(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2006-524698
(P2006-524698A)
(43)公表日　平成18年11月2日(2006.11.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	ZNA	4B024
A61P 31/14	(2006.01)	A61P	31/14		4C076
A61K 39/29	(2006.01)	A61K	39/29		4C084
A61K 47/34	(2006.01)	A61K	47/34		4C085
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 54 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-513239 (P2006-513239)
(86)(22)出願日　平成16年4月23日 (2004.4.23)
(85)翻訳文提出日　平成17年12月5日 (2005.12.5)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/012510
(87)国際公開番号　WO2004/096136
(87)国際公開日　平成16年11月11日 (2004.11.11)
(31)優先権主張番号　60/465,841
(32)優先日　平成15年4月25日 (2003.4.25)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　591076811
カイロン　コーポレイション
アメリカ合衆国，カリフォルニア　９４６０８，エミリービル，ホートン　ストリート　４５６０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】カチオン性微粒子およびＨＣＶＥ１Ｅ２ＤＮＡを含有する組成物ならびにその使用

(57)【要約】
免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２$_{809}$　ＤＮＡ組成物およびその使用方法を記載する。この組成物は、カチオン性微粒子（ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）（ＰＬＧ）微粒子など）に吸着したＨＣＶ　ＥＩＥ２$_{809}$　ＤＮＡを含む。本発明は、本質的に、薬学的に受容可能な賦形剤およびカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる組成物であって、該ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である、組成物を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
本質的に、薬学的に受容可能な賦形剤およびカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる組成物であって、該ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である、組成物。
【請求項２】
前記ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体が、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、およびポリ無水物からなる群より選択されるポリマーから形成される、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（Ｌ－ラクチド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド）、およびポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）からなる群より選択されるポリ（α－ヒドロキシ酸）から形成される、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成される、請求項４に記載の組成物。
【請求項６】
実質的に、
（ａ）薬学的に受容可能な賦形剤；および
（ｂ）ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成されたカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなるＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である、ポリヌクレオチド、
からなる組成物。
【請求項７】
実質的に、薬学的に受容可能な賦形剤およびカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる治療有効量の第１の組成物を被験体に投与する工程を包含する脊椎動物被験体の免疫応答を刺激する方法であって、該ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体であり、該ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体が、免疫応答を誘発するためにインビボで発現する、脊椎動物被験体の免疫応答を刺激する方法。
【請求項８】
前記ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体が、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロ

ラクトン、ポリオルトエステル、およびポリ無水物からなる群より選択されるポリマーから形成される、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（Ｌ－ラクチド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド）、およびポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）からなる群より選択されるポリ（α－ヒドロキシ酸）から形成される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成される、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
治療有効量の第２の組成物を被験体に投与する工程をさらに包含し、該第２の組成物が、免疫原性ＨＣＶポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含有する、請求項７に記載の方法。
【請求項１３】
前記第２の組成物が、前記第１の組成物の後に投与される、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記第２の組成物中の免疫原性ＨＣＶポリペプチドが、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１５】
前記ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体が、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記第２の組成物が、アジュバントをさらに含有する、請求項１２に記載の方法。
【請求項１７】
前記アジュバントが、免疫原性ＨＣＶポリペプチドに対する免疫応答を増強し得る１ミクロン未満の水中油型エマルジョンであり、該１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、（ｉ）全体積の１％～１２％の量で存在する代謝可能な油、および（ｉｉ）０．０１重量％～１重量％（ｗ／ｖ）の量で存在し、ポリオキシエチレンソルビタンのモノエステル、ジエステル、もしくはトリエステルおよび／またはソルビタンのモノエステル、ジエステル、もしくはトリエステルを含む乳化剤を含有し、該油および該乳化剤が、油滴を有する水中油型エマルジョンの形態で存在し、該油滴の実質的に全ての直径が約１００ｎｍから１ミクロン未満である、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、４～５ｗ／ｖ％スクアレン、０．２５～１．０ｗ／ｖ％モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、および／または０．２５～１．０％トリオレイン酸ソルビタン、ならびに、必要に応じてＮ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－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（ＭＴＰ－ＰＥ）を含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、実質的に、約５体積％のスクアレン、ならびにモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンからなる群より選択される１種以上の乳化剤からなり、該乳化剤の全存在量が、約１重量％（ｗ／ｖ）である、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
前記１種以上の乳化剤が、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンであり、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンの全存在量が約１重量％（ｗ／ｖ）である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】

前記第２の組成物が、ＣｐＧオリゴヌクレオチドをさらに含有する、請求項１２に記載の方法。
【請求項２２】
脊椎動物被験体の免疫応答を刺激する方法であって、該方法は、以下：
（ａ）実質的にポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成したカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる治療有効量の第１の組成物を該被験体に投与する工程であって、該ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなるＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体であって、該ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体がインビボで発現する、工程；ならびに
（ｂ）治療有効量の第２の組成物を該被験体に投与する工程であって、該第２の組成物が、該被験体で免疫応答を誘発するための（ｉ）図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体、（ｉｉ）アジュバント、および（ｉｉｉ）薬学的に受容可能な賦形剤を含有する、工程
を包含する、方法。
【請求項２３】
前記アジュバントが、前記第２の組成物中で免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体に対する免疫応答を増強し得る１ミクロン未満の水中油型エマルジョンであり、該１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、（ｉ）全体積の１％～１２％の量で存在する代謝可能な油、および（ｉｉ）０．０１重量％～１重量％（ｗ／ｖ）の量で存在し、ポリオキシエチレンソルビタンのモノエステル、ジエステル、もしくはトリエステルおよび／またはソルビタンのモノエステル、ジエステル、もしくはトリエステルを含む乳化剤を含み、該油および乳化剤が、油滴を有する油中水滴型エマルジョンの形態で存在し、該油滴の実質的に全ての直径が約１００ｎｍから１ミクロン未満である、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、４～５ｗ／ｖ％スクアレン、０．２５～１．０ｗ／ｖ％モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、および／または０．２５～１．０％トリオレイン酸ソルビタン、ならびに、必要に応じて、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－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（ＭＴＰ－ＰＥ）を含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、実質的に、約５体積％のスクアレンならびにモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンからなる群より選択される１種以上の乳化剤からなり、該乳化剤の全存在量が、約１重量％（ｗ／ｖ）である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
前記１種以上の乳化剤が、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンであり、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンの全存在量が約１重量％（ｗ／ｖ）である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記第２の組成物がＣｐＧオリゴヌクレオチドをさらに含有する、請求項２３に記載の方法。
【請求項２８】
薬学的に受容可能な賦形剤をカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドと組み合わせる工程を包含する、組成物を生成する方法において、該ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリ

ヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である、組成物を生成する方法。

【請求項２９】

脊椎動物被験体の免疫応答を刺激するための方法における請求項１～請求項６のいずれか１項に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、一般に、ＨＣＶ免疫原をコードするＤＮＡを含む免疫原性組成物に関する。特に、本発明は、カチオン性微粒子に吸着したＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２ポリペプチドをコードするＤＮＡを含む組成物およびその使用方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

（背景）

Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）は十数年前に同定され、非Ａ非Ｂ型肝炎の主な原因であることが知られている（Ｃｈｏｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８９）２４４：３５９－３６２；Ａｒｍｓｔｒｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ（２０００）３１：７７７）。ＨＣＶは、全世界で約３％（推定２００万人）が感染している（Ｃｏｈｅｎ，Ｊ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９９）２８５：２６）。米国では、毎年約３０，０００人がＨＣＶに感染している。さらに、発展途上国では、ＨＣＶ感染率が高い。免疫応答はＨＣＶ感染を除去することができるにもかかわらず、大部分の感染は慢性となる。ほとんどの急性感染は無症候性であり、通常、慢性感染の数年後にしか肝臓疾患を発症しない。

【０００３】

配列の獲得方法として、ＨＣＶのウイルスゲノム配列は公知である。例えば、国際公開番号ＷＯ８９／０４６６９；ＷＯ　９０／１１０８９；およびＷＯ　９０／１４４３６を参照のこと。ＨＣＶは、９．５ｋｂの正の向きの一本鎖ＲＮＡゲノムを有し、ウイルスのフラビウイルス科のメンバーである。系統樹分析に基づいて、少なくとも６つの異なるが関連するＨＣＶの遺伝子型が同定されている（Ｓｉｍｍｏｎｄｓｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９３）７４：２３９１－２３９９）。ウイルスは、３０００個を超えるアミノ酸残基を有する単一ポリタンパク質をコードする（Ｃｈｏｏｅｔａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８９）２４４：３５９－　３６２；Ｃｈｏｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９１）８８：２４５１－２４５５；Ｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９１）８８：１７１１－１７１５）。ポリタンパク質は、翻訳時および翻訳後に構造タンパク質および非構造（ＮＳ）タンパク質にプロセシングされる。２つの構造タンパク質は、Ｅ１およびＥ２として公知のエンベロープ糖タンパク質である。ＨＣＶ　Ｅ１およびＥ２糖タンパク質は、霊長類での研究でウイルス攻撃から保護することが示された（Ｃｈｏｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９４）９１：１２９４－１２９８）。

【０００４】

現在、唯一利用可能なＨＣＶの治療薬は、ＩＦＮ－αおよびリバビリンである。不運なことに、これらの薬剤は、治療患者の半分未満でしか有効ではない（Ｐｏｙｎａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ（１９９８）３５２：１４２６；ＭｃＨｕｔｃｈｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．（１９９８）３３９：１４８５）。したがって、ＨＣＶ感染を防止する有効なワクチンおよび既存の治療薬の代わりまたは組み合わせて使用される免疫治療薬の開発が急務である。

【０００５】

ＨＣＶに対するＴ細胞免疫は、ＨＣＶ感染およびＨＣＶ疾患の結果を決定することができる（Ｍｉｓｓａｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．（１９９６）９８：７０６；Ｃｏｏｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（１９９９）１０：４３９；およびＬｅｃｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．（２０００）１９１：１４９９）。１つの研究は、ＴＨ０／Ｔｈ１ＣＤ４＋Ｔヘルパー応答を支配的に示す個体はＨＣＶ感染を解決する一方で、Ｔｈ２型応答を示す個体は慢性化すると結論づけた（Ｔｓａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ（１９９７）２５：４４９－４５８）。さらに、ＨＣＶ特異的細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）の頻度とウイルス量とが逆相間することが示された（Ｎｅｌｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｎｕｎｏｌ．（１９９７）１５８：１４７３）。最近、チンパンジーにおけるＨＣＶの調節がＴｈ１Ｔ細胞応答に関連することが示された（Ｍａｊｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（２００２）７６：６５８６－６５９５）。したがって、ＨＣＶ特異的Ｔ細胞応答は、ＨＣＶ感染の調節で重要な役割を果たすようである。防御における抗体の役割は、患者の慢性感染の自発的解決というまれなケースに基づくと提案された（Ａｂｒｉｇｎａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｈｅｐａｔｏｌ．（１９９９）３１ Ｓｕｐｐｌｌ：２５９－２６３）。さらに、霊長類における防御は、抗Ｅ１Ｅ２抗体の力価と直接関連し、抗体が防御において役割を果たす可能性が証明された（Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９４）９１：１２９４－１２９８）。

【０００６】

ＤＮＡワクチンは、一定範囲の動物モデルにおいて強力な長期ＣＴＬおよびＴｈ１細胞応答を誘導することが示された（Ｇｕｒｕｎａｔｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０００）１８：９２７－９７４）。ＤＮＡワクチンは多数の臨床試験でヒトボランティアに投与され、安全に見えるが、その効力はより小さな動物モデルにおいて得られる応答との関連は低かった（Ｇｕｒｕｎａｔｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０００）１８：９２７－９７４）。例えば、検出可能なＣＴＬ応答がヒトボランティアで誘導されているが、高用量のＤＮＡ（２．５ｍｇ）でさえも検出可能な抗体応答を誘導できなかった（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９８）２８２：４７６－４８０）。効力を改善しようとしてＤＮＡ送達のために無針ジェット式注射デバイスを使用した場合でさえ、ＤＮＡ送達抗体応答はヒトボランティアで検出されなかった（Ｅｐｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎ．Ｔｈｅｒ（２００２）１３：１５５１－１５６０）。したがって、特にヒト応答のためにＤＮＡワクチンの効力および有効性の改善が明確に必要である。

【０００７】

適切な免疫応答を誘発するために、吸着または捕捉された抗原を有する特定のキャリアが使用される。特定のキャリアの例には、ポリ（ラクチド）由来の微粒子（例えば、米国特許第３，７７３，９１９号を参照のこと）、ＰＬＧとして公知のポリ（ラクチド－コ－グリコリド）（例えば、米国特許第４，７６７，６２８号を参照のこと）、およびＰＥＧとして公知のポリエチレングリコール（例えば、米国特許第５，６４８，０９５号を参照のこと）由来のキャリアが含まれる。ポリメチルメタクリレートポリマーは非分解性である一方で、ＰＬＧ粒子は乳酸とグリコール酸とのエステル結合の無作為な非酵素加水分解によって分解可能であり、通常の代謝経路で排泄される。

【０００８】

このようなキャリアは選択された高分子の複数のコピーを免疫系に送達して局所リンパ節中の分子の捕捉および保持を促進する。粒子をマクロファージによって貪食することができ、サイトカイン放出による抗原提示を増強することができる。国際公開番号ＷＯ ００／０５０００６は、吸着性表面を有するカチオン性微粒子の生成を記載する。ＤＮＡワクチンの送達系としてのカチオン性微粒子の使用により、効力が劇的に改善されることが示された（Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７：８１１－８１６）。例えば、微粒子により、ＨＩＶ抗原をコードするプラスミドと組み合わせて送達させた場合に一定範囲の動物モデルでの体液性応答および

Ｔ細胞応答の両方が増強されることが示された（Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７：８１１－８１６；Ｂｒｉｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．（２００１）１８：７０９－７１２；Ｏ’Ｈａｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．ｖｉｒｏｌ．（２００１）７５：９０３７－９０４３）。

【０００９】

吸着ＤＮＡに対する応答の増強を誘導するための、カチオン性ＰＬＧ微粒子の作用機構を決定するために多数の研究が行われている。予備研究により、ＰＬＧ／ＤＮＡはインビトロで樹状細胞のトランスフェクションを媒介することができるが、プラスミドＤＮＡではできないことが示された（Ｄｅｎｉｓ－Ｍｉｚｅ　ｅｔ　ａｌ，ＧｅｎｅＴｈｅｒ．（２０００）７：２１０５－２１１２）。さらに、ＰＬＧ／ＤＮＡは、分解からＤＮＡを保護し、筋肉および局所リンパ節中での遺伝子発現を増強する（Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７：８１１－８１６；Ｂｒｉｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．（２００１）１８：７０９－７１２；Ｄｅｎｉｓ－Ｍｉｚｅ　ｅｔ　ａｌ，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．（２０００）７：２１０５－２１１２）。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１０】

このような粒子送達系の使用にもかかわらず、従来のワクチンは標的にした病原体を適切に防御できないことがある。したがって、安全且つ非毒性の送達因子を含むＨＣＶに対する有効な免疫原性組成物が必要であり続けている。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

（発明の要旨）

本発明は、カチオン性微粒子に吸着させたＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡの使用により、Ｅ１Ｅ２ＤＮＡのみよりも抗体力価が有意に高くなるという驚くべき発見に一部基づく。カチオン性微粒子は、ＤＮＡを強力に吸着し、負荷効率（ｌｏａｄｉｎｇ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ）を高くし、吸着ＤＮＡの分解を保護し、筋肉中および局所リンパ節中での遺伝子発現を増強することができる。さらに、微粒子を使用して送達されたＤＮＡは、単独で送達されたＤＮＡと対照的に、免疫化後に多数の活性化ＡＰＣを注射部位に補充することもできる。したがって、このような組み合わせの使用により、ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２抗原の免疫原性を増強するための安全且つ有効なアプローチが得られる。

【００１２】

したがって、１つの実施形態では、本発明は、実質的に薬学的に受容可能な賦形剤およびカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる組成物に関する。ポリヌクレオチドは、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含む。ＨＣＶ免疫原は、ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列と少なくとも８０％の配列が同一であるアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である。

【００１３】

特定の実施形態では、ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体は、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる。

【００１４】

さらなる実施形態では、カチオン性微粒子は、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、およびポリ無水物（ポリ（Ｌ－ラクチド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド）、およびポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）からなる群より選択されるポリ（α－ヒドロキシ酸）など）からなる群より選択されるポリマーから形成される。

【００１５】
さらなる実施形態では、本発明は、実質的に、（ａ）薬学的に受容可能な賦形剤、および
（ｂ）ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成されたカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる組成物に関する。ポリヌクレオチドは、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、ＨＣＶ免疫原は、ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなるＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である。
【００１６】
なおさらなる実施形態では、本発明は、実質的に薬学的に受容可能な賦形剤およびカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる治療有効量の第１の組成物を被験体に投与する工程を含む脊椎動物被験体の免疫応答を刺激する方法に関する。ポリヌクレオチドは、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含む。ＨＣＶ免疫原は、ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列と少なくとも８０％の配列が同一であるアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体であり、ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体が免疫応答を誘発するためにインビボで発現する。
【００１７】
特定の実施形態では、ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体は、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる。
【００１８】
さらなる実施形態では、カチオン性微粒子は、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、およびポリ無水物（ポリ（Ｌ－ラクチド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド）、およびポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）からなる群より選択されるポリ（α－ヒドロキシ酸）など）からなる群より選択されるポリマーから形成される。
【００１９】
さらなる実施形態では、方法は、治療有効量の第２の組成物を被験体に投与する工程をさらに含み、第２の組成物は、免疫原性ＨＣＶポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む。
【００２０】
特定の実施形態では、第２の組成物を第１の組成物の後に投与する。加えて、第２の組成物中の免疫原性ＨＣＶポリペプチドは、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列と少なくとも８０％の配列が同一であるアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体であり得る。さらなる実施形態では、ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体は、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる。
【００２１】
さらなる実施形態では、第２の組成物は、免疫原性ＨＣＶポリペプチドに対する免疫応答を増強することができる１ミクロン未満などのアジュバントをさらに含む。１ミクロン未満の水中油型エマルジョンは、（ｉ）全体積の１％～１２％の量で存在する代謝可能な油と、（ｉｉ）０．０１重量％～１重量％の量で存在し、ポリオキシエチレンソルビタンのモノ、ジ、またはトリエステルおよび／またはソルビタンのモノ、ジ、またはトリエステルを含む乳化剤とを含み、油および乳化剤は、油滴を有する油中水滴型乳濁液の形態で存在し、油滴の実質的に全ての直径が約１００ｎｍから１ミクロン未満である。
【００２２】
特定の実施形態では、１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、４～５ｗ／ｖ％スクアレン、０．２５～１．０ｗ／ｖ％モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、および／または０．２５～１．０％トリオレイン酸ソルビタン、ならびに、任意選択的に、Ｎ

－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－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（ＭＴＰ－ＰＥ）を含む。

【００２３】

さらなる実施形態では、１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、実質的に、約５重量％のスクアレンならびにモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンからなる群より選択される１種以上の乳化剤からなり、乳化剤の全存在量が約１重量％（ｗ／ｖ）である。

【００２４】

さらなる実施形態では、１種以上の乳化剤がモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンであり、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンの全存在量が約１重量％（ｗ／ｖ）である。

【００２５】

なおさらなる実施形態では、第２の組成物は、ＣｐＧオリゴヌクレオチドをさらに含む。

【００２６】

別の実施形態では、本発明は、脊椎動物被験体の免疫応答を刺激する方法において、

（ａ）実質的にポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成したカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる治療有効量の第１の組成物を被験体に投与する工程と、ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、ＨＣＶ免疫原が、ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなるＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体であることと、ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体がインビボで発現することと、

（ｂ）治療有効量の第２の組成物を被験体に投与することと、この第２の組成物が、この被験体で免疫応答を誘発するための（ｉ）図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体、（ｉｉ）アジュバント、および（ｉｉｉ）薬学的に受容可能な賦形剤を含む、脊椎動物被験体の免疫応答を刺激する方法に関する。

【００２７】

特定の実施形態では、アジュバントは、第２の組成物中で免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体に対する免疫応答を増強することができる１ミクロン未満の水中油型エマルジョンである。１ミクロン未満の水中油型エマルジョンは、（ｉ）全体積の１％～１２％の量で存在する代謝可能な油と、（ｉｉ）０．０１重量％～１重量％の量で存在し、ポリオキシエチレンソルビタンのモノ、ジ、またはトリエステルおよび／またはソルビタンのモノ、ジ、またはトリエステルを含む乳化剤とを含み、油および乳化剤は、油滴を有する油中水滴型乳濁液の形態で存在し、この油滴の実質的に全ての直径が約１００ｎｍから１ミクロン未満である。

【００２８】

さらなる実施形態では、１ミクロン未満の水中油型エマルジョンは、４～５ｗ／ｖ％スクアレン、０．２５～１．０ｗ／ｖ％モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、および／または０．２５～１．０％トリオレイン酸ソルビタン、ならびに、任意選択的に、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－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（ＭＴＰ－ＰＥ）を含む。

【００２９】

さらなる実施形態では、１ミクロン未満の水中油型エマルジョンは、実質的に、約５重量％のスクアレンならびにモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンからなる群より選択される１種以上の乳化剤からなり、乳化剤の全存在

量が約１重量％（ｗ／ｖ）である。
【００３０】
さらなる実施形態では、１種以上の乳化剤はモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンであり、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンの全存在量が約１重量％（ｗ／ｖ）である。
【００３１】
特定の実施形態では、第２の組成物がＣｐＧオリゴヌクレオチドをさらに含む。
【００３２】
なおさらなる実施形態では、本発明は、薬学的に受容可能な賦形剤をカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドと組み合わせる工程を含む組成物の作製方法に関する。ポリヌクレオチドは、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含む。ＨＣＶ免疫原は、ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列と少なくとも８０％の配列が同一であるアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である。
【００３３】
本明細書中の開示を考慮して、当業者は、本発明のこれらおよび他の実施形態を容易に思いつく。
【発明を実施するための最良の形態】
【００３４】
（発明の詳細な説明）
本発明は、特に指定のない限り、当業者の技術の範囲内の従来の化学的方法、生物化学的方法、組換えＤＮＡ技術による方法および免疫学的方法を使用する。このような技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，ｖｏｌ．Ｉ　＆ＩＩ（Ｂ．Ｎ．Ｆｉｅｌｄｓ　および　Ｄ．Ｍ．Ｋｎｉｐｅ，ｅｄｓ．）；Ｈおよびｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｓ．Ｉ－ＩＶ（Ｄ．Ｍ．Ｗｅｉｒ　および　Ｃ．Ｃ．Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ　ｅｄｓ．，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ）；Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　および　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　および　Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９３）；Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｗｏｒｔｈ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，ｃｕｒｒｅｎｔ　ａｄｄｉｔｉｏｎ）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ　ａｌ．，ＭｏｌｅｃｕｌａｒＣｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８９）；Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｓ．Ｃｏｌｏｗｉｃｋ　および　Ｎ．Ｋａｐｌａｎ　ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）を参照のこと。
【００３５】
以下のアミノ酸の略語を本明細書を通して使用する：

