができる（前記は以下の文献で考察されている：Current Protocols In Molecular Biology, Ausabel et al. eds., John Wiley & Sons (New York: 1987) p. 8.1.1.-8.1.6）。したがって、所望の制限部位は、開始コドンで若しくは開始コドンの上流で、又は終止コドンで若しくは終止コドンの下流で操作され、その結果他の遺伝子の調製、切り出し、及び単離を可能にすることができる。

20

当業界で周知のように、必要な核酸（例示的にはDNA配列）が存在するかぎり（開始シグナル及び終止シグナルを含む）、付加される塩基対は通常はセグメントのいずれかの端に存在し、前記セグメントはなおタンパク質の発現に利用することができる。前記は、もちろん、発現を抑制したり、発現を所望される酵素を消費する更なる生成物を発現したり、前記所望酵素によって生成される目的の反応生成物を消費する生成物を発現したり、さもなければDNAセグメントの遺伝子の発現に干渉したりする機能的に連結されたDNA配列が前記セグメントに存在しないと仮定する。

30

したがって、DNAセグメントがそのような干渉的DNA配列を含まないかぎり、本発明のDNAセグメントは長さが約500から約15,000塩基対でありえる。複製と発現（所望される場合）のために必要な最小限のDNA配列の全てが存在するかぎり、組換えDNA分子（特に発現ベクター）の最大サイズは、一般に、便利さ及び宿主細胞によって収納されえるベクターのサイズによって決定される。最小限のベクターサイズは周知である。そのような長いDNAセグメントは好ましくないが、用いることはできる。

【0054】

以前に記載したキメラをコードするDNAセグメントは、化学的技術、例えばホスホトリエステル法（Matteucci et al. (1991) J. Am. Chem. Soc., 103:3185）によって合成することができる。もちろん、コード配列を化学的に合成することにより、任意の所望の改変は、天然のアミノ酸残基配列を適切な塩基で置換することによって簡単に実施することができる。しかしながら、以前に考察した配列を含むDNAセグメントが好ましい。

40

目的のHBcキメラは、多数の形質転換宿主系（典型的に宿主細胞）で製造（発現）することができるが、ただし無細胞、in vitro系での発現もまた意図される。これらの宿主細胞系には、組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換された微生物（例えば細菌）；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス；タバコモザイクウイルス）又は細菌発現ベクター（例えばTiプラスミド）で形質転換された植物細胞系；又は適切に形質転換された動物細胞系（例えばCHO又はCOS細胞）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。本発明は

50

、用いられる宿主細胞によって制限されない。

HBcキメラをコードする遺伝子を含むDNAセグメントは、好ましくは前記遺伝子を含む組換えDNA分子（プラスミドベクター）から入手される。キメラ遺伝子のHBcキメラタンパク質への発現を誘導することができるベクターは、本明細書では“発現ベクター”と称される。

【0055】

発現ベクターは、プロモーターを含む発現制御エレメントを含む。キメラコード遺伝子は発現ベクターに機能的に連結され、プロモーター配列が、RNAポリメラーゼ結合及びキメラコード遺伝子の発現を誘導するのを可能にする。ポリペプチドコード配列の発現で有用なものは、誘導性、ウイルス性、合成、構成性（Poszkowskiら（EMBO J. (1989) 3:271 10 9）及びOdehら（Nature (1985) 313:810）が記載したようなもの）プロモーターの他に、一過的調節性、空間的調節性、一過的空間的調節性プロモーター（Chuaら（Science (1989) 244:174-181）が提供したもの）である。

原核細胞（例えば大腸菌）で使用される好ましいプロモーターはRec 7プロモーターで、前記は外因的に供給されるナリジクス酸によって誘導することができる。より好ましいプロモーターは、プラスミドベクターJHEX25（Promegaから入手できる）に存在し、前記は外因的に供給されるイソプロピル-β-D-チオガラクト-ピラノシド（IPTG）によって誘導することができる。さらに好ましいプロモーター、tacプロモーターはプラスミドベクターpKK223-3に存在し、外因的に供給されるIPTGによってまた誘導することができる。pK 20 K223-3プラスミドは多数の大腸菌株（例えばXL-1、TB1、BL21及びBLR）から、約25から約100 μMのIPTGを誘導に用いて良好に発現させることができ、驚くべきことには、約25から約50 μMのIPTGの濃度が、2Lのシェーカーフラスコ及び発酵装置で最適結果を提供することが判明した。

【0056】

他の微生物（例えばサルモネラ（例えば腸チフス菌（*S. typhi*）、ネズミチフス菌（*S. typhimurium*）及びネズミチフス菌-大腸菌ハイブリッド）、酵母（例えばサッカロミセス・セレビシエ（*S. cerevisiae*）又はピキア・パストリス（*Pichia pastoris*））、哺乳動物細胞（例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）、単子葉及び双子葉の両植物細胞（一般的に及び特に双子葉植物の貯蔵器官、例えば根、種子又は果実が特に経口ワ 30 クチン又は接種物の場合に所望される）、昆虫細胞（例えばオートグラファ・カリフォルニカ（*Autographa californica*）核多角体病ウイルス（AcNPV）又はバキュロウイルスを使用する*S. フルギペルダ*（*Frugiperda*）細胞又はトリコプルシア（*Trichoplusia*））での目的のキメラ分子の発現は、前述の親出願の他に公開されたW002/14478 A2で詳細に考察されている。これらの発現態様は、したがって意図されているが本明細書ではこれ以上詳細には考察されない。

相補性粘着末端又は平滑端を介してDNAを機能的に結合させる多様な方法が開発された。例えば、相補的なホモポリマー索をDNAセグメントに付加し、ベクターDNAに挿入することができる。続いて前記ベクター及びDNAセグメントを相補的なホモポリマーテール間の水素結合によって結合させて組換えDNA分子を生成する。

また別には、1つ又は2つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーを用いて、以前に記載したように、DNAセグメントを発現ベクターと結合させることができる。 40 平滑端DNAセグメントを大過剰の合成リンカー分子と一緒に、平滑端DNA分子の連結を触媒することができる酵素（例えばバクテリオファージT4のDNAリガーゼ）の存在下で、インキュベートすることによって、合成リンカーを平滑端DNAセグメントに結合させる。

【0057】

したがって、反応生成物は、合成リンカー配列をその末端に含むDNAセグメントである。続いて、これらのDNAセグメントを適切な制限エンドヌクレアーゼで切断し、さらに発現ベクターに連結する（前記ベクターは予め合成リンカーの末端と適合できる末端を生じる酵素で切断されている）。種々の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは多数の供給元（New England Biolabs（Beverly, MA）を含む）から市販されている。所望の 50

DNAセグメントはまたPCR技術を用いて得ることができる。前記技術では、フォワード及びリバースプライマーは、遺伝子をベクターに挿入できるように、増幅後に切断できる所望の制限部位を含む。また別には、PCR生成物は、当業界で周知のように、T-オーバーハングを含むベクター（Promega Corp., A3600, Madison, WI）で直接クローニングすることができる。

発現されたキメラタンパク質は、単細胞であれ多細胞宿主内の細胞であれ、宿主細胞内で自己会合して粒子を形成する。粒子を含む細胞は標準的な方法を用いて採集し、前記細胞をフレンチプレッシャーセル、リゾチーム、ソニケーター、ビーズビーター又はマイクロフルイダイザー（Microfluidics International Corp., Newton, MA）を用いて溶解する。溶解物を清澄化した後、粒子を45%硫酸で沈殿させ、20mMのリン酸ナトリウム（pH6.8）に再懸濁させ、同じ緩衝液に対して透析する。透析した材料を短時間遠心によって清澄化し、上清をセファロース（商標）CL-4Bを用いてゲルろ過クロマトグラフィーに付す。粒子を含む分画を特定し、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに付し、硫酸で再度沈殿させ、その後、透析及びろ過滅菌を実施し、-70℃で保存する。

【0058】

接種物及びワクチン

先に記載した、好ましくは粒子状形の組換えHBcキメラ免疫原は、医薬的に許容できる賦形剤組成物（好ましくは水性である）に免疫原として有効な量で溶解又は懸濁させて、接種物又はワクチンを作る。免疫を必要とする、又は抗体の誘発が所望される宿主動物、例えば哺乳動物（例えばマウス、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシ、サル、尾無しサル又はヒト）又は鳥類（例えばニワトリ、シチメンチョウ、アヒルまたはカモ）に投与したとき、接種物は、前記免疫原に存在するインフルエンザA M2 B細胞エピトープと免疫反応する抗体を誘発する。ワクチンでは、このようにして誘発された抗体はまた、*in vivo*でウイルス又はウイルス感染細胞と免疫反応し（結合し）、宿主を病原性インフルエンザ感染から防御すると考えられる。ある動物でワクチンである組成物は、別の宿主にとって、インフルエンザAに感染していない第二の宿主で抗体が誘発される場合のように、接種物となりえる。

各免疫で用いられる組換えHBcキメラ免疫原の量は免疫原として有効な量と称され、広範囲に、とりわけ下記で考察するように組換えHBcキメラ免疫原、免疫される動物宿主、及びワクチン中のアジュバントの有無に応じて変動することができる。ワクチンおよび接種物の免疫原として有効な量によって、それぞれ下記で考察するように、防御又は抗体活性が提供される。

ワクチン又は接種物は典型的には、接種当たり約1マイクログラムから約1ミリグラム（ユニットドーズ）の組換えHBcキメラ免疫原濃度、好ましくは約10マイクログラムから約50マイクログラム/ユニットドーズの組換えHBcキメラ免疫原濃度を含む。マウスでの免疫は、典型的には10又は20 µgのキメラ粒子を含む。

【0059】

“ユニットドーズ”という用語は、本発明のワクチン又は接種物に関する場合、動物に対して分割できない投与量として適切な物理的に分離されたユニットを指し、各ユニットは、必要な希釈剤（すなわち担体又は賦形剤）と一緒に所望の免疫原としての効果を個々に又は総合的に生じるように計算した予め定めた量の活性物質を含む。一ユニット投与又は複数ユニット投与を用いて、免疫原として有効量の組換えHBcキメラ免疫原粒子を提供することができる。

ワクチン又は接種物は、典型的には回収された組換えHBcキメラ免疫原粒子から、生理学的に寛容性を有する（許容できる）希釈ビヒクル（例えば水、食塩水、リン酸緩衝食塩水（PBS）、酢酸緩衝食塩水（ABS）、リンゲル液など）中に前記粒子を分散させて水性組成物を形成することによって調製される。前記希釈ビヒクルはまた、以下で考察されるように油性物質、例えばピーナツ油、スクアラン又はスクアレノールを含むことができる。

免疫原として活性な成分はしばしば、医薬的に許容でき、かつ活性成分と適合する賦形剤と混合される。適切な賦形剤は、例えば水、食塩水、デキストロース、グリセロール、

エタノールなど及び前記の組合せである。さらにまた、所望される場合は、接種物又はワクチンは、組成物の免疫原としての有効性を強化する微量の補助物質、例えば湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝剤を含むことができる。

有利には意図されるワクチン又は接種物はまたアジュバントを含む。本発明のワクチンおよび接種物のために適切なアジュバントは、キメラのB細胞エピトープに対して抗体応答を強化することができるアジュバントとともに、キメラに含まれるT細胞エピトープに対して細胞仲介応答を強化することができるアジュバントを含む。アジュバントは当分野で周知である（例えば以下を参照されたい：Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach, 1995 Pharmaceutical Biotechnology, Vol.6, M.F. Powell and M.J. Newman, Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X）。

10

【0060】

典型的なアジュバントには、完全フロイントアジュバント（CFA）（前記は人間には使用されない）、不完全フロイントアジュバント（IFA）、スクアレレン、スクアラン及びミョウバン（例えばアルヒドロゲル（Alhydrogel（商標））（Superfos, Denmark））が含まれる。前記は当分野で周知であり、いくつかの供給元から市販されている。

本発明の免疫原とともに使用するために好ましいアジュバントには、アルミニウム又はカルシウムの塩（例えば水酸化物又はリン酸塩）が含まれる。本発明での使用に特に好ましいアジュバントは水酸化アルミニウムゲル、例えばアルヒドロゲル（商標）である。水酸化アルミニウムゲルの場合、キメラタンパク質は、単位投与量当たり約50から約800マイクログラム、好ましくは約400から約600マイクログラムが存在するようにアジュバントと混合される。リン酸カルシウムナノ粒子（CAP）は、バイオサンテ社（Biosante, Inc., Lincolnshire, IL）によって開発されたアジュバントである。問題の免疫原は粒子の外側を被覆されるか、又は内部に被包化される（He et al. (Nov. 2000) Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7(6):899-903）。

20

本発明の免疫原とともに使用されるまた別の特に好ましいアジュバントはエマルジョンである。意図されるエマルジョンは水中油エマルジョンまたは油中水エマルジョンである。免疫原性キメラタンパク質の他に、そのようなエマルジョンは、周知のスクアレレン、スクアラン、ピーナツ油などの油相および分散剤を含む。非イオン性分散剤が好ましく、そのような物質には、ソルビタン並びにマンニドのモノ-およびジ-C₁₂-C₂₄-脂肪酸エステル、例えばソルビタンモノ-ステアレート、ソルビタンモノ-オレートおよびマンニドモノ-オレートが含まれる。免疫原含有エマルジョンはエマルジョンとして投与される。

30

【0061】

好ましくは、そのようなエマルジョンは油中水エマルジョンであり、スクアレレン、グリセロール、及び界面活性剤、例えばマンニドモノ-オレート（Arlacel（商標）A）を含み（場合によってスクアランとともに）、水相中でキメラタンパク質とともに乳化される。油層は、好ましくは約0.1から約10%のワクチンを含み、より好ましくは約0.2から約1%を含む。油相のまた別の成分は、アルファ-トコフェロール、混合鎖ジ-及びトリ-グリセリド並びにソルビタンエステルを含む。そのようなエマルジョンのよく知られた例には、モンタニド（Montanide（商標））ISA-720及びモンタニド（商標）ISA703（Seppic, Castres, France）が含まれる。前記は各々、スクアレレンおよびスクアランの両方を含むと考えられ、いずれもスクアレレンが優勢であるが、モンタニド（商標）ISA703では優勢の程度は低い。もっとも好ましくは、モンタニド（商標）ISA-720が用いられ、油対水の比は7：3（w/w）が用いられる。他の好ましい水中油エマルジョンアジュバントには、W095/17210およびEP0399843に開示されたものが含まれる。

40

本明細書では小分子アジュバントの使用もまた意図される。本発明で有用な小分子アジュバントの1つのタイプは、米国特許4,539,205号、同4,643,992号、同5,011,828号及び同5,093,318号に記載された7-置換-8-オキソ-又は8-スルホ-グアノシン誘導体である（前記文献は参照により本明細書に含まれる）。これらの物質のうちで、7-アリル-8-オキソグアノシン（ロキソリピン）が特に好ましい。前記分子は抗原（免疫原）特異的応答の誘発に特に有効であることが示された。

50

【 0 0 6 2 】

好ましい有用なアジュバントには、モノホスホリル脂質A (MPL(商標))、3-デアシルモノホスホリル脂質A (3D-MPL(商標))が含まれ、前記は、リビウムノケム社 (Ribi Immunochem, Hamilton, Montana) によって製造されている周知のアジュバントである。前記アジュバントは、細菌から抽出された3つの成分 (モノホスホリル脂質 (MPL) A、トレハロースジミコレート (TDM) および細胞壁骨格 (CWS)) (MPL + TDM + CWS) を2%スクアレン/トウィーン (Tween (商標)) 80エマルジョン中に含んでいる。このアジュバントはGB2122204Bに教示された方法によって調製することができる。3-デ-0-アシル化モノホスホリル脂質Aの好ましい形態は、直径が0.2 μm未満の小粒子サイズを有するエマルジョンである (EP0689454B1)。

