

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-512405

(P2006-512405A)

(43) 公表日 平成18年4月13日(2006.4.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/015 (2006.01)	A 6 1 K 39/015 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 71 頁)

(21) 出願番号	特願2005-501650 (P2005-501650)	(71) 出願人	595136380
(86) (22) 出願日	平成15年10月22日 (2003.10.22)		グラクソスミスクライン・バイオリジカル
(85) 翻訳文提出日	平成17年6月13日 (2005.6.13)		ス・ソシエテ・アノニム
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/033462		GLAXOSMITHKLINE BIO
(87) 国際公開番号	W02004/037189		LOGICALS S. A.
(87) 国際公開日	平成16年5月6日 (2004.5.6)		ベルギー国ペー-1330リクセンザルト
(31) 優先権主張番号	60/420,265	(71) 出願人	505151807
(32) 優先日	平成14年10月23日 (2002.10.23)		アメリカ合衆国
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 20910-7500
(31) 優先権主張番号	60/447,026		メリーランド、シルヴァースプリング、
(32) 優先日	平成15年2月13日 (2003.2.13)		ネイヴァル メディカル リサーチ セン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ター、 オフィス オブ テクノロジー
			トランスファー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マラリアに対するワクチン接種の方法

(57) 【要約】

本発明は、ワクチン接種による、マラリア感染に対する防御方法に関する。本発明の方法は、DNA系ワクチンによって抗マラリア免疫応答を初回刺激し、タンパク質系ワクチンによってその応答を追加刺激するものである。本発明の方法はまた、タンパク質系ワクチンによる追加免疫によって、生じる免疫応答を広げることに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マラリアを引き起こす病原体に対するヒトの免疫感作方法であって、

a) 少なくとも 1 種の第 1 のマラリア抗原をコードしている少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含む初回刺激ワクチンを、その応答を確立するのに十分な初回刺激量で投与して、ヒトの免疫応答を初回刺激するステップと、

b) 続いて、少なくとも 1 種の第 1 のマラリア抗原と共通する少なくとも 1 種のエピトープを有する少なくとも 1 種の第 2 のマラリア抗原を含む少なくとも 1 種のポリペプチドを含む追加免疫ワクチンを、その初回刺激による免疫応答を追加刺激するのに十分な追加刺激量で投与して、前記ヒトの前記の初回刺激による免疫応答を追加刺激するステップとを含み、

前記初回刺激ワクチンの投与が CD8 + T 細胞を初回刺激し、前記追加免疫ワクチンの投与が、初回刺激による CD8 + T 細胞を復活させ、前記初回刺激による CD8 + T 細胞の応答を広げ、さらに抗マラリア CD8 + T 細胞、抗マラリア CD4 + T 細胞、及び抗マラリア抗体の産生をもたらす方法。

【請求項 2】

前記第 2 のマラリア抗原が、前記第 1 のマラリア抗原の全部又は一部を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記初回刺激量が、0.01 μg ~ 50 mg である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記初回刺激量が 2500 μg である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記初回刺激量を、前記第 2 のワクチンの投与前に 1 回 ~ 5 回投与する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記追加刺激量が 1 μg ~ 100 μg である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記追加刺激量が 50 μg である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記追加刺激量が 25 μg である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記初回刺激ワクチンを、IM、IV、ID、皮下、経粘膜、組換え細菌、組換えウイルス、若しくは遺伝子銃、又はこれらの組合せから選択される方法によって投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記追加免疫ワクチンを、IM、IV、ID、皮下、経粘膜、組換え細菌、組換えウイルス、若しくは遺伝子銃、又はこれらの組合せから選択される方法によって投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 CD8 + T 細胞が、細胞障害性 T リンパ球を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記の第 1 のマラリア抗原が、スポロゾイト周囲ポリペプチドの少なくとも断片を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記の第 2 のマラリア抗原が、スポロゾイト周囲ポリペプチドの少なくとも断片を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記初回刺激ワクチンが Pf CSP を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記追加免疫ワクチンが R T S , S を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 のマラリア抗原が、スポロゾイト周囲タンパク質の実質的に全部を含み、前記第 2 のマラリア抗原が R T S , S を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記のマラリアを引き起こす病原体が熱帯熱マラリア原虫 (P . f a l c i p a r u m) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 1 に記載の方法で使用するワクチンであって、少なくとも 1 種の第 1 のマラリア抗原をコードしている少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含む初回刺激組成物と、少なくとも 1 種の第 2 のマラリア抗原をさらに含む少なくとも 1 種のポリペプチドからなる追加免疫組成物とを、別々の構成部分として含むワクチン。 10

【請求項 19】

前記ポリヌクレオチドがスポロゾイト周囲タンパク質の実質的に全部をコードしている、請求項 18 に記載のワクチン。

【請求項 20】

前記初回刺激組成物が P f C S P を含む、前記追加免疫組成物が R T S , S を含む、請求項 18 に記載のワクチン。

【請求項 21】

前記の R T S , S を含む組成物がさらにアジュバントを含む、請求項 18 に記載のワクチン。 20

【請求項 22】

マラリアを引き起こす病原体に対するヒトの免疫感作用のキットであって、

a) 少なくとも 1 種の第 1 のマラリア抗原をコードしている少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含む初回刺激ワクチンと、

b) 前記の少なくとも 1 種のマラリア抗原と共通する少なくとも 1 種のエピトープを有する少なくとも 1 種の第 2 のマラリア抗原をさらに含む少なくとも 1 種のポリペプチドからなる追加免疫ワクチンと

を含み、前記初回刺激ワクチンの投与が C D 8 + T 細胞を初回刺激し、前記追加免疫ワクチンの投与が、初回刺激による C D 8 + T 細胞を復活させ、前記初回刺激による C D 8 + T 細胞の応答を広げ、さらに抗マラリア C D 8 + T 細胞、抗マラリア C D 4 + T 細胞、及び抗マラリア抗体の産生をもたらすキット。 30

【請求項 23】

前記初回刺激ワクチンが P f C S P を含む、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 24】

前記追加免疫ワクチンが R T S , S ワクチンを含む、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 25】

マラリアを引き起こす病原体に対するヒトの免疫感作用のキットであって、

a) C S タンパク質の実質的に全部又はその断片をコードしている少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含む初回刺激ワクチンと、 40

b) C S タンパク質の実質的に全部又はその断片を含む少なくとも 1 種のポリペプチドを含む追加免疫ワクチンと

を含むキット。

【請求項 26】

前記初回刺激ワクチンが P f C S P を含む、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

前記追加免疫ワクチンが、C S タンパク質の C 末端部分の実質的に全部、免疫優性領域の 4 箇所以上の縦列型反復部分、及び B 型肝炎ウイルス由来表面抗原 (H b s A g) を含むハイブリッドタンパク質を含む、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 28】

前記追加免疫ワクチンが、R T S , S、及びT h 1を誘導するアジュバントを含む、請求項27に記載のキット。

【請求項29】

C Sタンパク質の実質的に全部又はその断片をコードしている少なくとも1種のポリヌクレオチドを含む初回免疫組成物と、C Sタンパク質の実質的に全部又はその断片を含む少なくとも1種のポリペプチドを含む追加免疫組成物とを、別々の構成部分として含むワクチン。

【請求項30】

前記初回刺激組成物がP f C S Pを含む、請求項29に記載のワクチン。

【請求項31】

前記追加刺激組成物が、C Sタンパク質のC末端部分の実質的に全部、免疫優性領域の4箇所以上の縦列型反復部分、及びB型肝炎ウイルス由来表面抗原(H b s A g)を含むハイブリッドタンパク質を含む、請求項29に記載のワクチン。

【請求項32】

前記追加免疫組成物が、R T S , S、及びT h 1を誘導するアジュバントを含む、請求項31に記載のワクチン。

【請求項33】

マラリアを引き起こす病原体に対するヒトの免疫感作方法であって、

a) C Sタンパク質の実質的に全部又はその断片をコードしている少なくとも1種のポリヌクレオチドを含む初回刺激ワクチンを、その免疫応答を確立するのに十分な初回刺激量で投与して、ヒトの免疫応答を初回刺激するステップと、

b) 続いて、C Sタンパク質の実質的に全部又はその断片を含む少なくとも1種のポリペプチドを含む追加免疫ワクチンを、その初回刺激による免疫応答を追加刺激するのに十分な追加刺激用量で投与して、前記ヒトの前記の初回刺激による免疫応答を追加刺激するステップと

を含む方法。

【請求項34】

前記初回刺激ワクチンがP f C S Pを含む、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記追加免疫ワクチンが、前記C Sタンパク質のC末端部分の実質的に全部、免疫優性領域の4箇所以上の縦列型反復部分、及びB型肝炎ウイルス由来表面抗原(H b s A g)を含むハイブリッドタンパク質を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

前記追加免疫ワクチンが、R T S , S、及びT h 1を誘導するアジュバントを含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記初回刺激量が0.01 μg ~ 50 mgである、請求項33に記載の方法。

【請求項38】

前記初回刺激量が2500 μgである、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記初回刺激用量を、第2のワクチンの投与前に1回~5回投与する、請求項37に記載の方法。

【請求項40】

前記追加刺激用量が1 μg ~ 100 μgである、請求項33に記載の方法。

【請求項41】

前記追加刺激用量が50 μgである、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記追加刺激用量が25 μgである、請求項40に記載の方法。

【請求項43】

前記初回刺激ワクチンを、I M、I V、I D、皮下、経粘膜、組換え細菌、組換えウイ

10

20

30

40

50

ルス、若しくは遺伝子銃、又はこれらの組合せから選択される方法によって投与する、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 44】

前記追加免疫ワクチンを、IM、IV、ID、皮下、経粘膜、組換え細菌、組換えウイルス、若しくは遺伝子銃、又はこれらの組合せから選択される方法によって投与する、請求項 33 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2002年10月23日出願の米国特許仮出願第60/420,265号(整理番号4012.6001)及び2003年2月13日出願の米国特許仮出願第60/447,026号(整理番号4012.6002)に基づくものであり、その利権を主張する。これら仮出願の開示は、その全体を本明細書の依拠するところとし、参照により本明細書に援用する。

【背景技術】

【0002】

マラリアは、熱帯地方及び亜熱帯地方では公衆衛生の最も大きな問題の一つである。毎年、3~5億人の人々が新しいマラリア原虫に感染し、開発途上の国々では最高で270万人がマラリアで死亡している(110)。熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)は、マラリアによる死の大多数の原因となっているプスモディウム種である。

【0003】

熱帯熱マラリア原虫の生活環は、4期に分かれており、そのうち3期は人体中で営まれる。一般に115を参照されたい。第1期では、感染性のスポロゾイトをその唾液腺に入れて運ぶ蚊が、ヒトから血液というエサを得、そうしている際に、そのヒトの血流にそれらスポロゾイトを伝染させる。肝臓の実質細胞中に入ると、スポロゾイトは、複製してメロゾイトになる。第2期では、メロゾイトが赤血球(RBC)に感染しながら血流中を移動する。RBCは、メロゾイトで満たされると破裂し、子孫を放出し、これが新たなRBCに感染する。貧血は、この感染段階としてよくある症状である。最終的に、これらRBCのいくらかが、雄性及び雌性の生殖母細胞も産生することになる(第3期)。最終段階では、感染させた蚊が、感染したヒトを食し、生殖母細胞を消化する。蚊の中で、雌性の生殖母細胞が受精して、感染性のスポロゾイトの産生をもたらす、こうして生活環が完了する。

【0004】

熱帯熱マラリア原虫などの病原体が人体に侵入するとき、人体は、免疫系を活性化して応答する。最初に、全身性の応答が起こった後、病原体特異的な応答が生じる。病原体特異的な応答は、侵入病原体に特有の抗原を標的とする。病原体特異的な応答の主な2つの部門は、細胞性と液性である。CD8⁺及びCD4⁺T細胞は、細胞性免疫応答に参与する。詳細には、CD8⁺T細胞は、マクロファージなど、免疫系の他の構成要素に様々な刺激作用を及ぼすインターフェロン(IFN-γ)などのサイトカインを産生する。CD8⁺T細胞の特別なクラスである細胞障害性Tリンパ球(CTL)は、病原体抗原をその表面に発現させている感染細胞細胞を特異的に死滅させる。対照的に、CD4⁺T細胞又はヘルパーT細胞は、CTLの発育を促進し、B細胞を分裂させ、最終的に抗体を産生する。ヘルパーT細胞は、TH1CD4⁺T細胞とTH2CD4⁺T細胞の2種のサブセットに分けることができ、これらは、それぞれが産生するサイトカインのプロフィールに従って同定される。病原体特異的な免疫応答の第2の部門は、液性応答であり、その際、B細胞が複製し、分化し、やがて病原体を直接に結合する抗体を産生する。抗体は、宿主細胞と結合していない病原体を覆うのに特に有用である。次いで、マクロファージなどの食細胞が、抗体によって覆われた病原体を飲み込む。

【0005】

マラリア感染に関しては、病原体特異的免疫応答の別の部門が、熱帯熱マラリア原虫生活環の特定の段階で最も効果的である。感染性のスポロゾイトは、肝臓へと移動し、肝細胞に侵入するとき、細胞内病原体となり、感染細胞の外で過ごす時間はほとんどない。この段階では、 $CD8^+$ T細胞及び $CD4^+$ T細胞とIFN- γ などのそのサイトカイン産物が、感染した宿主細胞の殺し屋役を主に担うことから、これらの細胞は特に重要である。米海軍医学研究センター(NMRC)のマラリア事業及び他の研究所の重要なデータは、ネズミのマラリアにおける細胞内の肝臓寄生体が消滅するかどうか、肝臓期の寄生体によって発現されるペプチドに対する $CD8^+$ T細胞の応答次第であることを示唆している(45)。 $CD8^+$ T細胞が枯渇すると、スポロゾイトによる攻撃に対する防御が絶たれ(27、31、90、93、108)、未処置動物に $CD8^+$ T細胞を養子移入すると、防御が付与される(56、85、87、109)。

10

【0006】

DNAワクチンは、抗原特異的な $CD8^+$ 細胞障害性Tリンパ球(CTL)及び $Th1$ に偏った $CD4^+$ T細胞応答を含む、細胞内病原体及び腫瘍に対する主要機序である細胞媒介性の免疫応答を誘発する(6、11、45、63、104、106)。しかし、これまでDNAワクチンは、ヒトにおける防御免疫応答の誘発について最適状態に及ばないことがわかっている。

【0007】

対照的に、マラリア感染が第2期に及び、RBCに感染するとき、感染性のメロゾイトは、RBC内で複製するだけでなく、血流中を自由に循環する。この感染段階を扱う上では、2点の理由から抗体が最も有効である。第1に、CTLでは、感染宿主細胞が、MHC-Iと呼ばれる特別なタンパク質上に抗原を提示する必要がある。RBCは、MHC-Iを発現させず、そのためにCTLの有効性が弱まる。第2に、上で論じたように、抗体は、宿主細胞と結合していない病原体に対する食作用を媒介する。したがって、感染の第2期では、B細胞、及びB細胞を刺激する $CD4^+$ T細胞の両方が、感染と闘うために重要である。

20

【0008】

熱帯熱マラリア原虫に対するヒトの免疫応答が複雑であること、並びに多段階の寄生生活環にタンパク質の段階特異的な発現が伴うことは、熱帯熱マラリア原虫に対するワクチンの開発が困難となる一因である。それでもなお、マラリアワクチンは求められて止まない。

30

【0009】

スポロゾイト期の熱帯熱マラリア原虫は、マラリアワクチンの潜在的なターゲットとして同定されている。スポロゾイトの主な表面タンパク質は、スポロゾイト周囲タンパク質(CSタンパク質)として知られている。7G8系統由来のタンパク質は、クローン化、発現、及び配列決定がなされている(21)。このタンパク質は、4回の副繰返し単位Asn-Val-Asp-Proを差し挟んで37回繰返しされるテトラペプチドAsn-Ala-Asn-Proを含む中央の免疫優性反復領域を有することを特徴とする。他の株では、主副の各繰返し単位の数、並びにその相対的な位置が異なる。この中心部分は、CSタンパク質の反復なし部分と呼ばれる繰返されないアミノ酸配列からなるN末端及びC末端部分に隣接している。

40

【0010】

熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲(PfCSP)遺伝子を発現させるプラスミドを含有するDNA系ワクチンが、米カリフォルニア州サンディエゴのVicari, Inc.及び米海軍医学研究センターによって開発されている(47)。このワクチンは、1mlあたり2500 μ gの濃度でリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に含まれる裸のDNAからなるものである。プラスミドは、全PfCSP遺伝子をコードする全長遺伝子を含み、発現が、CMV IE遺伝子のプロモーター/エンハンサー、CMV IE遺伝子の5'側非翻訳領域、及びウシ成長ホルモン遺伝子の転写ターミネーターによって制御されるものである(64)。哺乳動物細胞中での抗原の発現及び分泌を増強するため、コード配列

50

の5'末端に、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子タンパク質(hTPA)のリーダーペプチドをコードする配列を付加してあった。したがって、このPfCSPプラスミドに含まれる2本のオープンリーディングフレーム配列は、カナマイシン耐性タンパク質とhTPAリーダー/PfCSP融合タンパク質とをコードする(40)。このPfCSPプラスミドは、ウイルス性若しくは発癌性のタンパク質をコードする既知の配列を含んでいない。このプラスミドは、6261個のヌクレオチド塩基対を含み、その分子量は、平均のDNA塩基対が650gmuであるとすれば、 4.07×10^6 gmuである。

【0011】

このPfCSP DNAプラスミドは、精製プラスミドから得たクローン化されたDNA区域を使用し、標準の分子遺伝学技術を利用して構築した。このプラスミドは、細菌(大腸菌)細胞をカナマイシン選択培地で培養して産生させた。細菌細胞によって醗酵させた後、プラスミドDNAを精製した。

【0012】

臨床治験の開始前に、NMRCでPfCSP DNAワクチンの前臨床免疫原性試験を実施した。詳細には、PfCSPプラスミドを培養哺乳動物細胞に一過性に形質移入し、その後、免疫プロット分析によって抗体発現を評価した。このプラスミドが、マウス及び非ヒト霊長類で抗原特異的な抗体応答及びCTL応答を誘発する能力も試験した(40、105)。マウスモデルでの試験では、プラスミドDNAによる免疫感作の後に抗原特異的なCTL応答及び抗体応答が誘発されたことが実証された(30)。試験ではさらに、免疫感作の筋肉内(IM)経路が、他の系で報告されたものと比べて、 $CD8^+ Th1$ 免疫応答の誘発に最適であったことを確認した(30)。さらに、後続の試験では、PfCSPプラスミドによる免疫感作を、単独で、又は赤血球期前肝臓期の他の熱帯熱マラリア原虫タンパク質をコードする最高で4種の他のプラスミドと組合せて、IM経路によって施した6匹のすべてのアカゲザルの抗原特異的なCTL応答及び/又は抗体応答が検出可能であったことが示された(106)。

【0013】

臨床治験で使用する前に、大規模な臨床前安全性試験を実施した。この試験は、1)静脈内(IV)経路又はIM経路で投与したプラスミドDNAのマウス組織分布試験、2)マウス及びウサギでの反復投与安全性試験、及び3)マウスでのプラスミドDNA組込み試験を含むものであった(67、75)。これら試験の概略を以下に示す。

【0014】

プラスミド分布試験：Parkerらは、マウスの異なる組織におけるプラスミド分布を評価している(75)。マウスに、ヒトに推奨される最高mg/kg用量の25倍とした1回分のPfCSPプラスミドをIV又はIMで投与した。組織を収集し、PCRを使用して、IV投与後には投与後1時間、2日、及び4週間、IM投与後には2日、4週間、及び8週間の時点でのプラスミドDNAの存在を評価した。プラスミドDNAは、IM投与してから1時間後には全組織にくまなく分布したことがわかった。IM投与してから2日後までに、プラスミドは、骨髄、血液、及び注射部位でしか見られなくなり、注射部位で最も高レベルであった。プラスミドDNAは、IM投与してから1週間後までに、注射部位でしか検出されなくなった。IV投与後、PfCSP DNAプラスミドは、生殖腺及び脳を除く全組織に低レベルで分布したことがわかった。IV投与してから4週間後には、DNAプラスミドは、1匹の動物の肺でしか検出されなかった。

【0015】

反復投与安全性試験：Parkerらは、マウス及びウサギにおけるワクチンの繰返し投与の安全性にも対処している(75)。マウスの反復投与安全性試験では、動物に、PfCSP DNAプラスミドのIM注射を $1.0 \mu g$ 、 $10 \mu g$ 、及び $100 \mu g$ の用量で28日間にわたり8回繰り返して施した(mg/kgでのヒト推奨用量の5~500倍に等しい累積用量)。異常な血液学若しくは血清化学、異常な組織病理学、又は抗核抗体若しくはdsDNAに対する抗体の誘導の形跡はなかった。ウサギの反復用量安全性試験では、動物に、プラスミドのIM注射を毎週 $150 \mu g$ 及び $450 \mu g$ の用量で6回施し

10

20

30

40

50

た。ここでもマウスの試験のように、異常な血液学若しくは血清化学、異常な組織病理学、又は抗核抗体若しくは dsDNA に対する抗体の誘導の形跡はなかった。したがって、Parker の試験では、PfCSP プラスミドが宿主の組織全体に十分に分布すること、このプラスミドが長期間にわたりそれらの組織の一部に残ること、並びにボランティアに投与して有害な反応がないことが示すように、このプラスミドをヒトに使用しても安全であることが示された。

【0016】

組込み試験：Martinらは、PfCSP プラスミドが宿主染色体DNAに組み込まれるかどうかを評価している(67)。各マウスに1回分のプラスミドDNAを注射し、投与してから30日後及び60日後に、PCR分析によってDNA1マイクログラムあたり1~10コピーの感度まで組織の分析を行った。全体として、これらの試験では、プラスミドの組込みの証拠は得られず、プラスミドDNAがゲノムDNAに組み込まれることがあるとしても、極めて低レベル、すなわち、自然突然変異に求められるものの数千分の一であることが示唆された。

【0017】

研究者がPfCSPワクチンの安全性を確認すると、NMRCは、第2相I臨床治験を実施した。最初の治験では、健康なマラリア未経験の成人ボランティアに、1997年~1998年の間PfCSP DNAワクチンを受けさせた(33、62、105、106)。合計20人のボランティアが参加し、20µg、100µg、500µg、及び2500µgの4通りの各投与群に5人のボランティアを割り振り、1カ月間隔で3回分を受けさせた。Leらが述べているように、すべての用量が、重症若しくは重篤な有害事象が出現することなく十分な耐容性を示した(62)。中程度の有害事象が4件あり、すべてワクチン投与との関連はなさそうであるとみなした。最もよくあった苦情は、注射部位の痛みと敏感さであった。これは軽く、48時間以上は続かず、薬剤投与の必要がなかった。ボランティアはいずれも、血清生化学の重大な異常を伴わなかった。

【0018】

20人の対象者はいずれも、抗dsDNA抗体が誘導されず、又はANA(抗核抗体)力価が基線から増大していなかった。Wangらは、ボランティアがいずれも、風乾スロロゾイトに対する間接蛍光抗体試験(IFAT)と組換えペプチド及び合成ペプチドに対する酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)とによって評価したところでは、PfCSPに対する抗体を生じなかったことを示した。しかし、20人のうち11人のボランティアは、CTL活性が、抗原特異的であり、遺伝的な拘束を受けていた。詳細には、対照ペプチドと共にインキュベートした自己由来ターゲット、又はその特定のペプチドと共にインキュベートしたHLAクラスI不適合ターゲットがほとんど又は全く認識されなかったため、CTL応答は、CD8+T細胞依存的、ペプチド特異的、かつ遺伝的にHLA拘束性であった。さらに、DNAから誘導されたCTLは、多彩なHLAアレルによる拘束を受けていた(105、107)。CTLの増加傾向は、用量と関連していた。残りの9人のボランティアでは、それぞれの投与後に実施したどのアッセイでもCTLが検出されなかった。

【0019】

1999年4月に開始した第2の臨床治験では、従来針IM(筋肉内)、Biojector(登録商標)IM、及びBiojector(登録商標)IM(用量の70%)プラスID(皮内)(用量の30%)の異なる3通りの経路で、14人の健康な成人ボランティアをPfCSP DNAワクチンによって0、4、及び8週目に免疫感作した。Biojector(登録商標)は、針を用いない急速注射装置である。この試験が小規模であることを考えて、ボランティアのHLA多様性を、この集団中で最も一般的であったHLAクラスIサブタイプであるHLA A2に限定して、遺伝的な拘束を受けているCTL応答をグループ間で比較できるようにした。この試験に参加したボランティアのうち10人は、その後、本発明の方法を使用する追加の治験に参加した。この治験及びその結果は、以下の「実施例」の項でさらに述べる。

10

20

30

40

50

【0020】

全体として、このワクチンは、安全であり、十分な耐容性を示した。ボランティアは、ワクチンと関連のある重症又は重篤な有害事象(AE)を経験しなかった。ボランティアはいずれも、試験した3通りのどの経路でも、PfCSPワクチン投与に関連した重大な検査の異常がなかった(33)。

