

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-109636

(P2018-109636A)

(43) 公開日 平成30年7月12日(2018.7.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z N A Z	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 L	4 B O 6 4
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 B O 6 5
C 4 O B 20/04 (2006.01)	C 4 O B 20/04	4 C O 8 4
審査請求 有 請求項の数 67 O L (全 133 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-22685 (P2018-22685)	(71) 出願人	509327817 メディジーン アーゲー
(22) 出願日	平成30年2月13日 (2018.2.13)		
(62) 分割の表示	特願2014-253911 (P2014-253911) の分割		ドイツ連邦共和国 プラネグ/マーティン スリエド 82152 ロシュハマー シ ュトラッセ 11
原出願日	平成20年6月2日 (2008.6.2)		
(31) 優先権主張番号	60/932.446	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成19年5月31日 (2007.5.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	07013264.2		
(32) 優先日	平成19年7月6日 (2007.7.6)	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
		(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンとしての変異型パルボウイルス構造タンパク質

(57) 【要約】

【課題】 抗原に対する結合剤に特異的に結合し得るパルボウイルス変異構造タンパク質を同定する方法を提供する。

【解決手段】 パルボウイルス変異構造タンパク質を同定するためのスクリーニング法は、(a)少なくとも1つの変異型パルボウイルス構造タンパク質を発現するパルボウイルススピリオンのライブラリーを提供する段階、(b)抗原の結合剤を提供する段階、(c)結合剤に特異的に結合する少なくとも1つのパルボウイルススピリオンを選択する段階、および(d)(i)段階c)で選択されたパルボウイルススピリオンのパルボウイルス変異構造タンパク質もしくはその変異部分、または(ii)段階c)で選択されたパルボウイルススピリオンのパルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子もしくはその変異部分を同定する段階を含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、抗原の結合剤に特異的に結合し得るパルボウイルス変異構造タンパク質を同定する方法：

- a) 少なくとも1つの変異型パルボウイルス構造タンパク質を発現するパルボウイルスペリオンのライブラリーを提供する段階、
- b) 抗原の結合剤を提供する段階、
- c) 結合剤に特異的に結合する少なくとも1つのパルボウイルスペリオンを選択する段階、および
- d) 段階c)で選択されたパルボウイルスペリオンの
 - i) パルボウイルス変異構造タンパク質もしくはその変異部分、または
 - ii) パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子もしくはその変異部分を同定する段階。

10

【請求項2】

段階c)で選択される少なくとも1つのパルボウイルスペリオンを、適切な条件下での産生細胞におけるウイルス複製およびそれに続くパッケージングにより増幅し、段階b)~c)を少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回、好ましくは1、2、3、4、または5回繰り返す、請求項1記載の方法。

【請求項3】

好ましくは直接、またはリンカーを介して担体上に固定化された結合剤を用いて選択段階を行う、請求項1または2のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項4】

選択段階を懸濁状態の結合剤を用いて行い、かつ任意に、結合剤に特異的に結合している少なくとも1つのパルボウイルスペリオンを沈殿させる、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

選択段階が洗浄段階を含む、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

選択されたパルボウイルスペリオンを、第2の結合剤に対する非結合に関してさらに選択する、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項7】

以下の段階をさらに含む、請求項1~6のいずれか一項記載の方法：

- e) パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子をランダム化する段階、
- f) ランダム化遺伝子をパルボウイルスのさらなるライブラリー中にパッケージングする段階、および
- g) 段階a)~d)を繰り返す段階。

【請求項8】

パルボウイルス変異構造タンパク質が、各パルボウイルス野生型構造タンパク質と比較して、少なくとも1つのランダム変異をさらに含む、請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項9】

パルボウイルスが、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ウシAAV(b-AAV)、イヌAAV(CAAV)、イヌパルボウイルス(CPV)、マウスパルボウイルス、マウスの微小ウイルス(MVM)、B19、H1、トリAAV(AAAV)、ネコ汎白血球減少症ウイルス(FPV)、およびガチョウパルボウイルス(GPV)からなる群より選択される、請求項8記載の方法。

【請求項10】

AAVが、AAV-1、AAV-2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、またはAAV-12であり、特にAAV-2である、請求項8または9記載の方法。

【請求項11】

遺伝子型/表現型連関ライブラリーをもたらす、100ゲノム/細胞以下、好ましくは10ゲ

50

ノム/細胞以下、より好ましくは1ゲノム/細胞以下の低コピー数のウイルスゲノムを用いる適切な条件下で、プラスミドライブラリーを産生細胞にトランスフェクトすることにより、パルボウイルスピリオンのライブラリーを作製する、請求項1~10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

細胞当たりのゲノムの比が5~5,000、好ましくは10~1,000、より好ましくは50~300、特に約100である適切な条件下でライブラリーを産生細胞に導入すること、および、特に飲作用および/または食作用を介した非特異的取り込みによる、感染経路から独立している導入条件を選択することにより、遺伝子型/表現型が連関したパルボウイルスライブラリーを作製する、請求項1~10のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項13】

パルボウイルスピリオンライブラリーの導入を、固定化パルボウイルスピリオン上に播種した産生細胞を用いて行う、請求項12記載の方法。

【請求項14】

細胞当たりのゲノムの比が10~10,000、好ましくは50~5,000、より好ましくは100~3,000、特に約1,000である適切な条件下で、ライブラリーを産生細胞に導入し、遺伝子型/表現型連関ライブラリーをもたらす、好ましくは特異的受容体結合を介した感染経路に依存する導入条件を選択することにより、パルボウイルスピリオンのライブラリーを作製する、請求項1~10のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項15】

産生細胞をピリオンライブラリーと共にインキュベートするが、ライブラリーのピリオンは固定化されていないという導入条件を適用する、請求項14記載の方法。

【請求項16】

ライブラリーが、少なくとも5%、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、特に少なくとも90%の遺伝子型/表現型連関を有する、請求項11~14のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

ライブラリーが、 10^5 を超える、好ましくは 10^6 を超える、特に 10^7 を超えるパルボウイルス変異体の多重度を有する、請求項1~16のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項18】

パルボウイルス変異体構造タンパク質が、4~30アミノ酸、好ましくは5~20アミノ酸、特に5~15アミノ酸の挿入を少なくとも1つ含む、請求項1~17のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

挿入が、ジスルフィド結合を形成して、挿入アミノ酸からなるループを形成し得る2つのシステインを含む、請求項1~18のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

パルボウイルス変異体構造タンパク質が、点突然変異、内部または末端欠失、第2の挿入、および置換から選択される少なくとも1つのさらなる変異を含む、請求項1~19のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項21】

第2の挿入が内部にあるかまたはN末端もしくはC末端融合であり、該挿入が4~40アミノ酸、好ましくは5~30アミノ酸、最も好ましくは7~20アミノ酸の長さを有する、請求項20記載の方法。

【請求項22】

第2の挿入がリガンドに対する結合に有用なタグである、請求項20または21記載の方法。

【請求項23】

a) 挿入が、I-1、I-34、I-138、I-139、I-161、I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-453、I-459、I-471、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664

50

、I-713、およびI-716、からなる群より選択される1つまたは複数の位置、より好ましくはI-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587からなる群より選択される1つまたは複数の位置、特にI-587に、挿入されるか；または

b) 挿入が、I-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587からなる群より選択される2つの位置、好ましくはI-261とI-587の組み合わせおよびI-261とI-453の組み合わせに挿入される、

請求項18～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

請求項1～23のいずれか一項記載の方法によって得られ得るパルボウイルス変異構造タンパク質。

10

【請求項25】

パルボウイルスにとって異種である少なくとも1つのB細胞エピトープを含むパルボウイルス変異構造タンパク質であって、B細胞エピトープがウイルスの表面上に位置するパルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項26】

B細胞エピトープが、病原体と、特に病原体のB細胞エピトープと同一ではない、請求項24または25記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項27】

哺乳動物または病原体B細胞エピトープと同一ではないが、哺乳動物またはB細胞エピトープの機能的誘導体である、パルボウイルスにとって異種である少なくとも1つのB細胞エピトープを含む、請求項24または25のいずれか一項記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

20

【請求項28】

請求項9、10、または18～23のいずれか一項に記載される通りにさらに特徴づけられる、請求項24～27のいずれか一項記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項29】

B細胞エピトープが寛容原由来エピトープである、請求項24～28のいずれか一項記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項30】

B細胞エピトープが、腫瘍抗原、誤って折りたたまれたタンパク質、血清タンパク質、膜タンパク質、TNFファミリーメンバー、およびインターロイキンからなる群より選択されるタンパク質の一部である、請求項24～29のいずれか一項記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

30

【請求項31】

B細胞エピトープが、CETP、CD20、アセチルコリン受容体、IL13R、EGFR、IgE、Melan A、HMW MAA、CA125、Her2/NEU、L1細胞接着分子、VEGF、EGFR、CD20、TNF- α 、IL-6、IL9、IL-13、IL-17、および α -アミロイドからなる群より選択されるタンパク質の一部である、請求項30記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項32】

B細胞エピトープが、ヒト α -アミロイドの一部またはヒト α -アミロイドミモトープである、請求項30記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

40

【請求項33】

B細胞エピトープが、ヒトIgEの一部またはヒトIgEミモトープである、請求項30記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項34】

B細胞エピトープが、ヒトCETPの一部またはヒトCETPミモトープである、請求項30記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項35】

B細胞エピトープが、ヒトTNF- α の一部またはヒトTNF- α ミモトープである、請求項30記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

50

【請求項36】

B細胞エピトープが、ヒトIL-6の一部またはヒトIL-6ミモトープである、請求項30記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項37】

B細胞エピトープが、ヒトIL-17の一部またはヒトIL-17ミモトープである、請求項30記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項38】

B細胞エピトープが、特に配列QMWAPQWGPDまたはそのパラトープもしくはミモトープを含むかまたは有する、ヒトHER2/neuの一部またはヒトHER2/neuミモトープである、請求項30記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

10

【請求項39】

B細胞エピトープが、
 QAGTFALRGDNPQG, SIGYPLP, NGR, CDCRGDCFC, RGDVGV,
 RGDTPS, GENQARS, RSNVVP, NSSRDLG, NDVRAVS, EYHHYNK,
 MTPFPTSNEANLGGGS, QPEHSST, VNTANST, NDVRSAN, NDVRAVS,
 VTAGRAP, APVTRPA, DLSNLTR および GQHPRPG

からなる群より選択されない、請求項24～38のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

20

【請求項40】

B細胞エピトープが、インテグリン、特に α_1 、 α_3 、 α_V 、または α_V インテグリン、およびCD13ではない、請求項24～39のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項41】

エピトープが構造タンパク質のN末端に融合されていない、請求項24～40のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項42】

標的抗原に結合し得る免疫グロブリンを誘導することができる、請求項24～41のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

30

【請求項43】

B細胞エピトープが、抗IgE抗体の抗イディオタイプエピトープ/ミモトープ、および/またはIgE寛容原由来エピトープ/ミモトープを含む、請求項24～42のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項44】

B細胞エピトープが、最初のG、W、およびVが保存されており、かつシステイン残基Cがジスルフィド架橋によりペプチドの環状型を媒介している

EFCINHRGYWVCGDまたは**INHRGYWV**

のミモトープ配列を含む、請求項24、25、28～30、31、33、42、または43のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

40

【請求項45】

B細胞エピトープが、
 VNLTWSRASG,
 TYQCRVTHPHLPRALMR, RHSTTQPRKTKGSG, DSNPRGVSAAYLSR,
 TITCLVVDLAPSK, KTKGSGFFVF, THPHLPRALMRS,
 GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK および LPRALMRS,

またはそのパラトープもしくはミモトープからなる群より選択される配列を含むかまたは有する、請求項24、25、28～31、33、42、または43のいずれか一項記載のバルボウイルス

50

変異構造タンパク質。

【請求項 4 6】

B細胞エピトープが、
PKTVSNLTESSSESVQS,
SLMGDEFKAVLET, QHSVAYTFEED, INPEIITRDG, DISLTGDPVITASYL,
DISLTGDPVITA, DQSIDFEIDSA, KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS,
KNVSEDLPLPT, CDSGRVRTDAPD および FPEHLLVDFLQSLs,

またはそのパラトープもしくはミモトープからなる群より選択される配列を含むかまたは有する、請求項24、25、28～31、34、または42のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。 10

【請求項 4 7】

B細胞エピトープが、
SSRTPSDKPVAVHVVANPQAE, SSRTPSDKPVAVHVVANP, SSRTPSDKP,
NADGNVDYHMNSVP, DGNVDYHMNSV, RSFKEFLQSSLRALRQ および
FKEFLQSSLRA,

またはそのパラトープもしくはミモトープからなる群より選択される配列を含むかまたは有する、請求項24、25、28～31、35～37、または42のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。 20

【請求項 4 8】

B細胞エピトープが、特に配列DAEFRHDSGを含むかまたは有する、
-アミロイドエピトープまたは -アミロイドミモトープである、請求項24、25、28～32、および42のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項 4 9】

B細胞エピトープがI-453および/またはI-587、特にAAV-1、AAV-2、またはAAV-6のI-453および/またはI-587に挿入される、請求項24、25、28～30、42～48のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

【請求項 5 0】

第2のタンパク質またはペプチドに融合させた、請求項24～49のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。 30

【請求項 5 1】

請求項24～50のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質を含む多量体構造。

【請求項 5 2】

キャプソメア、ウイルス様粒子、またはウイルスである、請求項51記載の多量体構造。

【請求項 5 3】

構造タンパク質少なくとも5個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも30個、最も好ましくは少なくとも60個の凝集体である、請求項51または52記載の多量体構造。 40

【請求項 5 4】

バルボウイルスにとって異種であるB細胞エピトープが多量体構造の表面上に位置する、請求項51～53のいずれか一項記載の多量体構造。

【請求項 5 5】

請求項24～50のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質をコードする核酸。

【請求項 5 6】

請求項24～50のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質、および/または請求項55記載の核酸を含むウイルス。 50

【請求項 57】

請求項55記載の核酸を含む細胞。

【請求項 58】

細菌、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である、請求項57記載の細胞。

【請求項 59】

以下の段階を含む、請求項24～50のいずれか一項記載の構造タンパク質を調製する方法：

- a) 適切な条件下で、請求項57または58記載の細胞を培養することにより、パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする核酸を発現させる段階、および
b) 段階a)の発現されたパルボウイルス変異構造タンパク質を単離する段階。

10

【請求項 60】

請求項24～50のいずれか以降記載の少なくとも1つのパルボウイルス変異構造タンパク質および/または請求項55記載の核酸、好ましくは請求項51～54のいずれか一項記載の少なくとも1つの多量体構造を含む薬剤。

【請求項 61】

ワクチンである、請求項60記載の薬剤。

【請求項 62】

自己免疫疾患、腫瘍疾患、アレルギー性疾患、代謝疾患、炎症性疾患、神経疾患を予防もしくは治療するため、または眼科において用いるための、請求項60または61記載の薬剤。

20

【請求項 63】

免疫寛容を破壊するための、請求項60～62のいずれか一項記載の薬剤。

【請求項 64】

疾患が感染症ではない、請求項60～63のいずれか一項記載の薬剤。

【請求項 65】

パルボウイルス変異構造タンパク質が、遺伝子療法においてベクターとして用いられない、請求項60～62または64のいずれか一項記載の薬剤。

【請求項 66】

好ましくは、自己免疫疾患および/もしくは慢性炎症性疾患、好ましくは関節リウマチおよび/もしくはクローン病、腫瘍疾患、アレルギー性疾患、喘息、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、代謝疾患、炎症性疾患、神経疾患を予防もしくは治療するため、または眼科において用いるためのワクチンを製造するための、パルボウイルスにとって異種である少なくとも1つのB細胞エピトープを含むパルボウイルス変異構造タンパク質の使用であって、特に薬剤が請求項60～65のいずれか一項に定義される通りである使用。

30

【請求項 67】

以下の治療および/または予防のための、請求項60～65のいずれか一項記載の薬剤：

- a) アレルギー性疾患および/または喘息、この場合のB細胞エピトープは、抗IgE抗体の抗イディオタイプエピトープ/ミモトープおよび/もしくはIgEエピトープ/ミモトープ、特に、最初のG、W、およびVが保存されており、かつシステイン残基Cがジスルフィド架橋によりペプチドの環状型を媒介している

40

EFCINHRGYWVCGDまたは**INHRGYWV**

の配列のミモトープ、または特に、

EKQRNGTLT, EDGQVMDVDLS,

TYQCRVTHPHLPRALMR, RHSTTQPRKTKGSG, DSNPRGVSAAYLSR,

TITCLVVDLAPSK, KTKGSGFFVF, THPHLPRALMRS,

GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK, LPRALMRS

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；

- b) アルツハイマー病、この場合のB細胞エピトープは、特に配列DAEFRHDSGまたはその機

50

能的活性変種を含むかまたは有する、 -アミロイドエピトープまたはミモトープを含む ;

c) アテローム性動脈硬化症、この場合のB細胞エピトープは、CETPエピトープまたはミモトープ、特に、

PKTVSNLTESSESQVQS, SLMGDEFKAVLET, QHSVAYTFEED,
INPEIITRDG, DISLTGDPVITASYL, DISLTGDPVITA, DQSIDFEIDSA,
KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS, KNVSEDLPLPT, CDSGRVRTDAPD, および
FPEHLLVDFLQSL

10

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む ;

d) 腫瘍疾患、この場合のB細胞エピトープは、増殖因子受容体または増殖因子のエピトープまたはミモトープ、特にHER2/neuエピトープまたはミモトープ、特にエピトープQMWAQWGPDまたはその機能的活性変種を含む ;

e) 自己免疫疾患および/または慢性炎症性疾患、好ましくは関節リウマチおよび/またはクローン病、この場合のB細胞エピトープは、サイトカインの、好ましくはTNF- α 、IL-6、および/またはIL-17のエピトープまたはミモトープ、特に、

SSRTPSDKPVAVHVVANPQAE,
SRTPSDKPVAVHVVANP, SSRTPSDKP, NADGNVDYHMNSVP,
DGNVDYHMNSV, RSFKEFLQSSLRALRQ, FKEFLQSSLRA

20

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む ; または

f) 感染症、好ましくはHIV感染症、この場合のB細胞エピトープは、ウイルス受容体の、好ましくはCCR5のエピトープまたはミモトープ、特に、

HYAAAQWDFGNTMCQL, YAAQWDFGNTMCQ, RSQKEGLHYT

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原の結合剤に特異的に結合し得るパルボウイルス変異構造タンパク質を同定する方法、パルボウイルスにとって異種である少なくとも1つのB細胞エピトープを含むパルボウイルス変異構造タンパク質、該タンパク質を含む多量体構造、該タンパク質をコードする核酸、該タンパク質を含むウイルスまたは細胞、該タンパク質を調製する方法、該タンパク質、核酸、または多量体構造を含む薬剤およびその使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

モノクローナル抗体療法は、腫瘍学、自己免疫疾患、および炎症性疾患などの治療分野において、ここ数年にわたり、新薬開発の最も成功している治療形態の1つである。モノクローナル抗体療法では、疾患に関連する抗原を認識する特異的モノクローナル抗体を患者に注射する。抗体は、抗体のイディオタイプとも称される抗体の可変ドメインで、それらの抗原を認識する。

40

【0003】

しかしながら、モノクローナル抗体にはある種の欠点もある。ある特定のイディオタイプを有する特異的抗体の濃度が高すぎる場合、患者の免疫系が、治療用モノクローナル抗体のイディオタイプに対する抗体応答を生じ、それによってその有効性を限定することが観察され得る。抗体のイディオタイプを認識するこの種の抗体は、抗イディオタイプ抗体と称される。加えて、モノクローナルの他の部分に対するモノクローナル治療用抗体に対する抗体が、受動抗体療法の有効性を限定する場合も多い。そのため、モノクローナル抗体薬の多くは、従来免疫抑制療法と併用して用いる必要があり、全体的な治療費が増大

50

する。さらに、腫瘍学的徴候に関するような疾患の段階を制御するために、無傷の免疫系が必要である場合には、患者の免疫系の能動的抑制は特に有害である。

【0004】

標的抗原に対する受動ワクチン接種として、モノクローナル抗体は、患者の血清中での抗体の半減期に応じて頻りに注射しなければならない。そのため、そのような治療は患者にとって高価でありかつ不便である。

【0005】

薬物として抗イディオタイプ抗体を用いるいくつかの臨床開発によって例証される、そのようなモノクローナル抗体療法の別法が既に存在する。そのような抗イディオタイプ抗体療法は、患者の免疫系が抗体のイディオタイプに対する抗体応答を誘導し得るという事実(上記を参照されたい)に基づいている。イディオタイプとして、標的エピトープ(パラトープまたはミモトープ)の機能的模倣物を示すモノクローナルを用いると、患者の免疫系はポリクローナル抗体応答を生じ、これらの抗体の一部は患者内の標的エピトープと交差反応することができる。パラトープを示すそのような抗体は、抗イディオタイプ抗体と称される(イディオタイプ関係のJerneのネットワークモデル(Jerne, 1974, Jerne et al., 1982)に基づく)。そのため、抗イディオタイプ抗体による選択的免疫化は、元の抗原に対する特異的免疫応答を誘導し得る(Varela and Coutinho, 1991, Jefferis, 1993, Chatterjee et al., 1994)。

【0006】

したがって、そのような抗イディオタイプ抗体によるワクチン接種は、ポリクローナル抗体応答を能動的に誘導する。結果として、そのような抗イディオタイプ抗体ワクチンは、標準的なモノクローナル抗体による受動免疫に勝るいくつかの利点を有する。その有効性を限定する抗イディオタイプ抗体に対する抗体応答が起こらず、それはまさにこの免疫系が治療原理として用いられる所以である。したがって、抗体治療を免疫抑制療法と併用する必要もない。さらに、抗イディオタイプ治療が能動免疫であるという事実から、薬物は、患者自身が生じる抗体応答を促進して特異的抗体の持続的な力価を維持するために、時々注射するだけでよい。さらに、抗イディオタイプ抗体は、例えば腫瘍細胞における治療に対する抵抗性の潜在的機構を妨げる、標的抗原に対するポリクローナル抗体応答を誘導する。

【0007】

しかしながら、抗イディオタイプ抗体療法は重要な不利点を抱えている。抗イディオタイプ抗体によるワクチン接種によって得られる誘導ポリクローナル抗体応答の力価は、有益な治療を確立できるほど高くない場合が多い。これは、もともと抗体の免疫原性がそれほど高くないという理由から、ワクチンとしての強力な抗原が欠如しているためである。さらに、免疫原性の欠如、および抗イディオタイプ抗体を同定することの技術上の難しさのために、特異的抗イディオタイプワクチンを作製することは困難である。

【0008】

一連の出版物は、ウイルス粒子 本明細書ではパピローマウイルス粒子 の秩序表面という状況に置かれた抗原が、各B細胞受容体を直接架橋することにより、そのような抗原に対するB細胞寛容をも破壊し得るB細胞応答を誘導し得ることを記載している。自己抗原 A に対する免疫応答を起こすために、ピオチンを介してA ペプチドに結合させたウシパピローマウイルス様粒子(VLP)が用いられた(Li et al., 2004)。さらに、このグループは、CCR5が自己抗原であるという事実にもかかわらず、ウイルスL1タンパク質の免疫優性部位に挿入されたマウスケモカイン受容体mCCR5を有するウシパピローマウイルス様粒子を用いてマウスを免疫し、高い抗CCR5抗体価を有する血清をもたらした。さらに、ブタオザルを免疫するために、マカクL1-CCR5融合タンパク質が用いられた。試験した動物5頭のうち4頭が、CCR5特異的抗体を産生した。さらなるアプローチにおいて、ピオチン-ストレプトアビジン相互作用を介して、TNF- がVLPに連結された(Chackerian et al., 2001)。これらのVLPは、マウスにおいて自己抗体応答を生じるのに成功し、これらの抗体は天然TNF- に結合した(US 6,719,978)。

10

20

30

40

50

【0009】

したがって、パピロームVLPは、強力なB細胞応答を起こすために、免疫系に対して抗原を提示するための適切な骨格であることが示されており、おそらくこれは、ワクチン接種エピトープの高密度で秩序のある密に詰まった配置による。それらの並はずれて強力なB細胞誘導のために、パピロームVLPは、自己抗原に対するB細胞寛容を克服するのに特に有用であり得る。

【0010】

しかしながら、ワクチン接種にとって有利なエピトープは三次元である場合があり、また挿入されたエピトープは挿入部位の特定環境により再折りたたみされる場合があるため、ピオチンによって連結されるか、または知識に基づく推測により挿入されたエピトープが、広範囲の寛容原に対する自己抗体の産生を誘導し得る可能性は疑わしい。これは、より大きな挿入の場合よりもウイルスキャプシド骨格の影響が大きく関係する、小さな抗原または個々のエピトープに特に当てはまる。

10

【0011】

したがって、本発明の問題は、上記の不利点(結合されるかまたは手動で挿入された寛容由来エピトープを有するBPVベースのVLP)の1つまたは複数回避する、特に抗体療法に接触可能な、疾患の治療用ワクチンとして有用である薬物候補を同定するための別法またはさらに優れた方法を見出すことであった。

【0012】

この問題は、抗原の結合剤に特異的に結合し得るパルボウイルス変異構造タンパク質を同定するためのスクリーニング法によって解決され、この方法は、(a) 少なくとも1つの変異型パルボウイルス構造タンパク質を発現するパルボウイルスビリオンのライブラリーを提供する段階、(b) 抗原の結合剤を提供する段階、(c) 結合剤に特異的に結合する少なくとも1つのパルボウイルスビリオンを選択する段階、および(d) (i) 段階c)で選択されたパルボウイルスビリオンのパルボウイルス変異構造タンパク質もしくはその変異部分、または(ii) 段階c)で選択されたパルボウイルスビリオンのパルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子もしくはその変異部分を同定する段階を含む。

20

【0013】

パルボウイルス、特にアデノ随伴ウイルス2型は、遺伝子療法用のウイルスベクターとして当技術分野で周知である(Muzyczka, 1992)。さらに、AAV2構造タンパク質は、AAV2の細胞指向性を変更し、それによって正常条件下では野生型AAV2が感染しない細胞または組織に対してウイルスを指向するように遺伝子改変されている。最初に成功したAAV2の再標的化は、Girod A. et al.(Girod et al., 1999)、(WO 99/67393)によって発表された。その筆者らは、構造タンパク質がビリオンに会合する能力を破壊することなく、例えば短いペプチド配列の挿入によって改変され得るAAVの挿入部位を同定した。ビリオンの表面上に提示させる最適なペプチド配列を挿入すると、細胞指向性が変化し、これはインビボでの試験に成功している(White et al., 2004)。AAVに対する中和抗体を有する患者の免疫系から免れるよう、AAVの抗原性を軽減するために(Huttner et al., 2003); (WO 01/05990)、および遺伝子療法用のAAVベクターの効率的な製造を可能にするよう、AAVビリオンのクロマトグラフィー特性を改変するために(WO 01/05991)、技術がさらに開発されて用いられた。この研究は確認されており、さらなる挿入部位が同定された(Shi et al., 2001)、特に表1~5、1708ページ「Identification of optimal sites for heterologous ligand insertion」;(Shi and Bartlett, 2003)、US 2002/0192823;(Wu et al., 2000))。

30

40

【0014】

所望の細胞または組織に対してAAVを再標的化する技術を改良するために、AAVの変異構造タンパク質のライブラリーが構築され、細胞指向性が変化したAAVクローンの選択に用いられるのに成功している(Perabo et al., 2003、Lieber, 2003、Muller et al., 2003、WO 03/054197)。

【0015】

パルボウイルス構造タンパク質はこれまでに、ワクチン接種目的のために用いられ得る

50

ウイルス様粒子を形成することが知られている。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)核タンパク質由来のCD8+エピトープを含む、プタバルボウイルス(PPV)およびイヌバルボウイルス(CPV)のハイブリッド組換えパルボウイルス様粒子を含むワクチンは、LCMVによる致死感染からマウスを防御した(Casal, 1999)。同じことが、ポリオウイルス由来のC3:TEピトープを含むPPVおよびCPVウイルス様粒子(VLP)についても示された(Casal, 1999)。また、B19構造タンパク質が、ワクチン接種目的でエピトープ送達に応用されている。ヒト単純ヘルペスウイルス1型およびマウス肝炎ウイルスA59の線状エピトープを提示させるために、ヒトパルボウイルスB19 VLPのVP-2キャプシドタンパク質が用いられた(Brown et al., 1994)、US 6,719,978)。

【0016】

10

しかしながら、これらの試みはかなり大きな病原体エピトープについて用いられているにすぎず、患者に有益な効果を及ぼすためにB細胞寛容が破壊されるべき寛容原または小さな抗原またはさらに個々のエピトープでは用いられていない。

【0017】

パルボウイルスライブラリーを用いるスクリーニング法は、WO 03/054197に以前に記載されている。その中では、細胞指向性が変化したパルボウイルスを同定するためのスクリーニング法が開示されている。その発明者らは、ウイルスのプールから免疫原性パルボウイルスを除去するための、患者血清などの抗体を用いる免疫選択段階(陰性選択)をさらに開示している。しかしながら、陽性選択である、例えば治療用抗体に結合するビリオンといった、結合剤に特異的に結合するパルボウイルスビリオンの選択は開示されなかった。

20

【発明の概要】

【0018】

本発明による薬剤は、先行技術に勝る多くの利点を有する。哺乳動物の免疫系は、一方の哺乳動物およびそれらの免疫系ともう一方のウイルスとの共進化により、特殊化されて、ウイルスキャプシドタンパク質に対する強力な抗体応答を生じる。強力な抗体応答とは、標準的なELISA法により測定される1000~100,000の力価を意味する。ウイルス様粒子は、ウイルスとの類似、およびそれによる抗原提示細胞によるそのような粒子の効率的取り込みのために、免疫原性が高い。ビリオンの大きさ、B細胞エピトープの密度および対称的秩序、ならびに任意の2つのB細胞エピトープ間の約50~100 という最適距離は、自己抗原または寛容原に対するB細胞寛容さえも破壊する、各B細胞受容体の直接的架橋により媒介される非常に強力なT細胞非依存性B細胞応答に関して主要な役割を担う(Szomolanyi-Tsuda and Welsh, 1998、Szomolanyi-Tsuda et al., 1998、Szomolanyi-Tsuda et al., 2000、Szomolanyi-Tsuda et al., 2001、Zinkernagel, 2002、Bachmann et al., 1993)。

30

【0019】

まとめると、このような薬剤は、能動的免疫応答を引き起こして持続的な抗体価をもたらす、ある種のB細胞エピトープに対するポリクローナル免疫応答を誘導し得る。ビリオンの多量体構造は、B細胞上の各受容体を直接架橋し、それによってT細胞非依存性B細胞応答を誘導する、多数の高密度に詰まった同一エピトープを含む。薬剤の粒子構造は、IgGクラススイッチおよび活性化B細胞の超変異を最終的に誘発し、高親和性IgG抗体の持続的放出およびB細胞の記憶細胞への分化を引き起こす、T細胞を活性化する抗原提示細胞による効率的な取り込みを介した免疫応答をさらに支持する。本発明の方法を用いて、このような薬剤を容易にスクリーニングおよび作製することができる。

40

[請求項101]

以下の段階を含む、抗原の結合剤に特異的に結合し得るパルボウイルス変異構造タンパク質を同定する方法:

- a) 少なくとも1つの変異型パルボウイルス構造タンパク質を発見するパルボウイルスビリオンのライブラリーを提供する段階、
- b) 抗原の結合剤を提供する段階、
- c) 結合剤に特異的に結合する少なくとも1つのパルボウイルスビリオンを選択する段階、および

50

d) 段階c)で選択されたパルボウイルスピリオンの

i) パルボウイルス変異構造タンパク質もしくはその変異部分、または

ii) パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子もしくははその変異部分を同定する段階。

[請求項102]

段階c)で選択される少なくとも1つのパルボウイルスピリオンを、適切な条件下での産生細胞におけるウイルス複製およびそれに続くパッケージングにより増幅し、段階b)~c)を少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回、好ましくは1、2、3、4、または5回繰り返す、請求項101記載の方法。

[請求項103]

好ましくは直接、またはリンカーを介して担体上に固定化された結合剤を用いて選択段階を行う、請求項101または102のいずれか一項記載の方法。

[請求項104]

選択段階を懸濁状態の結合剤を用いて行い、かつ任意に、結合剤に特異的に結合している少なくとも1つのパルボウイルスピリオンを沈殿させる、請求項101~103のいずれか一項記載の方法。

[請求項105]

選択段階が洗浄段階を含む、請求項101~104のいずれか一項記載の方法。

[請求項106]

選択されたパルボウイルスピリオンを、第2の結合剤に対する非結合に関してさらに選択する、請求項101~105のいずれか一項記載の方法。

[請求項107]

以下の段階をさらに含む、請求項101~106のいずれか一項記載の方法：

e) パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子をランダム化する段階、

f) ランダム化遺伝子をパルボウイルスのさらなるライブラリー中にパッケージングする段階、および

g) 段階a)~d)を繰り返す段階。

[請求項108]

パルボウイルス変異構造タンパク質が、各パルボウイルス野生型構造タンパク質と比較して、少なくとも1つのランダム変異をさらに含む、請求項101~107のいずれか一項記載の方法。

[請求項109]

パルボウイルスが、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ウシAAV(b-AAV)、イヌAAV(CAAV)、イヌパルボウイルス(CPV)、マウスパルボウイルス、マウスの微小ウイルス(MVM)、B19、H1、トリAAV(AAAV)、ネコ汎白血球減少症ウイルス(FPV)、およびガチョウパルボウイルス(GPV)からなる群より選択される、請求項108記載の方法。

[請求項110]

AAVが、AAV-1、AAV-2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、またはAAV-12であり、特にAAV-2である、請求項108または109記載の方法。

[請求項111]

遺伝子型/表現型関連ライブラリーをもたらず、100ゲノム/細胞以下、好ましくは10ゲノム/細胞以下、より好ましくは1ゲノム/細胞以下の低コピー数のウイルスゲノムを用いる適切な条件下で、プラスミドライブラリーを産生細胞にトランスフェクトすることにより、パルボウイルスピリオンのライブラリーを作製する、請求項101~110のいずれか一項記載の方法。

[請求項112]

細胞当たりのゲノムの比が5~5,000、好ましくは10~1,000、より好ましくは50~300、特に約100である適切な条件下でライブラリーを産生細胞に導入すること、および、特に飲作用および/または食作用を介した非特異的取り込みによる、感染経路から独立している導入条件を選択することにより、遺伝子型/表現型が関連したパルボウイルスライブラ

10

20

30

40

50

リーを作製する、請求項101～110のいずれか一項記載の方法。

[請求項113]

パルボウイルスピリオンライブラリーの導入を、固定化パルボウイルスピリオン上に播種した産生細胞を用いて行う、請求項112記載の方法。

[請求項114]

細胞当たりのゲノムの比が10～10,000、好ましくは50～5,000、より好ましくは100～3,000、特に約1,000である適切な条件下で、ライブラリーを産生細胞に導入し、遺伝子型/表現型関連ライブラリーをもたらず、好ましくは特異的受容体結合を介した感染経路に依存する導入条件を選択することにより、パルボウイルスピリオンのライブラリーを作製する、請求項101～110のいずれか一項記載の方法。

10

[請求項115]

産生細胞をピリオンライブラリーと共にインキュベートするが、ライブラリーのピリオンは固定化されていないという導入条件を適用する、請求項114記載の方法。

[請求項116]

ライブラリーが、少なくとも5%、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、特に少なくとも90%の遺伝子型/表現型関連を有する、請求項111～114のいずれか一項記載の方法。

[請求項117]

ライブラリーが、 10^5 を超える、好ましくは 10^6 を超える、特に 10^7 を超えるパルボウイルス変異体の多重度を有する、請求項101～116のいずれか一項記載の方法。

20

[請求項118]

パルボウイルス変異体構造タンパク質が、4～30アミノ酸、好ましくは5～20アミノ酸、特に5～15アミノ酸の挿入を少なくとも1つ含む、請求項101～117のいずれか一項記載の方法。

[請求項119]

挿入が、ジスルフィド結合を形成して、挿入アミノ酸からなるループを形成し得る2つのシステインを含む、請求項101～118のいずれか一項記載の方法。

[請求項120]

パルボウイルス変異体構造タンパク質が、点突然変異、内部または末端欠失、第2の挿入、および置換から選択される少なくとも1つのさらなる変異を含む、請求項101～119のいずれか一項記載の方法。

30

[請求項121]

第2の挿入が内部にあるかまたはN末端もしくはC末端融合であり、該挿入が4～40アミノ酸、好ましくは5～30アミノ酸、最も好ましくは7～20アミノ酸の長さを有する、請求項120記載の方法。

[請求項122]

第2の挿入がリガンドに対する結合に有用なタグである、請求項120または121記載の方法。

[請求項123]

a) 挿入が、I-1、I-34、I-138、I-139、I-161、I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-453、I-459、I-471、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664、I-713、およびI-716、からなる群より選択される1つまたは複数の位置、より好ましくはI-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587からなる群より選択される1つまたは複数の位置、特にI-587に、挿入されるか;または

40

b) 挿入が、I-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587からなる群より選択される2つの位置、好ましくはI-261とI-587の組み合わせおよびI-261とI-453の組み合わせに挿入される、

請求項118～122のいずれか一項記載の方法。

[請求項124]

請求項101～123のいずれか一項記載の方法によって得られ得るパルボウイルス変異構造

50

タンパク質。

[請求項125]

パルボウイルスにとって異種である少なくとも1つのB細胞エピトープを含むパルボウイルス変異構造タンパク質であって、B細胞エピトープがウイルスの表面上に位置するパルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項126]

B細胞エピトープが、病原体と、特に病原体のB細胞エピトープと同一ではない、請求項124または125記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項127]

哺乳動物または病原体B細胞エピトープと同一ではないが、哺乳動物またはB細胞エピトープの機能的誘導体である、パルボウイルスにとって異種である少なくとも1つのB細胞エピトープを含む、請求項124または125のいずれか一項記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

10

[請求項128]

請求項109、110、または118～123のいずれか一項に記載される通りにさらに特徴づけられる、請求項124～127のいずれか一項記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項129]

B細胞エピトープが寛容原由来エピトープである、請求項124～128のいずれか一項記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項130]

B細胞エピトープが、腫瘍抗原、誤って折りたたまれたタンパク質、血清タンパク質、膜タンパク質、TNFファミリーメンバー、およびインターロイキンからなる群より選択されるタンパク質の一部である、請求項124～129のいずれか一項記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

20

[請求項131]

B細胞エピトープが、CETP、CD20、アセチルコリン受容体、IL13R、EGFR、IgE、Melan A、HMW MAA、CA125、Her2/NEU、L1細胞接着分子、VEGF、EGFR、CD20、TNF- α 、IL-6、IL9、IL-13、IL-17、および α -アミロイドからなる群より選択されるタンパク質の一部である、請求項130記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項132]

B細胞エピトープが、ヒト α -アミロイドの一部またはヒト β -アミロイドミモトープである、請求項130記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

30

[請求項133]

B細胞エピトープが、ヒトIgEの一部またはヒトIgEミモトープである、請求項130記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項134]

B細胞エピトープが、ヒトCETPの一部またはヒトCETPミモトープである、請求項130記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項135]

B細胞エピトープが、ヒトTNF- α の一部またはヒトTNF- α ミモトープである、請求項130記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

40

[請求項136]

B細胞エピトープが、ヒトIL-6の一部またはヒトIL-6ミモトープである、請求項130記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項137]

B細胞エピトープが、ヒトIL-17の一部またはヒトIL-17ミモトープである、請求項130記載のパルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項138]

B細胞エピトープが、特に配列QMWPQWGPDまたはそのパラトープもしくはミモトープを含むかまたは有する、ヒトHER2/neuの一部またはヒトHER2/neuミモトープである、請求項13

50

0記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項139]

B細胞エピトープが、
QAGTFALRGDNPQG, SIGYPLP, NGR, CDCRGDCFC, RGDVGV,
RGDTPTS, GENQARS, RSNAVVP, NSSRDLG, NDVRAVS, EYHHYNK,
MTPFPTSNEANLGGGS, QPEHSST, VNTANST, NDVRSAN, NDVRAVS,
VTAGRAP, APVTRPA, DLSNLTR および GQHPRPG

からなる群より選択されない、請求項124～138のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。 10

[請求項140]

B細胞エピトープが、インテグリン、特に α_1 、 α_3 、 α_V 、または α_V インテグリン、およびCD13ではない、請求項124～139のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項141]

エピトープが構造タンパク質のN末端に融合されていない、請求項124～140のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項142]

標的抗原に結合し得る免疫グロブリンを誘導することができる、請求項124～141のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。 20

[請求項143]

B細胞エピトープが、抗IgE抗体の抗イデオタイプエピトープ/ミモトープ、および/またはIgE寛容原由来エピトープ/ミモトープを含む、請求項124～142のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項144]

B細胞エピトープが、最初のG、W、およびVが保存されており、かつシステイン残基Cがジスルフィド架橋によりペプチドの環状型を媒介している

EFCINHRGYWVCGDまたは**INHRGYWV**

のミモトープ配列を含む、請求項124、125、128～130、131、133、142、または143のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。 30

[請求項145]

B細胞エピトープが、
VNLTWSRASG,
TYQCRVTHPHLPRALMR, RHSTTQPRKTKGSG, DSNPRGVSAAYLSR,
TITCLVLDLAPSK, KTKGSGFFVF, THPHLPRALMRS,
GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK および LPRALMRS,

またはそのパラトープもしくはミモトープからなる群より選択される配列を含むかまたは有する、請求項124、125、128～131、133、142、または143のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。 40

[請求項146]

B細胞エピトープが、
PKTVSNLTESSSESVQS,
SLMGDEFKAVLET, QHSVAYTFEED, INPEITRDG, DISLTGDPVITASYL,
DISLTGDPVITA, DQSIDFEIDSA, KNVSEDLPPTFSPTLLGDS,
KNVSEDLPPT, CDSGRVRTDAPD および FPEHLLVDFLQSL,

またはそのパラトープもしくはミモトープからなる群より選択される配列を含むかまたは有する、請求項124、125、128～131、134、または142のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項147]

B細胞エピトープが、
SSRTPSDKPVAVHVVANPQAE, SRTPSDKPVAVHVVANP, SSRTPSDKP,
NADGNVDYHMNSVP, DGNVDYHMNSV, RSFKEFLQSSLRALRQ および
FKEFLQSSLRA,

またはそのパラトープもしくはミモトープからなる群より選択される配列を含むかまたは有する、請求項124、125、128～131、135～137、または142のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項148]

B細胞エピトープが、特に配列DAEFRHDSGを含むかまたは有する、
-アミロイドエピトープまたは
-アミロイドミモトープである、請求項124、125、128～132、および142のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項149]

B細胞エピトープがI-453および/またはI-587、特にAAV-1、AAV-2、またはAAV-6のI-453
および/またはI-587に挿入される、請求項124、125、128～130、142～148のいずれか一項
記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項150]

第2のタンパク質またはペプチドに融合させた、請求項124～149のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質。

[請求項151]

請求項124～150のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質を含む多量体構造。

[請求項152]

キャプソメア、ウイルス様粒子、またはウイルスである、請求項151記載の多量体構造。

[請求項153]

構造が、少なくとも5個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも30個、
最も好ましくは少なくとも60個の凝集体である、請求項151または152記載の多量体構造。

[請求項154]

バルボウイルスにとって異種であるB細胞エピトープが多量体構造の表面上に位置する、
請求項151～153のいずれか一項記載の多量体構造。

[請求項155]

請求項124～150のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質をコードする
核酸。

[請求項156]

請求項124～150のいずれか一項記載のバルボウイルス変異構造タンパク質、および/または
請求項155記載の核酸を含むウイルス。

[請求項157]

請求項155記載の核酸を含む細胞。

[請求項158]

細菌、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である、請求項157記載の細胞。

[請求項159]

以下の段階を含む、請求項124～150のいずれか一項記載の構造タンパク質を調製する方
法:

a) 適切な条件下で、請求項157または158記載の細胞を培養することにより、バルボウイルス変異構造タンパク質をコードする核酸を発現させる段階、および

b) 段階a)の発現されたバルボウイルス変異構造タンパク質を単離する段階。

10

20

30

40

50

[請求項160]

請求項124～150のいずれか一項記載の少なくとも1つのパルボウイルス変異構造タンパク質および/または請求項155記載の核酸、好ましくは請求項151～154のいずれか一項記載の少なくとも1つの多量体構造を含む薬剤。

[請求項161]

ワクチンである、請求項160記載の薬剤。

[請求項162]

自己免疫疾患、腫瘍疾患、アレルギー性疾患、代謝疾患、炎症性疾患、神経疾患を予防もしくは治療するため、または眼科において用いるための、請求項160または161記載の薬剤。

[請求項163]

免疫寛容を破壊するための、請求項160～162のいずれか一項記載の薬剤。

[請求項164]

疾患が感染症ではない、請求項160～163のいずれか一項記載の薬剤。

[請求項165]

パルボウイルス変異構造タンパク質が、遺伝子療法においてベクターとして用いられない、請求項160～162または164のいずれか一項記載の薬剤。

[請求項166]

好ましくは、自己免疫疾患および/もしくは慢性炎症性疾患、好ましくは関節リウマチおよび/もしくはクローン病、腫瘍疾患、アレルギー性疾患、喘息、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、代謝疾患、炎症性疾患、神経疾患を予防もしくは治療するため、または眼科において用いるためのワクチンを製造するための、パルボウイルスにとって異種である少なくとも1つのB細胞エピトープを含むパルボウイルス変異構造タンパク質の使用であって、特に薬剤が請求項160～165のいずれか一項に定義される通りである使用。

[請求項167]

以下の治療および/または予防のための、請求項160～165のいずれか一項記載の薬剤：

a) アレルギー性疾患および/または喘息、この場合のB細胞エピトープは、抗IgE抗体の抗イディオタイプエピトープ/ミモトープおよび/もしくはIgEエピトープ/ミモトープ、特に、最初のG、W、およびVが保存されており、かつシステイン残基Cがジスルフィド架橋によりペプチドの環状型を媒介している

EFCINHRGYWVCGDまたは**INHRGYWV**

の配列のミモトープ、または特に、

EKQRNGTLT, EDGQVMDVDLS,

TYQCRVTHPHLPRALMR, RHSTTQPRKTKGSG, DSNPRGVSAAYLSR,

TITCLVVDLAPSK, KTKGSGFFVF, THPHLPRALMRS,

GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK, LPRALMRS

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；

b) アルツハイマー病、この場合のB細胞エピトープは、特に配列**DAEFRHDSG**またはその機能的活性変種を含むかまたは有する、**-**アミロイドエピトープまたはミモトープを含む；

c) アテローム性動脈硬化症、この場合のB細胞エピトープは、**CETP**エピトープまたはミモトープ、特に、

PKTVSNLTESSESQVQS, SLMGDEFKAVLET, QHSVAYTFEED,

INPEIITRDG, DISLTGDPVITASYL, DISLTGDPVITA, DQSIDFEIDSA,

KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS, KNVSEDLPLPT, CDSGRVRTDAPD, および

FPEHLLVDFLQSL

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；

10

20

30

40

50

d) 腫瘍疾患、この場合のB細胞エピトープは、増殖因子受容体または増殖因子のエピトープまたはミモトープ、特にHER2/neuエピトープまたはミモトープ、特にエピトープQMWAPQWGPDまたはその機能的活性変種を含む；

e) 自己免疫疾患および/または慢性炎症性疾患、好ましくは関節リウマチおよび/またはクローン病、この場合のB細胞エピトープは、サイトカインの、好ましくはTNF- α 、IL-6、および/またはIL-17のエピトープまたはミモトープ、特に、
SSRTPSDKPVAHVVANPQAE,

SRTPSDKPVAHVVANP, SSRTPSDKP, NADGNVDYHMNSVP,

DGNVDYHMNSV, RSFKEFLQSSLRALRQ, FKEFLQSSLRA

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；または

f) 感染症、好ましくはHIV感染症、この場合のB細胞エピトープは、ウイルス受容体の、好ましくはCCR5のエピトープまたはミモトープ、特に、

HYAAAQWDFGNTMCQL, YAAQWDFGNTMCQ, RSQKEGLHYT

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む。

【図面の簡単な説明】

【0020】

(図1-1) パルボウイルスAAV1、AAV-6、AAV2、AAV-3b、AAV-7、AAV-8、AAV10、AAV-4、AAV11、b-AAV、AAV-5、GPV、B19、MVM、FPV、およびCPVのアミノ酸配列アライメントを示す。アライメントは、Multalinバージョン5.4.1(Corpet, 1988)を用いて作成した。記号比較表：blosum62、ギャップ荷重：12、ギャップ長荷重：2、コンセンサスレベル：高=90% 低=50%。コンセンサス記号：!はIVのいずれかである；\$はLMのいずれかである；%はFYのいずれかである；#はNDQEBZのいずれかである。AAV2のG₄₅₃およびN₅₈₇に対応するアミノ酸、ならびにI-453およびI-587の好ましい挿入範囲を四角で囲む。

名称	長さ	チェック	ウェイト	Seq. GP-No.
AAV1	799	4900	0.26	<u>9632548</u>
AAV-6	799	5176	0.26	<u>2766607</u>
AAV2	799	2359	0.50	<u>2906023</u>
AAV-3b	799	3639	0.50	<u>2766610</u>
AAV-7	799	132	0.50	<u>22652859</u>
AAV-8	799	3007	0.37	<u>22652862</u>
AAV10	799	4671	0.37	<u>48728343</u>
AAV-4	799	7292	0.74	<u>2337940</u>
AAV11	799	2546	0.74	<u>48728346</u>
b-AAV	799	5299	0.79	<u>48696559</u>
AAV-5	799	5950	1.34	<u>91134730</u>
GPV	799	3208	1.92	<u>9628653</u>
B19	799	1920	2.45	<u>4092542</u>
MVM	799	332	2.05	<u>2982110</u>
FPV	799	7156	1.61	<u>494031</u>
CPV	799	7674	1.61	<u>494746</u>
コンセンサス	799	6436	0.00	

10

20

30

40

50

さらなるパルボウイルスは、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_parvo.htm#SubFamily1に見出すことができる。

(図1-2) 図1-1の続きを示す図である。

(図1-3) 図1-2の続きを示す図である。

(図1-4) 図1-3の続きを示す図である。

(図1-5) 図1-4の続きを示す図である。

(図1-6) 図1-5の続きを示す図である。

(図2) AAV2のcap遺伝子の模式的構成を示す。

(図3) 結合体および非結合体プールを用いた感染および取り込み実験を示す。取り込みに関しては、ウェルをA20抗体でコーティングし、rAAV/GFP、結合体プール、または非結合体プールと共にインキュベートした(GPC 1×10^3)。非結合のウイルスを除去した後、HeLa細胞をウェルに播種した。48時間培養した後、細胞のGFP発現をフローサイトメトリーにより解析した。感染に関しては、HeLa細胞をウェルに播種し、rAAV/GFP、結合体プール、または非結合体プールに感染させた(GPC 1×10^3)。48時間培養した後、細胞のGFP発現をフローサイトメトリーにより解析した。

(図4) AAV変種と抗KLH抗体の相互作用を示す。(A) 抗KLH mAbによるAAVライブラリーのスクリーニングにより単離されたAAV変種(H3、B6、F10、A6、D9)のキャプシド 5.0×10^{10} 個および 1.0×10^{10} 個を、ニトロセルロース膜上にドットした。陰性対照として、wtAAVを、ドット当たり $1.0 \times 10^{10} \sim 1.6 \times 10^8$ 個キャプシドの段階希釈物としてスポットした(下のレーン)。同様に、BSAの段階希釈物($1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$)を陰性対照として膜上にスポットした。陽性対照として、KLHタンパク質の様々な希釈物をスポットした($1.0 \mu\text{g} \sim 0.02 \mu\text{g}$)(上のレーン)。膜を、AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗KLH抗体と共にインキュベートし、スポットしたAAV変種に対する抗KLH抗体の結合を、抗マウスIgG () HRPコンジュゲートで検出した。(B) 膜を剥離した後、膜に等量のAAV変種が結合していることをA20 mAbを用いて実証し、スポットされたAAVLPに対するA20 mAbの結合を、抗マウスIgG () HRPコンジュゲートで検出した。

(図5) 抗KLH抗体とAAV変種の構造モチーフの相互作用を示す。未変性キャプシドまたは熱不活化キャプシド(10分、95) 1×10^{10} 個を、ニトロセルロース膜上にスポットした。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 1.6 \times 10^9$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした(下のレーン)。陽性対照として、KLHタンパク質の様々な希釈物をスポットした($1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$)(上のレーン)。膜を、AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗KLH抗体と共にインキュベートし、スポットしたAAV変種に対する抗KLH抗体の結合を、抗マウスIgG HRPコンジュゲートで検出した。

(図6) AAV変種と抗KLH抗体の相互作用(ELISA)を示す。AAV粒子(H3、F10、B6、A6、D9) 5×10^{10} 個を、Maxisorpマイクロタイタープレートにコーティングした。陰性対照として、ウェル当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 7.8 \times 10^8$ 個キャプシドのwtAAVをコーティングした(示さず)。コーティングした粒子を、AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗KLH抗体と共にインキュベートした。固定化AAV変種に対する抗KLH抗体の結合を、基質としてTMB(テトラメチルベンジジン)を用いて、抗マウスIgG HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)コンジュゲートにより検出し、450 nmの吸光度を読み取った。アッセイの閾値を点線で示す。

(図7) AAV変種と抗IgE抗体の相互作用を示す。抗IgE抗体(XOLAIR(登録商標))によるAAVライブラリーのスクリーニングにより単離されたAAV変種(H5、D5、E8、A9、C7、G8) 5.0×10^{10} 個(左側ドット)および 1.0×10^{10} 個(右側ドット)を、ニトロセルロース膜上にスポットした(四角で示す)。変種C7は、キャプシド 1.0×10^{10} 個のみをドットした。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 3.9 \times 10^8$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした(下のレーン)。同様に、BSAの段階希釈物($1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$)を陰性対照として膜上にスポットした。陽性対照として、ヒトIgEタンパク質の様々な希釈物をスポットした($1.0 \mu\text{g} \sim 0.02 \mu\text{g}$)(上のレーン)。(A) 膜を、AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗IgE抗体と共にインキュベートし、スポットしたAAVLPに対する抗IgE抗体の結合を、抗ヒトIgG HRPコンジュゲートで検出した。(B) 等量のAAV変種が膜上にスポットされたことを実証する

10

20

30

40

50

ため、膜を剥離し、スポットされたAAVキャプシドをA20 mAbを用いて検出した。スポットされたAAVLPに対するA20 mAbの結合を、抗マウスIgG () HRPコンジュゲートで検出した。

(図8) AAV変種と抗IgE抗体 対 対照抗体の相互作用を示す。AAV変種H5、E8、D5、A9、G8の粒子 5×10^{10} 個および 1×10^{10} 個(H5は 1×10^{10} 個のみ)を、ニトロセルロース膜上にドットした。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 1.6 \times 10^9$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした(下のレーン)。陽性対照として、ヒトIgEタンパク質またはKLHタンパク質の様々な希釈物($1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$)をドットした(上のレーン)。膜を、(A) AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗IgE抗体、または(B) 対照抗体(抗KLH)と共にインキュベートした。AAV変種に対する抗体の結合を、それぞれの二次HRP標識抗体を用いて検出した。

(図9) AAV変種と抗CETP mAbの相互作用を示す。抗CETP抗体によるAAVライブラリーのスクリーニングにより単離されたAAV変種B8およびC4のキャプシド 5.0×10^{10} 個および 1.0×10^{10} 個を、ニトロセルロース膜上にスポットした。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 3.2 \times 10^9$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした(下のレーン)。同様に、BSAの段階希釈物($1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$)を陰性対照として膜上にスポットした。(A) 膜を、AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗CETP抗体と共にインキュベートし、スポットしたAAV変種に対する抗CETP抗体の結合を、抗マウスIgG HRPコンジュゲートで検出した。(B) 等量のAAV変種が膜上にスポットされたことを実証するために、膜を剥離し、スポットされたAAVキャプシドをA20 mAbを用いて検出した。スポットされたAAVLPに対するA20 mAbの結合を、抗マウスIgG () HRPコンジュゲートで検出した。

(図10) 抗CETP抗体と、AAV2キャプシドの587位に挿入された各CETPエピトープの相互作用を示す。変種AAV-CETP-587-短およびAAV-CETP-587-長のキャプシド 5.0×10^{10} 個、ならびに変種AAV-CETP-453-短およびAAV-CETP-453-長のキャプシド 5.0×10^{10} 個および 1.0×10^{10} 個を、ニトロセルロース膜上にスポットした。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 6.3 \times 10^9$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした。膜を、AAVキャプシドに挿入されたCETPエピトープに対して産生されたポリクローナル抗CETP抗体と共にインキュベートした。スポットしたAAV変種に対する抗CETP抗体の結合を、抗ウサギIgG HRPコンジュゲートで検出した。

