

(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2020-510650

(P2020-510650A)

(43) 公表日 令和2年4月9日 (2020. 4. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/385 (2006.01)	A 6 1 K 39/385 Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-545940 (P2019-545940)	(71) 出願人	516206107
(86) (22) 出願日	平成30年2月22日 (2018. 2. 22)		アルファード ペプティデス アクツイエ
(85) 翻訳文提出日	令和1年10月16日 (2019. 10. 16)		ンゲゼルシャフト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/054427		スイス国 ツェーハー 4 1 2 5 リーエ
(87) 国際公開番号	W02018/154010		ン, レラッハーシュトラーセ 5 0
(87) 国際公開日	平成30年8月30日 (2018. 8. 30)	(74) 代理人	110002077
(31) 優先権主張番号	17157687.9		園田・小林特許業務法人
(32) 優先日	平成29年2月23日 (2017. 2. 23)	(72) 発明者	クランガーラ, カロリーネ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		スイス国 4 0 5 8 バーゼル, シュヴ
		(72) 発明者	アルツヴァルアレー 1 7 1
			パウリッロ, サラ マリア
			スイス国 4 0 5 5 バーゼル, オルテ
			インガーシュトラーセ 5 3
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 免疫刺激性核酸 (nucleic acids) を封入する自己集合タンパク質ナノ粒子

(57) 【要約】

本発明は、免疫刺激性核酸 (nucleic acids) を封入する自己集合タンパク質ナノ粒子に関する。さらに、本発明は、ワクチン接種のためのかかるナノ粒子の使用に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) コイルドコイルオリゴマー化ドメインND 1、リンカーL 1、コイルドコイルオリゴマー化ドメインND 2並びにさらなる置換部分X 1及びY 1を含む連続鎖からなる式(I)

$X 1 - ND 1 - L 1 - ND 2 - Y 1$ (I)、

(式中、

ND 1は、m個のND 1サブユニットのオリゴマー($ND 1$)_mを含むコイルドコイルオリゴマー化ドメインであり、

ND 2は、n個のND 2サブユニットのオリゴマー($ND 2$)_nを含むコイルドコイルオリゴマー化ドメインであり、

m及びnは、それぞれ2と10の数であり、ただし、mは、nと等しくなく且つnの倍数でなく、nは、mの倍数でなく、

L 1は、生理学的状態で全体として少なくとも+2の正電荷を有するペプチドリinkerであり、

X 1は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1～1000個のアミノ酸を含むペプチド若しくはタンパク質配列であり、

Y 1は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1～1000個のアミノ酸を含むペプチド若しくはタンパク質配列である)

の複数の構築ブロックからなる自己集合タンパク質ナノ粒子(SAPN)であって、

式(I)の複数の構築ブロックは、コイルドコイルオリゴマー化ドメインND 3、リンカーL 2、コイルドコイルオリゴマー化ドメインND 4並びにさらなる置換部分X 2及びY 2を含む連続鎖からなる、式(II)

$X 2 - ND 3 - L 2 - ND 4 - Y 2$ (II)、

(式中

ND 3は、y個のND 3サブユニットのオリゴマー($ND 3$)_yを含むコイルドコイルオリゴマー化ドメインであり、

ND 4は、z個のND 4サブユニットのオリゴマー($ND 4$)_zを含むコイルドコイルオリゴマー化ドメインであり、

y及びzは、それぞれ2と10の数であり、ただし、yは、zと等しくなく且つzの倍数でなく、及びzはyの倍数でなく、

ND 3はND 1と同一であるか、又はND 4はND 2と同一であるか、又はND 3及びND 4の両方がそれぞれND 1及びND 2と同一であり、

L 2は、生理学的状態で全体として少なくとも+2の正電荷を有するペプチドリinkerであり、X 2は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1～1000個のアミノ酸を含むペプチド若しくはタンパク質配列であり

Y 2は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1～1000個のアミノ酸を含むペプチド若しくはタンパク質配列である)

の複数の構築ブロックと共集合していてもよい自己集合タンパク質ナノ粒子(SAPN)

、

(b) 免疫刺激性物質であって、前記免疫刺激性物質は核酸誘導体であり、前記核酸誘導体は、前記SAPNに封入される、免疫刺激性物質

を含む、対象において免疫応答を誘導するための組成物。

【請求項 2】

ペプチドリinkerL 1及び/又はペプチドリinkerL 2は、互いに独立に、少なくとも4アミノ酸からなり、生理学的状態で全体として少なくとも+3の正電荷を有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

ペプチドリinkerL 1及び/又はペプチドリinkerL 2は、互いに独立に、配列番号4に示されるアミノ酸配列、配列番号12に示されるアミノ酸配列、配列番号14に示され

10

20

30

40

50

るアミノ酸配列及び配列番号 15 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

核酸誘導体は、グアニンが続くシトシンを含む一本鎖 DNA であってシトシンヌクレオチドはメチル化されていない一本鎖 DNA、RNA ウイルス由来の一本鎖 RNA、RNA ウイルス由来の二本鎖 RNA 及び RNA ウイルス由来の二本鎖 RNA を模倣する高分子複合体からなる群より選択される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

核酸誘導体は、クラス A CpG ODN、クラス B CpG ODN 及びクラス C ODN からなる群より選択される CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 6】

核酸誘導体は、配列番号 13、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48 及び配列番号 49 で示されるヌクレオチド酸配列からなる群より選択される CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

核酸誘導体は、イオン性相互作用により SAPN と結合する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

20

式 (I) の複数の構築ブロックからなる SAPN のタンパク質鎖と核酸誘導体とのモル比は、約 1 対約 0.6 である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

ND1 及び / 又は ND3 又は ND2 及び / 又は ND4 のいずれかは、五量体コイルドコイル、四量体コイルドコイル、三量体コイルドコイル及び二量体コイルドコイルからなる群より選択されるコイルドコイルである、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

ND1 及び / 又は ND3 又は ND2 及び / 又は ND4 のいずれかは、4PN8、4PND、4WBA、3V2N、3V2P、3V2Q、3V2R、4EEB、4EED、3MIW、1MZ9、1FBM、1VDF、2GUV、2HYN、1ZLL 及び 1T8Z からなる群より選択される五量体コイルドコイルであるか、或いは ND1 及び / 又は ND3 又は ND2 及び / 又は ND4 のいずれかは、アミノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなった、4PN8、4PND、4WBA、3V2N、3V2P、3V2Q、3V2R、4EEB、4EED、3MIW、1MZ9、1FBM、1VDF、2GUV、2HYN、1ZLL 及び 1T8Z からなる群より選択される五量体コイルドコイルであり、各コイルドコイルは、RCSB タンパク質データバンク (RCSB PDB) の pdb エントリー番号付けにより示される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 11】

ND1 及び / 又は ND3 又は ND2 及び / 又は ND4 のいずれかは、5D60、5D5Y、5AL6、4WB4、4BHV、4C5Q、4GJW、4H7R、4H8F、4BXT、4LTO、4LTP、4LTQ、4LTR、3ZDO、3RQA、3R4A、3R4H、3TSI、3K4T、3F6N、2O6N、2OVC、2O1J、2O1K、2AG3、2CCE、1YBK、1U9F、1U9G、1U9H、1USD、1USE、1UNT、1UNU、1UNV、1UNW、1UNX、1UNY、1UNZ、1UO0、1UO1、1UO2、1UO3、1UO4、1UO5、1W5I、1W5L、1FE6、1G1I、1G1J、1EZJ、1RH4 及び 1GCL からなる群より選択される四量体コイルドコイルであるか、或いは ND1 及び / 又は ND3 又は ND2 及び / 又は ND4 のいずれかは、アミノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなった、5D60、5D5Y、5AL6、4WB4、4BHV、4C5Q、4GJW、4H7R、4H8F、4

40

50

BXT、4LTO、4LTP、4LTQ、4LTR、3ZDO、3RQA、3R4A、3R4H、3TSI、3K4T、3F6N、2O6N、2OVC、2O1J、2O1K、2AG3、2CCE、1YBK、1U9F、1U9G、1U9H、1USD、1USE、1UNT、1UNU、1UNV、1UNW、1UNX、1UNY、1UNZ、1UO0、1UO1、1UO2、1UO3、1UO4、1UO5、1W5I、1W5L、1FE6、1G1I、1G1J、1EZJ、1RH4及び1GCLからなる群より選択される四量体コイルドコイルであり、各コイルドコイルは、RCSTANPAK質データバンク(RCSBPDB)のpdbエントリ番号付けにより示される、請求項1から9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

ND1及び/又はND3又はND2及び/又はND4のいずれかは、5TOH、5TOI、5K92、5KB0、5KB1、5KB2、5KKV、5EFM、2N64、5ABS、5IEA、5APP、5APQ、5APS、5APY、5APZ、5D5Z、4YPC、4YV3、4CGB、4CGC、4CJD、4R0R、4UW0、4P67、4OXM、3W8V、3W92、3W93、4I2L、4K8U、4JBZ、3VTQ、4L1R、4JDO、4J4A、4E52、3VYI、3ZMF、3VU5、3VU6、2YNY、2YNZ、2YO0、2YO1、2YO2、4G1A、4GIF、3TQ2、4DZK、4DZL、4DZN、3TE3、3R48、3SWF、3SWY、3PR7、2YKO、2YKP、2YKQ、3NTN、3PP5、3MKO、3MGN、3NWA、3NWD、3NWF、3L35、3L36、3L37、3M9B、3M9D、2X6P、3LJM、3AHA、3H7X、3H7Z、3LT6、3LT7、3GJP、2KP8、3KPE、2WPR、2WPS、2WPY、2WPZ、2WQ0、2WQ1、2WQ2、2WQ3、3HFC、3HFE、3HRN、3HRO、3H5F、3H5G、2WG5、2WG6、2W6B、2JJL、2VRS、3EFG、3DUZ、2OT5、2Z2T、2QIH、3BK6、2O7H、2R32、2JGO、2Q7C、2Q3I、2Q5U、2IBL、1ZV8、1ZVB、2FXP、1WT6、2AKF、1TGG、1SLQ、1S9Z、1PW9、1PWB、1M7L、1GZL、1KYC、1KFM、1KFN、1IJ0、1IJ1、1IJ2、1IJ3、1HQJ、1QU1、1B08、1CZQ、1CUN、1SVF、1CE0、1PIQ、1AQ5、1AVY、1HTN、1AA0、1ZIJ、1ZIM、1COI、1SWI、1GCM及び1HUPからなる群より選択される三量体コイルドコイルであるか、或いはND1及び/又はND3又はND2及び/又はND4のいずれかは、アミノ酸改変を含む及び/又は片方若しくは両方の端で短くなった、5TOH、5TOI、5K92、5KB0、5KB1、5KB2、5KKV、5EFM、2N64、5ABS、5IEA、5APP、5APQ、5APS、5APY、5APZ、5D5Z、4YPC、4YV3、4CGB、4CGC、4CJD、4R0R、4UW0、4P67、4OXM、3W8V、3W92、3W93、4I2L、4K8U、4JBZ、3VTQ、4L1R、4JDO、4J4A、4E52、3VYI、3ZMF、3VU5、3VU6、2YNY、2YNZ、2YO0、2YO1、2YO2、4G1A、4GIF、3TQ2、4DZK、4DZL、4DZN、3TE3、3R48、3SWF、3SWY、3PR7、2YKO、2YKP、2YKQ、3NTN、3PP5、3MKO、3MGN、3NWA、3NWD、3NWF、3L35、3L36、3L37、3M9B、3M9D、2X6P、3LJM、3AHA、3H7X、3H7Z、3LT6、3LT7、3GJP、2KP8、3KPE、2WPR、2WPS、2WPY、2WPZ、2WQ0、2WQ1、2WQ2、2WQ3、3HFC、3HFE、3HRN、3HRO、3H5F、3H5G、2WG5、2WG6、2W6B、2JJL、2VRS、3EFG、3DUZ、2OT5、2Z2T、2QIH、3BK6、2O7H、2R32、2JGO、2Q7C、2Q3I、2Q5U、2IBL、1ZV8、1ZVB、2FXP、1WT6、2AKF、1TGG、1SLQ、1S9Z、1PW9、1PWB、1M7L、1GZL、1KYC、1KFM、1KFN、1IJ0、1IJ1、1IJ2、1IJ3、1HQJ、1QU1、1B08、1CZQ、1CUN、1SVF、1CE0、1PIQ、1AQ5、1AVY、1HTN、1

10

20

30

40

50

AA0、1ZIJ、1ZIM、1COI、1SWI、1GCM及び1HUPからなる群より選択される三量体コイルドコイルであり、各コイルドコイルは、RCSBタンパク質データベース(RCSB PDB)のpdbエントリー番号付けにより示される、請求項1から9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

ND1及び/又はND3又はND2及び/又はND4のいずれかは、5M97、5M9E、5FIY、5F4Y、5D3A、5HMO、5EYA、5IX1、5IX2、5JHF、5JVM、5JVP、5JVR、5JVS、5JVU、5JX1、5FCN、5HHE、2N9B、4ZRY、4Z6Y、4YTO、4ZI3、5AJS、5F3K、5F5R、5HUZ、5DJN、5DJO、5CHX、5CJ0、5CJ1、5CJ4、5C9N、5CFF、4WHV、3WUT、3WUU、3WUV、4ZQA、4XA3、4XA4、4PXJ、4YVC、4YVE、5BML、5AL7、4WOT、4CG4、5AMO、4WII、4WIK、4RSJ、4CFG、4R3Q、4WID、4CKG、4CKH、4NSW、4W7P、4QQ4、4OJK、4TL1、4OH9、4LPZ、4Q62、4L2W、4M3L、4CKM、4CKN、4N6J、4LTB、4LRZ、2MAJ、2MAK、4NAD、4HW0、4BT8、4BT9、4BTA、4HHD、4M8M、4J3N、4L6Q、4C1A、4C1B、4GDO、4BWK、4BWP、4BW X、4HU5、4HU6、4L9U、4G0U、4G0V、4G0W、4L3I、4G79、4GEU、4GEX、4GFA、4GFC、4BL6、4JMR、4JNH、2YMY、4HAN、3VMY、3VMZ、3VN0、4ABX、3W03、2LW9、4DZM、4ETO、3TNU、3THF、4E8U、3VMX、4E61、3VEM、3VBB、4DJG、3TV7、3STQ、3V8S、3Q8T、3U1C、3QH9、3AZD、3ONX、3OKQ、3QX3、3SJA、3SJB、3SJC、2L2L、3QFL、3QKT、2XV5、2Y3W、3Q0X、3AJW、3NCZ、3NI0、2XU6、3M91、3NMD、3LLL、3LX7、3ME9、3MEU、3MEV、3ABH、3ACO、3IAO、3HLS、2WMM、3A6M、3A7O、2WVR、3ICX、3ID5、3ID6、3HNW、3I1G、2K6S、3GHG、3G1E、2W6A、2V51、3ERR、3E1R、2VY2、2ZR2、2ZR3、3CL3、3D9V、2Z17、2JEE、3BBP、3BAS、3BAT、2QM4、2V71、2NO2、2PON、2V0O、2DQ0、2DQ3、2Q2F、2NRN、2E7S、2H9V、2FXM、2HJD、2GZD、2GZH、2FV4、2F2U、2EUL、2ESM、2ETK、2ETR、1ZXA、1YIB、1YIG、1XSX、1RFY、1U0I、1XJA、1T3J、1T6F、1R7J、1UII、1PL5、1S1C、1P9I、1R48、1URU、1OV9、1UIX、1NO4、1NYH、1MV4、1LR1、1L8D、1LJ2、1KQL、1GXK、1GXL、1GK6、1JR5、1GMJ、1JAD、1JCH、1JBG、1JTH、1JY2、1JY3、1IC2、1HCI、1HF9、1HBW、1FXK、1D7M、1QUU、1CE9、2A93、1BM9、1A93、1TMZ、2AAC、1ZII、1ZIK、1ZIL、2ARA、2ARC、1JUN、1YSA及び2ZTAからなる群より選択される二量体コイルドコイルであるか、或いはND1及び/又はND3又はND2及び/又はND4のいずれかは、アミノ酸改変を含む及び/又は片方若しくは両方の端で短くなった、5M97、5M9E、5FIY、5F4Y、5D3A、5HMO、5EYA、5IX1、5IX2、5JHF、5JVM、5JVP、5JVR、5JVS、5JVU、5JX1、5FCN、5HHE、2N9B、4ZRY、4Z6Y、4YTO、4ZI3、5AJS、5F3K、5F5R、5HUZ、5DJN、5DJO、5CHX、5CJ0、5CJ1、5CJ4、5C9N、5CFF、4WHV、3WUT、3WUU、3WUV、4ZQA、4XA3、4XA4、4PXJ、4YVC、4YVE、5BML、5AL7、4WOT、4CG4、5AMO、4WII、4WIK、4RSJ、4CFG、4R3Q、4WID、4CKG、4CKH、4NSW、4W7P、4QQ4、4OJK、4TL1、4OH9、4LPZ、4Q62、4L2W、4M3L、4CKM、4CKN、4N6J、4LTB、4LRZ、2MAJ、2

10

20

30

40

50

MAK、4NAD、4HW0、4BT8、4BT9、4BTA、4HHD、4M8M、4J3N、4L6Q、4C1A、4C1B、4GDO、4BWK、4BWP、4BWX、4HU5、4HU6、4L9U、4G0U、4G0V、4G0W、4L3I、4G79、4GEU、4GEX、4GFA、4GFC、4BL6、4JMR、4JNH、2YMY、4HAN、3VMY、3VMZ、3VN0、4ABX、3W03、2LW9、4DZM、4ETO、3TNU、3THF、4E8U、3VMX、4E61、3VEM、3VBB、4DJG、3TV7、3STQ、3V8S、3Q8T、3U1C、3QH9、3AZD、3ONX、3OKQ、3QX3、3SJA、3SJB、3SJC、2L2L、3QFL、3QKT、2XV5、2Y3W、3Q0X、3AJW、3NCZ、3NI0、2XU6、3M91、3NMD、3LLL、3LX7、3ME9、3MEU、3MEV、3ABH、3ACO、3IAO、3HLS、2WMM、3A6M、3A7O、2WVR、3ICX、3ID5、3ID6、3HNW、3I1G、2K6S、3GHG、3G1E、2W6A、2V51、3ERR、3E1R、2VY2、2ZR2、2ZR3、3CL3、3D9V、2Z17、2JEE、3BBP、3BAS、3BAT、2QM4、2V71、2NO2、2PON、2V0O、2DQ0、2DQ3、2Q2F、2NRN、2E7S、2H9V、2FXM、2HJD、2GZD、2GZH、2FV4、2F2U、2EUL、2ESM、2ETK、2ETR、1ZXA、1YIB、1YIG、1XSX、1RFY、1U0I、1XJA、1T3J、1T6F、1R7J、1UII、1PL5、1S1C、1P9I、1R48、1URU、1OV9、1UIX、1NO4、1NYH、1MV4、1LR1、1L8D、1LJ2、1KQL、1GXK、1GXL、1GK6、1JR5、1GMJ、1JAD、1JCH、1JBG、1JTH、1JY2、1JY3、1IC2、1HCI、1HF9、1HBW、1FXK、1D7M、1QUU、1CE9、2A93、1BM9、1A93、1TMZ、2AAC、1ZII、1ZIK、1ZIL、2ARA、2ARC、1JUN、1YSA及び2ZTAからなる群より選択される二量体コイルドコイルであり、各コイルドコイルは、RCSTBタンパク質データバンク(RCSTB PDB)のpdbエントリー番号付けにより示される、請求項1から9のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項14】

式(I)の複数の構築ブロックは、式(II)の複数の構築ブロックと共集合し、式(I)の複数の構築ブロック及び式(II)の複数の構築ブロックを含む共集合したSAPNは、約1から約12の式(II)の構築ブロックを含む連続鎖に対し約48から約59の式(I)の構築ブロックを含む連続鎖の共集合比率を有する、請求項1から13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項15】

ヒト又は非ヒト動物にワクチン接種する方法における使用のための、請求項1から14のいずれか一項に記載の組成物であって、方法は、かかるワクチン接種を必要とするヒト又は非ヒト動物に有効量の前記組成物を投与することを含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫刺激性核酸(nucleic acids)を封入する自己集合タンパク質ナノ粒子に関する。さらに、本発明は、ワクチン接種のためのかかるナノ粒子の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

CpG-TLR9

グアニンが続くシトシンを含む短い一本鎖合成DNA分子は、CpGオリゴデオキシヌクレオチド(又はCpG ODN)と呼ばれる。「p」は、(二本鎖DNAにおけるCGベースペアリングとは対照的に)2個の連続するヌクレオチド間のリン酸ジエステル結合を指し、一方、いくつかの合成ODNは、それらのin vivo安定性を増加させるため、代わりに改変されたホスホロチオエート骨格を有する。これらのCpGモチーフの

シトシンがメチル化されていない場合、それらは、免疫刺激性分子として作動し得る。脊椎動物のゲノムにおけるそれらの相対的な希少性（哺乳動物において、全てのCpGペア中のシトシンの約70%から80%はメチル化されている）と対照的に微生物ゲノムにおいて豊富であるために、CpGモチーフは、病原体関連分子パターン（PAMP）と考えられる。CpG PAMPは、いわゆるパターン認識受容体であるToll様受容体9（TLR9）により認識される。TLR9は、細菌及びウイルスのいずれからのDNAも認識するToll様受容体であり、一方、TLR3、TLR7及びTLR8は、病原体由来RNAを認識する。TLR9は、高等霊長類及びヒトにおける形質細胞様樹状細胞及びB細胞において構成的に発現され、従って、非メチル化CpGジヌクレオチド部位は、ヒトにおいてこれらの細胞上のTLR9により検出され得る。これは、細胞内感染を検出するため免疫系により用いられる。

10

【0003】

RNA

病原体由来RNAも、Toll様受容体により認識される。TLR3は、主に、二本鎖RNAのゲノムを運ぶウイルスからの二本鎖RNA及びポリI:Cを認識し；TLR7は、RNAウイルス由来の一本鎖RNAを認識し、TLR8は、低分子合成化合物、一本鎖ウイルスRNA及び貪食された細菌RNAを認識する。

【0004】

TLR3

最も一般的に使用される実験用TLR3アゴニストは、ポリI:ポリC（pIC）である。pICは、二本鎖RNA（dsRNA）を模倣する、巨大な合成高分子複合体である。pICの調製物は、鎖長、溶解性、及び毒性を含む他の生物学的特性の分布が様々である。

20

【0005】

実験的研究により、TLR3は、がん細胞において、アポトーシスをもたらすことが示されている。さらに、MDA5及びRIG-Iなどの、pICにも結合する、他のdsRNA結合受容体が細胞質に存在し、がん細胞におけるアポトーシスに寄与する。アポトーシスを誘導し、同時に免疫系を活性化するTLR3の能力は、pICなどのTLR3リガンドをがん治療のための魅力的な治療選択肢にする。

【0006】

30

TLR7及びTLR8

エンドソームに局在する場合、TLR7及びTLR8は、一本鎖RNA（ssRNA）を認識する。これは、マクロファージ又は樹状細胞などの免疫細胞により内部移行される、インフルエンザ、センダイ及びコクサッキーBウイルスなどのssRNAウイルスのゲノムの共通する特徴である。TLR7は、GUリッチssRNAを認識することができるが、ssRNAにおいてGUリッチ配列の存在は、TLR7を刺激するのに十分でない。イミキモドは、TLR7と相互作用することにより、免疫応答調整剤として作用する処方薬である。イミキモドは、表在性基底細胞がん、性器疣贅及び日光角化症を治療するのに用いられる。レシキモド（R-848）及びガルジキモド（Gardiquimod）は、イミキモドの誘導体である。

40

【発明の概要】

【0007】

第一の態様において、本発明は、

(a) コイルドコイルオリゴマー化ドメインND1、リンカーL1、コイルドコイルオリゴマー化ドメインND2並びにさらなる置換部分X1及びY1を含む連続鎖からなる、式(I)

$$X1 - ND1 - L1 - ND2 - Y1 \quad (I)$$

の複数の構築ブロックからなる自己集合タンパク質ナノ粒子（SAPN）であって、ここで、

ND1は、m個のND1サブユニットのオリゴマー（ND1）_mを含むコイルドコイルオ

50

リゴマー化ドメインであり、

ND 2 は、 n 個の ND 2 サブユニットのオリゴマー $(ND 2)_n$ を含むコイルドコイルオリゴマー化ドメインであり、

m 及び n は、それぞれ 2 と 10 の間の数であり、ただし、 m は、 n と等しくなく且つ n の倍数でなく、 n は、 m の倍数でなく、

L 1 は、生理学的状態で全体として少なくとも + 2 の正電荷を有するペプチドリinkerであり、

X 1 は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1 ~ 1000 個のアミノ酸を含むペプチド若しくはタンパク質配列であり、

