

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6158088号
(P6158088)

(45) 発行日 平成29年7月5日 (2017.7.5)

(24) 登録日 平成29年6月16日 (2017.6.16)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/00

C O 7 K 16/00 (2006.01)

C O 7 K 16/00

請求項の数 11 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-537909 (P2013-537909)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月7日 (2011.11.7)
 (65) 公表番号 特表2014-500013 (P2014-500013A)
 (43) 公表日 平成26年1月9日 (2014.1.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/059602
 (87) 国際公開番号 W02012/061815
 (87) 国際公開日 平成24年5月10日 (2012.5.10)
 審査請求日 平成26年10月17日 (2014.10.17)
 (31) 優先権主張番号 61/410,767
 (32) 優先日 平成22年11月5日 (2010.11.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 507301246
 ノババックス、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、メリーランド州 208
 78、ゲイザースバーグ、ファーストフ
 ィールド ロード 20
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史
 (74) 代理人 100117189
 弁理士 江口 昭彦
 (74) 代理人 100134120
 弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 狂犬病糖タンパク質ウイルス様粒子 (VLP)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

狂犬病ウイルス (RV) 糖タンパク質 (Gタンパク質) および NP9 洗浄剤を含むミセル
 であって、Gタンパク質が三量体型である、ミセル、および薬学的に許容される担体、希
 釈剤または賦形剤を含む、狂犬病感染を処置または防止するための医薬組成物。

【請求項 2】

RV Gタンパク質が配列番号 2 の配列を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

RV Gタンパク質がヒト、イヌ、コウモリ、アライグマ、スカンク、およびキツネか
 ら選択される RV 株由来である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

さらにアジュバントを含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

アジュバントがアルミニウムアジュバントである、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

ミセルが、宿主において抗 Gタンパク質抗体の産生を増加する、請求項 1 に記載の医薬
 組成物。

【請求項 7】

産生される抗 Gタンパク質抗体が中和抗体である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

産生される抗 G タンパク質抗体が防御抗体である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

単一用量の投与後に、ミセルが、宿主において抗 G タンパク質抗体の産生を誘導する、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

ミセルが、7 日間で、血清防御力価を提供する、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

三量体狂犬病ウイルス (RV) 糖タンパク質 (G タンパク質) を含むミセルの作製方法であって：

(a) RV G タンパク質をコードする単離された核酸で昆虫宿主細胞を形質転換する工程と、 10

(b) ミセルの産生を促す条件下で昆虫宿主細胞を培養する工程と、

(c) NP9 洗浄剤の存在下でミセルを単離する工程と、
を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011 年 11 月 5 日に提出された米国仮出願第 61/410,767 号の優先権を主張し、その仮出願の開示は、全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み入れられている。 20

【0002】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

これに添えて電子的に提出されたテキストファイルの内容は、全体として参照により本明細書に組み入れられている：配列表のコンピュータ可読形式のコピー（ファイル名：NOVV_047_01WO_SeqList_ST25.txt、記録日：2011 年 11 月 7 日、ファイルサイズ：7 キロバイト）。

【0003】

本発明は、概ね、狂犬病ウイルス (RV) 糖タンパク質 (G タンパク質) を含むウイルス様粒子 (VLP)、ならびに狂犬病ウイルス感染の処置および/または防止のためのワクチンなどの免疫原性組成物を含め、それらを作製し、用いるための方法に関する。 30

【背景技術】

【0004】

狂犬病ウイルス (RV) は、ラブドウイルス科の非分節型マイナス鎖 RNA ウイルスであり、ヒトおよび動物において致死的な神経疾患を引き起こす。70,000 人を超えるヒト死亡者数が毎年報告されており、他に何百万人という人々が曝露後の処置を必要としている。狂犬病の防止および制御においてかなり進歩してきたが、その疾患は依然として、公衆衛生にとっての大きな脅威であり、世界中で多数のヒトの死亡の原因となり続けている。イヌは依然として、たいていのヒト狂犬病症例が生じているアジア、アフリカ、およびラテンアメリカにおいて最も重要な保有宿主である。先進国において、ヒト狂犬病は、主にペット動物の定期的なワクチン接種の結果として、過去 50 年間の間にかなり衰退している。しかしながら、野生生物への曝露を介する狂犬病伝染が、その疾患の主な原因として浮上している。米国において、動物狂犬病症例の 90% 超が、野生生物において報告されており、公衆衛生上の持続的な脅威を表している。過去 10 年間にわたるほとんどのヒト症例は、コウモリ、特に銀髪コウモリに見出される RV に関連している。 40

【0005】

ラブドウイルスは、2 つの主要な構造コンポーネント：らせん状のリボ核タンパク質コア (RNP) と、それを包むエンベロープとを有する。狂犬病ゲノムは、以下の 5 つのタンパク質をコードする：核タンパク質 (N)、リンタンパク質 (P)、マトリックスタンパク質 (M)、糖タンパク質 (G)、およびポリメラーゼ (ラージタンパク質) (L)。 50

野生型狂犬病における遺伝子の順序は、3' - N - P - M - G - L - 5' である。Nタンパク質、Lタンパク質、およびPタンパク質がコアRNP複合体に付随している。RNP複合体は、Nが、ポリメラーゼLおよびPタンパク質と共にRNAゲノムをキャプシド化したものからなる。この複合体は、ウイルス転写および複製のための鋳型としての役割を果たす。RVのウイルスエンベロープコンポーネントは、膜貫通糖タンパク質(G)およびマトリックス(M)タンパク質で構成される。糖タンパク質は、ウイルスの表面上で密に整列する約400個の三量体スパイクを形成する。Mタンパク質は、エンベロープとRNPの両方と会合しており、ラブドウイルスアセンブリの中心的タンパク質となることができる。

【0006】

10

上記で述べたように、狂犬病は依然として、世界中で公衆衛生上の大きな脅威である。狂犬病を制御し、かつ狂犬病からヒトを防御することは、ペット動物および野生生物保菌者の定期的な免疫化、リスクのある人々の曝露前の免疫化、狂犬病の動物に噛まれた人々の曝露後の処置などのいくつかの制御ストラテジーを必要とする。細胞培養物から調製された不活性化狂犬病ウイルス(RV)ワクチンは安全で、耐容性がよいが、多数の欠点をもつ。それらは、製造するのが困難であり、貯蔵が困難であり、免疫原性が低く、複数回の注射を必要とする。さらに、それらは、高価であり、したがって、発展途上国においてワクチンを必要とするたいていの人々にとっては手が届かない。加えて、これらの不活性化ワクチンは、典型的には、望ましくない副作用を引き起こす可能性があるアジュバントを含む。それゆえ、より安全で、より安く、より効果的なRVワクチンが必要とされている。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本出願は、狂犬病糖タンパク質(G)を含むウイルス様粒子(VLP)の作製のための新規な方法を開発することで上記の要求に取り組むものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、狂犬病ウイルス感染の処置および防止のためのワクチンに用いる狂犬病ウイルス(RV)ウイルス様粒子(VLP)に関する。本発明のRV VLPは、哺乳類対象において狂犬病ウイルスに対する強力な免疫応答を誘導する能力を有する。

30

【0009】

第1の態様において、本発明は、1つまたは複数のRV糖タンパク質(Gタンパク質)を含むRV VLPを提供する。RV Gタンパク質は、任意の適切なRV株由来であってもよく、そのRV株には、ヒト、イヌ、コウモリ、アライグマ、スカンク、およびキツネのRV株が挙げられるが、それらに限定されない。一実施形態において、1つまたは複数のRV Gタンパク質を含むRV VLPは、ミセルの形をとり得る。いくつかの実施形態において、RV VLPは、核タンパク質(N)、リンタンパク質(P)、マトリックスタンパク質(M)、およびポリメラーゼ(ラージタンパク質)(L)から選択される、1つまたは複数の追加のRVタンパク質を含んでもよい。特定の実施形態において、本発明のRV VLPは、RVマトリックスタンパク質(M)を含んでもよい。一実施形態において、Mタンパク質は、ヒトRV株由来である。別の実施形態において、Mタンパク質は、イヌRV株由来である。さらに別の実施形態において、Mタンパク質は、コウモリRV株由来である。他の実施形態において、マトリックスタンパク質は、インフルエンザウイルス株由来のM1タンパク質であってもよい。一実施形態において、インフルエンザウイルス株は、トリインフルエンザウイルス株である。他の実施形態において、Mタンパク質は、ニューカッスル病ウイルス(NDV)株由来であってもよい。

40

【0010】

一実施形態において、RV Gタンパク質のコード配列は、適切な宿主細胞においてその発現を増強するようにさらに最適化される。一実施形態において、宿主細胞は、昆虫

50

細胞である。例示的な実施形態において、昆虫細胞は Sf9 細胞である。

【0011】

本発明の RV VLP は、RV 感染の防止および / または処置に用いられてもよい。したがって、別の態様において、本発明は、RV に対する免疫応答を誘発するための方法を提供する。方法は、ヒトまたは動物の対象などの対象に、RV VLP を含有する組成物の免疫学的有効量を投与することを含む。

【0012】

別の態様において、本発明は、1 つまたは複数の RV 糖タンパク質 (G タンパク質) を含む RV VLP を含む薬学的に許容されるワクチン組成物を提供する。

【0013】

一実施形態において、本発明は、1 つまたは複数の RV 糖タンパク質 (G タンパク質) を含む RV VLP の少なくとも 1 回の有効用量を含む免疫原性製剤を含む。別の実施形態において、本発明は、本発明のワクチン製剤の成分の 1 つまたは複数で満たされた 1 つまたは複数の容器を含む薬学的パックまたはキットを提供する。

【0014】

別の実施形態において、本発明は、感染または少なくとも 1 つのその疾患症状に対する免疫を哺乳類に誘導するワクチンまたは抗原性組成物を製剤化する方法であって、1 つまたは複数の RV 糖タンパク質 (G タンパク質) を含む RV VLP の有効用量を製剤に加えることを含む方法を提供する。好ましい実施形態において、感染は、RV 感染である。

【0015】

本発明の RV VLP は、感染病原体に対する免疫または実質的免疫を与える免疫応答を刺激する組成物を調製するのに有用である。したがって、一実施形態において、本発明は、1 つまたは複数の RV 糖タンパク質 (G タンパク質) を含む RV VLP の少なくとも 1 回の有効用量を投与することを含む、対象において感染または少なくとも 1 つのその疾患症状に対する免疫を誘導する方法を提供する。

【0016】

さらに別の態様において、本発明は、1 つまたは複数の RV 糖タンパク質 (G タンパク質) を含む RV VLP の少なくとも 1 回の有効用量を投与することを含む、対象において RV 感染または少なくとも 1 つの疾患症状に対する実質的免疫を誘導する方法を提供する。

【0017】

本発明の組成物は、脊椎動物 (例えば、ヒトまたはイヌ) に投与された場合、脊椎動物において実質的免疫を誘導することができる。したがって、一実施形態において、本発明は、1 つまたは複数の RV 糖タンパク質 (G タンパク質) を含む RV VLP の少なくとも 1 回の有効用量を投与することを含む、対象において RV 感染または少なくとも 1 つの疾患症状に対する実質的免疫を誘導する方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、1 つまたは複数の RV 糖タンパク質 (G タンパク質) を含む RV VLP の防御誘導量を哺乳類に投与することを含む、哺乳類に RV のワクチン接種をする方法を提供する。予防ワクチン製剤は、例えば、針とシリンジ、または無針注射器を用いる皮下注射または筋肉内注射によって、全身性に投与される。例示的な実施形態において、ワクチン製剤は、筋肉内に投与される。

【0018】

別の実施形態において、本発明は、1 つまたは複数の RV 糖タンパク質 (G タンパク質) を含む RV VLP の少なくとも 1 回の有効用量を投与することを含む、対象において感染または少なくとも 1 つのその症状に対する防御抗体応答を誘導する方法を含む。

【0019】

別の実施形態において、本発明は、1 つまたは複数の RV 糖タンパク質 (G タンパク質) を含む RV VLP の少なくとも 1 回の有効用量を投与することを含む、対象において RV 感染または少なくとも 1 つの疾患症状に対する防御細胞応答を誘導する方法を含む。

