

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6518193号  
(P6518193)

(45) 発行日 令和1年5月22日 (2019.5.22)

(24) 登録日 平成31年4月26日 (2019.4.26)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C O 7 K</b>	<b>14/465</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>14/465</b>	
<b>C O 7 K</b>	<b>14/47</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>14/47</b>	
<b>C O 7 K</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>19/00</b>	<b>Z N A</b>
<b>C O 7 K</b>	<b>14/31</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>14/31</b>	
<b>C O 7 K</b>	<b>14/35</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>14/35</b>	

請求項の数 18 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-547006 (P2015-547006)
(86) (22) 出願日	平成25年12月11日 (2013.12.11)
(65) 公表番号	特表2016-501266 (P2016-501266A)
(43) 公表日	平成28年1月18日 (2016.1.18)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/076289
(87) 国際公開番号	W02014/090905
(87) 国際公開日	平成26年6月19日 (2014.6.19)
審査請求日	平成28年12月9日 (2016.12.9)
(31) 優先権主張番号	12306560.9
(32) 優先日	平成24年12月11日 (2012.12.11)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号	61/802,836
(32) 優先日	平成25年3月18日 (2013.3.18)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	518034953
	オシバ、ソシエテ、パル、アクション、シ ンプリフィエ
	O S I V A X S A S
	フランス国パリ、リュ、ド、コペンアーク 、4
(74) 代理人	100091982
	弁理士 永井 浩之
(74) 代理人	100091487
	弁理士 中村 行孝
(74) 代理人	100082991
	弁理士 佐藤 泰和
(74) 代理人	100105153
	弁理士 朝倉 悟

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善された特性を有する改変コイルドコイル型タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

( i ) コイルドコイルドメインを有するタンパク質と、 ( i i ) 前記コイルドコイルドメインに連結された少なくとも 1 つの正電荷ペプチドとを含んでなる、改変タンパク質であって、該正電荷ペプチドが、配列番号 2 ( S P R R R R S )、配列番号 3 6 ( G R R R R R S ) または配列番号 3 7 ( S P R R R R R R R R R R S ) で示される配列からなる群から選択される配列を有するものであり、前記改変タンパク質が、配列番号 7、配列番号 4 2、配列番号 6 1 または配列番号 6 7 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでなる、改変タンパク質。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の改変タンパク質と 1 以上の抗原とを含んでなる、融合タンパク質。

【請求項 3】

前記抗原が、黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A、マイコバクテリア抗原 8 5 A およびインフルエンザ核タンパク質抗原からなる群から選択される、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

請求項 1 に定義される改変タンパク質に融合された、1 以上のブドウ球菌抗原を含んでなる、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記 1 以上のブドウ球菌抗原が、S p A、H l a、C l f B およびソルターゼ A からな

る群から選択されるものである、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

請求項 1 に定義される改変タンパク質に融合された、インフルエンザ核タンパク質などの 1 以上のインフルエンザ抗原を含んでなる、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

請求項 1 に定義される改変タンパク質に融合された、G n R H などの 1 以上の自己抗原を含んでなる、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

請求項 1 に定義される改変タンパク質に融合された抗原を含んでなる、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の改変タンパク質、または請求項 2 ～ 8 のいずれか一項に記載の融合タンパク質と、細胞内 T L R の核酸リガンドとを含んでなる、免疫原性組成物。

【請求項 10】

コイルドコイルドメインを含んでなる抗原またはコイルドコイルドメインを含んでなる担体タンパク質の免疫原性を増強するための方法であって、少なくとも 1 つの正電荷ペプチドを前記コイルドコイルドメインに連結することを含んでなり、前記正電荷ペプチドが配列番号 2 ( S P R R R R S )、配列番号 3 6 ( G R R R R R S ) または配列番号 3 7 ( S P R R R R R R R R R S ) で示される配列からなる群から選択される配列を有するものであり、および、得られた改変担体タンパク質が配列番号 7、配列番号 4 2 または配列番号 6 7 で示されるアミノ酸配列を有するものであり、かつ、得られた改変抗原が配列番号 6 1 で示されるアミノ酸配列を有するものである、方法。

【請求項 11】

抗原の免疫原性、特に T h 1 免疫原性を増強するための方法であって、  
・請求項 10 に記載の方法に従って前記改変担体タンパク質を作製すること、および  
・前記抗原を、前記改変担体タンパク質、および細胞内 T L R の核酸リガンドまたはヘパリンなどの負電荷ポリマーに会合させること  
を含んでなる、方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の改変タンパク質、または請求項 2 ～ 8 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、または請求項 9 に記載の免疫原性組成物を含んでなる、ワクチン組成物。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の改変タンパク質をコードする、または請求項 2 ～ 8 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする、核酸分子。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の少なくとも 1 つの核酸分子を含んでなる、ワクチン組成物。

【請求項 15】

請求項 1 に定義される改変タンパク質に融合された、1 以上のブドウ球菌抗原を含んでなる、請求項 2 に記載の融合タンパク質を含んでなる、ブドウ球菌感染症の治療および予防のための医薬組成物。

【請求項 16】

請求項 1 に定義される改変タンパク質に融合された、インフルエンザ核タンパク質などの 1 以上のインフルエンザ抗原を含んでなる、請求項 2 に記載の融合タンパク質を含んでなる、インフルエンザの治療および予防のための医薬組成物。

【請求項 17】

請求項 1 に定義される改変タンパク質に融合された抗原を含んでなる、請求項 2 に記載の融合タンパク質を含んでなる、家禽の免疫感作のための組成物。

【請求項 18】

前記 1 以上のブドウ球菌抗原が、S p A、H l a、C l f B およびソルターゼ A からなる群から選択されるものである、請求項 15 に記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、コイルドコイルドメインを含有する組換え抗原、またはコイルドコイルを含有するタンパクと融合された抗原に関し、ここで、前記コイルドコイルは改変されているこの改変は前記抗原の免疫原性を改善する。同時に、この改変は、DNAおよびRNAを含む核酸などの負電荷ポリマーに対する、またヘパリンに対するそれらの結合能も改善する。

## 【背景技術】

## 【0002】

コイルドコイルは、ロープの各ストランドのように、 $\alpha$ -ヘリックスが互いにコイル状に巻かれたタンパク質の構造モチーフである。コイルドコイルドメインは、天然タンパク質に豊富に存在し(1、2)、それらは自然界のタンパク質のオリゴマー化の最も一般的な方法であり得る。コイルドコイルは、単純でしかも融通の効くタンパク質折りたたみであるスーパーコイル状に互いに巻き付いている2本以上の $\alpha$ -ヘリックスからなる(3)。典型的なコイルドコイル一次配列は、「ヘプタッド(heptad)」と呼ばれる7残基のリピートからなる反復である。

## 【0003】

多くのコイルドコイル型タンパク質は、重要な生物学的機能に関与している。特に本明細書で注目するのは、抗原または担体タンパク質に見られるものである。

## 【0004】

抗原に見られるコイルドコイルの例としては、限定されるものではないが、次のものが挙げられる。

i) OCAファミリー(ここで、OCAは、オリゴマーコイルドコイル接着(oligomeric coiled coil adhesion)を意味する)に見られる二本鎖コイルドコイル: 例として、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)防御抗原NadA(4); エルシニア・エンテロコリチカ(*Yersinia enterocolitica*)由来YadA(5); モラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)由来UspA2(6); パルトネラ・ヘンセラ(*Bartonella henselae*)由来BadA(7)、およびインフルエンザ菌(*Haemophilus influenza*)由来HAdA(8)がある。

ii) 中でも、インフルエンザ血球凝集素HA2タンパク質(9)、呼吸器合胞体ウイルスF糖タンパク質(10)、HIV-1(11)およびHIV-2(12)のgp41糖タンパク質、ならびにエボラウイルスのgp1、2(13)に見られるトリマーコイルドコイル。

iii) ニューカッスル病HN(血球凝集素-ノイラミダーゼ)糖タンパク質および他のパラミクソウイルス(14、およびその中の参考文献)に見られるテトラマーコイルドコイル。

## 【0005】

担体タンパク質は、特に抗原の免疫原性を改善するために使用される。コイルドコイルを含有する担体タンパク質は、特に、COMP(15)およびペンタマーも形成する人工配列(34)に由来するペンタマー、および哺乳動物C4bpオリゴマー化ドメインに由来するヘプタマー。例えば、マウスドメインIMX108(16)、または鳥類C4bpオリゴマー化ドメイン(16、WO2005/077976およびWO2007/062819)など、これまでに記載されている。IMX313(WO2007/062819)と呼ばれるハイブリッド鳥類オリゴマー化ドメインを本明細書で例として用いる。

## 【0006】

従来技術では、コイルドコイルは、何がそれらのオリゴマー化状態およびそれらのヘリックスの適正な配向(平行または逆平行)を決定するのか理解するために鋭意検討の対象となってきた(35)。しかし、それらのコイルドコイルを改変することにより抗原の免疫原性を改善するための研究はなかった。従来技術において2つの注目すべき例は、ワク

10

20

30

40

50

チン接種の目的でコイルドコイルを含有する2つの別の抗原を精製することを必要としたワクチン産業界に関連するグループに関連し(10、36、37)、抗原におけるコイルドコイルを改変したグループはない。

#### 【0007】

従来技術では、いくつかの特異的ペプチドが、モノマータンパク質の結合特性を改善することが示されており、これらはコイルドコイルを欠いている。組換えタンパク質にポリアルギニンテールが融合されると、それらはイオン交換クロマトグラフィーによる精製が容易となることが示されている(17、18)。これまでの使用では、これらの付加的アルギニンは酵素的手段による精製の後に除去される(17、18)か、あるいはそのまま残って酵素の固定化および/または再折りたたみに使用された(19、20)。ヘパリン-セファロースカラムにモノマー酵素を固定化して、基質結合によるモノマーの凝集を防ぎ、酵素の再使用を可能とするために、連続する6個のアルギニンという短いペプチドが使用された(19、20)。FuchsおよびRainesは、モノマー酵素(RNアーゼA)をガラスおよびシリカ樹脂などの様々な支持体に固定化するために、アミノ酸9個のポリアルギニントグを使用できることを示した(22)。

10

#### 【0008】

1980年代にDNA結合モチーフとして同定されたSPKKモチーフなどの他の核酸結合ペプチドも開示されており、SPKKモチーフを含有するペプチドは二本鎖DNAと結合することができる(21)。しかしながら、RNAまたは一本鎖DNAとの結合は示されておらず、鈴木データの副溝は二重らせん分子にのみ存在することから、一本鎖DNAへの結合は生じないことを強く示唆する。

20

#### 【0009】

DNAと結合することが示されている他のペプチドとしては、本明細書においていくつかの例で使用されるペプチド配列SPRRRRSを含有するB型肝炎コア抗原(38)のプロタミン様ドメインが含まれる。

#### 【0010】

しかしながら、ポリアルギニンテールは、プロテアーゼ、特にセリンプロテアーゼによる切断に極めて感受性が高く、慣例の使用において、精製および固定化の両目的でそれらはポリヒスチジントグに置き換えられてきた(45)。

#### 【0011】

また別に、従来技術では、ペプチドは、それらの免疫原性を高めるためにモノマータンパク質と融合されてきた。Shibagakiおよび共同研究者らは、*in vitro*において樹状細胞(DC)の形質導入を高めるためにタンパク質導入ドメイン(PTD)が使用可能であること、および形質導入されたDCを動物に再注入すると、抗原の免疫原性の向上が得られることを示している(43)。さらに、Shimadaおよび共同研究者らは、ポリアルギニンペプチドが、それに融合されたタンパク質オボアルブミン(42)の免疫原性を、そのタンパク質を発現する腫瘍に直接注射した場合または皮内に注射した場合に(41)向上させ得ることを示した。

30

#### 【0012】

ほとんどの精製抗原は免疫原性が弱い。それらの免疫原性を増強するためにアジュバントが使用されてきた。抗原の免疫原性を増強するためのC4bpタンパク質の、コイルドコイルを含有する小ドメインの使用がこれまでに示されている：

40

・WO2007/062819は、第1成分としての鳥類C4bpドメインと第2成分としての抗原を含んでなる複合体を記載し、前記成分は融合タンパク質の形態であるか、または非共有結合的に会合されている。この複合体は、生物に投与された際に抗原の免疫原性の増強を示す。

・WO2011/045612は、ニワトリ由来のC4bpタンパク質フラグメントとマイコバクテリア抗原85Aを含有する融合タンパク質を記載している。前記ハイブリッドタンパク質は、齧歯類などの動物だけでなく霊長類でも85Aの免疫原性を高める。

#### 【0013】

50

加えて、免疫誘導法を改善するためには、T L R 受容体を介したシグナル伝達を誘導することも極めて重要であるが、このシグナル伝達を制限できることも少なくとも同程度に重要である。T o l l 様受容体 ( T L R ) は、自然免疫系において重要な役割を果たすタンパク質種である。微生物がひと度、生物の物理的バリアを破ると、それらは T L R により認識される。認識される微生物由来の特徴としては、ウイルスの二本鎖 R N A、細菌およびウイルス D N A の非メチル化 C p G 部位、および特定の他の R N A および D N A 分子が含まれる。

#### 【 0 0 1 4 】

このような核酸においては、それらが T o l l 様受容体 ( 以下、T L R ) 種、特に、T L R 3、T L R 7、T L R 8、T L R 9 および T L R 1 3 のリガンドであることから実質的な関心が寄せられている ( 2 3 およびその中の参考文献 )。これらは「細胞内 T o l l 様受容体」として分類される場合があるが、少なくとも T L R 3 は一部の細胞表面にも存在する ( 2 4 )。T L R 7 および T L R 9 は、細胞内区画 ( 特に、小胞体およびエンドソーム ) に局在し、T L R 9 および T L R 7 については、この受容体の切断が、それを介して受容体のリガンドがシグナルを伝達する M y D 8 8 の活性化に不可欠であることが明らかに示されている ( 2 5、2 6 )。この切断はエンドリソソーム内でのみ起こるので、それはおそらく自己の核酸からの不適切なシグナル伝達を防ぐための進化適応であると思われる。

#### 【 0 0 1 5 】

T L R 3 は、気道、子宮、角膜、膺、子宮頸部、胆管および腸管上皮細胞を含む様々な上皮細胞により発現され、これらの細胞は、これらの細胞表面に T L R 3 を発現すると思われる ( 2 4 )。従って、ポリ I : C の投与がいくつかの有害作用に関連付けられていることはおそらく驚くことではない ( 2 6 )。その研究では、3 ミリグラム / グラムの用量での反復投与が用いられた。平均マウス体重が 3 5 g 近くであれば、1 0 0 m g 用量の反復投与がこれらの作用を誘発し得る。本発明者らは、本明細書に記載の免疫誘導で一用量当たり 2 . 5  $\mu$  g のポリ I : C を必要としたに過ぎない。

#### 【 0 0 1 6 】

これらの受容体、特に T L R 3 受容体を介したシグナル伝達を制限することの重要性は、用量依存性である。従って、核酸リガンドを抗原に強固に結合させる利点は不可欠である。よって、強固に結合した細胞内 T L R リガンドは、結合が強固でない製剤よりも極めて好ましい。従って、当業者は T L R リガンドと効率的に結合することができる抗原性組成物を探しており、これにより、この抗原性組成物は、他所においては T L R 受容体に対するリガンドの結合により媒介される潜在的有害作用を無くすという目的で、抗原が免疫応答を惹起する細胞にそれが到達するまで抗原から分離されない。

#### 【 発明の概要 】

#### 【 0 0 1 7 】

本発明は、コイルドコイルドメインに正電荷ペプチドを連結することにより改変されたコイルドコイルドメインを含んでなるタンパク質に関する。この改変コイルドコイル型タンパク質は、改善された免疫原性と同時にヘパリンおよび核酸などの負電荷ポリマーに対して改善された結合特性を有する。これらのコイルドコイルタンパク質は総て組換え型であり、改変は、コイルドコイルの末端に短いペプチド配列を融合させることにより得られる。本明細書の例において、改変は遺伝子工学技術により行われるが、ペプチド合成などの、改変コイルドコイルを得る他の方法も存在する。

#### 【 0 0 1 8 】

この正電荷ペプチドは、優先的にはアルギニンを含んでなるが、代わりにリジン、または両方の組合せを含んでなることもできる。このペプチドは短く、アミノ酸 7 個以下、特に、アミノ酸 5 個、6 個または 7 個を含んでなる。コイルドコイルの各鎖に 1 以上のペプチドを使用してもよい。

#### 【 0 0 1 9 】

連結はコイルドコイルドメインに直接行われるか、またはコイルドコイルドメイン、正

10

20

30

40

50

電荷ペプチドおよびそれらの組合せの技術的效果に影響を及ぼさない１個以上のアミノ酸を含んでなるリンカーペプチドを介して行われる。リンカーはいずれのアミノ酸を含有してもよいが、好ましいリンカーは、グリシン、セリンまたはプロリン、またはそれらの組合せを含有する。

【００２０】

ある例のセットでは、改変タンパク質は、ニワトリのＣ４ｂｐタンパク質に由来する担体タンパク質ＩＭＸ３１３である。

【００２１】

本発明はまた、抗原に融合された改変コイルドコイル担体タンパク質を含んでなる融合タンパク質に関する。

【００２２】

本発明はまた、改変コイルドコイルドメインを含んでなる改変抗原に関する。

【００２３】

本発明はまた、改変融合タンパク質または改変抗原、および細胞内ＴＬＲに対する核酸リガンドを含んでなる免疫原性組成物に関する。

【００２４】

本発明はまた、本発明の改変タンパク質を担持する支持体に関し、この支持体への連結は、コイルドコイルドメインに連結されたペプチドを介して形成される。支持体ヘパリンは*in vitro*または*in vivo*で 사용할ことができる。正電荷タンパク質の免疫原性を高めるためにヘパリンを使用する方法は周知である（４７、およびその中の参照文献）。

【００２５】

本出願はまた、患者において免疫応答を誘導するための、上記のような改変抗原または改変融合タンパク質または免疫原性組成物の使用に関する。

【００２６】

改変タンパク質のコイルドコイルドメインに正電荷ペプチドが連結された本出願による改変コイルドコイル型タンパク質は、対応する非改変タンパク質に比べて、特に下記の利点を提供する：

- ・陽イオン交換カラムＳＰ　ＦＦなどの負電荷クロマトグラフィーカラム、特に、ヘパリン・セファロースカラムへの良好な結合；
- ・核酸への良好な結合；
- ・担体タンパク質および抗原の場合、これらの改変コイルドコイル型タンパク質である抗原、または前記改変担体タンパク質と会合している抗原の免疫原性の増強。

【発明の具体的説明】

【００２７】

本発明を詳細に記載する前に、本発明は特に例示される方法に限定されず、当然のことながら変更可能であると理解されるべきである。特に、本発明は、コイルドコイルドメインを有する改変抗原に関するものであり、コイルドコイルを含有する特定の担体タンパク質または特定の抗原に限定されない。

【００２８】

本明細書に引用されている刊行物、特許および特許出願は前掲または後掲を問わず、総て、引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる。しかしながら、本明細書に記載される刊行物は、その刊行物で報告され、かつ、本発明に関連して使用され得るプロトコール、試薬およびベクターを記述および開示する目的で引用される。

【００２９】

さらに、本発明の実施では、特に断りのない限り、当業者の範囲内の従来のタンパク質精製および分子生物学的技術を使用する。このような技術は当業者に周知であり、文献で十分に説明されている。以下の特許請求の範囲および本発明の引き続いての記載では、言語表現または必要な含意により文脈がそうではないことを必要とする場合を除き、用語「含んでなる(comprise)」、「含有する(contain)」、「包含する(involve)」または「含む

10

20

30

40

50

(include) 」または「含んでなる(comprises)」、「含んでなる(comprising)」、「含有する(containing)」、「包含する(involved)」、「含む(includes)」、「含む(including)」などの変形は、包含の意味で、すなわち、本発明の種々の実施態様において、記載の特徴の存在を明示するが、さらなる特徴の存在または付加を排除せずに使用される。

#### 【 0 0 3 0 】

以下の用語を本発明のより良い理解のために定義する。

「コイルドコイル型タンパク質」は、「コイルドコイル含有タンパク質」または「コイルドコイルドメインを有するタンパク質」とも称され、コイルドコイルモチーフ、すなわち、スーパーコイル状に互いに巻き付いている少なくとも2本の - ヘリックスストランド、を含んでなるタンパク質を表す。このようなコイルドコイルを含有するいくつかのタンパク質は文献で報告されている。本発明によれば、好ましいコイルドコイル型タンパク質は抗原および担体タンパク質である。

