

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6824154号  
(P6824154)

(45) 発行日 令和3年2月3日(2021.2.3)

(24) 登録日 令和3年1月14日(2021.1.14)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/40 (2006.01)	C 1 2 N 15/40	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C O 7 K 14/18 (2006.01)	C O 7 K 14/18	Z N A
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
請求項の数 22 (全 52 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-506955 (P2017-506955)	(73) 特許権者	514207706
(86) (22) 出願日	平成27年8月7日(2015.8.7)		ブイエルビー・セラピューティクス・リミ
(65) 公表番号	特表2017-523796 (P2017-523796A)		テッド・ライアビリティ・カンパニー
(43) 公表日	平成29年8月24日(2017.8.24)		V L P Therapeutics, L
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/003997		L C
(87) 国際公開番号	W02016/021209		アメリカ合衆国19801デラウェア州ウ
(87) 国際公開日	平成28年2月11日(2016.2.11)		イルミントン、オレンジ・ストリート12
審査請求日	平成30年7月25日(2018.7.25)		09番
(31) 優先権主張番号	62/035,037	(74) 代理人	100106518
(32) 優先日	平成26年8月8日(2014.8.8)		弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100138911
(31) 優先権主張番号	62/079,128		弁理士 櫻井 陽子
(32) 優先日	平成26年11月13日(2014.11.13)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルファウイルス由来のウイルス構造タンパク質を含み、該ウイルス構造タンパク質が、エンベロープタンパク質E3のフーリン部位のアミノ酸配列に少なくとも1つの抗原が挿入されているエンベロープタンパク質E3を含み、該少なくとも1つの抗原が、配列番号1の第321番および第326番に相当する残基の間、配列番号2の第321番および第326番に相当する残基の間、または配列番号3の第330番および第335番に相当する残基の間に挿入されているウイルス様粒子。

【請求項2】

該ウイルス構造タンパク質が、チクングニアウイルスまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス由来である、請求項1記載のウイルス様粒子。

【請求項3】

該ウイルス様粒子が、チクングニアウイルス株37997もしくはチクングニアウイルス株O PY-1、またはベネズエラウマ脳炎ウイルス株TC-83由来である、請求項2記載のウイルス様粒子。

【請求項4】

該ウイルス構造タンパク質が、さらにカプシド、エンベロープタンパク質E1、およびエンベロープタンパク質E2を含む、請求項1～3いずれかに記載のウイルス様粒子。

【請求項5】

少なくとも1つの抗原が、さらにエンベロープタンパク質E2に挿入されている、請求項

10

20

1 ~ 4 いずれかに記載のウイルス様粒子。

【請求項 6】

少なくとも1つの抗原が、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質、PD-1、PD-L1、CTLA-4、DISC1、IL-2、HER2、BTLAまたはHVEM由来である、請求項 1 ~ 5 いずれかに記載のウイルス様粒子。

【請求項 7】

少なくとも1つの抗原が、(NPNA)<sub>n</sub>(n=4-30)、配列番号6 - 9および15 - 29で表されるアミノ酸配列からなる群より選択される1つ以上のペプチドであり、エンベロープE3タンパク質に挿入されている、請求項 6 記載のウイルス様粒子。

【請求項 8】

アルファウイルス由来のウイルス構造タンパク質を含み、該ウイルス構造タンパク質がエンベロープタンパク質E3のフーリン部位のアミノ酸配列の1以上の残基の置換、付加および/または欠失によって、フーリン切断部位が、切断されないように改変または変異している修飾エンベロープタンパク質E3を含む、ウイルス様粒子。

【請求項 9】

該ウイルス構造タンパク質が、チクングニアウイルスまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス由来である、請求項 8 記載のウイルス様粒子。

【請求項 10】

該ウイルス様粒子が、チクングニアウイルス株37997もしくはチクングニアウイルス株0 PY-1、またはベネズエラウマ脳炎ウイルス株TC-83由来である、請求項 9 記載のウイルス様粒子。

【請求項 11】

該ウイルス構造タンパク質が、さらにカプシド、エンベロープタンパク質E1およびエンベロープタンパク質E2を含む、請求項 8 ~ 10 いずれかに記載のウイルス様粒子。

【請求項 12】

少なくとも1つの抗原が、エンベロープタンパク質E3に挿入されている、請求項 8 ~ 11 いずれかに記載のウイルス様粒子。

【請求項 13】

少なくとも1つの抗原が、エンベロープタンパク質E2に挿入されている、請求項 8 ~ 12 いずれかに記載のウイルス様粒子。

【請求項 14】

少なくとも1つの抗原が、配列番号1の第321番および第326番に相当する残基の間、配列番号2の第321番および第326番に相当する残基の間、または配列番号3の第330番および第335番に相当する残基の間に挿入されている請求項 12 または 13 に記載のウイルス様粒子。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 いずれかに記載のウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 16】

請求項 15 記載の核酸分子を含むベクターであって、該核酸分子に操作可能に結合している発現制御配列を含んでよい、ベクター。

【請求項 17】

(a) 請求項 1 ~ 14 いずれかに記載のウイルス様粒子、および  
(b) 薬学的に許容される担体  
を含む、医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 18】

がん、神経疾患、感染性疾患またはマラリアの処置または予防；哺乳動物における少なくとも1つの抗原に対する抗体の産生；免疫応答の調節；免疫刺激；少なくとも1つの抗原の機能の阻害；または抗原のマクロファージ上の提示のための、請求項 17 記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 19】

がん、神経疾患、感染性疾患またはマラリアの処置または予防；哺乳動物における少なくとも1つの抗原に対する抗体の産生；免疫応答の調節；免疫刺激；少なくとも1つの抗原の機能の阻害；または抗原のマクロファージ上の提示のための医薬の製造のための、請求項 1～14 いずれかに記載のウイルス様粒子の使用。

## 【請求項 20】

アルファウイルス由来のウイルス構造タンパク質を含み、該ウイルス構造タンパク質が、エンベロープタンパク質E3のフーリン部位のアミノ酸配列に少なくとも1つの抗原が挿入されているエンベロープタンパク質E3を含み、該少なくとも1つの抗原が、配列番号1の第321番および第326番に相当する残基の間、配列番号2の第321番および第326番に相当する残基の間、または配列番号3の第330番および第335番に相当する残基の間に挿入されているウイルス様粒子を発現する細胞株。

10

## 【請求項 21】

アルファウイルス由来のウイルス構造タンパク質を含み、該ウイルス構造タンパク質がエンベロープタンパク質E3のフーリン部位のアミノ酸配列の1以上の残基の置換、付加および/または欠失によって、フーリン切断部位が、切断されないように改変または変異している修飾エンベロープタンパク質E3を含む、ウイルス様粒子を発現する細胞株。

## 【請求項 22】

該細胞株が安定な細胞株である、請求項 20 または 21 記載の細胞株。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本願は、修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子および、その利用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ウイルス様粒子(VLP)は、標準の天然ウイルスの組織および構造を模倣しているが、ウイルスゲノムを欠損しており、より安全で安価なワクチン候補を産生できる可能性のある、多タンパク質構造である。予防用の、VLPベースのワクチンは、現在のところ、世界中でごく少数しか市販されていない：GlaxoSmithKlineによるEngerix（登録商標）（B型肝炎ウイルス）およびCervarix（登録商標）（ヒトパピローマウイルス）およびMerck and Co., Inc.によるRecombivax HB（登録商標）（B型肝炎ウイルス）およびGardasil（登録商標）（ヒトパピローマウイルス）はそのいくつかの例である。他のVLPベースのワクチンの候補は、臨床試験が行われているかまたは前臨床評価が行われており、例えば、インフルエンザウイルス、パルボウイルス、ノーウォークウイルスおよび種々のキメラVLPである。前臨床試験が成功しているにも関わらず、未だに小規模の基礎研究に限定されているものが他に多く存在する。大規模のVLP産生の意味は、プロセス制御、モニタリング化および最適化の点で議論されている。主要な上流および下流の技術的課題が特定されており、それに基づいて議論されている。VLPベースのワクチンの、成功した画期的新薬が、臨床試験の最新の結果ならびに治療的または予防的なワクチン接種のいずれかのためのキメラVLPベース技術の近年の発展とともに端的に表されている。

30

40

## 【0003】

これまでに、ヒトおよび他の動物に感染する30を超える異なるウイルスに対するVLPベースのワクチンが産生されている。例には、AAV(アデノ随伴ウイルス)、H5N3(トリインフルエンザ)、BFDV(Budgerigar fledgling disease virus)、BTV(ブルータングウイルス)、エボラ、エンテロウイルス71、GHPV(Goose hemorrhagic polyoma virus)、HBV(B型肝炎ウイルス)、HCV(C型肝炎ウイルス)、HDV(デルタ型肝炎ウイルス)、HEV(E型肝炎ウイルス)、HIV、HPV(ヒトパピローマウイルス)、IBDV(伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス)、インフルエンザA型、インフルエンザA H1N1型、インフルエンザA H3N2型、JCポリオーマウイルス(JC polyomavirus)、Marburg、MS2、IPCV(Indian peanut clump virus)、NDV(ニュー

50

ーカッスル病ウイルス)、No(ノロウイルス)、Nv(ノーウォークウイルス)、PhMV(Physalis mottle virus)、ポリオーマウイルス(Polyomavirus)、PPV(ブタパルボウイルス)、RHDV(ウサギ出血病ウイルス)、ロタウイルス、SARS、SIV(サル免疫不全ウイルス)、SV40(サルウイルス40)、SVDV(ブタ水疱病ウイルス)などが含まれる。(Expert Rev. Vaccines 9(10)、1149-1176、2010)。

【0004】

前臨床試験および臨床試験の両方のための大量のVLPまたはワクチンを素早く作成するために、ほとんど全ての医薬品開発が、高度に安定なワクチン産生株を迅速に作成するという同一の困難な障壁に直面するだろう。安定な細胞株を開発して同定することは、開発の重要な部分である。しかしながら、高力価かつ高品質で、安定な細胞株を作成することは、これまでのところそれほど簡単には達成されていない。

10

【0005】

チクングニアウイルス(CHIKV)は、2004年にこのアルファウイルスがケニアで再出現して以来、アフリカ、欧州およびアジアにおいて、数百万人の人々に感染している。該疾患の重症度およびこの流行性ウイルスの蔓延は、ワクチンまたは抗ウイルス療法の非存在下で、深刻な公衆衛生上の脅威を示す。流行性チクングニアウイルスに対するVLPワクチンは、感染に対して非ヒト霊長類を保護することが報告されている(Nat Med. 2010 March; 16(3): 334-338)。米国特許出願公開第2012/0003266号明細書は、感染またはその少なくとも1つの症状に対して免疫を誘発する、チクングニアウイルスに対するワクチンまたは抗原性組成物の製剤に有用な、1つ以上のチクングニアウイルス構造タンパク質を含む、ウイルス様粒子(VLP)を開示している。国際公開第2012/106356号には、アルファウイルスまたはフラビウイルスの修飾ウイルス様粒子(VLP)およびアルファウイルスおよびフラビウイルス介在疾患の予防または処置に用いるための、修飾VLPの産生の増強方法が開示されている(これらの引用文献は、参照により本明細書中に包含される)。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願公開第2012/0003266号明細書

【特許文献2】国際公開第2012/106356号

【非特許文献】

30

【0007】

【非特許文献1】Expert Rev. Vaccines 9(10)、1149-1176、2010

【非特許文献2】Nat Med. 2010 March; 16(3): 334-338

【発明の概要】

【0008】

本願によれば、以下が提供される：

- (1)修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス構造タンパク質を含む、ウイルス様粒子。
- (2)該ウイルス構造タンパク質が、アルファウイルスまたはフラビウイルス由来である、(1)記載のウイルス様粒子。
- (3)該ウイルス構造タンパク質が、チクングニアウイルスまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス由来である、(2)記載のウイルス様粒子。
- (4)該ウイルス様粒子が、チクングニアウイルス株37997もしくはチクングニアウイルス株OPY-1、またはベネズエラウマ脳炎ウイルス株TC-83由来である、(3)記載のウイルス様粒子。
- (5)該エンベロープタンパク質E3の1つ以上のアミノ酸残基が、ウイルス構造タンパク質のアミノ酸配列において、置換、付加および/または欠失されている、(1) - (4)のいずれか記載のウイルス様粒子。
- (6)1つ以上のアミノ酸残基が、エンベロープタンパク質E3のフーリン部位のアミノ酸配列において、置換、付加および/または欠失されている、(5)に記載のウイルス様粒子。

40

50

(7) ウイルス構造タンパク質が、カプシド、エンベロープタンパク質E1、エンベロープタンパク質E2およびエンベロープタンパク質E3を含む、(1) - (6)のいずれか記載のウイルス様粒子。

(8) 少なくとも1つの抗原が該エンベロープタンパク質E3に挿入されている、(1) - (7)のいずれか記載のウイルス様粒子。

(9) 少なくとも1つの抗原がさらに該エンベロープタンパク質E2に挿入されている、(8)記載のウイルス様粒子。

(10) 少なくとも1つの抗原が、配列番号1の第321番および第326番に相当する残基の間、配列番号2の第321番および第326番の残基の間、または配列番号3の第330番および第335番の残基の間に挿入されている、(8)または(9)記載のウイルス様粒子。

(11) 少なくとも1つの抗原が、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質、PD-1、PD-L1、CTLA-4、DISC1、IL-2、HER2、BTLAまたはHVEM由来である、(8) - (10)のいずれか記載のウイルス様粒子。

(12) (NPNA)<sub>n</sub>( $n=4-30$ )から選択されるペプチド、配列番号6 - 9および15 - 29で表されるアミノ酸配列が、エンベロープE3タンパク質に挿入されている、(11)記載のウイルス様粒子。

(13) 該ウイルス様粒子が、以下のアミノ酸配列、または、以下の配列に90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むチクングニアウイルス様粒子である、(8) - (12)いずれか記載のウイルス様粒子：

配列番号31または配列番号75で表されるアミノ酸配列からなるカプシド；

配列番号32または配列番号76で表されるアミノ酸配列からなるE1；および

配列番号33または配列番号77で表されるアミノ酸配列からなるE2およびE3の複合体であって、少なくとも1つの抗原のアミノ酸配列が配列番号2の第321番および第326番の残基に相当する残基の間に挿入されている複合体、

(14) 該ウイルス様粒子が、以下のアミノ酸配列、または、以下の配列に90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子である、(8) - (12)いずれか記載のウイルス様粒子：

配列番号35で表されるアミノ酸配列からなるカプシド；

配列番号36で表されるアミノ酸配列からなるE1；および

配列番号37で表されるアミノ酸配列からなるE2およびE3の複合体であって、少なくとも1つの抗原のアミノ酸配列が配列番号3の第330番および第335番の残基に相当する残基の間に挿入されている複合体。

(15) 該ウイルス様粒子がチクングニアウイルス様粒子であり、該ウイルス様粒子の構造が、以下の配列(1) - (4)のいずれか1つを含む、あるいは以下の配列(1) - (4)のいずれか1つに90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、(8) - (12)いずれか記載のウイルス様粒子：

(1)

配列番号32で表されるアミノ酸配列からなるE1；

マラリア抗原が挿入され、配列番号46で表されるアミノ酸配列からなるE2およびE3の複合体；および

配列番号31で表されるアミノ酸配列からなるカプシド；

(2)

配列番号32で表されるアミノ酸配列からなるE1；

PD-1抗原が挿入され、配列番号47で表されるアミノ酸配列からなるE2およびE3の複合体；および

配列番号31で表されるアミノ酸配列からなるカプシド；

(3)

配列番号32で表されるアミノ酸配列からなるE1；

PD-L1リガンド抗原が挿入され、配列番号48で表されるアミノ酸配列からなるE2およびE3の複合体；および

10

20

30

40

50

配列番号31で表されるアミノ酸配列からなるカプシド；または

(4)

配列番号32で表されるアミノ酸配列からなるE1；

CTLA-4抗原が挿入され、配列番号49で表されるアミノ酸配列からなるE2およびE3の複合体；および

配列番号31で表されるアミノ酸配列からなるカプシド。

(16)該ウイルス様粒子がベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子であり、該ウイルス様粒子の構造が、以下の配列(1) - (4)のいずれか1つを含む、あるいは以下の配列(1) - (4)のいずれか1つに90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、(8) - (12)のいずれか記載のウイルス様粒子；

10

(1)

配列番号36で表されるアミノ酸配列からなるE1；

マラリア抗原が挿入され、配列番号50で表されるアミノ酸配列からなる、E2およびE3の複合体；および

配列番号35で表されるアミノ酸配列からなるカプシド；

(2)

配列番号36で表されるアミノ酸配列からなるE1；

PD-1抗原が挿入され、配列番号51で表されるアミノ酸配列からなる、E2およびE3の複合体；および

配列番号35で表されるアミノ酸配列からなるカプシド；

20

(3)

配列番号36で表されるアミノ酸配列からなるE1；

PD-L1抗原が挿入され、配列番号52で表されるアミノ酸配列からなる、E2およびE3の複合体；および

配列番号35で表されるアミノ酸配列からなるカプシド；または

配列番号36で表されるアミノ酸配列からなるE1；

(4)

配列番号36で表されるアミノ酸配列からなるE1；

CTLA-4抗原が挿入され、配列番号53で表されるアミノ酸配列からなる、E2およびE3の複合体；および

30

配列番号35で表されるアミノ酸配列からなるカプシド。

(17)エンベロープタンパク質E3に位置するフーリン切断部位が、切断されないように改変または変異している、(1) - (5)のいずれか記載のウイルス様粒子。

(18)(1) - (17)のいずれか記載のウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

(19)配列番号38 - 45のいずれかで表されるヌクレオチド配列と、90%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、単離された核酸分子。

(20)配列番号38-45のいずれかで表されるヌクレオチド配列からなる、(19)記載の核酸分子。

(21)(18) - (20)のいずれか記載の核酸分子を含むベクターであって、該核酸分子に操作可能に結合している発現制御配列を含んでいてよいベクター。

40

(22)配列番号54または配列番号55で表されるヌクレオチド配列であって、少なくとも1つの抗原をコードするヌクレオチド配列が、配列番号54の第963番および第969番の残基の間、または配列番号55の第990番および第1006番の残基の間に挿入されているヌクレオチド配列；

を含む核酸分子と、

該核酸分子に操作可能に結合している発現制御配列、  
とを含むベクター。

(23)(a)(1) - (17)のいずれか記載のウイルス様粒子、(18) - (20)のいずれか記載の核酸分子および/または(21)または(22)記載のベクター；および

50

(b)薬学的に許容される担体；  
を含む、医薬組成物。

(24)(1) - (17)のいずれか記載のウイルス様粒子および薬学的に許容される担体を含む、  
ワクチン組成物。

(25)(1) - (17)のいずれか記載のウイルス様粒子を産生する方法であって：

該ウイルス様粒子を発現するように(21) - (22)記載のベクターを用いて遺伝子導入した細胞を培養する；および

作成された該粒子を精製する；  
工程を含む方法。

(26)ウイルス様粒子の産生を増強する方法であって：

10

(1)少なくとも1つの抗原をウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入すること、および

(2)少なくとも1つの抗原がウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されている、ウイルス様粒子を単離すること、  
を含む方法。

(27)工程(1)が、少なくとも1つの抗原がウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されているウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を作製し、該核酸分子を細胞用いて発現させることにより達成される、(26)記載の方法。

(28)該ウイルス様粒子が、(1) - (17)のいずれか記載のウイルス様粒子である、(26)または(27)記載の方法。

20

(29)(1) - (17)のいずれか記載のウイルス様粒子、(18) - (20)のいずれか記載の核酸分子、(21)または(22)記載のベクター、および/または(23)もしくは(24)記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、がん、神経疾患、感染性疾患もしくはマラリアの処置または予防；哺乳動物における少なくとも1つの抗原に対する抗体の産生；免疫応答の調節；免疫刺激；少なくとも1つの抗原の機能の阻害；または抗原のマクロファージ上の提示の方法。

(30)がん、感染性疾患もしくはマラリアの処置または予防；哺乳動物における少なくとも1つの抗原に対する抗体の産生；免疫応答の調節；免疫刺激；少なくとも1つの抗原の機能の阻害；または抗原のマクロファージ上の提示のための、医薬組成物またはキットの製造のための、(1) - (17)のいずれか記載のウイルス様粒子、(18) - (20)のいずれか記載の核酸分子または(21)もしくは(22)記載のベクターの使用。

30

(31)エンベロープタンパク質E3のフーリン部位のアミノ酸配列の改変/変異を含むウイルス構造タンパク質を含むウイルス様粒子を発現する細胞株。

(32)フーリン部位のアミノ酸配列に対する改変が、Ile-Glu/Asp-Gly-ArgまたはAsp-Asp-Asp-Asp-Lysへの改変である、(31)記載の細胞株。

(33)該細胞株が安定な細胞株である、(31)または(32)記載の細胞株。

(34)エンベロープタンパク質E3のフーリン部位が特定のプロテアーゼ認識部位に改変されている、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸分子を含む発現ベクターを、細胞株に遺伝子導入する；

工程を含む、ウイルス様粒子を発現する細胞株を産生する方法。

40

(35)該フーリン部位が、第Xa因子またはエンテロキナーゼ認識部位に改変されている、(34)記載の方法。

(36)安定な細胞株を提供する、(34)または(35)記載の方法。

(37)

i) (31) - (33)のいずれか記載の細胞株により産生される未熟なウイルス様粒子を作成する；および

ii) 未熟なウイルス様粒子からE3を除去する、

工程を含む、成熟したウイルス様粒子を産生するための方法。

(38)該E3がプロテアーゼによって除去されている、(37)記載の方法。

(39)該プロテアーゼが、第Xa因子またはエンテロキナーゼである、(38)記載の方法。

50

(40) ウイルス様粒子が、(1) - (17)のいずれか記載のウイルス様粒子である、(31)記載の細胞株。

【0009】

第一の局面において、本願は、修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子を提供する。

【0010】

第二の局面において、本願は、修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列を含むか、または、それからなる核酸分子を提供する。

【0011】

第三の局面において、本願は、(i)修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子および/または(ii)修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列を含むか、または、それからなる核酸分子を含む、医薬組成物および、該医薬組成物を含むキットを提供する。

10

【0012】

第四の局面において、本願は、修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子を産生する方法であって、該ウイルス様粒子を発現するようにベクターを用いて遺伝子導入した細胞を培養すること；該細胞により作成された該粒子を精製することを含む方法を提供する。