【0020】

10

20

30

40

50

さらに別の態様において、本発明は、狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）をコードする単離された核酸を提供する。例示的な実施形態において、狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）のタンパク質をコードする単離された核酸は配列番号1である。

【0021】

さらに別の態様において、本発明は、狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）をコードする核酸を含む単離された細胞を提供する。例示的な実施形態において、狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）のタンパク質をコードする単離された核酸は配列番号1である。

【0022】

さらに別の態様において、本発明は、狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）をコードする核酸を含むベクターを提供する。例示的な実施形態において、狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）のタンパク質をコードする単離された核酸は配列番号1である。一実施形態において、ベクターはバキュロウイルスベクターである。

10

【0023】

さらに別の態様において、本発明は、1つまたは複数の狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPを作製する方法であって、（a）狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）をコードする核酸を発現するように宿主細胞を形質転換する工程と、（b）上記RV VLPの産生を促す条件下で上記宿主細胞を培養する工程と、を含む方法を提供する。一実施形態において、狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）をコードする核酸は配列番号1である。別の実施形態において、宿主細胞は昆虫細胞である。さらなる実施形態において、宿主細胞は、狂犬病糖タンパク質（Gタンパク質）を含むバキュロウイルスベクターをトランスフェクションされた昆虫細胞である。

20

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】狂犬病ウイルスG核酸配列（配列番号1）を含むpFastBac1ベクターについてのプラスミドマップを示す図である。

【図2】還元条件下（図2A）および非還元条件下（図2B）における、抗RVウサギ血清を用いるRV Gタンパク質についてのウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図3】150,000xの倍率でのネガティブ染色電子顕微鏡法を用いて撮影された、ミセルの形をとる精製された組換えRV Gタンパク質粒子の画像を示す図である。

30

【図4】漸増希釈度のRV G粒子を投与されたウサギにおける抗体誘導アッセイの結果を示す図である。

【図5】狂犬病ウイルスG核酸配列（配列番号1）（上部）を含むpFastBac1ベクターについてのタンパク質配列およびRV Gタンパク質配列（配列番号2）（下部）を示す図である。

【図6】各免疫化投与計画（各免疫化群についてn=5）についての幾何平均としてプロットされた、異なる日における抗狂犬病ウイルス抗体力価を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0025】

定義

40

本明細書で用いられる場合、用語「アジュバント」は、製剤中、特定の免疫原（例えば、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLP）と組み合わせ用いられる場合、結果として生じる免疫応答を増大させ、または別の形で、変化させ、もしくは改変する化合物を指す。免疫応答の改変には、抗体免疫応答および細胞免疫応答の一方または両方の強化、またはその特異性を広げることが挙げられる。免疫応答の改変はまた、特定の抗原特異性免疫応答を減少させること、または抑制することも意味し得る。

【0026】

本明細書で用いられる場合、用語「抗原性製剤」または「抗原性組成物」は、脊椎動物、特に鳥類または哺乳類に投与された場合、免疫応答を誘導する調製物を指す。

50

【 0 0 2 7 】

本明細書で用いられる場合、用語「トリインフルエンザウイルス」は、主に鳥類に見出されるが、ヒトまたは他の動物にも感染することができるインフルエンザウイルスを指す。場合によっては、トリインフルエンザウイルスは、あるヒトから別のヒトへ伝染し、または広がる可能性がある。ヒトを感染させるトリインフルエンザウイルスは、ヒトにおいてインフルエンザパンデミック、すなわち、病的状態および／または死亡を引き起こす可能性を有する。パンデミックは、新しいインフルエンザウイルス株（ヒトが自然免疫をもたないウイルス）が出現した場合に生じ、個々の地域を越えて、あるいは世界中に、広がり、一度に多数のヒトを感染させる。

【 0 0 2 8 】

本明細書で用いられる場合、「有効用量」とは、一般的に、免疫を誘導するのに、感染を防止および／もしくは寛解させるのに十分な、感染もしくは疾患の少なくとも1つの症状を低下させるのに十分な、ならびに／または1つ以上のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPの別の用量の効力を増強するのに十分な、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPのその量を指す。有効用量は、感染または疾患の発症を遅らせ、または最小化するのに十分な、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPの量を指す場合がある。有効用量はまた、感染または疾患の処置または管理において治療的恩恵を提供する、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPの量を指す場合もある。さらに、有効用量は、感染または疾患の処置または管理において治療的恩恵を提供する、単独での、または他の治療と組み合わせての、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPに関する量である。有効用量はまた、感染病原体または感染疾患へのその後の曝露に対する対象（例えば、ヒト）自身の免疫応答を増強するのに十分な量の場合もある。免疫のレベルは、例えば、中和分泌型および／または血清抗体の量を、例えば、ブランク中和アッセイ、補体結合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイもしくはミクロ中和アッセイによって測定することにより、または限定されないが、細胞傷害性T細胞応答、抗原提示細胞応答、ヘルパーT細胞応答、樹状細胞応答、および／もしくは他の細胞の応答などの細胞応答を測定することにより、モニターすることができる。T細胞応答は、例えば、蛍光フローサイトメトリーにより特異的マーカーを用いて、存在する、例えば、CD4⁺細胞およびCD8⁺細胞の量を測定することにより、または限定されないがT細胞増殖アッセイ、T細胞傷害性アッセイ、TETRAMERアッセイ、および／もしくはELISPOTアッセイなどのT細胞アッセイにより、モニターすることができる。ワクチンの場合、「有効用量」は、疾患を防止し、および／または症状の重症度を低下させる用量である。

【 0 0 2 9 】

本明細書で用いられる場合、用語「有効量」は、望ましい生物学的効果を実現化するのに必要な、または十分な、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPの量を指す。組成物の有効量は、選択された結果を達成する量であり、そのような量は、当業者による日常的な実験の事項として決定することができる。例えば、感染を防止し、処置し、および／または寛解させるための有効量は、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPへの曝露により、免疫系の活性化を引き起こし、結果として、抗原特異的免疫応答の発生をもたらすのに必要な量であり得る。その用語はまた、「十分量」の同義語でもある。別の実施形態において、有効量は、関連した動物モデル、動物、またはヒト患者において、望ましい日数の間、例えば、7日間、10日間、14日間、またはそれ以上において血清抗体保有（seroprotection）を誘導するRV Gミセルの重量による量である。

【 0 0 3 0 】

本明細書で用いられる場合、用語「発現」は、ポリ核酸がmRNAに転写され、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳される過程を指す。ポリ核酸がゲノムDNA由来である場合には、発現は、適切な真核生物の宿主細胞または宿主生物が選択されてい

10

20

30

40

50

るならば、mRNAのスプライシングを含む場合がある。本発明の関連において、その用語はまた、RV G遺伝子mRNAの収量、およびその発現後に達成されるRV Gタンパク質の収量も包含する。

【0031】

本明細書で用いられる場合、用語「Gタンパク質」または「G糖タンパク質」または「Gタンパク質ポリペプチド」は、RV Gタンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部または一部を有するポリペプチドまたはタンパク質を指す。

【0032】

本明細書で用いられる場合、「免疫原」または「抗原」との用語は、免疫応答を誘発する能力があるタンパク質、ペプチド、ペプチド、核酸などの物質を指す。両方の用語はまた、エピトープを包含し、交換可能に用いられる。

10

【0033】

本明細書で用いられる場合、用語「免疫刺激物質」は、身体に備わっている化学的メッセンジャー（サイトカイン）を介して免疫応答を増強する化合物を指す。これらの分子は、インターフェロン（IFN-）、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13）；成長因子（例えば、顆粒球マクロファージ（GM）コロニー刺激因子（CSF））；およびマクロファージ炎症性因子、Flt3リガンド、B7.1；B7.2などの他の免疫刺激分子などの、免疫刺激活性、免疫強化活性、および炎症促進活性を有する様々なサイトカイン、リンホカイン、およびケモカインを含む。免疫刺激分子は、本発明のVLPと同じ製剤中で投与することができ、または別々に投与することができる。そのタンパク質またはそのタンパク質をコードする発現ベクターを、免疫刺激効果を生じるように投与することができる。

20

【0034】

本明細書で用いられる場合、用語「免疫原性製剤」は、脊椎動物、例えば、哺乳類に投与された場合、免疫応答を誘導する調製物を指す。

【0035】

本明細書で用いられる場合、用語「感染病原体」は、脊椎動物において感染を引き起こす微生物を指す。通常、その生物体は、ウイルス、細菌、寄生生物、原生動物、および/または真菌である。

【0036】

本明細書で用いられる場合、用語「多価の」は、複数の型または株の感染病原体または疾患に対する1つまたは複数の抗原性タンパク質/ペプチドまたは免疫原、例えば、1つより多い、RV Gタンパク質型、株、配列などを有する組成物を指す。

30

【0037】

本明細書で用いられる場合、用語「薬学的に許容されるワクチン」は、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPを含有する製剤を指し、それは、脊椎動物に投与することができる形をとり、かつ免疫を誘導するのに十分な、感染もしくは疾患を防止し、および/もしくは寛解させるのに十分な、ならびに/または感染もしくは疾患の少なくとも1つの症状を低下させるのに十分な、ならびに/または1つもしくは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPの別の用量の効力を増強するのに十分な防御免疫応答を誘導する。典型的には、ワクチンは、本発明の組成物が懸濁し、または溶解する通常の食塩水または緩衝水溶液媒体を含む。この形において、本発明の組成物は、感染を防止し、寛解させ、または別のやり方で処置するために便利に用いることができる。宿主へ導入されたとき、ワクチンは、限定されるわけではないが、抗体および/もしくはサイトカインの産生、ならびに/または細胞傷害性T細胞応答、抗原提示細胞応答、ヘルパーT細胞応答、樹状細胞応答、および/もしくは他の細胞応答の活性化を含む免疫応答を誘発することができる。

40

【0038】

本明細書で用いられる場合、「防御免疫応答」または「防御応答」との句は、脊椎動物（例えば、ヒト）によって示される、感染病原体または疾患に対する抗体によって媒介さ

50

れる免疫応答を指し、それは、感染を防止し、もしくは寛解させ、または少なくとも1つのその疾患症状を低下させる。1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含む本発明のRV VLPは、例えば、感染病原体を中和し、感染病原体が細胞に侵入するのを阻止し、感染病原体の複製を阻止し、および/または宿主細胞を感染と破壊から防御する、抗体の産生を刺激することができる。その用語はまた、脊椎動物（例えば、ヒト）によって示される、感染病原体または疾患に対するTリンパ球および/または他の白血球によって媒介される免疫応答を指し、それは、感染または疾患を防止し、もしくは寛解させ、または少なくとも1つのその症状を低下させる。

【0039】

本明細書で用いられる場合、「脊椎動物」、「対象」または「患者」との用語は、脊索動物亜門の任意のメンバーを指し、それには、限定されないが、ヒト、ならびにチンパンジーおよび他の類人猿およびサル種などの非ヒト霊長類を含む他の霊長類が挙げられる。ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、およびウマなどの家畜；イヌおよびネコなどの家庭内で飼育される哺乳類（domestic mammals）；マウス、ラット（コットンラットを含む）、およびモルモットなどの齧歯類を含む実験動物；ニワトリ、シチメンチョウおよび他のキジ類のトリ、カモ、ガンなどの飼育される鳥類、野鳥、および鴝鴖を含む鳥類もまた限定されない例である。用語「哺乳類」および「動物」はこの定義に含まれる。成体と新生児の両方の個体が網羅されるものとする。特に、ヒト、家庭内で飼育される哺乳類、および家畜は、RVワクチンまたは治療用物質の適切なレシピエントである。

【0040】

本明細書で用いられる場合、用語「ウイルス様粒子」（VLP）は、少なくとも1つの特質においてウイルスに似ているが、感染性であることを実証されることがない構造を指す。本発明によるウイルス様粒子は、ウイルス様粒子のタンパク質をコードする遺伝情報を有しない。一般的に、ウイルス様粒子は、ウイルスゲノムを欠き、それゆえに、非感染性である。加えて、ウイルス様粒子は、多くの場合、異種発現によって大量に産生することができ、容易に精製することができる。