【0021】

ワクチンに対する免疫応答に関しては、ボランティアはいずれも、風乾スポロゾイトに対するIFATと組換えペプチド及び合成ペプチドに対するELISAとによって評価したところでは、PfCSPに対する抗体を生じなかった(107)。PfCSP特異的抗体が存在しなかったことは、Biojector急速注射装置及び免疫感作のID経路が、動物モデルでは抗体産生の向上と関連付けられていたので、幾分意外であった(1、37、62)。T細胞応答は、ELISPOTアッセイでIFN- γ によって測定した。これらのアッセイを実施する際には、PfCSPプラスミドによってコードされたCSPタンパク質のT細胞エピトープを含むペプチドを使用した。

【0022】

針IM群の4人全員のボランティアは、アッセイの17.6%(26/148)で7/9種のペプチドに応答した。BiojectorIM群の5人全員のボランティアは、アッセイの26.5%(49/185)で9/9種のペプチドに応答した。BiojectorIM/ID群の5人のうち4人のボランティアが、アッセイの17.3%(32/185)で7/9のペプチドに応答した。14人のうち8人のボランティアは、CTL応答が検出可能であった。その8人のうち、2人は、針IM群(合計5/126のアッセイで4/7種のペプチドに応答)であり、3人は、BiojectorIM群(合計11/168のアッセイで6/8種のペプチドに応答)であり、3人は、BiojectorIM/ID群(合計14/162のアッセイで6/6種のペプチドに応答)であった(107)。全体として、この治験では、抗原特異的IFN- γ 応答を誘発するにはBiojectorIM接種経路が最も有効であること、並びに抗原特異的CTL応答を誘発するにはBiojectorIM又はIM/ID経路が最も有効であることが確認された。

【0023】

要するに、これら2種の臨床治験では、ペプチド特異的で、遺伝的に拘束され、CD8 $^{+}$ T細胞依存的なCTL活性による測定、及びIFN- γ 産生による測定を行ったところ、PfCSPポリヌクレオチドワクチンが、抗原特異的で遺伝的拘束を受けるCD8 $^{+}$ T細胞応答を誘発し得ることが実証された(105、107)。第2の臨床治験のボランティアは、PfCSPポリヌクレオチドワクチンを最後に投与されてから1年後に試験したとき、上記で測定されたようなCD8 $^{+}$ 抗原特異的T細胞応答を示さなかった。

【0024】

上で論じたように、CD8 $^{+}$ T細胞応答に加えて、PfCSPタンパク質の任意のペプチドに対する抗体も、マラリア感染の制御において重要な役割を果たす(1、78、99)。PfCSPDNAワクチンの大抵の受容者は、CD8 $^{+}$ 抗原特異的なT細胞応答を発するが、抗CSP特異的抗体を生じる受容者はいない。対照的に、研究者らは、RTS,Sが、CSPに対する強い抗体応答を誘発し得ることを示している(53、99、100)。RTS,Sは、TH-1型細胞性及び液性免疫の強力な誘発物質でもあり、RTS,S特異的なCD4 $^{+}$ T細胞応答は、主にTh2R免疫優性多形性領域に集中する(61)。

【0025】

RTS,Sを2回又は3回分投与すると、最後の免疫感作から2~3週間後に熱帯熱マラリア原虫を負荷させた60人を超えるボランティアの平均44%が防御され(8、54、99)、最後の免疫感作から2カ月間、半免疫性のガンビア人の70%が防御された(8)。しかし、この防御は短期間のものである(8、100)。RTS,Sによって免疫感作を施すと、抗PfCSP抗体が誘導され、CD4 $^{+}$ T細胞依存的なIFN- γ 応答も

10

20

30

40

50

誘発されるが、 $CD8^+$ T細胞依存的なCTL若しくはIFN- 応答は検出されなかった(61)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

本発明は、少なくとも1種の第1のマラリア抗原をコードするポリヌクレオチドを含む初回刺激ワクチンによって免疫応答を初回刺激し、次いで初回刺激ワクチンの少なくとも1種の第1のマラリア抗原と共通する少なくとも1種のエピトープを有する少なくとも1種の第2のマラリア抗原を含む少なくとも1種のポリペプチドを含む追加免疫ワクチンによって初回抗原刺激による応答を追加刺激する、新規なワクチン接種方法を提供する。この組合せは、現在の抗マラリアワクチン接種戦略に3通りの重大な改善点をもたらす。

10

【0027】

第1に、2種の異種ワクチンを組み合わせると、免疫系の両方の部門、すなわち $CD8^+$ T細胞及び $CD4^+$ T細胞と抗体とが活性化される。詳細には、PfCSPワクチン又はRTS, Sワクチンを使用する臨床試験の結果によれば、どちらのワクチンでも、単独では $CD8^+$ T細胞、 $CD4^+$ T細胞、及びCSPに対する抗体を呼び起こす持続可能な免疫応答が確認されなかった。本発明は、2種のワクチンを組み合わせ、それによって3種すべての応答を誘発して、この結果を改善するものである。詳細には、PfCSPワクチンが $CD8^+$ T細胞応答を初回刺激し、RTS, SワクチンがそのT細胞応答を追加刺激する。RTS, Sワクチンは、抗CSP抗体及び $CD4^+$ T細胞も誘導するので、CSPに対して生じる免疫応答は、 $CD8^+$ 及び $CD4^+$ のT細胞応答と抗体応答の両方を含む。ワクチン接種のこの総合的な戦略、すなわち、1種のワクチンで初回刺激し、次いでその初回刺激ワクチンと共通する少なくとも1個の共通エピトープをもつ異なるワクチンで追加免疫するものを、「初回刺激/追加免疫」戦略と呼ぶ。

20

【0028】

現在のワクチン接種戦略に対する本発明の第2の重要な改善点は、本発明が、ヒトの $CD8^+$ T細胞応答の刺激にタンパク質ワクチンを使用することにある。本発明の方法は、これまで $CD8^+$ T細胞応答の刺激には効果がないとみなされていたタンパク質系ワクチンを使用してT細胞応答を追加刺激する(61)。

【0029】

最後に、現在の抗マラリアワクチン接種戦略に対して本発明が提供する第三の重要な改善点は、本発明が、2通りの手段で免疫応答を広げることである。第1に、RTS, S単独では、 $CD4^+$ T細胞依存的なTh1 IFN 応答しか誘発されなかったが、DNAによる初回刺激では、 $CD4^+$ T細胞依存的な、 $CD8^+$ 1型(Tc1)及び $CD4^+$ 1型(Th1)の両方のIFN- 応答が開始されたので、DNA初回刺激/RTS, S追加免疫によって、より広いレパートリーのIFN- 産生T細胞(Tc1及びTh1)が誘導された。第2に、PfCSPワクチンは、単独で投与されると、 $CD8^+$ T細胞のある集団を初回刺激する。同様に、RTS, Sワクチンは、単独で、ある仲間の抗体を作るある集団の $CD4^+$ T細胞及びB細胞を初回刺激する。しかし、組み合わせると、その結果として生じる $CD8^+$ T細胞応答は、PfCSPワクチンによって最初に初回刺激されたエピトープに及ぶだけでなく、初回刺激PfCSPワクチン接種の後に最初に同定されなかった追加のエピトープにも及ぶ。タンパク質ワクチンが、確立された $CD8^+$ T細胞応答を追加刺激するだけでなく、それを広げるはずであるという概念は、当業界でタンパク質ワクチンについて知られていたことを考えると、思いがけないものである。

30

40

【課題を解決するための手段】

【0030】

本発明は、ヒトにマラリアに対する免疫感作を施す方法であって、a) 少なくとも1種のマラリア抗原をコードしているポリヌクレオチドを含む初回刺激ワクチンを投与してヒトの免疫応答を初回刺激するステップと、b) 続いて、前記初回刺激ワクチンの1種又は複数のマラリア抗原と共通する少なくとも1種のエピトープを有する少なくとも1種のマ

50

ラリア抗原を含む少なくとも1種のポリペプチドを含む追加免疫ワクチンを投与して、初回刺激による免疫応答を追加刺激して、マラリアに対する細胞性免疫応答及び液性免疫応答の両方を惹起するステップとを含む方法に関する。

【0031】

本発明の一実施形態では、初回刺激ワクチンは、追加免疫ワクチン中に存在する同じポリペプチドをコードしている。他の実施形態では、初回刺激ワクチンが、追加免疫ワクチン中に存在するマラリア抗原の一部をコードしているか、又は追加免疫ワクチン中に存在するポリペプチドが、初回免疫ワクチンによってコードされているマラリア抗原の部分であるかのどちらかである。別の実施形態では、各ワクチンは、少なくとも1種のマラリアT細胞エピトープを共通にもつ。さらに別の実施形態では、各ワクチンは、少なくとも1種のマラリアCD8⁺T細胞エピトープを共通にもつ。代替実施形態では、2種のワクチンは、数種のマラリアエピトープを共通にもつ。

10

【0032】

本発明の方法でマラリアを引き起こすどんな病原体を使用してもよい。一実施形態では、病原体は、熱帯熱マラリア原虫である。他の実施形態では、たとえば、病原体は、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、又は四日熱マラリア原虫でよい。同様に、本発明の方法は、病原体の生活環の任意の段階で発現されるどんなマラリア抗原を用いて使用してもよい。一実施形態では、初回刺激ワクチンは、肝臓期を含む、病原体の前RBC期の間で発現される1種又は複数の抗原をコードし、追加免疫ワクチンはそれを含む。さらに別の実施形態では、初回刺激ワクチンのポリヌクレオチドは、感染の肝臓期の間で発現されるスポロゾイト周囲タンパク質の少なくとも一部分をコードし、追加免疫ワクチンは、そのスポロゾイト周囲タンパク質の少なくとも一部分を含む。さらにまた別の実施形態では、初回刺激ワクチンのポリヌクレオチドは、スポロゾイト周囲タンパク質のほぼ全体をコードし、追加免疫ワクチンは、スポロゾイト周囲タンパク質の部分を含む。CSタンパク質の最小部分は、少なくとも1個のエピトープ又は数個のエピトープを含む免疫原性部分である。特定の一実施形態では、初回刺激ワクチンはPfCSPを含み、追加免疫ワクチンはRTS_Sを含む。別の実施形態では、初回刺激ワクチンはPfCSPワクチンであり、追加免疫ワクチンはRTS_Sワクチンである。

20

【0033】

本発明はさらに、本明細書に記載したような初回刺激ワクチンと追加免疫ワクチンとを含む薬剤キットを提供する。

30

【0034】

本発明はさらに、マラリアを予防し、その重症度を軽減するためのワクチンを調製する際に、本明細書に記載したような初回刺激ワクチン及び追加免疫ワクチンを使用するものである。

【0035】

したがって、本発明は、マラリア用の初回刺激 - 追加免疫ワクチンを製造する際に、少なくとも1種のマラリア抗原、特にCSタンパク質、又はその断片をコードしているポリヌクレオチドを初回刺激ワクチンとして使用し、少なくとも1種のマラリア抗原、特にCSタンパク質、又はその断片を含むポリペプチドを追加免疫ワクチンとして使用するものである。特定の一実施形態では、ポリヌクレオチドの一つは、DNAプラスミドの形であり、全長CSタンパク質又はその断片を発現させることが好ましい。CSタンパク質又はその断片をコードしているポリヌクレオチドは、当業界で知られているような異種プロモーターの制御下に置くことができる。一実施形態では、プロモーターは、任意選択でエキソン1を含むHCMV IEプロモーターである。特定の一実施形態では、追加免疫ワクチンのポリペプチドは、CSタンパク質のカルボキシ末端部分、たとえば、任意選択でカルボキシ末端の12アミノ酸を除く、カルボキシ末端部分からの少なくとも160個のアミノ酸を含むハイブリッドタンパク質である。初回刺激組成物及び追加免疫組成物は、どちらか又は両方が、追加のマラリア抗原又は他の抗原を含んでもよい。

40

【0036】

50

本発明のこの態様による実施形態では、初回刺激ワクチンは、異種プロモーターの制御下に置かれてDNAプラスミド中に存在する、全長CSタンパク質をコードしているポリヌクレオチドを含み、追加免疫ワクチンは、Th1誘導型アジュバント、詳細にはQS21、3D-MPL、及び水中油乳濁液を含むアジュバントと組み合わせたRTS,Sを含む。初回刺激ワクチン及び追加免疫ワクチンは、薬剤キットの形で提供してもよい。

【0037】

本発明は、これまでにマラリアを引き起こす病原体との接触がない、又は接触はあるが完全に防御されていないヒトを部分的に、増強して、又は完全に防御しようとするものである。本発明を使用すると、マラリア感染に罹患する可能性を減らし、感染時には悪化する可能性を減らし、感染しているときには発熱などの病気状態の重症度を軽減し、感染者中の寄生体濃度を低減し、又はマラリア寄生体に曝されているときにはマラリアによって死すべき運命を緩めることができる。マラリアが蔓延している地域では、部分的な防御でさえも有益である。たとえば、人口の約30%を防御するワクチン処置戦略が、地域社会に重大な影響を与え得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

本明細書で示すとおり、マラリア感染に対する多部門からなる免疫応答は、少なくとも1種のマラリア抗原をコードしているポリヌクレオチドを含む初回刺激ワクチンでヒト対象が免疫感作されることによる初回刺激を受け、次いで、初回刺激ワクチンの1種又は複数のマラリア抗原と共通する少なくとも1個のエピトープを有する少なくとも1種のマラリア抗原を含む少なくとも1種のポリペプチドを含む追加免疫ワクチンで免疫感作されることによる追加刺激を受けたものである。驚くべきことに、この免疫感作法では、ポリペプチドワクチンを使用して初回刺激による応答を追加刺激し、またそれを広げる。

【0039】

「ワクチン」とは、対象に投与されると免疫応答を誘発する分子を含む物体の組成物である。ワクチンは、ポリヌクレオチド分子、ポリペプチド分子、及び炭水化物分子、並びに糖タンパク質、リポタンパク質、炭水化物-タンパク質結合体、2種以上のポリペプチド若しくはポリヌクレオチド同士の融合体といったそれぞれの誘導體及び複合体などを含んでよい。ワクチンはさらに、当業者には容易に理解されるはずであるが、希釈剤、アジュバント、担体、又はこれらの混合物を含んでよい(83)。

【0040】

ヒト対象へのポリヌクレオチドワクチン又はタンパク質ワクチンの送達には、任意の接種方法又は接種経路を単独又は組合せで使用してよい。投与経路には、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、又は経粘膜が含まれる。送達手段は様々でよく、たとえば、ヒトにIV、IM、皮下、又はID経路で注射を行うことができる。ヒト対象に経粘膜経路で接種してもよい。或いは、送達は、針を用いない「遺伝子銃」、たとえばBiojector(登録商標)や他の急速注射装置を使用するなどの針を用いない手段によるものでもよいし、又は微粒子銃送達でもよい。ポリヌクレオチドは、PfCS PワクチンのDNAを含む細菌、又はPfCS PワクチンのDNAを含むウイルスとして送達してもよい。

【0041】

適切なウイルスベクターの例には、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルス若しくはアルファウイルスのベクター、レンチウイルスを含むレトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルスが含まれる。一実施形態では、これらのベクターが、複製に欠陥のあるウイルスベクターである。これらのウイルスを使用する遺伝子導入技術は、当業者に知られている。たとえば、レトロウイルスベクターを使用すると、本発明のポリヌクレオチドを宿主ゲノムに安定に組み込むことができるが、このような組換えが得策でない場合もある。複製に欠陥のあるアデノウイルスベクターは、これと比べると、エピソームのままであり、したがって、一過性の発現を可能にする。

【0042】

特定の実施形態では、生きているベクターとして使用するアデノウイルスは、複製に欠

10

20

30

40

50

陥のある、ヒト若しくはサルのアデノウイルスである。通常、これらのウイルスはE1欠失を含み、E1遺伝子で形質転換されている細胞系で増殖することができる。適切なサルアデノウイルスは、たとえば、チンパンジーから単離されたウイルスである。本発明での使用に適するウイルスの例には、C68 (Pan9としても知られている) (米国特許第6083716号、参照により本明細書に援用)、Pan5、6、及びPan7 (W003/046124、参照により本明細書に援用)が含まれる。したがって、遺伝子産物が発現されるよう、これらのベクターを操作して、本発明の異種遺伝子を挿入することができる。このような組換えアデノウイルスベクターの使用、定式化、及び製造については、W003/046142に詳細に述べられており、これを参照により援用する。

【0043】

ワクチンが、別々の構成部分からなってもよい。本明細書では、「別々の構成部分」とは、用語ワクチンが、対象に別々に投与される2種の別個のワクチンを実際に含む状況を指す。この意味で、別々の構成部分からなるワクチンは、別々になっているワクチン構成部分を含むキット又はパッケージであるとみてよい。たとえば、本発明においては、パッケージが、ポリヌクレオチドワクチン構成部分とポリペプチドワクチン構成部分とを含んでよい。

【0044】

ワクチン中に存在する1種又は複数の抗原が、ワクチン接種を受けた対象にその抗原に対する免疫応答を起こさせるとき、そのワクチンは、免疫応答を「誘発」している。ワクチン接種を受けた対象は、ワクチン抗原特異的T細胞、ワクチン抗原特異的B細胞、ワクチン抗原特異的抗体、及びサイトカインの産生を含む免疫系の活性化を証拠とする、免疫応答を起こす。生じる免疫応答は、ELISPOT、ELISA、クロム放出アッセイ、細胞内サイトカイン染色、FACS分析、及び(ペプチド特異的な細胞を同定するための)MHC四量体染色を含むいくつかの方法によって測定することができる。当業者でも、これらの方法を使用して、一次免疫応答又は二次免疫応答の測定を行うことができる。

【0045】

「抗原」とは、抗原に接触した対象において免疫応答を起こし得る物質である。抗原は、通常はポリペプチドであり、宿主の免疫応答の中心である。「エピトープ」又は「抗原決定基」とは、T細胞及び抗体が特異的に結合する抗原の部分である。抗原は、多数のエピトープを含む。

【0046】

本発明の方法で使用する初回刺激ワクチンは、以下で論じるマラリア抗原をコードしているポリヌクレオチドを含む。初回刺激ワクチンは、DNAのみでも、又は細菌若しくはウイルス内で外来のプロモーターの制御下に置かれているDNAでもよい。初回刺激ワクチンのポリヌクレオチドは、プラスミドや、細菌ベクター若しくはウイルスベクターなどの他のベクターなど、適切な送達ベクターの中に存在する。ポリヌクレオチドは、HCMV IE遺伝子に由来するプロモーターなどの適切なプロモーターの制御下に置かれていてよい。初回刺激ワクチンは、マラリア抗原に対する免疫応答を初回刺激するのに有効な量で投与する。本明細書では、免疫応答の「初回刺激」は、T細胞又はB細胞に抗原が提示されるときに起こる。その結果として、初回刺激を受けた細胞は、2回目の後続の免疫応答でも記憶細胞として再び同じ抗原に応答することができる。したがって、初回刺激は、一次免疫応答を起こし、免疫記憶を確立する。当業者には、一次免疫応答が、病原体やワクチンなどの特定の状況で抗原に最初に接触した後の適応免疫応答であることが了解される。しかし、本発明が、免疫に関して未処置の個体における初回刺激ワクチンの使用に限定されないことも理解されよう。むしろ、初回刺激は、初回刺激ワクチンを受けていないが、抗原に接触したことがある抗体でも起こり得る。

【0047】

「有効な」初回刺激投与量は、0.01 µg ~ 50 mgの範囲のDNAでよい。或いは、投与量は、1 µg ~ 10 mgのDNAでも、2.5 mg ~ 5 mgのDNAでもよい。ポリヌクレオチドワクチンは、追加免疫ポリペプチドワクチンの投与前に1回投与すること

10

20

30

40

50

ができる。別の実施形態では、初回刺激ワクチンを数回投与してもよい。「有効な」接種回数は、1回～5回の範囲でよい。或いは、投与回数は、追加免疫ワクチンの投与前に1回～3回、又は1回～2回でよい。

【0048】

「ポリヌクレオチド」とは、一般に任意のポリリボヌクレオチド(RNA)又はポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)を指し、RNA又はDNAは、変更されていても、されていなくてもよい。ポリヌクレオチドには、限定するものではないが、一本鎖及び二本鎖のDNA、一本鎖領域と二本鎖領域が混在するDNA、一本鎖及び二本鎖のRNA、及び一本鎖領域と二本鎖領域が混在しているRNAが含まれる。ポリヌクレオチドには、一本鎖でも、又はより一般的に二本鎖や一本鎖領域と二本鎖領域の混合でもよいDNAとRNAを含むハイブリッド分子も含まれる。また、「ポリヌクレオチド」は、RNA若しくはDNA又はRNA及びDNAの両方を含む三本鎖領域を指す。ポリヌクレオチドには、1種又は複数の修飾塩基を含むDNA若しくはRNA、及び安定性又は他の理由を考慮して主鎖が修飾されているDNA若しくはRNAが含まれる。「修飾」塩基には、たとえば、トリチル化された塩基、及びイノシンなどの例外的な塩基が含まれる。様々な変更をDNA及びRNAに添えることができ、したがって、「ポリヌクレオチド」は、自然界で通常見られるポリヌクレオチドが化学的、酵素的、又は代謝的に改変された形態、並びにウイルスや細胞のDNA及びRNAの特徴を有する化学物質形態を含む。オリゴヌクレオチドは、比較的短いポリヌクレオチドである。

10

【0049】

ポリヌクレオチド配列の「断片」とは、基準配列よりも短い、基準ポリヌクレオチドと同じであると認められる生物学的な機能又は活性を保持しているポリヌクレオチド配列を指す。断片は、基準ポリヌクレオチド配列によってコードされる基準ポリペプチドの少なくとも1個のエピトープをコードしている。本明細書では、「実質的に全部」とは、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの形容に使用するとき、ヌクレオチド塩基又はアミノ酸残基の少数の欠失を別にして、完全な全長のポリヌクレオチド又はポリペプチドをコードし、又はそれに相当する分子を指す。

20

【0050】

本発明の方法で使用する追加免疫ワクチンは、以下で論じる、少なくとも1種のマラリア抗原ポリペプチドを含む融合タンパク質を含んでいてよい。このワクチンに使用するポリペプチドは、自然の供給源から単離してもよいし、細菌などの外来生物体に入れた組換えタンパク質として提供してもよいし、又は化学的手段によって合成してもよい。追加免疫ワクチンは、マラリアポリペプチドの免疫原性を増強するために、追加のマラリア性でないポリペプチドをさらに含んでよい。たとえば、B型肝炎ウイルス表面抗原の一部又は全部を使用することができる。初回刺激ワクチン及び追加免疫ワクチンは、少なくとも1個の共通マラリアエピトープを共通にもつ。

30

【0051】

本発明による追加免疫ワクチンでの使用に適する融合タンパク質は、CSタンパク質の実質的に全部のC末端部分、免疫優性領域の4箇所以上の縦列型反復部分、及びB型肝炎ウイルス由来表面抗原(HbsAg)を含むハイブリッドタンパク質を含んでいてよい。ハイブリッドタンパク質は、CSタンパク質のC末端部分とほぼ相同である、少なくとも160個のアミノ酸を含む配列を含む。一実施形態では、CSタンパク質は、C末端から数えて12アミノ酸までを欠いていてよい。適切なハイブリッドタンパク質は、たとえば、HbsAgのN末端に線状のリンカーを介してフレーム単位で融合した、熱帯熱マラリア原虫7G8のアミノ酸210～398にほぼ対応するような、熱帯熱マラリア原虫CSタンパク質の部分を含む。リンカーは、HbsAgのpreS2の部分を含んでよい。

40

【0052】

別の実施形態は、参照により本明細書に援用する米国特許第5,928,902号及び国際特許出願第WO 93/10152号に記載されているRTS,Sと呼ばれるハイブリッド粒子である。このハイブリッドは、1.)ヌクレオチド1059～1061によっ

50

てコードされる、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) TDH3 遺伝子配列由来のメチオニン残基 (71)、2.) ハイブリッド遺伝子の構築に使用されるクローン化手順によって作られたヌクレオチド配列 (1062~1070) に由来する3個のアミノ酸 Met Ala Pro、3.) 熱帯熱マラリア原虫系統 7G8 のスポロゾイト周囲タンパク質 (CSP) のアミノ酸 210~398 に相当する、ヌクレオチド 1071~1637 によってコードされるアミノ酸 189 個の配列 (21)、4.) ハイブリッド遺伝子の構築に使用されるクローン化手順によって作られたヌクレオチド 1638~1640 によってコードされるアミノ酸 (Arg)、5.) ヌクレオチド 1641~1652 によってコードされ、B 型肝炎ウイルス (血清型 adw) preS2 タンパク質の4個のカルボキシ末端側残基に相当する4個のアミノ酸 Pro Val Thr Asn (103)、及び6.) ヌクレオチド 1653~2330 によってコードされ、B 型肝炎ウイルス (血清型 adw) の S タンパク質を規定するアミノ酸 226 個の配列からなる。

