

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4991308号
(P4991308)

(45) 発行日 平成24年8月1日 (2012. 8. 1)

(24) 登録日 平成24年5月11日 (2012. 5. 11)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 14/445 (2006. 01)	C O 7 K 14/445 Z N A
C 4 O B 40/10 (2006. 01)	C 4 O B 40/10 Z C C
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19

請求項の数 33 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-544395 (P2006-544395)	(73) 特許権者 593218462 インスティテュート・パスツール I N S T I T U T P A S T E U R フランス国、7 5 7 2 4 パリ・セデュ・ 1 5、リュウ・デュ・ドクトール・ルー、 2 5-2 8
(86) (22) 出願日 平成16年12月15日 (2004. 12. 15)	
(65) 公表番号 特表2008-504005 (P2008-504005A)	
(43) 公表日 平成20年2月14日 (2008. 2. 14)	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2004/014848	
(87) 国際公開番号 W02005/058948	
(87) 国際公開日 平成17年6月30日 (2005. 6. 30)	(74) 代理人 100078662 弁理士 津国 肇
審査請求日 平成19年11月29日 (2007. 11. 29)	
(31) 優先権主張番号 03293158. 6	(74) 代理人 100141357 弁理士 鈴木 音哉
(32) 優先日 平成15年12月15日 (2003. 12. 15)	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人 100075225 弁理士 篠田 文雄
	(72) 発明者 ドリュイル, ピエール フランス国、エフ-7 5 0 1 5 パリ、リ ュ・ルクルブ 2 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) の LSA-5 肝臓期および血中期抗原、この抗原を含有する免疫原性組成物、およびマラリアに対するワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1 6 の L S A - 5 抗原からなる、抗原性ポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 記載のポリペプチドである抗原性部分、および L S A - 5 抗原に対して非相同性である第 2 の部分を含む融合タンパク質から成る抗原性ポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 ~ 2 いずれか一項記載のポリペプチドであり、該ポリペプチドに脂質分子が結合されている、抗原性リポポリペプチド。

【請求項 4】

脂質分子が、C 末端パルミトイルシラアミド残基である、請求項 3 記載のリポポリペプチド。

【請求項 5】

配列

$X_1-E-X_2-X_2-P-E-E-L-X_3-E-X_4-V-I-X_5-E-X_6-X_7-X_2$ (配列番号：1 7)

〔式中、

$X_1 = E、K、または無し；$

$X_2 = V または I ；$

$X_3 = I、V、または R ；$

$X_4 = E$ または K ;
 $X_5 = P$ または A ;
 $X_6 = E、V、$ または K ;
 $X_7 = L$ または I]

からなる、種々の合成ペプチドを含むミクソトープ。

【請求項 6】

それぞれが配列番号：17 に定義された異なる配列からなる、少なくとも 50 個のポリペプチド混合体である、請求項 5 記載のミクソトープ。

【請求項 7】

それぞれが配列番号：17 に定義された異なる配列からなる、少なくとも 100 個のポリペプチド混合体である、請求項 5 記載のミクソトープ。

10

【請求項 8】

それぞれが配列番号：17 に定義された異なる配列からなる、少なくとも 500 個のポリペプチド混合体である、請求項 5 記載のミクソトープ。

【請求項 9】

合成ポリペプチドの少なくとも一部が、脂質分子と結合された、請求項 5 ～ 7 いずれか 1 項記載のミクソトープであるリポミクソトープ。

【請求項 10】

脂質分子が、パルミチン酸である、請求項 9 記載のリポミクソトープ。

【請求項 11】

20

支持体に結合させた、請求項 1 または 2 記載のポリペプチド、請求項 3 または 4 記載のリポポリペプチド、請求項 5 ～ 8 いずれか一項記載のミクソトープ、または請求項 9 または 10 記載のリポミクソトープを含むコンジュゲート。

【請求項 12】

支持体が、ウイルス粒子、またはニトロセルロースもしくはポリスチレンビーズ、またはリポホスホグリカンもしくはポリ-L 乳酸などの生分解性ポリマーである、請求項 11 記載のコンジュゲート。

【請求項 13】

免疫原として、請求項 1 ～ 2 いずれか一項記載のポリペプチド、あるいは請求項 3 または 4 記載のリポポリペプチド、請求項 5 ～ 10 いずれか一項記載のミクソトープもしくはリポミクソトープ、あるいは請求項 11 または 12 記載のコンジュゲートを含む免疫原性組成物。

30

【請求項 14】

免疫原として、請求項 1 ～ 2 いずれか一項記載のポリペプチド、請求項 3 または 4 記載のリポポリペプチド、請求項 5 ～ 10 いずれか一項記載のミクソトープもしくはリポミクソトープ、あるいは請求項 11 または 12 記載のコンジュゲートを含む、マラリアに対するワクチン。

【請求項 15】

LSA-1、LSA-3、LSA-5、SALSA、STARP、TRAP、PfEX P1、CS、MSP-3、P126-SERP-SERA、および GLURP の中から選択される少なくとも 1 種類の抗原を更に含む、請求項 13 記載の免疫原性組成物または請求項 14 記載のワクチン。

40

【請求項 16】

IgG1 または IgG3 クラスの細胞親和性である抗体を惹起するように処方される、請求項 13 または 15 記載の免疫原性組成物、あるいは請求項 14 または 15 記載のワクチン。

【請求項 17】

T リンパ球による IFN γ の分泌を惹起するように処方される、請求項 13 または 15 記載の免疫原性組成物、あるいは請求項 14 または 15 記載のワクチン。

【請求項 18】

50

皮内または筋肉内注射用に処方される、請求項 1 3 ～ 1 7 いずれか一項記載の免疫原性組成物またはワクチン。

【請求項 1 9】

1 回の注射用量に対して $1 \sim 100 \mu\text{g}$ の免疫原を含む、請求項 1 8 記載の免疫原性組成物またはワクチン。

【請求項 2 0】

前赤内期のマラリア原虫感染の予防または治療のための、請求項 1 3 ～ 1 9 のいずれか一項記載の免疫原性組成物またはワクチン。

【請求項 2 1】

血中期のマラリア原虫感染の予防または治療のための、請求項 1 3 ～ 2 0 いずれか一項記載の免疫原性組成物またはワクチン。 10

【請求項 2 2】

S B A S 2 および／またはミョウバン、および／またはモンタニドをアジュバントとして更に含む、請求項 1 3 ～ 2 1 いずれか一項記載の免疫原性組成物またはワクチン。

【請求項 2 3】

少なくとも請求項 1 ～ 2 いずれか一項記載のポリペプチドを含む、マラリアのインビトロ診断のためのキット。

【請求項 2 4】

抗原性ポリペプチドを支持体に結合させる、請求項 2 3 記載のキット。

【請求項 2 5】

抗原性ポリペプチドと生物学的試料中に存在する可能性がある抗体との抗原／抗体複合体の形成を可能にするための試薬、および形成されている可能性がある抗原／抗体複合体のインビトロ検出を可能にする試薬を更に含む、請求項 2 3 または 2 4 記載のキット。 20

【請求項 2 6】

請求項 1 ～ 2 いずれか一項記載の抗原性ポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2 7】

プロモーター配列、および請求項 1 ～ 2 いずれか一項記載の抗原性ポリペプチドをコードする単離された配列を含む、組換えポリヌクレオチド。

【請求項 2 8】

配列番号：1 8 の配列を さらに 含む、請求項 2 6 または 2 7 記載のポリヌクレオチド。 30

【請求項 2 9】

請求項 2 6 ～ 2 8 いずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む、組換えクローニングおよび／または発現ベクター。

【請求項 3 0】

ヌクレオチド配列が、宿主細胞に対して同種または異種の、宿主細胞における発現のためのプロモーターおよび調節エレメントの制御下にある、請求項 2 9 記載の組換えクローニングおよび／または発現ベクター。

【請求項 3 1】

請求項 2 6 ～ 2 8 いずれか 1 項記載の ヌクレオチドを含む DNA ワクチン または請求項 2 9 または 3 0 記載の発現ベクター。 40

【請求項 3 2】

請求項 3 0 記載のベクターにより形質転換された組換え宿主細胞。

【請求項 3 3】

細菌、酵母、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である、請求項 3 2 記載の宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、マラリアに対する保護に関する。より詳しくは、本発明は、スポロゾイト（sporozoite）期、肝臓期、および血中期で発現される、新規な *P. falciparum* 抗原（以下、 50

L S A－5という)の特徴付けに基づく。この抗原は、高度に抗原性であり、そして流行地域で生活する被験者内での抗体の有病率 (prevalence) は極めて高い (約 90%)。以下に記載する結果は、a) L S A－5 は、相当数の免疫処置した霊長類において、高用量の毒性のスποロゾイト期の寄生虫 (人類に対し致死性である種由来) による攻撃感染 (challenge infection) に対し、完全な殺菌性保護を得るために使用され得ること、および b) 自然感染に対する曝露により誘導される抗体は、マラリアに対する保護と非常に強く関連することを示す。したがって、本発明は、新しいポリペプチド分子に関し、そして抗マラリアワクチンおよび該疾患の診断方法における活性な本質 (principle) としてのその使用に関する。L S A－5 を認識する抗体、および抗マラリア治療または診断におけるその使用もまた想定される。

10

【0002】

ヒトにおいてマラリアの原因となる寄生虫は、ヒト宿主内で種々の形態を示し、そして体内でのその位置に応じて種々の抗原を発現する。ヒトにおけるこれらの寄生虫のそのライフサイクルにおける形態および抗原性の違いは、肝臓内および血液中での異なる発育期を規定することを可能にする。スποロゾイトは、媒介動物である蚊により注入される感染性形態であり、宿主の肝細胞内のシゾン (schizont) へと急速に形態変化し、そして、その後、赤血球に感染する。肝臓内の位置の *P. falciparum* は、それ自体をこの発育期に特異的な一群の抗原の発現において示し、そしてこれは、該疾患に晒される自然条件下で高度に免疫原性である。

【0003】

20

前赤内期 (pre-erthrocytic stage) のマラリアに対する完全な殺菌性保護は、試験用宿主およびヒトの両方において、放射線照射したスποロゾイトによる免疫処置により得られうる。長い間「抗スποロゾイト免疫」とみなされてきたものは、実際は、肝臓期 (liver phase) トロフォゾイト (trophozoite) の発生と関連しているようであり、そして「肝臓期依存性免疫」と称するべきである (Druilhe ら, 1998)。

【0004】

本発明者らは、*P. falciparum* 肝臓期の抗原を、ゲノム発現ライブラリー (クローン T 9 ~ 96) をヒト病期限定血清 (25 年間にわたってスποロゾイト接種に曝露したが、まだ連続的クロロキン予防法による血液形態 (blood forms) を発現していない被験者由来) を用いたスクリーニングすることに基づいて同定するための方法形態を開発した。クローンは、29 の遺伝子に割り当てられ、これらは、すべて、曝露された個体に認識される抗原をコードするという興味深い特徴を有する (Druilhe ら, 1998, (Charlotte Gruner, Snounou ら 2003))。このファミリーのクローンの最初のスクリーニングは、a) 様々な種のライフサイクルの異なる期における発現パターンおよび b) スποロゾイト期の *P. falciparum* 野生型単離株間での遺伝子の保存の研究を含んだ。したがって、アフィニティ精製抗体を、各クローンの産生物に対して調製し、そして *P. falciparum*、*P. yoelii*、*P. berghei* およびある程度 *P. vivax* との反応性を、a) スποロゾイト期、b) 肝臓期および c) 血中期にて研究するために使用した。保存の程度は、抗原の発現を、スποロゾイト期のタイ人からの一連の野生型単離株の表面上の同じ抗体を用いて研究することにより評価した。選択したクローンを、更に、その抗原性、免疫原性および予防効果について研究した。これにより、国際公開公報第 92/13884 号に記載の L S A－1 (肝臓期の抗原)、欧州特許第 0,407,230 号に記載の S A L S A (スποロゾイト肝臓期の抗原) ポリペプチド、S T A R P (Fidock, Bottius ら 1994)、および国際公開公報第 96/41877 号に記載の L S A－3 の特徴付けが導かれた。

30

40

【0005】

以下に試験的実施例に記載するように、L S A－5 は最も抗原性および免疫原があり、様々な単離株間で充分保存されており、そして、L S A－3 とともに、*P. falciparum* 攻撃に対して保護の効果を誘導できる非常に数少ない分子の 1 つとして卓越している。更に、保護の代用 (surrogate) は、見かけ上、L S A－5、L S A－3、および放射線照射したスποロゾイトにより誘導される免疫と類似し、これは、3 種類すべてが同様の防御機構

50

を誘導し得ることを示唆する。

【0006】

本発明の第1の目的は、したがって、以下の表1に記載する配列番号：1～14から成る群より選択される少なくとも1つのモチーフ（配列）を含む抗原性ペプチドまたはポリペプチドであって、抗LSA-5特異的抗体によって認識されるペプチドまたはポリペプチドである。配列番号：1～14のモチーフの1つの少なくとも1種類の変異体を含む抗原性ペプチドまたはポリペプチドもまた本発明の一部であるが、これらは、なお抗LSA-5特異的抗体によって認識されるものとし、そして上記変異体が1つの元のモチーフと、そのアミノ酸残基の1個または数個が、他方のモチーフの1個または数個の対応するアミノ酸残基（1個または複数）で置換されているという点で異なるものである。

10

【0007】

しかしながら、配列番号：3または配列番号：4で指定される配列から成るペプチドは、国際公開公報第86/00620号を鑑みて、本発明の範囲から除外する。しかしながら、これらのペプチドは、混合物またはミクストープに含まれ得、本発明の適用にしたがって使用され得る。

【0008】

【表1】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
								I	P
配列番号：1	E	E	Q	I	E	E	V	I	Q
配列番号：2	E	E	I	I	E	Q	V	V	P
配列番号：3	E	E	L	I	E	E	V	V	P
配列番号：4	E	E	I	I	E	E	V	I	P
配列番号：5	E	E	I	V	E	E	V	I	Y
配列番号：6					E	E	V	I	P
配列番号：7	E	E	L	V	E	E	V	I	A
配列番号：8	E	K	L	V	K	E	I	V	P
配列番号：9	E	Q	V	R	E	E	V	<u>I</u>	L
配列番号：10	E	E	I	V	E	E	<u>M</u>	<u>I</u>	P
配列番号：11	E	E	F	V	E	E	V	A	P
配列番号：12	E	V	E	I	E	E	I	I	P
配列番号：13	E	E	L	I	E	E	V	I	P
配列番号：20	E	V	L	V	E	E	A	V	P
配列番号：14	E	E	L	I	E	K	V	I	P

20

30

【0009】

配列番号：1～14のペプチド（モチーフ）および本発明によるその変異体を含む特定の群の配列は、したがって、配列番号：1のペプチド配列、配列番号：6ペプチド配列、ならびに以下のような配列番号：1および配列番号：6と異なるペプチド配列：

- 第2位のアミノ酸が、K、Q、またはVであり、そして／あるいは
- 第3位のアミノ酸が、I、L、V、F、またはEであり、そして／あるいは
- 第4位のアミノ酸が、VまたはRであり、そして／あるいは
- 第5位のアミノ酸が、Kであり、そして／あるいは
- 第6位のアミノ酸が、QまたはKであり、そして／あるいは
- 第7位のアミノ酸が、Iであり、そして／あるいは
- 第8位のアミノ酸が、P、V、またはAであり、そして／あるいは
- 第9位のアミノ酸が、Q、A、またはLである；

40

の点で配列番号：1と異なる変異体、

- 第1位のアミノ酸が、Kであり、そして／あるいは
- 第2位のアミノ酸が、QまたはKであり、そして／あるいは
- 第3位のアミノ酸が、Iであり、そして／あるいは

50

- 第4位のアミノ酸が、P、VもしくはAであり、そして／あるいは
- 第5位のアミノ酸がQ、Y、AもしくはLである；

点で配列番号：6と異なる変異体を含む。

【0010】

かかる特定の群の配列は、上記表1のものの中から選択される少なくとも2個、特に少なくとも4個のペプチドの混合物中に含まれ得る。

【0011】

先に定義したように配列番号：1のモチーフの少なくとも1種類の変異体を含み、抗LSA-5特異的抗体によって認識される抗原性ペプチドまたはポリペプチドは、本発明の特定の1実施態様であり、そして、特に、先に定義したペプチド混合物の調製のために使用される。

10

【0012】

本発明によるペプチド、ポリペプチド、またはリポペプチドは、好ましくは9～150個のアミノ酸、特に12～30個、または40個のアミノ酸、特に18～36個のアミノ酸を含む。

【0013】

本発明はまた、表1に記載する配列番号：1～14から成る群より選択される配列から成るアミノ酸配列を有するペプチドが2個以上、特に3個より多く会合 (association) する結果生じるペプチド混合物に関する。

20

【0014】

特定の実施態様において、上記ペプチド混合物は、少なくとも4個を含むか、またはそれらから成り、そして上記の群から選択される14個までの異なるペプチドを有する。

【0015】

上記ペプチド混合物の別の実施態様において、前記の開示した群から選択されるペプチドは、以下に記載するコンセンサスLSA-5ペプチドと会合する。

【0016】

好ましい実施態様において、ペプチド混合物は、該混合物が患者への投与に使用されるとき、免疫原性となる形態で調製される。したがって、上記混合物は、大集団の患者において使用するために、好都合には、寄生虫においてLSA-5抗原間で観察される相違を代表するものである。

30

【0017】

本発明の別の実施態様では、ペプチド混合物は、2個以上、特に、3または4個より多いペプチド、例えば、表1に記載する配列番号：1～14から成る群より選択される3～14個の異なるペプチド（これには、異なる配列を有する更なるペプチドまたはポリペプチド、例えば、以下に開示するコンセンサスLSA-5ペプチドなどが付加されていてもよい）の組合せの結果生じる組換えポリペプチドによって構成されている。

【0018】

本発明のペプチドまたはポリペプチドは、化学合成によって得られうるか、または組換え発現の産生物であり得る。

40

【0019】

本発明はまた、以下の配列：EEVVEELIEEVIPEELVL（配列番号：15）を有する配列コンセンサスLSA-5ペプチドに関し、これは、脂質分子と結合させてリポペプチドを形成させ得る。かかるコンセンサスリポペプチドの一例は、(EEVVEELIEEVIPEELVL (Plm) - CONH₂)（式中、Plmは、C末端パルミトイルシラアミド (palmitoyllysylamide) 残基である）。

【0020】

本発明の別の態様は、配列番号：16のLSA-5抗原 (DG571の配列) それ自体、および任意の抗原性ペプチドまたはポリペプチドであり、これらは、LSA-5または1個もしくは数個のアミノ酸の付加、欠失、または同類置換によりLSA-5に由来する

50

その変異体を含むが、上記ペプチドまたはポリペプチドは、抗 L S A - 5 特異的抗体によって認識されるものとする。

【0021】

かかる変異体は、例えば、配列番号：16に相当する L S A - 5 抗原の配列との60%を超える、特に62%を超えるか、または65%を超えるか、または更に70%を超える同一性もしくは類似性（すなわち、同類置換）を有するポリペプチドであり、上記の同一性または類似性は、上記両配列を、最適なグローバルアラインメント（global alignment）手順にしたがってアラインメントし、そして公知の方法に依存し、例えば、利用可能なバージョンの B L A S T（例えば、N C B Iにより入手可能なバージョンなど）を用いて比較すると決定される。

