

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2024-156964

(P2024-156964A)

(43)公開日 令和6年11月6日(2024.11.6)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00

A 6 1 K 39/385 (2006.01)

A 6 1 K 39/385

Z N A

A 6 1 K 39/245 (2006.01)

A 6 1 K 39/245

A 6 1 K 39/155 (2006.01)

A 6 1 K 39/155

A 6 1 P 31/22 (2006.01)

A 6 1 P 31/22

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全46頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-133744(P2024-133744)

(22)出願日 令和6年8月9日(2024.8.9)

(62)分割の表示 特願2021-510553(P2021-510553)
の分割

原出願日 令和1年5月3日(2019.5.3)

(31)優先権主張番号 1807378.3

(32)優先日 平成30年5月4日(2018.5.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(31)優先権主張番号 1807376.7

(32)優先日 平成30年5月4日(2018.5.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(71)出願人 520429679

スパイバイオテック・リミテッド

イギリス国 オックスフォード オックス
フォードシャー オーエックス4 2ジェ
イジー, オックスフォード・ビジネス
・パーク・ノース, アウレック・アイシ
ゴニス・ウェイ, ザ・クオラム 7 6 0 0

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100196508

弁理士 松尾 淳一

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

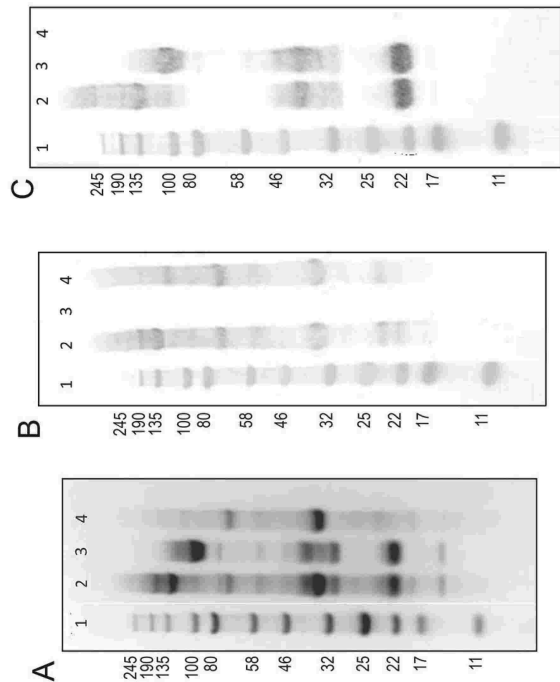
(54)【発明の名称】 ワクチン組成物

(57)【要約】 (修正有)

【課題】巨大な/多数の構成要素の抗原に対して使用が可能である、ワクチン組成物を提供する。

【解決手段】ワクチン組成物、最も顕著にはワクチン組成物であって、抗原性構成要素が大きい、例えば50kDaを超えるか、または多量体である、すなわちサブユニットで構成される、前記ワクチン組成物を提供する。こうした抗原性構成要素は、現在、それに対してワクチン接種が不可能である病原体由来の抗原性構成要素に相当しうるため、特に関心対象である。本発明は、抗原性構成要素をディスプレイする粒子を含む組成物であって、第一のペプチドタグを含む抗原性構成要素、および第二のペプチドタグを含む部分を含み、抗原性構成要素および部分が、前記の第一および第二のペプチドタグの間のイソペプチド結合を通じて連結されており、そして抗原性構成要素が50kDaを超えるか、または多量体性である、前記組成物を提供する。

【選択図】図4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原性構成要素をディスプレイする粒子を含む組成物であって：

- i) 第一のペプチドタグを含む抗原性構成要素、および
- ii) 第二のペプチドタグを含む部分

を含み、

抗原性構成要素および部分が、前記の第一および第二のペプチドタグの間のイソペプチド結合を通じて連結され、そして抗原性構成要素が 50 kDa を超える前記組成物。

【請求項 2】

抗原性構成要素が、60 kDa、70 kDa、80 kDa、90 kDa、100 kDa、110 kDa、120 kDa、130 kDa、140 kDa、150 kDa、160 kDa、170 kDa、180 kDa、190 kDa、200 kDa、300 kDa または 400 kDa より大きい、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

抗原性構成要素が、単量体または多量体であり、随意に、多量体が、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体または十量体である、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

部分が、ウイルス、細菌、ワクチン接種のための多量体化足場、多量体化してウイルス様粒子 (VLP) を形成するタンパク質構成要素、ウイルス構造タンパク質、ナノ粒子を形成する多量体化ドメイン、合成ナノ粒子または合成 VLP である、先行する請求項いずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

部分が HBS Ag である、先行する請求項いずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

第一および第二のペプチドタグが、SpyTag および SpyCatcher 対；SnoopTag または SnoopTag Jr および SnoopCatcher 対；RrgATag、RrgATag 2 または DogTag および RrgACatcher 対；IsopepTag Pilin - C 対；IsopepTag - N および Pilin - N 対；PscS Tag および PscS Catcher 対；ならびに SnoopLigase によって仲介される SnoopTag Jr および DogTag 対；あるいはその変異体、誘導体または修飾物の任意の 1 つより選択され、随意に、第一および第二のペプチドタグが SpyTag / SpyCatcher 対である、先行する請求項いずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

抗原性構成要素が HCMV 五量体の免疫原性構成要素を含む、先行する請求項いずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

HCMV 五量体の免疫原性構成要素が、gH、gL、pUL128、pUL130 または pUL131 サブユニットの 1 つまたはそれより多くを含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

HCMV 五量体の免疫原性構成要素が、gH、gL、pUL128、pUL130 および pUL131 サブユニットのすべてを含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

HCMV 五量体の免疫原性構成要素が、一部切除 (truncated) 膜貫通ドメインを含む gH サブユニットを含む、請求項 7 ~ 請求項 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 11】

gH、gL、pUL128、pUL130 および pUL131 サブユニットが、それぞれ、配列番号 28、31、35、33 および 36 に示すアミノ酸配列、またはその機能的

10

20

30

40

50

同等物を有する、請求項 8 ~ 請求項 10 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 12】

第一のペプチドタグが、gHサブユニットに、好ましくはgHサブユニットのC末端に付着している、請求項 8 ~ 請求項 11 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 13】

抗原性構成要素がRSV-Fタンパク質の免疫原性構成要素を含む、請求項 1 ~ 請求項 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

RSV-Fタンパク質の免疫原性構成要素が、プレ融合Fタンパク質、随意に、安定化プレ融合Fタンパク質である、請求項 13 に記載の組成物。

10

【請求項 15】

RSVプレ融合Fタンパク質の免疫原性構成要素がF₁およびF₂サブユニットの三量体を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記RSV-Fタンパク質が、配列番号50 ~ 58 のいずれか1つに示す配列を有する、請求項 13 ~ 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

第一のペプチドタグが、プレ融合Fタンパク質のC末端に付着している、請求項 13 ~ 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

第一のペプチドタグがSpyTagである、先行する請求項いずれかに記載の組成物。

20

【請求項 19】

SpyTagが配列番号30に示すアミノ酸配列を有する、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

SpyTagがリンカーを通じて付着している、請求項 18 または請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

リンカーが配列番号29に示すアミノ酸配列を有する、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

部分がHBsAgであり、そして随意に、第二のペプチドタグがSpyCatcherである、先行する請求項いずれかに記載の組成物。

30

【請求項 23】

第二のペプチドがSpyCatcherであり、前記SpyCatcherが配列番号38に示すアミノ酸配列を有する、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

部分がリンカー、好ましくは柔軟性リンカーを通じてSpyCatcherに付着している、請求項 22 または請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

リンカーが配列番号39に示すアミノ酸配列を有する、請求項 24 に記載の組成物。

40

【請求項 26】

免疫原性またはワクチン組成物である、先行する請求項いずれかに記載の組成物。

【請求項 27】

疾患の予防および/または治療において使用するための、請求項 1 ~ 26 のいずれかに記載の組成物を含むワクチン。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 26 のいずれかにしたがつた組成物を産生する方法であって：

- 第一のペプチドタグへの第一のタンパク質の第一の遺伝子融合物をコードする第一の核酸を、第一の宿主細胞内に導入し；

- 前記の第一の宿主細胞を、前記の第一の遺伝子融合物を発現するための条件下でイン

50

キュベーションし；

- 第二のペプチドタグへの第二のタンパク質の第二の遺伝子融合物をコードする第二の核酸を、第二の宿主細胞内に導入し；

- 前記の第二の宿主細胞を、前記の第二の遺伝子融合物を発現するための条件下でインキュベーションし；

- 随意に、発現された構成要素を精製し；

- 発現された構成要素を、第一のペプチドタグおよび第二のペプチドタグの間のイソペプチド結合の形成のための条件下でインキュベーションし；そして随意に、生じた組成物を精製する

工程を含む、前記方法。

10

【請求項 29】

第一のタンパク質が抗原性構成要素を含み、そして第二のタンパク質が部分を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

核酸分子が、配列番号 27 ~ 41 のいずれかに示すアミノ酸配列をコードする、請求項 28 または請求項 29 に記載の方法において使用するための核酸分子。

【請求項 31】

配列番号 12 ~ 26 または 42 ~ 46 のいずれかに示すヌクレオチド配列を有する、請求項 30 に記載の核酸分子。

【請求項 32】

20

核酸分子が、配列番号 50 ~ 58 のいずれかに示すアミノ酸配列をコードする、請求項 28 または請求項 29 に記載の方法において使用するための核酸分子。

【請求項 33】

配列番号 47 ~ 55 のいずれかに示すヌクレオチド配列を有する、請求項 32 に記載の核酸分子。

【請求項 34】

請求項 30 ~ 33 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 35】

請求項 30 ~ 32 に記載の核酸分子、または請求項 34 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

30

【請求項 36】

第一の免疫原性組成物を含む組成物、および随意に第二の免疫原性組成物を含む 1 つまたはそれより多いブースター組成物を含むキットであって、前記の第一および/または第二の免疫原性組成物が請求項 1 ~ 請求項 26 のいずれかに記載の組成物を含む、前記キット。

【請求項 37】

請求項 7 ~ 12 のいずれかに記載の組成物を含む、HCMV 感染の予防および/または治療において使用するためのワクチン。

【請求項 38】

請求項 13 ~ 17 のいずれかに記載の組成物を含む、RSV 感染の予防および/または治療において使用するためのワクチン。

40

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

ワクチンは、感染性疾患と闘いそしてこれを根絶するための安全でそして有効な方法である。ワクチン開発は非常に成功してきているが、ワクチンが現在まったく存在しないまま残る疾患課題のリストがあり、これには、手強い免疫学的障害に相当する多くの重大な病原体が含まれる。一般的に、有効なワクチンは、リンパ節に輸送され、免疫反応を生じるために十分な時間そこに留まらなければならないと見なされる。

【0002】

50

ワクチン開発は、必要な防御免疫反応を生じる一方で、こうした弱毒化株の使用に固有のリスクを回避することを目的として、弱毒化されたかまたは死んだ病原体の使用から、これらの病原体のより小さい抗原性構成要素の使用へと移行してきている。病原体構成要素（例えば病原体が細胞を感染させるために必要である構成要素）の免疫原性部位を発現する試みに対して重点的に努力がなされてきており、こうした構成要素は、簡単に言えば、巨大なまたは多数の構成要素の抗原の発現には技術的問題が伴うため、短い／小さいペプチドおよびタンパク質に制限されてきている。しかし、非常に短いまたは小さいペプチドを用いることに伴う潜在的な問題は、抗原的に可変性である病原体のリスクであり、こうした病原体は、抗原の特定のパートの変化を通じて、ワクチン接種によって誘導された免疫反応を逃れる。

10

【0003】

巨大な／多数の構成要素の抗原の発現に関しては免疫学的な利点があり、これには、1つの病原体の多数の中和性エピトープに対する抗体の生成が可能になる能力が含まれる。しかし、適切な抗原性エピトープが維持され、そして有効な抗体反応の生成のために提示されるように複合体を形成しうる、1つまたはそれより多い巨大な抗原の発現は、非常に困難なままである。したがって、臨床的に有意な免疫反応を生じうる方式で、巨大な抗原および／または多数の構成要素の抗原を発現させるための改善された方法の必要性がなおある。

【0004】

多数の抗原性構成要素に対する免疫反応を誘発するように設計された以前の組換えワクチンは、各々の構成要素が発現され、そして別々の粒子内に別個にパッケージングされることに頼るかいずれかであり、例えば、抗HPVワクチン、サーバリックスおよびガーダシルの場合、特定のHPV株の組換え主要カプシドL1タンパク質が別個に発現され、そしてウイルス様粒子（VLP）として組み立てられ、その後、異なるタイプのVLPがワクチン配合物に組み合わせられる。あるいは、多数の短いエピトープが選択され、そして単一の組換えワクチン（例えば多量体001インフルエンザワクチン）に組み合わせられるが、まさにその性質のため、これらのエピトープは短い直鎖エピトープであり、三次元構造または再フォールディングに關与する製造上の複雑さを回避するために選択されており、そしてしたがって、能動的感染において免疫系に提示されるような天然病原体を代表するようには試みられていない。

20

30

【0005】

例えば、ヘルペスヒトサイトメガロウイルス（HCMV、ヒトヘルペスウイルス-5（HHV-5）としてもまた知られる）は、新生児発達障害の主な原因ウイルスである。この遍在性のウイルスは、一般集団の60%以上に感染し、最初の感染は通常、軽症であるかまたは無症候性である。感染後、ウイルスは体内に潜在し続けるが、免疫低下した者（すなわちHIV患者、移植患者および化学療法を受けている者）または高齢者では深刻な疾患を引き起こしうる。HCMVは、発展途上国において、先天異常の主な感染性の原因である。最大4人/200人の赤ちゃんが先天性感染のためHCMVを持って生まれ、そしてこれらのうち最大10%が長期の結果に苦しむ。HCMV感染はまた、成人において、高血圧およびアテローム性動脈硬化症と関連付けられてきている（Chengら（2009年5月）Frueh K監修 "Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure". PLoS Pathog. 5(5): e1000427）。HCMVはしたがって、公衆衛生の優先事項である。しかし、集中的な努力にもかかわらず、HCMVワクチンの成功は現在まで達成されてきていない。

40

【0006】

呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、感染した健康な成人およびより年長の小児においては、健康にほとんど害を引き起こさない別の遍在性ウイルスである。しかし、世界中で1歳未満の乳児の2番目に大きな死因であり、マラリアに次いで2番目である。該ウイルスは、世界中で、年間、概算160,000件の死亡の原因である。このウイルスは、深

50

刻な呼吸器感染を引き起こし、そして合併症には肺炎および細気管支炎が含まれる。高リスク群には、1歳未満の乳児および免疫低下患者、高齢者、ならびに心臓および肺状態を有する者が含まれる。やはり、長年の活発な研究および開発にも関わらず、RSVに対する現在認可されたワクチンは存在しない。

【0007】

現在利用可能なワクチンがない、RSVおよびHCMVによって引き起こされるものなどの疾患に関しては、一般的に、ワクチン産生に対する現在のアプローチは望ましい有効性を示してきておらず、これは、こうした破局的な転帰を有する疾患に取り組むため、別のタイプのワクチンを提供する、大きな満たされていない必要性があることを示す。

【0008】

近年、自発的なまたは補助されたアミド結合形成を可能にするための、いくつかの遺伝的にコードされた系が記載されてきている。例えば、SpyTagは、2つの構成要素を混合した際、そのタンパク質パートナーSpyCatcherへの自発的および不可逆的イソペプチド結合が形成されるように操作されているペプチドである。タンパク質鎖内でのSpyTagおよびSpyCatcher構成要素の位置は、多様な位置であるように設計可能であり、そして広範囲のpH、緩衝および温度条件下で反応する。SpyTag/SpyCatcher対、ならびにその変異体および誘導体は、ワクチン開発において用いられてきているが、今日まで、単純な抗原の提示にしか用いられてきていない。自発的なアミド結合形成を可能にするための、他の遺伝的にコードされた系には、SnoopTag/SnoopTag JrおよびSnoopCatcher; RrgATag/RrgATag 2/DogTagおよびRrgACatcher、IsopepTag/IsopepTag-NおよびPilin-CまたはPilin-N、PscsTagおよびPscsCatcher; ならびにSnoopTag JrおよびDogTag (SnoopLigaseによって仲介される)、ならびにこれらの系すべての変異体が含まれる。

【0009】

本発明者らは、巨大な/多数の構成要素の抗原に対する反応を改善しうる、アミド結合形成を可能にするための遺伝的にコードされる系を用いて、ワクチン組成物における巨大な/多数の構成要素の抗原の使用が可能であることを立証した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】 Chengら (2009年5月) Frueh K監修 "Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure". PLoS Pathog. 5(5): e1000427

【発明の概要】

【0011】

本発明の第一の側面において、タンパク質構成要素をディスプレイする粒子を含む組成物であって:

- i) 第一のペプチドタグを含むタンパク質構成要素、および
- ii) 第二のペプチドタグを含む部分

を含み、

タンパク質構成要素および部分が、前記の第一および第二のペプチドタグの間のイソペプチド結合を通じて連結され、そしてタンパク質構成要素が50kDaを超える前記組成物を提供する。

【0012】

本発明の別の側面において、タンパク質構成要素をディスプレイする粒子を含む組成物であって:

- i) 第一のペプチドタグを含むタンパク質構成要素、および
- ii) 第二のペプチドタグを含む部分

を含み、

タンパク質構成要素および部分が、前記の第一および第二のペプチドタグの間のイソペプチド結合を通じて連結され、そしてタンパク質構成要素が多量体性である前記組成物を提供する。

【0013】

タンパク質構成要素は任意の機能を有してもよく、例えば酵素であってもよいしまたは酵素特性を有してもよい。タンパク質構成要素は全長タンパク質であってもよいし、あるいは全長タンパク質の一部、セグメント、ドメインまたは一部切除物 (t r u n c a t i o n) であってもよい。タンパク質構成要素は、抗原または免疫原であってもよい。タンパク質構成要素はまた、抗原性構成要素と称されてもよい。

10

【0014】

本発明の別の側面において、抗原性構成要素をディスプレイする粒子を含む組成物であって：

i i i) 第一のペプチドタグを含む抗原性構成要素、および

i v) 第二のペプチドタグを含む部分

を含み、

抗原性構成要素および部分が、前記の第一および第二のペプチドタグの間のイソペプチド結合を通じて連結され、そして抗原性構成要素がおよそ50kDaを超える前記組成物を提供する。

【0015】

本発明の任意の側面のいくつかの態様において、タンパク質構成要素または抗原性構成要素は、60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDa、160kDa、170kDa、180kDa、190kDaまたはそれより大きい、例えば200kDaより大きい、300kDaより大きい、あるいは400kDaより大きいことも可能である。

20

【0016】

多量体は、任意の数のサブユニットを含んでもよく、タンパク質または抗原性構成要素において、共有結合していてもまたはしていなくてもよい。多量体は、2~20のサブユニット、あるいは3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれより多いサブユニットを含むことも可能である。あるいは、多量体は、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体または十量体であることも可能である。多量体は任意の適切な病原体から形成されうるが、好ましくはウイルス多量体である。

30

【0017】

巨大タンパク質構成要素、すなわち50kDaを超えるものまたは上述のようなものの限定されない例には、ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) 由来の五量体複合体 (P C) およびgB糖タンパク質、RSV由来のGおよびF糖タンパク質、インフルエンザAウイルス由来の赤血球凝集素 (H A) およびノイラミニダーゼ (N A) 抗原、熱帯熱マラリア原虫 (P l a s m o d i u m f a l c i p a r u m) P f s 2 3 0、熱帯熱マラリア原虫CSP、ヒトHER2受容体、PCSK9、VAR2CSA、熱帯熱マラリア原虫RIPR、水痘帯状疱疹ウイルス (V Z V) 糖タンパク質E、狂犬病ウイルス糖タンパク質ならびにエプスタイン - バーウイルス (E B V) g H / g L 複合体が含まれる。

40

【0018】

本発明の任意の側面のいくつかの態様において、タンパク質構成要素または抗原性構成要素は、単量体または多量体、例えば二量体、三量体、四量体または五量体であることも可能である。本発明の任意の側面のいくつかの態様において、タンパク質構成要素または抗原性構成要素はタンパク質またはペプチド複合体であることも可能である。

【0019】

多量体抗原性構成要素の限定されない例には、ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) 由来の五量体複合体 (P C) およびgB三量体、RSV由来のGおよびF糖タンパク質、

50

インフルエンザ A ウイルス由来の赤血球凝集素 (H A) およびノイラミニダーゼ (N A) 抗原が含まれ、これらのいくつかは本明細書に記載される。他の例には、疾患病原体、例えばウイルス、細菌、真菌病原体、寄生虫または他の疾患媒介物の構成要素が含まれる。適切な多量体抗原性構成要素には、例えば、インフルエンザ (例えばインフルエンザ赤血球凝集素 (H A) (例えばインフルエンザ三量体))、呼吸器合胞体ウイルス (R S V) などのウイルスに由来するものが含まれる。

【0020】

タンパク質構成要素を、遺伝子融合によって、第一のペプチドタグに付着させ、そして適切な細胞において組換え的に発現させることも可能である。翻訳後修飾、例えばグリコシル化を含む構成要素に関しては、真核または哺乳動物細胞株において組換えタンパク質を発現させることが好ましい可能性もありうる。

10

【0021】

1つの態様において、「部分」は、該部分上で、タンパク質構成要素または抗原性構成要素がディスプレイされる、例えば免疫系に利用可能になることも可能である、構成要素である。1つの態様において、部分は多量体化して前記粒子を形成する。適切には、こうした部分は、ウイルス、細菌、ワクチン接種のための多量体化足場、または多量体化して V L P (ウイルス様粒子) を形成するタンパク質構成要素であることも可能である。適切には、部分は、バクテリオファージ、タバコモザイクウイルス粒子、アデノ随伴ウイルス様粒子 (A A V L P)、大腸菌 (E . c o l i) 等の構成要素であることも可能である。1つの態様において、部分の多量体化 (自己集合) がタンパク質構成要素または抗原性構成要素をディスプレイするための粒子を形成するように、部分はそれ自体、ウイルス、細菌等の構成要素である。1つの態様において、部分は、ウイルス構造タンパク質、例えばウイルスエンベロープまたはカプシドタンパク質または表面抗原であることも可能である。構造タンパク質の例には、インフルエンザウイルス由来のマトリックス M 1 タンパク質およびウイルスエンベロープ M 2 タンパク質、B 型肝炎ウイルス由来の H B s A g、大腸菌バクテリオファージ A P 2 0 5 ウイルスコートタンパク質 (C P 3)、ムンプス等を含む多様なウイルス由来の赤血球凝集素 - ノイラミニダーゼが含まれる。適切なウイルス構造タンパク質が当業者に知られる。他の態様において、部分は、タンパク質またはペプチド、例えば多量体化ドメイン、例えばナノ粒子を形成する I M X 3 1 3、またはコンピュータ由来粒子、例えば M I 3 であることも可能である。さらなる態様において、部分は、合成ナノ粒子または合成 V L P、例えば金、リポペプチドまたはポリ (乳酸 - グリコール酸共重合体) (P L G A) ナノ粒子であることも可能である。他の適切な部分には、リポソームまたは外膜小胞が含まれることも可能である。適切には、第二のペプチドタグを含む部分は、第二のペプチドタグが付着する部分である。

20

30

【0022】

ウイルス由来の構造表面抗原の使用が好ましい可能性もある。したがって、第二のペプチドタグを構造的表面抗原に付着させて、ウイルス様粒子 (V L P) の形成を可能にし、該粒子に第二のペプチドタグを付着させるか、または該粒子が第二のペプチドタグをディスプレイする。V L P は非感染性自己集合ナノ粒子であり、そしてその反復性の分子的に定義された構築は、多価性を操作するため、特にワクチン接種のため、魅力的である。V L P は、B 型肝炎ウイルス (B 型肝炎小分子表面抗原 (H B s A g) を含む)、パルボウイルス科 (例えばアデノ随伴ウイルス)、レトロウイルス科 (例えば H I V)、フラビウイルス科 (例えば C 型肝炎ウイルス) およびバクテリオファージ (例えば Q 、 A P 2 0 5) を含む、非常に多様なウイルスファミリーの構成要素から産生されてきている。これらのいずれも、本発明の部分としての使用に適切でありうる。

40

【0023】

第二のペプチドタグを、遺伝子融合を通じて部分に付着させることも可能である。この遺伝子融合は、単に末端に限定されるのではなく、配列中の任意の適切な点であることも可能である。当業者は、適切な細胞において、融合タンパク質を組換え的に発現可能であることを認識するであろう。

50

【0024】

第二のペプチドタグは、あるいは、化学的コンジュゲート化によって、ディスプレイされるか、または部分に付着されることも可能である。これは、例えば、コンジュゲート化が実行可能であるように、反応性アミン基の存在を必要とするであろう。

【0025】

したがって、1つの態様において、部分は、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)である。適切には、HBsAgは、本明細書に記載するような、配列番号41に示すアミノ酸配列(またはその機能的同等物)を有する。

【0026】

本発明の任意の側面の1つの態様において、タンパク質構成要素または抗原性構成要素は、HCMV五量体の免疫原性構成要素である。適切には、抗原性または免疫原性構成要素は、被験体、例えば患者内に導入した際に、その構成要素に対する免疫反応、例えば抗体反応を生じることが可能であるものである。したがって、「HCMV五量体の免疫原性構成要素」は、例えば、被験体において、抗HCMV抗体反応を生じることが可能な構成要素である。適切には、免疫原性構成要素は、gH、gL、pUL128、pUL130およびpUL131(pUL131Aとしてもまた知られる)より選択されるHCMV五量体サブユニット構成要素の1つまたはそれより多く(少なくとも1つ)を含む。いくつかの態様において、免疫原性構成要素は、1つまたはそれより多いこれらの「pUL」または「UL」構成要素を含む。他の態様において、免疫原性構成要素は、これらのgHまたはgL構成要素の1つまたはそれより多くを含む。1つの態様において、免疫原性構成要素は、1つまたはそれより多い「UL」構成要素と、gHまたはgL構成要素より選択される1つまたはそれより多い構成要素の組み合わせを含む。本発明の別の態様において、HCMV五量体の免疫原性構成要素は、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131サブユニットのすべてを含むHCMV五量体である。適切には、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131サブユニットは、タウン(Towne)(GI:239909366)、AD169(GI:219879600)、トレド(Toledo)(GI:290564358)およびマーリン(Merlin)(GI:155573956)を含む、任意の既知のHCMV株(実験室株および/または臨床単離体の両方を含む)由来のものに対応するアミノ酸配列、またはその機能的同等物を有する。機能的同等物によって、ある程度の相同性を共有し、そしていくつかのアミノ酸のみが異なるが、防御抗体を提供する抗原性サブユニットまたは五量体を形成可能である機能特性を保持するアミノ酸配列を意味する。構成要素gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131Aの適切な変異体が、例えば本明細書に援用されるWO2014/005959(4~10ページを参照されたい)に記載されている。好適には、ワクチンアプローチにおいて、HCMV五量体サブユニットを用いると、五量体アミノ酸配列レベルで、株間に高い度合いの相同性があるため、広範囲のHCMVウイルス株からの感染に対する免疫原性防御を提供可能である。

【0027】

いくつかの態様において、抗原性構成要素は、疾患病原体の構成要素、あるいはそのペクターまたは一部に対応することも可能である。抗原性構成要素は、例えば、製造を容易にするため、膜貫通ドメインを欠いていてもよい。適切には、HCMV五量体において、例えば、HCMV五量体の免疫原性構成要素は、精製を容易にするため、宿主細胞におけるタンパク質産生中に、サブユニットが細胞上清内に分泌されるように、一部切除膜貫通ドメイン(この領域から1つまたはそれより多いアミノ酸を欠失させることによって、一部切除されている)を含む、gHサブユニットを含む。

【0028】

1つの態様において、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131Aサブユニットは、それぞれ、配列番号28、31、35、33、36に示すアミノ酸配列(またはその機能的同等物)を有する(示すシグナルペプチドを含むまたは含まない)。機能的同等物によって、ある程度の相同性を共有し、そしていくつかのアミノ酸のみが異なる

が、例えば、防御抗体を提供する抗原性サブユニットまたは五量体を形成可能である機能特性を保持するアミノ酸配列を意味する。いくつかの態様において、機能的同等物は、関連するアミノ酸配列と70%、80%、90%またはそれより高い相同性を共有することも可能である。別の態様において、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131Aサブユニットは、配列番号13、16、20、18、21に示すものなどの核酸配列、またはそのコドン最適化型（シグナルペプチドのコード配列を含むまたは含まない）によってコードされる。いくつかの態様において、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131Aサブユニットの任意の1つは、シグナルペプチド、例えばその株の天然タンパク質上に存在するシグナルペプチド、シグナルペプチドの機能的同等物、またはHCMVの異なる株に由来するシグナルペプチドを有することも可能である。いくつかの態様において、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131Aサブユニットの任意の1つは、異種タンパク質由来のシグナルペプチドを有することも可能である。シグナルペプチドの選択は、発現されたタンパク質を、特定の細胞性（または細胞外）位置にターゲティングするか、または他の機能性を与えるために決定されることも可能である。サブユニット（単数または複数）の発現後、シグナルペプチドは、用いた発現系の天然の細胞機構または*in vitro*のいずれかによって、酵素的に切断される（例えばシグナルペプチダーゼによって）ことも可能である。いくつかの態様において、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131Aサブユニットの任意の1つは、シグナルペプチドを含まずに発現されることも可能である。いくつかの態様において、これらにより高い発現レベルを生じうる場合、イントロンを含む天然配列を用いることも可能である。適切には、UL128の天然核酸配列には2つのイントロンが含まれる。別の態様において、UL131Aの核酸配列には1つのイントロンが含まれる。いくつかの態様において、イントロンを除去してもよい。いくつかの態様において、天然配列は、適切な発現系のため、コドン最適化されることも可能である。

10

20

30

40

50

【0029】

本発明の任意の側面の1つの態様において、タンパク質構成要素または抗原性構成要素は、RSVウイルスの免疫原性構成要素、例えば付着糖タンパク質（Gタンパク質）または融合糖タンパク質（Fタンパク質）であり、これらはどちらも、感染初期を制御する。Gは、高グリコシル化された90kDa II型膜内在性タンパク質であり、そしてプロテオグリカン上のヘパラン硫酸との相互作用のいずれかを通じた宿主細胞膜へのウイルス付着を仲介可能であり、そしてタンパク質構成要素の優れた候補である。

【0030】

Fタンパク質は、膜内在性タンパク質であり、3つのF₀単量体で構成され、F₁およびF₂サブユニットへの集合中にプロセッシングされて、2つのジスルフィド結合によって共有連結される。Fタンパク質は、AおよびBサブグループ両方に由来するRSV単離体間で非常に保存され、そしてアミノ酸配列は、90%またはそれより高い同一性を示す。Fは、50キロダルトン（kDa）カルボキシ末端F₁断片および20kDaアミノ末端F₂断片からなる、574アミノ酸のクラスI融合タンパク質であり；ヘテロ二量体の三量体を構成する。これは、2つのフェーリン切断部位によって区別され、該部位は27アミノ酸糖ペプチドを放出し、そしてF₁アミノ末端で疎水性融合ペプチドを曝露する。F₂には2つのN連結グリコシル化部位があり、そしてF₁には1つしかない。F₂およびF₁の間の25アミノ酸シグナルペプチドおよび27アミノ酸糖ペプチドを除去した後、Fの残りの外部ドメインは472アミノ酸からなる。サブタイプAおよびBの間では、F外部ドメイン中、25アミノ酸のみが異なる。

【0031】

RSV-Fタンパク質から抗原性組成物を発展させるため、いくつかの研究は、三量体であるプレ融合タンパク質の変異体を作製することに重点を置いてきている。変異体は、成熟プレ-Fの2つのサブユニットを一本鎖に遺伝子融合させることによって産生されてきている。F₁に遺伝子融合したF₂ならびに融合ペプチドおよびpep27領域両方の欠失を含むDS-Cav1変異体を作製されてきている。F₂およびF₁サブユニットの

間のリンカーの相違は、免疫原性に影響を及ぼしていたようであり、そしてしたがって、変異体は異なるリンカーの選択を用いてもよい。天然RSV-Fタンパク質配列は、寄託番号P03420.1に見出されうる。

【0032】

プレ融合Fタンパク質のいくつかの型が研究され、そして開発されてきており、そしてその結果、公表されてきている。これらのプレ融合三量体は、本発明における使用にすべて適している可能性がある。DS-Cav1安定化融合糖タンパク質は、天然タンパク質に由来する。本明細書に援用されるEP2222710もまた、RSV-Fタンパク質ポリペプチドのF2ドメインおよびF1ドメイン、ならびに三量体化ドメインを含む、可溶性Fタンパク質ポリペプチドを含む、組換えRSV抗原を開示する。Krarrupら、Nat. Commun. 2015; 6: 8143において、非常に安定なプレ融合RSV-Fタンパク質が記載され、これもまた本明細書に援用される。

10

【0033】

本明細書に援用されるWO2014/160463は、プレ融合コンホメーションで安定化される単離組換えRSV-Fタンパク質、ならびに組換えRSV-Fタンパク質をコードする核酸分子を記載する。