【0041】

本明細書で用いられる場合、用語「キメラVLP」は、少なくとも2つの異なる感染病原体由来のタンパク質またはその部分（異種タンパク質）を含有するVLPを指す。通常、そのタンパク質の1つは、宿主細胞からVLPの形成を作動させることができるウイルス由来である。例示を目的として例を挙げれば、トリインフルエンザMタンパク質および/またはRV Gタンパク質である。RV VLPおよびキメラVLPという用語は、適切な場合、交換可能に用いることができる。

【0042】

本明細書で用いられる場合、用語「ワクチン」は、病原体に対する抗体の形成または免疫を誘導するために用いられる、死んだ、もしくは弱められた病原体の調製物、または由来する抗原決定基の調製物を指す。ワクチンは、疾患、例えば、インフルエンザウイルスによって引き起こされるインフルエンザに対する免疫を供給するために与えられる。加えて、用語「ワクチン」はまた、脊椎動物に投与されて、防御免疫、すなわち、感染に関連した疾患を防止し、またはその重症度を低下させる免疫を生じさせる、免疫原（例えば、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLP）の懸濁液または溶液を指す。本発明は、免疫原性であり、かつ感染に関連した疾患に対する防御を供給し得るワクチン組成物を提供する。

【0043】

狂犬病ウイルス（RV）ウイルス様粒子（VLP）

一態様において、本発明は、RV感染または少なくとも1つのその疾患症状に対して脊椎動物（例えば、ヒトおよび家庭内で飼育される動物）を防御するためのワクチンまたは抗原性製剤へ製剤化することができる、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRVウイルス様粒子（VLP）に関する。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むVLPは、N、P、M、およびL

10

20

30

40

50

などの追加のRVタンパク質をさらに含む。他の実施形態において、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むVLPは、インフルエンザウイルスタンパク質HA、NA、およびM1などの異種ウイルス株由来のタンパク質をさらに含む。一実施形態において、インフルエンザウイルスタンパク質M1は、トリインフルエンザウイルス株由来である（全体として参照により本明細書に組み入れられている米国特許出願第13/280,043号参照）。

【0044】

RVワクチン

RV感染は、脊椎動物に中和抗体を供給することによって防止することができるため、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPを含むワクチンは、脊椎動物に投与された場合、インビボで中和抗体を誘導し得る。1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPは、有利には、RV感染の防止および/または処置に用いられる。したがって、本開示の別の態様は、RVに対する免疫応答を誘発するための方法に関する。方法は、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPを含有する組成物の免疫学的有効量を対象（ヒトまたは動物の対象など）に投与することを含む。その組成物の免疫学的有効量の投与は、RV Gタンパク質に存在するエピトープに特異的な免疫応答を誘発する。そのような免疫応答は、B細胞応答（例えば、中和抗体の産生）および/またはT細胞応答（例えば、サイトカインの産生）を含み得る。好ましくは、RV Gタンパク質によって誘発される免疫応答は、RV Gタンパク質上に存在する少なくとも1つのエピトープが立体構造的に特異であるという要素を含む。一実施形態において、免疫応答は、ミセル立体構造に見出される、RV Gタンパク質上に存在するエピトープに特異的である。RV Gタンパク質および組成物は、RVとの接触後に、ウイルス疾患を増強することなく対象に投与することができる。好ましくは、本明細書に開示されたRV Gタンパク質および適切に製剤化された免疫原性組成物は、RVの感染を低下もしくは防止し、および/またはRVの感染後の病理学的応答を低下もしくは防止する、Th1偏向性免疫応答を誘発する。

【0045】

一実施形態において、本発明のRV Gタンパク質は、ミセル（例えば、ロゼット）の形で見出される。実施例2を参照されたい。一実施形態において、ミセルは、宿主細胞内での発現後、精製される。対象に投与された場合、本発明のミセルは、好ましくは、中和抗体を誘導する。いくつかの実施形態において、ミセルは、アジュバントと共に投与されてもよい。他の実施形態において、ミセルは、アジュバントなしで投与されてもよい。

【0046】

別の実施形態において、本発明は、RV感染または少なくとも1つのその疾患症状に対して脊椎動物（例えば、ヒト）を防御するためのワクチンまたは抗原性製剤へ製剤化することができる、RV Gタンパク質を含むRVウイルス様粒子（VLP）を含む。本発明はまた、RV VLP、ならびに異なるRVウイルス株由来の野生型および突然変異型RV遺伝子またはその組み合わせを含むベクターに関し、そのベクターは、宿主細胞へトランスフェクションされた場合、RVタンパク質を含むウイルス様粒子（VLP）を産生する。

【0047】

いくつかの実施形態において、RVウイルス様粒子は、少なくとも1つのウイルスマトリックスタンパク質（例えば、RV Mタンパク質）をさらに含んでもよい。一実施形態において、Mタンパク質は、ヒトRV株由来である。別の実施形態において、Mタンパク質は、イヌ、コウモリ、アライグマ、またはスカンクのRV株などの代替のRV株由来である。他の実施形態において、マトリックスタンパク質は、インフルエンザウイルス株由来のM1タンパク質であってもよい。一実施形態において、インフルエンザウイルス株はトリインフルエンザ株である。例示的な実施形態において、トリインフルエンザ株は、H5N1株A/Indonesia/5/05である。他の実施形態において、マトリックスタンパク質は、ニューカッスル病ウイルス（NDV）由来であってもよい。

【 0 0 4 8 】

さらなる実施形態において、本発明のVLPは、インフルエンザ血球凝集素(HA)および/またはノイラミニダーゼ(NA)などの1つまたは複数の異種免疫原を含んでもよい。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態において、本発明はまた、1つまたは複数のVLP中に同じ株および/または異なる株由来の異なるRV G、N、P、M、およびLタンパク質の組み合わせを含む。加えて、VLPは、免疫応答の増強のための1つまたは複数の追加の分子を含むことができる。

【 0 0 5 0 】

本発明の別の実施形態において、RV VLPは、核酸、siRNA、マイクロRNA、化学療法剤、造影剤、および/または患者に送達されるのに必要とする他の作用物質などの作用物質を有することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明のVLPは、ワクチンおよび免疫原性組成物を調製するために有用である。VLPの1つの重要な特徴は、脊椎動物の免疫系が関心対象となるタンパク質に対する免疫応答を誘導するように、関心対象となる表面タンパク質を発現する能力である。しかしながら、全てのタンパク質がVLPの表面上に発現できるとは限らない。なぜある特定のタンパク質がVLPの表面上に発現しないのか、またはあまり発現しないのかという多数の理由があり得る。1つの理由は、そのタンパク質が宿主細胞の膜に方向づけられていないこと、またはそのタンパク質が膜貫通ドメインを有しないことである。例として、インフルエンザ血球凝集素のカルボキシル末端近くの配列は、成熟インフルエンザエンベロープ化ヌクレオキャプシドの脂質二重層へのHAの組込み、およびHA三量体のインフルエンザマトリックスタンパク質M1との相互作用の構築に重要であり得る(Alira, (2000) J. Virol. 74, 8709-19)。

【 0 0 5 2 】

したがって、本発明の一実施形態は、RV由来のGタンパク質、およびその細胞表面上に通常には効率的に発現せず、または通常のRVタンパク質ではない少なくとも1つの免疫原を含むキメラVLPを含む。一実施形態において、RV Gタンパク質は、関心対象となる免疫原と融合してもよい。別の実施形態において、RV Gタンパク質は、異種ウイルス表面膜タンパク質、例えば、MMTVエンベロープタンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞質側末端を介して免疫原と会合する。

【 0 0 5 3 】

本発明の他のキメラVLPは、RV Gタンパク質、および異種感染病原体由来の少なくとも1つのタンパク質を含むVLPを含む。異種感染病原体の例には、ウイルス、細菌、原生動物、真菌、および/または寄生生物が挙げられるが、それらに限定されない。一実施形態において、別の感染病原体由来の免疫原は異種ウイルスタンパク質である。別の実施形態において、異種感染病原体由来のタンパク質は、エンベロープ関連タンパク質である。別の実施形態において、別の異種感染病原体由来タンパク質は、VLPの表面上に発現する。別の実施形態において、感染病原体由来タンパク質は、脊椎動物において防御免疫応答を生じさせるエピトープを含む。一実施形態において、別の感染病原体由来タンパク質は、RV Gタンパク質と共発現する。別の実施形態において、別の感染病原体由来タンパク質は、RV Gタンパク質と融合する。別の実施形態において、別の感染病原体由来タンパク質の一部だけがRV Gタンパク質と融合する。別の実施形態において、別の感染病原体由来タンパク質の一部だけが、RV Gタンパク質の一部と融合する。別の実施形態において、RV Gタンパク質と融合した、別の感染病原体由来タンパク質の一部は、VLPの表面上に発現する。

【 0 0 5 4 】

本発明はまた、本発明のVLP上またはVLP内に発現したタンパク質の変種を包含する。変種は、構成タンパク質のアミノ酸配列中に変化を含み得る。タンパク質に関する用

10

20

30

40

50

語「変種」は、参照配列に対して1つまたは複数のアミノ酸が変化しているアミノ酸配列を指す。変種は、置換アミノ酸が類似した構造的または化学的性質を有する、「保存的」変化（例えば、ロイシンのイソロイシンとの置き換え）を有することができる。あるいは、変種は、「非保存的」変化（例えば、グリシンのトリプトファンとの置き換え）を有することができる。類似の軽微なバリエーションはまた、アミノ酸欠失もしくは挿入、または両方を含むことができる。どのアミノ酸残基が、生物学的または免疫学的活性を除去することなく、置換、挿入、または欠失することができるかを決定するガイダンスは、当技術分野においてよく知られたコンピュータプログラム、例えば、DNA STARソフトウェアを用いて見出すことができる。

【0055】

10

天然の変種は、タンパク質における突然変異により生じ得る。これらの突然変異は、感染病原体、例えば、インフルエンザの個々の群内に抗原多様性をもたらす可能性がある。したがって、例えば、インフルエンザ株に感染した人がそのウイルスに対する抗体を産生し、より新しいウイルス株が出現した場合、より古い株に対するその抗体はもはや、そのより新しいウイルスを認識せず、再感染が起き得る。本発明は、VLPを作製するための感染病原体由来のタンパク質の全ての抗原多様性および遺伝的多様性を包含する。

【0056】

クローニング、突然変異、細胞培養などの本発明に適用できる分子生物学的技術を記載する一般的テキストには、BergerおよびKimrnel、Guide to Molecular Cloning Techniques、Methods in Enzymology 152巻 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrookら、Molecular Cloning - A Laboratory Manual (第3版)、1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 (「Sambrook」)、ならびにCurrent Protocols in Molecular Biology、F.M. Ausubelら編、Current Protocols、Greene Publishing Associates, Inc.とJohn Wiley & Sons, Inc.との共同事業 (「Ausubel」) が挙げられる。これらのテキストは、突然変異誘発、ベクター、プロモーターの使用、および例えば、RV G分子のクローニングおよび突然変異導入に関しての多数の他の関連トピックスなどを記載する。したがって、本発明はまた、本発明のVLP上またはVLP内に発現したタンパク質の特性を向上させ、または変化させるためにタンパク質工学および組換えDNAテクノロジーの公知の方法を用いることも包含する。様々な型の突然変異誘発を用いて、タンパク質分子をコードする変種核酸を産生および/もしくは単離し、ならびに/または本発明のVLP内もしくはVLP上のそのタンパク質をさらに改変/突然変異することができる。それらには、部位特異的突然変異誘発、ランダム点突然変異誘発、相同組換え (DNAシャッフリング)、ウラシル含有鋳型を用いる突然変異誘発、オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発、ホスホロチオエート修飾DNA突然変異誘発、ギャップド二重鎖DNAを用いる突然変異誘発などが挙げられるが、それらに限定されない。追加の適切な方法には、点ミスマッチ修復、修復欠損宿主株を用いる突然変異誘発、制限選択及び制限精製、欠失突然変異誘発、全遺伝子合成による突然変異誘発、二本鎖切断修復などが挙げられる。例えば、キメラ構築物に関わる、突然変異誘発もまた、本発明に含まれる。一実施形態において、突然変異誘発は、天然の分子、または変化した、もしくは突然変異した天然の分子の既知の情報、例えば、配列、配列比較、物理的性質、結晶構造などによって導くことができる。

