

(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2017-527293

(P2017-527293A)

(43) 公表日 平成29年9月21日(2017.9.21)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 1/19 (2006.01)
C 07 K 14/445 (2006.01)
C 07 K 19/00 (2006.01)
C 12 P 21/02 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00
C 12 N 1/19
C 07 K 14/445
C 07 K 19/00
C 12 P 21/02

テーマコード(参考)

4 B 06 4
4 B 06 5
4 C 08 5
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-513039 (P2017-513039)
(86) (22) 出願日 平成27年9月2日 (2015.9.2)
(85) 翻訳文提出日 平成29年5月2日 (2017.5.2)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2015/070044
(87) 國際公開番号 WO2016/037916
(87) 國際公開日 平成28年3月17日 (2016.3.17)
(31) 優先権主張番号 14183995.1
(32) 優先日 平成26年9月8日 (2014.9.8)
(33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号 62/047,286
(32) 優先日 平成26年9月8日 (2014.9.8)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 597159765
フランホーファーゲゼルシャフト ツール フォルデルング テル アンゲヴァン
テン フォルシュング エー. フアー.
ドイツ国, デー-80686 ミュンヘン
, ハンサシュトラーゼ 27ツェー
(74) 代理人 100092783
弁理士 小林 浩
(74) 代理人 100120134
弁理士 大森 規雄
(74) 代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
(72) 発明者 スピエゲル, ホルガー
ドイツ国 52074 アーヘン, クレン
ホフワインケル 26エー
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】三成分多段階マラリアワクチン

(57) 【要約】

本明細書において提供される技術は、前赤内期、血液、および有性寄生生物の主な段階に由来するいくつかの異なる熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 抗原を含む種々の組換えタンパク質、特に、組換え融合タンパク質から構成される新規マラリアワクチンに関する。タンパク質は、ヒトにおいて防御免疫応答を誘発するために混合物ワクチン製剤中に使用され得る。前記組換えタンパク質をコードする核酸分子、核酸を含有するベクターおよび宿主細胞ならびにこのようなタンパク質を調製および生成する方法、ならびに前記マラリアワクチンの使用によって誘導または作製される抗体ならびに受動免疫療法のためのこのような抗体または組換え誘導体の使用も開示されている。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

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

- a) P f C S P の前赤内期抗原 T S R - ドメインまたはその変異体もしくは断片、
- b) 血液段階抗原頂端膜抗原 (P f A M A 1) の 1 種または複数の変異体または断片およびメロゾイド表面タンパク質 P f M s p 1 - 1 9 またはその変異体もしくは断片および P f R h 5 由来のペプチドまたはその変異体、
- c) 有性段階、オーキネート抗原 P f s 2 5 またはその変異体もしくは断片を含む、混合物。

10

【請求項 2】

前記頂端膜抗原 (P f A M A 1) の変異体または断片が、P f A M A 1、P f A M A 1 - D I C O 1、P f A M A 1 - D I C O 2、P f A M A 1 - D I C O 3 の任意の野生型変異体ならびにその変異体もしくは断片からなる群から選択される、請求項 1 に記載の混合物。

【請求項 3】

前記頂端膜抗原の変異体または断片が、P f A M A 1 - D I C O 1、P f A M A 1 - D I C O 2 および P f A M A 1 - D I C O 3 を含む、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載の混合物。

20

【請求項 4】

前記抗原が、1 種または複数の組換え融合タンパク質中に含まれる、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の混合物。

【請求項 5】

3 種の組換え融合タンパク質を含み、前記異なる組換え融合タンパク質が、以下の抗原：

- a) 融合タンパク質 1 : P f A M A 1 - D I C O 1、P f s 2 5 および P f C S P _ T S R
- b) 融合タンパク質 2 : P f A M A 1 - D I C O 2、P f s 2 5 および P f M S P 1 - 1 9
- c) 融合タンパク質 3 : P f A M A 1 - D I C O 3、P f s 2 5 および P f R h 5 由来のペプチド

30

を含む、請求項 4 に記載の混合物。

【請求項 6】

前記 3 種の組換え融合タンパク質が、

- a) 融合タンパク質 1 : 配列番号 9、
- b) 融合タンパク質 2 : 配列番号 1 0、
- c) 融合タンパク質 3 : 配列番号 1 1、

または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失による組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチド

40

のアミノ酸配列を有する、請求項 5 に記載の混合物。

【請求項 7】

前記 3 種の組換え融合タンパク質が、

- a) 融合タンパク質 1 : 配列番号 9、
- b) 融合タンパク質 2 : 配列番号 1 0、
- c) 融合タンパク質 3 : 配列番号 1 2、

または 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失による組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチド

のアミノ酸配列を有する、請求項 5 に記載の混合物。

50

【請求項 8】

前記組換え融合タンパク質が、混合物中に等モル比で含まれる、請求項 5 から 7 のいずれか一項に記載の混合物。

【請求項 9】

a) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 または配列番号 12 の配列を有するポリペプチドをコードする核酸分子、

b) 好ましくは、1個もしくは複数のアミノ酸残基が保存的に置換されている、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 または配列番号 12 の配列を有する配列の修飾された形態をコードする核酸分子、

c) ストリンジエントな条件下で a) ~ b) の核酸分子のいずれかとハイブリダイズ可能である核酸分子、10

d) ストリンジエントな条件下で a) ~ c) の核酸分子のいずれかの相補体とハイブリダイズ可能である核酸分子、

e) a) ~ d) の核酸分子のいずれかと少なくとも 85 % の配列同一性を有する核酸分子、

f) または a) ~ e) の核酸分子のいずれかの相補体
からなる群から選択される単離された核酸分子。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のヌクレオチド分子を含むベクター。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のベクターを含む宿主細胞であって、酵母細胞、特に、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) である、宿主細胞。20

【請求項 12】

活性成分としての請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の混合物を含む、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に対してヒト個体を免疫処理するのに適した、ワクチン組成物。

【請求項 13】

アジュvantをさらに含む、請求項 12 に記載のワクチン組成物。

【請求項 14】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の組換えタンパク質の混合物を生成する方法であって、(a) 前記組換えタンパク質を生成するのに適した条件下、適した培養培地内で請求項 11 に記載の宿主細胞を培養するステップと、(b) 前記生成された組換えタンパク質を得るステップと、任意選択で、(c) 前記組換えタンパク質をプロセシングするステップとを含む、方法。30

【請求項 15】

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

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本開示は、前赤内期、血液および有性寄生生物の主な段階に由来するいくつかの異なる熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 抗原を含む種々の組換えタンパク質、特に、組換え融合タンパク質から構成される新規マラリアワクチンに関する。タンパク質は、ヒトにおいて防御免疫応答を誘発するために混合物ワクチン製剤中に使用され得る。前記組換えタンパク質をコードする核酸分子、核酸を含有するベクターおよび宿主細胞ならびにこのようなタンパク質を調製および生成する方法、ならびに前記マラリアワクチンの使用によって誘導または作製される抗体ならびに受動免疫療法のためのこのような抗体または組換え誘導体の使用も開示されている。

【背景技術】**【0002】**

10

20

30

40

50

マラリアは、アピコンプレクサ (Apicomplexa) 門原生動物の寄生生物、すなわちプラスモジウム属 (Plasmodium) の寄生生物による感染によって引き起こされる疾患であり、全世界で毎年 2 億人以上の新規感染、および 70 万人以上の死亡を引き起こす。マラリアは、アフリカでは特に深刻な問題であり、5 人に 1 人 (20%) の小児の死亡はこの疾患の影響によるものである。アフリカの小児は毎年、平均して 1.6 から 5.4 の間のマラリア発熱のエピソードを有する。

【0003】

ヒトでは、マラリア疾患はプラスモジウム属 (Plasmodium) 寄生生物のうち 5 種：熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*) および二日熱マラリア原虫 (*P. knowlesi*) によって引き起こされ、中でも最も蔓延しているのは熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) および三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*) である。熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) によって引き起こされるマラリア（悪性マラリア、熱帯熱マラリアまたは熱帶性マラリアとも呼ばれる）は最も危険な形態のマラリアであり、最高割合の合併症および死亡率を有する。ほとんどすべてのマラリアによる死亡は熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) によって引き起こされる。

【0004】

手短には、ヒトにおけるマラリア原虫の生活環（図 1）は、ハマダラカ属 (*Anopheles*) の蚊に刺されることによる 2、3 のスプロゾイトの播種で開始する。数分でスプロゾイトは肝細胞に侵入してその発達を開始し、シゾゴニーによって増殖する（肝臓段階または前赤内期段階）。マラリア原虫の種に応じて 5 ~ 14 日の期間の後、シゾントは何千ものメロゾイトに発達し、これが血流中に放出され、赤血球 (RBC) に侵入し、血液段階を開始する。RBC 内で各メロゾイトが、マラリア原虫の種に応じて、42 ~ 72 時間以内にトロホゾイトに発達し、これが成熟、分裂し、シゾントが生じ、これが十分に成熟した後、最大 32 個のメロゾイトを生じさせる。血流中に放出されたメロゾイトは他の RBC に侵入し、その生活環を維持する。いくつかのメロゾイトは RBC に侵入した後、有性型 - 雄または雌ガメトサイトに発達し、これも成熟および赤血球破裂後に血流に入る。雌のハマダラカ属 (*Anopheles*) の蚊が吸血し、ガメトサイトを摂取すると、感染することとなり、プラスモジウム属 (Plasmodium) 生活環の有性段階を開始する。蚊の腸では雄ガメトサイトが雌ガメトサイトと融合し、腸壁と結合し、それを通過するオーキネートを形成し、その外面と結合したままオーシストに変換する。オーシストはスプロゴニーによって分裂し、数千ものスプロゾイトが生じ、それらが蚊の体腔中に放出され、最終的にその唾液腺に移動し、ここでそれらは成熟し、吸血のために宿主を刺すときにヒトにおいて新規感染を開始できるようになる。

【0005】

既存の抗マラリア薬クロロキンに対する熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の耐性は 1960 年代に出現し、それから蔓延した。さらにマラリア原虫は、過去数十年かけてほとんどのその他の抗マラリア薬に対する耐性を発達させた。これは熱帯諸国における公衆衛生および旅行者を大きく脅かす。抗マラリア薬耐性の蔓延および程度は増大し続けると考える十分な根拠がある。殺虫剤耐性ベクターおよび薬剤耐性寄生生物の数の増大が、有効なマラリアワクチンの需要をさらに増大する。マラリアワクチンは単一の作用様式に限定されず、マラリアによる負担を劇的に軽減する可能性がある。

【0006】

効率的なマラリアワクチンを開発する困難の一部は、寄生生物の多段階の生活環に起因する。寄生生物発達の各段階は、異なる種類の免疫応答を誘発する異なるセットの表面抗原を特徴とする。提示されるさまざまな表面抗原にもかかわらず、それらに対する免疫応答は有効でないことが多い。理由の 1 つはマラリア原虫抗原の大規模な配列多形であり、これが種々の分離株の免疫回避を促進する。

【0007】

前赤内期のワクチンは、蚊によって注入される感染性形態（スプロゾイト）から保護し

10

20

30

40

50

、それによって肝臓における寄生生物発達を阻害する。これまでに曝露されていない個体では、2、3の寄生生物が前赤内期のワクチンによって誘導された免疫防御を逃れた場合、それらは最終的に血液段階に入り、赤血球内で増殖し、最も悪化した疾患を確立する。

【0008】

赤血球または血液段階ワクチンは、赤血球における寄生生物の侵襲および増殖を阻害し、したがって血液感染の間の重症疾患症状を防ぐ（または減少させる）。しかし、このアプローチによってプラスモジウム属（*Plasmodium*）生活環を完全に中断し、寄生生物の伝達を防ぐ可能性は低い。

【0009】

有性段階ワクチンは、ワクチン接種されているヒトを保護しないが、代わりに、寄生生物が蚊によって取り込まれると、ワクチンに応じて生じた抗体とともに、寄生生物の発達を阻害することによって伝達のサイクルを妨げる。伝達阻止ワクチンは、寄生生物排出に対して、同時に抗前赤内期または赤血球治療に対する寄生生物耐性の防止に対して向けられた多角的戦略の一部として含まれ得る。

10

【0010】

マラリア原虫の上記の複雑な多段階生活環は、相乗的ワクチニアプローチについて独特の課題を示す。マラリア原虫に対する免疫性は段階依存的であり、種依存的である。多数のマラリア研究者および教本の記述は、生活環の1段階のみに対応する単一抗原ワクチンは十分ではなく、有効な免疫性を誘導するには、寄生生物発達の異なる段階、すなわち少なくとも2段階、を標的とする複数抗原、多段階ワクチンが必要であると考え結論づけている（Mahajan, Berzofsky et al. 2010）。複数抗原ワクチンの構築（異なる寄生生物段階を変換することおよび可能性のある熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）エスケープ突然変異体を包囲しようという、ワクチンによって誘導される免疫応答の幅を増大することを目的とした）は、（フルサイズ）抗原と一緒に遺伝子連結することによって、組換えタンパク質の混合物によって、または異なる寄生生物タンパク質および段階に由来するいくつかのペプチドを含有する、合成ペプチドベースの（15～25マー）化学合成ワクチンによってのいずれかで達成され得る。