Y 1 は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1 ~ 1000 個のアミノ酸を含むペプチド若しくはタンパク質配列であり、

ここで式 (I) の複数の構築ブロックは、コイルドコイルオリゴマー化ドメイン ND 3、リンカー L 2、コイルドコイルオリゴマー化ドメイン ND 4 並びにさらなる置換部分 X 2 及び Y 2 を含む連続鎖からなる、式 (II)

$X 2 - ND 3 - L 2 - ND 4 - Y 2$ (II)、

の複数の構築ブロックと共集合していてもよく、ここで

ND 3 は、 y 個の ND 3 サブユニットのオリゴマー $(ND 3)_y$ を含むコイルドコイルオリゴマー化ドメインであり、

ND 4 は、 z 個の ND 4 サブユニットのオリゴマー $(ND 4)_z$ を含むコイルドコイルオリゴマー化ドメインであり、

y 及び z は、それぞれ 2 と 10 の間の数であり、ただし、 y は、 z と等しくなく及び z の倍数でなく、及び z は y の倍数でなく、ここで、

ND 3 は ND 1 と同一であるか、又は ND 4 は ND 2 と同一であるか、又は ND 3 及び ND 4 の両方がそれぞれ ND 1 及び ND 2 と同一であり、

L 2 は、生理学的状態で全体として少なくとも + 2 の正電荷を有するペプチドリinkerであり、

X 2 は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1 ~ 1000 個のアミノ酸を含むペプチド若しくはタンパク質配列であり、

Y 2 は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1 ~ 1000 個のアミノ酸を含むペプチド若しくはタンパク質配列であり、

(b) 免疫刺激性物質であって、前記免疫刺激性物質は核酸誘導体であり、前記核酸誘導体は、前記 SAPN に封入される、免疫刺激性物質

を含む対象において免疫応答を誘導するための組成物に関する。

【0008】

第二の態様において、本発明は、ヒト又は非ヒト動物にワクチン接種する方法に関し、これは、かかるワクチン接種を必要とする対象に、本明細書に記載の組成物の有効量を投与することを含む。

【0009】

第三の態様において、本発明は、i) 核酸誘導体を含む緩衝液に SAPN を加えること、及び ii) 通常のリフォールディングプロトコルを用いて、核酸誘導体の存在下で SAPN をリフォールディングすることを含む、本明細書に記載の SAPN を製造する方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図 1】封入 CpG ナノ粒子の単量体の模式図。以下は、単量体の構築ブロックである：

・ X 1 は、置換されていてもよい 1 から 1000 のアミノ酸を含む、ペプチド又はタンパク質配列である。・ ND 1 は、 m 個の ND 1 サブユニットのオリゴマー $(ND 1)_m$ を形成するコイルドコイルである。・ L 1 は、全体として + 3 の正電荷を有するペプチドリinkerである。・ ND 2 は、 n 個の ND 2 サブユニットのオリゴマー $(ND 2)_n$ を形成するコイルドコイルである。・ Y 1 は、存在しないか、又はさらに置換されてい

10

20

30

40

50

てもよい1～1000個のアミノ酸を含むペプチド若しくはタンパク質配列である。

【図2】DEDDL I - RRの分子モデル。A) TLR5受容体及びTLR9受容体のそれらそれぞれのアゴニストとのX線結晶構造：TLR5二量体は、2分子のフラジェリン（黄色及びマゼンタ）と相互作用し、TLR9は、CpGと相互作用する。B) 左：自己集合タンパク質の単量体構築ブロックは、hisタグ(X1)五量体コイルドコイル(ND1)、二量体コイルドコイル(ND2)及びフラジェリンのD0及びD1ドメイン(X2)から構成される。2つのコイルドコイルオリゴマー化ドメインND1及びND2は、3の正電荷(L1)を有するリンカーにより接合されている。右：CpG分子。C) 60のタンパク質鎖、及び中央の空洞封入された約36のCpG分子を有する集合タンパク質ナノ粒子。より明確にするために、円の内側のタンパク質鎖（正電荷を示す）は、粒子の内側の（負に帯電した）CpG分子を見えるようにするために示していない。パネルA)、B)及びC)において、全ての構造がサイズどおりに描かれているわけではないことに留意する。

10

【図3】pPEP - Tのベクターマップ。「prom」：プロモーター；「term」：ターミネーター；「ori」：起点；「bp」：ベースペア；「amp」：アンピシリン耐性遺伝子。

【図4A】コンストラクトDEDDL I - RRのSDS - PAGE。このコンストラクトは、44.8 kDaの理論分子量を有する。A) 試料について2つの異なる濃度での発現レベル。UI 未誘導 I 誘導

20

【図4B】コンストラクトDEDDL I - RRのSDS - PAGE。このコンストラクトは、44.8 kDaの理論分子量を有する。B) FPLCからの溶出プロファイル。タンパク質は、120から122 mMイミダゾールで溶出する。

【図4C】コンストラクトDEDDL I - RRのSDS - PAGE。このコンストラクトは、44.8 kDaの理論分子量を有する。C) Ni - アフィニティー精製後の純度。第一レーン：Mwマーカー；CL：透明溶解物；レーン3～9：通過画分；レーン15～20：溶出ピーク。

【図4D】コンストラクトDEDDL I - RRのSDS - PAGE。このコンストラクトは、44.8 kDaの理論分子量を有する。D) DEDDL I - RRとNHS - ニコチンのカップリング前（下）及び後（上）の質量分析。

【図5】コンストラクトDEDDL I - RR中への蛍光標識されたODN1826Fの封入を伴う又は伴わない相対蛍光単位(RFU)。封入比率の増加について、CpG - ODN1826Fのみ（黒色カラム）、及びSAPN DEDDL I - RR中に封入されるCpG - ODN1826F（破線カラム）についてのRFU値。ODN1826FのDNA鎖に対する、DEDDL I - RRのタンパク質鎖のモル比を示す。

30

【図6】コンストラクトDEDDL I - RRへの蛍光標識されたODN1826Fの封入後の相対蛍光単位(RFU)の差。封入比率の増加について、CpG - ODN1826Fのみ（黒色ダイヤモンド）、及びDEDDL I - RRに封入されたCpG試料における遊離のCpGに相当する差分（破線四角）についてのRFU値2つの曲線は、密接に重なり合っている。- RFUにおける差分の値は、特定のCpG封入比率で封入されるCpGを有するDEDDL I - RRからのシグナルから、1:0.6の封入比率でのシグナルを引いて計算される。- 「差分」の曲線（破線四角）の割合の値は、割合から0.6を引いて計算される。

40

【図7】DEDDL I - RRの透過型電子顕微鏡写真。組換えで発現させたタンパク質のリフォールディング及び共集合後、試料を炭素被覆グリッド上に吸着させ、2%酢酸ウランでネガティブ染色した。ナノ粒子は、実施例1に記載の配列番号1の配列を有する。上欄及び下欄のバーは、それぞれ、200 nm及び500 nmを表す。

【図8】封入されるODN1826を用いた及び用いない、DEDDL I - RRに対する免疫応答。それぞれ、10 µg及び30 µgの2のタンパク質濃度での3つの注入モード(IM、IN及びIV)、及びそれらの相当する抗体価。0.85 µg及び2.56 µgのCpGは、それぞれ「+」又は「-」記号で示された、10 µg及び30 µg用量で封

50

入された。抗体価を、B S A - ニコチン、すなわち、B S A と共有結合的に結合したニコチンでコートしたプレートに対する E L I S A 結合アッセイにより決定した。免疫付与において、封入された C p G 由来の試料において、抗体価における顕著な増加を観察することができる。

【図 9】コンストラクト D E D D L I - R R、2 R R 及び 3 R R 中に、蛍光標識された O D N 1 8 2 6 F の封入を伴う又は伴わない、相対蛍光単位 (R F U)。C p G - O D N 1 8 2 6 F のみ (ダイヤモンド)、及び封入比率を増加させるため、S A P N D E D D L I - R R (四角)、2 R R (三角) 及び 3 R R (円) 中に封入された C p G - O D N 1 8 2 6 F についての R F U 値。D E D D L I - R R のタンパク質鎖対 O D N 1 8 2 6 F の D N A 鎖のモル比を示す。C p G のみ (すなわち、封入を伴わない) D E D D L I - R R 2 R R 3 R R

10

【図 10】封入された O D N 1 8 2 6 を用いた及び用いない、L I V E L I ベースのコンストラクトに対する免疫応答。それぞれ、5 匹の B a l b / C マウスの群を、封入された C p G を用いて (L I V E L I 1 - R R 及び L I V E L I 2 - R R) 又は用いずに (L I V E L I 1 及び L I V E L I 2)、30 μ g タンパク質の用量で免疫した。L I V E L I 1 - R R 及び L I V E L I 2 - R R の投与量において封入される C p G の量は、約 2 . 5 μ g である。筋肉内に、2 週間ごとに 3 回注入した。封入された C p G 由来の試料において抗体価における顕著な増加を観察することができる。

【図 11】L I V E L I 1、L I V E L I 2、L I V E L I 1 - R R 及び L I V E L I 2 - R R の透過型電子顕微鏡写真。組換えで発現させたタンパク質のリフォールディング及び共集合後、試料を炭素被覆グリッドに吸収させ、2 % 酢酸ウラニルを用いて、ネガティブ染色した。ナノ粒子は、A) L I V E L I 1、B) L I V E L I 2、C) L I V E L I 1 - R R 及び D) L I V E L I 2 - R R に相当し、それぞれ、実施例 10 において記載される、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 18 及び配列番号 19 の配列を有する。全てのパネルにおいて、バーは、200 nm を表す。

20

【図 12】コンストラクト C C - R R 中への、蛍光標識された O D N 1 8 2 6 F の封入を伴う又は伴わない相対蛍光単位 (R F U)。C p G - O D N 1 8 2 6 F のみ (黒色カラム)、及び封入比率を増加させるため S A P N C C - R R (破線カラム) 中に封入された C p G - O D N 1 8 2 6 F についての R F U 値。D E D D L I - R R のタンパク質鎖対 O D N 1 8 2 6 F の D N A 鎖のモル比を示す。

30

【図 13】C C - R R - N N の分子モデル。A) 第一の自己集合タンパク質鎖の単量体構築ブロックは、h i s タグ及び C e l T O S (X 1) 第一のコイルドコイルドメイン (N D 1)、第二のコイルドコイルドメイン (N D 2) 及び C e l T O S (Y 1) の第二の分子から構成され、ここで、2 つのコイルドコイルドメインは 3 つの正電荷を有する (L 1) 短いペプチドリンカーによりにより接合している。B) 第二の自己集合タンパク質鎖の単量体構築ブロックは、h i s タグ及び C e l T O S (X 2) 第一のコイルドコイルドメイン (N D 3)、第二のコイルドコイルドメイン (N D 4) 及びフラジェリンの D 0 及び D 1 ドメイン (Y 2) から構成され、ここで 2 つのコイルドコイルドメインは、3 つの正電荷 (L 2) を有する短いペプチドリンカーにより接合している。C) C p G 分子 (パネル A 及び B のサイズに合わせて描かれてはいない) リフォールディングの間、共集合及び封入が同時に起こる。D) 第一及び第二のタンパク質鎖 58 : 2 の共集合比率で 60 のタンパク質鎖、及び中央の空洞中に封入される約 36 の C p G 分子を有する、集合タンパク質ナノ粒子。より明確にするために、粒子の内側の (負に帯電した) C p G 分子を可視化させるよう、円の内側のタンパク質鎖 (正電荷を表す) を示していない。E) 封入された C p G を有する共集合した S A P N の透過型電子顕微鏡写真。バーは、100 nm を表す。

40

【図 14】R R - S S I E F の透過型電子顕微鏡写真。組換えで発現させたタンパク質のリフォールディング後、試料を炭素被覆グリッド上に吸着させ、2 % 酢酸ウラニルでネガティブ染色した。ナノ粒子は、R R - S S I E F に相当し、封入された C p G O D N 1 585 (配列番号 39) を有し、実施例 12 に記載された配列番号 34 の配列を有する。

50

バーは、200nmを表す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

発明の詳細な説明

本発明において、DNA及び/又はRNA結合部位は、SAPNに核酸を封入すること
を目標としてSAPNの構造に組み込まれるよう記載される。SAPNは、例えば、Rama
n S.K. et al. Nanomed 2006, 2(2): 95-102; Pimentel T. A., et al. Chem Biol Dru
g Des. 2009. 73(1): 53-61; Indelicato, G., et al. Biophys J. 2016, 110(3): 64
6-660; Karch, C. P., et al. Nanomedicine 2016, 13(1): 241-251に記載されている
。SAPNは、WO2004071493、WO2009109428及びWO2015
104352にも記載されている。第一の態様において、本発明は：

(a) コイルドコイルオリゴマー化ドメインND1、リンカーL1、コイルドコイルオリ
ゴマー化ドメインND2並びにさらなる置換部分X1及びY1を含む連続鎖からなる、式
(I)

$X1 - ND1 - L1 - ND2 - Y1$ (I)、

の複数の構築ブロックからなる自己集合タンパク質ナノ粒子(SAPN)であって、

ND1は、m個のND1サブユニットのオリゴマー(ND1)_mを含むコイルドコイルオリ
ゴマー化ドメインであり、

ND2は、n個のND2サブユニットのオリゴマー(ND2)_nを含むコイルドコイルオリ
ゴマー化ドメインであり、

m及びnは、それぞれ2と10の数であり、ただし、mは、nと等しくなく且つnの
倍数でなく、nは、mの倍数でなく、

L1は、生理学的状態で全体として少なくとも+2の正電荷を有するペプチドリinkerで
あり、

X1は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1~1000個のアミノ酸を
含むペプチド若しくはタンパク質配列であり、

Y1は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1~1000個のアミノ酸を
含むペプチド若しくはタンパク質配列であり、

式(I)の複数の構築ブロックは、コイルドコイルオリゴマー化ドメインND3、リンカー
L2、コイルドコイルオリゴマー化ドメインND4並びにさらなる置換部分X2及びY
2を含む連続鎖からなる式(II)

$X2 - ND3 - L2 - ND4 - Y2$ (II)、

の複数の構築ブロックと共集合していてもよく、

ND3は、y個のND3サブユニットのオリゴマー(ND3)_yを含むコイルドコイルオリ
ゴマー化ドメインであり、

ND4は、z個のND4サブユニットのオリゴマー(ND4)_zを含むコイルドコイルオリ
ゴマー化ドメインであり、

y及びzは、それぞれ2と10の数であり、ただし、yは、zと等しくなく及びzの
倍数でなく、及びzはyの倍数でなく、ここで、ND3はND1と同一であるか、又はN
D4はND2と同一であるか、又はND3及びND4の両方がそれぞれND1及びND2
と同一であり、

L2は、生理学的状態で全体として少なくとも+2の正電荷を有するペプチドリinkerで
あり、

X2は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1~1000個のアミノ酸を
含むペプチド若しくはタンパク質配列であり、

Y2は、存在しないか、又はさらに置換されていてもよい、1~1000個のアミノ酸を
含むペプチド若しくはタンパク質配列である、

自己集合タンパク質ナノ粒子、

(b) 免疫刺激性物質であって、前記免疫刺激性物質は核酸誘導体であり、前記核酸誘
導体は、前記SAPNに封入される、免疫刺激性物質

10

20

30

40

50

を含む、対象において免疫応答を誘導するための組成物に関する。

【0012】

驚くべきことに、SAPNの2つのオリゴマー化ドメインを接続するリンカーが正に帯電したアミノ酸（複数）のストレッチを含み、結果としてリンカーの全体的な電荷を少なくともプラス2にする場合、負に帯電した核酸がSAPNに封入され得ることが見いだされた。これは、好都合なことに正電荷を持つリンカーはSAPNの中央の空洞に向かっており、結果として中央の空洞の正に帯電した表面コーティングを、ウイルスのゲノム材料を封入するウイルスカプシドの正に帯電した空洞と同様にさせるためである。にもかかわらず、これは、T1二十面体対称性を有するSAPNのように、60のタンパク質鎖がSAPNのために集合し、結果として、リンカーあたり少なくとも2の正電荷を用いて120もの正電荷が中央の空洞の相対的に小さなスペースに並んでおり、結果としてリフォールディングの間SAPNの形成に対抗する著しい反発力につながることは予期されていなかった。

10

【0013】

SAPNにおける核酸のこの封入にSAPNと核酸との特別な化学的付着を必要としないことは注目に値する。核酸の封入は、リフォールディング前のリフォールディング緩衝液への核酸の添加、及びその後、通常のリフォールディングプロトコルを用いて核酸の存在下でSAPNをリフォールディングした時に起こる。

【0014】

SAPNに封入され得る具体的な核酸は、免疫賦活性特性を含み得る。例えば、免疫付与プロトコルの間、封入されるCpGを有するSAPNを用いると、全体として免疫応答が著しく増加する。従って、本発明のSAPNは、免疫応答を増加させ、結果としてSAPNベースのワクチンの免疫原性を効率良く増加させる、洗練された方法を提供する。

20

【0015】

単量体構築ブロック

ペプチド（又はポリペプチド又はタンパク質）は、アミド結合により共有結合しているアミノ酸鎖又は配列である。ペプチドは、天然、改変された天然、部分的合成又は完全合成であってもよい。改変された天然、部分的合成又は完全合成は、天然に生じないことを意味すると理解される。用語、アミノ酸は、20の必須天然 α -L-アミノ酸から選択される天然に存在するアミノ酸、 α -D-アミノ酸、6-アミノヘキサン酸、ノルロイシン、ホモシステイン若しくは類似のものなどの合成アミノ酸、並びにリン酸化セリン若しくはリン酸化チロシン又はn-オクタノイル-セリンなどの他の改変物、又は類似のものなどの、何らかの方法で電荷などの特定の特性を変更された天然に存在するアミノ酸のいずれもを包含する。アミノ酸の誘導体は、例えば、アミド結合を形成するアミノ基が、アルキル化され、又は側鎖アミノ基、ヒドロキシル基若しくはチオ基がアルキル化又はアシル化され、又は側鎖カルボキシ基がアミド化またはエステル化される、アミノ酸である。好ましくは、本発明のペプチド又はタンパク質は、20の必須天然 α -L-アミノ酸から選択されるアミノ酸を含む。

30

【0016】

大まかな近似では、ペプチドは、それらのサイズに基づいて、タンパク質と区別することができる。すなわち、およそ、50アミノ酸鎖又はそれ未満は、ペプチドであると考えることができるが、一方、より長い鎖は、タンパク質であると考えることができる。従って、本明細書中に用いられる用語「ペプチド」は、50アミノ酸又はそれ未満のアミノ酸鎖、好ましくは、2から50アミノ酸のアミノ酸鎖を指し、本明細書中に用いられる用語、「タンパク質」は、50より多いアミノ酸のアミノ酸鎖、好ましくは51から10000アミノ酸のアミノ酸鎖を指す。ジペプチドは、最も短いペプチドであり、単一のペプチド結合により接合している2アミノ酸からなる。同様に、トリペプチドは、3アミノ酸からなり、テトラペプチドは、4アミノ酸からなる、などである。ポリペプチドは、長く、連続し、かつ非分岐のペプチド鎖である。文献において、ペプチドをタンパク質と区別するサイズの境界は、いささか薄弱である。アミロイドベータなどの長い「ペプチド」をタンバ

40

50

ク質と考え、反対に、インスリンなどのより小さなタンパク質をペプチドと呼ぶこともある。

【0017】

本発明によるオリゴマー化ドメインは、コイルドコイルである。コイルドコイルは、主に3および4残基離れた疎水性残基の連続したパターンを有するタンパク質配列であり、それは、以下により詳細に説明するように、集合して多量体ヘリックスバンドルを形成する。

【0018】

式(I)の単量体構築ブロックの構成要素ND1、ND2、X1及びY1、及び/又は式(II)の単量体構築ブロックの構成要素(ND3、ND4、X2及びY2)は、任意で、標的化実体(targeting entity)、又はナノ粒子のアジュバント特性を強化する置換部分によりさらに置換され得る。置換されるとは、単量体構築ブロック上の1つの化学基を、単量体構築ブロックと共有結合した置換部分を生じる別の化学基により、置き換えることを意味する。かかる置換部分は、免疫刺激性核酸、好ましくは、デオキシイノシンを含むオリゴデオキシヌクレオチド、デオキシウリジンを含むオリゴデオキシヌクレオチド、CGモチーフを含むオリゴデオキシヌクレオチド、核酸分子を含む、CpG、イミキモド、レシキモド、ガルジキモド(Gardiquimod)、イノシン及びシチジン、又は類似のものであり得る。置換部分として考えられる特定の標的化実体は、ER標的シグナル、すなわち、小胞体(ER)へのタンパク質又はペプチドの輸送を誘導するシグナルペプチドである。

10

20

【0019】

好ましい実施態様において、式(I)又は(II)の構築ブロックは、置換部分X1又は置換部分Y1又は置換部分X2又は置換部分Y2のいずれかを含む。

【0020】

別の好ましい実施態様において、式(I)又は(II)の構築ブロックは、置換部分X1及びY1、又は置換部分X2及びY2を含む。従って、最も好ましい実施態様において、置換部分X1、X2、Y1又はY2は、例えば、X1-ND1-L1-ND2-Y1として又はX2-ND3-L2-ND4-Y2として、といった、タンパク質鎖の通常、一端での、好ましくは両端での伸張(extension)を表し、組み合わせさせた単一の連続したタンパク質配列を作る、ペプチド又はタンパク質置換部分である。好都合なことに、かかる単一の連続したタンパク質鎖は、組換えタンパク質発現系において、1の単一分子として発現され得る。互いを独立に形成する(independently form each other)置換部分X1、Y1、X2及びY2は、1から1000アミノ酸を含むペプチド又はタンパク質配列であり、好ましくは、B細胞エピトープとして又はフラジェリン若しくはWO2015104352に記載のその4つのドメインのサブセットとして用いられ免疫応答を増強する、完全にフォールディングしたタンパク質又はタンパク質ドメインに相当する配列である。

30

【0021】

フラジェリンは、4つのドメインD0、D1、D2及びD3から構成される分子構造を有する。タンパク質鎖は、D0ドメインにおけるN末端から始まり、他のドメインD1、D2及びD3を介して大きなループを分子の先端まで走り、ここで、それは、回転し、D3、D2及びD1を介して戻り、D0ドメインにおけるそのC末端をN末端の極めて近くに持って行く。フラジェリンは、自然免疫系の活性化の2つのモードを有する。第一のモードは、主に、そのD1ドメイン(Yoon et al., loc. cit.)の高度に保存された部分を介する、TLR5受容体との結合による。活性化の別のモードは、主に、そのD0ドメインの高度に保存されたC末部分を介した、インフラマソームとの相互作用による(Lightfield K.L. et al., Nat Immunol. 2008, 9:1171-8)。

40

【0022】

従って、好ましい実施態様において、置換部分X1、Y1、X2及びY2の少なくとも1つは、全長フラジェリン、例えば、全長サルモネラ・チフィリウムフラジェリン又は2

50

若しくは3のドメインのみを含むフラジェリン、好ましくは少なくともTLR5結合ドメインD1を含むフラジェリン、より好ましくは、D0及びD1ドメインを含むフラジェリン、特に配列番号6に示されるフラジェリンである。欠けているドメイン(単数又は複数)は、残りのフラジェリン配列の2つの末端をつなぐ、1から20アミノ酸の柔軟なリンカーセグメントにより置換されていてもよく、あるいは、それらは、完全にフォールディングしたタンパク質抗原により置き換えられていても良い。好ましい実施態様において、柔軟なリンカーは、配列番号9に示されるアミノ酸配列を含む。柔軟なリンカー領域は、抗原の共有結合的カップリングに適切な付着部分を含んでいてもよい。従って、フラジェリンのD2及びD3ドメインを欠くフラジェリン誘導体コンストラクトは、D1及びD2ドメインのインターフェイスで、単にタンパク質鎖を接続することにより、作製することができる。同様に、N末端及びC末端を有するタンパク質抗原がD1及びD2間のインターフェイスでN末端及びC末端を接続させることができる場合に、先端ドメイン(D3、又はD2及びD3と一緒に、のいずれか)は、タンパク質抗原と置き換えることができる。先端ドメインD2及びD3は、抗原分子の共有結合的カップリングに適した残基を有するペプチド配列で置き換えることもできる。