10

もっとも好ましいものは、アミノアルキルグルコサミド4-ホスフェート (AGP) と称されるMPL(商標)アジュバントと構造的に関係する化合物で、例えばRC-529(商標)アジュバントの名称でコリキサ社 (Corixa Corp.) から市販されているもの、{ 2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル-アミノ]-エチル-2-デオキシ-4-0-ホスホノ-3-0-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル]-2-[(R)-3-テトラ-デカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-p-D-グルコピラノシドトリエチルアンモニウム塩} である。RC-529アジュバントは、RC-529SEとして販売されるスクアレンエマルジョンとして、さらにRC-529AFとして水性製剤としてコリキサ社 (Corixa Corp.) から入手できる (米国特許6,355,257号及び6,303,347; 米国特許6,113,918号及びU.S. Publication No.03-0092643を参照されたい)。

20

【 0 0 6 3 】

さらに意図されるアジュバントには、CpGヌクレオチドモチーフを1回又は2回以上 (+ フランキング配列) 含む合成オリゴヌクレオチドアジュバントが含まれる (Coley Pharmaceutical Groupから入手できる)。QS21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc.から入手できる) と称されるアジュバントは、南アメリカの樹木、クイラヤ=サボナリア=モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の樹皮に由来するアジュバント活性を有する免疫学的に活性なサポニン分画 (例えばクイル (Quil (商標)) A) であり、その製造方法は米国特許5,057,540号に開示されている。クイル(商標)Aの誘導体、例えばQS21 (QA21としても知られているクイル(商標)AのHPLC精製分画誘導体) 及び他の分画 (例えばQA17) もまた開示される。クイラヤ=サボナリア=モリナ (Quillaja Saponaria Molina) サポニンの半合成および合成誘導体、例えば米国特許5,977,081号および6,080,725号に記載されているものもまた有用である。MF59と称されるアジュバント (Chiron Corp.から入手できる) は米国特許5,709,879号および6,086,901号に記載されている。

30

ムラミルジペプチドアジュバントもまた意図され、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン (thur-MDP)、N-アセチル-nor-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (CGP11637、nor-MDPと称される)、およびN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトリル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)エチルアミン ((CGP) 1983A、MTP-PEと称される) が含まれる。いわゆるムラミルジペプチド類似体は米国特許4,767,842号に記載されている。

【 0 0 6 4 】

40

好ましいアジュバント混合物には、3D-MPLとQS21との組合せ (EP0671948B1)、3D-MPLとQS21とを含む水中油エマルジョン (W095/17210、PCT/EP98/05714)、他の担体との3D-MPL製剤 (EP0689454B1)、コレステロール含有リポソーム中で製剤化されたQS21 (W096/33739) 又は免疫刺激性オリゴヌクレオチド (W096/01555) が含まれる。SKB (今はGlaxo-Smithkline) から入手できるアジュバントSBAS2 (今はAS02) はQS21を含み、さらに水中油エマルジョンのMPLもまた有用である。また別のアジュバントには、W099/52549に記載されたもの及びポリオキシエチレンエーテルの非粒子状懸濁物 (UK特許出願9807805.8) が含まれる。

トール様 (toll-like) レセプター-4 (TLR-4) に対する1つ又は2つ以上のアゴニストを含むアジュバント (例えばMPL(商標)アジュバント) 又は構造的に関連する化合物 (例え

50

ばRC-529(商標)アジュバント又は脂質A模倣物)を、単独で又はTLR-9に対するアゴニスト(例えば非メチル化オリゴヌクレオチドデオキシヌクレオチド含有CpGモチーフ)と一緒に使用することが特に好ましい。そのようなアジュバントは、目的の免疫原性HBc-含有粒子又はそのような免疫原と化学的に連結されたものと混合されたとき、ガンマ-生成CD8+、CD4+ T細胞及び細胞障害性リンパ球の産生を強化する。ミョウバンもまたそのようなアジュバント混合物に存在することができる。初期の結果は、ミョウバンは、IgG1型抗体の産生を促進するTh2免疫応答を強化する傾向があり、一方、RC-529型アジュバントは、IgG2a及びIgG2b抗体の産生並びにT細胞免疫原が存在するときは(HBc粒子が免疫原を含む場合がそれである)、T細胞応答の強化を促進するTh1免疫応答を刺激することを示している。

10

【0065】

もっとも好ましいアジュバント混合物は、安定な油中水エマルジョンを含み、さらにアミノアルキルグルコサミンホスフェート(例えば米国特許6,113,918号に記載されたようなもの)を含む。アミノアルキルグルコサミンホスフェートのうちで、RC-529として知られている分子、{(2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル-アミノ]-エチル-2-デオキシ-4-O-ホスホノ-3-O-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル]-2-[(R)-3-テトラ-デカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-p-D-グルコピラノシドトリエチルアンモニウム塩)}がもっとも好ましい。好ましい油中水エマルジョンはW09956776に記載されている。

アジュバントはアジュバント量で用いられ、前記の量は、アジュバント、宿主動物および組換えHBcキメラ免疫原に応じて変動することができる。典型的な量は各免疫当たり約1µgから1mgで変動することができる。適切な濃度又は量は容易に決定できることは当業者には理解されよう。

20

【0066】

接種物およびワクチンは、便利には非経口的に注射によって、例えば皮下又は筋肉内に投与される。他の投与態様に適したさらに別の製剤には座薬、及びいくつかの事例では経口用製剤又は鼻腔スプレーによる製剤が含まれる。座薬の場合、伝統的な結合剤および担体、例えばポリアルカレングリコール又はトリグリセリドを含むことができ、そのような座薬は、0.5%から10%、好ましくは1%から2%の範囲で活性成分を含む混合物から形成することができる。経口製剤は、例えば医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような通常用いられる賦形剤を含む。

30

接種物又はワクチン組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤又は散剤の形態を有し、さらに活性成分として免疫学的に有効な量のHBcキメラを好ましくは粒子として含む。典型的な組成物では、好ましいHBcキメラ粒子の免疫学的に有効な量は、上記に記載したように単位用量当たり約1µgから約1mg、より好ましくは単位用量当たり約5µgから約50µgの活性成分である。

ワクチンは、典型的には鼻腔内(IN)又は非経口投与のために製剤化される。例示的な免疫は皮下(SC)、筋肉内(IM)、静脈内(IV)、腹腔内(IP)又は皮内(ID)に実施される。

40

【0067】

HBcキメラ粒子およびHBcキメラ粒子複合物は中性又は塩の形でワクチンに製剤化することができる。医薬的に許容できる塩には酸付加塩が含まれ(タンパク質又はハプテンの遊離アミノ基により形成される)、無機酸(例えば塩酸、リン酸)又は有機酸(例えば酢酸、蔞酸、酒石酸、リンゴ酸など)で形成される。遊離カルボキシル基で形成される塩もまた、無機塩基(例えば水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム若しくは鉄)および有機塩基(例えばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなど)から誘導することができる。

接種物又はワクチンは、投与製剤に適合した態様で、さらに治療的に有効で免疫を誘発する量(所望される抗体誘導量又は防御量)で投与される。投与されるべき量は、治療さ

50

れる対象者、対象者の免疫系の抗体合成能力、及び所望される防御の程度に左右される。投与に要求される活性成分の正確な量は医師の判定に依存し、各個体に固有である。しかしながら、適切な投薬範囲は個体当たり数百マイクログラムの規模である。初回投与およびブースター注射のための適切な治療計画もまた変動可能であるが、典型的には初回投与に間隔をあけて（数週又は数ヶ月）その後の注射または別の投与が続く。

いったん免疫したら、組換えHBcキメラ免疫原がM2タンパク質と結合する十分な力価の抗体の産生を誘導するために十分な時間前記宿主動物を維持する。抗M2抗体の産生のための維持期間は典型的には約3から約12週間続き、ブースター（ワクチンの第二回目の免疫投与）を含むことができる。所望の場合は、3回目の免疫もまた初回免疫後、数週間から5年で意図される。いったん防御レベルの抗体力価が得られたら、約1から約5年の間隔で投与される周期的ブースター免疫によって、ワクチン接種宿主動物は好ましくは前記抗体力価で又は抗体力価近くで維持される。

10

【0068】

抗体の産生は、免疫した宿主から血漿又は血清サンプルを得て、その中の抗体を合成M2ポリペプチド抗原と結合するそれらの能力について、以下で述べるようにELISAアッセイによって、又は別の免疫アッセイ（例えば当業界で周知のウェスタンブロット）によって分析することによって容易に確認される。

そのようにして誘導された以前に記載した抗体は、周知の技術を用いて宿主の血液から単離し、周知のように受動免疫のために第二のワクチンに再構成してもよい。同様な技術がヒトのガンマグロブリン免疫のために用いられる。例えば、1匹又は多数の免疫宿主由来の抗血清を硫酸水溶液（典型的には40 - 50パーセント飽和）で沈殿させ、沈殿させた抗体をクロマトグラフィー、例えばアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製することができる。前記アフィニティークロマトグラフィーでは、M2ポリペプチドがクロマトグラフィーカラムに固定された抗原として用いられる。

20

接種物は実質的にワクチンと同一ではあるけれども、インフルエンザに対する抗体の誘導が所望されるが、インフルエンザに対する防御は所望されない宿主動物で使用される。

更なる労作を要することなく、当業者は前述の記載及び下記の詳細な実施例を用いて本発明を完全に利用することができると確信する。以下の好ましい具体的な実施態様は単なる例示であり、以降の記載をいずれの場合においても制限するものではない。

30

【0069】

実施例1：B細胞エピトープ含有キメラの調製

A．プラスミドベクターpKK223-3N（pKK223-3の改変形）の調製

プラスミドベクターpKK223-3（Pharmacia）は、固有のNcoI制限部位を作出することによって改変し、HBc遺伝子のNcoI-HindIII制限フラグメントとしての挿入、その後の大腸菌宿主細胞での発現を可能にした。pKK223-3プラスミドベクターを改変するために、PCRプライマーpKK223-3/433-452-F及びpKK223-NcoI-mod-R、並びに鋳型としてpKK223-3を用いて、新しいSphI-HindIIIフラグメントを調製した。

このPCRフラグメントを制限酵素SphI及びHindIIIで切断して467bpのフラグメントを提供し、これをpKK223-3ベクターの4106bpフラグメントと連結して、本来の480bpのSphI-HindIIIフラグメントと効率的に置き換えた。得られたプラスミド（pKK223-3N；4573bp）はしたがって親プラスミドより13bp短く、導入されたNcoI部位の上流に改変ヌクレオチド配列を含んでいる（図2を参照されたい；図2では点線は存在しない塩基を示す）。プラスミドpKK223-3Nの制限部位は図2に示されている。さらにpKK223-3親プラスミドに施されたヌクレオチドの変更は、下記に示すように下線によって表示される。

40

【0070】

pKK223-3/433-452-F GGTGCATGCAAGGAGATG 配列番号：49

pKK223-NcoI-mod-R

GCGAAGCTTCGGATCccatggttttttctccttattgtgaaattgttatccgctc

配列番号：50

【0071】

50

B . V2、V16及びV8クローニングベクターの調製

改変HBc149 (V2及びV16) 又はHBc183 (V8) 遺伝子 (前記は、合成dsDNAフラグメントのイムノドミナントループ領域への方向性を有する挿入を可能にする) を、PCRを用いて構築した。 (D78とP79との間に挿入物を受け入れ、さらにV149に切り縮められているプラスミドはV2と称され、同じプラスミドでV149の後ろに付加システインを有するプラスミドはV16と称され、D78とP79との間に挿入物を受け入れC183で終わるプラスミドはV8と称される) 。 HBc149及びHBc183遺伝子は、2つのPCRプライマー対 (一方はアミノ末端を増幅し、他方はカルボキシ末端を増幅する) を用いて半分ずつ増幅させた。V2の場合、PCR反応の生成物は249bp (N-末端) 及び243bpフラグメント (C-末端) であり ; V16の場合、生成物は249bp (N-末端) 及び246bpフラグメント (C-末端) であり ; V8の場合、生成物は249bp (N-末端) 及び349bpフラグメント (C-末端) である。

10

調製されたN-末端フラグメントをNcoI及びEcoRIで消化し、C-末端フラグメントはEcoRI及びHindIIIで消化した。V2、V16及びV8フラグメント対を続いて共通のEcoRIオーバーハングで一緒に連結した。得られたNcoI-HindIIIフラグメントを続いてpKK223-3Nベクター (予めNcoI及びHindIIIで消化された) に連結した。

B細胞エピトープをV2、V16及びV8プラスミドに挿入するために、適切なプラスミドをEcoRI及びSacI制限酵素で消化した。続いて5' EcoRI及び3' SacIオーバーハングを含む合成dsDNAフラグメントを挿入した。全ての事例 (V2、V16及びV8) で、グリシン-イソロイシン (EcoRI) 及びグルタミン酸-ロイシン (SacI) アミノ酸対は挿入されたB細胞エピトープとフランキングしていた。挿入された制限部位は下記のプライマーで下線を付されている。

20

【 0 0 7 2 】

V2

HBc149/NcoI-F

5'-TTGGGCCATGGACATCGACCCTTA

配列番号:51

HBc-D78/EcoRI-R

5'-GCGGAATTCCATCTTCCAAATTAACACCCAC

配列番号:52

HBc-P79/EcoRI-SacI-F

5'-CGCGAATTCAAAAAAGAGCTCCAGCGTCTAGAGACCTAG

配列番号:53

HBc149/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:54

30

【 0 0 7 3 】

V16

HBc149/NcoI-F

5'-TTGGGCCATGGACATCGACCCTTA

配列番号:51

HBc-D78/EcoRI-R

5'-GCGGAATTCCATCTTCCAAATTAACACCCAC

配列番号:52

HBc-P79/EcoRI-SacI-F

5'-CGCGAATTCAAAAAAGAGCTCCAGCGTCTAGAGACCTAG

配列番号:53

HBc149+C/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTACTAGCAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:55

40

【 0 0 7 4 】

V8

HBc149/NcoI-F

5'-GGGCCATGGACATCGACCCTTA

配列番号:51

HBc-D78/EcoRI-R

5'-GCGGAATTCCATCTTCCAAATTAACACCCAC

配列番号:52

HBc-P79/EcoRI-SacI-F

5'-CGCGAATTCAAAAAAGAGCTCCAGCGTCTAGAGACCTAG

配列番号:53

HBc183/HindIII-R

50

5'-GGAAAGCTTACTAACATTGAGATTCCCG

配列番号:56

【0075】

C. V34及びV55クローニングベクターの調製

改変HBc149遺伝子（前記は、N-末端領域、5'からプレコア配列LGWLWGへの合成dsDNAフラグメントの方向性を有する挿入を可能にする）を、PCRを用いて構築した。（V149で終了するHBc配列をコードするプラスミドはV34と称され、一方、付加システインをC-末端からV149に保持するHBc配列をコードするプラスミドはV55と称される）。HBc149遺伝子は、2つのPCRプライマー対（その一方はアミノ末端を増幅し、他方はカルボキシ末端を増幅する）を用いて半分ずつ増幅させた。V34の場合、PCR反応の生成物は293bp（N-末端）フラグメント及び484bpフラグメント（C-末端）であり；V55の場合には同じN-末端フラグメントを用い、490bpのC-末端フラグメントが調製された。

10

PCRによって調製されたN-末端フラグメントをNcoI及びSacIで消化し、C-末端フラグメントをSacI及びHindIIIで消化した。V34及びV55フラグメント対を続いて共通のSacIオーバーハングと一緒に連結した。得られたNcoI-HindIIIフラグメントを続いてpKK223-3Nベクター（予めNcoI及びHindIIIで消化された）に連結した。

B細胞エピトープ含有挿入は、V2、V16及びV8クローニングベクターについて上記に概略した手順と同一の手順で達成した。制限部位は下記のオリゴヌクレオチドプライマーで下線を付されている。

【0076】

V34/V55

20

pKK-BamHI-F

5'-GCGGGATCCGGAGCTTATCGA

配列番号:57

HBc-NcoI/EcoRI/SacI-R

5'-GCGGAGCTCTTTTTGAATTCCTTAT

配列番号:58

PreC-SacI-HBc-F

5'-GCGGAGCTCCTTGGGTGGCTTTGGGGCATTGACATCGACCCTTATAAAG

配列番号:59

V34

HBc149/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:54

30

V55

HBc149+C/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTACTAGCAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:55

