

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年8月19日(19.08.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/092963 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01) A61P 33/06 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/015 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/051915
- (22) 国際出願日: 2010年2月10日(10.02.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-028134 2009年2月10日(10.02.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 琉球大学 (University of the Ryukyus) [JP/JP]; 〒9030213 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 Okinawa (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 新川 武 (ARAKAWA Takeshi) [JP/JP]; 〒9030213 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 国立大学法人琉球大学 熱帯生物圏研究センター 分子生命科学研究施設内 Okinawa (JP). 宮田 健 (MIYATA Takeshi) [JP/JP]; 〒9030213 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 国立大学法人琉球大学 熱帯生物圏研究センター 分子生命科学研究施設内 Okinawa (JP). 松崎 吾朗 (MATSUZAKI Goro) [JP/JP]; 〒9030213 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 国立大学法人琉球大学 熱帯生物圏研究センター 分子生命科学研究施設内 Okinawa (JP). 坪井 敬文 (TSUBOI Takafumi) [JP/JP]; 〒7910202 愛媛県東温市樋口1246-1 Ehime (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 小野国際特許事務所 (The Patent Corporate body of Ono & Co.); 〒1010024 東京都千代田区神田和泉町1-13-1 水戸部ビル4階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2010/092963 A1

- (54) Title: DRUG TRANSPORTER, AND ADJUVANT AND VACCINE EACH UTILIZING SAME
- (54) 発明の名称: 薬物運搬体並びにこれを利用したアジュバントおよびワクチン
- (57) Abstract: Disclosed is a drug transporter which can deliver a vaccine, an adjuvant or the like to a target cell or tissue efficiently, and which can improve the immunogenicity of a vaccine or can enhance the immunostimulating activity of an adjuvant. Also disclosed is a vaccine or an adjuvant which utilizes the drug transporter. The drug transporter is characterized by comprising a polymeric protein having a coiled-coil structure and a ligand molecule for a receptor of an immunocyte.
- (57) 要約: 本発明は、ワクチンやアジュバント等を標的とする細胞や組織に効率的に到達させるとともに、ワクチンの免疫原性を向上させ得る、またはアジュバントの免疫賦活作用を増強し得る薬物運搬体およびこれを利用したワクチンまたはアジュバントを提供することを目的とする。当該薬物運搬体は、コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質および免疫細胞のレセプターに対するリガンド分子とを含むことを特徴とする。

明 細 書

発明の名称：

薬物運搬体並びにこれを利用したアジュバントおよびワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、新規な薬物運搬体に関し、より詳細には、汎用性および安全性が高く、薬剤を効果的に標的細胞または組織に到達させることが可能であり、特にアジュバントやワクチンを搭載することにより、アジュバントの免疫賦活効果やワクチンの免疫原性を向上させることが可能な薬物運搬体並びにこれを利用したアジュバントおよびワクチンに関する。

背景技術

[0002] 感染症予防や癌などに対する新たな治療法の確立のために、細胞・組織特異的な薬物運搬システムの開発が行われている。感染症予防に対してこれまで様々なワクチンやアジュバント（免疫賦活機能性物質）が開発されてきた。従来ワクチンは、ウイルスや細菌を弱毒化したり不活化したものが主であったが、近年の遺伝子工学技術の発達により、特定の病原体由来の抗原を大量に生産できるようになり、より安全性の高いコンポーネントワクチンの開発が可能となった。しかしながら、その反面、高純度に精製されたりコンビナントタンパク質の免疫原性が低下するという問題も生じていた。

[0003] コンポーネントワクチンの免疫原性を向上させるために、抗原と補体4結合タンパク質（C4bp）との融合タンパク質をワクチンとして利用する技術が提案されている（特許文献1）。しかしながら、この技術では抗原を会合させることは可能であるが、抗原を部位特異的に運搬する能力はないという問題があった。

[0004] また、ワクチンの中でも、特に経口および経鼻などの粘膜ワクチンは粘膜面での免疫応答が低いため、防御効果の高い抗原を見出しても、有効な粘膜アジュバント（免疫賦活機能性物質）なしには十分な効果が得られないのが実情であった。臨床応用可能なアジュバントとしては、アルミニウム塩など

が知られているが、粘膜では有効性は示すことができず、さらに副反応誘発の懸念もある。粘膜アジュバントとしてはコレラトキシン（CT）が知られているが、毒素関連分子であり安全性の面から実験的なレベルでの使用にとどまっている。さらに、これらのアジュバントはワクチンと混合投与されているが、このような使用方法ではアジュバントが粘膜のバリアを超えることができず十分な効果が発揮されない場合もあった。

[0005] 一方、コイルドコイル構造を形成するタンパク質と融合させたタンパク質の可溶性や安定性を向上させる技術が提案されており（特許文献2）、コイルドコイル構造タンパク質を用いた新しい機能性物質の創製が期待されている。また、コイルドコイル構造を形成するタンパク質を用いて、コイルドコイルタンパク質に融合させたペプチドによる薬物ターゲティング及び送達システムの技術が提案されている（特許文献3）。これはコイルドコイルタンパク質を利用したナノ粒子を作製する方法であり、融合させたペプチドを送達させる為の足場として利用する技術である。しかしながら、これは融合させたペプチドを能動的でなく、受動的に送達する技術であるため効率的ではない。能動的に送達するためにはペプチドを標的化機能性物質として用いる必要があるが、ナノ粒子構造の場合は融合させたペプチドが立体構造的な障害によって、標的レセプターへの結合機能を十分に発揮しないという問題がある。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特表2007-528210号公報
特許文献2：特表2008-514585号公報
特許文献3：特表2006-519781号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] したがって、ワクチンやアジュバント等を標的とする細胞や組織に効率的

に到達させるとともに、ワクチンの免疫原性を向上させ得る、またはアジュバントの免疫賦活作用を増強し得る運搬システムの開発が切望されており、本発明はそのような薬物運搬体およびこれを利用したワクチンまたはアジュバントを提供することを課題とするものである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、ナノ粒子構造を形成せずに、コンパクトな状態のコイルドコイル構造の多量体タンパク質と、立体構造障害を軽減させるデザインで免疫応答細胞レセプターに対するリガンド分子とを融合した担体に、ワクチンやアジュバント分子を搭載することにより、効率的に標的組織または細胞に運搬することが可能であるとともに、優れた免疫賦活効果を示すことを見出し本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち本発明はコイルドコイル構造の多量体タンパク質および免疫担当細胞のレセプターに対するリガンド分子とを含む薬物運搬体である。

[0010] また本発明は、上記薬物運搬体にアジュバント分子が結合してなるアジュバントである。

[0011] さらに本発明は、上記薬物運搬体にワクチン分子が結合してなるワクチンである。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、標的組織または細胞へアジュバントまたはワクチンを有効に到達させることができ、またワクチンの免疫原性あるいはアジュバントの免疫賦活効果を増強することが可能である。さらに、構成する分子群の設計の自由度が高いため汎用性が高く、かつ安全性にも優れるものである。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例3におけるELISAデータを示す図である。

[図2]実施例4におけるマラリア原虫伝搬阻止解析の結果を示す図である。

[図3]実施例5におけるB細胞への標的化の結果を示す図である。

[図4]実施例8におけるELISAデータを示す図である。

[図5]実施例9におけるマラリア原虫伝搬阻止解析の結果を示す図である。

[図6]実施例11におけるマラリアメロゾイト期の抗原に対する抗体応答の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0014] 本発明の薬物運搬体は、コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質および免疫担当細胞のレセプターに対するリガンド分子とを含むものである。
- [0015] コイルドコイル構造の多量体タンパク質としては、種々のものが使用可能であり、例えば「The structure of α -helical coiled coils」(Adv Protein Chem. 2005;70:37-78 Andrei N. Lupas, Markus Gruberら)に記載のタンパク質が例示できる。多量体タンパク質を構成する単量体の数は特に限定されないが、2~7量体が好ましく、特に2~5量体が好ましい。この範囲であると、熱安定性に優れるとともに、免疫担当細胞のレセプターと親和性が向上し免疫原性が増強される。また、アミノ酸残基の数も特に限定されないが、通常20~80程度であり、好ましくは50~60である。この範囲であると、安定でコンパクトかつ抗原等を化学的に結合させる際の足場として機能する優位性があるために好ましい。
- [0016] 好ましいコイルドコイル構造の多量体タンパク質として具体的には、COMP (cartilage oligomeric matrix protein、5量体)、好熱菌Staphylothermus marinus由来で130°Cまでの耐熱性をもつテトラブラキオンコイルドコア (TBCC、4量体)、レオウイルス (Reovirus) 由来で粘膜上皮に存在するM細胞接着性を示す σ 1タンパク質 (3量体) 等のパラレル型コイルドコイル構造の多量体タンパク質が例示できる。これらの中でもCOMP、TBCCが好適に用いられる。COMPは、コイルドコイル構造として非常に安定で、熱耐性が高いために好ましい。またTBCCは130°Cという極度な熱安定性を保持しているために不安定な分子を組み合わせる場合にさらに好ましい (J. Mol. Biol. 1995;245, 385-401 Peter J, Nitsch Mら)。一方、アンチパラレル型コイルドコイル構造を持つヘパチスデルタウイルス (Hepatitis delta virus) 由来のヘパチスデルタ抗原 (HDAg、2量体) を使用することもできる。このようなアンチパラレル型コイルドコイル構造はそれ自身がスペーサー的機能を有し、よりコン

パクトな状態で免疫担当細胞レセプターとの結合が可能であるため有利である。

[0017] 配列番号 1 はCOMP、配列番号 2 はテトラブラキオン、配列番号 3 は σ 1タンパク質、配列番号 4 は、ヘパチチスデルタ抗原、配列番号 3 4 はTBCCのアミノ酸配列である。本発明のコイルドコイル構造の多量体タンパク質は、これらのアミノ酸配列のうち、オリゴマー形成ドメイン (OD) のアミノ酸配列からなるポリペプチドであってもよい。配列番号 5 は、COMPのODであり、配列番号 6 は、そのうちの保存領域である。また、これらのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドも包含される。さらに上記アミノ酸配列との相同性が、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上であるアミノ酸配列からなるポリペプチドも包含される。

[0018] 一方、免疫担当細胞レセプターに対するリガンド分子は、種々のポリペプチド、オリゴ糖、核酸、脂質等が使用可能であるが、具体的には、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) プロテインA由来の抗体結合ドメイン、Group G ストレプトコッカス (*Streptococcus*) G148由来Gタンパク質 (SpG) のB1ドメイン (SpG-B)、ファインゴルディア・マグナ (ペプトストレプトコッカス・マグナス) (*Finegoldia magna* (*Peptostreptococcus magnus*)) 由来のLタンパク質、補体系分子C3d、およびエルシニア・シュードチュベルキュロシスインベーシン (*Yersinia pseudotuberculosis* *invasin*) 等が例示できる。配列番号 7 はプロテインA由来の抗体結合ドメイン (Zドメイン)、配列番号 8 はストレプトコッカスG148由来Gタンパク質のB1ドメイン、配列番号 9 はファインゴルディア・マグナ (ペプトストレプトコッカス・マグナス) 由来のLタンパク質、配列番号 10 は補体系分子C3d、配列番号 11 は、エルシニア・シュードチュベルキュロシスインベーシンのアミノ酸配列であり、本明細書において、免疫担当細胞レセプターに対するリガンド分子には、上記特定のアミノ酸配列で示されるタンパク質だけでなく、これらのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列か

らなるポリペプチドが包含される。また、上記アミノ酸配列との相同性が、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上であるアミノ酸配列からなるポリペプチドも包含される。