10

【0053】

追加免疫ワクチンは、マラリア抗原に対する、初回刺激による免疫応答を「追加刺激」するのに有効な量で投与する。本明細書では、免疫応答を「追加刺激」とは、抗原への最初の接触によって初回刺激された (すなわち、すでに接触のあった) 対象において二次免疫応答を誘発することを意味する。二次免疫応答は、特定の記憶 T 細胞及び B 細胞の活性化及び増殖を特徴とする。したがって、特定の免疫応答の追加刺激は、その抗原にその後接触した後に免疫細胞を増殖させ、分化させることによって、初回刺激による免疫応答を増強する。以下で論じるように、PfCSP ワクチンの全長 CS タンパク質は、9 個の T 細胞エピトープを含み、RTS, S は、5 個の T 細胞エピトープを含む (61)。RTS, S エピトープのうち4個が、PfCSP ワクチン中に存在する。たとえば、初回刺激ワクチンが投与されて、抗マラリア CD8⁺ T 細胞を初回刺激する。追加免疫ワクチンは、次の効果、すなわち、CD4⁺ T 細胞の誘導、抗マラリア抗体の誘導、初回刺激ワクチンによる初回刺激を受けた CD8⁺ T 細胞の活性の追加刺激、及び最初の初回刺激による免疫応答で初めは確認されていない更なる CD8⁺ T 細胞の誘導のうち1又は複数の効果を実現することができる。追加免疫ワクチンは、CD4⁺ T 細胞及び抗マラリア抗体も誘導することができる。免疫応答の追加刺激は、当業界では免疫応答の「復活」としても知られている。

20

【0054】

「有効な」追加免疫投与量は、1 µg ~ 100 µg、又は 10 µg ~ 75 µg、又は 40 µg ~ 60 µg の範囲でよい。別の実施形態では、追加免疫投与量は 50 µg でよい。さらに別の実施形態では、追加免疫投与量は 25 µg でよい。追加免疫ワクチンの投与は、1 回でも複数回でもよい。「有効な」追加免疫投与の回数は、追加免疫ワクチンの 1 回 ~ 5 回分の範囲でよい。或いは、投与回数は、ヒト対象に対して 1 ~ 3 回又は 1 ~ 2 回でよい。別の実施形態では、一次免疫応答を追加刺激するのに、DNA ワクチンとタンパク質ワクチンの両方を使用してよい。

30

【0055】

「ポリペプチド」とは、ペプチド結合又は変更型ペプチド結合によって互いに結合している2種以上のアミノ酸、すなわちペプチド同配体を含む任意のポリペプチドを指す。「ポリペプチド」とは、一般にペプチド、オリゴペプチド、又はオリゴマーと呼ばれる短鎖のものと、一般にタンパク質と呼ばれる長鎖のものとの両方を指す。ポリペプチドは、コドンによって通常コードされるもの以外のアミノ酸を含んでいてもよい。

40

【0056】

ポリペプチドには、翻訳後プロセッシングなどの自然の過程、又は当業界でよく知られている化学修飾法によって改変されたアミノ酸配列が含まれる。そのような改変は、基礎の教本、より詳細な小研究論文、並びに膨大な研究文献に十分に記載されている。改変は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖、及びアミノ末端若しくはカルボキシ末端を含む、ポリペプチドのどの場所で行ってもよい。そのような改変は、所与のポリペプチド中のいくつかの部位で同程度又は様々な程度に存在してよい。また、所与のポリペプチドが、多くの種

50

類の改変を含んでいてもよい。ポリペプチドは、ユビキチン結合の結果として枝分かれしていてもよいし、枝分かれあり又は枝分かれなしで環状でもよい。環状、分枝状、及び分枝環状のポリペプチドは、翻訳後の自然の過程によって生じたものでもよいし、又は合成の方法によって作製してもよい。改変には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ピオチニル化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド若しくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの生成、ピログルタミン酸の生成、ホルミル化、カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカーの生成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解によるプロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノ化、硫酸化；アルギニル化など、転移RNAを媒介とするタンパク質へのアミノ酸付加、及びユビキチン結合が含まれる（79、82、94、113）。

10

【0057】

ポリペプチド配列の「断片」とは、基準配列よりも短いが、基準ポリヌクレオチドと同じであると認められる生物学的な機能又は活性を保持しているポリペプチド配列を指す。そのような活性には、たとえば、免疫応答を刺激する能力が含まれよう。断片は、基準ポリペプチドの少なくとも1個のエピトープを保持する。ポリペプチドの「部分」とは、基準ポリペプチドのアミノ酸配列の亜集団を指す。部分は、ポリペプチド中のその相対的な位置、たとえばC末端側部分又はN末端側部分によって記載することができる。

【0058】

本発明は、表A及び表Bに示すものなど、任意のマラリア抗原を用いて使用することができる。

20

【0059】

【表1】

表A

RBC前抗原

抗原	参考文献
CSP	13, 14, 29, 32, 41, 55 66, 69, 78, 85, 87, 91, 99, 114
SSP2	1, 13, 14, 29, 55, 56 86, 104, 111, 112
Exp1/Hep-17	15, 16, 27, 28, 29
<i>Pf</i> LSA1	29, 44
<i>Pf</i> LSA3	22

30

40

【0060】

【表 2】

表 B

RBC期抗原

抗原	参考文献
MSP-1	7, 10, 12, 20, 34, 35, 46, 58, 59, 65, 95, 96
MSP-2	3, 4, 17, 80, 81, 88
MSP-3	72, 73
MSP-4	50
MSP-5	7
AMA1	5, 18, 19, 24, 25, 101, 102
EBA175領域II	97, 98
SERA	26, 48, 49, 76, 77
RAP2	39, 76, 84, 89

10

20

【0061】

「種中周囲タンパク質」又は「CSP」とは、マラリア種中表面上の主要な表面ポリペプチドである。熱帯熱マラリア原虫由来のCSP (PfCSP) 系統7G8は、クローン化、配列決定、及び発現がなされている(21)。他のマラリア寄生体由来の別のCSPも特徴付けられており、表Aに含めてある。

【0062】

「RTS, S」とは、本明細書では、特定のマラリア抗原を指し、本発明の一実施形態である。RTS, S及びその製造については、米国特許第5,928,902号及び国際特許出願第WO93/10152号により十分な記載があり、両文献を参照により本明細書に援用する。

30

【0063】

「広げる」とは、T細胞応答のレパートリーを増やすことを指す。この場合では、RTS, Sは、単独ではCD4⁺T細胞依存的なTh1のIFN- γ 応答しか誘発しなかったが、DNAによる免疫感作/初回刺激は、CD4⁺T細胞依存的なCD8⁺1型(Tc1)及びCD4⁺1型1(Th1)の両方のIFN- γ 応答を起こしたので、DNAによる初回刺激/RTS, Sによる追加免疫によって、より広いレパートリーのIFN- γ 産生T細胞(Tc1及びTh1)が誘導された。当業者ならば、抗原特異的な検出アッセイを使用して、広げられた免疫応答を検出することができる。たとえば、当業者は、ELISPOT、MHC四量体染色、又はクロム放出CTLアッセイを使用して、T細胞のレパートリーを決定することができる。

40

【0064】

「広げる」とは、免疫応答の対象となるエピトープの範囲を増やすことも指す。最初に初回刺激された免疫細胞に加えて、初回刺激を受けていない、又は検出できないほど数の少ない免疫細胞も、増殖及び活性化が誘発される。したがって、広げられた免疫応答は、もともと初回刺激を受けている応答を拡大するだけでなく、一次応答の一部でなかった新しいエピトープに対する応答も含んでいる。当業者ならば、抗原特異的な検出アッセイを使用して、広げられた免疫応答を検出することができる。たとえば、当業者は、ELISPOT又はMHC四量体染色を使用して、一次免疫応答の対象であるエピトープのレパートリーを決定し、その範囲を、二次免疫応答の対象であるエピトープのレパートリーと比較

50

することができる。二次免疫応答が一次免疫応答よりも多数のエピトープを対象として起こる場合、二次免疫応答は広げられている。

【0065】

「CD8⁺T細胞」とは、CD8細胞表面マーカーを有することを特徴とする1クラスのTリンパ球である。CD8⁺T細胞は、MHCクラスIによる拘束を受ける「CTL」又は「サブレッサーT細胞」である。

【0066】

「CD4⁺T細胞」は、CD4細胞表面マーカーを有することを特徴とする1クラスのTリンパ球である。CD4⁺T細胞は、MHCクラスIIによる拘束を受けるTリンパ球である。1型又は2型の「ヘルパーT細胞」と呼ばれる2種類のCD4⁺T細胞がある。

10

【0067】

上述のように、免疫応答は、抗原に対して、その抗原と免疫系の細胞との相互作用によって起こる。生じる免疫応答は、液性免疫応答又は細胞媒介型免疫応答（伝統的に、それぞれ抗体及び細胞によるエフェクター防御機構で特徴付けられている）の極端な2部門に広く分類することができる。これらの応答部門は、Th1型応答（細胞媒介型応答）及びTh2型免疫応答（液性応答）と呼ばれている。極度のTh1型免疫応答は、抗原特異的ハプロタイプ拘束性のCTLの産生及びナチュラルキラー細胞の応答を特徴とするであろう。マウスでは、Th1型応答はしばしば、IgG2aサブタイプの抗体の産生を特徴とするが、ヒトではそれがIgG1型の抗体の産生である。Th2型の免疫応答は、マウスではIgG1、IgA、及びIgMを含む広範な免疫グロブリンアイソタイプの産生を特徴とする。

20

【0068】

これら2種類の免疫応答が起こる背後にある駆動力は、サイトカインという、免疫系の細胞を助け、来たるべき免疫応答をTh1又はTh2のどちらかの応答に向ける勤めを果たす、同定されているいくつかのタンパク質メッセンジャーである。したがって、Th1型のサイトカインが高レベルであると、所与の抗原に対する細胞媒介性免疫応答の誘発に有利になる傾向があり、Th2型のサイトカインが高レベルであると、その抗原に対する液性免疫応答の誘発に有利になる傾向がある。Th1型とTh2型の免疫応答の区別は絶対的でないことを留意されたい。現に、個体は、Th1優性又はTh2優性であると形容される免疫応答を支持することになる。しかし、マウスCD4⁺T細胞クローンにおいてMosmann及びCoffmaが述べていることに関して、サイトカインのファミリーを考えることがしばしば好都合である(70)。昔から、Th1型応答は、Tリンパ球によるINF-及びIL-2サイトカインの産生と関連付けられている。Th1型免疫応答の誘発としばしば直接に関連付けられる、IL-12などの他のサイトカインは、T細胞によって産生されない。対照的に、Th2型応答は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、及び腫瘍壊死因子(TNF-)の分泌と関連付けられている。

30

【0069】

本発明での使用に適するアジュバントには、水酸化アルミニウムゲル(アラム)やリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩が含まれるが、カルシウム、鉄、又は亜鉛の塩でもよいし、或いはアシル化されたチロシン若しくはアシル化された糖の不溶性懸濁液、陽イオン若しくは陰イオンに誘導体化された多糖、ポリホスファゼン、又はモンタナイドリポソームでもよい。

40

【0070】

本発明で使用するワクチンの製剤に際して、PfCSPプラスミドにおいては、アジュバントを投与してもしなくてもよい。RTS,Sの場合、アジュバント組成物は、Th1応答を優先的に誘発することができる。さらに、他の液性応答を含む別の応答も誘発することができる。

【0071】

ある種のワクチンアジュバントは、Th1型又はTh2型の各サイトカイン応答を刺激するのに特に適している。伝統的に、ワクチン接種後又は感染後の免疫応答のTh1:T

50

h 2 バランスの最適な指標としては、抗原による再刺激の後、Tリンパ球によるTh 1若しくはTh 2サイトカインの産生を *in vitro* で直接に測定した値、及び/又は抗原特異的抗体応答のIg G 1 : Ig G 2 a比の測定値が挙げられる。たとえば、Th 1型のアジュバントは、*in vitro* で抗原による再刺激がなされるとき、単離されたT細胞集団を刺激して、高レベルのTh 1型サイトカインを産生させ、Th 1型アイソタイプと関連する抗原特異的な免疫グロブリン応答を誘発するものである。本発明での使用に適するアジュバントを製造するために配合してよいTh 1型の免疫増強薬には、たとえば、モノホスホリル脂質A、詳細には3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A(3D-MPL)が含まれよう。3D-MPLは、米モンタナ州Ribi Immunochemによって製造されている周知のアジュバントである。化学的には、この物質はしばしば、3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質Aと、4、5、若しくは6本のアシル化鎖との混合物として供給される。これは、GB 2122204Bで教示されている方法によって精製、調製することができ、この参照文献は、ジホスホリル脂質A及びその3-O-脱アシル化変形形態も開示している。他の精製リポ多糖及び合成リポ多糖の記載もある(米国特許第6,005,099号、42、43、EP0729473B1、EP0549074B1)。一実施形態では、3D-MPLは、直径0.2µm未満の小さい粒径の微粒子製剤の形であり、その製造方法は、EP0689454で開示されている。

10

【0072】

サポニンは、本発明と共に使用してよいTh 1免疫増強薬のもう一つの例である。サポニンは、よく知られているアジュバントである(60)。たとえば、Quil A(南米産の樹木キラヤ(Quillaja Saponaria Molina)の樹皮由来)及びその画分が、米国特許第5,057,540号、EP0362279B1、及びKensilの(52)に記載されている。血液分解性(haemolytic)サポニンのQS21及びQS17(HPLCによって精製されたQuil A画分)は、強力な全身アジュバントとして記載されており、その製造方法は、米国特許第5,057,540号及びEP0362279B1で開示されている。これらの参照文献には、全身ワクチン用の強力なアジュバントとして働くQS7(血液分解性でないQuil-A画分)の使用も記載されている。QS21の使用は、Kensilらの(51)にさらに記載されている。QS21とポリソルベート若しくはシクロデキルトリンとの組合せも知られている(WO99/10008)。QS21やQS7などのQuil A画分を含む微粒子アジュバントは、WO96/33739及びWO96/11711に記載されている。

20

30

【0073】

免疫増強薬のさらに別の例は、メチル化されていないCpGジヌクレオチドを含む免疫促進性オリゴヌクレオチド(「CpG」)である。CpGは、DNA中に存在するシトシン-グアノシンジヌクレオチドモチーフの略語である。CpGは、全身経路及び経粘膜経路の両方によって投与するとアジュバントになることが当業界で知られている(WO96/02555、EP468520、23、68)。歴史的に、カルメット-گران桿菌(bacillus Calmette-Guerin)(BCG)のDNA画分が、抗腫瘍効果を発揮し得たことが観察されている。更なる研究では、BCG遺伝子配列由来の合成オリゴヌクレオチドが、免疫促進性の作用を誘発し得ることが示された(*in vitro* 及び *in vivo* の両方で)。これらの研究の著者らは、中央のCGモチーフを含むある種の回文配列がこの活性を受け持ったという結論を下している。CGモチーフの免疫促進における主要な役割は、後にKriegによって解明されている(57)。詳細な分析では、CGモチーフがある種の配列状況になければならないこと、並びにそのような配列が細菌DNA中にはよくあるが、脊椎動物DNA中ではまれであることが示されている。免疫促進性の配列はしばしば、プリン、プリン、C、G、ピリミジン、ピリミジンであり、CGモチーフはメチル化されていない。しかし、他のメチル化されていないCpG配列も免疫促進性であることがわかっており、本発明で使用してよい。

40

【0074】

50

6個のヌクレオチドのある種の組合せでは、回文配列が存在することがある。数個のこれらモチーフが、1種のモチーフの繰返し又は異なるモチーフの組合せとして、同じオリゴヌクレオチド中に存在してよい。これら免疫促進性配列を含むオリゴヌクレオチドが存在すると、ナチュラルキラー細胞（インターフェロンを産生し、細胞障害活性を有する）及びマクロファージ（Wooldrigeら、1977年）を含む様々な免疫サブセットが活性化され得る。メチル化されていないCpGを含み、このコンセンサス配列をもたない他の配列も、現在では免疫促進性であることがわかっている。ワクチンに製剤する際、CpGは一般に、随意の溶液にして遊離の抗原と共に投与し（WO96/02555、68）、又は抗原に共有結合させ（WO98/16247）、又は水酸化アルミニウムなどの担体を配合する（肝炎表面抗原）（9、23）。

10

【0075】

上述のような免疫増強薬には、たとえば、リポソーム、水中油乳濁液、及び又は（水酸化アルミニウムなどの）アルミニウム塩を含む金属塩などの担体を配合してよい。たとえば、3D-MPLには、水酸化アルミニウム（EP0689454）又は水中油乳濁液（WO95/17210）を配合することができ、QS21には、コレステロール含有リポソーム（WO96/33739）、水中油乳濁液（WO95/17210）、又はアラム（WO98/15287）を配合すると有利であり、CpGには、アラム（9、23）又は他の陽イオン担体を配合することができる。

【0076】

モノホスホリル脂質Aとサポニン誘導体の組合せ（WO94/00153、WO95/17210、WO96/33739、WO98/56414、WO98/05355、WO99/12565、WO99/11241）や、WO94/00153で開示されているようなQS21と3D-MPLの組合せなど、免疫増強薬の組合せを使用してもよい。或いは、CpGにQS21などのサポニンを加えた組合せも、本発明で使用することができる。したがって、適切なアジュバント系には、たとえば、3D-MPLなどのモノホスホリル脂質Aとアルミニウム塩の組合せが含まれる。別の実施形態は、WO94/00153で開示されているようなQS21と3D-MPLの組合せや、WO96/33739で開示されているような、QS21をコレステロール含有リポソーム中に入れて失活させてある反応性のより低い組成物（DQ）など、モノホスホリル脂質Aとサポニン誘導体を組み合わせている。QS21、3D-MPL、及びトコフェロールを水中油乳濁液中に入れて使用するさらに別のアジュバント製剤が、WO95/17210に記載されている。別の実施形態では、CpGオリゴヌクレオチドを単独で、又はアルミニウム塩と共に使用する。追加のアジュバント及び/又は担体の組合せの例には、3D-MPL+DQ中QS21、アラム+3D-MPL、アラム+DQ中QS21+3D-MPL、アラム+CpG、3D-MPL+DQ中QS21+水中油乳濁液、及びCpGが含まれる。

20

30

【0077】

別の実施形態では、3D-MPLとQS21とを、CpGを加え、又はCpGなしで組み合わせる。QS21：3D-MPLの比は、大体1：10～10：1、1：5～5：1、又は1：1でよい。一実施形態では、この比は、2.5：1～1：1のD-MPL：QS21である。通常、ヒトへの投与向けには、QS21と3D-MPLは、1回分あたり、1～1004gや10～Lg～50gなど、1pig～2004gの範囲でワクチン中に存在する。通常、水中油は、2～10%のスクアレン、2～10%のトコフェロール、及び0.33～3%のtween80を含む。スクアレン：トコフェロールの比は、より安定な乳濁液をもたらすので、1以下とする。Span85も、1%のレベルで存在してよい。場合によっては、本発明のワクチンが安定剤を含有すると有利になることもある。

40

【0078】

CSタンパク質又はその免疫原性部分を、任意選択でハイブリッドタンパク質の形で含む、RTS、Sなどの本発明によるポリペプチド追加免疫ワクチンと共に使用するアジュバントは、3D-MPLとQS21の組合せを、CpGと共に、又はCpGなしで含んで

50

よい。

【0079】

これまでの包括的な記述、及び以下の詳細な記述はどちらも、単に例を示し、説明するものであり、特許を請求する本発明を限定するものではない。また、本発明は、記載した特定の実施形態に限定されるものでなく、それなりに当然様々でよい。さらに、本発明の範囲は、その特許請求の範囲によってのみ限定されるので、特定の実施形態の記述に使用した用語は、限定的なものでない。

【0080】

値の範囲については、本発明は、文脈に明らかに別段の指摘がない限り、その範囲の上限と下限の間にある各値を、下限の単位の少なくとも10分の一まで含む。さらに、本発明は、記載した、他の任意の間にある値を含む。また本発明は、記載範囲から特に除外されない限り、その範囲の上限と下限のどちらか又は両方を除く範囲も含む。

10

【0081】

別段の規定がない限り、本明細書で使用するすべての科学技術用語の意味は、本発明が属する分野の技術者によって一般に理解されているものである。当業者ならば、本発明を実施し、又は試すのに、本明細書に記載のものと同様又は同等な方法及び材料を使用してよいことも承知されるであろう。さらに、本明細書で言及したすべての出版物を参照により援用する。

【0082】

本明細書及び添付の特許請求の範囲では、単数形の「a」、「or」、及び「the」は、文脈に明らかに別段の指示がない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがってたとえば、「a subject polypeptide」への言及は、複数のそのようなpolypeptideを含み、「the agent」への言及は、1種又は複数のagent及び当業者に知られているその同等物への言及を含むようになる。

20

【0083】

さらに、成分の量、反応条件、純度の%、ポリペプチド及びポリヌクレオチドの長さなどを示す、本明細書及び特許請求の範囲で使用するすべての数は、別段の指示がない限り、用語「約」によって緩和される。したがって、本明細書及び特許請求の範囲で述べる数に関するパラメータは、本明細書の所望の性質に応じて様々でよい近似値である。少なくとも、また特許請求の範囲に同等物の原則を適用することを制限しないものとして、数に関する各パラメータはせめて、有効数字で報告された数字を考慮して、通常の見捨て法を適用して解釈すべきである。それにもかかわらず、詳細な実施例で述べる数値は、できる限り正確に報告する。しかし、任意の数値は、その実験測定値の標準偏差からの一定の誤差を本質的に含む。

30

【0084】

以下の実施例で、本発明をさらに説明する。実施例は、本発明を単に例示するものにとすぎず、本発明のある実施形態の様々な有益な性質を開示するものである。以下の実施例は、本発明を限定するものと解釈すべきでない。

【実施例1】

40

【0085】

初回刺激による抗-PfCSP応答のRTS，Sワクチンによる追加刺激

24人のHLA-A*0201陽性ボランティアをこの試験に起用した。ボランティアのHLA多様性は、遺伝的拘束を受けるT細胞応答を集団間で比較できるようにするため、この集団で最も一般的なHLAクラスIサブタイプに限定した。このボランティアらはいずれも、以前にマラリアに接触していなかった。24人の個体のうち、10人が次の上述のPfCSPワクチン臨床試験に参加した。この試験の間、このボランティアらには、1回あたり2500µgとして、4週間の間隔を挟んで合計3回分のPfCSP DNA ワクチン(VCL-2510、前述のとおりVical, Inc(米カリフォルニア州サンディエゴ)製(62))を与えた(62)。したがって、この試験で、この10人のボ

50

ランティアらは、追加免疫 R T S , S ワクチンを与える 1 2 ~ 1 4 カ月前に D N A ワクチンの最後の投与を受けた。残りの 1 4 人のボランティアは、以前に P f C S P D N A ワクチンを与えられておらず、したがって非初回刺激対照として使用した。2 4 人のボランティアは全員、P f C S P D N A ワクチンと R T S , S ワクチンのどちらによる免疫感作の前にも、P f C S P、H I V、H B V コア抗原、H C V、ワクシニアウイルス、及び d s D N A に対する抗体について陰性であった。D N A によって初回刺激した 1 0 人のボランティアのうち 6 人、及び 1 4 人の非初回刺激対照のうち 8 人が、H B s A g に対する抗体について陽性であった。

【 0 0 8 6 】

2 4 人全員のボランティアの左三角筋に、0 週間目と 8 週間目の 2 回の R T S , S ワクチン注射を施した。R T S , S ワクチンは、B 型肝炎表面抗原 (H B s A g) と融合させた熱帯熱マラリア原虫 (N F 5 4 / 3 D 7) C S P タンパク質のアミノ酸 2 0 7 ~ 3 9 5 を含むものであった (8)。簡潔に述べると、R T S , S タンパク質は、C S タンパク質の実質的に全部の C 末端側部分、免疫優性領域の 4 箇所以上の縦列型反復部分、及び H B s A g を含むハイブリッドタンパク質である。R T S , S の調製の包括的な記述については、参照により本明細書に援用する W O 9 3 / 1 0 1 5 2 及び米国特許第 5 , 9 2 8 , 9 0 2 号を参照されたい。

10

【 0 0 8 7 】

得られる組換え型 R T S , S タンパク質を酵母中に発現させ (9 9)、油中水乳濁液にした免疫促進薬のモノホスホリル脂質 A 及び Q S 2 1 (G l a x o S m i t h K l i n e I n c、ベルギー R i x e n s a r t) と組み合わせて、R T S , S ワクチンを作製した。具体的には、凍結乾燥した製剤は、R T S , S ペレット及びアジュバント希釈剤を含んでいた。R T S , S ペレットは、R T S , S (5 0 μ g) 及びラクトース (3 . 1 5 %) を凍結保護物質として含んでいた。アジュバント希釈剤は、M P L (5 0 μ g)、Q S - 2 1 (5 0 μ g)、及び油 / 水乳濁液を含んでいた。得られるワクチン製剤は、1 m l 体積の乳濁液中に 5 0 μ g の R T S , S を含み、注射の 3 0 分前に調製した。3 人の H L A 不適合ボランティアには、P f C S P D N A ワクチン又は R T S , S ワクチンを与えなかった。この 3 人のボランティアからのサンプルを、アッセイで負の対照として使用した。非初回刺激群の 1 人のボランティアが、最初の免疫感作の後に試験を辞退した。

