

(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2016-41085

(P2016-41085A)

(43) 公開日 平成28年3月31日(2016.3.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 21/00 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/00 B	4 B 0 2 4
<b>C 0 7 K 14/015 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/015 Z N A	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-272 (P2016-272)	(71) 出願人	50438991 ノバルティス アーゲー
(22) 出願日	平成28年1月4日 (2016.1.4)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(62) 分割の表示	特願2013-503962 (P2013-503962) の分割	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
原出願日	平成23年4月7日 (2011.4.7)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/321, 856	(72) 発明者	イーサン セッテンバー アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 62-8097, エメリービル, ピー .オー. ボックス 8097, ノバル ティス バクシンス アンド ダイアグノ スティックス, インコーポレーテッド 気付
(32) 優先日	平成22年4月7日 (2010.4.7)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 パルボウイルス B 1 9 のウイルス様粒子を生成するための方法

## (57) 【要約】

【課題】 パルボウイルス B 1 9 のウイルス様粒子を生成するための方法の提供。

【解決手段】 本発明は、パルボウイルス V P 1 / V P 2 ウイルス様粒子 ( V L P ) を生じさせるためのプロセスを提供する。本発明は、さらに、パルボウイルス・V L P および V L P を含有する免疫原性組成物を精製するための方法を提供する。本発明は、パルボウイルスの V P 1 および V P 2 をコードする組換え核酸分子、および組換え核酸を含有する宿主細胞も包含する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

明細書に記載された発明。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

この出願は、2010年4月7日に提出された米国仮特許出願第61/321856号（この完全な内容は、参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

## 【背景技術】

## 【0002】

パルボウイルスB19は、免疫応答性の、血液学的に正常な個体において穏やかな自己限定性の疾病を生成するが、鎌状赤血球症または他の種類の慢性貧血を有する人においては重篤な疾病を引き起こし得る。そのような人において、パルボウイルスB19は、急性の重篤な貧血を引き起こし得る。病気の人は、青白く、弱々しく、疲労している可能性がある。さらに、免疫系に問題を有する人は、パルボウイルスB19に感染すると、医学的処置を必要とする慢性貧血も発症する可能性がある。白血病または癌を有する人、免疫欠損を持って生まれた人、臓器移植を受けた人、またはヒト免疫不全ウイルス（HIV）に感染している人は、パルボウイルスB19感染に起因する重篤な疾病についての危険性を有する。成人で最初にパルボウイルスB19に接触した血液学的に正常な個体は、数週間続く関節痛（arthralgia）を示す可能性がある。妊娠中の女性のパルボウイルスB19感染には、重篤な胎児の貧血に起因する胎児水腫が伴い、時には、流産または死産に至る。失血または他の理由に起因する急性貧血の人における輸血によるパルボウイルスB19の獲得は、造血による貧血の矯正を妨げる可能性がある。

10

20

## 【0003】

パルボウイルスB19は、通常、一般にリンゴ病（slapped cheek syndrome）として公知の第五病または伝染性紅斑と呼ばれる小児期発疹を引き起こす。パルボウイルスB19に感染している人は、この疾病の、皮疹が現れる前の初期の間、伝染性である。パルボウイルスB19は、皮疹が発症する前の、「ただの風邪をひいている」ように見える時点での感染した人の呼吸器分泌物（例えば、唾液、痰または鼻の粘液）において見いだされている。このウイルスは、おそらく、それらの分泌物と直接接触することにより人から人へと蔓延する。パルボウイルスB19は、現在、合併症が起こり得るので、特に妊娠中の女性およびその胎児にとって、または免疫系が不健康な人にとって、重篤な疾患であると考えられている。

30

## 【0004】

パルボウイルスB19感染の症状としては、発熱、倦怠感、頭痛、筋痛、悪心、および鼻漏からなり得る穏やかな非特異的な前駆の疾病が挙げられる。症状は、典型的に、最初に感染した5～7日後に始まる。これらの症状は、最初のウイルス血症に相当し、2～3日のうちに消失する。およそ1週間後、頬に明るい赤色の斑状の発疹が現れ、多くの場合、口囲蒼白が伴う。びまん性斑状丘疹状皮疹は、1～4日後に現れ、次第に消えて、そう痒性であり得、遠位の四肢（distal extremity）に徐々に広がり得るレース状紅斑性皮疹（lacy erythematous rash）になり得る。

40

## 【0005】

パルボウイルスB19は、小型DNAウイルスであるパルボウイルス科ファミリーのエリスロウイルス属に属する。パルボウイルスB19は、一本鎖の直鎖DNAゲノムを含有する、エンベロープを有さない正二十面体のウイルスである。パルボウイルスB19ピリオンは、直径20～25nmであり、5.6kbのゲノムを有する（Clewley、1984年、Cotmore & Tattersall、1984年）。パルボウイルスB19カプシドは、83kDaの副次的な構造タンパク質であるVP1と、58kDaの主要な構造タンパク質であるVP2とからなる。これは、2つの構造タンパク質、VP1とVP2とを、約5%～約95%の比で含有するタンパク質の殻で囲まれた、セグメント

50

に分かれていない一本鎖DNAゲノムを有する(Ozawaら、1987年)。この2つのタンパク質の配列は、共直線性(co-linear)であり、VP2はVP1のカルボキシル末端領域と同一である；しかし、VP1は、アミノ末端に追加的な227アミノ酸を含む。長く持続する抗体応答は、VP1タンパク質とVP2タンパク質の両方を対象とし、よって、これらのタンパク質は、単独で、有意な免疫応答を起こすことが予測される。

#### 【0006】

昆虫細胞における、パルボウイルスB19 VP1/VP2 VLPの発現および精製は、以前に記載されている(特許文献1)。パルボウイルスB19に関して公知であることに関わらず、パルボウイルスB19感染を予防するワクチンも実用的な医薬も存在しない。ヒト免疫グロブリンを含有する調製物が、時には、免疫不全の個体における慢性のパルボウイルスB19感染を処置するために使用される。しかし、免疫グロブリンを注射することは、十分に実用的でない、長く持続しない、または、広範にわたる予防的使用もしくはは常套的な予防的使用のために手頃でない。例えば、職場、保育所、または学校における社会的相互作用から第五病の人を排除することは、個体は特徴的な皮疹が発生する前にかなり伝染性であるので、ウイルスの蔓延を予防するために有効な方式ではない。よって、パルボウイルスB19免疫原性材料の効率的な調製を可能にする、パルボウイルスB19ワクチンを開発する改善された手法が必要とされている。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0007】

【特許文献1】米国特許第5,508,186号明細書

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明は、一部において、パルボウイルスのウイルス様粒子、例えば、パルボウイルスB19のウイルス様粒子を生成するための方法を提供する。一部の態様では、本発明の方法は、宿主細胞に、パルボウイルスVP1とパルボウイルスVP2の両方を含む組換え核酸、例えば、発現ベクターなどを提供するステップと、宿主細胞を、VP1タンパク質およびVP2タンパク質が発現され、パルボウイルス・VLPに集合する(assembly)条件下で維持するステップとを含む。別の態様では、本発明の方法は、免疫化された宿主においてVLPが形成されるように、宿主において、パルボウイルスVP2と、それよりも低いレベルのパルボウイルスVP1の発現を導くバイシストロン性の核酸ワクチンを提供するステップを含む。

#### 【0009】

本発明は、パルボウイルスのウイルス様粒子(VLP)を生成する方法であって、(a)第1の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルスVP1をコードするヌクレオチド配列と、第2の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルスVP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む組換え核酸分子を含有する宿主細胞を提供するステップと、(b)VP1タンパク質およびVP2タンパク質が発現され、VLPに集合する条件下で宿主細胞を維持するステップとを含む方法に関する。好ましい方法では、VP1が、VP2よりも低いアバンドンスで生成される。可溶性のVP1が可溶性のVP2よりも低いアバンドンスで生成されることが好ましい。特定の態様では、VP1およびVP2を含有するVLPが生成される。組換え核酸分子はバイシストロン性ベクターであることが好ましい。特定の態様では、第1の制御エレメントは、第2の制御エレメントの改変体であり、その改変体は、VP2と比較してVP1の生成を転写的に、翻訳的に、または転写的かつ翻訳的に減少させる修飾を含む。例えば、第1の制御エレメントは、VP1をコードする核酸の上流のTATAボックスの少なくとも一部分の欠失、VP1をコードする核酸の上流の接合部位の欠失、VP1をコードする核酸の上流の転写開始部位または転写終止部位の導入、またはそれらの組み合わせを含んでよい。特定の態様で

は、第2の制御エレメントは、ADH2 / GAPDHプロモーター（配列番号19）である。

【0010】

宿主細胞は、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、トリの細胞、細菌、テトラヒメナの細胞またはそれらの組み合わせであってよい。一態様では、宿主細胞を、VP1およびVP2が生成され、これらのタンパク質がVLPに集合するのに適した培養条件下で維持する。方法は、VLPを単離するステップをさらに含んでよい。VLPを、宿主細胞の馴化培地、宿主細胞の溶解物、宿主細胞のホモジネート、またはそれらの組み合わせから単離することができる。場合によって、単離されたVLPをさらに精製することができる。単離されたVLPは、スクロースクッション (sucrose cushion)、スクロース勾配遠心分離、クロマトグラフィー法、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される精製方法を用いて精製することができる。

10

【0011】

本発明は、本明細書に記載の任意の方法に従って生成される、VP1およびVP2を含有するパルボウイルスのウイルス様粒子 (VLP) にも関する。

【0012】

本発明は、パルボウイルス・VLPを含む免疫原性組成物にも関する。

【0013】

本発明は、第1の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルスVP1をコードするヌクレオチド配列と、第2の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルスVP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む組換え核酸であって、適切な宿主細胞内にVP1をコードする配列とVP2をコードする配列とが同量存在する場合、VP1が、VP2よりも低いアバンドンスで発現される、組換え核酸にも関する。可溶性のVP1が可溶性のVP2よりも低いアバンドンスで生成されることが好ましい。一態様では、第1の制御エレメントは弱いプロモーターであり、第2の制御エレメントは強力なプロモーターである。第1の制御エレメントは第2の制御エレメントの改変体であってよく、その改変体は、VP2と比較してVP1の生成を転写的に、翻訳的に、または転写的かつ翻訳的に減少させる修飾を含んでよい。修飾は、VP1をコードする核酸の上流のTATAボックスの少なくとも一部分の欠失、VP1をコードする核酸の上流の接合部位の欠失、VP1をコードする核酸の上流の転写開始部位または転写終止部位の導入、またはそれらの組み合わせであってよい。第2の制御エレメントは、ADH2 / GAPDHプロモーター（配列番号19）であってよい。核酸は、DNAまたはRNAの形態であってよく、一本鎖または二本鎖のいずれであっててもよい。組換え核酸はプラスミドであってよい。プラスミドは、検出可能なマーカーを含んでよい。

20

30

【0014】

本発明は、本明細書に記載の組換え核酸を含む宿主細胞にも関する。組換え核酸は、宿主細胞のゲノム内に組み込まれていてよい、または染色体外のエレメントに保有されていてよい。宿主細胞は、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、トリの細胞、細菌、テトラヒメナの細胞またはそれらの組み合わせであってよい。

【0015】

本発明は、本明細書に記載の方法に従って生成される、VP1およびVP2を含有するパルボウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を、治療目的および診断目的で、例えば診断用キット内の抗原として用いる方法にも関する。

40

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

パルボウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を生成する方法であって、(a) 第1の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルスVP1をコードするヌクレオチド配列と、第2の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルスVP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む組換え核酸分子を含有する宿主細胞を提供するステップと、(b) 前記VP1タンパク質およびVP2タンパク質が発現され、VLPに

50

集合する条件下で前記宿主細胞を維持するステップとを包含する、方法。

(項目 2)

VP1 が、VP2 よりも低いアバンダンスで生成される、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

VP1 および VP2 を含有する VLP が生成される、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記組換え核酸分子がバイシストロン性ベクターである、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記第 1 の制御エレメントが前記第 2 の制御エレメントの改変体であり、前記改変体が、VP2 と比較して VP1 の生成を転写的に、翻訳的に、または転写的かつ翻訳的に減少させる修飾を含む、項目 1 に記載の方法。

10

(項目 6)

前記第 1 の制御エレメントが、VP1 をコードする核酸の上流の TATA ボックスの少なくとも一部分の欠失、VP1 をコードする核酸の上流の接合部位の欠失、VP1 をコードする核酸の上流の転写開始部位もしくは転写終止部位の導入、またはそれらの組み合わせを含む、項目 4 に記載の方法。

(項目 7)

前記第 2 の制御エレメントが、ADH2 / GAPDH プロモーター (配列番号 19) である、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

前記宿主細胞が酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、トリの細胞、細菌、テトラヒメナの細胞またはそれらの組み合わせである、項目 1 に記載の方法。

20

(項目 9)

前記宿主細胞を、VP1 および VP2 が生成され、これらのタンパク質が VLP に集合するのに適した培養条件下で維持する、項目 1 に記載の方法。

(項目 10)

前記 VLP を単離するステップをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 11)

前記 VLP を、宿主細胞の馴化培地、宿主細胞の溶解物、宿主細胞のホモジネート、またはそれらの組み合わせから単離する、項目 10 に記載の方法。

30

(項目 12)

単離された前記 VLP をさらに精製する、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

単離された前記 VLP を、スクロースクッション、スクロース勾配遠心分離、クロマトグラフィー法、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される精製方法を用いてさらに精製する、項目 12 に記載の方法。

(項目 14)

項目 1 から 13 までのいずれか一項に記載の方法に従って生成される、VP1 および VP2 を含有するパルボウイルスのウイルス様粒子 (VLP)。

(項目 15)

項目 14 に記載のパルボウイルス・VLP を含む免疫原性組成物。

40

(項目 16)

第 1 の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルス VP1 をコードするヌクレオチド配列と、第 2 の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルス VP2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む組換え核酸であって、適切な宿主細胞内に VP1 をコードする前記配列と VP2 をコードする前記配列とが同量存在する場合、VP1 が、VP2 よりも低いアバンダンスで発現される、組換え核酸。

(項目 17)

前記第 1 の制御エレメントが弱いプロモーターであり、前記第 2 の制御エレメントが強力なプロモーターである、項目 16 に記載の組換え核酸。

50

## (項目18)

前記第1の制御エレメントが前記第2の制御エレメントの改変体であり、前記改変体が、VP2と比較してVP1の生成を転写的に、翻訳的に、または転写的かつ翻訳的に減少させる修飾を含む、項目17に記載の組換え核酸。

## (項目19)

前記修飾が、VP1をコードする核酸の上流のTATAボックスの少なくとも一部分の欠失、VP1をコードする核酸の上流の接合部位の欠失、VP1をコードする核酸の上流の転写開始部位もしくは転写終止部位の導入、またはそれらの組み合わせを含む、項目18に記載の組換え核酸。

## (項目20)

前記第2の制御エレメントが、ADH2/GAPDHプロモーター(配列番号19)である、項目16に記載の組換え核酸。

## (項目21)

前記核酸が、DNAまたはRNAの形態であり、かつ一本鎖または二本鎖のいずれかである、項目20に記載の組換え核酸。

## (項目22)

プラスミドである、項目21に記載の組換え核酸。

## (項目23)

前記プラスミドが検出可能なマーカーを含む、項目22に記載の組換え核酸。

## (項目24)

項目16から23までのいずれか一項に記載の組換え核酸を含む宿主細胞。

## (項目25)

前記組換え核酸が前記宿主細胞のゲノムに組み込まれているか、または染色体外のエレメントに保有されている、項目24に記載の宿主細胞。

## (項目26)

酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、トリの細胞、細菌、テトラヒメナの細胞またはそれらの組み合わせである、項目25に記載の宿主細胞。

## (項目27)

項目1から13までのいずれか一項に記載の方法に従って生成される、VP1およびVP2を含有するパルボウイルスのウイルス様粒子(VLP)を、診断用キット内の抗原として用いる方法。

## (項目28)

生物学的試料中の抗パルボウイルス抗体を検出する方法であって、個体から得られた生物学的試料を準備するステップと、前記試料を、項目1から13までのいずれか一項に記載のパルボウイルス・VLPと組み合わせるステップと、抗体-VLP複合体を検出するステップとを包含し、抗体-VLP複合体が存在することにより、抗パルボウイルス抗体が前記生物学的試料中に存在することが示される、方法。

## (項目29)

前記生物学的試料が血液試料または血清試料である、項目28に記載の方法。

## (項目30)

項目16に記載の組換え核酸を含む免疫原性組成物を、哺乳動物における免疫応答を上昇させることができる医薬品として使用する方法。

## (項目31)

前記医薬品を使用して、小児における伝染性紅斑、鎌状赤血球貧血、溶血性貧血、遺伝性球状赤血球症、慢性赤血球形成不全、免疫不全の患者における貧血、成人における持続性の関節症、免疫無防備状態の患者における血球減少症、マラリア原虫に同時感染している間の貧血の悪化、マラリアにおける貧血の悪化、妊娠中の女性における胎児水腫および自然流産からなる群から選択される状態を処置または予防する、項目28に記載の方法。

## (項目32)

パルボウイルスVP1および/またはVP2に対する免疫応答を誘導する方法であって

10

20

30

40

50

、個体に、有効量の項目 16 から 23 までのいずれか一項に記載の組換え核酸を投与し、それによって、免疫応答を誘導するステップを包含する、方法。

(項目 33)

前記組換え核酸を筋肉内注射によって投与する、項目 33 に記載の方法。

(項目 34)

パルボウイルス VP1 および / または VP2 に対する免疫応答を誘導する方法であって、個体に、項目 14 に記載のウイルス様粒子または項目 15 に記載の免疫原性組成物を有効量で投与し、それによって、免疫応答を誘導するステップを包含する、方法。

(項目 35)

前記ウイルス様または免疫原性組成物を筋肉内注射によって投与する、項目 34 に記載の方法。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図 1】図 1 は、酵母発現ベクター pBS24.1 の図である。このベクターは、*S. cerevisiae* において VLP を生成するのに適している。

【図 2】図 2 は、pBS24.1 に基づく、バイシストロン性の酵母発現ベクター pCDC.7 の図である。このベクターは、*S. cerevisiae* においてパルボウイルス B19 VP1・VLP およびパルボウイルス B19 VP2・VLP を同時発現させるのに適している。

【図 3A】図 3A ~ 3D は、*S. cerevisiae* においてパルボウイルス B19 VP1・VLP およびパルボウイルス B19 VP2・VLP を同時発現させるために用いる pCDC.7 のヌクレオチド配列 (配列番号 16) を示す。

20

【図 3B】図 3A ~ 3D は、*S. cerevisiae* においてパルボウイルス B19 VP1・VLP およびパルボウイルス B19 VP2・VLP を同時発現させるために用いる pCDC.7 のヌクレオチド配列 (配列番号 16) を示す。

【図 3C】図 3A ~ 3D は、*S. cerevisiae* においてパルボウイルス B19 VP1・VLP およびパルボウイルス B19 VP2・VLP を同時発現させるために用いる pCDC.7 のヌクレオチド配列 (配列番号 16) を示す。

【図 3D】図 3A ~ 3D は、*S. cerevisiae* においてパルボウイルス B19 VP1・VLP およびパルボウイルス B19 VP2・VLP を同時発現させるために用いる pCDC.7 のヌクレオチド配列 (配列番号 16) を示す。

30

【図 4】図 4 は、最適化されたパルボウイルス B19 VP1 のヌクレオチド配列 (配列番号 17) を示す。

【図 5】図 5 は、最適化されたパルボウイルス B19 VP2 のヌクレオチド配列 (配列番号 18) を示す。

【図 6】図 6 は、パルボウイルス B19 VP2 を発現させるために用いる ADH2 / GAPDH プロモーター (BamHI / HindIII フラグメントとして) のヌクレオチド配列 (配列番号 19) を示す。

【図 7】図 7 は、VP1 の開始メチオニン (太字) からすぐ上流に天然に存在するのと同じく、GAPDH 配列の 10 塩基がパルボウイルス B19 の天然ウイルス配列の 14 塩基 (下線が引かれている) と交換された、ADH2 / GAPDH プロモーターの「デルタ As」バージョンのヌクレオチド配列 (配列番号 20) を示す。

40

【図 8】図 8 は、パルボウイルス B19 VP1 を発現させるために用いる、TATA が欠失した ADH2 / GAPDH プロモーター (BamHI / MluI フラグメントとして) のヌクレオチド配列 (配列番号 21) を示す。

【図 9】図 9 は、ADH2 / GAPDH プロモーターと VP1 の開始メチオニン (太字) との間の接合部から上流に 1SS (合成の開始 - 終止配列、下線が引かれている) を有するパルボウイルス B19 VP1 のヌクレオチド配列 (配列番号 22) を示す。

【図 10】図 10 は、VP2 に対する抗体を用いたウエスタンブロットにおける、酵母において生成される可溶性の VP1 および可溶性の VP2 の相対的な量の変動を示す。上の

50

バンドは、VP1を表し、下の色の濃いバンドはVP2を表す。ラベルは、プラスミド内に何が入っているか、または行われた修飾の種類を記載している。例えば、レーン7は、1つの開始/終止により、VP1のレベルがVP2と比較して減少したことを示し、レーン8は、2つの開始/終止により、レベルがさらに減少したことを示す。

【図11】図11は、(A)精製されたパルボウイルスB19・VLPを示すクーマシーゲル、および(B)パルボウイルスB19・VLPの電子顕微鏡写真を示す。

【図12A】図12は、パルボウイルスB19・VLPの免疫原性を実証しているELISAデータを示す3つのグラフである。最も高い力価はMF59処方物で実証され、各用量濃度で同様であった。

【図12B】図12は、パルボウイルスB19・VLPの免疫原性を実証しているELISAデータを示す3つのグラフである。最も高い力価はMF59処方物で実証され、各用量濃度で同様であった。

【図12C】図12は、パルボウイルスB19・VLPの免疫原性を実証しているELISAデータを示す3つのグラフである。最も高い力価はMF59処方物で実証され、各用量濃度で同様であった。

【図13】図13は、VP1デルタTATA/VP2構築物の図である。この構築物は、本出願に記載のタンパク質の精製および実験において使用するのに適している。

【図14】図14は、パルボウイルスB19のVP1(配列番号23)およびVP2(配列番号24)のアミノ酸配列を示す。VP1は、781アミノ酸長であり、84kDaの分子量を有する。VP2は、554アミノ酸長であり、58kDaの分子量を有する。

【図15】図15は、VP1/VP2・VLPの発現に由来するスクロース棚(sucrose shelf)画分の(A)SDS-PAGEおよび(B)ウェスタンを示す。

【図16】図16は、パルボウイルスB19 VP1/VP2・VLPのCapto Q溶出からの画分の(A)クーマシー染色SDS-PAGEおよび(B)VP1/VP2抗体でプローブしたウェスタン(B)分析を示す。

【図17】図17は、精製されたVP1/VP2・VLPのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)(S-200)クロマトグラムである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、一部において、パルボウイルスB19のVP1およびVP2を同じ宿主細胞において発現させて、その両方のタンパク質を含有するVLPを生成することができるが、VLPの生成は効率的でないという発見に基づく。現在、VP1およびVP2を同じ宿主細胞(例えば、酵母細胞)において発現させると、VP1の発現により、VP2の発現およびVLPの形成が抑制されることが発見されている。この結果、VLPの形成が非効率的になり、不溶性材料の量が増加する。

【0018】

本発明は、パルボウイルスのVP1タンパク質とVP2タンパク質とを含有するVLPの非効率的な生成に関する問題の解決法を提供する。方法は、宿主細胞において、VP1およびVP2を、VP1がVP2と比較して低いアバンダンスで生成されるように生成することにより、パルボウイルスのVP1タンパク質とVP2タンパク質とを含有するVLPを生成するより優れた方式を提供する。可溶性のVP1が可溶性のVP2よりも低いアバンダンスで生成されることが好ましい。本発明は、VP1およびVP2をコードし、宿主細胞における所望の量のタンパク質の発現を駆動する組換え核酸を提供する。例えば、VP1およびVP2の発現を別々のプロモーターによって制御し、各タンパク質の発現を所望の比率に制御することができる。本発明は、組換え核酸を含有する宿主細胞を用いてVP1およびVP2を含有するパルボウイルス・VLPを生成するための方法も提供する。これらの方法は、VLPの生成効率の改善をもたらし、トランスフェクション効率の変動性(例えば、細胞間の変動性およびバッチ間の変動性)、VP2と比較したVP1の発現の変動性、およびVP1によるVP2の発現の抑制を含めた、VP1およびVP2を発現させるために別々のベクターを使用し、それらを一緒に混合して宿主細胞を生成する先

行方法に伴う変動性および品質管理の問題を減らす。

【0019】

本発明の他の態様は、組換え核酸、宿主細胞、VLPおよびVLPを含有する免疫原性組成物を生成するための方法を包含する。

【0020】

I. 定義

本出願において使用される科学用語および技術用語は全て、別段の指定がない限り、当技術分野で一般に使用される意味を有する。本出願において使用される場合、以下の単語または句は指定された意味を有する。

【0021】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a (1つの)」、「an (1つの)」および「the (その)」は、その内容からそうでないことが明らかでない限り、複数の言及を含むことに留意しなければならない。よって、例えば、「a (1つの) ポリヌクレオチド」への言及は、そのようなポリヌクレオチド2つ以上などの混合物を包含する。

【0022】

数値xに関して、用語「約」は、例えば、 $x + 10\%$ を意味する。

【0023】

本明細書で使用される場合、用語「パルボウイルス」は、哺乳動物種（例えば、ヒト、イヌ、ニワトリ、ネコ、マウス、ブタ、アライグマ、ミンク、キルハムラット (kill ham rat)、ウサギ (lapine) ) に関連する全てのパルボウイルス、および広範には、パルボウイルス科ファミリーの全ての属（すなわち、パルボウイルス（例えば、イヌパルボウイルス）、デPENDウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス）、エリスロウイルス（例えば、パルボウイルスB19）およびボカウイルス）をいう。パルボウイルスは、ヒトに感染する、すなわち、デPENDウイルス属、エリスロウイルス属、またはボカウイルス属のものであることが好ましい。パルボウイルスはパルボウイルスB19であることが最も好ましい。いくつかの実施形態において、パルボウイルスは、パルボウイルス属由来である。パルボウイルスという用語は、出願時には特徴づけられていない分離株も包含する。

【0024】

パルボウイルスB19種は、3つの別個の遺伝子型に細分される (Gallinellaら、2003年; Hokynarら、2002年; Nguyenら、2002年; Servantら、2002年)。これらの遺伝子型間のヌクレオチドの相違 (divergency) は、およそ10%であり、プロモーター領域においては20%超である。以前B19Vとして公知であったウイルスは全て、遺伝子型1として分類した。遺伝子型2は、比較的まれに見いだされる。遺伝子型2が見いだされる場合、およそ40歳よりも高齢の個体においてはるかに高い頻度で同定される。遺伝子型3のウイルスは、原型 (prototype) 株V9 (GenBank受託番号AX003421) 及び原型株D91.1 (GenBank受託番号AY083234) によって代表される2つのサブタイプにクラスター化される (Parsyanら、2007年)。遺伝子型3のウイルスは、西アフリカのガーナに特有であることが示されており (Candottiら、2004年)、また、ブラジルの特定の地域に存在する可能性がある。

【0025】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指し、生成物の最小の長さ限定されない。よって、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体などがこの定義の範囲内に含まれる。全長のタンパク質およびそのフラグメントの両方がこの定義に包含される。これらの用語は、ポリペプチドの発現後 (postexpression) 修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化なども包含する。さらに、本発明の目的のために、「ポリペプチド」とは、タンパク質が所望の活性を維持する限りは、天然の配列に対して修飾、例えば、欠失、付加および置換など（一般に天然に保存さ

10

20

30

40

50

れた)を含むタンパク質をいう。これらの修飾は、部位特異的変異誘発によるものなど、意図的なものであってよい、または、タンパク質を生成する宿主の変異によるものまたはPCR増幅に起因するエラーなどの偶発的なものであってよい。

**【0026】**

「実質的に精製された」とは、一般に、物質(化合物、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ポリペプチド組成物)が、その物質が、それが存在する試料における百分率の大部分を構成するように単離することをいう。典型的に、試料において、実質的に精製された成分は、その試料の50%、好ましくは80%~85%、より好ましくは90~95%を構成する。目的のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを精製するための技法は、当技術分野で周知であり、それらとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび密度にしたがった沈降が挙げられる。