【0034】

本明細書に援用されるWO2017/172890は、置換修飾プレ融合RSV-Fタンパク質、および該タンパク質をコードする核酸を記載する。さらなる説明は、やはり本明細書に援用される、Nat Struct Mol Biol. 2016 Sep; 23(9): 811-820, Iterative structure-based improvement of a respiratory syncytial virus fusion glycoprotein vaccine, M. Gordon Joyce, Baoshan Zhang, Li Ou, Man Chen, Gwo-Yu Chuang, Aliaksandr Druz, Wing-Pui Kong, Yen-Ting Lai, Emily J. Rundle, Yaroslav Tsybovsky, Yongping Yang, Ivelin S. Georgiev, Miklos Guttman, Christopher R. Lees, Marie Pancera, Mallika Sastri, Cinque Soto, Guillaume B.E. Stewart-Jones, Paul V. Thomas, Joseph G. Van Galen, Ulrich Baxa, Kelly K. Lee, John R. Mascola, Barney S. Graham, およびPeter D. Kwongに提供される。

20

30

【0035】

T4フィブリチン三量体化ドメインに連結された組換えF₂-F₁外部ドメインプロトマーをコードする例示的な核酸配列は、寄託番号: LP884611.1、LP884610.1、LP884609.1およびLP884608.1として入手可能である。

【0036】

いくつかの態様において、タンパク質または抗原性構成要素は、疾患病原体の構成要素あるいはそのベクターまたは一部に対応することも可能である。抗原性構成要素は、例えば、製造を容易にするため、膜貫通ドメインを欠いていてもよい。適切には、RSV-Fタンパク質またはそのプレ融合コンホメーションにおいて、例えばFタンパク質の免疫原性構成要素は、精製を容易にするため、宿主細胞におけるタンパク質産生中に、サブユニットが細胞上清内に分泌されるように、一部切除膜貫通ドメイン(この領域から1つまたはそれより多いアミノ酸を欠失させることによって、一部切除されている)を含む、F₂-F₁サブユニットを含む。したがって、RSV-Fタンパク質は機能性TMドメインを欠く。あるいは、第一のペプチドタグを含む遺伝子融合は、実際、機能的膜貫通ドメインの存在に関わらず、Fタンパク質が膜中に存在することを防ぐことも可能である。

40

【0037】

50

1つの態様において、プレ融合安定化サブユニットは、それぞれ、配列番号50～58に示すアミノ酸配列（またはその機能的同等物）を有する。機能的同等物によって、ある程度の相同性を共有し、そしていくつかのアミノ酸のみが異なるが、例えば、防御抗体を提供する抗原性サブユニットを形成可能である機能特性を保持するアミノ酸配列を意味する。いくつかの態様において、機能的同等物は、関連するアミノ酸配列と70%、80%、90%またはそれより高い相同性を共有することも可能である。1つの態様において、プレ融合安定化RSV-F三量体には、異種三量体化ドメインが含まれなくてもよい。

【0038】

タンパク質構成要素は、第一のペプチドタグを含む。組換え融合タンパク質を発現させることによって、この第一のペプチドタグをタンパク質構成要素に付着させてもよい。当業者は、適切な細胞系において組換えタンパク質を発現するため、ペプチド配列の遺伝子融合のための技術を知っている。翻訳後修飾、例えばグリコシル化を含む部分に関しては、真核または哺乳動物細胞株において組換えタンパク質を発現させることが好ましい。

10

【0039】

好適に、イソペプチド結合を形成する第一のペプチドタグおよび第二のペプチドタグ、例えば本明細書に記載するようなSpyTag-SpyCatcher系を用いると、防御/中和/免疫原性効果を提供しうる、抗・抗原（例えば抗HCMV）抗体を生成可能であるような方式で、抗原が免疫系に提示されるような正しい編成および配向で、前記巨大抗原、例えばVLPをディスプレイする部分上に、巨大および/または多量体抗原で「装飾」することが可能になる。可溶性抗原（巨大抗原、例えば多量体/五量体であっても）を用いてワクチン接種する伝統的なアプローチは、防御/中和/免疫原性効果を生じるにはより有効でない可能性がある。好適には、粒子、例えばVLPまたはナノ粒子上の抗原（例えば多量体抗原）のディスプレイは、可溶性抗原とは対照的に、免疫反応をロバストに誘発可能である同一抗原の幾何的反復アレイの提示を生じる。「遊離」抗原に比較して、より大きなサイズのVLPまたは他の適切な粒子はまた、より高い免疫原性効果を有しうる。さらに、多量体抗原、例えばHCMV五量体のディスプレイの配向は、免疫原性に重要でありうる。粒子上の多量体抗原に付着するための、対形成するタグ、例えば本明細書に記載するようなSpyTag-SpyCatcher系の使用は、抗原が特定の好適な配向で粒子に付着することを可能にする。例えば、HCMVの場合、gH/gLサブユニットは、「UL」サブユニットよりも中和エピトープを有する可能性がより低い可能性もある。したがって、好適には、本発明は、例えば、「UL」サブユニットが粒子の外側に向かってディスプレイされ、そしてしたがって個体の免疫系により容易に利用可能であるように、粒子上のHCMV五量体のディスプレイの配向が、第一のペプチドタグの適切な配置によって決定されることを可能にする。あるいは/さらに、抗原上の第一のペプチドタグの配置は、天然ウイルス上のものに対する抗原の類似の配向を生じるために決定されることも可能であり、それによって侵入性生ウイルスに対する免疫反応を誘導する可能性がより高い配向で抗原をディスプレイする粒子を、免疫系に提示する。

20

30

【0040】

対照的に、VLP上にタンパク質を提示するための伝統的なアプローチは化学連結を伴う可能性もあり、これは、こうした化学反応がよりランダムである可能性もあり、したがって、抗原の正しい（例えば免疫学的に好ましい）配向が確実に得られない可能性もあり、そして得られる連結反応のわずかな割合にしか相当しない可能性もあるという不利益を有する。さらに、化学コンジュゲート化に伴うプロセスは、適切な抗原提示のために必要な3D構造が維持されうる可能性を低くしうる。伝統的なアプローチのいくつかの不都合な点は、Bruneら 2016; Scientific Reports, 6: 19234, DOI: 10.1038/srep19234、Bruneら Bioconjugate Chemistry, 2017, 28, 1544-1551、およびLeneghanら(2017) Scientific reports, 7: 3811に記載される。

40

【0041】

50

同様に、ウイルスコートタンパク質への抗原の遺伝子融合は、ミスフォールディングに伴う問題、および2つの構成要素両方に関して最適な発現条件を決定する際の問題のため、困難であり、そして時間が掛かることが立証されてきている。さらに、遺伝子融合は、正しいコンホメーションでの有効な発現を達成することが非常に困難であるため、巨大抗原または多構成要素抗原の発現には適切ではないであろう。

【0042】

免疫原性であるようにタンパク質または抗原性構成要素を提示するため、天然タンパク質コンホメーションが維持され、そして随意に、適切であるならば、任意の翻訳後修飾が保持されるように、第一のペプチドタグの位置は、注意深く設計される必要がある。いくつかの抗原に関しては、グリコシル化の保持は、エピトープが提示される方式に影響を及ぼさないが、他のものに関しては、その維持または除去のいずれかが有効性を改善する。膜貫通タンパク質であるタンパク質構成要素に関しては、タンパク質構成要素の膜貫通部は、この配列が抗原性であるタンパク質構成要素のコンホメーションには関与せず、そして例えば、ワクチンにおいてはもはや必要とされない役割を提供するため、第一のペプチドタグを配置するための優れたターゲットを提供する。タンパク質構成要素に膜貫通タンパク質が含まれない場合、構成要素またはそのサブユニット（多量体の場合）のCまたはN末端に第一のペプチドタグを融合することが有益である可能性もあるが、第一のペプチドタグはまた、配列の任意のパートに含まれることも可能である。あるいは、第一のペプチドタグを、タンパク質または抗原性構成要素上のループ中に配置することも可能でありうる。

【0043】

免疫原性構成要素、例えばHCMV五量体の免疫原性構成要素を提示するため、第一のペプチドタグの位置は、天然タンパク質コンホメーションが維持されるように、注意深く設計される必要がある。HCMVに関して、1つの態様において、付着はgHサブユニットを通じ、適切にはgHサブユニットのC末端、またはgHサブユニットの膜貫通ドメイン（またはその部分）を通じる。五量体（または五量体の構成要素）のコンホメーションの維持に加えて、この合理的設計はまた、上に論じるように、粒子の外側に向けて、五量体のターゲット領域を提示する。本明細書において、ターゲット領域は、中和効果を持つ抗体を生じさせることが知られるタンパク質の部分であり、そしてまた、免疫原性部分とも称されうる。

【0044】

免疫原性構成要素、例えばRSVプレ融合Fタンパク質の免疫原性構成要素を提示するため、第一のペプチドタグの位置は、天然タンパク質コンホメーションが維持されるように、注意深く設計される必要がある。RSV-Fプレ融合タンパク質に関して、1つの態様において、付着は、適切には、Fプレ融合のC末端を通じ、該融合をコードする核酸の3'端を通じる。プレ融合Fタンパク質（またはその構成要素）のコンホメーションの維持に加えて、この合理的設計はまた、上に論じるような粒子の外側に向けて、プレ融合Fタンパク質の最も中和性であるエピトープを提示する。同じ考慮は、Fタンパク質の任意の他の変形にも当てはまるであろう。C末端での第一のペプチドタグの包含は、免疫原性タンパク質構成要素を正しくフォールディングしたままにして、うまく働くことが、本発明者らによって立証されてきている。

【0045】

1つの態様において、第一および第二のペプチドタグは、イソペプチド結合を形成可能なペプチドタグ/結合パートナー対のパーツである。このイソペプチド結合は、自発性であり、すなわち補助なしであるか、あるいは補助を必要とする、すなわちリガーゼまたは他のヘルパーを要する可能性もある。適切には、第一および第二のペプチドタグは、SpyTag/SpyCatcher対である。適切には、第一および第二のペプチドタグは、SpyTag/SpyCatcher、SnoopTag/SnoopTag JrおよびSnoopCatcher; RrgATag/RrgATag2/DogTagおよびRrgACatcher、IsopepTag/IsopepTag-NおよびPili

10

20

30

40

50

n - C または P i l i n - N、P s C s T a g および P s C s C a t c h e r ; ならびに S n o o p T a g J r および D o g T a g (S n o o p L i g a s e によって仲介される)、ならびにこれらすべての系の変異体、誘導体または修飾物を含むリストより選択される。

【 0 0 4 6 】

適切には、第一のペプチドタグは、ペプチドタグ / 結合パートナー対由来のペプチドタグ、例えば S p y T a g であり、そして第二のペプチドタグは、結合パートナー、例えば S p y C a t c h e r である。別の態様において、第一のペプチドタグは、結合パートナー、例えば S p y C a t c h e r であり、そして第二のペプチドタグは、ペプチドタグ / 結合パートナー対由来のペプチドタグ構成要素、例えば S p y T a g である。

10

【 0 0 4 7 】

適切には、第一のペプチドタグは、ペプチドタグ / 結合パートナー対由来のペプチドタグ、例えば S n o o p T a g であり、そして第二のペプチドタグは、結合パートナー、例えば S n o o p C a t c h e r である。別の態様において、第一のペプチドタグは、結合パートナー、例えば S n o o p C a t c h e r であり、そして第二のペプチドタグは、ペプチドタグ / 結合パートナー対由来のペプチドタグ構成要素、例えば S n o o p T a g である。したがって、第一のペプチドタグが、「タグ」または「キャッチャー」のいずれかであってもよく；第二のペプチドタグが、この対のパートナー、それぞれ「キャッチャー」または「タグ」であってもよいことがわかる。適切なペプチドタグ / 結合パートナー対は、本明細書に援用される、W O 2 0 1 1 / 0 9 8 7 7、W O 2 0 1 6 / 1 9 3 7 4 6、W O 2 0 1 8 / 1 8 9 5 1 および W O 2 0 1 8 / 1 9 7 8 5 4 に詳細に記載される。

20

【 0 0 4 8 】

1つの態様において、タンパク質または抗原性構成要素は、第一のペプチドタグとして、S p y T a g、S n o o p T a g、R r g A T a g、R r g A T a g 2、D o g T a g、I s o p e p T a g、I s o p e p T a g - N、P s C s T a g および S n o o p T a g J r の任意の1つに付着する。

【 0 0 4 9 】

第一のペプチドタグは、必要であれば、剛直でもまたは柔軟でもよいリンカーを通じて付着していることも可能である。当業者は、どのリンカーが適切であるか認識するであろう。

30

【 0 0 5 0 】

別の態様において、部分は、第二のペプチドタグとして、S p y C a t c h e r、S n o o p C a t c h e r、R r g A C a t c h e r、P i l i n - C、P i l i n - N、P s C s C a t c h e r および D o g T a g (S n o o p L i g a s e によって仲介される) のいずれか1つに付着する。

【 0 0 5 1 】

部分は、以前論じられるように、合成多量体化プラットフォームを含む、任意の適切な部分であることも可能である。

第二のペプチドタグを、フォールディングし、そして適切なコンホメーションを形成する能力に影響を及ぼさない、部分中の任意の適切な位置に付着させることも可能である。遺伝子融合が好ましい可能性もある。部分のCまたはN末端に第二のペプチドタグを含むことが好ましい可能性もあるが、第二のペプチドタグは、配列の任意の部分中にもまた含まれてもよい。あるいは、第二のペプチドタグを、部分のループ中に配置することも可能でありうる。例えば、RNAバクテリオファージAP205のウイルスコートタンパク質(CP3)のN末端へのSpy Catcherの遺伝子融合が、Bruner, Scientific Reports volume 6, 論文番号: 19234 (2016)に記載される。多量体化プラットフォームとして自己集合合成タンパク質を用いる代替融合が、Bruun, ACS Nano, 2018, 12(9), pp 8855 - 8866に論じられる。あるいは、第二のペプチドタグを、化学コンジュゲート化を通じて付着させることも可能である。

40

50

【0052】

第二のペプチドタグは、必要であれば、強固でもまたは柔軟でもよいリンカーを通じて付着していることも可能である。当業者は、どのリンカーが適切であるか認識するであろう。

【0053】

1つの態様において、抗原性構成要素、例えばHCMV五量体またはその免疫原性構成要素をSpyTagに付着させる。適切なSpyTagは、配列番号30に示すアミノ酸配列を有する。

【0054】

SpayTagは、リンカーを通じて付着していることも可能である。適切なリンカーには、配列番号29に示すアミノ酸配列を有するリンカーが含まれる。

別の態様において、部分は、SpyCatcher結合パートナー（第二のペプチドタグ）に付着する。部分は、適切には、HBsAgであることも可能である。適切なSpyCatcherは、配列番号38に示すアミノ酸配列を有する。1つの態様において、SpyCatcherは、リンカーを通じて付着する。リンカーは、剛直性リンカーまたは柔軟性リンカーであることも可能であり、適切には、リンカーは、配列番号39に示すアミノ酸配列を有する。

【0055】

別の態様において、タンパク質組成物または抗原性組成物は、本発明の任意の側面または態様にしたがって、別の、好ましくは異なる、第一のペプチドタグを含むタンパク質を、さらに含む。

【0056】

別の態様において、本発明の任意の側面または態様にしがった組成物は、別の、好ましくは異なる、第一のペプチドタグを含む抗原、例えば別のHCMV抗原を、さらに含む。適切には、他のHCMV抗原は糖タンパク質Bである。適切には、糖タンパク質B配列は、例えばW02014/005959に記載される。配列番号21、22、23または36を参照されたい。1つの態様において、組成物は、HCMV五量体および他のHCMV抗原の両方をディスプレイする粒子（例えばVLP）を含む。

【0057】

1つの態様において、組成物は、免疫原性組成物またはワクチン組成物である。好ましくは、前記免疫原性またはワクチン組成物は、個体への投与に際して、免疫反応、例えば抗体反応を誘導可能なものである。適切には、免疫反応は、防御免疫反応であることも可能である。適切な免疫原性組成物は、アジュバント、免疫刺激剤および/または薬学的に許容されうる賦形剤を含むさらなる構成要素をさらに含むことも可能である。

【0058】

適切なアジュバントは、例えば、アルミニウム、ペプチド、スクアレン、リポソーム、水中油エマルジョンおよびサポニンに基づくことも可能であり、そしてこれには、Alhydrogel（登録商標）、MF59、AS01、マトリックスM、ムラミルジペプチドおよびQuilAが含まれることも可能である。油中水アジュバントもまた適切である。スクアレン-水中油エマルジョン、例えばAddavaxTMが適切である。

【0059】

したがって、本発明の別の側面または態様において、本発明にしがった組成物を含む免疫原性またはワクチン組成物を提供する。適切には、ワクチン組成物は、免疫原性、好ましくは感染性病原体/ベクターからの免疫防御効果、例えばHCMV感染からの中和効果を提供する、本発明にしがった組成物のある量である、ワクチン用量を含む。適切には、ワクチン組成物は、感染性病原体/ベクターからの中和効果、例えばRSV感染からの中和効果を提供する、本発明にしがった組成物のある量であるワクチン用量を含む。免疫原性組成物に対して生成された抗体、好ましくは、中和抗体は、例えば本明細書に記載するように、標準化ELISAアッセイまたはマイクロ中和アッセイを含む、当業者によく知られる方法によって、検出し、そして測定することも可能である。