アラニン：Ａｌａ（Ａ）	アルギニン：Ａｒｇ（Ｒ）
アスパラギン：Ａｓｎ（Ｎ）	アスパラギン酸：Ａｓｐ（Ｄ）
システイン：Ｃｙｓ（Ｃ）	グルタミン：Ｇｌｎ（Ｑ）
グルタミン酸：Ｇｌｕ（Ｅ）	グリシン：Ｇｌｙ（Ｇ）
ヒスチジン：Ｈｉｓ（Ｈ）	イソロイシン：Ｉｌｅ（Ｉ）
ロイシン：Ｌｅｕ（Ｌ）	リジン：Ｌｙｓ（Ｋ）
メチオニン：Ｍｅｔ（Ｍ）	フェニルアラニン：Ｐｈｅ（Ｆ）
プロリン：Ｐｒｏ（Ｐ）	セリン：Ｓｅｒ（Ｓ）
トレオニン：Ｔｈｒ（Ｔ）	トリプトファン：Ｔｒｐ（Ｗ）
チロシン：Ｔｙｒ（Ｙ）	バリン：Ｖａｌ（Ｖ）。

【００３６】

（１．定義）
本発明の記載において、以下の用語を使用し、以下で示すように定義することを意図する。
【００３７】
本明細書および添付の特許請求範囲で使用される、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」には、文脈中で明らかに別のものを示さない限り、複数形が含まれることを留意しなければならない。したがって、例えば、「Ｅ１Ｅ２ポリペプチド」には、１種以上のこのようなポリペプチドの混合物などが含まれる。
【００３８】
用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指し、産物の長さの下限に制限されない。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、および多量体などは、この定義の範囲内に含まれる。全長タンパク質およびそのフラグメントは共にこの定義に含まれる。この用語には、ポリペプチドの発現後修飾（例えば、グリコシル化、アセチル化、およびリン酸化）も含まれる。さらに、本発明の目的のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を保持する限り、天然の配列の修飾（欠失、付加、および置換（一般に、事実上保存的））を含むタンパク質をいう。これらの修飾は部位特異的変異誘発による意図的なものであり得るか、タンパク質を産生する宿主の変異またはＰＣＲ増幅に起因するエラーなどによる偶然のものであり得る。
【００３９】
「Ｅ１ポリペプチド」は、ＨＣＶＥ１領域由来の分子を意味する。ＨＣＶ－１の成熟Ｅ１領域は、全長ＨＣＶ－１ポリタンパク質に関して番号をつけたポリペプチドの約アミノ酸１９２から始まり、約アミノ酸３８３まで続く。（図１および２Ａ～２Ｃを参照のこと。図２Ａ～２Ｃのアミノ酸１９２～３８３は配列番号２のアミノ酸２０位～２１１位に対応する）。約１７３から約１９１のアミノ酸（配列番号２のアミノ酸１～１９）は、Ｅ１のシグナル配列として作用する。したがって、「Ｅ１ポリペプチド」は、前駆体（Ｅ１タンパク質）（シグナル配列を含む）またはこの配列を欠く成熟Ｅ１ポリペプチドまたは異種シグナル配列を有するＥ１ポリペプチドのいずれかを意味する。Ｅ１ポリペプチドには、約アミノ酸３６０位～３８３位が得られるＣ末端メンバーアンカー配列が含まれる（１９９６年2月１５日に公開された国際公開番号ＷＯ　９６／０４３０１参照のこと）。本明細書中で定義される「Ｅ１タンパク質」は、Ｃ末端アンカー配列またはその一部を含んでも含まなくても良い。
【００４０】
「Ｅ２ポリペプチド」は、ＨＣＶＥ２領域由来の分子を意味する。ＨＣＶ－１の成熟Ｅ２領域は、全長ＨＣＶ－１ポリタンパク質に関して番号をつけた約アミノ酸３８３～３８５から始まる。（図１および２Ａ～２Ｃを参照のこと。図２Ａ～２Ｃのアミノ酸３８３～３８５は配列番号２のアミノ酸２１１位～２１３位に対応する）。シグナルペプチドは、ポリタンパク質の約アミノ酸３６４から始まる。したがって、「Ｅ２ポリペプチド」は、シグナル配列を含む前駆体Ｅ２タンパク質またはこの配列を欠く成熟Ｅ２ポリペプチド、または異種シグナル配列を有するＥ２ポリペプチドを意味する。Ｅ２ポリペプチドには、約アミノ酸７１５位～７３０位が得られるＣ末端膜アンカー配列が含まれ、約アミノ酸残基７４６の範囲まで伸長し得る（Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ．（１９９４）６８：５０６３－５０７３を参照のこと）。本明細書中で定義される、「Ｅ２ポリペプチド」は、Ｃ末端アンカー配列またはその一部を含んでも含まなくても良い。さらに、Ｅ２ポリペプチドは、Ｅ２のＣ末端の直ぐ隣に生じるｐ７領域の全部または一部も含み得る。図１および２Ａ～２Ｃに示すように、ｐ７領域は、全長ＨＣＶ－１ポリタンパク質に関して番号をつけた７４７位～８０９位に見出される（配列番号２のアミノ酸５７５位～６３７位）。さらに、複数のＨＣＶＥ２種が存在することが公知である（Ｓｐａｅｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ．（１９９２）１８８：８１９－８３０；Ｓｅｌｂｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ；Ｖｉｒｏｌ．（１９９６）７０：５１７７－５１８２；Ｇｒａｋｏｕｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９３）６７：１３８５－１３９５；Ｔｏｍｅｉ　ｅｔ

ａｌ．，Ｊ；Ｖｉｒｏｌ．（１９９３）６７：４０１７－４０２６）。したがって、本発明の目的のために、用語「Ｅ２」は、これらのＥ２種（Ｅ２のＮ末端から１～２０個またはそれ以上のアミノ酸が欠失した種（例えば、１、２、３、４、５．．．．１０．．．１５、１６、１７、１８、１９個のアミノ酸の欠失など）が含まれるが、これらに限定されない）を含む。このようなＥ２種には、アミノ酸３８７、アミノ酸４０２、アミノ酸４０３などから始まる種が含まれる。

【００４１】

ＨＣＶ－１の代表的なＥ１およびＥ２領域を、図２Ａ～２Ｃおよび配列番号２に示す。本発明の目的のために、Ｅ１およびＥ２領域を、ＨＣＶ－１のゲノムによってコードされるポリタンパク質のアミノ酸番号に関して定義し、開始目地温を１位と指定する。Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９１）８８：２４５１－２４５５を参照のこと。しかし、本明細書中で使用される、用語「Ｅ１ポリペプチド」または「Ｅ２ポリペプチド」は、ＨＣＶ－１配列に制限されないことに留意すべきである。これに関して、多のＨＣＶ単離物中の対応するＥ１またはＥ２領域を、配列アラインメントを最大にする様式での単離物由来の配列のアラインメントによって容易に決定することができる。任意の多数のコンピュータソフトウェア（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｖｉｒｇｉｎｉａ，Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ａｔｔｎ：Ｄｒ．Ｗｉｌｌｉａｍ Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ）から利用可能なＡＬＩＧＮ１．０など）を使用してこれを行うことができる。Ｐｅａｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８８）８５：２４４４－２４４８を参照のこと。

【００４２】

さらに、本明細書中で定義される、「Ｅ１ポリペプチド」または「Ｅ２ポリペプチド」は、図に示した配列を正確に有するポリペプチドに制限されない。実際には、ＨＣＶゲノムはインビボで常に不安定な状態であり、単離物間の可変性が比較的高いいくつかの可変ドメインを含む。これらの株の間で多数の保存領域および可変領域が公知であり、一般に、これらの領域由来のエピトープのアミノ酸配列の配列相同性は高く、例えば、２つの配列をアラインメントした場合、アミノ酸配列は、３０％超、好ましくは４０％超、６０％超、さらに８０～９０％相同である。この用語は任意の種々のＨＣＶ株および単離物（Ｓｉｍｍｏｎｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９３）７４：２３９１－２３９９に記載のＨＣＶの６つの任意の遺伝子型を有する単離物（例えば、株１、２、３、４など）ならびに新規に同定された単離物、およびこれらの単離物のサブタイプ（ＨＣＶ１ａ、ＨＣＶ１ｂなどなど）が含まれる）由来のＥ１およびＥ２ポリペプチドを含むことが容易に明らかである。

【００４３】

したがって、例えば、用語「Ｅ１」または「Ｅ２」ポリペプチドは、以下にさらに定義するように、任意のＨＣＶ株由来の天然のＥ１またはＥ２、ムテイン（ｍｕｔｅｉｎ）、および免疫原性フラグメントをいう。これらの株の多数の完全な遺伝子型は公知である。例えば、米国特許第６，１５０，０８７号ならびにＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＪ２３８８００およびＡＪ２３８７９９を参照のこと。

【００４４】

さらに、用語「Ｅ１ポリペプチド」および「Ｅ２ポリペプチド」は、天然の配列の修飾（内部欠失、付加、および置換など（事実上保存的））を含むタンパク質（親配列と実質的に相同なタンパク質）を含む。これらの修飾は部位特異的変異誘発による意図的なものであり得るか、天然に存在する変異事象などによる偶然のものであり得る。修飾Ｅ１およびＥ２ポリペプチドがその意図する目的のために機能する限り、これらの全修飾が本発明に含まれる。したがって、例えば、Ｅ１および／またはＥ２ポリペプチドをワクチン組成物中で使用され、免疫学的活性（すなわち、ポリペプチドに対する体液性または細胞性免疫応答を誘発する能力）が喪失しないように修飾すべきである。

【００４５】

「Ｅ１Ｅ２」複合体は、上記のように、少なくとも１つのＥ１ポリペプチドおよび少なくとも１つのＥ２ポリペプチドを含むタンパク質を意味する。このような複合体は、Ｅ２のＣ末端のすぐ隣りに生じるｐ７領域の全部または一部を含み得る。図１および２Ａぁら２Ｃに示すように、ｐ７領域は、全長ＨＣＶ－１ポリタンパク質（配列番号２のアミノ酸５７５７位～６３７位）に関して番号がつけられた７４７位～８０９位で見出される。ｐ７タンパク質を含む代表的なＥ１Ｅ２複合体を、本明細書中で「Ｅ１Ｅ２$_{809}$」と呼ぶ。

【００４６】

Ｅ１Ｅ２複合体中でのＥ１とＥ２の会合様式は重要でない。Ｅ１およびＥ２ポリペプチドを、静電気力などの非共有相互作用または共有結合によって会合することができる。例えば、本発明のＥ１Ｅ２ポリペプチドは、上記で定義のように、免疫原性Ｅ１ポリペプチドおよび免疫原性Ｅ２ポリペプチドを含む融合タンパク質の形態であり得る。融合物を、Ｅ１Ｅ２キメラをコードするポリヌクレオチドから発現することができる。あるいは、Ｅ１Ｅ２複合体は、個別に産生されたＥ１タンパク質とＥ２タンパク質との単純な混合によって自発的に形成することができる。同様に、同時発現して培地に分泌された場合、Ｅ１およびＥ２タンパク質は、自発的に複合体を形成することができる。したがって、この用語は、Ｅ１および／またはＥ２の精製時に自発的に形成するＥ１Ｅ２複合体（凝集体ともよばれる）を含む。このよう凝集体は、１種以上のＥ２単量体に会合した１種以上のＥ１単量体を含み得る。Ｅ１単量体およびＥ２単量体の存在数は、少なくとも１つのＥ１単量体および１つのＥ２単量体が存在する限り、同一である必要はない。Ｅ１Ｅ２複合体の存在は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動などの標準的なタンパク質検出技術および免疫沈降などの免疫学的技術を使用して容易に検出される。

【００４７】

用語「アナログ」および「ムテイン」は、本明細書中に記載のアッセイにおける免疫反応性などの所望の活性を保持した基準分子の生物活性誘導体（Ｅ１Ｅ２$_{809}$など）またはこのような誘導体のフラグメントをいう。一般に、用語「アナログ」は、天然のポリペプチド配列、ならびに、修飾によって免疫原性活性が破壊されない限り、天然の分子に対して１種以上のアミノ酸の付加、置換（一般に、事実上保存的）、および／または欠失を受けた構造をいう。用語「ムテイン」は、国際公開番号ＷＯ　９１／０４２８２などに記載の１種以上のペプチド模倣物（「ペプトイド」）を有するペプチドをいう。好ましくは、アナログまたはムテインは、少なくとも天然の分子と同一の免疫反応性を有する。ポリペプチドアナログおよびムテインの作製方法は当該分野で公知であり、以下にさらに記載する。

【００４８】

特に好ましいアナログは、事実上保存的な置換（すなわち、その側鎖に関連するアミノ酸ファミリー内で起こる置換）を含む。詳細には、アミノ酸は、一般に、以下の４つのファミリーに分類される：（１）酸性－－アスパラギン酸およびグルタミン酸；（２）塩基性－－リジン、アルギニン、ヒスチジン、（３）非極性－－アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、および（４）非荷電極性－－グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時折、芳香族アミノ酸として分類される。例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンとの単独置換、アスパラギン酸のグルタミン酸との単独置換、トレオニンのセリンとの単独置換、またはアミノ酸の構造が関連するアミノ酸への類似の保存的置換は、生物活性に大きな影響を与えないことが合理的に予想される。例えば、Ｅ１Ｅ２ポリペプチドなどの目的のポリペプチドは、分子の所望の機能が無傷なままである限り、約５～１０個の保存的または非保存的アミノ酸置換、さらに約１５～２５個または５０個の保存的または非保存的アミノ酸置換、または５～５０の間の任意の整数の保存的または非保存的アミノ酸置換を含み得る。当業者は、当該分野で周知のＨｏｐｐ／ＷｏｏｄｓおよびＫｙｔｅ－Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅプロットを参照した変化を許容することができる目的の分子の領域を容易に決定するこ

とができる。

【００４９】

「フラグメント」は、無傷な全長ポリペプチド配列および構造の一部のみからなるポリペプチドを意図する。フラグメントには、天然のポリペプチドのＣ末端欠失、Ｎ末端欠失、および／または内部欠失が含まれ得る。特定のＨＣＶタンパク質の「免疫原性フラグメント」には、一般に、目的のフラグメントが本明細書中に定義の免疫学的応答を誘発する能力を保持するという条件で、エピトープを定義する全長分子の少なくとも約５～１０個の連続アミノ酸残基、好ましくは全長分子の少なくとも約１５～２５個の連続アミノ酸残基、最も好ましくは全長分子の少なくとも約２０～５０個またはそれ以上の連続アミノ酸残基、または５個のアミノ酸と全長配列との間の任意の整数の連続アミノ酸残基が含まれる。ＨＣＶ　Ｅ１およびＥ２の公知の免疫原性フラグメントの説明については、例えば、Ｃｈｉｅｎ　ｅｔ　ａｌの国際公開番号ＷＯ　９３／００３６５を参照のこと。

【００５０】

本明細書中で使用される、用語「エピトープ」は、それ自体で配列またはより大きな配列の一部を定義し、投与した被験体における免疫学的応答を誘発する、少なくとも３～５個、好ましくは約５～１０個または１５個、多くて約５００個のアミノ酸（またはその間の任意の整数）の配列をいう。しばしば、エピトープは、このような配列に応答して生成された抗体に結合する。フラグメントの長さの上限は存在せず、タンパク質配列のほぼ全長を含み得るか、ＨＣＶポリタンパク質由来の１種以上のエピトープを含む融合タンパク質ですら含み得る。本発明で使用するためのエピトープは、由来する親タンパク質の一部の正確な配列を有するポリペプチドに限定されない。実際、ウイルスゲノムは、常に不安定な状態であり、単離物間の可変性が比較的高いいくつかの可変ドメインを含む。したがって、用語「エピトープ」は、天然の配列と同一の配列ならびに欠失、付加、および置換（一般に、事実上保存的）などの天然の配列に対する修飾配列を含む。

【００５１】

エピトープを含む所与のポリペプチド領域を、当該分野で周知の任意の数のエピトープマッピング技術を使用して同定することができる。例えば、Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．６６（Ｇｌｅｎｎ　Ｅ．Ｍｏｒｒｉｓ，Ｅｄ．，１９９６）Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙを参照のこと。例えば、線状エピトープを、例えば、固体支持体上での多数のペプチド（タンパク質分子の一部に対応するペプチド）の同時合成、および依然として支持体に結合しているペプチドの抗体との反応によって決定することができる。このような技術は当該分野で公知であり、例えば、米国特許第４，７０８，８７１号；Ｇｅｙｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８１：３９９８－４００２；Ｇｅｙｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２：１７８－１８２；Ｇｅｙｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：７０９－７１５に記載されている。このような技術を使用して、ＨＣＶの多数のエピトープが同定されている。例えば、Ｃｈｉｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｉｒａｌ　Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ　ａｆａｄ　Ｌｉｖｅ　Ｄｉｓｅａｓｅ（１９９４）ｐｐ．３２０－３２４およびさらに以下を参照のこと。同様に、エピトープの高次構造は、例えば、Ｘ線結晶学および二次元核磁気共鳴などによるアミノ酸の空間的高次構造の決定によって容易に決定される。例えば、Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｓｕｐｒａを参照のこと。タンパク質の抗原性領域を、標準的な抗原性およびハイドロパシープロット（例えば、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｇｒｏｕｐから利用可能なＯｍｉｇａバージョン１．０ソフトウェアプログラムをなどを使用して計算したものなど）を使用して同定することもできる。このコンピュータプログラムは、抗原性プロフィールを決定するためのＨｏｐｐ／Ｗｏｏｄｓ法（Ｈｏｐｐ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ（１９８１）７８：３８２４－３８２８）およびハイドロパシープロットのためのＫｙｔｅ－Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ技術（Ｋｙｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ；Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ

．（１９８２）１５７：１０５－１３２）を使用する。

【００５２】

本明細書中で使用される、用語「エピトープの高次構造」は、全長タンパク質内のエピトープをコードするアミノ酸起源とする構造の特徴を有する全長タンパク質の一部またはそのアナログもしくはフラグメントをいう。天然の構造の特徴には、グリコシル化構造および三次元構造が含まれるが、これらに限定されない。これらのエピトープが抗原の三次元の形状（例えば、折りたたみ）によって形成されると考えられる場合、エピトープ定義配列の長さを、幅広いバリエーションで供することができる。したがって、エピトープを定義するアミノ酸は、比較的少数であり得るが、分子の長さに沿って（または、二量体の場合、異なる分子上に）広範に分散し、折りたたみを介して正確なエピトープ高次構造となることができる。エピトープを定義する残基の間の抗原の一部は、エピトープの高次構造に重要ではない可能性がある。例えば、エピトープの高次構造に重要な配列が維持される場合、これらの介在配列の欠失または置換は高次構造エピトープに影響を与えないことが可能である（例えば、ジスルフィド結合を包含するシステイン、糖鎖付加部位等）。

【００５３】

高次構造エピトープは、上記考察の方法を使用して容易に同定される。さらに、所与のポリペプチド中の高次構造エピトープの有無を、抗体（高次構造エピトープに対するポリクローナル血清またはモノクローナル）での目的の抗原のスクリーニングおよびその反応性と線状エピトープ（存在する場合）のみを保持する抗原の変性バージョンの反応性との比較によって容易に決定することができる。ポリクローナル抗体を使用したこのようなスクリーニングでは、ポリクローナル抗原が変性抗原に最初に吸収され、目的の抗原に対する抗体を保持するかどうかを調査することが有利であり得る。Ｅ１およびＥ２領域由来の高次構造エピトープは、例えば、国際公開番号ＷＯ９４／０１７７８に記載されている。

【００５４】

ＨＣＶ抗原または組成物に対する「免疫学的応答」は、被験体における目的の組成物中に存在する分子に対する体液性および／または細胞性免疫応答の発生である。本発明の目的のために、「体液性免疫応答」は、抗体分子によって媒介される免疫応答をいい、「細胞性免疫応答」は、Ｔリンパ球および／または他の白血球によって媒介される免疫応答をいう。細胞性免疫の１つの重要な態様は、細胞溶解性Ｔ細胞（「ＣＴＬ」）による抗原特異的応答である。ＣＴＬは、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）によってコードされ、且つ細胞表面上で発現する、タンパク質に会合して提示されるペプチド抗体に特異的である。ＣＴＬは、細胞内微生物の細胞内破壊またはこのような微生物に感染した細胞の溶解の誘導および促進を補助する。細胞性免疫の別の態様は、ヘルパーＴ細胞による抗原特異的応答を含む。ヘルパーＴ細胞は、その表面上のＭＨＣ細胞と会合してポリペプチド抗原を表示する細胞に対する非特異的エフェクター細胞の機能を刺激し、その活性に集中する。「細胞免疫応答」はまた、活性Ｔ細胞および／または他の白血球によって産生されたサイトカイン、ケモカイン、および他のこのような分子（ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞由来のものが含まれる）の産生をいう。細胞免疫応答を誘発する組成物またはワクチンは、細胞表面のＭＨＣと会合した抗原の提示によって脊椎動物被験体を感作するように作用することができる。その表面で抗原を提示した細胞またはその近くで細胞媒介性免疫応答が指示される。さらに、免疫化宿主をさらに保護するために抗原特異的Ｔリンパ球を生成することができる。特定の抗原が細胞媒介性免疫学的応答を刺激する能力を、多数のアッセイ（リンパ増殖（リンパ球活性化）アッセイ、ＣＴＬ脂肪傷害性細胞アッセイ、または感作被験体における抗原に特異的なＴリンパ球についてのアッセイなど）によって決定することができる。このようなアッセイは当該分野で周知である。例えば、Ｅｒｉｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９９３）１５１：４１８９－４１９９；Ｄｏｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｒｉｏｌ．（１９９４）２４：２３６９－２３７６を参照のこと。

【００５５】

したがって、本明細書中で使用される、「免疫学的応答」は、ＣＴＬの産生および／ま

たはヘルパーＴ細胞の産生または活性化を刺激するものであり得る。目的の抗原はまた、抗体媒介性免疫応答（例えば、結合中和（ＮＯＢ）抗体が含まれる）を誘発することができる。ＮＯＢ抗体応答の存在は、例えば、Ｒｏｓａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９６）９３：１７５９に記載の技術によって容易に決定される。したがって、免疫学的応答には、１つまたは複数の以下の効果が含まれ得る：Ｂ細胞による抗体の産生、および／または目的の組成物またはワクチン中に存在する抗原に特異的に指向するサプレッサーＴ細胞および／またはγδＴ細胞の活性化。これらの応答は、免疫化宿主を防御またはその症状を緩和するために感染力を中和し、そして／または抗体－補体または抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を媒介するように作用することができる。このような応答を、当該分野で周知の標準的な免疫アッセイおよび中和アッセイを使用して決定することができる。

【００５６】

カチオン性微粒子などのＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２　ＤＮＡ組成物は、組成物が、カチオン性微粒子を使用しないで送達させた同量のＥ１Ｅ２　ＤＮＡによって誘発された免疫応答よりも免疫応答を誘発する能力が高い場合、組成物中のＤＮＡによって産生されたＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２ポリペプチドに対する免疫応答を増強する。このような免疫原性の増強を、さらなる成分を含むか含まないＥ１Ｅ２　ＤＮＡの投与および当該分野で周知の放射性免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡ、およびリンパ増殖アッセイなどの標準的なアッセイを使用して産生された抗体力価または細胞性免疫応答の比較によって決定することができる。

【００５７】

「単離」は、ポリペプチドを指す場合、示した分子が生物そのものから分離および別にされており、分子が天然に見出されるか、同型の他の生体高分子の実質的存在下で存在することを意味する。ポリヌクレオチドに関する用語「単離」は、通常は事実上会合している配列を全部または一部欠く核酸分子、事実上存在するが、異種配列が会合した配列、または染色体から解離した分子である。