10

**【0027】**

「単離された」とは、ポリペプチドについて言及する場合、示された分子が、その分子が天然に見いだされる、生物全体から分離されており、別個である、または、同じ種類の他の生物学的な高分子の実質的な不在で存在することを意味する。用語「単離された」は、ポリヌクレオチドに関しては、天然では通常それに関連している配列の全体またはその部分を欠く核酸分子;または、天然に存在するのと同様だが、それと結びついた異種配列を有する配列;または染色体から切り離された分子である。

**【0028】**

「組換え」とは、本明細書において核酸分子を説明するために使用される場合、その起源または操作によって、それが天然では関連しているポリヌクレオチドの全部または一部と結びついていない、ゲノム起源、cDNA起源、ウイルス起源、半合成起源、または合成起源のポリヌクレオチドを意味する。用語「組換え」は、タンパク質またはポリペプチドに関して使用される場合、組換えポリヌクレオチドを発現させることによって生成されるポリペプチドを意味する。一般に、下でさらに記載するように、目的の遺伝子をクローニングし、次いで、形質転換した生物において発現させる。宿主生物は、発現条件下で外来遺伝子を発現してタンパク質を生成する。

20

**【0029】**

用語「形質転換」とは、挿入するために用いる方法に関係なく、外因性のポリヌクレオチドを宿主細胞に挿入することをいう。例えば、直接的な取り込み、トランスフェクション、形質導入またはf-接合が含まれる。外因性のポリヌクレオチドは、非組み込み型ベクター、例えばプラスミドとして維持することができる、あるいは、宿主ゲノムに組み込むことができる。

30

**【0030】**

「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞株」、「細胞培養物」、および他のそのような単細胞の実体として培養された微生物またはそれよりも高等の真核細胞株を示す用語は、組換えベクターまたは他の移入DNAのレシピエントとして用いることができる、または用いられてきた細胞をいい、トランスフェクトされた元の細胞の元の後代を包含する。

**【0031】**

「コード配列」または選択されたポリペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列(または「制御エレメント」)の制御下に置かれると、in vivoで転写され(DNAの場合)、翻訳されて(mRNAの場合)ポリペプチドになる核酸分子である。コード配列の境界は、5'(アミノ)末端の開始コドンおよび3'(カルボキシ)末端の翻訳終止コドンによって決定することができる。コード配列としては、これに限定されないが、ウイルス、原核生物または真核生物のmRNA由来のcDNA、ウイルスまたは原核生物のDNAまたはRNA由来のゲノムDNA配列、およびさらには合成DNA配列を挙げることができる。転写終結配列は、コード配列の3'側に位置してよい。

40

**【0032】**

典型的な「制御エレメント」としては、これらに限定されないが、転写プロモーター、

50

転写エンハンサーエレメント、転写終結シグナル、ポリアデニル化配列（翻訳終止コドンの3'側に位置する）、翻訳の開始を最適化するための配列（コード配列の5'側に位置する）、および翻訳終結配列が挙げられる。

【0033】

用語「核酸」は、DNAおよびRNAを包含し、また、それらの類似体、例えば、修飾された骨格を含有するものなど（例えば、ホスホロチオエートなど）、およびペプチド核酸（PNA）なども包含する。本発明は、上記のものと相補的な配列を含む核酸を包含する（例えば、アンチセンスまたはプローブする（probing）目的で）。

【0034】

「作動可能に連結した」とは、そう記載されている成分がそれらの通常の機能を果たすように構成されている、エレメントの配置（arrangement）をいう。よって、コード配列に作動可能に連結した所与のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合に、コード配列の発現をもたらすことができる。プロモーターは、コード配列の発現を導くように機能する限りは、コード配列と隣接している必要はない。よって、例えば、介在性の、翻訳されないが転写された配列がプロモーター配列とコード配列の間に存在してよく、それでも、プロモーター配列はコード配列に「作動可能に連結した」とみなされ得る。

10

【0035】

「にコードされる」とは、ポリペプチド配列またはその部分が、少なくとも3アミノ酸のアミノ酸配列を含有するポリペプチド配列をコードする核酸配列をいう。

【0036】

「発現カセット」または「発現構築物」とは、目的の配列（複数可）または遺伝子（複数可）の発現を導くことができる集合体をいう。発現カセットは、一般に、上記の通り、制御エレメント、例えば、目的の配列（複数可）または遺伝子（複数可）に作動可能に連結している（それらの転写を導くために）プロモーターなどを含み、多くの場合、その上ポリアデニル化配列も含む。本発明のある特定の実施形態の範囲内では、本明細書に記載の発現カセットは、プラスミド構築物内に含有されてよい。発現カセットの成分に加えて、プラスミド構築物は、1または複数の選択マーカー、プラスミド構築物が一本鎖DNAとして存在することを可能にするシグナル（例えば、M13複製開始点）、少なくとも1つの多重クローニング部位、および「哺乳動物の」複製開始点（例えば、SV40またはアデノウイルス複製開始点）も含んでよい。

20

30

【0037】

「精製されたポリヌクレオチド」とは、本質的に遊離している、例えば、ポリヌクレオチドが天然に関連しているタンパク質を約50%未満、好ましくは約70%未満、およびより好ましくは少なくとも約90%未満含有する目的のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントをいう。目的のポリヌクレオチドを精製するための技法は、当技術分野で周知であり、それらとしては、例えば、ポリヌクレオチドを含有する細胞を、カオトロピック作用剤を用いて破壊すること、およびポリヌクレオチド（複数可）およびタンパク質を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび密度にしたがった沈降によって分離することが挙げられる。

【0038】

「ベクター」は、核酸配列を標的細胞に移入することができる（例えば、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、粒子キャリア、およびリポソーム）。典型的に、「ベクター構築物」、「発現ベクター」および「遺伝子移入ベクター」とは、目的の核酸の発現を導くことができる任意の核酸構築物を意味し、これは、核酸配列を標的細胞に移入することができる。よって、これらの用語は、クローニングビヒクルおよび発現ビヒクル、ならびにウイルスベクターを包含する。

40

【0039】

本明細書で使用される場合、用語「エピトープ」とは、一般に、T細胞受容体および/または抗体によって認識される抗原上の部位をいう。エピトープは、タンパク質抗原に由来する、またはその一部の短いペプチドであることが好ましい。しかし、この用語は、グ

50

リコペプチドおよび炭水化物エピトープ、および一次配列は連続していないが最終的に折りたたまれた構造では互いに近傍に位置するペプチドで構成される（グリコシル化などの修飾を伴う、または伴わない）タンパク質表面を有するペプチドも包含することが意図される。いくつかの異なるエピトープが単一の抗原性分子に保有され得る。エピトープは、1または複数の他の分子と共有結合的に、または非共有結合的に結びつく2つ以上の分子からできていてよい。用語「エピトープ」は、生物全体を認識する応答を刺激する、アミノ酸または炭水化物の修飾された配列も包含する。選択されたエピトープが、感染症を引き起こす感染性因子のエピトープであれば有利である。

#### 【0040】

本明細書で使用される場合、用語「T細胞エピトープ」は、一般に、T細胞応答を誘導することができるペプチド構造の特徴をいい、「B細胞エピトープ」は、一般に、B細胞応答を誘導することができるペプチド構造の特徴をいう。

10

#### 【0041】

抗原または組成物に対する「免疫学的応答」は、被験体における、目的の組成物内に存在する抗原に対する体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答の発生である。本発明の目的のために、「体液性免疫応答」とは、抗体分子によって媒介される免疫応答をいい、一方、「細胞性免疫応答」は、T-リンパ球および/または他の白血球によって媒介される免疫応答をいう。細胞性免疫の1つの重要な態様は、細胞溶解性T細胞(cytolytic T-cell)（「CTL」）による抗原に特異的な応答を伴う。CTLは、主要組織適合性複合体(MHC)にコードされるタンパク質と結びついて提示され、細胞の表面上で発現されるペプチド抗原に対する特異性を有する。CTLは、細胞内の微生物の破壊の誘導および促進、またはそのような微生物に感染した細胞の溶解を助ける。細胞性免疫の別の態様は、ヘルパーT細胞による抗原に特異的な応答を伴う。ヘルパーT細胞は、それらの表面上にMHC分子と結びついたペプチド抗原を提示している細胞に対する非特異的なエフェクター細胞の機能を刺激すること、およびその活性の焦点を合わせることを助けるように作用する。「細胞性免疫応答」とは、CD4+T細胞およびCD8+T細胞に由来するものを含めた、活性化されたT細胞および/または他の白血球によって生成される、サイトカイン、ケモカインおよび他のそのような分子の生成もいう。

20

#### 【0042】

細胞性免疫応答を惹起する免疫原性組成物またはワクチンは、脊椎動物の被験体を、細胞表面において抗原をMHC分子と結びつけて提示させることによって感作するために役立つ。細胞媒介性免疫応答は、それらの表面に抗原を提示している細胞、またはその近傍に向けられる。さらに、抗原に特異的なT-リンパ球を生じさせて、免疫化された宿主の将来の防御を可能にすることができる。

30

#### 【0043】

特定の抗原の、細胞媒介性免疫学的応答を刺激する能力は、いくつかのアッセイ、例えば、リンパ球増殖(リンパ球活性化)アッセイ、CTL細胞傷害性細胞アッセイによって、または、感作された被験体において抗原に特異的なT-リンパ球をアッセイすることによって決定することができる。そのようなアッセイは当技術分野で周知である。例えば、Ericssonら、J. Immunol. (1993年) 151巻: 4189~4199頁; Doeら、Eur. J. Immunol. (1994年) 24巻: 2369~2376頁を参照されたい。細胞媒介性免疫応答を測定する最近の方法は、細胞内のサイトカインまたはT細胞集団によるサイトカインの分泌を測定することを含む、または、エピトープに特異的なT細胞を測定することによる(例えば、四量体技法によって)(McMichael, A. J., およびO'Callaghan, C. A., J. Exp. Med. 187巻(9号) 1367~1371頁、1998年; Mcheyzer-Williams, M. G.ら、Immunol. Rev. 150巻: 5~21頁、1996年; Lalvan, A.ら、J. Exp. Med. 186巻: 859~865頁、1997年により概説されている)。

40

#### 【0044】

50

よって、免疫学的応答とは、本明細書で使用される場合、抗体の生成（例えば、細菌毒素、および細胞に進入して複製するウイルスなどの病原体を、毒素および病原体に結合することによって遮断し、典型的に、細胞を感染および破壊から保護する中和性抗体）を刺激するものであってよい。目的の抗原は、CTLの生成も惹起することができる。よって、免疫学的応答としては、以下の効果の1または複数を挙げることができる：B細胞による抗体の生成；ならびに/または、目的の組成物またはワクチンに存在する1または複数の抗原を特異的に向けさせるサブレッサーT細胞および/または記憶/エフェクターT細胞の活性化。これらの応答は、感染性を中和するため、および/または抗体-補体、または抗体依存性細胞傷害（ADCC）を媒介して、免疫化された宿主に防御をもたらすために役立つ。そのような応答は、当技術分野で周知の標準の免疫測定法および中和アッセイを使用して決定することができる（例えば、Montefiorisら（1988年）*J Clin Microbiol.* 26巻：231～235頁；Dreyerら（1999年）*AIDS Res Hum Retroviruses*（1999年）15巻（17号）：1563～1571頁を参照されたい）。哺乳動物の先天性免疫系は、病原性生物の分子上の特徴も、免疫細胞上のToll様受容体および同様の受容体分子を活性化することによって認識し、それに応答する。先天性免疫系が活性化されると、種々の非適応性の免疫応答細胞が活性化されて、例えば、種々のサイトカイン、リンフォカインおよびケモカインが生成される。先天性免疫応答によって活性化される細胞としては、単球（monocyte）および形質細胞様（plasmacytoid）系列（MDC、PDC）の未成熟樹状細胞および成熟樹状細胞、ならびにガンマ、デルタ、アルファおよびベータT細胞およびB細胞などが挙げられる。よって、本発明は、先天性応答と適応応答の両方を伴う免疫応答も意図している。

10

20

#### 【0045】

「免疫原性組成物」は、組成物を被験体に投与することにより被験体において目的の抗原性分子に対する体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答が発生する場合の、抗原性分子を含む組成物である。

#### 【0046】

用語「免疫原性」タンパク質またはポリペプチドは、上記の通り免疫学的応答を惹起するアミノ酸配列をいう。「免疫原性」タンパク質またはポリペプチドは、本明細書で使用される場合、前駆体および成熟形態、その類似体、またはその免疫原性フラグメントを含めた、問題のタンパク質の全長の天然配列または組換え配列を包含する。

30

#### 【0047】

上で定義されたパルボウイルスのポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドは、パルボウイルスに由来する分子であり、それぞれ、これらに限定することなく、パルボウイルスの種々の分離株の任意のものを含む。分子は、問題の特定の分離株に物理的に由来する必要はないが、合成的にまたは組換えによって生成することができる。

#### 【0048】

具体的には、パルボウイルスB19のゲノムは、3つのオープンリーディングフレームを含有する：77kDaの非構造タンパク質であるNS1は、ヌクレオチド436～2451にコードされ；副次的な構造タンパク質であるVP1は、ヌクレオチド2444～4787にコードされ、主要な構造タンパク質であるVP2は、ヌクレオチド3125～4787にコードされる（Corcoranら、*J. Med. Microb.*、2004年）。パルボウイルスB19は、構造遺伝子および非構造遺伝子を示差的に発現させることができる単一のプロモーター、p6を用いる（Blundellら、1987年、Ozawaら、1987年）。前述の番号付けは、パルボウイルスB19のゲノムのヌクレオチド配列に対するものであるが、パルボウイルスの他の遺伝子型および分離株から得られた配列における対応する位置も、本発明に含有されるものと理解されるべきである。VP1またはVP2をコードする核酸のうちのいずれか1つ、ならびにその改変体、例えば、その免疫原性フラグメントなど、ならびにそのような核酸にコードされるポリペプチド

40

50

を、本発明の実施において用いることができる。

【0049】

本明細書で使用される場合、用語「副次的な構造タンパク質」または「副次的な構造ポリペプチド」または「副次的なカプシドタンパク質」または「副次的なカプシドポリペプチド」または「VP1」は、パルボウイルスに関しては、パルボウイルスのORF2にコードされるポリペプチドと相同または同一である配列を含むポリペプチドをいい、それらに対して少なくとも約80～100%、これらの範囲内の任意の%同一性、例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の配列同一性などを含めた配列同一性を示す配列を含む。

10

【0050】

本明細書で使用される場合、用語「主要な構造タンパク質」または「主要な構造ポリペプチド」または「主要なカプシドタンパク質」または「主要なカプシドポリペプチド」または「VP2」は、パルボウイルスに関しては、パルボウイルスのORF3にコードされるポリペプチドと相同または同一である配列を含むポリペプチドをいい、それらに対して少なくとも約80～100%、これらの範囲内の任意の%同一性、例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の配列同一性などを含めた配列同一性を示す配列を含む。

20

【0051】

本明細書で使用される場合、用語「ウイルス様粒子」または「VLP」は、ウイルスカプシドを含有するが、ウイルスのゲノムの全部または一部、具体的には、ウイルスのゲノムの複製成分を欠く非複製的な、非感染性のウイルスの殻をいう。VLPは、一般に、1または複数のウイルスタンパク質、例えば、これらに限定されないが、カプシド、外被、殻、表面、構造タンパク質と称されるタンパク質など（例えば、VP1、VP2）で構成される。パルボウイルス・VLPは、適切な発現系においてVP2を組換え発現させると、自発的に形成され得る。特定のVLPを生成するための方法は当技術分野で公知であり、以下により詳細に考察されている。ウイルスタンパク質を組換え発現させた後のVLPの存在は、当技術分野で公知の従来技法、例えば、電子顕微鏡法、生物物理学的な特徴付けなどを使用して検出することができる。例えば、VLPは、密度勾配遠心分離によって単離することができ、かつ/または、特徴的な密度バンド形成(density banding)によって同定することができる。あるいは、問題のVLP調製物のガラス化した水性試料において低温電子顕微鏡法を実施し、適切な曝露条件下で画像を記録することができる。

30

【0052】

本明細書で使用される場合、「生物学的試料」は、これらに限定されないが、例えば、血液、血漿、血清、排泄物(fecal matter)、尿、骨髄、胆汁、脊髄液、リンパ液、皮膚試料、皮膚、呼吸器、腸、および泌尿生殖器の外分泌物、涙、唾液、乳、血球、器官、生検材料を含めた、被験体から単離された組織または流体の試料、ならびに、これらに限定されないが、細胞および組織、例えば組換え細胞、および細胞成分を培地中で成長させることによって生じる馴化培地を含めた、in vitro細胞培養物の構成成分の試料をいう。具体的には、パルボウイルスは、生物学的試料、例えば、ウイルスに感染した個体由来のエアロゾルまたは呼吸器分泌物または血液などから得ることができる。

40

【0053】

「被験体」は、これらに限定することなく、チンパンジーなどの非ヒト霊長類および他の類人猿およびサル種を含めたヒトおよび他の霊長類；農場動物、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマなど；家庭内哺乳動物、例えば、イヌおよびネコなど；げっ歯類、例えば、マウス、ラットおよびモルモットなどを含めた実験動物；家禽、野鳥および猟鳥、例えば、ニワトリ、シチメンチョウおよび他の家禽の鳥類、アヒル、ガチョウなどを

50

含めた鳥類などを含めた、脊索動物亜門の任意のメンバーを意味する。この用語は、特定の年齢を示さない。よって、成体個体および新生仔個体のどちらも包含されるものとする。

【0054】

「治療有効量」は、免疫原性組成物に関しては、抗体を生成させるため、またはバルボウイルス感染を処置もしくは予防するためのいずれかの免疫学的応答を誘導するであろう免疫原（例えば、免疫原性ポリペプチド、融合タンパク質、ポリタンパク質、VLP、または抗原をコードする核酸）の量を意味する。そのような応答は、一般に、被験体において、組成物に対する抗体媒介性免疫応答および/または分泌性免疫応答もしくは細胞性免疫応答の発生をもたらすであろう。通常、そのような応答は、これらに限定されないが、以下の効果の1または複数を含む；免疫グロブリンA、免疫グロブリンD、免疫グロブリンE、免疫グロブリンGまたは免疫グロブリンMなどの任意の免疫学的クラス由来の抗体の生成；Bリンパ球およびTリンパ球の増殖；免疫学的な細胞（immunological cell）に対する活性化シグナル、増殖シグナルおよび分化シグナルをもたらすこと；ヘルパーT細胞、サブレッサーT細胞、および/または細胞傷害性T細胞および/またはT細胞集団の増大。

10

【0055】

本発明の目的のために、アジュバントの「有効量」は、共投与された（coadministered）抗原または抗原をコードする核酸に対する免疫学的応答を増強する量となる。

20

【0056】

本明細書で使用される「処置」は、（i）伝統的なワクチンの場合と同様に感染または再感染の予防、（ii）症状の低減または排除、および（iii）問題の病原体の実質的な排除または完全な排除、のいずれかをいう。処置は、予防的に（感染する前に）、または治療的に（感染した後）実施することができる。

【0057】

発明を実施するための形態

本発明を詳細に説明する前に、本発明は、それ自体が当然変動し得る、特に例示されている分子またはプロセスのパラメータに限定されないことが理解されるべきである。本明細書において使用される用語法は、単に本発明の特定の実施形態を説明するためのものであり、限定的なものではないことも理解されるべきである。さらに、本発明の実施は、別段の指定のない限り、その全てが当技術分野の通常の技術の範囲内である、ウイルス学、微生物学、分子生物学、組換えDNA技法および免疫学の従来の方法を用いるであろう。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第3版、2000年）；DNA Cloning: A Practical Approach、第I&II巻（D. Glover編）；Oligonucleotide Synthesis（N. Gait編、1984年）；A Practical Guide to Molecular Cloning（1984年）；およびFundamental Virology、第4版、2001年（B. N. FieldsおよびD. M. Knipe編）；Handbook of Experimental Immunology、第I~IV巻（D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、Blackwell Scientific Publications）；A. L. Lehninger、Biochemistry（Worth Publishers, Inc., current edition）；Methods In Enzymology（S. ColowickおよびN. Kaplan編、Academic Press, Inc.）を参照されたい。本明細書に記載のものと同様または同等であるいくつかの方法および材料を本発明の実施において用いることができるが、本明細書には、好ましい材料および方法が記載されている。さらに、本明細書において引用された全ての刊行物、特許および特許出願は、上記のものであろうが下記のものである

30

40

50

うが、これによってそれらの全体が参照により組み込まれる。

【0058】

A. 核酸

本発明は、パルボウイルスVP1およびパルボウイルスVP2をコードする組換え核酸分子に関する。コードされるVP1およびVP2は、任意の所望のパルボウイルス、または任意の所望の組み合わせ由来であってよい。コードされるVP1およびVP2は、ヒトに感染するパルボウイルス、すなわち、デPENDウイルス属、エリスロウイルス属、またはボカウイルス属のパルボウイルス由来であることが好ましい。パルボウイルスは、パルボウイルスB19であることが最も好ましい。一部の態様では、VP1をコードする配列およびVP2をコードする配列、ならびにそれらのそれぞれの制御エレメントは、別々の核酸分子、例えば、別々のベクター上にある。VP1をコードする配列およびVP2をコードする配列、ならびにそれらのそれぞれの制御エレメントは、単一の核酸分子、例えば、バイシストロン性ベクターなどの成分であることが好ましい。

10

【0059】

パルボウイルスのVP1タンパク質およびVP2タンパク質は、天然に存在するタンパク質、例えば、パルボウイルスB19の天然に存在するVP1のアミノ酸配列などと同じ、または実質的に同じアミノ酸配列を有してよい。所望に応じて、いくつかの実施形態において、アミノ酸配列は、天然に存在する配列と、1または複数のアミノ酸の置換、付加および/または欠失により異なってよい。VP1またはVP2におけるアミノ酸残基の約10%未満または約5%未満が置換されている、付加されている、または欠失していることが好ましい。VP1タンパク質またはVP2タンパク質のアミノ酸配列は、天然に存在するパルボウイルスのVP1タンパク質またはVP2タンパク質と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一であることが好ましい。アミノ酸配列の変動は、一般に、VP1タンパク質またはVP2タンパク質の間で保存されておらず、よって、タンパク質の、VLPを形成する能力に干渉しない領域において許容される。所望に応じて、変異(例えば、アミノ酸の置換、付加または欠失)を導入して、ある特定の機能を変化させることができ、例えば、VP1を変異させて、そのホスホリパーゼ活性を不活化することができる。例えば、VP1のアミノ酸配列は、点変異(例えば、His153Ala)、またはWO06/032697、EP1791858またはUS20070286870に記載の任意の変異を含有してよい。

20

30

【0060】

本発明の組換え核酸は、VP1およびVP2の転写および/または翻訳の独立した調節をもたらす、したがって、VP1をコードする配列とVP2をコードする配列が適切な宿主細胞内に同量存在する場合、VP1が、VP2に対して低いアバンダンスで発現される。可溶性のVP1が可溶性のVP2よりも低いアバンダンスで生成されることが好ましい。いくつかの実施形態において、VP1をコードするヌクレオチド配列において使用されるコドンおよびVP2をコードするヌクレオチド配列において使用されるコドンは、VP1をコードする配列とVP2をコードする配列が適切な宿主細胞内に同量存在する場合、VP1が、VP2に対して低いアバンダンスで発現されるように選択される。可溶性のVP1が可溶性のVP2よりも低いアバンダンスで生成されることが好ましい。これは、例えば、VP2をコードする、コドン最適化されたヌクレオチド配列、および、VP1をコードする、コドン最適化されていないまたは脱コドン最適化(codon deoptimization)されたヌクレオチド配列を用いて実現することができる。

40

【0061】

他の実施形態において、VP1をコードする配列とVP2をコードする配列が適切な宿主細胞内に同量存在する場合、VP1が、VP2に対して低いアバンダンスで発現されるように、VP1をコードするヌクレオチド配列およびVP2をコードするヌクレオチド配列を異なる制御エレメントに作動可能に連結する。可溶性のVP1が可溶性のVP2よりも低いアバンダンスで生成されることが好ましい。VP1およびVP2の発現のための制

50

御エレメントは、V P 1をコードする配列とV P 2をコードする配列が所望の宿主細胞内に同量存在する場合、V P 1が、所望の宿主細胞によって、V P 2よりも低いアバンダンスで生成されるように選択される。これは、一般に、V P 1およびV P 2の転写、翻訳、または転写および翻訳に影響を及ぼす制御エレメントを使用して実現される。例えば、V P 2をコードするヌクレオチド配列は、強力なプロモーターに作動可能に連結してよく、V P 1をコードするヌクレオチド配列は、弱いプロモーターに作動可能に連結してよい。使用するプロモーターは、V P 1の発現とV P 2の発現を独立して調節することを可能にする任意のプロモーターであってよい。酵母において発現させるための例示的な強力なプロモーターは、p B S 2 4 . 1に組み込まれたA D H 2 / G A P D Hプロモーターである(図1)。酵母において発現させるための例示的な弱いプロモーターは、Y P T I構成的活性プロモーターである。S e a r sら、Y e a s t 14巻: 783~790頁(1998年)を参照されたい。酵母または他の宿主細胞において用いるための他の適切な強力なプロモーターおよび弱いプロモーターは当技術分野で公知である。例えば、哺乳動物細胞において発現させるための強力なプロモーターは、C M Vプロモーターである。細菌において発現させるための例示的な強力なプロモーターは、r e c Aプロモーターである。細菌において発現させるための例示的な弱いプロモーターは、a r a B A Dプロモーターである。

10

#### 【0062】

いくつかの実施形態において、V P 2をコードするヌクレオチド配列は、所望の宿主細胞において発現させるのに適したプロモーターに作動可能に連結しており、V P 1をコードするヌクレオチド配列は、そのプロモーターの改変体、例えば、発現脱最適化(d e o p t i m i z e)された改変体などに作動可能に連結している。改変体プロモーターは、V P 1の発現をV P 2と比較して低下させる(例えば、可溶性のV P 1を可溶性のV P 2よりも低いアバンダンスで生成させる)ために、親プロモーターに対してさまざまな方式で修飾することができる。例えば、改変体プロモーターは、V P 1をコードする核酸の上流の転写エレメントの配列の変更、またはV P 1をコードする核酸の上流の転写エレメントの一部の欠失、例えば、V P 1をコードする核酸の上流の1または複数の転写開始部位の導入による、V P 1をコードする核酸の上流の1または複数の転写終止部位の導入による、またはそれらの任意の組み合わせによるT A T Aボックスまたは接合部位の全部または一部の変更または欠失などによって修飾することができる。これらのプロモーターの機能性部分は、当技術分野で周知であり、任意の所望のプロモーターにおいて容易に同定し、修飾することができる。組換え核酸は、所望に応じて、V P 1をコードする配列とV P 2をコードする配列が所望の宿主細胞内に同量存在する場合、V P 1が、所望の宿主細胞によって、V P 2よりも低いアバンダンスで生成されるように、他の調節エレメント、例えば、エンハンサー結合部位、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、誘導性プロモーター、抑制因子、RNAの安定性に影響を及ぼすエレメント、s i R N A、スプライス部位など、ならびにそれらの欠失および変更を含有してよい。

20

30

#### 【0063】

いくつかの実施形態において、組換え核酸は、A D H 2 / G A P D Hプロモーターに作動可能に連結している、V P 2をコードするヌクレオチド配列(図6、配列番号19)、およびA D H 2 / G A P D Hプロモーターの改変体に作動可能に連結している、V P 1をコードするヌクレオチド配列を含有し、それにより、V P 1の発現がV P 2と比較して減少する(例えば、可溶性のV P 1が可溶性のV P 2よりも低いアバンダンスで生成される)。本発明において用いるのに適した改変体A D H 2 / G A P D Hプロモーターの例としては、プロモーターの1または複数の部分(例えば、約1 n t ~ 約20 n tの部分)が天然のパルボウイルス配列の部分と交換されている改変体、例えば、「デルタA s」改変体など(図7、配列番号20)、T A T Aボックスの全部または一部が欠失または変化している改変体、例えば、T A T A欠失改変体など(図8、配列番号21)、1または複数の転写開始配列および/または転写終止配列を含有する改変体、例えば、1 S S改変体など(図9、配列番号22)、およびこれらの修飾の任意の組み合わせを含有するプロモータ

40

50

ーが挙げられる。他の実施形態において、VP2をコードするヌクレオチド配列を所望の宿主細胞において発現させるためにコドン最適化し、VP1をコードするヌクレオチド配列は所望の宿主細胞において発現させるためのコドン最適化をしない、または例えば、好ましいコドンではないコドンを用いることによって脱コドン最適化(codon deoptimization)する。