20

【0011】

いくつかの異なる抗原または単一抗原のいくつかの異なる対立遺伝子からなる单一融合タンパク質アプローチ（寄生生物に対して相乗的活性を有する抗体を誘導するための）は、抗原多様性および免疫回避のための熱帯熱マラリア原虫（*P. falciparum*）の能力によって妨げられる（Richards, Beeson, 2009）。可能性のあるワクチン候補として多数の抗原が評価されたが、ほとんどの臨床治験は臨床マラリアを防ぐことに対して有意な影響を示さなかつたものの、それらのうち一部は寄生生物増殖を低減させるとわかった。得られた融合タンパク質／ワクチン候補の大きさは、2、3の選択された抗原の組合せのみを許可する、選択された抗原が自然免疫の標的でないこと、および／または相当な遺伝的多形性を示すことを排除しない別の制限因子である。複対立遺伝子を有する高度に可変性の抗原が、自然なチャレンジ下での免疫応答の明白な標的であり、PfAMA1およびPfMSP2のワクチン研究は対立遺伝子特異的効果が達成され得ることを示唆する（Schwartz, 2012）。現在組合せワクチンのみ（PfCSPおよびPfAMA1からなる）が、熱帯熱マラリア原虫（*P. falciparum*）の前赤内期および無性血液段階を標的とする臨床治験を受けている（Schwartz, 2012）。プラスモジウム属（*Plasmodium*）の3種の生活環の主要な段階のすべてを標的とする、融合物でも組合せアプローチでもない複数抗原ワクチン候補（ハマダラカ属（*Anopheles*）の蚊の有性段階を含み、したがって寄生生物伝達を妨げる）は、いまだ臨床治験で試験されていない。

30

【0012】

したがって、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）に対する新規および改善された複数成分多段階ワクチンを利用できることは、高度に有利となる。

40

【発明の概要】

【0013】

50

本開示は、好ましくは、必ずしもそうではないが、寄生生物の生活環の異なる段階の間に熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 寄生生物の表面に提示されるタンパク質に由来する複数の抗原または抗原ドメインを含む、マラリアに対するヒトワクチンとして適している、組換えポリペプチドの組合せ、特に、組換え融合タンパク質に関する。

【0014】

第1の態様では、本開示は、寄生生物生活環の前赤内期、血液および有性の主な段階の熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 表面タンパク質に由来する複数の抗原を含む寄生生物熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に対するヒトワクチンとして適している、組換えタンパク質の混合物に関する。混合物は、

a) P f C S P の前赤内期 (pre-erythrocytic) 抗原 T S R - ドメイン、またはその変異体もしくは断片、

b) 血液段階抗原頂端膜抗原 (P f A M A 1) の1種または複数の変異体または断片およびメロゾイト表面タンパク質 P f M s p 1 - 19 またはその変異体もしくは断片、および P f R h 5 由来のペプチドまたはその変異体、

c) 有性段階、オーキネート抗原 P f s 2 5 またはその変異体もしくは断片を含む。

【0015】

さらなる態様では、本開示の実施形態は、本開示の混合物中の種々の組換えタンパク質と結合する種々の単離された抗体またはその断片を含む抗体組成物に関する。

【0016】

別の態様では、本開示の実施形態は、本開示の組換えタンパク質および/または抗体の混合物を含む医薬組成物および/または診断用組成物に関する。

【0017】

さらなる態様では、本開示の実施形態は、生理学的に許容される培地中に活性成分として本開示の組換えタンパク質の混合物と担体とを含む、マラリアに対して哺乳動物、特に、ヒトを免疫処置するためのワクチン組成物に関する。

【0018】

さらに別の態様では、本開示の実施形態は、本開示の混合物中に含まれる前記組換え融合タンパク質をコードする核酸ならびにこのような核酸を含有するベクターおよび宿主細胞を提供する。

【0019】

その他の態様では、本開示は、熱帯性マラリアの予防および/または治療における本開示の組換えタンパク質の混合物の使用に関する。

【0020】

さらに、有効量の、本開示の混合物中に含まれる組換えタンパク質、本開示の組換え融合タンパク質の混合物を含む組成物または本開示のワクチン組成物を投与するステップを含む、プラスモジウム属感染に対して、特に熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に対してヒトを免疫処置する方法が開示される。

【0021】

本開示が詳細に記載される前に、本明細書において使用される技術用語は、単に特定の実施形態を説明する目的のものであり、限定とする意図がないということも理解されるべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲において使用されるように、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は文脈が明確に他のものを示さない限り、単数および/または複数の言及を含むということに留意されなければならない。数値によって範囲が定められるパラメータ範囲が与えられる場合には、範囲はこれらの限界値を含むと見なされるということがさらに理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の生活環のスキームを示す図である。

10

20

30

40

50

【図2】図2は、抗原PfAMA1-DICO1、Pfs25およびPfCSP-TSR(A)を含む第1の組換え融合タンパク質と、抗原PfAMA1-DICO2、Pfs25およびPfMSP1-19(B)を含む第2の組換え融合タンパク質と、抗原PfAMA1-DICO3、Pfs25およびPfRh5_Q5Aを含む第3の組換え融合タンパク質とを含有するワクチン混合物の一実施形態を示す図である。

【図3】図3は、A)PfAMA1-DICO1、Pfs25およびPfCSP-TSRを有する融合タンパク質1と、B)PfAMA1-DICO2、Pfs25およびPfMSP1-19を有する融合タンパク質2と、C)PfAMA1-DICO3、Pfs25およびPfRh5_Q5Aを有する融合タンパク質3とを含むワクチン混合物の一実施形態のSDS-PAGE(A)および(B)ウエスタンプロット解析を示す図である。 10

【図4】図4は、滑走運動性アッセイの結果を示す図である。

【図5】図5は、成長阻害アッセイの結果を示すグラフである。

【図6】図5は、標準膜飼育検定法(SMFA)の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0023】

発明の詳細な説明

本開示は、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)に対するヒトワクチンとして適した、組換えタンパク質の組合せ、特に、組換え融合タンパク質に関する。有利な実施形態では、本開示の組換えタンパク質およびワクチン組成物は、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)表面タンパク質または寄生生物発達の種々の段階に由来するそのドメインを組み合わせる。 20

【0024】

熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)の複雑な多段階生活環および遺伝的変動は、マラリアワクチン開発の成功にとって重大な課題に相当する。発達段階に応じて、寄生生物は、肝臓細胞の侵襲を低減または防止する(前赤内期の主な段階)、マラリアの臨床徴候を低減または防止する(血液の主な段階)、および蚊宿主によるマラリアの伝達を低減または防止することを目的として、防御免疫応答によって標的とされる必要がある表面タンパク質の異なるセットを提示する。さらに、多数の重要な表面タンパク質は、二形性またはさらには多形性である。したがって、効率的な多段階マラリアワクチン候補は、異なる段階に由来する複数の関連抗原を組み合わせ、多型を対象としなければならない。これに対処するための1つのアプローチは、いくつかの適したタンパク質および/またはタンパク質ドメインを含む融合タンパク質の設計である。さらに、単一ポリペプチドから構成されるこのようなワクチン候補の切望は、再現性があり、頑強な費用効率の高い生成に対する、実際の技術的で経済的な需要から主に起こっている。 30

【0025】

しかし当業者には、組換え発現される融合タンパク質には大きさの制限があるということも明確である。タンパク質特有の相違も同様に考慮されなければならないが、ポリペプチドの長さが増大するにつれ、発現レベルおよび収率の大きな低下がある。複数の課題が大きさによって比例する以上に増大し、大きなタンパク質の全体的な特性は小さいタンパク質、ドメインまたは断片のものよりも大幅に最適化を受け入れにくい。これらの問題すべては今まで、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)に対する効率的なワクチンの開発の大きなボトルネックであり、その結果複数の線形エピトープ、1種または2種の生活環の主な段階に由来する1種または2種の抗原のみを含む最適以下の、圧倒的な数のワクチン候補が得られてきた。代替法として、化学的または遺伝的に弱毒化された、または不活性化された生ワクチンが提案されているが(例えば照射されたスポロゾイト)、このようなアプローチは、バッチ間一貫性、スケールアップ生成および最も重要な生成物の安全性に関する困難に取り組まなければならない。 40

【0026】

他方、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)の段階および抗原多様性を対象と/orのように組換えタンパク質の混合物を使用することは、いくつかの利点を有する。組 50

換え抗原および／または抗原融合タンパク質の混合物を使用は、マラリアの伝播および臨床症状と関連する寄生生物生活環ならびに免疫学的に関連する熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 表面タンパク質の対立遺伝子変動の両方を対象とするためのよい選択肢に相当する。対立遺伝子変異体またはさらには人工的な多様性を網羅するものを、異なる段階に由来する保存された抗原と、遺伝子融合によって、ならびに製剤中でそれらを混合することによって組み合わせることができる。このような複数成分ワクチンにおける適した融合タンパク質の設計において、ポリペプチドの大きさならびにそれぞれの生成システムにおける収率および安定性が考慮され得る。一方では、複数成分ワクチンという概念は、それ自体、簡単なサブユニットワクチンまたは単一融合タンパク質アプローチと比較して、規制問題ならびに製造において種々の上流および下流プロセスを確立する必要性の増大によって引き起こされる、幾つかの固有の不利点を有し、他方、より高度な努力は、病原体の地理的分布および進化に対応するためのより高い柔軟性、ならびに単一融合タンパク質との関連の中では容易に認識され得ないいくつかの免疫関連抗原（ならびにそのBおよびT細胞エピトープ）を特徴とするこのような抗原カクテルを用いて誘発され得るより広い多段階特異的免疫応答によって相殺される。

10

【0027】

本開示において記載される混合物中に含まれる組換えタンパク質、特に、融合タンパク質は、選択された生成宿主ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) における最適な収率および安定性のために設計され、最適化される。融合タンパク質は、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 生活環のそれぞれの段階に対応し、所望の免疫応答を誘発するのに必要な最も必須の抗原または抗原ドメインを特徴とするよう設計された。融合タンパク質中に抗原を組み合わせることは、ワクチン混合物中に使用されるタンパク質の数を低減し、生成の際の上流、下流および品質管理費用を低減するのに有用であり、段階特異的抗原を融合タンパク質に組み合わせることは、組成物において種々の割合の段階特異的機能性を実行することによって、多段階、複数成分ワクチン組成物の有効性および特異性を微調整するための好都合な概念である。

20

【0028】

重要なことに、本開示の混合物中に含まれる融合タンパク質は、(i)種々の熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 表面タンパク質に由来するドメインを含み、(ii)十分に発現し、免疫学的に関連していると実験的に同定され、確認されているビルディングブロック（ドメイン）を使用して設計された。

30

【0029】

手短には、本開示の組換えタンパク質および融合タンパク質の記載された組合せは、十分に発現され、高い免疫学的関連を有し、改善された免疫原性を有し得る。有利な実施形態では、ワクチンとして使用される本開示の組換えタンパク質と融合タンパク質の組合せは、感染を阻止し、ならびに病状を防ぎ、寄生生物の伝達を妨げる感染防御免疫を誘発する立証された能力を有し、異なる寄生生物段階から得られたサブユニットから構成される組合せワクチンである可能性が高い。

【0030】

全般的に、本明細書において使用される命名法および本発明において利用される実験室手順として、分子的、生化学的、微生物学的および組換えDNA技術が挙げられる。このような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook et al., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号明細書；同4,683,202号明細書；同4,801,531号明細書；同5,192,

40

50

659号明細書および同5, 272, 057号明細書に示される方法論; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique” by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Third Edition; “Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, Conn. (1994); Mishell and Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W.H. Freeman and Co., New York (1980)を参照のこと; 利用可能なイムノアッセイは、特許および科学文献に広範に記載されている、例えば、米国特許第3, 791, 932号明細書; 同3, 839, 153号明細書; 同3, 850, 752号明細書; 同3, 850, 578号明細書; 同3, 853, 987号明細書; 同3, 867, 517号明細書; 同3, 879, 262号明細書; 同3, 901, 654号明細書; 同3, 935, 074号明細書; 同3, 984, 533号明細書; 同3, 996, 345号明細書; 同4, 034, 074号明細書; 同4, 098, 876号明細書; 同4, 879, 219号明細書; 同5, 011, 771号明細書および同5, 281, 521号明細書; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) and “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, Calif. (1990); Marshak et al., “Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996)を参照のこと; それらのすべては、本明細書において十分に記載されるかのように参照により組み込まれる。その他の一般的な参考文献は、本文書を通じて提供される。本明細書における手順は、当技術分野で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。本明細書に含有されるすべての情報は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0031】

語句「組換えタンパク質」は、宿主細胞中にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現されたタンパク質などの、組換え手段によって、調製され、発現され、作製されるか、または単離されるタンパク質、特に、組換え融合タンパク質を含む。

【0032】

用語「組換え融合タンパク質」は、特に、異なるタンパク質、異なるタンパク質ドメインまたは異なる生物などの異種供給源に由来するセグメント、すなわちアミノ酸配列を含む組換え技術によって生成されるタンパク質を指す。セグメントは、ペプチド結合によって互いに直接的または間接的のいずれかで接合される。間接的接合とは、ペプチドリンカーなどの介在するアミノ酸配列が、融合タンパク質を形成するセグメント間に並置されることを意味する。組換え融合タンパク質は、1種の遺伝子の異なる領域に由来するヌクレオチド配列を遺伝子的に接合することによって、および/または2種以上の別個の遺伝子に由来するヌクレオチド配列を接合することによって得られるヌクレオチド配列によってコードされる。これらのヌクレオチド配列は、熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)に由来し得るが、それらはまたその他の生物に、クローニング手順のために使用されるプラスミドに、またはその他のヌクレオチド配列に由来する場合もある。