【００５８】

「等価な抗原決定基」は、ＨＣＶの株１、２、３などの由来の異なるＨＣＶの亜種または種由来の抗原決定基を意味し、抗原決定基は配列の変化によって必ずしも同一でなくて良いが、目的のＨＣＶ配列中の等価な位置に生じる。一般に、等価な抗原決定のアミノ酸配列は、２つの配列をアラインメントした場合、配列相同性が高い（例えば、３０％超、通常４０％超（６０％超など）、さらに８０～９０％超のアミノ酸配列相同性）。

【００５９】

「相同性」は、２つのポリヌクレオチド部分または２つのポリペプチド部分の間の同一率をいう。２つのＤＮＡ配列または２つのポリペプチド配列は、定義した長さの分子について配列が少なくとも約８０％、好ましくは少なくとも約７５％、より好ましくは少なくとも約８０～８５％、好ましくは少なくとも約９０％、最も好ましくは少なくとも９５％～９８％の配列同一性を示す場合、互いに「実質的に相同」である。本明細書中で使用される、「実質的に相同」はまた、特定のＤＮＡ配列またはポリペプチド配列に対する完全な同一性を示す配列をいう。

【００６０】

一般に、「同一性」は、それぞれ２つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の正確なヌクレオチド－ヌクレオチドまたはアミノ酸－アミノ酸の対応をいう。配列アラインメントによる２分子間の配列情報の直接比較、２つのアラインメント配列間の正確な適合数の計数、より短い配列の長さで除すること、および結果に１００を掛けることによって同一率を決定することができる。ペプチド分析用のＳｍｉｔｈ　および　Ｗａｔｅｒｍａｎの局所相同性アルゴリズム（Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２－４８９，１９８１）に適合させたＡＬＩＧＮ（Ｄａｙｈｏｆｆ，Ｍ．Ｏ．ｉｎ　Ａｔｌａｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　および　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　Ｍ．Ｏ．Ｄａｙｈｏｆｆ　ｅｄ．，５　Ｓｕｐｐｌ．３：３５３－３５８，Ｎａｔｉｏｎａｌ　ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，Ｗａｓｈｉｎ

ｇｔｏｎ，ＤＣ）などの容易に利用可能なコンピュータプログラムを使用して、分析を補助することができる。ヌクレオチド配列同一性を決定するためのプログラムは、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ　８（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩから利用可能）で利用可能である（例えば、Ｓｍｉｔｈ　および　Ｗａｔｅｒｍａｎ　アルゴリズムにも依存するＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、およびＧＡＰプログラム）。これらのプログラムを、製造者によって推奨され、且つ上記で言及したＷｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｐａｃｋａｇｅに記載のデフォルトパラメータを使用して容易に利用される。例えば、基準配列に対する特定のヌクレオチド配列の同一率を、デフォルトスコアリングテーブルおよびヌクレオチド上の６つの位置でのギャップペナルティを使用したＳｍｉｔｈ　および　Ｗａｔｅｒｍａｎの相同性アルゴリズムを使用して決定することができる。

【００６１】

本発明の文脈中における同一率の別の確立方法は、エディンバラ大学が著作権を有し、Ｊｏｌｍ　Ｆ．Ｃｏｌｌｉｎｓ　および　Ｓｈａｎｅ　Ｓ．Ｓｔｕｒｒｏｋによって開発され、ＩｎｔｅｌｌｉＧｅｎｅｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）から販売されているＭＰＳＲＣＨプログラムパッケージを使用することである。このパッケージスイートから、スコアリングテーブルのためにデフォルトパラメータを使用するＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムを使用することができる（例えば、ギャップオープンペナルティ１２、ギャップ伸長ペナルティ１、およびギャップ６）。作成されたデータから、「適合」値は、「配列同一性」を反映する。２配列間の同一率または類似性を計算するための他の適切なプログラムは、当該分野で一般に公知であり、例えば、別のアラインメントプログラムはデフォルトパラメータを使用したＢＬＡＳＴである。例えば、ＢＬＡＳＴＮおよびＢＬＡＳＴＰを、以下のデフォルトパラメータを使用して使用することができる：遺伝コード＝標準；フィルタ＝なし；鎖＝両方；カットオフ＝６０；期待値＝１０；行列＝ＢＬＯＳＵＭ６２；記載＝５０配列；分類＝ハイスコア；データベース＝非冗長、ＧｅｎＢａｎｋ＋ＥＭＢＬ＋ＤＤＢＪ＋ＰＤＢ＋ＧｅｎＢａｎｋ　ＣＤＳ翻訳物　＋　Ｓｗｉｓｓ　ｐｒｏｔｅｉｎ＋Ｓｐｕｐｄａｔｅ＋ＰＩＲ。これらのプログラムの詳細を、以下のインターネットアドレスで見出すことができる：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｇｏｖ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＢＬＡＳＴ。

【００６２】

あるいは、相同領域間で安定な二重鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリッド形成、その後の一本鎖特異的ヌクレアーゼでの消化、および消化フラグメントのサイズ決定によって相同性を決定することができる。実質的に相同なＤＮＡ配列を、例えば、特定の系について定義したストリンジェントな条件下でのサザンハイブリッド形成実験で同定することができる。適切なハイブリッド形成条件の定義は、当業者の範囲内である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，ｓｕｐｒａ；ＤＮＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，ｓｕｐｒａ；Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ，ｓｕｐｒａを参照のこと。

【００６３】

用語「縮重改変体」は、宿主変異型が由来するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするその核酸配列が変化したポリヌクレオチドを意図する。したがって、Ｅ１Ｅ２８０９ＤＮＡの縮重改変体は、分子が由来するが同一のＥ１Ｅ２８０９アミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列中の１つまたは複数の塩基が異なる分子である。

【００６４】

選択配列の「コード配列」または選択配列を「コードする」配列は、適切な制御配列の調節下においた場合に転写されるか（ＤＮＡの場合）、ポリペプチドに翻訳される（ｍＲＮＡの場合）核酸分子である。コード配列の境界を、５’（アミノ）末端の開始コドンおよび３’（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンによって決定する。転写終結配列は、コー

ド配列に対して３’側に存在し得る。

【００６５】

「核酸」分子または「ポリヌクレオチド」には、二本差および一本鎖配列を含むことができ、ウイルス由来のｃＤＮＡ、原核生物もしくは真核生物ｍＲＮＡ、ウイルス（ＤＮＡウイルスおよびレトロウイルス）または原核生物ＤＮＡ由来のゲノムＤＮＡ配列、または合成ＤＮＡ配列をいうが、これらに限定されない。この用語は、ＤＮＡおよびＲＮＡの任意の公知の塩基アナログを含む配列も含む。

【００６６】

「ＨＣＶポリヌクレオチド」は、上記定義のように、ＨＣＶポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【００６７】

「作動可能に連結された」は、記載の成分がその所望の機能を発揮するように構成されたエレメントの配置をいう。したがって、コード配列に作動可能に連結された所与のプロモーターは、適切な転写因子などが存在する場合にコード配列の発現に影響を与えることができる。プロモーターは、その発現を指示するように機能する限り、コード配列に隣接する必要はない。したがって、例えば、イントロンを転写することができる場合、介翻訳されないが転写される介在配列はプロモーター配列とコード配列との間に存在することができるので、プロモータ配列を、依然としてコード配列に「作動可能に連結された」と見なすことができる。

【００６８】

核酸分子を説明するために本明細書中で使用される、「組換え」は、その起源または操作が事実上関連するポリヌクレオチドの全部または一部に関連しないゲノム、ｃＤＮＡ、ウイルス、半合成、または合成起源のポリヌクレオチドを意味する。タンパク質またはポリペプチドに関して使用される、用語「組換え」は、組換えポリヌクレオチドの発現によって産生されたポリペプチドを意味する。一般に、以下でさらに説明するように、目的の遺伝子をクローン化し、次いで、形質転換生物中で発現させる。宿主生物は、発現条件下でタンパク質を産生するための外来遺伝子を発現する。

【００６９】

「制御要素」は、連結されたコード配列の発現を補助するポリヌクレオチド配列をいう。この用語には、宿主細胞でのコード配列の転写および翻訳のために集合的に提供される、プロモーター、転写終結配列、上流調節ドメイン、ポリアデニル化シグナル、非翻訳領域（５’－ＵＴＲおよび３’－ＵＴＲ、ならびに、適切な場合、リーダー配列およびエンハンサーが含まれる）が含まれる。

【００７０】

本明細書中で使用される、「プロモーター」は、宿主細胞中でＲＮＡポリメラーゼに結合して作動可能に連結された下流（３’方向）コード配列の転写を開始することができるＤＮＡ調節領域である。本発明の目的のために、プロモーター配列には、バックグラウンドを超える検出レベルで目的の遺伝子の転写を開始するための最小数の塩基が含まれる。プロモーター内で、配列は、転写開始部位およびＲＮＡポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）である。真核生物プロモーターは、しばしば（常にではない）、「ＴＡＴＡ」ボックスおよび「ＣＡＴ」ボックスを含む。

【００７１】

ＲＮＡポリメラーゼがプロモーター配列に結合してコード配列をｍＲＮＡに転写する場合、調節配列は、細胞中のコード配列の「転写を指示し」、その後コード配列によってコードされたポリペプチドに翻訳される。

【００７２】

「発現カセット」または「発現構築物」は、目的の配列または遺伝子の発現を指示することができるアセンブリをいう。発現カセットには、目的の配列または遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターなどの上記の制御要素が含まれ、しばしばポリアデニル化配列も同様に含まれる。本発明の特定の実施形態では、本明細書中に記載の発現カセットを、

プラスミド構築物内に含めることができる。発現カセットの成分に加えて、プラスミド構築物は、１つまたは複数の選択マーカー、プラスミド構築物を一本鎖ＤＮＡとして存在させるシグナル（例えば、Ｍ１３複製起点）、少なくとも１つのクローニング部位、および「哺乳動物」の複製起点（例えば、ＳＶ４０またはアデノウイルスの複製起点）も含むことができる。

【００７３】

本明細書中で使用される、「形質転換」は、挿入のために使用した方法と無関係の宿主細胞への外因性ポリヌクレオチドの挿入（例えば、直接取り込み、トランスフェクション、および感染などによる形質転換）をいう。特定のトランスフェクション法については、以下をさらに参照のこと。外因性ポリヌクレオチドを、非組み込みベクター（例えば、エピソーム）として維持することができるか、宿主ゲノムに組み込むことができる。

【００７４】

「核酸免疫化」は、免疫原のインビボ発現のためのＥ１Ｅ２などの１つまたは複数の選択された免疫原をコードする核酸分子の宿主細胞への移入を意味する。核酸分子を、注射、吸入、経口投与、鼻腔内投与、および筋肉投与などによってレシピエントに直接移入することができるか、宿主から取出した細胞にエキソビボで移入することができる。後者の場合、形質転換細胞を核酸分子によってコードされた免疫原に対して免疫応答が増加する被験体に再移入する。

【００７５】

本明細書中で提供される、用語、免疫原性組成物の「有効量」または「薬学的有効量」は、非毒性であるが、免疫学的応答などの所望の応答ならびに、任意選択的に、対応する治療効果を得るために十分な組成物の量をいう。正確な必要量は、被験体の種、年齢、および一般的な健康状態、治療を受ける病態の重症度、目的の特定の高分子、ならびに投与様式などに依存して、被験体によって変化する。任意の各症例における適切な「有効」量を、当業者によって日常実験を使用して決定することができる。

【００７６】

「脊椎動物」は、脊索動物亜門の任意のメンバーを意味し、ヒトおよび他の霊長類（チンパンジーおよび他の類人猿およびサルが含まれる）；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、およびウマなどの家畜；イヌおよびネコなどのペット（ｄｏｍｅｓｔｉｃ　ｍａｍｍｍａｌｓ）；実験動物（マウス、ラット、およびモルモットなどのげっ歯類が含まれる）；トリ（ニワトリ、シチメンチョウなどの家禽、野生、および狩猟鳥、およびダチョウ、アヒル、およびガチョウなどの他の家禽類が含まれる）が含まれるが、これらに限定されない。この用語は、特定の年齢を意味しない。したがって、成体および新生個体を対象とすることが意図される。本明細書中に記載の発明は、これら全ての脊椎動物の免疫系が簡単に操作されるので、任意の上記脊椎動物種での使用が意図される。

【００７７】

本明細書中で使用される、用語「処置」は、（１）感染または再感染の防止（予防）、または（２）目的の疾患の症状の緩和または排除（治療）をいう。

【００７８】

（２．発明の実施様式）

本発明を詳細に説明する前に、本発明が特定の処方物またはプロセスパラメータに制限されず、勿論変更可能であると理解すべきである。本明細書中で使用した専門用語は本発明の特定の実施形態を説明することのみを目的とし、本発明を制限することを意図しないとも理解すべきである。

【００７９】

本明細書中に記載のものに類似するか等価な多数の方法および材料を、本発明で使用することができ、好ましい材料および方法を本明細書中に記載する。

【００８０】

カチオン性微粒子に吸着したＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２エンベロープタンパク質をコードするプラスミドＤＮＡが非吸着プラスミドＥ１Ｅ１ＤＮＡの使用と比較して有意に増強された抗

体応答を誘導するという発見が本発明の中核をなす。さらに、吸着ＤＮＡは、非吸着ＤＮＡを使用して検出可能な抗体を産生するのに必要な用量よりも非常に低い用量で検出可能な応答を誘導する。さらに、吸着ＤＮＡによって誘導された抗体応答は、Ｅ１Ｅ２タンパク質の投与によって達成される応答に匹敵する一方で、非吸着Ｅ１Ｅ２　ＤＮＡの送達は検出可能な応答をわずかに誘導する。カチオン性微粒子に吸着したＥ１Ｅ２は、プラスミドＤＮＡのみよりも組換えタンパク質での追加免疫化後の強力な応答のためのプライミング有効である。さらに、以下の実施例は、吸着Ｅ１Ｅ２　ＤＮＡが細胞性免疫応答を起こす能力を証明する。

【００８１】

したがって、以下により詳細に記載するように、最初に、被験体を、カチオン性微粒子に吸着したＥ１Ｅ２$_{809}$をコードするＤＮＡを投与する。その後、被験体を、Ｅ１Ｅ２複合体を含むＤＮＡ組成物および／またはＥ１Ｅ２タンパク質複合体を含むタンパク質組成物で追加免疫することができる。追加免疫のために使用したＥ１Ｅ２複合体は、いずれかのＥ１Ｅ２$_{809}$であり得るか、免疫応答が得られる限り、以下にさらに記載する他のＥ１Ｅ２タンパク質であり得る。さらに、上記組成物を、単独で使用するか、他の組成物（他のＨＣＶタンパク質を含む組成物、他のＨＣＶタンパク質をコードするＤＮＡを含む組成物、および付属物を含む組成物が含まれる）と組み合わせて使用することができる。他の組成物と組み合わせて使用する場合、このような組成物を、Ｅ１Ｅ２組成物の前、同時、または後に投与することができる。

【００８２】

本発明をさらに理解するために、本方法で使用するためのＥ１Ｅ２　ＤＮＡおよびタンパク質組成物、カチオン性微粒子、およびさらなる組成物に関して以下により詳細に考察する。

【００８３】

（Ｅ１Ｅ２ポリペプチドおよびポリヌクレオチド）

Ｅ１Ｅ２複合体は、非共有性または共有性相互作用のいずれかによって会合したＥ１およびＥ２ポリペプチドを含む。上記で説明するように、ＨＣＶ　Ｅ１ポリペプチドは糖タンパク質であり、およそアミノ酸１９２位からアミノ酸３８３位まで（ＨＣＶ－１のポリタンパク質に対する番号づけ）の長さである。Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９１）８８：２４５１－２４５５を参照のこと。約１７３位から約１９１位のアミノ酸は、Ｅ１のシグナル配列を示す。ＨＣＶ　Ｅ２ポリペプチドも糖タンパク質であり、およそアミノ酸３８３位または３８４位からアミノ酸７４６位までの長さである。Ｅ２のシグナルペプチドは、ポリタンパク質のおよそアミノ酸３６４位から始まる。したがって、本明細書中で使用される、用語「全長」Ｅ１または「非短縮」Ｅ１は、少なくともＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸１９２位～３８３位（ＨＣＶ－１に対する番号づけ）を含むポリペプチドをいう。Ｅ２に関して、本明細書中で使用される、用語「全長」または「非短縮」は、ＨＣＶポリタンパク質の少なくともアミノ酸３８３位または３８４位からアミノ酸７４６位（ＨＣＶ－１に対する番号づけ）を含むポリペプチドをいう。この開示から明らかなように、本発明で使用するためのＥ２ポリペプチドは、ｐ７領域由来のさらなるアミノ酸（アミノ酸７４７位～８０９位など）を含み得る。

【００８４】

Ｅ２は、複数の種として存在し（Ｓｐａｅｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ．（１９９２）１８８：８１９－８３０；Ｓｅｌｂｙｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９６）７０：５１７７－５１８２；Ｇｒａｌｃｏｕｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｏｌ．（１９９３）６７：１３８５－１３９５；Ｔｏｍｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９３）６７：４０１７－４０２６）、Ｅ１およびＥ２ポリペプチドのＮ末端およびＣ末端でクリッピングおよびタンパク質分解が起こり得る。したがって、本明細書中に記載の使用のためのＥ２ポリペプチドは、ＨＣＶポリタンパク質の少なくともアミノ酸４０５位～６６１位（例えば、４００位、４０１位、４０２位、．．．、６６１位（３８３位または３８４位～６６１位、３８３位または３８４位～７１５位、３８３位または３８４位～７４

６位、３８３位または３８４位～７４９位、３８３位または３８４位～８０９位、または３８３位または３８４位～６６１位と８０９位との間の任意のＣ末端など））（ＨＣＶ－１ポリタンパク質に対する番号づけ）を含み得る。同様に、本明細書中での使用に好ましいＥ１ポリペプチドは、ＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸１９２位～３２６位、１９２位～３３０位、１９２位～３３３位、１９２位～３６０位、１９２位～３６３位、１９２位～３８３位、または１９２位～３２６と３８３との間の任意のＣ末端を含み得る。

【００８５】

Ｅ１Ｅ２複合体を、エピトープを含むＥ１およびＥ２の免疫原性フラグメントから作製することもできる。例えば、Ｅ１ポリペプチドのフラグメントは、約５個から分子のほぼ全長まで（６、１０、２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、１８５、またはそれ以上など）のＥ１ポリペプチドのアミノ酸または示した数字の間の任意の整数のアミノ酸を含み得る。同様に、Ｅ２ポリペプチドのフラグメントは、６、１０、２５、５０、７５、１００、１５０、２００、２５０、３００、または３５０　個のＥ２ポリペプチドのアミノ酸、または示した数字の間の任意の整数のアミノ酸を含み得る。Ｅ１およびＥ２ポリペプチドは、同一または子となるＨＣＶ株に由来し得る。

【００８６】

例えば、エピトープは、例えば、アミノ酸３８４位～４１０位または３９０位～４１０位にわたる領域などのＥ２の超可変領域由来のエピトープを、Ｅ２ポリペプチドに含めることができる。Ｅ２配列に組み込むのに特に有効なＥ２エピトープには、この領域由来のコンセンサス配列（ＨＣＶ１型ゲノムのアミノ酸３９０位～４１０位のコンセンサス配列を示す、コンセンサス配列Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｒｇ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－　Ｇｌｎ－Ａｓｎなど）である。Ｅ１およびＥ２のさらなるエピトープは公知であり、例えば、Ｃｈｉｅｎ　ｅｔ　ａｌ．の国際公開番号ＷＯ　９３／００３６５に記載されている。

【００８７】

さらに、複合体のＥ１およびＥ２ポリペプチドは、膜貫通ドメインの全部または一部を欠き得る。膜アンカー配列は、ポリペプチドを小胞体に会合するように機能する。通常、このようなポリペプチドは、タンパク質を発現する生物が培養された成長培地に分泌することができる。しかし、国際公開番号ＷＯ９８／５０５５６に記載するように、このようなポリペプチドはまた、細胞内で回収され得る。成長培地への分泌は、多数の検出技術（例えば、ポリアクリルアミドゲルなどおよび、例えば、１９９６年２月１５日公開の国際公開番号ＷＯ９６／０４３０１に記載の免疫沈降アッセイなどの免疫学的技術が含まれる）を使用して容易に決定される。Ｅ１を使用して、一般に約アミノ酸３７０位およびそれ以上で終結するポリペプチド（ＨＣＶ－１　Ｅ１の番号づけに基づく）は、ＥＲによって保持されるので、培養培地に分泌されない。Ｅ２を使用して、約アミノ酸７３１位およびそれ以上で終結するポリペプチド（これもＨＣＶ－１　Ｅ２の番号づけに基づく）は、ＥＲによって保持されるので、分泌されない。（例えば、１９９６年２月１５日公開の国際公開番号ＷＯ９６／０４３０１を参照のこと）。これらのアミノ酸位は絶対的なものではなく、いくらか変化させることができることに留意すべきである。したがって、本発明は、本発明によって獲得されることが意図される、膜貫通結合ドメインならびに膜貫通結合ドメインの全部または一部を欠くポリペプチド（約アミノ酸３６９位およびそれ以下で終結するＥ１ポリペプチドおよび約アミノ酸７３０位およびそれ以下で終結するＥ２ポリペプチドが含まれる）を意図する。さらに、Ｃ末端短縮は、Ｎ末端にドメインが及ぶ膜貫通を超えて伸長することができる。したがって、例えば、３６０位未満の位置で生じるＥ１短縮および例えば、７１５位未満の位置で生じるＥ２短縮も本発明に含まれる。必要なのは短縮Ｅ１およびＥ２ポリペプチドがその意図する目的のための機能を保持することである。しかし、約アミノ酸３００位を超えて伸長しない短縮Ｅ１構築物が特に好ましい。３６０位で終結するものが最も好ましい。約アミノ酸７１５位を超えて伸長しないＣ末端短縮を有する短縮Ｅ２構築物が好ましい。特に好ましいＥ２短縮物は、７２５位などの任意

のアミノ酸７１５位～７３０位の後が短縮された分子である。短縮分子が使用される場合、両方が短縮されたＥ１およびＥ２分子を使用することが好ましい。

【００８８】

Ｅ１およびＥ２ポリペプチドおよびその複合体は、アシアロ糖タンパク質として存在することもできる。このようなアシアロ糖タンパク質を、末端グリコシル化が遮断された細胞の使用などによる当該分野で公知の方法によって産生する。これらのタンパク質をこのような細胞中で発現させてＧＮＺレクチンアフィニティクロマトグラフィによって単離する場合、Ｅ１およびＥ２タンパク質は自発的に凝集する。これらのＥ１Ｅ２凝集体の詳細な産生方法は、例えば、米国特許第６，０７４，８５２号に記載されている。

【００８９】

さらに、Ｅ１Ｅ２複合体は、上記のように、クリッピングおよびタンパク質分解性切断に起因する分子の異種混合物を含み得る。したがって、Ｅ１Ｅ２複合体を含む組成物には、複数のＥ１Ｅ２種（アミノ酸７４６位で終結するＥ１Ｅ２（$E1E2_{746}$）、アミノ酸８０９位で終結するＥ１Ｅ２（$E1E2_{809}$）など）または任意の他の種々の上記Ｅ１およびＥ２分子（Ｎ末端の１～２０個のアミノ酸が短縮したＥ２分子（アミノ酸３８７位、アミノ酸４０２位、アミノ酸４０３位などから始まるＥ２種など）など）が含まれ得る。