20

【 0 0 8 8 】

P f C S P D N A ワクチン中に含まれる全長 P f C S P 配列の上流領域には、R T S , S ワクチン中には存在しなかった、いくつかの T 細胞エピトープが含まれていた。しかし、2 種のワクチン間には、P f C S P D N A ワクチンによって予め免疫感作を施されたボランティアに、R T S , S ワクチンを潜在的な「追加免疫」ワクチンとして投与することを妥当にするだけの部分的重複があった。詳細には、R T S , S は、1 9 個の N A N P 繰返し部分からなる高度に保存された領域を含む P f C S P 部分と、酵母中で非融合型 H B s A g と共発現される B 型肝炎ウイルス表面抗原 (H B s A g) と融合した C S P カルボキシ末端とを含む (3 6)。P f C S P ワクチンの全長 C S タンパク質は、9 個の T 細胞エピトープを含み、R T S , S は、5 個の T 細胞エピトープを含んでいる (6 1)。R T S , S エピトープのうち 4 個は、P f C S P ワクチン中に存在する。

30

40

【 0 0 8 9 】

実施例 2 ~ 7 では、ボランティアそれぞれから採取した血液サンプルでその後行った分析を詳述する。簡潔に述べると、T 細胞応答は、P f C S P D N A ワクチンによる初回刺激を受けたボランティアについて、P f C S P D N A ワクチンを最後に投与してから 1 2 ~ 1 4 カ月後に、全員のボランティアについて、R T S , S ワクチンを最初及び 2 回目に投与してから 1、2、及び 6 週間後に試験した。抗体は、免疫感作前、並びに R T S , S ワクチンをそれぞれ投与してから 2、4、6、及び 8 週間後に試験した。

【 実施例 2 】

【 0 0 9 0 】

C T L 応答

50

上述のように、RTS, Sワクチン単独で免疫感作を施すと、ヒトでは、抗体が誘導され、CD4⁺T細胞依存的なIFN- γ 応答が誘発されるが、抗原特異的なCTLのヒトでの誘発は報告されていない(61)。DNAによって誘導された記憶CTLが、RTS, Sワクチンによる追加免疫によって復活し得るかどうか、並びに追加免疫による応答が、DNA初回刺激によるもとの応答よりも広げられたかどうかを判定するために、異なるボランティアで抗原特異的CTLの細胞障害活性の評価を行った。RTS, Sによる免疫感作の1~2週間前、並びにRTS, Sを最初及び/又は2回目に投与してから1又は2週間後に、DNAによって初回刺激したボランティア又は初回刺激していないボランティアの血液から末梢血単核細胞(PBMC)を収集した。次いで、これらのPBMCを、抗原提示ターゲット細胞の溶解を検出するクロム放出アッセイで使用した(105)。

10

【0091】

in vitroクロム放出アッセイは、以前に記載されているとおりに実施した(105)。詳細には、エフェクター細胞を産生させるのに、全PBMCの20%に、PfCSPを発現させるALVAC(vCP182)を、5pfu/細胞の密度で、37 $^{\circ}$ Cで90分間かけて感染させた。2回洗浄した後、これらのPBMCを残りのPBMCと合わせ、7~10日間培養した。48時間後に組換え型ヒトIL-2(Cetus、米カリフォルニア州Emeryville)を加えた(20U/ml)。ターゲット細胞は、10 μ g/mlのPfCSP特異的なCTLEピトープ又は対照ペプチドで一晩かけて感作した、自己由来又はMHC不適合のPHA芽細胞とした。CTL活性は、従来型の6時間のクロム放出アッセイによって評価した。溶解率(%)は、(実験放出-培地対照放出)/(最大放出-培地対照放出) \times 100と定めた。特異的溶解率(%)は、実験ペプチドと共にインキュベートしたターゲットの溶解率から、負の対照であるHIVgagA2拘束性ペプチドと共に培養したターゲットの溶解率を減じて決定した。CTL応答は、同じアッセイの少なくとも2種類のエフェクター:ターゲット(E:T)比で免疫感作後の特異的溶解率が10%であり、かつ免疫感作前の特異的溶解率が<10%であった場合に限り、陽性であるとみなした。

20

【0092】

純度80~95%の合成ペプチドを、Chiron Technologies(豪Clayton Victoria)から入手し、CTLターゲットの感作に使用した。PfCSP由来であり、RTS, S配列中に含まれる8種のペプチドも使用した。これら8種のペプチドには、9~10アミノ酸長の、4種の画定されたCTL MHCクラスI拘束性エピトープが含まれた。4種のCTLEピトープは、HLA-A*0201(ペプチドA2.319;アミノ酸残基319~327、YLNKIQNSL;配列番号1)、-A*0101(ペプチドA1.310;アミノ酸残基310~319、EPSDKHIKEY;配列番号2)、-A*0301(ペプチドA3/11.336;アミノ酸残基336~345、VTCGNGIQVR;配列番号3)、及び-B*3501(ペプチドB35.353;アミノ酸残基353~360、KPKDELIDY;配列番号4)による拘束を受けていた。他の4種のペプチドは、DR結合ペプチドのDR.316(アミノ酸残基316~335、IKEYLNKIQNSLSTEWSPCS;配列番号5)、DR.318(アミノ酸残基318~332、EYLNKIQNSLSTEW;配列番号6)、DR.363(アミノ酸残基363~383、DIEKKICKMEKCSSVFNVVNS;配列番号7)、及びDR.346(アミノ酸残基346~365、IKPGSANKPKDELIDYANDIE;配列番号8)であり、上述のように15~20アミノ酸長であった。(107)。15アミノ酸長の13種のPfCSP由来ペプチド、及び20種のHBsAg由来ペプチドの各プールは、Glaxo SmithKline Inc(ベルギーRixensart)から提供を受けた。13種のPfCSPペプチドのアミノ酸配列は、次のとおりである。

30

40

NEEPSDKHIKEYLNK (配列番号 9),

DKHIKEYLNKIQNSL (配列番号 10), EYLNKIQNSLSTEW (配列番号 11),
 IQNSLSTEWSPCSVT (配列番号 12), STEWSPCSVTCGNGI (配列番号 13),
 PCSVTCGNGIQVRIK (配列番号 14), CGNGIQVRIKPGSAN (配列番号 15),
 QVRIKPGSANKPKDE (配列番号 16), PGSANKPKDEL DYEN (配列番号 17),
 KPKDEL DYENDIEKK (配列番号 18), LDYANDIEKKICKME (配列番号 19),
 DIEKKICKMEKCSSVF (配列番号 20), および ICKMEKCSSVFN VVN (配列番号
 21).

10

インフルエンザマトリックスタンパク質由来のペプチド (残基 58 ~ 66、G I L G F V
 F T L、H L A - A 2 . 1 ; 配列番号 22)、又は破傷風毒素 T ヘルパーユニバーサルエ
 ピトープ P 30 (残基 947 ~ 969、F N N F T V S F W L R V P K V S A S H L E T
 、D R 及び D P 拘束性 ; 配列番号 23) を正の対照として使用した (74)。H I V g a
 g タンパク質由来のペプチド (残基 77 ~ 85、S L Y N T V A T L、H L A - A 2 . 1
 拘束性 ; 配列番号 24)、又は熱帯熱マラリア原虫タンパク質由来のペプチド E x p - 1
 (残基 82 ~ 96、配列 A G L L G N V S T V L L G G V、D R 拘束性 ; 配列番号 25)
 を負の対照として使用した。

20

【0093】

R T S , S 追加免疫による、D N A によって誘発された記憶 C T L の復活

D N A によって初回刺激され、又は初回刺激を受けていない、R T S , S ワクチン投与
 直前の各ボランティアでは、C T L が検出されなかった。R T S , S ワクチンのみを与え
 られた 14 人の非初回刺激ボランティアではいずれも、C T L 応答が検出されなかった。抗
 原特異的かつ遺伝的拘束を受ける C T L 応答が、5 / 10 人の D N A 初回刺激ボランティ
 アで検出された (図 1c)。5 人の応答者のうち 1 人は、最初に投与してから 1 週間後に
 C T L (V 6) を得、その他の者は、R T S , S の 2 回目の投与後に C T L を得た。D N
 A 初回刺激ボランティアでの C T L 応答の出現度 (7 / 113 アッセイ、6.2%) は、
 非初回刺激ボランティア (0 / 125 アッセイ、0%) と比べて有意に大きかった (P =
 0.0047)。C T L 応答の出現度は、12 ~ 14 カ月前に P f C S P D N A ワクチ
 ンを 3 回与えた 15 人のボランティアにおいて、単独の D N A 免疫感作の後に認められた
 ものとほぼ同等であった (30 / 458 アッセイ、6.6%) (107)。

30

【0094】

D N A による初回刺激及び R T S , S による追加刺激を受けているボランティアの C T
 L の規模 (特異的溶解率の範囲 [幾何平均] : 11.4 ~ 28.1 [15.4]) も、D
 N A 免疫感作のみによって誘発されたもの (10.5 ~ 90.0 [15.6]) と同じ範
 囲にあった。この R T S , S ワクチンは、以前の 2 件の研究で最も勢力の強い応答を伴っ
 た C D 8 + T 細胞エピトープを含んでいなかった (105、107)。

40

【0095】

R T S , S 配列中に存在する、画定された全 4 種の P f C S P 特異的 M H C クラス I 拘
 束性エピトープに対する C T L 応答が検出された。5 人の C T L 応答者のうち、4 人が H
 L A - A 2 拘束性エピトープ A 2 . 3 1 9 に対する C T L を得、1 人が H L A - A 1 拘束
 性エピトープ A 1 . 3 1 0 に応答し (V 2)、2 / 4 人の A 2 . 3 1 9 応答者は、H L A
 - A 3 拘束性及び H L A - B 7 拘束性のエピトープ、すなわちそれぞれ A 3 . 3 3 6 (V
 8) 及び B 7 . 2 8 5 (V 9) にも応答した。C D 8 + C T L エピトープ A 2 . 3 1 9 (下線部)
 を含む、報告する C D 4 + C T L エピトープ D R . 3 1 8 (配列 E Y L N K I Q
 N S L S T E W S ; 配列番号 26) に対する検出可能な C T L はなかった (69)。P f

50

CSP DNAを受けていないが、RTS, Sワクチンを2回受けている14人のボランティアでも、検出可能なCTL活性はなかった。こうしたボランティアらにCTL活性がなかったことは、このワクチンが、単独ではCD8⁺T細胞活性(たとえば、CTL活性)を誘発し得なかったことを示している以前の研究と一致する。

【0096】

RTS, Sワクチンによる追加免疫後に陽性のCTL応答を得た5人のDNA初回刺激ボランティアの中で、3人は、2回目及び3回目にPfCSP DNA免疫感作を施してから2週間後及び6週間後、RTS, S追加免疫のほぼ1年前に試験したとき、同じエピトープに対する検出可能なCTL活性を以前には示さなかった(107)。対照的に、5人のボランティアのうち2人は、単独のDNA免疫感作後、RTS, S内に含まれるペプチドに対する検出可能なCTL活性を以前にも示した。この2人のボランティアは、RTS, S追加刺激に反応しなかった。

10

【0097】

RTS, S追加免疫によるCTL応答は、DNA初回刺激によるCTL応答よりも広い
RTS, Sワクチンによって追加免疫した後、CTL応答が陽性であった5人のDNA初回刺激ボランティアのうち、3人(V3、V6、及びV8)は、RTS, S追加免疫後に、DNA初回刺激後には応答がなされなかったエピトープに反応した。詳細には、CTL応答は、両方の負の対照(MHC+対照及び非MHC+ペプチド)のバックグラウンドに対する免疫感作後の特異的溶解率が10%である場合に限り陽性とみなした。V3及びV6では、PfCSPワクチンによるDNA初回刺激後、エピトープA2.319に対するCTL応答はなかった(図1a及び図1b)。しかし、RTS, Sによる追加免疫の後、どちらのボランティアも、このエピトープに対するCTL応答を示した(図1c)。V8は、DNA初回刺激の後、エピトープA2.319及びA3.336に対するCTL応答を得なかったが、しかしこの初回刺激を施したボランティアにRTS, Sワクチンで追加免疫を施した後に、これらのエピトープに対するCTL応答が現れた(図1a、1b、及び1c)。

20

【0098】

上述のように、当業者は、タンパク質系ワクチンを、CTL応答の刺激に有効であるとみなしていなかった。同じく、タンパク質系ワクチンであるRTS, Sは、これまでCD8⁺T細胞応答の刺激に無効であるとみなされていた(61)。知られていたこととは対照的に、上記データは、DNA初回刺激の後、RTS, Sが、新たなCTLエピトープに対するCTL応答を刺激し得ることをはっきりと示している。

30

【0099】

ペプチド特異的なIFN- (以下)及びCTLの応答の出現度及び規模の分析は、2乗検定、フィッシャーの正確確率検定(2標本)、又は学生t検定(2標本)を使用して行った。各T細胞亜集団のIFN- mRNA発現レベルの割合の比較には、対応のあるサンプル用のt検定を使用した。有意性レベルは、p値<0.05であった。

【実施例3】

【0100】

PfCSPに対するT細胞のIFN- 応答
IFN- 応答の評価は、次のような標準のELISPOTアッセイによって行った。PfCSP特異的なIFN- 産生細胞の数を、以前に記載されているとおりに、10µg/mlのペプチドの存在下で36時間*in vitro*で刺激した後、ELISPOTによって測定した(107)。ウェル中のサイトカイン産生細胞に相当するスポットの数(細胞生成スポット; SFC)を、自動化されたスポットカウントシステム(Scana Lytics、米バージニア州Fairfax)で数えた。応答は、SFC/10⁶PBMCの平均数として示し、1)実験ペプチドを加えてあるウェル中の平均細胞数が対照ペプチドを加えたウェルよりも有意に大きかった場合(p<0.05、学生t検定)、2)正味のSFC/ウェル(実験ペプチドウェル中の平均SFC-対照ペプチド

40

50

ウェル中の平均)が 5 S F C / ウェルであった場合、及び 3) 刺激指数 (実験ペプチドウェル中の対照ペプチド中の平均 S F C 対平均 S F C の比) が 2 . 0 より大きい場合に有意であるとみなした。さらに、免疫感作の前に得た細胞の、P f C S P 特異的ペプチドに対する応答が上で定めたように陽性であった場合、免疫感作後の同じペプチドに対する応答は、陽性であるとみなさなかった。

【 0 1 0 1 】

本明細書では、I F N - E L I S P O T における「陽性応答者の出現度」とは、特定のペプチドについて陽性であると判定されるボランティアの数を、試験群のボランティアの総数で割ったものである。「陽性 I F N - E L I S P O T アッセイの出現度」とは、ペプチドに対する陽性反応の数を、そのペプチドで実施した試験の総数で割ったものである。たとえば、10人のボランティアそれぞれにつき6種のペプチドを試験する場合、試験の総数は60である。これら試験のうち36試験が陽性である場合、陽性アッセイの出現度は60のうち36である。「I F N - 応答の規模」は、P B M C 1 0 0 万個あたりの S F C の数で示す。

10

【 0 1 0 2 】

E L I S P O T アッセイでは、R T S , S ワクチンの最初及び2回目の投与の1~2週間前、並びにそれから6週間後に単離した P B M C を使用した。これらのアッセイでは、実施例2で論じた8種の画定された P f C S P ペプチド (H L A クラス I 拘束性エピトープを含む4種の9アミノ酸ペプチド、及びそれぞれがクラス I I 拘束性エピトープを含み、うち3種がクラス I 拘束性エピトープも含んでいた4種の15~20アミノ酸ペプチド

20

【 0 1 0 3 】

D N A 初回刺激又は非初回刺激の各ボランティアは、R T S , S 免疫感作前には検出可能な P f C S P 特異的 I F N - 応答を示さなかった。M H C クラス I 拘束性エピトープしか含んでいない9アミノ酸ペプチドだけを使用するアッセイでは、免疫感作後のどの時点でも I F N - 応答が検出されなかった。これらは、実施例2で論じたペプチドと同じである。最初の投与の後、10人中6人の D N A 初回刺激ボランティアで、4種すべての15~20アミノ酸 P f C S P ペプチドについて陽性の I F N - 応答が検出されたの

30

【 0 1 0 4 】

【表 3】

表 1 PfCSP特異的ペプチドに対するIFN- γ 応答の全般的な出現度及び規模

群	応答者数/試験数		陽性アッセイ数/全アッセイ (%)			正味SFC/10 ⁶ 個PBMC (幾何平均)の範囲	
	DAN初回刺激 ボランティア	非初回刺激 ボランティア	DNA初回刺激 ボランティア	非初回刺激 ボランティア	2群間の P値	DNA初回刺激 ボランティア	非初回刺激 ボランティア
最初の免疫感作後							
HBsAg (+)	4/6 (66.7)	2/8 (25.0)	13/69 (18.8)	4/95 (4.2)	0.001	13.1-105.5 (38.5)	20.0-63.1 (39.6)
HBsAg (-)	2/4 (50.0)	0/6 (0)	7/47 (14.9)	0/69 (0)	0.0009	13.8-82.5 (32.7)	neg
合計	6/10 (60.0)*	2/14 (14.3)*	20/116 (18.1)	4/164 (2.4)	<0.00001	13.1-105.5 (36.3)	20.0-63.1 (39.6)
2回目の免疫感作後							
HBsAg (+)	5/6 (83.0)	6/8 (75.0)	23/72 (31.9)	11/84 (13.1)	0.0078	11.9-82.5 (32.1)	14.4-96.9 (37.8)
HBsAg (-)	3/4 (75.0)	6/6 (100.0)	18/48 (37.5)	29/72 (40.3)	0.76	11.7-122.5 (33.4)	17.5-125.6 (41.0)
合計	8/10 (80.0)	11/14 (84.6)	41/120 (34.2)	40/156 (25.6)	0.12	11.7-122.5 (32.6)	14.4-125.6 (39.6)
全体							
HBsAg (+)	5/6 (83.0)	6/8 (75.0)	36/141 (25.5)	15/179 (8.4)	0.00003	11.9-105.0 (34.3)	14.4-96.9 (38.1)
HBsAg (-)	3/4 (75.0)	6/6 (100.0)	25/95 (26.3)	29/141 (20.6)	0.3	11.7-122.5 (33.2)	17.5-125.6 (41.0)
合計	8/10 (80.0)	11/14 (84.6)	61/238 (25.6)	44/320 (13.8)	0.0004	11.7-122.5 (33.9)	14.4-125.6 (39.6)

* 最初の免疫感作の後、DNA初回刺激ボランティアの陽性応答者数は、非初回刺激ボランティアよりも有意に多かった (6/10対2/14、 $p=0.019$)。

【0105】

R T S , S ワクチンの 2 回目の投与後、10人中8人のDNA初回刺激ボランティア及び14人中11人の非初回刺激ボランティアでIFN- γ 応答が検出された(表1)。R T S , S ワクチンの 2 回目の投与後の応答者数について、2群間に差はないが(陽性アッセイ数/全アッセイ(%))を参照のこと)、DNA初回刺激ボランティアの全体としての陽性アッセイ数は、非初回刺激ボランティアと比べて統計学的に有意に多かった(陽性アッセイ/全アッセイ、61/238[25.6%]対44/320[13.8%]、 $p=0.0004$) (表1)。全体としての陽性アッセイ数のこの差は、陽性アッセイの出現度によって明示されるように、ボランティアのHbSAg抗体状態と直接に関連していた。2回目のR T S , S 免疫感作後の陽性アッセイ数は、HBsAg抗体陽性の個体の中では、DNA初回刺激ボランティアで非初回刺激ボランティアよりも有意に多かったが(23/72[31.9%]対11/84[13.1%]、 $p=0.0078$)、HbSAg抗原陰性の個体ではそうでなかった(37.5%対40.3%の陽性アッセイ)。

【0106】

エピトープレベルでは、ペプチドDR.316、DR.318、及びDR.363に対するIFN- γ 応答を、DNA初回刺激群と非初回刺激群とで比較した。DR.316及びDR.318は、CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞の重なり合うエピトープを含み、DR.363は、CD4⁺T細胞エピトープのみを含んでいる(107)。

【0107】

表2に示すように、ペプチドDR.316に対するIFN- γ 応答は、最初のR T S , S ワクチン投与後では、非初回刺激ボランティアの14人中0人に対し、DNA初回刺激ボランティアの10人中4人で検出され($p=0.0095$)、R T S , S ワクチンの最初及び2回目の投与後では、非初回刺激ボランティアの13人中5人に対し、DNA初回刺激ボランティアの10人中6人で検出された($p=0.35$)。すべてのアッセイを総合的にみなしたとき(R T S , S ワクチンの最初及び2回目の投与後)、DNA初回刺激群は、陽性アッセイの出現度がより高かったが(陽性アッセイ/全アッセイ、17/60対8/81、 $p=0.0046$)、IFN- γ 応答の規模には差がなかった(SFCの範囲: 11.9~106.3[33.0]対17.5~58.1[28.4]、 $p=0.21$)。

【0108】

10

20

30

40

【表 4】

表 2 エピトープレベルでのPfcCSPに対するIFN- γ 応答の出現度

群	応答者数/試験数(%)			陽性アッセイ数/全アッセイ(%)		
	DR.316	DR.318	DR.363	DR.316	DR.318	DR.363
<u>最初の免疫感作後</u>						
DNA初回刺激	4/10 (40)	3/10(30.0)	3/10(30.0)	6/30 (20.0)	4/30 (13.3)	4/30 (13.3)
非初回刺激	0/14 (0)	0/14 (0)	2/14 (14.3)	0/42 (0)	0/42 (0)	2/42 (4.8)
P値	0.0095	0.028	0.35	0.0025	0.015	0.195
<u>2回目の免疫感作後</u>						
DNA初回刺激	5/10 (50.0)	6/10 (60)	2/10 (20)	11/30 (36.7)	10/30 (33.3)	4/30 (13.3)
非初回刺激	5/13 (38.5)	1/13 (7.7)	7/13 (54)	8/39 (20.5)	1/39 (20.5)	16/39 (41.0)
P値	0.58	0.0069	0.099	0.136	0.00054	0.012
<u>全体</u>						
DNA初回刺激	6/10 (60)	6/10 (60)	4/10 (40)	17/60 (28.3)	14/60 (23.3)	8/60 (13.3)
非初回刺激	5/13 (38.5)	1/13 (7.7)	9/14 (64)	8/81 (9.9)	1/81 (1.2)	18/81 (22.2)
P値	0.35	0.0069	0.24	0.0046	<0.00003	0.178

10

20

【0109】

また、表 2 に示したように、ペプチド DR . 316 の最初の 2 アミノ酸を含んでいないペプチド DR . 318 に対する IFN - γ 応答は、RTS , S ワクチンの最初の投与後では、非初回刺激ボランティアでの 14 人中 0 人に対し、DNA 初回刺激ボランティアの 10 人中 3 人で検出され ($p = 0.028$)、RTS , S ワクチンの最初及び 2 回目の投与後では、非初回刺激ボランティアの 13 人中 1 人に対し、DNA 初回刺激ボランティアの 10 人中 6 人で検出された ($p = 0.0069$)。最初及び 2 回目の RTS , S ワクチン投与後に実施した ELISPOT アッセイは、全体として、DNA 初回刺激群の陽性アッセイ出現度がより高かったことを示した (陽性アッセイ/全アッセイ、14/60 対 1/81、 $p < 0.00003$)。RTS , S ワクチンしか受けなかった群で、このペプチド

30

【0110】

既知の CD8⁺ T 細胞エピトープを含んでいないペプチド DR . 363 に対する IFN - γ 応答は、最初の RTS , S ワクチン投与後では、非初回刺激ボランティアの 14 人中 2 人に対し、DNA 初回刺激ボランティアの 10 人中 3 人で検出され ($p = 0.35$)、全体としての最初及び 2 回目の RTS , S ワクチン投与後では、非初回刺激ボランティアの 14 人中 9 人に対し、DNA 初回刺激ボランティアの 10 人中 4 人で検出された ($p = 0.24$) (表 2)。最初及び 2 回目の RTS , S ワクチン投与後に行ったアッセイは、DNA 初回刺激群と RTS , S 単独群の陽性アッセイ出現度に有意差がなかったことを示した (陽性アッセイ/全アッセイ、8/60 対 18/81、 $p = 0.178$)。しかし、2 回目の RTS , S 投与後の、非初回刺激ボランティアの IFN - γ 応答の規模は、DNA 初回刺激ボランティアよりも有意に高かった (SFC 範囲: 10^6 細胞あたり 13.1 ~ 58.8 [26.4 幾何平均] 対 10^6 細胞あたり 14.0 ~ 140.6 [47.9 幾何平均]、 $p = 0.004$)。

40

【0111】

同様に、RTS , S ワクチンを 2 回投与した後の陽性応答個体の出現度にも、DNA 初回刺激群と RTS , S 単独群とに差がなかった (8/10 対 11/13)。表 1 を参照されたい。DNA 初回刺激群の個体は、RTS , S ワクチンしか受けなかったボランティアよりも、応答した試験ペプチドが有意に多かった。10 人の DNA 初回刺激ボランティア

50

中の8人の応答者のうち、1人は、試験した15～20アミノ酸ペプチドの4種類全部に対して応答し、1人が3種のペプチドに、5人が2種のペプチドに応答し、1人だけが1種のペプチドにしか応答しなかった。13人の非初回刺激ボランティア中の11人の応答者のうち、1人が3種のペプチドに応答し、2人が2種のペプチドに応答し、8人が1種のペプチドにしか応答しなかった(2/8人がDR・316に応答し、6/8人がDR・363に応答した)。全体として、非初回刺激ボランティアの11人中3人に対し、DNA初回刺激ボランティアの8人中7人が、少なくとも2種の試験ペプチドに応答した($p = 0.0094$)。

