

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2016/080540

発行日 平成29年8月31日 (2017. 8. 31)

(43) 国際公開日 平成28年5月26日 (2016. 5. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 G	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/29 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 5
A 6 1 K 35/76 (2015. 01)	A 6 1 K 39/29	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/761 (2015. 01)	A 6 1 K 35/76	4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/763 (2015. 01)	A 6 1 K 35/761	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2016-560313 (P2016-560313)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2015/082778
 (22) 国際出願日 平成27年11月20日 (2015. 11. 20)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-235736 (P2014-235736)
 (32) 優先日 平成26年11月20日 (2014. 11. 20)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 500409323
 アンジェスMG株式会社
 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目7番15号
 (71) 出願人 504176911
 国立大学法人大阪大学
 大阪府吹田市山田丘1番1号
 (71) 出願人 311004773
 DSファーマアニマルヘルス株式会社
 大阪府大阪市中央区本町二丁目5番7号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA-ペプチド併用ワクチン

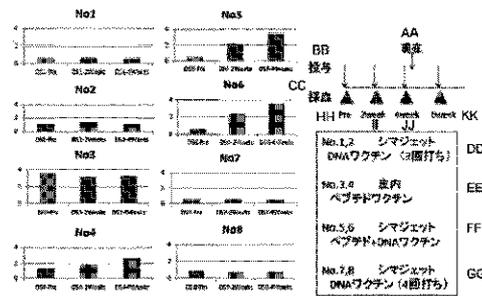
(57) 【要約】

本発明は、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するための組み合わせ製剤であって、

- (I) 当該抗原性ペプチド、及び
- (II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74~87又は130~138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

を含み、且つ

- (I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとが、適用対象に対して、実質的に同時に投与される、製剤を提供する。



AA Current
 BB Administration
 CC Blood drawn
 DD No. 1, 2; Shima Jet, DNA vaccine (3 administrations)
 EE No. 3, 4; intradermal, peptide vaccine
 FF No. 5, 6; Shima Jet, peptide + DNA vaccine
 GG No. 7, 8; Shima Jet, DNA vaccine (4 administrations)
 HH Pre
 II 2week
 JJ 4week
 KK 8week

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するための組み合わせ製剤であって、

(I) 当該抗原性ペプチド、及び

(II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74～87又は130～138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

を含み、且つ

(I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとが、適用対象に対して、実質的に同時に投与される、製剤。

10

【請求項 2】

キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドにおいて、抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基80と81の間に挿入されている、請求項1記載の製剤。

【請求項 3】

単一の製剤として製剤化されている、請求項1又は2記載の製剤。

【請求項 4】

(I)のペプチドと、(II)の発現ベクターとが適用対象に対して同一投与経路で投与される、請求項1～3のいずれか1項記載の製剤。

20

【請求項 5】

皮下、皮内、又は筋肉内に投与される請求項4記載の製剤。

【請求項 6】

投与回数が1回である、請求項1～5のいずれか1項記載の製剤。

【請求項 7】

投与にエレクトロポレーション及び/又は核酸導入用試薬を用いない、請求項1～6のいずれか1項記載の製剤。

【請求項 8】

アジュバントを含まない、請求項1～7のいずれか1項記載の製剤。

30

【請求項 9】

抗原性ペプチドが、適用対象の自己抗原タンパク質又はその部分ペプチドである、請求項1～8のいずれか1項記載の製剤。

【請求項 10】

自己抗原タンパク質が、疾患の増悪に寄与する抗原である、請求項9記載の製剤。

【請求項 11】

疾患が生活習慣病である、請求項10記載の製剤。

【請求項 12】

自己抗原タンパク質が、アンギオテンシンIIである、請求項10又は11記載の製剤。

【請求項 13】

心不全、高血圧症、腎不全、動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症、又は認知症の治療又は予防用である、請求項12記載の製剤。

40

【請求項 14】

僧房弁閉鎖不全症に起因する心不全の治療又は予防用である、請求項13記載の製剤。

【請求項 15】

自己抗原タンパク質が、VEGFである、請求項10又は11記載の製剤。

【請求項 16】

癌、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症、又は未熟児網膜症の治療又は予防用である、請求項15記載の製剤。

【請求項 17】

50

適用対象がヒトである、請求項1～16のいずれか1項記載の製剤。

【請求項18】

適用対象が非ヒト哺乳動物である、請求項1～16のいずれか1項記載の製剤。

【請求項19】

適用対象に対して、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するための方法であって、

(I) 当該抗原性ペプチド、及び

(II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74～87又は130～138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

10

を、実質的に同時に投与することを含む、方法。

【請求項20】

抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答の誘導において使用するための、組み合わせであって、

(I) 当該抗原性ペプチド、及び

(II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74～87又は130～138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

20

を含み、

(I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとが、適用対象に対して、実質的に同時に投与される、組み合わせ。

【請求項21】

抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するための医薬の製造における、組み合わせの使用であって、該組み合わせは、

(I) 当該抗原性ペプチド、及び

(II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74～87又は130～138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

30

を含み、

(I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとが、適用対象に対して、実質的に同時に投与される、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するための製剤に関する。

40

【背景技術】

【0002】

生体内の自己抗原に対する免疫応答を積極的に惹起し、当該自己抗原の活性を中和することにより、当該自己抗原が寄与する疾患の予防や治療を行うワクチン療法が提案されている。

【0003】

本発明者らは、アンギオテンシンII特異的エピトープをKLHとコンジュゲートし、これを投与することにより、アンギオテンシンIIに対する抗体産生を惹起し、高血圧症を良好に治療し得ることを報告している（非特許文献1）。また、本発明者らは、アンギオテン

50

シンII特異的エピトープが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基80と81の間に挿入された、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターの投与により、アンジオテンシンIIに対する抗体産生を惹起し、高血圧症等の生活習慣病を良好に治療又は予防し得ることを見出している（特許文献1）。また、アポリポプロテイン(a)の特異的エピトープが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基80と81の間に挿入された、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターの投与により、自己反応性のT細胞誘導を回避しつつ、アポリポプロテイン(a)に対する抗体産生を惹起し、動脈硬化症を良好に治療又は予防し得ることを見出している（特許文献2、非特許文献2）。更に、VEGFの特異的エピトープ及び/又はアンジオポエチン-2の特異的エピトープがB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基80と81の間に挿入された、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターの投与により、腫瘍血管新生を効果的に抑制し、癌を治療又は予防し得ることを見出している（特許文献3、非特許文献3）。

10

【0004】

抗原をコードする発現ベクターを用いたDNAワクチンについては、DNAワクチンを投与後に、当該抗原自体の投与によるブーストを行うことにより、ワクチン効果が増強されることが報告されている（非特許文献4~7）。

【0005】

しかしながら、このようなワクチンの有効性は十分に満足できるものではない。

【先行技術文献】

20

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO 2012/141280 A1

【特許文献2】JP 2014 60968 A

【特許文献3】WO 2014/034735 A1

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Int Heart J. 2014;55(2):96 100

【非特許文献2】Kyutoku M, Nakagami H, Koriyama H, Nakagami F, Shimamura M, Kurinami H, Tomioka H, Miyake T, Katsuya T, Morishita R. Inhibition of Neointima Formation through DNA Vaccination for Apolipoprotein(a): A New Therapeutic Strategy for Lipoprotein(a). Sci Rep. 2013 Apr 3;3:1600

30

【非特許文献3】Kyutoku M, Nakagami H, Koriyama H, Tomioka H, Nakagami F, Shimamura M, Kurinami H, Zhengda P, Jo DH, Kim JH, Takakura N, Morishita R. Development of novel DNA vaccine for VEGF in murine cancer model. Sci Rep. 2013 Nov 29;3:3380

【非特許文献4】Parasite Immunol. 2011 Nov;33(11):594 608

【非特許文献5】Immunology. 2012 Mar;135(3):216 25

【非特許文献6】Vet Microbiol. 2013 Apr 12;163(1 2):62 70

【非特許文献7】Antiviral Res. 2012 Apr;94(1):25 34

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

DNAワクチンについては、その導入効率を高めるため、エレクトロポレーションや核酸導入試薬を併用する場合があるが、これらの処置は、特殊な投与器具、装置、試薬等を要するので、治療コストの上昇に伴う患者への経済的負担をきたすおそれがある。また、エレクトロポレーション等の処置や、多数回に及ぶワクチンの繰り返し投与は、投与対象への身体的負担を伴う。そこで、これらの経済的及び身体的負担を軽減する技術の開発が望まれる。

【0009】

50

そこで、本発明は、エレクトロポレーションや核酸導入試薬等の処置を要せずとも、抗原に対する特異的免疫応答を効果的に誘導し得るDNAワクチン技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、鋭意検討の結果、抗原性ペプチドが挿入されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターと共に、当該抗原性ペプチド自体を同時に投与すると、当該抗原性ペプチドに対する特異的抗体が強力に誘導されることを見出した。このようなDNAワクチンとペプチドワクチンの同時併用により、エレクトロポレーションや核酸導入試薬を要せずとも、当該抗原性ペプチドに対する特異的抗体を強力に誘導できた。また、DNAワクチンとペプチドワクチンの同時併用により、単独投与時と比較して、当該抗原性ペプチドに対する特異的抗体の抗体価の上昇が長期間持続した。更に、DNAワクチンとペプチドワクチンの同時併用により、IgMよりもIgGが優先的に誘導された。これらの知見に基づき、更に検討を加え、本発明を完成させた。

【0011】

即ち、本発明は以下に関する。

[1] 抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するための組み合わせ製剤であって、

(I) 当該抗原性ペプチド、及び

(II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74～87又は130～138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

を含み、且つ

(I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとが、適用対象に対して、実質的に同時に投与される、製剤。

[2] キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドにおいて、抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基80と81の間に挿入されている、[1]記載の製剤。

[3] 単一の製剤として製剤化されている、[1]又は[2]記載の製剤。

[4] (I)のペプチドと、(II)の発現ベクターとが適用対象に対して同一投与経路で投与される、[1]～[3]のいずれか記載の製剤。

[5] 皮下、皮内、又は筋肉内に投与される[4]記載の製剤。

[6] 投与回数が1回である、[1]～[5]のいずれか記載の製剤。

[7] 投与にエレクトロポレーション及び/又は核酸導入用試薬を用いない、[1]～[6]のいずれか記載の製剤。

[8] アジュバントを含まない、[1]～[7]のいずれか記載の製剤。

[9] 抗原性ペプチドが、適用対象の自己抗原タンパク質又はその部分ペプチドである、[1]～[8]のいずれか記載の製剤。

[10] 自己抗原タンパク質が、疾患の増悪に寄与する抗原である、[9]記載の製剤。

[11] 疾患が生活習慣病である、[10]記載の製剤。

[12] 自己抗原タンパク質が、アンジオテンシンIIである、[10]又は[11]記載の製剤。

[13] 心不全、高血圧症、腎不全、動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症、又は認知症の治療又は予防用である、[12]記載の製剤。

[14] 僧房弁閉鎖不全症に起因する心不全の治療又は予防用である、[13]記載の製剤。

[15] 自己抗原タンパク質が、VEGFである、[10]又は[11]記載の製剤。

[16] 癌、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症、又は未熟児網膜症の治療又は予防用である、[15]記載の製剤。

10

20

30

40

50

[17] 適用対象がヒトである、[1] ~ [16] のいずれか記載の製剤。

[18] 適用対象が非ヒト哺乳動物である、[1] ~ [16] のいずれか記載の製剤。

[19] 適用対象に対して、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するための方法であって、

(I) 当該抗原性ペプチド、及び

(II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74~87又は130~138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

10

を、実質的に同時に投与することを含む、方法。

[20] 抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答の誘導において使用するための、組み合わせであって、

(I) 当該抗原性ペプチド、及び

(II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74~87又は130~138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

20

を含み、

(I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとが、適用対象に対して、実質的に同時に投与される、組み合わせ。

[21] 抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するための医薬の製造における、組み合わせの使用であって、該組み合わせは、

(I) 当該抗原性ペプチド、及び

(II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74~87又は130~138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

30

を含み、

(I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとが、適用対象に対して、実質的に同時に投与される、使用。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明により、抗原性ペプチドに対する特異的抗体を強力に誘導することが可能なワクチンが提供される。

本発明により、エレクトロポレーションや核酸導入試薬等の処置を要せずとも、DNAワクチンを用いて、抗原性ペプチドに対する特異的抗体を効果的に誘導することができる。

また、本発明により、抗原性ペプチドに対する特異的抗体の抗体価の上昇が長期間持続するので、ワクチン投与の回数を減らすことが出来る。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】DNA + ペプチド併用ワクチン投与による、アンギオテンシンIIに対する抗体価の上昇を示す。

【図 2】DNA + ペプチド併用ワクチン投与により上昇したアンギオテンシンIIに対する抗体価の長期間にわたる維持を示す。

【図 3】ペプチド単独投与群 (No. 4) 及びDNA + ペプチド併用ワクチン投与群 (No. 5, 6) への追加免疫による、ブースター効果を示す。

【図 4】ペプチド単独投与群 (No. 4) 及びDNA + ペプチド併用ワクチン投与群 (No. 5, 6

50

)への追加免疫後の、アンジオテンシンIIに対する抗体価の経時変化を示す。

【図5】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による、アンジオテンシンIIに対する抗体価の上昇を示す(No. 2, 4, 6)。

【図6】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による、血圧低下効果及び心不全パラメーター改善効果を示す。