[0019] これらのうち、スタフィロコッカスプロテインA由来抗体結合ドメインは58アミノ酸残基から構成され、分子量にして約6 kDaのタンパク質であるが、構造は三つの α -helixから成るコンパクトな形状をとり、この中のひとつの α -helixがイムノグロブリンのFc或いはFab領域と相互作用する。またSpGの構成ドメインであるB1ドメイン (SpG-B) は、B細胞レセプター (BCR) との結合力が高い。一方、自然免疫のエフェクター因子のひとつである補体系分子C3dは、B細胞や濾胞状樹状細胞に存在する補体レセプターのひとつCR2 (CD21) に結合するとともに、CR2はB細胞の補助レセプター複合体の重要な成分でB細胞の抗原に対する感受性を高めるために、リガンド分子のみならずアジュバントとしても機能するために好ましい。さらに、エルシニア・シュードチュベルキュロシスインベーションを用いると、M細胞上に発現する β 1インテグリンを標的とすることができる。

[0020] 本発明の薬物運搬体は、コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質と、免疫担当細胞のレセプターに対するリガンド分子とが化学的または遺伝子工学的に結合されたものであるが、中でもコイルドコイル構造を有する分子的安定性の高い多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質と、免疫担当細胞のレセプターに対するリガンドタンパク質とが結合した融合タンパク質を発現させ、それをin vivo或いはin vitroで会合により多量体形成させたものであることが好ましい。融合タンパク質中の2つのドメインの融合化には、N末端、C末端のいずれの位置でもよく、免疫担当細胞のレセプターに対するリガンドタンパク質が、コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質のN末端またはC末端に融合してもよい。または、単量体タンパク質中の反応性置換基と化学的に結合してもよいが、好ましくは、末端への遺伝子工学的結合である。リガンドタンパク質は、直接あるいはリンカー配列を介して、コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を

構成する単量体タンパク質に融合させることができるが、例えば、4~30個のアミノ酸残基、好ましくは10~25個のアミノ酸残基を有するペプチドであるリンカー配列を介して融合させることにより、レセプターとの結合において立体構造形成における分子間相互干渉を低減させることができ、またその柔軟性によってレセプターとの結合時において有利に作用するために好ましい。

[0021] このようなリンカー配列としては、特に限定されないが、例えばGPGPもしくはGGGGS (G_4S) の組み合わせによる配列を用いることができる。また、(G_4S) が1~4回繰り返された配列 ($(G_4S)_1 \sim (G_4S)_3$) を用いてリンカーとして使用することもでき、さらにこれにGPGPを組み合わせてもよい。さらに、リンカー配列中に、精製タグを挿入してもよく、例えば、His₆ (H_6) をリンカー配列に挿入することができる。好ましい例として、GPGP (G_4S) H_6 (G_4S) GPGPが例示できる。この配列中、(G_4S) 部分を繰り返し配列 ($(G_4S)_1 \sim 3$) に変えることも可能である。またGPGPH₆GPGPや $G_4SH_6G_4S$ の配列もリンカー配列として利用可能である。

[0022] 上記コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質および免疫担当細胞のレセプターに対するリガンド分子とを含む融合タンパク質は、通常の遺伝子工学的手法によって製造することが可能である。すなわち、上記コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列と免疫担当細胞のレセプターに対するリガンドタンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列とを発現ベクター上で連結し、この発現ベクターを用いて適切な宿主を形質転換することにより融合遺伝子の発現産物（目的の融合タンパク質）が得られる。

[0023] 発現ベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、人工染色体ベクター等が挙げられるが、簡便な取り扱いとコストの観点からプラスミドベクターが好ましい。具体的には、例えば、宿主が大腸菌の場合には、pET-22b、pET-21d等が挙げられる。発現ベクターには、

遺伝子発現に調節的役割を持つプロモーター、エンハンサー等の調節配列が含まれていてもよい。発現ベクターに融合タンパク質をコードするDNAの塩基配列を連結するには、制限酵素末端連結等の公知方法により行うことができる。

- [0024] このようにして作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、発現ベクターを含有する形質転換細胞を得ることができる。宿主としては、大腸菌、酵母、哺乳動物細胞株等の公知のものが挙げられる。大腸菌としては、BL21株、DH5アルファ等が例示できる。酵母としては、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられる。
- [0025] 宿主細胞への発現ベクターの導入は、宿主細胞に応じて公知の方法によって行うことができ、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法等が例示できる。導入後、選択マーカールを含む培地で培養することにより、前記発現ベクターが宿主細胞中に導入された形質転換細胞を選択することができる。
- [0026] 以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な条件下で培養することにより、融合タンパク質を産生することができる。発現した融合タンパク質は、自発的にオリゴマー化して多量体を形成し、細胞内で蓄積あるいは細胞外へ分泌される。得られたタンパク質は、一般的な精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等各種精製法が挙げられる。
- [0027] 上記のようにして得られる融合タンパク質からなる薬物運搬体として、配列表23で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものが例示できる。これはCOMPのオリゴマー形成ドメインの保存領域（配列番号6）とスタフィロコッカスプロテインA由来抗体結合ドメイン（配列番号7）がフレキシブルリンカー (GPGP (G₄S) H₆ (G₄S) GPGP) を介して結合したものであり、5量体を形成する。本発明の薬物運搬体には、このアミノ酸配列で示されるタンパク

質だけでなく、これらのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドが包含される。また、上記アミノ酸配列との相同性が、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上であるアミノ酸配列からなるポリペプチドも包含される。

[0028] かくして得られた融合タンパク質からなる薬物運搬体には、種々の薬物を搭載することができ、例えば、アジュバント分子、ワクチン分子、生理活性分子（薬物分子）等が例示できるが、特にアジュバント分子またはワクチン分子を搭載することが好ましい。使用可能なアジュバント分子またはワクチン分子としては、特に限定されず、従来公知のものが使用できる。具体的には、アジュバント分子として、コレラトキシン（CT）、コレラトキシンBサブユニット（CTB）、コレラトキシンAサブユニット（CTA）、百日咳菌毒素（PT）、百日咳菌毒素S1サブユニット（PTS1）、Toll様受容体9（TLR9）リガンド、Toll様受容体4（TLR4）リガンド等が例示できる。これらのうち、CTAとPTS1は、NF- κ B経路の活性化を誘導できるために好ましい。また、TLR9リガンドとしては、例えば、非メチル化CpGモチーフを有するoligodeoxynucleotides（CpG ODN）等が例示でき、TLR4リガンドとしては、内毒素（endotoxin）の一部であるリピッドAを無毒化したMonophosphoryl lipid A（MPLA）等が例示できる。

[0029] これらのアジュバントを利用した場合の作用機構としては、エンドソームを介したMHC class IIによる外来抗原提示ルートが主たる取り込み経路であり、主に抗体応答増強による免疫賦活効果と考えられる。

[0030] 一方、膜透過性機能を有するカチオン性ペプチドもアジュバント分子として使用でき、具体的には、ポリアルギニン、ポリリジン、Tat₄₉₋₅₇ペプチド、ペネトラチン等の膜転位配列、シグナル配列由来ペプチド等が例示できる。これらは細胞性免疫の誘導に対しても有効であり、細胞内寄生性細菌、がん、アレルギー等に有効であると考えられる。

[0031] ワクチン分子としては、種々の節足動物媒介性疾患、寄生虫起因、細菌性

またはウイルス性の感染症ワクチン候補抗原が利用可能であり、具体的には、日本脳炎ウイルス外殻タンパク質、マラリア原虫表層タンパク質、日本住血吸虫などの病原体由来の抗原が例示でき、これらのエピトープを含むポリペプチドが包含される。これらは抗体産生や細胞性免疫の誘導に対して有効であると考えられる。

[0032] このようなアジュバント分子またはワクチン分子は、融合タンパク質である薬物運搬体と直接あるいはリンカー配列を介して化学的または遺伝子工学的に結合される。アジュバント分子またはワクチン分子と運搬体融合タンパク質との結合は、いずれの可能な位置でもよく、コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質に対して、免疫担当細胞のレセプターに対するリガンドタンパク質と反対のN末端またはC末端に結合してもよく、あるいは、多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質中の反応性置換基に結合してもよいが、好ましくは、末端への融合である。

[0033] 化学的に結合させる手法としては、クロスリンカーを用いて、タンパク質に存在するアミノ基やチオール基（SH基）、タンパク質に存在する糖鎖のアルデヒド基などを利用して結合させる事ができるが、用いる官能基に制限はない。例えば、コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質のSH基とアジュバントまたはワクチンタンパク質中のアミノ基とを反応させる方法が例示でき、より具体的には、ジチオトレイトール（DTT）等の還元剤により還元処理した融合タンパク質と、N-スクシニル- γ -（2-ピリジルジチオ）プロプリオネート（SPDP）によりピリジルジスルフィド基を導入したアジュバントまたはワクチンタンパク質とをインキュベートすることによって結合させることができる。結合させるアジュバント分子またはワクチン分子は、コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質に対して、1分子以上であってもよい。クロスリンカーには化学物質からなるホモファンクショナルタイプ、ヘテロファンクショナルタイプなどが利用でき、その利用に制限はない。さらにビオチン、アビジンなどの生体分子同士の相互作用を利用した結合を利用することで化学的に結合することもできる。

[0034] 一方、遺伝子工学的に結合させる場合には、上記コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列と免疫担当細胞のレセプターに対するリガンドタンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列とを連結させ、発現ベクターにサブクローニングする。また、アジュバントタンパク質またはワクチンタンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列をも連続して連結させることが可能であり、上記と同様にして発現させることにより三部から構成される融合遺伝子全体の遺伝子発現産物として融合タンパク質を得ることができる。発現したアジュバントまたはワクチン-運搬体融合タンパク質も、自己集合して多量体を形成する。

[0035] かくして得られた融合体アジュバントまたはワクチンは、経口、経鼻、皮下、静脈内、腹腔内等任意の経路で投与できる。また、アジュバントまたはワクチンの用量は、アジュバントまたはワクチンの種類等によって適宜設定されるが、例えば、三日熱マラリア原虫の伝搬阻止抗原であるPvs25を結合したワクチンの場合、成人1用量あたり、通常5~100 μ g程度である。

[0036] 本発明のアジュバントまたはワクチンは、効率的に標的細胞・組織に到達可能であるとともに、免疫賦活効果または免疫原性を増強させることができるものであるが、これは免疫担当細胞に直接抗原を提示できる能力により、抗原取り込みの効率化を促進し、抗体産生応答及び細胞性免疫を増強するとともに、多量体を形成するため、免疫担当細胞の受容体を凝集、クロスリンクさせることによって、免疫担当細胞に対し効率良く細胞生理学的な刺激を与え、それに続く細胞内シグナル伝達誘導が増強されるためと考えられる。

実施例

[0037] 次に実施例等を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例等に限定されるものではない。

[0038] 実施例 1

COMP-Z運搬体の作製：

(COMP ODのクローニング)

下記の方法によりCOMPのオリゴマー化ドメイン (oligomerization domain : OD) をクローニングした。すなわち、COMP ODの55アミノ酸残基 (配列番号 5) にスペーサー配列として $(G_4S)_3$ のアミノ酸配列を付加した産物を得るため、配列番号 12 のセンスプライマーと配列番号 13 のアンチセンスプライマーを作製し、アニールさせた後にpCR2.1ベクターに導入し、サブクローニングした。