10

#### 【 0 0 3 1 】

「担体タンパク質」は、一般に、抗原がコンジュゲートまたは融合され、それにより抗原がより高い免疫原性とされるタンパク質を表す。ここで、この用語は、特に、抗原を担持するタンパク質の意味で使用される。このタンパク質の機能は、それがコンジュゲートまたは融合された前記抗原の免疫原性を高めることである。融合は、均質な生成物を作出するという利点を有する。より形式的に、「コンジュゲーション」は、免疫原性誘発タグまたは担体タンパク質をコードするDNAがスプライシングされて、抗原をコードするDNAとなる遺伝学として記載することができる。従来の化学コンジュゲーション法では、抗原がタンパク質に連結される位置を常に厳密に制御できるわけではない。この形態では、このサブクラスの担体タンパク質はまた、「免疫原性誘発タグ」またはさらには「アジュバント」(16)もしくは「遺伝学的アジュバント」とも呼ばれる。

20

#### 【 0 0 3 2 】

本発明によれば、「改変タンパク質」は、本発明による正電荷ペプチドの付加または部分的置換を伴う、野生型配列に対して改変された配列を有するタンパク質を表す。非改変タンパク質と本発明の改変タンパク質の間の差異は、付加または部分的に置換されたコイルドコイルドメインに連結された正電荷ペプチドにある。当業者には、本発明の改変タンパク質が組換えタンパク質、または自然界には見られないキメラであることが理解される。コイルドコイルドメインと電荷ペプチドドメインを含んでなるが、電荷ペプチドドメイン以外の他所で改変された天然タンパク質は本発明の一部ではない。

30

#### 【 0 0 3 3 】

本発明は、(i)コイルドコイルドメインを有するタンパク質と、(ii)前記コイルドコイルドメインに連結された少なくとも1つの正電荷ペプチドとを含んでなる、改変タンパク質であって、該正電荷ペプチドが、ZXB B B B Z (配列番号1)

[配列中、

- ・ Z は任意のアミノ酸であるか、または存在せず；
- ・ X は任意のアミノ酸であり；
- ・ B はアルギニン(R)またはリジン(K)である]

で示される配列を有するものである改変タンパク質に関する。

40

#### 【 0 0 3 4 】

前記ペプチドの最後のアミノ酸は、カルボキシペプチダーゼBなどのエキソプロテアーゼによる分解からペプチドを保護することが望まれる場合には、アルギニンまたはリジン残基でなくてもよい。

#### 【 0 0 3 5 】

本発明の改変タンパク質が配列番号1の正電荷ペプチドを2つ以上含んでなる場合、それらのペプチドは好ましくは互いに融合させて、式(ZXB B B B Z)<sub>n</sub> (式中、nは1以上、少なくとも6までの整数であり、特に、1、2、3、4、5または6、好ましくは、2である)の配列番号1の反復となる単一の正電荷ペプチドを形成させる。

#### 【 0 0 3 6 】

50

別の実施態様では、2、3、4、5または6つのペプチドを、下記に定義される2つ以上(one of more)のリンカーによって分離されてよい。

【0037】

本発明の好ましい実施態様では、ペプチドは、特にヘプタマーコイルドコイルでは、S P R R R R S (配列番号2)、G R R R R (配列番号3)、S P K K K K (配列番号4)、G K K K K (配列番号5)およびG R R R R R S (配列番号36)の配列からなる群から選択される配列を有する。特に、トリマーコイルドコイルでは、2つの正電荷ペプチドの融合が好ましく、第1のペプチドS P R R R R (配列番号38)と第2のペプチドR R R R R S (配列番号39)の組合せであるS P R R R R R R R R S (配列番号37)、および第1のペプチドG R R R R R (配列番号41)とペプチドR R R R R S (配列番号39)の組合せであるG R R R R R R R R R S (配列番号40)の配列からなる群から選択される配列を有するのがより好ましい。

10

【0038】

前記ペプチドはコイルドコイルのC末端に融合してもN末端に融合してもよい。ペプチドとタンパク質の融合は、ペプチドとタンパク質を連結する短いペプチド配列であるリンカーを用いて行うこともできるし、または用いずに行うこともできる。リンカーはいずれのアミノ酸を含んでもよいが、好ましいリンカーは、グリシン、セリンもしくはプロリン、またはそれらの組合せを含む。

【0039】

特定の実施態様では、前記タンパク質のC末端の数個のアミノ酸を欠失させ、1コピー以上のペプチドZ X B B B Zで置き換えることができる。

20

【0040】

本発明の好ましい態様において、ペプチドは、コイルドコイルのC末端に連結する。

【0041】

本発明の一態様において、改変タンパク質は担体タンパク質の機能を有し、特に、抗原の担体として働く。

【0042】

本発明の好ましい一態様では、改変タンパク質は、特許出願WO 2007/062819に記載されているヘプタマーコイルドコイルを含んでなる、IMX313と呼ばれるニワトリ由来担体C4結合タンパク質である。

30

【0043】

本発明による特定の改変タンパク質は、ペプチドG R R R R (配列番号3)がIMX313のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質IMX313である。

【0044】

本発明による別の特定の改変タンパク質は、ペプチドS P K K K K (配列番号4)がIMX313のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質IMX313である。

【0045】

本発明による別の特定の改変タンパク質は、ペプチドG K K K K (配列番号5)がIMX313のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質IMX313である。

【0046】

本発明による好ましい特定の改変タンパク質は、ペプチドS P R R R R S (配列番号2)がIMX313のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質IMX313である。

40

【0047】

IMX313、IMX313TおよびIMX313Pのアミノ酸配列を以下に示す(\*は終止コдонを表す)。



## 【化 1】

IMX313 KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKE\* (配列番号 6)

IMX313T KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQSPRRRRS\* (配列番号 7)

IMX313P KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVEGRRRRRRS\* (配列番号 42).

## 【0048】

好ましい実施態様では、担体タンパク質の機能を有するタンパク質は、IMX313P (配列番号 42) である。IMX313P (配列番号 42) の配列を含んでなるタンパク質はまた、単独、または 1 以上の正電荷ペプチドおよび抗原または別のタンパク質と融合されたものがそれ自体、本発明の目的である。

10

## 【0049】

最も好ましい実施態様では、IMX313P (配列番号 42) のコイルドコイルドメインは、配列番号 1 の 2 つの正電荷ペプチド、より好ましくは、SPRRRRRRRRRRRS (配列番号 37) の配列のペプチド、または GRRRRRRRRRRRRS (配列番号 40) の配列のペプチドの融合物に連結される。

## 【0050】

本発明の別の態様では、改変タンパク質は担体タンパク質ではなく、抗原である。前記オリゴマー抗原は、特に、

- ・インフルエンザ血球凝集素 HA タンパク質、
- ・呼吸器合胞体ウイルスの F 糖タンパク質、
- ・HIV-1 の gp41 糖タンパク質、
- ・HIV-2 の gp41 糖タンパク質、
- ・エボラウイルスの gp1, 2、
- ・髄膜炎菌由来の NadA、
- ・エルシニア・エンテロコリチカ由来の YadA、
- ・モラクセラ・カタラーリス由来の UspA2、
- ・バルトネラ・ヘンセラ由来の BadA、および
- ・インフルエンザ菌由来の HAdA

20

からなる群から選択される。

30

## 【0051】

本発明はまた、改変担体タンパク質と抗原の間の会合に関する。担体タンパク質 (IMX313) と抗原のこのような会合は、前記抗原の免疫原性を増強することがすでに示されている (特許出願 WO 2007/062819 参照)。改変担体タンパク質を用いれば、非改変 IMX313 タンパク質を用いるよりも免疫原性の増強はいっそう良好となる。

## 【0052】

特に、抗原と会合された改変担体タンパク質は、配列番号 42 の配列を有する IMX313P である。

## 【0053】

ある別法では、これら 2 つの会合成分は互いに非共有結合的に会合される。好ましい別法では、これら 2 つの会合成分は化学的にカップリングされ、融合タンパク質の形態である。当業者ならば、融合タンパク質を生産する目的で、2 つのペプチド成分をどのように接続すればよいかを知っている。

40

## 【0054】

本発明は特に、担体タンパク質を改変コイルドコイルおよび 1 以上の抗原とともに含んでなる融合タンパク質に関する。

## 【0055】

本発明の好ましい一態様では、下記の抗原の 1 つが IMX313T または IMX313P 改変タンパク質と融合される：

- i) 記載のように (27、44) 変異された黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)

50

プロテイン A タンパク質、または黄色ブドウ球菌タンパク質アルファ溶血素、または黄色ブドウ球菌タンパク質 C 1 f B または黄色ブドウ球菌タンパク質ソルターゼ A ;

i i ) 結核菌 (Mycobacterium tuberculosis) により分泌されるタンパク質 8 5 A ( 2 8 ) ;

i i i ) 自己抗原 G n R H ;

i v ) クリプトスポリジウム抗原 C p 1 5 ;

v ) インフルエンザ核タンパク質。

#### 【 0 0 5 6 】

本発明による特定の融合タンパク質は、ペプチド G R R R R R S ( 配列番号 3 6 ) が I M X 3 1 3 のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質 I M X 3 1 3 P ( 配列番号 4 2 ) であり、前記改変タンパク質が黄色ブドウ球菌プロテイン A タンパク質と融合される。

10

#### 【 0 0 5 7 】

本発明による別の特定の融合タンパク質は、ペプチド G R R R R R S ( 配列番号 3 6 ) が I M X 3 1 3 のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質 I M X 3 1 3 P ( 配列番号 4 2 ) であり、前記改変タンパク質がタンパク質 8 5 A と融合される。

#### 【 0 0 5 8 】

本発明による別の特定の融合タンパク質は、ペプチド S P K K K K ( 配列番号 4 ) が I M X 3 1 3 のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質 I M X 3 1 3 ( 配列番号 6 ) であり、前記改変タンパク質が黄色ブドウ球菌プロテイン A タンパク質と融合される。

20

#### 【 0 0 5 9 】

本発明による別の特定の融合タンパク質は、ペプチド S P K K K K ( 配列番号 4 ) が I M X 3 1 3 のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質 I M X 3 1 3 ( 配列番号 6 ) であり、前記改変タンパク質がタンパク質 8 5 A と融合される。

#### 【 0 0 6 0 】

本発明による別の特定の融合タンパク質は、ペプチド G K K K K ( 配列番号 5 ) が I M X 3 1 3 のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質 I M X 3 1 3 ( 配列番号 6 ) であり、前記改変タンパク質が黄色ブドウ球菌プロテイン A タンパク質と融合される。

#### 【 0 0 6 1 】

本発明による別の特定の融合タンパク質は、ペプチド G K K K K ( 配列番号 5 ) が I M X 3 1 3 のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質 I M X 3 1 3 ( 配列番号 6 ) であり、前記改変タンパク質がタンパク質 8 5 A と融合される。

30

#### 【 0 0 6 2 】

本発明による別の特定の融合タンパク質は、ペプチド S P R R R R S ( 配列番号 2 ) がタンパク質 I M X 1 0 8 ( 配列番号 6 3 ) のコイルドコイルドメインに融合されたタンパク質 I M X 1 0 8 T ( 配列番号 6 4 ) である。

#### 【 0 0 6 3 】

本発明による好ましい特定の改変タンパク質は、ペプチド S P R R R R S ( 配列番号 2 ) が I M X 3 1 3 のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質 I M X 3 1 3 ( 配列番号 6 ) であり、前記改変タンパク質が黄色ブドウ球菌プロテイン A タンパク質と融合される。

40

#### 【 0 0 6 4 】

本発明による別の好ましい特定の改変タンパク質は、ペプチド S P R R R R S ( 配列番号 2 ) が I M X 3 1 3 のコイルドコイルドメインに連結されたタンパク質 I M X 3 1 3 ( 配列番号 6 ) であり、前記改変タンパク質がタンパク質 8 5 A と融合される。

#### 【 0 0 6 5 】

例に示されるように、コイルドコイルの改変がそれらの免疫原性を高めたことを証明するためにこれら 2 つのモデル抗原を使用した。B 細胞応答および T 細胞応答の両方が改善された。さらに、改変コイルドコイルは、タンパク質または核酸のいずれかとして投与した場合、より免疫原性が高かった。

50

## 【 0 0 6 6 】

本発明はまた、上記のものなどの改変コイルドコイル型タンパク質、または上記のものなどの融合タンパク質とおよび細胞内 T L R の核酸リガンドとを含んでなる免疫原性組成物に関する。これらの T L R の核酸リガンドは改変担体タンパク質と優先的に複合体を形成する。有利には、核酸リガンドは改変タンパク質に結合されるが、対応する非改変担体タンパク質は、これらの T L R の核酸リガンドと有意に結合することができなかつた。

## 【 0 0 6 7 】

本発明はまた、上記のものなどの改変コイルドコイル型タンパク質、または上記のものなどの融合タンパク質とヘパリンとを含んでなる免疫原性組成物に関する。ヘパリンは改変担体タンパク質と優先的に複合体を形成する。有利には、ヘパリンは改変タンパク質に結合されるが、対応する非改変担体タンパク質は、ヘパリンと有意に結合することができなかつた。

## 【 0 0 6 8 】

本発明はまた、改変タンパク質を担持する固相支持体に関し、ここで、前記タンパク質は、ペプチド Z X B B B B Z で支持体に結合される。実際に、ペプチドにおける電荷の存在量は、改変タンパク質を表面に強く結合させるのに十分なものである。

## 【 0 0 6 9 】

本発明はまた、コイルドコイルドメインを含んでなるタンパク質の支持体への結合能を増強するための方法であって、少なくとも 1 つのペプチド Z X B B B B Z

〔配列中、

- ・ Z は任意のアミノ酸であるか、または存在せず；
- ・ X は任意のアミノ酸であり；
- ・ B はアルギニン（ R ）またはリジン（ K ）である〕

をコイルドコイルドメインに連結することを含んでなる方法に関する。

## 【 0 0 7 0 】

特に、前記支持体はクロマトグラフィーカラムである。総ての可溶性改変コイルドコイルタンパク質を、親和性タグとして正電荷ペプチドを用いてこのようなカラムに結合させることができる。作業者は、結合を強くするまたは弱くするために一般配列 Z X B B B B Z のペプチドにおけるアルギニン残基の数を変えることができる。あるいは、作業者は、結合を強くするために一般配列 Z X B B B B Z のペプチドの数を変えることもできる。オリゴマーのタンパク質鎖の数が少ないほど、使用されるべきペプチドまたはペプチド中のアルギニンの数は多くなる。従って、例えば、トリマーコイルドコイルを用いる場合、ヘパリン - セファロース上での同様の精製を保証するためには、好ましくは、鎖当たり 9 以上のアルギニンが使用されるべきである。

## 【 0 0 7 1 】

本発明はまた、コイルドコイルドメインを含んでなる担体タンパク質または抗原の免疫原性を増強するための方法であって、少なくとも 1 つのペプチド Z X B B B B Z

〔配列中、

- ・ Z は任意のアミノ酸であるか、または存在せず；
- ・ X は任意のアミノ酸であり；
- ・ B はアルギニン（ R ）またはリジン（ K ）である〕

を前記タンパク質のコイルドコイルドメインに連結することを含んでなる方法に関する。

## 【 0 0 7 2 】

本発明はまた、抗原の免疫原性を増強するための方法であって、

- ・ 上記のものなどの改変担体タンパク質を作製すること、および
  - ・ 前記抗原を前記改変担体タンパク質および細胞内 T L R の核酸リガンドまたはヘパリンに会合させること
- を含んでなる方法に関する。

## 【 0 0 7 3 】

本発明は特に、抗原の T h 1 免疫原性を増強するための方法であって、

・上記のものなどの改変担体タンパク質を作製すること、および  
 ・前記抗原を前記改変担体タンパク質および細胞内 T L R の核酸リガンドまたはヘパリン  
 に会合させること  
 を含んでなる方法に関する。

【 0 0 7 4 】

本発明はまた、ワクチンとして使用するための、本発明による改変抗原、または本発明  
 による融合タンパク質に関する。

【 0 0 7 5 】

本出願はまた、必要な患者において免疫応答を誘導するための方法であって、改変担体  
 タンパク質と抗原とを含んでなる融合タンパク質を含んでなるワクチン組成物の患者への  
 投与を含んでなる方法に関する。

10

【 0 0 7 6 】

本出願はまた、必要な患者において免疫応答を誘導するための方法であって、改変タン  
 パク質と細胞内 T L R の核酸リガンドまたはヘパリンとを含んでなる免疫原性組成物を含  
 んでなるワクチン組成物の患者への投与を含んでなる方法に関する。

【 0 0 7 7 】

本発明はまた、上記のものなどの改変タンパク質および融合タンパク質をコードする核  
 酸分子に関する。

【 0 0 7 8 】

さらに、本発明は、上記のものなどの少なくとも 1 つの核酸分子を含んでなるワクチン  
 組成物に関する。核酸分子を含んでなるワクチン組成物は当業者に周知であり、特に、引  
 用することにより本明細書の一部とされる特許出願 W O 2 0 0 8 / 1 2 2 8 1 7 に記載さ  
 れている。

20

【 0 0 7 9 】

このような核酸はそれ自体で使用可能であり、またはそれらは、これもまた特許出願 W  
 O 2 0 0 8 / 1 2 2 8 1 7 に記載されているウイルスベクターで投与することもできる。  
 いくつかのウイルスベクターは、その後、ウイルスベクターにコードされている改変抗原  
 に結合することができる核酸を産生するように改変されている。核酸を生産するためのウ  
 イルスベクターの改変は、引用することにより本明細書の一部とされる W O 2 0 0 7 / 1  
 0 0 9 0 8 に開示されている。

30

【 0 0 8 0 】

本発明はまた、上記のものなどの改変コイルドコイル型タンパク質を精製するための方  
 法であって、

・ヘパリン - セファロースクロマトグラフィーカラムに前記改変タンパク質をロードする  
 こと、および

・前記タンパク質を、 5 0 0 m M を超える塩濃度で溶出させること  
 を含んでなる方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 1 】

【図 1】 H i T r a p ヘパリン H P カラムで精製された I M X 3 1 3 T のクロマトグラ  
 ム。ヘパリン - セファロースカラムは、ほぼ純粋な I M X 3 1 3 T タンパク質（ピーク C  
 ）から夾雑物（ピーク A および B ）を明瞭に分離する。点線は、改変タンパク質を溶出さ  
 せるために用いた塩勾配を示す。

40

【図 2】 T L R 9 リガンドおよび I M X 4 9 7 タンパク質（ P A m - I M X 3 1 3 T ） -  
 アガロースゲル電気泳動（ T A E バッファー中 0 . 8 % ）。オリゴヌクレオチドが移動し  
 たゲルにおける位置は、ゲルを臭化エチジウムで染色すると紫外線下で観察できる。

【図 3】 T L R 7 および T L R 3 リガンドおよび I M X 4 9 7 タンパク質（ P A m - I M  
 X 3 1 3 T ） - アガロースゲル電気泳動（ T A E バッファー中 0 . 8 % ）。

【図 4】 T L R 7 リガンドおよび I M X 4 9 5 （ P A m ）、 I M X 4 9 4 （ P A m - I M  
 X 3 1 3 ） および I M X 4 9 7 （ P A m - I M X 3 1 3 T ） タンパク質 - アガロースゲル

50

電気泳動 (TAE バッファー 中 0.8%)。

【図5】雌BALB/cマウスの群 (n = 5) を、初回はCFA中に、次回はIFA中に処方したPAm、PAm-IMX313、PAm-IMX313TまたはPAmで、14日間隔で2回、皮下免疫した。初回免疫の28日後に、血清中のPAm特異的IgG力価を、プレートにPAmでコーティングしたELISAを用いて測定した。結果を405nmで測定されたサンプルのOD + SEMとして表す。異なる群の平均値間の有意差は、一元配置ANOVAとその後のTukeyの多重比較検定により判定した。p値 < 0.05を統計学的に有意と見なし、\*として表し、\*\*\*はp < 0.001、\*\*はp < 0.01を表す。

【図6】全T細胞集団におけるIFN- $\gamma$ の発現レベル。筋肉内に免疫したマウスにおける85A特異的細胞性免疫応答。雌BALB/cマウスの群 (n = 5) を、85A、85A-IR14、85A-TL18、85A-IMX313または85A-IMX313Tを発現するプラスミドで、14日間隔で2回免疫した。最後の免疫の2週間後に、マウスを屠殺し、脾臓T細胞を精製した。細胞を組換え85Aタンパク質と共培養した。異なる群の平均値間の有意差は、一元配置ANOVAとその後のTukeyの多重比較検定により判定した。p値 < 0.05を統計学的に有意と見なし。共培養上清中のIFN- $\gamma$  応答を、細胞100万個当たりのIFN- $\gamma$  分泌細胞として表す。

【図7】CD8+T細胞集団におけるIFN- $\gamma$  発現レベル。筋肉内に免疫したマウスにおける85A特異的細胞性免疫応答。雌BALB/cマウスの群 (n = 5) を、85A、85A-IR14、85A-TL18、85A-IMX313、または85A-IMX313Tを発現するプラスミドで、14日間隔で2回免疫した。最後の免疫の2週間後に、マウスを屠殺し、脾臓CD8+T細胞を精製した。細胞を85Aペプチドp11と共培養した。異なる群の平均値間の有意差は、一元配置ANOVAとその後のTukeyの多重比較検定により判定した。p値 < 0.05を統計学的に有意と見なし。共培養上清中のIFN- $\gamma$  応答を、細胞100万個当たりのIFN- $\gamma$  分泌細胞として表した。