10

【0022】

本発明のペプチドまたはポリペプチドは、発現ベクターを用いた細胞内での生物学的合成によって、または、例えば、R.B Merrifield により1963年に記載された固相ペプチド合成（S P P S）方法形態（J.Am.Chem.Soc.85, 2149）に従う化学合成、またはその後の誘導型の1つ（例えば、F m o cもしくはt-B o c 化学反応など）による、いずれかにより得られうる。本発明によるペプチドまたはポリペプチドのいずれかへの脂質分子の条件付きの付加は、例えば、Deprezらにより記載された手法（Deprez, Gras-Masseら 1995）を用いて行い得る。

【0023】

ペプチドまたはポリペプチドが、本発明の意味において「抗 L S A - 5 特異的抗体によって認識される」か否かを調べる試験は、以下のとおりである。ヒト抗 L S A - 5 特異的抗体を以下の材料および方法に記載のようにして得、そして、次いで、上記ペプチドまたはポリペプチドと配列番号：16の L S A - 5 抗原間の競合試験を、得られたヒト抗 L S A - 5 特異的抗体に対するそれらの結合能力を試験することにより行う。あるいは、結合試験は、配列番号：16の L S A - 5 抗原で免疫処置した動物において誘導した抗 L S A - 5 抗体、または直接 E L I S A もしくはウエスタンブロッティング、または試験対象のペプチド、またはポリペプチドの存在下で、L S A - 5 抗原で免疫処置した動物由来のリンパ球を伴う細胞試験を行うことにより免疫精製した抗 L S A - 5 抗体を用いて行い得る。ペプチドまたはポリペプチドが、「抗 L S A - 5 特異的抗体によって認識される」か否かを試験するためのより詳細なプロトコルは、以下の実施例9に記載している。

20

30

【0024】

本発明の他の目的は、前述のような抗 L S A - 5 特異的抗体によって認識されるペプチドまたはポリペプチドである抗原性部分、および L S A - 5 抗原に対して非相同性である第2の部分を含む融合タンパク質である。「L S A - 5 抗原に対して非相同性である」とは、本明細書では、この第2の部分の配列が L S A - 5 に由来しないことを意味する。特に、配列番号：16の配列と40%未満または30%未満の同一性を有する任意の配列が、L S A - 5 に対して非相同性であるとみなされる。かかる融合タンパク質の例を以下に記載するもの、例えば、β g a l - D G 5 7 1、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-L S A - 5、および6-ヒスチジン-テイルとの融合タンパク質（この場合、L S A - 5 がN末端位置にある）などである。もちろん、L S A - 5 部分を含む任意の他の融合タンパク質もまた本発明の一部であるが、「L S A - 5 部分」は、前述のような、L S A - 5 抗原それ自体および L S A - 5 に由来する任意の抗原性ペプチドまたはポリペプチドを示し、抗 L S A - 5 特異的抗体によって認識されるものとすることを理解されたい。

40

【0025】

本発明はまた、L S A - 5 ミクソトープに関する。「ミクソトープ（mixotope）」は、独自の合成によって、1個ではなく数個の異なるアミノ酸を、既に得たペプチド断片に同時に添加し、それにより、得られたペプチドの多様性の制御をもたらすことにより得られたペプチドの収束型（convergent）コンビナトリアルライブラリーである（Gras-Masse, Ameisenら 1992）。特に、本発明による L S A - 5 ミクソトープは、配列：

$$X_1 - E - X_2 - X_2 - P - E - E - L - X_3 - E - X_4 - V - I - X_5 - E - X_6 - X_7 - X$$

50

₂ (配列番号：17)

〔式中、

$X_1 = E、K、または無し；$

$X_2 = VまたはI；$

$X_3 = I、V、またはR；$

$X_4 = EまたはK；$

$X_5 = PまたはA；$

$X_6 = E、V、またはK；$

$X_7 = LまたはI〕$

を有する種々の合成ペプチドを含む。

10

【0026】

本発明のミクソトープは、好ましくは、配列番号：17に相当する異なる配列の少なくとも50個、少なくとも100個または少なくとも500個のペプチド混合体である。可能なすべての組合せが実現され、ミクソトープは、1152個までの異なるペプチドを含む。

【0027】

ペプチドまたはミクソトープの同様のコンビナトリアルライブラリーは、表1の配列1～14によるミクソトープを調製することにより得ることができ、この場合、可能な組合せの各々は、ミクソトープの手法により表1に示すアミノ酸置換にしたがって再現される（表1に列挙されていないが、可能であるものを含む）。

20

【0028】

本発明はまた、リポミクソトープに関し、これは、先に定義したミクソトープにおいて、合成ペプチドの少なくとも一部が脂質分子と結合されたものである。この脂質分子は、例えば、パルミチン酸、または11～25の炭素を有する任意の脂質鎖であり得る。

【0029】

本発明の特定の態様では、抗原性ペプチド、リポペプチド、ポリペプチド、リポポリペプチド、ペプチド混合物、ミクソトープまたはリポミクソトープを支持体に結合させる。したがって、本発明はまた、本発明によるペプチドと、特に、免疫原性が、それぞれ、担体分子およびペプチドにより担持される相補的な反応性基により高められることを可能にする生理学的に許容され得、かつ非毒性の（天然または合成の）担体分子との共有結合により得られるコンジュゲートに関する。天然タンパク質、例えば、破傷風トキソイド、オボアルブミン、血清アルブミン、ヘモシアニン、ツベルクリンPPD（精製したタンパク質誘導体）など、およびウイルス粒子（例えば、B型肝炎ウイルス粒子など）は、本発明によるコンジュゲートの構成に関与する巨大分子担体分子または支持体の考えられ得る例として挙げられ得る。これらのコンジュゲートの好ましい形態は、直径が1ナノメートル～500ナノメートルの不溶性のマイクロ粒子を生成するものである。というのは、かかる不溶性のマイクロ粒子は抗原提示細胞、特に樹状細胞によって優先的に取り込まれ、そして抗原をリンパ球への抗原提示経路に伝える（channel）からである。LSA-5抗原とニトロセルロース粒子またはポリスチレン粒子との結合により得られる微粒子製剤の実用価値は、実施例5に示す。

30

40

【0030】

生分解性ポリマー、例えば、リポホスホグリカン（lipophosphoglycane）（LPG）またはポリ-L乳酸などは、本発明によるコンジュゲートにおける支持体として好都合に使用され得る。

【0031】

合成の巨大分子支持体、例えば、ポリリシンまたはポリ（D-L-アラニン）-ポリ（-リシン）などもまた使用され得る。

【0032】

炭化水素または脂質支持体、例えば、飽和または不飽和脂肪酸、および好ましくはオレイルまたはパルミトレイルタイプの C_{16} または C_{18} 酸もまた、本発明による抗原性ペプチ

50

ドまたはポリペプチドに結合させ得る。したがって、リシン架橋により飽和または不飽和脂質残基に共有結合させたL S A-5に由来するポリペプチドから成るコンジュゲートもまた、より特別には、脂質残基がパルミトイルまたはパルミチルまたはオレイルの場合、本発明の一部を構成する。

【0033】

最後に、および限定を示唆することなく、本発明による抗原またはペプチドは、従来の支持体に結合させ得るか、またはかかる支持体、特に、ニトロセルロース、ラテックス、またはポリスチレンミクロスフェア、またはビーズ上に吸着させ得るか、またはTy1粒子に組み込み得る。

【0034】

本発明によるコンジュゲートを合成するため、ペプチドおよび適切な担体分子を用い、それ自体が公知の方法、例えば、Frantz および Robertson によりInfect.And Immunity, 33, 193-198(1981)に記載されたもの、またはApplied and Environmental Microbiology (1981年10月), 第42巻, No.4, 611-614にP.E.Kauffmanにより記載されたものなどを利用し得る。

【0035】

本発明はまた、免疫原として、先に定義したペプチド、ペプチド混合物、ポリペプチド、特に、組換えポリペプチド、リポペプチド、リポポリペプチド、ミクソトープ、リボミクソトープ、またはコンジュゲートを含む免疫原性組成物に関する。文言の簡略化のため、表現「ペプチドまたはポリペプチド」はまた、以下において、リポペプチド、リポポリペプチド、ペプチド混合物、ポリペプチド（組換えポリペプチドを含む）、ミクソトープおよびリボミクソトープ（支持体に結合させたもの、またはされていないもののいずれも）を示し、これらに適用する。

【0036】

実施例5および6に示すように、L S A-5による免疫処置は、P.yoelii攻撃（マウスにおいて、実施例5参照）およびP.falciparum攻撃（ヨザル属（Aotus）サルにおいて、実施例6参照）に対する保護を誘導し得る。これは、L S A-5が、抗マラリア前赤内期サブユニットワクチンの調製のための優れた候補物質であることを示す。したがって、本発明はまた、マラリアに対するワクチン組成物の調製のための、先の定義に従う免疫原性ペプチドまたはポリペプチドの使用に関する。免疫原として、先に定義したペプチドまたはポリペプチドを含むマラリアに対するワクチンもまた本発明の一部である。

【0037】

実施例8に記載するように、L S A-5と別の抗原との会合、特にL S A-3との会合は、L S A-5の免疫原性の増大をもたらす。したがって、本発明の免疫原性組成物およびワクチンは、Daubersiesら（2000）により記載されたL S A-3抗原、またはL S A-3特異的抗体によって認識されるその変異体を更に含み得る。L S A-5との会合に使用され得るL S A-3の変異体の定義は、国際公開公報第96/41877号の請求項1に規定されるポリペプチド分子に相当する。これらのL S A-3/L S A-5会合体において、該2つの抗原は、実施例8に記載のように、共有結合されていてもよく（例えば、融合タンパク質の場合）、共有結合されていなくてもよい。

【0038】

L S A-5を含む他の抗原会合体もまた、本発明に従って想定される。特に、本発明の免疫原性組成物およびワクチンは、L S A-5に加えて、L S A-1、L S A-3、S A L S A、S T A R P、T R A P、P f E X P 1、C S、M S P-3、P 1 2 6-C E R P-S E R A、およびG L U R Pを含む抗原の群において選択される1種類以上の他の抗原を含み得る。

【0039】

本発明の特定の実施態様において、免疫原性組成物またはワクチンは、皮下、皮内または筋肉内注射用に処方される。皮下注射用に処方される場合、本発明の免疫原性組成物またはワクチンは、好ましくは、1回の注射用量に対して1~100 μgの抗原性ペプチド

10

20

30

40

50

、より好ましくは2～50 μg/用量を含む。

【0040】

もちろん、通常のアジュバント、例えば、ミョウバンおよび/またはモンタニド (Montanide) などを、本発明の免疫原性組成物またはワクチンを添加してもよい。本発明の免疫原性組成物またはワクチンに使用され得る他の可能なアジュバントは、欧州特許第1210250A1号に記載されており、例えば、SB62、SB26およびSBAS2 (AS02) などであり、この後者が特に好ましい。

【0041】

実施例11に示すように、ワクチンの好ましい形態（特に、アジュバントとの組合せが挙げられる）は、単球と協働することができる抗体（特に、細胞親和性クラスに属する抗体、主に、そのFc断片が白血球上のFcγレセプターに結合し得るIgG1およびIgG3）を誘導して血中期の寄生虫を致死させるものである。

【0042】

かかる抗体は、単球依存性であり得、そしてその作用能力は、単球の存在下でP.falciparumインビトロ成長を阻害する抗体の能力を評価するためにデザインされたAntibody Dependent Cellular Inhibition（抗体依存型増殖阻害：ADCI）機構によりアッセイされ得る。ADCI手順は、特に、Bouharoun-Tayoun H.ら、1995; Bouharoun-Tayoun H.ら 1990, Theisen M.ら、2000）に開示されている。かかる抗体はまた、インビボでP.falciparum成長阻害を媒介し得ると考えられており、これは、例えば、P.falciparumに感染させたマウスにおいてアッセイされ得る。

【0043】

以下の実施例4に記載するように、抗LSA-5抗体の受動輸送は、少なくとも肝細胞内への寄生虫侵入を阻害するために有用であり得る。本発明の別の重要な態様は、したがって、配列番号：16のLSA-5抗原を認識する精製したポリクローナル血清またはモノクローナル抗体、および受動免疫療法により、感染した被験者および該疾患の症状を示しているか、または示す被験者を保護するための医薬組成物におけるその使用である。

【0044】

ポリクローナル抗体は、感染した人々の血清からのアフィニティ精製（以下の材料および方法に記載されている）、または当業者に既知の任意の他の方法、例えば、天然または組換えLSA-5タンパク質もしくは本発明によるペプチド、ペプチド混合物、リポペプチド、ポリペプチド、ミクソトープ、またはリボミクソトープ（単独で、または担体分子に結合させるかのいずれかで）、できればアジュバントの存在下で、哺乳動物を免疫処置することのいずれかにより作製され得る。かかるポリクローナル血清を得るためのプロトコルは、一般的なハンドブック、例えば、「Handbook of Experimental Immunology」, 第5版、D.M.Weir, L.A.Herzenberg, C.C.および L.A.Herzenberg編.Black well Scientific Publications, Ltd., Edimburgh, 1997などに記載されている。

【0045】

モノクローナル抗体は、

—細胞と、本発明による抗原の1つで予め免疫処置した動物の脾臓細胞とミエローマ細胞との融合

—上記の両細胞の融合により形成されたハイブリドーマの培養

—上記動物の免疫処置に使用した抗原を認識するモノクローナル抗体を形成し得るハイブリドーマの選択を含む標準的な手順にしたがうハイブリドーマ手法により作製され得る。

【0046】

免疫処置に選択される動物は、例えば、マウスであり得る。

【0047】

これらのモノクローナル抗体のうち、好都合には、細胞親和性モノクローナル抗体、すなわち、そのFc断片がヒト単球のFcγレセプターに結合し得るものが選択される。かかる抗体は、特に、IgG1またはIgG3のクラスのものである。

【0048】

抗体作製の別の手順により、ヒトモノクローナル抗体をインビトロで形成することが可能であり得る。これを行うため、例えば、エプスタイン-バーウイルスで不死化させたBリンパ球が使用される。これらのリンパ球は、P.falciparumに感染したヒトから採取されたものであり得る。この場合、新規な抗原によるインビトロ刺激に頼ることなく、いくつかの抗原に対するモノクローナル抗体を産生させることが可能である。

【0049】

別の可能性としては、前述のような不死化させたBリンパ球と、事前に本発明による抗原（これに対するモノクローナル抗体が、リンパ球の刺激を許容する培養条件下で形成されるのが望ましい）でインビトロ刺激したヒトBリンパ球との融合にある。

10

【0050】

参照として、好都合には、本発明のヒトモノクローナル抗体の調製に関するDesgranges C.ら（1987, J.of Virological Methods, Vol.16, p: 281-292）により記載された手法が好ましい。

【0051】

ヒト組換え抗体はまた、国際公開公報第03/016354号（Nielsen Leif Kofoedら）に記載された方法を用いることにより得られうる。

【0052】

遺伝子組換えによって、抗体の可変部分をコードする遺伝子の細菌を感染させるベクター内へのインビトロトランスフェクションを、ヒト免疫グロブリンの発現を許容する条件下で行うことによりヒトモノクローナル抗体を作製することもまた本発明の枠組み内で想定される。

20

【0053】

最後に、本発明は、任意のタイプのモノクローナル抗体、キメラもしくはハイブリッド、または更にFabまたはFab' 2タイプのポリクローナルもしくはモノクローナル抗体の任意の断片、または抗体の可変鎖の更により小さい断片であって、配列番号：16のLSA-5抗原性ポリペプチドのエピトープに対する同じ親和特性を示すものに関する。

【0054】

本発明による好ましいモノクローナル抗体は、IgG1またはIgG3クラスのヒト抗体、または動物において得られ、ヒトにおいて細胞親和性を有し、そしてその配列を上記に示した抗原の1種類以上に指向される抗体である。

30

【0055】

前述のような抗体を含有するマラリアの受動免疫療法、または予防用の医薬物もまた本発明の一部である。実際、LSA-5抗原は、スポロゾイトの表面に存在し、それにより、抗LSA-5抗体は、スポロゾイトの肝細胞内への浸透を阻害し得る。

【0056】

この医薬物は、LSA-1、LSA-3、LSA-5、SALSA、STARP、TRAP、PfEXP1、CS、MSP-3、P126-CERP-SERA、およびGLURPの中から選択される少なくとも1種類の他の抗原に対して指向される（すなわち、認識する）抗体を更に含み得る。これらの抗体は、抗LSA-5抗体について記載したものと同一プロトコルに従って作製され得る。

40

【0057】

また、本発明者らは、抗LSA-5抗体がまた、血中期のマラリア原虫（Plasmodium）、特にP.falciparum感染の予防のため、または治療用の薬物の調製に有用であり得ることを示した。

【0058】

更にまた、本発明者らは、抗LSA-5抗体が、脳マラリア患者治療用薬物の調製のために使用され得ることを示した。

【0059】

かかる場合において、抗LSA-5抗体は、低分子抗マラリア薬、例えば、キニーネ、

50

アーテスネート、および／またはメフロキンなどに関連させて、またはより一般的には、これらとともに治療に使用され得る。

【0060】

マラリア患者において寄生虫血症を低減させるため、またはマラリアの症状を示すか、もしくはマラリアに感染している可能性がある被験者においてPlasmodium falciparumに対して保護するか、もしくは治療するための方法もまた提供される。かかる方法は、上記被験者に前述のような抗LSA-5抗体を含む医薬物を投与することにある。

【0061】

本発明はまた、P.falciparumに感染している可能性がある個体におけるマラリアのインビトロ診断のための方法に関し、これは、上記個体由来の生物学的試料を、本発明の抗原性ペプチド、ペプチド混合物、またはポリペプチドもしくはミクソトープと、上記抗原性ペプチドまたはポリペプチドと生物学的試料中に存在する可能性がある抗体との抗原／抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させること、および形成されている抗原／抗体複合体のインビトロ検出を含む。この方法を行うために使用され得る生物学的試料の例は、赤血球、白血球、血清、または尿である。抗原／抗体複合体の形成を可能にする条件は、

10

当業者には既知であり、そして例えば、「Handbook of Experimental Immunology」（前出）に見られ得る。

【0062】

上記方法において、インビトロ診断は、例えば、「Handbook of Experimental Immunology」（前出）に記載された条件を用いるELISAアッセイにより行われ得る。

20

【0063】

本発明はまた、生物学的試料（例えば、血液など）に現れる（start from）P.falciparumによる感染に対する患者のワクチン接種をモニターするための手順において：

－P.falciparumに対する保護的抗体を含む生物学的試料を、本発明による少なくとも1種類の抗原に接触させて置くこと

－抗原－抗体反応の検出

を含むことを特徴とする、P.falciparumによる感染に対する患者のワクチン接種をモニターするための手順に関する。

【0064】

30

これらのインビトロ検出方法を行うため、本発明による抗原は、好都合には、放射能マーカー、酵素標識もしくは蛍光標識の補助により、または物理的な（physical）タイプのマーカーさえ補助により標識する。

【0065】

前記の診断およびモニター方法において、生物学的試料を、更に、他の前赤内期の抗原起源および／またはスポロゾイト期の抗原起源の1個または数個の抗原性ペプチド、例えば、LSA-1、LSA-3、SALSA、STARP、TRAP、PfEXP1、CS、MSP-3、P126-CERP-SERA、およびGLURPの中から選択される抗原起源のペプチドと接触させ得る。

【0066】

40

本発明はまた、本発明の抗原に対して指向される抗体の存在のインビトロ検出のための（例えば、マラリアのインビトロ診断のための、またはマラリアに対するワクチン接種をモニターするための）キットにおいて、本発明による少なくとも1個のペプチド、特に、その混合物、またはポリペプチドを、必要であれば、支持体に結合させて含有することを特徴とするキットに関する。

