

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7555826号
(P7555826)

(45)発行日 令和6年9月25日(2024.9.25)

(24)登録日 令和6年9月13日(2024.9.13)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	G
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12	
A 6 1 K	39/21 (2006.01)	A 6 1 K	39/21	
A 6 1 K	39/215 (2006.01)	A 6 1 K	39/215	
A 6 1 K	39/29 (2006.01)	A 6 1 K	39/29	
請求項の数 37 (全54頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2020-568685(P2020-568685)	(73)特許権者	501244222	
(86)(22)出願日	令和1年6月13日(2019.6.13)		ザ スクリプス リサーチ インスティテ	
(65)公表番号	特表2021-527077(P2021-527077		ュート	
	A)		アメリカ合衆国9 2 0 3 7カリフォルニ	
(43)公表日	令和3年10月11日(2021.10.11)		ア州ラ・ホヤ、ノース・トーリー・パイ	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/036917		ンズ・ロード1 0 5 5 0	
(87)国際公開番号	WO2019/241483	(74)代理人	100114188	
(87)国際公開日	令和1年12月19日(2019.12.19)		弁理士 小野 誠	
審査請求日	令和4年6月10日(2022.6.10)	(74)代理人	100119253	
(31)優先権主張番号	62/684,229		弁理士 金山 賢教	
(32)優先日	平成30年6月13日(2018.6.13)	(74)代理人	100124855	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 坪倉 道明	
前置審査		(74)代理人	100129713	
			弁理士 重森 一輝	
		(74)代理人	100137213	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規構成成分を含有するナノ粒子ワクチン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

自己組織化ナノ粒子の表面上に提示されたポリペプチド免疫原を含むワクチン組成物であって、ロッキングドメインがナノ粒子の内部に包埋されており、自己組織化ナノ粒子のサブユニットに連結されており、ロッキングドメインが、配列番号1～9のいずれかが1つに示されているアミノ酸配列または保存的なアミノ酸置換を有するその変異体を含み、N末端からC末端へ方向にポリペプチド免疫原、自己組織化ナノ粒子のサブユニット及びロッキングドメインを含み、自己組織化ナノ粒子のサブユニットが、配列番号21（E2p）、配列番号22（I3-01）もしくは配列番号25（I3-01変異体）に示されているポリペプチドまたは保存的なアミノ酸置換を含むその変異体を含む、ワクチン組成物。

10

【請求項2】

ロッキングドメインがナノ粒子のサブユニットに共有結合している、請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項3】

ロッキングドメインのN末端がリンカー配列を介してナノ粒子サブユニットのC末端に融合している、請求項2記載のワクチン組成物。

【請求項4】

汎反応性T細胞エピトープを更に含む、請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項5】

20

T細胞エピトープのN末端がロッキングドメインのC末端に融合している、請求項4記載のワクチン組成物。

【請求項6】

ワクチン組成物が、免疫原とナノ粒子サブユニットとの間に挿入されたネック領域を更に含み、ネック領域が、ナノ粒子の表面から更に遠くへ免疫原を上昇させる3ヘリックスタンパク質ドメインを含む、請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項7】

ワクチン組成物が、免疫原とナノ粒子サブユニットとの間に挿入されたタンパク質ドメインを更に含み、タンパク質ドメインが免疫原ポリペプチドを安定化させる、請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項8】

ナノ粒子が、回転対称性を有する球形のナノ粒子である、請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項9】

回転対称性が3回軸および／または5回軸を有する、請求項8記載のワクチン組成物。

【請求項10】

ナノ粒子が二十面体構造のものである、請求項9記載のワクチン組成物。

【請求項11】

ポリペプチド免疫原がウイルス免疫原である、請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項12】

ポリペプチド免疫原が、クラスI融合メカニズムを利用するウイルスからのウイルス免疫原である、請求項11記載のワクチン組成物。

【請求項13】

ウイルスが、HIV-1ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、アレナウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)およびコロナウイルスからなる群から選択される、請求項12記載のワクチン組成物。

【請求項14】

ポリペプチド免疫原が、クラスII融合メカニズムを利用するウイルスからのウイルス免疫原である、請求項11記載のワクチン組成物。

【請求項15】

ウイルスがHCVまたはジカウイルスである、請求項14記載のワクチン組成物。

【請求項16】

ポリペプチド免疫原が非ウイルス免疫原である、請求項11記載のワクチン組成物。

【請求項17】

ポリペプチド免疫原が、熱帯熱マラリア原虫[プラスモジウム・ファルシパルム(*Plasmodium falciparum*)]由来の抗原、結核菌[マイコバクテリウム・ツベルクローシス(*Mycobacterium tuberculosis*)](TB)由来の抗原またはヒトタンパク質プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシシ9型(PCSK9)である、請求項16記載のワクチン組成物。

【請求項18】

ポリペプチド免疫原がHIV-1 Env由来三量体タンパク質である、請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項19】

ロッキングドメインのN末端が、GGGGS(配列番号17)のタンデムコピーの1以上を含むリンカー配列を介してナノ粒子サブユニットのC末端に融合している、請求項18記載のワクチン組成物。

【請求項20】

汎反応性T細胞エピトープを更に含む、請求項18記載のワクチン組成物。

【請求項21】

T細胞エピトープのN末端がロッキングドメインのC末端に融合している、請求項20

10

20

30

40

50

記載のワクチン組成物。

【請求項 2 2】

T細胞エпитープが配列 A K F V A A W T L K A A A（配列番号 1 8）を含む、請求項 2 0 記載のワクチン組成物。

【請求項 2 3】

H I V - 1 三量体タンパク質のサブユニットの C 末端がナノ粒子のサブユニットの N 末端に共有結合している、請求項 1 8 記載のワクチン組成物。

【請求項 2 4】

H I V - 1 三量体タンパク質サブユニットがリンカー配列を介してナノ粒子サブユニットに融合している、請求項 1 8 記載のワクチン組成物。

【請求項 2 5】

リンカー配列が配列 (G a S b) n（ここで、a は 1 ～ 5 の整数であり、b は 1 ～ 2 の整数であり、n は 1 ～ 5 の整数である）を含む、請求項 2 4 記載のワクチン組成物。

【請求項 2 6】

自己組織化ナノ粒子が三量体配列を含む、請求項 1 8 記載のワクチン組成物。

【請求項 2 7】

H I V - 1 E n v 由来三量体タンパク質が g p 1 4 0 に由来する、請求項 1 8 記載のワクチン組成物。

【請求項 2 8】

H I V - 1 E n v 由来三量体タンパク質が未切断融合前最適化 (U F O) g p 1 4 0 三量体である、請求項 1 8 記載のワクチン組成物。

【請求項 2 9】

U F O g p 1 4 0 三量体が、H I V - 1 株 B G 5 0 5 からの修飾 g p 4 1 E C T O ドメインを含むキメラ三量体である、請求項 2 8 記載のワクチン組成物。

【請求項 3 0】

U F O g p 1 4 0 三量体のサブユニットが、配列番号 2 3 に示されている配列または保存的なアミノ酸置換を含むその変異体を含む、請求項 2 8 記載のワクチン組成物。

【請求項 3 1】

配列番号 2 3 に示されている H I V - 1 E n v 由来 U F O g p 1 4 0 三量体サブユニット、配列番号 2 1 に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット (E 2 p)、配列番号 1 に示されているロッキングドメイン (L D 4) および T 細胞エпитープ A K F V A A W T L K A A A（配列番号 1 8）を、N 末端から C 末端へ方向に含むサブユニット配列を有する、請求項 2 8 記載のワクチン組成物。

【請求項 3 2】

g p 1 4 0 三量体サブユニットとナノ粒子サブユニットとの間の第 1 リンカー配列 (G G G S)₂（配列番号 2 4）、および／またはナノ粒子サブユニットとロッキングドメインとの間の第 2 リンカー配列 G G G G S（配列番号 1 7）を更に含む、請求項 3 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 3 3】

配列番号 2 3 に示されている H I V - 1 E n v 由来 U F O g p 1 4 0 三量体サブユニット、配列番号 2 2 または 2 5 に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット (I 3 - 0 1)、配列番号 2 に示されているロッキングドメイン (L D 7) および T 細胞エпитープ A K F V A A W T L K A A A（配列番号 1 8）を、N 末端から C 末端へ方向に含むサブユニット配列を有する、請求項 2 8 記載のワクチン組成物。

【請求項 3 4】

g p 1 4 0 三量体サブユニットとナノ粒子サブユニットとの間の第 1 リンカー配列 (G G G S)₂（配列番号 2 4）、および／またはナノ粒子サブユニットとロッキングドメインとの間の第 2 リンカー配列 G G G G S（配列番号 1 7）を更に含む、請求項 3 3 記載のワクチン組成物。

【請求項 3 5】

10

20

30

40

50

請求項 1 記載のワクチン組成物と薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 3 6】

N 末端の免疫原ポリペプチド、自己組織化ナノ粒子サブユニットおよびロッキングドメインのサブユニットを N 末端から C 末端の方向に含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、ロッキングドメインが、配列番号 1～9 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列または保存的なアミノ酸置換を含むその変異体の配列を含み、自己組織化ナノ粒子のサブユニットが、配列番号 2 1 (E 2 p)、配列番号 2 2 (I 3 - 0 1) もしくは配列番号 2 5 (I 3 - 0 1 変異体) に示されているポリペプチドまたは保存的なアミノ酸置換を含むその変異体を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 3 7】

H I V - 1 感染を治療または予防するための、請求項 1 8 記載のワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は新規構成成分を含有するナノ粒子ワクチンに関する。

【0 0 0 2】

関連出願に対する相互参照

本特許出願は米国仮特許出願第 6 2 / 6 8 4 , 2 2 9 号 (2 0 1 8 年 6 月 1 3 日付け出願 ; 現在係属中) に基づく優先権の利益を主張するものである。該優先権出願の全開示の全体をあらゆる目的で参照により本明細書に組み入れることとする。

【0 0 0 3】

米国政府の援助に関する陳述

本発明は、米国国立衛生研究所 (N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h) により授与された助成金番号 R 0 1 A I 1 2 9 6 9 8 - 0 2 および R 5 6 A I 1 2 5 0 7 8 - 0 1 に基づく米国政府の援助によりなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

ウイルスのような種々の病原体の感染に対処するためのワクチンの設計において相当な進歩がもたらされている。H I V - 1 ワクチン分野において最近確立された新規技術および合理的なワクチン設計戦略は他のウイルス病原体および非ウイルス性疾患標的に対するワクチン開発のための可能な解決策を提供する。合理的なワクチン設計戦略は、広域中和抗体 (b N A b) の特定、b N A b - 抗原複合体の構造解析、ならびに構造に基づく免疫原の設計および試験からなる。免疫原の設計に関しては、幾つかのウイルスのエンベロープ (E n v) タンパク質の安定化および再設計において、ならびにウイルス様粒子 (V L P) または類似形状のナノ粒子上の最適化 E n v タンパク質の多価提示において、飛躍的進歩が見られる。V L P は、そのサイズが大きく、表面抗原が高密度で提示されるため、強力な長期持続性の免疫応答を誘導しうる。V L P は、成功を収めた同族ウイルス用ワクチン (ヒトパピローマウイルスに対する G a r d a s i l (登録商標)) として、または外来抗原のための担体として開発されている。B 細胞活性化のための最適抗原間隔は、少なくとも 2 0 ~ 2 5 個のエピトープが 5 ~ 1 0 n m の間隔で隔てられたものであると決定されている。したがって、有効な V L P 型ワクチンの開発のために多様な抗原が提示されるように、V L P の分子特性 (球形、1 0 ~ 1 0 0 ナノメートルなど) を有する自己組織化 (s e l f - a s s e m b l i n g 、自己集合性) ナノ粒子が再設計されうる。

【0 0 0 5】

幾つかのウイルスに関する E n v タンパク質の安定化および再設計において、著しい進歩がもたらされている。例えば、b N A b および E n v の構造に関して蓄積された情報の豊富さゆえに、H I V - 1 ワクチンの研究は、現在、抗原の選択および評価に焦点を合わせている。B G 5 0 5 S O S I P . 6 6 4 g p 1 4 0 三量体からの有望な初期データに基づいて、望ましいワクチンプラットフォームとして天然様三量体が浮上している。s c

10

20

30

40

50

ー g p 1 4 0 および N F L のような他の g p 1 4 0 設計も天然様三量体を生成した。しかし、全てのこれらの設計は、非 B G 5 0 5 E n v に適用された場合、三量体の収量、純度および安定性の有意な低下を被り、天然様三量体を得るためには追加的な E n v 安定化突然変異および複雑な精製方法を要するであろう。E n v 準安定性の主要原因、すなわち、g p 4 1 外部ドメイン (g p 4 1 E C T O) における H R 1 ベンド (アミノ酸 5 4 7 ~ 5 6 9) が合理的再設計により特定され直接的に標的化されたのは最近のことである。得られた三量体構築物は「未切断融合前最適化 (u n c l e a v e d p r e f u s i o n - o p t i m i z e d) (U F O)」設計と称される。また、g p 4 1 E C T O が E n v 準安定性の唯一の原因であること、ならびに U F O 設計の B G 5 0 5 g p 4 1 E C T O を使用して、相当な三量体収量、純度および安定性で多様な H I V - 1 亜型を安定化させて、三量体に基づく H I V - 1 ワクチン設計のための簡便で一般的で有効な戦略がもたらされることが実証されたのも、最近のことである。

【0006】

また、特に個々の抗原に関して観察された低い免疫原性を考慮して、ワクチン候補としての E n v 抗原を提示するための自己組織化ナノ粒子の使用においても、著しい進歩がもたらされている。例えば、野生型 (W T) マウス、ヒト I g ノックインマウス、ウサギおよび非ヒト霊長類 (N H P) における S O S I P および N F L に関して、H I V - 1 三量体の免疫原性が試験されており、ウサギおよび N H P においては自己ティア 2 N A b 応答が観察されたが、W T マウスにおいては観察されなかった。そのようなティア 2 N A b 応答の誘導は 6 ~ 1 2 か月の免疫化を要することが多く、このことは、可溶性三量体が最適ワクチン形態ではない可能性があることを示唆している。一貫して、より最近の研究は、固有の安定性および純度を有する U F O 三量体が、高収量かつ高純度で、2 4 量体フェリチン (F R)、6 0 量体 E 2 p および 6 0 量体 I 3 - 0 1 を含む 3 つのナノ粒子上で提示されうること示した。He ら, N a t . C o m m u n . 7 : 1 2 0 4 1 , 2 0 1 6 を参照されたい。そのようなナノ粒子は、8 週間後にマウスにおいて、顕著なティア 2 H I V - 1 中和抗体応答を初めて誘導したが、全ての可溶性三量体は誘導できなかった。そのようなナノ粒子の 1 つは、6 週間後にウサギにおいて、顕著なティア 2 H I V - 1 中和抗体応答を誘導したが、可溶性三量体は、そのような応答を生成するためには更に 8 週間 (第 1 4 週) を要した。He ら, S c i . A d v . 4 (1 1) : e a a u 6 7 6 9 , 2 0 1 8 を参照されたい。

【0007】

ワクチン設計における相当な進歩にもかかわらず、例えば種々のウイルス病原体または非ウイルス病原体の感染 (例えば、H I V - 1 感染) を予防するために、より有効かつ強力なワクチン免疫原が医学分野において尚も必要とされている。本発明は当技術分野における未だ満たされていない要求に対処するものである。

【発明の概要】

【0008】

発明の概括

1 つの態様においては、本発明は、(1) 自己組織化ナノ粒子の表面上に提示されたポリペプチド免疫原と、(2) ナノ粒子の内部に包埋され、自己組織化ナノ粒子のサブユニットに連結されたロッキング (l o c k i n g) ドメインとを含有するワクチン組成物を提供する。これらのワクチン組成物においては、ロッキングドメインは、界面における非共有相互作用により溶液中の近くのナノ粒子サブユニットに結合した別のロッキングドメインと二量体を自然に形成しうるタンパク質サブユニットである。幾つかの実施形態においては、使用されるロッキングドメインは、別の同一タンパク質ドメインまたはサブユニットとホモ二量体を形成するタンパク質ドメインまたはサブユニットである。これらの実施形態の幾つかにおいては、使用されるロッキングドメインのサブユニットは、配列番号 1 ~ 9 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列、それらの保存的修飾変異体または実質的に同一の配列を有する。

【0009】

本発明の幾つかのワクチン組成物においては、ロッキングドメインはナノ粒子のサブユニットに共有結合している。これらの実施形態の幾つかにおいては、ロッキングドメインのN末端はリンカー配列を介してナノ粒子サブユニットのC末端に融合している。本発明の幾つかのワクチン組成物は汎反応性T細胞エピトープを更に含有しうる。これらの実施形態の幾つかにおいては、T細胞エピトープのN末端はロッキングドメインのC末端に融合している。本発明の幾つかのワクチン組成物は、免疫原とナノ粒子サブユニットとの間に挿入されたネック（neck）領域を更に含有しうる。これらの実施形態においては、ネック領域は、ナノ粒子の表面から更に遠くへ免疫原を上昇させる3ヘリックスタンパク質ドメインでありうる。ナノ粒子を内部から安定化させるロッキングドメインに加えて、本発明の幾つかのワクチン組成物は、免疫原ポリペプチドを更に安定化させるための、免疫原とナノ粒子サブユニットとの間に挿入されたタンパク質ドメインを更に含有しうる。幾つかの好ましい実施形態においては、本発明のワクチン組成物を構築するために利用されるナノ粒子は、回転対称性を有する球形のナノ粒子である。これらの実施形態の幾つかにおいては、回転対称性は3回対称軸および／または5回対称軸を有する。これらの実施形態の幾つかにおいては、使用されるナノ粒子は二十面体構造のものである。

【0010】

本発明の幾つかのワクチン組成物においては、ナノ粒子上に提示されたポリペプチド免疫原はウイルス免疫原である。これらの実施形態の幾つかにおいては、提示ポリペプチド免疫原は、クラスI融合メカニズムを利用するウイルスからのウイルス免疫原である。例えば、免疫原はHIV-1ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、アレナウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）およびコロナウイルスに由来しうる。幾つかの他の実施形態においては、提示ポリペプチド免疫原は、クラスII融合メカニズムを利用するウイルスからのウイルス免疫原である。例えば、免疫原はHCVまたはジカウイルスに由来しうる。更に幾つかの他の実施形態においては、提示ポリペプチド免疫原は非ウイルス免疫原である。例えば、提示免疫原は、熱帯熱マラリア原虫〔プラスモジウム・ファルシパルム（*Plasmodium falciparum*）〕由来の抗原、結核菌〔マイコバクテリウム・ツベルクローシス（*Mycobacterium tuberculosis*）〕（TB）由来の抗原またはヒトタンパク質プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシシン9型（PCSK9）でありうる。

【0011】

本発明の幾つかのワクチン組成物は、HIV-1 Env由来三量体タンパク質を提示するHIV-1ワクチンである。これらの実施形態の幾つかにおいては、ロッキングドメインのN末端は、GGGGS（配列番号17）のタンデムコピーの1以上を含有するリンカー配列を介してナノ粒子サブユニットのC末端に融合している。幾つかの実施形態においては、ワクチン組成物は汎反応性T細胞エピトープを更に含有しうる。これらの実施形態の幾つかにおいては、T細胞エピトープのN末端はロッキングドメインのC末端に融合している。これらの実施形態の幾つかにおいては、T細胞エピトープは配列AKFVAAWTLKAAA（配列番号18）を有する。幾つかの実施形態においては、HIV-1三量体タンパク質のサブユニットのC末端はナノ粒子のサブユニットのN末端に共有結合している。幾つかの実施形態においては、HIV-1三量体タンパク質サブユニットはリンカー配列を介してナノ粒子サブユニットに融合している。種々の実施形態においては、使用されるリンカー配列は配列（GASb）_n（ここで、aは1～5の整数であり、bは1～2の整数であり、nは1～5の整数である）を有しうる。

【0012】

本発明の幾つかのワクチン組成物においては、自己組織化ナノ粒子は、三量体を構成する三量体配列を有する。これらの実施形態の幾つかにおいては、自己組織化ナノ粒子のサブユニットは、配列番号26（フェリチン）、配列番号21（E2p）、配列番号22（I3-01）または配列番号25（I3-01変異体）に示される配列、それらの保存的修飾変異体または実質的に同一の配列を有するポリペプチドである。幾つかのHIV-1ワクチン組成物においては、提示HIV-1 Env由来三量体タンパク質はgp140

に由来する。幾つかの実施形態においては、H I V - 1 E n v由来三量体タンパク質は未切断融合前最適化 (U F O) g p 1 4 0三量体である。これらの実施形態の幾つかにおいては、U F O g p 1 4 0三量体は、H I V - 1株B G 5 0 5からの修飾g p 4 1 E C T oドメインを含有するキメラ三量体である。幾つかの実施形態においては、U F O g p 1 4 0三量体のサブユニットは、配列番号23に示されているアミノ酸配列、その保存的修飾変異体または実質的に同一の配列を有する。

【0013】

幾つかの特定のH I V - 1ワクチン組成物は、N末端からC末端への方に以下のものを含有するサブユニット配列から構成される：配列番号23に示されているH I V - 1 E n v由来U F O g p 1 4 0三量体サブユニット、配列番号21 (E 2 p) に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット、配列番号1 (L D 4) に示されているロッキングドメイン、およびT細胞エпитープA K F V A A W T L K A A A (配列番号18)。これらの実施形態の幾つかにおいては、サブユニット配列は、g p 1 4 0三量体サブユニットとナノ粒子サブユニットとの間の第1リンカー配列 (G G G G S) ₂ (配列番号24)、および／またはナノ粒子サブユニットとロッキングドメインとの間の第2リンカー配列G G G G S (配列番号17) を更に含有しうる。幾つかの他の特定のH I V - 1ワクチン組成物は、N末端からC末端への方に以下のものを含有するサブユニット配列から構成される：配列番号23に示されているH I V - 1 E n v由来U F O g p 1 4 0三量体サブユニット、配列番号22または25 (I 3 - 0 1) に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット、配列番号2 (L D 7) に示されているロッキングドメイン、およびT細胞エ

【0014】

関連態様においては、本発明は、本明細書に記載されているワクチン組成物を含有する医薬組成物を提供する。該医薬組成物は、典型的には、薬学的に許容される担体をも含有する。幾つかの実施形態においては、該医薬組成物はアジュバントをも含有しうる。

【0015】

もう1つの態様においては、本発明は、N末端の免疫原ポリペプチド、自己組織化ナノ粒子サブユニットおよびロッキングドメインのサブユニットを含有する融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。融合タンパク質におけるロッキングドメインは、界面における非共有相互作用により溶液中の近くのナノ粒子サブユニットに結合した別のロッキングドメインと二量体を自然に形成しうるタンパク質サブユニットである。本発明の幾つかのポリヌクレオチドにおいては、コードされる融合タンパク質におけるロッキングドメインは、別の同一タンパク質サブユニットとホモ二量体を形成するタンパク質サブユニットである。幾つかの実施形態においては、コードされる融合タンパク質における免疫原ポリペプチドはナノ粒子サブユニットのN末端に融合している。幾つかの実施形態においては、コードされる融合タンパク質における免疫原ポリペプチドは多量体タンパク質のサブユニットである。幾つかの実施形態においては、コードされる融合タンパク質におけるロッキングドメインはナノ粒子サブユニットのC末端に位置する。幾つかの実施形態においては、コードされる融合タンパク質はC末端にT細胞エпитープを更に含有する。幾つかの実施形態においては、コードされる融合タンパク質における免疫原ポリペプチドはH I V - 1 E n v由来三量体タンパク質のサブユニットである。これらの実施形態の幾つかにおいては、コードされる融合タンパク質は該タンパク質の異なる成分の間に1以上のリンカー配列を更に含有しうる。これらの実施形態の幾つかにおいては、コードされる融合タンパク質は、免疫原ポリペプチドとナノ粒子サブユニットとの間の第1リンカー配列、および／またはナノ粒子サブユニットとロッキングドメインとの間の第2リンカー配列を含有しうる。種々の実施形態においては、使用されるリンカー配列は、それぞれ