【0013】

第五の局面において、本願は、修飾エンベロープタンパク質E3を有するウイルス構造タンパク質を含むウイルス様粒子の産生の増強方法を提供する。態様の一において、該ウイルス様粒子は、ウイルス構造タンパク質および少なくとも1つの外来性の抗原を含み：

20

(1)少なくとも1つの外来性の抗原を、ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入すること、および

(2)少なくとも1つの抗原がウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されているウイルス様粒子を単離すること、を含む。

【0014】

第六の局面において、本願は、がん、神経疾患、感染性疾患、もしくはマラリアの処置または予防；哺乳動物における少なくとも1つの抗原に対する抗体の産生；免疫応答の調節；免疫刺激；少なくとも1つの抗原の機能の阻害；または抗原のマクロファージ上の提示のための、医薬組成物またはキットの製造のための、(i)修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子、および/または(ii)修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列からなる核酸分子を提供する。

30

【0015】

全ての局面において、エンベロープタンパク質E3は、少なくとも1つの抗原を含むように、または、フーリン部位のアミノ酸配列に改変/変異を含むように、修飾されてよい。

【0016】

第七の局面において、本願は、フーリン部位のアミノ酸配列に改変/変異を含むウイルス構造タンパク質を発現してウイルス様粒子を作成することができる細胞株、および、その産生方法を提供する。

40

【0017】

第八の局面において、本願は：

i) 上述の細胞株によって産生される未熟なウイルス様粒子を作成する；

ii) 未熟なウイルス様粒子からE3を除去する；

工程を含む、成熟したウイルス様粒子を産生するための方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】 CHIKVまたはVEEVウイルス構造タンパク質の構造、および6Kの配列を示す。

【図2】 修飾E3およびE2エンベロープタンパク質を有するウイルス構造タンパク質の発現

50



ベクターの代表的な構造を示す。

【図3】ウェスタンブロッティングの結果を示す。熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質由来の抗原である、CSP NPNAのリピート配列を、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) (株TC-83) のウイルス様粒子のE2またはE3に挿入した。293F細胞で発現された抗原挿入VEEVウイルス様粒子を、マウス抗VEEV抗体(1:1000)を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。74:マラリアCSPリピート抗原(リピートX6)76:マラリアCSPリピート抗原(リピートX14)78:マラリアCSPリピート抗原(リピートX25)図3において、「74」は挿入抗原が6XNPNAであることを示し、「76」は挿入抗原が14XNPNAであることを示し、かつ「78」は挿入抗原が25XNPNAであることを示し；並びに「21」は該抗原がE2に挿入されていることを示し、「26」は抗原がE3に挿入されていることを示す。

10

【図4】ウェスタンブロッティングの結果を示す。マウスマラリアCSPリピート抗原を、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) (株TC-83) のウイルス様粒子E2またはE3に挿入した。293F細胞で発現された抗原挿入VEEVウイルス様粒子を、マウス抗VEEV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。図4において、「261.25」はマウスマラリアCSPリピート抗原を挿入したE2を含むVEEV VLPを示し、「261.66」はマウスマラリアCSPリピート抗原を挿入したE3を含むVEEV VLPを示す。

【図5】ウェスタンブロッティングの結果を示す。CSPリピート配列、マラリアpfs25ドメイン1エピトープまたはマラリアpfs25ドメイン2エピトープを、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) (株TC-83) のウイルス様粒子のE2またはE3に挿入した。293F細胞で発現された抗原挿入VEEVウイルス様粒子を、マウス抗VEEV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。図5において、「74」は挿入抗原がマラリアCSP リピートエピトープであることを示し、「302R」は挿入抗原がマラリアpfs25ドメイン1エピトープであることを示し、および「303R」は挿入抗原がマラリアpfs25ドメイン2エピトープであることを示し；並びに「21」は抗原がE2に挿入されていることを示し、「26」は抗原がE3に挿入されていることを示す。

20

【図6】ウェスタンブロッティングの結果を示す。PD-1エピトープまたはPD-L1エピトープを、チクングニアウイルス (CHIKV) (株37997) のウイルス様粒子のE2またはE3に挿入した。293F細胞で発現された抗原挿入CHIKVウイルス様粒子を、マウス抗CHIKV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。図6において、「274.11」はPD-1エピトープが挿入されたE2を含むCHIKV VLPを示し、「274.56」はマウスPD-1エピトープが挿入されたE3を含むCHIKV VLPを示し、「299.15」はPD-L1エピトープが挿入されたE2を含むCHIKV VLPを示し、および「299.56」はマウスPD-L1エピトープが挿入されたE3を含むCHIKV VLPを示す。

30

【図7】ウェスタンブロッティングの結果を示す。マラリアCSP リピートエピトープを、チクングニアウイルス (CHIKV) (株37997) のウイルス様粒子のE2またはE3に挿入した。293F細胞で発現された抗原挿入CHIKVウイルス様粒子を、マウス抗CHIKV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。図7において、「74.11」はマラリアCSPリピートエピトープが挿入されたE2を含むCHIKV VLPを示し、「74.16」はマウスマラリアCSPエピトープが挿入されたE3を含むCHIKV VLPを示す。

【図8】一過性遺伝子導入由来のCHIKVの未熟なコンストラクトについてのウェスタンブロッティングの結果を示す。

40

【図9】一過性遺伝子導入由来のVEEVの未熟なコンストラクトについてのウェスタンブロッティングの結果を示す。

【図10】DISC1\_451、\_452および\_454の抗原が、E3並びに、E2およびE3の両方（二重）に挿入された場合の、これらの抗原が挿入されたVLPが産生されたことを示す、ウェスタンブロッティングの結果を示す。

【図11】ヒトIL-2野生型およびヒトIL-2変異体の抗原がE3に挿入された場合の、これらの抗原が挿入されたVLPが産生されたことを示す、ウェスタンブロッティングの結果を示す。

【図12】マウスIL-2野生型およびマウスIL-2変異体の抗原がE3に挿入された場合の、こ

50

これらの抗原が挿入されたVLPが産生されたことを示す、ウェスタンブロッティングの結果を示す。

【図13】対照VLPで免疫化した10匹のマウスのうち、9匹がマラリアに感染しており；エンペロープタンパク質E2およびE3の両方に挿入されたマラリアCSP 4Xリピートを含むチクングニアVLP(261.261 VLP)で免疫化した10匹のマウスのうち、9匹はマラリアに感染しておらず；エンペロープタンパク質E2およびE3の両方に挿入されたマラリアCSP 14Xリピートを含むチクングニアVLPで免疫化した10匹のマウスのうち、9匹はマラリアに感染していなかったことを示す、PCRの結果を示す。

【図14】E3挿入VLP並びにE2およびE3挿入VLPが、E2挿入VLPよりも高い力価を有することを示す、ELISAの結果を示す。

10

【図15】hHER2挿入VLPが産生されていることを示す、ウェスタンブロッティングを示す。

【図16】E2およびE3挿入VLPが、E2挿入VLPよりも高い力価を示す、ELISAの結果を示す。

【図17】モノクローナル抗体が、hBTLA抗原を含むCHIKV-VLPを用いることにより得られたことを示す。

【図18】ヒトhHVEM抗原がE3に挿入された場合の、該抗原が挿入されたVLPが産生されたことを示す、ウェスタンブロッティングの結果を示す。

【図19】E3エンペロープタンパク質のフーリン部位が修飾されている未熟なチクングニアVLPを発現する細胞株が、3ヵ月培養後でも、未熟なVLPを作成できることを示す。

20

【図20】マウスPD-L1挿入VLPが、効果的にマウスを腫瘍から保護したことを示す。

【図21】CHIKV-VLP CSPリピート抗原挿入VLPが作製されたことを示す、ウェスタンブロッティングの結果を示す。

【図22】マラリアCSPリピート抗原76挿入VLPが、マウスの抗CSP抗原抗体の産生を刺激したことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

#### (1) 修飾エンペロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子

第一の局面において、本願は、修飾エンペロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子を提供する。

30

【0020】

本局面において、エンペロープタンパク質E3は、少なくとも1つの抗原を含むように、または、フーリン部位のアミノ酸配列(Arg-X-X-Arg)に改変/変異を含むように、修飾されてよい。

【0021】

「Arg-X-X-Arg」という語は、フーリンの最小切断部位(minimal cleavage site)を指し、「X-X」は、任意の2つのアミノ酸を含む。

【0022】

ウイルス様粒子は、粒子状の構造に自発的に集合する、1つ以上のウイルス構造タンパク質から構成される。

40

【0023】

本願に用いられるウイルス構造タンパク質は、フーリン部位を発現する限り、いずれのウイルス構造タンパク質であってよい。

【0024】

第七の局面において、本願は、細胞株、特にウイルス様粒子を発現する安定な細胞株、およびその産生方法を提供し、ここで、該ウイルス様粒子は、フーリン部位のアミノ酸配列(Arg-X-X-Arg)への改変/変異を含む。フーリン部位のアミノ酸配列に対する改変の例には、Ile-Glu/Asp-Gly-ArgまたはAsp-Asp-Asp-Asp-Lysへの改変が挙げられる。

【0025】

態様の一において、本願は、ウイルス様粒子のフーリン部位がプロテアーゼ認識部位に

50

改変されているウイルス様粒子を発現する細胞株を産生する方法を提供する。この態様において、本方法により作成された細胞株は、安定な細胞株であり得る。例えば、この態様により得られた安定な細胞株は、比較的長期間、例えば3ヵ月より長く、該VLPを発現して作成する能力を維持し得る。

【0026】

態様の一において、本願は、上述の細胞株によって産生される未熟なウイルス様粒子を提供する。

【0027】

第八の局面において、本願は、以下の工程を含む、成熟したウイルス様粒子を産生するための方法を提供する。

i) 上述の細胞株によって産生される未熟なウイルス様粒子を提供する；

ii) 未熟なウイルス粒子からE3を除去する。

【0028】

態様の一において、該未熟なウイルス様粒子のE3は、プロテアーゼ認識部位の分解により除去される。態様の一において、該未熟なウイルス様粒子のE3は、プロテアーゼにより除去される。プロテアーゼの例には、Arg-Cプロテイナーゼ、Asp-Nエンドペプチダーゼ、Asp-Nエンドペプチダーゼ+N末端Glu、BNPS-スカトール、カスパーゼ1からカスパーゼ10、キモトリプシン、クロストリパイン(クロストリジオペプチダーゼB)、CNBr、エンテロキナーゼ、第Xa因子、ギ酸、グルタミルエンドペプチダーゼ、グランザイムB、ヒドロキシルアミン、ヨードソ安息香酸、LysC、LysN、NTCB(2-ニトロ-5-チオシアナト安息香酸)、好中球エラスターゼ、ペプシン、プロリンエンドペプチダーゼ、PreScissionプロテアーゼ(PSP)、プロテイナーゼK、ブドウ球菌ペプチダーゼI、タバコエッチ病ウイルスプロテアーゼ、サーモリシン、トロンピンおよびトリプシンが挙げられるが、これらに限定するものではない。該プロテアーゼの好ましい例には、第Xa因子、エンテロキナーゼおよびPreScissionプロテアーゼ(PSP)が挙げられ、特に第Xa因子およびエンテロキナーゼ(例えばエンテロキナーゼ(エンテロペプチダーゼ)、軽鎖)が挙げられる。

【0029】

別の局面において、本願は、少なくとも1つの抗原を含むように修飾されているエンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子を提供する。少なくとも1つの抗原は、ウイルス構造タンパク質が由来するウイルスに由来しないペプチドであってよく、あるいは、ウイルス構造タンパク質を提供するのと同じウイルスに由来するペプチドであってよい。

【0030】

上述の粒子を修飾することによって作製し得る、上述のウイルス様粒子の誘導體もまた、本願により提供される。該修飾には、1つ以上のアミノ酸残基の付加、欠失または置換が挙げられるが、これらに限定するものではない。

【0031】

本願の提供する粒子は、i) 少なくとも1つのウイルス構造タンパク質およびii) 該ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されている少なくとも1つの抗原からなるか、またはこれらを含む粒子であってよい。少なくとも1つのウイルス構造タンパク質は、1種以上のタンパク質またはペプチドからなっていてよく、自発的に集合して粒子を形成する。態様の一において、本願の提供する粒子は、少なくとも10nmの直径、例えば、少なくとも20nm、好ましくは、少なくとも50nmの直径を有する。態様の一において、該粒子の分子量は、100kDa - 100,000kDaであり、好ましくは400kDa - 30,000kDaである。

【0032】

少なくとも1つの抗原が挿入されているエンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子の発現を可能にするために、ウイルス構造タンパク質のアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸残基が置換、付加および/または欠失され得る。

【0033】

好ましい態様の一において、エンベロープタンパク質E3に少なくとも1つの抗原を含む

10

20

30

40

50

本願の提供するウイルス様粒子は、エンベロープタンパク質E2に少なくとも1つの抗原を含むウイルス様粒子よりも、真核細胞（例えば293F細胞）において、より効率的に発現され得る。

【0034】

本願に用いるウイルス構造タンパク質は、アルファウイルスまたはフラビウイルス由来のウイルス構造タンパク質であってよい。従って、本願の提供する粒子は、アルファウイルスまたはフラビウイルス由来のウイルス様粒子を含む、ウイルス様粒子であり得る。

【0035】

アルファウイルスおよびフラビウイルスの例には、アウラウイルス、ババンキウイルス (Babanki virus)、バーマフォレストウイルス (Barmah Forest virus) (BFV)、ベバルウイルス、カバソウウイルス (Cabassou virus)、チクングニアウイルス (CHIKV)、東部ウマ脳炎ウイルス (EEEV)、エイラートウイルス (Eilat virus)、エバーグレードウイルス (Everglades virus)、フォートモーガンウイルス (Fort Morgan virus)、ゲタウイルス、ハイランドJウイルス (Highlands J virus)、キジラガチウイルス (Kyzylagach virus)、マヤロウイルス、メトリウイルス (Me Tri virus)、ミデルバーグウイルス (Middelburg virus)、モッソダスペドラスウイルス (Mosso das Pedras virus)、ムカンボウイルス、ヌドゥムウイルス、オニョンニョンウイルス、ピクスナウイルス、リオネグロウイルス、ロスリバーウイルス (RRV)、サケ膵臓病ウイルス (Salmon pancreas disease virus)、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス、ミナミゾウアザラシウイルス (Southern elephant seal virus)、トナテウイルス (Tonate virus)、トロカラウイルス (Trocara virus)、ウナウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV)、西部ウマ脳炎ウイルス (WEEV)、ワタロアウイルス、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスおよび黄熱ウイルスが含まれるが、これらに限定されない。

【0036】

本願により提供される該粒子は、チクングニアウイルスまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス由来のウイルス様粒子であってよい。チクングニアウイルスは、チクングニアウイルス37997株またはOPY-1株であってよい。ベネズエラウマ脳炎ウイルスは、ベネズエラウマ脳炎ウイルスTC-83株であってよい。

【0037】

ウイルス構造タンパク質は、カプシドタンパク質、エンベロープタンパク質、その断片または複合体であってよい。従って、本願に用いるウイルス構造タンパク質は、カプシドタンパク質および/またはエンベロープタンパク質および/またはその断片または誘導体からなるか、またはそれらを含んでいてよい。態様の1において、本願の提供するウイルス様粒子は、カプシド、E3、E2、およびE1タンパク質からなるか、またはそれらを含み、かつ、抗原はE3に挿入されている。例えば、本願の提供するウイルス様粒子は、240のカプシド、240のE1タンパク質、240のE2タンパク質および240のE3タンパク質を集合させることにより形成してよく、ここで、抗原は各E3タンパク質に挿入されている。

【0038】

生理的条件下で、E3は、フリーリン切断後にE2から分離され得る。態様の1において、E3中に位置するフリーリン切断部位は、フリーリン部位が切断されないように変異されていてよい。例えば、フリーリン切断部位に変異を導入するために、抗原がフリーリン切断部位に挿入され得る。この態様において、提供されるウイルス様粒子は、カプシド、E3、E2およびE1タンパク質からなるか、またはそれらを含んでよく、ここで、E3はE2に結合して単一タンパク質を形成し、かつ、抗原はE3領域に挿入されている。例えば、本願の提供するウイルス様粒子は、240のカプシド、240のE1タンパク質、240のタンパク質を集合させることにより形成してよく、各ウイルス様粒子において、E2はE3に結合し、かつ、抗原は各E3領域に挿入されている。

【0039】

抗原は、MHC分子によって提示されている場合に、抗体またはT細胞受容体 (TCR) によって結合され得る分子であってよい。抗原は、B細胞エピトープおよびT細胞エピトープを

10

20

30

40

50

包含し得る。2013年2月15日に出願された米国特許出願第US 2013/0251744号（本文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）で開示される抗原が、本願で用いられてよい。本願に用いられる抗原には、アレルゲン、自己抗原、ハプテン、がん抗原、感染性疾患抗原ならびに有機小分子、ならびにその断片および誘導体が含まれるが、これらに限定するものではない。

#### 【0040】

抗原は、天然起源のタンパク質および/または修飾タンパク質、それらの断片、または天然起源のタンパク質の誘導体またはその断片であってよい。本願の提供する粒子に含有される抗原として用いられる天然起源のタンパク質および/または修飾タンパク質の断片は、天然起源のタンパク質および/または修飾タンパク質のアミノ酸配列および/またはその3次元構造に基づいて選択してよい。例えば、抗原に用いる断片は、天然起源のタンパク質の表面に位置する断片からなるか、またはそれを含んでいてよい。好ましくは、本願の提供する粒子に含有される抗原に対する抗体は、抗原の機能を阻害し得る。抗原（例えば天然起源のタンパク質の断片）の長さは、10 - 300アミノ酸残基（例えば10 - 120、10 - 30または15 - 30アミノ酸残基）であってよい。天然起源の誘導体またはその断片は、天然起源のタンパク質またはその断片に、1つまたは数アミノ酸残基を付加、欠失または置換させることによって作製し得る。態様の一において、天然起源のタンパク質の誘導体またはその断片は、相当する天然起源のタンパク質またはその断片と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%のアミノ酸配列同一性を有する。態様の一において、天然起源のタンパク質の誘導体またはその断片は、相当する天然起源のタンパク質またはその断片に基づいて、アミノ酸の最大10%が欠失、置換および/または付加されている変異体である。

#### 【0041】

態様の一において、抗原またはエピトープ（例えば天然起源のタンパク質の断片）は、抗原のN - 末端残基とC - 末端残基の空間距離が、該抗原または該抗原を含む天然起源のタンパク質またはそれ由来の修飾ペプチドの結晶において測定した場合に、30（オングストローム）以下であるように選択してよい。例えば、本願の提供する粒子に用いる抗原は、フリーソフトウエア、例えばPyMOL（例えばPyMOL v0.99: <http://www.pymol.org>）を用いて設計してよい。態様の一において、抗原のN - 末端残基およびC - 末端残基の空間距離は、30以下、20以下、または10以下（例えば、5 - 15、5 - 12、5 - 11、5 - 10、5 - 8、8 - 15、8 - 13、8 - 12、8 - 11、9 - 12、9 - 11、9 - 10または10 - 11）である。

#### 【0042】

態様の一において、本願に用いてよい抗原またはエピトープは、マラリア抗原、PD-1抗原、PD-1リガンド抗原、CTLA-4抗原、IL-2抗原DISC1抗原、HER2抗原、BTLA抗原、HVEM抗原、PCSK9抗原またはDPP-4抗原であってよい。

#### 【0043】

本明細書中で用いる、「マラリア抗原」は、プラスモディウム寄生虫（*Plasmodium parasite*）由来の抗原またはエピトープを指す。プラスモディウム寄生虫は、例えば、熱帯熱マラリア原虫、四日熱マラリア、卵形マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、二日熱マラリア原虫、プラスモディウム・シャバウディおよびプラスモディウム・ヨエリなどの既知のプラスモディウム種のいずれかから選択されてよい。

#### 【0044】

態様の一において、マラリア抗原は、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質（以降、CSPタンパク質、マラリアCSPタンパク質、またはCSPと称する）B細胞エピトープである。熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質B細胞エピトープの例は、NPNAのリピート配列、例えば(NPNA)<sub>4-30</sub>（すなわち、4x NPNA、5x NPNA、6x NPNA、7x NPNA、8x NPNA、9x NPNA、10x NPNA、11x NPNA、12x NPNA、13x NPNA、14x NPNA、15x NPNA、16x NPNA、17x NPNA、18x NPNA、19x NPNA、20x NPNA、21x NPNA、22x NPNA、23x NPNA、24x NPNA、25x NPNA、26x NPNA、27x NPNA、28x NPNA、29x NPNAまたは30x NPNA）であり得

る。

【 0 0 4 5 】

態様の一において、マラリア抗原は、(QGPGAP)<sub>3-12</sub>を含む、プラスモディウム・ヨエリ  
のスポロゾイト周囲タンパク質B細胞エピトープである。

【 0 0 4 6 】

態様の一において、マラリア抗原は、(ANGAGNQPG)<sub>1-12</sub>を含む、三日熱マラリア原虫ス  
ポロゾイト周囲タンパク質B細胞エピトープである。

【 0 0 4 7 】

態様の一において、マラリア抗原は、(NAAG)<sub>4-30</sub>を含む、四日熱マラリア原虫スポロゾ  
イト周囲タンパク質B細胞エピトープである。

10

【 0 0 4 8 】

態様の一において、マラリア抗原は、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質  
T細胞エピトープである。熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質T細胞エピト  
ープの例は、EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT(配列番号4)であり得る。(EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT)<sub>1-6</sub>も  
、マラリア抗原として使用し得る。

【 0 0 4 9 】

態様の一において、マラリア抗原は、YNRNIVNRLG DALNGPEEK(配列番号5)である、ブラ  
スモディウム・ヨエリスポロゾイト周囲タンパク質T細胞エピトープである。(YNRNIVNRL  
GDALNGPEEK)<sub>1-6</sub>も、マラリア抗原として使用し得る。

20

【 0 0 5 0 】

本明細書中で用いる、「PD-1抗原」という語は、PD-1由来の抗原またはエピトープを指  
す。好ましくは、PD-1はヒトPD-1である。PD-1由来の抗原は、PD-1の断片またはPD-1の断  
片の誘導体であってよい。

【 0 0 5 1 】

本明細書中で用いる、「PD-1リガンド抗原」という語は、PD-1のリガンド由来の抗原ま  
たはエピトープを指す。PD-1のリガンドの例としては、例えば、PD-L1およびPD-L2が挙げ  
られるが、これらに限定するものではない。好ましくは、PD-1リガンドはヒトPD-L1また  
はヒトPD-L2である。PD-L1由来の抗原は、PD-L1またはPD-L2の断片；またはPD-L1またはP  
D-L2の断片の誘導体であってよい。