好都合には、かかるキットは、

－本発明による少なくとも1種類の抗原を含む抗原性組成物、および、場合により、

－上記抗原と生物学的試料中に存在する抗体との免疫学的反応を行わせるのに必要な試薬および／または

－免疫学的反応により生成する抗原－抗体複合体の検出を可能にする試薬

50

を含む。これらの試薬は、例えば、標識されているか、または標識された試薬により認識され得る。

【0067】

これらの試薬は、抗原または抗体のいずれかがフルオロフォアで標識されている場合、例えば、基質および／または発色団であり得る。本発明のキットに含まれ得る試薬の例は、「Handbook of Experimental Immunology」（前出）に記載されている。

【0068】

本発明によるキットの具体例は、以下の通りである。

・本発明によるL S A-5由来抗原でプレコートされたプレート（または任意の固相支持体）を含む、抗L S A-5抗体を検出するためのE L I S Aキット。このキットにより、種々の液体（例えば、血液または血清など）中に存在する抗体が、E L I S Aプレート上の抗原との接触後、洗浄し、そしてその体内で上記抗体が追求（seek）される動物種に対して指向される第2の抗体（例えば、抗ヒト二次抗体）を用いた可視化により検出される。上記第2の抗体は、酵素（例えば、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）、または蛍光分子（例えば、フルオレセイン、フィコエリトリン）などで標識されており、これにより、発色、酵素、もしくは蛍光による手段または任意の他の手段による第1の抗体の固定の可視化が可能になる。

【0069】

・上記抗原に特異的な抗体でプレコートされたプレート（または任意の固相支持体）を含む、L S A-5抗原を検出するためのE L I S Aキット。このキットにより、L S A-5抗原を、生体液（例えば、血液、血清、尿など）から捕捉試験において単離すること、およびL S A-5に特異的で標識された第2の抗体により、前記段落に記載した手段のいずれかを用いて、この捕捉を可視化することが可能になる。

【0070】

・L S A-5抗原に特異的な抗体の検出を可能にする免疫獲得（immunocapture）E L I S Aキットであって、プレート（または任意の他の固相支持体）が、その体内で抗L S A-5抗体の検出が追求される動物種由来の免疫グロブリンに特異的な抗体でプレコートされたキット。かかるキットを用い、上記動物種由来の血清をプレート上でインキュベートし、そして、次いで、プレート上に保持された抗体の可視化を、標識されたL S A-5由来ペプチドを用いて前記の記載にしたがって行う。

【0071】

・免疫着色（immunochromatic）キット、または計深棒（dipstick）もまた想定される。かかる「高速キット」は、抗原に結合できる1種類もしくは数種類のモノクローナル抗体、または抗L S A-5抗体に結合できる抗原を含む。

【0072】

・F A C S（蛍光標示式細胞分取器）解析用のプラスチックビーズを含むキット。上記ビーズは、その検出が追求される要素に応じて、L S A-5抗原または抗L S A-5抗体のいずれかでプレコートされている。

【0073】

・抗体または抗原のマイクロアレイ、すなわち、極めて少量の抗体または抗原を、E L I S Aキットに対して前記のものと同様の条件で固定するために処理されたプラスチックまたはガラスの表面。

【0074】

本発明によるキットはまた、好ましくは、その特定な用途のための使用説明書を含む。P. falciparumに感染している個体におけるマラリアのインビトロ診断のための、本発明の別の方法は、前記個体由来の生物学的試料を前述のような抗L S A-5抗体と、上記抗体と生物学的試料中に存在するP. falciparumに特異的な抗原との抗原／抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させること、そして形成されている可能性がある抗原／抗体複合体のインビトロ検出を含む。この方法に使用され得る生物学的試料としては、例えば、血液、赤血球、白血球、血清、および尿が挙げられる。

【0075】

抗LSA-5抗体を含むマラリアのインビトロ診断のためのキットもまた本発明の一部である。かかるキットは、上記抗体と生物学的試料中に存在する可能性があるLSA-5抗原との抗原／抗体複合体の形成を可能にするための試薬、および形成されている可能性がある抗原／抗体複合体のインビトロ検出を可能にする試薬を更に含み得る。

【0076】

本発明の別の態様によれば、マラリアの診断はまた、前述のような抗原性ペプチドまたはポリペプチドを含む免疫原性組成物の皮内注射によりインビボで行われ得る。適切な量の本発明の免疫原性組成物を含む既製のシリンジまたはデバイスもまた本発明の一部である。

10

【0077】

本発明の別の態様は、前述のような抗原性ペプチドまたはポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド配列、ならびにプロモーター配列、およびかかる抗原性ペプチドまたはポリペプチドをコードする配列を含む組換えヌクレオチド配列である。

【0078】

本発明の特定の配列は、配列番号：19のポリペプチド（すなわち、LSA-5抗原の変異体）をコードする配列番号：18の配列を含む。

【0079】

前記のようなヌクレオチド配列を含む組換えクローニングおよび／または発現ベクターもまた本発明の一部である。このベクターにおいて、ヌクレオチド配列は、好ましくは、宿主細胞に対して同種または異種の、宿主細胞における発現のためのプロモーターおよび調節エレメントの制御下にある。

20

【0080】

本発明のベクターは、*Plasmodium falciparum*に対する遺伝子による免疫のための医薬の調製に使用され得る。したがって、本発明はまた、前述のようなヌクレオチド配列を含むDNAワクチンに関する。例えば、VR1020ベクター（VICAL（登録商標））（例えば、（Kang, Calvoら 1998）および（Valenzuela, Belkaidら 2001）に記載）が、直接DNA免疫のための構築物を得るために使用され得る。

【0081】

本発明によるベクターで形質転換された組換え宿主細胞もまた本発明の一部である。この細胞は、例えば、細菌、酵母、および昆虫細胞、または哺乳動物細胞であり得る。

30

【0082】

本発明はまた、免疫原性組成物、ペプチド性ワクチン、または前述のような発現ベクターもしくはDNAワクチンを投与することにより、*P. falciparum*に感染している可能性がある個体に免疫処置を行う方法に関する。当業者は、使用する組成物のタイプに応じて、最良の投与形態を決定することができる。例えば、ペプチド性ワクチンは、皮下注射により投与され得、そしてDNAワクチンは、遺伝子ガンにより投与され得る。例えば、ペプチド性ワクチンは、皮下または筋肉内注射により、適切なアジュバントとともに投与され得、そしてDNAワクチンは、皮内、皮下または筋肉内注射により、針によって、遺伝子ガンによって、または粉末注射（powderject）によって、エンハンシング（enhancing）配列（例えば、CPGなど）とともに、または無しで投与され得る。

40

【0083】

また、本発明のさらなる特徴は、図面とともに説明し、そして本発明の分子の特別な特徴を示した以下の実施例において明らかとなる。

【0084】

以下の実施例は、以下に記載する材料および方法を用いて行った。

【0085】

材料および方法スポロゾイトおよび肝臓形態

*P. falciparum*のスポロゾイトは、感染した*Anopheles gambiae*または*Anopheles dirus*の

50

いずれかから、蚊を、Ponnudurai (Ponnudurai, Lensenら 1989) により記載された NF 54 の培養物由来生殖母細胞で、または 32 例のタイ人患者由来、すなわち、野生型のアジア人の単離株 (Galey, Druilheら 1990) 由来の生殖母細胞で膜上飼育 (membrane feeding) した後に得た。

【0086】

P.yoelii (17XNL株、17XNLクローン1. 1および265BY) ならびにP.berghei (Anka株) のスポロゾイトは、感染したA.stephensiから、蚊を感染性マウス血液飼料で飼育してから、それぞれ14日および18日後に抽出した。

【0087】

スポロゾイトは、無菌的に調製し、記載の0.01%グルタルアルデヒド (Druilhe Pradierら 1986) で速やかに固定し、そしてIFATに使用する前に4℃で保存した。

【0088】

P.falciparum肝臓シズントは、アフリカ人の単離株730XI (Druilhe, Pueblaら 1984) の 10^6 スポロゾイトで感染の5日後のカツラサル (Cebus appela)、またはNF54株 (Meis, Ponnuduraiら 1990) でのスポロゾイト感染後の第6日のチンパンジー (Pan troglodytes) のいずれかの肝臓生検組織から得た。

【0089】

P.yoelii肝臓シズントは、17XNLクローン1. 1の 1×10^6 スポロゾイトでの感染の42時間後のC3H/HeJマウスの肝臓生検組織から得た。

【0090】

ヒト抗LSA-5特異的抗体

ヒト抗体を、組換えタンパク質 β gal-DG 571 (LSA-5) および β gal-DG 662 (PfEMP3) (Gruner, Brahimiら 2001) ならびに β gal-DG 438 (Marchand および Druilhe 1990) において、 β -ガラクトシダーゼに対して反応性であるAbを欠損させた7例のヒト過免疫血清由来の抗体の逐次吸収によりアフィニティ精製した (Brahimi, Perignonら 1993)。簡単には、イソプロピルチオガラクトシド含浸ニトロセルロースフィルター (BA 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) により誘導し、そして更に面に吸着させた組換えタンパク質を、各過免疫血清とともに逐次インキュベートし、そして十分に洗浄した。特異的結合性Abを、0.2M グリシン pH 2.5を用いて回収し、そして、2M Tris pH 11の添加により直ちに中和した。アフィニティ精製したAbを、まずPBS pH 7.4に対して、次いでRPMIに対して、両方の場合において24時間にわたって4℃で透析した。試料を、Centricon 30膜 (Amicon, Millipore, USA) を用い、元の血清20分の1希釈に相当する容量まで濃縮した。また、同様の調製を、GSTおよびHis6組換えLSA-5からも行った。

【0091】

マウス抗LSA-5血清は、 β gal-DG 571で免疫処置したマウスから得た。この試験で使用した血清は、3回目の免疫処置の15日後に回収し、そして使用時まで-80℃で凍結保存したものであった。

【0092】

間接蛍光抗体試験

ヒト抗体および動物抗体とスポロゾイトおよび感染肝細胞との反応性を、抗体を30分間37℃で、i) グルタルアルデヒド固定スポロゾイト、ii) LS 感染肝臓組織の5 μ m切片とともにインキュベートすることにより評価した。次いで、スライドを3回、PBSで洗浄し、そして、更に30分間、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) で標識したヤギ抗ヒトIgG、A、M (Bio-Rad, France)、または抗マウスIgG、A、M (Cappel, Organon Teknika, Belgium) とともに (すべての場合において、1/2000エバンスブルーを加えたPBS中で1/200に希釈した) インキュベートした。肝臓シズントでのIFATによる陽性は、位相差顕微鏡検査およびその後の切片のギムザ染色 (Druilhe, Pueblaら 1984) により確認した。

【0093】

免疫学的疫学的調査

調査対象地域および被験者。本発明者らは、過去に調査した3つの流行地域を当てにし、それにより、抗原間の比較を可能にした(Fidock, Gras-Masseら 1994; Trape, Rogierら 1994; Bottius, BenMohamedら 1996)。個体は、あらゆる年齢群(1~75歳の範囲)を含んだ。ポドル(Podor)村は、セネガル北部に位置し、そしてサハラ砂漠の極めて乾燥した一地域である。蚊によるマラリアの伝染は季節限定的であり、そして伝染は、平均、1年につき1人あたり1箇所の感染性刺傷と推定された(1~5箇所の範囲の感染性刺傷/年)。ドンセ(Donse)は、ブルキナファソ(Burkina Faso)のワガドゥグー(Ouagadougou)の北50 kmのサバンナ地域である。マラリア伝染は、100箇所の感染性刺傷/個体/年に達し(Druilhe, Pradierら 1986)、これは高い数字であるが、アフリカ標準の平均である。

10

【0094】

ディエルモ(Dielmo)村は、セネガルのシンーサロウム(Sine-Saloum)地域に位置する。マラリアの伝染は激しく、年中見られるが、年ごとおよび季節ごとの変動が著しい。蚊による感染性の刺傷の平均は約250/人/年である。

【0095】

組換えタンパク質のイムノブロッティング。組換えタンパク質 β gal-571(LSA-5)および β gal-64(PfEMP3)を、7.5%アクリルアミド上でのドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動およびニトロセルロース膜へのエレクトロブロッティングに供した。LSA-5、およびPfEMP3組換え分子に対するAbの有病率を調べるため、ポドル村からの43例の血清を、1/100希釈で試験し、そしてペルオキシダーゼ標識した第2の抗体により顕在化させた。対照として、健常個体由来の9例の血清を、パラレルで試験した。

20

【0096】

ELISAアッセイ。ELISAは、マイクロタイタープレートを、10 μ g/mlのPBS中のLSA-5-71コンセンサスペプチド(EEVVEELIEEVIP EELVL(P1m)-CONH₂)溶液でコートすることにより行った(図1)。プレートを、0.01% Tween 20を含むPBS中で2回洗浄し、そして1時間、1/100希釈(PBS 0.05% Tween 20(PBST)、1.25%無脂肪乳中)のヒト血清50 μ lを添加する前に2.5%無脂肪乳(Regilait)を補充したPBS中でブロックした。次いで、プレートを、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、結合したIgGを、ペルオキシダーゼ-コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG(H+L)(Byosys, Compiegne, france)(PBST 1.25%無脂肪乳中1/4000希釈で添加)を用いて検出した。室温で1時間のインキュベーションおよび最終洗浄後、H₂O₂およびオルト-フェニレンジアミン(OPD, Sigma, St Louis)を、ペルオキシダーゼの基質として添加した(0.03%、1mg/ml o-フェニレンジアミン、0.1 Mクエン酸塩pH 5.5中)。30分後、450nmにおける吸光度を、Titertek Multiskan MCC/340(Flow Laboratories, France)において読み取った。結果を、試験血清の平均O.D.の、同じプレートにおいてパラレルで試験した10例の健常個体の平均<O.D.+3SDに対する比で示す。結果は、比率>1を陽性とみなす。

30

40

【0097】

肝臓期進展阻害アッセイ(ILSDA)

組換えタンパク質LSA-5-71(DG571)およびDG88(11.1)においてアフィニティ精製したヒト抗体を、ヒトまたはマウス肝細胞の初代培養物内へのP.falciparumおよびP.yoelii侵入に対するその阻害作用について、既報のように試験した(Mellouk, Berbiguierら 1990)。ヒト抗DG671(SALSA)抗体を対照として使用した(Bottius, BenMohamedら 1996)。簡単には、完全培地中に懸濁した肝細胞を、8チャンバLab-Tek プラスチックスライド(Nunc Inc., Napper Ville, IL)内に、10⁵細胞/チャンバの比で播種した。37℃での5%CO₂雰囲気内での24時間のインキュベーション後、培地を除き、そして、Ab 抗DG571、抗DG88または抗SA

50

L S A A bとともに 6×10^4 P.yoeliiまたはP.bergheiスポロゾイト（それぞれ、N F 5 4 株、1 7 X N L クローン 1 . 1 またはA N K A 株）を培養培地中に懸濁したものを、肝細胞培養物に添加した。3 7 °Cで3 時間後、抗体および非侵入スポロゾイトを含有する培地を廃棄し、そして新鮮培地に交換した。ヒト肝細胞を培養の9 6 時間後に、そしてマウス肝細胞は4 4 時間後に、冷メタノール中で1 0 分間固定した。発育中のP.falciparumまたはP.yoeliiの肝臓期を、I F A Tにより、それぞれ、抗L S A 1（D G 5 3 6）A bまたはモノクローナル抗体（M A b）N Y L S 3のいずれかで、記載のようにして（Charoenvit, Melloukら 1995）、Olympus紫外線（U V）顕微鏡を用いたエピ蛍光で同定した。

【0098】

10

種内（inter-species）阻害を評価するため、P.bergheiを用いてパラレル試験を行った。P.bergheiのC Sに対して指向されるM A bを、P.bergheiスポロゾイト侵入の阻害の対照として、およびのP.berghei肝臓シゾントをI F A T染色により記載のようにして（Charoenvit, Melloukら 1995）検出するために使用した。各培養ウェル内の肝臓シゾントの総数を計測し、そして二重培養ウェル内の肝臓シゾントの平均数を計算するために使用した。結果を、（対照における肝臓シゾントの数－試験における肝臓シゾントの数／対照における肝臓シゾントの数） $\times 100$ で計算される阻害のパーセンテージで表示した。

【0099】

スポロゾイト誘導感染に対する抗体によるインビボ受動保護

ヒト親和性精製抗体である抗L S A－5のP.yoeliiの発育に対するインビボでの効果を、既報のように（Brahimi, Badellら 2001）評価した。抗L S A－5－7 1、抗D G－7 2 9（L S A 3）、および対照ヒト抗D G 6 7 1（S A L S A）特異的抗体のいずれか1 0 0 μ g/mlの溶液0 . 2 ml、またはR P M Iを、P.yoeliiのスポロゾイト1 5 0 個に添加した。したがって、マウス1 匹あたりのA bの最終量は、2 0 μ gとした。2つの成分を、B A L B／cマウスの尾静脈へのi.v.接種直前にシリンジ内で混合した。寄生虫血症を、第4日から第2 1 日まで、尾部血液のギムザ染色薄膜（thin）スメアの顕微鏡検査によりモニターした。

20

【0100】

免疫原

免疫原性試験のほとんどは、最初に同定されたクローンL S A－5－7 1を用いて行った。このクローンは、様々なタイプの抗原送達用の多種多様なベクター系において、すなわち、ベクター λ G T 1 1にて発現させた β －ガラクトシダーゼ融合タンパク質として、ベクターP G E Xにて発現させたグルタチオン－S－トランスフェラーゼ融合タンパク質として、ベクターp T C R H i s－6において発現させた6－ヒスチジン－テイルにより、また、2つの異なるタイプのベクター（一方は、本発明者らの研究所においてデザインされたp N A KおよびV i c a l社特許のベクターV R 1 0 2 0）を用いる遺伝子による免疫治療用の多種多様なベクター系において発現させた。研究の一部はまた、 λ G T 1 1またはH i s－テイルベクターのいずれかにおいて発現させた1 1 . 1 抗原クローンD G 8 8を用いて行った。

30

【0101】

40

最後に、免疫処置はまた、リポミクソトープペプチドまたは脂質系成分、すなわちパルミチン酸に結合した配列内に観察される潜在的置換の各々に対応する合成ペプチドのコンビナトリアルライブラリーに相当するコンバトープ（convertope）を用いて行った。イムノアッセイでは、リピート間で最も高頻度に見られる配列を表すコンセンサスペプチド、および比較として1 1 . 1 遺伝子配列由来のP 9 Bペプチドもまた使用した（図1）。

【0102】

マウスにおける免疫処置および攻撃

第1群：C 5 7 B L／6、B A L B／cおよびF 1：（C 5 7 B L／6 x B A L B／c）マウスを、ニトロセルロースのマイクロ粒子上に吸着させた β g a l－D G 5 7 1 1 0 μ gで、第0日に免疫処置し、続いて、第3 0 日、1 0 0 日および第1 7 4 日に組換え

50

タンパク質 5 μ g の 3 回の注射を行った。対照群は、 β gal-DG 671 (SALSA) で上記のようにして免疫処置した。

【0103】

第 2 群：C3H/Hej、BALB/c マウスを、 5.6×10^4 ポリスチレンビーズ (0.5 μ m 径) 上に吸着させた GST-DG 571 50 μ g の高用量で、第 0 日に免疫処置し、続いて、第 15 日および第 36 日に同じ数のポリスチレンビーズに吸着させた組換えタンパク質 25 μ g の 2 回の注射を行った。C3H/Hej 対照マウスは、GST-DG 671 (SALSA) で上記のようにして免疫処置した。