10

20

30

40

50

【0023】

別の好ましい実施態様において、X1、Y1、X2及びY2は、互いに独立に、一続きの、1又はそれより多いCD4又はCD8エピトープのストリングも含んでもよい。別の好ましい実施態様において、X1、Y1、X2及びY2は、互いに独立に、これらのタイプの免疫学的関連ペプチド及びタンパク質配列の1以上の組み合わせを含んでもよい。

【0024】

オリゴマーを形成する傾向とは、かかるタンパク質が、条件に応じてオリゴマーを形成することができること、例えば、変性条件下でそれらは単量体であるが、生理学的状態でそれらは例えば、二量体、三量体、四量体又は五量体を形成し得ることを意味する。事前に定義された条件下でそれらは1つの単一のオリゴマー化状態をとり、それは、ナノ粒子形成に必要である。しかしながら、それらのオリゴマー化状態は、例えば、塩濃度が減少する際に三量体から二量体に(Burkhard P. et al., Protein Science 2000, 9: 2294-2301)又はpHを減少させると五量体から単量体にといった、条件を変化する際に変化し得る。

【0025】

式(I)又は(II)に記載の構築ブロック構造は、ウイルスカプシドタンパク質と明確に区別される。ウイルスカプシドは、60又はその倍数のオリゴマーを形成する1の単一タンパク質、例えば肝炎ウイルスB粒子(EP1 262 555、EP0 201 416)、又は共集合してウイルスカプシド構造を形成する1より多いタンパク質のいずれかから構成される。それは、ウイルスのタイプに応じて、二十面体とは別の他の形状にも採用することができる(Fender P. et al., Nature Biotechnology 1997, 15: 52-56)。本発明のSAPNは、(a)ウイルスカプシドタンパク質以外から構築され、且つ(b)ナノ粒子の中央における空洞は、全ウイルスゲノムのDNA/RNAを収容するには小さすぎるため、ウイルス様粒子とも明確に区別される。

【0026】

タンパク質オリゴマー化ドメインは、よく知られている(Burkhard P. et al., Trends Cell Biol 2001, 11: 82-88)。本発明において、オリゴマー化ドメインは、コイルドコイルドメインである。コイルドコイルは、通常、7アミノ酸(ヘプタドリピート)又は11アミノ酸(ウンデカドリピート)の配列中に、主として3および4残基離れた疎水性残基の連続したパターンを有するタンパク質配列であり、それは、集合(フォールディング)して多量体ヘリックスバンドルを形成する。3及び4残基間隔が多少不規則に分布した配列を有するコイルドコイルもまた考えられる。疎水性残基は、特に疎水性アミノ酸Val、Ile、Leu、Met、Tyr、Phe及びTrpである。主に疎水性とは、残基の少なくとも50%が言及した疎水性アミノ酸から選択されなければならないことを意味する。

【 0 0 2 7 】

ヘプタッドリピート及びコイルドコイル

例えば、好ましい式 (I) 及び / 又は (I I) の単量体構築ブロックにおいて、ND 1、ND 2、ND 3 及び / 又は ND 4 は、ヘプタッドリピート又はウンデカッドリピート、より好ましくは、ヘプタッドリピート、特に式

$[aa(a) - aa(b) - aa(c) - aa(d) - aa(e) - aa(f) - aa(g)]_x$ (I I I a)、

$[aa(b) - aa(c) - aa(d) - aa(e) - aa(f) - aa(g) - aa(a)]_x$ (I I I b)、

$[aa(c) - aa(d) - aa(e) - aa(f) - aa(g) - aa(a) - aa(b)]_x$ (I I I c)、 10

$[aa(d) - aa(e) - aa(f) - aa(g) - aa(a) - aa(b) - aa(c)]_x$ (I I I d)、

$[aa(e) - aa(f) - aa(g) - aa(a) - aa(b) - aa(c) - aa(d)]_x$ (I I I e)、

$[aa(f) - aa(g) - aa(a) - aa(b) - aa(c) - aa(d) - aa(e)]_x$ (I I I f)、

$[aa(g) - aa(a) - aa(b) - aa(c) - aa(d) - aa(e) - aa(f)]_x$ (I I I g)、 20

のいずれかのタンパク質を含み、

ここで、aa は、アミノ酸又はそれらの誘導体を意味し、aa (a)、aa (b)、aa (c)、aa (d)、aa (e)、aa (f) 及び aa (g) は、同一の若しくは異なるアミノ酸又はそれらの誘導体、好ましくは aa (a) 及び aa (d) は、同一の若しくは異なる疎水性アミノ酸又はそれらの誘導体であり；且つ x は 2 から 20 の間の数、好ましくは 3 から 10 の間の数である。

【 0 0 2 8 】

ヘプタッドは、式 aa (a) - aa (b) - aa (c) - aa (d) - aa (e) - aa (f) - aa (g) (I I I a) 又は式 (I I I b) から (I I I g) のその並べ替えのいずれかのヘプタペプチドである。

【 0 0 2 9 】

式 (I) 又は (I I) の単量体構築ブロックであって、タンパク質オリゴマー化ドメイン ND 1、ND 2、ND 3 及び / 又は ND 4 が

(1) 式 (I I I a) から (I I I g) のいずれかのタンパク質であって、x は 3 であり且つ aa (a) 及び aa (d) は、これらの 6 アミノ酸について表 1 からのスコアの合計が少なくとも 14 であるように 20 の天然 α - L - アミノ酸から選択され、且つかかるタンパク質は、最大 17 のさらなるヘプタッドを含む、タンパク質；又は

(2) 式 (I I I a) から (I I I g) のいずれかのタンパク質であって、x は 3 であり aa (a) 及び aa (d) は、これらの 6 アミノ酸について表 1 からのスコアの合計が少なくとも 12 であるように 20 の天然 α - L - アミノ酸から選択され、ただし、1 のアミノ酸 aa (a) は、隣接するヘプタッドのアミノ酸 aa (d) 又は aa (g) にヘリックス間塩架橋を形成することができる荷電アミノ酸であるか、あるいは、1 のアミノ酸 aa (d) は、隣接するヘプタッドのアミノ酸 aa (a) 又は aa (e) にヘリックス間塩架橋を形成することができる荷電アミノ酸であり、かかるタンパク質は最大 2 のさらなるヘプタッドを含む、タンパク質 40

を含む、単量体構築ブロックが好ましい。隣接するヘプタッドのアミノ酸にヘリックス間塩架橋を形成することができる荷電アミノ酸は、例えば、他のアミノ酸が L y s、A r g 又は H i s である場合に、A s p 又は G l u であり、あるいはその逆である。

【 0 0 3 0 】

表 1：嗜好性 (コイルドコイル傾向) の決定のためのアミノ酸のスコア

アミノ酸	位置 aa(a)	位置 aa(d)
L (Leu)	3.5	3.8
M (Met)	3.4	3.2
I (Ile)	3.9	3.0
Y (Tyr)	2.1	1.4
F (Phe)	3.0	1.2
V (Val)	4.1	1.1
Q (Gln)	-0.1	0.5
A (Ala)	0.0	0.0
W (Trp)	0.8	-0.1
N (Asn)	0.9	-0.6
H (His)	-1.2	-0.8
T (Thr)	0.2	-1.2
K (Lys)	-0.4	-1.8
S (Ser)	-1.3	-1.8
D (Asp)	-2.5	-1.8
E (Glu)	-2.0	-2.7
R (Arg)	-0.8	-2.9
G (Gly)	-2.5	-3.6
P (Pro)	-3.0	-3.0
C (Cys)	0.2	-1.2

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

タンパク質オリゴマー化ドメインND 1、ND 2、ND 3及び/又はND 4が、以下の好ましいタンパク質から選択されるタンパク質を含む、式(I)又は(I I)の単量体構築ブロックもまた好ましい：

(11) $aa(a)$ は、Val、Ile、Leu 及び Met 及びそれらの誘導体から選択され、且つ

$aa(d)$ は、Leu、Met、Val 及び Ile 及びそれらの誘導体から選択される、式 (IIIa) から (IIIg) のいずれかのタンパク質。

(12) 1つの $aa(a)$ は、Asn であり、且つ他の $aa(a)$ は、Asn、Ile 及び Leu から選択され、且つ $aa(d)$ は Leu である、式 (IIIa) から (IIIg) のいずれかのタンパク質。かかるタンパク質は、通常、二量体化ドメインである。

(13) $aa(a)$ 及び $aa(d)$ は、いずれも Leu であるか、又はいずれも Ile である、式 (IIIa) から (IIIg) のいずれかのタンパク質。かかるタンパク質は、通常、三量体化ドメインである。

(14) $aa(a)$ 及び $aa(d)$ は、いずれも Trp である、式 (IIIa) から (IIIg) のいずれかのタンパク質。かかるタンパク質は、通常、五量体化ドメインである。

(15) $aa(a)$ 及び $aa(d)$ はいずれも Phe である、式 (IIIa) から (IIIg) のいずれかのタンパク質。かかるタンパク質は、通常、四量体化ドメインである。

(16) $aa(a)$ 及び $aa(d)$ は、いずれも、Trp 又は Phe のいずれかである、式 (IIIa) から (IIIg) のいずれかのタンパク質。かかるタンパク質は、通常、五量体化ドメインである。

(17) $aa(a)$ は、Leu 又は Ile のいずれかであり、且つ 1つの $aa(d)$ は、Gln であり、且つ他の $aa(d)$ は Gln、Leu 及び Met から選択される、式 (IIIa) から (IIIg) のいずれかのタンパク質。かかるタンパク質は、五量体化ドメインになる可能性を有する。

他の好ましいタンパク質は、上文で定義したタンパク質 (1)、(2)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16) 及び (17) であって、さらに、(18) 少なくとも 1つの $aa(g)$ は、Asp 及び Glu から選択され、続くヘプタッドにおいて $aa(e)$ は Lys、Arg 又は His であり；且つ / 又は

(19) 少なくとも 1つの $aa(g)$ は Lys、Arg 及び His から選択され、且つ続くヘプタッドにおいて $aa(e)$ は Asp 又は Glu であり、且つ / 又は

(20) 少なくとも 1つの $aa(a$ から $g)$ は、Lys、Arg 及び His から選択され、配列において 3 又は 4 アミノ酸離れた $aa(a$ から $g)$ は Asp 又は Glu である。かかるアミノ酸 $aa(a$ から $g)$ のペアは、例えば $aa(b)$ 及び $aa(e)$ 又は $aa(f)$ である。

【0032】

PCOILS (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils>; Gruber M. et al., J. Struct. Biol. 2006, 155(2): 140-5) 又は MULTICOIL (<http://groups.csail.mit.edu/cb/multicoil/cgi-bin/multicoil.cgi>) などのコイルドコイル予測プログラムは、コイルドコイル形成タンパク質配列を予測することができる。従って、式 (I) 又は (II) の単量体構築ブロックにおいて、ND1、ND2、ND3 及び / 又は ND4 は、コイルドコイル予測プログラム PCOILS により 14、21 又は 28 のウィンドウ・サイズの少なくとも 1つを用い、その全てのアミノ酸について 0.9 より高い確率でコイルドコイルを形成すると予測される少なくとも 2 のヘプタッドリピートの長さの配列を含むタンパク質を含む。

【0033】

より好ましい式 (I) 又は (II) の単量体構築ブロックにおいて、ND1、ND2、ND3 及び / 又は ND4 は、14、21 又は 28 のウィンドウ・サイズの少なくとも 1つを用いてコイルドコイル予測プログラム PCOILS により、その全てのアミノ酸について 0.9 より高い確率でコイルドコイルを形成すると予測される、3 ヘプタッドリピートの長さの少なくとも 1 の配列を含むタンパク質を含む。

【0034】

別のより好ましい式 (I) 又は (II) の単量体構築ブロックにおいて、ND1、ND

10

20

30

40

50

2、ND3及び/又はND4は、14、21又は28のウィンドウ・サイズの少なくとも1つを用いてコイルドコイル予測プログラムPCOILSにより、その全てのアミノ酸について0.9より高い確率でコイルドコイルを形成すると予測される、少なくとも2つの別々の、2ヘプタッドリピートの長さの配列を含むタンパク質を含む。

【0035】

RCSB構造データベース

既知のコイルドコイル配列は、RCSBタンパク質データバンク (<http://www.rcsb.org>) などのデータバンクから取得し得る。

【0036】

五量体コイルドコイル

五量体コイルドコイルは、「コイルド」又は「ジッパー」についてのテキスト検索と組み合わせ、「タンパク質対称性は環状C5である」との弁別子(discriminator)を用いた、生物学的集合における対称性についての検索によりRCSBデータベース (<http://www.rcsb.org/pdb/>) から取得することができる。適切なエントリーのリストは、4PN8、4PND、4WBA、3V2N、3V2P、3V2Q、3V2R、4EEB、4EED、3MIW、1MZ9、1FBM、1VDF、2GUV、2HYN、1ZLL、1T8Zを含む。

【0037】

四量体、三量体及び二量体コイルドコイル

同様に、それぞれ、「コイルド」又は「ジッパー」についてのテキスト検索と組み合わせ、四量体コイルドコイルは、「タンパク質対称性は「環状C4」である」を用いて取得することができ、三量体コイルドコイルは、「タンパク質対称性は「環状C3」である」を用いて取得することができ、及び二量体コイルドコイルは、「タンパク質対称性は「環状C2」である」を用いて取得することができる。

【0038】

四量体コイルドコイルについて、これは、以下の適切なエントリーを生じる： 5D60、5D5Y、5AL6、4WB4、4BHV、4C5Q、4GJW、4H7R、4H8F、4BXT、4LTO、4LTP、4LTQ、4LTR、3ZDO、3RQA、3R4A、3R4H、3TSI、3K4T、3F6N、2O6N、2OVC、2O1J、2O1K、2AG3、2CCE、1YBK、1U9F、1U9G、1U9H、1USD、1USE、1UNT、1UNU、1UNV、1UNW、1UNX、1UNY、1UNZ、1UO0、1UO1、1UO2、1UO3、1UO4、1UO5、1W5I、1W5L、1FE6、1G1I、1G1J、1EZJ、1RH4、1GCL。

三量体コイルドコイルについて、これは、以下の適切なエントリーを生じる： 5TOH、5TOI、5K92、5KB0、5KB1、5KB2、5KKV、5EFM、2N64、5ABS、5IEA、5APP、5APQ、5APS、5APY、5APZ、5D5Z、4YPC、4YV3、4CGB、4CGC、4CJD、4R0R、4UW0、4P67、4OXM、3W8V、3W92、3W93、4I2L、4K8U、4JBZ、3VTQ、4L1R、4JDO、4J4A、4E52、3VYI、3ZMF、3VU5、3VU6、2YNY、2YNZ、2YO0、2YO1、2YO2、4G1A、4GIF、3TQ2、4DZK、4DZL、4DZN、3TE3、3R48、3SWF、3SWY、3PR7、2YKO、2YKP、2YKQ、3NTN、3PP5、3MKO、3MGN、3NWA、3NWD、3NWF、3L35、3L36、3L37、3M9B、3M9D、2X6P、3LJM、3AHA、3H7X、3H7Z、3LT6、3LT7、3GJP、2KP8、3KPE、2WPR、2WPS、2WPY、2WPZ、2WQ0、2WQ1、2WQ2、2WQ3、3HFC、3HFE、3HRN、3HRO、3H5F、3H5G、2WG5、2WG6、2W6B、2JJL、2VRS、3EFG、3DUZ、2OT5、2Z2T、2QIH、3BK6、2O7H、2R32、2JGO、2Q7C、2Q3I、2Q5U、2IBL、1ZV8、1ZVB、2FXP、1WT6、2AKF、1TGG、1SLQ、1S9Z、1PW9、1PWB、1M7L、1GZL、1KYC、1KFM、1KFN

10

20

30

40

50

、 1 I J 0、 1 I J 1、 1 I J 2、 1 I J 3、 1 H Q J、 1 Q U 1、 1 B 0 8、 1 C Z Q
 、 1 C U N、 1 S V F、 1 C E 0、 1 P I Q、 1 A Q 5、 1 A V Y、 1 H T N、 1 A A 0
 、 1 Z I J、 1 Z I M、 1 C O I、 1 S W I、 1 G C M、 1 H U P。

【 0 0 3 9 】

二量体コイルドコイルについて、これは、以下の適切なエントリーを生じる： 5 M 9 7
 、 5 M 9 E、 5 F I Y、 5 F 4 Y、 5 D 3 A、 5 H M O、 5 E Y A、 5 I X 1、 5 I X 2
 、 5 J H F、 5 J V M、 5 J V P、 5 J V R、 5 J V S、 5 J V U、 5 J X 1、 5 F C N
 、 5 H H E、 2 N 9 B、 4 Z R Y、 4 Z 6 Y、 4 Y T O、 4 Z I 3、 5 A J S、 5 F 3 K
 、 5 F 5 R、 5 H U Z、 5 D J N、 5 D J O、 5 C H X、 5 C J 0、 5 C J 1、 5 C J 4
 、 5 C 9 N、 5 C F F、 4 W H V、 3 W U T、 3 W U U、 3 W U V、 4 Z Q A、 4 X A 3
 、 4 X A 4、 4 P X J、 4 Y V C、 4 Y V E、 5 B M L、 5 A L 7、 4 W O T、 4 C G 4
 、 5 A M O、 4 W I I、 4 W I K、 4 R S J、 4 C F G、 4 R 3 Q、 4 W I D、 4 C K G
 、 4 C K H、 4 N S W、 4 W 7 P、 4 Q Q 4、 4 O J K、 4 T L 1、 4 O H 9、 4 L P Z
 、 4 Q 6 2、 4 L 2 W、 4 M 3 L、 4 C K M、 4 C K N、 4 N 6 J、 4 L T B、 4 L R Z
 、 2 M A J、 2 M A K、 4 N A D、 4 H W 0、 4 B T 8、 4 B T 9、 4 B T A、 4 H H D
 、 4 M 8 M、 4 J 3 N、 4 L 6 Q、 4 C 1 A、 4 C 1 B、 4 G D O、 4 B W K、 4 B W P
 、 4 B W X、 4 H U 5、 4 H U 6、 4 L 9 U、 4 G 0 U、 4 G 0 V、 4 G 0 W、 4 L 3 I
 、 4 G 7 9、 4 G E U、 4 G E X、 4 G F A、 4 G F C、 4 B L 6、 4 J M R、 4 J N H
 、 2 Y M Y、 4 H A N、 3 V M Y、 3 V M Z、 3 V N 0、 4 A B X、 3 W 0 3、 2 L W 9
 、 4 D Z M、 4 E T O、 3 T N U、 3 T H F、 4 E 8 U、 3 V M X、 4 E 6 1、 3 V E M
 、 3 V B B、 4 D J G、 3 T V 7、 3 S T Q、 3 V 8 S、 3 Q 8 T、 3 U 1 C、 3 Q H 9
 、 3 A Z D、 3 O N X、 3 O K Q、 3 Q X 3、 3 S J A、 3 S J B、 3 S J C、 2 L 2 L
 、 3 Q F L、 3 Q K T、 2 X V 5、 2 Y 3 W、 3 Q 0 X、 3 A J W、 3 N C Z、 3 N I 0
 、 2 X U 6、 3 M 9 1、 3 N M D、 3 L L L、 3 L X 7、 3 M E 9、 3 M E U、 3 M E V
 、 3 A B H、 3 A C O、 3 I A O、 3 H L S、 2 W M M、 3 A 6 M、 3 A 7 O、 2 W V R
 、 3 I C X、 3 I D 5、 3 I D 6、 3 H N W、 3 I 1 G、 2 K 6 S、 3 G H G、 3 G 1 E
 、 2 W 6 A、 2 V 5 1、 3 E R R、 3 E 1 R、 2 V Y 2、 2 Z R 2、 2 Z R 3、 3 C L 3
 、 3 D 9 V、 2 Z 1 7、 2 J E E、 3 B B P、 3 B A S、 3 B A T、 2 Q M 4、 2 V 7 1
 、 2 N O 2、 2 P O N、 2 V 0 O、 2 D Q 0、 2 D Q 3、 2 Q 2 F、 2 N R N、 2 E 7 S
 、 2 H 9 V、 2 F X M、 2 H J D、 2 G Z D、 2 G Z H、 2 F V 4、 2 F 2 U、 2 E U L
 、 2 E S M、 2 E T K、 2 E T R、 1 Z X A、 1 Y I B、 1 Y I G、 1 X S X、 1 R F Y
 、 1 U 0 I、 1 X J A、 1 T 3 J、 1 T 6 F、 1 R 7 J、 1 U I I、 1 P L 5、 1 S 1 C
 、 1 P 9 I、 1 R 4 8、 1 U R U、 1 O V 9、 1 U I X、 1 N O 4、 1 N Y H、 1 M V 4
 、 1 L R 1、 1 L 8 D、 1 L J 2、 1 K Q L、 1 G X K、 1 G X L、 1 G K 6、 1 J R 5
 、 1 G M J、 1 J A D、 1 J C H、 1 J B G、 1 J T H、 1 J Y 2、 1 J Y 3、 1 I C 2
 、 1 H C I、 1 H F 9、 1 H B W、 1 F X K、 1 D 7 M、 1 Q U U、 1 C E 9、 2 A 9 3
 、 1 B M 9、 1 A 9 3、 1 T M Z、 2 A A C、 1 Z I I、 1 Z I K、 1 Z I L、 2 A R A
 、 2 A R C、 1 J U N、 1 Y S A、 2 Z T A。しかしながら、周期的な二回対称性を有す
 る二量体コイルドコイルは、平行コイルドコイル及び逆平行コイルドコイルを選択するた
 め、この二量体構造のリストは逆平行コイルドコイルをも含む。構造の外観検査により、
 逆平行二量体コイルドコイルと平行コイルドコイルとを容易に区別することができる。

【 0 0 4 0 】

五量体、四量体、三量体及び二量体コイルドコイルについてのそれらのエントリーのい
 くつはさらなるタンパク質ドメインを含むものもあるが、外観検査時に、それらのさらな
 るドメインは容易に検出し取り除くことができる。

【 0 0 4 1 】

代替のウェブサイトとして、http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/ccplus/search/periodic_table/は、二量体、三量体、四量体及び五量体（ 2 G U V など）コイルドコイルか
 らのコイルドコイル構造の周期表を提供する。

【 0 0 4 2 】

10

20

30

40

50

これらの五量体、四量体、三量体及び二量体コイルドコイルドメインのアミノ酸改変も想定される。かかる改変は、例えば、位置 $aa(e)$ 、 $aa(g)$ 、 $aa(b)$ 、 $aa(c)$ 又は $aa(f)$ での、好ましくは $aa(b)$ 、 $aa(c)$ 又は $aa(f)$ の位置での、最も好ましくは $aa(f)$ の位置での、オリゴマーの外側の非コア残基 ($aa(a)$ 及び $aa(d)$) であるアミノ酸の置換であってもよい。可能性のある改変は、これらのオリゴマーをより可溶性にするための、荷電残基への置換である。これらのドメインのより短いコンストラクトも想定される。

【0043】

他のアミノ酸改変は、例えば、オリゴマーを安定化する目的のための、コア位置 ($aa(a)$ 及び $aa(d)$) でのアミノ酸の置換であってもよく、すなわち、あまり好ましくないコア残基をより好ましい残基と置き換えることによるものであってもよく、すなわち、原則として、表 1 により、より低いコイルドコイル傾向を有するコア位置での残基は、それらがコイルドコイルのオリゴマー化状態を変化させない場合、より高いコイルドコイル傾向を有する残基と置き換えることができる。