【0057】

本発明は、実質的な生物学的活性、例えば、本発明のVLP上またはVLP内に発現した場合、効果的な抗体応答を誘発する能力を示すタンパク質変種をさらに含む。そのような変種は、活性にほとんど影響を及ぼさないように当技術分野において知られた一般的なルールに従って選択された欠失、挿入、反転、反復、および置換されたものを含む。

50

【0058】

タンパク質をクローン化する方法は当技術分野において知られている。例えば、特定のRVタンパク質をコードする遺伝子は、狂犬病ウイルスに感染した細胞から抽出されるポリアデニル化mRNAからRT-PCRによって単離することができる。生じた結果物たる遺伝子は、DNA挿入断片としてベクターへクローン化することができる。用語「ベクター」は、核酸の、生物体、細胞、または細胞コンポーネント間の伝播および/または移動を可能にする手段を指す。ベクターには、自律的に複製し、または宿主細胞の染色体に統合されることができる、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、プロウイルス、ファージミド、トランスポゾン、人工染色体などが挙げられる。ベクターはまた、自律的に複製しない、未修飾の(naked)RNAポリヌクレオチド、未修飾のDNAポリヌクレオチド、同じ鎖内にDNAとRNAの両方で構成されるポリヌクレオチド、ポリリシンコンジュゲート化DNAまたはRNA、ペプチドコンジュゲート化DNAまたはRNA、リボソームコンジュゲート化DNAなどであり得る。全部ではないが、多くの一般的な実施形態において、本発明のベクターはプラスミドまたはバクミドである。

10

【0059】

したがって、本発明は、本発明のVLPの形成を誘導する細胞において発現することができる発現ベクターへクローン化される、キメラ分子を含む、タンパク質をコードするヌクレオチドを含む。「発現ベクター」は、発現を促進する能力、およびその中に組み込まれた核酸を複製する能力があるプラスミドなどのベクターである。典型的には、発現する核酸は、プロモーターおよび/またはエンハンサーへ「作動可能に連結され」、そのプロモーターおよび/またはエンハンサーによる転写制御管理を受ける。一実施形態において、ヌクレオチドは、(上記で論じられているような)RVGタンパク質をコードする。別の実施形態において、ベクターは、RVMTタンパク質をコードするヌクレオチドをさらに含む。別の実施形態において、ベクターは、M-RVタンパク質および/またはN-RVタンパク質をコードするヌクレオチドをさらに含む。別の実施形態において、ベクターは、M-RVタンパク質、L-RVタンパク質、および/またはN-RVタンパク質をコードするヌクレオチドをさらに含む。例示的な実施形態において、発現ベクターは、バキュロウイルスベクターである。

20

【0060】

本発明のいくつかの実施形態において、タンパク質は、サイレント置換、サイレント付加、またはサイレント欠失を生じるが、コードされたタンパク質の性質もしくは活性、またはそのタンパク質がどのように生成されるかを变化させない変化を含有する突然変異を含んでもよい。ヌクレオチド変種は、様々な理由のために、例えば、コドン発現を特定の宿主について最適化する(ヒトmRNAにおけるコドンを、Sf9細胞などの昆虫細胞によって好ましいコドンに変化させる)ために、作製することができる。全ての目的のために本明細書に援用されている米国特許出願公開第2005/0118191号を参照されたい。

30

【0061】

加えて、正しいコード領域がクローン化され、かついかなる望ましくない突然変異も含有しないことを保証するために、ヌクレオチドをシーケンシングすることができる。ヌクレオチドは、任意の細胞における発現のために発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)へサブクローニングすることができる。上記は、RVウイルスタンパク質がどのようにしてクローン化できるかの1つの例にすぎない。当業者は、追加の方法が利用可能であり、実行できることを理解している。

40

【0062】

本発明はまた、G、M、N、L、P、もしくはその部分を含むRV構造遺伝子をコードするRVヌクレオチド、および/または任意の上記のキメラ分子を含む構築物および/またはベクターを提供する。ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウイルス、またはレトロウイルスのベクターであってもよい。G、M、N、L、P、もしくはその部分を含むRV構造遺伝子、および/または任意の上記のキメラ分子を含む構築物および/また

50

はベクターは、限定されないが、例えば、A c M N P Vポリヘドリンプロモーター（または他のバキュロウイルス）、ファージ P Lプロモーター、大腸菌（E . c o l i）l a c、p h o A、およびt a cプロモーター、S V 4 0初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスL T Rのプロモーターなどの適切なプロモーターに作動可能に連結されるべきである。所望の宿主細胞および／または発現速度に依存する、他の適切なプロモーターは、当業者に知られているであろう。発現構築物は、転写開始点、転写終結点、および転写領域においては、翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含有する。構築物によって発現した転写物のコード部分は、好ましくは、適切に位置する、翻訳されることになっているポリペプチドの始めに翻訳開始コドン、および終わりに終結コドンを含む。

【0063】

発現ベクターは、好ましくは、少なくとも1つの選択マーカーを含む。そのようなマーカーには、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、真核細胞培養についてのG 4 1 8またはネオマイシン耐性、ならびに大腸菌および他の細菌における培養についてのテトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、またはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。ベクターの中でも好ましいのは、バキュロウイルス、ボックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アピボックスウイルス、カナリアボックスウイルス、鶏痘ウイルス、アライグマボックスウイルス、ブタボックスウイルスなど）、アデノウイルス（例えば、イヌアデノウイルス）、ヘルペスウイルス、およびレトロウイルスなどのウイルスベクターである。本発明と共に用いることができる他のベクターは、p Q E 7 0、p Q E 6 0およびp Q E - 9、p B l u e s c r i p tベクター、P h a g e s c r i p tベクター、p N H 8 A、p N H 1 6 a、p N H 1 8 A、p N H 4 6 A、p t r c 9 9 a、p K K 2 2 3 - 3、p K K 2 3 3 - 3、p D R 5 4 0、p R I T 5を含む、細菌に用いるベクターを含む。好ましい真核生物のベクターの中では、p F a s t B a c 1、p W I N E O、p S V 2 C A T、p O G 4 4、p X T 1およびp S G、p S V K 3、p B P V、p M S G、ならびにp S V Lである。他の適切なベクターは、当業者にとって容易に明らかであろう。一実施形態において、R V G遺伝子、加えてM、N、L、Pについての遺伝子もしくはその部分を含むR V遺伝子、および／または任意の上記のキメラ分子をコードするヌクレオチドを含むベクターはp F a s t B a cである。

【0064】

上記で述べた組換え構築物は、トランスフェクションし、感染させ、または形質転換するために用いることができ、R V Gタンパク質および少なくとも1つの免疫原を含むR Vタンパク質を発現することができる。一実施形態において、真核細胞および／または原核細胞への組換え構築物は、R V G、M、N、L、P、もしくはその部分、および／または任意の上記の分子を含む。したがって、本発明は、R V Gと、限定されないがR V N、L、およびP、もしくはその部分などの少なくとも1つの免疫原を含むR V構造遺伝子、ならびに／または任意の上記の分子をコードする核酸を含有し、かつ、V L Pの形成を可能にする条件下で宿主細胞においてR V G、N、L、もしくはP、もしくはその部分、および／または任意の上記の分子を含む遺伝子の発現を可能にするベクター（複数可）を含む宿主細胞を提供する。

【0065】

真核生物の宿主細胞の中では、酵母、昆虫、鳥類、植物、C . e l e g a n s（または線虫）、および哺乳類の宿主細胞である。昆虫細胞の例は、限定されないが、S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a（S f）細胞、例えば、S f 9、S f 2 1、T r i c h o p l u s i a n i細胞、例えば、H i g h F i v e細胞、およびD r o s o p h i l a S 2細胞である。（酵母を含む）真菌宿主細胞の例は、S . c e r e v i s i a e、K l u y v e r o m y c e s l a c t i s（K . l a c t i s）、C . a l b i c a n sおよびC . g l a b r a t aを含むカンジダ種、A s p e r g i l l u s n i d u l a n s、S c h i z o s a c c h a r o m y c e s p o m b e（S . p o m b e）、P i c h i a p a s t o r i s、およびY a r r o w i a l i p o l y t i c aである。哺乳類細胞の例は、C O S細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、マウスL細胞、

10

20

30

40

50

LNCaP細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児由来腎臓（HEK）細胞、およびアフリカミドリザル細胞、CV1細胞、HeLa細胞、MDCK細胞、Vero細胞、およびHep-2細胞である。アフリカツメガエル卵母細胞または両生類由来の他の細胞もまた用いられてもよい。原核生物の宿主細胞には、細菌細胞、例えば、大腸菌、*B. subtilis*、*Salmonella typhi*、およびマイコプラズマが挙げられる。

【0066】

ベクター、例えば、RV Gタンパク質；および限定されないが、RV N、L、P、もしくはその部分が挙げられる少なくとも1つの免疫原、および/または任意の上記のキメラ分子のポリヌクレオチドを含むベクターは、当技術分野においてよく知られた方法に従って、宿主細胞へトランスフェクションすることができる。例えば、核酸を真核細胞へ導入することは、リン酸カルシウム共沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、およびポリアミントランスフェクション試薬を用いるトランスフェクションによることができる。一実施形態において、ベクターは組換えバキュロウイルスである。別の実施形態において、組換えバキュロウイルスは、真核細胞へトランスフェクションされる。好ましい実施形態において、細胞は昆虫細胞である。別の実施形態において、昆虫細胞はSf9細胞である。

【0067】

本発明はまた、VLP産生の効率を増加させる構築物および方法を提供する。例えば、RV G、M、N、L、P、もしくはその部分、および/または任意の上記のキメラもしくは異種分子へのリーダー配列の付加は、細胞内に輸送するタンパク質の効率を向上させることができる。例えば、異種シグナル配列を、RV G、M、N、L、P、もしくはその部分、および/または任意の上記のキメラもしくは異種分子に融合させることができる。一実施形態において、シグナル配列は、昆虫細胞の遺伝子に由来することができ、かつRV G、M、N、L、P、もしくはその部分、および/または任意の上記のキメラもしくは異種分子に融合することができる。別の実施形態において、シグナルペプチドは、バキュロウイルス発現系において効率的に働くキチナーゼシグナル配列である。

【0068】

VLP産生の効率を増加させるための別の方法は、RV Gタンパク質、M、N、L、P、もしくはその部分を含むRV、および/または任意の上記のキメラもしくは異種分子をコードするヌクレオチドを特定の細胞型についてコドン最適化することである。一実施形態において、核酸は、昆虫細胞における発現についてコドン最適化される。例示的な実施形態において、昆虫細胞はSf9昆虫細胞である。

【0069】

本発明はまた、VLP形成を可能にする条件下で、RV Gタンパク質を含むRV遺伝子を発現することを含む、VLPを産生する方法を提供する。選択された発現系および宿主細胞に依存して、VLPは、組換えタンパク質が発現し、かつVLPが形成される条件下で、発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を成長させることにより産生される。一実施形態において、本発明は、少なくともRV Gタンパク質をコードするベクターを適切な宿主細胞へトランスフェクションする工程、およびVLP形成を可能にする条件下でRV Gタンパク質を発現する工程を含む、VLPを産生する方法を含む。別の実施形態において、真核細胞は、酵母、昆虫、両生類、鳥類、または哺乳類の細胞からなる群から選択される。適切な成長条件の選択は、当業者の技能の範囲内である。

【0070】

本発明のVLPを産生するように操作された細胞を成長させるための方法には、バッチ細胞培養、流加細胞培養、連続細胞培養、および灌流細胞培養の技術が挙げられるが、それらに限定されない。細胞培養は、バイオリクター（発酵チャンバー）中での細胞の成長および増殖を意味し、精製および単離のために、細胞は増殖し、タンパク質（例えば、組換えタンパク質）を発現する。典型的には、細胞培養は、バイオリクター中、無菌で、制御された温度および気圧の条件下で実施される。バイオリクターは、温度、気圧、攪拌

10

20

30

40

50

、および/またはpHなどの環境条件をモニターすることができる、細胞を培養するために用いられるチャンバーである。一実施形態において、バイオリクターは、ステンレススチールのチャンバーである。別の実施形態において、バイオリクターは、滅菌済みプラスチックバッグ（例えば、Cell bag（登録商標）、Wave Biotech、Bridgewater、NJ）である。他の実施形態において、滅菌済みプラスチックバッグは、約50L～1000Lのバッグである。