【0104】

P.yoelii スポロゾイト攻撃

10

低用量。最終免疫処置の 1 ヶ月後、C57BL/6、BALB/c および F1 : (C57BL/6 x BALB/c) マウスに 10000 個の生 P.yoelii スポロゾイト (17XNL 株) で攻撃し、そして C3H/Hej マウスは、低用量 (17XNL クローン 1.1 由来 500 個のスポロゾイト) で攻撃した (後眼窩血洞内に注射、これは、尾静脈よりもかなり信頼性が高い)。寄生虫血症を、第 5 日～第 14 日の各マウスからのギムザ染色血液スミアにおいて調べた。保護は、血中期の非存在または対照と比べたときのその出現の有意な遅滞のいずれかで規定し、これは、Sauzet, Perlaza ら 2001 に記載されており、そして現在、A.Hill らにより臨床試験にも適用されている。

【0105】

高用量。この群では、マウスを、100 万個の生 P.yoelii スポロゾイトで i.v. により攻撃した。肝臓を、攻撃の 42 時間～44 時間後に取り出した。各肝臓組織を 4～6 個の小片に切断し、そして直ちにカルノア中で固定した。試料を、5 μ に切断したパラフィン内に包埋し、ヘマトキシリン-エオシンで染色した。

20

【0106】

肝シゾントの数を、各動物から得た感染肝臓組織の種々の試料由来の 100 個以上の切片を観察した後に測定した。同じシゾントを 2 度計測することを回避するため、切片 10 個毎に 1 個だけを調べた。

【0107】

ヨザル属サル免疫処置および攻撃

免疫処置計画。免疫学研究所 (Immunology Institute) の霊長類センター (FUCEP) (バレー大学、Colombia Cali) の Aotus lemurinus griseimembra を使用した。800 g を超えない未処置成体サルのみを試験に含めた。免疫原性および保護に関する結果の解釈上の問題を回避するため、妊娠した雌または過去にマラリアに感染したことのある動物は除外した。

30

【0108】

合計 5 匹の未処置ヨザル属を、アジュバントなしでポリスチレンビーズに吸着させた GST-DG 571-組換えタンパク質 2 μ g で皮下免疫処置した。この低抗原用量は、マウスにおいて LSA3 および LSA-5 の両方の場合で得られた比較データ、およびヨザル属における同用量での LSA3 の場合の結果 (Perlaza, Zapata ら 2003) を考慮して選択した。各動物に 3 用量の免疫原を 21 日間隔で投与した。3 匹のヨザル属には、GST を単独で注射し、抗原対照として使用した。2 匹の更なる未処置サルを感染力対照とした。

40

【0109】

スポロゾイト攻撃。P.falciparum スポロゾイトを、P.falciparum Santa Lucia 株生殖母細胞で感染させたサル由来のマラリア感染血液を含有する人工フィーダーにて飼育した Anopheles albimanus 蚊から得た。スポロゾイトを正常サル血清を含む RPMI 培地中で、蚊の飼育の 14 日後に別途に記載のようにして (Hurtado, Salas ら 1997) 回収した。蚊の唾液腺切開後、スポロゾイトをサル大腿静脈内に注射して攻撃した。免疫処置群および対照群に、P.falciparum Santa Lucia スポロゾイトで感染させた (Hurtado, Salas ら 1997)。各ヨザル属に、スポロゾイト中用量 10^5 を静脈内注射した。2 匹の免疫処置をし

50

ていないヨザル属 (M 2 9 および V 9 7) に対照として 1 回分の (batch) 感染力の同用量のスポロゾイトを投与した。寄生虫血症を、攻撃後、厚膜 (thick) スメア、P C R および寄生虫 L D H (p L D H) 試験により、4 0 日間追跡調査した。寄生虫 / μ l で表示する寄生虫密度を、別途に記載のようにして (Zapata, Perlaza ら 2002) 計算した。寄生虫血症の追跡調査の最後に、動物を、サルファドキシシンとピリメタミンとの併用 (Kinnam on および Rothe 1975; Landgraf, Kollaritsch ら 1994) で処置した。

【0 1 1 0】

I F N - γ 測定。各サル由来の P B M C を、Ficoll Paque (Pharmacia Biotech) での勾配遠心分離により、I F N - γ 産生の測定のために免疫処置前と最終注射の 1 5 日後に単離した。

【0 1 1 1】

抗原 (1 0 μ g/ml) によるインビトロ刺激時、P B M C による I F N - γ 産生を、E l i s p o t により、および細胞培養上清み中の両方で測定した。T 細胞アッセイを、Ficoll Paque (Pharmacia Biotech) にて、これらの小型霊長類 (< 1 kg) 由来の倫理的に許容され得る最大量 (すなわち、第 0 日 (免疫処置前) および 3 回目の免疫処置の 1 5 日後に大腿静脈穿刺により採取した血液 3 ml) の血液から単離されたヨザル属 P B M C を用いて行った。I F N - γ 産生 P B M C の数を、ヒト I F N - γ E L I s p o t 用の市販のキット (MABTECH, Stockholm, Sweden) を用いて評価した。マイクロタイタープレートウェル (Millipore, MAHA S45, Bedford, MA, USA) を、抗ヒト I F N - γ m A b (1-D 1 K MABTECH AB, Sweden) 5 μ g/ml で、一晩 4 $^{\circ}$ C でコートした。R P M I 培地 + 1 0 %

ウシ胎児血清 (F C S) で 2 時間室温でのブロック後、 5×10^5 P B M C / ウェルの懸濁液を、組換えタンパク質または合成ペプチドのいずれか 2 0 μ g/ml と混合した。プレートを、4 0 時間 3 7 $^{\circ}$ C で、5 % C O ₂ - 9 5 % 大気雰囲気中でインキュベートした。P B S - T w e e n - 2 0 (P B S - T) 0 . 0 5 % での洗浄後、ビオチン化抗 I F N - γ m A b (7-B6-1, MABTECH AB, Sweden) を 0 . 3 μ g/ml で添加し、そして一晩 4 $^{\circ}$ C でインキュベートした。ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (Boehringer Mannheim) (1 / 1 0 0 0 希釈) を添加し、そして反応を基質 B C I P / N B T (5-ブromo-2-クロロ-3-インドリルホスファターゼ/ニトロブルーテトラゾリウム) (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.) で顕在化させると、暗青色のスポットの出現がみられた。スポットの数を、立体顕微鏡を用い、2 つの独立した読取装置により測定した ($\times 40$) 。結果を、 10^6 P B M C あたりの I F N - γ スポット形成細胞 (S F C) の平均数で示す。定量上の理由から、免疫処置したヨザル属のうちの 1 匹に由来する細胞は、この手法で試験することができなかった。

【0 1 1 2】

第 5 日に回収した P B M C 上清み中の I F N - γ 濃度を、2 サイト (two-site) 捕捉 E L I S A により、別途に記載のようにして (Benmohamed, Thomas ら 2000)、ヨザル属 I F N - γ と反応できることが確認された抗ヒト I F N - γ m A b の別の組合せを用いて測定した。

【0 1 1 3】

陰性対照および陽性対照 (非刺激細胞および P H A で刺激した細胞) を、各アッセイに含めた。I F N - γ 濃度 (IU/ml) は、各プレートに含まれ、そして既知量の組換えヒト I F N - γ (Pharmingen International, 19751G) から作製される標準的な曲線から計算した。特異性は、試験上清みおよび対照上清み中での濃度を比較することにより測定した。

【0 1 1 4】

L S A - 5 および L S A 3 による併用免疫処置

5 匹の C 3 H マウスから成る群を、a) 3 回、1 ヶ月間隔で、組換え L S A 3 - D G 7 2 9 もしくは組換え L S A - 5 . 7 1 もしくは L S A 3 - D G 7 2 9 + L S A - 5 . 7 1 の混合物のいずれか 5 0 μ g により、または b) 2 回のみ、1 ヶ月間隔で、同じ単独または併用の組換え体により、のいずれかで皮下にて免疫処置した。すべての抗原は、s . c

10

20

30

40

50

．でA S O 2 アジュバントとともに送達した。抗体応答を、組換え体の各々に対する最終免疫処置の3週間後にE L I S Aにより測定した。結果を、免疫処置をしていないC 3 Hマウス由来血清と比べた、1群あたり5匹のマウスでのA b比の平均（+／－S D）で示す。

【実施例1】

【0115】

L S A－5 抗原の部分的特徴付け

最初に同定されたクローンD G 5 7 1は、26年間スポロゾイト攻撃に曝露されたが、連続して毎日クロロキン予防を受けた聖職者の血清のスクリーニングにより同定された最初の119個の前赤内期断片の12個のクローンから成る一群または一ファミリーの一部であることがわかった。これらのクローン間の相同性は、12個のクローン生成物の各々に対するアフィニティ精製抗体を用いた免疫交差反応性によってだけでなく、これらの挿入断片間の交差ハイブリダイゼーションによっても示された。

断片の配列決定により、7個が、P f 1 1．1をコードする遺伝子の様々な領域との有意な相同性（＞60％）を有することが示され、一方、1個は、G L U R Pに属し、そして、残りの4個は、P.falciparumのゲノムに特徴的な反復配列を含有する。クローンD G 5 7 1の配列（399塩基対の挿入断片に相当する）は、9個アミノ酸から成るリピートおよそ15個から構成され、そしてグルタミン酸、イソロイシンおよびバリンを豊富に含むことがわかった（図1）。この理由のため、これは、グルタミン酸を豊富に含む他のP.falciparum抗原（例えば、G L U R PのR 2領域、L S A－3、11．1抗原、P f 3 3 2抗原およびR E S Aなどのリピート領域）との様々な程度の相同性を有する。

【0116】

公表されているゲノムデータの解析では、D G 5 7 1が巨大遺伝子P f 1 1．1に属するか否かに関する明確な結論は得られなかった。実際、いくつかのクローンは、11．1の公表されている配列との100％相同性を有したが、タンパク質レベルでのD G 5 7 1の相同性の程度は、わずかに55％であり（一方、核酸レベルでは87％である）、すなわち、すべてのうちで最も発散性であった。（表2参照）。更に、第10染色体に位置するp F 1 1．1の遺伝子座の配列は完全ではなく、そしてリピートのみで構成される非常に大きな領域について注解するのは困難である。最後に、D G 5 7 1 リピートは、これがD G 5 7 1による保護を誘導することが可能であった（下記参照）が、11．1タイプのリピートによる免疫処置では保護は誘導されなかったもので、固有の免疫学的特性を有するようである。したがって、これが11．1に属するとしても、まだ報告されていない、かなり固有の配列が内部にある。

【0117】

【表2】

抗体	NF 54	スポロゾイト期の野生型単離株												LS	P. yoelii spz	P. berghei spz
		XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	野生型単離株 オマキザル属 デンバンジー	3D7		
抗 LSA-5 Abs.																
◆ ヒト親和性 精製	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
◆ マウスにおいて 生成された	+++	NT	NT	NT	NT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NT	+++	+++	++
対照抗体																
◆ 抗 DG662 (PfEMP3)	+	NT	NT	NT	NT	0	++	++	0	0	+	++	+	+	+	0
◆ 抗 DG438	+	NT	NT	NT	NT	0	++	+	0	0	0	0	+	0	0	0

表2：スポロゾイトおよび肝臓期に対する抗体反応性

【0118】

I F A Tは、ヒト (L S A - 5) 抗 β G a l - D G 5 7 1 (L S A - 5) 免疫精製したマウスを用い、11例のタイ人単離株およびN F 5 4株；

i) スポロゾイト感染後のCebus apella (5日) およびチンパンジー (6日) から得たP. falciparum肝臓期；

ii) ハマダラカ (Anopheles stephensi) の唾液腺から単離したP.yoelii (17XNL) およびP.berghei (ANKA) スポロゾイト

由来のP.falciparumスポロゾイトにおいて行った。ヒト抗 β G a l - D G 6 6 2 (P f M P 3) および抗 β G a l - D G 4 3 8 免疫精製抗体を対照として使用した。

【0119】

マウス血清について、反応性 ≥ 100 を陽性とみなした。アフィニティ精製抗体は未希釈で使用した。したがって、結果は、陰性または陽性で表示する。

【実施例2】

【0120】

L S A - 5は、32例の患者単離株由来のスポロゾイトの表面上および肝臓期に一貫して発現される

L S A - 5 - 7 1に対してアフィニティ精製したヒト抗体は、I F A T (免疫蛍光抗体試験) により、N F 5 4のスポロゾイトの表面と強く反応性であることがわかり、スポロゾイト表面全体において均一に分布された標識で示される。この反応性はまた、12/12タイ人単離株においても検出された (表2)。蛍光のパターンおよび強度は、各株および単離株のスポロゾイトで同じであり、そして同じ試料において試験したヒト抗 D G 7 0 5 (C S遺伝子に対応するクローン) の場合で得られる反応性と同等であった (図2-A)。異なるP.falciparum単離物間でのL S A - 5の抗原性保存を更に評価するため、I F Aを、更に20例のタイ人単離株由来のスポロゾイトを用いて行い、そしてそれらの各々に対する反応性において同じ一貫したパターンを得た (図示せず)。

【0121】

ヒト特異的抗L S A - 5抗体を、I F A T (間接蛍光抗体試験) により、2種類の齧歯類マラリア種P.yoeliiおよびP.berghei由来のスポロゾイトにおいて更に試験した。同様のパターン (スポロゾイトの表面全体に均一な分布を伴う) がこれらの2種の場合でも得られたが、反応性は、P.yoeliiの場合のほうがより強かった (図2-C)。P.yoeliiまたはP.bergheiスポロゾイトのI F A T標識は、対照組換えタンパク質D G 4 3 8に対してアフィニティ精製したヒト抗体を用いても、またはP.bergheiに対するD G 6 6 2 (P f E M P 3) を用いても得られなかった。また、L S A - 5免疫処置マウスにおいて誘導された抗体は、調べたすべての株 (N F 5 4および7例のタイ人単離株) 由来のP.falciparumスポロゾイトと強く反応した。また、ヒト抗L S A - 5抗体との場合で得られるP.yoeliiスポロゾイト (17XNL) に対する交差反応性は、マウス由来の抗L S A - 5抗体を用い、I F A Tにより、試験したすべてのP.yoelii株 (265BY株、17XNL株および17XNLクローン1.1) において検出した。P.yoeliiおよびP.falciparumスポロゾイト抽出物のウェスタンブロッティングにより、195~81 kDa (図示せず) の範囲のいくつかのバンドが得られ、該分子の高G l u富化含量を反映していると考えられる。

【0122】

肝臓期のP.falciparumおよびP.yoeliiにおいて、L S A - 5の発現もまた、ヒト抗体およびマウス抗体を用いて検出することができた (図2-BおよびD)。I F Aによると、L S A - 5は、未成熟肝臓シズント (5日) の寄生虫恐怖症空胞 (parasitophorous vacuole) 内に位置し、そして、L S A 1 (Fidock, Bottiusら 1994)、S A L S A (Bottius, BenMohamedら 1996) およびL S A 3 (Daubersies, Thomasら 2000) と同様、偽胞子虫生殖体 (pseudocytomeres) 間に分布するようである。発現は、チンパンジーにおいて得たN F 5 4株およびこれから誘導した3 D 7クローン、ならびにCebus apellaの感染に用いたアフリカ系単離物の両方に由来する、調べた肝臓シズントすべてにおいて見られた。

10

20

30

40

50

【0123】

無性血中期の*P.falciparum*では、*P. f. 11. 1*で見られるものと類似する交差反応性が、両方タンパク質における高含量の*Glu*富化領域のため、*LSA-5*に対するヒト抗体およびマウス抗体で観察された。対照的に、同じヒト抗体およびマウス抗体は、非同期性物質（すなわち、すべての発育期を含む）を用いると無性血中期の*P.yoelii*と非反応性であることがわかった。

【0124】

*LSA-5*の超微形態的位置は、a) スポロゾイト（図3-AおよびB）（この場合、膜と会合しているが、細胞質内にも豊富にある）、およびb) 完全に成熟した肝臓形態（これは、該タンパク質が、出現している赤血球外メロゾイトを囲む寄生虫恐怖症空胞内に存在する綿毛状または羊毛状物質と会合していることを示した）（図4-A、B、およびC）の免疫金標識により明らかとなった。注目すべきことに、*LSA-5*の標識は、*PVM*（寄生虫恐怖症空胞膜）内で常に見られ、そして、肝細胞細胞質内では全く見られず、肝細胞表面上でも見られなかった。染色の強度は、*IFAT*および*EM*のいずれの場合でも、*LSA-5*は、肝臓でのシゾゴニー（schyzogony）中に活発に合成されることを示す。

10

【0125】

*LSA-5*の期特異的な発現が、上記試験により示された。*LSA-5-71*の、放射線照射したスポロゾイトにより免疫処置し、かつ攻撃時に保護された（したがって、主に、前赤内期の抗原に指向された抗体により）3例のヒトボランティア由来の血清、ならびに2例の他の聖職者の血清（*Pere Mauvais*に加えて*Soeur Neveu*および*Pere Gouel*）およびピリメタミン（スポロゾイトおよび肝臓期に対する*Ab*のみを発生させる）の処置を受けた*P.yoelii*攻撃マウス由来の血清との反応性が確認された（図示せず）。

20

【実施例3】

【0126】

*LSA-5*は、種々のレベルのマラリア伝染に曝露させた個体において高度に抗原性である

ヒトにおける免疫応答の高有病率は、マウスにおける保護が示された後の*LSA-5*の選択および保持の更なる基準の1つであった。

【0127】

30

有病率を、まず、地域的流行が非常に低い（1～5箇所の感染性刺傷／年）地域であるポドル（セネガル）で生活する年齢2～75歳の個体由来の43例の血清を用いた、組換えタンパク質*Bga1-571*（*LSA-5*）のウェスタンブロットにおいて評価した。*LSA-5*に対する*Ab*応答は、試験した個体の91%において検出され（図示せず）、したがって、同じ個体において*PfEMP3*では78%および*SALSA*では80%（*Bo ttius*, *BenMohamed*ら 1996）と比較すると、その抗原性を示す。

【0128】

この初期に示されたことは、2つの高伝染地域（ディエルモ（セネガル）およびドンセ（ブルキナファソ））および低伝染地域（ポドル（北セネガル））で生活する全年齢群の328例の個体由来の血清を用いた、更なる*ELISA*試験により完結した。結果を、表5にまとめる。コンセンサスペプチド571に対する*Ab*応答が、すべての試験群において検出され、抗体応答者の有病率の増加は年齢および地域の関数として、すなわち、寄生虫の曝露および伝染のレベルに依存した（ポドルで51.5%、ドンセで66%、およびディエルモで75.5%）。

40

【0129】

各地域では、若年被験者間で特に検出され得る*Ab*の有病率および力価の両方に年齢依存性の増加があった。5～10歳と比較した場合の0～5歳群における高有病率は、この第2の群が少数であること（8対12）と関連している。地域ごとに、特異的*IgG*の有病率または平均レベルのいずれかとスポロゾイト接種の平均回数との間に関連性があった。図2に示すように、*IgG Ab*応答は、蚊による感染刺傷への曝露とともに増加し、

50

ポドルでは17.5%、ドンセでは33.5%、およびディエルモでは52%と高度に応答した。

【0130】

低伝染地域であるポドルで得られた結果は、この場合も、特異的抗体応答が、非常に少ないマラリア感染性蚊刺傷の後に惹起されたため、天然のLSA-5の高い抗原性を支持した。

【0131】

LSA-5に関して記録された有病率は、したがって、同地域の同被験者で過去に記録された、LSA1 (Fidock, Gras-Masseら 1994)、Salsal (Bottius, BenMohamedら 1996)、Starp (Fidock, Bottiusら 1994)、CS (Bottius, BenMohamedら 1996)、PfEMP3およびEBA175に関するものよりも有意に高い。これらは、LSA3について記録されたもの (Perlaza, Sauzetら 2001) と同程度に高いか、それよりも高い。