10

20

30

40

50

【0060】

別の側面にしたがって：

- i) 第一のペプチドタグを含む部分
- ii) 第二のペプチドタグを含むタンパク質

を含み、

前記の第一のペプチドタグおよび前記の第二のペプチドタグはイソペプチド結合を形成する

VLPを提供する。いくつかの態様において、部分はHBsAgである。しかし、先に記載するように、任意の適切な部分を用いることも可能である。

【0061】

適切には、第一のペプチドタグは、ペプチドタグ/結合パートナー対由来のペプチドタグ、例えばSpyTagであり、そして第二のペプチドタグは、結合パートナー、例えばSpyCatcherである。別の態様において、第一のペプチドタグは、結合パートナー、例えばSpyCatcherであり、そして第二のペプチドタグは、ペプチドタグ/結合パートナー対由来のペプチドタグ、例えばSpyTagである。他の適切なペプチドタグ/結合パートナー対が本明細書に記載され、そして当業者に知られるであろう。適切には、第一および第二のペプチドタグは、SpyTag/SpyCatcher、SnoopTag/SnoopTag JrおよびSnoopCatcher; RrgATag/RrgATag 2/DogTagおよびRrgACatcher、IsopepTag/IsopepTag-NおよびPilin-CまたはPilin-N、PsCsTagおよびPsCsCatcher; ならびにSnoopTag JrおよびDogTag (SnoopLigaseによって仲介される)、ならびにこれらすべての系の変異体、誘導体または修飾物を含むリストより選択される。

【0062】

適切には、第二のペプチドタグを含むタンパク質は、50kDaより大きいタンパク質またはペプチド複合体である。第二のペプチドタグを含むタンパク質は、50kDa、60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDaまたは160kDa、170kDa、180kDa、190kDaまたはそれより大きい、例えば200kDaより大きい、300kDaより大きい、あるいは400kDaより大きい、タンパク質またはペプチド複合体であることも可能である。

【0063】

1つの態様において、第二のペプチドタグを含むタンパク質は、多量体タンパク質である。1つの態様において、第二のペプチドタグを含むタンパク質は、抗原、好ましくは多量体抗原である。適切には、多量体抗原は、本明細書に記載するようなHCMV五量体であることも可能である。適切には、タンパク質は、RSV-Fタンパク質またはその誘導体(例えばプレ融合Fタンパク質)であることも可能である。1つの態様において、第二のペプチドタグを含むタンパク質は、HCMV五量体の免疫原性構成要素である。本明細書に記載する通りであり、そして適切なリンカーおよびタグを含むHCMV五量体(gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131)は、160kDaを超える分子量を有する。他の適切な巨大または多量体タンパク質または抗原には、例えばインフルエンザウイルス、RSV等のウイルスを含む、他の感染性病原体由来の抗原が含まれる。

【0064】

好適には、この方法において、キャリアー(VLP)として、HBsAgを用いることもまた、あるいは抗B型肝炎ウイルス(HBV)反応とも記載される、抗HepBブーストを生じる可能性がある。

【0065】

別の側面において：

- i) 第一のペプチドタグを含むタンパク質
- ii) 第二のペプチドタグを含む部分

10

20

30

40

50

を含み、

前記の第一のペプチドタグおよび前記の第二のペプチドタグはイソペプチド結合を形成する

VLPを提供する。いくつかの態様において、部分はHBsAgである。しかし、先に記載するように、任意の適切な部分を用いることも可能である。

【0066】

適切には、第一のペプチドタグは、ペプチドタグ/結合パートナー対由来のペプチドタグ、例えばSpyTagであり、そして第二のペプチドタグは、結合パートナー、例えばSpyCatcherである。別の態様において、第一のペプチドタグは、結合パートナー、例えばSpyCatcherであり、そして第二のペプチドタグは、ペプチドタグ/結合パートナー対由来のペプチドタグ構成要素、例えばSpyTagである。他の適切なペプチドタグ/結合パートナー対が本明細書に記載され、そして当業者に知られるであろう。適切には、第一および第二のペプチドタグは、SpyTag/SpyCatcher、SnoopTag/SnoopTag JrおよびSnoopCatcher; RrgATag/RrgATag 2/DogTagおよびRrgACatcher、IsopepTag/IsopepTag-NおよびPilin-CまたはPilin-N、PscsTagおよびPscsCatcher; ならびにSnoopTag JrおよびDogTag (SnoopLigaseによって仲介される)、ならびにこれらすべての系の変異体、誘導体または修飾物を含むリストより選択される。

【0067】

適切には、第一のペプチドタグを含むタンパク質は、50kDaより大きいタンパク質またはペプチド複合体である。第一のペプチドタグを含むタンパク質は、50kDa、60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDaまたは160kDaあるいはそれより大きい、特に200kDa、300kDaまたはさらに400kDaより大きい、タンパク質またはペプチド複合体であることも可能である。1つの態様において、第一のペプチドタグを含むタンパク質は、多量体タンパク質である。1つの態様において、第二のペプチドタグを含むタンパク質は、抗原、好ましくは多量体抗原である。適切には、多量体抗原は、本明細書に記載するようなHCMV五量体であることも可能である。適切には、タンパク質は、RSV-Fタンパク質またはその誘導体(例えばプレ融合Fタンパク質)であることも可能である。1つの態様において、第一のペプチドタグを含むタンパク質は、HCMV五量体の免疫原性構成要素である。本明細書に記載する通りであり、そして適切なリンカーおよびタグを含むHCMV五量体(gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A)は、160kDaを超える分子量を有する。他の適切な巨大または多量体タンパク質または抗原には、例えばインフルエンザウイルス、RSV等のウイルスを含む、他の感染性病原体由来の抗原が含まれる。

【0068】

好適には、この方法において、キャリアー(VLP)として、HBsAgを用いることもまた、抗HBVブーストを生じる可能性がある。

本発明の別の側面において、本明細書に記載するような、SpyTagに連結されたHCMV五量体を提供する。

【0069】

本発明の別の側面にしたがって、本発明にしたがった組成物またはVLPを産生するための方法であって:

- 第一のペプチドタグへの第一のタンパク質の第一の遺伝子融合物をコードする第一の核酸を、第一の宿主細胞内に導入し;
- 前記の第一の宿主細胞を、前記の第一の遺伝子融合物を発現するための条件下でインキュベーションし; 随意に、発現された構成要素を精製し;
- 第二のペプチドタグへの第二のタンパク質の第二の遺伝子融合物をコードする第二の核酸を、第二の宿主細胞内に導入し;

10

20

30

40

50

- 前記の第二の宿主細胞を、前記の第二の遺伝子融合物を発現するための条件下でインキュベーションし；随意に、発現された構成要素を精製し；

- 発現された構成要素を、第一のペプチドタグおよび第二のペプチドタグの間のイソペプチド結合の形成のための条件下でインキュベーションし；随意に、生じた組成物を精製する

工程を含む、前記方法を提供する。

【0070】

適切には、発現された構成要素は、イソペプチド結合を形成するために、ともにインキュベーションされる。イソペプチド結合の形成は、リガーゼまたは類似のものとの同時インキュベーションを必要とすることも可能である。

10

【0071】

適切には、本発明にしたがって、組成物またはVLPを産生する方法は、VLP上にディスプレイされる抗原性構成要素を含む組成物を産生するためであることも可能である。

いくつかの態様において、「HCMV五量体の免疫原性構成要素」がHCMV五量体全体を含む場合、HCMV五量体の構成要素の組換え産生は、五量体が形成されるとともに集合のために正しくフォールディングされるために、各サブユニットが正しい化学量論で発現されることを必要とする。これらの態様において、必要な五量体のパーツのみの複合体（例えばgH/gL二量体および四量体、または5つのサブユニットのいずれか1つを欠く四量体）を、最終産物から排除する必要がある。好適には、本発明は、構成要素を別個に作製し、そして次いでこれらをコンジュゲート化する単純なアプローチを提供することにより、1つの系におけるワクチン構成要素のすべて（すなわちHBsAgおよびHCMV五量体の5つのサブユニット）を発現することによって、そうでなければ関連するであろう問題を克服する。したがって、1つの態様において、精製タグをUL130（Hofmannら、DOI 10.1002/bit.25670）上に取り込む。類似の原理は、他の免疫原性構成要素に適用可能であろう。

20

【0072】

いくつかの態様において、「RSV-Fタンパク質の免疫原性構成要素」が、Fタンパク質またはその誘導体全体を含む場合、Fタンパク質またはその誘導体の構成要素の組換え産生は、プレ融合Fタンパク質三量体を含む誘導体とともに、集合のため正しくフォールディングされることを必要とする。

30

【0073】

適切には、方法は、HBsAg VLP上でディスプレイされるHCMV五量体を含む組成物を産生するためである。適切には、方法は、HBsAg VLP上にディスプレイされるRSV-Fプレ融合Fタンパク質三量体を含む組成物を産生するためである。

【0074】

本発明の別の側面において、疾患の予防および/または治療において使用するためのワクチンを提供する。適切には、前記ワクチンは、本発明の任意の側面または態様にしたがった組成物またはVLPを含む。1つの態様において、疾患はHCMV感染である。別の側面において、HCMV治療の予防法を提供する。適切には、ワクチンはヒトにおける使用のためである。適切には、ワクチンは、成人、例えば生殖年齢の女性または妊娠女性における使用のためである。別の側面において、本発明は、個体においてHCMVに関する免疫原性反応、例えば防御免疫反応を誘導する方法であって、本発明の任意の側面または態様にしたがった組成物を投与する工程を含む、前記方法を提供する。

40

【0075】

本発明の別の側面において、薬剤として使用するための本発明の任意の側面にしたがった組成物を提供する。

本発明のさらなる側面において、ワクチン、好ましくはHCMV感染の予防および/または治療において使用するためのワクチンとして使用するための、本発明の任意の側面にしたがった組成物を提供する。本発明にしたがって、薬剤またはワクチンとして使用するための組成物は、成人、例えば生殖年齢の女性または妊娠女性に投与されることも可能で

50

ある。

【0076】

別の側面において、本発明は、本発明にしたがった方法において使用するための核酸分子を提供する。1つの態様において、本発明にしたがった核酸分子は、配列番号27~41のいずれかに示すようなアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。1つの態様において、本発明にしたがった核酸分子は、配列番号12~26または42~46のいずれかに示すような核酸配列を含む。

【0077】

別の側面において、本発明は、配列番号27~41に示すアミノ酸配列をコードする核酸分子を含む、複数の核酸分子を提供する。1つの態様において、本発明の核酸分子には、配列番号12~26または42~46のいずれかに示すような配列を有するものが含まれる。

10

【0078】

別の側面において、本発明は、本発明にしたがった方法において使用するための核酸分子を提供する。1つの態様において、本発明にしたがった核酸分子は、配列番号50~58のいずれかに示すようなアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。1つの態様において、本発明にしたがった核酸分子は、配列番号47~55のいずれかに示すような核酸配列を含む。

【0079】

別の側面において、本発明は、配列番号50~58に示すようなアミノ酸配列をコードする核酸分子を含む、複数の核酸分子を提供する。1つの態様において、本発明の核酸分子には、配列番号47~55のいずれかに示すような配列を有するものが含まれる。

20

【0080】

別の側面において、本発明は、本発明にしたがった単数の核酸分子または複数の核酸分子を含むベクターを提供する。適切には、ベクターは、本発明にしたがった組成物の任意の構成要素のアミノ酸配列を発現するための発現ベクターである。

【0081】

別の側面において、本発明は、本発明にしたがった組成物の構成要素を発現するための宿主細胞を提供する。適切な宿主細胞は、これらの構成要素の一過性または安定発現のためのものであることも可能である。CMVタンパク質を発現するための方法および宿主細胞は、例えば、どちらも本明細書に援用される、WO2014/005959およびWO2016/067239に記載される。いくつかの態様において、構成要素はグリコシル化されていることも可能である。

30

【0082】

本発明の別の側面において、プライム-ブーストワクチン接種措置において使用するための、本発明にしたがった組成物を含むキットを提供する。適切には、前記キットは、本発明にしたがった第一の免疫原性組成物を含むプライム組成物、および本発明にしたがった第二の免疫原性組成物を含むブースト組成物を含むことも可能である。あるいは、単回または複数回用量ワクチン接種措置、すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9または10用量を提供するキットを提供することも可能である。したがって、別の側面において、本発明は、およそ3週間間隔で適用される用量を含む投薬措置を提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】非還元および還元条件下での精製五量体SpyTagのSDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析。レーン1：サイズをkDaで示したColorPlusプレ染色広範囲タンパク質ラダー；レーン2：非還元試料；レーン3：還元試料。A) SDS-PAGEおよびクマシー染色分析、非還元はゲルの左に、そして還元は右に、HCMV五量体構成要素の位置を示す。B) 抗HCMV五量体抗体を用いたウェスタンブロット分析。

【図2】非還元(NR)および還元条件(R)下での精製SpyCatcher-HBs

50

A g の S D S - P A G E および ウェスタンブロット分析。A) S D S - P A G E および クーマシー染色分析。B) 抗 H B s A g モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット分析。

【図 3】s 2 0 0 i n c r e a s e 3 . 2 / 3 0 0 カラムを用いた H P L C 分析。A) 1 0 μ l の精製 H C M V 五量体 S p y T a g を装填し、そしてこれは単一ピークとして溶出された。B) 1 0 μ l の精製 S p y C a t c h e r - H B s A g を装填し、そしてこれはカラムのポイド容量で単一主ピークとして溶出された。

【図 4】還元条件下でのコンジュゲート化五量体 - S p y T a g および S p y C a t c h e r - H B s A g の S D S - P A G E および ウェスタンブロット分析。1 : サイズを k D a で示した C o l o r P l u s プレ染色広範囲タンパク質ラダー ; 2 : コンジュゲート化 ; 3 : 五量体 - S p y T a g ; 4 : S p y C a t c h e r - H B s A g 。A) S D S - P A G E および クーマシー染色分析。B) 抗 H B s A g モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット。C) 抗五量体ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット。

10

【図 5】s 2 0 0 i n c r e a s e 3 . 2 / 3 0 0 カラムを用いた H P L C 分析。3 0 μ l のコンジュゲート化五量体 - S p y T a g - S p y C a t c h e r - H B s A g を装填し、そしてこれはカラムのポイド容量で単一主ピークとして溶出された。

【図 6】A d d a v a x でアジュバント化した、H C M V 五量体 - H B s A g ワクチン対五量体タンパク質ワクチンの免疫原性、単回免疫後。可溶性タンパク質として、または五量体 - H B s A g V L P としてのいずれかで、B A L B / c マウスを 1 μ g または 0 . 1 μ g の H C M V 五量体 - S p y T a g で免疫した。マウス血清から、標準化 E L I S A によって、力価を測定した。線は平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す (n = 1 0) 。H C M V 五量体 - H B s A g V L P で免疫したマウスは、H C M V 五量体タンパク質のみで免疫したマウスと比較して、五量体で同等である V L P 用量が 1 0 x 低い場合であっても、実質的により強い血清 I g G 抗体反応を示す。

20

【図 7】五量体タンパク質ワクチンと比較した、H C M V 五量体 - H B s A g ワクチンで免疫したマウスの血清における中和活性。ワクチンを A d d a v a x でアジュバント化し、そして 1 回 (プライム後) または 2 回の免疫 (ブースト後) 後の反応を示す。A D 1 6 9 w t 1 3 1 株 (機能的五量体をディスプレイする) に感染した A R P E - 1 9 細胞上で、N T 5 0 を測定した。同じアッセイにおける C y t o g a m および商業的に入手可能な中和抗 g H m A b (B i o - R a d A n t i b o d i e s の H C M V 1 6 (5 1 C 1)) に関する中和力価を示す。

30

【図 8】1 回または 2 回の免疫後の、アジュバント化されていない H C M V 五量体 - H B s A g ワクチン対五量体タンパク質ワクチンの免疫原性。1 μ g または 0 . 1 μ g の S p y C a t c h e r - H B s A g にコンジュゲート化された H C M V 五量体 - S p y T a g (五量体 - H B s A g) 、あるいは 1 μ g の五量体 - S p y T a g タンパク質で、B A L B / c マウスを免疫した。マウス血清由来の標準化 E L I S A によって力価を測定した。線は平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す (n = 1 0) 。H C M V 五量体 - H B s A g V L P で免疫したマウスは、H C M V 五量体タンパク質のみで免疫したマウスと比較して、五量体で同等である V L P 用量が 1 0 x 低い場合であっても、実質的により強い血清 I g G 抗体反応を示す。