COMP ODのサブクローニング完了後、塩基配列を確認し、再度配列番号 14 のセンスプライマーおよび配列番号 15 のアンチセンスプライマーを用いてPCRでCOMP OD遺伝子を増幅し、制限酵素NcoI, XhoIで処理した後に大腸菌発現ベクターであるpET-22bのNcoI-XhoI部位にサブクローニングし、大腸菌DH5 α に一般的なリン酸カルシウム法によって形質転換した。さらに、ベクターに存在する薬剤耐性マーカーであるアンピシリンによってスクリーニングを行ない、目的の遺伝子導入クローンを選択した。そのクローンをタンパク質発現大腸菌株であるBL21 (DE3)に再度、リン酸カルシウム法によって形質転換し、アンピシリンによるスクリーニング後、COMP ODの発現コンストラクトを構築した。本発現株は一般的なLB-アンピシリン含有 (LB-Amp) 培地100m lで37°C一昼夜、前培養し、つづいて250m lのLB-Amp培地4本にOD600 nm = 0.1になるように植菌し、37°Cで1.5時間培養した。この時点で濁度OD 600 nmを測定し、OD = 0.4から0.6であることを確認し、最終濃度が1mMになるようにイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を加えて、37°Cで一昼夜培養し、タンパク質の発現誘導を行なった。発現誘導後、培養上清を遠心分離し (8,000 rpm、20min、4°C、2times)、0.45マイクロメートルのフィルターで濾過後にHis-tagカラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーで精製し、精製タンパク質の一部を15%アクリルアミド濃度SDS-PAGEを行なうことで、COMP OD部分の発現を確認した。

[0039] さらにCOMP ODの保存領域だけを選択し46アミノ酸配列のよりコンパクトな配列 (配列番号 6) だけを使用したCOMP ODを以下の方法により発現させた (COMP (Gly27-Gly72))。

COMP (Gly27-Gly72) 部分だけを増幅するために先に構築したpET-22b-COMP 0Dを鋳型にし、配列番号16のセンスプライマーおよび配列番号17のアンチセンスプライマーを用いてPCRを行い、COMP (Gly27-Gly72) 部分を増幅し、制限酵素NcoI、XhoIで処理した後に発現ベクターであるpET-22bのNcoI-XhoI部位にサブクローニングし、COMP (Gly27-Gly72) の発現コンストラクトを構築した (pET-22b-COMP (Gly27-Gly72))。塩基配列を確認後、発現解析を行い、本コンストラクトは培養上清にCOMP (Gly27-Gly72) を優位に分泌発現することが分かった。

[0040] (リンカー領域の導入)

次にCOMP (Gly27-Gly72) 部分にリンカー領域を導入した。リンカー領域としてGPGPとG₄Sを組み合わせ、さらにリンカー領域にタンパク質精製用タグとして使われるHis₆を併用したGPGP (G₄S)₆ (G₄S) GPGP (配列番号18) からなるリンカー領域をCOMP 0DのC末端部分に導入した。具体的なリンカー導入方法としては5' をリン酸化した配列番号19のセンスプライマーおよび配列番号20のアンチセンスプライマーを用いてリンカー領域をアニールさせた後、pET-22b-COMP (Gly27-Gly72) のXhoI部位にサブクローニングして構築を行った (pET-22b-COMP (Gly27-Gly72)-flexible linker)。塩基配列を確認後、発現解析を行い、本コンストラクトはCOMP (Gly27-Gly72) 同様に培養上清にCOMP (Gly27-Gly72)-flexible linkerを優位に分泌発現することが分かった。

[0041] (リガンド部分の融合)

上記COMP (Gly27-Gly72)-flexible linkerに下記方法によりリガンド部分の構築を行なった。リガンドとしてStaphylococcus aureus 由来タンパク質Protein A (SpA) 由来のBドメインホモログである抗体結合ドメイン(Zドメイン) を用いた (配列番号7)。このZドメインを先に構築したCOMP (Gly27-Gly72)-flexible linkerのC末端側に遺伝子工学的に融合させ構築した。具体的には配列番号21のセンスプライマーおよび配列番号22のアンチセンスプライマーの合成オリゴを作製し、アニールさせた後にpCR2.1ベクターに導入し、Zドメインのクローニングを完了した。塩基配列を確認後、制限酵素SalI、Xho

1で処理した後に、pET-22b-COMP(Gly27-Gly72)-flexible linkerのXhoI部位にサブクローニングして構築を完了させた(pET-22b-COMP-Z)。

[0042] (COMP-Zタンパク質の培養、発現誘導及び精製方法)

pET-22b- COMP-Zを含有する大腸菌BL21 (DE3) 株のフリーズストックから10 μ lを100 mlの LB-Amp培地に植菌し、37°Cで一昼夜前培養した。つづいて250 mlのLB-Amp培地4本にOD600 nm = 0.1になるように植菌し、37°Cで1.5時間培養した。この時点で濁度OD 600 nmを測定し、OD = 0.4から0.6であることを確認し、最終濃度が1mMになるようにイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG)を加えて、37°Cで一昼夜培養し、タンパク質の発現誘導を行なった。発現誘導後、全ての培養液を統一し、遠心分離し(8,000 rpm、20min、4°C、2times)、菌体と培養上清に分離した。その際、培養上清の一部を発現解析用に回収した。つづいて、培養上清を0.45 マイクロメートルのフィルターで濾過し、クロマトアプライ用サンプルとして調整した。COMP-ZのアフィニティークロマトグラフィーにはIgGセファロース樹脂(GEヘルスケア社)10 mlをオープンカラムに詰めて精製カラムを用意した。カラムの平衡化溶液としてカラム容量の2~3倍量のTST緩衝液(pH 8.0)でpHが8.0になるまで平衡化し、次にカラム容量の2~3倍量の0.5 M酢酸溶液(pH 3.5)を流した。これもpHが3.5になるまで平衡化し、このステップを二回繰り返す、最終的にTST緩衝液(pH8.0)でpHが8.0になるまで平衡化した(TST→酢酸→TST→酢酸→TST)。

次に調整したサンプル溶液を自然落下、もしくはペリスタポンプ等でカラムにアプライし、アフィニティークロマトグラフィーを実施した。

サンプルアプライ終了後、次に洗浄を行なった。10倍量のTST緩衝液(pH 8.0)で洗浄し、次に2倍量の0.5 M酢酸アンモニウム溶液(pH 5.5)で洗浄した。洗浄後、溶出buffer(0.5 M酢酸溶液(pH 3.5))を用いて50 mlで溶出した。培養上清、素通り画分、洗浄画分、溶出画分を15%アクリルアミド濃度SDS-PAGEで解析した。泳動後、発現パターンを確認し、溶出画分に発現が確認出来たら、限外濾過膜(Amicon Ultra-4 50K)にて濃縮し、PBSで置換した。PIERC E社のBCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid)試薬を用いたBCA法

により定量したところ、COMP-Z融合タンパク質の濃度は6 mg/mlであり、総タンパク質量は30mgとなった。

[0043] (COMP-Zのエンドトキシン除去処理)

大腸菌で作製したリコンビナントはエンドトキシンの混入が考えられるため、免疫実験を行なうにあたってエンドトキシンの除去およびタンパク質溶液のエンドトキシン濃度を検定した。

COMP-Zは高分子量のタンパク質であるのに対し、エンドトキシンは約10 kDaなので50 kDaの透析膜による処理を行なった。透析外液としてはPBSを用い4℃で数時間毎に外液を交換することで最終的に一昼夜透析した(約4~5回の1LのPBSによって透析した)。

この透析済みサンプルをエンドトキシン除去カラム(PIERCE社; Detoxi-Gel Endotoxin Removal Gel)にアプライし、エンドトキシンを除去した。エンドトキシン除去カラム後のサンプルをBCA定量し、リムルス試験(LAL)によりエンドトキシン濃度を検定した。

すなわち、LALのPyrogen Single Test 25回用を用いて最終容量を0.25 mlに希釈したサンプルを用いて検査した。サンプルの希釈にはエンドトキシンフリー水を用いた。必要濃度に調整したサンプル溶液を注射器でバイアルに注入し、軽く混合し、転倒しないように箱等に入れて37℃で一時間反応させた。反応後、静かに取り出して逆さにし、凝固していたら、エンドトキシン陽性、凝固してないもしくは溶液が一部溶けて落ちてくる場合はエンドトキシン陰性と判断した。陰性になる希釈ポイントの一段階前がエンドポイントと定義されるので、そこからエンドトキシンのUnit数を計算し、500 pg エンドトキシン/ μ g of proteinのレベル以上であった場合には、再度エンドトキシン除去カラムにアプライし、同様の操作を500 pg エンドトキシン/ μ g of protein以下となるレベルまで繰り返し行った。

[0044] 実施例 2

ワクチン-運搬体融合体の作製(1) :

三日熱マラリア原虫の伝搬阻止抗原であるPvs25をCOMP-Zの内部に存在する

SH基を利用し、化学的結合によってCOMP-Zに融合した。ワクチン抗原Pvs25は酵母*Pichia pastoris*で発現した均一な立体構造を持つPvs25H Aフォーム (Pvs 25H-A) を用いた。融合に必要なクロスリンカーとしてSPDPを用い、以下のような反応経路で融合体COMP-Z/Pvs25H-Aを完了させた。

融合に関しては、COMP-Z 5量体 (1 mg; 373 μ l; 13,793 pmol;) Pvs25H-A (2.84 mg; 499 μ l; 137,864.08pmol)で行なった (COMP-Zの分子量は72.5 kDa、Pvs25H-Aの分子量は20.6 kDaであり、COMP-Zが1 molに対してPvs25H-A 10 molである。)

(還元処理)

まずCOMP-ZのSH基を還元型にするために還元処理を行なった。COMP-Zは大腸菌で発現させた状態のままでも還元型SH基を有しているが、最大限利用できるSHの数を増加させるためである。COMP-Z 1mgを1,379.3 nmolのDTTを加えた後、37°Cで30分間反応させた。その後、限外濾過膜 (Amicon Ultra-4 10 K; 5000 x g 20 min×4 times with PBS) でDTTを除去した。

(融合処理)

使用直前にSPDP 2 mgを320 μ lのDMSOに溶解し、20 mM SPDP溶液を調製した。20 mM SPDP溶液 45 μ lを2.84 mgのPvs25H-A (1.5 mlにPBSで調整)を加え、60分間室温でインキュベートした (Pyridyldithiol-activated Pvs25H-Aの作製)。限外濾過膜 (Amicon Ultra-4 10k; 5000 x g 20 min×4 times with PBS) を用いて精製し、化学反応の副産物と過剰なSPDPを除去した。精製したPyridyldithiol-activated Pvs25H-A (solution volumeは200 μ l) に還元処理済みの1mg COMP-Z (240 μ l)を加え、一晩室温でインキュベートした。Amicon Ultra-4 10k (5000 x g 20 min×4 times) を使用し、化学反応の副産物 (Pyridine 2-thione) を除去し、PBSにバッファー交換して融合タンパク質COMP-Z/Pvs25H-Aを得た。

[0045] (結合パートナー分子の定量)

ワクチン融合運搬体の濃度をBCAで定量した。得られたワクチン融合運搬体 (COMP-Zあたりが) 100 μ gとコントロールとして実施例1で得られたCOMP-Z