【図7】ワクチン投与による、アンジオテンシンIIに対する抗体価の上昇を示す。

【図8】ペプチドワクチン及びDNA+ペプチド併用ワクチンの単回投与による、アンジオテンシンIIに対する抗体価の上昇を示す。

【図9】DNA+ペプチド併用ワクチンの単回投与により上昇したアンジオテンシンIIに対する抗体価の長期間にわたる維持を示す。

【図10】単回投与条件における、ペプチドワクチンとDNA+ペプチド併用ワクチンの免疫誘導効果の比較を示す。

【図11】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による免疫応答の増強を示す。

【図12-1】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による抗体価の上昇を示す(2W及び4W)。縦軸はELISAにおける吸光度を、横軸は血清の希釈率を示す。

【図12-2】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による抗体価の上昇を示す(8W及び12W)。縦軸はELISAにおける吸光度を、横軸は血清の希釈率を示す。

【図13-1】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による抗体価の上昇を示す(2W)。縦軸はELISAにおける吸光度を、横軸は血清の希釈率を示す。

【図13-2】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による抗体価の上昇を示す(2W)。250倍希釈した血清を用いた。縦軸はELISAにおける吸光度を示す。平均値±S.D. (n=6)。*p<0.01(同用量のアンジオテンシンIIワクチン1に対して)。

【図14-1】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による抗体価の上昇を示す(4W)。縦軸はELISAにおける吸光度を、横軸は血清の希釈率を示す。

【図14-2】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による抗体価の上昇を示す(4W)。250倍希釈した血清を用いた。縦軸はELISAにおける吸光度を示す。平均値±S.D. (n=6)。*p<0.01(同用量のアンジオテンシンIIワクチン1に対して)。

【図15】実施例8の試験スケジュールを模式的に示す。

【図16-1】No.1の個体の収縮期血圧及び心拍数の推移を示す。

【図16-2】No.2の個体の収縮期血圧及び心拍数の推移を示す。

【図16-3】No.3の個体の収縮期血圧及び心拍数の推移を示す。

【図17】DNA+ペプチド併用ワクチン投与による抗体価の上昇を示す(2W及び5W)。250倍希釈した血漿を用いた。縦軸はELISAにおける吸光度を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するための組み合わせ製剤であって、

(I) 当該抗原性ペプチド、及び

(II) 当該抗原性ペプチドが挿入又は付加されたキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74~87又は130~138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている、発現ベクター

を含む、製剤を提供するものである。

【0015】

抗原性ペプチドとは、投与対象の免疫系により認識され、当該ペプチドに対する特異的免疫応答、好ましくは、当該ペプチドに対する特異的液性免疫応答(即ち、当該ペプチドを特異的に認識する抗体の産生)を誘導する活性を有するペプチドをいう。

【0016】

抗体による抗原Xへの「特異的認識」とは、抗原抗体反応における、抗体の抗原Xに対す

10

20

30

40

50

る結合親和性が、非特異的な抗原（例、BSA）に対する結合親和性よりも高いことを意味する。

【0017】

本発明において用いられる抗原性ペプチドの種類は、抗原性を有する限り特に限定されないが、好ましくは、本発明の製剤の適用対象の自己抗原タンパク質又はその部分ペプチドである。本発明においては、抗原性ペプチドが挿入されたキメラB型肝炎ウイルスコア（HBc）抗原ポリペプチドをコードする発現ベクターであって、該抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基80と81の間に挿入されている、発現ベクターが用いられる。HBc抗原タンパク質は、自己集合して球状のコア粒子を構成する。このコア粒子は非常に免疫原性が高い。このHBc抗原タンパク質のアミノ酸残基80と81の間に、所望のペプチドを挿入すると、自己集合により形成される粒子の表面に当該ペプチドが提示される。そのため、このキメラHBc抗原ポリペプチドを用いると、挿入したエピトープが免疫系に認識され易くなり、当該ペプチドを特異的に認識する抗体産生を効率的に誘導することができる。そこで、このHBc抗原タンパク質をワクチンのプラットフォームとして利用して、免疫系に認識されにくい自己抗原タンパク質やその部分ペプチドに対する抗体産生を誘導することができる（D. C. Whitacre et al., Expert Rev. Vaccines, vol.8, no.11, pp.1565 1573, 2009 ; B. E. Clarke et al., Nature, vol.330, pp.381 384, 1987 ; 特許第3228737号公報）。

10

【0018】

自己抗原タンパク質とは、本発明の製剤の適用対象の動物自身の遺伝子上にコードされる抗原タンパク質を意味する。本発明の製剤の適用対象は、哺乳動物である。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の有蹄目、イヌ、ネコ等のネコ目、ヒト、サル、アカゲザル、カニクイザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類等を挙げることが出来る。哺乳動物は、好ましくはネコ目（イヌ、ネコ等）又は霊長類（ヒト等）である。従って、例えば、本発明の製剤をヒトへ適用する場合、好適にはヒト自己抗原タンパク質又はその部分ペプチドの使用が意図されるが、これに限定されない。また、本発明の製剤をイヌへ適用する場合、好適にはイヌ自己抗原タンパク質又はその部分ペプチドの使用が意図されるが、これに限定されない。さらに、本発明の製剤をネコへ適用する場合、好適にはネコ自己抗原タンパク質又はその部分ペプチドの使用が意図されるが、これに限定されない。

20

30

【0019】

本明細書において、特定の因子X（ポリペプチド又はポリヌクレオチド）について、「生物Y由来の因子X」又は「生物Y因子X」とは、該因子Xのアミノ酸配列又は核酸配列が、生物Yにおいて天然に発現している該因子Xのアミノ酸配列又は核酸配列と同一のアミノ酸配列又は核酸配列を有することを意味する。

【0020】

自己抗原タンパク質の種類は、特に限定されないが、一態様において、疾患の増悪に寄与する抗原である。本態様において、本発明の製剤を対象に投与すると、当該自己抗原タンパク質又はその部分ペプチドに対する特異的免疫応答、好ましくは、当該ペプチドに対する特異的液性免疫応答（即ち、当該ペプチドを特異的に認識する抗体の産生）が誘導され、当該自己抗原タンパク質の活性が抗体によって中和されることにより、当該自己抗原タンパク質が増悪に寄与する疾患を予防又は治療することができる。

40

【0021】

一態様において、自己抗原タンパク質は、生活習慣病の増悪に寄与する抗原（生活習慣病関連因子）である。本明細書において生活習慣病とは、食生活や運動習慣、休養、喫煙、飲酒などの生活習慣によって引き起こされる病気の総称である。生活習慣病としては、高血圧症、高脂血症、糖尿病、インスリン抵抗性、動脈硬化症（閉塞性動脈硬化症等）、虚血性疾患（心筋梗塞、脳卒中等）、肥満、糖尿病性網膜症、高LDL血症等を挙げることができる。本発明の製剤において、抗原性ペプチドとして生活習慣病関連因子又はその部

50

分ペプチドを用いることにより、生活習慣病関連因子に対する抗体産生を誘導し、その抗体が生活習慣病関連因子を中和することにより生活習慣病を治療又は改善し得る。

【0022】

一態様において、自己抗原タンパク質は、液性因子である。自己抗原タンパク質として、細胞内タンパク質や細胞表面タンパク質ではなく、液性因子のタンパク質を用いることにより、当該液性因子に対する液性免疫が優勢に誘導され、誘導された免疫（細胞性免疫及び液性免疫、特に細胞性免疫）による正常な組織への悪影響を避けつつ、当該液性因子の活性を効果的に中和することが出来る。

【0023】

疾患（例、生活習慣病）の増悪に寄与する、液性因子である自己抗原タンパク質としては、特に限定されないが、例えば、アンジオテンシンII、アンジオテンシンI、ACE、レニン、コレステリル・エステル転送蛋白（CETP）、VEGF（VEGF - A、B、C、D又はE、PLGF - 1、或いはPLGF - 2）、アンジオポエチン - 2、アポリポプロテイン（a）、プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型（PCSK9）、DPP4（Dipeptidyl Peptidase 4）、IL - 17（インターロイキン17）等を挙げることが出来る。アンジオテンシンII、アンジオテンシンI、ACE及びレニンは、心不全、高血圧症、高脂血症、腎不全の増悪に寄与する。CETPは、高脂血症の増悪に寄与する。VEGF及びアンジオポエチン - 2は、腫瘍血管新生を促進し、癌（特に固形癌）の増悪に寄与する。アポリポプロテイン（a）は、動脈硬化症（特に、アテローム性動脈硬化症）の増悪に寄与する。PCSK9は高LDL血症に関与する。DPP4は糖尿病及びインスリン抵抗性に関与する。IL - 17はリウマチ、SLE、潰瘍性大腸炎などの自己免疫性疾患・炎症性疾患、および癌に関与する。

【0024】

本発明において用いられる抗原性ペプチドの大きさは、通常5～30アミノ酸、好ましくは6～25アミノ酸、より好ましくは10～18アミノ酸、更により好ましくは11～16アミノ酸である。該ペプチドが小さすぎると抗原性が失われる可能性ある。またペプチドが長すぎると、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し難くなり、結果として当該ペプチドを特異的に認識する抗体の産生が効果的に誘導されなくなるおそれがある。

【0025】

本発明において、抗原性ペプチドとして、自己抗原タンパク質の部分ペプチドを用いる場合、当該部分ペプチドは、好適には、当該自己抗原タンパク質に特異的である。「特異的」とは、当該自己抗原タンパク質が由来する哺乳動物において天然に発現している当該自己抗原タンパク質以外の遺伝子産物（但し、イムノグロブリンおよびT細胞受容体の可変領域を除く）が当該部分ペプチドを含まないことを意味する。

【0026】

本発明において、抗原性ペプチドとして、自己抗原タンパク質の部分ペプチドを用いる場合、使用される部分ペプチドは、当該部分ペプチドを認識する抗体が、当該自己抗原タンパク質中の該部分ペプチドに結合した場合に、当該自己抗原タンパク質の活性が阻害される位置にあるものが好適に選択される。そのような部分ペプチドは、例えば、受容体結合部位、2価イオン結合部位、特異的酵素により認識される部位等の機能的部位にあり得る。シグナル配列等、タンパク質の成熟過程で除去される部位に含まれる部分ペプチドは、好ましくは、本発明において使用する部分ペプチドから除外される。当業者であれば、自己抗原タンパク質の立体構造等に基づき、適切な部分ペプチドを選択することができる。

【0027】

本発明において、抗原性ペプチドとして、自己抗原タンパク質の部分ペプチドを用いる場合、当該部分ペプチドの具体例として、以下のものを挙げることができる。

【0028】

（VEGF）（WO 2014/034735 A1）

a）IMRIKPHQSQHIG（配列番号1）

10

20

30

40

50

- b) MRIKPHQ (配列番号2)
- c) MQIMRIKPHQSQHIGEM (配列番号3)
- d) 配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列を含む、配列番号3で表されるアミノ酸配列の部分配列からなるペプチド
- e) IMRIKPHQGQHIG (配列番号4)
- f) MRIKPHQ (配列番号5)
- g) MQIMRIKPHQGQHIGEM (配列番号6)
- h) 配列番号4又は5で表されるアミノ酸配列を含む、配列番号6で表されるアミノ酸配列の部分配列からなるペプチド

【 0 0 2 9 】

10

配列番号1、2及び3は、マウスVEGF Aの部分アミノ酸配列である。配列番号4、5及び6はヒトVEGF Aの部分アミノ酸配列である。

【 0 0 3 0 】

上記d)及びh)において、部分配列の長さは8、9、10、11、12、13、14、15又は16アミノ酸である。

【 0 0 3 1 】

(アンジオポエチン - 2) (WO 2014/034735 A1)

- a) PQRQNTNKFNGIKWYY (配列番号7)
- b) YYPQRQNTNKE (配列番号8)

【 0 0 3 2 】

20

配列番号7及び8は、ヒトアンジオポエチン - 2の部分アミノ酸配列である。

【 0 0 3 3 】

(アンジオテンシンII) (WO2003/031466及びJournal of Hypertension, vol.25, no.1, pp.63 72, 2007)

- a) CGGDRVYIHPF (配列番号9)
- b) CGGDRVYIHPFHL (配列番号10)
- c) DRVYIHPFHLGGC (配列番号11)
- d) CDRVYIHPFHL (配列番号12)
- e) CHPFHL (配列番号13)
- f) CGPFHL (配列番号14)
- g) CYIHPF (配列番号15)
- h) CGIHPF (配列番号16)
- i) CGGHPF (配列番号17)
- j) CRVYIGGC (配列番号18)
- k) DRVYGGC (配列番号19)
- l) DRVGGC (配列番号20)
- m) DRVYIHPF (配列番号21)

30

a) ~ l) は、アンジオテンシンIIの部分アミノ酸配列を含むペプチドである。m) は、アンジオテンシンIIの全長ペプチドである。好ましくはDRVYIHPF (配列番号21) を抗原性ペプチドとして用いる。該ペプチドを用いるとアンジオテンシンIよりもアンジオテンシンIIに特異性の高い抗体が誘導される。尚、アンジオテンシンIIのアミノ酸配列は、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、及びラットにおいて共通しているので、a) ~ m) の各ペプチドは、ヒトのみならず、イヌ、ネコ、マウス、及びラットへも適用可能である。

40

【 0 0 3 4 】

(コレステリル・エステル転送蛋白(CETP)) (Vaccine, vol.24, pp.4942 4950, 2006)

