

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成21年3月26日(2009.3.26)

【公表番号】特表2005-514347(P2005-514347A)

【公表日】平成17年5月19日(2005.5.19)

【年通号数】公開・登録公報2005-019

【出願番号】特願2003-542209(P2003-542209)

【国際特許分類】

C 07 K	19/00	(2006.01)
A 61 K	39/00	(2006.01)
A 61 K	39/39	(2006.01)
A 61 P	11/06	(2006.01)
A 61 P	35/00	(2006.01)
A 61 P	37/08	(2006.01)
C 07 K	14/005	(2006.01)
C 07 K	14/01	(2006.01)
C 07 K	14/08	(2006.01)
C 07 K	14/47	(2006.01)
C 07 K	14/54	(2006.01)
C 12 N	7/00	(2006.01)
C 12 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 07 K	19/00	Z N A
A 61 K	39/00	H
A 61 K	39/00	Z
A 61 K	39/39	
A 61 P	11/06	
A 61 P	35/00	
A 61 P	37/08	
C 07 K	14/005	
C 07 K	14/01	
C 07 K	14/08	
C 07 K	14/47	
C 07 K	14/54	
C 12 N	7/00	
C 12 N	15/09	A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成21年1月19日(2009.1.19)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) R N A ファージのウイルス様粒子と、  
 (b) 少なくとも1つの抗原または抗原決定基と  
 を含み、前記抗原または前記抗原決定基が、IL-5、IL-13、またはエオタキシ

ンのタンパク質またはペプチドであり、

前記少なくとも1つの抗原または抗原決定基が前記ウイルス様粒子に少なくとも一つの非ペプチド共有結合により結合している、組成物。

【請求項2】

前記ウイルス様粒子が組換えウイルス様粒子である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記ウイルス粒子がRNAファージの組み換えタンパク質を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記RNA-ファージが、

- (a) バクテリオファージQ、
- (b) バクテリオファージR17、
- (c) バクテリオファージf r、
- (d) バクテリオファージG A、
- (e) バクテリオファージS P、
- (f) バクテリオファージM S 2、
- (g) バクテリオファージM 1 1、
- (h) バクテリオファージM X 1、
- (i) バクテリオファージN L 9 5、
- (k) バクテリオファージf 2、
- (l) バクテリオファージP P 7、および
- (m) バクテリオファージA P 2 0 5

からなる群から選択される、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

前記ウイルス様粒子がRNA-ファージQの組み換えタンパク質を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

前記ウイルス様粒子が、RNAファージf rまたはRNAファージA P 2 0 5の組換えタンパク質を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

前記抗原または抗原決定基がIL-5のタンパク質またはペプチドである、請求項1に記載の組成物。

【請求項8】

前記IL-5のタンパク質またはペプチドが、

- (a) 配列番号233のアミノ酸配列、
- (b) 配列番号234のアミノ酸配列、および
- (c) 配列番号233または234のいずれかの断片のアミノ酸配列

からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むか、あるいは当該アミノ酸配列からなる、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

前記抗原または抗原決定基がIL-13のタンパク質またはペプチドである、請求項1に記載の組成物。

【請求項10】

前記IL-13のタンパク質またはペプチドが、

- (a) 配列番号230のアミノ酸配列、
- (b) 配列番号231のアミノ酸配列、および
- (c) 配列番号230または231のいずれかの断片のアミノ酸配列

からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むか、あるいは当該アミノ酸配列からなる、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記抗原または抗原決定基がエオタキシンのタンパク質またはペプチドである、請求項1に記載の組成物。

【請求項12】

前記エオタキシンのタンパク質またはペプチドが、  
(a)配列番号242のアミノ酸配列、  
(b)配列番号243のアミノ酸配列、  
(c)配列番号244のアミノ酸配列、および  
(d)配列番号242、243、または244のいずれかの断片のアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むか、あるいは当該アミノ酸配列からなる、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

前記ウイルス様粒子が少なくとも1つの第1の付着部位を含み、且つ  
前記抗原または抗原決定基が、

(i)前記抗原または抗原決定基に天然に存在しない付着部位、及び  
(ii)前記抗原または抗原決定基に天然に存在する付着部位  
からなる群から選択された少なくとも1つの第2の付着部位をさらに含み、  
前記第2の付着部位は第1の付着部位に会合することが可能であり、前記抗原又は抗原決定基及び前記ウイルス粒子は前記会合を介して相互作用して、規則正しい反復性抗原アレイを形成する、請求項1に記載の組成物。

【請求項14】

前記抗原または抗原決定基がIL-5のタンパク質またはペプチドであり、前記少なくとも第2の付着部位を備えた前記抗原または抗原決定基が、

(a)配列番号335のアミノ酸配列、  
(b)配列番号336のアミノ酸配列、  
(c)配列番号337のアミノ酸配列、および  
(d)配列番号335～337のいずれかの断片のアミノ酸配列  
からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むか、あるいは当該アミノ酸配列からなる、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

前記抗原または抗原決定基がIL-13のタンパク質またはペプチドであり、前記少なくとも第2の付着部位を備えた前記抗原または抗原決定基が、

(a)配列番号330のアミノ酸配列、  
(b)配列番号331のアミノ酸配列、および  
(c)配列番号330または331の断片のアミノ酸配列  
からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むか、あるいは当該アミノ酸配列からなる、請求項13に記載の組成物。

【請求項16】

前記抗原または抗原決定基が、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの少なくとも1つの抗原性部位を含むIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドである、請求項1に記載の組成物。

【請求項17】

前記第1の付着部位がリジン残基である請求項13に記載の組成物。  
【請求項18】

前記第2の付着部位がスルフィドリル基又はシステイン残基である請求項13に記載の組成物。

【請求項19】

前記第1の付着部位がリジン残基であり、前記第2の付着部位がシステイン残基である請求項13に記載の組成物。

【請求項20】

(a)請求項1に記載の組成物、および

(b) 許容可能な医薬品担体を含む医薬品組成物。

【請求項 2 1】

(a) R N A ファージのウイルス様粒子、および  
(b) 少なくとも 1 つの抗原または抗原決定基を含み、

前記抗原または抗原決定基が I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドであって、及び、前記少なくとも 1 つの抗原または抗原決定基が前記ウイルス様粒子に少なくとも 1 つの非ペプチド共有結合により結合している、組成物を含んでなるワクチン組成物。

【請求項 2 2】

更にアジュバントを含む請求項 2 1 に記載のワクチン組成物。

【請求項 2 3】

前記ウイルス様粒子が R N A ファージの組換えタンパク質である、請求項 2 1 に記載のワクチン組成物。

【請求項 2 4】

前記ウイルス様粒子が R N A ファージ Q 、 R N A ファージ f r、又は R N A ファージ A P 2 0 5 の組換えタンパク質である、請求項 2 1 に記載のワクチン組成物。

【請求項 2 5】

(a) R N A ファージのウイルス様粒子を提供し、  
(b) I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドである少なくとも 1 つの抗原または抗原決定基を提供し、及び  
(c) 前記少なくとも 1 つの抗原または抗原決定基が前記ウイルス様粒子に少なくとも 1 つの非ペプチド共有結合により結合できるように、前記ウイルス様粒子と前記少なくとも 1 つの抗原または抗原決定基とを組み合わせることを含む、請求項 1 に記載の組成物を生成する方法。

【請求項 2 6】

薬剤として使用される請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

アレルギー性好酸球疾患を治療する薬剤を製造するための、請求項 1 に記載の組成物の使用。

【請求項 2 8】

(a) 少なくとも 1 つの第 1 の付着部位をそれぞれ備えた少なくとも 1 つの第 1 のコア粒子および少なくとも 1 つの第 2 のコア粒子であって、前記少なくとも 1 つの第 1 のコア粒子及び / 又は少なくとも 1 つの第 2 のコア粒子が R N A ファージのウイルス様粒子であるもの、および

(b) 少なくとも 1 つの第 2 の付着部位をそれぞれ備えた少なくとも 1 つの第 1 の抗原または抗原決定基および少なくとも 1 つの第 2 の抗原または抗原決定基とを含む組成物であって、

前記少なくとも 1 つの第 1 の抗原または抗原決定基および前記少なくとも 1 つの第 2 の抗原または抗原決定基が、I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンから選択され、前記第 2 の付着部位が、

(i) 前記抗原または抗原決定基に天然に存在しない付着部位、及び  
(i i) 前記抗原または抗原決定基に天然に存在する付着部位からなる群から選択され、

前記第 2 の付着部位が前記第 1 の付着部位に会合可能であり、前記少なくとも 1 つの第 1 および前記少なくとも 1 つの第 2 の抗原または抗原決定基と、前記少なくとも 1 つの第 1 および前記少なくとも 1 つの第 2 のコア粒子とが前記会合を介して相互に作用して規則正しい反復性抗原アレイを形成する、組成物。

【請求項 2 9】

前記少なくとも 1 つの第 1 の抗原または抗原決定基が I L - 5 のタンパク質またはペプチドであり、前記少なくとも 1 つの第 2 の抗原または抗原決定基が I L - 1 3 のタンパク質またはペプチドである、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記少なくとも 1 つの第 1 のコア粒子と前記少なくとも 1 つの第 2 のコア粒子が組換えウイルス様粒子である、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記少なくとも 1 つの第 1 のコア粒子と前記少なくとも 1 つの第 2 のコア粒子が同じ組換えウイルス様粒子である、請求項 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記ウイルス様粒子が R N A ファージの組換えタンパク質を含む請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記 R N A ファージが、

- ( a ) バクテリオファージ Q 、
- ( b ) バクテリオファージ R 1 7 、
- ( c ) バクテリオファージ f r 、
- ( d ) バクテリオファージ G A 、
- ( e ) バクテリオファージ S P 、
- ( f ) バクテリオファージ M S 2 、
- ( g ) バクテリオファージ M 1 1 、
- ( h ) バクテリオファージ M X 1 、
- ( i ) バクテリオファージ N L 9 5 、
- ( k ) バクテリオファージ f 2 、
- ( l ) バクテリオファージ P P 7 、および
- ( m ) バクテリオファージ A P 2 0 5

からなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

R N A ファージ Q の組換えタンパク質が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有するコートタンパク質を含むか、あるいは前記コートタンパク質から本質的になるか、あるいは前記コートタンパク質からなる、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記組成物を動物またはヒトへ投与することを含んでなる免疫化する方法に使用される請求項 1 - 1 9 または 2 8 - 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記抗原または抗原決定基が自己抗原である、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記動物がヒトであり、前記抗原または抗原決定基がヒト I L - 5 、ヒト I L - 1 3 またはヒトエオタキシンのタンパク質またはペプチドである、請求項 3 6 の組成物。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】アレルギー性好酸球性疾患を治療するための抗原アレイ

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、分子生物学、ウイルス学、免疫学、および医学の分野に関する。本発明は、規則的に繰り返し並べられた抗原または抗原決定基のアレイ、特に I L - 5 、 I L - 1 3

、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを含むアレイを構成する組成物を提供する。より具体的には本発明は、ウイルス様粒子と、そこに結合したIL-5、IL-13、及び／又はエオタキシンの少なくとも1種のタンパク質またはペプチドとを含む組成物を提供する。また本発明は、結合体と規則的な反復アレイをそれぞれ生成するためのプロセスも提供する。本発明の組成物は、好酸球成分に伴うアレルギー性疾患を治療するためのワクチンの製造に有用であり、また好酸球成分に伴うアレルギー性疾患を予防したまま治療しつつ免疫応答、特に抗体応答を効率的に引き起こす治療用ワクチン(*pharmaccine*)として有用である。さらに本発明の組成物は、指示される状況で自己特異的免疫応答を効率的に引き起こすのに特に有用である。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

喘息、鼻炎、鼻ポリープ、好酸球性症候群、およびアトピー性皮膚炎を含めたいいくつかのアレルギー性疾患は、明らかな好酸球浸潤を特徴とする顕著な炎症成分を有する。

#### 【0003】

これらの疾患で最も医学的に重要なグループであるアトピー性喘息は、臨床的には偶発的な空気流の閉塞、気道の炎症、および非特異的なアレルゲンに対する気管支の過剰反応を特徴とした、気道の慢性炎症性疾患であることがわかっている。気道閉塞および反応亢進の程度は、しばしば気道の炎症レベルと関連がある。このような臨床上の特徴は、喘息の重症度を示している(Kay, A. B.、J. Allergy Clin Immunol、1991、87:893; De Monchy, J. G. 他、Am Rev Respir Dis、1985、131:373; Beasley, R. 他、Am Rev Respir Dis、1989、139:806; Azzawi, M. 他、Am Rev Respir Dis、1990、142:1407; Ohashi, Y. 他、Am Rev Respir Dis、1992、145:1469; Nakajima, H. 他、Am Rev Respir Dis、1992、146:374; Broide, D. H. 他、J. Allergy Clin Immunol、1991、88:637; Warlaw, A. J. 他、Am Rev Respir Dis、1988、137:62)。細胞浸潤は、疾患の進行に関連し、病原および病理の主な要因である気道の炎症を示す。喘息における炎症性浸潤は複雑であるが、現在ではこの障害の臨床的な発現および病原において、Th2プロファイル(Th2細胞)のサイトカイン発現を伴うCD4<sup>+</sup>Thリンパ球が極めて重要な役割を果たすことが広く認識されている(Robinson, D. S. 他、J. Allergy Clin Immunol、1993、92:397; Walker, C. 他、J. Allergy Clin Immunol、1991、88:935)。Th2細胞は、IL-4、-5、-9、-10、-13などのある範囲のサイトカインを放出して気道のアレルギー性炎症を整えることにより、疾患の進行および気道過敏症(AHR)を調節する(Robinson, D. S. 他、N. Engl J. Med、1992、326:298; Robinson, D. S. 他、J. Allergy Clin Immunol、1993、92:313; Walker, C. 他、Am Rev Respir Dis、1992、146:109; Drzen, J. M. 他、J. Exp Med、1996、183:1)。Th2細胞と同様に、肺の中の好酸球およびその炎症産物のレベルは疾患の重症度に関連し、気道におけるこの白血球の蓄積は、遅発相喘息性反応中の気管支機能不全の中心的な特徴である(Bousquet, J. 他、N. Engl J. Med、1990、323:1033)。Th2細胞はアレルギー性応答の数多くの面を整えるが、IL-5の分泌によって好酸球増加症を抑制する際のその役割は、喘息での主要な炎症誘発性経路であると考えられる。

#### 【0004】

インターロイキン-5(IL-5)は、喘息患者で高レベルで発現する炎症誘発性サイトカインである。さらにIL-5は、アトピー性疾患の病原に主として関与するサイトカインである。これは特に、アトピー性疾患における組織損傷の主な原因である好酸球の產生、活性化、および局在化を制御する。さらにIL-5は、好酸球系列に著しく特異的な

、誘発性T細胞由来のサイトカインである。IL-5は転写レベルで制御され、遺伝子を調節することは、喘息や湿疹、鼻炎などの好酸球依存型アレルギー性障害の治療の将来有望な目標である。

#### 【0005】

好酸球が喘息におけるアレルギー反応の重要な成分であるという、数多くの証拠がある。IL-5は好酸球の産生に独自に関与するものであり、IL-13などの様々なその他のサイトカインの場合、エオタキシンなどのケモカインおよびその他のファクターが、その活性化、局在化、および生存を制御する。したがってIL-5は、新しい抗喘息薬の重要な薬物標的になっている(Foster, P. S. 他、*Pharmacol Ther*、2002、94(3):253; Foster, P. S. 他、*Trends Mol Med*、2002、8(4):162)。

#### 【0006】

ヒトタンパク質とマウスタンパク質との相同性は71%である(サイトカインハンドブック(*Cytokine hand book*)。IL-5のアミノ酸配列は、マウスインターロイキン3、マウスGM-CSF、およびマウスインターフェロンタンパク質の短いストレッチ領域を除き、その他のサイトカインのアミノ酸配列との相同性が著しいものではない。ヒトとマウス両方のタンパク質配列に関して予想される分子質量は、13.1kDaである。生物学的に活性なIL-5は、モノマーを頭-尾構造に向ける高度に保存されたシステイン残基(44~86'および86~44')が共有結合した、ジスルフィド結合ホモダイマーである(Takahashi, T. 他、*Mol. Immunol.* 27: 911~920、1990)。野生型モノマーIL-5は生物学的に不活性であるが、挿入性の突然変異誘発によって、機能性IL-5モノマーが設計製作されている(Dickason, R. R. 他、*J. Mol. Med.* 74: 535~46、1996)。ヒトIL-5の結晶構造の分析によれば、新規な2つのドメイン構造が示され、各ドメインでは2つの鎖の関与が必要であり、サイトカインの折畳みに対する高い類似性がGM-CSF、インターロイキン3、およびインターロイキン4に見られることが実証された(Millburn, M. V. 他、*Nature* 363: 172~176)。IL-5のC末端領域は、IL-5レセプターとの結合および生物活性に重要であるようにみえる(Proudfoot他、*J. Protein Chem.* 15(5): 491~9、1996)。IL-5とそのレセプターとの結合は、らせんAが主にレセプターのサブユニットの結合に関与する、らせんAとDが重複する領域で生じると考えられる(Graber, P. 他、*J. Biol. Chem.* 270: 15762~15769、1995)。天然のヒトIL-5には、2つの潜在的なグリコシル化部位があり、マウスIL-5には3つの部位がある。ヒトIL-5は、Thr3でNグリコシル化しかつOグリコシル化している。真核系内で発現した組換えIL-5は、差次的なグリコシル化が原因で、45~60kDaという広範囲にわたる分子質量を示す。脱グリコシル化したIL-5と原核細胞内で発現したIL-5は、完全な生体活性を維持する(Tominaga A. 他、*J. Immunol.* 144: 1345~1352、1990)。

#### 【0007】

薬物送達への経路は、一般に、IL-5産生の阻害剤のスクリーニング、リガンド拮抗剤、レセプターの発現およびレセプターの活性化の制御に基づく。特にIL-5の作用の阻害は、喘息および好酸球に関連するその他の疾患に対する治療方法を提供することができる。免疫療法は、IL-5レベルおよび喘息などの好酸球に関連した疾患状態を制御するための、もう1つの非常に魅力ある手法である。

#### 【0008】

現在、喘息の症状を予防する最も一般的な治療は、吸入用コルチコステロイドを使用することである。一般にこれらの薬剤を使用することは、非常に安全で安価である。しかしこれらの薬剤は、全身に免疫抑制作用を引き起こすことによって機能し、したがってこれらの薬剤を長期使用することにより、高血圧や骨粗鬆症、白内障の発症を含めた副作用が生じる。コルチコステロイドは毎日摂取しなければならず、そのためこれらの薬品を首尾

良く使用するうえで、患者のコンプライアンスが別の問題になる。さらに、コルチコステロイドを使用しても治りにくく、別の療法の使用を必要とする喘息患者がいる。IL-5を対象とした免疫治療薬を使用して、好酸球を選択的に標的とすることにより、多面的作用を伴う全身性免疫抑制剤を使用することの副作用を克服することができる。

#### 【0009】

喘息などの疾患の将来可能な治療には、受動免疫化、したがってIL-5に特異的なモノクローナル抗体の使用を含めることができる。喘息患者の好酸球を減少させることを目標とした、IL-5に対するヒト化モノクローナル抗体による臨床試験が進行中である。特に、様々な種のIL-5に対して活性なヒト化モノクローナル抗体であるSCH55700（エスリズマブ(eslizumab)）、Scherling Ploughを使用した臨床試験[Egan, R. W.他、Arzneimittel-Forschung、1999、49:779]と、ヒトおよび靈長類のインターロイキン5に特異的なヒト化抗体であるSB240563（メポリズマブ(mepolizumab)）、Glaxo Smith Klineを使用した臨床試験[Hart, T. K.他、Am J Respir Crit Care Med、1998、157:A744；Zia-Amirhosseini, P.他、J Pharmacol Exp Ther、1999、291:1060]が報告されている。どちらのモノクローナル抗体も、第1相試験で許容可能な安全プロファイルであることが実証され、その結果好酸球の数が減少したが、気道の機能亢進の低下は観察されなかった。好酸球によって喘息患者の気道に生じる有害な作用は、組織の再建を伴う慢性的な現象と考えられる。この意味で抗IL-5療法の効き目を試験するように設計された研究を評価する必要があり、開発中である。

#### 【0010】

しかしmbによる治療には、いくつかの欠点が伴う。モノクローナル抗体は、毎月または隔月に摂取しなければならない高価な治療薬である。注射用薬物の投与のために医療機関を繰り返し訪ねなければならないことから生じる患者の非コンプライアンスの問題は、重要な問題である。さらに、患者と治療用抗体とのアロタイプが様々であることから、モノクローナル抗体療法が結局効果のないものになる可能性がある。mbが高用量であり免疫形成が複雑であること、受動免疫化の効果を低下させる可能性がある。ワクチン接種を活発に行う試みにより、これらの合併症が抑制される。

#### 【0011】

慢性の喘息または実証された好酸球増加症に伴うその他の疾患またはIL-5に関連するその他の状態に対する治療薬を提供する別の手法が、WO97/45448に記載されている。その中で、天然または変異形態のIL5によって引き起こされた異常な作用を改善し、軽減し、またはその他の方法で低減させる際に「IL5の活性に拮抗可能な変性または変種形態のIL5分子」を使用することが提案されている。拮抗作用は、低親和性のIL5R鎖に結合するが高親和性のレセプターには結合しない変種形態のIL5の結果であることが報告されている。このように作用することによって、変種はIL5と競合し、IL5の生理的作用をもたらすことなくそのレセプターと結合しようとする。

#### 【0012】

エオタキシンは、好酸球、好塩基球、およびTh2細胞上に存在する、ケモカインレセプター3に特異的なケモカインである。しかしエオタキシンは、好酸球に対する特異性が高い(Zimmermann他、J. Immunol. 165:5839~46(2000))。好酸球の遊走は、エオタキシン1ノックアウトマウスで70%低減するが、依然として好酸球を発生させることができる(Rothenberg等、J. Exp. Med. 185:785~90(1997))。IL-5は、好酸球が骨髄から血液に遊走する原因と考えられ、エオタキシンは、組織内での局所的な遊走の原因と考えられる(Humble他、J. Exp. Med. 186:601~12(1997))。したがって、IL-5の他にエオタキシンを標的とすることによって、好酸球の減少に向けた免疫療法を強化することができる。

#### 【0013】

ヒトゲノムは、30%が相同な3個のエオタキシン遺伝子、エオタキシン1～3を含有する。今まで、2個の遺伝子、エオタキシン1およびエオタキシン2がマウスでわかっている(Zimmermann他、J. Immunol. 165: 5839～46(2000))。これらは38%が相同である。マウスエオタキシン2は、ヒトエオタキシン2に対して59%が相同である。マウスでは、エオタキシン1が、胃腸管に偏在して発現するようであり、一方エオタキシン2は、空腸に優先的に発現するようである(Zimmermann他、J. Immunol. 165: 5839～46(2000))。エオタキシン1は、気管支肺胞液中に存在する(Teixeira他、J. Clin. Invest. 100: 1657～66(1997))。ヒトエオタキシン1の配列は配列番号242で示され(aa1～23がシグナルペプチドに対応する)、ヒトエオタキシン2の配列は配列番号243で示され(aa1～26がシグナルペプチドに対応し)、ヒトエオタキシン3の配列は配列番号244で示され(aa1～23がシグナルペプチドに対応し)、マウスエオタキシン1の配列は配列番号245で示され(aa1～23がシグナルペプチドに対応し)、マウスエオタキシン2の配列は配列番号246で示される(aa1～23がシグナルペプチドに対応する)。

#### 【0014】

エオタキシンのモノマーは、その質量が8.3kDaであり、広範囲にわたる条件全体を通してダイマー-エオタキシンと平衡状態を保つ。推定されるKdは37で1.3mMであるが、モノマーが主な形態である(Crump他、J. Biol. Chem. 273: 22471～9(1998))。エオタキシンの構造は、NMR分光測定によって明らかにした。そのレセプターCCR3に対する結合部位はN末端にあり、第1のシステインの前にある領域が非常に重要である(Crump他、J. Biol. Chem. 273: 22471～9、1998)。エオタキシンに結合したケモカインレセプターから得られたペプチドが、この発見を裏付けた。エオタキシンは、2つのジスルフィド架橋を形成する4つのシステインを持ち、化学的に合成することができる(Clarke-Lewis他、生化学(Biochemistry)30: 3128～3135、1991)。エオタキシン1は、Thr71上で様々にOグリコシル化する(Noso, N.他、Eur. J. Biochem. 253: 114～122)。E. coli細胞質ゾルでのエオタキシン1の発現についても記述されている(Crump他、J. Biol. Chem. 273: 22471～9(1998))。封入体としてのE. coliでの発現とその後に続くリフォールディング(Mayer他、生化学(Biochemistry)39: 8382～95(2000))、および昆虫細胞の発現(Forssmann他、J. Exp. Med. 185: 2171～6(1997))が、エオタキシン2に関して報告されている。

#### 【0015】

インターロイキン13(IL-13)は、生物学的に活性なモノマーTh2サイトカインとして分泌される。成熟した形態のIL-13は、ヒトの場合は112個のアミノ酸を含み、マウスの場合は111個のアミノ酸を含む。計算されたタンパク質の分子質量は約12.4kDaである。IL-13は、N結合グリコシル化することができ(Fitzgerald K.A.他、The Cytokines Fact Book、第2版、Academic Press)、IL-13は、Th2細胞、マスト細胞、好塩基球、およびナチュラルキラー細胞によって産生される(Brombacher F、2000 Bioessays Jul; 22(7): 646～56)。機能的IL-13レセプターは、インターロイキン4レセプター鎖(IL-4R鎖)と、2つのIL-13レセプター結合タンパク質の一方とからなるヘテロダイマーである(Brombacher F、2000 Bioessays Jul; 22(7): 646～56)。

#### 【0016】

IL-13は、喘息の病状にかなりの役割を果たす。IL-13は、この疾患の中心的な特徴に関与することが示されている。これは、アレルゲン誘発性気道過敏症(AHR)および粘液産生に直接作用し、好酸球増加症に関与する(Kupperman D.A.、20

02、Nature Medicine、印刷前の電子版）。マウスにおけるIL-13の選択的中和により、喘息の表現型が著しく弱められた。さらに、IL-13を投与すると、喘息様の表現型が非感作T細胞欠失マウスまたは未処置のマウスに与えられた（Grunig G.他、1998、サイエンス（Science）、282（5397）：2261～3、Willis-Karp, M.他、1998、サイエンス（Science）、282（5397）：2258～61）。IL-13の標的欠失がなされたマウスは、アレルゲン誘発性AHRを発症させることができず、粘液産生が著しく低下したことが示された（Walter, D. M.他、2001、J Immunol、167（8）：4668～75）。IL-13は、マウス喘息モデルでは好酸球増加症にも影響を及ぼすので（Grunig G.他、1998、サイエンス（Science）、282（5397）：2261～3）、IL-13は、好酸球増加症に関連したより多くのアレルギー性疾患に関する可能性があり、したがってその活性を中和することによって、患者に将来有望な治療を提供することができる。

#### 【0017】

さらに、IL-13およびIL-13レセプターのアップレギュレーションが多くの腫瘍型に見られた（例えば、今日まで試験が行われているすべてのHodgkinリンパ腫疾患細胞系）。したがってIL-13に対する免疫化は、IL-13を過発現する腫瘍患者の治療方法を提供することができる。

#### 【0018】

ワクチン接種の効率を改善する1つの方法は、加えられる抗原の反復度を高めることである。単離されたタンパク質とは異なり、ウイルスは、T細胞の助けによりまたはT細胞の助けなしで、いかなるアジュバントも存在しない状態で、即座にかつ効率的に免疫応答を引き起こす（BachmannおよびZinkernagel、Ann. Rev. Immunol. 15: 235～270 (1991)）。ウイルスはしばしばごく少ないタンパク質からなるが、単離された成分よりも非常に強い免疫応答を引き起こすことができる。B細胞応答では、ウイルスの免疫原性に関する1つの極めて重要なファクターが、表面エピトープの反復性および順序正しさであることがわかっている。多くのウイルスは、エピトープに特異的な免疫グロブリンをB細胞に効率的に架橋するエピトープの規則正しいアレイを示す、準結晶質表面を示す（BachmannおよびZinkernagel、Immunol. Today 17: 553～558 (1996)）。この免疫グロブリンのB細胞への架橋は、細胞周期の進行およびIgM抗体の産生を直接誘発させる強力な活性化シグナルである。さらに、そのようなトリガーB細胞はTヘルパー細胞を活性化することができ、それによってB細胞内でIgMからIgG抗体産生への切換えを誘発させ、長命B細胞記憶を生成する - すなわちこれがすべてのワクチン接種の目標である（BachmannおよびZinkernagel、Ann. Rev. Immunol. 15: 235～270 (1997)）。ウイルス構造は、自己免疫疾患での抗抗体の生成にも関係し、病原に対する自然な応答の一部としても関係する（Fehr, T.他、J. Exp. Med. 185: 1785～1792 (1997) 参照）。したがって高度に組織化されたウイルス表面に存在する抗体は、強力な抗抗体応答を引き起こすことができる。

#### 【0019】

しかし上述のように、免疫系は通常、自己由来の構造に対する抗体を産生することができない。低濃度で存在する可溶性抗原の場合、これはTh細胞レベルでの寛容に起因する。これらの条件下、Tヘルプを送達することができる担体に自己抗原を連結することによって、寛容性が破壊される可能性がある。高濃度で存在する可溶性タンパク質または低濃度の膜タンパク質では、BおよびTh細胞が寛容になり得る。しかしB細胞寛容は可逆的であり（アネルギー）、高度に組織化された手法で外来の担体に連結した抗原の投与によって破壊される可能性がある（BachmannおよびZinkernagel、Ann. Rev. Immunol. 15: 235～270 (1997)）。

#### 【発明の開示】

#### 【0020】

本発明者等はついに、固有の反復性組織を有する構造のコア粒子、すなわち本明細書では特にウイルス様粒子（VLP）およびVLPのサブユニットにそれぞれ結合して高度に規則的で反復性の結合体になった、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドが、IL-5、IL-13、またはエオタキシンに特異的な抗体を誘発させるための潜在的な免疫原になることを見出した。さらにこれらの自動反応性抗体は、喘息のマウスモデルにおける好酸球増加症を阻害する。したがって本発明は、規則的で反復性の、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとコア粒子とのアレイ、特にVLPと、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとの結合体およびアレイをそれぞれ基にした、アレルギー性好酸球疾患を治療するための治療手段を提供する。この療法は、ワクチン接種した動物で抗IL-5、IL-13、またはエオタキシン抗体の高い力値を引き出すことができ、喘息のマウスモデルで好酸球増加症を阻害することができる。

#### 【0021】

したがって本発明は、（a）少なくとも1つの第1の付着部位を有するコア粒子と、（b）少なくとも1つの第2の付着部位を有する少なくとも1つの抗原または抗原決定基とを含む組成物を提供し、前記抗原または抗原決定基は、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドであり、前記第2の付着部位は、（i）前記抗原または抗原決定基に天然に存在しない付着部位、（ii）前記抗原または抗原決定基に天然に存在する付着部位からなる群から選択され、前記第2の付着部位は前記第1の付着部位と会合可能であり、前記抗原または抗原決定基と前記コア粒子とは、前記会合により相互に作用して、規則正しい反復性抗原アレイを形成する。本発明での使用に適するコア粒子の好ましい実施形態は、ウイルス、ウイルス様粒子、バクテリオファージ、細菌線毛またはべん毛、あるいは本発明による規則正しい反復性抗原アレイを形成することが可能な固有の繰返し構造を有する任意のその他のコア粒子である。

#### 【0022】

より詳細には、本発明は、規則的で反復性の抗原または抗原決定基アレイを含む組成物、したがって本明細書では特にIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとVLPとの結合体を含む組成物を提供する。より詳細には本発明は、ウイルス様粒子と、そこに結合したIL-5、IL-13、またはエオタキシンの少なくとも1つのタンパク質またはペプチドとを含む、組成物を提供する。また本発明は、結合体と、規則的で反復性のアレイとをそれぞれ生成するためのプロセスも提供する。本発明の組成物は、好酸球成分によるアレルギー性疾患を治療するためのワクチンの製造に有用であり、また、好酸球成分によるアレルギー性疾患を予防または治療し、免疫応答、特に抗体応答を効率的に引き起こすための治療用ワクチンとしても有用である。さらに本発明の組成物は、指示される状況で自己特異的な免疫応答を効率的に引き起こすのに特に有用である。

#### 【0023】

本発明では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドが、コア粒子およびVLPにそれぞれ結合し、典型的な場合は方向が示された手法で、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの規則正しい反復性抗原アレイが得られる。さらに、コア粒子およびVLPの高度に反復的かつ組織化された構造はそれぞれ、高度に規則的で反復的に、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの表示を媒介し、それが高度に組織化され反復的な抗原アレイにつながる。さらに、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとコア粒子およびVLPとの結合により、それぞれTヘルパー細胞エピトープが得られるが、これは、コア粒子とIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドのアレイ、さらにはVLPとIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドのアレイでそれぞれ免疫化した宿主に対して、コア粒子およびVLPが外来のものだからである。これらのアレイは、高度に組織化された構造であり、寸法であり、またアレイ表面に抗原が繰り返し存在する点で、従来技術の結合体とは異

なる。

#### 【0024】

本発明の一態様では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドが、IL5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質あるいはIL-5、IL-13、またはエオタキシンのペプチドの適正な折畳みに適合した安定な発現宿主に発現し、あるいは合成され、一方コア粒子およびVL Pはそれぞれ、コア粒子およびVL Pの折畳みおよび組織体にそれぞれ適した発現宿主で発現し、精製される。IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドは、化学的に合成することができる。次いで、IL-5、IL-13、またはエオタキシアレイのタンパク質またはペプチドをコア粒子およびVL Pにそれぞれ結合することによって、IL-5、IL-13、またはエオタキシンアレイのタンパクまたはペプチドを組織化(assembly)する。

#### 【0025】

別の態様で、本発明は、(a)ウイルス様粒子と、(b)少なくとも1つの抗原または抗原決定基とを含む組成物を提供し、前記抗原または前記抗原決定基は、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドであり、(a)請求項1または請求項22に記載の組成物と、(b)許容可能な医薬品担体とを含む医薬品組成物を提供する。

#### 【0026】

さらに別の態様では、本発明は、(a)少なくとも1つの第1の付着部位を有するコア粒子と、(b)少なくとも1つの第2の付着部位を有する少なくとも1つの抗原または抗原決定基とを含んだ組成物を含む、ワクチン組成物を提供し、前記抗原または抗原決定基は、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドであり、前記第2の付着部位は、(i)前記抗原または抗原決定基に天然に存在しない付着部位、(ii)前記抗原または抗原決定基に天然に存在する付着部位からなる群から選択され、前記抗原または抗原決定基と前記コア粒子とは、前記会合により相互に作用して、規則正しい反復性抗原アレイを形成する。

#### 【0027】

別の態様では、本発明は、(a)ウイルス様粒子と、(b)少なくとも1つの抗原または抗原決定基とを含んだ組成物を含む、ワクチン組成物を提供し、前記抗原または前記抗原決定基は、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドであり、前記少なくとも1つの抗原または抗原決定基は、前記ウイルス様粒子に結合する。

#### 【0028】

さらに別の態様では、本発明は、(a)ウイルス様粒子を提供する工程と、(b)少なくとも1つの抗原、あるいはIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを提供する工程と、(c)前記ウイルス様粒子と前記少なくとも1つの抗原または抗原決定基を結合して、前記少なくとも1つの抗原または抗原決定基が前記ウイルス様粒子に結合するようにする工程とを含む、請求項1に記載の組成物を生成するためのプロセスを提供する。

#### 【0029】

さらに別の態様では、本発明は、(a)少なくとも1つの第1の付着部位を有するコア粒子を提供する工程と、(b)少なくとも1つの第2の付着部位を有する少なくとも1つの抗原または抗原決定基を提供する工程であって、前記抗原または抗原決定基が、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドであり、前記第2の付着部位が、(i)前記抗原または抗原決定基に天然に存在しない付着部位、(ii)前記抗原または抗原決定基に天然に存在する付着部位からなる群から選択され、前記第2の付着部位が、前記第1の付着部位に会合可能なものである工程と、(c)前記コア粒子と、前記少なくとも1つの抗原または抗原決定基とを結合する工程であって、前記抗原または抗原決定基と前記コア粒子とが前記会合によって相互に作用して、規則正しい反復性抗原アレイを形成する工程とを含む、請求項22に記載の組成物を生成するためのプロセスを