100 μ gについてTotal 300 μ lにfill upして、IgGセファロース (TSTで平衡化済み、50% スラリー) 200 μ lと反応させ、4 $^{\circ}$ Cで2時間ローテーターを用いて吸着させた。遠心し (600 x g 2 min) 、上清 (500 μ l) を回収した。つぎにTST 1000 μ lで洗浄し、遠心し (600 x g 2 min) 、洗浄画分1を回収した。さらに0.5 M酢酸アンモニウム溶液 (pH 5.5) 200 μ lで洗浄し、遠心し (600 x g 2 min) 、洗浄画分2を回収した。最後に0.5 M酢酸溶液 (pH 3.5) 100 μ lで懸濁し、10 min間混合処理を行った後、遠心し (600 x g 2 min) 、100 μ lを回収した。回収した各BCA定量によって算出したタンパク質量から非結合分子量を導きだし、最終的に結合分子量を計算した。

すなわち、上清と洗浄画分に存在するタンパク質はフリーのパートナー分子 (ワクチン抗原) だと仮定し、アプライしたタンパク質量から逆算して、結合したパートナー分子の割合を算出した。最初にアプライしたタンパク質量は115.7 μ gであるので、割合としてはPvs25H-Aは85.5698 μ gでCOMP-Zは30.1302 μ gとなる。Pvs25H-A 85.5698 μ g中の48.82326 μ g (上清と洗浄画分のタンパク質量) が結合しなかった量になり、つまり36.53338 μ gが結合していることになる。molで計算すると1773.3 pmolのPvs25H-Aが結合していることになる。30.1 μ gのCOMP-Zは415.17pmolなので、つまりPvs25H-A:COMP-Z=4.3:1のモル比となる。最終的に1分子のCOMP-Zに4.3分子のPvs25H-Aが結合した融合体として作製できていることが示された。

[0046] (COMP-Z/Pvs25H-Aの融合確認)

COMP-ZがイムノグロブリンのFc領域に結合する性質を利用し、Pvs25H-A特異的ELISA法によってPvs25H-AがCOMP-Z分子に物理的に結合していることを確認した。まず、SUMILON 96well ELISA plate S type1にキャプチャー抗体としてHuman IgG (hIgG) を5 μ g/mlの濃度で各wellに50 μ lずつアプライし、4 $^{\circ}$ Cで一昼夜反応させ、コートさせる。hIgGをコートしたELISAプレートに1% BSA in PBS溶液を150 μ l/wellで加え、37 $^{\circ}$ C2時間反応させ、ブロッキング反応を行った。ブロッキング後に各アプライサンプルをCOMP-Zあたり2 μ g/wellの濃度でCOMP-Z或いはCOMP-Z/Pvs25H-A融合分子を加え、37 $^{\circ}$ C2時間反応させた。

この反応でFc/Z間の結合により両コンストラクトが捕らえられる。さらに、キャプチャー抗体 (hIgG) と結合していない可能性のある「フリー」の状態のZドメインをマスキングする目的で過剰量のhIgG (5 μ g/ml) を各wellに50 μ lずつアプライし37°C2時間反応した。その後、一次抗体として抗Pvs25マウスIgG抗血清 (200倍希釈) を50 μ l/wellでアプライし、37°C2時間反応させた。つづいて二次抗体としてAP conjugate抗マウス抗体 (3,000倍希釈) を50 μ l/wellでアプライし、37°C2時間反応させた。最後にAP基質 (Bio-Rad社) を用いて37°Cで反応させ、適切な反応時間 (5min、10min、20min) でOD415nmを測定することで、Pvs25H-A抗原特異的シグナルを検出した結果、COMP-ZとCOMP-Z/Pvs25H-Aのシグナルの違いからCOMP-ZにPvs25H-Aが結合していることが直接的に証明された。

[0047] 実施例 3

免疫原性確認試験：

Balb/cマウス、♀、7週齢 (日本SLC) に、Pvs25H-A (S) 30 μ gを皮下 (s.c.)、腹腔内 (i.p.)、静脈内 (i.v.)、経鼻 (i.n.) で3回 (0、2、4週目) 投与した (n=7、静脈内投与群のみn=2)。同様にして、Pvs25H-A 30 μ gとCOMP-Z 10.6 μ gを混合した試料 (M) または実施例2で得られたCOMP-Z/Pvs25H-A (L) 40.6 μ gを投与した。さらに、コレラ毒素 (CT;LBL) 1 μ gと試料S、L、MをPvs25H-Aあたり30 μ gになるように調製したものを経鼻で投与した (i.n./CT)。またフロイントアジュバント (IFA) を抗原投与容量と同量 (ここでは100 μ l) と試料Sを30 μ gを混合したものを皮下投与した。さらにIFAの非存在下で、S、M、LをPvs25H-Aあたり30 μ gになるように調製したものを皮下投与した。1、3、5週目に部分採血を行い、5週目のPvs25H-Aに対する抗体価の上昇を確認し、6週目に最終採血を行った。抗体価の解析はELISA法により行った。6週目の血清を50倍希釈で用い、コート抗原にPvs25H-A (5 μ g/ml) を用い、50倍希釈の血清、3000倍希釈のAP conjugate抗マウス抗体を用いてAP基質によるOD415nmを測定することによって行なった。ネガティブコントロールとして非免疫群の血清を用いた。結果を図1に示す。

[0048] この結果から、今回作製した新規ワクチン融合体は一般的なワクチンの効果として考えられるIFA存在下の抗原単独混合群で見られた抗体価以上の応答をIFAの存在なしに達成することができた。つまりこの新規ワクチン融合体は皮下免疫において既存のアジュバントなしに優位に抗体産生を誘導することができ、今回用いたリガンドである抗体結合ドメインがB細胞の表面に存在するイムノグロブリンに作用し、抗体の産生応答が見られたと推測される。

[0049] 実施例 4

伝搬阻止解析：

実施例 3 で得られた血清を各群 (s. c. /IFA S、s. c. S、s. c. M、s. c. L、i. n. S、i. n. /CT S、i. n. /CT M、i. n. /CT L) で混合し、混合血清をサンプルとした。アッセイは、4名の患者血液 (三日熱マラリア原虫生殖母体) を用いた。患者血液180 μ l に、混合血清90 μ l と正常ヒト血清90 μ l を混合した180 μ l を添加し、メンブレンフィーダーに入れて蚊 (*Anopheles dirus*) に吸血させた。蚊の中腸におけるオーシスト形成数を顕微鏡観察によって測定した。結果を図 2 に示す。

[0050] この結果から、今回作製した新規マラリアワクチン融合分子は抗体産生が優位に上昇した群で、実際の三日熱マラリア原虫を完全に殺傷する能力があることが分かった。さらにS、M、Lの順番で殺傷能力が上昇していることから、今回作製した分子によって誘導した抗体は実際のマラリア原虫を認識する能力があり、その効果はリガンド付加することでさらに上昇することが証明できた。またMの混合群においてもある程度の効果を示すことから、作製したCOMP-Z分子自身にもアジュバント活性がある可能性が示された。

[0051] 実施例 5

細胞標的機能解析：

実施例 1 で得られたCOMP-Zの細胞標的機能をフローサイトメトリーの手法を用いて解析を行った。すなわち、7週齢のBalb/cマウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製する。この得られた脾臓細胞約 10^5 cellsを用いて、標識B細胞マーカーと標識COMP-Zで検出し、標的機能を調べた。B細胞マーカーとしては

FITC標識した抗CD19抗体を0.2 mg/mlの濃度で用いた。COMP-ZはMaleimide-PE 02-Biotin によってビオチン化し、更に0.0001 mg/ml の濃度でPE-Streptavidin (SA-PE) を用いて検出を行った。より具体的には、0.01mgのビオチン化COMP-Zを1%BSA in PBSで懸濁した 10^5 cells/100mlに調製した脾臓細胞と混合し、氷中で30min反応させた。次にマスキングとしてhIgGを50 mg/mlの濃度で加えて、4°Cで30min反応させた。更にFc受容体阻害剤としてハムスターイムノグロブリンを加えて、4°Cで30min反応させた。その後に遠心分離して(1500 rpm, 5min) 上清を捨て、100mlの1%BSA in PBSで懸濁する。次にFITC-抗CD19抗体とSA-PEを加えて、4°Cで30min反応させた。その後に遠心分離して(1500 rpm, 5min) 上清を捨て、100mlの1%BSA in PBSで懸濁した。つづいて再度、遠心分離して(1500 rpm, 5min) 上清を捨て、最終的に1%ホルムアルデヒドで懸濁して、フローサイトメトリー用サンプルとした。リガンドのないサンプルとしてCOMP ODを同時に用いてネガティブコントロールとした。フローサイトメトリー解析はBD社のFACSシステムのマニュアルに準じて行った。結果を図3に示す。

[0052] この解析から、COMP ODではB細胞とタンパク質が結合していることを示すURIには5.25%の割合であったが、COMP-ZではURIは13.15%と上昇しており、これはCOMP-ZがB細胞へ結合していることを示している。

[0053] 実施例 6

TBCC-Z運搬体の作製：

(TBCC (wt) - flexible linkerのクローニング)

コア分子としてTBCCを用いて融合体を作製した。TBCCは野生型配列(配列番号34)を用いたものをTBCC (wt)と表記する。

COMP-Zの作製ではflexible linkerはCOMPのクローニング後に導入したが、TBCCの場合は便利性を考慮して同時にクローニングを行った。具体的な導入方法としては、まず、最初にTBCC (wt) - flexible linkerのクローニングを行った。すなわち、TBCC (wt) - flexible linkerの79アミノ残基(配列番号24)を得るため、配列番号25のセンスプライマーと配列番号26のアン

チセンスプライマーを作製し、アニールさせた後にpCR2.1ベクターに導入し、サブクローニングした。

制限酵素Nco I、Xho Iで処理した後に大腸菌発現ベクターであるpET-21dのNco I-Xho I部位にサブクローニングし、大腸菌DH5アルファに一般的なリン酸カルシウム法によって形質転換した。さらに、ベクターに存在する薬剤耐性マーカーであるアンピシリンによってスクリーニングを行い、目的の遺伝子導入クローンを選択した。そのクローンをタンパク質発現大腸菌株であるBL21(DE3)に再度、リン酸カルシウム法によって形質転換し、アンピシリンによるスクリーニング後TBCC (wt) -flexible linkerの発現コンストラクトを構築した。本発現株は一般的なLB-amp培地100mlで37°C一昼夜、前培養し、つづいて250mlのLB-Amp培地4本にOD600 nm = 0.1になるように植菌し、37°Cで1.5時間培養した。この時点で濁度OD 600 nmを測定し、OD = 0.4から0.6であることを確認し、最終濃度が1mMになるようにイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG)を加えて、37°Cで一昼夜培養し、タンパク質の発現誘導を行なった。発現誘導後、培養上清を遠心分離し、0.45 μmのフィルターで濾過後にHis-tagカラムを用いてアフィニティークロマトグラフィー精製し、精製タンパク質の一部を15 %アクリルアミド濃度SDS-PAGEを行うことで、TBCC (wt) -flexible linker部分の発現を確認した。

[0054] (リガンド部分の融合)

上記TBCC (wt) -flexible linkerに下記方法によりリガンド部分の構築を行った。リガンドとしてStaphylococcus aureus由来タンパク質protein A (SpA)由来のBドメインホモログである抗体結合ドメイン(Zドメイン)を用いた(配列番号7)。このZドメインを先に構築したTBCC (wt) -flexible linkerのC末端側に遺伝子工学的に融合させ構築した。具体的には配列番号21のセンスプライマーおよび配列番号22のアンチセンスプライマーの合成オリゴ作製し、アニールさせた後にpCR2.1ベクターに導入し、Zドメインのクローニングを完了した。塩基配列を確認後、制限酵素Sal I、Xho Iで処理した後に、pET-21d-TBCC (wt) -flexible linkerのXho I部位にサブクローニングし、