【0033】

さらに、コードするヌクレオチド配列は、例えばデジタル遺伝子配列からのオリゴヌクレオチド合成および得られた断片のその後のアニーリングによって最初の錆型DNAサンプルを必要とせずに、*in vitro*で合成され得る。所望のタンパク質配列は、例えば適当なソフトウェアツールを使用して「逆翻訳」され得る。ユニバーサルな遺伝暗号の縮重のために、オープンリーディングフレーム(すなわち組換えタンパク質コーディング領域)内の同義のコドンは、例えばシス作用性不安定性エレメント(例えばA U U U A)

10

20

30

40

50

を除去し、二次および三次mRNA構造（例えばショードノット、ステム・ループ、...）を除去、導入または修飾するよう、転写後遺伝子サイレンシング（PGTS）を引き起こし得る自己相補性領域を避けるよう、全体的なAT:GC含量を変更するよう、または発現宿主にコドン使用を調整するよう、種々の方法で交換されてもよい。このような変更是手作業で、または適当なソフトウェアツールを使用して、またはその組合せによって設計され得る。

【0034】

プラスモジウム属（Plasmodium）表面タンパク質またはそのドメインを含む組換え融合タンパク質は、当技術分野で公知であるように、組換えDNA法および適した宿主細胞における発現を使用して調製された組換え生成物であり得る（例えばSambrook et al., (2001) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Yを参照のこと）。特定の単離されたタンパク質ドメインをコードするスクレオチド配列は、例えば単離に必要なドメインの5'および3'領域に対応する適当なオリゴスクレオチドプライマー、および鑄型としての単離されるタンパク質ドメイン配列の全長コーディングを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって好都合に調製され得る。全長コーディングタンパク質配列の供給源は、例えば寄生生物細胞またはクローニングされた全長遺伝子を含有するプラスミドベクターから抽出されたDNAであり得る。あるいは、タンパク質コード配列はin vitroで部分的に、もしくは完全に合成され得るか、種々のアプローチの組合せが使用され得る。本開示の融合タンパク質の特性の限定されない例は、熱安定性およびpH安定性である。

10

20

【0035】

有利な実施形態では、本開示のワクチン組成物または組換えタンパク質の混合物は、寄生生物生活環の前赤内期、血液および有性の主な段階の熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium falciparum）表面タンパク質に由来する抗原を含み、ここで、

a) 前赤内期抗原は、PfCSPのTSR-ドメインまたはその変異体もしくは断片を含み、

b) 血液段階抗原は、頂端膜抗原（PfAMA1）の1種または複数の変異体または断片およびメロゾイト表面タンパク質PfMsp1-19またはその変異体もしくは断片およびPfRh5由来のペプチドまたはその変異体を含み、

c) 有性段階抗原（単数または複数）は、オーキネート抗原Pfs25またはその変異体もしくは断片を含む。

30

【0036】

さらなる有利な実施形態では、ワクチン組成物または本開示の組換えタンパク質の混合物は、寄生生物生活環の前赤内期、血液および有性の主な段階の熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium falciparum）表面タンパク質に由来する抗原を含み、ここで、混合物は、

d) PfCSPの前赤内期抗原TSR-ドメインまたはその変異体もしくは断片、

e) 血液段階抗原頂端膜抗原（PfAMA1）の1種または複数の変異体または断片およびメロゾイト表面タンパク質PfMsp1-19またはその変異体もしくは断片およびPfRh5由来のペプチドまたはその変異体、

f) 有性段階、オーキネート抗原Pfs25またはその変異体もしくは断片を含む。

40

【0037】

本明細書において、用語「熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium falciparum）表面タンパク質に由来する抗原」は、全長熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium falciparum）表面タンパク質または特に、特定のドメインまたはその他の部分のような全長タンパク質の一部のみのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0038】

前赤内期抗原「PfCSP_TSR」は、熱帯熱マラリア原虫（P. falciparum）のスボロゾイト周囲タンパク質（CSP）のTSR-ドメインを指す。

50

【0039】

「T S R ドメイン」は、免疫性、細胞接着、細胞間相互作用および神経細胞発達に関与している、細胞外タンパク質中または膜貫通タンパク質の細胞外部分中に見られる、小さな約60残基のドメインである (Tucker, 2004)。トロンボスポンジン-1 (T S P - 1; Tan et al. 2002) およびF-スポンジン (P D B コード 1 S Z L および 1 V E X) 由来の T S R ドメインの構造は解明されている。これらは、T S R ドメインが逆平行3本鎖シートからなる長い構造を有することを示す。ドメインコアは保存されたトリプトファン、アルギニンおよびシステインの側鎖の積み重ねられたアレイによって形成される。いくつかのタンパク質の T S R は、グリコサミノグリカン (G A G) 結合を媒介すると報告されている。例えばプラスモジウム属 (plasmodium) 表面タンパク質プラスモジウム属 (plasmodium) C S および T R A P は両方とも、接着性トロンボスponジン1型ドメイン、T S R を含有する。

【0040】

用語「断片」は本明細書において、全長熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 表面タンパク質またはそのドメインから分離されており、それとの関連にはない、突然変異を有する、または有さない、天然全長タンパク質またはドメインの連続部分を指す。それは全長または完全タンパク質の構造的 / 組織分布的または機能的サブユニットであり得る。

【0041】

一実施形態では、P f C S P の T S R - ドメインは、配列番号5のアミノ酸配列を含む。

【0042】

別の有利な実施形態では、本開示のタンパク質 (ポリペプチド) 混合物は、血液段階抗原頂端膜抗原 (P f A M A 1) および少なくともさらなる熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 血液段階抗原の1種または複数の変異体を含む。

【0043】

本明細書において、抗原「P f A M A 1」とは、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 頂端膜抗原 (A M A 1) 細胞外ドメイン1～3を指す。熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) A M A - 1の全エクトドメイン (ドメインI～III) に好ましくは相当する組換えタンパク質は、天然寄生生物を認識する抗体を誘導し、in vitroで赤血球のメロゾイト侵襲を阻害し得る。P f A M A 1の制限された多形は、天然に存在する対立遺伝子の極めて高い網羅度を有する (平均で > 97%) 3種の人工P f A M A 1配列の合理的な設計を可能にした。この多様性を網羅するアプローチ (D i C o) は、天然に見られる多形を克服し、すべての天然に存在するA M A 1対立遺伝子に対する広い応答を可能にすると予測される (Remarque et al. 2008)。

【0044】

したがって、頂端膜抗原 (P f A M A 1) の変異体は、P f A M A 1および/またはP f A M A 1 - D I C O 1、P f A M A 1 - D I C O 2および/またはP f A M A 1 - D I C O 3の任意の野生型変異体、ならびにまたその変異体、特に、除去されたまたは追加の潜在的なN-グリコシル化部位を有する変異体であり得る。N結合型グリコシル化は、タンパク質中のアミノ酸残基中の窒素原子への糖分子の結合 (グリコシル化として知られるプロセス) である (Drickamer et al. 2006)。

【0045】

本開示のいくつかの実施形態では、P f A M A 1 - D I C O 1は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。本開示のさらなる実施形態では、P f A M A 1 - D I C O 2は、配列番号2のアミノ酸配列を含む。本開示のさらなる実施形態では、P f A M A 1 - D I C O 3は、配列番号3のアミノ酸配列を含む。有利な実施形態では、本開示の組換えタンパク質の混合物は、血液段階抗原、特に、配列番号1の配列を有するP f A M A 1 - D I C O 1、特に、配列番号2の配列を有するP f A M A 1 - D I C O 2および特に、配列番号3の配列を有するP f A M A 1 - D I C O 3を含む。

【0046】

本開示の組換えタンパク質の混合物は、メロゾイト表面タンパク質をさらに含む。いくつかのメロゾイト表面タンパク質（MSP）が同定されているが、それらのほとんどについて、なおもその機能はさらに解明されなければならない。MSP-1と名付けられた主なMSPの場合には、RBCとのメロゾイト結合において、侵入と関連するその後の生化学的機序において役割が仮定されている。このタンパク質は、後期シゾント段階において185～210kDaの前駆体として合成され、分子量の変動するいくつかのポリペプチドを生成するようプロセシングされる。42kDaのポリペプチド（MSP1-42）はメロゾイト膜と結合されて維持され、19kDaのポリペプチド（MSP1-19）を生成するようさらにプロセシングされ、宿主細胞中に入る。いくつかの有利な実施形態では、さらなる熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）血液段階抗原は、特に、配列番号6のアミノ酸配列を含む、PfMsp1-19である。

10

【0047】

別の実施形態では、本開示の組換えタンパク質の混合物は、さらなる熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）血液段階抗原、特に、血液段階抗原PfRh5、好ましくは、血液段階抗原PfRh5に由来するペプチドを含む（Douglas et al. 2014）。いくつかの有利な実施形態では、PfRh5由来のペプチドは、配列番号7および／または配列番号8のアミノ酸配列を含む。

【0048】

本明細書において、用語「PfRh5由来のペプチド」は、PfRh5_Q5Aのような全長PfRh5タンパク質の一部のみを含み、完全な全長PfRh5タンパク質ではないポリペプチドを含む。

20

【0049】

有利な実施形態では、本開示の混合物は、少なくとも有性段階抗原、特に、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）由来のPfs25またはその変異体を含む。Pfs25は、蚊の中腸において発達するので寄生生物接合子の表面に見られる有性段階タンパク質である。いくつかの有利な実施形態では、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）有性段階抗原は、配列番号4のアミノ酸配列を含むPfs25である。

【0050】

有利な実施形態では、本開示の混合物は、配列番号1～7および／または配列番号1～6および配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその変異体、断片もしくは相同ポリペプチドを含む。

30

【0051】

上記のように、いくつかの有利な実施形態では、PfCSP_TSRおよびPfs25のような、またPfMsp1-19のような混合物中の抗原の変異体は、除去されたまたは追加の潜在的なN-グリコシル化部位も含む。

【0052】

有利な実施形態では、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）抗原のうちいくつかが、組換え融合タンパク質中に含まれ、例えば、抗原PfAMA1-DICO1、Pfs25およびPfCSP_TSRが1種の組換え融合タンパク質中に含まれ、抗原PfAMA1-DICO2、Pfs25およびPfMSP1-19が、1種の組換え融合タンパク質中に含まれ、ならびに／または抗原PfAMA1-DICO3、Pfs25およびPfRh5由来のペプチドが、組換え融合タンパク質中に含まれる。

40

【0053】

さらなる有利な実施形態では、PfAMA1-DICO1、Pfs25およびPfCSP_TSRを有する組換え融合タンパク質は、配列番号9を含み、PfAMA1-DICO2、Pfs25およびPfMSP1-19を有する組換え融合タンパク質は、配列番号10を含み、PfAMA1-DICO3、Pfs25およびPfRh5_Q5Aを有する組換え融合タンパク質は、配列番号11を含み、またはPfAMA1-DICO3、Pfs25およびPfRh5_9AD4を有する組換え融合タンパク質は、配列番号12もし

50

くは1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失による組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む。

【0054】

有利な実施形態では、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)抗原は、1種または複数の組換え融合タンパク質中に、例えば、配列番号9(融合タンパク質1)、配列番号10(融合タンパク質2)および配列番号11(融合タンパク質3)、1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失による組換えまたは合成法によって生成されるそれらの相同ポリペプチドを含む、3種の組換え融合タンパク質の混合物中に含まれる。

【0055】

別の有利な実施形態では、本開示の混合物またはワクチン組成物の抗原は、

- i) P f A M A 1 - D I C O 1、P f s 2 5 および P f C S P _ T S R
- i i) P f A M A 1 - D I C O 2、P f s 2 5 および P f M s p 1 - 1 9
- i i i) P f A M A 1 - D I C O 3、P s f 2 5 および P f R h 5 _ Q 5 A

を含む。

【0056】

一実施形態では、P f A M A 1 - D I C O 1、P f s 2 5 および P f C S P _ T S R 抗原は、第1の組換え融合タンパク質中に含まれ、P f A M A 1 - D I C O 2、P f s 2 5 および P f M s p 1 - 1 9 抗原は、第2の組換え融合タンパク質中に含まれ、ならびにP f A M A 1 - D I C O 3、P f s 2 5 および P f R h 5 _ Q 5 A 抗原は、第3の組換え融合タンパク質中に含まれる。

【0057】

別の有利な実施形態では、本開示の混合物またはワクチン組成物の抗原は、

- i) P f A M A 1 - D I C O 1、P f s 2 5 および P f C S P _ T S R
- i i) P f A M A 1 - D I C O 2、P f s 2 5 および P f M s p 1 - 1 9
- i i i) P f A M A 1 - D I C O 3、P s f 2 5 および P f R h 5 _ 9 A D 4