(図11) 抗CETP抗体と、AAV1キャプシドのS₅₈₈またはD₅₉₀の後に挿入された各CETPエピトープ(CETP-内部)の相互作用を示す。ウサギCETP-内部エピトープを保有する変種AAV1-CETP-588、rAAV1-GFP-CETP-588、およびrAAV1-GFP-CETP-590のキャプシド $5.0 \times 10^{11} \sim 3.1 \times 10^{10}$ 個の1:2の段階希釈物を、ニトロセルロース膜上にスポットした。対照として、ドット当たり $1.25 \times 10^{11} \sim 7.8 \times 10^9$ 個キャプシドの野生型AAV1、ならびにドット当たり $5.0 \times 10^{11} \sim 3.1 \times 10^{10}$ 個キャプシドの、453および587にCETP挿入(CETP-内部)を有するAAV2(AAV2-CETPin-2x)をスポットした。(A) 膜を、抗AAV1無傷粒子抗体(Progen)と共にインキュベートした。スポットしたAAV変種に対する抗AAV1抗体の結合を、抗マウスIgG HRPコンジュゲートで検出した。(B) 膜を、AAVキャプシドに挿入されたCETPエピトープ(CETP-内部)に対して産生されたポリクローナル抗CETP抗体と共にインキュベートした。スポットしたAAV変種に対する抗CETP抗体の結合を、抗ウサギIgG HRPコンジュゲートで検出した。HRPを、ECLシステム(Pierce)を用いて化学発光により検出した。

(図12) AAV2をワクチン接種したウサギの血清に対するAAV1の結合効率の決定に関するELISAを示す。ウェル当たり $1.0 \times 10^9 \sim 1.56 \times 10^7$ 個キャプシドの段階希釈物として、等量のキャプシドを37 で1時間コーティングした。ウェルを、AAV2をワクチン接種したウサギによる血清(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳で1:400)と共に37 で1時間インキュベートした。450 nmのODを測定した。

(図13) AAV2をワクチン接種したウサギの血清に対するAAV1の結合効率の決定に関するELISAを示す。rAAV2-GFP、rAAV1-GFP、rAAV1-GFP-CETP-588、およびrAAV1-GFP-CETP-590の等量のキャプシド(1×10^9 個)をMaxisorp 96ウェルプレート(Nunc)にコーティングし、AAV2をワクチン接種したウサギによる血清の段階希釈物(1:100 ~ 1:6400)と共にインキュベートした。450 nmのODを測定した。

10

20

30

40

50

(図14) 抗IgE抗体(Bsw17)と、AAV2キャプシドの587位に挿入された各IgEエピトープの相互作用を示す。587位に挿入されたIgEエピトープを表面において提示するAAV変種AAV-Kricekのキャプシド 2.5×10^{10} 個を、ニトロセルロース膜上にドットした。陰性対照として、wtAAVの段階希釈物($5.0 \times 10^{10} \sim 1.6 \times 10^9$ 個)、またはAAV変種D5の段階希釈物($5.0 \times 10^{10} \sim 0.5 \times 10^{10}$ 個)をドットした。陽性対照として、 $1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$ のヒトIgEをドットした。膜を抗IgE mAb Bsw17と共インキュベートし、スポットしたAAV変種に対するBsw17の結合を、抗マウスIgG HRPコンジュゲートで検出した。

(図15) トランスフェクト293細胞のFc RI 発現を示す。293細胞クローンに、ヒトFc RIの鎖および鎖を安定にトランスフェクトした。鎖は、EF1 1プロモーターまたはCMVプロモーターの制御下で発現される。Fc RI の細胞表面発現を、PE標識抗Fc RI mAbを用いてフローサイトメトリーにより解析した。

10

(図16) トランスフェクト293細胞のIgE結合を示す。ヒトFc RIの鎖および鎖を安定に発現する293細胞クローンD11を、IgE結合、およびIgE結合に及ぼす抗IgE抗体(XOLAIR(登録商標)またはBsw17)の影響の評価に使用した。一定濃度の抗IgE抗体または対照抗体(マウスIgG₁)の非存在下または存在下において、細胞を漸増濃度のヒトビオチン標識IgEと共にインキュベートした。IgE結合を、PE標識ストレプトアビジンを用いてフローサイトメトリーにより検出した。

(図17) トランスフェクトRBL2H3細胞のヒスタミン放出を示す。ラットRBL2H3細胞に、ヒトFc RIの鎖を安定にトランスフェクトした。安定にトランスフェクトされた細胞クローンE5を、ヒトIgEによる細胞の感作、およびその後のアナフィラキシー性抗ヒトIgE抗体(Le27)を用いる受容体結合ヒトIgEの架橋によって誘導されるヒスタミン放出の評価に使用した。細胞を漸増濃度のヒトIgEで感作し、アナフィラキシー性抗IgE抗体Le27で刺激した()。ヒスタミン放出を、市販のヒスタミンELISAを用いて測定した。対照においては、細胞を漸増濃度のヒトIgEで感作し、その後Le27で刺激しなかった()。

20

(図18) ヒスタミン放出に及ぼす抗IgE mAbの影響を示す。ヒトFc RIの鎖を安定にトランスフェクトしたラットRBL2H3細胞を、漸増濃度の抗ヒトIgE mAb XOLAIR(登録商標)の非存在下または存在下において、ヒトIgEで感作した。ヒスタミン放出を、アナフィラキシー性抗IgE mAb Le27を用いて受容体結合IgEの架橋により誘導した。ヒスタミン放出を、市販のヒスタミンELISAを用いて測定した。

(図19) -アミロイド特異的抗体による、I-587またはI-453/I-587においてAAV2により提示される -アミロイドエピトープの検出を示す。I-587、I-453およびI-587において -アミロイドエピトープを提示する精製AAV粒子、I-587においてCETPエピトープを提示する精製AAV粒子(陰性対照として)の段階希釈物($2 \times 10^{11} \sim 2 \times 10^8$ 個キャプシド)、ならびに -アミロイドペプチド(aa 1-42、Biosource、陽性対照として) $1 \mu\text{g} \sim 1 \text{ng}$ を、膜上にドットした。 -アミロイドエピトープを、抗 -アミロイドmAb 6E10(Chemicon)および二次抗体としてのペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(CALTAG)を用いて検出した。化学発光によりシグナルを検出した。

30

(図20) AAVベースのワクチン 対 ペプチドベースのワクチンによる自己抗体の誘導を示す。ウサギ(n=2)に、アジュバントの存在下で、AAVベースのCETPワクチンAAV-TP11、AAV-TP12、AAV-TP13、またはAAV-TP18を皮下免疫した。AAVベースのCETPワクチンを、LPH(アメリカカブトガニ(Limulus polyphemus)ヘモシアニン)に結合させた同じエピトープを含む対応するペプチドワクチンと比較した。免疫血清中のCETP自己抗体の力価を、2回目(灰色)および3回目(黒色)の追加免疫後に測定した。

40

(図21) AAVベースのワクチン 対 ペプチドベースのワクチンによるエピトープ特異的抗ペプチド抗体の誘導を示す。ウサギ(n=2)に、アジュバントの存在下で、AAVベースのCETPワクチンAAV-TP11、AAV-TP12、AAV-TP13、またはAAV-TP18を皮下免疫した。AAVベースのCETPワクチンを、LPHに結合させた同じエピトープを含む対応するペプチドワクチンと比較した。免疫血清中の、エピトープ(線状エピトープ)に対して産生された抗体の力価を、2回目(灰色)および3回目(黒色)の追加免疫後に測定した。

(図22) 未変性のおよび熱変性したAAVベースのワクチンによる自己抗体の誘導を

50

示す。ウサギ(n=4)に、アジュバントの存在下で、未変性の(灰色)または熱変性した(黒色)AAVベースのCETPワクチンAAV-TP11 2xまたはAAV-TP18 2xを皮下免疫した。免疫血清中のCETP自己抗体の力価を、1回目の追加免疫後に測定した。

(図23) AAV2ベースのワクチンによる免疫に及ぼす抗AAV2抗体の影響の評価を示す。(A) AAV2ベースのワクチンの免疫化の成功に及ぼす抗AAV2抗体の影響を評価するために、ウサギ(n=3)に、wtAAV2 4.5 µgを2回適用する(皮下または筋肉内)ことにより予備免疫した。2回目の適用の2週間後に、血清を抗AAV2抗体のレベルについて解析した。対照群(n=2)には、wtAAV2を予備免疫しなかった。(B) wtAAV2による予備免疫後に、ウサギにAAV2ベースのワクチンAAV-TP18(7.2 µg/適用)をワクチン接種した。アジュバントの存在下で、ワクチンを皮下または筋肉内投与した。1回目の追加ワクチン接種の2週間後に、血清をCETP自己抗体のレベルについて解析した。結果を、wtAAV2で予備免疫しなかった動物のワクチン接種(皮下)と比較した。

10

(図24) AAVベースのワクチンの異なる初回刺激/追加免疫投与計画の評価を示す。3つの異なる初回刺激/追加免疫投与計画を評価した。A群には、AAV2-CETin-2xの初回刺激適用を1回および追加免疫適用を3回付与した(AAV2ベースのワクチン接種)。B群には、AAV2-CETin-2xによる刺激免疫1回および追加免疫1回、ならびにその後のLPH結合CETP-内部ペプチドによる追加免疫2回を付与した(LPH-ペプチド追加免疫)。C群には、AAV2-CETin-2xによる刺激免疫1回および追加免疫1回、ならびにその後のAAV1-CETinによる追加免疫2回を付与した(転換AAV2ベース/AAV1ベースのワクチン)。2回目(灰色)および3回目(黒色)の追加免疫の2週間後に、免疫血清を抗CETP反応性(CETP自己抗体価)について解析した。

20

(図25) AAV2ベースのワクチンによる免疫化に及ぼすMontanide ISA 51の影響の評価を示す。ウサギ(n=2)に、アジュバントMontanide ISA 51の存在下で、CETPワクチンAAV-TP18を筋肉内または皮下免疫した。対照群には、Biogenesにより提供されるアジュバントの存在下で、同じワクチンを皮下免疫した。1回目(白色)、2回目(灰色)、および3回目(黒色)の追加免疫の2週間後に、免疫血清を抗CETP反応性(CETP自己抗体価)について解析した。

(図26) AAV1骨格を用いるCETPに対するワクチン接種を示す。ウサギ(n=2)に、1-588位にウサギCETP-内部を保有するAAV1粒子を免疫した。粒子(11.7 µg/ワクチン接種)を、Biogenesにより提供されるアジュバントの存在下で、各刺激免疫または追加免疫において筋肉内投与した。1回目(灰色)および2回目(黒色)の追加免疫の2週間後に、免疫血清を抗CETP反応性について解析した。

30

(図27) ヒト α -アミロイドに対するワクチン接種を示す。ウサギ(n=2)に、1-587位にヒト α -アミロイドエピトープ(aa 1-9, DAEFRHDSG, SEQ ID NO: 158)を保有するAAV2粒子を免疫した。粒子(1 µg/適用)を、Biogenesにより提供されるアジュバントの存在下で、各刺激免疫または追加免疫において皮下投与した。1回目(白色)、2回目(灰色)、および3回目(黒色)の追加免疫の2週間後に、免疫血清を抗 α -アミロイド(A α 1-42)反応性について解析した。

(図28) ヒトIgEに対するワクチン接種を示す。ウサギ(n=2)に、1-587位にヒトIgEエピトープ(「Kricek」)を保有するAAV2粒子を免疫した。対照群においては、ウサギに、LPHに結合させた同じIgEエピトープ(LPH-Kricek)を免疫した。1回目(白色)、2回目(灰色)、および3回目(黒色)の追加免疫の2週間後に、免疫血清を抗IgE反応性について解析した。n.d.: 未検。

40

(図29) IgE由来ペプチドによるウサギのワクチン接種を示す。ウサギ(n=2)に、合成Tヘルパーエピトープに結合させたヒトIgE由来エピトープ(GETYQSRVTHPHLPRALMRSTTK, SEQ ID NO: 236)

(Wangペプチド)を免疫した。別の群のウサギには、担体タンパク質としてのLPHに結合させたエピトープの短縮変種「Wang-CS」(LPH-Wang-CS)を免疫した。2回目(灰色)および3回目(黒色)の追加免疫の2週間後に、免疫血清を抗IgE反応性について解析した。

(図30) 抗IgE抗体のアナフィラキシー特性の評価を示す。好塩基球のIgE媒介性脱

50

顆粒に及ぼす抗IgE抗体(Wangペプチド、AAV-Kricek、AAV-3DEpi3、またはAAV-Flexによるウサギの免疫化に由来)の影響を、ヒトFc RIの鎖を過剰発現するRBL2H3細胞を用いて調べた。細胞を250 ng/mlヒトIgEとのインキュベーションにより感作し、その後3 mg/ml全IgGの濃度のポリクローナル抗IgE抗体(免疫ウサギの全IgG画分)で刺激した。陽性対照として、アナフィラキシー性モノクローナル抗IgE抗体Le27(15 ng/ml)を使用した。非関連免疫化(すなわち、CETPまたは -アミロイドに対するワクチン接種)に由来するウサギ全IgGを、陰性対照として使用した。ヒスタミン放出を、市販のヒスタミンELISA(Neogen)を用いて測定した。

(図31)抗IgE抗体のIgE中和特性の評価を示す。ウサギのワクチン接種により誘導されたポリクローナル抗IgE抗体がIgEを中和し得るかどうかを評価するために、好塩基球のIgE媒介性脱顆粒に及ぼす抗IgE抗体の影響を調べた。ヒトIgE(250 ng/ml)を、3 mg/mlポリクローナル抗IgE抗体(Wangペプチド、AAV-Kricek、AAV-3DEpi3、またはAAV-Flexを免疫したウサギの全IgG画分)と共にプレインキュベートした。陽性対照として、IgE(250 ng/ml)をXolair(1 µg/ml)と共にプレインキュベートした。非関連免疫化(すなわち、CETPまたは -アミロイドに対するワクチン接種)に由来するウサギ全IgGを、陰性対照として使用した。ヒトFc RIの鎖を過剰発現するラット好塩基球RBL2H3細胞を、ヒトIgE/抗IgE複合体とのインキュベーションにより感作した。アナフィラキシー性モノクローナル抗IgE抗体Le27を、受容体結合IgEの架橋に使用した。IgE媒介性ヒスタミン放出を、市販のヒスタミンELISAを用いて測定した。

(図32)抗CETP抗体と、AAV2キャプシドの異なる挿入部位に挿入された各CETPエピトープの相互作用を示す。表示の挿入部位にCETPエピトープ「CETP-内部」を保有する異なるAAV変種のキャプシド 1.0×10^{11} 個および 5.0×10^{11} 個を、膜上にドットした(上のパネル)。陰性対照として、I-587位にCETPエピトープTP10を有するAAV粒子をスポットした(AAV-TP10)。陽性対照として、I-453位およびI-587位にCETP-内部エピトープが組み込まれたAAV2変種(AAV2-CETIn-2x)をスポットした(下のパネル)。膜を、CETP-内部エピトープに対して産生されたポリクローナル抗CETP抗体と共にインキュベートした。スポットしたAAV変種に対する抗CETP抗体の結合を、抗ウサギIgG HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)コンジュゲートで検出した。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下の定義は、本発明の産物、方法、および使用との関連において、規定の用語がどのように解釈されるべきかを説明する。

【0022】

「構造タンパク質」とは、ウイルスのキャプシドの一部であるタンパク質を意味する。パルボウイルスに関して、構造タンパク質は一般的にVP-1、VP-2、および/またはVP-3と称される。

【0023】

「変異構造タンパク質」とは、野生型ウイルスの各構造タンパク質と比較して、少なくとも1つの変異を有する構造タンパク質を意味する。

【0024】

「パルボウイルス」とは、2つの亜科であるパルボウイルス亜科(パルボウイルス、エリスロウイルス、ディペンドウイルス、アムドウイルス、およびボカウイルス)およびデンソウイルス亜科(デンソウイルス、イテラウイルス、プレビデンソウイルス、ペフデンソウイルス、およびコントラウイルス)に分類されるいくつかの属を含むパルボウイルス科のメンバーを意味する(Fields: Virology, fourth edition 2001, Volume 2, chapters 69 and 70, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia; <http://virus.Stanford.edu/parvo/parvovirus.html> http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_parvo.htm#SubFamily1)。好ましいパルボウイルスは、AAV1、AAV2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV10、AAV11、AAV12、ウシAAV(b-AAV)、イヌAAV(CAAV)、イヌパルボウイルス(CPV)、マウスパルボウイルス、マウスの微小ウイルス(MVM)、B19、H1、トリAAV(A

AAV)、ネコ汎白血球減少症ウイルス(FPV)、およびガチョウパルボウイルス(GPV)などの、パルボウイルス属のメンバーである。

【0025】

好ましいパルボウイルスは、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ウシAAV(b-AAV)、イヌAAV(CAAV)、イヌパルボウイルス(CPV)、マウスの微小ウイルス(MVM)、B19、H1、AAAV、ネコ汎白血球減少症ウイルス(FPV)、およびガチョウパルボウイルス(GPV)である。特に好ましいのは、AAV1、AAV2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV10、AAV11、またはAAV12、特にAAV2である。

【0026】

「結合剤」という用語は、その各結合パートナーに特異的に結合する分子を指す。一般的に用いられる結合剤は、抗体、特にモノクローナル抗体、一本鎖抗体または抗体断片などの抗体誘導体である。原理的にはいかなるクラスの抗体も用いることができるが、好ましいのはIgG抗体である。抗体の断片または多量体も同様に用いることができる。一般的に用いられる断片は、一本鎖抗体、Fab断片、または(Fab)₂断片である。他の適切な結合剤の例は、アンチカリンもしくはリポカリンなどのタンパク質骨格(Nygren and Skerra, 2004)、受容体もしくはその一部(例えば、可溶性T細胞受容体)、アンキリン、マイクロボディー、またはアプタマーである。

【0027】

「特異的に結合する」という用語は、2つの分子AおよびB、好ましくはタンパク質が、少なくとも $K_D = 1 \times 10^{-5}$ mol/l、好ましくは 1×10^{-7} mol/l、より好ましくは 1×10^{-8} mol/l、特に 1×10^{-9} mol/lという親和性($K_D = k_{off}/k_{on}$)で互いに結合し、それによって複合体ABを生じることを意味する。

【0028】

本発明の産物、方法、および使用との関連における「抗原」という用語は、それに対して免疫応答が誘導されるはずである任意の標的抗原を指す。そのような標的抗原は通常、液性免疫応答の影響を受けやすい。それらは通常、例えばグリコシル化タンパク質のように、翻訳後修飾され得るタンパク質である。好ましい抗原は、血清タンパク質、血中で少なくとも特定の条件下で(例えば、疾患状態において)見出され得るタンパク質(例えば、CETP、IL-6、IL-17、TNF-)、および膜タンパク質、特に受容体タンパク質(例えば、CD20、アセチルコリン受容体、IL13R、EGFR)である。特に好ましい抗原は、IgE、腫瘍抗原(例えば、Melan A、高分子量メラノーマ関連抗原(HMW MAA)、CA125、IL13R、Her2/NEU、L1細胞接着分子)、VEGF、EGFR、CD20、IL-9、IL-13、CETP(コレステリルエステル転送タンパク質)、TNFファミリーメンバー(例えば、TNF-)、インターロイキン(IL-6、IL-17)、またはタンパク質凝集を引き起こし、ひいてはコンホメーション病をもたらす誤って折りたたまれたタンパク質(総説に関しては、Uversky et al., 2006を参照されたい)、例えば、 α -アミロイド)である。パルボウイルス抗原、すなわち、例えばB19に由来する未変異パルボウイルス自体に固有の抗原は、「抗原」の上記定義から除外される(Klenerman et al., 2002)。

【0029】

本発明との関連における「異種の」とは、パルボウイルス野生型ウイルスキャプシドおよび/または構造タンパク質上に存在しないペプチド配列、例えばエピトープを意味する。

【0030】

「寛容原」とは、その天然環境において液性免疫系に接触可能な自己抗原である。これは分泌される場合もあれば、またはさもなくば生細胞から放出される、もしくは細胞膜の外表面に会合している、もしくは細胞膜内に組み込まれている場合もある。一般的に言えば、寛容原は、同じ抗原に対する以前の曝露によって起こる抗原に対する寛容のために、例えば自己免疫疾患とは対照的に正常な環境において特異的免疫応答を誘発しない。寛容は、中枢性寛容または末梢性寛容によって起こり得る。中枢性寛容とは、対応する抗原が胸腺においてT細胞に曝露され、特異的T細胞の除去が起こった寛容原を指す。末

10

20

30

40

50

梢性寛容は、一般的に炎症によって提供される適切な付加的刺激なしで、抗原/エピトープ/ミモトープ/パラトープがT細胞に対して提示され、アネルギーを引き起こした場合に起こる。さらに、寛容原が、制御性B細胞応答をある程度誘導し得ることが認められている(Vogel et al., 2004)。

【0031】

1つの好ましい態様において、本発明は、末梢性寛容に起因する寛容原、好ましくは腫瘍抗原/エピトープ/ミモトープ/パラトープに由来する寛容原に関する。本発明によって包含される寛容原には、ペプチド、核酸、炭水化物、および脂質、好ましくはペプチドが含まれる。

【0032】

好ましい寛容原は、細胞、特に腫瘍細胞の表面上の抗原、例えば受容体、特に増殖因子受容体、腫瘍抗原、ウイルス受容体、CD20、アセチルコリン受容体、インターロイキン受容体である。さらなる好ましい寛容原は、インターロイキン、IgE、サイトカイン、免疫グロブリン、補体因子、CETP、およびVEGFなどの血中タンパク質であってよい。

【0033】

本発明の産物、方法、および使用との関連における特異的寛容原の「寛容原由来エピトープ」とは、

- i) 寛容原のB細胞エピトープと同じ、
- ii) 寛容原のB細胞エピトープに結合する抗体と交差反応する、寛容原のB細胞エピトープの誘導体(例えば、変異体)、
- iii) 寛容原のB細胞エピトープのミモトープ、および/または
- iv) 寛容原のB細胞エピトープのパラトープである

B細胞エピトープを指す。

【0034】

寛容原由来エピトープの長さは、典型的に4~30、好ましくは5~20、最も好ましくは5~15アミノ酸である。

【0035】

寛容原のB細胞エピトープの誘導体は、1つまたは複数のアミノ酸置換、好ましくは1つまたは複数の保存的アミノ酸置換、すなわちそれらの側鎖および化学的特性において関連があるアミノ酸のファミリー内で起こる置換によって作製され得る。そのようなファミリーの例は、塩基性側鎖、酸性側鎖、非極性脂肪族側鎖、非極性芳香族側鎖、非荷電極性側鎖、小側鎖、大側鎖等を有するアミノ酸である。さらに、誘導体は、1つまたは複数の単一アミノ酸欠失および/または挿入によっても得られ得る。

【0036】

B細胞エピトープと特異的モノクローナル抗体との「交差反応(crossreaction、crossreact)」とは、本発明によると、エピトープと抗体との親和性(K_D)が、B細胞エピトープをその誘導体と比較した場合に2桁以内、好ましくは1桁以内であることを意味する。

【0037】

本発明によるパルボウイルス変異構造タンパク質を含む多量体構造内の寛容原由来エピトープは、それらの天然環境において免疫系に接触可能な、寛容原の同じ、類似の、または模倣の抗原伸長、例えば細胞外部分に位置する膜タンパク質、血清タンパク質、免疫グロブリン、プラークタンパク質のエピトープである。そのような抗原伸長は、好ましくは、哺乳動物、好ましくはヒトの体内でそのようなタンパク質の表面上に位置する。

【0038】

「ミモトープ」とは、抗体が特異的に結合するキャプシドの全体的な三次元構造のために、近接して位置する構造タンパク質の線状配列の異なる領域に由来するいくつかのアミノ酸から構成される非線状構造エピトープ、または構造タンパク質の非連続的エピトープを模倣する線状エピトープである。

【0039】

「パラトープ」とは、抗体側の、特異的に結合する抗原結合部位である。

10

20

30

40

50

【0040】

本発明との関連におけるミモトープまたはパラトープは、挿入ペプチド配列(の一部)のみからなってもよいし、または挿入ペプチドとパルボウイルスコア粒子アミノ酸残基から構成されてもよい。

【0041】

アミノ酸の「挿入」とは、一般的に言えば、パルボウイルス構造タンパク質の本発明のための配列中への少なくとも1つの異種アミノ酸の挿入である。この関連における「異種の」とは、パルボウイルス構造タンパク質の由来元であるウイルスと比較して異種であることを意味する。挿入アミノ酸は、パルボウイルス構造タンパク質の2つの所与のアミノ酸の間に単純に挿入され得る。アミノ酸の挿入はまた、挿入部位においてパルボウイルス構造タンパク質の所与のアミノ酸の欠失を伴い、パルボウイルス構造タンパク質のアミノ酸の完全置換(例えば、10個の所与のアミノ酸が、10個またはそれ以上の挿入アミノ酸により置換される)、または部分置換(例えば、10個の所与のアミノ酸が8個の挿入アミノ酸により置換される)をもたらす得る。

10

【0042】

本発明は、抗原の結合剤に特異的に結合し得るパルボウイルス変異構造タンパク質を同定する方法に関し、本方法は、(a) 少なくとも1つの変異型パルボウイルス構造タンパク質を発現するパルボウイルスピリオンのライブラリーを提供する段階、(b) 抗原の結合剤を提供する段階、(c) 結合剤に特異的に結合する少なくとも1つのパルボウイルスピリオンを選択する段階、および(d) (i) 段階c)で選択されたパルボウイルスピリオンのパルボウイルス変異構造タンパク質もしくはその変異部分、または(ii) 段階c)で選択されたパルボウイルスピリオンのパルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子もしくはその変異部分を同定する段階を含む。次いで、同定された遺伝子またはその変異部分を細胞で発現させて、パルボウイルス変異構造タンパク質またはその変異部分を得ることができる。

20

【0043】

同定のために、パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子またはその変異部分を細胞内に導入することができ、結合剤に結合し得るパルボウイルス変異構造タンパク質を産生する細胞を同定することができる。パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子またはその変異部分は、その遺伝子を細胞内に導入することによりクローニングすることができ、結合剤に結合し得るパルボウイルス変異構造タンパク質を産生する細胞クローンを同定することができる。加えてまたはあるいは、パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子は、結合したピリオンを得る段階、ピリオン内に含まれるDNAを任意に増幅する段階、および配列決定する段階という個々の段階を含めて、配列決定することができる。配列決定は、例えば、挿入物を含むパルボウイルス構造タンパク質の少なくとも一部のPCR増幅後に、標準的な方法によって行うことができる。増幅産物をプラスミドにクローニングすることができ、プラスミドを細菌に形質転換することができる。単一のクローンを配列決定することができ、次にこの配列情報を用いて、クローン起源のAAV粒子を作製することができる。

30

【0044】

AAVの場合には、同定されたキャプシド配列を標準的なAAVヘルパープラスミド、または完全AAVゲノムを含むプラスミドにクローニングすることができる。例えば、AAV2の587挿入部位には、同定されたペプチドコード配列を異なるVP発現ベクターにサブクローニングするために使用できるNotI/AscI制限部位が隣接している。あるいは、BsiWI、およびcap ORFの3'側のベクター骨格を切断する第2制限酵素(例えば、pUC19中のXmaI)により、VP3の大部分をサブクローニングすることができる。

40

【0045】

好ましい態様において、本発明の方法の段階c)で選択された少なくとも1つのパルボウイルスピリオンは、適切な条件下での産生細胞におけるウイルス複製およびそれに続くパッケージングにより増幅し、段階b)~c)を少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、また

50

は10回、好ましくは1、2、3、4、または5回繰り返す。任意に、パルボウイルスピリオンの選択された混合物の遺伝子型と表現型を連関させる段階は、ライブラリー全体の連関に関して以下に記載する通りに行うことができる。

【0046】

そのようなパルボウイルス変異構造タンパク質を同定する一般的原理は、キャプシド表面上にランダムペプチドを提示するウイルスのライブラリーを用いて行うというものである。使用した結合剤、例えば抗体に結合し得るウイルスキャプシド変異体を選択し、これを増幅することができ、これを新たな選択ラウンドに再び使用する。各選択ラウンド後に、選択された配列を解析することができる。選択されたパルボウイルス変異構造タンパク質クローンおよび/またはその各核酸配列を次に用いて、薬剤、すなわちワクチンを作製する。

10

【0047】

本発明の同定段階を行うための好ましい結合剤は、Fab断片または(Fab)₂断片である。IgG抗体全体を用いる場合には、培養プレートなどの支持体に対する抗体の結合はランダムに起こり、その結果、ライブラリーはIgG抗体の様々な部分(例えば、所望のイディオタイプ、または望ましくない事象である大きなFc部分)に曝露されることになる。そのため、抗体イディオタイプにのみ結合するのではなく、IgG抗体の他の部分にも結合し得るAAV粒子が、最終的に単離される。これは、Fab断片または(Fab)₂断片のみを用いることによって回避することができる。特異的モノクローナル抗体に関してそのような断片が市販されていない場合には、市販のキットによりIgG抗体全体からそれらを作製することができる。

20

【0048】

いかにして結合を行い得るかという選択肢も存在する。1つの態様では、好ましくは直接またはリンカーを介して担体上に固定化された結合剤を用いて、選択段階を行う。そのようなリンカーは、結合剤の第2部位(第1部位は、ライブラリーのスクリーニングに用いられる部位である)を介して、支持体または例えば12ウェルプレートの表面に連結させることができ、例えば結合剤として抗体を用いる場合には、プロテインAまたはGセファロースなどのFc特異的リンカー、Fc特異的抗体または断片を介する。表面に対するリンカーを介した結合剤の結合は、結合剤が、パルボウイルス変異構造タンパク質の非特異的結合を回避できる定方向様式で結合するという利点を有する。この手段によって、主に抗体のイディオタイプがライブラリーの粒子に曝露される。

30

【0049】

本発明の方法に使用する支持体または表面は、ペトリ皿、12ウェルプレート等の表面であってよいが、CNBr活性化セファロースのような適切なクロマトグラフィー材料であってもよい。後者の場合には、懸濁状態でクロマトグラフィー材料を使用するバッチ法を用いることができる。

【0050】

あるいは、選択段階は、結合剤を懸濁状態で用いて行う。この場合、結合剤およびパルボウイルス変異構造タンパク質は懸濁状態で複合体を形成することができ、これはインピボでの状況を最もよく反映する。そのような複合体は、Fc特異的抗体または抗抗体アフィニティークロマトグラフィーによる標準的な免疫沈降を用いて沈殿させることができる。さらに、セファロースA/Gカラムにより、結合剤を捕獲することができる。標準的な免疫沈降の代わりに、選択抗体に、または改変パルボウイルス粒子に結合する任意の結合剤に結合させた磁気ビーズを用いて、ライブラリープールの中から所望の改変物を単離することもできる。

40

【0051】

いずれの方法においても、少なくとも1回の洗浄段階を加えて、非結合のまたは弱く結合したパルボウイルス変異構造タンパク質を除去することにより、選択段階の特異性を高めることができる。適切な洗浄条件は、例えば、高塩濃度またはTweenなどの界面活性剤の使用である。

50

【0052】

さらに、選択されたパルボウイルスピリオンを、第2の結合剤に対する非結合に関してさらに選択する。そのような結合剤は、例えば、各コア粒子を中和する抗体に由来し得る。別のクラスの結合剤は、挿入ペプチド配列を含まない同じパルボウイルスピリオンによって誘導される抗体である。選択のこの手段により、望ましくない免疫優性エピトープが排除され得る。

【0053】

遺伝子の細胞への導入は、好ましくは、DNAの取り込みが感染経路から独立しており、以下にさらに詳述する非特異的取り込み(例えば、飲作用または食作用)を介して起こる条件下で行う。

【0054】

あるいはまたはさらに、選択段階は、所望のパルボウイルス変種を選択するために用いられる最適な結合剤の特異的受容体を発現する細胞上で行うことができる。例えば、IgG抗体のFc部分を含む任意の結合剤に特異的であるFc RI受容体を発現する細胞を用いることができる。この例に関しては、そのようなFc RI発現細胞に、パルボウイルスのライブラリープールを導入することができる。最初に、陰性選択を行って、結合剤とFc RIとの相互作用から独立してそれら自体で細胞に導入され得るパルボウイルス候補の非特異的選択を回避することができる。そのため、Fc RI発現細胞をライブラリープールと共にインキュベートする。上清(細胞に導入され得ないパルボウイルスのプール)を回収し、続いて最適な結合剤(例えば、選択抗体)と共にインキュベートして、陽性選択を行う。陽性選択において、結合剤で修飾されたパルボウイルスは、細胞表面上のFc RIに対する結合剤の付着を介して、Fc RI発現細胞に導入され得る。次いで、導入された細胞を用いて、粒子を増幅することができる。

【0055】

選択されたパルボウイルス変異構造タンパク質の結合剤に対する特異的親和性または結合活性は、(e) パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする遺伝子をランダム化する段階、(f) ランダム化遺伝子をパルボウイルスのさらなるライブラリー中にパッケージングする段階、および(g) 上記選択法の段階(a)~(d)を繰り返す段階というさらなる段階によって、さらに高めることができる。

【0056】

好ましい態様において、パルボウイルス変異構造タンパク質は、構造エピトープ、ミモトープ、またはパラトープの形成に起因して、例えば抗原の結合剤に対する各ウイルス粒子の全体的な結合活性または親和性に直接または間接的に寄与するその変異アミノ酸残基により、各パルボウイルス野生型構造タンパク質と比較して、少なくとも1つのランダム変異をさらに含む。

【0057】

キャプシドタンパク質のさらなる変異は、例えば、i) 同じ標的抗原のさらなるまたはなお同じB細胞エピトープ、および/またはii) 1つもしくは複数のさらなる標的タンパク質のB細胞エピトープ(多標的ワクチン)、所望の T_{H1} 免疫応答をさらに促進するためのTヘルパー1(T_{H1})エピトープ、抗原提示細胞を標的化するためのペプチド配列を導入するのに、またはコア粒子の免疫原性が軽減されたキャプシド変異体を得るのに適切であり得る。後者は、効率的な初回刺激/追加免疫投与計画を設定するための1つの可能性となり得る。

【0058】

さらなる好ましい態様において、さらなる変異は、少なくとも1つの細胞傷害性T細胞エピトープ(CTLエピトープ)を導入するのに適切であり得る。感染症および癌のいずれに関しても、これらの疾患と闘うためには、液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を併用することが最も有用である。本発明による多量体構造は、原理的には細胞に偽感染し得る。したがって、これらの構造は、ウイルスのように細胞内に侵入することができ、ペプチドにプロセッシングされ、このペプチドはMHCクラスIおよびII分子上に負荷され、最終的にCD8陽性またはCD4陽性T細胞に提示される。T細胞は、MHCクラスIまたはII分子によ

10

20

30

40

50

て提示された、そのようなプロセシングされたペプチドの特異的認識後に、刺激される。そのような刺激の結果として、CD8細胞は細胞傷害性T細胞に分化し、ひいては細胞性免疫応答を引き起こし得る。CD4細胞はヘルパーT細胞に発達することができ、この細胞はB細胞を刺激して液性免疫応答を提供するか、またはCD8陽性T細胞を刺激して細胞傷害性免疫応答を提供し、それ自体は、感染細胞ならびに同じペプチドを保有および提示している他の細胞の溶解を引き起こし得る。種々の癌抗原またはウイルス抗原に関して、適切なCTLエピトープが当技術分野で公知であり、またはそれらは、例えば、http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/の下でParkerによるペプチド予測プログラム{Parker, 1994 # 865}を用いて、所与の抗原配列から予測することができる。HPV-エピトープに関して、US 6,838,084、実施例2~8(参照により本明細書に組み入れられる)で例証される方法に従って、提唱されるCTLエピトープを検証することができる。CTLエピトープのプロセシングは細胞内で起こるため、そのようなCTLエピトープは表面上に存在するか、または特異的立体構造内に存在する必要はない。

10

20

30

40

50

【0059】

特に直接的なB細胞受容体(BCR)架橋がB細胞のT細胞非依存性刺激および自己抗原に対する寛容の遮断に必要であるという状況において、多数の同じペプチドをキャプシドの表面上に最適に提示させることが重要である場合に、同じB細胞エピトープを2つの挿入部位、特にI-587およびI-453に挿入するというのは、本発明の好ましい態様である。B細胞エピトープの密度が高いと、BCR間の規定の距離(例えば、約5~10 nm)、およびひいてはバルボウイルスキャプシド上に提示されている各B細胞エピトープを必要とする最適なペプチド特異的BCR架橋の可能性が高くなる。本発明において示される通り(図19)、同時にバルボウイルスキャプシドの2つ(またはそれ以上)の異なる部位にこの場合 -アミロイドエピトープ という同じものを挿入すると、挿入部位I-453およびI-587に挿入されたエピトープ、この場合 -アミロイドエピトープを特異的に認識する抗体に対するキャプシドの親和性が高まり得る。結果として、この場合には、挿入ペプチドはB細胞エピトープ、より好ましくは寛容原由来エピトープであることが好ましい。したがって、同じペプチドをI-453およびI-587に挿入すること、ならびにこのペプチドがB細胞エピトープ、最も好ましくは寛容原由来エピトープであることは、本発明の特に好ましい態様である。

【0060】

さらなる好ましい二重挿入変種は、I-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587の考えられるすべての組み合わせ、好ましくはI-261とI-587の組み合わせおよびI-261とI-453の組み合わせである。

【0061】

さらに、多数の挿入B細胞エピトープによって、i) 天然バルボウイルスB細胞エピトープ/ミモトープがマスクされるため、および/またはii) わずかな構造キャプシドの変化がこれらの天然B細胞エピトープ/ミモトープの免疫原性を軽減するため、バルボウイルス骨格に対する望ましくない免疫応答の可能性が低くなる。したがって、少なくとも3つの挿入を含むバルボウイルス構造タンパク質が特に好ましい。

【0062】

好ましい態様において、ライブラリーの各ビリオン粒子の遺伝子型と表現型は連関している。これは、ビリオンのゲノム変異体が同じビリオンの表現型変異体と同一であるということ、または言い換えると、各構造改変ウイルスがその構造タンパク質変異体をコードするということを意味する。

【0063】

1つの細菌細胞によって1つのバクテリオファージしか取り込まれない細菌の形質転換とは対照的に、真核細胞のトランスフェクション法を用いると、1つの細胞につき多くのDNAコピー(最大 1×10^6)が取り込まれ得る(Dean et al., 2005)。したがって、AAVライブラリーの場合、1つの細胞が何千ものAAVゲノムを同時に複製することができ、各ゲノムは、異なるペプチド配列がAAVのVP-1、VP-2、および/またはVP-3中に挿入されている異なる変異構造タンパク質を発現し得る。これらの構造タンパク質の少なくともいくつかは、細胞内

に存在する何千ものAAVゲノムのうち1つのみをキャプシド封入している完全なウイルスキャプシド(VP-1タンパク質5個、VP-2タンパク質5個、およびVP-3タンパク質50個からなる)を構築することができる。遺伝子型/表現型連関ライブラリーの場合、得られたAAV粒子の少なくとも10%、好ましくは25%超、特に50%超が、そのキャプシドを構成する60個のVPタンパク質の少なくとも25%、好ましくは50%超、特に80%超をコードするキャプシド封入ゲノムを有する。結果として、非連関ライブラリーを標的抗体に対する第1スクリーニングに使用した場合、スクリーニングされた粒子がこの特異的ペプチド配列をコードするゲノムを含む機会は、非常に低いと考えられる。

【0064】

一般的に、遺伝子型/表現型連関ビリオン粒子/ライブラリーは、ウイルスゲノムの単一コピーを各ビリオン産生細胞中に導入し、これが細胞核に侵入する場合に得られる。この細胞は、まさに挿入されたゲノムにコードされるキャプシドタンパク質変種のみを産生し、このゲノムは複製されて、その後変異ビリオン粒子内にパッケージングされる。種々の実験設定で、これを確認することができる。

10

【0065】

パルボウイルスビリオンの遺伝子型/表現型連関ライブラリーを得るためには、遺伝子型/表現型連関ビリオン/ライブラリーをもたらす、100ゲノム/細胞以下、好ましくは10ゲノム/細胞以下、より好ましくは1ゲノム/細胞以下の低コピー数のウイルスゲノムを用いる適切な条件下で、プラスミドライブラリーを産生細胞にトランスフェクトすることにより、パルボウイルスビリオンのライブラリーを作製する。トランスフェクトしようとする細胞当たりの理想的なウイルスゲノム数には、全体的なトランスフェクション効率が最終的に決定的である。

20

【0066】

例えば、GFPなどのレポーター遺伝子をコードする、ウイルスゲノムと類似の大きさを有する自己複製プラスミドをモデル系として用いれば、必要なウイルスプラスミド量を定量することができる。自己複製プラスミドは、例えば、SV40複製開始点およびラージT抗原、またはEBV(エプスタイン・バーウイルス)P1開始点およびEBNAを含む系である。自己複製レポーター遺伝子プラスミドの漸増量を、全DNA量を一定に保つ空プラスミドDNA(例えば、pUC誘導体)などの担体DNAと同時にトランスフェクトする。理論的には、レポーター遺伝子プラスミドをトランスフェクトされた各細胞は、その自己複製のために、検出されるべき十分量のレポータータンパク質を発現する。レポーター遺伝子ベクターと担体DNAのある比率では、レポーター遺伝子プラスミドが増加するほどに、トランスフェクト細胞の数も対応して増加する。この手段により、理想的なベクターゲノム量を反映させる形で、理想的な自己複製レポーター遺伝子プラスミド量を決定することができる。

30

【0067】

同様に、トランスフェクションに成功した細胞を検出するための別の読み取り系は、単一細胞のレベルで、トランスフェクトされたプラスミドゲノムを検出するためのインサイチューPCRなどの方法である。

【0068】

あるいは、細胞当たりのゲノムの比が5~5,000、好ましくは10~1,000、より好ましくは50~300、特に約100である適切な条件下で(非連関または部分的連関)ビリオンライブラリーを産生細胞に導入し、遺伝子型/表現型連関ビリオン/ライブラリーをもたらす、特に飲作用および/または食作用を介した非特異的取り込みによる、感染経路から独立している導入条件を選択することにより、パルボウイルスビリオンの遺伝子型/表現型連関ライブラリーを作製することができる。AAV2のI-587部位へのペプチド挿入は、HeLa細胞または293細胞などのHSPG受容体含有細胞の効率的感染に必要なヘパリン結合モチーフを破壊する場合が多い(挿入ペプチドの配列に依存する)ことが知られているため、単純な感染法ではスクリーニング法にバイアスがかかり、特異的に各受容体を介して、AAV2の場合にはヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)を介して、HeLa細胞になお侵入し得る変異体しか得られ得ない。したがって、産生細胞によるウイルス粒子の非特異的取り込みが有利である

40

50

。このような非特異的取り込みは、固定化パルボウイルスピリオン上に産生細胞を播種することにより、達成することができる。したがって、好ましい態様は、固定化パルボウイルスピリオン上に播種した産生細胞を用いて、パルボウイルスピリオンライブラリーの導入を行う方法に関する。この方法のため、ピリオンを支持体/表面、例えば組織培養プレートに直接コーティングする。あるいは、最初にキャプシド特異的抗体(AAV2の場合、例えばA20)を支持体/表面にコーティングし、次にコーティングした抗体にキャプシドを結合させる。後者の場合の利点は、抗体/ウイルス粒子複合体またはウイルス粒子自体が、支持体/表面からより効率的に剥離され、それにより細胞によって内部に取り入れられるという点である。重要なことには、AAV2のI-587に外来ペプチド配列を導入しても、A20のエピトープはペプチド挿入によって、仮にあったとしてもほとんど影響を受けないために、A20の各変異粒子に対する親和性は破壊されない。最終的に、細胞、例えばHeLa細胞を、結合しているキャプシド上に播種する。この手順によって、おそらくは飲作用および/または食作用により、天然感染経路から独立して、細胞によるウイルス、例えばAAVの取り込みが起こると予測される。

【0069】

さらなる好ましい態様では、選択されたピリオンが産生細胞によって特異的に取り込まれる方法によって、パルボウイルスピリオンの遺伝子型/表現型連関ライブラリーを得ることができる。この場合には、細胞当たりのゲノムの比が10~10,000、好ましくは50~5,000、より好ましくは100~3,000、特に約1,000である適切な条件下で、ライブラリーを産生細胞に導入し、遺伝子型/表現型連関ピリオン/ライブラリーをもたらす、特に特異的受容体結合を介した感染経路に依存する導入条件を選択することにより、パルボウイルスピリオンのライブラリーを作製する。このような受容体特異的取り込みを達成するためには、ライブラリーのピリオンは好ましくは固定化せずに、懸濁状態で細胞に添加し、この場合、細胞とピリオンの両方が懸濁状態であってよく、または細胞を固定化し、ピリオンを懸濁状態で添加する。したがって、細胞のトランスフェクションは基本的に、ウイルスの感染経路に依存する。これに関連して、(プールを結合剤と共にインキュベートする代わりに)選択されたプールをA20抗体で修飾されたAAV粒子と共にインキュベートすること以外は上記の通りに、Fc RI発現細胞に導入することが考えられる。

【0070】

感染経路への依存とは、例えば受容体特異的取り込み、例えばAAV2に関してはヘパリン硫酸プロテオグリカン(HSPG)特異的取り込みを介して(例えば、天然感染経路が挿入ランダムペプチド配列によって遮断または破壊されていないピリオンライブラリーに関して)、ピリオンが細胞によって取り込まれることを意味する。ペプチド配列がI-587に挿入されているAAV2粒子では、細胞の感染は、キャプシドが十分なHSPG結合モチーフ、または連関段階に用いる細胞株上に発現される第2受容体の結合モチーフを含む限り機能する。AAVキャプシドは、それぞれがI-587挿入部位を含むキャプシドタンパク質60個からなる。したがって、所与の割合の野生型配列キャプシドタンパク質を含むモザイクキャプシドピリオンは、HSPGまたは第2受容体を介して、細胞になお感染することができる。あるいは、HSPGまたは第2受容体に対する親和性を部分的に回復するペプチド挿入を有するピリオンは、HeLaまたは293などの細胞に感染することができる。特に、正確な位置にリジンまたはアルギニンなどの塩基性アミノ酸残基を含むペプチド配列は、I-587 AAVキャプシド変異体の天然HSPG感染経路を回復することが示されている。7merランダム配列中の塩基性アミノ酸残基の頻度を考えると、およびAAVキャプシドがキャプシドタンパク質60個からなるという事実を考えると、モザイクキャプシドを有する粒子からなる非連関I-587 AAV2ライブラリーのピリオンの、大部分ではなくとも多くは、HSPG受容体媒介性取り込みにより、なおある程度は細胞に感染する。

【0071】

連関段階(ウイルスゲノムのトランスフェクションによるか、または取り込みもしくは感染のいずれかの手段によるピリオン粒子の細胞導入による)中にライブラリーの生物多様性を保持するには、各ウイルス変種が増幅されることを保証するために、常に、パルボ

10

20

30

40

50

ウイルス変異体の多重度と比較して少なくとも10倍、好ましくは100倍、特に500倍過剰のゲノム粒子を導入すべきである。得られたライブラリーにおいて各ウイルスが関連していることをさらに保証するには、ゲノム粒子の総数と比較して少なくとも2倍、好ましくは少なくとも5倍過剰の細胞を用いるべきである。

【0072】

遺伝子型/表現型関連は、パッケージングされたDNAの遺伝情報を容易に用いて、各抗原結合剤に対する高い親和性または結合活性を有する粒子の配列を得ることができるため、望ましい。少なくとも5%、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、特に少なくとも90%の関連を有する遺伝子型/表現型関連ライブラリーを、パルボウイルス変異構造タンパク質を同定するために用いることは、本発明の目的である。

10

【0073】

好ましい態様において、ライブラリーは、 10^5 を超える、好ましくは 10^6 を超える、特に 10^7 を超えるパルボウイルス変異体の多重度を有する。多重度とは、本発明によれば、ライブラリー中の異なるビリオンまたはウイルスゲノムの数を意味する。原理上は、適切なまたはさらには理想的なクローンを同定する可能性は、ライブラリーの多重度と共に高まるため、多重度の高いライブラリーを用いることが有利である。

【0074】

ライブラリーの多重度は、パルボウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子のコード領域内に核酸挿入物を挿入し、パルボウイルス構造タンパク質内の特定の位置においてアミノ酸挿入を引き起こすことによって作製する。本発明によれば、挿入は、I-1、I-34、I-138、I-139、I-161、I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-453、I-459、I-471、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664、I-713、およびI-716、より好ましくはI-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587からなる群より選択される1つまたは複数の位置、特にI-587に挿入されることが好ましい。

20

【0075】

使用した命名法I-###は、AAV2のVP1タンパク質に関連したアミノ酸番号を###で指定した挿入部位を指すが、挿入は、所与のアミノ酸のN末端側またはC末端側5アミノ酸、好ましくは所与のアミノ酸のN末端側またはC末端側3アミノ酸、より好ましくは2アミノ酸、特に1アミノ酸の配列内の1つのアミノ酸の直接N末端側またはC末端側、好ましくは直接C末端側に位置してよいことを意味している。AAV2以外のパルボウイルスについては、アミノ酸アライメントを行うことにより、または利用できる場合にはキャプシド構造を比較することにより、対応する挿入部位を同定することができる。そのようなアライメントは、パルボウイルスAAV1、AAV-6、AAV2、AAV-3b、AAV-7、AAV-8、AAV10、AAV-4、AAV11、b-AAV、AAV-5、GPV、B19、MVM、FPV、およびCPVについて行われている(図1を参照されたい)。

30

【0076】

例えば、挿入部位I-587は、強調によって示される以下のアミノ酸のうちの1つの前および/または後の挿入に対応する

AAV1の

SEQ ID NO: 1: FQSSS TDPAT

40

、

AAV2の

SEQ ID NO: 2: LQRGN₅₈₇ RQAAT

、

AAV-3bの

SEQ ID NO: 3: LQSSN TAPTT

、

AAV-6の

50

SEQ ID NO: 4: LQSSS TDPAT

、
AAV-7の

SEQ ID NO: 5: LQAANN TAAQT

、
AAV-8の

SEQ ID NO: 6: LQQQNN TAPQI

10

、
AAV10の

SEQ ID NO: 7: LQQANN TGPIV

、
AAV11の

SEQ ID NO: 8: NQNATT TAPIT

、および
AAV-5の

20

SEQ ID NO: 9: NQSST TAPAT

。
【 0 0 7 7 】

さらに、挿入部位I-453は、以下の10アミノ酸それぞれの直接N末端側またはC末端側、好ましくは強調によって示されるアミノ酸の直接C末端側の挿入に対応する

AAV1の

SEQ ID NO: 10: QNQSG SAQNK

30

、
AAV2の

SEQ ID NO: 11: NTPSG₄₅₃ TTTQS

、
AAV-3bの

SEQ ID NO: 12: GTTSG TTNQS

、
AAV-6の

SEQ ID NO: 13: QNQSG SAQNK

40

、
AAV-7の

SEQ ID NO: 14: SNPGG TAGNR

、
AAV-8の

SEQ ID NO: 15: QTTGG TANTQ

、
AAV10の

SEQ ID NO: 16: QSTGG TQGTQ

50

、

AAV11の

SEQ ID NO: 17: SGETL NQGNA

、および

AAV-5の

SEQ ID NO: 18: FVSTN NTGGV

。

【 0 0 7 8 】

AAV2配列に関して、本発明によって包含されるAAVおよび他のパルボウイルスの挿入部位を表1に記載する。

【 0 0 7 9 】

(表1) パルボウイルスの挿入部位

挿入部位	AAV2 の対応アミノ酸 / 配列			参考文献
I-1	M ₁	M ₁ AADGY	SEQ ID NO: 19	(Wu et al., 2000)
I-34	P ₃₄	PPPKP ₃₄ AERHK	SEQ ID NO: 20	(Wu et al., 2000)
I-138	T ₁₃₈	EPVKT ₁₃₈ APGKK	SEQ ID NO: 21	(Wu et al., 2000, Warrington et al., 2004, Lux et al., 2005)
I-139	A ₁₃₉	PVKTA ₁₃₉ PGKKR	SEQ ID NO: 22	(Shi et al., 2001, Shi and Bartlett, 2003, Arnold et al., 2006)
I-161	K ₁₆₁	SGT GK ₁₆₁ AGQQP	SEQ ID NO: 23	(Shi et al., 2001, Arnold et al., 2006)
I-261	S ₂₆₁	YKQIS ₂₆₁ SQSGA	SEQ ID NO: 24	(Girod et al., 1999)
I-266	A ₂₆₆	SQSGA ₂₆₆ SNDNH	SEQ ID NO: 25	(Wu et al., 2000)
I-381	N ₃₈₁	YLTLN ₃₈₁ NGSQA	SEQ ID NO: 26	(Girod et al., 1999)
I-453	G ₄₅₃	NTPSG ₄₅₃ TTTQS	SEQ ID NO: 11	本発明のデータ
I-447	R ₄₄₇	YYLSR ₄₄₇ TNTPS	SEQ ID NO: 27	(Girod et al., 1999, Wu et al., 2000)
I-448	T ₄₄₈	YLSRT ₄₄₈ NTPSG	SEQ ID NO: 28	(Grifman et al., 2001)
I-459	R ₄₅₉	TTQSR ₄₅₉ LQFSQ	SEQ ID NO: 29	(Shi et al., 2001, Arnold et al., 2006)
I-471	R ₄₇₁	ASDIR ₄₇₁ DQSRN	SEQ ID NO: 30	(Asokan and Samulski, 2006, Moskalenko et al., 2000)
I-534	F ₅₃₄	EEKFF ₅₃₄ PQSGV	SEQ ID NO: 31	(Girod et al., 1999)
I-570	P ₅₇₀	RTTNP ₅₇₀ VATEQ	SEQ ID NO: 202	Δ566-575 に関する本発明のデータ
I-573	T ₅₇₃	NPVAT ₅₇₃ EQYGS	SEQ ID NO: 32	(Girod et al., 1999)
I-584	Q ₅₈₄	STNLQ ₅₈₄ RGNRQ	SEQ ID NO: 33	(Shi et al., 2001, Shi and Bartlett, 2003)
I-587	N ₅₈₇	LQRGN ₅₈₇ RQAAT	SEQ ID NO: 2	(Girod et al., 1999, Shi et al., 2001, Maheshri et al., 2006, Ried et al., 2002, Grifman et al., 2001, Nicklin et al., 2001, Arnold et al., 2006)
I-588	R ₅₈₈	QRGNR ₅₈₈ QAATA	SEQ ID NO: 34	(Shi and Bartlett, 2003)
I-591	A ₅₉₁	NRQAA ₅₉₁ TADV N	SEQ ID NO: 35	(Wu et al., 2000)
I-657	P ₆₅₇	VPANP ₆₅₇ STTFS	SEQ ID NO: 36	
I-664	A ₆₆₄	TFSAA ₆₆₄ KFA SF	SEQ ID NO: 37	(Wu et al., 2000)
I-713	T ₇₁₃	NVDFT ₇₁₃ VDTNG	SEQ ID NO: 38	
I-716	T ₇₁₆	FTVDT ₇₁₆ NGVYS	SEQ ID NO: 39	(Maheshri et al., 2006)

10

20

30

40

アミノ酸138は、VP-2のN末端である。好ましい態様は、AAV2の伸長
T₁₃₈ APGKKR (SEQ ID NO: 40)

内のアミノ酸、または他のパルボウイルスの対応するアミノ酸のうちの1つに対してN末端融合を有するVP-2構造タンパク質である。

【0081】

I-570は、挿入部位においてパルボウイルス構造タンパク質の所与のアミノ酸の欠失を伴い、完全置換をもたらす挿入部位として特に適している。この場合、アミノ酸

RTTNPVATEQ

をエピトープまたはミモトープにより置換することができる。

【0082】

さらに、VP-1の最初のアミノ末端アミノ酸1~50に対応する任意の部位に、挿入核酸配列を挿入してもよい。

【0083】

AAV2以外のAAV血清型中に挿入を作製するのにも成功している。

【0084】

(表2) AAV2以外のAAV血清型への挿入

AAV血清型	配列		AAV2に関連する挿入部位/アミノ酸		参考文献
AAV1	FQSSS ₅₈₈ TDPAT	SEQ ID NO: 1	I-587	N ₅₈₇	自身のデータ
AAV1	SSSTD ₅₉₀ PATGD	SEQ ID NO: 41	I-589	Q ₅₈₉	(Arnold et al., 2006, Stachler and Bartlett, 2006)
AAV-3	NNLQS ₅₈₆ -SNTAP	SEQ ID NO: 42	I-585	R ₅₈₅	(Arnold et al., 2006)
AAV-4	GGDQS ₅₈₄ -NSNLP	SEQ ID NO: 43	I-585		(Arnold et al., 2006)
AAV-5	TNNQS ₅₇₅ -STTAP	SEQ ID NO: 44	I-585		(Arnold et al., 2006)