#### 【0064】

VP1およびVP2の発現を制御する発現制御エレメントは、任意の所望のVP1:VP2の発現比率(%:%)、例えば、約49:51、約40:60、約30:70、約25:75、約20:80、約15:85、約10:90、約9:91、約8:92、約7:93、約6:94、約5:95、約4:96、約3:97、約2:98、約1:99、約2:98~約20:80、約5:95~約20:80、約5:95~約15:85、または約7:93~約12:88などが生成するように選択してよい。発現比率は、可溶性のVP1:可溶性のVP2の比率であることが好ましい。

10

#### 【0065】

いかなる特定の理論にも束縛されることを望まないが、VP1の発現がVP2の発現に対して低くなることにより、VP1に媒介されるVP2の発現、集合および/または安定性の抑制が低下し、その結果、VP1およびVP2を含有するVLPのより効率的な生成およびより高い収率をもたらされると考えられている。

#### 【0066】

パルボウイルスタンパク質をコードする核酸は、任意の適切な方法を用いて構築することができ(例えば、化学合成によって、組換えDNA技術を用いて)、また、種々の形態をとってよい(例えば、一本鎖、二本鎖、ベクターなど)。組換え構築物を生成するための多くの適切な方法が当技術分野では周知であり、慣例的である。例えば、組換え核酸は、VP1タンパク質もしくはVP2タンパク質の部分をコードする配列を含む2以上のオリゴヌクレオチドから、または標準の分子生物学技法を用いてオリゴヌクレオチドをライゲーションして全長のVP1タンパク質もしくはVP2タンパク質をコードする配列を形成することによって生成することができる。例えば、米国特許第6,632,601号および米国特許第6,630,298号を参照されたい。核酸は、実質的に純粋な形態で調製されることが好ましい(すなわち、他の宿主細胞または非宿主細胞の核酸を実質的に含まない)。

20

30

#### 【0067】

目的のVP1タンパク質および/またはVP2タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、感染した個体由来の呼吸器分泌物または血液中に存在するウイルスRNAに由来するゲノムライブラリーから単離することができる。あるいは、パルボウイルスの核酸は、感染したヒトまたは他の哺乳動物から、または感染した個体から収集した呼吸器分泌物もしくは血液から単離することができる。PCRなどの増幅方法を使用して、パルボウイルスのゲノムRNAまたはパルボウイルスをコードするcDNAのいずれかからポリヌクレオチドを増幅することができる。あるいは、ポリヌクレオチドは、化学的に合成することができる。ヌクレオチド配列は、所望の特定のアミノ酸配列に対する適切なコドンを用いて設計することができる。合成構築物は、VP2タンパク質またはVP1/VP2タンパク質が生成される目的の宿主細胞において発現させるために最適化されたコドンを含むことが好ましい。目的のポリヌクレオチドの完全な配列は、標準の方法によって調製した重複しているオリゴヌクレオチドから組み立てることができる。例えば、Edge(1981年)Nature 292巻:756頁;Nambairら(1984年)Science 223巻:1299頁;Jayら(1984年)J. Biol. Chem. 259巻:6311頁;Stemmerら(1995年)Gene 164巻:49~53頁を参照されたい。ポリヌクレオチドは、RNAまたは一本鎖DNAもしくは二本鎖DNAであってよい。ポリヌクレオチドは、タンパク質および脂質などの他の成分がなく単離されることが好ましい。

40

#### 【0068】

50

あるいは、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を有するベクターから得ることができる、または、当技術分野で公知の種々のオリゴヌクレオチド合成技法、例えば、部位特異的変異誘発および適切な場合にはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技法などを用いて完全にまたは部分的に合成することができる。例えば、Sambrook、上記を参照されたい。具体的には、所望のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を得る1つの方法は、重複している合成オリゴヌクレオチドの相補的なセットをアニーリングし、次いで適切なDNAリガーゼを用いてライゲーションし、ライゲーションされたヌクレオチド配列をPCRによって増幅することによる。例えば、Jayaramanら（1991年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88巻：4084～4088頁を参照されたい。さらに、オリゴヌクレオチド特異的合成（oligonucleotide directed synthesis）（Jonesら（1986年）Nature 54巻：75～82頁）、既存のヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド特異的変異誘発（Riechmannら（1988年）Nature 332巻：323～327頁およびVerhoevenら（1988年）Science 239巻：1534～1536頁）、およびギャップ形成された（gapped）オリゴヌクレオチドの、T4 DNAポリメラーゼを用いた酵素的穴埋め（Queenら（1989年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86巻：10029～10033頁）を用いることができる。

10

## 【0069】

VP1タンパク質および/またはVP2タンパク質をコードする組換え構築物は、発現ベクターなどの適切なベクターにおいて、従来の方法を使用して調製することができる。好ましい組換え構築物、例えば、発現ベクターなどは、パルボウイルスVP1タンパク質をコードする核酸配列およびパルボウイルスVP2タンパク質をコードする核酸配列を含む。組換え構築物は、DNA、RNA、またはRNAとDNAの組み合わせの形態であってよく、また、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい。例えば、構築物は、プラスミド、直鎖DNAまたはRNA、mRNA、自己複製するRNA（例えば、アルファウイルススペースのレプリコン）などの形態であってよい。

20

## 【0070】

所望の宿主細胞において組換えタンパク質を発現させるためのいくつかの適切なベクターが当技術分野では周知であり、慣例的である。適切なベクターは、これらに限定されないが、以下の1または複数を含めたいくつもの成分を含有してよい：複製開始点；選択マーカー遺伝子；1もしくは複数の発現制御エレメント、例えば、転写性の制御エレメントなど（例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター）、および/または1もしくは複数の翻訳シグナル；ならびに選択された宿主細胞（例えば、哺乳動物起源の宿主細胞または異種哺乳動物もしくは非哺乳動物種由来の宿主細胞）の分泌経路にターゲティングするためのシグナル配列またはリーダー配列。例えば、昆虫細胞における発現のために、適切なバキュロウイルス発現ベクター、例えば、pFastBac（Invitrogen）などを使用して、組換えバキュロウイルス粒子を生成することができる。バキュロウイルス粒子を増幅し、昆虫細胞に感染させるために使用して、組換えタンパク質を発現させる。哺乳動物細胞における発現のために、所望の哺乳動物の宿主細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞）において構築物の発現を駆動するベクターを用いる。同様に、酵母における発現のために、所望の酵母宿主細胞（例えば、Saccharomyces cerevisiae、Candida albicans、Candida maltosa、Hansenula polymorpha、Kluyveromyces fragilis、Kluyveromyces lactis、Pichia guilliermondii、Pichia pastoris、Schizosaccharomyces pombeおよびYarrowia lipolytica）において発現を駆動するベクターを用いる。

30

40

## 【0071】

ウイルスベクターは、真核細胞において本発明のVLP、例えば、ワクシニアウイルス

50

およびトリポックスウイルスを含めたポックスファミリーのウイルスに由来するものなどのVLPを生成するために用いることができる。さらに、Tomeira、J. *Virology* (1993年) 67巻: 4017~4026頁およびSelbyら、J. *Gen. Virol.* (1993年) 74巻: 1103~1113頁に記載のワクシニアに基づく感染/トランスフェクション系も、本発明における用途がある。この系では、まず、細胞に、バクテリオファージのT7 RNAポリメラーゼをコードする組換えワクシニアウイルスを*in vitro*で感染させる。このポリメラーゼは、T7プロモーターを担持する鋳型のみを転写するという点で優れた特異性を示す。感染させた後に、細胞を、T7プロモーターによって駆動される目的のDNAを用いてトランスフェクトする。組換えワクシニアウイルス由来の細胞質において発現されたポリメラーゼにより、トランスフェクトされたDNAがRNAに転写され、次いでそれが、宿主の翻訳機構によりタンパク質に翻訳される。あるいは、「前駆体」系の場合と同様に、T7を精製タンパク質または酵素として加えることができる(StudierおよびMoffatt、J. *Mol. Biol.* (1986年) 189巻: 113~130頁)。この方法により、多量のRNAおよびその翻訳生成物(複数可)が、細胞質内で、高レベルで一過性に生成される。

10

20

30

40

50

#### 【0072】

組換え核酸は、パルボウイルスB19 VP1タンパク質をコードする第1の核酸配列およびパルボウイルスB19 VP2タンパク質をコードする第2の核酸配列を含んでよく、各核酸配列は、別々のプロモーターによって制御される。パルボウイルスB19のVP1タンパク質およびVP2タンパク質ならびにそれらのそれぞれの制御配列は、組換え核酸(例えば、プラスミド)において任意の所望の方向または順番で現れてよく、本明細書で使用される場合、言葉「第1の核酸」および「第2の核酸」によって限定されない。

#### 【0073】

組換え核酸は、パルボウイルスB19 VP1の発現を、パルボウイルスB19 VP2と比較して転写的におよび/または翻訳的に減少させる修飾を含むプラスミドであってよい。修飾は、TATAボックスの配列の全部または一部の欠失または変更、パルボウイルスB19 VP1をコードする核酸の上流の接合部位の配列の欠失または変更、パルボウイルスB19 VP1をコードする核酸の上流の1または複数の転写開始部位および/もしくは転写終止部位の導入、またはこれらの修飾の任意の組み合わせであってよい。例えば、修飾は、TATAボックスの一部の欠失およびパルボウイルスB19 VP1をコードする核酸の上流の接合部位の欠失であってよい、または修飾は、パルボウイルスB19 VP1をコードする核酸の上流の2つ以上の転写開始部位および/または転写終止部位の導入であってよい。

#### 【0074】

所望に応じて、組換え核酸は、検出可能なマーカーを含んでよいベクターであってよい。例えば、検出可能なマーカーは、1または複数の抗生物質に対する耐性を付与するポリペプチドであってよい。

#### 【0075】

##### B. 宿主細胞

本発明は、本明細書に記載の、パルボウイルスVP1およびパルボウイルスVP2をコードする組換え核酸分子を含有する組換え宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態において、VP1をコードするヌクレオチド配列およびVP2をコードするヌクレオチド配列、ならびにそれらのそれぞれの制御エレメントは、別々の核酸分子、例えば、別々のベクター上にある。これらの実施形態において、宿主細胞は、2つの異なる組換え核酸分子を含有する。宿主細胞は、実質的に等量の、VP1をコードするヌクレオチド配列とVP2をコードするヌクレオチド配列(例えば、実質的に等量の、2つの異なる組換え核酸)を含有することが好ましい。VP1をコードするヌクレオチド配列、VP2をコードするヌクレオチド配列、ならびにそれらのそれぞれの制御エレメントは、単一の核酸分子、例えば、パイシストロン性ベクターなどの成分であることがより好ましい。これらの実施形態において、宿主細胞は、複数のコピーで存在し得る単一の組換え核酸分子を含有する。

## 【0076】

組換え宿主細胞は、本明細書に記載の核酸分子の任意のものを含むものでよい。適切な宿主細胞としては、例えば、酵母細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、*Candida maltosa*、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces fragilis*、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia guilliermondii*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe*および*Yarrowia lipolytica*）、昆虫細胞（例えば、*Aedes aegypti*、*Autographa californica*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda*、および*Trichoplusia ni*）、哺乳動物細胞（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、およびげっ歯類（例えば、ハムスター）、トリの細胞（例えば、ニワトリ、アヒル、およびガチョウ、細菌（例えば、*E. coli*、*Bacillus subtilis*、および*Streptococcus*種）、テトラヒメナの細胞（例えば、*Tetrahymena thermophila*）またはそれらの組み合わせが挙げられる。適切な酵母株としては、例えば、*S. cerevisiae*のAD2株、JSC310株、AD3株およびAD4株が挙げられる。

10

## 【0077】

多くの適切な昆虫細胞および哺乳動物細胞が当技術分野で周知である。適切な昆虫細胞としては、例えば、Sf9細胞、Sf21細胞、Tn5細胞、シュナイダーS2細胞、およびHigh Five細胞（親の*Trichoplusia ni* BTI-TN-5 B1-4細胞株（Invitrogen）から得たクローン単離株）が挙げられる。適切な哺乳動物細胞としては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児性腎臓細胞（HEK293細胞、典型的に、せん断されたアデノウイルス5型DNAにより形質転換される）、NIH-3T3細胞、293-T細胞、Vero細胞、HeLa細胞、PERC.6細胞（EACC寄託番号96022940）、Hep G2細胞、MRC-5（ATCC CCL-171）、WI-38（ATCC CCL-75）、アカゲザル胎仔肺細胞（ATCC CL-160）、メイディン・ダービー・ウシ腎臓（「MDBK」）細胞、メイディン・ダービー・イヌ腎臓（「MDCK」）細胞（例えば、MDCK（NBL2）、ATCC CCL34；またはMDCK 33016、DSM ACC 2219）、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、例えば、BHK21-F、HKCC細胞などが挙げられる。適切なトリの細胞としては、例えば、ニワトリ胚性幹細胞（例えば、EBx（登録商標）細胞）、ニワトリ胚線維芽細胞、ニワトリ胚性生殖細胞、アヒルの細胞（例えば、AGE1.CR細胞株およびAGE1.CR.pIX細胞株（ProBioGen）、例えば、*Vaccine* 27巻：4975～4982頁（2009年）およびWO2005/042728に記載されている）、EB66細胞などが挙げられる。

20

30

## 【0078】

適切な昆虫細胞発現系、例えば、バキュロウイルス系などは、当業者に公知であり、例えば、SummersおよびSmith、*Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555*（1987年）に記載されている。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料および方法は、とりわけ、Invitrogen、San Diego CAからキットの形態で市販されている。トリ細胞発現系も当業者に公知であり、例えば、米国特許第5,340,740号；同第5,656,479号；同第5,830,510号；同第6,114,168号；および同第6,500,668号；欧州特許EP0787180B；欧州特許出願EP03291813.8；WO03/043415；およびWO03/076601に記載されている。同様に、酵母、細菌および哺乳動物細胞の発現系も当技術分野で公知であり、例えば、*Genetic Engineering*（Barrら編、1989年）But

40

50

terworths、Londonに記載されている。

【0079】

C. ウイルス様粒子 (VLP) の生成

本発明は、VP1およびVP2を含有するパルボウイルス・VLPを生成するためのプロセスを提供する。VLPは、任意の所望のパルボウイルス由来のVP1およびVP2、または任意の所望の組み合わせを含有してよい。本明細書に記載の通り、VP1タンパク質およびVP2タンパク質は、天然に存在するパルボウイルスのVP1またはVP2と同じ、または実質的に同じアミノ酸配列を有してよい、あるいは、1もしくは複数のアミノ酸の置換、欠失または付加を含有してよい。例えば、VP1を変異させて、そのホスホリパーゼ活性を不活化することができる。例えば、VP1のアミノ酸配列は、点変異（例えば、His153Ala）、またはWO06/032697、EP 1791858もしくはUS20070286870に記載の任意の変異を含有してよい。VP1およびVP2を含有するVLPは、ヒトに感染するパルボウイルス、すなわち、デPENDウイルス属、エリスロウイルス属、またはボカウイルス属のパルボウイルス由来であることが好ましい。VLPは、パルボウイルスB19 VP1およびパルボウイルスB19 VP2を含有することが最も好ましい。プロセスは、VP1およびVP2を生成する宿主細胞を、本明細書に記載の通り、組換え核酸にコードされるVP1タンパク質およびVP2タンパク質が生成され、VP1およびVP2を含有するVLPに集合させる条件下で維持するステップを含む。本発明の方法では、VP1は、宿主細胞により、VP2に対して低いアバンドランスで生成される。可溶性のVP1が可溶性のVP2よりも低いアバンドランスで生成されることが好ましい。場合によって、プロセスは、VLPを培養培地から、細胞溶解物もしくはホモジネートから、またはそれらの任意の組み合わせから単離または精製するステップをさらに含む。

10

20

【0080】

一部の態様では、方法は、VP1タンパク質およびVP2タンパク質をコードする組換え核酸を含有する宿主細胞を、VP1およびVP2が発現され、VP1およびVP2が自己集合してVLPを形成するのに適した条件下で培養するステップを含む。VLPの形成に適した条件は周知であり、当業者が容易に決定することができる。例えば、酵母細胞 (*Saccharomyces cerevisiae*) および昆虫細胞 (SF9) におけるウイルス粒子の生成について記載している米国特許第7,527,801号、および、HEK293T細胞におけるVLPの生成について記載しているTaube, S.ら、*Archives of Virology*、150巻:1425~1431頁(2005年)を参照されたい。所望に応じて、方法は、パルボウイルス・VLPを、培養培地、細胞（例えば、細胞溶解物またはホモジネートから）またはそれらの組み合わせから単離または精製するステップをさらに含んでよい。一部の好ましい実施形態において、VLPを生成するために用いる宿主細胞は、酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、またはそれらの組み合わせであり、宿主細胞は、VP2と比較して少ないVP1を生成する。

30

【0081】

本明細書に記載の通り、宿主細胞は、VP1およびVP2をコードする核酸に作動可能に連結している個々の制御エレメントに起因して、ならびに/またはVP1およびVP2をコードする組換え核酸の他の特徴、例えば、最適化されたコドンの使用および脱最適化 (deoptimize) されたコドンの使用などに起因して、VP1をVP2と比較して低いアバンドランスで生成する（例えば、可溶性のVP1を可溶性のVP2よりも低いアバンドランスで生成する）。そのような制御エレメント（例えば、プロモーター）および特徴（例えば、コドンの使用）により、VP1およびVP2の相対的な生成を制御することが可能になる。VP1をVP2よりも低いアバンドランスで生成することを可能にする任意の適切な宿主細胞をこの方法において用いることができる。例えば、酵母細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、*Candida maltosa*、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces fragilis*、*Kluyveromyces lact*

40

50

is、*Pichia guillierimondii*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe*および*Yarrowia lipolytica*）、昆虫細胞（例えば、*Aedes aegypti*、*Autographa californica*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda*、および*Trichoplusia ni*）、哺乳動物細胞（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、およびげっ歯類（例えば、ハムスター）、トリの細胞（例えば、ニワトリ、アヒル、およびガチョウ）、細菌（例えば、*E. coli*、*Bacillus subtilis*、および*Streptococcus*種）、テトラヒメナの細胞（例えば、*Tetrahymena thermophila*）またはそれらの組み合わせを用いることができる。小規模培養条件および大規模培養条件を含めた、そのような宿主細胞を維持して組換え核酸の発現を可能にするための適切な方法は当技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、酵母細胞、哺乳動物細胞または昆虫細胞である。より詳細な実施形態において、宿主細胞は、*S. cerevisiae*のAD2株、JSC310株、AD3株、AD4株またはそれらの組み合わせなどの酵母細胞である。

10

#### 【0082】

いくつかの実施形態において、提供される宿主細胞は、VP1をコードする組換え核酸分子およびVP2をコードする組換え核酸分子の2つの異なる組換え核酸分子を含有する。他の実施形態において、提供される宿主細胞は、VP1をコードする配列、VP2をコードする配列、およびそれらのそれぞれの制御エレメントを含む単一の組換え核酸分子（複数のコピーで存在してよい）を含有する。例えば、これらの実施形態において、組換え核酸は、VP1をコードするヌクレオチド配列が第1の制御配列に作動可能に連結しており、VP2をコードするヌクレオチド配列が第2の制御配列に作動可能に連結しているバイシストロン性ベクターであってよい。例えば、VP2をコードするヌクレオチド配列は、強力なプロモーターに作動可能に連結してよく、VP1をコードするヌクレオチド配列は、弱いプロモーターに作動可能に連結してよい。酵母において発現させるための例示的な強力なプロモーターは、pBS24.1に組み込まれたADH2/GAPDHプロモーターである（図1）。酵母において発現させるための例示的な弱いプロモーターは、YPTI構成的活性プロモーターである。Searsら、*Yeast* 14巻：783～790頁（1998年）を参照されたい。酵母または他の宿主細胞において用いるための他の適切な強力なプロモーターおよび弱いプロモーターは当技術分野で公知である。使用するプロモーターは、VP1の発現とVP2の発現を独立して調節することを可能にする任意のプロモーターであってよい。

20

30

#### 【0083】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、VP2をコードするヌクレオチド配列が、所望の宿主細胞において発現させるのに適したプロモーターに作動可能に連結しており、VP1をコードするヌクレオチド配列が、そのプロモーターの改変体、例えば、発現最適化（*deoptimize*）された改変体などに作動可能に連結している組換え核酸を含有する。改変体プロモーターは、VP1の発現をVP2と比較して低下させる（例えば、可溶性のVP1を可溶性のVP2よりも低いアバダンスで生成する）ために、さまざまな方式で親プロモーターに対して修飾することができる。例えば、改変体プロモーターは、VP1をコードする核酸の上流の転写エレメントの一部の欠失、例えば、TATAボックス、接合部位の全部または一部の配列の欠失または変更などによって、VP1をコードする核酸の上流の1または複数の転写開始部位の導入によって、VP1をコードする核酸の上流の1または複数の転写終止部位の導入によって、それらの任意の組み合わせによって修飾することができる。これらのプロモーターの機能性部分は当技術分野で周知であり、任意の所望のプロモーターにおいて容易に同定し、修飾することができる。組換え核酸は、所望に応じて、VP1をコードする配列とVP2をコードする配列が所望の宿主細胞内に同量存在する場合、VP1が、所望の宿主細胞によって、VP2よりも低いアバン

40

50

ダンスで生成されるように、他の調節エレメント、例えば、エンハンサー結合部位、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位など、ならびにそれらの欠失および変更を含有してよい。

#### 【0084】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、ADH2 / GAPDHプロモーターに作動可能に連結している、VP2をコードするヌクレオチド配列（図6、配列番号19）、およびADH2 / GAPDHプロモーターの改変体に作動可能に連結している、VP1をコードするヌクレオチド配列を含有する組換え核酸を含み、それにより、VP1の発現がVP2と比較して減少する。本発明において用いるのに適した改変体ADH2 / GAPDHプロモーターの例としては、プロモーターの1または複数の部分（例えば、約1塩基～約20塩基の部分）が天然のバルボウイルス配列の部分と交換されている改変体、例えば、「デルタAs」改変体など（図7、配列番号20）、TATAボックスの全部または一部が欠失または変化している改変体、例えば、TATA欠失改変体など（図8、配列番号21）、1または複数の転写開始配列および/または転写終止配列を含有する改変体、例えば、1SS改変体など（図9、配列番号22）、およびこれらの修飾の任意の組み合わせを含有するプロモーターが挙げられる。他の実施形態において、宿主細胞は、所望の宿主細胞において発現させるためにコドン最適化された、VP2をコードするヌクレオチド配列、および所望の宿主細胞において発現させるためにコドン最適化されていない、または例えば、好ましいコドンではないコドンを用いることによって脱コドン最適化（codon deoptimize）された、VP1をコードするヌクレオチド配列を含有する組換え核酸を含む。

10

20

#### 【0085】

提供される宿主細胞は、VP1およびVP2の発現を制御する発現制御エレメントが、任意の所望のVP1：VP2の発現比率が生成するように選択された組換え核酸を含有してよい。例えば、宿主細胞は、VP1およびVP2を、VP1：VP2の発現比率（%：%）約49：51、約40：60、約30：70、約25：75、約20：80、約15：85、約10：90、約9：91、約8：92、約7：93、約6：94、約5：95、約4：96、約3：97、約2：98、約1：99、約2：98～約20：80、約5：95～約20：80、約5：95～約15：85、または約7：93～約12：88で生成してよい。発現比率は、可溶性のVP1：可溶性のVP2の比率であることが好ましい。

30

#### 【0086】

方法の特定の実施形態において、宿主細胞は、VP1およびVP2、好ましくはバルボウイルスB19 VP1およびバルボウイルスB19 VP2をコードする発現ベクターを含む。例えば、発現ベクターは、VP2をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している調節エレメント、およびVP1をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している、その調節エレメントの改変体を含むプラスミドであってよい。改変体調節エレメントにより、VP1の発現がVP2と比較して転写的に、翻訳的に、または転写的かつ翻訳的に減少する。改変体調節エレメントは、例えば、TATAボックス配列の一部の変更または欠失、VP1遺伝子上流の接合部位の一部の欠失、またはそれらの組み合わせを有してよい。改変体調節エレメントは、その代わりに、またはそれに加えて、1または複数の、VP1コード配列の上流の転写開始部位/転写終止部位の導入を含有してよい。そのような改変体調節エレメント、および本明細書に記載のその他の改変体調節エレメントにより、効率的なVP1 / VP2・VLPの生成が可能になる。改変体調節エレメントが、VP1をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している場合、改変体調節エレメントは、本明細書に記載の特定の修飾の任意の1または複数、任意の所望の組み合わせで含有してよい（例えば、TATAボックスの配列の全部または一部の欠失または変更、Aリッチ接合領域の全部または一部の欠失または変更、VP1コード配列の上流の1または複数の転写開始部位および/または転写終止部位の導入、およびそれらの任意の組み合わせ）。例えば、VP1をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している

40

50

改変体調節エレメントは、i) T A T A ボックスの配列の全部または一部の欠失または変更、および A リッチ接合領域の全部または一部の欠失または変更；ii) T A T A ボックスの配列の全部または一部の欠失または変更、および 1 または複数の、V P 1 コード配列の上流の転写開始部位および / または転写終止部位の導入；または iii) A リッチ接合領域の全部または一部の欠失または変更、および 1 または複数の、V P 1 コード配列の上流の転写開始部位および / または転写終止部位の導入を含んでよい。

【0087】

一部の態様では、方法は、V L P を、宿主細胞の培養培地（例えば、馴化培地）、宿主細胞（例えば、細胞溶解物、細胞ホモジネート）またはそれらの組み合わせから単離または精製するステップをさらに含む。V L P は、宿主細胞の培養培地、すなわち、馴化培養培地から直接単離または精製することが好ましい。しかし、所望に応じて、例えば遠心分離によって宿主細胞を回収することができ、任意の適切な方法を用いて宿主細胞のホモジネートまたは溶解物を形成することができ、そのホモジネートまたは溶解物から V L P を単離することができる。細胞を溶解しても、V L P を実質的にインタクトなままに保つために用いることができる適切な化学的方法、物理的方法または機械的方法は当技術分野で公知であり、例えば、Protein Purification Applications: A Practical Approach、(E. L. V. Harris および S. Angal 編、1990年)に記載されている。

10

【0088】

V L P は、培養培地または宿主細胞、例えば、細胞溶解物またはホモジネートから、任意の適切な方法を用いて単離することができる。V L P の完全性を維持する適切な方法、例えば、密度勾配遠心分離、例えば、スクロース勾配、PEG 沈殿、ペレット形成など（例えば、Kirnbauerら、J. Virol. (1993年) 67巻: 6929 ~ 6936 頁を参照されたい）、ならびにクロマトグラフィー、例えば、イオン交換クロマトグラフおよびゲルろ過クロマトグラフを含めた標準の精製技法を用いることができる。スクロースクッションまたはスクロース勾配での遠心分離は、V L P を、V P 1 および V P 2 の単量体またはオリゴマーから、および他の細胞成分から単離するための都合のよい方法である。これらの方法は、単独で、連続的に、またはより大きな精製スキームに組み込んで用いることができる。例えば、スクロースクッションまたはスクロース勾配で精製された V L P は、その後、所望に応じて、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ろ過の技法または任意の他の適切な方法を用いてさらに精製することができる。

20

30

【0089】

一実施形態において、本発明は、パルボウイルス・V L P を宿主細胞から単離する方法であって、宿主細胞の溶解物またはホモジネートを調製するステップと；任意の適切な方法を用いて宿主細胞の溶解物またはホモジネートから前記 V L P を分離するステップと；前記 V L P をさらに精製するステップとを含む方法を提供する。本発明のこの態様による V L P の精製は、例えば、スクロース勾配によって精製することを含んでよい。

【0090】

本発明は、さらに、本明細書に記載の方法を用いて作製した V L P を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、V P 1 タンパク質および V P 2 タンパク質をコードする組換え核酸を含有する宿主細胞を、V P 1 および V P 2 が発現され、V P 1 および V P 2 が自己集合して V L P を形成するのに適した条件下で培養するステップを含む。所望に応じて、方法は、V L P を、宿主細胞の培養培地（例えば、馴化培地）、宿主細胞（例えば、細胞溶解物、細胞ホモジネート）またはそれらの組み合わせから単離または精製するステップをさらに含んでよい。

40

【0091】

D. 免疫原性組成物

本発明は、本明細書に記載の方法によって生成される V P 1 および V P 2 を含有するパルボウイルス・V L P を含む免疫原性組成物、および本明細書に記載のパルボウイルスの