【0077】

D. V47、V48及びV54クローニングベクターの調製

改変HBc149及びHBc遺伝子（前記は、合成dsDNAフラグメントのアミノ酸残基I3とD4との間のN-末端領域への方向性を有する挿入を可能にする）を、PCRを用いて構築した。（V149で終了するHBcキメラをコードするプラスミドはV47と称され、付加システインをC-末端からV149に保持するHBcキメラをコードするプラスミドはV54と称され、C183で終了するHBcキメラをコードするプラスミドはV48と称される）。V47、V48及びV54のために、PCRプライマー対を用いて、鋳型HBc149（HBc遺伝子に先行する配列を含む）からアミノ末端フラグメントを増幅した。得られたPCRフラグメントは190bpを有する。V47のC-末端フラグメントのために、PCRプライマー対を用いてHBc遺伝子を増幅し、469bpフラグメントを得た。V54の場合、C-末端フラグメントは475bpである。V48のC-末端のために、PCRプライマー対を用いてHBc183遺伝子を増幅し、574bpフラグメントを得た。

40

この点から用いたクローニング手順は、クローニングベクターV34及びV55について上記で概略した手順と同一であった。

異種配列をV47、V48及びV54プラスミドに挿入するために、前記プラスミドを最初にNcoI及びSacI制限酵素で消化した。5' AfIII及び3' SacIオーバーハングを含む合成dsDNAフラグメントを続いて挿入した（注記：制限酵素AfIII及びNcoIは適合オーバーハングを残

50

す)。全ての事例(V47、V48及びV54)で、HBc残基D2及びI3は欠失し、その結果、異種免疫原性配列は残基M1の直ぐ後に続き、SacI制限部位によってコードされるグルタミン酸-ロイシ(EL)アミノ酸対は挿入されたエピトープの後に続く。挿入された制限部位は、下記のオリゴヌクレオチドプライマーで下線を付されている。

【0078】

V47/V48/V54

pKK(167-150)-F

5'-GCATAATTCGTGTCGCTC

配列番号:60

HBc-I3/EcoRI-R

5'-GCGGAATTCCGATGTCCATGGTTTTTCTC

配列番号:61

HBc-EcoRI/SacI/D4-F

5'-GCGGAATTCAAAAAGAGCTCGACCCTTATAAAGAATTTGGA

配列番号:62

V47

HBc149/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:54

V54

HBc149+C/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTACTAGCAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:55

V48

HBc183/HindIII-R

5'-GGAAAGCTTACTAACATTGAGATTCCCG

配列番号:56

【0079】

E. V7クローニングベクターの調製

T細胞エピトープとHBcキメラのC-末端とを融合させるために、新規なベクターV7を構築した。固有のEcoRI及びSacI制限部位をバリニン149とHindIII部位との間に挿入し、合成dsDNAのEcoRI-HindIII(又はEcoRI-SacI)制限部位への方向性を有する挿入を容易にした。下記のPCRプライマー対を用いて、アミノ末端にNcoI制限部位を、さらにカルボキシ末端にEcoRI、SacI及びHindIII部位をもつHBc149遺伝子を増幅した。PCR反応生成物(479bp)をNcoI/HindIIIで消化し、pKK223-3NでクローニングしてV7を生成した。

T細胞エピトープを挿入するために、プラスミド(V7)をEcoRI/HindIII(又はEcoRI/SacI)で消化し、EcoRI/HindIII(又はEcoRI/SacI)オーバーハングをもつ合成dsDNAフラグメントをV7に連結した。全てのV7構築物について、天然のHBcの最後のアミノ酸(バリニン-149)及び挿入されるT細胞エピトープの最初のアミノ酸は、グリシン-イソロイシンジペプチド配列(EcoRI制限部位を形成するヌクレオチドによってコードされる)によって分離される。EcoRI/SacIに挿入されるエピトープの場合、T細胞エピトープの跡で終止コードの前に付加されたグルタミン酸-ロイシン残基が存在し、これはSacI部位によって与えられる。制限部位はまた表示したプライマーで下線を付されている。

【0080】

HBc149/NcoI-F

5'-TTGGGCCATGGACATCGACCCTTA

配列番号:51

HBc149/SacI-EcoRI-H3-R

5'-CGCAAGCTTAGAGCTCTTGAATTCACAAACAGTAGTCTCCG

配列番号:63

【0081】

F. 部分的切端粒子を発現するための発現ベクターの合成

切端HBc粒子のための発現プラスミドを作製するために、ただ1つのアミノ末端オリゴヌクレオチドPCRプライマー(HBc149/NcoI-F)を固有のC-末端プライマーと組み合わせて用いた。例えば、HBc156(E.cR)発現プラスミドを作製するために、プライマー、HBc149/NcoI-F及びHBc156(E.cR)-H3-Rを用いた。HBc156(E.cR)+C発現プラスミドを作製するために、プライマーHBc149/NcoI-F及びHBc156C(E.cR)-H3-Rを用いた。粒子の末端の短縮、及びいくつかの事例ではC-末端システイン残基の取り込みの他に、大腸菌での発現に最適である

10

20

30

40

50

コドンもまた用いた。天然のHBc配列で見出される希少なアルギニンコドンの連続的な置換を可能にするために、先ず初めにHBc156遺伝子を合成し、続いてHBc163構築物のための鋳型として用いた。HBc163構築物を続いてHBc171構築物の鋳型として用いた。使用した全てのプライマーの配列を下記に提示する。全てのPCR生成物を制限酵素NcoI及びHindIIIで切断し、発現ベクターpKK223-3N（同じ酵素で予め切断されていた）でクローニングした。

【 0 0 8 2 】

HBc149/NcoI-F

5'-TTGGGCCATGGACATCGACCCTTA

配列番号:51

HBc156(E.cR)-H3-R

10

5'-GCGAAGCTTACTAAGGGGAGCGGCCTCGTCGACGAACAACAGTAGTCTCCGG

配列番号:64

HBc156C(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTAACAAGGGGAGCGGCCTCGTCGACGAACAACAGTAGTCTCCGG

配列番号:65

HBc163(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTAAGGCGAGGGAGTGCGCCGACGAGGGGAGCGGCCTCG

配列番号:66

HBc163C(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTAACAAGGCGAGGGAGTGCGCCGACGAGGGGAGCGGCCTCG

配列番号:67

HBc171(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTACGGCGATTGAGAGCGTCGACGGCGAGGGGAGGGAGT

配列番号:68

HBc171C(E.cR)-H3-R

20

5'-GCGAAGCTTACTAACACGGCGATTGAGAGCGTCGACGGCGAGGGGAGGGAGT

配列番号:69

【 0 0 8 3 】

クローン番号	クローンの名称
CV-1600	HBc156(E.cR)
CV-1601	HBc156(E.cR)+C
CV-1632	HBc163(E.cR)+C
CV-1634	HBc163(E.cR)
CV-1642	HBc171(E.cR)
CV-1643	HBc171(E.cR)+C

30

【 0 0 8 4 】

実施例2：インフルエンザA M2ポリペプチド配列を含むキメラの製造

A．インフルエンザA M2のN-末端ドメインのV2、V7、V8、V16、V34、V47、V48、V54及びV55クローニングベクターへの挿入

V2、V7、V8、V16、V34及びV55構築物の場合、M2e配列（インフルエンザA M2タンパク質の残基2-24；配列番号:9）をコードする合成dsDNAをEcoRI/SacI制限部位に挿入し、一方、V47、V48及びV54構築物については、同タンパク質の残基1-24をNcoI/SacI制限部位に挿入した。合成dsDNAフラグメントは、相補的な一本鎖DNAオリゴヌクレオチドを等モル濃度で混合し、95℃で5分加熱し、続いて毎分1℃の速度で室温に冷却した。このアニーリング反応はTE緩衝液中で実施した。二本鎖DNAは、コードされるエピトープ（上部に表示）とともに下記に示す。

40

【 0 0 8 5 】

V2/V7/V8/V16/V34/V55

M2(2-24)

I S L L T E V E T P I R N E W G C R

AATTAGCCTGTTAACCGAAGTGGAGACGCCGATCCGTAACGAATGGGGCTGCCG

TCGGACAATTGGCTTACCTCTGCGGCTAGGCATTGCTTACCCCGACGGC

C N D S S D E L

配列番号:70

CTGTAATGATTCTTCCGACGAGCT

配列番号:71

50

GACATTACTAAGAAGGCTGC

配列番号:72

V47/V48/V54

M2(1-24)

M S L L T E V E T P I R N E W G C R
 CATGTCTCTGCTGACCGAAGTTGAAACCCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGA
 AGAGACGACTGGCTTCAACTTTGGGGATAGTCTTTGCTTACCCCCACGTCT

C N D S S D E L
 TGTAACGATTCAAGTGATGAGCT
 ACATTGCTAAGTTCACTAC

配列番号:73

配列番号:74

配列番号:75

10

【0086】

B. 個々のシステイン変異インフルエンザA M2 N-末端ドメイン[M2(1-24/C17S)、M2(1-24/C19S)]のV47発現ベクターへの挿入

17位又は19位のどちらかのシステインがセリンに変異したM2タンパク質の残基1-24をコードするDNAフラグメントをアニールさせたものを以下に示す。上記のAに記載したようにそれらをV47のNcoI/SacI制限部位に挿入した。

【0087】

V47

M2(1-24/C17S)

M S L L T E V E T P I R N E W G S R
 CATGTCTCTGCTGACCGAAGTTGAAACCCCTATCAGAAACGAATGGGGGTCTAGA
 AGAGACGACTGGCTTCAACTTTGGGGATAGTCTTTGCTTACCCCCAGATCT

20

C N D S S D E L
 TGTAACGATTCAAGTGATGAGCT
 ACATTGCTAAGTTCACTAC

配列番号:76

配列番号:77

配列番号:78

M2(1-24/C19S)

M S L L T E V E T P I R N E W G C R
 CATGTCTCTGCTGACCGAAGTTGAAACCCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGA
 AGAGACGACTGGCTTCAACTTTGGGGATAGTCTTTGCTTACCCCCACGTCT

30

S N D S S D E L
 TCGAACGATTCAAGTGATGAGCT
 AGCTTGCTAAGTTCACTAC

配列番号:79

配列番号:80

配列番号:81

【0088】

C. システイン変異インフルエンザA M2 N-末端ドメイン[M2(2-24/C17S,C19S)]の発現ベクターV8、V16、V47、V48及びV54への挿入

V8及びV16構築物の場合、2つのシステインがセリンに変化した変異をもち、M2e免疫原性配列(インフルエンザA M2タンパク質の残基2-24)をコードする合成dsDNAをEcoRI/SacI制限部位に挿入し、一方、V47、V48及びV54構築物の場合は同タンパク質の残基1-24をNcoI/SacI制限部位に挿入した。合成dsDNAフラグメントは上記Aに記載したように調製した。

40

【0089】

V8, V16

M2(2-24/C17S,C19S)

I S L L T E V E T P I R N E W G S R
 AATTTCTCTGTAAACCGAAGTGGAGACGCCGATTCGTAACGAATGGGGTAGCCGC
 AGAGACAATTGGCTTCACCTCTGCGGCTAAGCATTGCTTACCCCATCGGCG

50

S N D S S D E L

配列番号:82

TCTAATGATAGCTCTGACGAGCT

配列番号:83

AGATTACTATCGAGACTGC

配列番号:84

M2(1-24/C17S,C19S)

M S L L T E V E T P I R N E W G S R

CATGTCTCTGCTGACCGAAGTTGAAACCCCTATCAGAAACGAATGGGGGTCTAGA

AGAGACGACTGGCTTCAACTTTGGGGATAGTCTTTGCTTACCCCCAGATCT

S N D S S D E L

配列番号:85

10

TCGAACGATTCAAGTGATGAGCT

配列番号:86

AGCTTGCTAAGTTCACTAC

配列番号:87

【0090】

D. 発現ベクターV54.M(1-24)へのインフルエンザA M2 N-末端ドメインの更なるコピーの挿入

天然のM2配列 [M2(1-24)] 又は変異させたM2配列 [M2(1-24/C17S,C19S)] のもう1つのコピーを現存のM2(1-24)配列のN-末端でクローン化した。これらのクローンの構築に際して、本来のメチオニンを除去し、その結果添加されるコピーがただ1つの開始メチオニンを供給することができる。PCRを用いて、構築物を2つのフラグメントとして作製した。2つの天然のM2コピーをもつクローン [M2(1-24)/V54.M2(2-24)] を作製するために、鋳型V54.M2(1-24)を用いて、先ず初めにN-末端フラグメント（前記はXhoI部位（したがってアミノ酸ロイシン、それに続くグルタミン酸）をM2配列のD24の後に挿入する）（生成されたフラグメントは353bpである）、続いてC-末端フラグメント（前記はM2配列のS2のN-末端側にXhoI部位を挿入し、それによってメチオニンを除去する）（生成フラグメントは538bp）を増幅した。変異体とそれに続くM2の天然のコピーを含むクローン [M2(1-24)/C17S,C19S/V54.M2(2-24)] を作製するために、鋳型V54.M2(1-24/C17S,C19S)を用いてN-末端フラグメントを作製し、一方、C-末端フラグメントは上記のものと同一である（生成フラグメントもまた同一である）。

調製したN-末端フラグメントをBamHI及びXhoIで消化し、C-末端フラグメントはXhoI及びHindIIIで消化した。続いてフラグメント対を共通のXhoIオーバーハングと一緒に連結した。得られたBamHI-HindIIIフラグメントを続いてpKK223-3Nベクター（あらかじめBamHI及びHindIIIで消化して調製されていた）に連結した。

変異させたM2配列のさらに2つのコピーを現存のM2(2-24)配列のN-末端でクローン化した。さらにまた、ただ1つの1つの開始メチオニンを遺伝子の1位に温存し、構築物M2(1-24/C17S,C19S/M2(2-24/C17S,C19S/V54.M2(2-24)を得た。また同じように、クローンは2つのPCRフラグメントとして作製された。鋳型V54.M2(1-24/C17S,C19S)を用いて、N-末端フラグメントを作製した。前記は、PstI部位（したがってアミノ酸ロイシン、それに続くグルタミン）を変異M2配列の残基D24の後に挿入する（生成フラグメントは353bpである）。上記の鋳型M2(1-24/C17S,C19S/V54.M2(2-24)を用いて、C-末端フラグメントを作製した。前記は、変異M2配列のS2のN-末端側にPstI部位を挿入し、それによってメチオニンを除去する。（生成フラグメントは613bpである）。

調製したN-末端フラグメントをBamHI及びPstIで消化し、C-末端フラグメントはPstI及びHindIIIで消化した。続いてフラグメント対を共通のPstIオーバーハングと一緒に連結した。得られたBamHI-HindIIIフラグメントを続いてpKK223-3Nベクター（あらかじめBamHI及びHindIIIで消化して調製されていた）に連結した。

【0091】

M2(1-24)/V54.M2(2-24); M2(1-24/C17S,C19S/V54.M2(2-24)

pKK-BamHI-F

5'-CGTAGAGGATCCGGAGCTTATCGACTGCACGG

配列番号:88

50

M2-D24/XhoI-R

5'-GCGCTCGAGATCACTTGAATCGTT

配列番号:89

M2-XhoI/S2-F

5'-GCGCTCGAGAGCTTATTGACCGAAGTTGAAACC

配列番号:90

HBc149+C/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTACTAGCAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:55

M2(1-24/C17S,C19S)/M2(2-24/C17S,C19S)/V54.M2(2-24)

10

pKK-BamHI-F

5'-CGTAGAGGATCCGGAGCTTATCGACTGCACGG

配列番号:57

M2-D24/PstI-R

5'-GCGCTGCAGATCACTTGAATCGTT

配列番号:91

M2-PstI/S2-F

5'-GCGCTGCAGTCTCTGCTGACCGAAG

配列番号:92

20

HBc149+C/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTACTAGCAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:55