【0071】

その後、VLPは、例えば塩化セシウム、ショ糖、およびイオジキサノールの勾配遠心分離、加えて、例えば、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを含む標準精製技術によるなどの、VLPの完全性を保存する方法を用いて単離される。

10

【0072】

以下は、本発明のVLPをどのようにして作製し、単離し、精製することができるかの例である。通常、VLPは、細胞が細胞培養において成長した場合にVLPを生じるように操作された組換え細胞系から産生される（上記参照）。当業者は、本発明のVLPを作製および精製するために利用することができる追加の方法があることを理解しているだろう。したがって、本発明は、記載された方法に限定されない。

【0073】

本発明のVLPの産生は、Sf9細胞（非感染）を振盪フラスコ中へ播種し、細胞を増殖させておき、細胞が成長し、増加するにつれてスケールアップする（例えば、125mLのフラスコから50LのWaveバッグへ）ことから始めることができる。細胞を成長させるために用いられる培地は、適切な細胞系用に配合される（好ましくは、無血清培地、例えば、昆虫培地ExCell-420、JRH）。次に、細胞を、最も高い感染多重度（例えば、細胞あたり約1～約3のプラーク形成単位）で組換えバキュロウイルスに感染させる。いったん感染が起きたならば、RVGタンパク質および/または任意の上記のキメラもしくは異種分子が、ウイルスゲノムから発現し、VLPへ自己組織化し、感染から約24～72時間後、細胞から分泌される。通常、感染は、細胞が成長の対数期の中間部（ $4 \sim 8 \times 10^6$ 細胞/mL）にある場合、最も効率的であり、少なくとも約90%生存可能である。

20

【0074】

VLPは、細胞培地中のVLPのレベルが最大値に近いが、広範な細胞溶解の前である、感染から約48～96時間後に、収集することができる。収集時点におけるSf9細胞密度および生存率は、約 0.5×10^6 細胞/mL～約 1.5×10^6 細胞/mLで、色素排除アッセイによって示される場合、少なくとも20%生存率を有する。次に、培地を取り出し、清澄化する。VLP凝集を避けるために、NaClを、約0.4～約1.0Mの濃度まで、好ましくは約0.5Mまで培地に加えることができる。本発明のVLPを含有する細胞培地からの細胞および細胞片の除去は、使い捨ての滅菌済み中空繊維0.5μmまたは1.00μmのフィルターカートリッジまたは類似した装置を用いる接線流濾過（TFF）により達成することができる。

30

【0075】

次に、清澄化された培地中のVLPを、使い捨ての滅菌済み500,000分子量カットオフ中空繊維カートリッジを用いる限外濾過によって濃縮することができる。濃縮されたVLPを、残留培地成分を除去するために、0.5M NaClを含有するpH7.0～8.0リン酸緩衝食塩水（PBS）10体積に対してダイアフィルトレーションすることができる。

40

【0076】

濃縮され、ダイアフィルトレーションされたVLPを、約4～約10で、6,500×gでの遠心分離により、20%～60%の不連続なショ糖濃度勾配を有し、0.5M NaClを含むpH7.2 PBS緩衝液を用いてさらに精製することができる。通常、VLPは、約30%～約40%のショ糖の間に、または界面（20%と60%の段

50

階勾配中)に、特有の目に見えるバンドを形成し、それは勾配から回収して貯蔵することができる。この産物を、精製過程における次の工程のための調製において200mMのNaClを含むように希釈することができる。

【0077】

VLPのさらなる精製は、陰イオン交換クロマトグラフィーまたは44%等密度ショ糖クッション遠心分離により達成することができる。陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて、ショ糖勾配からの試料(上記参照)を、陰イオンを有する媒体を含有するカラム(例えば、Matrix Fractogel EMD TMAE)へ負荷し、VLPを他の混入物(例えば、バキュロウイルスおよびDNA/RNA)から分離することができる塩勾配(NaClの約0.2M~約1.0M)によって溶出する。ショ糖クッション方法において、VLPを含む試料を、44%ショ糖クッションに加え、30,000gで約18時間、遠心分離する。VLPは44%ショ糖の上面にバンドを形成するが、バキュロウイルスは底部で沈殿し、他の混入タンパク質は、0%ショ糖層の上面に留まる。VLPピークまたはバンドを回収する。

【0078】

無傷バキュロウイルスは、必要に応じて、不活性化することができる。不活性化は、化学的方法、例えば、ホルマリンまたはγ-プロピオラクトン(BPL)によって達成することができる。無傷バキュロウイルスの除去および/または不活性化はまた、上記で例示されているような、当技術分野において知られた、選択的沈殿およびクロマトグラフィー方法を用いることにより、大部分は達成することができる。不活性化の方法は、VLPを含有する試料を0.2%のBPL中、約25~約27で3時間、インキュベートすることを含む。バキュロウイルスはまた、VLPを含有する試料を、0.05%BPLにおいて、4で3日間、その後、37で1時間、インキュベートすることによって不活性化することもできる。

【0079】

不活性化/除去工程後、VLPを含む産物を、不活性化工程からのいかなる試薬もおよび/またはいかなる残留ショ糖も除去するために、ならびにVLPを望ましい緩衝液(例えば、PBS)中へ置くために、別のダイアフィルトレーション工程に流すことができる。VLPを含む溶液は、当技術分野において知られた方法(例えば、濾過滅菌法)によって滅菌し、冷蔵庫または冷凍庫内で貯蔵することができる。

【0080】

上記技術は、様々なスケールにわたって実行することができる。例えば、Tフラスコ、振盪フラスコ、スピナーボトル、工業規模のバイオリクターまで。バイオリクターは、ステンレススチールタンクまたは滅菌済みプラスチックバッグ(例えば、Wave Biotech、Bridgewater、NJによって販売されているシステム)のどちらでも含むことができる。当業者は、何が彼らの目的にとって最も望ましいかを知っているだろう。

【0081】

組換えRV VLPを産生するための、バキュロウイルス発現ベクターの増殖および産生、ならびに組換えバキュロウイルスでの細胞の感染は、前に記載されているように、昆虫細胞、例えば、Sf9昆虫細胞において達成することができる。一実施形態において、細胞は、RV VLPを産生するように操作された組換えバキュロウイルスに感染したSf9である。

【0082】

薬学的製剤またはワクチン製剤、および投与

本明細書において有用な薬学的組成物は、その組成物を受ける脊椎動物に有害な免疫応答の発生をそれ自体、誘導しない任意の薬学的作用物質を含み、かつ、過度の毒性なしに投与され得る、任意の適切な希釈剤または賦形剤を含む薬学的に許容される担体、および1つまたは複数のRV糖タンパク質(Gタンパク質)を含むRV VLPを含有する。本明細書で用いられる場合、用語「薬学的に許容される」は、哺乳類用、より具体的には、

ヒト用として、連邦政府もしくは州政府の管理機関によって承認されていること、または米国薬局方、ヨーロッパ薬局方、もしくは他の一般的に認識された薬局方に掲載されていることを意味する。これらの組成物は、脊椎動物において防御免疫応答を誘導するためのワクチン組成物および／または抗原性組成物として有用であり得る。

【0083】

本発明は、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPを含む薬学的に許容されるワクチン組成物を包含する。一実施形態において、薬学的に許容されるワクチン組成物は、少なくとも1つのRV Gタンパク質および少なくとも1つの追加の免疫原を含むVLPを含む。別の実施形態において、薬学的に許容されるワクチン組成物は、少なくとも1つのRV Gタンパク質および少なくとも1つのRV Mタンパク質を含むVLPを含む。別の実施形態において、薬学的に許容されるワクチン組成物は、少なくとも1つのRV Gタンパク質および少なくとも1つのインフルエンザMタンパク質を含むVLPを含む。別の実施形態において、薬学的に許容されるワクチン組成物は、少なくとも1つのRV Gタンパク質および少なくとも1つのトリインフルエンザM1タンパク質を含むVLPを含む。

10

【0084】

本発明はまた、少なくとも1つのRV Gタンパク質を含むVLPを含む、ヒト対象などの脊椎動物を免疫化するためのキットを包含する。

【0085】

一実施形態において、本発明は、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPの少なくとも1回の有効用量を含む免疫原性製剤を含む。

20

【0086】

本発明の免疫原性製剤は、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLP、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む。薬学的に許容される担体には、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、滅菌等張性水性緩衝液、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。薬学的に許容される担体、希釈剤、および他の賦形剤の徹底的な議論は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J., 最新版) に示されている。製剤は、投与様式に適合しているべきである。好ましい実施形態において、製剤は、ヒトへの投与に適しており、好ましくは、無菌の、非粒子性および／または非発熱性である。

30

【0087】

組成物は、必要に応じて、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有することができる。組成物は、再構成に適した凍結乾燥粉末などの固形、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、丸薬、カプセル、徐放製剤、または粉末であり得る。経口製剤は、医薬品グレードのマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的担体を含むことができる。

【0088】

本発明はまた、本発明のワクチン製剤の成分の1つまたは複数で満たされた1つまたは複数の容器を含む薬学的パックまたはキットを提供する。一実施形態において、キットは2つの容器を含み、一方が1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPを含有し、他方がアジュバントを含有する。そのような容器（複数可）に添付することができるものは、医薬品または生物学的製剤の製造、使用、または販売を規制する行政機関によって規定された形での通告であり、その通告は、製造、使用、または販売の機関によるヒト投与についての承認を反映する。

40

【0089】

本発明はまた、製剤が、組成物の量を表示するアンプルまたはサッシェなどの密封容器内にパッケージングされていることを提供する。一実施形態において、組成物は、液体として供給され、別の実施形態においては、密封容器内に乾燥滅菌された凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給されて、対象への投与のために、例えば、水または食塩水で適切

50

な濃度へ再構成することができる。

【0090】

代替の実施形態において、組成物は、組成物の量および濃度を表示する密封容器内に液体の形で供給される。好ましくは、組成物の液体型は、密封容器内に、少なくとも約50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは少なくとも約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも1 mg/ml で供給される。

【0091】

例として、1つまたは複数のRV糖タンパク質を含むRV VLPは、免疫応答を刺激するのに十分な(上記で定義されているような)有効量または有効数量で投与され、それぞれが1つまたは複数のRV株に対して応答する。1つまたは複数のRV糖タンパク質(Gタンパク質)を含むRV VLPの投与は、RVに対する免疫を誘発する。典型的には、用量は、例えば、年齢、体調、体重、性別、食事、投与時間、および他の臨床的因子に基づいてこの範囲内で調整することができる。予防ワクチン製剤は、例えば、針とシリンジ、または無針注射器を用いる皮下注射または筋肉内注射によって、全身性に投与される。例示的な実施形態において、ワクチン製剤は、筋肉内に投与される。

10

【0092】

したがって、本発明はまた、感染または少なくとも1つのその疾患症状に対する免疫を哺乳類に誘導するワクチン組成物または抗原性組成物を製剤化する方法であって、1つまたは複数のRV糖タンパク質(Gタンパク質)を含むRV VLPの有効用量をその製剤に加えることを含む方法を含む。一実施形態において、感染はRV感染である。

20

【0093】

単一用量での免疫の刺激は可能であるが、望ましい効果に達するために追加の投薬量を、同じまたは異なる経路で投与することができる。例えば、新生児および乳児において、十分なレベルの免疫を誘発するのに、複数回の投与が必要とされる場合がある。感染、例えば、RV感染に対する十分なレベルの防御を維持するために、必要に応じて、小児期を通じて折々に、投与を継続することができる。同様に、例えば、ヘルスケアワーカー、デイケアワーカー、幼児の家族、高齢者、および心肺機能障害をもつ個体などの反復性または重篤性感染に特に罹りやすい成人は、防御免疫応答を確立および/または維持するために複数回の免疫化を必要とする場合がある。誘導された免疫のレベルは、例えば、中和分泌型抗体および血清抗体の量を測定することによって、モニターすることができ、望ましいレベルの防御を誘発し、かつ維持するために、必要に応じて、投薬量を調整し、またはワクチン接種を繰り返すことができる。