独立して、 $(G a S b)_n$ （ここで、 a は1～4の整数であり、 b は1～2の整数であり、 n は1～6の整数である）の配列を有しうる。

【0016】

本発明の幾つかの特定のポリヌクレオチドは、本明細書に記載されているHIV-1ポリペプチドワクチン組成物をコードしている。これらの実施形態の幾つかにおいては、コードされる融合タンパク質はN末端からC末端へ方向に以下のものを含有する：配列番号23に示されているUFO gp140三量体サブユニット、配列番号21（E2p）に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット、およびT細胞エпитープAKFVAAWTLKAAA（配列番号18）。幾つかの実施形態においては、コードされる融合ポリペプチドは、gp140三量体サブユニットとナノ粒子サブユニットとの間の第1リンカー配列（GGGGS）₂（配列番号24）、および／またはナノ粒子サブユニットとロッキングドメインとの間の第2リンカー配列GGGGS（配列番号17）を更に含有しうる。幾つかの他の実施形態においては、コードされる融合タンパク質はN末端からC末端へ方向に以下のものを含有する：配列番号23に示されているUFO gp140三量体サブユニット、配列番号22または25（I3-01）に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット、配列番号2（LD7）に示されているロッキングドメイン、およびT細胞エпитープAKFVAAWTLKAAA（配列番号18）。幾つかの実施形態においては、コードされる融合ポリペプチドは、gp140三量体サブユニットとナノ粒子サブユニットとの間の第1リンカー配列（GGGGS）₂（配列番号24）、および／またはナノ粒子サブユニットとロッキングドメインとの間の第2リンカー配列GGGGS（配列番号17）を更に含有しうる。

【0017】

幾つかの関連実施形態においては、本発明は、本明細書に記載されているポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを提供する。幾つかの関連実施形態においては、本発明は、本明細書に記載されているポリヌクレオチドの1以上を含有するベクターを提供する。幾つかの他の関連実施形態においては、本発明は、本明細書に記載されているポリヌクレオチドまたはベクターの1以上を含有する医薬組成物を提供する。

【0018】

もう1つの態様においては、本発明は、対象におけるHIV-1感染の治療または予防方法を提供する。これらの方法は、本明細書に記載されているHIV-1ポリペプチドワクチン組成物の治療的有効量を含有する医薬組成物を対象に投与することを含む。これらの実施形態の幾つかにおいては、投与されるHIV-1ワクチン組成物はN末端からC末端へ方向に以下のものを含有する：配列番号23に示されているUFO gp140三量体サブユニット、配列番号21（E2p）に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット、配列番号1（LD4）に示されているロッキングドメイン、およびT細胞エпитープAKFVAAWTLKAAA（配列番号18）。幾つかの他の実施形態においては、投与されるHIV-1ワクチン組成物はN末端からC末端へ方向に以下のものを含有する：配列番号23に示されているUFO gp140三量体サブユニット、配列番号22または25（I3-01）に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット、配列番号2（LD7）に示されているロッキングドメイン、およびT細胞エпитープAKFVAAWTLKAAA（配列番号18）。幾つかの関連実施形態においては、本発明は、本明細書に記載されているポリヌクレオチドまたは発現ベクターの治療的有効量を含有する医薬組成物を対象に投与することによる、対象におけるHIV-1感染の治療または予防方法を提供する。これらの実施形態の幾つかにおいては、投与されるポリヌクレオチドまたはベクターは、N末端からC末端へ方向に以下のものを含有する融合タンパク質をコードしている：配列番号23に示されているUFO gp140三量体サブユニット、配列番号21（E2p）に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット、配列番号1（LD4）に示されているロッキングドメイン、およびT細胞エпитープAKFVAAWTLKAAA（配列番号18）。幾つかの他の実施形態においては、投与されるポリヌクレオチドまたはベクターは、N末端からC末端へ方向に以下のものを含有する融合タンパク質をコー

ドしている：配列番号 23 に示されている UFO gp140 三量体サブユニット、配列番号 22 または 25 (I3-01) に示されている自己組織化ナノ粒子サブユニット、配列番号 2 (LD7) に示されているロッキングドメイン、および T 細胞エпитープ AKFVAAWTLKAAA (配列番号 18)。

【0019】

本発明の性質および利点の更なる理解は、本明細書の残りの部分および特許請求の範囲を参照することにより実現されうる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図 1】図 1 は HIV-1 UFO gp140 ナノ粒子ワクチンの構造を示す。

10

【図 2】図 2 は、本明細書に記載されているロッキングドメイン安定化 HIV-1 ナノ粒子免疫原の一例を発現する CMV ベクターの構造を図示する。

【図 3】図 3 は幾つかのアッセイによる CHO/Exp CHO 産生ナノ粒子タンパク質の品質評価の結果を示す。

【図 4】図 4 は 2 つのロッキングドメイン安定化 HIV-1 ナノ粒子免疫原の抗原および構造分析のインビトロ評価を示す。

【図 5】図 5 はマウスおよびウサギにおける 2 つの例示ロッキングドメイン安定化 HIV-1 ナノ粒子免疫原の免疫原性活性のインビボ研究を示す。

【図 6】図 6 は、種々のロッキングドメインで安定化された HIV-1 ナノ粒子免疫原の構築物設計、ならびに Exp CHO 細胞において一過性に発現されたワクチン免疫原の収量および純度を示すサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) プロファイルを示す。

20

【図 7】図 7 は、種々のロッキングドメインで安定化された HIV-1 ナノ粒子免疫原のブルー・ネイティブ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE) 分析、および幾つかの良好に形成されたナノ粒子のネガティブ染色電子顕微鏡 (EM) イメージを示す。

【図 8】図 8 は、分子モデル、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) およびエボラ GPΔMuc 三量体提示ナノ粒子のネガティブ染色 EM イメージ、ならびにそれに続く設計概念および分子モデル、生化学的および生物物理学的分析、例えば SEC およびブルー・ネイティブ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE)、および抗原性の特徴づけ、例えば種々のロッキングドメインを含有するエボラ GPΔMuc 三量体提示ナノ粒子に関する ELISA を示す。E2p と組合された LD1-LD7 に関する、および I3-01 と組合された LD4-LD9 に関する SEC プロファイルを示し、これらは全て、エボラ GPΔMuc-UFOg 三量体を提示している。

30

【図 9】図 9 は、ラッサウイルス (LASV) GPC 三量体提示ナノ粒子の分子モデル、ならびに 24 量体フェリチンナノ粒子および 60 量体 E2p ナノ粒子 (ロッキングドメイン LD4 および T 細胞エпитープ PADRE を含有するもの) における GPC 三量体のネガティブ染色 EM イメージを示す。

【図 10】図 10 はヒト呼吸器合抱体ウイルス (hRSV) F 三量体提示ナノ粒子の分子モデル、ならびに 24 量体フェリチンナノ粒子、60 量体 E2p ナノ粒子 (ロッキングドメイン LD4 および T 細胞エпитープ PADRE を含有するもの) および 60 量体 I3-01 ナノ粒子 (ロッキングドメイン LD7 および PADRE を含有するもの) における hRSV F 三量体のネガティブ染色 EM イメージを示す。

40

【図 11】図 11 は MERS コロナウイルス S 三量体提示ナノ粒子の分子モデル、ならびに 24 量体フェリチンナノ粒子、60 量体 E2p ナノ粒子 (ロッキングドメイン LD4 および T 細胞エпитープ PADRE を含有するもの) および 60 量体 I3-01 ナノ粒子 (ロッキングドメイン LD7 および PADRE を含有するもの) における MERS コロナウイルス S 三量体パイクのネガティブ染色 EM イメージを示す。

【図 12】図 12 はワクチン概念、分子モデル、生化学的および生物物理学的分析、例えばサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、ブルー・ネイティブ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE) ならびにネガティブ染色 EM イメージ、ならびに抗原の特徴づけ、例えば C 型肝炎ウイルス (HCV) 糖タンパク質 E2 コア提示ナノ粒子 (ロッ

50

キングドメインを含有するもの及び含有しないもの) に対するE L I S A結合を示す。

【図13】図13はジカウイルス(Z I K V) D I E E-10GS-I3-01ナノ粒子の分子モデル、ならびにそれに続く生化学的および生物物理学の特徴づけ、例えばサイズ排除クロマトグラフィー(S E C)、ブルー・ネイティブ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(B N-P A G E)、および24量体フェリチンナノ粒子、60量体E2pナノ粒子および60量体I3-01ナノ粒子(ロッキングドメインLD7およびT細胞エпитープP A D R Eを含有するもの)上に提示されたD I E Eドメインに関するネガティブ染色E M分析を示す。

【図14】図14は、熱帯熱マラリア原虫(P. f a l c i p a r u m) (マラリア) 抗原P f s 25およびそれと公知中和抗体との複合体の構造、ネックドメインを含有するP f s 25ナノ粒子の設計概念、ならびに24量体フェリチンナノ粒子、60量体E2pナノ粒子(ロッキングドメインLD4およびT細胞エпитープP A D R Eを含有するもの)および60量体I3-01(ロッキングドメインLD7およびP A D R Eを含有するもの)(全て、P f s 25とナノ粒子との間に挿入されたネックドメインを含有する)におけるP f s 25のネガティブ染色E Mイメージを示す。

【図15】図15は、熱帯熱マラリア原虫(マラリア) 抗原スプロゾイト周囲タンパク質(C S P)の組成概要、G S K R T S, Sワクチンの組成概要、C S Pに基づくナノ粒子ワクチンを設計するための段階的戦略、60量体フェリチンおよび60量体I3-01ナノ粒子(ロッキングドメインLD7およびT細胞エпитープP A D R Eを含有するもの)における抗原C S Pの種々の成分のネガティブ染色E Mイメージ、ならびにサイズ排除クロマトグラフィー(S E C)プロファイルを示す。

【図16】図16はプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシシ9型(P C S K 9)の構造、ネックドメインを含有するP C S K 9ナノ粒子の設計概念、ならびに24量体フェリチンナノ粒子および60量体I3-01ナノ粒子(ロッキングドメインLD7およびT細胞エпитープP A D R Eを含有するもの)(全て、P C S K 9とナノ粒子との間に挿入されたネックドメインを含有する)におけるネガティブ染色E Mイメージを示す。

【0021】

詳細な説明

I. 概要

本発明は、部分的には、種々のウイルス性または非ウイルス性標的(例えば、H I V-1 E n v、エボラG P、H C V E 2タンパク質または結核菌抗原)に対する新規ワクチン免疫原の、ならびに安定性および活性の改善を示すナノ粒子提示免疫原(すなわち、ワクチン組成物)の、本発明者らの開発に基づく。典型的には、本発明のワクチンまたはワクチン組成物は、自己組織化ナノ粒子またはウイルス様粒子(V L P)上に提示された免疫原ポリペプチドまたはタンパク質(例えば、H I V-1 E n v由来三量体タンパク質)を含有する。ナノ粒子ワクチンは、本明細書に記載されている1以上の新規構成成分をも含有する。これらの追加的構成成分は、ナノ粒子の表面上の免疫原の提示を促進させるように、および/または提示免疫原の安定性を増強するように、および/または自己組織化タンパク質ワクチンの収量および純度を改善するように機能する。幾つかの実施形態においては、本発明のナノ粒子ワクチンは、ナノ粒子を安定化させるロッキングドメインを含有する。本明細書の実施例に詳細に記載されているとおり、ロッキングドメインはナノ粒子を内部から安定化させ、その結果、免疫原ポリペプチド(例えば、H I V-1 E n v由来三量体タンパク質)を提示するナノ粒子は製造、ワクチン製剤化および免疫化において無傷のままとなりうる。このようにして構築された新規ワクチン免疫原は、有意に増強した安定性を有する。また、ロッキングメカニズムはナノ粒子プラットフォームには左右されない。本明細書に例示されているとおり(例えば、H I V-1 ワクチン)、それは、異なるナノ粒子、例えば60量体I3-01およびE2pナノ粒子に適用可能であり、S E C、B N-P A G E、D S C、ネガティブ染色E Mおよび抗原プロファイリングにより示されるとおり、ほぼ同じ結果をもたらす。

【0022】

ワクチンをコードする構築物は、ロッキングドメイン以外に、追加的または代替的に、種々の他の構造成分を含有しうる。例えば、T4フィブリチンの三量体化モチーフ（「フォールドン」）のように、免疫原ポリペプチドを安定化させるのに役立つ、または3ヘリックスバンドル（「ネックドメイン」）のように、ナノ粒子表面から免疫原ポリペプチドを上昇させるのに役立つ、または既知結合抗体を含有するタンパク質ドメインのように、免疫親和性精製を促進させるのに役立つタンパク質ドメインのコード配列が、免疫原ポリペプチド配列とナノ粒子サブユニット配列との間に付加されうる。化学的コンジュゲート化のための活性部位として働くポリペプチド断片またはモチーフのコード配列が、適切な位置において、構築物内に挿入されうる。CD4+ TヘルパーエпитープまたはCD8+ T細胞エпитープのような追加的構造成分も、本明細書に記載されているとおり、適切な位置において構築物内に挿入されうる。本明細書に例示されているとおり、構築物における種々の構造成分を連結するために、1以上のリンカー（リンカー配列、モチーフまたは部分）が使用されうる。

【0023】

本明細書に詳細に記載されているとおり、本発明のワクチン組成物は、本明細書に記載されている構造成分の機能的に連結されたコード配列を含有する構築物から発現され、自己組織化される。該構築物においては、免疫原ポリペプチドをコードする配列は、そのC末端において、ナノ粒子サブユニットをコードする配列のN末端に直接的または間接的に融合している。その他の構造成分をコードする配列は、本明細書に記載されている適切な位置において構築物内に挿入される。例えば、ロッキングドメインが使用される場合、ロッキングドメインをコードする配列は、ナノ粒子サブユニットをコードする配列のC末端に直接的または間接的に融合されうる。

【0024】

本明細書に例示されているナノ粒子ワクチン構築物は、天然様抗原構造が表面上に提示されていて、高い収量、高い純度および高い安定性を示し、天然様抗原プロファイルを向上させ、動物における免疫原性を増強した。例えば、HIV-1ナノ粒子ワクチンは野生型マウスおよびウサギにおいて6～8週以内にティア2自己中和抗体応答を誘導したが、可溶性三量体は単独でマウスにおいてティア2中和抗体を全く誘導できず、抗体誘導には少なくとも2～3か月を要した。したがって、本発明の改善されたHIV-1ワクチン免疫原は、ワクチン製造に、より適しており、ワクチン接種において、より良好な免疫応答を可能にする。

【0025】

本明細書中に特に示されていない限り、本発明のワクチン免疫原、コード化ポリヌクレオチド、発現ベクターおよび宿主細胞ならびに関連治療用途は全て、本明細書に例示されている方法または当技術分野でよく知られている常套的に実施されている方法に従い作製され、実施されうる。例えば、以下のものを参照されたい：Methods in Enzymology, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis, J. N. Abelson, M. I. Simon, G. B. Fields (編), Academic Press; 1st edition (1997) (ISBN-13: 978-0121821906); 米国特許第4,965,343号および第5,849,954号; Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N. Y., (3rd ed., 2000); Brentら, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou編, 2003); Davisら, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); または Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152, S. L. Berger and A. R. Kimmerl編, Academic Press Inc., San Diego

10

20

30

40

50

, USA (1987); Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coliganら編, John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacinoら編, John Wiley and Sons, Inc.)、および Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Matherおよび David Barnes編, Academic Press, 1st edition, 1998)。以下の節は、本発明の組成物および方法を実施するための追加的な指針を提供する。

10

【0026】

II. 定義

特に示されていない限り、本明細書中で用いられる全ての科学技術用語は、本発明が関連する当業者に一般的に理解されているのと同じ意味を有する。以下の参考文献は、本発明で用いられる用語の多くの一般的定義を当業者に示すものである: Academic Press Dictionary of Science and Technology, Morris (編), Academic Press (1st ed., 1992); Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smithら (編), Oxford University Press (revised ed., 2000); Encyclopaedic Dictionary of Chemistry, Kumar (編), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singletonら (編), John Wiley & Sons (3rd ed., 2002); Dictionary of Chemistry, Hunt (編), Routledge (1st ed., 1999); Dictionary of Pharmaceutical Medicine, Nahler (編), Springer-Verlag Telos (1994); Dictionary of Organic Chemistry, Kumarおよび Anandand (編), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); ならびに A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martinおよび Hine (編), Oxford University Press (4th ed., 2000)。これらの用語が本発明に具体的に適用される場合のこれらの用語の幾つかの更なる説明が本明細書に示されている。

20

30

【0027】

本明細書中で用いる単数形は、文脈に明らかに矛盾しない限り、単数形および複数形の両方を意味する。例えば、「Env由来三量体」は単一または複数の両方のEnv由来三量体分子を意味することが可能であり、「少なくとも1つのEnv由来三量体」なる表現と同等であると見なされうる。

40

【0028】

本明細書中で用いる「抗原」または「免疫原」なる語は、対象において免疫応答を誘導しうる物質、典型的にはタンパク質を意味するものとして互換的に用いられる。この用語はまた、(対象に直接的に投与することにより、または該タンパク質をコードするヌクレオチド配列またはベクターを対象に投与することにより) 対象に投与すると、そのタンパク質に対する体液性および／または細胞性免疫応答を誘導しうる点で免疫学的に活性なタンパク質をも意味する。特に示されていない限り、「ワクチン免疫原」なる語は「タンパク質抗原」または「免疫原ポリペプチド」と互換的に用いられる。

【0029】

50

「保存的修飾変異体」なる語はアミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。個々の核酸配列に関して、保存的修飾変異体は、同一または実質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を意味し、あるいは核酸がアミノ酸配列をコードしていない場合には、実質的に同一の配列を意味する。遺伝暗号の縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が任意の所与タンパク質をコードする。ポリペプチド配列の場合には、「保存的修飾変異体」は、保存的なアミノ酸置換を有する変異体を意味し、この場合、アミノ酸残基は、類似電荷を有する側鎖を有する他のアミノ酸残基により置換されている。類似電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野において定められている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、無極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。

10

【0030】

エピトープは抗原決定基を意味する。これらは、特異的免疫応答を誘導するように抗原性である、分子上の特定の化学基またはペプチド配列であり、例えば、エピトープは、B細胞および／またはT細胞が応答する抗原領域である。エピトープは、連続的アミノ酸、またはタンパク質の三次フォールディングにより並置された不連続的アミノ酸の両方から形成されうる。

20

【0031】

ワクチンまたは他の物質の有効量は、所望の応答、例えば、エイズのような病態または疾患の徴候または症状の低減または排除をもたらすのに十分な量である。例えば、これは、ウイルス複製を抑制するのに、またはHIV-1感染の場合のT細胞数の増加のようなウイルス感染の表面的症状を、測定可能な様態で変化させるのに必要な量でありうる。一般に、この量は、ウイルス（例えば、HIV）の複製または感染性を、測定可能な様態で抑制するのに十分である。対象に投与される場合、ウイルス複製のインビトロ抑制を達成することが示されている目標組織濃度（例えば、リンパ球におけるもの）を達成する投与量が一般に使用される。幾つかの実施形態においては、「有効量」は、例えばHIV-1感染を治療するために、障害または疾患のいずれかの1以上の症状および／または根本原因を治療（予防を含む）する量である。幾つかの実施形態においては、有効量は治療の有効量である。幾つかの実施形態においては、有効量は、特定の疾患または病態の徴候または症状の1以上、例えば、エイズに関連する徴候または症状の1以上の発生を予防する量である。

30

【0032】

本明細書中で用いる融合タンパク質は、単一タンパク質を生成するようにペプチド結合を介して互いに連結された少なくとも2つの無関係なタンパク質からの組換えタンパク質含有アミノ酸配列である。無関係なアミノ酸配列は互いに直接的に連結可能であり、あるいはそれらは、リンカー配列を使用して連結可能である。本明細書中で用いるタンパク質が無関係であると言えるのは、それらのアミノ酸配列がそれらの天然環境（例えば、細胞内）においてペプチド結合を介して互いに連結されたものとしては通常見出されない場合である。例えば、ビー・ステアロサーモフィルス（*B. stearothermophilus*）ジヒドロリポイルアシルトランスフェラーゼ（E2p）のような細菌酵素のアミノ酸配列、およびHIV-1 gp120またはgp41糖タンパク質のアミノ酸配列は、ペプチド結合を介して互いに連結されたものとしては通常見出されない。

40

【0033】

ヘプタッド反復（7アミノ酸繰り返し）（HR）は、7個のアミノ酸：a b c d e f g H P H C P C [ここで、Hは疎水性残基を表し、Cは典型的には荷電残基を表し、Pは極

50

性（したがって親水性）残基を表す]の反復パターンからなる構造モチーフを意味する。

【0034】

HIV-1エンベロープタンパク質（env）は、最初は、gp160と称される、845～870アミノ酸のサイズの、より長い前駆体タンパク質として合成される。gp160はホモ三量体を形成し、ゴルジ装置内でグリコシル化を受ける。インビボでは、gp160糖タンパク質はエンドタンパク質分解的にプロセッシングされて成熟エンベロープ糖タンパク質gp120およびgp41となり、これらはウイルス表面上で複合体として互いに非共有結合する。gp120表面タンパク質は、HIVの主要受容体であるヒトCD4に対する高親和性結合部位、ならびにケモカイン受容体CCR5およびCXCR4のような融合補助受容体と相互作用するドメインを含有する。gp41タンパク質はウイルス膜にわたって広がり、そのアミノ末端に、ウイルス膜と細胞膜との融合に重要なアミノ酸の配列を含有する。HIV-1エンベロープ糖タンパク質複合体の天然融合可能形態は、3つのgp120サブユニットおよび3つのgp41サブユニットから構成される三量体構造である。受容体結合（CD4および補助受容体）部位はgp120部分に存在し、一方、融合ペプチドはgp41成分に位置する。野生型gp160ポリペプチドの例示的配列は、GenBankにおいて、例えばアクセッション番号AAB05604およびAAD12142として示されている。

10

【0035】

gp140は、gp120および全gp41外部ドメインの全てを含有するHIVエンベロープタンパク質のオリゴマー形態を意味する。本明細書中で用いるHIV-1 gp140三量体免疫原は、典型的には、gp140ドメインおよびgp140の修飾または再設計外部ドメイン（gp41_{ECTO}）を含有する。

20

【0036】

gp120はヒト免疫不全ウイルス（HIV）のエンベロープタンパク質である。gp120はHIVエンベロープ糖タンパク質複合体の外部表面露出ドメインの大部分を含有し、細胞CD4受容体と細胞ケモカイン受容体（例えば、CCR5）との両方に結合するのはgp120である。成熟gp120野生型ポリペプチドは一次配列において約500アミノ酸を有する。gp120は高度にN-グリコシル化されていて、120kDの見掛け分子量を有する。該ポリペプチドは、5つの保存領域（C1～C5）と、高可変性の5つの領域（V1～V5）とから構成される。その三次構造においては、gp120糖タンパク質は3つの主要構造ドメイン（外部ドメイン、内部ドメインおよび架橋シート）と可変ループとから構成される。例えば、Wyattら、Nature 393, 705-711, 1998；およびKwongら、Nature 393, 649-59, 1998を参照されたい。内部ドメインはgp41エンベロープ糖タンパク質と相互作用すると考えられており、一方、外部ドメインは構築エンベロープ糖タンパク質三量体上に露出している。

30

【0037】

gp120の可変領域1および可変領域2（V1/V2ドメイン）は、HIV-1の最高可変性部分の2つ（V1ループおよびV2ループ）を含有する約50～90個の残基から構成され、V1/V2ドメインの残基の10個中1個はN-グリコシル化されている。

40

【0038】

gp41の前駆体HIVエンベロープタンパク質のタンパク質分解産物である。それはN末端融合ペプチド（FP）、膜貫通ドメイン、および融合ペプチドと膜貫通ドメインとを連結する外部ドメインを含有する。gp41は三量体形態のままであり、gp120と非共有結合的に相互作用する。例示的なgp41のアミノ酸配列がGenBankのアクセッション番号CAD20975に記載されている。