【 0 0 9 2 】

E . 天然M2-HBcの切端型の構築

183残基の完全長HBc配列を含む本来のM2-HBc構築物 (Neirynck et al. (October 1999) Nature Med. 5(10):1157-1163 ; W099/07839) をV149に切り縮め、遺伝子全体をpKK223-3発現ベクターに移した。前記を実施するために、プラスミド3453 (Gent 大学 (University of Gent) から提供された) をPCR反応の鋳型として用い、523bpの生成物を得た。この生成物を制限酵素AflIII及びHindIIIで消化し、pKK223-3Nベクター (予めNcoI及びHindIIIで消化して調製) に連結した。

30

AflIII-M2-F

5'-CGCGACATGTCTCTGCTGACCG

配列番号:93

HBc149-HindIII-R

5'-CGCAAGCTTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:54

40

50

【 0 0 9 3 】

クローン番号	クローンの名称
CV-1438	V34. M2 (2-24)
CV-1440	V2. M2 (2-24)
CV-1475	V16. M2 (2-24)
CV-1492	V52. M2 (2-24)
CV-1560	3453/149
CV-1569	V16. M2 (1-24/C17S, C19S)
CV-1586	V8. M2 (2-24)
CV-1587	V8. M2 (1-24/C17S, C19S)
CV-1588	V7. M2 (2-24)
CV-1590	V47. M2 (1-24)
CV-1603	V47. M2 (1-24/C17S, C19S)
CV-1604	V54. M2 (1-24)
CV-1605	V54. M2 (1-24/C17S, C19S)
CV-1606	V48. M2 (1-24)
CV-1607	V48. M2 (1-24/C17S, C19S)
CV-1671	V47. M2 (1-24/C17S)
CV-1672	V47. M2 (1-24/C19S)
CV-1816	M2 (1-24) /V54. M2 (2-24)
CV-1817	M2 (1-24/C17S, C19S) /V54. M2 (2-24)
CV-1818	M2 (1-24/C17S, C19S) /M2 (2-24/C17S, C19S) /V54. M2 (2-24)

10

20

【 0 0 9 4 】

実施例3：アッセイの方法

A . 抗原性

1 . 粒子ELISA

精製粒子をコーティング緩衝液（50mM重炭酸ソーダ、pH9.6）中で10 μ g/mLの濃度に希釈し、ELISAストリップ又はプレートのウェルを被覆した（50 μ L/ウェル）。前記ELISAストリップを室温で一晩インキュベートした（約18時間）。次の朝、前記ウェルをELISA洗浄緩衝液（リン酸緩衝食塩水（PBS）、pH7.4、0.05%トウイーン(Tween(商標))-20）で洗浄し、さらにPBS中の3%BSAで1時間ブロックした（75 μ L/ウェル）。ELISAストリップを乾燥状態で必要になるまで-20 で保存した。

30

粒子の抗原性を決定するために、抗血清をPBS中の1%BSAを用いて希釈し、50 μ L/ウェルを抗原被覆ELISAウェルに添加した。血清を1時間インキュベートし、ELISA洗浄緩衝液（上記）で洗浄し、抗マウス(IgG)-HRP(The Binding Site, San Diego, CA; HRP=セイヨウワサビペルオキシダーゼ)複合物（50 μ L/ウェル）又は他の適切な二次抗体を30分間用いて探索した。ELISA洗浄緩衝液で洗浄した後、前記反応をTMブルー基質（50 μ L/ウェル）の添加によって可視化した。10分後に1NのH₂SO₄（100 μ L/ウェル）を添加して反応を停止させ、ELISAプレートリーダーで450nmで読み取った。

40

2 . 合成ペプチドELISA

24アミノ酸残基の合成ペプチドM2をコーティング緩衝液（50mM重炭酸ソーダ、pH9.6）中で2 μ g/mLの濃度に希釈し、ELISAストリップのウェルを被覆した（50 μ L/ウェル）。一晩（約18時間）、排気をONにしたフードの中でインキュベートすることによってウェル上のペプチドを乾燥させる。次の朝、前記ウェルをELISA洗浄緩衝液（リン酸緩衝食塩水（PBS）、pH7.4、0.05%トウイーン(Tween(商標))-20）で洗浄し、さらにPBS中の3%BSAで1時間ブロックした（75 μ L/ウェル）。ELISAストリップを乾燥状態で必要になるまで-20で保存した。

50

粒子の抗原性を決定するために、抗血清（モノクローナル又はポリクローナル）をPBS中の1%BSAを用いて希釈し、50 μ L/ウェルを抗原被覆ELISAウェルに添加した。血清を1時間インキュベートし、ELISA洗浄緩衝液で洗浄し、抗マウス(IgG)-HRP複合物又は他の二次抗体を30分間（上記のように50 μ L/ウェルで）用いて探索し、再びELISA洗浄緩衝液で洗浄し、続いてTMブルー基質又は他の適切な基質（50 μ L/ウェル）の添加によって可視化した。10分後に1NのH₂SO₄（100 μ L/ウェル）を添加して反応を停止させ、450nmに設定したELISAプレートリーダーで読み取った。

【0095】

B. 粒子の免疫原性

粒子の免疫原性をアッセイするために、選択したアジュバント中に10 μ gの粒子でマウスをIP免疫し、続いて3週間の感覚で1回又は2回、同じアジュバント中に10 μ gの粒子でブースター免疫した。マウスをそれぞれの免疫前及び免疫後2、4、6および8週で採血した。

10

【0096】

実施例4：280：260吸収比の決定

精製粒子の280：260吸収比を決定するために、粒子を20mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.8）に約0.2mg/mLの濃度で希釈し、260および280nmの波長で吸収値を測定した。280nmで測定された吸収を260nmの値で割って、280：260比を決定した。前記の比をいくつかのサンプル（天然粒子（HBc183）、残基149位の後ろで切り縮めたHBc粒子（HBc149）、および本明細書のいずれかの場所で特定したいいくつかのHBcキメラを含む）について得た。前記の比は下記の表に示されている。完全長粒子CV-1559は、Neirynckらの論文（Nature Med. 5(10):1157-1163）及び親出願（W09907839）で最初に報告された粒子調製物で、一方、完全長粒子CV-1607は同様な粒子であるが、ポリペプチドの17位および19位のM2ポリペプチドシステイン（配列番号：9のX₁₇およびX₁₉）がセリン残基に変異していた。

20

【0097】

表 1

粒子番号	完全長 (F) 又はC-末端切端 (T)	280 : 260吸収比
HBc183, CV-1532	F	0.84
HBc149	T	1.59
CV-1438	T	1.57
CV-1440	T	NT
CV-1475	T	1.04
CV-1492	T	1.33
CV-1559	F	0.68
CV-1560	T	1.36
CV-1569	T	1.38
CV-1588	T	1.16
CV-1590	T	1.51
CV-1603	T	1.68
CV-1604	T	1.40
CV-1605	T	1.26
CV-1607	F	0.73
CV-1600	T	1.23
CV-1601	T	1.12
CV-1634	T	0.92
CV-1632	T	0.96
CV-1642	T	0.79
CV-1643	T	0.77
CV-1671	T	NT
CV-1672	T	1.27

10

20

NT : テスト実施せず。*CV-1159はNeiryck (1999)が記載したIM2-HBcと同一である。

【 0 0 9 8 】

実施例5：熱安定性プロトコル

精製粒子は、50mMのNaPO₄ (pH6.8) を用いて1mg/mLの濃度に希釈し、アジ化ナトリウムを最終濃度0.02%で添加して細菌の増殖を防いだ。サンプルをSDS-PAGEサンプル緩衝液 (還元性) と混合し、15% SDS-PAGEゲルで泳動した。クーマシーブルーを用いてゲルを染色し、続いて分析した。

30

【 0 0 9 9 】

実施例6：ハイブリッド粒子の解析的ゲルろ過分析

25mLのスーパーロース (Superrose(商標)) 6HR10/30クロマトグラフィーカラム (Amersham Pharmacia #17-0537-01) およびBioCAD (商標) SPRINT還流クロマトグラフィーシステムを用いて、精製ハイブリッドHBc粒子の解析的ゲルろ過分析を実施した。UV検出装置を280nmの波長でモニターするために設定する。カラムは、3カラム容積 (CV ; 約75mL) の緩衝液 (50mM NaPO₄ (pH6.8)) を流速0.75mL/分で用いて平衡化した。

40

分析するべき粒子を50mMのNaPO₄ (pH6.8) を用いて1mg/mLの濃度に希釈した。続いて200マイクロリットル (μL) のサンプルを200μLのループにロードし、前記カラムに注入した。流速0.75mL/分で50mMのNaPO₄ (pH6.8) を用いてサンプルをカラムから溶出させた。

N-末端システイン残基を含む粒子又はそのようなシステインを含まない同様な粒子を上記の方法を用いて解析した。280nmトレースの積算はBioCAD(商標)ソフト (PerSeptive(商標)) を用いて実施し、結果を示す。

【 0 1 0 0 】

実施例7：インフルエンザM2構築物

最近、Neiryckら (Nature Med. 5(10):1157-1163 (1999) 及びW099/07839) は、M2の24アミノ酸の細胞外ドメインと完全長HBc粒子 (HBc183) (アミノ酸残基1 - 4を欠く) のN

50

-末端との融合を報告した。本明細書でIM2HBcと称する前記構築物の模式図は下記に示されている。前記模式図では前記24量体はHBcのN-末端と連結されている。

IM2HBc

MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD-HBc(5-183)

配列番号:94

ある例示的調製物では、M2エピトープは肝炎Bコアのイムノドミナントループに挿入され、ICC-1475と称される粒子は、そのような挿入および精製のために以前に考察された技術を用いて良好に発現され、精製することができた。M2エピトープの変異型（M2の天然の17位および19位の2つのシステイン残基はアラニン残基によって置換されている）もまたイムノドミナントループで発現され（ICC-1473粒子）、生じた粒子は精製された。これら2つの粒子を下記に模式的に示す。

ICC-1475

HBc(1-78)-GI-SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD-EL-HBc(79-149)

配列番号:95

ICC-1473

HBc(1-78)-GI-SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD-EL-HBc(79-149)-C

配列番号:96

【0 1 0 1】

ICC-1473粒子構築物は、天然の配列（ICC-1475）と比較したとき約7倍多い精製粒子が得られた。システイン残基の変異が粒子の潜在保護能力を変化させたのか否かは決定されていない。システイン残基の変異が粒子の防御的潜在能力を変化させたのか否かは未だ決定されていない。しかしながら、HBcのイムノドミナントループにデリバーされたエピトープは、それらが他の領域（N-末端を含む）に融合されたときと比較して通常は顕著に免疫原性を示し、生じた粒子は抗HBc免疫原性の低下を示す。

M2のN-末端24量体配列がC-末端切端肝炎Bコア粒子のN-末端と融合された粒子もまた調製された。前記構築物（ICC-1438）もまたN-末端プレコア配列（配列番号:66）を含んでいた。ハイブリッドタンパク質（ICC-1492）の末端（この事例ではHBc遺伝子のVal-149の直後）にただ1つのシステイン残基を含む同様な構築物を調製した。これらの構築物を下記に模式的に示す。

ICC-1438

MGISLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDELLGLWLWGI-HBc(2-149)

配列番号:97

ICC-1492

MGISLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDELLGLWLWGI-HBc(2-149)-C

配列番号:98

天然のHBcイニシエーターメチオニンからの翻訳開始を防止するために、前記残基のコドンを変異させてイソロイシン残基をコードさせたことは特記されるべきである。EcoRI（GI）およびSacI（EL）制限部位によって付与された残基には下線が付されている。プレコア配列は下線を付されたEL残基と“-HBc(2-149)”の間に挙げられている。

本明細書の別の箇所では考察したSDS-PAGEによる分析によって、ICC-1438モノマー構築物（レーン2）は、ICC-1492（レーン3）と、SDS-PAGEゲルでまた別の分子量コントロールとして機能するHBc-149（レーン1）、ICC-1475（レーン4）及びICC-1473（レーン5）とともに比較されたとき、調製時に不安定であることが示された（図10）。ICC-1438モノマーの不安定性は粒子の解析的ゲルろ過を用いたときは明瞭ではなかった。

ICC-1475（図10、レーン4）及びICC-1473（図10、レーン5）は両方とも、ICC-1438及びICC-1492よりもわずかに小さな分子量を有すると予想された。なぜならば、前者の2つはイムノドミナントループに直接挿入されたM2エピトープを含み、したがってICC-1438及びICC-1492に存在するプレコア配列（配列番号:66）を欠くからである。予想通り、ICC-1492はICC-1475及びICC-1473よりも大きかったが、しかしながらICC-1438（ICC-1492と同一であるが、C-末端のシステイン残基を確保している）は、明白な切断のためにICC-1475及びICC-1473より明瞭には大きくはない。

HBcのN-末端（ドメインI）又はループ（ドメインII）に連結された以前に考察したM2のN-末端細胞外配列を含み、さらにまた、HBcのC-末端（ドメインIV）のシステイン残基を含む構築物もまた意図される。

【0 1 0 2】

10

20

30

40

50

イムノドミナントループ融合を含むハイブリッドHBc粒子のアミノ末端を改変してシステイン残基、および最小限のM2-由来配列を取り込むために、一連の合成オリゴヌクレオチドを合成する。V2.Pf1(N-M2(17-24/C17S))を作製するために、オリゴヌクレオチドM2(17-24/C17S)-NcoI-FおよびHBc149/HindIII-Rを用いて、ベクターV2.Pf1からハイブリッドHBc遺伝子を増幅する。得られた546bpフラグメントをNcoIおよびHindIIIで切断し、pKK223-3N(同じ2つの酵素によってその前に切断されている)に挿入する。

V2.Pf1(N-M2(17-24/C19S))を作製するために、オリゴヌクレオチドM2(17-24/C19S)-NcoI-FおよびHBc149/HindIII-Rを用いて、ベクターV2.Pf1のハイブリッドHBc遺伝子を増幅する。得られた540bpフラグメントをNcoIおよびHindIIIで切断し、pKK223-3N(同じ2つの酵素によってその前に切断されている)に挿入する。

10

【0103】

M2(17-24/C17S)-NcoI-F

M	G	S	R	C	N	D	S	S	D	I	D	P	Y	K	E	F	G	配列番号:99
GGCGCCATGGGGTCTAGATGTAACGATTCAAGTGACATCGACCCTTATAAAGAATTTGC																		配列番号:100

M2(17-24/C19S)-NcoI-F

M	G	C	N	D	S	S	D	I	D	P	Y	K	E	F	G	配列番号:101
GCGCCATGGGGTGTAAACGATTCAAGTGACATCGACCCTTATAAAGAATTTGG																配列番号:102

【0104】

実施例8：N-およびC-末端の両システイン残基を含む又は含まないHBcキメラ分子

20

C-末端が残基149に切り縮められたHBcのN-末端で、又はN-末端近くでペプチド結合したインフルエンザA M2タンパク質の残基1-24を含む、一連のHBcキメラ分子含有粒子を調製した。前記キメラタンパク質分子は種々のN-末端配列を含んでいた。前記配列はM2配列又は変種を含み、さらにいくつかはC-末端システイン残基を含んでいた。

以下の表2に挙げた全ての精製粒子を、解析用サイズ排除クロマトグラフィーによって分析して、精製後の粒子状構造の保持を評価した。ICC-1603と称される粒子(N-末端システイン残基を含まない)は、亜粒子状構造への分解を示す証拠を提示した(図3)。その理由は、タンパク質が1500秒の範囲で溶出したからである(正確に形成された粒子はほぼ1000秒で溶出する)。

粒子ICC-1590(N-末端M2配列の2つのセリン残基がシステイン残基に変異していることを除いてICC-1603粒子と同様である)の同様な分析によって、前記構築物は精製の後で粒子状構造を維持することが示され、溶出は約1000秒で生じ、これはハイブリッド粒子に典型的である(図4)。ICC-1590粒子については分解の証拠はなかった。

30

ICC-1560粒子(そのキメラタンパク質もまた2つのN-末端システイン残基を有する)の分析によって、前記もまた精製後に粒子状であることが示されたが、ただし、前記はある程度の分解も示し(図5)、安定化はICC-1590粒子ほどは強固でないことが示唆された。ICC-1590とICC-1560粒子のN-末端立体配置の比較(以下の表2)によって、ICC-1560粒子の2つのシステイン残基の相対位置は、3つのアミノ酸残基(DEL)の欠落のためにICC-1590粒子に対して3アミノ酸残基だけシフトしていることが示され、システイン残基は、最適な架橋を可能にするためにコア遺伝子の開始部から最小限の距離を有することが要求される可能性があること示している。