【0044】

本明細書中使用される用語、「アミノ酸改変」は、ポリペプチド配列におけるアミノ酸置換、挿入、及び/又は欠失を含む。本明細書中「アミノ酸置換 (substitution)」又は「置換」は、親ポリペプチド配列における、特定の位置でのアミノ酸の別のアミノ酸への置き換えを意味する。例えば、置換 R94K は、位置 94 のアルギニンがリジンに置き換えたバリエーションポリペプチドを指す。本明細書における目的のため、複数の置換は典型的にはスラッシュで区切られる。例えば、R94K/L78V は、置換 R94K 及び L78V を含むダブルバリエーションを指す。本明細書中に用いられる「アミノ酸挿入」又は「挿入」は、親ポリペプチド配列における、特定の位置でのアミノ酸の付加を意味する。例えば、インサート 94 は、位置 94 での挿入を指定する。本明細書中に用いられる「アミノ酸欠失」又は「欠失」は、親ポリペプチド配列における特定の位置でのアミノ酸の除去を意味する。例えば、R94- は、位置 94 でのアルギニンの欠失を指定する。

【0045】

本明細書に記載のアミノ酸改変を含むペプチド又はタンパク質は、親 (改変されていない) ペプチド又はタンパク質と、好ましくは少なくとも約 80%、最も好ましくは少なくとも約 90%、より好ましくは、少なくとも約 95%、特に 99% のアミノ酸配列同一性を持つであろう。好ましくは、アミノ酸改変は、保存的改変である。

【0046】

本明細書中に用いられる、用語「保存的改変」又は「保存的配列改変」は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に著しく影響を及ぼすものでなく又は抗体の結合特性を変更するものでない、アミノ酸改変を指すことを意図する。かかる保存的改変は、アミノ酸置換、挿入及び欠失を含む。改変は、部位特異的変異生成及び PCR 媒介性変異生成などの当該技術分野で知られた標準的技術により、本発明のタンパク質に導入され得る。

【0047】

保存的アミノ酸置換とは、それにおいてアミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖 (例、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例、アスパラギン酸、グルタミン酸)、極性無電荷側鎖 (例、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖 (例、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)、ベータ分岐側鎖 (例、トレオニン、バリン、イソロイシン) 及び芳香族側鎖 (例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を有するアミノ酸を含む。

【0048】

特定のコイルドコイル

実施例に記載される、コイルドコイル配列及び単量体構築ブロックは、最も好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

リンカー

リンカーは、第一のオリゴマー化ドメインの最後のコア残基（ a a (a) 又は a a (d) のいずれか）から、第二のコイルドコイルオリゴマー化ドメインの最初のコア残基（ a a (a) 又は a a (d) のいずれか）に、2つのコイルドコイルオリゴマー化ドメインを接続する。

【 0 0 5 0 】

ペプチドリンカー L 1 及び / 又は L 2 は、通常、3 から 5 0 個のアミノ酸を有する、好ましくは 3 から 1 0 個のアミノ酸を有する、より好ましくは、4 から 9 個のアミノ酸を有するペプチド鎖から構成される。好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、少なくとも 2 アミノ酸、少なくとも 4 アミノ酸、少なくとも 5 アミノ酸、少なくとも 6 アミノ酸、少なくとも 7 アミノ酸、少なくとも 8 アミノ酸、少なくとも 9 アミノ酸、又は少なくとも 1 0 アミノ酸からなる。より好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、少なくとも 4 アミノ酸、少なくとも 7 アミノ酸、又は少なくとも 9 アミノ酸からなる。さらにより好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、少なくとも 4 アミノ酸からなる。

10

【 0 0 5 1 】

さらに好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、2 アミノ酸、4 アミノ酸、5 アミノ酸、6 アミノ酸、7 アミノ酸、8 アミノ酸、9 アミノ酸、又は 1 0 アミノ酸からなる。より好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、4 アミノ酸、7 アミノ酸、又は 9 アミノ酸からなる。さらにより好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、4 アミノ酸からなる。

20

【 0 0 5 2 】

特定の実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列、配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列及び配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、好ましくは配列番号 4 に示されるアミノ酸配列及び配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、より好ましくは、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【 0 0 5 3 】

ペプチドリンカー L 1 及び / 又は L 2 は、互いに独立に、通常、生理学的状態で、2 の及び 1 0、好ましくは 3 から 7 の正電荷を含む。生理学的状態は、水性溶液中、p H 6 . 5 から 8 . 5 で、好ましくは約 7 . 0 から 7 . 6 の p H の状態に相当する。好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、少なくとも 2 の正電荷、少なくとも 3 の正電荷、少なくとも 4 の正電荷、少なくとも 5 の正電荷、少なくとも 6 の正電荷、少なくとも 7 の正電荷、少なくとも 8 の正電荷、少なくとも 9 の正電荷、又は少なくとも 1 0 の正電荷を含む。より好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、少なくとも 3 の正電荷、少なくとも 5 の正電荷、又は少なくとも 7 の正電荷を含む。さらにより好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、少なくとも 3 の正電荷を含む。

40

【 0 0 5 4 】

さらに好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、2 の正電荷、3 の正電荷、4 の正電荷、5 の正電荷、6 の正電荷、7 の正電荷、8 の正電荷、9 の正電荷、又は 1 0 の正電荷を含む。より好ましい実施態様において、ペプチドリンカー L 1 及び / 又はペプチドリンカー L 2 は、互いに独立に、

50

3 の正電荷、5 の正電荷、又は7 の正電荷を含む。さらにより好ましい実施態様において、ペプチドリinker-L 1 及び / 又はペプチドリinker-L 2 は、互いに独立に、3 の正電荷を含む。

【0055】

好ましい実施態様において、ペプチドリinker-L 1 及び / 又はペプチドリinker-L 2 は、互いに独立に、RRGR (配列番号4) 又はKKGK (配列番号12) などの少なくとも1 のグリシン残基を含む。

【0056】

好ましい実施態様において、ペプチドリinker-L 1 及び / 又はペプチドリinker-L 2 は、互いに独立に、少なくとも4 アミノ酸からなり、生理学的状態で全体として少なくとも + 3 の正電荷を有する。

10

【0057】

好ましい実施態様において、ペプチドリinker-L 1 及びペプチドリinker-L 2 は同一である。

【0058】

核酸誘導体

本明細書中に用いられる用語、核酸誘導体は、一本鎖DNAを含む。シトシンヌクレオチドがメチル化されておらずグアニンが続くシトシン、RNA ウイルス由来の一本鎖RNA、RNA ウイルス由来の二本鎖RNA 及びRNA ウイルス由来の二本鎖RNA を模倣する高分子複合体を含む。

20

【0059】

二本鎖RNA (dsRNA) を模倣する高分子複合体は、例えば、ポリI : ポリC (pIC) であり、それは、好ましい。pIC は、二本鎖RNA (dsRNA) を模倣する巨大な合成高分子複合体である。pIC の調製物は、鎖長、溶解性及び毒性を含む他の生物学的特性の分布が様々である。

【0060】

グアニンが続くシトシンを含む一本鎖DNA であってシトシンヌクレオチドがメチル化されていない一本鎖DNA は、通常、CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) である。合成分子であるCpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) は、典型的なリン酸ジエステル骨格の代わりに、完全にまたは部分的にホスホロチオエート骨格を有し、任意で5' エンド、3' エンドにポリG のテイルを有するという点で、天然微生物DNA とは異なる。ポリG テイルは、高分子量集合体をもたらす細胞への取り込みを増強する分子間テトラドを形成し、ホスホロチオエートを有する改変は、in vivo でDNase などのヌクレアーゼによる分解からODN を保護する。

30

【0061】

多くの異なる配列は、CpG 二量体の数と位置、並びにCpG 二量体に隣接する正確な塩基配列が異なるTLR 9 を刺激することを示されてきた。それは、CpG ODN の5 つの非公式クラス又はカテゴリーに分類され得る。これらのクラスは、それらの配列、二次構造及びヒト末梢血単核細胞 (PBMC) への効果に基づき、クラスA (タイプD)、クラスB (タイプK)、クラスC、クラスP 及びクラスS と呼ばれる。

40

【0062】

クラスA ODN は、大量のタイプI インターフェロン、最も重要なものであるIFN α の産生を刺激し、形質細胞様樹状細胞の成熟を誘導するという点で、クラスB ODN と明確に異なる。クラスA ODN は、間接的なサイトカインシグナリングを介したNK 細胞の強力な活性化剤でもある。他方、クラスB ODN は、ヒト単球及びB 細胞成熟の強力な刺激剤である。それらは、形質細胞様樹状細胞の成熟も刺激し、それらは、クラスA ODN よりも少ない範囲でこれを行う。それらは、非常に少ない量のIFN α も刺激する。

【0063】

クラスA

50

ODN 2216 は、クラス A CpG ODN であり、ヒト TLR9 に最適ナリガンドである。それは、配列 5' - g g G G G A C G A : T C G T C g g g g g g - 3' (配列番号 43) を有する 20mer である。大文字に示される塩基は、リン酸ジエステルであり、小文字に示される塩基は、ヌクレアーゼ耐性ホスホロチオエートである。パリンδροームに下線を引いた。ODN 2336 は、ヒト TLR9 について嗜好性を有する、別の A - クラス CpG ODN である。それは、配列 5' - g g g G A C G A C : G T C G T G g g g g g g - 3' (配列番号 44) を有する 21mer である。

【0064】

クラス B

ODN 1826 は、マウス TLR9 に特異的なクラス B CpG ODN である。それは、配列 5' - t c c a t g a c g t t c c t g a c g t t - 3' (配列番号 13) を有する 20mer である。全ての塩基は、ヌクレアーゼ耐性のホスホロチオエート類である。ODN 2006 は、クラス B CpG ODN であり、ヒト TLR9 の最適ナリガンドである。それは、配列 5' - t c g t c g t t t t g t c g t t t t g t c g t t - 3' (配列番号 42) を有する 24mer である。ODN BW006 は、さらなるタイプ B CpG ODN であり、ヒト GTCGTT における、最適なモチーフの 2 倍を含む。それは、配列 5' - t c g a c g t t c g t c g t t c g t c g t t c - 3' (配列番号 45) を有する 23mer である。別のタイプ B CpG は、ODN D-SL01 である。それは、多様な脊椎動物種、すなわち、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ及びイヌにおける TLR9 アゴニストであり、配列 5' - t c g c g a c g t t c g c c c g a c g t t c g g t a - 3' (配列番号 49) (26mer) を有する。

【0065】

クラス C

ODN 2395 は、ヒト及びマウス TLR9 に特異的な CpG ODN クラス C である。C - クラス CpG ODN として、それは、完全なホスホロチオエート骨格及びパリンδροームモチーフを含む CpG を含む。C - クラス CpG ODN は、pDC からの強力な IFN- α 産生及び B 細胞刺激を誘導する。それは、配列 5' - t c g t c g t t t t c g g c g c : g c g c c g - 3' (配列番号 46) を有する 22mer である。全ての塩基は、ホスホロチオエートであり、パリンδροームに下線を引いた。ODN M362 は、ヒト及びマウス TLR9 に特異的な、別の CpG ODN クラス C である。それは、配列 5' - t c g t c g t c g t t c : g a a c g a c g t t g a t - 3' (配列番号 47) を有する 25mer である。別のタイプ C CpG ODN は、ODN D-SL03 である。それは、多様な脊椎動物種、すなわち、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ及びイヌにおける、TLR9 アゴニストである。ODN D-SL03 は、ダブルステムループ、ホスホロチオエート骨格、及び各ループにおいて AACGTT モチーフ及び TTCGAA モチーフを有する 2 つのパリンδροームから構成される。ODN D-SL03 は、おそらくパリンδροーム配列の存在により、ロバスタな IFN- α の誘導剤である。D-SL03 は、多様な脊椎動物種、すなわち、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びブタから得られる P BMC / 脾細胞並びにヒト B 細胞、NK 細胞及び単核細胞を強く活性化することが示されている。ODN D-SL03 は、確立された乳がんを有するマウスにおいて抗腫瘍活性を実証する。それは、配列 5' - t c g c g a a c g t t c g c c g c g t t c g a a c g c g g - 3' (配列番号 48) を有する 29mer である。

【0066】

好ましい実施態様において、核酸誘導体は、CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) である。好ましい実施態様において、核酸誘導体は、CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) であって、CpG モチーフにおける、少なくとも 1 のヌクレオチド、好ましくは少なくとも 1 のシトシンヌクレオチドはメチル化されていない、CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) である。好ましい実施態様において、核酸誘導体は、CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) であって、CpG モチーフにおける、1 ~ 10 の、好ましくは 2 ~ 8 の、より好ましくは、2 ~ 5 のシ

10

20

30

40

50

トシヌクレオチドはメチル化されていない、C p G オリゴデオキシヌクレオチド (C p G ODN) である。

【0067】

さらにより好ましい実施態様において、核酸誘導体は、クラスA C p G ODN、クラスB C p G ODN及びクラスC C p G ODNからなる群より選択されるC p G オリゴデオキシヌクレオチド (C p G ODN) である。特定の好ましい実施態様において、核酸誘導体は、配列番号13、配列番号39、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48及び配列番号49で示されるヌクレオチド酸配列からなる群より選択されるC p G オリゴデオキシヌクレオチド (C p G ODN) であり、特に、核酸誘導体は、配列番号13で示されるヌクレオチド酸配列及び配列番号39で示されるヌクレオチド酸配列からなる群より選択されるC p G オリゴデオキシヌクレオチド (C p G ODN) である。

10

【0068】

本発明による組成物において、核酸誘導体は、SAPNと共有結合的に結合していない、すなわち、核酸誘導体は、イオン性相互作用によりSAPNと結合している。通常、核酸誘導体は、イオン性相互作用により、ペプチドリinker-L1及び/又はL2と結合している。

【0069】

自己集合タンパク質ナノ粒子：LCMユニット

SAPNは、任意で式(II)の単量体構築ブロックと共集合した式(I)の単量体構築ブロックから形成される。かかる構築ブロックが集合する場合、それらは、いわゆる「LCMユニット」を形成するであろう。かかるLCMユニットへと集合するであろう単量体構築ブロックの数は、最小公倍数(LCM)により定義されるであろう。従って、例えば、単量体構築ブロックのオリゴマー化ドメインが五量体(ND1)₅ (m=5)及び三量体(ND2)₃ (n=5)を形成する場合、15の単量体が、LCMユニットを形成するであろう。リンカーセグメントL1及びL2が適切な長さを有する場合、このLCMユニットは、球状タンパク質ナノ粒子の形で集合しても良い。SAPNは、1のみ又は1より多いLCMユニット(表2)の集合により形成されてもよい。かかるSAPNは、トポロジ的に閉じた構造を表す。

20

【0070】

正多面体

5つの正多面体、四面体、立方体、八面体、十二面体及び二十面体が存在する。それらは、異なる内部の回転対称要素を有する。四面体は、2回及び2つの3回軸を有し、立方体及び八面体は、2回、3回及び4回回転対称軸を有し、十二面体及び二十面体は、2回、3回及び5回回転対称軸を有する。立方体においてこれらの軸の空間的配向は八面体と全く同じであり、且つ十二面体及び二十面体においてこれらの軸の互いに対する空間的配向は全く同じである。従って、本発明のSAPNの目的のために、十二面体及び二十面体は、同一であると考えられることができる。十二面体/二十面体は、60の同一の3次元構築ブロック(表1)から構築される。これらの構築ブロックは、多面体の非対称ユニット(AU)である。それらは角錐であり、角錐のエッジは、回転対称軸の1つに相当し、従って、これらのAUはそれらのエッジで2回、3回及び5回対称性要素を運ぶであろう。これらの対称性要素がタンパク質オリゴマー化ドメインから生じる場合、かかるAUは、上記単量体構築ブロックから構築される。AUの対称軸の2つに沿って、2つのオリゴマー化ドメインND1及びND2又はND3及びND4を並べることで十分である。これらの2つのオリゴマー化ドメインが安定なオリゴマーを形成する場合、第三の対称軸に沿った対称性インターフェイスは自動的に生じるであろうし、且つこのインターフェイスに沿った相互作用、例えば、疎水性、親水性相互作用又はイオン性相互作用、又はジスルフィド架橋などの共有結合を最適化することにより、安定化してもよい。

40

【0071】

好ましい実施態様において、式(I)又は(II)のオリゴマー化ドメインND1、N

50

D 2、ND 3 及び ND 4 の少なくとも 1 つ、好ましくは ND 1 及び / 又は ND 3 又は ND 2 及び / 又は ND 4 のいずれかは、二量体、三量体、四量体及び / 又は五量体ドメイン、より好ましくは、二量体、四量体及び / 又は五量体ドメイン、さらにより好ましくは、二量体及び / 又は五量体ドメインを含む。

【0072】

より好ましい実施態様において、式 (I) 又は (II) のオリゴマー化ドメイン ND 1、ND 2、ND 3 及び / 又は ND 4 の 1 つ、より好ましくは、ND 1 及び / 又は ND 3 又は ND 2 及び / 又は ND 4 のいずれかは、4PN8、4PND、4WBA、3V2N、3V2P、3V2Q、3V2R、4EEB、4EED、3MIW、1MZ9、1FBM、1VDF、2GUV、2HYN、1ZLL 及び 1T8Z からなる群より選択される五量体コイルドコイルを含むか、又は 4PN8、4PND、4WBA、3V2N、3V2P、3V2Q、3V2R、4EEB、4EED、3MIW、1MZ9、1FBM、1VDF、2GUV、2HYN、1ZLL 及び 1T8Z からなる群より選択される五量体コイルドコイルであって、アミノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなった五量体コイルドコイルを含み、各コイルドコイルは、RCSB タンパク質データベース (RCSB PDB) の p d b エントリー番号付けにより示される。さらにより好ましくは、ND 1 は、トリプトファン - ジッパー五量体化ドメイン (p d b - e n t r y : 1 T 8 Z)、又はアミノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなったトリプトファン - ジッパー五量体化ドメイン (p d b - e n t r y : 1 T 8 Z)、特に配列番号 3 又は配列番号 25 を含む五量体コイルドコイル) 又はアミノ酸改変を有する及び / 又はいずれかの末端又は両端が短くなった配列番号 3 又は配列番号 25 を含む五量体コイルドコイルからなる群より選択される五量体コイルドコイルである。

10

20

【0073】

別のより好ましい実施態様において、式 (I) 又は (II) のオリゴマー化ドメイン ND 1、ND 2、ND 3 及び ND 4 の少なくとも 1 つ、より好ましくは、ND 1 及び / 又は ND 3 又は ND 2 及び / 又は ND 4 のいずれかは、四量体コイルドコイル 5D60、5D5Y、5AL6、4WB4、4BHV、4C5Q、4GJW、4H7R、4H8F、4BXT、4LTO、4LTP、4LTQ、4LTR、3ZDO、3RQA、3R4A、3R4H、3TSI、3K4T、3F6N、2O6N、2OVC、2O1J、2O1K、2AG3、2CCE、1YBK、1U9F、1U9G、1U9H、1USD、1USE、1UNT、1UNU、1UNV、1UNW、1UNX、1UNY、1UNZ、1UO0、1UO1、1UO2、1UO3、1UO4、1UO5、1W5I、1W5L、1FE6、1G1I、1G1J、1EZJ、1RH4、1GCL からなる群より選択される四量体コイルドコイル、又はアミノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなった 5D60、5D5Y、5AL6、4WB4、4BHV、4C5Q、4GJW、4H7R、4H8F、4BXT、4LTO、4LTP、4LTQ、4LTR、3ZDO、3RQA、3R4A、3R4H、3TSI、3K4T、3F6N、2O6N、2OVC、2O1J、2O1K、2AG3、2CCE、1YBK、1U9F、1U9G、1U9H、1USD、1USE、1UNT、1UNU、1UNV、1UNW、1UNX、1UNY、1UNZ、1UO0、1UO1、1UO2、1UO3、1UO4、1UO5、1W5I、1W5L、1FE6、1G1I、1G1J、1EZJ、1RH4、1GCL からなる群より選択される四量体コイルドコイルを含む。各コイルドコイルは、RCSB タンパク質データベース (RCSB PDB) の p d b エントリー番号付けにより示される。

30

40

【0074】

最も好ましい実施態様において、四量体コイルドコイルは、テトラブラキオン (t e t r a b r a c h i o n) (p d b - エントリーコード 1FE6) 由来であるか、又は四量体コイルドコイルは、アミノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなったテトラブラキオン (t e t r a b r a c h i o n) (p d b - エントリーコード 1FE6) 由来であって、各 SHB は、RCSB タンパク質データベース (RCSB PDB) の p d p エントリー番号付けにより示されるものである。

50

【 0 0 7 5 】

別のより好ましい実施態様において、式 (I) 又は (I I) のオリゴマー化ドメイン ND 1、ND 2、ND 3 及び ND 4 の 1 つは、より好ましくは、ND 1 及び / 又は ND 3 又は ND 2 及び / 又は ND 4 のいずれかは、三量体コイルドコイル 5 T O H、5 T O I、5 K 9 2、5 K B 0、5 K B 1、5 K B 2、5 K K V、5 E F M、2 N 6 4、5 A B S、5 I E A、5 A P P、5 A P Q、5 A P S、5 A P Y、5 A P Z、5 D 5 Z、4 Y P C、4 Y V 3、4 C G B、4 C G C、4 C J D、4 R 0 R、4 U W 0、4 P 6 7、4 O X M、3 W 8 V、3 W 9 2、3 W 9 3、4 I 2 L、4 K 8 U、4 J B Z、3 V T Q、4 L 1 R、4 J D O、4 J 4 A、4 E 5 2、3 V Y I、3 Z M F、3 V U 5、3 V U 6、2 Y N Y、2 Y N Z、2 Y O 0、2 Y O 1、2 Y O 2、4 G 1 A、4 G I F、3 T Q 2、4 D Z K、4 D Z L、4 D Z N、3 T E 3、3 R 4 8、3 S W F、3 S W Y、3 P R 7、2 Y K O、2 Y K P、2 Y K Q、3 N T N、3 P P 5、3 M K O、3 M G N、3 N W A、3 N W D、3 N W F、3 L 3 5、3 L 3 6、3 L 3 7、3 M 9 B、3 M 9 D、2 X 6 P、3 L J M、3 A H A、3 H 7 X、3 H 7 Z、3 L T 6、3 L T 7、3 G J P、2 K P 8、3 K P E、2 W P R、2 W P S、2 W P Y、2 W P Z、2 W Q 0、2 W Q 1、2 W Q 2、2 W Q 3、3 H F C、3 H F E、3 H R N、3 H R O、3 H 5 F、3 H 5 G、2 W G 5、2 W G 6、2 W 6 B、2 J J L、2 V R S、3 E F G、3 D U Z、2 O T 5、2 Z 2 T、2 Q I H、3 B K 6、2 O 7 H、2 R 3 2、2 J G O、2 Q 7 C、2 Q 3 I、2 Q 5 U、2 I B L、1 Z V 8、1 Z V B、2 F X P、1 W T 6、2 A K F、1 T G G、1 S L Q、1 S 9 Z、1 P W 9、1 P W B、1 M 7 L、1 G Z L、1 K Y C、1 K F M、1 K F N、1 I J 0、1 I J 1、1 I J 2、1 I J 3、1 H Q J、1 Q U 1、1 B 0 8、1 C Z Q、1 C U N、1 S V F、1 C E 0、1 P I Q、1 A Q 5、1 A V Y、1 H T N、1 A A 0、1 Z I J、1 Z I M、1 C O I、1 S W I、1 G C M、1 H U P からなる群より選択される三量体コイルドコイル、又はアミノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなった 5 T O H、5 T O I、5 K 9 2、5 K B 0、5 K B 1、5 K B 2、5 K K V、5 E F M、2 N 6 4、5 A B S、5 I E A、5 A P P、5 A P Q、5 A P S、5 A P Y、5 A P Z、5 D 5 Z、4 Y P C、4 Y V 3、4 C G B、4 C G C、4 C J D、4 R 0 R、4 U W 0、4 P 6 7、4 O X M、3 W 8 V、3 W 9 2、3 W 9 3、4 I 2 L、4 K 8 U、4 J B Z、3 V T Q、4 L 1 R、4 J D O、4 J 4 A、4 E 5 2、3 V Y I、3 Z M F、3 V U 5、3 V U 6、2 Y N Y、2 Y N Z、2 Y O 0、2 Y O 1、2 Y O 2、4 G 1 A、4 G I F、3 T Q 2、4 D Z K、4 D Z L、4 D Z N、3 T E 3、3 R 4 8、3 S W F、3 S W Y、3 P R 7、2 Y K O、2 Y K P、2 Y K Q、3 N T N、3 P P 5、3 M K O、3 M G N、3 N W A、3 N W D、3 N W F、3 L 3 5、3 L 3 6、3 L 3 7、3 M 9 B、3 M 9 D、2 X 6 P、3 L J M、3 A H A、3 H 7 X、3 H 7 Z、3 L T 6、3 L T 7、3 G J P、2 K P 8、3 K P E、2 W P R、2 W P S、2 W P Y、2 W P Z、2 W Q 0、2 W Q 1、2 W Q 2、2 W Q 3、3 H F C、3 H F E、3 H R N、3 H R O、3 H 5 F、3 H 5 G、2 W G 5、2 W G 6、2 W 6 B、2 J J L、2 V R S、3 E F G、3 D U Z、2 O T 5、2 Z 2 T、2 Q I H、3 B K 6、2 O 7 H、2 R 3 2、2 J G O、2 Q 7 C、2 Q 3 I、2 Q 5 U、2 I B L、1 Z V 8、1 Z V B、2 F X P、1 W T 6、2 A K F、1 T G G、1 S L Q、1 S 9 Z、1 P W 9、1 P W B、1 M 7 L、1 G Z L、1 K Y C、1 K F M、1 K F N、1 I J 0、1 I J 1、1 I J 2、1 I J 3、1 H Q J、1 Q U 1、1 B 0 8、1 C Z Q、1 C U N、1 S V F、1 C E 0、1 P I Q、1 A Q 5、1 A V Y、1 H T N、1 A A 0、1 Z I J、1 Z I M、1 C O I、1 S W I、1 G C M、1 H U P からなる群より選択される三量体コイルドコイルを含み、ここで、各コイルドコイルは、R C S B タンパク質データバンク (R C S B P D B) の p d b エントリー番号付けにより示される。