【実施例4】

【0112】

HBsAgに対するT細胞のIFN- 応答

RTS, Sは、PfCSPの部分及びB型肝炎表面抗原(HBsAg)からなる融合タンパク質である。HBsAgに対する抗体を有する個体では、アジュバント中に含めたRTS, Sによる免疫感作の、T細胞応答の誘発における効率は有意に劣っていた。この結果は、DNA初回刺激ボランティアでは、はるかに目立たなくなった。4種の15～20アミノ酸ペプチドに対する応答にHBsAg抗体状況が及ぼした影響が顕著であったので、調査を拡大した。最初及び2回目のRTS, S免疫感作後、すべての試験時点で13種のPfCSPペプチド(pPfCSP)プールと19種のHBsAgペプチドプールをPBMC中に同時に用いて上述のようなELISPOTアッセイを行って、PfCSPとHBsAgに対する各IFN- 応答を比較した。未処置の非DNA初回刺激個体では、HBsAg成分がT細胞応答に免疫優性であったが(HBsAg陰性の非初回刺激ボランティアでは、PfCSPの0/6人の応答者に対してHBsAgは6/6人の応答者、並びにHBsAg陽性の非初回刺激ボランティアでは、PfCSPの1/8人の応答者に対してHBsAgは7/8人の応答者)、PfCSP DNAで初回刺激すると、T細胞応答がPfCSPに向けられて、この免疫優性が釣合いをもったと思われた(表3; HBsAg陰性の初回刺激ボランティアでは、PfCSPの2/4人の応答者に対してHBsAgが2/4人の応答者、並びにHBsAg陽性の初回刺激ボランティアでは、PfCSPの4/6人の応答者に対してHBsAgが6/6人の応答者)。

【0113】

10

20

【表 5】

表3 HBsAg血清陽性及びHBsAg血清陰性の各ボランティアのIFN-γ 応答の出現度及び規模

ペプチドプール に対する応答	DNA初回刺激ボランティア			非初回刺激ボランティア		
	HBsAg (+)	HBsAg (-)	P 値	HBsAg (+)	HBsAg (-)	値
<u>出現度 [陽性応答者/全ボランティア (%)]</u>						
<u>最初の免疫感作後</u>						
pPfcSP	4/6 (66.7)	2/4 (50.0)	0.6	1/8 (12.5)	0/6 (0)	0.37
pHBsAg	6/6 (100.0)	2/4 (50.0)	0.05	7/8 (87.5)	6/6 (100.0)	0.37
P 値	0.12	1.00		0.003	0.0005	
<u>2回目の免疫感作後</u>						
pPfcSP	5/6 (83.0)	3/4 (75.0)	0.75	3/7 (42.9)	5/6 (83.0)	0.14
pHBsAg	5/6 (83.0)	3/4 (75.0)	0.75	7/7 (100.0)	6/6 (100.0)	-
P 値	1.00	1.00		0.018	0.3	
<u>出現度 [陽性アッセイ/全アッセイ (%)]</u>						
<u>最初の免疫感作後</u>						
pPfcSP	4/15 (26.7)	2/11 (18.2)	0.61	2/23 (8.7)	0/15 (0)	-
pHBsAg	12/15 (80.0)	3/11 (27.3)	0.007	16/23 (69.6)	9/15(60.0)*	0.54
P 値	0.0034	0.61		0.00002	-	
<u>2回目の免疫感作後</u>						
pPfcSP	9/18 (50)	7/12 (58.3)	0.65	3/21 (14.3)	12/18 (66.7)	0.0008
pHBsAg	12/18 (66.7)	7/12 (58.3)	0.64	16/21 (76.2)	17/18 (94.4)*	0.12
P 値	0.31	1.00		0.00006	0.035	
<u>規模 [正味SFC/10⁶個PBMC(幾何平均)]</u>						
<u>最初の免疫感作後</u>						
pPfcSP	19.5-52.2 (33.7)	53.1-82.5 (66.2)	0.23	35.6-54.4 (44.0)	neg	-
pHBsAg	13.5-80.0 (37.7)	21.3-144.4 (46.0)	0.54	13.1-222.9 (60.1)	13.1-132.5 (33.9)*	0.013
P 値	0.41	0.78		0.052	-	
<u>2回目の免疫感作後</u>						
pPfcSP	18.1-68.8 (33.8)	11.7-122.5 (37.9)	0.11	25.0-54.4 (37.6)	17.5-125.6 (46.1)	0.09
pHBsAg	18.8-131.3 (52.8)	17.9-215.0 (57.6)	0.34	20.0-278.8 (62.3)	12.5-317.5 (97.3)*	0.013
P 値	0.024	0.29		0.0032	0.0001	

* 非初回刺激群からのHBsAg血清陰性ボランティアでは、HBsAgに対するIFN-γ 応答の出現度及び規模が共に、2回目の免疫感作後に最初の免疫感作後と比べて有意に増大し、それぞれ、P値=0.035及び0.00003であった。

【 0 1 1 4 】

非初回刺激ボランティアでは、HBsAgに対するIFN-γ 応答が、HBsAgに対する抗体を有するか否かにかかわらず、すべてのボランティアで高かった(表3及び表4、非初回刺激ボランティアを参照のこと)。表3に示したように、RTS, Sワクチンの最初の投与後、Hb s A g ペプチドプールに対する応答の規模は、HBsAgに対する抗体が予め存在している個体で、そのような抗体をもたない個体よりも有意に大きかった(SFC範囲/10⁶個PBMC[幾何平均]: 13.1~222.9[60.1]対13.1~132.5[33.9]、p=0.013)。しかし、RTS, Sワクチンによる2回目の免疫感作後では、2群間にINFの規模の差はなかった(規模のデータを参照のこと)。HBsAg抗体陰性個体のHBsAgに対する応答は、RTS, Sワクチンの2回目の投与後に、最初の投与後と比べて有意に増大した(表3)。詳細には、2回のRTS, Sワクチン投与後の陽性アッセイの出現度は、最初の投与後で9/15であったのに対し、17/18であった(p=0.035)(表3の脚注を参照のこと)。IFN-γ 応答の規模は、1回だけの投与で13.1~132.5[幾何平均=53.3.9]であったのに対し、12.5~317.5[幾何平均=97.3]であった(p=0.024)(表3の脚注を参照のこと)。2回目の投与後、SFC数は、Hb s A g 抗体陰性個体

10

20

30

40

50

で、HBsAg抗体陽性個体よりも有意に多かった(12.5~317.5[97.3]に対して20.0~278.8[62.3]、 $p = 0.013$) (表3)。

【0115】

表3が示すように、PfCSPに対するIFN- γ 応答は、HBsAgに対する応答とは異なるパターンを示した。RTS, Sワクチンの1回目の投与後に、8人中7人のHBsAg陽性ボランティア及び6人全員のHBsAg陰性ボランティアとして示される、14人中13人の非初回刺激ボランティアが、HBsAgに応答した。対照的に、PfCSPに対しては、8人中1人のHBsAg陽性ボランティア及び6人中0人のHBsAg陰性ボランティアとして示される、この14人中1人の個体しか応答しなかった($p = 0.0049$)。全体として、RTS, Sの最初及び2回目の投与後の陽性応答者出現度及び陽性アッセイ出現度によって評価したところ、RTS, Sによって誘発されたIFN- γ 応答は、DNAによる初回刺激を受けなかったすべてのボランティアで、PfCSPに対してはHBsAgに対してよりも有意に低く、抗HBsAg抗体が予め存在している個体においてさえ低かった(表3)。非初回刺激ボランティアのp値を参照されたい。同様に、IFN- γ 応答の規模も、各免疫感作後、HBsAg抗体陽性個体($p < 0.05 \sim 0.0032$)及びHBsAg抗体陰性個体($p = 0.0001$)の両方でより低かった(表3)。表3の規模の欄の、強調表示したp値を参照されたい。これらのデータは、非初回刺激個体では、RTS, Sが、PfCSPとHBsAgとに対するT細胞応答を惹起し、HBsAgに対する応答の方がPfCSPに対する応答よりも有意に強かったことを示した(表4)。

【0116】

HbsAg抗体陽性でもあるDNA初回刺激ボランティアでは、最初のRTS, S投与後の陽性アッセイ数は、PfCSPに対してよりもHBsAgに対しての方が多かった(12/15対4/15、 $p = 0.0034$) (表3)。しかし、2回目のRTS, Sワクチンを投与すると、PfCSPに対する陽性アッセイの出現度は、HBsAg抗体陽性ボランティアのHBsAgについての出現度と異なっていなかった。DNA初回刺激ボランティアについての出現度のデータを参照されたい。DNA初回刺激を受けたHbsAg抗体陰性ボランティアでは、RTS, Sワクチンの最初又は2回目の投与後、これらの出現度は異なっていなかった。PfCSP及びHbsAgに対する各応答の規模は、HbsAg抗体状態にかかわらず、最初の投与後では類似していた(表3)。しかし、2回目の投与後では、DNA初回刺激を受けたHBsAg抗体陽性個体の、HBsAgに対する応答の規模が、PfCSPに対する応答の規模に比べて有意に増大した(SFC範囲/10⁶個PBMC[幾何平均]: 18.1~68.8[33.8]対18.8~131.3[52.8]、 $p = 0.024$)。これらの結果は、RTS, Sワクチンが複数回投与された場合、HBsAgに対する応答が、PfCSPに対する応答よりも結局優勢になり得ることを示唆した。

【実施例5】

【0117】

ヒトにおいて、RTS, SはTh1応答しか誘発しないが、DNAワクチンは、Tc1(CD8⁺)型及びTh1(CD4⁺)型の両方の応答を誘発する

PfCSP DNAワクチン又はRTS, Sワクチンは、単独でIFN- γ 応答を誘発することができるので、RTS, Sワクチンの2回目の投与後、陽性応答者については、両方の群のIFN- γ 応答が同等であった(8/10に対して11/14)(表1)。それでもやはり、これまでに報告したように、単独のPfCSP DNAワクチン又はRTS, Sワクチンによって誘発されたIFN- γ 応答は、異なるT細胞サブタイプに応じて異なっていた。DNAによる免疫感作は、CD4⁺細胞及びCD8⁺T細胞の両方に依存的なIFN- γ 応答を誘発し(107)、RTS, Sは、CD4⁺T細胞依存的な応答だけを誘発する(61)。

【0118】

両方の誘発のIFN- γ 応答のT細胞プロフィール、及び*in vitro*でのエフェ

10

20

30

40

50

クター相の特徴付けを、それぞれELISPOT及びリアルタイムPCRによって、DNA単独、RTS, S単独で免疫感作したボランティア、又はDNA初回刺激/RTS, S追加免疫ボランティアからのPBMCを用いて行った。

【0119】

ELISPOTアッセイは、抗CD4⁺又は抗CD8⁺でコートしたDynabeads M-450 (Dynal, Inc., 米ニューヨーク州Great Neck)を使用して、ペプチドと共に培養する前にCD4⁺T細胞又はCD8⁺T細胞を枯渇させたPBMCを用いて実施した。IFN- γ mRNAの発現レベルは、選択的に濃縮処理したT細胞集団、すなわちCD4⁺/CD45RA⁺、CD4⁺/CD45RA⁻、CD8⁺/CD45RA⁺、及びCD8⁺/CD45RA⁻の各T細胞でのリアルタイムPCRによって測定した。これらのアッセイでは、凍結したPBMCを、10%のヒトAB血清を加えた、24穴プレート中の完全RPMI培地2ml中で 3×10^6 細胞/ウェルの密度で一晩培養して元に戻し、次いで短いペプチド(9~10アミノ酸A2ペプチド配列GILGFVFTL; 配列番号27)で2時間、又は長いペプチド(15~20アミノ酸)で4時間、10 μ g/mlの密度で刺激した。次に、PBMCを収集し、MACS MultiSortキットを使用してCD8⁺T細胞又はCD4⁺T細胞の濃縮を行い、次いで、濃縮処理したCD4⁺T細胞又はCD8⁺T細胞を、CD45RA MicroBeads (Miltenyi Biotec, 米カリフォルニア州Auburn)に通して、CD45RA⁺細胞及びCD45RA⁻細胞を分離した。

10

【0120】

リアルタイムPCRによってIFN- γ mRNAを定量化するために、RNeasy kit (Qiagen, カリフォルニア州バレンシア)を使用して、濃縮処理したT細胞サブセットから全RNAを単離した。ランダム六量体及びTaqMan Reverse transcriptionキット(PE Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスターシティー)を使用して、全RNAからcDNAを合成した。リアルタイムPCRによるIFN- γ mRNAの相対定量は、TaqMan PCRキットを製造者の指示に従って使用しながら、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Perkin-Elmer)によって行った。IFN- γ 及びGAPDH mRNAを増幅するためのプライマー、プローブ、及び標準物質は、社内で設計及び標準化した。リアルタイムPCRによるIFN- γ mRNAの相対定量は、TaqMan PCRキットを製造者の指示に従って使用しながら、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Perkin-Elmer)によって行った。IFN- γ 及びGAPDH mRNAを増幅するためのプライマー(hIFN- γ -F、TTGGTGATGATTTGAACATTGGA、配列番号28; hIFN- γ -R、CCCA GTTCCTGCAGAGTAGAAAA、配列番号29; hGAPDH-F、5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC、配列番号30; hGAPDH-R、GAAGATGGTGAATGGGATTTTC、配列番号31)、プローブ(hIFN- γ プローブ: TGTCACTTGCAAAACACACAGCTTGTCTGAA、配列番号32; hGAPDHプローブ: CAAGCTTCCC GTTCTCAGCC、配列番号33)は、製造者のプロトコルに従って社内で設計及び標準化した。各実験サンプルでGAPDHの増幅を内在対照として行って、各反応に加える全RNAの量及び質の差を計上した。熱循環条件は、50 $^{\circ}$ Cで2分間及び95 $^{\circ}$ Cで10分間の後、95 $^{\circ}$ Cで15秒及び60 $^{\circ}$ Cで1分間からなる2ステップのPCRを50回とした。全サンプルを3通りに増幅した。ターゲットmRNAレベルと逆の相関がある閾値サイクル(threshold cycle)(Ct)を、レポーター蛍光発光が閾値レベルを上回って増大したサイクル数として測定した。ターゲット遺伝子の発現は、GAPDH遺伝子の発現の値をもとに異なるサンプル間で標準化した。

20

30

40

【0121】

T細胞のどのサブセットがIFN- γ 応答の誘発相に関与したかを*in vitro*で同定するために、ELISPOTアッセイの前に、枯渇処理したT細胞集団を、画定され

50

た P f C S P ペプチドと共にインキュベートした。平行して、P B M C を、E L I S P O T アッセイに使用したものと同一ペプチドと共にインキュベートした後、縮処理した T 細胞集団サブセットでのリアルタイム P C R によって I F N - γ mRNA の発現レベルを評価して、実際に I F N - γ を分泌したエフェクター T 細胞の輪郭を描いた。ペプチド D R . 3 6 3 (クラス I I 拘束性 C D 4 ⁺ T 細胞エピトープのみを含む) 及び D R . 3 1 6 (クラス I 及びクラス I I 拘束性の重なり合う C D 4 ⁺ エピトープ及び C D 8 ⁺ エピトープを含む) に対する応答を評価して、P f C S P に対する、異なるワクチン送達系による I F N - γ 応答の根底にある機序を比較した。H L A - A 2 拘束性、免疫優性、かつ保存されている、インフルエンザマトリックスタンパク質 (F l u M A 2) 由来 C D 8 ⁺ T 細胞エピトープ、及び H L A - D R 拘束性の、破傷風毒素 (T T - D R) 由来 C D 4 ⁺ T 細胞エピトープに対する応答も同時に評価して、異なるエピトープ、アッセイ、及びボランティア間の内部標準化を果たした。

10

【 0 1 2 2 】

F l u M A 2 ペプチドに対する I F N - γ 応答の *in vitro* での誘発は、受けた抗マラリアワクチンの種類が何であるかにかかわらず、試験した 17 人すべての個体で、P B M C の培養直前に C D 4 ⁺ T 細胞でなく C D 8 ⁺ T 細胞を枯渇させると、I F N 応答が完全になくなるか、又は有意に減少したことから、C D 4 ⁺ T 細胞でなく C D 8 ⁺ T 細胞に依存的であった (図 2 a) 。対照的に、ペプチド T T - D R に対する応答は、試験した 3 人全員の陽性応答者で、完全に C D 8 ⁺ T 細胞でなく C D 4 ⁺ T 細胞に依存的であった (図 2 b) 。

20

【 0 1 2 3 】

濃縮処理した 4 種の T 細胞集団 (C D 4 ⁺ / C D 4 5 R A ⁺ 、 C D 4 ⁺ / C D 4 5 R A ⁻ 、 C D 8 ⁺ / C D 4 5 R A ⁺ 、 及び C D 8 ⁺ / C D 4 5 R A ⁻) でのリアルタイム P C R によって測定した I F N - γ mRNA の発現レベルは、E L I S P O T アッセイから得た知見と一致していた。I F N - γ mRNA は、F l u M A 2 ペプチドで刺激した後、主に C D 8 ⁺ T 細胞中でアップレギュレーションされた (図 2 e : 規準物質) 。I F N - γ mRNA の発現レベルは、C D 8 ⁺ T 細胞では 6 . 8 倍 (範囲、3 . 4 ~ 1 2 . 9 倍) に増加したのに対し、C D 4 ⁺ T 細胞では 2 . 2 倍 (範囲、0 . 9 8 ~ 7 . 5 8 倍) の増加であった ($p = 0 . 0 3$) 。C D 8 ⁺ T 細胞における I F N - γ mRNA のアップレギュレーションの百分率は、C D 4 ⁺ T 細胞を上回って平均で 7 8 % であった (範囲、6 2 ~ 9 9 %) 。対照的に、T T - D R による刺激後では、I F N - γ mRNA が、主に C D 4 ⁺ T 細胞でアップレギュレーションされた (図 2 e : 規準物質) 。I F N - γ mRNA レベルは、C D 4 ⁺ T 細胞では 7 . 6 倍 (範囲、2 . 4 ~ 1 8 . 3) に増加したのに対し、C D 8 ⁺ T 細胞では 2 . 2 倍 (範囲、1 . 1 ~ 4 . 6) の増加であった ($p = 0 . 0 2$) 。C D 4 ⁺ T 細胞における I F N - γ mRNA のアップレギュレーションは、C D 8 ⁺ T 細胞を上回って 7 9 % (範囲、7 4 ~ 1 0 0 %) であった。これらの結果は、C D 8 ⁺ T 細胞が、F l u M A 2 ペプチドに対する I F N - γ 応答の機能エフェクターであり、C D 4 ⁺ T 細胞が T T - D R ペプチドに対する機能エフェクターであることを示唆した。

30

【 0 1 2 4 】

発明者らは、上述のように、アッセイを 2 種の標準物質と平行して行い、D N A P f C S P ワクチン又は R T S , S ワクチンによって誘発された、2 種の異なる P f C S P ペプチド (D R . 3 6 3 及び D R . 3 1 6) に対する I F N - γ 応答の T 細胞プロフィールを明らかにした。ペプチド D R . 3 6 3 が C D 4 ⁺ T 細胞エピトープを含んでいるが C D 8 ⁺ T 細胞エピトープを含んでいないことと一致して、枯渇処理した T 細胞集団を用いた E L I S P O T の結果は、P f C S P D N A ワクチンのみ (被験者 2 / 2 人、V 1 及び V 5) 又は R T S , S のみ (被験者 6 / 6 人) を受けたボランティアで、ペプチド D R . 3 6 3 に対する I F N - γ 応答が、完全に C D 4 ⁺ T 細胞依存的であったことを示した (図 2 c) 。濃縮処理した T 細胞集団における I F N - γ mRNA の発現レベルは、E L I S P O T による T 細胞依存性と整合性があった。I F N - γ mRNA は、P f C S P

40

50

DNAワクチン及びRTS, Sワクチンで免疫感作されたどちらのボランティアでも、主にCD4⁺T細胞でアップレギュレーションされた(図2e: DR.363)。DNAで免疫感作した5人の被験ボランティアでは、IFN- γ mRNAレベルが、CD4⁺T細胞では5.3倍(範囲、2.6~11.5)に増加したのに対し、CD8⁺T細胞では1.7倍(範囲、0.99~3.2)の増加であった(p=0.014)。CD4⁺T細胞におけるIFN- γ mRNAのアップレギュレーションは、CD8⁺T細胞を上回って74%であった(範囲、64~91%)。RTS, Sで免疫感作した4人のボランティア被験ボランティアでも同じパターンが見られ(図2e)、IFN- γ mRNAレベルが、CD4⁺T細胞では9.2倍(範囲、2.9~53.5)に増加したのに対し、CD8⁺T細胞では0.9倍(範囲、0.6~1.1)の増加であり、CD4⁺T細胞におけるIFN- γ mRNAのアップレギュレーションは、CD8⁺T細胞を上回って86%(範囲、73~98%)であった。これらの結果は、DNA PfCSPワクチンが、CD8⁺T細胞依存的なIFN- γ 応答に加え、PfCSP特異的かつCD4⁺T細胞依存的なIFN- γ 応答を誘発したことの第1の証拠となった。

10

【0125】

DR.316(CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞の重なり合うエピトープ)に対するIFN- γ 応答は、単独のPfCSP DNAワクチン又はRTS, Sワクチンを受けているボランティアでは、種々のT細胞サブセットに応じて様々であった。これまでに報告されているように(107)、この応答は、DNAのみを受けたボランティア(V1)ではCD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞の両方に依存的であったのに対し(図2d)、RTS, Sワクチンのみを受けたボランティア(3/3人の被験ボランティア)では、CD4⁺T細胞のみに依存的で、CD8⁺T細胞には依存的でなかった(図2d)。さらに、IFN- γ mRNAは、DNAで免疫感作したボランティアにおいて主にCD8⁺T細胞でアップレギュレーションされたが(図2e: DR.316)、ELISPOTによると、この応答はCD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞の両方に依存的であった。

20

【0126】

IFN- γ mRNAの発現レベルは、CD8⁺T細胞で64.7倍に増加したのに対し、CD4⁺T細胞では0.36倍の増加であり、CD8⁺T細胞におけるIFN- γ mRNAのアップレギュレーションは、CD4⁺T細胞を上回って99.6%であった。対照的に、RTS, Sワクチンで免疫感作したボランティアでは、IFN- γ mRNAの転写が、主にCD4⁺T細胞でアップレギュレーションされた(図2e: DR.316)。IFN- γ mRNAの発現レベルは、CD4⁺T細胞では24.7倍(範囲、5.3~176.7倍)に増加したのに対し、CD8⁺T細胞では2.5倍(範囲、1.1~5.6倍)の増加であった。CD4⁺T細胞におけるIFN- γ mRNAのアップレギュレーションは、CD8⁺T細胞を上回って86%(範囲、69~98%)であった。これらの知見は、DNAによる免疫感作では、CD4⁺T細胞は、IFN- γ 応答の*in vitro*誘発相にしか関与しておらず、CD8⁺T細胞がDR.316に対して実際にIFN- γ を分泌する細胞であることを示唆した。RTS, Sワクチンで免疫感作した個体では対照的に、これらの結果は、CD4⁺T細胞が、同じペプチド(DR.316)に対してIFN- γ を産生するエフェクターT細胞であることを示唆した。

30

40

【実施例6】

【0127】

DNA初回刺激/RTS, S追加免疫は、IFN- γ 産生T細胞のレパートリーを広げる

DNA初回刺激ボランティアにおけるRTS, Sワクチンでの追加免疫によって、IFN- γ 産生T細胞のレパートリーの輪郭が浮かび上がった。ペプチドDR.363(CD8⁺T細胞エピトープを含んでいない)に対するIFN- γ 応答は、単独のPfCSP DNAワクチン又はRTS, Sワクチンで免疫感作したボランティアで、CD4⁺T細胞にのみ依存的であった。RTS, Sによる追加刺激免疫後のDNA初回刺激群の2/3人の応答者(V1及びV5)でも、DR.363に対する同じ型の応答が検出された。驚くべ

50

きことに、 $CD4^+$ T細胞中のIFN- γ mRNAの発現レベルによって測定した応答規模は、DNAのみの3回の免疫感作後では、V1で7.6倍、V5で12.5倍の増加であったのに対し、RTS, Sによる追加免疫の後、ボランティアV1で94.9倍、V5で46.7倍に増大した。図3の「DNA単独」バーを参照されたい。RTS, S追加免疫後の応答の規模は、V1ではDNA免疫感作後の12.5倍、V5では3.7倍であった(図3; 「DNA単独」バーと「DNA/RTS, S」バーを比較されたい)。

【0128】

ペプチドDR.316に対するIFN- γ 応答は、単独のPfCSP DNAワクチン又はRTS, Sワクチンを受けたボランティアでは、種々のT細胞サブセットに応じて様々であった。DNAによって誘発された応答は、誘発相では $CD4^+$ T細胞及び $CD8^+$ T細胞の両方に依存的であったが、エフェクター相では $CD8^+$ T細胞のみに依存的であった。エフェクター相の測定を行うときには、ペプチドで刺激した後にT細胞集団を枯渇させた。対照的に、RTS, Sによって誘発された応答は、誘発相及びエフェクター相の両方で、 $CD4^+$ T細胞のみに依存的であった。したがって、RTS, Sによる追加刺激後、DNA初回刺激ボランティアのDR.316に対する応答が、単独のDNA又はRTS, Sで免疫感作したボランティアで見られる2通りのパターンが混ざったものであったことは意外でない(図2d)。