提供する。

【0030】

別の態様では、本発明は、請求項1または請求項22または請求項74に記載の組成物を動物またはヒトに投与する工程を含む、免疫化の方法を提供する。

【0031】

別の態様では、本発明は、好酸球成分によるアレルギー性疾患を治療する薬品を製造するための、請求項1または請求項22または請求項74に記載の組成物の使用を提供する。

【0032】

さらに別の態様では、本発明は、好酸球成分によるアレルギー性疾患、好ましくは喘息を治療しまたは予防する薬品を調製するための、請求項1または請求項22または請求項74に記載の組成物の使用を提供する。さらに別の態様では、本発明は、好酸球成分によるアレルギー性疾患、特に喘息を治療しまたは予防するための組成物、ワクチン、薬物、または薬品を製造するために、請求項1または請求項22または請求項74に記載の組成物を単独でまたは他の薬剤と併せて使用することを提供する。

【0033】

さらに本発明は、特に、好酸球成分によるアレルギー性疾患またはそれに関連した状態を予防しかつ／または軽減させるのに適したワクチン組成物を提供する。本発明はさらに、動物、特に雌ウシ、ヒツジ、ウシ、ならびにヒトにおける、好酸球成分によるアレルギー性疾患またはそれに関連した状態を予防しかつ／または軽減させるための、免疫化およびワクチン接種の方法をそれぞれ提供する。本発明の組成物は、予防的にまたは治療的に使用することができる。

【0034】

特定の実施形態では、本発明は、「自己」遺伝子産物、すなわち本明細書で使用する「自己抗原」によって引き起こされまたは悪化する、好酸球成分によるアレルギー性疾患またはそれに関連した状態を、予防しかつ／または軽減させる方法を提供する。関係する実施形態では、本発明は、「自己」遺伝子産物によって引き起こされまたは悪化する好酸球成分によるアレルギー性疾患またはそれに関連した状態を予防しかつ／または軽減させる抗体の産生をもたらす免疫応答を、動物および個体においてそれぞれ誘発させる方法を提供する。

【0035】

当業者に理解されるように、本発明の組成物を動物またはヒトに投与する場合、その組成物は、塩、緩衝液、アジュバント、またはこの組成物の効能を改善するのに望ましいその他の物質を含有する組成物でよい。医薬品組成物の調製に適した物質の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A. 編、Mack Publishing Co. (1990))を含めた非常に数多くの出典に示されている。

【0036】

本発明の組成物は、その投与が受容者個人によって許容可能である場合、「薬理学的に許容可能」といえる。さらに本発明の組成物は、「治療上有効な量」(すなわち、所望の生理学的効果をもたらす量)で投与される。

【0037】

本発明の組成物は、当技術分野で知られている様々な方法で投与することができるが、通常は注射、輸液、吸入、経口投与、またはその他の適切な物理的方法によって投与される。あるいは組成物は、筋肉内、静脈内、または皮下から投与することができる。投与される組成物の成分には、滅菌水溶液(例えば生理食塩水)、または滅菌非水性溶液または懸濁液が含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルなどの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。担体または密封包帯法を使用して、皮膚の浸透を増すことができ、抗原吸収を高めることができる。

## 【0038】

本発明のその他の実施形態は、当技術分野で知られている事項、下記の本発明の図面および記述、特許請求の範囲に照らし、当業者に明らかにされよう。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0039】

他に特に示さない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本発明を実施した時は試験するにあたり、本明細書に記述するものと同様のまたは均等な任意の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法および材料について以下に記述する。

## 【0040】

## 1. 定義

好酸球成分によるアレルギー性疾患：本明細書で使用される好酸球成分によるアレルギー性疾患という用語は、循環血液または体組織および体液中の好酸球の数が増加する、疾患の状態または条件を指す。好酸球が増加して、疾患状態に直接または間接的な影響が生じる疾患には、喘息、枯草熱、鼻炎、鼻ポリープ、特発性好酸球增多症、アトピー性皮膚炎、皮膚病および発疹、レフラー症候群などの肺疾患、慢性好酸球肺炎、チャウグ・シトラウス症候群、および原因不明の過好酸性症候群が含まれる。当業者なら、好酸球成分によるアレルギー性疾患を理解することができる。

## 【0041】

アミノ酸リンカー：本明細書で使用されるように、本明細書内の「アミノ酸リンカー」は、単なる「リンカー」という用語も同様に、抗原または抗原決定基を第2の付着部位に会合させ、またはより好ましくは第2の付着部位をすでに含みまたは含有し、典型的な場合は、必ずしも必要ではないが、1つのアミノ酸残基として、好ましくはシステイン残基として含みまたは含有する。しかし本明細書で使用する「アミノ酸リンカー」という用語は、アミノ酸残基からなるアミノ酸リンカーが本発明の好ましい実施形態であったとしても、そのようなアミノ酸リンカーがアミノ酸残基のみからなることを示唆するものではない。アミノ酸リンカーのアミノ酸残基は、天然に生ずるアミノ酸または当技術分野で知られている非天然のアミノ酸、全L型または全D型、あるいはこれらの混合物からなることが好ましい。しかし、スルフヒドリル基またはシステイン残基を有する分子を含むアミノ酸リンカーも、本発明に包含される。そのような分子は、C1～C6アルキル、シクロアルキル(C5、C6)、アリール、またはヘテロアリール部分を含むことが好ましい。しかしアミノ酸リンカーの他、好ましくはC1～C6アルキル、シクロアルキル(C5、C6)、アリール、またはヘテロアリール部分を含んで任意のアミノ酸に欠けるリンカーも、本発明の範囲内に包含すべきである。抗原または抗原決定基あるいは任意選択の第2の付着部位とアミノ酸リンカーとの会合は、少なくとも1つの共有結合によることが好ましく、少なくとも1つのペプチド結合によることがより好ましい。

## 【0042】

動物：本明細書で使用する「動物」という用語は、例えばヒト、ヒツジ、オオシカ、シカ、ミンク、哺乳類、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、トリ、ニワトリ、爬虫類、魚、昆虫、およびクモを含むものとする。

## 【0043】

抗体：本明細書で使用する「抗体」という用語は、エピトープまたは抗原決定基に結合することが可能な分子を指す。この用語は、抗体全体と、その抗原結合断片であって、1本鎖抗体を含めたものを含むものとする。抗体は、ヒト抗原結合抗体断片であり、Fab、Fab'およびF(ab')2、Fd、1本鎖Fvs(scfv)、1本鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs(sdfv)、およびVLまたはVHドメインを含んだ断片を含むがこれらに限定するものではないことが、最も好ましい。抗体は、トリおよび哺乳類を含めた任意の動物由来のものから形成することができる。抗体は、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリであることが好ましい。本明細書で使用

する「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、あるいは1つまたは複数のヒト免疫グロブリンに関して遺伝子導入された動物から単離した抗体、および内因性免疫グロブリンを発現しない抗体を含み、例えばKucherlapati他による米国特許第5,939,598号に記載されるものである。

#### 【0044】

**抗原**：本明細書で使用する「抗原」という用語は、抗体に、あるいはMHC分子によって提示される場合にはT細胞レセプター（TCR）に結合可能な分子を指す。本明細書で使用する「抗原」という用語は、T細胞エピトープも包含する。抗原はさらに、免疫系によって認識することができ、かつ／または体液性免疫応答及び／又は細胞免疫応答を引き起こして、B及び／又はTリンパ球の活性化をもたらすことができる。しかしこれは、少なくともある特定の場合には、抗原がTh細胞エピトープを含有しまたは結合し、アジュバントに与えられることを必要とする。抗原は、1つまたは複数のエピトープ（BおよびTエピトープ）を有することができる。上述の特定の反応は、抗原が、典型的な場合には非常に選択性的な手法で、好ましくはその対応する抗体またはTCRと反応し、他の抗原によって引き起こされる可能性のある数多くのその他の抗体またはTCRとは反応しないことを示すものとする。本明細書で使用する抗体は、いくつかの個別の抗原の混合物でもよい。

#### 【0045】

**抗原決定基**：本明細書で使用する「抗原決定基」という用語は、BまたはTリンパ球によって特異的に認識される抗原のタンパク質を指すものとする。抗原決定基に応答するBリンパ球は抗体を産生し、一方Tリンパ球は、細胞及び／又は体液性免疫の媒介に極めて重要なエフェクター機能の増大および確立によって、抗原決定基に応答する。

#### 【0046】

**会合**：本明細書で使用する「会合」という用語は、第1および第2の付着部位に適用されるように、少なくとも1つの非ペプチド結合によることが好ましい第1および第2の付着部位の結合を指す。会合の性質は、共有結合、イオン結合、疎水結合、極性結合、またはこれらの任意の組合せでよく、この会合の性質は共有結合であることが好ましい。

#### 【0047】

**第1の付着部位**：本明細書で使用する「第1の付着部位」という文言は、抗原または抗原決定基上に位置する第2の付着部位が会合し得る、非天然または天然由来の要素を指す。第1の付着部位は、タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、ペプチド、糖、ポリヌクレオチド、天然または合成のポリマー、二次代謝産物または化合物（ビオチン、フルオレセイン、レチノール、ジゴキシゲニン、金属イオン、フェニルメチルスルホニルフルオリド）、またはこれらの組合せ、あるいはその化学反応基でよい。第1の付着部位は、典型的な場合かつ好ましくは、好ましくはウイルス様粒子などのコア粒子の表面に位置する。複数の第1の付着部位は、コアおよびウイルス様粒子の表面にそれぞれ存在し、典型的な場合は繰返し構成体内にある。

#### 【0048】

**第2の付着部位**：本明細書で使用する「第2の付着部位」という文言は、コア粒子およびウイルス様粒子の表面にそれぞれ位置付けられた第1の付着部位が会合し得る、抗原または抗原決定基に会合する要素を指す。抗原または抗原決定基の第2の付着部位は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖、ポリヌクレオチド、天然または合成のポリマー、二次代謝産物または化合物（ビオチン、フルオレセイン、レチノール、ジゴキシゲニン、金属イオン、フェニルメチルスルホニルフルオリド）、またはこれらの組合せ、あるいはその化学反応基でよい。少なくとも1つの第2の付着部位は、抗原または抗原決定基上に存在する。したがって「少なくとも1つの第2の付着部位を有する抗原または抗原決定基」という用語は、抗原または抗原構造であって、少なくとも抗原または抗原決定基と第2の付着部位を含むものを指す。しかし特に、非天然由来の第2の付着部位、すなわち抗原または抗原決定基内に自然に生じないものに関しては、これらの抗原または抗原構造が、

「アミノ酸リンカー」を含む。

【0049】

結合：本明細書で使用する「結合」という用語は、例えば化学的な連結による共有結合、または例えばイオン的相互作用や疎水的相互作用、水素結合などの非供給結合などの、結合または結着を指す。共有結合は、例えばエステル、エーテル、リン酸エステル、アミド、ペプチド、イミド、炭素-イオウ結合、炭素-リン結合などでもよい。「結合」という用語は、「連結」や「融合」、「結着」などの用語よりも広く、これらを含むものである。

【0050】

コートタンパク質：本明細書で使用する「コートタンパク質」という用語は、バクテリオファージまたはRNAファージのカプシド組織体内に組み込むことが可能なバクテリオファージまたはRNAファージのタンパク質を指す。しかし、RNAファージのコートタンパク質遺伝子の特定の遺伝子産物を指す場合は、「CP」という用語を使用する。例えば、RNAファージQのコートタンパク質遺伝子の特定の遺伝子産物を「Q CP」と呼び、一方バクテリオファージQの「コートタンパク質」は、「Q CP」ならびにA1タンパク質を含む。バクテリオファージQのカプシドは、主にQ CPからなり、さらに少量のA1タンパク質を含有する。同様にVLP Q コートタンパク質は、主にQ CPを含有し、さらに少量のA1タンパク質を含有する。

【0051】

コア粒子：本明細書で使用する「コア粒子」という用語は、固有の反復性組織を有する硬質構造を指す。本明細書で使用するコア粒子は、合成プロセスの生成物または生物学的プロセスの産物でもよい。

【0052】

連結：本明細書で使用する「連結」という用語は、共有結合または強力な非共有相互作用による結着を指し、典型的な場合かつ好ましくは、共有結合による結着を指す。本発明では、生物学的に活性な物質を連結させるために当業者によって通常使用される任意の方法を、使用することができる。

【0053】

有効な量：本明細書で使用する「有効な量」という用語は、所望の生物学的効果を実現するのに必要なまたは十分な量を指す。組成物の有効な量は、この選択された結果を実現する量であると考えられ、そのような量は、当業者により日常的な業務として決定することができる。例えば、免疫系障害を治療するのに有効な量とは、免疫系の活性化を引き起こし、それよって、抗原に曝されたときに抗原特異的免疫応答を誘発させるのに必要な量である。この用語は、「十分な量」とも同義である。

【0054】

任意の特定の適用例での有効な量は、治療する疾患や状態、投与される特定の組成物、被験者のサイズ、及び/又は疾患または状態の重症度などのファクターに応じて様々に変えることができる。当業者なら、必要以上の実験を行うことなく、本発明の特定の組成物の有効な量を経験的に決定することができる。

【0055】

エオタキシンタンパク質：本明細書で使用する「エオタキシンタンパク質」という用語は、エオタキシン遺伝子によってコードされたタンパク質を指す。エオタキシンタンパク質の種々の変種は、ヌクレオチド点変異および多形性によってそれぞれ引き起こすことができ、同様に1つまたは複数のヌクレオチドの挿入、欠失、及び/又は置換によって引き起こすことができ、明らかに本発明の範囲内に包含されるべきである。エオタキシンが差次的にグリコシル化した形、ならびにタンパク質分解によって切断された形など、翻訳後修飾によってさらに変化を引き起こすことができる。本明細書で使用する「エオタキシンタンパク質」という用語は、上述の好ましい例も含むがこれらに限定されないエオタキシンタンパク質変種も包含すべきである。

【0056】

エオタキシンペプチド：本明細書で使用する「エオタキシンペプチド」という用語は、エオタキシンタンパク質の一部であり、もとのエオタキシンタンパク質の少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも4個、より好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも6個の連続したアミノ酸を含有し、すなわちエオタキシンタンパク質の一部であり、最も好ましくはB細胞エピトープを含有するエオタキシンタンパク質の折畳み部分であり、さらにより好ましくは中和エピトープを含有するエオタキシンの一部である、任意のペプチドと広く定義される。

【0057】

「エオタキシンペプチド」という用語は、さらに好ましくは、前記エオタキシンペプチドの任意の一部分を包含すべきであり、前記一部分は、エオタキシンタンパク質のNおよび/C末端で1つまたは複数のアミノ酸が欠失することによって得られることが好ましい。エオタキシンペプチドは、例えばエオタキシンペプチドの折畳み、発現、または溶解を促進させるために、あるいはエオタキシンペプチドの精製を促進させるために、真核または原核発現系における組換え発現によって、エオタキシンペプチド単独としてあるいは他のアミノ酸またはタンパク質との融合として、得ることができる。エオタキシンペプチドとVLPまたはカプシドのサブユニットタンパク質との連結を可能にするために、好ましくは少なくとも1つの第2の付着部位をエオタキシンペプチドに付加することができる。あるいはエオタキシンペプチドを、当技術分野で知られている方法を使用して合成することができる。本明細書で使用するエオタキシンペプチドという用語は、好ましくはエオタキシンの3次元表面構造をシミュレートするペプチドも包含すべきである。そのようなエオタキシンペプチドは、必ずしもエオタキシンの連続アミノ酸配列から得るものではなく、エオタキシンからの不連続なアミノ酸残基によって形成することができる。そのようなペプチドは、対応するエオタキシンタンパク質中に存在しないアミノ酸を含有してもよい。

【0058】

エピトープ：本明細書で使用する「エピトープ」という用語は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトにおいて、抗原性または免疫原性活性を有するポリペプチドの連続または不連続な部分を指す。エピトープは、抗体によって、またはMHC分子の場合にはT細胞レセプターを介してT細胞によって認識される。本明細書で使用する「免疫原性エピトープ」は、当技術分野で知られている任意の方法によって決定されるように、動物の抗体応答を引き出したりT細胞応答を誘発させるポリペプチドの一部と定義される（例えばGeysen他、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 81:3998~4002(1983)参照）。本明細書で使用する「抗原性エピトープ」という用語は、当技術分野で周知の任意の方法によって決定されるように、抗体がその抗原を免疫特異的に結合させることができるタンパク質の一部と定義される。免疫特異的結合は、非特異的結合を除外するものであるが、必ずしも他の抗原との交差反応性を除外するものではない。抗原エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。抗原性エピトープはT細胞エピトープでもよく、その場合、MHC分子の場合にはT細胞に免疫特異的に結合することができる。

【0059】

エピトープは、空間構造内に3個のアミノ酸を含むことができるが、これはこのエピトープに独特なものである。一般にエピトープは、少なくとも約5個のそのようなアミノ酸からなり、より一般的には少なくとも約8~10個のそのようなアミノ酸からなる。エピトープが有機分子である場合、ニトロフェニル程度に小さくなる。

【0060】

融合：本明細書で使用する「融合」という用語は、コードヌクレオチド配列のフレーム内の組合せによる、1つのポリペプチド鎖での異なる由来のアミノ酸配列の組合せを指す。「融合」という用語は、末端の一方への付加の他、内部融合、すなわちポリペプチド鎖内への異なる由来の配列の挿入を明らかに包含する。

【0061】

免疫応答：本明細書で使用する「免疫応答」という用語は、B及び/又はTリンパ球及

び／又は抗原提示細胞の活性化または増殖に繋がる体液免疫応答及び／又は細胞免疫応答を指す。しかし、ある場合には、この免疫応答の強度が低くなる可能性があり、本発明による少なくとも1つの物質を使用した場合にしか検出することができなくなる。「免疫原性」は、生きている生物の免疫系を刺激するのに使用される薬剤を指し、したがって免疫系の1つまたは複数の機能が増大し、免疫原性薬剤へと向かう。「免疫原性ポリペプチド」は、アジュバントの存在下でまたは存在しない状態で、単独であってもまたは担体に結合した状態であっても細胞及び／又は体液免疫応答を引き出すポリペプチドである。抗原提示細胞は、活性化できることが好ましい。

#### 【0062】

免疫応答を「高める」物質とは、その物質を添加せずに測定した同じ免疫応答と比べた場合、その物質を添加することによって多少なりとも大きくなりまたは強くなりまたは偏向した免疫応答が観察される物質を指す。例えば細胞障害性T細胞の溶解活性は、例えば免疫化中にその物質を使用してまたは使用せずに得られたサンプルで、<sup>51</sup>Cr放出アッセイを使用して測定することができる。この物質がない場合のCTL溶解活性に比べてCTL溶解活性が高められた物質の量は、抗原に対する動物の免疫応答を高めるのに十分な量と言える。好ましい実施形態では、免疫応答が少なくとも約2倍、より好ましくは約3倍以上、高められる。分泌されたサイトカインの量またはタイプは変えてよい。あるいは、誘発された抗体またはそのサブクラスの量を変えることができる。

#### 【0063】

免疫化：本明細書で使用する、「免疫化する」または「免疫化」という用語あるいはこれに関連する用語は、標的抗原またはエピトープに対して実質的な免疫応答を引き起こす能力を与えることを指す（抗体及び／又は細胞免疫性であってエフェクターCTLなど）。これらの用語は、完全な免疫性をもたらすことを必要とせず、むしろベースラインよりも実質的に大きい免疫応答を生成することを指す。例えば哺乳類は、本発明の方法を適用した後に標的抗原に対する細胞及び／又は体液免疫応答が生じた場合、標的抗原に対して免疫化されたと考えられる。

#### 【0064】

天然由来：本明細書で使用する「天然由来」という用語は、その全体または一部が合成ではなく、自然に存在しまたは産生されることを意味する。

#### 【0065】

非天然：本明細書で使用されるこの用語は、一般に、天然からのものではないことを意味し、より具体的にはこの用語は、人の手によるものであることを意味する。

#### 【0066】

非天然由来：本明細書で使用する「非天然由来」という用語は、一般に、合成したものまたは天然からのものではないことを意味し、より具体的には、この用語は人の手によるものであることを意味する。

#### 【0067】

規則的で反復性の抗原または抗原決定基アレイ：本明細書で使用する「規則的で反復性の抗原または抗原決定基アレイ」という用語は、一般に、抗原または抗原決定基の反復パターンを指し、典型的な場合かつ好ましくは、コア粒子およびウイルス様粒子に対してそれぞれ抗原または抗原決定基が均一な空間配置であることを特徴とする。本発明の一実施形態で、反復パターンは幾何学的パターンでよい。適切な規則的で反復性の抗原または抗原決定基アレイの典型的かつ好ましい例は、厳密に繰り返される準結晶の配列の抗原または抗原決定基を所有するものであり、好ましくは1～30ナノメートルの間隔があり、好ましくは5～15ナノメートルの間隔があるものである。

#### 【0068】

線毛（pili）：本明細書で使用する「線毛」（単数形は「pilus」）は、規則的で反復性のパターンに組織化されたタンパク質モノマー（例えばビリンモノマー）からなる細菌細胞の細胞外構造を指す。さらに線毛は、細菌細胞と宿主細胞表面レセプターとの結着や、細胞間での遺伝子交換、および細胞-細胞認識などのプロセスに関与する構造

である。線毛の例には、1型線毛、P線毛、F1C線毛、S線毛、および987P線毛が含まれる。線毛の追加の例を、以下に示す。

【0069】

線毛様構造：本明細書で使用する「線毛様構造」という文言は、線毛の構造およびタンパク質モノマーからなる構造と同様の特徴を有する構造を指す。「線毛様構造」の一例は、天然の線毛と同一の規則的で反復性のアレイを形成しない修飾ピリンタンパク質を発現する細菌細胞によって形成された構造である。

【0070】

ポリペプチド：本明細書で使用する「ポリペプチド」という用語は、アミド結合（ペプチド結合とも呼ばれる）によって線形に結合したモノマー（アミノ酸）からなる分子を指す。これはアミノ酸の分子鎖を示し、生成物の特定の長さを指すものではない。したがってペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質は、ポリペプチドの定義に含まれる。この用語は、ポリペプチドの発現後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化なども指すものとする。組換えまたは誘導ポリペプチドは、必ずしも指定された核酸配列から翻訳される必要はない。化学合成を含めた任意の手法で生成してもよい。

【0071】

IL-5タンパク質：本明細書で使用する「IL-5タンパク質」という用語は、IL-5遺伝子によってコードされたタンパク質を指す。IL-5タンパク質の種々の変種は、ヌクレオチド点変異および多形性によってそれぞれ誘発させることができ、同様に1つまたは複数のヌクレオチドの挿入、欠失、及び／又は置換によって誘発させることができ、本発明の範囲内に明らかに含まれるべきである。IL-5が差次的にグリコシル化した形、ならびにIL-5がタンパク質分解によって切断された形など、翻訳後修飾によって別の変化を引き起こすことができる。本明細書で使用する「IL-5」という用語は、上述の好ましい例も含むがこれらに限定されないIL-5タンパク質変種も包含すべきである。

【0072】

IL-5ペプチド：本明細書で使用する「IL-5ペプチド」という用語は、IL-5タンパク質の一部であり、もとのIL-5タンパク質の少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも4個、より好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも6個の連続したアミノ酸を含有し、すなわちIL-5タンパク質の一部であり、最も好ましくはB細胞エピトープを含有するIL-5の折畳み部分であり、さらにより好ましくは中和エピトープを含有するIL-5の一部である、任意のペプチドと広く定義される。

【0073】

「IL-5ペプチド」という用語は、さらに好ましくは、前記IL-5ペプチドの任意の一部を包含すべきであり、前記一部分は、IL-5タンパク質のNおよび／C末端で1つまたは複数のアミノ酸が欠失することによって得られることが好ましい。IL-5ペプチドは、例えばIL-5ペプチドの折畳み、発現、または溶解を促進させるために、あるいはIL-5ペプチドの精製を促進させるために、真核または原核発現系における組換え発現によって、IL-5ペプチド単独としてあるいは他のアミノ酸またはタンパク質との融合として、得ることができる。IL-5ペプチドとVLPまたはカプシドのサブユニットタンパク質との連結を可能にするために、好ましくは少なくとも1つの第2の付着部位をIL-5ペプチドに付加することができる。あるいはIL-5ペプチドを、当技術分野で知られている方法を使用して合成することができる。本明細書で使用するIL-5ペプチドという用語は、好ましくはIL-5の3次元表面構造をシミュレートするペプチドも包含すべきである。そのようなIL-5ペプチドは、必ずしもIL-5の連続アミノ酸配列から得る必要はなく、IL-5からの不連続なアミノ酸残基によって形成することができる。そのようなペプチドは、対応するIL-5タンパク質中に存在しないアミノ酸を含有してもよい。

## 【0074】

IL-13タンパク質：本明細書で使用する「IL-13タンパク質」という用語は、IL-13遺伝子によってコードされたタンパク質を指す。IL-13タンパク質の種々の変種は、ヌクレオチド点変異および多形性によってそれぞれ誘発させることができ、同様に1つまたは複数のヌクレオチドの挿入、欠失、及び/又は置換によって誘発させることができ、本発明の範囲内に明らかに含まれるべきである。IL-13が差次的にグリコシル化した形、ならびにIL-13がタンパク質分解によって切断された形など、翻訳後修飾によって別の変化を引き起こすことができる。本明細書で使用する「IL-13」という用語は、上述の好ましい例も含むがこれらに限定されないIL-13タンパク質変種も包含すべきである。

## 【0075】

IL-13ペプチド：本明細書で使用する「IL-13ペプチド」という用語は、IL-13タンパク質の一部であり、もとのIL-13タンパク質の少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも4個、より好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも6個の連続したアミノ酸を含有し、すなわちIL-13タンパク質の一部であり、最も好ましくはB細胞エピトープを含有するIL-13の折畳み部分であり、さらにより好ましくは中和エピトープを含有するIL-13の一部である、任意のペプチドと広く定義される。

## 【0076】

「IL-13ペプチド」という用語は、さらに好ましくは、前記IL-13ペプチドの任意の一部分を包含すべきであり、前記一部分は、IL-13タンパク質のNおよび/C末端で1つまたは複数のアミノ酸が欠失することによって得られることが好ましい。IL-13ペプチドは、例えばIL-13ペプチドの折畳み、発現、または溶解を促進するために、あるいはIL-13ペプチドの精製を促進させるために、真核または原核発現系における組換え発現によって、IL-13ペプチド単独としてあるいは他のアミノ酸またはタンパク質との融合として、得ることができる。IL-13ペプチドとVLPまたはカプシドのサブユニットタンパク質との連結を可能にするために、好ましくは少なくとも1つの第2の付着部位をIL-13ペプチドに付加することができる。あるいはIL-13ペプチドを、当技術分野で知られている方法を使用して合成することができる。本明細書で使用するIL-13ペプチドという用語は、好ましくはIL-13の3次元表面構造をシミュレートするペプチドも包含すべきである。そのようなIL-13ペプチドは、必ずしもIL-13の連続アミノ酸配列から得る必要はなく、IL-13からの不連続なアミノ酸残基によって形成することができる。そのようなペプチドは、対応するIL-13タンパク質中に存在しないアミノ酸を含有してもよい。

## 【0077】

残基：本明細書で使用する「残基」という用語は、ポリペプチドの主鎖または側鎖における特定のアミノ酸を意味するものとする。

## 【0078】

自己抗原：本明細書で使用する「自己抗原」という用語は、宿主のDNAでコードされたタンパク質を指し、宿主のDNAでコードされたタンパク質またはRNAにより生成された生成物は、自己と定義される。さらに、2個またはいくつかの自己分子の組合せから得られ、あるいは自己分子の一部であるタンパク質と、上述の相同性の高い2個の自己分子(>95%、好ましくは>97%、より好ましくは>99%)を有するタンパク質は、自己と見なしてもよい。

## 【0079】

治療：本明細書で使用する「治療」、「治療する」、「治療した」、または「治療している」という用語は、予防及び/又は療法を指す。例えば感染症に対して使用する場合、この用語は、病原体で感染に対する被験者の耐性を増大させ、すなわち言い換れば被験者が病原体に感染したまたは感染に起因する病気の徴候を示す可能性を低下させる予防的治療を指し、同様に、被験者が感染した後にその感染と闘うための治療、例えば感染を軽減

しまではなくし、あるいは悪化するのを防止する治療を指す。好酸球成分によるアレルギー性疾患に対して使用する場合、「治療」という用語は、とりわけかつ好ましくは、アレルギー性好酸球疾患に伴うアレルギー性炎症成分を阻害または減少させる予防的治療または療法を指す。

#### 【 0 0 8 0 】

ワクチン：本明細書で使用する「ワクチン」という用語は、本発明の組成物を含有しつつ動物に投与可能な形態の製剤を指す。典型的な場合、ワクチンは、本発明の組成物を懸濁させまたは溶解させた、従来の生理食塩水または緩衝水溶液媒体を含む。この形態では、本発明の組成物を都合よく使用して、状態を予防し、改善し、またはその他の方法で治療することができる。宿主に導入することにより、ワクチンは、抗体及び／又はサイトカインの産生、及び／又は細胞障害性T細胞、抗原提示細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞の活性化、およびまたはその他の細胞応答も含むがこれらに限定することのない免疫応答を引き起こすことができる。

#### 【 0 0 8 1 】

任意選択で、本発明のワクチンはさらに、本発明の化合物に対して少量または多量の割合で存在可能なアジュvantを含む。本明細書で使用する「アジュvant」という用語は、免疫応答の非特異的刺激物質、または本発明のワクチンと組み合わせたときに免疫応答をさらに高めるデポー剤を宿主内で生成することが可能な物質を指す。様々なアジュvantを使用することができる。例として、完全および不完全フロイントアジュvant、水酸化アルミニウム、および変性ムラミールジペプチドが含まれる。

#### 【 0 0 8 2 】

ウイルス様粒子（VLP）：本明細書で使用する「ウイルス様粒子」は、ウイルス粒子に似ている構造を指す。さらに本発明によるウイルス様粒子は、ウイルスゲノムのすべてまたは一部、特にウイルスゲノムの複製的で感染性の成分が欠けているので、非複製的であり非感染性である。本発明によるウイルス様粒子は、そのゲノムとは異なる核酸を含有してよい。本発明によるウイルス様粒子の典型的かつ好ましい実施形態は、対応するウイルス、バクテリオファージ、またはRNAファージのウイルスカプシドなどのウイルスカプシドである。本明細書で同義として使用される「ウイルスカプシド」または「カプシド」という用語は、ウイルスタンパク質サブユニットからなる高分子組織体を指す。典型的な場合かつ好ましくは、ウイルスタンパク質サブユニットは、固有の反復性組織を備えた構造を有するウイルスカプシドおよびカプシドにそれぞれ組織化され、前記構造は、典型的な場合、球状または管状である。例えばRNAファージまたはHBcAgのカプシドは、対称な正二重面体の球形である。本明細書で使用する「カプシド様構造」という用語は、上記定義した意味でカプシドの形態に似ているが、典型的な対称組織体から逸脱すると共に十分な程度の規則性と反復性を維持する、ウイルスタンパク質サブユニットからなる高分子組織体を指す。

#### 【 0 0 8 3 】

バクテリオファージのウイルス様粒子：本明細書で使用する「バクテリオファージのウイルス様粒子」という用語は、バクテリオファージの構造に似ており、非複製的で非感染性であり、さらに少なくともバクテリオファージの複製機構をコードする遺伝子に欠けているウイルス様粒子、典型的な場合はウイルスの宿主への結着またはウイルスの宿主への進入の原因となるタンパク質をコードする遺伝子にも欠けているウイルス様粒子を指す。しかしこの定義は、前述の遺伝子が依然として存在するが不活性であり、したがってバクテリオファージの非複製的で非感染性のウイルス様粒子が得られる、バクテリオファージのウイルス様粒子も包含すべきである。

#### 【 0 0 8 4 】

RNAファージコートタンパク質のVLP：RNAファージコートタンパク質の180個のサブユニットの自己組織化から形成され、任意選択で宿主RNAを含有するカプシド構造は、「RNAファージコートタンパク質のVLP」と呼ばれる。特定の例は、Qコートタンパク質のVLPである。この特定の場合では、Qコートタンパク質のVLPが

Q C P サブユニットのみから組織化され（例えば抑制によってより長い A 1 タンパク質のすべての発現を除外する T A A 停止コドンを含有した Q C P 遺伝子の発現によって生成、Kozlovska, T. M. 他、*Intervirology* 39: 9~15 (1996)）、または追加としてカプシド組織体中に A 1 タンパク質サブユニットを含有してよい。

【0085】

ウイルス粒子：本明細書で使用する「ウイルス粒子」という用語は、ウイルスの形態学的形状を指す。いくつかのウイルスのタイプでは、タンパク質カプシドで取り囲まれたゲノムを含み、その他のタイプでは、追加の構造（例えば外被や末端部など）を含む。

【0086】

1つ：この開示で「1つ」という用語を使用する場合は、他に特に指示しない限り、「少なくとも1つ」または「1つまたは複数」を意味する。

【0087】

当業者に明らかにされるように、本発明のある特定の実施形態は、クローニングやボリメラーゼ連鎖反応、DNAおよびRNAの精製、原核細胞および真核細胞での組換えタンパク質の発現などの、組換え核酸技術の使用を含む。そのような方法は当業者に周知であり、出版された実験方法マニュアルに都合よく見出すことができる（例えばSambrook, J. 他編、分子クローニング（Molecular Cloning）、実験室マニュアル（A Laboratory Manual）第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)；Ausbel, F. 他編、分子生物学における現代のプロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）、John Wiley & Sons, Inc. (1997)）。組織培養細胞系を用いた基本的な実験室技法（Cellis, J. 編、細胞生物学（Cell Biology）、Academic Press、第2版 (1998)）、および抗体をベースにした技術（Harlow, E. およびLane, D.、抗体（Antibodies）：実験室マニュアル（A Laboratory Manual）、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)；Deutscher, M. P.、「タンパク質精製の手引き（Guide to Protein Purification）」、Meth. Enzymol. 128、Academic Press San Diego (1990)；Scopes, R. K.、タンパク質精製の原理および実践（Protein Purification Principles and Practice）、第3版、Springer-Verlag、New York (1994)）も、文献に十分に記載されており、そのすべてを参考により本明細書に援用する。

【0088】

2. 免疫応答を高めるための組成物および方法

開示される発明は、動物の、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドに対する免疫応答を高めるための、組成物および方法を提供する。本発明の組成物は、(a) 少なくとも1つの第1の付着部位を有するコア粒子と、(b) 少なくとも1つの第2の付着部位を有する少なくとも1つの抗原または抗原決定基とを含み、あるいはこれらからなり、前記抗原または抗原決定基は、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドであり、前記第2の付着部位は、(i) 前記抗原または抗原決定基との天然でない付着部位、(ii) 前記抗原または抗原決定基との天然の付着部位からなる群から選択され、前記第2の付着部位は前記第1の付着部位と会合可能であり、前記抗原または抗原決定基と前記コア粒子とは、前記会合により相互に作用して、規則正しい反復性抗原アレイを形成する。より詳細には、本発明の組成物は、ウイルス様粒子と少なくとも1つの抗原または抗原決定基とを含みあるいはこれらからなり、抗原または抗原決定基は、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドであり、少なくとも1つの抗原または抗原決定基は、規則的で反復性の抗原VL

Pアレイが形成されるようにウイルス様粒子に結合する。さらに本発明によれば、とりわけ好酸球成分によるアレルギー性疾患を治療しかつ／または予防的に阻止するために、そのような組成物を医者が都合よく構成することが可能である。