30

【 0 0 5 2 】

抗原として用いるPD-1抗原の例としては、LNWYRMSPSNQTDKLA AF(配列番号6)、MLNWYRMSP  
SNQTDKLA AF S(配列番号7)、VLNWYRMSPSNQTDKLA AFP(配列番号8)、GAISLHPKAKIEES(配列番号  
9)、CGAISLHPKAKIEEC(配列番号10)、VLNWYRMSPSNQTDKLA AF(配列番号11)、GAISLAPKAQIKES  
(配列番号12)、RND SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV T(配列番号13) およびRND SGTYLCGAISLHP  
KAKIEESPGAELVVT(配列番号14)が挙げられるが、これらに限定するものではない。抗原と  
して用いるPD-1リガンド抗原の例としては、CIISYGGADYC(配列番号15)、CMISYGGADYC(配  
列番号16)、LQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVN(配列番号17)、LQDAGVYRAMISYGGADYKRITVKVN(配  
列番号18)、DLAALIVYWEMEDKNIIQFVH(配列番号19)、DLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGG(配列番号20  
)、FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVE(配列番号21)、LQDAGVYCCII SYGGADYKRITLKV N(配列番号2  
2)、LQDAGVYAAII SYGGADYKRITLKV N(配列番号23)、DLLALVYWEKEDEQVIQFVA(配列番号24)、D  
LLALVYWEKEDEQVIQFVAGG(配列番号25)およびFTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVE(配列番号26)  
が挙げられるが、これらに限定するものではない。

40

【 0 0 5 3 】

本明細書中で用いる、「CTLA-4抗原」という語は、CTLA-4(細胞傷害性Tリンパ球抗原4  
)由来の抗原またはエピトープを指す。好ましくは、CTLA-4はヒトCTLA-4である。CTLA-4  
由来の抗原は、CTLA-4の断片またはCTLA-4の断片の誘導体であってよい。

抗原として用いるCTLA-4抗原の例としては、GGKVELMYPPPYFVGMGG(配列番号27)、CATTFTEK  
NTVGFLDY PFC(配列番号28)およびATTFTKNTVGFLDY PF(配列番号29)が挙げられるが、これら  
に限定するものではない。

【 0 0 5 4 】

50

本明細書中で用いる、「DISC1抗原」という語は、DISC1由来の抗原またはエピトープを指す。抗原として用いるDISC1抗原の例としては、SGGLLIQSLQLQEARGELSVEDERQMDDLEGG(S(DISC1\_451)(配列番号105)、SGGEARGELSVEDERQMDDLEGG(S(DISC1\_452)(配列番号106)およびSGGEARGELSVEGGS(DISC1\_454)(配列番号107)が挙げられるが、これらに限定するものではない。

【0055】

本明細書中で用いる、「HER2抗原」という語は、HER2由来の抗原またはエピトープを指す。抗原として用いるHER2抗原の例としては、SGGVTYNTDTFESMPGGS(配列番号108)、SGGEYVNARHCLPGGS(配列番号109)、SGGYVNARHCLGGS(配列番号110)、SGGYVNARHGLGGS(配列番号111)、SGGKFPDEEGACQPCPIGGS(配列番号112)、SGGKFPDEEGACQPGGS(配列番号113)、SGGKDPPFCVGGGS(配列番号114)、SGGYKDPPFCVAGGS(配列番号115)、およびSGGYKDPPFCVGGGS(配列番号116)が挙げられるが、これらに限定するものではない。

10

【0056】

本明細書中で用いる、「BTLA抗原」という語は、BTLA由来の抗原またはエピトープを指す。抗原として用いるBTLA抗原の例としては、SGGCKLNGTTCGGS(配列番号132)が挙げられるが、これらに限定するものではない。

【0057】

本明細書中で用いる、「HVEM抗原」という語は、HVEM由来の抗原またはエピトープを指す。抗原として用いるHVEM抗原の例としては、SGGCVKEASGELTGTVC GGS(配列番号133)、SGGCYRVKEASGELTGTVSEPCGGS(配列番号134)、SGGCSRNSRTENAVCGGS(配列番号135)、およびSGGCQMSDPAMGLRSRNC GGS(配列番号136)が挙げられるが、これらに限定するものではない。

20

【0058】

本願の提供する粒子において、ウイルス構造タンパク質および抗原は、ウイルス構造タンパク質中に存在する少なくとも1つの第一付着部位と、抗原中に存在する少なくとも1つの第二付着部位を介して連結してよい。

【0059】

本明細書中で用いる、「第一付着部位」および「第二付着部位」という語はそれぞれ、1つ以上の物質が互いに連結している部位を指す。

【0060】

ウイルス構造タンパク質および抗原は、直接または間接的に融合していてもよい。態様の一において、1つまたは2つのリンカーが、抗原のN - 末端残基とウイルス構造タンパク質および/または抗原のC - 末端残基とウイルス構造タンパク質の間に介在していてもよい。

30

【0061】

抗原またはウイルス構造タンパク質は、切断されて、短いリンカーにより置換されていてよい。いくつかの態様において、抗原またはウイルス構造タンパク質は、1つ以上のペプチドリリンカーを含む。典型的には、リンカーは2 - 25アミノ酸(例えば、2、3、4、5、または6アミノ酸)からなる。通常、リンカーは2 - 15アミノ酸の長さであるが、特定の状況下では、1アミノ酸のみ、例えば単独のグリシン残基であってもよい。

【0062】

40

態様の一において、ウイルス構造タンパク質をコードするポリヌクレオチドが遺伝学的に抗原をコードするポリヌクレオチドと融合している核酸分子は、宿主細胞(例えば、哺乳動物細胞(例えば293F細胞))において、第一付着部位および第二付着部位がペプチド結合を介して結合するように発現する。この場合、該ウイルス構造タンパク質および該抗原は、ペプチド結合を介して結合する。この態様に関して、該第一付着部位および/または該第二付着部位は、本来のタンパク質または抗原から、遺伝的に修飾されていてもよい。例えば、該第一付着部位は、タンパク質がSG、GS、SGG、GGSおよびSGSGを含むリンカーペプチドを介して抗原と結合するように、該ウイルス構造タンパク質から修飾されている。該ウイルス構造タンパク質が抗原と化学的に結合している場合、該第一付着部位および該第二付着部位は、化合物である化学クロスリンカーを介して結合し得る。該クロスリン

50

カーの例としては、SMPH、スルホ - MBS、スルホ - EMCS、スルホ - GMBS、スルホ - SIAB、スルホ - SMPB、スルホ - SMCC、SVSB、SIAおよびPierce Chemical Companyより入手可能な他のクロスリンカーが挙げられるが、これらに限定するものではない。

【 0 0 6 3 】

好ましくは、抗原は、遺伝工学によって製造した融合タンパク質として、チクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質に結合し得る。

【 0 0 6 4 】

本願で用いるチクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質は、チクングニアまたはベネズエラウマ脳炎ウイルスエンベロープタンパク質またはカプシドまたは1つ以上のエンベロープタンパク質および/またはカプシドタンパク質の複合体であってよい。

10

【 0 0 6 5 】

チクングニアウイルスの例としては、37997株およびLR2006 OPY-1株が挙げられるが、これらに限定するものではない。

ベネズエラウマ脳炎ウイルスの例としては、TC-38株が挙げられるが、これらに限定するものではない。

【 0 0 6 6 】

本発明で用いるチクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質は、天然起源のウイルス構造タンパク質またはその修飾タンパク質であってよい。該修飾タンパク質は、天然起源のウイルス構造タンパク質の断片であってよい。態様の一において、該修飾タンパク質は、天然起源のウイルスカプシドおよび/またはエンベロープタンパク質と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%のアミノ酸配列同一性を有する。態様の一において、修飾タンパク質は、アミノ酸の最大10%が天然起源のウイルスカプシドおよび/またはエンベロープタンパク質に基づいて欠損、置換および/または付加されている変異体である。例えば、K64AまたはK64N変異を、本願で用いるベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質のカプシドに導入してよい。

20

【 0 0 6 7 】

チクングニアまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質は、カプシド、E3、E2およびE1タンパク質からなっている、またはこれらを含んでいてもよい。E3およびE2タンパク質は、E2およびE3が1つのタンパク質を形成し得るように、共に発現されてよい。

30

【 0 0 6 8 】

チクングニアウイルス構造タンパク質の例としては、チクングニアウイルス株37997のカプシド-E3-E2-E1およびチクングニアウイルスLR2006 OPY-1のカプシド-E3-E2-E1が含まれるが、これらに限定するものではない。

【 0 0 6 9 】

ベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質の例としては、ベネズエラウマ脳炎ウイルス株TC-83のカプシド-E3-E2-E1が含まれるが、これらに限定するものではない。

【 0 0 7 0 】

チクングニアウイルス構造タンパク質配列の例は、Genbank受入番号第ABX40006.1にて提供される、以下の配列である（配列番号1）：

40



## 【化 1】

mefiptqtfnrryqprpwtprptiqvirprprpqrqagqlaqlisavnkltmravpqqkpr  
 rnrknkkqkqkqapqnnntnqkkqppkkkpaqkkkkpgrrrermcmkiendcifevkhegkvt  
 gyaclvgdkvmkpahvkgtidnadlaklafkrsskydlecaqipvhmksdaskfthekpegy  
 ynwvhgavqysggrftiptgagkpgdsgrpifdnkgrvvaivlgganegartalsvvtwnkd  
 ivtkitpegaeewslaipvmcllanttfpcsqppctpcceyekepeetlrmllednvmrpgyyyq  
 llqasltcsphrqrstkdnfnykatrpylahcpdcgegshschspvalerirneatdgtlk  
 iqvslqigiktddshdwtklrymdnhmpadaeraglfvrtsapctitgtmghfilarcpkge  
 tltvgftdsrkishscthpfhhdppvigrekfhsrpqhghkelpcstyvqstaateeievhm  
 ppdtpdrtlmsqqsgnvkitvngqtvrykcneggsneglttttdkvinncvdqchaavtnhk  
 kwqynsplvprnaelgdrkgkihipfplanvtcrvpkarnptvtygknqvmllypdhptll  
 syrnmggeepnyqeewvmhkkevltvpteglevtwgnnepkywpglstngtahghpheiil  
 yyyelyptmtvsvvatfillsmvgmaagmcmcarrrcitpyeltpgatvpfllsliccir  
 takaatyqeaaiylwneqqplfwlqaliplaalivlcnclrlpcccktlaflavmsvgaht  
 vsayehvtvipntvgvpyktlvnrpgyspmvlemellsvtleptlsldytceyktvipspy  
 vkccgtaeckdknlpdysckvftgvypfmwggaycfdaentqlseahveksescktefasa  
 yrahtasasaklrlyqgnnitvtayangdhavtvkdakfivgpmssawtpfdnkivvykgd  
 vynmdyppfgagrpqgqfgdiqsrtpeskdvyantqlvlqrpavgtvhvpysqapsqgfywlk  
 ergaslqhtapfgcqiatsnpvravncavgnmpisidipeaaftrvvdapsltdmscevpaht  
 hsdffggvaiikyaaskkgkcavhsmtnavtireaeievegnsqqlqisfstalasaefrvqv  
 cstqvhcaaechppkdhiwnypashttlgvqdisatamswvqkitggvgglvavaalilivv  
 lcvsfsrh

10

20

## 【0071】

チクングニアウイルス構造タンパク質配列の他の例は、Genbank受入番号ABX40011.1に  
 て提供される以下の配列である（配列番号2）：

## 【化 2】

mefiptqtfnrryqprpwaprptiqvirprprpqrqagqlaqlisavnkltmravpqqkpr  
 rnrknkkqkqkqapqndpkqkkqppqkpaqkkkkpgrrrermcmkiendcifevkhegkvm  
 gyaclvgdkvmkpahvkgtidnadlaklafkrsskydlecaqipvhmksdaskfthekpegy  
 ynwvhgavqysggrftiptgagkpgdsgrpifdnkgrvvaivlgganegartalsvvtwnkd  
 ivtkitpegaeewslalpvlcllanttfpcsqppctpcceyekepestlrmllednvmrpgyyyq  
 llkasltcsphrqrstkdnfnykatrpylahcpdcgegshschspialerirneatdgtlk  
 iqvslqigiktddshdwtklrymdshdpadaeragllvrtsapctitgtmghfilarcpkge  
 tltvgftdsrkishscthpfhheppvigrerfhsrpqhghkelpcstyvqstaataeeievhm  
 ppdtpdrtlmtqqsgnvkitvngqtvrykcneggsneglttttdkvinncidqchaavtnhk  
 nwqynsplvprnaelgdrkgkihipfplanvtcrvpkarnptvtygknqvtmllypdhptll  
 syrnmggeepnyheewvthkkevltvpteglevtwgnnepkywpgmstngtahghpheiil  
 yyyelyptmtvsvvasfvllsmvgtavgmvcarrcitpyeltpgatvpfllsllccvr  
 ttkaatyeeaaaylwneqqplfwlqaliplaalivlcnclklpcccktlaflavmsigaht  
 vsayehvtvipntvgvpyktlvnrpgyspmvlemelqsvtleptlsldytceyktvipspy  
 vkccgtaeckdkslpdysckvftgvypfmwggaycfdaentqlseahveksescktefasa  
 yrahtasasaklrlyqgnnitvaayangdhavtvkdakfivgpmssawtpfdnkivvykgd  
 vynmdyppfgagrpqgqfgdiqsrtpeskdvyantqlvlqrpaaagtvhvpysqapsqgfywlk  
 ergaslqhtapfgcqiatsnpvravncavgnipisidipdaaftrvvdapsvtdmscevpaht  
 hsdffggvaiikytaskkgkcavhsmtnavtireadvevegnsqqlqisfstalasaefrvqv  
 cstqvhcaaaachppkdhiwnypashttlgvqdisttamswvqkitggvgglivavaalilivv  
 lcvsfsrh

30

40

## 【0072】

ベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質の例は、以下の配列である（配列番号3）  
 :

## 【化3】

mfpfqpmypmqmpmpympfaaprrpwpfrtdpflamqvqeltrsmantfkqrrdappegpsaakpkkeasqkqkgggqgkknqgkknkakt  
 gppnpkaqngnkkknkpgkrqrmvmklesdktpimlegkingyacvvggklfrpmhvegkidndvlaiktkaskydleyadvpqnmradt  
 fkythekpqgyyswhhgavqyengrftvpkgvgakgdsgrpildnqgrvvaivlggvnegsrtalsvwmwnekgtvkytpenceqswslvtmcll  
 anvtfpcaqppicydrkpaetlamlsnvndnpgydelleaavkcpgrkrsteelfneykltrpymarcircavgschspiaieavksdghdgyvrlqts  
 sqygidssgnikgrtmrydmhgtikeiplhqvslytsrpchivdghgyfllarcpgagsitmeffkdsvrhscsvpyevkfnpvgrelythppegveq  
 acqvayahdaqnrgayvemhipgsevdsslvslsgssvtvtpdgtalvececggtkisetinktkqfsqctkqecrayrlqndkwvynsdikpka  
 agatlkglhvpfladgkctvplapepmittfgrsvslklhpknptylitrqladephythelisepavmftvtekgwefvwnhpcprfwaqetapgnp  
 hgiphevithyrypmstligisicaaiatvsaaastwifcrsvacitprrtpnaripfclaviccaraettwesidhlwnnnqgmfwlqlliplaaliv  
 trlrcvccvvpflvmagaagagayehattmpsqagisyntivnragyaplpisitptkikliptvnieyvtchytgmdspaikkcgsgectptyrpdeq  
 ckvtfgvypfmwggaycfdtentqvskayvmksddcladhaeaykahtasvqafinitvgehsivttvyvnetpvnfnvgvitagpistawtpdr  
 kivqyageiynydfpeygagqpafgdiqsrvtssdlyantnlvqrpkaiahvpytqapsqfegwkkdkapsikftapfgeiytnpiraencavg  
 siplafidipdalfrvsetptisaaectinecvysdsggiatvkysaskgkavhvpstgatikeaavelteqgsatihfstanihpelriqictsyvtckgd  
 chppkdhivthpqyhaqftaavsktawtwitslpggsaviiiglvlativamyvltqnkhn

10

## 【0073】

態様の－において、第一付着部位は、アミノ基、好ましくはリジン残基のアミノ基を含む。態様の－において、第二付着部位は、スルフヒドリル基、好ましくはシステインのスルフヒドリル基を含む。

20

## 【0074】

本願によれば、チクングニアまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質と少なくとも1つの抗原とを含む、チクングニアウイルス様粒子またはベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子であって、少なくとも1つの抗原がウイルス構造タンパク質のE3に挿入され、かつ、チクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質および該抗原が、融合タンパク質として発現する粒子を提供し得る。該抗原は、ウイルス構造タンパク質のE3に直接または間接的に挿入されてよい。

## 【0075】

チクングニアウイルスならびにベネズエラウマ脳炎のウイルス構造タンパク質は、E1、E2、6KおよびE3からなる。6Kは、集合の過程で自然に切断され、VLPから除かれる。成熟したVLPは、カプシド、E1およびE2からなる（図1参照）。本明細書および特許請求の範囲において、「ウイルス構造タンパク質」は6Kを有するタンパク質のみならず、6Kが除かれた後のタンパク質も指す。

30

## 【0076】

実用的な例で用いるCHIKVおよびVEEVの6K配列は、次の通りである：

CHIKV OPY-1株、6K: 配列番号1の749-809aa

ATYQEAAYLWNEQQPLFWLQALIPLAALIVLCNCLRLLPCCCKTLAFLAVMSVGAHTVSA(配列番号137)

CHIKV 37997株、6K: 配列番号2の749-809aa

ATYYEAAAYLWNEQQPLFWLQALIPLAALIVLCNCLKLLPCCCKTLAFLAVMSIGAHTVSA(配列番号138)

VEEV TC-83株、6K: 配列番号3の758-813aa

ETTWESLDHLWNNNQGMFWIQLLIPLAALIVVTRLLRCVCCVVPFLVMAGAAGAGA(配列番号139)

40

## 【0077】

チクングニアウイルス構造タンパク質については、少なくとも1つの抗原が、配列番号1または2の322R - 325Rのフォーリン部位（RKRR）の代わりに挿入されてよい。例えば、チクングニアウイルス構造タンパク質については、少なくとも1つの抗原が、配列番号1または2の第321番のHと第326番のSの残基の間；配列番号1または2の第320番のPと第326番のSの間；または配列番号1または2の第319番のSと第326番のSの間に挿入される。VLP\_CHI 0.56ベクター（配列番号30）を、抗原が配列番号1または2の第321番と第326番の残基の間に挿入

50

されているチクングニアウイルス様粒子の作製に用いてよい。抗原が、配列番号1または2の第321番と第326番の残基の間に挿入される場合、本願の提供するウイルス様粒子は、E2およびE3の複合体、カプシドおよびE1からなるチクングニアウイルス様粒子であってよく、ここで、配列番号1または2の321および326に相当する残基の間に挿入されている場合、少なくとも1つの抗原がE3領域に挿入され、かつ該カプシドは配列番号31（または配列番号75）で表されるアミノ酸配列からなり；該E1は配列番号32または配列番号76で表されるアミノ酸配列からなり；並びにE2およびE3の該複合体は配列番号33または配列番号77で表されるアミノ酸配列からなる。

【0078】

ベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質について、少なくとも1つの抗原が、配列番号3の331R - 334Rのフーリン部位（RKRR）の代わりに挿入されてよい。例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質については、少なくとも1つの抗原が、配列番号3の第330番のGと第335番のSの間；配列番号3の第329番のPと第335番のSの間；または配列番号3の第328番のCと第335番のSの間に挿入される。VLP\_VEEV 0.66ベクター（配列番号34）を、該抗原が配列番号3の第330番および第335番の残基の間に挿入されているベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子の作製に用いてよい。該抗原が、配列番号3の第330番および第335番の残基の間に挿入される場合、本願の提供するウイルス様粒子は、E2およびE3の複合体、カプシドおよびE1からなるベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子であってよく、ここで、少なくとも1つの抗原のアミノ酸配列が配列番号3の第330番および第335番の残基の間に挿入されている場合、少なくとも1つの抗原がE3領域に挿入され、かつ、該カプシドは配列番号35で表されるアミノ酸配列からなり；該E1は配列番号36で表されるアミノ酸配列からなり；かつE2およびE3の該複合体は配列番号37で表されるアミノ酸配列からなる。

【0079】

態様の一において、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質由来の抗原、PD-1由来の抗原、PD-L1由来の抗原、CTLA-4由来の抗原、IL-2由来の抗原、DISC1由来の抗原、HER2由来の抗原、BTLA由来の抗原、HVEM由来の抗原、PCSK9由来の抗原またはDPP-4由来の抗原から選択される少なくとも1つの抗原は、チクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質のE3に挿入される。

【0080】

該融合タンパク質は、該分野で慣用される技術を用いて発現させてよい。該融合タンパク質の発現に、種々の発現系を用いてよい。例えば、該融合タンパク質は、293F細胞、Sf9細胞、大腸菌（*E.coli*）、昆虫細胞またはバキュロウイルス（*Baculovirus*）に発現させてよい。

【0081】

チクングニアウイルス（CHIKV）またはベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）由来のタンパク質は、天然起源のウイルスタンパク質であっても、その修飾されたタンパク質であってもよい。

【0082】

ウイルス由来のタンパク質が抗原由来のタンパク質と結合している場合、SG、GS、SGG、GGS SGSGおよびTRGGSを含むリンカーペプチドを用いてよい。ウイルス由来のタンパク質（以降「PFV」と称する）の抗原由来のタンパク質（以降「PFA」と称する）との結合の例としては、PFV-SG-PFA-GS-PFV；PFV-SG-PFA-GGS-PFV；PFV-SSG-PFA-GS-PFV；PFV-SGG-PFA-GGS-PFV；PFV-SGSG-PFA-GS-PFV；およびPFA-SGG-PFA-TRGGS-PFVが挙げられるが、これらに限定するものではない。

【0083】

態様の一において、本願は、チクングニアウイルス（CHIKV）またはベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）由来のタンパク質および熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質、PD-1、PD-L1、CTLA-4由来のタンパク質の融合タンパク質、IL-2由来の抗原、DISC1由来の抗原、HER2由来の抗原、BTLA由来の抗原、HVEM由来の抗原、PCSK9由来の抗原、およびDPP-4由来の抗原を含むウイルス様粒子を提供し、ここで、該ウイルス様粒子は、配列番号