50

V P 1 および V P 2 をコードする組換え核酸を含有する免疫原性組成物も提供する。

【0092】

免疫原性組成物は、単一の型の V L P、または2種以上の異なる V L P、および所望に応じて1または複数の追加的な抗原の混合物を含んでよい。抗原は、例えば、予防的な（すなわち、感染を予防するための）免疫原性組成物または治療的な（感染を処置するための）免疫原性組成物中で、個別に、または組み合わせて投与することができる。免疫原性組成物は、所望の効果を実現するために、2回以上与えてよい（例えば、「初回刺激（prime）」投与、その後の1または複数の「追加刺激（boost）」）。同じ組成物を、1または複数の初回刺激ステップおよび1または複数の追加刺激ステップで投与してよい。あるいは、初回刺激および追加刺激のために異なる組成物を用いてよい。例えば、核酸組成物を初回刺激のために投与してよく、V L P 組成物を追加刺激のために追加してよい、またはその逆もまた同様である。

10

【0093】

パルボウイルスの V P 1 および V P 2 をコードする組換え核酸を含有する免疫原性組成物において、組換え核酸は、本明細書に記載の任意の組換え核酸、例えば、直鎖 D N A または R N A、プラスミド D N A、m R N A、自己複製する R N A などであってよい。所望に応じて、核酸は、ヌクレアーゼ分解に対する安定性および/または抵抗性を改善するために1または複数の修飾塩基を含有してよい。所望に応じて、免疫原性核酸は、細胞による核酸の取り込みを容易にするため、および/またはヌクレアーゼ分解を低下させるために、1または複数の成分、例えば、カチオン性の微小粒子またはナノ粒子、カチオン性脂質なども含んでよい。

20

【0094】

免疫原性組成物は、一般に、1または複数の「薬学的に許容される賦形剤またはビヒクル」、例えば、水、生理食塩水、グリセロール、エタノールなどを、単独で、または組み合わせて含む。免疫原性組成物は、典型的に、上記の成分に加えて、1または複数の「薬学的に許容されるキャリア」を含む。これらとしては、それ自体は、組成物を受容する個体に有害な抗体の生成を誘導しない任意のキャリアが挙げられる。適切なキャリアは、典型的に、大型の、ゆっくりと代謝される高分子、例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、アミノ酸ポリマー、アミノ酸共重合体、および脂質凝集体（例えば、油滴またはリポソームなど）などである。そのようなキャリアは、当業者に周知である。さらに、補助的な物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などが存在してよい。薬学的に許容される成分の徹底的な考察は、Gennaro（2000年）Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 第20版、ISBN: 0683306472において入手可能である。

30

【0095】

薬学的に許容される塩、例えば、無機塩類、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、または硫酸塩など、ならびに有機酸の塩、例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、または安息香酸塩なども、本発明の免疫原性組成物において用いることができる。

【0096】

所望に応じて、抗原は、リポソームおよび粒子キャリア、例えば、ポリ(D, L-ラクチドco-グリコリド)(PLG)の微小粒子またはナノ粒子などに吸着させる、その中に閉じ込める、またはその他の方法でそれと結びつけることができる。抗原は、免疫原性を増強するために、キャリアタンパク質に結合体化することができる。Ramsayら（2001年）Lancet 357巻（9251号）：195～196頁；Lindberg（1999年）Vaccine 17 Suppl 2巻：S28～36頁；Buttery & Moxon（2000年）J R Coll Physicians Lond 34巻：163～168頁；Ahmad & Chapnick（1999年）Infect Dis Clin North Am 13巻：113～133頁、vi i；Goldblatt（1998年）J. Med. Microbiol. 47巻：563～567頁；欧州特許第0477508号；米国特許第5,306,492；W

40

50

O 9 8 / 4 2 7 2 1 ; C o n j u g a t e V a c c i n e s ( C r u s e r 編 ) I S B N 3 8 0 5 5 4 9 3 2 6、特に10巻：48～114頁；H e r m a n s o n ( 1 9 9 6 年 ) B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s I S B N : 0 1 2 3 4 2 3 3 6 8 または 0 1 2 3 4 2 3 3 5 X を参照されたい。

【0097】

本発明の免疫原性組成物は、他の免疫調節剤と併せて投与することができる。例えば、本発明の免疫原性組成物は、アジュバントを含んでよい。好ましいアジュバントとしては、これらに限定されないが、下記のアジュバントの以下の1または複数の型が挙げられる。本発明の免疫原性組成物は、投与する前にアジュバントと予め混合することもできる。

【0098】

一実施形態において、免疫原性組成物は、パルボウイルスB19・VLP（例えば、1ml当たりタンパク質0.05μg、0.5μg、5μg）およびMF59C.1アジュバントを含み、最終的な体積の50%がMF59C.1アジュバントである。特定の実施形態において、免疫原性組成物は、0.8mg/mlのパルボウイルスB19・VLPおよびアジュバントとしてMF59C.1を、最終的な体積1:1で含む。

【0099】

ミョウバン

一実施形態において、本発明において用いるためのアジュバントは、ミョウバン（硫酸アルミニウムカリウム（ $AlK(SO_4)_2$ ））、またはミョウバン誘導体、例えば、リン酸緩衝液中の抗原をミョウバンと混合し、次いで、水酸化アンモニウムまたは水酸化ナトリウムなどの塩基を用いて滴定し、沈殿させることによって*in-situ*で形成されるミョウバン誘導体などである。

【0100】

レチノイン酸

一実施形態において、本発明において用いるためのアジュバントは、ビタミンAの酸化形態であり、部分的なビタミンA機能のみを持つレチノイン酸である。

【0101】

MF59C.1

一実施形態において、本発明において用いるためのアジュバントは、クエン酸緩衝液中の水中油エマルジョン（スクアレン）であるMF59C.1である。MF59C.1は、有効なアジュバントであり、パルボウイルスB19に対する高い力価の中和性抗体の生成を増強することが示されている（Ballouら、JID、187巻：675～678頁（2003年））。

【0102】

鉱質を含有する組成物

本発明においてアジュバントとして用いるのに適した、鉱質を含有する組成物としては、無機塩、例えば、アルミニウム塩およびカルシウム塩などが挙げられる。本発明は、無機塩、例えば、水酸化物（例えば、オキシ水酸化物）、リン酸塩（例えば、ヒドロキシリン酸塩、オルトリン酸塩）、硫酸塩などを包含する[例えば、Vaccine Design... (1995年) Powell & Newman編 ISBN: 030644867X、Plenumの第8章および9章を参照されたい]、または、任意の適切な形態（例えば、ゲル、結晶、非晶質など）を取り、吸着が好ましい化合物と、異なる鉱質化合物との混合物を包含する。鉱質を含有する組成物は、金属塩の粒子として処方することもできる。

【0103】

「水酸化アルミニウム」として公知のアジュバントは、典型的にはオキシ水酸化アルミニウム塩であり、これは、通常、少なくとも部分的に結晶である。式 $AlO(OH)$ で表すことができるオキシ水酸化アルミニウムは、水酸化アルミニウム $Al(OH)_3$ のようなその他のアルミニウム化合物から、赤外（IR）分光法により、特に $1070\text{ cm}^{-1}$ での吸収バンドおよび $3090\sim 3100\text{ cm}^{-1}$ での強いショルダーの存在により区別

10

20

30

40

50

できる [ Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum. の第9章 ]。水酸化アルミニウムアジュバントの結晶化度は、半分の高さでの回折バンドの幅 (width of the diffraction band at half height) (WHH) により反映され、結晶性が乏しい粒子は、より小さい晶子サイズのために、より大きな線の広がりを示す。表面積は、WHHが増加するにつれて増加し、より高いWHHの値を有するアジュバントは、抗原吸着のための能力がより大きいことが観察されている。繊維状の形態 (例えば透過型電子顕微鏡写真で観察されるような) は、水酸化アルミニウムアジュバントに典型的である。水酸化アルミニウムアジュバントのpIは、典型的に約11であり、すなわちアジュバント自体は生理的pHにて正の表面電荷を有する。pH7.4にてAl<sup>+++</sup>1mgあたり1.8~2.6mgのタンパク質の吸着能力が、水酸化アルミニウムアジュバントについて報告されている。

10

## 【0104】

「リン酸アルミニウム」として公知のアジュバントは、典型的には、少量の硫酸塩も頻繁に含有しているヒドロキシリン酸アルミニウムである (すなわち、アルミニウムヒドロキシホスフェートサルフェート (aluminium hydroxyphosphate sulfate))。これらは、沈殿により得ることができ、沈殿の間の反応条件および濃度は、塩中のヒドロキシルのホスフェートによる置換の程度に影響する。ヒドロキシリン酸塩は、通常、PO<sub>4</sub>/Alモル比が0.3~1.2である。ヒドロキシリン酸塩は、ヒドロキシル基の存在により厳密なAlPO<sub>4</sub>から区別できる。例えば、3164cm<sup>-1</sup> (例えば200に加熱時)でのIRスペクトルのバンドは、構造上のヒドロキシルの存在を示す [ Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum. の第9章 ]。

20

## 【0105】

リン酸アルミニウムアジュバントのPO<sub>4</sub>/Al<sup>3+</sup>モル比は、通常、0.3~1.2、好ましくは0.8~1.2、より好ましくは0.95±0.1である。リン酸アルミニウムは、特にヒドロキシリン酸塩について、一般的に、非晶質である。典型的なアジュバントは、0.84~0.92のPO<sub>4</sub>/Alモル比を有する非晶質ヒドロキシリン酸アルミニウムであり、0.6mg Al<sup>3+</sup>/mlで含まれる。リン酸アルミニウムは、一般的に、粒子状である (例えば透過型電子顕微鏡写真で観察されるような板状の形態)。この粒子の典型的な直径は、任意の抗原を吸着した後に0.5~20μm (例えば約5~10μm)の範囲である。pH7.4にてAl<sup>+++</sup>1mgあたり0.7~1.5mgタンパク質の吸着能力が、リン酸アルミニウムアジュバントについて報告されている。

30

## 【0106】

リン酸アルミニウムのゼロ電荷点 (PZC) は、ヒドロキシルのホスフェートによる置換の程度と反比例し、この置換の程度は、沈殿により塩を調製するために用いる反応条件および反応物の濃度に依存して変動できる。PZCは、溶液中の遊離ホスフェートイオンの濃度を变化させること (より多いホスフェート=より酸性側のPZC)、またはヒスチジン緩衝剤のような緩衝剤を加えること (PZCをより塩基性にする) によっても変更される。本発明に従って用いられるリン酸アルミニウムは、通常、4.0~7.0、より好ましくは5.0~6.5、例えば約5.7のPZCを有する。

40

## 【0107】

本発明の組成物を調製するために用いるアルミニウム塩の懸濁物は、緩衝液 (例えば、リン酸緩衝液またはヒスチジン緩衝液またはトリス緩衝液) を含有してよいが、これは必ずしも必要ではない。懸濁物は、滅菌されており、発熱物質を含まないことが好ましい。懸濁物は、例えば、1.0mMから20mMの間、好ましくは5mMから15mMの間、より好ましくは約10mMの濃度で存在する遊離の水性ホスフェートイオンを含むことができる。懸濁物は、塩化ナトリウムも含んでよい。

## 【0108】

50

一実施形態において、アジュバント成分としては、水酸化アルミニウムとリン酸アルミニウムの両方の混合物が挙げられる。この場合、リン酸アルミニウムが水酸化アルミニウムよりも多く、例えば、少なくとも2:1、例えば、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1などの重量比で存在してよい。

#### 【0109】

患者に投与するための組成物中の $Al^{+++}$ の濃度は、10mg/ml未満、例えば、5mg/ml、4mg/ml、3mg/ml、2mg/ml、1mg/mlなどであることが好ましい。好ましい範囲は、0.3mg/mlから1mg/mlの間である。最大0.85mg/用量が好ましい。

#### 【0110】

##### 油エマルジョン

本発明においてアジュバントとして用いるのに適した油エマルジョン組成物としては、MF59などのスクアレン-水エマルジョン[Vaccine Design... (1995年) Powell & Newman編、ISBN: 030644867X、Plenumの第10章](マイクロフルダイザーを用いてサブミクロンの粒子に処方した5%スクアレン、0.5%Tween 80、および0.5%Span 85)が挙げられる。完全フロイントアジュバント(CFA)および不完全フロイントアジュバント(IFA)も用いることができる。

#### 【0111】

種々の適切な水中油エマルジョンが公知であり、それらは、代表的には、少なくとも1種の油および少なくとも1種の界面活性剤を含み、油(複数可)および界面活性剤(複数可)は、生分解性(代謝可能)かつ生体適合性である。エマルジョン中の油滴は、一般的には、直径5 $\mu$ m未満であり、有利には、上記エマルジョンは、理想的にはサブミクロンの直径の油滴を有し、これらの小さいサイズは、マイクロフルダイザーを用いて安定なエマルジョンを得ることにより達成される。220nm未満のサイズの液滴は、フィルタ滅菌に供することができるので好ましい。

#### 【0112】

本発明は、動物(例えば魚類)または植物の供給源からのもののような油とともに使用することができる。植物油の供給源は、堅果、種子および穀粒を含む。ピーナツ油、大豆油、ヤシ油およびオリーブ油が、最も一般的に入手可能な堅果油の例である。例えばホホバ豆から得られるホホバ油を用いることができる。種子油は、紅花油、綿実油、ひまわり種子油、ごま種子油などを含む。穀粒の群において、コーン油が最も容易に入手可能であるが、コムギ、オートムギ、ライムギ、イネ、テフ、ライコムギなどのようなその他の穀類の穀粒の油も用いてよい。グリセロールおよび1,2-プロパンジオールの6~10炭素脂肪酸エステルは、種子油中に天然に存在しないが、堅果油および種子油から出発する適切な材料の加水分解、分離およびエステル化により調製し得る。哺乳動物の乳からの脂肪および油は代謝可能であり、よって本発明の実施において用いてよい。動物の供給源から純粋な油を得るために必要な分離、精製、けん化およびその他の手段の手順は、当該技術において周知である。ほとんどの魚類は、容易に回収し得る代謝可能な油を含有する。例えば、タラ肝油、サメ肝油および鯨ろうのような鯨油は、本明細書において用い得る魚油のいくつかの例である。いくつかの分岐鎖油が、5炭素イソブレンユニットで生化学的に合成され、一般的に、テルペノイドとよばれる。サメ肝油は、スクアレン、2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエンとして公知の分岐不飽和テルペノイドを含有する。他の好ましい油は、トコフェロールである(下記参照のこと)。スクアレンを含む水中油エマルジョンが特に好ましい。油の混合物を用いることができる。

#### 【0113】

界面活性剤は、それらの「HLB」(親水性/親油性比)により分類できる。本発明の好ましい界面活性剤は、少なくとも10、好ましくは少なくとも15、そしてより好ましくは少なくとも16のHLBを有する。本発明は、それらに限定されないが、ポリオキシ

10

20

30

40

50

エチレンソルビタンエステル界面活性剤（一般的にTweeenとよばれる）、特にポリソルベート20およびポリソルベート80；線状EO/POブロックコポリマーのようなDOWFAX（商標）の商標の下で販売されるエチレンオキシド（EO）、プロピレンオキシド（PO）および/またはブチレンオキシド（BO）のコポリマー；反復エトキシ（オキシ-1,2-エタンジイル）基の数変動し得るオクトキシノール、特にオクトキシノール-9（Triton X-100またはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）が興味深い；（オクチルフェノキシ）ポリエトキシエタノール（IGEPAL CA-630/NP-40）；ホスファチジルコリン（レシチン）のようなリン脂質；トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（Brij 30）のようなラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコールに由来するポリオキシエチレン脂肪エーテル（Brij 10界面活性剤として公知である）；ならびにソルビタントリオレート（Span 85）およびソルビタンモノラウレートのようなソルビタンエステル（一般的にSPANとして公知である）を含む界面活性剤を用いることができる。エマルジョンに含むために好ましい界面活性剤は、Tweeen 80（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート）、Span 85（ソルビタントリオレート）、レシチンおよびTriton X-100である。上記したように、Tweeen 80のような洗浄剤は、以下の実施例にみられる熱安定性に寄与し得る。

#### 【0114】

界面活性剤の混合物、例えばTweeen 80 / Span 85混合物を用いることができる。ポリオキシエチレンソルビタンエステル（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート（Tweeen 80））およびオクトキシノール（例えば、t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（Triton X-100））の組み合わせも適切である。別の有用な組み合わせは、ラウレス9とポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび/またはオクトキシノールとを含む。

#### 【0115】

界面活性剤の好ましい量（重量%）は、ポリオキシエチレンソルビタンエステル（例えばTweeen 80）0.01~1%、特に約0.1%；オクチル-またはノニルフェノキシポリオキシエタノール（例えばTriton X-100またはTritonシリーズのその他の洗浄剤）0.001~0.1%、特に0.005~0.02%；ポリオキシエチレンエーテル（例えばラウレス9）0.1~20%、好ましくは、0.1~10%、特に0.1~1%または約0.5%である。

#### 【0116】

本発明で有用な具体的な水中油型エマルジョンアジュバントは、以下のものを含むが、それらに限定されない：

- ・スクアレンとTweeen 80とSpan 85とのサブミクロンのエマルジョン。エマルジョンの体積での組成は、約5%スクアレン、約0.5%ポリソルベート80および約0.5%Span 85であり得る。重量の点において、これらの比率は、4.3%スクアレン、0.5%ポリソルベート80および0.48%Span 85になる。このアジュバントは、「MF59」として公知である。MF59エマルジョンは、有利には、シトレートイオン、例えば10mMクエン酸ナトリウム緩衝液を含む。

#### 【0117】

- ・スクアレンとトコフェロールとポリソルベート80とを含むエマルジョン。これらのエマルジョンは、2~10%スクアレン、2~10%トコフェロールおよび0.3~3%Tweeen 80を有してよく、スクアレン：トコフェロールの重量比は、より安定なエマルジョンを提供するので、好ましくは1（例えば、0.90）である。スクアレンとTweeen 80とは、約5：2の体積比または約11：5の重量比で存在してよい。あるこのようなエマルジョンは、Tweeen 80をPBS中に溶解して2%溶液を得て、次いで90mlのこの溶液を、（5gのDL-トコフェロールおよび5mlスクアレン）の混合物と混合し、次いで混合物を微小流動化する（microfluidise）ことにより作製できる。得られるエマルジョンは、100~250nm、好ましくは約180

10

20

30

40

50

nmの平均直径のサブミクロンの油滴を有し得る。

【0118】

・スクアレンとトコフェロールとTriton洗浄剤（例えばTriton X - 100）とのエマルジョン。エマルジョンは、3d-MPL（下記参照のこと）も含んでよい。エマルジョンは、リン酸緩衝液を含有してよい。

【0119】

・ポリソルベート（例えばポリソルベート80）とTriton洗浄剤（例えばTriton X - 100）とトコフェロール（例えば - トコフェロールスクシネート）を含むエマルジョン。エマルジョンは、これらの3成分を、約75 : 11 : 10の質量比で含んでよく（例えば750 μg/ml ポリソルベート80、110 μg/ml Triton X - 100および100 μg/ml - トコフェロールスクシネート）、これらの濃度は、抗原からのこれらの成分のいずれの寄与も含むべきである。エマルジョンは、スクアレンも含んでよい。エマルジョンは、3d-MPL（下記参照のこと）も含んでよい。水相は、リン酸緩衝液を含有してよい。

10

【0120】

・スクワランとポリソルベート80とポロキサマー401（「Pluronic（商標）L121」）とのエマルジョン。エマルジョンは、リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4中で処方できる。このエマルジョンは、ムラミルジペプチドについての有用な送達ビヒクルであり、スレオニル-MDPとともに「SAF-1」アジュバント中で用いられている（0.05~1% Thr-MDP、5%スクワラン、2.5%Pluronic L121および0.2%ポリソルベート80）。これは、「AF」アジュバントにおけるように、Thr-MDPなしで用いることもできる（5%スクワラン、1.25%Pluronic L121および0.2%ポリソルベート80）。微小流動化が好ましい。

20

【0121】

・スクアレンと水性溶媒とポリオキシエチレンアルキルエーテル親水性非イオン性界面活性剤（例えばポリオキシエチレン（12）セトステアリルエーテル）と疎水性非イオン性界面活性剤（例えばソルビタンモノオレートまたは「Span 80」のようなソルビタンエステルまたはマンニドエステル）を含むエマルジョン。エマルジョンは、好ましくは、熱可逆性であり、かつ/または少なくとも90%の油滴（体積による）が200nm未満のサイズである。エマルジョンは、アルジトール、凍結保護剤（例えばドデシルマルトシドおよび/またはスクロースのような糖）、および/またはアルキルポリグリコシドの1または複数も含んでよい。このようなエマルジョンは、凍結乾燥してよい。

30

【0122】

・0.5~50%の油と、0.1~10%のリン脂質と、0.05~5%の非イオン性界面活性剤とを含むエマルジョン。好ましいリン脂質成分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリンおよびカルジオリピンである。サブミクロンの液滴サイズが有利である。

【0123】

・非代謝性油（例えば軽鉱油（light mineral oil））と少なくとも1種の界面活性剤（例えばレシチン、Tween 80またはSpan 80）とのサブミクロンの水中油型エマルジョン。Quil Aサポニン、コレステロール、サポニン親油性物質結合体（例えば脂肪族アミンをデスアシルサポニンに、グルクロン酸のカルボキシル基を介して付加することにより生成される、GPI-0100）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（dimethyldioctadecyl ammonium）プロミドおよび/またはN,N-ジオクタデシル-N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）プロパンジアミンのような添加物を含んでよい。

40

【0124】

・鉱油と、非イオン性親油性エトキシ化脂肪アルコールと、非イオン性親水性界面活性剤（例えばエトキシ化脂肪アルコールおよび/またはポリオキシエチレン-ポリオキシブ

50

ロピレンブロックコポリマー)とを含むエマルジョン(WO2006/113373を参照のこと)。

【0125】

・鉱油と、非イオン性親水性エトキシ化脂肪アルコールと、非イオン性親油性界面活性剤(例えばエトキシ化脂肪アルコールおよび/またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリマー)とを含むエマルジョン(WO2006/113373を参照のこと)。

【0126】

・サポニン(例えばQuilAまたはQS21)とステロール(例えばコレステロール)とが、らせん状ミセルとして会合しているエマルジョン。

10

【0127】

組成物中の抗原(VLP)およびアジュバントは、典型的に、患者に送達される時には、混和物中にあるであろう。エマルジョンは、抗原(VLP)と、製造中に混合することができる、または、送達時に即席で混合することができる。よって、アジュバントおよび抗原(VLP)は、使用時に最終的な処方物にすぐ準備できる、包装または分配されたワクチン中に別々に保持することができる。抗原(VLP)は、一般に、最終的に2つの液体を混合することによってワクチンを調製するために、水性の形態であろう。混合するための2つの液体の体積比は、変動してよいが(例えば、5:1と1:5の間)、一般に約1:1である。

【0128】

サポニン処方物(Vaccine Design... (1995年) Powell & Newman編、ISBN: 030644867X、Plenumの第22章を参照されたい)

20

サポニン処方物も、本発明においてアジュバントとして用いることができる。サポニンは、広範囲の植物種の樹皮、葉、茎、根、さらには花において見いだされるステロール配糖体およびトリテルペノイド配糖体の不均一な群である。Quillaria saponaria Molinaの木の樹皮由来のサポニンがアジュバントとして広く研究されている。サポニンは、Smilax ornata(サルサパリラ(sarsapilla))、Gypsophylla paniculata(ブライダルベール(bridal veil))、およびSaponaria officianalis(ソープルート(soap root))から商業的に取得可能である。サポニンアジュバント処方物としては、QS21などの精製された処方物、ならびにISCOMなどの脂質処方物が挙げられる。QS21は、Stimulon(商標)として販売されている。

30

【0129】

サポニン組成物は、HPLCおよびRP-HPLCを用いて精製されてきた。これらの技法を用いて特異的に精製された画分が同定されており、それらとしては、QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-BおよびQH-Cが挙げられる。サポニンはQS21であることが好ましい。QS21の生成方法は、米国特許第5,057,540号に開示されている。サポニン処方物は、コレステロールなどのステロールも含んでよい。

40

【0130】

サポニンとコレステロールの組み合わせを使用して、免疫賦活性複合体(ISCOM)と呼ばれる独特の粒子を形成することができる(Vaccine Design... (1995年) Powell & Newman編、ISBN: 030644867X、Plenumの第23章)。ISCOMは、典型的には、リン脂質、例えば、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンなども含む。任意の公知のサポニンをISCOMに用いることができる。ISCOMはQuilA、QHAおよびQHCの1または複数を含むことが好ましい。ISCOMは、WO96/33739にさらに記載されている。場合によって、ISCOMは、追加的な洗浄剤を欠いてよい。

【0131】

50

### ピロソームおよびウイルス様粒子

ピロソームおよびウイルス様粒子（VLP）も、本発明においてアジュバントとして用いることができる。これらの構造は、一般に、場合によってリン脂質と組み合わされる、またはリン脂質と一緒に処方される、ウイルス由来の1または複数のタンパク質を含有する。これらは、一般に、非病原性、非複製的であり、概して、いかなる天然のウイルスのゲノムも含有しない。ウイルスタンパク質を、組換え生成することができる、またはウイルス全体から単離することができる。ピロソームまたはVLPにおいて用いるのに適したこれらのウイルスタンパク質としては、インフルエンザウイルス（例えば、HAまたはNAなど）、B型肝炎ウイルス（例えば、コアタンパク質またはカプシドタンパク質など）、E型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、シンドビスウイルス、ロタウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、ノーウォークウイルス、ヒトパピローマウイルス、HIV、RNA-ファージ、Q-ファージ（例えば、コートタンパク質など）、GA-ファージ、fr-ファージ、AP205ファージ、およびTy（例えば、レトロトランスポゾンTyタンパク質p1など）に由来するタンパク質が挙げられる。

#### 【0132】

##### 細菌誘導体または微生物誘導体

本発明において用いるのに適したアジュバントは、細菌誘導体または微生物誘導体、例えば、腸内細菌のリポ多糖（LPS）の無毒性の誘導体など、リポD誘導体、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびADP-リボシル化毒素およびその解毒された誘導体を包含する。

#### 【0133】

LPSの無毒性の誘導体としては、モノホスホリルリポD（MPL）および3-O-脱アシル化MPL（3dMPL）が挙げられる。3dMPLは、4、5または6のアシル化された鎖を有する3脱O-アシル化モノホスホリルリポDの混合物である。好ましい3脱O-アシル化モノホスホリルリポDの「小粒子」形態は、EP-A-0689454に開示されている。そのような3dMPLの「小粒子」は、0.22μmの膜を通して滅菌ろ過するのに十分小さい（EP-A-0689454）。他の無毒性のLPS誘導体としては、モノホスホリルリポD模倣体（mimic）、例えば、RC-529などのアミノアルキルグルコサミニドホスフェート誘導体などが挙げられる。

#### 【0134】

リポD誘導体としては、Escherichia coli由来のリポDの誘導体、例えば、OM-174などが挙げられる。OM-174は、例えば、Meraldiら（2003年）Vaccine 21巻：2485～2491頁およびPajakら（2003年）Vaccine 21巻：836～842頁に記載されている。

#### 【0135】

本発明においてアジュバントとして用いるのに適した免疫賦活性オリゴヌクレオチドとしては、CpGモチーフを含有するヌクレオチド配列（リン酸結合によってグアノシンと連結した、メチル化されていないシトシンを含有するジヌクレオチド配列）が挙げられる。パリンδροーム配列またはポリ（dG）配列を含有する二本鎖RNAおよびオリゴヌクレオチドも、免疫賦活性であることが示されている。

#### 【0136】

CpGは、ヌクレオチドの修飾/類似体、例えば、ホスホロチオエート修飾などを含んでよく、また、二本鎖または一本鎖であってよい。参考文献であるKandimallaら（2003年）Nucleic Acids Research 31巻：2393～2400頁；WO02/26757、およびWO99/62923は、可能性のある類似体の置換、例えば、グアノシンの、2'-デオキシ-7-デアザグアノシンとの交換を開示している。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は、Krieg（2003年）Nature Medicine 9巻：831～835頁；McCluskieら（2002年）FEMS Immunology and Medical Microbiology 32巻：179～185頁；WO98/40100；US6,207,6

10

20

30

40

50

46 ; US 6 , 239 , 116 ; および US 6 , 429 , 199 においてさらに考察されている。

【0137】

CpG配列(例えば、GTCGTTモチーフまたはTTCTGTTモチーフなど)は、TLR9に向けられ得る(Kandimallara(2003年)Biochemical Society Transactions 31巻(第3部):654~658頁)。CpG配列は、例えば、CpG-A ODNなど、Th1免疫応答の誘導に特異的であってよい、または、例えば、CpG-B ODNなどB細胞応答誘導により特異的であってよい。CpG-A ODNおよびCpG-B ODNは、Blackwellら(2003年)J Immunol 170巻:4061~4068頁;Krieg(2002年)Trends Immunol 23巻:64~65頁およびWO01/95935において考察されている。CpGは、CpG-A ODNであることが好ましい。