【図8】CD4+T細胞集団におけるIFN- $\gamma$  発現レベル。筋肉内に免疫したマウスにおける85A特異的細胞性免疫応答。雌BALB/cマウスの群 (n = 5) を、85A、85A-IR14、85A-TL18、85A-IMX313または85A-IMX313Tを発現するプラスミドで、14日間隔で2回免疫した。最後の免疫の2週間後に、マウスを屠殺し、脾臓CD8+T細胞を精製した。細胞を85Aペプチドp15と共培養した。異なる群の平均値間の有意差は、一元配置ANOVAとその後のTukeyの多重比較検定により判定した。p値 < 0.05を統計学的に有意と見なし。共培養上清中のIFN- $\gamma$  応答を、細胞100万個当たりのIFN- $\gamma$  分泌細胞として表した。

【図9】雌BALB/cマウスの群 (n = 5) を、85A-IMX313プラスミド、85A-IMX313Tプラスミドならびにより短い配列85A-IR14および85A-TL18で、14日間隔で2回、筋肉内免疫した。初回免疫の28日後に、血清中の85A特異的IgGレベルを、85A特異的ELISAを用いて測定した。結果を405nmで測定されたサンプルのOD + SEMとして表す。異なる群の平均値間の有意差は、一元配置ANOVAとその後のTukeyの多重比較検定により判定した。p値 < 0.05を統計学的に有意と見なし。NSは有意でないことを意味し、有意性値はアスタリスクにより示す：\*\*\* (p < 0.001)、\*\* (p < 0.01)、\* (p < 0.05)。

【図10】親プラスミドpCDNA3-NPのマップ-実施例に記載の通りに構築したこのプラスミドおよびその誘導体をDNAワクチン接種に用いた。

【図11】IMX313に融合されたNPに対して、NPをコードするプラスミドによる免疫に反応してIFN- $\gamma$  を分泌する全T細胞の比較。

【図12】NPをコードするプラスミドまたはIMX313に融合されたNPをコードするプラスミドによる免疫に反応してIFN- $\gamma$  を分泌するCD8およびCD4 T細胞の比較。

【図13】NPまたはIMX313に融合されたNPのいずれかをコードするDNAプラスミドにより誘導された組換えNPに対するIgG抗体応答の比較。

10

20

30

40

50

【図14】NPまたはIMX313に融合されたNPのいずれかをコードするDNAプラスミドにより誘導された組換えNPに対するIgG抗体サブクラス応答の比較。

【図15】NP、モノマーNP(NP-M)、IMX313に融合されたモノマーNP(NP-M-IMX313)およびIMX313Tに融合されたモノマーNP(NP-M-IMX313T)をコードするプラスミドに対する全T細胞応答の比較。

【図16】NP、モノマーNP(NP-M)、IMX313に融合されたモノマーNP(NP-M-IMX313)およびIMX313Tに融合されたモノマーNP(NP-M-IMX313T)をコードするプラスミドに対するCD8+およびCD4+ T細胞応答の比較。

【図17】NP、モノマーNP(NP-M)、IMX313に融合されたモノマーNPおよびIMX313Tに融合されたモノマーNPをコードするプラスミドに対する、組換えNPを用いたELISAにより測定されたIgG抗体応答の比較。

【図18】NP、モノマーNP(NP-M)、IMX313に融合されたモノマーNPおよびIMX313Tに融合されたモノマーNPをコードするプラスミドに対する、組換えNPを用いて測定されたIgG抗体サブクラス応答の比較。

【図19】種々のNP融合タンパク質の、tPAシグナルペプチドによる分泌の効果。全T細胞をIFN- $\gamma$  ELISpotにより測定し、NP、分泌型NP(tPA-NP)、分泌型モノマーNP(tPA-NP-M)、分泌型IMX313融合NP(tPA-NP-IMX313)、分泌型IMX313融合モノマーNP、およびIMX313T融合分泌型モノマーNP(tPA-NP-M-IMX313T)を比較した。

【図20】NP、分泌型NP(tPA-NP)、分泌型モノマーNP(tPA-NP-M)、分泌型IMX313融合NP(tPA-NP-IMX313)、分泌型IMX313融合モノマーNP、および分泌型IMX313T融合モノマーNP(tPA-NP-M-IMX313T)を比較する、IFN- $\gamma$  ELISpotにより測定された、種々のNP融合タンパク質に対するCD8+およびCD4+ 応答に及ぼす、tPAシグナルペプチドによる分泌の効果。

【図21】NP、分泌型NP(tPA-NP)、分泌型モノマーNP(tPA-NP-M)、分泌型IMX313融合NP(tPA-NP-IMX313)、分泌型IMX313融合モノマーNP、および分泌型IMX313T融合モノマーNP(tPA-NP-M-IMX313T)を比較する、ELISAにより測定された、種々のNP融合タンパク質に対するIgG応答の、tPAシグナルペプチドによる分泌の効果。

【図22】NP、分泌型NP(tPA-NP)、分泌型モノマーNP(tPA-NP-M)、分泌型IMX313融合NP(tPA-NP-IMX313)、分泌型IMX313融合モノマーNP、および分泌型IMX313T融合モノマーNP(tPA-NP-M-IMX313T)を比較する、ELISAにより測定された、種々のNP融合タンパク質に対するIgGサブクラス応答に及ぼす、tPAシグナルペプチドによる分泌の効果。

【図23】この図は、IMX743タンパク質はDNAオリゴヌクレオチドODN1826と強く結合するが、IMX744は同じオリゴヌクレオチドと弱くしか結合しないことを示す。アガロースゲル電気泳動は、TAEバッファー中0.8%で行った。オリゴヌクレオチドが移動したゲル中の位置は、ゲルを臭化エチジウムで染色すると紫外線下で観察できる。ゲルの上の表に記載の通りに、TLR9リガンドODN1826とIMX744およびIMX743タンパク質の種々の組合せを調製し、複合体形成をアガロースゲル電気泳動により分析した。複合体は複合体を形成していないリガンドよりもずっとゆっくり移動したので、複合体形成は明瞭に検出可能であった。タンパク質の濃度が低下するにつれ、観察される複合体は発散性が高くなり、非結合TLRリガンドのバンドが見えるようになった。このゲルは、ゲルシフトはIMX743では再現性があるが(レーン6と12を比較)、IMX744(レーン3~5)は、ゲルにほとんど認識できないようなシフトをもたらすに過ぎないことを示す。

【実施例】

【0082】

10

20

30

40

50

# 1. IMX313、IMX313TおよびIMX313Pタンパク質の生産

IMX313は、標準的な方法によりこのオリゴマー化ドメインをT7に基づく発現ベクターにクローニングすることにより生産した。PCR産物は、N末端のNdeI部位および第2の終止コドンとオーバーラップするHindIII部位を含んでいた。ヌクレオチド配列は、

配列番号8：

【化2】

CATATGTCAAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAGAGGTTGCTTATATTCAGAGCGTCGTCTCCGA  
TTGCCACGTGCCTACAGCGGAACTGCGTACTCTGCTGGAATACGAAAACCTTCCTGGAGATTCAAAAAC  
GAAGGTGGAATTGCAAGGACTGAGCAAGGAGTAATAAGCTT

10

である。

【0083】

この遺伝子は、下記のタンパク質配列（配列番号9）：

【化3】

MSKKQGDADVCGEVAYIQSVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKE\*\*

をコードする。

【0084】

アスタリスクは、終止コドンを表す。質量分析により判定したところ、2番目のセリンは、開始メチオニンの完全な除去を可能とした。

20

【0085】

IMX313を大腸菌(*Escherichia coli*)株C43(DE3)で発現させた。形質転換細胞を37℃にてTerrific Broth培地でOD600がおおよそ0.6となるまで増殖させた後、1mM濃度のIPTGで発現を誘導し、この培養物を37℃で一晩増殖させた。回収した細菌を、50mMリン酸ナトリウムpH7.4を含有するバッファー中で音波処理により溶解させ、4℃にて18,000rpmで30分間遠心分離した。IMX313タンパク質は可溶性画分に見られた。

【0086】

IMX313Tは、IMX313の最後の5つのC末端アミノ酸（GLSKE）を次のように正電荷ペプチド（SPRRRRS）で置換することにより作出した：PstI制限部位（CTGCAG：アミノ酸ロイシンおよびグルタミンをコードする）を、置換されるアミノ酸（GLSKE）のすぐ前に部位特異的突然変異誘発により作出した。これにより、IMX313の最後の5つのアミノ酸の、アニーリングして終止コドンのすぐ下流にあるPstI部位およびHindIII部位にライゲート可能な2つの相補的オリゴヌクレオチドによりコードされる任意のアミノ酸による置換が可能となる。

30

【0087】

アニーリングされPstIとHindIII部位：

【化4】

配列番号12: 5' GTCTCCGCGTCGCCGTCGCTCCTAATA 3' および

40

配列番号13: 5' AGCTTATTAGGAGCGACGGCGACGCGGAGACTGCA 3'.

の間にクローニングされた際、下記のリン酸化オリゴヌクレオチドは、LQGLSKE\*  
\*（配列番号10）をコードする配列をLQSPRRRRS\*\*（配列番号11、ここで、\*は終止コドンを表す）に置換した。

【0088】

IMX313Tをコードするヌクレオチド配列は下記の通りである。（配列番号14）

:

## 【化 5】

atgtcaaagaagcaaggtgatgctgatgtgtgctgagaggttgcttatattcagagcgctgctccgattgccacgtgcctacagcggaac  
tgcgtactctgctggaatacgaactcttctggagattcaaaaactgaaggtggaactgcagctccgcgtcgccgtcgctcctaata  
a

## 【0089】

また、IMX313Tも大腸菌株C43( DE3)で発現させた。形質転換細胞を37  
にてTerrific Broth培地でOD600がおおよそ0.6となるまで増殖さ  
せた後、IPTGを1mMまで加えることにより発現を誘導し、この培養物を37で一  
晩増殖させた。これらの細菌を、50mMリン酸ナトリウムpH7.4を含有するバッ  
ファー中で音波処理により溶解させ、4にて18,000rpmで30分間遠心分離した  
。IMX313Tタンパク質も可溶性画分に見られた。

10

## 【0090】

IMX313Pは、IMX313Tを発現するプラスミドをオリゴヌクレオチド：

## 【化 6】

IMX205: 5' GGAGATTCAAAAACCTGAAGGTGGAAGGTCGCCGTCGCCGTCGCTCC 3' (配列番号 43) および  
IMX139: 5' GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC 3' (配列番号 44).

で変異させることにより構築した。

## 【0091】

20

このPCR産物を、Geiser(29)の方法により、IMX313Tタンパク質を  
発現するT7ベクターに挿入した。

## 【0092】

IMX313Pをコードするヌクレオチド配列は下記の通りである。(配列番号45)

:

## 【化 7】

ATGTCAAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAGAGGTTGCTTATATTAGAGCGTCGTCTCCGATTG  
CCACGTGCCTACAGCGGAACTGCGTACTCTGCTGGAAATACGAAAACCTCTCCTGGAGATTCAAAAACCTGAA  
GGTGAAGGTCGCCGTCGCCGTCGCTCCTAA

30

## 【0093】

溶解バッファーも1M NaClを含有したこと以外は、IMX313Tタンパク質と  
同じ方法でIMX313Pタンパク質を精製した。清澄化した細菌溶解液を80で20  
分間加熱し、4にて(are 4)18,000rpmで30分間の遠心分離により再び清  
澄化した。

## 【0094】

2. IMX313と同様にIMX313PおよびIMX313Tはヘプタマーである

タンパク質IMX313Tを、50mMリン酸ナトリウムpH7.4で平衡化したHi  
Trap SP FF 5mlカラムで精製した。このタンパク質を0Mから1MのN  
aCl勾配で溶出させた。タンパク質IMX313Tを含有する画分をプールし、1倍P  
BSに対して透析し、1倍PBSで平衡化したHi Load 26/60 Super  
dex 75pgカラムに適用した。IMX313Tの溶出容量(Ve 170ml)は  
、IMX313(Ve 162ml)の溶出容量と酷似していた。

40

## 【0095】

タンパク質IMX313Pは、ヘパリンセファロースカラムで精製した。このタンパク  
質は、このカラムにロードする前に、まず、Tris-HCl pH8.0および150  
mM NaClの溶液に対して透析した。次に、このカラムをTris-HCl pH8  
.0および2M NaClで展開した。溶出したIMX313Pタンパク質画分をプール  
し、500mM NaClを含有するPBSに対して透析し、500mM NaClを  
含有する1倍PBSで平衡化したHi Load 26/60 Superdex 75p

50



g カラムに適用した。溶出容量は、IMX313Tの溶出用量と識別可能であった。

【0096】

SDS-PAGEゲル上でヘプタマー形成を実証するために、精製したIMX313TおよびIMX313Pタンパク質を非変性条件、変性条件および還元条件下で分析した。還元剤の不在下で、IMX313TおよびIMX313PはIMX313と同様にオリゴマー化し、総て、それらのモノマーよりもはるかに高い分子量で移動した。

【0097】

### 3. 短い正電荷ペプチドのIMX313への融合はタンパク質精製を容易にする

上記のように精製したIMX313Tタンパク質を次に、10mM Tris-HCl および150mM NaClを含有するバッファーpH7.5にて、HiTrapヘパリンHP 5mlカラムにロードした。結合したタンパク質の溶出は、塩勾配：同じバッファー中2MのNaCl 15カラム容量で行った。正電荷IMX313Tタンパク質はヘパリンカラムに結合し、およそ1M NaClで溶出した。別のカラム実施で、IMX313はヘパリン-セファロースカラムに結合せず、その代わりにフロースルー画分に見られたことが示された。

【0098】

ヘパリンセファロースは、アフィニティークロマトグラフィーカラムである。ヘパリンセファロースは、凝固因子、リパーゼ、リポタンパク質およびホルモン受容体を含む血清タンパク質を精製するために広く使用され、また、増殖因子を精製するためにも首尾良く使用されている。DNAおよびRNAの類似体として働くヘパリンのポリ陰イオン構造は、ポリメラーゼ、リガーゼ、キナーゼ、およびリボゾームタンパク質を含む、DNAまたはRNAと相互作用する多種類のタンパク質の精製を可能にしてきた。

【0099】

本発明者らは、本明細書で、正電荷ペプチド（ポリアルギニンテールなど）の融合によるコイルドコイルの改変が、負電荷ヘパリンセファロースカラムへの有用な結合能を付与し、精製を大幅に簡単にすることを示した。

【0100】

このことは、Stempferら(19, 20)が、ヘパリン-セファロース上に酵素を固定化するためにその酵素に融合させた6つのアルギニン残基を用いた際には予期されず、この酵素は0.35M NaClを用いた場合にのみカラムから溶出可能であった。この塩濃度では、実施例4に示されるように、細胞抽出液中の他のタンパク質も溶出し、500mM NaCl未満などの塩濃度で、カラムに結合する大部分のタンパク質を溶出させ、次いで、さらに高い塩濃度で改変コイルドコイル融合タンパク質を実質的に純粋な形態で溶出させることができるという大きな利点がある。これによりステップグラジェントまたはバッチ精製の実施が可能となる。従って、ヘパリン-セファロースカラムは、IMX313T、および本明細書に記載の様式で改変された他のコイルドコイルに融合されたタンパク質のアフィニティークラムとして使用することができる。

【0101】

HiTrap SP FFなどの陽イオン交換カラムに比べ、ヘパリン-セファロースカラムは、改変コイルドコイルにより特異的であるためにより有用である。本発明者らの研究では、陽イオン交換カラム(HiTrap SP FF; pH7.4)から溶出されたタンパク質IMX313Tは、完全に純粋ではなかった。このSP FFおよびS75で精製したタンパク質をヘパリン-セファロースカラム(HiTrap Heparin HP)にロードすると、夾雑物の痕跡がフロースルー中に除去され、IMX313Tタンパク質は純度>98%で溶出され、このことは、同等濃度のNaClでどちらのカラムからも当該タンパク質が溶出されたが、ヘパリンカラムは、ペプチドSPRRRRSの付加により改変されたコイルドコイルに対してSP FFよりも特異性が高いことを示す。

【0102】

### 4. ヘパリンセファロースは改変コイルドコイルのアフィニティークラムとして機能する

IMX313を実施例1に記載の通り作製した。細菌溶解液を10mM Tris-HCl、150mM NaClを含有するバッファーpH7.5中で音波処理し、Sorvall SS34ローターにて4、18,000rpmで30分間遠心分離した後に、可溶性画分を得た。

【0103】

融合タンパク質を含有する上清を、10mM Tris-HClおよび150mM NaCl pH7.5で平衡化したHi Trap Heparin HPカラムにロードした。溶出は、塩勾配：同じバッファー中2MのNaClで行った。ほとんど総ての夾雑物がフロースルー中、または低い塩濃度で除去され、IMX313タンパク質は、後におよそ1M NaClで、ただ1回のクロマトグラフィー工程だけで極めて高純度（およそ95%）で溶出された。さらにゲル濾過により精製すると、実質的に純粋なタンパク質が得られる。結果を図1に示す。

10

【0104】

5. IMX313に融合された他の短い正電荷ペプチド

異なるリンカー（グリシン対セリンおよびプロリン）を比較するため、またはアルギニンとリジンを比較するために、IMX313Tの他の3つの改変を行った。IMX313Tを発現するプラスミドを、オリゴヌクレオチド：

【化8】

IMX206: 5' GGAGATTCAAAACTGAAGGTGGAAGGTCGCCGTCGCCGTTAATAAGCTTGATCCGGC 3'

(配列番号 46) または

20

IMX207: 5' CTGAAGGTGGAATCTCCGaaaaagaaaagTAATAAGCTTGATCCGGCTG 3' (配列番号 47) または

IMX208: GGAGATTCAAAACTGAAGGTGGAAGGTAAAAAGAAAAAGTAATAAGCTTGATCCGGC 3'

(配列番号 48) および

IMX139 5' GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC 3' (配列番号 49)

を用いて増幅することにより変異させ、そのPCR産物をGeiser(29)の方法により、IMX313タンパク質を発現するT7ベクターに挿入した。

【0105】

pIMX427、pIMX428およびpIMX429と呼称する得られたプラスミドは、タンパク質：

30

【化9】

IMX427: MSKKQGDADVCGEVAYIQSVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVEGRRRR\* (配列番号 50)

IMX428: MSKKQGDADVCGEVAYIQSVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVESPKKKK\* (配列番号 51)

IMX429: MSKKQGDADVCGEVAYIQSVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVEGKKKK\*

(配列番号 52)

をコードする。

【0106】

40

これらをIMX313Pと同様に精製し、次いで、それらの5mlヘパリン-セファロースカラム上での挙動を、IMX313TおよびIMX313Pと比較して調べた。

【0107】

【表 1】

	Ve (ml)	NaCl (mM)	C 末端	pI
IMX428	34.4	786	SPKKKK	8.88
IMX429	37.38	817	GKKKK	8.88
IMX313T	41.18	901	SPRRRRS	9.18
IMX427	44.24	968	GRRRR	9.02
IMX313P	48.38	1058	GRRRRRS	9.41

10

## 【0108】

条件は次の通りであった：ローディングバッファー 20 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl。次いで、第2バッファーを用いて勾配溶出を行った。第2バッファーは、20 mM Tris pH 7.5 および 2 M NaCl であった。

## 【0109】

これらの結果は、アルギニン7個のペプチドが NaCl 濃度 820 mM でヘパリンセファロースから溶出し、リジン7個のペプチドが 640 mM NaCl 濃度で溶出したことを示した Fromm および共同研究者ら (47) の実験と比較することができる。明らかに、正電荷ペプチドのコイルドコイルとの融合は、それらのヘパリンへの結合を改善する。

20

## 【0110】

6. 抗原 PAm、ならびに融合タンパク質 PAm-IMX313 および PAm-IMX313T の生産および精製

抗原 PAm の IMX313 との融合物を生産するために、黄色ブドウ球菌オープンリーディングフレーム由来のプロテイン A を、オリゴヌクレオチド：

## 【化10】

(配列番号 15) - IMX1078: 5' CTTTAAGAAGGAGATATACATATGgctgatgcgcaaaaaataac 3' および

30

(配列番号 16) - IMX1079: 5' CCGCACACatcagcatcaccttgcttttttggtgcttgagcatcatttagc 3'

を用いてプラスミド pEZZ18 (Amersham Pharmacia) から増幅させ、その約 233 bp 塩基対の PCR 産物を、Geiser (29) の方法により、IMX313 タンパク質を発現する T7 ベクターに挿入した。次に、プロテイン A リーディングフレームを、Kimra (27) により記載されている突然変異を導入するために、オリゴヌクレオチド：

## 【化11】

(配列番号 17) - IMX1080: 5' cttcaacaaga**AAaaAaGa**Acgccttctatg 3' および

(配列番号 18) - IMX1081: 5' gcgctttggcttgagccgcttttaagctttgg 3'

40

を用いて変異させ、発現ベクター pIMX494 を作出し、これは下記の発現カセット (配列番号 19)：

## 【化 1 2】

atggctgatgcgaacaaaataacttcaacaaaggaaaaaagaacgccttctatgaaatc  
 ttgaatatgcctaacttaaacgaagaacaacgcaatggtttcatccaaagcttaaaagcg  
 gctccaagccaaagcgctaaccttttagcagaagctaaaaagctaaatgatgctcaagca  
 ccaaaaaagcaaggtgatgctgatgtgtgaggaggttgccttatattcagagcgtcgtc  
 tccgattgccacgtgcctacagcggaactgcgtactctgctggaatacgaactcttc  
 ctggagattcaaaaactgaaggtggaattgcaataataa

10

を有する。

## 【0 1 1 1】

これは下記のタンパク質（配列番号 2 0）：

## 【化 1 3】

MADAQQNNFNKGKKNFYELNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAPKKQGDADVCGEVAY  
 IQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQ\*\*

をコードする。

## 【0 1 1 2】

このバージョンの I M X 3 1 3 は、計画された免疫誘導の解釈を容易にするために、5  
 5 アミノ酸バージョンに見られる最後の 5 つのアミノ酸（G L S K E）を欠いていること  
 に留意されたい。I M X 4 9 4 融合タンパク質（P A m - I M X 3 1 3）は、C 4 3（D  
 E 3）株で I P T G による誘導時に発現された。この細胞ペレットを 2 0 m M T r i s  
 - H C l p H 7 中での音波処理により溶解させ、4 にて 1 8 , 0 0 0 r p m で 1 5 分  
 間遠心分離した。融合タンパク質はペレット中に見られ、次にこれを 5 0 m M T r i s  
 - H C l、3 M 尿素から構成されるバッファー p H 7 . 4 中で音波処理し、再び 1 8 0 0  
 0 r p m で遠心分離した。この時、融合タンパク質は上清中に存在し、これを H i T r a p  
 Q F F 5 m l カラムにロードし、カラムを 1 M N a C l 勾配で展開した。

20

## 【0 1 1 3】

I M X 4 9 4 タンパク質を含有する画分をプールし、P B S に対して透析し、H i L  
 o a d 2 6 / 6 0 S u p e r d e x 7 5 カラムでのゲル濾過によりさらに精製した  
 。

30

## 【0 1 1 4】

担体タンパク質に融合されていない抗原 P A m を生産するために、ベクター p I M X 4  
 9 4 から I M X 3 1 3 コード配列を、オリゴヌクレオチド：

## 【化 1 4】

（配列番号 21）- I M X 1279 5' gcagccggatcaagcttattatttgggtgcttgagcatc 3' および配列番号 22 - T7  
 フォワード: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'.