- a) RDGFLLLQMDFGFPEHLLVDFLQSL (配列番号22)

a) は、ヒト、マウス及びラットのCETPの部分ペプチドである。

【 0 0 3 5 】

(アポリポプロテイン (a))

- a) EAPSEQAPTEQR (配列番号23)

50

【 0 0 3 6 】

配列番号23は、ヒトアポリポプロテイン (a) の部分アミノ酸配列である。

【 0 0 3 7 】

(DPP4) (Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 1;111(13):E1256 63)

- a) SKDEAAADSRRT (配列番号33)
- b) KSTFRVKSYS (配列番号34)
- c) ENSTFESFG (配列番号35)

a) ~ c) は、マウスDPP4の部分ペプチドである (a : 29 - 40aa、b : 48 - 57aa、c : 89 - 97aa)。

【 0 0 3 8 】

(IL - 17) (Immunotherapy, vol. 4, no. 12, 1799 1807, 2012)

- a) SSACPNTTEAKD (配列番号36)
- b) KVSSRRPSDYLNRSST (配列番号37)
- c) HRNEDPDRYPSVIWE (配列番号38)
- d) KREPESCPFT (配列番号39)
- e) EKMLVGVGCTCVASI (配列番号40)

a) ~ e) は、マウスIL - 17の部分ペプチドである。

【 0 0 3 9 】

上述の非ヒト哺乳動物のタンパク質の部分ペプチドに対応する、ヒトオルソログタンパク質の部分ペプチドも、抗原性ペプチドとして有用であり得る。そのような抗原性ペプチドは、非ヒト哺乳動物のタンパク質のアミノ酸配列と、ヒトオルソログタンパク質のアミノ酸配列とをアラインし、注目する部分ペプチドに対応するヒトオルソログタンパク質アミノ酸配列中の領域を特定することにより、当業者であれば容易に同定することができる。

【 0 0 4 0 】

本発明の製剤において、(I)の抗原性ペプチドは、好ましくは単離されている。「単離」とは、目的とする細胞や成分以外の因子を除去する操作がなされ、天然に存在する状態を脱していることを意味する。「単離された抗原性ペプチドX」の純度(総ペプチド量に占める抗原性ペプチドX量の百分率(重量/重量))は、通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは99%以上、最も好ましくは100%である。

【 0 0 4 1 】

本発明の製剤において、(I)の抗原性ペプチドは、免疫系により認識されやすくするため、ウシ血清アルブミン、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)、VLP (Virus like particle) 等のキャリアータンパク質に架橋した複合体として、本発明の製剤に含まれていても良い。この場合、「単離された抗原性ペプチドX」の純度は、単離された複合体の純度に置き換えて計算する。

【 0 0 4 2 】

抗原性ペプチドのキャリアータンパク質への架橋方法は、特に限定されず、周知のタンパク質架橋剤を用いて行うことができる。タンパク質架橋剤としては、例えば、アルデヒド(例、グルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒド、ホルムアルデヒド等)、ヘテロ二価反応性クロスリンカー (ANB NOS, BMPS, EMCS, GMBS, LC SPDP, MBS, PDPH, SBA, SIA, SMCC, SMPB, SMPH, SPDP, Sulfo LC SPDP, Sulfo MBS, Sulfo SANPAH, Sulfo SMCC等)、ホモ二価反応性クロスリンカー (BS2G, BS3, DSG, DSP, DSS, DSSeb, DST, DTSSP, EGS, Sulfo EGS等)、スパーサーアームの長さがゼロのクロスリンカー (CDI, DCC, EDC HCL, NHS, Sulfo NHS等)、重水素化クロスリンカー (BS2G d4, BS3 d4, ESG d4, DSP d8, DSS d4等) 等が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくはタンパク質架橋剤はアルデヒド(グルタルアルデヒド等)である。

【 0 0 4 3 】

抗原性ペプチドがシステイン残基を含まない場合、架橋を容易にするため、該抗原性ペ

10

20

30

40

50

プチドの末端にシステインを付加することにより、スルフヒドリル基を導入してもよい。

【 0 0 4 4 】

また、抗原性ペプチドをその構造を維持しながら複合体上に安定に提示し、抗体の抗原性ペプチドへの接近を容易にするため、抗原性ペプチドの末端にスペーサー配列を導入してもよい。スペーサー配列の長さは、抗原性ペプチドの抗原性が失われない限り特に限定されないが、通常1~10アミノ酸、好ましくは1~5アミノ酸、より好ましくは1~3アミノ酸である。

【 0 0 4 5 】

一態様において、抗原性ペプチドの末端に、スペーサー配列を付加せずに、該抗原性ペプチドとキャリアータンパク質（KLH等）とをアルデヒド（グルタルアルデヒド等）により固定する。

10

【 0 0 4 6 】

本発明において使用されるB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドは、

(1) 配列番号24で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は
(2) 配列番号24で表されるアミノ酸配列と90%以上（好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、更に好ましくは99%以上）の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ自己集合によりコア粒子を形成する活性を有するポリペプチドである。

【 0 0 4 7 】

自己集合とは、溶液中に溶けている分子が会合することによって集合体を形成する現象をいう。コア粒子とは、固有の反復性の構成を有する剛性構造をいう。本明細書中のコア粒子は合成工程の産物又は生物的工程の産物であってよい。

20

【 0 0 4 8 】

(2)の態様のポリペプチドとして、W02003/031466に開示された配列番号25で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。配列番号25で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの位置48、61、107及び185に対応する位置の1つ又は複数のシステイン残基を欠失させた、又は他のアミノ酸残基（例えば、セリン残基）で置換したポリペプチドも、(2)の態様のポリペプチドとして好ましい。当業者が認識しているように、配列番号25に示されているものと異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドにおける同様な位置にあるシステイン残基も欠失させ、又は他のアミノ酸残基で置換することができ、これらの欠失、置換により得られるポリペプチドも(2)の態様のポリペプチドに包含される。

30

【 0 0 4 9 】

また、(2)の態様のポリペプチドには、配列番号25における位置97に対応する位置のイソロイシン残基がロイシン残基又はフェニルアラニン残基で置換されている変異体ポリペプチドが包含される（Yuanら、J. Virol. 第73巻、10122~10128頁（1999））。また、多くのHBcAg変異体ならびに数種のB型肝炎コア抗原前駆変異体のアミノ酸配列がGenBank報告AF121240、AF121239、X85297、X02496、X85305、X85303、AF151735、X85259、X85286、X85260、X85317、X85298、AF043593、M20706、X85295、X80925、X85284、X85275、X72702、X85291、X65258、X85302、M32138、X85293、X85315、U95551、X85256、X85316、X85296、AB033559、X59795、X8529、X85307、X65257、X85311、X85301、X85314、X85287、X85272、X85319、AB010289、X85285、AB010289、AF121242、M90520、P03153、AF110999及びM95589に開示されており（この開示のそれぞれが参照により本明細書に組込まれる）、これらの変異体のアミノ酸配列を含むポリペプチドも(2)の態様のポリペプチドに包含される。上記変異体は、配列番号25における位置12、13、21、22、24、29、32、33、35、38、40、42、44、45、49、51、57、58、59、64、66、67、69、74、77、80、81、87、92、93、97、98、100、103、105、106、109、113、116、121、126、130、133、135、141、147、149、157、176、178、182及び183に存在するアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を含む多くの位置におけるアミノ酸配列が異なっている。

40

【 0 0 5 0 】

50

更に、全部が参照により本明細書に組込まれる国際公開第01/98333号、国際公開第01/77158号及び国際公開第02/14478号に記載されたHBcAg変異体のアミノ酸配列を含むポリペプチドも、(2)の態様のポリペプチドに包含される。

【0051】

Pumpens et al. Intervirology 2001; 44:98-114において、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチド中の各アミノ酸残基における置換可能なアミノ酸の種類が記載されている。当業者であれば、この情報に基づき、配列番号24で表されるアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより、(2)の態様のポリペプチドを容易にデザインすることができる。

【0052】

本明細書において、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸残基の位置は、特にことわりのない限り、配列番号24で表されるアミノ酸配列を基準として特定される。配列番号24で表されるアミノ酸配列を含まないポリペプチドの場合には、当該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号24で表されるアミノ酸配列と並び合わせ、対応するアミノ酸残基の位置が採用される。

【0053】

本発明において使用されるB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドは、好ましくは、配列番号24で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0054】

本発明の製剤において、(II)の発現ベクターにコードされるキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドにおいては、抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74~87又は130~138の領域内に挿入されているか、或いはB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加されている。B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74~87及び130~138の領域は、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのB細胞エпитープであるので(Pumpens et al. Intervirology 2001; 44:98-114)、この領域内に抗原性ペプチドを挿入することにより、当該抗原性ペプチドに対する抗体の産生が効率的に誘導されることが期待される。好適には、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドにおいて、抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基80と81の間に挿入されている。

【0055】

キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドにおいて、抗原性ペプチドが、B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基74~87又は130~138領域内に挿入されている態様においては、本発明に用いられるキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドは、以下の(a)~(c)の構成要素:

(a) B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端部分ポリペプチド残基(B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端からアミノ酸残基Xまでの連続する部分アミノ酸配列からなる)(ここで、Xは74~86及び130~137からなる群から選択されるいずれかの整数であり、好ましくは80である)、

(b) 抗原性ペプチド残基、及び

(c) B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのC末端部分ポリペプチド残基(B型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのアミノ酸残基YからC末端までの連続する部分アミノ酸配列からなる)(ここで、YはXに1を加えた整数であり、好ましくは81である)

をN末端側から(a)、(b)、(c)の順序で含む。

【0056】

本発明に用いられるキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドは、上記構成により、自己集合によりコア粒子を形成し、その粒子の外側に抗原性ペプチド残基が提示される。

【0057】

構成要素(a)と構成要素(c)との間の挿入アミノ酸配列には、構成要素(b)(抗原性ペプチド残基)に加えて、更に1以上(好ましくは1~3個、より好ましくは1個)の他の

10

20

30

40

50

抗原性ペプチド残基が含まれていてもよい。更なる抗原性ペプチド残基は、構成要素(a)と構成要素(b)の間、構成要素(b)と構成要素(c)の間のいずれの位置に挿入されてもよい。更なる抗原性ペプチド残基の長さは、通常5~30アミノ酸、好ましくは6~25アミノ酸、より好ましくは10~18アミノ酸、更により好ましくは11~16アミノ酸である。

【0058】

構成要素(a)と構成要素(c)との間に、複数個の抗原性ペプチド残基が挿入される場合、抗原性ペプチド残基間は、直接共有結合により連結されていてもよいし、スペーサー配列を介して連結されていてもよい。スペーサー配列とは、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドに含まれる2つの近接した構成要素の間に挿入される1以上のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を意味する。複数の抗原性ペプチド残基がその構造を維持しながら安定に提示され得るように、抗原性ペプチド残基間は、スペーサー配列を介して連結されていることが好ましい。スペーサー配列の長さは、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し、その粒子の外側に挿入された全ての抗原性ペプチド残基が提示される限り限定されないが、通常1~10アミノ酸、好ましくは1~5アミノ酸、より好ましくは1~3アミノ酸、最も好ましくは2又は3アミノ酸である。

【0059】

構成要素(a)と構成要素(c)との間の最もN末端側の抗原性ペプチド残基と、構成要素(a)とは、直接共有結合により連結されていてもよいし、スペーサー配列を介して連結されていてもよい。キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合して形成するコア粒子の外側に、抗原性ペプチドがその構造を維持しながら安定に提示され得るように、構成要素(a)と最もN末端側の抗原性ペプチド残基とは、スペーサー配列を介して連結されていることが好ましい。スペーサー配列の長さは、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し、その粒子の外側に抗原性ペプチドが提示される限り限定されないが、通常1~10アミノ酸、好ましくは1~5アミノ酸、より好ましくは1~3アミノ酸、最も好ましくは2又は3アミノ酸である。スペーサー配列の種類も、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し、その粒子の外側に抗原性ペプチドが提示される限り限定されない。好ましいスペーサー配列として、IT、GAT、CGG等を例示することができるが、これらに限定されない。

【0060】

構成要素(a)と構成要素(c)との間の最もC末端側の抗原性ペプチド残基と、構成要素(c)とは、直接共有結合により連結されていてもよいし、スペーサー配列を介して連結されていてもよい。キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合して形成するコア粒子の外側に、抗原性ペプチドがその構造を維持しながら安定に提示され得るように、最もC末端側の抗原性ペプチド残基と構成要素(c)とは、スペーサー配列を介して連結されていることが好ましい。スペーサー配列の長さは、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し、その粒子の外側に抗原性ペプチドが提示される限り限定されないが、通常1~10アミノ酸、好ましくは1~5アミノ酸、より好ましくは1~3アミノ酸、最も好ましくは2又は3アミノ酸である。スペーサー配列の種類も、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し、その粒子の外側に抗原性ペプチドが提示される限り限定されない。好ましいスペーサー配列として、IT、GAT、CGG等を例示することができるが、これらに限定されない。

【0061】

構成要素(a)と構成要素(c)との間の挿入アミノ酸配列の長さは、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し、その粒子の外側に抗原性ペプチドが提示され、該抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導できる限り特に限定されないが、通常5~80アミノ酸である。挿入アミノ酸配列が短すぎるとエピトープとしての抗原性が失われる可能性がある。また挿入アミノ酸配列が長すぎると、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し難くなり、結果として挿入した抗原性ペプチドを特異的に認識する抗体が産生されなくなる可能性がある。