40

【図 9】五量体タンパク質ワクチンと比較した、H C M V 五量体 - H B s A g ワクチンで免疫したマウスの血清における中和活性。ワクチンはアジュバント化されず、そして 1 回 (プライム後) または 2 回の免疫 (ブースト後) 後の反応を示す。A D 1 6 9 w t 1 3 1 株 (機能的五量体をディスプレイする) に感染した A R P E - 1 9 細胞上で、N T 5 0 を測定した。同じアッセイにおける C y t o g a m および商業的に入手可能な中和抗 g H m A b (B i o - R a d A n t i b o d i e s の H C M V 1 6 (5 1 C 1)) に関する中和力価を示す。

【図 1 0】非還元および還元条件下での精製 R S V - F - S p y T a g の S D S - P A G E および ウェスタンブロット分析。A) S D S - P A G E および クーマシー染色分析、レーン 1 : C o l o r P l u s プレ染色広範囲タンパク質ラダー ; レーン 2 : 非還元試料 ;

50

レーン3：還元試料。B) 抗RSV-Fモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット分析、レーン1：ColorPlusプレ染色広範囲タンパク質ラダー；レーン2：非還元試料；レーン3：還元試料。

【図11】還元条件下でのSpyCatcher-HBsAgとコンジュゲート化されたRSV-F-SpyTagのSDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析。1：ColorPlusプレ染色広範囲タンパク質ラダー；2：RSV-F-SpyTag-SpyCatcher-HBsAgコンジュゲート、3：RSV-F-SpyTag、4：SpyCatcher-HBsAg。A) SDS-PAGEおよびクマシー染色分析。B) 抗HBsAgモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット。C) 抗RSV-Fモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット。

10

【図12】コンジュゲート化RSV-F-SpyTag-SpyCatcher-HBsAg(「Sc9-10-HBsAg」)対非コンジュゲート化RSV-F-SpyTag(「Sc9-10」)の免疫原性。アジュバント化されないかまたはAddavaxTMでアジュバント化されたかいずれかの、1μgのSpyCatcher-HBsAgにコンジュゲート化されたRSV-F-SpyTag(RSV-F VLP)または1μgのRSV-F-SpyTagタンパク質で、BALB/cマウスを免疫した。

【発明を実施するための形態】

【0084】

ウイルス様粒子

伝統的には、ワクチンアプローチは、弱毒化されたまたは死んだ全病原体を用いていたが、これは、適切な病原体由来のタンパク質を含む組換えサブユニットの使用によって置き換えられてきている。より最近では、ウイルス様粒子(VLP)を用いるアプローチが開発されてきている。VLPは、サイズ(およそ20~200nm)、その形状およびその反復タンパク質配置がウイルスに似ているが、病原体由来のいかなる遺伝子材料も欠く粒子である。そのサイズのため、VLPはリンパ節により排出されやすく、抗原提示細胞による取り込みおよび提示に理想的となる。さらに、その反復構造は、補体固定およびB細胞受容体架橋を容易にする(Kushnirら Vaccine 2012; Vol 31(1): 58-83)。しかし、これらの作用機構は理論には制限されない。

20

【0085】

HCMV

ヒトサイトメガロウイルス(HCMV、ヒトヘルペスウイルス-5(HHV-5)としてもまた知られる)は、大部分の成人が曝露されたことがあるウイルスであり、最初の感染は通常、単に軽症であるかまたは無症候性である。感染後、ウイルスは体内で潜在性であるが、免疫低下している者または高齢者においては、深刻な疾患を引き起こしうる。HCMVはまた、発展途上国において、先天異常の主な感染性の原因である。最大4人/200人の赤ちゃんが先天性感染のためHCMVを持って生まれ、そしてこれらのうち最大10%が長期の結果に苦しむ。HCMV感染は、成人において、高血圧およびアテローム性動脈硬化症と関連付けられてきている(Chengら(2009年5月) Frueh K監修 "Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure". PLoS Pathog. 5(5): e1000427)。

30

40

【0086】

ウイルスタンパク質gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131Aを含むHCMVの五量体複合体は、この複合体に対する抗体が、上皮細胞内へのウイルスの進入を中和するとともに、周産期のHCMV伝染リスクを減少させることが可能であるという観察に基づいて、HCMVの潜在的に有用なワクチンターゲットと同定されてきている。しかし、集中的な努力にもかかわらず、成功したHCMVワクチンは今日まで開発されてきていない。

【0087】

HCMV五量体

50

臨床的単離体および実験室株を含むHCMV株は、ゲノム配列が異なる。HCMV株には、マーリン(GI:155573956)、タウン(GI239909366)およびAD169(GI:219879600)、トレド(GI290564358)およびTB40/Eが含まれる。HCMVは、多数の膜タンパク質およびタンパク質複合体を含有する。五量体タンパク質gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131Aは、上皮および内皮細胞のHCMV感染に重要であり、エンドサイトーシス経路を通じると考えられる。この複合体の構成要素の他の組み合わせは、例えば線維芽細胞の感染に重要であると示されてきている。「pUL」サブユニット/構成要素はまた、「UL」とも称され;「pUL131」はまた、「pUL131A」および「pUL131a」、または「UL131A」とも称される。

10

【0088】

多様なHCMV株がATCCに寄託されてきており、そして:マーリン(VR-1590)、タウン(VR-977)およびAD169(VR-538)として見出されうる。ゲノム配列は、寄託番号:マーリン(AY446894.2)、タウン(GO121041.1)、AD169(FJ527563.1)、トレド(GU37742.2)およびTB40/E(KF297339.1)を通じて参照されうる。

【0089】

RSV

呼吸器合胞体ウイルスは、世界中で、小児における深刻な呼吸器疾患の主因である。5歳未満の小児、概算340万人が、深刻なRSV下気道感染で毎年入院し、生後6ヶ月未満の小児において発生率が最高である。1歳未満の乳児において、そして発展途上国において、大部分の死亡が起こる。現在、防止および制御のためのオプションは限定されている。

20

【0090】

RSV-Fプレ融合三量体

F糖タンパク質は、I型ウイルス融合タンパク質である。RSV F前駆体(F0)は2つの部位でフェューリン様プロテアーゼによって切断され、3つの断片を生じると考えられる。より短いN末端断片(F₂)は、2つのジスルフィド結合によって、より大きいC末端断片(F₁)に共有結合する。27アミノ酸の介在する断片は、切断後に解離し、そして成熟タンパク質中には見られない。

30

【0091】

先に論じるように、多くの安定化プレ融合F三量体が利用可能である。本明細書に提起する例において、これらのプレ融合三量体をコードする例示的配列は、配列番号48、48、54および55に見出される。SpyTagとの融合を含む配列は、配列番号47および53として含まれる。アミノ酸配列は、プレ融合三量体に関しては配列番号51、52、57および58として示され、そしてSpyTagを含むものは配列番号40および56である。他の例示的な配列に本明細書で言及する。

【0092】

タンパク質タグ/結合パートナー対

自発的なイソペプチド結合形成が可能であるタンパク質(いわゆる「イソペプチドタンパク質」)は、互いに共有結合し、そして不可逆的相互作用を提供するペプチドタグ/ポリペプチド結合パートナー対(すなわち2パーツリンカー)を発展させるために好適に用いられてきている(例えばどちらも本明細書に援用されるWO2011/098772およびWO2016/193746とともに、どちらも本明細書に援用されるWO2018/189517およびWO2018/197854を参照されたい)。これに関連して、自発的イソペプチド結合形成が可能なタンパク質は、ペプチドタグおよびペプチドタグのポリペプチド結合パートナーを提供する、別個の断片として発現されることも可能であり、ここで2つの断片は、イソペプチド結合形成によって、共有再構築が可能であり、それによって、ペプチドタグおよびそのポリペプチド結合パートナーに融合した分子または構成要素を連結する。ペプチドタグおよびそのポリペプチド結合パートナーによって形成

40

50

されるイソペプチド結合は、非共有相互作用が、例えば、長時間（例えば数週間）に渡って、高温（少なくとも95℃まで）、高圧で、または厳しい化学処理（例えばpH 2～11、有機溶媒、界面活性剤または変性剤）で、急速に解離するであろう条件下で安定である。

【0093】

イソペプチド結合は、カルボキシル/カルボキサミドおよびアミノ基の間で形成されるアミド結合であり、ここで、カルボキシルまたはアミノ基の少なくとも1つは、タンパク質主鎖（タンパク質の骨格）の外側にある。こうした結合は、典型的な生物学的条件下では化学的に不可逆的であり、そしてこれらは大部分のプロテアーゼに耐性である。イソペプチド結合は、本質的に共有性であるため、これらは最強と測定されるタンパク質-タン

10

【0094】

簡潔には、2パーツリンカー、すなわちペプチドタグおよびそのポリペプチド結合パートナー（いわゆるペプチドタグ/結合パートナー対）は、イソペプチド結合を自発的に形成可能なタンパク質（イソペプチドタンパク質）に由来することも可能であり、ここで、タンパク質のドメインは、別個に発現されて、イソペプチド結合に関与する残基（例えばアスパラギン酸またはアスパラギン、あるいはリジン）の1つを含むペプチド「タグ」、ならびにイソペプチド結合に関与するもう一方の残基（例えばリジン、あるいはアスパラギン酸またはアスパラギン）およびイソペプチド結合を形成するために必要な少なくとも1つの他の残基（例えばグルタミン酸）を含むペプチドまたはポリペプチド結合パート

20

【0095】

イソペプチド結合の自発的形成は孤立していることも可能であり、そしていかなる他の実体も添加する必要がないことも可能である。いくつかのペプチドタグおよびタグパート

30

【0096】

SpyTag/SpyCatcherと称されるペプチドタグ/結合パートナー対（2パーツリンカー）は、化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）FbaBタンパク質（Zakeriら、2012、Proc Natl Acad Sci U S A 109, E690-697）のCnaB2ドメインに由来し、そしてワクチン開発を含む多様な適用に用いられてきている（Bruneら、2016、Scientific reports 6, 19234; Thraneら、2016、Journal of Nanobiotechnology 14, 3

40

【0097】

適切には、第一および第二のペプチドタグは、SpyTag/SpyCatcherと称されるペプチドタグ/結合対を形成する。適切には、SpyCatcher構成要素は、「SpyCatcher」と比較して、N末端に23のアミノ酸一部切除を有する、デルタN1（N1）SpyCatcherである（Li, L., Fierer, J. O., Rapoport, T. A. & Howarth, M. Structural analysis and optimization of the covalent association between SpyCatcher and a peptide Tag. J. Mol. Biol. 426, 309-

50

317(2014)に記載される通り)(配列番号38)。

【0098】

他の態様において、第一および第二のペプチドタグは、例えば、同時係属出願GB1706430.4に記載されるものなどの、イソペプチド結合形成に関する反応速度増加を示すSpyTag/SpyCatcherの突然変異型であるペプチドタグ/結合対を形成する。いくつかの態様において、これらの突然変異型は、巨大タンパク質(例えば>50kDaまたは>100kDa、例えば本明細書に記載するような>160kDa HCMV五量体タンパク質)の付着に、および/または緩慢な反応または立体障害が問題となりうる場合に、有用でありうる。

【0099】

他の態様において、イソペプチドタンパク質には、例えばWO 2016/193746に記載されるSnoopTag/SnoopCatcherが含まれることも可能である。

【0100】

いくつかの態様において、イソペプチドタンパク質の一方または両方は、NまたはC末端一部切除を有しながら、なお、イソペプチド結合の反応性を保持することも可能である。

【0101】

例示的な第一および第二のペプチドタグ対(ペプチドタグ/結合パートナー対;反応性対)は、例えば、WO2011/098722、WO2016/193746、GB1706430.4、GB1705750.6またはLi, L.ら, J. Mol. Biol. 426, 309-317(2014)に記載され、以下の表に記載される。

【0102】

10

20

30

40

50

【表 1】

	反応性対		
(a)	SpyTag	SpyCatcher	10
	SpyTag002		
	SpyTag002 RG T3H		
(b)	SpyTag	SpyCatcher002	10
	SpyTag002		
	SpyTag002 RG T3H		
(c)	SpyTag	SpyCatcher002 D5A A92P Q100D	20
	SpyTag002		
	SpyTag002 RG T3H		
(d)	SnoopTag	SnoopCatcher	
	SnoopTagJr		
(e)	RrgATag	RrgACatcher	30
	RrgATag2		
	DogTag		
(f)	Isopeptag	Pilin-C	30
(g)	Isopeptag-N	Pilin-N	
(h)	PsCsTag	PsCsCatcher	
(i)	SnoopTagJr	DogTag [SnoopLigase によって仲介される]	40

【0103】

結合対の変異体、誘導体および修飾物は、任意の適切な手段によって作製されてもよい。変異体、誘導体および機能的に有効な修飾物は、適切な結合パートナーとイソペプチド結合を形成する能力に関して同じ機能を保持する、アミノ酸付加、置換、改変または欠失を伴うことも可能である。

【0104】

いくつかの結合対に関しては、酵素などの第三の実体による仲介が必要である。例えば S n o o p L i g a s e は、S n o o p T a g J r および D o g T a g の間の結合形成を仲介するために用いられうる。したがって、対形成は、リガーゼなどの酵素の補助を必要

としうる。

【0105】

HBsAg

「HBsAg」によって、B型肝炎ウイルスに由来する表面抗原(HBsAg)またはその一部を意味する。1つの態様において、HBsAgは、HBsAgのN末端、例えば、B型肝炎ウイルス(adw血清型)のSタンパク質の226アミノ酸を含む、配列番号41中に示すようなHBsAg配列を指すことも可能である。適切には、HBsAgには、Valenzuelaら、(1979) 'Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen' 10

Nature 280: 815 - 819に記載されるような、B型肝炎ウイルス(adw血清型)プレS2タンパク質の4つのカルボキシ末端残基に相当する、4アミノ酸配列、Pro Val Thr Asnが含まれる。HBsAgより形成されるVLPは、Recombivax HB(https://vaccines.procon.org/sourcefiles/recombivax_package_insert.pdf)、およびEnergiX B(https://au.gsk.com/media/217195/engerix-b_pi_006_approved.pdf)を含めて、B型肝炎に対する臨床的使用のために認可されてきている(Kushnirら Vaccine 2012; Vol 31(1): 58 - 83)。HBsAgはまた、フェーズIII臨床試験を完了し、そして現在まで、最も進歩したマラリアワクチンである、前赤内期マラリアワクチンRTS,Sの基礎としても用いられてきている(http://www.malariavaccine.org/sites/www.malariavaccine.org/files/content/page/files/RTSS%20FAQs_FINAL.pdf; KaslowおよびBiernaux, Vaccine 2015, Vol. 33(52): 7425 - 7432)。 20

【0106】

リンカーの詳細

タンパク質(例えばVLPおよび装飾抗原)の間の距離は、タンパク質中の抗原性エピトープの利用可能性、単数または複数のタンパク質の安定性に影響を有する可能性もあり、そしてまた、イソペプチド結合パートナー(例えばSpyTag/SpyCatcher)のいずれかのアクセス可能性のため、コンジュゲート化効率にも影響を有する可能性もある。したがって、利用可能性、安定性、および/またはアクセス可能性を最適化するために適切な特性を持つリンカーを選択することも可能である。リンカーは、広く、柔軟性および剛直性サブタイプに下位分類されうる。 30

【0107】

柔軟性リンカー

連結されるドメインが動きを必要とする場合、柔軟性リンカーを用いてもよい。これらは通常、小分子非極性(例えばGly)または極性(例えばSer、Thr)アミノ酸からなり、ここで、小さなサイズであると柔軟性が提供される(Chenら、2013 Adv Drug Deliv Rev. Oct 15; 65(10): 1357 - 1369)。SerまたはThrの付加は、溶液中での安定性維持を補助することも可能であり、そして長さの調節は、タンパク質の適切なフォールディングに影響を及ぼしうる(Chenら、2013)。関連する実体に適した性質および長さを有する、任意の適切な柔軟性リンカーを用いてもよい。適切には、柔軟性リンカーには、こうしたタイプの2~70アミノ酸の間の組み合わせが含まれてもよい。 40

【0108】

例:

【0109】

【表 2】

配列名	配列	配列番号
柔軟性リンカー1	GSG	n/a
柔軟性リンカー2 - (GSG) ₂	GSGGSG	配列番号 1
柔軟性リンカー3 - (GSG) ₃	GSGGSGGSG	配列番号 2
柔軟性リンカー4 - (G4S) ₁	GGGGS	配列番号 3
柔軟性リンカー5 - (G4S) ₃	GGGGSGGGGS	配列番号 4
柔軟性リンカー6 - (G4S) ₄	GGGGSGGGGS	配列番号 5
柔軟性リンカー7	GSAGSAAGSGEF	配列番号 6
柔軟性リンカー8	KESGSVSSEQLAQFRSLD	配列番号 7
柔軟性リンカー9	EGKSSGSGSESKST	配列番号 8