【0039】

BG505 SOSIP.664 gp140は、クレードA株BG505からのgp140三量体を使用して開発されたHIV-1 Env免疫原である。それは、切断されたgp120とgp41_{ECTO}との間に、操作されたジスルフィド結合（SOSと称される

50

）による共有結合を含有する。また、それは、g p 4 1の融合後コンホメーションを不安定化させるI 5 5 9 P突然変異（I Pと称される）、そしてまた、可溶性を改善するための、残基6 6 4における膜近位外部領域（M P E R）のトランケーションを有する。このH I V - 1免疫原は優れた抗原プロファイルと、天然スパイクの優れた構造模倣性とを有する。S O S I P三量体を選別プローブとして使用して、新規b N A bが特定され、特徴づけされている。S O S I P設計は他のH I V - 1株にも拡張されており、追加的な安定化突然変異の組み込みを可能にしている。最近、ウサギおよび非ヒト霊長類におけるS O S I P三量体の免疫原性が報告され、ヒトワクチン試験への道が開かれた。

【0040】

免疫原は、病原体に感染した哺乳動物またはそのリスクを有する哺乳動物のような哺乳動物において免疫応答を誘導しうるタンパク質またはその一部である。免疫原の投与は目的の病原体に対する防御免疫および／または予防免疫をもたらしうる。

【0041】

免疫応答は、B細胞、T細胞または単球のような免疫系細胞の、刺激に対する応答を意味する。幾つかの実施形態においては、応答は特定の抗原に特異的である（「抗原特異的応答」）。幾つかの実施形態においては、免疫応答はT細胞応答、例えばC D 4 + 応答またはC D 8 + 応答である。幾つかの他の実施形態においては、応答はB細胞応答であり、特異的抗体の産生をもたらす。

【0042】

免疫原性組成物は、免疫原性ポリペプチドを発現するウイルスに対する測定可能なC T L 応答を誘導する又は免疫原性ポリペプチドに対する測定可能なB細胞応答（例えば、抗体の産生など）を誘導する免疫原性ポリペプチドを含む組成物を意味する。

【0043】

2以上の核酸配列または2以上のアミノ酸配列間の配列同一性または類似性は配列間の同一性または類似性に関して表される。配列同一性は同一性の割合（％）として測定可能であり、その割合が高ければ高いほど、配列はより同一である。2つの配列が、以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用する測定または手動アライメントおよび目視検査による測定で、比較ウィンドウまたは指定領域にわたって最大の一致が得られるように比較されアライメント（整列）された場合に、特定の割合（すなわち、特定された領域にわたる、または特定されていない場合には配列全体にわたる60％の同一性、所望により、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％または99％の同一性）の同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する場合、2つの配列は「実質的に同一」である。場合によっては、同一性は、少なくとも約50ヌクレオチド長（または10アミノ酸長）の領域にわたって、またはより好ましくは100～500または1000以上のヌクレオチド長（または20、50、200以上のアミノ酸長）の領域にわたって存在する。

【0044】

核酸またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準的な方法を用いてアライメントされた場合、比較的高い度合の配列同一性／類似性を有する。比較のための配列のアラインメントの方法は当技術分野においてよく知られている。種々のプログラムおよびアライメントアルゴリズムがSmith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpetら, Nuc. Acids Res. 16:10881-90, 1988; Huangら Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; およびPearsonら, Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994に記載されている。Altschulら, J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990は配列アライメント方法およびホモロジー計算の詳細な考察を記載している。

10

20

30

40

50

【0045】

「対象」なる語は、哺乳動物、例えばヒト、および非ヒト哺乳動物として分類される任意の動物を意味する。非ヒト動物の例には、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどが含まれる。特に示されていない限り、「患者」または「対象」なる語は本明細書においては互換的に用いられる。好ましくは、対象はヒトである。

【0046】

「治療」または「緩和」なる語は、疾患（例えば、HIV感染）の症状、合併症または生化学的徴候の発生開始を予防し又は遅延させるために対象に化合物または物質を投与すること、症状を緩和すること、あるいは疾患、状態または障害の更なる進行を阻止または抑制することを含む。治療を要する対象は、疾患または障害に既に罹患している対象、および障害を発生するリスクを有する対象を含む。治療は（疾患の発生開始を予防し又は遅延させるための、あるいはその臨床的または亜臨床的症状の発現を予防するための）予防的抑制、または疾患の発現の後の症状の治療的抑制もしくは緩和でありうる。

【0047】

未切断融合前最適化（UFO）三量体は、より安定化したHIV-1 gp140三量体を与えるgp41 ECTOドメインとgp120タンパク質とにより形成されるHIV-1 gp140三量体タンパク質を意味する（図1）。再設計gp41 ECTOドメインは原型HIV-1株BG505（および原型gp140三量体BG505 SOSIP.664 gp140）に基づいており、野生型BG505 gp41 ECTO配列と比較して1以上の修飾を含有する。これらの修飾には、（1）融合前gp140構造を安定化させるために、HR1の21残基N末端（残基548～568）を、より短いループ配列で置換すること、および（2）gp120とgp41との間のフューリン切断部位（残基508～511）を、柔軟なリンカー配列、例えばGGGGS（配列番号17）モチーフのタンデムリピートで置換することが含まれる。幾つかの実施形態においては、UFO三量体はgp120とgp41との間の操作されたジスルフィド結合および／またはgp41における安定化突然変異を更に含有しうる。例えば、HIV-1株BG505に基づくUFO三量体は残基A501CとT605Cとの間に操作されたジスルフィド結合を含有しうる。UFO三量体の詳細な説明は、例えば、Kongら、Nat. Comm. 7:12040, 2016に記載されている。BG505株配列に基づくUFO三量体に加えて、操作されたgp41 ECTOドメインを使用して、多数の異なるHIV-1株または亜型からのgp120ポリペプチドとペア形成させて「キメラ」gp140三量体を形成させることが可能である。そのようなキメラ三量体は、本明細書に例示されているとおり、「UFO-BG」または「UFO²-BG」と称される。UFO-BGおよびUFO²-BG三量体の詳細な説明は、例えば、Heら、Sci Adv. 4(11):eaau6769, 2018に記載されている。

【0048】

ワクチンは、対象において予防的または治療的免疫応答を誘導する医薬組成物を意味する。幾つかの場合には、免疫応答は防御免疫応答である。典型的には、ワクチンは、病原体の抗原、例えばウイルス病原体、または病理学的状態と関連する細胞成分に対する抗原特異的免疫応答を誘導する。ワクチンは、ポリヌクレオチド（例えば、開示されている抗原をコードする核酸）、ペプチドまたはポリペプチド（例えば、開示されている抗原）、ウイルス、細胞または1以上の細胞成分を含む。本発明の幾つかの実施形態においては、ワクチンまたはワクチン免疫原またはワクチン組成物は融合構築物から発現され、表面上に免疫原ポリペプチドまたはタンパク質を提示するナノ粒子へと自己組織化する。

【0049】

ウイルス様粒子（VLP）は、幾つかのウイルスのいずれかに由来する非複製性ウイルス殻を意味する。VLPは、一般に、1以上のウイルスタンパク質、例えば、キャプシド、コート（外被）、殻、表面および／またはエンベロープタンパク質と称されるタンパク質（これらに限定されるものではない）、あるいはこれらのタンパク質に由来する粒子形成性ポリペプチドから構成される。VLPは適切な発現系におけるタンパク質の組換え発

10

20

30

40

50

現に際して自発的に生成しうる。特定のVLPの製造方法は当技術分野で公知である。ウイルスタンパク質の組換え発現後のVLPの存在は、当技術分野で公知の通常の技術、例えば電子顕微鏡法、生物物理学的特徴づけなどを用いて検出されうる。例えばBakerら(1991) *Biophys. J.* 60:1445-1456; およびHagenseら(1994) *J. Virol.* 68:4503-4505を参照されたい。例えば、VLPは密度勾配遠心分離により単離可能であり、および／または特徴的密度バンディングにより特定可能である。あるいは、極低温電子顕微鏡法が、問題のVLP調製物のガラス化水性サンプルに対して実施可能であり、適切な曝露条件下でイメージが記録されうる。
【0050】

自己組織化ナノ粒子は、VLPに類似した外観を有するナノ粒子へと自然に集合(組織化)しうる非ウイルス性タンパク質の同一コピーにより形成された明らかな表面幾何学的形状および数十ナノメートルの直径を有する球形のタンパク質殻を意味する。公知例には、フェリチン(FR)(これは種間で保存されており、24量体を形成する)、ビー・ステアロサーモフィルス(*B. stearothermophilus*) ジヒドロリポイルアシルトランスフェラーゼ(E2p)、アクイフェクス・エオリクス(*Aquifex aeolicus*) ルマジシンターゼ(LS) およびサーモトガ・マリティマ(*Thermotoga maritima*) エンカプスリン(encapsulin)(これらは全て、60量体を形成する)が含まれる。適切な発現系におけるタンパク質の組換え発現に際して自己組織化ナノ粒子は自然に形成しうる。ナノ粒子の製造、検出および特徴づけのための方法は、VLP用に開発されたものと同じ技術を用いて行われうる。

【0051】

III. ワクチン組成物を製造するための免疫原ポリペプチドまたはタンパク質

いずれかのポリペプチド免疫原または多量体タンパク質が本発明のワクチン設計において使用されうる。これらには、免疫応答の誘導が望まれうる病原体に由来する任意のタンパク質またはポリペプチドが含まれる。したがって、本発明のワクチン組成物は、任意のウイルス、細菌または他の病原性生物に由来する免疫原ポリペプチドを使用しうる。本発明のための適切な免疫原ポリペプチドはまた、ヒトタンパク質を含む非病原性種であって、それに対する免疫応答の誘導が治療効果をもたらし、疾患症状を軽減し、または全身健康状態を改善しうる非病原性種に由来しうる。一般に、免疫原ポリペプチドは、少なくとも約10個のアミノ酸残基を含有する任意の構造的または機能的ポリペプチドまたはペプチドでありうる。幾つかの実施形態においては、免疫原ポリペプチドは、長さが約10～約10,000アミノ酸の残基を含有する。幾つかの実施形態においては、免疫原ポリペプチドは、長さが約25～約2000アミノ酸の残基を含有する。幾つかの実施形態においては、免疫原ポリペプチドは、長さが約50～約500アミノ酸の残基を含有する。したがって、本発明に適した免疫原ポリペプチドまたはタンパク質は1kDa～約1,000kDa、好ましくは約2.5kDa～約250kDaの分子量を有しうる。幾つかのより好ましい実施形態においては、使用される免疫原ポリペプチドは約5kDa～約25kDaまたは50kDaの分子量を有する。

【0052】

幾つかの実施形態においては、本発明のワクチン組成物において使用される免疫原ポリペプチドまたはタンパク質はウイルス表面またはコアタンパク質(標的ポリペプチド)に由来しうる。宿主細胞のウイルス感染に重要な多数の公知ウイルスタンパク質が存在する。具体例には以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない: HIVの糖タンパク質(または表面抗原、例えばGP120およびGP41) およびキャプシドタンパク質(または構造タンパク質、例えばP24タンパク質); A型、B型、C型、D型またはE型肝炎ウイルスの表面抗原またはコアタンパク質[例えば、小さなB型肝炎ウイルス表面抗原(S-HBsAg) およびC型肝炎ウイルスのコアタンパク質、NS3、NS4 およびNS5抗原]; エプスタインバーウイルス(EBV)の糖タンパク質gp350/220、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)の糖タンパク質(Gタンパク質)または融合タンパク質(Fタンパク質); 単純ヘルペスウイルスHSV-1およびHSV-2の表面お

よびコアタンパク質（例えば、H S V - 2 からの糖タンパク質 D）、ポリオウイルスの表面タンパク質（例えば、g B、g C、g D、g H および g L）、麻疹ウイルス（M V）のエンベロープ糖タンパク質ヘマグルチニン（H）および融合タンパク質（F）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（L C M V）の糖タンパク質 G、アデノウイルスのファイバーおよびペントンベースタンパク質、コロナウイルスの S スパイク、フラビウイルス、例えば Dengue ウイルス、黄熱ウイルスおよびジカウイルスのエンベロープ（E）タンパク質、ならびにピコルナウイルスの無エンベロープキャプシドタンパク質。

【0053】

幾つかの実施形態においては、本発明に適したウイルス免疫原は、感染のためにクラス I 融合メカニズムを利用するウイルスに由来しうる。クラス I ウイルス融合タンパク質は、細胞侵入中に劇的なコンホメーション変化を受ける三量体である。ウイルスタンパク質における特定の領域は完全にリフォールディングして膜融合を促進させうる。本明細書に例示されているとおり、クラス I 融合メカニズムを利用するウイルスの免疫原の例には、H I V - 1、出血熱を引き起こすウイルス、例えばフィロウイルス（例えば、エボラウイルスおよびマールブルグウイルス）およびアレナウイルス（例えば、ラッサウイルス）、呼吸器合胞体ウイルス（R S V）、ならびにコロナウイルス、例えば M E R S - C o V および S A R S - C o V から得られる構造タンパク質またはポリペプチドが含まれる。本明細書に例示されているとおり、適切な免疫原は、H I V - 1 U F O 三量体、エボラ G P 外部ドメイン、L A S V 糖タンパク質複合体（G P C）、R S V 糖タンパク質 F および M E R S - C o V スパイクタンパク質 S に由来する任意のタンパク質およびポリペプチドでありうる。これらの免疫原、またはクラス I 融合メカニズムを利用する他のウイルスの構造タンパク質に由来する免疫原はいずれも、全て、本発明のワクチン設計において使用されうる。

【0054】

幾つかの実施形態においては、本発明に適したウイルス免疫原は、感染のクラス II 融合メカニズムを利用するウイルスに由来しうる。クラス II ウイルス融合タンパク質はヘテロ二量体（例えば、C 型肝炎ウイルス）またはホモ二量体（例えば、Dengue 熱ウイルスおよびジカウイルス）の形態で存在し、それらは膜融合前にリフォールディングして三量体スパイクを形成する。本明細書に例示されているとおり、適切な免疫原は、H C V エンベロープ糖タンパク質（例えば、E 2）、ジカウイルス E タンパク質（例えば、D I I E ドメイン）、またはクラス II 融合メカニズムを利用する他のウイルスの任意の構造タンパク質に由来する任意のタンパク質およびポリペプチドでありうる。これらの免疫原のいずれも、全て、本発明のワクチン設計において容易に使用されうる。

【0055】

幾つかの実施形態においては、本発明のワクチン組成物において使用される免疫原ポリペプチドまたはタンパク質は非ウイルス標的に由来しうる。これらには、任意の非ウイルス性病原体（例えば、細菌病原体）から、およびヒトのような哺乳動物宿主内の寄生生物から得られうる免疫原が含まれる。幾つかの実施形態においては、細菌感染に重要な細菌タンパク質は、本発明のワクチン設計における免疫原ポリペプチドを得るのに適している。適切な免疫原は、例えば結核菌（T B）に関して本明細書に例示されている A g 8 5 複合体および M t b 7 2 のような、細菌の構造タンパク質に由来する任意のタンパク質およびポリペプチドでありうる。幾つかの実施形態においては、寄生生物の伝染、宿主における繁殖および生活環に重要な寄生生物タンパク質が、本発明のワクチン設計における免疫原ポリペプチドを得るのに適している。適切な免疫原は、例えば本明細書に例示されている熱帯熱マラリア原虫（マラリア）の P f s 2 5、スポロゾイト周囲タンパク質（C S P）および細網細胞結合タンパク質ホモログ 5（P f R H 5）のような、寄生生物の構造タンパク質に由来する任意のタンパク質およびポリペプチドでありうる。

【0056】

幾つかの実施形態においては、使用される免疫原ポリペプチドは、免疫応答の誘導が望まれる哺乳動物宿主（例えば、ヒト）からの内因性タンパク質でありうる。これらには、

例えば、本明細書に例示されているコレステロールレベルを調節するためのPCSK9、および食欲を制御するためのグレリンが含まれる。本発明の設計に従いワクチンを構築するための適切な免疫原ポリペプチドを得るために、種々の他の哺乳動物タンパク質も使用される。幾つかの実施形態においては、ワクチン設計のための非ウイルス標的は、ヒトの疾患に関与する他のタンパク質でありうる。これらには、癌の発生に関与するタンパク質が含まれる。癌関連免疫原の例には、非突然変異自己抗原、例えばMAGE-A3、Melan-A/Mart1、gp100、Her2/NeuおよびNY-ESO-1も含まれる。幾つかの追加的な実施形態においては、本発明のワクチン組成物における使用のための免疫原ポリペプチドまたはタンパク質には、他の慢性ヒト疾患または障害に関与するタンパク質が含まれる。そのようなヒト標的の例には、例えば、高血圧に対するAng-II、炎症に対するTNF- α 、病原体誘発性好酸球増加症に対するIL-9、喘息に対するIL-5、脳卒中に対するN-メチル-D-アスパラギン酸受容体-1、およびホルモンレベルを低下させるためのヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)が含まれる。

【0057】

IV. ロッキングドメイン

前記のとおり、本発明の幾つかのナノ粒子ワクチンまたは免疫原は、本発明者らにより開発されたロッキングメカニズムを利用する。ロッキングメカニズムは、免疫原タンパク質またはポリペプチド（例えば、Env由来HIV-1三量体タンパク質）を提示する際にナノ粒子を内部から安定化させるように機能するタンパク質ドメイン（「ロッキングドメイン」）に関するものである。一般に、ロッキングドメインは、二量体を形成しうる任意のタンパク質でありうる。種々の実施形態においては、ロッキングドメインは、界面での非共有結合相互作用により溶液中で別のタンパク質サブユニットと二量体を自然に形成しうるタンパク質サブユニットである。幾つかの好ましい実施形態においては、それらの2つのタンパク質サブユニットは配列が同一であることが可能であり、ホモ二量体を形成しうる。幾つかの他の場合においては、それらの2つのタンパク質サブユニットは、界面での非共有結合相互作用により溶液中でヘテロ二量体を形成しうる異なるタンパク質、または操作により誘導された単一タンパク質の、2つの異なるドメインでありうる。典型的には、ロッキングドメインは、免疫原ポリペプチド（例えば、HIV-1 Env由来三量体タンパク質のサブユニット）が連結されているナノ粒子サブユニットに共有結合により融合している。幾つかの好ましい実施形態においては、ロッキングドメインは、それがナノ粒子殻内に封入されるように、約500個以下のアミノ酸を含有する二量体タンパク質から選択される。幾つかの実施形態においては、ロッキングドメインは、約400、300、250、200、150個以下のアミノ酸を含有する二量体タンパク質に由来する。幾つかの実施形態においては、ロッキングドメインは、約30～約100個のアミノ酸を含有する二量体タンパク質に由来する。本明細書に記載されているとおり、ロッキングドメインは、疎水性（ファンデルワールス）接触、水素結合および／または塩橋のような特定の相互作用により界面を形成しうる任意の二量体タンパク質でありうる。幾つかの実施形態においては、ロッキングドメインは、ヘリックス、シート、ループまたは前記構造要素の任意の組合せの相互作用により界面を形成しうる任意の二量体タンパク質でありうる。幾つかの実施形態においては、ロッキングドメインは、共有結合、例えばジスルフィド結合または特定の化学的架橋が操作されうる界面を形成しうる任意の二量体タンパク質でありうる。種々の実施形態においては、二量体の2つのサブユニット間のアフィニティは、熱および化学的処理のような外的変動に抵抗するのに十分に強力であり、そうでなければ、そのようなロッキングドメインを欠く野生型(WT)ナノ粒子は該外的変動に耐えられないであろう。

【0058】

当技術分野で公知の多数のタンパク質が本発明の実施においてロッキングドメインとして使用される。これらには、例えば、本明細書中の後記実施例に例示される2つのロッキングドメインLD4（配列番号1）およびLD7（配列番号2）が含まれる。本発明に適した幾つかの他の例示的なロッキングドメインは配列番号3～16に示されている。H

ⅠⅤ－１ワクチンに関して本明細書に例示されているとおり、ロッキングドメインLD4またはLD7によって安定化されたHⅠⅤ－１ナノ粒子UFO三量体ワクチンは、驚くほど強力な免疫原性を示した。これらの例示配列のいずれかを有するロッキングドメインに加えて、保存的修飾変異体または実質的に同一の配列を有する変異体も使用されうる。

【0059】

適切なロッキングドメインはタンパク質データベース(PDB)の公知タンパク質から容易に特定されうる。例えば、二量体タンパク質は、「ホモ二量体」のようなキーワードまたは「タンパク質化学量論A2」のような検索条件を使用して、タンパク質データバンク(PDB)(<https://www.rcsb.org/>)または他のデータベースから見つけられうる。これらの二量体タンパク質は、それらのサイズ(特に30~100アミノ酸)に基づいて更にフィルタリングされうる。残りのタンパク質は、小型構造フォルドまたは他の望ましい特性を有するものを特定するために視覚的に検査されうる。本明細書に例示されているとおり、これらの手順を用いて、幾つかの二量体タンパク質を特定し、後記に詳細に記載されているとおり必要に応じて修飾した。このようにして特定された約20個の二量体タンパク質のうち、9個を、60量体ナノ粒子E2pおよびI3-01を安定化させるロッキングドメインとして試験した。試験した9個のロッキングドメインの配列を以下に示す。それらの元の配列と比較して、実際に使用されるロッキングドメインの配列(配列番号1~9)は、操作目的で、柔軟なN末端および/またはC末端における数個の残基のランケーションを含有しうる。操作されたLD9(配列番号9)の場合、元の配列のN末端およびC末端におけるランケーションに加えて、それは残基42におけるSからAへの突然変異をも含有する。

【0060】

LD1 1NI8__A:

SEALKILNNIRTLRAQARECTLETLEEMLEKLEVVVNERR
(配列番号3)

LD2 4AYA__B:

MNDCYSKLELVPSIPQNKKVSKMEILQHVIDYILDLQIA
LD SH (配列番号4)

LD3 1OVX__A:

LLYCSFCGKSQHEVRKLIAGPSVYICDECVDLCNDIIREE
IKEVAPHRRER (配列番号5)

LD4 2MG4__A:

FSEEQKKALDLAFYFDRRLTPEWRRYLSQRLGLNEEQIER
WFRRKEQQIGWSHPQFEK (配列番号1)

LD5 2JV7__A:

DQPSVGDAFDKYNEAVRVFTQLSSAANCDAACLSLSAS
SAACIAAVGELGLDVPLDLACAATATSSATEACKGCLW (配
列番号6)

LD6 1JR5__A:

KNIDTVREIITVASILIKFSREDIVENRANFIAFLNEIGV
THEGRKLNQNSFRKIVSELTQEDKKTLIDEFNEGFEQVYR
YLEMYTNK (配列番号7)

LD7 1PZQ__A:

SPAVDIGDRLDELEKALEALSAEDGHDDVGQRLESLLRRW
NSRRAD (配列番号2)

LD8 1R2A__A:

PPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARR (配
列番号8)

LD9 2JRX__A:

YSDEQVEQLLAELLNVLEKHKAPTDLSLMVLGNMVTNLIN

10

20

30

40

50

TAIAPAQRQA IANSFARALQSSINE (配列番号9)

試験したこれらのLDに加えて、類似した構造的特徴を有する他の二量体タンパク質も、ナノ粒子表面を安定化させるために使用されうる。そのような追加的配列の例には以下のものが含まれる。

【0061】

1L6E__A:

HMGHIQIPPGLTLLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARR (配列番号10)

1PZR__A:

ASDDELFSMLDQRFGGGEDLLMSGDNGMTEEEKLRRYLKRTVTELD SVTARLREVEHRAGE (配列番号11)

1R05__A:

MADKRAHHNALERKRRDHIKDSFHS LRDSVPSLQGEKASRAQILDKATEYIQYMRRKVHTLQQDIDDLKRQNALLEQQVRALEGGSGC (配列番号12)

1TKV__A:

MNKNIDTVREIITVASILIKFSREDIVENRANFIAFLNEIGVTHEGRKLNQNSFRKIVSELTQEDKKTLIDEFNEGFEQVYRYLEMYTNK (配列番号13)