10

【0138】

CpGオリゴヌクレオチドは、受容体を認識するために5'末端を利用できるように構築することが好ましい。場合によって、2つのCpGオリゴヌクレオチド配列を、それらの3'末端に付着させて、「イムノマー(immunomer)」を形成することができる。例えば、Kandimallara(2003年)Biochemical Society Transactions 31巻(第3部):654~658頁およびKandimallara(2003年)BBRC 306巻:948~953頁;Bhagatara(2003年)BBRC 300巻:853~861頁およびWO03/035836を参照されたい。

20

【0139】

免疫賦活性オリゴヌクレオチドに基づく特に有用なアジュバントは、IC-31(商標)として公知である(Schellackら(2006年)Vaccine 24巻:5461~72頁)。よって、本発明で用いるアジュバントは、(i)少なくとも1つの(好ましくは複数の)CpIモチーフ(すなわち、イノシンと連結してジヌクレオチドを形成しているシトシン)を含めたオリゴヌクレオチド(例えば、15~40ヌクレオチド)と(ii)少なくとも1つの(好ましくは複数の)Lys-Arg-Lysトリペプチド配列(複数可)を含めたオリゴペプチド(例えば、5~20アミノ酸)などのポリカチオンポリマーの混合物を含んでよい。オリゴヌクレオチドは、26merの配列5'-(IC)<sub>13</sub>-3'(配列番号1)を含むデオキシヌクレオチドであってよい。ポリカチオンポリマーは、11-merのアミノ酸配列K L K L L L L L K L K(配列番号2)を含むペプチドであってよい。

30

【0140】

細菌ADP-リボシル化毒素およびその解毒された誘導体を、本発明においてアジュバントとして用いることができる。タンパク質は、E.coli(E.coli熱不安定性エンテロトキシン「LT」)、コレラ(「CT」)、または百日咳(「PT」)に由来することが好ましい。解毒されたADP-リボシル化毒素の、粘膜アジュバントとしての使用は、WO95/17211に記載されており、非経口的なアジュバントとしての使用は、WO98/42375に記載されている。毒素または類毒素は、AサブユニットおよびBサブユニットの両方を含むホロ毒素の形態であることが好ましい。Aサブユニットは、解毒性変異を含有することが好ましく;Bサブユニットは変異していないことが好ましい。アジュバントは、解毒されたLT変異体、例えば、LT-K63、LT-R72、およびLT-G192などであることが好ましい。ADP-リボシル化毒素およびその解毒された誘導体、特にLT-K63およびLT-R72の、アジュバントとしての使用は、Beignonら(2002年)Infect Immun 70巻:3012~3019頁;Pizzara(2001年)Vaccine 19巻:2534~2541頁;Pizzara(2000年)Int J Med Microbiol 290巻:455~461頁;Scharton-Kerstenら(2000年)Infect Immun 68巻:5306~5313頁;Ryanら(1999年)Infect Immun

40

50

n 67巻：6270～6280頁；Partidosら（1999年）Immunol Lett 67巻：209～216頁；Peppoloniら（2003年）Expert Rev Vaccines 2巻：285～293頁；Pineら（2002年）J Control Release 85巻：263～270頁およびTebbeyら（2000年）Vaccine 18巻：2723～34頁に見いだすことができる。有用なCT変異体はCT-E29Hである。アミノ酸置換についての数値での参照は、その全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれるDomenighiniら（1995年）Mol Microbiol 15巻：1165～1167頁に記載のADP-リボシル化毒素のAサブユニットとBサブユニットのアラインメントに基づくことが好ましい。

10

## 【0141】

## ヒト免疫調節物質

本発明においてアジュバントとして用いるのに適したヒト免疫調節物質としては、サイトカイン、例えば、インターロイキンなど（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12など）（WO99/40936およびWO99/44636）、インターフェロン（例えば、インターフェロン- $\alpha$ ）、マクロファージコロニー刺激因子、および腫瘍壊死因子が挙げられる。好ましい免疫調節物質はIL-12である。

## 【0142】

生体接着剤（bioadhesive）および粘膜接着剤（mucoadhesive）

20

生体接着剤および粘膜接着剤も、本発明においてアジュバントとして用いることができる。適切な生体接着剤としては、エステル化されたヒアルロン酸マイクロスフェア（Singhら）（2001年）J Cont Release 70巻：267～276頁）、または粘膜接着剤、例えば、ポリ（アクリル酸）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖およびカルボキシメチルセルロースの架橋した誘導体などが挙げられる。キトサンおよびその誘導体も、本発明においてアジュバントとして用いることができる（WO99/27960）。

## 【0143】

## 微小粒子

30

微小粒子も、本発明においてアジュバントとして用いることができる。ポリ（ラクチド-co-グリコリド）を用いて、生分解性かつ無毒性の材料（例えば、ポリ（ $\epsilon$ -ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ酸無水物、ポリカプロラクトンなど）から形成された微小粒子（すなわち、直径約100nm～約150 $\mu$ m、より好ましくは直径約200nm～約30 $\mu$ m、最も好ましくは直径約500nm～約10 $\mu$ mの粒子）が好ましく、場合によって、それを、負に荷電した表面を有するように処理する（例えば、SDSを用いて）または正に荷電した表面を有するように処理する（例えば、CTABなどの陽イオン洗浄剤を用いて）。

## 【0144】

リボソーム（Vaccine Design...（1995年）Powell & Newman編、ISBN：030644867X、Plenumの第13章および14章）

40

アジュバントとして用いるのに適したリボソーム処方物の例は、US6,090,406、US5,916,588およびEP A0626169に記載されている。

## 【0145】

## ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル処方物

本発明において用いるのに適したアジュバントは、ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル（WO99/52549）を包含する。そのような処方物としては、さらに、オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（WO01/21207）ならびに少なくとも1つの追加的な非イオン性界

50

面活性剤、例えば、オクトキシノールなどと組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはエステル界面活性剤 (WO 01/21152) が挙げられる。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群から選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル (ラウレス9)、ポリオキシエチレン-9-ステオリル (steoryl) エーテル、ポリオキシエチレン (polyoxyethylene) -8-ステオリル (steoryl) エーテル、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。

【0146】

ポリホスファゼン (PCPP)

PCPP処方物は、例えば、Andrianovら (1998年) Biomaterials 19巻：109~115頁およびPayneら (1998年) Adv Drug Delivery Review 31巻：185~196頁に記載されている

10

ムラミルペプチド

本発明においてアジュバントとして用いるのに適したムラミルペプチドの例としては、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル (normuramyl) -L-アラニル-D-イソグルタミン (nor-MDP)、およびN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミンMTP-PE) が挙げられる。

【0147】

20

イミダゾキノロン (Imidazoquinolone) 化合物

本発明においてアジュバントとして用いるのに適したイミダゾキノロン化合物の例としては、イミキモド (Imiquamod) およびその同族化合物 (例えば、「レシキモド (Resiquimod) 3M」) が挙げられ、Stanley (2002年) Clin Exp Dermatol 27巻：571~577頁およびJones (2003年) Curr Opin Investig Drugs 4巻：214~218頁においてさらに記載されている。

【0148】

本発明は、上記のアジュバントの1または複数の態様の組み合わせも含んでよい。例えば、以下のアジュバント組成物を本発明において用いることができる：(1) サポニンおよび水中油エマルジョン (WO 99/11241)；(2) サポニン (例えば、QS 21) + 無毒性のLPS誘導體 (例えば、3dMPL) (WO 94/00153)；(3) サポニン (例えば、QS 21) + 無毒性のLPS誘導體 (例えば、3dMPL) + コレステロール；(4) サポニン (例えば、QS 21) + 3dMPL + IL-12 (場合によって、+ステロール) (WO 98/57659)；(5) 3dMPLと、例えば、QS 21および/または水中油エマルジョンの組み合わせ (欧州特許出願第0835318号、同第0735898号および同第0761231号)；(6) サブミクロンのエマルジョンに微小流動化 (microfluidize) した、またはボルテックスしてより大きな粒子サイズのエマルジョンを生じさせた、10%スクアラン、0.4% Tween 80 (商標)、5% プルロニック-ブロックポリマー-L121、および thr-MDP を含有する SAF；(7) 2% スクアレン、0.2% Tween 80、ならびに、モノホスホリルリピドA (MPL)、トレハロースジミコレート (TDM)、および細胞壁の骨格 (CWS)、好ましくはMPL + CWS (Detox (商標)) からなる群からの1または複数の細菌の細胞壁成分を含有するRibi (商標) アジュバント系 (RAS)、(Ribi Immunochem)；および(8) 1または複数の無機塩類 (例えば、アルミニウム塩など) + LPSの無毒性の誘導體 (例えば、3dMPLなど)。

30

40

【0149】

免疫賦活剤としての機能を果たす他の物質は、Vaccine Design . . . (1995年) Powell & Newman 編 ISBN：030644867X. Plenumの第7章に開示されている。水酸化アルミニウムおよび/またはリン酸ア

50

ルミニウムアジュバントの使用は、特に小児において有用であり、一般に、抗原はこれらの塩に吸着される。水中スクアレンエマルジョンも、特に高齢者において好ましい。有用なアジュバントの組み合わせとしては、Th1アジュバントとTh2アジュバントの組み合わせ、例えば、CpGとミョウバンの組み合わせ、またはレシキモド(Resiquimod)とミョウバンの組み合わせなどが挙げられる。リン酸アルミニウムと3dMPLの組み合わせを用いてもよい。

#### 【0150】

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に記載のVP1およびVP2を含有するパルボウイルス・VLP、およびMF59などのアジュバントを含有する免疫原性組成物である。VLPとアジュバント(例えば、MF59)は、予め混合し、単一の組成物として提供することができる、または、投与する前に混合するための別々の成分として提供することができる。

10

#### 【0151】

##### E. 投与

本発明の組成物は、一般に、患者に直接投与されるであろう。直接的な送達は、例えば、シリンジおよび皮下針を用いた非経口的な注射(例えば、皮下に、腹腔内に、静脈内に、筋肉内に、もしくは組織の間質腔(interstitial space)へ)、または粘膜を通じて、例えば、直腸投与、経口投与(例えば、錠剤、噴霧)、腔への投与、局所投与、経皮(transdermal)投与(例えば、WO99/27961を参照されたい)または経皮(transcutaneous)投与(例えば、WO02/074244およびWO02/064162を参照されたい)、鼻腔内投与(例えば、WO03/028760を参照されたい)、眼への投与、耳への投与、肺への投与または他の粘膜投与などによって実現することができる。免疫原性組成物も、皮膚の表面に直接移すことによって局所的に投与してもよい。局所投与は、いかなるデバイスも利用することなく、または包帯または包帯様デバイスを利用して裸の皮膚を免疫原性組成物と接触させることによって実現することができる(例えば、米国特許第6,348,450号を参照されたい)。

20

#### 【0152】

投与形式は、非経口的な免疫化、粘膜免疫化、または粘膜免疫化と非経口的な免疫化の組み合わせであることが好ましい。投与形式は、1~3週間離した合計1~2回のワクチン接種での非経口的な免疫化、粘膜免疫化、または粘膜免疫化と非経口的な免疫化の組み合わせであることがさらに好ましい。投与経路は、これらに限定されないが、経口的な送達、筋肉内の送達および経口的な送達および筋肉内の送達の組み合わせを含むことが好ましい。特に好ましい投与形式は、例えば、シリンジおよび皮下針を用いた筋肉内注射によるものである。免疫原性組成物は、2用量で筋肉内に投与することが好ましい。

30

#### 【0153】

本発明の組成物は、常套的な小児期免疫化と、または青年期の女性に送達されるヒトパピローマウイルスおよび/もしくはB群連鎖球菌(group B strep)ワクチン接種と同時に投与することができる。

#### 【0154】

粘膜病原体由来の抗原、例えば、Helicobacter pylori抗原などに対する粘膜免疫応答および全身免疫応答は、粘膜に初回刺激し、その後全身的に追加刺激する免疫化により増強し得ることがすでに実証されている(Vajdyら(2003年) Immunology 110巻:86~94頁)。いくつかの実施形態において、パルボウイルスによる感染を処置または予防するための方法は、それを必要とする被験体に、1または複数のパルボウイルス抗原を含む第1の免疫原性組成物を、粘膜に投与し、次いで、1または複数のパルボウイルス抗原を含む第2の免疫原性組成物を治療有効量で非経口的に投与することを含む。

40

#### 【0155】

免疫原性組成物は、全身免疫および/または粘膜免疫を惹起するため、好ましくは増強

50

された全身免疫および/または粘膜免疫を惹起するために用いることができる。

【0156】

免疫応答は、血清IgG免疫応答および/または腸のIgA免疫応答の誘導を特徴とすることが好ましい。

【0157】

上記の通り、初回刺激-追加刺激方法は、1または複数の遺伝子送達ベクターおよび/またはポリペプチド抗原を「初回刺激」ステップで送達し、その後、1または複数の第2の遺伝子送達ベクターおよび/またはポリペプチド抗原を「追加刺激」ステップで送達する場合に用いることが好ましい。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の1または複数の遺伝子送達ベクターまたはポリペプチド抗原を用いた初回刺激および追加刺激の後に、1または複数のポリペプチドを含有する組成物（例えば、パルボウイルス抗原を含むポリペプチド）をさらに追加刺激する。VLPは、ポリペプチドを含有する組成物である。VLPは、適切な遺伝子送達ベクターで免疫化した宿主において形成することができる。

10

【0158】

共投与を伴う任意の方法では、種々の組成物を任意の順序で送達することができる。よって、複数の異なる組成物または分子を送達することを含む複数の実施形態において、核酸の全てがポリペプチドの前に送達される必要はない。例えば、初回刺激ステップは、1または複数のポリペプチドを送達することを含んでよく、追加刺激は、1もしくは複数の核酸および/または1もしくは複数のポリペプチドを送達することを含む。複数のポリペプチドを投与した後に、複数の核酸の投与を行うことができる、またはポリペプチドおよび核酸の投与を任意の順序で実施することができる。よって、本明細書に記載の遺伝子送達ベクターの1または複数、および本明細書に記載のポリペプチドの1または複数、任意の順序で任意の投与経路によって共投与することができる。よって、本明細書に記載のポリヌクレオチドとポリペプチドの任意の組み合わせを使用して、免疫反応を惹起することができる。

20

【0159】

(i) 投薬レジメン

投薬処置は、単回用量スケジュールまたは多回用量スケジュールに従ってもよい。多回用量は、一次免疫化スケジュールおよび/または追加免疫化スケジュールで用いることができる。多回用量スケジュールにおいて、様々な用量を、同じまたは異なる経路、例えば非経口的な初回刺激および粘膜での追加刺激、粘膜での初回刺激および非経口的な追加刺激などにより与えてよい。例えば、多回用量スケジュールは、初回刺激、その後の2回の追加刺激を含んでよい。初回刺激用量および/または追加刺激用量は、アジュバントと共投与することが好ましいであろう。

30

【0160】

投薬レジメンにより、抗体応答のアビディティが増強され、中和特性を持つ抗体がもたらされることが好ましい。in-vitro中和アッセイを用いて、中和性抗体について検査することができる（例えば、Asanakaら(2005年) J of Virology 102巻: 10327頁; Wobusら(2004年) PLOS Biology 2巻(12号); e432頁; およびDubektiら(2002年) J Medical Virology 66巻: 400頁を参照されたい)。

40

【0161】

血清抗体レベルとパルボウイルスによって引き起こされる疾患からの防御との相関が強力な場合がある。

【0162】

上記のパルボウイルス・VLPを、哺乳動物、例えば、マウス、ヒヒ、チンパンジー、またはヒトなどに投与して、パルボウイルスに特異的なT細胞をin-vivoで活性化することができる。投与は、針またはシリンジを用いた注射を含めた非経口注射、鼻腔内注射、筋肉内注射または皮下注射を含めた当技術分野で公知の任意の手段によるものでよ

50

い。

【0163】

パルボウイルス・VLPを含む本発明の組成物は、使用される特定の組成物と適合する様式で、かつ免疫応答（例えば、T細胞応答および/または体液性応答）、好ましくは防御免疫応答を誘導するために有効な量で投与する。

【0164】

パルボウイルスに特異的なT細胞応答は、とりわけ、51Cr放出アッセイ、リンパ球増殖アッセイによって、またはIFN- $\gamma$ を細胞内染色することによって測定することができる。タンパク質は、パルボウイルスに感染していない哺乳動物に投与することができる、または、パルボウイルスに感染している哺乳動物に投与することができる。組成物中のタンパク質の詳細な投与量は、これらに限定されないが、組成物を投与する哺乳動物の種、年齢、および全身状態、ならびに組成物の投与形式を含めた多くの因子に左右されるであろう。本発明の組成物の有効量は、常套的な実験のみを用いて容易に決定することができる。適切な用量を同定するために*in vitro*モデルおよび*in vivo*モデルを用いることができる。一般に、0.5mg、0.75mg、1.0mg、1.5mg、2.0mg、2.5mg、5mg、10mg、20mgまたは50mgのパルボウイルスポリペプチドまたはVLPを、大型の哺乳動物、例えば、ヒヒ、チンパンジー、またはヒトなどに投与するであろう。所望に応じて、共起刺激分子またはアジュバントも、組成物の前、その後、またはそれと一緒に提供することができる。

10

【0165】

本発明の組成物を送達することによって生じる、パルボウイルスに特異的なT細胞の活性化を含めた哺乳動物の免疫応答は、投与量、投与経路、または追加刺激レジメンを変動させることによって増強することができる。本発明の組成物は、単回投与スケジュール、または、好ましくは、ワクチン接種の一次過程が1~10の別個の用量を含み、その後、その後の免疫応答を維持し、かつ/または強化するために必要な時間間隔で他の用量を与え、例えば、1~4カ月で第2の用量を与え、必要に応じて、その後、数か月後に1または複数の用量を与える多回用量スケジュールで与えてよい。

20

【0166】

F. 免疫応答の効力を決定するための試験

治療的な処置の効力を評価する1つの方式は、本発明の組成物を投与した後に、感染をモニターすることを伴う。予防的処置の効力を評価する1つの方式は、組成物を投与した後に、本発明の組成物中の抗原に対する免疫応答をモニターすることを伴う。

30

【0167】

本発明の免疫原性組成物のタンパク質成分の免疫原性を評価する別の方式は、タンパク質を組換えによって発現させること、および患者の血清または粘膜からの分泌物を免疫ブロットによってスクリーニングすることである。タンパク質と患者の血清の間の陽性の反応は、患者が以前問題のタンパク質に対する免疫応答を展開したことがあること、すなわち、タンパク質が免疫原であることを示す。この方法は、免疫優性のタンパク質および/またはエピトープを同定するためにも用いることができる。

【0168】

治療的な処置の効力を調査する別の方式は、本発明の組成物を投与した後に、感染をモニターすることを伴う。予防的処置の効力を調査する1つの方式は、組成物を投与した後に、本発明の組成物中の抗原に対する全身免疫応答をモニターすること（例えば、IgG1生成レベルおよびIgG2a生成レベルをモニターすることなど）および/または粘膜免疫応答をモニターすること（例えば、IgA生成レベルをモニターすることなど）を伴う。典型的に、血清特異的な抗体応答は、免疫化した後、攻撃する前に決定されるが、一方、粘膜特異的な抗体応答は、免疫化し、攻撃した後に決定される。

40

【0169】

現在、本発明のヒトパルボウイルス（例えば、パルボウイルスB19）免疫原性組成物によって誘導される防御免疫を評価するための、承認された動物モデルはない。しかし、

50

そのような組成物の免疫応答を誘導する能力は、本明細書に記載の通り、適切な動物において評価することができる。本発明の、他の、ヒトパルボウイルスではない免疫原性組成物は、宿主、例えば、ヒトへの投与に先立って、*in vitro*動物モデルおよび*in vivo*動物モデルにおいて評価することができる。特に有用なマウスモデルとしては、腹腔内免疫化の後に、腹腔内攻撃または鼻腔内攻撃のいずれかを行うモデルが挙げられる。

【0170】

本発明の免疫原性組成物の効力は、*in vivo*において、感染の動物モデル、例えば、モルモットまたはマウスまたはアカゲザルに、免疫原性組成物を用いて攻撃することによって決定することもできる。免疫原性組成物は、攻撃用株と同じ株に由来してもしなくてもよい。免疫原性組成物は、攻撃用株と同じ株から導き出せることが好ましい。

10

【0171】

免疫応答は、TH1免疫応答およびTH2応答の一方または両方であってよい。免疫応答は、改善された、または増強された、または変化した免疫応答であってよい。免疫応答は、全身免疫応答および粘膜免疫応答の一方または両方であってよい。免疫応答は、増強された全身応答および/または粘膜応答であることが好ましい。

【0172】

増強された全身免疫および/または粘膜免疫は、増強されたTH1免疫応答および/またはTH2免疫応答に反映される。免疫応答の増強は、IgG1および/またはIgG2aおよび/またはIgAの生成の増加を含むことが好ましい。粘膜免疫応答は、TH2免疫応答であることが好ましい。粘膜免疫応答は、IgAの生成の増加を含むことが好ましい。

20

【0173】

活性化されたTH2細胞は、抗体生成を増強し、よって、細胞外の感染に対する応答において価値がある。活性化されたTH2細胞は、IL-4、IL-5、IL-6、およびIL-10の1または複数を分泌し得る。TH2免疫応答により、将来の防御のためにIgG1、IgE、IgAおよび記憶B細胞が生成され得る。

【0174】

TH2免疫応答は、TH2免疫応答に関連するサイトカイン（例えば、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10など）の1または複数の増加、またはIgG1、IgE、IgAおよび記憶B細胞の生成の増加のうち1または複数を含んでよい。増強されたTH2免疫応答は、IgG1生成の増加を含むようになることが好ましい。

30

【0175】

TH1免疫応答は、CTLの増加、TH1免疫応答に関連するサイトカイン（例えば、IL-2、IFN、およびTNFなど）の1または複数の増加、活性化されたマクロファージの増加、NK活性の増加、またはIgG2aの生成の増加のうち1または複数を含んでよい。増強されたTH1免疫応答は、IgG2a生成の増加を含むようになることが好ましい。

【0176】

本発明の免疫原性組成物、具体的には、本発明の1または複数の抗原を含む免疫原性組成物は、単独で、または他の抗原と組み合わせて、場合によってTh1応答および/またはTh2応答を惹起することができる免疫調節剤と一緒に用いることができる。

40

【0177】

免疫応答は、抗体媒介性免疫機構であってよい。抗体は、血清抗体、より好ましくは、中和性血清抗体であることが好ましい。本発明の免疫原性組成物は、主に、抗体力価（例えば、全抗体および/または中和性抗体）を、任意の適切な方法、例えば、パルボウイルスVP1および/またはVP2に対する免疫応答性を評価するためのウエスタンブロットまたはELISAなどを用いて評価することにより試験することができる（Wongら、*J. of Virology*、82巻（5号）：2470～2476頁（2008年）；Bosticら、*J. Infectious Disease*、179巻：619～

50

626頁(1999年)。

【0178】

本発明の免疫原性組成物は、感染に有効に対処するために、細胞媒介免疫応答ならびに体液免疫応答の両方を惹起するようになることが好ましい。この免疫応答により、1または複数の感染性抗原に曝露させると直ちに応答し得る、長く持続する(例えば、中和性)抗体媒介免疫および細胞媒介免疫が誘導されることが好ましいであろう。例として、患者の血液試料中の中和性抗体の形跡は、それらの形成が、パルボウイルス感染においてウイルスを排除するために決定的に重要であるので、防御についての代理のパラメータとみなされる(YoungおよびBrown、NEJM 350巻:586~97頁、2004年を参照されたい)。

10

【0179】

本発明は、1または複数の免疫調節剤、例えば、アルミニウム塩などの無機塩など、およびCpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチドを含む免疫原性組成物も含む。免疫原性組成物は、アルミニウム塩とCpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチドの両方を含むことが最も好ましい。あるいは、免疫原性組成物は、ADPリボシル化毒素、例えば、解毒されたADPリボシル化毒素など、およびCpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチドを含む。1または複数の免疫調節剤はアジュバントを含むことが好ましい。アジュバントは、上でさらに説明されているTH1アジュバントおよびTH2アジュバントからなる群の1または複数から選択することができる。

20

【0180】

G. 医薬品としての免疫原性組成物の使用

本発明は、医薬品として使用するための本発明の組成物も提供する。医薬品は、哺乳動物における免疫応答を生じさせることができること(すなわち、免疫原性組成物である)が好ましく、ワクチンであることがより好ましい。本発明は、哺乳動物における免疫応答を上昇させるための医薬品の製造における本発明の組成物の使用も提供する。医薬品は、ワクチンであることが好ましい。ワクチンを使用して、小児における伝染性紅斑、赤血球悪液質の患者における一過性の骨髄無形成クリーゼ、通常鎌状赤血球貧血、溶血性貧血または遺伝性球状赤血球症、慢性赤血球形成不全および免疫不全の患者における貧血、免疫抑制された個体における持続感染、成人における持続性の関節症、免疫無防備状態の患者における持続性の、時には致死的な血球減少症、マラリア原虫に同時感染している間の貧血の悪化、マラリアにおける貧血の悪化および妊娠中の女性における胎児水腫または自然流産を予防および/または処置することが好ましい。

30

【0181】

本発明は、本明細書に記載の組成物を用いて免疫応答を誘導する、または増大させるための方法を提供する。免疫応答は、防御的であることが好ましく、抗体媒介免疫および/または細胞媒介免疫を含んでよい(全身免疫および粘膜免疫を含む)。免疫応答は、追加刺激応答を含む。

【0182】

本発明は、有効量の本発明の組成物を投与するステップを含む、哺乳動物における免疫応答を上昇させるための方法も提供する。免疫応答は、防御的であることが好ましく、抗体媒介免疫および/または細胞媒介免疫を伴うことが好ましい。免疫応答は、TH1免疫応答およびTH2免疫応答の一方または両方を含むことが好ましい。方法により、追加刺激応答が生じてよい。

40

【0183】

哺乳動物は、ヒトであることが好ましい。免疫原性組成物が、予防的使用のためのワクチンであることが好ましい場合、ヒトは、小児(例えば、よちよち歩きの幼児または乳児、好ましくは就学前、好ましくは1歳以下または3歳以降(好ましくは1~4歳))またはティーンエイジャー(青年期)であることが好ましい; ワクチンが治療的使用のためのものである場合、ヒトは、ティーンエイジャーまたは成人であることが好ましい。小児用ワクチンは、例えば、安全性、投与量、免疫原性などを評価するために、成人に投与する

50

こともできる。ヒトは、ティーンエイジャー（青年期）であることが好ましい。ヒトは、青年期前のティーンエイジャーであることがより好ましい。ヒトは、青年期前の女性または男性であることがさらに好ましい。青年期前の男性または女性はおよそ9～12歳であることが好ましい。青年期の男性または女性はおよそ15～19歳であることが好ましい。男性または女性はおよそ20～49歳であることが好ましい。男性または女性は、49歳を超えていることが好ましい。ヒトは高齢者、好ましくはおよそ60～80歳であることが好ましい。

【0184】

本発明の免疫原性組成物（例えば、ワクチン）が有益であり得る他の集団としては、6～10歳の小児；昼間保育を受けている小児；学齢の小児および上記の小児集団および/または高齢者集団；慢性貧血患者；鎌状赤血球貧血の小児；遺伝性球状赤血球症の小児；女兒、出産可能な年齢の青年期または成人の女性、例えば、先天性感染（胎児の感染）を予防するため；マラリアまたは鉤虫にかかる危険性がある地理的な地域（例えば、マラリアまたは鉤虫が風土病である地域）に住んでいる小児；免疫抑制される小児または成人（例えば、癌患者、移植を待っている患者）；失血を伴い、輸血を必要とする可能性が高い外科的処置が予定されている小児または成人；移植レシピエント、および免疫無防備状態の個体が挙げられる。

10

【0185】

H. キット

本発明は、本発明の免疫原性組成物の1または複数の容器を含むキットも提供する。組成物は、個々の抗原がそうであり得るように、液体の形態であってよい、または凍結乾燥されてよい。組成物用の適切な容器としては、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、および試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックを含めた種々の材料から形成されていてよい。容器は、滅菌アクセスポートを有してよい（例えば、容器は、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針で穴をあけることができる止め栓を有するバイアルであってよい）。

20

【0186】

キットは、薬剤的に許容できる緩衝液、例えば、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、またはブドウ糖溶液などを含む第2の容器をさらに含んでよい。これは、他の薬学的に許容される処方用溶液、例えば、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジまたは他の送達デバイスなどを含めた、最終使用者にとって有用な他の材料も含有してよい。キットは、アジュバントを含む第3の成分をさらに含んでよい。