10

【0110】

剛直性リンカー

20

いくつかの場合、剛直性リンカーはタンパク質分離の提供を補助しうるため、剛直性リンカーが好ましい可能性もある。剛直性リンカーは二次構造を有する。最も一般的な剛直性リンカーの1つは、らせん構造を採用する(EAAAK)_n(式中、nは反復の数である)である(Araiら、(2001) Protein Eng. Aug; 14(8): 529-32)。他の剛直性リンカーには、(XP)_n、式中、Xは、任意のアミノ酸であるが、優先的にAla(A)、Lys(K)またはGlu(E)である、が含まれることも可能であり、ここでプロリンがコンホメーション上の束縛を提供する(Chenら、2013)。

【0111】

他の適切なリンカーが、例えばKleinら(2014) Protein Eng Des Sel. Oct; 27(10): 325-330によって記載される。関連する実体に適した性質および長さを有する、任意の適切な剛直性リンカーを用いてもよい。適切には、剛直性リンカーには、こうしたタイプの2~70アミノ酸の間の組み合わせが含まれてもよい。

30

【0112】

例：

【0113】

【表 3】

配列名	配列	配列番号
剛直性リンカー1	EAAAK	配列番号 9
剛直性リンカー2 - (EAAAK) ₃	EAAAKEAAAKEAAAK	配列番号 10
剛直性リンカー3 - (AP) ₇	APAPAPAPAPAP	配列番号 11

40

【0114】

宿主細胞および発現ベクター

適切には、本発明にしたがったタンパク質および組成物を産生する核酸の発現のための宿主細胞は、当業者に知られるであろう。

50

【0115】

1つの態様において、宿主細胞は、一過性発現に適しているであろう。別の態様において、宿主細胞は、安定細胞株を形成可能な細胞であろう。適切には、イソペプチド結合形成ペプチドタグを含むものを含めて、抗原性構成要素、例えばHCMV五量体およびRSV-Fタンパク質をコードするコード配列は、1つの宿主細胞内に組み込まれるであろう。1つの態様において、五量体などの多量体のサブユニットをコードする核酸配列は各々、宿主細胞の、例えば5つすべてのプラスミド/ベクターでのトランスフェクションが、適切な条件下で培養された際、宿主細胞によって産生される五量体を生じるように、異なるプラスミド/ベクターに含まれるであろう。他の態様において、プラスミド/ベクターは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのプラスミドが導入可能であるように、1つまたはそれより多いコード配列の組み合わせを含みうる。あるいは、全タンパク質構成要素および第一のペプチドタグが、同じベクター上にコードされるように、全融合ペプチドコード配列を1つのベクター中で提供してもよい。

10

【0116】

1つの態様において、これらのベクターは、宿主細胞ゲノム内へのコード配列の安定組み込みに用いられる。安定発現に適した宿主細胞には、哺乳動物細胞、例えばHEK細胞（ヒト胚性腎臓293細胞）またはCHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞を含む齧歯類細胞が含まれる。本発明にしたがった組成物のタンパク質構成要素の発現に適した哺乳動物細胞およびベクターは、当業者に知られ、そして例えばWO2016/067239、15~16ページ、およびHofmannら、(2015) Biotechnand Bioeng, 112(12):2505-2515に記載される。本発明にしたがった構成要素の発現のための例示的な安定構築物配列は、以下の実施例3に見出される。

20

【0117】

アフィニティ精製

いくつかの態様において、本発明にしたがった組成物の構成要素の発現に使用するための発現構築物には、アフィニティ精製などの精製を容易にする、単数または複数の「タグ」配列が含まれることも可能である。タンパク質構成要素および第一のペプチドタグを、産生した系から分離するため、任意の適切なタグ、例えばアフィニティタグを含めてもよい。組換えタンパク質産生の当業者は、精製目的で含めてもよい、HisタグおよびStreptタグなどの系を知っている。こうしたタグは、タンパク質精製を劇的に補助し、そして生物学的または生化学的活性に不都合に影響を及ぼすことはほとんどなく、そしてしたがって望ましい。適切なタグ配列には、C-タグ、ヒスチジントグ（His-タグ）、ストレプトアビジントグ（Strept-タグ）、マルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）およびFLAGタグが含まれる。

30

【0118】

タンパク質構成要素および/または部分はどちらも、アフィニティ精製タグを含んでもよい。使用を容易にするため、これらは、一般的に、タンパク質のCまたはN末端に遺伝子融合される。

【0119】

したがって、いくつかの態様において、例えば、HCMVのgH、gL、pUL128、pUL130、pUL131A（またはその断片）サブユニット、RSVプレ融合Fタンパク質、あるいはHBsAgペプチド/タンパク質は、NまたはC末端に、精製を容易にするさらなるアミノ酸残基を含んでもよい。こうしたさらなるアミノ酸残基は、例えば、His-タグまたはC-タグなどのタグを含んでもよい。いくつかの態様において、C-タグは、よりきれいな精製を提供可能である。他の適切なタグ配列には、マルトース結合タンパク質（MBP）、Strept-タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）およびFLAGタグが含まれる。いくつかの態様において、タグが、例えば切断可能リンカーを用いることによって、精製後に切断されうる方式で、アミノ酸配列に連結されることも可能である。他の態様において、非アフィニティ精製法を用いることも可能

40

50

である。

【0120】

他の態様において、RSVプレ融合Fタンパク質は、CまたはN末端に、精製を容易にするさらなるアミノ酸残基を含むことも可能である。本明細書に例示するように、RSVプレFタンパク質は、アフィニティ精製のC-タグを有する。

【0121】

第一および第二のペプチドタグ対のコンジュゲート化

第一および第二のペプチドタグ/結合パートナー/反応性対のコンジュゲート化を4で一晚行うことも可能である。あるいは、カップリング速度は、室温で増加すると予期されるため、コンジュゲート化反応を、室温で3~4時間行うことも可能である。所定のカップリング反応のための最適な第一および第二の結合パートナー比は、各結合パートナーのサイズに依存する。例えば、VLP単量体対抗原の1:1.5モル比がより小さい抗原(~20kDa)には十分である可能性もある一方、同じVLP単量体と組み合わせたより大きい抗原(>100kDa)に関しては、1:1質量比が十分である可能性もある。しかし、どちらの比も過剰な抗原(より小さい結合パートナー)を生じる。いかなる過剰な抗原も、例えば、サイズ排除クロマトグラフィ(SEC)によって、または透析によって除去可能である。透析は、SECほど効率的ではないため、より小さい抗原により適している可能性もある。あるいは、すべての抗原がコンジュゲート化され、そしてしたがって下流精製が不要であるように、VLP/粒子対抗原の比を最適化することも可能である。より低い濃度は反応速度を減少させるため、およそ1mg/mlの適切な最終タンパク質濃度がコンジュゲート化反応には最適である。中性pHに近い広範囲の緩衝剤がカップリング/コンジュゲート化に適合する。コンジュゲート化緩衝液の標準的な選択は、TBS(20mM Trisおよび150mM NaCl、pH7.4)である。いくつかの状況において、クエン酸緩衝液の10xストック(40mM Na₂HPO₄、200mMクエン酸ナトリウム、pH6.2)の添加を、Bruner Sci Rep.(2016)に記載されるように用いることも可能である。

【0122】

薬学的組成物および使用

本発明の組成物をワクチンまたは免疫原性組成物内に取り込むことも可能である。適切には、ワクチンまたは免疫原性組成物は、免疫原用量で、本発明の粒子を含むであろう。

【0123】

薬学的組成物は、薬学的に許容されうるキャリアーとともに提供される、本発明記載の粒子または免疫原組成物を含むことも可能である。適切なキャリアーは当業者に周知である。1つの態様において、薬学的組成物は、緩衝剤、賦形剤またはキャリアーを含む。適切には、薬学的組成物は、組成物の安定性を維持するために適した賦形剤および配合物を含むことも可能である。適切には、配合物はアジュバントを含むことも可能である。1つの態様において、配合物は、AddavaxTMまたは類似のスクアレンに基づく水中油なエマルジョンを、MF59(登録商標)と類似の配合物とともに含むことも可能である。他の適切なアジュバントには、リポソームに基づくアジュバント、例えばマトリックスマおよびAS01が含まれる。他の適切なアジュバントには、アルミニウムに基づく配合物、例えばAlhydrogel(登録商標)が含まれる。1つの態様において、配合物は、EDTAを、例えば5mMの濃度で含むことも可能である。適切な賦形剤または配合物は、粒子または免疫原性組成物の特性に応じる可能性もあり;例えば発現系の選択が、組成物のタンパク質の安定性、グリコシル化またはフォールディングに影響を及ぼす可能性もあり、これが次に、組成物の最適な配合に影響を及ぼす可能性もある。適切な賦形剤、配合物またはアジュバントの決定法は、当業者に知られるであろう。

【0124】

本発明の多様なさらなる側面および態様は、本開示を考慮すると、当業者には明らかであろう。

本明細書に言及するすべての文書は、その全体が本明細書に援用される。

10

20

30

40

50

【0125】

「および/または」は、本明細書において、他方を含むまたは含まない、2つの明記する特徴または構成要素の各々の特異的開示と解釈されるものとする。例えば、「Aおよび/またはB」は、ちょうど、各々が本明細書に個々に示されるように、(i)A、(ii)Bならびに(iii)AおよびBの各々の特異的開示と解釈されるものとする。

【0126】

背景が別に指示しない限り、上記に示す特徴の説明および定義は、本発明のいかなる特定の側面または態様にも限定されず、そして記載するすべての側面および態様に等しく適用される。

【0127】

本発明は、いくつかの態様に言及して、例として記載されてきているが、本発明が開示する態様に限定されず、そして付随する請求項に定義するような本発明の範囲から逸脱することなく、別の態様が構築されることが、当業者にはさらに認識されるであろう。

【0128】

「組換え」は、本明細書において、ポリヌクレオチドを記載する際、ゲノム、cDNA、半合成、または合成起源のポリヌクレオチドを意味し、これはその起源または操作によって：(1)天然に会合するポリヌクレオチドのすべてまたは一部と会合せず、そして/または(2)天然に連結しているもの以外のポリヌクレオチドに連結されている。用語「組換え」は、本明細書において、タンパク質またはポリペプチドに関して、組換えポリヌクレオチドの発現によって産生されるポリペプチドを意味する。

【0129】

特に明記しない限り、工程を含むプロセスを、任意の適切な順序で行ってもよい。したがって、工程を任意の適切な順序で行ってもよい。

ポリペプチド配列間の配列同一性は、好ましくは、デフォルトパラメータ(例えば、EBL O S U M 6 2 スコアリングマトリックスを用い、ギャップオープニングペナルティ = 10.0、およびギャップ伸長ペナルティ = 0.5を用いる)を用いて、Needleman - Wunsch 広範囲整列アルゴリズム(Needleman および Wunsch 1970)を用いた対整列アルゴリズムによって決定される。このアルゴリズムは、好適に、EMBOSS パッケージ中のneedle ツール中に実装される(Rice, Longden および Bleasby 2000)。本発明のポリペプチド配列の全長に渡って、配列同一性を計算すべきである。

【0130】

本明細書に言及する構成要素の任意の相同体は、典型的には機能的相同体であり、そして典型的には、タンパク質の適切な領域に少なくとも40%相同である。既知の方法を用いて、相同性を測定することも可能である。例えば、UWGC G Package は、相同性を計算するために使用可能なBESTFIT プログラムを提供する(例えばデフォルトセッティングで用いる)(Devereuxら(1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395)。PILEUP および BLAST アルゴリズムを用いて、例えば Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F (1990) J Mol Biol 215:403-10に記載されるように、相同性を計算するかまたは配列を整列させることも可能である(典型的にはデフォルトセッティングで)。BLAST 分析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通じて、公的に入手可能である。

【0131】

BLAST アルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計分析を実行する; 例えば、Karlin および Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照されたい。BLAST アルゴリズムによって提供される類似性の1つの測定値は、最小和確率(smallest su

10

20

30

40

50

m p r o b a b i l i t y) (P (N)) であり、これは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のマッチが偶然起こる確率の指標を提供する。例えば、第二の配列に第一の配列を比較した際の最小和確率が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、そして最も好ましくは約0.001未満である場合、配列は、別の配列と類似であると見なされる。

【0132】

変異ポリペプチドは、天然タンパク質に少なくとも40%の同一性を有する配列を含む（または該配列からなる）。好ましい態様において、変異体配列は、少なくとも20、好ましくは少なくとも30、例えば少なくとも40、60、100、200、300、400またはそれより多い隣接アミノ酸で、あるいはさらに変異体の全配列に渡って、天然タンパク質の特定の領域に対して、少なくとも55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、そしてより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同であることも可能である。あるいは、変異体配列は、全長天然タンパク質に対して、少なくとも55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、そしてより好ましくは少なくとも95%、97%または99%相同であることも可能である。典型的には、変異体配列は、天然タンパク質の適切な領域とは、少なくとも2、5、10、20、40、50または60突然変異（各々は置換、挿入または欠失であってもよい）で、またはこれら未満で、異なる。本発明の変異体配列は、上述の配列の任意の長さに渡って、特定のパーセンテージ相同性値のいずれかと同じである、全長天然タンパク質の特定の領域とのパーセンテージ同一性を有してもよい（すなわち、少なくとも40%、55%、80%または90%、そしてより好ましくは少なくとも95%、97%または99%同一性を有してもよい）。

10

20

【0133】

タンパク質の変異体にはまた、一部切除も含まれる。変異体がなお機能性である限り、いかなる一部切除を用いてもよい。一部切除は、典型的には活性/機能に、特にイソペプチド結合の形成に非必須であり、そして/またはフォールディングされたタンパク質のコンホメーション、特に任意の免疫原性部位のフォールディングに影響を及ぼさない配列を除去するように作製されるであろう。一部切除はまた、構成要素の産生の容易さを改善するように選択されることも可能である。適切な一部切除は、NまたはC末端からの多様な長さの配列の体系的な一部切除によって、ルーチンに同定可能である。

30

【0134】

天然タンパク質の変異体には、天然タンパク質の特定の領域に関して、1つまたはそれより多い、例えば2、3、4、5~10、10~20、20~40またはそれより多いアミノ酸挿入、置換または欠失を有する突然変異体がさらに含まれる。欠失および挿入は、好ましくは抗原性領域の外側で作製される。挿入は、典型的には、天然タンパク質由来の配列のNまたはC末端で、例えば組換え発現のために作製される。置換はまた、典型的には、活性/機能に非必須であり、そして/またはフォールディングされるタンパク質のコンホメーションに影響を及ぼさない領域中で作製される。こうした置換は、タンパク質の可溶性または他の特性を改善するために作製されうる。置換は、タンパク質の安定性を増加させるために作製されうる。

40

【0135】

置換は、好ましくは、1つまたはそれより多い保存的变化を導入し、こうした変化は、アミノ酸を、類似の化学構造、類似の化学特性または類似の側鎖体積の他のアミノ酸で置換する。導入されるアミノ酸は、これらが置換するアミノ酸に類似の極性、親水性、疎水性、塩基性、酸性、中和性または電荷を有してもよい。あるいは、保存的变化は、あらかじめ存在する芳香族または脂肪族アミノ酸の代わりに、芳香族または脂肪族である別のアミノ酸を導入してもよい。保存的アミノ酸変化は、当該技術分野に周知である。

【0136】

誘導体は、親実体のある部分の置換によって、親実体から生じるかまたは作製される実体である。

50

【実施例】

【0137】

〔実施例1〕

例示的な多量体 - VLP組成物 (HCMV五量体 - HBsAg VLP) の生成

ExpifectamineTM 293トランスフェクション試薬 (ThermoFisher Scientific) および以下の配列をコードする5つの別個のプラスミドを用いて、Exp293F細胞において、HCMV五量体を一過性に発現させた。以下に記載するHCMV五量体は、グリコシル化を伴わずにおよそ162kDaである (タグおよびリンカーを含むが、シグナルペプチドを含まない)。

【0138】

10

ヌクレオチド配列

HCMV五量体配列は、以下の適切な節に記載する2つの導入された突然変異 (1つはgH中、1つはUL128中) を除いて、マーリン株 (GenBank: AY446894.2; 低継代 (すなわち弱毒化) HCMV株) 由来の天然配列 (イントロンを含む) を発現した。

【0139】

gH - SpyTag - Hisヌクレオチド配列 (配列番号12)