30

【0094】

1つまたは複数のRV糖タンパク質(Gタンパク質)を含むRV VLPを含む組成物(例えば、ワクチン製剤および/または抗原性製剤)を投与する方法には、非経口(例えば、皮内、筋肉内、静脈内、および皮下)投与、硬膜外投与、および粘膜投与(例えば、鼻腔内および口腔内、または肺経路、または座剤による)が挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の組成物は、筋肉内に、静脈内に、皮下に、経皮的に、または皮内に投与される。組成物は、任意の便利な経路により、例えば、注入またはボラス注射により、上皮層または皮膚粘膜層(例えば、口腔粘膜、結腸、結膜、上咽頭、中咽頭、膣、尿道、膀胱、および腸管粘膜など)を通しての吸収により投与されてもよく、他の生物活性物質と共に投与されてもよい。

40

【0095】

本発明のワクチン製剤および/または免疫原性製剤はまた、投薬スケジュール、例えば、ワクチン組成物の初回投与、その後のブースター投与で投与されてもよい。特定の実施形態において、組成物の2回目の投薬は、初回の投与から、おおよそ2週間後から1年後まで、好ましくは、約1カ月後から、約2カ月後、約3カ月後、約4カ月後、約5カ月後、約6カ月後までに投与される。追加として、3回目の投薬は、2回目の投薬後で、初回の投与から約3カ月後から約2年後まで、またはさらに長い期間後、好ましくは、約4カ月後、約5カ月後、または約6カ月後、または約7カ月後、約1年後までに、投与されて

50

もよい。2回目の投薬後、対象の血清および/または尿または粘膜の分泌物中に特定の免疫グロブリンが検出されない、または低いレベルで検出される場合、3回目の投薬が任意選択により実施されてもよい。好ましい実施形態において、2回目の投薬は、1回目の投与から約1カ月後に実施され、3回目の投薬は、1回目の投与から約6カ月後に実施される。別の実施形態において、2回目の投薬は、1回目の投与から約6カ月後に実施される。別の実施形態において、本発明の組成物は、併用療法の一部として投与することができる。例えば、本発明の組成物は、他の免疫原性組成物、抗ウイルス剤、および/または抗生物質と共に処方することができる。

【0096】

薬学的組成物の投薬量は、当業者によって、例えば、まず、予防的または治療的免疫応答を誘発するのに有効な用量を、例えば、ウイルス特異的免疫グロブリンの血清力価を測定することにより、または血清試料、もしくは尿試料、もしくは粘膜分泌物中の抗体の阻害比率を測定することにより、同定することによって、容易に決定することができる。投薬量は、動物研究から決定することができる。ワクチンの効力を研究するために用いられる動物のリストとしては、限定されないが、モルモット、ハムスター、フェレット、チンチラ、マウス、およびコトンラットが含まれる。たいていの動物は、感染病原体の天然の宿主ではないが、それでもなお、その疾患の様々な態様の研究において役割を果たすことができる。例えば、上記の動物のいずれかは、ワクチン候補、例えば、1つまたは複数のRV糖タンパク質(Gタンパク質)を含むRV VLPを、誘導される免疫応答を部分的に特徴づけるために、および/またはいくらかの中和抗体が産生されているかどうかを決定するために、投薬することができる。例えば、マウスは小さいサイズであり、かつそれらの低コストによって、研究者がよりラージスケールで研究を行うことが可能になるため、マウスモデルにおいて多くの研究が行われている。

【0097】

加えて、ヒト臨床研究は、当業者により、ヒトについての好ましい有効用量を決定するために実施することができる。そのような臨床研究は、当技術分野において日常的であり、よく知られている。用いられるべき正確な用量はまた、投与経路に依存する。有効用量は、インビトロまたは動物試験系から導かれた用量反応曲線から推定されてもよい。

【0098】

当技術分野においてもよく知られているように、特定の組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られている、免疫応答の非特異的刺激物質の使用によって増強することができる。アジュバントは、未知の抗原に対する免疫の汎用性(generalized)増加を促進するために、実験的に用いられている(例えば、米国特許第4,877,611号)。免疫化プロトコールは、長年、応答を刺激するためにアジュバントを用いており、それとして、アジュバントは当業者にとってよく知られている。いくつかのアジュバントは、抗原が提示される様式に影響を及ぼす。例えば、タンパク質抗原がアルミニウムによって沈殿する場合、免疫応答が増加する。抗原の乳化もまた、抗原提示の持続期間を延ばす。全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み入れられている、Vogelら、「A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients(第2版)」に記載された任意のアジュバントの含有は、本発明の範囲内で想定される。

【0099】

例示的なアジュバントには、フロイント完全アジュバント(死滅した結核菌を含有する免疫応答の非特異的刺激物質)、フロイント不完全アジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。他のアジュバントは、GMCSF、BCG、水酸化アルミニウム、thur-MDPおよびnor-MDPなどのMDP化合物、CGP(MTP-PE)、リピドA、ならびにモノホスホリルリピドA(MPL)を含む。細菌から抽出された3つの成分のMPL、トレハロースジミコレート(TDM)、および細胞壁骨格(CWS)を2%スクアレン/Tween 80乳濁液中に含有するRIBIもまた企図される。MF-59、Novasomes(登録商標)、MHC抗原もまた用いられてもよ

10

20

30

40

50

い。

【0100】

本発明の一実施形態において、アジュバントは、脂質二重層をもたない大きな無定形中心腔を囲む、水層によって分離された、実質的に球殻の形をとって配置された約2～10個の二重層を有する少数層状(paucilamellar)脂質小胞である。少数層状脂質小胞は、非特異的刺激物質として、抗原の担体として、追加のアジュバントの担体として、およびそれらの組み合わせとして、いくつかの方法で免疫応答を刺激するように働き得る。例えば、ワクチンが、抗原が小胞の細胞外に留まるように、あらかじめ形成された小胞と抗原を混合することにより調製される場合、少数層状脂質小胞は、非特異的免疫刺激物質として働く。小胞の中心腔内に抗原をカプセル化することにより、小胞は、免疫刺激物質と、抗原の担体の両方として働く。別の実施形態において、小胞は、主として、非リン脂質小胞でできている。他の実施形態において、小胞は、Novasomes(登録商標)である。Novasomes(登録商標)は、約100nm～約500nmの範囲である少数層状非リン脂質小胞である。それらは、Brj 72、コレステロール、オレイン酸、およびスクアレンを含む。Novasomesは、インフルエンザ抗原についての有効なアジュバントであることが示されている(全ての目的のために本明細書に援用される米国特許第5,629,021号、第6,387,373号、および第4,911,928号参照)。

10

【0101】

本発明の組成物は、「免疫刺激物質」と共に処方することができる。免疫系の応答を増加させるための身体自身の化学的メッセンジャー(サイトカイン)がある。免疫刺激物質には、インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13);成長因子(例えば、顆粒球マクロファージ(GM)コロニー刺激因子(CSF));およびマクロファージ炎症性因子、Flt3リガンド、B7.1、B7.2などの他の免疫刺激性分子などの免疫刺激活性、免疫強化活性、および炎症促進活性を有する様々なサイトカイン、リンホカイン、およびケモカインが挙げられるが、それらに限定されない。免疫刺激性分子は、本発明の組成物と同じ製剤中で投与することができ、または別々に投与することができる。そのタンパク質かまたはそのタンパク質をコードする発現ベクターのいずれかが、免疫刺激効果を生じるように投与することができる。したがって、一実施形態において、本発明は、アジュバントおよび/または免疫刺激物質を含む抗原性製剤ならびにワクチン製剤を含む。

20

30

【0102】

免疫応答を刺激する方法

1つまたは複数のRV糖タンパク質(Gタンパク質)を含むRV VLPは、感染病原体に対する免疫または実質的な免疫を与える免疫応答を刺激する組成物を調製するのに有用である。本発明は、1つまたは複数のRV糖タンパク質(Gタンパク質)を含むRV VLPの少なくとも1回の有効用量を投与することを含む、対象において、感染または少なくとも1つのその疾患症状に対する免疫を誘導する方法を包含する。

【0103】

一態様において、本発明は、1つまたは複数のRV糖タンパク質(Gタンパク質)を含むRV VLPの少なくとも1回の有効用量を投与することを含む、対象において、RV感染または少なくとも1つのその疾患症状に対する免疫を誘導するための方法を含む。一実施形態において、対象は脊椎動物である。別の実施形態において、脊椎動物は哺乳類である。さらに別の実施形態において、哺乳類はヒトである。さらに別の実施形態において、哺乳類は、飼いならされた動物である。別の実施形態において、方法は、製剤を1回、投与することにより、RV感染または少なくとも1つの疾患症状に対する免疫を誘導することを含む。別の実施形態において、方法は、製剤を複数回、投与することにより、RV感染または少なくとも1つの疾患症状に対する免疫を誘導することを含む。

40

【0104】

本発明の組成物は、脊椎動物(例えば、ヒト)に投与された場合、脊椎動物において実

50

質的な免疫を誘導することができる。実質的な免疫は、脊椎動物において、感染を防御し、もしくは寛解させ、または少なくとも感染の症状を低下させる、本発明の組成物に対する免疫応答に起因する。場合によっては、脊椎動物が感染したとしても、感染は無症状であろう。応答が、完全な防御応答ではない場合がある。この場合、脊椎動物が感染病原体に感染したならば、脊椎動物は、非免疫化脊椎動物と比較して、症状の低下、または症状のより短い持続期間を経験するだろう。

【0105】

別の実施形態において、本発明は、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPの少なくとも1回の有効用量を投与することを含む、対象において、感染または少なくとも1つのその症状に対する防御抗体応答を誘導する方法を含む。

10

【0106】

本明細書で用いられる場合、「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子の断片によって実質的に、または部分的にコードされる1つまたは複数のポリペプチドを含むタンパク質である。認識されている免疫グロブリン遺伝子には、 κ 、 λ 、 μ 、および δ 定常領域遺伝子、加えて、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、 κ または λ のいずれかとして分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、または γ として分類され、それらが、次には、免疫グロブリンクラス、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEをそれぞれ、定義する。典型的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は四量体を含む。各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖ペアで構成され、各ペアは、1つの「軽鎖」（約25kD）および1つの「重鎖」（約50～70kD）を有する。各鎖のN末端は、主に抗原認識を担う、約100～110個、またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を定義する。抗体は、無傷の免疫グロブリンとして、または様々なペプチダーゼでの消化により生じた、いくつかの十分特徴づけられた断片として存在する。

20

【0107】

一実施形態において、本発明は、1つまたは複数のRV糖タンパク質（Gタンパク質）を含むRV VLPの少なくとも1回の有効用量を投与することを含む、対象において、RV感染または少なくとも1つの疾患症状に対する防御細胞応答を誘導する方法を含む。

【0108】

上記で述べられているように、本発明の免疫原性組成物は、対象においてRV感染の少なくとも1つの症状を防止し、または低下させる。RVの症状は、当技術分野においてよく知られている。それらには、発熱、頭痛、および全身の脱力感または不快感が挙げられる。疾患が進行するにつれて、より特異的な症状が現れ、それらには、不眠、不安、精神錯乱、軽度または部分的な麻痺、興奮、幻覚、動揺、過流涎（唾液の増加）、嚥下困難、および恐水病（水への恐怖心）が挙げられ得る。したがって、本発明の方法は、RVに伴う少なくとも1つの症状の防止または低下を含む。症状の低下は、主観的に、または客観的に、例えば、対象による自己評価により、臨床医の評価により、または、例えば、生活の質の評価、RV感染または追加の症状の進行の遅延、RV症状の重症度の低下を含む適切なアッセイもしくは測定（例えば、体温）もしくは適したアッセイ（例えば、抗体力価および/またはT細胞活性化アッセイ）を行うことにより、決定されてもよい。客観的評価は、動物評価とヒト評価の両方を含む。

30

40

【0109】

本発明はさらに、以下の実施例によって例証され、その実施例は、限定として解釈されるべきではない。本出願を通して引用された全ての参考文献、特許、および公開特許出願の内容、加えて図面および配列表は、全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられている。