【 0 0 7 6 】

別のより好ましい実施態様において、式 (I) 又は (I I) のオリゴマー化ドメイン ND 1、ND 2、ND 3 及び ND 4 の 1 つは、より好ましくは、ND 1 及び / 又は ND 3 又は ND 2 及び / 又は ND 4 のいずれかは、二量体コイルドコイル 5 M 9 7、5 M 9 E、5 F I Y、5 F 4 Y、5 D 3 A、5 H M O、5 E Y A、5 I X 1、5 I X 2、5 J H F、5

10

20

30

40

50

J V M、5 J V P、5 J V R、5 J V S、5 J V U、5 J X 1、5 F C N、5 H H E、2
 N 9 B、4 Z R Y、4 Z 6 Y、4 Y T O、4 Z I 3、5 A J S、5 F 3 K、5 F 5 R、5
 H U Z、5 D J N、5 D J O、5 C H X、5 C J 0、5 C J 1、5 C J 4、5 C 9 N、5
 C F F、4 W H V、3 W U T、3 W U U、3 W U V、4 Z Q A、4 X A 3、4 X A 4、4
 P X J、4 Y V C、4 Y V E、5 B M L、5 A L 7、4 W O T、4 C G 4、5 A M O、4
 W I I、4 W I K、4 R S J、4 C F G、4 R 3 Q、4 W I D、4 C K G、4 C K H、4
 N S W、4 W 7 P、4 Q Q 4、4 O J K、4 T L 1、4 O H 9、4 L P Z、4 Q 6 2、4
 L 2 W、4 M 3 L、4 C K M、4 C K N、4 N 6 J、4 L T B、4 L R Z、2 M A J、2
 M A K、4 N A D、4 H W 0、4 B T 8、4 B T 9、4 B T A、4 H H D、4 M 8 M、4
 J 3 N、4 L 6 Q、4 C 1 A、4 C 1 B、4 G D O、4 B W K、4 B W P、4 B W X、4 10
 H U 5、4 H U 6、4 L 9 U、4 G 0 U、4 G 0 V、4 G 0 W、4 L 3 I、4 G 7 9、4
 G E U、4 G E X、4 G F A、4 G F C、4 B L 6、4 J M R、4 J N H、2 Y M Y、4
 H A N、3 V M Y、3 V M Z、3 V N 0、4 A B X、3 W 0 3、2 L W 9、4 D Z M、4
 E T O、3 T N U、3 T H F、4 E 8 U、3 V M X、4 E 6 1、3 V E M、3 V B B、4
 D J G、3 T V 7、3 S T Q、3 V 8 S、3 Q 8 T、3 U 1 C、3 Q H 9、3 A Z D、3
 O N X、3 O K Q、3 Q X 3、3 S J A、3 S J B、3 S J C、2 L 2 L、3 Q F L、3
 Q K T、2 X V 5、2 Y 3 W、3 Q 0 X、3 A J W、3 N C Z、3 N I 0、2 X U 6、3
 M 9 1、3 N M D、3 L L L、3 L X 7、3 M E 9、3 M E U、3 M E V、3 A B H、3
 A C O、3 I A O、3 H L S、2 W M M、3 A 6 M、3 A 7 O、2 W V R、3 I C X、3
 I D 5、3 I D 6、3 H N W、3 I 1 G、2 K 6 S、3 G H G、3 G 1 E、2 W 6 A、2 20
 V 5 1、3 E R R、3 E 1 R、2 V Y 2、2 Z R 2、2 Z R 3、3 C L 3、3 D 9 V、2
 Z 1 7、2 J E E、3 B B P、3 B A S、3 B A T、2 Q M 4、2 V 7 1、2 N O 2、2
 P O N、2 V 0 O、2 D Q 0、2 D Q 3、2 Q 2 F、2 N R N、2 E 7 S、2 H 9 V、2
 F X M、2 H J D、2 G Z D、2 G Z H、2 F V 4、2 F 2 U、2 E U L、2 E S M、2
 E T K、2 E T R、1 Z X A、1 Y I B、1 Y I G、1 X S X、1 R F Y、1 U 0 I、1
 X J A、1 T 3 J、1 T 6 F、1 R 7 J、1 U I I、1 P L 5、1 S 1 C、1 P 9 I、1
 R 4 8、1 U R U、1 O V 9、1 U I X、1 N O 4、1 N Y H、1 M V 4、1 L R 1、1
 L 8 D、1 L J 2、1 K Q L、1 G X K、1 G X L、1 G K 6、1 J R 5、1 G M J、1
 J A D、1 J C H、1 J B G、1 J T H、1 J Y 2、1 J Y 3、1 I C 2、1 H C I、1
 H F 9、1 H B W、1 F X K、1 D 7 M、1 Q U U、1 C E 9、2 A 9 3、1 B M 9、1 30
 A 9 3、1 T M Z、2 A A C、1 Z I I、1 Z I K、1 Z I L、2 A R A、2 A R C、1
 J U N、1 Y S A、2 Z T A からなる群より選択される二量体コイルドコイル、又はアミ
 ノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなった 5 M 9 7、5 M 9 E、5 F
 I Y、5 F 4 Y、5 D 3 A、5 H M O、5 E Y A、5 I X 1、5 I X 2、5 J H F、5 J
 V M、5 J V P、5 J V R、5 J V S、5 J V U、5 J X 1、5 F C N、5 H H E、2 N
 9 B、4 Z R Y、4 Z 6 Y、4 Y T O、4 Z I 3、5 A J S、5 F 3 K、5 F 5 R、5 H
 U Z、5 D J N、5 D J O、5 C H X、5 C J 0、5 C J 1、5 C J 4、5 C 9 N、5 C
 F F、4 W H V、3 W U T、3 W U U、3 W U V、4 Z Q A、4 X A 3、4 X A 4、4 P
 X J、4 Y V C、4 Y V E、5 B M L、5 A L 7、4 W O T、4 C G 4、5 A M O、4 W
 I I、4 W I K、4 R S J、4 C F G、4 R 3 Q、4 W I D、4 C K G、4 C K H、4 N 40
 S W、4 W 7 P、4 Q Q 4、4 O J K、4 T L 1、4 O H 9、4 L P Z、4 Q 6 2、4 L
 2 W、4 M 3 L、4 C K M、4 C K N、4 N 6 J、4 L T B、4 L R Z、2 M A J、2 M
 A K、4 N A D、4 H W 0、4 B T 8、4 B T 9、4 B T A、4 H H D、4 M 8 M、4 J
 3 N、4 L 6 Q、4 C 1 A、4 C 1 B、4 G D O、4 B W K、4 B W P、4 B W X、4 H
 U 5、4 H U 6、4 L 9 U、4 G 0 U、4 G 0 V、4 G 0 W、4 L 3 I、4 G 7 9、4 G
 E U、4 G E X、4 G F A、4 G F C、4 B L 6、4 J M R、4 J N H、2 Y M Y、4 H
 A N、3 V M Y、3 V M Z、3 V N 0、4 A B X、3 W 0 3、2 L W 9、4 D Z M、4 E
 T O、3 T N U、3 T H F、4 E 8 U、3 V M X、4 E 6 1、3 V E M、3 V B B、4 D
 J G、3 T V 7、3 S T Q、3 V 8 S、3 Q 8 T、3 U 1 C、3 Q H 9、3 A Z D、3 O
 N X、3 O K Q、3 Q X 3、3 S J A、3 S J B、3 S J C、2 L 2 L、3 Q F L、3 Q 50

K T、2 X V 5、2 Y 3 W、3 Q 0 X、3 A J W、3 N C Z、3 N I 0、2 X U 6、3 M
 9 1、3 N M D、3 L L L、3 L X 7、3 M E 9、3 M E U、3 M E V、3 A B H、3 A
 C O、3 I A O、3 H L S、2 W M M、3 A 6 M、3 A 7 O、2 W V R、3 I C X、3 I
 D 5、3 I D 6、3 H N W、3 I 1 G、2 K 6 S、3 G H G、3 G 1 E、2 W 6 A、2 V
 5 1、3 E R R、3 E 1 R、2 V Y 2、2 Z R 2、2 Z R 3、3 C L 3、3 D 9 V、2 Z
 1 7、2 J E E、3 B B P、3 B A S、3 B A T、2 Q M 4、2 V 7 1、2 N O 2、2 P
 O N、2 V 0 O、2 D Q 0、2 D Q 3、2 Q 2 F、2 N R N、2 E 7 S、2 H 9 V、2 F
 X M、2 H J D、2 G Z D、2 G Z H、2 F V 4、2 F 2 U、2 E U L、2 E S M、2 E
 T K、2 E T R、1 Z X A、1 Y I B、1 Y I G、1 X S X、1 R F Y、1 U 0 I、1 X
 J A、1 T 3 J、1 T 6 F、1 R 7 J、1 U I I、1 P L 5、1 S 1 C、1 P 9 I、1 R
 4 8、1 U R U、1 O V 9、1 U I X、1 N O 4、1 N Y H、1 M V 4、1 L R 1、1 L
 8 D、1 L J 2、1 K Q L、1 G X K、1 G X L、1 G K 6、1 J R 5、1 G M J、1 J
 A D、1 J C H、1 J B G、1 J T H、1 J Y 2、1 J Y 3、1 I C 2、1 H C I、1 H
 F 9、1 H B W、1 F X K、1 D 7 M、1 Q U U、1 C E 9、2 A 9 3、1 B M 9、1 A
 9 3、1 T M Z、2 A A C、1 Z I I、1 Z I K、1 Z I L、2 A R A、2 A R C、1 J
 U N、1 Y S A、2 Z T A からなる群より選択される二量体コイルドコイルを含み、こ
 こで、各コイルドコイルは、R C S B タンパク質データバンク (R C S B P D B) の p d
 b エントリー番号付けにより示される。

10

【0077】

好ましい実施態様において、X 1 は、H i s タグを含むアミノ酸配列、配列番号 2 9 に
 示される H i s タグを含むアミノ酸配列、H i s タグ及びマラリア原虫オオキネート及び
 スポロゾイトの細胞横断タンパク質 (C e l T O S) を含むアミノ酸配列、H i s タグ及
 び配列番号 3 0 に示されるマラリア原虫オオキネート及びスポロゾイトの細胞横断タン
 パク質 (C e l T O S) を含むアミノ酸配列、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、配列番
 号 2 9 に示されるアミノ酸配列、配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列、並びに配列番号
 2、配列番号 3 0、配列番号 2 9 又は配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列であってアミ
 ノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなったアミノ酸配列からなる群よ
 り選択される。より好ましくは、X 1 は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、配列番号
 2 9 に示されるアミノ酸配列、配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列、並びに、配列番号
 2、配列番号 2 9 又は配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列であってアミノ酸配列がアミ
 ノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなったアミノ酸配列からなる群よ
 り選択される。

20

30

【0078】

好ましい実施態様において、X 2 は、H i s タグを含むアミノ酸配列、配列番号 2 9 に
 示される H i s タグを含むアミノ酸配列、H i s タグ及びマラリア原虫オオキネート及び
 スポロゾイトの細胞横断タンパク質 (C e l T O S) を含むアミノ酸配列、H i s タグ及
 び配列番号 3 0 に示されるマラリア原虫オオキネート及びスポロゾイトの細胞横断タン
 パク質 (C e l T O S) を含むアミノ酸配列、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、配列番
 号 2 9 に示されるアミノ酸配列、配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列、及び配列番号 2
 、配列番号 3 0、配列番号 2 9 又は配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列であってアミ
 ノ酸配列はアミノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなったアミノ酸配
 列からなる群より選択される。より好ましくは、X 1 は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配
 列、配列番号 2 9 に示されるアミノ酸配列、配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列、及び
 配列番号 2、配列番号 2 9 又は配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列であってアミノ酸配
 列はアミノ酸改変を含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなったアミノ酸配列から
 なる群より選択される。

40

好ましい実施態様において、Y 1 は、マラリア原虫オオキネート及びスポロゾイトの細
 胞横断タンパク質 (C e l T O S) を含むアミノ酸配列、配列番号 2 7 に示されるアミ
 ノ酸配列及び配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列であってアミノ酸配列はアミノ酸改変を
 含む及び / 又は片方若しくは両方の端で短くなったアミノ酸配列からなる群より選択され

50

る。

【0079】

好ましい実施態様において、Y2は、フラジェリンのD0及びD1ドメインを含むアミノ酸配列、配列番号28又は配列番号6に示されるアミノ酸配列、又は配列番号28又は配列番号6に示されるアミノ酸配列であってアミノ酸配列はアミノ酸改変を含む及び/又は片方若しくは両方の端で短くなった配列番号28又は配列番号6に示されるアミノ酸配列である。

【0080】

好ましい実施態様において、ペプチドリinker-L1は、少なくとも3アミノ酸からなり、且つ式(I)の構築ブロックのX1、ND1、ND2及びY1の、少なくとも1、好ましくは少なくとも2、より好ましくは少なくとも3、さらにより好ましくは全てが、配列番号2又は配列番号24に示されるX1；配列番号3又は配列番号25に示されるND1；配列番号5又は配列番号26に示されるND2；及び配列番号6又は配列番号27に示されるY1からなる群より選択され、或いは、ペプチドリinker-L1は、少なくとも3アミノ酸からなり、且つ式(I)の構築ブロックのX1、ND1、ND2及びY1の少なくとも1、好ましくは少なくとも2、より好ましくは少なくとも3、さらにより好ましくは全てが、配列番号2又は配列番号24に示されるX1；配列番号3又は配列番号25に示されるND1；配列番号5又は配列番号26に示されるND2；及び配列番号6又は配列番号27に示されるY1からなる群より選択され、ここで配列番号2、配列番号24、配列番号3、配列番号25、配列番号5、配列番号26、配列番号6又は配列番号27の少なくとも1は、アミノ酸改変を含む及び/又は片方若しくは両方の端で短くなっている。

10

20

好ましい実施態様において、ペプチドリinker-L2は、少なくとも3アミノ酸からなり、且つ式(I)の構築ブロックの、X2、ND3、ND4及びY2の少なくとも1、好ましくは、少なくとも2、より好ましくは、少なくとも3、さらにより好ましくは全ては、配列番号24に示されるX2；配列番号25に示されるND3；配列番号26に示されるND4；及び配列番号28に示されるY2からなる群より選択され、或いは、ペプチドリinker-L2は、少なくとも3アミノ酸からなり、且つ式(I)の構築ブロックの、X2、ND3、ND4及びY2の少なくとも1、好ましくは少なくとも2、より好ましくは、少なくとも3、さらにより好ましくは全ては、配列番号24に示されるX2；配列番号25に示されるND3；配列番号26に示されるND4；及び配列番号28に示されるY2であって、配列番号24；配列番号25；配列番号26又は配列番号28の少なくとも1つは、アミノ酸改変を含む及び/又は片方若しくは両方の端で短くなったものからなる群より選択される。

30

【0081】

好ましい実施態様において、式(I)の構築ブロックは、配列番号1に示されるアミノ酸配列、配列番号16に示されるアミノ酸配列、配列番号17に示されるアミノ酸配列、配列番号18に示されるアミノ酸配列、配列番号19に示されるアミノ酸配列、配列番号22に示されるアミノ酸配列及び配列番号34に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸の連続鎖を含むか、又は式(I)の構築ブロックは、配列番号1に示されるアミノ酸配列、配列番号16に示されるアミノ酸配列、配列番号17に示されるアミノ酸配列、配列番号18に示されるアミノ酸配列、配列番号19に示されるアミノ酸配列、配列番号22に示されるアミノ酸配列及び配列番号34に示されるアミノ酸配列であって、少なくとも1の、配列番号16；配列番号17；配列番号18、配列番号19、配列番号22又は配列番号34は、アミノ酸改変を含む及び/又は片方若しくは両方の端で短くなったアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸の連続鎖を含む。

40

【0082】

好ましい実施態様において、式(II)の構築ブロックは、配列番号23に示されるアミノ酸の連続鎖を含むか、又は式(II)の構築ブロックは、配列番号23に示されるアミノ酸であって、配列番号23に示されるアミノ酸が、アミノ酸改変を含む及び/又は

50

は片方若しくは両方の端で短くなったアミノ酸の連続鎖を含む。

【0083】

好ましい実施態様において、式(I)の複数の構築ブロック、式(II)の複数の構築ブロック又は式(I)及び式(II)の複数の共集合した構築ブロックからなるSAPNのタンパク質鎖、より好ましくは、式(I)の複数の構築ブロックからなるSAPNのタンパク質鎖の、核酸誘導体に対するモル比は、約1対約0.4から0.8、好ましくは約1対約0.6である。

【0084】

好ましい実施態様において、組成物は、式(II)の複数の構築ブロックと共集合した式(I)の複数の構築ブロックからなるSAPNを含む。

10

【0085】

好ましい実施態様において、式(I)の複数の構築ブロック及び式(II)の複数の構築ブロックを含む共集合したSAPN、より好ましくは、本明細書に記載のフラジェリンを含む、式(I)の複数の構築ブロック及び式(II)の複数の構築ブロックを含む共集合したSAPNは、約12から約1の式(II)の構築ブロックを含む連続鎖に対し、約48から約59の式(I)の構築ブロックを含む連続鎖、より好ましくは、約5から約2の式(II)の構築ブロックを含む連続鎖に対し、約55から約58の式(I)の構築ブロックを含む連続鎖、例えば、約5の式(II)の構築ブロックを含む連続鎖に対し約55の式(I)の構築ブロックを含む連続鎖、約4の式(II)の構築ブロックを含む連続鎖に対し約56の式(I)の構築ブロックを含む連続鎖、約3の式(II)の構築ブロックを含む連続鎖に対し約57の式(I)の構築ブロックを含む連続鎖、又は約2の式(II)の構築ブロックを含む連続鎖に対し約58の式(I)の構築ブロックを含む連続鎖、さらにより好ましくは、約2の式(II)の構築ブロックを含む連続鎖に対し約58の式(I)の構築ブロックを含む連続鎖の共集合比率を有する。

20

【0086】

正多面体対称性を有する自己集合タンパク質ナノ粒子(SAPN)への集合

規則的な形状(十二面体、二十面体、八面体、立方体及び四面体)を有する自己集合タンパク質ナノ粒子(SAPN)を作製するために、1より多いLCMユニットが必要である。例えば、三量体及び五量体オリゴマー化ドメインを含む単量体から二十面体を形成するためには、それぞれ15の単量体構築ブロックから構成される、4つのLCMユニットが必要であり、すなわち、規則的な形状を有するタンパク質ナノ粒子は、60の単量体構築ブロックから構成されるであろう。対応する多面体を形成するのに必要とされる、2のオリゴマー化ドメインのオリゴマー化状態及びLCMユニットの数の組み合わせを、表2に示した。

30

【0087】

表2：正多面体の形成においてオリゴマー化状態の可能な組み合わせ

ID No.	m	n	多面体タイプ	LCM	偶数 ユニット数	構築ブロック数
1	5	2	十二面体／二十面体	10	6	60
2	5	3	十二面体／二十面体	15	4	60
3	4	3	立方体／八面体	12	2	24
4	3	4	立方体／八面体	12	2	24
5	3	5	十二面体／二十面体	15	4	60
6	2	5	十二面体／二十面体	10	6	60
7	5	4	不規則	20	1	20
8	4	5	不規則	20	1	20

10

20

LCMユニットが、さらに集合して、1より多いLCMユニットから構成される正多面体を形成するであろうかどうかは、2つのオリゴマー化ドメインND1及びND2並びに2つのオリゴマー化ドメインND3及びND4のそれぞれの互いに対する幾何学的配置に依存し、特に2つのオリゴマー化ドメインの回転対称軸間の角度に依存する。これは、主に、i) ナノ粒子における、隣接するドメイン間の相互作用、ii) リンカーセグメントL1及びL2の長さ、iii) 個々のオリゴマー化ドメインの形状により制御される。LCMユニットにおいて、この角度は、正多面体の配置と比較して、より大きい。正多面体とは対照的に、この角度は、単量体構築ブロックにおいて同一ではない。

30

【0088】

2つのオリゴマー化ドメイン間の角度が十分に小さい(二十面体対称性を有する正多面体においてよりもさらに小さい)場合、その時、多数(数百)のタンパク質鎖はタンパク質ナノ粒子に集合することができる。三量体-五量体構造を有するSAPNの生物物理学的及び数学的分析については、最近報告された(Indelicato, G., et al. Biophys J 2016, 110(3): 646-660)。

【0089】

好ましくは、SAPN上のループ構造に提示される抗原は、(a)がん細胞に対する免疫応答を誘導するのに適するタンパク質又はペプチド；(b)感染性疾患に対する免疫応答を誘導するのに適するタンパク質又はペプチド；(c)アレルギーに対する免疫応答を誘導するのに適するタンパク質又はペプチド；(d)ヒト疾患の治療のための免疫応答を誘導するのに適するタンパク質又はペプチドからなる群より選択される。

40

【0090】

かかるタンパク質又はペプチドを含むSAPNは、ヒトにおいて又は家畜及び愛玩動物において免疫応答を誘導するのに適していてもよい。

【0091】

さらなる態様において、本発明は、上で定義した式(I)又は(II)の単量体構築ブロックに関する。

【0092】

50

別の態様において、本発明は、ワクチンとして適する本明細書に記載のタンパク質ナノ粒子を含む組成物、例えば、ワクチンとしての使用のための本明細書に記載のタンパク質ナノ粒子を含む組成物に関する。好ましいワクチン組成物は、水性緩衝液中にタンパク質ナノ粒子を含み、かつ例えば、糖由来添加剤（グリセロール、トレハロース、スクロースなど）又はアミノ酸由来添加剤（アルギニン、プロリン、グルタメートなど）又は陰イオン性、陽イオン性、非イオン性又は双性イオン界面活性剤（コレート、デオキシコレート、tweenなど）又は溶液のイオン強度を調節するためのあらゆる種類の塩（NaCl、MgCl₂など）をさらに含み得る。

【0093】

別の態様において、本発明は、ヒト又は非ヒト動物にワクチン接種する方法に関する、かかるワクチン接種を必要とする対象に、本明細書中すでに記載した組成物の有効量を投与することを含む。かかるワクチン接種を必要とする対象は、通常、ヒト又は非ヒト動物である。

10

【0094】

本明細書中すでに記載した、ヒト又は非ヒト動物にワクチン接種する方法における使用のための組成物であって、方法は、かかるワクチン接種を必要とするヒト又は非ヒト動物に有効量の前記組成物を投与することを含む、組成物も提供される。

【0095】

ヒト又は非ヒト動物にワクチン接種するための医薬の製造のための、本明細書中すでに記載した組成物の使用も提供される。

20

【0096】

ヒト又は非ヒト動物にワクチン接種するための、本明細書中すでに記載した組成物の使用も提供される。

【0097】

用語「個体」「対象」又は「患者」は、本明細書中で交換可能に用いられる。ある特定の態様において、対象は、哺乳動物である。哺乳動物は、霊長類（ヒト及び非ヒト霊長類を含む）を含むがこれらに限定されない。好ましい実施態様において、対象はヒトである。さらなる態様において、本発明は、i) 核酸誘導体を含む緩衝液にSAPNを加えること及びii) 通常のリフォールディングプロトコルを用いて、核酸誘導体の存在下でSAPNをリフォールディングすることを含む、本明細書に記載のSAPNを製造する方法に関する。