40

【0105】

実施例9：M2またはM2変種配列および1つのC-末端システイン残基を含む粒子

ICC-1603粒子は、精製後迅速に分解することが図3で示された。ICC-1605粒子を含むHBcキメラ分子は、ICC-1605成分のキメラ分子がただ1つのC-末端安定化システインを有することを除いてICC-1603粒子のキメラ分子と類似する。C-末端システイン残基のICC-1603粒子への付加が粒子により高い安定性を付与することができるか否かを解明するために、ICC-1605粒子の発現を誘導するプラスミドを作製した。精製に続いて、ICC-1605粒子を解析的サイズ排除クロマトグラフィーを用いて分析した(図6)。

この実験の結果によって、粒子の安定化はICC-1603粒子の場合よりも完全であるが、IC

50

C-1590粒子よりも不完全であることが示された（ICC-1590粒子は2つのアミノ末端システイン残基を含みC-末端安定化システインを含まない）。顕著な量のICC-1605が粒子構造のままであったが、広い範囲にわたって溶出する亜粒子構造の不均質な混合物の存在を示す証拠があった。これらの観察は、このハイブリッド粒子（ICC-1603）の場合、ICC-1605粒子で見出されるようなC-末端安定化は、ICC-1590粒子で見出されるN-末端安定化よりも不完全であることが示唆される。

ハイブリッド粒子のアミノ末端およびカルボキシ末端システイン合体安定化の両立性を解明するために、ICC-1604粒子の発現を誘導する発現プラスミドを構築した。ICC-1604粒子の成分キメラ分子は、（ICC-1590のように）天然のM2ポリペプチド配列に存在する2つのアミノ末端安定化システイン残基を、（ICC-1605のように）C-末端安定化システインと同様に含む。ICC-1604粒子の分析によって、前記粒子は精製後均質な粒子状態を維持することが示され（図7）、前記2つの安定化の方法は補完的であり、互いに協調的に用いることができることを示した。

HBcのN-末端とN-末端システイン残基との間のまた別のリンカー配列を、ICC-1438粒子及びICC-1492粒子を用いて解明した。これら粒子は両方とも、アミノ酸配列ELLGWLWGIDI（配列番号:103）をM2融合物とHBcのアミノ酸D4との間に含んでいる。アミノ酸残基LGWLWGIDIはHBcのプレコアのアミノ酸-6からアミノ酸13に由来し、この位置から翻訳が開始するのを防ぐためにHBcのイニシエーターコドンが欠落している（前記は本実験の妥協の産物である）。HBプレコア配列は-7位にシステインを含んでいる。

これらの粒子は、ICC-1438成分キメラ分子はHBcの149位で終了するが、ICC-1492成分キメラ分子はHBcの149位で終了し、配列番号:1のHBcに対応する150位に末端システインを含むという点でのみ相違していた。また別の方法であるが上記で考察したものと類似の方法（それによれば粒子は約10分で溶出する）を用いて解析的ゲルろ過によって分析したとき、両構築物は精製後に粒子状態であることが（ICC-1438は図8、及びICC-1492は図10で）示された。この実験は、切端粒子のアミノ末端およびカルボキシル末端システイン安定化の両立性、並びにアミノ酸配列における実質的変動性およびN-末端システイン残基とHBc遺伝子の開始部間の距離に対する寛容性を示した。いくつかの実験から得られたデータは、下記の表2A、2B及び2Cに示されている。

【 0 1 0 6 】

表2A

10

20

30

構築物 番号	N-末端融合物	HBcN- 末端開始	M2とHBc 間の残基	C-末端 の位置	核酸 結合	C-末端システイン 安定化
ICC-1438	M2(2-24)	D2	ELLGWLWGI	149	無し	無し
ICC-1492	M2(2-24)	D2	ELLGWLWGI	149	無し	有り (C150)
ICC-1560	M2(1-24)	D4	無し	149	無し	無し
ICC-1590	M2(1-24)	D4	EL	149	無し	無し
ICC-1603	M2(1-24) (2C>2S)	D4	EL	149	無し	無し
ICC-1604	M2(1-24)	D4	EL	149	無し	有り (C150)
ICC-1605	M2(1-24) (2C>2S)	D4	EL	149	無し	有り (C150)
ICC-1606	M2(1-24)	D4	EL	183	有り	有り (C183)
ICC-1607	M2(1-24) (2C>2S)	D4	EL	183	有り	有り (C183)
ICC-1671	M2(1-24) (C17S)	D4	EL	149	無し	無し
ICC-1672	M2(1-24) (C19S)	D4	EL	149	無し	無し
ICC-1816	M2(1-24)/ LE/M2(2-24)	D4	EL	149	無し	有り (C150)
ICC-1817	M2(1-24)/ (2C>2S)/LE/ M2(2-24)	D4	EL	149	無し	有り (C150)
ICC-1818	M2(1-24)/ (2C>2S)/LQ/ M2(2-24) (2C>2S)/LE/ M2(2-24)	D4	EL	149	無し	有り (C150)

10

20

30

【 0 1 0 7 】

表 2B

構築物 番号	ループ融合物	5'/3'融合物 フランキング配列	C-末端 の位置	核酸結合	C-末端システイン 安定化
ICC-1440	M2(2-24)	GI/EL	149	無し	無し
ICC-1475	M2(2-24)	GI/EL	149	無し	有り (C150)
ICC-1569	M2(2-24) (2C>2S)	GI/EL	149	無し	有り (C150)
ICC-1586	M2(2-24)	GI/EL	183	有り	有り (C183)
ICC-1587	M2(2-24) (2C>2S)	GI/EL	183	有り	有り (C183)

40

【 0 1 0 8 】

表 2C

構築物 番号	C-末端 融合物	HBe C-末端	M2とHBe 間の残基	C-末端	核酸結合	C-末端システイン 安定化
ICC-1588	M2(2-24)	V149	GI	(M2)EL	無し	無し

【 0 1 0 9 】

下記の表3は、HBeAg、及びN-末端融合物を持つ粒子のN-末端の立体配置を明らかにするアラインメントを示している。配列は、全ての構築物が共有する配列番号:1のHBeのN-末端のアミノ酸残基4位からアラインメントされている。存在する場合は、N-末端のシステイン残基には下線が付されている。

【 0 1 1 0 】

表 3

構築物番号	配列	配列番号
HBeAg	SKL <u>CL</u> GLWLGMDID	103
ICC-1438/ICC-1492	MGISLLTEVETPIRNEWGC <u>RC</u> NDSSDELLGLWLGIDID	104
ICC-1560	MSLLTEVETPIRNEWGC <u>RC</u> NDSSD	105
ICC-1590/ICC-1604/ICC-1606	MSLLTEVETPIRNEWGC <u>RC</u> NDSSDELD	106
ICC-1603/ICC-1605/ICC-1607	MSLLTEVETPIRNEWGSRNDSSDELD	107
ICC-1671	MSLLTEVETPIRNEWGSR <u>RC</u> NDSSDELD	108
ICC-1672	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSDELD	109
ICC-1816	MSLLTEVETPIRNEWGC <u>RC</u> NDSSDLESLLTEVET- PIRNEWGC <u>RC</u> NDSSDELD	110
ICC-1817	MSLLTEVETPIRNEWGSRNDSSDLESLLTEVET- PIRNEWGC <u>RC</u> NDSSDELD	111
ICC-1818	MSLLTEVETPIRNEWGSRNDSSDLQSLLETVETPIRN- EWGSRNDSSDLESLLTEVETPIRNEWGC <u>RC</u> NDSSDELD	112

【 0 1 1 1 】

下記の表4は、本明細書で意図される、N-末端インフルエンザA M2配列または変種を含む粒子について安定性を評価した結果の一覧表を提供する。表に示されているように、安定な粒子は、配列番号:1のHBe配列のN-末端に対してマイナス14(-14)位からおよそN-末端自体までの位置にN-末端システイン残基を含むHBeキメラ分子から生成されている。

【 0 1 1 2 】

表 4

10

20

30

40

構築物 番号	HBcD4とN-末端システイン 残基との間のアミノ酸		C-末端システイン 安定化	安定な粒子形成
	Cys 1	Cys 2		
HBeAg	—	9	無し	無し
ICC-1438	18	16	無し	有り
ICC-1492	18	16	有り	有り
ICC-1560	6	4	無し	有り
ICC-1590	9	7	無し	有り
ICC-1603	—	—	無し	無し
ICC-1604	9	7	有り	有り
ICC-1605	—	—	有り	有り/無し
ICC-1607	—	—	有り	有り
ICC-1671	—	7	無し	有り
ICC-1672	9	—	無し	有り
ICC-1816	34*/9	32*/7	有り	実施せず
ICC-1817	9	7	有り	有り
CV-1818	9	7	有り	有り

10

* : 第二のN-末端M2コピーから数える。

20

【 0 1 1 3 】

実施例10：M2含有粒子の収量及び核酸結合

収量は、500mL培養から得られる精製粒子のミリグラムとして表される。結合核酸の存在は精製粒子のA280：A260比の測定によって決定した。1.0より大きい比は結合核酸が存在しないことを示し、1.0未満の比は結合核酸の存在を示す。Fiersと共同研究者らが記載した最初の完全長IM2HBc (Neirynck et al. (1999) Nat. Med. 5(10):1157-1163; 及び親出願W09907839) はICC-1559と同じものである。

【 0 1 1 4 】

粒子	M2e配列	挿入部位	C-末端	核酸結合	収量 (mg/500mL)
1123 (HBc149+C)	無し	NA	切端/ 安定化	無し	16.6
1559 (IM2HBc)	M2 (1-24)	N-末端	完全長	有り	3.2
1604	M2 (1-24)	N-末端	切端/ 安定化	無し	16.7
1569	M2 (2-24) (C17S, C19S)	イムノドミナント ループ (D78とP79 との間)	切端/ 安定化	無し	11.2
1475	M2 (2-24)	イムノドミナント ループ (D78とP79 との間)	切端/ 安定化	無し	1.1

30

40

【 0 1 1 5 】

実施例11：種々のM2含有粒子の抗原性

ELISAを用いてモノクローナル抗体14C2に対する種々の粒子の抗原性を調べた。その本来の構造で粒子が維持されていることを担保するために、粒子を捕捉するポリクローナル抗体 (ウサギ) で先ず初めにELISAプレートを被覆し、続いて14C2モノクローナル抗体又は、HBc粒子のイムノドミナントループに対して特異性を有する2つの抗HBcモノクローナル抗体のどちらかの種々の希釈を用いて調べた。下記の表に提示したデータは、HBcのイ

50

ムノドミナントループにおけるM2eの提示は、N-末端での提示と比較して、14C2モノクローナル抗体のM2eエピトープへのアクセス能力を顕著には変化させないことを示している（IM2HBc/ICC-1559およびICC-1604）。これらの観察は驚くべきことではない。なぜならば、14C2は、N-末端に結合するのではなくM2eの内部領域（M2のアミノ酸8、10、11および14）と結合することが以前に示されたからである（Zebedee et al. (1988) J. Virol. 62 (8):2762-2727）。

さらにまた、ICC-1569を除く全ての粒子が抗HBcモノクローナル抗体3120及び3105に対する抗原性を維持していた。3105による認識の低下は、イムノドミナントループに挿入された配列を有する粒子について以前に観察された現象であり、これは典型的には免疫後にこれら粒子に対する抗HBc応答の低下と解釈される。モノクローナル抗体3105及び3120はTokyo Institute of Immunology (Japan) から購入した。

10

【0116】

粒子	モノクローナル抗体		
	14C2	3105	3120
ICC-1123	—	+	+
IM2HBc/ICC-1559	+	+	+
ICC-1604	+	+	+
ICC-1569	+	—	+

20

【0117】

実施例12：種々のM2含有粒子の免疫原性

ICC-1604及びICC-1569粒子の免疫原性をマウスで調べた。前記2つの粒子間で抗M2e力価にほとんど相違はなかったが、抗HBc力価には顕著な相違がこの2つの粒子間で観察された。ICC-1604粒子（天然のイムノドミナントループをもつ）は、IM2HBcのように、ICC-1569粒子の場合よりもおよそ100倍高い抗HBc力価を誘発した。これらのデータは、エピトープ挿入によるHBcのイムノドミナントループの破壊（これはHBcモノクローナル抗体3105による認識の低下をもたらす）は、劇的に抗HBc抗体応答を低下させるという事実を改めて強調する。逆に、両粒子は、IM2HBc/ICC-1559で以前に観察されたものと匹敵する同様な抗M2e抗体応答を誘発し、終末力価は約1：100,000であった。

30

粒子はアルヒドロゲル（Alhydrogel(商標)）で製剤化し、10匹のマウスの複数グループを0日目及び28日目に2回10 μ gの製剤化粒子で免疫した。プールした血清を2回目の注射後2週間して抗HBc及び抗M2e抗体応答についてELISAアッセイで分析した。ブースター後2週間で10匹のマウスからプールした血清を、捕捉抗原としてM2e(2-24)合成ペプチド及び組換えHBc（ICC-1123）を用いてELISAで分析した。

マウスの致死的攻撃モデルでのICC-1569及びICC-1604粒子の直接比較は、両粒子をアルヒドロゲル(商標)で製剤化したときは致死的攻撃量に対して完全な防御を与えることができることを示した。これらの結果は、したがって、両粒子は抗M2e抗体で同様な力価を誘発するという観察と一致する。

ゲント大学（University of Ghent）のFiersと共同研究者らの種々の一連の粒子及びアジュバントを用いた多くのマウス実験のデータを組み合わせることによって、IgG2aサブクラスの抗M2e力価と防御効率との間の相関性の可能性を示す証拠が明らかになった。10⁴を超える抗M2e IgG2a力価を示すマウスは致死的攻撃から完全に防御されえるが、一方、抗M2e IgG2a力価が10⁴未満であるマウス（ただしIgG1力価は10⁴を超える）は典型的には不完全な防御を示す。これらのデータは、それらが、抗M2e抗体はM2の機能を単に阻止するのではなく、そうでなければ防御はIgGサブクラス偏向に左右されないであろうということを示唆しているという点で、可能な防御メカニズムとの関連性を示す。それどころか、マウスIgG2a（及びIgG2b）は補体結合及びFc γ RIIIレセプター結合のためにもっとも有効なサブクラスであるので（Fc γ RIIIレセプターはNK細胞で発現される（Ravetch et al. (1991) Annu. Rev. Immunol. 9:457-492））、前記のデータはCDC及び/又はADCCを巻き

40

50

込む免疫メカニズムを示唆している。

【0118】

実施例13：抗体のサブクラスおよび防御

本実施例は、種々のM2e-HBc構築物（10 μ g/マウス）および種々のアジュバントをアッセイしたいくつかの実験の要約である。約1/2に腹腔投与し、約1/2に鼻内投与した。各群（14匹マウス）について、血清をプールし、抗M2e IgGサブクラス抗体の力価を決定した。結果は第二のブースター後1週間で採取した血清から得られた。IgG2a力価が10⁴を超えるマウスについて、IgG1の力価は10⁴（*）であった。

IgG2a	群の数	パーセント防御
10 ⁴	8	100
<10 ⁴ *	4	70-95

10

アジュバントは、ワクチンに対し免疫応答の規模及び持続期間を強化させるというそれらの能力について、免疫応答のTh1/Th2偏向の調節能力と同様にますます明らかにされつつある。多くの実験的アジュバントは研究中であるが、ミョウバンは、米国でFDAが承認するワクチン成分であるただ1つのアジュバントである。典型的にはミョウバンは免疫応答をTh2型に偏向させる（前記偏向はマウスでの高レベルのIgG1抗体産生によって示される）。