【0129】

*in vitro*の誘発相では、最初のRTS, S投与の後、3/5人の応答者(4/6アッセイ)で、 $CD4^+$ T細胞及び $CD8^+$ T細胞の両方に依存的な、DR.316に対するIFN- γ 応答が検出された。2回目のRTS, S投与の後、4/6人の応答者(7/12アッセイ)で、完全に $CD4^+$ T細胞依存的であり、 $CD8^+$ T細胞には部分的にしか依存的でないIFN- γ 応答が検出された。 $CD8^+$ T細胞を枯渇させても、IFN- γ の産生は変わらず(図4a)、RTS, Sによる初回刺激後には、 $CD8^+$ Tだけでなく $CD4^+$ T細胞もIFN- γ を産生したことが示唆された。同時に、エフェクター相では、IFN- γ mRNAの発現レベルが、DNA単独で免疫感作したボランティアでは $CD8^+$ T細胞でのみ、又はRTS, S単独で免疫感作したボランティアでは $CD4^+$ T細胞でのみアップレギュレーションされたのに対し、 $CD8^+$ T細胞(8/8人の応答者)だけでなく、 $CD4^+$ T細胞(RTS, Sの最初の投与後4/8人の応答者、2回目の投与後6/8人の応答者)でもアップレギュレーションされた(図2e: DR.316、VI(DNA)とV22(RTS, S)を比較されたい)。

【0130】

全体として、RTS, Sによる追加免疫の後、8人中6人の応答者で、 $CD8^+$ T細胞及び $CD4^+$ T細胞の両方におけるIFN- γ mRNAのアップレギュレーションが検出され、 $CD4^+$ T細胞でのIFN- γ mRNAのアップレギュレーションが3.0~28.3倍(幾何平均、6.6倍)であったのに対し、 $CD8^+$ T細胞では、4.0~281.03(幾何平均、19.7倍)であった。 $CD4^+$ T細胞におけるIFN- γ mRNAのアップレギュレーションの百分率は、 $CD8^+$ T細胞を上回って23.5%(範囲、6.5~45.1%であった)。ここまでの結果は、RTS, Sによる追加刺激後のDNA初回刺激ボランティアで、DR.316に特異的な $CD4^+$ T細胞が、 $CD8^+$ T細胞にIFN- γ を産生させるためのヘルパーT細胞として(DNAによって誘発されるIFN- γ 応答の特徴)だけでなく、IFN- γ を産生するエフェクターとして(RTS, Sによって誘発されるIFN- γ 応答の特徴)も機能したことを実証したものであった(表5)。

【0131】

上記データによって、 $CD8^+$ T細胞依存的なIFN- γ 応答が、非初回刺激ボランティアでは実証されなかったが、DNA初回刺激-RTS, S追加免疫ボランティアでは実証された。これらのデータからは、同じエピトープに対する、 $CD4$ 及び $CD8$ の両方に依存的なIFN- γ 応答も実証された。ペプチドDR.316は、IFN- γ 応答が異なるT細胞サブセットに依存的であることから、 $CD4$ 及び $CD8$ の重なり合うエピトープ

10

20

30

40

50

であると特定された。

【 0 1 3 2 】

【 表 6 】

表4 RTS, S免疫感作後のDNA初回刺激群と非初回刺激群のIFN

IFN-γ 応答の対象	特異的抗原 PfcSP		主鎖抗原 HBsAg	
	HBsAg (+)	HBsAg (-)	HBsAg (+)	HBsAg (-)
基点でのHBsAg 血清学				
DNA 初回刺激群				
最初の投与後	++	++	++	++
2回目の投与後	++	++	++	++
非初回刺激群				
最初の投与後	+/-	-	++++	++++
2回目の投与後	+	++	++++	++++

10

20

応答性スコアの判定基準は、(1) 陽性応答者の出現度、(2) 陽性アッセイの出現度、及び(3) 基点と比べての陽性応答の規模についての統計学的に有意な増加 (p<0. 05)、並びに(4) 2回目の免疫感作後のIFN-γ 応答の、最初の免疫感作後と比べての有意な増大に基づく。-、応答なし;+/-、増加したが統計学的に有意でない;+、++、+++、及び++++はそれぞれ、4段階の判定基準の1、2、3、又は4を表す。

【 実施例 7 】

【 0 1 3 3 】

30

DNA 初回刺激 / RTS, S 追加免疫ボランティアの抗体応答

風乾熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトに対する抗体応答の評価を、RTS, Sによる免疫感作前、RTS, Sを最初に投与してから2、4、6及び8週間後、2回目に投与してから1、2、4、及び6週間後に行った。抗体の力価は、これまでに記載されているような間接蛍光抗体試験 (IFAT) によって決定した (33)。予想どおり、各群で抗体応答に若干の変動性があったものの、抗体力価は上等であった (図5)。力価は、2回目のRTS, S投与の4週間後に最高点に達し、幾何平均力価は、5120 ~ 20480の範囲であった。しかし、1件を除き、どの時点でも全スポロゾイトに対する抗体力価に統計学的な有意差はなかった。最初に投与してから2週間後において、PfcSPを受けたことがなく、HBsAgに対する抗体を有するボランティア群 (DNA - / HB +) の、IFATによる抗体の幾何平均力価3225が、PfcSPを受けたことがあり、HBsAgに対する抗体を有するボランティア (DNA + / HB +) の幾何平均力価718.4よりも大きかった (P = 0.02)。これは主に、予定されていたRTS, Sによる2回目の免疫感作のちょうど前の6週間の時点の後に試験を辞退した、DNA - / HB +群の1人のボランティアの高い力価10240によるものであった。2回目のRTS, S投与後、各群間に統計学的有意差は存在しなかった。

40

【 0 1 3 4 】

結論

熱帯熱マラリア原虫、結核菌 (Mycobacterium tuberculosis)、及びHIVのような感染に対する有効で持続性のあるワクチン開発の経過は、予想

50

以上に手間取り、困難であり、かつ複雑であることがわかった。上記の本発明の分析は、P f C S P DNAによる初回刺激とR T S , Sによる追加免疫とによって、免疫系の細胞性及び液性の両部門による応答が誘発されることを示すものである。さらに、H B s A gに対する抗体を有する個体の中で、P f C S P DNAワクチンによる初回刺激を受けた個体は、R T S , Sアジュバント添加ワクチンの投与後、P f C S P DNAを受けたことのないボランティアよりも良好なT細胞応答を生じた。マラリアワクチン又は他のワクチンの大抵の受容者は、免疫感作又は感染によるH B s A gに対する抗体をもつことになるので、このことは、この初回刺激追加免疫による免疫感作戦略の重要な強みとなり得る。

【0135】

この分析は、R T S , S DNAによるワクチンを最後に接種してから12～14カ月後に追加刺激することによって、ボランティアの50%で、DNA初回刺激によるP f C S P特異的なC T L応答が復活したことを示し、DNAワクチンが、記憶T細胞の応答を長持ちさせるのに非常に有効であったことを示唆している。R T S , S注射後にC T Lが復活した5人中2人のボランティアは、DNAのみで免疫感作した後にはC T Lが検出可能でなかったため、DNAワクチンによる免疫感作が、これらの個体において記憶C T Lを誘導するには優れていたが、エフェクターT細胞応答の誘発には最適でなかったかもしれないことが示唆される(38、92)。R T S , Sのみを受けた非初回刺激ボランティアではC T Lが検出されなかったため、R T S , Sは、P f C S P特異的なC T Lを初回刺激することができなかったが、DNAワクチンによって引き起こされたC T L応答を追加刺激する能力を備えていた。DNA初回刺激によるP f C S P特異的なI F N - 応答も、R T S , Sによって、特に最初の投与後に強く追加刺激された。4種のうち1種のペプチドに対してしか応答を示さなかった14人中2人の非初回刺激ボランティアに対し、10人中6人のDNA初回刺激ボランティアは、試験した4種すべてのペプチドに対するI F N - 応答を示した。R T S , Sの2回の投与後、応答の出現度及び規模については有意差がなかったものの、I F N - 応答のエピトープレベルでの幅は、DNA初回刺激ボランティアで非初回刺激ボランティアよりも有意に広がった。11人中3人の非初回刺激ボランティアに対して8人中7人のDNA初回刺激ボランティアが、少なくとも2種の試験ペプチドに反応した($p = 0.0094$)。

【0136】

結果は、DNA初回刺激/R T S , S追加免疫が、I F N - 産生T細胞のレパートリーを広げることも示唆している。DNA初回刺激によって、I F N - 産生T細胞の2通りのプロファイル、すなわち(1)重なり合うC D 4⁺/C D 8⁺T細胞エピトープ(D R . 3 1 6及びD R . 3 1 8)に対するC D 4⁺T細胞依存的なC D 8⁺1型応答、及び(2)D R拘束性C D 4⁺T細胞エピトープ(D R . 3 6 3)に対するC D 4⁺1型I F N - 応答が開始された。一方、単独のR T S , Sは、C D 4⁺1型I F N - 応答のみを誘発した(図2)。D R . 3 1 6、すなわち重なり合うC D 4⁺/C D 8⁺T細胞エピトープに関しては、単独のDNAがC D 4⁺依存的なC D 8⁺1型応答を誘発し、単独のR T S , Sがこのペプチドに対するC D 4⁺1型応答を誘発した。しかし、DNAで初回刺激し、R T S , Sで追加免疫すると、D R . 3 1 6に対する両方のパターンのI F N - 応答が同時に誘発された(図4、表4)。加えて、R T S , Sは、DNA初回刺激後には検出されなかった、新たなC T Lエピトープに対するC T L応答を刺激した。

【0137】

C D 4⁺T細胞は、C D 8⁺T細胞によるI F N - 産生の傍観者的な助力者の役目を果たすのではないか。上記の結果は、それぞれ、P B M Cをペプチドによって*i n v i t r o*で刺激する前後に枯渇又は濃縮処理したT細胞集団で、E L I S P O Tアッセイ及びリアルタイムP C Rを平行して実施して、この仮説を検証するものである。I F N - 産生細胞の数及びI F N - m R N Aの発現レベルをペプチドによる刺激の前後で比較すると、単独のDNAワクチン及び単独のR T S , Sワクチンによって誘発されるI F N - 応答に関与するT細胞の機能プロファイルの輪郭が浮かび上がった。

10

20

30

40

50

【0138】

ここでの結果は、DNAによる初回刺激が、追加免疫後の応答を、初回刺激された抗原の方に向け得ることを示唆している。RTS, Sによる免疫感作に関しては、このことが特に重要であると思われる。RTS, Sは、マラリア抗原PfCSPに対するT細胞応答を増強し得るはずの担体としてHBsAgを備えた設計がなされた。基点においてHBsAg抗原に対する抗体をもっていた個体は、以前にB型肝炎ワクチンによって免疫感作されている。サハラ以南のアフリカで送達された抗マラリアワクチンのターゲット集団は、HBsAgに自然に接触し、又は以前にそれに対するワクチン接種を受けていることが予想されるはずである。

【0139】

PfCSPに対するIFN- 応答をDNA初回刺激ボランティアと非初回刺激ボランティアとで比較すると、抗HBsAg抗体が存在していた個体間で有意差が示された(表1、3、及び5)。HBsAg及びPfCSPに対する個々のIFN- 応答を同時に比較すると、RTS, Sによって誘発されたIFN- 応答は、DNAによる初回刺激を受けていないすべてのボランティアで、PfCSPに対する応答がHBsAgよりも有意に低く、抗HBsAgが予め存在している個体においてでさえも低かったことが明らかになった。RTS, Sを1回投与した後、HBsAgには13/14人の対象ボランティアが応答したが、PfCSPに対するIFN- 応答は、14人中1人の個体でしか検出されなかった。一方、RTS, Sによる追加免疫の後、PfCSPに対するIFN- 応答の出現度及び規模が、HBsAg血清陽性個体とHBsAg血清陰性個体とで同等であったので(表5)、DNA初回刺激ボランティアの主鎖抗原に対する応答は、PfCSPに対するIFN- 応答の誘発に、ほとんど又は全く影響を及ぼさなかった。これらの結果は、DNAが、T細胞応答を開始し、それを特異的抗原に向け、所望の免疫とバックグラウンド応答との釣合いを取ることを実証した。DNA初回刺激ボランティアは、抗HBsAg血清が陽性であるかにかかわらず、PfCSP及びHBsAgに対するIFN- 応答が同等であり、非初回刺激ボランティアは、HBsAgに対するIFN- 応答がPfCSPと比べて有意に強い(表4)。

【0140】

現在、組換え融合タンパク質、並びにターゲットタンパク質を発現させる組換え型のウイルス及び細菌を生み出すことにはかなりの労力が払われている。多くの場合、HBsAg、ワクシニア、ポリオウイルス、及び腸チフス菌(*Salmonella typhi*)のための免疫感作を受けた個体には、そのワクチンのこれらの主鎖成分に対する抗体が予め存在することになる。ワクチンの主鎖成分(たとえば、HBsAg)に対する抗体を有する個体において、ターゲットタンパク質をコードしているDNAによって初回刺激を施すと、ターゲットタンパク質に対するT細胞免疫応答が、組換えタンパク質のみで初回刺激するのよりも増強されたことは、この初回刺激追加免疫による疫感作戦略の強みとなり得る。

【0141】

10

20

30

【表 7】

表5 抗原特異的なIFN- γ 応答のT細胞レパートリー

ペプチド	DNA 単独	RTS,S 単独	DNA 初回刺激 / RTS,S 追加免疫
Flu M A2 (CD8⁺ T エピトープ)			
誘発相	CD8+	CD8+	CD8+
エフェクター相	CD8+	CD8+	CD8+
TT-DR (CD4⁺ T エピトープ)			
誘発相	CD4+	CD4+	CD4+
エフェクター相	CD4+	CD4+	CD4+
PfCSP DR.363 (CD4⁺ T エピトープ)			
誘発相	CD4+	CD4+	CD4+
エフェクター相	CD4+	CD4+	CD4+
PfCSP DR.316 (重なり合うCD4⁺ and CD8⁺ T エピトープ)			
誘発相	CD4+及びCD8+	CD4+	CD4+及びCD8+
エフェクター相	CD8+	CD4+	CD8+及びCD4+

10

20

【0142】

DNAをワクチン媒体として使用して免疫応答を初回刺激すると、最初のT細胞応答を組換え免疫原に集中させることが可能になる。単にその免疫原がDNAワクチン中に発現される唯一の外来タンパク質だからである。組換えRTS,S又はポックスウイルスは、DNAベクターよりもワクチン媒体として本質的により免疫原性であるかもしれないが、ウイルスを感染させた細胞は、T細胞の免疫優性を得ようと組換え免疫原と競合する多種類のウイルス由来エピトープを産生する。ワクチンを受けている多くの個体は、必然的に担体抗原に接触し、又は組換えウイルス若しくはタンパク質中に抗原を含む他のワクチン接種を受けている可能性が最も見込まれるので、担体抗原に対するエフェクター応答によって、特異的抗原に対するT細胞応答の誘発が妨害されることになる。

30

【0143】

この研究では、DNA初回刺激/組換えタンパク質追加免疫による免疫感作戦略によって、抗原特異的CD4⁺ヘルパー、CD8⁺T細胞依存的CTL、及びIFN- γ の各応答、並びにTh1型CD4⁺T細胞依存的なIFN- γ 応答が、ヒトのボランティアにおいてすべて同時に実現した。免疫応答の両部門を誘発することのできるこの戦略は、予防及び治療用のワクチンに無類の強みを提供するものである。

40

【0144】

以下の刊行物、並びにこの出願の任意の箇所で他に言及した刊行物を、参照により特に本明細書に援用する。

1. Aguiar, J. C., Hedstrom, R. C., Rogers, W. O., Charoenvit, Y., Sacchi, J. B., Jr, Lanar, D. E., Majam, V. F., Stout, R. R., 及び Hoffman, S. L., 「無針ジェット装置を用いた免疫化によるマラリアDNAワクチンに対するウサギの免疫応答の増強 (Enhancement of the immune response in rabbits to a malaria DNA vaccine by immunization with a needle-free jet device)」、Vaccine 20:275~80 (2001)。

50

2. Aidoo, M., Lalvani, A., Allsopp, C. E., Plebanski, M., Meisner, S. J., Krausa, P., Brownin g, M., Morris Jones, S., Gotch, F., Fidock, D. A. ら、「マラリアに対する細胞毒性Tリンパ球誘導ワクチン用の保存抗原成分の同定 (I dentification of conserved Antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte - ind ucing vaccine against malaria)」、Lancet 345:1003 (1995)。
3. al Yaman, F., Genton, B., Anders, R., Falk , M., Triglia, T., Lewis, D. ら、「パプアニューギニアの風土病流行地域における熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) メロゾイト表面抗原 - 2 に対する体液性応答とマラリア罹患率との関係 (Relation ship between humoral response to Plasmod ium falciparum merozoite surface antigen - 2 and malaria morbidity in a highly end emic area of Papua New Guinea)」、Am. J. Tro p. Med. Hyg. 51:593 (1994)。
4. al Yaman, F., Genton, B., Anders, R., Tara ika, J., Ginny, M., Mellor, S. ら、「臨床的マラリアからのパプ アニューギニアの子どもへの保護におけるRESA及びSPf66と比較した熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) MSP2 に対する体液性応答の 役割の評価 (Assessment of the role of the humo ral response to Plasmodium falciparum MS P2 compared to RESA and SPf66 in protect ing Papua New Guinean children from clin ical malaria)」、Parasite Immunol 17:493 (19 95)。
5. Anders, R. F., Crewther, P. E., Edwards, S. , Margetts, M., Matthew, M. L., Pollock, B., Pye , D.、 「組み換えAMA - 1 を用いる免疫化がプラスモジウムチャバウジ (Plasm odium chabaudi) への感染からネズミを守る (Immunisation with recombinant AMA - 1 protects mice ag ainst infection with Plasmodium chabaudi)」、Vaccine 16 (2~3):240~7 (1998)。
6. Barouch, D. H. ら、「サイトカイン増強DNAワクチン接種によるア カゲザルにおけるウイルス血症制御及び臨床的AIDS予防 (Control of v iremia and prevention of clinical AIDS i n rhesus monkeys by cytokine - augmented DNA vaccination)」、Science 290, 486~92 (2000)。
7. Blackman, M. J., Heidrich, H. G., Donachie , S., McBride, J. S. 及びHolder, A. A.、 「マラリアメロゾイト 表面タンパク質の単一断片が赤血球侵入中に寄生虫上に残存し侵入阻害抗体の標的となる (A single fragment of a malaria merozoit e surface protein remains on the parasit e during red cell invasion and is the ta rget of invasion - inhibiting antibodies)」、J. Exp. Med. 172:379 (1990)。
8. Bojang, K. A., Milligan, P. J., Pinder, M. , Vigneron, L., Allouche, A., Kester, K. E., Bal 50

- 100, W. R., Conway, D. J., Reece, W. H., Gothard, P., Yamuah, L., Delchambre, M., Voss, G., Greenwood, B. M., Hill, A., McAdam, K. P., Tornieporth, N., Cohen, J. D., Doherty, T.; RTS, S マラリアワクチン試験チーム、「ガンビアの半免疫成年男性における熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 感染に対する RTS, S / AS02 マラリアワクチンの有効性 - ランダム試験 (Efficacy of RTS, S / AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial)」、*Lancet* 358: 1927~34 (2001)。 10
9. Brazolot Milian, C. L., Weeratna, R., Krieg, A. M., Siegrist, C. A., Davis, H. L.、「CpG DNA が若いネズミにおける B 型肝炎表面抗原に対する強力な Th1 体液性及び細胞媒介免疫応答を誘導する (CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice)」、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15553~8 (1998)。
10. Burns, J. M., Daly, T. M., Vaidya, A. B. 及び Long, C. A.、「ネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) メロゾイト表面抗原の 3' 部分が保護モノクローナル抗体により認識されるエピトープをコードする (The 3' portion of the gene for a *Plasmodium yoelii* merozoite surface antigen encodes the epitope recognized by a protective monoclonal antibody)」、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 5: 602 (1988)。 20
11. Calarota, S. 、「HIV-1 感染患者における DNA ワクチン注射により誘導される細胞毒性応答 (Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients)」、*Lancet* 351: 1320~25 (1998)。 30
12. Chang, S. P., Case, S. E., Gosnell, W. L., Hashimoto, A., Kramer, K. J., Tam, L. Q., Hashiro, C. Q., Nikaïdo, C. M., Gibson, H. L., Lee Ng, C. T., Barr, P. J., Yokota, B. T. 及び Hut, G. S.、「熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) メロゾイト表面タンパク質 1 の組み換えバキュロウイルス 42 キロダルトン C-末端断片がマラリアからヨザルを守る (A Recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria)」、*Infect. Immun.* 64: 253 (1996)。 40
13. Charoenvit, Y., Lee, M. L., Yuan, L. F., Sedegah, M. 及び Beaudoin, R. L.、「段階特異的スプロゾイト抗原に対して作られるネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) モノクローナル抗体の特徴付け (Characterization of *Plasmodium yoelii* monoclonal antibodies directed against stage-specific sporozoite antigens)」、*Infect. Immun.* 55: 604 (1987)。 50

14. Charoenvit, Y., Collins, W. E., Jones, T. R., Millet, P., Yuan, L., Campbell, G. H., Beaudoin, R. L., Broderick, J. R. 及び Hoffman, S. L.、「マラリアワクチンがその配列内の保護エピトープに抗体を誘導することの不可能性 (Inability of malaria vaccine to induce antibodies to a protective epitope within its sequence)」、*Science* 251:668 (1991)。
15. Charoenvit, Y., Mellouk, S., Cole, C., Bechara, R. ら、「ネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) - 17-kD 肝臓及び赤血球段階タンパク質は阻害性モノクローナル抗体の標的 (*Plasmodium yoelii*: 17-kD hepatic and erythrocytic stage protein is the target of an inhibitory monoclonal antibody)」、*Exp. Parasitol.* 80:419~429 (1995)。 10
16. Charoenvit, Y., Fallarme Majam, V., Corradin, G. P. ら、「ネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) 17キロダルトン肝細胞赤血球タンパク質からの線状合成ペプチドを用いた免疫化によるネズミマラリアからの CD4+ T-細胞及び -インターフェロン依存性の保護 (CD4+ T-cell- and gamma interferon dependent protection against murine malaria by immunization with linear synthetic peptide from *Plasmodium yoelii* 17-kilodalton hepatocyte erythrocyte protein)」、*Infect. Immun.* 67:5604~5614 (1999)。 20
17. Clark, J. T., Donachi, S., Anand, R. ら、「熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) メロゾイト表面からの 46~53 kD 糖タンパク質 (46-53 kD glycoprotein from the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites)」、*Mol. Biochem.* 32:15~24 (1988)。
18. Collins, W. E., Galland, G. G., Sullivan, J. S. 及び Morris, C. L.、「フクロウザルにおける血液段階ワクチンの試験用の熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の異なる菌株の選定 (Selection of different strains of *Plasmodium falciparum* for testing blood-stage vaccines in *Aotus nancymai* monkeys)」、*Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:224~232 (1994)。 30
19. Collins, W. E., Pye, D., Crewther, P. E., Vandenberg, K. L., Galland, G. G., Sulzer, A. J., Kemp, D. J., Edwards, S. J., Coppel, R. L., Sullivan, J. S., Morris, C. L. 及び Anders, R. F.、「プラスモジウムフラジャイル (*Plasmodium fragile*) の組み換え頂端膜抗原-1 を用いてリスザルに誘導された保護免疫 (Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*)」、*Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:711~719 (1994)。 40
20. Daly, T. M. 及び Long, C. A.、「ネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) 17XL メロゾイト表面タンパク質 1 の組み換え 15 キロダルトンカルボキシル末端断片がネズミにおける保護免疫応答を誘導する (A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal f 50

- ragment of Plasmodium yoelii yoelii 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice)」、Infect. Immun. 61:2462~2467(1993)。
21. Dame, J. B., Williams, J. L., McCutchan, T. F., Weber, J. L., Wirtz, R. A., Hockmeyer, W. T., Maloy, W. L., Haynes, J. D., Schneider, I., Roberts, D. 5、「ヒトマラリア寄生虫、熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)のスポロゾイト上の免疫優性表面抗原をコードする遺伝子の構造(Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite Plasmodium falciparum)」、Science 225(4662):593~9(1984)。 10
22. Daubersies, P., Thomas, A. W., Millet, P., Brahim, K., Langermans, J. A., Ollomo, B., BenMohamed, L., Sliereendregt, B., Eling, W., Van Belkum, A., Dubreuil, G., Meis, J. F., Guerin-Marchand, C., Cayphas, S., Cohen, J., Gras-Masse, H., Druilhe, P., 及び Mohamed, L. B. 20、「保存された前赤血球肝臓段階抗原3を用いた免疫化によるチンパンジーにおける熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)マラリアに対する保護(Protection against Plasmodium falciparum malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3)」、Nat. Med. 6:1258~63(2000)。
23. Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., Krieg, A. M., Weeranta, R. 30、「CpG DNAは組み換えB型肝炎表面抗原で免疫化したネズミにおける特異的免疫の強力なエンハンサー(CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen)」、J. Immunol. 160:870~6(1998)。
24. Deans, J. A.、「血液段階二日熱マラリア原虫(plasmodium knowlesi)寄生虫の保護抗原(Protective antigens of bloodstage Plasmodium knowlesi parasites)」、Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. 307:159~169(1984)。
25. Deans, J. A., Knight, A. M., Jean, W. C., Waters, A. P., Cohen, S. 及び Mitchell, G. H. 40、「微量で不変の二日熱マラリア原虫(plasmodium knowlesi)66kDメロゾイト抗原を用いたアカゲザルにおけるワクチン接種試験(Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, Plasmodium knowlesi 66 kD merozoite antigen)」、Parasite Immunol. 10:535~552(1988)。
26. Delplace, P., Bhatia, A., Cagnard, M. 5、「タンパク質p126 - - 熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)メロゾイトの放出に関連する寄生虫恐怖性空胞抗原(Protein p126: a parasitophorous vacuole antigen associ 50

ated with the release of *Plasmodium falciparum* merozoites)」、*Biol. Cell.* 64:215 (1987)。