【００９０】

便宜上、Ｅ１およびＥ２領域を、一般に、Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８８：２４５１に記載のようにＨＣＶ－１ａのゲノムによってコードされたポリタンパク質に対するアミノ酸番号に関して定義し、開始メチオニンを１位と指定することに留意すべきである。しかし、本発明で使用するためのポリペプチドは、ＨＣＶ－１ａ配列由来のものに制限されない。ＨＣＶの任意の株または単離物を、本発明で使用するための免疫原性配列の獲得の基本として使用することができる。これに関して、別のＨＣＶ単離物中の対応する領域を、配列アラインメントを最大にする様式での２つの単離物由来の配列のアラインメントによって容易に決定することができる。

【００９１】

ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が互いに異なるＨＣＶの種々の株および単離物は当該分野で公知である。例えば、単離物ＨＣＶ Ｊｌ．１は、Ｋｕｂｏ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｊａｐａｎ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：１０３６７－１０３７２；Ｔａｋｅｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｇｅｎｅ ９１：２８７－２９１；Ｔａｋｅｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７１：３０２７－３０３３；およびＴａｋｅｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８：４６２６に記載されている。２つの独立した単離物ＨＣＶ－ＪおよびＢＫの完全なコード配列は、Ｋａｔｏ ｅｔ ａｌ．，（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：９５２４－９５２８およびＴａｋａｍｉｚａｗａ ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６５：１１０５－１１１３にそれぞれ記載されている。ＨＣＶ－１単離物は、Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｂｒｉｔ．Ｍｅｄ．Ｂｕｌｌ．４６：４２３－４４１；Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：２４５１－２４５５およびＨａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：１７１１－１７１５に記載されている。 ＨＣＶ 単離物ＨＣ－Ｊ１およびＨＣ－Ｊ４は、Ｏｋａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊａｐａｎ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．６０：１６７－１７７に記載されている。ＨＣＶ単離物ＨＣＴ １８、ＨＣＴ ２３、Ｔｈ、ＨＣＴ ２７、ＥＣ１、およびＥＣ１０は、Ｗｅｉｎｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｖｉｒｏｌ．１８０：８４２－８４８に記載されている。ＨＣＶ単離物Ｐｔ－１、ＨＣＶ－Ｋ１、およびＨＣＶ－Ｋ２は、Ｅｎｏｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ． １７０：１０２１－１０２５に記載されている。ＨＣＶ単離物Ａ、Ｃ、Ｄ、およびＥは、Ｔｓｕｋｉｙａｍａ－ Ｋｏｈａｒａ ｅｔ ａｌ．（１９

９１）Ｖｉｒｕｓ Ｇｅｎｅｓ ５：２４３－２５４に記載されている。本発明の組成物および方法で使用するためのＨＣＶ Ｅ１Ｅ２ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、ＨＣＶの任意の上記株または感染患者の組織または流動物から単離した新規に発見された単離物から得ることができる。

【００９２】

タンパク質としてのＥ１Ｅ２複合体の送達が望ましい場合（例えば、免疫応答の増加のため）、このようなＥ１Ｅ２複合体を、融合タンパク質として組換えによるか、宿主細胞と目的のＥ１およびＥ２ポリペプチドをコードする構築との接触によって容易に産生する。トランスまたはシスのいずれかで（すなわち、個別のベクターの使用によるか、Ｅ１遺伝子およびＥ２遺伝子の両方を有する１つのベクターの使用による）同時トランスフェクションを行うことができる。１つのベクターを使用して行う場合、両遺伝子を１つの制御要素組によって駆動することができるか、あるいは、遺伝子は、個別の制御要素によって駆動された個別の発現カセット中のベクターに存在し得る。発現後、Ｅ１およびＥ２タンパク質は自発的に会合する。あるいは、精製形態または半精製形態のいずれかで個別に産生された各タンパク質の混合またはタンパク質が分泌される場合にタンパク質を発現する宿主細胞を培養した培養培地の混合によって複合体を形成させることができる。最後に、本発明のＥ１Ｅ２複合体を、Ｅ１の所望の位置がＥ２の所望の部分に融合した融合タンパク質として発現し得る。

【００９３】

培地に分泌された全長短縮Ｅ１およびＥ２タンパク質ならびに細胞内で産生された短縮タンパク質由来のＥ１Ｅ２複合体の産生方法は当該分野で公知である。例えば、米国特許第６，１２１，０２０号；Ｒａｌｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ．（１９９３）６７：６７５３－６７６１，Ｇｒａｋｏｕｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９３）６７：１３８５－１３９５；およびＬａｎｆｏｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ（１９９３）１９７：２２５－２３５に記載のように、このような複合体を組換えによって産生することができる。

【００９４】

したがって、本発明で使用するためのＨＣＶ Ｅ１Ｅ２ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、標準的な分子生物学技術を使用して作製することができる。例えば、上記分子をコードするポリヌクレオチド配列を、遺伝子を発現する細胞からのｃＤＮＡおよびゲノムライブラリーのスクリーニングまたはこれを含むことが知られているベクターからの遺伝子の誘導などの組換え法を使用して得ることができる。さらに、Ｈｏｕｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，３５０，６７１号などに記載の技術を使用して、所望の遺伝子をウイルス核酸分子から直接単離することができる。目的の遺伝子を、クローニングよりもむしろ合成によって産生することもできる。特定の配列の適切なコドンを有する分子をデザインすることができる。次いで、標準的方法によって調製した重複オリゴヌクレオチドから完全な配列をアセンブリし、完全なコード配列にアセンブリする。例えば、Ｅｄｇｅ（１９８１）Ｎａｔｕｒｅ ２９２：７５６；Ｎａｍｂａｉｒ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２３：１２９９；およびＪａｙ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５９：６３１１を参照のこと。

【００９５】

したがって、特定のヌクレオチド配列を、所望の配列を有するベクターから得るか、当該分野で公知の種々のオリゴヌクレオチド合成技術（適切な場合には、部位特異的変異誘発およびポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術など）を使用して完全または部分的に合成することができる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｓｕｐｒａを参照のこと。特に、所望の配列をコードするヌクレオチド配列を得る１つの方法は、従来の自動化ポリヌクレオチド合成機で産生した重複合成オリゴヌクレオチドの相補組のアニーリングおよびその後のＰＣＲを介した適切なＤＮＡリガーゼでのライゲーションおよびライゲーションしたヌクレオチド配列の増幅による。例えば、Ｊａｙａｒａｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：４０８４－４０８８を参照のこと。

さらに、オリゴヌクレオチド特異的合成（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ　５４：７５－８２）、既存のヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド特異的変異誘発（Ｒｉｅｃｈｍａｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２７およびＶｅｒｈｏｅｙｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４－１５３６）、およびＴ４ＤＮＡポリメラーゼを使用した空隙を含む（ｇａｐｐｅｄ）オリゴヌクレオチドの酵素充填（Ｑｕｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：１００２９－１００３３）を使用して、抗原結合能力および免疫原性が変化または増強された分子を得ることができる。

【００９６】

一旦コード配列が調製または単離されると、このような配列を任意の適切なベクターまたはレプリコンにクローン化することができる。多数のクローニングベクターが当業者に公知であり、適切なクローニングベクターを選択することができる。適切なベクターには、適切な制御要素と会合した場合に複製することができるプラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、またはウイルスが含まれるが、これらに限定されない。

【００９７】

次いで、コード配列を、発現に使用した系に依存して、適切な制御要素の存在下におく。したがって、コード配列を、プロモーター、リボゾーム結合部位（細菌発現用）、および、選択的に、オペレーターの調節下におくことができ、その結果、適切な形質転換体によって目的のＤＮＡ配列がＲＮＡに転写される。コード配列は、その後宿主によって翻訳後プロセシングにおいて除去することができるシグナルペプチドまたはリーダー配列を含んでも含まなくても良い。例えば、米国特許第４，４３１，７３９；４，４２５，４３７；４，３３８，３９７を参照のこと。

【００９８】

調節配列に加えて、宿主細胞の成長に関する配列の発現を制御する制御配列を付加することが望ましい。制御配列は当業者に周知であり、例には、化学的または物理的刺激（制御化合物の存在が含まれる）に応答して遺伝子発現がオンまたはオフになる制御配列が含まれる。他の制御エレメント型は、ベクター中にも存在し得る。例えば、本明細書中でエンハンサーエレメントを使用して、構築物の発現レベルを増加させることができる。例には、ＳＶ４０初期遺伝子エンハンサー（Ｄｉｊｋｅｍａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８５）ＥＭＢＯ　Ｊ．４：７６１）、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復（ＬＴＲ）由来のエンハンサー／プロモーター（Ｇｏｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７９：６７７７）、およびヒトＣＭＶ由来のエレメント（Ｂｏｓｈａｒｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｃｅｌｌ　４１：５２１）（ＣＭＶイントロンＡ配列中に含まれるエレメントなど（米国特許第５，６８８，６８８号））が含まれる。発現カセットは、適切な宿主細胞における自律的複製のための複製起点、１つまたは複数の選択マーカー、１つまたは複数の制限部位、高コピー数のポテンシャル、および強力プロモーターをさらに含み得る。

【００９９】

特定のコード配列が適切な制御配列を有するベクターに位置づけられるようにし、調節配列に関するコード配列の位置づけおよび方向をコード配列が調節配列の「調節」下で転写されるように発現ベクターを構築する（すなわち、調節配列でＤＮＡ分子が結合するＲＮＡポリメラーゼはコード配列を転写する）。目的の分子をコードする配列の修飾は、この目的を達成するのに望ましい。例えば、いくつかの場合、適切な方向で（すなわち、読み枠を維持するため）調節配列に付着することができるように配列を修飾することが必要であり得る。調節配列および他の制御配列を、ベクターへの挿入前にコード配列にライゲーションすることができる。あるいは、コード配列を、調節配列および適切な制限部位を既に含む発現ベクターに直接クローン化することができる。

【０１００】

上記で説明するように、目的のポリペプチドの変異型またはアナログを産生することも望ましい。本発明の組成物で使用するためのＨＣＶポリペプチドの変異体またはアナログ

を、目的のポリペプチドをコードする配列の一部の欠失、配列の挿入、および／または配列内の１つまたは複数のヌクレオチドの置換によって調製することができる。部位特異的変異誘発などのヌクレオチド配列の修飾方法は当業者に周知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，ｓｕｐｒａ；Ｋｕｎｋｅｌ，Ｔ．Ａ．（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８５）８２：４４８；Ｇｅｉｓｓｅｌｓｏｄｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８７）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ５：７８６；Ｚｏｌｌｅｒ および Ｓｍｉｔｈ（１９８３）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１００：４６８；Ｄａｌｂｉｅ－ＭｃＦａｒｌおよび ｅｔ ａｌ．（１９８２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ７９：６４０９を参照のこと。

【０１０１】

広範な種々の系（昆虫、哺乳動物、細菌、ウイルス、および酵母の発現系（全て当該分野で周知）が含まれる）で分子を発現することができる。例えば、バキュロウイルス系などの昆虫細胞発現系が当業者に公知であり、例えば、Ｓｕｍｍｅｒｓ および Ｓｍｉｔｈ，Ｔｅｘａｓ Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ Ｓｔａｔｉｏｎ Ｂｕｌｌｅｔｉｎ Ｎｏ．１５５５（１９８７）に記載されている。バキュロウイルス／昆虫細胞発現系の材料および方法は、特に、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ ＣＡ（「ＭａｘＢａｃ」キット）からキット形態で市販されている。同様に、細菌および哺乳動物発現系は当該分野で周知であり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，ｓｕｐｒａに記載されている。酵母発現系が当該分野で公知であり、例えば、Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（Ｂａｒｒ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９８９）Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｌｏｎｄｏｎに記載されている。

【０１０２】

上記系で使用するための多数の適切な宿主細胞も公知である。例えば、哺乳動物細胞株が当該分野で公知であり、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から利用可能な不死化細胞株（チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、サル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト胚腎臓細胞、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、ＨｅｐＧ２）、Ｍａｄｉｎ－Ｄａｒｂｙウシ腎臓（「ＭＤＢＫ」）細胞などであるが、これらに限定されない）が含まれる。同様に、Ｅ．コリ、バチルス・ズブチリス、およびストレプトコッカス属などの細菌宿主は、本発明の発現構築物で適用される。本発明で有用な酵母宿主には、特に、サッカロミセス・セレビシエ、カンジダ・アルビカンス、カンジダ・マルトサ、ハンセイヌラ・ポリホルファ、クルイベロマイセス・フラジリス、クルイベロマイセス／ラクチス、ピキア・グイレリモンジイ（Ｐｉｃｈｉａ ｇｕｉｌｌｅｒｉｍｏｎｄｉｉ）、ピキア・パストリス、シゾサッカロミセス・ポンベ、およびヤロウィア・リポリチカが含まれる。バキュロウイルス発現ベクターと共に使用するための昆虫細胞には、特に、アエデス・アエギプチ、オートグラファ・カリフォルニア、ボンビックス・モリ、ドロソフィラ・メラノガスター、スポドプテラ・フルギペルダ、およびトリコプルシ属が含まれる。

【０１０３】

目的のヌクレオチド配列を含む核酸分子を、宿主細胞ゲノムに安定に組み込むか当該分野で周知の種々の遺伝子送達技術を使用して適切な宿主細胞安定なエピソームエレメントを組み込むことができる。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ．５，３９９，３４６を参照のこと。

【０１０４】

選択した発現系および宿主に依存して、タンパク質が発現する条件下での上記発現ベクターによって形質転換された宿主細胞の成長によって、分子を産生する。ついで、発現タンパク質を、宿主細胞から単離し、精製する。発現系が成長培地にタンパク質を分泌する場合、産物を培地から直接精製することができる。分泌されない場合、細胞溶解物から単離することができる。適切な成長条件および回収方法の選択は、当業者の範囲内である。

【０１０５】

上記の組換え体産生方法を使用して、Ｅ１Ｅ２組成物との投与のための他のポリペプチ

ド（下記の他のＨＣＶポリペプチドなど）を得ることができる。

【０１０６】

（微粒子）

上記で説明するように、Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡを、送達前にカチオン性微粒子に吸着させる。さらに、微粒子を使用して、他のＨＣＶタンパク質免疫原およびこれをコードするＤＮＡを送達することができる。例えば、カチオン性、アニオン性、または非電荷性のいずれかである微粒子を、例えば、Ｅ１Ｅ２　ＤＮＡ、Ｅ１Ｅ２タンパク質のその後の送達またはさらなる免疫原の送達のための免疫応答の増加のために組成物中で使用することもできる。タンパク質免疫原を送達させるために使用する場合、免疫原を微粒子内に取り込むか吸着させることができる。

【０１０７】

本明細書中で使用される、用語「微粒子」は、約１００ｎｍ～約１５０μｍの直径、より好ましくは約２００ｎｍ～約３０μｍの直径、最も好ましくは約５００ｎｍ～約１０μｍの直径の粒子をいう。好ましくは、微粒子は、ニードルおよびキャピラリーを塞ぐことなく非経口投与が可能な直径である。微粒子のサイズは、当該分野で周知の技術（光子相関分光法、レーザ回折顕微鏡および／または走査電子顕微鏡など）によって容易に決定される。

【０１０８】

本明細書中で使用するための微粒子を、滅菌された非毒性の性分解性材料から形成する。このような材料には、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリビニルアルコール、およびエチレンビニルアセテートが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明で使用するための微粒子は、ポリ（α－ヒドロキシ酸）（特に、ポリ（ラクチド））（例えば、米国特許第３，７７３，９１９号を参照のこと）にまたはＤ，Ｌ－ラクチドとグリコリドまたはグリコール酸とのコポリマー（ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）（「ＰＬＧ」または「ＰＬＧＡ」）など）（例えば、米国特許第４，７６７，６２８号を参照のこと）に由来する。微粒子は、種々の分子量、ＰＬＧなどのコポリマーの場合、種々のラクチド：グリコリド比を有し、ポリペプチドの所望の用量および治療される障害に依存して広範に選択することができる任意の種々の重合開始物質に由来し得る。これらのパラメータを、以下でより完全に考察する。本発明の有用な微粒子を製造するための生分解性ポリマーは、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｉｎｇｅｌｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ　および　Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ　Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，ＡＬから容易に購入することができる。

【０１０９】

本明細書中で使用するための特に好ましいポリマーは、ＰＬＡおよびＰＬＧである。これらのポリマーは、種々の分子量で利用可能であり、目的のポリヌクレオチドまたはポリペプチドについての所望の放出速度を得るために適切な分子量を、当業者は容易に決定する。したがって、例えば、ＰＬＡについては、適切な分子量は、約２０００～２５０，０００である。ＰＬＧについては、適切な分子量は、一般に、約１０，０００から約２００，０００まで、好ましくは約１５０，０００～約１５０，０００、最も好ましくは約５０，０００～約１００，０００の範囲である。

【０１１０】

ＰＬＧなどのコポリマーを使用して微粒子を形成する場合、本明細書中で種々のラクチド：グリコリド比が適用され、その比を、所望の分解速度に一部依存して、広範に選択することができる。例えば、５０％のＤ，Ｌ－ラクチドおよび５０％グリコリドを含む５０：５０ＰＬＧポリマーは迅速な再吸収コポリマーを提供し、７５：２５ＰＬＧはよりゆっくり分解し、８５：１５および９０：１０は、ラクチド成分の増加によりなおさらにゆっくり分解する。適切なラクチド：グリコリド比を、治療される障害の性質に基づいて当業者は容易に決定することが容易に明らかである。さらに、種々のラクチド：グリコリド比の微粒子混合物は、所望の放出速度を達成するための処方物で適用される。種々のラクチ

ド：グリコリド比および分子量のＰＬＧコポリマーは、複数の業者（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｉｎｇｅｌｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ および Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，ＡＬ）から容易に購入することができる。これらのポリマーを、Ｔａｂａｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．（１９８８）２２：８３７－８５８などに記載の当該分野で周知の技術を使用した乳酸成分の簡単な重縮合によって合成することもできる。

【０１１１】

典型的には、Ｅ１Ｅ２ ＤＮＡ（または他のＨＣＶなどをコードする他のＤＮＡ）を送達させるために使用する場合、ＤＮＡが表面に吸着するように微粒子を調製する。タンパク質送達のために、抗原を捕捉するか吸着させることができる。このような微粒子のいくつかの調製方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第３，５２３，９０７号およびＯｇａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｚ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．（１９８８）３６：１０９５１１０３などに記載の二重乳濁液（ｄｏｕｂｌｅ ｅｍｕｌｓｉｏｎ）／溶媒蒸発技術を本明細書中で使用して微粒子を作製することができる。これらの技術は、ポリマー液の液適からなる一次乳濁液（ｐｒｉｍａｒｙ ｅｍｕｌｓｉｏｎ）の形成およびその後の粒子安定剤／界面活性剤を含む連続水相との混合を含む。

【０１１２】

より詳細には、Ｏ’Ｈａｇａｎ ｅｔ ａｌ．Ｖａｃｃｉｎｅ（１９９３）１１：９６５－９６９およびＪｅｆｆｅｒｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ．（１９９３）１０：３６２に記載のように、水中油滴型（ｗ／ｏ／ｗ）溶媒蒸発系を使用して、微粒子を形成することができる。この技術では、特定のポリマーを、有機溶媒（酢酸エチル、ジメチルクロリド（塩化メチレンおよびジクロロメタンとも呼ばれる）、アセトニトリル、アセトン、クロロホルムなど）と合わせる。ポリマーを、約２～１５％、より好ましくは約４～１０％、より好ましくは６％の有機溶媒溶液で提供する。ポリマー溶液を、例えば、ホモジナイザーを使用して乳化する。次いで、乳濁液を、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）またはポリビニルピロリドンなどの大量の乳化安定剤の水溶液と合わせる。乳化安定剤は、典型的には、約２～１５％、より典型的には約４～１０％の溶液で提供する。次いで、混合物をホモジナイズして安定なｗ／ｏ／ｗ型二重乳濁液が得られる。次いで、有機溶媒を蒸発させる。

【０１１３】

小さな（５μｍ未満）および大きな（３０μｍ超）微粒子を調製するように配合パラメータを操作することができる。例えば、Ｊｅｆｆｅｒｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．（１９９３）１０：３６２－３６８；ＭｃＧｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｉｃｒｏｅｎｃａｐ．（１９９６）を参照のこと。例えば、弱く震盪すると、内相体積が増加するので、巨大な微粒子が得られる。水相の体積を小さくしてＰＶＡ濃度を高くすることによって小さな粒子が得られる。例えば、Ｔｈｏｍａｓｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ（１９９６）４１：１３１；米国特許第２，８００，４５７号；Ｍａｓｔｅｒｓ，Ｋ．（１９７６）ＳｐｒａｙＤｒｙｉｎｇ ２ｎｄ Ｅｄ．Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋに記載の噴霧乾燥およびコアセルベーション、Ｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．，（１９８０）Ｔｈｅ「Ｗｕｒｓｔｅｒ Ｐｒｏｃｅｓｓ」ｉｎ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ，Ｔｈｅｏｒｙ，および Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ａ．Ｆ．Ｋｙｄｏｎｉｅｕｓ，ｅｄ．），Ｖｏｌ．２，ｐｐ．１３３－１５４ ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ および Ｄｅａｓｙ，Ｐ．Ｂ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．（１９８８）Ｓ（２）：９９－１３９に記載のパンコーティングおよびＷｕｒｓｔｅｒコーティングなどのエアサスペンションコーティング技術、ならびに、例えば、Ｌｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８０）２１０：９０８－９１０に記載のイオン性ゲル化を使用して、微粒子を形成することもできる。

【０１１４】

例えば、ヘリウム－ネオンレーザを組み込んだ分光計を使用したレーザ光散乱によって

粒子サイズを決定することができる。一般に、粒子サイズを室温で決定し、粒子直径の平均値を得るための目的のサンプルの複数回（例えば、５～１０回）の分析を含む。粒子サイズは、走査電子顕微鏡法（ＳＥＭ）を使用しても容易に決定される。

【０１１５】

微粒子の使用前に、適切な免疫学的応答を誘発するために適切な微粒子の量を被験体に送達させることができるように、ＤＮＡまたはタンパク質の含有量（例えば、微粒子に吸着されたかその中に捕捉されたＤＮＡまたはタンパク質の量）を決定することができる。微粒子のＤＮＡおよびタンパク質含有量を、微粒子の破壊および捕捉または吸着した分子の抽出などによる当該分野で公知の方法にしたがって決定することができる。例えば、Ｃｏｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．（１９９１）８：７１３；Ｅｌｄｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．（１９９１）５９：２９７８；およびＥｌｉｄｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ（１９９０）１１：２０５に記載のように、微粒子をジメチルクロリドおよび蒸留水に抽出された薬剤に溶解することができる。あるいは、微粒子を、５％（ｗ／ｖ）ＳＤＳを含む０．１Ｍ ＮａＯＨに分散させることができる。サンプルを震盪し、遠心分離し、適切なアッセイを使用して特定の薬剤について上清をアッセイした。例えば、Ｏ’Ｈａｇａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．（１９９４）１０３：３７－４５を参照のこと。