2DSM__A:

MVENPMVINNWHDKLTETDVQIDFYGDEVTPVDDYVIDGGEIILRENLERYLREQLGF EFKNQLE (配列番号14)

2JPQ__A:

MPITSKYTDEQVEKILAEVALVLEKHAASPELTLMIAAGNIATNVLNQRVAASQRKLIAEKFAQALMSSLETPKTHLE (配列番号15)

2K01__A:

GMKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCACQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKCLNK (配列番号16)

これらの特定のLDおよび二量体タンパク質に加えて、既に存在する又はタンパク質データベース(PDB)から容易に誘導されうる、前記基準に合致する他のタンパク質も、本発明におけるロッキングドメインとして使用されうる。更に、大きな二量体タンパク質の界面形成部分またはドメインは、それが前記の構造的および機能的要件に合致する場合には、単独で働くロッキングドメインとして使用されうる。

【0062】

V. 追加的な構成成分またはモチーフ

ロッキングドメイン以外に、本発明のナノ粒子提示免疫原ワクチン構築物および得られるワクチン組成物は、追加的または代替的に、他の構成成分またはモチーフを含有しうる。幾つかの実施形態においては、本発明のロッキングドメイン安定化ナノ粒子ワクチンは、強力なT細胞応答を促進させるための、およびB細胞発生をbNAbへと誘導するためのT細胞エпитープを含有する。T細胞エпитープは、ナノ粒子表面上の免疫原ポリペプチドの提示に影響を及ぼさない限り、その他の構成成分に対して任意の位置に位置しうる。したがって、幾つかの実施形態においては、T細胞エпитープは、例えば、T細胞エпитープのN末端をナノ粒子サブユニットのC末端に融合させることにより、ナノ粒子サブユニットのC末端に位置する。幾つかの他の実施形態においては、T細胞エпитープは免疫原ポリペプチドのC末端とナノ粒子サブユニットのN末端との間に位置する。当技術分野で公知の任意のT細胞エпитープ配列またはペプチドが本発明の実施において使用されうる。それらは、MHCクラスIIエпитープを含有する任意のポリペプチド配列であって、免疫化に際してCD4+およびCD8+ T細胞を有効に活性化しうるポリペプチド配列(例えば、CD4+ Tヘルパー細胞を活性化するTヘルパーエпитープ)を含む。

例えば、Alexanderら, Immunity 1, 751-761, 1994; Ahlersら, J. Clin. Invest. 108:1677-1685, 2001; Fraserら, Vaccine 32, 2896-2903, 2014; De Grootら, Immunol. Cell Biol. 8:255-269, 2002; および Gene Ther. 21:225-232, 2014を参照されたい。幾つかの好ましい実施形態においては、使用されるTヘルパーエпитープは普遍的な汎反応性T細胞エпитープペプチドAKFVAAWTLKAAA（配列番号18）（Alexanderら, Immunity 1, 751-761, 1994）である。適切なT細胞エпитープの他の例には、ペプチドQSIALSSLMVAQAIP（配列番号19）およびILMQYIKANSKFIGIIPMGLPQSIALSSLMVAQ（配列番号20）、またはこれらの例示T細胞エпитープペプチドのいずれかの保存的修飾変異体もしくは実質的に同一（例えば、少なくとも90%、95%または99%同一）の配列が含まれる。

【0063】

本明細書に記載されているロッキングドメインおよび他の構成成分の代わりに又はそれらに加えて、本発明の幾つかのナノ粒子ワクチンは、ナノ粒子の表面上の免疫原の提示を促進させるネック領域またはドメインを含有する。マラリアワクチン用のPCSK9ワクチンおよび熱帯熱マラリア原虫免疫原Pf s 25に関して本明細書に例示されているとおり、ネック領域は、ウイルスタンパク質に由来する3ヘリックスバンドルを構成する。典型的には、ネックドメインは免疫原とナノ粒子サブユニットとの間に挿入され、それにより、免疫原ポリペプチドをナノ粒子表面から上昇させる。所望により、ネックドメインの挿入のために、リンカー配列（例えば、10GSリンカー）が使用される。ネックドメインのための適切なタンパク質の例には、本明細書に例示されているヘンドラウイルスドメイン（PDB ID: 4HEO）および麻疹ウイルスドメイン（PDB ID: 1OKS）に由来するヘリックスバンドルが含まれる。示されているとおり、そのような構造設計は、得られるナノ粒子ワクチンの収量および純度を更に改善しうる。

【0064】

本明細書に記載されているロッキングドメインおよび他の構成成分の代わりに又はそれらに加えて、本発明の幾つかのナノ粒子ワクチンは、免疫原ポリペプチドを安定化させるように働くタンパク質ドメインを含有しうる。幾つかの実施形態においては、この目標を達成するために使用されるタンパク質ドメインは、当技術分野でよく知られているT4フィブリチン（フォールドン）のC末端三量体化モチーフでありうる。このフォールドンドメインは、バクテリオファージT4からの三量体タンパク質フィブリチンのC末端の30アミノ酸残基を構成し、フィブリチンのフォールディングおよび三量体化を促進させるように機能する。例えば、Papanikolopoulouら, J. Biol. Chem. 279:8991-8998, 2004; およびGutheら, J. Mol. Biol. 337:905-915, 2004を参照されたい。MERS-CoVワクチン用のSスパイク三量体に関して本明細書に例示されているとおり、このタンパク質ドメインはSスパイクサブユニットとナノ粒子サブユニットとの間に容易に挿入されうる。所望により使用されうるリンカー（例えば、10GSリンカー）が挿入に使用されうる。ナノ粒子サブユニットのC末端に挿入されるロッキングドメインとは異なり、このタンパク質ドメイン（フォールドン）はナノ粒子サブユニットのN末端に挿入される。MERS-CoVワクチンに関して本明細書に示されているとおり、そのような構成成分（例えば、フォールドン）は、単独で、またはロッキングドメインと組合せて使用された場合、ナノ粒子の表面上に提示される免疫原の安定性を増強しうる。

【0065】

種々の実施形態においては、本明細書に記載されている免疫原ポリペプチドまたはタンパク質のいずれか（例えば、HIV-1 Env由来三量体免疫原）を提示するナノ粒子は、免疫原ポリペプチドまたは多量体免疫原タンパク質（例えば、三量体免疫原）のサブユニットをナノ粒子のサブユニット（例えば、E2pまたはI3-01サブユニット）およびロッキングドメインならびに本明細書に記載されているその他の随意的（すなわち、

所望により使用されうる) または代替的成分に融合させることにより構築されうる。本発明のナノ粒子提示融合ワクチン免疫原を構築するためには、連結を容易にし、異なる成分の構造的完全性を維持するために、1以上のリンカーモチーフまたは部分が使用されうる。したがって、幾つかの実施形態においては、免疫原ポリペプチド(例えば、HIV-1三量体タンパク質サブユニット)のC末端をナノ粒子サブユニットのN末端に連結するために、リンカーモチーフが使用されうる。追加的または代替的に、ナノ粒子サブユニットのC末端(または免疫原ポリペプチドのC末端)をロッキングドメインのN末端に連結するために、第2のリンカーモチーフが使用されうる。幾つかの他の実施形態においては、T細胞エпитープを連結するために、例えば、ロッキングドメインのC末端をT細胞エпитープのN末端に連結するために、またはT細胞エпитープのC末端をロッキングドメインのN末端に連結するために、第3のリンカーモチーフが使用されうる。本明細書に例示されているとおり、ネックドメインまたはフォールドドメインをナノ粒子ワクチン構築物内に挿入するためにも、リンカーが使用されうる。典型的には、リンカーモチーフは短いペプチド配列を含有する。種々の実施形態においては、リンカーまたはリンカーモチーフは、2つのタンパク質ドメインを、それらの機能を妨げることなく連結する任意の柔軟なペプチドでありうる。例えば、該構築物において使用されるこれらのリンカーはいずれも、 $(G a S b)_n$ (ここで、aは約1~5の整数であり、bは約0~2の整数であり、nは約1~5の整数である)の配列を有する、GCに富むペプチドでありうる。幾つかの他の実施形態においては、T細胞エпитープは、免疫原ポリペプチドのC末端とナノ粒子サブユニットのN末端との間のリンカーまたはリンカーの一部として使用されうる。

【0066】

本明細書に記載されている本発明の新規構造成分(例えば、ロッキングドメインで安定化されたHIV-1三量体免疫原)含有するワクチン組成物は、本明細書(例えば、実施例1~15)に記載されている方法および/または当技術分野で記載されている他の方法[Heら, Nat. Comm. 7, 12041, 2016; Kongら, Nat. Comm. 7, 12040, 2016; およびHeら, Sci Adv. 4(11): eaau6769, 2018]に従い組換え法により構築されうる。例示として、2つの特定のHIV-1ナノ粒子ワクチン構築物が本明細書に記載されている。第1の構築物は、N末端からC末端へ方向に以下のものを含有する融合ポリペプチドを発現する: HIV-1 UFO BG505. SOSIP. 664 gp140サブユニット、E2pサブユニット(例えば、配列番号21)、前記のリンカーモチーフ $(G a S b)_n$ [例えば、 $(GGGGS)_2$ (配列番号24)]、配列番号1(LD4)に示されているロッキングドメイン、およびT細胞エпитープ(例えば、配列番号18に示されているPADREエпитープ)。所望により、免疫原ポリペプチド(例えば、HIV-1ワクチンのためのgp140サブユニット)は、リンカー配列、例えば、GGGGGS(配列番号17)または $(GGGGGS)_2$ (例えば、配列番号24)を介してナノ粒子サブユニット(例えば、E2p)に連結されうる。第2の構築物は、N末端からC末端へ方向に以下のものを含有する融合ポリペプチドを発現する: HIV-1 UFO BG505. SOSIP. 664 gp140、リンカー配列 $(GGGGGS)_2$ (配列番号24)、I3-01サブユニット(例えば、配列番号22または25)、前記の第2のリンカー $(G a S b)_n$ [例えば、GGGGGS(配列番号17)]、配列番号2(LD7)に示されているロッキングドメイン、およびT細胞エпитープ(例えば、配列番号18に示されているエпитープ)。所望により、本発明のワクチン構築物のいずれかにおいて、ロッキングドメインとT細胞エпитープとの間にジペプチドリンカーGSが挿入されうる。ワクチン免疫原(例えば、HIV-1ナノ粒子免疫原)の抗原性および構造的完全性は、標準的なアッセイ、例えば抗体結合アッセイおよびネガティブ染色電子顕微鏡法(EM)によって容易に分析されうる。本明細書に例示されているとおり、融合分子は全て、Env由来三量体(例えば、gp140)の免疫原性エпитープを提示するナノ粒子へと自己組織化しうる。頑強な三量体特異的bnAbを誘導することにより、本発明のナノ粒子ワクチンは、本明細書に例示されている広範なウイルス(例えば、HIV-1、エボラ、ラッサおよびHCVウイルス)に対して

10

20

30

40

50

個体にワクチン接種するのに有用である。

【0067】

V I . 提示スキャフォールド

本発明のワクチンの構築において免疫原タンパク質またはポリペプチド（例えば、H I V - 1 E n v 三量体タンパク質）を提示するために、任意の異種スキャフォールド（s c a f f o l d）が使用されうる。これには、ウイルス様粒子（V L P）、例えばバクテリオファージQ_β V L Pおよびナノ粒子が含まれる。幾つかの好ましい実施形態においては、三量体H I V - 1 タンパク質を提示またはディスプレイするための異種スキャフォールドは自己組織化ナノ粒子である。本発明のワクチン組成物を製造する際に、種々のナノ粒子プラットフォームが使用されうる。一般に、本発明で使用されるナノ粒子は単一サブユニットの複数コピーにより形成される必要がある。ナノ粒子は典型的には球形であり、および／または回転対称性（例えば、3 回軸および5 回軸）を有し、例えば、本明細書に例示されている二十面体構造を有する。追加的または代替的に、粒子サブユニットのアミノ末端は露出している必要があり、3 回軸に接近している必要があり、3 つのアミノ末端の間隔は種々のH I V - 1 三量体成分のカルボキシオール末端の間隔と厳密に一致している必要がある。幾つかの好ましい実施形態においては、免疫原は、約20nm以下の直径（通常は12、24または60個のサブユニットから構成される）および粒子表面上の3 回軸を有する自己組織化ナノ粒子を含む。そのようなナノ粒子は、本明細書に例示されているとおり、多価H I V - 1 三量体ワクチンを製造するための適切な粒子プラットフォームを提供する。

【0068】

幾つかの好ましい実施形態においては、免疫原タンパク質またはポリペプチド（例えば、H I V - 1 三量体タンパク質）は、自己組織化ナノ粒子、例えば、本明細書に例示されているフェリチン（F R）、E 2 pおよびI 3 - 0 1 に由来する自己組織化ナノ粒子上で提示される。E 2 pはバチルス・ステアロサーモフィルス（B a c i l l u s s t e a r o t h e r m o p h i l u s）由来のジヒドロリポイルアシルトランスフェラーゼの再設計変異体であり、これは熱安定性60量体ナノ粒子へと自己組織化することが示されている。例えば、Heら，N a t . C o m m u n . 7 : 1 2 0 4 1 , 2 0 1 6を参照されたい。同様に、I 3 - 0 1 は、超安定性ナノ粒子へと自己組織化しうる操作されたタンパク質である。例えば、H s i aら，N a t u r e 5 3 5 , 1 3 6 - 1 3 9 , 2 0 1 6を参照されたい。これらのタンパク質のサブユニットの配列は当技術分野で公知である。例えば、W O 2 0 1 7 / 1 9 2 4 3 4を参照されたい。本明細書に例示されているE 2 pおよびI 3 - 0 1 ナノ粒子サブユニットのアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号21および22に示されている。元の配列と比較して、配列番号21に示されているE 2 p配列は、以下の配列において強調表示されているとおり、残基92にA l a置換を含有する。配列番号22に示されているI 3 - 0 1 サブユニット配列に加えて、配列番号25に示されている再設計I 3 - 0 1 サブユニット配列も本発明の実施において使用されうる。種々の実施形態においては、本発明のH I V - 1 ナノ粒子ワクチンは、これらの公知ナノ粒子のいずれか、およびそれらの保存的修飾変異体または実質的に同一（例えば、少なくとも90%、95%または99%同一）の配列を有する変異体を使用しうる。

【0069】

E 2 pサブユニット配列（配列番号21）

AAAKPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSHKHTAPHV
TLMDEADVTKLV AHRKKFKAI AAEKG I K L T F L P Y V V K A L V
S A L R E Y P V L N T A I D D E T E E I I Q K H Y Y N I G I A A D T D R G L L V
P V I K H A D R K P I F A L A Q E I N E L A E K A R D G K L T P G E M K G A S C
T I T N I G S A G G Q W F T P V I N H P E V A I L G I G R I A E K P I V R D G E
I V A A P M L A L S L S F D H R M I D G A T A Q K A L N H I K R L L S D P E L L
L M

I 3 - 0 1 サブユニット配列（配列番号22）

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIE
ITFTVPDADTVIKELSFLEKEMGAIIGAGTVTSVEQCRKAV
ESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMPTTELVKA
MKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVN
LDNVCEWFKAGVLA VGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKI
RGCTE

I3-01-jz9変異体配列（配列番号25）

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKMKALAVFVGGVHLIE
ITFTVPDADTVIKELSFLEKELGAIIGAGTVTSVEQCRKAV
ESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMPTTELVKA
MKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVN
LDNVCEWFKAGVLA VGVGSALVKGTIAEVAAKAAAFVEKI
RGCTE

10

フェリチン配列（配列番号26）

MLSKDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAG
LFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKF
EGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAISKSDHATFNFL
QWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKG
IAKSRKS

20

これら例示ナノ粒子配列に加えて、当技術分野で公知の多数の他のナノ粒子またはVLPも本発明の実施において使用されうる。これらには、例えば、アキフェックス・エオリクス（*Aquifex aeolicus*）ルマジシンターゼ、サーモトガ・マリティマ（*Thermotoga Maritima*）エンカプスリン（encapsulin）、ミキソコッカス・ザンサス（*Myxococcus xanthus*）エンカプスリン、バクテリオファージQベータウイルス粒子、フロックハウスウイルス（FHV）粒子、ORSAYウイルス粒子および伝染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV）粒子が含まれる。

【0070】

前記のとおり、本発明のワクチンの設計においては多数のワクチン免疫原が使用されうる。これらには、種々のウイルス免疫原および非ウイルスタンパク質が含まれる。HIV-1ワクチンの場合、任意のEnv由来HIV-1三量体タンパク質がナノ粒子提示ワクチン組成物において使用されうる。Env由来三量体タンパク質は種々のHIV-1株から得られうる。幾つかの実施形態においては、ナノ粒子は、天然三量体形態の、HIV-1 Envに基づく糖タンパク質またはドメイン、例えばgp140、gp120またはV1V2ドメインを提示する。幾つかの実施形態においては、使用されるHIV-1 Env由来三量体タンパク質は未切断融合前最適化（UFO）gp140三量体である。幾つかの実施形態においては、Env由来三量体はHIV-1株BG505、例えばBG505.SOSIP.664gp140三量体に由来する。幾つかの実施形態においては、ナノ粒子は、修飾されたgp140三量体免疫原、例えば、Kongら、Nat. Comm. 7, 12040, 2016に記載されているHR1修飾gp140三量体（「UFO三量体」）を提示する。このHR1修飾gp140三量体タンパク質のサブユニットのアミノ酸配列は配列番号23に示されている。幾つかの実施形態においては、本発明において使用されるHIV-1三量体免疫原はUFO²-BG三量体でありうる。UFO²-BG三量体は、（1）再設計されたHR1 N末端バンドと切断部位リンカーとを有するBG505 gp41ドメイン（Kongら、Nat. Comm. 7, 12040, 2016に記載されているとおり）と、（2）他の多様なHIV-1株または亜型の1つからのgp120タンパク質とを含有するキメラgp140三量体である。BG505株由来の再設計gp41ECTOドメインに加えて、本発明に適したキメラgp140三量体におけるgp41ドメインも、HIV-1配列データベースから誘導されるコンセンサスgp41ECTOドメインでありうる。また、本発明のHIV-1ナノ粒子ワクチンを構築する際

30

40

50

には、本明細書に記載されている種々のHIV-1三量体タンパク質の保存的修飾変異体またはその実質的に同一の配列を有する変異体が使用されうる。

【0071】

HR1修飾gp140三量体の配列（配列番号23）

AENLWVTVYYGVVPVWKDAETTLFCASDAKAYETEKHNVWA
THACVPTDPNPQEIHLENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIIS
LWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNVNTNITDDMRGELKNC
FNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKE
YRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKD
KKFNGTGPCPSVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEEV
MIRSENIITNNAKNILVQFNTVPVQINCTRPNNNTRKSI
RIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNVSKATWNETLGKVV
KQLRKHFGNNTIIRFANSSGGDLEVTTTHSFNCGGEFF
YCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPCRIKQ
IINMWQRIGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGST
NSTTETFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTR
CKRRVVGGGGSGGGGSAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGA
ASMTLTVQARNLLSGNPDWLPDMTVWGIKQLQARVLA
VERYLRDQQLLGIWGC SGKLICCTNVPWNS
SWSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYT
QIIYGLLEESQNQQEKNEQDLLALD

10

20

VII. ポリヌクレオチドおよび発現構築物

本発明のワクチン組成物は、典型的には、まず、本明細書に記載されている種々の構造成分の機能的連結コード配列を含有する発現構築物（すなわち、発現ベクター）を作製することにより製造される。したがって、幾つかの関連態様においては、本発明は、本明細書に記載されている新規構造成分（例えば、ロッキングドメインで安定化されたHIV-1 Env三量体提示ナノ粒子）を含有するナノ粒子提示免疫原をコードする実質的に精製されたポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）、ならびにそのようなポリヌクレオチドを含有する発現ベクター（例えば、本明細書に例示されているCMVベクター）、およびワクチン免疫原を製造するための宿主細胞（例えば、本明細書に例示されているExp i CHO細胞）を提供する。該ポリヌクレオチドによりコードされる、または該ベクターから発現される融合ポリペプチドも、本発明に含まれる。本明細書に記載されているとおり、そのようなポリペプチドは、表面上に免疫原ポリペプチドまたはタンパク質を提示するナノ粒子ワクチンへと自己組織化する。

30

【0072】

ポリヌクレオチドおよび関連ベクターは、標準的な分子生物学的技術または本明細書に例示されている方法を用いて容易に作製されうる。例えば、クローニング、トランスフェクション、一過性遺伝子発現および安定なトランスフェクト化細胞系の入手のための一般的なプロトコルは当技術分野において例えば以下のものに記載されている：Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N. Y., (3rd ed., 2000)；およびBrentら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (ringb ou ed., 2003)。PCRによるポリヌクレオチド配列への突然変異の導入は、例えば以下のものに記載されているとおりに行われうる：PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich（編）, Freeman Press, NY, NY, 1992；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innisら（編）, Academic Press, San Diego, CA, 1990；Mattilaら、Nucleic Acids Res. 19:967, 1991；およびEckertら、PCR Methods an

40

50

d Applications 1:17, 1991.