を含む。

【0058】

一実施形態では、P f A M A 1 - D I C O 1、P f s 2 5 および P f C S P _ T S R 抗原は、第1の組換え融合タンパク質中に含まれ、P f A M A 1 - D I C O 2、P f s 2 5 および P f M s p 1 - 1 9 抗原は、第2の組換え融合タンパク質中に含まれ、P f A M A 1 - D I C O 3、P f s 2 5 および P f R h 5 _ 9 A D 4 抗原は、第3の組換え融合タンパク質中に含まれる。

【0059】

別の有利な実施形態では、本開示のワクチン混合物は、3種の組換え融合タンパク質を含み、ここで、異なる組換え融合タンパク質は、以下の抗原：

- a) 融合タンパク質1：P f A M A 1 - D I C O 1、P f s 2 5 および P f C S P _ T S R
- b) 融合タンパク質2：P f A M A 1 - D I C O 2、P f s 2 5 および P f M S P 1 - 1 9
- c) 融合タンパク質3：P f A M A 1 - D I C O 3、P f s 2 5 および P f R h 5 _ Q 5 A

を含む。

【0060】

別の有利な実施形態では、本開示のワクチン混合物は、3種の組換え融合タンパク質を含み、ここで、異なる組換え融合タンパク質は、以下の抗原：

- a) 融合タンパク質1：P f A M A 1 - D I C O 1、P f s 2 5 および P f C S P _ T S R
- b) 融合タンパク質2：P f A M A 1 - D I C O 2、P f s 2 5 および P f M S P 1 - 1 9

10

20

30

40

50

c) 融合タンパク質3：P f A M A 1 - D I C O 3、P f s 2 5 および P f R h 5_9
A D 4
を含む。

【0061】

別の実施形態では、上記の第1の組換え融合タンパク質（融合タンパク質1）は、配列番号9または1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む。

【0062】

別の実施形態では、上記の第2の組換え融合タンパク質（融合タンパク質2）は、配列番号10または1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む。 10

【0063】

別の実施形態では、上記の第3の組換え融合タンパク質（融合タンパク質3）は、配列番号11または1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む。

【0064】

別の実施形態では、上記の第3の組換え融合タンパク質（融合タンパク質3）は、配列番号12または1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失により組換えまたは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドを含む。 20

【0065】

有利な実施形態では、本開示の混合物は、3種の組換え融合タンパク質を含み、ここで、異なる組換え融合タンパク質は、

- a) 融合タンパク質1：配列番号9
- b) 融合タンパク質2：配列番号10
- c) 融合タンパク質3：配列番号11

または1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失による組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドのアミノ酸配列を有する。 20

【0066】

別の有利な実施形態では、本開示の混合物は、3種の組換え融合タンパク質を含み、ここで、異なる組換え融合タンパク質は、

- a) 融合タンパク質1：配列番号9
- b) 融合タンパク質2：配列番号10
- c) 融合タンパク質3：配列番号12

または1個もしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加もしくは欠失による組換えもしくは合成法によって生成されるその相同ポリペプチドのアミノ酸配列を有する。 30

【0067】

例えば、組換えポリペプチドおよび/または融合タンパク質は、等モルでまたは任意の他の割合で混合物中に含まれる。有利な実施形態では、組換え融合タンパク質は、混合物中に等モル比で含まれる。 40

【0068】

有利な組換えタンパク質、特に、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）に対するヒトワクチンとして適した、混合物中に含まれる組換え融合タンパク質（配列番号9～12）および本開示の混合物中に含まれる個々の抗原または抗原ドメイン（配列番号1～8）が、以下の表1に列挙されている。

【0069】

【表1-1】

表1

配列番号	ドメイン	配列
熱帶熱マラリア原虫(<i>P. falciparum</i>)ワクチンの單一段階、單一または複数ドメインタンパク質		
1	<i>PfAMA1-DIC01</i>	<p>QNYWEHPYQKSDVYHPINEHREHPKEYEYPLHQEHTYQQEDSGEDENTLQHA YPIDHEGAEPAPQEQLFSSIEIVERSNYMGNPWTTEYMAKYDIEEVHGSGIRVLD GEDAEVAGTQYRLPSGKCPVFGKIIENSQTTFLKPVATGNQDLKDGGFAFPPT NPLISPMTLNGMRDFYKNNEYVKNLDETLCSRHAGNMNPNDENSNYKYP VYDYNDKKCHILYIAAQENNGPRYCNKDESKRNSMFCFRPAKDKLFENYVYLSK NVVHNWEEVCPRKNLENALKGLWVDGNCEDIPHNEFSANDLFECNKLVFELS ASDQPKQYEQHLDYEIKEGFKNKNADMIRSAFLPTGAFKADRYKSRGKGYN WGNYNRKTQKCEIFNVKPTCLINDKSYIATTALSHPIEVENNFPCSLYKNEIMKE IERESKRKLNNDNDEGNKKIIAPRIFISDDKDSLKCPCDPEIVSQSTCNFFVCKC VERRAEVTSNNEVVVKEEYKDEYADIPEHKPTYDKM</p>
2	<i>PfAMA1-DIC02</i>	<p>QNYWEHPYQKSDVYHPINEHREHPKEYEYPLHQEHTYQQEDSGEDENTLQHA YPIDHEGAEPAPQEQLFSSIEIVERSNYMGNPWTTEYMAKYDIEEVHGSGIRVLD GEDAEVAGTQYRLPSGKCPVFGKIIENSQTTFLKPVATGNQDLKDGGFAFPPT NPLISPMTLNGMRDFYKNNEYVKNLDETLCSRHAGNMNPNDENSNYKYP VYDYNDKKCHILYIAAQENNGPRYCNKDESKRNSMFCFRPAKDKLFENYVYLSK NVVHNWEEVCPRKNLENALKGLWVDGNCEDIPHNEFSANDLFECNKLVFELS ASDQPKQYEQHLDYEIKEGFKNKNADMIRSAFLPTGAFKADRYKSRGKGYN WGNYNRKTQKCEIFNVKPTCLINDKSYIATTALSHPIEVENNFPCSLYKNEIMKE IERESKRKLNNDNDEGNKKIIAPRIFISDDKDSLKCPCDPEIVSQSTCRFFVCKC VERRAEVTSNNEVVVKEEYKDEYADIPEHKPTYDNM</p>
3	<i>PfAMA1-DIC03</i>	<p>QNYWEHPYQKSDVYHPINEHREHPKEYEYPLHQEHTYQQEDSGEDENTLQHA YPIDHEGAEPAPQEQLFSSIEIVERSNYMGNPWTTEYMAKYDIEEVHGSGIRVLD GEDAEVAGTQYRLPSGKCPVFGKIIENSQTTFLKPVATENQDLKDGGFAFPPT EPLMSPMTLDDMRDLYKDNKYVKNLDETLCSRHAGNMIPNDKNSNYKYP VYDYEDKKCHILYIAAQENNGPRYCNKDQSQRNSMFCFRPAKDISFQNYVYLSK NVVDNWEKVCPRKNLQNAKGLWVDGNCEDIPHNEFSAIDLFECKLNLFELS ASDQPKQYEQHLDYEIKEGFKNKNADMIRSAFLPTGAFKADRYKSHGKGYN WGNYNTEQKCEIFNVKPTCLINDKSYIATTALSHPNEVEHNFPCLYKDEIKKE IERESKRKLNNDNDEGNKKIIAPRIFISDDKDSLKCPCAPEIVSQSTCNFFVCKC KRAEVTSNNEVVVKEEYKDEYADIPEHKPTYDKM</p>

【0070】

【表1-2】

4	<i>Pfs25</i>	VTVDTCRKGFLIQMSGHLECKCENDLVLVNEETCEEKVLKCDEKTVNKPCGDF SKCIKIDGNPVSYACKCNLGYDMVNNVCIPNECKNVACGNGKCILDTSNPVKTG VCSCNIGKVPNVQDQKCSKDGETKCSLKCLKENEACKAVDGIYKCDCKDGFIIDN EASICT
5	<i>PfCSP-TSR</i>	PSDKHIKEYLNKIQNLSLEWSPCSVTCGNGIQVRIKPGSANKPKDELDY ANDIEKKICKMEKCSSVFNVVNS
6	<i>PfMsp1-19</i>	ISQHQCVKKQCPENSGCFRHLDEREECKCLLYKQEGDKCVENPNPACNENNG GCDADAKCTEEDSGSNGKKITCECTKPDSYPLFDGIFCSSSN
7	<i>PfRH5 ペプチド_Q5A</i>	STYGKAIAVDAFIKKI
8	<i>PfRH5 ペプチド_9AD4</i>	TNGIRYHYDEYIH
9	<i>PfAMA1-DICO1-Pfs25-PfCS P-TSR</i>	EFQNYWEHPYQKSDVYHPINEHREHPKEYEYPLHQEHTYQQEDSGEDE NTLQHAYPIDHEGAEPAPQEQLFSSIEIVERSNYMGNPWTTEYMAKYDI EEVHGSGIRVDLGEDAEVAGTQYRLPSGKCPFGKGIIENSQTTFLPVA TENQDLKDGGFAFPPTKPLMSPMTLDQMRHFYKDNEYVKNLDETLCL SRHAGNMNPNDKNSNYKYPAVYDDKDKKCHILYIAAQENNGPRYCN KDESKRNSMFCFRPAKDKSFQNYVYLSKNVVDNWEKVCPRKNLENAK FGLWVDGNCEDIPHVNFSANDLFECNKLVFELSASDQPKQYEQHLTD YEKIKEGFKNKNADMIRSAFLPTGAFKADRYKSHGKGYNWGNYNRKT QKCEIFNVKPTCLINDSYIATTALSHPIEVEHNFPCSLYKDEIKKEIERES KRIKLNDNDDEGNKKIIAPRIFISDDKDSLKCPCDPEIVSQSTCNFFVCKC VEKRAEVTSNNEVVVKEEYKDEYADIPEHKPTYDKMAAVTVDTVCKRG FLIQMSGHLECKCENDLVLVNEETCEEKVLKCDEKTVNKPCGDFSKCIKI DGNPVSYACKCNLGYDMVNNVCIPNECKNVACGNGKCILDTSNPVKTG VCSCNIGKVPNVQDQKCSKDGETKCSLKCLKENEACKAVDGIYKCDCKD GFIIDNEASICTAAPSDKHIKEYLNKIQNLSLEWSPCSVTCGNGIQVRIK PGSANKPKDELDYANDIEKKICKMEKCSSVFNVVNS

10

20

30

【0071】

40

【表1-3】

10	<i>PfAMA1-DICO2_Pfs25_PfM sp1-19</i>	EFQNYWEHPYQKSDVYHPINEHREHPKEYEYPLHQEHTYQQEDSGEDENTLQ HAYPIDHEGAEPAPQEQLFSSIEIVERSNYMGNPWTEYMAKYDIEEVHGSGIR VDLGEDADEVAGTQYRLPSGKCPVFGKIIENSQTTFLKPVATGNQDLKDGGFAF PPTNPLISPMTLNGMRDFYKNNEYVKNLDETLCSRHAGNMNPNDENSNYK YPAVYDYNDKKCHILYIAAQENNGPRYCNKDESKRNSMFCFRPAKDKLFENYVY LSKNVVHNWEEVCPRKNLENNAKFGLWWDGNCEDIPHVNFSANDLFECNKLV FELSASDQPKQYEQHLTDYEKIKEGFKNKNADMIRSAFLPTGAKADRYKSRGK GYNWGNYNRKTQKCEIFNVKPTCLINDKSYIATTALSHPIEENNFPSCSLYKNEI MKEIERESKRICKLNDNDEGNKIIAPRIFISDDKDSLKCPCDPEMVSQSTCRFFV CKCVERRAEVTSNNNEVVVKEEKDEYADIPEHKPTYDNMAAVTVDTVKRGFLI QMSGHLECKCENDLVLVNEETCEEKVLKCDEKTVNKPCGDFSKCIKIDGNPVSY ACKCNLGYDMVNNVCIPNECKNVACGNGKCILDTSNPVKTGVCSNIGKVPNVQ DQKCSKDGETKCSLKCLKENEACKAVDGIYKCDCKDGFIIDNEASICTAAISQHQC VKKQCPENSGCFRHLDEREECKCLLYNKQEGDKCVENPNPACNENNGCDADA KCTEEDSGSNGKKITCECTKPDSYPLFDGIFCSSSN
11	<i>PfAMA1-DICO3_Pfs25_PfRh 5_Q5A</i>	EFQNYWEHPYQKSDVYHPINEHREHPKEYEYPLHQEHTYQQEDSGEDENTLQ HAYPIDHEGAEPAPQEQLFSSIEIVERSNYMGNPWTEYMAKYDIEEVHGSGIR VDLGEDADEVAGTQYRLPSGKCPVFGKIIENSQTTFLTPVATENQDLKDGGFAF PPTEPLSPMTLDDMRDLYKDNKYVKNLDETLCSRHAGNMIPDNDKNSNYK YPAVYDYEDKKCHILYIAAQENNGPRYCNKDKQSKRNSMFCFRPAKDISFQNYVY LSKNVVDNWEKVCPRKNLQNAKFGLWWDGNCEDIPHVNFSAILFECNKLVF ELSASDQPKQYEQHLTDYEKIKEGFKNKNADMIRSAFLPTGAKADRYKSHKG YNWGNYNTETQKCEIFNVKPTCLINDKSYIATTALSHPNEVEHNFPSCSLYKDEIK KEIERESKRICKLNDNDEGNKIIAPRIFISDDDSLKCPCAPEIVSQSTCNFFVCK CVEKRAEVTSNNNEVVVKEEKDEYADIPEHKPTYDKMAAVTVDTVKRGFLIQ MSGHLECKCENDLVLVNEETCEEKVLKCDEKTVNKPCGDFSKCIKIDGNPVSYA CKCNLGYDMVNNVCIPNECKNVACGNGKCILDTSNPVKTGVCSNIGKVPNVQD QKCSKDGETKCSLKCLKENEACKAVDGIYKCDCKDGFIIDNEASICTSTYGKAI DAFIKKI