【0062】

10

20

30

40

50

標的とする抗原性ペプチドがB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのN末端又はC末端に付加される態様においては、該抗原性ペプチドとB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドとは、直接共有結合により連結されていてもよいし、スペーサー配列を介して連結されていてもよい。キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合して形成するコア粒子の外側に、抗原性ペプチドがその構造を維持しながら安定に提示され得るように、該抗原性ペプチドとB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドとは、スペーサー配列を介して連結されていることが好ましい。スペーサー配列の長さは、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し、その粒子の外側に抗原性ペプチドが提示される限り限定されないが、通常1~10アミノ酸、好ましくは1~5アミノ酸、より好ましくは1~3アミノ酸、最も好ましくは2又は3アミノ酸である。スペーサー配列の種類も、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドが自己集合によりコア粒子を形成し、その粒子の外側に抗原性ペプチドが提示される限り限定されない。

【0063】

本発明の製剤において、(II)の発現ベクターは、上記キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ組換えベクターである。当該発現ベクターを対象哺乳動物に投与すると、当該対象哺乳動物の細胞内に該発現ベクターが取り込まれ、該細胞が上記キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドを発現する。キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入する発現ベクターとしてはプラスミド、ウイルス、ファージ、コスミド、及び、当分野において従来用いられるその他のベクターを例示することができる。プラスミドベクターとしては、pCAGGS (Gene 108 : 193 ~ 199 (1991))、pCR X8 (Vaccine 24 : 4942 ~ 4950 (2006))、pcDNA3.1(商品名、Invitrogen)、pZeoSV(商品名、Invitrogen)、及びpBK CMV(商品名、Stratagene)、pVAX1(商品名、Life Technologies)等を例示することができるがこれらに限定されない。ウイルスベクターは、DNAウイルス又はRNAウイルスである。ウイルスベクターとしては、無毒化レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス(HVJ)、SV40、及びヒト免疫不全ウイルス(HIV)等を例示することができるがこれらに限定されない。さらにセンダイウイルスエンベロープ(HVJ E)等も利用できる。

【0064】

上記発現ベクターにおいては、キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(好ましくはDNA)が、投与対象である哺乳動物(好ましくはヒト、イヌ、又はネコ)の細胞内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結されている。

【0065】

使用されるプロモーターは、投与対象である哺乳動物の細胞内で機能し得るものであれば特に制限はない。プロモーターとしては、polII系プロモーター、polIII系プロモーター、polIII系プロモーター等を使用することができる。具体的には、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルスLTR等のウイルスプロモーター、 α -アクチン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成蛋白質遺伝子プロモーター、並びにtRNAプロモーター等のRNAプロモーター等が用いられる。

【0066】

上記発現ベクターは、好ましくはキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有する。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子(テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等)をさらに含有することもできる。

【0067】

一態様において、上記発現ベクターは、免疫効果を増強するため、免疫刺激性配列(IS S)(CpGともいう)を含んでいてもよい。免疫刺激性配列は、細菌の非メチル化CpGモチ

10

20

30

40

50

ーフを含むDNAであり、特定の受容体 (Toll like receptor 9) のリガンドとして働くことが知られている (詳細はBiochim. Biophys. Acta 1489, 107 116 (1999) 及び Curr. Opin. Microbiol. 6, 472 477 (2003)参照)。免疫刺激性配列の好適な例として、以下を挙げることができる。

CpG B1018 22bp

5' tga ctg tga acg ttc gag atg a 3' (配列番号26)

CpG A D19 20bp (D type)

5' ggt gca tcg atg cag ggg gg 3' (配列番号27)

CpG CC274 21bp

5' tcg tcg aac gtt cga gat gat 3' (配列番号28)

CpG CC695 25bp

5' tcg aac gtt cga acg ttc gaa cgt t 3' (配列番号29)

【0068】

或いはこれらのISSのうちの2、3又は4個を連結して使用してもよい。連結したISS配列の好適な例として以下を挙げることができる。

5' ggt gca tcg atg cag ggg gg tga ctg tga acg ttc gag atg a tcg tcg aac gtt cga gat gat tcg aac gtt cga acg ttc gaa cgt t 3' (配列番号30)

【0069】

当業者であれば、例えば、"edit. Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y."、及び、"edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987) John Wiley & Sons" 等に記載の周知の遺伝子工学的技術により上述の発現ベクターを構築することが可能である。

【0070】

本発明の製剤は、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを同時に製剤化して得られる単一の製剤であっても、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを別々に製剤化して得られる2種の製剤の組み合わせであってもよい。好ましい態様において、本発明の製剤は、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを同時に製剤化して得られる単一の製剤である。

【0071】

本発明の製剤は、有効量の(I)の抗原性ペプチド及び/又は(II)の発現ベクターに加え、任意の担体、例えば医薬上許容される担体を含む医薬組成物として提供することができる。

【0072】

医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム - グリコール - スターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑沢剤、クエン酸、メントール、グリチルリチン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0073】

本発明の製剤は、経口的に又は非経口的に、適用対象の哺乳動物に対して投与することが可能であるが、本発明の製剤は、好ましくは、非経口的に哺乳動物へ投与される。

【0074】

10

20

30

40

50

非経口的な投与（例えば、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプル、バイアル、注射器のカートリッジのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。一態様において、本発明の製剤は、有効量の(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクター、並びに医薬上許容される担体を、単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入した製剤として、提供される。別の態様において、本発明の製剤は、有効量の(I)の抗原性ペプチド及び医薬上許容される担体を、単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入した製剤と、有効量の(II)の発現ベクター及び医薬上許容される担体を、単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入した製剤との組み合わせとして提供される。

10

【0075】

本発明の製剤は、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を増強するため、アジュバントを更に含有してもよい。アジュバントとしては、水酸化アルミニウム、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント、ポリ(I:C)、CpG-DNA等が挙げられる。尚、(II)の発現ベクター内に免疫刺激性配列（ISS）が含まれる場合、当該ISSは、ここにいうアジュバントには包含されない。

20

【0076】

本発明の製剤は、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを組み合わせることにより、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する効果が増強されているので、上述の様なアジュバントを要せずに、十分な、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導することができる。従って、一態様において、本発明の製剤はアジュバントを含まない。本態様においては、抗原提示細胞への(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターの取り込みを上昇させ、抗原提示細胞による抗原性ペプチドの提示を促進し、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を強力に誘導する観点から、本発明の製剤を、皮内、皮下、又は筋肉内に投与（注射）することが好ましい。

【0077】

(II)の発現ベクターの細胞内への導入を促進するために、本発明の製剤は、核酸導入用試薬を更に含有してもよい。核酸導入用試薬としては、リポフェクチン(商品名、Invitrogen)、リポフェクタミン(商品名、Invitrogen)、トランスフェクタム(商品名、Promega)、DOTAP(商品名、Roche Applied Science)、dioctadecylamidoglycyl spermine(DOGS)、L dioleoyl phosphatidyl ethanolamine(DOPE)、dimethyldioctadecyl ammonium bromide(DDAB)、N,N di n hexadecyl N,N dihydroxyethylammonium bromide(DHDEAB)、N n hexadecyl N,N dihydroxyethylammonium bromide(HDEAB)、ポリブレン、あるいはポリ(エチレンイミン)(PEI)等の陽イオン性脂質、を用いることができる。また、(II)の発現ベクターを静電的リポソームのような脂質二重層で構成される任意の既知のリポソームに封入してもよい。該リポソームは、不活化センダイウイルス(Hemagglutinating virus of Japan; HVJ)のようなウイルスに融合させてもよい。HVJリポソームは、通常のリポソームと比較して細胞膜に対して非常に高い融合活性を有する。また、発現ベクターとしてレトロウイルスを用いる場合には、導入試薬としてレトロネクチン、ファイブネクチン、ポリブレン等を用いることができる。

30

40

【0078】

本発明の製剤は、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを組み合わせることにより、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する効果が増強されているので、上述の様な核酸導入用試薬を要せずに、十分な、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導することができる。従って、一態様において、本発明の製剤は核酸導入用試薬を含まない。本態様においては、抗原提示細胞への(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベク

50

一の取り込みを上昇させ、抗原提示細胞による抗原性ペプチドの提示を促進し、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を強力に誘導する観点から、本発明の製剤を、皮内、皮下、又は筋肉内に投与（注射）することが好ましい。

【0079】

当該医薬組成物中の、(I)の抗原性ペプチドの含有量は、特に限定されず広範囲に適宜選択されるが、通常、医薬組成物全体の約0.00001ないし99重量%である。当該医薬組成物中の、(II)の発現ベクターの含有量は、特に限定されず広範囲に適宜選択されるが、通常、医薬組成物全体の約0.00001ないし99重量%である。上記数値範囲は、本発明の製剤が、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを同時に製剤化して得られる単一の製剤であっても、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを別々に製剤化して得られる2種の製剤の組み合わせであっても、適用可能である。

10

【0080】

本発明の製剤においては、(I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとが、適用対象に対して、実質的に同時に投与される。

【0081】

「実質的に同時」とは、(I)の抗原性ペプチド又は(II)の発現ベクターの一方を投与することにより当該抗原性ペプチド特異的な獲得免疫応答が誘導される前に、他方を追加投与することを意味する。(I)の抗原性ペプチドの投与と(II)の発現ベクターの実質的同時投与においては、(I)の抗原性ペプチドの投与と(II)の発現ベクターの投与の時間差が、通常24時間以内、好ましくは12時間以内、6時間以内、2時間以内、1時間以内、30分以内、15分以内、5分以内、又は1分以内、最も好ましくは0分（同時）である。(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターの一方を投与することにより当該抗原性ペプチド特異的な獲得免疫応答が誘導した後に、他方を追加投与することにより当該免疫応答反応を増強する「ブースト」は、「実質的に同時」に投与することには含まれない。

20

【0082】

(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターの投与形態は、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとが、実質的に同時に適用対象に投与される限り、特に限定されない。このような投与形態としては、例えば、(1) (I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、(2) (I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での同時投与、(3) (I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、(4) (I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での同時投与、(5) (I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与（例えば、(II)の発現ベクター (I)の抗原性ペプチドの順序での投与、あるいは逆の順序での投与）等が挙げられる。

30

【0083】

好ましい態様において、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを同時に製剤化して得られる単一の製剤を、適用対象に対して投与する。

【0084】

本発明の製剤は、投与対象哺乳動物に、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する限り、いかなる方法により投与してもよい。好ましくは、本発明の製剤は非経口的に、適用対象に抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導するのに十分な量が投与される。例えば、皮内、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、脂肪組織内、又は乳腺組織内の経路を介しての投与；ガス誘導性粒子衝撃法（電子銃等による）；無針注射器（パネ式（例、シマジェット等）、火薬式（例、ダイセル等）を含む）による投与；点鼻薬等の形態での粘膜経路を介する方法等が投与方法として例示される。抗原提示細胞への(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターの取り込みを上昇させ、抗原提示細胞による抗原性ペプチドの提示を促進し、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を強力に誘導する観点から、本発明の製剤は、好ましくは皮内、皮下、又は筋肉内に投与（注射）される。

40

50

【0085】

(I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとを別々に投与する際には、それぞれの投与方法は同一であっても、異なってもよいが、好ましくは同一の方法により投与される。本態様においては、好ましくは、(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターを、それぞれ、適用対象の皮内、皮下、又は筋肉内に投与する。この際、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターの投与部位は、同一であっても異なってもよいが、好ましくは同一部位に投与する。

【0086】

好ましい態様において、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを同時に製剤化して得られる単一の製剤を、適用対象に対して、皮内、皮下、又は筋肉内に投与する。

10

【0087】

一実施態様において、本発明の製剤は、針無注射器により皮内、皮下又は筋肉内に投与される。針無注射器は、好ましくは圧力注射器である。針無注射器としては、シマジェット(商品名、島津製作所)、ツインジェクターEZII(商品名、日本ケミカルリサーチ)、シリジェット(商品名、キーストン)、ZENE0(商品名、クロスジェクト)等を挙げることができるが、これらに限定されない。この場合、本発明の製剤は、(I)の抗原性ペプチド、(II)の発現ベクター及び針無注射器を含み、(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターが該針無注射器に封入された、注射製剤として提供することができる。

【0088】

一実施態様において、本発明の製剤は、遺伝子銃により皮下、皮内又は筋肉内へ投与される。この場合、(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターを、生体内に導入されるコロイド金粒子等の担体粒子上に被覆して、投与に用いることができる。ポリヌクレオチドで担体粒子をコートする技術は公知である(例えば、W093/17706参照)。

20

【0089】

本発明の製剤は、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを組み合わせることにより、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する効果が増強されているので、上述の様な、針無注射器、遺伝子銃等の特殊な器具や装置を要せずに、投与対象に投与することによって、十分に抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導することができる。例えば、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターを、通常の注射器(針有)により、適用対象に対して、皮内、皮下、又は筋肉内に投与する。

30

【0090】

本発明の製剤を、投与対象の複数個所(例えば、2~10か所)に分けて実質的に同時に投与してもよい。本発明の製剤を、複数個所に投与することにより、良好な免疫応答を得ることができる。