【0085】

最も好ましい挿入部位は、以下のものである：

i) I-587：AAV2の

N₅₈₇ (LQRGN₅₈₇ RQAAT, SEQ ID NO: 2)

周囲のアミノ酸伸長において、種々の挿入が作製されている。この伸長内で、AAV2ではアミノ酸Q₅₈₄、N₅₈₇、R₅₈₈、およびA₅₉₁のC末端において(表1)、ならびにAAV2のR₅₈₅およびQ₅₈₉に対応する他のAAV血清型のアミノ酸のC末端において(表2)、種々のペプチドの挿入が作製された。

ii) I-453：本発明に従って、AAV2においてG₄₅₃のC末端にエピトープを挿入することに成功している。

iii) AAV1の

FQSSS₅₈₈ TDPAT (SEQ ID NO: 1)またはSSSTD₅₉₀ PATGD (SEQ ID NO: 41)

。

iv) I-261：本発明に従って、AAV2においてS₂₆₁のC末端にエピトープを挿入することに成功している。

v) I-534：本発明に従って、AAV2においてF₅₃₄のC末端にエピトープを挿入することに成功している。

10

20

30

40

50

vi) I-570: 本発明に従って、AAV2においてP₅₇₀のC末端にエピトープを挿入することに成功している。

vii) I-573: 本発明に従って、AAV2においてT₅₇₃のC末端にエピトープを挿入することに成功している。

【0086】

本明細書で開示するパルボウイルスに関する、本明細書で特定する全挿入部位の対応アミノ酸は、図1におけるアライメントから検索することができ、本明細書に記載されないパルボウイルスに関しては、本明細書で用いたような標準的なパラメータ下でのアライメントを、そのようなパルボウイルスの提供されたアミノ酸配列を用いて形成することができ、そのようなアライメントから対応アミノ酸を検索することができる。

【0087】

アミノ酸番号は、VP-1アミノ酸配列に関連して提供される。しかしながら、構造タンパク質をコードする構造遺伝子への挿入は、一般的に、VP-1挿入に対応する部位において挿入を含む変異型VP-2タンパク質および任意に変異型VP-3タンパク質もまた生じ得る。その理由は、VP-2およびVP-3は一般的に、下流に位置する翻訳開始のための開始コドンを用いて同じ構造遺伝子から発現され、VP-1と比較してN末端側が切断された構造タンパク質を生じるためである。AAV2のcap遺伝子の模式的構成を図2に提供する。したがって、本発明は、VP-1、VP-2、および/またはVP-3タンパク質において対応する挿入を有する、パルボウイルスの構造遺伝子を包含する。例えばAAV2では、アミノ酸1~138をコードするコドン間へのcap遺伝子への挿入は、VP-1のみへの挿入をもたらし、アミノ酸138~203をコードするコドンへの挿入は、VP-1およびVP-2への挿入をもたらし、アミノ酸203をコードするコドン後の挿入は、VP-1、VP-2、およびVP-3への挿入をもたらす。

【0088】

好ましい挿入部位は、AAV2アミノ酸番号139、161、261、381、447、453、459、534、570、573、584、587、588、657、および713、特に261、453、534、570、573、587、および588、最も好ましくは453および587に対応するアミノ酸に続く位置である。アミノ酸番号は、AAV2のVP-1アミノ酸配列に関して示される。

【0089】

本発明のさらなる態様は、これまでに記載されていない挿入部位I-453および/またはI-570内に挿入を含むパルボウイルスの構造タンパク質である。

【0090】

隣接する残基は、構造タンパク質内に挿入されたペプチドの曝露および機能性に影響し得るため、I-453ベースのライブラリーを用いると、(I-587ベースのライブラリーを用いる場合)別のペプチドが選択される可能性がある。加えて、これらの部位(I-587およびI-453)は、AAVキャプシドの異なるループ上に位置する。したがって、細胞相互作用の異なる機構が想定され得る。さらに、I-453ライブラリーに由来するAAV粒子は、I-587と重複するヘパリン結合部位が無傷のままであるために、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。I-587と重複しない他の挿入部位、好ましくは挿入部位I-261、I-534、I-570、およびI-573にも、同様のことが当てはまる。

【0091】

1つの潜在的態様では、別々のスクリーニングラウンドで選択された挿入を、独立して選択された他の挿入と組み合わせることができる。例えば、スクリーニング法のために、I-587部位にランダムペプチドの挿入を有するライブラリーを使用し、これとは独立して、別の部位にランダムペプチドの挿入を有する第2ライブラリーを使用することができる。次に、2つのスクリーニング法で選択された構造タンパク質を、標準的なクローニング技法により組み合わせて、各2つの挿入部位において、スクリーニングされた挿入物を含む1つのクローンを作製することができる。

【0092】

さらなる態様において、好ましいライブラリーは、構造タンパク質の複数の部位において複数の挿入を含む。特に好ましいライブラリー/構造タンパク質は、I-453およびI-587

10

20

30

40

50

に挿入を有する。

【0093】

核酸挿入物の配列を設計することにより、ライブラリーの多重度を調節することができる。そのようなライブラリーの作製は、例えば、参照により本明細書に組み入れられるWO 03/054197に記載されている。

【0094】

核酸挿入物はいくつかの特徴を有する。核酸挿入物は、パルボウイルス遺伝子のコード領域内に挿入することにより、フレームシフト、およびひいては切断型パルボウイルス構造タンパク質を生じない。したがって、挿入により、3ヌクレオチドの多量体をパルボウイルス構造遺伝子のコード領域に挿入する。配列はランダムにまたは部分的にランダムに作製された配列であり、それによりライブラリーの多重度が生じる。例えば部分的ランダム配列を用いて、配列の挿入によって生じる潜在的終止コドンの数を減らし、それにより非機能的な構造変異タンパク質の数を減らすこと、および/または、例えば並行して終止コドンの数を3つから1つに減らすNNK設計(Nはそれぞれ任意のヌクレオチドであり、KはGまたはTを表す)を選択することによって、20種の異なるアミノ酸のより均一な分布を達成することができる。

10

【0095】

好ましい態様において、核酸挿入物は、ランダムにまたは部分的にランダムに作製された配列に加えて、ランダム化もしくは部分的ランダム化核酸配列の上流および/もしくは下流の少なくとも1コドン、好ましくは、小アミノ酸、好ましくはAla、Gly、Ser、Pro、およびCysをコードする2~12コドンのさらなる伸長、特に、ランダム化もしくは部分的ランダム化核酸配列の上流のAlaの3コドンおよび下流のAlaの2コドンの挿入、またはランダム化もしくは部分的ランダム化核酸配列の上流および下流両方のグリシン残基2~5個の挿入を含み得る。そのような付加的アミノ酸は、挿入の多重度を拡大しないが、ビリオンの表面における挿入アミノ酸の適切な接近性に寄与するためのスペーサーとして作用し得る。

20

【0096】

さらなる好ましい態様において、挿入は、挿入をよりよく提示するために、挿入ペプチド配列の環状化を可能にするリンカー配列を含む。したがって、スペーサー配列は、当技術分野で周知のジンクフィンガー(Znフィンガー)を形成するように選択される。好ましいZnフィンガーモチーフは、

30

これらに限定されないが、モチーフ



(Laity et al., 2001 and Gamsjaeger et al., 2006)

を含む C_2H_2 、 C_4 、および C_2HC である。

【0097】

好ましいZnフィンガーリンカーの例は：



40

(X=GlyまたはAla、C=Cys；Nはそれぞれ任意のヌクレオチドであり、KはGまたはTを表す)である。したがって、ランダムNNK配列はキャプシド表面から突出する。

【0098】

B細胞エピトープは少なくとも4アミノ酸から構成され(US 2004/0228798A1)、好ましい態様において、パルボウイルス変異構造タンパク質は、4~30アミノ酸、好ましくは5~20アミノ酸、特に5~15アミノ酸の挿入を少なくとも1つ含む。B細胞エピトープ、パラトープ、またはミモトープは、挿入配列のみから構成されてもよいし、または挿入ペプチド配列およびウイルスコアタンパク質の両方のアミノ酸残基から構成されてもよい。

【0099】

さらなる好ましい態様において、挿入は、ランダムにまたは部分的にランダムに作製さ

50

れた配列の上流および下流の固定された伸長内に、ジスルフィド結合を形成し得る少なくとも1つのシステインを両側に含む。このようなジスルフィド結合は自発的に形成され、それによって2つのシステイン間の挿入アミノ酸からなるループが安定化する。このようなループは、抗体に対する挿入配列の最適な曝露を促進する。

【0100】

パルボウイルス変異構造タンパク質が、異なる位置に少なくとも1つのさらなる変異を含むこともまた本発明の態様である。そのようなさらなる変異を用いて、より複雑なモチーフを構成すること、ビリオンのある特性を改変すること(例えば、さらなる変異を用いて、その天然抗原性を改変することができる(例えば、(Huttner et al., 2003); WO 01/05990))、そのクロマトグラフィー特性を改変すること(例えば、WO 01/05991)、第2のB細胞エピトープ、好ましくは寛容原由来エピトープを挿入すること、またはCTLエピトープを挿入することができる。そのようなさらなる変異は、点突然変異、内部または末端欠失、挿入、および置換から選択される。好ましくは、さらなる(第2の)挿入は内部にあるかまたはN末端もしくはC末端融合であり、さらなる挿入は4~40アミノ酸、好ましくは5~30アミノ酸、最も好ましくは7~20アミノ酸の長さを有する。1つの具体的な態様において、挿入は、リガンドに対する結合に有用なタグである。そのようなタグは当技術分野で周知であり、その例を表3に記載する。

10

【0101】

(表3) タグおよび対応するリガンド

タグ	リガンド
HIS	ニッケル
GST	グルタチオン
プロテインA	IgG
ビオチンまたはStrep	ストレプトアビジン
カルモジュリン結合ペプチド	カルモジュリン
IgGのFcペプチド	プロテインA
Flag	GLAGまたは3×FLAGペプチド
HA(血球凝集素)	HAペプチド

20

30

【0102】

さらなる好ましい態様では、挿入以外の部位においておよびまたは挿入内に、核酸当たり少数のランダム変異を有する、そのようなパルボウイルス変異構造タンパク質をコードする核酸のライブラリーを作製し、パルボウイルス変異構造タンパク質を同定する方法を再度開始することにより、同定されたパルボウイルス変異構造タンパク質の結合剤に対する親和性を改変すること、好ましくは高めることができる。そのような過程は、数回、好ましくは1~5回、特に1~2回繰り返すことができる。この関連における少数のランダム変異とは、同定されたパルボウイルス変異構造タンパク質の開始配列と比較して、1~10個、好ましくは3~8個、特に4~6個の変異を有する、平均して少なくとも10個の配列決定されたクローンを意味する。そのようなランダム変異は、誤りがちなPCRおよびDNAシャッフリングなどの、当技術分野で公知の標準的な技法により挿入することができる。これを達成するためには、変異体のウイルスゲノムを単離し、適切なプラスミド骨格にクローニングする。次いで、例えば誤りがちなPCRおよび/またはDNAシャッフリングにより、ランダム変異を挿入する。この後、新たなパッケージングを行い、続いて遺伝子型/表現型連関段階、および最適な結合剤に対する結合、例えば抗体結合に関する新たな選択を行う。

40

【0103】

本発明の別の態様は、上記で開示した方法によって得られ得るパルボウイルス変異構造タンパク質である。

【0104】

50

本発明のさらなる主題は、パルボウイルスにとって異種であるが、病原体と、特に病原体のB細胞エピトープと同一ではない少なくとも1つのB細胞エピトープを含むパルボウイルス変異構造タンパク質であって、B細胞エピトープがウイルスの表面上に位置するパルボウイルス変異構造タンパク質に関する。

【0105】

本発明の好ましい態様は、本発明の方法との関連において上記のように定義され得る本発明のパルボウイルス変異構造タンパク質である。本明細書で用いるB細胞エピトープという用語は、ミモトープも含むことが意図されている。したがって、エピトープは線状または構造的のいずれであってもよい。しかしながら、特に、ミモトープではない線状エピトープが好ましい。

10

【0106】

典型的に、B細胞エピトープの大きさは少なくとも4アミノ酸である(US 2004/0228798A1)。したがって、パルボウイルス変異構造タンパク質が、4~30アミノ酸、好ましくは5~20アミノ酸、特に5~15アミノ酸の少なくとも単一のまたは多量体のB細胞エピトープからなる挿入、ならびにB細胞エピトープの上流および/もしくは下流の少なくとも1アミノ酸、好ましくはAla、Gly、Ser、Pro、およびCysからなる群より選択される2~12アミノ酸、特に、B細胞エピトープの上流の3つのAlaおよび下流の2つ、B細胞エピトープの上流の5つのAlaおよび下流の5つ、またはB細胞エピトープの上流の5つのGlyおよび下流の5つのGlyのさらなる伸長を有することは、好ましい態様である。そのようなB細胞エピトープは、病原体と、特に病原体のB細胞エピトープと同一ではないこと、その天然環境において液性免疫応答に接触可能であることが好ましい。本発明による病原体とは、ウイルス、細菌、および/または真核生物寄生虫を意味する。

20

【0107】

そのように除外される病原体のB細胞エピトープは、当業者に公知のタンパク質データベースを検索することにより、同定することができる。検索にかけた配列が、病原体のタンパク質中に存在する配列と同一である場合には、本発明のこの好ましい態様に従って、そのようなB細胞エピトープを本発明から除外する。

【0108】

さらなる態様において、パルボウイルスにとって異種であるB細胞エピトープは、哺乳動物(ヒトを含む)または病原体B細胞エピトープと同一ではないが、哺乳動物またはB細胞エピトープの機能的誘導体である。機能的誘導体は、例えば本発明による方法によって同定可能であるか、またはそのような哺乳動物または病原体B細胞エピトープに対する特異的モノクローナル抗体と交差反応するB細胞エピトープと定義される。

30

【0109】

さらなる態様において、本発明のパルボウイルス変異構造タンパク質は、上に定義した通りにさらに特徴づけられ、特にこの場合、寛容原は上に定義した通りである。

【0110】

特に好ましい態様において、パルボウイルス変異構造タンパク質は、寛容原由来エピトープであるB細胞エピトープを含む。

【0111】

好ましくは、B細胞エピトープは、上で定義した抗原の一部である。好ましい抗原は、IgE、腫瘍抗原(例えば、Melan A、高分子量メラノーマ関連抗原(HMW MAA)、CA125、IL13R、Her2/NEU、L1細胞接着分子)、ウイルス受容体(CCR5)、VEGF、EGFR、CD20、IL-6、IL-9、IL-13、IL-17、CETP、TNFファミリーメンバー(例えば、TNF- α)、または β -アミロイドである。

40

【0112】

好ましい態様において、B細胞エピトープは、以下からなる群より選択される、AAV2の1-587/1-587位にこれまでに挿入された配列ではない
表4に記載の

SEQ ID NO: 45: QAGTFALRGDNPQG,

SEQ ID NO: 46: SIGYPLP,

SEQ ID NO: 47: NGR,

SEQ ID NO: 48: CDCRGDCFC,

SEQ ID NO: 49: RGDVAVGV,

SEQ ID NO: 50: RGDTPPTS,

SEQ ID NO: 51: GENQARS,

SEQ ID NO: 52: RSNVAVP,

SEQ ID NO: 53: NSSRDLG,

SEQ ID NO: 54: NDVRAVS,

SEQ ID NO: 55: EYHHYNK,

SEQ ID NO: 56: MTPFPTSNEANLGGGS,

SEQ ID NO: 57: QPEHSST,

SEQ ID NO: 58: VNTANST,

SEQ ID NO: 59: NDVRSAN,

SEQ ID NO: 60: NDVRAVS,

SEQ ID NO: 61: VTAGRAP,

SEQ ID NO: 62: APVTRPA,

SEQ ID NO: 63: DLSNLTRおよび

SEQ ID NO: 64: GQHPRPG

10

20

°

【 0 1 1 3 】

30

(表4) 標的細胞において導入の増大を示した、AAV2の587/588における挿入(1-587または1-588に挿入された)

wt AAV2の587/588周囲の配列 QRGN-----RQAA SEQ ID NO: 65	標的	導入の増大	参考文献
QRGN-QAGTFALRGDNPQG-----RQAA SEQ ID NO: 45	β_1 および β_3 インテグリン	B16F10, RN22	(Girod et al., 1999)
QRGN-ASIGYPLPA-----RQAA SEQ ID NO: 66	HUVECにおいて ファージ ディスプレイにより 選択されたペプチド	HUVEC, HSVEC	(Nicklin et al., 2001)
QRGN-NGR-----RQAA SEQ ID NO: 47	CD13	RD, KS1767	(Grifman et al., 2001)
QRGN-ATGCDRCRGDCFC-----QAA SEQ ID NO: 67	$\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$	HeLa, K562, Raji, SKOV-3, インビボでの 局所適用	(Shi and Bartlett, 2003)
QRGN-AAARGDAVGVAA-----RQAA SEQ ID NO: 68	未知 AAVディスプレイ により選択	MO7e	(Perabo et al., 2003)
QRGN-AAARGDTPTSAA-----RQAA SEQ ID NO: 69	未知 AAVディスプレイ により選択	MO7e	(Perabo et al., 2003)
QRGN-AAAGENQARSAA-----RQAA SEQ ID NO: 70	未知 AAVディスプレイ により選択	Mec1, prim. B-CLL	(Perabo et al., 2003)
QRGN-AAARSNAVVPAA-----RQAA SEQ ID NO: 71	未知 AAVディスプレイ により選択	Mec1	(Perabo et al., 2003)
QRGQR-GNSSRDLGA-----QAA SEQ ID NO: 72	未知 AAVディスプレイ により選択	初代ヒト 冠状動脈 内皮細胞； 全身適用後の 心臓	(Muller et al., 2003)
QRGQR-GNDVRAVSA-----QAA SEQ ID NO: 73	未知 AAVディスプレイ により選択	初代ヒト 冠状動脈 内皮細胞	(Muller et al., 2003)
QRGN-ASEYHHYNKA-----RQAA SEQ ID NO: 74	未知、 初代ヒト伏在静脈 SMCにおいて ファージ ディスプレイ により選択	初代ヒト 伏在静脈 および 動脈SMC	(Work et al., 2004)
QRGN-ASMTPFPTSNEANLGGGSA-----RQAA SEQ ID NO: 75	未知、 HUVECにおいて ファージ ディスプレイ により選択	HUVEC、 全身適用後の 静脈内皮細胞	(White et al., 2004)
QRGN-ASQPEHSSTA-----RQAA SEQ ID NO: 76	未知、 インビボファージ ディスプレイ により選択	全身適用後の 脳内皮	(Work et al., 2006)

10

20

30

40

QRGN- <u>ASVNTANSTA</u> -----RQAA SEQ ID NO: 77	未知、 インビボファージ ディスプレイ により選択	全身適用後の 肺内皮	(Work et al., 2006)
QRGQR- <u>GNDVRSANA</u> -----QAA SEQ ID NO: 78	未知 AAVディスプレイ により選択	HSaVEC	(Waterkamp et al., 2006)
QRGQR- <u>GNDVRAVSA</u> -----QAA SEQ ID NO: 79	未知 AAVディスプレイ により選択	HSaVEC	(Waterkamp et al., 2006)
QRGQR- <u>GVTAGRAPA</u> -----QAA SEQ ID NO: 80	未知 AAVディスプレイ により選択	Calu6	(Waterkamp et al., 2006)
QRGQR- <u>GAPVTRPAA</u> -----QAA SEQ ID NO: 81	未知 AAVディスプレイ により選択	Calu6	(Waterkamp et al., 2006)
QRGQR- <u>GDLNLTRA</u> -----QAA SEQ ID NO: 82	未知 AAVディスプレイ により選択	PC3	(Waterkamp et al., 2006)
QRGQR- <u>GGQHPRPGA</u> -----QAA SEQ ID NO: 83	未知 AAVディスプレイ により選択	H9C2	(Waterkamp et al., 2006)

10

20

太字：新規受容体を標的化するために用いられたペプチド挿入のアミノ酸配列；イタリック体および下線：標的化ペプチドに隣接するリンカー配列として用いられたアミノ酸；太字および二重下線：野生型配列と比較して置換されたアミノ酸；

B16F10 = マウスメラノーマ細胞株、RN22 = ラットシュワン腫、HUVEC = ヒト臍帯静脈内皮細胞、HSVEC = ヒト伏在静脈内皮細胞、RD = 横紋筋肉腫、KS1767 = カボジ肉腫、HeLa = ヒト子宮頸癌、K562 = ヒト慢性骨髄性白血病急性転化、Raji = パーキットリンパ腫細胞株、SKOV-3 = 卵巣癌、MO7e = 巨核球細胞株、Mec1 = 前リンパ球形質転換したB細胞慢性リンパ性白血病由来、HSaVEC = 初代ヒト静脈内皮細胞、Calu6 = 肺癌細胞株、PC3 = 前立腺癌細胞株、H9C2 = ラット心筋芽細胞

【0114】

好ましい態様において、B細胞エピトープは、インテグリン、特にa₁、a₃、av₃、またはav₅インテグリン、およびCD13からなる群より選択されない。

【0115】

好ましい態様において、エピトープはウイルスの構造タンパク質のN末端に融合されていない、特にVP1またはVP2のN末端に融合されていないが、本発明においてVP3のN末端への融合は想定される。

【0116】

好ましい態様において、パルボウイルス変異構造タンパク質は、B細胞エピトープの由来元の抗原に結合し得る免疫グロブリンを誘導することができる。

【0117】

B細胞エピトープがウイルスの表面上に位置することは、重要な特徴である。

【0118】

本発明の好ましい態様において、上で定義したパルボウイルスの構造タンパク質は、抗IgE抗体の抗イディオタイプエピトープ/ミモトープ、および/またはIgEエピトープ/ミモトープを含む。

【0119】

喘息およびアレルギー性疾患の治療のためのワクチン

アトピー性喘息およびアレルギー性鼻炎は、通常であれば無害な環境タンパク質、アレルギーに対する、IgEに代表される有害な免疫応答によって起こる。感作個体では、アレルギー特異的IgEが、種々の組織中の肥満細胞、ならびに血液中の好塩基球および好酸球

30

40

50

の発現するIgEの高親和性受容体、Fc RIに結合することにより、組織に局在する。次にアレルゲンと遭遇すると、IgE/Fc RIの架橋が起こり、これにより、エフェクター細胞脱顆粒、ならびに予め形成されたメディエータ(ヒスタミン、タンパク質分解酵素、およびプロテオグリカン)および新規合成されたメディエータ(プロスタグランジンD₂、ロイコトリエン、およびサイトカイン)の放出が誘発される。共にこれらのメディエータは、花粉症、喘息、および湿疹を含むアレルギー反応、ならびに生命にかかわるアナフィラキシー反応の臨床症状に關与する。標準的治療には、吸入コルチコステロイド剤(ICS)、ジプロピオン酸ベクロメタゾン(BDP)、長時間作用性 作動薬(LABA)、およびロイコトリエン受容体遮断薬(LTRA)が含まれる。

【0120】

ヒトIgEの受容体結合領域は、以前にCH3ドメインのN末端領域にマッピングされた(Helm et al., 1988、Helm et al., 1989)。IgE(Presta et al., 1994)およびFc RI(Cook et al., 1997)の両方において、相互作用に直接關与するアミノ酸残基を同定するための部位特異的突然変異誘発研究が行われた。加えて、ヒトIgE-Fc RI 複合体の結晶構造が、最近になってGarmanら(Garman et al., 2000)によって解析された。受容体結合に關与するアミノ酸領域は、3つのループに位置し、C 3ドメインの大部分に広がっている(Pro-364、Arg-365、Arg-408、Ser-411、Lys-415、Glu-452、Arg-465、およびMet-469)。結合は主に、静電相互作用によって媒介される。

【0121】

抗IgE療法は、IgEの受容体結合標的ドメインC 3領域に結合し、それによりFc RI受容体に対するIgEの結合を妨げ、そのため肥満細胞および好塩基球の感作を妨げる抗体に基づく。しかしながら、たとえ遊離IgEの99%が抗IgE抗体によって中和されたとしても、わずかに残るIgE分子が各細胞を感作するのに十分であるため、この療法はやはり失敗する。治療効果は、付加的な作用によって提供される：遊離IgEのレベルが減少すると、好塩基球および肥満細胞上のFc RIの密度が減少し、感受性が低下するという方法で、Fc RI発現が遊離IgEのレベルにより調節を受ける。また、抗IgEは、おそらくは膜結合型IgEを架橋し、アポトーシス、アネルギーを引き起こすことによって、または最も可能性が高いのは、補体媒介性および細胞媒介性細胞溶解によって、IgE発現B細胞を除去または下方制御することにより、IgE産生の下方制御をもたらす(Wang et al., 2003)。しかしながら、後者の機構は、オマリズマブを用いて行われた臨床試験において認められなかった。このモノクローナル抗体に関しては、IgEレベルの低下によって媒介されるB細胞(形質細胞)からのIgE産生の減少は、動物およびインビトロ実験でしか認められなかった。

【0122】

開発中の治療用モノクローナル抗体の大部分は、遊離IgEまたはB細胞に結合しているIgEにのみ結合し、これを中和することができる。対照的に、Fc RI結合IgEは、これらの抗IgE抗体に接触することができない。受容体結合領域の外側にあるIgE分子の領域(IgEイデオタイプと称される、IgEの可変抗原結合ドメインなど)に対する抗IgE抗体は、IgE分子をその受容体に結合させたまま、このIgE分子に結合することができる。その結果、受容体結合IgEの架橋が起こり、そのような抗体で全身処置した動物ではアナフィラキシーショックが生じる。重要なことには、寄生中感染に対する防御機構を除けば、IgEは正常な生理機能において役割を果たしていないようであり、IgEの欠損した人は、明白な病理症状を示すことなく健康である(Levy and Chen, 1970)。

【0123】

オマリズマブ(XOLAIR(登録商標))は、受動免疫用のヒト化モノクローナル抗IgE抗体であり、初めて市販用に利用可能となり/認可された抗IgE療法である。Fc RI受容体を架橋することなく、IgEのC 3領域に結合するこのモノクローナルIgE抗体では(総説に関しては、(Bousquet et al., 2005)を参照されたい)、全部で7回の第III相臨床試験が行われた。オマリズマブにより、喘息憎悪の割合が38%、および全救急来院の割合が47%、有意に低下した。オマリズマブの有効性は、患者の年齢、性別、ベースライン血清IgEによって、または2週もしくは4週ごとの投与スケジュールによって影響を受けなかったが、利点は絶

10

20

30

40

50

対的には、ベースライン時の予測1秒間強制呼気量(FEV₁)に対する割合のより低い値によって定義される、より重篤な喘息を有する患者において最も高いようであった。

【0124】

先に概説した通り、モノクローナル抗体による受動免疫の1つの不利点は、比較的高い抗体用量を2~4週間ごとに注入する必要がある、そのような療法が高価なものになることである。したがって、アトピー性アレルギーまたは喘息のようなアレルギー性疾患の治療には、別のアプローチが必要とされる。

【0125】

本発明に従って、この問題は、抗IgE抗体の抗イディオタイプエピトープ/ミモトープおよび/またはIgEエピトープ/ミモトープを含むパルボウイルスの構造タンパク質によって解決される。このような構造タンパク質は、好ましくはウイルス様粒子を形成し得る。それらは、キャプシド殻の表面上に抗IgE抗体の抗イディオタイプエピトープ/ミモトープおよび/またはIgEエピトープ/ミモトープを保有する。したがって、抗IgE抗体の抗イディオタイプエピトープ/ミモトープまたはIgEエピトープ/ミモトープは、液性免疫系に接触可能である。このような構造タンパク質を患者において用いて、IgEに対する免疫応答、すなわちIgEと交差反応する抗体(抗IgE抗体)を特異的に誘導し、それによってIgEのその高親和性受容体Fc RIへの結合を妨げることができる。

【0126】

AAV選択のための標的抗体として用いることができる公的に入手可能な多くの治療用抗体について、エピトープは未知である。標的抗体と、例えばワクチン接種後にマウスにおいて誘導された抗体のエピトープを比較できるように、エピトープマッピングを行うことができる。例えば、ナイロン膜上にスポットした各IgE由来の重複ペプチドスキャンを用いて、抗マウスまたは抗ヒトIgE抗体によって認識されるエピトープを、アレイから同定することができる。好ましい抗体は、オマリズマブの結合パターンと類似の結合パターンを有する抗体であり、これをAAVキャプシドライブラリーからのミモトープの選択に用いることができる。例えばワクチン接種後にマウスにおいて誘導された抗体によって認識されるエピトープを、スライドガラス上にスポットしたアレイから同定することができる。抗ヒトIgE抗体、または他のIgの定常鎖領域によるワクチン接種後にマウスにおいて誘導された抗体の交差反応性を、ウェスタンブロット実験でモニターすることができる。

【0127】

本発明の特に好ましい態様は、IgEエピトープまたはミモトープ、好ましくはこれまでに知られているエピトープまたはミモトープを含むパルボウイルス、特にAAVの構造タンパク質である。Rudolf、Stadler、Vogelら(Rudolf et al., 1998、Rudolf et al., 2000、Stadler et al., 1999、Vogel et al., 2000)によって記載される通りに、BSW17、マウスモノクローナル抗ヒトIgE抗体を認識する粒子についてスクリーニングされたペプチドファージディスプレイライブラリーに基づいて、いわゆるミモトープ免疫ワクチンを開発することができる。BSW17によって最も良好に認識されるペプチド配列は、同定された配列すべてにおいてG、W、およびV(下線)が保存されているミモトープ配列

EFCINHRGYWVCGD ('Rudolf' (Rudolf et al., 2000)), および

(SEQ ID NO: 84)

INHRGYWV ('C4M', {Rudolf, 2000 #52}) (SEQ ID NO: 203)

(システイン残基(太字)は、ジスルフィド架橋によりペプチドの環状形成を媒介する)、およびエピトープ

VNLTWSRASG (Kricek et al., 1999).

(SEQ ID NO: 85)

である。

【0128】

本発明の過程において、喘息のようなアレルギー性疾患に対するワクチン接種目的に特に適している、これまでの新規エピトープが同定された：

10

20

30

40

50

EKQRNGTLT ('Bind2')	(SEQ ID NO: 204)	
EDGQVMDVDLS ('Flex')	(SEQ ID NO: 205)	
TYQCRVTHPHLPRALMR ("3DEpi1")	(SEQ ID NO: 206)	
RHSTTQPRKTKGSG ("3DEpi2")	(SEQ ID NO: 207)	
DSNPRGVSAYLSR ("3DEpi3")	(SEQ ID NO: 208)	
TITCLVVDLAPSK ("3DEpi4")	(SEQ ID NO: 209)	
KTKGSGFFVF ("C4E")	(SEQ ID NO: 210)	10
THPHLPRALMRS ("Wang-CS")	(SEQ ID NO: 211)	
GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK ("Wang")	(SEQ ID NO: 212)	
LPRALMRS (C21)	(SEQ ID NO: 213)	

【 0 1 2 9 】

したがって、本発明はさらに、新規IgE B細胞エピトープBind2、Flex、3DEpi1、3DEpi2、3DEpi3、3DEpi4、C4E、Wang-CS、Wang、およびC21、ならびに/またはそれらの機能的活性変種に関する。これらのエピトープの機能的活性変種とは、実施例10.9によるウサギワクチン接種実験において、ヒトIgEに結合する特異的抗体の力価として測定可能なB細胞応答を生じるB細胞エピトープを意味する。本発明はさらに、このようなエピトープまたはその機能的活性変種を一般的に含む薬剤、好ましくは、アレルギー性疾患、特に喘息の治療または予防のための、そのようなエピトープまたはその機能的活性変種を含むワクチンに関する。

20

【 0 1 3 0 】

そのような機能的活性変種は、所与の配列の最大40アミノ酸、好ましくは最大25アミノ酸、より好ましくは15アミノ酸、特に9アミノ酸のペプチド配列からなる単一ペプチドもしくは単一ペプチドの混合物、または担体に対するそのような機能的活性変種の融合物であってよい。そのような担体は、天然IgEタンパク質またはその一部を除く任意の分子(機能的活性変種よりも大きい)、好ましくはパルボウイルス粒子、さらにまたそのような機能的活性変種に対するB細胞応答(上に定義される)を生じさせ得る異なるウイルス粒子もしくはバクテリオファージ粒子、ポリマー(例えば、LPH)、または融合タンパク質であることが意図される。担体に対するそのような融合物は、すなわち、その変種を担体に化学結合させることにより、または融合タンパク質もしくは挿入変種を遺伝的に作製することにより、得ることができる。

30

【 0 1 3 1 】

システイン残基を含むかまたは除外するこれらのおよび類似の配列またはその一部、ならびに隣接配列を、図14に記載される通りに、AAV VPの1-587位および他の位置に導入することができる。対応するAAV粒子を製造し(最初はゲノム含有感染性AAVとして)、精製し、かつ特徴づけることができる。AAVキャプシドはファージとは異なる立体構造を有するが、ペプチド配列のループ構造を構築するシステイン残基のために、ミモトープ配列

40

EFCINHRGYWVCGD (SEQ ID NO: 84)

の類似の構造がファージおよびAAVの両方に存在する確率が高い。

VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 85)

などの線状エピトープに関しても、互換性はあるはずである。これらのAAV粒子がBSW17(ファージディスプレイに対して用いられた抗IgE抗体)に結合する場合、これらを、適切なアジュバントと同時に製剤化して、およびすることなく使用可能な抗IgEワクチンとして用いることができる。

【 0 1 3 2 】

50

本発明の特に好ましい態様は、免疫適格性哺乳動物にひとたび注射したならば、架橋特性をもたずに治療効果を有する抗IgE特異的抗体を誘導する、IgEエピトープ/ミモトープを含むパルボウイルスの構造タンパク質である。架橋特性とは、免疫適格性哺乳動物において、生じた抗IgE抗体が、IgE/Fc RI結合がなお可能である方法でIgE分子に結合していることを意味する。このようにして、1つの抗体がいくつかのIgE分子に同時に結合すると、高親和性Fc RI受容体がエフェクター細胞上で架橋され、その脱顆粒が起こる。これにより、全身的なアナフィラキシーショックが誘導される。一方、パルボウイルスの構造タンパク質は、(IgEエピトープ/ミモトープまたは抗IgE抗体の抗イディオタイプエピトープ/ミモトープに結合する)各B細胞受容体を直接架橋して、T細胞応答から独立して、対応するB細胞を活性化すること、および抗IgE抗体産生を誘導することができる。

10

【0133】

アルツハイマー病の治療のためのワクチン

本発明の特に好ましい態様は、アルツハイマー病の治療のために用いることができる、
-アミロイドエピトープまたはミモトープ、好ましくは公知のエピトープまたはミモトープを含むパルボウイルス、特にAAVの構造タンパク質である。本発明との関連において、
-アミロイドのB細胞エピトープをパルボウイルスキャプシドに挿入し、キャプシドの表面上に提示させた。好ましい態様において、B細胞エピトープはヒトエピトープである。好ましくは、これをI-453および/またはI-587、特にAAV1、AAV2、またはAAV-6のI-453および/またはI-587に挿入する。特に好ましい態様において、B細胞エピトープは、配列DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 158)を有する。

20

【0134】

一般的に、タンパク質凝集をもたらし、ひいてはコンホメーション病を引き起こす誤って折りたたまれたタンパク質は、AAVワクチンによる能動免疫アプローチの優れた候補標的である。理想的には、誤って折りたたまれたタンパク質またはタンパク質凝集体によって示されるB細胞エピトープのみが、AAV粒子上への提示に選択される(総説に関しては、Uversky et al., 2006、特に表1-1を参照されたい)。

【0135】

アテローム性動脈硬化症の治療のためのワクチン

アテローム性動脈硬化症は、動脈血管を侵す疾患である。これは、動脈壁における慢性炎症反応であり、大部分はマクロファージ白血球の蓄積に起因し、高密度リポタンパク質(HDL)によってマクロファージから脂肪およびコレステロールが適切に除去されることなく、低密度(特に小粒子)リポタンパク質(コレステロールおよびトリグリセリドを運搬する血漿タンパク質)によって促進される。これは通常、動脈の「硬化」または「下地生成(furring)」と称される。これは、動脈内に複数のプラークが形成するによって起こる。HDL中のコレステロール(HDL-C)の血漿濃度と、冠動脈心疾患(CHD)の発症との間には、強い逆相関がある。HDL-Cの血漿濃度は、CHDの強力な予測因子である。CHD患者の33%が、主な脂質異常としてHDL-Cの低血漿レベルを有するが、現在のところHDL-Cの血漿濃度を上昇させる効果的な治療法は存在しない。食事制限および適度な運動は効果がなく、スタチンはHDL-Cのわずか5%~7%増加を提供するにすぎず、またナイアシンには、その使用を限定する副作用および服薬遵守特性がある。

30

40

【0136】

血漿HDL-C濃度を上昇させるために示唆された1つの治療アプローチは、コレステリルエステル転送タンパク質(CETP)活性の阻害である。CETPは、リポタンパク質間の中性脂質およびリン脂質の転送を促進し、HDL-Cの血漿濃度の調節に寄与する74kDa血漿糖タンパク質である。CETPは、コレステリルエステルをHDLからVLDLおよびLDLへ移動させることにより、血漿においてHDL-Cの濃度を低下させるように機能する(Rittershaus et al., 2000)。

【0137】

したがって、本発明の1つの態様は、アテローム性動脈硬化症の治療のために用いることができる、CETPエピトープまたはミモトープを含むパルボウイルス、特にAAVの構造タ

50

ンパク質を提供することである。適切なエピトープまたはミモトープは、ヒトCETP由来ペプチドhTP10、hTP11、hTP12、hTP13、hTP18、およびhTP20、hRitsch-1、hRitsch-2、hRitsch-3、hCETP-内部およびhCETP-C末端である：

PKTVSNLTSSSESVQS (hTP10)	(SEQ ID NO: 214)	
SLMGDEFKAVLET (hTP11)	(SEQ ID NO: 215)	
QHSVAYTFEED (hTP12)	(SEQ ID NO: 216)	
INPEIITRDG (hTP13)	(SEQ ID NO: 217)	
DISLTGDPVITASYL (hTP18)	(SEQ ID NO: 218)	10
DISLTGDPVITA (hTP20)	(SEQ ID NO: 219)	
DQSIDFEIDSA (hRitsch-1)	(SEQ ID NO: 220)	
KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS (hRitsch-2)	(SEQ ID NO: 221)	
KNVSEDLPLPT (hRitsch-3)	(SEQ ID NO: 222)	
CDSGRVRTDAPD (hCETP-内部)	(SEQ ID NO: 223)	
FPEHLLVDFLQSLS (hCETP C末端)	(SEQ ID NO: 224)	

【 0 1 3 8 】

本発明はさらに、新規CETP B細胞エピトープhTP10、hTP11、hTP12、hTP13、hTP18、hTP20、hRitsch-1、hRitsch-2、hRitsch-3、hCETP-内部およびhCETP-C末端、ならび/またはそれらの機能的活性変種に関する。本発明はさらに、このようなエピトープまたはその機能的活性変種を一般的に含む薬剤、好ましくは、アテローム性動脈硬化症の治療または予防のための、そのようなエピトープまたはその機能的活性変種を含むワクチンに関する。

【 0 1 3 9 】

腫瘍疾患の治療のためのワクチン

Herceptin、Avastin、Erbitux、Omnitarg、Rituxan、Campath、Zevalin、Mylotarg、Bexxar、またはパニツムマブなどの抗体療法は、種々の型の腫瘍疾患と闘う上でさらなる役割を果たす。これらの抗体は、増殖因子受容体または増殖因子など、細胞増殖の制御不能を引き起こす因子のエピトープに特異的に結合する。したがって、本発明のさらなる態様は、細胞増殖の制御不能を引き起こすそのような因子のエピトープを含むパルボウイルス、特にAAVの構造タンパク質を提供することである。

【 0 1 4 0 】

HER2/neu(ErbB-2、ERBB2としても知られる)は、乳癌においてより高い攻撃性を付与するタンパク質である。これは、より一般的には上皮増殖因子受容体ファミリーとして知られるErbBタンパク質ファミリーのメンバーである。HER2/neuは、CD340とも呼称される。HER2/neuは、乳癌の発病におけるその役割に関して、および治療の標的として注目に値する。これは、細胞膜表面結合型受容体チロシンキナーゼであり、通常は、細胞の増殖および分化をもたらすシグナル伝達経路に参与する。乳癌の約25~35パーセントは、HER2/neu遺伝子の増幅またはそのタンパク質産物の過剰発現を有する。過剰発現は、卵巣癌および胃癌などの他の癌においても起こる。臨床的に、HER2/neuは、モノクローナル抗体トラスツズマブ(Herceptinとして市販されている)の標的として重要である。

【 0 1 4 1 】

能動ワクチン接種アプローチに関しては、環状法で提示されたエピトープ配列QMWAPQWGPD(SEQ ID NO: 225)が、治療効果を有するポリクローナル抗体を誘導することが示されている。したがって、適切なアダプター配列を用いて、ペプチドQMWAPQWGPD(SEQ ID NO: 225)をAAVに挿入することにより、Her2/NEU-AAVワクチンを作製することができる(Riemer et al., 2007)。

【 0 1 4 2 】

自己免疫疾患および慢性炎症性疾患の治療のためのワクチン

50

自己免疫疾患および炎症性疾患は、体内に通常存在する物質および組織に対する身体の過活動免疫応答によって起こる。つまり、身体がそれ自身の細胞を攻撃する。

【0143】

関節リウマチ(RA)は、先進工業国の集団の0.5~1.0%が罹患している、関節、関節周囲の組織、および身体他の器官の慢性炎症を引き起こす自己免疫疾患である。これは通常、顕著な身体障害、およびひいては生活の質の顕著な低下を招く。適切に治療されなければ、RAによって平均余命が低下する(Smolens and Steiner, 2003)。

【0144】

乾癬は、表皮細胞の異常増殖、血管新生、免疫細胞の浸潤、およびサイトカインの産生増加を特徴とする、皮膚の慢性炎症性疾患である。

【0145】

免疫細胞の同様の活性化およびサイトカインの産生増加は、以下にさらに記載する自己免疫疾患および(慢性)炎症性疾患にも関連している。

【0146】

そのような疾患誘発/関連免疫応答を限定または制御するためには、自己免疫疾患および炎症性疾患の病因に關与するサイトカインを中和することが、確立された治療様式となっている。RAおよび他の疾患の治療において、TNF- α の作用を中和する抗体(インフリキシマブ、アダリムマブ)および可溶性受容体構築物(エタネルセプト)が開発された。現在、RAの病因において、IL-32およびIL-17を含むいくつかの新規サイトカインを意味づける証拠が存在する。加えて、既存の標的、特にIL-1、IL-6、IL-15、IL-18、およびIL-12スーパーファミリーが臨床評価に近づいているため、筆者らはこれらの開発を評価する(Asquith et al., 2007)。

【0147】

感染症の治療のためのワクチン

ウイルスの細胞受容体に対する自己抗体の誘導によるウイルス感染の遮断は、好ましくは、標的受容体としてCCR5を用いるHIVのような従来のワクチン接種の試みが失敗に終わっているウイルスに関して、ウイルスに対する予防的または治療的ワクチン接種の推奨される機構である(Chackerian, 1999)。

【0148】

したがって、本発明の好ましい態様は、そのようなウイルス感染症および関連疾患、好ましくはHIV感染症/エイズの治療のためのワクチンとして用いることができる、ウイルス受容体、好ましくはCCR5のエピトープまたはミモトープ、好ましくは公知のエピトープまたはミモトープを含むパルボウイルス、特にAAVの構造タンパク質である。好ましい態様において、B細胞エピトープはヒトエピトープである。

【0149】

好ましいB細胞エピトープは、
HYAAAQWDFGNTMCQL (SEQ ID NO: 357),
YAAQWDFGNTMCQ (SEQ ID NO: 358), RSQKEGLHYT (SEQ ID NO: 359)

、またはそれらの機能的活性変種である。

【0150】

したがって、本発明の好ましい態様は、自己免疫疾患および/または慢性炎症性疾患、好ましくは関節リウマチおよび/またはクローン病の治療に用いることができる、サイトカインの、好ましくはTNF- α 、IL-6、および/またはIL-17のエピトープまたはミモトープ、好ましくは公知のエピトープまたはミモトープを含むパルボウイルス、特にAAVの構造タンパク質である。好ましい態様において、B細胞エピトープはヒトエピトープである。好ましくは、これをI-453および/またはI-587、特にAAV1、AAV2、またはAAV-6のI-453および/またはI-587に挿入する。好ましいB細胞エピトープはヒトエピトープである：

10

20

30

40

SSRTPSDKPVAAHVWANPQAE (TNF- α V1)	(SEQ ID NO: 226)
SRTPSDKPVAAHVANP (TNF- α V2)	(SEQ ID NO: 227)
SSRTPSDKP (TNF- α V3)	(SEQ ID NO: 228)
NADGNVDYHMNSVP (IL-17 V1)	(SEQ ID NO: 229)
DGNVDYHMNSV (IL-17 V2)	(SEQ ID NO: 230)
RSFKEFLQSSLRALRQ (IL-6 V1)	(SEQ ID NO: 231)
FKEFLQSSLRA (IL-6 V2)	(SEQ ID NO: 232)

10

【 0 1 5 1 】

本発明はさらに、新規サイトカインB細胞エプトープTNF- V1、TNF- V2、TNF- V3、IL-17 V1、IL-17 V2、IL-6 V1、およびIL-6 V2、ならびに/またはそれらの機能的活性変種に関する。本発明はさらに、このようなエプトープまたはその機能的活性変種を一般的に含む薬剤、好ましくは、自己免疫疾患および/または炎症性疾患、好ましくは関節リウマチ、クローン病、または乾癬の治療または予防のための、そのようなエプトープまたはその機能的活性変種を含むワクチンに関する。

【 0 1 5 2 】

本発明によると、パルボウイルスの構造タンパク質は、公知のパルボウイルスの大部分、特にAAVに関して、VP-1、VP-2、および多くの場合VP-3と称されるウイルスキャプシドタンパク質である。原理上は、変異cap遺伝子から作製された組換えパルボウイルスを、動物モデルまたはさらにはヒトにおけるワクチン接種に直接用いることができる。しかしながら、このようなワクチン接種は遺伝子療法であるため、ワクチン接種目的には、不活化された(例えば、線または紫外線照射による)ゲノム含有AAV粒子、または各パルボウイルスのウイルス様粒子を用いることが好ましい。このようなウイルス様粒子は、各パルボウイルスの構造タンパク質、例えばVP-1、VP-2、および/もしくはVP-3、またはN末端もしくはC末端切断型構造タンパク質などのそれらの一部から構成されるが、ウイルスゲノムを含まないキャプシド様構造である。VP-2のみでウイルス様粒子に会合することが示されており、例えば大腸菌(*E. coli*)といった細菌、例えばサッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、ハンゼヌラ・ポリモルファ(*hansenula polymorpha*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)といった酵母、例えばバキュロウイルス発現系(SF9、SF+、またはHigh Five細胞)といった昆虫細胞、または哺乳動物細胞(CHO、HeLa、293、BHK、またはPerC6など)などの種々の発現系において発現させることができる。

20

30

【 0 1 5 3 】

別の好ましい態様は、規則的なウイルス様粒子を形成せずに、高度に構造化されたおよび/または高密度な様式で外来エプトープ/ミモトープを提示するキャプソメアまたはその他の規則的なもしくは無定形な凝集体を形成するパルボウイルスの構造タンパク質である。

【 0 1 5 4 】

パルボウイルス変異構造タンパク質を、第2のタンパク質またはペプチドにさらに融合させることができる。そのような第2のタンパク質は、表3に提供するようなタグであってよい。タグは、例えば精製目的で用いることができる。

40

【 0 1 5 5 】

好ましくは、パルボウイルス変異構造タンパク質は多量体構造を形成することができる。したがって、本発明の別の主題は、本発明によるパルボウイルス変異構造タンパク質を含む多量体構造に関する。そのような多量体構造は、キャプソメア、ウイルス様粒子、またはウイルスであってよい。キャプソメアとは、典型的にキャプシドタンパク質5~6個からなる(五量体および六量体)、ウイルスキャプシドの多量体サブユニットである。ウイルス様粒子は空のウイルスであり、すなわち、ウイルス様粒子は、ウイルスゲノムまたはその関連部分などの遺伝物質を含まない。

50

【0156】

多量体構造はまた、構造タンパク質少なくとも5個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも30個、最も好ましくは少なくとも60個の凝集体であってもよい。キャプソメアまたはウイルス様粒子と比較して、凝集体は対照的秩序のない無定形構造である。

【0157】

好ましくは、パルボウイルスにとって異種であるB細胞エピトープは、多量体構造の表面上に位置する。

【0158】

本発明のさらなる態様は、DNA、RNA、mRNAなどの、本発明のパルボウイルス変異構造タンパク質をコードする核酸である。

10

【0159】

本発明のさらなる態様は、本発明のパルボウイルス変異構造タンパク質、およびまたは本発明のパルボウイルス変異構造タンパク質をコードする核酸を含むウイルスである。このようなウイルスは活性があってもまたはなくてもよく、例えばこのようなウイルスは、弱毒化、または照射などの標準的な技法により不活化されていてよい。

【0160】

本発明のさらなる態様は、パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする核酸を含む細胞である。このような細胞は、細菌、好ましくは大腸菌、酵母、好ましくはサッカロミセス・セレピシエ、ハンゼヌラ・ポリモルファ、もしくはピキア・パストリス、昆虫細胞、好ましくはSF-9、SF+、もしくはHigh5、または哺乳動物細胞、好ましくはHeLa、293、VERO、PERC6、BHK、もしくはCHOであってよい。

20

【0161】

本発明のパルボウイルス変異構造タンパク質は、(a) 適切な条件下で、上に定義した細胞を培養することにより、パルボウイルス変異構造タンパク質をコードする核酸を発現させる段階、および(b) 段階(a)の発現されたパルボウイルス変異構造タンパク質を単離する段階を含む方法により、調製することができる。

【0162】

本発明の別の主題は、本発明の少なくとも1つのパルボウイルス変異構造タンパク質および/または本発明の核酸、好ましくは本発明の少なくとも1つの多量体構造を含む薬剤、好ましくはワクチンに関する。好ましくは、薬剤はワクチンである。

30

【0163】

本発明の好ましい態様において、ワクチンは、本明細書においてさらに定義されるように、パルボウイルス変異構造タンパク質を含む2つ以上の多量体構造の混合物である。好ましくは、患者へのワクチン接種のために、本明細書においてさらに定義されるように、異なるB細胞エピトープを提示するパルボウイルスのウイルス様粒子2~3種を併用する。さらに、本発明によるワクチンを、患者の便宜のために、何らかの他の型のウイルスと併用する。

【0164】

本発明の薬剤は、薬学的に許容される担体および/または賦形剤をさらに含み得る。本発明において有用な薬学的に許容される担体および/または賦形剤は従来のものであり、これには緩衝剤、安定剤、希釈剤、保存剤、可溶化剤が含まれ得る。E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)によるRemington's Pharmaceutical Sciencesは、本明細書に開示した(ポリ)ペプチドの薬学的送達に適した組成物および製剤を記載している。一般に、担体または賦形剤の性質は、使用する特定の投与様式に依存する。例えば、非経口用製剤は通常、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、デキストロース水溶液、グリセロールなどの薬学的小および生理的に許容される液体を媒体として含む注射液を含む。固体組成物(例えば、散剤、丸剤、錠剤、またはカプセル剤形態)の場合、従来の非毒性固体担体には、例えば、製薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが含まれ得る。投与しようとする薬学的組成物は、生物学的に

40

50

中性の担体に加えて、湿潤剤もしくは乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤等、例えば酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートなどの微量の非毒性補助物質を含み得る。

【0165】

好ましい態様において、薬剤は、アジュバントなどの免疫賦活物質をさらに含む。アジュバントは投与法に基づいて選択することができ、これにはフロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバントなどのミネラルオイルベースのアジュバント、ISAなどのMontanide不完全Seppicアジュバント、Ribiアジュバントシステムなどの水中油型乳剤アジュバント、ムラミルジペプチドを含むシントックスアジュバント製剤、またはアルミニウム塩アジュバントが含まれ得る。好ましくは、アジュバントは、ミネラルオイルベースのアジュバント、特にISA206(SEPPIC、フランス、パリ)、最も好ましくはISA51(SEPPIC、フランス、パリ)である。別の好ましい態様において、パルボウイルス変異構造タンパク質は、CpG、イミダゾキノリン、MPL、MDP、MALP；フラジェリン、LPS、LTA、もしくはコレラ毒素、またはそれらの誘導體、HSP60、HSP70、HSP90、サポニン、QS21、ISCOM、CFA、SAF、MF59、アダマンタン、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、またはサイトカインなどの少なくとも1つの適切なアジュバントと同時に製剤化する。

10

【0166】

より好ましい態様において、免疫賦活物質は、ポリカチオン性ポリマー、特にポリアルギニンなどのポリカチオン性ペプチド、免疫賦活性デオキシヌクレオチド(ODN)、少なくとも2つのLysLeuLysモチーフを含むペプチド、特に

20

KLKLLLLLKLK

、向神経活性化化合物、特にヒト成長ホルモン、ミョウバン、アジュバント、またはそれらの組み合わせを含む群より選択される。好ましくは、組み合わせは、ポリカチオン性ポリマーと免疫賦活性デオキシヌクレオチド、または少なくとも2つのLysLeuLysモチーフを含むペプチドと免疫賦活性デオキシヌクレオチドのいずれかである。さらにより好ましい態様において、ポリカリチン性ポリマーはポリカチオン性ペプチドである。

【0167】

本発明のさらにより好ましい態様において、免疫賦活物質は少なくとも1つの免疫賦活性核酸である。免疫賦活性核酸は、例えば、中性もしくは人工的なCpG含有核酸、非脊椎動物に由来する核酸の短い伸長、または規定の塩基状況において非メチル化シトシン-グアニン-ジヌクレオチド(CpG)を含む短いオリゴヌクレオチド(ODN)の形態(例えば、WO 96/02555に記載されるような)である。あるいは、例えばWO 01/93903に記載されるようなイノシンおよびシチジンに基づく核酸、またはデオキシイノシン残基および/もしくはデオキシウリジン残基を含むデオキシ核酸(WO 01/93905およびWO 02/095027に記載される)もまた、好ましくは本発明において免疫賦活性核酸として用いることができる。好ましくは、異なる免疫賦活性核酸の混合物を本発明において用いる。さらに、上述のポリカリチン性化合物を、上述の免疫賦活性核酸のいずれかと併用してもよい。好ましくは、そのような組み合わせは、WO 01/93905、WO 02/32451、WO 01/54720、WO 01/93903、WO 02/13857、およびWO 02/095027、ならびに豪州特許出願第A 1924/2001号に記載されている組み合わせに従う。

30

【0168】

さらなる態様において、パルボウイルスにとって異種である少なくとも1つのB細胞エпитープを含むパルボウイルス変異構造タンパク質を含む薬剤は、好ましくは、自己免疫疾患(例えば、1型糖尿病)、腫瘍疾患(例として、メラノーマ：例えばHMW MAA、多形性神経膠芽腫：例えばCA125、抗IL-13R、結腸癌：例えばCA125または抗EGF(R)、乳癌：例えばHer2/NEU、卵巣癌：例えばL1接着分子、B細胞リンパ腫：例えばCD20がある)、アレルギー性疾患(喘息、例えばアレルギー性鼻炎などのアレルギー、例えば標的はIgE、IL-4、IL-9、IL-13である)、代謝疾患(例えば、高コレステロール、コレステロール代謝への介入(標的例:CETP)、肥満、高血圧(標的例：アンジオテンシンII)、炎症性疾患(例えば、関節リウマチ、クローン病；標的例：IL-6、IL-17、およびTNF- α)、神経疾患(例えば、アルツハイマー病；標的例： β -アミロイド)を予防もしくは治療するため、または眼科(例えば、A

40

50

MD；標的例：VEGF)において用いるためのワクチンである(ワクチンの製造に用いられる)。

【0169】

本発明のバルボウイルス変異構造タンパク質およびまたは本発明のバルボウイルス変異構造タンパク質をコードする核酸の有効量を患者に投与することによるワクチン接種の方法、および/または本明細書において特定する疾患を治療もしくは予防するための方法もまた、本発明によって包含される。