を用いて欠失させた。この P C R 産物を親ベクターに挿入し（2 7）、プラスミド p I M  
 X 4 9 5 を作出した。

40

## 【0 1 1 5】

C 4 3（D E 3）株中 p I M X 4 9 5 の 5 0 0 m l 培養物 (A 500ml culture of pIMX49  
 5 in the strain C43(DE3) を 1 m M I P T G で誘導し、一晩増殖させた。回収した細菌  
 をバッファー: 5 0 m M リン酸ナトリウム p H 7 . 4 中での音波処理により溶解させ、S  
 o r v a l l S S 3 4 ローターにて、4、1 8 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離し  
 た。タンパク質 I M X 4 9 5（その N 末端メチオニンを欠く P A m）は上清に見られ、  
 その上清を 7 6 で 1 5 分間加熱した後に 1 8 k で 1 5 分間の 2 回目の遠心分離を行うこ  
 とにより精製した。この時にも、I M X 4 9 5 は上清に見られ、これを 5 0 m M M E  
 S p H 6 バッファーに対して透析した。上清を H i T r a p S P F F 5 m l カ

50

ラムにロードし、NaCl勾配で溶出させた。最後に、IMX495タンパク質をPBS中、Hi prep 26/60 sephacryl S-100 HRカラムでのゲル濾過により精製した。

#### 【0116】

融合タンパク質PAm-IMX313TをコードするベクターpIMX497を生産するために、ベクターpIMX494を、最後の2つのアミノ酸ロイシンおよびグルタミンをコードする配列をTTGCA AからCTGCA Gに同義的に変異させることによって改変し、次いで、新たに作出されたPst I部位と、第2の終止コドンとオーバーラップするHind III部位との間に、オリゴヌクレオチド：

#### 【化15】

(配列番号23)- 5' GTCTCCGCGTCGCCGTCGCTCCTAATA 3' および

(配列番号24)- 5' AGCTTATTAGGAGCGACGCGACGCGGAGACTGCA 3'

を用いてクローニングし、IMX313のC末端をLQ\*\*からLQSPRRRRS\*\* (配列番号11)に変更した。

#### 【0117】

次に、コードされているタンパク質IMX497をC43(DE3)株で発現させ、細菌ペレットを50mMリン酸ナトリウムpH7.4に溶解させて18krpmで遠心分離することにより精製した。融合タンパク質はペレット中に見られ、50mMリン酸ナトリウム、8M尿素、pH7.4中での音波処理により再懸濁させた。さらなる遠心分離の後、上清を50mMリン酸ナトリウムpH7.4に対して透析し、この透析物を遠心分離した。上清を15分間75℃に加熱した後、再び遠心分離した。上清を2MへのNaCl勾配で展開させるHi Trap SP FFカラムで精製し、IMX497融合タンパク質を含有する画分をプールし、PBSに対して透析し、Hi Load 26/60 superdex 75カラムでのゲル濾過により精製した。

#### 【0118】

### 7. 細胞内TLRリガンドの結合

これらのタンパク質が細胞内TLRリガンドと結合できたかどうかを判定するために、電気泳動移動度シフトアッセイ(electrophoretic mobility shift assay) (EMSA)を行った。

#### 【0119】

細胞内TLRリガンドとIMX497タンパク質(PAm-IMX313T)の種々の組合せを調製し、複合体形成をアガロースゲル電気泳動により分析した。

#### 【0120】

用いたTLRリガンドは次の通りであった。

・TLR3の場合：二本鎖RNAの類似体としてのポリシチジル酸にハイブリダイズされるポリイノシン酸ポリヌクレオチドの二重鎖であるポリI:C。鎖長は各鎖20ヌクレオチドであった。

・TLR7の場合：配列5' GsCsCsCsGsUsCsUsGsUsUsGsUsGsUsGsAsCsUsC 3' (ここで、「s」はホスホチオエート結合(phosphothioate linkage)を表す) (配列番号25)を有する、ssRNA40と呼ばれるオリゴヌクレオチド。

・TLR9の場合：配列：5' tccatgacgttctctgacgtt 3' (配列番号26)を有する、ODN1826と呼ばれるオリゴヌクレオチド。

#### 【0121】

TLR9リガンドに関して、結果を図2に示す。左から右へ：

レーン1：低分子量ラダー(NEB)；

レーン2：タンパク質IMX497(1mg/ml)；

レーン3：FITC-CpG ODN(Eurogentec)10μM；

レーン4：タンパク質IMX497(1mg/ml)とFITC-CpG ODN 10μM；

10

20

30

40

50

レーン 5 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 0 . 5 m g / m l ) と F I T C C p G O D N  
1 0 μ M ;

レーン 6 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 0 . 2 5 m g / m l ) と F I T C C p G O D N  
1 0 μ M ;

レーン 7 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 0 . 1 2 5 m g / m l ) と F I T C C p G O D  
N 1 0 μ M。

#### 【 0 1 2 2 】

複合体は複合体を形成していないリガンドよりもずっとゆっくり移動し、従って、ゲル  
上でリガンドが「シフトする」ので、複合体形成は明瞭に検出可能であった。タンパク質  
の濃度が低下するにつれ、観察される複合体は発散性が高くなり、非結合 T L R リガンド  
のバンドが見えるようになった（それは、対照として用いた T L R リガンドのみを含有す  
るサンプルと同じ距離の移動であった）。

10

#### 【 0 1 2 3 】

タンパク質 IMX 4 9 7 と T L R 7 および T L R 3 リガンドの組合せを図 3 に示すが、  
これらの核酸もまた複合体を形成し、E M S A により容易に検出された。

#### 【 0 1 2 4 】

図 3 の凡例（T L R 7 リガンドまたは T L R 3 リガンド + I M X 4 9 7）：

レーン 1 : 低分子量ラダー（N E B）；

レーン 2 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 1 m g / m l ) ；

レーン 3 : F I T C s s R N A ( E u r o g e n t e c ) 1 0 μ M ；

20

レーン 4 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 1 . 5 m g / m l ) / F I T C s s R N A 1 0  
μ M ；

レーン 5 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 1 m g / m l ) / F I T C s s R N A 1 0 μ M  
；

レーン 6 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 0 . 5 m g / m l ) / F I T C s s R N A 1 0  
μ M ；

レーン 7 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 0 . 2 5 m g / m l ) / F I T C s s R N A 1  
0 μ M ；

レーン 8 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 0 . 1 2 5 m g / m l ) / F I T C s s R N A  
1 0 μ M ；

30

レーン 9 : F I T C s s R N A 1 0 μ M ；

レーン 1 0 : 陰性対照；

レーン 1 1 : ポリ（I : C）（R & D T O C R I S B i o s c i e n c e）0 . 5 m  
g / m l ；

レーン 1 2 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 1 . 5 m g / m l ) / ポリ（I : C）0 . 5 m g  
/ m l ；

レーン 1 3 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 1 m g / m l ) / ポリ（I : C）0 . 5 m g / m  
l ；

レーン 1 4 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 1 m g / m l ) / ポリ（I : C）0 . 2 5 m g /  
m l ；

40

レーン 1 5 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 0 . 5 m g / m l ) / ポリ（I : C）0 . 5 m g  
/ m l ；

レーン 1 6 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 0 . 5 m g / m l ) / ポリ（I : C）0 . 2 5 m  
g / m l ；

レーン 1 7 : タンパク質 IMX 4 9 7 ( 0 . 2 5 m g / m l ) / ポリ（I : C）0 . 5 m  
g / m l 。

#### 【 0 1 2 5 】

本発明者らはまた、IMX 4 9 4（P A m - I M X 3 1 3）および IMX 4 9 5（P A  
m）もまた C p G オリゴヌクレオチド（T L R 9 リガンド）とともにこのようなゲルシフ  
トをもたらすことができたかどうかを検討した。結果を図 4 に示す。

50

## 【 0 1 2 6 】

図 4 の凡例：

- レーン 1：低分子量ラダー（NEB）；  
 レーン 2：タンパク質 IMX 4 9 7（1 mg / ml）；  
 レーン 3：タンパク質 IMX 4 9 4（1 mg / ml）；  
 レーン 4：タンパク質 IMX 4 9 5（1 mg / ml）；  
 レーン 5：FITC CpG ODN（Eurogentec）10 μM；  
 レーン 6：タンパク質 IMX 4 9 7（1, 5 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM；  
 レーン 7：タンパク質 IMX 4 9 7（1 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM；  
 レーン 8：タンパク質 IMX 4 9 7（0.5 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM；  
 レーン 9：タンパク質 IMX 4 9 7（0.25 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM；  
 レーン 10：タンパク質 IMX 4 9 4（1 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM；  
 レーン 11：タンパク質 IMX 4 9 4（0.5 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM；  
 レーン 12：タンパク質 IMX 4 9 4（0.25 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM；  
 レーン 13：タンパク質 IMX 4 9 5（1 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM；  
 レーン 14：タンパク質 IMX 4 9 5（0.5 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM；  
 レーン 15：タンパク質 IMX 4 9 5（0.25 mg / ml）と FITC CpG ODN 10 μM。

## 【 0 1 2 7 】

図 4 のゲルは、ゲルシフトは IMX 4 9 7 では再現性があるが、IMX 4 9 5（レーン 13 ~ 15）は検出可能なゲルシフトはもたらさず、また、IMX 4 9 4（レーン 10 ~ 12）で見られるゲルシフトはかろうじて検出可能であって、IMX 4 9 7で見られるものよりもはるかに著しさを欠くことを示す。

## 【 0 1 2 8 】

IMX 4 9 4 と IMX 4 9 7 の間の違いは、IMX 4 9 7 にはタンパク質のコイルドコイルの C 末端に融合された配列 S P R R R R S が存在することである。

## 【 0 1 2 9 】

結論：

前記ペプチドが無ければ、IMX 3 1 3 と抗原 P A M の融合タンパク質は、TLR 受容体の核酸リガンドと結合することができない。

## 【 0 1 3 0 】

#### 8. IMX 3 1 3 T に会合された抗原の免疫原性

次に、単独であれ IMX 3 1 3 または IMX 3 1 3 T に融合された場合であれ、また、細胞内 TLR リガンドを伴う処方を用いる場合であれ用いない場合であれ、P A m の免疫原性を判定するために、マウスに免疫を行った。フロイントの完全または不完全アジュバント（C F A / I F A）とともに処方した P A m を対照として用いた。

## 【 0 1 3 1 】

この目的で、雌 B A L B / C マウスを、初回は C F A 中に、次回は I F A 中に処方した P A m、P A m - IMX 3 1 3、P A m - IMX 3 1 3 T または P A m で、14 日間隔で 2 回、1 回の注射につき各タンパク質 2 ナノグラムを用いて皮下免疫した。初回免疫の 28 日後に、血清中の P A m 特異的 I g G 力価を、プレートに P A m でコーティングした E

L I S Aを用いて測定した。結果を405nmで測定されたサンプルのOD + SEMとして表す。異なる群の平均値間の有意差は、一元配置ANOVAとその後のTukeyの多重比較検定により判定した。p値<0.05を統計学的に有意と見なして異なる\*として表し、\*\*\*はp<0.001、\*\*はp<0.01を表す。

#### 【0132】

結果を図5に示す。PAm単独で免疫したマウスの血清中には抗PAm IgG抗体は存在しないかまたは極めて低いレベルであった。他方、PAm-IMX313またはPAm-IMX313Tで免疫したマウスは、高レベルの全身性PAm特異的IgG抗体応答を示したが、PAm-IMX313T免疫マウスは、PAm-IMX313免疫マウスに比べて有意に高い(p<0.001)IgG抗体応答を示し、PAm-IMX313Tと同等の応答がPAm+CFA/IFAをアジュバントとして用いた場合に得られた。

10

#### 【0133】

このことは、ペプチドSPRRRRSの付加は、親配列IMX313に比べ、抗原に対して有意に向上した免疫原性を付与することを示す。

#### 【0134】

抗原PAmを細胞内TLRリガンド(一本鎖DNAまたはRNAであれ二本鎖RNAであれ)とともに処方した場合、その免疫原性は実質的に改善し、同等の改善が、処方前に抗原がIMX313に融合された場合にも見られた。しかしながら、明らかに最良の結果は、TLRリガンドとともに処方する前に抗原がIMX313Tに融合された場合に見られた。

20

#### 【0135】

ここで結果を表にまとめ、以下に概略を示す。

#### 【0136】

#### 【表2】

表1：PAmに対するIgGのエンドポイント希釈力価

	PAm	PAm-IMX313	PAm-IMX313T
アジュバント無し	0	800	1600
ポリI:C含有	100	3200	12800
ODN CpG含有	100	3200	6400
ssRNA含有	0	2400	6400
CFA/IFA含有	1600	-	-

30

#### 【0137】

着目される問題は、これらの改善が、抗原、この場合PAmに対して得られた免疫応答のタイプを改変するかどうかということである。Th1またはTh2応答は選択的に改善されるのか。これに答えるために、本発明者らは、IgG1力価がTh2型応答の典型であり、一方、IgG2aはTh1型応答に相当することから、IgG1応答とIgG2a応答を比較した。結果を表2に示す。

40

#### 【0138】

PAmはそれ自体でほとんど等しいTh1応答とTh2応答を誘導するが、それをフロイントのアジュバントとともに処方した場合には、これを劇的に変化させ、この場合にはTh2応答(IgG1)が優勢となることが明らかである。PAmとIMX313の融合は、Th1応答とTh2応答の両方が増強されること、およびこの応答のタイプに有意なシフトがないことを示す。IMX313Tを用いた場合には、Th1応答(IgG2a)が優勢化し始めるが、この効果はフロイントのアジュバントを用いた場合よりもはるかに小さく、逆方向である。免疫学者の共通認識は、Th1応答の方がTh2応答よりも好ましいということである。

#### 【0139】

50



この分析をさらに考慮して、本発明者らは、細胞内TLRリガンドを用いた処方が、Th1応答またはTh2応答のいずれかを生成するように免疫系を再指向するために使用可能であるかどうかを検討した。Th応答のタイプを評価するためにIgG抗体アイソタイプデータを扱い、IgG2aまたはIgG1抗体の優勢性は、それぞれTh1様応答またはTh2様応答を示す。Th1様応答は極めて高いIgG2a/IgG1比を有し、従って、群平均値も高かった。IgG2a/IgG1比は、Th1優勢(IgG2a>IgG1)、Th2優勢(IgG1>IgG2a)、または混合型Th1/Th2(Th0、IgG1=IgG2a)応答のいずれかの指標として用いた。

【0140】

結果を下記の表2に示す。

【表3】

免疫原性組成物	PAm 特異的 IgG1	PAm 特異的 IgG2a	IgG2a/IgG1 比	TH 応答
PAm	0.147	0.150	1.02	Th0
PAm-CFA/IFA	0.530	0.241	0.45	Th2
PAm-IMX313	0.387	0.497	1.28	Th1
PAm-IMX313T	0.436	0.686	1.57	Th1
PAm-IMX313T+TLR9 リガンド	0.301	0.896	2.97	Th1
PAm-IMX313T+TLR7 リガンド	0.391	0.71	1.81	Th1
PAm-IMX313T+TLR3 リガンド	0.424	1.28	3.25	Th1

【0141】

PAm-IMX313TをTLRリガンドとともに処方すると、3種類のリガンドのそれぞれでTh1応答が優勢となる傾向を強めることが明らかであり、この効果はTLR3リガンドポリI:Cで最も顕著であり、TLR9リガンドを用いる場合とほとんど同じ顕著さである。

【0142】

#### 9. T細胞応答

正電荷ペプチドによるIMX313コイルドコイルの改変はT細胞応答も改善できたかどうかを判定するために、本発明者らはマイコバクテリア抗原85Aをモデルとして用いたが、これはIMX313がマウスおよびサルにおいてこの抗原に対するT細胞応答を改善することが示されていたためである(28)。抗原85A単独またはIMX313Tとの融合物もしくはその14もしくは18個のアミノ酸だけを含むIMX313の2つの末端切断型との融合物を発現する一連の組換えプラスミドを、まず、Spencerら(28)により記載されているpSG2-85A-IMX313ベクターから85A-IMX313コード配列をGatewayプラスミドpENTR4-LPにサブクローニングすることにより作製した。このpENTR4骨格において、IMX313を欠失させるか改変するような誘導体を作製した。

【0143】

これらのIMX313変異体のアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化 1 6】

IR14

IRKLFLEIQKLKVE\* (配列番号 27)

TL18

TLLEIRKLFLEIQKLKVE\* (配列番号 28)

IMX313 KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKE\* (配列番号 6)

IMX313T KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQSPRRRRS\* (配列番号 7)

## 【 0 1 4 4】

IMX313の14マーおよび18マーフラグメントは37（および42でさえも）ヘプタマーを維持しており、従って、DNAワクチン接種後に発現させた際にヘプタマー融合タンパク質を形成するはずであることから、それらを選択した。IMX313の改変は次のように行った。

10

## 【 0 1 4 5】

フォワードプライマーIMX043およびIMX044とリバースプライマーIMX045を用いてIMX313のフラグメントを増幅し、このPCR産物を用いて(29)親プラスミドのIMX313と置換した。

## 【 0 1 4 6】

## 【化 1 7】

IMX043: 5' gaagcccacctgcaacgtgatccATACGAAACTCTTCCTGGAGA 3' (配列番号 29)

IMX044: 5' gaagcccacctgcaacgtgatccACTCTGCTGGAAATACGA 3' (配列番号 30)

20

IMX045: 5' agggccctctagatgcatgctcgagcgccgcttattaTTCCACCTTCAGTTTTTG 3' (配列番号 31)

## 【 0 1 4 7】

IMX313コード配列を、プライマーIMX037およびIMX047と、鋳型としての親プラスミドを用いて欠失させ、次に、得られたPCR産物を用いて(29)IMX313配列と置換した。

## 【 0 1 4 8】

## 【化 1 8】

IMX037: 5' cagaatagaatgacacctactcag 3' (配列番号 32)

IMX047: 5' GAAGCCCCGACCTGCAACGTTAATAAgcgccgctcgagcatg 3' (配列番号 33)