【０１１６】

粒子は、好ましくは、約０．０５％～約４０％（ｗ／ｖ）（１％～３０％（例えば、０．５％．．．１％．．．１．５％．．．２％などから２５％まで（ｗ／ｖ））など）、さらにより好ましくは約０．５％～４％から約１８％～２０％（ｗ／ｗ）のＤＮＡまたはポリペプチドを含む。下記でより詳細に考察するように、微粒子中のＤＮＡまたはポリペプチドの負荷は、所望の用量および治療される病態に依存する。

【０１１７】

調製後、微粒子を、さらに使用するために、そのまま、または凍結乾燥物として保存することができる。ＤＮＡおよび／またはタンパク質を微粒子に吸着させるために、微粒子調製物を、目的の分子と簡単に混合し、得られた処方物を使用前に再度凍結乾燥させることができる。一般に、本発明の目的のために、約１μｇ～１００ｍｇのＤＮＡ（１０μｇ～５ｍｇなど）または１００μｇ～５００μｇ（１．．．５．．．１０．．．２０．．．３０．．．４０．．．５０．．．１００μｇなどから５００μｇまでのＤＮＡなど）およびこれらの範囲内の任意の整数のＤＮＡを、本明細書中に記載の粒子と吸着させる。

【０１１８】

調製した微粒子上での高分子の１つの好ましい吸着方法は、国際公開番号ＷＯ００／５０００６に記載されている。簡単に述べれば、微粒子を、再水和し、透析可能な陰イオン性または陽イオン性界面活性剤を使用した微粒子の本質的に単量体の懸濁液に分散させる。有用な界面活性剤には、任意の種々のＮ－メチルグルアカミド（ＭＥＧＡとしても公知）（ヘプタノイル－Ｎ－メチルグルアカミド（ＭＥＧＡ－７）、オクタノイル－Ｎ－メチルグルアカミド（ＭＥＧＡ－８）、ノナノイル－Ｎ－メチルグルアカミド（ＭＥＧＡ－９）、およびデカノイル－Ｎ－メチルグルアカミド（ＭＥＧＡ－１０）など）；コール酸；デオキシコール酸；デオキシコール酸ナトリウム；タウロコール酸；タウロコール酸ナトリウム；タウロデオキシコール酸；タウロデオキシコール酸ナトリウム；３－［（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）；３－［（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－２－ヒドロキシ－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳＯ）；ブドデシル（Ｂｄｏｄｅｃｙｌ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アンモニオ－１－プロパン－スルホネート（ＺＷＩＴＴＥＲＧＥＮＴ３－１２）；Ｎ，Ｎ－ビス－（３－Ｄ－グルコンアミドプロピル）－デオキシコールアミド（ＤＥＣＸＹ－ＢＩＧＣＨＡＰ）；ボクチルグルコシド；モノラウリン酸スクロース；グリココール酸／グリココール酸ナトリウム；ラウロサルコシン（ナトリウム塩）；グリコデオキシコール酸／グリコデオキシコール酸ナトリウム；硫酸ドデシルナトリウム（ＳＤＳ）；３－（トリメチルシリル）－１－プロパンスルホン酸（ＤＳＳ）；セトリミド（ＣＴＡＢ、その主

成分はヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドである）；ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド；ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド；ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド；テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド；ベンジルジメチルドデシルアンモニウムブロミド；ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；およびベンジルジメチルテトラデシルアンモニウムブロミドが含まれるが、これらに限定されない。上記界面活性剤は、例えば、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯから市販されている。当該分野で公知の種々のカチオン性脂質を、界面活性剤として使用することもできる。Ｂａｌａｓｕｂｒａｍａｎｉａｍ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，３：１６３－７２およびＧａｏ，Ｘ．，およびＬ．Ｈｕａｎｇ．１９９５，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，２：７１１０－７２２を参照のこと。

【０１１９】

次いで、微粒子／界面活性剤混合物を、例えば、セラミック性の乳鉢および乳房でなめらかなスラリーが形成されるまで物理的に粉砕する。次いで、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）またはＴｒｉｓ緩衝化生理食塩水などの適切な水溶液を添加し、得られた混合物を、微粒子が完全に懸濁するまで超音波処理するかホモジナイズする。Ｅ１Ｅ２　ＤＮＡまたはポリペプチドなどの目的の高分子を微粒子懸濁液に添加し、系を透析して界面活性剤を除去する。目的の高分子が微粒子表面に吸着する一方で、高分子の活性は依然として保持されるように、ポリマー微粒子および界面活性剤系を選択することが好ましい。以下にさらに記載するように、表面吸着高分子を含む得られた微粒子を洗浄して非結合高分子を除去し、適切な緩衝液との懸濁液として保存するか、適切な賦形剤と共に凍結乾燥させることができる。

【０１２０】

陰イオン性または陽イオン性界面活性剤などの荷電界面活性剤の存在下で製造した微粒子により、正味の負電荷または正味の正電荷を有する荷電表面を有する微粒子が得られる。これらの微粒子は、より多様な分子に吸着することができる。例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）または３－（トリメチルシリル）－１－プロパンスルホン酸（ＤＳＳ）などの陰イオン性界面活性剤を使用して製造した微粒子（すなわち、ＰＬＧ／ＳＤＳまたはＰＬＧ／ＤＳＳ微粒子）は、タンパク質などの正電荷の免疫原を吸着し、本明細書中で、「陰イオン性」とよぶ。同様に、ＣＴＢＡなどの陽イオン性界面活性剤を使用して製造した微粒子（すなわち、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ微粒子）は、ＤＮＡなどの負電荷の高分子に吸着し、本明細書中で「陽イオン性」と呼ぶ。

【０１２１】

（他のＨＣＶポリペプチドおよびポリヌクレオチド）

上記で説明するように、本発明は、ＨＣＶ抗原またはこのような抗原をコードするＤＮＡを含む他の組成物を使用することができる。このような組成物を、Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡ構築物の前、後、または同時、および使用する場合、免疫応答の増加のための組成物の前、後、または同時に送達させることができる。

【０１２２】

Ｃ型肝炎ウイルスのゲノムは、典型的には、ポリタンパク質に転写される約９６，００ヌクレオチドの単一の読み取り枠を含む。ポリタンパク質の全長配列は、Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．３８８，２３２および米国特許第６，１５０，０８７号に開示されている。表１および図１に示すように、ＨＣＶタンパク質は、切断時にＮＨ２－コア－Ｅｌ－Ｅ２－ｐ７－ＮＳ２－ＮＳ３－ＮＳ４ａ－ＮＳ４ｂ－ＮＳ５ａ－ＮＳ５ｂ－ＣＯＯＨの順序の少なくとも１０個の異なる産物が産生される。コアポリペプチドは、ＨＣＶ－１に対する番号をつけた１位～１９１位に生じる（ＨＣＶ－１ゲノムについては、Ｃｈｏｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：２４５１－２４５５を参照のこと）。このポリペプチドをさらにプロセシングして、約アミノ酸１位～１７３位のＨＣＶポリペプチドが産生される。エンベロープポリペプチドＥ１およびＥ２は、それぞれ１９２位～３８３位および３８４位～７４６位に

生じる。Ｐ７ドメインは、約７４７位～８０９位に見出される。ＮＳ２は、タンパク質分解活性を有する膜内在性タンパク質であり、ポリペプチドの約８１０位～１０２６位で見出される。ＮＳは、単独またはＮＳ３（約１０２７位～１６５７位で見出される）と組み合わせて、ＮＳ２－ＮＳ３シスル結合（ｓｉｓｓｌｅ　ｂｏｎｄ）を切断してＮＳ３のＮ末端が得られ、セリンプロテアーゼよびＲＮＡヘリカーゼ活性を含む巨大ポリタンパク質を放出する。約１０２７位～１２０７位で見出されるＮＳ３プロテアーゼは、残存ポリタンパク質をプロセシングするように作用する。ヘリカーゼ活性は、約１１９３位～１６５７位で見出される。ポリタンパク質成熟の完了は、ＮＳ３セリンプロテアーゼによって触媒されるＮＳ３－ＮＳ４ａ連結点の自触的切断によって開始される。その後のＨＣＶポリタンパク質のＮＳ３媒介切断は、別のポリペプチドのＮＳ３分子によるポリタンパク質切断連結点の認識に関与するようである。これらの反応では、ＮＳ３は、ＮＳ３補因子（約１６５８位～１７１１位で見出されるＮＳ４ａ）、２つのタンパク質（約１７１２位～１９７２位で見出されるＮＳ４ｂおよび約１９７３位～２４２０位で見出されるＮＳ４ｂ）、およびＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（約２４２１位～３０１１位で見出されるＮＳ５ｂ）を遊離する。

【０１２３】

【表１】

表1

ドメイン	およその境界*
C（コア）	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011

*ＨＣＶ－１に対する番号づけ。Ｃｈｏｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：２４５１－２４５５を参照のこと。

【０１２４】

上記ＨＣＶポリタンパク質産物の配列、これをコードするＤＮＡ、および由来する免疫原性ポリペプチドは公知である（例えば、米国特許第５，３５０，６７１号を参照のこと）。例えば、ＨＣＶポリタンパク質由来の多数の一般的および特定の免疫原性ポリペプチドが記載されている。例えば、Ｈｏｕｇｈｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｐｕｂｌ．Ｎｏｓ．３１８，２１６　および　３８８，２３２；Ｃｈｏｏ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８９）２４４：３５９－３６２；Ｋｕｏ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８９）２４４：３６２－３６４；Ｈｏｕｇｈｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ（１９９１）１４：３８１－３８８；Ｃｈｉｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９２）８９：１００１１－１００１５；Ｃｈｉｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔ．Ｈｅｐａｔｏｌ．（１９９３）８：Ｓ３３－３９；Ｃｈｉｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｐｕｂｌ．Ｎｏ．ＷＯ　９３／００３６５；Ｃｈｉｅｎ，Ｄ．Ｙ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｐｕｂｌ．Ｎｏ．ＷＯ　９４／０１７７８を参照のこと。これらの刊行物は、一般に、ＨＣＶならび

にＨＣＶポリペプチド免疫原性領域の製造および使用についての広範なバックグラウンドを提供する。

【０１２５】

任意の所望の免疫原性ＨＣＶポリペプチドまたはこれをコードするＤＮＡを、本発明で使用することができる。例えば、アミノ酸１～１９１；アミノ酸１０～５３；アミノ酸１０～４５；アミノ酸６７～８８；アミノ酸８６～１００；８１～１３０；アミノ酸１２１～１３５；アミノ酸１２０～１３０；アミノ酸１２１～１７０の間で見出される領域由来のポリペプチドなどのコア領域ＨＣＶポリペプチドおよび、例えば、Ｈｏｕｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，３５０，６７１号；Ｃｈｉｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９２）８９：１００１１－１００１５；Ｃｈｉｅｎ ｅｔａｌ．Ｊ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔ．Ｈｅｐａｔｏｌ．（１９９３）８：Ｓ３３－３９；Ｃｈｉｅｎ ｅｔａｌ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｐｕｂｌ．Ｎｏ．ＷＯ ９３／００３６５；Ｃｈｉｅｎ，Ｄ．Ｙ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｐｕｂｌ．Ｎｏ．ＷＯ ９４／０１７７８；および米国特許第６，１５０，０８７号で同定された任意のコアエピトープは、本発明の組成物および方法で適用される。

【０１２６】

さらに、ウイルスの非構造領域由来のポリペプチドも本明細書中で適用される。ＨＣＶポリタンパク質のＮＳ３／４ａ領域が記載されており、タンパク質のアミノ酸配列および全構造は、Ｙａｏ ｅｔ ａｌ．Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｎｏｖｅｍｂｅｒ １９９９）７：１３５３－１３６３に開示されている。Ｄａｓｍａｈａｐａｔｒａ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，８４３，７５２号も参照のこと。上記で説明するように、天然の配列または免疫原性アナログを、本発明の処方物で使用することができる。Ｄａｓｍａｈａｐａｔｒａ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，８４３，７５２号およびＺｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，９９０，２７６号は共に、ＮＳ３／４ａのアナログおおびその作製方法を記載している。

【０１２７】

さらに、本発明の組成物中で使用するためのポリペプチドおよび方法は、ＨＣＶポリタンパク質のＮＳ３領域に由来し得る。多数のこのようなポリペプチドは、公知であり、ｃ３３ｃおよびｃ１００領域由来のポリペプチドおよびｃ２５などのＮＳ３エピトープを含む融合タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。これらのおよび他のＮＳ３ポリペプチドは、本発明の組成物で有用であり、当該分野で公知であり、例えば、Ｈｏｕｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ，米国特許第５，３５０，６７１号；Ｃｈｉｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９２）８９：１００１１－１００１５；Ｃｈｉｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｆ．Ｈｅｐａｔｏｌ．（１９９３）８：Ｓ３３－３９；Ｃｈｉｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｐｕｂｌ．Ｎｏ．ＷＯ ９３／００３６５；Ｃｈｉｅｎ，Ｄ．Ｙ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｐｕｂｌ．Ｎｏ．ＷＯ ９４／０１７７８；および米国特許第６，１５０，０８７号に記載されている。

【０１２８】

さらに、例えば、米国特許第６，５１４，７３１号および６，４２８，７９２号に記載の複数のエピトープ融合抗原（「ＭＥＦＡ」と呼ぶ）を、本発明の組成物で使用することができる。このようなＭＥＦＡには、２つまたはそれ以上の種々のウイルス領域由来の複数のエピトープが含まれる。エピトープは、好ましくは、１つを超えるＨＣＶ株に由来するので、１つのワクチン中の複数のＨＣＶ株を防御する活性が追加される。

【０１２９】

上記で説明するように、便宜上、変異ＨＣＶ領域を、Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８８：２４５１に記載のようにＨＣＶ－１ａのゲノムによってコードされたポリタンパク質に対するアミノ酸番号に関して定義し、開始メチオニンを１位と指定することに留意すべきである。しかし、上記で詳細に説明するように、本発明で使用するためのＨＣＶポリペプチドおよびポリヌクレオチド

は、ＨＣＶ－１ａ配列由来のものに制限されず、ＨＣＶの任意の株または単離物を、本発明で使用するための免疫原性配列の獲得の基本として使用することができる。

【０１３０】

Ｅ１Ｅ２ポリペプチドおよびポリヌクレオチドのための上記の組換え産生方法を使用して、上記ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを得ることができる。

【０１３１】

（免疫原性組成物および投与）

（Ａ．組成物）

一旦産生されると、Ｅ１Ｅ２ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または他の免疫原を、免疫学的組成物（例えば、予防用（すなわち、感染の防止）または治療用（感染後にＨＣＶを治療するため）のワクチン組成物）に提供することができる。組成物は、一般に、１つまたは複数の「薬学的に受容可能な賦形剤または媒体（ｖｅｈｉｃｌｅ）」（水、生理食塩水、グリセロール、エタノールなど）を含む。さらに、湿潤剤、乳化剤、ｐＨ緩衝化物質などの補助剤をこのような媒体中で使用することができる。

【０１３２】

キャリアは、任意選択的に、例えば、Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡに対する免疫応答を増加させるために使用されるタンパク質組成物中に存在する。キャリアは、それ自体が組成物を投与された個体に有害な抗体の産生を誘導しない分子である。適切なキャリアは、典型的には、巨大でゆっくりと代謝される高分子（タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体（油滴またはリポソーム）、および不活性ウイルス粒子など）である。このようなキャリアは、当業者に周知である。さらに、免疫原性ポリペプチドを、ジフテリア、破傷風、コレラなど由来の類毒素に抱合することができる。

【０１３３】

免疫応答を増強するために組成物中にアジュバントも存在することができ、以下などが含まれるが、これらに限定されない：（１）水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなどのアルミニウム塩（ミョウバン）；（２）例えば、以下などの水中油型エマルジョン処方物：（ａ）Ｍｏｄｅｌ　１１０Ｙのミクロフルイダイザー（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ，Ｎｅｗｔｏｎ，ＭＡ）などのフルイダイザーを使用して１ミクロン未満の粒子に処方した５％スクアラン、０．５％Ｔｗｅｅｎ８０、および０．５％スパン８５を含む（任意選択的に種々の量のＭＴＰ－ＰＥを含む）ＭＦ５９（ＰＣＴ　Ｐｕｂｌ．Ｎｏ．ＷＯ　９０／１４８３７；米国特許第６，２９９，８８４号および６，４５１，３２５号）、（ｂ）１ミクロン未満の乳濁液にミクロ流動化するか、巨大な粒子サイズの乳濁液を得るためにボルテックスした１０％スクアラン、０．４％Ｔｗｅｅｎ８０．５％プルロニック遮断ポリマーＬ１２１、およびｔｈｒ－ＭＤＰ（以下を参照のこと）を含むＳＡＦ、（ｃ）ならびに２％スクアラン、０．２％Ｔｗｅｅｎ８０、モノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ）、トレハロースジミコレート（ＴＤＭ）、および細胞壁骨格（ＣＷＳ）（好ましくは、ＭＰＬ＋ＣＷＳ（ＤｅｔｏｘＴＭ））からなる群由来の１つまたは複数の細菌細胞壁成分を含むＲｉｂｉ（登録商標）アジュバント系（ＲＡＳ）（Ｒｉｂｉ　Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍ，Ｈａｍｉｌｔｏｎ，ＭＴ）；（３）使用することができるＱＳ２１またはＳｔｉｍｕｌｏｎ（登録商標）（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ）などのサポニンアジュバント、またはＩＳＣＯＭ（免疫刺激複合体）などのこれらから生成された粒子（ＩＳＣＯＭはさらなる決定基を欠き得る）（例えば、国際公開番号ＷＯ　００／０７６２１）；（４）完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）および不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）；（５）ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１２などのインターロイキン（例えば、国際公開番号ＷＯ　９９／４４６３６）、γインターフェロンなどのインターフェロン、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）などのサイトカイン；（６）コレレラ毒素（ＣＴ）、百日咳毒素（ＰＴ）、またはＥ．コリ熱不安定性毒素（ＬＴ）、特に、ＬＴ－Ｋ６３（野生型アミノ酸６３位をリジンに置換）、ＬＴ－Ｒ７２

（野生型アミノ酸７２位をアルギニンに置換）、ＣＴ－Ｓ１０９（野生型アミノ酸１０９位をセリンに置換）、およびＰＴ－Ｋ９／Ｇ１２９（野生型アミノ酸９位をリジンに置換および１２９位をグリシンに置換）などの細菌ＡＤＰ－リボシル化毒素の解毒変異体（例えば、国際公開番号Ｗ０９３／１３２０２およびＷ０９２／１９２６５を参照のこと）；（７）任意選択的にミョウバンの実質的非存在下でのモノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ）または３－Ｏ－脱アシル化ＭＰＬ（３ｄＭＰＬ）（例えば、ＧＢ ２２２０２２１；ＥＰＡ ０６８９４５４を参照のこと）（例えば、国際公開番号ＷＯ ００／５６３５８を参照のこと）；（８）３ｄＭＰＬの、例えば、ＱＳ２１および／または水中油型エマルジョンとの組み合わせ（例えば、ＥＰＡ ０８３５３１８；ＥＰＡ ０７３５８９８；ＥＰＡ０７６１２３１を参照のこと）；（９）ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル（例えば、国際公開番号ＷＯ ９９／５２５４９を参照のこと）；（１０）サポニンおよびＣｐＧオリゴヌクレオチドなどの免疫原性オリゴヌクレオチド（例えば、国際公開番号ＷＯ ００／６２８００を参照のこと）；（１１）免疫刺激物質およびその金属塩粒子（例えば、国際公開番号ＷＯ ００／２３１０５を参照のこと）；（１２）サポニンおよび水中油型エマルジョン（例えば、国際公開番号ＷＯ９９／１１２４１を参照のこと）；（１３）サポニン（例えば、ＱＳ２１）＋３ｄＭＰＬ＋ＩＬ－１２（任意選択的＋ステロール）（例えば、国際公開番号 ＷＯ ９８／５７６５９を参照のこと）；および（１４）組成物の有効性を増強するための免疫刺激薬として作用する他の物質。

【０１３４】

ムラミルペプチドには、Ｎ－アセチル－ムラミル－Ｌ－トレオニル－Ｄ－イソグルタミン（ｔｈｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチル－ノルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミン（ｉｓｏｇｌｕａｔｍｅ）（ｎｏｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－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（ＭＴＰ－ＰＥ）などが含まれるが、これらに限定されない。

【０１３５】

組成物中で使用するための特に好ましいアジュバントは、１ミクロン未満の水中油型エマルジョンである。本明細書中での使用のための好ましい１ミクロン未満は、４～５ｗ／ｖ％スクアレン、０．２５～１．０ｗ／ｖ％のＴｗｅｅｎ８０（登録商標）（モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン）、および／または０．２５～１．０％のＳｐａｎ８５（登録商標）（トリオレイン酸ソルビタン）、ならびに、任意選択的に、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－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（ＭＴＰ－ＰＥ）を含むスクアラン／水乳濁液（例えば、「ＭＦ５９」として公知の１ミクロン未満の水中油型エマルジョン）である（国際公開番号ＷＯ９０／１４８３７；米国特許第６，２９９，８８４号および６，４５１，３２５号；および Ｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，「ＭＦ５９－－Ｄｅｓｉｇｎ および Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｓａｆｅ および Ｐｏｔｅｎｔ Ａｄｊｕｖａｎｔ ｆｏｒ Ｈｕｍａｎ Ｖａｃｃｉｎｅｓ」in Ｖａｃｃｉｎｅ Ｄｅｓｉｇｎ：Ｔｈｅ Ｓｕｂｕｎｉｔ および Ａｄｊｕｖａｎｔ Ａｐｐｒｏａｃｌ２（Ｐｏｗｅｌｌ，Ｍ．Ｆ．および Ｎｅｗｍａｎ，Ｍ．Ｊ．ｅｄｓ．）Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９５，ｐｐ．２７７－２９６）。ＭＦ５９は、４～５ｗ／ｖ％スクアレン（例えば、４．３％）、０．２５～０．５ｗ／ｖ％ Ｔｗｅｅｎ８０（登録商標）、および０．５ｗ／ｖ％ Ｓｐａｎ ８５（登録商標）を含み、任意選択的に、種々の量のＭＴＰ－ＰＥを含み、Ｍｏｄｅｌ １１０Ｙのミクロフルイダイザー（ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚｅｒ）（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ，Ｎｅｗｔｏｎ，ＭＡ）などのフルイダイザーを使用して１ミクロン未満の粒子に処方した。例えば、ＭＴＰ－ＰＥは、約０～５００ μｌｇ／投与、より好ましくは０～２５０μｇ／投与、最も好ましくは０～１００μｇ／投与の量で存在し得る。本明細書中で使用される、用語「ＭＦ５９－０」は、ＭＴＰ－ＰＥを欠く上記１ミクロン未満の水中油型エマルジョンをいう一方で、用語「ＭＦ５９－ＭＴ」は、ＭＴＰ－ＰＥを含む処方物を示す。例