【0091】

本発明の製剤の投与回数は、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する限り、特に限定されず、1回のみ投与してもよいし、複数回投与してもよい。尚、本発明の製剤を、分割して、実質的に同時に複数回投与する場合は、実質的に同時に投与された複数回の投与をまとめて、本発明の製剤の1回の投与とカウントする。例えば、(I)の抗原性ペプチドと、(II)の発現ベクターとを、別々に実質的に同時に投与する態様においては、(I)の抗原性ペプチドの1回の投与と、(II)の発現ベクターの1回の投与とを併せて、本発明の製剤の1回の投与とカウントする。また、本発明の製剤を、投与対象の複数個所に実質的に同時に投与する場合、実質的に同時に投与された複数回の投与をまとめて、1回の投与とカウントする。一態様において、良好な免疫応答を誘導するため、本発明の製剤を、一定の間隔をあけて複数回投与する。該回数は、免疫応答の強さをモニターしながら適宜設定することができるが、通常2~10回、好ましくは2~6回である。投与頻度は、通常1週間~1年に1回、好ましくは1~6ヶ月に1回である。

40

【0092】

本発明の製剤は、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを組み合わせることにより、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する効果が増強されているので、一

50

態様において、1回のみでの投与によっても、十分に抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導することができる。

【0093】

本発明の製剤は、適用対象である哺乳動物の組織（又は細胞）内への(II)の発現ベクターの導入により、上記キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのin vivo発現を誘導し、この発現したキメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドと投与した(I)の抗原性ペプチドによる感作の結果、当該抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答（好ましくは、当該抗原性ペプチドを特異的に認識する抗体産生）を誘導するものである。発現ベクター等の核酸を生体内へ導入する種々の方法が知られており（T. Friedman, Science 244: 1275 - 1281 (1989)）、上記キメラB型肝炎ウイルスコア抗原ポリペプチドのin vivo発現を誘導し、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答（好ましくは、当該抗原性ペプチドを特異的に認識する抗体産生）を誘導する限り、どのような導入方法を採用することも可能である。

10

【0094】

in vivoで哺乳動物の組織（又は細胞）内に発現ベクターを導入する方法としては、内部型リポソーム法、静電気型リポソーム法、HVJリポソーム法、HVJ AVEリポソーム法、受容体媒介遺伝子導入、パーティクルガン法、裸のDNA(naked DNA)法、陽性荷電ポリマーによる導入法、エレクトロポレーション法等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】

本発明の製剤は、(I)の抗原性ペプチドと(II)の発現ベクターとを組み合わせることにより、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する効果が増強されているので、一態様において、裸のDNA(naked DNA)法のような比較的緩和な導入方法によっても、十分に抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導することができる。本態様においては、抗原提示細胞への(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターの取り込みを上昇させ、抗原提示細胞による抗原性ペプチドの提示を促進し、抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を強力に誘導する観点から、本発明の製剤を、好ましくは皮内、皮下、又は筋肉内に投与（注射）する。

20

【0096】

本発明の製剤の投与量に関して、有効量（抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する量）の(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターが投与される。投与量は、投与方法、投与対象者の状況（性別、年齢、体重など）、抗原性ペプチドの投与対象哺乳動物における免疫原性、発現ベクターに含まれるプロモーター等の制御配列の強さ等に依存するが、一定量の(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターを投与対象である哺乳動物に投与し、ELISA等の検定法により抗原性ペプチドに特異的な抗体価を測定して、免疫応答を観察することにより当業者であれば良好な免疫応答に必要な用量を決定することができる。(I)の抗原性ペプチドの投与量は、注射により哺乳動物（例、ヒト、イヌ、ネコ）へ皮下、皮内又は筋肉内投与する場合、抗原性ペプチド量として、1回の投与あたり、例えば1 μ g~1mg、好ましくは、5 μ g~50 μ g程度であるが、これに限定されない。(II)の発現ベクターの投与量は、注射により哺乳動物（例、ヒト、イヌ、ネコ）へ皮下、皮内又は筋肉内投与する場合、発現ベクター量として、1回の投与あたり、例えば1 μ g~200 μ g、好ましくは、5 μ g~100 μ g程度であるが、これに限定されない。

30

40

【0097】

一態様において、本発明の製剤は、相乗的な「抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する」作用を有する。ここで「相乗的な抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する作用」とは、「(I)の抗原性ペプチド単独投与による抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する作用」と、「(II)の発現ベクター単独投与による抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する作用」との和を上回る「抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を誘導する作用」を意味する。本態様においては、相乗的有効量の(I)の抗原性ペプチド及び(II)の発現ベクターが適用対象に投与される。

【0098】

50

上述の通り、本発明の製剤において、抗原性ペプチドとして、特定の疾患（例、生活習慣病）の増悪に寄与する抗原である、自己抗原タンパク質又はその部分ペプチドを用いると、当該自己抗原タンパク質又はその部分ペプチドに対する特異的免疫応答、好ましくは、当該ペプチドに対する特異的液性免疫応答（即ち、当該ペプチドを特異的に認識する抗体の産生）が誘導され、当該自己抗原タンパク質の活性が抗体によって中和されることにより、当該自己抗原タンパク質が増悪に關与する疾患（例、生活習慣病）を予防又は治療することができる。従って、本発明の製剤は、そのような疾患の予防又は治療剤として用いることができる。

【0099】

例えば、抗原性ペプチドとして、アンギオテンシンII、アンギオテンシンI、ACE、レニンや、それらの部分ペプチドを用いた場合、本発明の製剤は、腎不全、心不全、高血圧症、高脂血症、動脈硬化（閉塞性動脈硬化症等）、心筋梗塞、脳梗塞、認知症等の予防又は治療剤として用いることができる。抗原性ペプチドとして、CETPを用いた場合、本発明の製剤は、高脂血症の予防又は治療剤として用いることができる。抗原性ペプチドとして、VEGF又はアンギオポエチン - 2を用いた場合、本発明の製剤は、癌（特に固形癌）、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症、未熟児網膜症等の予防又は治療剤として用いることができる。抗原性ペプチドとして、アポリポ蛋白（a）を用いた場合、本発明の製剤は、動脈硬化症（特に、アテローム性動脈硬化症）の予防又は治療剤として用いることができる。抗原性ペプチドとして、PCSK9やその部分ペプチドを用いた場合、本発明の製剤は、高LDL血症の予防又は治療剤として用いることができる。抗原性ペプチドとして、DPP4やその部分ペプチドを用いた場合、本発明の製剤は、糖尿病及びインスリン抵抗性の予防又は治療剤として用いることができる。抗原性ペプチドとして、IL - 17を用いた場合、本発明の製剤は、リウマチ、SLE、潰瘍性大腸炎などの自己免疫性疾患・炎症性疾患；及び癌の予防又は治療剤として用いることができる。

【0100】

特に、抗原性ペプチドとして、アンギオテンシンIIやその部分ペプチドを用いた場合、本発明の製剤は、イヌ心不全の予防又は治療剤として優れた効果を奏する。ヒトの心不全では、多くの場合、高血圧により左心室が肥厚し、硬くなることにより拡張機能障害を起こすが、イヌの心不全では、多くの場合、弁膜症により僧房弁がきちんと閉じなくなることにより、血液の送り出しが悪くなり、心臓への負担が増すことがその原因である。本発明者らは、このような弁膜症（僧房弁閉鎖不全症）に起因する心不全に、本発明の製剤が極めて有効であることを見出した。例えば、僧房弁閉鎖不全症を発症した対象（例、イヌ）は心不全を発症するリスクが高いので、このような対象に、抗原性ペプチドとして、アンギオテンシンIIやその部分ペプチドを用いた本発明の製剤の有効量を投与することにより、僧房弁閉鎖不全症に起因する心不全症を予防することができる。また、僧房弁閉鎖不全症に起因する心不全症を発症した対象（例、イヌ）に対して、アンギオテンシンIIやその部分ペプチドを用いた本発明の製剤の有効量を投与することにより、当該心不全症を治療することができる。

【0101】

また、腎不全（特にネコの腎不全）においては、アンギオテンシンIIによる糸球体の血圧の増加と糸球体の肥大が主要な原因の1つと考えられているので、抗原性ペプチドとして、アンギオテンシンIIやその部分ペプチドを用いた本発明の製剤の有効性が期待できる。

【0102】

このように、特定の疾患の予防又は治療を目的として本発明の製剤を用いる場合、適用対象は、当該疾患の患者、当該疾患の罹患歴を有する者、又は当該疾患の発症リスクを有する当該疾患に罹患していない者であり得る。本発明の剤を、特定の疾患の患者に投与することにより、当該疾患の増悪に寄与する抗原に対する中和抗体を誘導し、当該疾患を治療する。本発明の剤を、特定の疾患の罹患歴を有する者に投与することにより、当該疾患の増悪に寄与する抗原に対する中和抗体を誘導し、当該疾患の再発を抑制することができる。

る。本発明の剤を、特定の疾患の発症リスクを有する当該疾患に罹患していない者に投与することにより、当該疾患の増悪に寄与する抗原に対する中和抗体を誘導し、当該疾患の発症を予防することが出来る。

【0103】

このように、特定の疾患の予防又は治療を目的として本発明の製剤を用いる場合、本発明の製剤は、当該疾患の予防又は治療の有効量（好ましくは、相乗的予防又は治療の有効量）が、適用対象に対して投与される。

【0104】

刊行物、特許文献等を含む、本明細書に引用されたすべての参考文献は、引用により、それらが個々に具体的に参考として援用されかつその内容全体が具体的に記載されているのと同程度まで、本明細書に援用される。

10

【0105】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0106】

[参考例1]

ワクチン投与によるアンギオテンシンIIに対する抗体価の上昇

(方法)

PCR及びライゲーションにより、HBcのアミノ酸残基80と81の間に、スペーサー配列およびアンギオテンシンIIのアミノ酸配列DRVYIHPF（配列番号21）が挿入された、改変HBcをコードするDNA断片を得た。このDNA断片をpcDNA 3.1/V5 His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen)にTAクローニングすることによりpcDNA3.1 HBc AngII ベクターを得た。

20

6匹の犬を3群に分け（1群あたりn=2）、pcDNA3.1 HBc AngIIにより、以下の3つのプロトコールで免疫し、免疫開始日を0日目として、0日目、4週間後、及び6週間後に、末梢血のアンギオテンシンIIに対する抗体価を測定した。

(I) 100 µg/100 µlに調製したpcDNA3.1 HBc AngIIを、1回の投与につき、4箇所、針無注射器 シマジエット(商品名、島津製作所)を用いてイヌの皮内に投与した。投与量は0.4 mg/time/匹である。この投与を0日目及び14日目の2回行った。

(II) 150 µg/100 µlに調製したpcDNA3.1 HBc AngIIを、CpG DNA（総投与量 160 µg/time/匹）と共に、1回の投与につき、8箇所、シマジエットを用いてイヌの皮内に投与した。pcDNA3.1 HBc AngIIの投与量は1.2 mg/time/匹である。この投与を0日目及び14日目の2回行った。使用したCpG DNAは、以下の2つの配列からなる1本鎖DNAの1：1混合物である。

30

No. 2006: TCGTCGTTTTGTCGTTTTCTCGTT（配列番号31）

No. YW07: TCGTCGTTAACGTTAACGCTA（配列番号32）

(III) 3mg/2mlに調製したpcDNA3.1 HBc AngIIを、CpG DNA（総投与量 160 µg/time/匹）と共に、イヌの筋肉内に1箇所注射した。pcDNA3.1 HBc AngIIの投与量は3.0 mg/time/匹である。この投与を0日目及び14日目の2回行った。

【0107】

(結果)

pcDNA3.1 HBc AngIIの筋肉内投与によっては、アンギオテンシンIIに対する抗体価はほとんど上昇しなかった。シマジエットによる投与の6週間後において、アンギオテンシンIIに対する抗体価の若干の上昇を認めた。

40

【0108】

[実施例1]

DNA + ペプチド併用ワクチンによる抗体価の上昇

8匹の犬を4群に分け（1群あたりn=2）、pcDNA3.1 HBc AngII及びアンギオテンシンIIの部分ペプチドとKLHとのコンジュゲート（AngII KLH）により、以下の4つのプロトコールで免疫し、経時的に、末梢血のアンギオテンシンIIに対する抗体価を測定した。

(I) 250 µg/100 µlに調製したpcDNA3.1 HBc AngIIを、CpG DNA（総投与量 40 µg/time/

50

匹)と共に、1回の投与につき、4箇所、シマジェットを用いてイヌの皮内に投与した。pcDNA3.1 HBc AngIIの投与量は1.0 mg/time/匹である。この投与を0日目、14日目及び42日目の3回行った。(DNA単独投与群1)

(II) 12.5 µg/250 µlに調製したAngII KLHを、CpG DNA(総投与量 40 µg/time/匹)と共に、1回の投与につき、2箇所、イヌの皮内に投与した。AngII KLHの投与量は25 µg/time/匹である。この投与を0日目、14日目及び42日目の3回行った。(ペプチド単独投与群)

(III) pcDNA3.1 HBc AngII終濃度250 µg/100 µl、及びAngII KLH終濃度6.25 µg/100 µlに調製した溶液を、CpG DNA(総投与量 40 µg/time/匹)と共に、1回の投与につき、4箇所、シマジェットを用いてイヌの皮内に投与した。pcDNA3.1 HBc AngIIの投与量は1.0 mg/time/匹であり、AngII KLHの投与量は25 µg/time/匹である。この投与を0日目、14日目及び42日目の3回行った。(DNA+ペプチド併用群)

(IV) 250 µg/100 µlに調製したpcDNA3.1 HBc AngIIを、CpG DNA(総投与量 80 µg/time/匹)と共に、1回の投与につき、8箇所、シマジェットを用いてイヌの皮内に投与した。pcDNA3.1 HBc AngIIの投与量は2.0 mg/time/匹である。この投与を0日目、14日目、28日目及び42日目の4回行った。(DNA単独投与群2)