30

【0098】

CpG-SAPN（CpGを封入する自己集合タンパク質ナノ粒子）の設計
本発明によるCpG-SAPNの特定の例としては、以下のコンストラクト「DEDDL I-RR」、（配列MGDKHHHHHHHHHHKDGSDKGSWEWNARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWARWRATWRRGRLLSRLERLERRNEELRRLQLIRHENRMVLQFVRA L SMQNAELERRLEE LARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLRINSARDDAAGQAIANRFTANIRGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLD SIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLT IQVGANDGETIIDIDLRQINSQTLGLDQLNVQQKYKDGDKGDDKTENPLQRI DAALAQVDA LRS D LGAVQNRFN SAITNLGNTVN NLS EARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR（配列番号1）を有する式（I）に相当する）が挙げられる。

40

【0099】

これは、以下の部分構造：

X1：MGDKHHHHHHHHHHHHKDGSDKGS（配列番号2）

ND1：WEWNARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWARWRATW（配列番号3）

50

L 1 : R R G R (配列番号 4)

N D 2 : L L S R L E R L E R R N E E L R R L L Q L I R H E N R M V L Q F V R A L
S M Q N A E L E R R L E E L (配列番号 5)

Y 1 : A R G M A Q V I N T N S L S L L T Q N N L N R S Q S A L G T A I E R L S S
G L R I N S A R D D A A G Q A I A N R F T A N I R G L T Q A S R N A N D G I S
I A Q T T E G A L N E I N N N L Q R V R E L A V Q S A N S T N S Q S D L D S I Q
A E I T Q R L N E I D R V S G Q T Q F N G V R V L A Q D N T L T I Q V G A N D G
E T I D I D L R Q I N S Q T L G L D Q L N V Q Q K Y K D G D K G D D K T E N P L
Q R I D A A L A Q V D A L R S D L G A V Q N R F N S A I T N L G N T V N N L S E
A R S R I E D S D Y A T E V S N M S R A Q I L Q Q A G T S V L A Q A N Q V P Q N
V L S L L R (配列番号 6)

10

から構成されるコンストラクトである。

【 0 1 0 0 】

精製を容易にするために、D E D D L I - R R は、式 (I) :

M G D K H H H H H H H H H H K D G S D K G S (配列番号 2)

に定義される配列 X 1 から始まり、それは、ニッケルアフィニティー精製のための H i s タグと、さらなるサブクローニングのための、DNA レベルの制限部位 (N c o I 及び B a m H I) に含む。

【 0 1 0 1 】

N D 1 について、五量体化ドメインを選択した (m = 5) 。具体的な五量体コイルドコイルは、p d b - e n t r y 1 T 8 Z を有する、トリプトファン - ジッパー五量体化ドメイン (Liu, J., et al. Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101(46) : 16156-16161) の新規な改変物である。

20

【 0 1 0 2 】

オリジナルのトリプトファン - ジッパー五量体化ドメインは、配列

S S N A K W D Q W S S D W Q T W N A K W D Q W S N D W N A W R S D W Q A W K D D
W A R W N Q R W D N W A T (配列番号 7) を有する。

【 0 1 0 3 】

D E D D L I - R R に用いられる五量体化ドメインの改変されたコイルドコイル配列は、位置 1 3 で始まり、位置 4 9 で終わり、及び C 末端に配列バリエーション (N Q R W (配列番号 3 7) の代わりに R A T W (配列番号 3 6)) と、溶解性の目的で、コイルドコイルの非コアであるが、オリジナルの配列 (配列番号 8) にあるようなコア位置でのトリプトファン残基のヘプタッドリピートパターンを保つ、いくつかの電荷改変とを含む。また、2つのリジン残基は、五量体コイルドコイルへのハプテン分子のカップリングを避けるため、アルギニン残基に変更される。a a (a) 及び a a (d) 位置でのコイルドコイルコア残基を太字で示し、下線を引いた。

30

【 0 1 0 4 】

1 3 - WE E WN A R WD E WE N D WN D WR E D WQ A WR D D WA R WR A T W
- 4 8 (配列番号 3)

40

その後、この配列は、配列 R R G R (配列番号 4) を有する短いリンカー L 1 により伸張り、コイルドコイル配列 N D 2 と接続する。L 1 は、ナノ粒子の 2 つのコイルドコイル部分の間に柔軟な残基 G (グリシン) を含む。それは、負に帯電した封入される核酸とのイオン性相互作用を提供する、3 つの正に帯電したアルギニンアミノ酸を含む。

【 0 1 0 5 】

L 1 の後に、以下の配列 :

LLSRLERLERRNEELRRLLQLIRHENRMVLQFVRALSMQN
AELERRLEEL (配列番号5)

を有する、第二のコイルドコイルドメインND2が続く。

【0106】

それは、アスパラギン残基が占める3つのコアaa(a)位置を有する二量体コイルドコイルを形成することを目的としている、新規に設計されたコイルドコイルであり、それは、二量体コイルドコイル形成を好む。位置aa(a)及びaa(d)でコイルドコイルコア残基は、太字で示され、及び強調される。それは、それ自体に、配列ID BAA01449.1を有するインフルエンザAウイルスのマトリックスタンパク質1の残基173から181に相当する、プロミスキヤス(promiscuous)CD4/CD8エピトープIRHENRMVL(配列番号8)(Parida R. et al., Vaccine 2007, 25: 7530-7539)を含むパンDR結合CD4エピトープストリングELRRLQLIRHENRMVLQFVRALSMQNA(配列番号7)を含む。

【0107】

セグメントY1は、以下の配列:

ARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLR
 INSARDDAAGQAIANRFTANIRGLTQASRNANDGISIAQT
 TTEGALNEINNNLQRVRELA VQS ANSTNSQSDLD SIQAEI
 TQRLNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLT IQVGANDGETI
 DIDLRQINSQTLGLDQLNVQQKYKDGDKGDDKTENPLQRI
 DAALA QVDA LRSDLGAVQNRFN SAITNLGNTVNNLSEARS
 RIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLS
 LLR(配列番号6)

を有する。

【0108】

それは、XmaI制限部位を内部に含む配列ARG、及びそれに続くフラジェリンの断片を含み、且つ表面露出しないリジン側鎖がアルギニンに変異するが、配列DGDKGDDK(配列番号9)を有するフラジェリンのD0及びD1ドメインを接続するループ中で4つのリジン残基がニコチン、ヘロイン、コカイン又はその同等物などの共有結合的にカップリングハブテン分子の目的のために組み込まれるように、さらに改変されたサルモネラ・ティフィムリウムフラジェリン(米国特許8,420,102にあるような)のD0及びD1ドメインから構成される。このループは、表面露出している。

【0109】

配列

MAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLRINS
 ARDDAAGQAIANRFTANIRGLTQASRNANDGISIAQTTE
 GALNEINNNLQRVRELA VQS ANSTNSQSDLD SIQAEITQR
 LNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLT IQVGANDGETIDID
 LRQINSQTLGLDQLNVQQKYK(配列番号10)

【0110】

それにおいて残基20、42、59、136及び161をリジンからアルギニンに変異させている一方、残基172はトレオニンからグルタミンに変異させてDNAレベルでMfeI制限部位を挿入している、べん毛生合成タンパク質FlhCのP06175.2の残基1から180に相当する。

【0111】

配列

TENPLQRIDAALA QVDA LRSDLGAVQNRFN SAITNLGNTV
 >NNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQAN

Q V P Q N V L S L L R (配列番号 1 1)

それにおいて残基 4 0 9 をリジンからアルギニンに変異させている P 0 6 1 7 5 . 2 の残基 4 0 3 から 4 9 3 に相当する。それは、変異 T 4 1 9 A、T 4 4 6 S 及び S 4 4 7 E も含む。

【0 1 1 2】

T = 1 二十面体対称性と仮定し、単量体形及び二十面体形において、D E D D L I - R R 単量体のモデルを図 2 に示す。D E D D L I - R R の E M 画像を図 7 に示す。

【実施例】

【0 1 1 3】

実施例

以下の実施例は、本発明をさらに説明するために有用であるが、決して本発明の範囲を限定するものではない。

【0 1 1 4】

実施例 1 - D E D D L I - R R の分子クローニング

ナノ粒子コンストラクトをコードする DNA を、標準的な分子生物学の手順を用いて調製した。タンパク質配列 D E D D L I - R R

M G D K H H H H H H H H H H K D G S D K G S W E E W N A R W D E W E N D W N D W
R E D W Q A W R D D W A R W R A T W R R G R L L S R L E R L E R R N E E L R R L L
L Q L I R H E N R M V L Q F V R A L S M Q N A E L E R R L E E L A R G M A Q V I
N T N S L S L L T Q N N L N R S Q S A L G T A I E R L S S G L R I N S A R D D A
A G Q A I A N R F T A N I R G L T Q A S R N A N D G I S I A Q T T E G A L N E I
N N N L Q R V R E L A V Q S A N S T N S Q S D L D S I Q A E I T Q R L N E I D R
V S G Q T Q F N G V R V L A Q D N T L T I Q V G A N D G E T I D I D L R Q I N S
Q T L G L D Q L N V Q Q K Y K D G D K G D D K T E N P L Q R I D A A L A Q V D A
L R S D L G A V Q N R F N S A I T N L G N T V N N L S E A R S R I E D S D Y A T
E V S N M S R A Q I L Q Q A G T S V L A Q A N Q V P Q N V L S L L R (配列番号 1
2)

をコードする DNA を含むプラスミドを、p P E P - T (図 3) の塩基性 S A P N 発現コンストラクトの N c o I / E c o R I 制限部位へのクローニングにより構築した。ワクチン免疫原は、ニコチンの活性化型である N H S - ニコチンを用いて、リジン残基へのキャリアとエピトープニコチンを共有結合的に付着させることにより作製した。

【0 1 1 5】

構造 X 1 - N D 1 - L 1 - N D 2 - Y 1 を有するこのコンストラクトの配列は、詳細に上述した。簡潔に、このコンストラクトは、配列 R R G R (配列番号 4) を有するリンカー L 1 により、二量体の新規に設計されたコイルドコイル (N D 2) と結合し、五量体コイルドコイルの最後のコア位置と二量体コイルドコイルの最初のコア位置との間に 3 つの正電荷を含む、五量体コイルドコイルトリプトファンジッパー (N D 1) から構成される。N 末端で配列 X 1 は、H i s タグ及び 3 つのハブテン / ニコチン結合部位 (リジン) を含む一方、配列 Y 1 は、サルモネラ・ティフィムリウム フラジェリンの断片を含み、改変されたフラジェリンの D 0 及び D 1 ドメインから構成される。

【0 1 1 6】

実施例 2 - 発現

プラスミドは E s c h e r i c h i a c o l i T u n e r (D E 3) 細胞を形質転換させ、それを H y p e r B r o t h 中、抗生物質アンピシリンの存在下で増殖させた (図 4 A)。前培養物を 2 8 で増殖させた。翌日、前培養物の 1 : 5 0 0 希釈物を、発現 1 L 培養物に植菌し、細胞を 5 L エルレンマイヤーフラスコ中で振とうさせながら、約 0 . 8 ~ 0 . 9 の O D 6 0 0 に到達するまで 3 7 で増殖させた。その後、細胞培養物を I P T G (1 m M の最終濃度) を用いて誘導した。誘導後、培養物を振とう下、3 7 で 3 時間、増殖させた。その後、細胞を 4 , 0 0 0 x g で 1 5 分間の遠心分離により収集した。細胞のペレットを - 2 0 で保存した。ペレットを氷上で融解させ、p H 8 . 0 で

10

20

30

40

50

6 M グアニジン HCl、300 mM NaH_2PO_4 、20 mM イミダゾールからなる溶解バッファーに懸濁した。

【0117】

実施例 3 - 精製

以下の精製緩衝液を用いた：

- 1．高リン酸溶解バッファー：6 M グアニジン HCl、300 mM NaH_2PO_4 、20 mM イミダゾール pH 8.0
- 2．低リン酸洗浄バッファー：6 M グアニジン HCl、20 mM NaH_2PO_4 、20 mM イミダゾール、pH 8.0
- 3．エンドトキシン除去のための洗浄緩衝液：10 mM Tris pH 8.0、60% (v/v) イソプロパノール 10
- 4．溶出緩衝液：様々な濃度のイミダゾールと共に、低リン酸緩衝液 6 M グアニジン HCl、20 mM NaH_2PO_4 pH 8.0

【0118】

細胞ペレットのグラムあたり、5 から 10 mL 体積の溶解バッファー (6 M GuHCl、300 mM NaH_2PO_4 、20 mM イミダゾール pH 8.0) を用いた。25 mL の溶解バッファーを 3 分間、氷上で超音波処理した。溶解物を、15 K rpm で 45 分間の遠心分離を用いて透明にした。遠心分離後、透明溶解物を 0.45 μm フィルター (Sartorius) を用いてろ過し、2 * 5 mL His-trap HP アフィニティカラムで精製した。 20

【0119】

第一に、タンパク質をカラムに結合させ、続いて以下のスキームに従い洗浄工程を行った：

- 1．高リン酸溶解バッファーを用いてカラムを平衡化すること
- 2．ろ過した透明溶解物 (CL) のカラムへの結合
- 3．高リン酸溶解バッファー (5 カラム体積) を用いた洗浄 1
- 4．低リン酸緩衝液 (5 カラム体積) を用いた洗浄 2
- 5．10 mM Tris pH 8.0 (10 カラム体積) 中 60% イソプロパノールを用いた洗浄 3
- 6．低リン酸緩衝液 (15 カラム体積) を用いた洗浄 4 30

【0120】

工程 3 を行い、核酸断片を除去し、エンドトキシンを除去するためには工程 5 を用いた。

【0121】

その後、120 から 132 mM に増加するイミダゾールのイミダゾール濃度を用いた段階的溶出を以下のスキームに従い行った (図 4 B)：

- 1．低リン酸緩衝液 (5 カラム体積) を用いたカラム洗浄
- 2．20 mM イミダゾール (2 カラム体積 - フラクションサイズ 3 mL) を用いた溶出
- 3．122 mM イミダゾール (2 カラム体積 - フラクションサイズ 3 mL) を用いた溶出
- 4．124 mM イミダゾール (2 カラム体積 - フラクションサイズ 3 mL) を用いた溶出 40
- 5．126 mM イミダゾール (2 カラム体積 - フラクションサイズ 3 mL) を用いた溶出
- 6．128 mM イミダゾール (2 カラム体積 - フラクションサイズ 3 mL) を用いた溶出
- 7．130 mM イミダゾール (2 カラム体積 - フラクションサイズ 3 mL) を用いた溶出
- 8．132 mM イミダゾール (2 カラム体積 - フラクションサイズ 3 mL) を用いた溶出
- 9．250 mM イミダゾール (4 カラム体積 - フラクションサイズ 6 mL) を用いた溶出
- 10．低リン酸緩衝液 (10 カラム体積) を用いたカラム洗浄

精製した DEDDLI - RR の SDS - PAGE を (図 4 C) に示し、これは純粋なタンパク質の高収率を示す。

【0122】

実施例 4 - ニコチンのカップリング

DEDDLI-RR及びLIVELI1-RRの第一のプールされた溶出フラクションは、5 mM EDTAと少なくとも1時間インキュベーションし、浸出した金属イオンを除去した。続いてプールされた溶出フラクションの接線流ろ過を用いて、6 M グアニジン塩酸塩、100 mM HEPES pH 7.2、150 mM NaCl からなるカップリング緩衝液に対し、透析を行った。透析には、スペクトラ-ポア6-8 kDa カットオフ膜を用いた。

【0123】

11.03 mg/mL の濃度でのDEDDLI-RRの12 mgを、1090 µL の体積に相当するカップリングに用いた。タンパク質対NHS-ニコチンのモル比は1:50であった。従って、この比について以下の量のタンパク質及びNHS-ニコチンが用いられた：

DEDDLI-RR：0.267 µmol (12 mg)

エナンチオピュアなNHS-ニコチン：13.35 µmol

【0124】

カップリング反応を、マグネチックスターラーを使用して攪拌しながら、暗所で(すなわち、アルミホイルで覆って)、室温で3時間行った。カップリング反応後、試料をPD mini trap G-25 充填カラムに通過させカップリングしていないNHS-ニコチンを除去し、8 M 尿素、20 mM Tris pH 8.5、150 mM NaCl 及び10%トレハロース(図4D)からなるプレ-リフォールディング緩衝液に緩衝液交換をした。カップリング前及び後のコンストラクトの分子量を、タンパク質鎖あたり平均8.9ニコチン分子、すなわち、8つ全てのリジン側鎖及びN末端アミンがほとんど完全にNHS-ニコチンとカップリングしている(図4D)に相当する、それぞれ、44527.31及び46838.55 Daであると決定した。

【0125】

実施例5-リフォールディング

免疫付与実験のためのCpG又は封入研究のための蛍光標識されたCpGのいずれかを含む、最終リフォールディング緩衝液を調製した。

配列5'-T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G

*T*T-3' (配列番号13)

を有するマウス特異的CpG(1826)であって、それにおいてDNA骨格における塩基はホスホロチオエート結合(記号*により示す)により接続されている、配列。CpG 1826の分子量は6362.7 g/molである。フルオレセイン標識CpG ODN 1826 Fは、6899.7 g/molの分子量を有する。ODN 1826は、クラスB CpG配列であり、2つの非メチル化CpGジヌクレオチドを含み、それらは太字で強調表示されている。クラスB CpGは、迅速な分解を防ぐ完全なホスホロチオエート骨格内に、1又はそれより多いCpGジヌクレオチドを含む。それらは、B細胞を強く活性化するがIFN-α分泌を弱く刺激する。

【0126】

哺乳動物DNAと比較して、これらの非メチル化CpGジヌクレオチドは、20倍の頻度で細菌DNAにおいて存在する。このマウス特異的ODN 1826配列におけるこれらのモチーフは、マウスToll様受容体9により認識され、その後、強力な免疫刺激性効果を引き起こす。

【0127】

迅速なリフォールディング後、最終タンパク質濃度は、タンパク質、0.31ナノモルに相当する、0.05 mg/mLである。封入実験のため、タンパク質対CpGの異なるモル比を調製した。異なる最終リフォールディング緩衝液のため、次の量のCpGを調製した：DEDDLI-RR：ODN 1826 Fの1:0.2、1:0.3、1:0.45、1:0.6、1:0.75、1:1、1:1.5及び1:2の割合に相当する、0.0

10

20

30

40

50

6、0.09、0.14、0.186、0.233、0.031、0.451及び0.62ナノモル。

【0128】

その後、プレ-リフォールディング緩衝液中のタンパク質を、異なる量のODN1826を含む、20mM Tris pH8.0、50mM NaCl、10%トレハロースを含む、最終リフォールディング緩衝液に滴下希釈した。迅速なリフォールディング工程は以下のように行われた：CpGを含む最終リフォールディング緩衝液を絶えず攪拌し続けた。タンパク質DEDDLI-RRを（CpGを有する）最終リフォールディング緩衝液に滴下し、リフォールディング工程を開始した。タンパク質を加えた後、絶えず攪拌しながらリフォールディング工程を5分間継続させた。

10

【0129】

実施例6 - 封入

迅速なリフォールディング後、ろ過の前に、全相対蛍光単位（RFU）を測定した。その後、300μLのDEDDLI-RR：ODN1826Fの全量を用いて、タンパク質を2.5倍濃縮する（すなわち、保持液を300μLから約120μLに減少させた）ことにより第一のろ過工程を実行した。遊離のCpGは通過するが封入されたCpGを有するかもしれない集合SAPNは保持されることを可能とする、100kDaカットオフ遠心フィルターを用いてろ過工程を実行した。第一のろ過工程後、通過画分及び保持液のRFUを測定した。

20

【0130】

試料	比／量	ろ過前の R F U	ろ過後の R F U	
			保持液	通過画分
DEDDLI-RR:ODN1826F	1:0.2	20213	19894	623
	1:0.3	24002	23916	1006
	1:0.45	26838	27099	1031
	1:0.6	27328	27226	1338
	1:0.75	30608	29400	3199
	1:1	37291	33636	18600
	1:1.5	44474	38639	29848
	1:2	47463	41840	36059
ODN1826F のみ	0.2	27357	15369	2981
	0.3	30792	23780	4803
	0.45	35611	26132	16263
	0.6	37880	27995	23710
	0.75	40254	28328	26177
	1	42871	34370	27173
	1.5	46935	41114	33326
	2	49291	42812	37622

表 3 : 封入後の蛍光

【 0 1 3 1 】

蛍光クエンチングのため、蛍光測定値のシグナル (R F U) は濃度について極めて非線形であることに注意することは重要である。従って、成功した封入は、カラム「通過画分」フラクションにおいて最も良く観察することができる。C p G が S A P N に封入される場合、それは、その後、フィルターを通過しないであろうし、「通過画分」においてシグナルを与えないであろう。最大 1 : 0 . 6 の封入比率まで、S A P N (D E D D L I - R R : O D N 1 8 2 6 F) を有する試料の「通過画分」における検出可能な蛍光はほとんどないが、S A P N を有しない試料 (O D N 1 8 2 6 F のみ) においては、より低い封入比率 1 : 0 . 3、1 : 0 . 4 5 及び 1 : 0 . 6 に相当するこれらの濃度で蛍光強度の急速な増加があった (図 5)。より高い比においては、S A P N が全ての蛍光 (すなわち、C p G) を保持することができず、従って、蛍光シグナルは、S A P N を含む試料の「通過画分」において著しく増加する (D E D D L I - R R : O D N 1 8 2 6 F)。これは、S A P N が、タンパク質鎖のモル比の 0 . 6 倍に相当する C p G の量を封入することができ、

すなわち、60のタンパク質鎖を有するSAPNのT1二十面体対称性を仮定すると、およそ、ナノ粒子あたり合計36のCpG分子が封入されることを意味する。

【0132】

6899.7g/molの分子量を有する、NaCl緩衝液中でのDNAの1.8g/cm³の密度を仮定すると、36分子のODN1826Fは、直径7.6nmを有する球体を占める。SAPNのコンピューターモデルに基づいた中央の空洞の体積と非常によく一致している。

【0133】

SAPNに封入され得るよりも多くのCpGが添加される場合、その後、さらなるCpGは、膜を通過し、通過画分において蛍光強度の増加をもたらすであろう。非封入CpGによる、通過画分における蛍光強度のこの増加は、相当するCpG濃度での、CpGのみ試料から測定されるシグナルとよく相関する(図6)。従って、SAPNを含む試料において非封入CpGから検出されるシグナルは、CpGのみ試料からのシグナルとよく類似しており、濃度依存曲線はほとんど重なり合っている(図6)。

10

【0134】

実施例7 - 電子顕微鏡法

ODN1826を有する封入DEDDL I - RRの透過型電子顕微鏡分析は、非常にいい、非凝集ナノ粒子形成(図7)を示す。

【0135】

実施例8 - マウス免疫付与実験

20

免疫付与実験のため、モル比1:0.6のDEDDL I - RR:ODN1826を用いた。迅速なリフォールディング後、封入されるCpGを有する、リフォールディングさせたDEDDL I - RRを含む溶液を透析し、ろ過した。試料をその後、100kDaカットオフ遠心フィルター(Millipore)を用いて濃縮した。滅菌フードにおいて、0.2μmシリンジフィルター(Sartorius)を用いて最終滅菌ろ過ステップを行った。各5匹のBalb/Cマウスの群を10μg及び30μgの2つの異なる投与量で、封入されたCpGを有する又は有しないタンパク質を免疫した。それらの投与量におけるCpGの量は、それぞれ0.85μg及び2.56μgである。2週間ごとに3回の注入を、筋肉内(IM)、鼻腔内(IN)及び静脈内(IV)注入の3つの異なる免疫付与プロトコルについて行った。免疫原のSAPN中にCpGが封入される場合に、3回の免疫付与プロトコルのそれぞれについて、抗体価の著しい増加を観察することができる(表3、図8)。