えば、「ＭＦ５９－１００」は、１００μｇ　ＭＴＰ－ＰＥ／投与などを含む。本明細書中で使用するための別の１ミクロン未満であるＭＦ６９は、４．３ｗ／ｖ％スクアレン、０．２５ｗ／ｖ％　Ｔｗｅｅｎ８０（登録商標）、および０．７５ｗ／ｖ％　Ｓｐａｎ８５（登録商標）、および、任意選択的にＭＴＰ－ＰＥを含む。さらに別の１ミクロン未満の水中油型エマルジョンは、１０％スクアレン、０．４％Ｔｗｅｅｎ８０（登録商標）、５％プルロニック遮断ポリマーＬ１２１、およびｔｈｒ－ＭＤＰを含むＳＡＦとしても公知のＭＦ７５であり、１ミクロン未満の乳濁液にミクロ流動化もする。ＭＦ７５－ＭＴＰは、１００～４００μｇのＭＴＰ－ＰＥ／投与などのＭＴＰを含むＭＦ７５処方物を示す。

【０１３６】

１ミクロン未満の水中油型エマルジョン、その作製方法、および組成物中で使用するためのムラミルペプチドなどの免疫刺激薬は、国際公開番号ＷＯ　９０／１４８３７、米国特許第６，２９９，８８４号、および６，４５１，３２５号に詳細に記載されている。

【０１３７】

被験体に含めるための他の好ましい薬剤は、免疫刺激核酸配列（ＩＳＳ）などの免疫刺激分子（ＣｐＧオリゴヌクレオチドなどの非メチル化ＣｐＧモチーフが含まれるが、これらに限定されない）である。

【０１３８】

非メチル化ＣｐＧモチーフを含むオリゴヌクレオチドは、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、および抗原提示細胞（ＡＰＣ）（単球およびマクロファージなど）の活性化を誘導することが示されている。例えば、米国特許第６，２０７，６４６号を参照のこと。したがって、分子のＣｐＧファミリー、ＣｐＧジヌクレオチド、および米国特許第６，２０７，６４６号に開示の任意の種々の免疫刺激ＣｐＧオリゴヌクレオチドなどのＣｐＧモチーフを含む合成オリゴヌクレオチド由来のアジュバント（例えば、Ｋｒｉｅｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ（１９９５）３７４：５４６およびＤａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　ｌｉｎｎｉｕｎｏｌ．（１９９８）１６０：８７０－８７６を参照のこと）を、本発明の方法および組成物で使用することができる。このようなＣｐＧオリゴヌクレオチドは、一般には、少なくとも８から約１００までの塩基対、好ましくは８～４０塩基対、より好ましくは１５～３５塩基対、好ましくは１５～２５塩基対、およびこれらの値の間の任意の塩基対数を含む。例えば、式５’－Ｘ１ＣＧＸ２－３’（式中、Ｘ１およびＸ２はヌクレオチドであり、Ｃは非メチル化されている）で示されるコンセンサスＣｐＧモチーフを含むオリゴヌクレオチドは、免疫刺激性ＣｐＧ分子として適用される。一般に、Ｘ１はＡであり、Ｘ２はＣまたはＴである。他の有用なＣｐＧ分子には、式５’－Ｘ１Ｘ２ＣＧＸ３Ｘ４（式中、Ｘ１およびＸ２は、ＧｐＴ、ＧｐＧ、ＧｐＡ、ＡｐＡ、ＡｐＴ、ＡｐＧ、ＣｐＴ、ＣｐＡ、ＣｐＧ、ＴｐＡ、ＴｐＴ、またはＴｐＧなどの配列であり、Ｘ３およびＸ４は、ＴｐＴ、ＣｐＴ、ＡｐＴ、ＡｐＧ、ＣｐＧ、ＴｐＣ、ＡｐＣ、ＣｐＣ、ＴｐＡ、ＡｐＡ、ＧｐＴ、ＣｐＡ、またはＴｐＧであり、「ｐ」は、リン酸結合を示す）によって示されるものが含まれる。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、５’末端および／または３’末端またはその付近にＧＣＧ配列を含まない。さらに、ＣｐＧは、好ましくは、２つのプリン（好ましくは、ＧｐＡジヌクレオチド）またはプリンおよびピリミジン（好ましくは、ＧｐＴ）を含むその５’末端に隣接し、２つのピリミジン（好ましくは、ＴｐＴまたはＴｐＣジヌクレオチド）を含むその３’末端に隣接する。したがって、好ましい分子は、配列ＧＡＣＧＴＴ、ＧＡＣＧＴＣ、ＧＴＣＧＴＴ、またはＧＴＣＧＣＴを含み、これらの配列はいくつかのさらなるヌクレオチドに隣接する。この中心コア領域の外側のヌクレオチドは、非常に変化しやすいようである。

【０１３９】

さらに、本明細書中で使用するためのＣｐＧオリゴヌクレオチドは、二本鎖でも一本鎖でもよい。二本鎖分子はインビボでより安定である一方で、一本鎖分子は免疫活性が増強する。さらに、リン酸骨格を、ＣｐＧ分子の免疫刺激活性を増強するために修飾（ホスホロジチオエート修飾など）することができる。米国特許第６，２０７，６４６号に記載す

るように、ホスホロチオエート骨格を有するＣｐＧ分子は優先的にＢ細胞を活性化する一方で、ホスホジエステル骨格を有するものは単球（マクロファージ、樹状細胞、および単球）およびＮＫ細胞を優先的に活性化する。

【０１４０】

当該分野で周知の標準的な技術を使用して、免疫応答を刺激する能力についてＣｐＧ分子を容易に試験することができる。例えば、分子が体液性および／または細胞性免疫応答を刺激する能力を、上記の免疫アッセイを使用して容易に決定する。さらに、免疫応答が増強されるかどうかを決定するために、免疫原性組成物を、ＣｐＧ分子を使用するか使用しないで投与することができる。

【０１４１】

本発明で使用するための組成物は、治療有効量のＥ１Ｅ２複合体をコードするＤＮＡ（または治療有効量のタンパク質）および必要に応じて任意の他の上記成分を含む。「治療有効量」は、投与された個体の免疫学的応答、好ましくは防御免疫学的応答を誘導するタンパク質またはこれをコードするＤＮＡの量を意味する。このような応答により、一般に、被験体中で組成物に対する抗体媒介および／または分泌または細胞性免疫応答が生じる。通常、このような応答には、１つまたは複数の以下の効果が含まれるが、これらに限定されない：免疫グロブリンＡ、Ｄ、Ｅ、またはＭなどの任意の免疫学的クラスからの抗体の産生；Ｂリンパ球およびＴリンパ球の増殖；免疫細胞の活性化、成長、および分化シグナルの供給；ヘルパーＴ細胞、サプレッサーＴ細胞、および／または細胞傷害性Ｔ細胞および／またはγδＴ細胞集団の拡大。

【０１４２】

例えば、Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡの投与後に免疫応答を増加させるために使用されるＥ１Ｅ２タンパク質組成物は、１つを超えるウイルス単離物由来のＥ１Ｅ２複合体などの１つまたは複数のＥ１Ｅ２複合体ならびにさらなるＨＣＶ抗原の混合物を含み得る。さらに、上記で説明するように、Ｅ１Ｅ２複合体は、クリッピングおよびタンパク質分解性切断に起因する分子の異種混合物として存在し得る。したがって、Ｅ１Ｅ２複合体を含む組成物には、複数のＥ１Ｅ２種（アミノ酸７４６で終結したＥ１Ｅ２（Ｅ１Ｅ２７４６）、アミノ酸８０９で終結したＥ１Ｅ２（Ｅ１Ｅ２$_{809}$）など）、または任意の他の上記変異型Ｅ１およびＥ２分子（１～２０個のアミノ酸がＮ末端で短縮したＥ２分子（アミノ酸３８７、アミノ酸４０２、アミノ酸４０３などから始まるＥ２種など）など）が含まれ得る。

【０１４３】

組成物（ＤＮＡおよびタンパク質の両方）を、他の抗原および免疫調節薬（例えば、免疫グロブリン、サイトカイン、リンホカイン、およびケモカイン（ＩＬ－２、修飾ＩＬ－２（ｃｙｓ１２５～ｓｅｒ１２５）、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－１２、γ－インターフェロン、ＩＰ－１０、ＭＩＰ１β、ＦＬＰ－３、リバビリン、およびＲＡＮＴＥＳなどのサイトカインが含まれる））と組み合わせて投与することとができる。

【０１４４】

（Ｂ．投与）

典型的には、免疫原性組成物（ＤＮＡおよびタンパク質の両方）を、注射可能な液体もしくは懸濁液として調製し、注射前に溶液中、懸濁液中、液体媒体中で適切な固体形態も調製することができる。したがって、一旦処方されると、組成物を、従来のように、非経口（例えば、注射、皮下、または筋肉内）に投与する。他の投与様式に適切なさらなる処方物には、蛍光および肺用処方物、座剤、および経皮塗布が含まれる。投薬治療は、単回投与計画または複数回計画であり得る。好ましくは、有効量は、病徴の治療または防止に十分である。正確な量は、治療をうける被験体、治療を受ける個体の年齢および一般的な健康状態、個体の免疫系が抗体を合成する能力、所望の防御の程度、治療を受ける病態の重症度、選択された特定の高分子およびその投与様式などによって変化する。適切な有効量を、当業者は容易に決定することができる。「治療有効量」は、範囲が比較的広く、当該分野で公知のインビトロおよびインビボモデルを使用したに日常的試験によって決定することができる。以下の実施例で使用したＥ１Ｅ２　ＤＮＡおよびポリペプチドにより、

抗Ｅ１、抗Ｅ２、および／または抗Ｅ１Ｅ２抗体の誘発を最適にするために使用することができる一般的ガイダンスが得られる。

【０１４５】

例えば、免疫原を、好ましくは、霊長類（例えば、ヒヒ、チンパンジー、またはヒト）などの大型哺乳動物に筋肉内注射する。Ｅ１Ｅ２ＤＮＡのカチオン性微粒子の吸着量は、一般に、約１μｇ～５００ｍｇのＤＮＡ（５μｇ～１００ｍｇのＤＮＡなど）（例えば、１０μｇ～５０ｍｇまたは１００μｇ～５ｍｇ（２０．．．３０．．．４０．．．５０．．．６０．．．１００．．．２０．．．μｇなどから５００μｇのＤＮＡなど））、および示した範囲の間の任意の整数である。本発明のＥ１Ｅ２発現構築物を、標準的な遺伝し送達プロトコールを使用して投与する。遺伝子送達方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第５，３９９，３４６号、５，５８０，８５９号、５，５８９，４６６号を参照のこと。Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡを、脊椎動物被験体に直接送達させるか、被験体由来の細胞および被験体に再移植された細胞に送達させることができる。

【０１４６】

Ｅ１Ｅ２ポリペプチドをコードするＤＮＡの投与により、哺乳動物における細胞性免疫応答、および／または抗Ｅ１、抗Ｅ２、および／または抗Ｅ１Ｅ１の抗体力価を誘発することができ、これが少なくとも１週間、２週間、１ヶ月、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、６ヶ月、１年、またはそれ以上続く。記憶応答を得るためにＥ１Ｅ２ＤＮＡを投与することもできる。このような応答が達成された場合、抗体力価は時間と共に減少し得るが、ＨＣＶウイルスまたは免疫原への曝露により、例えば、たった数日で抗体が迅速に誘導される。任意選択的に、上記で説明するように、最初の注射から２週間後、１ヶ月後、２ヶ月後、３ヶ月後、４ヶ月後、５ヶ月後、６ヶ月後、１年後、またはそれ以降のＥ１Ｅ２ポリペプチドの１回または複数回の追加免疫注射によって、哺乳動物の抗体力価を維持することができる。

【０１４７】

好ましくは、以下の実施例に記載の免疫アッセイなどの標準的な免疫アッセイを使用して決定したところ、少なくとも１０、１００、１５０、１７５、２００、３００、４００、５００、７５０、１，０００、１，５００、２，０００、３，０００、５，０００、１０，０００、２０，０００、３０，０００、４０，０００、５０，０００（幾何平均力価）、またはそれ以上、または示した力価の間の任意の数字の抗体力価が誘発される。例えば、Ｃｈｉｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ（１９９３）３４２：９３３；およびＣｈｉｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９２）８９：１００１１を参照のこと。

【０１４８】

Ｅ１Ｅ２タンパク質の追加免疫のために、一般に、投与あたり約０．１μｇ～約５．０ｍｇまたは示した範囲の間の任意の量（０．５μｇ～１０ｍｇ、１μｇ～約２ｍｇ、２．５μｇ～約２５０μｇ、４μｇ～約２００μｇなど）（４、５、６、７、８、９、１０、．．．２０．．．３０．．．４０．．．５０．．．６０．．．７０．．．８０．．．９０．．．１００など）の免疫原自体を投与する。免疫原を、ＨＣＶに感染していない哺乳動物に投与するか、ＨＣＶ感染哺乳動物に投与することができる。

【０１４９】

（発明の実施で有用な株の寄託）

以下の株の生物学的に純粋な培養物を、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡに寄託した。示したアクセッション番号は、特許手続き上の微生物寄託の国際的承認に関するブタペスト条約（ブダペスト条約）の条項にしたがって、効率の良い生存試験および料金支払い後に割り当てられた。これは、生きた培養物を受託日から３０年間維持することを保証する。ブダペスト条約の条項にしたがって生物をＡＴＣＣから利用可能であり、ＡＴＣＣは、米国法典第３５巻第１２２条およびこれに準じる長官の規則（ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎｅｒ’ｓ ｒｕｌｅ）（連邦規則集第３７巻第１．１２条

が含まれ、特に、８８６　ＯＧ　６３８を参照のこと）に従って米国特許商標局長官およびその権利を与えられた者によって決定された微生物の子孫を永久且つ無制限の利用を保証するものである。特許付与時、受託された培養物の公的利用に関する全ての制限が解除される。

【０１５０】

これらの寄託物は当業者の利便性のみを目的として提供されるが、連邦規則集第３７巻第１．１２条の下で寄託が必要とされる場合は許可されない。これらの遺伝子の核酸配列およびこれによってコードされる分子のアミノ酸配列は、本明細書中の記載と任意に抵触する事象において規制される。受託された物質を作製、使用、または販売するためには許可が必要であり得るが、このような許可は本明細書によって付与されない。

【０１５１】

プラスミド	寄託日	アクセッション番号
Ｅ１Ｅ２－８０９	２００１年８月１６日	ＰＴＡ－３４６３

【実施例】

【０１５２】

（２．実施例）

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の実施例である。実施例は、例示のみを目的として提供し、本発明の範囲を制限することを決して意図しない。

【０１５３】

使用した数値（例えば、量、温度など）は確実に正確であるように努めたが、勿論、幾らかの実験の誤差および偏差が含まれる可能性がある。

【０１５４】

（材料と方法）

酵素を業者から購入し、製造者の指示にしたがって使用した。

【０１５５】

ＤＮＡフラグメントの単離では、記載しない限り、標準的な手順にしたがって全てのＤＮＡ操作を行った。Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，ｓｕｐｒａを参照のこと。制限酵素であるＴ４ＤＮＡリガーゼ、Ｅ．コリ、ＤＮＡポリメラーゼＩＩ、Ｋｌｅｎｏｗフラグメント、および他の生物試薬を、業者から購入し、製造者の指示にしたがって使用することができる。二本鎖ＤＮＡフラグメントを、アガロースゲルで分離した。

【０１５６】

化学試薬の供給元には、一般に、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ；Ａｌｒｉｃｈ，Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ；Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮが含まれる。

【０１５７】

（プラスミドデザイン）

プラスミドｐＣＭＶｔｐａＥ１Ｅ２ｐ７（６２７５ｂｐ）を、上流組織プラスミノゲンアクチベーター（ｔｐａ）シグナル配列を有するアミノ酸１９２～８０９をコードするＨＣＶ－１のｐｎｅｗＣＭＶ－ＩＩ発現ベクターへのクローニングによって構築した。ｐｎｅｗＣＭＶベクターは、以下のエレメントを含むｐＵＣ１９－ベースのクローニングベクターである：ＳＶ４０複製起点、ヒトＣＭＶエンハンサー／プロモーター、ヒトＣＭＶイントロン、ヒト組織プラスミノゲンアクチベーター（ｔＰＡ）リーダー、ウシ成長ホルモンｐｏｌｙＡターミネーター、およびアンピシリン耐性遺伝子。

【０１５８】

以前に記載のように（Ｓｐａｅｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ（１９９２）１８８：８１９－８３０）、$E1E2_{809}$を組換えＣＨＯ細胞から発現させた。ＴｒｉｔｏｎＸ－１００界面活性剤を使用して、ＣＨＯ細胞の内部からＥ１Ｅ２抗原を抽出した。ガランサス・ニバリスレクチンのアガロース（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，Ｃａｌｉｆ．）クロマトグラフィおよびファーストフローＳ－

Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ陽イオン交換クロマトグラフィ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を使用して、Ｅ１Ｅ２抗原を精製した。水中油滴型アジュバントＭＦ５９は、Ｃｈｉｒｏｎ Ｖａｃｃｉｎｅｓ，Ｍａｒｂｕｒｇで製造されており、以前に詳細に記載されている（Ｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，「ＭＦ５９－－Ｄｅｓｉｇｎ および Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｓａｆｅ および Ｐｏｔｅｎｔ Ａｄｊｕｖａｎｔ ｆｏｒ Ｈｕｍａｎ Ｖａｃｃｉｎｅｓ」ｉｎ Ｖａｃｃｉｎｅ Ｄｅｓｉｇｎ：Ｔｈｅ Ｓｕｂｕｎｉｔ および Ａｄｊｕｖａｎｔ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐｏｗｅｌｌ，Ｍ．Ｆ．および Ｎｅｗｍａｎ，Ｍ．Ｊ．ｅｄｓ．）Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９５，ｐｐ．２７７－２９６））。

【０１５９】

ＣＴＬアッセイのために、ＨＣＶ－１ａのＥ１およびＥ２タンパク質（アミノ酸１９２～８０９）にわたる４４のペプチド（それぞれ１０アミノ酸が重複した２０アミノ酸長）を、Ｃｈｉｒｏｎ Ｍｉｍｏｔｏｐｅｓ Ｐｔｙ．Ｌｔｄ．（Ｃｌａｙｔｏｎ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）によって遊離アミンＮ末端および遊離酸Ｃ末端を使用して合成した。凍結乾燥ペプチドを、１０％ＤＭＳＯ水に再懸濁し、それぞれ２ｍｇ／ｍｌに希釈した。同量の各ペプチドを使用して、それぞれ２７ペプチドの以下の２つのループを作製した：プール１（アミノ酸１９２～４７０）およびプール２（アミノ酸４６１～７４０）。ＨＣＶ－１ａアミノ酸１３４～９６６（Ｓｃ５９Ｅ１２Ｃ／Ｂ）を発現する組換えワクシニアウイルス（ＶＶ）を、以前に記載の方法によって作製した（Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９４）９１：１２９４－１２９８）。Ｕ９６－Ｎｕｎｃ Ｍａｘｉｓｏｒｐプレート（Ｎａｌｇｅｎｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ、ヤギ抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰ抱合体（Ｃａｌｔａｇ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）、およびＴＭＢマイクロウェルペルオキシダーゼ置換系（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）をＥＬＩＳＡのために使用した。

【０１６０】

ポリラクチド－コ－グリコリド（ＲＧ ５０４、５０：５０ ラクチド：グリコリド単量体比）を、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｉｎｇｅｌｈｅｉｍ，ＵＳＡ．から入手した。Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｕ．Ｓ．Ａ．からＣＴＡＢを入手し、輸送日に使用した。ＰＬＧ／ＣＴＡＢ微粒子を、本質的に以前に記載の溶媒蒸発技術を使用して調製した（Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７：８１１－８１６；Ｂｒｉｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．（２００１）１８：７０９－７１２）。１００ｍｇの微粒子と２００μｇ／ｍｌのＤＮＡを含む１×ＴＥ緩衝液との４℃で１２時間の穏やかに撹拌しながらインキュベートすることによってＨＣＶ Ｅ１Ｅ２プラスミドを微粒子に吸着させた。次いで、粒子を遠心分離によって分離し、凍結乾燥させた。ＤＮＡの吸着量を、ＰＬＧ微粒子の加水分解によって決定した。微粒子のサイズ分布を、粒子サイズ分析器（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｕ．Ｋ．）を使用して決定した。ＤＥＬＳＡ ４４０ ＳＸ Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ（Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｃｏｒｐ．Ｍｉａｍｉ，ＦＬ）を使用して、ζポテンシャルを測定した。

【０１６１】

（実施例１）

（カチオン性微粒子に吸着したＥ１Ｅ２ ＤＮＡを使用したマウスの免疫化）

カチオン性微粒子に吸着したＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡの免疫原性を決定するために、３つのマウス研究を行った。第１の研究では、６～８週齢で約２０～２５ｇの１０匹の雌ＣＢ６Ｆ１マウス群を、０日目および２８日目にＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡまたはＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡ（１０および１００μｇ）で免疫化した。処方物を含む生理食塩水をＴＡ経路によって各動物の後足に注射した（部位あたり５０μｌ）。４２日目に眼窩後叢でマウスから採血し、血清を分離した。ＨＣＶ Ｅ１Ｅ２特異的血清ＩｇＧ力価を、ＥＬＩＳＡによって定量した。

【０１６２】
第２の研究では、０日目および２８日目の１および１０μｇのＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡでの免疫化を、２μｇの組換えＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９での免疫化と比較した（各群は１０匹のマウスを含む群）。さらなるマウス群を、比較のために１０μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡで免疫化し、アッセイ４２日目で血清を分離した。
【０１６３】
第３のマウス研究では、Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡ、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡおよびＤＮＡプライム／タンパク質追加免疫によって誘発した免疫応答を比較した。Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡ（１０μｇ）、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡ（１０μｇ）、または５μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９を使用して、最初の免疫化を行った。それぞれ１０匹を含む３つの群を、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡ、Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡ、またはＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９で排他的に３回免疫化した。さらに、２つのさらなるマウス群に、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡまたはＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡのいずれか（１０μｇ）を２回投与し、両群を、Ｅ１Ｅ２$_{809}$タンパク質（５μｇ）を含むＭＦ５９の１回投与からなる第３の免疫化を使用して追加免疫を行った。全動物群を、３つの場合で免疫化し、４週間後までに分離し、７０日目に血清を回収した。
【０１６４】
マウスにおけるＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２に対する抗体応答を、各免疫化から２週間後に回収した血清に対してＥＬＩＳＡによって測定した。マイクロタイタープレートを、０．６２５μｇ／ｍｌの２００μｌの精製ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２$_{809}$で４℃で一晩コーティングした。コーティングしたウェルを、３００μｌの１％ＢＳＡを含むリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）にて３７℃で１時間ブロッキングした。プレートを、洗浄緩衝液（ＰＢＳ、０．３％Ｔｗｅｅｎ－２０）で５回洗浄し、捕捉し、乾燥させた。血清サンプルおよび血清標準を、最初にブロッキング緩衝液で希釈し、その後コーティングしたブロッキングプレートに移し、サンプルを同一の緩衝液で３倍ずつ連続希釈した。３７℃で１時間のインキュベーション後に、プレートを洗浄した。ヤギ抗マウスＩｇＧγ鎖特異的抗体に抱合した西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ｃａｌｔａｇ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）を使用して、ＩｇＧ力価を決定した。３７℃で１時間のインキュベーション後、プレートを洗浄して非結合抗体を除去した。ＯＰＤ基質を使用して、プレートを発色させ、３０分後に４Ｎ　ＨＣｌの添加によって呈色反応をブロッキングした。ＩｇＧ抗体の力価を、サンプル希釈倍率の逆数として示した（希釈サンプルの光学密度は４９２ｎｍおよび６２０ｎｍで等しく、０．５であった）。
【０１６５】
第１の研究では、Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡのみでの免疫化と比較して、両用量（１０および１００μｇのＤＮＡ）でＰＬＧ／ＣＴＡＢ微粒子へのＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡの吸着によって、Ｅ１Ｅ２に対する血清ＩｇＧ抗体応答が有意に増強された。さらに、１０μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡでは、検出可能な応答を誘導するのに必要な閾値用量未満であることが明らかである。対照的に、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡは、１０μｇで強力な応答を誘導した（図３）。
【０１６６】
第２の研究は、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡが、１０μｇではＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡのみよりも有意に高い応答を誘導する能力が確認されたが、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡは１μｇでは強力な応答を誘導しないことも示した。さらに、この研究は、２μｇのＭＦでアジュバント化した（ａｄｊｕｖａｎｔｅｄ）Ｅ１Ｅ２$_{809}$タンパク質と比較してＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡ（１０μｇ）が類似の応答を誘導することも示した（図４）。
【０１６７】
第３の研究は、前の研究からの所見を確認し、拡大した。ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２