【0109】

(結果)

ペプチド単独投与群(II)及びDNA+ペプチド併用群(III)において、アンギオテンシンIIに対する抗体価の上昇を認めた(図1)。特に、併用群(III)において、抗体価の上昇が顕著であった。

【0110】

DNA+ペプチド併用群(III)において、投与開始から2~10週のおよそ2ヶ月間にわたり、アンギオテンシンIIに対する高い抗体価が維持されることが確認された(図2)。

【0111】

DNA+ペプチド併用群(III)においては、投与開始から20週後においても、アンギオテンシンIIに対する有意な抗体価が確認された(図3)。投与開始から20週後に追加投与を行うと、ペプチド単独投与群(II)(No. 4)及びDNA+ペプチド併用群(III)(No. 5, 6)のいずれにおいてもブースター効果が認められたが、併用群(III)の方がその効果が強かった(図3)。

【0112】

高希釈倍率(1250倍希釈)で観察すると、20週目における追加免疫により上昇した抗体価は、3回投与後のピークよりは低かった。併用群(III)の方がペプチド単独投与群(II)よりもブースター効果が強かった。

【0113】

追加免疫による抗体価の上昇は、DNA+ペプチド併用群(III)(No. 5, 6)の方がペプチド単独投与群(II)(No. 4)よりも長期間持続した(図4)。

【0114】

[実施例2]

イヌ心不全モデルに対するDNA+ペプチド併用ワクチンの効果

(方法)

以下のプロトコールでDNA+ペプチド併用ワクチンの効果を検討した。

- ・イヌ：n=3
- ・心不全モデル：ワクチン投与開始の4週間前に、僧房弁の腱索断裂手術を施行して僧房弁閉鎖不全症を生じさせることによりイヌ心不全モデルを作成した。
- ・ワクチン：pcDNA3.1 HBc AngII + AngII KLH
- ・投与スケジュール

(I) ワクチン投与群

[(pcDNA3.1 HBc AngII終濃度250 µg/100 µl + AngII KLH 終濃度6.25 µg/100 µl) × 4箇所 (DNA 1 mg + ペプチド 25 µg) + CpG (投与量 40 µg/time/匹)] × 3回 (0日目、14日目、及び42日目) (シマジェット)

10

20

30

40

50

(II) コントロール群

生理食塩水 × 4箇所 × 3回 (0日目、14日目、及び42日目) (シマジェット)

・ 評価項目

末梢血のアンギオテンシンIIに対する抗体価の経時変化を測定した。

また、心不全のパラメーターとして、平均血圧の変化量(dMAP)、左房圧の変化量(dLAP)、体血管抵抗の変化量(dSVR)及び心拍出量の変化量(dCO)の経時変化を測定した。血圧、LAPはテレメトリーにより測定した。COは心エコーにより計測した。

【 0 1 1 5 】

(結果)

ワクチン投与群 (No. 2, 4, 6) において、アンギオテンシンIIに対する抗体価の有意な上昇を認めた (図5)。

10

ワクチン投与群において、血圧低下傾向とともに、心不全パラメーターの改善傾向を認めた (図6)。

【 0 1 1 6 】

[実施例3]

SHRラットに対するDNA + ペプチド併用ワクチンの効果

以下のプロトコールでDNA + ペプチド併用ワクチンの効果を検討した。

- ・ SHRラット (高血圧自然発症ラット) : n = 3
- ・ ワクチン : pcDNA3.1 HBc AngII 及び / 又は AngII KLH
- ・ コントロールベクターとして、AngIIペプチドの挿入を含まないpcDNA3.1 HBcを用いた

20

・ 試験群

- (I) pcDNA3.1 HBc AngII + AngII KLH (シマジェット、皮内)
- (II) pcDNA3.1 HBc + AngII KLH (シマジェット、皮内)
- (III) AngII KLH (シマジェット、皮内)
- (IV) pcDNA3.1 HBc AngII + AngII KLH (筋肉内)
- (V) フロイントアジュバント + AngII KLH (皮下)

いずれも、0日目、14日目、及び28日目に投与

・ 評価項目

末梢血のアンギオテンシンIIに対する抗体価の経時変化を測定した。

30

【 0 1 1 7 】

(結果)

pcDNA3.1 HBc AngIIとAngII KLHとの併用により、AngII KLH単独投与時よりもアンギオテンシンIIに対する抗体価が顕著に上昇した。DNA + ペプチド併用ワクチンは、シマジェット (皮内投与) のみならず、筋肉内投与でも有効であった。抗体価の上昇は、DNA + ペプチド併用ワクチンの方が、ペプチド単独投与群よりも長期間持続する傾向が認められた (図7)。

【 0 1 1 8 】

[実施例4]

DNA + ペプチド併用ワクチン単回投与の免疫効果

40

(方法)

以下のプロトコールでDNA + ペプチド併用ワクチンの単回投与による免疫効果を検討した。

- ・ SHRラット (高血圧自然発症ラット) : n = 3
- ・ ワクチン : pcDNA3.1 HBc AngII + AngII KLH

・ 試験群

- (I) pcDNA3.1 HBc AngII + AngII KLH (1 µg) (シマジェット、皮内)
- (II) pcDNA3.1 HBc AngII + AngII KLH (5 µg) (シマジェット、皮内)
- (III) pcDNA3.1 HBc AngII + AngII KLH (20 µg) (シマジェット、皮内)
- (IV) AngII KLH (1 µg) (シマジェット、皮内)

50

(V) AngII KLH (5 µg) (シマジェット、皮内)

(VI) AngII KLH (20 µg) (シマジェット、皮内)

いずれも、単回投与(0日目)。

・評価項目

末梢血のアンジオテンシンIIに対する抗体価の経時変化を測定した。

【0119】

(結果)

DNA + ペプチド併用ワクチンは、単回投与でも、ペプチド単独投与群よりも高い、抗アンジオテンシンII抗体価の上昇を認めた。抗体価の上昇は、DNA + ペプチド併用ワクチンの方が、ペプチド単独投与群よりも長期間持続した(図8~10)。

10

【0120】

[実施例5]

DNA + ペプチド併用ワクチンの免疫効果

(方法)

以下のプロトコールでDNA + ペプチド併用ワクチンの免疫効果を検討した。

・Balb/caマウス(雌、6週齢(ワクチン投与開始時において)) : n = 6

・ワクチン : pcDNA3.1 HBc mVEGF + mVEGF KLH

WO 2014/034735 A1を参照のこと。

mVEGFペプチド : IMRIKPHSQSHIG (配列番号1)

・試験群

20

(I) pcDNA3.1 HBc mVEGF (2mg/ml, 60 µl) + mVEGF KLH (1mg/ml, 10 µl) (足筋肉内投与、各足35 µl) (エレクトロポレーションあり)

(II) 生理食塩水 (60 µl) + mVEGF KLH (1mg/ml, 10 µl) (足筋肉内投与、各足35 µl) (エレクトロポレーションあり)

(III) pcDNA3.1 HBc mVEGF (2mg/ml, 60 µl) + mVEGF KLH (1mg/ml, 10 µl) (足筋肉内投与、各足35 µl) (エレクトロポレーションなし)

0日目及び14日目に計2回投与。

・評価項目

末梢血のVEGFに対する抗体価の経時変化を測定した。

【0121】

30

(結果)

DNA + ペプチド併用ワクチンを用いることにより、エレクトロポレーションを用いることなく、VEGFに対する抗体価の上昇を認めた。エレクトロポレーションなしの群(III)の方が、エレクトロポレーションありの群(I)よりも、むしろVEGFに対する抗体価が高かった(図11)。

【0122】

以上の結果から、DNA + ペプチド併用ワクチンを用いることにより、エレクトロポレーションやシマジェット(針無注射器)のような特殊な装置を用いずに、目的とする抗原性ペプチドに対する特異的免疫応答を効果的に誘導し得ることが示された。

【0123】

40

[実施例6]

DNA + ペプチド併用ワクチンの免疫効果

(方法)

以下のプロトコールでpVAX1ワクチンとpcDNA3.1ワクチンの薬効を比較した。

・SHRラット : n = 5~6

・各群共に薬剤(200 µl)を大腿筋肉に単回筋肉内投与し、投与日(投与直前)、投与2、4、8、12週後に採血を行った。

・試験群

1群 : pcDNA3.1 HBc AngII (200 µg) + AngII KLH (5 µg)

2群 : pVAX1 HBc AngII (200 µg) + AngII KLH (5 µg)

50

3群：pVAX1 HBc AngII (40 μ g) + AngII KLH (5 μ g)

4群：pVAX1 HBc AngII (8 μ g) + AngII KLH (5 μ g)

・評価項目

末梢血のAngIIに対する抗体価を測定した。

【 0 1 2 4 】

(結果)

DNA + ペプチド併用ワクチンにおいて、ベクターとして、pVAX1を用いた場合でも、pcDNA3.1を用いた場合と同程度の抗体価の上昇が認められた(図12)。ベクター投与量を200 μ gよりも少なくすることができる可能性が示された。投与後の早い段階(2、4週)では、各群の抗体価に大きな違いはないが、DNAワクチンの投与量が多い程、高い抗体価がより長い期間持続することが示唆された。

10

【 0 1 2 5 】

[実施例7]

DNA + ペプチド併用ワクチンにおける、AngIIペプチドのKLHへのコンジュゲートの態様の比較

3種類のAngII KLHコンジュゲートを用いて、以下のプロトコールでDNA + ペプチド併用ワクチン接種を行い、末梢血のアンギオテンシンIIに対する抗体価への効果を比較した。

【 0 1 2 6 】

・使用動物

SDラット(雄性、8週齢(投与時)、日本エスエルシー株式会社)：n = 6

20

【 0 1 2 7 】

・試験材料

(1) 被検物質1：アンギオテンシンIIワクチン1

KLH AngIIコンジュゲート(グルタルアルデヒド法により調製)及びpVAX1 HBc AngIIを含有する溶液(生理食塩水)。

(2) 被検物質2：アンギオテンシンIIワクチン2

KLH Cys AngIIコンジュゲート(Sulpho GMBS法により調製)及びpVAX1 HBc AngIIを含有する溶液(生理食塩水)。

(3) 被検物質3：アンギオテンシンIIワクチン3

KLH Cys Gly Gly AngIIコンジュゲート(Sulpho GMBS法により調製)及びpVAX1 HBc AngIIを含有する溶液(生理食塩水)。

30

【 0 1 2 8 】

・被検物質投与液濃度

【 0 1 2 9 】

【表1】

投与液	KLH コンジュゲート	pVAX1-HBc-AngII
低用量	0.125 mg/mL (0.025 mg/200 μ L)	1 mg/mL (0.2 mg/200 μ L)
高用量	0.5 mg/mL (0.025 mg/200 μ L)	1 mg/mL (0.2 mg/200 μ L)

【 0 1 3 0 】

・試験群

(1) アンギオテンシンIIワクチン1、低用量、n = 6。

(2) アンギオテンシンIIワクチン1、高用量、n = 6。

(3) アンギオテンシンIIワクチン2、低用量、n = 6。

(4) アンギオテンシンIIワクチン2、高用量、n = 6。

(5) アンギオテンシンIIワクチン3、低用量、n = 6。

(6) アンギオテンシンIIワクチン3、高用量、n = 6。

【 0 1 3 1 】

50

・投与

各ワクチン溶液を、200 μ L / 匹の用量で、ポリプロピレン製注射筒及び27G注射針を用いて、ラットの大腿筋肉内へ単回投与した。

【 0 1 3 2 】

・採血

(1) プラスミドDNA濃度測定用血液

被検物質投与約4時間後に、3.0%イソフルラン吸入麻酔下で頸静脈より血液を約0.4mL採血した。予め100mmol/L EDTAを60 μ L添加したチューブに血液300 μ Lを採取した。血液は液体窒素により直ちに凍結し、測定時まで80にて冷凍保存した。

(2) 抗体価測定用血清

被検物質投与前日、被検物質投与2及び4週間後に3.0%イソフルラン吸入麻酔下で頸静脈より血液約500 μ Lを微量採血管(キャピジェクト、テルモ株式会社)に採取し、遠心機を用いて遠心分離(1800g、室温、10分)し、血清を得た。血清は測定時まで80にて冷凍保存した。

10

【 0 1 3 3 】

・評価項目

(1) 抗体価測定

ワクチン投与前、投与後2週間及び4週間の血清中のAngIIペプチドに対する抗体価を酵素免疫測定法により測定した。

(2) プラスミドDNA濃度測定

ワクチン投与後4時間の血液中プラスミド濃度を定量的PCRにより測定した。定量的PCRには、プラスミドを特異的に検出する、69bpを増幅領域とするプライマーセットを用いた。

20

【 0 1 3 4 】

・結果

(1) 抗体価

ワクチン投与2週間及び4週間の血清中のAngIIペプチドに対する抗体価は、いずれの群においても投与前よりも上昇が認められた。アンジオテンシンIIワクチン1の低用量群及び高用量群で有意な高値を示した($p < 0.01$ 、図13 1、13 2、14 1及び14 2)。