【実施例4】

【0132】

抗LSA-5抗体は、肝細胞内へのP. falciparumおよびP. yoelii侵入を、インビトロおよびインビボの両条件下において、強く阻害する

4. 1. インビトロ結果。LSA-5と2種類の齧歯類マラリア寄生虫P. yoeliiおよびP. bergheiとの間に共有されるB細胞エピトープの存在が示されたため、抗LSA-5抗体の、P. yoeliiおよびP. bergheiスポロゾイトによるマウス肝細胞のインビトロ侵入に対する効果を調べた。

【0133】

2種類の齧歯類種を用いた試験をパラレルで行った、すなわち、単一の肝細胞調製物を用いて行った (図6)。LSA-5-71において免疫精製したヒト抗体は、それぞれ、P. yoeliiスポロゾイト侵入の99%阻害およびP. bergheiスポロゾイト侵入の60%阻害を示した。阻害は、抗体を1:1抗原に属する組換えタンパク質DG88において免疫精製した場合、50%であった。非交差反応性抗原SALSAにおいて免疫精製した抗体は、有意な効果を有さなかった (<10%阻害)。

【0134】

抗LSA-5抗体の場合に得られたほぼ完全な阻害は、抗LSA-3 (Bottius, BenMohamedら 1996) の場合で得られるものと類似し、そしてこれまでに得られた中で最も高い。実際、スポロゾイト侵入の阻害は、抗スポロゾイト周囲タンパク質モノクローナル抗体およびSTARP、SALSA、LSA-3に対するヒト抗体を用いて、過去に得られた。しかしながら、抗CS、STARPおよびSALSAでは、阻害は、強い場合もあるが、完全ではなかった。肝臓期に変換できるスポロゾイトが常にある割合で残った。これは、標的抗原に関連する。それは、試験したいかなる抗体濃度 (抗CS Mabに関して1リットルあたり1gもの高い濃度) でも存在したためである。一方、LSA-3およびLSA-5の結果は、アフィニティ精製抗体、すなわち、比較的中程度の抗体濃度 (スポロゾイト表面で1:2~1:100に漸増) (一方、0.5 g/lの抗CS Mabは1×10⁷の力価を有した) を用いてまとめた。

【0135】

ヒト肝細胞内へのP. falciparumスポロゾイト侵入阻害: ヒト親和性精製した抗LSA-5-71およびマウスにおいて生成された抗体 (エンドポイント力価1/50に調整) を、P. falciparumスポロゾイトとともにヒト肝細胞初代培養物に添加した。二重で行った予備試験では、侵入の95%阻害がヒトAbの場合で観察された。抗体の効果の特異性は、阻害作用の復活 (reversion) により、LSA-5-71抗原の10 μg/mlの濃度での添加により確認した。対照ウェルでは、抗原はそれ自体が阻害作用を示さず、また、抗LSA-5-71ヒト抗体に添加すると、観察された侵入阻害が完全に復活し、それにより、阻害作用はパラトープ (抗体抗原結合性部位) によるものであること、すなわち、抗体調製物に関連するいずれかの種類の毒性効果によるものでないことが明白に示された。更に

、抗LSA-5-71抗体を含むウェルでは、残留したスポロゾイトが凝集し（すなわち、抗体によると考えられる）、そして、これは、抗原により逆戻り（reverse）した。マウスにおいて生成された抗体は、ヒト親和性精製抗体よりもはるかに弱い効果を有した（45%）。抗スポロゾイト周囲タンパク質2A10 Mabを陽性対照として用い、そしてスポロゾイトにおいて発現されないDG536（LSA-1）に対する抗体を陰性対照として用いた。これらの結果は最近得られ、そして別の試験で繰り返されるべきであるため、これらは示さない。

【0136】

4. 2. インビボ結果：受動輸送試験。インビトロ侵入阻害を、インビボ試験により確認した。ヒト親和性精製抗DG571抗体を、受動輸送試験において試験した。ヒト抗DG729（LSA3 Nterm）抗体（これについては、P.yoeliiスポロゾイト感染に対する保護的効果が過去に示された）を、パラレルで陽性対照として使用した。1群あたり2匹のマウスを試験した。各群では、マウスに、特異的抗体を併せて混合したスポロゾイトを注射した。陰性対照の群には、スポロゾイトを抗SALSA抗体（P.yoeliiスポロゾイトとは反応しない）と一緒に注射したマウスを含めたが、最後の群のマウスには、寄生虫感染力を確認するためにスポロゾイトを単独で投与した。接種後、第4日から第21日までは、抗LSA-5抗体を投与したマウスにおいて寄生虫は検出され得ず、これは、ヒト抗LSA-5抗体が、マウスをP.yoeliiスポロゾイト感染に対して完全な保護を示した。対照的に、抗SALSA抗体とともにプレインキュベートしたスポロゾイト、または未処置スポロゾイトを投与した対照マウスは、第5日からパテント（patent）の寄生虫血症を有し、そして感染は、通常の過程にしたがった（表3）。P.yoeliiのモノクローナルAb抗TRAPまたは抗CSPを用いて行った受動試験（この場合、大量の抗体を輸送しなければならなかった（それぞれ、500 µg（Gantt, Perssonら 2000）、および1 mg（Charoenvit, Melloukら 1991））とは対照的に、抗LSA-5抗体は、はるかに少ない量（20 µg）で保護的であったことを理解されたい。

【0137】

【表3】

Ab	スポロゾイト		N°感染数／試験数		
	IFAT				
	<i>P.f</i>	<i>P.y</i>	1回目試験	2回目試験	合計
抗-LSA-5	+	+	0/2		0/2
抗-Bgal-DG729	+	+	0/2	0/2	0/4
抗-Bgal-DG671	+	-	2/2	2/2	4/4
なし			2/2	2/2	4/4

表3：受動輸送試験における抗LSA-5Abのインビボ保護的効果。ヒト抗LSA-5、抗βgal-DG729（LSA3）または抗βgal-DG671（SALSA）Ab 100 µg/mlを150個のP.yoeliiスポロゾイトに最終容量200 µl／マウスで添加し、そしてBalb／Cマウスの尾静脈内に注射した。寄生虫血症を、攻撃後、第4日から第21日まで記録した。

【実施例5】

【0138】

LSA-5による免疫処置は、いくつかの系統のマウスにおいてP.yoeliiスポロゾイト攻撃に対する保護を誘導する

低用量スポロゾイト攻撃。第1の試験において、3つの系統のマウス（C57BL／6、BALB／cおよびF1（C57BL／6 x BALB／c））に、βgal-DG571（LSA-5）またはβgal-DG671（SALSA）のいずれかの4回の免疫処置を行い、そして、10,000個のP.yoeliiスポロゾイト（17XNL株）の静脈内接

種により攻撃を与えた。

【0139】

C57BL/6同系交配マウスの4/5(80%)、BALB/cの4/5(80%)および非近交系交配マウスF1:(C57BL/6XBALB/c)14/16(87%)が有意な程度の保護(図7)を示した。

【0140】

5匹のC57BL/6のうち2匹(40%)は、殺菌性保護を有し、一方、2匹の他のマウスでは、対照群のマウスと比べ、寄生虫血症は3日遅滞した(肝内寄生虫負荷の平均99.2%低下に相当)。LSA-5免疫処置したBALB/cマウスの5匹のうち4匹は、部分保護され、寄生虫血症の発現の48時間遅滞を示した。非近交系交配マウス5匹の5匹とも、部分保護を示し、2匹のマウスは3日の遅滞および3匹は、1日の遅滞を示した。第2の試験では、部分保護が、11匹の非近交系交配マウスの9匹(81%)において更に確認され、そして5匹のマウスは3日、4匹は2日遅滞した。対照的に、血液寄生虫血症の発症は、攻撃後第5日に起こり、すなわち、抗原βgal-DG671(SALLSA)で免疫処置したすべての31例の対照マウスおよび20匹の対照の免疫処置をしていないマウスで遅滞はなかった。

【0141】

第3の試験では、5匹のC3H/HeJおよび5匹のBALB/cマウスを、ポリスチレンビーズ上に吸着させたLSA-5組換えGST-DG 571 50μgで免疫処置し、そして、続いて、5 GST 対照とともに、500個の生きたP.yoeliiスポロゾイト(17XNLクローン1.1)(これは、動物1匹あたり100個スポロゾイトの率で一貫して感染性である)で攻撃した。すべての5匹のC3Hおよび5匹のBALB/Cマウスは保護を示し、2匹では完全に、残りの免疫処置マウスでは一部であった。遺伝子による免疫処置を試みたが、9匹の対照に比べ、8匹の免疫処置動物の各々において、明白さ(patency)において、より中程度の24時間の遅滞しかもたらされなかった。

【0142】

一連のLSによる高用量攻撃。続いて、保護率を、高スポロゾイト接種を用いて調べた後、感染肝臓のインサイチュー(in situ)試験を行った。図8に示すように、得られる肝臓シizontの数の大きな低下が、LSA-5で免疫処置した4つのすべての系統のマウスにおいて観察され、対照と比べると、82~98.2%阻害であった。

【0143】

肝臓シizontの数の98.2%減少がBALB/cにおいて得られ、C57BL/6では95%、およびF1:(C57BL/6xBALB/c)マウスでは82%であった。また、完全な保護が、CFAとともにLSA-5-71で免疫処置した2/2 CD1マウスにおいて得られた。これらのレベルの保護は、過去にLSA3免疫処置したマウス(Sauzet, Perlazaら 2001)において得られたものと同程度に高い。

【0144】

インサイチュー観察結果。LSA-5での免疫処置は、高用量攻撃時の肝臓形態の総数の顕著な減少をもたらすだけでなく、肝臓内における寄生虫の周囲での強いインサイチュー細胞防御とも関連した(図9)。健常肝臓形態は、100万個のスポロゾイトを投与した対照F1:(C57BL/6xBALB/c)マウスの肝臓において観察された(図9-A)。逆に、LSA-5で免疫処置した動物では、肝臓はリンパ単核細胞により浸潤され、稀に細胞肉芽腫の存在を伴い、ほとんどリンパ球およびマクロファージから成り、ここでは、無傷の肝臓形態は見られ得なかったが、寄生虫抗原は検出され得た(抗LSA3特異的Abにより顕在化した)(図9-D)。場合によっては、肝臓形態はなお、形態学的に可視的であったが、変形し、そして白血球が浸潤していた(図9-B、C)。

【0145】

P.yoelii低用量攻撃試験は、これを、同時に攻撃した対照抗原または対照アジュバントマウスにおける血液中での寄生虫の出現の再現性、すなわちLS成熟までの時間と対比させることによってのみ解釈され得る。>100匹の対照マウス間では遅滞は観察されない

ことが過去に報告され (Sauzet, Perlazaら 2001)、そして、最近、300匹を超える対照マウスにおいて、最大24時間の遅滞が、症例の3%未満において観察されると計算された。わずかな部分保護が高頻度で得られることは、驚くべきことではなかろう。マウスを、*P. falciparum*分子で免疫処置し、*P. yoelii* (これは相同な交差反応性分子含有する) で攻撃した。これらの2種間で共有されるエピトープの数は減少し、このため、完全な殺菌性保護は、標的抗原が同一でなく、そして限定的なエピトープ類似性のみ含有するため、達成することがより困難になると考えられる。様々な数のスポロゾイトを攻撃に使用した試験では、寄生虫血症における1、2、3日の遅滞が、それぞれ、80、96および99.2%の寄生虫負荷の低下に相当することがわかった (Sauzet, Perlazaら 2001)。高用量攻撃後にインサイチュー評価した保護の程度 (このとき、動物1匹あたりの肝臓形態の総数の実際の低下を正確に測定した) は、実際にこれらの数値と一致する。

【0146】

最近の結果により、LSA-5の非常に高い免疫原性、特に、アジュバントなしの微粒子製剤の高い免疫原性が確認される。2つの血統のマウス、すなわち、C3HまたはBalb/Cにおいて、免疫処置を、アジュバントなしで、LSA-5-DG571タンパク質をコートしたポリスチレンマイクロ粒子の皮下接種により行った。高レベル増殖性応答、抗体応答およびIFN- γ 分泌が、全用量の全動物において、両方の血統のマウスでみられた。図15および16は、特に、Elispotアッセイにより測定されたインターフェロン- γ の分泌を示し、これは、保護の状態と最も相関している。結果は、C3Hと比較した場合、Balb/Cにおける結果のより大きな用量依存性を示す。最高用量では、応答性細胞の数は、PBMC100万個あたり100~250のスポットと非常に高く、571-ヒスチジン組換えタンパク質および/またはコンセンサス571 LSA-5ペプチド、ミクソトープLSA-5に応答し、公表されている11.1配列由来のP9AおよびP9Bペプチドまたは対照抗原 (例えば、LSA-1など) に対してはかなり少なく応答した。

【0147】

最後に、肝臓におけるインサイチュー調査では、LSA-5抗原周囲でのTリンパ球の非常に強い動員が示され、これは、特異的リンパ球がこの位置に移動およびホーム (home) し得ることを示す。

【0148】

結局、これらの結果は、アジュバントなしで、マイクロ微粒子形態で送達される非常に低用量から中用量の抗原非常に強い免疫応答、特に、マウス、非ヒト霊長類またはヒトにおける保護の状態と関連することが過去にわかっているものを誘導し得ることを示す。

【実施例6】

【0149】

ヨザル属サルのアジュバントなしでのLSA-5による免疫処置は、*P. falciparum*攻撃に対する保護を誘導し得ることを示した。

マイクロ粒子に吸着させたDG 571組換えタンパク質で免疫処置した4匹のヨザル属のうち3匹は、Santa Lucia株由来のスポロゾイトでの攻撃後、完全に保護された (図10-C)。対照的に、対照Agで免疫処置した3匹のヨザル属 (図10-A) および2匹の免疫処置をしていない動物 (図10-B) は、パテント*P. falciparum*寄生虫血症 (第0日から第10日に検出可能) を発症した。すべてのヨザル属には、第60日に薬物投与を施した。

【0150】

LSA-5免疫処置した群のうち、3匹のサル (M217、M219およびV86) は、40日の追跡調査期間におけるいずれの時点においても (whatsoever) 寄生虫血症を示さなかったが、残りの1匹 (M221) は、一日だけ (第13日) 明白さ (patency) を示した。対照群および2匹の免疫処置した非保護ヨザル属における寄生虫血症は、71~500の寄生虫/ μ lと中等度であった。すべてのヨザル属には、第60日に薬物投与を施した。

【0151】

結果はなお予備的であるが、それにもかかわらず、これらは、ヨザル属サルにおいて *P. falciparum* スポロゾイト攻撃（この場合、異種株の攻撃による）に対する保護を誘導できるマラリア前赤内期サブユニットワクチン候補物質の第2の報告を表す。この結果は、免疫処置サルにおける LSA-5 の保護的效果を示唆している。

【0152】

他の前赤内期 Ags（例えば、CS または Spf 66 など）を有するヨザル属において行った過去の試行では、これまで、LSA3（Perlaza, Zapata ら 2003）を除き、*P. falciparum* スポロゾイトでの攻撃後に保護を誘導することができなかった。

【0153】

重要なことは、他のマラリアワクチン候補物質で報告されている高い多型性を考慮し、T9-96 クローンに由来する LSA-5 タンパク質により提供される保護を、Santa Lucia 株による攻撃に拡張された。これは、前記の報告された寄生虫単離物間における高い割合での LSA-5 配列保存と一致する。

【実施例7】

【0154】

LSA-5 により誘導される保護は、IFN- γ 応答の増大と関連する

IFN- γ は、ここでは、2つの理由：第1は、これがマラリア肝臓期に対する保護の主要なメディエーターとして確立されているため、そして第2は、これが、増殖性アッセイ（これは、特に、ヨザル属リンパ球の場合、困難である（Perlaza, Zapata ら 2003）より信頼性のあるT細胞活性化の指標であることを考慮した。

【0155】

上清み中の IFN- γ ：すべての LSA-5 免疫処置サル由来の細胞による IFN- γ 産生を、組換えタンパク質 DG-571 により特異的に誘導した（図11）。レベルは、LSA-3 免疫処置動物（Perlaza, Zapata ら 2003）において特異的に産生されるものと同等であった。重要な点としては、PBMC による IFN- γ 分泌もまた、*P. falciparum* スポロゾイト抽出物に反応して誘導され、これは、LSA-5 内の天然のエピトープが、ワクチン刺激細胞によって良好にプロセッシングおよび認識されたことを示す。IFN- γ 産生の特異性は、パラレルで試験した3匹の対照サルから得られた陰性結果によって、および免疫処置前に得た細胞により示された（図示せず）。

【0156】

ELISPOT：3匹の免疫処置したヨザル属の細胞のみを、この手法により研究（定量上の理由から）。IFN- γ 産生細胞の頻度は、 $62 \sim 190 / 1 \times 10^6$ PBMC の範囲であり、組換えタンパク質に対応した（図12）。非保護ヨザル属 M221 のみが LSA-5 に対して最低の応答を示したこと、およびより重要なことには、同じアッセイで使った LSA-5 由来合成ペプチドに対して全く反応しなかったことは、注目に値する。対照的に、研究したその他の2匹の動物は、該ペプチドに対して有意な反応を有した。最後に、LSA-5 特異的 IFN- γ 産生細胞は、3匹の GST-免疫処置対照ヨザル属のいずれにおいても検出されなかった。

【0157】

LSA-5 で免疫処置したすべての3匹の保護ヨザル属は、LSA-5 に対する特異的 T細胞応答を高める（mount）ことができた。非保護動物では、上清み中に有意なシグナルが存在したが、Elispot ではなかった。しかしながら、この動物は、寄生虫血症を1日だけ示したこと、すなわち、一部保護され得たこと、および第2に、IFN- γ 力価は、攻撃の2ヶ月前に測定したことに注目されたい。

【0158】

逆に、特異的 Ab は、ほとんど検出されなかった。Elisa では、これらは、1匹（M217、表4参照）を除き、すべての動物において非存在であり、そして、IFAT では、これらは、有意なレベル（陽性度（positivity）の閾値 $1 / 100$ ）で存在したが、力価は低から中程度であった（ $1 / 200 \sim 1 / 800$ 、表4）。この免疫応答プロフ

10

20

30

40

50

ィール（高い I F N - γ 応答および少ない抗体で構成される）は、保護に関連するプロフ
ィールに典型的である。これは、送達された L S A 3 を用い、同様にして、マウスおよび
ヨザル属の両方において過去に観察され（Perlaza, Zapataら 2003）、そして、遺伝子に
よる免疫処置後にも、マウス（Sauzet, Perlazaら 2001）およびチンパンジーの両方にお
いて観察され、そして、また、アジュバントなしでのリポペプチドの場合に得られたもの
（この場合、強い T 細胞応答が支配的であった（BenMohamed, Gras-Masseら 1997; Perla
za, Arevalo-Herreraら 1998））と非常に近い。

【 0 1 5 9 】

【表 4】

ヨザル属	抗原	ELISA 力価 ^a	Spz IFA 力価 ^{b,c}
V85	GST	<100 ^d	400
	571-GST	<100	
	571 ペプチド	<100	
	P9B ペプチド	<100	
V86	GST	<100	400
	571-GST	<100	
	571 ペプチド	<100	
	P9B ペプチド	<100	
M217	GST	<100	800
	571-GST	350	
	571 ペプチド	<100	
	P9B ペプチド	240	
M219	GST	<100	200
	571-GST	<100	
	571 ペプチド	<100	
	P9B ペプチド	<100	
M221	GST	<100	400
	571-GST	<100	
	571 ペプチド	<100	
	P9B ペプチド	<100	