構築を完了させた (pET-21d-TBCC (wt) -Z) 。

[0055] (Cys残基導入コンストラクトTBCC (Cys) -Zの作製)

TBCC (wt) -Z(配列番号27)はワクチン抗原等を遺伝子工学的に結合できるが、化学融合の際に利用するシステイン残基を有していないため、システイン残基を導入したコンストラクトであるTBCC (S52C) -Z(配列番号28)およびTBCC (G60) -Z(配列番号29)を作製した。TBCC (S52C) -ZはTBCC (wt) -Zの52番目のセリン残基をシステイン残基に置換したコンストラクトである。TBCC (G60) -ZはTBCC (wt) -Zの60番目のアミノ酸にシステイン残基を挿入したコンストラクトである。Cysの導入方法はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社) を用いて行った。具体的にはTBCC (S52C) -ZはTBCC (wt) -Zを鋳型に配列番号30のセンスプライマーと配列番号31のアンチセンスプライマーを用い、TBCC (G60) -ZはTBCC (wt) -Zを鋳型に配列番号32のセンスプライマーと配列番号33のアンチセンスプライマーを用い、PCR法により目的産物の増幅を行った。得られた各々のPCR増幅産物に対してDpn Iを1 μ l添加し37°Cで1 hrインキュベートした後、大腸菌XL1-Blue株に形質転換を行った。LB-amp培地によってスクリーニングし、得られた各々のクローンを構築し、塩基配列を確認した。その後各々を大腸菌BL21 (DE3) 株に形質転換した。

[0056] (各種TBCC-Z (野生型、およびCys導入型) のタンパク質の培養、発現誘導及び精製方法)

各種pET-21d-TBCC-Zを含有する大腸菌BL21 (DE3) 株のフリーズストックから10 μ lを100mlのLB-amp培地に植菌し、37°Cで一晩培養した。つづいて250mlのLB-Amp培地4本にOD_{600 nm} = 0.1になるように植菌し、37°Cで1.5時間培養した。この時点で濁度OD_{600 nm}を測定し、OD = 0.4から0.6であることを確認し、最終濃度が1mMになるようにイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を加えて、37°Cで一昼夜培養し、タンパク質の発現誘導を行なった。発現誘導後、全ての培養液を統一し、遠心分離し (8,000 rpm、20 min、4°C、2 times) 、菌体と培養上清に分離した。培養上清の一部を発現解析用に

回収した。

培養上清に最終濃度20 mMとなるようにイミダゾールを添加後、0.45 μ mフィルターで濾過し、クロマトアプライ用サンプルとして調整した。HisTrapカラム (GEヘルスケア社) 5 mlに、カラムを平衡化するため、洗浄バッファー (20 mM イミダゾール、20 mMリン酸バッファー、pH 7.4) をカラム容量の5倍アプライした。平衡化したカラムに、調整したサンプルに対しペリスタポンプを利用してアプライし、アフィニティークロマトグラフィーを行った。

サンプルアプライ終了後、次に洗浄および溶出を行った。カラムに対し5倍量の洗浄バッファーで洗浄し、次にカラムに対し5倍量の溶出バッファー (50 mM イミダゾール、20 mMリン酸バッファー、pH 7.4) で溶出した。培養上清、素通り画分、洗浄画分、溶出画分を15 %アクリルアミド濃度SDS-PAGEで解析した。泳動後、発現パターンを確認し、溶出画分に発現が確認されたら、限外濾過膜 (Amicon Ultra-15 30kDa) にて濃縮し、PBSに置換した。次いで、さらに精製度を上げるために、濃縮されたTBCC-Z溶液に最終濃度50 mM DTTを添加後30分間室温で振とうし、PBSにて10倍に希釈し (最終濃度5 mM DTT)、再度HisTrapカラム (5 ml) にアプライした。そして次に洗浄バッファーをカラムの5倍量アプライし、次にカラムに対し5倍量の溶出バッファーで溶出させた。カラム処理前サンプル、素通り画分、洗浄画分、溶出画分を15 %アクリルアミド濃度SDS-PAGEで解析した。泳動後、発現パターンを確認し、溶出画分に発現が確認されたら、限外濾過膜 (Amicon Ultra-15 30kDa) にて濃縮し、PBSに置換した。BCA protein Assay Reagent (bicinchoninic acid) (PIERCE社) を用いてタンパク質の定量を行った結果TBCC-Zタンパク質の濃度はTBCC (wt) -Zが3.1 mg、TBCC (S52C) -Zが14.5 mgそしてTBCC (C60) -Zが10.2mgとなった。TBCC (S52C) -ZおよびTBCC (C60) -ZをまとめてTBCC (Cys) -Zと標記する。

[0057] (各種TBCC-Zのエンドトキシン除去処理)

大腸菌で作製したリコンビナントはエンドトキシンの混入が考えられるため、免疫実験を行うにあたってエンドトキシンの除去およびタンパク質溶液

のエンドトキシン濃度を検定した。

TBCG-Zは分子量が約60 kDaであるのに対し、エンドトキシンは分子量が約10 kDaなので50 kDaの透析膜による限外濾過処理を行った。透析外液はPBSを用い、4°Cで数時間毎に外液を交換することで最終的に一昼夜透析を行った。この透析済みサンプルをエンドトキシン除去カラム（PIERCE社：Detoxi-Gel Endotoxin Removal Gel）にアプライし、素通りした画分を回収した後、BCA定量を行いリムルス試験（LAL）によりエンドトキシン濃度を検定した。すなわち、LALのPyrogen Single Test 25回用を用いて最終容量を0.25 mlに希釈したサンプルを用いて検査した。サンプルの希釈にはエンドトキシンフリー水を用いた。必要濃度に調整したサンプル溶液を注射器でバイアルに注入し、軽く混合し、転倒しないように箱等に入れて37°Cで一時間反応させた。1時間後、振動を与えないようにインキュベーターから取り出し、一度転倒させた。サンプル溶液が凝固したならば、エンドトキシン陽性、凝固していないもしくは、一部だけ溶けて落ちる場合はエンドトキシン陰性と判断した。陰性になる希釈ポイントの一段階前がエンドポイントと定義されるので、そこからエンドトキシンのUnit数を計算し、500 pgエンドトキシン/ μ g of proteinのレベル以上であった場合には、再度エンドトキシン除去カラムにアプライし、同様の操作を500 pgエンドトキシン/ μ g of protein以下となるレベルまで繰り返し行った。

[0058] 実施例7

ワクチン-運搬体融合体の作製(2)：

三日熱マラリア原虫の伝播阻止抗原であるPvs25をTBCG(Cys)-Zの内部に存在するSH基を利用し、化学結合によりTBCG(Cys)-Zに融合した。ワクチン抗原Pvs25は酵母*Pichia pastoris*で発現した均一な立体構造を持つPvs25H Aフォーム(Pvs25H-A)を用いた。融合に必要なクロスリンカーとしてSPDPを用い、以下の反応方法で融合体TBCG-Z/Pvs25H-Aを完了させた。

融合に関しては、TBCG-Z tetramer (2 mg : 1.55 ml : 34 nmol)、Pvs25H-A (2.8 mg : 1.46 ml : 137.2 nmol)で行った。

[0059] (還元処理)

まず、TBCC (Cys) -ZのSH基を還元型にするために還元処理を行った。TBCC (Cys) -Zは大腸菌で発現させた状態でも還元型SH基を有しているが、最大限利用できるSH基の数を増加させるために、還元処理を行った。TBCC (Cys) -Z (4 mg) 溶液に最終濃度50 mMのDTTを添加した後、室温で30分間振とうした。その後、限外濾過膜による処理 (Amicon Ultra-4 10k ; 5000 × g 20 min × 4 times with PBS) でDTTを除去し、BCA定量法によりタンパク質濃度を決定した。

[0060] (融合処理)

使用直前にSPDP 2 mgを320 μlのDMSOに溶解し、20 mM SPDP溶液を調製した。20 mM SPDP溶液 84 μlを5.6 mg/2.8 mlのPvs25H-Aを加え、60分間室温でインキュベートした (Pyridyldithiol-activated Pvs25H-Aの作製)。限外濾過膜 (Amicon Ultra-4 10k ; 5000 x g 20 min × 4 times with PBS) を用いて精製し、化学反応の副産物と過剰なSPDPを除去した。精製したPyridyldithiol-activated Pvs25H-A (2.8 mg/1.46 ml) に還元処理済みの2 mg TBCC (Cys) -Z (1550 μl) を加え、一晩室温でインキュベートした。Amicon Ultra-4 10k (5000 x g 20 min × 4 times) を使用し、化学反応の副産物 (Pyridine 2-thione) を除去し、PBSにバッファー交換して融合タンパク質TBCC (Cys) -Z/Pvs25H-Aを得た。

[0061] (TBCC-Z/Pvs25H-Aの融合確認)

TBCC-ZがイムノグロブリンのFc領域に結合する性質を利用し、Pvs25H-A特異的ELISAによってPvs25H-AがTBCC (Cys) -Z分子に物理的に結合していることを確認した。まず、SUMILON 96 well ELISA Plate S typeにキャプチャー抗体としてHuman IgG (h IgG) をバイカーボネートバッファーを用いて5 μg/mlの濃度で各wellに50 μlずつアプライし、4℃で一晩反応させ、コートした。hIgGをコートしたELISAプレートに1% BSA in PBS溶液を150 μl/wellで加え、37℃で2時間反応させ、ブロッキング反応を行った。ブロッキング後に各サンプルTBCC (Cys) -Zあたり2 μg/wellの濃度でTBCC (Cys) -Z或いはTBCC (Cy

s)-Z/Pvs25H-A融合分子を加え、37°Cで2時間反応させた。この反応でFc/Z間の結合により両コンストラクトが捕らえられる。さらに、キャプチャー抗体 (hIgG) と結合していない可能性のある「フリー」状態のZドメインをマスキングする目的で過剰量のhIgG (5 μ g/ml) を各wellに50 μ lずつアプライし37°Cで2時間反応させた。その後、一次抗体として抗Pvs25マウスIgG抗血清 (200倍希釈) を50 μ l/wellでアプライし、37°Cで2時間反応させた。つづいて二次抗体としてAP conjugate抗マウス抗体 (3,000倍希釈) を50 μ l/wellでアプライし、37°C2時間反応させた。最後にAP基質 (Bio-Rad社) を用いて37°Cで反応させ、適切な反応時間 (5min、10min、20min) でOD415nmを測定することで、Pvs25H-A抗原特異的シグナルを検出した結果、TBCC (Cys) -ZとTBCC (Cys) -Z/Pvs25H-Aのシグナルの違いからTBCC (Cys) -ZにPvs25H-Aが結合していることが直接的に証明された。

[0062] 実施例 8

免疫原性確認試験：

Balb/cマウス、♀、7週齢 (日本SLC) に、Pvs25H-A (S) 30 μ gを皮下 (s.c.)、経鼻 (i.n.) で3回 (0、2、4週目) 投与した (n = 7)。同様にして、Pvs25H-A 30 μ gとTBCC (S52C) -Z 21.4 μ gもしくはTBCC (C60) -Z 21.4 μ gを混合した試料 (M) または実施例6で得られたTBCC (S52C) -Z/Pvs25H-A (L) もしくはTBCC (C60) -Z/Pvs25H-A (L) 51.4 μ gを投与した。さらに、コレラ毒素 (CT; LBL) 1 μ gと試料S、M、Lを混合し、経鼻投与した (i.n./CT)。また、不完全フロイントアジュバント (IFA) もしくはAlumアジュバントを抗原投与容量と同量 (ここでは100 μ l) と試料Sを30 μ gを混合したものを皮下投与した (s.c./IFA、s.c./Alum)。