10

20

30

【0072】

【表1-4】

12	<i>PfAMA1-DICO3_Pfs25_PfRh5_9AD4</i>	EFQNYWEHPYQKSDVYHPINEHREHPKEYEYPLHQEHTYQQEDSGEDENTLQ HAYPIDHEGAEPAPQEQLFSSIEIVERSNYMGNPWTEYMAKYDIEEVHGSGIR VDLGEDAEVAGTQYRLPSGKCPVFGKIIENSKTTFLTPVATENQDLKDGGFAF PPTEPLMSPTLDDMRDLYKDNKYVKNLDETLCSRHAGNMIPDNDKNSNYK YPAVYDYEDKKCHILYIAAQENNGPRYCNKDQSQRNSMFCFRPAKDISFQNYVY LSKNVVDNWEKVCPRKNLQNAKFLWWDGNCEDIPHVNNEFSAIDLFECKLVF ELSASDQPKQYEQHLTDYEKIKEGFKNKNADMIRSAFLPTGAFKADRYKSHKG YNWGNYNTETQKCEIFNVKPTCLINDSYIATTALSHPNEVEHNFPCSLYKDEIK KEIERESKRILNDNDDEGNKKIIAPRIFISDDIDSLKCPCAPEIVSQSTCNFFVCK CVEKRAEVTSNNEVVVKEEYKDEYADIPEHKPTYDKMAAVTVDTVCKRGFLIQ MSGHLECKCENDLVLVNEETCEEKVLKCDEKTVNKPCGDFSKCIKIDGNPVSYA CKCNLGYDMVNNVCIPNECKNVACGNGKCILDTSNPVKTGVCSNIGKVPNVQD QKCSKDGGETKCSLKCLKENEACKAVDGIYKCDCKDGFIDNEASICTTNGIRYHY DEYIH
----	--------------------------------------	---

10

20

【0073】

さらなる実施形態は、特に無作為法による、または部位指定カップリング法の使用による、組換えタンパク質をそれ自身またはその他の分子、タンパク質または担体とコンジュゲートするための方法に関する。特に部位指定カップリングは、組換えタンパク質内に特異的に保持される、または導入されるN-グリコシル化部位に収容され得る。

【0074】

本開示は、本開示のポリヌクレオチドに由来するすべての分子、および遺伝的にコードされるアミノ酸配列と比較した、翻訳後プロセシングによる本願に記載されるそのすべての変異体を含むということも理解される。これらの翻訳後修飾は、天然宿主または任意の適した発現宿主による生成/発現の際に起こるとき、これらに限らないが、リーダーおよび/またはプロ配列などのN末端配列のタンパク質分解による切断、C末端伸長のタンパク質分解による除去、N-および/またはO-グリコシル化または脱グリコシル化、脂質化、アシル化、脱アミド化、ピログルタミン酸形成、リン酸化および/またはその他、またはそれらの任意の組合せを含む。これらの翻訳後修飾は、本明細書において調査されたようにタンパク質の特性に影響を有する場合も有さない場合もある。

30

【0075】

用語「修飾」は本明細書において、例えばアミノ酸配列中の特定の位置でのアミノ酸残基の置換、挿入または欠失、ならびにポリペプチド状の特定の位置のリン酸化、パルミトイル化のようなアセチル化、メチル化、硫酸化、グリコシル化、イソプレニル化のような脂質化、ファルネシル化、脂肪酸部分の結合、グリピエーション(glypiation)および/もしくはユビキチン化、またはそれらの組合せを指す。

40

【0076】

用語「修飾すること」は本明細書において、抗体またはその抗原結合部分中の1個または複数のアミノ酸を変更することを含む。変更は、1つまたは複数の位置でアミノ酸を附加、置換または欠失することによってもたらされ得る。変更は、PCR突然変異誘発などの既知技術を使用してもたらされ得る。

【0077】

用語「変異体」とは、元の非変異体ポリペプチドに対する相同ポリペプチドを含み、元の非変異体ポリペプチドと結合する少なくとも1種の抗体によって認識され得、ここで、変異体は、1つまたは複数の(いくつかの)位置で変更、すなわち、置換、挿入および/

50

または欠失を含む。用語「変異体」はまた、修飾を有するポリペプチドも含むが、元のポリペプチドの同一または相同アミノ酸配列を含む。

【0078】

用語「相同ポリペプチド」は、本開示によれば、本開示の混合物またはワクチン組成物中の組換えタンパク質に対して少なくとも70%、または好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、97%もしくは99%の配列同一性を有する任意の組換えタンパク質を含む。特に、配列番号9、配列番号10および配列番号11または配列番号12の配列を含む混合物に対して。

【0079】

相同性は、本開示の融合タンパク質の類似体または変異体として規定される。融合タンパク質は特定のアミノ酸を特徴とし、特定の核酸配列によってコードされる。このような配列は組換えまたは合成法によって生成される類似体および変異体を含み、このようなポリペプチド配列は組換えポリペプチド中の1個または複数のアミノ酸残基の置換、挿入、付加または欠失によって修飾されており、本明細書において記載される生物学的アッセイのいずれかにおいて依然として免疫原性であると理解される。置換は、好ましくは「保存的」である。置換は、好ましくはアミノ酸配列の何らかの変更につながらないが、タンパク質の発現を増強するよう導入され得るコドン使用におけるサイレント置換である。表4によれば、第2列の同一ブロック中の、好ましくは第4列の同一の並び中のアミノ酸は互いに置換され得る。第2および第4列中のアミノ酸は1文字コードで示されている。

【0080】

別の態様では、本開示は、
 a) 配列番号9、配列番号10、配列番号11もしくは配列番号12の配列を有するポリペプチドをコードする核酸分子、
 b) 好ましくは、1個もしくは複数のアミノ酸残基が保存的に置換されている配列番号9、配列番号10、配列番号11もしくは配列番号12の配列を有する配列の修飾された形態をコードする核酸分子、
 c) ストリンジエントな条件下でa)～b)の核酸分子のいずれかとハイブリダイズ可能である核酸分子、
 d) ストリンジエントな条件下でa)～c)の核酸分子のいずれかの相補体とハイブリダイズ可能である核酸分子、

e) a)～d)の核酸分子のいずれかと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有する核酸分子、
 f) またはa)～e)の核酸分子のいずれかの相補体

をコードする単離された核酸分子または複数の核酸分子に関連する。

【0081】

用語「核酸分子」または「核酸」は、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAまたはRNA、ペプチド核酸(PNA)またはLNA起源の任意の一本鎖または二本鎖核酸分子を示すよう意図される。

【0082】

用語「保存的突然変異」または「保存的置換」はそれぞれ、当業者が第1の突然変異に対して保存的と考えるアミノ酸突然変異を指す。この関連で「保存的」は、アミノ酸の特徴の点で同様のアミノ酸を意味する。例えば突然変異が、特定の位置で、非脂肪族アミノ酸残基(例えばSer)の脂肪族アミノ酸残基(例えばLeu)との置換につながる場合、異なる脂肪族アミノ酸(例えばIleまたはVal)との同一位置における置換は保存的突然変異と呼ばれる。さらなるアミノ酸の特徴として、残基の大きさ、疎水性、極性、電荷、pK値およびその他の当技術分野で公知のアミノ酸の特徴が挙げられる。したがって保存的突然変異は、塩基性と塩基性の置換、酸性と酸性の置換、極性と極性の置換などの置換を含み得る。このように導かれたアミノ酸のセットは構造的理由のために保存される可能性が高い。

【0083】

10

20

30

40

50

本開示はまた、本開示のヌクレオチド分子を含むベクターを対象とする。用語「ベクター」は、連結されている別の核酸を輸送できる核酸分子を含む。ある種のベクターは、さらなるDNAセグメントがライゲーションされ得る環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。別の種類のベクターは、さらなるDNAセグメントがウイルスゲノム中にライゲーションされ得るウイルスペクターである。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自己複製できる（例えば細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。その他のベクター（例えば非エピソーム哺乳動物ベクター）は宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ得、それによって宿主ゲノムとともに複製される。さらに特定のベクターは、作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示できる。このようなベクターは本明細書において「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターはプラスミドの形態であることが多い。本明細書において「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最もよく使用される形態であるので同義的に使用され得る。しかし本開示は、同等の機能を果たすウイルスペクター（例えば複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）など発現ベクターの、このような他の形態を含むことを意図する。

10

20

30

40

50

【0084】

有利な実施形態では、組換えタンパク質のヌクレイック（nucleic）配列は、例えば、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）中に形質転換され得る適した酵母発現ベクター中に挿入され得る。

【0085】

本開示はまた、本開示の組換え融合タンパク質を含むベクターを有する宿主細胞を対象とする。語句「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）は、組換え発現ベクターが導入されている細胞を含む。このような用語は特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の後代も指すことを意図することは理解されなければならない。突然変異または環境の影響のいずれかによって、続いて起こる世代において特定の修飾が起こり得るので、このような後代は実際親細胞と同一でない場合もあるが、なおも本明細書における用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

【0086】

宿主細胞は単一の宿主細胞の後代を含み、後代は天然の、偶発的または計画的な突然変異および／または変更により、元の親細胞と必ずしも完全に同一でない場合もある（形態において、または全DNA相補体において）。宿主細胞は本開示の組換えベクターまたはポリヌクレオチドを用いて、in vivoまたはin vitroでトランスフェクトされた、または感染した細胞を含む。本発明の組換えベクターを含む宿主細胞は「組換え宿主細胞」とも呼ばれることがある。

【0087】

用語「宿主細胞（単数または複数）」は、本開示に従って組換えタンパク質を精製するプロセスにおいて使用され得る細胞（単数または複数）を指す。このような宿主細胞は対象のタンパク質（POI）を保持する。宿主細胞はタンパク質発現細胞とも呼ばれ得る。本発明の宿主細胞は、これらに限らないが、原核細胞、真核細胞、古細菌、細菌細胞、昆虫細胞、酵母、哺乳動物細胞および／または植物細胞であり得る。宿主細胞として想定される細菌はグラム陰性またはグラム陽性のいずれか、例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）、エルウィニア（*Erwinia*）種、クレブジエラ（*Klebsellia*）種、ラクトバチルス（*Lactobacillus*）種、シュードモナス・フルオレッセンス（*Pseudomonas fluorescence*）種または枯草菌（*Bacillus subtilis*）であり得る。通常の酵母宿主細胞はサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）およびピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）からなる群から選択される。

【0088】

有利な実施形態では、宿主細胞は、酵母細胞、特に、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）酵母細胞である。

【0089】

本開示の組換えタンパク質を発現するために、融合タンパク質またはその一部をコードするDNAは、遺伝子が転写および翻訳制御配列と作動可能に連結されるよう発現ベクター中に挿入され得る。この関連で、用語「作動可能に連結された」は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、タンパク質遺伝子の転写および翻訳を調節するその意図される機能を果たすよう、タンパク質遺伝子がベクター中にライゲーションされることを意味する。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するよう選択される。単離されたタンパク質ドメイン配列は通常、同一発現ベクター中に挿入される。タンパク質遺伝子は、標準法によって発現ベクター中に挿入される。さらに、組換え発現ベクターは、培養上清への標的タンパク質の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。

10

【0090】

一般に当業者はベクターを十分に構築し、組換え遺伝子発現のためのプロトコールを設計できる。さらなる詳細については、例えば参考により本明細書において組み込まれるMolecular Cloning : a Laboratory Manual : 2nd edition, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press(またはこの研究の後の版)およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992を参照のこと。

20

【0091】

有利な実施形態では、発現ベクターは既知技術に従って酵母細胞に送達され得る。

【0092】

本開示のさらなる態様は、本明細書において記載される核酸分子から本明細書において記載されるように組換えタンパク質を宿主細胞において発現する方法、前記タンパク質を生成するための適当な培養条件において本明細書において記載される融合タンパク質を発現できる宿主細胞、適当な条件下でこのような宿主細胞を培養することを含む組換えタンパク質を生成する方法に関し、この方法は細胞培養から前記タンパク質を単離することをさらに含み得、単離された融合タンパク質を適したさらなる成分(例えば別のタンパク質または賦形剤または担体であり得る)と混合することをさらに含み得る。

30

【0093】

上記で論じたように、本開示に従って、組換えタンパク質は任意の望ましい系において生成され得る。ベクター構築物および発現系は当技術分野で公知であり、本明細書において提供される組換え融合ポリペプチドの使用を組み込むよう適応され得る。