30

## 【 0 1 4 9】

85A-IMX313Tを作製するために、下記のオリゴを用いて、プラスミドpIMX497からIMX313Tを増幅し、次に、そのPCR産物を親プラスミド：

## 【化 1 9】

IMX1030: 5' GTGCCTACAGAGGACGTGAAATGCTGCTGGAAATACGAAACTCTTCCTGG 3' (配列番号 34)

IMX046: 5' AgggccctctagatgcatgctcgagcgccgcttattaGGAGCGACGGCGACGCGGAGA 3' (配列番号 35)

40

に挿入した(29)。

## 【 0 1 5 0】

次に、これらの5つのプラスミド(85A、85A-IR14、85A-TL18、85A-IMX313および85A-IMX313Tをコードする)をDNA免疫に用いた。

## 【 0 1 5 1】

5群のBALB/cマウスを、これら5つのプラスミドのそれぞれで、0日目と14日目に1回の注射当たり25μgを用いて筋肉内免疫した。抗原特異的T細胞応答の誘導は、28日目に脾細胞を用い、ELISPOTにより測定した。免疫マウスから単離した精製脾臓CD4+、CD8+および全T細胞を組換え85Aタンパク質(Clinibio

50

sciences)またはEurogentecから購入したペプチドp11もしくはp15(26)のいずれかと共培養した。

#### 【0152】

##### ELISPOTアッセイ:

平底96ウェルニトロセルロースプレート(Millititer; Millipore)をIFN- $\gamma$  mAb(15  $\mu$ g/ml; MABTECH、ストックホルム)でコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。PBSで洗浄した後、プレートを37℃にて1時間、10%ウシ胎仔血清でブロッキングした。2  $\times$  10<sup>6</sup>細胞/ウェルを、15  $\mu$ g/mlの抗ヒトIFN- $\gamma$ でコーティングしたIPVH膜上にて、終濃度2  $\mu$ g/mlの関連ペプチド(CD8エピトープp11、CD4エピトープp15または85Aタンパク質)で刺激し、20時間インキュベートした。インキュベーション後、これらのプレートをPBSで十分に洗浄して細胞を除去し、IFN- $\gamma$  mAb(1  $\mu$ g/mlのビオチン、MABTECH)を各ウェルに加えた。37℃で2時間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、室温で1時間、ストレプトアビジン-HRP(1  $\mu$ g/ml; MABTECH)で現像した。洗浄した後、基質(3-アミノ-9-エチルカルバゾール(3-amino-9-ethyrcarbazol)(Sigma))を加え、15分間インキュベートした。さらに洗浄した後に、赤色スポットを顕微鏡下で計数した。

#### 【0153】

85A-IMX313、85A-IR14または85A-TL18または85A-IMX313T免疫マウスから単離された精製脾臓CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>Tおよび全T細胞は、85A免疫マウスに比べて有意に高いIFN- $\gamma$  応答を示し、IMX313および他の改変配列のT細胞応答増強能が確認された。さらに、85A-IMX313T接種マウス由来の脾臓CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>および全T細胞は、他のいずれの免疫群よりも有意に多いIFN- $\gamma$  を産生した( $p < 0.001$ )(図6、7、8)。

#### 【0154】

CD8<sup>+</sup>T細胞は、CD4<sup>+</sup>T細胞とは異なるサイトカインプロファイルを示し、見られた優勢なサイトカイン産生集団は、IFN- $\gamma$  を産生するCD8<sup>+</sup>T細胞であった(図7および8)。

#### 【0155】

IMX313がIMX313Tで置換されるとCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>両方の抗原特異的T細胞応答が増強されるということは注目すべきことである。

#### 【0156】

結論として、IMX313により改善される抗原85Aに対するT細胞応答は、代わりにIMX313Tを使用することによりさらに改善される。

#### 【0157】

##### 10. DNAワクチン接種により誘導されるB細胞応答

DNAワクチンで免疫したマウスの血清において、抗原85Aに対する抗体力価をELISAにより測定した(図9)。

#### 【0158】

85A-IMX313プラスミド、85A-IMX313Tプラスミドおよび短鎖型のIMX313(IR14およびTL18)で免疫したマウスは、85Aを発現するプラスミドで免疫したマウスよりも有意に高い抗原特異的な総IgG力価を生じた(図9)。85A-IMX313Tで免疫した群は、最高のIgG応答を示した( $p < 0.001$ )。85A単独で免疫したマウスでは、それらの血清中の抗85A IgG抗体は極めて低レベルであった。

#### 【0159】

短い正電荷ペプチドSPRRRRSが付加された場合の免疫応答のTh1への再指向は、DNAがワクチン接種に使用される場合にも見られた。本発明者らは、85Aタンパク質に特異的なIgGアイソタイプをELISAにおいて評価した(表3)。BALB/cマ

10

20

30

40

50

ウスにおいて、I g G 2 a アイソタイプはT h 1 型免疫応答に関連付けられ、I g G 1 アイソタイプはT h 2 型免疫応答に関連付けられる。

【 0 1 6 0 】

注目すべきは、I M X 3 1 3 または I M X 3 1 3 T のいずれかの使用は、T ヘルパータイプ 1 ( T h 1 ) 関連抗原特異的 I g G へのシフトをもたらし、抗原 8 5 A 単独に比べて有意に高いレベルの I g G 2 a と低いレベルの I g G 1 を伴い ( 表 3 )、これらの結果は T h 1 分極の直接的エビデンスを成し、これらの結果は細胞性免疫応答で見られた結果と一致する。

【 0 1 6 1 】

表 3 . 雌 B A L B / C マウスの群 ( n = 5 ) を、8 5 A - I M X 3 1 3、8 5 A - I M X 3 1 3 T、短い I M X 3 1 3 配列 8 5 A - I R 1 4 および 8 5 A - T L 1 8、および 8 5 A 単独を発現するプラスミドで、1 4 日間隔で 2 回、筋肉内免疫した。初回免疫の 2 8 日後に、血清中の 8 5 A 特異的 I g G 1 および I g G 2 a レベルを、8 5 A 特異的 E L I S A を用いて測定した。結果を 4 0 5 n m で測定されたサンプルの O D + S E M として表す。本発明者らが上記のように分析すると、これらのアイソタイプデータを分類する同様のデータが得られた。

【 0 1 6 2 】

【表 4】

表3:

	IgG2a/IgG1 ratio	TH 応答
85A	0.8	Th2
85A-IR14	1.6	Th1
85A-TL18	1.47	Th1
85A-IMX313	1.73	Th1
85A-IMX313T	2.57	Th1

【 0 1 6 3 】

明らかに、総てのバージョンの I M X 3 1 3 には優先的に T h 1 応答を増強する傾向があり、コイルドコイルに融合された短い正電荷ペプチドを有する I M X 3 1 3 T のバージョンで効果が最も顕著であった。

【 0 1 6 4 】

1 1 . 特定の融合タンパク質 I M X 3 1 3 T + インフルエンザ由来核タンパク質 ( N P ) 抗原の使用

D N A ワクチン接種のため、図 1 0 に示されるような親プラスミド p c D N A 3 - N P を下記の例に記載するように改変した。

【 0 1 6 5 】

1 1 . 1 - N P コードプラスミドへの I M X 3 1 3 の挿入

I M X 3 1 3 コード配列をプラスミド p I M X 4 9 4 から、オリゴヌクレオチドプライマー:

【化 2 0】

IMX1289 5' caatgcagaggagtacgacaatggatccaagaagcaaggtgatgctgatg 3' (配列番号 53) および  
IMX1290 5' GTAGAAACAAGGGTATTTTCTTtattactccttgctcagtccttgc 3' (配列番号 54)

を用いて増幅し、G e i s e r ( 2 9 ) に記載されているようにプラスミド p c D N A 3 - N P に挿入した。

【 0 1 6 6 】

1 1 . 2 - t P A シグナルペプチドの挿入

t P A シグナルペプチドをベクター p S G 2 - 8 5 A ( 2 8 ) から、オリゴヌクレオチド：

【化 2 1】

IMX1305 5' cactgagtgcacatcaaaatcatgGATGCAATGAAGAGAGGGC 3' (配列番号 55) および IMX1306 5'

cgtaagaccgtttggctgccttgctagctcttctgaatcgggcatggatttcc 3' (配列番号 56)

を用いて増幅し、Geiser ( 2 9 ) により記載されているようないくつかのプラスミドに、NP コード配列の N 末端とインフレームで挿入した。

【0167】

11.3 - そのモノマー化のための NP の 2 つの点突然変異の作出

オリゴヌクレオチドプライマー：

【化 2 2】

IMX1287 5' ccattctgccgatttgCagatctaagag 3' (配列番号 57) および

IMX1288 5' CAAAAGGGAGATTTGCCTGTACTGAGAAC 3' (配列番号 58)

を用いて NP 遺伝子の内部フラグメントを増幅し、得られた PCR 産物を Geiser に記載されているように NP コードプラスミドに挿入した。両オリゴヌクレオチドとも NP 遺伝子との一致は不完全であったので、この PCR 産物の挿入は 2 つの点突然変異を作り出した。IMX1287 プライマーは NP 遺伝子に突然変異 E 3 3 9 A ( G A A から G C A へ ) を生成し、IMX1288 プライマーは突然変異 R 4 1 6 A ( A G A から G C A へ ) を生成した。

【0168】

11.4 - IMX313T の挿入

IMX313T コード配列をプラスミド pIMX497 から、オリゴヌクレオチドプライマー：

【化 2 3】

IMX1289 (配列番号 53) および

IMX051 5'

GTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTattaggagcgacggcgacgc 3' (配列番号 59)

を増幅し、Geiser に記載されているように種々の p c D N A 3 - N P 由来プラスミドに挿入した。

【0169】

11.5 - 本発明による核酸を用いた DNA 免疫

11.5.1. プロトコール

5 個体の雌 B A L B / C マウスの群を、種々のプラスミド DNA で、14 日間隔で 2 回、1 回の注射につき各プラスミド 20  $\mu$ g を用いて筋肉内免疫した。28 日目に免疫応答を測定し、種々の改変：+ / - IMX313 または IMX313T；+ / - t P A シグナルペプチド；+ / - モノマー化突然変異の影響を判定した。

【0170】

抗原特異的 T 細胞応答は、28 日目に脾細胞を用いて E L I S P O T により測定した。免疫マウスから単離した精製脾臓 C D 4 +、C D 8 + および全 T 細胞を、Eurogentec から購入した NP A インフルエンザペプチド (アミノ酸 366 ~ 374) と共培養した。

【0171】

E L I S P O T アッセイ：

平底 96 ウェルニトロセルロースプレート (Millititer ; Millipore) を IFN -  $\gamma$  mAb (15  $\mu$ g / ml ; MABTECH、ストックホルム) でコーティングし、4  $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。PBS で洗浄した後、プレートを 37  $^{\circ}$ C にて 1 時間、10 % ウシ胎仔血清でブロッキングした。2  $\times$  10<sup>6</sup> 細胞 / ウェルを、15  $\mu$

10

20

30

40

50

g / m l の抗ヒト I F N -  $\gamma$  でコーティングした I P V H 膜上にて、終濃度 2  $\mu$  g / m l の関連ペプチド ( N P A インフルエンザペプチド ) で刺激し、20 時間インキュベートした。インキュベーション後、これらのプレートを P B S で十分に洗浄して細胞を除去し、I F N -  $\gamma$  m A b ( 1  $\mu$  g / m l のビオチン、M A B T E C H ) を各ウェルに加えた。37  $^{\circ}$  C で 2 時間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、室温で 1 時間、ストレプトアビジン - H R P ( 1  $\mu$  g / m l ; M A B T E C H ) で現像した。洗浄した後、基質 ( 3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール ( 3-amino-9-ethycarbazol ) ( S i g m a ) ) を加え、15 分間インキュベートした。さらに洗浄した後に、赤色スポットを顕微鏡下で計数した。

#### 【 0 1 7 2 】

10

体液性免疫応答を検討するため、本発明者らは、T h 1 と T h 2 の総体的割合を評価するために、全 I g G に特異的な E L I S A、ならびに I g G 1 および I g G 2 a の個々に特異的な E L I S A により抗体レベルを評価した。B A L B / c マウスは一般に、インフルエンザワクチンには T h 2 型免疫応答で応答し、これは I g G 1 抗体の刺激に関連する。しかしながら、ウイルス感染から生き残ったマウスの血清中に存在する主要な抗体アイソタイプは I g G 2 a であり、これは T h 1 型免疫応答の際に刺激される ( 3 2 )。I g G 2 a 抗体の刺激は、インフルエンザワクチン接種の有効性の増強に関連付けられている。

#### 【 0 1 7 3 】

E L I S A については、抗原を 0 . 1 M 炭酸ナトリウム / 重炭酸 ( p H 9 . 6 ) 中で 5 m g / m l の濃度に希釈した後、M a x i S o r b プレート ( N u n c - I m m u l o n 、デンマーク ) のウェルのコーティングに用いた。これらのウェルに試験血清の 2 倍連続希釈液を加え、洗浄後、結合した抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされた抗マウス I g G、または抗マウス I g G 1 または抗マウス I g G 2 a ( S i g m a ) で検出した。o - フェニレンジアミン ( S i g m a ) および H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> を加え、反応を 1 M 硫酸で停止させた後に 490 n m での吸光度を測定した。

20

#### 【 0 1 7 4 】

結果を図 1 1 ~ 1 4 に示す。

#### 【 0 1 7 5 】

#### 1 1 . 5 . 2 .

30

予備実験で、本発明者らは、N P または I M X 3 1 3 に融合された N P のいずれかをコードする D N A ワクチンにより誘導された N P に対する全 T 細胞応答を調べた。N P - I M X 3 1 3 免疫マウスから単離された全 T 細胞は、N P 免疫マウスの場合に比べて有意に高い I F N -  $\gamma$  応答を示し、I M X 3 1 3 の T 細胞応答増強能が確認された。

#### 【 0 1 7 6 】

図 1 1 は、親 N P 抗原遺伝子と I M X 3 1 3 遺伝子の融合が N P に対する T 細胞応答を改善することを示す。

#### 【 0 1 7 7 】

#### 1 1 . 5 . 3 .

E L I S P O T で検出された I F N -  $\gamma$  が C D 4  $^{+}$  T 細胞により産生されたか C D 8  $^{+}$  T 細胞により産生されたかを判定するために、本発明者らは免疫マウス由来の脾臓 C D 4  $^{+}$  T 細胞および C D 8  $^{+}$  T 細胞を精製し、これらをインフルエンザ A N P ペプチドと共培養した。N P - I M X 3 1 3 で免疫した群で、C D 8  $^{+}$  T 細胞からの I F N -  $\gamma$  産生の有意な増加が検出された。I F N -  $\gamma$  を産生する抗原特異的 C D 8  $^{+}$  細胞のパーセンテージは、対応する C D 4  $^{+}$  T 集団よりも高かった ( 図 1 2 )。

40

#### 【 0 1 7 8 】

図 1 2 は、N P 抗原遺伝子と I M X 3 1 3 遺伝子の融合が N P 抗原に対する C D 4  $^{+}$  応答および C D 8  $^{+}$  応答を改善することを示す。

#### 【 0 1 7 9 】

#### 1 1 . 5 . 4 .

50

本発明者らは、次に、免疫後および最後の免疫から14日後のNPに対する抗体応答を検討し、血清においてNP特異的IgG Ab応答を測定した。NP対照マウスとNP-IMX313を与えたマウスは中等度のNP特異的IgG Abを示し(図13)、NP-IMX313で免疫した群の方が高かった。

【0180】

図13は、NP遺伝子とIMX313遺伝子の融合がNP抗原に対するIgG抗体応答を改善することを示す。

【0181】

11.5.5.

NP特異的IgG1抗体およびIgG2a抗体(Balb/CマウスにおいてそれぞれTh2型およびTh1型の応答を表す)の存在に関しても血清を調べた。NP-IMX313免疫マウスの血清ではNP特異的IgG1およびIgG2a抗体アイソタイプが検出されたが、NPだけを与えたマウス由来の血清サンプルは、低レベルのIgG1およびIgG2a Abを示したに過ぎなかった(図14)。

【0182】

図14は、NP抗原に対して誘導された抗体のサブクラス分布を示す。IMX313遺伝子との融合はIgG1応答よりもIgG2A応答を高め、NPに対するTh2に傾いた応答をNP-IMX313に対するTh1に傾いた応答に転換する。

【0183】

11.6-組換えNP-M-IMX313Tタンパク質の生産

タンパク質NP-M-IMX313Tをコードする合成遺伝子を大腸菌での発現のためにコドン最適化して合成した。この合成遺伝子をT7に基づく発現ベクターpIMX04(これは、f1オリジンがプラスミドpSC101のpar遺伝子座により置換されているInvitrogenからのベクターpRsetCである)にクローニングした。発現を数種の標準培地(LB、Studierの自己誘導培地)で誘導し、過剰発現されたタンパク質を、最初は、清澄化およびイオン交換工程に関してYe(30)およびTarus(31)により記載されているように精製したが、最終工程では、融合タンパク質を上記のようにヘパリンセファロースに対する親和性により精製した。

【0184】

11.7.組換えタンパク質NP-M-IMX313Tは次のように免疫に使用される：

5個体の雌BALB/Cマウスの群を、種々のタンパク質調製物(TLRリガンドを含む処方を用い、または用いずに)で、14日間隔で2回、1回の注射につき2ナノグラムのタンパク質を用いて筋肉内免疫した。28日目に脾細胞を用いて免疫応答を測定し、抗原特異的T細胞応答(ELISPOTにより測定)を判定した。免疫前と28日目の抗体応答を、抗原としてNPを用いたELISAにより測定した。

【0185】

結果：

図15は、NPのモノマー化がその免疫原性を若干改善すること、これはIMX313遺伝子との融合によりさらに改善されるが、最大の改善はモノマーNPとIMX313T遺伝子を融合させることにより得られることを示す。

【0186】

図16は、CD4+応答およびCD8+応答の分析において、図6の場合と同様の順位付けが見られ、NPのモノマー化がNPの免疫原性を若干改善すること、これはIMX313遺伝子との融合によりさらに改善されるが、最大の改善は、モノマーNPとIMX313T遺伝子を融合させることにより得られることを示す。

【0187】

図17は、B細胞応答に関しても、図6および7でT細胞応答(CD4+およびCD8+の両方)に関して見られたものと同様の順位付けが見られることを示す。NPに対する全IgG応答は、IMX313を用いる場合よりもIMX313Tを用いる場合に高かった。

10

20

30

40

50

## 【0188】

図18は、モノマーNP抗原に対して誘導される抗体のサブクラス分布を示す。NPの場合と同様に、IMX313遺伝子との融合はIgG1応答よりもIgG2A応答を増強し、NPに対するTh2に傾いた応答をNP-IMX313に対するTh1に傾いた応答に転換する。特に注目されるのは、このTh1バイアスに対するTh2バイアスの除去は、IMX313との融合よりもIMX313Tとの融合によって増幅された。インフルエンザワクチンにおけるIgG2a抗体の発現はウイルスのクリアランスと関連し、致死的なインフルエンザチャレンジに対する保護を増強した。ELISAにより測定された両抗体アイソタイプの誘導の増強は、中和単独よりもワクチンの有効性により良い相関があった(32)。

10

## 【0189】

## 11.8 - NP抗原の分泌はその免疫原性を改善した

組織プラスミノーゲン活性化因子(tPA)分泌シグナル配列を含有する一連のNP DNAワクチン構築物:tPA-NP、tPA-NP-M、tPA-NP-M-IMX313、およびtPA-NP-M-IMX313Tを作製した。免疫動物由来の体液性免疫応答および細胞性免疫応答に対するtPAとNPの融合の効果を分析した。

## 【0190】

tPA含有構築物で免疫したマウスは、NP免疫マウスに比べて有意に高いIFN 応答を示し、IMX313Tおよびモノマー化突然変異のT細胞応答増強能が確認された。

## 【0191】

20

図19は、NP抗原の分泌の強制は、それがモノマーであってもなくても(tPA-NP対tPA-NP-M)、その免疫原性を改善する(NP対tPA-NP)ことを示す。しかしながら、IMX313との融合は、モノマー型のNPの使用が非改変抗原の使用よりも免疫原性が高かった(tPA-NP-IMX313対tPA-NP-M-IMX313)ことを示した。そして、IMX313のIMX313Tによる置換はNPの免疫原性をさらに改善した(tPA-NP-M-IMX313対tPA-NP-M-IMX313T)。

## 【0192】

図20は、NPの種々の分泌型に対するCD8+応答およびCD4+応答を示す。図19と同じ順位付けが見られ、IMX313が付加される場合にもまた抗原をモノマー化する有用性が明らかである。上記の図面と同様に、IMX313よりもむしろIMX313Tが使用される場合に最大の免疫応答が見られる。

30

## 【0193】

図21は、抗原NPに対する全IgG応答を示し、T細胞応答に関する図20と同様の結論を導き、IMX313Tが使用される場合に最大応答が見られるが、分泌(NP対tPA-NP)およびモノマー化(tPA-NP-IMX313 versus tPA-NP-M-IMX313)も重要な寄与となる。