【0073】

個々のベクターの選択は、融合ポリペプチドの意図される用途に左右される。例えば、選択されたベクターは、所望の細胞型において、その細胞型が原核生物であろうと真核生物であろうと、融合ポリペプチドの発現を駆動しうるものでなければならない。多数のベクターは、機能的に連結された遺伝子配列の原核生物ベクター複製と真核生物発現との両方を可能にする配列を含有する。本発明に有用なベクターは自律複製可能であり、すなわち、該ベクターは染色体外に存在し、その複製は宿主細胞のゲノムの複製に必ずしも直接関連しているわけではない。あるいは、ベクターの複製は宿主の染色体DNAの複製に関連づけられることが可能であり、例えば、ベクターは、レトロウイルスベクターにより、および安定にトランスフェクトされた細胞系において達成されるように、宿主細胞の染色体内に組み込まれうる。哺乳類宿主細胞内で免疫原を製造するためには、ウイルスに基づく発現ベクターおよび非ウイルス発現ベクターの両方が使用されうる。非ウイルスベクターおよび系には、プラスミド、エピソームベクター、（典型的には、タンパク質またはRNAを発現させるための発現カセットを含有する）およびヒト人工染色体が含まれる（例えば、Harringtonら, Nat. Genet. 15:345, 1997を参照されたい）。有用なウイルスベクターには、レンチウイルスまたは他のレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、SV40、乳頭腫ウイルス、HBVエプスタインバーウイルス、ワクシニアウイルスおよびセムリキフォレストウイルス（SFV）に基づくベクターが含まれる。Brentら, 前掲; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; および Rosenfeldら, Cell 68:143, 1992を参照されたい。

【0074】

融合ポリペプチドを発現させるために使用される具体的なベクターに応じて、種々の公知の細胞または細胞系が本発明の実施に使用されうる。宿主細胞は、本発明の融合体を含有する組換えベクターが導入されうる任意の細胞であることが可能であり、ここで、該ベクターは融合ポリペプチドの発現を駆動することを可能にし、本発明において有用である。それは幾つかの細菌株のいずれかのような原核生物であることが可能であり、あるいは酵母または他の真菌細胞、昆虫もしくは両生類細胞または例えばげっ歯類、サルまたはヒト細胞を含む哺乳類細胞のような真核生物であることが可能である。本発明の融合ポリペプチドを発現する細胞は初代培養細胞であることが可能であり、あるいは樹立細胞系であることが可能である。したがって、本明細書に例示されている細胞系（例えば、CHO細胞）に加えて、当技術分野でよく知られている多数の他の宿主細胞系も本発明の実施において使用されうる。これらには、例えば、種々のCos細胞系、HeLa細胞、HEK293、AtT20、BV2およびN18細胞、骨髄腫細胞系、形質転換B細胞およびハイブリドーマが含まれる。

【0075】

ポリペプチドを発現する哺乳類組織細胞培養の使用は、例えば、Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987において全般的に考察されている。融合ポリペプチド発現ベクターは、当業者に公知の多数の適切な方法のいずれかにより、選択された宿主細胞内に導入されうる。哺乳類細胞内への融合ポリペプチドコード化ベクターの導入のためには、用いられる方法はベクターの形態に左右されるであろう。プラスミドベクターの場合には、融合ポリペプチド配列をコードするDNAは、例えば脂質媒介性トランスフェクション（「リポフェクション」）、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーションまたはリン酸カルシウム沈殿を含む多数のトランスフェクション方法のいずれかにより導入されうる。これらの方法は、例えばBrent, 前掲に詳細に記載されている。多種多様な形質転換細胞および非形質転換細胞または初代細胞の一過性トランスフェクションに適したりポフェクション試薬および方法が広範に利用可能であり、したがって、リポフェクションは、真核生物、特に培養内の哺乳類細胞内に構築物を導入するための

魅力的な方法となっている。例えば、LipofectAMINE（商標）（Life Technologies）またはLipoTaxi（商標）（Stratagene）キットが利用可能である。リポフェクション用の試薬および方法を提供している他の企業には、Bio-Rad Laboratories、CLONTECH、Glen Research、Life Technologies、JBL Scientific、MBI Fermentas、PanVera、Promega、Quantum Biotechnologies、Sigma-AldrichおよびWako Chemicals USAが含まれる。

【0076】

組換え融合ポリペプチドの長期間にわたる高収量製造のためには、安定な発現が好ましい。ウイルス複製起点を含有する発現ベクターを使用する代わりに、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）および選択マーカーにより制御される融合ポリペプチドコード化配列で宿主細胞を形質転換することが可能である。組換えベクターにおける選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、細胞がその染色体にベクターを安定して組み込むことを可能にする。一般に使用される選択マーカーには、アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo（Colberre-Garapin, ら, J. Mol. Biol., 150:1, 1981）、およびハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygro（Santerre, ら, Gene, 30:147, 1984）が含まれる。適切な選択により、トランスフェクトされた細胞は、融合ポリペプチドをコードする配列の組み込みコピーを含有する。

【0077】

VIII. 医薬組成物および治療用途

もう1つの態様においては、本発明は、本明細書に記載されている新規構造成分（例えば、ロッキングドメイン）を含有するナノ粒子ワクチン組成物を使用する医薬組成物および関連治療方法を提供する。幾つかの実施形態においては、HIV-1 Env三量体ワクチン組成物は、HIV-1感染を予防および治療するために使用されうる。種々の他の実施形態においては、本明細書に記載されている種々のウイルス性または非ウイルス性免疫原を含有するナノ粒子ワクチンは、対応する疾患、例えば、種々の病原体により引き起こされる感染症を予防または治療するために使用されうる。本発明の幾つかの実施形態は、エボラウイルス感染を予防または治療するためのEBOVワクチンの使用に関する。本発明の幾つかの実施形態は、ラッサウイルス感染を予防または治療するためのLASVワクチンの使用に関する。本発明の幾つかの他の実施形態は、RSV感染を予防または治療するための、本明細書に記載されているRSVワクチンの使用に関する。本発明の幾つかの他の実施形態は、HCV感染を予防または治療するための、本明細書に記載されているHCVワクチンの使用に関する。本発明の更に幾つかの他の実施形態は、MERS-CoV感染を予防または治療するための、本明細書に記載されているCoVワクチンの使用に関する。幾つかの他の実施形態においては、本発明は、ジカウイルス感染を予防または治療するための、ZIKVワクチンの使用方法を提供する。幾つかの他の実施形態においては、本発明は、マラリアを予防または治療するための、熱帯熱マラリア原虫免疫原（例えば、Pf s25）由来のワクチンの使用方法を提供する。幾つかの他の実施形態においては、本発明は、結核を予防または治療するための、結核菌免疫原Ag85AまたはMt b72由来のワクチンの使用方法を提供する。更に幾つかの他の実施形態においては、本発明は、ヒト対象においてLDLコレステロールを低下させるための、PCSK9ワクチンの使用方法を提供する。

【0078】

本発明の種々の治療法の実施においては、疾患または病態（例えば、HIV-1感染症またはマラリア）の予防または治療を要する対象に、本明細書に記載されている対応ナノ粒子ワクチン、免疫原ポリペプチドまたはコード化ポリペプチドを投与する。典型的には、本明細書に開示されているナノ粒子ワクチン、免疫原ポリペプチドまたはコード化ポリ

ヌクレオチドは医薬組成物中に含まれる。該医薬組成物は治療用製剤または予防用製剤のいずれかでありうる。典型的には、該組成物は更に、1以上の薬学的に許容されるビヒクル、そして所望により、他の治療成分（例えば、抗生物質または抗ウイルス薬）を含む。種々の薬学的に許容される添加物も該組成物において使用されうる。

【0079】

したがって、本発明の医薬組成物の幾つかはワクチン組成物である。ワクチン組成物においては、適切なアジュバントが追加的に配合されうる。適切なアジュバントの例には、例えば、水酸化アルミニウム、レシチン、フロイントアジュバント、MPL（商標）およびIL-12が含まれる。幾つかの実施形態においては、本明細書に開示されているワクチン組成物またはナノ粒子免疫原（例えば、HIV-1ワクチンまたはマラリアワクチン組成物）は制御放出（コントロールリリース）または徐放性製剤として製剤化されうる。これは、徐放性ポリマーを含有する組成物において、またはマイクロカプセル化送達系もしくは生体接着性ゲルにより達成されうる。種々の医薬組成物は、当技術分野でよく知られた標準的な方法に従い製造されうる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1995; Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson編, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978; 米国特許第4,652,441号および第4,917,893号; 米国特許第4,677,191号および第4,728,721号; ならびに米国特許第4,675,189号を参照されたい。

【0080】

本発明の医薬組成物は、対象においてHIV-1感染を治療するために又はHIV-1に対する免疫応答を惹起するために、種々の治療用途または予防用途において、例えば、対象においてHIV-1感染またはマラリアを治療するために、または対象においてHIV-1または熱帯熱マラリア原虫に対する免疫応答を誘導するために容易に使用されうる。種々の実施形態においては、ワクチン組成物は、ナノ粒子ワクチンにおける提示免疫原ポリペプチドが由来する病原体により引き起こされる感染症を治療または予防するために使用されうる。したがって、本発明のワクチン組成物は、種々のウイルス（例えば、HIV-1、エボラウイルス、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、RSV、MERS-CoV、SARS-CoV、HCV、デングウイルスまたはジカウイルス）または他の病原体（例えば、結核菌（マイコバクテリウム・ツベルクローシス（Mycobacterium tuberculosis））のような細菌および熱帯熱マラリア原虫（プラスモジウム・ファルシパルム（Plasmodium falciparum））のような寄生生物）により引き起こされる感染症を治療または予防するための多様な臨床状況において使用されうる。それらはまた、哺乳動物対象（例えば、ヒト）における内因性標的に対する所望の免疫応答を誘導するために、例えば、PCSK9またはグレリンに対する抗体応答を誘導するために使用されうる。特に示されていない限り、HIV-1ワクチン組成物の治療用途を例示するために本明細書に記載されている開示は、いずれかの他のウイルス性または非ウイルス性免疫原を提示するナノ粒子ワクチンに同様に適用されうる。

【0081】

例示として、HIV-1ナノ粒子ワクチン組成物は、HIV-1に対する免疫応答を誘導するために、例えば、HIV-1に対する広域中和抗体の産生を誘導するために、対象に投与されうる。HIV感染の発生のリスクを有する対象には、本発明のワクチン組成物を投与して、ウイルス感染に対する予防的防御をもたらすことが可能である。本明細書に記載されているその他の免疫原に由来するワクチンの治療的適用および予防的適用が同様に実施されうる。具体的な対象および病態に応じて、本発明の医薬組成物は、当業者に公知の種々の投与方法により、例えば、筋肉内、皮下、静脈内、動脈内、関節内、腹腔内または非経口経路により対象に投与されうる。一般に、医薬組成物は、選択された疾患もしくは病態またはその1以上の症状を予防、抑制および／または改善するのに十分な時間に

わたり、およびそれらのための十分な条件下で、そのような治療を要する対象に投与される。免疫原性組成物は、HIV-1に対する免疫応答を誘導するのに十分な量で投与される。治療用途には、該組成物は、本明細書に記載されているHIV-1ナノ粒子免疫原の治療的有効量を含有すべきである。予防用途には、該組成物は、本明細書に記載されているHIV-1ナノ粒子免疫原の予防的有効量を含有すべきである。免疫原の適切な量は、治療または予防される具体的な疾患または病態、重症度、対象の年齢、および具体的な対象の他の個人的属性（例えば、対象の健康の全般的状態および対象の免疫系の頑健性）に基づいて決定されうる。有効投与量の決定は更に、動物モデル研究、およびそれに続く、ヒトでの臨床試験により導かれ、対象における標的疾患症状または病態の発生頻度または重症度を有意に低減する投与プロトコールにより導かれる。

10

【0082】

予防用途には、免疫原性組成物は、いずれかの症状に先立って、例えば、感染に先立って投与される。免疫原性組成物の予防投与は、いずれかの後の感染を予防または改善するのに役立つ。したがって、幾つかの実施形態においては、治療される対象は、例えばウイルス（例えば、HIV感染）に対する曝露または曝露の可能性ゆえに、感染（例えば、HIV感染）を有する者または感染の発生リスクを有する者である。開示されている治療用組成物の治療的有効量の投与の後、対象は、感染（例えば、HIV-1感染）、感染（例えば、HIV-1感染）に関連する症状またはその両方に関してモニターされうる。

【0083】

治療用途には、免疫原性組成物は、疾患または感染の発生開始時または発生開始後、例えば、感染（例えば、HIV-1感染）の症状の発生の後または感染の診断の後に投与される。したがって、免疫原性組成物は、感染および／または関連疾患症状の予想される重症度、持続時間または度合を低減するために、HIVウイルスへの予想される曝露の前に、またはウイルスへの曝露の後もしくは該曝露が疑われた後、または感染の実際の開始の後に投与されうる。

20

【0084】

本発明の医薬組成物は、関連病原体による感染（例えば、HIV感染）を治療または予防するための当技術分野で公知の他の物質と組合せられうる。再びHIV-1感染を例示として用いると、これらの公知物質には、例えば抗体、または他の抗ウイルス剤、例えばヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、例えばアバカビル（abacavir）、AZT、ジダノシン（didanosine）、エムトリシタビン（emtricitabine）、ラミブジン（lamivudine）、スタブジン（stavudine）、テノホビル（tenofovir）、ザルシタビン（zalcitabine）、ジドブジン（zidovudine）など、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、例えばデラビルジン（delavirdine）、エファビレンツ（efavirenz）、ネビラピン（nevirapine）、プロテアーゼインヒビター、例えばアンプレナビル（amprenavir）、アタザナビル（atazanavir）、インジナビル（indinavir）、ロピナビル（lopinavir）、ネルフィナビル（nelfinavir）、オサムプレナビル（osamprenavir）、リトナビル（ritonavir）、サキナビル（saquinavir）、チプラナビル（tipranavir）など、および融合タンパク質インヒビター、例えばエンフビルチド（enfuvirtide）などが含まれる。該医薬組成物および該公知抗HIV剤の投与は同時または連続的でありうる。

30

【0085】

本発明に記載されている新規構成成分を含有するナノ粒子ワクチン組成物（例えば、ロッキングドメインで安定化されたHIV-1ワクチン）または本発明の医薬組成物はキットの成分として提供されうる。所望により、そのようなキットは、追加的成分、例えばパッケージング、説明、ならびに種々の他の試薬、例えばバッファー、基質、抗体またはリガンド、例えば対照抗体もしくはリガンド、および検出試薬を含みうる。所望により含まれる説明書が更に、キットにおいて提供されうる。

40

50

【0086】

実施例

以下の実施例は本発明を例示するために記載されており、本発明を限定するものではない。

【0087】

実施例1 種々のLDを含有するBG505 gp140ナノ粒子の収量および純度

表面上に提示されたHIV-1 BG505 UFO三量体を含有する60量体E2PおよびI3-01ナノ粒子に関して、種々のロッキングドメイン(LDS)の有用性を検証した。構築物の設計を図6に図示する。LD含有ナノ粒子を100mLのExp CHO細胞において一過性に発現させ、ついで2G12またはPGT145抗体カラムを使用して精製した。ついでスーパーロース(Superoose)6 10/300 GLカラムでのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により、ナノ粒子サンプルをそれらの収量および純度に関して特徴づけした。SECプロファイルは、ほとんどのLDがHIV-1 BG505 UFO gp140ナノ粒子を種々の度合の収量および純度で安定化させることを示した。E2pの場合には、LD4およびLD5は、高品質BG505 UFO gp140ナノ粒子を他のLDより高い収量で与え、一方、I3-01の場合には、LD4、LD5およびLD7はナノ粒子の収量および純度の点で他のLDより優れていた。注目すべきことに、E2p-LD_xナノ粒子は2G12抗体カラムにより精製され、これは部分的組織化ナノ粒子および単一三量体をも上清から抽出し、一方、I3-01-LD_xナノ粒子はPGT145抗体カラムにより精製され、これは完全組織化ナノ粒子に非常に特異的である。したがって、E2p-LD_xとI3-01-LD_xとの間の純度の差異は、ナノ粒子プラットフォームやLD設計によってではなく、精製に使用された抗体カラムによって生じたものである。

【0088】

実施例2 種々のLDを含有するBG505 gp140ナノ粒子の構造組織化

LD含有HIV-1 BG505 gp140ナノ粒子の組織化(集合、assembly)を更に検証するために、まず、ブルー・ネイティブ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(BN-PAGE)によりE2p-LD_xおよびI3-01-LD_xナノ粒子を分析した。結果を図7に示す。ナノ粒子は大きなサイズおよび高い分子量を有するため、予想通り、BN-PAGEは低分子量バンドを何ら示さず、全てのサンプルがレーン最上部のウェル内に捕捉されることを証明した。選択されたE2p-LD_xおよびI3-01-LD_x構築物をネガティブ染色電子顕微鏡法(EM)により分析し、これは、良好に形成されたナノ粒子を示した。EM生イメージにおいては、より低いストリンジェンシーの抗体カラムを使用したため、E2p-LD_xナノ粒子は単一三量体または部分的組織化ナノ粒子と時々混合していた。それでも、BN-PAGEおよびネガティブ染色EM分析は、ロッキングドメインが、天然様HIV-1 gp140三量体を提示するための2つの大きなナノ粒子プラットフォームを有効に安定化させることを示した。

【0089】

実施例3 ロックメカニズムを有するHIV-1ナノ粒子ワクチンの設計

2つの構築物を第1世代ワクチン構築物として選択した。それぞれはBG505 UFO.664 gp140、10アミノ酸GSリンカー(I3-01専用)、ナノ粒子サブユニット(E2pまたはI3-01のいずれか)、5アミノ酸GSリンカー、自己組織化に際してナノ粒子バックボーンを安定化させるロッキングドメイン(LD)、およびB細胞発生をbNAbへと導く強力な濾胞性Tヘルパー(Tfh)応答を誘導する汎反応性T細胞エピトープ(PADREエピトープ)をコードしている。哺乳類発現に一般に使用されるCMVベクターに基づいてDNAプラスミドを設計し、この場合、「抗原」遺伝子をベクター内に挿入した(図2)。これらの2つのナノ粒子構築物は「UFO-E2p-LD4-PADRE」および「UFO-10GS-I3-01-LD7-PADRE」と称される。ロッキングメカニズムが図2の右隅に図示されている。簡潔に説明すると、二量体LDタンパク質のN末端はナノ粒子サブユニットのC末端に融合している。自己組織化

中に、2つのナノ粒子サブユニットが一緒になって二量体界面を形成すると、それらはそれらの結合LDを接近させて、第2の遙かに強力な界面をナノ粒子殻の直下に形成し、これはその安定性を有意に増強する。

【0090】

実施例4 ロッキングメカニズムを有するナノ粒子ワクチンの製造

ワクチンは精製ナノ粒子タンパク質であり、これは液相中でアジュバントと混合される。該タンパク質物質は一過性ExpiCHO細胞または安定化CHO-S細胞のいずれかにおいてGMP施設で製造されうる。製造プロセスは、3つの工程、すなわち、CHO細胞における発現、PGT145アフィニティーカラムによる精製および品質管理(QC)を含む。

【0091】

実験室規模の製造においては、UFGP140ナノ粒子をExpiCHOの細胞(ThermoFisher)において一過性に発現させる。簡潔に説明すると、ExpiCHO細胞を解凍し、ExpiCHO(商標)発現培地(Expression Medium)(ThermoFisher)と共に37℃、135rpm、8%CO₂でシェーカーインキュベーター内でインキュベートする。細胞が10×10⁶ml⁻¹の密度に達したら、ExpiCHO(商標)発現培地を添加して、トランスフェクションのために細胞密度を6×10⁶ml⁻¹に減少させる。製造業者の説明に従いExpiCHO細胞における100mlのトランスフェクションのためにExpiFectamine(商標)CHO/プラスミドDNA複合体を調製する。合計100μgのプラスミドおよび320μlのExpiFectamine(商標)CHO試薬を7.7mlの冷OptiPRO(商標)培地(ThermoFisher)内で混合する。第1日の最初の供給(フィード)の後、MaxTiterプロトコルに従いExpiCHO細胞を32℃、120rpm、8%CO₂でシェーカーインキュベーター内で培養し、第5日に追加的な供給を行う(ThermoFisher)。トランスフェクションの13~14日後に培養上清を回収し、4000rpmで20分間の遠心分離により清澄化し、0.45μmのフィルター(ThermoFisher)を使用して濾過する。ナノ粒子は、PGT145抗体アフィニティーカラムを使用して培養上清から抽出されうる。プラスミドDNAシード(seed)は本発明者らの研究室で作製可能であり、契約者のGMP製造施設における大規模製造のための契約者に提供可能である。

【0092】

実施例5 ロッキングメカニズムを有するナノ粒子ワクチンの品質管理

CHO/ExpiCHO製造ナノ粒子タンパク質の品質は、(1)収量および純度に関してはSuperose610/300GLカラムおよびブルー・ネイティブ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(BN-PAGE)により、(2)熱安定性に関してはMicroCalVP-キャピラリー熱量計(Malvern)での示差走査熱量測定(DSC)により、(3)抗原性に関してはOctetRED96、定量バイオセンサーおよびbNAbと非NAbとのパネルを使用するバイオレイヤー(bio-layer)干渉法(BLI)により、ならびに(4)ナノ粒子組織化および構造的完全性に関してはネガティブ染色電子顕微鏡法(EM)により評価されうる。QCプロセスは、選択されたナノ粒子構築物に関して本発明者らの研究室において検証されている(後記を参照されたい)。注目すべきことに、QC工程(1)~(2)は、タンパク質の発現、製造および精製の後、任意のGMP施設の現場で容易に行われうる。

【0093】

100mlのExpiCHO細胞における一過性発現およびPGT145抗体アフィニティーカラムを使用する細胞上清からの精製の後、Superose610/300GLカラムでのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によりナノ粒子を分析した(図3A)。SECプロファイルで8mlにおける単一の鋭いピークが観察され、これは両方の構築物に関する高い純度を示している。更に、UV₂₈₀値はE2p系構築物およびI3-01系構築物に関してそれぞれ約450および約350に達し、これは、15~20m

g/Lと推定される、両方の構築物に関する高い収量を示している。特に注目すべきことに、ロッキングメカニズムは安定性だけでなく、純粋なナノ粒子の収量をもI3-01およびE2pに関して2〜3倍改善しうる。また、SEC前のナノ粒子サンプルをBN-PAGEにより分析した。これは、ゲル上の低分子量種に対応するバンドを示さず、ナノ粒子は大きなサイズおよび高い分子量を有するため、全てのサンプルがレーン最上部のウェル内に捕捉された(図3B)。したがって、BN-PAGEは、SEC分析において認められた高い純度を証明した。

【0094】

ついで、精製されたナノ粒子を、熱安定性を測定するためにDSCにより評価した。それは、E2p系構築物およびI3-01系構築物に関して、それぞれ69.52および68.26℃の融解温度(Tm)を示し、これは、BG505 UFO三量体の場合(Tm=68.24℃)と比較して高度の熱安定性を示している(図3C)。したがって、ロッキングメカニズムにより、Tmはナノ粒子プラットフォームには左右されず、提示抗原(この場合はUFGp140三量体)の熱安定性のみにより決定される。前記の選択された2つのナノ粒子構築物は化学物質に対して耐性であり、-80℃から4℃までの広い温度範囲で安定であることも判明している。例えば、凍結融解サンプルまたは4℃で数週間保存されたサンプルをネガティブ染色EMにより分析したところ、温度変化による分解は観察されなかった。

【0095】

GMP製造ナノ粒子の構造および抗原性を後記のとおりに更に特徴づけした。

【0096】

実施例6 抗原性および免疫原性の評価

簡便で頑強な製造プロセスならびに優れた生化学的および生物物理学的特性に加えて、更なるインビトロおよびインビボ評価は、ロッキングメカニズムを有するこれらのUFGp140ナノ粒子が遥かに最も有望なHIV-1ワクチン候補となりうることを示した。

【0097】

インビトロ評価ー抗原分析および構造解析(またはQC工程3および4): 前記の2つの選択されたナノ粒子を、BLIおよび5つのbNAb(図4A)と4つの非NAb(図4B)とのパネルを使用して、抗体結合に関して評価した。UFO三量体を対照として含めた。全体的に、両方のナノ粒子は、V2頂部、N332スーパーサイトおよびCD4bを認識するbNAbへの有意に増強(3〜4倍増強)した結合を示したが、35022によるgp120-gp41界面への結合を低減した。これは、ナノ粒子表面上のこの部位への接近が妨げられたことによるものである可能性が高い。ナノ粒子提示は、19b結合の中等度の増強を示したV3頂部を除き、CD4b、CD4i部位および免疫優性gp41エピトープへの非NAb結合を増強しないことも注目に値する。

【0098】

また、前記の2つの選択されたナノ粒子をネガティブ染色EMによって構造的に分析した。これは、表面から突出する天然様UFGp140三量体の高密度層を有する良好に形成された均一ナノ粒子を示した(図4C)。注目すべきことに、ほとんどの場合、ナノ粒子殻内のロッキングドメイン(LD)はこの低解像度では視認できなかった。しかし、LDタンパク質に対応する、ナノ粒子表面から内側に突出する構造が時折認識可能であった。

【0099】

小動物モデルにおけるインビボ評価: 本発明者らはマウスおよびウサギにおいてUFO三量体およびナノ粒子のサブセットを評価している。マウスにおいては、全ての三量体(スキヤフォールド付きgp140.681構築物を除く)は自己ティア2 NAbを誘導できなかった。フェリチンナノ粒子とI3-01ナノ粒子設計の初期形態(「UFO-PADRE-I3-01」と称される)とは第8週に自己ティア2 NAbを誘導し、I3-01において、より強力な応答が観察された(図5A)。マウス血清における非特異的抗ウイルス活性を排除するために精製IgGを使用して、TZM-bl HIV中和ア

ッセイを行った。注目すべきことに、これはWTマウスにおけるEnv誘導性ティア2 NA b 応答の最初の観察であるが、以前の研究では、BG505 SOSIP三量体は16週間の免疫化の後でWTマウスにおいて自己ティア2 NA b 応答を誘導できなかった。また、UFO三量体およびフェリチンナノ粒子の免疫原性をウサギにおいて評価し、抗体応答を長期的に測定した。フェリチンナノ粒子は第8週に自己ティア2 NA b を誘導するが、BG505 UFO三量体はそのようなティア2 NA b 応答を誘導するためには更に2か月を要することを、結果は示した(図5B)。最近の研究において、Zhuの研究室は、最終的なナノ粒子構築物の1つであるUFO-E2p-LD4-PADREでWTマウスを免疫した。試験した8匹のマウスのうち、1匹は他のマウスより遥かに強力なティア2 NA b 応答を示したが、全ての動物は、第11週に1mg/mlのIgG濃度で50~95%の中和を伴うティア2 NA b 応答を示した(データ非表示)。したがって、ロックメカニズムを有する最終的なナノ粒子ワクチン構築物がインビボでは未だ評価されていないとしても、該インビボデータは本発明者らのUFO gp140ナノ粒子のワクチンの可能性を明確に示している。これらの2つのナノ粒子構築物は、それらのティア2分離体に対する、より広域で強力な中和抗体応答を誘導すると予想される。