表 4：抗体応答

a：E L I S A 力価は、3 回目の免疫処置の 1 4 0 日に採取した試料測定した。力価は、
4 5 0 nmでの光学密度を 1 0 匹の対照ヨザル属血清の平均 + 2 S D とした試験血清の希釈
率に相当する。

b：I F A、間接免疫蛍光アッセイ。データは、エンドポイント希釈率の逆数で表示する
。

c：3 回目の免疫処置後、第 4 0 日の血清に対する I F A 力価。

d：希釈率 1：1 0 0 の陰性

【実施例 8】

【 0 1 6 0 】

L S A - 3 および L S A - 5 による同時免疫処置は、両分子が、一緒に提示されたときに
免疫原性となることを示す。

【 0 1 6 1 】

L S A - 5 は、スポロゾイト攻撃に対する保護を誘導できる非常に稀な抗原の 1 つであ
るため、L S A 3 + L S A - 5 の併用免疫処置を行い、そして、同じバッチのマウスにお
ける単独免疫処置と比較した。各組換えタンパク質で個々に免疫処置したマウスでは、最
高用量で強い特異的抗体応答が誘導された。1 μ g という低用量では、両タンパク質は、
なお高度に免疫原性であった（図 1 3）。しかしながら、抗 L S A - 3 A b 力価は、高
用量と比べて有意な相違は認められなかったが、抗 L S A - 5 力価は、3 分の 2 倍、低か
った。両抗原を合わせた場合、すなわち、同じシリンジにて一緒に注射した場合、各々の
免疫原性は低用量であっても温存され、そして、これらのマウスでの各タンパク質に対す
る抗体力価は用量に非依存性であった。特に興味深い点は、低用量の L S A - 3 + L S A

ー5で免疫処置したマウスは、LSA-5単独で免疫処置したマウスよりも、3桁多い抗LSA-5抗体を示した（力価は、高用量で免疫処置したレベルと同様のレベルになった）ことである。この結果は、両抗原を関連させることは、免疫学的レベルで（少なくともAb応答の点で）有益なことを示す傾向にある。というのは、抗LSA-5Ab応答は、とりわけ、共有結合していない場合でも、抗LSA-3特異的応答の補助がある程度有益であり得るためである。

【0162】

本発明者らは、過去に、抗原を組み合わせると、各々の免疫原性が高頻度に低減されることを観察した。例えば、LSA1の免疫原性は、スポロゾイト周囲タンパク質と関連させた場合、顕著に低減した（Londono, Gras-Masseら 1990）。同じことが、RTS'SをTRAPと関連させた場合に起こり、そして、RTS'S単独で見られた保護は消失した。チンパンジーでは、LSA3と、Starp、SalsaまたはLSA1のいずれかとの関連させることにより、LSA3に対するIFN力価の顕著な減少およびLSA3単独により誘導された保護の消失の両方が導かれた（未公表物質）。したがって、LSA3とLSA-5間のマイナスの障害の非存在、および更には記録された免疫原性の増大は、非常に肯定的であり、むしろ例外的な所見である。

【0163】

考察

LSA-5の期特異性は、ヒト抗体、マウス抗体およびヨザル属抗体のスポロゾイト表面および肝臓期に対する反応性により（IFATおよびEMの両方によって）、また、インビトロおよびインビボの両方での侵入阻害により示された。LSA-5の同定を、P.falciparumスポロゾイト表面上のAbによって標的化され得る分子の範囲に拡張する。更に、スポロゾイトおよび肝臓期の両方において発現されるLSA-5は、液性防御機構および細胞性防御機構の両方により標的化され得る。

【0164】

他の前赤内期ワクチン候補物質（例えば、CSPおよびTRAPなど）とは対照的に、LSA-5は、ドミナントエピトープ（dominant epitopes）が、患者の生殖母細胞に由来するスポロゾイト期の32例の単離株において検出され得たため、非常に良好に保存されている。これは、抗原多型性がワクチン開発にとって主な制限となっていることが繰り返し強調されていることから、明らかに重要な特徴である（Facer および Tanner 1997）。攻撃をヨザル属の異種性寄生虫Santa Lucia株を用いて行ったこと、一方、ワクチン製剤がT9-96クローンから得られた遺伝子配列に基づいたものであったこと強調しておくことは重要である。これは、多型性が存在し、保護が限定的であることが既知であり、したがって、攻撃は、同種の株に依存しなければならない（Kwiatkowski および Marsh 1997）他のマラリアワクチン候補物質とは非常に対照的である。

【0165】

該分子の抗原性は、非常に満足のいくものであることがわかった。特異的抗体は、3つの流行地域で高い有病率で検出された。有病率は、他の前赤内期の候補物質（例えば、LSA1、SALSA、STARPおよびCSなど）（Fidock, Bottiusら 1994; Fidock, Gras-Masseら 1994; Bottius, BenMohamedら 1996）（ならびに多くの無性血中期の抗原の場合）と、同程度に高いか、またはこれらよりも高く、これは、調査したマラリア伝染が最も低い地域の場合、特に明白であった。ポドルでの1人あたり平均1～5箇所の感染性の蚊刺傷および各刺傷による平均10個のスポロゾイト送達で、0～5歳および5～10歳の年齢群の応答性小児（したがって、合計で、平均50～250および100～500匹の寄生虫を有する）の割合は、驚くほど高い。調べた3つの異なる地域のデータおよび応答の年齢パターンの比較は、免疫応答が、感染性の蚊刺傷への曝露の関数であることを示す。

【0166】

保護を支持する示唆は、インビトロ試験により、P.yoeliiおよびP.falciparumの両方で、抗体のインビボ受動輸送により、P.yoeliiスポロゾイトで免疫処置したマウスの攻撃に

より、および*P.falciparum*で免疫処置したヨザル属霊長類の攻撃により得られた。

【0167】

インビトロ阻害に関し、そのA g -特異性を、過剰A g 存在下でのA b 効果の復活により確認した。信頼性のある結果をもたらすことができる唯一の宿主細胞であるヒト肝細胞の使用に加え (Mellouk, Berbiguierら 1990)、復活のこの手順は、血液または肝臓形態のいずれかのために行った他の侵入阻害アッセイにおいて、他の研究グループによっては使用されていなかった。しかしながら、これは、その抗原特異性を示すための最も信頼性のある手段である。

【0168】

*P.yoelii*インビボモデルに関し、このモデルの厳格性の高さを主張することは、以下の理由により重要である：i) マウスは、100個程度の少ないスポロゾイト注射により血液感染が誘導され得るため、スポロゾイト感染に高度に感受性である。ii) 免疫処置に使用される組換えタンパク質は、ヒトマラリア*P.falciparum*寄生虫に由来するが、攻撃に使用される寄生虫は、齧歯類*P.yoelii*種である。したがって、観察された保護は、これら2つの種の間で共有される限定的な数のエピトープに依存する。高用量での攻撃後に測定された保護の割合は、寄生虫血症の発症の遅滞に基づいて推定される低下と十分に一致する。更に、インサイチュー調査により、リンパ球動員は、保護を担う主要な防御機構であることが強調された。最近、肝臓におけるエピトープ特異的細胞動員を解析するためにデザインされ、そしてペプチドコートポリスチレンビーズを組換え免疫処置したマウスの門脈内 (intra-portal) に注射する手法が報告された。この手法は、LSA3由来ペプチドを用いて確認され (Hebert, Sauzetら 2003)、保護を誘導し得るか、または誘導し得ない (明確に異なるアジュバントを用いる) いずれかの免疫処置プロトコルにより誘導された細胞動員を比較するために更に使用された。これはまた、LSA-5コンセンサスペプチドでコートされた肝内粒子を投与したLSA-5.71免疫処置マウスにおいて用いられた。これは、試験ビーズ周囲で強いペプチド特異的細胞動員を誘導し、対照ビーズの周囲では誘導しなかった (図示せず)。これは、報告された攻撃寄生虫周囲で見られたものと本質的に類似し (図9-D)、そして、CD3、CD4、CD8、NK細胞およびマクロファージで大半が構成された。抗体は、明白な役割を果たすことがわかったが、これらのインサイチュー調査は、細胞性機構、特に、高レベルのIFN- γ を分泌でき、そして肝内シゾンに対して移動できるT細胞が、最も重要な役割を果たすことを強く示唆する。

【0169】

ヨザル属サルで得られた結果は、LSA-5が、*P.falciparum*スポロゾイト攻撃に対する保護を成し得る非常に稀な候補物質の1つであることを示唆している。実際、マウスにおいて、齧歯類マラリア攻撃、CS、TRAP およびこれら2つの組合せ (最も研究されている) に対する免疫を誘導したいくつかの分子が存在する (Schneider, Gilbertら 1998)。逆に、霊長類またはヒトにおいて、*P.falciparum*攻撃に対する保護的効果を示した分子はほとんどない。これは、これまで、同種および異種の両方の株の攻撃に対するLSA-3およびLSA-5によってのみ達成され、および、より限定的な程度で短時間だが、RTSS (CSの微粒子製剤) によって達成された (Stoute, Slaouiら 1997)。これらの結果は、ヒト高等霊長類において、他の特徴付けされた分子 (同程度の保護を達成することが証明されなかった分子、すなわち、LSA-1、TRAP、SALSA、STARP、PfEXP1、SpF66) の場合で過去に得られたものと対照的である。

【0170】

保護が、非常に低用量の抗原を用いて、任意の強力なまたは毒性のアジュバントの使用を必要としない送達系により得ることができたことは、注目すべきである。この結果は、この形態の免疫処置はマウスにおける過去の試験での保護と関連するT細胞応答を優先的に誘導することがわかっており、そして低免疫処置用量の抗原は、高用量よりもより効果的であることがわかっていたため (Sauzetらの調製物)、予期された。登録可能な霊長類 (稀少かつ貴重で高価な動物) の数のため、統計的有意性を達成することが許容され得な

いが、ヨザル属における *Santa Lucia* 株のスποロゾイトによる攻撃の再現性は、過去に 11 を超える感染において確立され (Zapata, Perlaza ら 2002)、そして、ここで用いた 5 匹の対照および過去の試験で用いた 4 匹 (Perlaza, Zapata ら 2003) で得られた結果により確認される。本発明でマウスおよび霊長類において成功裏に用いられたこの形態の免疫処置は、マウスおよびヨザル属において *LSA-3* の場合で過去に成功裏であることがわかったものと同じであることは、注目に値し、そして両方の種において同様のタイプの応答および保護をもたらした (Perlaza, Zapata ら 2003)。

【0171】

IFN- γ は、*LS* 発達に対して活性な最も強力なサイトカインである (Ferreira, Schofield ら 1986; Mellouk, Maheshwari ら 1987; Schofield, Ferreira ら 1987)。結果は、*PBMC* による特異的 *IFN- γ* 分泌が、前赤内期の *P.falciparum* に対する防御の重要な成分であること確認する傾向にある (少なくとも本発明の試験の *Elispot* により)。スποロゾイト天然のタンパク質に応答して得られた特異的 *IFN- γ* 分泌は、*T* 細胞への提示、すなわち、免疫原適正なコンホメーションのための、天然の、そして「人工」のエピトープの両方の適正なプロセッシングを示唆する。これらの結果は、別のワクチン候補物質 *LSA-3* の場合で、チンパンジーおよびヨザル属の両方において得られた過去のデータと一致する。実際、マウスおよび霊長類の両方において、*LSA-5* 誘導性保護と関連する高い *IFN- γ* および低い抗体応答は、*LSA-3* 試験で過去に記録されたもの (BenMohamed, Gras-Masse ら 1997; Benmohamed, Thomas ら 2000; Daubersies, Thomas ら 2000) と本質的に類似した代用である。これらはまた、放射線照射したスποロゾイトにより免疫処置したマウスおよびチンパンジーにおいて記録されたもの (Druilhe ら、1998, ら *JI*、および未公表物質) と類似する。したがって、3つの状況において保護に利用可能なマーカーには収束性 (convergence) があり、これは、保護が3つの状況において同じ効果または機構に媒介され得るという間接的表示とみなされ得る。

【0172】

ヒトマラリアスποロゾイトによる攻撃の利用可能な形態の制限内で、*LSA-3* および *LSA-5* は、今日、2つの非常に有望な候補物質と思われ、これらは、非常に抗原性の免疫源であり、非毒性であり、そして有効性が示されているが、免疫処置した動物すべてにおけるものではない。併用ワクチンの開発は、臨床前レベルで有効性が証明される可能性がある候補物質 (これは、*LSA-3* および *LSA-5* の両方についていえる) を組み合わせることを示唆する。更に、ここでは、*LSA-3* および *LSA-5* による併用免疫処置が、*LSA-5* 応答の改善をもたらすことが示された。したがって、2つの異なる抗原標的に対する発症を組み合わせることにより、改善された保護が達成され得るか否かを調査することは価値があると考えられる。

【実施例9】

【0173】

ペプチドまたはポリペプチドが抗 *LSA-5* 特異的抗体によって認識されるか否かを試験するための試験プロトコル

典型的な試験プロトコルは *ELISA* アッセイ (例えば、前記の材料および方法に記載したものなど) であり、この場合、試験ペプチドを、この *ELISA* 方法に記載された *LSA-571* コンセンサスペプチドの代わりに使用し、そしてコンセンサスペプチドまたは表 1 に示す任意の他の配列に指向される抗体を、試験ペプチドとのその反応性を試験するために使用する (コンセンサスペプチドに対するヒト親和性精製抗体またはコンセンサスペプチドで免疫処置した動物由来の血清のいずれかを、適切なアジュバント (例えば、モンタニド *ISA720* またはフロイント完全アジュバントなど) とともに用いる)。

【0174】

ペプチドまたはポリペプチドが *LSA-5* 特異的抗体によって認識されるか否かを評価する別の方法は、前記図 13 の開示に関して記載した手順を使用することであり、そしてこのとき、コンセンサスペプチドでのコートを伴い、そして試験ペプチドを、抗体のコンセンサスペプチドに対する結合が阻害され得るか否かを調べるため、様々な濃度 (試験抗

体 1 ml に対して 10 μ g ~ 1 mg の範囲) で混合する競合アッセイにおいて使用する。

【0175】

イムノブロッティング試験においてペプチドをニトロセルロース表面に結合させる場合、または、最終的に、試験ペプチドを前記 ELISA で記載したものと同様の IFAT 阻害アッセイにおいて使用する場合、同じタイプの手順を使用し得、このとき、試験ペプチドを抗コンセンサス配列抗体と混合し、そして IFAT アッセイにおいて寄生虫に対する結合を阻害するために使用する。

【実施例 10】

【0176】

前赤内期に対する保護に関する更なるデータ

10

I. 1-放射線照射したスポロゾイトで免疫処置したヒトボランティアの血清による LSA-3 および LSA-5 の認識

これらの試験は、2つの目的：a) 前赤内期、すなわち、スポロゾイトおよび肝臓期におけるこれらの2つの分子の発現を、前赤内期の *Plasmodium falciparum* を保有しない個体における免疫応答を示すことにより、間接的に確認すること、および b) 他の分子と比較した分子の免疫原性を評価することを達成するために行った。実際、前赤内期の分子に属する 120 個の遺伝子断片間 (約 39 個の遺伝子に相当) では、極めて少数しか、放射線照射したスポロゾイトで免疫処置した個体により発現された免疫応答により認識されなかった (これらの個体は保護されるという事実にもかかわらず)。これは、120 個の遺伝子断片の中から *P. falciparum* の放射線照射したスポロゾイトで免疫処置した個体由来の血清の場合で最も強い最も顕著な陽性度を示した LSA-3 を最初に同定するために実際に使用された手段である。例えば、曝露の天然条件下で免疫原性が強い他の分子 (例えば、LSA-1、SALSA、STARP、PfEXP1、TRAP など) は、放射線照射したスポロゾイト保護されたボランティア由来の血清によって認識されない。これは、また T 細胞レベルでの放射線照射したスポロゾイトで免疫処置し、そしてこれに保護された 4 例の個体由来の細胞を用いて行った *Elispot* アッセイにも該当する。

20

【0177】

ELISA アッセイは、8 例の未処置ボランティア血清 (これは、陽性度の閾値を規定するために使用した) を用いて行った。これは、8 例の陰性対照の平均 OD 値 + 3 標準偏差に相当した。試験血清には、それぞれ、26 年および 21 年間、連続的な毎日のクロロキンによる予防条件下で生活した 2 例の聖職者 (Pere Mauvais および Soeur Neveu) 由来の血清 (彼らは、スポロゾイト表面抗原および肝臓期の抗原に対して非常に強い応答を示したが、血中期分子は、あったとしてもごくわずかであった)、および Naval Medical Research Institute により伝達された (communicate)、一年にわたって数百の放射線照射した蚊による 12 ~ 14 回の免疫処置および半分の免疫処置を受けそして攻撃時に保護されたボランティア由来の 4 例の血清 (血清 VI-4) を含めた。血清は、免疫処置後で攻撃前に回収した。

30

【0178】

随意単位または対照の平均 + 3 SD と比べた試験血清の OD 値の比で表示した主な結果を以下の表にまとめる。

40

【0179】

これらは (表 1) は 2 つの分子、LSA-3 および LSA-5 との特異的抗体反応性を示し、これは、スポロゾイトおよび / または肝臓形態との接触がこれらの 2 つ分子に特異的な抗体を誘導したこと、そして、更に、前記のように、これらの分子は、かかる免疫処置条件下で免疫原性であることを示し、これまでに開発された他の前赤内期の大半のワクチン候補物質 (Circum Sporozoite Protein を含む) と明確に異なる

【0180】

2-抗 LSA-5 応答と野外条件下での感染性蚊刺傷に対する保護との関連性

この試験では、本発明者らは、ディエルモ、セネガルでの設定を用い、この場合、臨床でのマラリアの発症の極めて正確な記録が各居住区への毎日の医師の訪問、医療チームと

50

の終日を通しての連続的接触、寄生虫密度の正確な計測および年齢依存的な発熱発生率の閾値を測定することで得られ、マラリア発症に、任意の発熱エピソード、頭痛またはマラリアに明確に関連する他の症状を正確に割り当てた。

【0181】

抗LSA-5総IgG抗体応答を、ELISAアッセイにより、コンセンサスLSA-5ペプチドをコート抗原（10マイクロG/mlの濃度で使用）としてを用いて測定した。

【0182】

抗体データを、完全治療および感染した蚊刺傷への天然曝露後の血液リポジティブーション（repositivation）の遅滞を統計学的解析により解析した。ディエルモ村のあらゆる年齢群の95例の個体に25mg/kg/日の割合で8日間、キニーネによる完全治療を施し、そして、毎日血液スメアを用い、連続的な天然スポロゾイト攻撃下で血中期における寄生虫の再出現の遅滞を追跡調査した。このパラメータを、以下「リポジティブーションの遅滞」と呼ぶ。

10

【0183】

重要な混乱（confounding）因子、例えば、年齢または鎌形赤血球形質、グルコース-6-ホスフェート欠損によりもたらされる保護などを考慮するため、本発明者らは、多変量段階的回帰分析モデルを用いた。この場合、いくつかの変量の影響は、ソフトウェアを用いて同時に試験した。ヌル仮説の試験は、Fで示される分散比に基づき、そしてヌル仮説からの逸脱は、 $F > 1$ の値を与える傾向がみられた。

【0184】

20

抗LSA-5抗体を、多変量段階的回帰分析においていくつかの変量、すなわち、リポジティブーションの遅滞、年齢、ヘモグロビンタイプ（AAまたはAS）G6PD欠損、脾臓割合、抗血中期のIgG応答とともに解析した場合、唯一の有意な関連は以下のとおりである。

リポジティブーションの遅滞は年齢とともに増加（F比=4.22； $P=0.042$ ）、脾臓割合とともに減少（F比=4.79； $P=0.031$ ）、抗LSA-5応答とともに増加