## 【0194】

NP単独で免疫したマウスの血清中には抗NP IgG抗体は存在しないかまたは極めて低いレベルであった(図21)。他方、NP-M-IMX313、tPA-NP-M-IMX313、NP-M-IMX313TまたはtPA-NP-M-IMX313Tで免疫したマウスは、高レベルの全身性NP特異的IgG抗体応答を示したが、tPA-NP-M-IMX313T免疫マウスは、総ての免疫マウス群に比べて有意に高い(p<0.001)IgG抗体応答を有した。このことは、これらの改変の総ての組合せ(モノマー化突然変異、tPAおよびIMX313T)が、親配列または他の組合せに比べて、抗原に対して有意に高い免疫原性を付与することを示す。

40

## 【0195】

図22は、NPに対するB細胞応答のサブクラス分析を示し、NP単独を用いた場合の最初のTh2バイアスはIMX313により、およびIMX313Tにより逆転されることを示す。分泌はそれ自体での効果はほとんどないが(NP対tPA-NP)、モノマー

50



化 ( t P A - N P - I M X 3 1 3 対 t P A - N P - M - I M X 3 1 3 ) およびその後の I M X 3 1 3 の I M X 3 1 3 T による置換 ( t P A - N P - M - I M X 3 1 3 対 t P A - N P - M - I M X 3 1 3 T ) は総て、 T h 2 ( I g G 1 ) 応答に対する T h 1 ( I g G 2 a ) 応答の改善に寄与する。

#### 【 0 1 9 6 】

t P A - N P - M - I M X 3 1 3 T がそれ自体で T h 1 応答と T h 2 応答をほぼ等しく高めることは極めて重要である。 N P と I M X 3 1 3 の融合は、 T h 1 応答と T h 2 応答の両方が増強され、応答のタイプに有意なシフトが無いことを示す。しかし、 I M X 3 1 3 T とモノマー化突然変異を用いると、 T h 1 応答 ( I g G 2 a ) が優勢化し始める。免疫学者の共通認識は、 T h 1 応答の方が T h 2 応答よりも好ましいということである ( 図 2 2 )。

#### 【 0 1 9 7 】

##### 1 1 . 9 - I M X 3 1 3 T は分泌経路通過時にプロテアーゼにより分解されない

I M X 3 1 3 T を含有するプラスミドを用いた D N A 免疫により得られた結果は、分子のテールが、プロテアーゼが豊富な分泌経路を通過する際にプロテアーゼにより切断されないことを強く示唆する。この疑問をより直接的に検討するために、 i n v i v o で N P - M - I M X 3 1 3 T を発現させるために使用されるプラスミドを用いて C H O K 1 細胞のトランスフェクションを行った。トランスフェクションは記載のように行った ( 3 3 )。

#### 【 0 1 9 8 】

1 8 ~ 2 4 時間後、トランスフェクト細胞の上清を遠心分離により回収し、濾過した後に、上記のようにヘパリンセファロースカラムにロードした。

#### 【 0 1 9 9 】

小さな「ピーク C」が見られ、これは S D S - P A G E およびウエスタンブロット法で、タンパク質 N P - M - I M X 3 1 3 T を含有することが判明した。

#### 【 0 2 0 0 】

##### 1 2 . トリマーコイルドコイルの改変

トリマーコイルドコイルの改変が抗原の免疫原性を改善するかどうかを判定するために、インフルエンザ血球凝集素のトリマーコイルドコイルをコードする合成 H A 2 遺伝子を用いて 2 つのプラスミドを構築した。

#### 【 0 2 0 1 】

第 1 のプラスミドは、 H A 2 コイルドコイルがペプチド : S P R R R R R R R R R S ( 配列番号 3 7 ) の融合により改変された p I M X 7 4 3 であった。

#### 【 0 2 0 2 】

下記の N d e I ~ H i n d I I I 制限フラグメントを T 7 発現ベクターにクローニングした。

#### 【 化 2 4 】

CATATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATCATGTTAGTGGTTATGCAGCCGATCAGAAAAGCACG  
CAAAATGCGATTAACGGCATTACCAACAAAGTCAATTCTGTGATCGAAAAGATGAATATCCAGTTTACTGCT  
GTAGGCAAAGAGTTCAACAACTGGAGAAACGCATGGAAAACCTGAACAAGAAAGTGGATGATGGGTTTCT  
GGATATTTGGACCTATAACGCGGAATTACTTGTGCTCTTAGAAAACGAACGGACATTGGACTTCCATGATTC  
GAACGTCAAGAACCTGTATGAGAAAGTGAAGGCCAGCTGAAGAACAATGCCTCACCACGTCGCCGTCGTC  
GCCGTCGCCGTCGCAGTTAATAAGCTT (配列番号 60)

#### 【 0 2 0 3 】

コードされるタンパク質配列は、

10

20

30

40

【化 2 5】

MRGSHHHHHHHHSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWT  
YNAELLVLENERLTDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNASPRRRRRRRRRS\*\* (配列番号 61)

であった。

【0 2 0 4】

対照プラスミド p I M X 7 4 4 は、オリゴヌクレオチドプライマー：

【化 2 6】

IMX203:5' GTTAGCAGCCGGATCAAGCTTATTAGGCATTGTTCTTCAGCTGGC 3' (配列番号 62)

10

および T 7 F を用いてペプチドを欠失させて H A 2 インサートを増幅することにより作出し、次にこれを親プラスミドに挿入した。

【0 2 0 5】

ヌクレオチド配列は、

【化 2 7】

CATATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTAGTGGTTATGCAGCCGATCAGAAAAGCACGCAAAAT  
GCGATTAACGGCATTACCAACAAAGTCAATTCTGTGATCGAAAAGATGAATATCCAGTTTACTGCTGTAGGC  
AAAGAGTTCAACAACTGGAGAAACGCATGGAAAACCTGAACAAGAAAGTGGATGATGGGTTTCTGGATAT  
TTGGACCTATAACGCGGAATTACTTGTGCTCTTAGAAAACGAACGGACATTGGACTTCCATGATTCGAACGT  
CAAGAACCTGTATGAGAAAGTGAAAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCTAATAAGCTT (配列番号 63)

20

であった。

【0 2 0 6】

また、コードされるタンパク質配列は、

【化 2 8】

MRGSHHHHHHSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYN  
AELLVLENERLTDFHDSNVKNLYEKVKSQKNN\*\* (配列番号 64)

であった。

30

【0 2 0 7】

次に、両タンパク質を、まず I M A C アフィニティーカラムで、その後へパリンセファ  
ロースカラムで精製した。I M X 7 4 3 タンパク質は、I M X 7 4 4 タンパク質よりも高  
い塩 ( N a C l ) 濃度で溶出し、I M X 7 4 3 タンパク質は 1 . 4 M ( 原文のまま ) の塩  
濃度で溶出し、一方、I M X 7 4 4 タンパク質は 6 0 0 m M の塩濃度で溶出した。

【0 2 0 8】

次に、両タンパク質を用い、4 群の 5 ~ 6 週齢雌 B A L B / c マウスを、0 日目と 1 4  
日目に 1 回の注射につき 2 0 μ g で免疫した。2 1 日目に E L I S A および E L I S P O  
T のために血清および脾臓を採取した。2 群はアジュバント A d d a v a x 中のタンパク  
質を受容し、他の 2 群はアジュバント無しで免疫した。タンパク質 I M X 7 4 4 を E L I  
S A 抗原として、また脾細胞を刺激するためにも使用した。

40

【0 2 0 9】

結果を下記の表 4 に示す。

【0 2 1 0】

【表 5】

免疫原	アジュバント	IgG 応答 希釈系列	Th パターン	細胞応答 INF $\gamma$ ELISPOT (x 10 <sup>6</sup> 脾細胞)
744	none	100	Th2	115
744	MF59	900	Th1=Th2	417
743	none	500	Th1	305
743	MF59	8000	Th1	733

10

## 【 0 2 1 1 】

これらの結果は、アジュバントが使用されても使用されなくても、IMX743 タンパク質にのみ存在する正電荷ペプチド（配列番号 37）が、IMX743 タンパク質を、他の点では同一のタンパク質 IMX744 よりもはるかに高い免疫原性とすることを明らかに示す。さらに、アジュバントの使用が、コイルドコイル含有抗原の免疫原性をさらに改善する。

## 【 0 2 1 2 】

20

## 13. マウス C4b p オリゴマー化ドメイン IMX108 改変

参照 16 に記載されている融合タンパク質 DsbA - IMX108 のコイルドコイルを、それがまた IMX313 上に付与される改善された特性も獲得したかどうかを判定するために改変した。それを改変するために、DsbA - IMX108 遺伝子を、オリゴヌクレオチド：

## 【化 29】

IMX212: 5'

GGAGCGACGGCGACGCGGAGActggagctgtagtagttcaacctcc 3' (配列番号 65)

および T7F を用いて増幅し、IMX313 の代わりに IMX313 T を発現するプラスミドに挿入した（29）。このタンパク質をイオン交換クロマトグラフィー、次いで、ヘパリン - セファロースカラム（これに該タンパク質は結合したが、親構築物 DsbA - IMX108 は結合しなかった）により精製した。

30

## 【 0 2 1 3 】

以下に親 IMX108 配列（配列番号 66）を IMX108 T 配列（配列番号 67）に対してアラインする。

## 【化 30】

IMX108: EASEDLKPALGTGNKTMQYVPNSHDVKMALEIYKLTLEVELLQLQIQKEKHTEAH\*

IMX108T: EASEDLKPALGTGNKTMQYVPNSHDVKMALEIYKLTLEVELLQLQSPRRRRS\*

40

## 【 0 2 1 4 】

改変 IMX108 タンパク質は家禽の免疫に有用であり、改変 IMX313 融合タンパク質を使用することの潜在的自己免疫作用が回避されるはずである（16）。他の哺乳動物 C4b p オリゴマー化ドメイン（参照 16 および WO2007/062819 に挙げられている）も、この目的で本明細書に記載されているように改変することができる。

## 【 0 2 1 5 】

## 14. ブドウ球菌アルファ溶血素の N 末端および改変 IMX313 タンパク質を含んでなる融合タンパク質

改変 IMX313 タンパク質との融合がブドウ球菌毒素アルファ溶血素（Hla）の N 末端ドメインの免疫原性を改善することができたかどうかを判定するために、末端切断型

50

溶血素遺伝子をNewman株のゲノムDNAから増幅し、T7発現ベクターにクローニングした。オリゴヌクレオチド：

【化31】

IMX056: 5' GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAcatatggcagattctgatattaatattaaaaccgg 3'

(配列番号 68) および

IMX057: 5' GTTAGCAGCCGGATCAAGCTTATTAatcgattttatatctttctgaagaacgatctgtc 3'

(配列番号 69)

を用いた。

10

【0216】

成熟毒素のN末端の63のアミノ酸を改変IMX313タンパク質に融合させるため、IMX313Tをプライマー：

【化32】

IMX110: 5' AGAACGAAAGGTACCATTTGCTGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCT 3' (配列番号 70) および

IMX139: 5' GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC 3' (配列番号 44)

を用い、IMX313T発現プラスミドから増幅し、このPCR産物を用いて、H1a毒素遺伝子をさらに末端切断すると同時にアミノ酸63個を改変IMX313遺伝子に融合させた。得られたプラスミドは、H1a63-IMX313Tと呼ばれる融合タンパク質を発現し、それは下記のタンパク質配列：

20

【化33】

ADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGSKKQGDADVCGEVA  
YIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQSPRRRS (配列番号 71)

を有し、下記のヌクレオチド配列：

【化34】

ATGGCAGATTCTGATATTAATATTAACCGGTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAAAAACAGGT  
GATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAGTATTTTATAGTTTTATCGATGATAAAATC  
ATAATAAAAACTGCTAGTTATTAGAACGAAAGGTACCATTTGCTGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCTGATG  
TGTGCGGAGAGGTTGCTTATATTCAGAGCGTCGTCTCCGATTGCCACGTGCCTACAGCGGAAGTGCCTACT  
CTGCTGGAATAACGAAACTCTTCCTGGAGATTCAAAAACTGAAGGTGGAAGTGCAGTCTCCGCGTCGCCG  
TCGCTCCTAA (配列番号 72)

30

によりコードされている。

【0217】

このタンパク質を生産するために、C43(DE3)株の500ml培養物を1mM IPTGで誘導し、一晚増殖させた。回収した細菌を音波処理により溶解させ、不溶性タンパク質を50mM Tris pH7.5、150mM NaClおよび6M尿素(バッファA)に再懸濁させた。これをHi-Trap SP FFカラムにロードし、1M NaClを含有するバッファAで溶出させた。部分的に精製したタンパク質をバッファ50mM Tris pH7.5、150mM NaClに対して透析し、ヘパリンセファロースカラムにロードし、そこからNaCl勾配(50mM Tris pH7.5、1M NaCl)で溶出させた。溶出したタンパク質をPBSに対して透析し、ゲル濾過によりさらに精製した。

40

【0218】

N末端フラグメント(IMX313Tを欠く)を、C末端6Hisタグをクローニングすることにより改変し、IMACニッケルアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過により精製した。

50

## 【0219】

両方の精製タンパク質を次に、アジュバントの存在下および不在下でマウスの免疫に用いた。

## 【0220】

5個体の5～6週齢雌BALB/cマウス4群を、HLA63タンパク質またはIMX313Tに融合された同抗原のいずれか5ミリモルで、0日目と14日目に免疫した。28日目に、ELISAおよびELISPOTのために血清および脾臓を採取した。タンパク質63HLA 6HisをELISA抗原として、また脾細胞を刺激するためにも使用した。

## 【0221】

結果を表5に示す。

## 【表6】

免疫原	アジュバント	IgG 応答 希釈系列	細胞応答 INF $\gamma$ ELISPOT (x 10 <sup>6</sup> 脾細胞)
63 HLA	無し	-	17
63 HLA	ISA 51	100	68
63 HLA-IMX313T	無し	100	47
63 HLA-IMX313T	ISA 51	600	128

## 【0222】

これらの結果は、アジュバントが使用されても使用されなくても、アルファ溶血素（HLA）のN末端は、IMX313Tタンパク質に融合された場合に免疫原性がより高いことを明らかに示す。

## 【0223】

## 15. 改変IMX313タンパク質に融合された全長ブドウ球菌プロテインA

IMX313TおよびIMX313Pが全長ブドウ球菌プロテインA抗原（SpA）の免疫原性を改善することができたかどうかを判定するために、5つの相同ドメイン（参照44に記載の通りに変異させた）をコードする合成遺伝子をT7発現ベクターにNdeI-HindIIIフラグメントとしてクローニングした。ヌクレオチド配列は、

10

20

30

## 【化 3 5】

CATATGGCGCAACACGATGAAGCTCAAGCGAATGCATTCTACCAGGTTCTGAACATGCCGAATTTGAATGCG  
 GACCAACGTAATGGCTTTATTCAATCCCTGAAGGACGCACCGTCCCAAAGCGCAAACGTTCTGGGTGAAGC  
 GCAAAAAGTGAATGATAGCCAGGCCCCGAAAGCCGATGCCAGCAGAACAAGTTCAATAAGGATCAGGCCT  
 CTGCGTTCTATGAGATTTTGAATATGCCGAACCTTGAATGAGGAGCAACGCAACGGCTTTATCCAAAGCCTGA  
 AAGATGCACCAAGCCAAAGCACGAACGTCCTGGGTGAGGCAAAGAACTGAACGAGAGCCAGGCGCCGAAA  
 GCGGACAACAATTTCAATAAAGAGCAAGCGAACGCCTTTTACGAAATTCTGAATATGCCTAACCTGAACGAA  
 GAACAACGTAACGGCTTCATCCAGAGCTTGAAGGACGCGCCGTCGCAAAGCGCGAATCTGCTGGCCGAGGC  
 GAAAAAGCTGAATGAGAGCCAAGCGCCGAAGGCGGACAATAAGTTTAAACAAAGAACAGGCGAACGCATTCT  
 ATGAAATCCTGCATCTGCCGAATCTGAATGAAGAACAGCGCAATGGTTTTATCCAGAGCCTGAAGGATGCG  
 CCAAGCCAGAGCGCAAACCTGTTGGCTGAGGCCAAGAAGCTGAACGATGCGCAGGCTCCGAAAGCTGACAA  
 CAAATTCAACAAAGAGCAGGCCAACGCTTTTTACGAGATTCTGCACTTGCCGAACCTGACCGAAGAAGCAGCG  
 TAATGGTTTTATCCAGTCTCTGAAAGACGCACCGAGCGTGAGCAAAGAGATTCTGGCAGAGGCGAAGAAGT  
 TGAACGACGCGCAGGCACCGAAAGGATCCCATCACCACCACCATCACTAATAAGCTT (配列番号 73)

10

であり、コードされるタンパク質配列は、

## 【化 3 6】

MAQHDEAQANAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDAPSQSANVLGEAQKLNDSPKADAQQNKFNDQASAFY  
 EILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEQANAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQS  
 LKDAPSQSANLLAEAKKLNESQAPKADNKFNEQANAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDAPSQSANLLAEAKKLN  
 DAQAPKADNKFNEQANAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDAPSVSKEILAEAKKLNDAQPKGSHHHHHH\*  
 (配列番号 74)

20

であった。

## 【0 2 2 4】

抗原をIMX313TおよびIMX313Pタンパク質に融合させるため、C末端His  
 タグをコードするBamH I - Hind I IIIフラグメントを、313タンパク質  
 をコードするBamH I - Hind I IIIフラグメントで置換した。

30

## 【0 2 2 5】

タンパク質を次のように精製した： 細菌株BLRでSpA-6Hisを産生させ、細  
 菌ペレットをバッファーA(1×PBS、1M NaCl、20mMイミダゾール、1m  
 M PMSF)に溶解し、細菌溶解液を15分間75℃に加熱し、次いで、遠心分離によ  
 り清澄化した後、IMACニッケルアフィニティーカラムにロードした。タンパク質をバ  
 ッファーB(1×PBS、500mMイミダゾール)中のイミダゾール勾配で溶出させた  
 。このタンパク質をゲル濾過によりさらに精製した。

## 【0 2 2 6】

また、SpA-IMX313TおよびSpA-IMX313PもBLR株で発現させ、  
 細菌溶解液を15分間75℃に加熱し、遠心分離により清澄化した。次に、両タンパク質  
 をSPイオン交換カラム、次いでヘパリンセファロースカラムで精製した。

40

## 【0 2 2 7】

これら3つのタンパク質を用い、6群の5～6週齢Balb/c雌マウスを、0日目と  
 14日目に免疫した。1回の免疫につき5ミリモルの各タンパク質を、アジュバントAd  
 daVaxとともにまたは伴わずに用いた。28日目に、ELISAおよびELISPO  
 Tのために血清および脾臓を採取した。SpA-6Hisタンパク質をELISA抗原と  
 して、また脾細胞を刺激するためにも使用した。

## 【0 2 2 8】

結果を下記の表6に示す。IMX313TまたはPに融合された抗原SpAは、融合さ

50

れていない抗原よりも明らかに免疫原性が高く、IMX313P型は、IMX313T型よりもやや免疫原性が高い。

【0229】

【表7】

表6

免疫原	アジュバント	IgG 応答 希釈系列	Th パターン	細胞応答 INF $\gamma$ ELISPOT(x 10 <sup>6</sup> 脾細胞)
SpA	無し	100	Th1=Th2	15
SpA	AddaVax	1,300	Th1=Th2	29
SpA-IMX313T	無し	1,200	Th1	77
SpA-IMX313T	AddaVax	7,800	Th1	150
SpA-IMX313P	無し	2,700	Th1	117
SpA-IMX313P	AddaVax	12,800	Th1	207

【0230】

16. ClfBと改変IMX313タンパク質の融合タンパク質

ブドウ球菌抗原ClfBの免疫原性を改善するために、N2N3ドメインを、下記のオリゴ：

【化37】

IMX239: 5' CATCATCATCATCATCACgggGCTGAACCGGTAGTAAATGCTGCTGATGCTAAAGG 3'

(配列番号 75) および

IMX240: 5' cccaaggggttatgctagttaATTTACTGCTGAATCACCATCagcacttcaccacc 3' (配列番号 76)