【0094】

一般に、当技術分野で公知の標準法は、本開示に従って酵母を培養するために使用され得る。

【0095】

特定の実施形態では、本明細書に従う組換えポリペプチド/タンパク質は任意の既知方法によって生成され得る。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は酵母細胞またはその一部において発現される。タンパク質は、当技術分野で公知の従来の条件および技術に従って単離および精製され得る。これらは抽出、沈殿、クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などといった方法を含む。本発明は、当技術分野で公知であり、本明細書において提供されるさまざまな植物発現系のいずれかを使用する、組換えポリペプチド(单数または複数)の生成物の精製および手頃なスケールアップを含む。

40

【0096】

したがって、いくつかの有利な実施形態は、本開示の組換えタンパク質、特に、組換え融合タンパク質を生成する方法に関連し、方法は、

- a) 組換え融合タンパク質をコードする核酸を含む核酸構築物を提供するステップと、
- b) 核酸構築物を宿主細胞中に導入するステップと、
- c) 融合タンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を維持するステップと

50

を含む。

【0097】

さらに、本開示は、生理学的に許容される媒体中に、活性成分としての本開示の混合物および担体を含む、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に対してヒト個体を免疫処置するためのワクチン組成物に関連する。

【0098】

「ワクチン」は、例えば、対象に投与されると、免疫応答を誘導する物質分子の組成物である。ワクチンは、ポリヌクレオチド分子、ポリペプチド分子および炭水化物分子ならびに糖タンパク質、リポタンパク質、炭水化物 - タンパク質コンジュゲート、2種以上のポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の融合物などといった各々の誘導体および組合せを含み得る。ワクチンは、当業者によって容易に理解されるであろうが、希釈剤、アジュバント、担体またはそれらの組合せをさらに含み得る。一実施形態では、ワクチン組成物は、アジュバントをさらに含む。

【0099】

上記のように、ワクチン組成物中の組換えタンパク質は、炭水化物または脂質部分、例えば、担体に連結され得る、またはその他の方法で修飾され、例えばアセチル化され得る。適した担体は、プラスチック、例えばポリスチレンなどのポリペプチド（単数または複数）が疎水性非共有結合相互作用によって結合されているポリマーまたは多糖またはポリペプチド、例えばウシ血清アルブミン、オボアルブミンまたはキーホールリンペットヘマトシアニンなどのポリペプチド（単数または複数）が共有結合によって結合されているポリマーからなる群から選択される。適した媒体は、希釈剤および懸濁剤からなる群から選択される。アジュバントは、好ましくはジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド (D D A)、Qu i l A、ポリ I : C、水酸化アルミニウム、フロイントの不完全アジュバント、I F N - 、I L - 2、I L - 1 2、モノホスホリル脂質 A (M P L)、トレハロースジミコール酸 (T D M)、トレハロースジベヘナートおよびムラミルジペプチド (M D P)、イヌリンまたはグルコピラノシリル脂質アジュバント安定エマルジョン (G L A - S E) からなる群から選択される。

【0100】

活性成分としてペプチド配列を含有するワクチンの調製は、参照によってすべて本明細書に組み込まれる、米国特許第4,608,251号明細書、同4,601,903号明細書、同4,599,231号明細書および同4,599,230号明細書によって例示されるように、一般に当技術分野で十分に理解されている。

【0101】

ワクチンのアジュバント効果を達成するその他の方法として、水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウム（ミョウバン）などの薬剤の使用、糖の合成ポリマー（Carbopol）、熱処理によるワクチン中のタンパク質の凝集、アルブミンに対するペプシン処理された（F a b）抗体を用いる再活性化による凝集、C. パルバム (parvum) などの細菌細胞またはグラム陰性菌の内毒素もしくはリポ多糖類成分との混合物が挙げられ、モノオレイン酸マンニド (A r a c e l A) などの生理学的に許容されるオイル媒体中のエマルジョンまたはブロック代用物として使用されるパーカー・フルオロカーボン (F lu o s o l - D A) の20%溶液を有するエマルジョンも使用され得る。その他の可能性は、上記のアジュバントと組み合わせたサイトカインまたはポリ I : C などの合成 I F N - 誘導因子などの免疫調節物質の使用を含む。

【0102】

アジュバント効果を達成するための別の可能性は、Gosselin et al, 1992に記載される技術を使用することである。手短には、本発明の抗原などの関連抗原は、単球 / マクロファージ上の F c 受容体に対する抗体（または抗原結合抗体断片）とコンジュゲートされ得る。

【0103】

ワクチンは、投与製剤と適合する方法で、治療上有効であり免疫原性であるような量で

10

20

30

40

50

投与される。投与されるべき量は、例えば免疫応答を開始する個体の免疫系の能力および所望の保護の程度を含み、治療されるべき対象に応じて変わる。適した投与量範囲は約0.1マイクロg～1000マイクロgの好ましい範囲、例えば約1マイクロg～300マイクロgの範囲の、特に約10マイクロg～50マイクロgの範囲の、ワクチン接種あたりほぼ数百マイクログラム程度の活性成分のものである。最初の投与およびブースターショットのための適したレジメンも可変性であるが、それは最初の投与と、それに続くその後の接種またはその他の投与によって典型的に表される。適用の方法は広く変わり得る。ワクチンの投与のための従来法のいずれかが適用可能である。これらは、固体の生理学的に許容される基剤での、または生理学的に許容される分散物中での経口投与、注射などによる非経口的投与を含むと考えられている。ワクチンの投与量は投与経路に応じて変わり、ワクチン接種されるべきヒトの年齢、より少ない程度であるがワクチン接種されるヒトの大きさに従って変わる。

10

【0104】

ワクチンは注射、例えば皮下注射または筋肉内注射のいずれかによって従来的に非経口的に投与される。その他の投与様式に適しているさらなる製剤として、坐剤が挙げられ、いくつかの場合には、経口製剤が挙げられる。坐剤については、従来の結合剤および担体として、例えばポリアルカレングリコールまたはトリグリセリドを挙げることができ、このような坐剤は0.5パーセント～10パーセント、好ましくは1～2パーセントの範囲の活性成分を含有する混合物から形成され得る。経口製剤は、例えば医薬等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリソナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなど通常使用される賦形剤を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤または散剤の形態をとり、有利には10～95パーセントの活性成分、好ましくは25～70%の活性成分を含有する。

20

【0105】

多数の例では、ワクチンの複数の投与を有することが必要であろう。特にワクチンはマラリアの感染を防ぐために、および/または確定的なマラリア感染を治療するために投与され得る。感染を防ぐために投与される場合には、ワクチンは感染の決定的な臨床徵候または感染症状が存在する前に予防的に与えられる。

30

【0106】

遺伝的変動のために、異なる個体は同一タンパク質に対して変動する強度の免疫応答を有して反応し得る。したがって、本開示のワクチンは免疫応答を増大するために、本開示のいくつかの異なる融合タンパク質を含み得る。ワクチンは2種以上の融合タンパク質または免疫原性部分を含み得、そこでタンパク質のすべては上記で定義されるとおりであり、またはペプチドのすべてではない一部は、熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)またはプラスモジウム属(*Plasmodium*)由来のその他の寄生生物に由来し得、後の実施例では、ポリペプチドについて上記で示される判定基準を必ずしも満たさないポリペプチドは、その自身の免疫原性ゆえ作用し得るか、または単にアジュバントとして作用し得る。ワクチンは、1～20種、例えば2～20種またはさらに3～20種の異なる組換えタンパク質または融合タンパク質、例えば3～10種の異なるタンパク質または融合タンパク質を含み得る。

40

【0107】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は前記担体に吸着されるか、または共有結合によって結合される。別の実施形態では、担体は担体タンパク質である。

【0108】

本開示はまた、本開示の混合物中の種々の組換えタンパク質と結合する単離された抗体またはその断片を含む抗体組成物に関連する。本開示によれば、用語「抗体」は、これらに限らないが、組換え抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、ミニボディー、ダイアボディー、ナノボディー、トリボディーならびにF_ab'、F_ab、F(a_b)₂および上述の單一ドメイン抗体などの本開示の抗体の抗原結合部分を含む抗体断片を含む。

50

【0109】

本開示のさらなる態様は、治療有效量の本開示の組換えタンパク質の混合物を投与するステップを含む、患者において熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) によって引き起こされるマラリアを治療および／または予防するための方法に関連する。

【0110】

対象に投与される本開示の混合物の実際の投与量は、体重、状態の重症度、治療されている疾患の種類、これまでのまたは同時発生的治療的介入、患者の特発性および投与経路などに関する物理的および生理学的因素によって決定され得る。投与に責任のある医師がいかなる事象においても、組成物中の活性成分（単数または複数）の濃度および個々の対象に適当な用量を決定する。

10

【0111】

以下の方法および実施例は例示目的で提供され、決して本開示の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0112】

方法および実施例

以下の実施例では、本開示の材料および方法が提供される。これらの実施例は単に例示目的であって、決して本開示を限定すると解釈されてはならないということが理解されなければならない。本明細書において引用されたすべての刊行物、特許および特許出願は、すべての目的でその全文が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0113】

例として、VAMAX I (配列番号9)、VAMAX II (配列番号10) および VAMAX VI (配列番号11)と名付けられた3種の異なる組換え融合タンパク質が、P. パストリス (*P. pastoris*) において発酵によって生成された。その後、タンパク質は、SDS-PAGE およびウエスタンプロットによって精製および分析された。

【0114】

1. 発現構築物のクローニング

P. パストリス (*P. pastoris*) コドン使用頻度について最適化された合成遺伝子 (GeneArt) を、導入遺伝子発現を制御するためのメタノール誘導性AOX1プロモーターおよびAOX1ターミネーターを含むP. パストリス (*P. pastoris*) 発現ベクター中に挿入した。発現カセットはまた、天然 *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*) 因子分泌配列を特徴としていた。pUC複製起点および選択のための、プロモーターとしての *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*) TEF1 および合成原核EM7 およびターミネーターとしての *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*) CYC1 領域の制御下の、ゼオシン耐性タンパク質 Sh ble。最適化された配列を、EcoRI および XbaI 断片として P. パストリス (*P. pastoris*) 発現ベクター中に挿入した。各プラスミドの 1.5 μg のアリコートを、PmeI (NEB、Frankfurt、Germany) を用いて線形化し、沈殿 (70% イソプロパノール、10% 4M LiCl) によって精製し、10 μl の滅菌再蒸留水に再溶解した。(Cregg et al. 2000) によって記載されたようにエレクトロポレーションのために P. パストリス (*P. pastoris*) KM71H 細胞を調製し、-80

30

で保存した。2 mmキュベット、2500 V の充電電圧および 5 ms のパルス長を用いる Multiporator デバイス (Eppendorf、Wesseling-Berzdorf、Germany) を使用して、40 μl のコンピテント細胞中に 5 μl のプラスミドDNAを導入することによってエレクトロポレーションを実施した。細胞を直ちに、氷冷 1 M ソルビトールと混合し、2 ml の YSD 培地 (1% 酵母抽出物、2% ダイズペプトン、2% デキストロース) 中に移した。28 および 160 rpm (VKS-75 Control Shaker、Edmund Buhler、Hechingen、Germany) で 45 分間インキュベートした後、細胞を遠心分離 (800 × g) によってペレット化し、50 μl の滅菌水に再懸濁し、選択培地 (100 μg/L のゼオシンを補給したYSD) 上にプレーティングし、28 で、暗所に 48 時間置いた。

40

50

【0115】

図2は、この実施例において使用されるVAMAX I(配列番号9)、VAMAX II(配列番号10)およびVAMAX VI(配列番号11)と名付けられた組換え融合タンパク質の模式図を示す。

【0116】

2.スクリーニング

各形質転換事象の最大24個のコロニーを、マイクロタイタープレート中の $100\mu l$ のYSD選択培地中に選びとり、VKS-75 Control Shaker(Edmund Buhler, Hechingen, Germany)中、28で24時間インキュベートした。 $50\mu l$ の前培養物を使用して、深底ウェルプレート中の、 $750\mu l$ の、ゼオシン(Zeocin)を補給したYSG培地(1%酵母抽出物、ダイズペプトン2%、グリセロール2%)に播種した。28および900rpm(VKS-75 Control Shaker, Edmund Buhler, Hechingen, Germany)で24時間インキュベートした後、24時間間隔での1%メタノールの添加によって、発現を2回誘導した。遠心分離($2000 \times g$ 、4、10分)によって細胞を回収し、 $1/5000$ の希釈で、対応する骨髄腫細胞株MRA-315(LH MillerおよびASaulによって寄託されたMR4によって得られた)から生成されたPfs25特異的マウスモノクローナル抗体mAb 4B7を使用するドットプロットによって、分泌された組換えタンパク質の存在について上清を試験し、続いて、標識されたヤギ抗マウスH+Lアルカリホスファターゼを用いて検出した。NBT/BCIP(基質バッファー: 150 mM NaCl、2 mM MgCl₂、50 mM Tris-HCl、pH 9.6中の1 mg/ml-1)を用いてバンドを可視化した。インキュベーションステップの間に、メンブランを、0.05% (v/v) Tween-20を補給したPBSを用いて3回洗浄した。

【0117】

3.流加発酵

播種材料調製

$150\mu l$ の予め確立したリサーチセルバンクを、 $200ml$ のYSGを含有する $500ml$ のバッフル底振盪フラスコに移すことによって播種材料を調製した。培養物を28および160rpmの振盪速度で一晩インキュベートした。