30

- IM免疫付与について、10μg投与量 免疫付与では、CpGを有する場合も有していない場合も、抗体価の観点から同一の強さの免疫応答を示すが、30μgの投与量については、CpGを有しない試料と比較して、封入されたCpGを有する試料について236%の増加を観察することができる。

- IN免疫付与については、封入されるCpGは、タンパク質10μg(CpGの0.85μgに相当する)のより低い投与量ですでに免疫応答を161%増加させている。30μgタンパク質投与量(2.56μg CpG)について、増加は319%である。

- IM免疫付与に対する免疫応答は一般に最も強いが、CpGのインフルエンザは、タンパク質10μg及び30μg(CpG0.85μg及び2.56μg)の、低い投与量及び高い投与量について18%及び87%の増加を伴い、より穏やかである。

40

【0136】

表3: CpG封入を伴う及び伴わない、免疫応答

免疫付与	筋肉内 (I M)				鼻腔内 (I N)				静脈内 (I V)			
投与量 (タンパク質)	10μg	10μg	30μg	30μg	10μg	10μg	30μg	30μg	10μg	10μg	30μg	30μg
CpG	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
A b 価	4066	3898	3715	12465	1363	3558	2576	10790	5497	6494	10295	19266
増加		-4%		236%		161%		319%		18%		87%

10

20

30

40

50

【 0 1 3 7 】

実施例 9 - 異なる長さのリンカー L 1 及びリンカー L 1 の全体としての電荷の試験

より長いリンカー L 1 を有し、全体としてプラス 3 の電荷を有する D E D D L I - R R よりも多くの正電荷を運ぶ S A P N は、より効率良く負に帯電した核酸を封入するであろう、すなわち、それらは核酸のより大きな積載量を運ぶことができるであろうことが予測される。この仮定を試験するため、それぞれ R R G R R G R (配列番号 1 4) 及び R R G R R G R G R (配列番号 1 5) のリンカー L 1 を有する 2 つの新しい粒子を設計した。第一のコンストラクト (2 R R と呼ばれる) のリンカー L 1 の長さは、5 の正電荷 (アルギニン) を有する 7 アミノ酸であり、一方、第二のコンストラクト (3 R R と呼ばれる) は、合計で 7 の正電荷 (アルギニン) を有する 9 アミノ酸長のリンカー L 1 を有した。

【 0 1 3 8 】

改変されたリンカーの理論的根拠は、リンカー L 1 の長さを増加させることにより 2 つのオリゴマー化ドメイン N D 1 及び N D 2 をさらに離れさせることができ、従って、積み荷を積むためのスペースをより多く与える、中央の空洞のサイズを増加させる。リンカーにさらなる電荷を加えることにより、最大積載量として負に帯電した核酸とタンパク質との間で電荷をより良く釣り合わせることが可能になる。

【 0 1 3 9 】

リフォールディング挙動は、タンパク質鎖の全体としての電荷に大きく依存し、従って粒子そのものの全体としての電荷に大きく依存するため、2 R R 及び 3 R R のリンカー L 1 におけるさらなる正電荷は、五量体 N D 1 の始まりの直前の X 1 の端での負に帯電したグルタミン酸の挿入により補い、及び 3 R R については五量体 N D 1 の C 末端近くのアルギニン残基を負に帯電したアスパラギン酸へ変更することにより補った。これは、2 R R 及び 3 R R のタンパク質鎖の全体としての電荷を、D E D D L I - R R の全体としての電荷と同一である、- 7 に保つ。2 R R 及び 3 R R の配列は、その結果、それぞれ、
M G D K H H H H H H H H H K D G S D K G S E E W E E W N A R W D E W E N D W N
D W R E D W Q A W R D D W A R W R A T W R R G R R G R L L S R L E R L E R R N E
E L R R L L Q L I R H E N R M V L Q F V R A L S M Q N A E L E R R L E E L A R G
M A Q V I N T N S L S L L T Q N N L N R S Q S A L G T A I E R L S S G L R I N S
A R D D A A G Q A I A N R F T A N I R G L T Q A S R N A N D G I S I A Q T T E G
A L N E I N N N L Q R V R E L A V Q S A N S T N S Q S D L D S I Q A E I T Q R L
N E I D R V S G Q T Q F N G V R V L A Q D N T L T I Q V G A N D G E T I D I D L
R Q I N S Q T L G L D Q L N V Q Q K Y K D G D K G D D K T E N P L Q R I D A A L
A Q V D A L R S D L G A V Q N R F N S A I T N L G N T V N N L S E A R S R I E D
S D Y A T E V S N M S R A Q I L Q Q A G T S V L A Q A N Q V P Q N V L S L L R (配列番号 1 6)

及び

M G D K H H H H H H H H H H H K D G S D K G S E E W E E W N A R W D E W E N D W N
 D W R E D W Q A W R D D W A R W D A T W R R G R R G R R G R L L S R L E R L E R
 R N E E L R R L L Q L I R H E N R M V L Q F V R A L S M Q N A E L E R R L E E L
 A R G M A Q V I N T N S L S L L T Q N N L N R S Q S A L G T A I E R L S S S G L R
 I N S A R D D A A G Q A I A N R F T A N I R G L T Q A S R N A N D G I S I A Q T
 T E G A L N E I N N N L Q R V R E L A V Q S A N S T N S Q S D L D S I Q A E I T
 Q R L N E I D R V S G Q T Q F N G V R V L A Q D N T L T I Q V G A N D G E T I D
 I D L R Q I N S Q T L G L D Q L N V Q Q K Y K D G D K G D D K T E N P L Q R I D
 A A L A Q V D A L R S D L G A V Q N R F N S A I T N L G N T V N N L S E A R S R
 I E D S D Y A T E V S N M S R A Q I L Q Q A G T S V L A Q A N Q V P Q N V L S L
 L R (配列番号 17)

10

である。2 R R 及び 3 R R の計算された分子量は、それぞれ、45431.93 Da 及び
 M w 45760.26 Da である。

【0140】

2つのコンストラクトを、実施例1、2及び3のとおり、クローニングし、発現させ及
 び精製した。D E D D L I - R R と比較してわずかに異なる分子量を説明するため、わず
 かに変更された、封入比率に用いられるタンパク質量を用い、D E D D L I - R R につい
 て実施例5に記載のように、リフォールディング及び付随する封入を行った。

【0141】

図9による驚くべき発見は、2 R R 及び 3 R R の、より長く且つより正に帯電したリン
 カーは、より多くの C p G を封入させることはできなかったことである。C p G のみ試料
 と比較して、通過画分ヘフィルターを通過せず上清中に保持される C p G が依然として非
 常に明確に存在するが、それは D E D D L I - R R の封入効率よりもやや少ない。

20

【0142】

実施例10 - T L R 5 バックグラウンド免疫刺激を用いない、T L R 9 活性化の試験

コンストラクト D E D D L I - R R において、フラジェリン分子の D 0 / D 1 ドメイン
 は、T L R 5 を活性化して、強力な免疫応答を誘導する。これは、T L R 9 に結合する C
 p G からの免疫応答を覆うであろう。主に T L R 9 活性化から生じる、免疫応答を試験す
 るため、D E D D L I - R R における T L R 5 相互作用部位を改変し、受容体との相互作
 用を無効にさせた。T L R 5 / フラジェリン相互作用部位でのアルギニン残基 (Yoon S. I
 . et al., Science 2012, 335 : 859-64) をリジンに変異させた。また、フラジェリンの
 C 末端のインフラマソーム相互作用部位をに変異させ、インフラマソームとの相互作用を
 妨害した (Lightfield K.L. et al., Nat Immunol. 2008, 9 : 1171-8)。2つのタンパク
 質配列の名称は、L I V E L I 1 - R R 及び L I V E L I 2 - R R であり、対応する配列
 は、M G D K H H H H H H H H H H H K D G S D K G S W E E W N A R W D E W E N D W N
 D W R E D W Q A W R D D W A R W R A T W R R G R L L S R L E R L E R R N E E L R
 R L L Q L I R H E N R M V L Q F V R A L S M Q N A E L E R R L E E L A R G M A Q
 V I N T N S L S L L T Q N N L N R S Q S A L G T A I E R L S S S G L R I N S A R D
 D A A G Q A I A N R F T A N I R G L T Q A S R N A N D G I S I A Q T T E G A L N
 E I N N N L Q K V K E L A V Q S A N S T N S Q S D L D S I Q A E I T Q R L N E I
 D R V S G Q T Q F N G V R V L A Q D N T L T I Q V G A N D G E T I D I D L R Q I
 N S Q T L G L D Q L N V Q Q K Y K D G D K G D D K T E N P L Q R I D A A L A Q V
 D A L K S D L G A V Q N R F N S A I T N L G N T V N N L S E A R S R I E D S D Y
 A T E V S N M S R A Q I L Q Q A G T S V L A Q A N Q V P Q N V A A A A R (配列番
 号 18)

30

40

及び

M G D K H H H H H H H H H H H K D G S D K G S W E E W N A R W D E W E N D W N D W
 R E D W Q A W R D D W A R W R A T W R R G R L L S R L E R L E R R N E E L R R L
 L Q L I R H E N R M V L Q F V R A L S M Q N A E L E R R L E E L A R G M A Q V I
 N T N S L S L L T Q N N L N K S Q S A L G T A I E R L S S S G L R I N S A R D D A

50

AGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEI
NNNLQKVKE LAVQS ANSTNSQSDLD SIQAEITQRLNEIDR
VSGQTQFNGVKVLAQDNTLT IQVGANDGETIDIDL RQINS
QTLGLDQLNVQQKYKDGDKGDDDKTENPLQKIDAALA QVDA
LKSDLGAVQNRFN SAITNLGN TVNNLSEARSRIEDSDYAT
EVSNM SRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVAAAAAR (配列番号 1
9)

である。

【0143】

コンストラクトLIVE LI 1 - RRにおいて、コンストラクトDEDD LI - RRの
アルギニン残基206、208及び322をリジンに変異させ、LIVE LI 2 - RRに
10 において、DEDD LI - RRのアルギニン残基135、174、251及び310もリジ
ンに変化させた。リジン残基の第一級アミンでハブテニコチンをカップリングすること
により、フラジェリン及びTLR5間のインターフェイスでバルキーな基が挿入され、従
って、複合体形成を阻害し、従って、tol l - 様受容体ベースの免疫刺激を阻害する。
コンストラクトLIVE LI 1 - RR及びLIVE LI 2 - RRのいずれにおいても、フ
ラジェリンのD0ドメインのインフラマソーム相互作用部位は改変されてDEDD LI -
RR (LSLL) の残基390から393が4つのアラニン (AAAA) (配列番号40
20) に置き換えられている。この改変は、2つのコンストラクトLIVE LI 1 - RR及び
LIVE LI 2 - RRのインフラマソーム活性化を阻害するであろう (Lightfield K.L.
et al., Nat Immunol. 2008, 9: 1171-8)。

【0144】

正に帯電したリンカーを有するコンストラクトについて、封入されるCpGを伴わない
リフォールディングは上手くいかないため、コンストラクトのペアを調製した。それにお
いて正に帯電したリンカーRRGR (配列番号4) が配列MGGR (配列番号41) と置
き換えられており、従って、リンカーL1において、3つの正電荷のうち2つが除かれて
いる。LIVE LI 1及びLIVE LI 2と名付けられたそれらのコンストラクトを封入
されるCpGを伴わない免疫付与に用い、それらは、全体として配列

MGDKHHHHHHHHHHKDGSDKGSWE EWNARWDEWENDWNDW
REDWQAWRDDWARWRATWMGGRLLSRLERLERRNEELRRL
LQLIRHENRMVLQFVRALSMQNAELERRLEEELARGMAQVI
NTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLRINSARDDA
AGQAIANRFTANIRGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEI
NNNLQKVKE LAVQS ANSTNSQSDLD SIQAEITQRLNEIDR
VSGQTQFNGVVRVLAQDNTLT IQVGANDGETIDIDL RQINS
QTLGLDQLNVQQKYKDGDKGDDDKTENPLQRIDAAALA QVDA
LKSDLGAVQNRFN SAITNLGN TVNNLSEARSRIEDSDYAT
EVSNM SRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVAAAAAR (配列番号 2
0)

及び

MGDKHHHHHHHHHHHHKDGSDKGSWE EWNARWDEWENDWNDW
REDWQAWRDDWARWRATWMGGRLLSRLERLERRNEELRRL
LQLIRHENRMVLQFVRALSMQNAELERRLEEELARGMAQVI
NTNSLSLLTQNNLNKSSQSALGTAIERLSSGLRINSARDDA
AGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEI
NNNLQKVKE LAVQS ANSTNSQSDLD SIQAEITQRLNEIDR
VSGQTQFNGVKVLAQDNTLT IQVGANDGETIDIDL RQINS
QTLGLDQLNVQQKYKDGDKGDDDKTENPLQKIDAALA QVDA
LKSDLGAVQNRFN SAITNLGN TVNNLSEARSRIEDSDYAT
EVSNM SRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVAAAAAR (配列番号 2
50)

1)

を有した。

【0145】

コンストラクト L I V E L I 1 / L I V E L I 1 - R R 及び L I V E L I 2 / L I V E L I 2 - R R の 2 つのペアを、実施例 1、2 及び 3 のとおりクローニングし、発現させ、精製した。D E D D L I - R R について実施例 5 に記載のように、リフォールディング及び付随する封入を、D E D D L I - R R と比較してわずかに異なる分子量を説明するために、わずかに改変された封入比率に用いたタンパク質量を用いて行った。免疫付与実験のため、1 : 0 . 6 のタンパク質 : O D N 1 8 2 6 のモル比を用いた。迅速なリフォールディング後、封入された C p G を有するリフォールディングさせたナノ粒子を含む溶液を透析し、ろ過した。その後、試料を 1 0 0 k D a カットオフ遠心フィルター (M i l l i p o r e) を用いて濃縮した。滅菌フードにおいて、0 . 2 μ m シリンジフィルター (S a r t o r i u s) を用いて最終滅菌ろ過ステップを行った。

10

【0146】

各 5 匹の B a l b / C マウスの群を、(L I V E L I 1 - R R 及び L I V E L I 2 - R R) を用いて又は封入された C p G (L I V E L I 1 及び L I V E L I 2) を用いずに、3 0 μ g タンパク質の投与量を用いて免疫した。L I V E L I 1 - R R 及び L I V E L I 2 - R R 投与量における封入された C p G の量は、約 2 . 5 μ g である。免疫付与プロトコルにおいて、2 週間差で各 3 回の筋肉内注入を行った。免疫原の S A P N に C p G は封入される場合、免疫原のいずれのペアについても抗体価の著しい増加を観察することができる (図 1 0) 。 L I V E L I 1 及び L I V E L I 2 免疫原について O D N 1 8 2 6 を用いない抗体価はそれぞれ、5 7 6 . 3 及び 3 6 7 . 6 であったが、一方、L I V E L I 1 - R R 及び L I V E L I 2 - R R に封入された C p G は、抗体価を、およそ 2 0 倍の増加に相当する、それぞれ、1 0 9 5 8 . 0 及び 7 6 1 8 . 4 に増加させた。

20

【0147】

実施例 1 1 - フラジェリンを含むタンパク質鎖 (C C - R R) との共集合によるマラリアワクチン

本発明による C p G - S A P N のさらなる例は、以下のコンストラクト「C C - R R」であり、それにおいて、

式 (I) について、配列、

30

M G H H H H H H H H H H H T F R G N N G H N S S S S L Y N G S Q F I E Q L N N S F
T S A F L E S Q S M N K I G D D L A E T I S N E L V S V L Q K N S P T F L E S S
F D I K S E V K K H A K S M L K E L I K V G L P S F E N L V A E N V K P P K V D
P A T Y G I I V P V L T S L F N K V E T A V G A K V S D E I W N Y N S P D V S E
S E E S L S D D F F D A S G S A K F V A A W T L K A A A S G S W E R W N A K W D
E W R N D Q N D W R E D W Q A W R D D W A Y W T L T W R R G R L Y S R L A R I E
R R V E E L R R L L Q L I R H E N R M V L Q F V R A L S M Q A R R L E A L I D Y
N K A A L S K F K E D A R G T F R G N N G H N S S S S L Y N G S Q F I E Q L N N
S F T S A F L E S Q S M N K I G D D L A E T I S N E L V S V L Q K N S P T F L E
S S F D I K S E V K K H A K S M L K E L I K V G L P S F E N L V A E N V K P P K
V D P A T Y G I I V P V L T S L F N K V E T A V G A K V S D E I W N Y N S P D V
S E S E E S L S D D F F D (配列番号 2 2)

40

及び

式 (I I) について、配列、M G H H H H H H H H H H H T F R G N N G H N S S S S L Y
N G S Q F I E Q L N N S F T S A F L E S Q S M N K I G D D L A E T I S N E L V S
V L Q K N S P T F L E S S F D I K S E V K K H A K S M L K E L I K V G L P S F E
N L V A E N V K P P K V D P A T Y G I I V P V L T S L F N K V E T A V G A K V S
D E I W N Y N S P D V S E S E E S L S D D F F D A S G S A K F V A A W T L K A A
A S G S W E R W N A K W D E W R N D Q N D W R E D W Q A W R D D W A Y W T L T W
R R G R L Y S R L A R I E R R V E E L R R L L Q L I R H E N R M V L Q F V R A L

50

SMQARRLERRLEEELARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQS
 ALGTAIERLSSGLRINSARDDAAGQAIANRFTANIRGLTQ
 ASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANST
 NSQSDLDSDIQAETITQRLNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNT
 LTIQVGANDGETIDIDLRLQINSQTLGLDQLNVQQKYKDG
 KGDDKTENPLQRIDAAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITN
 LGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSV
 LAQANQVPQNVLSLLR (配列番号23)

を有する式(I)及び(II)に相当する2つの異なるタンパク質鎖が共集合する。

第一のコンストラクトは、以下の部分構造

X1: MGHHHHHHHHHHTFRGNNGHNSSSSSLYNGSQFIEQL
 NNSFTSAFLESQSMNKIGDDLAEETISNELVSVLQKNSPT
 FLESSFDIKSEVKKHAKSMLKELIKVGLPSFENLVAENVK
 PKVDPATYGIIVPVLTSLFNKVETAVGAKVSDEIWNYN
 SPDVSESEESLSDDFFDASGS AKFVA AWT LKAAASGS (配列番号24)

ND1: WERWNAKWDEWRNDQNDWREDWQAWRDDWAYWTLTW (配列番号25)

L1: RRGR (配列番号4)

ND2: LYSRLARIERRVEELRRL LQLIRHENRMVLQFVRA
 LSMQARRL (配列番号26)

Y1: EALIDYNKAAALS KFKEDARGTFRGNNGHNSSSSSLYN
 GSQFIEQLNNSFTSAFLESQS MNKIGDDLAEETISNELV
 SVLQKNSPTFLESSFDIKSEVKKHAKSMLKELIKVGLPSFE
 NLVAENVKPKVDPATYGIIVPVLTSLFNKVETAVGAKVS
 DEIWNYN SPDVSESEESLSDDFFD (配列番号27)

を有する式X1 - ND1 - L1 - ND2 - Y1 (I) に相当する。

【0148】

第二のコンストラクトは、

以下の部分構造

X2: MGHHHHHHHHHHTFRGNNGHNSSSSSLYNGSQFIEQLN
 NSFTSAFLESQSMNKIGDDLAEETISNELVSVLQKNSPTF
 LESSFDIKSEVKKHAKSMLKELIKVGLPSFENLVAENVK
 PKVDPATYGIIVPVLTSLFNKVETAVGAKVSDEIWNYN
 SPDVSESEESLSDDFFDASGS AKFVA AWT LKAAASGS (配列番号24)

ND3: WERWNAKWDEWRNDQNDWREDWQAWRDDWAYWTLTW (配列番号25)

L2: RRGR (配列番号4)

ND4: LYSRLARIERRVEELRRL LQLIRHENRMVLQFVRA
 SMQARRL (配列番号26)

Y2: ERRLEEELARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGT
 AIERLSSGLRINSARDDAAG QAIANRFTANIRGLTQASR
 NANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQ
 SDLDSDIQAETITQRLNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLTI
 QVGANDGETIDIDLRLQINSQTLGLDQLNVQQKYKDGDKG
 DKTENPLQRIDAAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGN
 TVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQ
 ANQVPQNVLSLLR (配列番号28)

を有する、式X2 - ND3 - L2 - ND4 - Y2 (II) に相当する。

10

20

30

40

50

特に、これらのコンストラクトにおける異なる断片は以下のとおりである：

X 1 は、制限部位 N c o I、N h e I 及び B a m H I をコードするペプチド配列 (M G、A S G S 及び S G S) に挟まれそれにより区切られた、H i s タグ (H H H H H H H H H) (配列番号 2 9)、それに続くマラリアの抗原 C e l T O S (T F R G N N G H N S S S S L Y N G S Q F I E Q L N N S F T S A F L E S Q S M N K I G D D L A E T I S N E L V S V L Q K N S P T F L E S S F D I K S E V K K H A K S M L K E L I K V G L P S F E N L V A E N V K P P K V D P A T Y G I I V P V L T S L F N K V E T A V G A K V S D E I W N Y N S P D V S E S E E S L S D D F F D) (配列番号 3 0) 及びパン - D R 結合エピトープ P A D R E (A K F V A A W T L K A A A) (配列番号 3 1) を含む。

10

【 0 1 4 9 】

N D 1 はいくつかの電荷改変を有する、トリプトファンジッパー (Liu J et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(46) : 16156-61、p d b - e n t r y 1 T 8 Z、配列番号 7) 由来の五量体コイルドコイルである。それは、配列番号 3 を有する D E D D L I - R R の N D 1 ドメインと類似する。

【 0 1 5 0 】

L 1 は、D E D D L I - R R における配列 R R G R 及び配列番号 4 を有するものと同じのリンカーである。

【 0 1 5 1 】

N D 2 は、配列 I D B A A 0 1 4 4 9 . 1 を有するインフルエンザ A ウイルスのマトリックスタンパク質 1 の残基 1 7 3 から 1 8 1 に相当するプロミスキヤス C D 4 / C D 8 エピトープ I R H E N R M V L (配列番号 8) (Parida R. et al., Vaccine 2007, 25 : 7530-7539) も含むコンストラクト D E D D L I - R R における N D 2 (配列番号 5) とよく類似する配列を有するコイルドコイルドメインである。

20

【 0 1 5 2 】

Y 1 は、リンパ球性脈絡髄膜炎マンマレナウイルスの糖タンパク質由来の C D 4 エピトープを含む配列から始まり、L I D Y N K A A L S K F K E D (配列番号 3 2) その後、DNA レベルで制限部位 X h o I 及び X m a I をコードするペプチド配列 (L E 及び A R G) に挟まれそれにより区切られたマラリア抗原 C e l T O S (T F R G N N G H N S S S S L Y N G S Q F I E Q L N N S F T S A F L E S Q S M N K I G D D L A E T I S N E L V S V L Q K N S P T F L E S S F D I K S E V K K H A K S M L K E L I K V G L P S F E N L V A E N V K P P K V D P A T Y G I I V P V L T S L F N K V E T A V G A K V S D E I W N Y N S P D V S E S E E S L S D D F F D) (配列番号 3 0) の第二のコピーが続く。X h o I 制限部位は、断片 N D 2 と共有される。

30

【 0 1 5 3 】

第一のコンストラクトと第二のコンストラクトとの唯一の違いは、部分構造 Y 1 及び Y 2 における違いであり、すなわち、他の断片は、2 つのコンストラクト間で同一であり、それは、X 1 は X 2 と等しく、N D 1 は N D 3 と等しく、L 1 は L 2 と等しく及び N D 2 は N D 4 と等しいことを意味する。従って、2 つのコンストラクトのコイルドコイルオリゴマー化ドメインは同一であるため、2 つのコンストラクトは、共集合することができる。これは、特許 W O 2 0 1 5 / 1 0 4 3 5 2 A 1 に記載されている概念であり、それにおいて、フラジェリンを含むタンパク質鎖はタンパク質鎖を運ぶ B 細胞エピトープと共集合する。

40

【 0 1 5 4 】

第二のコンストラクトの Y 2 は、第一のコンストラクトの Y 1 と対照的に、フラジェリンの D 0 及び D 1 ドメインを含む。それは、N D 4 のコイルドコイルをもう少し伸張させるフラジェリン配列前の小さな α ヘリックスセグメント (E R R L E E L) (配列番号 3 3) から始まる。Y 2 は、X h o I 制限部位が断片 N D 4 と共有されながら制限部位 X h o I 及び X m a I をコードするペプチド配列 (L E 及び A R G) に挟まれそれにより区切られる。