10

20

30

40

50

38 - 45で表されるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む発現ベクターを哺乳類細胞（例えば293F細胞）に遺伝子導入することにより作製される。この態様については、修飾融合タンパク質は、配列番号38 - 45と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%のアミノ酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む発現ベクターを、哺乳類細胞（例えば293F細胞）に遺伝子導入することにより作製され得る。

#### 【0084】

態様の一において、本願は：

チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の1つ以上のカプシド；

チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の1つ以上のE1； 10

チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の1つ以上のE2；  
および

チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の1つ以上のE3を含むか、またはこれらからなるウイルス様粒子を提供し、ここで、各E2は各E3に結合し、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質由来の抗原、PD-1由来の抗原、PD-1のリガンド(例えばPD-L1、PD-L2)由来の抗原、CTLA-4由来の抗原、IL-2由来の抗原、DISC1由来の抗原、HER2由来の抗原、BTLA由来の抗原、HVEM由来の抗原、PCSK9由来の抗原およびDPP-4由来の抗原からなる群から選択される抗原が、チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)のE3に挿入されている。例えば、本願は：

チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の240のカプシド； 20

チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の240のE1；および

チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の240のE2；

チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の240のE3を含むか、またはこれらからなるウイルス様粒子を提供し、ここで、各E2は各E3に結合し、かつ、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質由来の抗原、PD-1、PD-1のリガンド(例えばPD-L1、PD-L2)由来の抗原、CTLA-4由来の抗原、IL-2由来の抗原、DISC1由来の抗原、HER2由来の抗原、BTLA由来の抗原、HVEM由来の抗原、PCSK9由来の抗原およびDPP-4由来の抗原からなる群から選択される抗原が、チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の各E3に挿入されている。 30

#### 【0085】

ウイルス様粒子は、人体に投与され得る抗原の担体として機能しうる。抗原の担体として機能し得るCHIKV VLPの例としては、E2およびE3の複合体、カプシドおよびE1を含むか、またはこれらからなるチクングニアウイルス様粒子であって、該カプシドは配列番号31(または配列番号75)で表されるアミノ酸配列からなり；該E1は配列番号32(または配列番号76)で表されるアミノ酸配列からなり；およびEとE3の該複合体は配列番号33(または配列番号77)で表されるアミノ酸配列からなり、少なくとも1つの抗原のアミノ酸配列が配列番号1または配列番号2の321と326に相当する残基の間に挿入されたチクングニアウイルス様粒子が挙げられるが、これらに限定するものではない。抗原の担体として機能し得るVEEV VLPの例としては、E2およびE3の複合体、カプシドおよびE1を含むか、またはこれらからなるベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子であって、該カプシドは配列番号35で表されるアミノ酸配列からなり；該E1は配列番号36で表されるアミノ酸配列からなり；およびE2およびE3の該複合体は配列番号37で表されるアミノ酸配列からなり、少なくとも1つの抗原のアミノ酸配列が、配列番号3の330と335に相当する残基の間に挿入されたベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子が挙げられるが、これらに限定するものではない。 40

#### 【0086】

チクングニアウイルス構造タンパク質、ならびに、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質由来の抗原、PD-1由来の抗原、PD-L1由来の抗原、CTLA-4由来の抗原、IL-2由来の抗原、DISC1由来の抗原、HER2由来の抗原、BTLA由来の抗原、HVEM由来の抗原、PCS 50

K9由来の抗原およびDPP-4由来の抗原を含むウイルス様粒子の例としては、少なくとも1つの抗原が挿入されているE2およびE3の複合体、カプシド、およびE1からなるチクングニアウイルス様粒子であって、少なくとも1つの抗原がE3領域に挿入され、かつ、該カプシド、E1、少なくとも1つの抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のそれぞれのアミノ酸配列が以下に記載されているチクングニアウイルス様粒子が挙げられるが、これらに限定するものではない：

(1)

E1のアミノ酸配列は、配列番号32で表される；

該マラリア抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のアミノ酸配列は、配列番号46で表される；および

カプシドのアミノ酸配列は、配列番号31で表される；

(2)

E1のアミノ酸配列は、配列番号32で表される；

該PD-1抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のアミノ酸配列は、配列番号47で表される；および

カプシドのアミノ酸配列は、配列番号31で表される；

(3)

E1のアミノ酸配列は、配列番号32で表される；

該PD-L1抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のアミノ酸配列は、配列番号48で表される；および

カプシドのアミノ酸配列は、配列番号31で表される；または

(4)

E1のアミノ酸配列は、配列番号32で表される；

該CTLA-4抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のアミノ酸配列は、配列番号49で表される；および

カプシドのアミノ酸配列は、配列番号31で表される。

【 0 0 8 7 】

ベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質および熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質由来の抗原、PD-1由来の抗原、PD-L1由来の抗原、CTLA-4由来の抗原、IL-2由来の抗原、DISC1由来の抗原、HER2由来の抗原、BTLA由来の抗原、HVEM由来の抗原、PCS K9由来の抗原またはDPP-4由来の抗原を含むウイルス様粒子の例としては、少なくとも1つの抗原が挿入されているE2およびE3の複合体、カプシドおよびE1からなるベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子であって、該カプシド、E1、少なくとも1つの抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のそれぞれのアミノ酸配列が以下に記載されているチクングニアウイルス様粒子が挙げられるが、これらに限定するものではない：

(1)

E1のアミノ酸配列は、配列番号36で表される；

該マラリア抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のアミノ酸配列は、配列番号50で表される；および

カプシドのアミノ酸配列は、配列番号35で表される；

(2)

E1のアミノ酸配列は、配列番号36で表される；

該PD-1抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のアミノ酸配列は、配列番号51で表される；および

カプシドのアミノ酸配列は、配列番号35で表される；

(3)

E1のアミノ酸配列は、配列番号36で表される；

該PD-L1抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のアミノ酸配列は、配列番号52で表される；および

カプシドのアミノ酸配列は、配列番号35で表される；または

10

20

30

40

50

(4)

E1のアミノ酸配列は、配列番号36で表される；

該CTLA-4抗原が挿入されているE2およびE3の複合体のアミノ酸配列は、配列番号53で表される；および

カプシドのアミノ酸配列は、配列番号35で表される。

【0088】

さらに、これらの態様に関しては、チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の修飾カプシド、チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の修飾E1、ならびに／またはチクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)のE2およびE3の修飾複合体を、該ウイルス様粒子に用いてもよい。例えば、チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の該修飾カプシドは、配列番号31(または配列番号75)または配列番号35で表されるアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%のアミノ酸配列同一性を有してよく；チクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)の修飾E1は、配列番号32(または配列番号76)または配列番号36で表されるアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%のアミノ酸配列同一性を有してよく；および／またはチクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)のE2およびE3の修飾複合体は、配列番号33(または配列番号77)または配列番号37で表されるアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%のアミノ酸配列同一性を有してよい。また、該修飾カプシド、E1ならびに／またはE2およびE3の複合体は、配列番号31(または配列番号75)または配列番号35で表されるアミノ酸配列からなるカプシド；配列番号32(または配列番号76)または配列番号36で表されるアミノ酸配列からなるE1；および／または配列番号33(または配列番号77)または配列番号37で表されるアミノ酸配列からなるE2およびE3の複合体に基づいて、アミノ酸の最大10%が欠損、置換および／または付加されている変異体であってもよい。

【0089】

ウイルス様粒子は、該ウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列を有するDNA分子を含む発現ベクターを細胞（例えば293細胞）に導入し、超遠心分離法を用いて馴化培地から該ウイルス様粒子を回収することにより、作製してよい。

【0090】

## (2)ヌクレオチド、ベクター

第二の局面において、本願は、修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列を含むか、または、それからなる核酸分子を提供する。

【0091】

上述の核酸分子を修飾することにより作製し得る、上述の核酸分子の誘導体もまた、本願により提供される。該誘導体は、上述の核酸分子のヌクレオチド配列と70%、80%、90%、95%または98%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなっておりよい。

【0092】

本願の提供する核酸分子は、修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス構造タンパク質を含むウイルス様粒子（例えばチクングニアウイルス様粒子、ベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子）をコードする単離された核酸分子であってよい。態様の一において、該ウイルス様粒子は、ウイルス構造タンパク質と、該ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されている少なくとも1つの抗原とを含む。

【0093】

当業者は、配列番号54 - 55で表されるカプシドおよび／またはエンベロープをコードするチクングニアウイルス構造タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質の例示的なヌクレオチド配列に基づいて、上述の本願の提供する核酸分子を作製し得る。

【0094】

態様の一において、抗原をコードするヌクレオチド配列は、チクングニアウイルス構造

10

20

30

40

50

タンパク質またはベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質のE3をコードするヌクレオチド配列に挿入され得る。例えば、抗原をコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1つの抗原を含むように修飾されているエンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列からなる核酸分子を作製するために、(CHIKVでは)配列番号54の963と969の残基の間に、または(VEEVでは)配列番号55の990と1006の残基の間に挿入される。本願の提供する核酸分子の例としては、配列番号38 - 45のいずれかにより表されるヌクレオチド配列からなる核酸分子が挙げられるが、これらに限定するものではない。配列番号38 - 45のいずれかにより表されるヌクレオチド配列と70%、80%、90%、95%、または98%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる核酸分子もまた、提供される。

10

**【0095】**

態様のーにおいて、本願は、上述の核酸分子を含むベクターを提供し、ここで、該ベクターは、該核酸分子に操作可能に結合している発現制御配列を含んでいてよい。本明細書で用いられるベクターは、エンハンサー配列、ポリアデニル化シグナル、および抗生物質耐性遺伝子を含むプロモーターを改変してよい。例えば、配列番号54または配列番号55で表されるヌクレオチド配列からなる核酸分子であって、少なくとも1つの抗原をコードするヌクレオチド配列が、(CHIKV VLPでは)配列番号54の963と969の残基の間に、または、(VEEV-VLPでは)配列番号55の990と1006の残基の間に挿入される核酸分子；および該核酸分子に操作可能に結合している発現制御配列を含むベクターが提供される。

20

**【0096】**

発現制御配列の例としては、プロモーター、例えばCMVプロモーター、ファージラムダPLプロモーター、大腸菌のlac、phoAおよびtacプロモーター、SV40初期および後期プロモーターおよびレトロウイルスのLTRのプロモーターが挙げられるが、これらに限定するものではない。

**【0097】**

この態様において、上述の核酸分子に操作可能に結合している発現制御配列を含むベクターは、本願の提供する粒子を作製するための発現ベクターとして使用し得る。

**【0098】**

該発現ベクターは、国際公開第2012/006180号に基づいて当業者が作製してよく、該文献の内容はその全体が参照により本明細書に包含される。

30

**【0099】**

チクングニアウイルス(CHIKV)由来のタンパク質と抗原の融合タンパク質を含むウイルス様粒子を発現させるのに使用し得るベクターの例としては、VLP\_CHI 0.56ベクター(配列番号30)に示すベクターが挙げられる。

**【0100】**

VLP\_CHI 0.56ベクター(配列番号30)に基づき、当業者は、チクングニアウイルス(CHIKV)由来のタンパク質と所望の抗原の融合タンパク質を含むウイルス様粒子を発現させるのに使用し得るベクターを作製し得る。例えば、当業者が、マラリア抗原(Sggnpnanpnanpnannpnannpnaggs(配列番号56))挿入E3を含むCHIKV VLPを、VLP\_CHI 0.56ベクターに基づき作製する場合、当業者は、該抗原をコードするヌクレオチドに下線を引いている以下に記載のベクター(配列番号57)を作製し得る。

40

**【0101】**

caattaccattgcatagttgatcatcatataataatgtacatttatattggctcatgtccaa  
cattaccgccatggttgacattgattattgactagttattaatagtaaatcaattacgggggtcatt  
agttcatagcccatatatggagttccggcttacataacttacggtaaatggcccgccctgggtga  
ccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatggtcccatagtaacgccaatag  
ggactttccattgacgtcaatgggtggagttatttacggtaaaactgccacttggcagttacatca  
agtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgccctggcat  
tatgcccagttacatgaccttatgggaactttctacttggcagttacatctacgtattagtcatcg  
ctattaccatgggtgatggggttttggcagttacatcaatgggcgtggatagcgggttgactcacg  
gggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacg  
gactttccaaaatgtogtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtagggcgtgtacggg  
gggaggtctatataagcagagctcggtttagtgaaccgctcagatcgccctggagacgccaatccacg  
ctggtttgacctccatagaagacacccgggaccgatccagccctccgttaacgggtggagggcagtg  
tagtctgagcagttactcggtgctgcgcgcgcgcgcaccagacataatagctgacagactaacag  
actgttcccttccatgggtcttttctgcagtcaccgctcgctgcacagctgtgatcagatatcgcg  
gcgcgccaccatggaggttcaccccgacgcaaaactttctataacagaagggtaccaacccccgacct  
gggccccacgcccatacaattcaagtaattagacctagaccacgtccacagaggcagggtgggca  
actcgcccagctgatctccgcagttcaacaaattgaccatgcgcgcgggtacctcaacagaagcct  
cgcagaaatcggaaaaacaagaagcaaaaggcagaagaagcaggcgccgcgcaaaacgacccaaagc  
aaaagaagcaaccaccacaaaagaagccgggtcaaaagaagaagaacccaggccgtagggagag  
aatgtgcatgaaaattgaaaatgattgcatcttcgaagtcaagcatgaaggcaaaagtgatgggc  
tacgcatgocctgggtgggggataaaagtaatgaaaccagcacatgtgaagggaactatcgacaatg  
ccgatctggctaaaactggcctttaagcggctcgtctaaatacgatcttgaaatgtgcacagatacc  
gggtgcacatgaagtctgatgcctcgaagtttaccacagagaaacccgaggggtactataactgg  
catcacgggagcagtgacgtattcaggagggccgggttcaactatcccgacgggtgcaggcaagccgg  
gagacagcggcgagaccgatcttcgacaacaaaaggacgggtgggtggccatcgctcctaggaggggc  
caacgaagggtgcccgcacggccctctccgtggtgacgtggaacaaaagacatcgctcacaaaaatt  
acccctgaggggagccgaagagtgaggccctcgccctccgggtcttggtgctggttggtggcaaaccta  
cattccctgctctcagccgccttgccacacccctgctgctacgaaaaggaaacgggaaagcacctt  
ggcctgcttgaggacaacgtgatgagaccgggatactaccagctactaaaagcatcgctgact  
tgctctcccccactccgggaggaaacccgaatgccaatcccaacgcgaaccccaatgctaacccaa  
atgccaaacccaaacgccaaaccccaacgctgggtgggtacagttactaaggacaatttttaattgtcta  
taaaggccacaagaccatatctagctcattgtcctgactgoggagaaagggcatttcgtgccacagc  
cctatcgcatgtggagcgcacagaaatgaagcaacgggacgggaacgctgaaaatccagggtctctt  
tgcagatcgggataaaagacagatgacagccacgattgggaccaagctgcgcctatatgggatagcca  
tacgcccgcggacgcgggagcgcgcgggattgcttgtaagggaacttcagcacccgtgcacgatcac  
gggacccatgggacactttattctcgcccgatgcccgaaggagagacgctgacagttgggattta  
cggacagcagaaaagatcagccacacatgcacacacccgttccatcatgaaccacctgtgtatagg  
taggggagaggttccactctcgaccacaacatggtaaaagagttacottgcagcacgtaacgtgcag  
agcacccgtgcccactgctgaggagatagaggtgcataatgccccagataactcctgacccgcacgc  
tgatgacgcagcagctctggcaacgtgaagatcacagttaatgggcagacgggtgcgggtacaagtg  
caactgcgggtggctcaaacgaggggactgacaaccaagacaaagtgatcaataactgcaaaatt  
gatcagtgccatgctgcagttcaatacacagaattggcaatacaactcccccttagtccgcg  
gtcaacagctgaactcggggacogtaaaagggaagataccacatcccatccattggcacaacgtgac  
ttgcagagtgccaaaagcaagaacccctacagtaacttacggaaaaaaccaagtcacactgctg  
ctgtatcctgaccatccgacactcttgcttaccgtaacatgggacaggaaccaaattaccacg  
aggagtggggtgacacacaagaaggaggttaccttgacccgtgcctactgaggggtctggaggtcac  
ttgggggcaacaacgaaccatacaagtaactggccgcagatgtctacgaacgggtactgctcatgggt  
caccacatgagataatcttgtaactattatgagctgtacccactatgactgttagtcattgtgt  
cggtggcctcgttcgtgcttctgtcgatgggtgggcacagcagtggggaatgtgtgtgtgcgcacg  
gcgcagatgcattacaccatataaattaacaccaggagccactgttcccttccctgctcagccgt  
ctatgctgcctcagaacgaccaaggcgccacatattacagggctgcggccatatactatggaac

40



## 【化 5】

aacagcagccccctgttctgtgtgcaggtctttatcccgctggcgccttgatcgtcctgtgcaa  
 ctgtctgaaactcttgccatgctgctgtaagacccctggcttttttagccgtaatgagcatcggg  
 gccacactgtgagcgcgtacgaacacgtaacagtgatccgaacacgggtgggagtagcgtata  
 agactcttgtaacagaccgggttacagccccatgggtgttgagatggagctacaatcagtcac  
 cttggaaccaacactgtcacttgactacatcacgtgcgagtacaaaactgtcatccccctccccg  
 taagtgaagtgtgtgtgtacagcagagtgcaggacaagagcctaccagactacagctgcaagg  
 tctttactggagtctacccatttatgtggggcgggcgcctactgcttttgcgacgcgaaaatac  
 gcaattgagcagggcacatgtagagaaatctgaatcttgcaaacagagtttgcatcggcctac  
 agagcccacacccgcatcggcgtcggcgaagctccgcgtcctttaccaaggaaacaacattacog  
 tagctgcctacgctaaccggtgacctgcccgtcacagtaaaaggacgccaagtttgctgtgggccc  
 aatgtcctccgctggacaccttttgacaacaaaatcgtgggtgtacaaaggcgacgtctacaac  
 atggactaccacaccttttggcgcaggaagaccaggacaatttggtgacattcaaagtctgacac  
 cggaaagttaaagacgttttatgccaacactcagttggtactacagaggccagcagcaggcacggg  
 acatgtaccatactctcaggcaccatctggcttcaagtattggctgaaggaaacgaggagcatcg  
 ctacagcacacggpacctgtcgggtgcccagattgcgacaaaaccggtaagagctgtaaattgog  
 ctgtgggggaacataccaatttccatcgacataccggatgcggcctttactagggttgctgatgc  
 accctctgtaacggacatgtcatgcgaagtaccagcctgcactcactcctccgactttgggggc  
 gtcccatcatcaaatcacagctagcaagaaaggtaaatgtgcagtagcattcgatgaccaacg  
 ccgttaccattcgagaagccgacgtagaagttagaggggaactcccagctgcaaatatccttctc  
 aacagccctggcaagcgcgagtttcgcgtgcaagtgtgctccacacaagtacactgcgcagcc  
 gcatgccaccctccaaaaggaccacatagtcaattaccagcatcacacaccacccttgggggtcc  
 aggatatatccacaacggcaatgtcttgggtgcagaagattacgggaggagtaggattaattgt  
 tgctgttgctgccttaatttttaattgtgggtgctatgcgtgtcgttttagcaggcactaaggatct  
 agatctgctgtgccttctagtgtccagccatctgttgtttgccccctcccccgctgccttccctga  
 ccttggaaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcacgcattgtct  
 gagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaa  
 gacaatagcaggcatgctggggatgcgggtgggctctatgggtaccaggtgctgaagaattgac  
 ccggttccctcctggggccagaaagaagcaggcacatccccttctctgtgacacaccctgtccacg  
 cccctggttcttagttccagccccactcataggacactcatagctcaggagggctccgccttca  
 atcccacccgctaaagtacttggagcgggtctctccctccctcatcagccccacaaaacccaaact  
 agcctccaagagtgggaagaaattaaagcaagataggctattaagtgcagagggagagaaaaatg  
 cctccaacatgtgaggaagtaattgagagaaatcatagaattttaaggccatgatttaaggccat  
 catggcctaagcttgaaaggagataggatcaaagcttggcgtaatcatggctcatagctgtttcc  
 tgtgtgaaattgttatccgctcacaaattccacacacatacagagccgggaagcataaaagtgtaaa  
 gcctgggggtgcctaattgagtgtgactaacatttaattgcgttgcgctcactgcccgtttcc  
 agtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaaacgcgcgggggagaggcggttt  
 gcgtattgggcgtcttccgcttccctcgtcactgactcgtgcgtcggctcgttccgctgcgg  
 cgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcag  
 gaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgcgtggc  
 gtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtgcagggtgg  
 cgaaaccgcagaggactataaaagataaccaggcggtttcccttggaagctccctcgtgcgtctc  
 ctgttccgaccctgcgcttaccggataacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgct  
 ttctcatagctcacgctgtaggatctcagttcgggtgtaggctcgttcgctccaagctgggctgt  
 gtgcagaaacccccggttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtcca  
 acccggtaaagacagacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggatttagcagagcgag  
 gtatgtaggcgggtgtacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaaca  
 gtatttggtatctgcgtctgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgat  
 ccggcaaaacaaaccacgctggtagcgggtggttttttggtttgcagcagcagattacgcgcag  
 aaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacgggggtctgacgctcagtggaacgaa  
 aactcacggttaagggtattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaa  
 attaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggctctgacagttacca

10

20

30

40

## 【化 6】

atgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatcttcggttcacatagttgcctga  
 ctccccgtcgtgtagataaactacgatacgggagggccttaccatctggccccagtgctgcaatga  
 tacccgcgagaaccacgctcaccgggtccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggc  
 cgagcgcgagaagtggctcctgcaactttatccgcctccatccagttctattaattgttgccgggaa  
 gctagagtaagtagttcggcagtttaatagtttgccgaacgttggtgccattgctacagggcatcg  
 tgggtgtcacgctcgtcgttttggtatggcttcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagt  
 tacatgatcccccatgttggtgcaaaaaagcgggttagctccttcgggtcctccgatcgttgctcaga  
 agtaagttggccgcagtggttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtca  
 tgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtg  
 tatggcgcgacccagagttgctcttgcccggtcgaatacgggataataccgcgcacatagcaga  
 acttttaaagtgtcatcatttgaaaaagcttcttcggggcgaaaaactctcaaggatcttacgcg  
 tggtgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttacttt  
 caccagcgtttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatgcccgaaaaaagggaataaggggcg  
 acacggaaatgttgaaactcatactcttctttttcaatattattgaagcatttatcaggggtt  
 attgtctcatgagcggatacatatttgaaatgtatttagaaaaataaacaatagggggttcgcgcg  
 cacatttccccgaaaagtgcacactgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctat  
 aaaaataggcggtatcacgaggccctttcgggtcgcgcgtttcgggtgatgacgggtgaaaacctct  
 gacacatgcagctcccggtgacgggtcacagcttgctctgtaagcggatgcggggagcagacaagc  
 ccgtcagggcgcgctcagcgggtgttgccgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagag  
 cagattgtactgagagtgaccataaaaattgtaaacgttaatatctttgttaaaattcgcgttaa  
 atttttgttaaatcagctcatttttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatc  
 aaaagaatagcccgagatagggttgagtgttggtccagtttggaacaagagtcactattaaag  
 aacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaacgctctatcagggcgatggcccactacgtgaac  
 catcaccacaaatcaagttttttgggggtcgaggtgcgcgttaaagcactaaatcggaaacctaaagg  
 gagcccccgatttagagcttgacgggggaaagcggcggaacgtggcgagaaagggaagggaagaaa  
 gcgaaaggagcgggcgttagggcgctggcaagtgtagcgggtcacgctgcgcgttaaccaccacac  
 ccgcgcgcgttaatgcgcgcgtacagggcgcgctactatgggtgctttgacgtatgcggtgtgaa  
 ataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcacatcaggcgccattcgcattcaggctgcgcga  
 actgttggaaggcgatcgggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatg  
 tgctgcaaggcgattaagtgggtaacgccagggttttccagtcacgacgttgtaaaacgcagc  
 gccagtgaattccatggtctcaactttc

10

20

## 【0102】

ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)に由来するタンパク質と抗原の融合タンパク質を含むウイルス様粒子を発現させるのに使用し得るベクターの例としては、VLP\_VEEV 0.66ベクター(配列番号34)に示すベクターが挙げられる。

30

## 【0103】

VLP\_VEEV 0.66ベクター(配列番号34)に基づき、当業者は、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)由来のタンパク質と所望の抗原の融合タンパク質を含むウイルス様粒子を発現させるのに使用し得るベクターを、作製し得る。例えば、当業者が、マラリア抗原(SGG-qpggapqpggapqpggapqpggap-GGS(配列番号58))挿入E3を含むVEEV VLPを、VLP\_VEEV 0.66ベクターに基づき作製する場合、当業者は、該抗原をコードするヌクレオチドに下線を引いている(化7-8)以下に記載のベクター(配列番号59)を作製し得る。

## 【0104】

40

## 【化 7】

gaattccattgcatacgttgatccatatcataatatgtacatttatattggctcatgtccaacattacog  
ccatgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacgggggcattagttcatagcccatat  
atggagttccgcgttacataaactacggtaaatggcccgccctggctgacccgccaacgacccccgcccattg  
acgtcaaatgaagttatgttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgaagtcattgggtggagttat  
ttacggtaaaactggccactggcagtaacaaagtgtatcatatgccaagtaacgccccctattgaagtcatt  
gacggtaaatggcccgccctggcattatgcccagtaacatgacettatgggaactttccattggcagtaacac  
taogtattagtcacgtcattaccatgggtgatgggttttggcagtaacatcaatggggcgtggatagcgggtt  
gactcaacggggattttccaaagtctccaccccattgaagtcattgggaactttgttttggcaccacaaatcaacgg  
gaactttccaaaatgtcgttaacaaactccgccccattgaacgcaaatggggcgttagggcgtgtacgggtggaggtc  
tatataagcagagctcgttttagtgaaacgtcagatcgccctggagacgccatccacgctgttttgacctccat  
agaagacacccgggacagatccagcctccgttaacgggtggagggcagtgtagtctgagcagtaactcgttggctg  
ccgcgcgcgcgccaccagacataatagctgacagactaacagactgttccctttccatgggtcttttctgcagtc  
accgtcgtgcacgtgtgatcagatatcgogggccgaccatgttcccggtccagccaatggatccgatccgat  
agccaatggccatcgccacacccggttcggcccgcccgccaggccctgggtcccccagacccgcccccttctcgg  
cgatgcaggtgcaggaaattaaacccgctcgatggcctaacctgaagttcaagcaacgcccgggacgcgccacctg  
aggggcccattccgctaataaacggaaggaaggccctcgcaaaaacagaaagggggagggccaagggaagaaga  
agaagaaccaagggaagaagaaggctaaagacagggccgcctaatccgaaggcacagaatggaaacaagaaga  
agaccaacaagaacacaggaagacagcgcctatggcctatgaaattgggaattctgacaagacgttcccaatca  
tgtttggaagggaagataaaacggctacgcttgtgtgggtcggaggggaagttattcaggccgatgcagtggaag  
gcaagatcgacaacgagcgttctggccgcgcttaagaacgaagaaagcatccaaatcagatcttgagtatgcag  
atgtgccacagaacatcgogggccgatacattcaaatacacccatgagaaaccccaaggctattacagctggc  
atcatgggacagtcacaaatgaaaaatggggcttccaggtgcggaaggagttggggccaagggaagacagcg  
gacgacccattctggataaacagggaacgggtgggtcgttattgtgtcggaggtgtgaatgaaggatctagga  
cagccctttcagtcgtcatgtggaacgagaaggaggttacogtgaagtatactccagagaactgcagacat  
ggtaactagtgaccacccatgtgtcgtcgtcccaatgtgacgttcccatgtgtcacaacacacatttctcag  
acagaaaaaccagcagagactttggccatgtcagcgttaacgttgacaacccgggctacgatgagctcgtgg  
aagcagctgttaagtgcocccgggtccggagggacagggacctggcgctcctcagggaacccggggcaccacagg  
gcccagggcccccacaggggcccctggggcccctgggggacccctccaccgaggagctgtttaatgagtataagc  
taacgcgcctttacatggccagatgcacagatgtgcagttgggagctgccatagtcacaaatagcaatcgagg  
cagtaaaagagcgaacgggacacagcgttatgttagacttcagacttccctcgcagtatggcctggattccctccg  
gcaacttaaagggcaggacccatgcggtatgacatgcacgggacccattaaagagataccactacatcaagtg  
cactctatacatctcgcgcgtgtcacattgtggatgggacaggttatttccctcgttgcaggtgcocccgacg  
gggactccatccacatgggaatttaagaaagattccgtcagacactcctcgtcgtgcggtatgaagtgaat  
ttaactcgttaggcagagaactctatactcatccccagaaacagggagtagagcaagcgtgccagtcctacg  
cacatgatgcacagaacagaggagcttatgtcagatgcacccctccgggctcagaagtggacagcagtttgg  
ttcccttgagcggcagttcagtcacccctcctgatgggactagcgcctcgtgggaatgcagtggtg  
gcggcacaagatctccagagaccatcaacaagacaaaacagttcagccagtgcaaaaagaaggagcagtgca  
gagcatatcggtgcagaaagataagtggtgtataattctgacaaactgcccaaaagcagcgggagccacct  
taaaaggaaaaactgcagtcacattcttctcgtggcagacggcaaatgcacccgtgcctctagcaccagaacct  
tgataacccctcgggttcagatcagtgtaactgaaactgcacccctaaagaatccacatatcctaactcaccgoc  
aacttgctgatgagcctcactacacgcagagctcatatctgaaccagctgttaggaattttaccgtcacgg  
aaaaagggtgggagtttgtatggggaaaccccccgcgaaaagggttttgggcacagggaacagcaccggga  
atccacatgggctacccgacagaggtgataactcattattaccacagataccctatgtccacacatccctgggt  
tgtcaatttgtgcgcgcatgtgaacccgtttccgttgacagctcactcgtgttttggcagatcaagagttg  
cgtgcctaaactcctacccggttaacacccctaacgctaggataccattttgtctcgtgtgtgtgtgtgtgtg  
gcaactgcocggggcagagacacccctgggagtccttggatccactatggaaacataacacacagatgttctgga  
ttcaattgtgtatccctcgtgcgcgcttgatcgtagtgaactcgcctcgtcaggtgcgtgtgtgtgtgtgtg  
cttttttagtcagtcggc  
gaatctcgtataacactatagtcacacagagcaggtcagcaccactccctatcagcataacacacacacacac  
tcaagctgatacctacagtgaaacttgagtagcgtcacctgccactacaaaacaggaatggattcaccagcca  
tcaaatgctgcggatctcaggaatgcactccaaacttacaggccctgatgaacagtgcaaaagcttccacagggg  
tttaccgcgttcagtggtgggtgcatattgtctttggacactgagaacaccccaagtcagcaaggccctacg  
taatgaaactcagcagctgccttgcgatcatgctgaagcatataaagcgcacacagcctcagtcagggcgt  
tcccaacatccacagtgaggagaacactctattgtgactacogtgtatgtgaatggagaaactcctgtgaatt  
tcaatggggctcaaaaataactgcaggtccgctttccacagcttggacacccctttgatcgcaaatcgtgcag  
atgcgggggagatctataattatgatttccctgagtagtggggcagggaacacccagagcatttggagatatac  
aatccagaacagctcacaagctcgtatctgtatgccaataccaaacctagtgctgcagagaccccaagcaggag  
cgatccacgtgcacatacactcaggaacccctcgggtttttagcaatggaagaaagataaagctccatcattga  
aatttaacggccctttcggatgogaaatatatacaaaacccattcgcgcgcaaaactgtgtgtgtagggtcaa  
ttccattagccctttgacattcccgacgccttgggtccaccaggtgtgcagaaacacccgacactttcagcggcgc  
aatgcactcttaacagagtgctgtattcttccgactttgggtggatcgccacgggtcaagtaactcggccagca  
agtcaggcaagtgccagtcacatgtgcatcagggaactgtacccctaaaagaagcagcagtcagagtcacccg  
agcaagggtcggcagctatccatttctcagccgcaaatatccacccggagttcaggctccaaatagtcacat  
catatgttaogtgcaaaagtgattgtcaccccccgaagacccatattgtgacacacccctcagtatcagccc  
aaacatttacagccgcggtgtcaaaaacccgctggagctggttaacatccctcgtgggaggtacagccgtaa

10

20

30

40

## 【化 8】

ttattataattggcttggtgctggtactattgtggccatgtacgtgctgaccaaccagaaacataat  
 taaggatctagatctgctgtgcttctagttgcccagccatctgttgtttgcccctcccctgctgcttc  
 cttgacctggaaggtgcccactcccactgtcctttcttaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtc  
 tgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagac  
 aatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatgggtaccaggtgctgaagaattgacctgggttc  
 ctctggggccagaaagaagcaggcacatccccctctctgtgacacacctgtccacgccccctggttct  
 tagttccagccccactcataggacactcatagctcaggagggtccgcttcaatcccacccgctaaa  
 gtacttggagcgggtctctccctccctcatcagcccacaaacaaacctagcctccaagagtgggaag  
 aaattaaagcaagatagggtattaaagtgcagagggagagaaaaatgctccaacatgtgaggaaat  
 gagagaaatcatagaattttaaggccatgatttaaggccatcatggcctaagcttgaaaggagatagg  
 atcaaagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttctgtgtgaaattgttatccgctcacaattcca  
 cacaacatacagagccggaagcataaaagtgtaaagcctgggggtgcctaagtagtgagctaaactcacatt  
 aattgogtggcgtcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgcccagctgcattaatgaatcg  
 gccaacgcgcggggagaggcgggtttgctgattgggcgtctctccgcttccctcgtcactgactcgtg  
 cgtcgtggtcgttccgctgcccgcagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggttatccacaga  
 atcaggggtataagcaaacatgtgacaaaagccagcaaaaaggccaggaaggaaggaaggaagga  
 ccgctgtgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagt  
 cagaggtggcgaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcg  
 ctctccgtgtccgacctgcccgttacccgatacctgtccgctttctccctccgggaagcgtggcgc  
 tttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttccggtgtaggtcgttccgctccaagctgggctgtgtg  
 cacgaacccccctgacgcccagcgtgccccttatccggttaactatcgtcttgagtcacacccggt  
 aagacacgacttatccgactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcg  
 gtgctacagagttcttgaaagtgggtggcctaacggtacactagaagaacagttattggtatctgc  
 gctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaaacacccgc  
 tggtagcgggtggttttttggtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatc  
 ctctgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcaggttaagggtatttgggtcatg  
 agattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaag  
 tatatatgagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatct  
 gtctatttctgctcatcatagttgctgactccccctcgtgtgataaactacgatacgggagggtta  
 ccacttggccccagtgctgcaatgataccgcgagaaacacgctcacccgctccagatttatcagcaat  
 aaaccagccagccgggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagctca  
 ttaattgttgccgggaagctagagtaagtagttccgagttaatagtttgccgcaacggtgttgccatt  
 gctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtggttgggtatgggttcattcagctccgggttcccaacgac  
 aagggcagttacatgatcccccatgttggtgcaaaaaagcgggttagctcctccggtcctccgatcgttg  
 tcagaagtaagttggcgcagtggttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtc  
 atgcatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtagtcaaccaagtcattctgagaatagtgat  
 gggcgacagagttgctcttgcgcgctcaatacgggataataccggcgccacatagcaactttaa  
 aagtgctcatcattggaacggttcttccggggcgaacactctcaaggatcttaccgctgttgagatcc  
 agttcgatgtaacccactcgtgcacccaaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgg  
 gtgagcaaaaacaggaagggcaaatgcgcgaacaaagggaataaaggggcagacaggaatgttgaaac  
 tcatactcttcccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatcata  
 tttgaatgtatttagaaaaataaaacaaataggggttccggcgcacatttccccgaaaagtgcacccga  
 cgtctaagaaaccattattatcatgacattaaacctataaaaaataggcgtatcacgagggcctttcggg  
 tccgctgctttcgtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggttgacggtcacagcttgt  
 ctgtaagcgggtgcccggagcagacaagcccgctcaggggcgcgtcagcgggtgttgccgggtgtcgggg  
 ctggcttaactatgcccgcacagagcagattgtactgagagtgaccataaaattgtaaacgttaata  
 ttttggttaaaattccgcttaaaattttgttaaatcagctcattttttaaccaataggccgaaaatcggc  
 aaaaatcccttataaatcaaaagaatagcccgagataggggttgagtggtgttccagtttggaacaagag  
 tccactattaaagaacgtggactccaaagtcgaaggggcgaacacccgtctatcagggcgatggcccac  
 taogtgaacctcaccataatcaagtttttgggggtcgaggtgcggtaaagcactaaatcggaaccc  
 aaagggaaccccgatttagagcttgacgggggaagccggcgaacgtggcgagaaaggaaggaa  
 agcgaaggaagcggcgctaggcgctggcaagtgtagcgtcacgctgcgcgttaaccacacccg  
 ccgctttaatgcgcgctacagggcgctactatggttgctttgacgtatgcggtgtgaaatccgc  
 acagatgcgttaaggagaaataccgcacagggcgcattccgcatcaggtgcgcgaactgttgggaa  
 gggcgatcgtgcgggcctcttgcctattacgcagctggcgaaagggggtgtgctgcaaggcgatt  
 aagttgggttaacgcagggttttccagtcacgagcttgtaaaacgacggccagtgaaattccatggtc  
 tcaactttc

## 【0105】

少なくとも1つの抗原をコードするヌクレオチド配列がE2およびE3領域に挿入されてい  
 るウイルス構造タンパク質を発現するために用いるプラスミドベクターの代表的な構造を  
 図2に示す。

## 【0106】

配列番号57および59のいずれかで表されるヌクレオチド配列を有する核酸分子と少な  
 くとも70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%のヌクレオチド配列同一性を有する核酸分  
 子、および、配列番号57および59のいずれかで表されるヌクレオチド配列を有する核酸分

10

20

30

40

50

子に基づき、アミノ酸の最大10%が欠損、置換および/または付加されている変異体であり得る核酸分子もまた、本願により提供される。

#### 【0107】

上述のVLPは、安定な細胞株により作製されてよい。該安定な細胞株は、上述のベクターを用いて、慣用される手順に従い作製され得る。例えば、安定な細胞株を作成するために次の手順を用いてよい：

1. 293F細胞などの遺伝子導入細胞を、ハイグロマイシンBなどの選択マーカーを含有するVLP発現プラスミドで遺伝子導入する。

2. 遺伝子導入された細胞を1日間インキュベートする。

3. 遺伝子導入された細胞を、例えばハイグロマイシンを150-200ug/mlで含有する選択培地中で、1-2週間培養する。

4. 選択培地中で成長し、少なくとも1回分裂できる細胞を選択する。

5. 単一細胞を単離し、ウェスタンブロッティングにより上清中のVLPの発現を確認する。

#### 【0108】

### (3) 医薬組成物、キット

第三の局面において、本願は、医薬組成物および医薬組成物を含むキットを提供し、ここで、該医薬組成物は、(i) 修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子および/または(ii) 修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列からなるウイルス様粒子を含む。

#### 【0109】

態様の一において、本願は、医薬組成物または医薬組成物を含むキットを提供し、ここで、該医薬組成物は、上述のアルファウイルスまたはフラビウイルスのウイルス様粒子（例えばチクングニアウイルス様粒子またはベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子）または上述の核酸分子；および薬学的に許容される担体を含む。該組成物中の、該アルファウイルスまたはフラビウイルスのウイルス様粒子の含有量および核酸分子の含有量は、医薬組成物の0.00001 - 1w/w%であってよい。

#### 【0110】

本願の提供する粒子（例えばCHIKV VLPまたはVEEV VLP）の用量は、1 - 500 μg / 日であってよい。

#### 【0111】

上述のように、態様の一において、本願の提供する医薬組成物に用いられるウイルス様粒子に含有される抗原は、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質、PD-1、PD-L1、CTLA-4、IL-2、DISC1、HER2、BTLA、HVEM、PCSK9またはDPP-4に由来してよい。

#### 【0112】

該医薬組成物は、さらにアジュバントを含んでいてもよい。アジュバントの例としては、Ribi solution(Sigma Adjuvant system、Sigma-Aldrich)が挙げられるが、これに限定するものではない。本発明の提供する医薬組成物は、緩衝剤、例えばリン酸水素ナトリウム水和物、リン酸二水素ナトリウムおよび塩化ナトリウム；および保存剤、例えばチメロサルを含んでいてよい。態様の一において、該医薬組成物は、0.001 - 1w/w%の、ウイルス構造タンパク質および抗原（例えば熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質、PD-1またはPD-L1由来の抗原）を含む粒子（例えばCHIKV VLPまたはVEEV VLP）、1 - 10w/w%の緩衝剤、0.01 - 1w/w%のアジュバントおよび0.00001 - 0.001w/w%の保存剤を含む水溶液である。

#### 【0113】

当業者は、慣用される技術を用いて、本医薬組成物を作製し得る。例えば、ウイルス構造タンパク質および抗原（例えば熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質、PD-1、PD-L1、CTLA-4、IL-2、DISC1、HER2、BTLA、HVEM、PCSK9またはDPP-4由来の抗原）を含む粒子（例えばCHIKV VLPまたはVEEV VLP）を、生理学的なpH（例えばpH5 - 9、pH7）を有する緩衝溶液と混合して、該医薬組成物を作製する。



## 【 0 1 1 4 】

態様の一において、該医薬組成物は、修飾エンベロープタンパク質E3を有するウイルス構造タンパク質を含む粒子を含む、ワクチンまたは免疫刺激薬である。態様の一において、該ウイルス粒子は、ウイルス構造タンパク質および抗原（例えば熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質、PD-1、PD-L1、CTLA-4、IL-2、DISC1、HER2、BTLA、HVEM、PCSK9またはDPP-4由来の抗原）を含む。例えば、本願の提供ワクチン組成物を、免疫療法；癌の処置もしくは予防；感染性疾患の処置もしくは予防；またはマラリアの処置もしくは予防に用いてよい。

## 【 0 1 1 5 】

態様の一において、該医薬組成物は、修飾エンベロープタンパク質E3を有するウイルス構造タンパク質を含む粒子を発現させるためのヌクレオチド配列を含む核酸分子を含むDNAワクチンである。態様の一において、該ウイルス様粒子は、ウイルス構造タンパク質および外来性の抗原（例えば熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質、PD-1、PD-L1、CTLA-4、IL-2、DISC1、HER2、BTLA、HVEM、PCSK9またはDPP-4由来の抗原）を含む。態様の一において、本願の提供する該DNAワクチンは、CpGオリゴヌクレオチドを含む。

## 【 0 1 1 6 】

本願の第三の局面で提供する医薬組成物は、1回以上投与してもよい。本願の第三の局面で提供する医薬組成物を2回以上投与する場合、各投与に、本願の第一の局面で提供する異なる粒子（例えばCHIKV VLPまたはVEEV VLP）を用いてよい。態様の一において、本願の第一の局面で提供するCHIKV VLPを用いた免疫化および本願の第一の局面で提供するVEEV VLPを用いた免疫化の組み合わせを用いる。例えば、本願の第一の局面で提供するCHIKV VLPを1回目の免疫化に用い、本願の第一の局面で提供するVEEV VLPを2回目の免疫化に用いても、または、本願の第一の局面で提供するVEEV VLPを1回目の免疫化に用い、本願の第一の局面で提供するCHIKV VLPを2回目の免疫化に用いてもよい。

## 【 0 1 1 7 】

当業者は、本願の提供する組成物またはワクチンを用いた免疫化のタイミングを決定し得る。例えば、2回目の免疫化は、1回目の免疫化の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10週後に行われる。

態様の一において、本願は、

(a)本願の第一の局面で提供する粒子を含む医薬組成物；および

(b)本願の第一の局面で提供する粒子を含む他の医薬組成物

を含むキットを提供し、ここで、(a)に含まれる粒子は、(b)に含まれる粒子とは異なるウイルス様粒子である。この態様において、(a)に含まれる粒子は、チクングニアウイルス様粒子であってよく、(b)に含まれる粒子は、ベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子であってよい。

## 【 0 1 1 8 】

態様の一において、本願は、

(a)本願の第一の局面で提供する粒子を含む医薬組成物；および

(b)本願の第一の局面で提供する粒子を含む他の医薬組成物、

(c)本願の第一の局面で提供する粒子をそれぞれが含む、1つ以上の医薬組成物

を含むキットを提供し、ここで、(a)は免疫化を刺激するのに用いられ、(b)および(c)は免疫化の追加に使用され；(a)に含まれる粒子は、(b)に含まれる粒子とは異なるウイルス様粒子であり；(c)に含まれる粒子は、(a)および(b)に含まれる粒子とは異なるか、または(a)または(b)に含まれる粒子と同じである。