27. Doolan, D. L., Sedegah, M., Hedstrom, R. C., Hobart, P., Charoenvit, Y. 及び Hoffman, S. L. 「マラリアに対する保護の遺伝的制限の多遺伝子DNA免疫化を用いた無効化 - - CD8+ 細胞、 - インターフェロン、及び酸化窒素依存性免疫 (Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multi-gene DNA immunization: CD8+ T cell, interferon-gamma, and nitric oxide dependent immunity)」、*J. Exp. Med.* 183:1739~1746 (1996)。 10

28. Doolan, D. L., Hedstrom, R. C., Rogers, W. O., Charoenvit, Y., Rogers, M., De la Vega, P. 及び Hoffman, S. L. 「熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) から搬出されたタンパク質1の相同体、ネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) の保護肝細胞赤血球タンパク質17kDa遺伝子の同定及び特徴付け (Identification and characterization of the protective hepatocyte erythrocyte protein 17 kDa gene of *Plasmodium yoelii*, homolog of *Plasmodium falciparum* exported protein 1)」、*J. Biol. Chem.* 271:17861~17868 (1996)。 20

29. Doolan, D. L., Hoffman, S. L., Southwood, S., Wentworth, P. A., Sidney, J., Chestnut, R. W., Keogh, E., Apella, E., Nutman, T. B., Lal, A. A., Gordon, D. M., Oloo, A. 及び Sette, A. 「HLA-A及びHLA-B上位型アレルにより制限される熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) からの変性細胞毒性T細胞エピトープ (Degenerate cytotoxic T cell epitopes from *P. falciparum* restricted by HLA-A and HLA-B supertypes alleles)」、*Immunity* 7:97~112 (1997)。 30

30. Doolan, D. L., Hedstrom, R. C., Gardner, M. J., Sedegah, M., Wang, H., Gramzinski, R. A., Margalith, M., Hobart, P., 及び Hoffman, S. L. 「マラリア制御へのアプローチとしてのDNAワクチン接種 - - 現状と戦略 (DNA vaccination as an approach to malaria control: current status and strategies)」、*Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 226:37~56 (1998)。

31. Doolan, D. L., Hoffman, S. L. 「ネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) モデルにおいてCD8+ T細胞により開始するマラリアに対する抗原特異的な適応免疫にはIL-12及びNK細胞が必要 (IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model)」、*J. Immunol.* 163(2):884~92 (1999)。 40

32. Egan, J. E., Weber, J. L., Ballou, W. R., Hollingdale, M. R., Majarian, W. R., Gordon, D. M., Maloy, W. L., Hoffman, S. L., Wirtz, R. A., Schn 50

neider, I., Woollett, G. R., Young, J. F. 及び Hockineyer, W. T.、「ネズミマラリアスポロゾイトワクチンの有効性 - ヒトワクチン開発への影響 (Efficacy of murine malaria sporozoite vaccines: implications for human vaccine development)」、Science 236: 453~456 (1987)。

33. Epstein, J., Gorak, E., Charoenvit, Y., Wang, R., Freyberg, N., Osinowo, O., Richie, T. L., Stoltz, E., Trespalacios, F., Nerges, J., Ng, J., Fallanne-Majam, V., Abot, E., Goh, L., Parker, S., Kumar, S., Hedstrom, R., Norman, J., Stout, R., Hoffman, S. L.、「有針又は無針ジェット注射を經由した PfCSP DNA マラリアワクチン投与後の安全性、耐容性、及び抗体応答の不在、並びに筋肉内経路と筋肉内/皮内経路の組合せとの比較 (Safety, Tolerability and Lack of Antibody Responses following Administration of a PfCSP DNA Malaria Vaccine via Needle or Needle-free Jet Injection, and Comparison of Intramuscular and Combination Intramuscular/Intradermal Routes)」、Human Gene Therapy 13: 1551~60 (2002)。 10 20

34. Etlinger, H. M., Caspers, P., Matile, H., Schoenfeld, H. J., Stueber, D. 及び Takacs, B.、「熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) の非相同的挑戦からサルを守る組み換え又は天然タンパク質の能力 (Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with Plasmodium falciparum)」、Infect. Immun. 59: 3498~3503 (1991)。

35. Freeman, R. R. 及び Holder, A. A.、「精製ネズミマラリア (Plasmodium yoelii) 分裂体抗原で免疫化した BALB/c ネズミの保護応答特性 (Characteristics of the protective response of BALB/c mice immunized with a purified Plasmodium yoelii schizont antigen)」、Clin. Exp. Immunol. 54: 609~616 (1983)。 30

36. Gordon, D. M., McGovern, T. W., Krzych, U., Cohen, J. C., Schneider, I., LaChance, R., Hepner, D. G., Yuan, G., Hollingdale, M., Slaoui, M. ら、「組み換え生成した熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) スポロゾイト周囲タンパク質 - B 型肝炎抗原サブユニットワクチンの安全性、免疫原性、及び有効性 (Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine)」、J. Infect. Dis. 171: 1576~85 (1995)。 40

37. Gramzinski, R. A., Maris, D. C., Doolan, D., Charoenvit, Y., Obaldia, N., Rossan, R., Sedegah, M., Wang, R., Hobart, P., Margalith, M., 及び Hoffman, S.、「ヨザルにおけるマラリア DNA ワクチン (Malaria 50

DNA vaccines in Aotus monkeys)」、Vaccine 15:913~915(1997)。

38. Gurunathan, S., Wu, C.Y., Freidag, B.L. 及び Seder, R.A.、「DNAワクチン - - 長期細胞免疫誘発へのカギ(DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity)」、Curr. Opin. Immunol. 12, 442~7(2000)。

39. Harnyuttanakorn, P., McBride, J.S., Donachie, S., Heidrich, H.G., Ridley, R.G.、「阻害性モノクローナル抗体は熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)のRAP-1タンパク質のタンパク分解性開裂部位に隣接するエピトープを認識する(Inhibitory monoclonal antibodies recognise epitopes adjacent to a proteolytic cleavage site on the RAP-1 protein of Plasmodium falciparum)」、Mol. Biochem. Parasitol. 55:177~86(1992)。 10

40. Hedstrom, R., Doolan, D., Wang, R.ら、「熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)前赤血球段階DNAワクチンのin vitro発現及びin vivo免疫原性(In vitro expression and in vivo immunogenicity of Plasmodium falciparum pre-erythrocytic stage DNA vaccines)」、Int. J. Molec. Med. 2:29~38(1998)。 20

41. Herrington, D., Davis, J., Nardin, E., Beyer, M., Cortese, J., Eddy, H., Losonsky, G., Hollingdale, M., Szein, M., Levine, M., Nussenzweig, R.S., Clyde, D. 及び Edelman, R.、「照射を受けたスポロゾイトを有するヒトの免疫化の成功 - - 保護された個人の体液性及び細胞応答(Successful immunization of humans with irradiated sporozoites: humoral and cellular responses of the protected individuals)」、Am. J. Trop. Med. Hyg. 45:539~547(1991)。 30

42. Hilgers, L.A., Snippe, H., Jansze, M., Willers, J.M.、「体液性免疫応答に対する合成免疫賦活剤の相乗効果(Synergistic effects of synthetic adjuvants on the humoral immune response)」、Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 79:392~6(1986)。

43. Hilgers, L.A., Snippe, H., Jansze, M., Willers, J.M.、「合成スルホリポ多糖類 - - 体液性免疫応答用の新規免疫賦活剤(Synthetic sulpholipopolysaccharides: novel adjuvants for humoral immuneresponses)」、Immunology. 60:141~6(1987)。 40

44. Hill, A.V.S., Elvin, J., Willis, A.C.ら、「HLA-B53と重篤マラリアへの抵抗性との関連の分子解析(Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria)」、Nature 360:434(1992)。

45. Hoffman, S.L. 及び Doolan, D.L. 「マラリアワクチンが標的とする感染肝細胞(Malaria vaccines - targeting infected hepatocytes)」、Nature Med. 6:1218-1 50

9 (2000)。

46. Holder, A. A. 及び Freeman, R. R.、「精製寄生虫抗体を用いた血液段階ロデントマラリアに対する免疫化 (Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens)」、*Nature* 294: 361~364 (1981)。

47. Horn, N. A., Meek, J. A., Budahazie, G., Marquet, M.、「プラスミドDNAを用いた癌遺伝子治療 - ヒト臨床試験用のDNA精製 (Cancer Gene Therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials)」、*Human Gene Therapy* 6 (5): 565~73 (1995)。 10

48. Inselburg, J., Bzik, D. J., Li, W. B., Green, K. M., Kansopon, J., Hahm, B. K., Bathurst, I. C., Barr, P. J. 及び Rossan, R. N.、「熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の組み換えSERAタンパク質によりヨザルに誘導された保護免疫 (Protective immunity induced in Aotus monkeys by recombinant SERA proteins of *Plasmodium falciparum*)」、*Infect. Immun.* 59: 1247~1250 (1991)。 20

49. Inselburg, J., Bathurst, I. C., Kansopon, J., Barchfeld, G. L., Barr, P. J. 及び Rossan, R. N.、「熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の組み換えSERAタンパク質によりヨザルに誘導された保護免疫 - 保護免疫の誘導に対する免疫賦活剤の効果 (Protective immunity induced in Aotus monkeys by a recombinant SERA protein of *Plasmodium falciparum*: adjuvant effects on induction of protective immunity)」、*Infect. Immun.* 61: 2041~2047 (1993)。

50. Kedzierski, L., Black, C. G., 及び Coppel, R. L.、「組み換えネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) メロゾイト表面タンパク質を用いた免疫化により致死性の挑戦から5分の4のネズミが守られる (Immunization with recombinant *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 protects mice against lethal challenge)」、*Infect Immun.* 68: 6034~7 (2000)。 30

51. Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M., Marciani, D.、「キラジャサポナリアモリナコルテックス (*Quillajasaponaria Molina cortex*) からの免疫賦活活性を有するサポニンの分離及びその特徴付け (Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillajasaponaria Molina cortex*)」、*J. Immunol.* 146: 431~7 (1991)。 40

52. Kensil, C. R. 「ワクチン免疫賦活剤としてのサポニン (Saponins as vaccine adjuvants)」、*Grit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 12: 1~55 (1996)。

53. Kester, K. E., McKinney, D. A., Toinnieporth, N., Ockenhouse, C. F., Heppner, D. G., Hall, T., Krzych, U., Delchambre, M., Voss, G., Dowler, M. G., Palensky, J., Wittes, J., Cohen, J., Ba 50

llou, W. R.; RTS, Sマラリアワクチン評価グループ、「実験熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) マラリアに対する組み換えスポロゾイト周囲タンパク質ワクチン療法の有効性 (Efficacy of Recombinant Circumsporozoite Protein Vaccine Regimens Against Experimental *Plasmodium falciparum* Malaria)」、*J. Infect. Dis.* 183 (4): 640~7 (2001)。

54. Kester, K. E.ら、「実験熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) マラリアに対する組み換えスポロゾイト周囲タンパク質ワクチン療法の有効性 (Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria)」、*J. Infect. Dis.* 183: 640~47 (2001)。

55. Khusmith, S., Charoenvit, Y., Kumar, S., Sedegah, M., Beaudoin, R. L. 及び Hoffman, S. L.、「スポロゾイト表面タンパク質2及びCSタンパク質を用いたワクチン接種によるマラリアに対する保護 (Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein)」、*Science* 252: 715~718 (1991)。

56. Khusmith, S., Sedegah, M. 及び Hoffman, S. L.、「スポロゾイト表面タンパク質2を認識するCD8+細胞毒性T細胞クローンの養子移入によるネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) に対する完全保護 (Complete protection against *Plasmodium yoelii* by adoptive transfer of a CD8+ cytotoxic T cell clone recognizing sporozoite surface protein 2)」、*Infect. Immun.* 62: 2979~2983 (1994)。

57. Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., Klinman, D. M.、「微生物DNA中のCpGモチーフが直接的なB細胞活性化を開始させる (CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation)」、*Nature* 374: 546~9 (1995)。

58. Kumar, S., Yadava, A., Keister, D. B., Tian, J. H., Ohl, M., Perdue Greenfield, K. A., Miller, L. H. 及び Kaslow, D. C.、「ヨザルにおける組み換え熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) メロゾイト表面タンパク質-1の免疫原性及びin vivo有効性 (Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in *Aotus* monkeys)」、*Mol. Med.* 1: 325~332 (1995)。

59. Kumar, S., Collins, W., Egan, A., Yadava, A., Garraud, O., Blackman, M. J., Patino, J. A., Diggs, C., Kaslow, D. C.、「メロゾイト表面タンパク質1の19キログルトンC末端に基づく複数の免疫賦活剤処方のうち4種の組み換え熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) ワクチンのヨザルにおける免疫原性及び有効性 (Immunogenicity and Efficacy in *Aotus* Monkeys of Four Recombinant *Plasmodium*

- falciparum Vaccines in Multiple Adjuvant Formulations Based on the 19-Kilodalton C Terminus of Merozoite Surface Protein 1)」、*Infect Immun.* 68:2215~2223 (2000)。
60. Lacaillle-Dubois, M. 及び Wagner, H.、「サポニンの生物及び薬理活性に関する検討 (A review of the biological and pharmacological activities of saponins)」、*Phytoinedicine.* 2:363~386 (1996)。
61. Lalvani, A., Moris, P., Voss, G., Pathan, A. ら、「組み換え熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) マラリアワクチン、RTS, S/SBAS2 による集中的 Th1 型細胞及び体液性免疫応答の強力な誘導 (Potent induction of focused Th1-Type cellular and humoral immune responses by RTS, S/SBAS2, a recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine)」、*J. Infect. Dis.* 180:1656~64 (1999)。 10
62. Le, T., Coonan, K., Hedstrom, R. ら、「健康な成人ボランティアに対するマラリア DNA ワクチンの筋肉内投与後の安全性、耐容性、及び体液免疫応答 (Safety, tolerability, and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers)」、*Vaccine* 18:1893~1901 (2000)。 20
63. Lee, A. Y. ら、「DNA 免疫化によりプライミングされた免疫優性の HCV 特異的 CTL エピトープに特異的な細胞毒性 T 細胞の数の定量化 (Quantification of the number of cytotoxic T cells specific for an immunodominant HCV-specific CTL epitope primed by DNA immunization)」、*Vaccine* 18:1962~68 (2000)。
64. Luke, C. J., Carner, K., Liang, X., Barbour, A. G.、「ospA に基づく DNA ワクチンがライム病ボレリア感染からネズミを守る (An ospA-based DNA vaccine protects mice against infection with *Borrelia burgdorferi*)」、*J. Inf. Dis.* 175:191~7 (1997)。 30
65. Majarian, W. R., Daly, T. M. ら、「IgG3 モノクローナル抗体を用いたネズミマラリアに対する受動的免疫化 (Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody)」、*J. Immunol.* 132:3131 (1984)。
66. Malik, A., Egan, J. E., Houghten, R. A., Sadowff, J. C. 及び Hoffman, S. L. 「熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) スポロゾイト周囲タンパク質に対抗するヒト細胞毒性 T リンパ球 (Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein)」、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3300~3304 (1991)。 40
67. Martin, T., Parker, S. E., Hedstrom, R. ら、「プラスミド DNA マラリアワクチン - - 筋肉内注射後のゲノム組込みの可能性 (Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration following intramu 50

scular injection)」、Human. Gen. Ther. 10:759~68 (1999)。

68. McCluskie, M. J., Davis, H. L., 「CpG DNAはネズミに対する鼻腔内投与によりB型肝炎表面抗原に対して全身及び粘膜免疫反応の強力なエンハンサーとなる(CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice)」、J. Immunol. 161:4463~6 (1998)。

69. Moreno, A., Clavijo, P., Edelman, R., Davis, J., Szein, M., Herrington, D.及びNardin, E., 「スポロゾイトで免疫化したボランティアからの細胞毒性CD4+ T細胞は熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)CSタンパク質を認識する(Cytotoxic CD4+ T cells from a sporozoite-immunized volunteer recognize the Plasmodium falciparum CS protein)」、Int. Immunol. 3:997-1003 (1991)。 10

70. Mosmann, T. R.及びCoffman, R. L., 「TH1及びTH2細胞 - 異なるパターンのリンホカイン分泌により異なる機能的特性が得られる(TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties)」、Ann. Rev. of Immunol. 7:145~173 (1989)。 20

71. Musti, A. M., Zehner, Z., Bostian, K. A., Paterson, B. M.,及びKramer, R. A., 「ニワトリ遺伝子と相同な配列により単離されるグリセリンアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼをコードする2種の酵母遺伝子の転写マッピング(Transcriptional mapping of two yeast genes coding for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene)」、Gene 25:133~143 (1983)。 30

72. Oeuvray, C., Bouharoun Tayoun, H., Grasse Masse, H.ら、「メロゾイト表面タンパク質-3 - 血液単球と協同して熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)の死滅を促進させる抗体を誘導するマラリアタンパク質(Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote Plasmodium falciparum killing by cooperation with blood monocytes)」、Blood 84:1594 (1994)。

73. Oeuvray, C., Bouharoun Tayoun, H., Grasse Masse, H.ら、「細胞-抗体協同メカニズムの抗原性及び抗体の生物活性により同定される、熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)の新規メロゾイト表面抗原(MSP-3)(A novel merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies)」、Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Supp 2:77 (1994)。 40

74. Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., Lanzavecchi 50

a, A., 「一般に免疫原性のT細胞エピトープ: T細胞によるヒトMHCクラスIIへの乱交雑な結合及び乱交雑な認識 (Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells)」, Eur. J. Immunol. 12: 2237 ~ 42 (1989)。

75. Parker, S. E., Borellini, F., Wenk, M. L. ら、「プラスミドDNAマラリアワクチン - - ネズミ及びウサギにおける組織分布及び安全性研究 (Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits)」, Human Gene Ther. 10 (5): 741 ~ 58 (1999)、

10

76. Perrin, L. H., Dayal, R. 及び Rieder, H., 「ヒト免疫血清と反応する熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) の赤血球段階からの抗原の特徴付け (Characterization of antigens from erythrocytic stages of Plasmodium falciparum reacting with human immune sera)」, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 163 ~ 165 (1981)。

77. Perrin, L. H., Ramirez, E., Lambert, P. H. 及び Miescher, P. A. 「モノクローナル抗体によるヒト赤血球における熱帯熱マラリア原虫 (P. falciparum) の成長阻害 (Inhibition of P. falciparum growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies)」, Nature 289: 301 ~ 303 (1981)。

20

78. Potocnjak, P., Yoshida, N., Nussenzweig, R. S. 及び Nussenzweig, V., 「スポロゾイト表面抗原 (Pb44) に対するモノクローナル抗体の一価の断片 (Fab) がマラリア感染からネズミを守る (Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malaria infection)」, J. Exp. Med. 151: 1504 ~ 1513 (1980)。

30

79. 『タンパク質 - - 構造と分子特性 (Proteins - Structure and Molecular Properties)』第2版、T. E. Creighton 著、W. H. Freeman and Company、ニューヨーク、1993

80. Ramasamy, R., 「ヒトマラリア寄生虫、熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) における糖タンパク質 - レクチン結合特性、及び可能な糖質 - タンパク質結合に関する研究 (Studies on glycoproteins in the human malaria parasite Plasmodium falciparum - lectin binding properties and the possible carbohydrate - protein linkage)」, Immunol. Cell. Biol. 65: 147 (1987)。

40

81. Ramasamy, R. J., Jones, G., Lord, R., 「マラリアワクチン候補抗原上の阻害性モノクローナル抗体により定義されたエピトープの特徴付け (Characterization of an inhibitory monoclonal antibody defined epitope on a malaria vaccine candidate antigen)」, Immunol. Lett. 23: 305 (1990)。

50

82. Rattanら、「タンパク質合成 - 翻訳後の修飾及びエイジング (Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging)」、Ann. NY Acad. Sci. 663: 48~62 (1992)。
83. 『レミントンの薬学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)』第18版 (A. Gennaro (編)、Mack Pub.、イーストン、ペンシルバニア州、1990)。
84. Ridley, R. G., Takacs, B., Etlinger, H., Scaife, J. G.、「熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) のロプトリー抗原はリスザルにおいて保護作用を示す (Arthroptry antigen of Plasmodium falciparum is protective in Saimiri monkeys)」、Parasitology 101:187~92 (1990)。
85. Rodrigues, M. M., Cordey, A. - S., Arreaza, G., Corradin, G., Romero, P., Maryanski, J. L., Nussenzweig, R. S. 及び Zavala, F. 「ネズミマラリア (Plasmodium yoelii) スポロゾイト周囲タンパク質由来のCD8+細胞毒性T細胞クローンはマラリアから保護する (CD8+ cytolytic T cell clones derived against the Plasmodium yoelii circumsporozoite protein protect against malaria)」、Int. Immunol. 3: 579~585 (1991)。
86. Rogers, W. O.ら、「二日熱マラリア原虫 (plasmodium knowlesi) マラリア用の多段階多抗原非相同性プライムブーストワクチンはアカゲザルにおいて部分的保護を提供する (Multistage multiantigen heterologous prime boost vaccine for Plasmodium knowlesi malaria provides partial protection in rhesus macaques)」、Infect. Immun. 69: 5565~72 (2001)。
87. Romero, P., Maryanski, J. L., Corradin, G., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V. 及び Zavala, F.、「クローニングされた細胞毒性T細胞はスポロゾイト周囲タンパク質中のエピトープを認識し、マラリアから保護する (Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria)」、Nature 341: 323~325 (1989)。
88. Saul, A., Lord, ., Jones, G. L.ら、「熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) 抗原MSA2の不変異ペプチドを用いた保護的免疫化 (Protective immunization with invariant peptides of the Plasmodium falciparum antigen MSA2)」、J. Immunol. 148: 208 (1992)。
89. Schofield, L., Bushnell, G. R., Cooper, J. A.ら、「熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) のロプトリー抗原は阻害性モノクローナル抗体により認識される保存された可変のエピトープを含有する (Arthroptry antigen of Plasmodium falciparum contains conserved and variable epitopes recognised by inhibitory monoclonal antibodies)」、Mol. Biochem. Parasitol. 18: 183~95 (1986)。

90. Schofield, L., Villaquiran, J., Ferreira, A. ら、「マラリアスポロゾイトに対する免疫に必要な γ -インターフェロン、CD8+ T細胞、及び抗体 (Gamma-interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites)」、Nature. 330: 664~666 (1987)。
91. Sedegah, M. ら、「DNAに基づく免疫化により誘導される保護免疫の向上 - 抗原及びGM-CSFをコードするプラスミドDNAを用いたプライミング及び抗原発現組み換えポックスウイルスを用いたブースティング (Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing Recombinant poxvirus)」、J. Immunol. 164: 5905~12 (2000)。 10
92. Seder, R. A. 及び Hill, A. V.、「細胞免疫を必要とする細胞感染に対するワクチン (Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity)」、Nature 406、793~8。(2000)。
93. Seguin, M. C., Klotz, F. W., Schneider, I., Weir, J. P., Goodbary, M., Slayter, M. ら、「照射されたネズミマラリア原虫 (Plasmodium berghei) に感染した蚊にさらされたネズミは酸化窒素シンターゼの誘導によりマラリアから保護される - γ -インターフェロン及びCD8+ T細胞の関与 (Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells)」、J. Exp. Med. 180: 353-358 (1994)。 20
94. Seiffter ら、「タンパク質修飾及び非タンパク質補助因子の分析 (Analysis for protein modifications and non protein cofactors)」、Meth. Enzymol. 182: 626~646 (1990)。 30
95. Shi, Y. P., Sayed, U., Qari, S. H., Roberts, J. M., Udhayakumar, V., Oloo, A. J., Hawley, W. A., Kaslow, D. C., Nahlen, B. L. 及び Lai, A. A. 「熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) メロゾイト表面タンパク質1のC-末端19キロダルトン領域に対する自然免疫応答 (Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1)」、Infect. Immun. 64: 2716~2723 (1996)。 40
96. Siddiqui, W. A., Tam, L. Q., Kramer, K. J., Hui, G. S., Case, S. E., Yamaga, K. M., Chang, S. P., Chan, E. B. 及び Kan, S. C.、「メロゾイト表面被覆前駆体タンパク質はヨザルを熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) から完全に保護する (Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkey against Plasmodium falciparum malaria)」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3014~3018 (1987)。 50