【0118】

発酵

培養を、 $30L$ の作業容量および3のH/D比を有するBiopilot 40バイオリアクター(Applikon, Schiedam, The Netherlands)において実施した。リアクターは3つの6羽Rushton羽根車、高いガス流速流速を確実にするための1つのL-スページャ、BlueInOne Fermオフガス分析機器(BlueSens, Herten, Germany)およびACTOMAT N IIコントロールシステム(Heinrich Frings, Bonn, Germany)と組み合わせたALCOSENSプローブを備えていた。

【0119】

発泡を防ぐために、 $15L$ の減少した、 $25ml/L$ のH₃PO₄(8.5%, v/v)、 $2.31g/L$ のMgSO₄·7H₂O、 $0.18g/L$ のCaSO₄·2H₂O、 $0.72g/L$ のKOH、 $2.85g/L$ のK₂SO₄、 $20g/L$ のグリセロールおよび $0.25ml/L$ のStruktrol J673(Schill + Seilacher「Struktrol」GmbH, Hamburg, Germany)を含有する基礎塩類培地を用いて流加培養を開始した。

【0120】

滅菌および25% (w/w)アンモニアを用いるpH調整後、 $8ml/L$ のピキア微量金属(PTM)溶液を無菌的に添加した。PTM溶液は、 $0.10g/L$ のビオチン、 $0.01g/L$ のH₃BO₃、 $0.10g/L$ のCoCl₂·6H₂O、 $0.30g/L$ の

10

20

30

30

40

50

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、32.50 g/L の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.50 ml/L の H_2SO_4 、1.50 g/L の $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.04 g/L の NaI 、0.10 g/L の $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、10 g/L の ZnCl_2 を含有していた。培養は、以下の条件下で制御された：成長温度28°、誘導温度25°、通気1vvmおよび1~2.1バールの間で変動する絶対圧力。 pH は、25% (w/w) アンモニアの添加によって6.0で維持した。誘導相を除いて、溶存酸素飽和(DO)は、350から610 rpmに攪拌速度を増大することによって30%を上回って維持した。150 mlの前培養物を用いて播種した後、すべての発酵は、2相戦略に従って実施した：第1相は、OD₆₀₀ 約 60 ± 10 の DO 値の急上昇によって示されるバッチグリセロールの枯渇で終了した。その後、0.25% (v/v) メタノールを添加することによって第2相(誘導相)を開始した。その結果、すべての添加された溶液および除去されたサンプル容量を考慮して発酵容量を算出した。得られた抵抗読み取り値を、ACETOMAT N II の再較正のために使用した。再較正後、メタノール濃度を、閉ループ制御を使用して0.25% (v/v) で一定に維持した。合計約2700 g のメタノールを添加した後に誘導を停止し、発酵培養液を20%未満の温度に冷却した。その後、全培養液を回収し、細胞を、Beckman Avanti J20 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) ビーカー遠心分離機 (4,900 × g で 20 分間) における遠心分離によって上清から分離した。上清を回収し、800 / 450 mL アリコートで -20° で保存した。

10

20

30

【0121】

4. タンパク質精製

pHを7.0に調整した後、発酵培養液を回収し、4%および9000 × gで20分間遠心分離した (Beckmann Avanti J-26 X P)。上清を、即時処理のため、または-20°での貯蔵のために回収した。

30

40

【0122】

その後の処理/精製のために、2種の直交型クロマトグラフィー法を使用した：捕獲ステップとしての固定化された金属イオンアフィニティーコロマトグラフィー (IMAC) と、それに続く、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)。

50

【0123】

IMAC

IMACの間の生成物の効率的な結合を確実にするために、上清を室温に順化させ、必要な場合には、pHを、5 M NaOHを用いて7.0に調整した。0.45/0.2 μm フィルター (Sartopore 2 150, Sartorius Stedim, Goettlingen) を使用して、粒子を除去し、したがって、クロマトグラフィカラムが閉塞するのを防いだ。

50

【0124】

条件付けされた上清を、平衡化された (200 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄、10 mM イミダゾール、pH 7.0)、銅担持キレーティングセファロースファストフロー (GE Healthcare) 上に、200~250 cm/h の流速でローディングした。ローディング後、カラムを、7カラム容積 (CV) の平衡バッファーを用いて洗浄し、続いて、生成物を溶出した (200 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄、75~125 mM イミダゾール、pH 7.4)。溶出物を SDS-PAGE、クマシ染色およびウエスタンプロットによって分析した。最後に、適当な画分をブールした。

50

【0125】

バッファー交換

陰イオン交換クロマトグラフィーを流す前に、IMAC溶出液のバッファーを、HiPrep 26/10 脱塩カラム (GE Healthcare, Munich, Germany) を使用して 20 mM Tris バッファー、pH 8.0 と交換した。

50

【0126】

陰イオン交換クロマトグラフィー

先に脱塩したIMAC溶出液を、平衡化された（バッファーA：20 mM Tris、pH 8.0）、5 mLのQセファロースHP（GE - Health care, Munich, Germany）を詰めたMedia Scout（登録商標）Minichromカラム（ATOOL、Weingarten, Germany）上にローディングした。その後、カラムをバッファーAを用いて洗浄し、20%バッファーB（20 mM Tris、1 M NaCl、pH 8.0）を使用する第2の洗浄ステップを続けた。最後に、ワクチン候補に応じて、生成物溶出のために以下の濃度のバッファーBを使用した：

【0127】

【表2】

表1. ワクチン候補の溶出のために使用されるバッファーB濃度の概説

10

ワクチン候補	濃度バッファーB
VAMAX 1	24%
VAMAX 2	25-26%
VAMAX 6	25-26%

20

【0128】

S E C

IMAC溶出液／プールを、10 kDa MWCOメンブレン（Merck Millipore、Darmstadt）を有するCentriprep遠心フィルタユニットを使用して10～30倍濃縮した。最大2 mLの濃縮物を、平衡化した（2.7 mMのKCl、1.5 mMのKH₂PO₄、137 mMのNaCl、8.1 mMのNa₂HPO₄）セファクリルS-100 HR 16/60カラム（GE Health care）上にローディングした。生成物を、平衡バッファーを用いるイソクラティック溶出によって分離した。

30

【0129】

5. SDS-PAGEおよび免疫プロット解析

タンパク質を、非還元条件下で市販の4～12%（w/v）勾配ゲル（In vitro gen）で分離し、フェアバンクス（Fairbanks）プロトコール（Wong et al. 2000）に従ってクマシーアーR-250で染色した。分離されたタンパク質をニトロセルロースメンブレン（Whatmann、Dassel, Germany）上にプロッティングし、PBSに溶解した5%（w/v）脱脂粉乳を用いてプロッキングした。タンパク質を、1:5000希釈のPfAMA1特異的ラットmAb4G2を用いてプローピングした。二次抗体は、アルカリホスファターゼ標識されたヤギ抗ラットIgGとした。バンドをNBT/BCIP（基質バッファー：150 mM NaCl、2 mM MgCl₂、50 mM Tris-HCl、pH 9.6中、1 mg·mL⁻¹）を用いて可視化した。インキュベーションステップの間に、メンブランを0.05%（v/v）Tween-20を補給したPBSを用いて3回洗浄した。

40

【0130】

図3は、V1:PfAMA1-DICO1、Pfs25およびPfcSP-TSRを有するVAMAX I、V2:PfAMA1-DICO2、Pfs25およびPfMSP1-19を有するVAMAX IIならびにV3:PfAMA1-DICO3、Pfs25およびPfRh5_Q5Aを有するVAMAX VIのSDS-PAGE（A）およびウエスタンプロット解析（B）を示す。3種の融合タンパク質は、十分に発現され、単離

50

後ワクチン接種のために使用され得る。図は、3種の融合タンパク質すべてが無傷であり、酵母において十分に発現されることを示す。

【0131】

図3中の略語は以下である：

V1 : V A M A X I (配列番号9)
V2 : V A M A X I I (配列番号10)
V3 : V A M A X V I (配列番号11)
M : 分子量マークー

【0132】

6. ウサギの免疫処置

精製されたタンパク質(配列番号9～11)を、等モル比量で混合し(本明細書において以下、VAMAX-Mixと呼ばれる)、凍結乾燥した。製造業者の使用説明書に従つてAlhydrogel(Brenntag)を用いる50μg用量の製剤化後に、1回の初回刺激および2回の連続追加免疫注射(28および56日目)を使用してウサギを免疫処置するために、組換えタンパク質混合物を、Biogenes(Berlin, Germany)に送った。70日目に血液サンプルを採取した。

10

【0133】

7. ウサギ血清から得られた抗体のプロテインA精製

免疫処置後、ウサギ抗血清から得られた抗体を、プロテインAクロマトグラフィーによって精製した。手短には、血清サンプルをPBSを用いて1：5希釈し、精製に先立つて0.45μmフィルターを通して濾過した。抗体をプロテインA樹脂(GE Health care)上に結合させ、結合していない不純物をPBSを用いる洗浄ステップによって除去した。結合している抗体を100mMグリシンpH3.0を用いて溶出し、1MTRIS pH8.0を用いて直接中和した。溶出画分を、2.5mlに濃縮し、5mMリン酸バッファーpH7.5(PD10)に対してバッファー交換し、凍結乾燥した。抗体を600μlのPBSに溶解し、濾過滅菌した。濃度を、分析用SEC(S2005/150)で1/20希釈で測定した。

20

【0134】

8. 滑走運動性アッセイ

96ウェルガラス底黒色プレートを、抗CSP mAb 3SP2を用いてコーティングして、shed CSPタンパク質を捕獲した。10,000個の熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)ス포ロゾイトを、ウサギIgGとともに30分間プレインキュベートし、次いで、3SP2コーティングされたスライド上に移した。90分インキュベートした後、ス포ロゾイトを洗浄除去した。滑走痕跡を固定化し、抗CSPビオチン、続いてストレプトアビシン-AF594を用いて染色した。1000×の倍率で蛍光顕微鏡によって滑走痕跡を可視化し、イメージをFIJIイメージングソフトウェアを用いて分析した。

30

【0135】

図4は、滑走運動性アッセイから得た結果を示す。精製されたウサギ免疫IgGを、9、3および1mg/mlで使用した。プロットは、正常なウサギ血清から精製された抗体に対する阻害パーセントを示す。阻害の明確な用量依存性が観察された。

40

【0136】

9. 成長阻害アッセイ

プラスモジウム属(*Plasmodium*)寄生生物に対する成長阻害の可能性を、標準化されたプロトコールを使用して実施した。熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)寄生生物株3D7A、HB3、V1-Sおよび7GB(MR4によって提供された)を、37℃で5%CO₂、5%O₂および90%N₂で、10%Albumax II (Invitrogen)、25mM Hepes、12μg/mlのゲンタマイシンおよび100μgのヒポキサンチンを補給した RPMI培地中、4%のヘマトクリットで、5%未満の寄生虫症で培養物中に維持した。培養物を日常的なルーチンで維持し、ギムザ染色によって寄生中

50

症を推定した。アッセイに使用される赤血球は15人のマラリア無感作血液ドナーから混合し、それらは3週間以内のものだった。赤血球はSAG-マンニトール中、4℃で保存した。寄生生物を、侵襲後1～16時間の時間ウィンドウ内の10%ソルビトール処理によって同調させた。アッセイには、侵襲後36～40時間の高度に同調した培養物のみを使用した。

【0137】

寄生生物および新鮮なRBCおよび抗体を、およそ、0.1%の最終寄生中症および2%の最終ヘマトクリットを有するよう96ウェルプレート中で混合した。バックグラウンド対照のために、寄生生物を含まないRBCのみを寄生生物と同一条件下で培養物中に維持した。添加を行わずに熱帯熱マラリア原虫(*plasmodium falciparum*)寄生生物を培養することによって、寄生生物成長をモニタリングするための成長制御を実施した。すべてのサンプルを3連で測定した。陰性対照として、マラリア無感作ウサギおよびヒト血漿を得、精製された抗体を試験した。完全侵襲阻害の陽性対照として、EDTA(4mM最終濃度)およびBG98ウサギ抗AMA-1ポリクローナル抗体を使用した。プレートは37℃、95%湿度、5%CO₂、5%O₂および90%N₂で40～44時間インキュベートした。回収時に、冷PBSを用いて1回ウェルを洗浄し、凍結した。寄生生物成長をMalsatt(商標)アッセイ32によって推定した。吸光度を分光光度計を使用して655nmの波長で30分後に測定した。阻害能は以下の式によって推定した：

$$\text{阻害\%} = 100\% - ((A_{655} \text{ IgGサンプル} - A_{655} \text{ RBC対照}) / (A_{655} \text{ シゾント対照} - A_{655} \text{ RBC対照})) * 100\%$$

【0138】

上記のように、成長阻害アッセイは抗体の阻害の可能性を評価するための標準のin vitroアッセイである。アッセイは無性段階/血液段階をシミュレートする。

【0139】

図5は、成長阻害アッセイから得た結果を示す。精製された免疫IgGを、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156および0.078mg/mlで使用した。4種の試験された株のすべて(各グラフの上に示される)について、10mg/mlで45%～68%の寄生生物成長阻害が観察され、VAMAX-Mixによって誘導される交雑株有効性が確認された。

【0140】

10. 標準膜飼育検定法(SMFA)

精製したIgGサンプルを、熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)株NF54-hs p70-1uc由来の段階Vガメトサイト、ヒト赤血球と組み合わせ、アノフェレス・ステフェンシ(*Anopheles stephensi*)蚊に与えた。実験は、活性相補体の存在下で実施した。8日後、個々の蚊におけるルシフェラーゼ発現を分析した。

【0141】

図6は、SMFAから得た結果を示す。精製したウサギ免疫IgGを、1、0.3、0.1、0.03および0.01mg/mlで使用した。プロットは、正常なウサギ血清から精製された抗体に対する阻害パーセントを示す。阻害の明確な用量依存性が観察された。

【0142】

(参考文献)

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

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

10

20

30

40

50

Clegg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol. Biotechnol. 16:23-52.