さらにIFAの非存在下で、S、M、LをPvs25H-Aあたり30 μ gになるように調製したものを皮下投与した。1、3、5週目に部分採血を行い、5週目のPvs25H-Aに対する抗体価の上昇を確認し、6週目に最終採血を行った。抗体価の解析はELISA法により行った。6週目の血清を50倍希釈で用い、コート抗原にPvs25H-A (5 μ g/ml) を用い、50倍希釈の血清、4000倍希釈のAnti-mouse IgG-APを用い

てAP基質によるOD415nmを測定することによって行なった。ネガティブコントロールとして非免疫群の血清を用いた。結果を図4に示す。

[0063] この結果から、今回作製した新規ワクチン融合体は一般的なワクチンの効果として考えられるIFA存在下の抗原単独混合群で見られた抗体価と同等な応答を誘導することが可能であり、更にAlumアジュバントとの混合投与においてより増強させることができた。つまりこの新規ワクチン融合体は皮下免疫においてアジュバントの依存なしに抗体応答を誘導できるが、臨床に用いられているアジュバントを併用するとより効果の高い抗体産生を誘導することが示された。

[0064] 実施例9

伝搬阻止解析：

実施例8で得られた血清を各群（s.c./IFA S、s.c.S、s.c.M、s.c.L、s.c./Alum S、s.c./Alum M、s.c./Alum L、i.n.S、i.n./CT S、i.n./CT L）で混合し、混合血清をサンプルとした。アッセイは、4名の患者血液（三日熱マラリア原虫生殖母体）を用いた。患者血液180 μ lに、混合血清90 μ lと正常ヒト血清90 μ lを混合した180 μ lを添加し、メンブレンフィーダーに入れて蚊（*Anopheles dirus*）に吸血させた。蚊の中腸におけるオーシスト形成数を顕微鏡観察によって測定した。結果を図5に示す。

[0065] この結果から、今回作製したTBCCをコアとして用いた新規マラリアワクチン融合分子は抗体産生が優位に上昇した群で、実際の三日熱マラリア原虫を完全に殺傷する能力があることが分かった。さらにS、M、Lの順番で殺傷能力が上昇しているほか、Alumとの併用投与によって、より殺傷能力が高くなることがわかり、既存のアジュバントの効果を増強させる可能性がある。

[0066] 実施例10

ワクチン-運搬体融合体の作製(3)：

MSP1-19を搭載した融合体を作製し、その抗体応答機能を調べた。MSP1-19はPvs25と同じマラリア抗原ではあるが、メロゾイト期の抗原であり、伝搬阻止抗原であるPvs25は、蚊の中でマラリア原虫が発現するものであるのに対し

て、MSP1-19は、ほ乳類の中でマラリア原虫が発現する抗原である。

具体的にはMSP1-19をTBCC(Cys)-ZおよびCOMP-Zの内部に存在するSH基を利用し、化学結合によりに融合した。ワクチン抗原MSP1-19は酵母*Pichia pastoris*で発現した均一な構造を持つMSP1-19 Sフォーム (MSP1-19H-S) を用いた。融合に必要なクロスリンカーとしてSPDPを用い、以下の反応方法で融合体TBCC(Cys)-Z /MSP1-19H-SおよびCOMP-Z/MSP1-19H-Sを完了させた。

融合に関しては、TBCC-Z tetramer (750 μ g : 625 μ l : 12.5 nmol)、COMP-Z pentamer (750 μ g : 625 μ l : 10.4 nmol)、MSP1-19H-S (3 mg : 1.5ml : 210nmol) で行った。

[0067] (還元処理)

まず、TBCC(Cys)-ZおよびCOMP-ZのSH基を還元型にするために還元処理を行った。TBCC(Cys)-ZおよびCOMP-Zは大腸菌で発現させた状態でも還元型SH基を有しているが、最大限利用できるSH基の数を増加させるために、還元処理を行った。TBCC(Cys)-ZおよびCOMP-Z (4 mg) 溶液に最終濃度50 mMのDTTを添加した後、室温で30分間振とうした。その後、限外濾過膜による処理 (Amicon Ultra-4 10k ; 5000 \times g 20 min \times 4 times with PBS) でDTTを除去し、BCA定量法によりタンパク質濃度を決定した。

[0068] (融合処理)

使用直前にSPDP 2 mgを320 μ lのDMSOに溶解し、20 mM SPDP溶液を調製した。20 mM SPDP溶液 84 μ lを3 mg/1.5 mlのMSP1-19H-Sを加え、60分間室温でインキュベートした (Pyridyldithiol-activated MSP1-19H-Sの作製)。限外濾過膜 (Amicon Ultra-4 10k ; 5000 \times g 20 min \times 4 times with PBS) を用いて精製し、化学反応の副産物と過剰なSPDPを除去した。精製したPyridyldithiol-activated MSP1-19H-S (3mg/1.5 ml) に還元処理済みの0.5 mg TBCC(Cys)-ZおよびCOMP-Z (500 μ l) を加え、一晩室温でインキュベートした。Amicon Ultra-4 10k (5000 \times g 20 min \times 4 times) を使用し、化学反応の副産物 (Pyridine 2-thione) を除去し、PBSにバッファー交換して融合タンパク質TBCC(Cys)-Z /MSP1-19H-SおよびCOMP-Z/MSP1-19H-Sを得た。

[0069] (TBCC(Cys)-ZおよびCOMP-Zの融合確認)

TBCC-ZがイムノグロブリンのFc領域に結合する性質を利用し、MSP1-19H-S特異的ELISAによってMSP1-19H-SがTBCC(Cys)-ZおよびCOMP-Z分子に物理的に結合していることを確認した。まず、SUMILON 96 well ELISA Plate S typeにキャプチャー抗体としてHuman IgG (h IgG) をバイカーボネートバッファを用いて5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で各wellに50 μl ずつアプライし、4°Cで一晩反応させ、コートした。hIgGをコートしたELISAプレートに1% BSA in PBS溶液を150 $\mu\text{l/well}$ で加え、37°Cで2時間反応させ、ブロッキング反応を行った。ブロッキング後に各サンプルTBCC(Cys)-ZおよびCOMP-Z分子あたり2 $\mu\text{g/well}$ の濃度でTBCC-Z/MSP1-19H-SおよびCOMP-Z/MSP1-19H-S融合分子を加え、37°Cで2時間反応させた。この反応でFc/Z間の結合により両コンストラクトが捕らえられる。さらに、キャプチャー抗体 (hIgG) と結合していない可能性のある「フリー」状態のZドメインをマスキングする目的で過剰量のhIgG (5 $\mu\text{g/ml}$) を各wellに50 μl ずつアプライし37°Cで2時間反応させた。その後、一次抗体として抗MSP1-19マウスIgG抗血清 (200倍希釈) を50 $\mu\text{l/well}$ でアプライし、37°Cで2時間反応させた。つづいて二次抗体としてAP conjugate抗マウス抗体 (3,000倍希釈) を50 $\mu\text{l/well}$ でアプライし、37°C2時間反応させた。最後にAP基質 (Bio-Rad社) を用いて37°Cで反応させ、適切な反応時間 (5min、10min、20min) でOD415nmを測定することで、MSP1-19H-S抗原特異的シグナルを検出した結果、TBCC(Cys)-ZおよびCOMP-ZとTBCC(Cys)-Z /MSP1-19H-SおよびCOMP-Z/MSP1-19H-Sのシグナルの違いからTBCC(Cys)-ZおよびCOMP-ZにMSP1-19H-Sが結合していることが直接的に証明された。

[0070] 実施例 1 1

免疫原性確認試験：

C57B/6マウス、♀、7週齢 (日本SLC) に、MSP1-19H-S (S) 30 μg を皮下 (s.c.)、で3回 (0、2、4週目) 投与した。同様にして、MSP1-19H-S 30 μg とTBCC(Cys)-Z またはCOMP-Z 10.6 μg を混合した試料 (M) または実施例 1 0で得られたTBCC(Cys)-Z /MSP1-19H-SおよびCOMP-Z/MSP1-19H-S (L) 40.6 μg

を投与した。さらに、フロイントアジュバント(IFA)を抗原投与容量と同量(ここでは100 μ l)と試料Sを30 μ gを混合したものを皮下投与した。1、3、5週目に部分採血を行い、5週目のMSP1-19H-Sに対する抗体価の上昇を確認し、6週目に抗体価の解析を行った。抗体価の解析はELISA法により行った。6週目の血清を50倍希釈で用い、コート抗原にMSP1-19H-S(5 μ g/ml)を用い、50倍希釈の血清3,000倍希釈のAP conjugate抗マウス抗体を用いてAP基質によるOD 415nmを測定することによって行なった。ネガティブコントロールとして非免疫群の血清を用いた。結果を図6に示す。

[0071] この結果から、今回作製した抗原を変更した新規マラリアワクチン融合分子についても抗原単独に比べて、有意に免疫応答が高かった。つまりTIPsに搭載した抗原は種類に関わらず免疫原性を増強させることができる可能性がある。TIPsの汎用性を証明する結果となった。

産業上の利用可能性

[0072] 本発明の薬物運搬体は、構成する分子群の設計の自由度が高いため汎用性が高く、かつ安全性にも優れるものであり、標的細胞または組織に効率的に薬物を運搬するとともに、薬物の作用を増強し得るものである。したがって、感染症等に対するドラッグデリバリーシステムのプラットフォームとして極めて有用である。

請求の範囲

- [請求項1] コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質および免疫細胞のレセプターに対するリガンド分子とを含む薬物運搬体。
- [請求項2] コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質と免疫担当細胞のレセプターに対するリガンドタンパク質とが結合した融合タンパク質がオリゴマー化したものである請求項1記載の薬物運搬体。
- [請求項3] 融合タンパク質が、コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質と免疫担当細胞のレセプターに対するリガンドタンパク質とがリンカーを介して結合したものである請求項1または2記載の薬物運搬体。
- [請求項4] コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質が2量体から7量体のものである請求項1ないし3のいずれかの項記載の薬物運搬体。
- [請求項5] コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質が、COMP (cartilage oligomeric matrix protein)、テトラブラキオンコイルドコア (TBCC)、レオウイルス (Reovirus) 由来の σ 1タンパク質およびヘパチチスデルタウイルス (Hepatitis delta virus) 由来のヘパチチスデルタ抗原 (HDAg) よりなる群から選ばれたものである請求項1ないし4のいずれかの項記載の薬物運搬体。
- [請求項6] コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質が、COMP (cartilage oligomeric matrix protein) である請求項5記載の薬物運搬体。
- [請求項7] COMP (cartilage oligomeric matrix protein) が、配列番号5で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものである請求項6記載の薬物運搬体。
- [請求項8] COMP (cartilage oligomeric matrix protein) が、配列番号5で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものである請求項6記載の薬物運搬体。