【0170】

したがって、本発明のさらなる局面は、以下の治療および/または予防のための本発明の薬剤に関する

a) アレルギー性疾患および/または喘息、この場合のB細胞エピトープは、抗IgE抗体の抗イディオタイプエピトープ/ミモトープおよび/もしくはIgEエピトープ/ミモトープ、特に、最初のG、W、およびVが保存されており、かつシステイン残基Cがジスルフィド架橋によりペプチドの環状型を媒介しているEFCINHRGYWVCGDもしくはINHRGYWVの配列のミモトープ、または特に、

EKQRNGTLT (SEQ ID NO:

204), EDGQVMDVDLS (SEQ ID NO: 205), TYQCRVTHPHLPRALMR (SEQ ID NO: 206), RHSTTQPRKTKGSG (SEQ ID NO: 207), DSNPRGVSAAYLSR (SEQ ID NO: 208), TITCLVVDLAPSK (SEQ ID NO: 209), KTKGSGFFVF (SEQ ID NO: 210), THPHLPRALMRS (SEQ ID NO: 211),

GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK (SEQ ID NO: 212), LPRALMRS (SEQ ID NO: 213)

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；

b) アルツハイマー病、この場合のB細胞エピトープは、特に配列DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 158) またはその機能的活性変種を含むかまたは有する、 -アミロイドエピトープまたはミモトープを含む；

c) アテローム性動脈硬化症、この場合のB細胞エピトープは、CETPエピトープまたはミモトープ、特に、

PKTVSNLTESSESQVQS (SEQ ID NO: 214), SLMGDEFKAVLET (SEQ ID NO: 215), QHSVAYTFEED (SEQ ID NO: 216), INPEIITRDG (SEQ ID NO: 217), DISLTGDPVITASYL (SEQ ID NO: 218), DISLTGDPVITA (SEQ ID NO: 219), DQSIDFEIDSA (SEQ ID NO: 220), KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS (SEQ ID NO: 221), KNVSEDLPLPT (SEQ ID NO: 222), CDSGRVRTDAPD (SEQ ID NO: 223), FPEHLLVDFLQSL (SEQ ID NO: 224)

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；

d) 腫瘍疾患、この場合のB細胞エピトープは、増殖因子受容体または増殖因子のエピトープまたはミモトープ、特にHER2/neuエピトープまたはミモトープ、特にエピトープ QMWAPQWGP (SEQ ID NO: 225)

またはその機能的活性変種を含む；

e) 自己免疫疾患および/または慢性炎症性疾患、好ましくは関節リウマチおよび/またはクローン病、この場合のB細胞エピトープは、サイトカインの、好ましくはTNF- α 、IL-6、および/またはIL-17のエピトープまたはミモトープ、特に、

SSRTPSDKPVAVVAVANPQAE (SEQ ID NO: 226), SRTPSDKPVAVVAVANP
(SEQ ID NO: 227), SSRTPSDKP (SEQ ID NO: 228), NADGNVDYHMNSVP
(SEQ ID NO: 229), DGNVDYHMNSV (SEQ ID NO: 230),
RSFKEFLQSSLRALRQ (SEQ ID NO: 231), FKEFLQSSLR (SEQ ID NO: 232)

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；または
f) 感染症、好ましくはHIV感染症、この場合のB細胞エピトープは、ウイルス受容体の、
好ましくはCCR5のエピトープまたはミモトープ、特に、

HYAAAQWDFGNTMCQL (SEQ ID NO: 357), YAAQWDFGNTMCQ (SEQ ID
NO: 358), RSQKEGLHYT (SEQ ID NO: 359)

10

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む。

【 0 1 7 1 】

本発明のなおさらなる局面では、本明細書において特定する本発明の薬剤を、以下を治
療または予防する方法において使用し、

a) アレルギー性疾患および/または喘息、この場合のB細胞エピトープは、抗IgE抗体の抗
イディオタイプエピトープ/ミモトープおよび/もしくはIgEエピトープ/ミモトープ、特に
、最初のG、W、およびVが保存されており、かつシステイン残基Cがジスルフィド架橋によ
りペプチドの環状型を媒介している

20

EFCINHRGYWVCGDもしくはINHRGYWV

の配列のミモトープ、または特に、

EKQRNGTLT (SEQ ID NO:

204), EDGQVMDVDLS (SEQ ID NO: 205), TYQCRVTHPHLPRALMR (SEQ ID
NO: 206), RHSTTQPRKTKGSG (SEQ ID NO: 207), DSNPRGVSAAYLSR (SEQ
ID NO: 208), TITCLWDLAPSK (SEQ ID NO: 209), KTKGSGFFVF (SEQ ID
NO: 210), THPHLPRALMRS (SEQ ID NO: 211),

GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK (SEQ ID NO: 212), LPRALMRS (SEQ ID
NO: 213)

30

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；

b) アルツハイマー病、この場合のB細胞エピトープは、特に配列

DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 158)

またはその機能的活性変種を含むかまたは有する、 -アミロイドエピトープまたはミモ
トープを含む；

c) アテローム性動脈硬化症、この場合のB細胞エピトープは、CETPエピトープまたはミモ
トープ、特に、

40

PKTVSNLTESSSESVQS (SEQ ID NO: 214), SLMGDEFKAVLET (SEQ ID NO:
215), QHSVAYTFEED (SEQ ID NO: 216), INPEIITRDG (SEQ ID NO: 217),
DISLTGDPVITASYL (SEQ ID NO: 218), DISLTGDPVITA (SEQ ID NO: 219),
DQSIDFEIDSA (SEQ ID NO: 220), KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS (SEQ ID NO:
221), KNVSEDLPLPT (SEQ ID NO: 222), CDSGRVRTDAPD (SEQ ID NO:
223), FPEHLLVDFLQSL (SEQ ID NO: 224)

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；

d) 腫瘍疾患、この場合のB細胞エピトープは、増殖因子受容体または増殖因子のエピトー

50

ブまたはミモトープ、特にHER2/neuエピトープまたはミモトープ、特にエピトープ
 QMWAPQWGPD (SEQ ID NO: 225)

またはその機能的活性変種を含む；

e) 自己免疫疾患および/または慢性炎症性疾患、好ましくは関節リウマチおよび/または
 クローン病、この場合のB細胞エピトープは、サイトカインの、好ましくはTNF- α 、IL-6
 、および/またはIL-17のエピトープまたはミモトープ、特に、

SSRTPSDKPVAHVANPQAE (SEQ ID NO: 226), SRTPSDKPVAHVANP
 (SEQ ID NO: 227), SSRTPSDKP (SEQ ID NO: 228), NADGNVDYHMNSVP
 (SEQ ID NO: 229), DGNVDYHMNSV (SEQ ID NO: 230),
 RSFKEFLQSSLRALRQ (SEQ ID NO: 231), FKEFLQSSLRA (SEQ ID NO: 232)

10

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む；または
 f) 感染症、好ましくはHIV感染症、この場合のB細胞エピトープは、ウイルス受容体の、
 好ましくはCCR5のエピトープまたはミモトープ、特に、

HYAAAQWDFGNTMCQL (SEQ ID NO: 357), YAAQWDFGNTMCQ (SEQ ID
 NO: 358), RSQKEGLHYT (SEQ ID NO: 359)

、およびそれらの機能的活性変種からなる群より選択されるエピトープを含む、
 この場合、該薬剤の治療有効量を、予防または治療を必要とする患者に投与する。

20

【0172】

免疫に用いるワクチンは、経口、鼻腔内、筋肉内(i.m.)、リンパ節内、皮内、腹腔内、
 皮下(s.c.)、およびこれらの組み合わせを含む任意の従来の様式で、しかし最も好ましく
 は筋肉内注射により、ワクチンを必要とする対象、好ましくは哺乳動物、さらにより好ま
 しくはヒトに投与することができる。

【0173】

各投与量の容量は、好ましくは最大約5 ml、さらにより好ましくは1 ml~3 ml、最も好
 ましくは約2 mlである。筋肉内注射が選択された投与経路である場合の用量は、好ましく
 は最大約5 ml、好ましくは最大3 ml、好ましくは1 ml~3 ml、より好ましくは0.5 ml~2
 ml、最も好ましくは約1 mlである。各用量中のワクチンの量は、これをワクチン接種した
 対象に対して効果的な免疫を付与し、該対象が臨床徴候を発症するリスクを減少させるの
 に十分でなければならない。

30

【0174】

好ましくは、タンパク質または核酸の単位用量は、最大約5 μ gタンパク質/kg体重、よ
 り好ましくは約0.2~3 μ g、さらにより好ましくは約0.3~1.5 μ g、より好ましくは約0.4
 ~0.8 μ g、さらにより好ましくは約0.6 μ gである。別の好ましい単位用量は、最大約6 μ g
 タンパク質または核酸/kg体重、より好ましくは約0.05~5 μ g、さらにより好ましくは約0
 .1~4 μ gであってよい。

【0175】

用量は好ましくは、例えば1~3週間の間隔をあけて、1~4回、特に1~3回投与する。用
 量当たりのタンパク質の好ましい量は、約1 μ g~約1 mg、より好ましくは約5 μ g~約500
 μ g、さらにより好ましくは約10 μ g~約250 μ g、最も好ましくは約25 μ g~約100 μ gであ
 る。

40

【0176】

核酸送達の組成物および方法は、当業者に公知である。本発明の核酸は、本発明の方法
 においてまたは本明細書に記載する組成物においてDNA配列として使用することができ、
 裸のDNAとして、薬学的に許容される担体を伴って、またはベクター中に含めて投与する
 ことができる。核酸は、例えば注射により、治療的にまたはワクチン組成物の一部として
 投与することができる。

【0177】

50

核酸組成物の「有効量」は、インビボ効果を示し得る、例えば徴候または症状を予防または改善し得る量として計算することができる。このような量は、当業者によって決定され得る。好ましくは、このような組成物は非経口的に、好ましくは筋肉内にまたは皮下に投与する。しかしながら、このような組成物は、鼻腔内、経口、または局所を含む任意の他の適切な経路によって投与されるように製剤化することも可能である。このような治療用組成物の送達経路および投与量の選択は、当技術分野の技術の範囲内である。

【0178】

本発明との関連における治療とは、治療処置および予防または防止対策の両方を指し、その目的は、標的とする病的状態または障害を予防するまたは遅延させる(軽減する)ことである。治療を必要とするものには、既に障害を有するもの、および障害を有しやすいもの、または障害が予防されるべきものが含まれる。

【0179】

本発明に特に適している自己免疫疾患の例を表5に記載する。

【0180】

(表5) 自己免疫疾患および適切な抗体標的/抗原

疾患	抗体標的/抗原
重症筋無力症	アセチルコリン受容体
グレーブス病	甲状腺刺激ホルモン受容体
甲状腺炎	甲状腺
インスリン抵抗性糖尿病	インスリン受容体
喘息	$\beta 2$ アドレナリン受容体
若年性インスリン依存性糖尿病	膵島細胞
悪性貧血	胃壁細胞
アジソン病	副腎細胞
特発性副甲状腺機能低下症	副甲状腺細胞
自発不妊	精子
早期卵巣機能不全	間質細胞、黄体細胞
天疱瘡	皮膚の細胞間物質
原発性胆汁性肝硬変	ミトコンドリア
自己免疫性溶血性貧血	赤血球
特発性血小板減少性紫斑病	血小板
特発性好中球減少症	好中球
白斑	メラニン形成細胞
骨硬化症およびメニエール病	II型コラーゲン
慢性活動性肝炎	肝細胞の核
グッドパスチャー症候群	基底膜
関節リウマチ	γ グロブリン、ウイルス関連抗原、IL-6, IL-17, TNF- α
シェーグレン症候群	核およびセントロメア
全身性エリテマトーデス	核、DNA、RNA、赤血球等
強皮症	核およびセントロメア
多発性筋炎	核、RNA

10

20

30

40

【0181】

好ましい自己免疫疾患は、喘息、若年性インスリン依存性糖尿病(1型糖尿病)、および関節リウマチである。したがって、好ましい抗原は、 $\beta 2$ アドレナリン受容体、膵島細胞、 γ グロブリンE、ウイルス関連抗原、IL-6、IL-17、およびTNF- α という対応する抗原である。

【0182】

本発明に特に適している腫瘍疾患の例を表6に記載する。

【0183】

(表6) 腫瘍疾患および適切な抗体標的/抗原

疾患	抗体標的/抗原
メラノーマ	HMW MAA (= 高分子量メラノーマ関連抗原), BAGE, GAGE, MAGE-3, Melan A, MART-1, NY ESO, gp 100, チロシナーゼ
結腸癌	CA125, EGFR
多形性神経膠芽腫 (GBM)	CA125, IL13R
乳癌	Her2/NEU
卵巣癌	L1細胞接着分子
種々の癌 (例えば、結腸癌、肺小細胞癌)	VEGF
B細胞リンパ腫、 例えば非ホジキンリンパ腫	CD20

10

【 0 1 8 4 】

アレルギー性疾患の例は、喘息、特にアトピー性喘息、およびすべての型のアレルギーである。アレルギー性疾患に対するワクチン接種の好ましい標的抗原は、IgE、IL9、およびIL13、特にIgEである。

20

【 0 1 8 5 】

代謝疾患の例は、コレステロール代謝の障害(例えば、アテローム性動脈硬化症)であり、好ましい標的抗原はCETPである。

【 0 1 8 6 】

本発明に特に適している炎症性疾患の例を表7に記載する。

【 0 1 8 7 】

(表7)(慢性)炎症性疾患

疾患	
COPD(慢性閉塞性肺疾患)	
OA(変形性関節症)	
関節リウマチ	
リウマチ性多発筋痛症	
痛風性関節炎、痛風、偽痛風	
アテローム性動脈硬化症	10
クローン病(炎症性腸疾患)	
肩腱炎、滑液包炎	
大腸炎	
多発性硬化症	
全身性エリテマトーデス	
乾癬	
若年性糖尿病	
I型糖尿病(インスリン抵抗性糖尿病)	20
甲状腺機能低下症	
慢性疲労症候群	
川崎病	
循環器疾患	
心膜炎	
リンパ節腫大	
レイノー現象	30
サルコイドーシス	
シェーグレン症候群	
脊椎関節症	
血管炎	
強皮症	
グッドパスチャー症候群	
ウェゲナー肉芽腫症	
側頭＝巨細胞性動脈炎	40
セリアック病	
アジソン病	
自己免疫性肝炎	
グレース病	
移植片対宿主病	

【 0 1 8 8 】

好ましい標的抗原は、IL-6、IL-17、TNF- 、およびCD20である。

【0189】

眼科の疾患の例は、加齢性黄斑変性症(AMD)および糖尿病性網膜炎であり、これらの徴候における好ましい標的はVEGFである。

【0190】

他の好ましい疾患は、標的抗原が β -アミロイドであるアルツハイマー病である。

【0191】

パルボウイルスにとって異種である少なくとも1つのB細胞エピトープを含むパルボウイルス変異構造タンパク質は、免疫寛容を破壊するための薬剤の製造に特に有用であり得る。

【0192】

本発明の使用との関連において、パルボウイルス変異構造タンパク質の特徴は、上に定義する通りである。

【0193】

好ましい態様において、疾患は、感染症、すなわちウイルス、細菌、菌類、または真核生物寄生虫によって起こる疾患ではない。

【0194】

さらなる態様において、パルボウイルス変異構造タンパク質は、遺伝子療法において用いられるベクターを作製するために用いられない。

【0195】

本明細書において、引用したすべての文献の内容は参照により含まれる。

【0196】

以下の実施例および図面は、本発明を限定することなくこれを詳細に説明するためのものである。

【実施例】

【0197】

実施例

以下の実施例は、AAV、特にAAV2に関して本発明を例証する。アデノ随伴ウイルスと他のパルボウイルスの構造は全般的に類似しているため、本発明を他のパルボウイルスに容易に移行することができる。

【0198】

1. AAVライブラリーの作製

AAVライブラリーのクローニングおよびAAVキャプシド改変ウイルス粒子の産生は、Perabo et al.(Perabo et al., 2003)によって記載されている。AAVライブラリーは、AAVキャプシドタンパク質の1-587位に7アミノ酸のランダム挿入を保有する、約 4×10^6 個のキャプシド改変ウイルス粒子からなる。7-merの選択は実験に基づくものであり、許容される多様性の量を生じるのに十分長い、キャプシドの安定性を損なわない配列を挿入する必要性によって決定された。典型的なB細胞エピトープは一般的に5または6アミノ酸長から構成されるため(US 2004/0228798)、このライブラリーのペプチド配列は、AAVキャプシド変種をワクチンとして用いた場合に挿入ペプチド配列に対する特異的B細胞応答を誘導し得るB細胞エピトープを規定するのに十分である。

【0199】

2. AAVライブラリーの表現型と遺伝子型の連関

AAVライブラリーは、キャプシドタンパク質全60個のVP3領域の1-587位における7アミノ酸のランダム挿入が互いに異なるAAVキャプシド変異体のプールを含む。AAVライブラリーの産生に際しては、変異キャプシドタンパク質、ウイルス複製タンパク質Repをコードし、かつ逆方向末端反復配列(ITR)を保有するプラスミドのプールを、トランスフェクションにより293細胞に導入する(Perabo et al., 2003)。

【0200】

一般に、高DNA濃度の所与のプラスミドプールをトランスフェクトすると、細胞当たりいくつものコピーが導入される。したがって、単一の293細胞はそれぞれいくつもの異なる

10

20

30

40

50

るAAVプラスミドを取り込み、これらプラスミドはすべて細胞内で複製し、異なる挿入7mer配列を有するAAVキャプシドタンパク質を発現する。したがって、多くのトランスフェクト細胞は、異なる7mer挿入を有するキャプシドタンパク質から構成されるモザイクキャプシドを構築する。これらのキャプシドはランダムに選択された1つのAAVゲノムをキャプシド封入するため、AAV粒子の多くは、そのキャプシドを構成するその60個のキャプシドタンパク質のいずれにも関連しないベクターゲノムを含み、すなわち、これらのモザイクウイルスの遺伝子型と表現型は関連していない。以下に記載する抗イディオタイプAAVライブラリースクリーニングアプローチは、一般的にAAV表現型(個々のAAV粒子のキャプシド変種)に基づくため、および選択されたAAV変種に関する配列情報が各AAVゲノムから推定されることが好ましいため、遺伝子型と表現型の連関が非常に好ましい。したがって、それぞれが、1種類のペプチド挿入のみを提示し、かつ各自のウイルスゲノムのみを含むウイルスキャプシドからなるウイルス変異体のプールをもたらす連関段階を導入することができる。

10

【0201】

細胞1個につきAAV変異体が1個のみ複製されることを達成するために、細胞1個当たり1つのウイルスゲノムを導入することを目的として、低いウイルス濃度での細胞導入による連関を確立した。1個または少数のAAV粒子をHeLa細胞に導入するための2つの異なる方法を確立した：A) 非特異的取り込み、およびB) 限定数のAAV粒子によるHeLa細胞のウイルス感染。

20

【0202】

2.1 非特異的取り込みによる遺伝子型と表現型の連関

非特異的なAAVキャプシドの取り込み、およびそれに続く感染HeLa細胞によるAAV増幅により、AAVライブラリーの遺伝子型と表現型の連関を行った。

【0203】

2.1.1 固定化A20抗体に対するAAVの結合

細胞培養プレート(15 cm、TPP) 1枚をAAV2キャプシド特異的A20抗体(各ハイブリドーマの上清) 10 mlで、室温で2時間コーティングした。A20抗体は、1-587位に挿入された配列とは無関係に、無傷のAAVキャプシドに結合する(Grimm et al., 1999, Wistuba et al., 1997)。A20コーティングプレートを、1% Tween-20を含むD-PBS 20 mlで3回洗浄して、非結合のA20抗体を除去した。洗浄後、プレートに対するAAV粒子の非特異的結合を回避するために、コーティングプレートをブロッキング緩衝液(1% Tween-20を含むD-PBS中の5% 粉乳) 20 mlと共に室温で2時間インキュベートした。

30

【0204】

次に、プレートを全量10 mlのブロッキング緩衝液中で、細胞当たりのゲノム粒子(GPC) 10、100、および1000個のAAVライブラリーと共に室温で2時間インキュベートした。AAV集団のゲノム力価は、以下に記載する通りに、定量的リアルタイムPCRにより決定しておいた。A20コーティングプレートをAAVライブラリーと共にインキュベートした後、D-PBS/1% Tween-20 10 mlで20回洗浄し、その後D-PBS 10 mlで4回洗浄することにより、非結合のウイルスを除去した。

40

【0205】

2.1.2. HeLa細胞によるAAVの取り込みおよび増幅

15 cm培養プレート当たり 4.0×10^6 個のHeLa細胞を、A20抗体によって捕獲されたAAV粒子上に播種した。同時に、HeLa細胞をMOI 5のアデノウイルス2型(AdV2)に感染させて、AAV粒子の複製を誘導した。HeLa細胞の感染および培養を、10%(v/v)ウシ胎仔血清(FCS)および1%(v/v)ペニシリン/ストレプトマイシンを含む全量10 mlのDMEM中で、加湿雰囲気中の37 °Cおよび5% CO₂で24時間行った。培養の24時間後、10%(v/v) FCSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むさらなる10 mlのDMEMをプレートに添加して、全量を20 mlとした。細胞を加湿雰囲気中の37 °Cおよび5% CO₂で、さらに24時間培養した。培養の24時間後、細胞スクレーパーを用いてHeLa細胞を回収し、遠心分離(3000 g、10分、4 °C)により収集した。細胞をD-PBS 5 mlで洗浄した。遠心分離(3000 g、10分、4 °C)後、細胞ペレッ

50

トを溶解緩衝液(150 mM NaCl、50 mM Tris、pH 8.5) 500 µlに再懸濁した。液体窒素および37 °Cに調節したサーモブロックを用いる3回の融解/凍結サイクルにより、細胞を溶解した。細胞溶解物を50 U/mlベンゾナーゼ(Merck)で、37 °Cで30分間処理した。ベンゾナーゼ処理後、細胞溶解物を遠心分離(3700 g、4 °C、20分)により清澄化した。

【0206】

2.1.3. Light Cycler PCRによるAAVゲノム力価の評価

ゲノム力価を決定するため、ウイルスを含むベンゾナーゼ処理細胞溶解物50 µlをDNAの単離に使用した。AdVの不活化のため、溶解物を60 °Cで30分間インキュベートした。溶解物をPBSで4倍希釈し、プロテイナーゼK処理を含むDNeasy組織キット(Qiagen)を用いて全DNAを精製した。DNAを、Tris-HCl、pH 7.5 200 µl中に溶出した。Light CyclerファストスタートDNAマスターSYBRグリーンIキット(Roche)を用いて、DNA 2.0 µlをLight Cycler PCRマスターミックスに添加した。PCR増幅には、プライマー

10

4066-Back 5'-ATG TCC GTC CGT GTG TGG -3' および (SEQ ID NO: 86)

3201-For 5'-GGT ACG ACG ACG ATT GCC -3' (SEQ ID NO: 87)

を用いた。Roche Light Cycler 2.0と共に提供されるプログラムを用いて、コンピュータ評価により力価を決定し、標準物質と比較した。

【0207】

2.1.4. AAVライブラリー挿入部位のPCR増幅およびサブクローニング

HeLa細胞によるAAVの非特異的取り込みおよび増幅後のAAVライブラリーの遺伝子型と表現型の連関を解析するために、挿入部位を含むAAVライブラリーDNAをPCRにより増幅し、pRC-Kotin(以下に記載する)にサブクローニングし、配列決定により解析した。そのため、上記の通りに、導入されたHeLa細胞の溶解物の一定分量50 µlから全DNAを精製した。細胞溶解物をPBSで4倍希釈し、製造業者の説明書に従ってDNeasy組織キットを用いて全DNAを調製した。全DNAをH₂O 50 µl中に溶出した。ライブラリー挿入部位を含むAAVゲノムの断片を、全量50 µl中で、細胞溶解物から調製した鋳型としての全DNA 5.0 µl、ならびに20 pmolのプライマー

20

BsiWI back 5'-TAC CAG CTC CCG TAC GTC CTC GGC -3'

(SEQ ID NO: 88)

30

および

SnaBI forward 5'-CGC CAT GCT ACT TAT CTA CG -3' (SEQ ID NO: 89)

を用いて、PCRにより増幅した。PCRは、ハイフィディリティPlatinum Pfxポリメラーゼキット(Invitrogen)を用いて行った。95 °Cで3分間のDNA鋳型の最初の熱変性後に、35回のPCRサイクル(95 °Cで45秒の変性、56 °Cで40秒のアニーリング、68 °Cで2分の伸長)により、DNAを増幅した。68 °Cで10分間の最終的な伸長段階の後、増幅を停止した。PCR反応物の一定分量を、1% TBEアガロースゲルで解析した。PCR産物を、PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製した。PCR産物を、ベクターpRC-KotinのBsiWI/SnaBI部位にクローニングした。pRCプラスミドは以前に記載されている(Girod et al. 1999)。pRC-Kotinでは、ITRが除去されており、Cap ORFの下流に付加的なSnaBI制限部位が導入された。エレクトロコンピテント大腸菌XL-1 Blue MRFに、エレクトロポレーションによってこのベクターを形質転換した。このクローニング反応の単一の独立クローン100個のプラスミドを調製し、ライブラリーの挿入部位を、プライマー

40

4066-back 5'-ATG TCC GTC CGT GTG TGG -3'. SEQ ID NO: 86

を用いて配列決定した。

【0208】

2.1.5. HeLa細胞による非特異的取り込み後のAAVライブラリー配列の統計解析

単一クローンの少なくとも100個のプラスミドの配列決定から得られたヌクレオチド配

50

列をタンパク質配列に翻訳し、AAV2 capの1-587位に挿入された7merペプチド配列を解析した。AAV2ライブラリーの遺伝子型と表現型の連関の状態は、1-587位に挿入された7merペプチド配列内に検出された終止コドンの量によって反映される。なぜならば、キャプシドタンパク質とインフレイムの終止コドンをコードする配列は、2つ以上のキャプシドコードプラスミドがHeLa細胞1個にトランスフェクトされた場合に限り、無傷のAAVキャプシドに構築され得るからである。コドン使用頻度の点から、7merペプチド配列100個中に14.6個の終止コドンが予測され(ライブラリーのNNB設計のため)、元の非連関AAVライブラリーでは100個中に8.6個が存在し、各AAV DNAライブラリーでは平均して9.0個の終止コドンが見出された。

【0209】

終止コドンの数をライブラリーの連関状態の指標として見なすと、終止コドンの数は、ライブラリーの表現型/遺伝子型連関後に顕著に減少するはずである。加えて、ライブラリーの生物多様性は維持されるべきである。生物多様性の指標は、重複配列が存在しないことである。

【0210】

GPC 10でのAAV取り込み後に、配列のうちの約40%の単一配列が2回以上出現したことを考えると、これは生物多様性が低下したと見なすべきである。GPC 100および1000を使用する取り込み実験では、重複配列は存在せず、ゲノム粒子と細胞との比率がより優れていること、および多様性がより優れていることが示される。終止コドンの数は元のライブラリーよりも少なく、これにより十分に連関されたライブラリーであることが示される(表8)。GPC 1000の場合には、2つ以上のウイルス変異体が1つの細胞によって取り込まれ得る可能性が非常に高いため、より高いGPCを用いた場合、配列100個当たりで計算された終止コドンの数は予測通り増加した。まとめると、GPC 100での取り込みが、表現型と遺伝子型の連関およびAAVライブラリーの適切な多様性の維持の観点から適している。

【0211】

(表8) 取り込み(GPC 10、100、および1000)による連関後の終止コドンの頻度：少なくとも100個の配列を解析し、終止コドンの数を配列100個当たりで計算した。

	非連関のウイルスプール	取り込み		
		GPC 10	GPC 100	GPC 1000
終止コドン/ 配列100個	8.6	1.4	2.0	4.6

【0212】

2.2. 感染による遺伝子型と表現型の連関

非連関AAVライブラリーによる各モザイクピリオンが、AAV粒子感染を付与する細胞結合モチーフを少なくとも1つ含む場合、生物多様性を喪失することのない、感染によるAAVライブラリーの連関が機能する。あるいは、例えばそれぞれ10分の1の粒子のみになお感染性があるとすると(対応する結合モチーフおよび細胞内輸送モチーフが少量であるため)、各ゲノムが少なくとも1つの感染粒子にパッケージングされる可能性が比例して増大するという理由から、10倍過剰の粒子を処理して、ライブラリーによる各配列が細胞によって少なくとも1回取り込まれることを保証しなければならない。取り込み実験の場合と同様に、異なるGPCを試験して、AAVライブラリーの完全な生物多様性を保持する最適な連関効率を決定した。

【0213】

15 cm細胞培養プレート(TPP)に、 2×10^6 個のHeLa細胞を培地(10%(v/v) FCSおよび1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM) 15 mlで播種し、加湿雰囲気中の37 °C、5% CO₂で24時間培養した。24時間後、培地を交換し、細胞を細胞当たりのAAVゲノム粒子(GPC) 10、100、および1000個に感染させ、アデノウイルス(MOI 5)の存在下で48時間インキュベートして、AAVの複製およびパッケージングを可能にした。細胞スクレーパーを用いてH

10

20

30

40

50

eLa細胞を回収し、遠心分離(3000 g、10分、4)により収集した。細胞をD-PBS 5 mlで洗浄した。遠心分離(3000 g、10分、4)後、細胞ペレットを溶解緩衝液(150 mM NaCl、50 mM Tris、pH 8.5) 500 µlに再懸濁した。液体窒素および37 に調節したサーモブロックを用いる3回の融解/凍結サイクルにより、細胞を溶解した。細胞溶解物を遠心分離により清澄化した。

【 0 2 1 4 】

上記の通りに、全DNAを精製し、ウイルスDNAをPCRにより増幅し、AAV pRC-Kotinベクターにクローニングした。上記の通りに、プラスミドを細菌に形質転換し、単一クローンを拾い、配列を決定した。

【 0 2 1 5 】

2.2.1. HeLa細胞の感染後のAAVライブラリー配列の統計解析

単一クローンの少なくとも100個のプラスミドの配列決定から得られたヌクレオチド配列をタンパク質配列に翻訳し、AAV2 VPの1-587位に挿入された7merペプチド配列を解析した。上記の通りに(2.1.5)、AAVライブラリーの遺伝子型と表現型の連関の状態は、1-587位に挿入された7merペプチド配列内に検出された終止コドンの量によって反映される。

【 0 2 1 6 】

非特異的取り込みによる連関に関して観察されたのと同様に、AAVライブラリーによるHeLa細胞の感染にGPC 10を用いた場合には、比較的多数の配列が2回以上出現した。AAVライブラリーによるHeLa細胞の感染にGPC 100および1000を用いた場合には、解析した少なくとも100個の配列中に重複配列は同定されなかったため、ライブラリーの多様性は高かった。遺伝子型と表現型の連関の状態の指標としての終止コドンの数は、GPC 100および1000ではゼロにまで下がり(表9)、ライブラリーの表現型と遺伝子型の効率的な連関が実証された。

【 0 2 1 7 】

(表9) GPC 10、100、および1000での感染実験における終止コドンの頻度：少なくとも100個の配列を解析し、終止コドンの数を配列100個当たりで計算した。

	非連関のウイルスプール	感染		
		GPC 10	GPC 100	GPC 1000
終止コドン/ 配列100個	8.6	1.2	0	0

【 0 2 1 8 】

2.3. 限界希釈による遺伝子型と表現型の連関

上記の連関法(取り込みまたは感染)に加えて、AAVライブラリーの遺伝子型と表現型の連関を、限定数のライブラリープラスミドによるHeLa細胞のトランスフェクションによって行うことができる。トランスフェクションに使用するプラスミドの量を、統計的に1つの単一プラスミドのみが各HeLa細胞によって取り込まれ、最終的に核に侵入するように計算するか、または以下のモデル読み取り系によってAAVライブラリーゲノムの理想的な数を決定する。

【 0 2 1 9 】

自己複製(例えば、B1/EBNAまたはSV40ori/ラージT抗原)レポーター遺伝子プラスミド(GFPなど)の漸増量を、全DNA量を一定に保つpUC19などの非関連担体DNAと同時にトランスフェクトする。自己複製プラスミド系を用いることによって、各トランスフェクト細胞が、フローサイトメトリーアッセイで検出される十分なGFPを産生することが保証される。細胞当たりの蛍光およびGFP陽性細胞の割合によって、レポーター遺伝子プラスミドのコピー数を増やしても、GFP陽性細胞の増加とはもはや比例せず、かつ細胞当たりの蛍光が増加して、細胞当たり2つ以上の単一レポーター遺伝子プラスミドが取り込まれることを意味する交差点が規定される。細胞当たり最大1つのライブラリープラスミドが取り込まれることを保証するには、交差点における濃度未満のレポーター遺伝子プラスミドまたはラ

10

20

30

40

50

イブラリープラスミドの量を選択しなければならない。

【0220】

したがって、アデノウイルスによる感染後、各トランスフェクト細胞は、細胞によって取り込まれたライブラリープラスミドに対応する1つの規定されたAAV変種型のみを産生する。

【0221】

3. HeLa細胞によるAAVの非特異的取り込みの評価

AAVライブラリーのランダムペプチド配列は、AAVのヘパリン結合ドメインを含むAAVキャプシドの587位に導入されているため、AAV変種を、挿入されたランダムペプチド配列による結合モチーフの再構成のために、ヘパリンになお結合する変種(結合体)と、ヘパリンに結合しない変種(非結合体)とに分類することができる。

10

【0222】

capに挿入されたランダムペプチドを含むAAVヘルパープラスミド(ヘルパープラスミドライブラリー)を、二本鎖GFPベクタープラスミドと同時にトランスフェクトして、GFPベクターピリオンライブラリーを作製した。このライブラリーを感染によって連関させた。この連関ライブラリーをヘパリンアフィニティーカラムに供して、ヘパリン結合変種と非結合変種を分離した。このため、ライブラリーをヘパリンカラム(HiTrap、Amersham Bioscience)に供した。フロースルーが非結合体を含むのに対し、結合体はカラムに結合し、その後1M NaClによって結合体をカラムから溶出した。次に、両画分をイオジキサノール段階勾配遠心分離により精製して、ピリオンを濃縮した。その後、両プールのゲノム力価をLight Cycler PCRにより決定した。精製段階後、ゲノム力価 $1 \times 10^7 / \mu\text{l}$ (全500 μl)が得られた。

20

【0223】

結合体プールおよび非結合体プールを用いたHeLa細胞での感染および取り込み実験は、細胞に侵入する変種の異なる能力を反映するはずである。結合体および非結合体は、異なるヘパリン結合特性およびHSPGと相互作用する能力に起因して、それらの感染性に関して明確な相違を示すことが予測された。対照的に、取り込みはHSPGおよびヘパリン結合モチーフから独立していると想定されるため、結合体および非結合体は、取り込み実験において、それらの導入効率に関して大きな相違を示さないことが予測された。

【0224】

これについて解析するため、HeLa細胞 5.0×10^4 個/ウェルを、0.5 ml量の培地(10%(v/v) FCSおよび1%(v/v)ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM)で、24ウェル細胞培養プレートに播種した。細胞を、5.0% CO₂を含む加湿雰囲気中で37 °Cで1日培養した後、細胞を、ウェル当たり 1×10^8 個のゲノム粒子(GPC 1×10^3)の結合体/GFPプール、非結合体/GFPプール、またはrAAV/GFP(対照としての、GFPをコードする組換えwtAAV)に感染させた。5.0% CO₂を含む加湿雰囲気中で37 °Cで48時間培養した後、細胞のGFP発現レベルをフローサイトメトリーにより決定した(図3)。取り込み実験に関しては、24ウェルプレートを100 μl /ウェルのA20抗体(無傷のAAVキャプシドを認識するハイブリドーマ上清)で、室温で1時間コーティングした。D-PBS/1% Tween-20を用いて10回洗浄することにより、非結合のA20を除去した。0.5 ml/ウェルのブロッキング緩衝液(D-PBS/1% Tween-20中の10%粉乳)と共に室温で2時間インキュベートすることにより、ウェルをブロッキングした。A20コーティングウェルを、ウェル当たり 1×10^8 個のゲノム粒子(GPC 1×10^3)で、rAAV/GFP、結合体ライブラリー、または非結合体ライブラリーと共にインキュベートした。室温で1時間インキュベートした後、D-PBS/1% Tween-20を用いて10回洗浄し、その後D-PBSで4回洗浄することにより、非結合のAAV粒子を除去した。次に、結合しているAAV粒子の上に、HeLa細胞 1.0×10^5 個/ウェルを0.5 ml量の培地(10% FCSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM)で播種し、5.0% CO₂を含む加湿雰囲気中で37 °Cで48時間インキュベートした。導入効率(細胞のGFP発現)を、フローサイトメトリーにより決定した(図3)。

40

【0225】

予測通り、結合体プールおよびrAAV/GFPは、感染実験において匹敵する導入効率を示し

50

たのに対し、非結合体プールの感染性は強く低下した。感染実験において非結合体プールで認められた残存する20%の導入効率は、マクロ飲作用もしくは飲作用などのHSPG非依存的経路または別の受容体によって媒介される可能性が最も高い。

【0226】

感染実験とは対照的に、取り込み実験では、結合体プールと非結合体プールの導入効率は匹敵することが判明した。

【0227】

これらのデータから、感染とは対照的に、HeLa細胞によるAAV変種の取り込みは、ヘパリン結合ドメインから独立しており、かつAAVキャプシドの587位に挿入されたペプチド配列から独立していることが実証される。

【0228】

4. AAV変種の産生および精製

4.1. AdVヘルパープラスミド

293細胞または293T細胞におけるAAVの製造には、AdV E2、E4、およびVAI-VAIIをコードするAdVヘルパープラスミドを使用した。ヘルパープラスミドpUCAdvE2/E4-VAI-VAIIは、pAdEasy-1に由来するアデノウイルスE2およびE4-ORF6をコードするBamHI制限断片をpUC19の部位BamHI部位にサブクローニングすることによって構築した。得られたプラスミドをpUCAdvE2/E4と称する。pAdvantageに由来するVAI-VAII断片を、プライマー

XbaI-VAI-780-3' 5'-TCT AGA GGG CAC TCT TCC GTG GTC TGG TGG-3'

(SEQ ID NO: 90)

および

XbaI-VAII-1200-5' 5'-TCT AGA GCA AAA AAG GGG CTC GTC CCT GTT

TCC-3',

(SEQ ID NO: 91)

を用いてPCRにより増幅し、pTOPOにクローニングした後、pUCAdvE2/E4のXbaI部位にサブクローニングした。得られたプラスミドpUCAdvE2/E4-VAI-VAII(簡潔にpUCAdv)を、以下に記載する通りに、AAVの産生について同時トランスフェクション実験において評価した。AAV粒子形成を、A20 ELISAを用いて解析した。

【0229】

4.2. HEK 293 T細胞の同時トランスフェクションによるAAV変種の産生

AAV粒子の産生のため、サブクローニングされたライブラリー挿入配列を含むベクタープラスミドpRC-Kotin、pGFP、およびヘルパープラスミドpUCAdv(上記)をHEK 293-T細胞に同時にトランスフェクトした。プラスミドpGFPは、CMVプロモーターの制御下にGFP(緑色蛍光タンパク質) cDNAを含む。このGFPカセットには、AAV由来ITRが隣接している。したがって、293-T細胞にこれら3種のプラスミドを同時にトランスフェクトすると、表面にライブラリー7mer配列を提示し、かつウイルスゲノムとしてITRを有するGFPカセットを含むAAV粒子が産生される。

【0230】

直接的クローニングアプローチによって得られたAAV変種(以下に記載する)を、以下の修正を加えて上記の通りに産生させた。エピトープ/ミモトープ(1-453または1-587における)を含むベクタープラスミドpUCAV2とpUCAdvの同時トランスフェクションには、プラスミドのモル比1:1を選択した。上記のリン酸カルシウムトランスフェクションプロトコールを用いる、293-T細胞を有する培養プレート1枚のリン酸カルシウムトランスフェクションのために、pUCAV2(1-453または1-587にエピトープ/ミモトープを含む) 12.0 μgおよびpUCAdv 24.0 μgを使用した。トランスフェクションを上記の通りに行った。

【0231】

同時トランスフェクションのため、トランスフェクションの24時間前に、 7.5×10^6 個の293-T細胞を全量17.5 mlの培地(10% FCS、5 mM L-Gln、およびABAMを含むDMEM)で各 15 cm細胞培養プレートに播種し、加湿雰囲気中の37、5% CO₂で培養した。pRC-Kotin、pG

10

20

30

40

50

FP、およびpUCAdVの同時トランスフェクションに関しては、プラスミドのモル比1:1:1を選択した。US 2004/0053410に開示されているリン酸カルシウムトランスフェクションプロトコルを用いる、293-T細胞を有する培養プレート1枚のリン酸カルシウムトランスフェクションのために、pRC-Kotin 9.0 µg、pGFP 9.0 µg、およびpUCAdV 18.0 µgを270 mM CaCl₂ 875 µl中に混合した。簡潔に説明すると、2×BBS(50 mM BES(pH 6.95)、280 mM NaCl、および1.5 mM Na₂HPO₄) 875 µlを混合物に添加し、得られた溶液をピペティングにより慎重に混合した。この溶液を室温で20分間インキュベートした後、細胞培養プレートに1滴ずつ添加した。細胞を、加湿雰囲気中の35 °C、3% CO₂で18時間培養した。35 °Cおよび3% CO₂での18時間後、細胞を加湿雰囲気中の37 °C、5% CO₂でさらに3日間培養した。

【0232】

293-T細胞を細胞リフターで回収し、50 mlプラスチックチューブ(Falcon)に移し、3000 g、4 °Cで10分間遠心分離した。細胞ペレットを溶解緩衝液(150 mM NaCl、50 mM Tris、pH 8.5) 1.0 mlに再懸濁し、3回の凍結および融解サイクルに供した。溶解物を100 U/mlベンゾナーゼ(Merck)で、37 °Cで30分間処理した。細胞溶解物を2回の遠心分離段階(3700 g、4 °C、20分)により清澄化し、AAV含有上清をさらなる精製に使用した。

【0233】

溶解物のAAVキャプシド力価を、市販のELISA(AAV力価測定ELISA、Progen)を用いて決定した。

【0234】

4.3. イオジキサノールを用いる密度勾配遠心分離によるAAV粒子の精製

【0235】

イオジキサノール勾配遠心分離により、AAV粒子を精製した。ウイルス含有細胞溶解物を遠心分離(3700 g、4 °C、20分)により清澄化し、清澄化溶解物をQuickseal超遠心チューブ(26×77 mm、Beckman)に移した。異なる濃度のイオジキサノール溶液(Sigma)を、ウイルス含有溶解物の下に重層した。これにより、上部にウイルス溶液を有して、底の60% 6.0 ml、40% 5.0 ml、25% 6.0 ml、および15% 9.0 mlイオジキサノールから構成されるイオジキサノール勾配を作製した。勾配を超遠心機で、416,000 g、18 °Cで1時間遠心した。次に、40%相の下部でチューブに穴を開け、25%相が到達するまで溶液を回収チューブ中に滴下させることにより、カニユーレを用いてAAV粒子を含む40%相を抽出した。40%相のAAVキャプシド力価を、市販のELISA(AAV力価測定ELISA、Progen)を用いて決定した。

【0236】

5. 連関ウイルスライブラリーからの、標的抗体に対する特異的親和性を有するAAV粒子の選択

5.1. 抗KLH抗体を用いる抗イディオタイプ選択

抗イディオタイプAAV変種の選択の概念を試験するため、抗KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)マウスモノクローナル抗体(R&D Systems)を選択抗体として使用した。マウス抗KLHモノクローナル抗体(IgG₁アイソタイプ)は、抗原として精製KLHで免疫したマウスから得られた。別のアプローチでは、固定化選択抗体の非存在下における、細胞培養プレートへのAAV粒子の非特異的結合を解析した(陰性対照)。本実施例に記載する実験では、上記の通りに(2.2)、GPC1000での感染によって遺伝子型と表現型を連関させたAAVライブラリーを使用した。

【0237】

5.1.1. 固定化抗KLH抗体に対するAAVの結合 対 非コーティング細胞培養プレートに対するAAVの結合

細胞培養プレート(10 cm、TPP)を、コーティング緩衝液(0.2 M NaHCO₃ 0.8 ml、0.2 M Na₂CO₃ 1.7 ml、H₂Oで10 mlに調整)中の10 µg/ml濃度の抗KLHモノクローナルIgG₁抗体5 mlで、4 °Cで18時間~24時間コーティングした。別のアプローチ(陰性対照)では、プレートを抗体の非存在下でコーティング緩衝液で処理した。すべてのプレートを、1% Tween-20を含むD-PBS 10 mlで3回洗浄した。洗浄後、プレートに対するAAV粒子の非特異的結合を回避するために、プレートをブロッキング緩衝液(1% Tween-20を含むD-PBS中の5%粉乳) 1

10

20

30

40

50

0 mlと共に室温で2時間インキュベートした。次に、プレートを全量5 mlのプロッキング緩衝液中で、ゲノム含有AAVライブラリー粒子 1×10^8 個と共に室温で2時間インキュベートした。AAV集団のゲノム力価は、上記の通りに、定量的リアルタイムPCRにより決定した。抗KLH mAbコーティングプレートまたは非コーティングプレート(陰性対照)をAAVライブラリーと共にインキュベートした後、D-PBS/1% Tween-20 10 mlで20回洗浄し、その後D-PBS 10 mlで4回洗浄することにより、非結合のウイルスを除去した。

【 0 2 3 8 】

5.1.2. HeLa細胞によるAAVの取り込みおよび増幅

プレート当たり 1.0×10^6 個のHeLa細胞を、抗KLH mAbによって捕獲された、または対照アプローチ(陰性対照)において非特異的方法でプレートに吸着されたAAV粒子上に播種した。同時に、HeLa細胞をMOI 5のアデノウイルス2型(AdV2)に感染させて、AAV粒子の複製を誘導した。HeLa細胞の感染および培養を、10%(v/v)ウシ胎仔血清(FCS)および1%(v/v)ペニシリン/ストレプトマイシンを含む全量10 mlのDMEM中で、加湿雰囲気中の37 °Cおよび5% CO₂で48時間行った。培養の48時間後、細胞スクレーパーを用いてHeLa細胞を回収し、遠心分離(3000 g、10分、4 °C)により収集した。細胞をD-PBS 5 mlで洗浄した。遠心分離(3000 g、10分、4 °C)後、細胞ペレットを溶解緩衝液(150 mM NaCl、50 mM Tris、pH 8.5) 250 μlに再懸濁した。液体窒素および37 °Cに調節したサーモブロックを用いる3回の凍結/融解サイクルにより、細胞を溶解した。

【 0 2 3 9 】

5.1.3. AAVライブラリー挿入部位のPCR増幅およびサブクローニング

導入されたHeLa細胞の溶解物の一定分量50 μlから、全DNAを精製した。細胞溶解物をPBSで4倍希釈し、製造業者の説明書に従ってDNeasy組織キットを用いて全DNAを調製した。全DNAをH₂O 50 μl中に溶出した。ライブラリー挿入部位を含むAAVゲノムの断片を、全量50 μl中で、細胞溶解物から調製した鋳型としての全DNA 5 μl、ならびに20 pmolのプライマー

BsiWI back 5'-TAC CAG CTC CCG TAC GTC CTC GGC -3'

(SEQ ID NO: 92)

および

SnaBI forward 5'- CGC CAT GCT ACT TAT CTA CG -3' (SEQ ID NO: 93)

を用いて、PCRにより増幅した。PCRは、ハイフィディリティPlatinum Pfxポリメラーゼキット(Invitrogen)を用いて行った。95 °Cで3分間のDNA鋳型の最初の熱変性後に、35回のPCRサイクル(95 °Cで45秒の変性、56 °Cで40秒のアニーリング、68 °Cで2分の伸長)により、DNAを増幅した。68 °Cで10分間の最終的な伸長段階の後、増幅を停止した。PCR反応物の一定分量を、1% TBEアガロースゲルで解析した。PCR産物を、PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製した。PCR産物を、ベクターpRC-KotinのBsiWI/SnaBI部位にクローニングした。エレクトロコンピテント大腸菌XL-1 Blue MRFに、エレクトロポレーションによってこのベクターを形質転換した。単一クローン100個のプラスミドを調製し、ライブラリーの挿入部位を、プライマー

4066 back 5'- ATG TCC GTC CGT GTG TGG -3'. (SEQ ID NO: 86)

を用いて配列決定した。

【 0 2 4 0 】

得られたヌクレオチド配列をタンパク質配列に翻訳し、AAV2 VPの1-587位に挿入された7merペプチド配列を解析した。結果を表10にまとめる。非コーティング培養プレートを用いるライブラリーのスクリーニング(陰性対照)によって得られたAAV粒子と同じペプチド配列をライブラリー挿入部位に含むAAV粒子は、非特異的結合粒子であると見なし、さらなる解析から除外した。

【 0 2 4 1 】

10

20

30

40

50

(表10) ライブラリースクリーニングアプローチにおいて同定されたAAV変種

AAV 変種	選択抗体	配列	頻度			
			ラウンド I	ラウンド II	ラウンド III	ラウンド IV
H3	抗-KLH	ARAGLPG SEQ ID NO: 94	20,9	0,0	N/A	N/A
B6	抗-KLH	LRPDARP SEQ ID NO: 95	15,4	50,0	N/A	N/A
A6	抗-KLH	PRTDSPR SEQ ID NO: 96	26,4	45,0	N/A	N/A
F10	抗-KLH	PTLTPPR SEQ ID NO: 97	19,8	0,0	N/A	N/A
D9	抗-KLH	STLAPPA SEQ ID NO: 98	2,2	0,0	N/A	N/A
C4	抗-CETP	SRPPNPA SEQ ID NO: 99	73,2	22,2	33,3	N/A
B8	抗-CETP	MGSPSTR SEQ ID NO: 100	0,0	33,3	33,3	N/A
E2	抗-CETP	RDHPGIR SEQ ID NO: 101	0,0	0,0	29,8	N/A
B6	抗-CETP	VGSPSTR SEQ ID NO: 102	0,0	0,0	3,5	N/A
A2	抗-CETP	LPTARSP SEQ ID NO: 103	2,8	0,0	0,0	N/A
C7	抗-IgE	VYSPTGK SEQ ID NO: 104	0,0	8,1	84,0	97,4
D5	抗-IgE	SDAPLPR SEQ ID NO: 105	65,2	86,0	0,0	0,0
H5	抗-IgE	ETQLRAT SEQ ID NO: 106	0,0	72,7	17,1	0,0
E8	抗-IgE	GLGTQPR SEQ ID NO: 107	0,0	0,0	22,9	61,5
G8	抗-IgE	DKTGSKP SEQ ID NO: 108	23,8	0,0	0,0	0,0
A9	抗-IgE	TSASRAP SEQ ID NO: 109	0,0	0,0	12,0	0,0
E11	抗-IgE	ACAPTGV SEQ ID NO: 110	0,0	0,0	5,7	0,0

10

20

30

40

50

【0242】

5.1.4. 抗KLH mAbスクリーニングの第2ラウンド

HeLa細胞溶解物中に含まれるゲノム粒子の数(ゲノムAAV力価)を、定量的リアルタイムPCRにより決定した(2.1.3を参照されたい)。第2ラウンドの選択のため、細胞培養プレートを上記の通りに抗KLH mAbでコーティングするか、またはコーティングしないままにしておいた(陰性対照)。プレートのブロッキングおよび洗浄を、上記の通りに行った。プレートを全量5 mlのブロッキング緩衝液中、GPC 100に対応するHeLa細胞溶解物(第1選択ラウンドのAAVプールを含む)の容量と共にインキュベートした。プレートを、第1ラウンドの

選択から得られたAAVプールと共に室温で2時間インキュベートした後、D-PBS/1% Tween-20 10 mlで20回洗浄し、その後D-PBS 10 mlで4回洗浄することにより、非結合のウイルスを除去した。HeLa細胞による抗KLH mAb結合AAV（陰性対照）または非特異的結合AAVの取り込みおよび増幅を、上記の通りに行った。全DNAの調製、PCR増幅、およびAAVライブラリー挿入部位のサブクローニングを、上記の通りに行った。結果を表10にまとめる。非コーティング培養プレートを用いるライブラリーのスクリーニングによって得られたAAV粒子と同じペプチド配列をライブラリー挿入部位に含むAAV粒子は、非特異的結合粒子であると見なし、さらなる解析から除外した。

【0243】

5.1.5. AAVライブラリーの抗KLHスクリーニングによって得られたAAV粒子の特徴づけ

ライブラリースクリーニングアプローチのAAV粒子を、上記の通りに产生させ、精製した。AAVキャプシド力価を、AAV力価測定ELISAを用いて解析した。

【0244】

ドットプロット解析

抗KLH mAbを用いたAAVライブラリーのスクリーニングによって単離されたAAVキャプシド変種(H3、B6、F10、A6、D9)を、ドットプロット実験により解析した(図4)。AAV粒子 5.0×10^{10} 個および 1.0×10^{10} 個を、真空装置を用いてニトロセルロース膜上にスポットした。陰性対照として、ドット当たり $1.0 \times 10^{10} \sim 1.6 \times 10^8$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした。同様に、BSAの段階希釈物($1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$)を陰性対照として膜上にスポットした。陽性対照として、KLHタンパク質の様々な希釈物をスポットした($1.0 \mu\text{g} \sim 0.02 \mu\text{g}$)。膜をブロッキング緩衝液(0.05% Tween-20を含むPBS中の5%粉乳)でブロッキングした後、膜をAAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗KLH抗体(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳中、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)と共に4で18時間~24時間インキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットしたAAV変種に対する抗KLH抗体の結合を、抗マウスIgG () HRPコンジュゲート(CALTAG)で検出した。膜を抗マウスIgG () HRPコンジュゲートと共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ECLシステム(Amersham Bioscience)を用いて、化学発光によりシグナルを検出した(図4A)。

【0245】

等量のAAV変種が膜上にスポットされたことを実証するため、AAVキャプシド特異的mAb A20(Progen)を用いてAAVキャプシドを検出した。剥離緩衝液(0.1 Mグリシン、pH 2.5)で膜を剥離した後、0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳中 $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ のA20 mAbを用いて、膜に対するAAV変種の結合を実証した。膜をA20抗体(Progen)(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳で1:10希釈したハイブリドーマ上清)と共に室温で2時間インキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットされたAAV変種に対するA20 mAbの結合を、抗マウスIgG () HRPコンジュゲート(CALTAG)で検出した。膜を抗マウスIgG () HRPコンジュゲートと共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ECLシステム(Amersham Bioscience)を用いて、化学発光によりシグナルを検出した(図4B)。

【0246】

結果から、AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗KLH抗体により、AAVキャプシド変種H3、B6、A6、およびB9が特異的に検出されることが実証される。wtAAVとの交差反応はない。A20抗体によるB6の検出が弱いのは、少量のキャプシドが固定化されたためか、またはAAVキャプシド変種の構造的変化によって起こった、A20抗体によるB6変種の検出不良のためであると考えられる。パネルBの上列においてA20によるKLHの検出が弱いのは、左側に示した膜の剥離が不完全であったためである。

【0247】

抗KLH抗体がAAV変種の構造的モチーフを認識したのか、または線状モチーフを認識したのかを解析するために、未変性キャプシドまたは熱不活化キャプシド(95で10分) 1×10^{10} 個をニトロセルロース膜上にスポットした(図5)。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 1.6 \times 10^9$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした。陽性対照として、KLHタンパク質の様々な希釈物をスポットした($1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$)。ブロッキング後、上記の通りに、膜を

10

20

30

40

50

、AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗KLH抗体と共にインキュベートした。スポットしたAAVLP変種に対する抗KLH抗体の結合を、抗マウスIgG HRPコンジュゲートで検出した(図5)。

【0248】

これらのデータから、未変性のH3およびB6変種は抗KLH抗体によって認識されるが、熱変性したH3およびB6変種は抗KLH抗体によって認識されないことが実証され、この抗体がAAVキャプシド内の線状エピトープではなく構造エピトープを認識することが示される。A6およびD9はこの抗体によって認識されず、スポットしたキャプシド(1×10^{10} 個)が少数であった可能性が最も高い。

【0249】

ELISA実験

ドットプロット実験の結果を確認するため、KLH抗体によるAAV変種の検出を、ELISA形式でも解析した(図6)。AAV粒子(H3、F10、B6、A6、D9) 5×10^{10} 個を、Maxisorpマイクロタイタープレート(Nunc)上にコーティングした。陰性対照として、ウェル当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 7.8 \times 10^8$ 個キャプシドのwtAAVをコーティングした。ブロッキング後、ウェルを、AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗KLH抗体と共にインキュベートした。固定化AAV粒子に対する抗KLH抗体の結合を、基質としてTMBを用いて、抗マウスIgG HRPコンジュゲートで検出した。450 nmの吸光度を読み取った。