（F比=4.16； $P=0.044$ ）。

【0185】

換言すると、抗LSA-5抗体は、スポロゾイトの肝臓形態への変換および血液形態の出現に対して、年齢の場合と同程度に強い効果を有した。

30

【実施例11】

【0186】

血中期に対する保護を支持する証拠

1：次いで、本発明者らは、抗LSA-5抗体データを、マラリアの発症とともに解析した。マラリアの発症は、寄生虫の赤血球内侵入期、（血液のサンプリング後の1年間に観察された）、年齢、ヘモグロビン（AAまたはAS）、G6PD欠損、脾臓指数、血中期の抽出物に対する抗体応答による。95例の個体において同じ抗体データを使用し、抗LSA-5抗体と抗LSA-5抗体を測定するために採取した血液試料後の1年間での臨床マラリア発症からの保護との関連性を多変量段階的回帰分析により解析した。

40

【0187】

年齢の関数として減少する（F比=20.72； $P<0.0001$ ）マラリア発症は、ASヘモグロビンを有する被験者においてあまり優勢でなく（F比=8.85； $P=0.0037$ ）、そしてマラリア発症は、抗LSA-5IgG応答の関数として減少した（F比=13.68； $P=0.0004$ ）ことがわかった。

【0188】

このため、抗LSA-5抗体の保護的効果は、鎌形赤血球形質に付与される場合よりも強く、マラリア発症に対する抵抗の主要な遺伝因子の1つとして充分確立される。

【0189】

2：前記のことを更に解析し、そして免疫応答を全血中期抽出物を越えて他のマラリア

50

抗原に含めるため、更なる解析を、155例の個体において行った。該個体では、体内で抗LSA-5抗体、1年間のマラリアの発症、年齢、ヘモグロビンタイプ、G6PD欠損、抗AMA-1 IgG応答、抗MSP-1 IgG応答を得ることができた。

【0190】

この解析でもまた、予期したとおり、マラリア発症が年齢の関数として減少すること（F比=23.43； $P<0.001$ ）、抗MSP-1 IgG力価の関数としてのマラリアの発症が増加傾向にあること（F比=2.85； $P=0.0093$ ）、およびマラリア発症が抗LSA-5 IgG応答の関数として減少すること（F比=18.98； $P<0.0001$ ）が示された。

【0191】

換言すると、この解析は、抗血中期の抽出物抗体、抗AMA-1抗体の保護的効果除外し、ボーダーラインの有意性により抗MSP-1抗体の増加に伴うマラリアのリスクの増加を示し（すなわち、陰性効果）、および抗LSA-5が保護的効果を有することを示した。これは、年齢の場合と同程度の極めて強い効果を示し、これは、他の場所のようにディエルモでマラリア発症に対する保護に対する感受性の状態間での変換の主要な変数であることは、周知である。

【0192】

3 インビトロ試験：寄生虫致死、抗体-単球協働性効果によるエビデンス

上記の免疫学的疫学的試験の観点から、抗LSA-5抗体は、マラリアの発症回数を大きく低下させるという証拠があった。本発明者らは、したがって、抗LSA-5抗体の直接および間接効果を調べた。過去にタイで行った受動輸送で用いたヒト抗体を、組換えDG571に対するアフィニティ精製抗体を調製するために使用した。

【0193】

対応する抗体は、無性血中期の寄生虫増殖に対して直接的な効果を示さない、例えば、赤血球内へのメロゾイト侵入を阻害しないことがわかった。逆に、正常血液単球の存在下では、抗LSA-5抗体が正常血液単球と協働してPlasmodium falciparumのインビトロ成長を低下させる寄生虫致死因子を生成し得ることが観察された。試験は、3回、対照、すなわち、陰性対照IgG、陽性対照アフリカ人IgG（これは、タイの小児に保護を伝播し得る）とともにを行い、そして、同様の結果が各試験において観察された。アフィニティ精製抗体（1：200に滴定、これは、10倍または20倍に希釈して用いた（すなわち、1：20または1：10の最終力価、これは極めて低い抗体濃度））を用い、強い寄生虫致死効果78%（1：20力価で）または45%（1：10力価で）のいずれかが再現可能に得られた。

【0194】

この結果は、抗LSA-5抗体が、抗MSP-3抗体について記載したものの同様のタイプの寄生虫致死効果を有することを示す。

【0195】

4：ディエルモ、セネガルで行った更なる試験は、IgG3-抗LSA-5の役割を示す。

上記の免疫学的疫学およびインビトロデータを考慮し、本発明者らは、保護における様々なサブクラスの役割を調べた。実際、細胞親和性サブクラスの抗体、IgG1およびIgG3のみが、ADCI機構において機能し得る。詳細な試験は、ディエルモの個体138例でのIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4抗LSA-5抗体の量の測定をもたらした。

【0196】

抗LSA-5のIgG3サブクラスのみが、マラリアの発症に反比例することがわかった（標準係数=-0.380； $p=0.0003$ ）。

【0197】

段階的回帰モデルの解析では、マラリアの発症回数とIgG3抗LSA-5抗体の増加との関連が確認され、F比=14.6および α -p値=0.0002であった。

10

20

30

40

50

【0198】

最後に、Nominal Logistic解析を用い、これを再度確認した（LRchi2 10.45； $p=0.001$ ）。

【0199】

5：ディオップ（Ndiope）（セネガル）で行った追加試験

同じ試験を、ディオップ近隣の、伝染が少ない村で、90例の個体（6月齢～92歳）において行った。

【0200】

この場合も、この集団で、マラリア発症に対する保護とIgG3抗LSA-5抗体レベルとの間に極めて強い関連が観察された（F比=27.53； $p>0.0001$ ）が、これは、抗LSA-5応答では見られなかった。

10

【0201】

6：コレ（Kolle）、マリで行った更なる試験

この試験では、マラリア寄生虫の薬物耐性の試験を行うことを主な目的とし、クロロキンに耐性である寄生虫を保有する個体のコホートの半数が、明白な寄生虫血症にもかかわらず、マラリアから回復し得たことが観察された。試験した50例の個体のうち31例は、寄生虫学的観察および臨床的観察の両方にしたがって保護された。寄生虫血症を消失し得た患者は、これを消失し得なかった患者よりもLSA-5に対して有意に高い抗体力価を有し、そして同じことがMSP-3にもあてはまった。両方の場合で、最も強い関連が、IgG3抗LSA-5およびIgG3抗MSP-3についてわかった。寄生虫密度の減少と関連する抗体応答の更なる試験は、IgG3抗LSA-5抗体力価と低い寄生虫密度に対する強い関連を示した：F比=7.06； $p=0.01$ ）。

20

【0202】

7：IgG3抗LSA-5抗体を保有する脳マラリア患者の生存率の改善

217例における東南アジアマラリア患者の（このうち、108例は脳マラリアの発症を、109例は、急性合併症のないマラリアの発症を呈した）間で、寄生虫全抽出物、MSP-3、またはLSA-5に対する抗体力価の差はなかった。これらの結果は、過去に4つの他の脳マラリアコホートで得られた結果と一致する。

【0203】

108例の脳マラリア患者の亜群はすべて、最も有効な薬物の併用、すなわち、アーテスネートとメフロキンを投与した。入院時での抗体力価の解析は、これらの患者に予め存在する抗マラリア抗体力価に応じて、薬物投与した脳マラリアの治療成績に関して有意差を示した。有意な改善がみられた、すなわち、生存率の増加が、高いIgG3抗MSP-3抗体または高いIgG3抗LSA-5抗体を有する個体において見られた（下記参照）。対照的に、他のマラリアワクチン候補物質（例えば、抗SERP-P126または抗AMA-1など）に対する対照抗体は、薬物投与した脳マラリアの治療成績と関連しなかった（これらのマラリアワクチン候補物質に対する抗体力価と関連する改善は見られなかった）。

30

【0204】

したがって、総合すると、研究は、予め存在する抗LSA-5抗体および抗MSP-3抗体では、生存率が改善し、これは、脳マラリアの新規な治療のための道を開くことを強く示唆する、すなわち、薬物投与した脳マラリア患者の生存率を改善するための抗マラリア薬物とLSA-5および／またはMSP-3に対する抗体との関連を強く示唆する。

40

【0205】

結論として、LSA-5は、最も有望なワクチン候補物質の1つと考えられ、2つの主要な標的（一方は前赤内期の、他方は血中期の）を有する。

【0206】

1. LSA-5は、マウス、ヨザル属サル、およびヒトにおいて、スポロゾイト攻撃に対する保護を誘導することができ、そして肝細胞内へのスポロゾイト侵入をブロックする抗体を誘導することができる。

50

【0207】

2. LSA-5は、単球依存性寄生虫致死を、インビトロ条件およびインビボ条件下で、マラリアに晒されたヒトにおいて、多くの異なる設定において、急性合併症のないマラリアおよび合併症のあるマラリアに対して保護する形態で媒介することができる。

【0208】

臨床マラリアが極めて正確に記録された最も詳細な設定の1つにおいて、抗LSA-5応答は、臨床マラリアに対する後天的耐性の主要な、高度に有意な要因の1つのようである。用いた統計学的解析のタイプは、考えられる混乱性因子（このうち、年齢およびヘモグロビンタイプが主要である）を制御し、そして、他の抗体応答（これは、保護と関連しないことがわかっている）と比較した場合、マラリアに対する後天的保護に関するLSA-5に指向される所与の抗体の特異性の影響を明白に示す。

10

【0209】

【表5】

217例の東南アジアマラリア患者の特徴

- 単変量解析により得られた数字：

	平均±SD	95%信頼区間
年齢(歳) =	37,5 ± 14,9	[35,4 – 39,5]
rlgG1-P.f. =	8,915 ± 5,721	[8,149 – 9,681]
rlgG3-P.f. =	13,798 ± 9,204	[12,567 – 15,031]
rlgG1 MSP3-Cterm =	12,097 ± 12,490	[10,426 – 13,769]
rlgG3 MSP3-Cterm =	15,738 ± 16,322	[13,554 – 17,922]
rlgG1 MSP3b =	1,760 ± 1,600	[1,546 – 1,974]
rlgG3 MSP3b =	4,358 ± 4,872	[3,707 – 5,008]
rlgG1 LSA5 =	11,513 ± 5,039	[10,841 – 12,183]
rlgG3 LSA5 =	12,993 ± 11,311	[11,483 – 14,503]

20

30

【0210】

【表 6】

108例の脳マラリア患者と109例の急性マラリアを発症した患者との比較：

	脳マラリア	急性発症
年齢(歳) =	37,8 ± 14,5	37,1 ± 15,4
rlgG1- <i>P.f.</i> =	9,05 ± 5,68	9,97 ± 5,99
rlgG3- <i>P.f.</i> =	14,59 ± 9,52	13,72 ± 9,09
rlgG1 MSP3-Cterm =	12,65 ± 13,23	12,61 ± 12,50
rlgG3 MSP3-Cterm =	15,85 ± 15,31	17,21 ± 18,37
rlgG1 MSP3b =	1,72 ± 1,46	1,93 ± 1,85
rlgG3 MSP3b =	4,62 ± 5,08	4,35 ± 4,93
rlgG1 LSA5 =	11,66 ± 5,10	11,76 ± 4,95
rlgG3 LSA5 =	14,59 ± 10,52	12,80 ± 12,32

10

脳マラリア患者と急性マラリアを発症した患者との間に年齢または抗体応答における検出可能な差を示す主な数字は確認されなかった(単変量分析により検定した場合)。

20

【 0 2 1 1 】

【表 7】

108例の脳マラリア患者の亜群において治療成績に関して得られたデータの比較*：

	死亡率 (N= 33)	生存率 (N= 75)	Mann-Whitney U-検定
年齢 =	40,6 ± 14,8	36,5 ± 14,3	$p = .087$
rlgG1- <i>P.f.</i> =	7,69 ± 4,96	9,70 ± 6,01	
rlgG3- <i>P.f.</i> =	12,31 ± 9,44	15,52 ± 9,33	$p = .052$
rlgG1 MSP3-Cterm =	8,88 ± 6,78	14,11 ± 14,89	
rlgG3 MSP3-Cterm =	10,04 ± 10,43	18,17 ± 16,36	$p = .003$
rlgG1 MSP3b =	1,42 ± 0,65	1,84 ± 1,67	
rlgG3 MSP3b =	2,73 ± 1,59	5,40 ± 5,80	$p = .002$
rlgG1 LSA5 =	11,46 ± 5,87	11,76 ± 4,91	
rlgG3 LSA5 =	11,10 ± 8,65	16,04 ± 10,94	$p = .0155$

30

40

(*患者は有意に異なる治療を受けなかった)

平均年齢が若干上がる傾向が、症状悪化を伴う患者で観察された

【 0 2 1 2 】

—多変量解析で得られた表示

年齢を調整した場合、脳マラリアのリスク (急性合併症のないマラリアの場合との比較) は、rlgG3-LSA5 応答が高い場合、低下が見られた：

L-R カイ二乗 = 7, 65 ; $p = .0057$ 。

50

【0213】

治療成績（死亡対生存）を、次いで、脳マラリア患者の亜群において、年齢および抗体応答の両方に関して試験した。

【0214】

治療成績は有意に改善された（生存者の存在の増加が見られた）、このとき、r I g G 3 - M S P 3 - C r t e r m または r I g G 3 - M S P 3 b または r I g G 3 - L S A - 5 が上昇した。

【0215】

高い I g G 3 特異的応答の相対的な「利益」（＝死亡者の存在の減少）（抗体応答は、個々に試験した）以下のとおりである

I g G 3 - M S P 3 - C r t e r m では L - R カイ二乗 = 7.41 ; p = .0065

I g G 3 - M S P 3 b では L - R カイ二乗 = 10.70 ; p = .0011

I g G 3 - L S A - 5 では L - R カイ二乗 = 6.047 ; p = 0.0139

【0216】

【表8】

試験血清	LSA-3 NR2	LSA-5 (His-6-5.71)
Père Mauvais	2,8	1,9
Sœur Neveu	1,8	1,95
Irr-spz.V.1	3,8	3,0
Irr-spz.V.2	2,6	1,65
Irr-spz.V.3	3,4	1,48
Irr-spz.V.4	2,3	2,2

表I

【0217】

10

20

30

【表 9】

参考文献

- BenMohamed, L., H. Gras-Masse, et al. (1997). "Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees." Eur J Immunol **27**(5): 1242-53.
- Benmohamed, L., A. Thomas, et al. (2000). "High immunogenicity in chimpanzees of peptides and lipopeptides derived from four new *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic molecules." Vaccine **18**(25): 2843-55. 10
- Bouharoun-Tayoun H et al , 1990J. Exp. Med. December 1990 1633-1641.
- Bouharoun-Tayoun H et al, 1995 J.Exp.Med. August 1995 409-418
- Bottius, E., L. BenMohamed, et al. (1996). "A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and CTL epitopes." J Immunol **156**(8): 2874-84. 20
- Brahimi, K., E. Badell, et al. (2001). "Human antibodies against *Plasmodium falciparum* liver-stage antigen 3 cross-react with *Plasmodium yoelii* preerythrocytic-stage epitopes and inhibit sporozoite invasion in vitro and in vivo." Infect Immun **69**(6): 3845-52.
- Brahimi, K., J. L. Perignon, et al. (1993). "Fast immunopurification of small amounts of specific antibodies on peptides bound to ELISA plates." J Immunol Methods **162**(1): 69-75. 30
- Charlotte Gruner, A., G. Snounou, et al. (2003). "Pre-erythrocytic antigens of *Plasmodium falciparum*: from rags to riches?" Trends Parasitol **19**(2): 74-8.
- Charoenvit, Y., S. Mellouk, et al. (1991). "Monoclonal, but not polyclonal, antibodies protect against *Plasmodium yoelii* sporozoites." J Immunol **146**(3): 1020-5.
- Charoenvit, Y., S. Mellouk, et al. (1995). "*Plasmodium yoelii*: 17-kDa hepatic and erythrocytic stage protein is the target of an inhibitory monoclonal antibody." Exp Parasitol **80**(3): 419-29. 40

- Daubersies, P., A. W. Thomas, et al. (2000). "Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3." Nat Med **6**(11): 1258-63.
- Deprez, B., H. Gras-Masse, et al. (1995). "Pimelautide or trimexautide as built-in adjuvants associated with an HIV-1-derived peptide: synthesis and in vivo induction of antibody and virus-specific cytotoxic T-lymphocyte-mediated response." J Med Chem **38**(3): 459-65. 10
- Druilhe, P., O. Pradier, et al. (1986). "Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection." Infect Immun **53**(2): 393-7.
- Druilhe, P., R. M. Puebla, et al. (1984). "Species- and stage-specific antigens in exoerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*." Am J Trop Med Hyg **33**(3): 336-41. 20
- Facer, C. A. and M. Tanner (1997). "Clinical trials of malaria vaccines: progress and prospects." Adv Parasitol **39**: 1-68.
- Ferreira, A., L. Schofield, et al. (1986). "Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon." Science **232**(4752): 881-4.
- Fidock, D. A., E. Bottius, et al. (1994). "Cloning and characterization of a novel *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigen, STARP." Mol Biochem Parasitol **64**(2): 219-32. 30
- Fidock, D. A., H. Gras-Masse, et al. (1994). "*Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1 is well conserved and contains potent B and T cell determinants." J Immunol **153**(1): 190-204.
- Galey, B., P. Druilhe, et al. (1990). "Evidence for diversity of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens derived from analysis of antibodies elicited in humans." Infect Immun **58**(9): 2995-3001. 40

- Gantt, S., C. Persson, et al. (2000). "Antibodies against thrombospondin-related anonymous protein do not inhibit Plasmodium sporozoite infectivity in vivo." Infect Immun **68**(6): 3667-73.
- Gras-Masse, H., J. C. Ameisen, et al. (1992). "Synthetic vaccines and HIV-1 hypervariability: a "mixotope" approach." Pept Res **5**(4): 211-6.
- Gruner, A. C., K. Brahimi, et al. (2001). "The Plasmodium falciparum knob-associated PfEMP3 antigen is also expressed at pre-erythrocytic stages and induces antibodies which inhibit sporozoite invasion." Mol Biochem Parasitol **112**(2): 253-61. 10
- Hebert, A., J. P. Sauzet, et al. (2003). "Analysis of intra-hepatic peptide-specific cell recruitment in mice immunised with Plasmodium falciparum antigens." J Immunol Methods **275**(1-2): 123-32.
- Hurtado, S., M. L. Salas, et al. (1997). "Regular production of infective sporozoites of Plasmodium falciparum and P. vivax in laboratory-bred Anopheles albimanus." Ann Trop Med Parasitol **91**(1): 49-60. 20
- Kang, Y., P. A. Calvo, et al. (1998). "Comparison of humoral immune responses elicited by DNA and protein vaccines based on merozoite surface protein-1 from Plasmodium yoelii, a rodent malaria parasite." J Immunol **161**(8): 4211-9.
- Kinnamon, K. E. and W. E. Rothe (1975). "Biological screening in the U.S. Army antimalarial drug development program." Am J Trop Med Hyg **24**(2): 174-8. 30
- Kwiatkowski, D. and K. Marsh (1997). "Development of a malaria vaccine." Lancet **350**(9092): 1696-701.
- Landgraf, B., H. Kollaritsch, et al. (1994). "Plasmodium falciparum: susceptibility in vitro and in vivo to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Ghanaian schoolchildren." Trans R Soc Trop Med Hyg **88**(4): 440-2.
- Londono, J. A., H. Gras-Masse, et al. (1990). "Secondary structure and immunogenicity of hybrid synthetic peptides derived from two 40

- Plasmodium falciparum pre-erythrocytic antigens." J Immunol **145**(5): 1557-63.
- Marchand, C. and P. Druilhe (1990). "How to select Plasmodium falciparum pre-erythrocytic antigens in an expression library without defined probe." Bull World Health Organ **68 Suppl**: 158-64.
- Meis, J. F., T. Ponnudurai, et al. (1990). "Plasmodium falciparum: studies on mature exoerythrocytic forms in the liver of the chimpanzee, Pan troglodytes." Exp Parasitol **70**(1): 1-11. 10
- Mellouk, S., N. Berbiguier, et al. (1990). "Evaluation of an in vitro assay aimed at measuring protective antibodies against sporozoites." Bull World Health Organ **68 Suppl**: 52-9.
- Mellouk, S., R. K. Maheshwari, et al. (1987). "Inhibitory activity of interferons and interleukin 1 on the development of Plasmodium falciparum in human hepatocyte cultures." J Immunol **139**(12): 4192-5. 20
- Perlaza, B. L., M. Arevalo-Herrera, et al. (1998). "Immunogenicity of four Plasmodium falciparum preerythrocytic antigens in Aotus lemurinus monkeys." Infect Immun **66**(7): 3423-8.
- Perlaza, B. L., J. P. Sauzet, et al. (2001). "Long synthetic peptides encompassing the Plasmodium falciparum LSA3 are the target of human B and T cells and are potent inducers of B helper, T helper and cytolytic T cell responses in mice." Eur J Immunol **31**(7): 2200-9. 30
- Perlaza, B. L., C. Zapata, et al. (2003). "Immunogenicity and protective efficacy of Plasmodium falciparum liver-stage Ag-3 in Aotus lemurinus griseimembra monkeys." Eur J Immunol **33**(5): 1321-1327.
- Ponnudurai, T., A. H. Lensen, et al. (1989). "Infectivity of cultured Plasmodium falciparum gametocytes to mosquitoes." Parasitology **98 Pt 2**: 165-73.
- Sauzet, J. P., B. L. Perlaza, et al. (2001). "DNA immunization by Plasmodium falciparum liver-stage antigen 3 induces protection against Plasmodium yoelii sporozoite challenge." Infect Immun **69**(2): 1202-6. 40

Schneider, J., S. C. Gilbert, et al. (1998). "Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara." Nat Med 4(4): 397-402.