- [請求項9] COMP (cartilage oligomeric matrix protein) が、配列番号6で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものである請求項6記載の薬物運搬体。
- [請求項10] COMP (cartilage oligomeric matrix protein) が、配列番号6で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものである請求項9記載の薬物運搬体。
- [請求項11] コイルドコイル構造を有する多量体タンパク質が、テトラブラキオンコイルドコア (TBCC) である請求項5記載の薬物運搬体。
- [請求項12] テトラブラキオンコイルドコア (TBCC) が、配列番号34で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものである請求項6記載の薬物運搬体。
- [請求項13] テトラブラキオンコイルドコア (TBCC) が、配列番号34で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものである請求項6記載の薬物運搬体。
- [請求項14] 免疫担当細胞のレセプターに対するリガンドタンパク質が、スタフィロコッカス (Staphylococcus) プロテインA由来の抗体結合ドメイン、Group G ストレプトコッカス (Streptococcus) G148のGタンパク質 (SpG) 由来のB1ドメイン、ファインゴルディア・マグナ (Finegoldia magna) 由来のLタンパク質、補体系分子C3dおよびエルシニア・シュードチューベルキュロシスインベーシン (Yersinia pseudotuberculosis invasin) よりなる群から選ばれたものである請求項1ないし13のいずれかの項記載の薬物運搬体。
- [請求項15] 免疫担当細胞のレセプターに対するリガンドタンパク質が、スタフィロコッカス (Staphylococcus) プロテインA由来の抗体結合ドメインである請求項14記載の薬物運搬体。
- [請求項16] スタフィロコッカス (Staphylococcus) プロテインA由来の抗体結

合ドメインが、配列番号7で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものである請求項15記載の薬物運搬体。

[請求項17] スタフィロコッカス (Staphylococcus) プロテインA由来の抗体結合ドメインが、配列番号7で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むものである請求項15記載の薬物運搬体。

[請求項18] 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む請求項1記載の薬物運搬体。

[請求項19] 配列番号23で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む請求項1記載の薬物運搬体。

[請求項20] 配列番号27で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む請求項1記載の薬物運搬体。

[請求項21] 配列番号27で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む請求項1記載の薬物運搬体。

[請求項22] 配列番号23で表されるアミノ酸配列または配列番号23で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子。

[請求項23] 配列番号27で表されるアミノ酸配列または配列番号27で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子。

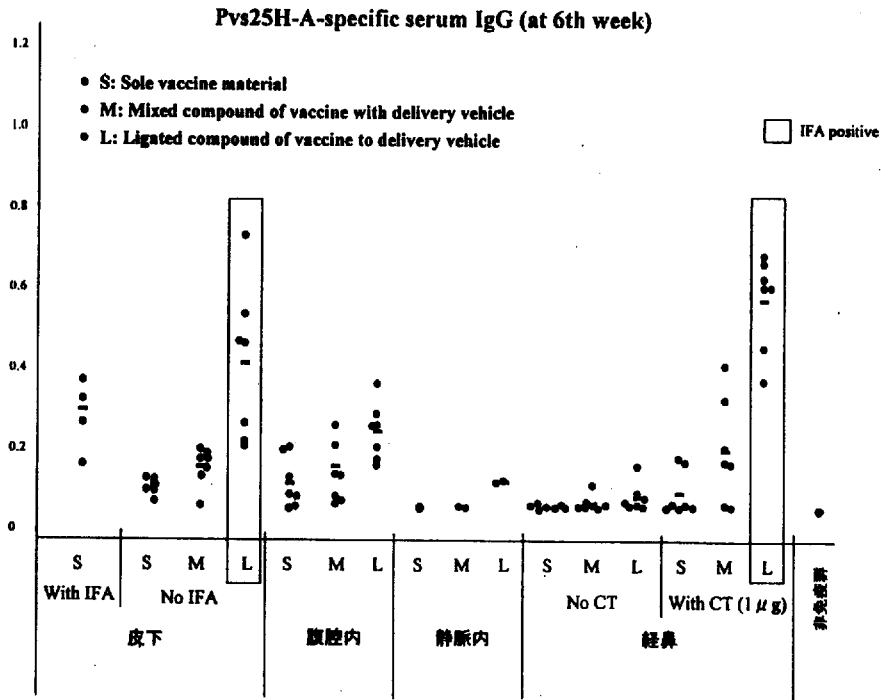
[請求項24] 請求項1ないし21の何れかの項に記載の薬物運搬体にアジュバント分子が結合してなるアジュバント。

[請求項25] 薬物運搬体中のコイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質にアジュバント分子が結合したものである請

求項 2 4 記載のアジュバント。

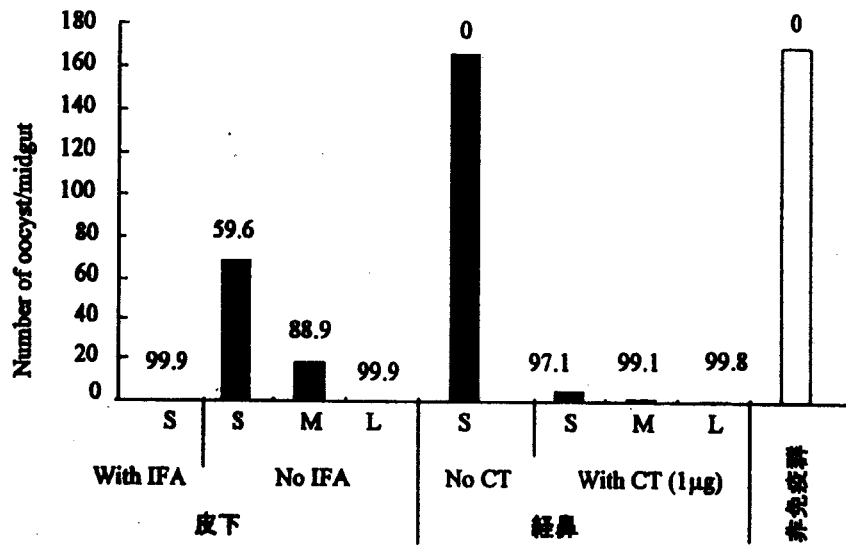
- [請求項26] アジュバント分子が、コレラトキシン (CT)、コレラトキシンBサブユニット (CTB)、コレラトキシンAサブユニット (CTA)、百日咳菌毒素 (PT)、百日咳菌毒素S1サブユニット (PTS1)、Toll様受容体 9 (TLR9) リガンド、Toll様受容体4 (TLR4) リガンドおよび膜透過性機能を有するカチオン性ペプチドよりなる群から選ばれたものである請求項 2 4 または 2 5 記載のアジュバント。
- [請求項27] 請求項 1 ないし 2 1 のいずれかの項に記載の薬物運搬体にワクチン分子が結合してなるワクチン。
- [請求項28] 薬物運搬体中のコイルドコイル構造を有する多量体タンパク質を構成する単量体タンパク質にワクチン分子が結合したものである請求項 2 7 記載のワクチン。
- [請求項29] ワクチン分子が、節足動物媒介性疾患、寄生虫起因、細菌性またはウイルス性の感染症ワクチン候補抗原である請求項 2 7 または 2 8 記載のワクチン。
- [請求項30] ワクチン分子が、日本脳炎ウイルス外殻タンパク質またはマラリア原虫表層タンパク質である請求項 2 9 記載のワクチン。

[図1]



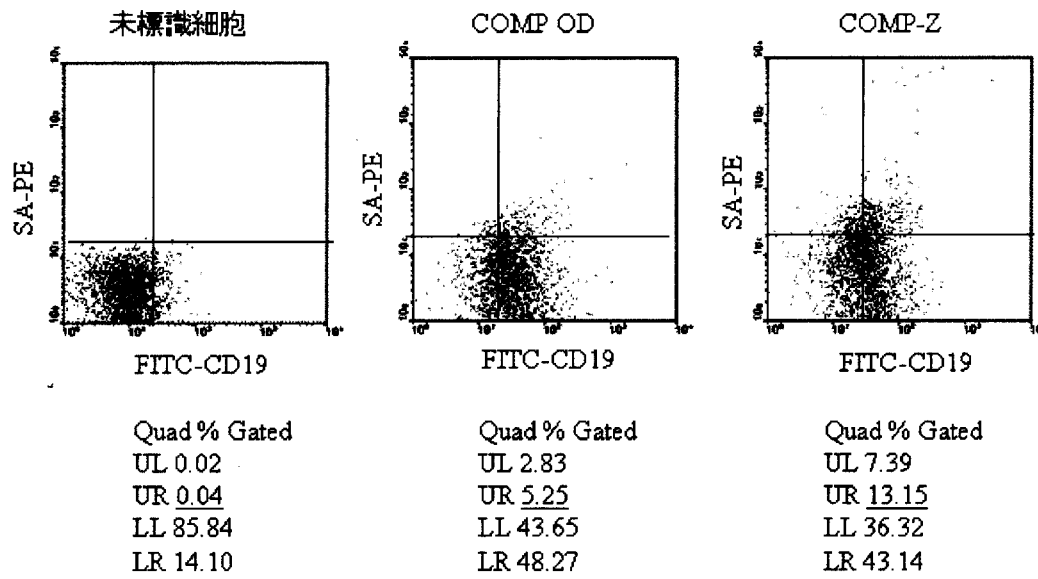
[図2]

マラリア原虫伝搬阻止解析

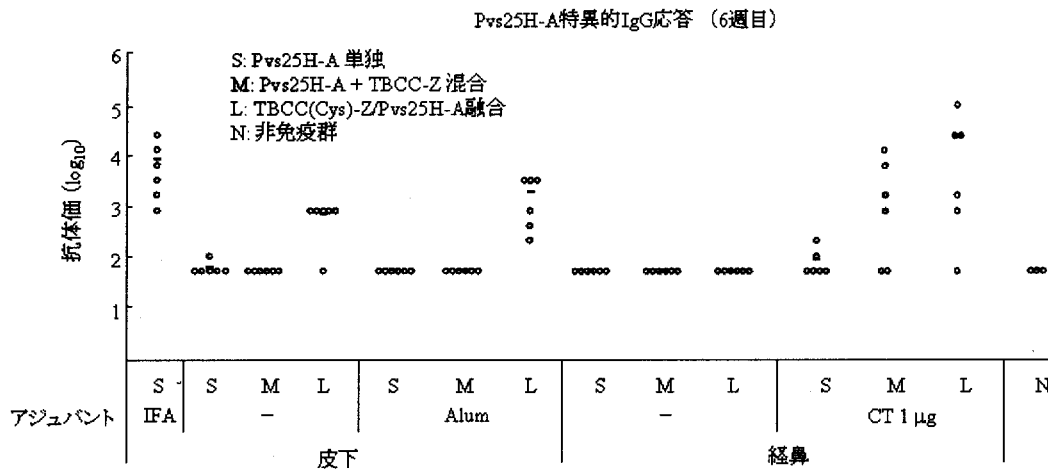


グラフ中の数値は、非免疫群と比較した場合の感染防御率(%)を示す。

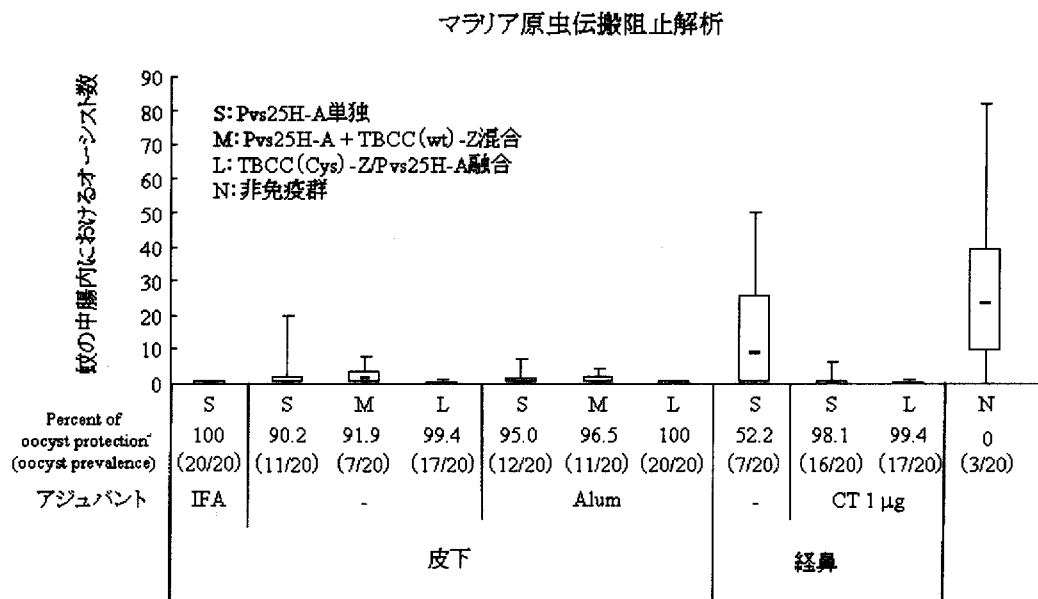
[図3]