【 0 1 3 5 】

(2) プラスミドDNA濃度

ワクチン投与後4時間の血液中プラスミド濃度(コピー/ μ L血液)を、以下の表に示す。いずれの群においても、顕著な差は認められなかった。

30

【 0 1 3 6 】

【表 2】

試験群	アンジオテンシンⅡ ワクチン-1		アンジオテンシンⅡ ワクチン-2		アンジオテンシンⅡ ワクチン-3	
	低用量群	高用量群	低用量群	高用量群	低用量群	高用量群
1	2.14×10^4	5.14×10^3	2.01×10^4	1.54×10^3	1.33×10^3	2.45×10^4
2	3.50×10^3	3.71×10^3	1.03×10^4	3.40×10^3	6.39×10^3	4.60×10^3
3	1.15×10^4	2.56×10^3	1.71×10^3	1.15×10^3	1.34×10^3	2.99×10^4
4	1.12×10^3	3.86×10^3	1.76×10^3	3.59×10^3	2.42×10^3	5.71×10^3
5	7.27×10^2	4.78×10^3	3.56×10^3	5.53×10^3	2.56×10^3	4.10×10^3
6	6.22×10^3	2.19×10^3	4.35×10^4	6.22×10^3	4.59×10^4	3.66×10^4
Mean	7.41×10^3	3.72×10^3	1.35×10^4	3.57×10^3	9.98×10^3	1.76×10^4
SD	7.91×10^3	1.15×10^3	1.63×10^4	2.04×10^3	1.77×10^4	1.45×10^4

【 0 1 3 7 】

[実施例 8]

20

SHRラットの血圧に対するDNA + ペプチド併用ワクチンの効果（テレメトリーによる測定）

以下のプロトコールに沿って、SHR/Izmラットに血圧測定用のテレメトリー送信機を埋め込み、DNA + ペプチド併用ワクチン投与の血圧に対する影響を評価した。

【 0 1 3 8 】

・試験スケジュール

図15に記載したスケジュールに沿って、試験を実施した。

【 0 1 3 9 】

・使用動物

SHR/Izmラット（雄性、21週齢（ワクチン投与時）、日本エスエルシー株式会社） 3匹

30

【 0 1 4 0 】

・ワクチン

KLH AngIIコンジュゲート（ $50 \mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ ）及びHBc AngII発現ベクター（pVAX1 HBc AngII： $200 \mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ ）を含有する溶液。

【 0 1 4 1 】

・投与

ワクチン溶液を、 $200 \mu\text{L}$ /匹の用量で、ポリプロピレン製注射筒及び27G注射針を用いて、ラットの大腿筋肉内へ単回投与した。

【 0 1 4 2 】

・テレメトリー送信機の埋め込み手術

40

塩酸ケタミン及びキシラジン筋肉内投与により、ラットに麻酔を施した。大腿動脈を露出し、テレメトリー送信機（TA11PA C40、DSI社）のカテーテルを血管内に留置した。テレメトリー送信機本体を腹腔内に留置し、傷口を縫合した。

【 0 1 4 3 】

・血圧及び心拍数測定

測定期間：ワクチン投与1週前（10日前）から5週後（35日後）まで。

測定項目：収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、心拍数（血圧脈波より算出）

測定方法：ラットに埋め込んだテレメトリー送信器から送られてくる血圧の信号を受信ボード（RPC 1、Data Sciences International）で受信し、慢性実験テレメトリー自動計測システム（Ponemah Physiology Platform 5.0）に取り込んだ。

50

データの取り込み：測定期間中は連続的にデータを取り込み、適時データを保存した。

サンプリング時間：血圧及び心拍数は1時間毎の平均値を算出した。

【0144】

・採血

採血時期：ワクチン投与前（センサー埋め込み時）、ワクチン投与2週間後及び5週間後

採血方法：イソフルラン吸入麻酔下で、ラット頸静脈より約0.5 mL採血し、EDTA入りの採血管に入れて攪拌した。血液を遠心分離（3000 rpm、10分、4℃）して血漿を回収した。

回収した血漿は、80℃にて凍結保存した。

【0145】

・抗体価測定

ワクチン投与前、投与後2週間及び5週間後の血漿中のAngIIペプチドに対する抗体価を酵素免疫測定法により測定した。

【0146】

・結果

(1) 血圧に対する効果

ワクチン投与前及びワクチン投与2週間後における、各個体の、活動期（夜間）及び非活動期（昼間）において10分間抽出した血圧及び心拍数の連続データを図16 1～図16 3に示す。

【0147】

No.1およびNo.2の個体において、ワクチン投与により、有意に、収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、心拍数が低下した。No. 3の個体においても、ワクチン投与により、夜間（活動期）における収縮期血圧、及び心拍数の低下傾向が確認できた。

【0148】

(2) 抗体価

250倍希釈した血漿を用いて、AngIIペプチドに対する抗体価（吸光度）を酵素免疫測定法により測定した結果を図17に示す。いずれの個体においても、ワクチン投与2週間及び5週間後において、AngIIペプチドに対する抗体価の上昇が認められた。血圧低下効果の低かったNo.3の個体では、AngIIペプチドに対する抗体価も低く、血圧低下効果とAngIIペプチドに対する抗体価との間の相関が認められた。

【産業上の利用可能性】

【0149】

本発明により、抗原性ペプチドに対する特異的抗体を強力に誘導することが可能なワクチンが提供される。

本発明により、エレクトロポレーションや核酸導入試薬等の処置を要せずとも、DNAワクチンを用いて、抗原性ペプチドに対する特異的抗体を効果的に誘導することができる。

また、本発明により、抗原性ペプチドに対する特異的抗体の抗体価の上昇が長期間持続するので、ワクチン投与の回数を減らすことが出来る。

【0150】

ここで述べられた特許、特許出願明細書及び科学文献を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

【0151】

本出願は、日本で出願された特願2014 235736（出願日：2014年11月20日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

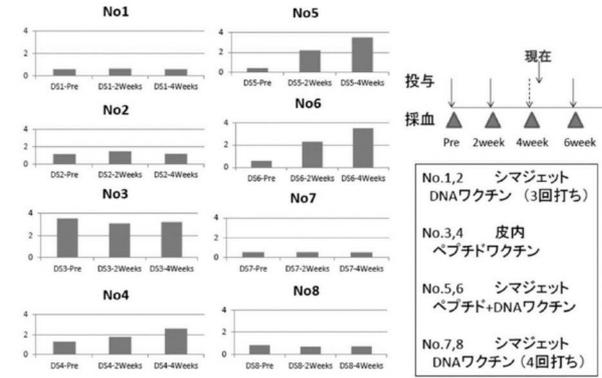
10

20

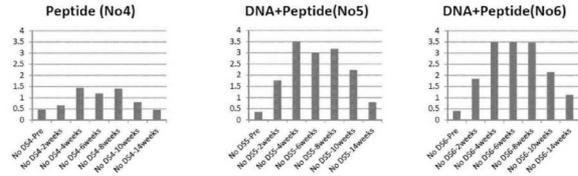
30

40

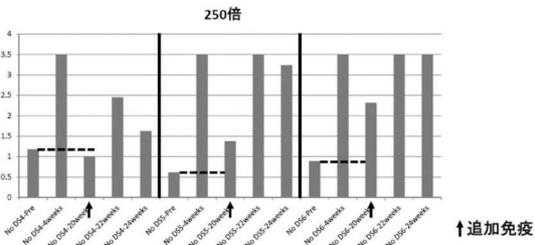
【 図 1 】



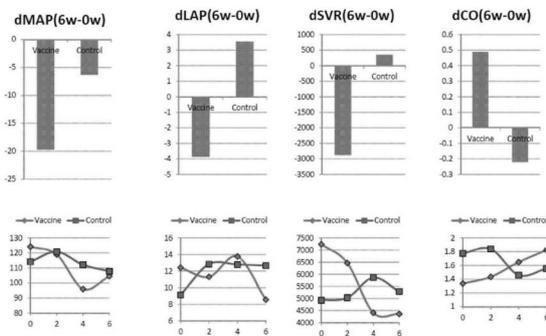
【 図 2 】



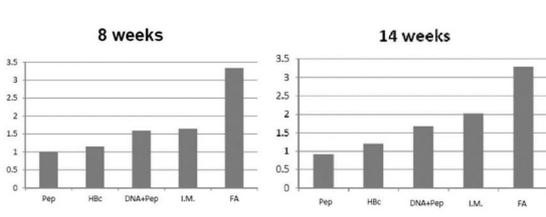
【 図 3 】



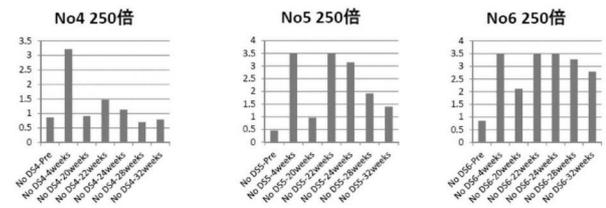
【 図 6 】



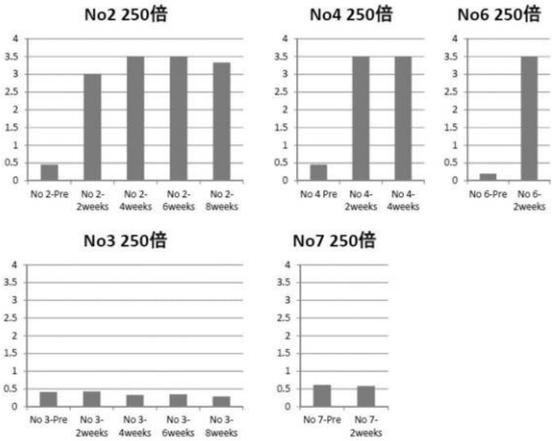
【 図 7 】



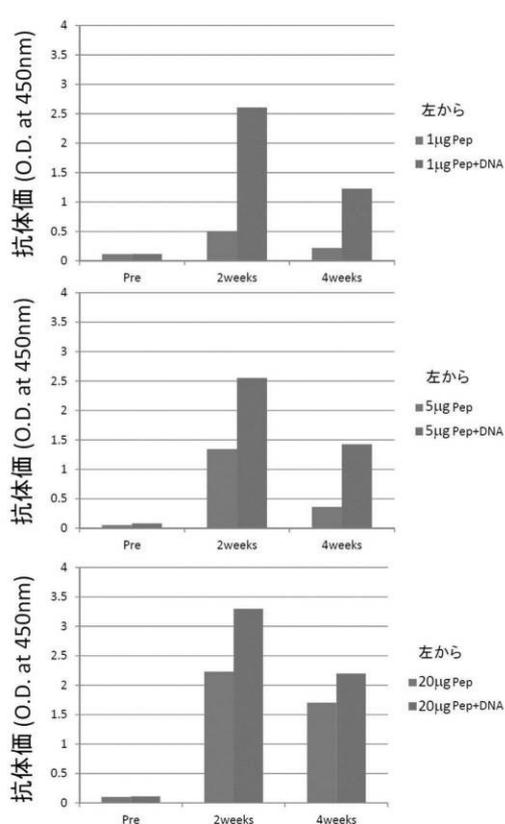
【 図 4 】



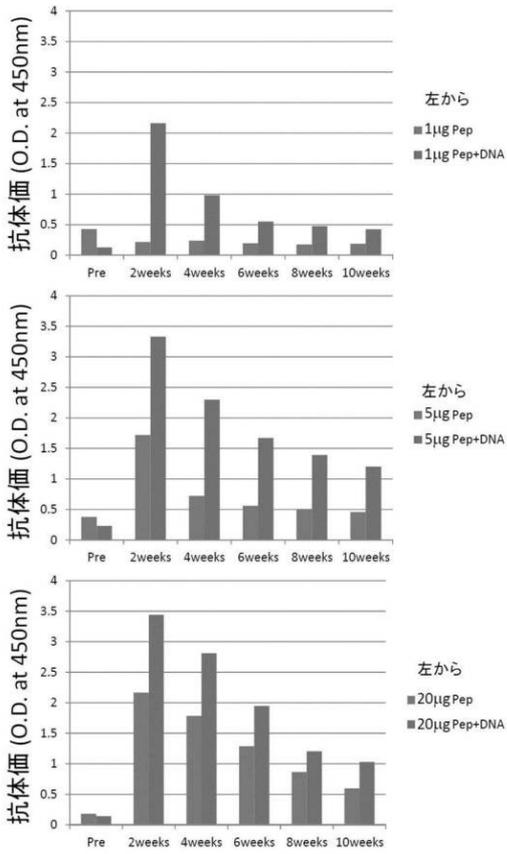
【 図 5 】



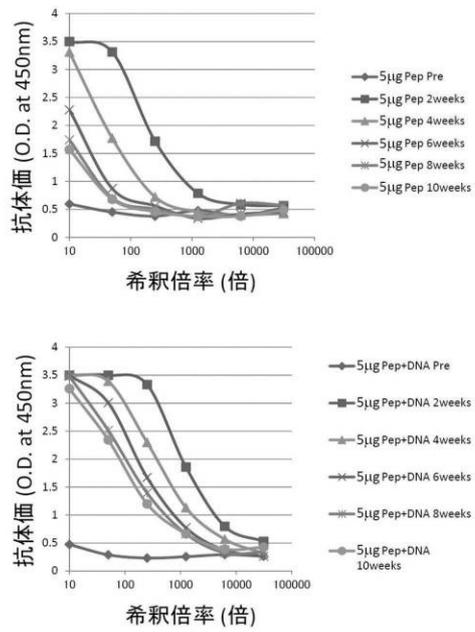
【 図 8 】



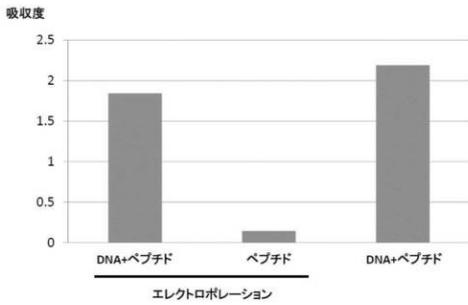
【 図 9 】



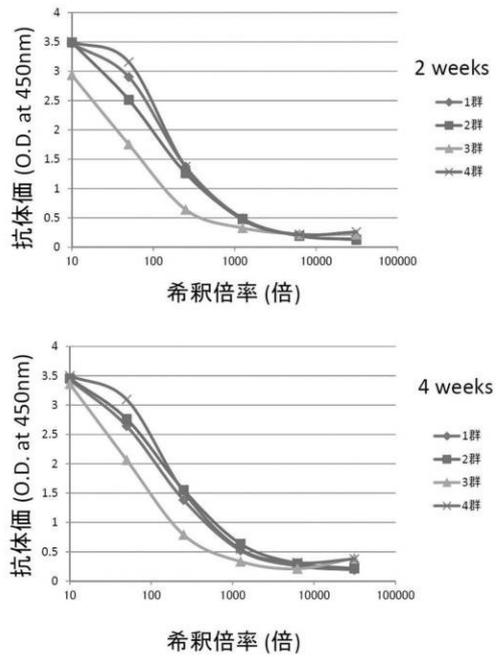
【 図 1 0 】



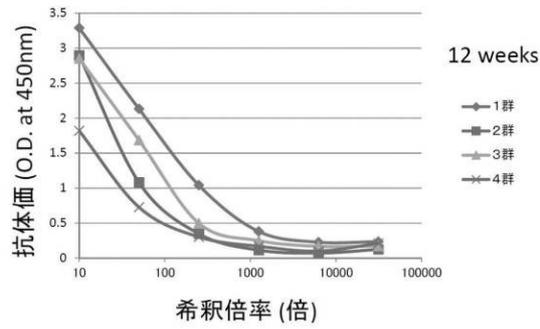
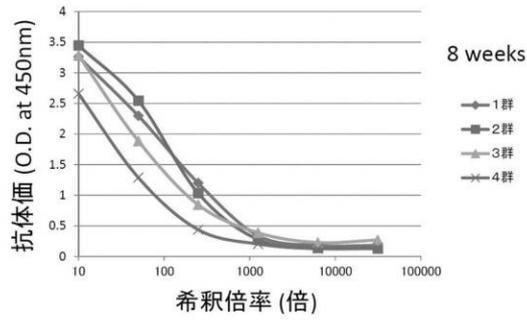
【 図 1 1 】



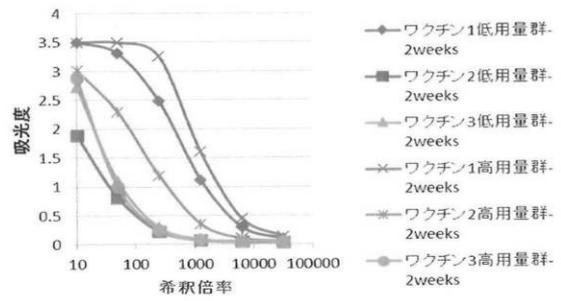
【 図 1 2 - 1 】



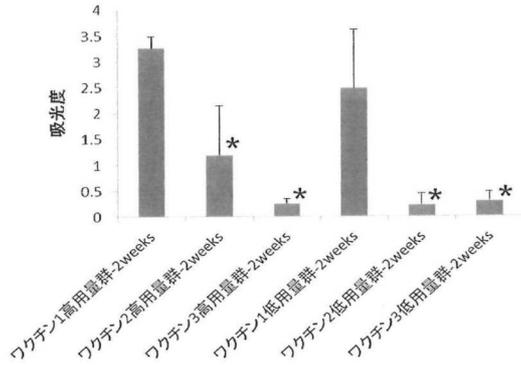
【図12-2】



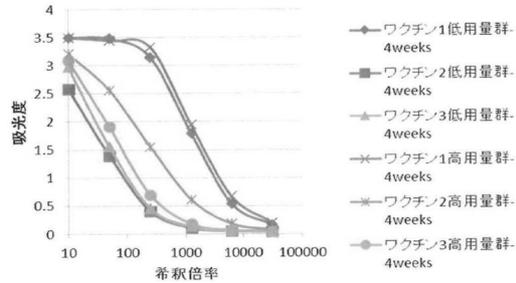
【図13-1】



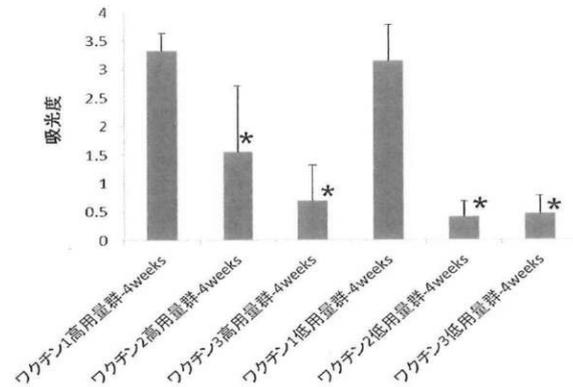
【図13-2】



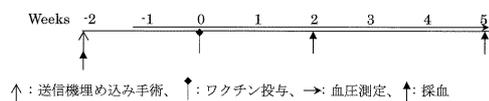
【図14-1】



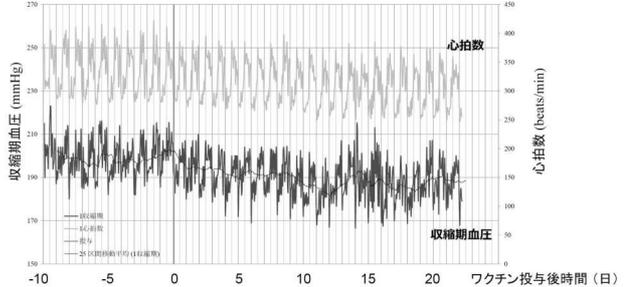
【図14-2】



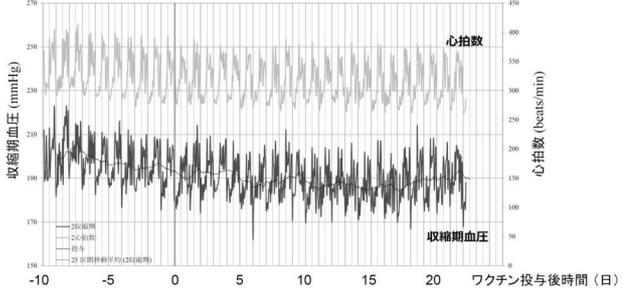
【図15】



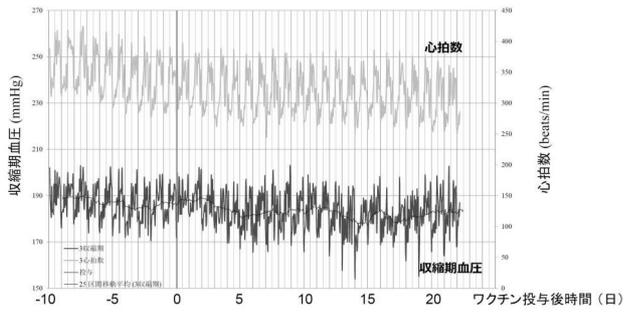
【図16-1】



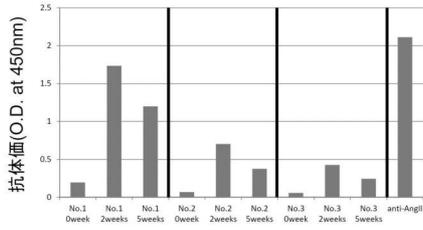
【図16-2】



【図 16-3】



【図 17】



【配列表】

201608054000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/082778
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/00(2006.01)i, A61K39/29(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39/00, A61K39/29, A61P9/00, A61P9/12 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 3-216186 A (The Wellcome Foundation Ltd.), 24 September 1991 (24.09.1991), claim 3; example 6 & US 2003/0175296 A1 claim 3; example 6 & GB 8921172 A & GB 9017728 A & EP 421635 A1 & DE 69021002 C & NZ 235315 A & AU 6269090 A & ES 2075883 T & DD 298134 A & DK 421635 T & IE 903370 A & AU 626183 B & CA 2025598 A & ZA 9007233 A	<u>1-11, 17-21</u> 12-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 February 2016 (01.02.16)		Date of mailing of the international search report 09 February 2016 (09.02.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/082778

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> <u>A</u>	WO 2012/141280 A1 (Osaka University), 18 October 2012 (18.10.2012), claim 1 & US 2014/0099335 A1 claim 1 & EP 2698164 A1 & CN 103796673 A & KR 10-2014-0048119 A	<u>1-11,17-21</u> 12-16
<u>Y</u> <u>A</u>	JP 2014-060968 A (AnGes MG, Inc.), 10 April 2014 (10.04.2014), claim 1 & US 2014/0086944 A1 claim 1	<u>1-11,17-21</u> 12-16
<u>Y</u> <u>A</u>	WO 2014/034735 A1 (Osaka University), 06 March 2014 (06.03.2014), claim 1 & US 2015/0202271 A1 claim 1 & EP 2891497 A1 & KR 10-2015-0070116 A & CN 104768575 A	<u>1-11,17-21</u> 12-16
<u>Y</u> <u>A</u>	FELBER B.K.et al., HIV DNA Vaccine: Stepwise Improvements Make a Difference, Vaccines, 2014.05, Vol.2, p.354-379	<u>1-11,17-21</u> 12-16
<u>Y</u> <u>A</u>	YANG Y.et al., Protective immune response induced by co-immunization with the Trichinella spiralis recombinant Ts87 protein and a Ts87 DNA vaccine, Veterinary Parasitology, 2013, Vol.194, p.207-210	<u>1-11,17-21</u> 12-16
<u>Y</u> <u>A</u>	ISHIKAWA T.et al., Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice, Microbes and Infection, 2007, Vol.9, p.1089-1095	<u>1-11,17-21</u> 12-16

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 8 2 7 7 8	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/00(2006, 01) i, A61K39/29(2006, 01) i, A61P9/00(2006, 01) i, A61P9/12(2006, 01) i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/00, A61K39/29, A61P9/00, A61P9/12			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS /WPIDS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y A	JP 3-216186 A (ザ ウエルカム ファウンデーション リミテッド) 1991.09.24, 請求項3、例6 & US 2003/0175296 A1, Claim3, Example6 & GB 8921172 A & GB 9017728 A & EP 421635 A1 & DE 69021002 C & NZ 235315 A & AU 6269090 A & ES 2075883 T & DD 298134 A & DK 421635 T & IE 903370 A & AU 626183 B & CA 2025598 A & ZA 9007233 A	1-11, 17-21 12-16	
☞ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☞ パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 01.02.2016		国際調査報告の発送日 09.02.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 9548

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 8 2 7 7 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>Y</u> A	WO 2012/141280 A1 (国立大学法人大阪大学) 2012.10.18, 請求項 1 & US 2014/0099335 A1, Claim1 & EP 2698164 A1 & CN 103796673 A & KR 10-2014-0048119 A	<u>1-11, 17-21</u> 12-16
<u>Y</u> A	JP 2014-060968 A (アンジェスMG株式会社) 2014.04.10, 請求項 1 & US 2014/0086944 A1, Claim1	<u>1-11, 17-21</u> 12-16
<u>Y</u> A	WO 2014/034735 A1 (国立大学法人大阪大学) 2014.03.06, 請求項 1 & US 2015/0202271 A1, Claim1 & EP 2891497 A1 & KR 10-2015-0070116 A & CN 104768575 A	<u>1-11, 17-21</u> 12-16
<u>Y</u> A	FELBER B.K. et al., HIV DNA Vaccine: Stepwise Improvements Make a Difference, Vaccines, 2014.05, Vol.2, p.354-379	<u>1-11, 17-21</u> 12-16
<u>Y</u> A	YANG Y. et al., Protective immune response induced by co-immunization with the Trichinella spiralis recombinant Ts87 protein and a Ts87 DNA vaccine, Veterinary Parasitology, 2013, Vol.194, p.207-210	<u>1-11, 17-21</u> 12-16
<u>Y</u> A	ISHIKAWA T. et al., Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice, Microbes and Infection, 2007, Vol.9, p.1089-1095	<u>1-11, 17-21</u> 12-16

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K	35/763	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 6
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 3
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
C 0 7 K 14/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	C 0 7 K	14/02	
	C 0 7 K	7/08	
	C 0 7 K	7/06	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 富麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 中神 啓徳

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 森下 竜一

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 郡山 弘

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 富岡 英樹

大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目7番15号 アンジェスMG株式会社内

(72)発明者 猶原 兼人

大阪府大阪市中央区本町2丁目5番7号 DSファーマアニマルヘルス株式会社内

Fターム(参考) 4C084 AA13 MA16 MA66 NA05 NA11 NA13 NA14 ZA151 ZA161 ZA331
ZA361 ZA391 ZA421 ZA451 ZA751 ZA811 ZB091 ZB261 ZB331 ZC171
ZC351
4C085 AA04 BA89 BB01 BB11 CC08 CC32 EE03 GG01 GG03 GG04
GG05
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA16 MA66 NA05 NA11 NA13 NA14
ZA15 ZA16 ZA33 ZA36 ZA39 ZA42 ZA45 ZA75 ZA81 ZB09
ZB26 ZB33 ZC17 ZC35
4H045 AA11 AA20 AA30 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA54 CA02
CA40 DA86 EA20 FA50 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。