50

【 0 1 5 5 】

2つのコンストラクトの共集合物は、両方のコイルドコイルにB細胞エプトープC e l T O Sを提示するS A P Nを形成するが、少数のフラジェリン分子は、第一のコンストラクトと第二のコンストラクトとの共集合比率に応じて、S A P Nに組み込まれている。正に帯電したリンカーL 1及びL 2は、再び、S A P Nの中央の空洞に位置し、従って、負に帯電したC p Gとのイオン性相互作用可能にする。再び、C p G O D N 1 8 2 6は、リフォールディングの間にS A P Nに封入される。

【 0 1 5 6 】

実施例1、2及び3のとおり、2つのコンストラクトをクローニングし、発現させ、精製した。D E D D L I - R Rと比較して異なる分子量を説明するために、1 : 0 . 6 (タンパク質 : C p G)の同一の封入比率について用いるタンパク質量を変更して、D E D D L I - R Rについて実施例5に記載のようにリフォールディング及び付随する封入を行った。D E D D L I - R Rコンストラクトと同様に、封入効率は、上記蛍光ろ過実験における保持率から明らかなように、タンパク質鎖対C p G O D N 1 8 2 6 F分子の割合について約1 : 0 . 6である。C C - R Rは、最大1 : 0 . 6の共集合比率で蛍光O D N 1 8 2 6 F分子を保持することができる(図12)。

【 0 1 5 7 】

S A P Nの分子構造を記載する図、共集合 / 封入手順の工程並びに第一の及び第二のタンパク質鎖の58 : 2の共集合比率についてのE M顕微鏡写真を図13に示した。

【 0 1 5 8 】

実施例12 - C D 4及びC D 8エプトープを有するH S Vマウス免疫原「R R - S S I E F」

D E D D L I - R Rコンストラクト(実施例1)について、R R - S S I E FをコードするDNAは、標準的な分子生物学の手順を用いて調製した。タンパク質配列R R - S S I E F

M G D K H H H H H H H H H H K D G S D K G S W E E W N A R W D E W E N D W N D W
R E D W Q A W R D D W A R W R A T W R R G R L L S R L E R L E R R N E E L R R L
L Q L I R H E N R M V L Q F V R A L S M Q N A E L E R R L E E L A R G M A Q V I
N T N S L S L L T Q N N L N R S Q S A L G T A I E R L S S G L R I N S A R D D A
A G Q A I A N R F T A N I R G L T Q A S R N A N D G I S I A Q T T E G A L N E I
N N N L Q R V R E L A V Q S A N S T N S Q S D L D S I Q A E I T Q R L N E I D R
V S G Q T Q F N G V R V L A Q D N T L T I Q V G A N D G E T I D I D L R Q I N S
Q T L G L D Q L N V Q Q A K F V A A W T L K A A A S S I E F A R L Q F D D T E N
P L Q R I D A A L A Q V D A L R S D L G A V Q N R F N S A I T N L G N T V N N L
S E A R S R I E D S D Y A T E V S N M S R A Q I L Q Q A G T S V L A Q A N Q V P
Q N V L S L L R (配列番号34)

をコードするDNAを含むプラスミドは、p P E P - Tの塩基性S A P N発現コンストラクトのN c o I / E c o R I制限部位へのクローニングにより構築した(図3)。

【 0 1 5 9 】

構造X 1 - N D 1 - L 1 - N D 2 - Y 1を有するこのコンストラクトの配列は、詳細に上述したD E D D L I - R Rの1つに類似する。簡潔に、このコンストラクトは、五量体コイルドコイルの最後のコア位置及び二量体コイルドコイルの最初のコア位置の間に3つの正電荷を含む配列R R G Rを有するリンカーL 1により、新規に設計された二量体コイルドコイル(N D 2)と結合した五量体コイルドコイルトリプトファンジッパー(N D 1)から構成される。配列X 1は、N末端にH i sタグを含み、配列Y 1は、改変されたフラジェリンのD 0及びD 1ドメインから構成される、サルモネラ・ティフィムリウムフラジェリンの断片を含む。フラジェリンのD 0及びD 1ドメインを接続するペプチド配列は、M f e I及びP s t Iの制限部位の間に、配列Q L N V Q Q A K F V A A W T L K A A A S S I E F A R L Q F D D T E N P L Q (配列番号35)を有する。これは、ヒトアルファヘルペスウイルス2のエンベロープ糖タンパク質Bのマウス特異的(ハプロタイプH

- 2 k) C D 8 エピトープ S S I E F A R L と、パン - D R 結合 C D 4 エピトープ P A D R E を含む断片を接続する。M H C - I 分子を有する複合体中でのこのペプチドの結晶構造は、エントリーコード 1 T 0 M で、B r o o k h a v e n データベースに寄託した。

【 0 1 6 0 】

T h 1 免疫応答を誘導するために、クラス B O D N 1 8 2 6 の代わりに、クラス A C p G O D N 1 5 8 5 を用いた。O D N 1 5 8 5 は、リン酸ジエステル結合を表す大文字の塩基を有し、小文字の塩基は、塩基間のホスホロチオエート結合を含む、配列 5' - g g G G T C A A C G T T G A g g g g g g - 3' (配列番号：39) を有する。

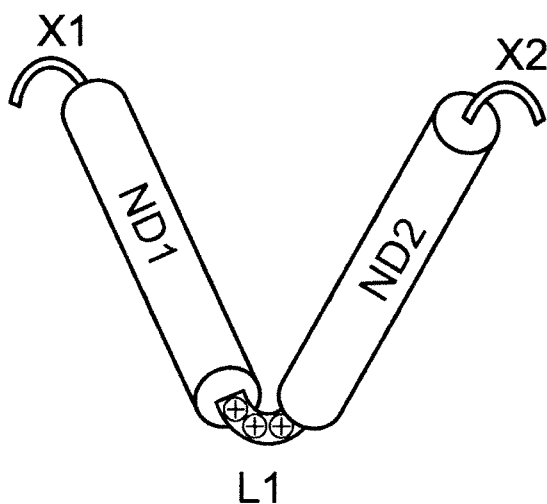
【 0 1 6 1 】

実施例 1、2 及び 3 において、コンストラクト R R - S S I E F をクローニングし、発現させ、精製した。D E D D L I - R R と比較してわずかに異なる R R - S S I E F の分子量、及び O D N 1 8 2 6 に対し O D N 1 5 8 5 の異なる分子量を説明するために、封入比率のために用いられるタンパク質量をわずかに変更して、D E D D L I - R R について実施例 5 に記載するように、リフォールディング及び付随する封入を行った。免疫付与実験のため、モル比 1 : 0.6 のタンパク質 : O D N 1 5 8 5 を用いた。迅速なリフォールディング後、封入される C p G を有するリフォールディングさせたナノ粒子を含む溶液を透析し、ろ過した。その後、試料を 100 k D a カットオフ遠心フィルター (M i l l i p o r e) を用いて濃縮した。滅菌フードにおいて、0.2 μ m シリンジフィルター (S a r t o r i u s) を用いて最終滅菌ろ過ステップを行った。封入された O D N 1 5 8 5 と R R - S S I E F の透過型電子顕微鏡分析は、非常によく、非凝集ナノ粒子形成 (図 14) を示す。

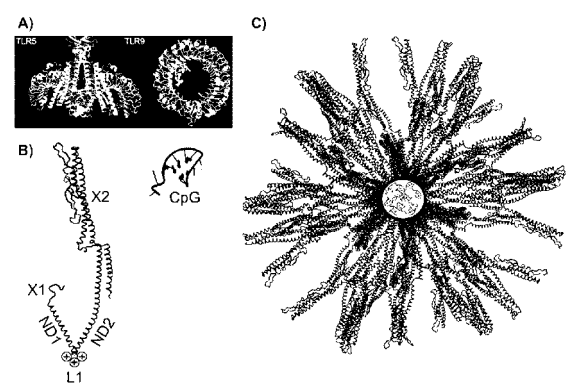
10

20

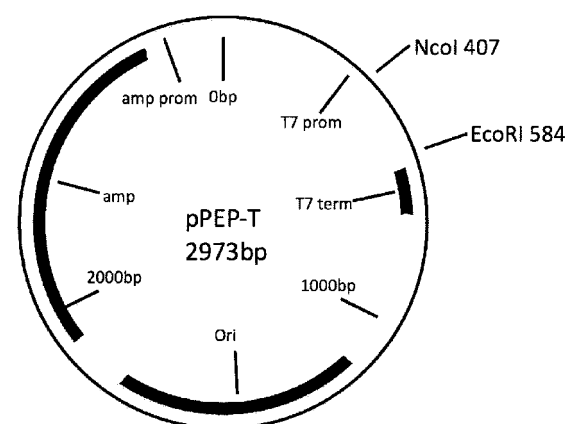
【 図 1 】



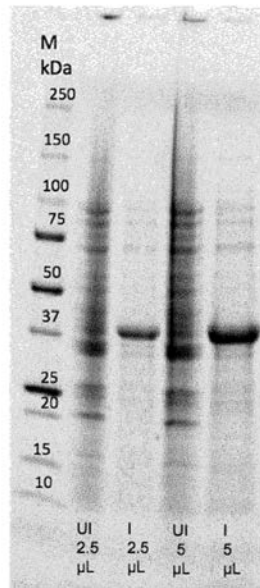
【 図 2 】



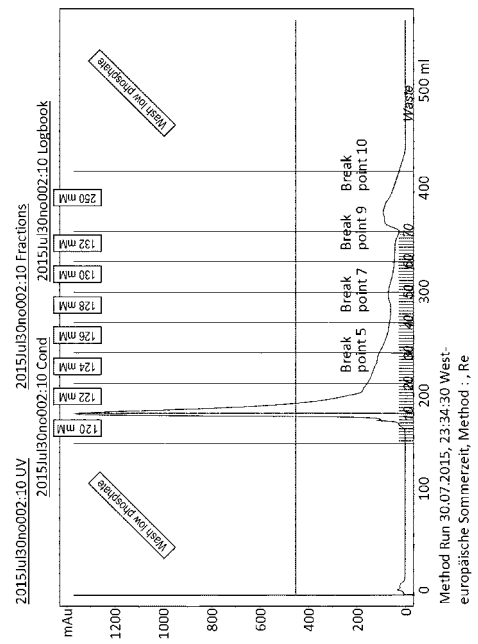
【 図 3 】



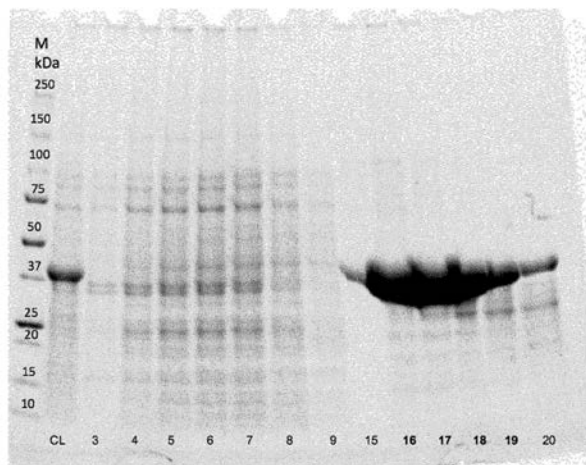
【 図 4 A 】



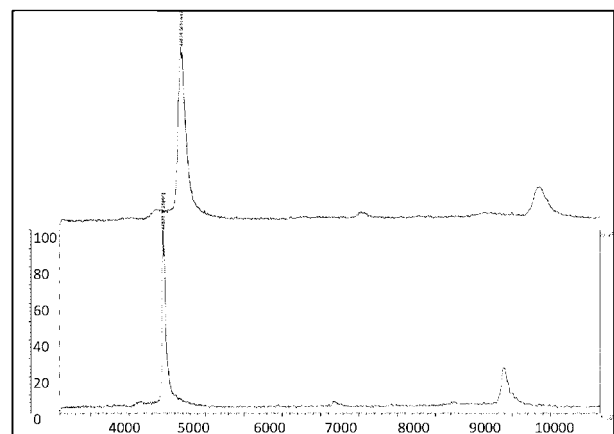
【 図 4 B 】



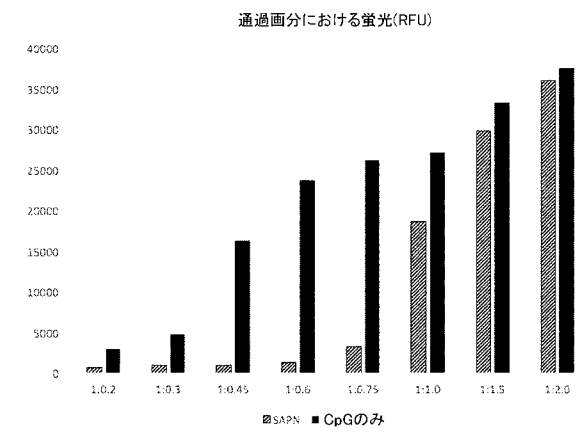
【 図 4 C 】



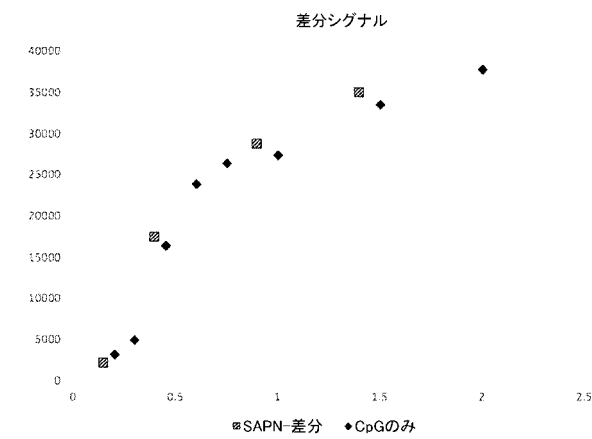
【 図 4 D 】



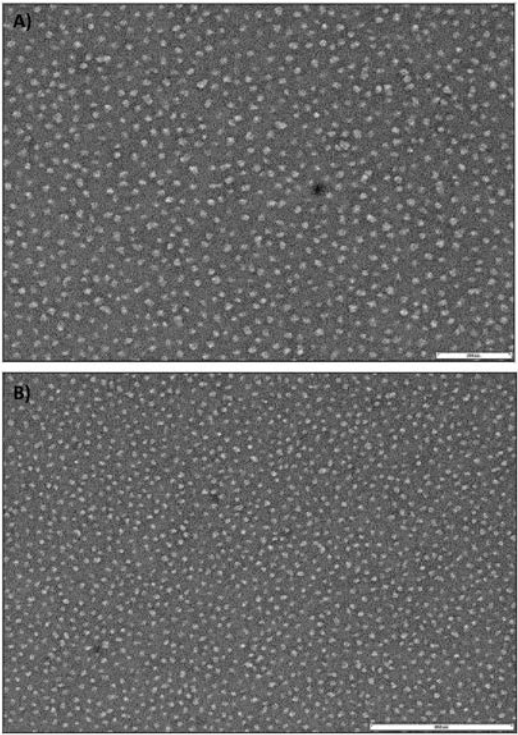
【 図 5 】



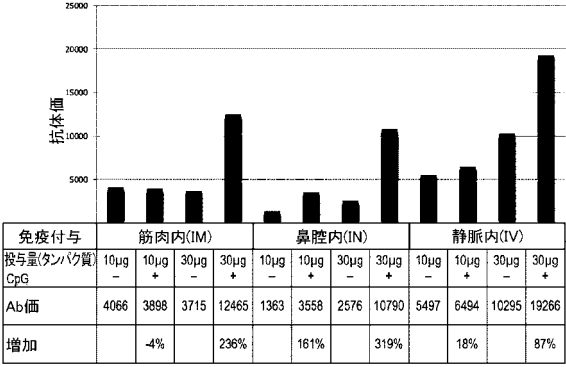
【 図 6 】



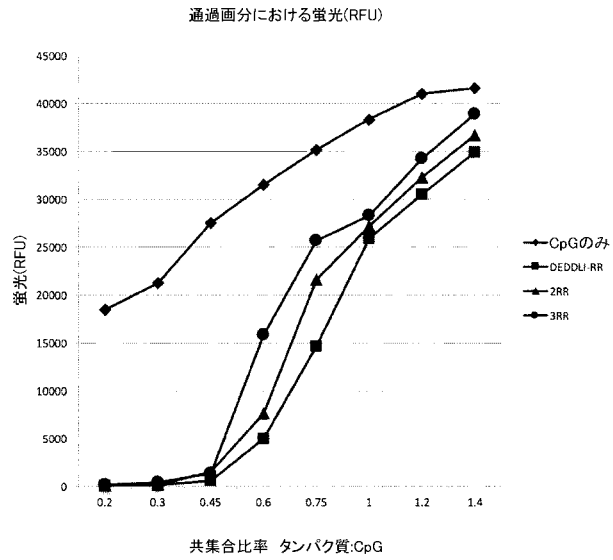
【 図 7 】



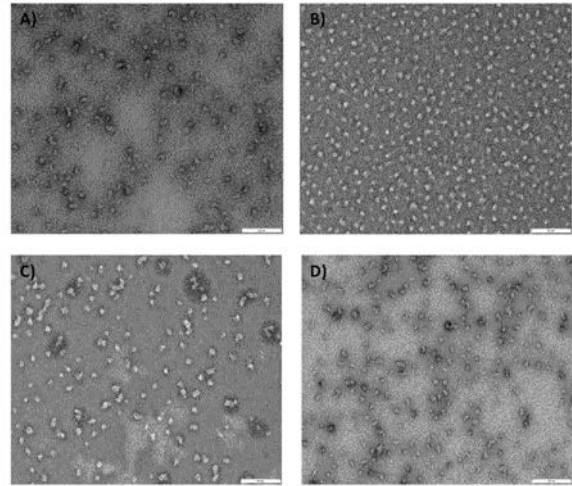
【 図 8 】



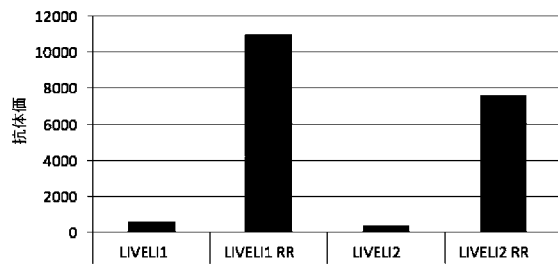
【図 9】



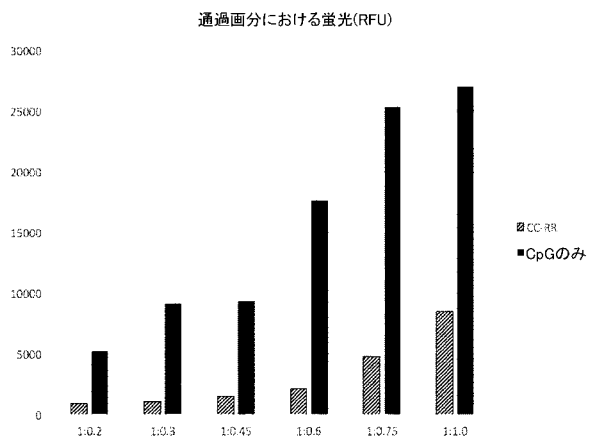
【図 1 1】



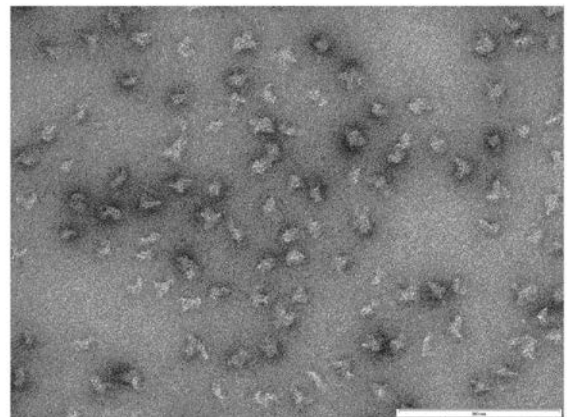
【図 1 0】



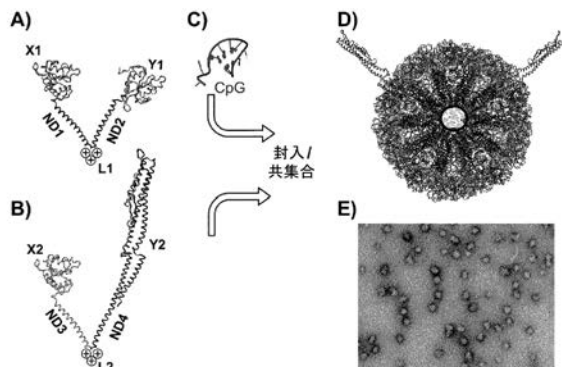
【図 1 2】



【図 1 4】



【図 1 3】



【配列表】

2020510650000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/054427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/385 A61P37/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAKAMURA S ET AL: "DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration", GENE THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 11, no. 7, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 628-635, XP002539286, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/SJ.GT.3302193 [retrieved on 2004-02-19] the whole document ----- -/--	1-15

☒ 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 but published on or after the international filing date

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

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

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

"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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April 2018

Date of mailing of the international search report

14/05/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Orlando, Michele

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/054427

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YONGKUN YANG ET AL: "Encapsulation of gold nanoparticles into self-assembling protein nanoparticles", JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL, GB, vol. 10, no. 1, 31 October 2012 (2012-10-31), page 42, XP021121598, ISSN: 1477-3155, DOI: 10.1186/1477-3155-10-42 the whole document page 2, right-hand column, paragraph 1; figure 1	1-15
Y	----- WO 2015/104352 A1 (ALPHA O PEPTIDES AG [CH]) 16 July 2015 (2015-07-16) the whole document page 13, line 29 - page 14, line 7; claims; examples page 14, lines 30-32	1-15
A	----- KABA S A ET AL: "A Nonadjuvanted Polypeptide Nanoparticle Vaccine Confers Long-Lasting Protection against Rodent Malaria", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 183, no. 11, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 7268-7277, XP002696052, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/JIMMUNOL.0901957 [retrieved on 2009-11-13] the whole document	1-15
A	----- DOLL TAIS A P F ET AL: "Nanoscale assemblies and their biomedical applications", JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY. INTER, THE ROYAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 10, no. 80 6 March 2013 (2013-03-06), page ArticleNo.:20120740, XP008173961, ISSN: 1742-5689, DOI: 10.1098/RSIF.2012.0740 Retrieved from the Internet: URL:http://www.journals.royalsoc.ac.uk/content/111337/	1-15
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/054427

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KARCH CHRISTOPHER P ET AL: "Vaccination with self-adjuvanted protein nanoparticles provides protection against lethal influenza challenge", NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE, ELSEVIER, NL, vol. 13, no. 1, 2 September 2016 (2016-09-02), pages 241-251, XP029879773, ISSN: 1549-9634, DOI: 10.1016/J.NANO.2016.08.030 cited in the application -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/054427

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015104352 A1	16-07-2015	AU 2015205567 A1	14-07-2016
		CA 2934472 A1	16-07-2015
		CN 105960412 A	21-09-2016
		EA 201691202 A1	30-01-2017
		EP 3092245 A1	16-11-2016
		JP 2017503857 A	02-02-2017
		US 2016324958 A1	10-11-2016
		WO 2015104352 A1	16-07-2015

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 14/255 (2006.01)	C 0 7 K 14/255	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72) 発明者 ピアッツァ , マッテオ
イギリス国 シーエイチ 2 3 ピーキュー チェスター , フォークナー ストリート 1 0 6

(72) 発明者 ラマン , センティル クマール
スイス国 4 0 5 6 パーゼル , ザイント - ルーイ - シュトラッセ 1 4

(72) 発明者 ブルクハルト , ペーター
ドイツ国 7 9 6 5 0 ショップハイム , アン デア ハルテン 1 8

F ターム(参考) 4C076 AA31 AA65 AA95 BB11 BB13 BB15 BB25 CC06 CC07 EE41A
4C085 AA03 AA38 BB11 BB23 CC21 EE03 EE06 GG01
4C086 AA01 AA02 AA10 EA16 MA02 MA05 MA41 MA43 MA66 NA05
NA13 ZB09
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 EA20 EA22 FA72 FA74
GA15 GA26