30

【0187】

キットは、免疫誘導する方法のため、または感染を処置するための使用説明書を含む添付文書も含んでよい。添付文書は、承認されていないドラフト添付文書であってよい、または食品医薬品局（FDA）または他の規制機関によって承認された添付文書であってよい。

【0188】

本発明は、本発明の免疫原性組成物を予め満たした送達デバイス、例えば、皮下針を有する、または有さないシリンジなども提供する。

40

【0189】

本発明は、上記の方法によって生成されるVLPを、パルボウイルスについて血清陽性を決定するための抗原として用いる診断用キットも提供する。診断用キットは、本明細書に記載のパルボウイルス・VLP、および、個体がパルボウイルスに結合する抗体について血清陽性であるかどうかを決定するための1または複数の補助的な試薬を含有してよい。適切な補助的な試薬としては、例えば、緩衝液、二次抗体または検出抗体（例えば、標識された抗ヒトIg抗体、標識された抗イヌIg抗体）、検出剤などが挙げられる。一実施例では、キットは、パルボウイルス・VLP、およびELISAまたは他の適切な免疫測定法を実施するための補助的な試薬を含有する。キットは、診断アッセイを実施するための説明書をさらに含んでよい。

50

## 【実施例】

## 【0190】

以下は、本発明を実行するための特定の実施形態の例である。実施例は、単に例示的な目的で提供されており、いかなる形でも本発明の範囲を限定するものではない。

## 【0191】

2種の等しい強度のプロモーターの制御下にあるVP1およびVP2を含有する最初のプラスミドを、伝統的な分子生物学的技法を用いて生じさせた。次いで、VP1の前のプロモーターを上記の通り修飾した（例えば、TATA欠失、Aリッチ上流配列の種々の欠失、VP1開始コドンの上流の開始/終止部位の導入）。

## 【0192】

## 【表1】

表1：異なるクローニングステップにおいて用いるオリゴヌクレオチドの一覧

C489G_A490C	5'-CTGCTGTTGATTCTGCTGCTAGAAATTGCTGATTTTCAGATACTCTCAATT-3' (配列番号3)
VP1-MS1:	5'-AGATCTACGCGTACAAAACAAAATGTCTAAGAAATCTGGTAAATGG-3' (配列番号4)
VP1-MS2	5'-AGATCTGTCGACTCATTACAATGGATGAACTCTAGATTTAGCAGTCC-3' (配列番号5)
VP2-AN1:	5'-AGATCTCCTAGGACAAAACAAAATGACATCTGTTAATTCTGCTGAAGC-3' (配列番号6)
VP2-AN2:	5'-AGATCTGCGGCCGCTCATTACAATGGATGAACTCTAGATTTAGCAGTC-3' (配列番号7)
dTATA.1:	5'-AGATCTGGATCCTTCAATATGCGCACATACGCTG-3' (配列番号8)
dTATA.2:	5'-TCTAGACCTAGGGGAATAATTTTCAGGGAACTGGTTTCAACC-3' (配列番号9)
am-1:	5'-CTAGCATTGTAATCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTC-3' (配列番号10)
am-2:	5'-TTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAAAC-3' (配列番号11)
am-3:	5'-ACCAAGAACTTAGTTTTGAATAAACACACATAAACAAACA-3' (配列番号12)
am-4:	5'-CGCGTGTGTTGTTTATGIGTGTGTTTATTCGAAACTAAGTTCCTGGIGTTTT AAAATAAAAAAAGAC-3' (配列番号13)
am-5:	5'-TAACTATAAAAGTAGAATTTAAGAAGTTTAAGAAATAGATTTACAGAATTA CAATG-3' (配列番号14)

第1のステップは、pCDC7酵母発現ベクター（図2）にクローニングするのに適したMluI-SalI制限末端を有する、VP1のためのPCR生成物、そして、pCDC7の第2の発現カセットにクローニングするのに適したAvrII-NotI制限末端を有する、VP2のためのPCR生成物を生成するためのものであった。さらに、VP1配列またはVP2配列の5'末端の制限部位と開始Metの間にACAAAACA（配列番号15）配列を導入した。

## 【0193】

VP2については、PCR増幅反応は、100ngのpMK-RG\_\_parvo\_\_shade\_\_vp1、プライマーであるVP2-AN1およびVP2-AN2各50pmol、MgCl2を含む10×緩衝液10μl、それぞれ1.25mMのdNTP16μl、

10

20

30

40

50

H<sub>2</sub>O最大100 $\mu$ lおよびRoche Expand High Fidelity PCRキット由来のDNAポリメラーゼ0.75 $\mu$ lを含有した。増幅条件：95 で5分、35サイクルの95 で30秒、60 で1分、72 で2分、その後、単回の72 で7分の伸長サイクルおよび4 での保持。

## 【0194】

VP2 PCR反応物を、Promega Wizard PCR Preps DNA Purification Systemを使用して精製し、AvrIIおよびNotIを、最終的な体積300 $\mu$ l中各酵素120uで用い、37 で3時間消化した。次いで、1685bpのAvrII-NotIフラグメントを、1%アガロースGTG(遺伝子技術グレード)から、Qiagen MinElute Gel Extractionキットを用いて精製した。

10

## 【0195】

VP2 AvrII-NotIゲル精製PCR生成物15ngを、Roche Rapid DNA Ligationキットを用いて、脱リン酸化された、ゲル精製したpT7Blue2 AvrII-NotIベクターとライゲーションした。室温で20分後、ライゲーション反応物を使用してコンピテントなHB101を形質転換し、次いで、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天プレート上で平板培養した。ミニプレッププラスミドDNAを、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するTerrific Broth中で成長させた単一のアンピシリン耐性コロニーから調製した；DNAの一部を、AvrII+NotIを用いて消化して、VP2挿入物の存在を確認した。3つの陽性のクローン由来のプラスミドを、配列決定を用いて解析した。

20

## 【0196】

VP1については、PCR増幅反応は、100ngのpMK-RG\_\_parvo\_\_shade\_\_vp1、プライマーであるVP1-MS1およびVP1-MS2各50pmol、5' Hot Master Mix(2.5x)40 $\mu$ lおよびH<sub>2</sub>O最大100 $\mu$ lを含有した。増幅条件：95 で5分、35サイクルの95 で30秒、60 で1分、72 で2分、その後、単回の72 で7分の伸長サイクルおよび4 での保持。

## 【0197】

VP1 PCR反応物を、Promega Wizard PCR Preps DNA Purification Systemを使用して精製し、MluIおよびSalIを、最終的な体積300 $\mu$ l中各酵素120uで用い、37 で3時間消化した。次いで、2366bpのMluI-SalIフラグメントを、1%アガロースGTG(遺伝子技術グレード)から、Qiagen MinElute Gel Extractionキットを用いて精製した。

30

## 【0198】

VP1 MluI-SalIゲル精製PCR生成物のアリコートを用いて、脱リン酸化された、ゲル精製したpGEM4Z MluI-SalIベクターとライゲーションした。室温で20分後、ライゲーション反応物を使用してコンピテントなHB101を形質転換し、次いで、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天プレート上で平板培養した。ミニプレッププラスミドDNAを、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するTerrific Broth中で成長させた単一のアンピシリン耐性コロニーから調製した；DNAの一部を、MluI+SalIを用いて消化して、VP1挿入物の存在を確認した。3つまたは4つの陽性のクローン由来のプラスミドを、配列決定を用いて解析した。

40

## 【0199】

次に、VP2制限フラグメントおよびVP1制限フラグメントを、配列を確認したサブクローンから調製した。VP2については、10 $\mu$ gのpT7Blue2.AvrII.NotI.Parvo.VP2#11を、それぞれ最終的な体積200 $\mu$ l中80ユニットのAvrIIおよびNotIを用い、37 で2.5時間消化した。VP1については、12 $\mu$ gのpGEM4Z.opti.Parvo.VP1#3を、それぞれ最終的な体

50

積300 $\mu$ l中100uのMluIおよびSalIを用い、37 $^{\circ}$ Cで3時間消化した。VP1フラグメントにベクターが混入することを防止するために、PvuI酵素をVP1プレップ消化物に含めた。VP2フラグメントおよびVP1フラグメントを、Qiagen MinElute Gel Extractionキットを用いて1%アガロースGTGから精製した。

#### 【0200】

バイシストロン性の酵母発現ベクターpCDC7を、AvrII+NotIを用いて消化し、仔ウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化し、次いで、Qiagen MinElute Gel Extractionキットを用いて1%アガロースGTGから精製した。VP2 AvrII-NotIフラグメントおよそ90ngを、Roche Rapid DNA Ligationキットを用いて、反応生成物20 $\mu$ l中約30ngのAvrII-NotI pCDC7ベクターとライゲーションした。室温で20分後、ライゲーション反応物を使用してコンピテントなHB101を形質転換し、次いで、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天プレート上で平板培養した。ミニプレッププラスミドDNAを、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するTerrific Broth中で成長させた単一のアンピシリン耐性コロニーから調製した；プラスミドDNAを、AvrII+NotIを用いて消化して、VP2挿入物の存在を確認した。

10

#### 【0201】

VP1をpCDC7の第2の発現カセットにクローニングするためのベクターを調製するために、およそ10 $\mu$ gのpCDC7.ParvoB19.VP2#11プラスミドDNAを、それぞれ最終的な体積200 $\mu$ l中100uのMluIおよびSalIを用い、37 $^{\circ}$ Cで3時間消化した。次いで、消化されたプラスミドを、7uの仔ウシ腸アルカリホスファターゼを用い、37 $^{\circ}$ Cで1時間脱リン酸化した。次に、ベクターをQiagen MinElute Gel Extractionキットを用いて1%アガロースGTGから精製した。

20

#### 【0202】

最終的に、ゲル精製したVP1 MluI-SalIフラグメント約100ngを、pCDC7.ParvoB19.VP2#11MluI-SalIベクター約60ngと、2つの別々の20 $\mu$ lライゲーション反応においてRoche Rapid Ligationキットを用いてライゲーションした。室温で20分後、ライゲーション反応物を使用してコンピテントなHB101を形質転換し、次いで、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天プレート上で平板培養した。ミニプレッププラスミドDNAを、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するTerrific Broth中で成長させた単一のアンピシリン耐性コロニーから調製した；プラスミドDNAを、MluI+SalIを用いて消化して、VP1挿入物の存在を確認した。pCDC7.ParvoB19.VP2.VP1#2を、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するTerrific Broth 100mlにおいて増幅のために選択し、その後、Qiagen Maxi Prepキットを用いてプラスミドDNAを精製した。

30

#### 【0203】

次に、TATAプロモーター制限フラグメントを、配列を確認したサブクローンから調製した。pT7Blue2.TATA#9およそ8 $\mu$ gを、それぞれ最終的な体積300 $\mu$ l中120ユニットのBamHIおよびMluIを用い、37 $^{\circ}$ Cで4時間消化した。BamHI-MluI酵母発現ベクターを、5 $\mu$ gのpCDC7.ParvoB19.VP2.VP1#2を、それぞれ反応体積200 $\mu$ l中80ユニットのBamHIおよびMluIを用いて消化し、次いで37 $^{\circ}$ Cで1時間、10uの仔ウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化することによって調製した。プロモーターおよびベクターフラグメントの両方を、Qiagen MinElute Gel Extractionキットを用いて1%アガロースGTGから精製した。

40

#### 【0204】

50

最終的に、1333bpのBamHI-MluI TATAプロモーターフラグメント約20ngを、20μlの反応において約20ngのBamHI-MluI pCDC7ベクター（先の段落に記載の）と、Roche Rapid DNA Ligationキットを用いてライゲーションした。室温で20分後、ライゲーション反応物を使用してコンピテントなHB101を形質転換し、次いで、100μg/mlのアンピシリンを含有するLB寒天プレート上で平板培養した。ミニプレッププラスミドDNAを、100μg/mlのアンピシリンを含有するTerrific Broth中で成長させた単一のアンピシリン耐性コロニーから調製した；DNAを、BamHI+MluIを用いて消化して、1333bpのTATAプロモーターの存在を確認した。pCDC7.ParvoB19.VP2+TATA.VP1#16を、100μg/mlのアンピシリンを含有するTerrific Broth 100mlにおいて増幅のために選択し、その後、Qiagen MaxiPrepキットを用いてプラスミドDNAを精製した。

10

## 【0205】

(実施例1)

酵母におけるパルボウイルスB19の発現

パルボウイルスB19のVP2遺伝子およびVP1遺伝子を、以下の通り特徴づけられる*S.cerevisiae* AD3において同時発現させた：MATa、leu2、ura3-52、prb1-1122、pep4-3、prc1-407、gal2、[cir]::pDM15(pGAP/ADR1::G418R)、::Yip5 leuAD。

20

## 【0206】

酵母をYEPDプレート上に画線した後、形質転換するためのコンピテント細胞を調製するための単一のコロニーを選択する。酵母の形質転換を、Invitrogen S.C. EasyComp Transformationキットを使用して実施した。ura-8%グルコース選択プレート上に形質転換体(transformant)を得た。ura-8%グルコース選択プレート上の単一のコロニーに関して、数個の形質転換体を画線した。次いで、プラスミドのコピー数を増加させるために、単一のコロニーをleu-8%グルコース選択プレート上にパッチした。

## 【0207】

単一のコロニーパッチのうちの数個について小規模発現調査を行った。まず、leu-7.1%グルコース培地中で一晚培養物3mlを成長させた。次いで、leu-培養物を、YEPDまたはVeggie YEPD中に1:20希釈した。培養物を30 または25 で48~72時間振とうした。培地からグルコースが枯渇すると誘導が起こった。

30

## 【0208】

細胞ペレットを解凍し、水中で洗浄し、目盛り付きのチューブ内でペレットにし、充填細胞体積(packaged cell volume)を推定できるようにした。次いで、異なる発現培養物の密度の差異を正規化するために、各ペレットを、充填細胞体積と等しい体積の冷たい溶解緩衝液(10mMのNaPO<sub>4</sub>、pH7.5、0.1%Triton X-100、0.5MのNaCl)に再懸濁させた。細胞/緩衝液懸濁物のアリコートを用いて、洗浄したガラスビーズ(Sigma G8772)を用いて、4、最高速度で1時間ボルテックスすることにより溶解した。粗製の溶解物を、4の微量遠心分離機(microfuge)中、13Kで30分遠心分離して不溶性画分をペレットにした。上清のタンパク質の濃度を決定した後、150μlのSDS試料緩衝液+50mMのDTT中で試料300μgを調製した。その間に、不溶性のペレット画分(IP)を、1mlのSDS試料緩衝液+50mMのDTTに再懸濁させた。可溶性画分および不溶性画分の試料を、4~20%トリス-グリシゲルにローディングする前に煮沸した。可溶性画分については、10μl(20μgの総タンパク質)をローディングし；不溶性のペレットについては、5μlをローディングした。

40

## 【0209】

ゲルを2連で泳動させた(run)-1つはクーマシー染色(Invitrogen

50

Simply Blue Safestain) 用であり、1つはパルボウイルスB19に対するマウスモノクローナル抗体 (Santa Cruz sc-58178) でプローブするウエスタンブロット用であった。

#### 【0210】

同じプロトコルを使用して4つの異なるコロニーを分析して、コロニー間の変動性を認識した。72時間振とうフラスコ発現培養物4つに、4つの単一の - コロニー Leu - パッチ由来の細胞を接種した。図9bのウエスタンブロットは、各構築物の4つのコロニー由来の可溶性のVP2およびVP1についての変動性の範囲を示す。

#### 【0211】

(実施例2)

パルボウイルスB19精製プロトコル

ウシ血清アルブミン (albumin) (BSA) を用いたBCAタンパク質アッセイ (Pierce) を、タンパク質の濃度を決定するための標準の参照として使用した。一部の場合では、BCAの結果で校正することによって示される通り1吸光度単位 = 1 mg / ml と仮定して、280 nmにおけるUV吸光度を用いた。

#### 【0212】

Invitrogenからのゲル (NuPAGE 4 ~ 12 % ビス - トリス カタログ番号 NP0322BOX) および NuPAGE MES SDS Running Buffer (カタログ番号 NP0002 - 02) を用いて SDS - PAGE を実施した。SDS - PAGE のために用いたマーカーは、Full range rainbow 分子量マーカー (GE Healthcare、カタログ番号 RPN800E) であった。Native PAGE 3 ~ 12 % ビス - トリスゲル (Invitrogen カタログ番号 BN1003BOX) を、Native PAGE Running buffer キット (Invitrogen カタログ番号 BN2007 および Native PAGE マーカー (Invitrogen カタログ番号 151 - 1901) と一緒に用いた。SDS PAGE ゲルを、Teknovaからのクーマシーブルー (Coomassie Blue) R - 250 染色溶液 (カタログ番号 C1050) を用いて染色した。

#### 【0213】

ウエスタンブロット分析によって純度および正体を得るために、SDS - PAGE ゲルを I - Blot システム (Invitrogen) によってニトロセルロース膜にブロットングした。酵母の混入物を決定するために、Yeast Whole Cell ELISA キットを使用した (S. cerevisiae HCP ELISA Kit - CYGNUS Technologies、#F135)。

#### 【0214】

VP1 と VP2 の両方を発現している酵母細胞からパルボウイルスB19のウイルス様粒子 (VLP) を精製した。酵母細胞を溶解緩衝液に再懸濁させ、高圧 (25,000 psi) で複数回マイクロフルダイザー内を通過させて細胞を破壊した。低スピードで回転 (15,000 x g) させて細胞の残屑を分離した後、上清を、4時間の高スピード回転 (100,000 x g) に供して、20% / 70% スクロースステップクッションに入れた。クッションを分画し、VLP を含有する画分を、緩衝液 (20 mM のトリス、pH 7.5、100 mM の NaCl) で希釈した。VLP を capto Q カラムにローディングし、高塩濃度で溶出した。VLP を含有する溶出画分を濃縮し、緩衝液をより低い塩濃度の緩衝液 (20 mM のトリス、pH 7.5、100 mM の NaCl) と交換し、4 で貯蔵した。

#### 【0215】

パルボウイルスB19 VP1 / VP2 · VLP を、90% 超の純度にまで精製し、同一のサイズだと考えられる (約 26 nm) (図 11A、11B)。ゲルは、VP2 / VP1 (デルタ TATA) VLP に基づく。部位特異的な変異体を含む追加的な VLP を構築した。

#### 【0216】

10

20

30

40

50

## スクロース棚クッションおよび分画

38 mLのポリアロマーチューブ (Seton Scientific) 中にスクロース棚を調製した。スクロース棚は2つの層：20%スクロース5 mLおよび70%スクロース26 mLを有する。清澄化した溶解物6 mLを、スクロースの最上部に穏やかに加えた。このステップは、最大8 mLの清澄化した溶解物を用いて実施し、2 mL未満の70%スクロースを使用した。スクロース棚を、4、JS-24ローター内で100,000 × gで4時間遠心分離した。

## 【0217】

Piston Gradient Fractionator (BioComp) を用いて上部からスクロース棚を分画して1 mLの画分にした。20%：70%スクロースの界面において目的のVLPが見いだされた。VLPを含有する画分のBrix値は28.5から38.5の間であった（一般に画分12から14の間）。VP1とVP2の両方を認識する市販の抗体 (Santa Cruz BioTech カタログ番号sc-71852) を用いたウェスタンを実施して、VLPの位置および濃度を調査した。この材料を、4で少なくとも1週間、タンパク質分解せずに貯蔵した。

10

## 【0218】

## Captor Qクロマトグラフィー

VP1/VP2特異的な抗体 (Santa Cruz BioTech カタログ番号sc-71852) を用いたウェスタン分析により、スクロース棚から最大量のタンパク質を含有する画分を同定した。これらの画分をプールした、または別々に保持した（特定の試行に基づく）。これらの画分を、緩衝液A（25 mMのトリス、100 mMのNaCl、pH 7.5）で1：4希釈し、予め洗浄しかつ予め平衡化したカラムに6 cm/時間でローディングした。ローディングされたタンパク質の中になお存在するスクロースにより、タンパク質がより速い流速（すなわち、60 cm/時間）でカラムに結合することが部分的に妨げられた。NaCl勾配を用いて、結合したタンパク質を溶出した。クロマトグラフィーを以下の通り実行した：

20

緩衝液A：25 mMのトリス、100 mMのNaCl、pH 7.5；緩衝液B：25 mMのトリス、2 MのNaCl、pH 7.5；洗浄：緩衝液Aを用いて5 CV；勾配：0～40%のB（10 CV）；洗浄：100%のB、5 CV；流速：0.2 ml/min。分画：溶出の間に1 ml。約5%のBから約10%のBまでプール。11.6。

30

緩衝液の交換および濃縮。

## 【0219】

VP1バンドを超える強度、またはそれと同等の強度のバンドがないようにCaptor Q画分を選択した。これらの画分をプールし、50 kDaのカットオフUltra4 (Millipore - 再生セルロース) コンセントレーターを用いた濃縮および希釈方法によって25 mMのトリス、100 mMのNaClに緩衝液交換した。最終濃度は約0.8 mg/mLであった。このプロセスにより、>95%純粋である材料がもたらされ、内毒素は低い検出可能レベルであったか、検出できないレベルであった。この材料は、使用する前に>1カ月貯蔵することができた。一般的な収率は、バイオマス20グラムに対して、精製された材料およそ1.5 mgであった（1 Lの振とうフラスコでの結果）。

40

## 【0220】

## 【表 2】

表 2. VP1/VP2・VLP生成接種範囲。

ロット	1	2
Inoc OD	3.1	2.9
1 リットル当たりの湿重量(g)	20.3	21.2
VP1 対 VP2 の百分率	21	26
収量 (細胞の湿重量 1g 当たりのタンパク質 ( $\mu\text{g}$ ))	36	48
純度	>95%	>95%
内毒素レベル (用量 $10\mu\text{g}$ 当たりの EU)	0.264	0.734

10

## ( 実施例 3 )

## パルボウイルス B 1 9 ・ V L P の分析

20

## V L P の純度

クーマシーおよびウェスタン分析によって V L P の純度が示された。クーマシー染色した SDS - P A G E および対応するウェスタンの例が図 1 6 に示されている

## V L P の同定

2 つの抗体を用いて V L P の同定を行った。1 つの抗体 ( S a n t a C r u z B i o T e c h カタログ番号 s c - 7 1 8 5 2 ) は、共通の V P 2 領域を認識し、よって、V P 1 と V P 2 の両方を同定することができる ( - V P 1 / V P 2 抗体 )。第 2 の抗体 ( U S B i o P 3 1 1 3 - 8 1 D ) は、V P 1 に独特の領域だけを認識し、よって、V P 1 のみを同定することができる。完全に煮沸されていない画分が還元されると、V P 2 の二量体がお目に見える。予測通り、 - V P 1 抗体で膜をプローブすると、V P 2 バンドは存在しないが、同じ V P 1 バンドが目に見える。

30

## 【 0 2 2 1 】

## V L P の特徴

V L P に集合しなかったタンパク質を除去するためにスクロース棚を用いて V L P を選択した。精製された V L P を、単量体の含有量について、S E C、n a t i v e P A G E、D L S および電子顕微鏡法を用いて分析した。結果により、V L P が、V L P を代表する単一の高分子量種で > 9 9 % であることが確認された ( 図 1 7 )。

## 【 0 2 2 2 】

## V L P の安定性

V L P は、M F 5 9 中および 2 5 m M の トリス、1 0 0 m M の N a C l 緩衝液中の両方で、4 で少なくとも 3 カ月安定に見えた。これは、クーマシー染色した SDS - P A G E、パルボウイルスに特異的な抗体を用いたウェスタン、n a t i v e P A G E および電子顕微鏡法を用いて検査した。さらに、V L P は、0 . 0 5 % S D S を用いて分裂させて単量体にすることができたが、0 . 5 % T r i t o n X - 1 0 0 ではできなかった。

40

## 【 0 2 2 3 】

## 内毒素検査

タンパク質を、C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s E n d o s a f e - P T S システムを用いて内毒素について分析した。これは、内毒素の L i m u l u s A m e b o c y t e L y s a t e 検出を用いるカートリッジに基づくシステムである ( 製品コード P T S 2 0 )。アッセイを、E n d o t o x i n S p e c i f i c

50

B u f f e r ( 製品コード B G 1 2 0 ) を製造者の指示通りに用いて実施して、二次的な活性化経路を通じて - グルカン ( 酵母細胞壁の成分 ) によって生じる偽のバックグラウンドシグナルを減少させた。複数のアッセイからの結果により、材料の用量  $5 \mu\text{g}$  当たりの範囲が  $0.036 \text{ EU} / \text{用量}$  から検出可能限界の  $0.013 \text{ EU} / \text{用量}$  を下回るまでであることが実証された。

【 0 2 2 4 】

( 実施例 4 )

マウスの免疫原性データ

B a l b / c マウス (  $n = 10$  ) において免疫原性を試験した。免疫前の血清を、第 1 の免疫化の前日に取得した。免疫化は、異なるアジュバント ( リン酸緩衝生理食塩水、ミョウバン、または M F 5 9 ) とともにさまざまな濃度 (  $0.05 \mu\text{g}$ 、 $0.5 \mu\text{g}$  または  $5 \mu\text{g}$  ) の I M によって施した。20 日目にマウスから採血し、21 日目にマウスに第 2 の免疫化を受けさせた。第 2 の免疫化の 3 週間後 ( 3 w p 2、41 日目 ) にマウスから再度採血し、42 日目にマウスに第 3 の免疫化を施した。56 日目 ( 2 w p 3 - 第 2 の 2 週間後 ) および 84 日目 ( 6 w p 3 - 第 3 の 6 週間後 ) に血清試料を再度取得した。

10

【 0 2 2 5 】

各ワクチン群について血清をプールした ( P B S ワクチン接種について  $n = 5$ 、他の全ての群について  $n = 10$  )。パルボウイルス B 1 9 ・ V L P でコーティングしたプレートを用いて I g G E L I S A を実施した ( 図 1 2 )。M F 5 9 処方物で最も高い力価が実証され、各用量濃度で同様であった。

20

【 0 2 2 6 】

( 実施例 5 )

細胞に基づく中和

中和アッセイは、q R T - P C R に基づき、ウイルス基質として C D 3 6 + およびおよびグロボシド + ( 主要な細胞受容体 ) である赤血球前駆細胞を用いた。アッセイにより、感染中にのみ存在する R N A 配列の存在または非存在を測定した。中和力価を決定するために、血清を、ウイルスと一緒にプレインキュベートした後、細胞と混合した。48 時間後に細胞を回収し感染についてプローブした。免疫化したマウスについての最も高い中和力価は、 $6 \times 10^4$  であった。このアッセイで検査した回復期のヒト血清は、 $1 \times 10^4$  の中和力価 ( I C 5 0 ) を有した。

30

【 0 2 2 7 】

【 表 3 】

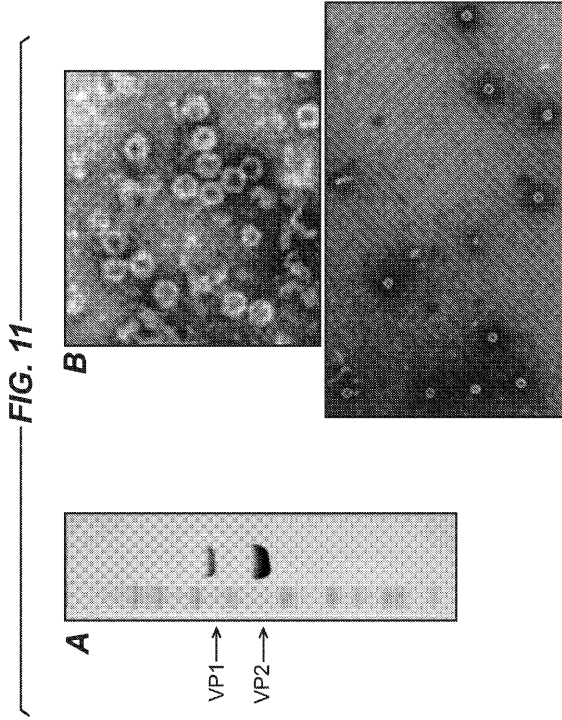
表 3 : 第 3 の免疫化の 2 週間後の動物の血清由来の中和力価に対応する E L I S A 力価 ( 血清 I g G ) の表。

VLP (MF59 でアジュバント添加)	用量( $\mu\text{g}$ )	ELISA 力価(血清 IgG)	中和力価 (IC50)
VP2 単独	0.05	$5 \times 10^5$	<10
VP2 単独	0.5	$5 \times 10^5$	<10
VP2 単独	5.0	$5 \times 10^5$	<10
VP1/VP2	5.0	$5 \times 10^5$	$6 \times 10^4$