【実施例】

【0110】

（実施例1）

動物研究のための狂犬病G粒子の精製

50

この実施例の目的は、どのようにしてRV Gウイルス様粒子が、Sf9昆虫細胞におけるバキュロウイルスベクターからの発現後に精製されたかを示すことである。

【0111】

RV VLPを構築するために、RV Gタンパク質（配列番号2）をコードする核酸配列を、図1に示されたバキュロウイルスベクター（pFastBac1 Rabies G）から発現した。

【0112】

Sf9昆虫細胞を、0.2のMOIで 2.5×10^6 細胞/mlにおいて感染させた。感染後69時間目に、4000gで15分間の遠心分離により細胞を収集した。細胞を1×PBSで洗浄し、再び回転させ、-70℃で凍結した。

10

【0113】

およそ2Lの細胞培養物から得られた23グラムの細胞ペレットを用いた。細胞ペレットを、25mM TrisCl pH8.0、50mM NaCl、0.5%NP9、4ug/mlロイペプチンの200mlで再懸濁した。それを室温で1時間、攪拌し、4において7000gで60分間、回転させ、クロマトグラフィーのために上清200mlを取っておいた。

【0114】

細胞ペレットからの狂犬病G839抽出の終了後、可溶性タンパク質を、Fractogel EMD TMAE Hicap (M)クロマトグラフィーカラム上に負荷した。カラムの仕様は以下の通りであった：カラム製造会社：GE Healthcare；カラムの型：XK50f20；樹脂製造会社：EMD Chemicals；樹脂の型：Fractogel EMD TMAE Hicap (M)；充填カラム寸法：約10cm高さ×5.0cm直径；充填カラム体積：200ml；充填流速：30ml/分；充填緩衝液：25mM Tris pH8.0/300mM NaCl。

20

【0115】

陰イオン交換工程の仕様は以下の通りであった：ランニング流速：20ml/分；カラム平衡緩衝液：25mM Tris pH8.0、50mM NaCl、0.02%NP9；溶離液A：25mM Tris pH8.0、50mM NaCl、0.02%NP9；溶離液B1：25mM Tris pH8.0、180mM NaCl、0.02%NP9；溶離液B2：25mM Tris pH8.0、500mM NaCl、0.02%NP9；溶離液B3：25mM Tris pH8.0、1500mM NaCl、0.02%NP9；カラム負荷：狂犬病G VLP抽出上清200ml；負荷後のカラム洗浄：2CV溶離液A；カラム溶出：2CV溶離液B1、2CV溶離液B2、2CV溶離液B3。

30

【0116】

主な画分回収および体積は以下の通りであった：通過画分：250mL；B1 180mM NaCl溶出：175ml（産物）；B2 500mM NaCl溶出：100ml；B3 1500mM NaCl溶出：100ml。

【0117】

TMAEカラムの180mM NaCl溶出画分をレンチルレクチンカラム上に負荷した。カラムの仕様は以下の通りであった：カラム製造会社：GE Healthcare；カラムの型：XKI6/20；樹脂製造会社：GE Healthcare；樹脂の型：レンチルレクチンセファロース4B；樹脂カタログ#：17-0444-01；充填カラム寸法：2.5cm高さ×1.6cm直径；充填カラム体積：約5ml；充填流速：2.5ml/分；充填緩衝液：25mM NaHPO₄ pH6.8、50mM NaCl、0.02%NP9；ランニング流速：2ml/分；カラム平衡緩衝液：25mM NaHPO₄ pH6.8、50mM NaCl、0.02%NP9；溶離液A：25mM NaHPO₄ pH6.8、50mM NaCl、0.02%NP9、溶離液B：25mM NaHPO₄ pH6.8、50mM NaCl、0.02%NP9、500mM メチル - D - マンノピラノシド（Fisher Scientific）；カラム負

40

50

荷：狂犬病 G 8 3 9 T M A E 1 8 0 m M N a C l 溶出の 1 7 5 m l ; 負荷後のカラム洗浄：溶離液 A での 5 C V ; カラム溶出：溶離液 B での 1 0 C V 。

【 0 1 1 8 】

主な画分回収および体積は以下の通りであった：通過画分：1 8 0 m l ; 溶出画分：3 0 m l (産物) 。

【 0 1 1 9 】

レンチルレクチン溶出を F r a c t o g e l E M D S O 3 - H i c a p (M) クロマトグラフィーカラム上に負荷した。カラムの仕様は以下の通りであった：カラム製造会社：G E H e a l t h c a r e ; カラムの型：X K 1 6 / 2 0 ; 樹脂製造会社：E M D C h e m i c a l s ; 樹脂の型：F r a c t o g e l E M D S O 3 - H i c a p (M) ; 充填カラム寸法：5 c m 高さ x 1 . 6 c m 直径；充填カラム体積：1 0 m l ; 充填流速：7 . 5 m l / 分；充填緩衝液：2 5 m M N a H P O ₄ p H 6 . 8、5 0 m M N a C l、0 . 0 2 % N P 9 。

【 0 1 2 0 】

陽イオン交換工程の仕様は以下の通りであった：ランニング流速：5 m L / 分；カラム平衡緩衝液：2 5 m M N a H P O ₄ p H 6 . 8、5 0 m M N a C l、0 . 0 2 % N P 9 ; 溶離液 A : 2 5 m M N a H P O ₄ p H 6 . 8、5 0 m M N a C l、0 . 0 2 % N P 9 ; 溶離液 B : 2 5 m M N a H P O ₄ p H 6 . 8、3 0 0 m M N a C l、0 . 0 2 % N P 9 ; カラム負荷：狂犬病 G 8 3 9 レクチンレクチン溶出 3 0 m L ; 負荷後のカラム洗浄：溶離液 A で 3 C V ; カラム溶出：4 C V 段階溶出溶離液 B ; 主な画分回収および体積：溶出画分：9 m l (最終産物) ; S O 3 - カラム 3 0 0 m M N a C l 溶出産物の 9 m l を 0 . 2 μ m フィルターで濾過する：フィルター製造会社 (0 . 2 μ m) : C o r n i n g ; フィルターの型：0 . 2 ミクロン S F C A 膜を有する 2 8 m m シリンジフィルター。

【 0 1 2 1 】

抗 R V G ウサギ血清を用いるウェスタンブロッティングを行った (図 2) 。上記条件を用いた R V G 粒子の純度は 8 6 % であった。総タンパク質量は 0 . 3 9 m g / m l であり、R V G 粒子の濃度は 0 . 3 3 m g / m l であり、2 L 細胞培養物から合計 2 . 9 7 m g の R V G 粒子であり、約 1 . 5 m g / L 細胞培養物の収率であった。重要なことには、R V G 粒子は、4 で少なくとも 1 カ月間、安定であった (データ未提示) 。

【 0 1 2 2 】

(実施例 2)

R V G タンパク質立体構造の分析のための電子顕微鏡法

精製された R V G タンパク質を、ネガティブ染色電子顕微鏡法によって分析した (図 3) 。0 . 0 2 % N P 9 での R V G 粒子の平均分子量は、 $1 . 0 4 \times 1 0^{-6}$ であった。タンパク質三量体は、1 7 5 . 5 k D a の分子量を示し、粒子中の三量体の平均数は、5 . 9 個であった。R V G タンパク質はミセル (ロゼット) の形をとって凝集した。G スパイクが電子顕微鏡法下でミセル形態を示すという事実は、G タンパク質粒子が天然タンパク質の正しい 3 次元構造を有することを示唆する。

【 0 1 2 3 】

(実施例 3)

R V G 粒子はウサギにおいて高い抗体レベルを誘導する

R V G 粒子の免疫応答を誘導する能力を試験するために、ウサギに、R V G 粒子を様々な濃度で投与した。これらの実験の結果は図 4 に示されている。R V G 粒子は、ウサギにおいて高レベルの抗体を誘導することができた。

【 0 1 2 4 】

(実施例 4)

マウスにおける R V 中和アッセイおよび R V 誘発研究

1 つまたは複数の G タンパク質を含む R V V L P を含むワクチンの、R V 感染に対する防御における効率を試験するために、中和アッセイをマウスにおいて行う。簡単に述べ

10

20

30

40

50

れば、マウスの群に、RV VLPまたはRV VLP+アルミニウムなどのアジュバントを筋肉内に注射する。加えて、マウスに、比較ワクチン剤として用いられるRabipur（登録商標）（市販の不活性化狂犬病ウイルスワクチン）を注射する。1つまたは複数のGタンパク質を含むRV VLP（すなわち、RV Gミセル）は、一般的に、Rabipur（登録商標）と比較して、中和抗体のより高い力価を誘導することが予想される。

【0125】

（実施例5）

RV G粒子かまたは市販の狂犬病ワクチンRabipur（登録商標）のいずれかを注射されたBalb/cマウスにおける抗狂犬病力価の比較

10

本発明のVLPの免疫原性を、Balb/cマウスモデルにおいて市販の狂犬病ワクチンRabipur（登録商標）と比較した。実施例1に記載されているように、RV G VLP粒子を構築し、精製した。VLPはミセルの形に凝集した（図3）。

【0126】

研究は4つの群（各群についてn=5）を含んだ：

群I：陽性対照（市販の狂犬病ワクチンRabipur（登録商標））

群II：RV G VLP（5μg）

群III：RV G VLP（2μg）

群IV：RV G VLP（1μg）

20

【0127】

マウスに、0日目、3日目、および7日目に、0.1mLにおけるそれぞれの免疫原を投与した。0日目、4日目、7日目、10日目、14日目、21日目、28日目、35日目に、マウスから血清試料を採取した。血清を、ELISAにより中和抗狂犬病抗体について試験した。

【0128】

研究設計の概要は下記の表1に示されている。

【0129】

【表1】

表1 研究設計				
パラメーター	ELISAによる血清中の抗狂犬病力価(中和)			
分析物	血清			
識別	群I	群II	群III	群IV
	陽性対照	試験1	試験2	試験3
マウスの数	5	5	5	5
免疫原	市販の狂犬病 ワクチン Rabipur (登録商標)	RV G VLP (5μg)	RV G VLP (2μg)	RV G VLP (1μg)
免疫化のスケジュール	0.1mL、1/D、0日目、3日目、7日目			
採血(日数)	0、4、7、10、14、21、28、35			
分析物	中和抗狂犬病ウイルス力価についての血清			

30

40

【0130】

上記で論じられているように、抗狂犬病中和抗体を、マウス血清において、上記で示された時点で測定した。力価を、各測定値の幾何平均としてプロットした（図6）。図6に示されているように、各用量における本発明のVLPミセルは、市販のワクチンRabipur（登録商標）より迅速かつ高い抗体力価を提供する。具体的には、RV G VLPは、Rabipur（登録商標）ワクチンより数日早く、血清防御力価（0.5 EU /

50

m L) を提供した (図 6 、 表 2) 。

【 0 1 3 1 】

表 2 はまた、各免疫化群についてのパーセント血清抗体保有率 (すなわち、中和抗体力価 0 . 5 E U / m L) を示す。表は、血清抗体保有が、R a b i p u r (登録商標) ワクチンを投与された動物と比較して、(全ての 3 つの用量における) 本発明の R V G V L P で処置された動物においてより迅速に生じる。

【 0 1 3 2 】

【表 2】

表2 各免疫化群についてのパーセント血清抗体保有率							
識別	以下の日における%血清抗体保有率(n=5)						
	0	7	10	14	21	28	35
Rabipur(登録商標)単独 (群I)	0	0	40	60	60	60	60
RV G VLP (5μg) (群II)	0	0	60	100	100	100	100
RV G VLP (2μg) (群III)	0	40	80	100	100	100	100
RV G VLP (1μg)	0	0	60	100	100	100	100

【 0 1 3 3 】

前述の詳細な記載は、明瞭な理解のためにのみ与えられたものであり、これらの改変は当業者にとって容易なものであろうから、それらから不必要な限定が理解されるべきではない。本明細書に提供される情報のいずれも、現在主張されている本発明の先行技術であり、または関連しているものと認めるわけではなく、具体的に、もしくは暗に参照されたいかなる刊行物も先行技術であるものと認めるわけでもない。