## 【 0 1 1 9 】

上述のキットに含まれるそれぞれの医薬組成物は、同時、別または連続的に投与してよい。

## 【 0 1 2 0 】

本願の第一の局面で提供するアルファウイルスまたはフラビウイルスウイルス様粒子（例えばチクングニアウイルスまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス）または本願の第二の局面

10

20

30

40

50

で提供する核酸分子は、本願の第三の局面で提供する医薬組成物に使用し得る。

【0121】

例えば、

1つ以上（例えば240）のチクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)のカプシド；

1つ以上（例えば240）のチクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)のE1；

1つ以上（例えば240）のチクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)のE2；および

1つ以上（例えば240）のチクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)のE3

を含むか、またはこれらからなるチクングニアまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子であって、ここで、各E2は各E3に結合し、抗原はチクングニアウイルス(CHIKV)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)のE3に挿入されているチクングニアまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス様粒子を、本願の第三の局面で提供される組成物またはワクチンの作成に用いてよい。該抗原が挿入されているE2およびE3の複合体は、配列番号:46-49のいずれかで表されるアミノ酸配列からなってよく；該E1は配列番号32(または配列番号76)で表されるアミノ酸配列からなってよく；および該カプシドは配列番号31(または配列番号75)で表されるアミノ酸配列からなってよく；あるいは、

該抗原が挿入されているE2およびE3の複合体は、配列番号:50 - 53のいずれかで表されるアミノ酸配列からなってよく；該E1は配列番号35で表されるアミノ酸配列からなってよく；および該カプシドは配列番号36で表されるアミノ酸配列からなってよい。

【0122】

#### (4)ウイルス様粒子の作製方法

第四の局面において、本願は修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子の作製方法であって：

該ウイルス様粒子を発現するようにベクターを用いて遺伝子導入した細胞を培養すること；および該粒子を精製すること

を含む方法を提供する。

【0123】

本願の第一の局面が提供するウイルス様粒子は、本願の第四の局面が提供する方法により作製され得る。

【0124】

態様の一において、抗原は、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質由来の抗原、PD-1由来の抗原、PD-L1由来の抗原またはCTLA-4由来の抗原、IL-2由来の抗原、DISC1由来の抗原、HER2由来の抗原、BTLA由来の抗原、HVEM由来の抗原、PCSK9由来の抗原またはDPP-4由来の抗原であってよい。

【0125】

様々な宿主 - ベクター系が、該ウイルス様粒子の発現に用いられ得る。真核細胞は、本願の第四の局面が提供する方法に用いられ得る。真核細胞の例としては、昆虫細胞(例えばsf9細胞、H5細胞)、酵母細胞(例えば出芽酵母(*S. cerevisiae*))および哺乳動物細胞(例えばCHO細胞、ヒト胎児由来腎臓(HEK)293F細胞)が挙げられるが、これらに限定するものではない。本願の第四の局面が提供する方法に用いられるベクターには、発現させるウイルス様粒子をコードする核酸分子が含まれる。細胞は、慣用される方法(例えば、リポフェクション、エレクトロポレーション)を用いて、該ベクターにより遺伝子導入されてよい。当業者は、本願の第四の局面が提供する方法に用いる細胞に応じて、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害薬および酪酸ナトリウムなどのヒストン脱アセチル化酵素阻害薬を含む培地を選択し得る。遺伝子導入後、ウイルス様粒子が、細胞中および/または培養上清中に産生され得る。ウイルス様粒子は、培養上清から回収され、超遠心分離法を用いて精製されてよい。

## 【 0 1 2 6 】

例えば、細胞は、CHIKV 構造タンパク質のカプシド、6K、E1、E2およびE3をコードする遺伝子を含むベクターで遺伝子導入され、ここで、E3は所望の抗原を含むように修飾されている。該発現ベクターで遺伝子導入された細胞は、該タンパク質を産生し、該タンパク質は自発的に集合して、培地から回収され得るVLPを形成する。6Kタンパク質は、E1タンパク質を小胞体に輸送するためのシグナル配列として働き、ここで、6Kタンパク質は宿主のシグナルペプチダーゼによりプロセッシングされ、ウイルス粒子には集合しない。

## 【 0 1 2 7 】

(5) ウイルス様粒子の作製を増強する方法

10

第五の局面において、本願は、修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子の産生の増強方法を提供する。本局面の一態様において、該ウイルス様粒子は、ウイルス構造タンパク質および少なくとも1つの抗原を含み、該方法は：

(1) 少なくとも1つの抗原を、ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入すること、および

(2) 少なくとも1つの抗原がウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されている、ウイルス様粒子を単離すること、を含む。

## 【 0 1 2 8 】

少なくとも1つの抗原を、E3の好適な位置に挿入し得る。好ましい態様の一において、抗原挿入E3を含むウイルス様粒子が、少なくとも1つの抗原が挿入されたE2を含むウイルス様粒子の発現と比較してより効率的に発現され得るように、少なくとも1つの抗原が、ウイルス構造タンパク質(例えばCHIKV構造タンパク質、VEEV構造タンパク質)のE3に存在するフーリン切断部位に挿入される。

20

## 【 0 1 2 9 】

例えば、チクングニアウイルス構造タンパク質については、少なくとも1つの抗原が、配列番号1または2の第321番のHと第326番のSの残基の間；配列番号1または2の第320番のPと第326番のSの間；または配列番号1または2の第319番のSと第326番のSの間に挿入される。

## 【 0 1 3 0 】

例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質については、少なくとも1つの抗原が、配列番号3の第330番のGと第335番のSとの間；配列番号3の第329番のPと第335番のSの間；または配列番号3の第328番のCと第335番のSの間に挿入される。

30

## 【 0 1 3 1 】

少なくとも1つの抗原を、ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入する工程は、少なくとも1つの抗原がウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を作製することにより達成され得；そして、該核酸分子を、昆虫細胞(例えばsf9細胞、H5細胞)、酵母細胞(例えば出芽酵母)および哺乳動物細胞(例えばCHO細胞、293F細胞)などの細胞に発現させる。

## 【 0 1 3 2 】

少なくとも1つの抗原がウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されているウイルス様粒子を単離する工程は、超遠心分離法を用いて該ウイルス様粒子を精製することにより達成され得る。

40

## 【 0 1 3 3 】

(6) 本発明に記載するウイルス様粒子の使用

第六の局面において、本願は、がん、神経疾患、感染性疾患、マラリアもしくは慢性の生活習慣病(lifestyle chronic disease)の治療；哺乳動物における少なくとも1つの抗原に対する抗体の産生；免疫応答の調節；免疫刺激；少なくとも1つの抗原の機能の阻害；または抗原のマクロファージ上の提示のための、医薬組成物またはキットの製造のための、i) 修飾エンベロープタンパク質E3を含むウイルス様粒子および/または(ii) 修飾エンベロ

50



ーブタンパク質E3を含むウイルス様粒子をコードするヌクレオチド配列からなる核酸分子の使用を提供する。

【0134】

該医薬組成物は哺乳動物（例えばヒト）に、筋肉内（i.m.）、皮内（i.c.）、皮下（s.c.）、真皮内（i.d.）または腹腔内（i.p.）に投与し得る。

態様の一において、該医薬組成物は、ワクチンであり、免疫療法に適用し得る。態様の一において、PD-1、PD-L1、CTLA-4、HER2、BTLAまたはHVEM由来の抗原がウイルス様粒子の製造に使用される場合、該ウイルス様粒子は癌または自己免疫疾患の治療に用いられてよい。態様の一において、PD-1またはPD-L1由来の抗原がウイルス様粒子の製造に使用される場合、該ウイルス様粒子は感染性疾患の処置または予防に用いられてよい。態様の一において、抗原が熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質に由来する場合、該ウイルス様粒子はマラリアの処理または予防に用いられてよい。態様の一において、DISC1由来の抗原がウイルス様粒子の製造に用いられる場合、該ウイルス様粒子は神経疾患の処置または予防に用いられてよい。態様の一において、抗原がPCSK9またはDPP-4に由来する場合、該ウイルス様粒子は慢性の生活習慣病の処置または予防に用いられてよい。

【0135】

処置し得るがんの例としては、黒色腫、腎臓がん、前立腺がん、乳がん、結腸がんおよび非小細胞肺癌がんが挙げられるが、これらに限定されるものではない。該がんの他の例としては、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、皮膚性または眼内の悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん、精巣がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道がん、小腸がん、内分泌系がん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎腺がん、軟組織肉腫、尿道がん、陰茎がん、慢性または急性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、幼児期の固形腫瘍、リンパ性リンパ腫、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂がん、中枢神経系（CNS）の腫瘍、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄腫瘍、脳幹がん、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮がん、T細胞リンパ腫、環境誘発性のがん、例えばアスベストにより誘発されるがんおよびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0136】

処置し得る感染性疾患の例としては、HIV、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア、マラリア、リーシュマニア、肝炎ウイルス（A型、B型およびC型）、ヘルペスウイルス（例えばVZV、HSV-I、HAV-6、HSV-IIおよびCMV、エプスタイン・バーウイルス）、アルファウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス（coronavirus）、RSウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、HTLVウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、JCウイルスおよびアルボウイルス脳炎ウイルスによる感染症、クラミジア菌、リケッチア菌、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌およびコノコッカス（*conococci*）、クレブシエラ、プロテウス、セラチア、シュドモナス、レジオネラ、ジフテリア、サルモネラ、桿菌、コレラ、破傷風菌、ボツリヌス、炭疽菌、ペスト、レプトスピラ症およびライム病菌による感染症、カンジダ菌（カンジダ・アルビカンズ、カンジダ・クルセイ、カンジダ・グラブラータ、カンジダ・トロピカリス等）、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、アスペルギルス（アスペルギルス・フミガーツス、クロコウジカビ等）、ケカビ属（Genus *Mucorales*）（ムコール属、アブシディア属、リゾプス属）、スポロトリックス・シェンキイ、ブラストミセス・デルマチジス、南アメリカ分芽菌、コクシジオイデス・イミチスおよびヒストプラズマ・カプスラーツムによる感染症ならびに寄生生物である、赤痢アメーバ、大腸バランチジウム、フォーラーネグレリア、アカントアメーバ菌種、ランブル鞭毛虫、クリプトスポリジウム菌種、ニューモシスチス・カリニ、三日熱マラリア原虫、ネズミバベシア、ブルセイトリパノソーマ、クルーズトリパノソーマ、ドノバンリーシュマニア、トキソプラズマ原虫およ

びブラジル鉤虫による感染症が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0137】

処置し得る神経疾患の例としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかんまたは統合失調症が挙げられるが、これらに限定するものではない。

【0138】

処置し得る慢性の生活習慣病の例としては、糖尿病または高脂血症が挙げられるが、これらに限定するものではない。

【0139】

ウイルス構造タンパク質および抗原（例えば熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質由来の抗原、PD-1由来の抗原、PD-L1由来の抗原、CTLA-4由来の抗原、IL-2由来の抗原、DISC1由来の抗原、HER2由来の抗原、BTLA由来の抗原、HVEM由来の抗原、PCSK9由来の抗原およびDPP-4由来の抗原）を含む医薬組成物を哺乳動物（例えばヒト）に投与すると、該抗原に対する抗体が、該哺乳動物の血液中で産生される。産生された抗体は、免疫応答を調節するか；免疫刺激性の効果を示すか；または該抗原の機能を阻害し得る。

【0140】

産生された抗体は、慣用される技術を用いてヒト化してよい。本発明の第一の局面で提供される粒子を用いて、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を作製し得る。態様の一において、本願は、本願の第一の局面で提供する粒子を非ヒト哺乳動物に投与し、非ヒト哺乳動物が産生した抗体をヒト化することを含む、抗体を作製する方法を提供する。

【0141】

本明細書中で用いる、「抗体」という用語は、エピトープまたは抗原決定基に結合できる分子を指す。該用語は、抗体全体およびその抗原結合断片、例えば一本鎖抗体を含むことを意図する。該抗体は、ヒト抗原結合性抗体断片を含み、Fab、Fab' およびF(ab')<sub>2</sub>、Fd、一本鎖Fvs(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs(sdFv) およびVLまたはVHドメインのいずれかを含む断片が挙げられるが、これらに限定するものではない。該抗体は、鳥および哺乳動物を含む任意の動物由来であってよい。好ましくは、該抗体は、哺乳動物、例えばヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ等、または他の適当な動物、例えばニワトリ由来であってよい。本明細書中で、「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単離された抗体、または例えば米国特許第5,939,598号明細書（その記載は、全体が参照により本明細書中に包含される）に記載されているように、1つ以上の免疫グロブリンについてトランスジェニックであり、内在性の免疫グロブリンを発現しない動物由来の抗体を含む。

【0142】

本願は、以下の実施例により詳細に記述されるが、これは本願を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0143】

[ 実施例 1 ]

実施例 1：ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されたマラリアCS  
プリペイト抗原を含む、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV) - ウイルス様粒子(VLP)の作製

以下のマラリアCSPタンパク質のポリペプチドを、マラリアCSPプリペイト抗原を含むVEEV-VLPの作製に用いた。該抗原において、SGGはN末端リンカーであり、GGGはC末端リンカーである。

【0144】

74(NPNAアミノ酸配列の6リピート)

SGGNPNANPNANPNANPNANPNANPNAGGS(配列番号56)

(tccggaggaaacccgaatgccaatcccaacgcgaaccccaatgctaaccctaaatgccaaaccaaagccaaccccaacgctggtgatcc)(配列番号60)

【0145】

76(NPNAアミノ酸配列の14リピート)

SGGNPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAGGS(配列番号61)

(tccggaggcaacccaacgccaaccctaatagccaatcccaacgctaatacccaatgctaaccctaacgcaaatccaaatg  
caaacccaatgccaacccaacgctaaccctaacgccaaccctaacgcaaacccaacgccaatcctaatactgctaaccga  
aatgcaaacctaatactgctggcgatcc)(配列番号62)

【0146】

78(NPNAアミノ酸配列の25リピート)

SGGNPNANPNANPNANPNANPNANPNVDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAGGS(配列番号63)

(tccggaggaaacccgaatgccaatcccaacggaacccaacgctaacccaacgccaatccgaatgcaaacccgaacg  
ttgacccaacgccaacccgaatgccaatcccaacggaacccaatgctaacccaatgccaacccaacgccaaccc  
aacgctaataccaaacgccaaccctaacgccaatcccaacggaatcctaacgctaatacccaacgcaaatcccaatgcta  
tccgaacggaacccctaatactgcaaacccaacgccaacccgaacgctaacccgaacgctaatacccaacgccgtggatcc)  
(配列番号64)

【0147】

各ポリヌクレオチドを、配列番号3の第518番のSerをコードするコドンと第519番のSer  
をコードするコドンの間に挿入し、各抗原がベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質  
のE2に挿入されているVEEV-VLPの発現用プラスミド(以降、それぞれpVEEV-74.21、pVEEV-  
-76.21およびpVEEV-78.21と称する)を構築した。同様に、各ポリヌクレオチドを、配列  
番号3の第330番のGlyをコードするコドンと第335番のSerをコードするコドンの間に挿入  
し、各抗原がベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているVEEV-VLP  
の発現用プラスミド(以降、それぞれpVEEV-74.26、pVEEV-76.26およびpVEEV-78.26と称  
する)を構築した。

【0148】

293F細胞(Lifetechnology)を、PEI(GE Healthcare)を用いて180μgの各プラスミド(す  
なわち、それぞれpVEEV-74.21、pVEEV-76.21、pVEEV-78.2、pVEEV-74.26、pVEEV-76.26  
およびpVEEV-78.26)で遺伝子導入した。該遺伝子導入の4日後、馴化培地を回収し、3000  
rpmで15分間遠心分離して、細胞から分離した。該上清を0.45μmフィルターを用いて濾  
過し、ウイルス様粒子を得た。該ウイルス様粒子は、TFFカラムを用いて濃縮し、QXLカ  
ラム(GE Healthcare)を用いて精製し、精製ウイルス様粒子を得た。動物をウイルス様粒  
子で免疫化する場合、該精製ウイルス様粒子をさらに、スピンカラム(分子量カットオフ  
:100kDa)を用いて濃縮し、免疫化用のウイルス様粒子を調製した。

【0149】

VEEV構造ポリペプチドと結合したCSPリピート抗原74、76または78を含むVLPの産生は、  
抗VEEV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した(図3参照)。図3に見ら  
れるように、抗原挿入VLPは、該抗原がE2に挿入された場合と比較してE3に挿入された場  
合に、より効率的に産生された。

【0150】

[実施例2]

実施例2：ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されたマウスマ  
リアCSPリピート抗原を含む、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)-ウイルス様粒子(VLP)  
の作製

以下のマウスマリアCSPタンパク質のポリペプチドを、マウスマリアCSPリピート抗  
原を含むVEEV-VLPの作製に用いた。該抗原において、SGGはN末端リンカーであり、GGGはC  
末端リンカーである。

【0151】

261(「qgggap」のリピート)

SGG-QGPGAPQGPGAPQGPGAPQGPGAP-QGS(配列番号58)

tccggaggacaggacactggcgctcctcagggaccaggggaccacagggcccgccacaggggacctggggcccc  
tgggggatcc(配列番号65)

## 【 0 1 5 2 】

該ポリヌクレオチドを、配列番号3の第518番のSerをコードするコドンと第519番のSerをコードするコドンの間に挿入し、該抗原がベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質のE2に挿入されているVEEV-VLPの発現用プラスミド（以降、pVEEV-261.25と称する）を構築した。同様に、該ポリヌクレオチドを、配列番号3の第330番のGlyをコードするコドンと第335番のSerをコードするコドンの間に挿入し、該抗原がベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているVEEV-VLPの発現用プラスミド（以降、pVEEV-261.66と称する）を構築した。

## 【 0 1 5 3 】

293F細胞（Lifetechnology）を、PEI（GE Healthcare）を用いて180 μgの各プラスミド（すなわち、それぞれpVEEV-261.25およびpVEEV-261.66）で遺伝子導入した。該遺伝子導入の4日後、馴化培地を回収し、3000rpmで15分間遠心分離して、細胞から分離した。該上清を0.45 μmフィルターを用いて濾過し、ウイルス様粒子を得た。該ウイルス様粒子は、TF Fカラムを用いて濃縮し、QXLカラム（GE Healthcare）を用いて精製し、精製ウイルス様粒子を得た。動物をウイルス様粒子で免疫化する場合、該精製ウイルス様粒子をさらに、スピンカラム（分子量カットオフ：100kDa）を用いて濃縮し、免疫化用のウイルス様粒子を調製した。

## 【 0 1 5 4 】

VEEV構造ポリペプチドと結合したCSPリピート抗原261を含むVLPの発現は、抗VEEV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した（図4参照）。図4に見られるように、抗原挿入VLPは、該抗原がE2に挿入された場合と比較してE3に挿入された場合に、より効率的に産生された。

## 【 0 1 5 5 】

## 〔 実施例 3 〕

実施例 3：ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されたマラリア抗原を含むベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV) - ウイルス様粒子(VLP)の作製

以下のマラリアタンパク質由来ペプチドを、マラリアCSPリピート抗原を含むVEEV-VLPの作製に用いた。SGGは、抗原のN末端リンカー（核酸配列ではTCCGGAGGA）であり、GGGは抗原のC末端リンカー（核酸配列ではGGAGGATCC）である。

## 【 0 1 5 6 】

74(NPNAアミノ酸配列の6リピート)

SGGNPNANPNANPNANPNANPNANPNAGGS(配列番号56)

(tccggaggaaacccgaatgccaatcccaacgcgaaccccaatgctaaccctaaatgccaacccaaacgccaaccccaacgctggtggatcc)(配列番号60)

## 【 0 1 5 7 】

302R(pfs25由来の抗原)

SGG-CIKIDGNPVSAC-GGS(配列番号66)

tccggaggggtgcatcaagatcgacggcaaccccggtgtcctacgcctgcgggggatcc(配列番号67)

## 【 0 1 5 8 】

303R(pfs25由来の抗原)

SGG-CILDTSNPVKTGVC-GGS(配列番号68)

tccggaggctgcatcctggacaccagcaaccccggtgaaaacggcggtgtgtggcgatcc(配列番号69)

## 【 0 1 5 9 】

各ポリヌクレオチドを、配列番号3の第518番のSerをコードするコドンと第519番のSerをコードするコドンの間に挿入し、各抗原がベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質のE2に挿入されているVEEV-VLPの発現用プラスミド（以降、pVEEV-74.21、pVEEV-302R.21およびpVEEV-303R.21と称する）を構築した。同様に、各ポリヌクレオチドを、配列番号3の第330番のGlyをコードするコドンと第335番のSerをコードするコドンの間に挿入し、該抗原がベネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているVEEV-VLPの発現用プラスミド（以降、それぞれpVEEV-74.66、pVEEV-302R.66およびpVEEV-303R.66と称

10

20

30

40

50

する)を構築した。

#### 【0160】

293F細胞(Lifetechnology)を、PEI(GE Healthcare)を用いて180 µgの各プラスミド(すなわち、それぞれpVEEV-74.21、pVEEV-302R.21、pVEEV-303R.2、pVEEV-74.66、pVEEV-302R.66およびpVEEV-303R.66)で遺伝子導入した。該遺伝子導入の4日後、馴化培地を回収し、3000rpmで15分間遠心分離して、細胞から分離した。該上清を0.45 µmフィルターを用いて濾過し、ウイルス様粒子を得た。該ウイルス様粒子は、TFFカラムを用いて濃縮し、QXLカラム(GE Healthcare)を用いて精製し、精製ウイルス様粒子を得た。動物をウイルス様粒子で免疫化する場合、該精製ウイルス様粒子をさらに、スピンカラム(分子量カットオフ:100kDa)を用いて濃縮し、免疫化用のウイルス様粒子を調製した。

10

#### 【0161】

VEEV構造ポリペプチドと結合した抗原74、302Rまたは303Rを含むVLPの発現は、抗VEEV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した(図5参照)。図5に見られるように、抗原挿入VLPは、該抗原がE2に挿入された場合と比較してE3に挿入された場合に、より効率的に産生された。

#### 【0162】

##### [実施例4]

実施例4：ウイルス構造タンパク質と、PD-1抗原またはPD-1リガンド抗原とを含む、チクングニアウイルス(CHIKV)-ウイルス様粒子の作製

以下のPD-1またはPD-L1のポリペプチドを、PD-1抗原またはPD-1リガンド抗原を含むCHIKV-VLPの作製に用いた。SGGは、抗原のN末端リンカー(核酸配列ではTCCGGAGGA)であり、GGGは抗原のC末端リンカー(核酸配列ではGGAGGATCC)である。