【0250】

これらのデータから、KLH特異的ELISAにおいて変種B6およびA6は検出されるが、ELISAの感度はドットプロットの感度よりも低いことが実証される。これは、プレートに対するAAV粒子の結合が少量であったためか、またはプレートのプラスチック表面への吸着によって起こったキャプシドの構造変化のためであると考えられる。

【0251】

5.2. 抗IgE抗体を用いる抗イディオタイプ選択

抗イディオタイプAAVワクチンの選択の概念を試験するため、抗IgE抗体をAAVキャプシドライブラリーのスクリーニングに使用した。本実施例では、上記の通りに(2.1および2.2)、GPC 1000での感染またはGPC 100での非特異的取り込みによって遺伝子型と表現型を連関させたAAVライブラリーを使用した。

【0252】

5.2.1. 固定化抗IgE抗体に対するAAVの結合

細胞培養プレート(15 cm、TPP)を、コーティング緩衝液(0.2 M NaHCO_3 0.8 ml、0.2 M Na_2CO_3 1.7 ml、 H_2O で10.0 mlに調整)中の $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度の抗IgE抗体(XOLAIR(登録商標)) 10 mlで、4で18時間~24時間コーティングした。抗IgE抗体コーティングプレートを、1% Tween-20を含むD-PBS 20 mlで3回洗浄して、非結合の抗体を除去した。洗浄後、プレートに対するAAV粒子の非特異的結合を回避するために、コーティングプレートをブロッキング緩衝液(1% Tween-20を含むD-PBS中の5%粉乳) 20 mlと共に室温で2時間インキュベートした。次に、プレートを全量10 mlのブロッキング緩衝液中で、ゲノム含有AAVライブラリー粒子 4×10^8 個と共に室温で2時間インキュベートした。AAV集団のゲノム力価は、上記の通りに、定量的リアルタイムPCRにより決定した。抗IgE抗体コーティングプレートをAAVライブラリーと共にインキュベートした後、D-PBS/1% Tween-20 20 mlで20回洗浄し、その後D-PBS 20 mlで4回洗浄することにより、非結合のウイルスを除去した。

【0253】

5.2.2. HeLa細胞によるAAVの取り込みおよび増幅

プレート当たり 4.0×10^6 個のHeLa細胞を、抗IgE mAbによって捕獲されたAAV粒子上に播種した。同時に、HeLa細胞をMOI 5のアデノウイルス2型(AdV2)に感染させて、AAV粒子の複製を誘導した。HeLa細胞の感染および培養を、10%(v/v)ウシ胎仔血清(FCS)および1%(v/v)ペニシリン/ストレプトマイシンを含む全量20 mlのDMEM中で、加湿雰囲気中の37°Cおよび5% CO_2 で24時間行った。培養の48時間後、細胞スクレーパーを用いてHeLa細胞を回収し、遠心分離(3000 g、10分、4°C)により収集した。細胞をD-PBS 5 mlで洗浄した。遠心分

10

20

30

40

50

離(3000 g、10分、4)後、細胞ペレットを溶解緩衝液(150 mM NaCl、50 mM Tris、pH 8.5) 500 µlに再懸濁した。液体窒素および37 °Cに調節したサーモブロックを用いる3回の凍結/融解サイクルにより、細胞を溶解した。

【 0 2 5 4 】

5.2.3. AAVライブラリー挿入部位のPCR増幅およびサブクローニング

導入されたHeLa細胞の溶解物の一定分量50 µlから、全DNAを精製した。細胞溶解物をPBSで4倍希釈し、製造業者の説明書に従ってDNeasy組織キット(Qiagen)を用いて全DNAを調製した。全DNAをH₂O 50 µl中に溶出した。ライブラリー挿入部位を含むAAVゲノムの断片を、全量50 µl中で、細胞溶解物から調製した鋳型としての全DNA 5 µl、ならびに20 pmolのプライマー

BsiWI back 5'-TAC CAG CTC CCG TAC GTC CTC GGC -3'

(SEQ ID NO: 92)

および

SnaBI forward 5'- CGC CAT GCT ACT TAT CTA CG -3' (SEQ ID NO: 89)

を用いて、PCRにより増幅した。PCRは、ハイフィディリティPlatinum Pfxポリメラーゼキット(Invitrogen)を用いて行った。95 °Cで3分間のDNA鋳型の最初の熱変性後に、35回のPCRサイクル(95 °Cで45秒の変性、56 °Cで40秒のアニーリング、68 °Cで2分の伸長)により、DNAを増幅した。68 °Cで10分間の最終的な伸長段階の後、増幅を停止した。PCR反応物の一定分量を、1% TBEアガロースゲルで解析した。PCR産物を、PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製した。PCR産物を、ベクターpRC-KotinのBsiWI/SnaBI部位にクローニングした。エレクトロコンピテント大腸菌XL-1 Blue MRFに、エレクトロポレーションによってベクターを形質転換した。単クローン100個のプラスミドを調製し、ライブラリーの挿入部位を、プライマー

4066 back 5'- ATG TCC GTC CGT GTG TGG -3'. (SEQ ID NO: 86)

を用いて配列決定した。得られたヌクレオチド配列をタンパク質配列に翻訳し、AAV2 VPの1-587位に挿入された7merペプチド配列を解析した。結果を表10にまとめる。非コーティング培養プレートを用いるライブラリーのスクリーニング(5.1を参照されたい)によって得られたAAV粒子と同じペプチド配列をライブラリー挿入部位に含むAAV粒子は、非特異的結合粒子であると見なし、さらなる解析から除外した。

【 0 2 5 5 】

5.2.4. 抗IgE抗体スクリーニングの第2、第3、および第4ラウンド

HeLa細胞溶解物中に含まれるゲノム粒子の数(ゲノムAAV力価)を、定量的リアルタイムPCRにより決定した(2.1.3を参照されたい)。第2、第3、および第4ラウンドの選択のため、細胞培養プレートを上記の通りに抗IgE抗体(XOLAIR(登録商標))でコーティングした。コーティングプレートのブロッキングおよび洗浄を、上記の通りに行った。抗IgE抗体コーティングプレートを全量10 mlのブロッキング緩衝液中、GPC 100に対応するHeLa細胞溶解物(それぞれ第1、第2、または第3選択ラウンドのAAVプールを含む)の容量と共にインキュベートした。抗IgE抗体コーティングプレートを、前のラウンドの選択から得られたAAVプールと共に室温で2時間インキュベートした後、D-PBS/1% Tween-20 20 mlで20回洗浄し、その後D-PBS 20 mlで4回洗浄することにより、非結合のウイルスを除去した。HeLa細胞による抗IgE mAb結合AAVの取り込みおよび増幅を、上記の通りに行った。全DNAの調製、PCR増幅、およびAAVライブラリー挿入部位のサブクローニングを、上記の通りに行った。第2、第3、および第4選択ラウンドの結果を表10にまとめる。非コーティング培養プレートを用いるライブラリーのスクリーニング(4.1を参照されたい)によって得られたAAV粒子と同じペプチド配列をライブラリー挿入部位に含むAAV粒子は、非特異的結合粒子であると見なし、さらなる解析から除外した。

【 0 2 5 6 】

10

20

30

40

50

5.2.5. AAVライブラリーの抗IgE抗体スクリーニングによって得られたAAV粒子の特徴づけライブラリースクリーニングアプローチのAAV粒子を、上記の通りに产生させ、精製した。AAVキャプシド力価を、AAV力価測定ELISAを用いて解析した。

【0257】

ドットプロット解析

抗IgE抗体(XOLAIR(登録商標))を用いたAAVライブラリーのスクリーニングによって単離されたAAVキャプシド変種(H5、D5、E8、A9、C7、G8)を、ドットプロット実験により解析した(図7)。キャプシド 1×10^{10} 個のみをスポットしたC7を除き、AAV変種のキャプシド 5.0×10^{10} 個および 1.0×10^{10} 個を、真空装置を用いてニトロセルロース膜上にスポットした。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 3.9 \times 10^8$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした。同様に、BSAの段階希釈物($1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$)を陰性対照として膜上にスポットした。陽性対照として、ヒトIgEタンパク質の様々な希釈物をスポットした($1.0 \mu\text{g} \sim 0.02 \mu\text{g}$)。膜をブロッキング緩衝液(0.1% Tween-20を含むPBS中の5%粉乳)でブロッキングした後、膜を、AAVライブラリーのスクリーニングに使用したXOLAIR(登録商標)抗体(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳中、 $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$)と共に4で18時間~24時間インキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットしたAAV変種に対する抗IgE抗体の結合を、抗ヒトIgG HRPコンジュゲートで検出した(図7A))。

【0258】

等量のAAV変種が膜上にスポットされたことを実証するため、上記の通りに膜を剥離し、スポットされたAAVキャプシドをA20を用いて検出した(図7B)。このために、膜をA20抗体(Progen)(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳で1:10希釈したハイブリドーマ上清)と共に室温で2時間インキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットされたAAV変種に対するA20 mAbの結合を、抗マウスIgG () HRPコンジュゲート(CALTAG)で検出した。結果から、AAVキャプシドライブラリーのスクリーニングに使用した抗IgE抗体(XOLAIR(登録商標))により、AAV変種H5、D5、およびE8が特異的に検出されることが実証される。

【0259】

AAV変種に対する抗IgE抗体の結合の特異性を実証するために、実験を繰り返し、対照mAb(抗KLH)を実験に含めた(図8)。AAV変種の粒子 5×10^{10} 個および 1×10^{10} 個(H5は 1×10^{10} 個のみ)を、ニトロセルロース膜上にドットした。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 1.6 \times 10^9$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした。陽性対照として、ヒトIgEタンパク質またはKLHタンパク質の様々な希釈物($1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$)をドットした。膜をブロッキング緩衝液(0.1% Tween-20を含むPBS中の5%粉乳)でブロッキングした後、膜を、AAVライブラリーのスクリーニングに使用したXOLAIR(登録商標)抗体(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳中、 $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$)(図8A)、または対照抗KLH mAb(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳中、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)(図8B)と共に4で18時間~24時間インキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットしたAAV変種に対する抗IgE抗体または抗KLH mAbの結合を、二次HRP結合抗体で検出した。D5(粒子 5×10^{10} 個)のシグナルは強すぎたため、露光時に基質が使い果たされたことに留意されたい。

【0260】

これらのデータから、変種H5、E8、およびD5は抗IgE抗体に特異的に結合するのにし、対照抗KLH抗体には結合しないことが実証される。対照的に、変種G8は非特異的方法で免疫グロブリンに結合するようである。

【0261】

5.3. 抗CETP抗体を用いる抗イディオタイプ選択

抗イディオタイプAAVワクチンの選択の概念を試験するため、抗CETP抗体をAAVキャプシドライブラリーのスクリーニングに使用した。本実施例では、上記の通りに(2.2)、GPC 1000での感染によって遺伝子型と表現型を連関させたAAVライブラリーを使用した。

【0262】

5.3.1. 固定化抗CETP抗体に対するAAVの結合

細胞培養プレート(10 cm、TPP)を、コーティング緩衝液(0.2 M NaHCO₃ 0.8 ml、0.2 M Na₂CO₃ 1.7 ml、H₂Oで10 mlに調整)中の10 µg/ml濃度の抗CETP抗体(クローンATM192、Acris-Antibodies) 5.0 mlで、4℃で18時間~24時間コーティングした。抗CETP抗体コーティングプレートを、1% Tween-20を含むD-PBS 10 mlで3回洗浄して、非結合の抗体を除去した。洗浄後、プレートに対するAAV粒子の非特異的結合を回避するために、コーティングプレートをブロッキング緩衝液(1% Tween-20を含むD-PBS中の5%粉乳) 10 mlと共に室温で2時間インキュベートした。次に、プレートを全量5 mlのブロッキング緩衝液中で、ゲノム含有AAVライブラリー粒子 1×10^8 個と共に室温で2時間インキュベートした。AAV集団のゲノム力価は、上記の通りに、定量的リアルタイムPCRにより決定した。抗CETP抗体コーティングプレートをAAVライブラリーと共にインキュベートした後、D-PBS/1% Tween-20 10 mlで20回洗浄し、その後D-PBS 10 mlで4回洗浄することにより、非結合のウイルスを除去した。

10

【0263】

5.3.2. HeLa細胞によるAAVの取り込みおよび増幅

プレート当たり 1.0×10^6 個のHeLa細胞を、抗CETP mAbによって捕獲されたAAV粒子上に播種した。同時に、HeLa細胞をMOI 5のAdV2に感染させて、AAV粒子の複製を誘導した。HeLa細胞の感染および培養を、10%(v/v)ウシ胎仔血清(FCS)および1%(v/v)ペニシリン/ストレプトマイシンを含む全量10 mlのDMEM中で、加湿雰囲気中の37℃および5% CO₂で48時間行った。培養の48時間後、細胞スクレーパーを用いてHeLa細胞を回収し、遠心分離(3000 g、10分、4℃)により収集した。細胞をD-PBS 5 mlで洗浄した。遠心分離(3000 g、10分、4℃)後、細胞ペレットを溶解緩衝液(150 mM NaCl、50 mM Tris、pH 8.5) 250 µlに再懸濁した。液体窒素および37℃に調節したサーモブロックを用いる3回の凍結/融解サイクルにより、細胞を溶解した。

20

【0264】

5.3.3. AAVライブラリー挿入部位のPCR増幅およびサブクローニング

導入されたHeLa細胞の溶解物の一定分量50 µlから、全DNAを精製した。細胞溶解物をPBSで4倍希釈し、製造業者の説明書に従ってDNeasy組織キットを用いて全DNAを調製した。全DNAをH₂O 50 µl中に溶出した。ライブラリー挿入部位を含むAAVゲノムの断片を、全量50 µl中で、細胞溶解物から調製した鋳型としての全DNA 5 µl、ならびに20 pmolのプライマー

30

BsiWI back 5'-TAC CAG CTC CCG TAC GTC CTC GGC -3'

(SEQ ID NO: 88)

および

SnaBI forward 5'- CGC CAT GCT ACT TAT CTA CG -3' (SEQ ID NO: 89)

を用いて、PCRにより増幅した。PCRは、ハイフィディリティPlatinum Pfxポリメラーゼキット(Invitrogen)を用いて行った。95℃で3分間のDNA鋳型の最初の熱変性後に、35回のPCRサイクル(95℃で45秒の変性、56℃で40秒のアニーリング、68℃で2分の伸長)により、DNAを増幅した。68℃で10分間の最終的な伸長段階の後、増幅を停止した。PCR反応物の一定分量を、1% TBEアガロースゲルで解析した。PCR産物を、PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製した。PCR産物を、ベクターpRC-KotinのBsiWI/SnaBI部位にクローニングした。エレクトロコンピテント大腸菌XL-1 Blue MRFに、エレクトロポレーションによってベクターを形質転換した。このクローニング反応の単一クローン100個のプラスミドを調製し、ライブラリーの挿入部位を、プライマー

40

4066 back 5'- ATG TCC GTC CGT GTG TGG -3'. (SEQ ID NO: 86)

を用いて配列決定した。得られたヌクレオチド配列をタンパク質配列に翻訳し、AAV2 VPのI-587位に挿入された7merペプチド配列を解析した。結果を表10にまとめる。非コーティング培養プレートを用いるライブラリーのスクリーニング(4.1を参照されたい)によっ

50

て得られたAAV粒子と同じペプチド配列をライブラリー挿入部位に含むAAV粒子は、非特異的結合粒子であると見なし、さらなる解析から除外した。

【0265】

5.3.4. 抗CETP抗体スクリーニングの第2および第3ラウンド

HeLa細胞溶解物中に含まれるゲノム粒子の数(ゲノムAAV力価)を、定量的リアルタイムPCRにより決定した(2.1.3を参照されたい)。第2および第3ラウンドの選択のため、細胞培養プレートを上記の通りに抗CETP抗体でコーティングした。コーティングプレートのブロッキングおよび洗浄を、上記の通りに行った。抗CETP抗体コーティングプレートを全量5 mlのブロッキング緩衝液中、GPC 100に対応するHeLa細胞溶解物(それぞれ第1および第2選択ラウンドのAAVプールを含む)の容量と共にインキュベートした。抗CETP抗体コーティングプレートを、第1および第2ラウンドの選択から得られたAAVプールと共に室温で2時間インキュベートした後、D-PBS/1% Tween-20 10 mlで20回洗浄し、その後D-PBS 10 mlで4回洗浄することにより、非結合のウイルスを除去した。HeLa細胞による抗CETP mAb結合AAVの取り込みおよび増幅を、上記の通りに行った。全DNAの調製、PCR増幅、およびAAVライブラリー挿入部位のサブクロニングを、上記の通りに行った。非コーティング培養プレートを用いるライブラリーのスクリーニング(4.1を参照されたい)によって得られたAAV粒子と同じペプチド配列をライブラリー挿入部位に含むAAV粒子は、非特異的結合粒子であると見なし、さらなる解析から除外した。

10

【0266】

5.3.5. AAVライブラリーの抗CETP抗体スクリーニングによって得られたAAV粒子の特徴づけ

20

ライブラリースクリーニングアプローチのAAV粒子を、上記の通りに産生させ、精製した。AAVキャプシド力価を、AAV力価測定ELISAを用いて解析した。

【0267】

ドットプロット解析

抗CETP抗体を用いたAAVライブラリーのスクリーニングによって単離されたAAVキャプシド変種B8およびC4を、ドットプロット実験により解析した(図9)。AAV変種 5.0×10^{10} 個および 1.0×10^{10} 個を、真空装置を用いてニトロセルロース膜上にスポットした。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 3.2 \times 10^9$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした。同様に、BSAの段階希釈物(1.0 μ g ~ 0.03 μ g)を陰性対照として膜上にスポットした。膜をブロッキング緩衝液(0.1% Tween-20を含むPBS中の5%粉乳)でブロッキングした後、膜を、AAVライブラリーのスクリーニングに使用した抗CETP抗体(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳中、5 μ g/ml)と共に4で18時間~24時間インキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットしたAAV変種に対する抗CETP抗体の結合を、抗マウスIgG HRPコンジュゲートで検出した。膜を抗マウスIgG HRPコンジュゲートと共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ECLシステム(Amersham Bioscience)を用いて、化学発光によりシグナルを検出した(図9A)。

30

【0268】

等量のAAV変種が膜上にスポットされたことを実証するため、上記の通りに膜を剥離し、スポットされたAAVキャプシドをA20を用いて検出した(図9B)。このために、膜をA20抗体(Progen)(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳で1:10希釈)と共に室温で2時間インキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットされたAAV変種に対するA20 mAbの結合を、抗マウスIgG () HRPコンジュゲート(CALTAG)で検出した。膜を抗マウスIgG () HRPコンジュゲートと共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ECLシステム(Amersham Bioscience)を用いて、化学発光によりシグナルを検出した(図9B)。結果から、AAVキャプシドライブラリーのスクリーニングに使用した抗CETP抗体により、AAV変種B8およびC4が特異的に検出されることが実証される。

40

【0269】

5.4. 選択抗体の提示の最適化

選択抗体の定常F_c領域に結合する種およびアイソタイプ特異的F(ab)₂断片で細胞培養ブ

50

レートまたは他の支持体(セファロースビーズのような)を予めコーティングすることにより、選択に使用する抗体の提示を改善することができる。これにより、選択抗体は、固定化F(ab)₂断片に定常領域が結合した状態で配向性をもって提示されるようになり、抗体のイディオタイプ部分がAAV変種に接触可能となる。したがって、スクリーニングアプローチにおいて、選択抗体の他の領域(例えば、F_c部分)に結合する偽陽性AAV変種が単離される数が減少する。同様に、免疫グロブリンの定常領域に結合するプロテインAまたはプロテインGを含む他の分子を用いて、選択抗体を配向させることもできる。加えて、プラスチック細胞培養プレートの代わりに他の支持体(セファロースビーズのような)を使用することにより、固定化選択抗体の表面密度を増加させることができる。

【0270】

10

5.5. 選択抗体によって捕獲されたAAV粒子のゲノムのPCRベースの増幅

AdVによるHeLa細胞の感染後のAAV粒子の細胞取り込みおよび増幅(上記)の別法として、第1またはその後の選択ラウンド後に標的抗体に結合したAAV粒子のゲノムを、PCRベースのアプローチにより増幅することができる。選択抗体によって捕獲されたAAV粒子を適切な緩衝液により溶解し、DNAを適切な方法によって単離する。例えば、製造業者によって提供されるプロトコル「Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells」に従ってDNeasy血液および組織キット(Qiagen)を用いて、AAVゲノムを単離することができる。各挿入配列を有するライブラリー挿入部位を含むcap遺伝子の断片を、単離されたDNAおよび適切なプライマーを用いて、PCRにより増幅することができる。この断片を適切なベクターにサブクローニングし、配列決定により解析することができる。例えば、PCR_xエ

20

BsiWI-back: 5'-TAC CAG CTC CCG TAC GTC CTC GGC-3'

(SEQ ID NO: 88)

および

SnaBI-forward: 5'-CGC CAT GCT ACT TAT CTA CG-3' (SEQ ID NO: 89)

を用いて、Platinum Pfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen)により、以下のPCRプログラム: 95、3分の最初の变性; 35回の増幅サイクル: 95 で45秒、56 で40秒、68 で2分; および68、10分の最終的な伸長に従って、ライブラリー挿入部位を含むcap遺伝子のDNA断片を増幅することができる。

30

【0271】

BsiWIおよびSnaBIでの制限後に、PCR産物を、BsiWI/SnaBIで線状化したベクターpUCAV2(pUCAV2は、US6,846,665に詳述されている)にクローニングすることができる。プライマ

4066back 5'-ATG TCC GTC CGT GTG TGG-3' (SEQ ID NO: 86)

を用いて配列決定することにより、クローンを解析することができる。

【0272】

6. 遺伝子操作による、AAVキャプシドの1-587位または1-453位におけるエピトープまたはミモトープ配列の挿入による改変AAV変種の作製

40

規定のクローニング戦略を用いて、AAVキャプシドの1-587位にエピトープまたはミモトープを挿入するために、以下に記載するアプローチを使用する。この戦略は、AAV capの1-587位において、短いまたは長いアラニンアダプター配列が隣接したエピトープまたはミモトープをコードするDNA断片の挿入を可能にする、部位特異的突然変異誘発によるcap遺伝子内でのNotIおよびAscI制限部位の作製を含む。

【0273】

6.1. ベクターpCI-VP2における唯一のNotIおよびAscI制限部位の創出

マイナーなACG開始コドンを変異させるAAV2 VP2遺伝子のPCR増幅、およびpCI(Pro mega)のポリリンカー配列への各PCR産物のクローニングにより、ベクターpCI-VP2を作製

50

した。製造業者の説明書に従って、QuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene)と共にプライマー

mutashe-3: 5'- GAG TCG ACC CGG GCA GCC GCT TCG AGC -3'

(SEQ ID NO: 111)

および

mutashe-4 5'- GCT CGA AGC GGC TGC CCG GGT CGA CTC- 3'

(SEQ ID NO: 112)

を用いて、部位特異的突然変異誘発により、pCI-VP2のヌクレオチド18(pCIのヌクレオチド1099)におけるNotI部位を破壊した。得られたベクターをpCI-VP2- Not18と称した。AAVキャプシドの1-587位においてエピトープまたはミモトープ配列のクローニングを可能にするNotIおよびAscI制限部位を導入するために、ベクター-pCI-VP2- Not18を、プライマー

pCI-VP2-ΔNot-1587-for 5'-CC AAC CTC CAG AGA GGC AAC GCG GCC
GCA AGG CGC GCC AAG CAG CTA CCG CAG-3'

(SEQ ID NO: 113)

および

pCI-VP2-ΔNot-1587-rev 5'-CTG CGG TAG CTG CTT GGC GCG CC TT GCG
GCC GCG TTG CCT CTC TGG AGG TTG G -3'.

(SEQ ID NO: 114)

を用いて、部位特異的突然変異誘発により改変した。部位特異的突然変異誘発は、製造業者の説明書に従ってQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene)を用いて行った。得られたベクターをpCIVP2-1587-NotI-AscIと称する。

【 0 2 7 4 】

6.2. エピトープまたはミモトープ配列のpCIVP2-1587-NotI-AscIへのクローニング

エピトープまたはミモトープ配列をpCIVP2-1587-NotI-AscIにクローニングするため、短いまたは長いアラニンアダプター配列を有する各エピトープまたはミモトープ配列をコードし、かつ5'側伸長を含むセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計した。オリゴヌクレオチドの5'側伸長は、センスオリゴヌクレオチドとアンチセンスオリゴヌクレオチドのアニリングによって、プラスミドpCIVP2-1587-NotI-AscIのNotIおよびAscI制限により生じるオーバーハングと適合する5'側および3'側オーバーハングを有するdsDNAが得られるように設計した。オリゴヌクレオチドの配列、およびアラニンアダプターを含む各エピトープまたはミモトープ配列を表11にまとめる。挿入されたエピトープまたはミモトープ配列のそれぞれには、以下の図式に従って(X_n はミモトープまたはエピトープ配列を表す)、短いまたは長いアダプターが隣接する：

短いAlaアダプター： $(Ala)_3-X_n-(Ala)_2$

長いAlaアダプター： $(Ala)_5-X_n-(Ala)_5$

【 0 2 7 5 】

(表11) エピトープまたはミモトープ配列のクローニングに用いたオリゴヌクレオチド

10

20

30

40

名称/ ペプチド配列	型	センス オリゴヌクレオチド	アンチセンス オリゴヌクレオチド	アラニン アダプター
Kricek VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 85)	エピトープ	5' GGCCGCAGTGAACC TGACCTGGAGCAGAGCC TCCGGCGCGG 3' SEQ ID NO: 115	5' CGCGCCGCGCCGGAG GCTCTGCTCCAGGTCAGG TTCAGTGC 3' SEQ ID NO: 116	短
		5' GGCCGCAGCGGCGG TGAACCTGACCTGGAGC AGAGCCTCCGGCGCGG GGCGGCGG 3' SEQ ID NO: 117	5' CGCGCCGCGCCGCC GCGCCGGAGGCTCTGCTC CAGGTCAGGTTACCGCC GCTGC 3' SEQ ID NO: 118	長
Rudolf EFCINHRGYWVCG D (SEQ ID NO: 84)	ミモトープ	5' GGCCGCAGAATTCT GCATAAACACAGGGGA TACTGGGTGTGCGGAGA CGCGG 3' SEQ ID NO: 119	5' CGCGCCGCGTCTCCG CACACCCAGTATCCCCTG TGGTTTATGCAGAATTCT GC 3' SEQ ID NO: 120	短
		5' GGCCGCAGCGGCGG AATTCTGCATAAACAC AGGGGATACTGGGTGTG CGGAGACGCGGCGGCGG CGG 3' SEQ ID NO: 121	5' CGCGCCGCGCCGCC GCGTCTCCGCACACCCAG TATCCCCTGTGGTTTATG CAGAATTCCGCGCTGC 3' SEQ ID NO: 122	長
CETP- 内部 CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 123	エピトープ	5' GGCCGCATGCGACG CTGGCAGTGTGCGCACC AATGCACCAGACGCGG 3' SEQ ID NO: 124	5' CGCGCCGCGTCTGGT GCATTGGTGCACACTG CCAGCGTCGCATGC 3' SEQ ID NO: 125	短
		5' GGCCGCAGCGGCGT GCGACGCTGGCAGTGTG CGCACCAATGCACCAGA CGCGGCGGCGGCGG 3' SEQ ID NO: 126	5' CGCGCCGCGCCGCC GCGTCTGGTGCATTGGTG CGCACACTGCCAGCGTGC CACGCGCTGC 3' SEQ ID NO: 127	長

10

20

30

【 0 2 7 6 】

オリゴヌクレオチドをアニールするために、センスオリゴヌクレオチド50.0 µgおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド50.0 µgを全量200 µlの1×PCR緩衝液(Qiagen)中で混合し、サーモミキサー中で95 °Cで3分間インキュベートした。95 °Cで3分間後、サーモミキサーのスイッチを切り、チューブをインキュベーター中にさらに2時間置いておき、インキュベーターの冷却中にオリゴヌクレオチドがアニールできるようにした。アニールしたオリゴヌクレオチドをpCIVP2-1587-NotI-AscIにクローニングするため、ベクターをNotIおよびAscIによる制限によって線状化し、迅速DNAライゲーションキット(Roche)を用いてクローニング反応を行った。簡潔に説明すると、アニールしたオリゴヌクレオチドを1×DNA希釈緩衝液で10倍希釈し、50 °Cで5分間インキュベートした。これらのアニールしたオリゴヌクレオチド100 ngおよび線状化ベクターpCIVP2-1587-NotI-AscI 50 ngをライゲーション反応において使用し、迅速DNAライゲーションキット(Roche)の製造業者の説明書に従ってライゲーション反応を行った。大腸菌XL1 blueにライゲーション反応の一定分量を形質転換し、LB-Amp寒天プレート上にプレーティングした。標準的な手順に従ってプラスミドを調製し、配列決定により解析した。

40

【 0 2 7 7 】

6.3. エピトープまたはミモトープ配列のpCIVP2からpUCAV2へのサブクローニング

1-587位にミモトープまたはエピトープ挿入を保有する組換えAAV粒子の産生のため、1-587位にエピトープまたはミモトープを含むVP2断片をコードするpCI-VP2-587-NotI-AscIのBsiWI/XmaI断片を、以下に記載する通りに改変したpUCAV2にサブクローニングした。

50

【 0 2 7 8 】

ベクター-pUCAV2のクローニングは、US 6,846,665に詳述されている。基本的に、このベクターは、pUC19のBamHIにクローニングされたpAV2(Laughlin et al., 1983)由来の完全なAAVゲノム(Bgl II断片)を含む。

【 0 2 7 9 】

pUCAV2を改変AAV粒子の産生に使用する。pUCAV2にはXmaI部位が3カ所存在するため、pCI-VP2-587-NotI-AscIのBsiWI/XmaI断片のサブクローニングに、pUCAV2のXmaI部位を用いることは不可能である。したがって、XmaIと適合し、かつpUCAV2中に存在しない新たなAgeI部位をpUCAV2中に導入した。AgeI部位を導入するため、pUCAV2をSnaBI(pUCAV2のnt 287 3位)により線状化し、脱リン酸化し、続いて内部AgeI部位を含む短いdsオリゴヌクレオチドアダプターと平滑末端で連結した。dsオリゴヌクレオチドアダプターは、上記の通りに、AgeI制限部位を含む

センス 5'-GTA GCC CTG GAA ACT AGA **ACC GGT** GCC TGC GCC -3'

(SEQ ID NO: 128)

および

アンチセンス 5'-GGC GCA GGC **ACC GGT** TCT AGT TTC CAG GGC TAC 3'

(SEQ ID NO: 129)

オリゴヌクレオチドをアニールすることにより作製した。上記の通りに迅速DNAライゲーションキット(Roche)を用いて、アニールしたオリゴヌクレオチドを、SnaBIで線状化し、脱リン酸化したpUCAV2と連結した。得られたベクターをpUCAV2-AgeIと称する。pUCAV2-AgeIをBsiWIおよびAgeIで線状化し、I-587位に各エピトープまたはミモトープを含むVP2断片をコードするpCI-VP2-587-NotI-AscIのBsiWI/XmaI断片と連結した。

【 0 2 8 0 】

6.4. HEK 293 T細胞の同時トランスフェクションによるAAV変種の産生

AAV変種の産生のため、上記の通りに(3.2)、サブクローニングされたミモトープまたはエピトープ配列を含むベクタープラスミドpUCAV2およびヘルパープラスミドpUCAdVを、HEK 293-T細胞に同時にトランスフェクトした。上記の通りに(3.3)、イオジキサノール勾配遠心分離によりAAV変種を精製した。

【 0 2 8 1 】

6.4.1. AAV2キャプシドのI-587位へのCETPエピトープの挿入

ウサギCETP(コレステリルエステル転送タンパク質)のエピトープ
(CDAGSVRTNAPD, SEQ ID NO: 123)

を、上記のクローニングアプローチにより、AAV2のI-587位に導入した。エピトープには、短いまたは長いアラニンアダプターが隣接している。AAV変種の産生のため、上記の通りに(4.2)、サブクローニングされたCETPエピトープ配列をI-587位に含むベクタープラスミドpUCAV2およびヘルパープラスミドpUCAdVを、HEK 293-T細胞に同時にトランスフェクトした。上記の通りに(4.3)、イオジキサノール勾配遠心分離によりAAV変種を精製した。

【 0 2 8 2 】

AAVキャプシド変種AAV-CETP-587-短およびAAV-CETP-587-長を、ドットプロット実験により解析した(図10)。精製AAV粒子 5×10^{10} 個を、真空装置を用いてニトロセルロース膜上にスポットした。同様に、AAV2のI-453位において、短いまたは長いAlaアダプター配列が隣接したウサギCETPの同じエピトープを提示する精製AAV粒子(6.4.3を参照されたい) 5×10^{10} 個または 1×10^{10} 個を、同じ膜上にスポットした。陰性対照として、ドット当たり $5.0 \times 10^{10} \sim 6.3 \times 10^9$ 個キャプシドのwtAAVをスポットした。膜をブロッキング緩衝液(0.05% Tween-20を含むPBS中の5%粉乳)でブロッキングした後、膜を、KLH結合CETPエピトープをウサギに免疫することにより生じたポリクローナル抗CETP血清と共にインキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットしたAAV変種に対する抗CETP抗体の結

合を、抗ウサギIgG HRPコンジュゲート(CALTAG)で検出した。洗浄後、ECLシステム(Amersham Bioscience)を用いて、化学発光によりシグナルを検出した。

【0283】

結果から、AAVキャプシドのI-587位およびI-453位(方法については6.4.3を参照されたい)に挿入されたCETPエピトープが、各CETP抗体によって特異的に検出されることが実証され、エピトープがAAV粒子の表面上に提示されることが示される。

【0284】

6.4.2. AAV2キャプシドのI-587位へのIgEエピトープの挿入

モノクローナル抗IgE抗体Bsw17によって認識されるIgEのエピトープ(VNLTWSRASG、SEQ ID NO: 85)(Kricek et al., 1999)を、上記のクローニングアプローチにより、AAV2のI-587位に導入した。AAVキャプシドにおいて、エピトープには長いアラニンアダプターが隣接している。各AAV変種(AAV-Kricek)の産生のため、上記の通りに(3.2)、サブクローニングされたIgEエピトープ配列をI-587位に含むベクタープラスミドpUCAV2およびヘルパープラスミドpUCAdvを、HEK 293-T細胞に同時にトランスフェクトした。上記の通りに(3.3)、イオジキサノール勾配遠心分離によりAAV変種(AAV-Kricek)を精製した。

【0285】

AAVキャプシド変種AAV-Kricekを、ドットプロット実験により解析した(図14)。AAV-Kricek粒子 2.5×10^{10} 個を、真空装置を用いてニトロセルロース膜上にドットした。陰性対照として、wtAAVの段階希釈物($5.0 \times 10^{10} \sim 1.6 \times 10^9$ 個)、またはAAV変種D5(4.2.5.1を参照されたい)をドットした。陽性対照として、 $1.0 \mu\text{g} \sim 0.03 \mu\text{g}$ のヒトIgEをドットした。膜をブロッキング緩衝液(0.05% Tween-20を含むPBS中の5%粉乳)でブロッキングした後、膜を抗IgE mAb Bsw17と共にインキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットしたAAV変種に対するBsw17の結合を、抗マウスIgG HRPコンジュゲート(CALTAG)で検出した。洗浄後、ECLシステム(Amersham Bioscience)を用いて、化学発光によりシグナルを検出した。

【0286】

結果から、AAV Kricek粒子がBsw17 mAbによって特異的に検出されることが示され、抗体が、AAVキャプシドのI-587位に組み込まれたIgE由来エピトープ(VNLTWSRASG, SEQ ID NO: 85)

を認識することが実証される。

【0287】

6.4.3 AAV2キャプシドのI-453位へのCETPエピトープの挿入

AAVキャプシドのI-453位にCETPエピトープ
(CDAGSVRTNAPD, SEQ ID NO: 123)

を挿入するために、以下に記載するアプローチを使用する。

【0288】

ベクターpCI-VP2における唯一のNotIおよびAscI制限部位の創出

マイナーなACG開始コドン(ATG)に変異させるAAV2 VP2遺伝子のPCR増幅、およびpCI(Promega)のポリリンカー配列への各PCR産物のクローニングにより、ベクターpCI-VP2を作製した。上記の通りに(6.1)、pCI-VP2のヌクレオチド18(pCIのヌクレオチド1099)におけるNotI部位を破壊した。得られたベクターをpCI-VP2-Not18と称した。AAVキャプシドのI-453位においてエピトープまたはミモトープ配列のクローニングを可能にするNotIおよびAscI制限部位を導入するために、ベクターpCI-VP2-Not18を、最初にAscI部位を導入するためにプライマー

mutashe-5 5'-CA AAC ACT CCA AGT GGA GGG CGC GCC GCT ACC
ACC ACG CAG TC-3' (SEQ ID NO: 130)

および

mutashe-6 5'-GA CTG CGT GGT GGT AGC GGC GCG CCC TCC ACT
TGG AGT GTT TG-3' (SEQ ID NO: 131)

を用いて、および次にNotI部位を導入するためにプライマー

mutashe-7 5'-CA AAC ACT CCA AGT GGA GCG GCC GCA GGG CGC
GCC GCT AC -3' (SEQ ID NO: 132)

10

および

mutashe-8 5'-GT AGC GGC GCG CCC TGC GGC CGC TCC ACT TGG
AGT GTT TG -3' (SEQ ID NO: 133)

を用いて、部位特異的突然変異誘発により改変した。部位特異的突然変異誘発は、製造業者の説明書に従ってQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene)を用いて行った。得られたベクターをpCIVP2-1453-NotI-AscIと称する。

【0289】

CETPエピトープのpCIVP2-1453-NotI-AscIへのクローニング

20

CETPエピトープ

(CDAGSVRTNAPD, SEQ ID NO: 123)

をpCIVP2-1453-NotI-AscIにクローニングするため、短い

(Ala)₃-CDAGSVRTNAPD-R-(Ala)₂ (SEQ ID NO: 134)

または長い

(Ala)₅-CDAGSVRTNAPD-(Ala)₂-R-(Ala)₂ (SEQ ID NO: 135)

アラニンアダプター配列が隣接した各エピトープ配列をコードし、かつ5'側伸長を含むフォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドを設計した(表12)。オリゴヌクレオチドの5'側伸長は、フォワードオリゴヌクレオチドとリバースオリゴヌクレオチドのアニーリングによって、プラスミドpCIVP2-1453-NotI-AscIのNotIおよびAscI制限により生じるオーバーハングと適合する5'側および3'側オーバーハングを有するdsDNAが得られるように設計した。

30

【0290】

(表12) 1-453位におけるCETPエピトープ配列のクローニングに用いたオリゴヌクレオチド

名称/ ペプチド配列	型	フォワード オリゴヌクレオチド	リバース オリゴヌクレオチド	アラニン アダプター
CETP- 内部 CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 123	エピトープ	5'-ggccgcatgcgacgctgg cagtgtgcgaccaatgcacc agac -3' SEQ ID NO: 136	5'-cgcggtctggtgcattggt gcgcacactgccagcgtcgc a tgc -3' SEQ ID NO: 137	短
		5'-ggccgcagccgcatgcca cgctggcagtgtgcccaccaat gcaccagacgaggca -3' SEQ ID NO: 138	5'-cgcggtgccgctgtggtgc attggtgcccacactgccagc gtcgcagcggctgc -3' SEQ ID NO: 139	長

40

【0291】

50

オリゴヌクレオチドをアニールするために、フォワードオリゴヌクレオチド50.0 μgおよびリバーズオリゴヌクレオチド50.0 μgを全量200 μlの1×PCR緩衝液(Qiagen)中で混合し、サーモミキサー中で95 °Cで3分間インキュベートした。95 °Cで3分間後、サーモミキサーのスイッチを切り、チューブをインキュベーター中にさらに2時間置いておき、インキュベーターの冷却中にオリゴヌクレオチドがアニールできるようにした。アニールしたオリゴヌクレオチドをpCIVP2-1453-NotI-AscIにクローニングするため、ベクターをNotIおよびAscIによる制限によって線状化し、迅速DNAライゲーションキット(Roche)を用いてクローニング反応を行った。簡潔に説明すると、アニールしたオリゴヌクレオチドを1×DNA希釈緩衝液で10倍希釈し、50 °Cで5分間インキュベートした。これらのアニールしたオリゴヌクレオチド100 ngおよび線状化ベクター-pCIVP2-1453-NotI-AscI 50 ngをライゲーション反応において使用し、迅速DNAライゲーションキット(Roche)の製造業者の説明書に従ってライゲーション反応を行った。大腸菌XL1 blueにライゲーション反応の一定分量を形質転換し、LB-Amp寒天プレート上にプレティングした。標準的な手順に従ってプラスミドを調製し、配列決定により解析した。

10

【0292】

1-453位におけるCETPエピトープのpCIVP2からpUCAV2へのサブクローニング

1-453位にCETPエピトープを保有する組換えAAV粒子の産生のため、1-453位にエピトープを含むVP2断片をコードするpCI-VP2-453-NotI-AscIのBsiWI/XmaI断片を、上記の通りに(6.3)改変したpUCAV2にサブクローニングした。pUCAV2-AgeIをBsiWIおよびAgeIで線状化し、1-453位にCETPエピトープを含むVP2断片をコードするpCI-VP2-453-NotI-AscIのBsiWI/XmaI断片と連結した。

20

【0293】

HEK 293 T細胞の同時トランスフェクションによるAAV変種の産生

AAV変種の産生のため、上記の通りに(4.2)、サブクローニングされたCETPエピトープ配列を1-453位に含むベクタープラスミドpUCAV2およびヘルパープラスミドpUCAdVを、HEK 293-T細胞に同時にトランスフェクトした。上記の通りに(4.3)、イオジキサノール勾配遠心分離によりAAV変種を精製した。

【0294】

AAVキャプシド変種AAV-CETP-453-短およびAAV-CETP-453-長を、上記の通りに(6.4.1、図10)、ドットプロット実験により解析した。

30

【0295】

6.4.4. さらなるAAV変種の作製

AAV2キャプシドの1-587位へのCETPエピトープの挿入

上記の通りにアニールしたオリゴヌクレオチドを用いて、以下のウサギCETP由来をAAV2キャプシドの1-587位にクローニングし、AAV粒子の産生に用いた。挿入されたエピトープ配列のそれぞれには、以下の図式に従って(X_n はエピトープ配列を表す)、以下のアラニン/グリシンアダプターの1つが隣接する：

I型アダプター：Ala-(Gly)₃- X_n -(Gly)₄-Ala

II型アダプター：Ala-(Gly)₄- X_n -(Gly)₄-Ala

III型アダプター：Ala-(Gly)₄- X_n -Ala-(Gly)₃-Ala

40

【0296】

(表13) CETP由来エピトープ

名称/ ペプチド配列	型	センス オリゴヌクレオチド	アンチセンス オリゴヌクレオチド	アダ プター
CETP TP10 AKAVSNLTESRS ESLQS SEQ ID NO: 237	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTGCCAA GGCCGTGAGCAACCTACCGA GAGCAGAAGCGAGAGCCTGC AGAGCGGGGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 245	5' CGCGCACCGCCACC CCCGCTCTGCAGGCTC TCGCTTCTGCTCTCGG TCAGGTTGCTCACGGC CTTGGCACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 246	I型
CETP TP11 SLTGDEFKKVLE T SEQ ID NO: 238	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTAGCCT GACCGGCGACGAATTCAAGA AGGTGCTGGAGACCGGGGGT GGCGGTG 3' SEQ ID NO: 247	5' CGCGCACCGCCACC CCCGGTCTCCAGCACC TTCTTGAATTCGTGCG CGGTCAGGCTACCTCC GCC 3' SEQ ID NO: 248	I型
CETP TP12 REAVAYRFEED SEQ ID NO: 239	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTAGAGA GGCCGTGGCCTACAGATTCG AAGAGGACGGGGTGGCGGT G 3' SEQ ID NO: 249	5' CGCGCACCGCCACC CCCGTCTCTTCGAAT CTGTAGGCCACGGCCT CTCTACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 250	I型
CETP TP13 INPEIITLDG SEQ ID NO: 240	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTATCAA CCCCGAGATCATCACCTGG ACGGCGGGGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 251	5' CGCGCACCGCCACC CCCGCGTCCAGGGTG ATGATCTCGGGGTGA TACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 252	I型
CETP TP18 DISVTGAPVITAT YL SEQ ID NO: 241	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTGACAT CAGCGTGACCGGTGCACCCG TGATCACCGCCACCTACCTG GGGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 253	5' CGCGCACCGCCACC CCCCAGGTAGGTGGCG GTGATCACGGGTGCAC CGGTCACGCTGATGTC ACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 254	I型
CETP TP20 DISVTGAPVITA SEQ ID NO: 242	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTGACAT CAGCGTGACCGGTGCACCCG TGATCACCGCCGGGGTGGC GGTG 3' SEQ ID NO: 255	5' CGCGCACCGCCACC CCCGGCGGTGATCACG GGTGCACCGGTACGC TGATGTCACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 256	I型
Ritsch-1 DQSVD FEIDSA SEQ ID NO: 243	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTGACCA GAGCGTGGACTTCGAGATCG ACAGCGCCGGGGTGGCGGT G 3' SEQ ID NO: 257	5' CGCGCACCGCCACC CCCGGCGCTGTGATC TCGAAGTCCACGCTCT GGTCACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 258	I型
Ritsch-3 KNVSEAFPLRA SEQ ID NO: 244	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTAAGAA CGTGAGCGAGGCTTCCCTC TGAGAGCCGGGGTGGCGGT G 3' SEQ ID NO: 259	5' CGCGCACCGCCACC CCCGGCTCTCAGAGGG AAGGCTCGCTCACGT TCTTACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 260	I型

10

20

30

40

【0297】

上記の方法に従って、対応するウサギCETP配列のヒト相同体である以下の配列を、AAV2キャプシドの1-587位に組み込むことができる。

【0298】

(表14) 1-587位におけるCETP由来エピトープ

エピトープ	ウサギ配列	ヒト配列
CETP 内部	CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 123	CDSGRVRTDAPD SEQ ID NO: 223
CETP C末端	FPKHLLVDFLQSL SEQ ID NO: 261	FPEHLLVDFLQSL SEQ ID NO: 224
TP10	AKAVSNLTESRSESLQS SEQ ID NO: 237	PKTVSNLTESSESQVS SEQ ID NO: 214
TP11	SLTGDEFKVKLET SEQ ID NO: 238	SLMGDEFKAVLET SEQ ID NO: 215
TP12	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 239	QHSVAYTFEED SEQ ID NO: 216
TP13	INPEITLDG SEQ ID NO: 240	INPEITRDG SEQ ID NO: 217
TP18	DISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 241	DISLTGDPVITASYL SEQ ID NO: 218
TP20	DISVTGAPVITA SEQ ID NO: 242	DISLTGDPVITA SEQ ID NO: 219
Ritsch-1	DQSVDFEIDSA SEQ ID NO: 243	DQSIDFEIDSA SEQ ID NO: 220
Ritsch-2	KNVSEAFPLRAFPPGLLGDS SEQ ID NO: 262	KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS SEQ ID NO: 221
Ritsch-3	KNVSEAFPLRA SEQ ID NO: 244	KNVSEDLPLPT SEQ ID NO: 222

10

20

【 0 2 9 9 】

AAV2キャプシドの1-453位へのCETPエピトープの挿入

上記の通りにアニールしたオリゴヌクレオチドを用いて、以下のウサギCETP由来エピトープをAAV2キャプシドの1-453位にクローニングした。AAV2骨格の1-453に挿入されたエピトープ配列のそれぞれには、以下の図式に従って(X_n はエピトープ配列を表す)、以下のアラニン/グリシンアダプターが隣接する：

30

I型Ala/Glyアダプター： $(Ala)_2-(Gly)_3-X_n-(Gly)_4-Arg-(Ala)_2$

II型Ala/Glyアダプター： $(Ala)_3-(Gly)_3-X_n-(Gly)_4-Arg-(Ala)_2$

【 0 3 0 0 】

(表 1 5) 1-453位におけるウサギCETP由来エピトープ

名称/ ペプチド配列	型	センス オリゴヌクレオチド	アンチセンス オリゴヌクレオチド	アダ プター
CETP TP10 AKAVSNLTESRS ESLQS SEQ ID NO: 237	エピ トープ	5' GGCCGGCGGTGGAGCCA AGGCCGTGAGCAACCTGAC CGAGAGCAGAAGCGAGAGC CTGCAGAGCGGTGGCGGTG GA 3' SEQ ID NO: 263	5' CGCGTCCACCGCCACCG CTCTGCAGGCTCTCGCTTC TGCTCTCGGTGAGGTTGCT CACGGCCTTGGCTCCACCG CC 3' SEQ ID NO: 264	I型 Ala/Gly
CETP TP11 SLTGDEFKVVLE T SEQ ID NO: 238	エピ トープ	5' GGCCGGCGGTGGAAGCC TGACCGGCAGCAATTCAA GAAGGTGCTGGAGACCGGT GGCGGTGGA 3' SEQ ID NO: 265	5' CGCGTCCACCGCCACCG GTCTCCAGCACCTTCTTGA ATTCTGTCGCCGGTCAGGCT TCCACCGCC 3' SEQ ID NO: 266	I型 Ala/Gly
CETP TP12 REAVAYRFEED SEQ ID NO: 239	エピ トープ	5' GGCCGGCGGTGGAAGAG AGGCCGTGGCCTACAGATT CGAAGAGGACGGTGGCGGT GGA 3' SEQ ID NO: 267	5' CGCGTCCACCGCCACCG TCCTCTTCGAATCTGTAGG CCACGGCCTCTTCCACC GCC 3' SEQ ID NO: 268	I型 Ala/Gly
CETP TP13 INPEIITLDG SEQ ID NO: 240	エピ トープ	5' GGCCGGCGGTGGAATCA ACCCGAGATCATCACCT GGACGGCGGTGGCGGTGGA 3' SEQ ID NO: 269	5' CGCGTCCACCGCCACCG CCGTCCAGGGTGATGATCT CGGGTTGATTCCACCGCC 3' SEQ ID NO: 270	I型 Ala/Gly
CETP TP18 DISVTGAPVITAT YL SEQ ID NO: 241	エピ トープ	5' GGCCGGCGGTGGAGACA TCAGCGTGACCGGTGCACC CGTGATCACCGCCACCTAC CTGGGTGGCGGTGGA 3' SEQ ID NO: 271	5' CGCGTCCACCGCCACCC AGGTAGGTGGCGGTGATCA CGGGTGCACCGGTGACGCT GATGTCTCCACCGCC 3' SEQ ID NO: 272	I型 Ala/Gly
CETP TP20 DISVTGAPVITA SEQ ID NO: 242	エピ トープ	5' GGCCGGCGGTGGAGACA TCAGCGTGACCGGTGCACC CGTGATCACCGCCGGTGGC GGTGA 3' SEQ ID NO: 273	5' CGCGTCCACCGCCACCG GCGGTGATCACGGGTGCAC CGGTCACGCTGATGTCTCC ACCGCC 3' SEQ ID NO: 274	I型 Ala/Gly
Ritsch-1 DQSVDFEIDSA SEQ ID NO: 243	エピ トープ	5' GGCCGGCGGTGGAGACC AGAGCGTGGACTTCGAGAT CGACAGCGCCGGTGGCGGT GGA 3' SEQ ID NO: 275	5' CGCGTCCACCGCCACCG GCGCTGTGATCTCGAAGT CCACGCTCTGGTCTCCACC GCC 3' SEQ ID NO: 276	I型 Ala/Gly

10

20

30

【 0 3 0 1 】

上記の方法に従って、対応するウサギCETP配列のヒト相同体である以下の配列を、AAV2キャプシドのI-453位に組み込むことができる。

【 0 3 0 2 】

(表16) I-453位におけるCETP由来エピトープ

40

エピトープ	ウサギ配列	ヒト配列
CETP 内部	CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 123	CDSGRVRTDAPD SEQ ID NO: 223
CETP C末端	FPKHLLVDFLQSL SEQ ID NO: 261	FPEHLLVDFLQSL SEQ ID NO: 224
TP10	AKAVSNLTESRSESLQ SEQ ID NO: 237	PKTVSNLTESSESQ SEQ ID NO: 214
TP11	SLTGDEFKAVLET SEQ ID NO: 238	SLMGDEFKAVLET SEQ ID NO: 215
TP12	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 239	QHSVAYTFEED SEQ ID NO: 216
TP13	INPEITLDG SEQ ID NO: 240	INPEITRDG SEQ ID NO: 217
TP18	DISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 241	DISLTGDPVITASYL SEQ ID NO: 218
TP20	DISVTGAPVITA SEQ ID NO: 242	DISLTGDPVITA SEQ ID NO: 219
Ritsch-1	DQSVDFEIDSA SEQ ID NO: 243	DQSIDFEIDSA SEQ ID NO: 220
Ritsch-2	KNVSEAFPLRAFPPG SEQ ID NO: 262	KNVSEDLPLPTFSPT SEQ ID NO: 221
Ritsch-3	KNVSEAFPLRA SEQ ID NO: 244	KNVSEDLPLPT SEQ ID NO: 222

10

20

30

【 0 3 0 3 】

AAV2キャプシドのI-453位およびI-587位へのCETPエピトープの挿入

9に記載するクローニング戦略を用いて、I-453位およびI-587位にウサギCETPエピトープを保有する以下のAAV2キャプシド変種を作製した。

【 0 3 0 4 】

(表17) CETP二重挿入変異体

名称	I-453におけるエピトープ	I-587におけるエピトープ
AAV-TP10-2x	AKAVSNLTESRSESLQS SEQ ID NO: 237	AKAVSNLTESRSESLQS SEQ ID NO: 237
AAV-TP11-2x	SLTGDEFKKVLET SEQ ID NO: 238	SLTGDEFKKVLET SEQ ID NO: 238
AAV-TP12/13	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 239	INPEITLDG SEQ ID NO: 240
AAV-TP12-2x	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 239	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 239
AAV-TP13-2x	INPEITLDG SEQ ID NO: 240	INPEITLDG SEQ ID NO: 240
AAV-TP18-2x	DISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 241	DISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 241
AAV-TP20-2x	DISVTGAPVITA SEQ ID NO: 242	DISVTGAPVITA SEQ ID NO: 242
AAV-Ritsch1-2x	DQSVDFEIDSA SEQ ID NO: 243	DQSVDFEIDSA SEQ ID NO: 243
AAV2-CETin-2x	CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 123	CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 123

10

20

【 0 3 0 5 】

AAV2キャプシドのI-587位へのヒトIgEエピトープの挿入

上記の通りにアニールしたオリゴヌクレオチドを用いて、以下のヒトIgE由来エピトープをAAV2キャプシドのI-587位にクローニングし、AAV粒子の産生に用いた。挿入されたエピトープ配列のそれぞれには、上記のI-587に関する本項6.4.4に従って、以下のアラニン/グリシンアダプターの1つが隣接する。

【 0 3 0 6 】

(表18) I-587におけるヒトIgE由来エピトープ

30

名称/ ペプチド配列	型	センス オリゴヌクレオチド	アンチセンス オリゴヌクレオチド	アダ プター
3DEpi3	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTGGTG ACAGCAACCCTAGAGGCGT GAGCGCCTACCTGAGCAGA GGGGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 277	5' CGCGCACCGCCACCCCC TCTGCTCAGGTAGGCGCTC ACGCCTCTAGGGTTGCTGT CACCACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 278	II型
Wang-CS	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTACCC ACCCACCTGCCAGAGC CCTGATGAGAAGCGGGGGT GGCGGTG 3' SEQ ID NO: 279	5' CGCGCACCGCCACCCCC GCTTCTCATCAGGGCTCTG GGCAGGTGGGGGTGGGTAC CTCCGCC 3' SEQ ID NO: 280	I型
Flex	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTGAGG ACGGCCAGGTGATGGACGT GGACCTGAGCGGGGGTGGC GGTG 3' SEQ ID NO: 281	5' CGCGCACCGCCACCCCC GCTCAGGTCCACGTCCATC ACCTGGCCGTCCTCACCTC CGCC3' SEQ ID NO: 282	I型
Bind2	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTGAGA AGCAGAGAAACGGCACCT GACCGGTGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 283	5' CGCGCACCGCCACCACC GGTCAGGGTGCCGTTTCTC TGCTTCTCACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 284	I型
C21	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTGGTC TGCCAGAGCCCTGATGAG AAGCGCCGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 285	5' CGCGCACCGCCACCGGC GCTTCTCATCAGGGCTCTG GGCAGACCACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 286	III型

10

20

【 0 3 0 7 】

AAV2キャプシドのI-587位へのサイトカインエピトープの挿入

上記の通りにアニールしたオリゴヌクレオチドを用いて、以下のマウスサイトカイン由来エピトープをAAV2キャプシドのI-587位にクローニングし、AAV粒子の産生に用いた。挿入されたエピトープ配列のそれぞれには、上記のI-587に関する本項6.4.4に従って、以下のアラニン/グリシンアダプターの1つが隣接する。

30

【 0 3 0 8 】

(表19) I-587におけるマウスサイトカイン由来エピトープ

名称/ ペプチド配列	型	センス オリゴヌクレオチド	アンチセンス オリゴヌクレオチド	アダ プター
mTNFα-V1 SSQNSSDKPV AHVVANHQVE SEQ ID NO: 287	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTAGCA GCCAGAACAGCAGCGACAA GCCCCGTGGCCCACGTGGTG GCTAACCACCAGGTGGAGG GGGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 294	5' CGCGCACCGCCACCCCC CTCCACCTGGTGGTTAGCC ACCACGTGGGCCACGGGCT TGTCGCTGCTGTTCTGGCT GCTACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 295	I型
mTNFα-V2 SQNSSDKPVA HVVAH SEQ ID NO: 288	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTAGCC AGAACAGCAGCGACAAGCC CGTGGCCCACGTGGTGGCT AACCACGGGGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 296	5' CGCGCACCGCCACCCCC GTGGTTAGCCACCACGTGG GCCACGGGCTTGTCGCTGC TGTTCTGGCTACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 297	I型
mTNFα-V3 SSQNSSDKP SEQ ID NO: 289	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTAGCA GCCAGAACAGCAGCGACAA GCCCCGGGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 298	5' CGCGCACCGCCACCCCC GGGCTTGTCGCTGCTGTTC TGGCTGCTACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 299	I型
mIL-17-V1 NAEGKLDHMH NSVL SEQ ID NO: 290	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTAACG CCGAGGGCAAGCTTGACCA CCACATGAACAGCGTGCTG GGGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 300	5' CGCGCACCGCCACCCCC CAGCACGCTGTTTATGTGG TGGTCAAGCTTGCCCTCGG CGTTACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 301	I型
mIL-17-V2 EGKLDHMHNS V SEQ ID NO: 291	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTGAGG GCAAGCTTGACCACCACAT GAACAGCGTGGGGGTGGC GGTG 3' SEQ ID NO: 302	5' CGCGCACCGCCACCCCC CACGCTGTTTATGTGGTGG TCAAGCTTGCCCTCACCTC CGCC 3' SEQ ID NO: 303	I型
mIL-6-V1 KSLEEFKVTL RSTRQ SEQ ID NO: 292	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTAAGA GCCTGGAGGAATTCCTGAA GGTGACCCTGAGAAGCACC AGACAGGGGGTGGCGGTG 3' SEQ ID NO: 304	5' CGCGCACCGCCACCCCC CTGTCTGGTGTCTTCTCAGG GTCACCTTCAAGGAATTCCT CCAGGCTCTTACCTCCGCC 3' SEQ ID NO: 305	I型
mIL-6-V2 LEEFKVTLR SEQ ID NO: 293	エピ トープ	5' GGCCGGCGGAGGTCTGG AGGAATTCCTGAAGGTGAC CCTGAGAAGCGGGGTGGC GGTG 3' SEQ ID NO: 306	5' CGCGCACCGCCACCCCC GCTTCTCAGGGTCACCTTC AGGAATTCCTCCAGACCTC CGCC 3' SEQ ID NO: 307	I型

10

20

30

40

【 0 3 0 9 】

上記の方法に従って、対応するマウスサイトカイン配列のヒト相同体である以下の配列を、AAV2キャプシドの1-587位に組み込むことができる。

【 0 3 1 0 】

(表 20) サイトカイン由来エピトープ

サイトカイン	マウスエピトープ	ヒトエピトープ
TNF-α V1	SSQNSSDKPVAHVANHQVE SEQ ID NO: 287	SSRTPSDKPVAHVANPQAE SEQ ID NO: 226
TNF-α V2	SQNSSDKPVAHVANH SEQ ID NO: 288	SRTPSDKPVAHVANP SEQ ID NO: 227
TNF-α V3	SSQNSSDKP SEQ ID NO: 289	SSRTPSDKP SEQ ID NO: 228
IL-17 V1	NAEGKLDHMHNSVL SEQ ID NO: 290	NADGNVDYHMNSVP SEQ ID NO: 229
IL-17 V2	EGKLDHMHNSV SEQ ID NO: 291	DGNVDYHMNSV SEQ ID NO: 230
IL-6 V1	KSLEEFKVTLRSTRQ SEQ ID NO: 292	RSFKEFLQSSLRALRQ SEQ ID NO: 231
IL-6 V2	LEEFKVTLR SEQ ID NO: 293	FKEFLQSSLRA SEQ ID NO: 232

10

【 0 3 1 1 】

AAV2キャプシドの1-453位へのサイトカインエピトープの挿入

20

上記の通りにアニールしたオリゴヌクレオチドを用いて、以下のマウスサイトカイン由来エピトープをAAV2キャプシドの1-453位にクローニングした。AAV2骨格の1-453に挿入されたエピトープ配列のそれぞれには、上記の1-453に関する本項6.4.4に従って、アラニン/グリシンアダプターが隣接する。

【 0 3 1 2 】

(表 2 1) 1-453におけるマウスサイトカイン由来エピトープ

名称/ ペプチド配列	型	センス オリゴヌクレオチド	アンチセンス オリゴヌクレオチド	アダ プター
mTNFα-V1 SSQNSSDKPVA HVANHQVE SEQ ID NO: 287	エピ トープ	5' GGCCGCCGGTGGAGGCA GCAGCCAGAACAGCAGCGA CAAGCCCGTGGCCACGTG GTGGCTAACACCAGGTGG AGGGCGGTGGAGGG 3' SEQ ID NO: 308	5' CGCGCCCTCCACCGCCC TCCACCTGGTGGTTAGCCA CCACGTGGGCCACGGGCTT GTCGCTGCTGTTCTGGCTG CTGCCTCCACCGGC 3' SEQ ID NO: 309	II型 Ala/Gly
mIL-17-V1 NAEGKLDHMHN SVL SEQ ID NO: 290	エピ トープ	5' GGCCGCCGGTGGAGGCA ACGCCGAGGGCAAGCTTGA CCACCACATGAACAGCGTG CTGGCGGTGGAGGG 3' SEQ ID NO: 310	5' CGCGCCCTCCACCGCCC AGCACGCTGTTTCATGTGGT GGTCAAGCTTGCCCTCGGC GTTGCCTCCACCGGC 3' SEQ ID NO: 311	II型 Ala/Gly
mIL-6-V2 LEEFKVTLR SEQ ID NO: 293	エピ トープ	5' GGCCGCCGGTGGAGGCC TGGAGGAATTCCTGAAGGT GACCCTGAGAAGCGGCGGT GGAGGG 3' SEQ ID NO: 312	5' CGCGCCCTCCACCGCCG CTTCTCAGGGTCACCTTCA GGAATTCCTCCAGGCCTCC ACCGGC 3' SEQ ID NO: 313	II型 Ala/Gly

30

40

【 0 3 1 3 】

上記の方法に従って、対応するマウスサイトカイン配列の相同体である以下の配列を、AAV2キャプシドの1-453位に組み込むことができる。

【 0 3 1 4 】

(表 2 2) 1-453におけるヒトサイトカイン由来エピトープ

サイトカイン	マウスエピトープ	ヒトエピトープ
TNF-α V1	SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 287	SSRTPSDKPVAHVVANPQAE SEQ ID NO: 226
TNF-α V2	SQNSSDKPVAHVVANH SEQ ID NO: 288	SRTPSDKPVAHVVANP SEQ ID NO: 227
TNF-α V3	SSQNSSDKP SEQ ID NO: 289	SSRTPSDKP SEQ ID NO: 228
IL-17 V1	NAEGKLDHMMNSVL SEQ ID NO: 290	NADGNVDYHMNSVP SEQ ID NO: 229
IL-17 V2	EGKLDHMMNSV SEQ ID NO: 291	DGNVDYHMNSV SEQ ID NO: 230
IL-6 V1	KSLEEFKVTLRSTRQ SEQ ID NO: 292	RSFKEFLQSSLRALRQ SEQ ID NO: 231
IL-6 V2	LEEFKVTLR SEQ ID NO: 293	FKEFLQSSLRA SEQ ID NO: 232

10

【 0 3 1 5 】

AAV2キャプシドのI-453位およびI-587位へのサイトカインエピトープの挿入

9に記載するクローニング戦略を用いて、I-453位およびI-587位に異なるサイトカイン
エピトープを保有する以下のAAV変種を作製することができる(二価ワクチン)。

20

【 0 3 1 6 】

(表23) サイトカイン由来エピトープの二重挿入変種

組み合わせ	I-453におけるエピトープ	I-587におけるエピトープ
TNF-α / IL-17	mTNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 287	mIL-17-V1 NAEGKLDHMMNSVL SEQ ID NO: 290
TNF-α / IL-6	mTNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 287	mIL-6-V2 LEEFKVTLR SEQ ID NO: 293
IL-17 / TNF-α	mIL-17-V1 NAEGKLDHMMNSVL SEQ ID NO: 290	mTNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 287
IL-6 / TNF-α	mIL-6-V2 LEEFKVTLR SEQ ID NO: 293	mTNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 287
IL-17 / IL-6	mIL-17-V1 NAEGKLDHMMNSVL SEQ ID NO: 290	mIL-6-V2 LEEFKVTLR SEQ ID NO: 293
IL-6 / IL-17	mIL-6-V2 LEEFKVTLR SEQ ID NO: 293	mIL-17-V1 NAEGKLDHMMNSVL SEQ ID NO: 290

30

40

【 0 3 1 7 】

7. キメラAAV2 Rep/AAV1 Capベクターの作製

AAV1キャプシドの産生用の発現プラスミドを作製するために、以下に記載するアプローチを使用する。この戦略は、AAV1 Capのアミノ酸S₅₈₈またはD₅₉₀のC末端側において、グリシンアダプター配列が隣接したエピトープまたはモトープをコードするDNA断片の挿入を可能にする、部位特異的突然変異誘発によるcap遺伝子内でのNotIおよびAscI制限部

50

位の作製を含む。

【 0 3 1 8 】

7.1. pUC「rep/fs/cap」内でのAAV2 CapのAAV1 Capによる置換

ベクター-pUCrep/fs/capのクローニングは、US 2004/0087026(第0124項およびそれ以前の項、そこではpUC「rep/fs/cap」37と称される)に詳述されている。Xiao et al.(Xiao et al., 1999)によって公表される完全なAAV1 cap ORFを、エキスパンドハイフィディリティPlus PCRシステム(Roche ; #03300242001)を用いて、PCRにより増幅した。特異的改変プライマーを用いて、制限部位をcap断片に導入した。プライマー

AAV1 Swa for: 5'-GAT TTA AAT CAG GTA TGG CGT CCG ATG-3'

(SEQ ID NO: 140)

10

AAV1 Nde back:5'-ACC GAT AAC ATA TGA AGG ACA GGA G-3'

(SEQ ID NO: 141)

を用いて、SwaIをVP-1 ATGのN末端に挿入し、NdeIをポリA部位のC末端に挿入した。

【 0 3 1 9 】

したがって、AAV1のN末端の元の配列(Seq. GP-No: 9632548)は改変されて、

2201 5'-.....caataaatga **ttaaat**cag gtatggctgc cgatggttat cttccagatt.....3'

(SEQ ID NO: 142)

20

VP-1の開始ATGは太字、SwaI制限部位は囲みと表示される。

【 0 3 2 0 】

したがって、AAV1のC末端の元の配列は改変されて、

4441 5'-...**ttaatcaata** **aaccggtga** ttcgttcag tgaacttg gtctcctgct **cttcaatg**
tatcggttac..3'

(SEQ ID NO: 143)

ポリAシグナルは太字、mRNAの3'末端は下線、NdeI制限部位は囲みと表示される。

30

【 0 3 2 1 】

PCR断片を精製し、製造業者の説明書に従って、制限酵素SwaIおよびNdeI(New England Biolabs)で消化した。同じ消化をpUC「rep/fs/cap」でも行った。pUC「rep/fs/cap」においてSwaIは単一切断酵素ではないため、SwaIによりNdeI線状化pUC「rep/fs/cap」の部分消化を行った。PCR断片、および5077 bpの所望の骨格断片pUC「rep/fs/cap」(SwaIは、pUCrep/fs/capをbp 7311において切断する)を切り出し、Qiagenゲル抽出キット(Qiagen # 28104)を用いて精製した。製造業者のプロトコールに従って迅速DNAライゲーションキット(Roche # 11 635 379 001)を用いて、PCR断片と骨格を連結した。得られたベクターをpUC rep/fs/cap_AAV1と称する。

40

【 0 3 2 2 】

7.2. pUCAV_AgeI内でのAAV2 capのAAV1 capによる置換

ベクター-pUCAV2_AgeIのクローニングは、6.3に詳述されている。Xiao et al.(Xiao et al., 1999)によって公表される完全なAAV1 cap ORFを、エキスパンドハイフィディリティPlus PCRシステム(Roche ; #03300242001)を用いる標準的な手順を使用して、PCRにより増幅した。特異的改変プライマーを用いて、制限部位をcap断片に導入した。プライマー

AAV1 SwaI for: 5'-GAT TTA AAT CAG GTA TGG CGT CCG ATG-3'

(SEQ ID NO: 140)

AAV1 SnaBI back: 5'-CGA TAA GAT ACG TAG GAC AGG AGA C-3'

(SEQ ID NO: 144)

を用いて、SwaIをVP-1 ATGのN末端に挿入し、SnaBIをポリA部位のC末端に挿入した。

【 0 3 2 3 】

したがって、AAV1のN末端の元の配列は改変されて、7.1に記載される通りに表示される。

【 0 3 2 4 】

したがって、AAV1のC末端の元の配列は改変されて、

4441 5'-.ttaatcaata aaccggttga ttcgttcag ttgaactttg gtctcctgtc ctacgtact tatcggttac.-
3'

(SEQ ID NO: 145)

ポリAシグナルは太字、mRNAの3'末端は下線、SnaBI制限部位は囲みと表示される。

【 0 3 2 5 】

PCR断片を精製し、製造業者の説明書に従って、制限酵素SwaIおよびSnaBI(New England Biolabs)で消化した。同じ消化をpUAV2_AgeIでも行った。アガロースゲルにおいて完全な消化を解析し、PCR断片、およびpUCAV2_AgeIの所望の骨格断片を、Qiagenゲル抽出キット(Qiagen # 28104)を用いて精製した。製造業者のプロトコールに従って迅速DNAライゲーションキット(Roche # 11 635 379 001)を用いて、PCR断片と骨格を連結した。得られたベクターをpUAV1_AgeIと称する。

【 0 3 2 6 】

7.3. AAV1 cap内のアミノ酸S₅₈₈位またはD₅₉₀位における唯一のNotIおよびAscl制限部位の創出

AAV1キャプシドのアミノ酸S₅₈₈またはD₅₉₀のC末端においてエピトープまたはミモトープ配列のクローニングを可能にするNotIおよびAscl制限部位を導入するために、ベクターpUCrep/fs/cap_AAV1を、プライマー

AAV1 590 NotI Ascl for: 5'-ttc cag agc agc agc aca gac gcg gcc gca aag gcg
cgc cct gcg acc gga gat gtg cat- 3'

(SEQ ID NO: 146)

AAV1 590 NotI Ascl reverse: 5'-atg cac atc tcc ggt cgc agg gcg cgc ctt tgc gcc
cgc gtc tgt gct gct gct ctg gaa-3'

(SEQ ID NO: 147)

AAV1 588 NotI Ascl for: 5'-gtc aat ttc cag agc agc agc gcg gcc gca agg gcg
gcc aca gac cct gcg acc gga gat-3'

(SEQ ID NO: 148)

AAV1 588 NotI Ascl reverse: 5'-atc tcc ggt cgc agg gtc tgt ggc gcg cct tgc gcc
cgc gct gct gct ctg gaa att gac-3'

(SEQ ID NO: 149)

を用いて、部位特異的突然変異誘発により改変した。下線は、挿入されるNotIまたはAscl

10

20

30

40

50

制限部位の配列である。

【 0 3 2 7 】

部位特異的突然変異誘発は、製造業者の説明書に従ってQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene)を用いて行った。得られたベクターを、それぞれpUCrep/fs/cap_AAV1_1588およびpUCrep/fs/cap_AAV1_1590と称する。

【 0 3 2 8 】

7.4. AAV1変種のクローニング

7.4.1. ウサギCETP-内部エピトープ配列のpUCrep/fs/cap_AAV1_1588またはpUCrep/fs/cap_AAV1_1590へのクローニング

ウサギCETP-内部配列

10

(CDAGSVRTNAPD, SEQ ID NO: 123)

をそれぞれpUCrep/fs/cap_AAV1_1588およびpUCrep/fs/cap_AAV1_1590にクローニングするため、両側に3つのグリシン残基のアダプター配列を有する各CETPint配列をコードし、かつ5'側伸長を含むフォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドを設計した。オリゴヌクレオチドの5'側伸長は、フォワードオリゴヌクレオチドとリバースオリゴヌクレオチドのアニーリングによって、プラスミドそれぞれpUCrep/fs/cap_AAV1_1588およびpUCrep/fs/cap_AAV1_1590のNotIおよびAscI制限により生じるオーバーハングと適合する5'側および3'側オーバーハングを有するdsDNAが得られるように設計した。

20

【 0 3 2 9 】

オリゴヌクレオチド

CE_int_1590 AAV1 for: 5'-G gcc gca ggc ggt gga **tg**c **gac gct ggc agt g**tg **cg**c **acc aat**
gca cca gac ggc ggt gga gcg-3'

(SEQ ID NO: 150)

CE_int_1590 AAV1 rev: 5'-Cg **cg**c **cg**c tcc acc gcc **gtc** **tg**g **tg**c **att ggt g**cg **cac act gcc**
agc gtc gca tcc acc gcc tgc-3'

(SEQ ID NO: 151)

CE_int_1588 AAV1 for: 5'-G gcc gca ggc ggt gga **tg**c **gac gct ggc agt g**tg **cg**c **acc aat**
gca cca gac ggc ggt gga gca -3'

30

(SEQ ID NO: 152)

CE_int_1588 AAV1 rev: 5'-C **gc**g cgc tcc acc gcc **gtc** **tg**g **tg**c **att ggt g**cg **cac act gcc**
agc gtc gca tcc acc gcc tgc-3'

(SEQ ID NO: 153)

下線はGリンカーであり、太字は挿入されるCETP配列である。

【 0 3 3 0 】

オリゴヌクレオチドをベクターにクローニングするプロトコールについては、実施例6.4.3の「CETPエピトープのクローニング...」の部分を参照されたい。

40

【 0 3 3 1 】

7.4.2. IgEエピトープ(Kricekおよび3DEpi3)のpUCrep/fs/cap_AAV1_1588へのクローニング

Kricek配列

VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 85)

および3DEpi3配列をそれぞれpUCrep/fs/cap_AAV1_1588にクローニングする戦略は、7.4においてCETP挿入について記載したのと同様であった。アダプター配列に関しては、5つのグリシン残基を3DEpi3挿入の上流および下流に組み入れた。Kricek挿入については、AAV1

50

配列内のKricek挿入の上流および下流に5つのアラニンを生じるアラニンリンカーを設計した。AAV2における453挿入のためのオリゴヌクレオチドの挿入の一般的設計は、AAV1における588挿入と適合するため、元々AAV2挿入のために作製したオリゴヌクレオチドを、AAV1 588挿入のために用いることができた。

【 0 3 3 2 】

オリゴヌクレオチド：

Kricek long AAV1 for 5'-G GCC GCA GCC GCA **GTG AAC CTG ACC TGG AGC**
AGA GCC TCC GGC GCG GCA GCT GCA GCT-3'
 (SEQ ID NO: 314)

10

Kricek long AAV1 rev 5'-C GCG AGC TGC AGC TGC CGC **GCC GGA GGC TCT**
GCT CCA GGT CAG GTT CAC TGC GGC TGC-3'
 (SEQ ID NO: 315)

下線はAリンカーであり、太字は挿入されるKricek配列である。

3DEpi3 453 uni: 5'-GGCC GGC GGT GGA GGC GGT **GAC AGC AAC CCT**
AGA GGC GTG AGC GCC TAC CTG AGC AGA GGA GGC
GGT GGA GGG-3'
 (SEQ ID NO: 316)

20

3DEpi3 453 rev: 5'-CGCG CCC TCC ACC GCC TCC **TCT GCT CAG GTA**
GGC GCT CAC GCC TCT AGG GTT GCT GTC ACC
GCC TCC ACC GCC-3'
 (SEQ ID NO: 317)

下線はGリンカーであり、太字は挿入される3DEpi3配列である。

オリゴヌクレオチドをベクターにクローニングするプロトコールについては、実施例6.4.3の「CETPエピトープのクローニング...」の部分を参照されたい。

【 0 3 3 3 】

7.4.3. ウサギCETP-内部エピトープのpUCrep/fs/cap_AAV1_1588またはpUCrep/fs/cap_AAV1_1590からpUCAV1_AgeIへのサブクローニング

30

pUCAV1_AgeIをBsiWIおよびAgeIで線状化し、標準的な手順に従って、各アミノ酸S₅₈₈またはD₅₉₀の後にウサギCETP-内部エピトープを含むVP-2断片をコードするpUCrep/fs/cap_AAV1_1588またはpUCrep/fs/cap_AAV1_1590のBsiWI/AgeI断片と連結した。

【 0 3 3 4 】

7.4.4. Kricekおよび3DEpi3のpUCrep/fs/cap_AAV1_1588からpUCAV1_AgeIへのサブクローニング

pUCAV1_AgeIをBsiWIおよびAgeIで線状化し、標準的な手順に従って、Kricekおよび3DEpi3エピトープそれぞれを含むVP-2断片をコードするpUCrep/fs/cap_AAV1_1588のBsiWI/AgeI断片と連結した。

40

【 0 3 3 5 】

7.4.5. アミノ酸S₅₈₈位におけるNotIおよびAscI制限酵素部位のpUCrep/fs/cap_AAV1_1588からpUCAV1_AgeIへのサブクローニング

pUCAV1_AgeIへのポリペプチドの直接的なクローニングを可能にするために、NotI/AscI挿入部位をpUCAV1_AgeIにクローニングした。そのために、pUCAV1_AgeIをBsiWIおよびAgeIで線状化し、標準的な手順に従って、NotI/AscI挿入それぞれを含むVP-2断片をコードするpUCrep/fs/cap_AAV1_1588のBsiWI/AgeI断片と連結した。得られたベクターをpUCAV1-AgeI-1588と命名する。

【 0 3 3 6 】

7.4.6. ウサギCETP配列TP18のpUCAV1-AgeI-1588へのクローニング

50

TP18配列

DISVTGAPVITATYL (SEQ ID NO 241)

をそれぞれpUCAV1-AgeI-1588にクローニングする戦略は、7.4においてCETP挿入について記載したのと同様であった。アダプター配列に関しては、TP18挿入の上流に3つのグリシン残基を、および下流に4つのグリシン残基を組み入れた。AAV2における453挿入のためのオリゴヌクレオチドの挿入の一般的設計は、AAV1における588挿入と適合するため、元々AAV2挿入のために作製したオリゴヌクレオチドを、AAV1 588挿入のために用いることができた。

【0337】

オリゴヌクレオチド：

TP18- 453 uni 5'-GGCC GGC GGT GGA **GAC ATC AGC GTG ACC GGT GCA**
CCC GTG ATC ACC GCC ACC TAC CTG GGT GGC GGT GGA-
 3' (SEQ ID NO: 318)

TP18- 453 rev 5'-CGCG TCC ACC GCC ACC **CAG GTA GGT GGC GGT GAT**
CAC GGG TGC ACC GGT CAC GCT GAT GTC TCC ACC GCC-
 3' (SEQ ID NO: 319)

下線はリンカーであり、太字は挿入されるTP18配列である。

オリゴヌクレオチドをベクターにクローニングするプロトコールについては、実施例6.4.3の「CETPエピトープのクローニング...」の部分を参照されたい。

【0338】

7.5. HEK 293-T細胞の同時トランスフェクションによるAAV1変種の産生

AAV粒子の産生のため、(アミノ酸S₅₈₈またはD₅₉₀の後に)サブクローニングされたエピトープを含むまたは含まないベクタープラスミドpUCAV1またはpUCrep/fs/cap_AAV1、およびヘルパープラスミドpUCAdVを、HEK 293-T細胞に同時にトランスフェクトした。pUCrep/fs/cap_AAV1は、パッケージングシグナルとして機能するAAV ITRをコードしていないため、(サブクローニングされたエピトープを含むまたは含まない)pUCrep/fs/cap_AAV1由来キ

ャプシドの産生には、pGFPもさらにトランスフェクトした。pGFPは、AAV2 ITRが隣接しているGFPをコードする。したがって、GFPは導入遺伝子としてパッケージングされる。

【0339】

ウサギCETPエピトープCETP-内部を保有する得られたウイルス粒子は、pucAV1誘導体から導出されたものをAAV1-CETP-588およびAAV1-CETP-590、ならびにpUCrep/fs/cap_AAV1誘導体から導出されたものをrAAV1-GFP-CETP-588、rAAV1-GFP-CETP-590と命名した。

【0340】

ウイルス粒子の産生および精製は、上記の通りに行った(実施例4を参照されたい)。

【0341】

驚くべきことに、AAV1粒子の収率はAAV2粒子と比較して約3~6倍高かったため、AAV1変異構造タンパク質は、本発明のそのすべての局面における特に好ましい態様となる。

【0342】

7.6. アミノ酸S₅₈₈またはD₅₉₀の後にウサギCETP-内部エピトープを保有するAAV1粒子の評価

588位または590位にCETP-内部エピトープを保有するAAV1キャプシド変種を、ドットブロット解析により解析した(図11)。AAVキャプシド 5.0×10^{11} ~ 3.1×10^{10} 個を、真空装置を用いてニトロセルロース膜上にスポットした。対照として、AAV2-CETPin 2x(1-453位および1-587位にCETP-内部エピトープを保有するAAV2粒子)およびwtAAV1粒子をスポットした。膜をブロッキング緩衝液(0.05% Tween-20を含むPBS中の5%粉乳)で室温で1時間ブロッキングした後、膜を抗CETPポリクローナルウサギ血清(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉

10

20

30

40

50

乳で1:2,500)と共に室温で1時間インキュベートした。血清は、LPH結合CETP-内部ペプチドをワクチン接種したウサギに由来した。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットしたAAV変種に対する抗CETP血清の結合を、抗マウスIgG HRPコンジュゲートで検出した。膜を抗ウサギIgG HRPコンジュゲート(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳で1:2,500)と共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ECLシステム(Pierce)を用いて、化学発光によりシグナルを検出した(図11B)。

【0343】

等量のAAV変種が膜上にスポットされたことを実証するため、および抗体の交差反応を排除するため、さらなる膜に上記の通りにスポットし、スポットしたAAVキャプシドを、無傷のAAV1粒子を認識する抗AAV1抗体(Progen)を用いて検出した(図11B)。このために、膜を抗抗体(Progen)(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳で1:500希釈)と共に室温で1時間インキュベートした。膜をPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、スポットしたAAV変種に対するAAV1 mAbの結合を、抗マウスIgG () HRPコンジュゲート(CALTAG)で検出した。膜を抗マウスIgG () HRPコンジュゲートと共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ECLシステム(Pierce)を用いて、化学発光によりシグナルを検出した(図11A)。

10

【0344】

結果から、AAV1 CETP変種が抗CETP血清により特異的に検出されることが実証され、両位置(アミノ酸S₅₈₈およびD₅₉₀の後)に挿入されたCETPエピトープがキャプシドの表面上に提示されることが示される。

20

【0345】

7.7. AAV2をワクチン接種したウサギの血清によるAAV1キャプシドの交差反応性の解析

野生型のAAV2キャプシドおよびAAV1キャプシドを、Maxisorp 96ウェルプレート(Nunc)にコーティングした。ウェル当たり $1.0 \times 10^9 \sim 1.56 \times 10^7$ 個キャプシドの段階希釈物として、等量のキャプシドを37 で1時間コーティングした。ブロッキング緩衝液(0.05% Tween-20を含むPBS中の5%粉乳)で37 で1時間ブロッキングした後、ウェルを、AAV2をワクチン接種したウサギによる血清(0.05% Tween-20を含むPBS中の1%粉乳で1:400)と共に37 で1時間インキュベートした。ウェルをPBS/0.05% Tween-20で洗浄した後、コーティングしたAAV変種に対するポリクローナルウサギ血清の結合を、抗ウサギIgG HRPコンジュゲート(DAKO)で検出した。ウェルを抗ウサギIgG HRPコンジュゲートと共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、基質(TMB)をウェルに添加した。15分後、0.2 M H₂SO₄を添加することにより、反応を停止させた。450 nmのODをELISAリーダーで測定した。

30

【0346】

結果から、AAV2をワクチン接種したウサギによる血清は、AAV2と比較してAAV1に対する結合は効率が低く(OD値の点で最大8倍)(図12)、AAV1とAAV2は、抗キャプシド抗体による交差反応性がほとんどない異なる血清型であることが確認される。したがって、AAV2血清陽性のヒトにおける交差反応性抗体は、ヒトに適用されたAAV1ワクチンに対する中和活性が限られていると結論づけることができる。ウイルス骨格に対する(中和)抗体は、ワクチン接種および遺伝子導入効率をいずれも限定し得るため、このことから、ワクチン接種および遺伝子導入の両方に関して、AAV1がAAV2血清陽性のヒトの治療に好ましい血清型であることが示される。

40

【0347】

これらの結果は、rAAV2-GFP、rAAV1-GFP、rAAV1-GFP-CETP-588、およびrAAV1-GFP-CETP-590の等量のキャプシド(1×10^9 個)をMaxisorp 96ウェルプレート(Nunc)にコーティングし、AAV2をワクチン接種したウサギによる血清の段階希釈物(1:100 ~ 1:6400)と共にインキュベートした同様の実験においても確認された。結合アッセイは、上記の通りに行った(図13)。

【0348】

この実験から上記の結果がさらに確認され、加えてCETP挿入がこの結果を妨げないことが示される。

【0349】

50

8. 抗IgE抗体を研究するための手段

8.1. ヒトFc RIの鎖および鎖を過剰発現する293細胞の作製

pENTR(商標) 221にクローニングされたヒトFcERIの鎖(Fc RI)のcDNA(終止コドンを含む)をInvitrogenから入手し、製造業者の説明書に従ってGatewayクローニングシステム(Invitrogen)を用いて、発現ベクター-pEF5/FRT/V5-Dest(Invitrogen)にサブクローニングした。得られた発現ベクターをpEF5-Fc RIと称する。このベクターにおいて、Fc RI cDNAは、真核生物EF1プロモーターの制御下で発現される。

【0350】

lipofectamine(商標) 2000を用いて、Flp-In(商標) 293細胞(Invitrogen)にベクター-pEF5-Fc RIをトランスフェクトした。4×10⁵個の細胞を、10% FCS、5 mMグルタミン、NEAA(1×)(非必須アミノ酸)、および100 μg/ml zeocinを補充した全量2.0 mlのDMEMで、6ウェル細胞培養プレートの1ウェルに播種した。培養の24時間後、培地を無血清DMEMで置換し、製造業者の説明書に従って、細胞に全量100 μlのMEM中のlipofectamine 10 μl、ベクター-pEF5-Fc RI 2 μg、およびベクター-pOG44(Invitrogen) 2 μgの混合物をトランスフェクトした。

【0351】

ベクター-pOG44は、関心対象の遺伝子(Fc RI)およびFRT部位を含むベクターの、Flp組換え標的(FRT)部位を介したFlp-In(商標) 293細胞のゲノム中への組込みを媒介するリコンビナーゼ(Flpリコンビナーゼ)をコードする。6時間後、最終濃度が5%となるようにFCSを細胞に添加した。トランスフェクションの48時間後に、細胞を1:10比で分割し、DMEM、10% FCS、5 mMグルタミン、NEAA(1×)、および100 μg/mlハイグロマイシンBで培養して、トランスフェクト細胞を選択した。拾い上げた細胞クラスターをDMEM、10% FCS、5 mMグルタミン、NEAA(1×)、および100 μg/mlハイグロマイシンB中で継代培養することにより、単一の安定にトランスフェクトされた細胞クローンを単離した。

【0352】

Fc RI cDNAの細胞のゲノムへの組込みを、PCRにより解析した。トランスフェクト細胞のゲノムDNAを、DNeasy組織DNA単離キット(Qiagen)を用いて単離した。プライマー FcεRIα-uni 5'-TGT GTG TAG CCT TAC TGT TCT TCG C-3'

(SEQ ID NO: 154)

および

FcεRIα-rev 5'-CTTCTCACGCGGAGCTTTTATTAC-3'

(SEQ ID NO: 155)

、
ならびにTaqポリメラーゼマスターミックス(Qiagen)を用いて、PCRを行った。プライマーはヒトFc RI 遺伝子のエキソン-イントロン境界に位置するため、細胞のゲノムに組み込まれたFc RI のcDNAのみがPCRによって増幅される。

【0353】

Fc RI のcDNAはトランスフェクト細胞のゲノムに安定に組み込まれたが、Fc RI の有意な細胞表面発現は、0.5% BSAを補充したPBS中の最終濃度2.5 μg/mlのPE標識Fc RI 特異的mAb(eBioscience)を用いて、フローサイトメトリーにより検出されなかった。

【0354】

Fc RIの鎖の同時発現がFc RI の細胞表面発現を増加させることが知られているため(Kuster et al., 1990)、鎖が安定にトランスフェクトされた単一の293細胞クローン(クローンA3)に、Fc RI のcDNAをトランスフェクトした。ベクター-pENTR(商標) 221にクローニングされたFc RI のcDNA(終止コドンを含む)をInvitrogenから入手し、発現ベクター-pEF-DEST51(Invitrogen)およびpcDNA6.2-V5-DEST(Invitrogen)にサブクローニングした。pEF-DEST51またはpcDNA6.2-V5-DESTそれぞれにおいて、このcDNAは、真核生物EF1プロモーターまたはCMVプロモーターの制御下で発現される。上記の通りに、lipofecta

10

20

30

40

50

mine(商標) 2000およびベクター4 μ gを用いて、293細胞クローンA3にベクターpEF-Fc RI またはpcDNA6.2-Fc RI それぞれをトランスフェクトした。10% FCS、5 mMグルタミン、NEAA(1 \times)、100 μ g/mlハイグロマイシンB、および5 μ g/mlブラストサイジンを含むDMEM(選択培地)中で細胞を培養することにより、Fc RIの鎖および鎖を発現するトランスフェクト細胞を選択した。トランスフェクト細胞プールから拾い上げた細胞クラスターを、選択培地中で継代培養することにより、単一の安定にトランスフェクトされた細胞クローンを単離した。

【0355】

細胞クローンのFc RI 細胞表面発現を、0.1% BSAを補充したPBS中の最終濃度2.5 μ g/mlのPE標識抗ヒトFc RI mAb(eBioscience)を用いて、フローサイトメトリーによりモニターした(図15)。細胞 $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 個を全量100 μ lのPBS、0.5% BSA(インキュベーション緩衝液)中で、20 μ g/ml濃度のビオチン標識ヒトIgE(Dianova)と共に室温(RT)で30分間インキュベートすることにより、細胞のIgE結合を解析した。細胞をインキュベーション緩衝液で洗浄した後、IgE結合を、(インキュベーション緩衝液20 μ l中)15 μ g/mlのPE標識抗ストレプトアビジン(CALTAG)を用いて、フローサイトメトリーにより検出した。細胞をPE標識抗ストレプトアビジンで、氷上で30分間染色した(データは示さず)。

10

【0356】

結果から、鎖の同時発現により、Fc RI 鎖の細胞表面発現が増加することが実証される。細胞表面発現の増加は、トランスフェクト細胞によるヒトIgEの結合増加を伴い、細胞表面に露出した鎖が機能的に活性を有することが実証される。個々の細胞クローンはFc RI の細胞表面発現に関して異なり、最も高い発現およびIgE結合を示すクローンをその後のアッセイに選択した。

20

【0357】

Fc RI に対するヒトIgEの結合に及ぼす抗IgE抗体の影響を評価するために、鎖(EF1aプロモーターの制御下)および鎖(CMVプロモーターの制御下)を同時発現する細胞クローンD11を、IgE結合アッセイに使用した(図16)。全量100 μ lのインキュベーション緩衝液中で、漸増濃度のビオチン標識ヒトIgE(78 ng/ml \sim 10 μ g/ml)を一定濃度(2.5 μ g/ml)の抗IgE抗体Bsw17(Stadler, Bern教授により提供)またはXOLAIR(登録商標)と共に室温で1.5時間プレインキュベートした。陰性対照として、IgEを同じ条件下でマウスIgG₁と共にプレインキュベートした。80 \sim 90%コンフルエントな細胞(クローンD11)を有するT175細胞培養フラスコを細胞解離緩衝液(Gibco)を用いて回収し、細胞をDMEM培地15 mlに再懸濁した。この細胞懸濁液200 μ lを、96ウェル組織培養プレートの各ウェルに添加した。プレートを遠心分離し、細胞をインキュベーション緩衝液で洗浄し、IgE/抗IgE混合液100 μ lで再懸濁した。細胞を室温で30分間インキュベートした。細胞をインキュベーション緩衝液で洗浄した後、細胞をPE標識ストレプトアビジン(15 μ g/ml)で氷上で30分間染色した。IgE結合をフローサイトメトリーにより検出した(図16)。

30

【0358】

これらのデータから、ヒトFc RIの鎖および鎖を発現するトランスフェクト293細胞が、Fc RI に対するヒトIgEの結合およびその結合に及ぼす抗IgE抗体の影響をモニターするための手段を提供することが実証される。

40

【0359】

8.2. ヒトFc RIの を過剰発現するRBL2H3細胞の作製

pENTR(商標) 221にクローニングされたヒトFc RIの鎖(Fc RI)(終止コドンを含む)をInvitrogenから入手し、Gatewayクローニングシステム(Invitrogen)を用いて、発現ベクターpEF-DEST51(Invitrogen)およびpcDNA6.2-V5-DEST(Invitrogen)にサブクローニングした。上記の通りに、lipofectamine(商標) 2000およびベクター4 μ gを用いて、ラット好塩基球RBL2H3細胞(80 \sim 90%コンフルエント)に、結果として得られたベクターpEF-Fc RI またはpcDNA6.2-Fc RI それぞれをトランスフェクトした。15 μ g/mlブラストサイジンを補充した10% FCS、5 mMグルタミン、1 \times NEAAを含むRPMI(選択培地)中で細胞を培養することにより、Fc RIの鎖を発現するトランスフェクト細胞を選択した。トランスフェ

50

クト細胞プールから拾い上げた細胞クラスターを、選択培地中で継代培養することにより、単一の安定にトランスフェクトされた細胞クローンを単離した。細胞クローンのFc RI 細胞表面発現を、0.5% BSAを補充したPBS中の最終濃度2.5 µg/mlのPE標識抗ヒトFc RI mAb(eBioscience)を用いて、フローサイトメトリーによりモニターした(データは示さず)。

【0360】

細胞クローンE5(EF1 プロモーターの制御下で 鎖を安定に発現する)を、ヒトIgE媒介性ヒスタミン放出の評価に使用した。1.0 × 10⁴個の細胞を96ウェル組織培養プレートのウェルに播種し、全量200 µlのRPMI/10% FCS/5 mMグルタミン/1 × NEAA中で、37 °Cおよび5.0 % CO₂の加湿雰囲気において培養した。全量250 µl中、完全RPMI培地中の漸増濃度(0.08 ~ 10.0 µg/ml)のヒトIgE(Dianova)の存在下で2時間または48時間培養することにより、細胞を感作した。0.1% BSAを補充したタイロッド塩溶液(Sigma)で細胞を洗浄し、全量100 µlのタイロッド塩溶液/0.1% BSA中の抗ヒトIgE抗体Le27(100 nM)(Stadler, Bern教授により提供 ; (Grassi et al., 1986))による受容体結合ヒトIgEの架橋により、ヒスタミン放出を1時間誘導した。培地中のヒスタミン含量を、市販のヒスタミンELISA(Neogen)を用いて測定した(図17)。

10

【0361】

安定にトランスフェクトされたRBL2H3細胞のヒトIgE依存的ヒスタミン放出に及ぼす抗IgE抗体の影響を評価するために、細胞(クローンE5)を、XOLAIR(登録商標) mAb(5.0 ~ 25.0 µg/ml)と共に室温で2時間プレインキュベートした2.0 µg/mlヒトIgEで感作した。感作に際しては、細胞を全量100 µlのRPMI培地中で、上記の通りにIgE/XOLAIR(登録商標) mAb混合物と共に2時間培養した。上記の通りにヒスタミン放出を抗IgE mAb Le27により誘導し、培地のヒスタミン含量をELISA(Neogen)により測定した(図18)。

20

【0362】

これらのデータから、ヒトFc RIの 鎖を発現するトランスフェクトRBL2H3細胞がヒトIgEで感作され得、ヒトIgE架橋剤の存在下でヒスタミンを放出するよう誘導され得ることが実証される。この細胞は、好塩基球のヒトIgE誘発性脱顆粒、およびその脱顆粒に及ぼす抗IgE抗体の影響を研究するための手段を提供する。

【0363】

8.3. 組換えFc RI を用いるインビトロ結合アッセイ

ヒトFc RIの 鎖を、原核細胞または真核細胞において組換えタンパク質として発現させることができる。精製後に、組換えFc RI を適切な基材(例えば、プラスチックプレート、ビーズ)上に固定化することができる。精製および固定化は、組換えFc RI のN末端またはC末端に融合させた適切なタグ(例えば、Hisタグ、FLAGタグ、Sタグ、GSTタグ)を用いて行うこともできる。固定化Fc RI を標識ヒトIgEと共にインキュベートする。標識は、例えば蛍光色素、ビオチン、ペルオキシダーゼ、またはアルカリホスファターゼであってよい。IgEの結合を、この標識および適切な検出系(蛍光測定、ストレプトアビジン標識、ペルオキシダーゼ基質、アルカリホスファターゼ基質)を用いて検出する。IgEと組換えFc RI との相互作用に及ぼす抗IgE抗体の影響を評価するために、IgEを抗IgE抗体と共にプレインキュベートし、その後上記の結合アッセイにおいてこれを使用する。

30

40

【0364】

9. AAVキャプシドのI-453位およびI-587位における -アミロイドエピトープの二重挿入
規定のクローニング戦略を用いて、AAVキャプシドのI-453位およびI-587位にエピトープまたはミモトープ配列を二重挿入するために、以下に記載するアプローチを使用する。

【0365】

9.1. FseI制限部位のpCIVP2への挿入

QuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene)、ならびにオリゴヌクレオチド

mutashe-9 5'-GGT GAA TCC GGG GCC GGC CAT GGC AAG C-3'

(SEQ ID NO: 156)

および

mutashe-10 5'-GCT TGC CAT GGC CGG CCC CGG ATT CAC C-3'

(SEQ ID NO: 157)

を用いて、部位特異的突然変異誘発により、FseI制限部位をベクターpCIVP2-1587-NotI-AscIおよびpCIVP2-1453-NotI-AscIの1-453と1-587の間に挿入した。

【0366】

9.2. pUCAV2の1-587位における -アミロイドエピトープのクローニング
-アミロイドエピトープ

DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 158)

(ヒト -アミロイドのaa1-9)を、センスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド

β -amyloid-for 5'-GGC CGC AGG CGG AGG GGG AGG CGA CGC CGA GTT
CAG ACA CGA CAG CGG CGG CGG AGG GGG AGG CGC GG-3'

(SEQ ID NO: 159)

および

β -amyloid-rev 5'-CGC GCC GCG CCT CCC CCT CCG CCG CCG CTG TCG
TGT CTG AAC TCG GCG TCG CCT CCC CCT CCG CCT GC-3'

(SEQ ID NO: 160)

を用いて、ベクターpCIVP2-1587-NotI-AscI(9.1に記載する通りに改変してある)のNotI/AscI制限部位にクローニングした。このオリゴヌクレオチドは、グリシンアダプター配列を伴う -アミロイドエピトープ:

(A)₃-(G)₅-DAEFRHDSG-(G)₅-(A)₂ (SEQ ID NO: 161)

をコードする。上記の通りに(6.2)、クローニングを行った。

【0367】

1-587位に -アミロイドエピトープを含むVP-2断片をコードするpCIVP2-587-NotI-AscIのBsiWI/XmaI断片を、上記の通りに(6.3)、pUCAV2-AgeIにサブクローニングした。得られたベクターをpUCAV2-アミロイド-587と称した。

【0368】

9.3. pCIVP2の1-453位における -アミロイドエピトープのクローニング
-アミロイドエピトープ

(DAEFRHDSG, SEQ ID NO: 158)

を、センスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド

Amyloid 453for 5'-G GCC GGC GGA GGC GGT GGG GAC GCC GAA TTC
AGA CAC GAC AGC GGC GGA GGC GGT GGA GGG-3'

(SEQ ID NO: 162)

Amyloid 453rev 5'-C GCG CCC TCC ACC GCC TCC GCC GCT GTC GTG
TCT GAA TTC GGC GTC CCC ACC GCC TCC GCC-3'

(SEQ ID NO: 163)

10

20

30

40

50

を用いて、ベクター-pCIVP2-1453-NotI-AscI(9.1に記載する通りに変更してある)の挿入部位1-453におけるNotI/AscI制限部位にクローニングした。このオリゴヌクレオチドは、グリシンアダプター配列を伴う -アミロイドエピトープ:

(A)₂-(G)₅-DAEFRHDSG-(G)₅-R-(A)₂ (SEQ ID NO: 164)

をコードする。上記の通りに(6.2)、クローニングを行った。

【0369】

9.4. pUCAV2の1-453位および1-587位における -アミロイドエピトープのクローニング
1-587位および1-453位に -アミロイドエピトープを保有する組換えAAV粒子の産生のため、ベクター-pUCAV2-アミロイド-587をBsiWI/FseIで切断し、pCI-VP2-453-NotI-AscIの0.6 kb BsiWI/FseI断片と連結した。pCI-VP2-453-NotI-AscIのBsiWI/FseI断片は、1-453位に -アミロイドエピトープを含むVP-2断片をコードする。得られたベクターをpUCAV2-アミロイド-453-587と称した。

10

【0370】

9.5. 1-453および1-587に -アミロイドエピトープを保有するAAV粒子の産生、精製、および評価

1-587位および1-453位に -アミロイドエピトープを保有する組換えAAV粒子の産生のため、上記の通りに(4.2および4.3)、ベクター-pUCAV2-アミロイド-453-587およびヘルパープラスミドpUCAdVを293細胞にトランスフェクトした。対応するAAV粒子を、AAV-アミロイド-453-587と称した。

20

【0371】

1-587位に -アミロイドエピトープを保有する組換えAAV粒子の産生のため、上記の通りに、ベクター-pUCAV2-アミロイド-587およびヘルパープラスミドpUCAdVを293細胞にトランスフェクトした。対応するAAV粒子を、AAV-アミロイド-587と称した。いずれのAAV粒子も上記の通りに精製した。

【0372】

AAVキャプシドの表面における -アミロイドエピトープの発現を評価するために、精製AAV粒子AAV-アミロイド-453-587およびAAV-アミロイド-587の段階希釈物を膜上にドットした(図19)。陰性対照として、1-587位にCETPエピトープを保有するAAV粒子をドットした。陽性対照として、 -アミロイドペプチド(aa 1-42)(Biosource)をドットした。膜をブロッキング緩衝液(0.05% Tween-20を含むPBS中の5%粉乳)でブロッキングした後、抗 -アミロイドmAb 6E10(Chemicon)を用いて -アミロイドエピトープを検出した(図19)。抗 -アミロイドmAbは、PBS/1%粉乳/0.05% Tween-20中の1.0 μg/ml濃度で使用した。抗 -アミロイドmAbの結合は、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(CALTAG)を用いて検出した。洗浄後、スーパーシグナルWest Pico化学発光基質(Pierce)を用いて、化学発光によりシグナルを検出した。

30

【0373】

これらのデータから、挿入部位1-453および1-587にエピトープを二重挿入すると、1-587位におけるエピトープの唯一の挿入よりも、キャプシド表面におけるエピトープ密度が高くなることが実証される。

40

【0374】

10. AAVベースのワクチンによるウサギの免疫化

10.1. 免疫化実験用のAAV2ベースのワクチンの産生および精製

AAV粒子の産生のため、上記の通りに、(1-453および/または1-587に)サブクローニングされたエピトープを含むベクタープラスミドpUCAV2、およびヘルパープラスミドpUCAdVを、HEK 293-T細胞に同時にトランスフェクトした。大規模産生のために、15 cm細胞培養プレート30~60枚に7.5 × 10⁶個の293-T細胞を播種し、加湿雰囲気において37 °C、5% CO₂で培養した。上記の通りに、(1-453または1-587に)エピトープを含むベクタープラスミドpUCAV2およびpUCAdVによる細胞の同時トランスフェクションを行った。トランスフェクションの72時間後に、293-T細胞および培地を回収し、3000 g、4 °Cで15分間遠心分離した。

50

細胞ペレットを溶解緩衝液(50 mM HEPES、200 mM NaCl、2.5 mM MgCl₂; pH 6.8) 15~30 mlに再懸濁し、3回の凍結および融解サイクルに供した。清澄化細胞培養上清は、SARTOCO N(登録商標) Slice 200カセット(Hdyrosart膜)を用いるSARTOFLOW(登録商標) Slice 200 Benchtopクロスフローシステムを用いて、TFF(接線流濾過)により濃縮した。細胞培養上清のTFF濃縮物(約35 ml)を清澄化粗溶解物と共にプールし、次に1667 U/mlベンゾナーゼ(Merck)で、37 °Cで2時間~4時間処理した。ベンゾナーゼ処理後、粗溶解物とTFF濃縮物のプールを、3600 g、4 °Cで5分間遠心分離した。AAV含有上清を、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)カラムを通して分離した。SECは、SUPERDEX 200(登録商標)樹脂ビーズを充填したXK50/20カラム、およびSEC移動緩衝液(50 mM HEPES、400 mM NaCl、2.5 mM MgCl₂; pH 6.8)を用いて行った。SEC画分をAAV2 ELISAにより解析した。AAV含有画分をプールし、イオジキサノール勾配遠心分離に供した。QUICKSEAL(登録商標)遠心チューブ(25×89 mm; Beckman)中で、異なる濃度のイオジキサノール溶液を、ウイルス含有SEC画分のプールの下に重層した。これにより、上部にウイルス溶液を有して、底の60% 4.0 ml、40% 5.0 ml、25% 4.0 ml、および15% 5.5 mlイオジキサノールから構成されるイオジキサノール勾配を作製した。固定角ローター(Ti 70.1ローター、Beckman)を用いて、勾配を65000 rpm、18 °Cで1時間遠心分離した。次に、40%相の下部でチューブに穴を開け、溶液を回収チューブ中に滴下させることにより、カニユーレを用いてAAV粒子を含む40%相を抽出した。25%相が到達するまで、約0.5 mlの画分を回収した。画分のAAVキャプシド力価を、市販のELISA(AAV力価測定ELISA、Progen)を用いて決定した。AAV含有画分の純度を、SDS-PAGEおよびこれに続くコロイドクマシー染色により決定した。高純度のAAV粒子を有する画分をプールし、最終プールのキャプシド力価をAAV2力価測定ELISAにより決定した。

10

20

【0375】

10.2. AAVベースのワクチンによる自己寛容の破壊

ウサギCETPに由来するエピトープを保有するAAVベースの一連のワクチンを、上記の通りに作製した。AAVベースのCETPワクチンを、担体タンパク質としてのLPH(アメリカカブトガニヘモシアニン)に結合させた同じエピトープを含む対応するペプチドワクチンと比較した。ペプチドは、LPHにペプチドを結合させるために使用するC末端またはN末端システイン残基を付加して化学合成した。ペプチドの合成および結合は、Biogenes(ドイツ、ベルリン)によって行われた。表24に記載するワクチンを、ウサギの免疫化に使用した。

【0376】

30

(表24) ウサギの免疫化に使用したワクチン

ワクチンの名称	ワクチン担体	挿入部位	エピトープ	用量(μg)
AAV-TP11	AAV2	I-587	SLTGDEFKKVLET SEQ ID NO: 238	10.9
AAV-TP12	AAV2	I-587	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 239	14.1
AAV-TP13	AAV2	I-587	INPEIITLDG SEQ ID NO: 240	13.3
AAV-TP18	AAV2	I-587	DISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 241	7.2
LPH-TP11	LPH	N/A	CSLTGDEFKKVLET SEQ ID NO: 320	本文参照
LPH-TP12	LPH	N/A	CREAVAYRFEED SEQ ID NO: 321	本文参照
LPH-TP13	LPH	N/A	CINPEIITLDG SEQ ID NO: 322	本文参照
LPH-TP18	LPH	N/A	CDISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 323	本文参照

10

20

30

40

【0377】

各ワクチン接種アプローチについて、上表に示したワクチンをウサギ2匹に4回皮下免疫した(刺激免疫1回および追加免疫3回)。1回目の追加免疫は、最初の刺激免疫の2週間後に行った。ウサギに、3週間の間隔でワクチンをさらに2回追加免疫した。各追加免疫の2週間後に、免疫動物の血清を調製した。

【0378】

AAVベースの精製ワクチンは、粒子の安定化のために等量の製剤化緩衝液(1%ソルビトール、0.2% Tween-20、25%プロピレングリコール、200 mM NaCl、および2.5 mM MgCl₂を含むPBS)と混合し、投与するまで-80 で保存した。必要に応じて、適用前に、AAVベースのワクチンの容量を0.3 mlになるように製剤化緩衝液で直接調整した。ワクチンは、アジュバント0.7 mlの存在下で皮下投与した(全量1 ml)。アジュバントはBiogenesにより提供され、特に、0.01%フォルミディウム属由来リポポリ多糖、95%パラフィン油、2.4% Tween-40、および0.1%コレステロールを含んでいた。

【0379】

LPH結合ペプチド(TBS 0.3 ml中)は、Biogenesによって提供されるアジュバント0.7 mlの存在下で皮下投与した。刺激免疫には、LPH-ペプチドコンジュゲート1 mgを投与した。1回目の追加免疫にはコンジュゲート0.5 mgを使用し、2回目および3回目の追加免疫にはコンジュゲート0.25 mgを使用した。

【0380】

ワクチン接種した動物における抗CETP自己抗体の誘導を、抗原として組換えウサギCETPを用いてELISAにより決定した。ウサギCETPの産生のため、プライマー

rCETP-uni 5'-GGG GAA TTC ATG TCC CAA AGG CGC CTC CTA CG-3'

(SEQ ID NO: 324)

および

rCETP-rev 5'-GGG GGA TCC CTA GCT CAG GCT CTG GAG GAA ATC C-3'

(SEQ ID NO: 325)

ならびに鋳型としてのウサギ肝臓ポリA⁺ RNA(Clontech)を用いて、RT-PCRによりCETP cDNAを増幅した。CETP cDNAを、ベクター-p3XFLAG-CMV-8(SIGMA)のEcoRI/BamHI部位にクローニングした。得られたベクターは、C末端FLAG(登録商標)タグ、および組換えタンパク質の分泌のためのN末端プレプロトリプシンリーダー配列を有する成熟CETP配列をコードする。組換えウサギCETPの発現のため、上記の通りに、リン酸カルシウムトランスフェクションによりこのベクターを293T細胞にトランスフェクトした。抗FLAG(登録商標) M2アガロースビーズ(SIGMA)を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより、CETPを細胞培養上清から精製した。組換えウサギCETPの純度を、SDS-PAGEおよびこれに続くコロイドクマシー染色により解析した。CETP活性は、市販のCETP活性アッセイ(Roar)を用いて決定した。

10

【0381】

免疫血清中のウサギCETP自己抗体の力価測定のため、96ウェルMaxisorpプレート(Nunc)を精製組換えウサギCETP(100 ng/ウェル)で、37 °Cで1時間コーティングした。コーティング後、ウェルを洗浄緩衝液(PBS/0.1% Tween-20)で洗浄し、続いてブロッキング緩衝液(洗浄緩衝液中の5%粉乳)と共に37 °Cで1時間インキュベートした。ウェルのブロッキング後、固定化CETPを、希釈緩衝液(1%脱脂乳および1% BSAを含む洗浄緩衝液)中で、免疫血清の段階希釈物と共に37 °Cで1時間インキュベートした。ウサギ免疫前血清、または非関連ワクチン接種のウサギ血清を陰性対照とした。洗浄後、固定化CETPに対するウサギIgGの結合を、HRP標識抗ウサギIgG抗体(H+L)(DAKO; 希釈緩衝液で1:2500)を用いて検出した。基質としてTMB(KemEnTec)を用いて、シグナル(OD)を検出した。

20

【0382】

CETP自己抗体価を終点希釈により決定した。免疫血清の力価は、免疫血清の検量線とアッセイの検出限界の交差点に相当する。

30

【0383】

アッセイの検出限界(LOD)は以下の通りに算出した：
平均OD(非特異的血清) + 3.3 × 標準偏差OD(非特異的血清)

【0384】

CETP自己抗体価に加えて、免疫血清の抗ペプチド力価も解析した。遊離ペプチド(AAVキャプシドに組み込まれた、またはLPHに結合させたエピトープに対応する)を、96ウェルプレート(REACTI-BIND(商標)アミン結合、無水マレイン酸活性化プレート; Pierce)に共有結合で固定化した。ペプチドの固定化のため、96ウェルプレートを全量50 μlのPBS中で、ウェル当たり1 μgのペプチドと共に37 °Cで少なくとも1時間インキュベートした。ペプチドのコーティング後、ウェルを200 μl/ウェルのブロッキング緩衝液(PBS/5%脱脂乳/0.1% Tween-20)で、37 °Cで1時間ブロッキングした。ウェルのブロッキング後、固定化ペプチドを、希釈緩衝液(1%脱脂乳、1% BSA、および0.1% Tween-20を含むPBS)中で、免疫血清の段階希釈物と共に37 °Cで1時間インキュベートした。ウサギ免疫前血清、または非関連ワクチン接種のウサギ血清を陰性対照とした。洗浄後、固定化CETPに対するウサギIgGの結合を、HRP標識抗ウサギIgG抗体(DAKO; 希釈緩衝液で1:2500)を用いて検出した。基質としてTMB(KemEnTec)を用いて、シグナル(OD)を検出した。抗体価を上記の通りに決定した。

40

【0385】

AAV-TP13をワクチン接種した動物1匹を除くと、データから、AAVベースのワクチンによるワクチン接種により、ペプチドベースのワクチンを用いて得られない、高力価の標的特異的自己抗体が誘導されることが実証される。したがって、AAVベースのワクチンは自己

50

寛容を破壊し、高レベルの自己抗体を誘導することができる(図20)。ペプチドベースのワクチンの免疫原性特性は、ペプチドワクチンによって誘導される高力価のペプチド特異的抗体に反映される(図21)。しかしながら、これらの抗体は天然ウサギCETPとは弱い反応しか示さず(図20)、ペプチドベースのワクチンは免疫原性はあるものの自己寛容を破壊する能力は限られており、低レベルの自己抗体を誘導することが示唆される。

【0386】

10.3. 自己寛容の破壊および自己抗体の誘導に必須であるAAVキャプシド構造

免疫系の自己寛容の破壊および自己抗体の誘導に、キャプシド構造、およびAAVキャプシド内でのエピトープの構造化反復提示が必須であることを実証するために、熱変性したAAV-TP11-2x粒子またはAAV-TP18-2x粒子をウサギに免疫した。結果を、対応する未変性粒子を用いるワクチン接種と比較した。AAV変種AAV-TP11-2xは、1-453位および1-587位にウサギCETP TP11エピトープ

(SLTGDEFKVKLET, SEQ ID NO: 238)

を保有する。AAV変種AAV-TP18-2xは、1-453位および1-587位にウサギCETP TP18エピトープ

(DISVTGAPVITATYL, SEQ ID NO: 241)

を保有する。熱変性のために、粒子を等量の製剤化緩衝液(1%ソルビトール、0.2% Tween-20、25%プロピレングリコール、200 mM NaCl、および2.5 mM MgCl₂を含むPBS)と混合し、90 で15分間インキュベートした。粒子の立体構造の破壊を、天然キャプシド内の立体構造エピトープを認識するAAV2力価測定ELISAにより解析した。熱変性粒子のタンパク質濃度をMicro BCAアッセイ(Pierce)により決定し、AAV2の精製VP3タンパク質をウサギに免疫することによって産生されたポリクローナル抗AAV2抗体を用いて、ウェスタンブロッティングにより解析した(データは示さず)。

【0387】

熱変性AAV-TP11-2x粒子(5.7 μg/適用)またはAAV-TP18-2x粒子(1.8 μg/適用)を、上記の通りにBiogenesによって提供されるアジュバントの存在下で、ウサギに皮下免疫した。最初の刺激免疫の2週間後に、ウサギに熱変性粒子を追加免疫した。追加免疫の2週間後に、動物の血清を、上記の通りにCETP自己抗体のレベルについて解析した。対照群では、熱変性粒子の場合と同じ投与計画を用いて、ウサギに未変性のAAV-TP11-2x粒子またはAAV-TP18-2x粒子をワクチン接種した。

【0388】

免疫動物の血清中のCETP自己抗体価の解析から、天然キャプシドの立体構造を破壊すると、未変性ワクチンと比較してCETP抗体の誘導が強く損なわれることが実証され(図22)、天然キャプシド構造およびキャプシド内でのエピトープの構造化提示が自己寛容の破壊に必須であることが示される。

【0389】

10.4. AAV2ベースのワクチンによる免疫化に及ぼす抗AAV2抗体の影響の評価

免疫化実験から、AAVベースのワクチンが、標的特異的抗体に加えて、高力価の抗AAVキャプシド抗体も誘導することが実証された(データは示さず)。しかしながら、大部分のヒトはAAV2陽性であり、すなわち、これらの人々は、AAV2ベースの粒子を用いるワクチン接種結果に潜在的に影響し得る抗AAV2抗体価を有する。AAV2ベースのワクチンの免疫化の成功に及ぼす抗AAV2抗体の影響を評価するために、AAV2ベースのCETPワクチン(AAV-TP18)による免疫化(刺激免疫および2回の追加免疫)を開始する前に、wtAAV2(4.5 μg/適用)を2回適用することによりウサギに予備免疫した。wtAAV2粒子を、上記の通りにBiogenesによって提供されるアジュバントの存在下で、皮下または筋肉内投与した。wtAAV2による最初の刺激免疫の2週間後に、ウサギにwtAAV2を再度追加免疫した。刺激免疫および1回目の追加免疫の2週間後に、血清を抗AAV2抗体のレベルについて解析した。抗AAV2抗体価を、以下に記載する通りに、固定化wtAAV2粒子を用いてELISAにより決定した。データから、皮下

10

20

30

40

50

および筋肉内投与のいずれについても、wtAAV2を2回適用した後に、高レベルの抗wtAAV2抗体が検出可能であることが実証される(図23A)。

【0390】

wtAAV2による追加免疫の3週間後に、ウサギに、AAV2ベースのワクチンAAV-TP18(7.2 μg/適用)による最初の刺激免疫を付与した。上記の通りにBiogenesによって提供されるアジュバントの存在下で、ワクチンを皮下または筋肉内投与した。刺激ワクチン接種の2週間後に、ウサギにワクチンを追加免疫した。追加ワクチン接種の2週間後に、血清をCETP自己抗体のレベルについて解析した(図23B)。CETP自己抗体価を上記の通りに決定した。結果を、wtAAV2で予備免疫しなかった動物のワクチン接種(皮下)と比較した。

【0391】

データから、wtAAV2予備免疫によって高力価の抗AAV2キャプシド抗体が生じることが実証される。しかしながら、これらの高い抗AAV2キャプシド抗体は、この場合抗CETP自己抗体の誘導に関して、AAV2ベースのワクチンの免疫化の成功を損なわない。したがって、AAV2血清陽性のヒトも、血清陰性のヒトと同様にAAV2粒子によるワクチン接種に適格である、およびワクチン接種を受けたヒトのワクチン接種プロトコール中の血清転換によって、ワクチン接種の成功は損なわれないと結論づけられる。

【0392】

抗wtAAV2抗体価の決定：

抗AAV2抗体価は、固定化wtAAV2粒子を用いてELISAにより決定した。簡潔に説明すると、wtAAV2粒子 5×10^9 個を、ウェル当たり全量50 μlのPBS中で、96ウェルMaxisorpプレート(Nunc)の各ウェルに固定化した。プレートを37 °Cで1時間インキュベートした。ウェルをPBS、5%脱脂乳、0.1% Tween-20でブロッキングした後、固定化wtAAV2粒子を、希釈緩衝液(1%脱脂乳、1% BSA、0.1% Tween-20を含むPBS)中で、免疫血清の段階希釈物と共に37 °Cで1時間インキュベートした。ウサギ免疫前血清、または非関連ワクチン接種のウサギ血清を陰性対照とした。洗浄後、固定化AAV2に対するウサギIgGの結合を、HRP標識抗ウサギIgG抗体および基質としてのTMBを用いて検出した。抗体価を上記の通りに決定した。

【0393】

10.5. AAVベースのワクチンの初回刺激/追加免疫投与計画

I-453位およびI-587位にCETP-内部エピトープ(CDAGSVRTNAPD、SEQ ID NO: 123)を保有するAAV2粒子(AAV2-CETin-2x) 16.4 μgを、上記の通りにBiogenesによって提供されるアジュバントと共に、各刺激免疫または追加免疫において筋肉内投与した。

【0394】

3つの異なる投与計画を評価した。A群には、AAV2-CETin-2xの初回刺激適用を1回および追加免疫適用を3回付与した(AAV2ベースのワクチン接種)。B群には、AAV2-CETin-2xによる刺激免疫1回および追加免疫1回、ならびにその後のLPH結合CETP-内部ペプチドによる追加免疫2回を付与した(LPH-ペプチド追加免疫)。C群には、AAV2-CETin-2xによる刺激免疫1回および追加免疫1回、ならびにその後のAAV1-CETin(I-588位にCETP-内部エピトープを保有するAAV1粒子; 11.7 μg/適用)による追加免疫2回を付与した。各群において、1回目の追加免疫は刺激免疫の2週間後に行った。2回目および3回目の追加免疫は、その前の追加ワクチン接種の3週間後に行った。

【0395】

1回目、2回目、および3回目の追加免疫の2週間後に、免疫血清を、上記の通りに抗CETP反応性(CETP自己抗体価)について解析した(図24)。

【0396】

これらのデータから、AAV2-CETin-2xのみをワクチン接種した動物(A群)において、高レベルのCETP自己抗体が検出可能であることが実証される。LPH結合CETPペプチドを追加免疫した動物の群(B群)では、CETP自己抗体の増加は認められない。さらに、AAV骨格の血清型の転換が(C群)、個々のAAV血清型による追加ワクチン接種と比較して、自己抗原に対する免疫反応を増加させる能力を有することがデータから実証される。

【0397】

10

20

30

40

50

10.6. AAV2ベースのワクチンによる免疫化に及ぼす異なるアジュバントの影響の評価

Biogenesにより提供されるアジュバントはヒトでの適用に適していない可能性があるため、別のアジュバントを評価した。最初のアプローチでは、Montanide ISA 51 VG無菌(Seppic)を試験した。ウサギに、CETPワクチンAAV-TP18(7.2 µg/適用)を筋肉内または皮下免疫した。精製ワクチンの容量を製剤化緩衝液で0.5 mlになるよう調整し、等量のMontanide ISA 51 VG無菌と混合した。対照群には、上記の通りにBiogenesにより提供されるアジュバントを用いて、AAV-TP18を皮下免疫した。各ワクチン接種アプローチについて、ウサギに2匹に4回免疫した(刺激免疫1回および追加免疫3回)。1回目の追加免疫は、最初の刺激免疫の2週間後に行った。ウサギに、3週間の間隔でワクチンをさらに2回追加免疫した。1回目、2回目、および3回目の追加免疫の2週間後に、免疫血清を、上記の通りに抗CETP反応性(CETP自己抗体価)について解析した。Montanide ISA 51の存在下でAAV-TP18を皮下にワクチン接種した動物のCETP自己抗体価の解析から、Biogenesアジュバントを用いるワクチン接種アプローチと同様の力価が誘導されることが実証される(図25)。Montanide ISA 51の存在下におけるAAV-TP18ワクチンの皮下投与と筋肉内投与の比較から、筋肉内ワクチン接種によってより高い自己抗体価が生じることが示される。これらのデータから、AAVベースのワクチンは、Montanide ISA 51 VG無菌のような臨床的に適用可能なアジュバントの存在下で自己抗体を誘導できることが実証される。

【0398】

加えて、AAVベースのワクチンと、アルミニウムベースのアジュバントAlhydrogel2%などの他のアジュバントとの併用も、それに応じて自己抗体の誘導に関して評価することができる。

【0399】

10.7. AAV1ベースのCETPワクチンによるウサギのワクチン接種

AAV2ベースの粒子によって得られた結果を、他のAAV血清型または他のバルボウイルスに容易に移行することができることを証明するために、7.4.1.に記載した通り、CETP-内部ペプチド

(CDAGSVRTNAPD, SEQ ID NO: 123)

をAAV1キャプシドに挿入してあった。

【0400】

ワクチン接種アプローチのため、10.2に記載した通りに、ウサギ2匹にそれぞれ11.7 µgの構築物AAV1-CETP-588(588位におけるCETP-内部エピトープの挿入)を筋肉内より免疫した。1回目の追加免疫は、最初の刺激免疫の2週間後に行った。ウサギに、3週間の間隔でワクチンをさらに2回追加免疫した。各追加免疫の2週間後に、免疫動物の血清を調製した。CETP自己抗体価を上記の通りに決定した。

【0401】

得られたデータから、AAV1ベースのCETPワクチンAAV1-CETP-588が高レベルのCETP自己抗体を誘導することが実証される(図26)。CETP自己抗体の誘導は、少なくともAAV2-CETin-2xワクチン接種に匹敵する(10.5を参照されたい)。この実験から、AAV2骨格がAAV1骨格によって置換され得ると結論づけることができる。

【0402】

10.8. ヒト -アミロイドに対するワクチン接種

ヒト -アミロイドに対するワクチン接種のため、1-587位にヒト -アミロイド(aa 1-9)エピトープ

(DAEFRHDSG, SEQ ID NO: 158)

を保有するAAV2粒子1.0 µgを、Biogenesにより提供されるアジュバントの存在下で、各刺激免疫または追加免疫において皮下投与した。ウサギ2匹に4回免疫した(刺激免疫1回および追加免疫3回)。1回目の追加免疫は、最初の刺激免疫の2週間後に行った。ウサギに、3週間の間隔でワクチンをさらに2回追加免疫した。1回目、2回目、および3回目の追加免疫の2週間後に、以下に記載する通りに、免疫血清を抗 -アミロイド反応性について解析し

10

20

30

40

50

た。

【0403】

得られたデータから、AAV2ベースの β -アミロイドワクチンをウサギに免疫すると、 β -アミロイドに対する抗体が効率的に誘導されることが実証される(図27)。

【0404】

抗 β -アミロイド抗体価の決定：

抗 β -アミロイド抗体価は、抗原として固定化A β (1-42)(Biosource)を用いてELISAにより決定した。簡潔に説明すると、A β (1-42)ペプチド250 ngを、ウェル当たり全量50 μ lのPBS中で、96ウェルMaxisorpプレート(Nunc)の各ウェルに固定化した。プレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。ウェルをPBS/5%脱脂乳/0.1% Tween-20でブロッキングした後、固定化A β (1-42)を、希釈緩衝液(1%脱脂乳、0.1% Tween-20を含むPBS)中で、免疫血清の段階希釈物と共に37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。ウサギ免疫前血清、または非関連ワクチン接種のウサギ血清を陰性対照とした。洗浄後、固定化A β (1-42)に対するウサギIgGの結合を、HRP標識抗ウサギIgG抗体および基質としてのTMBを用いて検出した。抗体価を上記の通りに決定した。

【0405】

10.9. AAVベースのワクチンを用いるヒトIgEに対する免疫化

ヒトIgEに由来するエピトープを保有するAAVベースの一連のワクチンを、上記の通りに作製した。AAVベースのIgEワクチンを、担体タンパク質としてのLPHに結合させた同じエピトープを含む対応するペプチドワクチンと比較した。ペプチドは、LPHにペプチドを結合させるために使用するC末端またはN末端システイン残基を付加して化学合成した。ペプチドの合成および結合は、Biogenes(ドイツ、ベルリン)によって行われた。

【0406】

以下のワクチンをウサギの免疫化に使用した。

【0407】

(表25) ヒトIgEに対する免疫化に使用したAAVベースおよびLPHベースのワクチン

ワクチンの名称	ワクチン担体	挿入部位	エピトープ	用量(μ g)	適用
AAV-Kricek	AAV2	I-587	VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 85)	3.1	s.c.
AAV-3DEpi3	AAV2	I-587	3DEpi3	4.4	s.c.
AAV-Flex	AAV2	I-587	Flex	16.3	i.m.
AAV-Bind2	AAV2	I-587	Bind2	5.1	i.m.
LPH-Kricek	LPH	N/A	VNLTWSRASGC SEQ ID NO: 326	本文参照	i.m.
LPH-3DEpi3	LPH	N/A	CDSNPRGVSAAYLSR SEQ ID NO: 327	本文参照	i.m.
LPH-Flex	LPH	N/A	CEDGQVMDVDLS SEQ ID NO: 328	本文参照	i.m.
LPH-Bind2	LPH	N/A	CEKQRNGTLT SEQ ID NO: 329	本文参照	i.m.

【0408】

各ワクチン接種アプローチについて、上表に示したワクチンをウサギ2匹に4回免疫した

(刺激免疫1回および追加免疫3回)。1回目の追加免疫は、最初の刺激免疫の2週間後に行った。ウサギに、3週間の間隔でワクチンをさらに2回追加免疫した。

【0409】

AAVベースの精製ワクチンは、粒子の安定化のために等量の製剤化緩衝液(1%ソルビトール、0.2% Tween-20、25%プロピレングリコール、200 mM NaCl、および2.5 mM MgCl₂を含むPBS)と混合し、投与するまで-80 で保存した。必要に応じて、適用前に、ワクチンの容量を0.3 ml~0.5 mlになるように製剤化緩衝液で直接調整した。AAVベースのワクチンを、Biogenesアジュバントと共に皮下または筋肉内投与した(全量1 ml)。

【0410】

LPH結合ペプチド(TBS 0.3 ml中)は、Biogenesによって提供されるアジュバント0.7 mlの存在下で筋肉内投与した。刺激免疫には、LPH-ペプチドコンジュゲート1 mgを投与した。1回目の追加免疫にはコンジュゲート0.5 mgを使用し、2回目および3回目の追加免疫にはコンジュゲート0.25 mgを使用した。

10

【0411】

ワクチン接種した動物における抗ヒトIgE抗体の誘導を、抗原としてヒトIgE(Diatec、ノルウェー、オスロ)を用いてELISAにより決定した。96ウェルMaxisorpプレート(Nunc)をヒトIgE(1 µg/ウェル)で、37 で1時間コーティングした。コーティング後、ウェルを洗浄緩衝液(PBS/0.1% Tween-20)で洗浄し、続いてブロッキング緩衝液(洗浄緩衝液中の5%粉乳)と共に37 で1時間インキュベートした。ウェルのブロッキング後、固定化ヒトIgEを、希釈緩衝液(1%脱脂乳および1% BSAを含む洗浄緩衝液)中で、免疫血清の段階希釈物と共に37 で1時間インキュベートした。ウサギ免疫前血清、または非関連ワクチン接種のウサギ血清を陰性対照とした。洗浄後、固定化IgEに対するウサギIgGの結合を、HRP標識抗ウサギIgG抗体(DAKO; 希釈緩衝液で1:2500)を用いて検出した。基質としてTMB(KemEnTec)を用いて、シグナル(OD)を検出した。

20

【0412】

IgE力価に加えて、免疫血清の抗ペプチド力価も解析した。遊離ペプチド(AAVキャプシドに組み込まれた、またはLPHに結合させたエピトープに相当する)を、上記の通りに96ウェルプレート(REACTI-BIND(商標)アミン結合、無水マレイン酸活性化プレート; PIERCE)に共有結合で固定化した。ウェルのブロッキング後、固定化ペプチドを、希釈緩衝液(1%脱脂乳、1% BSA、および0.1% Tween-20を含むPBS)中で、免疫血清の段階希釈物と共に37 で1時間インキュベートした。ウサギ免疫前血清、または非関連ワクチン接種のウサギ血清を陰性対照とした。洗浄後、固定化CETPに対するウサギIgGの結合を、HRP標識抗ウサギIgG抗体(DAKO; 希釈緩衝液で1:2500)を用いて検出した。基質としてTMB(KemEnTec)を用いて、シグナル(OD)を検出した。抗体価を上記の通りに決定した。

30

【0413】

免疫血清の抗IgE力価を以下の表26にまとめる。

【0414】

(表26) AAVベース 対 LPHベースのIgEワクチンによる免疫化の平均抗IgE力価

ワクチン	抗IgE力価 追加免疫1回目	抗IgE力価 追加免疫2回目	抗IgE力価 追加免疫3回目
AAV-Kricek	4750	20150	25460
AAV-Kricek*	n.d.	7950	27000
AAV-3DEpi3*	5000	18200	30140
AAV-Bind2	575	3075	7750
AAV-Flex	17200	40300	38100
LPH-Kricek	n.d.	1300	400
LPH-3DEpi3	705	1400	1600
LPH-Flex	15000	14000	23250
LPH-Bind2	0	0	0

10

*AAVベースのワクチンを刺激免疫および1回目の追加免疫に使用した；2回目および3回目の追加免疫は、対応するLPH結合ペプチドを用いて行った。

20

【0415】

興味深いことに、LPH-Kricek、LPH-3DEpi3、またはLPH-Bind2によるウサギのワクチン接種では、ヒトIgEに対して有意なレベルの抗体を誘導することができなかった。ペプチドベースのワクチンの免疫原性特性は、ペプチドワクチンによって誘導されるペプチド特異的抗体に反映される(データは示さず)。しかしながら、これらの抗体は天然ヒトIgEとは反応を示さないか、または弱い反応しか示さない。LPH-Flexのみが、天然ヒトIgEに特異的な適度に高力価の抗体を誘導した。これは、対応するLPH融合構築物と比較してかなり高いヒトIgE特異的抗体価を生じるAAV-Kricek(図28)のような、対応するAAVベースのワクチンで得られる結果とは明らかに対照的である。このことから、AAV2キャプシドにおける対応するIgEエピトープの固定された立体構造が、LPH結合ペプチドよりもより良好な方法で、IgE分子内のその配列の構造と類似していることが示される。ウサギによるこの動物モデルにおいて抗ヒトIgE抗体が産生されても、自己抗原に対する免疫系の寛容が克服されないことに留意されたい。

30

【0416】

非ヒト霊長動物モデル(例えば、カニクイザル)において、AAVベースの抗ヒトIgEワクチンの安全性および有効性を評価するには、ヒトと非ヒト霊長動物のIgEエピトープが両種において同一であることが重要である。カニクイザルIgE配列(Fc領域)が、ドイツ霊長類センター(ドイツ、ゲッティンゲン)において配列決定された。カニクイザルIgEの配列を以下に示す。ヒトとカニクイザルIgEの配列アライメントから(データは示さず)、両種においてKricekおよび3DEpi3エピトープが同一であることが明らかになった。したがって、カニクイザルは、Kricekおよび3DEpi3エピトープを保有するワクチンの安全性および有効性試験に適した動物モデルである。配列決定データから、86位がM(太字)であるのかまたはTであるのかは十分に明らかではない。これは、配列決定の誤りまたは多型に起因し得る。ヒト配列はこの位置にMを有する。

40

【0417】

カニクイザルIgE(Fc領域)の配列：

001 SVFTASIQSP FVFPLIPCK HIASNATSVT LGCLATGYFP EPVMVTWDAG
 051 SLNRSTMTLP ATTFTPSGHY ATISLLTVSG AWAKEMFTCH VVHTPSSADK
 101 EVNKTFGVCS RNFTPPTVKI LQSSCDDDGH FPPTIQLLCL ISGYTPGAIN
 151 VTWLENGQVM KVNSTPPAT QEGELASTQS EFTLAQKHWL SDRTYTCQVT
 201 YQGGTYNDST KKCADSNPRG VSAYLSRPS FDLFISKSPT ITCLVVDLAP
 251 SKETVNLTWS RASGKPVPHI PATEKKQQRN GTLTVTSILP VVTQDWIEGE
 301 TYQCRVTHPH LPRALVRSMT KTSGPRAAPE VYVFATPEKL ESRDKRTLAC
 351 LIQNFMPEDI SVQWLHSDVQ LPDARHSVTQ PRKTKGSGFF VFSRLEVTKA
 401 EWEQKDEFIC RAVHEAASPS WIVQQAVSVN PGK*

10

(SEQ ID NO: 233)

【 0 4 1 8 】

10.10. 合成Tヘルパーエピトープに融合させたIgEエピトープによるウサギのワクチン接種

公表されたデータ({Wang, 2003 #65} ; WO 99/67293)によると、IgE由来ペプチド

CGETYQSRVTHPHLPRALMRSTTKC (SEQ ID NO: 234)

20

は、末端システイン末端残基(太字で表示)間でジスルフィド結合が形成され、環状ペプチドを以下の図式に従って合成Tヘルパーペプチドに連結させた場合に、マウスにおいて高力価の中和抗IgE抗体を誘導することができる：

**TAKSKKFPSYTATYQFGGKKKIITRITITIDGGC*GETYQSRVTHPHLPRALMR
 STTKC*** (SEQ ID NO: 235)

*ジスルフィド結合により連結する

【 0 4 1 9 】

本発明者らの免疫化実験においてこのIgEペプチドワクチンを評価するために、ワクチン(「Wangペプチド」)を合成し(Activotec)、ウサギの免疫化に使用した(Biogenes)。ペプチドワクチン100 μg(PBS 0.2 ml中)を、Biogenesにより提供されるアジュバントの存在下で筋肉内投与した。

30

【 0 4 2 0 】

Wang et al.により記載される完全なIgE由来配列に加えて、「Wang-CS」と称される典型的なB細胞エピトープを含むこのペプチドの短縮配列を合成し、LPHに結合させ(付加的末端システイン残基を介して)、Biogenesにより提供されるアジュバントの存在下で、ウサギの筋肉内ワクチン接種に使用した。LPH結合ペプチドWang-CS(TBS 0.3 ml中)を、Biogenesにより提供されるアジュバント0.7 mlの存在下で筋肉内投与した。刺激免疫には、LPH-ペプチドコンジュゲート1 mgを投与した。1回目の追加免疫にはコンジュゲート0.5 mgを使用し、2回目および3回目の追加免疫にはコンジュゲート0.25 mgを使用した。

40

【 0 4 2 1 】

ウサギに異なるペプチドワクチンを4回免疫した(刺激免疫1回および追加免疫3回)。1回目の追加免疫は、最初の刺激免疫の2週間後に行った。ウサギに、3週間の間隔でワクチンをさらに2回追加免疫した。1回目、2回目、および3回目の追加免疫の2週間後に、免疫血清を、上記の通りに抗ヒトIgE反応性について解析した。

【 0 4 2 2 】

これらのデータから、短いLPH結合ペプチド「Wang-CS」をウサギにワクチン接種すると、上記のワクチン「Wangペプチド」で得られた力価の範囲にある抗IgE力価が生じることが実証される(図29)。

【 0 4 2 3 】

50

公表されたデータから、Wangペプチドにより、ワクチン接種した動物において中和抗IgE抗体が誘導されることが実証されるため(WO 99/67293)、これらのポリクローナル抗体の機能的特性を細胞ヒスタミン放出アッセイにおいて評価した(以下を参照されたい)。

【0424】

「Wang-CS」配列を、上記の通りにAAV2キャプシドの1-587位に挿入し、ワクチン接種実験に使用する。エピトープ「Wang-CS」または全長配列
GETYQSRVTHPHLPRALMRSTTK (SEQ ID NO: 236)

または「Wang」

GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK (SEQ ID NO: 212)

10

を保有するAAVベースのワクチンの主な利点は、自己寛容を破壊する、および高レベルの抗ヒトIgE自己抗体を誘導するその高い能力である。

【0425】

11. 細胞アッセイにおける抗ヒトIgE抗体の特徴づけ

11.1. ワクチン接種したウサギの血清からの全IgGの精製

免疫血清の全IgGを、ウサギIgGとプロテインAとの相互作用に基づく市販のキット(Protus)を用いて調製した。精製は、製造業者により提供されるプロトコールに従って行った。全IgGのタンパク質濃度を、MICRO BCA(商標)タンパク質アッセイ(PIERCE)により解析した；調製した全IgGの純度を、SDS-PAGEおよびコロイドクマシー染色により解析した(データは示さず)。

20

【0426】

11.2. 抗IgE抗体のアナフィラキシー特性の評価

ウサギのワクチン接種により誘導されたポリクローナル抗IgE抗体がアナフィラキシー性であるかどうかを評価するために、好塩基球のIgE媒介性脱顆粒に及ぼす抗IgE抗体の影響を調べた(Takagi et al., 2003)。ヒトFc RIの鎖を過剰発現するラット好塩基球RBL 2H3細胞(1×10^5 個細胞)を、96ウェルプレートにおいて、全量200 μ lのRPMI培地(10% FCSおよびNEAAを補充)中で、250 ng/mlヒトIgE(Dianova)と共に2時間インキュベートすることにより感作した。細胞を培地で洗浄し、0.1% BSAを補充したタイロード塩溶液(Sigma) 100 μ lに再懸濁した。ポリクローナル抗IgE抗体(免疫ラットの全IgG画分)を、最大濃度3 mg/ml全IgGで感作細胞に添加した。様々な濃度のアナフィラキシー性モノクローナル抗IgE抗体Le27を、陽性対照として使用した。非関連免疫化(すなわち、CETPまたは γ -アミロイドに対するワクチン接種)に由来するウサギ全IgGを、陰性対照として使用した。細胞を1時間インキュベートし、市販のヒスタミンELISA(Neogen)を用いてヒスタミン放出を測定した。

30

【0427】

得られた結果から、AAVベースのIgEワクチン(AAV-Kricek、AAV-3DEpi3、またはAAV-Flex)によるウサギのワクチン接種によって誘導されたポリクローナル抗ヒトIgE抗体は、評価したいずれもがIgE感作好塩基球の脱顆粒を誘導せず、これらの抗IgE抗体が検出可能なアナフィラキシー特性をもたないことが実証される(図30)。

40

【0428】

11.3. 抗IgE抗体のIgE中和特性の評価

ウサギのワクチン接種により誘導されたポリクローナル抗IgE抗体がIgEを中和するかどうかを評価するために、好塩基球のIgE媒介性脱顆粒に及ぼす抗IgE抗体の影響を調べた。ヒトIgE(250 ng/ml ; Dianova)を、ポリクローナル抗IgE抗体(3 mg/ml全IgG画分)と共に室温で2時間プレインキュベートした。陽性対照として、ヒトIgEをXOLAIR(登録商標)(1 μ g/ml)と共にプレインキュベートした。ヒトFc RIの鎖を過剰発現するラット好塩基球RBL 2H3細胞($1E+05$ 個細胞)を、96ウェルプレートにおいて、全量100 μ lのRPMI培地(10% FCSおよびNEAAを補充)中で、ヒトIgE/抗IgE複合体と共に2時間インキュベートすることにより感作した。細胞を培地で1回およびタイロード塩溶液で1回洗浄し、続いて0.1% BSAを補充

50

したタイロート塩溶液(Sigma) 100 μ lに再懸濁した。アナフィラキシー性モノクローナル抗IgE抗体Le27(100 nM)を、受容体結合IgEの架橋に使用した。細胞をLe27と共に1時間インキュベートし、市販のヒスタミンELISA(Neogen)を用いてヒスタミン放出を測定した。

【0429】

得られたデータから、AAV-KricekまたはAAV-3DEpi3によるウサギのワクチン接種により誘導されたポリクローナル抗IgE抗体により、IgE媒介性ヒスタミン放出が約30%減少することが実証される(図31)。「Wangペプチド」(上記を参照されたい)によるウサギのワクチン接種により誘導されたポリクローナル抗IgE抗体は、ヒスタミン放出を約20%阻害する。AAV-Flexまたは非関連ワクチン接種(すなわち、CETPまたは β -アミロイドに対するワクチン接種)によるウサギの免疫化から得られたポリクローナル抗体では、有意な効果は認められなかった。

【0430】

12. AAV2骨格内のさらなるエピトープまたはミモトープ挿入部位の評価

AAV2キャプシド内に組み込み部位を導入するために、2つの異なる戦略に従った

- 規定の挿入部位における外来エピトープの挿入(例えば、I-328)
- AAV2キャプシドのアミノ酸残基の欠失、および所与のエピトープまたはミモトープ配列による置換による挿入(例えば、 Δ 324-332)

【0431】

(表27) AAV2キャプシド内の挿入部位

組み込み部位	組み込み部位におけるAAV2配列
I-261	YKQIS ₂₆₁ SQSGA SEQ ID NO: 24
I-328	TQNDG ₃₂₈ TTTIA SEQ ID NO: 330
Δ 324 -332	KEVTQNDGTTTIANN SEQ ID NO: 331
Δ 374 -380	MVPQYGYLTLNNGS SEQ ID NO: 332
Δ 566 -575	EEEIRTTNPVATEQYGS SEQ ID NO: 333
I-534	EKFF ₅₃₄ PQSGV SEQ ID NO: 31
I-573	NPVAT ₅₇₃ EQYGS SEQ ID NO: 32
I-709	NKSVN ₇₀₉ VDFTV SEQ ID NO: 334
Δ 708 - 714	SNYNKSVNVDFTVDNTG SEQ ID NO: 335

挿入部位は先行アミノ酸に関して示す；

欠失/置換配列を太字で示す。

【0432】

表27に記載する部位にエピトープまたはミモトープ配列を挿入するために、2つの制限

部位 (MroI/AscI) を、ベクター pCR-Kotin-C11 の上記の表に示す部位に挿入した。ベクター pCR-Kotin-C11 は ITR を除いた完全な AAV2 ゲノムを含み、cap 遺伝子内に以下のアミノ酸置換を含む：R459K、Y500F、G512D、N551D、A664T (Endell, 2006 #711)、45 ページ)。

【 0 4 3 3 】

表 28 に記載するプライマーと共に QUIKCHANGE (登録商標) II 部位特異的突然変異誘発キット (STRATEGENE) を用いて、部位特異的突然変異誘発により挿入部位を導入した。

【 0 4 3 4 】

(表 2 8) AAV2 Cap の部位特異的突然変異誘発に使用したプライマー

挿入部位	突然変異誘発プライマー1 (ユニバース)	突然変異誘発プライマー2 (リバース)
I-261	5'-c tac aaa caa att tcc GGC GCG CCA GGA TCC GGA agc caa tca gga gcc-3' SEQ ID NO: 336	5'-ggc tcc tga ttg gct TCC GGA TCC TGG CGC GCC gga aat ttg ttt gta g SEQ ID NO: 337
I-328	5'-gtc acg cag aat gac ggt GGC GCG CCA GGA TCC GGA acg acg acg att gcc- 3' SEQ ID NO: 338	5'-ggc aat cgt cgt cgt TCC GGA TCC TGG CGC GCC acc gtc att ctg cgt gac SEQ ID NO: 339
I-534	5'-c gat gaa gaa aag ttt ttt GGC GCG CCA GGA TCC GGA cct cag agc ggg gtt ctc-3' SEQ ID NO: 340	5'-gag aac ccc gct ctg agg TCC GGA TCC TGG CGC GCC aaa aaa ctt ttc ttc atc g-3' SEQ ID NO: 341
I-573	5'-cc aat ccc gtg gct acg GGC GCG CCA GGA TCC GGA gag cag tat ggt tct gta tc-3' SEQ ID NO: 342	5'-ga tac aga acc ata ctg ctc TCC GGA TCC TGG CGC GCC cgt agc cac ggg att gg-3' SEQ ID NO: 343
I-709	5'-ctac aac aag tct gtt aat GGC GCG CCA GGA TCC GGA gtg gac ttt act gtg g-3' SEQ ID NO: 344	5'-c cac agt aaa gtc cac TCC GGA TCC TGG CGC GCC att aac aga ctt gtt gta g-3' SEQ ID NO: 345
Δ 374-380	5'-gac gtc ttc atg gtg cca GGC GCG CCA GGA TCC GGA aac aac ggg agt cag gc-3' SEQ ID NO: 346	5'-gc ctg act ccc gtt gtt TCC GGA TCC TGG CGC GCC tgg cac cat gaa gac gtc-3' SEQ ID NO: 347
Δ 324-332	5'-c att caa gtc aaa gag gtc GGC GCG CCA GGA TCC GGA gcc aat aac ctt acc agc-3' SEQ ID NO: 348	5'-gct ggt aag gtt att ggc TCC GGA TCC TGG CGC GCC gac ctc ttt gac ttg aat g-3' SEQ ID NO: 349
Δ 566-575	5'-ca gac gaa gag gaa atc GGC GCG CCA GGA TCC GGA tat ggt tct gta tct acc- 3' SEQ ID NO: 350	5'-ggt aga tac aga acc ata TCC GGA TCC TGG CGC GCC gat ttc ctc ttc gtc tg-3' SEQ ID NO: 351
Δ 708-714	5'-cc aac tac aac aag tct GGC GCG CCA GGA TCC GGA gac act aat ggc gtg tat tc-3' SEQ ID NO: 352	5'-ga ata cac gcc att agt gtc TCC GGA TCC TGG CGC GCC aga ctt gtt gta gtt gg-3' SEQ ID NO: 353

10

20

30

40

【 0 4 3 5 】

Ascl/MroI制限部位の導入により、Ascl/MroI部位の間に位置する新たなBamHI制限部位

50

も挿入された。所与の配列の欠失も、表28に示すプライマーを用いて部位特異的突然変異誘発により行った。これらのプライマーを用いる配列の欠失により、対応する位置にMroIおよびAscl制限部位が挿入される。

【0436】

AAV粒子の産生のため、新たな挿入部位を含むpRC-Kotin C11のEcoNI/SnaBI制限断片をベクター-pUCAV2にサブクローニングした。

【0437】

新たに創出された挿入部位にエピトープまたはミモトープが組み込まれ得るかどうかを評価するために、対応する位置にCETPエピトープ(CETP-内部)を挿入した。アニールしたオリゴヌクレオチドCETin-Ascl-uniおよびCETin-MroI-rev:

CETin-Ascl-uni 5'-CGCG GGC GGA tgc gac gcc ggc agt gtg cgc acc
aat gca cca gac GGT GGC G-3' (SEQ ID NO: 354)

CETin-MroI-rev 5'-CCGG C GCC ACC gtc tgg tgc att ggt gcg cac
act gcc ggc gtc gca TCC GCC-3' (SEQ ID NO: 355)

を用いて、CETPエピトープをpUCAV2の新たなAscl/MroI制限部位にクローニングした:

【0438】

ユニバースオリゴヌクレオチドとリバースオリゴヌクレオチドのアニーリングにより、MroIおよびAscl制限pUCAV2に相補的な5'側および3'側オーバーハング(大文字で表示)を有するdsDNA断片が生じる。アニールしたオリゴヌクレオチドは、アラニン/グリシン残基が隣接したCETP-内部エピトープ配列をコードする(小文字で示したオリゴヌクレオチド配列によってコードされる)。アニールしたものを、上記の通りに改変したpUCAV2のAscl/MroI制限部位にクローニングした。AAVキャプシドにおいて、エピトープ(太字で示す)には、以下の図式に従ってアラニン/グリシンリンカーが隣接する:

GAGG CDAGSVRTNAPD GGAG (SEQ ID NO: 356)

【0439】

AAV変種を上記の通りに小規模に産生させ、細胞溶解物のキャプシド力価を、AAV2キャプシド内の立体構造エピトープを認識するA20 mAbに基づく市販のAAV2 ELISA(Progen)(A20 ELISA)を用いて測定した。AAV2 ELISAによって認識されない改変キャプシド立体構造を有するAAV2変種(A20陰性粒子)を定量するために、キャプシドを大規模に産生させ、上記の通りにイオジキサノール勾配遠心分離により精製し、mAb B1に基づくELISA(Progen)を用いて定量した。B1 mAbは、エピトープの挿入によって改変されない、キャプシドタンパク質のC末端における線状エピトープ配列を認識する。AAV変種の定量のために、イオジキサノール勾配の40%相中に見出される精製粒子を熱処理により変性させ、Maxisorp 96ウェルプレート(Nunc)に固定化し、B1 mAb次にHRP結合抗マウスIgG抗体により検出した。並行して、公知のキャプシド力価を有する熱変性wtAAV2キャプシドの希釈系列を固定化することにより、検量線を作成した。この検量線をAAV変種の定量に使用した。

【0440】

B1およびA20に基づくELISAのデータから、1-534位または1-573位および1-261位にCETPエピトープを挿入すると、B1 ELISAにより認識されるが、A20 ELISAにより認識されない粒子が形成されることが実証される(表29)。1-328位にCETPエピトープを有する粒子は、A20またはB1 ELISAにより、イオジキサノール勾配の40%相内にほとんど検出され得ない。A20またはB1 ELISAによって測定される、40%イオジキサノール相中の変種 566~575のキャプシド力価間の差は、公知の非主要A20エピトープ{Wobus, 2000 #67}が欠失して、A20ベースの力価測定ELISAにおいてA20 mAbに対するこの変種の親和性が低下したことに起因する可能性が高い(表29)。

【0441】

10

20

30

40

50

324-332、 374-380、 708-714、またはI-709位にCETPエピトープが組み込まれた変種では、粒子形成は認められなかった。

【0442】

(表29) CETP-内部エピトープを保有するAAV2変種のキャプシド力価(キャプシド/ml)

挿入部位	A20 ELISA	B1 ELISA
I-328	5.2×10^{10}	BDL
I-261	BDL	1.1×10^{13}
I-573	BDL	1.1×10^{13}
I-534	BDL	2.6×10^{13}
Δ566-575	1.5×10^{12}	1.4×10^{13}

BDL : ELISAの検出限界未満

【0443】

CETPエピトープが新たな変種のキャプシド表面に位置するかどうかを評価するために、精製粒子(40%イオジキサノール相)を膜上にドットした(ドット当たり 5.0×10^{11} 個または 1.0×10^{11} 個の粒子)。陽性対照として、I-453位およびI-587位にCETP-内部エピトープを保有するAAV2粒子(AAV2-CETin-2x)をドットした。陰性対照として、非関連CETPエピトープ(TP10)を保有するAAV2変種をドットした。LPH結合CETP-内部ペプチドをウサギに免疫することによって産生されたCETP-内部エピトープに対するポリクローナル免疫血清と共に、プロットをインキュベートした。AAV変種に対するCETP抗体の結合を、HRP結合抗ウサギIgG抗体を用いて検出した(図32)。

【0444】

データから、新たなキャプシド変種 566-575(I-570)、I-534、I-573、I-261、およびI-328に関して、CETPエピトープがこの抗体によって認識されることが実証され、エピトープがキャプシドの表面に位置することが判明する。AAV変種AAV-TP10はこの抗体により認識されないため、CETP抗体とAAVキャプシドは非特異的に交差反応しない。したがって、I-261、I-573、I-534、および置換 566-575による挿入は、本発明のすべての局面に関してさらなる好ましい挿入部位である。

【0445】

異なるAAV血清型または異なるパルボウイルスの対応する挿入部位は、I-453およびI-587について示した通りに図1から得ることができる。

【0446】

参考文献(参照により本明細書に組み入れられる)

10

20

30

- Arnold, G. S., Sasser, A. K., Stachler, M. D. and Bartlett, J. S. (2006) *Mol Ther*, 14, 97-106.
- Asokan, A. and Samulski, R. J. (2006) *Nat Biotechnol*, 24, 158-60.
- Asquith, D. L. and I. B. McInnes (2007) 19(3): 246-51.
- Bachmann, M. F., Rohrer, U. H., Kundig, T. M., Burki, K., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1993) *Science*, 262, 1448-51.
- Bousquet, J., Cabrera, P., Berkman, N., Buhl, R., Holgate, S., Wenzel, S., Fox, H., Hedgecock, S., Blogg, M. and Cioppa, G. D. (2005) *Allergy*, 60, 302-8.
- Brown, C. S., Welling-Wester, S., Feijlbrief, M., Van Lent, J. W. and Spaan, W. J. (1994) *Virology*, 198, 477-88.
- Casal, J. I. (1999) *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 141-150.
- Chackerian, B., Lowy, D. R. et al. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2373-8. 10
- Chackerian, B., Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (2001) *J Clin Invest*, 108, 415-23.
- Chatterjee, M. B., Foon, K. A. and Kohler, H. (1994) *Cancer Immunology Immunotherapy*, 38, 75-82.
- Cook, J. P., Henry, A. J., McDonnell, J. M., Owens, R. J., Sutton, B. J. and Gould, H. J. (1997) *Biochemistry*, 36, 15579-88.
- Corpet, F. (1988) *Nucleic Acids Res*, 16, 10881-90.
- Dean, D. A., Strong, D. D. and Zimmer, W. E. (2005) *Gene Ther*, 12, 881-90.
- Gamsjaeger, R., C. K. Liew, et al. (2007). *Trends Biochem Sci* 32(2): 63-70.
- Garman, S. C., Wurzburg, B. A., Tarchevskaya, S. S., Kinet, J. P. and Jardetzky, T. S. (2000) *Nature*, 406, 259-66.
- Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G. and Hallek, M. (1999) *Nat Med*, 5, 1438. 20
- Grassi, J., Didierlaurent, A. and Stadler, B. M. (1986) *J Allergy Clin Immunol*, 77, 808-22.
- Grifman, M., Trepel, M., Speece, P., Gilbert, L. B., Arap, W., Pasqualini, R. and Weitzman, M. D. (2001) *Mol Ther*, 3, 964-75.
- Grimm, D., Kern, A., Pawlita, M., Ferrari, F., Samulski, R. and Kleinschmidt, J. (1999) *Gene Ther*, 6, 1322-30.
- Helm, B., Kebo, D., Vercelli, D., Glovsky, M. M., Gould, H., Ishizaka, K., Geha, R. and Ishizaka, T. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9465-9.
- Helm, B., Marsh, P., Vercelli, D., Padlan, E., Gould, H. and Geha, R. (1988) *Nature*, 331, 180-3.
- Huttner, N. A., Girod, A., Perabo, L., Edbauer, D., Kleinschmidt, J. A., Buning, H. and Hallek, M. (2003) *Gene Ther*, 10, 2139-47.
- Jefferis, R. (1993) *Immunol Today*, 14, 119-21. 30
- Jerne, N. K. (1974) *Ann Immunol (Paris)*, 125C, 373-89.
- Jerne, N. K., Roland, J. and Cazenave, P. A. (1982) *Embo J*, 1, 243-7.

- Klenerman, P., Tolfvenstam, T., Price, D. A., Nixon, D. F., Broliden, K. and Oxenius, A. (2002) *Pathol Biol (Paris)*, 50, 317-25.
- Kricek, F., Ruf, C., Rudolf, M. P., Effenberger, F., Mayer, P. and Stadler, B. M. (1999) *Int Arch Allergy Immunol*, 118, 222-3.
- Kuster, H., Thompson, H. and Kinet, J. P. (1990) *J Biol Chem*, 265, 6448-52.
- Laity, J. H., B. M. Lee, et al. (2001). *Curr Opin Struct Biol* 11(1): 39-46.
- Laughlin, C. A., Tratschin, J. D., Coon, H. and Carter, B. J. (1983) *Gene*, 23, 65-73.
- Levy, D. A. and Chen, J. (1970) *N Engl J Med*, 283, 541-2.
- Li, Q., Cao, C., Chackerian, B., Schiller, J., Gordon, M., Ugen, K. E. and Morgan, D. (2004) *BMC Neurosci*, 5, 21.
- Lieber, A. (2003) *Nat Biotechnol*, 21, 1011-3. 10
- Lux, K., Goerlitz, N., Schlemminger, S., Perabo, L., Goldnau, D., Endell, J., Leike, K., Kofler, D. M., Finke, S., Hallek, M. and Buning, H. (2005) *J Virol*, 79, 11776-87.
- Maheshri, N., Koerber, J. T., Kaspar, B. K. and Schaffer, D. V. (2006) *Nat Biotechnol*, 24, 198-204.
- Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B. A., Snyder, R. O., McArthur, J. G. and Patel, S. D. (2000) *J Virol*, 74, 1761-6.
- Muller, O. J., Kaul, F., Weitzman, M. D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J. A. and Trepel, M. (2003) *Nat Biotechnol*, 21, 1040-6.
- Muzyczka, N. (1992) *Curr Top Microbiol Immunol*, 158, 97-129.
- Nicklin, S. A., Buening, H., Dishart, K. L., de Alwis, M., Girod, A., Hacker, U., Thrasher, A. J., Ali, R. R., Hallek, M. and Baker, A. H. (2001) *Mol Ther*, 4, 174-81.
- Nygren, P. A. and Skerra, A. (2004) *J Immunol Methods*, 290, 3-28. 20
- Parker, K. C., M. A. Bednarek, et al. (1994). *J Immunol* 152(1): 163-75.
- Perabo, L., Buning, H., Kofler, D. M., Ried, M. U., Girod, A., Wendtner, C. M., Enssle, J. and Hallek, M. (2003) *Mol Ther*, 8, 151-7.
- Presta, L., Shields, R., O'Connell, L., Lahr, S., Porter, J., Gorman, C. and Jardieu, P. (1994) *J Biol Chem*, 269, 26368-73.
- Ried, M. U., Girod, A., Leike, K., Buning, H. and Hallek, M. (2002) *J Virol*, 76, 4559-66.
- Riemer, A. B., Untersmayr, E., Knittelfelder, R., Duschl, A., Pehamberger, H., Zielinski, C. C., Scheiner, O. and Jensen-Jarolim, E. (2007) *Cancer Res*, 67, 3406-11.
- Rittershaus, C. W., Miller, D. P., Thomas, L. J., Picard, M. D., Honan, C. M., Emmett, C. D., Pettey, C. L., Adari, H., Hammond, R. A., Beattie, D. T., Callow, A. D., Marsh, H. C. and Ryan, U. S. (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 2106-12.
- Rudolf, M. P., Vogel, M., Kricek, F., Ruf, C., Zurcher, A. W., Reuschel, R., Auer, M., Miescher, S. and Stadler, B. M. (1998) *J Immunol*, 160, 3315-21. 30
- Rudolf, M. P., Zuercher, A. W., Nechansky, A., Ruf, C., Vogel, M., Miescher, S. M., Stadler, B. M. and Kricek, F. (2000) *J Immunol*, 165, 813-9.
- Shi, W., Arnold, G. S. and Bartlett, J. S. (2001) *Hum Gene Ther*, 12, 1697-711.
- Shi, W. and Bartlett, J. S. (2003) *Mol Ther*, 7, 515-25.
- Smolen, J. S. and Steiner, G. (2003) *Nat Rev Drug Discov*, 2, 473-88.
- Stachler, M. D. and Bartlett, J. S. (2006) *Gene Ther*, 13, 926-31.
- Stadler, B. M., Zurcher, A. W., Miescher, S., Kricek, F. and Vogel, M. (1999) *Int Arch Allergy Immunol*, 118, 119-21.
- Szomolanyi-Tsuda, E., Brien, J. D., Dorgan, J. E., Garcea, R. L., Woodland, R. T. and Welsh, R. M. (2001) *Virology*, 280, 160-8.
- Szomolanyi-Tsuda, E., Brien, J. D., Dorgan, J. E., Welsh, R. M. and Garcea, R. L. (2000) *J Immunol*, 164, 5877-82. 40
- Szomolanyi-Tsuda, E., Le, Q. P., Garcea, R. L. and Welsh, R. M. (1998) *J Virol*, 72, 6665-70.
- Szomolanyi-Tsuda, E. and Welsh, R. M. (1998) *Curr Opin Immunol*, 10, 431-5.
- Takagi, K., R. Nakamura, et al. (2003). *Biol Pharm Bull* 26(2): 252-5.
- Uversky V.N., Fernández A. and Fink A. L. (2006) chapter 1, 1-20 in: *Protein Reviews Volume 4*, editor: M. Zouhair Atassi: *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Disease, Part A: Protein Aggregation and Conformational Disease*; Springer.

Varela, F. J. and Coutinho, A. (1991) *Immunol Today*, 12, 159-66.
 Vogel, M., Miescher, S., Kuhn, S., Zurcher, A. W., Stadler, M. B., Ruf, C., Effenberger, F., Kricek, F. and Stadler, B. M. (2000) *J Mol Biol*, 298, 729-35.
 Vogel, M., Tschopp, C., Bobrzynski, T., Fux, M., Stadler, M. B., Miescher, S. M. and Stadler, B. M. (2004) *J Mol Biol*, 341, 477-89.
 Wang, C. Y., Walfield, A. M., Fang, X., Hammerberg, B., Ye, J., Li, M. L., Shen, F., Shen, M., Alexander, V. and MacGlashan, D. W. (2003) *Vaccine*, 21, 1580-90.
 Warrington, K. H., Jr., Gorbatyuk, O. S., Harrison, J. K., Opie, S. R., Zolotukhin, S. and Muzyczka, N. (2004) *J Virol*, 78, 6595-609.
 Waterkamp, D. A., Muller, O. J., Ying, Y., Trepel, M. and Kleinschmidt, J. A. (2006) *J Gene Med*, 8, 1307-19.
 White, S. J., Nicklin, S. A., Buning, H., Brosnan, M. J., Leike, K., Papadakis, E. D., Hallek, M. and Baker, A. H. (2004) *Circulation*, 109, 513-9.
 Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. and Kleinschmidt, J. A. (1997) *J Virol*, 71, 1341-52.
 Work, L. M., Buning, H., Hunt, E., Nicklin, S. A., Denby, L., Britton, N., Leike, K., Odenthal, M., Drebber, U., Hallek, M. and Baker, A. H. (2006) *Mol Ther*, 13, 683-93.
 Work, L. M., Nicklin, S. A., Brain, N. J., Dishart, K. L., Von Seggern, D. J., Hallek, M., Buning, H. and Baker, A. H. (2004) *Mol Ther*, 9, 198-208.
 Wu, P., Xiao, W., Conlon, T., Hughes, J., Agbandje-McKenna, M., Ferkol, T., Flotte, T. and Muzyczka, N. (2000) *J Virol*, 74, 8635-47.
 Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S. C., McCullough, B., Gao, G. and Wilson, J. M. (1999) *J Virol*, 73, 3994-4003.
 Zinkernagel, R. M. (2002) *Immunological Reviews*, 185, 103-125.

10

20

【 図 1 - 1 】

1	50
AAV-1	MAADGYPDW LEDNLSSEGR EWDLKPQAF KPKANQQKQD DGRGLVLPGY
AAV-6	MAADGYPDW LEDNLSSEGR EWDLKPQAF KPKANQQKQD DGRGLVLPGY
AAV-2	MAADGYPDW LEDNLSSEGR EWDLKPQAF KPKANQQKQD DGRGLVLPGY
AAV-3B	MAADGYPDW LEDNLSSEGR EWDLKPQAF KPKANQQKQD NRRGLVLPGY
AAV-7	MAADGYPDW LEDNLSSEGR EWDLKPQAF KPKANQQKQD NRRGLVLPGY
AAV-8	MAADGYPDW LEDNLSSEGR EWDLKPQAF KPKANQQKQD DGRGLVLPGY
AAV-10	MAADGYPDW LEDNLSSEGR EWDLKPQAF KPKANQQKQD DGRGLVLPGY
AAV-4	MTDGYLPDW LEDNLSSEGR EWDLKPQAF KPKANQQKQD NARGLVLPGY
AAV-11	MAADGYPDW LEDNLSSEGR EWDLKPQAF KPKANQQKQD DGRGLVLPGY
b-AAV	MSFVDHPPDW LE-SIGDQPR EFLGLEAGPF KPKANQQKQD NARGLVLPGY
AAV-5	MSFVDHPPDW LEE-VGEGLR EFLGLEAGPF KPKANQQKQD QARGLVLPGY
GPV	
B19	
MVM	
FPV	
CPV	
コンセンサス
100	100
AAV-1	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
AAV-6	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
AAV-2	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
AAV-3B	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
AAV-7	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
AAV-8	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
AAV-10	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
AAV-4	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
AAV-11	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
b-AAV	KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
AAV-5	NYLGPNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNFY LRYNHADAEP
GPV	
B19	
MVM	
FPV	
CPV	
コンセンサス
150	150
AAV-1	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
AAV-6	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
AAV-2	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
AAV-3B	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
AAV-7	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
AAV-8	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
AAV-10	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
AAV-4	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
AAV-11	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
b-AAV	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
AAV-5	QERLQEDTSF GGNLGRAVQF AKRRLVLEPLG LVEEGAKTAP G-KKRVPVQS
GPV	
B19	
MVM	
FPV	
CPV	
コンセンサス

【 図 1 - 2 】

151	200
AAV-1	PQE-PDSSSG IGKTGQQPAK KRLNFGQGTG SESVDPDPQL GEPPATPAAV
AAV-6	PQE-PDSSSG IGKTGQQPAK KRLNFGQGTG SESVDPDPQL GEPPATPAAV
AAV-2	PVE-PDSSSG TGKAGQQPAR KRLNFGQGTG ADSVDPDPQL GPPAAPPSGL
AAV-3B	PQE-PDSSSG VGKSGQPAR KRLNFGQGTG SESVDPDPQL GPPAAPPSGL
AAV-7	PQRS PDSSTG IGKKGQPAR KRLNFGQGTG SESVDPDPQL GPPAAPPSGV
AAV-8	PQRS PDSSTG IGKKGQPAR KRLNFGQGTG SESVDPDPQL GPPAAPPSGV
AAV-10	PQRS PDSSTG IGKKGQPAR KRLNFGQGTG SESVDPDPQL GPPAAPPSGL
AAV-4	PQQ-PDSSSG IGKKGQPAR KRLNFGQGTG SESVDPDPQL GPPAAPPSGL
AAV-11	PQE-PDSSSG IGKKGQPAR KRLNFGQGTG SESVDPDPQL GPPAAPPSGL
b-AAV	PQE-PDSSSG VGKKGQPAR KRLNFGQGTG DEPGAAGDPPP -EGSTSGAMS
AAV-5	DDHFPKRKKA RTEEDSKPST SS-----D AEAGPSGSGQ LQIQAQPASS
GPV	
B19	
MVM	
FPV	
CPV	
コンセンサスp.....
201	250
AAV-1	-GPTTMSAGG GAPMADNNEG ADGVGNASGN WHCDSTWLDG RVITSTRTW
AAV-6	-GPTTMSAGG GAPMADNNEG ADGVGNASGN WHCDSTWLDG RVITSTRTW
AAV-2	-GTNTMATGS GAPMADNNEG ADGVGNASGN WHCDSTWMDG RVITSTRTW
AAV-3B	-GSNTMASGG GAPMADNNEG ADGVGNASGN WHCDSTWLDG RVITSTRTW
AAV-7	-GSGTVAAGG GAPMADNNEG ADGVGNASGN WHCDSTWLDG RVITSTRTW
AAV-8	-GPNMTAAGG GAPMADNNEG ADGVGNASGN WHCDSTWLDG RVITSTRTW
AAV-10	-GSGTVAAGG GAPMADNNEG ADGVGNASGN WHCDSTWLDG RVITSTRTW
AAV-4	-DDEEMRAAA GGNVAVDAGGQ SDGVGNASGD WHCDSTWSEG HVTTSTRTW
AAV-11	-SDIEMRAAF GGNVAVDAGGQ SDGVGNASGD WHCDSTWSEG HVTTSTRTW
b-AAV	-TETEMRAAA GGNVAVDAGGQ SDGVGNASGD WHCDSTWSEG HVTTSTRTW
AAV-5	LGADTMSAGG GSPIDNNQCG ADGVGNASGD WHCDSTWMDG RVITSTRTW
GPV	
B19	
MVM	
FPV	
CPV	
コンセンサスgg gg.....g.g ..Gvg..sg. whcdstw.g. .v.t.t.trtw
251	300
AAV-1	ALPTYNNHLY KQISSASTG- ASND----- ---NHYFGYS TPWGYDFDNR
AAV-6	ALPTYNNHLY KQISSASTG- ASND----- ---NHYFGYS TPWGYDFDNR
AAV-2	ALPTYNNHLY KQISSQSG- ASND----- ---NHYFGYS TPWGYDFDNR
AAV-3B	ALPTYNNHLY KQISSQSG- ASND----- ---NHYFGYS TPWGYDFDNR
AAV-7	ALPTYNNHLY KQISSASTG- ATND----- ---NHYFGYS TPWGYDFDNR
AAV-8	ALPTYNNHLY KQISSASTG- ATND----- ---NHYFGYS TPWGYDFDNR
AAV-10	ALPTYNNHLY KQISSASTG- ATND----- ---NHYFGYS TPWGYDFDNR
AAV-4	VLPTYNNHLY KRLGE----- SLQS----- ---NTYFGYS TPWGYDFDNR
AAV-11	VLPTYNNHLY LRLGT----- TSSS----- ---NTYFGYS TPWGYDFDNR
b-AAV	VLPTYNNHLY LRLGS----- SNAS----- ---DTYFGYS TPWGYDFDNR
AAV-5	VLPSYNNHLY REIKSGSVD- GSNA----- ---NAYFGYS TPWGYDFDNR
GPV	
B19	
MVM	
FPV	
CPV	
コンセンサス	..p.ynnh.ygys TPWgyDFDNR

【 図 1 - 3 】

	301		350		
AAV-1	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTN	DGV-TT---I
AAV-6	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTN	DGV-TT---I
AAV-2	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTQ	DGT-TT---I
AAV-3B	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTQ	DGT-TT---I
AAV-7	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTN	DGV-TT---I
AAV-8	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTQ	EGT-KT---I
AAV-10	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTQ	EGT-KT---I
AAV-4	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKAMRVKIF	NIQVKEVTS	NGE-TT---V
AAV-11	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGL	RPKAMRVKIF	NIQVKEVTS	NGE-TT---V
b-AAV	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGL	RPKSMQVKIF	NIQVKEVTS	NGE-TT---V
AAV-5	FHSHWSPRDW	QRLINNNWGF	RFRSLRVKIF	NIQVKEVTQ	DST-TT---I
GPV	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKSLRFKIF	NVQVKEVTQ	DGT-KT---I
B19	LNLFLQSPLEF	QHLIENWGS	AFDRLVTIS	EJAVKDVTDK	TGGGQ---V
MVM	WGVWLPQSDW	QYICNTMSQL	NLVSLDQEIF	NVVLKTVTEQ	DSGGQAIKY
FPV	WGVWFNPGDW	QLIVNTMSEL	HLVSFDQEIF	NVVLKTVSES	ATQPT-KVY
CPV	WGVWFNPGDW	QLIVNTMSEL	HLVSFDQEIF	NVVLKTVSES	ATQPT-KVY
コンセンサス	fh.hfsPr#w	Qrli#n.wg.	rp.sl...if	#!qvKvEt...t....

【 図 1 - 4 】

	451		I-453	500	
AAV-1	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
AAV-6	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
AAV-2	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
AAV-3B	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
AAV-7	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
AAV-8	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
AAV-10	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
AAV-4	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
AAV-11	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
b-AAV	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
AAV-5	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
GPV	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
B19	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
MVM	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
FPV	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
CPV	SYTFEEDVPH	SSVAHSOSLD	RLMNLIDQV	LYYLNRTQ-N	QSGAQNLD
コンセンサス	t%.Fe.vPfh	s.a.a.sq.l.	.l.npl.dqy	l.....t....t....

	351		400		
AAV-1	ANLSTSTVQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGL	PPFPADVFI	PQYGYLTLN
AAV-6	ANLSTSTVQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGL	PPFPADVFI	PQYGYLTLN
AAV-2	ANLSTSTVQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGL	PPFPADVFM	PQYGYLTLN
AAV-3B	ANLSTSTVQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGL	PPFPADVFM	PQYGYLTLN
AAV-7	ANLSTSTVQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGL	PPFPADVFI	PQYGYLTLN
AAV-8	ANLSTSTVQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGL	PPFPADVFI	PQYGYLTLN
AAV-10	ANLSTSTVQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGL	PPFPADVFI	PQYGYLTLN
AAV-4	ANLSTSTVQI	FADSSVELPY	VMDAGQESL	PPFPADVFM	PQYGYLTLN
AAV-11	ANLSTSTVQI	FADSSVELPY	VMDAGQESL	PPFPADVFM	PQYGYLTLN
b-AAV	ANLSTSTVQI	FADSSVELPY	VMDAGQESL	PPFPADVFM	PQYGYLTLN
AAV-5	ANLSTSTVQI	FADSSVELPY	VMDAGQESL	PPFPADVFM	PQYGYLTLN
GPV	ANLSTSTVQV	FADSSVELPY	VMDAGQESL	PPFPADVFM	PQYGYLTLN
B19	TDSTTGRLCM	LVDHSEKYPY	VLGGQDGLA	PELPIWVFP	PQYAVLTVCD
MVM	NNDLTACMVM	AVDSNNLIPY	TPAANSMETL	GFYPKWPTIA	SPRYRYFCVD
FPV	NNDLTASIMV	ALDSNNMTPF	TPAAMRSSETL	GFYPKWPTIP	TPWRYVFOVD
CPV	NNDLTASIMV	ALDSNNMTPF	TPAAMRSSETL	GFYPKWPTIP	TPWRYVFOVD
コンセンサス	.#nltst.gv	f.ds.g.y.l#	v.g....g.l	p.f.p.v...l	pyqy.t...

	501		550		
AAV-1	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
AAV-6	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
AAV-2	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
AAV-3B	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
AAV-7	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
AAV-8	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
AAV-10	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
AAV-4	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
AAV-11	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
b-AAV	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
AAV-5	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
GPV	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
B19	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
MVM	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
FPV	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
CPV	LFSRGSFAGM	SVQPKNWLP	PCYRQORVSK	TKTDN----	NNSNFTWGA
コンセンサス	.f.....t....nw.Pg	p.....g....t....g.....

	401		450		
AAV-1	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-TF
AAV-6	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-TF
AAV-2	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-TF
AAV-3B	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-TF
AAV-7	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-TF
AAV-8	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-TF
AAV-10	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-TF
AAV-4	-----TGMT	---SQGTD---	-----RNAFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-EI
AAV-11	-----TGE-	---SQGTD---	-----RNAFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-EI
b-AAV	-----TGG-	---SQGTD---	-----RNAFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-EI
AAV-5	-----RDN-	---PENPTE---	-----RSSFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-EF
GPV	-----TNGN	---GARFND---	-----RSFAFY	CLEYP-PSQM	LRTGNNP-EF
B19	VNTQGISGDS	KLASE----	-----ESAFY	VLEHS-SFQL	LGCGTA-TM
MVM	RDLSTVYENO	EGTIEHNVMG	PTKGMNSQFF	TIENTQOITL	LRTGDFEATG
FPV	RTLIPSHGTG	SGTPTNVIHG	TDPP-DVQFY	TIFNSVPHL	LRTGDFEATG
CPV	RTLIPSHGTG	SGTPTNVIHG	TDPP-DVQFY	TIFNSVPHL	LRTGDFEATG
コンセンサスt....rs.F#t....rs.F#t....

	551		600		
AAV-1	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
AAV-6	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
AAV-2	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
AAV-3B	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
AAV-7	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
AAV-8	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
AAV-10	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
AAV-4	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
AAV-11	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
b-AAV	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
AAV-5	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
GPV	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
B19	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
MVM	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
FPV	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
CPV	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEKFF	PMSGVMIFGK	ESAGASNTAL
コンセンサスl.....pGp....t....t....t....

【 図 1 - 5 】

	601		I-587	650	
AAV-1	---DNVMTD	EEEEKATNPV	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
AAV-6	---DNVMTD	EEEEKATNPV	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
AAV-2	---EKVMTD	EEEEKATNPV	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
AAV-3B	---DNVMTD	EEEEKATNPV	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
AAV-7	---ENVLMTN	EEEEKATNPV	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
AAV-8	---SDVMTS	EEEEKATNPV	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
AAV-10	---SSVMTS	EEEEKATNPV	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
AAV-4	---GTLIFTS	EEELAAATNP	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
AAV-11	---NLLFTS	EEELAAATNP	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
b-AAV	---NLLMFTS	EEELAAATNP	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
AAV-5	YIEGNMLTS	ESEIATNPV	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
GPV	GI-SDIMVTE	EQEVATNPV	ATERFGTVAV	NFOSSSTDP	TGDOVHMAGL
B19	YQGGVGRFPN	EKE-----QL	KQLGGLNMHT	YFPNKTQQY	TQDIE-RFLM
MVM	DTRDGFPIQA	PLVV-----PV	PLNGILTNAN	HGTGNDIHF	SNVFNSTYGL
FPV	YPEGDWIQNI	NFNL-----PV	TNDNVLLPTD	HGGGHDGINY	TNFNTYGLP
CPV	YPEGDWIQNI	NFNL-----PV	TNDNVLLPTD	HGGGHDGINY	TNFNTYGLP
コンセンサスt....	e.e.....npvt....t....t....

【 図 1 - 6 】

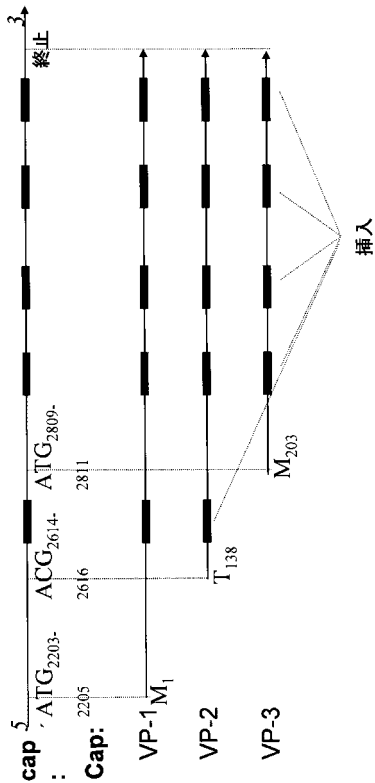
	751		799		
AAV-1	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-6	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-2	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-3B	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-7	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-8	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-10	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-4	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-11	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
b-AAV	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-5	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
GPV	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
B19	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
MVM	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
FPV	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
CPV	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
コンセンサスt....pd.	tg.y...r.i	stryltr.l.t....

	651		700		
AAV-1	PGMWQDRDV	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
AAV-6	PGMWQDRDV	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
AAV-2	PGMWQDRDV	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
AAV-3B	PGMWQDRDV	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
AAV-7	PGMWQDRDV	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
AAV-8	PGMWQDRDV	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
AAV-10	PGMWQDRDV	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
AAV-4	PGMWQDRDI	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
AAV-11	PGMWQDRDI	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
b-AAV	PGMWQDRDI	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
AAV-5	PGMWQDRDI	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
GPV	PGMWQDRDI	YLOGPIWAKI	PHTDGHFHP	-PLMGGFGLK	NPPPQILIKN
B19	VCSVWNRAL	HYESQLSWIK	FNLDSFKTQ	FAALGGHGLH	OPPPQILIKI
MVM	TTF-HPSPV	YFQGIWDK-	ELDLHKPR	LHITAPPVCK	NNAPQMLVR
FPV	TALN-NVPPV	YFQGIWDK-	ELDLHKPR	LHINAPPVCK	NNCFGLFVX
CPV	TALN-NVPPV	YFQGIWDK-	ELDLHKPR	LHINAPPVCK	NNCFGLFVX
コンセンサス	pg.vw...zdv	y.#gpiwaki	p..D..fhps	.p..ggfglk	.ppPq..likn

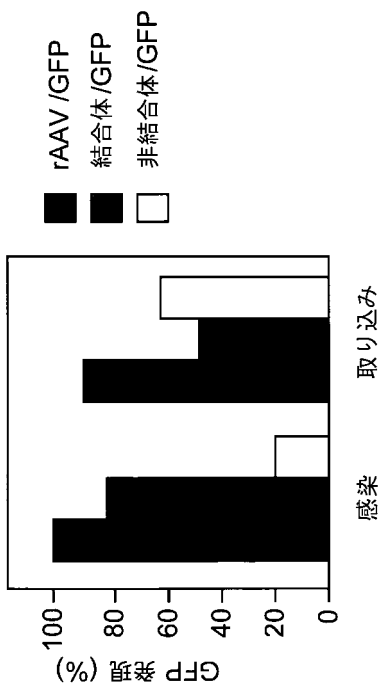
	701		750		
AAV-1	TPVPANPPAE	FSATKFASEI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
AAV-6	TPVPANPPAE	FSATKFASEI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
AAV-2	TPVPANPSTT	FSAKFASEI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
AAV-3B	TPVPANPPTT	FSPAKFASEI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
AAV-7	TPVPANPEV	FTPAKFASEI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
AAV-8	TPVPADPPTT	FNOAKFASEI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
AAV-10	TPVPADPPTT	FNOAKFASEI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
AAV-4	TPVPANPATT	FSSTPVNSFI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
AAV-11	TPVPANPATT	FSAARVDSFI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
b-AAV	TPVPANPATT	FSPARVDSFI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
AAV-5	TPVPANPATT	FSPARVDSFI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
GPV	TPVPANPATT	FSPARVDSFI	TOYSTGOVSV	EIEWEL-QKE	NSKRWNPEVQ
B19	--LQSGPIG	GKSMGITTL	VQYAVGIMTV	TMTFKLGRP	ATGRWNPOPG
MVM	LGNLTDQYD	PNG-ATLSRI	VTYGTFWKG	KLTMRA-KLR	ANTTWNPVYQ
FPV	VAPNLTQYD	PDASANMSRI	VTYSDFWKG	KLTFKA-KLR	ASHTWNPIQQ
CPV	VAPNLTQYD	PDASANMSRI	VTYSDFWKG	KLTFKA-KLR	ASHTWNPIQQ
コンセンサス	tpvp.....s.i	tqYstgg.v	...wel..ke	.skrWNPe.q

AAV-2

【 図 2 】

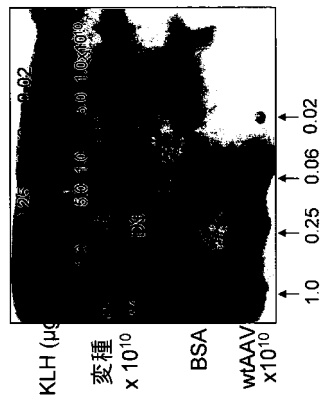


【 図 3 】

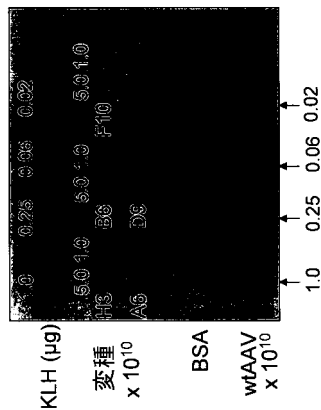


【 図 4 】

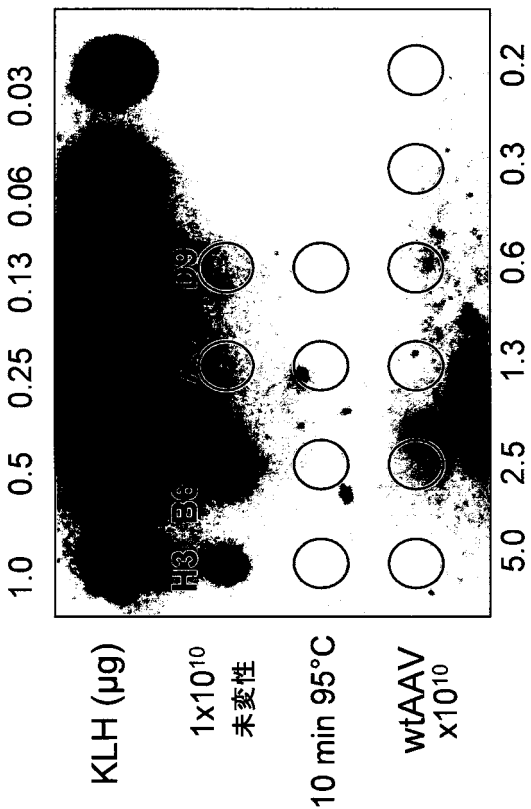
B) 抗-AAV2 (A20)



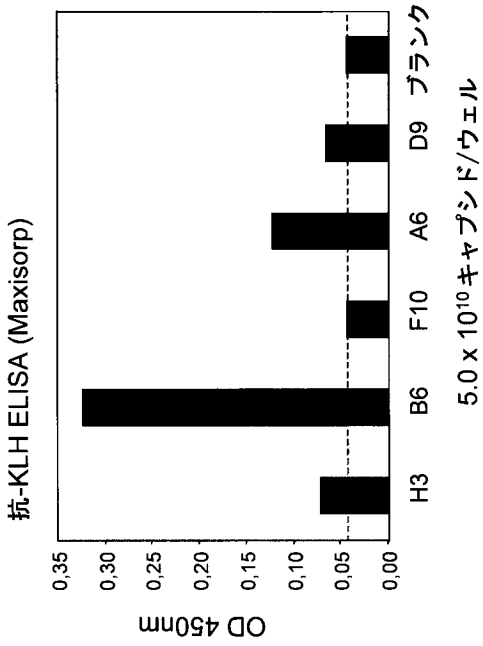
A) 抗-KLH



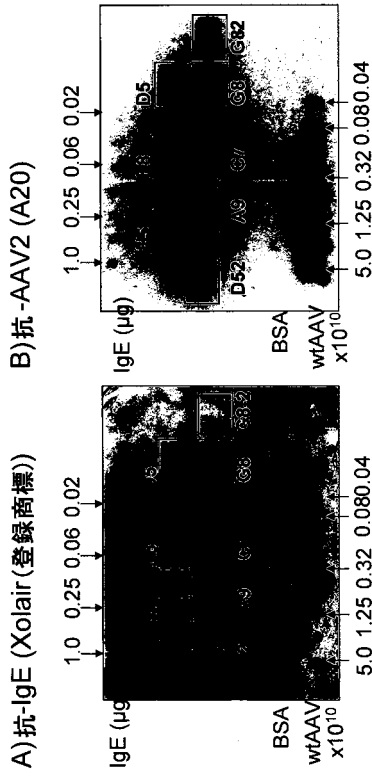
【 図 5 】



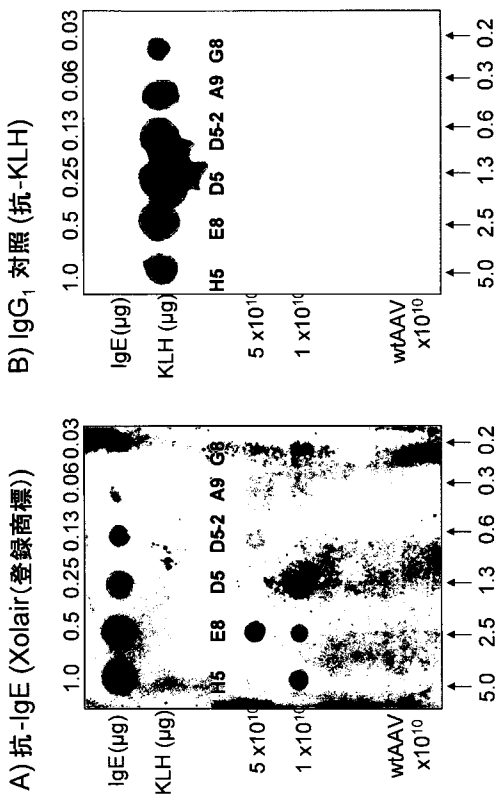
【 図 6 】



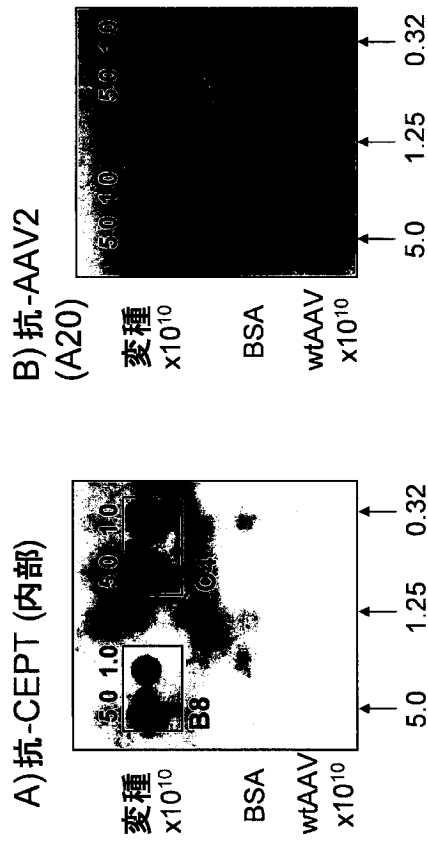
【 図 7 】



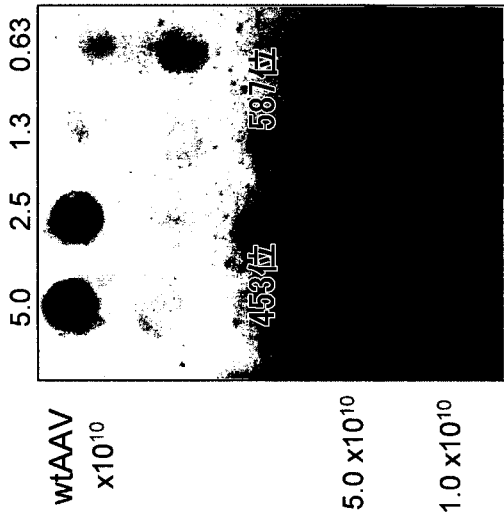
【 図 8 】



【 図 9 】

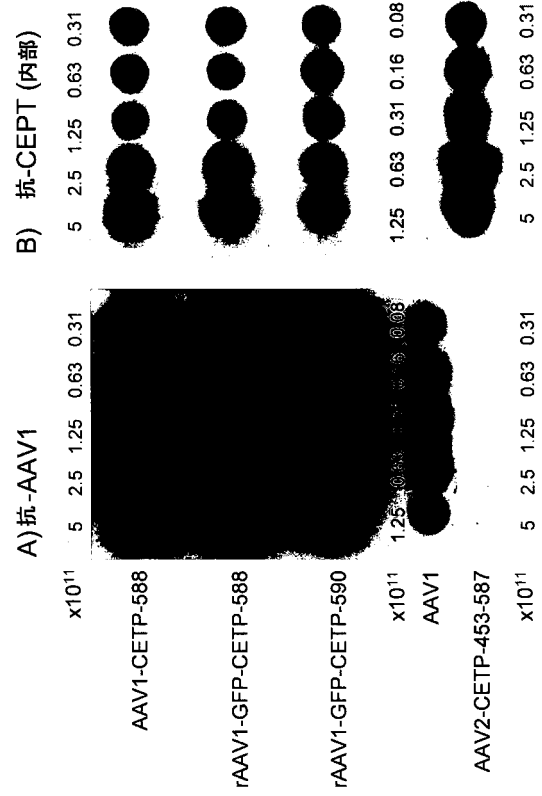


【図 1 0】

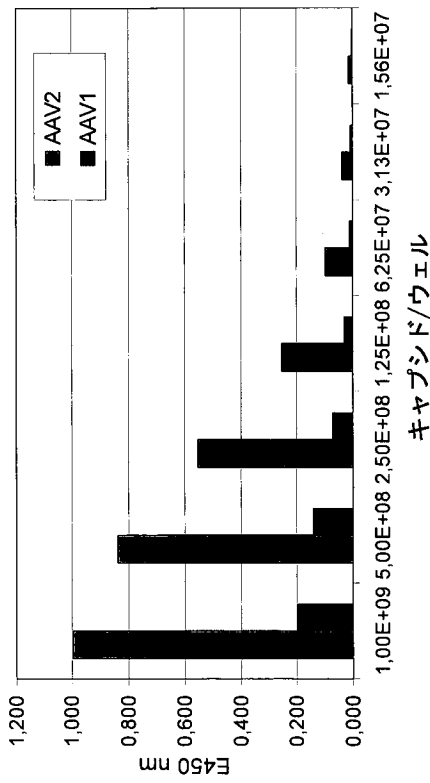


短 長 短 長

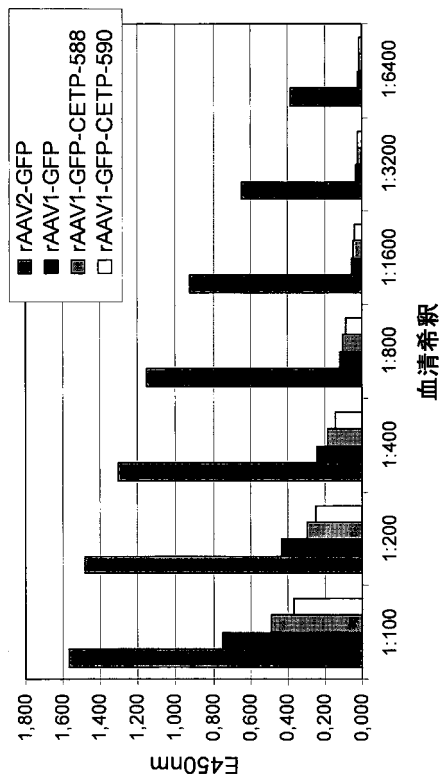
【図 1 1】



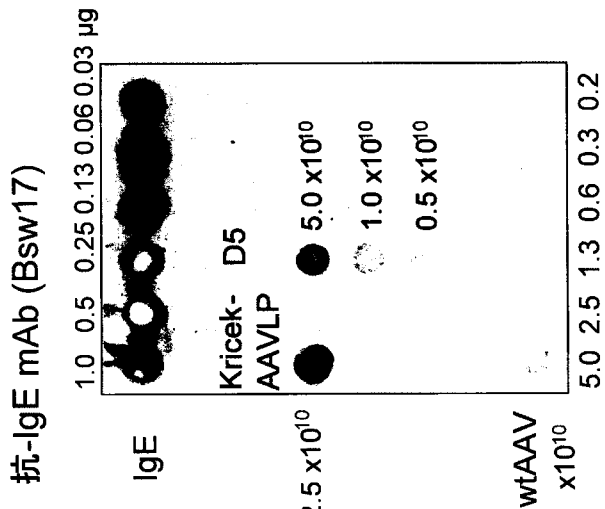
【図 1 2】



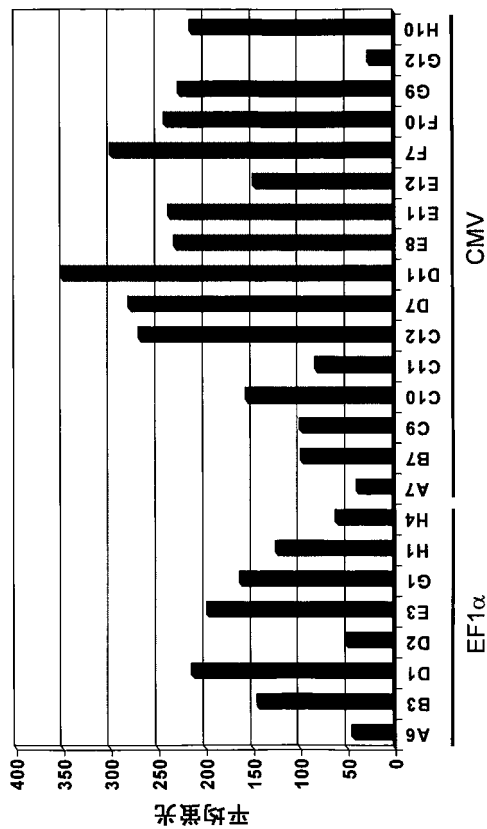
【図 1 3】



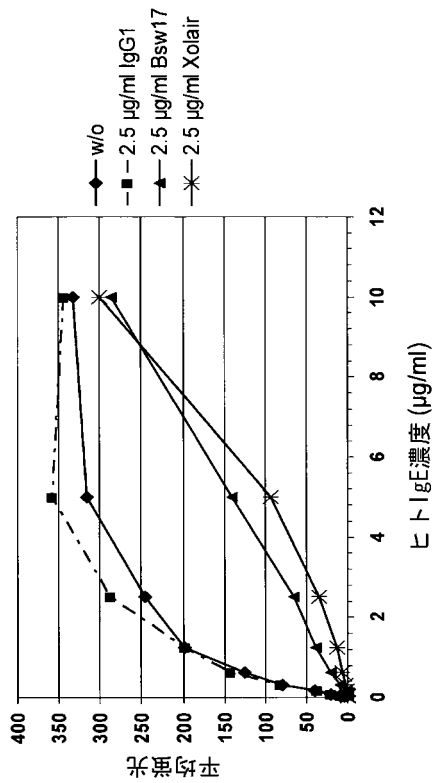
【 図 1 4 】



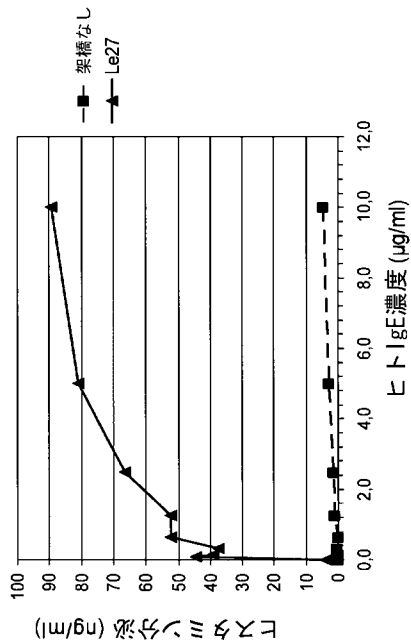
【 図 1 5 】



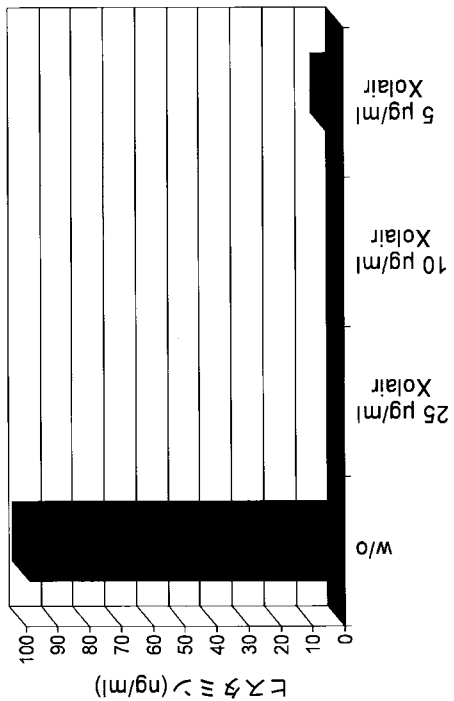
【 図 1 6 】



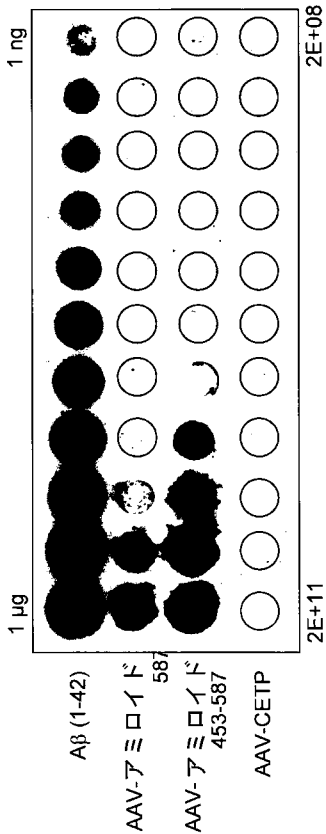
【 図 1 7 】



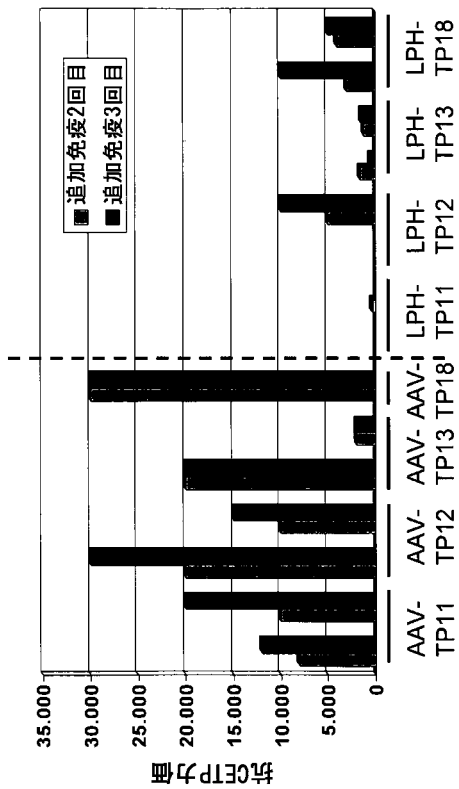
【 図 18 】



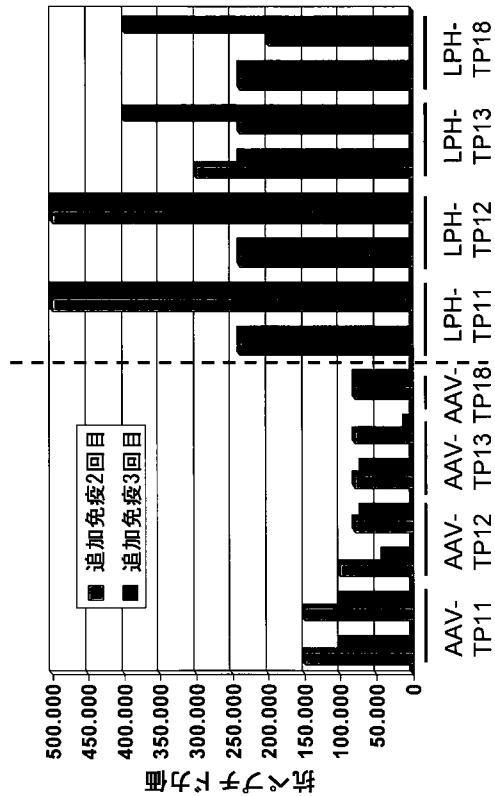
【 図 19 】



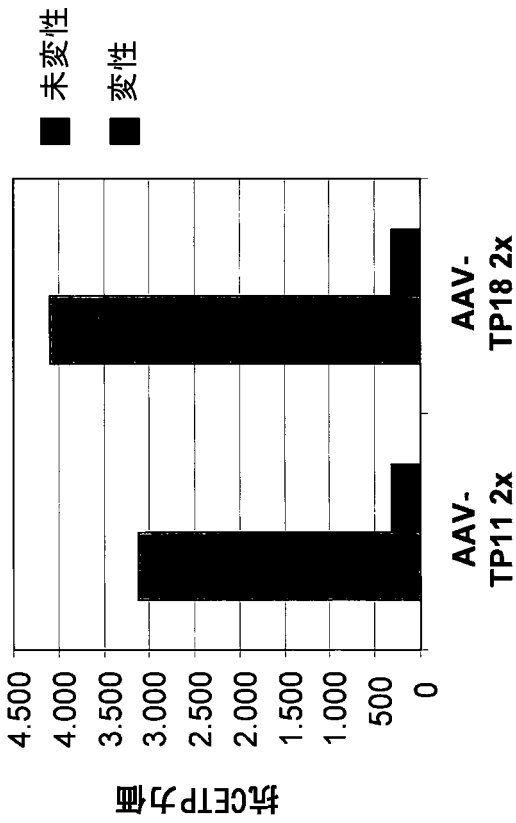
【 図 20 】



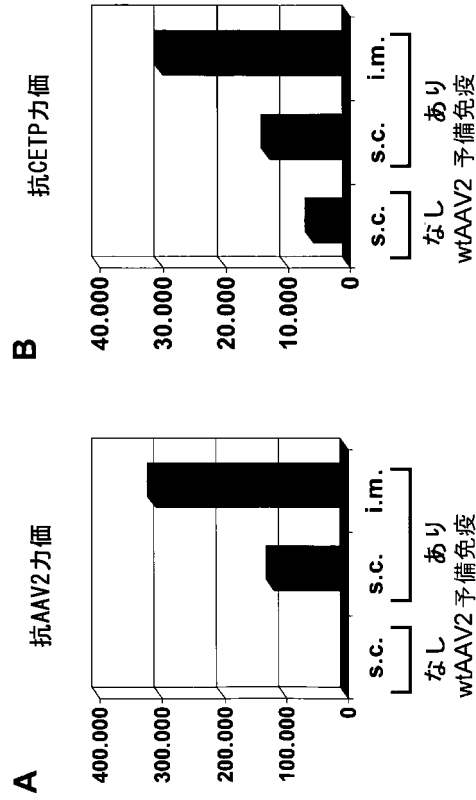
【 図 21 】



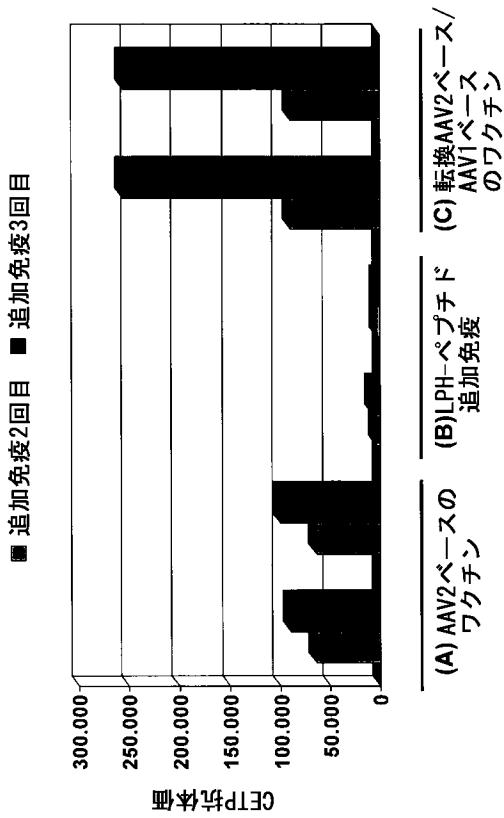
【 図 2 2 】



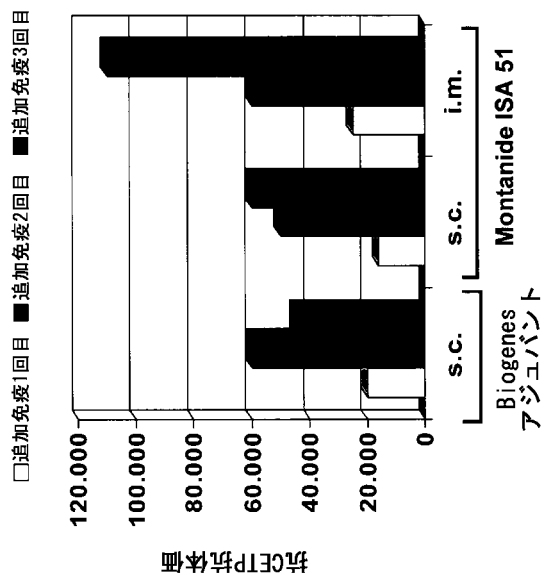
【 図 2 3 】



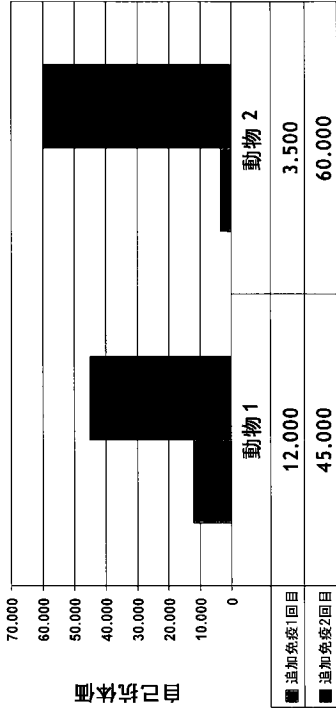
【 図 2 4 】



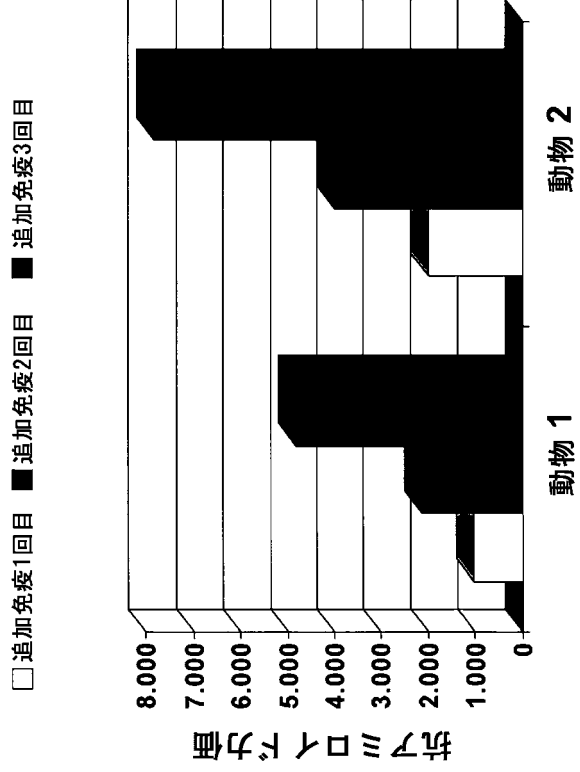
【 図 2 5 】



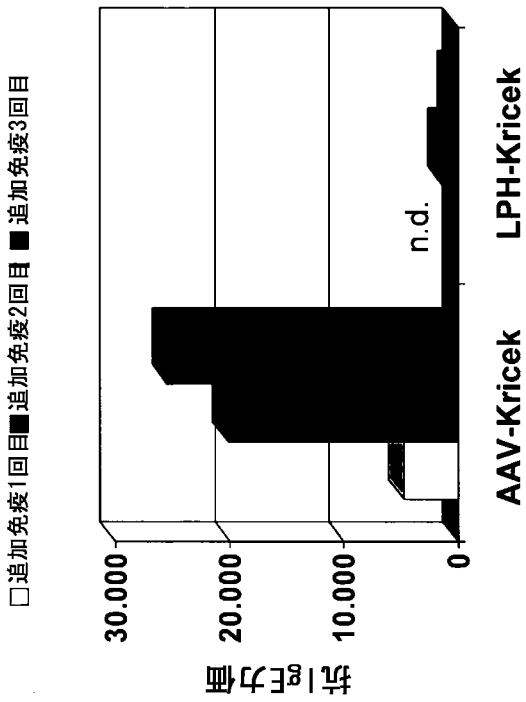
【 図 2 6 】



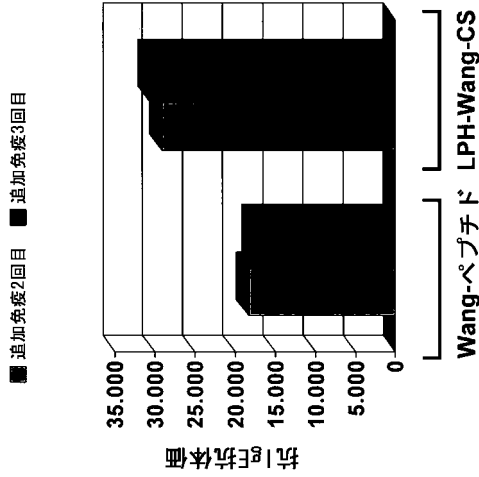
【 図 2 7 】



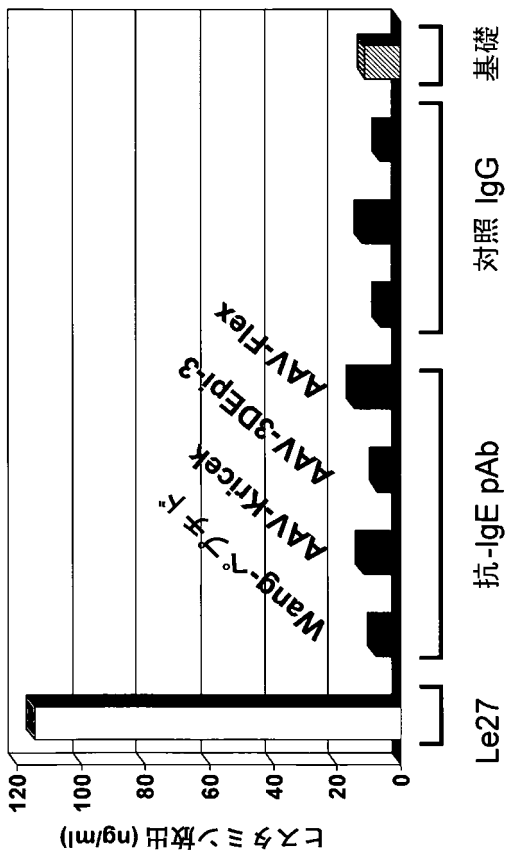
【 図 2 8 】



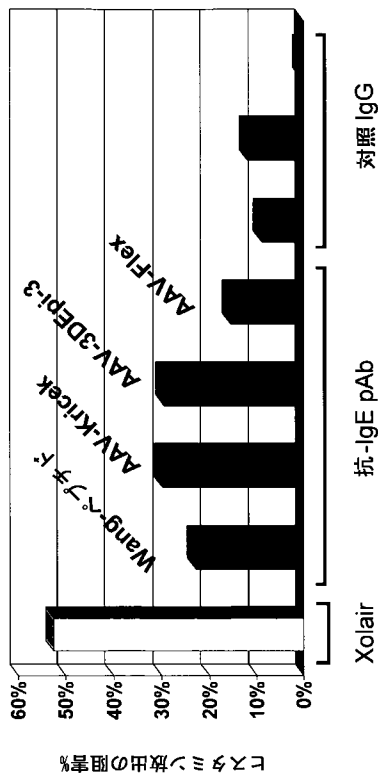
【 図 2 9 】



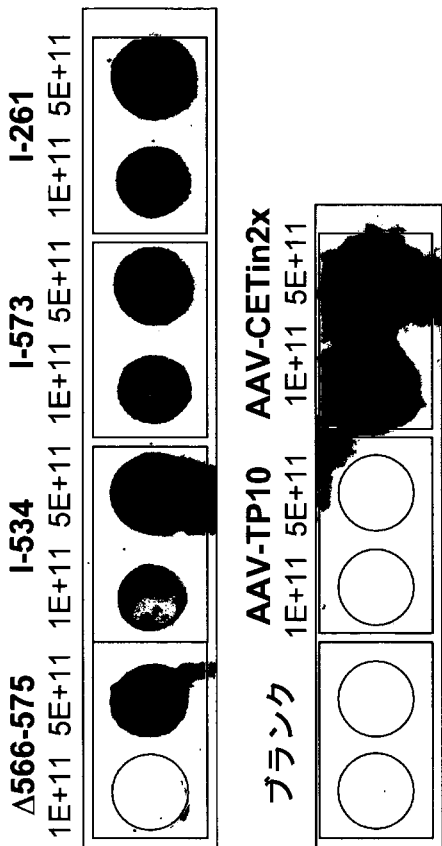
【 図 3 0 】



【 図 3 1 】



【 図 3 2 】



【配列表】

2018109636000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 4 0 B 30/04 (2006.01)	C 4 0 B 30/04	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015	4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	4 H 0 4 5
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 K 39/23 (2006.01)	A 6 1 K 39/23	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ベニン ヒルデガルド

ドイツ連邦共和国 ケルン アーシェナール シュトラッセ 5 9 0

(72)発明者 ニーランド ジョン

デンマーク王国 オルフス スコプリネット 4 2

(72)発明者 ペラボ ルカ

ドイツ連邦共和国 ケルン ツェルピシェール シュトラッセ 2 1 4

(72)発明者 ゴルドノー ダニエラ

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン カルネイドプラッツ 3 2

(72)発明者 ルクス ケルステン

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン アルフレッド シュミット シュトラッセ 3 7
 (72)発明者 アレック マイケル
 ドイツ連邦共和国 ケルン マックス スケラー - シュトラッセ 1 1
 (72)発明者 ヘレール マルクス
 ドイツ連邦共和国 ブラネグ ヨセフ バイエル シュトラッセ 1 0
 (72)発明者 リッター ミルコ
 ドイツ連邦共和国 ブラネグ ブラウハウスシュトラッセ 1 3
 F ターム(参考) 2G045 AA28 AA40 BA13 BB01 BB10 BB20 CA18 CA19 CB01 CB17
 CB21 DA09 DA13 DA14 DA35 DA36 DA37 FA29 FA37 FB01
 FB02 FB03 FB12 GC10 GC12 GC15 JA01
 4B063 QA18 QQ43 QR62 QS25 QS34 QX02
 4B064 AG32 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA90X AA95X AB01 AC14 BA01 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA13 NA14 ZA012 ZA162 ZA332 ZA452 ZA592 ZA662 ZA962 ZB132
 ZB152 ZB262 ZB322 ZC212 ZC552
 4C085 AA03 BA75 BB11 CC01 CC07 CC08 CC21 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 ZA01 ZA16 ZA33 ZA45 ZA59
 ZA66 ZA96 ZB13 ZB15 ZB26 ZB35 ZC21 ZC55
 4H045 AA11 AA30 BA41 CA01 CA40 DA86 EA31 EA50 FA74 GA15

专利名称(译)	突变细小病毒结构蛋白作为疫苗		
公开(公告)号	JP2018109636A	公开(公告)日	2018-07-12
申请号	JP2018022685	申请日	2018-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	MEDI基因AG		
申请(专利权)人(译)	MEDI基因AG		
[标]发明人	ベニンヒルデガルド ニーランドジョン ペラボルカ ゴルドノーダニエラ ルクスケルステン アレックマイケル ヘレールマルクス リッターミルコ		
发明人	ベニン ヒルデガルド ニーランド ジョン ペラボ ルカ ゴルドノー ダニエラ ルクス ケルステン アレック マイケル ヘレール マルクス リッター ミルコ		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/15 C40B20/04 C40B30/04 C07K14/015 C12N15/09 C12N7/01 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/68 C07K19/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P9/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/18 A61P35 /00 A61P37/06 A61P37/08 A61K39/23 A61K48/00 A61P31/00 A61K31/7088		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/5256 A61P1/04 A61P3/00 A61P9/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25 /28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/005 C07K16/081 C07K16/4291 C07K2317/34 C07K2317/76 C12N2750 /14122 C12N2750/14143 G01N33/56983 G01N2333/015 G01N2500/04		
FI分类号	G01N33/50.ZNA.Z G01N33/53.D G01N33/569.L G01N33/15.Z C40B20/04 C40B30/04 C07K14/015 C12N15/00.A C12N7/01 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02.C C12Q1/68.A C07K19/00 A61P1 /04 A61P3/00 A61P9/10.101 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61K39/23 A61K48/00 A61P31/00 A61K31/7088 G01N33/50.ZZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB01 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/CA18 2G045 /CA19 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA09 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA35 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FA29 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045 /FB12 2G045/GC10 2G045/GC12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA18 4B063/QQ43 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG32 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064 /DA01 4B065/AA90X 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA162 4C084/ZA332 4C084/ZA452 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA962 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZC212 4C084/ZC552 4C085/AA03 4C085/BA75 4C085/BB11 4C085/CC01 4C085/CC07 4C085 /CC08 4C085/CC21 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/ZA01 4C086/ZA16 4C086/ZA33 4C086/ZA45 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA96 4C086 /ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB35 4C086/ZC21 4C086/ZC55 4H045/AA11 4H045/AA30		

代理人(译)
清水初衷
井上隆一
佐藤俊光
小林智彦
正人大关

優先権
60/932446 2007-05-31 US
2007013264 2007-07-06 EP

外部链接
Espacenet

摘要(译)

要解决的问题：提供一种鉴定能够特异性结合抗原结合物的细小病毒突变结构蛋白的方法。解决方案：鉴定细小病毒突变结构蛋白的筛选方法包括以下步骤：(a) 提供细小病毒文库表达至少一种突变的细小病毒结构蛋白的病毒体，(b) 提供抗原的结合物，(c) 选择至少一种特异性结合粘附剂的细小病毒病毒粒子，和(d) 鉴定(i) 细小病毒突变的结构蛋白或a其突变部分，或(ii) 编码步骤c) 中选择的细小病毒病毒体的细小病毒突变结构蛋白的基因或其突变部分。所选图：无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2018-109636 (P2018-109636A)
		(43) 公開日 平成30年7月12日(2018.7.12)
(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード(参考)
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50	ZNAZ 2G045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D 4B063
GO1N 33/569 (2006.01)	GO1N 33/569	L 4B064
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15	Z 4B065
C4OB 20/04 (2006.01)	C4OB 20/04	4C084
	審査請求 有	請求項の数 67 OL (全 133 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2018-22685 (P2018-22685)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成30年2月13日(2018.2.13)	メティション アーゲー
(62) 分割の表示	特願2014-253911 (P2014-253911) の分割	ドイツ連邦共和国 ブラネグ/マーティン スリエド 82152 ロシュハマール シュトラッセ 11
原出願日	平成20年6月2日(2008.6.2)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	60/932,446	100102978
(32) 優先日	平成19年5月31日(2007.5.31)	弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国(US)	100102118
(31) 優先権主張番号	07013264.2	弁理士 香名 雅夫
(32) 優先日	平成19年7月6日(2007.7.6)	(74) 代理人
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)	100160923
		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人
		100119507
		弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人
		100142929
		弁理士 井上 隆一
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	ワクチンとしての変異型パルボウイルス構造タンパク質	