Schofield, L., A. Ferreira, et al. (1987). "Interferon-gamma inhibits the intrahepatocytic development of malaria parasites in vitro." J Immunol 139(6): 2020-5.

10

Stoute, J. A., M. Slaoui, et al. (1997). "A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group." N Engl J Med 336(2): 86-91.

Theisen, M. et al 2000, Vaccine Sep 15; 19(2-3):204-12

Trape, J. F., C. Rogier, et al. (1994). "The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal." Am J Trop Med Hyg 51(2): 123-37.

20

Valenzuela, J. G., Y. Belkaid, et al. (2001). "Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein." J Exp Med 194(3): 331-42.

Zapata, J. C., B. L. Perlaza, et al. (2002). "Reproducible infection of intact Aotus lemurinus griseimembra monkeys by Plasmodium falciparum sporozoite inoculation." J Parasitol 88(4): 723-9.

30

【図面の簡単な説明】

【 0 2 1 8 】

【図 1】 D G 5 7 1 のペプチド配列（配列番号：16）および誘導されるペプチド。

【図 2】 前赤内期の P. falciparum および P. yoelii の間接免疫蛍光。（A）非固定 N F 5 4 スポロゾイトの、および（B）P. falciparum の肝臓シゾンにおけるヒト親和性精製単一特異的抗 L S A - 5 . 7 1 による免疫蛍光。（C、D）同じ抗体で標識した 1 7 X N L スポロゾイトおよび P. yoelii 由来肝臓シゾンにおける I F A T。

【図 3】 P. falciparum N F 5 4 スポロゾイトの免疫電子顕微鏡検査。金標識された二次抗体として用い（15nm）、ヒト親和性精製抗体である抗 L S A - 5 . 7 1 で標識した（λ g t 1 1 にて β - ガラクトシダーゼ組換え）P. falciparum スポロゾイトの免疫電子顕微鏡写真。

40

【図 4】 金標識された抗ヒト抗体（10nm粒子）により顕在化させた、ヒト親和性精製抗体である抗 L S A - 5 . 7 1 で標識した（β - ガラクトシダーゼ組換え）成熟（第 6 日）P. falciparum 肝臓シゾントの免疫電子顕微鏡写真。L S A - 5 は、出現中の若い赤血球外メロゾイド（分裂小体）を囲むフロキュラ物質（flocular material）において見られ、明白なロプトリー（杵小体）（R）および核（N）を伴う。β - g a l からから精製した対照抗体は、陰性であった。

【図 5】 様々な流行地域における抗 L S A - 5 A b の有病率。

50

【図6】インビトロP.yoeliiおよびP.bergheiスポロゾイト侵入に対する抗LSA-5抗体の効果。ヒト過免疫血清由来のヒト抗体を組換えLSA-5-C-termまたは組換えLSA-5-N-termに対してアフィニティ精製し、そしてP.yoeliiまたはP.bergheiスポロゾイトによるマウス肝細胞の初代培養物のインビトロ侵入に関して試験した。同様に、LSA-3又はSALSAタンパク質に対して精製した抗体をP.yoeliiのそれぞれ陽性または陰性対照として試験した。P.berghei CSPに対する1つのモノクローナル抗体を、P.bergheiの陽性対照として使用した。%阻害は、抗体なしのアッセイにおける肝臓シゾントの数から推定した。

【図7】スポロゾイト攻撃時の、LSA-5によりマウスにおいて誘導された保護のLSA3との比較。マウスは、3回、マイクロ粒子上に吸着させた組換えLSA-5またはLSA-3 (DG729) またはSALSA 2~50 µgで免疫処置した。これらを、1000個のP.yoeliiスポロゾイト (17XNL) のIV注射により攻撃した。血中期の寄生虫血症を攻撃後の第4日~第14日に追跡調査した。

【図8】P.yoeliiスポロゾイト100万個で攻撃したLSA-5免疫処置したマウスにおける肝臓期負荷におけるLSA-5の低下。42時間後、肝臓を、感染マウスから取り出し、生検組織をカルノア (Carnoy) 中に固定し、そしてパラフィン内に包埋した。肝臓シゾントの数を、ヘマトキシリンで染色した肝臓切片5 µgから測定した。肝臓形態を、生検材料1つあたり100個の切片において計測した。

【図9】肝臓におけるインサイチュー (in situ) 細胞イベントである。LSA-5免疫処置したマウスを、P.yoeliiスポロゾイト100万個の静脈内接種により攻撃した。(A) 対照マウスで観察された健常シゾント。(B、C) ニトロセルロース粒子上に吸着させたβ-gal-LSA-5. 71で免疫処置したC57BL6の肝臓において単核細胞に浸潤された2個の肝臓シゾント。(D) 同じ動物において残留シゾントが見られない細胞肉芽腫。

【図10】 10^6 P.falciparumスポロゾイトでの攻撃後のPf. LSA-5で免疫処置したヨザル属の保護。

【図11】IFN-γヨザル属/サーネジアント (surnageant)。

【図12】ELISPOTヨザル属。

【図13】同じ混合物中で、各々または両方のタンパク質のいずれかで免疫処置したマウスにおけるLSA3およびLSA-5の免疫原性。C3Hマウスを、組換え体LSA-3 DG729、またはLSA-5. 71、またはLSA-3-DG729+LSA-5. 71との混合物 3×50 µgまたは 2×1 µg (アジュバントASO2中) で免疫処置した。抗体応答を、最終免疫処置の3週間後にELISAにより、組換え体の各々に対して測定した。結果を、1群あたり5匹のマウスでの抗体比の平均 (+/-SD) で示し、免疫処置していないC3Hマウスの血清と比較する。

【図14】LSA-5タンパク質をコードするヌクレオチド配列 (配列番号: 18)。

【図15】マイクロ粒子上のLSA-5で免疫処置したBALB/cマウス: 脾臓細胞上のELISPOT/IFN-γ。

【図16】マイクロ粒子上のLSA-5で免疫処置したC3H/Hejマウス: 脾臓細胞のELISPOT/IFN-γ。

10

20

30

40

【図 1】

```

      I P
      E E Q I E E V V I
      Q E E I I E E Q V V
      P E E L I E E V V
      P E E I I E E V V I
      P E E I V E E V V I
      P E E L V E E V V I
      A E K L V K E I V
      P E Q V R E E V I
      L E E I V E E M I
      P E E F V E E V A
      P E V E I E E I I
      P E E L I E E V I
      P E V L V E E A V
      P E E L I E K V I
      P
  
```

571のペプチドの配列

P9B Y P E E L V E E V I P E E L V E E V I P K

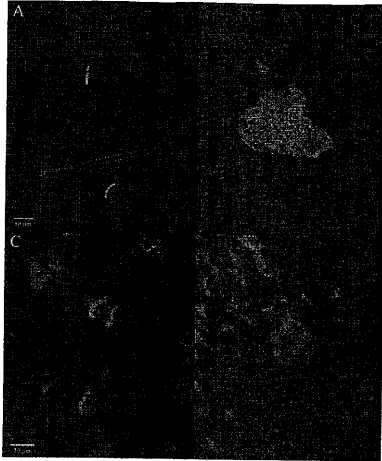
571 コンセンサス E E V V E E L I E E V I P E E L V I (Palm)-CONH2

571 ミクソトープ E E V V P E E L V E V I E V L V K (Palm)-CONH2

K I I R K A K I I

【図 2】

FIGURE 2



【図 3】

FIGURE 3

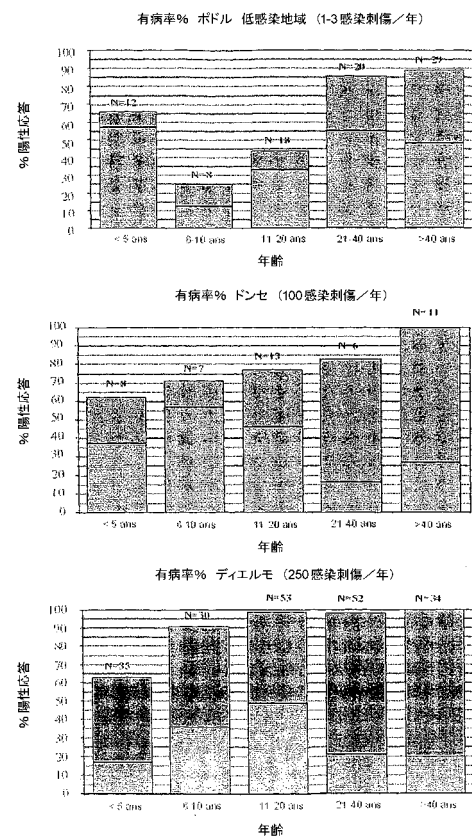


【図 4】

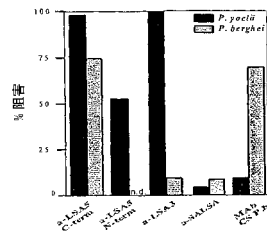
FIGURE 4



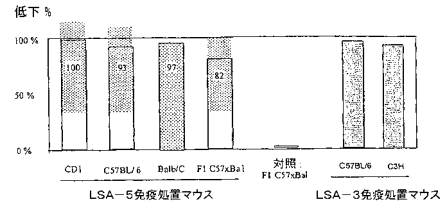
【図 5】



【図 6】

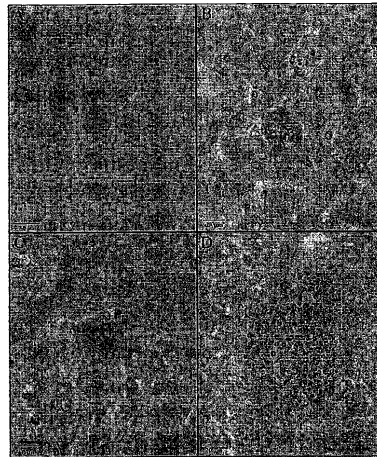


【図 8】

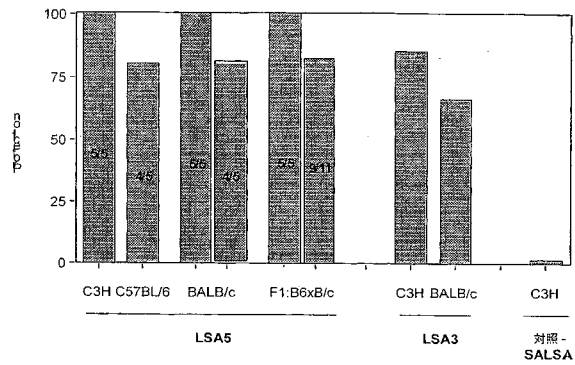


【図 9】

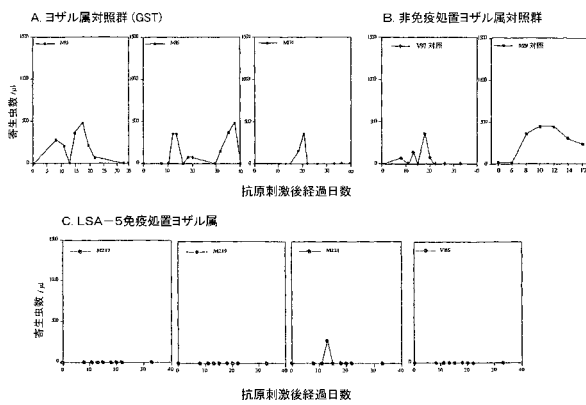
FIGURE 9



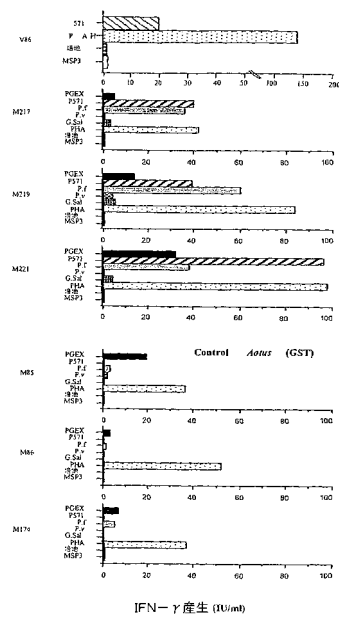
【図 7】



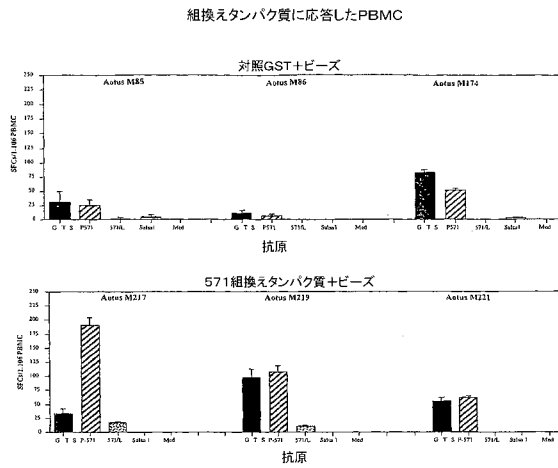
【図 10】



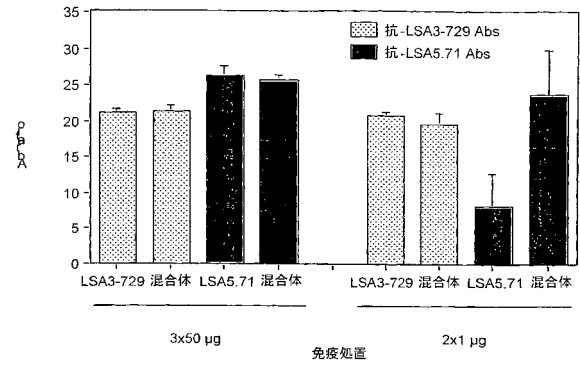
【図 11】



【図 12】



【図 13】

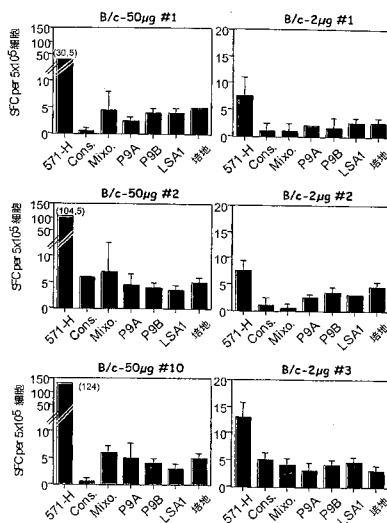


【図 14】

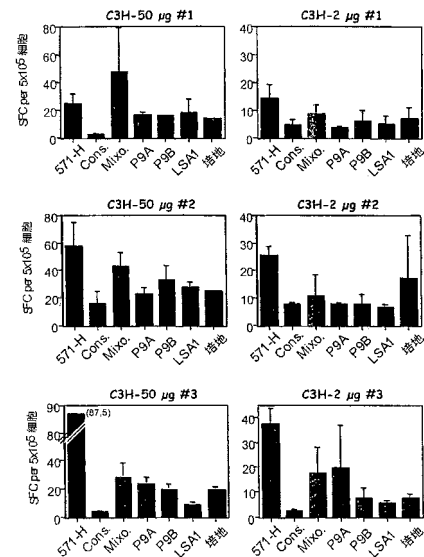
FIGURE 14

ATT CCA GAA GAA CAA ATT GAA GAG GTT ATA CAA GAA GAA
 ATA ATT GAA CAA GTT GTA CCA GAA GAA TTA ATT GAA GAA
 GTT GTA CCA GAA GAA ATA ATT GAA GAG GTT ATA CCA GAA
 GAA ATA GTT GAA GAG GTA ATA TAT GAA GAG GTG ATA CCT
 GAA GAA CTA GTA GAA GAA GTT ATA GCT GAG AAA CTG GTT
 AAA GAG ATT GTA CCA GAA CAA GTT CGT GAA GAA GTA ACA
 TTA GAG GAA ATC GTT GAG GAG ATG ATA CCC GAA GAA TTT
 GTA GAA GAG GTT GCA CCA GAA GTT GAA ATC GAG GAA ATA
 ATT CCT GAG GAA TTA ATA GAA GAA GTT ATA CCA GAG GTA
 TTA GTT GAA GAG GCT GTA CCA GAA GAA CTA ATA GAA AAA
 GTT ATA CC

【図 15】



【図 16】



【配列表】

0004991308000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> <i>1/21</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> <i>5/00</i> <i>1 0 1</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/015</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i> <i>39/015</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>31/7088</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i> <i>31/7088</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/39</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i> <i>39/39</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>33/06</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> <i>33/06</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/50</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> <i>33/50</i> <i>T</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/569</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> <i>33/569</i> <i>A</i>

(72)発明者 ブラヒミーゼギドゥール, カリマ
フランス国、エフー7 5 0 1 3 パリ、リュ・ヴェルニョ 5 4

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表昭6 2－5 0 3 1 6 9 (J P, A)
国際公開第0 2／0 3 8 1 7 6 (WO, A 2)
国際公開第0 2／0 1 2 3 4 9 (WO, A 2)
"Gene 11-1 protein precursor.", [online], UniProt, 2 0 0 3年1 0月 1日, Ver.3, AC:
Q8I6U6, [検索日：平成22年8月30日], U R L, [http://www.uniprot.org/uniprot/Q8I6U6.txt?v](http://www.uniprot.org/uniprot/Q8I6U6.txt?version=3)
ersion=3
KOENEN, M. et al., NATURE, 1 9 8 4年 9月2 7日, Vol.311, No.5984, P.382-385
GARDNER, M.J. et al., NATURE, 2 0 0 2年1 0月 3日, Vol.419, No.6906, P.498-511

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C07K 1/00-19/00
C12N 15/00-15/90
UniProt/GeneSeq
PubMed
Science Direct
CiNii
WPI