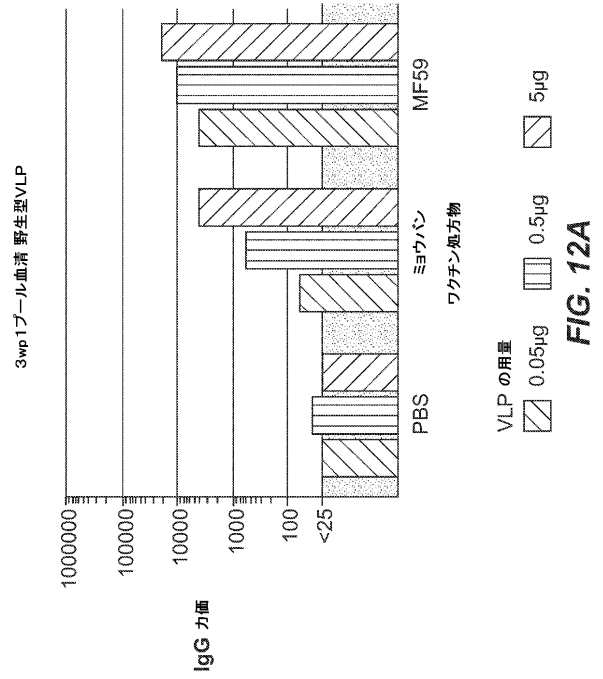
40



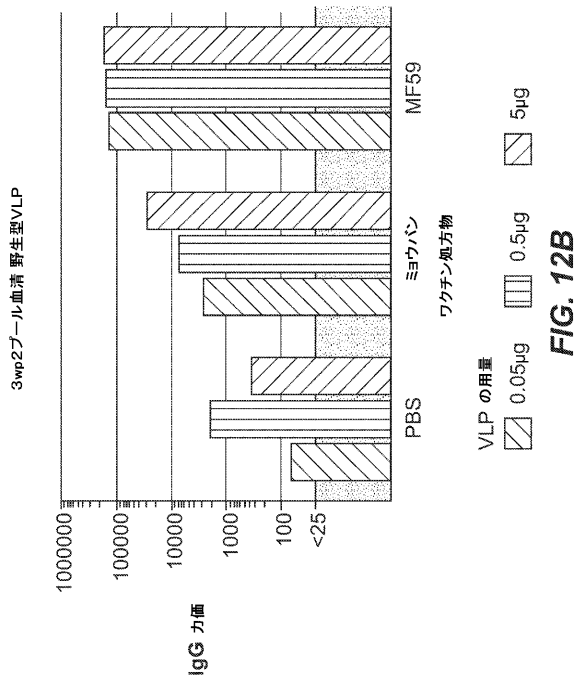
【 図 1 1 】



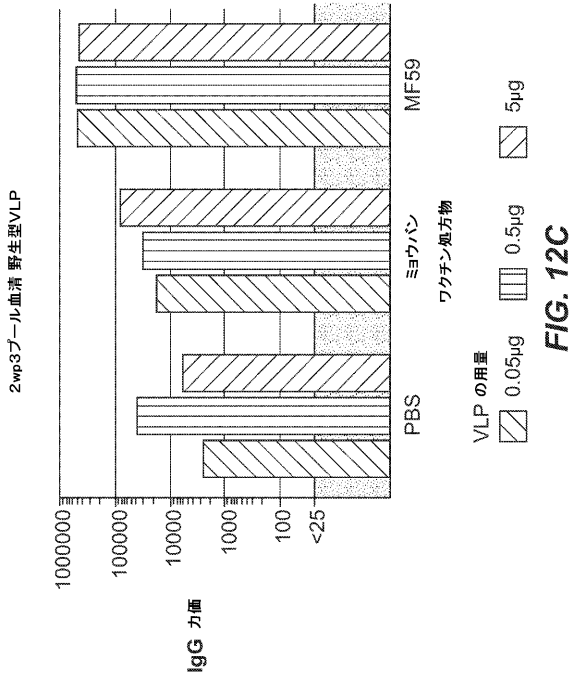
【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



【 図 1 2 C 】



【 図 1 3 】

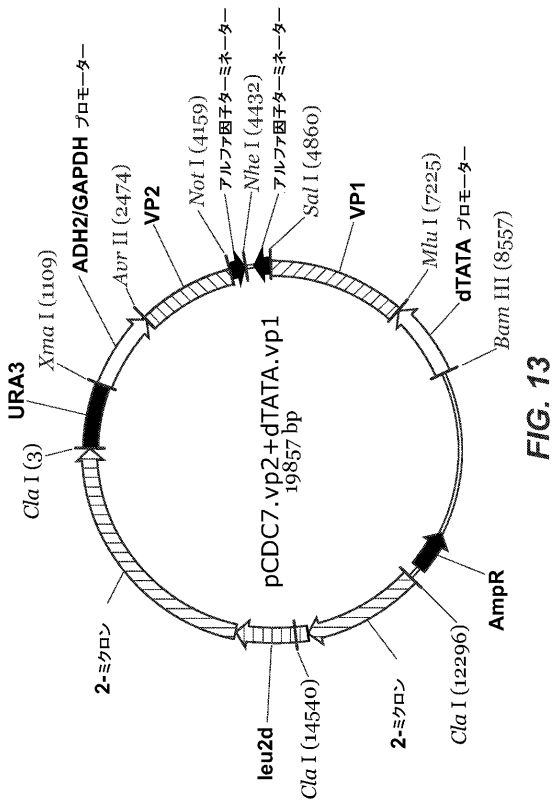
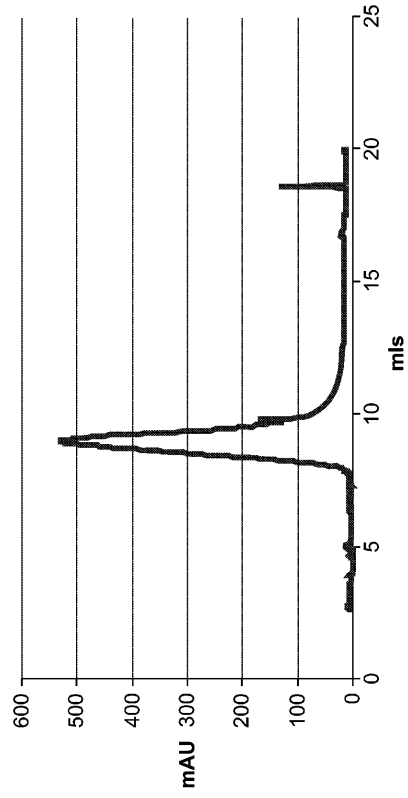


FIG. 13

【 図 1 7 】



【 図 3 A 】

S. cerevisiaeにおいてParvoB19 VP1-VLPおよびParvoB19 VP2-VLPを同時発現させるために用いるpCDC7

ATCGATAAGCTTTTCAATTCATCATTTTTTTTTTTATTCCTTTTTTTTGATTTCGGTTTCCTTGAAAATTTTTTTGAT  
 TCGGTAATCTCCGAACAGAAGGAAGAACGAAGGAAGGAGCACAGACTTAGATTGGTATATATAACGCATATGTAGT  
 GTTGAAGAAACATGAAATTTGCCAGTATTTCTTAACCCAACTGCACAGAACAAAAACCTGCAGGAAACGAAGATAA  
 ATCATGTCCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGCTACTCATCCTAGTCCCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATATC  
 ATGCACGAAAAGCAAACAAACTTTGTGTGCTTCATTGGATGTTTCGTACCACCAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAA  
 GCATTAGGTCCCAAAATTTGTTTACTAAAAACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTTCCATGGAGGGCACAGTT  
 AAGCCGCTAAAGGCATTATCCGCCAAGTACAATTTTTTACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTGGTAAT  
 ACAGTCAAATTCGAGTACTCTCGGGTGTATACAGAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGAATGCACACGGTGTG  
 GTGGGCCAGGTATTTGTTAGCGGTTTGAAGCAGGCGCCAGAAGAAGTAACAAAGGAACCTAGAGCCCTTTTTGATG  
 TTAGCAGAATTTGTCATGCAAGGGCTCCCTATCTACTGGAGAATATACTAAGGGTACTGTTGACATTGCGAAGAGC  
 GACAAAGATTTTGTATCCGCTTTTATGCTCAAAGAGACATGGGTGGAAGAGATGAAGTTACGATTGGTTGATT  
 ATGACACCCGGTGTGGGTTTAGATGACAAGGGAGACGCATTGGGTCAACAGTATAGAACCCTGGATGATGTGGTC  
 TCTACAGGATCTGACATTATTTATGTTGGAAGAGGACTATTTGCAAAGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTAA  
 CGTTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAACCTAAAAAACTGTATTATAAGTA  
 AATGCATGTATACTAAACTCACAAATTAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCGGG

TTCAATATGCGCACATACGCTGTATGTTCAAGGTCCCTTCGTTTAAAGAACGAA  
 AGCGGTCTTCCCTTTTGAGGGATGTTTCAAGTTGTTCAAATCTATCAAATTTGCAAATCCC  
 CAGTCTGTATCTAGAGCGTGAATCGGTGATGCGATTTGTTAATTAATTTGATGGTGTCA  
 CCATTACCAGGTCTAGATATAACCAATGGCAAACCTGAGCACAACAATACCAGTCCGGATCA  
 ACTGGCACCATCTCTCCCGTAGTCTCATCTAATTTTTCTTCCGGATGAGGTTCCAGATAT  
 ACCGCAACACCTTTATFATGGTTTCCCTGAGGGAATAATAGAATGTCCCATTGCAAAATCA  
 CCAATTTCAAACCTGGGCGAATTTGATTTTCGGGTTTGTAACTCGTTCCAGTCAGGAATG  
 TTCCACGTGAAGCTATCTTCCAGCAAAGTCTCCACTTCTTCATCAAATTTGTGGGAGAATAC  
 TCCCAATGCTCTTATCTATGGGACTTCCGGGAAACACAGTACCGATACTTCCCAATTCGT  
 CTTGAGAGCTCATTGTTTGTTTGAAGAGACTAATCAAAGAATCGTTTTCTCAAAAAAAT  
 AATATCTTAACTGATAGTTTGATCAAAGGGGCAAACCGTAGGGGCAAACAAACGGAAAAA  
 TCGTTTCTCAAATTTCTGATGCCAAGAACTCTAACAGTCTTATCTAAAAAATTCCTTA  
 TGATCCGCTCTCCGGTTACAGCCTGTGTAACCTGATTAATCCCTGCCTTTCTAATCACCAT  
 TCTAATGTTTAAATTAAGGGATTTTGTCTTCATTAACGGCTTTTCGCTCATAAAAAATGTTA  
 TGACGTTTTCGCCGAGGCGGAAACCATCCACTTCACGAGACTGATCTCCTCTGCCGGA  
 ACACCCGGCATCTCCAATTTATAAGTTGGAGAAATAAGAGAATTTAGATTGAGAGAATG  
 AAAAAAAAAAACCC

CTTAGTTTATAGGTCCATTTCTTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGG  
 CAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAA  
 GGCAATGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTCCTTACACCTTCTATTACCTCTGCTCT  
 CTCTGATTTGAAAAAGCTGAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATTAFTCCCTAC  
 TTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTTCTGTAATCTATTTCTTAAA  
 CTTCCTAAATTTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTTAAACACCAAGAACCTTAG  
 TTTCGAATAAACACACATAAAACAAAC

cctaggacttctaagcgccgc  
 TTTGTTCCACGTACTTTTAGCTCGTACAAAATACAATATACTTTTCATTTCT  
 CCGTAAACAACATGTTTTCCCATGTAAATACCTTTTCTATTTTTTCGTTCCGTTACCAACT  
 TTACACATACTTTATATAGCTATTCACTTCTATACACTAAAAACTAAGACAATTTTAAT  
 TTTGCTGCCGTCATATTTCAATTTGTTATAAATTCCTATAATTTATCCTATTAGTAGCT  
 AAAAAAAGATGAATGTGAATCGAATCCTAAGA

FIG. 3A

【 3 B 】

GCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCC  
 GACCGCTTTGGCCCGCCAGTCCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCCACTACGGGATCATGGCGACC  
 ACACCCGTCCTGTGGATCAGATCCAATTTCTTTAGGATTCGATTCACATTCATCTTTTTTTAGCTACTAATAGGA  
 TAAATTTATAGGAATTTATAACAAATTTGAAATATGGCAGGCAGCAAAATTAATAATTTGCTTTAGTTTTTTAGTGTAT  
 AGAAGTGAATAGCTATATAAAGTATGTGTAAAGTTGGTAACGGAAACGAAAAATAGAAAAGGATATTACATGGGAA  
 AACATGTTGTTTACGGAGAAATGAAAAGTATATTGTATTTTGTACGAGCTAAAAGTACAGTGGGAACAAA

GTCCGACTTTCACAGGCAACGCGTGTGTTTGTATGTGTGTTTATTGAAACTAAGTTCCTG  
 GTGTTTTAAACTAAAAAAGACTAACTATAAAGTAGAATTTAAGAAGTTTAAGAAAT  
 AGATTTACAGAATFACAATCAATACCTACCGTCTTTATATACTTATTAGTCAAGTAGGGG  
 AATAATTTACAGGAACTGGTTTTCAACCTTTTTTTTTTTCAGCTTTTTTCCAAATCAGAGAGAGC  
 AGAAGGTAATAGAAGGTGTAAGAAAATGAGATAGATACATGCGTGGGTCAATTGCCTTGT  
 GTCATCATTTACTCCAGGCAGGTTGCATCACTCCATGAGGTTGTGCCCCGTTTTTTCGCT  
 GTTTGTGCCCTGTCTCTGTAGTTGCGCTAAGAGAAATGGACCTATGAACTAAGGGTTTT  
 TTTTTTCAATCTCTCAATCTGAAATTTCTCTTATTTCTCCAATTTATAAGTTGGAGATGC  
 CCGGTGTTCCGGCAGAGAGATCAGTCTCGTGAAGTGGATGGTTTTCCCGCTGCGGGCAA  
 AACGTGATAACATTTTATGAGCGAAAAGCCGTTAATGAAGACAAAATCCCTTAATTAATA  
 CATTAGAATGGTGATTAGAAAAGGCAGGATTAATCAGTTACACAGGCTGTAACCGGAGAGA  
 CGGATCATAAGGCAATTTTTAGATAAGACTGGTTAGAGTTCTTGGCATCAGAAAATTTGA  
 GBAACGATTTTTCCGTTTGTGTTGCCCCCTACGTTTTGCCCCCTTTGATCAAACATCAGTTA  
 AGATATTAATTTTTTTGAGAAAACGATTTCTTTGATTAGTCTCTTCAAACAAACRATGAGC  
 TCTGAAGACGAATGGGAAGTATCGGTACTGTGTTTTCCCGGAAGTCCCATAGATAAGAGC  
 ATTCGGAGTATTTCTCCACAATTTGATGAAGAAGTGGAGACTTTCTGGAAGATAGCTTC  
 ACGTGGAACATTCCTGACTGGAACGAGTTAACAAACCCGAAATACAATTCGCCCAGGTTT  
 AGAATTTGGTGATTTGGAATGGGACATTTCTATTATTTCCCTCAGCGAAACCATAATAAAGGT  
 GTTGGCGTATATCTGGAACCTCATCCGGAAGAAAATTAGATGAGACTACGGGAGAGATG  
 GTGCCAGTTGATCCGACTGGTATTGTTGTGCTCAGTTTGCATTTGGTATATCTAGACCT  
 GGTAATGGTGACACCATCAATTTAATTAACAAATCGCATCACCGATTCACCGCTCTAGAT  
 ACAGACTGGGGATTTGCAAAATTTGATAGATTTGAACAACCTTGAAACATCCCTCAAAGGA  
 AGACCGCTTTGTTCTTAAACGAAGGGACCTTGAACATAACAGCGTATGTGCGCATATTTG  
 AA

GGATCCTCGACCGAT  
 GCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGGCGGGGCATGACTATCCTGCGCCACTTATGAC  
 TGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGCGTCAFTTTCGGCCAGGACCGCTTTCCG  
 CTGGAGCGCGACGATGATCGGCTGTGCTTGGGTTATTGGAATCTTGCACGCCCCCTGCTCAAGCCTTCTGTAC  
 TGGTCCCGCCACCAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCCCATGGCGCCGACGCGCTGGGCTACGT  
 CTTCTGGCGTTTCGGCAGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATATGATTTCTTCTGCTTCCGGCGGCATCGGGAT  
 GCGCGCTGCGGATGCTGTCCAGGCAGGTAGTTGACGACCATGATGGTCTTCGGTTTTCCGTGTTTTCGTAAAGTCTGGAARCG  
 TCTTACCAGCCTAACCTTCGATCATTTGGACCGCTGATCGTCAACCGGATTTATGCGGCTTCCGGCAGCAGCATGGAA  
 CGGGTTGGCATGATTTGAGGGCCGCCCCATACCTTGTCTGCTTCCCCGCGTTGCGTCCGGTGCATGGAGCCG  
 GGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCACCACTCCAAGAAATGGAGCCAATCAA  
 TTCTTGGCGAGAATGTGAATCGGCAACCAACCCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGC  
 CGCAGCGGGCGCATCTCGGGCAGCGTTGGGTCTTGGCCACCGGTGCGCATGATCGTCTCTGTCTGTGAGGACC  
 CGGCTAGGCTGCGCGGTTGCTTACTGGTTAGCAGAAATGAATCACCGATACCGGAGCGAAGCTGAAGCGCATGCT  
 TCTGCAAAACGTTTCGGACCTGAGCAACCAACATGATGGTCTTCGGTTTTCCGTGTTTTCGTAAAGTCTGGAARCG  
 CGGAAGTCAGCGCCTGCACCAATATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCTGTGGAACACCT  
 ACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGAATTTTTCTCTGCTCCCGCCGATCCATACCGCCAGT  
 TGTTTTACCCTCACACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTCAATCATCAGTAACCCGATCGTGAGCATCCTCTCTCGT  
 TTCATCGGTATCAATACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAACAGGABBAACC  
 GCCCTTAACATGCCCCGCTTTATCAGRAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCAACGAGCTGGACCGGGAT  
 GAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTACGACCAAGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCCTCGCGCTTTCCGGT  
 GATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCAACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGC  
 AGACAAGCCCTCAGGGCGCGTCAAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCAAGTAGCGAT  
 AGCGGAGTGTATACTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAA  
 TACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGGCTCTTCCGCTTCCCTGCTCACTGACTCGCTGCGCT  
 CGGTGCTTCCGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA  
 ACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGGCTTTT  
 TCCATAGGACTCCGCCCCCTGACAGACATCACAAAATCGAAGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGAC  
 TATAAAGATCACAGCGCTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCCTTACCGGAT  
 ACCTGTCCGCTTCTCCCTTCCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGT  
 AGGTGCTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCAGCAACCCCGCTTACGCCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACT  
 ATCGTCTTGAATCCACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGCGAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG

FIG. 3B

【 3 C 】

CGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTG  
STATCTGGCCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG  
CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGGCCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGA  
TCTTTTCTACGGGGTCTGACCGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTGGTCAATGAGATATCAAAA  
GGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGT  
CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTCAATCCATAGTTTGCCT  
GACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAG  
ACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTG  
CAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTT  
TGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTCAAGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCG  
GTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGA  
TCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTCTTACATGCA  
TGCCATTCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATATGATGATGCGCGGAC  
CGGATTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATTTG  
GAAAACGTTCTTGGGGGCAAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTG  
CACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGGCTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCG  
CAAAAAGGGCAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAATATATTGAAGCATT  
ATCAGGGTATTGTTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCA  
CATTTCCCGCAAAAAGTCCACCTGACGTCTAAGAAACCAATFATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGCGGTA  
TCAGGAGGCTTTTCTGCTTCAAGAAATCTCATGTTTACAGCTTATCATGATCCACTTGTATATTTGGATGAA  
TTTTTGAGGAACTTCTGAACAGTCTTAAACAGGATAATAGGACCGGCAATTTCTCAAGCAATAAACAGGAATAC  
CAATTAATAAAGATAAATAGTCAAGTCTGACATAAAGCTTTGAAGAAAAATGCGCCTTATTTCAATCTTTGCT  
ATAAAAAATGGCCAAAATCTCACATTTGGAAGCATTGATGACCTCATTTCTTCAATGAAGGGCCTAACGGAG  
TTGACTAATGTTGTGGGAAATTTGAGCGATAAGCGTGTCTGTGCGTGGCCAGGCAACGTATACTCATCAGATA  
ACAGCAATACCTGATCACTACTTCCGACTAGTTTCTCGGTACTATGCATATGATCCAAATATCAAAGGAAATGATA  
GCATTTGAAGGATGAGACTAATCCAATGAGGAGTGGCAGCATATAGAACAGCTAAAGGGTAGTGTGAAGGAAGC  
ATACGATAACCCGATGGAATGGGATAATATCACAGGAGGACTACTAGACTACCTTTTCACTACATAAATAGACGC  
ATATAAGTACCGCATTTAAGCATAAACACGCACTATGCGGTTCTTCTCATGTATATATATACAGGCAACACGCA  
GATATAAGTGGCAGCTGAACAGTGAAGTGTATGTGCGCAGCTCGCGTTGCATTTTCGGAAAGCGCTCGTTTTCGGA  
AACGCTTTGAAGTTTCTATTCCGAAGTTTCTATTCTTAGAAAGTATAGGAACTTCAGAGCGCTTTTGA AAAACCA  
AAAGCGCTCTGAAGACGCACTTTCAAAAACCAAAAACGCAACCGGACTGTAACGAGCTACTAAAATATTTGCGAAT  
ACCGCTTCCACAAACATTGCTCAAAAGTATCTCTTGTGCTATATATCTCTGTGCHATATCCCTATATAACCTACCC  
ATCCACCTTTGCTCCTTGAACCTTGCATCTAAACTCGACCTCTACATTTTTTATGTTTATCTCTAGTATACTCT  
TTAGACAAAAAATTTGTAGTAAGAATTTTATAGAGTGAATCGAAAACAATACGAAAATGTAACATTTTCTAT  
ACGTAGTATATAGAGACAAAATAGAAGAACCGTTTATAATTTCTGACCAATGAAGAAATCAACAGCTTATCAC  
TTTTCTGTTCAAAAAGTATGCGCAATCCACATCGGTATAAGAAATAAATCGGGGATGCTTTTATCTTGA AAAAATGC  
AACCGCAGCTTCCCTAGTAAATCAGTAAACCGGGAAAGTGGAGTCAAGGCTTTTTTTTATGGAAGAGAAAATAGACAC  
CAAAGTAGCCTTCTTCTAACCTTAACGGACCTACAGTGCAAAAAGTTATCAAGAGACTGCATTAAGAGCGCACA  
AAGGAGAAAAAAGTAATCTAAGATGCTTTGTTAGAAAAATAGCGCTCTCGGGATGCATTTTTTGTAGAACAAAA  
AGAAGTATAGATTCTTTGTTGGTAAAATAGCGCTC  
TCGCGTTCGATTTCTGTTCTGTAAAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGA AAAAATTAGCGCTCTCCGGTT  
GCATTTTTGTTTTACAAAAATGAAGCACAGATTCTTCGTTGGTAAAATAGCGCTT  
TCGCGTTCGATTTCTGTTCTGTAAAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGA AAAAATTAGCGCTCTCCGGTT  
GTTTGTTTGAAAAATTAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTTGTTCTACAAAATGAAGCACAGATGCTTCGTTAAACAAA  
GATATGCTATTGAAGTGAAGATGGAACGCAGAAAATGAACCGGGGATGCGACSTGCAAGATTACCTATGCAAT  
AGATGCAATAGTTTCTCCAGGAACCGAAATACATACATTTGTTCTTCGTAAGCGCTTAGACTATATATTATATAC  
AGGTTCAAAATATACTATCTGTTTCAGGSAAAAACCTCCAGGTTGGGATGTTCAAAAATCAATGATGGGTAAACAAG  
TAGCATCGTAAATCTGTAAACAGTTTGTCCGATATTAGGCTGTATCTCCTCAAAGCGTATTCGAAATATCATTGA  
GAAGCTGCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATATATATTTCAAGGATATACCATTTGTAATGTCTG  
CCCCTAAGAAGATCGTGGTTTTGCCAGGTGACCAGCTTGGTCAAGAAATCACAGCCSAAGCCATTAAGGTTCTTA  
AAGCTATTTCTGATGTTCTGTTCCAATGTCAAGTTGATTTGAAAATCATTTAATTTGTTGGTGTCTGCTATCGATG  
CTACAGGTGTTCCACTTCCAGATGAGGCGCTGGAAGCCTCCAAGAASGCTGATGCGCTTTGTTAGGTGCTGTGG  
GTGGTCTAAATGGGGTACCGGTAGTGTAGACCTGAACAAGGTTTACTAAAAATCCGTAAAGAACTTCAATTTGT  
ACGCCAACTTAAGACCATGTAACCTTTGCATCCGACTCTTTTTAGACTTATCTCCCAATCAAGCCACAATTTGCT  
AAAGGTACTGACTTCGTTGTTGTTAGAGAATTAGTGGGAGGATTTACTTTGGTAAAGAGAAAGGAGACGATGGT  
GATGGTGTGCTTTGGGATAGTGAACAATACACCGTTCCAGAAGTGCAAGAATCACAGAATGGCCGCTTTCATG  
GCCCTACAACATGAGCCACCATTGCTATTTGGTCTTTGGATAAAGCTAATGTTTTGGCTCTTCAAGATTATGG  
AGAAAAACTGTGGAGGAAACCACTCAAGAACGAATTTCCCTACATGAAAGTTCAACATCAATTTGATTTGATCTGCC  
GCCATGATCTTAGTAAAGAACCCCAACCCCACTAAATGGTATTATAATCACCAGCAACATGTTTTGGTGTATATCATC  
TCCGATGAAGCCTCCGTTATCCAGCCTCCTTTGGGTTTGGTGGCATCTGCGTCTTGGCTCTTTGCCAGACAAG  
AACACCGCATTTGGTTTTGTACGAACCATGCCATGGTTCCGCTCCAGATTTGCCAAAGAAATAGGTTCAACCCATC  
GCCACTATCTTGTCTGCTGCAATGATGTTGAAATTTGCTATTGAACTTGCCCTGAAGAGGTAAGCCATTTGAAGAT  
GCAGTTAAAAAGGTTTTGGATGCAGGTATCAGAAGTGGTATTAGGTGGTCCAACAGTACCACCGAAGTCCGT

FIG. 3C



【 図 6 】

ParvoB19 VP2の発現に用いるADH2/GAPDHプロモーター  
(BamHI/HindIIIフラグメントとして)

GGATCCTTCAATATGCGCACATACGCTGTTATGTTCAAGGTCCCTTCGTTTAAGAACGAAAGCGGTCTTCCTTTTGA  
GGGATGTTTTCAAGTTGTTCAAATCTATCAAATTTGCAAATCCCCAGTCTGTATCTAGAGCGTTGAATCGGTGATGCG  
ATTTGTTAATTAATAATTGATGGTGTACCATTACCAGGTCTAGATATACCAATGGCAAACGAGCACAACAATACCAG  
TCCGGATCAACTGGCACCATCTCTCCCGTAGTCTCATCTAATTTTTCTTCCGGATGAGGTTCCAGATATACCGCAAC  
ACCTTTATTATGGTTTCCCTGAGGGAATAATAGAATGTCCCATTCGAAATCACCAATTTCTAAACCTGGGCGAATTGT  
ATTTCCGGTTTGTAACTCGTTCAGTCAGGAATGTTCCACGTGAAGCTATCTCCAGCAAAGTCTCCACTTCTTCA  
TCAAATTTGTTGGAGAATACTCCCAATGCTCTTATCTATGGGACTTCCGGGAAACACAGTACCGATACTTCCCAATTC  
GTCTTCAGAGCTCATTGTTTGTGTTGAAGAGACTAATCAAAGAATCGTTTTCTCAAAAAAATTAATATCTTAACTGAT  
AGTTTGATCAAAGGGGCAAAACGTTAGGGGCAAAACAAACGGAAAAATCGTTTTCTCAAATTTTTCTGATGCCAAGAACTC  
TAACCACTCTTATCTAAAAATTGCCTTATGATCCGTCTCTCCGGTTACAGCCTGTGTAAGTGAATTAATCTGCCTTT  
CTAATCACCATTTCTAATGTTTAAATTAAGGGATTTTGTCTTCATTAACGGCTTTTCGCTCATAAAAAATGTTATGACGT  
TTTGCCCGCAGGCGGGAAACCATCCACTTCACGAGACTGATCTCCTCTGCCGGAACACCGGGCATCTCCAACCTTATA  
AGTTGGAGAAATAAGAGAATTTAGATTGAGAGAATGAAAAAACCCTTAGTTTATAGGTCCATTCTCTTAGC  
GCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGT  
AAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCT  
CTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTCGAAATTATTCCCCTACTTGACTAATAAGTATAT  
AAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTTCTACTTTTATAGTTAGTCTT  
TTTTTTAGTTTAAAAACCAAGAACTTAGTTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAGCTT

**FIG. 6**

【 図 7 】

VP1の開始Met(黒く強調されている)のすぐ上流に天然に存在するのと同じく、GAPDH配列の10塩基が、  
パルボウイルスB19の天然ウイルス配列の14塩基(下線が引かれている)と交換されている。  
ADH2/GAPDHプロモーターの「デルタAs」バージョン

GGATCCTTCAATATGCGCACATACGCTGTTATGTTCAAGGTCCCTTCGTTTAAGAACGAA  
AGCGGTCTTCCTTTTGAAGGATGTTTCAAGTTGTTCAAATCTATCAAATTTGCAAATCCC  
CAGTCTGTATCTAGAGCGTTGAATCGGTGATGCGATTTGTTAATTAATAATTGATGGTGTCA  
CCATTACCAGGTCTAGATATACCAATGGCAAACGAGCACAACAATACCAGTCCGGATCA  
ACTGGCACCATCTCTCCCGTAGTCTCATCTAATTTTTCTTCCGGATGAGGTTCCAGATAT  
ACCGCAACACCTTTATTATGGTTTCCCTGAGGGAATAATAGAATGTCCCATTCGAAATCA  
CCAATTTCTAAACCTGGGCGAATTGTTATTTCCGGTTTGTAACTCGTTCAGTCAGGAATG  
TTCCACGTGAAGCTATCTTCCAGCAAAGTCTCCACTTCTTCATCAAATTTGTGGGAGAATA  
CTCCCAATGCTCTTATCTATGGGACTTCCGGGAAACACAGTACCGATACTTCCCAATTCG  
TCTCAGAGCTCATTGTTTGTGTTGAAGAGACTAATCAAAGAATCGTTTTCTCAAAAAAAT  
TAATATCTTAACTGATAGTTTGTATCAAAGGGGCAAAACGTTAGGGGCAAAACGAAACG  
ATCGTTTCTCAAATTTTTCTGATGCCAAGAACTCTAACCAGTCTTATCTAAAAAATTCCTT  
ATGATCCGTCCTCTCCGGTTACAGCCTGTGTAAGTGAATTAATTCCTGCCTTTCTAATCACCA  
TTCTAATGTTTTAATTAAGGGATTTTGTCTTCATTAACGGCTTTTCGCTCATAAAAAATGTT  
ATGACGTTTTGCCCCGAGGCGGGAAACCATCCACTTCACGAGACTGATCTCCTCTGCCGG  
AACACCGGGCATCTCCAACCTTATAAGTTGGAGAAATAAGAGAATTTAGATTGAGAGAAT  
GAAAAAACCCTTAGTTTATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGG  
GCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAA  
ATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTCTTACACCTTCTAT  
TACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTCTG  
AAATATTCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCT  
GAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTT  
TAAACACCAAGAACTTAGTTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAGCTTTGTAGATTATG

**FIG. 7**

## 【 図 8 】

ParvoB19 VP1およびVP1mutを発現させるために用いる、  
TATAが欠失したADH2/GAPDHプロモーター(BamHI/MluIフラグメントとして)

GGATCC TTCAATATGCGCACATACGCTGTTATGTTCAAGGTCCCTTCGTTTAAGAACGAA  
AGCGGTCTTCCTTTTGAGGGATGTTTCAAGTTGTTCAAATCTATCAAATTTGCAAATCCC  
CAGTCTGTATCTAGAGCGTTGAATCGGTGATGCGATTGTTAATTAAATTGATGGTGTCA  
CCATTACCAGGTCTAGATATAACCAATGGCAAACCTGAGCACAACAATACCAGTCCGGATCA  
ACTGGCACCATCTCTCCCCTAGTCTCATCTAATTTTTCTTCCGGATGAGGTTCCAGATAT  
ACCGCAACACCTTTATTATGGTTTCCCTGAGGGAATAATAGAAATGTCCCATTTCGAAATCA  
CCAATTCCTAAACCTGGGCGAATTGTATTTCCGGTTTGTTAACTCGTTCCAGTCAGGAATG  
TTCCACGTGAAGCTATCTTCCAGCAAAGTCTCCACTTCTTCATCAAATTTGTTGGGAGAATA  
CTCCCAATGCTCTTATCTATGGGACTTCCGGGAAACACAGTACCGATACTTCCCAATTCG  
TCTTCAGAGCTCATTGTTTGTGTTGAAGAGACTAATCAAAGAATCGTTTTCTCAAAAAAAT  
TAATATCTTAACTGATAGTTTGATCAAAGGGGCAAACCTAGGGGCAAACAAACGGAAAA  
ATCGTTTTCTCAAATTTTCTGATGCCAAGAACTCTAACCAGTCTTATCTAAAAAATTGCCTT  
ATGATCCGTCTCTCCGGTTACAGCCTGTGTAACCTGATTAATCCCTGCCTTTCTAATCACCA  
TTCTAATGTTTTAATTAAGGGATTTTGTCTTCAATTAACGGCTTTCGCTCATAAAAAATGTT  
ATGACGTTTTTGCCCGCAGGCGGGAAACCATCCACTTCAAGAGACTGATCTCCTCTGCCGG  
AACACCGGGCATCTCCAACCTTATAAGTTGGAGAAATAAGAGAATTTTCAGATTGAGAGAAT  
GAAAAAAAAAAACCCTTAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGG  
GCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAA  
ATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTCTTACACCTTCTAT  
TACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTTG  
AAATTAATTCOCCTAGCATTGTAATCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCCTAC  
TTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTTAAACACCAAGAACTTAGTTTTCGAATAAACAC  
ACATAAACAAACACGCGT

**FIG. 8**

## 【 図 9 】

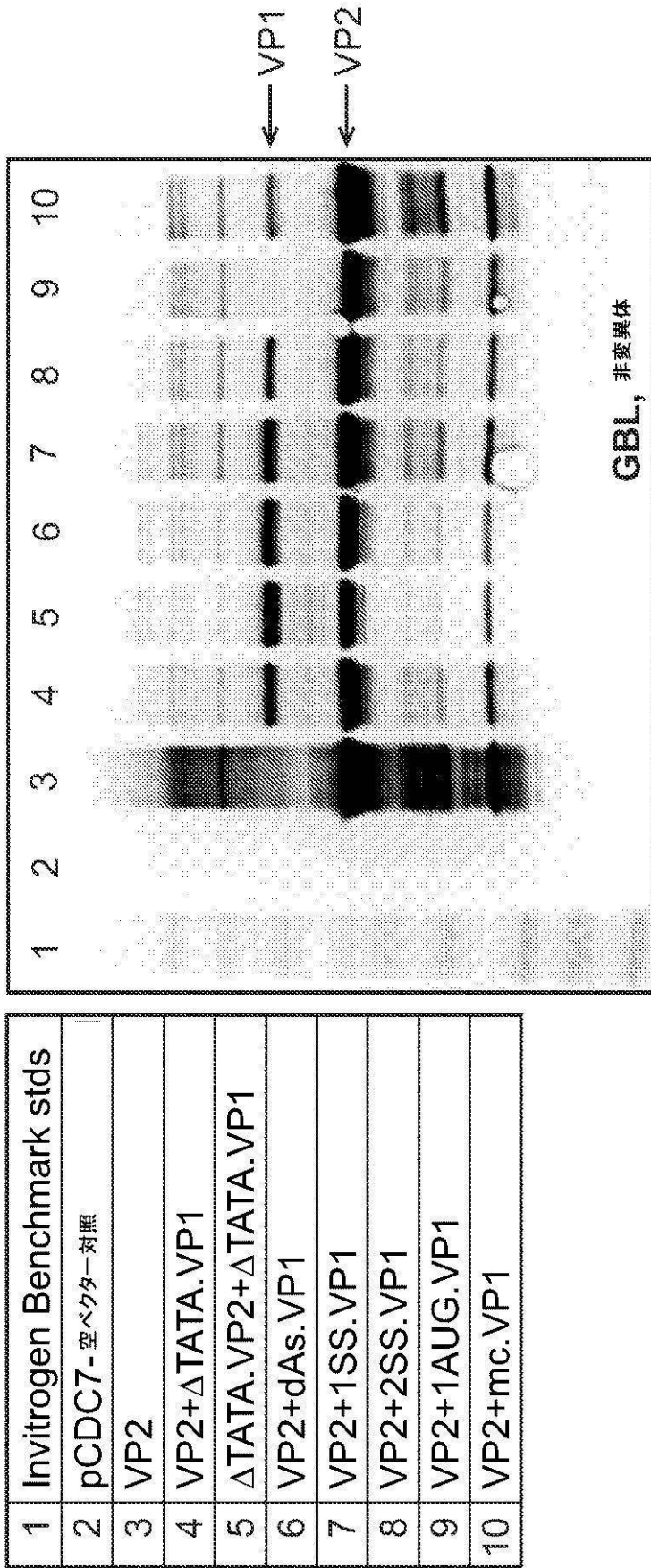
ADH2/GAPDHプロモーターとVP1の開始メチオニン(黒で強調されている)との間の接合部から上流に1SS(合成の開始-終止配列、下線が引かれている)を有するParvoB19 VP1

ACGCGTATGATGCCTAGTTAATGAACAAAACAAAVIGTCTAAGAAATCCGGAAAATGGTG  
 GGAATCTGATGATAAATTTGCTAAGGCTGTTTACCAACAAATTTGTTGAATTTTACGAAAA  
 GGTACTGGTACTGATTTGGAATTGATTCAAATTTTGAAGGATCATTACAACATTTCTTT  
 GGATAATCCATTGGAAAATCCATCTTCATTGTTTGGTTGCTAGAATTAAGAACAA  
 CTTGAAGAACTCTCCAGATTTGTATTCTCATCATTTCCAATCTCATGGTCAATTGTCTGA  
 TCATCCACATGCTTTATCTTCATCTTCATCTCATGCTGAACCAAGAGGTGAAAATGCTGT  
 TTTATCTTCTGAAGATTTGCATAAACCAGGTCAAGTTTCTGTTCAATTGCCAGGTACTAA  
 TTACGTTGGTCCAGGTAATGAATTGCAAGCTGGTCCACCACAATCTGCTGTTGATTCTGC  
 TGCTAGAATTCATGATTTCAAGATACTCTCAATTGGCTAAGTTGGGTATTAATCCATATAC  
 TCATTGGACTGTTGCTGATGAAGAATTGTTGAAGAACATTAAGAATGAAACTGGTTTTCA  
 AGCTCAAGTTGTTAAAGATTACTTCACTTTGAAAGGTGCTGCTGCTCCAGTTGCTCATT  
 TCAAGGTTCTTTGCCAGAAGTTCCAGCTTATAACGCTTCTGAAAAATATCCATCTATGAC  
 ATCTGTTAATCTGCTGAAGCATCTACTGGTGCAGGTGGAGGTGGTTCTAATTCTGTTAA  
 ATCTATGTGGTCTGAAGGTGCTACTTTTTCTGCTAATTCAGTTACTTGTACTTTCTCTAG  
 ACAATCTTGATTCCATATGATCCAGAACATCATTACAAAGTTTTTTCCACCAGCTGCTTC  
 ATCTTGTACATAATGCTTCAGGTAAAGAAGCTAAGGTTTGTACTATTTCTCCAATTATGGG  
 TTATTCTACTCCTTGGAGATACTTGGATTTTAAATGCTTTGAACTTGTTTTTTTCTCCATT  
 GGAATTTCAACATTTGATTGAAAACACGGTCTATGCTCCAGATGCTTTGACTGTTAC  
 TATTTCTGAAATTTGCTGTTAAGGATGTTACTGATAAAACAGGTGGTGGTGTTCAGTTAC  
 TGATTCTACTACTGGTAGATTGTGCATGTTGGTTGATCATGAATACAAATACCCATACGT  
 TTTGGGTCAAGGTCAAGATACTTTGGCTCCAGAATTGCCAATTTGGGTTTTATTTCCACC  
 ACAATACGCTTATTTGACTGTTGGTGTGTTAATACTCAAGGTATTTCTGGTGTATCTAA  
 AAAGTTGGCTTCTGAAGAATCTGCTTTTTACGTTTTTGGAACATTCTTCTTTTCAATTGTT  
 GGGTACTGGTGGTACTGCTTCTATGTCTTACAAATTTCCACCAGTTCCACCTGAAAATTT  
 GGAAGGTTGTTCTCAACATTTTTACGAAATGTACAATCCATTGTATGGTTCTAGATTGGG  
 TGTTCCAGATACTTTGGGTGGTGTATCCAAAATTTAGATCTTTGACTCATGAAGATCATGC  
 TATTTCAACCACAAAATTTTCATGCCAGGTCCATTGGTTAATTTCTGTTTCTACTAAAGAAGG  
 TGATTCTTCTAATACAGGTGCTGGTAAAGCATTGACTGGTTTGTCTACTGGTACTTCTCA  
 AAACACTAGAATTTCTTTAAGACCAGGTCCAGTTTCCACAACCATATCATCATTGGGATAC  
 TGATAAGTACGTTACTGGTATTAATGCTATTTACATGGTCAAACACTACTTATGGTAATGC  
 TGAAGATAAAGAATATCAACAAGGTGTTGGTAGATTTCCAAACGAAAAAGAACAATTGAA  
 ACAATGCAAGGTTTGAATATGCATACTTACTTTCCAAACAAAGGTACTCAACAATACAC  
 TGATCAAATGAAAGACCATTGATGGTTGGTCTGTGTTGGAATAGAAGAGCTTTGCATTA  
 TGAATCTCAATTGTGGTCTAAGATTCCAAATTTAGATGATTCTTTCAAGACTCAATTTGC  
 TGCTTTGGGTGGTTGGGGTTTGCATCAACCTCCACCACAAATTTTCTTGAAGATTTTGCC  
 ACAATCTGGTCCAATTTGGTGGTATTAAATCTATGGGTATTACTACTTTGGTTCAATATGC  
 TGTTGGTATTATGACTGTTACAATGACTTTTTAAGTTGGGTCCAAGAAAAGCTACAGGTAG  
 ATGGAATCCACAACCAGGTGTTTATCCACCACATGCTGCTGGTCATTTGCCTTACGTTTT  
 GTATGATCCAACCTGCTACTGATGCTAAACAACATCATAGACATGGTTATGAAAACCTGA  
 AGAATTGTGGACTGCTAAATCTAGAGTTCATCCATTGTAATGAGTCGAC

**FIG. 9**

【 図 10 】

FIG. 10



## 【 図 1 4 】

VP1野生型アミノ酸配列

アミノ酸 : 781  
 分子量 : 84 kDa

MSKKSGKWWESDDKFAKAVYQQFVEFYEKVTGTDLELIQILKDHYNI SLDNPLENPSSLF  
 DLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPRGENAVLSSSEDLHKPGQ  
 VSVQLPGTNYVGPGNELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTVADEELLK  
 NIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAAPVAHFQGS LPEVPAYNASEKYPSMTSVNSAEASTGA  
 GGGGSNSVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLI PYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAK  
 VCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLENIYGS IAPDALTVTI SEIAVKDVTD  
 KTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTVGDVN  
 TQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTASMSYKFPVPPENLEGCSQH FYEMY  
 NPLYGSRLGVPD TLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTKEGDSNTGAGKAL  
 TGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGR  
 FPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQLWSKI PNL  
 DDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKI LPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIMTVTMTFK  
 LGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHHRHGYEKPEELWTAKSRVHP  
 L

VP2アミノ酸配列

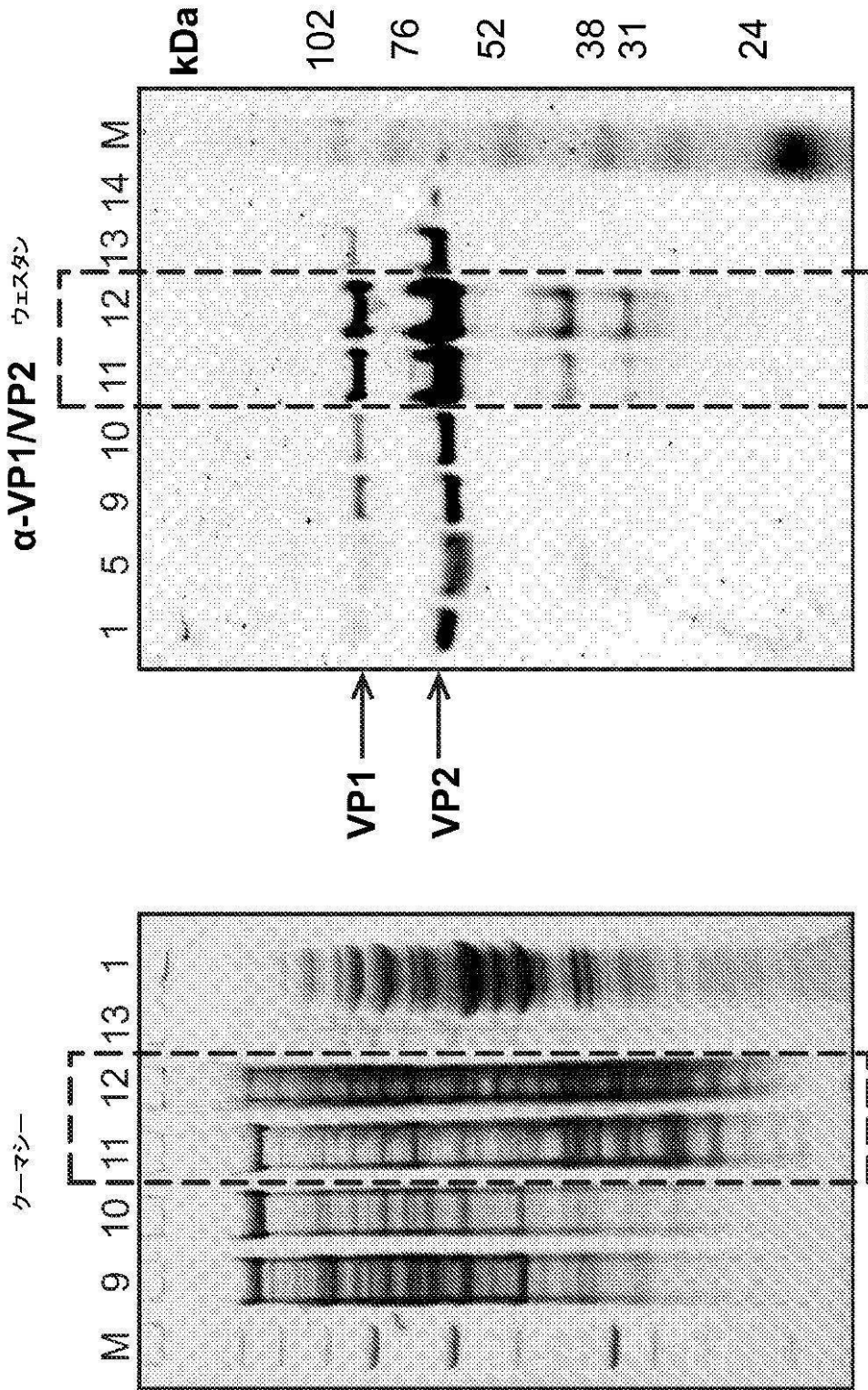
アミノ酸 : 554  
 分子量 : 58 kDa

MTSVNSAEASTGAGGGGSNSVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLI PYDPEHHYKVFSPA  
 ASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLENIYGS IAPDALT  
 VTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYF  
 PPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTASMSYKFPVPPPE  
 NLEGCSQH FYEMYNPLYGSRLGVPD TLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTK  
 EGDSSNTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWTDKYVTGINAISHGQTTYG  
 NAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRRAL  
 HYESQLWSKI PNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKI LPQSGPIGGIKSMGITTLVQ  
 YAVGIMTVTMTFKLGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHHRHGYEK  
 PEELWTAKSRVHPL

**FIG. 14**

【 図 15 】

FIG. 15



【 図 1 6 】

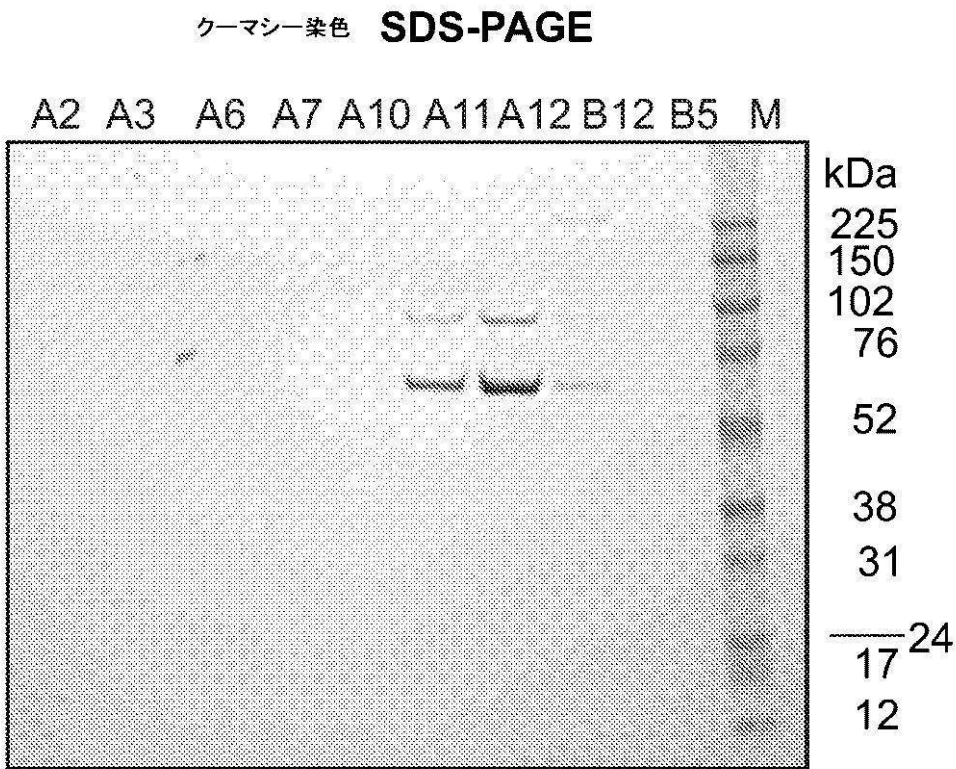
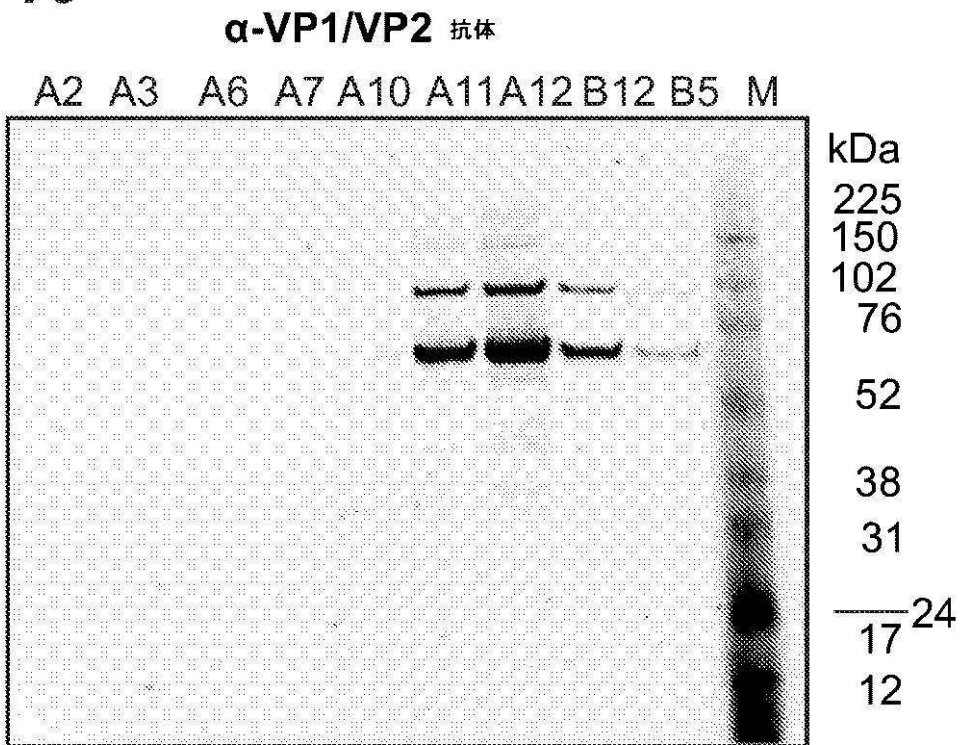


FIG. 16



【 配 列 表 】

2016041085000001 . 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 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 C 0 8 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P	33/06	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 0 1 A
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	L

(72)発明者 アンジェリカ メディナ - セルビー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7 , エメリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7 , ノバルティス バクシズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド 気付

(72)発明者 ドリス コイト

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7 , エメリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7 , ノバルティス バクシズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド 気付

(72)発明者 フィリップ アール. ドルミツァー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7 , エメリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7 , ノバルティス バクシズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド 気付

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 CA20 DA12 EA04 GA11 HA11  
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QR48 QS33  
 4B064 AG32 CA06 CA19 CC24 CE07 CE10 DA01  
 4B065 AA80X AB01 BA01 BD01 BD15 BD18 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA13 MA66 NA14 ZA511 ZA551 ZA891 ZA961 ZB091 ZB381  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA66 NA14 ZA51 ZA55 ZA89  
 ZA96 ZB09 ZB38  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA16 CA01 DA86 EA20 EA50 FA74 GA15  
 GA22

【外国語明細書】

2016041085000001.pdf

专利名称(译)	产生病毒样细小病毒B19颗粒的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016041085A</a>	公开(公告)日	2016-03-31
申请号	JP2016000272	申请日	2016-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	イーサンセッテンバー アンジェリカメディナセルビー ドリスコイト フィリップアールドルミツァー		
发明人	イーサン セッテンバー アンジェリカ メディナ-セルビー ドリス コイト フィリップ アール. ドルミツァー		
IPC分类号	C12P21/00 C07K14/015 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 C12N7/01 A61K31/713 A61P7/06 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P33/06 A61P37/04 A61K48/00 G01N33 /53 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	A61K2039/5258 A61K2039/53 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/02 C07K14/005 C12N7/00 C12N2750 /14222 C12N2750/14223 C12N2750/14243 C12N2830/20 C12N2830/34 Y02A50/412 A61K39/23		
FI分类号	C12P21/00.B C07K14/015.ZNA C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 C12N7/01 A61K31/713 A61P7/06 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P33/06 A61P37/04 A61K48 /00 G01N33/53.N G01N33/543.501.A G01N33/569.L C12N15/35 C12N15/63.Z C12N15/70.Z C12N15 /74.Z C12N15/81.Z C12N15/85.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QR48 4B063/QS33 4B064/AG32 4B064/CA06 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE07 4B064/CE10 4B064/DA01 4B065/AA80X 4B065 /AB01 4B065/BA01 4B065/BD01 4B065/BD15 4B065/BD18 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA511 4C084/ZA551 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB091 4C084/ZB381 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086 /MA66 4C086/NA14 4C086/ZA51 4C086/ZA55 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB09 4C086/ZB38 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA22		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/321856 2010-04-07 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供用于产生细小病毒B19病毒样颗粒的方法。解决方案：本发明提供了用于产生细小病毒VP1 / VP2病毒样颗粒 (VLP) 的方法。本发明还提供了用于纯化细小病毒VLP和含有VLP的免疫原性组合物的方法。本发明还包括编码细小病毒VP1和VP2的重组核酸分子和含有重组核酸的宿主细胞。选择的附图：无

(21) 出願番号	特願2016-272 (P2016-272)	(71) 出願人	504389991
(22) 出願日	平成28年1月4日 (2016.1.4)		ノバルティス アーゲー
(62) 分割の表示	特願2013-503962 (P2013-503962) の分割		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
原出願日	平成23年4月7日 (2011.4.7)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/321,856		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成22年4月7日 (2010.4.7)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	イーサン セッテンバー アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 62-8097, エメリービル, ビー .オー. ボックス 8097, ノバル ティス バクシンス アンド ダイアグノ スティックス, インコーポレーテッド 気付
			最終頁に続く