【0100】

実施例7 クラスI融合を利用する他のウイルス(フィロウイルス)に対するワクチン

本発明者らはフィロウイルスに対するナノ粒子ワクチンを開発した。エボラウイルス(EBOV)およびマールブルグウイルスのようなフィロウイルスはヒトおよび非ヒト霊長類(NHP)において致命的な出血熱を引き起こしうる。フィロウイルスはヒトの疾患の突発を過去に引き起こしているが、エボラウイルスは2013~2016年の史上最大の突発の唯一の原因であり、これはアフリカの9カ国に広がり、28,600の症例および11,325人の死亡をもたらした。現在、コンゴ民主共和国(DRC)でエボラ出血熱の突発が続いており、600人以上の命を奪っている。フィロウイルス糖タンパク質(GP)は、付着および膜融合を開始させることにより細胞侵入をもたらす、ワクチン設計の主要標的である。GPは、ヒト生存者および免疫化動物から単離された中和抗体により認識されうる(Saphireら, Cell 174(4):938-952, 2018を参照されたい)。

【0101】

本発明者らの研究においては、GPの外部ドメイン(アミノ酸33~632)を含有するが非構造化ムチン様ドメイン(MLD;アミノ酸313~463)を欠失している種々のGPの融合構築物(したがって、GPΔMucと称される)を設計するために、エボラウイルスのザイル株(GenBank:NP_066246)のアミノ酸配列を使用した。GPのGPΔMuc形態は構造研究に広範に使用されているため(Leeら, Nature 454(7201):177-182, 2008)、それはフィロウイルスワクチン設計のための合理的な基礎を提供する。本発明者らはフェリチン、E2pおよびI3-01ナノ粒子プラットフォーム上に野生型(WT)GPΔMucおよびGPΔMucの一般的UFO(UFOg)形態を提示させた(図8A)。Exp CHO細胞における一過性発現の後、Superose 6 10/300カラムでの精製の前に、MAb100抗体カラム(フェリチンおよびE2pの場合)またはMAb114抗体カラム(I3-01の場合)を使用して融合タンパク質を上清から抽出した。全体として、SECプロファイルにより示されるとおり、GPΔMuc-UFOgを提示するナノ粒子において、WT GPΔMucを提示するものより大きな収量および純度が認められた(図8B)。フェリチンの場合、GPΔMuc-UFOg-フェリチンは、WT GPΔMuc-フェリチンより顕著な、ナノ粒子のピークを示した。E2pの場合、WT GPΔMuc-E2pはナノ粒子および未組織化タンパク質のピークを示し、一方、GPΔMuc-UFOg-E2pは主にナノ粒子の高いピークを示した。I3-01の場合、両方の融合構築物はナノ粒子組織化に問題があるようであり、SECプロファイルにおいて、15~16mlにおける未組織化融合タンパク質の高いピークが示された。それでも、ネガティブ染色EMは、WT GPΔMuc三量体およびGPΔMuc-UFOg三量体を提示する良好に形成

されたフェリチン、E2PおよびI3-01ナノ粒子を示した（図8C）。

【0102】

これまでに、本発明者らはHIV-1 UFO三量体提示E2pおよびI3-01ナノ粒子のためのロッキングドメインを体系的にスクリーニングしている。本研究においては、エボラGPΔMuc-UFOg三量体提示E2pおよびI3-01ナノ粒子のためのロッキングドメインを体系的にスクリーニングした。ロッキングメカニズムは概要図において例示されうる（図8D、左）。ロッキングドメインを有する60量体ナノ粒子の構造を可視化するために、E2pナノ粒子に関する原子モデルを構築し、ロッキングドメイン（LD4）およびT細胞エピトープ（PADRE）を該モデル内に段階的に組み込んだ（図8D、右）。本発明者らの研究においては、7個のGPΔMuc-UFOg-E2p-LDn構築物（n = 1~7）および5個のGPΔMuc-UFOg-10GS-I3-01-LDn構築物（n = 4/5/7/8/9）をExp CHO細胞において一過性に発現させた。Superose 6 10/300カラムでの精製の前に、Mab100抗体カラム（フェリチンおよびE2p用）またはMab114抗体カラム（I3-01用）のいずれかを使用して、GPΔMuc融合タンパク質を上清から抽出した。全てのE2p系構築物のうち、LD4およびLD7が最高の収量および純度を示し、全てのI3-01系構築物のうち、LD7およびLD8が最良の結果を示した（図8E）。これはHIV-1 UFO gp140ナノ粒子に関する本発明者らの過去の知見とほぼ一致しており、該知見においては、LD4およびLD7がそれぞれE2pおよびI3-01に最も適合しているようであった。したがって、LD4と組合されたE2pおよびLD7と組合されたI3-01が、提示される免疫原には無関係に、ワクチン開発のための2つの一般的なナノ粒子プラットフォームとして使用されうる。

【0103】

HIV-1 gp140ナノ粒子に関する本発明者らの観察に一致するもう1つの知見は、ロッキングドメインのC末端へのT細胞エピトープの付加が、得られるナノ粒子（この場合はGPΔMuc-UFOgナノ粒子）の収量および純度を顕著に改善するというものであった（図8F）。これは、中空ナノ粒子の中心に疎水性T細胞エピトープクラスターが形成されることにより説明されうるであろう（図8D、右）。BN-PAGEは、ゲル上に高分子量のバンドを示すことにより、ナノ粒子組織化を更に証明した（図8G）。しかし、全てのGPΔMuc-I3-01融合構築物が未組織化二量体および単量体種を示した。最後に、3個のWT GPΔMucナノ粒子および3個のGPΔMuc-UFOgナノ粒子の抗原性プロファイルを、ELISAにおいて、それらのそれぞれのGPΔMuc三量体と比較した（図8H）。全体として、GPΔMucナノ粒子は、GPΔMuc三量体より遥かに強力な、中和抗体への結合を示した。

【0104】

実施例8 クラスI融合を利用する他のウイルス（アレナウイルス）に対するワクチン

同じ設計戦略に基づいて、本発明者らはアレナウイルスに対するナノ粒子ワクチンを開発した。アレナウイルスもヒトにおいて重度の出血熱を引き起こすことが公知である。ラッサマンレナウイルス（LASV）はラッサ熱の原因因子であり、西アフリカにおける重大な公衆衛生問題である。LASV糖タンパク質複合体（GPC）は、受容体結合サブユニットGP1と膜貫通型融合媒介性サブユニットGP2とをそれぞれが含有するヘテロ二量体の三量体である。HIV-1 gp160およびエボラGPのような他のクラスI融合タンパク質と同様に、LASV GPCは細胞侵入をもたらし、中和抗体応答のための主要標的となる。現在、LASV感染を予防するために利用可能なワクチンは存在しない。最近、ヒト中和抗体と複合体形成したLASV GPCの結晶構造が報告された（Hastieら，356（6341）：923-928，2017を参照されたい）。

【0105】

本発明者らの研究においては、LASV株（GenBank：NP_694870）の外部ドメインのアミノ酸配列に基づいてGPC融合構築物を設計した。LASV GPCおよびナノ粒子のタグ非利用精製のために、中和抗体37.7H（Hastieら，Sc

10

20

30

40

50

ience 356 (6341) : 923-928, 2017を参照されたい) に基づく抗体カラムをパックした。2つの融合構築物 (GPC-10GS-FRおよびGPC-5GS-E2p-LD4-PADRE) を、それぞれ26.3 nmおよび37.6 nmの直径を有するナノ粒子を与えるLASVナノ粒子ワクチンの概念を試験するために設計した (図9A)。これらの2つの融合構築物をExp CHO細胞において一過性に発現させ、37.7 H抗体カラムを使用して精製した。37.7 HはLASV GPC三量体のGP2に基部において結合するため、ナノ粒子表面上のGP2への接近の制限ゆえに、それはGPCナノ粒子の精製に最適でないかもしれない。これは、両方の構築物で観察された低い収量を説明するものである。それでも、37.7 H精製タンパク質をネガティブ染色EMにより分析したところ、それは、未組織化タンパク質と混合した良好に形成されたナノ粒子を示した (図9B)。GPCとフェリチンナノ粒子との間の長い柔軟なリンカーゆえに、GPCスパイクはフェリチンナノ粒子表面上で認識され得なかった (図9B、左)。これとは対照的に、GPC-5GS-E2p-LD4-PADREのEMイメージの拡大図はE2pナノ粒子表面上にGPC三量体の層を示した (図9B、右)。総合すると、本発明者らの研究が証明したところによると、より有効な抗体カラムがGPCナノ粒子の純度を更に改善する可能性はあるものの、LASV GPCは、ロッキングドメインを含有する60量体ナノ粒子上で提示されうる。

【0106】

実施例9 クラスI融合メカニズムを利用する他のウイルス (RSV) に対するワクチン

本発明者らは更に、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) に対するナノ粒子ワクチンを開発した。ヒト呼吸器合胞体ウイルス (hRSV) 感染は乳児、幼児および高齢者における細気管支炎および入院の主要原因である。融合糖タンパク質 (F) は細胞侵入をもたらし、ワクチン設計の主要標的である。Fは、感染ドナーから単離された中和抗体により認識されうる。HIV-1 gp160、エボラGPおよびラッサGPCと同様に、hRSV FはクラスI膜貫通表面タンパク質であり、N末端にシグナルペプチド (アミノ酸1~25) を有し、C末端付近に膜アンカーを有する。Fは最初に不活性前駆体タンパク質F0として合成され、これはフューリンまたはフューリン様細胞エンドプロテアーゼによるトランスゴルジ複合体における切断による活性化に際してホモ三量体へと組織化する。該切断はNH₂-F₂-F₁-COOHの形態の2つのジスルフィド結合サブユニットを与える。F₁のN末端は、該切断の結果として、融合ペプチド (アミノ酸137~154) を含有し、これは、宿主細胞膜内に直接挿入されて融合を誘発する疎水性ペプチドである。F₁サブユニットは、ヘプタッド反復 (7アミノ酸繰り返し) (HR) の、2つの領域をも含有し、これらは融合中に結合し、ウイルス膜と細胞膜とを接近させる。中和抗体と複合体形成した融合前Fの結晶構造は原子分解能で決定されている (McLellanら, 340 (6136) : 1113-1117, 2013を参照されたい)。

【0107】

本発明者らの研究においては、フェリチン、E2pおよびI3-01ナノ粒子上に融合前hRSV Fを提示させ、E2pおよびI3-01 60量体において種々のロッキングドメインおよびリンカーを試験した。分子モデリングは、hRSV F FRナノ粒子が33.9 nm以上のサイズを有し、hRSV F E2p (またはI3-01) が少なくとも45.2 nmの直径を有することを示した (図10A)。本発明者らは、融合前F特異的ヒト中和抗体D25を使用して、hRSV FおよびF提示ナノ粒子のタグ非利用精製のための抗体カラムをパックした (McLellanら, 340 (6136) : 1113-1117, 2013を参照されたい)。全てのhSV F融合構築物をExp CHO細胞において一過性に発現させた。F融合タンパク質を、D25抗体カラムを使用して上清から抽出し、ネガティブ染色EMにより分析した。FのC末端とフェリチンのN末端との間に10アミノ酸の (G₄S)₂リンカーを含有するF-10GS-FR構築物は、分子モデリング (図10A) に一致する、視認可能な「親指様」融合前F三量体をフェリチン表面上に含有するナノ粒子を形成した (図10B)。ついで、ロッキングドメイン (LD4) とT細胞エプトープ (PADRE) とを含有するE2pナノ粒子上に融合前Fを提示

させた。FのC末端とE2pサブユニットのN末端との間に10アミノ酸の(G4S)₂リンカーを含有する及び含有しない2つの構築物を試験した。長いリンカーの非存在下では、融合前F三量体はE2pナノ粒子表面上に粒状突起として現れたが(図10C、左)、長いリンカーの存在下では、一連の「親指様」融合前F三量体がE2pナノ粒子表面上で認識可能であった(図13C、右)。最後に、ロッキングドメイン(LD7)とPADREとを含有するI3-01ナノ粒子上に融合前Fを提示させた。T細胞エпитープ(PADRE)がFとE2pとの間に挿入され(外部)、LD7のC末端に結合している(内部)2つの構築物を作製して、ロッキングドメインの存在下のナノ粒子組織化に対するT細胞エпитープの位置の影響を調べた。前者(F-5GS-PADRE-I3-01-LD7)に関しては、良好に形成されたナノ粒子が観察されたが、ナノ粒子表面上に融合前Fスパイクは認識されなかった(図11D、左)。後者(F-10GS-I3-01-LD7-PADRE)に関しては、未組織化F三量体が存在するにもかかわらず、「親指様」融合前F三量体の層で修飾された良好に形成されたナノ粒子が観察された(図11D、右)。

【0108】

総合すると、本発明者らの結果は、ロッキングドメインを含有するE2pおよびI3-01ナノ粒子上にhRSVFが提示されうることを実証し、種々の長さのリンカーの使用および種々の位置におけるT細胞エпитープの配置の具体例を提供した。

【0109】

実施例10 クラスI融合メカニズムを利用する他のウイルス(CoV)に対するワクチン

本発明者らはまた、コロナウイルス(CoV)に対するナノ粒子ワクチンを開発した。CoVは、プラス鎖RNAゲノムを有するエンベロープウイルスである。2002年のアジアにおける重症急性呼吸器症候群(SARS)の突発は新たなコロナウイルスの発見につながり、それは後にSARS-CoVと命名された。SARS-CoVは突発中に8000人以上に感染し、致死率は約10%であった。2012年に、コロナウイルスの新種である中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)が特定され、それ以来、該ウイルスは27か国で2000人以上に感染し、致死率は約35%であった。どちらのコロナウイルスにおいても、ウイルスゲノムはスパイク(S)、エンベロープ(E)、膜(M)およびヌクレオカプシド(N)構造タンパク質をコードし、そのうちのSタンパク質はS1サブユニットにおける受容体結合ドメイン(RBD)を介した宿主受容体への結合ならびにそれに続く膜融合およびウイルス侵入をもたらす。RBDはコアサブドメインおよび受容体結合モチーフ(RBM)を含有する。コアサブドメインはそれらの2つのコロナウイルス間で非常に類似しているが、それらのRBMは、異なる受容体特異性を示す。すなわち、SARS-CoVはアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)を認識し、一方、MERS-CoVはジペプチジルペプチダーゼ4(DPP4)に結合する。どちらのコロナウイルスの場合も、Sタンパク質が感染をもたらし、したがって、ワクチン設計の主要標的となる。

【0110】

本発明者らの研究においては、フェリチン、E2PおよびI3-01ナノ粒子(E2pおよびI3-01構築物内にはロッキングドメインが組み込まれている)上にMERS-CoV S三量体(Pallesenら, PNAS, 114: E7348-E7357およびPDB ID: 5W9Kを参照されたい)を提示させた。S構築物は特定のMERS-CoV株(GenBank: JX869059)に由来する。分子モデリングは、MERS S FRナノ粒子が34.0nm以上のサイズを有し、MERS S E2p(またはI3-01)が少なくとも45.2nmの直径を有することを示した(図11A)。本発明者らは、RBD特異的中和抗体MCA1を使用して、MERS-CoV SおよびSナノ粒子のタグ非利用精製のための抗体カラムを開発した。Exp CHO細胞における一過性発現の後、S融合タンパク質を、MCA1抗体カラムを使用して上清から抽出し、ネガティブ染色EMにより直接分析した。SのC末端とフェリチンサブユニットのN末端

との間に10アミノ酸のGSリンカー（配列番号24）を含有するMERS S-10GS-FRは、表面上に視認可能な大きなSスパイクを含有するナノ粒子を形成した（図11B、左）。MERS S-10GS-E2p-LD4-PADRE（図11B、中央）およびS-10GS-I3-01-LD7-PADRE（図11B、右）は、表面上に20個のSスパイクが提示された、より大きなナノ粒子を形成した。しかし、EMイメージは未組織化S融合タンパク質をも示した。

【0111】

ナノ粒子上のSタンパク質の安定性を改善するために、Sとナノ粒子サブユニットとの間に「T4フィブリチンのC末端三量体化モチーフ」、すなわちフォールドンを挿入した。S-フォールドン-10GS-FR（図11C、左）およびS-フォールドン-10GS-I3-01-LD4-PADRE（図11C、右）により形成されたナノ粒子上に、SスパイクがEMイメージにおいて明らかに認識可能であった。このことは、追加的な構成成分が、ロッキングドメインを含有するナノ粒子内に組み込まれうることを証明している。

【0112】

実施例11 クラスII融合メカニズムを利用するウイルス（HCV）に対するワクチン

本発明者らは更に、HCV E2コアナノ粒子ワクチンの開発において、同じワクチン設計戦略を適用した。C型肝炎ウイルス（HCV）はフラビウイルス科ヘパシウイルス属の小さな包膜一本鎖プラス鎖RNAウイルスである。世界人口の1～2%が感染しているHCVは重大な健康問題であり、年間約50万人の死亡および毎年推定150～200万人の新たに感染を引き起こしている。HCVは高い遺伝的多様性を有し、7個の主要遺伝子型および86個の亜型に分類されうる。HCVは迅速な突然変異を受けることがあり、これは感染個体内にウイルス準種を生じさせて、宿主免疫系から逃れさせる。しかし、急性感染患者の20～30%における自発的ウイルスクリアランスは、HCV感染が、ワクチン接種により誘導される有効な免疫応答で予防可能であることを示唆している。E1およびE2エンベロープ糖タンパク質は、宿主肝細胞内へのウイルス侵入をもたらすHCVエンベロープ上のヘテロ二量体を形成する。E2は、受容体結合タンパク質として、宿主細胞受容体CD81およびSR-B1と直接相互作用し、主にCD81相互作用を遮断することによりHCVを中和する中和抗体の主要標的である。構造解析を容易にするために、高可変領域1（HVR1）ならびに可変領域2および3（VR2/3）（E2コアと称される）にランケーションを含有するE2構築物を開発した。広域中和抗体AR3Cと複合体形成した分離株H77（遺伝子型1a）由来E2コアの結晶構造（Kongら、Science 342（6162）：1090-1094，2013を参照されたい）、および中和抗体2A12に結合した分離株J6（遺伝子型2a）由来ランケート化E2の結晶構造（Khanら、Nature，509（7500）：381-384，2014）は、HCVエンベロープ糖タンパク質の免疫認識に対する最初の洞察を提供した。しかし、現在、HCV感染を予防するために利用可能な認可されたワクチンは存在しない。

【0113】

本発明者らの研究においては、HCVワクチンとしてE2コアナノ粒子を設計した。24～60個のE2コアをそれぞれが表面上に提示するナノ粒子は、保存されたE2エピトープに対する有効な中和抗体応答を誘導可能であり、したがって、有望なHCVワクチン候補となりうると仮定した（図12A）。この仮定を検証するために、3つのナノ粒子プラットフォーム、すなわち、24.5～37.5nmのE2コアナノ粒子を与える24量体フェリチン（FR）ならびに60量体E2pおよびI3-01を試験した（図12B）。本発明者らの研究で使用したE2コア構築物は、2つの分離株H77（遺伝子型1a）およびHK6a（遺伝子型6a）のE2のアミノ酸配列に由来するものであった。本発明者らの設計において、E2コアのC末端を、10-GSリンカー（配列番号24）を介してナノ粒子サブユニットのN末端に遺伝的に融合させた。E2コア融合構築物をExplicHOまたは293F細胞において一過性に発現させ、AR3C抗体カラムで精製し、ついで、Superose 6 10/300 GLカラムを使用するSECにより精製した

(図12C)。H77分離株由来の構築物の場合、SECプロファイルは全てのE2コアナノ粒子に関して高収量および高純度を示し、24量体と60量体とで異なるパターンが観察された。E2-コア-10GS-FRは、凝集体に対応する8~9mlにおけるピークを示したが、E2-コア-10GS-E2pおよびI3-01構築物は共に、ナノ粒子のピークから尾引きする15~20mlにおけるピークを示した(図12C)。HK6a分離株由来の構築物の場合、粒子の収量および純度の低下は低分子量種の増加を伴っていた。SECにより精製されたE2コア融合タンパク質をBN-PAGEおよびネガティブ染色EMで分析したところ、それは、それぞれ、高分子量バンドおよび均質ナノ粒子を示した(図12Dおよび12E)。最も広域中和性の抗体のEC50における最大100倍の変化により示されるとおり、E2コアナノ粒子に対する抗体結合の増強が観察された(図12F)。抗原性に対する多価提示の効果を更に調べるために、オクテット(Octet)および小パネル抗体を使用して、H77由来E2コアナノ粒子およびHK6a由来E2コアナノ粒子をそれらのそれぞれのE2コアに対して試験した(図12G)。ピーク抗体結合シグナルと抗原価との間の相関性がH77由来ナノ粒子およびHK6a由来ナノ粒子の両方で観察された: 60量体>24量体>単量体。

【0114】

最後に、E2コアナノ粒子におけるロッキングドメインの使用を検討した。この目的のために、HCV H77分離株由来の構築物E2-コア-10GS-E2p-LD4-PADREおよびE2-コア-10GS-I3-01-LD7-PADREを試験した。ネガティブ染色EMは、どちらの構築物においても、綺麗な均質ナノ粒子を示した(図12H)。注目すべきことに、E2-コア-10GS-E2p-LD4-PADREは、LD4およびPADREにより形成される高密度内部殻ゆえに、EMイメージにおいて硬質表面を示したが、LD4およびPADREを含有しないその対応物は中空であるようであった。それでも、本発明者らの結果は、HCV E2コアが、ロッキングドメインを含有するナノ粒子上に提示されうることを証明した。

【0115】

実施例12 クラスII融合メカニズムを利用するウイルス(ZIKV)に対するワクチン

本発明者らはまた、本明細書に記載されているワクチン設計戦略をジカウイルス(ZIKV)DIIINANO粒子ワクチンの開発のために適用した。ZIKVはフラビウイルス科のプラス鎖RNAウイルスであり、デング熱(DENV)、西ナイルウイルス(WNV)、日本脳炎ウイルス(JEV)および黄熱病ウイルス(YFV)をも含む。ZIKVゲノムは3つの構造タンパク質(キャプシド、prMおよびエンベロープ)および7つの非構造タンパク質(NS1、NS2a/b、NS3、NS4a/bおよびNS5)をコードする。2015年および2016年のZIKVの突発は世界的な公衆衛生上の危機を引き起こしている。ZIKVは、主にヤブカ(Aedes)属の蚊により伝染し、成人におけるギラン・バレー症候群(GBS)および新生児における小頭症を引き起こしうる。エンベロープ(E)に基づく幾つかのワクチン候補がマウスおよびNHPにおいてZIKV感染を予防することが報告されている。しかし、既存の抗フラビウイルス免疫による、ZIKVの感染および発病の抗体依存性感染増強(ADE)は、現在のワクチン戦略に関する安全性の懸念を招いている。ZIKV感染を予防するのに利用可能な、より有効で安全な他のワクチンは存在しない。

【0116】

ZIKV Eタンパク質は3つの構造ドメインDI、DIIおよびDIIIからなる。これらの3つのドメインのうち、細長い指様DIIはE二量体化をもたらし、ウイルス膜と宿主細胞膜との融合によるpH依存的侵入を誘発する保存された融合ループ(FL)を含有する。DIIIは、ウイルスの付着に寄与するC末端免疫グロブリン(Ig)様ドメインを形成する。多数の中和抗体および非中和抗体が、DENVへの過去の曝露の有無にかかわらず、ZIKV感染ドナーから特定されている。一般に、DIIIに対する抗体はZIKVに特異的である傾向にあり、DI/IIに対する抗体より強力に中和する傾向に