ミョウバンによって製剤化されたM2e-HBc粒子は顕著にIgG1応答を誘発するが、IgG2aおよびIgG2b抗体（前記はTh1インジケーターである）もまた誘発される。Th1型IgGサブクラスの産生を強化させるために、RC529を補充したアルヒドロゲル（Alhydrogel（商標））製剤粒子（RC529はコリキサ社（Corixa Corporation）が開発したMPLの合成誘導体である）をマウスでテストした。これらの実験によって、アルヒドロゲル（商標）製剤へのRC529の包含は、抗M2e IgG2a：IgG1比を約10倍高めて、抗M2e IgG2a力価の劇的な強化をもたらすことが明らかにされた。両群の全てのマウスが致死攻撃から完全に防御されたが、しかしながら、アルヒドロゲル（商標）単独に対して、アルヒドロゲル（商標）+RC529で製剤化されたICC-1569で免疫したマウスで罹患率の低下（体温降下および体重減少）が示された。

20

【0119】

実施例14：部分的切端HBc粒子：部分的切端粒子発現のための発現ベクターの合成

30

部分的に切り縮められたHBc粒子を発現する発現プラスミドを調製するために、ただ1つのアミノ末端オリゴヌクレオチドPCRプライマー（HBc149/NcoI-F）を固有のC-末端プライマーと組み合わせて用いた。例えば、HBc156（E.Cr；ICC-1600粒子）発現プラスミドを調製するために、プライマーHBc149/NcoI-F及びHBc156（E.cR）-H3-Rを用いる。プライマーHBc149/NcoI-F及びHBc156（E.cR）-H3-Rを用いて、HBc156（E.cR）+C（ICC-1601粒子）発現プラスミドを調製する。用いた全てのプライマーの配列は下記に示されている。

粒子の切り縮めの他に、いくつかの事例では、C-末端システイン残基、大腸菌での発現に最適なコドンの取り込みもまた実施された。いくつかのアルギニンコドン（特にAGA及びAGG）は大腸菌ではほとんど用いられず、翻訳時のタンパク質合成を遅延させて未成熟な終了をもたらすことによって大腸菌での効率的なタンパク質発現にとって障害となると考えられている。HBcの150と183の間にある16のアルギニンコドンのうち、7つは希少なAGAコドンによってコードされ、2つは極めて希少なAGGコドンによってコードされている。したがって、本実験では、全てのAGA及びAGGコドンが大腸菌でより高頻度で使用するコドンで置き換えた。

40

希少なアルギニンコドンを連続的に置換させるために、HBc156遺伝子を先ず初めに合成し（ICC-1600及びHBc156+C ICC-1601粒子）、続いてHBc163構築物（ICC-1634及びHBc163+C ICC1632粒子）のための鋳型として用いる。その後、HBc163構築物をHBc171構築物（ICC-1642及びHBc171+C ICC-1643粒子）のため鋳型として用い、最後にHBc171構築物をアルギニンコドン最適化HBc182及びHBc183構築物のための鋳型として用いる。非最適化HBc182構築物（ICC-1575）もまたコントロールのために調製する。全てのPCR生成物を制限酵素Nco

50

I及びHindIIIで切断し、発現ベクターpKK223-3N（以前に述べたように前記は予め同じ酵素で切断されている）でクローニングする。

アミノ末端プライマー配列（NcoI制限部位には下線が付されている）：

【0 1 2 0】

HBc149/NcoI-F

5'-TTGGGCCATGGACATCGACCCTTA

配列番号:51

カルボキシ末端プライマー配列（HindIII制限部位には下線が付されている）：

HBc156(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTAAGGGGAGCGGCCTCGTCGACGAACAACAGTAGTCTCCGG

配列番号:64

10

HBc156C(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTAACAAGGGGAGCGGCCTCGTCGACGAACAACAGTAGT-CTCCGG

配列番号:65

HBc163(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTAAGGCGAGGGAGTGCGCCGACGAGGGGAGCGGCCTCG

配列番号:66

HBc163C(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTAACAAGGCGAGGGAGTGCGCCGACGAGGGGAGCGGCCTCG

配列番号:67

HBc171(E.cR)-H3-R

20

5'-GCGAAGCTTACTACGGCGATTGAGAGCGTCGACGGCGAGGCGAGGGAGT

配列番号:68

HBc171C(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTAACACGGCGATTGAGAGCGTCGACGGCGAGGCGAGGGAGT

配列番号:69

HBc183(E.cR)-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTAACATTGAGATTCCCGAGATTGAGATCGCCGGCGACGCGG-CGATTGAGAGCGTC

配列番号:113

HBc182-H3-R

5'-GCGAAGCTTACTATTGAGATTCCCGAGATTGA

配列番号:114

30

HBc183-H3-R

5'-GGAAAGCTTACTAACATTGAGATTCCCG

配列番号:115

HBc149/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:54

HBc149+C/HindIII-R

5'-CGCAAGCTTACTAGCAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG

配列番号:55

【0 1 2 1】

下記の表5は、完全長HBcAg（HBc183）及びC-末端短縮を有する全ての粒子のC-末端の立体配置を明らかにするアラインメントを示している。配列は、配列番号:1（前記は全ての構築物が共有する）のHBcのN-末端のアミノ酸残基149位からアラインメントされている。C-末端システイン残基には、存在する場合は下線が付されている。

40

【0 1 2 2】

表 5

構築物の名称	配列	配列番号
HBc183	VRRRGRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC	116
HBc182	VRRRGRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQ	117
HBc171(E.cR)+C	VRRRGRSPRRRTSPRRRRSQSPC	118
HBc171(E.cR)	VRRRGRSPRRRTSPRRRRSQSP	119
HBc163(E.cR)+C		

50

	VRRRGRSPRRRTSPSPC	120
HBc163(E.cR)	VRRRGRSPRRRTSPSP	121
HBc156(E.cR)+C	VRRRGRSPC	122
HBc156(E.cR)	VRRRGRSP	123

【 0 1 2 3 】

実施例 15：N-末端システインを含む、又は含まないHBcキメラを用いた粒子の生成及び安定性

システイン残基を0個（粒子1891）、1つ（粒子1892及び1893）、又は2つ（粒子1890）含む、149位で切り縮められた肝炎Bコアのアミノ酸D4に融合した短いN-末端融合物を含む、4種の一連のキメラタンパク質を調製した。分析用サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いて前記キメラを分析し、精製後の粒子の完全性を判定した。これらのN-末端融合物の配列及び単離収量は下記の表6に示されている。

【 0 1 2 4 】

表6：

キメラタンパク質	N-末端融合物*	配列番号	収量(mg/500mL細胞培養)
1890	MGCRNDSS	124	6.8
1891	MGSRSNDSS	125	0
1892	MGSRCNDSS	126	1.9
1893	MGCRSNDSS	127	6.7

20

1つ又は2つ以上のシステインを含む3種のキメラタンパク質は1.9から6.8mg/500mL細胞培養の範囲の収量で精製することができた。イニシエーターメチオニンに対して3位と5位に2つのシステインを含むキメラ（粒子1890）又は3位にただ1つのシステインを含むキメラ（粒子1893）は、5位にただ1つのシステインを含むキメラ（粒子1892）と比較してより高収量で精製された。システイン3又はシステイン5のいずれも含まないキメラタンパク質は粒子として精製することができず、このキメラタンパク質分子は安定な粒子を形成しないことを示唆した。

分析用SECで調べたとき、3種のタンパク質は全て約5 - 8mLで溶出する主要なピーク（前記は粒子を示す）を示した。この発見は、N-末端システインを欠くキメラタンパク質分子（例えばキメラ粒子ICC-1048、前記は粒子及びより低次構造物の混合物として存在する）とは対照的である。SECプロフィルのより詳細な分析は、キメラタンパク質分子1890は検出可能な低次構造物を含まない優れた粒子を形成するが、キメラ1892は少量の非粒子状物質が存在し、さらにキメラ1893はいっそう多くの非粒子状物質が存在することは明らかにした。

異種エピトープを提示する粒子を安定化させるN-末端システイン残基の能力を調べるために、キメラ1890と同じN-末端の立体配置を有し、イムノドミナントループのアミノ酸78と79の間に挿入された、P.ファルシパルム（P. falciparum；NANPNVDPNANPNANPNANP；配列番号：128）由来のCSリピートを含むキメラタンパク質分子を構築した。精製に続いて、得られたキメラ（1894）の粒子の完全性をN-末端融合物を欠く類似のキメラの粒子（1045）と比較した。

これらの構築物のSEC分析によって、キメラ1045は粒子と低次構造物の両方のピークを提示することが示された。キメラ1894のデータの同様な分析では、説明できない粒子形成欠如が示され、これは現在究明中である。

【 0 1 2 5 】

実施例 16：連続的に連結されたN-末端M2ペプチドをもつ粒子の免疫原性

N-末端に融合した種々のM2コピーを含むように遺伝子操作した粒子の免疫原性をウサギでアッセイした（1つ、1604（実施例12）；2つ、1817（実施例9）；又は3つ、1818（実施例9））。これらの粒子は調製後に凍結して、以前に考察され次の実施例でも考察されるように、存在すると考えられるプロテアーゼの影響を最小限にした。4匹のウサギの複数

50

グループを筋肉内ルートで、アルヒドロゲル(商標) (500 μ gアルミニウム/投与)/RC-529-AF (25 μ g/投与)で製剤化した粒子(25 μ g/投与)で3回免疫した。ウサギは0日目、28日目及び56日目に免疫し、さらに0日目(前採血)、14日目、28日目、56日目及び70日目に採血した。血清はELISAを用いて抗M2e抗体レベルについて調べた。

ELISAは、M2e(2-24/C17S,C19S)ペプチドで被覆し(2 μ g/mL、約18時間)、さらに3%B SAでブロックしたマイクロタイタープレートを用いて実施した。血清は1:100稀釈で始め3倍稀釈を用い、デュプリケートでプレートに添加した。ただし予備採血分はトリプリケートで調べた。固定された抗体を検出するために、抗ウサギIgG HRP複合物を添加し、続いて発色原基質TMブルーを添加した。予備採血分のデータを用い、バックグラウンド+予備採血血清サンプル(0日目)の3標準偏差を決定することによって、各ウサギについて各血清稀釈で“カットオフ”を計算した。カットオフより高い吸収値を示す最後の血清稀釈を特定することによって、与えられた血清の稀釈として終末点力価を決定した。個々のウサギが、他のウサギが検出可能な力価(すなわち>0)を示したグループで無応答個体(すなわち力価0)であった場合、そのグループ内の相乗平均力価(GMT)の計算を可能にするために前記無応答個体に力価10を与えた。

10

驚くべきことに、N-末端にただ1つのM2eコピーが融合した粒子は(1604)検出可能な抗M2e応答を生じることができなかったが、粒子1817及び1818は、一次注射後14日で検出可能な抗M2e免疫応答を生じた(表7)。1817粒子については14,030のピーク力価が70日目に観察され、一方、1818粒子では24,300のピーク力価が56日目で観察された。抗M2e力価は、1回、2回又は3回投与後に1604で免疫されたウサギではいずれにおいても観察されなかった。

20

【0126】

表7: 種々のM2e含有粒子で免疫されたウサギのGMT

粒子	14日目	28日目	56日目	70日目
1604	0	0	0	0
1817	0	1,559	6,155	14,030
1818	684	14,030	24,300	8,100

【0127】

実施例17: 内在性プロテアーゼ活性の回避

継続実験によって、M2含有粒子は、メタロプロテアーゼと考えられる未知のプロテアーゼによって切断を受けることが示された(メタロプロテアーゼと思われる理由は、これら粒子のタンパク分解が、粒子の単離及び保存に用いられる緩衝液に10mMのEDTAを混合することによって防止することができるからである)。より低い濃度のEDTAもまた有効であるか否かを決定するために、実施例9で調製し上記でも考察したICC-1818粒子を用いて安定性実験を実施した。これらの粒子を20mMのリン酸ナトリウム(pH7.2)を含む保存緩衝液に入れた。前記緩衝液は、さらに0、1、2、5又は10mMのEDTAを含んでいた。図11に提示した結果は、1mMのEDTAはタンパク質分解の防止に10mMのEDTAと同じように有効であることをはっきりと示している。実際、1mMより低い濃度でも有効でありえる。

30

40

驚くべきことに、EDTAの非存在下でタンパク質分解は、室温でのインキュベーションに比べて37 で低下した。この観察は、このプロテアーゼは非常に易熱性で、したがって比較的低温(40 - 60)で不活化される可能性を示唆している。したがって、粒子の完全性を維持しながら前記タンパク質分解活性を熱処理によって破壊できるか否かを決定する実験を実施した。

プロテアーゼの不活化に加熱工程を用いることができるか否かを判定するために、粒子を40、50、60又は70 で1.5時間又は3時間加熱した。モノマーの完全性はSDS-PAGEを用いて評価し(図12A)、データは全てのモノマーが熱処理後同じようであることを示している。図12Bに提示した第二のゲルは、未処理の粒子は室温(RT)で1週間後に完全に切断されるが、40 で熱処理された粒子は切断の低下を示し、50 でインキュベートされたもの

50

は最小限の切断を示し、60 又は70 でインキュベートされたものはインキュベートされなかったコントロールと外見的に特別できないことを明瞭に示している。

粒子の完全性に対する熱処理の影響を判定するために、熱処理粒子を分析用SECで調べた。図13Aに提示したデータは、60 及び70 での熱処理は粒子の完全性に極めてわずかな影響しか与えないことを示し、これは、モノマー/ダイマーピーク（前記は主要な粒子ピークの後で溶出する）のわずかな増加によって立証することができる。50 及びそれより低い温度での熱処理はSEC溶出プロファイルに対して明白な影響を与えず、粒子はこの加熱工程で悪影響を受けずに持ちこたえることが示唆された。

1週間RTでインキュベートした後の熱処理粒子のSEC分析は、粒子ピークの溶出時間の増加によって立証されたように、熱未処理コントロールのタンパク質分解を明瞭に示している（図13B、RTサンプル）。これは、SDS-PAGEを用いて観察されたタンパク質分解（図12B）と一致し、粒子からM2eが切断されることによって粒子サイズの低下がもたらされることを示唆している。熱処理サンプルはいずれも極めて明瞭な完全粒子ピークを示し、これはまたSDS-PAGE（図12）によって示された切断の欠如と一致する。

これらのデータは、M2e含有粒子の切断をもたらすタンパク質分解活性の不活化に用いられる熱処理は、タンパク質分解の制限のために実行可能な選択肢でありえることを示している。予備的実験は、55 - 60 で3時間のインキュベーションが、粒子の完全性を維持しながらタンパク質分解の不活化を達成するために最適でありえることを主張している。さらにまた、製造プロセスに関しては、加熱工程の結果として遊離されるモノマー及びダイマーが効率的に除去できるように、加熱工程をセファロース(商標)CL-4B工程の前に実施することがおそらく好ましいであろう。この方法を使用することによって、粒子をEDTAの非存在下で保存することができる。

【0128】

実施例18：EDTA及び加熱工程を用いる精製は安定な粒子をもたらす

上記に提示したデータを基にして、EDTA及びM2e切断プロテアーゼ活性の熱不活化を取り入れたプロトタイプの精製プロセスをCV-1906を用いて調べた。前記CV-1906は、ICC-1818粒子のように3つのM2eのN-末端コピーを含み、前記コピーは残基4（アスパラギン酸）で開始するHBc配列に連結されており、さらに前記配列で48位及び107位のシステインはセリン残基で置換され、HBc配列はC-末端配列を除去するために149位に切り縮められており、システイン残基が150位に付加されている（HBc149C48S/C107S,C150）。M2eの3つのコピーに存在することができる6つのシステイン残基のうち、HBc配列に最も近いM2e配列中の2つのシステインのみが実際には存在し、他の4つのシステインはセリン残基で置換されている。

精製プロセスは、熱処理によるプロテアーゼの不活化まで全ての緩衝液で10mMのEDTAの使用を必要とし、前記の時点で、EDTAはセファロース(商標)CL-4Bクロマトグラフィーの間に除去された。熱不活化工程を含むプロセス又は前記を含まないプロセスを比較した。用いたプロセスの詳細は以下のとおりである：