この配列 (配列番号12) において、GeneArt (登録商標) 合成のため、1146位にサイレント突然変異C>Aを導入し、これはこのヌクレオチド周囲の天然配列CACCTGCに、潜在的に問題があると警告されたためであった。該構築物は：シグナルペプチド (nt 1~69)、外部ドメイン (nt 70~2151)、膜貫通ドメイン (一部切除) (nt 2152~2157) (シグナルペプチド、外部ドメインおよび膜貫通ドメイン (一部切除) は、ともに、配列番号13に示される)、リンカー (nt 2158~2175; 配列番号14)、SpyTag (nt 2176~2214; 配列番号15)、6xHisタグ (nt 2215~2232)、停止コドン (nt 2233~2235) を含む。ヌクレオチド1~2157 (配列番号13) は、gHコード配列に相当する。

20

【0140】

gLヌクレオチド配列 (配列番号16)

この配列中：シグナルペプチド (nt 1~90)、外部ドメイン (nt 91~834)、停止コドン (nt 835~837)。

30

【0141】

UL130 - C - タグヌクレオチド配列 (配列番号17)

この配列中：シグナルペプチド (nt 1~75)、外部ドメイン (nt 76~642)、リンカー (nt 643~687)、C-タグ (nt 688~699)、停止コドン (nt 700~702)。

【0142】

UL128ヌクレオチド配列 (配列番号20) (天然配列中に存在する2つのイントロンを含む)

この配列中：シグナルペプチド (nt 1~81)、イントロン：nt 165~287、nt 423~542、外部ドメインエクソン (nt 82~164、nt 288~422、nt 543~756)、停止コドン (nt 757~759)。

40

【0143】

ヌクレオチド634にT>C突然変異を導入した。T634ヌクレオチドは、マーリン株において、UL128の未成熟終結を引き起こすとして、GenBankファイル中に言及されており、そして本発明者らはしたがって、全長タンパク質の発現に復帰させるため、どの塩基を置換すべきか情報を提供する異なる株 (GenBank: GQ396662.1、株HAN38) 由来の注釈を用いた。

【0144】

UL131Aヌクレオチド配列 (配列番号21) (天然配列中に存在するイントロンを含

50

む)

この配列中：シグナルペプチド (nt 1 ~ 54)、イントロン (nt 237 ~ 344)、外部ドメインエクソン (nt 55 ~ 236、nt 345 ~ 495)、停止コドン (nt 496 ~ 498)。

【0145】

Spy Catcher - HBsAgヌクレオチド配列 (配列番号22)

この配列中：Spy CatcherデルタN1 (nt 1 ~ 276)、柔軟性リンカー (nt 277 ~ 303)、PVTNリンカー (nt 304 ~ 315)、HBsAg (nt 316 ~ 993)、C-タグ (nt 994 ~ 1005)、停止コドン (nt 1006 ~ 1008)。

【0146】

アミノ酸配列

上記ヌクレオチド配列の発現は、以下のアミノ酸配列を生じると予測される。

gH - Spy Tag - Hisアミノ酸配列 (配列番号27)

予測分子量 81.852 kDa (シグナルペプチドを含まない)、84.364 kDa (シグナルペプチドを含む)。

【0147】

この配列中：シグナルペプチド (aa 1 ~ 23)、外部ドメイン (aa 24 ~ 717)、膜貫通ドメイン (一部切除) (aa 787 ~ 719) (シグナルペプチド、外部ドメインおよび膜貫通ドメイン (一部切除) は、ともに、配列番号28に示される)、リンカー (aa 720 ~ 725; 配列番号29)、Spy Tag (aa 726 ~ 738; 配列番号30)、6xHisタグ (aa 739 ~ 744)。アミノ酸残基1 ~ 719は、一部切除TMドメインを含む天然マーリン株gHアミノ酸配列に相当する (配列番号28)。

【0148】

gLアミノ酸配列 (配列番号31)

予測分子量 27.522 kDa (シグナルペプチドを含まない)、30.815 kDa (シグナルペプチドを含む)。

【0149】

この配列中；シグナルペプチド (aa 1 ~ 30)、外部ドメイン (aa 31 ~ 278)。アミノ酸残基1 ~ 278は、天然マーリン株gLアミノ酸配列に相当する。

UL130 - C-タグアミノ酸配列 (配列番号32)

予測分子量 23.167 kDa (シグナルペプチドを含まない)、26.081 kDa (シグナルペプチドを含む)。

【0150】

この配列中：シグナルペプチド (aa 1 ~ 25)、外部ドメイン (aa 26 ~ 214) (シグナルペプチドおよび外部ドメインは、ともに、配列番号33に示される)、リンカー (aa 215 ~ 229; 配列番号34)、C-タグ (aa 230 ~ 233)。アミノ酸残基1 ~ 214は、天然マーリン株UL130アミノ酸配列に相当する。

【0151】

UL128アミノ酸配列 (配列番号35)

予測分子量 16.659 kDa (シグナルペプチドを含まない)、19.717 kDa (シグナルペプチドを含む)。

【0152】

この配列中：シグナルペプチド (aa 1 ~ 27)、外部ドメイン (aa 28 ~ 171)。アミノ酸残基1 ~ 171は、天然マーリン株UL128アミノ酸配列に相当する。

UL131Aアミノ酸配列 (配列番号36)

予測分子量 12.985 kDa (シグナルペプチドを含まない)、14.989 kDa (シグナルペプチドを含む)。

【0153】

10

20

30

40

50

上記配列中：シグナルペプチド（aa 1～18）、外部ドメイン（aa 19～129）。アミノ酸残基1～129は、天然マーリン株UL131Aアミノ酸配列に相当する。

【0154】

Spy Catcher - HBsAgアミノ酸配列（配列番号37）

タグおよびリンカーを含む予測分子量、36.824kDa。

この配列中：Spy CatcherデルタN1（aa 1～92；配列番号38）、柔軟性リンカー（aa 93～101；配列番号39）、PVTNリンカー（aa 102～105；配列番号40）、HBsAg（aa 106～331；配列番号41）、C-タグ（aa 332～335）。

【0155】

五量体の精製

五量体 - Spy TagはEXPI293F細胞中で発現され、そして上清内に分泌された（gHサブユニットからTMドメイン（の一部）を欠失させたため）。アフィニティ精製を用いてHCMV五量体を精製する最初の試みは、C-タグを含むgHサブユニットの発現に頼るが、これはgH/gLヘテロホモ二量体ならびに五量体の単離を生じた。別の戦略において、UL130サブユニット（配列番号17（ヌクレオチド）および配列番号32（アミノ酸））にC-タグを付加して、C-タグアフィニティ精製（ThermoFisher）およびサイズ排除クロマトグラフィを用いた、上清からの五量体の精製を可能にした。五量体は、SDS-PAGEによって分析した際、非還元および還元条件下で予期された通りに現れ（図1A）、そして抗HCMV五量体抗体（Native Antigen Company（AbCMV2450））と反応し（図1B）、～14kDaで少量の混入物質のみが観察された。

【0156】

HBsAg VLP単量体の精製

Spy Catcher - HBsAgをピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）中で発現させ、そして細胞ホモジネートから精製した。SDS-PAGEゲル上での還元条件下で、主なタンパク質バンドは、単量体の予期されるサイズ（およそ37kDa）に対応し、さらに大きいバンドは、オリゴマー種の存在を示し、粒子の優れた架橋が起こっていることを示した（図2A、レーン「R」）。非還元条件下で（レーン「NR」）、物質は、主に、ある程度のスミアとともにゲル上部に留まり、これは、VLP粒子がよく形成され、そしてしたがってゲル内に完全に移動するには大きすぎることを示す（図2A）。非還元および還元Spy Catcher - HBsAgは、どちらも、マウス抗HBsAgモノクローナル抗体（Bio-Rad（MCA4658）より得た）と強く反応し（図2B）、Spy Catcherの存在が反応性エピトープに負に影響しないことを示した。HCMV五量体 - Spy TagおよびSpy Catcher - HBsAgは、どちらも、s200increase 3.2/300カラム上でのHPLCサイズ排除分析によって評価された際、単一ピークとして溶出した（図3A～B）。HCMV五量体 - Spy Tagは、～400kDaで溶出し（図3A）、これは予期されるよりも大きい。しかし、これは、五量体構造が球状ではなく、こうした場合、サイズ排除クロマトグラフィ中に、タンパク質の保持時間が改変されることが知られていることによって、説明されうる。Spy Catcher - HBsAgは、カラムのポイド体積中に溶出し、これは、粒子が適切に形成され、溶液中に単量体が検出不能であることを示す（図3B）。

【0157】

抗原 - VLPコンジュゲート化

HCMV五量体 - Spy TagをSpy Catcher - HBsAgに、4で一晚コンジュゲート化し、HCMV - 五量体でコーティングされたHBsAg VLPを生じた。5mM EDTAを補充した、Tris緩衝生理食塩水を含む緩衝液（TBS；20mM Trisおよび150mM NaCl、pH7.4）をコンジュゲート化に用いた。SDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析ならびにHPLCを用いて、コンジ

10

20

30

40

50

ュゲート化を監視した。コンジュゲート化反応を、五量体 - S p y T a g または S p y C a t c h e r - H B s A g のみのいずれかに比較すると、還元条件下で ~ 130 k D a の新規バンドの存在があり (図 4 A、レーン 2)、これはモノクローナル抗 H B s A g (図 4 B) およびポリクローナル抗 H C M V 五量体 (図 4 C) 抗体の両方と反応性であり、該バンドが、少なくともコンジュゲート化 H B s A g - g H を含有することが示された。H P L C サイズ排除クロマトグラフィによって分析した際、97% は、コンジュゲート化 H C M V 五量体 - H B s A g 単量体の予測されるサイズに対応する主ピーク中に溶出した (図 5)。

【 0 1 5 8 】

〔 実施例 2 〕

H C M V - S p y - T a g - - S p y C a t c h e r - H B s A g V L P (アジュバント化) の i n v i v o 試験

コンジュゲート化 H C M V 五量体 - H B s A g V L P、ならびに非コンジュゲート化 H C M V 五量体 - S p y T a g を、B A L B / c マウスを用いた免疫スケジュール中で用いて、(i) 産生された H C M V 五量体 - S p y T a g の免疫原性を確認し、そして (i i) 非コンジュゲート化 H C M V 五量体 - S p y T a g 対コンジュゲート化 H C M V 五量体 - H B s A g V L P の免疫原性を比較した。

【 0 1 5 9 】

3 週間間隔でのプライム - ブースト - ブーストのスケジュールを以下のように用いた :

第 0 日 : 免疫 (プライム) ; 第 20 日 : 尾採血 ; 第 21 日 : 免疫 (ブースト 1) ; 第 41 日 : 尾採血 ; 第 42 日 : 免疫 (ブースト 2) ; 第 63 日 : 心採血。

【 0 1 6 0 】

免疫群は以下の通りであった。各群に関して、n = 10 :

1) A d d a V a x ^{T M} (I n v i v o g e n) 中の 1 μ g H C M V 五量体 - S p y T a g

2) A d d a V a x ^{T M} 中の 1 μ g H C M V 五量体 - S p y T a g - - S p y C a t c h e r - H B s A g V L P (1 μ g の五量体の同等物)

3) A d d a V a x ^{T M} 中の S p y C a t c h e r - H B s A g V L P (群 2 中の S p y C a t c h e r - H B s A g の量に対して標準化)

4) A d d a V a x ^{T M} 中の 0 . 1 μ g H C M V 五量体

5) A d d a V a x ^{T M} 中の 0 . 1 μ g H C M V 五量体 - S p y T a g - - S p y C a t c h e r - H B s A g V L P (0 . 1 μ g の五量体の同等物)

6) T B S (20 m M T r i s および 150 m M N a C l、p H 7 . 4)

A d d a V a x ^{T M} は、アジュバント化インフルエンザワクチンに関して欧州で認可されている M F 59 (登録商標) に類似の配合物を含む、スクアレンに基づく水中油ナノエマルジョンである。スクアレン水中油エマルジョンは、細胞性 (T h 1) および体液性 (T h 2) 免疫反応両方を誘発することが知られる。他の適切なアジュバントは、当業者に知られるであろう。

【 0 1 6 1 】

E L I S A を用いて、免疫原性を評価した。H C M V 五量体に対する標準化 E L I S A を用いて、各群中に生じた抗血清の力価を決定した。プレートに 5 μ g / m l の五量体 (S p y T a g を含まない)、50 μ L / ウェルで一晩コーティングし ; 洗浄し ; ミルクで 1 時間ブロッキングし ; 洗浄し ; マウス血清 (P B S 中のおよその希釈物) を 1 時間適用し ; 洗浄し ; ヤギ抗マウス - アルカリホスファターゼ抗体 (1 : 10, 000) を 1 時間適用し ; 洗浄し ; 現像した。

【 0 1 6 2 】

異なる用量の非コンジュゲート化 (群 1 および 4) およびコンジュゲート化 H C M V 五量体 - H B s A g (群 2 および 5) の両方を含めて、コンジュゲート化 H C M V 五量体 - H B s A g V L P ワクチンおよび非コンジュゲート化 H C M V 五量体 - S p y T a g の間の免疫原性の比較を可能にし、これにより、他の H C M V 五量体ワクチン (例えば可溶

10

20

30

40

50

性五量体)に対する推定が可能になる。群3および6は陰性対照に相当する。

【0163】

各時点で、試料のOD値を適切な希釈で読み取り、そして各プレート上で作製した標準曲線を用いてELISA単位を決定した。群1、2、4および5のプライム後に関する結果を示すデータを図6に示す。HCMV五量体-HBsAg免疫マウスは、1μgまたは0.1μg用量の非コンジュゲート化HCMV五量体で免疫したマウスと比較して、1μgおよび0.1μg用量の両方を用いて、実質的により強い血清IgG抗体反応を示す。やはり図6に示すように、群3および6のELISA単位は、このアッセイに関するベースラインを提供した。

【0164】

Wangら(Vaccine 33(2015) 7254-7261; DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.10.110)に基づくマイクロ中和アッセイを用いて、生じた抗体の機能的活性を調べた。群1、2、4および5に関する中和力価を図7に示す。五量体-HBsAg VLPで免疫したマウス由来の血清は、五量体-SpyTagタンパク質のみで免疫したマウスのもものよりも、実質的により中和性である。

【0165】

[実施例3]

安定構築物配列

2つの安定構築物(Hofmannら,(2015) Biotechnol Bioeng, 112(12):2505-2515より採用)を、HCMV五量体-SpyTagの構成要素をCHO発現するために最適化した。HCMV五量体配列からイントロンを除去したが、シグナル配列を保持した。

【0166】

HCMV gH-SpyTag/gL安定発現構築物

安定ベクター構築物HCMV-gH-(GS₂)-SpyTag-His-IRES-gLを、それぞれ、EV71 IRESの上流および下流に、gH-SpyTag-His構成要素(配列番号42)およびgL構成要素(配列番号43)を含むよう設計した。この構築物中で用いるコード配列を以下に記載する。

【0167】

ヌクレオチド配列

EV71 IRES上流に挿入されたgH-(GS₂)-SpyTag-His(イントロンを含まない)(配列番号42)

この配列中:シグナルペプチド(nt 1~69)、外部ドメイン(nt 70~2151)、一部切除膜貫通ドメイン(nt 2152~2157)、(GS₂)リンカー(nt 2158~2175)、SpyTag(nt 2176~2214)、Hisタグ(nt 2215~2232)、停止コドン(nt 2233~2235)。

【0168】

EV71 IRES下流に挿入されたgL(イントロンを含まない)(配列番号43)

この配列中:シグナルペプチド(nt 1~90)、外部ドメイン(nt 91~834)、停止コドン(nt 835~837)

HCMV UL128/UL130/UL131A安定発現構築物

安定構築物HCMV-UL128-IRES-UL130-(G4S)₃-C-タグ-IRES-UL131Aは、UL128構成要素(配列番号44)、UL130構成要素(配列番号45)およびUL131A構成要素(配列番号46)を含むように設計された。UL130構成要素を、プラスミドの第一のEV71 IRESの後ろに挿入し、そしてUL131A構成要素を第二のEV71 IRESの後ろに挿入した。この構築物中で用いたコード配列を以下に記載する。

【0169】

ヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

U L 1 2 8 (イントロンを含まない) (配列番号 4 4)

この配列中：シグナルペプチド (n t 1 ~ 8 1)、外部ドメイン (n t 8 2 ~ 5 1 3)、停止コドン (n t 5 1 4 ~ 5 1 6)。

【 0 1 7 0 】

U L 1 3 0 - (G 4 S) 3 - C - タグ (イントロンを含まない) (配列番号 4 5)

この配列中：シグナルペプチド (n t 1 ~ 7 5)、外部ドメイン (n t 7 6 ~ 6 4 2)、(G 4 S)₃リンカー (n t 6 4 3 ~ 6 8 7)、Cタグ (n t 6 8 8 ~ 6 9 9)、停止コドン (n t 7 0 0 ~ 7 0 2)。

【 0 1 7 1 】

U L 1 3 1 A (イントロンを含まない) (配列番号 4 6)