ある。後者は、しばしば、DENVと交差反応し、中和が不十分であり、場合によっては、インビボでウイルス感染を著しく増強する。

【0117】

本発明者らの研究においては、潜在的なZIKVワクチン候補として、24量体フェリチン（FR）ならびに60量体E2pおよびI3-01に基づいてDIIINANO粒子を設計した。DIII融合構築物は、アフリカ株MR766（GenBank：MK105975）およびアジア株BeH818995（GenBank：KU365777）のETAタンパク質に由来するDIIIのアミノ酸配列に基づくものであった。また、DIIIに対する中和抗体ZK2B10を使用するDIIINANO粒子のタグ非利用精製のための抗体カラムを開発した（Yuら，JCI Insight 2（12）：93042，2017を参照されたい）。該DIII-FR融合構築物の全てをExp CHO細胞において一過性に発現させ、ZK2B10抗体カラムにより精製した。分子モデリングは、DIIIの層を表面上に有する60量体I3-01が約35nmのナノ粒子を与えることを示している（図13A、左）。SECプロファイルにおいては、良好に形成されたDIII-FRフェリチンナノ粒子に対応する高いピークが観察された（図13A、右）。Superose 6 10/300 GLカラムで14mlにおいて溶出したSEC画分をBN-PAGEにより分析したところ、それは、FRナノ粒子に特徴的な高分子量バンドを示した（図13B）。ネガティブ染色EMは、良好に形成されたDIIINANO粒子を示した（図13C、左）。しかし、DIIIのサイズが小さく、柔軟な10GSリンカーを使用したため、ナノ粒子表面上にDIIIを認めることはできなかった。同じプロトコルに従い、I3-01およびE2p融合タンパク質を製造し、ネガティブ染色EMにより、それらのナノ粒子組織化を評価した（図13C、中央および右）。DIII-10GS-I3-01ナノ粒子はEMイメージにおいて容易に認めることができたが、E2pはナノ粒子組織化が困難であるらしく、低い収量を示した。

【0118】

最後に、ロッキングメカニズムがI3-01ナノ粒子上のDIII提示を更に改善するかどうかを調べた。実際、ネガティブ染色EMは、Exp CHO細胞において高収量および高純度で製造された均質なDIII-10GS-I3-01-LD7-PADREナノ粒子を示した（図13D）。要約すると、本発明者らは、ロッキングドメインLD7とT細胞エпитープPADREとを含有するI3-01ナノ粒子構築物で観察された最適な特性を有する種々のナノ粒子プラットフォーム上にZIKV DIIIを提示させることに成功した。

【0119】

実施例13 非ウイルス標的に対するワクチンの開発（マラリアワクチン）

本発明者らは更に、熱帯熱マラリア原虫 [プラスモジウム・ファルシパルム (Plasmodium falciparum)] (マラリア) および結核菌 [マイコバクテリウム・ツベルクローシス (Mycobacterium tuberculosis)] (TB) のような細胞内病原体、ならびにプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型 (PCSK9) のようなヒトタンパク質へと、本発明者らのワクチン研究を拡張した。本発明者らの主な仮説は、ナノ粒子の提示が細胞内病原体に対する免疫応答を増強し、ヒトタンパク質に対する免疫寛容を破壊するというものである。抗体およびT細胞の応答は主な免疫学的測定値として測定される。

【0120】

マラリアワクチン。熱帯熱マラリア原虫 [プラスモジウム (ピー)・ファルシパルム (Plasmodium (P.) falciparum)] は、生命を脅かす疾患であるマラリアをヒトにおいて引き起こす単細胞原虫寄生生物である。熱帯熱マラリア原虫は、感染した雌ハマダラカ (Anopheles) に刺されることによりヒトに伝染しうる。2017年に、熱帯熱マラリア原虫は87か国において推定2億1900万人に感染し、約435,000人のマラリア関連死をもたらした。現在、マラリアは治療可能であるものの、熱帯熱マラリア原虫感染を予防するための認可されたワクチンは存在しない。本発明

者らの研究においては、この寄生生物の生活環に重要な3つの抗原、すなわち、P f s 2 5、スポロゾイト周囲タンパク質（C S P）および網状細胞結合タンパク質ホモログ5（P f R H 5）に基づいて、マラリアナノ粒子ワクチンを開発した。

【0121】

第1の抗原であるP f s 2 5は、寄生生物の接合体およびオーキネート形態の表面上で発現される25 k D aの有性段階の抗原である。抗P f s 2 5抗体は、媒介動物である蚊の中腸における熱帯熱マラリア原虫オーシストの発生を阻止しうる。現在、P f s 2 5は、最も開発された伝染阻止ワクチン（T B V）候補であり、ヒトの臨床試験において試験されている。アジュバントであるモンタニド（M o n t a n i d e）I S A 5 1における可溶性P f s 2 5でのヒトへのクチン接種により誘導される抗P f s 2 5抗体は標準的膜フィーディングアッセイ（s t a n d a r d m e m b r a n e f e e d i n g a s s a y）（S M F A）において機能的であり、熱帯熱マラリア原虫の実験室分離株および野外分離株の両方の発生を阻止する。ヒト化マウスから単離されたモノクローナル抗体と複合体形成したP f s 2 5の構造が決定されており（S c a l l y ら，N a t C o m m u n，8：1568，2017を参照されたい）、合理的なワクチン設計のための基礎を提供している（図14A）。

【0122】

本発明者らは、2つの抗P f s 2 5抗体、すなわち、F a b 1 2 6 0とF a b 1 2 6 9（図14B）を、細胞上清からP f s 2 5を精製するそれらの能力に関して試験した。E L I S A データに基づいて、P f s 2 5 ナノ粒子のタグ非利用精製用の抗体カラムにパック（充填）するためにF a b 1 2 6 0を選択した。また、平坦なL字構造を有するP f s 2 5の、ナノ粒子表面上の多価提示を促進させるために、「ネック（n e c k）」領域を設計した（図14C）。より詳細には、ウイルスタンパク質に由来する3ヘリックスバンドルを、リンカーの存在下または非存在下、P f s 2 5とナノ粒子サブユニットとの間に挿入した（図14C）。ヘンドラウイルスドメイン（P D B I D：4 H E O）および麻疹ウイルスドメイン（P D B I D：1 O K S）に由来する2つのヘリックスバンドル（ネックおよびネック2と称される）を、種々のナノ粒子プラットフォームと組合せて試験した。全ての融合構築物をE x p i C H O細胞において発現させ、ついで、F a b 1 2 6 0抗体カラムを使用して精製した。F a b 1 2 6 0で精製された融合タンパク質をネガティブ染色EMにより特徴づけしたところ、それはネック1含有構築物のみに関するナノ粒子を示した（図14D）。特に、P f s 2 5-ネック1-10GS-FRナノ粒子は、EMにより示されるとおり、最高の収量および純度を示した（図14D、左）。P f s 2 5-ネック1-E2p-LD4-PADRE構築物は、良好に形成されたナノ粒子と凝集体との混合物を生成したようであった（図14D、中央）。P f s 2 5-ネック1-10GS-I3-01-LD7-PADRE構築物は、フェリチン構築物と同様に高純度であるが僅かに低い収量のナノ粒子を生成した（図14D、右）。この結果は、各3回軸を囲むI3-01のN末端が5nmの大きな間隔を有するという事実と一致し、これは、不規則な形状の大きなタンパク質、例えばP f s 2 5を提示するのに適している。要約すると、P f s 2 5は、ロッキングドメインとT細胞エпитープとを含有する60量体ナノ粒子上で提示されうる。

【0123】

第2の抗原であるスポロゾイト周囲タンパク質（C S P）は、プラスモジウム寄生生物のスポロゾイト段階の分泌タンパク質であり、スポロゾイト機能および肝細胞侵入に重要である。C S Pは、ヒトでの臨床試験が現在行われているR T S，Sワクチン（M o s q u i r i x（商標））に使用されている抗原である。最も臨床的に進んだワクチン候補として、R T S，S/A S O 1（R T S，S）は小児におけるマラリアに対する部分的防御をもたらすことが示されている。C S Pは、シグナルペプチド配列と、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合し、保存されたタンパク質分解切断部位を有する領域Iを含むN末端領域；4アミノ酸モチーフN A N PまたはN V D Pの多数の反復を含有する中央領域；および領域II〔トロンボスポンジン（T S P）様ドメイン〕と標準的なグリコシルホス

10

20

30

40

50

ファチジルイノシトール（GPI）アンカー付加配列とを含有するC末端領域を含む（図15A、上）。RTS，Sワクチンは、B型肝炎ウイルス表面抗原（HBsAg）に結合した、最後の18個のNANP反復と、GPIアンカー付加配列を除くC末端とを含む、CSP由来の189アミノ酸（アミノ酸199～387）を含有する（図15A、下）。
【0124】

本発明者らの研究においては、ロッキングドメインを含有するCSPナノ粒子ワクチンを設計するための段階的な戦略を用いた（図15B）。すなわち、最小B細胞エピトープ（工程1）、完全長B細胞エピトープ（工程2）、完全長B細胞エピトープ+C末端T細胞エピトープ（工程3）、およびナノ粒子上のCSPタンパク質のRTS，S抗原（工程4）を提示させた。タグ非利用精製を可能にするために、Fab1450を使用して抗体カラムをパックした。Fab1450に関しては、NANP（配列番号27）反復との複合体構造が決定されている（図15A、左下）。全てのCSP融合構築物を25mlのExpichO細胞において一過性に発現させ、ついでFab1450精製およびネガティブ染色EM分析を行った。工程1においては、最小B細胞エピトープである5つのNANP反復（NANP5）を2つのナノ粒子上に提示させた。試験した全ての構築物で非常に高い収量が観察された。ネガティブ染色EMは、他のタンパク質種を含まない高純度のNANP5-5GS-FRおよびNANP5-10GS-FRナノ粒子を示した（図15C、左および中央）。また、NANP5-5GS-PADRE-I3-01-LD7構築物を発現させた。これは高収量および高純度で均質ナノ粒子を形成した（図15C、右）。したがって、本発明者らの結果は、ロッキングドメインの存在下および非存在下のNANP5ナノ粒子組織化体およびFab1450抗体カラムの有用性を証明した。工程2においては、ネガティブ染色EM分析のために、3つのナノ粒子プラットフォーム上にRTS，Sワクチン抗原NANP19における完全長B細胞エピトープを提示させた（図15D）。NANP反復の数の有意な増加にもかかわらず、全ての構築物は高収量および高純度で均質ナノ粒子を形成した。したがって、本発明者らの結果はロッキングドメインの存在下および非存在下のNANP19ナノ粒子組織化を証明した。

【0125】

工程3においては、完全長B細胞エピトープNANP19とC末端T細胞エピトープαTSRドメイン〔それらの間に5GSリンカー（配列番号17）が存在する〕とを全てが含有する6つの融合構築物を設計し、特徴づけした。ネガティブ染色EMは、NANP19-5GS-αTSRがロッキングドメインの存在下および非存在下の全3個のナノ粒子プラットフォーム上に成功裏に提示されうることを証明した（図15E）。NANP19-5GS-αTSRは、RTS，S抗原における構造的および機能的に定められた成分の全てを含有し、リンカーにおいて異なるだけであるため、それらの2つの抗原は同一特性を共有するはずである。

【0126】

本発明者らは更に、25mlのExpichO細胞において製造されたこれらのNANP19-5GS-αTSRナノ粒子の収量および純度をSECにより評価した（図15F）。EMデータと一致し、SECプロファイルにおける単一ピークにより示されるとおり、NANP19-5GS-αTSRナノ粒子は高純度を示した。収量に関しては、ナノ粒子特異的パターンが観察された：FR>E2p>I3-01。総合すると、本発明者らは、CSPの構成成分および抗原成分（それらの全ては、ロッキングドメインを含有する60量体ナノ粒子上に提示されうる）の種々の組合せに基づいて一連のマラリアワクチン候補を開発した。

【0127】

第3の抗原である熱帯熱マラリア原虫網状赤血球結合タンパク質ホモログ5（PfRH5）は、赤血球侵入に必要なメロゾイトアドヘンシである。PfRH5は、赤血球表面タンパク質バシジン（CD147およびEMMPRIINとしても公知である）とのその相互作用により、全ての試験された株において赤血球侵入に必要なことが実証された唯一のメンバーである（Wongら，Nature 565：118-121，2019を参

10

20

30

40

50

照されたい)。P f R H 5 の結晶構造は決定されている (W r i g h t ら, N a t u r e 5 1 5 : 4 2 7 - 4 3 0 , 2 0 1 4 を参照されたい)。本発明者らは、抗体 9 A D 4 および Q A 1 に基づいて、P f R H 5 および P f R H 5 ナノ粒子のタグ非利用精製のための抗体カラムを開発した。本発明者らは、ロッキングドメインの存在下および非存在下のナノ粒子上に P f R H 5 を提示させるための融合構築物を設計した。

【0128】

実施例 14 非ウイルス標的に対するワクチン（結核ワクチン）の開発

結核 (T B) は、主に肺に感染するマイコバクテリウム・ツベルクロシス (M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s) 細菌により引き起こされる潜在的に重篤な感染症である。T B は世界人口の 2 5 % に感染しており、2 0 1 7 年には最大 1 0 0 0 万の症例を引き起こして、1 3 0 万人の死亡をもたらした。カルメット・ゲラン桿菌 (B a c i l l e C a l m e t t e - G u e r i n) (B C G) ワクチンが、T B がよく見られる国々で広く使用されているが、それは T B に対する完全な防御をもたらさない。結核菌に対する幾つかの新規 T B ワクチン候補が開発されており、現在、ヒト臨床試験に付されている (K h o s h n o o d ら, I n t . J . B i o l . M a c r o m o l . 1 2 0 : 1 8 0 - 1 8 8 , 2 0 1 8 を参照されたい)。

【0129】

本発明者らの研究において、2 つの T B 抗原をナノ粒子上に提示させた。第 1 の抗原である A g 8 5 複合体は、細胞壁のアラビノガラクトタンへのミコール酸の転移を触媒することにより、およびトレハロースジミコラート (コードファクター) の合成により、細胞壁の完全性を維持させる。A g 8 5 は高免疫原性であり、強力な T 細胞応答および抗体応答を誘導しうる。最近のワクチン試験は B C G ワクチン接種後の乳児における A g 8 5 A に対する抗体価の上昇を報告しており、更に重要なことに、A g 8 5 A 特異的 I g G は T B のリスク低下と関連していた。本発明者らは、A g 8 5 A、B および C を個々に H E K 2 9 3 F 細胞において発現させ、A g 8 5 A および B に関しては、十分にフォールディングした単量体を観察したが、A g 8 5 C に関しては三量体タンパク質を観察した。本発明者らは、ロッキングドメインの存在下および非存在下のナノ粒子上に A g 8 5 A、B および C を提示させるための融合構築物を設計した。A g 8 5 に対する抗体は報告されていないため、ファージ提示技術を利用して、A g 8 5 A、B および C ナノ粒子のタグ非利用精製のための A g 8 5 結合抗体を特定した。

【0130】

第 2 の抗原である M t b 7 2 は、M t b 3 2 と M t b 3 9 とからなる融合タンパク質である。M t b 7 2 は G S K アジュバント A S 0 1 と組合せて使用されており、臨床試験で 5 4 . 0 % の有効性を示した (K h o s h n o o d ら, I n t . J . B i o l . M a c r o m o l . 1 2 0 : 1 8 0 - 1 8 8 , 2 0 1 8 を参照されたい)。本発明者らは M t b 3 2 および M t b 3 9 を別々の抗原として H E K 2 9 3 F 細胞において発現させ、比較的低い収量を観察した。ロッキングドメインの存在下および非存在下のナノ粒子上に提示される M t b 3 2 および M t b 3 9 を使用して、融合構築物を設計した。ファージライブラリースクリーニングを行って、抗体カラムのパッキングのための抗体を選択した。これらの T B 抗原は、H C V E 2 および Z I K V D I I I に類似した単量体 (A g 8 5 A、A g 8 5 B および M t b 3 2)、または H I V - 1 E n v およびエボラ G P に類似した三量体 (A g 8 5 C および M t b 3 9) のいずれかであるため、得られた T B ナノ粒子はほぼ同様の特性を示した。

【0131】

実施例 15 非ウイルス標的に対するワクチン (P C S K 9 ワクチン) の開発

2 種類のリポタンパク質、すなわち、低密度リポタンパク質 (または L D L) および高密度リポタンパク質 (または H D L) が、細胞から、そして細胞へと、コレステロールを運搬する。L D L は動脈内の脂肪蓄積に寄与するため、L D L コレステロールは「悪玉」コレステロールと見なされる。血中の L D L コレステロールレベルの上昇は、西欧諸国における早死の一般的原因である心血管疾患のリスクの増加に関連づけられている。プロタ

ンパク質転換酵素スブチリシン・ケキシシ9型（PCSK9）は、LDL受容体（LDLR）の分解を制御することにより、血清LDLコレステロール（LDL-C）を調節する。PCSK9は74kDaのセリンプロテアーゼであり、以下の3つのドメインを含有する：N末端プロドメイン、スブチリシン様触媒ドメインおよびC末端システイン／ヒスチジンリッチドメイン（CTD）（図16A）。PCSK9は自己触媒的切断を受けるが、14kDaのプロドメインは触媒ドメインに非共有結合したままであり、プロテアーゼを不活性にする。機能喪失型PCSK9突然変異はLDLコレステロール濃度の低下および心疾患のリスク低下に関連していることが判明している。これらの機能喪失型突然変異は有害な副作用を引き起こさないため、ワクチン誘導性抗体によるPCSK9阻害は、LDLコレステロール濃度を低下させるための魅力的な治療戦略となる。種々のリガンドと複合体形成した完全長PCSK9およびトランケート化PCSK9の結晶構造が解明されており、ワクチン設計のための合理的な基礎を提供している（図16A）。

【0132】

本発明者らの研究においては、ロッキングドメインの存在下または非存在下の全3個のナノ粒子プラットフォーム上でPCSK9を提示させた。PCSK9はサイズが大きく、形状が不規則であるため、Pfs25ナノ粒子で使用したのと同様の「ネック」設計を採用した（図16B）。簡潔に説明すると、ウイルス由来の3ヘリックスバンドル（ヘンドラウイルスドメイン）を構築物においてPCSK9とナノ粒子サブユニットとの間に挿入した。PCSK9およびPCSK9ナノ粒子のタグ非利用精製のために、ファイザー（Pfizer）により開発された強力な抗PCSK9抗体であるJ16（Liangら、J Pharm Exp Ther, 340（2）：228-236, 2012を参照されたい）を使用して、抗体カラムをバックした。Exp iCHO細胞における一過性発現の後、融合タンパク質をJ16抗体カラムにより上清から抽出し、ネガティブ染色EMにより分析した。最初に、ネック設計を有さない2つの融合構築物を試験した（図16C）。PCSK9-10GS-FRは均質ナノ粒子を形成したが（図16C、左）、PCSK9-5GS-PADRE-I3-01-LD7は、おそらくPCSK9の大きなサイズおよび不規則な形状ゆえに、組織化できなかった（図16C、右）。ついで、ネック1を含有するナノ粒子構築物を発現させた（図16D）。どちらのフェリチン構築物もナノ粒子を形成したが、ネック1とフェリチンとの間に、より長いリンカーを有するもの、すなわち、PCSK9-10GS-ネック1-10GS-FRは、より高い収量および純度でナノ粒子を生成した（図16D、パネル1および2）。外部に提示されておりロッキングドメイン（LD7）のC末端に融合しているPADREを含有する2つのI3-01構築物は、両方のEMイメージにおいて未組織化融合タンパク質が観察されたものの、若干異なる形態のナノ粒子を形成した（図16D、パネル3および4）。

【0133】

要約すると、PCSK9は、ネックドメイン、ロッキングドメインおよびT細胞エプーブPADREを含有する60量体I3-01および24量体フェリチン上に提示可能であり、ナノ粒子は自己寛容を破壊し、高い力価の抗体応答を誘導しうるため、PCSK9より有効なワクチン候補が提供されうる。

【0134】

このように、本発明は広く開示されており、前記の代表的な実施形態に関して例示されている。本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明に種々の修飾が施されうると理解される。

【0135】

本明細書中に引用されている全ての刊行物、配列アクセッション番号、特許および特許出願の全体を、それぞれが本明細書中に組み入れられると個々に示されている場合と同様に、あらゆる目的で明示的に本明細書中に組み入れることとする。参照により組み入れられるテキストに含まれている定義は、それらが本開示における定義と矛盾する場合には除外される。