- ・ トリス/EDTA緩衝液中でマイクロフルイダイザーを用いた溶解
- ・ 遠心
- ・ 20%硫酸沈殿
- ・ 遠心
- ・ 1MのNaCl/10mMのEDTA中でのペレットの再懸濁
- ・ EDTA存在下でのフェニルHIC（～300mMのNaClでの溶出）
- ・ +/-熱不活化（60 、3時間）
- ・ EDTAの非存在下でのセファロース(商標)CL-4Bクロマトグラフィー
- ・ セラミックHAクロマトグラフィー

この比較実験によって、予想されたとおり、熱工程に付されなかったCV - 1906粒子は、EDTAが除去されるや直ちに（すなわちセファロース(商標)CL-4Bに続いて）切断が始まった（図14、レーン2）。対照的に、加熱工程を含むプロセスを用いて精製したCV-1906粒子は完全なままであった（図14、レーン1）。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 9 】

実施例19：1つ、2つ又は3つの縦並びM2ペプチドを含むキメラによるサイズ実験

HBcのN-末端に融合した0個、1、2又は3個の縦並びのM2eコピーを含むハイブリッドHBc-M2e粒子を大腸菌で発現させ精製した（表8）。これらの粒子はまた、以前に記載したように、調製後に凍結し使用直前に融解した。種々のモノマーのサイズを還元SDS-PAGEを用いて比較した（図15）。M2e-HBcハイブリッドの相対的移動度はそれらの予想分子量と一致した（表8）。

【 0 1 3 0 】

表8：M2e-HBcハイブリッド粒子の詳細

	M2eコピー	アミノ酸総数	モノマーの予想分子量 (kDa)
1123	0	150	16.95
1604	1	173	19.57
1817	2	198	22.39
1818	3	223	25.20

10

【 0 1 3 1 】

実施例20：1つ、2つ又は3つの縦並びM2ペプチドを含むキメラによる免疫原性実験

N-末端に融合したM2の種々のコピーを含むように遺伝子操作した粒子（1つ、1604；2つ、1817；又は3つ、1818）の免疫原性及び防御効率を、致死攻撃モデルを用いてBALB/cマウスで比較した。特定病原体を含まない雌のBALB/cマウスをチャールズリバー（Charles River, Germany）から入手し、8週齢で免疫に用いた。前記動物を温度制御環境下で12時間の明暗サイクルで飼育し、飼料と水は任意に摂取させた。

20

以下の免疫プロトコルを用いて、全マウスの腹腔に100 μ Lのワクチンを接種した：3週間間隔の接種で、初回ワクチン接種、1回目及び2回目のブースターに、アルヒドロゲル（商標）（100 μ g/投与）及びRC-539-AF（10 μ g/投与）で製剤化した10 μ gのM2e-HBc粒子を用いる。これらの粒子はまた調製後に凍結し、使用直前に融解してプロテアーゼの影響を最小限にした。各免疫前および2週間後に、腹側尾静脈の穿刺により血液サンプルを採集した。最後の採血は心臓穿刺によって実施した。37℃で30分間血液を凝固させ、その後の2回の遠心から上清を採取することによって血清を集めた。M2e特異的IgGの力価はELISAにより決定した。

30

1817又は1818粒子で免疫したマウスは致死攻撃に続いて完全な生存を示したが、1604粒子で免疫したマウスはある程度の死亡率を示した（図16参照）。M2e非含有粒子（1123）又はPBSで免疫したマウスは100%の死亡率を示し（図16）、攻撃の激烈さを示した。1817及び1818粒子で免疫したマウスの防御の強化は、1604粒子と比較して罹患率の低下（体重減少及び体温低下）によって補完され、2つ又は3つのM2eコピーを発現する粒子で免疫されたマウスの防御は、ただ1つにコピーを発現する粒子（1604）と比べてより強固であることを示した（図17及び図18）。

抗M2e力価はELISAを用いて決定された。ELISAプレートに50mMの重炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.7）中の50 μ LのM2eペプチド溶液（2 μ g/mL）で37℃で一晩（約18時間）被覆した。マイクロタイタープレート（タイプII F96 MaxiSorp（商標））を用いた。プレートを洗浄後、200 μ LのPBS+2%BSA溶液を用いてブロックした。1時間インキュベートした後、種々の血清サンプルの1/3段階希釈（1/50希釈から開始）をペプチド被覆ウェルに加えた。結合抗体は、それぞれマウスIgG1及びIgG2に対して作製したペルオキシダーゼ標識抗体（Southern Biotechnology Associates, Inc.）（PBS+1%BSA+0.05%トウイーン（商標）-20中で1/6000に希釈）で検出した。洗浄後、マイクロタイタープレートをTMB基質とともに5分間インキュベートした。反応は1MのH₃PO₄の添加により停止し、吸収を450nmで測定した。M2eに特異的な結合のための値を得るために、免疫前血清について得られた吸収を対応する希釈の免疫血清で得られた吸収から差し引いた。

40

ELISAのデータは、粒子1817及び1818は、粒子1604よりそれぞれ10.4倍及び8.4倍高い抗

50

M2e IgG1力価を誘引することを示した。同様に粒子1817及び1818は、1604で観察された力価よりそれぞれ5.5倍及び7.6倍高い抗M2e IgG2a力価を誘引した（表9）。

【0132】

表9：粒子1604、1817及び1818*に対する抗M2e力価
（IgG1及びIgG2aサブクラス）の比較

粒子	抗M2e	
	IgG1	IgG2a
1604	149,850 (82,901)	9,100 (7,386)
1817	1,564,546 (605,630)	50,469 (24,228)
1818	1,261,731 (654,156)	69,161 (48,556)

10

*個々のマウスの血清サンプルをアッセイした。標準偏差はカッコ内に示されている。

抗HBcの決定については、ELISAプレート（タイプII F96 MaxiSorp(商標)）を、HBcに対して作製したポリクローナルウサギ抗体溶液（DAKO）（10 µg/mL）の100 µLで被覆した。プレートを洗浄後、PBS+3%BSA溶液をブロックに用いた。洗浄後、HBc抗原（重炭酸ナトリウム緩衝液中に10 µg/mL）を1時間捕捉させた。洗浄後、種々の血清サンプルの1/3段階希釈（1/1000希釈から開始）をウェルに加えた。結合抗体は、マウスIgGに対して作製したアルカリホスファターゼ標識抗体（Sigma）（PBS+1%BSA中で1/10,000に希釈）で検出した。更に洗浄した後、マイクロタイタープレートを基質とともに30分間インキュベートした。吸収を415nmで測定した。

20

肝炎Bコア抗原に特異的な反応性の値を得るために、免疫前血清について得られた吸収を、対応する希釈の免疫血清で得られた吸収から差し引いた。個々のサンプルのIgG1抗HBc力価の決定のために、マウスIgG1に対して作製したペルオキシダーゼ標識抗体（Southern Biotechnology Associates, Inc.）（PBS+1%BSA+0.05%トウイーン(商標)-20中で1/6000に希釈）を用いて、結合抗体を検出した。洗浄後、マイクロタイタープレートをTMB基質とともに5分間インキュベートした。反応は1MのH₃PO₄の添加により停止し、吸収を450nmで測定した。

30

ELISAのデータは、粒子1817及び1818は、粒子1604について観察された力価よりそれぞれ2.4倍及び10.1倍低い抗HBc IgG1力価を誘引することを示した（表10）。これらのデータは、HBc粒子の表面のM2e密度の増加は、HBc担体に対する抗体応答を積極的に抑制することを示している。したがって、抗M2e：抗HBc比（IgG1）は、1604粒子と比較して、1818粒子については75倍高く、1817粒子については23倍高かった。したがって、ワクチン接種宿主でインフルエンザM2eに対する免疫応答は、HBc担体粒子（非常に免疫原性が高いことが知られている）に対する免疫応答よりもいっそう高い。

【0133】

表10：抗M2eと抗HBc力価*（IgG1サブクラス）の比較

	抗M2e	抗HBc	抗M2e：抗HBc比
1604	149,850 (82,901)	4,264,650 (1,940,769)	0.04
1817	1,564,546 (605,630)	1,766,423 (473,443)	0.89
1818	1,261,731 (654,156)	420,577 (218,052)	3.00

40

*個々のマウスの血清サンプルを調べた。

*標準偏差はカッコ内に示されている。

本明細書に引用した特許及び文献の各々が参照により本明細書に含まれる。冠詞の“a

50

”又は“an”は1つ又は2つ以上を含むことを意図している。

前述の説明及び実施例は例示を意図しており、制限と解釈されるべきではない。本発明の範囲内であらう他の変型例が可能であり、それらは当業者に容易に提示されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0134】

【図1】図1Aおよび図1Bとして2つのパネルで示されている図1は6つのウイルスに由来する哺乳類HBcタンパク質の6種の公表された配列のアラインメントを提供する。第一（配列番号:1）のヒトのウイルス配列はaywサブタイプであり、Galibertら（Nature 281:646-650（1983））の報告に記載されている。第二のヒトのウイルス配列（配列番号:2）はadwサブタイプであり、Onoら（Nucleic Acids Res. 11(6):1747-1757（1983））の報告に記載されている。第三のヒトのウイルス配列は、adw2サブタイプであり、Valenzuelaら（Animal Virus Genetics, Field et al. eds., Academic Press, New York 1980, pages 57-70）によって刊行されている。第四のヒトのウイルス配列（配列番号:4）はadywサブタイプであり、Pasekら（Nature 282:575-579（1979））の報告に記載されている。第五の配列（配列番号:5）は、Galibertら（J. Virol. 41:51-65（1982））が記載したウッドチャックウイルスの配列である。第六の哺乳類の配列（配列番号:6）は、Seegerら（J. Virol. 51:367-375（1984））が記載した地上リスのウイルスの配列である。

10

【図2】組換えHBcキメラの製造のために本明細書で用いられるプラスミドベクターpKK223-3Nの調製で、市販のプラスミドベクターpKK223-3で実施された改変を示す。改変配列（配列番号:7）は市場で入手できるベクター（配列番号:8）の配列の下に示されている。付加されるNcoI部位の塩基は小文字で示され、付加塩基は二重下線で示され、一方、欠落塩基は点線で示されている。前記配列のこのセグメントに存在する2つの制限部位（NcoIおよびHindIII）が表示されている。

20

【図3】ICC-1603粒子のサイズ排除分析クロマトグラフィーの溶出プロファイルである。前記では280nmの吸収は縦座標で示され、時間（秒）は横座標で示されている。

【図4】図3について説明したように、ICC-1590粒子のサイズ排除分析クロマトグラフィーの溶出プロファイルである。

【図5】図3について説明したように、ICC-1560粒子のサイズ排除分析クロマトグラフィーの溶出プロファイルである。

【図6】図3について説明したように、ICC-1605粒子のサイズ排除分析クロマトグラフィーの溶出プロファイルである。

30

【図7】図3について説明したように、ICC-1604粒子のサイズ排除分析クロマトグラフィーの溶出プロファイルである。

【図8】図3について説明したように、ICC-1438粒子のサイズ排除分析クロマトグラフィーの溶出プロファイルである。

【図9】図3について説明したように、ICC-1492粒子のサイズ排除分析クロマトグラフィーの溶出プロファイルである。

【図10】粒子調製後の還元条件下でのSDS-PAGE分析の写真である。前記は、ICC-1438モノマー構築物は、ICC-1492構築物（レーン3）と比較してエージング後に不安定であったことを示している。HBc-149（レーン1）、ICC-1475（レーン4）及びICC-1473（レーン5）はさらに別の分子量コントロールとして供されている。

40

【図11】2枚のパネルは、順次連結された3つのM2eポリペプチドを含むCV-1818粒子の、粒子保存緩衝液（20mMリン酸ナトリウム、pH7.2）中のEDTA、0、1、2、5及び10mM（各カラムの上に示されている）を室温（RT；図11A）及び37（図11B）で用いた安定実験後のSDS-PAGE分析の写真を示し、EDTAの添加（1 - 10mM）により切断がないことが示されている。コントロール（C）は、使用直前に冷凍庫から取り出された同じ粒子のサンプルであった。

【図12】2枚のパネルは、図11の場合のようにコントロール（図12A）の室温での保存、表示温度での1.5時間又は3時間（表示のとおり）の加熱処理後又は1週間保存後（図12B）のCV-1818粒子モノマーのタンパク分解の低下が明示されるSDS-PAGEの写真を示す。

50

【図 18】インフルエンザAウイルスで攻撃された上記マウスの体重を示すグラフである

```

41 alespehcsp hhtairgail cwgelmtilat wvgvnledpa
alespehcsp hhtairgail cwgelmtilat wvgvnlgdpa
alespehcsp hhtairgail cwgelmtilat wvgvnledpa
alespehcsp hhtairgail cwgelmtilat wvgvnledpa
eltgrehcsp hhtairgalv cwdelmtkia wmsentseeg
eltgrehcsp hhtairgalv cweeltrilit wmsentteev

```

```

161
psprxrqs prrrsqsre sqc
rtpsprrrs qsprrrsqs resqc
rtpsprrrs qsprrrsqs resqc
psprrrs prrrsqsre sqc
prrrtprrr rrsqsprrr sqc
rrrtpsprrr rrsqprrrs qspasnc

```

```

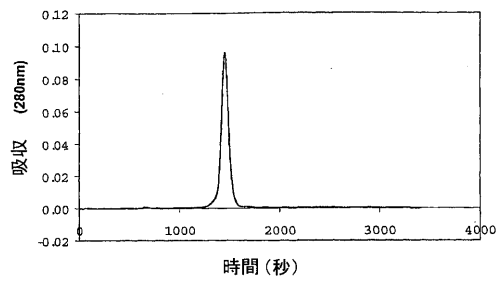
151
psprrrrsqs prrrrsqsre sqc
rtpsprrrrs qsprrrrsqs resqc
rtpsprrrrs qsprrrrsqs resqc
psprrrrsqs prrrrsqsre sqc
prrrtsprrr rtsqsprrrr sqc
rrtsprrrr rqsqprrrrr qspasnc