$_{809}$ＤＮＡは、１０μｇで２回または３回の投与後ではＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡよりも有意により強力であり、２回または３回投与後の５μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９での免疫化に類似していた。さらに、３回の投与での１０μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡは検出可能な応答を誘導しないにもかかわらず、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅｌ Ｅ２$_{809}$ＤＮＡの２回投与（１０μｇ）では強力な応答を誘導した（図５）。さらに、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅｌ Ｅ２$_{809}$ＤＮＡの２回投与（１０μｇ）は、Ｅ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９での追加免疫後に強力な応答をプライミングする一方で、Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡのみ（１０μｇ）ではプライミング投与計画としての効果を低かった。さらに、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅｌ Ｅ２$_{809}$ＤＮＡの３回投与（１０μｇ）は、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅｌ Ｅ２$_{809}$ＤＮＡの２回投与（１０μｇ）およびその後の５μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９の単回投与での追加免疫と強度は等しかった（図５）。

【０１６８】

本明細書中で示されるように、Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドは、マウスにおいて１００μｇの用量で検出可能な力価を誘導することができた。しかし、Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡが吸着したカチオン性ＰＬＧ微粒子は顕著により強力であり、ＭＦ５９でアジュバント化した組換えＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質での免疫化によって誘導された応答と類似していた。これは、マウスにおいてＨＣＶＥ２プラスミドを使用した以前の研究と対照的である（Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（２０００）７４：２０２０－２０２５）。その研究では、プラスミドＤＮＡは、高用量（１００μｇ）でさえも、検出可能な抗体応答を誘導することができず、タンパク質ブースターの用量は血清反応反転の誘導に必要であった。本結果は、ＰＬＧ微粒子に吸着したＨＩＶプラスミドに関する以前のデータと一致し（Ｏ’Ｈａｇａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ ｖｉｒａｌ（２００１）７５：９０３７－９０４３）、本明細書中で使用したプラスミドから発現したＥ１Ｅ２$_{809}$抗原は、以前にＰＬＧと組み合わせて評価された抗原と非常に異なる。以前に評価されたｅｎｖプラスミド（Ｂｒｉｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａａｍｎ．Ｒｅｓ．（２００１）１８：７０９－７１２；Ｏ’Ｈａｇａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（２００１）７５：９０３７－９０４３）は、抗原を最適に分泌しながら哺乳動物細胞を高レベル発現するためにコドンを最適化する一方で（Ｗｉｄｅｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０００）１６４：４６３５－４６４０）、以前に評価されたｇａｇプラスミド（Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７：８１１－８１６；Ｏ’Ｈａｇａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（２００１）７５：９０３７－９０４３）もコドンが最適化され、細胞から有効に分泌される（Ｚｕｒ Ｍｅｇｅｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（２０００）７４：２６２８－２６３５）。対照的に、本研究で使用したＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドを、抗原を細胞内に産生するようにデザインした（例えば、国際公開番号ＷＯ ９８／５０５５６を参照のこと）。したがって、本研究における驚くべき所見は、ＰＬＧ微粒子が細胞から分泌されるようにデザインした抗原に対して増強された抗体応答を誘導する能力である。

【０１６９】

第３のマウス研究では、Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡとＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅｌ Ｅ２$_{809}$ＤＮＡとの組換えＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９アジュバントでの追加免疫後に強力な抗体応答をプライミングする能力を研究した。Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡは、タンパク質による追加免疫応答をプライミングすることができたが、Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡのみ（１０μｇ）では、３回投与しても一次応答を引き起こすことができなかった。対照的に、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅｌ Ｅ２$_{809}$ＤＮＡの２回投与（１０μｇ）では、強力な血清抗体応答を誘導した。さらに、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅｌ Ｅ２$_{809}$ＤＮＡはまた、Ｅ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡのみよりもタンパク質に対する追加免疫応答のプライミングに有効であった。さらに、非常に驚くべき所見は、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅｌ Ｅ２$_{809}$ＤＮＡの３回の投与は、２回投与後にタンパク質追加免疫を行うのと類似していることであった。いくつかの前の状況では、ＤＮＡは、強力な免疫応答の誘

導に無効であることが示されたが、応答はタンパク質追加免疫によって有意に増強された。

【０１７０】

（実施例２）

（カチオン性微粒子に吸着したＥ１Ｅ２ＤＮＡを使用したアカゲザルの免疫化）

上記の正の結果に基づいて、以下の霊長類研究を行った。３頭のアカゲザル群を、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡ（１ｍｇ）または５０μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９を、０、４週目、８週目、および２４週目に免疫化した。さらに、６４週目に、４０μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９で全動物を追加免疫した（表２を参照のこと）。

【０１７１】

【表２】

群	動物番号	処方物	用量（経路）	免疫化スケジュール（週）
1	AY922 BB227 BB230	PLG/CTAB/ E1E2$_{809}$DNA	1 mg (IM)	0, 4, 8, 24 および 64 (40 μg E1E2$_{809}$ タンパク質追加免疫)
2	15862 15863 15864	E1E2$_{809}$ タンパク質/MF59	50 μg (IM)	0, 4, 8, 24 および 64 (40 μg E1E2$_{809}$ タンパク質追加免疫)

（表２）

表２．ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡまたはＥ１Ｅ２$_{809}$組換えタンパク質を含むＭ５９で免疫化した３頭のアカゲザルの２群についての免疫化計画。

【０１７２】

アカゲザルにおけるＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２に対する抗体応答を、上記プロトコールにしたがって測定した。変更点は二次抗体としてヤギ抗アカゲザル抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ，Ｉｎｃ．）を使用したことのみである。

【０１７３】

麻酔下で大腿静脈から末梢血を採取した。Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ勾配による遠心分離によってＰＢＭＣを獲得し、５×１０^{6}細胞／ウェルを２４ウェルディッシュで培養した。これらの細胞のうち、１×１０^{6}個を、１０μＭのペプチドプール（個別のペプチドからなる）にて３７℃で１時間感作し、洗浄し、１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－７（Ｒ　＆　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）を補足した２ｍｌの培養培地（ＲＰＭＩ１６４０、１０％熱不活化ＦＢＳ、および１％抗生物質）中の残存する４×１０^{6}個の非処置ＰＢＭＣに添加した。４８時間後、５％（最終）のＩＬ－２含有上清（ＰＨＡを含まないＴ－ＳＴＩＭ、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ－Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｌａｂｗａｒｅ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）および５０Ｕ／ｍｌ（最終）のｒＩＬ－２を培地に添加した。培養物に３～４日間栄養を与えた。培養１０日後に、製造者の指示にしたがって、磁性ビーズ（Ｄｙｎａｌ，Ｏｓｌｏ，Ｎｏｒｗａｙ）に結合した抗ＣＤ８抗体を使用してＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を単離した。精製ＣＤ８$^{+}$細胞（フローサイトメトリーによって測定したところ、純度９３％超）を、さらに２～３日間培養し、その後細胞傷害活性についてアッセイした。ヒヒヘルペスウイルス産生細胞株Ｓ３９４由来の上清を使用して、Ｂ－ＬＣＬは各動物に由来していた。

【０１７４】

標準的な^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいて細胞傷害活性を評価した。自家Ｂ－ＬＣＬを、９．２５ｍｇ／ｍｌペプチドおよび５０ｍＣｉの^{51}Ｃｒと共に１．５時間インキュベートし、３回洗浄し、５×１０^{3}細胞／ウェルにて９６ウェルプレートにプレートした。Ｃ

Ｄ８＋Ｔ細胞を、２連で３つのエフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比においた。ヒヒヘルペスウイルスによるＢ－ＬＣＬの溶解および／または内因性泡沫状ウイルス特異的ＣＴＬを最小にするように含まれるウェルあたり３．７５×10^5個の非標識標的の存在下で、エフェクターおよび標的を共に４時間インキュベートした。上清（５０ｍｌ）をＬｕｍａｐｌａｔｅ（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｍｅｒｉｄｅｎ，ＣＴ）に移し、Ｗａｌｌａｃ　Ｍｉｃｒｏｂｅｔａ　１４５０シンチレーション装置（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）を使用して放射能を測定した。特異的溶解率を、１００×［（平均実験放出－平均自発的放出）／（平均最大放出－平均自発的放出）］として計算した。２つの最も高いＥ：Ｔ細胞比での特異的溶解率がコントロール標的の溶解率＋１０％以上である場合、ＣＴＬ応答を陽性とスコアリングした。

【０１７５】

第２の免疫化から２週間後のＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９で免疫化した３頭全てのアカゲザルは、血清ＩｇＧ応答が得られ、第３の免疫化で応答が増加した。ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡで免疫化した３頭のアカゲザルのうちの２頭は、第２の免疫化から２週間後に応答し、３頭全ての動物は、第３の免疫化後に応答した。したがって、第３の投与後にＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡで免疫化した３頭全てのアカゲザルで血清反応反転が起こった。第３の投与で２頭の動物が応答したことは応答増加の証拠にはならないが、全動物で第４のＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡの投与後に応答増加が認められた（表３）。これにより、有効な応答増加を得るためには第３のＤＮＡ投与の間隔を第２の投与に非常に近づけるということが示唆される。第３の投与と第４の投与との間ではさらにより遅れており、第４の投与後に応答が増加した。それにもかかわらず、各免疫化後のＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡによって誘導されたＩｇＧレベルは、一般に、Ｅ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９によって誘導された応答よりも低かった。しかし、Ｅ１Ｅ２$_{809}$タンパク質の単回投与により、前にＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡで免疫化されたアカゲザルにおいて優れた応答増加を誘導する一方で、前に４回タンパク質で免疫化された動物へのタンパク質の投与では類似のレベルの応答増加は誘導されなかった。したがって、５回の免疫化後、タンパク質のみを含むＭＦ５９で免疫化するかＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡで免疫化後にＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９で１回追加免疫を行った両群において類似の血清抗体応答が得られた。

【０１７６】

ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡでの第４の免疫化から２週間後、全動物でＰＢＭＣ由来のＣＴＬ応答を評価した。ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡで免疫化した３頭のうちの１頭の動物（ＢＢ２２７）は、ペプチド特異的ＣＴＬ応答を示した（表４）。この動物（ＢＢ２２７）は、抗体に対する応答は最も弱く、第３のＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡ投与後に弱く血清反応反転を示しただけであった。

【０１７７】

まとめるために、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡ微粒子により、３回の免疫化後に３／３の動物で血清反応反転が誘導され、第４の投与後に応答が増加した。第３の免疫化後にＤＮＡに対する応答はほとんど増加しなかったにもかかわらず、第３の投与では依然として応答しない残りの１頭で血清反応反転が誘導されなかった。ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡによって誘導された血清ＩｇＧ応答が組換えＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９によって誘導された応答よりも有意に低いにもかかわらず、複数回の大量投与後でさえも霊長類における抗体応答の誘導のための以前のＤＮＡワクチンの有効性が低いことを考えると（Ｇｕｒｕｎａｔｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０００）１８：９２７－９７４）、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡがアカゲザル中で血清反応反転を誘導する能力は、顕著且つ向上している。

【０１７８】

ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡのみではＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質を含むＭＦ５９での免疫化に対する類似の血清ＩｇＧ応答を誘導することができないにもかかわら

ず、$E1E2_{809}$タンパク質の単回追加免疫投与により、PLG／CTAB／$E1E2_{809}$DNA免疫化アカゲザルにおける抗体応答が有機に増強された。組換え$E1E2_{809}$タンパク質を含むMF59での単回追加免疫投与後、PLG／CTAB／$E1E2_{809}$DNA群は、5回の投与で排他的に$E1E2_{809}$タンパク質を含むMF59で免疫化したアカゲザルと類似の血清IgG力価を示した。$E1E2_{809}$は細胞内抗原複合体として産生されるので（Heile et al.，J.Virol.（2000）74：6885）、普遍的なHCVワクチンに必要なレベルで組換えタンパク質として製造するのは困難である。したがって、PLG／CTAB／$E1E2_{809}$DNAが単回用量のE1E2タンパク質を含むMF59で追加免疫することができる抗E1E2応答をプライミングする能力により、ワクチン開発のためのタンパク質用量を控えた選択肢が得られる。さらに、DNAワクチンは、HCVに対する防御免疫応答で重要であり得るCTL応答をプライミングすることができる。一般に、タンパク質ベースのワクチンは、非ヒト霊長類およびヒトにおけるCTL応答の誘導に無効であった（Singh and O'Hagan，Nat.Biotechnol（1999）17：1075－1081）。PLG／CTAB／$E1E2_{809}$DNAで免疫化した3頭のアカゲザルのうちの1頭では、第4の免疫化後にCTL応答が検出された。CTLは$E1E2_{809}$／MF59免疫化動物で評価されていないが、本発明者らは、このアジュバントがCTL応答を誘導しないと確信するに足る十分な経験を有している。

【0179】

【表3】

E2抗体力価

以下で免疫化した動物	$E1E2_{809}$＋MF59			PLG/CTAB/$E1E2_{809}$DNA		
	15862	15863	15864	AY922	BB227	BB230
前	<5	<5	<5	<5	<5	<5
1回目後2週間	NT	NT	NT	<5	<5	<5
2回目後2週間	550	638	538	150	<5	75
3回目後2週間	988	763	2488	125	25	75
3回目後14週間	113	50	250	<5	<5	<5
4回目後2週間	813	625	6525	375	63	375
4回目後40週間	25	13	188	<5	<5	<5
5回目後2週間	475	575	1388	925	363	3075

表3．PLG／CTAB／$E1E2_{809}$DNAまたは$E1E2_{809}$組換えタンパク質を含むMF59で免疫化したアカゲザルの血清IgG抗体の応答。

【0180】

【表4】

エフェクター／標的細胞比	非感作コントロール	ブール1感作標的での溶解率
40/1	5	24
13/1	<1	14
4/1	<1	12

（表4）

表4．第4の免疫化から2週間後にPLG／CTAB／$E1E2_{809}$DNAで免疫化

したアカゲザルの細胞傷害性Ｔリンパ球応答。Ｐｅｒｃｅｎｔ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｌｙｓｉｓ ａｔ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｅｆｆｅｃｔｏｒ／ｔａｒｇｅｔ ｃｅｌｌ ｒａｔｉｏｓ：異なるエフェクター／標的細胞比での特異的溶解率。

【０１８１】

（実施例３）

（カチオン性微粒子に吸着したＥ１Ｅ２ＤＮＡを使用したチンパンジーの免疫化）

表５および６に示すように、チンパンジー群の各大腿部に３ｍｇ（大腿部あたり）の以下のプラスミド混合物で免疫化した：ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡ、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＨＣＶ ＮＳ３４ａ、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＨＣＶ ＮＳ４ａＮＳ４ｂ、およびＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＨＣＶ ＮＳ５。コントロールアミノ酸にはワクチンを投与しなかった。６ヶ月目に、チンパンジーを、ＨＣＶ－Ｈ株の１００ＣＩＤで静脈内に攻撃誘発した。

【０１８２】

表に示すように、ＰＬＧ ＤＮＡは抗Ｅ１Ｅ２抗体をプライミングした。さらに、攻撃誘発後、ワクチン摂取した動物はウイルス血症を発症したが、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡを投与した動物の４／５は最終的に回復し、ヒトにおけるＨＣＶがもたらす主な影響であるキャリア状態に進行しなかった。対照的に、ＨＣＶ－Ｈで攻撃誘発した全１４頭のコントロールのうち、６／１４がウイルス感染を消失させることができた。これらのデータは、カチオン性微粒子に吸着したＥ１Ｅ２ＤＮＡが予防効果を示すことを証明する。

【０１８３】

さらに、攻撃誘発後、ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／ＥｌＥ２$_{809}$ＤＮＡを投与した動物はコントロールと比較してＨＣＶ特異的Ｔ細胞の肝臓への流入がより迅速であることが自明であり、カチオン性微粒子に吸着したＥ１Ｅ２ＤＮＡの有効性がさらに証明される。

【０１８４】

Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡ組成物およびその使用方法を記載する。本発明の好ましい実施形態がある程度詳細に記載されているが、特許請求の範囲によって定義された本発明の精神および範囲を逸脱することなく明らかな変形形態を得ることができると理解される。

【０１８５】

（表５）

（ＣＨＯ Ｅ１Ｅ２に対する抗体力価についてのＥｌｉｓａ）

【０１８６】

【表５】

チンパンジー	日付	処置	OD	希釈	力価
4x0179		コントロール	0.049	40	-
4x0195	(0週目)		0.048	40	-
4x0197			0.024	40	-
4x0320			0.024	40	-
4x0397			0.026	40	-
4x0179		コントロール	0.037	40	-
4x0195	(4週目)		0.069	40	-
4x0197			0.029	40	-
4x0320			0.039	40	-
4x0397			0.045	40	-
4x0179		コントロール	0.030	40	-
4x0195	(8週目)		0.050	40	-
4x0197			0.032	40	-
4x0320			0.040	40	-
4x0397			0.047	40	-
4x0179		コントロール	0.026	40	-
4x0195	(12週目)		0.053	40	-
4x0197			0.037	40	-
4x0320			0.025	40	-
4x0397			0.026	40	-
4x0179		コントロール	0.017	40	-
4x0195	(16週目)		0.050	40	-
4x0197			0.030	40	-
4x0320			0.028	40	-
4x0397			0.018	40	-
4x0179		コントロール	0.058	40	-
4x0195	(22週目)		0.034	40	-
4x0197			0.036	40	-
4x0320			0.042	40	-
4x0397			0.043	40	-
4x0179		コントロール	0.035	40	-
4x0195	(28週目)		0.041	40	-
4x0197			0.033	40	-
4x0320			0.051	40	-
4x0397			0.031	40	-

（表６）
（ＣＨＯ　Ｅ１Ｅ２に対する抗体力価についてのＥｌｉｓａ）
【０１８７】

【表６】

チンパンジー	日付	処置	OD	希釈	力価	GM+/-SE
4x0238		PLG DNA	0.187	40	-	
4x0239	(-3週目)		0.341	40	14	
4x0250			0.146	40	-	
4x0278			0.145	40	-	
4x0288			0.117	40	-	1.7+/-0.9
4x0238		PLG DNA	0.139	40	-	
4x0239	(0週目)		0.497	40	20	
4x0250			0.513	40	21	
4x0278			0.194	40	-	
4x0288			0.167	40	-	3.4+/-2.5
4x0238		PLG DNA	0.317	40	13	
4x0239	(4週目)		0.594	800	475	
4x0250			0.602	200	120	
4x0278			0.184	40	-	
4x0288			0.150	40	-	14.9+/-18.6
4x0238		PLG DNA	0.691	40	28	
4x0239	(8週目)		0.529	800	423	
4x0250			0.569	200	114	
4x0278			0.355	40	14	
4x0288			0.136	40	-	28.5+/-29.2
4x0238		PLG DNA	0.685	40	27	
4x0239	(12週目)		0.751	200	150	
4x0250			0.843	40	34	
4x0278			0.334	40	13	
4x0288			0.131	40	-	17.8+/-14.6
4x0238		PLG DNA	0.531	40	21	
4x0239	(16週目)		0.571	200	114	
4x0250			0.722	40	29	
4x0278			0.236	40	-	
4x0288			0.131	40	-	9.3+/-8.9
4x0238		PLG DNA	0.370	40	15	
4x0239	(22週目)		0.684	40	27	
4x0250			0.455	40	18	
4x0278			0.196	40	-	
4x0288			0.082	40	-	5.9+/-4.3
4x0238		PLG DNA	0.248	40	-	
4x0239	(27週目)		0.567	40	23	
4x0250			0.509	40	20	
4x0278			0.165	40	-	
4x0288			0.094	40	-	3.4+/-2.6

【図面の簡単な説明】

【０１８８】

【図１】図１は、ＨＣＶポリペプチドの種々の領域を示すＨＣＶゲノムの図である。

【図２Ａ】図２Ａ～２Ｃ（配列番号１および２）は、ＨＣＶ－１　Ｅ１／Ｅ２／ｐ７領域のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。図中に示す数字は、全長ＨＣＶ－１ポリタンパク質に関する。Ｅ１、Ｅ２、およびｐ７領域を示す。

【図２Ｂ】図２Ａ～２Ｃ（配列番号１および２）は、ＨＣＶ－１　Ｅ１／Ｅ２／ｐ７領域のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。図中に示す数字は、全長ＨＣＶ－１ポリタンパク質に関する。Ｅ１、Ｅ２、およびｐ７領域を示す。

【図２Ｃ】図２Ａ～２Ｃ（配列番号１および２）は、ＨＣＶ－１　Ｅ１／Ｅ２／ｐ７領域のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。図中に示す数字は、全長ＨＣＶ－１ポリタンパク質に関する。Ｅ１、Ｅ２、およびｐ７領域を示す。

【図３】図３は、１０μｇおよび１００μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡのみまたはＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡ（図中でＰＬＧ／ＤＮＡと示す）でのマウスの０および４週間の免疫化後の血清ＩｇＧ力価（Ｎ＝１０、＋／－ＳＥＭ）を示す。

【図４】図４は、１０μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡ、１μｇおよび１０μｇの

ＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡ、または２μｇのＭＦ５９アジュバント中のＥ１Ｅ２$_{809}$組換えタンパク質でのマウスの０および４週間の免疫化後の血清ＩｇＧ力価（Ｎ＝１０、＋／－ＳＥＭ）を示す。

【図５】図５は、１０μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡまたはＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡ、または５μｇのＭＦ５９アジュバント中のＥ１Ｅ２$_{809}$組換えタンパク質でのマウスの０、４、８週間の免疫化後の血清ＩｇＧ力価を示す。さらに、２つのマウス群を、１０μｇのＥ１Ｅ２$_{809}$プラスミドＤＮＡまたはＰＬＧ／ＣＴＡＢ／Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡで０および４週間２回免疫化し、５μｇのＭＦ５９中のＥ１Ｅ２$_{809}$組換えタンパク質で８週間追加免疫を行った（Ｎ＝１０、＋／－ＳＥＭ）。Ｄ＝Ｅ１Ｅ２$_{809}$ＤＮＡ（１０μｇ）、Ｐ－５μｇのＭＦ５９中のＥ１Ｅ２$_{809}$タンパク質。