【 0 1 3 4 】

他に規定がない限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

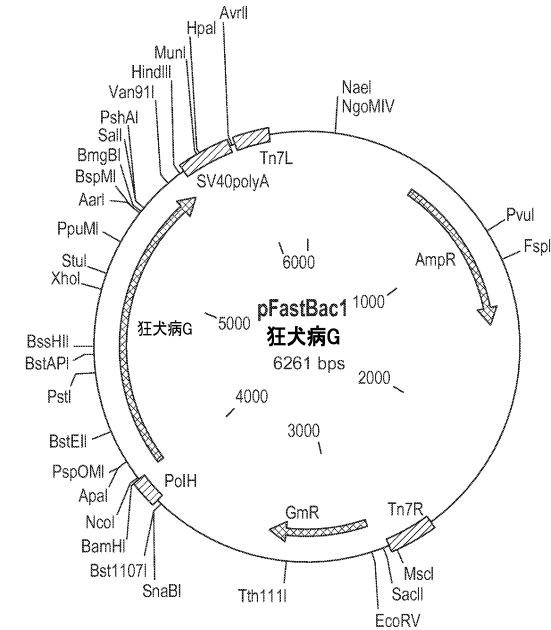
【 0 1 3 5 】

本出願は、読者の注意を特定の実施形態に向けるためにセクションに分かれているが、そのようなセクションは、実施態様の間での区分として解釈されるべきではない。各セクションの教示および本明細書に記載された実施形態は、他のセクションに適用できる。

【 0 1 3 6 】

本発明は、その特定の実施形態に関連して記載されているが、それはさらに改変することができ、本出願は、一般的には本発明の原理に従い、かつ本発明が属する技術分野内の公知または慣習的な実施内に入るような、および上文で示された本質的な特徴に当てはまり得るような、および添付された特許請求の範囲の範囲内で従うような本開示からの逸脱を含め、本発明のいかなるバリエーション、使用、または適応も網羅することを意図されることは理解されているであろう。

【 図 1 】

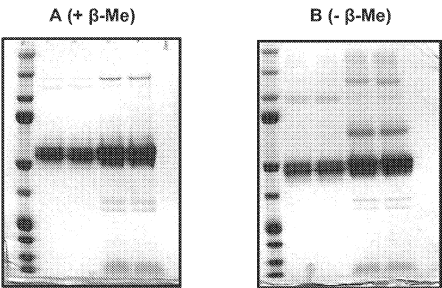


【 図 2 】

試料	ロット	試料 ID	BCA-mg/ml	DNA-μg/ml	BV-ELISA-μg/ml
2	031810	狂犬病 G839	0.39	0.34	5.5

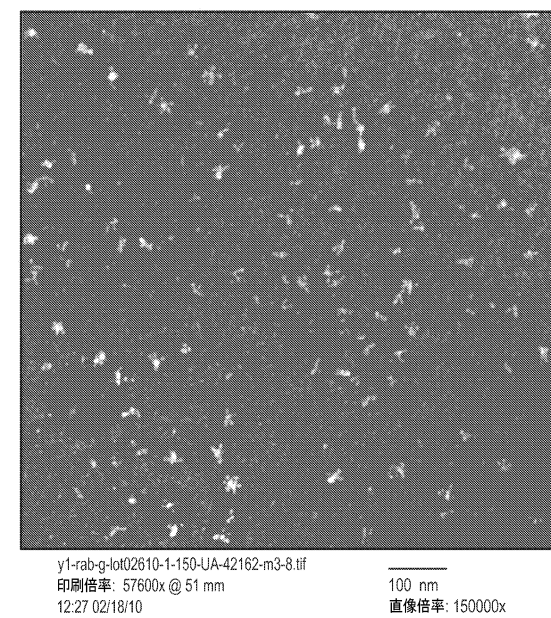
試料	ロット	試料 ID	無菌性(sterility)	LAL EU/ml	ブランク pfu/ml
2	031810	狂犬病 G839 (DIL)	陰性	0.41	10 ⁻⁶ 以下で検出されず

試料 ID					
ロット#	表記	レーン	バンド	MW	% バンド純度
031810	狂犬病 G839	4	狂犬病	54.0	85.2
031810	狂犬病 G839	5	狂犬病	54.6	86.1



レーン 1: Precision Plus Protein Standard
レーン 2: RV G タンパク質 (ロット 021610)
レーン 3: RV G タンパク質 (ロット 021610)
レーン 4: RV G タンパク質 (ロット 031810)
レーン 5: RV G タンパク質 (ロット 031810)

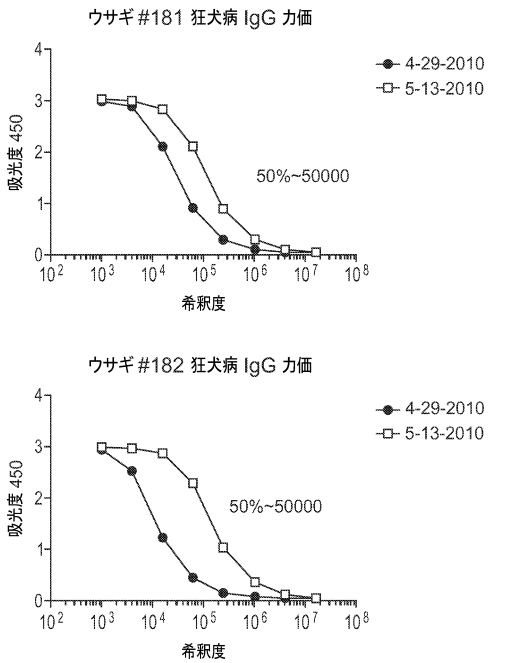
【 図 3 】



y1-rab-g-lot02610-1-150-UA-42162-m3-8.tif
印刷倍率: 57600x @ 51 mm
12:27 02/18/10

100 nm
直像倍率: 150000x

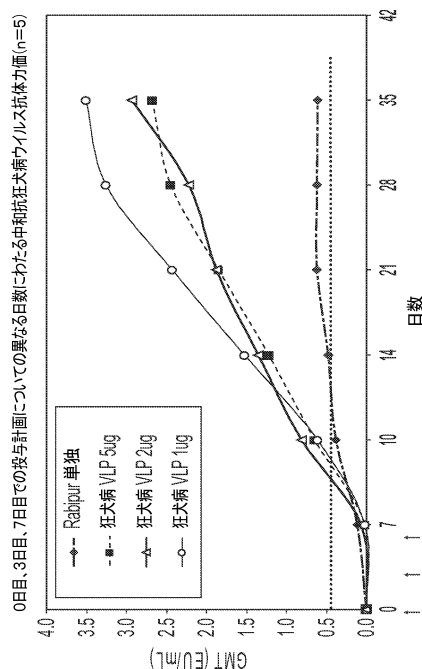
【 図 4 】



【图 6】

ATGGTGGCCCCAGGCTCTCTCTCTGTCGCTTTTGCTGCTCTTCCCACTCTGCTTCGGCAAGTTCGCCCATACACC
ATTCCTGCAACAGCTGGGCCCTGGTCCCTTATGCAGATCCAACTTCTCTGTCCTTACCAACCTGGTGCTGAG
GACGGAAGCTGCATCAACTGCTGCGGATCTCTTACATAGAGCTGAAAGTGGGTGAGCTCTCCGCTATCAAGAT
AACGGCTCTCACTTGCAGCGGCTGCTGACGAGGAGGATTCACCAACTTTCAGCTCTGCTCAACTTCC
TTCAGGAAGAGCATCTGCACCAACTCCGAGCTTGCAGGGCTGCCACAACTGGAGATGGCCGGAGACCA
AGATACAGGAAGTCCCTGCACAAACCTTACCAGAGCTACCACTGCTCCGATCACTGAAGATACCAAGAGGCT
CTGGTCTCACTTCGCCCATCTGCTGCTGACTGCAGCCACTGACGCTAGCTGTGACTGAAAGCTCTCCAGGT
GGAAACTGCAGCGGAGTGGCCGTCTCTTACTTACTGCTCAACCAACGACGCTACACTATCTGGATGCCAGAG
AATCCCCGCTGGGCTAGCTGCGACATCTTCCACCACTCAGCTGGAAAGGCCGCTCCAAAGGTTCTTGAGACT
TCGCGCTTCGTGAGCAAGAAAGGGTTGTACAAAGTCCCTGAAGGCGCTTCCAGAGCTTTCGCGCGTCTGCTG
GGACTCAGATTGTGAGACGGCGCATCGGTGGCCATCGACATCGAACAGACGAACTGGTGGCCCCCTGGACAA
CTCGTGAATCTGCACGACTTCGCTTCAGACGAGATCGAACCACTGTTGGTGCAGGAACCTCGTCAAGAAGCGCGAG
GAATGCTCCGAGCTCTGCAGAGCATATGATCATCTCAAGAGGCTTCATCTCGTCTGTTCACACTGAGAGAG
CTCGCTCCCGGTTTCGGCAAGGCTTACACTTCCCAAGCAAGCTCTGAGAGGCTGACGCCCATCAAGACTCC
GTGCTCATCTGCAAGCAAAATCTCCCTCTAAGGTTGCTGCTGCTGCGAGGTAGATGCCACCTCCAGCTGAAC
GGAGTCTTCTCAACGGTATCATCTCTGGGTCTGACGGCAAGCTGCTCATCCAGAGATGCAAAAGCTCACTCTTG
CAGCAACATCAATGAACTGTGCTGCTCTCTGATCCCTCTATCCAGTCAACCATTTGGTCAAGCAACGCTCTT
AAGAACGGCGACGAGGCGAAGACTCTGGAGGTGCTGCTGAGGAGCTCACTGCAAGAGTGCACAGCACTCTCCGAGTGCAC
CTGGGTCTCCCAACTGGGGAAGTACGTGTGCTGCTGCTGGTGGCCCTACACGCTTTGATGCTGATCATCTTC
TTGATGACTTCTGTGAGGAGAGTCAACAGGCTTGAGGCTACTCAGCAACAACCTGAGGGGAACGGGTAGAGAGAGT
TCCGTCACCTCAACAATCTGGAAGATCATCAGCTCATGGGAGAGCTACAAGTCAAGGCGGAGAAAGCCGGTCTG

MVPQALLFVPLLVPFLCPFGKFPYIYIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNLNVLEDEGCTNLSGF
SYMELGVYVLSIAKMGNETCTGVTEVAETNIPFVGVTYITFKRHHFPTPADCAAAWNNK
MAGDPYRESLHNPYDPYHMLTVKTTKTESVLIISPSVADLPDYDRSLHRSVPGMGCSG
VAVSSTYCTNHDTYITWMPENPRLMGSCDIFTNSRGKRAKSGSETCGFVDERGLYKSLKG
ACKLKLGVGLLGRGLWQTHWAKTSTNETNKGCPQGLVNLHDPRESIDHLEVLVEELVKRKE
ECLDALESIMTKSVSFRLLSHMQLVPGFCKAYITFNKLTMEADHAYGKSVRTWNEIIP5
KGLCLVGGRCHPHVNGVFFNGIILPGDGNVLIPEMQSSLLQQHMHLLVSSVIPLMHPLAD
PSTVFKNGEADEDFVEVHLDPVHERISVGLDLPNWGKYVILSAGALTALMLIIFLMTCW
RRNVSEPTOHNLRGCTREVSYTPOSGKIISSEWYSKGGTGL



0006158088000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 39/205 (2006.01)		A 6 1 K 39/205
A 6 1 K 39/145 (2006.01)		A 6 1 K 39/145
A 6 1 K 39/17 (2006.01)		A 6 1 K 39/17
A 6 1 P 31/16 (2006.01)		A 6 1 P 31/16
A 6 1 P 31/14 (2006.01)		A 6 1 P 31/14
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12

(72)発明者 スミス, ゲイル
 アメリカ合衆国, メリーランド州 20850, ロックビル, ベルワード キャンパス ドライブ
 9920, ノバボックス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 リウ, イエ
 アメリカ合衆国, メリーランド州 20850, ロックビル, ベルワード キャンパス ドライブ
 9920, ノバボックス, インコーポレイテッド内

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第2009/153801(WO, A1)
 国際公開第2010/077717(WO, A1)
 UniProtKB, Last modified: January 1, 1988 - v1, Accession No.P08667, [検索日: 2015年10
 月22日], URL, <http://www.uniprot.org/uniprot/P08667>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00-90
 Caplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)