```

SEQ ID NO:7
 pKK223-3N TTACATAAGGAGCGAAAAAaccatcgGATCCG--
 -----AAGCTT
 NcoI
 SEQ ID NO:8

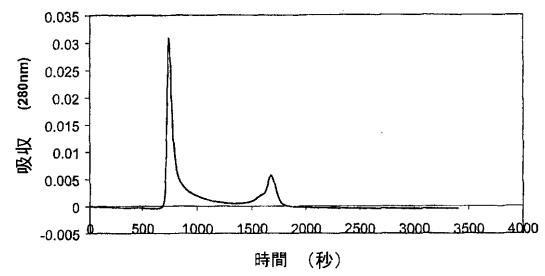
【 図 3 】

Fig. 3



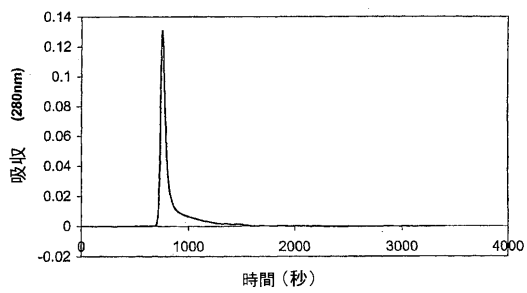
【 図 5 】

Fig. 5



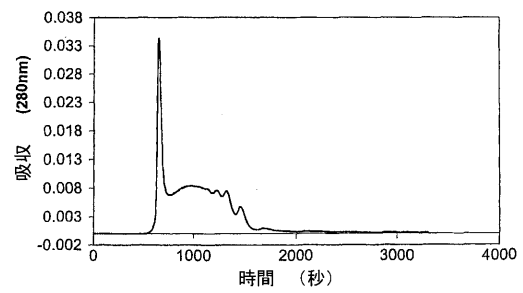
【 図 4 】

Fig. 4



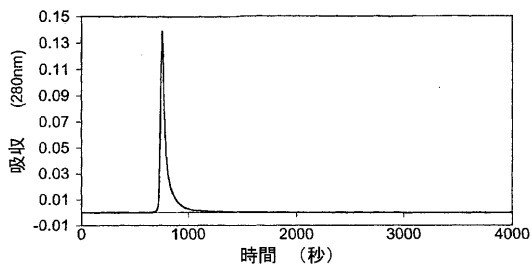
【 図 6 】

Fig. 6



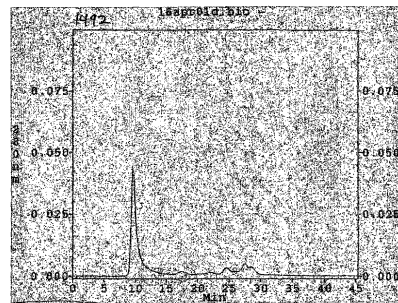
【 図 7 】

Fig. 7



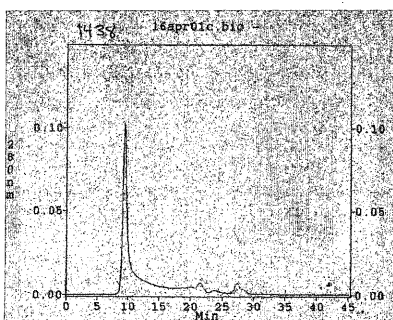
【 図 9 】

Fig. 9

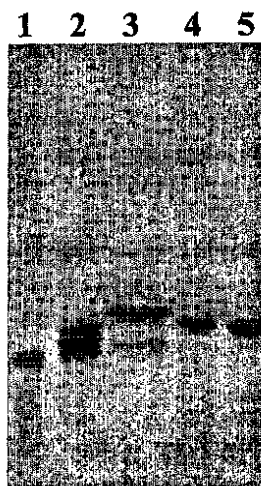


【 図 8 】

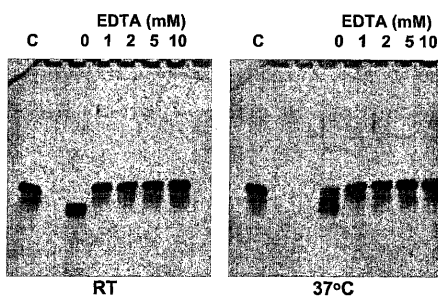
Fig. 8



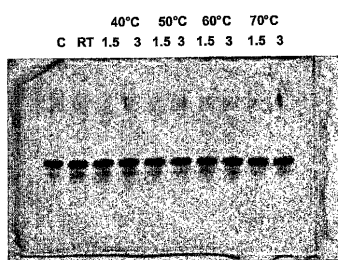
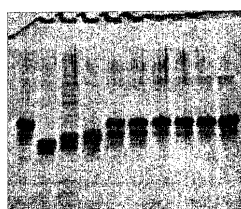
【 図 1 0 】

Fig. 10

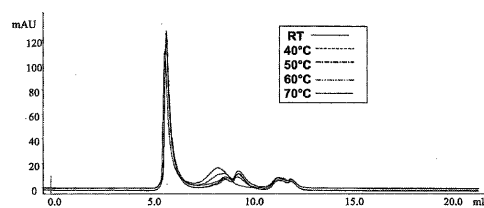
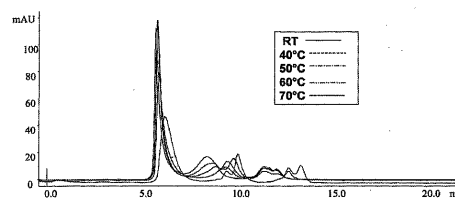
【 図 1 1 】

Fig. 11**Fig. 11A****Fig. 11B**

【 図 1 2 】

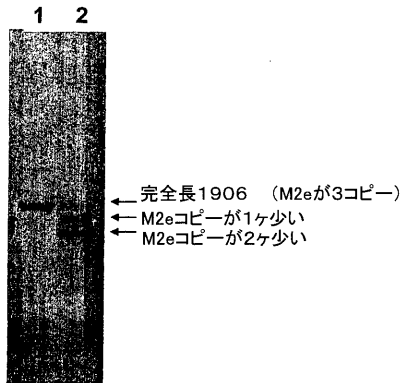
Fig. 12**Fig. 12A****Fig. 12B**

【 図 1 3 】

Fig. 13**Fig. 13A****Fig. 13B**

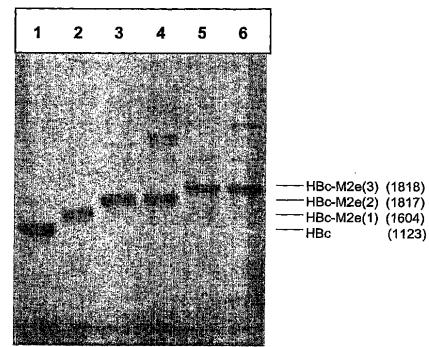
【図 14】

Fig. 14



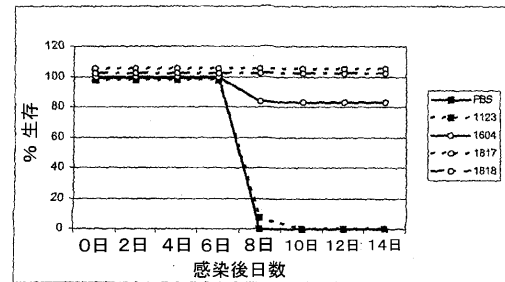
【図 15】

Fig. 15



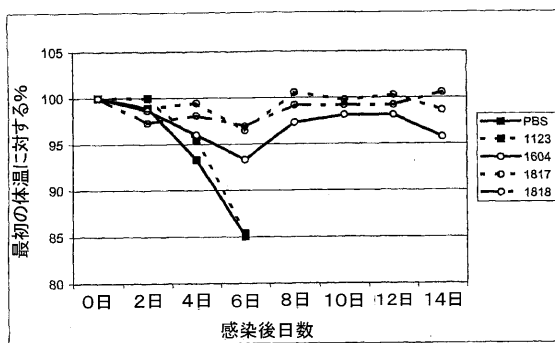
【図 16】

Fig. 16



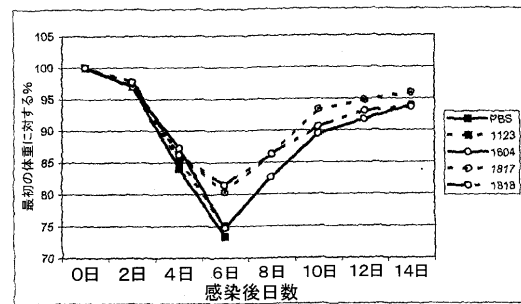
【図 17】

Fig. 17



【図 18】

Fig. 18



【配列表】

2007513634000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/418.																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/145, 39/29, 39/00, 39/385, 39/295- <i>CD7K 14/02, 14/11, 17/00</i> US CL : 424/206.1, 227.1, 189.1, 192.1, 196.11, 202.1, 209.1; 530/350, 403 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/206.1, 227.1, 189.1, 192.1, 196.11, 202.1, 209.1; 530/350, 403 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) East - USPAT, PGPUBS, EPO, JPO, DERWENT; STN - Medline																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>NEIRYNCK, S. et al., "A universal influenza A vaccine based upon the extracellular domain of the M2 protein", Nature Medicine, October 1999, Vol. 5(10), pages 1157-1163. Especially Fig. 1 on page 1157 and page 1162.</td> <td>1-2 and 4-53</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 01/98333 A2 (CELLTECH PHARMACEUTICALS LIMITED) 27 December 2001 (27.12.2001) pages 2, 10-20.</td> <td>1-2, 4-6, 8-53</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ULRICH, R. et al. "Core Particles of Hepatitis B Virus as Carrier for Foreign Epitopes", Adv Virus Res., 1998, Vol. 50, pages 141-182. Especially page 163.</td> <td>1, 7, 32-45</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>YOSHIKAWA, A. et al. "Chimeric Hepatitis B Virus Core Particles with Parts of Copies of the Hepatitis C Virus Core Protein", Journal of Virology, October 1993, Vol. 67(10), pages 6064-6070. Especially page 6068.</td> <td>1, 7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>MILICH, D.R. et al., "Conversion of poorly immunogenic malaria repeat sequences into a highly immunogenic vaccine candidate", Vaccine, 12 December 2001, Vol. 20(5-6), pages 771-88. Especially page 773.</td> <td>32-45</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	NEIRYNCK, S. et al., "A universal influenza A vaccine based upon the extracellular domain of the M2 protein", Nature Medicine, October 1999, Vol. 5(10), pages 1157-1163. Especially Fig. 1 on page 1157 and page 1162.	1-2 and 4-53	Y	WO 01/98333 A2 (CELLTECH PHARMACEUTICALS LIMITED) 27 December 2001 (27.12.2001) pages 2, 10-20.	1-2, 4-6, 8-53	Y	ULRICH, R. et al. "Core Particles of Hepatitis B Virus as Carrier for Foreign Epitopes", Adv Virus Res., 1998, Vol. 50, pages 141-182. Especially page 163.	1, 7, 32-45	Y	YOSHIKAWA, A. et al. "Chimeric Hepatitis B Virus Core Particles with Parts of Copies of the Hepatitis C Virus Core Protein", Journal of Virology, October 1993, Vol. 67(10), pages 6064-6070. Especially page 6068.	1, 7	Y	MILICH, D.R. et al., "Conversion of poorly immunogenic malaria repeat sequences into a highly immunogenic vaccine candidate", Vaccine, 12 December 2001, Vol. 20(5-6), pages 771-88. Especially page 773.	32-45
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y	NEIRYNCK, S. et al., "A universal influenza A vaccine based upon the extracellular domain of the M2 protein", Nature Medicine, October 1999, Vol. 5(10), pages 1157-1163. Especially Fig. 1 on page 1157 and page 1162.	1-2 and 4-53																		
Y	WO 01/98333 A2 (CELLTECH PHARMACEUTICALS LIMITED) 27 December 2001 (27.12.2001) pages 2, 10-20.	1-2, 4-6, 8-53																		
Y	ULRICH, R. et al. "Core Particles of Hepatitis B Virus as Carrier for Foreign Epitopes", Adv Virus Res., 1998, Vol. 50, pages 141-182. Especially page 163.	1, 7, 32-45																		
Y	YOSHIKAWA, A. et al. "Chimeric Hepatitis B Virus Core Particles with Parts of Copies of the Hepatitis C Virus Core Protein", Journal of Virology, October 1993, Vol. 67(10), pages 6064-6070. Especially page 6068.	1, 7																		
Y	MILICH, D.R. et al., "Conversion of poorly immunogenic malaria repeat sequences into a highly immunogenic vaccine candidate", Vaccine, 12 December 2001, Vol. 20(5-6), pages 771-88. Especially page 773.	32-45																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
* Special categories of cited documents: <table border="1"> <tbody> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed									
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family																			
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 03 March 2005 (03.03.2005)		Date of mailing of the international search report 06 SEP 2005																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Michael M. McGowan <i>Valerie Bell-Hagans</i> Telephone No. 571-272-1606																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International s
PCT/US04/41879

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HEINEN, P.P. et al. "Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza virus", <i>Journal of General Virology</i> , August 2002, vol. 83, pages 1851-1859. Especially abstract and page 1858.	32-45
A	JEGERLEHNER A. et al. "Influenza A Vaccine Based on the Extracellular Domain of M2: Weak Protection Mediated via Antibody-Dependent NK Cell Activity", <i>Journal of Immunology</i> , 01 May 2004, Vol. 172, pages 5598-5605.	32-45
A	US 2003/0198645 A1 (PAGE et al) 23 October 2003 (23.02.2003)	1-53
A	ZHOU, S. et al. "Cys Residues of the Hepatitis B Virus Capsid Protein Are Not Essential for the Assembly of Viral Core Particles but Can Influence Their Stability", <i>Journal of Virology</i> , September 1992, Vol. 66(9), pages 5393-5398.	1-31
A	JEGERLEHNER, A. et al. "A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses", <i>Vaccine</i> , 19 August 2002, Vol. 20(25-26) pages 3104-3112.	1-31
A	PUMPENS, P. et al. "Hepatitis B Virus Core Particles as Epitope Carriers", <i>Intervirology</i> , 1995, Vol. 38, pages 63-74.	1-53
Y	TSUDA, S. et al. "Application of the Human Hepatitis B Virus Core Antigen from Transgenic Tobacco Plants for Serological Diagnosis", <i>Vox Sangunis</i> , 1998, Vol. 74, pages 148-155. Especially page 149.	34

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
C 0 7 K 14/02 (2006.01)	C 0 7 K 14/02	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 バークETT アシュレー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 1 ボストン サウス ストリート 2 1 0 #
7 - 2

(72)発明者 フィール ワルテール

ベルギー ベー 9 0 7 0 デステルベルゲン ブーケンドレーフ 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 CA07 DA05 DA06 EA04 FA02 GA11 HA01
4B065 AA01X AA26X AA96Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA45
4C076 AA12 AA17 AA22 AA31 BB11 CC35 DD22 DD24 DD34 DD59F
DD63F DD68 DD69 EE41 EE59 FF11 FF16 FF63 FF68 FF70
GG41
4C085 AA03 BA55 CC08 DD62 DD86 EE01 EE06 EE10 FF01 FF02
FF11 FF13 FF14 FF17 FF18 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA02 DA86 EA31 FA74

【要約の続き】

【化1】

A

地上性リス

mylfhlcclvf acvpcptvqa sklcclgwlwd

1

HBC AYW	mdidpykefg	atvellsflp	sdffpsvrdl	ldtasalyre
HBC ADW	mdidpykefg	atvellsflp	sdffpsvrdl	ldtasalyre
HBC ADW2	mdidpykefg	atvellsflp	sdffpsvrdl	ldtasalyre
HBC ADYW	mdidpykefg	atvellsflp	sdffpsvrdl	ldtaaalyrd
ウッドチャック	mdidpykefg	ssyqllnflp	ldffpdlnal	vdtaalyee
地上性リス	mdidpykefg	ssyqllnflp	ldffpdlnal	vdtaaalyee

41

HBC AYW	alespehcsp	hhtalrqail	cwgelmtlat	wvgvnledpa
HBC ADW	alespehcsp	hhtalrqail	cwgelmtlat	wvgnnlqdp
HBC ADW2	alespehcsp	hhtalrqail	cwgelmtlat	wvgnnledpa
HBC ADYW	alespehcsp	hhtalrqail	cwgdlnltat	wvgtnledpa
ウッドチャック	eltgrehcsp	hhtairqalv	cwdeltklia	wmsnitseq
地上性リス	eltgrehcsp	hhtairqalv	cweeltrlit	wmsentteev

B

81

HBC AYW	srdlvvsyvn	cnmglkirql	lwfhiscltf	gretvieylv
HBC ADW	srdlvvnynv	cnmglkirql	lwfhiscltf	gretvleylv
HBC ADW2	srdlvvnynv	cnvglkirql	lwfhiscltf	gretvleylv
HBC ADYW	srdlvvsyvn	cnvglkirql	lwfhiscltf	gretvleylv
ウッドチャック	virtliivnhvn	dtwglkvrqs	lwfhlscoltf	gqhtvqeflv
地上性リス	rrriivdhvnn	twglkvrqtl	wfhlscoltfg	qhtvqeflvs

121

HBC AYW	sfgwirtpp	ayrppnapil	stlpettvvr	rrgrsprrrt
HBC ADW	sfgwirtpp	ayrppnapil	stlpettvvr	rrdrgsprrr
HBC ADW2	sfgwirtpp	ayrppnapil	stlpettvvr	rrdrgsprrr
HBC ADYW	sfgwirtpp	ayrppnapil	stlpettvvr	rrgrsprrrt
ウッドチャック	sfgwirtpa	pyrppnapil	stlpehtvir	rrggarasrs
地上性リス	fgwirtpap	yrppnapils	tlpehtvirr	rggsraarsp

161

HBC AYW	psprxrirsqs	prrrrsqsre	sqc
HBC ADW	rtpsprxrirs	qsprrrrsqs	resqc
HBC ADW2	rtpsprxrirs	qsprrrrsqs	resqc
HBC ADYW	psprxrirsqs	prrrrsqsre	sqc
ウッドチャック	prrrtpsprrr	rrsqsprrrr	sqc
地上性リス	rrrrtpsprrr	rsqsprrrrs	qspasnc