【図１】

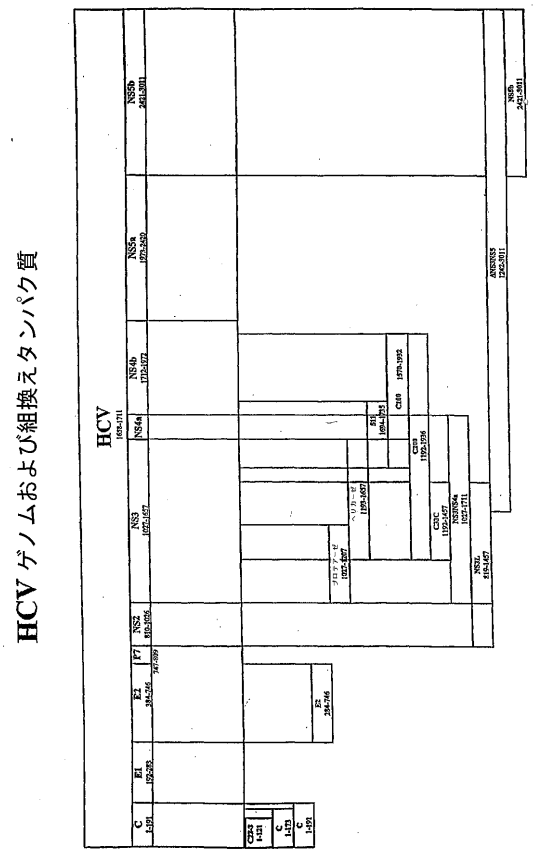


FIG. 1

【図２Ａ】

天然 E1
SerPheSerIlePheLeuLeuAlaLeuLeuSerCysLeuThrValProAlaSerAlaTyr 192
TCTTTCTCTATCTTCCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCTTGACTGTGCCCGCTTCGGCCTAC
AGAAAGAGATAGAAGGAAGACCGGGACGAGAGAACGAACTGACACGGGCGAAGCCGGATG

GlnValArgAsnSerThrGlyLeuTyrHisValThrAsnAspCysProAsnSerSerIle 212
CAAGTGCGCAACTCCACGGGGCTCTACCACGTCACCAATGATTGCCCTAACTCGAGTATT
GTTCACGCGTTGAGGTGCCCCGAGATGGTGCAGTGGTTACTAACGGGATTGAGCTCATAA

ValTyrGluAlaAlaAspAlaIleLeuHisThrProGlyCysValProCysValArgGlu 232
GTGTACGAGGCGGCCGATGCCATCCTGCACACTCCGGGGTGCGTCCCTTGCGTTCGCGAG
CACATGCTCCGCCGGCTACGGTAGGACGTGTGAGGCCCCACGCAGGGAACGCAAGCGCTC

GlyAsnAlaSerArgCysTrpValAlaMetThrProThrValAlaThrArgAspGlyLys 252
GGCAACGCCTCGAGGTGTTGGGTGGCGATGACCCCTACGGTGGCCACCAGGGATGGCAAA
CCGTTGCGGAGCTCCACAACCCACCGCTACTGGGGATGCCACCGGTGGTCCCTACCGTTT

LeuProAlaThrGlnLeuArgArgHisIleAspLeuLeuValGlySerAlaThrLeuCys 272
CTCCCCGCGACGCAGCTTCGACGTCACATCGATCTGCTTGTCGGGAGCGCCACCCTCTGT
GAGGGGCGCTGCGTCGAAGCTGCAGTGTAGCTAGACGAACAGCCCTCGCGGTGGGAGACA

SerAlaLeuTyrValGlyAspLeuCysGlySerValPheLeuValGlyGlnLeuPheThr 292
TCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTGTGCGGGTCTGTCTTTCTTGTCGGCCAACTGTTTACC
AGCCGGGAGATGCACCCCCTGGACACGCCCAGACAGAAAGAACAGCCGGTTGACAAATGG

PheSerProArgArgHisTrpThrThrGlnGlyCysAsnCysSerIleTyrProGlyHis 312
TTCTCTCCCAGGCGCCACTGGACGACGCAAGGTTGCAATTGCTCTATCTATCCCGGCCAT
AAGAGAGGGTCCGCGGTGACCTGCTGCGTTCCAACGTTAACGAGATAGATAGGGCCGGTA

IleThrGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrpSerProThrThrAlaLeu 332
ATAACGGGTCACCGCATGGCATGGGATATGATGATGAACTGGTCCCCTACGACGGCGTTG
TATTGCCCAGTGGCGTACCGTACCCTATACTACTACTTGACCAGGGGATGCTGCCGCAAC

ValMetAlaGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaIleLeuAspMetIleAlaGlyAlaHis 352
GTAATGGCTCAGCTGCTCCCGGATCCCACAAGCCATCTTGGACATGATCGCTGGTGCTCAC
CATTACCGAGTCGACGAGGCCTAGGGTGTTCGGTAGAACCTGTACTAGCGACCACGAGTG

TrpGlyValLeuAlaGlyIleAlaTyrPheSerMetValGlyAsnTrpAlaLysValLeu 372
TGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAACTGGGCGAAGGTCCTG
ACCCCTCAGGACCGCCGTATCGCATAAAGAGGTACCACCCCTTGACCCGCTTCCAGGAC

E2
ValValLeuLeuLeuPheAlaGlyValAspAlaGluThrHisValThrGlyGlySerAla 392
GTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCGGAAACCCACGTCACCGGGGGAAGTGCC
CATCACGACGACGATAAACGGCCGCAGCTGCGCCTTTGGGTGCAGTGGCCCCCTTCACGG

GlyHisThrValSerGlyPheValSerLeuLeuAlaProGlyAlaLysGlnAsnValGln 412
GGCCACACTGTGTCTGGATTTGTTAGCCTCCTCGCACCAGGCGCCAAGCAGAACGTCCAG
CCGGTGTGACACAGACCTAAACAATCGGAGGAGCGTGGTCCGCGGTTCGTCTTGCAGGTC

FIGURE 2A

【図２Ｂ】

```
LeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisLeuAsnSerThrAlaLeuAsnCysAsnAspSer 432
CTGATCAACACCAACGGCAGTTGGCACCTCAATAGCACGGCCCTGAACTGCAATGATAGC
GACTAGTTGTGGTTGCCGTCAACCGTGGAGTTATCGTGCCGGGACTTGACGTTACTATCG

LeuAsnThrGlyTrpLeuAlaGlyLeuPheTyrHisHisLysPheAsnSerGlyCys 452
CTCAACACCGGCTGGTTGGCAGGGCTTTTCTATCACCACAAGTTCAACTCTTCAGGCTGT
GAGTTGTGGCCGACCAACCGTCCCGAAAAGATAGTGGTGTTCAAGTTGAGAAGTCCGACA

ProGluArgLeuAlaSerCysArgProLeuThrAspPheAspGlnGlyTrpGlyProIle 472
CCTGAGAGGCTAGCCAGCTGCCGACCCCTTACCGATTTTGACCAGGGCTGGGGCCCTATC
GGACTCTCCGATCGGTCGACGGCTGGGGAATGGCTAAAACTGGTCCCGACCCCGGGATAG

SerTyrAlaAsnGlySerGlyProAspGlnArgProTyrCysTrpHisTyrProProLys 492
AGTTATGCCAACGGAAGCGGCCCCGACCAGCGCCCCTACTGCTGGCACTACCCCCCCAAAA
TCAATACGGTTGCCTTCGCCGGGGCTGGTCGCGGGGATGACGACCGTGATGGGGGGTTTT

ProCysGlyIleValProAlaLysSerValCysGlyProValTyrCysPheThrProSer 512
CCTTGCGGTATTGTGCCCGCGAAGAGTGTGTGGTCCGGTATATTGCTTCACTCCCAGC
GGAACGCCATAACACGGGCGCTTCTCACACACACCAGGCCATATAACGAAGTGAGGGTCG

ProValValValGlyThrThrAspArgSerGlyAlaProThrTyrSerTrpGlyGluAsn 532
CCCGTGGTGGTGGGAACGACCGACAGGTCGGGCGCGCCCACCTACAGCTGGGGTGAAAAT
GGGCACCACCACCCTTGCTGGCTGTCCAGCCCGCGCGGGTGGATGTCGACCCCACTTTTA

AspThrAspValPheValLeuAsnAsnThrArgProProLeuGlyAsnTrpPheGlyCys 552
GATACGGACGTCTTCGTCCTTAACAATACCAGGCCACCGCTGGGCAATTGGTTCGGTTGT
CTATGCCTGCAGAAGCAGGAATTGTTATGGTCCGGTGGCGACCCGTTAACCAAGCCAACA

ThrTrpMetAsnSerThrGlyPheThrLysValCysGlyAlaProProCysValIleGly 572
ACCTGGATGAACTCAACTGGATTCACCAAAGTGTGCGGAGCGCCTCCTTGTGTCATCGGA
TGGACCTACTTGAGTTGACCTAAGTGGTTTCACACGCCTCGCGGAGGAACACAGTAGCCT

GlyAlaGlyAsnAsnThrLeuHisCysProThrAspCysPheArgLysHisProAspAla 592
GGGGCGGGCAACAACACCCTGCACTGCCCCACTGATTGCTTCCGCAAGCATCCGGACGCC
CCCCGCCCGTTGTTGTGGGACGTGACGGGGTGACTAACGAAGGCGTTCGTAGGCCTGCGG

ThrTyrSerArgCysGlySerGlyProTrpIleThrProArgCysLeuValAspTyrPro 612
ACATACTCTCGGTGCGGCTCCGGTCCCTGGATCACACCCAGGTGCCTGGTCGACTACCCG
TGTATGAGAGCCACGCCGAGGCCAGGGACCTAGTGTGGGTCCACGGACCAGCTGATGGGC

TyrArgLeuTrpHisTyrProCysThrIleAsnTyrThrIlePheLysIleArgMetTyr 632
TATAGGCTTTGGCATTATCCTTGTACCATCAACTACACTATATTTAAAATCAGGATGTAC
ATATCCGAAACCGTAATAGGAACATGGTAGTTGATGTGATATAAATTTTAGTCCTACATG

ValGlyGlyValGluHisArgLeuGluAlaAlaCysAsnTrpThrArgGlyGluArgCys 652
GTGGGAGGGGTCGAGCACAGGCTGGAAGCTGCCTGCAACTGGACGCGGGGCGAACGTTGC
CACCCTCCCCAGCTCGTGTCCGACCTTCGACGGACGTTGACCTGCGCCCCGCTTGCAACG

AspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeuLeuThrThrThrGlnTrp 672
GATCTGGAAGATAGGGACAGGTCCGAGCTCAGCCCGTTACTGCTGACCACTACACAGTGG
CTAGACCTTCTATCCCTGTCCAGGCTCGAGTCGGGCAATGACGACTGGTGATGTGTCACC
```

FIGURE 2B

【図２Ｃ】

```
GlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSerThrGlyLeuIleHisLeu 692
CAGGTCCTCCCGTGTTCCTTCACAACCCTGCCAGCCTTGTCCACCGGCCTCATCCACCTC
GTCCAGGAGGGCACAAGGAAGTGTTGGGACGGTCGGAACAGGTGGCCGGAGTAGGTGGAG

HisGlnAsnIleValAspValGlnTyrLeuTyrGlyValGlySerSerIleAlaSerTrp 712
CACCAGAACATTGTGGACGTGCAGTACTTGTACGGGGTGGGGTCAAGCATCGCGTCCTGG
GTGGTCTTGTAACACCTGCACGTCATGAACATGCCCCACCCCAGTTCGTAGCGCAGGACC

AlaIleLysTrpGluTyrValValLeuLeuPheLeuLeuLeuAlaAspAlaArgValCys 732
GCCATTAAGTGGGAGTACGTCGTCCTCCTGTTCCTTCTGCTTGCAGACGCGCGGTCTGC
CGGTAATTCACCCTCATGCAGCAGGAGGACAAGGAAGACGAACGTCTGCGCGCGCAGACG

                                                    P7
SerCysLeuTrpMetMetLeuLeuIleSerGlnAlaGluAlaAlaLeuGluAsnLeuVal 752
TCCTGCTTGTGGATGATGCTACTCATATCCCAAGCGGAAGCGGCTTTGGAGAACCTCGTA
AGGACGAACACCTACTACGATGAGTATAGGGTTCGCCTTCGCCGAAACCTCTTGGAGCAT

IleLeuAsnAlaAlaSerLeuAlaGlyThrHisGlyLeuValSerPheLeuValPhePhe 772
ATACTTAATGCAGCATCCCTGGCCGGGACGCACGGTCTTGTATCCTTCCTCGTGTTCTTC
TATGAATTACGTCGTAGGGACCGGCCCTGCGTGCCAGAACATAGGAAGGAGCACAAGAAG

CysPheAlaTrpTyrLeuLysGlyLysTrpValProGlyAlaValTyrThrPheTyrGly 792
TGCTTTGCATGGTATCTGAAGGGTAAGTGGGTGCCCGGAGCGGTCTACACCTTCTACGGG
ACGAAAACGTACCATAGACTTCCCATTCACCCACGGGCCTCGCCAGATGTGGAAGATGCCC

MetTrpProLeuLeuLeuLeuLeuAlaLeuProGlnArgAlaTyrAlaOC        809
ATGTGGCCTCTCCTCCTGCTCCTGTTGCCGTTGCCCCAGCGGGCGTACGCGTAA
TACACCGGAGAGGAGGACGAGGACAACCGCAACGGGGTCGCCCGCATGCGCATT
```

FIGURE 2C

【図３】

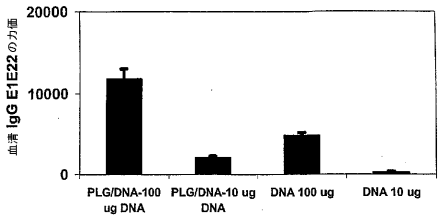


Fig. 3

【図４】

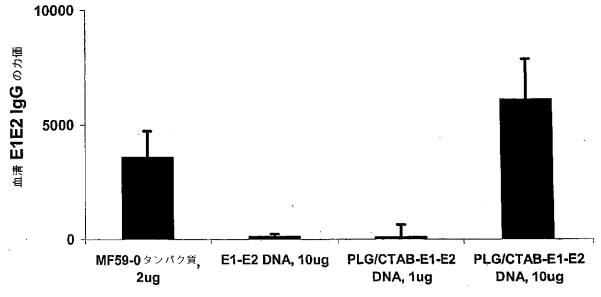


Fig. 4

【図５】

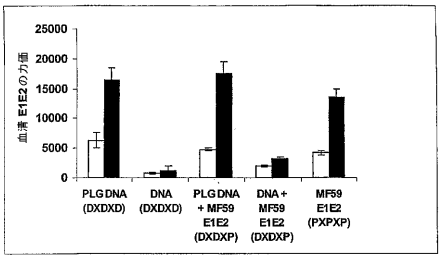


Fig. 5

【手続補正書】
【提出日】平成18年1月19日(2006.1.19)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
本質的に、薬学的に受容可能な賦形剤およびカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる組成物であって、該ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である、組成物。
【請求項２】
前記ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体が、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、およびポリ無水物からなる群より選択されるポリマーから形成される、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（Ｌ－ラクチド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド）、およびポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）からなる群より選択されるポリ（α－ヒドロキシ酸）から形成される、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成される、請求項４に記載の組成物。
【請求項６】
本質的に、
（ａ）薬学的に受容可能な賦形剤；および
（ｂ）ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成されたカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなるＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である、ポリヌクレオチド、
からなる組成物。
【請求項７】
本質的に、薬学的に受容可能な賦形剤およびカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる第１の組成物を備える、脊椎動物被験体の免疫応答を刺激するためのキットであって、該ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体であり、該ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体が、免疫応

答を誘発するためにインビボで発現する、キット。
【請求項８】
前記ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体が、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる、請求項７に記載のキット。
【請求項９】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、およびポリ無水物からなる群より選択されるポリマーから形成される、請求項７に記載のキット。
【請求項１０】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（Ｌ－ラクチド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド）、およびポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）からなる群より選択されるポリ（α－ヒドロキシ酸）から形成される、請求項９に記載のキット。
【請求項１１】
前記カチオン性微粒子が、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成される、請求項１０に記載のキット。
【請求項１２】
第２の組成物を備えるキットであって、該第２の組成物が、免疫原性ＨＣＶポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含有する、請求項７に記載のキット。
【請求項１３】
前記第２の組成物が、前記第１の組成物の後に投与されるために処方されている、請求項１２に記載のキット。
【請求項１４】
前記第２の組成物中の免疫原性ＨＣＶポリペプチドが、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である、請求項１２に記載のキット。
【請求項１５】
前記ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体が、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる、請求項１４に記載のキット。
【請求項１６】
前記第２の組成物が、アジュバントをさらに含有する、請求項１２に記載のキット。
【請求項１７】
前記アジュバントが、免疫原性ＨＣＶポリペプチドに対する免疫応答を増強し得る１ミクロン未満の水中油型エマルジョンであり、該１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、（ｉ）全体積の１％～１２％の量で存在する代謝可能な油、および（ｉｉ）０．０１重量％～１重量％（ｗ／ｖ）の量で存在し、ポリオキシエチレンソルビタンのモノエステル、ジエステル、もしくはトリエステルおよび／またはソルビタンのモノエステル、ジエステル、もしくはトリエステルを含む乳化剤を含有し、該油および該乳化剤が、油滴を有する水中油型エマルジョンの形態で存在し、該油滴の実質的に全ての直径が約１００ｎｍから１ミクロン未満である、請求項１６に記載のキット。
【請求項１８】
前記１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、４～５ｗ／ｖ％スクアレン、０．２５～１．０ｗ／ｖ％モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、および／または０．２５～１．０％トリオレイン酸ソルビタン、ならびに、必要に応じてＮ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－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（ＭＴＰ－ＰＥ）を含む、請求項１７に記載のキット。
【請求項１９】
前記１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、本質的に、約５体積％のスクアレン、ならびにモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンからなる群より選択される１種以上の乳化剤からなり、該乳化剤の全存在量が、約１重量％

（ｗ／ｖ）である、請求項１７に記載のキット。
【請求項２０】
前記１種以上の乳化剤が、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンであり、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンの全存在量が約１重量％（ｗ／ｖ）である、請求項１９に記載のキット。
【請求項２１】
前記第２の組成物が、ＣｐＧオリゴヌクレオチドをさらに含有する、請求項１２に記載のキット。
【請求項２２】
脊椎動物被験体の免疫応答を刺激するためのキットであって、該キットは、以下：
（ａ）本質的にポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）から形成したカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドからなる第１の組成物であって、該ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなるＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体であって、該ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体がインビボで発現する、第１の組成物；ならびに
（ｂ）第２の組成物であって、該第２の組成物が、該被験体で免疫応答を誘発するための（ｉ）図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の配列からなる免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体、（ｉｉ）アジュバント、および（ｉｉｉ）薬学的に受容可能な賦形剤を含有する、第２の組成物
を備える、キット。
【請求項２３】
前記アジュバントが、前記第２の組成物中で免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体に対する免疫応答を増強し得る１ミクロン未満の水中油型エマルジョンであり、該１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、（ｉ）全体積の１％～１２％の量で存在する代謝可能な油、および（ｉｉ）０．０１重量％～１重量％（ｗ／ｖ）の量で存在し、ポリオキシエチレンソルビタンのモノエステル、ジエステル、もしくはトリエステルおよび／またはソルビタンのモノエステル、ジエステル、もしくはトリエステルを含む乳化剤を含み、該油および該乳化剤が、油滴を有する水中油型エマルジョンの形態で存在し、該油滴の実質的に全ての直径が約１００ｎｍから１ミクロン未満である、請求項２２に記載のキット。
【請求項２４】
前記１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、４～５ｗ／ｖ％スクアレン、０．２５～１．０ｗ／ｖ％モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、および／または０．２５～１．０％トリオレイン酸ソルビタン、ならびに、必要に応じて、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－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（ＭＴＰ－ＰＥ）を含む、請求項２３に記載のキット。
【請求項２５】
前記１ミクロン未満の水中油型エマルジョンが、本質的に、約５体積％のスクアレンならびにモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンからなる群より選択される１種以上の乳化剤からなり、該乳化剤の全存在量が、約１重量％（ｗ／ｖ）である、請求項２３に記載のキット。
【請求項２６】
前記１種以上の乳化剤が、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンであり、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびトリオレイン酸ソルビタンの全存在量が約１重量％（ｗ／ｖ）である、請求項２５に記載のキット。

【請求項２７】
前記第２の組成物がＣｐＧオリゴヌクレオチドをさらに含有する、請求項２３に記載のキット。
【請求項２８】
薬学的に受容可能な賦形剤をカチオン性微粒子に吸着したポリヌクレオチドと組み合わせる工程を包含する、組成物を生成する方法において、該ポリヌクレオチドが、インビボでコード配列の転写および翻訳を指示する制御要素に作動可能に連結されたＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）免疫原をコードするコード配列を含み、さらに、該ＨＣＶ免疫原は、該ポリヌクレオチドがＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体以外のＨＣＶ免疫原をコードしないという条件で、図２Ａ～２Ｃの１９２位～８０９位に示すアミノ酸の連続配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸の連続配列を有する免疫原性ＨＣＶ　Ｅ１Ｅ２複合体である、組成物を生成する方法。
【請求項２９】
脊椎動物被験体の免疫応答を刺激するための請求項１～請求項６のいずれか１項に記載の組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/12510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C07H 21/04; C12N 15/00
US CL : 536/23.72; 435/320.1
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. : 536/23.72, 24.1; 435/320.1; 424/184.1, 192.1, 450, 228.1, 278.1, 283.1

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)
West, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/47551 A (CHIRON CORPORATION) 05 July 2001 (05.07.2001), document.	1-29
Y	WO 03/002065 A (CHIRON CORPORATION) 09 January 2003 (09.01.2003), document, esp., Fig. 2, and claims.	1-29
Y	US 6,210,663 B (ERTL, Hildegund) 03 April 2001 (03.04.2001), abstract, columns 2-3, 10-14.	12-28
A	US 2003/0072764 A (O'HAGAN, Derek) 17 April 2003 (17.04.2003), reference.	1-29
A	US 6,086,901 A (O'HAGAN et al) 11 July 2000 (11.07.2000), reference.	17-20, 22-26
A	WO 02/26209 A (CHIRON CORPORATION) 04 April 2002 (04.04.2002), reference	3-6, 9-11, 22-27
A	US 6,207,646 B (KRIEG et al) 27 March 2001 (27.03.2001), reference.	21, 27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 April 2005 (01.04.2005)

Date of mailing of the international search report
15 APR 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
Zachariah Lucas
Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 47/44	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 47/44		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 37/04	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 37/04		
Ａ６１Ｋ 31/7088	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 31/7088		
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	
Ｃ０７Ｋ 14/18	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ 14/18		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,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,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 オハーガン, デリック
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８, エミリービル, ホートン ストリート ４５６０, カイロン コーポレイション 気付
(72)発明者 ホートン, マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８, エミリービル, ホートン ストリート ４５６０, カイロン コーポレイション 気付
(72)発明者 シン, マンモハン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８, エミリービル, ホートン ストリート ４５６０, カイロン コーポレイション 気付

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA33 CA04 CA05 CA06 DA02 EA04 FA02 FA10 GA11
GA18 HA08 HA14 HA17
4C076 AA17 CC03 CC07 DD09 DD34 DD46 EE24 EE41
4C084 AA13 MA05 MA22 NA14 ZB07 ZB09
4C085 AA03 AA38 BA92 EE06 FF11
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA03 MA05 MA22 NA14 ZB07 ZB09
4H045 AA20 AA30 BA10 CA02 DA86 EA29 EA31 FA72 FA74