20

#### 【0163】

1. 299(マウスPD-L1配列): 抗原として用いた、リンカー結合マウスPD-L1ドメイン3Sの配列:

核酸配列

tccggaggatgcatcatcagctacggcggagccgactacggaggatcc(配列番号70)

アミノ酸配列

SGG-ciisyygadyC-GGS(配列番号71)

#### 【0164】

2. 274(マウスPD-1配列): 抗原として用いた、リンカー結合マウスPD-1ドメイン2ショート配列:

核酸配列

tccggaggaggcgccatcagcctgcaccccaaggccaagatcgaggaatctggaggatcc(配列番号72)

アミノ酸配列

SGG-gaislhpakiees-GS(配列番号73)

30

#### 【0165】

各ポリヌクレオチドを、配列番号2の第531番のSerをコードするコドンと第532番のAsnをコードするコドンの間に挿入し、PD-1由来ペプチドまたはPD-L1由来ペプチドがチクングニアウイルス構造タンパク質のE2に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミド(以降、それぞれpCHIKV-299.15およびpCHIKV-274.11と称する)を構築した。同様に、各ポリヌクレオチドを、配列番号2の第321番のHをコードするコドンと第326番のSをコードするコドンの間に挿入し、PD-1由来ペプチドまたはPD-L1由来ペプチドがチクングニアウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミド(以降、それぞれpCHIKV-299.56およびpCHIKV-274.56と称する)を構築した。

40

#### 【0166】

293F細胞(Lifetechnology)を、PEI(GE Healthcare)を用いて180 µgの各プラスミド(すなわち、それぞれpCHIKV-274.11、pCHIKV-299.15、pCHIKV-274.56およびpCHIKV-299.56)で遺伝子導入した。該遺伝子導入の4日後、馴化培地を回収し、3000rpmで15分間遠心

50

分離して、細胞から分離した。該上清を0.45 μmフィルターを用いて濾過し、ウイルス様粒子を得た。該ウイルス様粒子は、TFFカラムを用いて濃縮し、QXLカラム (GE Healthcare) を用いて精製し、精製ウイルス様粒子を得た。動物をウイルス様粒子で免疫化する場合、該精製ウイルス様粒子をさらに、スピンカラム (分子量カットオフ: 100kDa) を用いて濃縮し、免疫化用のウイルス様粒子を調製した。

#### 【0167】

CHIKV構造ポリペプチドと結合した抗原274または299を含むVLPの発現は、抗CHIKV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した (図6参照)。図6に見られるように、抗原挿入VLPは、該抗原がE2に挿入された場合と比較してE3に挿入された場合に、より効率的に産生された。

10

#### 【0168】

##### [実施例5]

実施例5：ウイルス構造タンパク質とマラリア抗原とを含む、チクングニアウイルス(CHIKV)-ウイルス様粒子の作製

以下のマラリアCSPタンパク質のポリペプチドを、マラリアCSPリピート抗原を含むCHIKV-VLPの作製に用いた。SGGは、抗原のN末端リンカー (核酸配列ではTCCGGAGGA) であり、GGGは抗原のC末端リンカー (核酸配列ではGGAGGATCC) である。

#### 【0169】

CSPリピート抗原74(NPNAアミノ酸配列の6リピート)

SGGNPNANPNANPNANPNANPNANPNAGGS (配列番号56)

20

(tccggaggaaacccgaatgccaatcccaacgcgaacccaatgctaaccctaaatgccaacccaacgcgaacccaacgctggtggatcc) (配列番号60)

#### 【0170】

該ポリヌクレオチドを、配列番号2の第531番のSerをコードするコドンと第532番のAsnをコードするコドンの間に挿入し、該マラリアCSPリピート抗原がチクングニアウイルス構造タンパク質のE2に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミド (以降、pCHIKV-74.11と称する) を構築した。同様に、該マラリアCSPリピート抗原を、配列番号2の第321番のHをコードするコドンと第326番のSをコードするコドンの間に挿入し、該マラリアCSPリピート抗原がチクングニアウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミド (以降、pCHIKV-74.16と称する) を構築した。

30

#### 【0171】

293F細胞 (Lifetechnology) を、PEI (GE Healthcare) を用いて180 μgの各プラスミド (すなわち、それぞれpCHIKV-74.11およびpCHIKV-74.16) で遺伝子導入した。該遺伝子導入の4日後、馴化培地を回収し、3000rpmで15分間遠心分離して、細胞から分離した。該上清を0.45 μmフィルターを用いて濾過し、ウイルス様粒子を得た。該ウイルス様粒子は、TFFカラムを用いて濃縮し、QXLカラム (GE Healthcare) を用いて精製し、精製ウイルス様粒子を得た。動物をウイルス様粒子で免疫化する場合、該精製ウイルス様粒子をさらに、スピンカラム (分子量カットオフ: 100kDa) を用いて濃縮し、免疫化用のウイルス様粒子を調製した。

40

#### 【0172】

CHIKV構造ポリペプチドと結合したVLP74を含むVLPの発現は、抗CHIKV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した (図7参照)。図7に見られるように、抗原挿入VLPは、該抗原がE2に挿入された場合と比較してE3に挿入された場合に、より効率的に産生された。

#### 【0173】

##### [実施例6]

実施例6：ウイルス構造タンパク質とCTLA-4抗原とを含む、チクングニアウイルス(CHIKV)-ウイルス様粒子の作製

以下のCTLA-4のポリペプチドを、CTLA-4抗原を含むCHIKV-VLPの作製に用いた。SGGは、抗

50

原のN末端リンカー（核酸配列ではTCCGGAGGA）であり、GGGは抗原のC末端リンカー（核酸配列ではGGAGGATCC）である。

【0174】

mCTLA4\_ver2

SGGGGKVELMYPPYFVGMGGGGS(配列番号74)

tccggaggcgccggaaggtggaactcatgtaccacccgccatactttgtgggcatggcgccggcgatcc(配列番号78)

【0175】

mCTLA4\_ver4

SGGCATTFTEKNTVGFLDYPFCGGS(配列番号79)

tccggaggctgtgccacgacattcacagagaagaatacagtgggcttcctagattacccttctgcggcgatcc(配列番号80)

【0176】

mCTLA4\_ver5

SGGATTFTEKNTVGFLDYPFGGS(配列番号81)

tccggaggcgccacgacattcacagagaagaatacagtgggcttcctagattacccttccggcgatcc(配列番号82)

【0177】

該ポリヌクレオチドを、配列番号2の第321番のHをコードするコドンと第326番のSをコードするコドンの間に挿入し、該mCTLA-4抗原がチクングニアウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミドを構築した。

【0178】

293F細胞（Lifetechnology）を、PEI（GE Healthcare）を用いて180 μgの各プラスミドで遺伝子導入した。該遺伝子導入の4日後、馴化培地を回収し、3000rpmで15分間遠心分離して、細胞から分離した。該上清を0.45 μmフィルターを用いて濾過し、ウイルス様粒子を得た。該ウイルス様粒子は、TFFカラムを用いて濃縮し、QXLカラム（GE Healthcare）を用いて精製し、精製ウイルス様粒子を得た。動物をウイルス様粒子で免疫化する場合、該精製ウイルス様粒子をさらに、スピンカラム（分子量カットオフ：100kDa）を用いて濃縮し、免疫化用のウイルス様粒子を調製した。

【0179】

CHIKV構造ポリペプチドと結合した各mCTLA-4\_ver2、4および5を含むVLPの発現は、抗CHIKVサル血清を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

【0180】

[実施例7]

実施例7：成熟したCHIKV VLPの作製

CHIKVのE3領域の末端にあるフリーン部位RQRRがSGGGSで置換されているCHIKVウイルス構造タンパク質を発現できる、CHIKV-P2 VLP発現プラスミド；CHIKVのE3領域の末端にあるフリーン部位RQRRが第Xa因子認識モチーフであるIDGRで置換されているCHIKVウイルス構造タンパク質を発現できる、CHIKV-Xa VLP発現プラスミド、およびCHIKVのE3領域の末端にあるフリーン部位RQRRがエンテロキナーゼ認識モチーフであるDDDDKで置換されているCHIKVウイルス構造タンパク質を発現できる、CHIKV-En VLP発現プラスミドを用いた。該3つのプラスミド全てについて10 μgを293F細胞に遺伝子導入し、遺伝子導入の4日後に、上清を回収した。20 μlの上清を、水（対照）、第Xa因子またはエンテロキナーゼで一晩処理した。その後、上清中のVLPを、抗CHIKV血清を用いたウェスタンブロッティングにより測定した。結果を図8に示す。

【0181】

プラスミドCHIKV-P2、CHIKV-XaおよびCHIKV-Enで遺伝子導入された細胞の上清中で、未熟なVLPが発現した。CHIKV-Xa遺伝子導入細胞由来の未熟なVLPを、第Xa因子で分解した。該未熟なVLPはE3を放出し、成熟VLP型になった（レーン5）。CHIKV-En-遺伝子導入細胞由

10

20

30

40

50

来の未熟なVLPを、エンテロキナーゼで分解した。該未熟なVLPはE3を放出し、成熟VLP型になった(レーン9)。

【0182】

[ 実施例 8 ]

#### 実施例 8 : 成熟したVEEV VLPの作製

VEEVのE3領域の末端にあるフーリン部位のRQRRがSGGGSで置換されているVEEVウイルス構造タンパク質を発現できるVEEV-P2 VLP発現プラスミド；VEEVのE3領域の末端にあるフーリン部位のRQRRが第Xa因子認識モチーフであるIDGRで置換されているVEEVウイルス構造タンパク質を発現できるVEEV-IDGR VLP発現プラスミド；およびVEEVのE3領域の末端にあるフーリン部位のRQRRが別のXa 認識モチーフであるIEGRで置換されているVEEVウイルス構造タンパク質を発現できるVEEV-IEGRプラスミドを、用いた。該3つのプラスミド全てについて10 µgを293F細胞に遺伝子導入し、遺伝子導入の4日後に、上清を回収した。20 µlの上清を、水(対照)、第Xa因子で一晩処理した。その後、上清中のVLPを、抗VEEV血清を用いたウェスタンブロッティングにより測定した。プラスミドVEEV-P2、VEEV-IDGRおよびVEEV-IEGRで遺伝子導入された細胞の上清中で、未熟なVLPが発現した。VEEV-IDGRおよびVEEV-IEGR遺伝子導入細胞由来の未熟なVLPを、第Xa因子で分解した。VEEV-IDGRおよびVEEV-IEGR-遺伝子導入細胞由来の未熟なVLPを、第Xa因子で分解した。結果を図9に示す。VEEV-IDGRおよびVEEV-IEGR-遺伝子導入された細胞由来の未熟なVLPはE3を放出し、成熟VLP型になった(レーン5および6)。

【0183】

[ 実施例 9 ]

#### 実施例 9 : ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されたDISC1\_451、452または454を含むチクングニアウイルス(CHIKV)-ウイルス様粒子の作製

以下のDISC1タンパク質のポリペプチドを、DISC1抗原を含むCHIKV-VLPの作製に用いた。

【0184】

【表 1】

名称	アミノ酸配列
DISC1_451	SGGLLIQSLQLQEARGELSVEDERQMDDLEGGS ( 配列番号 : 105)
DISC1_452	SGGEARGELSVEDERQMDDLEGGS ( 配列番号 : 106)
DISC1_454	SGGEARGELSVEGGS ( 配列番号 : 107)

【0185】

【表 2】

名称	DNA配列
DISC1_451	tccggaggggctgctgatccagtctctgcagctgcaggaagccagagggc gagctgagcgtggaagatgagcggcagatggacgacctggaagggggga tcc ( 配列番号 117)
DISC1_452	tccggagggggaagccagagggcgagctgagcgtggaagatgagcggcag atggacgacctggaaggggggatcc ( 配列番号 118)
DISC1_454	tccggagggggaagccagagggcgagctgagcgtggaaggggggatcc ( 配列番号 119)

【0186】

SGGは、抗原のN末端リンカー(核酸配列ではTCCGGAGGA)であり、GGGは抗原のC末端リンカー(核酸配列ではGGAGGATCC)である。

【0187】



各ポリヌクレオチドを、配列番号2の第531番のSerをコードするコドンと第532番のAsnをコードするコドンの間、ならびに、配列番号2の第321番のHをコードするコドンと第326番のSをコードするコドンの間に挿入し、該DISC1由来ペプチドがチクングニアウイルス構造タンパク質のE2およびE3の両方に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミドを構築した。各ポリヌクレオチドを、配列番号2の第321番のHをコードするコドンと第326番のSをコードするコドンの間に挿入し、該DISC1由来ペプチドがチクングニアウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミド（以降、それぞれpCHIKV-299.56およびpCHIKV-274.56と称する）を構築した。

293F細胞を、指示したDISC1発現VLPで遺伝子導入した。遺伝子導入の4日後に、該上清を回収した。

【0188】

CHIKV構造ポリペプチドと結合したDISC1\_451、\_452または\_454を含むVLPの発現は、抗CHIKV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した（図10参照）。1次抗体（1:1000希釈）はチクングニアに対する抗血清であり、二次抗体（1:5000希釈）は抗マウスIgG-HRP抗体だった。図10で見られるように、該抗原をE3、およびE2とE3の両方（二重）に挿入した場合に、DISC1\_451、\_452および\_454挿入VLPが産生された。

【0189】

[ 実施例 10 ]

実施例 10：ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E3に挿入されたIL-2を含むチクングニアウイルス(CHIKV)-ウイルス様粒子の作製

ヒトIL-2変異体を、Levin et. al、Nature 484(7395): 529-533、2012に記載の方法に従い作製した。マウスIL-2変異体はF54A(Mott HR et al. J.Mol.Biol. 247、979-994、1995)およびD34K(Berndt et al. Biochemistry 33、6571、1994)であり、これらの文献の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0190】

各ポリヌクレオチドを、配列番号2の第321番のHをコードするコドンと第326番のSをコードするコドンの間に挿入し、該IL-2由来ペプチドがチクングニアウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミド（以降、それぞれpCHIKV-299.56およびpCHIKV-274.56と称する）を構築した。実施例6に記載の方法と同じ方法に従い、IL-2を含むチクングニアウイルス様粒子を作製して精製した。

【0191】

CHIKV構造ポリペプチドと結合したIL-2を含むVLPの発現は、マウス抗CHIKV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した（図11および12参照）。図11および12で見られるように、これらの抗原がE3に挿入された場合に、ヒトIL-2野生型、ヒトIL-2変異体、マウスIL-2野生型、およびマウスIL-2変異体挿入VLPが産生された。

【0192】

提供されるエンベロープタンパク質E3中にIL-2由来ペプチドを含むCHIKVウイルス構造タンパク質、並びに該ウイルス構造タンパク質を発現するベクターは、配列番号:83-92である。これらの配列は6Kタンパク質を含有するが、6Kタンパク質は、E1タンパク質を小胞体に輸送するためのシグナル配列として働き、ここで、6Kタンパク質は宿主のシグナルペプチダーゼによりプロセッシングされ、ウイルス粒子には集合しない。

【0193】

[ 実施例 11 ]

実施例 11：ウイルス構造タンパク質のエンベロープタンパク質E2およびE3の両方に挿入されたマウスマラリア(プラスモディウム・ヨエリ)を含むCHIKV VLPの筋肉内注射による、マウスのマラリアに対する保護

エンベロープタンパク質E2およびE3の両方に挿入されたマラリアプラスモディウム・ヨエリCSP 4Xリピートを含むチクングニアVLP(261.261 CHIKV VLP)と、エンベロープタンパク質E2およびE3の両方に挿入されたマラリアプラスモディウム・ヨエリCSP 14Xリピート

10

20

30

40

50

を含むチクングニアVLP(264.264 CHIKV VLP)を、前述の実施例と同様の方法で作製して精製した。本実施例で用いられる、リンカーと有するリピート抗原のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、配列番号：93-96である。E2およびE3の両方に抗原を含有するCHIKVウイルス構造タンパク質と、該ウイルス構造タンパク質の発現ベクターは、配列番号：97-100である。これらの配列は6Kタンパク質を含有するが、6Kタンパク質は、E1タンパク質を小胞体に輸送するためのシグナル配列として働き、ここで、6Kタンパク質は宿主のシグナルペプチダーゼによりプロセッシングされ、ウイルス粒子には集合しない。

【 0 1 9 4 】

該マウス (n=10) を、筋肉内注射により、0週目および3週目に261.261 CHIKV VLPまたは264.264 CHIKV VLPを用いて2回免疫化した (マウス1匹あたり20 μg VLP)。VLPを、注射前にアルハイドロゲルアジュバントと混合した。5週目に、261.261 CHIKV VLP、264.264 CHIKV VLPおよび挿入抗原を有さないCHIKV VLP(対照群)で免疫化したマウスに対し、1000用量のプラスモディウム・ヨエリスポロゾイトにより、静脈内に負荷を行った。

【 0 1 9 5 】

マラリア感染をPCRにより確認した。ゲノムDNAを負荷後14日目のマウス血液から精製した。18SマラリアDNAを、PCRにより増幅した。図13は、PCRの結果を示し、対照VLPで免疫化した10匹のマウスのうち、9匹がマラリアに感染しており；エンペローブタンパク質E2およびE3の両方に挿入されたマラリアCSP 4Xリピートを含むチクングニアVLP(261.261 VLP)で免疫化した10匹のマウスのうち、9匹はマラリアに感染しておらず；エンペローブタンパク質E2およびE3の両方に挿入されたマラリアCSP 14Xリピートを含むチクングニアVLPで免疫化した10匹のマウスのうち、9匹はマラリアに感染していなかったことを示す。

【 0 1 9 6 】

[ 実施例 1 2 ]

実施例 1 2：ウイルス構造タンパク質およびヒトマラリアCSPリピートエピトープを含むチクングニアウイルス(CHIKV)-ウイルス様粒子の免疫原性：74.74(E2およびE3(二重)挿入)、74(E2挿入)および74(E3挿入)

E2またはE3に、並びにE2およびE3の両方に、マラリアCSP 6Xリピート抗原 (6XNPNA) を含むチクングニアウイルス構造タンパク質を、前述の実施例と同様の方法で作製した。E2およびE3の両方にCSP 6Xリピート抗原を含むCHIKVウイルス構造タンパク質は配列番号101であり、該ウイルス構造タンパク質の発現ベクターは配列番号102(74.74.58)である。CSP 6Xリピート抗原を含むCHIKV VLPを、実施例6と同じ方法で作製して精製した。

【 0 1 9 7 】

該マウス (群当たりn=4) を、10 μgの図中に示したVLPで免疫化した。免疫化後10日目に、免疫化したマウスの血清中の抗CSP抗体力価を、組換えCSPでコートしたELISAにより測定した。

【 0 1 9 8 】

図14は、E3挿入VLP、並びに、E2およびE3 (二重) 挿入VLPが、E2挿入VLPよりも高い力価を有したことを示す。

【 0 1 9 9 】

[ 実施例 1 3 ]

実施例13：ウイルス構造タンパク質およびhHER2抗原を含むチクングニアウイルス(CHIKV)-ウイルス様粒子の作製

以下のhHER2タンパク質由来ポリペプチドを、hHER2抗原を含むCHIKV-VLPの作製に用いた。SGGは、抗原のN末端リンカー (核酸配列ではTCCGGAGGA) であり、GGGは抗原のC末端リンカー (核酸配列ではGGAGGATCC) である。

【 0 2 0 0 】

10

20

30

40

【表 3】

VLP	アミノ酸配列
401	SGGVTYNTDTFESMPGGS ( 配列番号 : 108)
403	SGGYVNARHCLGGS ( 配列番号 : 110)
404	SGGYVNARHGLGGS ( 配列番号 : 111)
405	SGGKFPDEEGACQPCPIGGS ( 配列番号 : 112)
406	SGGKFPDEEGACQPGGS ( 配列番号 : 113)
407	SGGKDPPFCVGGGS ( 配列番号 : 114)
408	SGGYKDPPFCVAGGS ( 配列番号 : 115)
409	SGGYKDPPFCVGGGS ( 配列番号 : 116)

10

【 0 2 0 1 】

【表 4】

VLP #	DNA配列
401	aaaaaatccggaggcggtcacctacaacacagacacggttgagtcctatgcccgggcg gatccaaa ( 配列番号 : 120)
403	aaaaaatccggaggctatgtgaatgccaggcactgtttgggaggatccaaa ( 配列 番号 : 121)
404	aaaaaatccggaggctatgtgaatgccaggcacggtttgggaggatccaaa ( 配列番号 : 122)
405	aaaaaatccggaggcaagtttccagatgaggagggcgcatgccagccttgcccca tcggcggatccaaa ( 配列番号 : 123)
406	aaaaaatccggaggcaagtttccagatgaggagggcgcatgccagcctggcggat ccaaa ( 配列番号 : 124)
407	aaaaaatccggaggcaaggaccctcccttctgcgtgggaggatccaaa ( 配列番号 : 125)
408	aaaaaatccggaggctataaggaccctcccttctgcgtgggaggatccaaa ( 配列番号 : 126)
409	aaaaaatccggaggctataaggaccctcccttctgcgtgggaggatccaaa ( 配列 番号 : 127)

20

30

40

【 0 2 0 2 】

各ポリヌクレオチドを、配列番号2の第531番のSerをコードするコドンと第532番のAsnをコードするコドンの間に挿入し、該hHER2由来ペプチドがチクングニアウイルス構造タンパク質のE2に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミドを構築した。同様に、各ポリヌクレオチドを、配列番号2の第321番のHをコードするコドンと第326番のSをコードするコドンの間に挿入し、該hHER2由来ペプチドがチクングニアウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミドを構築した。

【 0 2 0 3 】

50

実施例6に記載の方法と同じ方法に従い、hHER2を含むチクングニアウイルス様粒子を作製して精製した。

#### 【0204】

CHIKV構造ポリペプチドと結合したhHER2を含むVLPの発現は、マウス抗CHIKV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した(図15参照)。これらのうち、401、404、406、および409は、異なるエピトープをコードするために、比較的高い発現レベルだった。

#### 【0205】

##### [実施例14]

##### 実施例14：免疫原性

該マウス(群当たりn=4)を、E2またはE2およびE3の両方(二重)に挿入されたhHER2抗原#401を含む、10 $\mu$ gのCHIKV VLPを用いて免疫化した。該マウス(n=10)を、筋肉内注射により、0週目および3週目に、hHER2抗原を含むVLPまたは抗原を含まないCHIKV VLPを用いて2回免疫化した。VLPを、注射前にアルハイドロゲルアジュバントと混合した。