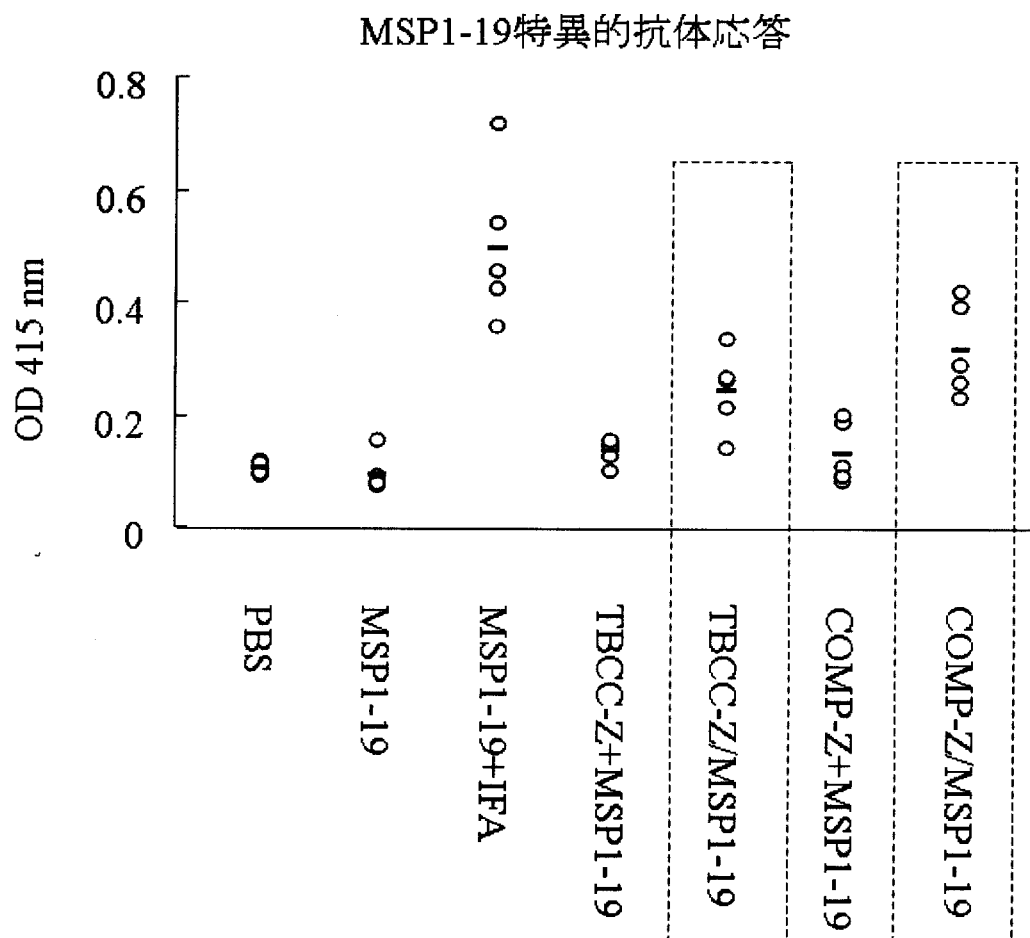
[図4]



[図5]



[圖6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/385(2006.01)i, A61K39/39(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P33/06(2006.01)i, A61K39/015(2006.01)n, A61K39/12(2006.01)n, C07K19/00(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K39/385, A61K39/39, A61K47/42, A61K47/48, A61P31/14, A61P33/06, A61K39/015, A61K39/12, C07K19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	BELITSKAYA, S.Y. et al., "Design of chimeric proteins on the basis of a pentameric superhelical fragment of human cartilage oligomeric matrix protein: I. The properties of a hybrid containing the immunodominant domain of the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum", Russ. J. Bioorg. Chem., (2004), Vol.30, No.1, pp.35-41, entire text (particularly, page 35, Abstract; right row, lines 11 to 20; page 36, left row, lines 16 to 32; page 41, right row, lines 3 to 7)	<u>1-10, 24-30</u> 1-30

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 February, 2010 (26.02.10)

Date of mailing of the international search report
16 March, 2010 (16.03.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051915

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<p>X Y</p>	<p>BELITSKAYA, S.Y. et al., "Design of chimeric proteins on the basis of a pentameric superhelical fragment of human cartilage oligomeric matrix protein: II.1 The properties of a hybrid containing the antigen VNTR(MUC1) from human tumors", Russ. J. Bioorg. Chem., (2004), Vol.30, No.1, pp.42-46, entire text (particularly, page 42, Abstract)</p>	<p><u>1-10, 24-28</u> 1-28</p>
<p>X Y</p>	<p>US 2005/0137156 A1 (JOHNSTON, S.A. et al.), 23 June 2005 (23.06.2005), entire text (particularly, claim 32; paragraphs [0047], [0075], [0135] to [0137]; fig. 6B) (Family: none)</p>	<p><u>1-10, 24-30</u> 1-30</p>
<p>Y</p>	<p>WO 2007/027640 A2 (CELLDEX THERAPEUTICS LTD.), 08 March 2007 (08.03.2007), entire text (particularly, claims 1, 2, 5, 6, 9; page 14, lines 16 to 23; page 39, lines 15 to 30) & US 2007/0160628 A1 & EP 1931378 A & JP 2009-516641 A</p>	<p>1-30</p>
<p>Y</p>	<p>JP 62-272989 A (KabiGen AB.), 27 November 1987 (27.11.1987), entire text (particularly, claims 1, 6, 7; page 3, lower right column, lines 7 to 14; upper right column, lines 2 to 6; page 4, upper right column, lines 9 to 15) & US 5411732 A & EP 243333 A2</p>	<p>1-30</p>
<p>Y</p>	<p>DEMPSEY, P.W. et al., "C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity", Science, (1996), Vol.271, pp.348-350, entire text (particularly, page 348, abstract; page 350, 2nd line from the bottom to the last line)</p>	<p>1-14, 24-30</p>
<p>X</p>	<p>JP 2008-536916 A (Optvent AB.), 11 September 2008 (11.09.2008), entire text (claim 7; paragraphs [0141], [0146]) & WO 2006/112777 A2 & EP 1871422 A</p>	<p>1-5, 11-13</p>
<p>P, X</p>	<p>MIYATA, T. et al., "Tricomponent immunoactivating pentavalent system (TIPs) for malaria vaccine development", The Japanese Society of Parasitology Taikai Program Shorokushu, (Feb. 2009), Vol.78th, p.46, entire text</p>	<p>1-10, 14-19, 22, 24-30</p>
<p>P, X</p>	<p>WO 2009/109428 A2 (ALPHA-O PEPTIDE AG.), 11 September 2009 (11.09.2009), entire text & EP 2085405 A2</p>	<p>1-5, 11-13, 24-30</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051915

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/0170337 A1 (HOGLE, J.M.), 04 August 2005 (04.08.2005), entire text (Family: none)	1-30
A	WO 2007/067681 A2 (UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH FOUNDATION, INC.), 14 June 2007 (14.06.2007), entire text & US 2007/172504 A1 & EP 1976565 A2 & JP 2009-518426 A	1-30

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/385(2006.01)i, A61K39/39(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P33/06(2006.01)i, A61K39/015(2006.01)n, A61K39/12(2006.01)n, C07K19/00(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A61K39/385, A61K39/39, A61K47/42, A61K47/48, A61P31/14, A61P33/06, A61K39/015, A61K39/12, C07K19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMII)
UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X ----- Y	BELITSKAYA, S.Y. et al., "Design of chimeric proteins on the basis of a pentameric superhelical fragment of human cartilage oligomeric matrix protein: I. The properties of a hybrid containing the immunodominant domain of the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum", Russ. J. Bioorg. Chem., (2004), Vol.30, No.1, pp.35-41, 全文(特に第 35 頁 Abstract, 右列 11-20 行, 第 36 頁左列 16-32 行, 第 41 頁右列 3-7 行参照)	1-10,24-30 ----- 1-30

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.02.2010

国際調査報告の発送日

16.03.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐藤 巖

4B

3334

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X ----- Y	BELITSKAYA, S.Y. et al., "Design of chimeric proteins on the basis of a pentameric superhelical fragment of human cartilage oligomeric matrix protein: II.1 The properties of a hybrid containing the antigen VNTR(MUC1) from human tumors", Russ. J. Bioorg. Chem., (2004), Vol.30, No.1, pp.42-46, 全文(特に第 42 頁 Abstract 参照)	1-10,24-28 ----- 1-28
X ----- Y	US 2005/0137156 A1 (JOHNSTON, S.A. et al.) 2005.06.23, 全文(特に請求項 32, 段落[0047], [0075], [0135]-[0137], Fig.6B 参照) (ファミリーなし)	1-10,24-30 ----- 1-30
Y	WO 2007/027640 A2 (CELLDEX THERAPEUTICS LIMITED) 2007.03.08, 全文(特に請求項 1,2,5,6,9, 第 14 頁 16-23 行, 第 39 頁 15-30 行参照) & US 2007/0160628 A1 & EP 1931378 A & JP 2009-516641 A	1-30
Y	JP 62-272989 A (カビイエン・アー・ペー) 1987.11.27, 全文(特に請求の範囲第 1,6,7 項, 第 3 頁右下欄 7-14 行, 右上欄 2-6 行, 第 4 頁右上欄 9-15 行参照) & US 5411732 A & EP 243333 A2	1-30
Y	DEMPSEY, P.W. et al., "C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity", Science, (1996), Vol.271, pp.348-350, 全文(特に第 348 頁要約, 第 350 頁下から 2 行-最終行参照)	1-14,24-30
X	JP 2008-536916 A (オプトヴェント・アクチボラゲット) 2008.09.11, 全文(請求項 7, 段落【0141】, 【0146】参照) & WO 2006/112777 A2 & EP 1871422 A	1-5,11-13
P,X	MIYATA, T. et al., "Tricomponent immunoactivating pentavalent system (TIPs) for malaria vaccine development", 日本寄生虫学会大会プログラム抄録集, (Feb. 2009), Vol.78th, p.46, 全文	1-10,14-19,22, 24-30
P,X	WO 2009/109428 A2 (ALPHA-O PEPTIDE AG) 2009.09.11, 全文 & EP 2085405 A2	1-5,11-13, 24-30
A	US 2005/0170337 A1 (HOGLE,J.M.) 2005.08.04, 全文 (ファミリーなし)	1-30
A	WO 2007/067681 A2 (UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2007.06.14, 全文 & US 2007/172504 A1 & EP 1976565 A2 & JP 2009-518426 A	1-30