を用いて増幅し、このPCR産物をT7発現ベクターにN末端Hisタグとともにクローニングした(27)。

【0231】

N2N3フラグメントのヌクレオチド配列は、

10

20

30

## 【化 3 8】

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTgctgaaccggtagtaaatgctgctgatgctaagggtacaaat  
 gtaaatgataaagttacggcaagtaatttcaagttagaaaagactacatttgacccaatcaaagtggaacacatttatggcggcaaatt  
 ttacagtgcagataaagtgaaatcaggggattattttacagcgaagttaccagatagtttaactggtaatggagacgtggattattcta  
 tcaaataatcagatgccaatgcagacattaaaagtagaatggcgatggttagctaaagcaacatatgatatcttgactaagacgtata  
 catttgtctttacagattatgtaataataaagaaaatattaacggacaattttcattacctttatttacagaccgagcaaaggcacctaaa  
 tcaggaacatatgatgcgaatattaatattgcggatgaaatgtttaataataaaaattacttataactatagttcgccaattgcaggaattga  
 taaaccaaattggcgcaacatttcttctcaaattattgggttagatacagcttcagggtcaaacacatacaagcaaacagattttgtaac  
 cctaagcaacagatttttaggtaatacgtgggtgtatattaaaggctaccaagataaaatcgaagaaagtagcggtaagtaagtgtaca  
 gatacaaaactgagaatttttgaagtgaatgatacatctaaattatcagatagctactatgcagatccaaatgactctaacttaagaag  
 taacagaccaatttaaaaatagaatctattatgagcatccaaatgtagctagtattaaatttggtgatattactaaaacatatgtagtatta  
 gtagaagggcattacgacaatacaggaagaacttaaaaactcaggttattcaagaaaatgtgatcctgtaacaaatagagactacagt  
 attttcggttgaataatgagaatgtgtacgttatgggtggaagtgtctgattcagcagtaaatata (配列番号 77)

10

であり、タンパク質配列は、

## 【化 3 9】

MRGSHHHHHHHGAEPVVNAADAKGTNVNDKVTASNFKLEKTTFDPNQSGNTFMAANFTVTDKVKSGDYFTAK  
 LPDSLGTNGDGDVDSNSNNTMPIADIKSTNGDVVAKATYDILTKTYTFVFTDYVNNKENINGQFSLPLFTDRAKAPKS  
 GTYDANINIADEMFNKITYNYSSPIAGIDKPNGANISSQIIGVDTASGQNTYKQTVFVNPQQRVLGNTWVYIKGYQ  
 DKIEESSGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYADPNDSNLKEVTDQFKNRIYEHNPVNASIKFGDITKTYVVLVEGHY  
 DNTGKNLKTQVIQENVPVTNRDYSIFGWNNENVVRYGGGSADGDSAVN\* (配列番号 78)

20

である。

## 【0 2 3 2】

次に、IMX313TおよびIMX313Pドメインを、オリゴヌクレオチド：

## 【化 4 0】

IMX248: 5' gctgatggtgattcagcagtaaatggatccaagaagcaaggtgatgctgatg 3' (配列番号 79)

30

およびIMX139を用いて増幅し、N3ドメインのC末端にクローニングした。非改変N2N3ドメイン、および融合タンパク質N2N3-IMX313TおよびIMX313Pは次のように発現させる。

## 【0 2 3 3】

C43(DE3)株の500ml培養物を1mMのIPTGで誘導し、一晚誘導後、細菌ペレットをバッファーA(1xPBS、1M NaCl、20mMイミダゾール、1mM PMSF)に溶解し、次いで、遠心分離により清澄化した後、IMACニッケルアフィニティークラムにロードした。タンパク質をバッファーB(1xPBS、500mMイミダゾール)中イミダゾールの勾配で溶出させた。融合タンパク質をヘパリン-セファロースでのアフィニティークロマトグラフィー、次いで、Sephacryl S-300 HRゲル濾過によりさらに精製し、一方、非融合タンパク質はS-75ゲル濾過カラムでのゲル濾過によりさらに精製する。

40

## 【0 2 3 4】

### 17. ソルターゼAと改変IMX313タンパク質の融合タンパク質

ソルターゼA、またはSrtAとして知られるブドウ球菌プロテアーゼの免疫原性を改善するため、次のように、不活性型をIMX313、IMX313TおよびIMX313Pにインフレームでクローニングした。野生型ソルターゼA遺伝子をNewman株ゲノムDNAからオリゴヌクレオチド：



## 【化 4 1】

IMX005 5' GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATatgCAAGCTAAACCTCAAATTCC 3' (配列番号 80) および

IMX1275 5' GTTAGCAGCCGGATCAAGCTTATTATTTGACTTCTGTAGCTACAA 3' (配列番号 81)

を用いて増幅し、T7発現ベクターにクローニングした。次に、活性部位のシステイン残基を、オリゴヌクレオチド：

## 【化 4 2】

IMX215: 5' 10

GATAACAATTAACATTAATTACTTCTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCG 3' (配列番号 82)

を用いてセリンに変異させた。

## 【0 2 3 5】

次に、IMX313、313Tおよび313P遺伝子を、オリゴヌクレオチド：

## 【化 4 3】

IMX006: 5'

TTGTAGCTACAGAAGTCAAAAAGAAGCAAGGTGATGCTGATG 3' (配列番号 83) および IMX139: 5'

GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC 3' (配列番号 44)

20

を用いて、それらの各発現ベクターから増幅し、不活性化プロテアーゼ遺伝子とインフレームで挿入した(29)。

## 【0 2 3 6】

IMX313TおよびIMX313P融合タンパク質をSPカラムでのイオン交換、次いでヘパリンセファロースカラムで精製した。

## 【0 2 3 7】

#### 18. CP15 DNA免疫

改変IMX313タンパク質が、IMX313自体の使用によって得られる改善以上に、クリプトストリジウム抗原CP15の免疫原性をさらに改善できたかどうかを判定するために、大腸菌でCp15、Cp15-IMX313およびIMX313Tを発現するように設計された3つのプラスミドを用いて、DNAワクチンとしてのpcDNA3ベクターを作製した。pcDNA3のtPAシグナルペプチドの下流に挿入するための、T7発現ベクター由来の3つの遺伝子を増幅するために使用したプライマーは、

30

## 【化 4 4】

IMX092: 5' ggaaatccatgcccgattcagaaga GCGCGTGTCTGATCAAAGAGAAGC 3' (配列番号 84) および

IMX093: 5' gccagtgtgatggatggcggtagtattgctcagcggtgg 3' (配列番号 85).

であった。

## 【0 2 3 8】

これら3つのPCR産物をpcDNA3ベクター(N末端tPAシグナルペプチドを含む)に別々に挿入した。

40

## 【0 2 3 9】

これらの3つのコード配列は次の通りであった。

## 【化 4 5】

**Cp15** については

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCAGCCA  
ggaaatccatgcccgattcagaagaGCGCGTGTTCTGATCAAAGAGAAGCAGAATATGGGCAATCTCAAAAGCTGT  
TGTTCTTTGCTGACGAACACTCATTGACCAGCACTCAACTGGTTGTAGGAAATGGCTCTGGTGCCTCTGAA  
ACCGCAAGCAATCATCCACAGGAAGAAGTGAACGACATTAACACGTTTAACGTGAAACTGATCATGCAAGAT  
CGCTCCAAACTGGATTGTGAGGTCGTCTTTGACAGTACCAGCATCAGTCTGAGTGGTGATGGCAAATGCCG  
CAATATCGCGTTAGACGAGATTCACCAGCTTCTGTATTCTGAAGGAGGAATTAAGCCGTGTGGAATCTTCAG  
CTGGGATTTCCGATAGCGATAACTGCGTAGCCATTACCTGAAAGAATCGGGTAACTGCATTCCGTTGTTCT  
TCAACAATTCGCAGGATAAAGAACGCTTTGTGGCAACAGCGAATAAGTTCAAACCGAACTTTAACCATCATC  
ACCATCATCATTA (配列番号 86)

10

**Cp15-IMX313** については

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCAGCCA  
ggaaatccatgcccgattcagaagaGCGCGTGTTCTGATCAAAGAGAAGCAGAATATGGGCAATCTCAAAAGCTGT  
TGTTCTTTGCTGACGAACACTCATTGACCAGCACTCAACTGGTTGTAGGAAATGGCTCTGGTGCCTCTGAA  
ACCGCAAGCAATCATCCACAGGAAGAAGTGAACGACATTAACACGTTTAACGTGAAACTGATCATGCAAGAT  
CGCTCCAAACTGGATTGTGAGGTCGTCTTTGACAGTACCAGCATCAGTCTGAGTGGTGATGGCAAATGCCG  
CAATATCGCGTTAGACGAGATTCACCAGCTTCTGTATTCTGAAGGAGGAATTAAGCCGTGTGGAATCTTCAG  
CTGGGATTTCCGATAGCGATAACTGCGTAGCCATTACCTGAAAGAATCGGGTAACTGCATTCCGTTGTTCT  
TCAACAATTCGCAGGATAAAGAACGCTTTGTGGCAACAGCGAATAAGTTCAAACCGAACTTTAACGGATCCA  
AGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAGAGGTTGCTTATATTCAGAGCGTCGTCTCCGATTGCCACGTG  
CCTACAGCGGAACTGCGTACTCTGCTGGAAATACGAAAACCTCTTCCTGGAGATTCAAAAACCTGAAGGTGCAC  
CATCACCATTAA (配列番号 87)

20

および **CP15-IMX313T** については

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCAGCCA  
ggaaatccatgcccgattcagaagaGCGCGTGTTCTGATCAAAGAGAAGCAGAATATGGGCAATCTCAAAAGCTGT  
TGTTCTTTGCTGACGAACACTCATTGACCAGCACTCAACTGGTTGTAGGAAATGGCTCTGGTGCCTCTGAA  
ACCGCAAGCAATCATCCACAGGAAGAAGTGAACGACATTAACACGTTTAACGTGAAACTGATCATGCAAGAT  
CGCTCCAAACTGGATTGTGAGGTCGTCTTTGACAGTACCAGCATCAGTCTGAGTGGTGATGGCAAATGCCG  
CAATATCGCGTTAGACGAGATTCACCAGCTTCTGTATTCTGAAGGAGGAATTAAGCCGTGTGGAATCTTCAG  
CTGGGATTTCCGATAGCGATAACTGCGTAGCCATTACCTGAAAGAATCGGGTAACTGCATTCCGTTGTTCT  
TCAACAATTCGCAGGATAAAGAACGCTTTGTGGCAACAGCGAATAAGTTCAAACCGAACTTTAACGGATCCA  
AGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAGAGGTTGCTTATATTCAGAGCGTCGTCTCCGATTGCCACGTG  
CCTACAGCGGAACTGCGTACTCTGCTGGAAATACGAAAACCTCTTCCTGGAGATTCAAAAACCTGAAGGTGGA  
CTGCAGTCTCCGCGTCGCCGTCGCTCCTAA (配列番号 88)

30

40

## 【0 2 4 0】

インサートを持たない p c D N A 3 ベクターを対照プラスミドとして使用した。これら  
4 つのプラスミドを用いて、4 群の 5 ~ 6 週齢 B a l b / c 雌マウスを 0 日目と 1 4 日  
目に免疫した。各免疫につき 2 5 マイクログラムの各プラスミドを筋肉内注射した。2 8 日  
目に、E L I S A および E L I S P O T のために血清および脾臓を採取した。大腸菌から  
精製した C p 1 5 - 6 H i s タンパク質を E L I S A 抗原として、また脾細胞を刺激する

50

ためにも使用した。

【 0 2 4 1 】

E L I S A および E L I S P O T の結果を下記の表 7 に示す。

【 0 2 4 2 】

【表 8】

免疫原	IgG 応答 光学密度 (405)	TH パターン	細胞応答 INF $\gamma$ ELISPOT (x10 <sup>6</sup> 脾細胞)
Cp15	0.159	Th1=Th2	35
Cp15-IMX313	0.358	Th1=Th2	117
Cp15-IMX313T	0.697	Th1=Th2	175
Empty Vector	0.087	-	12

【 0 2 4 3 】

これらの結果は、I M X 3 1 3 は C p 1 5 抗原に対する抗体力価とインターフェロン  
応答の両方を改善するが、これらの応答は I M X 3 1 3 の代わりに I M X 3 1 3 T を使用  
することによりさらに改善されることを示す。

【 0 2 4 4 】

19. 自己抗原と改変 I M X 3 1 3 タンパク質の融合物：G n R H - I M X 3 1 3 T によ  
る免疫

I M X 3 1 3 に融合された際の自己抗原 G n R H により誘導される抗体応答をさらに改  
善するために、タンパク質 G n R H - I M X 3 1 3 T を作製した。このタンパク質コード  
配列は

【化 4 6】

ATGGAACATTGGAGCTATGGCCTGCGTCCGGGCGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAG  
AGGTTGCTTATATTCAGAGCGTCGTCTCCGATTGCCACGTGCCTACAGCGGAAGTGCCTACTCTGCTGGAA  
ATACGAAAAGTCTTCCTGGAGATTCAAAAAGTGAAGGTGGAAGTGCAGTCTCCGCGTCGCCGTCGCTCCTAA  
TAA (配列番号 89)

であり、タンパク質配列は、

【化 4 7】

MEHWSYGLRPGGSKKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQSPRRRS\*\*  
(配列番号 90)

である。

【 0 2 4 5 】

20. アジュバントと改変 I M X 3 1 3 タンパク質および抗原との相乗作用

改変 I M X 3 1 3 タンパク質の使用により得られた免疫原性の改善が古典的アジュバン  
トの使用によりさらに改善できるかどうか、また、2つのアジュバントの使用により誘導  
できるかどうかを判定するために、下表の「アジュバント」の欄に示されているように下  
記のタンパク質：P A m、P A m - I M X 3 1 3 および P A m - I M X 3 1 3 T (上記の  
実施例 6 に記載の通りに作製) を作製した。次に、処方したタンパク質を用いて、7 群の

5～6週齢 B a l b / c 雌マウスを、0日目と14日目に免疫した。1回の免疫につき5ミリモルの各タンパク質を、アジュバント A d d a V a x とともにまたは伴わずに、また、T L R リガンドポリ I : C とともにまたは伴わずに用いた。7番目の群には、T L R リガンドポリ I : C をまずタンパク質 P A m - I M X 3 1 3 T とともに処方した後に、アジュバント A d d a V a x とともに処方した。

【0246】

28日目に、E L I S A および E L I S P O T のために血清および脾臓を採取した。P A m タンパク質を E L I S A 抗原として、また脾細胞を刺激するためにも使用した。

【0247】

これらの結果を下記の表に示す(表8)。

【0248】

【表9】

免疫原	アジュバント	IgG 応答 希釈系列	細胞応答 INF $\gamma$ ELISPOT( $\times 10^6$ 脾 細胞)
PAm	無し		15
PAm	Addavax	100	28
PAm-IMX313	無し	400	63
PAm-IMX313	Addavax	900	177
PAm-IMX313T	無し	800	105
PAm-IMX313T	Addavax	6400	307
PAm-IMX313T	Addavax+ ポリ I:C	6000	395

【0249】

明らかに、改変 I M X 3 1 3 タンパク質とともにアジュバントを使用することに利点があり、免疫原性は第2のアジュバントであるポリ I : C を使用することによりさらに改善できる。

【0250】

参考文献

10

20

30

## REFERENCES

- 1) Odgren PR, Harvie LW Jr, Fey EG. 1996. Phylogenetic occurrence of coiled coil proteins: implications for tissue structure in metazoan via coiled coil tissue matrix. *Proteins* **24**:467-484.
- 2) Rose A, Schraegle SJ, Stahlberg EA, Meier I. 2005. Coiled-coil protein composition of 22 proteomes--differences and common themes in subcellular infrastructure and traffic control. *BMC Evol Biol.* **5**:66. 10
- 3) Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**:82-88.
- 4) Tavano R, Capecchi B, Montanari P, Franzoso S, Marin O, Sztukowska M, Cecchini P, Segat D, Scarselli M, Aricò B, Papini E. 2011. Mapping of the *Neisseria meningitidis* NadA cell-binding site: relevance of predicted {alpha}-helices in the NH2-terminal and dimeric coiled-coil regions. *J Bacteriol.* **193**:107-115.
- 5) El Tahir Y, & Skurnik M. 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:209-218. 20
- 6) Cotter SE, Surana NK, St. Geme III JW. 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **13**:199-205.
- 7) Szczesny P, Linke D, Ursinus A, Bär K, Schwarz H, Riess TM, Kempf VA, Lupas AN, Martin J, Zeth K. 2008. Structure of the head of the *Bartonella* adhesin BadA. *PLoS Pathog.* **4**:e1000119.
- 8) Serruto D, Spadafina T, Scarselli M, Bambini S, Comanducci M, Höhle S, Kilian M, Veiga E, Cossart P, Oggioni MR, Savino S, Ferlenghi I, Taddei AR, Rappuoli R, Pizza M, Masignani V, Aricò B. 2009. HadA is an atypical new multifunctional trimeric coiled-coil adhesin of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*, which promotes entry into host cells. *Cell Microbiol.* **11**:1044-1063. 30
- 9) Chen J, Wharton SA, Weissenhorn W, Calder LJ, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. 1995. A soluble domain of the membrane-anchoring chain of influenza virus hemagglutinin (HA2) folds in *Escherichia coli* into the low-pH-induced conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:12205-12209.
- 10) Swanson KA, Settembre EC, Shaw CA, Dey AK, Rappuoli R, Mandl CW, Dormitzer PR, Carfi A. 2011. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:9619-9624. 40
- 11) Tan K, Liu J, Wang J, Shen S, Lu M. 1997. Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:12303-12308.

- 12) Chen YH, Christiansen A, Böck G, Dierich MP. 1995. **HIV-2 transmembrane protein gp36 like HIV-1 gp41 binds to human lymphocytes and monocytes.** *AIDS* 9:1193-1194.
- 13) Lee JE, Fusco ML, Hessel AJ, Oswald WB, Burton DR, Saphire EO. 2008. **Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor.** *Nature* 454:177-182.
- 14) Yuan P, Swanson KA, Leser GP, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. 2011. **Structure of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase (HN) ectodomain reveals a four-helix bundle stalk.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:14920-14925.
- 15) Chambers RS, Johnston SA. (2003) **High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization.** *Nat Biotechnol.* 21:1088-1092.
- 16) Ogun SA, Dumon-Seignovert L, Marchand JB, Holder AA, Hill F. 2008. **The oligomerization domain of C4-binding protein (C4bp) acts as an adjuvant, and the fusion protein comprised of the 19-kilodalton merozoite surface protein 1 fused with the murine C4bp domain protects mice against malaria.** *Infect Immun.* 76:2817-3823.
- 17) Sassenfeld HM & Brewer SJ. 1984. **A polypeptide fusion designed for the purification of recombinant proteins.** *Biotechnology.* 2:76-81.
- 18) Smith JC, Derbyshire RB, Cook E, Dunthorne L, Viney J, Brewer SJ, Sassenfeld HM, Bell LD. 1984. **Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification.** *Gene.* 32:321-327.
- 19) Stempfer G, Höll-Neugebauer B, Rudolph R. 1996. **Improved refolding of an immobilized fusion protein.** *Nat Biotechnol.* 14:329-334.
- 20) Stempfer G, Höll-Neugebauer B, Kopetzki E, Rudolph R. 1996. **A fusion protein designed for noncovalent immobilization: stability, enzymatic activity, and use in an enzyme reactor.** *Nat Biotechnol.* 14:481-484.
- 21) Suzuki M. 1989. **SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone.** *EMBO J.* 8:797-804.
- 22) Fuchs SM & Raines RT. 2005. **Polyarginine as a multifunctional fusion tag.** *Protein Science* 14:1538-1544.
- 23) Blasius AL & Beutler B. 2010. **Intracellular Toll-like Receptors.** *Immunity* 32:305-315.
- 24) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell* 124:783-801.
- 25) Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, Barton GM. 2008. **The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor.** *Nature* 456:658-662.
- 26) Mendlowski B, Field AK, Tytell AA, Hilleman MR. 1975. **Safety assessment of poly I:C in NZB/NZW mice.** *Proc Soc Exp Biol Med.* 148:476-483.