97. Sim, B. K. L., Orlandi, P. A., Haynes, J. D. ら、「175K熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 赤血球結合抗原の一次構造、並びにマラリアメロゾイトの侵入を阻害する抗体を誘導するペプチドの同定 (Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion)」、*J. Cell. Biol.* 111: 1877 (1990)。
98. Sim, B. K. L., Chitnis, C. E., Deal, C. D. ら、「熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*): メロゾイトリガンドEBA-175の機能的に活性な領域のさらなる特徴付け (*Plasmodium falciparum*: further characterization of a functionally active region of the merozoite ligand EBA-175)」、78: 259 (1994)。
99. Stoute, J. A., Slaoui, M., Heppner, D. G. ら、「熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) マラリアに対する組み換えスポロゾイト周囲タンパク質ワクチンの予備的評価 (A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria)」、*N. Eng. J. Med.* 336: 86~91 (1997)。
100. Stoute, J. A., Kester, K. E., Krzych, U. ら、「RTS, Sマラリアワクチンを用いた免疫化後の長期有効性及び免疫反応 (Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS, S malaria vaccine)」、*J. Infect. Dis.* 178: 1139~44 (1998)。
101. Thomas, A. W., Trape, J. F., Rogier, C., Goncalves, A., Rosario, V. E., Narum, D. L.、「全長バキュロウイルス組み換えPF83/AMA-1を用いた捕捉酵素結合免疫吸着アッセイにより検出された熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 83キログルトン頂端膜抗原 (PF83/AMA-1) に対する自然抗体の高い保有率 (High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1)」、*Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 730-40 (1994)。
102. Thomas, A. W., Narum, D., Waters, A. P., Trape, J. F., Rogier, C., Goncalves, A., Rosario, V., Druilhe, P., Mitchell, G. H., Dennis, D.、「ヒト及び非ヒト霊長類マラリアにおけるAMA-I族分子に対する免疫の諸相 (Aspects of immunity for the AMA-I family of molecules in humans and non-human primates malarial)」、*Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89 Suppl. 2: 67~70 (1994)。
103. Valenzuela, P., Gray, P., Quiroga, M. ら、「B型肝炎ウイルス表面抗原の主要タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列 (

Nucleotide Sequences of the Gene Coding for the Major Protein of Hepatitis B Virus Surface Antigen)」、Nature 280:815-819(1979)。

104. Wang, R., Charoenvit, Y., Corradin, G., De la Vega, P., Franke, E. D. 及び Hoffman, S. L.、「ネズミマラリア(Plasmodium yoelii)スポロゾイト表面タンパク質2線状ペプチドによる、CD4+ T細胞及びEN- に依存した感染肝細胞の除去の誘導による、マラリアに対する保護(Protection against malaria by Plasmodium yoelii sporozoite surface protein 2 linear peptide induction of CD4+ T cell- and IFN-gamma-dependent elimination of infected hepatocytes)」、J. Immunol. 157:4061~4067(1996)。 10

105. Wang, R., Doolan, D. L., Le, T. P., Hedstrom, R. C., Coonan, K. M., Charoenvit, Y., Jones, T. R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W. R., Sedegah, M., de Taisne, C., Norman, J. A. 及び Hoffman, S. L.、「マラリアDNAワクチンによるヒトにおける抗原特異的細胞毒性Tリンパ球の誘導(Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine)」、Science 282:476~480(1998)。 20

106. Wang, R., Doolan, D. L., Charoenvit, Y., Hedstrom, R. C., Gardner, M. J., Hobart, P., Tine, J., Sedegah, M., Fallarone, V., Sacci, J. B., Jr., Kaur, M., Klinman, D. M., Hoffman, S. L., Weiss, W. R.、「4種の熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)DNAプラスミドの混合物を用いた免疫化による非ヒト霊長類における複数の抗原特異的細胞毒性Tリンパ球の同時誘導(Simultaneous induction of multiple antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonhuman primates by immunization with a mixture of four Plasmodium falciparum DNA plasmids)」、Infect. Immun. 66:4193~202(1998)。 30

107. Wang, R., Epstein, J., Baraceros, F. M., Gorak, E. J., Charoenvit, Y., Carucci, D. J., Hedstrom, R. C., Rahardjo, N., Gay, T., Hobart, P., Stout, R., Jones, T. R., Richie, T. L., Parker, S. E., Doolan, D. L., Norman, J., Hoffman, S. L.、「マラリアDNAワクチンによるヒトにおけるCD4(+) T細胞依存性CD8(+)タイプ1応答の誘導(Induction of CD4(+) T cell-dependent CD8(+) type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine)」、PNAS-USA 98(19):10817~22(2001)。 40

108. Weiss, W. R., Sedegah, M., Beaudoin, R. L., Miller, L. H., Good, M. F.、「マラリアスポロゾイトで免疫化させるネズミの保護にはCD8+ T細胞(細胞毒性/抑制因子)が必要(CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with m 50

- a l a r i a s p o r o z o i t e s)」、P N A S - U S A . 8 5 (2) : 5 7 3 ~ 6 (1 9 8 8)。
109. Weiss, W. R., Berzofsky, J. A., Houghten, R. A., Sedegah, M., Hollindale, M., Hoffman, S. L., 「ネズミマラリア (Plasmodium yoelii) 及びネズミマラリア原虫 (Plasmodium berghei) の両方からネズミを守るスポロゾイト周囲タンパク質を対象とするT細胞クローン (A T cell clone directed at the circumsporozoite protein which protects mice against both Plasmodium yoelii and Plasmodium berghei)」、J. Immunol. 15; 149 (6) : 2103~9 (1992)。 10
110. WHO報告書『世界のワクチンと免疫化の現状 (State of the World's Vaccines and Immunization)』、ジュネーブ：世界保健機構 (1996)。
111. Wize, B., Rogers, W. O., Houghten, R. A., Lanar, D. E., Tine, J. A. 及び Hoffman, S. L., 「熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) スポロゾイト表面タンパク質 2 に対するネズミ細胞毒性Tリンパ球の導入 (Induction of murine cytotoxic T lymphocytes against Plasmodium falciparum sporozoite surface protein 2)」、Eur. J. Immunol. 24 : 1487~1495 (1994) 20
- 。 112. Wize, B., Houghten, R., Church, P., Tine, J. A., Lanar, D. E., Gordon, D. M., Ballou, W. R., Sette, A. 及び Hoffman, S. L., 「スポロゾイト免疫化ボランティアにおける複数の熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) スポロゾイト表面タンパク質 2 エピトープに対するHLA-A2制限細胞毒性Tリンパ球応答 (HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple Plasmodium falciparum sporozoite surface protein 2 epitopes in sporozoite-immunized volunteers)」、J. Immunol. 155 : 766~775 (1995)。 30
113. Wold, F., 「翻訳後のタンパク質修飾 - 展望と見通し (Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects)」、1~12、『タンパク質の翻訳後の共有結合修飾 (Post-translational Covalent Modification of Proteins)』、B. C. Johnson (編)、Academic Press、ニューヨーク、1983年。
114. Yang, C., Collins, W. E., Sullivan, J. S. ら、「ブロックコポリマー免疫賦活剤中のメロゾイト表面タンパク質 1 の組み換えC-末端断片を用いた免疫化によるリスザルにおける三日熱マラリア原虫 (Plasmodium vivax) 血液段階感染に対する部分的保護 (Partial protection against Plasmodium vivax blood-stage infection in Saimiri monkeys by immunization with a Recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant)」、Infect. Imm. 67 : 342 (1999)。 40
115. 『ジンサー細菌学 (Zinsser Microbiology)』1180~83 (Wolfgang K. Joklik, Hilda P. Willett, D 50

. Bernard Amos, 及び Catherine M. Wilfert (編)、第 20 版、Appleton and Lange 1992)。

【0145】

当業者ならば、本明細書を考察し、ここで開示する本発明を実施することによって、本発明の他の実施形態が明らかとなる。本明細書及び実施例は、単に例示的なものとみなし、本発明の正確な範囲及び意図は、添付の特許請求の範囲によって示されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0146】

【図1】DNA初回刺激直後(図1a)、RTS, Sによる追加免疫直前(図1b)、及びRTS, S追加免疫直後(図1c)のCTL応答を陽性対象及び陽性ペプチドごとに示すグラフである。黒の棒は、試験ペプチドを含み相応なMHC提示のあるサンプルを表す。点模様の棒は、対照ペプチドを含み相応なMHC提示のあるサンプルを表す。しま模様の棒は、試験ペプチドを含み相応なMHC提示のないサンプルを表す。DNA初回刺激後(a)、追加免疫前(b)、又は1回目(ボランティア番号6=V6)若しくは2回目(V2、3、8、及び9)のRTS, S投与から2週間後(c)に採取した新鮮なPBMCを、PfCSPを発現させるALVACによって*in vitro*で7日間刺激し、5時間のクロム放出アッセイにおいて、実験用の8~10アミノ酸PfCSP由来ペプチド又は対照ペプチド(HLA-A*0201拘束性HIVgag)(MHC+対照)と共にインキュベートした、HLAクラスI適合ターゲット(MHC+ペプチド)又は不適合ターゲット(非MHC+ペプチド)に対して試験した。応答は、実験ペプチドと対照ペプチドを適用した各ターゲット細胞の溶解率(%)の差が、少なくとも2種のエフェクター細胞対ターゲット細胞の比(E:T)について10%であった場合に限り陽性であるとみなした。単一のE:T比(20:1又は40:1)での溶解率を、ペプチドごとに、同時に評価したその対照を添えて示す。

【図2】*in vitro*でIFN- γ 応答に関与したT細胞を、それぞれ誘発相及びエフェクター相で特徴付けるグラフである。PfCSP DNAのみで3回(VI及びV5)又はRTS, Sのみで2回(V19、V21、及びV22)免疫感作したボランティアの凍結PBMCを、ペプチド(a)Flu M A2、(b)TT-DR、(c)PfCSP DR.363、又は(d)PfCSP DR.316と共に培養する直前に対照Dyna beadsで処理したもの、又はそのCD4⁺T細胞若しくはCD8⁺T細胞を枯渇させたものを用いて、ELISPOTアッセイを実施した。平行して、IFN- γ mRNAの発現レベル(e)を、選択的に濃縮処理した、同じボランティア由来のT細胞集団(CD4⁺/CD45RA⁺、CD4⁺/CD45RA⁻、CD8⁺/CD45RA⁺、及びCD8⁺/CD45RA⁻)でのリアルタイムPCRによって、ELISPOTアッセイで試験した同じセットのペプチドと共に36時間培養した直後に同じ試験時点で測定した。

【図3】リアルタイムPCR IFN- γ によって測定した、T細胞サブセット中のIFN- γ mRNAの発現レベルを示すグラフである。PfCSP DNA(DNA単独)を3回投与した後、及びその個体がRTS, Sワクチン(DNA/RTS, S)の2回の投与によって追加免疫を受けた後に得た、2人のボランティア(VI及びV5)の凍結細胞を試験した。細胞をペプチドPfCSP DR.363と共に36時間インキュベートし、選択的に濃縮処理し、IFN- γ mRNAの発現を評価した。DNAによる免疫感作の後、IFN- γ mRNAの発現は、CD4⁺T細胞の、ボランティアV1のCD45RA⁻サブセット及びボランティアV5のCD45RA⁺サブセットでは適度にアップレギュレーションされたが(5~10倍)、CD8⁺T細胞ではアップレギュレーションされなかった。RTS, Sによる追加免疫に伴って、両方のボランティアのアップレギュレーションされたCD4⁺Tサブセットでは、IFN- γ mRNAの発現レベルが有意に(80~100倍)増加したが、CD8⁺T細胞では増加しなかった。

【図4】RTS, Sの最初の投与後の、ペプチドDR.316(CD8⁺Tc1のみ)に

対する I F N - 応答の D N A によって誘発されたパターンから、R T S , S ワクチンの 2 回目の投与後の 2 通りのパターンの混合 (C D 8 ⁺ T c 1 及び C D 4 ⁺ T h 1) への移行を示すグラフである。ボランティア V 2 の細胞で行った e x v i v o E L I S P O T では、(a) R T S , S の最初の投与後、I F N - 応答が、C D 4 ⁺ T 細胞及び C D 8 ⁺ T 細胞の培養前の枯渇処理によって有意に減少した (D N A によって誘発された I F N - 応答の特徴) 。 R T S , S ワクチンの 2 回目の投与後では、C D 4 ⁺ T 細胞のみの枯渇処理が活性を有意に低下させた。平行して、リアルタイム P C R によるエフェクター相では、(b) I F N - m R N A の発現は、R T S , S の最初の投与後、C D 8 ⁺ T 細胞でアップレギュレーションされたが、C D 4 ⁺ T 細胞ではアップレギュレーションされず、R T S , S の 2 回目の投与後、C D 8 ⁺ T 細胞及び C D 4 ⁺ T 細胞の両方でアップレギュレーションされた。「 2 w k p 1 」は最初の投与から 2 週間後を指し、「 2 w k p 2 」は 2 回目の投与から 2 週間後を指す。

【図 5】D N A 初回刺激 / R T S , S 追加免疫ボランティアの I F A T 抗体力価を示すグラフである。抗体の力価は、R T S , S の最初の投与前に H B s A g に対する抗体をもつ (+) 、またもたない (-) D N A 初回刺激 (+) ボランティア及び非初回刺激 (-) ボランティアの幾何平均 \pm S E (9 5 % 信頼区間) として示した。抗体アッセイは、R T S , S による最初及び 2 回目の免疫感作の後に実施した。最初の投与から 2 週間後に、D N A - / H B s A g + ボランティアの力価が D N A + / H B s A g + よりも有意に大きかった (P < 0 . 0 2) ことを除き、どの群の間にも有意差がなかった。

【配列表】

10

20

SEQUENCE LISTING

<110> GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A.
 THE UNITED STATES OF AMERICA REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE
 NAVY

<120> METHODS FOR VACCINATING AGAINST MALARIA

<130> 04012.0374-00304

<140>
 <141>

<150> 60/447,026
 <151> 2003-02-13

<150> 60/420,265
 <151> 2002-10-23

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 1
 Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu
 1 5

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 2
 Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr
 1 5 10

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 3

10

20

30

40

Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg
 1 5 10

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 4
 Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr
 1 5

10

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 5
 Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp
 1 5 10 15

20

Ser Pro Cys Ser
 20

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 6
 Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp
 1 5 10

30

<210> 7
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 7
 Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe
 1 5 10 15

40

Asn Val Val Asn Ser
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

10

<400> 8
Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala
1 5 10 15

Asn Asp Ile Glu
20

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

20

<400> 9
Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys
1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 10
Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu
1 5 10 15

30

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 11
Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser

40

1	5	10	15	
---	---	----	----	--

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12 10
 Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 13 20
 Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 14
 Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys
 1 5 10 15

<210> 15 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 15
 Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 15

40

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 16
Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu
1 5 10 15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17
Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Asn
1 5 10 15

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 18
Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Asn Asp Ile Glu Lys Lys
1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

30

<400> 19
Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu
1 5 10 15

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

40

peptide

<400> 20

Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe
 1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

10

<400> 21

Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn
 1 5 10 15

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

20

<400> 22

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
 1 5

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 23

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15

30

Ala Ser His Leu Glu Thr
 20

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

40

<400> 24

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
 1 5

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

10

<400> 25

Ala Gly Leu Leu Gly Asn Val Ser Thr Val Leu Leu Gly Gly Val
 1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 26

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser
 1 5 10 15

20

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 27

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
 1 5

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 28

ttggtgatga tttgaacatt gga

23

<210> 29

30

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 29
 cccagttcct gcagagtaga aaa 23

 <210> 30 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 30
 gaaggtgaag gtcggagtc 19

 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 31
 gaagatggtg atgggatttc 20

 <210> 32
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 32 30
 tgtcacttgc aaacacacag ctgtcgaa 29

 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

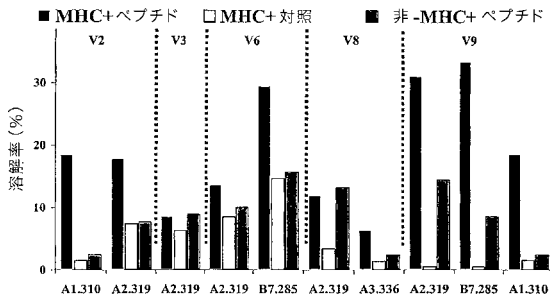
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

 <400> 33 40

 caagcttccc gttctcagcc

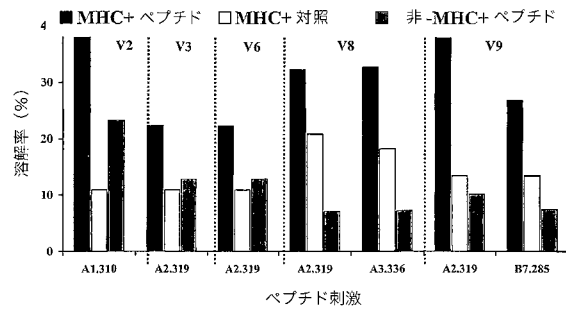
【 図 1 a 】

DNAによる免疫感作後のPfcSP特異的なCTL



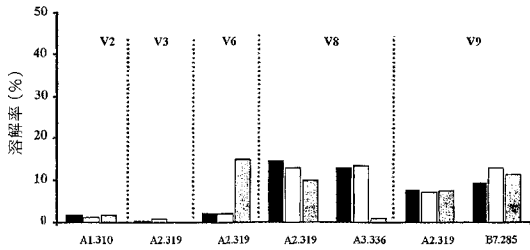
【 図 1 c 】

RTS,Sによる追加免疫後のPfcSP特異的なCTL

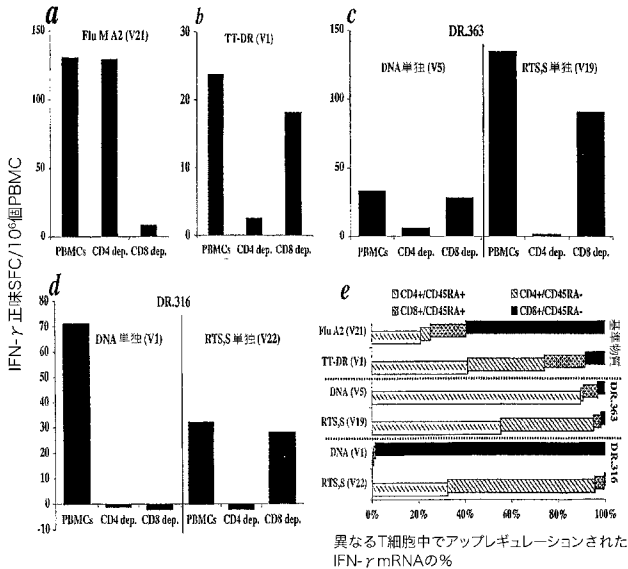


【 図 1 b 】

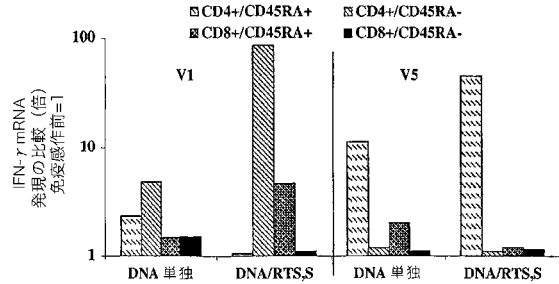
RTS,Sによる追加免疫直前のPfcSP特異的なCTL



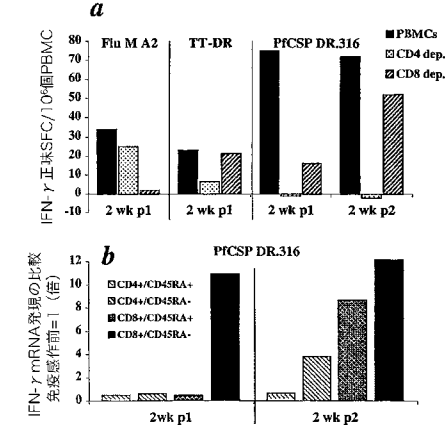
【 図 2 】



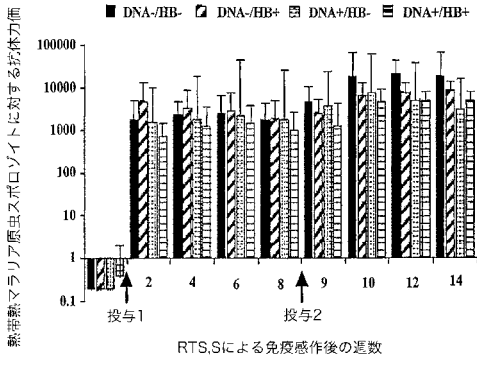
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/33462
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01N 43/04; A61K 39/02, 39/005, ; G01N 33/53 US CL : 424/184.1, 265.1, 269.1, 272.1; 435/975; 514/44 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) U.S. : 424/184.1, 265.1, 269.1, 272.1; 435/975; 514/44 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DOOLAN et al. DNA-based Vaccines Against Malaria: Status and Promise of the Multi-Stage Malaria DNA Vaccine Operation. International Journal for Parasitology. 2001, Vol. 31, pages 753-762, see entire document.	1-2, 9-36, 43-44 ----- 3-8, 37-42
Y	WANG et al. Induction of CD4+ T Cell-dependent CD8+ type I Responses in Humans by a Malaria DNA Vaccine. PNAS. Vol. 98, No. 19, pages 10817-10822, see entire document.	1-44
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "B" earlier application or patent 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 May 2004 (26.05.2004)		Date of mailing of the international search report 02 SEP 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Lynette Smith Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/33462

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
MEDLINE, BIOSIS, CA, CAPLUS, EMBASE, USPATFULL
terms: malaria, plasmodium, falciparum, PICSP, RTS,S, DNA, protein, immunize, vaccine,

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100066692

弁理士 浅村 皓

(74) 代理人 100072040

弁理士 浅村 肇

(74) 代理人 100102897

弁理士 池田 幸弘

(74) 代理人 100088926

弁理士 長沼 暉夫

(72) 発明者 ホフマン、スティーブン、エル。

アメリカ合衆国、メリーランド、ゲイサースバーグ、アーガシー ドライブ 308

(72) 発明者 ワン、ルオピン

アメリカ合衆国、メリーランド、ポトマック、オーバーゲート プレース 10416

(72) 発明者 エプスタイン、ジュディス、イー。

アメリカ合衆国、メリーランド、ロックビル、エドソン レーン 5821、ナンバー ティー 1

(72) 発明者 コーエン、ジョセフ、ディー。

ベルギー国、ブリュッセル、リュ 9 ジャン パティスト - ムニエル

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA61 CA02 DA03 DA12 EA04 GA11 HA03 HA17

4C084 AA13 NA14 ZB38

4C085 AA03 BA06 BB11 CC40 DD86

专利名称(译)	接种疟疾疫苗的方法		
公开(公告)号	JP2006512405A	公开(公告)日	2006-04-13
申请号	JP2005501650	申请日	2003-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司 美国政府		
申请(专利权)人(译)	葛兰素史克生物制品醋兴业ANONYME 美国		
[标]发明人	ホフマンステーブンエル ワンルオビン エプスタインジュディスイー コーエンジョセフディー		
发明人	ホフマン、ステーブン、エル. ワン、ルオビン エプスタイン、ジュディス、イー. コーエン、ジョセフ、ディー.		
IPC分类号	A61K39/015 A61K48/00 A61P33/06 C12N15/09 A01N43/04 A61K A61K39/005 A61K39/02 C07K14/445 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/015 A61K2039/53 A61K2039/545 A61K2039/57 C07K14/445 Y02A50/412 Y02A50/58		
FI分类号	A61K39/015.ZNA A61K48/00 A61P33/06 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/BA61 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA17 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB38 4C085/AA03 4C085/BA06 4C085/BB11 4C085/CC40 4C085/DD86		
代理人(译)	池田幸		
优先权	60/420265 2002-10-23 US 60/447026 2003-02-13 US		
其他公开文献	JP5404990B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过疫苗接种预防疟疾感染的方法。本发明的方法涉及用基于DNA的疫苗引发抗疟疾免疫应答，并用基于蛋白质的疫苗加强该应答。本发明的方法还涉及通过用基于蛋白质的疫苗加强来扩大所得的免疫应答。

特許2006-512405

(P2006-512405)

(43) 公表日 平成18年4月13日(2006.4.13)

(51) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考)
A 6 1 K 39/015 (2006.01)	A 6 1 K 39/015 ZNA	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 71 頁)

(21) 出願番号	特願2005-501650 (P2005-501650)	(71) 出願人	595136380
(66) (22) 出願日	平成15年10月22日(2003.10.22)		
(85) 翻訳文提出日	平成17年6月13日(2005.6.13)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/033462		
(87) 国際公開番号	W02004/037189		
(87) 国際公開日	平成16年5月6日(2004.5.6)		
(31) 優先権主張番号	60/420,265		
(32) 優先日	平成14年10月23日(2002.10.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/447,026		
(32) 優先日	平成15年2月13日(2003.2.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		(71) 出願人	595151807
			アメリカ合衆国
			アメリカ合衆国 20910-7500
			メリーランド、シルヴァースプリング、
			ネイヴアル メディカル リサーチ センター、
			オフィス オブ テクノロジー
			トランスファー