#### 【0206】

2回目の免疫化の2週間後(1回目の免疫化の5週間後)に、免疫化したマウスの血清中の抗hHER2抗体力価を、組換えhHER2でコートしたELISAプレートにより測定した。

#### 【0207】

図16は、E2またはE2およびE3の両方(二重)にhHER2抗原#401を含むCHIKV VLPが、hHER2タンパク質に対する抗体を作成し、二重挿入VLP(すなわち、抗原がE2およびE3の両方に挿入されている)が、抗原がE2に挿入されているVLPよりも、高い力価を提示し得たことを示す。

#### 【0208】

##### [実施例15]

##### 実施例15：ウイルス構造タンパク質およびhHER2抗原を含むチクングニアウイルス(CHIKV)-ウイルス様粒子の作製

以下のhHER2タンパク質由来ポリペプチド(GENBANK番号:NM\_001005862)および誘導体を、hHER2抗原を含むCHIKV-VLPの作製に用いた。

#### 【0209】

##### 【表5】

404(hHer2 original): sgg yvnarhgl ggs

404-1 : sggcgyvnarhglgcggs

409 (hHer2 original):sgg ykdppfcv ggs

(409-1): sgg ykdppfgv ggs

#### 【0210】

これらのアミノ酸配列は、配列番号128、129、130および131に相当する。

#### 【0211】

該抗原において、SGGはN末端リンカーであり、GGSはC末端リンカーである。

#### 【0212】

各ポリヌクレオチドを、配列番号2の第321番のHをコードするコドンと第326番のSをコードするコドンの間に挿入し、該hHER2由来ペプチドがチクングニアウイルス構造タンパク質のE3に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミドを構

10

20

30

40

50

築した。

【 0 2 1 3 】

各ポリヌクレオチドを、配列番号2の第531番のSerをコードするコドンと第532番のAsnをコードするコドンの間に挿入し、該hHER2由来ペプチドがチクングニアウイルス構造タンパク質のE2に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質の発現用プラスミドを構築した。

【 0 2 1 4 】

同様に、各ポリヌクレオチドをチクングニアウイルス構造タンパク質のE2およびE3の両方に挿入した。

【 0 2 1 5 】

実施例6に記載の方法と同じ方法に従い、hHER2を含むチクングニアウイルス様粒子を作製して精製した。CHIKVウイルス構造タンパク質のE2、E3または二重(E2およびE3の両方)に挿入されたhHER2を含むVLPの発現を、抗CHIKV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

【 0 2 1 6 】

[ 実施例 1 6 ]

実施例16：ウイルス構造タンパク質およびBTLA抗原を含むチクングニアウイルス(CHIKV)-ウイルス様粒子の作製

【 0 2 1 7 】

hBTLAのポリペプチド(383: SGGCKLNGTTCGGS(配列番号132)、GENBANK番号: NM\_001085357由来)を、hBTLA 抗原を含むCHIKV-VLPの作製に用いた。該抗原において、SGGはN末端リンカーであり、GGSはC末端リンカーである。

【 0 2 1 8 】

該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを、配列番号2の第321番のHと第326番のSとをコードするコドンの間に挿入して、hBTLA由来ペプチドがE3に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質を発現するプラスミドを構築した。

【 0 2 1 9 】

実施例6に記載の方法と同じ方法に従いhBTLA 抗原を含むチクングニアウイルス様粒子を作製して精製した。

【 0 2 2 0 】

このように得られたVLPで免疫化したマウスから、慣用される手順によりモノクローナル抗体を作製した。該モノクローナル抗体の該抗原への結合特性を、BTLAタンパク質でコートしたELISAにより測定した。図17は、BTLA抗原を含むCHIKV VLPが、マウスBTLA(mBT LA)およびヒトBTLA(hBTLA)タンパク質の両方に結合するモノクローナル抗体を作成し得ることを示す。

【 0 2 2 1 】

[ 実施例 1 7 ]

実施例17：ウイルス構造タンパク質およびHVEM抗原を含むチクングニア(CHIKV)-ウイルス様粒子の作製

以下のヒトHVEMペプチド(hHVEM、GENBANK番号:NM\_001297605由来)を、hHVEM抗原を含むCHIKV-VLPの作製に用いた。

354: SGGCVKEASGELTGTVC GGS(配列番号133)

356: SGGCYRVKEASGELTGTVSEPCGGS(配列番号134)

362: SGGCSRNSRTENAVCGGS(配列番号135)

372: SGGCQMSDPAMGLRSRNC GGS(配列番号136)

【 0 2 2 2 】

該抗原において、SGGはN末端リンカーであり、GGSはC末端リンカーである。該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを、配列番号2の第321番のHと第326番のSとをコードするコドンの間に挿入して、hHVEM由来ペプチドがE3に挿入されているチクングニアウイルス構造タンパク質を発現するプラスミドを構築した。

10

20

30

40

50

## 【0223】

実施例6に記載の方法と同じ方法に従い、hHHVEMを含むチクングニアウイルス様粒子を作製して精製した。CHIKV構造ポリペプチドと結合したhHVEMを含むVLPの発現を確認した(図18参照)。

## 【0224】

## [実施例18]

実施例18：安定な細胞株からの未熟なCHIKV VLPの発現

実施例8で得られた未熟なVLPを発現する遺伝子導入細胞株を作製した。

1. ハイグロマイシンBなどの選択マーカーを含む、実施例8で用いた発現ベクターを、293F細胞に遺伝子導入した。
2. 遺伝子導入された細胞を、1日間インキュベートした。
3. 遺伝子導入された細胞を、150-200ug/mlでハイグロマイシンを含有する選択培地で、1-2週間培養した。
4. 選択培地中で増殖でき、少なくとも1回でわけることができる細胞を選択した。
5. 単一細胞を単離してクローン化した。その後、ウェスタンブロッティングにより、細胞が上清中にVLPを分泌していることを確認した。

10

## 【0225】

クローン細胞を、酪酸ナトリウムを含む培地中で3ヵ月間培養し、培養液の上清を得て、上清中の未熟なVLPを確認した。結果は図19に示す。本データは、得られた細胞株が安定であり、長期間にわたって未熟なVLPを連続的に作成できたことを示している。

20

## 【0226】

## [実施例19]

実施例19：PD-L1 VLPによる、腫瘍に対する保護

実施例4に従い得られたPD-L1 VLPを用いた。該マウス(群当たりn=10)を、0、3、6および9週目に、PBS(対照)またはPD-L1 VLPで注射した。

## 【0227】

該マウスを、8週目に、CT26細胞株( $1 \times 10^6$ 細胞)で負荷した。腫瘍サイズを測定した。

図20は、PD-L1 VLPが腫瘍に対してマウスを保護することを示す。

## 【0228】

30

## [実施例20]

実施例20：ウイルス構造タンパク質と、そのエンベロープタンパク質E2およびE3の両方に挿入されたマラリア抗原とを含む、チクングニアウイルス(CHIKV)様粒子を含む医薬組成物の作製

E3のみに、またはE2およびE3の両方にマラリアCSP 14Xリピート抗原76(14XNPNA)を含むチクングニアウイルス構造タンパク質を、前述の実施例に従い同様の方法で、293F細胞で発現した(E2およびE3にCSP 14Xリピート抗原76を含有するCHIKVウイルス構造タンパク質は配列番号103であり、該ウイルス構造タンパク質の発現ベクターは配列番号104である)。該チクングニアウイルス様粒子を、前述の実施例と同様の方法で作製して精製した。CHIKV構造ポリペプチドと結合したCSPリピート抗原76を含むVLPの発現を、CHIKV-VLP免疫化サル血清に対するウェスタンブロッティングにより確認した。図21参照。

40

## 【0229】

ワクチン組成物である医薬組成物を作製するために、80 µgの作製した粒子を、1 mlのリン酸スクロース溶液、pH7.2、エンドトキシン不含有(Teknova、SP buffer)と混合した。

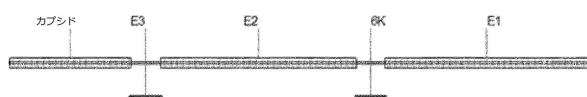
## 【0230】

BALB/cマウスの群(n=4)を、このように得られた15 µgのVLPにより、3週間の間隔を空けて、アルハイドロゲル2%アジュバント有りまたは無しで、3回筋肉内に免疫化した。三回目の投与後2週間目に、血清を回収した。血清の抗CSP NANP力価を、コーティングに(NAN P)<sub>6</sub>ペプチドを用いたELISAにより測定した。本実験の結果は図22に示している。CSPエピ

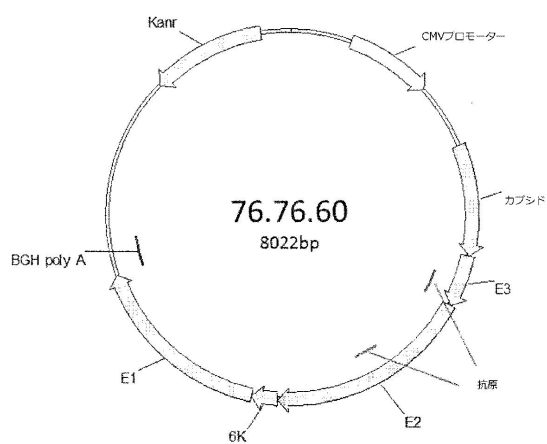
50

トープNANPを含むVLPは、抗CSP NANP抗体の産生を刺激し、その応答はアルミ（Alum）の使用により増強された。

【図 1】

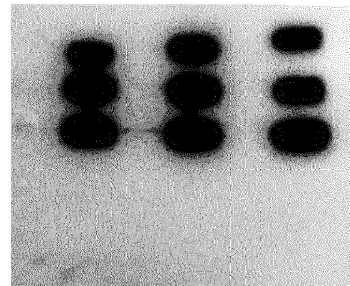


【図 2】

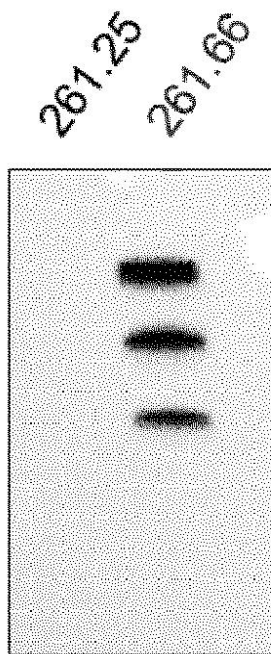


【図 3】

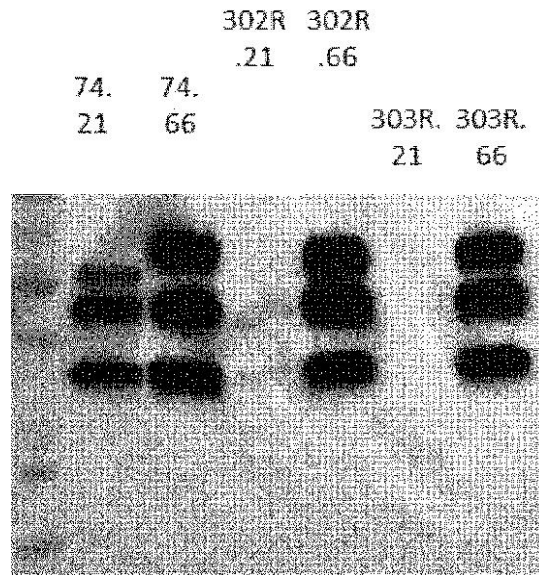
74.	74.	76.	76.	78.	78.
21	26	21	26	21	26



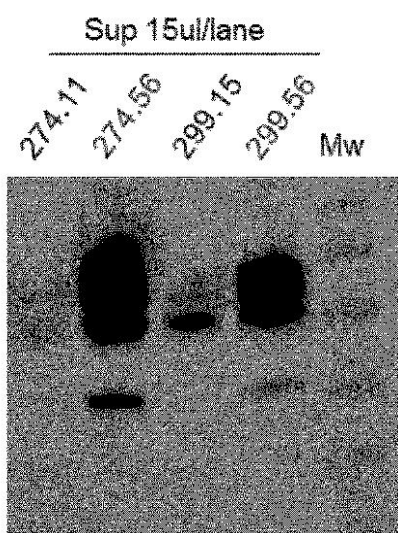
【図 4】



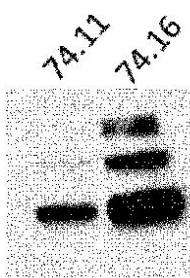
【図 5】



【図 6】



【図 7】

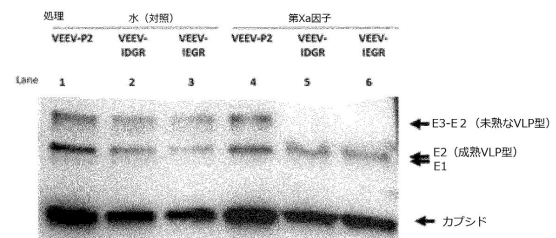


【図 8】



CHIKV- Xa ; フーリン認識部位を第Xa因子認識モチーフ (IDGR) に置換  
CHIKV- En ; フーリン認識部位をエンテロキナーゼ認識モチーフ (DDDDK) に置換

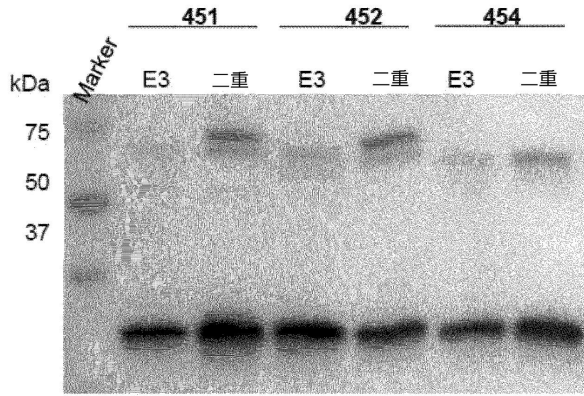
【図 9】



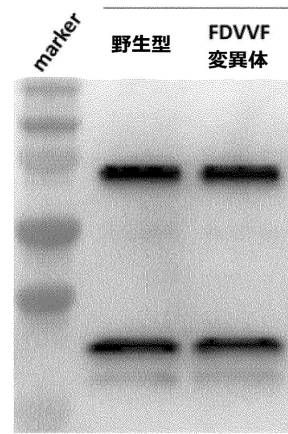
VEEV- IDGR ; フーリン認識部位を第Xa因子認識モチーフ (IDGR) に置換  
VEEV- IEGR ; フーリン認識部位を第Xa因子認識モチーフ (IEGR) に置換



【図 1 0】

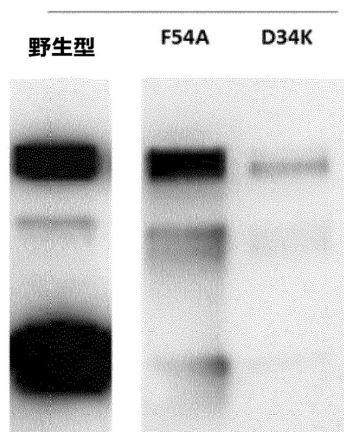


【図 1 1】

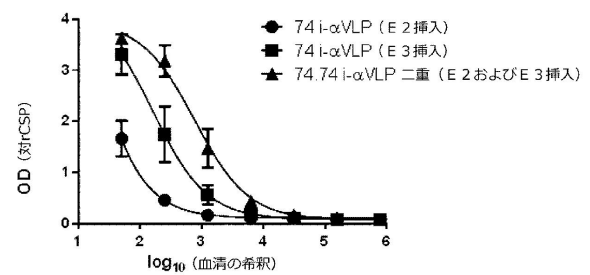
ヒトIL-2 野生型および変異体 i- $\alpha$ VLP

プロットティング ; 抗CHIKVマウス血清1:1000

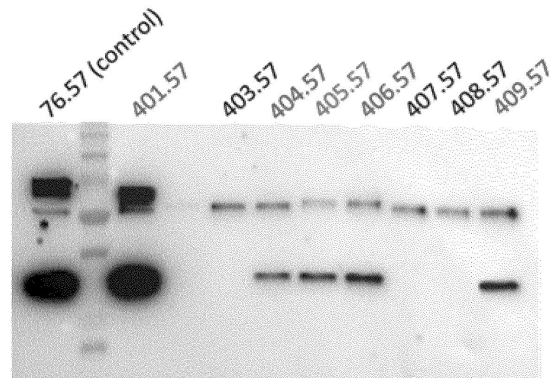
【図 1 2】

マウスIL-2 野生型および変異体 i- $\alpha$ VLP

【図 1 4】

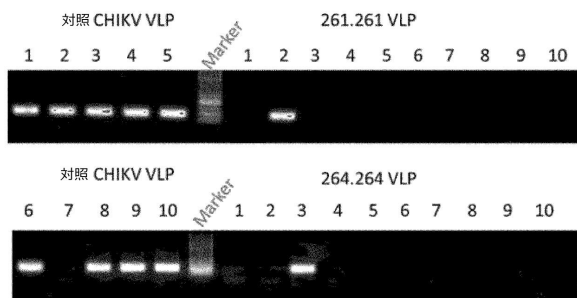


【図 1 5】

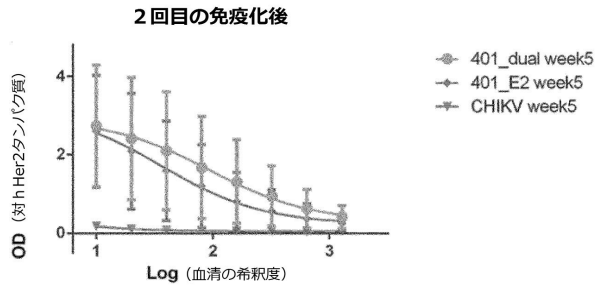


CHIKV VLP免疫化マウスの血清1:1000

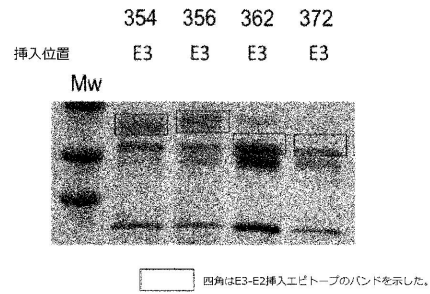
【図 1 3】



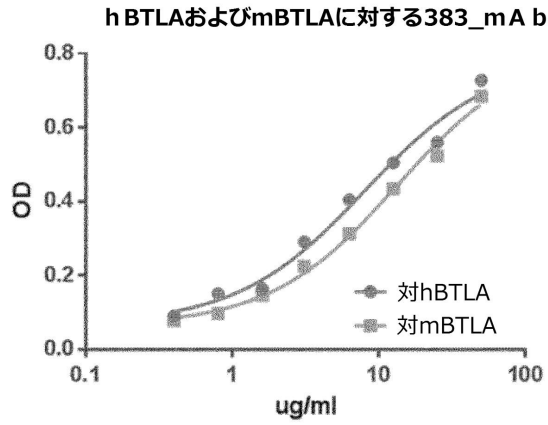
【図 16】



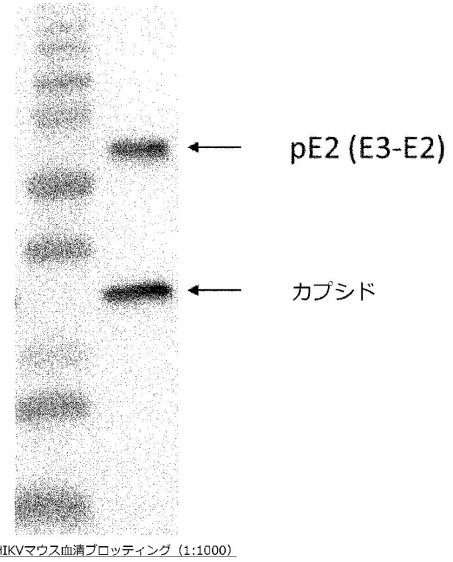
【図 18】



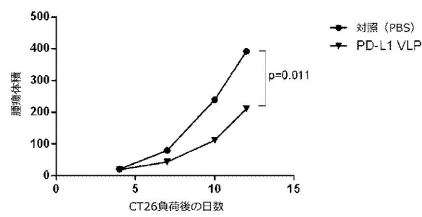
【図 17】



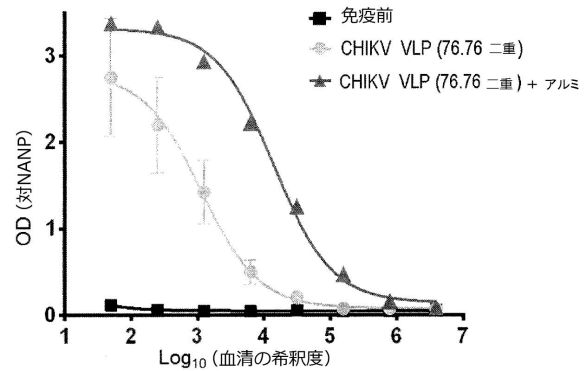
【図 19】



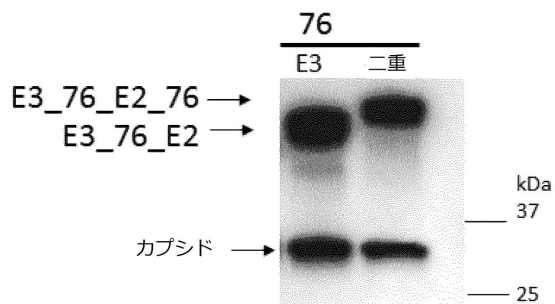
【図 20】



【図 22】



【図 21】



【配列表】

0006824154000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K	39/12	(2006.01)	A 6 1 K 39/12
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 K	39/015	(2006.01)	A 6 1 K 39/015
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K 39/00 G
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	33/06	(2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P 33/06
			A 6 1 P 37/04

(31)優先権主張番号 62/101,514

(32)優先日 平成27年1月9日(2015.1.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/120,569

(32)優先日 平成27年2月25日(2015.2.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/198,949

(32)優先日 平成27年7月30日(2015.7.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

## 前置審査

(72)発明者 赤畑 渉

アメリカ合衆国 2 0 8 9 5 メリーランド州ケンジントン、ホワイト・フrint・ドライブ 5 2 1 1 番

(72)発明者 上野 隆司

アメリカ合衆国 2 1 6 0 1 メリーランド州イーストン、マラード・ドライブ 2 8 3 0 7 番

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 2 2 2 6 2 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 2 / 1 7 2 5 7 4 (WO, A 1)

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2 0 0 8 年, 283(2), 21899-21908

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

A 6 1 K

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq