

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/084944

発行日 平成29年10月12日 (2017.10.12)

(43) 国際公開日 平成28年6月2日 (2016.6.2)

| (51) Int.Cl.                        | F I                  | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|----------------------|-------------|
| <b>C07K 14/445 (2006.01)</b>        | C O 7 K 14/445 Z N A | 4 B O 3 3   |
| <b>C07K 17/14 (2006.01)</b>         | C O 7 K 17/14        | 4 C O 7 6   |
| <b>C12N 11/04 (2006.01)</b>         | C 1 2 N 11/04        | 4 C O 8 5   |
| <b>C12N 11/08 (2006.01)</b>         | C 1 2 N 11/08        | 4 H O 4 5   |
| <b>C12N 11/14 (2006.01)</b>         | C 1 2 N 11/14        |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く |                      |             |

|              |                              |          |                    |
|--------------|------------------------------|----------|--------------------|
| 出願番号         | 特願2016-561961 (P2016-561961) | (71) 出願人 | 515255478          |
| (21) 国際出願番号  | PCT/JP2015/083437            |          | 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 |
| (22) 国際出願日   | 平成27年11月27日 (2015.11.27)     |          | 東京都千代田区大手町一丁目7番1号  |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2014-241420 (P2014-241420) | (74) 代理人 | 100126505          |
| (32) 優先日     | 平成26年11月28日 (2014.11.28)     |          | 弁理士 佐貫 伸一          |
| (33) 優先権主張国  | 日本国 (JP)                     | (74) 代理人 | 100131392          |
|              |                              |          | 弁理士 丹羽 武司          |
|              |                              | (74) 代理人 | 100151596          |
|              |                              |          | 弁理士 下田 俊明          |
|              |                              | (72) 発明者 | 奥 浩之               |
|              |                              |          | 日本国群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 |
|              |                              |          | 国立大学法人群馬大学内        |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼタンパク質の部分配列を用いた人工抗原とその製造方法

## (57) 【要約】

熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分アミノ酸配列を持つ、GMP製造時の規格設定に対応した分子構造を有する生理活性ペプチドの提供。(i) A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02 (配列番号1) または(ii) A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04 (配列番号2) のアミノ酸配列を有するペプチド2つが、それぞれのカルボキシ末端と、(iii) Lys-A05-Cys-A06で表されるリンカーペプチドのLysの2つのアミノ基とのアミド結合により2分岐状に並べられた構造を有するペプチド。好ましくは該ペプチドが、該ペプチド内のリンカーペプチド配列のCys残基間のS-S結合によって2量化された構造を有するペプチド。(i)、(ii)、(iii)において、A01からA06は0を含む任意の数のアミノ酸残基を示す。)

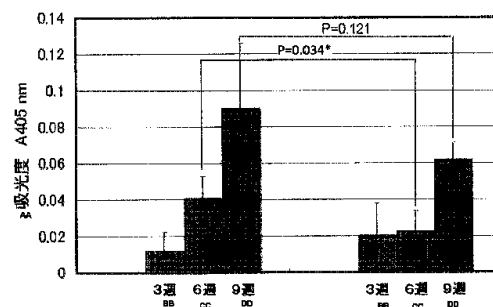


FIG. 8  
Absorbance A405 nm  
BB Week 3  
CC Week 6  
DD Week 9

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

( i ) A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02 ( 配列番号 1 ) または ( ii ) A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸配列を有するペプチド 2 つが、それぞれのカルボキシ末端と、下記 ( iii ) で表されるリンカーペプチドのLysの 2 つのアミノ基とのアミド結合により 2 分岐状に並べられた構造を有するペプチド。

( iii ) Lys-A05-Cys-A06

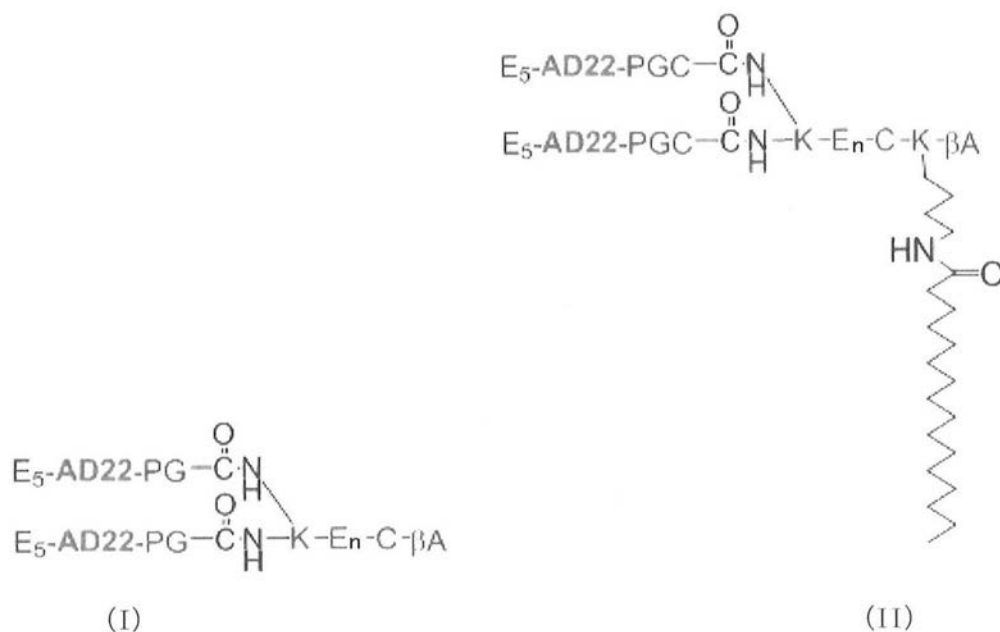
( ( i ) 、 ( ii ) 、 ( iii ) ) において、A01からA06は 0 を含む任意の数のアミノ酸残基を示す。

10

## 【請求項 2】

下記 ( I ) または ( II ) で示される請求項 1 に記載のペプチド。

## 【化 1】



20

30

( AD22は配列番号 1 のアミノ酸配列を示し； n は 4 または 5 の整数を示す。 )

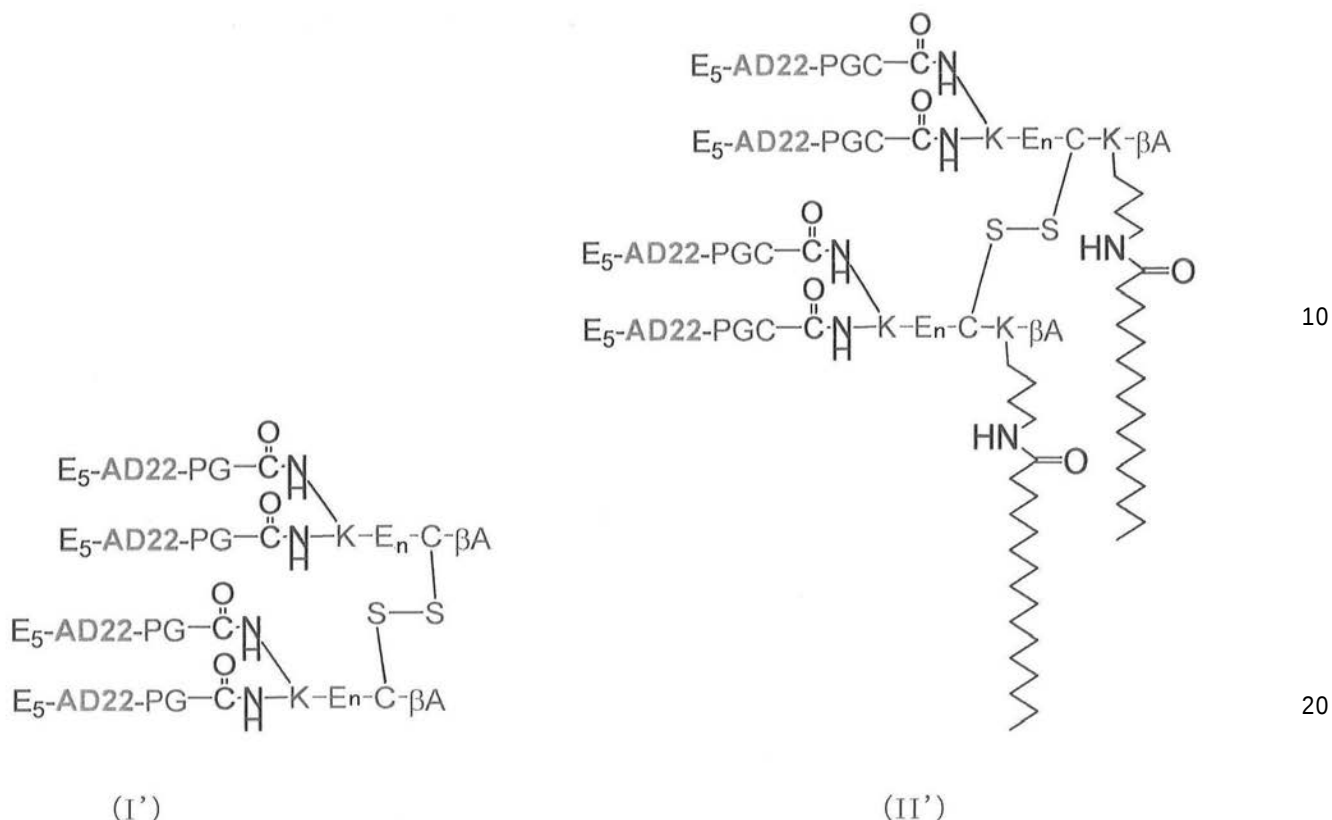
## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドが、該ペプチド内の前記 ( iii ) で表されるリンカーペプチド配列のCys残基間のS-S結合によって 2 量化された構造を有するペプチド。

## 【請求項 4】

下記 ( I' ) または ( II' ) で示される請求項 3 に記載のペプチド。

## 【化 2】



(AD22は配列番号1のアミノ酸配列を示し；nは4または5の整数を示す。)

## 【請求項5】

請求項1～4のいずれか一項に記載のペプチドを含む、マラリアに対して免疫学的応答を誘発させるためのワクチン。

## 【請求項6】

マラリアに起因するエノラーゼとプラスミノーゲンとの相互作用を阻止または阻害する免疫学的応答を誘発させるための、請求項5に記載のワクチン。

## 【請求項7】

マラリアがヒトまたはサルマラリア原虫の感染に起因するマラリアである、請求項5または6に記載のワクチン。

## 【請求項8】

マラリアが熱帯熱マラリア原虫の感染に起因するマラリアである、請求項5または6に記載のワクチン。

## 【請求項9】

マラリアが熱帯熱マラリア原虫および他のヒトまたはサルマラリア原虫の混合感染に起因するマラリアである、請求項5または6に記載のワクチン。

## 【請求項10】

請求項1～4のいずれか一項に記載のペプチドの溶液を、生分解性高分子を含む揮発性有機溶媒と混合してエマルジョンを作製し、得られたエマルジョンを負電荷を呈するポリマー水溶液と混合する工程によって製造された、抗原含有微粒子。

## 【請求項11】

生分解性高分子がポリ乳酸-グリコール酸共重合体であることを特徴とする、請求項10に記載の抗原含有微粒子。

## 【請求項12】

生分解性高分子がポリデブシペプチドであることを特徴とする、請求項10に記載の抗原含有微粒子。

## 【請求項13】

10

20

30

40

50

請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗原含有微粒子と、医薬的に許容可能な担体を含む、マラリア原虫感染症の予防または治療のための医薬組成物。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドを、フィルム、ラテックス粒子、金属超微粒子又はプラスチックプレートの固相表面に結合させてなる物質。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の物質を用いて血清または血漿中のマラリア抗体価を検査する工程を含む、血清または血漿中のマラリア抗体価の検査方法。

【請求項 16】

請求項 14 に記載の物質を用いて請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドに対する抗体を測定する工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドの免疫学的応答の解析方法。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の物質を用いて請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドに対する抗体を測定する工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドが投与された個体の抗体価測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な生理活性ペプチドとその用途に関する。本発明はまた、マラリア原虫由来のエノラーゼの部分アミノ酸配列を有することを特徴とする、ヒトおよび他の動物との免疫反応を利用した、マラリア原虫の増殖を抑える免疫用抗原、医薬組成物および抗体価検査材料に関する。

【背景技術】

【0002】

[従来技術とその問題点]

(1) 感染症としてのマラリアの現況：

WHO世界保健機関は最新の報告の中で、マラリアは世界103ヶ国で流行し、2012年に2億700万人の罹患者と62万7千人の死亡者数が推定されている[非特許文献1]。ほとんどの症例(80%)と死亡者(90%)がアフリカ地域からの報告である。さらに死亡者の77%は5歳未満の子どもたちである。近年の地球規模での対策が進むことで、2000年と2012年を比較すると罹患者数(29%)や死亡者数(45%)は大きく減少した。これはWHOやGlobal Fundなどの国際機関、日本を始めとする政府組織や非政府組織が、有効な薬や蚊帳を配布するなどの積極的な活動の成果であると評価されている。しかし経済成長の続いているインド、ブラジル、タイ、マレーシア、中国などの国々でも未だに流行地域を抱えている。さらに薬剤耐性マラリア原虫の出現と拡散という課題に世界は直面している。従って現在でもマラリアは最も主要な感染症の一つとなっている。

【0003】

わが国においてマラリアは、全数届出が義務づけられている4類感染症に指定されている。1959年の彦根市を最後に国内の土着マラリアは制圧された。しかしわが国の経済成長によって人の移動が盛んになり、日本人渡航者が流行地で感染する例や、流行地から日本への入国者が国内で発症する“輸入マラリア”の症例が1980年代から急増した[非特許文献2]。そして2000年には最多の154例の報告があったが、現在は渡航者のマラリア予防知識の普及などにより、年間50~60症例で推移している。

【0004】

また隣国の韓国では、いったん制圧された“土着マラリア”が1993年に再興し、2000年には4,000症例まで増加したが、2012年は394症例まで減少した[非特許文献3]。韓国から日本への輸入マラリア症例も報告されている[非特許文献4]。韓国で三日熱マラリアを媒介する主な蚊の種類が、日本と同じシナハマダラカであり、日本・韓国間の渡航者や物流の多さ、韓国で20年間も制圧されない現状を考えると、韓国のマラリア原虫や媒介蚊のわ

10

20

30

40

50

が国への流入が大いに危惧されるところである。従ってマラリア対策は流行地のみならず、わが国の防疫上もきわめて重要な課題となっている。

【0005】

またマラリアは健康問題のみならず、アフリカ諸国での経済活動の停滞と社会不安の一因ともなっている。流行地に於ける近年の感染者の増加は、熱帯雨林開発や温暖化との関連も指摘され、International Panel on Climate Change報告(1996 & 1998)によると地球温暖化の場合2 の温度上昇で5000-8000万人の増加が予測されている。そのため、第二次大戦後にDDT散布と衛生対策によって根絶したはずの日本を含む温帯地域においても、マラリア再流行が懸念されている。

【0006】

(2) マラリア原虫の種類と生活史:

マラリアは、マラリア原虫属(Plasmodium属)が原因の寄生虫感染症であり、ヒトに感染するマラリア原虫には熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫(*P. vivax*)、四日熱マラリア原虫(*P. malariae*)、卵形マラリア原虫(*P. ovale*)の4種類である。なかでも、熱帯熱マラリア原虫は最も病原性が高く、重い貧血および脳性マラリアなどの重症化症状を引き起し、患者を死に至らせることもある。

【0007】

また2004年にサルマラリアの一種(*P. knowlesi*)が東南アジアの広い地域でヒトに感染していることが報告され5番目のヒトに感染するマラリア原虫と考えられ始めている[非特許文献5]。また、日本国内での輸入感染例も報告されている[非特許文献6]。サルマラリアの感染は近年の熱帯雨林開発も原因の一つと考えられている。また、ヒトにマラリア原虫を媒介するハマダラカ(*Anopheles*属)は約60種類が知られている。

【0008】

(3) マラリアの感染経路、原虫の生活環:

マラリアは、メスのハマダラカの刺咬により、マラリア原虫が体内に侵入して罹患する。マラリア原虫の生活環は蚊体内およびヒト体内の2段階に分けられる。マラリア原虫を保有する蚊にヒトが吸血されると、蚊の唾液腺に存在する感染性のスポロゾイト(肝内型)がヒト血中に侵入し、速やかに肝臓に移行する。スポロゾイトは肝細胞内で急速に分裂し、多核のシゾンが生じる。成熟したシゾンから多数のメロゾイド(赤内型)が血中に放出され、赤血球に侵入する。メロゾイトは赤血球内でリング(輪状体)、トロフォゾイト(成熟栄養体)、シゾン(分裂体)へと形態を変えながら分裂し、原虫の種類により48~72時間で1個のメロゾイトから8~32個の新たなメロゾイトが生じる。この段階で、成熟すると、赤血球を破壊して、血中に放出され、新たな赤血球に侵入する。以後この赤血球期サイクルを繰り返す。感染者は、赤血球破壊およびメロゾイト放出が刺激となり発熱、悪寒などのマラリアの症状を呈する。また、放出されたメロゾイトの一部は雌雄異株のガメトサイト(生殖母体)に分化し、血中で長期にわたり生存する。

この感染者が蚊に吸血されると、ガメトサイトが蚊の体内に侵入し、その中腸内で雌雄の生殖体(ガメト)に変態し、雌雄で接合した後、オーキネートからオーシストに分化する。そして、オーシスト内で急速に増殖した数千個のスポロゾイトは、オーシストの破壊により蚊の中腸壁から放出されて唾液腺に移動し、蚊が吸血することで新たにヒトに感染することによって感染サイクルが続いてゆく。三日熱マラリアと卵形マラリアではヒトの肝臓内でヒプノゾイト(休眠体)が形成され、1~数ヵ月、ときには1年以上経過してから再発することも特徴である。

【0009】

(4) さまざまな治療薬と薬剤耐性マラリア:

既存の抗マラリア薬のほとんどは血中期に作用する。クロロキンは第二次世界大戦を以て戦中戦後と長くマラリア特效薬として投与されてきた。しかし1950年代後半以降クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫が世界中へ広がり、薬剤としての有用性は大きく低下した。特に、タイとその周辺諸国、オセアニア、ブラジルのアマゾン川流域、東アフリカでは高度耐性の熱帯熱マラリア原虫が検出されている。また、ピリメタミンはスルファドキ

10

20

30

40

50

シンとの合剤として使用されるが、アマゾン川流域、東南アジアで高度耐性例が検出されている。メフロキン耐性はタイとカンボジアやミャンマーとの国境地帯に多く、アマゾン川流域、アフリカでも報告されている。従来、多剤耐性マラリア治療にキニーネが有効であったが、感受性低下が東南アジアやブラジルから報告されている。三日熱マラリアでもクロロキン耐性が出現している。さらに三日熱マラリアの肝内での休眠原虫ヒブノゾイトを殺滅する医薬品プリマキンに対しても治療抵抗性の症例が報告されている[非特許文献7]。

#### 【0010】

##### (5) マラリアの標準的治療薬：

熱帯熱マラリアでは治療が遅れると重症化するため（流行地住民をのぞく）、迅速かつ適切な抗マラリア薬による治療が必須である。標準的治療法では、末梢血中の赤血球に寄生したマラリア原虫を殺滅し、急性期の発熱を抑止して臨床症状を改善することを目的とする治療が行われる。しかしわが国で承認されている抗マラリア薬は4種類のみである。すなわち現在入手可能で使いやすい（1）塩酸メフロキン、（2）アトバコン/プログアニル塩酸塩の合剤、現在流通していない（3）スルファドキシシン/ピリメサミンの合剤、処方プロトコルが煩雑な（4）キニーネ経口薬、の4種類である。上記に説明した薬剤耐性マラリア原虫の報告された地域で罹患したと考えられる熱帯熱マラリア患者では、（5）アーテメター/ルメファントリンの合剤、（2）アトバコン/プログアニルの合剤、が投与される。

#### 【0011】

三日熱マラリアや卵形マラリアでは（6）クロロキンが第一選択薬となりえるが、さらに再発防止の根治薬が必要である。すなわち、患者の肝細胞内に潜むヒブノゾイトと呼ばれるステージの原虫は、赤血球期の薬剤には反応せず、肝内型原虫を特異的に殺すプリマキンの投薬が追加される必要性がある。パプアニューギニア周辺の南半球の三日熱マラリアはプリマキン低感受性の報告が多く2倍量の投薬が推奨されている。また、プリマキンはG6PD欠損症の人に血管内溶血を起こす副作用が強いため、投薬前にG6PD酵素活性検査の必要がある。

#### 【0012】

##### (6) ワクチンの必要性和ワクチン開発の問題：

上記のように新規マラリア治療薬には薬剤耐性原虫の発生と拡散が絶えずつきまとうことが問題である。そこでマラリア感染を予防する切り札としてワクチンの開発が望まれている。特に重症化すると死に至る恐れのある熱帯熱マラリアのワクチン開発研究が世界中で進められてきた。開発は1980年代から始まったが、未だ実用化に至った成果は達成されていない。この原因の一つに、マラリア原虫はヒトの防御免疫を回避する寄生適応メカニズムが発達していることが明らかとなり、ワクチン投与や一度の感染既往で人が防御免疫を獲得できる“二度なし感染症”である麻疹や天然痘とは大きな違いがあることが分かってきた。免疫機構を回避するメカニズムには、様々な形態変化(標的抗原も変化)を起こす複雑な原虫の生活史に加え、多重遺伝子族の形成や遺伝子多型提示などが明らかにされている[非特許文献8]。

#### 【0013】

多重遺伝子族の例としては熱帯熱マラリア原虫感染赤血球の表面に形成される“knob”に存在するPfEMP1タンパク質が有名であり、1つの原虫が非常に多数のコピーを保有している[非特許文献9,10]。すなわち、原虫の赤血球内サイクルが回る毎に異なるコピーを赤血球表面に発現するため、免疫系の攻撃ターゲットとして狙いが定めづらい。遺伝子多型の例としては、メロゾイトの表面に存在する膜タンパク質MSP1がある[非特許文献11,12]。これは1つの原虫は1コピーしか保有していないが、それぞれ原虫毎に異なった配列を保有しているため、はじめの感染でMSP1へ成立した防御免疫システムは次の感染では役に立たない。

#### 【0014】

##### (7) これまでに行われてきたマラリアワクチン開発：

原虫を媒介するハマダラカの刺咬により体内に入った“スポロゾイト”は、血中から速やかに肝細胞に侵入し、そこでまず分裂・増殖する（肝内ステージ）。その後血中に放出された“メロゾイト”が赤血球内に侵入して分裂増殖を繰り返し（赤血球内ステージ）、増殖した原虫の一部は雌雄の“ガメトサイト”となり、他のヒトへハマダラカの吸血によって伝搬されてゆく（蚊ステージ）。このマラリア原虫の生活史における各ステージをターゲットとして、ワクチン開発研究が進んでいる[非特許文献13,14]。

#### 【0015】

世界で初めて行われたマラリアワクチンの臨床研究は、コロンビアのPatarroyoらによってSPf66と呼ばれる44残基の化学合成ペプチド抗原を用いて行われた[非特許文献15]。しかしSPf66はアジアやアフリカの流行地でも試されたが、十分な有効性は確認されなかった。

10

#### 【0016】

これ以降、様々なワクチン候補の臨床試験が実施されるようになったが、現在最も開発が進んでいるのはGlaxoSmithKline (GSK)社のRTS,S/AS01ワクチンであり、世界初の大規模なPhase III臨床試験が行われている。途中経過では2010年10月アフリカの1～5才の乳幼児で感染リスクが半減した結果が報告されたことで、大きなニュースとなった[非特許文献16]。しかし2012年11月の最終報告では3200人の乳幼児に対してマラリア感染について31%の有効率、重症マラリアについて37%の有効率と結論づけられた。すなわち最先端のRTS,S/AS01ワクチンでも30%程度の有効率しか得られないことが明らかとなった[非特許文献17]。

20

#### 【0017】

わが国では大阪大学の堀井らによるSE36/AHGワクチンの臨床試験が、日本国内(2005年)およびウガンダ流行地(2010年4月-2011年2月)で実施されている[非特許文献18]。

#### 【0018】

これまでのマラリアワクチンの臨床開発[非特許文献19]では、ヒトの免疫系に抗体を作らせる組換えタンパク質抗原を直接投与する方法がほとんどであった。抗体の標的としては、(1) スポロゾイト表面抗原(CSP)（肝臓細胞への原虫侵入阻止）、(2) メロゾイト表面抗原(MSP1)（赤血球への原虫侵入阻止）、(3) 感染赤血球表面抗原(PfEMPI、SERA5)（赤血球内での原虫増殖阻害）、(4) 伝搬阻止抗原(蚊の体内で原虫の中腸への侵入阻止や増殖を阻害)、などである。また、抗原を体内で発現する(5) 弱毒化アデノウイルスを用いたDNAワクチン、(6) 放射線照射や遺伝子工学的に弱毒化した原虫(生ワクチン)、の例もある。さらに(7) 複数の原虫抗原をつないだ“マルチステージワクチン”や、(8) 複数のワクチン候補を人工的に組み合わせた“プライムブーストワクチン”もある。

30

#### 【0019】

(8) エノラーゼを用いたマラリアワクチンとなる医薬組成物の開発の現況：

マラリアの疫学調査によると死亡者の多くは「流行地の乳幼児」と「日本人など非流行地からの渡航者」であることが知られている。一方「流行地の大人」はマラリアに感染しても回復しやすい。これは、流行地の住民は「絶えずマラリアに感染することでマラリアへの免疫を獲得、維持している」ためと考えられている。従ってワクチン開発には、免疫状態の個人差を考慮しなくてはならないことが明らかである。

40

#### 【0020】

疫学研究の過程で、群馬大学医学部の鈴木と狩野は、南米と東南アジアの流行地の野外調査から、急性期の熱帯熱マラリア患者が病態の回復に関与する共通の抗原分子として、原虫由来の解糖系酵素・エノラーゼを発見した [非特許文献20]。すなわち、ヒトに感染した熱帯熱マラリア原虫が産生する解糖系酵素、エノラーゼが熱帯熱マラリアへの防御免疫分子として働いていることを見出し、これを利用したワクチン開発を開始した[非特許文献21,22]。

#### 【0021】

エノラーゼによるワクチン抗原は、免疫状態の個人差を考慮したワクチンとして、従来の実験室から得られたデータにのみ基づくワクチンのアイディアと大きく差別化されてい

50

る。従って、原虫エノラーゼを抗原に用いたワクチン研究は最近行われているものの[非特許文献23]、本発明者らによる着想の発端と現在までのワクチン抗原の開発について、大きく研究方向は異なることが容易に理解される。

#### 【0022】

本発明者らはワクチン開発を始めるに当たって、先ず熱帯熱マラリア原虫由来のアミノ酸配列を有する組み換え型エノラーゼおよび部分アミノ酸配列を用いた抗原ペプチドの分子設計と化学合成の研究を行った。例えばAD22配列(Ala256-Asp277)(配列番号1)およびAT28配列(Ala256-Thr283)(配列番号2)である。これらのエノラーゼおよび人工抗原ペプチド配列を用いた免疫学的な研究により、ウサギへの免疫投与によって作成した抗エノラーゼ抗体や抗ペプチド抗体は熱帯熱マラリア原虫の*in vitro*での増殖を抑制することが明らかとなった[特許文献1]。

10

#### 【0023】

続いて熱帯熱マラリア原虫由来のエノラーゼおよびAD22部分配列ペプチドを抗原として用いて、ヨザル13頭によるワクチン試験を行った。ヨザル末梢血における、赤血球へのマラリア原虫の寄生率の推移をプロットした。その結果、ワクチンを投与したヨザルは寄生率の急激な上昇が抑えられており、ワクチンとしての効果に優れていることが明らかとなった。また、何れの抗原によっても血清中には原虫エノラーゼと免疫学的に反応する抗体を産生していることも明らかとなった。

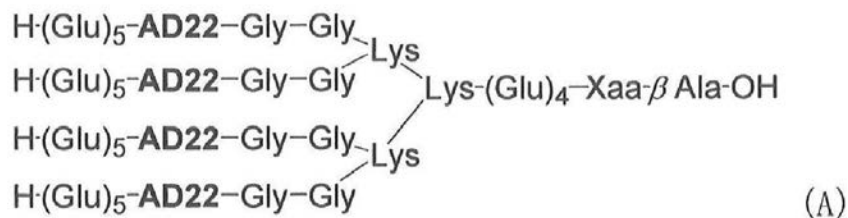
#### 【0024】

ヨザルに免疫を生じさせる抗原は22残基のペプチド(AD22)を4本並べたタンデム構造を有する化学合成ペプチド抗原であり、下記(A)の構造を有する。抗原の構造式(A)中のXaaは任意であるが、ここでは側鎖をacetamidomethyl基によって保護されたCys(Acm)残基を用いている。

20

#### 【0025】

##### 【化1】



30

#### 【0026】

また、化学合成の観点から、AD22抗原ペプチドのプロセス研究を進め、大量合成法に適したフラグメント縮合法の開発に成功した[特許文献2]。即ち、5つの短鎖ペプチドセグメントを縮合し1本の保護ペプチド鎖とすることにより、目的とするマラリア原虫エノラーゼの部分配列を持つペプチドまたはその類似体の合成を大規模に行う方法を見出した。

#### 【0027】

さらに発明者らの研究グループは疫学的な知見に基づいたワクチンとして、新規な医薬組成物の開発に着手した。すなわちマラリア流行地の住民は、くり返し原虫に感染することで、防御的な免疫状態を維持していることが知られている。そこで、流行地の免疫状態を材料化学的に再現することを目的として、持続的に抗原を徐放する人工抗原材料の開発を行った。すなわち、AD22抗原ペプチドを生分解性微粒子に内包させた、抗原ナノ微粒子の作成法と免疫学的にすぐれた性質を見いだした[特許文献3]。また、重合体に抗原ペプチドを導入したペプチド提示微粒子についても報告した[特許文献4]。

40

#### 【0028】

このように、本発明者らの長年の努力によって、ようやく原虫エノラーゼの部分配列さらにはAD22配列のワクチン抗原としての有用性がわかり始めてきた。次の問題点として、このAD22配列をペプチド抗原として用いる場合には医薬品としての基準を満たすように抗原ペプチドを合成する必要性が生じた。

50

## 【 0 0 2 9 】

## ( 9 ) AD22抗原ペプチド合成法の検討：

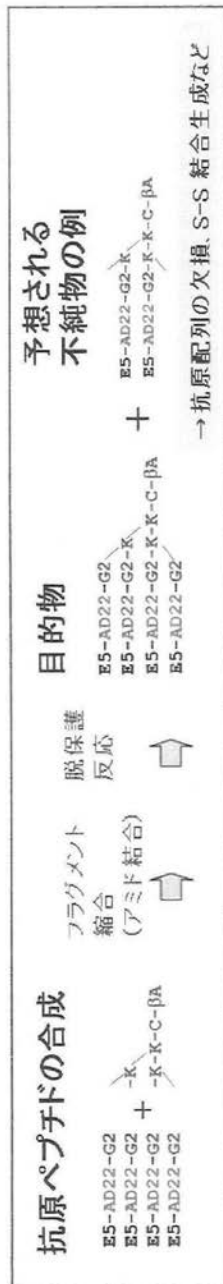
原虫エノラーゼの部分構造であるAD22配列およびその類似体をヒトへ投与できる医薬品とするためには、医薬品に求められるGMP製造時の規格設定に対応した分子構造や製造法であることや、特に化学合成品の原薬のガイドラインに沿った品質規格（質量分析、HPLC分析、不純物や類縁体の分析など）を設定することが、要求されている。

## 【 0 0 3 0 】

はじめに上記（A）の構造を有するペプチド抗原について、医薬品製造を考慮した合成法によって製造を行った。通常はC末端から逐次、Fmoc保護アミノ酸を縮合反応することによって行うのが容易である。しかし本発明者らは、下記のスキームに示すように、Fmoc法によるAD22抗原を含む直鎖配列部位（E<sub>5</sub>-AD22-G<sub>2</sub>：配列番号5）とLys分岐部位をアミド結合によるフラグメント縮合による合成を行った。この方法はそれぞれのペプチドフラグメントを十分に精製した後に合成を行うことで原薬中の不純物や類縁体の解析を容易にする利点を有している。

## 【 0 0 3 1 】

## 【化 2】



10

20

30

## 【 0 0 3 2 】

本発明者らは、目的物が1ロットあたり50mgとなるようにして3回合成を行い目的物に相当する物質を得ることができた。しかし合成した抗原ペプチドについて質量分析やGPC分析などによる確認試験が困難であるとわかった(図1)。すなわち原虫エノラーゼの部分構造であるAD22配列およびその類似体をヒトへ投与できる医薬品とするためには、ペプチド抗原の分子構造をGMP製造時に用いる規格設定(分析方法)に適した全く新しい分子構造へ変更する必要があると明らかになった。

40

## 【 0 0 3 3 】

## ( 1 0 ) 感染症に起因するプラスミノーゲン作用

エノラーゼは解糖系における9番目の酵素であり、細胞内でのエネルギー産生を担っている。一方、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)などの病原微生物では、細胞表面においてヒトの線溶系タンパク質(プラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子tPA)と結合することで宿主細胞への感染を促進していることが注目されている[非特許文献24]。

50

## 【 0 0 3 4 】

マラリア感染においては、媒介蚊の体内でのオーキネートという原虫形態において、細胞表面エノラーゼによる、蚊の中腸細胞へ侵入促進が報告されている[非特許文献25]。

## 【 0 0 3 5 】

プラスミノーゲンは通常、血漿中に含まれており、レセプタータンパク質と結合することで活性化される。プラスミノーゲンは791残基からなるタンパク質であり、一つのプラスミノーゲンは5つのクリングルドメインとセリンプロテアーゼ領域から構成されている。クリングルドメインは約80個のアミノ酸から構成され、3組の S-S 架橋による特徴的な2次構造をもつ。このクリングルドメインにレセプタータンパク質が結合することにより、プラスミノーゲンアクチベーター部位の加水分解が起きることで、プラスミン活性が発現する。近年、様々な病原微生物において、細胞表面のエノラーゼがレセプタータンパク質として働き、宿主細胞への感染促進に関わっていることが報告されるようになっている[非特許文献26]。

10

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 3 6 】

【 特許文献 1 】 特開2002-371098号公報

【 特許文献 2 】 W02006/035815公報

【 特許文献 3 】 特開2009-256324号公報

【 特許文献 4 】 特開2012-240940号公報

20

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 3 7 】

【 非特許文献 1 】 WHO. Impact of malaria control. World Malaria Report 2013. Geneva: WHO Press, 2013: 55-68.

【 非特許文献 2 】 Kano S. and Kimura M., Acta Tropica, 89(3):271-278, 2004.

【 非特許文献 3 】 WHO. Country Profiles (Republic of Korea). World Malaria Report 2013. Geneva: WHO Press, 2013: 165-166.

【 非特許文献 4 】 Iwagami M, Itoda I, Hwang SY, Kho WG, Kano S. Plasmodium vivax P CR genotyping of the first malaria case imported from South Korea into Japan. J Infect Chemother. 15(1): 27-33, 2009.

30

【 非特許文献 5 】 Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. Lancet.363(9414):1017-1024, 2004.

【 非特許文献 6 】 Tanizaki R, Ujiie M, Kato Y, Iwagami M, Hashimoto A, Kutsuna S, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Kano S, Ohmagari N. First case of Plasmodium knowlesi infection in a Japanese traveller returning from Malaysia. Malaria J. 12: 128, 2013.

【 非特許文献 7 】 狩野繁之. わが国のマラリア-いまどのように診断して治療するか-(How we can diagnose and treat imported malaria patients in Japan). モダンメディア 57巻, pp. 299-308, 2011年.

40

【 非特許文献 8 】 Stanisic DI, Barry AE, Good MF. Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge. Trends Parasitol. 29(12): 612-22, 2013.

【 非特許文献 9 】 Mercereau-Puijalon O, Fandeur T, Guillotte M, Bonnefoy S. Parasite features impeding malaria immunity: antigenic diversity, antigenic variation and poor immunogenicity. Res Immunol. 142(8):690-697, 1991.

【 非特許文献 10 】 Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. Mol Biochem Parasitol. 115(2):129-143, 2001.

【 非特許文献 11 】 Tanabe K, Sakihama N, Kaneko A. Stable SNPs in malaria antigen

50

genes in isolated populations. Science. 2004, 303, 493.

【非特許文献 1 2】Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 61(2):315-320, 1993.

【非特許文献 1 3】奥浩之, 狩野繁之. マラリアの基礎とワクチン. バムサジャーナル. 26(1): 31-35, 2014.

【非特許文献 1 4】奥浩之, 狩野繁之. マラリアワクチン. レギュラトリーサイエンス学会誌. 2(2): 159-165, 2012.

【非特許文献 1 5】Patarroyo ME, Amado R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of Plasmodium falciparum malaria. Nature. 332(6160): 158-161, 1988.

【非特許文献 1 6】RTS,S Clinical Trials Partnership. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. New Engl J Med. 365(20): 1863-1875, 2011.

【非特許文献 1 7】RTS,S Clinical Trials Partnership. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. New Engl J Med. 367(24): 2284-2295, 2012.

【非特許文献 1 8】Palacpac NM, Arisue N, Tougan T, Ishii KJ, Horii T. Plasmodium falciparum serine repeat antigen 5 (SE36) as a malaria vaccine candidate. Vaccine. 29(35): 5837-5845, 2011.

【非特許文献 1 9】Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. J Clin Invest. 120(12): 4168-4178, 2010.

【非特許文献 2 0】Kano S, El Gaddal AA, Suzuki M. Clinical and epidemiological studies on a 47kD Plasmodium falciparum antigen. Jpn J Trop Med Hyg. 18(4): 317-324, 1990.

【非特許文献 2 1】Norazmi MK, Kano S, Alias A, Abdullah MS, Suzuki M. Reactivity of sera from patients with acute Plasmodium falciparum and P. vivax infections with an antigen Preparation from a P. falciparum isolate: mutually exclusive reactivity with a 47kD and 29 kD band respectively. Jpn J Trop Med Hyg. 24(4):237-239, 1996.

【非特許文献 2 2】Kano S, Onda T, Matsumoto Y, Buchachart K, Krudsood S, Looaree suwan S, Aikawa M, Suzuki M. Serological evaluation of malaria patients in Thailand: antibody response against electrophoresed antigenic polypeptides of Plasmodium falciparum. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 29(2): 341-343, 1998.

【非特許文献 2 3】Pal-Bhowmick I, Mehta M, Coppens I, Sharma S, Jarori GK. Protective properties and surface localization of Plasmodium falciparum enolase. Infect Immun. 75(11): 5500-5508, 2007.

【非特許文献 2 4】Cork AJ, Ericsson DJ, Law RH, Casey LW, Valkov E, Bertozzi C, Stamp A, Jovceviski B, Aquilina JA, Whisstock JC, Walker MJ, Kobe B. PLoS One. 2015, vol. 10, pp.e0121764.

【非特許文献 2 5】Ghosh AK, Coppens I, Gardsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, vol.108, pp. 17153-17158.

【非特許文献 2 6】Raymond BB, Djordjevic S. Veterinary Microbiology. 2015, vol. 178, pp. 1-13.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0038】

本発明の課題は、GMP製造に対応可能な新しいマラリアワクチン用の抗原ペプチドの分子構造を提供することにある。本発明は特に、ヒトおよび他の動物との免疫反応を利用したマラリア原虫に対する免疫学的応答を誘発することができるペプチドおよびその類似体

を含んだ微粒子、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の増殖を抑える免疫用抗原を含んだ微粒子の製造方法に適した方法を提供することも課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0039】

本発明者らはGMP製造に対応可能な新しいマラリアワクチン用の抗原ペプチドを開発すべく全く新しいAD22抗原ペプチド分子構造および製造法の開発を行った。さまざまな条件や実験を重ねた結果、Lys残基上の2つのアミノ基にそれぞれAD22抗原配列を含むペプチドを結合させることで、全く新しい2分岐状構造の抗原ペプチドの合成に成功した。

【0040】

この2分岐状ペプチドは分子量が15000を超えている合成ペプチドであるにもかかわらず、大変意外なことに、一般的なペプチド抗原の問題である、溶解性 (>1mg/mLの水溶性)、HPLC分析 (ODSやGPCカラムでのピーク分離)、質量分析 ( $m/z \pm 5$  以内の半値幅) の問題を解決している物質であることが明らかとなった。すなわち、本発明のペプチド化合物は医薬品の規格設定に用いることができる高精度な分析データを再現性良く得られることが明らかとなった。

【0041】

これらの製造法を確立することでようやくGMP製造に対応可能な新しいマラリアワクチン用の抗原ペプチドの分子構造とその製造法を見いだすことに成功した。

【0042】

すなわち、本発明は以下を提供する。

[1] (i) A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02 (配列番号1) または (ii) A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04 (配列番号2) のアミノ酸配列を有するペプチド2つが、それぞれのカルボキシ末端と、下記 (iii) で表されるリンカーペプチドのLysの2つのアミノ基とのアミド結合により2分岐状に並べられた構造を有するペプチド。

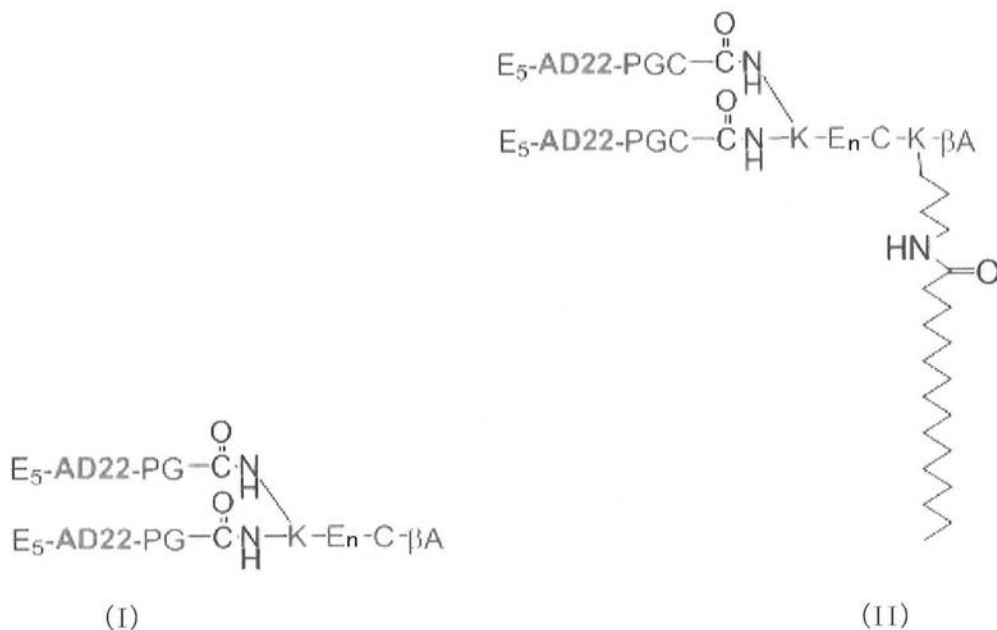
(iii) Lys-A05-Cys-A06

((i)、(ii)、(iii)において、A01からA06は0を含む任意の数のアミノ酸残基を示す。)

[2] 下記 (I) または (II) で示される [1] に記載のペプチド。

【0043】

【化3】



10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

( AD22は配列番号 1 のアミノ酸配列を示し ; n は 4 または 5 の整数を示す。 )

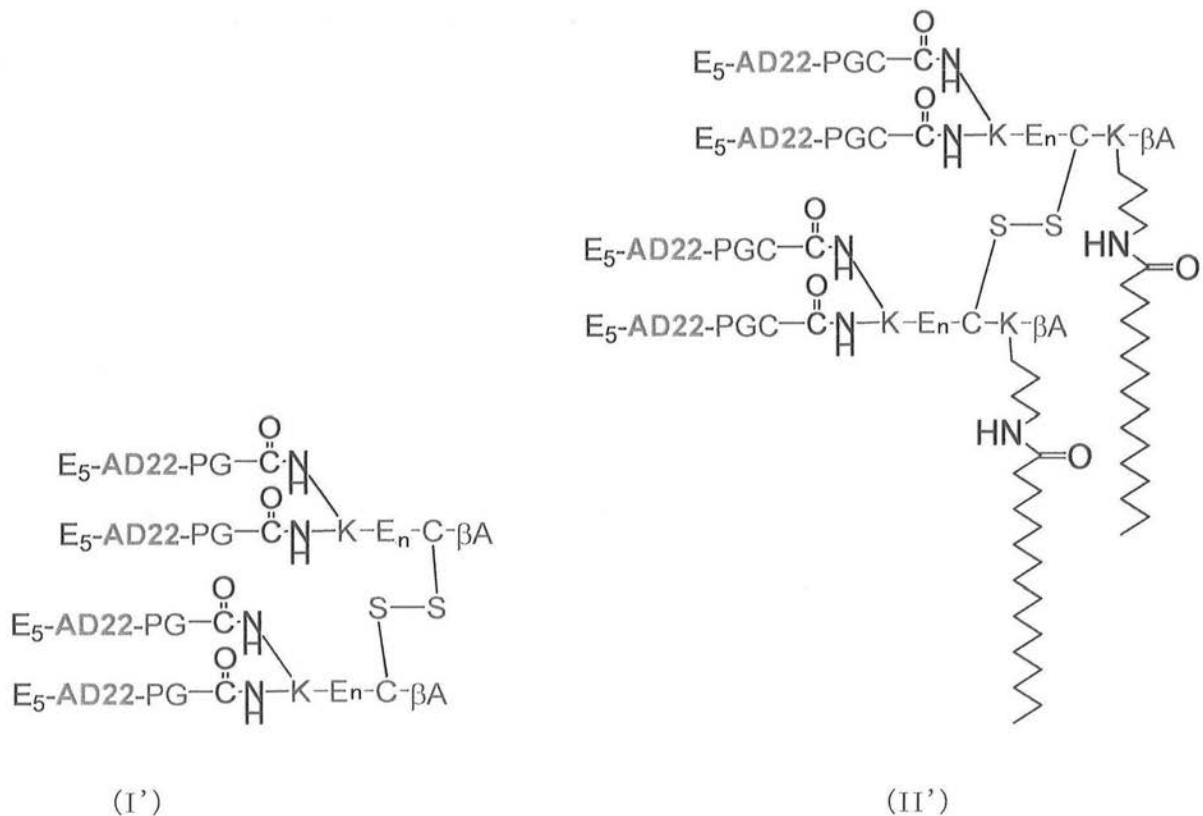
## 【 0 0 4 5 】

[ 3 ] [ 1 ] または [ 2 ] に記載のペプチドが、該ペプチド内の前記 ( iii ) で表されるリンカーペプチド配列のCys残基間のS-S結合によって 2 量化された構造を有するペプチド。

[ 4 ] 下記 ( I' ) または ( II' ) で示される [ 3 ] に記載のペプチド。

## 【 0 0 4 6 】

## 【 化 4 】



## 【 0 0 4 7 】

( AD22は配列番号 1 のアミノ酸配列を示し ; n は 4 または 5 の整数を示す。 )

## 【 0 0 4 8 】

[ 5 ] [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載のペプチドを含む、マラリアに対して免疫学的応答を誘発させるためのワクチン。

[ 6 ] マラリアに起因するエノラーゼとプラスミノーゲンとの相互作用を阻止または阻害する免疫学的応答を誘発させるための、[ 5 ] に記載のワクチン。

[ 7 ] マラリアがヒトまたはサルマラリア原虫の感染に起因するマラリアである、[ 5 ] または [ 6 ] に記載のワクチン。

[ 8 ] マラリアが熱帯熱マラリア原虫の感染に起因するマラリアである、[ 5 ] または [ 6 ] に記載のワクチン。

[ 9 ] マラリアが熱帯熱マラリア原虫および他のヒトまたはサルマラリア原虫の混合感染に起因するマラリアである、[ 5 ] または [ 6 ] に記載のワクチン。

[ 1 0 ] [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載のペプチドの溶液を、生分解性高分子を含む揮発性有機溶媒と混合してエマルジョンを作製し、得られたエマルジョンを負電荷を呈するポリマー水溶液と混合する工程によって製造された、抗原含有微粒子。

[ 1 1 ] 生分解性高分子がポリ乳酸 - グリコール酸共重合体であることを特徴とする、[ 1 0 ] に記載の抗原含有微粒子。

[ 1 2 ] 生分解性高分子がポリデブシペプチドであることを特徴とする、[ 1 0 ] に記載

の抗原含有微粒子。

[ 1 3 ] [ 1 0 ] ~ [ 1 2 ] のいずれかに記載の抗原含有微粒子と、医薬的に許容可能な担体を含む、マラリア原虫感染症の予防または治療のための医薬組成物。

[ 1 4 ] [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載のペプチドを、フィルム、ラテックス粒子、金属超微粒子又はプラスチックプレートの固相表面に結合させてなる物質。

[ 1 5 ] [ 1 4 ] に記載の物質を用いて血清または血漿中のマラリア抗体価を検査する工程を含む、血清または血漿中のマラリア抗体価の検査方法。

[ 1 6 ] [ 1 4 ] に記載の物質を用いて [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載のペプチドに対する抗体を測定する工程を含む、[ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載のペプチドの免疫学的応答の解析方法。

10

[ 1 7 ] [ 1 4 ] に記載の物質を用いて [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載のペプチドに対する抗体を測定する工程を含む、[ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載のペプチドが投与された個体の抗体価測定方法。

#### 【 0 0 4 9 】

[ 1 8 ] [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載のペプチドの溶液を、生分解性高分子を含む揮発性有機溶媒と混合してエマルジョンを作製する工程、および、得られたエマルジョンを負電荷を呈するポリマー水溶液と混合する工程を含む、抗原含有微粒子の製造方法。

[ 1 9 ] 生分解性高分子がポリ乳酸 - グリコール酸共重合体であることを特徴とする、[ 1 8 ] に記載の抗原含有微粒子の製造方法。

[ 2 0 ] 生分解性高分子がポリデブシペプチドであることを特徴とする、[ 1 8 ] に記載の抗原含有微粒子の製造方法。

20

[ 2 1 ] [ 1 8 ] ~ [ 2 0 ] のいずれかに記載の製造方法により抗原含有微粒子を製造する工程、および、該抗原含有微粒子と医薬的に許容可能な担体を配合し医薬組成物を調製する工程を含む、マラリア原虫感染症の予防または治療のための医薬組成物の製造方法。

#### 【 発明の効果 】

#### 【 0 0 5 0 】

本発明によれば、熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分アミノ酸配列を持つ、GMP製造時の規格設定に対応した分子構造を有する生理活性ペプチドが提供される。特に原薬の確認試験（質量分析、HPLC分析）を容易に実施できることに特徴がある。本発明のペプチドは、患者血清と反応させることで熱帯熱マラリア感染の診断材に、また熱帯熱マラリア原虫の増殖を抑える抗体を産生する免疫用抗原として用いることができる。すなわち、熱帯熱患者には能動免疫を生じさせる症状改善薬として、非感染者には防御免疫を用いたワクチンとして作用することができる。

30

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 5 1 】

【 図 1 】従来の方法で得られた式 ( A ) の抗原ペプチドの分析結果 ( GPCクロマトグラムとMALDI-TOF-MSスペクトル ) を示す図。

【 図 2 】熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの分子構造、および 3 5 残基配列 ( 配列番号 3 のアミノ酸番号 2 5 4 ~ 2 8 8 ; 配列番号 2 1 ) の位置するループ構造 ( 点線部分 ) を示す図。

40

【 図 3 】抗原ペプチド ( I ' ) ( AD22map2-SS ) のHPLCクロマトグラム。

【 図 4 】抗原ペプチド ( I ' ) ( AD22map2-SS ) のESI-MSデータ。

【 図 5 】抗原ペプチド ( II ' ) ( AD22map2pal-SS ) のHPLCクロマトグラム。

【 図 6 】抗原ペプチド ( II ' ) ( AD22map2pal-SS ) のESI-MSデータ。

【 図 7 】免疫投与に用いた抗原含有微粒子の光学顕微鏡写真 ( 図面代用写真 ) 。

【 図 8 】免疫後の採血 ( 3 週目、6 週目、9 週目 ) における、免疫群 ( 実験区 1、図中の左側 ) および非免疫群 ( 実験区 2、図中の右側 ) におけるペプチド抗原に対するIgG抗体価の推移。本図では、ELISA法に於ける250倍希釈での吸光度を用い、0 週での吸光度を各週での吸光度値から差し引くことでプロットを作成した。

【 図 9 】免疫後の採血 ( 3 週目、1 0 週目 ) における、免疫群 ( 実験区 1、図中の左側 )

50

および非免疫群（実験区 2、図中の右側）におけるペプチド抗原に対する IgG 抗体価の推移。本図では、ELISA 法に於ける 250 倍希釈での吸光度を用い、0 週での吸光度を各週での吸光度値から差し引くことでプロットを作成した。

【図 10】熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ（*P. falciparum* enolase、GenBank 登録番号 AB026051）（配列番号 3）とヒト由来  $\alpha$  エノラーゼ（Human  $\alpha$  enolase、GenBank 登録番号 M14328）（配列番号 4）のアミノ酸配列の比較。AD22 は下線にて、AT28 は下線と破線にてそれぞれ標記した箇所である。

【図 11】ペプチド 1-ペプチド 8 と プラスミノーゲンの結合を検出する、Dot-Blot 測定における DAB 試薬による発色後の写真（図面代用写真）。図中の 1 から 8 までの番号はペプチド 1 からペプチド 8 までのペプチド溶液をスポットした箇所、P はプラスミノーゲン溶液をスポットした箇所（ポジティブコントロール）である。

【図 12】ペプチド 1-ペプチド 8 と プラスミノーゲンの結合を検出する、ELISA 測定における TMB 試薬による発色後のプレート写真（図面代用写真）。プレート内の各ウェルにペプチド 1-ペプチド 8 を固相化した後にプラスミノーゲンと反応させた。結合検出は HRP 修飾-抗プラスミノーゲン抗体と TMB 試薬の発色により行った。

【図 13】ペプチド 1-ペプチド 8 と プラスミノーゲンの結合を検出する、ELISA 測定における TMB 発色後の吸光度データ（450 nm）（プラスミノーゲン濃度、1  $\mu$ g/well）。

【図 14】これまでに報告されたエノラーゼ分子中のプラスミノーゲン結合に関与する部分配列構造。熱帯熱マラリア原虫の部分ペプチド（配列番号 18）、肺炎球菌エノラーゼ（*Streptococcus pneumoniae* enolase）の部分ペプチド（配列番号 19）、ヒト由来  $\alpha$  エノラーゼの部分ペプチド（配列番号 20）。

【発明を実施するための形態】

【0052】

以下、本発明をより詳細に説明する。

本発明は、マラリア原虫由来のタンパク質の部分配列をもとにした以下のペプチドに関する。

(i) A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02（配列番号 1）または (ii) A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04（配列番号 2）のアミノ酸配列を有するペプチド 2 つが、それぞれのカルボキシ末端と、下記 (iii) で表されるリンカーペプチドの Lys の 2 つのアミノ基とのアミド結合により 2 分岐状に並べられた構造を有するペプチド。

(iii) Lys-A05-Cys-A06

((i)、(ii)、(iii)において、A01 から A06 は 0 を含む任意の数のアミノ酸残基を示す。)

配列表に配列番号 1 として示すペプチドは、(i) の配列において、A01 及び A02 が 0 の場合である。

配列表に配列番号 2 として示すペプチドは、(ii) の配列において、A03 及び A04 が 0 の場合である。

【0053】

A01 および A03 は 0 ~ 10 個のアミノ酸残基であることが好ましく、その配列は抗原ペプチドの免疫応答性に影響を与えない限り特に制限されないが、ペプチド全体の溶解性を高めるために 3 ~ 10 個の連続した酸性アミノ酸残基（グルタミン酸もしくはアスパラギン酸）または塩基性アミノ酸残基（リジン、アルギニンもしくはヒスチジン）であることがより好ましい。

A02 および A04 は 0 ~ 10 個のアミノ酸残基であることが好ましく、1 ~ 5 個のアミノ酸残基であることがより好ましく、その配列は抗原ペプチドの免疫応答性に影響を与えない限り特に制限されないが、エノラーゼペプチドとリンカーの結合の自由度を確保できる配列であることが好ましく、例えば、Pro-Yaa または Lys-Yaa（Yaa は Gly や Pro など自由度の高いアミノ酸残基）が挙げられる。Pro-Yaa-Cys または Lys-Yaa-Cys であってもよい。

A05は0～10個のアミノ酸残基であることが好ましく、その配列は抗原ペプチドの免疫応答性に影響を与えない限り特に制限されないが、ペプチドの溶解性を高めるために3～10個の連続した酸性アミノ酸残基または塩基性アミノ酸残基であることがより好ましい。

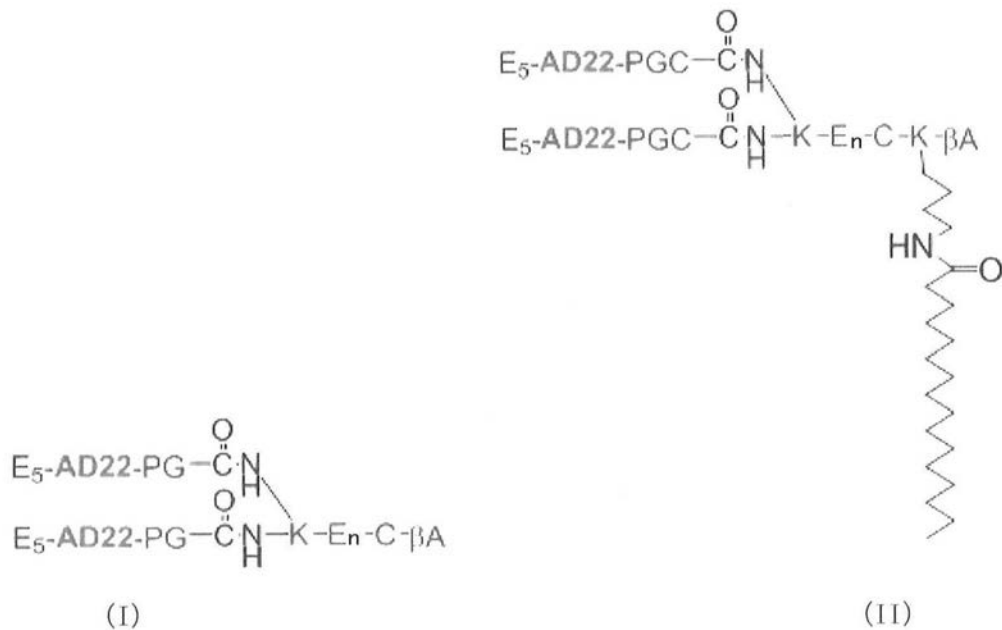
A06は0～10個のアミノ酸残基であることが好ましく、その配列は抗原ペプチドの免疫応答性に影響を与えない限り特に制限されないが、樹脂上で固相合成をする場合には、立体障害の低い第1アミノ酸としてβA(β-アラニン)をカルボキシ末端に含むアミノ酸残基であることが好ましい。A06はβAのみでもよい。しかし、ペプチド合成反応の進行に差し支えないならば他の残基に代替することが可能である。また、A06の一部のアミノ酸にパルミトイル基などの脂溶性を向上させるための修飾基が付加されていてもよい。例えば、A06をLys-βAとし、Lysの側鎖アミノ基に修飾基が付加されてもよい。脂溶性の修飾基が付加されることによる利点は、製剤時に用いる非イオン性界面活性剤(TweenやSpanなど)との相溶性の向上や自己集合による抗原性の向上などが期待されるためである。パルミトイル基の代わりになる他に適している修飾基としては、脂溶性の高いカルボン酸をアミド結合させることで修飾基として用いることができる。これには例えばステアリン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸、コール酸、などを例示することができる。

【0054】

本発明のペプチドの好ましい形態としては、以下の(I)または(II)のペプチドが例示される。

【0055】

【化5】



【0056】

$E_5$ はGlu残基が5つ連続した配列を、AD22は配列番号1のアミノ酸配列をそれぞれ表している。また、PGはPro-Gly配列を意味し、GはGly残基からカルボキシル基を除いた部分を示している。さらに、分岐部のKはLys残基の2つのアミノ基を除いた部分を示しており、当該2つのLys残基のアミノ基にはそれぞれ $E_5-AD22-PG-$ 配列又は $E_5-AD22-PGC-$ 配列が結合している。 $E_n$ はGlu残基が4つ又は5つ連続した配列を表しており、好ましくはGlu残基が4つ連続した配列である $E_4$ 、すなわちnが4である。CはCys残基である。C末端はβAla残基または側鎖アミノ基がパルミトイル化されたLys残基とβAla残基の配列を表している。N末端は無保護のアミノ基であり、C末端は無保護のカルボキシル基となっているが保護基を有してもよい。

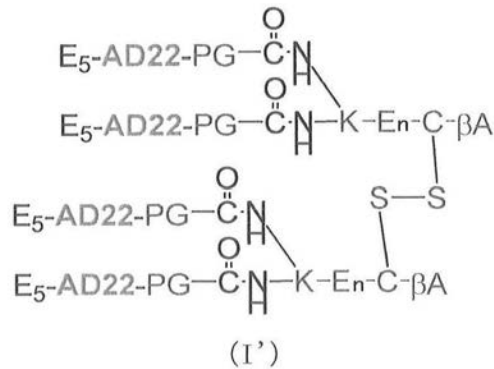
## 【 0 0 5 7 】

本発明のより好ましい形態は、上記ペプチドが、ペプチド内の (iii) で表されるリンカーペプチド配列のCys残基間のS-S結合によって2量化された構造を有するペプチドである。すなわち、(i) または (ii) のペプチドが (iii) のペプチドにより二量化され、さらに、Cys残基のS-S結合によって四量化されていることが好ましい。

具体例としては、以下の2種類のペプチド構造体が挙げられる。

## 【 0 0 5 8 】

## 【 化 6 】



10

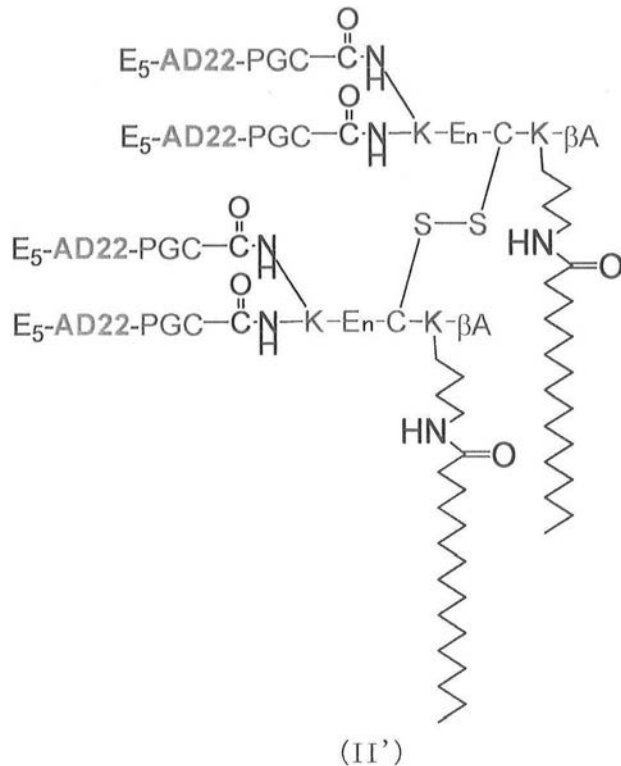
## 【 0 0 5 9 】

$E_5$  はGlu残基が5つ連続した配列を、AD22は配列番号1のアミノ酸配列をそれぞれ表している。また、PGはPro-Gly配列を意味し、GはGly残基からカルボキシル基を除いた部分を示している。さらに、分岐部のKはLys残基の2つのアミノ基を除いた部分を示しており、当該2つのLys残基のアミノ基にはそれぞれ $E_5$ -AD22-PG-配列が結合している。EnはGlu残基が4つ又は5つ連続した配列を表しており、好ましくはGlu残基が4つ連続した配列である $E_4$ 、すなわちnが4である。CはCys残基からメルカプト基を除いた部分であり、側鎖においてジスルフィド結合(-S-S-)を形成している様子を図示している。C末端の $\beta A$ は $\beta$ Ala残基を表している。N末端は無保護のアミノ基であり、C末端は無保護のカルボキシル基となっているが保護基を有してもよい。

20

## 【 0 0 6 0 】

## 【化 7】



10

20

## 【0061】

$E_5$ はGlu残基が5つ連続した配列を、AD22は配列番号1のアミノ酸配列をそれぞれ表している。また、PGCはPro-Gly-Cys配列を意味し、GはGly残基からカルボキシル基を除いた部分を示している。さらに、分岐部のKはLys残基の2つのアミノ基を除いた部分を示しており、当該2つのLys残基のアミノ基にはそれぞれ $E_5$ -AD22-PGC-配列が結合している。EnはGlu残基が4つ又は5つ連続した配列を表しており、好ましくはGlu残基が4つ連続した配列である $E_4$ 、すなわちnが4である。CはCys残基からメルカプト基を除いた部分であり、側鎖においてジスルフィド結合(-S-S-)を形成している様子を図示している。C末端側の-K-βAは側鎖アミノ基がパルミトイル化されたLys残基とβAla残基の配列を表している。N末端は無保護のアミノ基であり、C末端は無保護のカルボキシル基となっているが保護基を有してもよい。

30

## 【0062】

これらのペプチド構造体は通常のパепチド合成法に基づいて製造することができる。より具体的には後述の実施例に記載の方法で製造することができる。

## 【0063】

本発明によれば、上記ペプチドを含む微粒子及びその製造方法も提供される。微粒子の粒径は特に制限されず、用途に応じて適宜調整されるが、100nm～50μmが好ましい。

40

微粒子としては、特開2009-256324に開示されているような、生理活性物質と生分解性高分子を含む微粒子であって、生理活性物質を含む揮発性有機酸水溶液または生理活性物質の揮発性有機酸溶液を、生分解性高分子を含む揮発性有機溶媒と混合してエマルジョンを作製する工程、および得られたエマルジョンを負電荷を有するポリマーの水溶液と混合する工程によって作製された微粒子が例示される。ここで、微粒子作成に用いる生分解性高分子としては、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体やポリデブシペプチドが好ましく使用できる。揮発性有機酸としては常温で液体のカルボン酸基を有する有機化合物から選択することができる。酢酸やギ酸が例示され、その他にも、カルボン酸以外の官能基として水酸基を有する乳酸、カルボン酸基を複数有するフマル酸、マロン酸、リンゴ酸などが挙げられる。揮発性有機溶媒としては、生分解性高分子を溶解することのできる、揮発性で水

50

と混ざりにくい有機溶媒が用いられるが、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、ジエチルエーテルなどが好ましく用いられる。負電荷を有するポリマーとしては、酸素原子を含むポリマーが挙げられ、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコールが好ましく用いられる。上記製造方法により製造される微粒子の一例としては、最外層が負電荷を有するポリマーを含み、中間層が生分解性高分子を含み、内層が本発明のペプチドを含むW/O/W型エマルジョン又は該エマルジョンの乾燥微粒子；あるいは、外層が負電荷を有するポリマーを含み、内層が生分解性高分子及び本発明のペプチドを含むW/O型エマルジョン又は該エマルジョンの乾燥微粒子が挙げられる。

また、特開2012-240940に開示されているような、重合体の表面にペプチドを提示させる微粒子も挙げられる。

10

#### 【0064】

本発明の抗原ペプチドおよび抗原ペプチドを含む微粒子はアルミニウムイオンを含むアジュバントと共に用いられるものであってもよい。一般的に用いられる水酸化アルミニウムゲル（アラム）は微粒子と均一に懸濁することが可能であり、アジュバントの効果によって抗原ペプチドの抗原性がより促進される。これは例えば、Lindblad、Vaccine 2004年、22巻、3658-3668 ページおよび引用文献を参考にして、最適なアルミニウム塩の選択や微粒子の設計をすることができる。

#### 【0065】

その他に、本発明はアルミニウムイオン以外のアジュバントを使用してもよい。アジュバントは微粒子に抗原と共に含有させてもよく、または生理食塩水に含有させてもよい。アジュバントが含まれることにより、抗原ペプチドの抗原性がより促進される。これは例えば、Guy、Nature Reviews Microbiology 2007年、5巻、505-517 ページおよび引用文献を参考にして、最適なアジュバントの選択や微粒子の設計をすることができる。

20

#### 【0066】

また、本発明の抗原ペプチドおよび抗原ペプチドを含む微粒子は医薬的に許容可能な担体と組み合わせて医薬組成物としてもよい。担体は微粒子に抗原と共に含有させてもよく、または生理食塩水に含有させてもよい。ここで、医薬的に許容可能な担体としては、緩衝剤、凍結乾燥補助剤、安定化補助剤、可溶化補助剤、抗菌剤など製剤過程で許容される成分が挙げられる。緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、スルホサリチル酸塩、および酢酸塩などが挙げられる。凍結乾燥補助剤としては、マンニトール、ラクトース、ソルビトール、デキストラン、フィコール（Ficoll）、およびポリビニルピロリジン（PVP）などが挙げられる。安定化補助剤としては、アスコルビン酸、システイン、モノチオグリセロール、亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、ゲンチシン酸、イノシトールなどが挙げられる。可溶化補助剤としては、エタノール、グリセリン、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート、ソルビタンモノオレアート、ポリソルベート類、ポリ（オキシエチレン）ポリ（オキシプロピレン）ポリ（オキシエチレン）ブロックコポリマー（Pluronic）およびレシチンなどが挙げられる。抗菌剤としては、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、クロルブタノール、メチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンなどが挙げられる。

30

#### 【0067】

医薬組成物の剤型は特に制限されず、注射剤、経口剤、塗布剤などが挙げられるが、注射剤が好ましい。注射剤は、微粒子を希釈剤などに溶解し、必要に応じて安定剤、保存剤、緩衝剤等を添加することによって製造することができる。

40

#### 【0068】

投与対象はマラリアに感染した哺乳類、または感染の危険性もしくは感染の疑いがある哺乳類があげられ、具体的には、ヒト、サル、マウス、ラットなどがあげられ、好ましくはヒトである。

マラリア症としては、熱帯熱マラリア原虫の単独感染に起因するマラリアやヒトまたはサルマラリア原虫の感染に起因するマラリア、さらには、それらの混合感染に起因するマラリアが例示される。

50

## 【 0 0 6 9 】

本発明の医薬組成物のヒトへの投与量は、対象者の年齢、性別、体重、免疫状態、投与方法、あるいは該医薬組成物に含有される生理活性の割合などにより異なるが、1回の投与において1  $\mu$ g ~ 200 mgが好ましい。

投与回数は特に制限されず、一定期間をの複数の投与はブースト効果による抗体価の上昇と維持が期待できる。一定期間とは2週間から6ヶ月が好ましく、3週間から3ヶ月がより好ましい。複数回とは2回から20回が好ましく、2回から4回がより好ましい。

## 【 0 0 7 0 】

投与方法は特に制限されないが、例えば抗原ペプチド、抗原ペプチド含有微粒子または微粒子状の医薬組成物を生理食塩水に懸濁させて、上腕部への筋肉内への注射または皮下注射または皮内注射によって投与する投与方法が例示される。この投与方法によって微粒子が投与部位の筋肉組織や皮内や皮下へ浸透し、免疫系の細胞によって抗原ペプチドまたはその製剤が取り込まれて、最終的に液性免疫や細胞性免疫が引き起こされることが予想される。この方法は旧来からの方法であるが、確実なために今後も広く用いられると考えられる。

10

## 【 0 0 7 1 】

この他の投与方法として、生理食塩水による懸濁物は鼻腔へ投与する方法も例示される。鼻腔への投与法はスプレーやスポイトによる方法が例示されるがこの限りではない。鼻腔への投与法によると、抗原ペプチドが鼻腔粘膜に浸透し、免疫系の細胞によって取り込まれて、最終的に免疫応答が引き起こされることが考えられる。これは皮下注射による方法と比較して安全性の面で優れていると考えられる。また、皮下投与と異なる点は、一般的に粘膜における分泌型抗体のIgAの産生を多く促すと予想される。そのためにマラリアのような赤血球内で増殖する原虫感染症には、皮下投与法を補完する投与方法として適切であると考えられる。

20

## 【 0 0 7 2 】

さらにこの他の投与方法として、上腕部の皮膚局所に貼って使用するパッチ剤やパップ剤と呼ばれる剤形を用いた皮下や皮内への投与方法も例示される。これらの投与方法によって抗原ペプチドが投与部位の皮内や皮下へ浸透し、免疫系の細胞によって取り込まれて、最終的に液性免疫や細胞性免疫が引き起こされることが予想される。これは皮下注射による方法と比較して安全性の面で優れていると考えられる。一方、皮下注射の場合と比較して製剤中の全ての抗原ペプチドが皮内や皮下へ浸透するかどうか実用上の課題として残っている。

30

## 【 0 0 7 3 】

本発明の生理活性ペプチドまたはそれを含む医薬組成物は、免疫学的応答を誘導するための抗原、すなわち、ワクチンとして使用できる。これにより、マラリア症の感染や発症を予防したり、マラリア患者の免疫を高めて症状の進行を抑えたり、症状を改善させたりすることができる。

## 【 0 0 7 4 】

なお、本発明において「免疫学的応答」とは細胞性免疫学的応答と体液性免疫学的応答の両方を含む概念である。このうち、細胞性免疫学的応答とは、例えばマクロファージ、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、好酸球、T細胞などにより引き起こされる免疫のことをいい、熱帯熱マラリア原虫に対する細胞性免疫学的応答としては、キラーT細胞が関与するものが知られている。また、体液性免疫学的応答としては、熱帯熱マラリア原虫由来のタンパク質、糖鎖などに対して特異的に結合することができる宿主由来の抗体により引き起こされるものが知られている。本発明により製造される抗原ペプチドからは体液性免疫学的応答として抗体を誘導させることが望ましい。また、本発明の抗原ペプチドから引き起こされる免疫学的応答としては、マラリアに起因するエノラーゼとプラスミノーゲンとの相互作用を阻止または阻害する免疫学的応答であることが好ましい。

40

## 【 0 0 7 5 】

50

本発明の生理活性ペプチドは、固相表面に結合させ、固定化し、若しくは吸着させることにより、マラリアの診断や検査のための検査診断材として提供することができる。すなわち、本発明の一形態として、本発明のペプチドが、固相表面に結合されている、マラリアの診断や検査用物質を提供することができる。ここで固相表面としては、例えばフィルム、ラテックス粒子、プラスチックプレートまたはマイクロビーズなどの固相表面が挙げられるが、これらには限定されない。例えば、フィルム状にした本発明のペプチド化合物は、スピンキャスト法で調製することができ、このフィルム上に試験試料をプロットすることにより試験試料中の抗体の存在を検出することができる。ラテックス粒子に結合した本発明の化合物は、乳化重合法、懸濁重合法に従って調製することができ、凝集反応に使用することができる。プラスチックプレート上またはマイクロビーズ上への固定化は、例えば、50  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$ の本発明の化合物をプラスチックプレートのウェル中に適量を滴下することにより、または200  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$ の本発明の溶液中にマイクロビーズを浸すことにより行うことができる。このような検査診断材は、血清または血漿中のマラリア抗体価検査への適用や、本発明の抗原ペプチドの免疫学的応答の解析への適用や、本発明の抗原ペプチドを免疫投与した個体の抗体価測定への適用などが期待される。

10

#### 【0076】

以下、上記の生理活性ペプチド含有微粒子または微粒子状の医薬組成物を生理食塩水に懸濁させて用いる製剤および製剤キットの概要について、特にヒトに適用する場合に想定される一例を示すが、本発明をもとにして考えられる製剤の概要及び組成・性状はこの例示の限りではない。

20

例えば特開2009-256324に開示された方法に従うと、微粒子作成時の抗原含有量（抗原重量／微粒子重量）としておよそ0.1  $\mu\text{g}/\text{mg}$ から100  $\mu\text{g}/\text{mg}$ の間で作成が可能である。実際には、抗体価の持続性や微粒子から抗原が一定に放出される（0次放出）理想的な微粒子を考えると、1  $\mu\text{g}/\text{mg}$ から50  $\mu\text{g}/\text{mg}$ の間が好ましく、さらには1  $\mu\text{g}/\text{mg}$ から30  $\mu\text{g}/\text{mg}$ の間がより好ましい。

#### 【0077】

一般に1キットあたりの構成（2.0mgの微粒子、0.5 mLの生理食塩水）は、通常は成人1回あたりの投与量に相当する。通常抗原投与量の上限は、げっ歯類や非げっ歯類を用いた安全性試験によって決定されるが、本剤は安全性の比較的高いペプチド抗原を使用しているために、一回の投与に於ける抗原量は1  $\mu\text{g}$ から200  $\mu\text{g}$ の間で広く投与が可能と予想される。実際には抗体価の持続性や製造時のコストを考えると2  $\mu\text{g}$ から100  $\mu\text{g}$ が好ましく、さらには4  $\mu\text{g}$ から60  $\mu\text{g}$ がより好ましい。

30

また、このキットの構成には例えば、微粒子や生理食塩水を2本の別々のバイアル瓶またはアンプル瓶に密封した製剤キットとして構成されてもよく、投与時の安全性や保存料（チメロサルなど）を使用しないことを目的としてプレフィルドシリンジとして一体型に構成されてもよいが、これらの限りではない。

#### 【0078】

##### [製剤および製剤キットの概要例]

##### (a) 製剤の概要

本剤は、マラリア流行地と日本国内での疫学調査から快復期に關与する抗原として報告された、熱帯熱マラリア原虫由来の解糖系酵素エノラーゼの22残基部分配列を抗原として用いたものである。また一般に流行地住民はマラリアの持続感染によって免疫を維持していることから、これを模倣すべくPLGA（ポリ乳酸-グリコール酸共重合体）微粒子中からの抗原を徐放するインテリジェント材料が用いられている。抗原はPLGA（ポリ乳酸-グリコール酸共重合体）ミクロスフェア中に封じ込められている。

40

#### 【0079】

抗原は22残基のペプチド（AD22）を4本並べたタンデム構造を有する化学合成ペプチド抗原であり、上記（1'）の構造を有する。本剤は使用時に、微粒子を生理食塩水に懸濁して用いる液剤である。抗原は製造時に、高速液体クロマトグラフ、アミノ酸分析計によって分析がなされており、抗原の構造式（1'）であることが確認されている。

50

## 【 0 0 8 0 】

## (b) 組成

本剤は、1キットに(5.0mgの微粒子、0.5 mLの生理食塩水)中に次の成分を含有する。

有効成分： AD22合成ペプチド抗原(1') 50 µg。

添加物： 微粒子はほとんどがポリ乳酸-グリコール酸共重合体(およそ5.0 mg)であり、表面に被覆された微量のポリビニルアルコールを含有する。その他に微粒子を懸濁させるために生理食塩水0.50 mL中に塩化ナトリウム 4.25 mgを含有する。

## 【 0 0 8 1 】

## (c) 微粒子の性状

外観・性状： 無色の微粉末、無臭。

溶解性： 生理食塩水や精製水に容易に分散する。(通常は1~10mg/0.1mLにて使用。)

吸湿性： 外部をポリビニルアルコールで被覆しているため潮解性はない。

融点など： 高分子材料のため、およそ60 以上で軟化する。

その他の示性値： 電子顕微鏡観察によって0.1 ~ 40 µmの球状微粒子として観察された。

有効成分の定量法： 微粒子中の抗原含有量(抗原重量/微粒子重量)は溶媒抽出法(塩化メチレン-水系溶媒)または元素分析によるC H N組成比から定量される。(本剤の含有量は $10 \pm 1 \mu\text{g}/\text{mg}$ 。)

## 【 0 0 8 2 】

## (d) 使用時の性状

本剤は、使用時に微粒子5 mgを生理食塩水0.5 mLに懸濁して用いる液剤である。懸濁して振り混ぜるとき、均等に白濁する液剤である。

pH： 5.5~8.0

浸透圧比(生理食塩液に対する比)： 約 1

## 【 0 0 8 3 】

次にヒトに投与する場合の一例を以下に示すが、投与量や投与間隔や投与回数はこの例示の限りではない。

[ 効能又は効果 ]

## (e) 効能又は効果/用法及び用量

マラリア感染における重症化の予防： 通常、0.5 mLずつを4週間隔で2回、更に、20~24週を経過した後に1回0.5 mLを皮下又は筋肉内に注射する。ただし、10歳未満の者には、0.25 mLずつを同様の投与間隔で皮下に注射する。

ただし、能動的AD22抗体が獲得されていない場合には追加注射する。

\*\*本剤の3回目接種1~2箇月後を目途に抗体検査を行い、AD22抗体が獲得されていない被接種者には追加接種を考慮すること。

## 【 0 0 8 4 】

## (f) 有効性

マラリア感染における重症化の予防： AD22抗原、熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼ抗体が陰性の成人、小児を対象に本剤0.5 mL(10歳未満0.25 mL)の3回接種を行うとほとんどの被験者がAD22抗体陽性となることが予想される。さらにマラリア流行地にてマラリア感染を受けた場合に重症化の遅延が期待され、治療開始の遅れによる死亡が阻止できるものと期待される。

## 【 0 0 8 5 】

## (g) 安全性

一般的な事例から考えて、接種を受けた被験者のおよそ10%位に副反応が予想される。主な副反応は局所における疼痛、腫脹、熱感、倦怠感、頭痛・頭重感、発熱、などが考えられる。構成成分の違いから本剤は、既存のワクチンに多用されているアラムアジュバントに多く見られる硬結は起こりにくいと考えられる。

## 【 0 0 8 6 】

## (h) 薬効薬理

原虫を媒介する蚊の刺咬により体内に入ったマラリア原虫は血中から速やかに肝細胞に侵入し、肝細胞内で潜伏期間を経た後に肝細胞内で分裂・増殖してメロゾイトという原虫の一形態として血中に放出され、赤血球内に侵入する。赤血球内では分裂・増殖して再びメロゾイトとして血中に放出された後に、赤血球中へ再侵入することで分裂増殖を繰り返す。マラリアによる発熱の症状は赤血球内サイクルによって引き起こされる。熱帯熱マラリアは他の3種に比較して治療が遅れると重症化と死亡の危険をもたらす。特に免疫のない流行地の乳幼児や非流行地からの旅行者などは重症化しやすいことが知られている。

## 【0087】

しかし、メロゾイトが赤血球内に侵入すると同時に抗体も取り込まれる。取り込まれた抗体は原虫の増殖時のエネルギー産生する解糖系のエノラーゼの酵素反応をブロックすることで、原虫の増殖を抑制または阻害する。またしかし、エノラーゼはメロゾイトの表面に局在していることも分かっているので、抗体がそのエピトープに反応して、原虫の赤血球への侵入を抑制または阻害することも考えられる。これらの作用機序によりマラリア感染を受けた場合に重症化の遅延が可能となり、治療開始の遅れによる死亡が阻止できる。

10

## 【実施例】

## 【0088】

以下に、実施例を示して、本発明について更に詳細に説明を加えるが、本発明はその要旨を超えない限り、これらの実施例に限定されるものではない。

20

## 【0089】

マラリア原虫感染におけるエノラーゼとプラスミノゲンの役割：

近年、マラリア原虫はヒト血液中のプラスミノゲンと原虫表面のエノラーゼを介して結合することで宿主への進入していることが報告され始めてきた[Ghosh AK, Coppens I, Gardsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, vol.108, pp. 17153-17158.; Bergmann S, Wild D, Diekmann O, Frank R, Bracht D, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of Streptococcus pneumoniae. Mol Microbiol. 49(2): 411-423, 2003.; Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of Plasmodium and other pathogens. Mem Inst Oswaldo Cruz. 106(Suppl 1): 85-90, 2011.]。すなわち原虫表面でのプラスミン活性つまりタンパク質分解活性が宿主細胞への侵入を促進していると推定されている。詳細に報告されているのは蚊の中腸へ原虫オーキネートが侵入する場合のみであり、その他に予想される肝臓細胞や赤血球への侵入時には直接確認されていない。

30

## 【0090】

前述のように本発明者らはマラリア原虫由来のエノラーゼ分子が、熱帯熱マラリアに対して一定の免疫力を持っている患者血清と強く反応することを疫学調査で見いだしたことからワクチン抗原候補として研究を行ってきた。当初は細胞内のエネルギー産生系において働く酵素をIgG抗体で止めることを予想していたために、IgGが細胞内に入る説明ができず大きな矛盾となっていた。すなわち疫学的に観察されてきたマラリア流行地住民の高い抗エノラーゼ抗体価がどのように、マラリア原虫の寄生率を抑制できるのか説明ができなかった。

40

## 【0091】

初期の研究においてすでにメロゾイト表面にエノラーゼを発現していることもわかっていたが[Kano S, Nakamura N, Murakami T, Ishikawa H, Suzuki M. Localization of 47kD antigenic polypeptides in malaria parasites by confocal laser scanning microscopy. Bioimages. 3(1): 13-17, 1995.]、当時は何故解糖系の酵素が原虫表面に観察されるのか説明ができなかった。本発明者らの長年の研究によってようやく、疫学的に観察されてきたマラリア流行地住民の高い抗エノラーゼ抗体はメロゾイト原虫表面のエノラーゼ

50

とヒトプラスミノーゲンの結合（さらにはオーキネートやメロゾイトの宿主細胞への侵入）を阻害しているのではないかと考えられるようになってきた。

【0092】

マラリア原虫エノラーゼにおけるプラスミノーゲン結合部位：

プラスミノーゲンは通常、血漿中に含まれており、レセプタータンパク質と結合することで活性化される。プラスミノーゲンは791残基からなるタンパク質であり、一つのプラスミノーゲンは5つのクリングルドメインとセリンプロテアーゼ領域から構成されている。クリングルドメインは約80個のアミノ酸から構成され、3組の S-S 架橋による特徴的な2次構造をもつ。このクリングルドメインにレセプタータンパク質が結合することにより、プラスミノーゲンアクチベーター部位の加水分解が起きることで、プラスミン活性が発現し、オーキネート蚊の中腸への侵入を果たしていることが報告された。[Ghosh AK, Coppens I, Gardsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, vol.108, pp. 17153-17158.; Bergmann S, Wild D, Diekmann O, Frank R, Bracht D, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of Streptococcus pneumoniae. Mol Microbiol. 2003, 49, 411-423.; Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of Plasmodium and other pathogens. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011, 106(Suppl 1), 85-90.]

10

【0093】

エノラーゼにおけるプラスミノーゲン結合部位は、他の病原微生物におけるエノラーゼの報告などの配列を比較することにより、マラリア原虫のアミノ酸配列に換算しておおよそ260番目から285番目の範囲が考えられている。これは大変意外なことに、本発明者らによって患者血清との反応性が調べられてきたペプチド抗原のAD22配列（Ala256-Asp277）およびAT28配列（Ala256-Thr283）と良く合致している[Nonaka R, Oku H., Sato K, Kano S., Suzuki M, Katakai R. Synthesis of Small Domain Peptides of Glycolytic Enzyme Enolase. Peptide Science 2000, T. Shioiri, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka; pp. 301-304 (2001).]。

20

【0094】

このように従来技術では、疫学的に観察されてきたマラリア流行地住民の高い抗エノラーゼ抗体価がどのように、マラリア原虫の寄生率を抑制できるのかメカニズムの説明ができなかった。しかしようやく、最近の報告例と本発明者らの研究を合わせて考えると、メロゾイト原虫表面のエノラーゼとヒトプラスミノーゲンの結合（さらにはオーキネートやメロゾイトの宿主細胞への侵入）を抗エノラーゼ抗体が阻害するのではないかと、考えることができるようになった。そこで本発明者らの研究してきた抗原配列についてプラスミノーゲン結合部位の有無を確認することにした。

30

【0095】

< 参考例 1 >

原虫エノラーゼのアミノ酸配列のうち254番目から288番目の35残基配列（図2）を分割したペプチドライブラリー ペプチド1～8（配列番号10～17）を用いて、Dot-Blot法とELISA法によりプラスミノーゲンと反応させることでプラスミノーゲンが認識するアミノ酸配列の探索を行った。

40

【0096】

Dot-Blot法によるペプチドライブラリーとプラスミノーゲンの反応性：

8種類のペプチド1-ペプチド8の10%アセトニトリル溶液を、(a)ニトロセルロース膜（ポアサイズ0.45 μm）に固定化、(b)次にプラスミノーゲン溶液中で反応、(c)HRP標識された抗プラスミノーゲン抗体との反応、(d)DAB発色、の順にDot-Blot測定を行った。DAB発色後のニトロセルロース膜の写真を図11、12に示した。この測定結果より、ペプチド2, 3, 7, 8に対してペプチド鎖とプラスミノーゲンの結合が観察された。

【0097】

50

ELISA法によるペプチドライブラリーとプラスミノーゲンの反応性：

次にペプチドライブラリーとプラスミノーゲンの反応の様子を、数値化・定量化することを目的として、次にELISA法による結合検出を行うこととした。その結果を図13に示した。この結果より、10残基ペプチド配列ではペプチド3,5に対して比較的強い反応が見られた。また、25残基ペプチド配列であるペプチド7、35残基ペプチド配列であるペプチド8に対しても強い反応が見られた。10残基ライブラリーの中でペプチド3は最もプラスミノーゲンとの強い反応を示すことがわかった。

【0098】

Dot-Blot法およびELISA法データの考察：

ELISA測定より、10残基ライブラリーのうちペプチド3に対して最も強い反応があることがわかった。これまでの研究で報告されているプラスミノーゲン結合を阻害するまたは結合する配列と比較をしてみると、ペプチド3配列の後半部分、YDLDFKT配列は他の種と相同性が比較的高く、共通のプラスミノーゲン結合部位と考えられる。一方、ペプチド3の始め部分、NKT配列は他の種では欠失しており、マラリア原虫に固有のプラスミノーゲン結合部位と考えられる(図14)。

10

【0099】

一般的には(ペプチド3にある)NKT配列は、生物種によってはN型糖鎖の結合配列であり、原虫酵素における糖鎖修飾の有無について確認が必要ではとの疑問が生じる。しかしマラリア原虫ではSDS-PAGE(446残基、47kD)とwestern-blottingの解析からエノラーゼへの糖鎖修飾は観察されない。実際にマラリア原虫のN型糖鎖とO型糖鎖はほとんど無いが非常に低いレベルであると報告されている[Dieckmann-Schuppert A, Bender S, Odenthal-Schnittler M, Bause E, Schwarz RT. Apparent lack of N-glycosylation in the asexual intraerythrocytic stage of Plasmodium falciparum. Eur J Biochem.1992, 205, 815-825.; Gowda DC, Davidson EA. Reply. Parasitol Today. 2000, 16, 39-40.].そのためマラリア原虫のタンパク質に観察される糖鎖修飾はGPIアンカーである[Gowda DC, Davidson EA. Protein glycosylation in the malaria parasite. Parasitol Today. 1999, 15, 147-152.; von Itzstein M, Plebanski M, Cooke BM, Coppel RL. Hot, sweet and sticky: the glycobiology of Plasmodium falciparum. Trends Parasitol. 2008, 24, 210-218.].メロゾイトやオーキネート表面のエノラーゼもタンパク質C末端近傍に位置する432番目のAsn残基を介したGPIアンカーによって提示されることが考えられる。

20

30

【0100】

このように本発明者らの研究によって、疫学的に観察されてきたマラリア流行地住民の高い抗エノラーゼ抗体の役割が、例えばメロゾイト原虫表面のエノラーゼとヒトプラスミノーゲンの結合(さらにはオーキネートやメロゾイトの宿主細胞への侵入)を阻害していることにあるのではないかと考えられるようになった。

【0101】

以下本発明の実施態様である、抗原ペプチド(I')と抗原ペプチド(II')の製造法についてについて詳細を実施例1に、抗原ペプチド(I')と抗原ペプチド(II')の分析データを実施例2と実施例3に、抗原含有微粒子の作成法について詳細を実施例3に、抗原含有微粒子の免疫投与について実施例4に示した。しかし以下の具体例は本発明を限定するものではなく、例えば高分子については他の既知の生分解性高分子への置換や溶液量や濃度の調整など、また例えば抗原を含有した微粒子については他の抗原や微粒子への置換や投与量や溶液量や濃度の調整など、適宜変更できることは勿論である。

40

【0102】

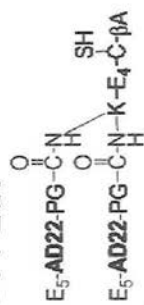
(実施例1)抗原ペプチド(I')および抗原ペプチド(II')の合成法合成スキームの例示を下記に示した。(E<sub>5</sub>-AD22-PG:配列番号6; E<sub>5</sub>-AD22-PGC:配列番号7; K-E<sub>4</sub>-C:配列番号8; K-E<sub>4</sub>-CK:配列番号9)

【0103】

【化 8】

新規抗原ペプチド (I') (AD22map2-SS) 製造スキームの例

精査した反応条件による  
固相ペプチド合成



SHアリ-

C324 H462 N78 O134 S1

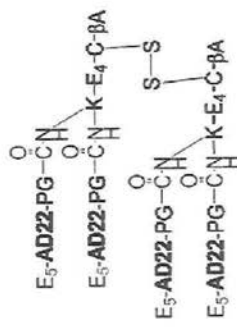
Mw = 7625.68

Actm/保護

C326 H467 N79 O135 S1

Mw = 7684.75

目的物



C648 H922 N156 O268 S2

Mw = 15249.36

10

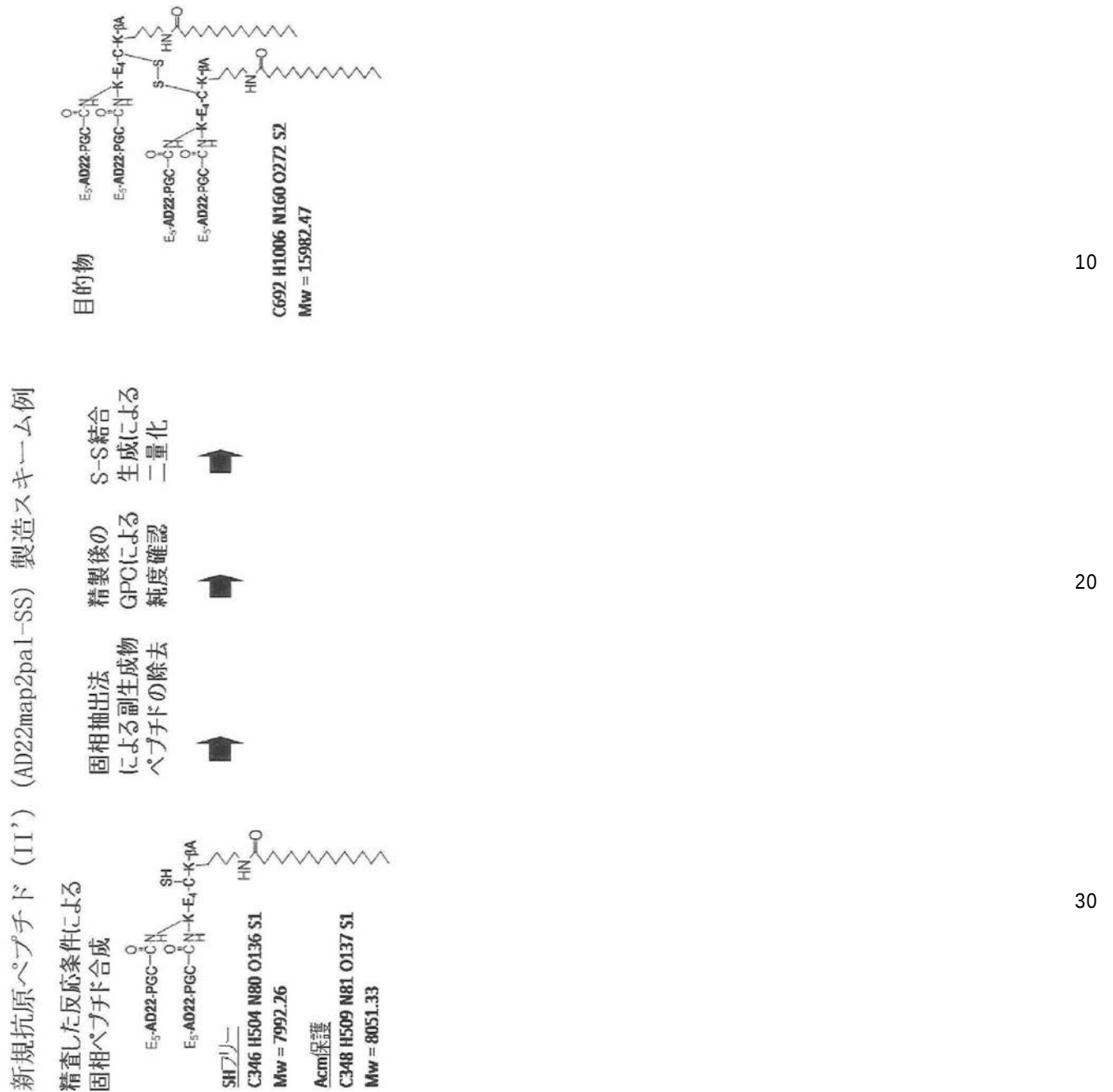
20

30

40

【 0 1 0 4 】

## 【化 9】



## 【0105】

はじめに、それぞれの抗原ペプチド (I') と抗原ペプチド (II') の単量体 (それぞれAD22map2とAD22map2pal) について、通常のFmocペプチド合成法に従って行った。Fmocペプチド合成法には、常法に従って第1アミノ酸が予め導入された樹脂Fmoc-βAla-PEGresin (ここでの樹脂へのFmocアミノ酸導入量を1 eqとする) を用いた。Fmoc基の脱保護には2%DBU/DMF (または30%piperidine/DMF)、縮合にはFmocアミノ酸 (10 eq)、HCTU, HOBt (10 eq)、DIEA (20 eq) を使い、縮合時間30 minでペプチド鎖の伸長を行った。

## 【0106】

全アミノ酸伸長後、ペプチド担持樹脂にクリーンベジカクテルとしてTFA:水:TIS:ethanedithiol = 95:2.5:2.5:2.5を加え、樹脂からの切り出しを行った。濾液を回収して、減圧濃縮し、Diethyl etherで粉末化させ、粗生成物を得た。

## 【0107】

この粗生成物をHPLC、ESI-MSによる同定を行い、Sep-Pak Vac 20 cc (5 g) (Waters製

40

50

）による固相抽出法で精製した。すなわち、試料を10%MeCNaq (0.1 % TFA) 溶液とした後にSep-Pakカラムへロードした後、溶出溶媒としてMeCN水溶液 (0.1 % TFA) を20%から30%にかけて溶出溶媒を各50mLずつ用いて固相抽出を行った。

【0108】

目的物の分画をHPLCにより確認した後に凍結乾燥により目的物を得た。続いて目的物の溶液をヨウ素酸化によるジスルフィド結合の生成と再度の精製を行い、最終的に抗原ペプチドを得ることができた。

【0109】

(実施例2) 抗原ペプチド (I') (AD22map2-SS) の分析データ

外観: 白色凍結乾燥体

10

アミノ酸分析値: (加水分解条件: 6M HCl aq. (with Phenol) 110 , 22hrs)

Asp(28)28.00, Thr (8) 7.78, Ser (8) 7.21, Glu(36) 35.62, Gly (4) 4.02, Ala (4) 4.00, Cys (2) 1.36, Leu (4) 4.03, Tyr (8) 8.00, Lys(10)10.07, NH<sub>3</sub>(16) 18.08, Pro (8) 8.18, Phe (8) + β-Ala (2) 10.01.

【0110】

純度(HPLC): 96.3 % (図3)

分析条件: Column, Zorbax 300SB-C18 (4.6x150mm); Eluant, 10-60% MeCN/0.1%TFA (25min); Temp. 50 ; Flow rate: 1.0 ml/min; Detector, 220 nm; Load, 4 μL (0.28mg/0.560mL 50%AcOH).

【0111】

20

ESI-MS: MW = 15249.3 (理論値 15249.3) (図4)

測定条件装置: Agilent Technologies社製 HP 1100 series LC/MSD

サンプル濃度: 1 nmol / 5 micro-L

希釈溶媒 : 50% MeCN/H<sub>2</sub>O: 1N NH<sub>3</sub> aq. = 95 : 5

【0112】

(実施例3) 抗原ペプチド (II') (AD22map2pal-SS) の分析データ

外観: 白色凍結乾燥体

アミノ酸分析値: (加水分解条件: 6M HCl aq. (with Phenol) 110 , 22hrs)

Asp(28) 27.96, Thr (8) 7.75, Ser (8) 7.21, Glu(36)35.70, Gly (4) 4.01, Ala (4) 4.00, Cys (2) 1.90, Leu (4) 4.04, Tyr (8) 7.81, Lys(12)11.99, NH<sub>3</sub>(16) 17.21, Pro (8) 8.20, Phe (8) + β-Ala (2) 9.98

30

【0113】

純度(HPLC): 96.4 % (図5)

分析条件: Column, Zorbax 300SB-C18 (4.6x150mm); Eluant, 30-80% MeCN/0.1%TFA (25min); Temp. 50 ; Flow rate, 1.0 ml/min; Detector: 220 nm; Load, 8 μL (0.32mg/0.320mL 50%AcOH).

【0114】

ESI-MS: MW = 15982.2 (理論値 15982.5) (図6)

測定条件装置: Agilent Technologies社製 HP 1100 series LC/MSD

サンプル濃度: 1 nmol / 5 micro-L

希釈溶媒 : 50% MeCN/H<sub>2</sub>O: 1N NH<sub>3</sub> aq. = 95 : 5

【0115】

(実施例4) 抗原含有微粒子の作成

この実験において、抗原には抗原ペプチド (I') (AD22map2-SS) を用い、抗原を含有した微粒子は特開2009-256324に開示された方法、すなわち、抗原物質を含む溶液または抗原物質を含む懸濁液を生分解性高分子を含む揮発性有機溶媒と混合し、さらにこの混合液を負電荷を有するポリマーの水溶液と混合する工程によって製造した(図7)。このうち生分解性高分子には平均分子量2万のポリ(乳酸-グリコール酸)共重合体(乳酸-グリコール酸組成比75:25、和光純薬製PLGA7520)を、負電荷を有するポリマーの水溶液には0.5%ポリビニルアルコール水溶液を用いた。微粒子の単位重量あたりの抗原量は元

50

素分析法によるC H N重量比から算出し24 micro-g/mgと決定した。

【0116】

(実施例5) 抗原含有微粒子の免疫投与

ここではBalb/cマウスに対して抗原含有微粒子を免疫投与した場合の効果を詳細に記載する。すなわちマウス10匹(Balb/cマウス、メス)を用いた1回の免疫投与を行い、投与後3週目6週目9週目に各マウスから採血した血清について抗体価の測定を行った。

【0117】

免疫実験は下記の2実験区(Balb/cマウス、メス、各5匹)に分けて行った。免疫投与は抗原投与群のマウス5匹に対して実施例4で作成した抗原含有微粒子を各マウスあたり抗原量に換算して10 µgずつ皮下投与を行った。

10

【0118】

[実験区1] 1匹あたり10 µgの抗原を含む微粒子(0.41 mg)を200 µLの生理食塩水に懸濁させたものを投与(免疫群)。

[実験区2] 1匹あたり生理食塩水溶液200 µLのみを投与(非免疫群)。

【0119】

図8と図9には免疫後の採血(3週目、6週目、9週目、10週目)における、免疫群および非免疫群における抗原ペプチド(1') (AD22map2-SS)に対するIgG抗体価の推移を図示した。ELISA法に於ける250倍希釈での吸光度をプロットした。吸光度のプロットは抗体重量の対数プロットとおおよそ比例することが知られている。

【0120】

20

図8と図9に示した結果より、本実施例では1回免疫の投与法にもかかわらず、驚くことに免疫群は非免疫群と比較して統計的に有意なIgG抗体の上昇が観察された。従って、本方法では微粒子抗原による抗体価の持続的な上昇と原虫感染に起因する免疫効果と合わせて、ペプチド抗原に対するIgG抗体価の上昇が観察された。吸光度のプロットは抗体重量の対数プロットとおおよそ比例することが知られている。

【0121】

さらに追加の実験例として、実施例5で得られるマウスの抗血清は、例えば熱帯熱マラリア原虫の培養系に10倍、20倍、200倍希釈で添加してゆくことでin vitroにおける原虫増殖抑制効果を調べることができる。このとき血清の希釈率を上げることで増殖率抑制効果が下がると予想される。これは実際に一般的に用いられている方法であり、本実施例に於いても容易に実施が可能である。

30

【0122】

またさらに追加の実験例として、実施例5で得られるマウスは、例えばマウスマラリア原虫の致死株マラリア原虫(Plasmodium berghei ANKA、 $1 \times 10^6$ の原虫数)を腹腔投与することで感染実験を行い、in vivoにおける原虫増殖抑制効果やマウスにおけるマラリア感染に起因する重症化や死亡を遅延または阻止する効果を調べることができる。このとき抗体価を上げることで増殖率が抑えられると予想される。これは実際に一般的に用いられている方法であり、本実施例に於いても容易に実施が可能である。

【0123】

これらの実施例から本発明の抗原ペプチドを用いることで、ヒトにおけるマラリア感染に起因する重症化や死亡を遅延または阻止する方法を、抗原ペプチドの製造から抗原微粒子の製造さらにはマウスでの免疫反応を利用した動物実験によって見いだすことができた。さらにこれらの実施例や本発明者らの研究成果をもとにすることで、従来不可能であった、ヒトでのマラリア原虫に対する免疫学的応答を誘発することを可能にする、ヒトの免疫反応への生理活性ペプチドの適用方法を考えることも可能となった。

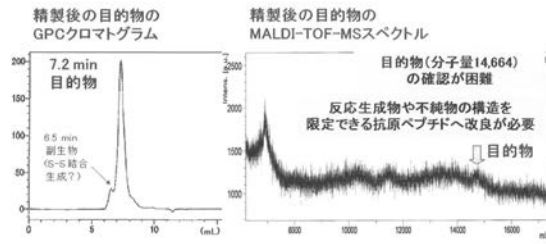
40

【産業上の利用可能性】

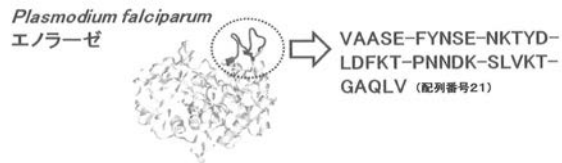
【0124】

本発明は、医薬、試薬等に適用できる。

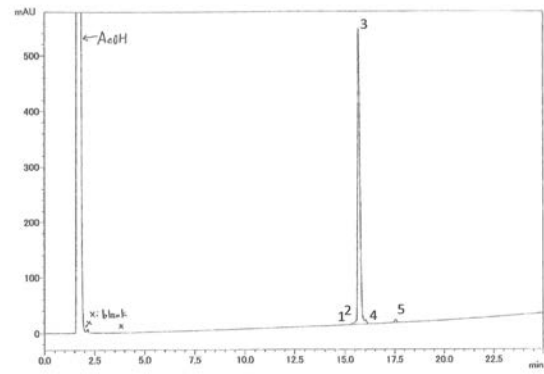
【図 1】



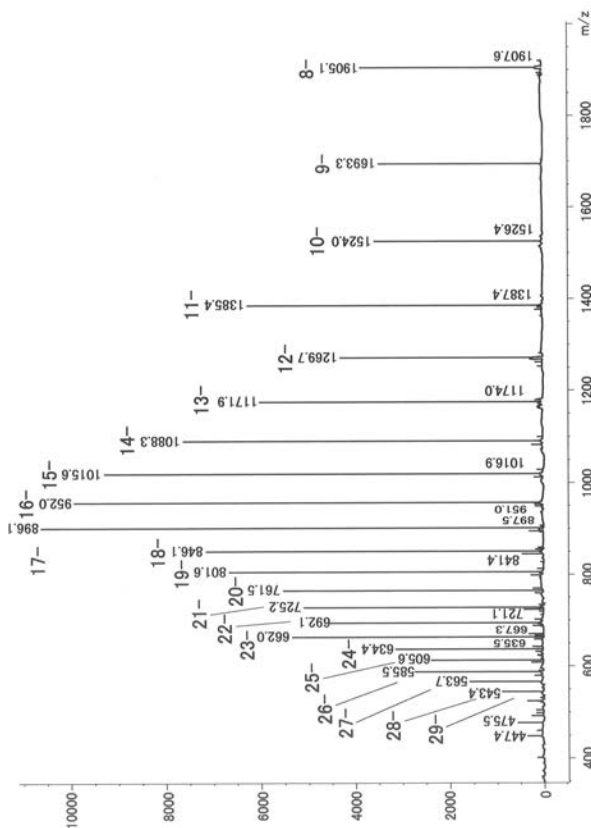
【図 2】



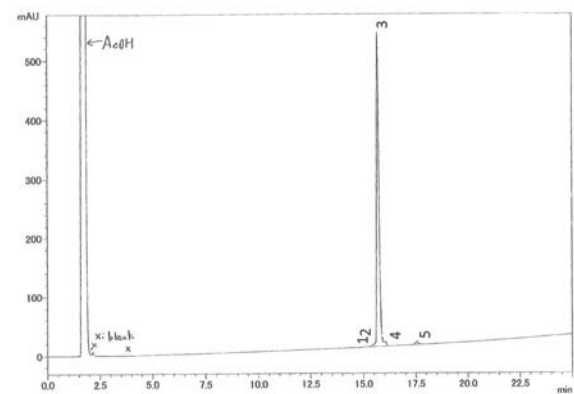
【図 3】



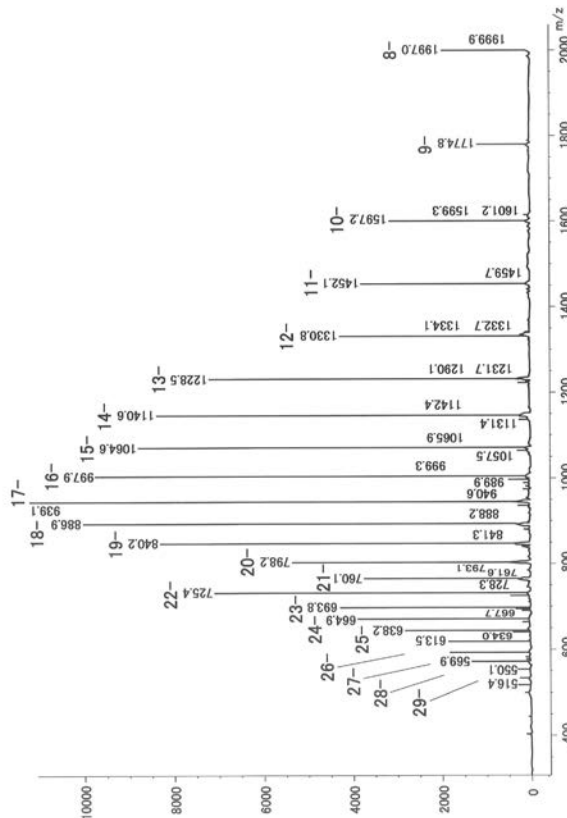
【図 4】



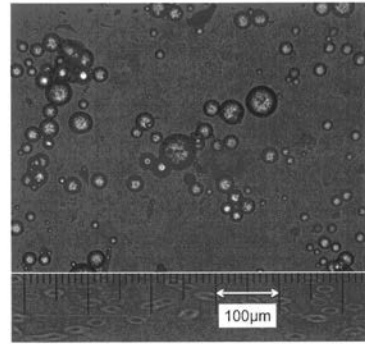
【図 5】



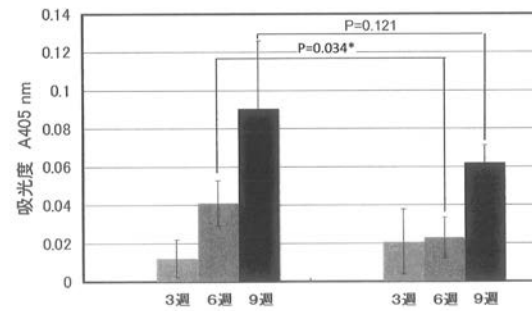
【図 6】



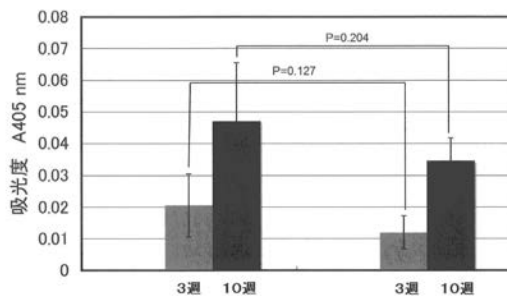
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【図 10】

Human alpha enolase (配列番号4)  
*P. falciparum* enolase (配列番号3)  
 (下線部はエノラーゼ部分配列、AD22を示す。)

```

1  MSILKIH--AREIFDSRCNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALRLNDKTR 56
1  MAHVITRINAREILDSRGDPTVEVDLETNLGLFRAAVPSGASTGIYEALRLNDKSR 58

57  YMKGVS KAVEHINKTIAPALVSKKLNTEQEIKDKLMIE-MDGTEN-----KSKFGA 109
59  YLGKGVQKATKNINEI IAPKLI--GMNCTEQKKIDNLMVEELDGSKNEWGWSKSLGA 114

110 NAILGVLAVCKAGAVEKGVPLYRHIADLAGN-SE-VILPVPANVINGGSHAGNKLA 165
115 ANILAIMAVCRAGAAPNKVSLKYLAQLAGKKSDQMVLVPCLNVINGGSHAGNKKS 172

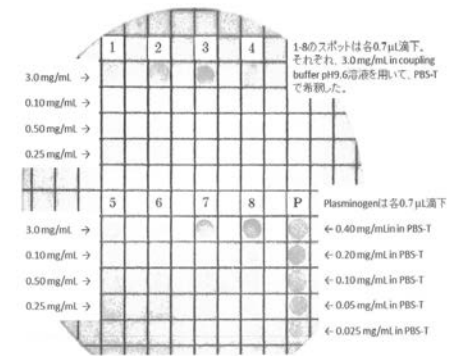
166 MQEFMILPVGAANFREAMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGDATNVGDEGGFAPNILENKE 223
173 YEQYMI VPGAPSYKEALRYGAETHLTKSEIKKKYGDATNVGDEGGFAPNILENKE 230

224 GLELLKTAIGKAGYTDKVVIGMDVAASEFFRSG-K-YDLDFKSPD-DPSRYISPDQLA 279
231 ALDLLVTAIKSAGYEGVKVIAMDVAASEFYNSNKTYDLDFTKPNNDKSLVKTGAQLV 288
                                AD22                AT28
280 DLYKSFIDYPPVSIEDPFDQDDWGAWQKFTASAGI-QVVGDDLTVTNPKRIKAVN 335
289 DIYIDL VKKYP I VSIEDPFDQDDWENYAKLTAATGKDVIQVGDLLVTNPTRITLAE 346

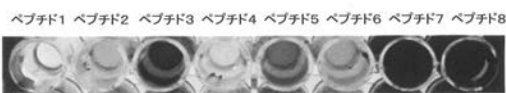
336 EKSCNCLLLKVNQIGSVTESLQACKLAQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTG 393
347 KNACNALLKVNQIGSITGATEACLLSQKNWGMVSHRSGETEDVFIADLVVALRTG 404

394 QIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELGSKAKFAGRNFRNPLAK 436
405 QIKTGAPCRSERNAKYNQLLRIEESLGNAVFAGEKFRQLN 446
  
```

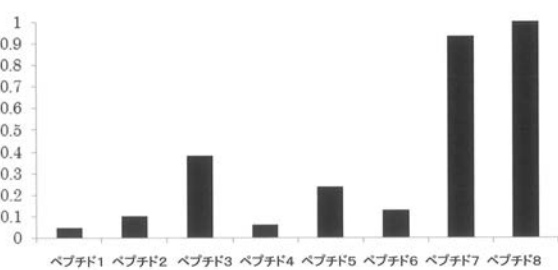
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 配 列 表 】

2016084944000001.app

【 図 1 4 】

| 結合配列の相同性を比較する |                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 本発明者らの知見      | 熱帯熱マラリア原虫 (ペプチド8 強い結合) (配列番号17)<br>熱帯熱マラリア原虫 (ペプチド3 強い結合) (配列番号12)                                                                                                                                                                                    |
| これまでの報告       | 熱帯熱マラリア原虫 (ペプチド、阻害) (配列番号18)<br>(Proc Natl Acad Sci USA, 2011, vol. 108, pp. 17153-17158.)<br>肺炎球菌 (ペプチド、阻害) (配列番号19)<br>(Mol Microbiol, 2003, vol. 49, pp. 411-423.)<br>ヒト(ファージディスプレイ、結合) (配列番号20)<br>(Thromb Haemost, 1997, vol. 78, pp. 1097-103.) |

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/083437

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/445(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P33/06(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)n

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K14/445, A61K38/00, A61P33/06, A61P37/04, G01N33/53, C12N9/88

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),  
CAPLUS/REGISTRY/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | JP 2002-371098 A (Japan Atomic Energy Research Institute),                                                                                                                               | 1, 3, 5-9,            |
| Y         | 26 December 2002 (26.12.2002),<br>claims; paragraphs [0025] to [0027]; fig. 1, 2;<br>table 1<br>(Family: none)                                                                           | 14-17<br>10-13        |
| Y         | JP 2009-256324 A (National University Corporation Gunma University),<br>05 November 2009 (05.11.2009),<br>claims; paragraphs [0020], [0030], [0031],<br>[0040]; fig. 3<br>(Family: none) | 10-13                 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 February 2016 (05.02.16)Date of mailing of the international search report  
16 February 2016 (16.02.16)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/JP2015/083437

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | WO 2006/035815 A1 (National University Corporation Gunma University),<br>06 April 2006 (06.04.2006),<br>abstract; fig. 1 to 8<br>& JP 4568842 B & US 2007/0269377 A1<br>abstract; fig. 1 to 8<br>& EP 1803731 A1        | 1-17                  |
| A         | JP 2012-240940 A (National University Corporation Gunma University),<br>10 December 2012 (10.12.2012),<br>claims; fig. 2<br>(Family: none)                                                                              | 1-17                  |
| A         | JP 8-231423 A (Terumo Corp.),<br>10 September 1996 (10.09.1996),<br>fig. 7<br>(Family: none)                                                                                                                            | 1-17                  |
| A         | EP 450715 A1 (ENIRICERCHÉ S.p.A.),<br>09 October 1991 (09.10.1991),<br>examples<br>& DE 69115539 C & IT 9019914 A                                                                                                       | 1-17                  |
| A         | NOI, Masaki et al., Solution-phase synthesis and structural analysis of multiple antigenic peptides having partial sequences of Plasmodium falciparum enolase, Peptide Science, 2003, Volume Date 2002, 39th, p.309-312 | 1-17                  |
| A         | KOKUBO, Miho et al., Synthesis of multiple-antigenic peptides having partial sequence of enolase, Peptide Science, 2002, Volume Date 2001, 38th, p.331-334                                                              | 1-17                  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                           |                                                        |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| 国際調査報告                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                           | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 8 3 4 3 7                   |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| <b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b><br>Int.Cl. C07K14/445(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P33/06(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)n                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                           |                                                        |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| <b>B. 調査を行った分野</b><br>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))<br>Int.Cl. C07K14/445, A61K38/00, A61P33/06, A61P37/04, G01N33/53, C12N9/88                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                           |                                                        |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 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<br><table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>                                                                                                                                                                              |                                                                                           |                                                        |  | 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 |
| 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)<br>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CPlus/REGISTRY/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                           |                                                        |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| <b>C. 関連すると認められる文献</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                           |                                                        |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号                                         |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | JP 2002-371098 A (日本原子力研究所) 2002.12.26, 特許請求の範囲, 段落0025-0027, 図1, 2, 表1 (ファミリーなし)         | 1, 3, 5-9, 14-17                                       |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                           | 10-13                                                  |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | JP 2009-256324 A (国立大学法人群馬大学) 2009.11.05, 特許請求の範囲, 段落0020, 0030, 0031, 0040, 図3 (ファミリーなし) | 10-13                                                  |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「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<br>「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)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「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<br>「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<br>「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<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |                                                                                           |                                                        |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 国際調査を完了した日<br>05.02.2016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                           | 国際調査報告の発送日<br>16.02.2016                               |  |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>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)<br>田中 晴絵<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |  |           |            |             |            |             |            |             |            |

| 国際調査報告                |                                                                                                                                                                                                                         | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 8 3 4 3 7 |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                         |                                      |
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号                       |
| A                     | WO 2006/035815 A1 (国立大学法人群馬大学) 2006.04.06, 要約, 図 1 ~ 8 & JP 4568842 B & US 2007/0269377 A1, abstract, figure 1-8 & EP 1803731 A1                                                                                        | 1 - 1 7                              |
| A                     | JP 2012-240940 A (国立大学法人群馬大学) 2012.12.10, 特許請求の範囲, 図 2 (ファミリーなし)                                                                                                                                                        | 1 - 1 7                              |
| A                     | JP 8-231423 A (テルモ株式会社) 1996.09.10, 図 7 (ファミリーなし)                                                                                                                                                                       | 1 - 1 7                              |
| A                     | EP 450715 A1 (ENIRICERCHÉ S.p.A.) 1991.10.09, examples & DE 69115539 C & IT 9019914 A                                                                                                                                   | 1 - 1 7                              |
| A                     | NOI, Masaki et al., Solution-phase synthesis and structural analysis of multiple antigenic peptides having partial sequences of Plasmodium falciparum enolase, Peptide Science, 2003, Volume Date 2002, 39th, p.309-312 | 1 - 1 7                              |
| A                     | KOKUBO, Miho et al., Synthesis of multiple-antigenic peptides having partial sequence of enolase, Peptide Science, 2002, Volume Date 2001, 38th, p.331-334                                                              | 1 - 1 7                              |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.   |               | F I              |                | テーマコード ( 参考 ) |
|----------------|---------------|------------------|----------------|---------------|
| <b>C 0 7 K</b> | <b>17/02</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>C 0 7 K</b> | <b>17/02</b>  |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>33/06</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 P</b> | <b>33/06</b>  |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>37/04</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 P</b> | <b>37/04</b>  |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>39/00</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>39/00</b>  |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>9/107</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>9/107</b>  |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>9/113</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>9/113</b>  |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>9/52</b>   | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>9/52</b>   |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>47/42</b>  | <b>(2017.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>47/42</b>  |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>47/34</b>  | <b>(2017.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>47/34</b>  |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>47/65</b>  | <b>(2017.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>47/65</b>  |
| <b>G 0 1 N</b> | <b>33/53</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>G 0 1 N</b> | <b>33/53</b>  |
| <b>G 0 1 N</b> | <b>33/569</b> | <b>(2006.01)</b> | <b>G 0 1 N</b> | <b>33/569</b> |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>9/14</b>   | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>9/14</b>   |

(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

(72)発明者 狩野 繁之

日本国東京都新宿区戸山 1 丁目 2 1 番地 1 号 国立研究開発法人国立国際医療研究センター内

(72)発明者 矢野 和彦

日本国東京都新宿区戸山 1 丁目 2 1 番地 1 号 国立研究開発法人国立国際医療研究センター内

F ターム(参考) 4B033 NA34 NA42 NB34 NB62 NC06 ND06  
 4C076 AA17 AA18 AA30 AA67 AA94 BB15 BB16 BB25 BB31 CC07  
 CC29 CC34 CC41 EE24F EE24H EE24K EE24M EE41 EE41F EE41H  
 EE41K EE41M EE59 FF16 FF27 FF31 FF43  
 4C085 AA03 CC21 CC32 DD32 DD51 DD84 EE01 GG03 GG04 GG05  
 GG10  
 4H045 AA30 BA18 BA40 BA62 BA63 CA22 DA86 DA89 EA31 EA50  
 FA15 FA20 FA84

(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。

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)   | 利用恶性疟原虫烯醇酶蛋白部分序列的人工抗原及其制备方法                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 公开(公告)号   | <a href="#">JPWO2016084944A1</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 公开(公告)日 | 2017-10-12 |
| 申请号       | JP2016561961                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 申请日     | 2015-11-27 |
| [标]发明人    | 奥浩之<br>狩野繁之<br>矢野和彦                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 发明人       | 奥 浩之<br>狩野 繁之<br>矢野 和彦                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| IPC分类号    | C07K14/445 C07K17/14 C12N11/04 C12N11/08 C12N11/14 C07K17/02 A61P33/06 A61P37/04 A61K39/00 A61K9/107 A61K9/113 A61K9/52 A61K47/42 A61K47/34 A61K47/65 G01N33/53 G01N33/569 A61K9/14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| CPC分类号    | A61K38/00 C12Y402/01011 C07K14/445 C12N9/88 G01N33/53 A61K9/1647 A61K9/1658 A61K9/1682 A61K39/015 A61K47/646 A61K2039/575 A61K2039/6068 G01N33/543 G01N33/56905 G01N33/6854 G01N2333/445 G01N2333/988 G01N2800/52                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| FI分类号     | C07K14/445.ZNA C07K17/14 C12N11/04 C12N11/08 C12N11/14 C07K17/02 A61P33/06 A61P37/04 A61K39/00.H A61K9/107 A61K9/113 A61K9/52 A61K47/42 A61K47/34 A61K47/65 G01N33/53.N G01N33/569.A A61K9/14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| F-TERM分类号 | 4B033/NA34 4B033/NA42 4B033/NB34 4B033/NB62 4B033/NC06 4B033/ND06 4C076/AA17 4C076/AA18 4C076/AA30 4C076/AA67 4C076/AA94 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB25 4C076/BB31 4C076/CC07 4C076/CC29 4C076/CC34 4C076/CC41 4C076/EE24F 4C076/EE24H 4C076/EE24K 4C076/EE24M 4C076/EE41 4C076/EE41F 4C076/EE41H 4C076/EE41K 4C076/EE41M 4C076/EE59 4C076/FF16 4C076/FF27 4C076/FF31 4C076/FF43 4C085/AA03 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/DD32 4C085/DD51 4C085/DD84 4C085/EE01 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG10 4H045/AA30 4H045/BA18 4H045/BA40 4H045/BA62 4H045/BA63 4H045/CA22 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA15 4H045/FA20 4H045/FA84 |         |            |
| 优先权       | 2014241420 2014-11-28 JP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| 其他公开文献    | JP6642835B2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 外部链接      | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |            |

# 摘要(译)

本发明提供了一种生物活性肽，其包括恶性疟原虫烯醇酶的部分氨基酸序列，并且具有与符合GMP的生产方法的规格设定相容的分子结构。提供具有两种肽的结构的肽，所述肽各自具有 ( i ) 由下式表示的氨基酸序列：A01-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp -Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-A02 ( SEQ ID NO : 1 ) 或 ( ii ) 由下式表示的氨基酸序列：A03-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr- Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr-A04 ( SEQ ID NO : NO : 2 ) 通过两个肽的相应羧基末端和 Lys的两个氨基基团之间的酰胺键连接在由 ( iii ) 代表的接头肽中：Lys-A05-Cys-A06并且以两个的形式排列 - 分叉的分支。优选的是具有二聚化结构的肽，其中两个上述肽通过相应两个肽中包含的接头肽序列中的 Cys残基之间的S-S键连接。( 在上述 ( i ) , ( ii ) 和 ( iii ) 中，A01至A06各自表示包括0 ) 的任意数目的氨基酸残基。