Douglas AD1, Williams AR, Knuepfer E, Illingworth JJ, Furze JM, Crosnier C, Choudhary P, Bustamante LY, Zakutansky SE, Awuah DK, Alanine DG, Theron M, Worth A, Shimkets R, Rayner JC, Holder AA, Wright GJ, Draper SJ. 2014. Neutralization of *Plasmodium falciparum* merozoites by antibodies against PfRH5. J Immunol. 2014 Jan 1;192(1):245-58. doi: 10.4049/jimmunol.1302045. Epub 2013 Nov 29.

10

Drickamer K, Taylor ME (2006). Introduction to Glycobiology (2nd ed.). Oxford University Press, USA. ISBN 978-0-19-928278-4.

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

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

20

Remarque EJE, Faber BWB, Kocken CHMC, Thomas AWA (2008) A diversity-covering approach to immunization with *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 induces broader allelic recognition and growth inhibition responses in rabbits. Infect Immun 76: 2660-2670. doi:10.1128/IAI.00170-08.

Richards, J. S. and J. G. Beeson (2009). "The future for blood-stage vaccines against malaria." Immunol Cell Biol 87(5): 377-390.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1 to 3, 2nd edition. Sambrook J E F Fritsch and T Maniatis Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition Vols 1 2 and 3 Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor New York USA Illus Paper (1989).

30

Schwartz, L., G. V. Brown, et al. (2012). "A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table." Malar J 11: 11.

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

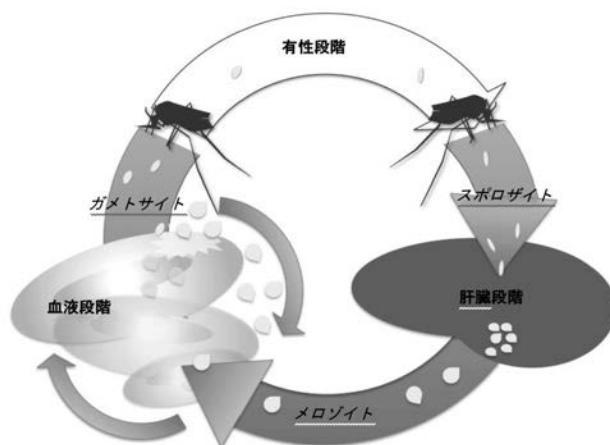
Tucker R.P. 2004. The thrombospondin type 1 repeat family. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36: 969-974.

40

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

【図 1】

図1



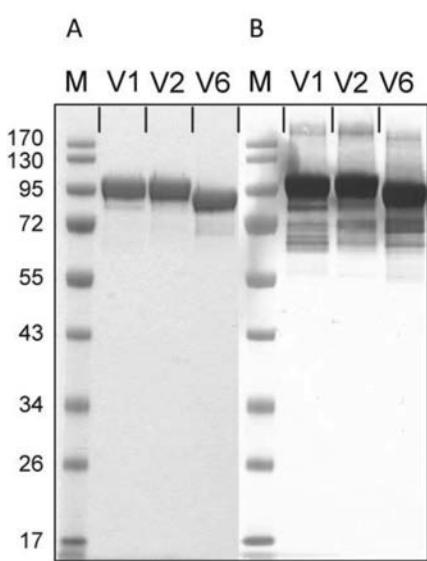
【図 2】

図2

A)	<i>PfAMA1-DICOI</i>	<i>Pfs25</i>	<i>PfCSP_TSR</i>
B)	<i>PfAMA1-DICOII</i>	<i>Pfs25</i>	<i>PfMsp1-19FUP</i>
C)	<i>PfAMA1-DICOIII</i>	<i>Pfs25</i>	<i>PfRh5_Q5A</i>

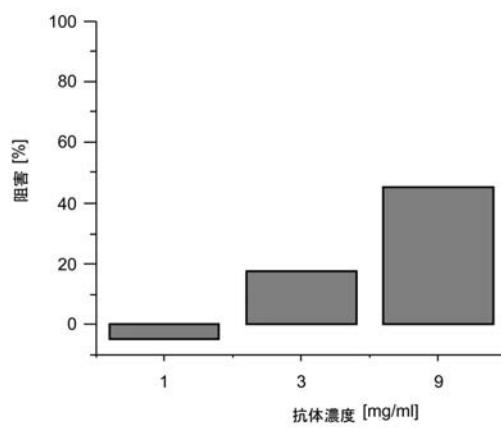
【図 3】

図3



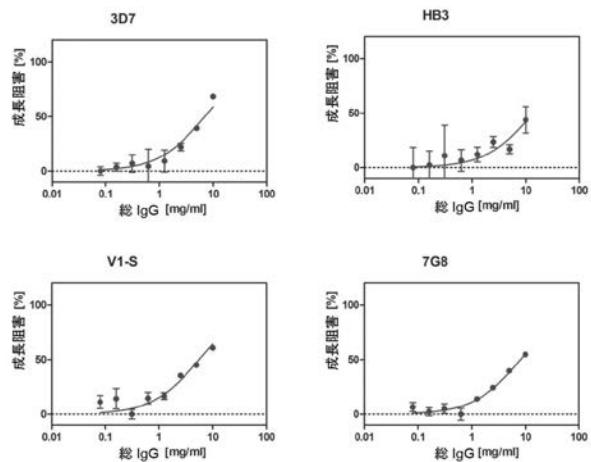
【図 4】

図4



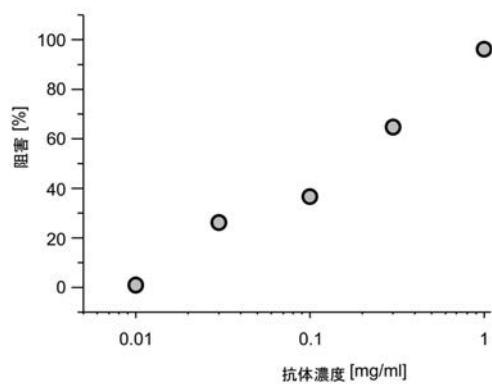
【図5】

図5



【図6】

図6



【配列表】

2017527293000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2015/070044						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/015 C12N15/62 A61K39/00 ADD.								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> B. W. FABER ET AL: "Diversity Covering AMA1-MSP119 Fusion Proteins as Malaria Vaccines", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 81, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 1479-1490, XP055155037, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.01267-12 abstract page 1480, right-hand column, line 5 - page 1481, left-hand column, last paragraph page 1482, left-hand column, paragraph first - page 1484, right-hand column, paragraph third; figures 4-7 ----- -/-/ </td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	B. W. FABER ET AL: "Diversity Covering AMA1-MSP119 Fusion Proteins as Malaria Vaccines", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 81, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 1479-1490, XP055155037, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.01267-12 abstract page 1480, right-hand column, line 5 - page 1481, left-hand column, last paragraph page 1482, left-hand column, paragraph first - page 1484, right-hand column, paragraph third; figures 4-7 ----- -/-/	1-15
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	B. W. FABER ET AL: "Diversity Covering AMA1-MSP119 Fusion Proteins as Malaria Vaccines", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 81, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 1479-1490, XP055155037, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.01267-12 abstract page 1480, right-hand column, line 5 - page 1481, left-hand column, last paragraph page 1482, left-hand column, paragraph first - page 1484, right-hand column, paragraph third; figures 4-7 ----- -/-/	1-15						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.						
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed								
Date of the actual completion of the international search 26 October 2015		Date of mailing of the international search report 04/11/2015						
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hermann, Patrice						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/070044

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALYSSA E. BARRY ET AL: "Strategies for Designing and Monitoring Malaria Vaccines Targeting Diverse Antigens", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 5, 28 July 2014 (2014-07-28), XP055155060, ISSN: 1664-3224, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00359 abstract, p. 3 left-hand column last paragraph - p. 7 left-hand column last paragraph, fig. 1 and Table 1 -----	1-15
A	C. ARAMA ET AL: "The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives", JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE, vol. 275, no. 5, 18 May 2014 (2014-05-18), pages 456-466, XP055155009, ISSN: 0954-6820, DOI: 10.1111/joim.12223 abstract, p. 458 paragraph bridging the left- to the right-hand column - p. 463 left-hand column first paragraph, fig. 1 and table 1 -----	1-15
A	WO 2012/047679 A2 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; INOVIO PHARMACEUTICALS INC [US]; WEINER DAVID) 12 April 2012 (2012-04-12) the whole document -----	1-15
A	P. SRINIVASAN ET AL: "Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 111, no. 28, 15 July 2014 (2014-07-15), pages 10311-10316, XP055145125, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1409928111 abstract page 10312, left-hand column, last line - page 10314, right-hand column, paragraph first full page 10315, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph fifth ----- -/-	1-15
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/070044

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	R. KUMAR ET AL: "Potent Malaria Transmission-Blocking Antibody Responses Elicited by Plasmodium falciparum Pfs25 Expressed in Escherichia coli after Successful Protein Refolding", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 82, no. 4, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 1453-1459, XP055155015, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.01438-13 the whole document -----	1-15
A	R. MARK JONES ET AL: "A Plant-Produced Pfs25 VLP Malaria Vaccine Candidate Induces Persistent Transmission Blocking Antibodies against Plasmodium falciparum in Immunized Mice", PLOS ONE, vol. 8, no. 11, 18 November 2013 (2013-11-18), page e79538, XP055155019, DOI: 10.1371/journal.pone.0079538 the whole document -----	1-15
A	CINDY TAMMINGA ET AL: "Human adenovirus 5-vectorized Plasmodium falciparum NMRC-M3V-Ad-PfCA vaccine encoding CSP and AMA1 is safe, well-tolerated and immunogenic but does not protect against controlled human malaria infection", HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS, vol. 9, no. 10, 4 October 2013 (2013-10-04), pages 2165-2177, XP055155024, ISSN: 2164-5515, DOI: 10.4161/hv.24941 the whole document -----	1-15
A	WO 2007/027860 A2 (GENVEC INC [US]; US NAVY NAVAL RES LAB [US]; BRUDER JOSEPH T [US]; KOV) 8 March 2007 (2007-03-08) the whole document -----	1-15
A	US 2013/216570 A1 (SCHNEERSON RACHEL [US] ET AL) 22 August 2013 (2013-08-22) the whole document -----	1-15
A	DE 10 2012 013860 A1 (DANDEKAR THOMAS [DE]) 9 January 2014 (2014-01-09) the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2015/070044

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2012047679 A2	12-04-2012	AU	2011312465 A1	02-05-2013
		CA	2812789 A1	12-04-2012
		CN	103354750 A	16-10-2013
		EP	2621540 A2	07-08-2013
		JP	2013543721 A	09-12-2013
		KR	20130138790 A	19-12-2013
		US	2013273112 A1	17-10-2013
		WO	2012047679 A2	12-04-2012
<hr/>				
WO 2007027860 A2	08-03-2007	AU	2006284756 A1	08-03-2007
		BR	PI0615400 A2	17-05-2011
		CA	2620495 A1	08-03-2007
		EC	SP088231 A	30-07-2008
		EP	1929021 A2	11-06-2008
		JP	2009505680 A	12-02-2009
		US	2009148477 A1	11-06-2009
		WO	2007027860 A2	08-03-2007
		ZA	200802218 A	29-04-2009
<hr/>				
US 2013216570 A1	22-08-2013	CN	102264381 A	30-11-2011
		EP	2346523 A2	27-07-2011
		US	2011182929 A1	28-07-2011
		US	2013216570 A1	22-08-2013
		WO	2010040000 A2	08-04-2010
<hr/>				
DE 102012013860 A1	09-01-2014	NONE		
<hr/>				

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/002 (2006.01)	A 6 1 K 39/002	
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72) 発明者 ボーズ , アレクサンダー
ドイツ国 5 0 7 6 9 アーヘン , ベシュレン コールヘン 13ビー
 (72) 発明者 エドグ , ゲーベン
ドイツ国 5 2 0 6 2 アーヘン , グナイゼナウシュトラーセ 25
 (72) 発明者 ベイズ , ベロニカ
ドイツ国 5 2 0 6 2 アーヘン , テンプラーグラベン 8
 (72) 発明者 サック , マルクス
ドイツ国 5 2 4 7 7 アルスドルフ , ゲーテストラーセ 34
 (72) 発明者 レイマン , アンドレアス
ドイツ国 4 7 8 0 7 クレフェルド , ボマースウェグ 17
 (72) 発明者 フィッシャー , レイナー
ドイツ国 5 2 0 7 6 アーヘン , ポマーロッター ウェグ 31
 F ターム(参考) 4B064 AG31 CA06 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA77X AA86Y CA24 CA45
 4C085 AA03 BA02 BB11 CC21 DD62 GG01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA50 DA50 DA86 EA31 FA74