#### 【0089】

一実施形態では、コア粒子には、ウイルス、細菌線毛、細菌性ピリンから形成された構造、バクテリオファージ、ウイルス様粒子、ウイルスカプシド粒子、またはこれらの組換え形態が含まれる。規則的で反復性の被覆及び／又はコアタンパク質構造を有する当技術分野で知られている任意のウイルスが、本発明のコア粒子として選択することができ、適切なウイルスの例には、シンドビスおよびその他のアルファウイルス、ラブドウイルス（例えば水疱性口内炎ウイルス）、ピコルナウイルス（例えばヒトライノウイルス、アイチウイルス）、トガウイルス（例えば風疹ウイルス）、オルトミクソウイルス（例えばトゴトウイルス、バトケンウイルス、家禽ペストウイルス）、ポリオーマウイルス（例えばポリオーマウイルスB K、ポリオーマウイルスJ C、トリポリオーマウイルスB F D V）、パルボウイルス、ロタウイルス、ノーウォークウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、タバコモザイクウイルス、フロックハウスウイルス、およびヒトパピローマウイルスが含まれ、好ましくはRNAファージ、バクテリオファージQ、バクテリオファージR 17、バクテリオファージM 11、バクテリオファージM X 1、バクテリオファージN L 95、バクテリオファージf r、バクテリオファージG A、バクテリオファージS P、バクテリオファージM S 2、バクテリオファージf 2、バクテリオファージP P 7である（例えばBachmann, M. F. およびZinkernagel, R. M. 、Immunol. Today 17: 553~558 (1996) の表1参照）。

#### 【0090】

別の実施形態では、本発明は、ウイルスの遺伝子工学を利用して、規則的で反復性のウイルス外被タンパク質と、選択された異種タンパク質、ペプチド、抗原決定基、または反応性アミノ酸残基を含む第1の付着部位との融合を生成する。本発明の組成物を構成するには、当技術分野で知られるその他の遺伝子操作を含めることができ、例えば遺伝子の変異により組換えウイルスの複製能力を制限することが望ましい。さらに本発明で使用されるウイルスは、化学的または物理的不活性が原因となって、または示されるように複製適格ゲノムが欠けていることから、複製不可能である。第1の付着部位に融合するよう選択されたウイルスタンパク質は、組織化された繰返し構造を有するべきである。そのような組織化繰返し構造は、ウイルスの表面に、間隔が5~30ナノメートル、好ましくは5~15nmの準結晶質組織を含む。このタイプの融合タンパク質の生成によって、ウイルス表面に、複数の規則的で反復性の第1の付着部位が得られ、天然のウイルスタンパク質の通常の組織化を反映することになる。当業者に理解されるように、第1の付着部位は、任意の適切なタンパク質、ポリペプチド、糖、ポリヌクレオチド、ペプチド（アミノ酸）、天然または合成ポリマー、二次代謝産物、またはこれらの組合せでよく、あるいはこれらの一部でよく、すなわちこれらは抗原または抗原決定基に特異的に結着するよう役立てることができ、それによって規則正しい反復性抗原アレイが得られる。

#### 【0091】

本発明の別の実施形態で、コア粒子は組換えアルファウイルスであり、より詳細には組換えシンビスウイルスである。アルファウイルスは、感染細胞の細胞質で、DNAの中間体なしで、そのゲノムRNA全体を複製するプラス鎖RNAウイルスである（Strauss, J. およびStrauss, E. 、Microbiol. Rev. 58: 491~562 (1994)）。アルファウイルス科のいくつかのメンバー、シンドビス（Xiong, C. 他、サイエンス（Science）243: 1188~1191 (1989) ; Schlesinger, S. 、Trends Biotechnol. 11: 18~22 (1993) ）、セムリキ森林ウイルス（SFV）（Liljestrom, P. & Garoff, H. 、Bio/Technology 9: 1356~1361 (1991) ）、およびその他のもの（Davis, N. L. 他、Virology 171

: 189 ~ 204 (1989) ) は、様々な異なるタンパク質に関するウイルスベースの発現ベクターとして (Lundstrom, K. 、 Curr. Opin. Biotech nol. 8 : 578 ~ 582 (1997) ; Liljestrom, P. 、 Curr. Opin. Biotechnol. 5 : 495 ~ 500 (1994) ) 、さらにワクチン開発の候補物質として使用することを目的に、かなりの注目を集めている。最近、異種タンパク質の発現およびワクチンの開発のためにアルファウイルスを使用することを対象としたいいくつかの特許が発行されている (米国特許第 5,766,602 号; 第 5,792,462 号; 第 5,739,026 号; 第 5,789,245 号、および第 5,814,482 号参照)。本発明のアルファウイルスコア粒子の構成体は、参照により本明細書に援用する前述の論文に記載されている、組換え DNA 技術の分野で一般に知られている手段によって行うことができる。

#### 【0092】

抗原または抗原決定基結着用のウイルスベースのコア粒子を生成するには、様々な異なる組換え宿主細胞を利用することができる。例えばアルファウイルスは、広い宿主範囲を有することが知られており、シンドビスウイルスは、培養した哺乳動物、爬虫類、両性類細胞、ならびにいくつかの昆虫細胞に感染する (Clark, H. 、 J. Natl. Cancer Inst. 51 : 645 (1973) ; Leake, C. 、 J. Gen. Virol. 35 : 335 (1977) ; Stollar, V. 、 THE TOGAVIRUSES, R. W. Schlesinger 編、 Academic Press (1980) 、第 583 ~ 621 頁)。したがって本発明の実施に際して数多くの組換え宿主細胞を使用することができる。BHK、COS、Vero、HeLa、および CHO 細胞が、異種タンパク質の生成に特に適しているが、その理由は、これらの細胞がヒト細胞と同様の手法で異種タンパク質をグリコシル化することができ (Watson, E. 他、糖鎖生物学 (Glycobiology) 4 : 227 (1994) )、選択することができ (Zang, M. 他、 Bio/Technology 13 : 389 (1995) )、または遺伝子工学によって合成することができ (Renner, W. 他、 Biotech. Bioeng. 4 : 476 (1995) ; Lee, K. 他、 Biotech. Bioeng. 50 : 336 (1996) )、それによって血清を含まない培地ならびに懸濁液中で成長させることができるからである。

#### 【0093】

宿主細胞内へのポリヌクレオチドベクターの導入は、標準的な実験室マニュアルに記載されている方法により行うことができ (例えば Sambrook, J. 他編、分子クローニング (MOLECULAR CLONING) 、実験室マニュアル (A LABORATORY MANUAL) 、 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 、第 9 章; Ausbel, F. 他編、分子生物学における現代のプロトコル (CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY) 、 John Wiley & Sons, Inc. (1997) 、第 16 章参照) 、電気穿孔法や DEAE デキストラン媒介型トランスフェクション、トランスフェクション、微量注入、陽イオン脂質媒介型トランスフェクション、形質導入、スクレーブローディング、弾丸導入、および感染などの方法が含まれる。宿主細胞に外因性 DNA 配列を導入する方法は、Felgner, P. 他の米国特許第 5,580,859 号で論じられている。

#### 【0094】

宿主細胞に感染させるには、パッケージの RNA 配列を使用することもできる。このようなパッケージ RNA 配列は、培地に添加することによって宿主細胞に導入することができる。例えば非感染性のアルファウイルス粒子の調製について、「シンドビス発現系 (Sindbis Expression System) 」バージョン C (Invitrogen カタログ番号 K750-1) を含めたいいくつかの出典に記載されている。

#### 【0095】

ウイルスベースのコア粒子を生成するために組換え宿主細胞として哺乳動物細胞を使用する場合、この細胞は一般に、組織培養によって増殖させることになる。培養によって細胞を増殖させる方法は、当技術分野では周知である（例えば、C el i s , J . 編、細胞生物学（ C E L L B I O L O G Y ）、 A c a d e m i c P r e s s 第 2 版（ 1 9 9 8 ）； S a m b r o o k , J . 他編、分子クローニング（ M O L E C U L A R C L O N I N G ）、実験室マニュアル（ A L A B O R A T O R Y M A N U A L ）第 2 版、 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s 、 C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . ( 1 9 8 9 ) ； A u s b e l , F . 他編、分子生物学における現代のプロトコル（ C U R R E N T P R O T O C O L S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y ）、 J o h n H . W i l l e y & S o n s , I n c . ( 1 9 9 7 ) ； F r e s h n e y , R . 、動物細胞の培養（ C U L T U R E O F A N I M A L C E L L S ）、 A l a n R . L i s s , I n c . ( 1 9 8 3 ) 参照）。

#### 【 0 0 9 6 】

本発明のコア粒子としての使用に適している R N A ウイルスの別の例には、下記のものが含まれるが、これらに限定するものではない：すなわちオルトレオウイルス属（哺乳動物とトリレトロウイルスの両方の複数の血清型）、オルビウイルス属（ブルータングウイルス、オイゲナンギーウイルス、ケメロボウイルス、アフリカウマウイルス、およびコロラドダニ熱ウイルス）、ロタウイルス属（ヒトロタウイルス、ネプラスカ子ウシ下痢ウイルス、マウスロタウイルス、サルロタウイルス、ウシまたはヒツジロタウイルス、トリロタウイルス）を含むレオウイルス科；エンテロウイルス属（ポリオウイルス、コクサッキーウイルス A および B 、エコーウイルス（ E C H O ）、 A 、 C 、 D 、 E 、および G 型肝炎ウイルス、サルエンテロウイルス、マウス脳脊髄炎（ M E ）ウイルス、ポリオウイルスマリス（ m u r i s ）、ウシエンテロウイルス、ブタエンテロウイルス）、カルジオウイルス属（脳心筋炎ウイルス（ E M C ）、メンゴウイルス）、ライノウイルス属（少なくとも 1 1 3 のサブタイプを含むヒトライノウイルス；その他のライノウイルス）、アフトウイルス属（口蹄疫（ F M D V ））を含むピコルナウイルス科；ブタ小水疱性発疹ウイルス、サンミゲルアシカウイルス、ネコピコルナウイルス、およびノーウォークウイルスを含むカリシウイルス科；アルファウイルス属（東部ウマ脳脊髄炎ウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、シンドビスウイルス、チクングニヤウイルス、オニヨンニヨンウイルス、ロスリバーウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス）、フラビウイルス属（蚊媒介黄熱病ウイルス、デング熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マリーバレー脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、クンジンウイルス、中欧ダニ媒介ウイルス、極東ダニ媒介ウイルス、キャサヌール森林ウイルス、跳躍病ウイルス、ポワッサンウイルス、オムスク出血性熱ウイルス）、ルビウイルス属（風疹ウイルス）、ペストウイルス属（粘膜病ウイルス、ブタコレラウイルス、ボーダー病ウイルス）を含むトガウイルス科；ブンヤウイルス属（ブンヤムウェラおよび関連するウイルス、カリフォルニア脳炎ウイルス）、フレボウイルス属（シシリアサシチョウバエウイルス、リフトバレー熱ウイルス）、ナイロウイルス属（クリミア - コンゴ出血性熱ウイルス、ナイロビヒツジ病ウイルス）、およびウークウイルス属（ウークニエミおよび関連するウイルス）を含むブンヤウイルス科；インフルエンザウイルス属（インフルエンザウイルス A 型、多くのヒトサブタイプ）を含むオルソミクソウイルス科；ブタインフルエンザウイルス、トリおよびウマインフルエンザウイルス；インフルエンザ B 型（多くのヒトサブタイプ）、およびインフルエンザ C 型（可能な別の属）；パラミクソウイルス属（パラインフルエンザウイルス 1 型、センダイウイルス、 H A ウイルス、パラインフルエンザウイルス 2 ~ 5 型、ニューカッスル病ウイルス、ムンブスウイルス）、麻疹ウイルス属（はしかウイルス、亜急性硬化性全脳炎ウイルス、ジステンパーウイルス、牛痘ウイルス）、ニューモウイルス属（呼吸器合胞体ウイルス（ R S V ）、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、およびマウス肺炎ウイルス）を含むパラミクソウイルス科；森林ウイルス、シンドビスウイルス、チクングニヤウイルス、オニヨンニヨンウイルス、ロスリバーウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス）、フラビウイルス属（蚊媒介黄熱病ウイルス、デングウ

イルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マリーバレー脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、クンジンウイルス、中欧ダニ媒介ウイルス、極東ダニ媒介ウイルス、キヤサヌール森林ウイルス、跳躍病ウイルス、ポワッサンウイルス、オムスク出血性熱ウイルス）、ルビウイルス属（風疹ウイルス）、ペスチウイルス属（粘膜病ウイルス、ブタコレラウイルス、ポーダー病ウイルス）；ブンヤウイルス属（ブンヤムウェラおよび関連するウイルス、カリフォルニア脳炎ウイルス）、フレボウイルス属（シシリアサシチョウバエウイルス、リフトバレー熱ウイルス）、ナイロウイルス属（クリミアン・コンゴ出血性熱ウイルス、ナイロビヒツジ病ウイルス）、およびウークウイルス属（ウークニエミおよび関連するウイルス）を含むブンヤウイルス科；インフルエンザウイルス属（インフルエンザウイルスA型、多くのヒトサブタイプ）を含むオルソミクソウイルス科；ブタインフルエンザウイルス、トリおよびウマインフルエンザウイルス；インフルエンザB型（多くのヒトサブタイプ）、およびインフルエンザC型（可能な別の属）；パラミクソウイルス属（パラインフルエンザウイルス1型、センダイウイルス、H Aウイルス、パラインフルエンザウイルス2～5型、ニューカッスル病ウイルス、ムンブスウイルス）、麻疹ウイルス属（はしかウイルス、亜急性硬化性全脳炎ウイルス、ジステンパーウイルス、牛痘ウイルス）、ニューモウイルス属（呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、およびマウス肺炎ウイルス）を含むパラミクソウイルス科；ベシクロウイルス属（VSV）（チャンディプラウイルス、フランダース・ハートパークウイルス）、リッサウイルス属（狂犬病ウイルス）、フィッシュラブドウイルス、およびフィロウイルス（マーブルグウイルスおよびエボラウイルス）を含むラブドウイルス科；リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCM）、タカリベウイルス複合体、およびラッサウイルスを含むアレナウイルス科；伝染性気管支炎ウイルス（IBV）、マウス肝炎ウイルス、ヒト腸炎コロナウイルス、およびネコ伝染性腸炎ウイルスを含むコロナウイルス科のメンバーである。

#### 【0097】

コア粒子として使用することができる例示的なDNAウイルスには下記のものが含まれるが、これらに限定されない。すなわち、オルソポックスウイルス属（大痘瘡、小痘瘡、サル痘ワクシニア、牛痘、バッファロー痘ウイルス、家兔痘、エクトロメリア）、レボリポックスウイルス属（粘液腫、線維腫）、アビポックスウイルス属（鶏痘、その他のトリポックスウイルス）、カプリポップスウイルス属（ヒツジ痘、ヤギ痘）、スイポックスウイルス属（豚痘）、パラポックスウイルス（伝染性膿疱性皮膚炎ウイルス、偽牛痘、ウシ丘疹性口内炎ウイルス）を含むポックスウイルス科；イリドウイルス科（アフリカブタ熱ウイルス、カエルウイルス2および3型、魚のリンホシスチウイルス）；ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス1および2型、水痘帶状疱疹、ウマ流産ウイルス、ウマヘルペスウイルス2および3型、仮性狂犬病ウイルス、伝染性ウシ角結膜炎ウイルス、伝染性ウシ鼻気管炎ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス）、ヘルペスウイルス（ヒトサイトメガロウイルス、ブタ、サル、およびげっ歯類のサイトメガロウイルス）を含むヘルペスウイルス科；ヘルペスウイルス（エプスタイン・バーウイルス（EBV）、マレック病ウイルス、ヘルペスsaimiri、ヘルペスウイルஸatelines、ヘルペスウイルஸsyphilagus、モルモットヘルペスウイルス、リュッケ腫瘍ウイルス）；マストアデノウイルス属（ヒトサブグループA、B、C、D、およびEと、分類されていないもの）、サルアデノウイルス（少なくとも23の血清型）、伝染性イヌ肝炎、ウシ、ブタ、ヒツジ、カエル、および多くのその他の種のアデノウイルス、アビアデノウイルス属（トリアデノウイルス）を含むアデノウイルス科；非培養性アデノウイルス；パピローマウイルス属（ヒトパピローマウイルス、ウシパピローマウイルス、ショープウサギパピローマウイルス、その他の種の様々な病原性パピローマウイルス）、ポリオーマウイルス属（ポリオーマウイルス、サル空胞剤（SV-40）、ウサギ空胞剤（RKV）、Kウイルス、BKウイルス、JCウイルス、およびリンパ増殖性パピローマウイルスなどのその他の靈長類のポリオーマウイルス）を含むパポウイルス科；アデノ隨伴ウイルス属、パルボウイルス属（ネコ汎白血球減少症ウイルス、ウシパルボウイルス、イヌパルボウイルス、アリューシャンミンク病ウイルスなど）を含むパルボウイルス科である。

る。最後に、DNAウイルスには、慢性伝染性神経障害剤（CHINAウイルス）などのウイルスを含めることができる。

#### 【0098】

その他の実施形態では、細菌性ピリン、細菌性ピリンの小部分、あるいは細菌性ピリンまたはその小部分を含有する融合タンパク質を使用して、本発明の組成物およびワクチン組成物をそれぞれ調製することができる。ピリンタンパク質の例には、大腸菌、インフルエンザ菌、ナイセリアメンインギチジス（*Neisseria meningitidis*）、淋菌、カウロバクタークレセンタス（*Caulobacter crescentus*）、シュードモナス・スタツツエリ（*Pseudomonas stutzeri*）、および緑膿菌によって生成されたピリンが含まれる。本発明と共に使用するのに適したピリンタンパク質のアミノ酸配列には、GenBankレポートAJ000636（配列番号1）、AJ132364（配列番号2）、AF229646（配列番号3）、AF051814（配列番号4）、AF051815（配列番号5）、およびX00981（配列番号6）に記載されたものが含まれ、その開示の全体を参照により本明細書に援用する。

#### 【0099】

細菌性ピリンタンパク質は、一般に、タンパク質を細菌性ペリプラズムへと移出する前に、N末端リーダー配列が除去されるようにプロセッシングされる。さらに当業者に理解されるように、本発明の組成物およびワクチン組成物をそれぞれ調製するのに使用される細菌性ピリンタンパク質は、一般に、天然に存在するリーダー配列を持たない。

#### 【0100】

本発明での使用に適するピリンタンパク質の1つの特定の例は、*E. coli*のPピリンである（GenBankレポートAF237482（配列番号7））。本発明と共に使用するのに適した1型*E. coli*ピリンの例は、GenBankレポートP04128に記載されたアミノ酸配列（配列番号8）を有するピリンであり、これは、GenBankレポートM27603に記載されたヌクレオチド配列（配列番号9）を有する核酸でコードされたものである。これらGenBankレポートの開示全体を、参照により本明細書に援用する。同様に、一般に上記タンパク質の成熟形態を使用して、本発明の組成物およびワクチン組成物をそれぞれ調製することができる。

#### 【0101】

本発明を実施する際、使用に適する細菌性ピリンまたはピリン小部分は、一般に規則正しい反復性抗原アレイが形成されるよう会合することができる。

#### 【0102】

ピリンおよび線毛様構造を生体外で調製する方法は、当技術分野で知られている。例えばBullitt他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12890~12895(1996)は、*E. coli* P線毛サブユニットのin vitro再構成体について述べている。さらにEshdat他、J. Bacteriol. 148:308~314(1981)は、*E. coli*の1型線毛の解離および線毛の再構成体に適した方法について述べている。簡単に言えば、これらの方法は以下の通りである。すなわち線毛を、飽和塩酸グアニジン中、37でインキュベートすることによって解離させる。次いでピリンタンパク質をクロマトグラフィーで精製し、その後、5mMのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩（pH 8.0）に対して透析することにより、ピリンダイマーを形成する。Eshdat他は、5mM MgCl<sub>2</sub>を含有する5mMのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（pH 8.0）に対して透析することにより、ピリンダイマーが再会合して線毛を形成することも見出した。

#### 【0103】

さらに、例えば従来の遺伝子工学およびタンパク質変性方法を使用して、抗原または抗原決定基が第2の付着部位を介して結合される第1の付着部位が含まれるように、ピリンタンパク質を変性させることができる。あるいは抗原または抗原決定基は、第2の付着部位を介して、これらのタンパク質中に自然に存在するアミノ酸残基に直接結合することができる。次いでこれらの変性ピリンタンパク質を、本発明のワクチン組成物に使用するこ

とができる。

#### 【0104】

本発明の組成物およびワクチン組成物をそれぞれ調製するのに使用される細菌性ピリンタンパク質は、H B c A g に関して本明細書で述べた場合と同様の手法で変性させることができる。例えばシスティンおよびリジン残基は、欠失させることができ、または他のアミノ酸残基で置換することができ、第1の付着部位をこれらのタンパク質に付加することができる。さらにピリンタンパク質を、変性した形で発現させることができ、または発現後に化学的に変性させることができる。同様に、無傷の線毛を細菌から収集し、次いで化学的に変性させることができる。

#### 【0105】

別の実施形態では、線毛または線毛様構造を細菌（例えばE. coli）から収集し、これを使用して本発明の組成物およびワクチン組成物を形成する。組成物およびワクチン組成物の調製に適した線毛の一例は、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するピリンモノマーから形成された、E. coliの1型線毛である。

#### 【0106】

細菌線毛を収集する方法のいくつかは、当技術分野で知られている。例えばBullittおよびMakowski (Biophys. J. 74: 623~632 (1998))は、E. coliからP線毛を収集するための線毛精製方法について述べている。この方法によれば、線毛は、P線毛プラスミドを含有する過度に線毛化したE. coliから剪断され、溶解およびMgCl<sub>2</sub> (1.0M)沈殿のサイクルによって精製される。

#### 【0107】

収集した後、線毛または線毛様構造を様々な方法で変性させることができる。例えば第1の付着部位は、第2の付着部位を介して抗原または抗原決定基を結着させることができる線毛に付加することができる。言い換えれば、細菌線毛または線毛様構造を収集して変性させることにより、規則正しい反復性抗原アレイを得ることができる。

#### 【0108】

抗原または抗原決定基は、線毛または線毛様構造内に存在する、天然に生ずるシスティン残基またはリジン残基に結合することができる。そのような場合、天然に生ずるアミノ酸残基が高度に配列され繰り返されることにより、抗原または抗原決定基と線毛または線毛様構造とが連結するようになる。例えば線毛または線毛様構造は、異種2官能性架橋剤を使用して、抗原または抗原決定基の第2の付着部位に結合することができる。

#### 【0109】

生物体によって自然に合成される構造（例えば線毛）を使用して本発明の組成物およびワクチン組成物を調製する場合、所望の特徴を有する構造が生成されるように、これらの生物体を遺伝子工学を使用して合成することがしばしば有利になる。例えばE. coliの1型線毛を使用する場合、この線毛が収集されるE. coliは、特定の特徴を備えた構造が生成されるように、変性させることができる。ピリンタンパク質の可能な変性例には、1つまたは複数のリジン残基の挿入、1つまたは複数の天然に存在するリジン残基の欠失または置換、1つまたは複数の天然に存在するシスティン残基の欠失または置換が含まれる（例えば、配列番号8の位置44および84のシスティン残基）。

#### 【0110】

さらに、追加の変性をピリン遺伝子に行うことができ、その結果、リジン残基以外の第1の付着部位を含有する発現生成物が得られる（例えばFOSまたはJUNドメイン）。当然ながら一般に、適切な第1の付着部位は、本発明のワクチン組成物での使用に適する線毛または線毛様構造をピリンタンパク質が形成するのを妨げないものに限定される。

#### 【0111】

細菌細胞内に自然に存在するピリン遺伝子は、生体内で変性させることができ（例えば同種組換えによって）、または特定の特徴を備えたピリン遺伝子を、これらの細胞に挿入することができる。例えばピリン遺伝子は、複製可能なクローニングベクターまたは細菌染色体に挿入されるベクターの成分として、細菌細胞に導入することができる。挿入され

たピリン遺伝子は、発現調節制御配列（例えば 1 a c オペレーター）に結合してもよい。

【 0 1 1 2 】

ほとんどの場合、本発明の組成物およびワクチン組成物でそれぞれ使用される線毛または線毛様構造は、單一タイプのピリンサブユニットからなる。同一サブユニットからなる線毛または線毛様構造は、高度に配列されかつ繰り返された抗原アレイを提示する構造を形成することが予想されるので、一般的に使用される。

【 0 1 1 3 】

しかし本発明の組成物は、異質なピリンサブユニットから形成された線毛または線毛様構造を含んだ組成物およびワクチンも含む。これらの線毛または線毛様構造を形成するピリンサブユニットは、細菌細胞内に自然に存在する遺伝子から発現させることができ、または細菌細胞に導入することができる。天然に存在するピリン遺伝子と導入した遺伝子は共に、線毛または線毛様構造を形成する細胞内で発現し、その結果、一般にこれらのピリンタンパク質の混合物から形成された構造になる。さらに、2個以上のピリン遺伝子が細菌細胞内で発現した場合、各ピリン遺伝子の相対的な発現は典型的な場合、線毛または線毛様構造における異なるピリンサブユニットの比を決定するファクターになる。

【 0 1 1 4 】

混合型ピリンサブユニットの特定の組成物を有する線毛または線毛様構造が望まれる場合、ピリン遺伝子の少なくとも1つの発現は、異種誘発性プロモーターによって調節することができる。他の遺伝要素と同様にそのようなプロモーターを使用して、細菌細胞内で產生される異なるピリンサブユニットの相対的な量を調節することができ、したがって線毛または線毛様構造の組成を調節することができる。

【 0 1 1 5 】

さらに、抗原または抗原決定基は、ペプチド結合ではない結合によって細菌線毛または線毛様構造に結合することができ、本発明の組成物に使用される線毛または線毛様構造を產生する細菌細胞を遺伝子工学により合成して、抗原または抗原決定基と融合するピリンタンパク質を生成することができる。線毛または線毛様構造を形成するそのような融合タンパク質は、本発明のワクチン組成物で使用するのに適している。

【 0 1 1 6 】

本願におけるウイルス様粒子は、ウイルス粒子に似ているが病原体ではない構造を指す。一般にウイルス様粒子はウイルスゲノムに欠けており、したがって非感染性である。またウイルス様粒子は、異種発現によって大量に生成することもでき、容易に精製することもできる。

【 0 1 1 7 】

好ましい実施形態で、ウイルス様粒子は組換えウイルス様粒子である。当業者なら、組換えDNA技術と一般に公開されているウイルスコード配列とを使用して、VLPを生成することができる。例えばウイルス外被またはコアタンパク質のコード配列は、ウイルスプロモーターの調節制御の下、市販のバキュロウイルスベクターを使用するバキュロウイルス発現ベクターにおける発現を目的として設計製作することができるが、この場合、配列の適切な変更によってコード配列と調節配列との機能的連鎖が可能になる。ウイルス外被またはコアタンパク質のコード配列は、例えば細菌発現ベクターでの発現を目的として設計製作することもできる。

【 0 1 1 8 】

VLPの例には、B型肝炎ウイルスのカプシドタンパク質 (U1rich他、Virus Res. 50: 141~182 (1998))、はしかウイルス (Warnes他、遺伝子 (Gene) 160: 173~178 (1995))、シンドビスウイルス、口タウイルス (米国特許第5,071,651号および米国特許第5,374,426号)、口蹄疫ウイルス (Twomey他、ワクチン (Vaccine) 13: 1603~1610 (1995))、ノーウォークウイルス (Jiang, X.他、サイエンス (Science) 250: 1580~1583 (1990); Matsui, S. M.他、J. Clin. Invest. 87: 1456~1461 (1991))、レトロウイルスGA

Gタンパク質 (WO 96 / 30523)、レトロトランスポゾン Ty タンパク質 p 1、B型肝炎ウイルスの表面タンパク質 (WO 92 / 11291)、ヒトパピローマウイルス (WO 98 / 15631)、RNAファージ、Ty、fr ファージ、GA ファージ、および Q ファージが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0119】

当業者に容易に明らかにされるように、本発明の VLP は、いかなる特定の形態にも限定するものではない。粒子は、化学的に合成することができ、あるいは自然のまたは非自然の生物学的プロセスを経て合成することができる。例として、このタイプの実施形態は、ウイルス様粒子またはその組換え形態を含む。

#### 【0120】

より特定の実施形態では、VLP は、口タウイルスの組換えポリペプチド、ノーウォークウイルスの組換えポリペプチド、アルファウイルスの組換えポリペプチド、口蹄疫ウイルスの組換えポリペプチド、はしかウイルスの組換えポリペプチド、シンドビスウイルスの組換えポリペプチド、ポリオーマウイルスの組換えポリペプチド、レトロウイルスの組換えポリペプチド、B型肝炎ウイルスの組換えポリペプチド (例えば H B c A g)、タバコモザイクウイルスの組換えポリペプチド、フロックハウスウイルスの組換えポリペプチド、ヒトパピローマウイルスの組換えポリペプチド、バクテリオファージの組換えポリペプチド、RNA ファージの組換えポリペプチド、Ty の組換えポリペプチド、fr ファージの組換えポリペプチド、GA ファージの組換えポリペプチド、および Q ファージの組換えポリペプチドから選択された、組換えポリペプチドまたはその断片を含むことができ、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。ウイルス様粒子はさらに、そのようなポリペプチドの 1 つまたは複数の断片、ならびにそのようなポリペプチドの変種を含むことができ、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。ポリペプチドの変種は、例えばこれに対応する野生型との同一性が、アミノ酸レベルで少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、または 99% である。

#### 【0121】

好ましい実施形態で、ウイルス様粒子は、RNA ファージの組換えタンパク質またはその断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。RNA ファージは、a) バクテリオファージ Q、b) バクテリオファージ R 17、c) バクテリオファージ fr、d) バクテリオファージ GA、e) バクテリオファージ SP、f) バクテリオファージ MS 2、g) バクテリオファージ M 11、h) バクテリオファージ MX 1、i) バクテリオファージ NL 95、k) バクテリオファージ f 2、および l) バクテリオファージ PP 7 からなる群から選択されることが好ましい。

#### 【0122】

本発明の別の好ましい実施形態では、ウイルス様粒子が、RNA バクテリオファージ Q または RNA バクテリオファージ fr の組換えタンパク質またはその断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。

#### 【0123】

本発明の別の好ましい実施形態で、組換えタンパク質は、RNA ファージのコートタンパク質を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。

#### 【0124】

したがって、VLP のカプシドを形成する RNA ファージコートタンパク質、あるいはカプシドまたは VLP への自己組織体に適合したバクテリオファージコートタンパク質の断片は、本発明のさらに好ましい実施形態である。例えばバクテリオファージ Q コートタンパク質は、E. coli 内で組換えによって発現することができる。さらにそのような発現の後、これらのタンパク質は自然発生的にカプシドを形成する。さらにこれらのカプシドは、固有の繰返し編成を持つ構造を形成する。

#### 【0125】

本発明の組成物を調製するのに使用可能なバクテリオファージコートタンパク質の特定の好ましい例には、バクテリオファージ Q (配列番号 10; PIR データベース、受入

番号 V C B P Q 、 Q C P を指す。配列番号 1 1 ; 受入番号 A A A 1 6 6 6 3 、 Q A 1 タンパク質を指す。) 、 バクテリオファージ R 1 7 ( 配列番号 1 2 ; P I R 受入番号 V C B P R 7 ) 、 バクテリオファージ f r ( 配列番号 1 3 ; P I R 受入番号 V C B P F R ) 、 バクテリオファージ G A ( 配列番号 1 4 ; G e n B a n k 受入番号 N P - 0 4 0 7 5 4 ) 、 バクテリオファージ S P ( 配列番号 1 5 ; G e n B a n k 受入番号 C A A 3 0 3 7 4 、 S P C P を指す。配列番号 1 6 ; 受入番号、 S P A 1 タンパク質を指す。) 、 バクテリオファージ M S 2 ( 配列番号 1 7 ; P I R 受入番号 V C B P M 2 ) 、 バクテリオファージ M 1 1 ( 配列番号 1 8 ; G e n B a n k 受入番号 A A C 0 6 2 5 0 ) 、 バクテリオファージ M X 1 ( 配列番号 1 9 ; G e n B a n k 受入番号 A A C 1 4 6 9 9 ) 、 バクテリオファージ N L 9 5 ( 配列番号 2 0 ; G e n B a n k 受入番号 A A C 1 4 7 0 4 ) 、 バクテリオファージ f 2 ( 配列番号 2 1 ; G e n B a n k 受入番号 P 0 3 6 1 1 ) 、 バクテリオファージ P P 7 ( 配列番号 2 2 ) などの、 R N A バクテリオファージのコートタンパク質が含まれる。さらに、 バクテリオファージ Q の A 1 タンパク質、あるいはその C 末端から 1 0 0 、 1 5 0 、 または 1 8 0 のアミノ酸を失った C 末端切断型を、 Q コートタンパク質のカプシド組織体に組み込むことができる。一般に、カプシド組織体における Q C P に対する Q A 1 タンパク質のパーセンテージは、カプシドの形成を確実にするために、限定されている。

## 【 0 1 2 6 】

Q コートタンパク質は、 E . c o l i で発現した場合、カプシドに自己組織化することも見出されている ( K o z l o v s k a T M . 他、 遺伝子 ( G E N E ) 1 3 7 : 1 3 3 ~ 1 3 7 ( 1 9 9 3 ) ) 。得られたカプシドまたはウイルス様粒子は、 直径 2 5 n m 、 T = 3 の、 準対称的な正二十面体のファージ様カプシド構造を示した。さらに、 ファージ Q の結晶構造も解析された。カプシドは、コートタンパク質の 1 8 0 のコピーを含有するが、 これらのコピーは、ジスルフィド架橋によって共有 5 量体または 6 量体に結合しており ( G o l m o h a m m a d i , R . 他、 構造 ( S t r u c t u r e ) 4 : 5 4 3 ~ 5 5 5 4 ( 1 9 9 6 ) ) 、 Q コートタンパク質のカプシドは極めて安定した状態になる。しかし、組換え Q コートタンパク質から作製された V L P のカプシドは、ジスルフィド結合を介してカプシド内の他のサブユニットに結合していないかまたは不完全に結合しているサブユニットを含有する可能性がある。したがって組換え Q カプシドを非還元 S D S - P A G E に導入することによって、モノマー Q コートタンパク質に対応するバンドならびに Q コートタンパク質の 6 量体または 5 量体に対応するバンドが目に見えるようになる。不完全なジスルフィド結合サブユニットは、非還元 S D S - P A G E で、 2 量体、 3 量体、 または 4 量体のバンドとしても現れる。 Q カプシドタンパク質は、有機溶媒および編成剤に対しても異常な耐性を示す。意外なことに本発明者等は、 D M S O およびアセトニトリルの濃度が 3 0 % 程度でありグアニジン濃度が 1 M 程度であると、カプシドの安定性に影響が生じないことを観察した。 Q コートタンパク質のカプシドの安定性が高いことは、本発明による哺乳類およびヒトの免疫化およびワクチン接種で使用する場合に、特に有利な特徴である。

## 【 0 1 2 7 】

E . c o l i での発現後、 Q コートタンパク質の N 末端メチオニンは、 S t o 1 1 , E . 他、 J . B i o l . C h e m . 2 5 2 : 9 9 0 ~ 9 9 3 ( 1 9 7 7 ) に記載されている N 末端 E d m a n 配列決定によって本発明者等が観察したように、通常は除去される。 N 末端メチオニンが除去されていない Q コートタンパク質から構成された V L P 、あるいは N 末端メチオニンが切断されまたは存在する Q コートタンパク質の混合物を含む V L P も、本発明の範囲内にある。

## 【 0 1 2 8 】

別の R N A ファージコートタンパク質も、細菌宿主内で発現した後に自己組織化することが示されている ( K a s t e l e i n , R A . 他、 遺伝子 ( G e n e ) 2 3 : 2 4 5 ~ 2 5 4 ( 1 9 8 3 ) 、 K o z l o v s k a y a , T M . 他、 D o k l . A k a d . N a u k S S S R 2 8 7 : 4 5 2 ~ 4 5 5 ( 1 9 8 6 ) 、 A d h i n , M R . 他、 V i r o

logy 170: 238~242 (1989)、Ni, CZ. 他、Protein Sci. 5: 2485~2493 (1996)、Priano, C. 他、J. Mol. Biol. 249: 283~297 (1995)）。Q ファージカプシドは、コートタンパク質の他に、いわゆる読抜けタンパク質 A1 および成熟タンパク質 A2 を含有する。A1 は UGA 停止コドンで抑制によって生成され、その長さは 329aa である。本発明で使用されるファージ Q 組換えコートタンパク質のカプシドは、A2 溶解タンパク質に欠けており、宿主からの RNA を含有する。RNA ファージのコートタンパク質は、RNA 結合タンパク質であり、ウイルスのライフサイクル中に翻訳抑制因子として働くレプリカーゼ遺伝子のリボソーム結合部位のステムループと相互に作用する。この相互作用の配列および構造要素は知られている (Witherell, GW. & Uhlenbeck, OC. 、生化学 (Biochemistry) 28: 71~76 (1989); Lim, F. 他、J. Biol. Chem. 271: 31839~31845 (1996))。ステムループおよび RNA は一般に、ウイルス組織体に関与することが知られている (Golmohammadi, R. 他、構造 (Structure) 4: 543~5554 (1996))。

## 【0129】

本発明の別の好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、RNA ファージの組換えタンパク質またはその断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなり、この組換えタンパク質は、RNA ファージの変異コートタンパク質、好ましくは上述の RNA ファージの変異コートタンパク質を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。別の好ましい実施形態では、置換によって少なくとも 1 つのリジン残基を除去することにより、または置換によって少なくとも 1 つのリジン残基を付加することにより、RNA ファージの変異コートタンパク質を変性させ、あるいは、少なくとも 1 つのリジン残基の欠失により、または挿入によって少なくとも 1 つのリジン残基を付加することにより、RNA ファージの変異コートタンパク質を変性させた。

## 【0130】

別の好ましい実施形態で、ウイルス様粒子は、RNA バクテリオファージ Q の組換えタンパク質またはその断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなり、この組換えタンパク質は、配列番号 10 のアミノ酸配列を有するコートタンパク質、あるいは配列番号 10 と配列番号 11 のアミノ酸配列を有するコートタンパク質の混合物、あるいは配列番号 11 の変異体を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなり、N 末端メチオニンは切断されていることが好ましい。

## 【0131】

本発明のさらに好ましい実施形態で、ウイルス様粒子は Q の組換えタンパク質またはその断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなり、この組換えタンパク質は、変異 Q コートタンパク質を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。別の好ましい実施形態では、置換による少なくとも 1 つのリジン残基の除去によって、または置換による少なくとも 1 つのリジン残基の付加によって、これらの変異コートタンパク質を変性させた。あるいは、少なくとも 1 つのリジン残基の欠失によって、または挿入による少なくとも 1 つのリジン残基の付加によって、これらの変異コートタンパク質を変性させた。

## 【0132】

Q タンパク質のカプシド表面には 4 個のリジン残基が露出する。露出したリジン残基に代わってアルギニンが配置された Q 变異体も、本発明で使用することができる。したがって本発明を実施する際には、下記の Q コートタンパク質変異体および変異 Q V LP を使用することができる：「Q - 240」(Lys 13 - Arg; 配列番号 23)、「Q - 243」(Asn 10 - Lys; 配列番号 24)、「Q - 250」(Lys 2 - Arg、Lys 13 - Arg; 配列番号 25)、「Q - 251」(配列番号 26) および「Q - 259」(Lys 2 - Arg、Lys 16 - Arg; 配列番号 27)。したがって本発明のさらに好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、a) 配列番号 23

のアミノ酸配列、b)配列番号24のアミノ酸配列、c)配列番号25のアミノ酸配列、d)配列番号26のアミノ酸配列、およびe)配列番号27のアミノ酸配列の群から選択されたアミノ酸配列を有するタンパク質を含む、変異Q コートタンパク質の組換えタンパク質を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。上述のQ コートタンパク質、変異Q コートタンパク質VLPおよびカプシドの構成体、発現、および精製のそれぞれは、2002年1月18日に本願の譲受人によって出願された係属中の米国出願第10/050,902号に開示されている。特に本明細書では、上述の出願の実施例18を参照する。

#### 【0133】

本発明のさらに好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、Q の組換えタンパク質またはその断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなり、この組換えタンパク質は、前述のQ 変異体のいずれか1つと対応するA1タンパク質との混合物を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。

#### 【0134】

本発明のさらに好ましい実施形態で、ウイルス様粒子は、RNAファージAP205の組換えタンパク質またはその断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。

#### 【0135】

AP205ゲノムは、成熟タンパク質、コートタンパク質、レプリカーゼ、および関連するファージに存在しない2つのオープンリーディングフレームからなり；溶解遺伝子およびオープンリーディングフレームは、成熟遺伝子の翻訳で役割を果たす(Klovin, J.、他、J. Gen. Virol. 83: 1523~33(2002))。AP205コートタンパク質は、プラスミドpAP283-58(配列番号94)から発現することができるが、これはpQb10の誘導体であり(Kozlovska, T. M. 他、遺伝子(Gene)137: 133~37(1993))、AP205リボソーム結合部位を含むものである。あるいはAP205コートタンパク質は、ベクターに存在するリボソーム結合部位の下流でpQb185にクローニングすることができる。いずれの手法も、その全体を参照により援用する2002年7月16日に本願譲受人によって出願された「分子抗原アレイ(Molecular Antigen Arrays)」という名称の同時係属の米国仮特許出願に記載されているように、タンパク質を発現させ、カプシドを形成する。ベクター-pQb10およびpQb185は、pGEMベクターから得られたベクターであり、これらのベクターでクローニングされた遺伝子の発現は、trpプロモーターによって制御される(Kozlovska, T. M. 他、遺伝子(Gene)137: 133~37(1993))。プラスミドpAP283~58(配列番号79)は、XbaI部位の下流でありかつAP205コートタンパク質のATG開示コドンのすぐ上流に、以下の配列の推定AP205リボソーム結合部位を含む:tctagaATTCTGGCGCCAAAGTGAGGAAATCACatg。ベクター-pQb185は、XbaI部位の下流でありかつ開始コドンの上流に、シャイン-ダルガーノ配列を含む(tctagaTTAACCCAACGCGTGGAGTCAGGCCatg、下線はシャイン-ダルガーノ配列)。

#### 【0136】

本発明のさらに好ましい実施形態で、ウイルス様粒子は、RNAファージAP205の組換えコートタンパク質またはその断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。

#### 【0137】

したがって本発明のこの好ましい実施形態は、カプシドを形成するAP205コートタンパク質を含む。そのようなタンパク質は、組換えによって発現させ、または自然源から調製する。細菌内で生成されたAP205コートタンパク質は、電子顕微鏡(EM)および免疫拡散法によって明らかにされるように、自発的にカプシドを形成する。AP205コートタンパク質(配列番号80)によって形成されたカプシドおよびAP205 RN

A ファージのコートタンパク質によって形成されたカプシドの構造的特性は、EMで見た場合にほとんど見分けがつかない。AP205 VLPは免疫原性が高く、抗原及び/又は抗原決定基に結合して、繰り返し向きが定められた抗原及び/又は抗原決定基を示すワクチン構成体を生成することができる。そのように示された抗原に対して高い力価が引き出され、結合した抗原及び/又は抗原決定基は抗体分子と相互に作用し易く、免疫原性であることが示される。

#### 【0138】

本発明のさらに好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、RNAファージAP205の組換え変異コートタンパク質またはその断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。

#### 【0139】

本発明を実施する際、アミノ酸5でプロリンがトレオニンに置換されたAP205コートタンパク質(配列番号81)を含む、組織体-AP205 VLPのコンピテント変異形態を使用してもよく、さらに好ましい本発明の実施形態になる。これらのVLP、自然源から得られたAP205 VLP、またはAP205ウイルス粒子を抗原に結合して、本発明による抗原の規則的で反復性のアレイを生成することができる。

#### 【0140】

AP205 P5-T変異コートタンパク質は、プラスミドpAP281-32(配列番号82)から発現することができるが、これはpQb185から直接誘導されたものであり、またQコートタンパク質遺伝子の代わりに変異AP205被覆タンパク質遺伝子を含有するものである。AP205コートタンパク質の発現用ベクターは、AP205コートタンパク質の発現を目的としてE.coliに形質移入される。

#### 【0141】

VLPへの自己組織体に繋がるコートタンパク質および変異コートタンパク質をそれぞれ発現させるための方法は、「分子抗原アレイ(Molecular Antigen Arrays)」という名称の、2002年7月16日に本願譲受人により出願された、同時係属の米国仮特許出願に記載されており、その全体を参照により援用する。適切なE.coli株には、E.coli K802、JM109、RR1が含まれるが、これらに限定されない。適切なベクターおよび株およびそれらの組合せは、SDS-PAGEによって、コートタンパク質および変異コートタンパク質の発現をそれぞれ試験することにより確認でき、また、カプシドの形成および組織体は、任意選択でまずゲルろ過によりカプシドを精製し、その後、免疫拡散アッセイ(Ouchterlony試験)または電子顕微鏡でそれらを試験することによって、確認できる(Kozlovska, T.M.他、遺伝子(Gene)137:133~37(1993))。

#### 【0142】

ベクターpAP283-58およびpAP281-32から発現したAP205コートタンパク質は、E.Coliの細胞質内のプロセッシングが原因で、初期メチオンニンアミノ酸に欠けている可能性がある。AP205 VLPの切断形態、非切断形態、またはその混合物は、本発明のさらに好ましい実施形態である。

#### 【0143】

本発明のさらに好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、RNAファージAP205の組換えコートタンパク質またはその断片と、RNAファージAP205の組換え変異コートタンパク質またはその断片との混合物を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。

#### 【0144】

本発明のさらに好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、RNAファージAP205の組換えコートタンパク質または組換え変異コートタンパク質の断片を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる。

#### 【0145】

VLPおよびカプシドにそれぞれ組織化可能な組換えAP205コートタンパク質断片

も、本発明の実施に有用である。これらの断片は、コートタンパク質および変異コートタンパク質それぞれの内部またはその末端における欠失によって生成することができる。コートタンパク質および変異コートタンパク質の配列への挿入、あるいはコートタンパク質および変異コートタンパク質の配列との抗原配列の融合、およびVLPへの組織体との適合性は、本発明の別の実施形態であり、キメラAP205コートタンパク質および粒子がそれぞれ得られる。コートタンパク質配列への挿入、欠失、および融合の結果と、これらがVLPへの組織体に適合するか否かは、電子顕微鏡によって決定することができる。

#### 【0146】

上述のAP205コートタンパク質、コートタンパク質断片、およびキメラコートタンパク質によって形成された粒子は、その全体を参照により援用する「分子抗原アレイ（Molecular Antigen Arrays）」という名称の、2002年7月16日に本願譲受人により出願された同時係属の米国仮特許出願に記載されているように、沈殿による分画工程と、例えばセファロースCL-4B、セファロースCL-2B、セファロースCL-6Bカラム、およびこれらの組合せを使用したゲルろ過による精製工程との組合せにより、純粋な形で単離することができる。ウイルス様粒子を単離するための他の方法が当技術分野で知られており、バクテリオファージAP205のウイルス様粒子（VLP）を単離するのに使用することができる。例えば、その全体を本明細書に参照により援用する米国特許第4,918,166号には、酵母レトロトランスポゾンTyのVLPを単離するために超遠心分離を使用することが記載されている。

#### 【0147】

いくつかのRNAバクテリオファージの結晶構造が決定されている（Golmoham-madi, R. 他、構造（Structure）4:543~554（1996））。そのような情報を使用して、表面が露出した残基を同定することができ、したがってRNAファージコートタンパク質は、1つまたは複数の反応性アミノ酸残基を挿入または置換することによって挿入できるように、変性させることができる。その結果、バクテリオファージコートタンパク質が変性した形のものも、本発明で使用することができる。したがって、本発明の組成物を調製するにあたり、カプシドまたはカプシド様構造（例えばバクテリオファージQ、バクテリオファージR17、バクテリオファージfr、バクテリオファージGA、バクテリオファージSP、およびバクテリオファージMS2のコートタンパク質）を形成するタンパク質の変種も使用することができる。

#### 【0148】

上記で論じた変種タンパク質の配列は、これに対応する野生型の配列とは異なるが、これらの変種タンパク質は一般に、カプシドまたはカプシド様構造を形成する能力を維持することになる。したがって本発明はさらに、カプシドまたはカプシド様構造を形成するタンパク質の変種をさらに含んだ組成物およびワクチン組成物をそれぞれ含み、同様に、そのような組成物およびワクチン組成物のそれぞれと、そのような組成物の調製に使用される個々のタンパク質サブユニットと、これらのタンパク質サブユニットをコードする核酸分子を調製する方法も含む。したがって本発明の範囲内には、カプシドまたはカプシド様構造を形成しつつカプシドまたはカプシド様構造を会合し形成する能力を維持する野生型タンパク質の変種形態が含まれる。

#### 【0149】

その結果、本発明はさらに、規則的なアレイを形成して固有の繰返し構造をそれぞれ有する、野生型タンパク質と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、または99%同一なアミノ酸配列を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなる組成物およびワクチン組成物をそれぞれ含む。

#### 【0150】

本発明の範囲内には、本発明の組成物を調製するのに使用されるタンパク質をコードする核酸分子がさらに含まれる。

#### 【0151】

その他の実施形態では、本発明はさらに、配列番号10~27で示されるアミノ酸配列

のいずれかと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、または 99% 同一なアミノ酸配列を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなるタンパク質を含んだ組成物を含む。

#### 【0152】

本発明での使用に適するタンパク質は、カプシドまたはカプシド様構造あるいは VLP を形成するタンパク質の C 末端切断型変異体も含む。そのような切断型変異体の特定の例には、配列番号 10 ~ 27 のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するタンパク質が含まれ、この場合、1、2、5、7、9、10、12、14、15、または 17 アミノ酸は C 末端から除去されている。典型的な場合、これらの C 末端切断型変異体は、カプシドまたはカプシド用構造を形成する能力を維持することになる。

#### 【0153】

本発明での使用に適する別のタンパク質は、カプシドまたはカプシド様構造を形成するタンパク質の N 末端切断型変異体も含む。そのような切断型変異体の特定の例には、配列番号 10 ~ 27 のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するタンパク質が含まれ、この場合、1、2、5、7、9、10、12、14、15、または 17 アミノ酸は N 末端から除去されている。典型的な場合、これらの N 末端切断型変異体は、カプシドまたはカプシド用構造を形成する能力を維持することになる。

#### 【0154】

本発明での使用に適する追加のタンパク質は、カプシドまたはカプシド様構造を形成する N 末端および C 末端切断型変異体を含む。適切な切断型変異体は、配列番号 10 ~ 27 のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を含み、この場合、1、2、5、7、9、10、12、14、15、または 17 アミノ酸が N 末端から除去されており、1、2、5、7、9、10、12、14、15、または 17 アミノ酸が C 末端から除去されている。典型的な場合、これらの N 末端および C 末端切断型変異体は、カプシドまたはカプシド用構造を形成する能力を維持することになる。

#### 【0155】

本発明はさらに、上述の切断型変異体と少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、または 99% が同一なアミノ酸配列を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなるタンパク質を含んだ組成物を含む。

#### 【0156】

したがって本発明は、カプシドまたは VLP を形成するタンパク質から調製された組成物およびワクチン組成物と、個々のタンパク質サブユニットおよび VLP またはカプシドからこれらの組成物を調製する方法と、これらのタンパク質サブユニットおよびこれらのサブユニットをコードする核酸分子を調製する方法と、本発明のこれらの組成物を使用して、個体にワクチン接種しあつ / または個体に免疫応答を誘発させる方法を含む。

#### 【0157】

前述のように、本発明は、ウイルス様粒子またはその組換え形態を含む。1つのさらに好ましい実施形態では、本発明の組成物に使用される粒子は、B 型肝炎コアタンパク質 (HBcAg) または HBcAg の断片からなる。別の実施形態では、本発明の組成物に使用される粒子は、B 型肝炎コアタンパク質 (HBcAg) または HBcAg タンパク質の断片からなるが、これはいくつかの遊離システイン残基を排除したまたはその数が減少するように変性させたものである。Zhou 他 (J. Virol. 66: 5393 ~ 5398 (1992)) は、天然に存在するシステイン残基が除去されるよう変性させた HBcAg がカプシドを会合し形成する能力を維持することを実証した。したがって本発明の組成物での使用に適する VLP は、天然に存在するシステイン残基の 1 つまたは複数が欠失したまたは別のアミノ酸残基 (例えばセリン残基) で置換された変性 HBcAg またはその断片を含んだものを含む。

#### 【0158】

HBcAg は、B 型肝炎コア抗原前駆体タンパク質をプロセッシングされることによって生成されたタンパク質である。HBcAg のいくつかのアイソタイプが同定され、それ

らのアミノ酸配列は、当業者が容易に入手可能である。ほとんどの場合、本発明の組成物およびワクチン組成物のそれぞれは、H B c A g をプロセッシングされた形のもの（すなわちB型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のN末端リーダー配列を除去したH B c A g ）を使用して調製される。

#### 【0159】

さらに、プロセッシングが行われない条件下でH B c A g を生成する場合、一般にH B c A g は、「プロセッシングされた」形で発現させる。例えば、細胞質に向けてタンパク質を発現させるE . c o l i 発現系を使用して、本発明のH B c A g を生成する場合、一般にこれらのタンパク質は、B型肝炎コア抗原前駆体タンパク質のN末端リーダー配列が存在しないように発現することになる。

#### 【0160】

本発明で使用することができるB型肝炎ウイルス様粒子の調製は、例えばWO 00 / 3 2 2 2 7 、本明細書では特に実施例17～19および21～24と、WO 01 / 8 5 2 0 8 、本明細書では特に実施例17～19、21～24、31、および41と、2002年1月18日に本願譲受人によって出願された係属中の米国出願第10 / 0 5 0 , 9 0 2 に開示されている。後者の出願では、特に実施例23、24、31、および51に記載されている。3つの文書のすべてを参照により本明細書に明らかに援用する。

#### 【0161】

また本発明は、1つまたは複数の追加のシステイン残基を欠失させまたは置換するよう変性したH B c A g 変種も含む。遊離システイン残基がいくつかの化学副反応に関与しえることが、当技術分野で知られている。これらの副反応には、ジスルフィド交換、あるいは例えば他の物質と共に併用療法で注入されまたは形成された化学物質または代謝産物との反応、あるいはUV光に曝露することによるヌクレオチドとの直接酸化および反応が含まれる。毒性付加物は、H B c A g が核酸に結合する傾向が強い点を特に考慮して、このように生成される。したがって毒性付加物は、それぞれが個々に低濃度で存在するが一緒にになると毒性レベルに達する複数の種の間に分布する。

#### 【0162】

上記事項に鑑み、天然に存在するシステイン残基が除去されるよう変性させたワクチン組成物にH B c A g を使用することの1つの利点とは、抗原または抗原決定基が結着したときに毒性種が結合可能な部位が、数のうえでは減少しますはすべてなくなることである。

#### 【0163】

本発明の実施に際して使用に適した天然に生ずるH B c A g 変種の数が確認されている。例えばY u a n 他 ( J . V i r o l . 7 3 : 1 0 1 2 2 ~ 1 0 1 2 8 ( 1 9 9 9 ) ) は、配列番号28の位置97に対応した位置のイソロイシン残基をロイシン残基またはフェニルアラニン残基で置換した変種について述べている。いくつかのH B c A g 変種のアミノ酸配列が、いくつかのB型肝炎コア抗原前駆体変種と同様にG e n B a n k レポートA A F 1 2 1 2 4 0 ( 配列番号29 ) 、A F 1 2 1 2 3 9 ( 配列番号30 ) 、X 8 5 2 9 7 ( 配列番号31 ) 、X 0 2 4 9 6 ( 配列番号32 ) 、X 8 5 3 0 5 ( 配列番号33 ) 、X 8 5 3 0 3 ( 配列番号34 ) 、A F 1 5 1 7 3 5 ( 配列番号35 ) 、X 8 5 2 5 9 ( 配列番号36 ) 、X 8 5 2 8 6 ( 配列番号37 ) 、X 8 5 2 6 0 ( 配列番号38 ) 、X 8 5 3 1 7 ( 配列番号39 ) 、X 8 5 2 9 8 ( 配列番号40 ) 、A F 0 4 3 5 9 3 ( 配列番号41 ) 、M 2 0 7 0 6 ( 配列番号42 ) 、X 8 5 2 9 5 ( 配列番号43 ) 、X 8 0 9 2 5 ( 配列番号44 ) 、X 8 5 2 8 4 ( 配列番号45 ) 、X 8 5 2 7 5 ( 配列番号46 ) 、X 7 2 7 0 2 ( 配列番号47 ) 、X 8 5 2 9 1 ( 配列番号48 ) 、X 6 5 2 5 8 ( 配列番号49 ) 、X 8 5 3 0 2 ( 配列番号50 ) 、M 3 2 1 3 8 ( 配列番号51 ) 、X 8 5 2 9 3 ( 配列番号52 ) 、X 8 5 3 1 5 ( 配列番号53 ) 、U 9 5 5 5 1 ( 配列番号54 ) 、X 8 5 2 5 6 ( 配列番号55 ) 、X 8 5 3 1 6 ( 配列番号56 ) 、X 8 5 2 9 6 ( 配列番号57 ) 、A B 0 3 3 5 5 9 ( 配列番号58 ) 、X 5 9 7 9 5 ( 配列番号59 ) 、X 8 5 2 9 9 ( 配列番号60 ) 、X 8 5 3 0 7 ( 配列番号61 ) 、X 6 5 2 5 7 ( 配列番号62 ) 、

X 8 5 3 1 1 (配列番号 6 3 )、X 8 5 3 0 1 (配列番号 6 4 )、X 8 5 3 1 4 (配列番号 6 5 )、X 8 5 2 8 7 (配列番号 6 6 )、X 8 5 2 7 2 (配列番号 6 7 )、X 8 5 3 1 9 (配列番号 6 8 )、A B 0 1 0 2 8 9 (配列番号 6 9 )、X 8 5 2 8 5 (配列番号 7 0 )、A B 0 1 0 2 8 9 (配列番号 7 1 )、A F 1 2 1 2 4 2 (配列番号 7 2 )、M 9 0 5 2 0 (配列番号 7 3 )、P 0 3 1 5 3 (配列番号 7 4 )、A F 1 1 0 9 9 9 (配列番号 7 5 )、およびM 9 5 5 8 9 (配列番号 7 6 )に開示されており、そのそれぞれの開示を参考により本明細書に援用する。これらのH B c A g 変種は、配列番号 7 7 における位置 1 2 、 1 3 、 2 1 、 2 2 、 2 4 、 2 9 、 3 2 、 3 3 、 3 5 、 3 8 、 4 0 、 4 2 、 4 4 、 4 5 、 4 9 、 5 1 、 5 7 、 5 8 、 5 9 、 6 4 、 6 6 、 6 7 、 6 9 、 7 4 、 7 7 、 8 0 、 8 1 、 8 7 、 9 2 、 9 3 、 9 7 、 9 8 、 1 0 0 、 1 0 3 、 1 0 5 、 1 0 6 、 1 0 9 、 1 1 3 、 1 1 6 、 1 2 1 、 1 2 6 、 1 3 0 、 1 3 3 、 1 3 5 、 1 4 1 、 1 4 7 、 1 4 9 、 1 5 7 、 1 7 6 、 1 7 8 、 1 8 2 、 および 1 8 3 に位置付けられたアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を含めたいくつかの位置で、アミノ酸配列が異なっている。本発明の組成物での使用に適する他のH B c A g 変種、および本明細書の開示に従ってさらに変性し得るものが、WO 00/198333、WO 00/177158、およびWO 00/214478に記載されている。

#### 【0164】

上述のように、一般にプロセッシングされたH B c A g (すなわちリーダー配列にかけたもの)が、本発明の組成物およびワクチン組成物でそれぞれ使用される。本発明は、ワクチン組成物、ならびに上述の変種H B c A g を用いるこれらの組成物の使用方法を含む。

#### 【0165】

ポリペプチドのアミノ酸配列が、上記野生型アミノ酸配列の1つに少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 7 % 、または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を有するか否かは、B e s t f i t プログラムなどの既知のコンピュータプログラムを従来通り使用して決定することができる。例えば特定の配列が参照アミノ酸配列と 9 5 % 同一であるか否かを決定するのに、B e s t f i t または任意のその他の配列アライメントプログラムを使用する場合、パラメータは、同一性のパーセンテージが完全長の参照アミノ酸配列全体にわたって計算されるように、かつ参照配列のアミノ酸残基の総数の 5 % までが相同なギャップが可能になるように設定する。

#### 【0166】

配列番号 2 9 ~ 7 2 および 7 3 ~ 7 7 に示されるアミノ酸配列を有するH B c A g 変種および前駆体は、互いに相対的に類似している。したがって、配列番号 7 7 の特定の位置に対応する位置に位置付けられたH B c A g 変種のアミノ酸残基を言う場合は、配列番号 7 7 で示されるアミノ酸配列のその位置に存在するアミノ酸残基を指す。H B c A g 変種同士の相同性は、哺乳類に感染するB型肝炎ウイルスのほとんどの部分で十分に高く、そのため当業者は、配列番号 7 7 に示されるアミノ酸配列と特定のH B c A g 変種のアミノ酸配列の両方について検討しかつ「対応する」アミノ酸残基を特定することがほとんど困難ではない。さらに、ウッドチャックに感染するウイルスから得られたH B c A g のアミノ酸配列を示す、配列番号 7 3 に示されるH B c A g アミノ酸配列は、配列番号 7 7 に示されるアミノ酸配列を有するH B c A g と十分に相同であり、配列番号 7 7 のアミノ酸残基 1 5 5 と 1 5 6 の間の配列番号 6 4 に 3 アミノ酸残基挿入断片が存在することが容易に明らかにされる。

#### 【0167】

また本発明は、トリに感染するB型肝炎ウイルスのH B c A g 変種を含んだワクチン組成物、ならびにこれらのH B c A g 変種の断片を含んだワクチン組成物も含む。これらのH B c A g 変種では、これらのポリペプチドに自然に存在するシステイン残基の1つ、2つ、3つ、またはそれ以上を、別のアミノ酸残基で置換しましたは欠失させ、その後、本発明のワクチン組成物に含めることができる。

#### 【0168】

上記で論じたように、遊離システイン残基をなくすことによって、毒性成分がH B c A gに結合できる部位の数を減少させ、また、同じかまたは隣接するH B c A g分子のリジンおよびシステイン残基の架橋が生じ得る位置をなくす。したがって本発明の別の実施形態では、B型肝炎ウイルスカプシドタンパク質の1つまたは複数のシステイン残基を欠失させ、または別のアミノ酸残基で置換した。

#### 【0169】

その他の実施形態で、本発明の組成物およびワクチン組成物のそれぞれは、C末端領域（例えば配列番号77のアミノ酸残基145～185または150～185）を除去したH B c A gを含有することになる。そのため、本発明を実施する際の使用に適した追加の変性H B c A gは、C末端切断型変異体を含む。適切な切断型変異体は、1、5、10、15、20、25、30、34、35アミノ酸がC末端から除去されたH B c A gを含む。

#### 【0170】

本発明を実施する際の使用に適したH B c A gは、N末端切断型変異体も含む。適切な切断型変異体は、1、2、5、7、9、10、12、14、15、または17アミノ酸がN末端から除去された変性H B c A gを含む。

#### 【0171】

本発明を実施する際の使用に適したH B c A gは、NおよびC末端切断型変異体を含む。適切な切断型変異体は、1、2、5、7、9、10、12、14、15、および17アミノ酸がN末端から除去され、1、5、10、15、20、25、30、34、35アミノ酸がC末端から除去された、H B c A gを含む。

#### 【0172】

本発明はさらに、上述の切断型変異体と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、または99%同一なアミノ酸配列を含み、あるいは本質的にこれらからなり、あるいはこれらからなるH B c A gポリペプチドを含んだ組成物およびワクチン組成物をそれぞれ含む。

#### 【0173】

本発明のある特定の実施形態では、H B c A gポリペプチドにリジン残基を導入して、I L - 5、I L - 13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとH B c A gのV L Pとの結合を媒介するようにする。好ましい実施形態では、本発明の組成物は、配列番号77のアミノ酸1～144、または1～149、1～185を含み、あるいはこれらからなるH B c A gを使用して調製するが、これは、位置79および80に対応するアミノ酸がG 1 y - G 1 y - L y s - G 1 y - G 1 yを有するペプチドで置換されるように変性させたものである（配列番号78）。さらに好ましい実施形態では、配列番号77の位置48および107のシステイン残基をセリンに変異させる。本発明はさらに、配列番号29～74のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する対応するポリペプチドを含んだ組成物を含むが、これは上述のアミノ酸の変化があるものである。本発明の範囲内には、カプシドまたはV L Pを形成するように会合すること可能でありかつ上述のアミノ酸変化を有する、追加のH B c A G変種がさらに含まれる。したがって本発明はさらに、野生型アミノ酸配列のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、または99%同一なアミノ酸配列を含み、あるいはこれらからなるH B c A gポリペプチドと、適切な場合にはN末端リーダー配列を除去するようプロセッシングされて上述の変化によって変性されるこれらタンパク質のプロセッシングされた形とを含んだ組成物およびワクチン組成物をそれぞれ含む。

#### 【0174】

本発明の組成物またはワクチン組成物は、種々のH B c A gの混合物を含んでよい。したがってこれらのワクチン組成物は、アミノ酸配列が異なるH B c A gからなる。例えば、「野生型」H B c A gと、1つまたは複数のアミノ酸残基が変化した（例えば欠失し、挿入され、または置換された）変性H B c A gとを含む、ワクチン組成物を調製することができる。さらに、本発明の好ましいワクチン組成物は、抗原がI L - 5、I L - 13、

またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドである、高度に規則正しい反復性抗原アレイを提示するものである。本発明のさらに好ましい実施形態では、少なくとも1つの共有結合によって、IL-5、IL-13、またはエオタキシンの少なくとも1つのタンパク質またはペプチドが前記コア粒子およびウイルス様粒子にそれぞれ結合する。IL-5、IL-13、またはエオタキシンの少なくとも1つのタンパク質またはペプチドは、少なくとも1つの共有結合によってコア粒子およびウイルス様粒子にそれぞれ結合し、前記共有結合は非ペプチド結合であって、コア粒子とIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとの規則的で反復性のアレイと、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとVL<sub>P</sub>とのアレイまたは結合体をそれぞれもたらすものであることが好ましい。このIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとVL<sub>P</sub>とのアレイおよび結合体のそれぞれは、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとVL<sub>P</sub>またはVL<sub>P</sub>サブユニットに結合することが好ましい。反復性で規則性のIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドアレイおよび結合体の形成はそれぞれ、下記の事項で明らかにされるように、配列され向きが定められ、かつ画定されたIL-5、IL-13、またはエオタキシンの少なくとも1つのタンパク質またはペプチドとVL<sub>P</sub>との結合および結着によって、確実になされる。さらに、VL<sub>P</sub>の典型的な固有の高度に繰り返され編成された構造は、高度に編成され繰り返されたIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドアレイおよび結合がそれぞれ得られるように、高度に順序付けられ繰り返される手法で、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを表示することに寄与することが有利である。

#### 【0175】

したがって、好ましい本発明の結合体およびアレイのそれぞれは、高度に編成された構造、寸法であること、およびアレイ表面の抗原の反復性が、従来技術の結合体とは異なる。さらに本発明の好ましい実施形態によれば、発現宿主内で粒子と抗原の両方を発現させることが可能になり、抗原、すなわちIL-5、IL-13、またはエオタキシンの少なくとも1つのタンパク質またはペプチドの適正な折畳みと、VL<sub>P</sub>の適正な折畳みおよび組織体が保証される。

#### 【0176】

本発明は、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをコア粒子およびVL<sub>P</sub>にそれぞれ結合する方法を開示する。示すように、本発明の一態様では、化学的架橋によって、典型的な場合かつ好ましくは異種2官能性架橋剤を使用することによって、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをそれぞれコア粒子およびVL<sub>P</sub>に結合させる。いくつかの異種1官能性架橋剤は、当技術分野で知られている。好ましい実施形態で、異種2官能性架橋剤は、好ましい第1の付着部位、すなわちコア粒子およびVL<sub>P</sub>または少なくとも1つのVL<sub>P</sub>サブユニットそれぞれのリジン残基の側鎖アミノ基とそれぞれ反応することができる官能基と、好ましい第2の付着部位、すなわちIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド上に天然に存在し、還元による反応に供され、または設計製作され、任意選択で還元による反応にも供される、システイン残基と反応することができる別の官能基を含有する。この手順の第1の工程は、典型的な場合は誘導体化と呼ばれ、コア粒子またはVL<sub>P</sub>と架橋剤との反応である。この反応の生成物は、活性化コア粒子または活性化VL<sub>P</sub>であり、活性化担体とも呼ばれる。第2の工程では、ゲルろ過や透析などの通常の方法を使用して、未反応の架橋剤を除去する。第3の工程では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを活性化担体と反応させるが、この工程は典型的な場合、連結工程と呼ばれる。未反応のIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドは、例えば透析によって、第4の工程で任意選択で除去すること

ができる。いくつかの異種2官能性架橋剤が当技術分野で知られている。これらには、好みの架橋剤 SMPH ( Pierce ) 、 Sulfo-MBS 、 Sulfo-EMCS 、 Sulfo-GMBS 、 Sulfo-SIAB 、 Sulfo-SMPB 、 Sulfo-SMCC 、 SVSB 、 SIA と、例えば Pierce Chemical Company ( Rockford 、 IL 、米国) から入手可能であって一方の官能基がアミノ基に対して反応性があり他方の官能基がシステイン残基に対して反応性があるその他の架橋剤が含まれる。上述の架橋剤はすべて、チオエーテル結合の形成をもたらす。本発明の実施に適した別のクラスの架橋剤は、連結によって、 IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとコア粒子または VLP との間にジスルフィド結合を導入することを特徴とする。このクラスに属する好みの架橋剤には、例えば SPDP および Sulfo-LC-SPDP ( Pierce ) が含まれる。架橋剤によるコア粒子および VLP それぞれの誘導化の程度は、各反応相手の濃度や、1つの試薬が他の試薬よりも過剰であること、 pH 、温度、およびイオン強度などの実験条件を変えることによって影響を受ける可能性がある。連結の程度、すなわちコア粒子および VLP それぞれのサブユニット当たりの IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの量は、ワクチンの要件に一致するよう上述の実験条件を変化させることによって調節することができる。 IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの溶解度によって、各サブユニットに連結し得る IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの量に制限が課される可能性があり、得られるワクチンが不溶性である場合は、サブユニット当たりの IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの量を減少させることが有利である。

## 【 0177 】

IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをコア粒子および VLP にそれぞれ結合させる特に好みの方法は、コア粒子および VLP の表面のリジン残基をそれぞれ、 IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド上のシステイン残基と結合させることである。したがって本発明の好みの実施形態では、第1の 付着部位 がリジン残基であり、第2の 付着部位 がシステイン残基である。いくつかの実施形態では、コア粒子および VLP それぞれに結合させるため、 IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドに対し、第2の 付着部位 と/or またはその一部として、システイン残基を含有するアミノ酸リンカーを設計製作することが必要になる。あるいは、 IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド内への挿入または変異によって、システインを導入することができる。あるいはシステイン残基またはチオール基を、化学的な連結によって導入することができる。

## 【 0178 】

アミノ酸リンカーの選択は、抗原および自己抗原のそれぞれの性質に応じてなされ、すなわち IL-5 、 IL-13 、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの性質、 pI や電荷分布、グリコシル化などのその生化学的特性に応じてなされる。一般に、フレキシブルなアミノ酸リンカーが好みの。アミノ酸リンカーの好みの実施形態は、 ( a ) CGG 、 ( b ) N 末端 1 リンカー、 ( c ) N 末端 3 リンカー、 ( d ) Ig ヒンジ領域、 ( e ) N 末端グリシンリンカー、 ( f ) ( G ) <sub>k</sub> C ( G ) <sub>n</sub> であって n = 0 ~ 12 および k = 0 ~ 5 であるもの、 ( g ) N 末端グリシン - セリンリンカー、 ( h ) ( G ) <sub>k</sub> C ( G ) <sub>m</sub> ( S ) <sub>1</sub> ( GGGGS ) <sub>n</sub> であって n = 0 ~ 3 、 k = 0 ~ 5 、 m = 0 ~ 10 、 l = 0 ~ 2 であるもの、 ( i ) GGC 、 ( k ) GGC - NH2 、 ( l ) C 末端 1 リンカー、 ( m ) C 末端 3 リンカー、 ( n ) C 末端グリシンリンカー、 ( o ) ( G ) <sub>n</sub> C ( G ) <sub>k</sub> であって n = 0 ~ 12 および k = 0 ~ 5 であるもの、 ( p ) C 末端グリシン - セリンリンカー、 ( q ) ( G ) <sub>m</sub> ( S ) <sub>1</sub> ( GGGGS ) <sub>n</sub> ( G ) <sub>o</sub> C ( G ) <sub>k</sub> であって n = 0 ~ 3 、 k = 0 ~ 5 、 m = 0 ~ 10 、 l = 0 ~ 2 、および o = 0 ~ 8 であるものからなる群から選択される。

## 【 0179 】

アミノ酸リンカーのさらに好ましい例は、免疫グロブリンのヒンジ領域、グリシンセリンリンカー ( G G G G S ) <sub>n</sub>、およびグリシンリンカー ( G ) <sub>n</sub> であって、すべてが第 2 の付着部位としてシステイン残基をさらに含有し、さらに任意選択でグリシン残基を含有するものである。典型的な場合、前記アミノ酸リンカーの好ましい例は、N 末端 1 : C G D K T H T S P P ; C 末端 1 : D K T H T S P P C G ; N 末端 3 : C G G P K P S T P P G S S G G A P ; C 末端 3 : P K P S T P P G S S G G A P G G C G ; N 末端グリシンリンカー : G C G G G G ; C 末端グリシンリンカー : G G G G C G ; C 末端グリシン - リジンリンカー : G G K K G C ; N 末端グリシン - リジンリンカー : C G K K G G である。

## 【 0 1 8 0 】

本発明のさらに好ましい実施形態では、特に抗原が I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンペプチドである場合、ペプチドの C 末端の G G C G、G G C、または G G C - N H 2 (「N H 2」はアミド化の略である) リンカーあるいはその N 末端の C G G は、アミノ酸リンカーとして好ましい。一般にグリシン残基は、連結反応におけるバルク状アミノ酸の可能性ある立体障害が回避されるように、バルク状アミノ酸と第 2 の付着部位として使用されるシステインとの間に挿入される。

## 【 0 1 8 1 】

I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド上に存在するシステイン残基は、活性化 V L P 上の異種 2 官能性架橋剤と反応するように、その還元状態になければならず、すなわち遊離システインまたは遊離スルフィドリル基を有するシステイン残基が利用可能でなければならない。結合部位として機能するシステイン残基が酸化された形のものである場合、例えばそれがジスルフィド架橋を形成する場合は、例えば D T T、T C E P、または メルカプトエタノールとのこのジスルフィド架橋の還元が必要とされる。

## 【 0 1 8 2 】

上述の好ましい方法による異種 2 官能性架橋剤を使用することによる、I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとコア粒子および V L P との結合のそれぞれは、向きが定められた手法によって、I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとコア粒子および V L P との連結をそれぞれ可能にする。I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとコア粒子および V L P とをそれぞれ結合するその他の方法には、カルボジイミド E D C、および N H S を使用して、I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをコア粒子および V L P にそれぞれ結合させる方法が含まれる。I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドは、例えば S A T A、S A T P、またはイミノチオタンとの反応によって最初にチオール化してもよい。次いで I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドは、必要に応じて脱保護を行った後、コア粒子および V L P のそれぞれに以下のように連結することができる。過剰なチオール化試薬を分離した後、I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、システイン反応性部分を含む異種 2 官能性架橋剤で事前に活性化させたコア粒子および V L P のそれぞれと反応させ、したがって少なくとも 1 つまたはいくつかの官能基がシステイン残基に対して反応性があることが示されるが、これは上述のように、I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのチオール化タンパク質またはペプチドが反応することが可能なものである。任意選択で、少量の還元剤を反応混合物に含める。別の方法では、グルタルアルデヒドや D S G、B M [ P E O ] <sub>4</sub>、B S <sup>3</sup>、( Pierce Chemical Company、Rockford、I L、米国) などの同種 2 官能性架橋剤、あるいは、コア粒子および V L P それぞれのアミン基またはカルボキシル基に対して反応性を有する官能基を備えたその他の知られている同種 2 官能性架橋剤を使用して、I L - 5、I L - 1 3、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをコア粒子および V L P にそれぞれ結着する。

## 【 0 1 8 3 】

別の実施形態では、グリコシル化した IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド上に存在する炭水化物部分を変性させ、その後コア粒子およびVLPのそれぞれと反応させることによって、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、コア粒子およびVLPのそれぞれに結合する。一実施形態では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのグリコシル化タンパク質またはペプチドを、炭水化物部分の緩慢な酸化反応で過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて、1つまたは複数のアルデヒド官能基を持つIL-5、IL-13、またはエオタキシンの活性化タンパク質またはペプチドを得る。このように活性化したIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを過剰な過ヨウ素酸ナトリウムから分離し、さらにコア粒子およびVLPのそれぞれと反応させるが、この場合、例えばHermannson, G.T.、Bioconjugate Techniques、Academic Press Inc.、San Diego、CA、米国に記載されているように、コア粒子およびVLPのそれぞれまたは少なくとも1つのVLPサブユニットのリジン残基を、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド上の事前形成されたアルデヒド官能基と反応させる。IL-5、IL-13、またはエオタキシンの活性化タンパク質またはペプチドの自己重合は、前述の文献に記載されているように、pHを調節することによって制御することができる。形成されたシップ塩基は、好ましくはシアノホウ水素化ナトリウムでさらに還元し、その後ゲルろ過または透析によって除去する。あるいは、コア粒子およびVLPのそれぞれを、コア粒子およびVLPのそれぞれまたは少なくとも1つのVLPサブユニットのカルボキシル基でEDCと反応させ、さらにアジピン酸ジヒドラジドなどのジヒドラジドと反応させて、IL-5、IL-13、またはエオタキシンの活性化タンパク質またはペプチド上に存在する1つまたは複数のアルデヒド官能基と反応することが可能なヒドラジド部分を得る。このように形成されたヒドラジンは、シアノホウ水素化ナトリウムでさらに還元することができる。あるいは、1つまたは複数のアルデヒド官能基を持つIL-5、IL-13、またはエオタキシンの活性化タンパク質またはペプチドをシステアミンと反応させて、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドにシステイン基を導入する。コア粒子およびVLPのそれぞれに対するIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドに適した追加の架橋方法および架橋剤、ならびに連結反応の実施と化学架橋剤および化学架橋手順の使用に関する指針は、Hermannson, G.T.、Bioconjugate Techniques、Academic Press Inc.、San Diego、CA、米国に見出すことができる。

#### 【0184】

VLPをIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドに結合するその他の方法には、コア粒子およびVLPのそれぞれをビオチニル化し、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをストレプタビジン融合タンパク質として発現させる方法、あるいは、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとコア粒子およびVLPのそれぞれとの両方を、例えばWO 00/23955に記載されているようにビオチニル化する方法が含まれる。この場合、自由な結合部位を、次の工程で添加されるコア粒子およびVLPのそれぞれの結合にそのまま利用することができるよう、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとストレプタビジンとの比を調節することによって、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをまずストレプタビジンまたはアビジンに結合させる。あるいは、すべての成分を「ワンポット(one pot)」反応で混合することができる。その他のリガンド-レセプター対は、可溶形態にあるレセプターおよびリガンドを利用可能であり、コア粒子およびVLPのそれぞれと架橋可能であり、あるいは、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとコア粒子およびVLPのそれぞれとを結合させるための結合剤として使用することができる。あるいは、リガンドまたはレセプターをIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタ

ンパク質またはペプチドと融合させ、それによって、このレセプターまたはリガンドにそれ respective 化学結合しまたは融合しているコア粒子および VLP のそれへの結合を仲介することができる。融合は、挿入または置換によって行ってもよい。

#### 【 0 1 8 5 】

既に述べたように、本発明の好ましい実施形態では、VLP は RNA ファージの VLP であり、より好ましい実施形態では、VLP は RNA ファージ Q コートタンパク質の VLP である。

#### 【 0 1 8 6 】

1つまたはいくつかの抗原分子、すなわち IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドは、立体的に可能な場合、好ましくは RNA ファージの VLP の露出したリジン残基によって、カプシドまたは RNA ファージコートタンパク質の VLP の 1 つのサブユニットに結着することができる。したがって RNA ファージのコートタンパク質の VLP、特に Q コートタンパク質 VLP の特定の特徴とは、サブユニット当たりいくつかの抗原に連結できることである。このため、稠密な抗原アレイを生成することが可能になる。

#### 【 0 1 8 7 】

本発明の好ましい実施形態で、少なくとも IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとコア粒子およびウイルス様粒子のそれとの結合および結着は、それぞれ、ウイルス様粒子の少なくとも 1 つの第 1 の 付着部位 と、抗原または抗原決定基の少なくとも 1 つの第 2 の 付着部位 との相互作用および会合による。

#### 【 0 1 8 8 】

Q コートタンパク質の VLP またはカプシドは、その表面に、定められた数のリジン残基を示し、3 個のリジン残基がカプシドの内部に向かって RNA と相互に作用し、他の 4 個のリジン残基がカプシドの外部に露出しているという、定められたトポロジーを持つ。これらの定められた性質は、リジン残基が RNA を相互に作用する粒子の内部よりも粒子の外部に抗原が結着するのに都合良い。その他の RNA ファージコートタンパク質の VLP も、その表面に定められた数のリジン残基を有し、これらのリジン残基は定められたトポロジーを持つ。

#### 【 0 1 8 9 】

本発明の別の実施形態で、第 1 の 付着部位 はリジン残基であり、かつ / または第 2 の 付着部位 はスルフィドリル基またはシステイン残基を含む。本発明の非常に好ましい実施形態では、第 1 の 付着部位 がリジン残基であり、第 2 の 付着部位 がシステイン残基である。

#### 【 0 1 9 0 】

本発明の非常に好ましい実施形態で、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドは、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド上に天然に存在しまたは設計製作されたシステイン残基を介して、RNA ファージコートタンパク質の VLP リジン残基、特に Q コートタンパク質の VLP に結合する。

#### 【 0 1 9 1 】

RNA ファージから得られた VLP の別の利点は、細菌内でのその発現収量が高いことであり、手ごろなコストで大量の物質の生成が可能になる。

#### 【 0 1 9 2 】

述べたように、本発明の結合体およびアレイはそれぞれ、高度に編成された構造、寸法である点と、アレイ表面の抗原の反復性に関して、従来技術の結合体とは異なる。さらに、VLP を担体として使用することによって、抗原密度が様々な頑丈な抗原アレイおよび結合体がそれぞれ形成される。特に RNA ファージの VLP を使用することによって、本明細書では特に RNA ファージ Q コートタンパク質の VLP を使用することによって、非常に高いエピトープ密度を実現することが可能になる。エピトープ密度の高い RNA ファージコートタンパク質の VLP 組成物の調製は、本願の教示を使用して行うことができる。

## 【0193】

本明細書で定義する第2の付着部位は、抗原または抗原決定基に自然に存在するかまたは自然に存在しないものでよい。抗原または抗原決定基に、適切な天然の第2の付着部位が存在しない場合は、天然のものではない付着部位を抗原に対して設計製作しなければならない。

## 【0194】

上述のように、4個のリジン残基がQコートタンパク質のVLP表面に露出している。典型的な場合、これらの残基は、架橋剤分子との反応によって誘導化される。露出したリジン残基のすべてが抗原に連結し得るとは限らない場合、誘導化工程の後に、架橋剤分子がアミノ基に結合した状態で、架橋剤と反応したリジン残基が残る。これは、VLPの溶解性および安定性に有害な、1つまたはいくつかの正電荷の消失に繋がる。以下に開示するQコートタンパク質変異体と同様に、アルギニン残基は架橋剤と反応しないので、リジン残基のいくつかをアルギニンに代えることによって、本発明者等は正電荷が過剰に消失するのを防止する。さらに、リジン残基をアルギニンに代えることにより、抗原との反応に利用部位が少なくなるので、より明確に定められた抗原アレイを得ることができる。

## 【0195】

したがって、本願で開示する以下のQコートタンパク質変異体および変異体Q-VLPでは、露出したリジン残基をアルギニンに代えた：Q-240（Lys13-Arg；配列番号23）、Q-250（Lys2-Arg、Lys13-Arg；配列番号25）、およびQ-259（Lys2-Arg、Lys16-Arg；配列番号27）。これらの構造体をクローニングし、タンパク質を発現させ、VLPを精製して、ペプチドおよびタンパク質抗原との連結に使用した。Q-251；（配列番号26）も構成し、Q-251コートタンパク質のVLPをどのように発現させ、精製し、かつ連結させるかについての指針は、本願全体を通して見出すことができる。

## 【0196】

他の実施形態では、本発明者等は、密度がさらに高い抗原アレイを得るのに適した、1つの追加のリジン残基を有するQ変異体コートタンパク質を開示する。この変異Qコートタンパク質、Q-243（Asn10-Lys；配列番号24）をクローニングし、タンパク質を発現させ、カプシドまたはVLPを単離して精製したが、追加のリジン残基の導入が、サブユニットとカプシドまたはVLPとの自己組織体に適合することを示した。したがって、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドと結合体のそれぞれは、Qコートタンパク質変異体のVLPを使用して調製することができる。抗原とVLP、特にRNAファージコートタンパク質のVLP表面に存在するリジン残基と、抗原、すなわちIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド上に自然に存在しまたは設計製作されたシステイン残基とを結合することである。システイン残基を第2の付着部位として有効なものにするため、スルフィドリル基を連結に利用しなければならない。したがって、システイン残基を還元状態にしなければならず、すなわち遊離したシステインまたは遊離したスルフィドリル基を持つシステイン残基を利用可能にしなければならない。第2の付着部位として機能するシステイン残基が酸化形態にある場合、例えばそれがジスルフィド架橋を形成する場合には、このジスルフィド架橋を、例えばDTT、TCEP、またはメルカプトエタノールで還元することが必要である。還元剤の濃度、および抗原よりも過剰な還元剤のモル数は、各抗原ごとに調節しなければならない。10μM程度またはそれ以下に低い濃度から始まり最高で10～20mMまたは必要に応じてそれ以上の濃度に至る還元剤の滴定範囲を試験し、抗原と担体との連結について評価する。2002年1月18日に本願譲受人により出願された係属中の米国出願第10/050,902号に記載されるように、還元剤が低濃度であることは連結反応に適合することであるが、濃度がより高くなると、当業者に知られるようにこの連結反応が阻害され、その場合は還元剤を透析またはゲルろ過によって除去しなければなら

ない。透析または平衡緩衝液のpHは7未満であり、好ましくは6である。pHの低い緩衝液と抗原の活性または安定性との適合性について試験をしなければならない。

#### 【0197】

RNAファージコートタンパク質のVLP上のエピトープ密度は、架橋剤またはその他の反応条件を選択することによって調節できる。例えば架橋剤Sulfo-GMBSやSMPHでは、典型的な場合、高いエピトープ密度に達することが可能である。誘導化は、還元剤の濃度を高くすることによって、良い影響が得られ、反応条件の操作を行うことによって、RNAファージコートタンパク質のVLP、特にQコートタンパク質のVLPに連結する抗原の数を制御することができる。

#### 【0198】

非天然の第2の付着部位を設計する前に、そこに融合し挿入されまたは一般に設計製作される位置を選択しなければならない。第2の付着部位の位置の選択は、例として、抗原の結晶構造に基づくものでよい。そのような抗原の結晶構造は、分子のCまたはN末端の利用可能性（例えば溶媒に対するその接触可能性から決定される）に関する情報、またはシステイン残基など、第2の付着部位としての使用に適する残基の溶媒への曝露に関する情報を提供することができる。Fab断片の場合のように、露出したジスルフィド架橋は、一般に緩慢な還元によって单一システイン残基に変換可能であるので、第2の付着部位の源であってもよい。IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの免疫原性に影響を及ぼさない緩慢な還元条件が選択される。一般に、自己抗原による免疫化が、この自己抗原とその自然のリガンドとの相互作用を阻害する目的である場合、自然のリガンドとの相互作用の部位に対して抗体が生成されるように、第2の付着部位が付加されることになる。したがって第2の付着部位の位置は、第2の付着部位またはこれを含有する任意のアミノ酸リンカーからの立体障害が回避されるように、選択されることになる。他の実施形態では、自己抗原とその自然のリガンドとが相互に作用する部位とは別の部位を対象とした抗体応答が望まれる。そのような実施形態では、自己抗原とその自然のリガンドとの相互作用の部位に対する抗体の生成が妨げられるように、第2の付着部位を選択することができる。

#### 【0199】

第2の付着部位の位置を選択する際のその他の基準には、抗原のオリゴマー化状態、オリゴマー化の部位、補因子の存在、抗原の変性が自己抗原の機能または自己抗原を認識する抗体の生成に適合する抗原構造および配列内の部位を開示する実験的証拠の利用可能性が含まれる。

#### 【0200】

ほとんどの好ましい実施形態で、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドは、コア粒子およびVLPまたはVLPサブユニットとのそれぞれにある第1の付着部位と会合可能な单一の第2の付着部位または单一の反応性付着部位を含む。このため、少なくとも1つであるが典型的な場合は複数であり、好ましくは10、20、40、80、120個を超える抗原とコア粒子およびVLPそれぞれとの画定されかつ均一な結合および会合のそれぞれが確実になる。したがって、抗原上に单一の第2の付着部位または单一の反応性付着部位を設けることによって、单一および均一なタイプの結合および会合のそれぞれが確実になり、その結果、非常に高度に規則的で反復性のアレイが得られる。例えば、結合および会合のそれぞれが、リジン（第1の付着部位として）およびシステイン（第2の付着部位として）の相互作用を介して行われる場合、本発明のこの好ましい実施形態によれば、このシステイン残基が抗原上に天然のものとして存在するかまたは非天然のものとして存在するかに関わらず、抗原当たりただ1つのシステイン残基と、VLPおよびコア粒子の第1の付着部位との結合および会合のそれぞれが確実になる。

#### 【0201】

いくつかの実施形態で、抗原上に第2の付着部位を設計製作することは、本発明の開示による第2の付着部位として適切なアミノ酸を含有するアミノ酸リンカーの融合を必要と

する。したがって本発明の好ましい実施形態では、少なくとも1つの共有結合によって、アミノ酸リンカーを抗原または抗原決定基に結合する。アミノ酸リンカーは、第2の付着部位を含み、あるいはこれからなることが好ましい。さらに好ましい実施形態では、アミノ酸リンカーは、スルフィドリル基またはシステイン残基を含む。別の好ましい実施形態では、アミノ酸リンカーがシステインである。アミノ酸リンカーを選択するいくつかの基準、ならびに本発明によるアミノ酸リンカーのさらに好ましい実施形態については既に述べた。

#### 【0202】

本発明のさらに好ましい実施形態では、少なくとも1つの抗原または抗原決定基、すなわちIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、コア粒子およびウイルス様粒子にそれぞれ融合させる。上述のように、VLPは、典型的な場合、VLPに組織化する少なくとも1つのサブユニットからなる。したがって、本発明のさらに好ましい実施形態でも同様に、抗原または抗原決定基、好ましくは少なくとも1つのIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、ウイルス様粒子またはVLPに組込み可能なタンパク質の少なくとも1つのサブユニットに融合させて、キメラのVLPサブユニットとIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとの融合体を生成する。

#### 【0203】

IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの融合は、VLPサブユニット配列への挿入によって行うことができ、あるいは、VLPサブユニットのNまたはC末端あるいはVLPに組込み可能なタンパク質との融合によって、行うことができる。以下、タンパク質またはペプチドとVLPサブユニットとの融合を指す場合、サブユニット配列の両端への融合またはサブユニット配列内部へのペプチドの内部挿入が含まれる。

#### 【0204】

融合は、サブユニット配列の一部が欠失したVLPサブユニットの変種にIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド配列を挿入することによって行ってもよく、これは切断型変異体とも呼ばれるものである。切断型変異体は、NまたはC末端を有し、あるいはVLPサブユニットの配列の一部に内部欠失を有する。例えば、アミノ酸残基79～81の欠失を伴うような特定のVLP-HBcAgは、内部欠失を有する切断型変異体である。IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドと、切断型変異体VLPサブユニットのNまたはC末端との融合も、本発明の実施形態になる。同様に、VLPサブユニットの配列へのエピトープの融合は、置換によって行ってもよく、例えば特定のVLP-HBcAgでは、アミノ酸79～81を外来のエピトープに代える。したがって以下に述べる融合は、VLPサブユニットの配列にIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド配列を挿入することによって、あるいはVLPサブユニットの配列の一部をIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド配列で置換することによって、あるいは欠失、置換、または挿入の組合せによって行うことができる。

#### 【0205】

IL-5、IL-13、またはエオタキシンのキメラタンパク質またはペプチドのサブユニットは、一般に、VLPに自己組織化することが可能である。そのサブユニットに融合したエピトープを示すVLPも、本明細書ではキメラVLPと呼ぶ。示されるように、ウイルス様粒子は、少なくとも1つのVLPサブユニットを含み、あるいはこれからなる。本発明の別の実施形態で、ウイルス様粒子は、キメラVLPサブユニットと非キメラVLPサブユニット、すなわちそこに抗原が融合していないVLPサブユニットとの混合物であり、いわゆるモザイク粒子と呼ばれる。これは、VLPの形成およびVLPへの組織体を確実にするのに有利である。これらの実施形態で、キメラVLPサブユニットの割合は、1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、95%、またはそれ以上でよい。

## 【0206】

ペプチドの配列の両端またはVLPのサブユニットの配列の両端に融合されるエピトープには、フランкиングアミノ酸残基を付加することができ、またはそのようなペプチド配列をVLPのサブユニットの配列に内部挿入することができる。グリシンおよびセリン残基は、融合するIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドに付加されるフランкиング配列に使用するのに特に好ましいアミノ酸である。グリシン残基は追加の柔軟性をもたらし、それによって、外来の配列をVLPサブユニットの配列に融合する際に不安定な影響が出る可能性を減じることができる。

## 【0207】

本発明の特定の実施形態で、VLPはB型肝炎コア抗原VLPである。HBcAgのN末端への融合タンパク質(Neyrinck, S.他、Nature Med. 5: 1157~1163 (1999))またはいわゆる主免疫優性領域(MIR)への挿入が記載されており(Pumpens, P.およびGreens, E.、Intervirology 44: 98~114 (2001)、WO 01/98333)、本発明の好ましい実施形態である。MIR内の欠失を伴う天然に生ずるHBcAgの変種も記載されており(Pumpens, P.およびGreens, E.、Intervirology 44: 98~114 (2001)、その全体を参照により明確に援用する)、NまたはC末端への融合、ならびにwtHBcAgと比較した場合の欠失部位に対応するMIRの位置での挿入は、本発明の別の実施形態である。C末端への融合についても記載されている(Pumpens, P.およびGreens, E.、Intervirology 44: 98~114 (2001))。当業者なら、古典的な分子生物学的技法を使用して融合タンパク質をどのように構成すべきかという方向性を容易に見出すであろう(Sambrook, J.他編、分子クローニング(Molecular Cloning)、実験室マニュアル第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)、Ho他、遺伝子(Gene)、77: 51 (1989))。HBcAgおよびHBcAg融合タンパク質をコードし、HBcAgおよびHBcAg融合タンパク質の発現に有用な、ベクターおよびプラスミドが記載されており(Pumpens, P.およびGreens, E.、Intervirology 44: 98~114 (2001)、Neyrinck, S.他、Nature Med. 5: 1157~1163 (1999))、本発明を実施する際に使用することができる。また本発明者等は、例として(実施例6)、キメラ自己組織化HBcAgをもたらすHBcAgのMIRへのエピトープの挿入についても述べている。自己組織体の効率およびHBcAgのMIRに挿入するエピトープのディスプレイを最適化するための重要なファクターは、挿入部位の選択、ならびに挿入によってMIR内のHBcAg配列から欠失するアミノ酸の数(Pumpens, P.およびGreens, E.、Intervirology 44: 98~114 (2001); EP 421'635; 米国第6,231,864号)であり、言い換えればHBcAgからのアミノ酸類を新しいエピトープで置換しなければならない。例えば、HBcAgアミノ酸76~80、79~81、79~80、75~85、または80~81を、外来のエピトープで置換することが記載されている(Pumpens, P.およびGreens, E.、Intervirology 44: 98~114 (2001); EP 0421635; 米国第6,231,864号)。HBcAgは、カプシド組織体には重要ではなく核酸に結合可能な長いアルギニン末端部(Pumpens, P.およびGreens, E.、Intervirology 44: 98~114 (2001))を含有する(Pumpens, P.およびGreens, E.、Intervirology 44: 98~114 (2001))。このアルギニン末端部を含みまたは含まないHBcAgは、いずれも本発明の実施形態である。

## 【0208】

本発明のさらに好ましい実施形態で、VLPは、RNAファージのVLPである。RNAファージの主なコートタンパク質は、細菌内、特にE. coli内での発現によって自発的にVLPに組織化する。本発明の組成物を調製するのに使用可能なバクテリオファー

ジコートタンパク質の特定の例には、バクテリオファージQ（配列番号10；PIRデータベース、受入番号VCBHQ、QCPを指すもの、および配列番号11；受入番号AAA16663、Q A1タンパク質を指すもの）やバクテリオファージfr（配列番号4；PIR受入番号VCBPFR）などのRNAバクテリオファージのコートタンパク質が含まれる。

#### 【0209】

より好ましい実施形態では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンの少なくとも1つのタンパク質またはペプチドを、Qコートタンパク質に融合させる。切断型のQのA1タンパク質のC末端にエピトープを融合させ、またはA1タンパク質内にエピトープを挿入した融合タンパク質構成体が、記述されている（Kozlovska, T. M. 他、Intervirology、39:9~15（1996））。A1タンパク質は、UGA停止コドンで抑制することによって生成し、N末端メチオニンの切断を考慮した場合、その長さは329aaまたは328aaである。アラニン（QCP遺伝子によってコードされた第2のアミノ酸）の前のN末端メチオニンの切断は、通常E.coliで起こり、Qコートタンパク質CPのN末端ではそれが起こる。UGAアンバーコドンのA1遺伝子3'の部分は、長さが195アミノ酸であるCP伸長部をコードする。CP伸長部の位置72と73の間に少なくとも1つのIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを挿入することも、本発明の実施形態になる（Kozlovska, T. M. 他、Intervirology、39:9~15（1996））。C末端切断型のQ A1タンパク質のC末端で、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを融合することも、本発明のさらに好ましい実施形態になる。例えばKozlovska他は（Intervirology、39:9~15（1996））、位置19で切断されたQ CP伸長部のC末端でエピトープが融合した、Q A1タンパク質融合について述べている。

#### 【0210】

Kozlovska他（Intervirology、39:9~15（1996））によって記述されるように、融合エピトープを示す粒子の組織体は、典型的な場合、A1タンパク質とIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとの融合体と、wtCPとの両方を存在させて、モザイク粒子を形成する必要がある。しかし、ウイルス様粒子、本明細書では特にRNAファージQコートタンパク質のVLPであって、そこに融合した少なくとも1つのIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを有するVLPサブユニットのみからなるものを含む実施形態も、本発明の範囲内である。

#### 【0211】

モザイク粒子の生成は、いくつかの方法で行うことができる。Kozlovska他、Intervirolog、39:9~15（1996）は、2つの方法について述べており、これらはいずれも本発明を実施する際に使用することができる。第1の手法では、VLP上での融合エピトープの効率的な提示が、クローニングされたUGAサブレッサートRNAをコードするプラスミドを収容したE.coli株のCPとCP伸長部との間にUGA停止コドンを有するQ A1タンパク質融合体をコードするプラスミドの発現によって仲介され、UGAコドンがTrpに翻訳される（pISM3001プラスミド（Smiley B. K. 他、遺伝子（Gene）134:33~40（1993））。別の手法では、CP遺伝子停止コドンをUAAに変更し、A1タンパク質とIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとの融合体を発現する第2のプラスミドを同時形質転換する。第2のプラスミドは、異なる抗生物質耐性をコードし、複製源は第1のプラスミドに適合するものである（Kozlovska, T. K. 他、Intervirology、39:9~15（1996））。第3の手法では、Kozlovska他、Intervirology、39:9~15（1996）の図1に記載されているように、CPと、A1タンパク質とIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとの融合体を、2シストロン的手法でコードし、Trpプロ

モーターなどのプロモーターに動作可能に結合する。

【0212】

別の実施形態では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、fr CPのアミノ酸2と3（切断CPの付番、すなわちN末端メチオニンが切断される）の間に挿入し、したがってIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとfr CP融合タンパク質になる。VLPに自己組織化するfr CP融合タンパク質を構成し発現するためのベクターおよび発現系であって、本発明の実施に有用なものが、記載されている（Pushko P.他、Prot. Eng. 6: 883~891 (1993)）。特定の実施形態では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド配列を、アミノ酸2の後の、fr CPの欠失変種、すなわちfr CPの残基3および4が欠失している部分に挿入する（Pushko P.他、Prot. Eng. 6: 883~891 (1993)）。

【0213】

RNAファージMS-2のコートタンパク質のN末端隆起ヘアピンへのエピトープの融合と、その後の、RNAファージMS-2の自己組織化VLP上の融合エピトープの提示についても記述されており（WO 92/13081）、MS-2 RNAファージのコートタンパク質への挿入または置換によるIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの融合も、本発明の範囲内に含まれる。

【0214】

本発明の別の実施形態では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、バピローマウイルスのカプシドタンパク質に融合する。より特定の実施形態では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、ウシバピローマウイルス1型（BPV-1）の主要カプシドタンパク質L1に融合する。バキュロウイルス/昆虫細胞系内でBPV-1融合タンパク質を構成し発現させるためのベクターおよび発現系について、記述されている（Chackerian, B.他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2373~2378 (1999)、WO 00/23955）。BPV-1 L1のアミノ酸130~136を、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドで置換することによって、BPV-1 L1と、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドとの融合タンパク質が得られるが、これは本発明の好ましい実施形態である。バキュロウイルスベクターでのクローニング、およびバキュロウイルス感染Sf9細胞での発現について記述されており、本発明を実施する際に使用することができる（Chackerian, B.他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2373~2378 (1999)、WO 00/23955）。IL-5、IL-13、またはエオタキシンの融合タンパク質またはペプチドを示す組織化粒子の精製は、ゲルろ過やショ糖勾配超遠心分離などのいくつかの方法で行うことができる（Chackerian, B.他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2373~2378 (1999)、WO 00/23955）。

【0215】

本発明の別の実施形態では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、Ty VLPに組込み可能なTyタンパク質に融合する。より特定の実施形態では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを、TYA遺伝子でコードしたp1またはカプシドタンパク質に融合する（Roth, J. F.、酵母（Yeast）、16: 785~795 (2000)）。酵母レトロトランスポゾンTy1、2、3、および4は、Saccharomyces cerevisiaeから単離し、一方、レトロトランスポゾンTf1は、シゾサッカロミセスポンベ（Schizosaccharomyces pombe）から単離した（Boeke, J. D. および Sandmeyer, S. B.、「Yeast Transposable Elements」、The molecular and cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome

dynamics, Protein Synthesis, and Energetics、第193頁、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1991))。レトロトランスポゾンTy1および2は、コピア種の植物および動物要素に関係し、一方Ty3は、植物および動物のレトロウイルスに関するジブシー科のレトロトランスポゾンに属する。Ty1レトロトランスポゾンでは、Gagまたはカプシドタンパク質とも呼ばれるp1タンパク質の長さが440アミノ酸である。P1は、位置408でのVLPの成熟中に切断され、その結果、VLPの本質的な成分であるp2タンパク質が得られる。

#### 【0216】

p1との融合タンパク質と、酵母内で前記融合タンパク質を発現させるためのベクターが記述されている(Adams, S. E. 他、ネイチャー(Nature)329:68~70(1987))。したがって例えば、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをコードする配列をpMA5620プラスミドのBamH1部位に挿入することによって、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをp1に融合することができる(Adams, S. E. 他、ネイチャー(Nature)329:68~70(1987))。pMA5620ベクターへの外来エピトープをコードする配列のクローニングによって、外来エピトープのN末端にC末端が融合したTy1-15のp1のアミノ酸1~381を含む融合タンパク質が発現する。同様に、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドのN末端融合、あるいはp1配列への内部挿入、あるいはp1配列の一部の置換も、本発明の範囲内に含まれるものとする。特に、Tyタンパク質p1のアミノ酸30~31と、67~68と、113~114と、132~133との間のTy配列に、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを挿入することも(EP0677111)、本発明の好ましい実施形態になる。

#### 【0217】

IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの融合に適する別のVLPは、例えば、レトロウイルス様粒子(WO9630523)、HIV2Gag(Kang, Y. C. 他、Biol. Chem. 380:353~364(1999))、ササゲモザイクウイルス(Taylor, K. M. 他、Biol. Chem. 380:387~392(1999))、パルボウイルスVP2 VLP(Rueda, P. 他、Virology 263:89~99(1999))、HBsAg(米国第4,722,840号、EP0020416B1)である。

#### 【0218】

本発明の実施に適するキメラVLPの例として、Intervirology 39:1(1996)に記載されているものもある。本発明での使用が企図されるVLPのその他の例は、HPV-1、HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-33、HPV-45、CRPV、COPV、HIV GAG、タバコモザイクウイルスである。SV-40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ロタウイルス、およびノーウォークウイルスのウイルス様粒子も作製され、これらVLPのキメラVLPも、本発明の範囲内にある。

#### 【0219】

本発明のさらに好ましい実施形態では、抗原または抗原決定基が、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドである。

#### 【0220】

本発明のさらに好ましい実施形態で、抗原または抗原決定基はIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの変種であり、例えばアミノ酸の置換、ペプチドの挿入、または多形性を含むものである。既に述べたように、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドの変種を含む組成物およびワクチン組成物のそれぞれは、本発明の範囲に含まれる。

#### 【0221】

IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドは、原核または真核発現系でIL-5、IL-13、またはエオタキシンcDNAを発現させることによって生成することができる。これに関する様々な例が文献に記載されており、おそらくは変性後に使用して、任意の所望の種の任意のIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを発現することができる。IL-5のタンパク質またはペプチドをどのように生成するかについてもWO900/65058に開示されており、その関連事項も記載されている。

#### 【0222】

本発明のさらに好ましい実施形態では、抗原または抗原決定基がIL-5、IL-13、またはエオタキシンペプチドである。そのようなIL-5、IL-13、またはエオタキシンペプチドまたはその断片は、標準的な分子生物学的技法を使用して生成することができ、すなわち問題となっている断片をコードするヌクレオチド配列をPCRで増幅し、GSTタグやMBPタグ、ヒスチジンタグ、Flagタグ、mycタグ、または抗体の定常部(Fc領域)などのポリペプチドタグに、融合体としてクローニングする。IL-5、IL-13、またはエオタキシン断片とタグとの間にプロテアーゼ切断部位を導入することによって、対応するプロテアーゼを用いた消化による精製の後、IL-5、IL-13、またはエオタキシンペプチドをタグから分離することができる。別の手法では、当業者に知られている標準的なペプチド合成反応を使用して、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをin vitro合成することができる。別の手法では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンの完全長タンパク質のプロテアーゼ消化または化学的切断によって、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのペプチドを生成することができるが、これらの方法はどちらも当業者に周知である。

#### 【0223】

本発明のさらに好ましい実施形態では、抗原または抗原決定基はさらに、(i)前記抗原または抗原決定基との天然でない付着部位、(ii)前記抗原または抗原決定基との天然の付着部位からなる群から選択された少なくとも1つの第2の付着部位を含む。ウイルス様粒子との結合のためにIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドをどのように変性させるかに関する指針は、本願全体を通して示されている。好ましい第2の付着部位は、誘導化VLPと結合するシステイン残基を含み、その例が、上記事項と実施例12および13に記載されている。

#### 【0224】

本発明者等は、IL-5の3次元構造モデルの分析を行って、本発明によるVLP上の第1の付着部位に連結可能になるよう選択された第2の結着部(NH<sub>2</sub>末端)の接触可能性について決定した。N末端は、追加のシステイン残基と共にアミノ酸リンカーを含む第2の付着部位を結着するのに好ましい。しかし、第2の付着部位としてシステイン残基を含有し、IL-5構成体のC末端で融合するアミノ酸リンカーも、本発明のさらに好ましい実施形態になる。システイン残基融合Lを含有するN末端アミノ酸リンカーを持つヒトIL-5構成体は、本発明の非常に好ましい実施形態である。

#### 【0225】

当業者なら、同様の手順を使用して、VLPの第1の付着部位との連結が最適化されるように、IL-13およびエオタキシン上の付着部位の接触可能性をモデル化することができる。

#### 【0226】

マウスIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド構成体が開示されており、好ましいヒトIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチド断片構成体も生成することができる。さらに好ましい構成体は、すべてのヒトIL-5、IL-13、またはエオタキシンタンパク質、ヒトIL-5、IL-13、またはエオタキシンペプチドである。好ましくはVLPに結合したIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドを含む本発明の組成物を使用した、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドに対する免疫

化は、好酸球成分に伴うアレルギー性疾患を治療したるは予防する方法を提供することができる。

#### 【0227】

本発明のさらに好ましい実施形態では、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドが、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質の少なくとも1つの抗原部位を含む。当業者なら、対応するペプチドおよびアミノ酸配列のそれぞれをどのように識別するか理解している。

#### 【0228】

本発明のさらに好ましい実施形態では、モノクローナル抗体を中和することによって定められるような(Dickason, R.R.他、J. Immunol. 156(3):1030~7 1996)、IL-5、IL-13、またはエオタキシンの非隣接または隣接ペプチドが含まれる。

#### 【0229】

本発明のさらに好ましい実施形態では、レセプターの相互作用に關与しあつIL-5のCOO-末端からなどのレセプターとの相互作用に重要であることが予想される、IL-5、IL-13、またはエオタキシンの非隣接または隣接ペプチドが含まれる。

#### 【0230】

本発明での使用に適するその他のIL-5、IL-13、またはエオタキシンのペプチドは、T細胞または抗体応答を誘発するその固有の性質によって実験的に決定することができる。これは一般に、免疫学的に適切な製剤において選択されたペプチドで個別に実験動物を免疫化し、当業者に知られている方法を使用してT細胞およびB細胞、すなわち抗体応答を測定することによって実現される。抗原がタンパク質またはペプチドである場合、この領域は、連続アミノ酸配列によって形成することができる。あるいは、不連続アミノ酸配列によって抗体エピトープを形成することができ、その場合、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの3次元折畳みの後、空間的に互いに近付いてエピトープを形成するような状態で、アミノ酸が配列する。問題となっている連続ペプチド断片は、上述の免疫化実験によって識別することができる。

#### 【0231】

本発明での使用に適するさらに好ましいIL-5、IL-13、またはエオタキシンのペプチドは、既存のまたは将来のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用して識別することができ、これに関する手順は当業者に知られている。

#### 【0232】

本発明での使用に適するその他のIL-5、IL-13、またはエオタキシンのペプチドは、IL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドに特異的な抗体で、ファージディスプレイベプチドライブライアリーをスクリーニングすることによって識別することができ、これは当業者に周知の方法である。

#### 【0233】

本発明のさらに好ましい実施形態では、抗原または抗原決定基は、任意の動物から単離したIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質、ならびに任意の動物の、任意のIL-5、IL-13、またはエオタキシンの抗原ペプチドである。当業者なら、これらの単離されたIL-5、IL-13、またはエオタキシンのタンパク質またはペプチドからどのようにペプチドを生成するかを理解している。

#### 【0234】

本発明の別の好ましい実施形態では、抗原決定基がインターロインキン13(IL-13)である。IL-13は、活性化Tリンパ球によって分泌され、単球、マクロファージ、およびB細胞に影響を及ぼすサイトカインである。前駆体ヒトIL-13のアミノ酸配列を配列番号230で示し、プロセッシングされたヒトIL-13のアミノ酸配列を配列番号231で示す。前駆体タンパク質の最初の20のアミノ酸はシグナルペプチドに対応し、プロセッシングされたタンパク質は存在しない。マウス配列も記載されており、プロセッシングされたアミノ酸配列を配列番号232に示す(Brown K.D.他、J.

Immuno1.142:679~687(1989)。発現宿主に応じて、IL-13構成体は、例えば真核宿主での発現および分泌では前駆体タンパク質の配列を含むことになり、あるいは例えばE.coliでの細胞質発現では、成熟タンパク質からなる。E.coliのペリプラズムでの発現では、IL-13のシグナルペプチドを細菌シグナルペプチドに代える。

#### 【0235】

IL-13は、最近になってアレルギー性気道応答(喘息)に結び付けられたTヘルパー-2由来サイトカイン(IL-4、IL-5など)である。IL-13およびIL-13レセプターのアップレギュレーションは、多くの腫瘍型(例えばホジキンリンパ腫)に見出されている。インターロイキン13は、ホジキン細胞およびリード-ステンベルグ細胞の増殖によって分泌され、これらの細胞の増殖を刺激する(Kapp U他、J Med. 189:1939~46(1999))。したがってIL-13に対する免疫化は、とりわけ喘息やホジキンリンパ腫などの上述の状態を治療する方法を提供する。

#### 【0236】

組成物は、遊離システイン残基を含有して成熟IL-13配列のNまたはC末端に融合するアミノ酸リンカーを含み、それによってタンパク質内に第2の付着部位を導入することが好ましい。さらに好ましい実施形態では、遊離システインを含有するアミノ酸リンカーは、IL-13のNMR構造により自由に接触可能であるので、成熟形態のIL-13のN末端に付加する(Eisenmesser, E.Z.他、J.Mol.Biol. 310:231(2001))。さらに好ましい実施形態でも、遊離システインを含有するアミノ酸リンカーを、プロセッシング済みのタンパク質の配列に対応する配列のN末端に融合し、またはシグナルペプチドのC末端側にある成熟形態のタンパク質の配列のN末端で挿入する。さらに好ましい実施形態では、遊離システイン残基を含有するアミノ酸リンカーを、タンパク質のC末端に付加する。

#### 【0237】

IL-13は、E.coliで発現させることができ(Eisenmesser E.Z.他、Protein Expr. Purif. 20:186~95(2000))、またはNS-0細胞(真核細胞系)で発現させることができる(Cannon-Carlson S.他、Protein Expr. Purif. 12:239~48(1998))。実施例8は、細菌内での、システイン残基を含有するアミノ酸リンカーに融合したマウスIL-13-Fの、クローニング、構成体の発現、および精製について示している。また、エオタキシン-VLPワクチンの生成および試験についても述べている。ヒトIL-13構成体は、実施例8の教示により生成することができ、融合タンパク質の発現と、第Xa因子およびエンテロキナーゼのそれぞれによる切断の後に、タンパク質であるヒトC-IL-13(配列番号330)およびヒトC-IL-13-S(配列番号331)が得られる。このように生成されたタンパク質は、VPLおよび線毛に連結することができ、本発明の好ましい実施形態が得られる。

#### 【0238】

本発明のさらに別の実施形態では、抗原決定基がインターロイキン5(IL-5)である。IL-5は、好酸球形成に関する系統特異的サイトカインであり、喘息などの、好酸球数の増加に関連する疾患において重要な役割を果たす。前駆体およびプロセッシング済みのヒトIL-5の配列を、配列番号233および配列番号234にそれぞれ示し、プロセッシングされたマウスアミノ酸配列を配列番号235で示す。

#### 【0239】

IL-5の生物学的機能は、いくつかの研究で示されており(Coffman R.L.他、サイエンス(Science)245:308~10(1989); Kopf他、免疫性(Immunity)4:15~24(1996))、これらは、好酸球により媒介される疾患において、IL-5の機能を阻害するという有益な作用を示している。したがってIL-5の動作の阻害は、喘息および好酸球に関連するその他の疾患に対する治療法を提供する。

## 【0240】

IL-5は、ジスルフィド架橋によって共有結合するダイマーを形成する。IL-5の2つのモノマーがペプチドリンカーによって結合される1本鎖(s c)構成体が報告されている。

## 【0241】

本発明の好ましい実施形態で、遊離システインを含有するペプチドリンカーは、プロセッシング済み形態のIL-5の配列のN末端に付加される。遊離システインを含有するリンカーの付加は、好ましくはプロセッシング済み形態のs c IL-5の配列のN末端でなされることも考えられる。さらに好ましい実施形態では、遊離システインを含有するアミノ酸リンカーが、プロセッシング済みタンパク質の配列に対応した配列のN末端に融合され、シグナルペプチドのC末端側にある成熟形態のタンパク質の配列のN末端に挿入される。

## 【0242】

さらに好ましい実施形態でも、遊離システインを含有するリンカーが、IL-5の配列のC末端に融合し、またはs c IL-5配列のC末端に融合する。

## 【0243】

IL-5に関するいくつかの発現系が記載されており、本発明の組成物の調製に使用することができる。E. coliを使用する細菌発現系が、Proudfoot他により述べられている(Biochem J. 270: 357~61(1990))。E. coliの細胞質内でIL-5が発現する場合、IL-5構成体にはシグナルペプチドが欠けている。本発明の組成物を作成するためにIL-5構成体を生成する際、昆虫細胞を使用してもよい(Pierrot C.他、Biochem. Biophys. Res. Commun. 253: 756~60(1998))。同様に、バキュロウイルス発現系(sf9細胞; Ingley E.他、Eur. J. Biochem. 196: 623~9(1991)、およびBrown P. M.他、Protein Expr. Purif. 6: 63~71(1995))を使用することもできる。最後に、哺乳動物発現系も報告されており(CHO細胞)、本発明のこれらの組成物を調製するのに使用することができる(Kodama S他、J. Biochem. (東京) 110: 693~701(1991))。

## 【0244】

バキュロウイルス発現系(Mitchell他、Biochem. Soc. Trans. 21: 332S(1993); Kunimoto DY他、サイトカイン(Cytokine)3: 224~30(1991))およびCHO細胞を使用する哺乳動物細胞発現系(Kodama S他、Glycobiology 2: 419~27(1992))も、マウスIL-5に関するものが記載されている。

## 【0245】

実施例7および10は、VLPおよび線毛と連結するためのシステイン残基を含有するアミノ酸リンカーに対してIL-5配列がそのN末端で融合しているマウスIL-5構成体の、実験的喘息のマウスモデルにおける、発現、精製、VLPとの連結、免疫化、及び試験について述べている。ヒト構成体は、実施例7および10の教示により生成することができ、VLPおよび線毛との連結に適したタンパク質であるヒトC-IL-5-E(配列番号335)、ヒトC-IL-5-F(配列番号336)、およびヒトC-IL-5-S(配列番号337)が得られ、本発明の好ましい実施形態になる。

## 【0246】

別の特定の実施形態では、抗原決定基はエオタキシンである。エオタキシンは、好酸球、好塩基球、およびTh2細胞上に存在する、ケモカインレセプター3に特異的なケモカインである。しかしエオタキシンは、好酸球に非常に特異的であるようにみえる(Zimmermann他、J. Immunol. 165: 5839~46(2000))。好酸球の遊走は、エオタキシン1ノックアウトマウスで70%低下するが、依然として好酸球が発生する可能性がある(Rothenberg他、J. Exp. Med. 185: 785

~90(1997))。IL-5は、骨髄から血液に好酸球が遊走する原因であり、エオタキシンは、組織内での局所的遊走の原因であるようにみえる(Humble他、J. Exp. Med. 186:601~12(1997))。

#### 【0247】

したがって好ましい実施形態では、本発明の組成物は、第2の付着部位としてシステイン残基を含有し、かつ好ましくはエオタキシン配列のC末端に融合するアミノ酸リンカーを含む。その他の好ましい実施形態では、遊離システインを含有するアミノ酸リンカーは、プロセッシングされたタンパク質の配列に対応した配列のN末端に融合し、またはシグナルペプチドのC末端側にある成熟形態のタンパク質の配列のN末端に挿入される。これらの特定の構成体をコードする遺伝子は、適切な発現ベクターでクローニングする。

#### 【0248】

実施例9および11は、マウスエオタキシン構成体のクローニングおよび発現について述べており、この場合エオタキシン配列は、そのC末端が、VLPおよび線毛に連結するためのシステイン残基を含有するアミノ酸残基に融合している。ヒト構成体は、実施例9の教示により生成することができ、VLPおよび線毛との連結に適したタンパク質が得られ、本発明の好ましい実施形態になる。エオタキシンは、化学的に合成することができる(Clark-Lewis他、生化学(Biochemistry)30:3128~3135(1991))。E. coliでの発現も、細胞質でのエオタキシン1に関して記載されている(Crump他、J. Biol. Chem. 273:22471~9(1998))。封入体としてのE. coliでの発現とその後の折畳み(Mayeur他、生化学(Biochemistry)39:8382~95(2000))、および昆虫細胞の発現(Forssmann他、J. Exp. Med. 185:2171~6(1997))が、エオタキシン2に関して述べられており、さらにこれを用いて、本発明の特定の実施形態とすることができる。

#### 【0249】

当業者なら、本明細書に記載する方法および適用例に対する他の適切な変更例および適応例が、容易に明らかになり、本発明の範囲またはその任意の実施形態から逸脱することなく変更を加えかつ適応可能であることが理解されよう。本発明について詳細に述べてきたが、本発明は、本発明の単なる例示を目的とするものであり本発明を限定しようとするものではない以下の実施例を参照することによって、より明確に理解されよう。

#### 【実施例1】

#### 【0250】

変異Q コートタンパク質の構成体および発現、変異Q コートタンパク質VLPまたはカプシドの精製

プラスミドの構成体および変異コートタンパク質のクローニング

pQ 240の構成体

プラスミドpQ 10(Kozlovska, TM他、遺伝子(Gene)137:133~137)を、pQ-240の構成体用の初期プラスミドとして使用した。逆PCRによって、変異Lys13 Argを引き起こした。逆プライマーは、逆向き尾-尾結合方向:

5' - G G T A A C A T C G G T C G A G A T G G A A A A C A A A C T C T G G T C  
C - 3'、および

5' - G G A C C A G A G T T T G T T T C C A T C T C G A C C G A T G T T A C  
C - 3'

に設計した。第1のPCRの生成物を、第2のPCR反応用の鑄型として使用したが、その場合、上流プライマー

5' - A G C T C G C C C G G G A T C C T C T A G - 3'、および下流プライマー  
5' - C G A T G C A T T T C A T C C T T A G T T A T C A A T A C G C T G G G T  
T C A G - 3'

を使用した。第2のPCRの生成物を、XbaIおよびMph1103Iで消化し、p

Q 10 発現ベクターにクローニングし、これを同じ制限酵素によって切断した。PCR 反応は、PCR キット試薬を用い、製造業者のプロトコルに従って行った (MBI Fermentas, Vilnius, リトアニア)。

【0251】

直接標識組込み法を使用した配列決定により、所望の変異体を確認した。pQ - 240 を収容する *E. coli* 細胞は、Q ファージ粒子から単離した対照 Q コートタンパク質と共に SDS-PAGE で共遊走する 14-kD タンパク質の効率的な合成を支援した。

得られたアミノ酸配列 (配列番号 23) :

AKLETVTLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAG  
AVPALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGS  
CDPSVTRQKYADVTFSFTQYSTDEERAFAFVRTELAAALLASP  
LLIDAIIDQLNPAY

【0252】

pQ - 243 の構成体 :

プラスミド pQ 10 を、pQ - 243 の構成体用の初期プラスミドとして使用した。逆PCR によって、変異 Asn 10 Lys を引き起こした。逆プライマーは、逆向き尾 - 尾結合方向 :

5' - GGC AAA ATTAGAGACTGTTACTTTAGGTAAGATCGG  
- 3' 、および  
5' - CCGATCTTACCTAAAGTAACAGTCTCTAATTGCCC  
- 3'

で設計した。第1のPCR の生成物を、第2のPCR 反応用の鑄型として使用したが、その場合、上流プライマー

5' - AGCTCGCCCGGGGATCCCTCTAG - 3' 、および下流プライマー  
5' - CGATGCAATTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGT  
TCAG - 3'

を使用した。第2のPCR の生成物を、XbaI および Mph1103I で消化し、pQ 10 発現ベクターにクローニングし、これを同じ制限酵素によって切断した。PCR 反応は、PCR キット試薬を用い、製造業者のプロトコルに従って行った (MBI Fermentas, Vilnius, リトアニア)。

【0253】

直接標識組込み法を使用した配列決定により、所望の変異体を確認した。pQ - 243 を収容する *E. coli* 細胞は、Q ファージ粒子から単離した対照 Q コートタンパク質と共に SDS-PAGE で共遊走する 14-kD タンパク質の効率的な合成を支援した。

得られたアミノ酸配列 (配列番号 24) :

AKLETVTLGKIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAG  
AVPALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGS  
CDPSVTRQKYADVTFSFTQYSTDEERAFAFVRTELAAALLASP  
LLIDAIIDQLNPAY

【0254】

pQ - 250 の構成体 :

プラスミド pQ 240 を、pQ - 250 の構成体用の初期プラスミドとして使用した。部位特異的突然変異誘発によって、変異 Lys 2 Arg を引き起こした。変異 PCR 断片を合成するために、上流プライマー

5' - GGCCATGGCACGACTCGAGACTGTTACTTTAGG - 3' 、および下流プライマー

5' - GATTTAGGTGACACTATAG - 3'

を使用し、これを、独自の制限部位 NcoI および HindIII で pQ - 185 発

現ベクターに導入した。PCR反応は、PCRキット試薬を用い、製造業者のプロトコルに従って行った(MBI Fermentas、Viilnius、リトアニア)。

【0255】

直接標識組込み法を使用した配列決定により、所望の変異体を確認した。pQ - 250を収容するE. coli細胞は、Q ファージ粒子から単離した対照Q コートタンパク質と共にPAGEで共遊走する14-kDタンパク質の効率的な合成を支援した。

得られたアミノ酸配列(配列番号25)：

ARLETVTLGNIGNGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVVASLSQAG  
AVPALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGS  
CDPSVTRQKYADVTFSFTQYSTDEERAFAVRTELAAALLASP  
LLIDAIIDQLNPAY

【0256】

pQ - 251の構成体

プラスミドpQ 10を、pQ - 251の構成体用の初期プラスミドとして使用した。逆PCRによって、変異Lys16 Argを引き起こした。逆プライマーは、逆向き尾-尾結合方向：

5' - GATGGACGTCAAACTCTGGTCCCTCAATCCGCGTGGG  
G - 3'、および  
5' - CCCCCACGCCGGATTGAGGACCCAGAGTTGACGTCCT  
C - 3'

で設計した。第1のPCRの生成物を、第2のPCR反応用の鋳型として使用したが、その場合、上流プライマー

5' - AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG - 3'、および下流プライマー  
5' - CGATGCATTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGT  
TCAG - 3'

を使用した。第2のPCRの生成物を、XbaIおよびMph1103Iで消化し、pQ 10発現ベクターにクローニングし、これを同じ制限酵素によって切断した。PCR反応は、PCRキット試薬を用い、製造業者のプロトコルに従って行った(MBI Fermentas、Viilnius、リトアニア)。

【0257】

直接標識組込み法を使用した配列決定により、所望の変異体を確認した。pQ - 251を収容するE. coli細胞は、Q ファージ粒子から単離した対照Q コートタンパク質と共にSDS-PAGEで共遊走する14-kDタンパク質の効率的な合成を支援した。この構成体でコードされた、得られたアミノ酸配列を、配列番号26に示す。

【0258】

pQ - 259の構成体

プラスミドpQ - 251を、pQ - 259の構成体用の初期プラスミドとして使用した。部位特異的突然変異誘発によって、変異Lys2 Argを引き起こした。上流プライマー

5' - GGCCATGGCACGACCTCGAGACCTGTTACTTTAGG - 3'、および下流プライマー

5' - GATTTAGGTGACACTATAG - 3'

を、変異PCR断片の合成に使用し、これを、独自の制限部位NcoIおよびHindIIIでpQ - 185発現ベクターに導入した。PCR反応は、PCRキット試薬を用い、製造業者のプロトコルに従って行った(MBI Fermentas、Viilnius、リトアニア)。

【0259】

直接標識組込み法を使用した配列決定により、所望の変異体を確認した。pQ - 259を収容するE. coli細胞は、Q ファージ粒子から単離した対照Q コートタンパク質と共にSDS-PAGEで共遊走する14-kDタンパク質の効率的な合成を支援し

た。

得られたアミノ酸配列（配列番号27）：

A K L E T V T L G N I G K D G K Q T L V L N P R G V N P T N G V A S L S Q A G  
A V P A L E K R V T V S V S Q P S R N R K N Y K V Q V K I Q N P T A C T A N G S  
C D P S V T R Q K Y A D V T F S F T Q Y S T D E E R A F V R T E L A A L L A S P  
L L I D A I D Q L N P A Y

【0260】

Q およびQ 変異体を発現し精製するための一般的手順

発現

E. coli JM109を、Q コートタンパク質発現プラスミドで形質転換した。20 μg / ml のアンピシリンを含有するLB液体培地5mlを、Q コートタンパク質発現プラスミドで形質転換したクローンと共にインキュベートした。接種培養物を、振盪せずに、37で16～24時間インキュベートした。調製された接種材料を、引き続き20 μg / ml のアンピシリンを含有する新鮮なLB培地100～300mlに入れて1:100に希釈し、振盪せずに37で一晩インキュベートした。得られた第2の接種材料を、フラスコ内で、1%カザミノ酸および0.2%グルコースを含有するM9培地に入れ、1:50に希釈し、これを振盪せずに37で一晩インキュベートした。

【0261】

精製

精製手順用の溶液および緩衝液

1. Lysis緩衝液LB

50 mM Tris-HCl pH 8.0

5 mM EDTA 0.1%、トリトンX100、および新たに調製したPMSFを、濃度ml当たり5マイクログラム含む。

リゾチームおよびDNaseなし。

2. SAV

飽和硫酸アンモニウム水溶液

3. 緩衝液NET

20 mM Tris-HCl、pH 7.8

5 mM EDTA および150 mM NaClを含む。

4. PEG

ポリエチレングリコール6000の40%（w/v）NET溶液。

【0262】

破壊および溶解

凍結細胞を、LBに2ml/g細胞で再懸濁した。溶液を氷上で冷却するために1分の間隔を空けて、混合物を15分間22kHで5回超音波処理した。次いでJaneck K60ローターを使用して、溶解産物を1時間、14000rpmで遠心分離した。下記の遠心分離工程は、他に特に示さない限り、すべて同じローターを使用して行った。上清を4で貯蔵し、細胞破壊片は、LBで2回洗浄した。遠心分離後、溶解産物の上清と洗浄画分を溜めた。

【0263】

分画

飽和硫酸アンモニウム溶液を1滴ずつ、攪拌しながら、上述の溜めた溶解産物に添加した。SAVの体積を、全体積の5分の1になるように調節して、飽和度が20%になるようにした。溶液を一晩放置し、翌日14000rpmで20分間遠心分離した。ペレットを少量の20%硫酸アンモニウムで洗浄し、再び遠心分離した。得られた上清を溜め、SAVを1滴ずつ添加して、飽和度40%にした。溶液を一晩放置し、翌日14000rpmで20分間遠心分離した。得られたペレットをNET緩衝液に溶解した。

【0264】

クロマトグラフィー

N E T 緩衝液に再度溶解したカプシドまたはV L P タンパク質を、セファロースC L - 4 B カラムに導入した。クロマトグラフィー中、3つのピークが溶出された。最初の1つは主に、膜および膜断片を含有し、回収しなかった。カプシドは2番目のピークに含有され、3番目のピークはその他のE . c o l i タンパク質を含有していた。

#### 【0265】

ピーク画分を溜め、N a C l 濃度を調節して、その最終濃度を0 . 6 5 M にした。溜めたピーク画分の2分の1に相当する体積のP E G 溶液を、攪拌しながら1滴ずつ添加した。溶液を、攪拌せずに一晩放置した。1 4 0 0 0 r p m で20分間遠心分離することによって、カプシドタンパク質を沈降させた。次いでこれを、最小体積のN E T に溶解し、再びセファロースC L - 4 B カラムに導入した。ピーク画分を溜め、飽和度6 0 % ( w / v ) の硫酸アンモニウムで沈殿させた。遠心分離してN E T 緩衝液に再度溶解した後、カプシドタンパク質をセファロースC L - 6 B カラムに導入して、再びクロマトグラフィーを行った。

#### 【0266】

##### 透析および乾燥

上記得られたピーク画分を溜め、滅菌水に対して広範にわたり透析し、凍結乾燥して貯蔵した。

#### 【0267】

##### 発現および精製 Q - 2 4 0

細胞 ( E . c o l i J M 1 0 9 、 プラスミドp Q - 2 4 0 で形質転換された ) をL B に再懸濁し、15分間、5回超音波処理し、1 3 0 0 0 r p m で1時間遠心分離した。上清を、さらにプロセッシングされるまで4で貯蔵し、細胞破壊片は、L B 9 m l で2回洗浄し、最後に、L B に溶かした0 . 7 M 尿素9 m l で洗浄した。すべての上清を溜め、セファロースC L - 4 B カラムに導入した。溜めたピーク画分を、硫酸アンモニウムで沈殿させ、遠心分離した。次いで再溶解したタンパク質をセファロース2 B カラムでさらに精製し、最後にセファロース6 B カラムで精製した。最後にカプシドのピークを、水に対して広範にわたり透析し、上述のように凍結乾燥した。コートタンパク質とカプシドとの組織体を、電子顕微鏡によって確認した。

#### 【0268】

##### 発現および精製 Q - 2 4 3

細胞 ( E . c o l i R R 1 ) をL B に再懸濁し、一般的手順で述べたように処理した。セファロースC L - 4 B カラムで、タンパク質を、連続した2回のゲルろ過工程により精製し、最後にセファロースC L - 2 B カラムで精製した。ピーク画分を溜め、上述のように凍結乾燥した。コートタンパク質がカプシドに組み込まれた組織体を、電子顕微鏡によって確認した。

#### 【0269】

##### 発現および精製 Q - 2 5 0

細胞 ( E . c o l i J M 1 0 9 、 p Q - 2 5 0 で形質転換した ) をL B に再懸濁し、上述のように処理した。タンパク質を、セファロースC L - 4 B カラムでゲルろ過により精製し、最後にセファロースC L - 2 B カラムで精製し、上述のように凍結乾燥した。コートタンパク質がカプシドに組み込まれた組織体を、電子顕微鏡によって確認した。

#### 【0270】

##### 発現および精製 Q - 2 5 9

細胞 ( E . c o l i J M 1 0 9 、 p Q - 2 5 9 で形質転換した ) をL B に再懸濁し、超音波処理した。細胞破壊片をL B 1 0 m l で1回洗浄し、2回目は、L B に溶かした0 . 7 M 尿素1 0 m l で洗浄した。タンパク質を、セファロースC L - 4 B カラムで、2回のゲルろ過クロマトグラフィー工程により精製した。タンパク質を、上述のように透析し凍結乾燥した。コートタンパク質がカプシドに組み込まれた組織体を、電子顕微鏡によって確認した。

#### 【実施例2】

## 【0271】

リジン残基を含有するペプチドの、H B c A g ( 1 ~ 1 4 9 ) c / e 1 エピトープへの挿入

H B c A g の c / e 1 エピトープ ( 残基 7 2 ~ 8 8 ) を、B 型肝炎ウイルスカプシド ( H B c A g ) の表面の先端領域に位置付けた。この領域の一部 ( プロリン 7 9 およびアラニン 8 0 ) を、ペプチド G 1 y - G 1 y - L y s - G 1 y - G 1 y ( H B c A g - L y s 構成体 ) で遺伝的に置き換えた。導入されたリジン残基は、その側鎖に反応性アミノ基を含有するが、これは、H B c A g 粒子と遊離システイン基を含有する任意の抗原との分子間化学架橋に使用することができる。

## 【0272】

配列番号 7 8 で示されるアミノ酸配列を有する H B c A g - L y s DNA を、P C R で生成した。H B c A g 断片 ( アミノ酸残基 1 ~ 7 8 および 8 1 ~ 1 4 9 ) をコードする 2 つの断片を P C R により別々に増幅した。これらの P C R に使用されるプライマーも、G 1 y - G 1 y - L y s - G 1 y - G 1 y ペプチドをコードする DNA 配列を導入した。H B c A g ( 1 ~ 7 8 ) 断片は、プライマー E c o R I H B c A g ( s ) および L y s - H B c A g ( a s ) を使用して p E c o 6 3 から増幅した。H B c A g ( 8 1 ~ 1 4 9 ) 断片は、プライマー L y s - H B c A g ( s ) および H B c A g ( 1 ~ 1 4 9 ) H i n d ( a s ) を使用して p E c o 6 3 から増幅した。プライマー L y s - H B c A g ( a s ) および L y s - H B c A g ( s ) は、2 つの P C R 生成物の両端で相補的 DNA 配列を導入し、したがって 2 つの P C R 生成物の融合が後続の組織体 P C R で可能になった。組織化された断片は、プライマー E c o R I H B c A g ( s ) および H B c A g ( 1 ~ 1 4 9 ) H i n d ( a s ) を使用して、P C R によって増幅した。

## 【0273】

P C R では、各オリゴ 1 0 0 p m o l と鑄型 DNA 5 0 n g を、P w o ポリメラーゼ 2 単位、0 . 1 m M d N T P 、および 2 m M M g S O 4 の 5 0 m l 反応混合物中で使用した。両方の反応で、温度サイクルは以下のように実施した： 9 4 、 2 分間； 9 4 ( 1 分 ) 、 5 0 ( 1 分 ) 、 7 2 ( 2 分 ) 3 0 サイクル。

プライマー配列：

E c o R I H B c A g ( s ) :

( 5 ' - C C G G A A T T C A T G G A C A T T G A C C C T T A T A A A G - 3 ' )  
;

L y s - H B c A g ( a s ) :

( 5 ' - C C T A G A G G C C A C C T T T G C C A C C A T C T T C T A A A T T A G T A C C C A C C C A G G T A G C - 3 ' ) ;

L y s - H B c A g ( s ) :

( 5 ' - G A A G A T G G T G G C A A A G G T G G C T C T A G G G A C C T A G T A G T C A G T T A T G T C - 3 ' ) ;

H B c A g ( 1 ~ 1 4 9 ) H i n d ( a s ) :

( 5 ' - C G C G T C C C A A G C T T C T A A A C A A C A G T A G T C T C C G G A A G - 3 ' )

## 【0274】

P C R による 2 つの P C R 断片の融合では、プライマー E c o R I H B c A g ( s ) および H B c A g ( 1 ~ 1 4 9 ) H i n d ( a s ) 1 0 0 p m o l を、P w o ポリメラーゼ 2 単位、0 . 1 m M d N T P 、および 2 m M M g S O 4 を含有する 5 0 m l 反応混合物に溶かした 2 つの精製済み P C R 断片 1 0 0 n g と共に使用した。P C R サイクル条件は： 9 4 、 2 分間； 9 4 ( 1 分 ) 、 5 0 ( 1 分 ) 、 7 2 ( 2 分 ) 3 0 サイクルであった。組織化した P C R 生成物をアガロースゲル電気泳動によって分析し、精製し、E c o R I および H i n d I I I 制限酵素を含む適切な緩衝液に入れて 1 9 時間消化した。消化された DNA 断片を、E c o R I / H i n d I I I 消化 p K K ベクターにライゲートして、p K K - H B c A g - L y s 発現ベクターを生成した。P C R 生成物のベクターへ

の挿入を、EcoRI/HindIII制限分析および挿入物のDNA配列決定によって分析した。

【実施例3】

【0275】

HBCAg-Lysの発現および精製

E.coli株K802またはJM109を、pKK-HBCAg-Lysで形質転換した。一晩培養した細菌1mlを使用して、100μg/mlアンピリシンLB培地100mlに接種した。この培養物を、600nmでODが約0.8に達するまで、37度で4時間成長増殖させた。IPTGを添加することにより、HBCAg-Lysの合成の誘発を行って、最終濃度を1mMにした。誘発後、細菌をさらに、37度で4時間振盪した。細菌を、5000×gで15分間遠心分離することにより収集した。ペレットを-80度凍結した。ペレットを解凍し、200μg/mlリゾチームおよび10μlのベンゾナーゼ(Merck)が補われた細菌溶解緩衝液(10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH7.0、30mM NaCl、0.25%Tween-20、10mM EDTA)に再懸濁した。細胞を室温で30分間インキュベートし、超音波によって破壊した。pKK-HBCAg-Lys発現プラスミドまたは対照プラスミドを収容するE.coli細胞を使用して、IPTGでHBCAg-Lys発現を誘発させた。IPTGを添加する前に、pKK-HBCAg-Lysプラスミドを持つ細菌培養物と、対照プラスミドを持つ培養物からサンプルを取り出した。IPTGを添加してから4時間後、pKK-HBCAg-Lysを含有する培養物と対照培養物からサンプルを再び取り出した。タンパク質の発現を、SDS-PAGEによってモニターした後、クーマシー染色を行った。

【0276】

次いで不溶性細胞破壊片を除去するため、溶解産物を、12,000×gで30分間遠心分離した。HBCAgに対するモノクローナル抗体(YVS1841、Accurate Chemical and Scientific Corp.、Westbury、NY、米国から購入)を使用して、上清とペレットをウェスタンプロット法によって分析したが、かなりの量のHBCAg-Lysタンパク質が可溶性であることが示された。簡単に、HBCAg-Lysを発現するE.coliと対照細胞からの溶解産物を、14,000×gで30分間遠心分離した。上清(=可溶性画分)とペレット(=不溶性画分)を分離し、SDSサンプル緩衝液で希釈して等体積にした。サンプルを、SDS-PAGEにより分析し、その後、抗HBCAgモノクローナル抗体YVS1841でウェスタンプロット法を行った。

【0277】

4mlの6.5%ショ糖溶液上に3mlの1.5%ショ糖溶液があり、その次に細菌溶解産物4mlがある、ショ糖ステップ勾配を使用したステップ勾配遠心分離に、清浄にした細胞溶解産物を使用した。サンプルを、100,000×g、4度で3時間遠心分離した。遠心分離後、勾配最上部から1ml画分を回収し、SDS-PAGEによって分析し、その後、クーマシー染色を行った。HBCAg-Lysタンパク質は、クーマシー染色によって検出した。

【0278】

1.5%と6.5%のショ糖の間ではHBCAg-Lysタンパク質が濃縮され、カプシド粒子を形成することが示された。細菌タンパク質のほとんどは、ショ糖を含まない勾配上層で維持され、したがってHBCAg-Lys粒子のステップ勾配遠心分離により、粒子が濃縮されかつ部分的に精製された。

【0279】

HBCAg-Lysの大規模な発現および精製は、以下のように行った。100ml LB、100μg/mlアンピシリンに単コロニーを接種し、培養物を37度で一晩増殖させることによって、一晩培養物を調製した。翌日、予備培養物25mlを、800mlのLBアンピシリン培地で希釈し、その培養物を増殖させて光学密度OD<sup>600</sup>を0.6~0.8にした。次いで1mMのIPTGで培養を誘発させ、さらに4時間増殖させた。

細胞を、本質的に上述のように収集し溶解した。

【0280】

次いでH B c A g - L y sを、まず清浄にした細胞溶解産物から硫酸アンモニウム(30%飽和)でタンパク質を沈殿させ、次いで再溶解したペレットをゲルろ過カラム(セファクリルS-400、Pharmacia)に導入することによって、精製した。溜まつた画分を硫酸アンモニウムで再び沈殿させ、ペレットを再溶解して同じゲルろ過カラムに2回目の導入を行った。最後に、画分を溜め、濃縮し、その濃度をプラッドフォード試験を使用して評価した(BioRad)。

【実施例4】

【0281】

遊離システイン残基に欠けており挿入したリジン残基を含有する、H B c A gの構成体配列番号77の48および107に対応する位置でシステイン残基に欠けておりかつ挿入されたリジン残基を含有する、本明細書ではH B c A g - 1 y s - 2 c y s - M u tと呼ぶ肝炎コア抗原(H B c A g)を、以下の方法を使用して構成した。

【0282】

以下のPCRプライマーの組合せを用い、実施例2で述べたように調製したH B c A g - L y s遺伝子の3つの断片を最初に別々に増幅することによって、2つの変異体を導入した。PCR法および従来のクローニング技法を使用して、H B c A g - 1 y s - 2 c y s - M u t遺伝子を調製した。

【0283】

簡単に言うと、下記のプライマーを使用して断片1を調製した。

プライマー1：E c o R I H B c A g (s)

C C G G A A T T C A T G G A C A T T G A C C C T T A T A A A G

プライマー2：48as

G T G C A G T A T G G T G A G G T G A G G A A T G C T C A G G A G A C T C

【0284】

以下のプライマーを使用して、断片2を調製した。

プライマー3：48s

G S G T C T C C T G A G C A T T C C T C A C C T C A C C A T A C T G C A C

プライマー4：107as

C T T C C A A A A G T G A G G G A A G A A A T G T G A A A C C A C

【0285】

以下のプライマーを使用して断片3を調製した。

プライマー5：H B c A g 149hind - as

C G C G T C C C A A G C T T C T A A A C A A C A G T A G T C T C C G G A A G C

G T T G A T A G

プライマー6：107s

G T G G T T T C A C A T T T C T T C C C T C A C T T T T G G A A G

【0286】

次いで断片1および2をPCRプライマーE c o R I H B c A g (s)および107asと組み合わせて、断片4を得た。次いで断片4および断片3をプライマーE c o R I H B c A g (s)およびH B c A g 149hind - asと組み合わせて、完全長の遺伝子を生成した。次いで完全長の遺伝子を、E c o R I (G A A T T C)およびH i n d I I I (A A G C T T)酵素で消化してpKKベクター(Pharmacia)にクローニングし、同じ制限部位で切断した。H B c A g - 1 y s - 2 c y s - M u tの発現および精製は、実施例3で述べたように行った。

【実施例5】

【0287】

H B c A g 1 - 185 - L y sの構成体

実施例2で述べたように、肝炎コア抗原(H B c A g)1 - 185を変性させた。c /

e 1 エピトープ（残基 72 ~ 88）領域の一部（プロリン 79 およびアラニン 80）を、ペプチド G1y - G1y - Lys - G1y - G1y で遺伝的に置き換えた（HBcAg 1 - 185 - Lys 構成体）。導入されたリジン残基は、その側鎖に反応性アミノ基を含有し、これを HBcAg 粒子と遊離システィン基を含有する任意の抗原との分子間化学架橋に使用することができる。PCR 法および従来のクローニング技法を使用して、HBcAg 1 - 185 - Lys 遺伝子を調製した。

#### 【0288】

実施例 2 で述べたように、pEco63 からの HBcAg 遺伝子の 2 つ別個の断片を増幅し、その後これら 2 つの断片を PCR により融合して G1y - G1y - Lys - G1y - G1y 配列を挿入し、それによって完全長の遺伝子を組織化した。以下の PCR プライマーの組合せを使用した。

#### 【0289】

断片 1 :

プライマー 1 : EcoRI HBcAg (s) (実施例 2 参照)

プライマー 2 : Lys - HBcAg (as) (実施例 2 参照)

断片 2 :

プライマー 3 : Lys - HBcAg (s) (実施例 2 参照)

プライマー 4 : HBcAg wt HindIII

C G C G T C C C A A G C T T C T A A C A T T G A G A T T C C C G A G A T T G

組織体 :

プライマー 1 : EcoRI HBcAg (s) (実施例 2 参照)

プライマー 2 : HBcAg wt HindIII

#### 【0290】

次いで組織化した完全長遺伝子を、EcoRI (GAATTTC) および HindIII (AAGCTT) 酵素で消化し、pKKベクター (Pharmacia) にクローニングし、同じ制限部位で切断した。

#### 【実施例 6】

#### 【0291】

HBcAg の MIR 領域でのペプチドエピトープの融合

HBcAg 1 - 185 の残基 79 より 80 を、配列 VNLTWSRASG のエピトープ C - H3 で置換した。C - H3 配列は、ヒト IgE の H 鎌の第 3 定常ドメインの配列から得られる。組織体 PCR 法を使用して、エピトープを HBcAg 1 - 185 配列に挿入した。最初の PCR 工程では、ATCC クローン pEco63 由来の HBcAg 1 - 185 遺伝子であってプライマー HBcAg - wt EcoRI fwd および HBcAg - wt HindIII rev で増幅したものを、2 つの個別の反応で鑄型として使用して、C - H3 配列をコードする配列要素を含有した 2 つの断片を増幅した。次いでこれら 2 つの断片を、第 2 の PCR 工程で、組織体 PCR 反応により組織化した。

#### 【0292】

第 1 の PCR 工程でのプライマーの組合せ : HBcAg - wt HindIII rev を持つ C - H3 fwd 、および C - H3 rev を持つ HBcAg - wt EcoRI fwd 。組織体 PCR 反応では、まず第 1 の PCR 工程で単離した 2 つの断片を、3 回の PCR サイクル中は外部プライマーなしで組織化し、その後、次の 25 回のサイクルでは外部プライマーを反応混合物に添加した。外部プライマー : HBcAg - wt EcoRI fwd および HBcAg - wt HindIII rev 。

#### 【0293】

Ecoli での発現のため、EcoRI および HindIII 部位を使用して、PCR 産物を pKK223.3 にクローニングした（実施例 2 参照）。キメラ VLP を Ecoli で発現させ、実施例 2 で述べたように精製した。HBcAg 1 - 185 - C - H3 がゲルろ過から溶出した溶出体積は、融合タンパク質とキメラ VLP との組織体を示していた。

プライマー配列：

C H 3 f w d :

5' GTT AAC TTG ACC TGG TCT CGT GCT TCT G  
GT GCA TCC AGG GAT CTA GTA GTC 3'  
V N L T W S R A S G A 8 0 S R D L V V 8 6

C H 3 r e v :

5' ACC AGA AGC ACG AGA CCA GGT CAA GTT A  
AC ATC TTC CAA ATT ATT ACC CAC 3'  
D 7 8 E L N N G V 7 2

H B c A g - w t E c o r I f w d :

5' C C G g a a t t c A T G G A C A T T G A C C C T T A T A A A G

H B c A g - w t H i n d I I I r e v :

5' C G C G T C C C a a g c t t C T A A C A T T G A G A T T C C C G A G A T T  
G

### 【実施例 7】

#### 【0 2 9 4】

システイン残基を含有するN末端アミノ酸リンカーを備えたIL-5のクローニング、発現、および精製。好酸球成分によるアレルギー性喘息の実験モデルにおける、VLPとの連結、免疫化、および効能の実証

A. マウス His - C - IL - 5 のクローニングおよび、E. coli での封入体としての発現

以下の2つのプライマーを使用して、PCRによりATCCクローン(pmIL5-4G; ATCC番号：37562)からIL-5を増幅した：Spelinker3-F1(配列番号340)およびIL5StopXho-R(配列番号342)。このPCRの産物を、プライマーSpelinker3-F2(配列番号341)およびIL5StopXho-Rを用いた第2のPCRでの鋳型として使用した。挿入物を、SpeIおよびNotIで消化した。この挿入物を、事前にNheIおよびNotIで消化したpETベクター誘導体(pMODEC3-8ベクター)にライゲートし、E. coli TG1細胞に形質転換した。pMODEC3-8にIL5をクローニングすることによって生成された構成体は、そのN末端から、ヘキサヒスチジンタグ(精製を促進させる)、エンテロキナーゼ切断部位、システイン残基を含有する3誘導アミノ酸リンカー(N末端がアミノ酸ALVに、C末端がASに隣接する)、および成熟形態のIL-5タンパク質をコードするDNAを含む。クローニング手順の中実度を、DNA配列決定により確認した。

#### 【0 2 9 5】

上記IL-5を含有する構成体を、pMODEC6-IL5.2とし(pMODEC6-IL5とも呼ぶ)、E. coli株BL21-DE3に形質転換した。E. coliで発現した組換えタンパク質を、His-C-IL5と呼ぶ。

#### 【0 2 9 6】

pMODEC6-IL5を収容するクローンBL21-DE3細胞を、1mg/Lのアンピシリンを含有するLB 5ml中で一晩増殖させた。この培養物の一定量2.0mlを、1mg/Lのアンピシリンを含有する100mlの富栄養培地(TB)で希釀した。培養物を、光学密度OD<sub>600nm</sub>で0.7~1.0になるまで増殖させ、1.0Mのイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)保存液を0.1ml添加することにより、4時間にわたり発現を誘導した。組換えHis-C-IL5を不溶形態で発現させ、誘導細胞の封入体画分に位置付けた。His-C-IL5の発現は、以下のように確認した。誘導後4時間経てから培養サンプル10mlを取り、4000×gで10分間遠心分離した。ペレットを、50mMのTris-HCl、2mMのEDTA、0.1%のトリトンX-100(pH8.0)からなる0.5mlの溶解緩衝液に再懸濁した。この懸濁液に、リゾチーム(40mg/ml)20μlを添加し、4で30分間経た後、2分間超音波処理した。ベンゾナーゼの一定量1.0mlと、50mM MgCl<sub>2</sub>の一定

量  $100 \mu l$  とを添加し、室温で 30 分間インキュベートした。  $13000 \times g$  で 15 分間遠心分離した後、上清を捨て、ペレットを SDS 導入緩衝液  $100 \mu l$  中で、98 度 5 分間加熱した。次いで一定量  $10 \mu l$  を、還元条件下で SDS-PAGE により分析した(図 17A)。SDS-PAGE 分析によれば、IL-5 の質量に対応する  $17 \text{ kDa}$  のタンパク質のバンドが示された。対照として、IPTG が存在しない状態で pMODC6-IL5 を含有する BL21-DE2 細胞を増殖させ、上述のように不溶性細胞画分から抽出物を調製した。

#### 【0297】

##### B. マウス His-C-IL5 の精製および折畳み

ワクチン生成に十分な量の純粋な IL-5 を得るために、BL21-DE3 細胞でクローン pMODC6-IL5 から IL-5 を大規模に発現させた。培養物を一晩増殖させ、 $1.0 \text{ mg/L}$  のアンピシリンを含有する体積  $100 \text{ ml}$  または  $1 \text{ L}$  の TB 培地で希釈した。合計 3 リットルの培養物をこのように調製し、OD<sub>600 nm</sub> が 0.7 になるまで 37 度で増殖させ、その時点で IPTG を添加することにより、最終濃度  $1.0 \text{ mM}$  を得た。4 時間のインキュベーションの後、 $10000 \times g$  で 30 分間遠心分離することによって細胞を収集した。ペレットを収集した後、PBS ( $5.0 \text{ ml/g}$  湿潤重量) に再懸濁し、 $10000 \times g$  で 15 分間遠心分離した。洗浄したペレットを、次に使用するまで -20 度で貯蔵した。

#### 【0298】

細菌ペレットを、Dounce ホモジナイザーを使用して PBS ( $2.0 \text{ ml/g}$  細胞 湿潤重量) に再懸濁した。この懸濁液にリゾチーム ( $0.8 \text{ mg/ml}$ ) を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。懸濁液を、氷上で 1 分間、3 回にわたり超音波処理し、次いでベンゾナーゼおよび MgCl<sub>2</sub> (最終濃度  $10 \text{ mM}$ ) を添加して、室温で 30 分間インキュベートした。トリトン X-100 を添加して最終濃度 1% (w/v) にし、その混合物を、30 分間室温で静かに攪拌した。溶液を、 $20000 \times g$  で 20 分間遠心分離し (SS34 チューブ)、上清を捨てた。封入体を収容したペレットを、Dounce ホモジナイザーを使用して洗浄緩衝液 ( $2 \text{ M}$  尿素および 1% (w/v) トリトン X-100 を含有する PBS) に懸濁し ( $5.0 \text{ ml/g}$  湿潤重量)、5 分間攪拌した。溶液を  $20000 \times g$  で 20 分間遠心分離し、上清を捨てた。ペレットを洗浄し、上述のようにさらに 2 回遠心分離した。トリトン X-100 が存在しない状態で、洗浄緩衝液で封入体の最後の洗浄を行った。

#### 【0299】

ペレットの封入体中に存在する His-C-IL5 を、変性緩衝液 ( $100 \text{ mM}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、 $10 \text{ mM}$  Tris-HCl、 $6.0 \text{ M}$  塩酸ゲアニジン、pH 8.0) に溶解し ( $5.0 \text{ ml/g}$  細胞 湿潤重量)、25 度で 1 時間、静かに攪拌した。懸濁液を  $20000 \times g$  で 20 分間遠心分離し、上清を Ni-NTA 樹脂と混合した (QIAgen、可溶化緩衝液と平衡)。4 度 3 時間、静かに攪拌した後、スラリーをガラスカラム (C10/10) に注ぎ、樹脂を、 $100 \text{ ml}$  の  $100 \text{ mM}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、 $10 \text{ mM}$  Tris、 $6.0 \text{ M}$  塩酸ゲアニジン (pH 6.3) で洗浄した。さらに  $15 \text{ ml}$  の  $10 \text{ mM}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、 $10 \text{ mM}$  Tris、 $6.0 \text{ M}$  塩酸ゲアニジン (pH 5.9) を用いて洗浄工程を実行した。マウス His-C-IL5 は、 $20 \text{ ml}$  の  $100 \text{ mM}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、 $10 \text{ mM}$  Tris、 $6.0 \text{ M}$  塩酸ゲアニジン (pH 4.5) を加えることによって樹脂から溶出した。精製は、SDS-PAGE によって分析した。

#### 【0300】

His-C-IL5 を含有する溶出工程からの画分を溜め、 $10 \text{ kDa}$  のカットオフ膜を使用して、 $8.0 \text{ M}$  尿素、 $100 \text{ mM}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、 $10 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH 8.0) を含む緩衝液に対して 4 度透析した。透析の後、以下の式を使用して、タンパク質濃度を分光測光により決定した：タンパク質 (mg/ml) =  $(1.55 \times A_{280 \text{ nm}}) - (0.76 \times A_{260 \text{ nm}})$ 。タンパク質の濃度を、透析緩衝液で希釈して  $0.2 \text{ mg/ml}$  にした。次いで溶液を、 $2.0 \text{ M}$  尿素、 $50 \text{ mM}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

、5 mM還元グルタチオン、0.5 mM酸化グルタチオン、0.5 Mアルギニン、10% (v/v)グリセロール (pH 8.5) を含むリフォールディング緩衝液1に対し、3.5 kDa膜で24時間にわたり4°で透析し、さらに50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5 mM還元グルタチオン、0.5 mM酸化グルタチオン、0.5 Mアルギニン、10% (v/v)グリセロール (pH 8.5) を含む別のリフォールディング緩衝液2に対して24時間透析した。最後にタンパク質をPBS pH 8.0に対して4°で24時間透析し、次いで30分間10000×gで遠心分離した。上清のタンパク質含量を、ブラッドフォードアッセイにより評価した。

### 【0301】

His-C-IL5をさらに精製するために、HiTrap Q樹脂 (Amersham Pharmacia Uppsala、スウェーデン) を用いた陰イオン交換を行った。His-C-IL5を、遠心分離フィルタ (Ultrafree-15 Millipore、10 kDaカットオフ) を使用して1 mg/mlに濃縮し、50 mMリン酸緩衝液pH 8.4に対して14時間透析した。溶液をHiTrap Qカラムに導入し、50 mMリン酸pH 8.4緩衝液で洗浄した。0~1MのNaCl勾配を加えることによって、His-C-IL-5をカラムから溶出した。His-C-IL5は、100 mM NaClでカラムから溶出した。精製の分析をSDS-PAGEで行い、濃度をブラッドフォードアッセイで測定した。タンパク質の4次構造を、非還元条件下で行ったSDS-PAGEにより評価した。

### 【0302】

#### C. ワクチン生成：His-C-IL5のQへの連結

様々な条件を調査して、連結反応の効率を最適化した。この手法には、His-C-IL5への還元剤 (TCEP) の添加、連結反応におけるQモノマーとHis-C-IL5のモル比の変化が含まれ、これを表1にまとめる。効能を調査するためのワクチンは、以下の方法で生成した。精製したHis-C-IL-5 (40 μM) を、pH 8.0のPBSに溶かした等モル量のTCEPで1時間還元した。還元したIL-5 (80 μM) を、全体積が700 μlのSMPHで誘導化した40 μM Qと共に、22°で4時間インキュベートした。反応生成物を、300 kDaのカットオフ透析膜を使用してpH 8.0のPBSに対して12時間透析した。連結反応は、SDS-PAGEと、抗Hisおよび抗Q抗体を用いたウェスタンプロット法によって分析した。タンパク質濃度をブラッドフォードで測定した。クーマシーブルー染色SDS-PAGEの濃度測定分析によって、連結効率 [すなわちモルQ-IL5 / モルQモノマー (合計)] を評価した。

### 【0303】

表1 His-C-IL5とQβとの化学架橋を最適化するために使用した種々の連結条件

誘導化Qβの濃度(μM)	His-C-IL5の濃度(μM)	TCEP/IL5比(μM)
70	40	TCEPなし
70	40	1:2
70	40	1:1
70	40	1.5:1
70	40	2:1
70	40	16.6:1
20	30	TCEPなし
20	30	1:2
20	30	1:1
20	30	1.5:1
20	30	2:1
20	30	16.6:1

## 【0304】

## D. ワクチンを評価するためのELISA

マウスHis-C-IL5のQへの連結は、図4に示す「4重」ELISAを使用して評価した。96ウェルELISAプレートを、ウェル当たり1mg/Lのヤギ抗ウサギIgG 100ulで一晩被覆した。プレートを、PBS-Tween 0.1%(v/v)(PBST)で4回洗浄し、次いでPBSTに溶かした2%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA)を用いて37で2時間ブロックした。PBSTで洗浄した後、ウサギからのポリクローナル抗Q血清(1:5000に希釈)を添加し、1時間インキュベートした。プレートをPBSTで2回洗浄し、様々な量のQ-His-C-IL5または対照を添加し(図5)、25で1時間インキュベートした。2つの異なる3次抗体をアッセイに使用した。すなわちラット抗マウスIL5(TRFK4)またはラット抗マウスIL5(TRFK5)であり、いずれも中和モノクローナル抗体である。すべては濃度1μg/mlで使用した。検出抗体はホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)に結合され、これは3次抗体の特定のFc断片に特異的であった。サンドイッチアッセイでの結合は、化学発光法(EL)により450nmで測定した。

## 【0305】

## F. IL-5活性のアッセイ

マウスIL-5に応答してB細胞リンパ腫系BCL1が増殖する能力を用いて、リフォールディング組換えHis-C-IL-5の生物活性をチェックした(Harriman G.R.(1991)免疫学における現行プロトコル(Current Protocols in Immunology)6.5.1~6.5.5、John Wiley and Sons Inc.)。Qに共有結合したHis-C-IL5の増殖活性についても評価した。対照として組換えマウスIL-5(R&D system、Minneapolis、米国)を使用した。様々な形態の組換えIL-5を、ウェル当たり $2 \times 10^4$  BCL1細胞を有する平底96ウェルプレートでインキュベートし、37、5%CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートした。<sup>3</sup>Hチミジン1μCi(Hartmann Analytic、スイス)を各ウェルに添加し、このプレートをさらに6時間、37、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。細胞を収集し、洗浄し、液体シンチレーションカウンターで放出をカウントすることによってチミジンの組込みを決定した。

## 【0306】

## G. 免疫化プロトコル

マウスIL-5に対する自己反応性抗体を生成するために、4匹のBalbCマウスに

対して第0日目と第14日目に、PBS 200 μl に溶かした Q - His - C - IL 5 ワクチン 25 μg を皮下注射した。陰性対照として役立てるため、5匹のマウスを第0日目と第14日目に、6.4 μg の Q と 16 μg の IL 5 の単純混合物で、すなわち非共有結合した (Q + His - C - IL - 5) を PBS に溶かしたもので免疫化した。免疫化の前と、免疫化プロトコルの第21日目に、マウスから出血させた。血清を ELISA で分析した。

### 【0307】

#### H. 血清分析

ELISA。Maxisorp ELISAプレート (Nunc) を、精製した His - C - IL - 5 (3 μg / ml) 50 μl で、4 度で 14 時間被覆した。プレートを PBS で 3 回洗浄し、PBS に溶かした 2% BSA で、37 度で 2 時間ブロックし、次いで PBS で 2 回洗浄した。5 倍希釈した血清を、2% BSA、0.1% FCS を PBS に溶かしたものに添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを引き続き PBS で 3 回洗浄し、抗マウス IgG を HRP に結合させたもの (希釈 1:1000) と共に、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを再び PBS で 3 回洗浄し、100 μl / ウエルの展開溶液 (0.066 M Na2HPO4、0.035 M クエン酸、0.032% H2O2、0.4% 1,2-フェニレンジアミン 2 塩酸塩) を添加した。室温で 2 分間反応させた後、ELISA を ウエル当たり 50 μl の 5% H2SO4 で停止させた。吸光度を、Spectramax 分光光度計 (Molecular Devices) で 450 nm で測定した。

### 【0308】

Q - IL 5 で免疫化したマウスの血清によるウェスタンプロット染色。His - C - IL 5、Q 、および対照を SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜上に電気プロットした。膜を、PBS に溶かした 5% (w/v) 粉乳で 1 時間ブロックし、次いで、PBS に溶かした 1% (w/v) 粉乳 10 ml 中に、ワクチン接種したマウスからの第21日目の血清を溶かしたもの 20 μl と共にインキュベートした。膜を PBS で 15 分間洗浄し、次いで抗マウス IgG 抗体をホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) に 1:1000 の希釈率で結合させたものを含有する PBS に溶かした 1% (w/v) 粉乳 10 ml と共に、1 時間インキュベートした。膜を PBS 中で 15 分間洗浄し、ECL (Amersham Pharmacia、スウェーデン) で現像して、写真フィルムに露光した。

### 【0309】

#### I. 好酸球増加症モデル

アレルギー性気道炎症の実験喘息モデルを使用して、好酸球増加症に対するワクチン接種の効果について評価した。Balb/c マウス (グループ当たり 4 匹) を、上述の Q - His - C - IL - 5 で免疫化した。ワクチン接種プログラムの第 23 日目に、マウスに対し、Alum (Alu-Gel-S) に溶かした 50 μg のオボアルブミン (OVA) を腹膜内注射した。免疫化されていない 4 匹のマウスの第 3 のグループにも注射をした。10 日が経過した後 (すなわち第 33 日目)、マウスは 4 日間にわたり毎日、PBS に溶かした OVA 100 μg の鼻内投与を受けた。最後の投与から 24 時間後、マウスを屠殺して、肺を PBS で洗浄した。気管支肺胞洗浄液 (BAL) に含有される細胞を Mai grunwald - Giemsa で染色し、カウントした (Trifilieff 他、Clin Exp Allergy, 2001 年 6 月; 31 (6): 934 ~ 42)。

### 【0310】

#### 結果および考察

発現。BL21 - DE2 細胞での構成体 pMODC6 - IL 5 の発現について、SDS - PAGE により分析した (図 1)。クーマシーブルー染色したゲルは、17 kDa パク質の IPTG 誘導型発現が、IL - 5 の質量に対応するものであることを実証した。対照として、pMODC6 - IL 5 を含有する BL21 - DE2 細胞を、IPTG が存在

しない状態で増殖させ、抽出物を、上述のように不溶性細胞画分から調製した。予想通り、これらの条件下では、17 kDaの誘導はなかった。His-C-IL5は、不溶性封入体画分に局在化した。

#### 【0311】

抽出、精製、およびリフォールディング。不溶性His-C-IL5を、6M塩酸ゲアニジンを用い、洗浄剤で洗浄した封入体から抽出した。溶解したタンパク質を、金属キレートアフィニティクロマトグラフィーによって精製し、SDS-PAGEで分析した(図2)。組換えHis-C-IL5は、この手順によって非常に濃縮されたことがわかつた。変性したタンパク質を、上述のように尿素中でのリフォールディング手順にかけ、さらに陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。これらの工程では、SDS-PAGEで判断されたように、可溶性で高純度のHis-C-IL5が得られ(図5、レーン1)、回収率23%、収量6.9mgであった。

#### 【0312】

生物学的に活性な未処理のIL-5はジスルフィド結合ホモダイマーであるので、精製された組換えHis-C-IL5がダイマーを形成する能力について、非還元条件下で実施されるSDS-PAGEにより評価した(図3)。37 kDaの分子質量により判断されるように、His-C-IL5は、未処理の4次構造が保存されている状態を示す性質からダイマーであることが実証された。

#### 【0313】

組換えHis-C-IL5の生物活性を、マウスB細胞系の増殖を刺激する能力を決定することによって評価した(図4)。His-C-IL5の存在下で培養されたBC1細胞は、培地単独またはその他のタンパク質に比べて増殖速度が高められたことを示した。さらに、増殖が高まったことは、市販のマウスIL-5で観察された場合に類似している。His-C-IL5が、おそらくはその同族のレセプターとの相互作用によってB細胞の増殖を刺激することができ、またダイマー構造の形態をとることは、いずれも、組換えタンパク質が未処理の構造形態をとることを示している。

#### 【0314】

ワクチンの生成および分析。His-C-IL5とウイルス様粒子Qとの共有化学結合を、SDS-PAGEおよびウェスタンプロット分析によって評価した。この連結反応のクーマシープルーチングは、分子量が、Qに共有結合したHis-C-IL5に関して予測されるものに相当するバンドが現れることを実証した(図5)。さらにウェスタンプロット分析によれば、抗His抗体または抗Q抗体で染色した場合にこれらのバンドが共存することが示された(図6)。連結効率[すなわちモルQ-IL5 / モルQモノマー(総量)]は、クーマシープルーチングしたSDS-PAGEの濃度測定分析によって評価し、40.6%であった。

#### 【0315】

Qに共有架橋したHis-C-IL-5がB細胞増殖を刺激することができる能力は、前述のように評価した。図5は、Q-His-C-IL5によって、無関係のサイトカインに連結したQよりも増殖を高めることができることを示す。

#### 【0316】

Qに連結したHis-C-IL5の構造について、4重ELISAを使用してさらに分析した(図7a)。図7bは、His-C-IL5がIL-5中和モノクローナル抗体TRFK4およびTRFK5によって認識されることを実証している。反応を、Q-His-C-IL-5ではなくQと共に行った場合、シグナルは検出されなかった。モノクローナル抗体TRFK4は、IL-5内の中和エピトープを認識する。IL-5特異的モノクローナル抗体が、共有結合したHis-C-IL-5を認識できることは、中和エピトープがワクチン製剤中に保存されることを示している。

#### 【0317】

血清の分析。マウスの免疫前血清と、Q-His-C-IL5でワクチン接種したマウスの第21日目の血清を回収し、ELISAで分析した(図8)。その結果は、自己抗

原IL-5に対する免疫寛容が、アジュバントのない状態で、かつマウス(4/4)にワクチン接種した後にのみ、克服されたことを示している。最大半減力値は、1:2000～1:6000の範囲になるように計算した。His-C-IL5と混合したQを受け取った対照グループでは、有意な抗IL-5力値が検出されなかった。しかし5匹のうち3匹のマウスでは、低抗体力値<1:50がもたらされた。Q-His-C-IL5でワクチン接種したマウスからの免疫血清を、ウェスタンプロット分析によってさらに試験した。すべての場合において、免疫血清はマウスIL-5を特異的に認識した。

#### 【0318】

実験的喘息の動物モデルでのワクチン効率。Q-His-C-IL5によるワクチン接種が好酸球増加症に及ぼす影響について、喘息の重要な病態を模倣するアレルギー性気道炎症のマウスモデルで評価した。この実験では、Q-His-C-IL-5のワクチン接種により生成された抗IL5抗体が、内因性IL-5のin vivo動作をダウンレギュレーションする能力について試験した。対照実験では、OVA感作および投与の前に、マウスにPBSを接種した。この場合、多数の好酸球がBALでカウントされた。カウントされた細胞200個当たりの好酸球の平均の数は、96±14S.D.であった。これとは対照的に、Q-His-C-IL5をワクチン接種した4匹のマウスからのBAL好酸球の平均値は、細胞200個当たり27.5±11S.D.であることがカウントされた。これは71.4%の減少であり、高度に配列された免疫アレイとして提示されるHis-C-IL-5による免疫化で生成された自己抗体が、内因性標的分子を認識し、それによって喘息の実験モデルで好酸球増加症をダウンレギュレートすることの証拠である。

#### 【実施例8】

#### 【0319】

VLPおよび線毛に連結するためのシステイン残基を含有するC末端アミノ酸リンカーを備えるマウスmIL-13の、分子のクローニング、発現、リフォールディング、および精製。マウスインターロイキン13とVLPおよび線毛との連結

##### A. 原核発現のためのIL-13のクローニング

IL-13をクローニングするためのDNAを、RT-PCRでin vitro活性化脾細胞から単離したが、これは以下のようにして得られたものである。すなわち、CD4+T細胞をマウス脾臓細胞から単離し、事前に抗CD3および抗CD28抗体で被覆した6ウェルプレートでIMDM(+5%FCS+10ng/ml IL4)中で3日間インキュベートした。これらの細胞からのRNAを使用して、ワンステップRT-PCR(QiagenワンステップPCRキット)により、IL13をコードするcDNAを増幅した。プライマーXhoIL13-RはRNAの逆転写に使用し、プライマーNheIL13-F(配列番号338)およびXhoIL13-R(配列番号339)は、IL13cDNAのPCR増幅に使用した。NheI/XhoI制限部位を使用して、pMODベクターに、増幅したIL13cDNAをライゲートした(ベクターpMODB1-IL13を与える)。得られたcDNA配列の同一性を、ヌクレオチド配列決定によって決定した。

#### 【0320】

同じプライマーNheIL13-F(配列番号338)およびXhoIL13-R(配列番号339)を使用して、pMODB1-IL13プラスミドからIL-13cDNAを増幅し、pMODGST-EK-C1ベクターにライゲートし、それによってプラスミドpMODGST-EK-IL13-C1を得た。このプラスミドのcDNA配列を、ヌクレオチド配列決定によって決定した。エンテロキナーゼ切断部位に融合したグルタチオンSトランスフェラーゼと、それに続くC末端リンカー1を備えたIL-13配列に対するコード配列を含むcDNAを、プラスミドpMODGST-EK-IL13-C1を鑄型として使用して、プライマーGST-BamHI\_ssおよびC1-BsmBI/XhoIを用いたPCRにより増幅した。このcDNAを制限酵素BamHIおよびBsmBIで消化し、BamHI/XhoI制限部位を使用してpMODB-N1ベクターにライ

ゲートした。得られたプラスミド pMod-GST-EK-IL13-C1-His は、グルタチオン S トランスフェラーゼ、エンテロキナーゼ切断部位、IL-13、システイン含有リンカー、およびポリヒスジジンタグからなる融合タンパク質 (GST-EK-IL13-C1-His) をコードする。この融合タンパク質をコードする cDNA の同一性を、スクレオチド配列決定によって決定した。

オリゴヌクレオチドの配列：

GST-BamHI ss :

5' - C G C C G G A T C C T A T A C T A G G T T A T T G G - 3'

C1-BsmBI/XbaI as :

5' - G G G C G C G T C T C C T C G A G A C C G C A A C C A C C A C C A - 3'

### 【0321】

B. E. coli における IL-13 の発現

プラスミド pMod-GST-EK-IL13-C1-His を、細菌宿主株 BL21 (DE3) に形質転換した。2% グルコース (事前培養物) を含有する LB 培地で回収した 90 分後、0.2% グルコースおよび 100 μg アンピシリン / l を含有する 250 ml の MOPS 緩衝 SB 培地に、250 μl の事前培養物を接種し、振盪プラットフォーム上で一晩 37° でインキュベートした。翌朝、種培養物を、100 μg アンピシリン / l を含有する 750 ml の事前に温めた MOPS 緩衝 SB 培地で希釈し、振盪プラットフォーム上でさらに 90 分間、OD<sub>600</sub> が 4.5 に達するまで 125 rpm、37° でインキュベートした。1000 ml の培養物を、100 μg アンピシリン / l を含有する 500 ml の MOPS 緩衝 SB 培地で希釈し、24° のインキュベータに移し、プラットフォームを振盪させながら 30 分間、OD<sub>600</sub> が 3.75 に達するまでインキュベートした。GST-EK-IL13-C1-His 融合タンパク質の発現は、0.75 mM の IPTG を添加することによって誘導した。4 時間後、遠心分離によって細菌を収集し、超音波処理で破壊した。

### 【0322】

C. 变性条件下での、封入体からの IL-13 の精製

溶解後、封入体を低速遠心分離 (10000 g、60 分、4°) により沈降させた。上清を回収し、再び同じ条件下で遠心分離した。ペレットを粗製封入体画分として保持した。封入体を、以下の洗浄緩衝液、すなわち 50 mM トリス HCL、pH 7.6、250 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、2 M 尿素、2% トリトン X-100、および 10 U ベンゾナーゼ / ml で 4 回洗浄した。封入体を遠心分離によって回収し、100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM トリス HCL、および 6 M グアニジン - HC pH 8.0 を含有する変性緩衝液に再懸濁した。封入体を、10 U ベンゾナーゼ / ml の存在下で超音波処理し、室温で 2 時間、回転ホイール上でインキュベートした。遠心分離後、上清を保持し、ペレットを再び変性緩衝液に再懸濁し、上述のように処理した。上清を溜め、変性緩衝液で平衡にした Ni<sup>2+</sup> アガロースカラムに導入した。結合したタンパク質を、pH 6.3 および pH 4.5 の変性緩衝液を用いて 2 段階で溶出した。一定量の画分を、アミドブラック染色し、TCA 沈降後、SDS-PAGE によって分析した (図 10)。

### 【0323】

D. GST-EK-IL13-C1-His のリフォールディング

溶出したタンパク質に メルカプトエタノールを添加して、最終濃度 10 mM にし、8.0 M 尿素、100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM トリス HCL、10 mM メルカプトエタノール (pH 8.0) を含有する緩衝液 2 リットルに対し、10 kDa のカットオフ膜を使用して 4° で一晩透析した。透析後、タンパク質濃度を決定し、そのタンパク質の濃度を透析緩衝液で希釈して 0.2 mg / ml にした。この溶液を、2.0 M 尿素、50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5 mM 還元グルタチオン、0.5 mM 酸化グルタチオン、0.5 M アルギニン、10% (v/v) グリセロールを含むリフォールディング緩衝液 1 (pH 8.5) に対し、4° で 24 時間透析した。翌日このリフォールディング緩衝液 1 を、50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.5 mM 還元グルタチオン、0.25 mM

酸化グルタチオン、0.25M アルギニン、10% (v/v) グリセロールを含むリフォールディング緩衝液2 (pH 8.5) に対して交換し、さらに24時間、4℃で透析した。最後にこの溶液を、20mM エタノールアミン、150mM NaCl、および10% (v/v) グリセロールを含むリフォールディング緩衝液3 (pH 9.0) に対して4℃で透析した。リフォールディング緩衝液3を2時間後に一度交換し、透析をさらに14時間続行した。透析物を、4℃で15分間、20000gで遠心分離した。上清を保持し、タンパク質を、5kDa分子量カットオフ (Millipore) を備えた「バイオマックス遠心分離フィルタ装置」で遠心分離することにより濃縮して、最終的なタンパク質濃度を2mg/mlにした。タンパク質を、SDS-PAGEと、GST、マウスIL-13、およびHisタグに対するそれぞれの単一特異性抗体を用いたウェスタンプロットによって分析した。

#### 【0324】

E. エンテロキナーゼによるGST-EL13-Cl-His融合タンパク質の切断

GST-EL13-Cl-His融合タンパク質を、1×エンテロキナーゼ緩衝液 (50mM トリスHCl pH 8.0、10mM CaCl<sub>2</sub>、および1%Tween-20) と、12.5μgの融合タンパク質当たり1Uのエンテロキナーゼ (Invitrogen)と共に、4℃で24時間インキュベートする。

#### 【0325】

F. IL13-Cl-Hisの精製

エンテロキナーゼによる処理の後、切断されたGSTを、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、およびアフィニティーコロマトグラフィーの組合せによって分離する。IL-13-Cl-Hisタンパク質を濃縮して、最終的なタンパク質濃度を2mg/mlにする。

#### 【0326】

G. 連結反応のためのIL-13-Cl-Hisタンパク質の調製

IL-13-Cl-Hisタンパク質を連結するのに最適な条件を決定するため、タンパク質を、様々な濃度 (0 μM ~ 500 μM) の還元試薬 (DTTまたはTCEP) を用いた緩慢な還元条件下でプロセッシングされる。還元IL-13-Cl-Hisタンパク質を、誘導化したVLPおよび線毛との効率的な連結に関して試験する。

#### 【0327】

H. IL-13-Cl-HisとQ カプシドとの連結

120 μMのQ カプシドを溶かした20mM Hepes、150mM NaCl (pH 7.2) の溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した25倍モル数が過剰なSMPH (Pierce)などの異種2官能性架橋剤と、25%のロッキングシェーカー上で30分間反応させる。その後、反応溶液を、1Lの20mM Hepes、150mMのNaCl (pH 7.2) に対して2時間にわたり4℃で2回透析する。次いで透析した誘導化Q 反応混合物を、調製済みのIL-13-Cl-Hisタンパク質と混合する。連結反応では、IL-13-Cl-Hisタンパク質が、誘導体化Q カプシドよりも2倍モル数が過剰である。連結反応を、ロッキングシェーカー上で25℃で4時間続行する。連結生成物をSDS-PAGEにより分析し、さらにウェスタンプロット法で分析する。

#### 【0328】

I. IL-13-Cl-Hisとfr カプシドタンパク質の連結

120 μMのfr カプシドを溶かした20mM Hepes、150mM NaCl (pH 7.2) の溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した25倍モル数が過剰なSMPH (Pierce) と、25%のロッキングシェーカー上で30分間反応させる。その後、反応溶液を、1Lの20mM Hepes、150mMのNaCl (pH 7.2) に対して2時間にわたり4℃で2回透析する。次いで透析したfr カプシドタンパク質反応混合物を、調製済みのIL-13-Cl-Hisタンパク質と反応させる。連結反応では、IL-13-Cl-Hisタンパク質が、誘導体化fr カプシドよりも2倍モル数が過剰

である。連結反応を、ロッキングシェーカー上で25で4時間続行する。連結生成物をSDS-PAGEにより分析し、さらにウェスタンプロット法で分析する。

## 【0329】

IL-13-C1-HisとHBcAg-Lys-2cyc-Mutの連結  
120 μMのHBcAg-Lys-2cyc-Mutカプシドを溶かした20 mM Hepes、150 mM NaCl(pH 7.2)の溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した25倍モル数が過剰なSMPH(Pierce)と、25のロッキングシェーカー上で30分間反応させる。その後、反応溶液を、1Lの20 mM Hepes、150 mMのNaCl(pH 7.2)に対して2時間にわたり4で2回透析する。次いで透析したHBcAg-Lys-2cyc-Mut反応混合物を、調製済みのIL-13-C1-Hisタンパク質と反応させる。連結反応では、IL-13-C1-Hisタンパク質が、誘導体化HBcAg-Lys-2cyc-Mutカプシドよりも2倍モル数が過剰である。連結反応を、ロッキングシェーカー上で25で4時間続行する。連結生成物をSDS-PAGEにより分析し、さらにウェスタンプロット法で分析する。

## 【0330】

IL-13-C1-Hisタンパク質と線毛の結合  
20 mM Hepesに125 μMのE.coliの1型線毛を加えた溶液(pH 7.4)を、DMSO中の保存溶液から希釈した50倍モル数が過剰な架橋剤SMPHと、室温のロッキングシェーカー上で60分間反応させる。反応混合物を、PD-10カラム(Amersham-Pharmacia Biotech)上で脱塩する。カラムから溶出したタンパク質含有画分を溜め、脱塩した誘導体化線毛タンパク質を、調製済みのIL-13-C1-Hisタンパク質と反応させる。連結反応では、IL-13-C1-Hisタンパク質が、誘導体化したE.coliの1型線毛よりも2倍モル数が過剰である。連結反応を、ロッキングシェーカー上で25で4時間続行する。連結生成物をSDS-PAGEにより分析し、さらにウェスタンプロット法で分析する。

## 【0331】

Qカプシドタンパク質に連結されたIL-13-C1-Hisによるマウスの免疫化  
メスのBalb/cマウスに、アジュバントを添加することなく、VLPに連結されたIL-13-C1-Hisをワクチン接種する。各サンプルの全タンパク質25 μgをPBS中に希釈して200 μlにし、第0日目と第14日目に皮下注射する(両腹側部に100 μl)。第31日目に、マウスを、眼窩後方から出血させ、その血清を、IL-13特異的ELISAを使用して分析する。

## 【実施例9】

## 【0332】

cys含有アミノ酸リンカー配列によるエオタキシンのクローニング、発現、精製、および連結

マウスエオタキシンを、そのC末端で融合しているアミノ酸リンカーC1により組換え発現させた。このリンカーは、VLPに連結するための1つのシステインを含有していた。

## 【0333】

pmEo-C1およびpmHisEo-C1の構成体

アニールされたオリゴプライマーMCS-1FおよびプライマーMCS-1Rで当初の配列をNdeI部位からXhoI部位に置き換えることによって、pET22b(+)のMCS(Novagen, Inc.)をGTTTAACTTTAAGAAGGAGATA  
TACATATGGATCCGGCTAGCGCTCGAGGGTTAACGGCG  
GCGCGCATGCCに変えた(アニーリングは、15 mMのトリスHCl pH 8緩衝液で)。得られたプラスミドをpMod00とし、これはそのMCSにNdeI、BamHI、NheI、XhoI、PmeI、およびNotI制限部位を有するものであった。アニールされたBamhis6-EK-Nhe-FとBamhis6-EKNhe-Rのオリゴ対と、アニールされた1F-C-グリシン-リンカーと1R-C-グリシン-

リンクーのオリゴ対を、BamHI - NotI消化pMod00プラスミドと一緒にライゲートしてpModEC1を得たが、これはN末端ヘキサヒスチジンタグ、エンテロキナーゼ切断部位、および1つのシステイン残基を含有するC末端アミノ酸グリシンリンクーを有するものであった。以下のプライマーを使用して、すなわちm工オタキシン-F、Nhe-m工オタキシン-F、およびm工オタキシン-Xho-Rを使用して、マウスエオタキシンを、PCRによってATCCクローン(ATCC番号3148394)から増幅した。m工オタキシン-Fは、内部NdeI部位を有し、Nhe-m工オタキシン-Fは、内部NheI部位を有し、m工オタキシン-Xho-Rは内部XhoI部位を有していた。プライマー対m工オタキシン-Fとm工オタキシン-Xho-RからのPCR産物を、NdeIおよびXhoIで消化し、同じ酵素で消化したpModEC1にライゲートした。得られたプラスミドをpModEC1としたが、これは、エオタキシンと、そのC末端にリンクーを含有するシステインとからなる融合タンパク質をコードするものである。プライマー対Nhe-m工オタキシン-Fとm工オタキシン-Xho-RからのPCR産物を、NheIおよびXhoIで消化し、同じ酵素で消化されたpModEC1にライゲートした。得られたプラスミドをpHisModC1としたが、これは、N末端Hisタグと、その後に続くエンテロキナーゼ切断部位、エオタキシン、およびシステインリンクーからなる融合タンパク質をコードするものである。

## 【0334】

PCR反応では、各オリゴ15pmolと鋳型DNA1ngを、50μlの反応混合物(2単位のPFXポリメラーゼ、0.3mM dNTP、および2mM MgSO<sub>4</sub>)中で使用した。温度サイクルは下記の通りであった：94 2分間、その後、94 (30秒)、60 (30秒)、68 (30秒)を30サイクル、その後、68 2分間。その他すべての工程は、標準的な分子生物学的プロトコルによって実施した。

オリゴヌクレオチドの配列：

m工オタキシン-F：5' G G A A T T C C A T A T G C A C C C A G G C T C C A T C C C A A C 3'

Nhe-m工オタキシン-F：5' C C T A G C T A G C G C A C C C A G G C T C C A T C C C A A C 3'

m工オタキシン-Xho-R：5' C C C G C T C G A G T G G T T T G G A G T T T G G A G T T 3'

## 【0335】

pModC1の発現

コンピテントE.coli BL21(DE3)細胞を、プラスミドpModC1で形質転換した。アンピシリン(Amp)含有寒天平板からの單一コロニーを液体培養(150mM MOPS、pH7.0、100ug/ml Amp、0.5%グルコースを含むSB)で拡張し、30で一晩、220rpmで振盪させながらインキュベートした。次いでSB(150mM MOPS、pH7.0、100ug/ml Amp)11に、一晩培養したものを1:50v/v接種し、150rpmで振盪させながら30でOD600=1.7になるまで増殖させた。1mM IPTGで発現を誘導した。9時間誘導した後、6000rpmで5分間遠心分離することによって細胞を収集した。細胞ペレットを、0.8mg/mlのリゾチームを加えた溶解緩衝液(10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、30mM NaCl、10mM EDTA、および0.25% Tween-20)に懸濁し、超音波処理し、ベンゾナーゼで処理した。48000RCFで20分間遠心分離した後、上清を16%PAGEゲル上で分離させ、マウスエオタキシンの発現を、ウェスタンプロット法で抗マウスエオタキシン抗体(R&D system)により確認した(図12)。これは、予測される分子量8.8KDで実験したときのエオタキシン-C1の発現を明らかに示していた。

## 【0336】

マウスエオタキシン-C1とマウスHis-エオタキシン-C1のタンパク質配列を、cDNA配列から翻訳した。

## マウスエオタキシン - C 1 :

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

## マウスH i s - エオタキシン - C 1 :

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

## 【0337】

## マウスエオタキシン - C 1 と Q カプシドタンパク質の連結

6 mg / ml の Q カプシドタンパク質を、20 mM Hepes、150 mM NaCl (pH 7.2) に溶かした 1.48 ml の溶液を、25℃で、SMPH (Pierce) (DMSO に溶解した 100 mM 保存溶液から) 14.8 μl と 60 分間反応させる。その後、この反応溶液を、21 の 20 mM Hepes、150 mM NaCl、pH 7.0 に対して 4℃で 3 時間にわたり、2 回透析する。3.6 mg / ml のマウスエオタキシン - C 1 タンパク質を 20 mM Hepes、150 mM NaCl、pH 7.2 に溶かした 1.3 ml の溶液を、25℃で、TCEP (Pierce) (H<sub>2</sub>O に溶解した 36 mM 保存溶液から) 9.6 μl と 1 時間反応させる。次いで誘導化し透析された Q 130 μl を、還元エオタキシン - C 1 129 μl を 241 μl の 20 mM Hepes、150 mM NaCl、pH 7.0 に溶かしたものと、25℃で一晩反応させる。抗 Q および抗エオタキシン抗体によるウェスタンプロット分析は、エオタキシンと Q とが共有結合したことを示している。

## 【0338】

## B. Q カプシドタンパク質に連結したマウスエオタキシン - C 1 によるマウスの免疫化

メスの Balb / c マウスに、アジュバントを添加することなく、Q カプシドタンパク質に連結したマウスエオタキシン - C 1 をワクチン接種する。各サンプルのすべてのタンパク質 25 μg を PBS に希釈して 200 μl とし、第 0 日目と第 14 日目に皮下注射する（両腹側部に 100 μl）。第 31 日目にマウスの眼窩後方から出血させ、その血清を、エオタキシン特異的 E L I S A を使用して分析する。

## 【0339】

## C. E L I S A

E L I S A プレートを、濃度 5 μg / ml でマウスエオタキシン - C 1 で被覆する。このプレートをブロックし、次いで連続希釈したマウス血清と共にインキュベートする。結合した抗体を、酵素標識した抗マウス IgG 抗体で検出する。対照として、同じマウスからの免疫前血清も試験する。

## 【実施例 10】

## 【0340】

VLP および線毛に連結するためのシステイン残基を含有する N 末端アミノ酸リンカーを備えたインターロイキン 5 (IL-5) のクローニングおよび発現

## A. E. coli 中の封入体として発現させるための IL-5 のクローニング

以下の 2 つのプライマー、すなわち SpeI linker 3-F1 (配列番号 340) および IL5StopXho-R (配列番号 342) を使用した PCR によって、ATCC クローン (pMIL5-4G; ATCC 番号: 37562) から IL-5 を增幅した。この PCR 産物を、プライマー SpeI linker 3-F2 (配列番号 341) および IL5StopXho-R による第 2 の PCR 用鉄型として使用した。挿入物を、SpeI および NotI で消化した。この挿入物を、事前に NheI および NotI で消化した（脱リン酸化していない）pETベクター誘導体 (pMODEC3-8ベクター) にライゲートし、E. coli TG1 細胞に形質転換した。pMODEC3-8ベクターへのクローニングによって生成された IL5 構成体は、その N 末端にヘキサヒスチジンタグを含

有し、その後にエンテロキナーゼ部位、システイン残基を含有するN末端 3 アミノ酸リンカーが続き、そのC末端側には配列A Sが隣接し、N末端側には配列A L Vが隣接し、成熟形態のIL 5遺伝子となる。エンテロキナーゼを用いた切断によって遊離したタンパク質を、「マウスC-IL-5-E」(配列番号332)と呼ぶ。得られたクローンpMODC6-IL5.2(pMODC6-IL5とも呼ぶ)のプラスミドDNAは、その配列がDNA配列決定によって確認されたものであり、E.coli株BL21に形質転換した。

#### 【0341】

クローンpMODC6-IL5/BL21を、1mg/Lのアンピシリンを含有する5mlのLB中で一晩増殖させた。この培養物2mlを、1mg/Lのアンピシリンを含有する100mlの富栄養培地(TB)で希釀した。培養は、培養によって光学密度がOD600=0.7に達したときに、イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の1M溶液0.1mlを添加することによって誘導した。2時間ごとに、サンプル10mlを採取した。これらのサンプルを、40000×gで10分間、遠心分離した。ペレットを、50mMトリスHCl、2mM EDTA、0.1%トリトンX-100(pH8)を含有する0.5mlの溶解緩衝液に再懸濁した。リゾチーム(40mg/ml)20μlを添加してチューブを4で30分間インキュベートした後、細胞を2分間超音波処理した。50mM MgCl<sub>2</sub>溶液100μlとベンゾナーゼ1mlを添加した。次いで細胞を、室温で30分間インキュベートし、13000×gで15分間遠心分離した。

#### 【0342】

上清を捨て、ペレットを、SDS導入緩衝液100μl中、98で5分間沸騰させた。導入緩衝液中のサンプル10μlを、還元条件下でSDS-PAGEにより分析した(図17A)。図17Aのゲルは、IL-5構成体の発現を明確に示している。図17Aのゲルに導入されたサンプルは、下記の通りであった。

レーンM:マーカー(NEB、プロードレンジ着色マーカー)

レーン1:誘導前の1ml培養の細胞抽出物

レーン2:誘導後4時間の1ml培養の細胞抽出物

#### 【0343】

B. 哺乳動物細胞(HEK-293T)中で発現させるためのIL-5のクローニング  
a) IL-5は、そのN末端でシステイン残基を含有するアミノ酸リンカーに融合し、そのC末端でFc断片に融合する。

(A)(ATCCクローン37562)で述べた鋳型を、以下の構成体のクローニングに使用した。プラスミドpMODB1-IL5(pET誘導体)をBamHI/XhoIで消化して、システインを含有するN末端アミノ酸リンカーに融合したIL5をコードする小断片を得た。この断片を、BamHIおよびXhoIで事前に消化されたベクターpCEP-SP-XA-Fc\*(Xho)にライゲートした。ライゲーションをE.coli株TG1に電気穿孔し、得られたクローンpCEP-SP-IL5-Fc.2のプラスミドDNAであって、その配列がDNA配列決定によって確認されたものを使用して、HEK-293T細胞を形質移入した。このプラスミドによってコードされた、得られたIL-5構成体は、IL-5成熟配列のN末端に融合したアミノ酸配列ADPGCGGGGGGLAを有していた。この配列は、システインを含有するアミノ酸リンカー配列GCGGGGを含み、これはクローニング手順中に導入された追加のアミノ酸に隣接している。第Xa因子による融合タンパク質の切断によって遊離したIL-5タンパク質を、以下「マウスC-IL-5-F」(配列番号333)と呼ぶ。

#### 【0344】

ピューロマイシンに形質移入し選択した後、培養上清を、抗His(マウス)および抗マウスIgG抗体であってホースラディッシュペルオキシダーゼに結合したものを使用して、ウェスタンプロットによって分析した(図17B)。ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合した抗マウスIgG抗体も、Fc融合タンパク質を検出する。タンパク質の

精製は、プロテインA樹脂上でのアフィニティークロマトグラフィーにより実施した。図17Bの結果は、IL-5構成体の発現を明瞭に示している。

【0345】

図17Bのウェスタンプロットに導入されたサンプルは、下記の通りであった。レーン1: IL5-Fcを発現するHEK培養の上清(20μl)。SDS-PAGEは還元条件下で行った。レーン2: IL13-Fcを発現するHEK培養の上清(20μl)。SDS-PAGEは非還元条件下で行った。レーン3: IL5-Fcを発現するHEK培養の上清(20μl)。SDS-PAGEは非還元条件下で行った。

【0346】

B. GST(グルタチオンSトランスフェラーゼ)でクローニングされたIL-5と、そのN末端で融合しているシステイン残基を含有するアミノ酸リンカー

IL-5(ATCCC37562)を、プライマーNhe-1ink1-IL13-FおよびIL5StopXho-Rで増幅した。NheIおよびXhoIで消化した後、挿入物を、NheIおよびXhoIで事前に消化されたpCEP-SP-GST-EKにライゲートした。得られたプラスミドpCEP-SP-GST-IL5を配列決定し、HEK-293T細胞のトランスフェクションに使用した。このプラスミドによってコードされた、得られたIL-5構成体は、IL-5成熟配列のN末端で融合しているアミノ酸配列LACGGGGGを有していた。この配列は、システイン残基を含有するアミノ酸リンカーパ配列ACGGGGGを含み、これはクローニング手順中に導入された追加のアミノ酸に隣接している。エンテロキナーゼを用いた切断によって遊離したタンパク質を、以下「マウスC-IL-5-S」(配列番号334)と呼ぶ。得られたタンパク質の精製は、グルタチオンアフィニティーカラム上でのアフィニティーカロマトグラフィーによって行った。

【0347】

C. マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-SとQカプシドタンパク質の連結

120μMのQカプシドタンパク質を、20mM Hepes、150mM NaCl(pH7.2)に溶かした溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した25倍モル数が過剰なSMPH(Pierce)と30分間、25℃でロッキングシェーカー上で反応させる。その後、この反応溶液を、1Lの20mM Hepes、150mM NaCl、pH7.2に対して4℃で2時間にわたり、2回透析する。次いで透析したQ反応混合物を、マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-S溶液と、25℃のロッキングシェーカー上で4時間反応させる(最終濃度: 60μM Qカプシドタンパク質、60μM マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-S)。連結生成物を、SDS-PAGEで分析する。

【0348】

D. マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-Sとfrカプシドタンパク質の連結

120μMのfrカプシドタンパク質を、20mM Hepes、150mM NaCl(pH7.2)に溶かした溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した25倍モル数が過剰なSMPH(Pierce)と30分間、25℃でロッキングシェーカー上で反応させる。その後、この反応溶液を、1Lの20mM Hepes、150mM NaCl、pH7.2に対して4℃で2時間にわたり、2回透析する。次いで透析したfr反応混合物を、マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-S溶液と、25℃のロッキングシェーカー上で4時間反応させる(最終濃度: 60μM frカプシドタンパク質、60μM マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-S)。連結生成物を、SDS-PAGEで分析する。

【0349】

E. マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-S溶液とHBCAG-Lys-2cyc-Mutの連結

120μMのHBCAG-Lys-2cyc-Mutカプシドを、20mM Hepes

s、150 mM NaCl (pH 7.2) に溶かした溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した25倍モル数が過剰なSMPH (Pierce) と30分間、25℃でロッキングシェーカー上で反応させる。その後、この反応溶液を、1Lの20 mM Hepes、150 mM NaCl、pH 7.2に対して4℃で2時間にわたり、2回透析する。次いで透析したHBcAg-Lys-2cyc-Mut反応混合物を、マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-S溶液と、25℃のロッキングシェーカー上で4時間反応させる(最終濃度: 60 μM HBcAg-Lys-2cyc-Mut、60 μM マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-S)。連結生成物を、SDS-PAGEで分析する。

## 【0350】

F. マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-Sと線毛の連結  
125 μMのE.coliの1型線毛を20 mM Hepes、pH 7.4に溶かした溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した50倍モル数が過剰な架橋剤SMPHと60分間、室温でロッキングシェーカー上で反応させる。反応混合物を、PD-10カラム(Amersham-Pharmacia Biotech)で脱塩する。このカラムから溶出したタンパク質含有画分を溜め、脱塩した誘導体化線毛タンパク質を、マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-S溶液と、25℃のロッキングシェーカー上で4時間反応させる(最終濃度: 60 μM 線毛、60 μM マウスC-IL-5-FまたはマウスC-IL-5-S)。連結生成物を、SDS-PAGEで分析する。

## 【実施例11】

## 【0351】

VLPおよび線毛に対するIL-13のクローニング、発現、および精製  
A. VLPおよび線毛と連結するためのシステイン残基を含有するN末端アミノ酸リinkerを備えたインターロイキン(IL-13)のクローニングおよび発現

a) Fc融合タンパク質として哺乳動物細胞中で発現させるためのマウスIL-13(HEK-293T)のクローニング

IL-13のクローニング用DNAを、*in vitro*活性化脾細胞からRT-PCRにより単離したが、この細胞は、以下のようにして得られた。すなわち、CD4+T細胞をマウス脾臓細胞から単離し、事前に抗CD3および抗CD28抗体で被覆された6ウェルプレートのIMDM(+5%FCS+10 ng/ml IL4)中で3日間インキュベートしたものである。これらの細胞からのRNAを使用して、ワンステップRT-PCR(QiagenワンステップPCRキット)によりIL13を増幅した。プライマーXhoIL13-RはRNAの逆転写に使用し、プライマーNheIL13-F(配列番号338)およびXhoIL13-R(配列番号339)はIL13 cDNAのPCR増幅に使用した。増幅したIL13 cDNAを、NheI/XhoI制限部位を使用してpMODベクターにライゲートした(ベクター-pMODB1-IL13を得る)。pMODB1-IL13は、消化されたBamHI/XhoIであり、IL13を含有する断片を、事前にBamHI/XhoIで消化したpCEP-SP-XA-Fc\*(xho)ベクターに、すなわちFc配列の終わりのXhoI部位が除去されたpCEP-SP-XA-Fc\*の類似体にライゲートした。このライゲーションから得られたプラスミド(pCEP-SP-IL13-Fc)を配列決定し、HEK-293T細胞のトランスフェクションに使用した。このプラスミドでコードされた、得られたIL13構成体は、IL13成熟配列のN末端で融合しているアミノ酸配列ADPGCGGGGGLAを有していた。この配列は、クローニング手順中に導入された追加のアミノ酸が隣接しているアミノ酸リinker配列GCGGGGGを含む。IL13-Fcは、pCEP-SP-IL13-Fcが形質移入された細胞の上清から、プロテインA樹脂で精製することができる。発現の結果を図17Bに示す(サンプルの詳細については実施例10参照)。そのN末端で前述のアミノ酸配列に融合している成熟IL-13は、第Xa因子による融合タンパク質の切断によって遊離し、その結果、以下「マウスC-IL-13-F」と呼ばれかつ配列番号328を有するタンパク質が得られる。図17Bの結果は、IL-13構成体の発現を明確に

示している。

【0352】

b) そのN末端で融合しているGST(グルタチオンSトランスフェラーゼ)を備えた、哺乳動物細胞中で発現させるためのマウスIL-13(HEK-293T)のクローニング

N末端GSTを持つIL-13のクローニングに使用されるcDNAは、上記(a)のTH2活性化T細胞のcDNA由来のものである。IL-13は、プライマーNhe1ink1IL13-FおよびIL13StopXhoNot-Rを使用して、このcDNAから増幅した。PCR産物をNheIおよびXhoIで消化し、事前にNheI/XhoIで消化されたpCEP-SP-GST-EKベクターにライゲートした。ライゲーション(pCEP-SP-GST-IL13)から単離可能なプラスミドを使用して、HEK-293T細胞を形質移入した。このプラスミドでコードされた、得られたIL13構成体は、IL-13成熟配列のN末端に融合したアミノ酸配列LACGGGGGを有していた。この配列は、クローニング手順中に導入された追加のアミノ酸が隣接しているアミノ酸リンカー配列ACGGGGGを含む。pCEP-SP-GST-IL13が形質移入された細胞の培養上清は、融合タンパク質GST-IL13を含有しており、これは、標準のプロトコルに従ってグルタチオンアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。そのN末端で前述のアミノ酸配列に融合する成熟IL-13は、エンテロキナーゼによる融合タンパク質の切断によって遊離し、その結果、以下「マウスC-IL-13-S」と呼ばれかつ配列番号329の配列を有するタンパク質が得られる。

【0353】

B. マウスC-IL-13-F、マウスC-IL-13-SとQ カプシドタンパク質との連結

120 μMのQ カプシドを溶かした20 mM Hepes、150 mM NaCl(pH 7.2)の溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した25倍モル数が過剰なSMPH(Pierce)と、25 のロッキングシェーカー上で30分間反応させる。その後、反応溶液を、1Lの20 mM Hepes、150 mMのNaCl(pH 7.2)に対して2時間にわたり4 度で2回透析する。次いで透析したQ 反応混合物を、マウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S溶液と、ロッキングシェーカー上25度で4時間反応させる(最終濃度: 60 μM Q カプシドタンパク質、60 μM マウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S)。連結生成物をSDS-PAGEにより分析する。

【0354】

C. マウスC-IL-13-F、マウスC-IL-13-Sとfr カプシドタンパク質との連結

120 μMのfr カプシドタンパク質を溶かした20 mM Hepes、150 mM NaCl(pH 7.2)の溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した25倍モル数が過剰なSMPH(Pierce)と、25 のロッキングシェーカー上で30分間反応させる。その後、反応溶液を、1Lの20 mM Hepes、150 mMのNaCl(pH 7.2)に対して2時間にわたり4 度で2回透析する。次いで透析したfr 反応混合物を、マウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S溶液と、ロッキングシェーカー上25 度で4時間反応させる(最終濃度: 60 μM fr カプシドタンパク質、60 μM マウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S)。連結生成物をSDS-PAGEにより分析する。

【0355】

D. マウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S溶液とHBcAg-Lys-2cys-Mutとの連結

120 μMのHBcAg-Lys-2cys-Mutカプシドを溶かした20 mM Hepes、150 mM NaCl(pH 7.2)の溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した25倍モル数が過剰なSMPH(Pierce)と、25 のロッキングシェーカー

ー上で30分間反応させる。その後、反応溶液を、1Lの20mM Hepes、150mMのNaCl(pH7.2)に対して2時間にわたり4度で2回透析する。次いで透析したHBCAg-Lys-2cys-Mut反応混合物を、マウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S溶液と、ロッキングシェーカー上25度で4時間反応させる(最終濃度: 60μM HBCAg-Lys-2cys-Mut、60μMマウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S)。連結生成物をSDS-PAGEにより分析する。

## 【0356】

E.マウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S溶液と線毛の連結 125μMのE.coliの1型線毛を溶かした20mM Hepes、pH7.4の溶液を、DMSO中の保存溶液から希釈した50倍モル数が過剰な架橋剤SMPHと、室温のロッキングシェーカー上で60分間反応させる。反応混合物を、PD-10カラム(Amersham-Pharmacia Biotech)で脱塩する。このカラムから溶出したタンパク質含有画分を溜め、脱塩した誘導体化線毛タンパク質を、マウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S溶液と、ロッキングシェーカー上25度で4時間反応させる(最終濃度: 60μM 線毛、60μM マウスC-IL-13-FまたはマウスC-IL-13-S)。連結生成物をSDS-PAGEにより分析する。

## 【0357】

明確な理解のため、例としていくらか詳細に本発明について十分に述べてきたが、当業者なら、本発明またはその任意の特定の実施形態に影響を及ぼすことなく、条件、配合物、およびその他のパラメータの広くかつ均等な範囲内で本発明を修正したまたは変更を加えることによって同様の事項を実施することができ、またそのような修正または変更が、添付の特許請求の範囲内に包含されることが、明らかであろう。

## 【0358】

本明細書で述べたすべての刊行物、特許、および特許出願は、本発明が関係する当業者のレベルを示すものであり、個々の刊行物、特許、または特許出願のそれぞれが参照により援用されるよう具体的にかつ個々に示されるかのように同様の程度まで参照により本明細書に援用する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0359】

【図1】マウスHis-C-IL5の発現を示す図である。IPTGと共にまたは無しで、pMODC6-IL5/BL21-DE3を培養した後に得られた不溶性細胞画分からの抽出物を、上述のように調製した。等量の抽出物を、16%SDSポリアクリルアミドゲル上に導入し、電気泳動を行い、クーマシーブルーで染色した。レーンMはサイズマーカー(NEB、プロードレンジ、染色前マーカー)、レーン1は非誘発(uninduced)培養からの抽出物、レーン2は、IPTGで4時間誘発させた(induced)培養からの抽出物。

【図2】Ni-NTAによるHis-C-IL5精製のSDS-PAGE分析を示す図である。様々な段階の精製から得られたサンプルを16%SDS-PAGEにかけ、還元条件下で実行した。タンパク質をクーマシーブルーで染色した。M:マーカー、1:可溶性封入体、2:フロースルー(非結合物質)、3:洗浄1 pH6.5、4:洗浄2 pH6.5、5:洗浄3 pH5.9、6~8:溶出液pH4.5、9:純粋な組換えマウスIL-5。

【図3】組換えマウスHis-C-IL5の精製を示すSDS-PAGEである。一定分量5μgの精製済みマウスHis-C-IL5を、ジチオスレイトールの存在下(左から第2レーン目)、または存在しない状態で(左から第3レーン目)、16%SDSポリアクリルアミドゲル上に分離した。ゲルを、タンパク質に関してクーマシーブルーR-250で染色した。レーンMはサイズマーカー(NEB、プロードレンジ、染色前マーカー)を含む。

【図4】His-C-IL-5がBCL1細胞の増殖に及ぼす影響を示す図である。下記

の物質の存在下、すなわちマウス I L - 5 ( 3 0 n g / m l ) His - C - I L 5 ( 3 0 n g / m l ) ; Q ( 2 0 0 n g / m l ) ; Q - 無関係のサイトカインと化学的に架橋したもの ( 2 0 0 n g / m l ) または Q - His - C - I L 5 ( 1 0 5 n g / m l ) の存在下、B C L 1 細胞を <sup>3</sup> H - チミジンと共にインキュベートした。希釈していない出発濃度を括弧内に示し、この示される出発濃度から 5 倍に連続希釈した。 <sup>3</sup> H - チミジンの取込みは、液体シンチレーションカウントによって決定した。

【図 5】クーマシーブルーで染色した S D S - P A G E による連結反応の分析を示す図である。レーン M : 染色前分子量マーカー、レーン 1 : 精製済み His - C - I L - 5 、レーン 2 : 化学架橋剤 S M P H で誘導化した後の Q 、レーン 3 : 連結反応、レーン 4 : 透析後の連結反応。連結反応における種々の分子種の名称を図の右側に示す。

【図 6】ウェスタンプロット法による連結反応の分析を示す図である。レーン M : 分子量マーカー、レーン 1 : 精製済み His - C - I L - 5 、レーン 2 : 化学架橋剤 S M P H によって誘導化した後の Q 、レーン 3 : 連結反応。 His - C - I L 5 を検出するための一次抗体は、後に H R P に結合する抗ラット抗体と共にインキュベートする、ラット抗 H i s 抗体であった。 Q に対してウサギポリクローナル抗血清で染色することによって、 Q を検出し、その後、 H R P 結合抗ラビット抗体により検出した。同一のプロットは、図示のように染色された。

【図 7】4段階の E L I S A を示す図である。 A . 捕捉 E L I S A の概略図。アッセイの様々な成分は、 1 : ヤギ抗ウサギ I g G 、 2 : ウサギ抗 Q ポリクローナル抗血清、 3 : Q - His - C - I L 5 、 Q 、または P B S 、 4 : 抗 I L 5 モノクローナル A b 、 T R F K 4 または 5 、 5 : 抗マウス I g G - H R P 。 B . 4段階 E L I S A の結果。モノクローナル抗体を中和して、規則的抗体アレイに共有結合した His - C - I L 5 と相互に作用させることができた能力を、 E L I S A によって決定した。

【図 8】 I L - 5 に対する血清の E L I S A を示す図である。 E L I S A プレートを His - C - I L 5 で被覆し、免疫前のマウス、または Q - His - C - I L 5 でワクチン接種し ( 4 匹 ) または His - C - I L - 5 と混合した Q でワクチン接種して ( 5 匹 ) 2 1 日過ぎた後のマウスから採取した血清と共にインキュベートした。血清の出発希釈率は 1 : 5 0 であり、 5 倍希釈を行った。 I L - 5 特異的抗体の結合を、 H R P に結合した抗マウス I g G および色素生成基質で検出した。

【図 9】 B L 2 1 での組換え G S T - E K - I L 1 3 - C 1 - H i s 発現の誘導を示す図である。 1 6 % S D S - P A G E のクーマシーブルー染色。導入量は、示される細菌溶解産物の 0 . 1 O D <sub>600</sub> に相当する。 I L - 1 3 - 融合タンパク質の発現を 0 . 7 5 m M I P T G で誘導し、 S D S - P A G E により 4 時間後にサンプルを分析した。対応するプラスミド ( p M o d - G S T - E K - I L 1 3 - C 1 - H i s ) で形質転換されかつ I P T G で誘導された細菌には、 I L - 1 3 - 融合タンパク質の強力な発現があることに留意されたい ( 矢印参照 ) 。

【図 1 0】変性下での G S T - E K - I L 1 3 - C 1 - H i s の精製を示す図である。 1 6 % S D S - P A G E のクーマシーブルー染色。導入量は、示される画分の 5  $\mu$  l に相当する。 I L - 1 3 - 融合タンパク質を封入体から得て、グアンジン - H C 1 変性緩衝液に溶解し、 N i <sup>2+</sup> アガロースカラムに導入し、同じ緩衝液で平衡状態にした。結合したタンパク質を、異なる p H で 2 段階で溶出した。図は、 p H 4 . 5 の第 2 の緩衝液で溶出された、図示される画分 ( # 5 ~ # 3 0 ) の、 T C A 沈殿による一定分量の分析を示す。 C 末端 H i s タグにより、 I L - 1 3 融合タンパク質が N i <sup>2+</sup> アガロースカラムに効率的に結合し、 p H を下げることによって溶出されたことに留意されたい。

【図 1 1】リフォールディング後の可溶性 I L - 1 3 融合タンパク質の分析を示す図である。 G S T - E K - I L 1 3 - C 1 - H i s 融合タンパク質を、セクション 1 8 D で述べるようにリフォールディングした。リフォールディング反応が終了した後、一定分量のタンパク質溶液を、 S D S - P A G E により分析し、その後クーマシー染色 ( A ) またはウェスタンプロット ( B ) を行った。示される一次抗体は、 R & D S y s t e m ( - I L 1 3 、 A F - 4 1 3 - N A ) から、 Q i a g e n ( - P e n t a H i s , 3 4 6 6 0

) および Amersham Biosciences ( - GST、24-4577) によって、それぞれ購入した。抗体は、製造業者の取扱い説明書に従った濃度で使用した。

【図12】マウスエオタキシンC1の発現を示す図である。1mMのIPTGによる誘導の9時間後、p\_mEo-C1で形質転換されたBL21/DE3細胞の細胞溶解産物からの上清について、16%PAGEゲル上で実験し、ニトロセルロース膜にプロットして、ヤギ抗マウスエオタキシン抗体 (R&D System) と反応させた。レーン1：染色前タンパク質マーカー (New England Biolabs)、レーン2：1mMのIPTGによる誘導の9時間後、p\_mEo-C1で形質転換されたBL21/DE3細胞の細胞溶解産物の上清、レーン3：染色前タンパク質マーカー (New England Biolabs)、レーン4：抗マウスエオタキシン抗体でプローブした、レーン2と同じ溶解産物のウェスタンプロット。