10

20

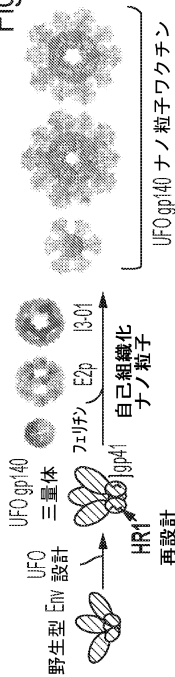
30

40

50

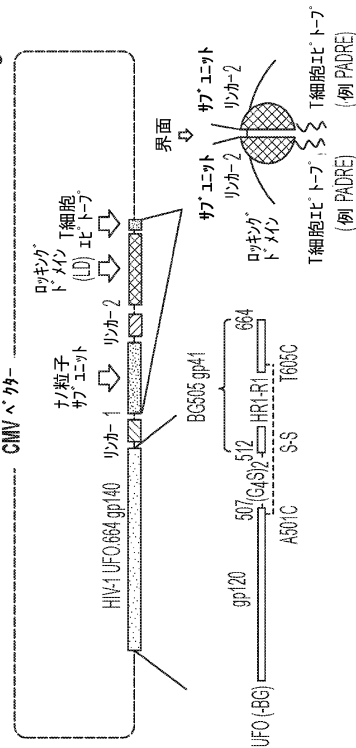
【図面】
【図 1】

Figure 1



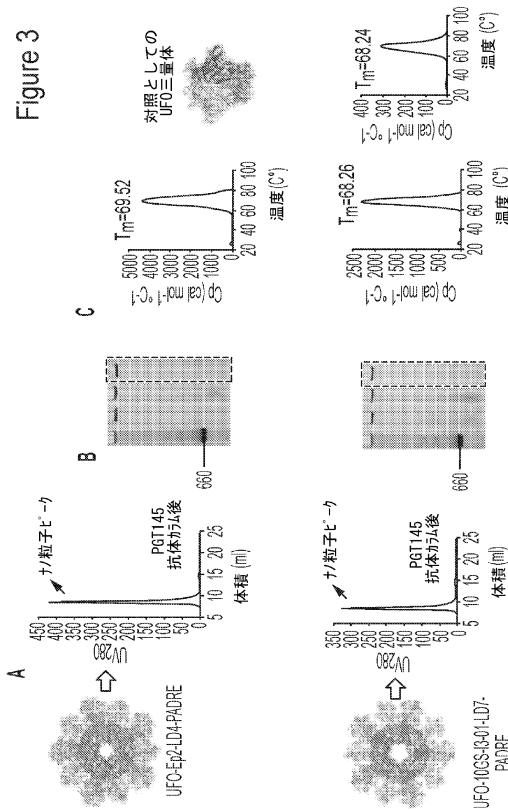
【図 2】

Figure 2



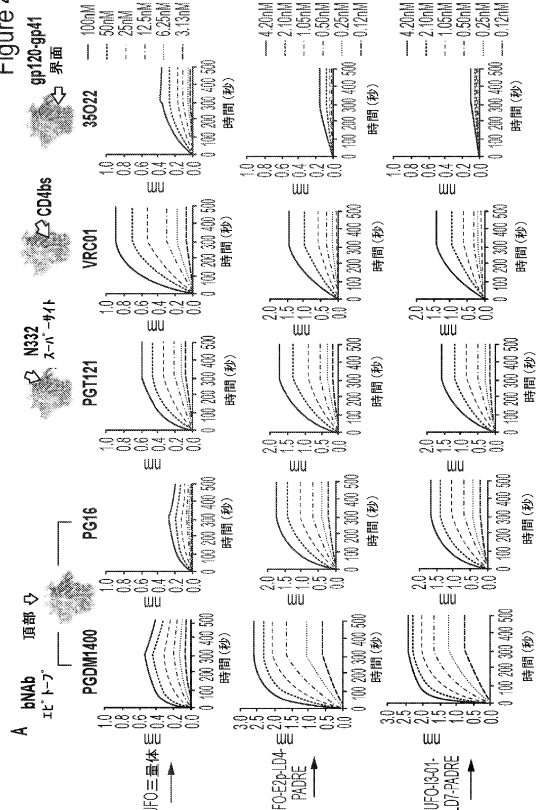
【図 3】

Figure 3



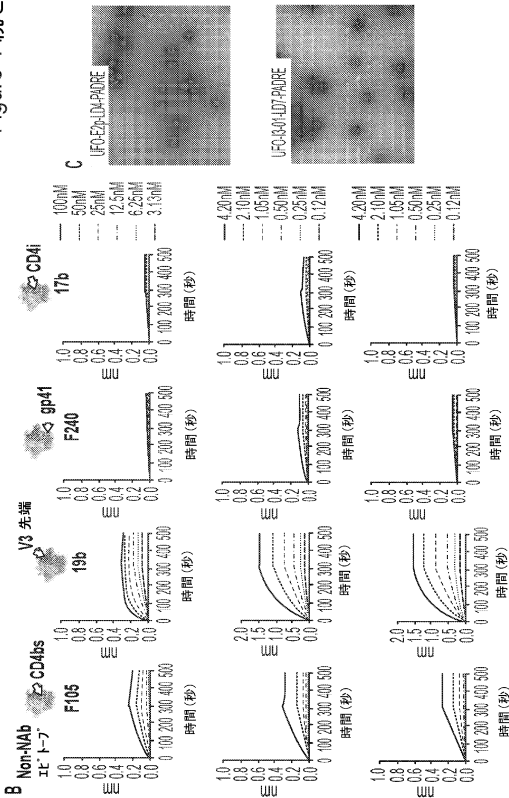
【図 4 - 1】

Figure 4



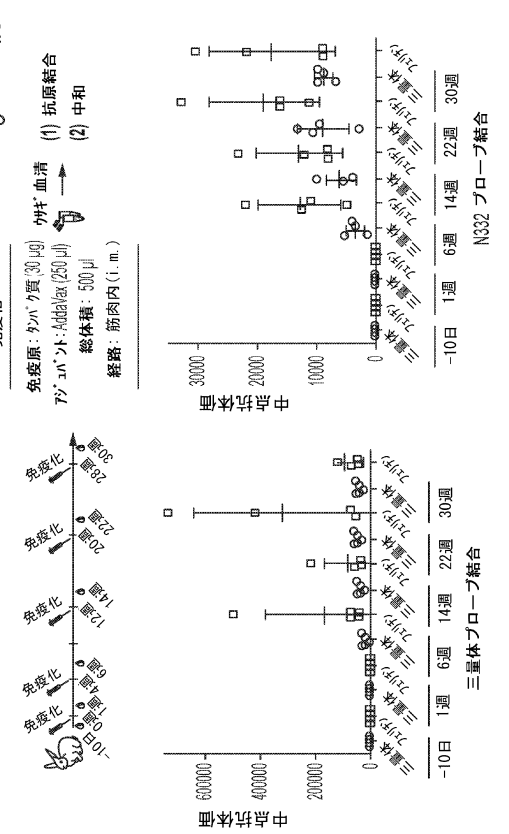
【図 4 - 2】

Figure 4 続き



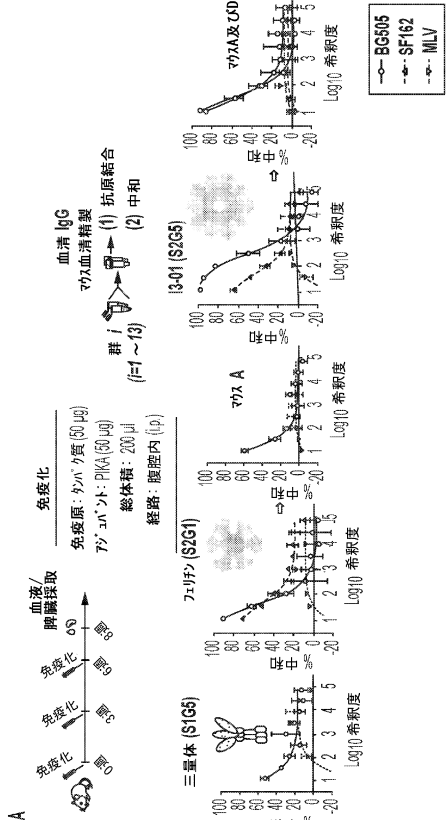
【図 5 - 2】

Figure 5 続き



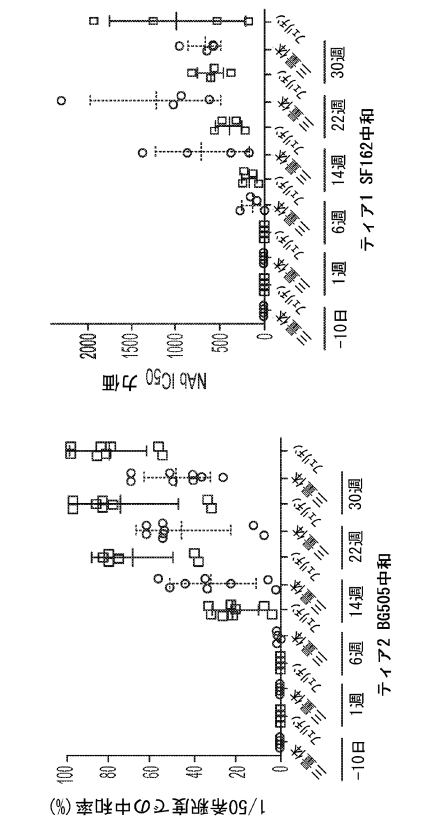
【図 5 - 1】

Figure 5



【図 5 - 3】

Figure 5 続き



10

20

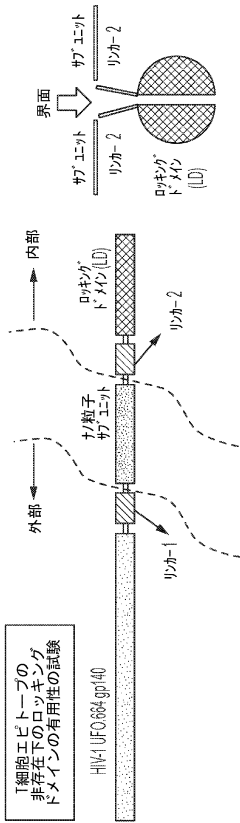
30

40

50

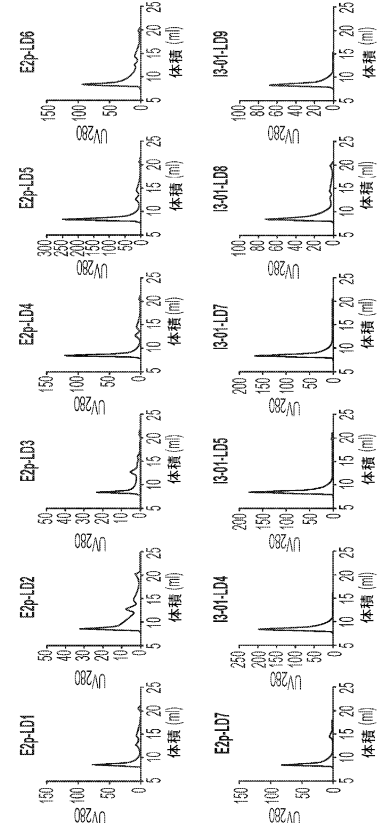
【図 6 - 1】

Figure 6



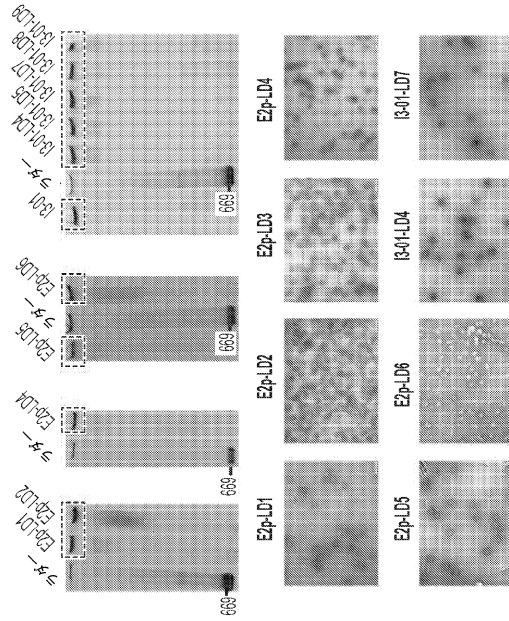
【図 6 - 2】

Figure 6 続き



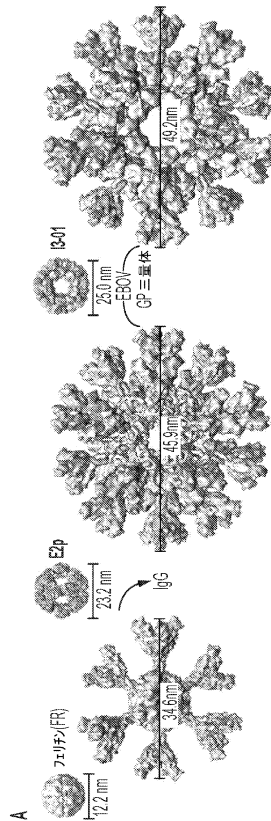
【図 7】

Figure 7



【図 8 - 1】

Figure 8



10

20

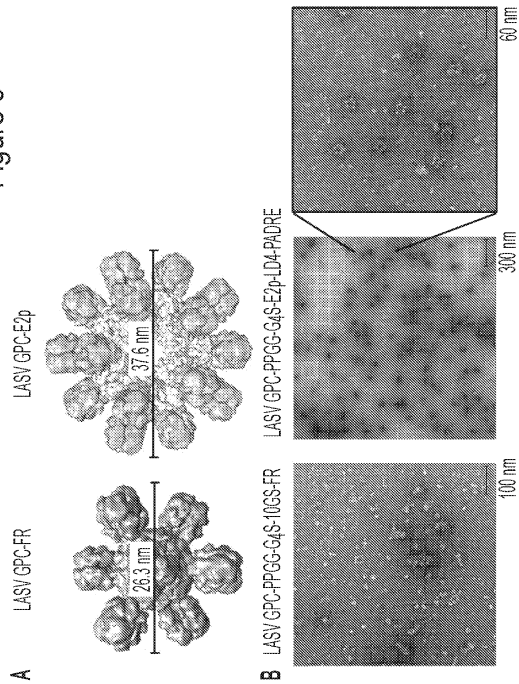
30

40

50

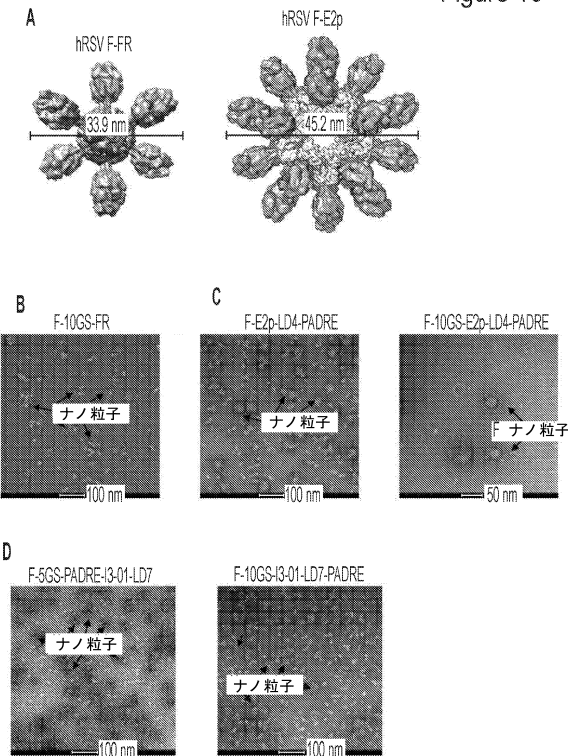
【図 9】

Figure 9



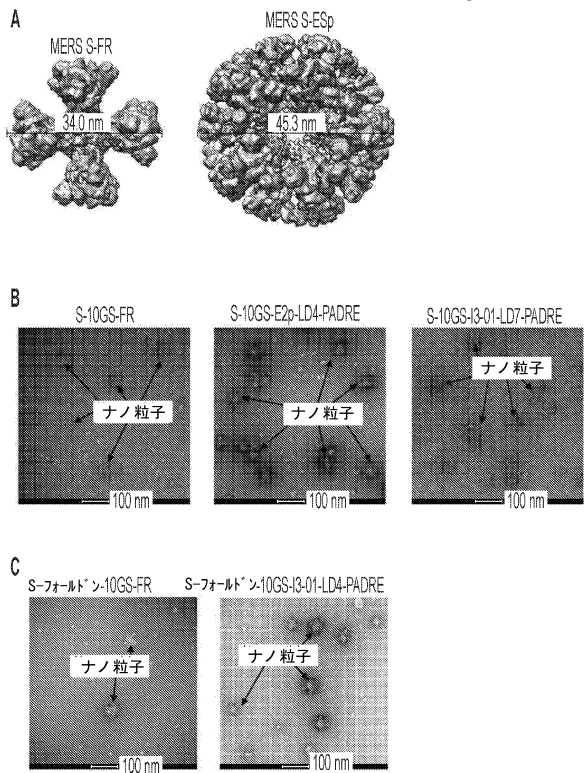
【図 10】

Figure 10



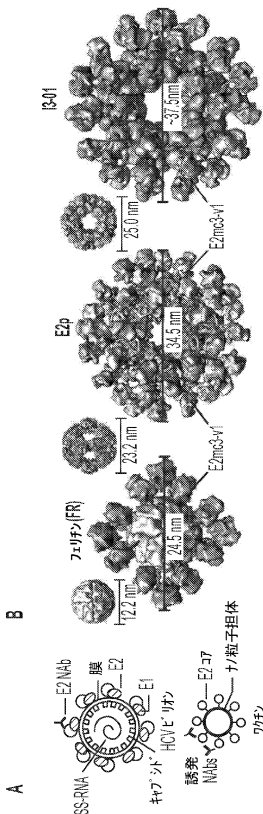
【図 11】

Figure 11



【図 12 - 1】

Figure 12



10

20

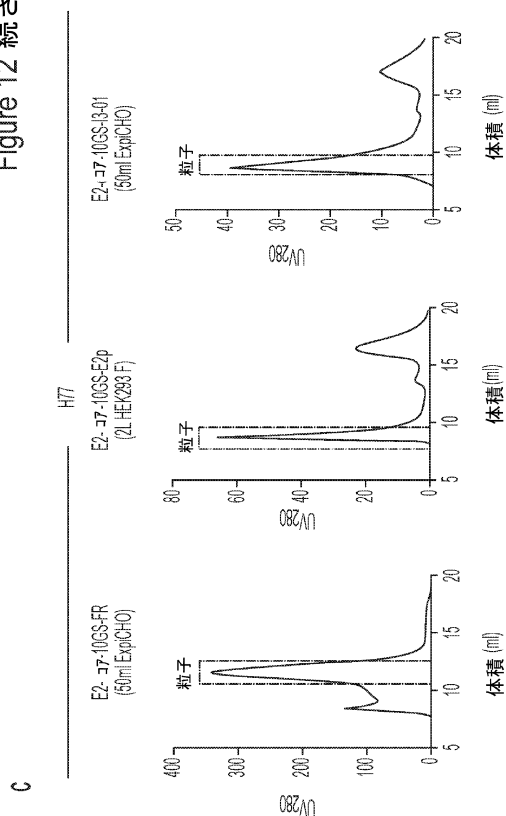
30

40

50

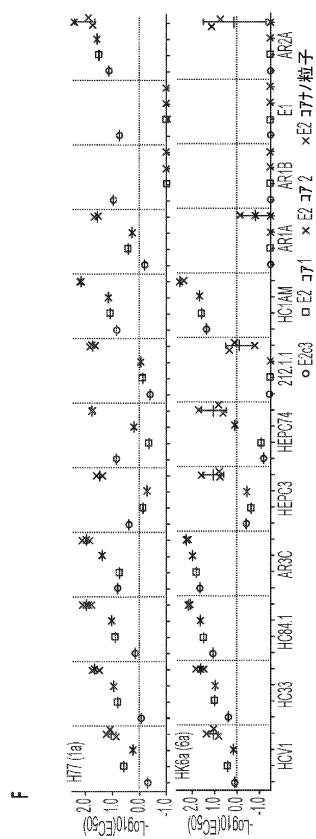
【圖 12-2】

Figure 12 続老



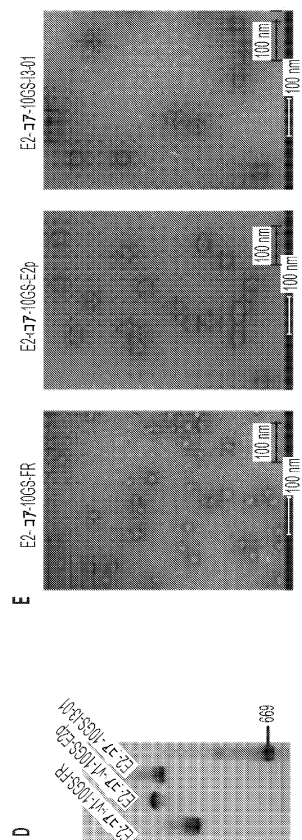
【圖 12-4】

Figure 12 続き



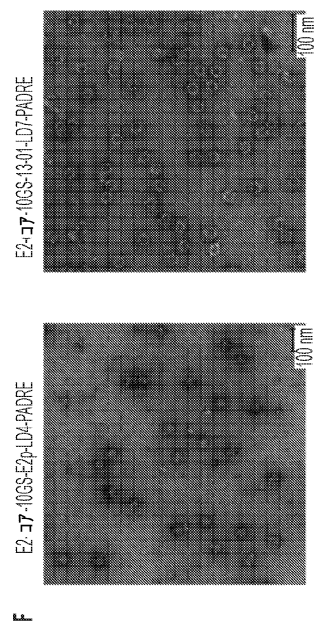
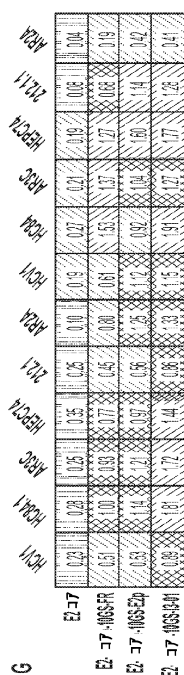
【圖 12-3】

Figure 12 続き



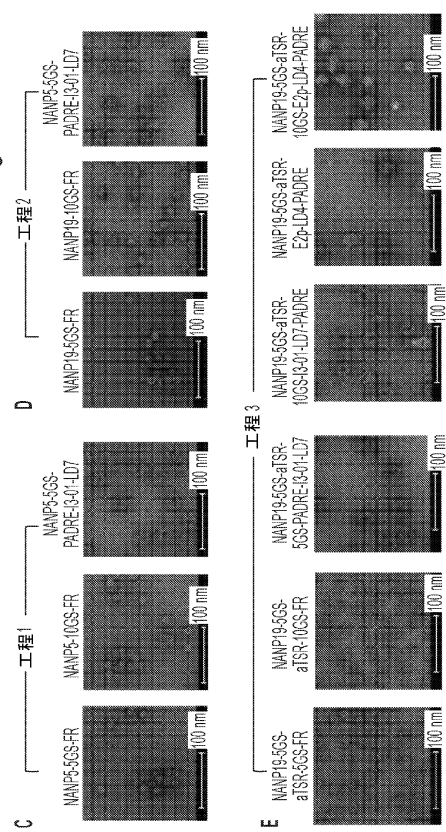
【圖 12-5】

Figure 12 続老



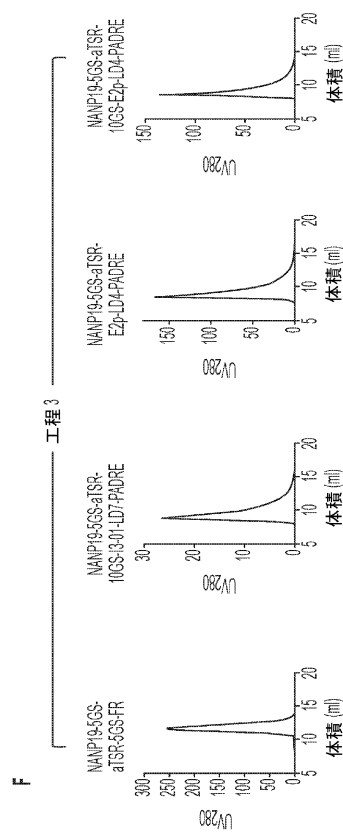
【図 15 - 3】

Figure 15 続き



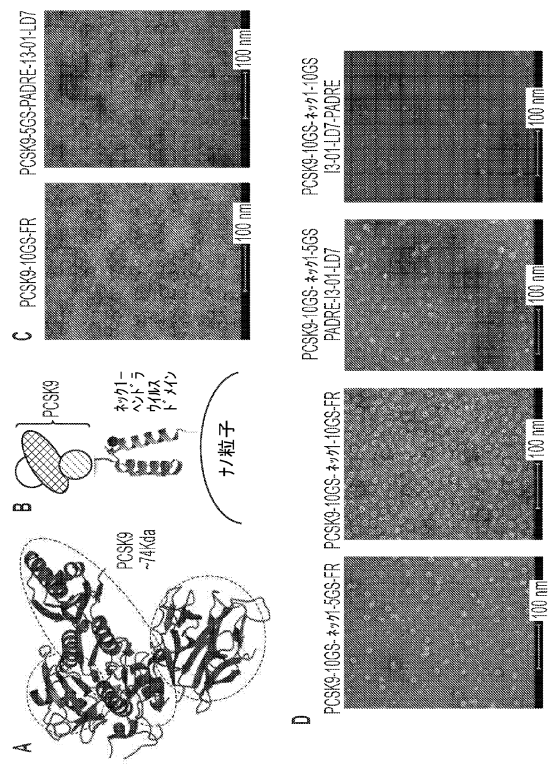
【図 15 - 4】

Figure 15 続き



【図 16】

Figure 16



【配列表】
0007555826000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 31/00 (2006.01)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)
A 6 1 P 31/12 (2006.01)
A 6 1 P 31/18 (2006.01)
A 6 1 P 31/14 (2006.01)
A 6 1 P 31/06 (2006.01)
A 6 1 P 33/06 (2006.01)
A 6 1 K 39/04 (2006.01)
A 6 1 K 39/015 (2006.01)
A 6 1 K 9/14 (2006.01)
A 6 1 K 47/64 (2017.01)
A 6 1 K 47/65 (2017.01)
B 8 2 Y 5/00 (2011.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)
C 0 7 K 14/005 (2006.01)
C 0 7 K 14/35 (2006.01)
C 0 7 K 14/725 (2006.01)

F I

A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 31/14
A 6 1 P 31/06
A 6 1 P 33/06
A 6 1 K 39/04
A 6 1 K 39/015
A 6 1 K 9/14
A 6 1 K 47/64
A 6 1 K 47/65
B 8 2 Y 5/00
C 0 7 K 19/00
C 0 7 K 14/005
C 0 7 K 14/35
C 0 7 K 14/725

Z N A

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100228980

弁理士 副島 由加里

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ホー, リンリン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 1 2 2、サン・ディエゴ、ロビンズ・ストリート・4 2 6 7

(72)発明者 ジュー, ジャン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 1 2 2、サン・ディエゴ、ロビンズ・ストリート・4 2 6 7

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 2 4 3 4 (WO, A 1)

特表 2 0 1 7 - 5 0 3 8 5 7 (JP, A)

特表 2 0 0 8 - 5 4 2 1 9 4 (JP, A)

特表 2 0 1 3 - 5 0 3 1 8 4 (JP, A)

Chemistry & Biology, 2003年, Vol. 10, p.723-731

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K

A 6 1 P

C 0 7 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)