10

20

30

40

- 27) Kim HK, Cheng AG, Kim HY, Missiakas DM, Schneewind O. 2010. **Nontoxicogenic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice.** *J Exp Med.* **207**:1863-1870.
- 28) Spencer AJ, Hill F, Honeycutt JD, Cottingham MG, Bregu M, Rollier CS, Furze J, Draper SJ, Søgaard KC, Gilbert SC, Wyllie DH,. 2012. **Fusion of the *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A to an oligomerization domain enhances its immunogenicity in both mice and non-human primates.** *PLoS One* **7**:e33555.
- 29) Geiser M, Cèbe R; Drewello D, Schmitz R. 2001. **Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase.** *Biotechniques* **31**:88-92. 10
- 30) Ye Q, Krug RM, Tao YJ. (2006) **The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA.** *Nature.***444**:1078-1082.
- 31) Tarus B, Bakowicz O, Chenavas S, Duchemin L, Estrozi LF, Bourdieu C, Lejal N, Bernard J, Moudjou M, Chevalier C, Delmas B, Ruigrok RW, Di Primo C, Slama-Schwok A. (2012) **Oligomerization paths of the nucleoprotein of influenza A virus.** *Biochimie.* **94**:776-785. 20
- 32) Huber VC, McKeon RM, Brackin MN, Miller L, Keating R, Brown SA, Makarova N, Perez DR, MacDonald GH, McCullers JA. 2006 **Distinct Contributions of Vaccine-Induced Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a Antibodies to Protective Immunity against Influenza.** *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY* **13**: 981-990.
- 33) Krammer F, Pontiller J, Tauer C, Palmberger D, Maccani A, Baumann M, Grabherr R. (2010) **Evaluation of the influenza A replicon for transient expression of recombinant proteins in mammalian cells.** *PLoS One.* **5**:e13265.
- 34) Yang Y, Ringler P, Müller SA, Burkhard P. (2012) **Optimizing the refolding conditions of self-assembling polypeptide nanoparticles that serve as repetitive antigen display systems.** *J Struct Biol.* **177**:168-176. 30
- 35) Parry DA, Fraser RD, Squire JM. (2008) **Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure.** *J Struct Biol.* **163**:258-269.
- 36) Bommakanti G, Citron MP, Hepler RW, Callahan C, Heidecker GJ, Najar TA, Lu X, Joyce JG, Shiver JW, Casimiro DR, ter Meulen J, Liang X, Varadarajan R. (2010) **Design of an HA2-based *Escherichia coli* expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**:13701-13706.
- 37) Bommakanti G, Lu X, Citron MP, Najar TA, Heidecker GJ, ter Meulen J, Varadarajan R, Liang X. (2012) **Design of *Escherichia coli*-expressed stalk domain immunogens of H1N1 hemagglutinin that protect mice from lethal challenge.** *J Virol.* **86**:13434-13444. 40
- 38) Birnbaum F, Nassal M. (1990) **Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein.** *J Virol.* **64**:3319-3330.

- 39) Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O'Keeffe KM, Walsh EJ, Foster TJ, McLoughlin RM. (2012) Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. *PLoS Pathog.* 8(12):e1003092.
- 40) Shibagaki N, Okamoto T, Mitsui H, Inozume T, Kanzaki M, Shimada S. (2010) Novel immunotherapeutic approaches to skin cancer treatments using protein transduction technology. *J Dermatol Sci.* 61:153-161.
- 41) Mitsui H, Okamoto T, Kanzaki M, Inozume T, Shibagaki N, Shimada S. (2010) Intradermal injections of polyarginine-containing immunogenic antigens preferentially elicit Tc1 and Th1 activation and antitumour immunity. *Br J Dermatol.* 162:29-41 10
- 42) Mitsui H, Inozume T, Kitamura R, Shibagaki N, Shimada S. (2006) Polyarginine-mediated protein delivery to dendritic cells presents antigen more efficiently onto MHC class I and class II and elicits superior antitumor immunity. *J Invest Dermatol.* 126:1804-1812.
- 43) Shibagaki N, Udey MC. (2002) Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J Immunol.* 168:2393-2401.
- 44) O'Seaghda M, van Schooten CJ, Kerrigan SW, Emsley J, Silverman GJ, Cox D, Lenting PJ, Foster TJ. (2006) *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J.* 273:4831-4841. 20
- 45) Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 48:1-13.
- 46) Fromm JR, Hileman RE, Caldwell EE, Weiler JM, Linhardt RJ. (1995) Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Arch Biochem Biophys.* 323:279-287.
- 47) Chudasama SL, Espinasse B, Hwang F, Qi R, Joglekar M, Afonina G, Wiesner MR, Welsby IJ, Ortel TL, Arepally GM. (2010) Heparin modifies the immunogenicity of positively charged proteins. *Blood.* 116:6046-6053. 30

#### Patent references

WO 2007/062819  
 WO 2007/100908  
 WO 2011/045612  
 WO 2008/122817



【図 1】

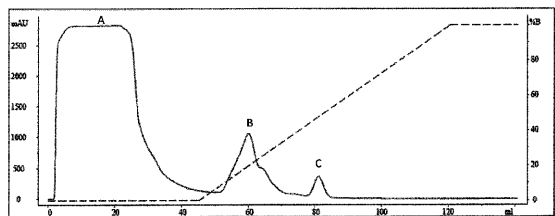


Figure 1

【図 3】

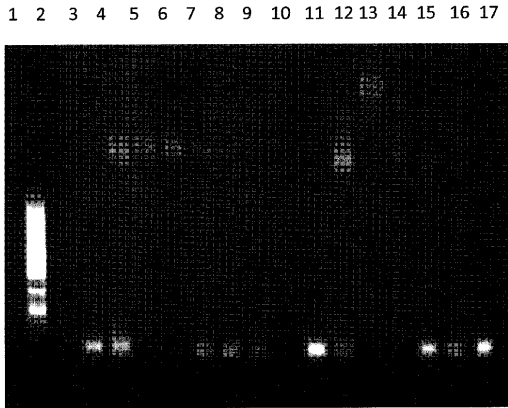


Figure 3

【図 2】

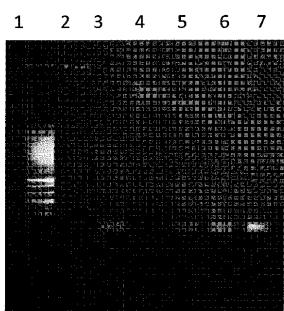


Figure 2

【図 4】

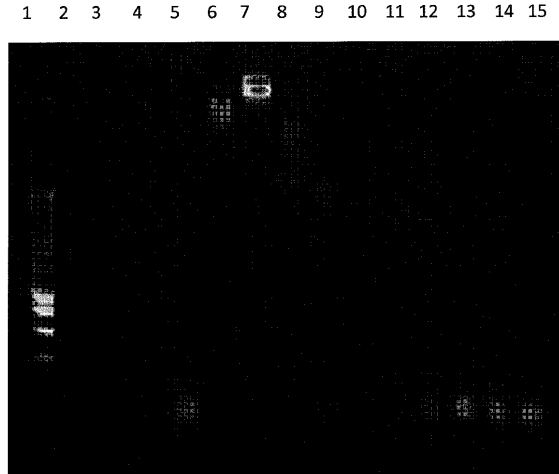
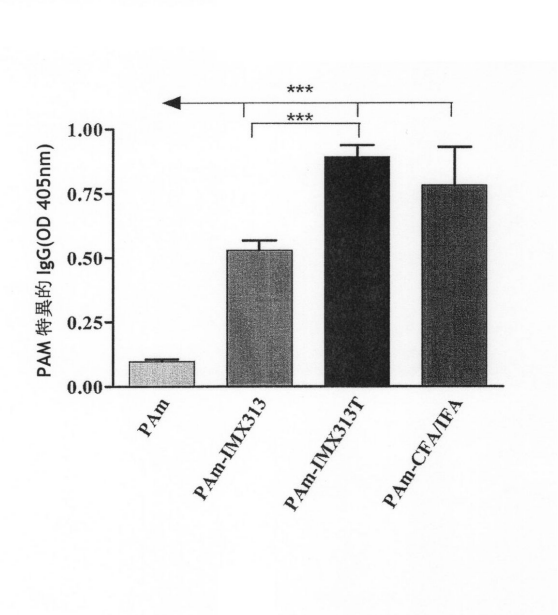
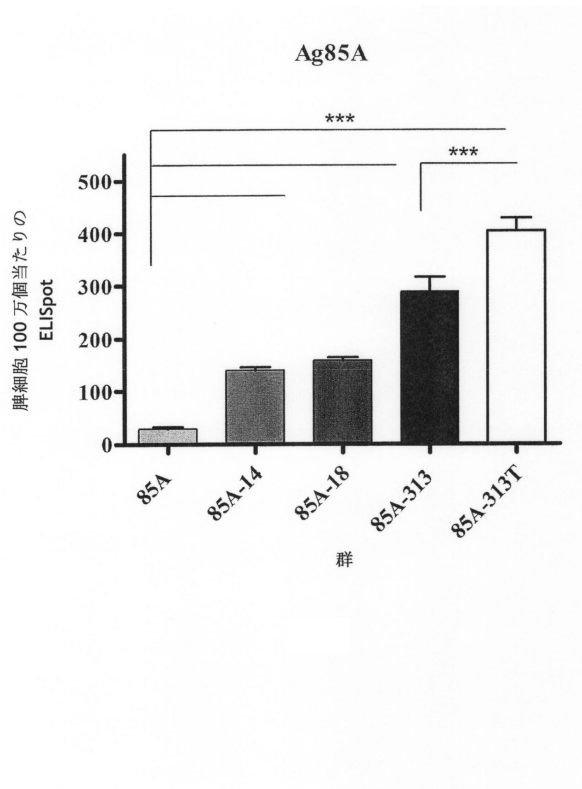


Figure 4

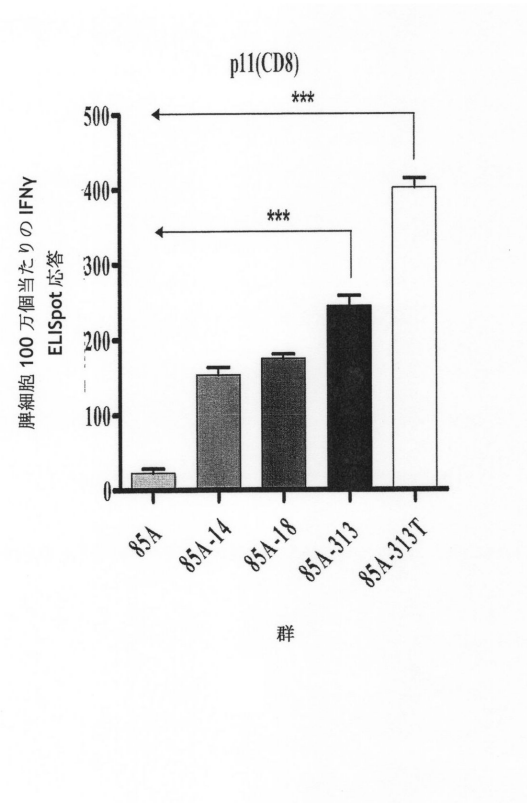
【図 5】



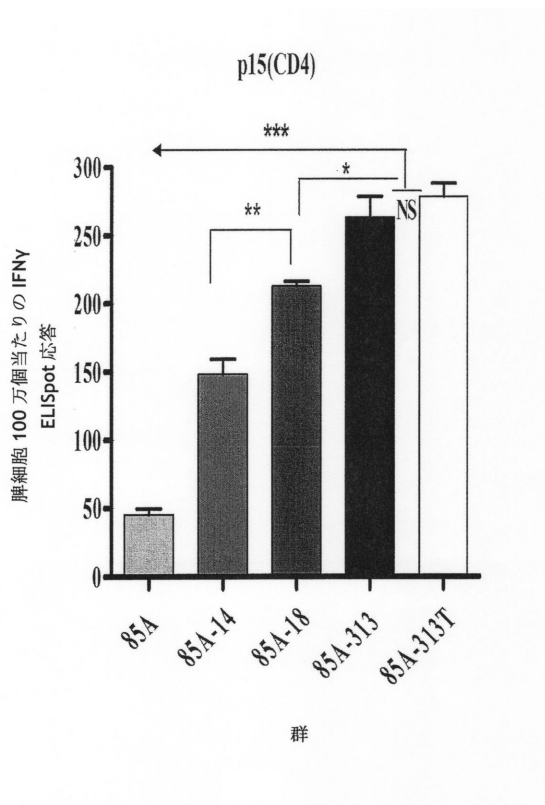
【 図 6 】



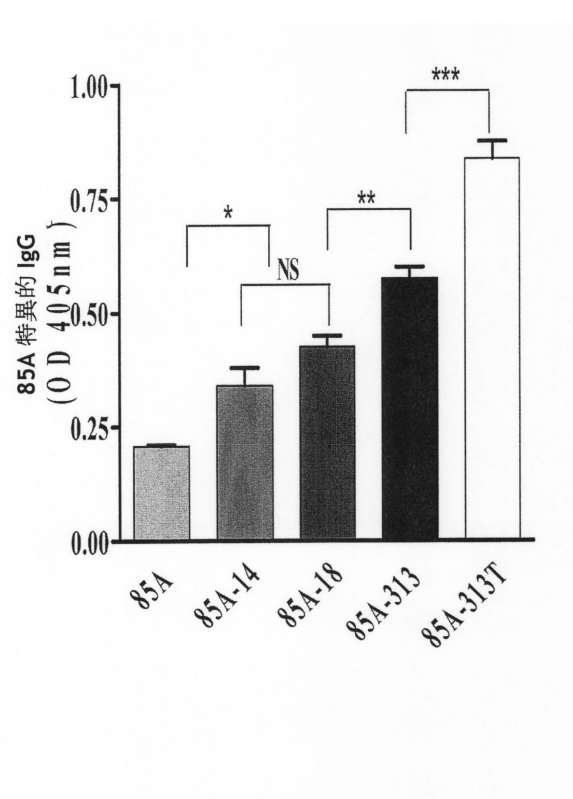
【 図 7 】



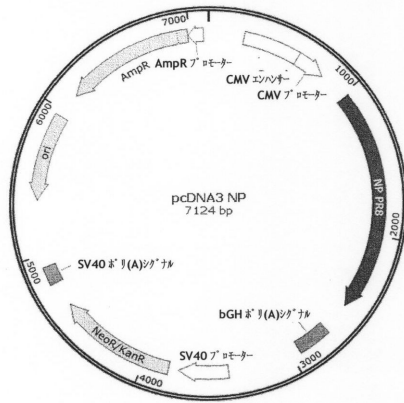
【 図 8 】



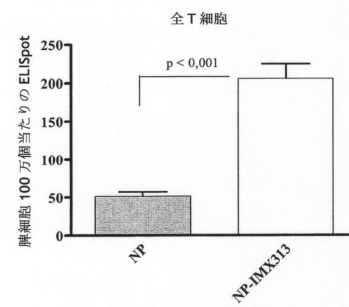
【 図 9 】



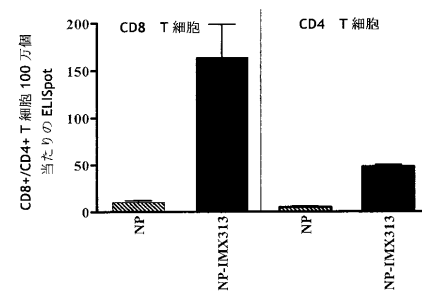
【図 10】



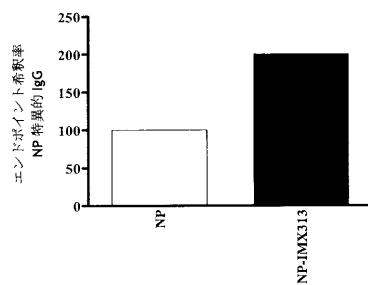
【図 11】



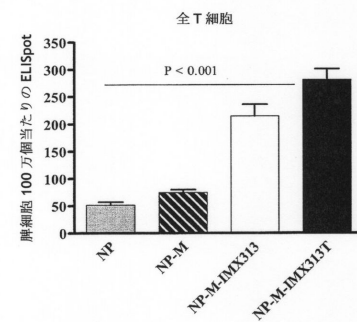
【図 12】



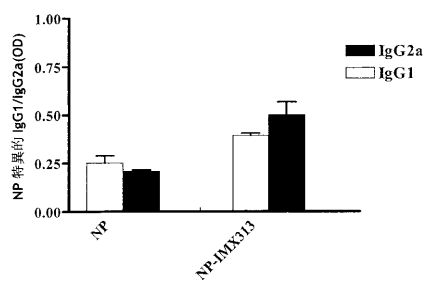
【図 13】



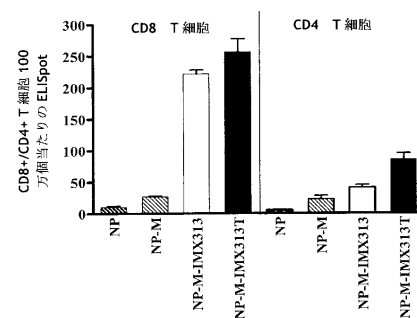
【図 15】



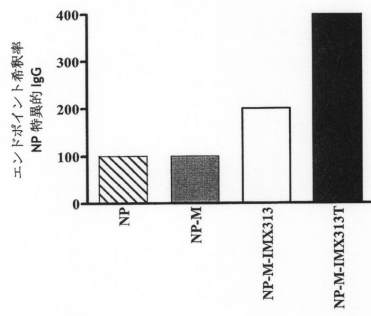
【図 14】



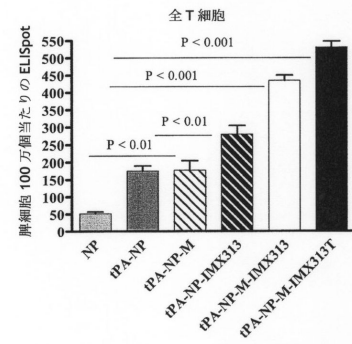
【図 16】



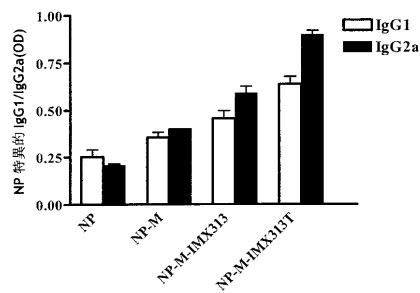
【図 17】



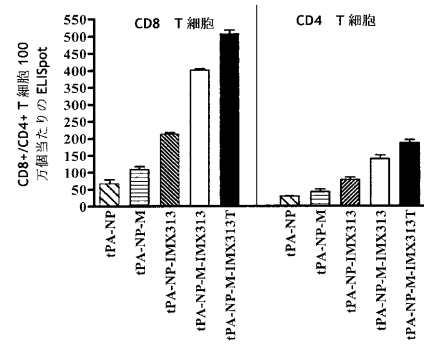
【図 19】



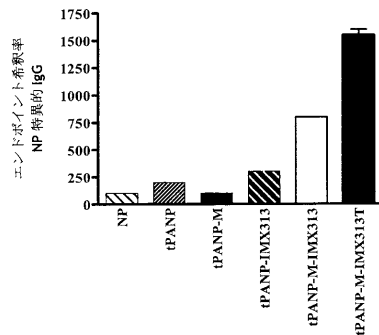
【図 18】



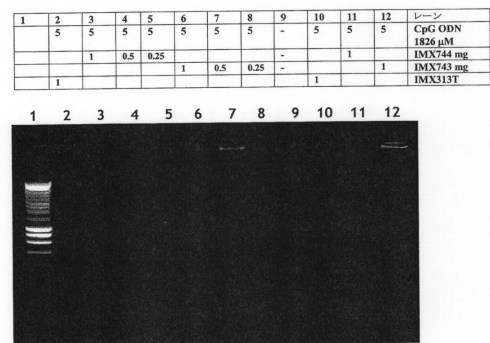
【図 20】



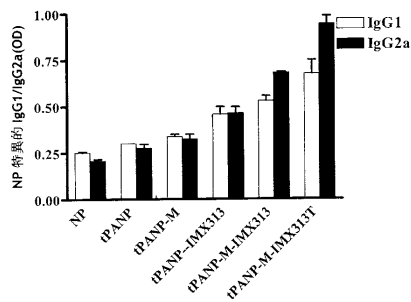
【図 21】



【図 23】



【図 22】



【配列表】

0006518193000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 14/11 (2006.01)		C 0 7 K 14/11	
C 0 7 K 14/575 (2006.01)		C 0 7 K 14/575	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)		C 1 2 N 15/62	Z
A 6 1 P 31/16 (2006.01)		A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	J
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 7 1
A 6 1 K 39/085 (2006.01)		A 6 1 K 39/085	
A 6 1 K 39/145 (2006.01)		A 6 1 K 39/145	

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(74)代理人 100104617

弁理士 池田 伸美

(72)発明者 ジュディス、デル、カンボ、アスカラテイル

フランス国タベルニー、リュ、ピエール、ド、クベルタン、1 2

(72)発明者 イメネ、トゥルキ、ハニ

フランス国リヨン、リュ、ジョセフ、シャペル、6

(72)発明者 フェルガル、ヒル

フランス国リヨン、クール、ド、ラ、リベルテ、3 9

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 特表2007-500726(JP,A)

国際公開第2007/062819(WO,A1)

RecName: Full=Serine/Arginine-related protein 53; Short=SRrp53; AltName: Full=Arginine  
/serine-rich coiled-coil protein 1, GenPept, ACCESSION: Q96IZ7, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/61216831?sat=16&satkey=15487525>, 検索日: 2017年10月25日

Gene, 1984年, Vol.32, Issue3, p.321-327

Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003年, Vol.60, p.523-533

British J. Dermatology, 2010年, Vol.162, Issue1, p.29-41

PLOS ONE, 2012年3月28日, Vol.7, Issue3, e33555(p.1-11)

PLOS ONE, 2012年9月12日, Vol.7, Issue9, e44943(p.1-12)

Infection and Immunity, 2008年, Vol.76, No.8, p.3817-3823

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 0 8 5

A 6 1 K 3 9 / 1 4 5

A 6 1 P 3 1 / 0 4

A 6 1 P 3 1 / 1 6

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 6 2

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)

P u b M e d