この配列中：シグナルペプチド (n t 1 ~ 5 4)、外部ドメイン (n t 5 5 ~ 3 8 7)、停止コドン (n t 3 8 8 ~ 3 9 0)。

【 0 1 7 2 】

〔 実施例 4 〕

H C M V - S p y T a g - - S p y C a t c h e r - H B s A g (非アジュバント化) の i n v i v o 試験

コンジュゲート化 H C M V 五量体 - H B s A g V L P、ならびに非コンジュゲート化 H C M V 五量体 - S p y T a g を、B A L B / c マウスを用いた免疫スケジュール中で用いて、コンジュゲート化五量体 - H B s A g V L P 対非コンジュゲート化五量体 - S p y T a g タンパク質の免疫原性をさらに研究した。

【 0 1 7 3 】

3 週間間隔でのプライム - ブースト - ブーストのスケジュールを以下のように用いた：
第 0 日：免疫 (プライム)；第 2 0 日：尾採血；第 2 1 日：免疫 (ブースト 1)；第 4 1 日：尾採血；第 4 2 日：免疫 (ブースト 2)；第 6 3 日：心採血。

【 0 1 7 4 】

免疫群は以下の通りであった。各群に関して、n = 1 0：

- 1) 1 μ g 非アジュバント化 H C M V 五量体 - S p y T a g
- 2) 1 μ g 非アジュバント化 H C M V 五量体 - S p y T a g - - S p y C a t c h e r - H B s A g V L P (1 μ g の五量体の同等物)
- 3) 0 . 1 μ g 非アジュバント化 H C M V 五量体 - S p y T a g - - S p y C a t c h e r - H B s A g V L P (0 . 1 μ g の五量体の同等物)

E L I S A を用いて、免疫原性を評価した。H C M V 五量体に対する標準化 E L I S A を用いて、各群中に生じた抗血清の力価を決定した。プレートに 5 μ g / m l の五量体 (S p y T a g を含まない)、5 0 μ L / ウェルで一晩コーティングし；洗浄し；ミルクで 1 時間ブロッキングし；洗浄し；マウス血清 (P B S 中のおよその希釈物) を 1 時間適用し；洗浄し；ヤギ抗マウス - アルカリホスファターゼ抗体 (1 : 1 0 , 0 0 0) を 1 時間適用し；洗浄し；現像した。

【 0 1 7 5 】

各時点で、試料の O D 値を適切な希釈で読み取り、そして各プレート上で作製した標準曲線を用いて E L I S A 単位を決定した。プライム後およびブースト後のデータを図 8 に示す。H C M V 五量体 - H B s A g 免疫マウスは、可溶性タンパク質としての 1 μ g の H C M V 五量体のみで免疫したマウスに比較して、1 μ g および 0 . 1 μ g 用量の両方を用いて、実質的により強い血清 I g G 抗体反応を示す。

【 0 1 7 6 】

W a n g ら (2 0 1 5) に基づくマイクロ中和アッセイを用いて、生じた抗体の機能的活性を調べた。プライム後およびブースト後の中和力価を図 9 に示す。非アジュバント化五量体 - H B s A g V L P で免疫したマウス由来の血清は、非アジュバント化五量体 - S p y T a g タンパク質のみで免疫したマウスのもものよりも、実質的により中和性である。

【 0 1 7 7 】

10

20

30

40

50

〔実施例5〕

RSV-F-SpyTagの発現および精製

抗原RSV-F Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C由来の配列をSpyTagに融合させて、RSV-F-SpyTagを生成し、そしてExpichOTM発現系キットおよびExpifectamineTMトランスフェクション試薬(ThermoFisher Scientific)を用いて、プラスミドpcDNA3.4中のヌクレオチド配列、配列番号47でExpichOTM細胞を一過性にトランスフェクションすることによって、発現させた。

【0178】

RSV-F Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C(国立衛生研究所)は、Joyceら(2016)(Iterative structure-based improvement of a respiratory syncytial virus fusion glycoprotein vaccine. Nat Struct Mol Biol. 2016 Sep; 23(9): 811-820)に記載されるような呼吸器合胞体ウイルス融合タンパク質(プレ融合RSV-F)の変異体である。この変異体は、遺伝子連結Fサブユニットを含む融合(F)糖タンパク質のプレ融合安定化型であり、融合ペプチドは欠失し、T4フィブリチン三量体化モチーフ(foldonドメイン)を含み、そしてプロモーター間運動は、さらなるプロモーター間ジスルフィド結合(A149C Y458C)によって安定化されている。

【0179】

ヌクレオチド配列

RSV-F-SpyTag-Cタグヌクレオチド配列(配列番号47)

Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458Cの元来の配列を、トロンピン部位、6xHis-タグおよびStrep-タグ(登録商標)IIの欠失によって、3'で修飾した。これらの欠失ドメインを、リンカー-SpyTag-C-タグ配列で置換して、Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C(nt 1~1515、シグナルペプチド(nt 1~75)、およびT4フィブリチンfoldonドメイン(nt 1435~1515)を含む)、(GSG)₂リンカー(nt 1516~1533; 配列番号14)、SpyTag(nt 1534~1572; 配列番号15)、C-タグ(nt 1573~1584)および停止コドン(nt 1585~1587)を含む、1587ntカセット(配列番号47)を生じた。リンカー、SpyTag、C-タグおよび停止コドンを除いたSc9-10 DS-Cav1 A149C Y458Cヌクレオチド配列が配列番号48に含まれる。シグナルペプチド、リンカー、SpyTagまたはC-タグを除いたSc9-10 DS-Cav1 A149C Y458Cヌクレオチド酸(nucleotide acid)配列が、配列番号49に含まれる。

【0180】

アミノ酸配列

ヌクレオチド配列、配列番号47の発現は、以下のドメイン: Sc9-10 DS-Cav1 A149C Y458C((aa 1~505、シグナルペプチド(aa 1~25)およびfoldonドメイン(aa 479~505)を含む)、リンカー(aa 506~511; 配列番号29)、SpyTag(aa 512~524; 配列番号30)、C-タグ(aa 525~528)を含むRSV-F-SpyTag-Cタグアミノ酸配列(配列番号50)を生じると予期された。タンパク質の予測分子量は、シグナルペプチドを含めて、57.9kDa、シグナルペプチドを含まず、55.3kDaであった。リンカー、SpyTagまたはC-タグを除いたSc9-10 DS-Cav1 A149C Y458Cアミノ酸配列は、配列番号51に含まれる。シグナルペプチド、リンカー、SpyTagまたはC-タグを除いたSc9-10 DS-Cav1 A149C Y458Cアミノ酸配列は、配列番号52に含まれる。

【0181】

RSV-F-SpyTagの精製

10

20

30

40

50

RSV-F-SpyTag抗原は細胞から分泌され、そしてこれをC-タグアフィニティ精製およびサイズ排除クロマトグラフィを用いて、上清から精製した。RSV-F-SpyTagは、SDS-PAGEによって分析した際、非還元および還元条件下で予想されるように出現し(図10A)、そして抗RSV-F[2F7]モノクローナル抗体(ab43812; Abcam)と反応した(図10B)。

【0182】

HBsAg VLP単量体の精製

SpyCatcher-HBsAg(VLP単量体)を上記実施例1に記載するように調製し、そして精製した。図2もまた参照されたい。

【0183】

RSV-F-SpyTagのSpyCatcher-HBsAgへのコンジュゲート化

RSV-F-SpyTagを、4で一晚、SpyCatcher-HBsAgにコンジュゲート化して、RSV-F三量体でコーティングされたHBsAg VLPを生じた(RSV-F-SpyTag-SpyCatcher-HBsAg)。Tris緩衝生理食塩水を含む緩衝液(TBS; 20mM Trisおよび150mM NaCl、pH7.4)をコンジュゲート化のために用いた。SDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析を用いて、コンジュゲート化を監視した(図11)。コンジュゲート化反応を、RSV-F-SpyTagまたはSpyCatcher-HBsAgのみのいずれかに比較すると、還元条件下で~105kDaの新規バンド(レーン2)の存在があり(図11A)、これは抗HBsAgモノクローナル抗体(MCA4658、Bio-Rad)(図11B)および抗RSV-F[2F7]モノクローナル抗体(ab43812; Abcam)(図11C)の両方と反応性であり、該バンドが、コンジュゲート化RSV-F-SpyTag-SpyCatcher-HBsAgを含有することが示された。

【0184】

〔実施例6〕

コンジュゲート化RSV-F-SpyTag-SpyCatcher-HBsAgの免疫原性

BALB/cマウスを用いた免疫スケジュールを設計して、産生されたRSV-F抗原の免疫原性を確認し、そしてコンジュゲート化RSV-F-SpyTag-SpyCatcher-HBsAg VLP対非コンジュゲート化RSV-F-SpyTagタンパク質の免疫原性を比較した。試料中のRSV-F-SpyTagの量に基づいて、群に投薬し、そして3週間間隔のプライム-ブーストスケジュールを選択して、最終時点をブースト免疫の2週間後とした。

【0185】

プライム後のRSV-F-SpyTag-SpyCatcher-HBsAgで免疫したマウスは、ワクチンがアジュバント化されていない(図6)か、またはAddavaxTMとともに配合されている(図6)かに関わらず、RSV-F-SpyTagタンパク質のみで免疫されたマウスと比較して、実質的に強い血清IgG抗体反応を示す。

【0186】

配列表

【0187】

10

20

30

40

50

【表 4】

配列	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列
柔軟性リンカー2 - (GSG) ₂	n/a	配列番号 1
柔軟性リンカー3 - (GSG) ₃	n/a	配列番号 2
柔軟性リンカー4 - (G4S) ₁	n/a	配列番号 3
柔軟性リンカー5 - (G4S) ₃	n/a	配列番号 4
柔軟性リンカー6 - (G4S) ₄	n/a	配列番号 5
柔軟性リンカー7	n/a	配列番号 6
柔軟性リンカー8	n/a	配列番号 7
柔軟性リンカー9	n/a	配列番号 8
剛直性リンカー1	n/a	配列番号 9
剛直性リンカー2 - (EAAAK) ₃	n/a	配列番号 10
剛直性リンカー3 - (AP) ₇	n/a	配列番号 11
gH-SpyTag-His	配列番号 12	配列番号 27
一部切除膜貫通ドメインを含む gH	配列番号 13	配列番号 28
gH 構築物由来のリンカー (2158-2175bp)	配列番号 14	配列番号 29
SpyTag (2176-2214bp)	配列番号 15	配列番号 30
gL	配列番号 16	配列番号 31
UL130-C-タグ	配列番号 17	配列番号 32
U130 (シグナル配列および外部ドメイン)	配列番号 18	配列番号 33
UL130 構築物由来のリンカー	配列番号 19	配列番号 34
UL128 (2つのイントロンを含む)	配列番号 20	配列番号 35
UL131A (イントロンを含む)	配列番号 21	配列番号 36
SpyCatcher-HBsAg	配列番号 22	配列番号 37
SpyCatcher デルタ N1	配列番号 23	配列番号 38
SpyCatcher-HBsAg 由来の柔軟性リンカー	配列番号 24	配列番号 39
SpyCatcher-HBsAg 由来の PVTN リンカー	配列番号 25	配列番号 40
HBsAg	配列番号 26	配列番号 41
CHO 発現のために最適化された gH-SpyTag-His	配列番号 42	配列番号 27
CHO 発現のために最適化された gL	配列番号 43	配列番号 31
CHO 発現のために最適化された UL128	配列番号 44	配列番号 35
CHO 発現のために最適化された UL130	配列番号 45	配列番号 32
CHO 発現のために最適化された UL131	配列番号 46	配列番号 36
RSV-F-SpyTag-Ctag	配列番号 47	配列番号 50
Sc-9-10 DS-Cav1 A149C Y458C (RSV-F)	配列番号 48	配列番号 51
シグナルペプチドを含まない Sc-9-10 DS-Cav1 A149C Y458C	配列番号 49	配列番号 52
RSV-F DS-Cav1-SpyTag-Ctag	配列番号 53	配列番号 56
RSV-F DS-Cav1	配列番号 54	配列番号 57
シグナルペプチドを含まない RSV-F DS-Cav1	配列番号 55	配列番号 58
一部切除膜貫通ドメインを含み、シグナルペプチドを含まない gH	配列番号 59	配列番号 60

10

20

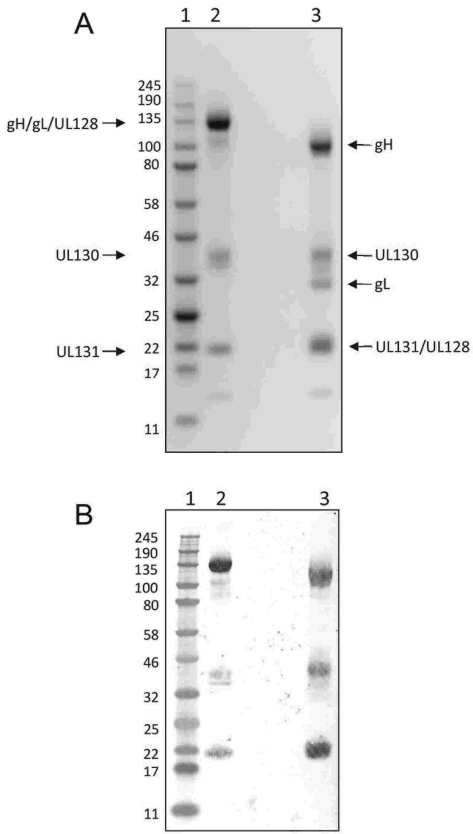
30

40

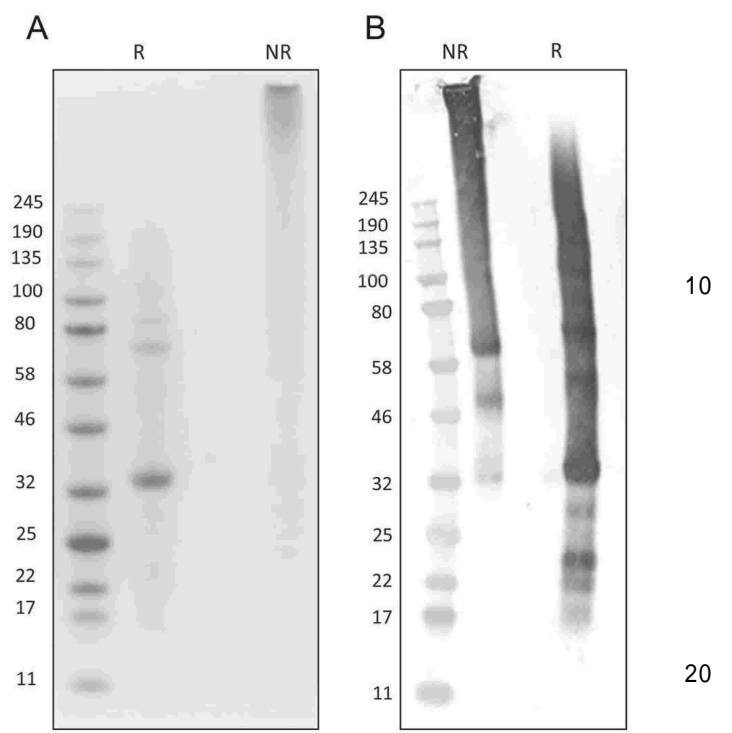
50

【 図面 】

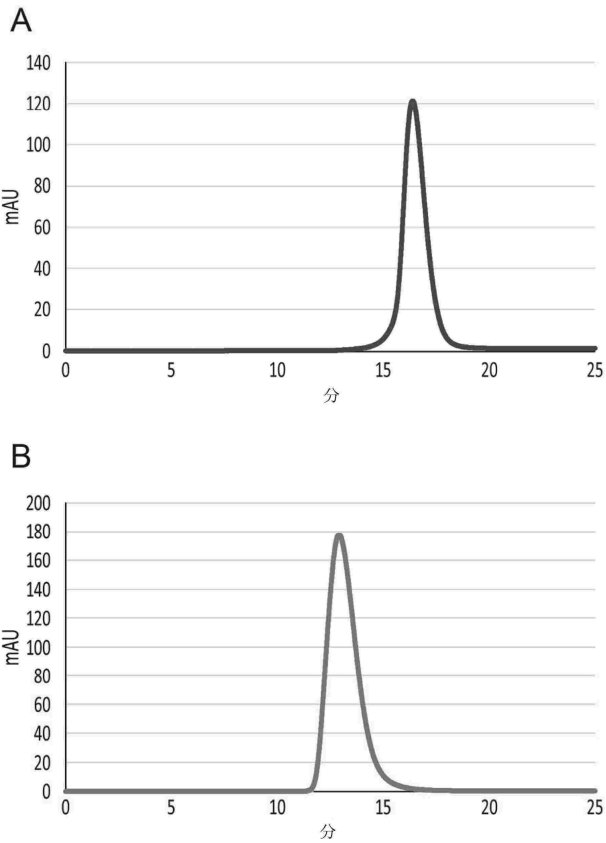
【 図 1 】



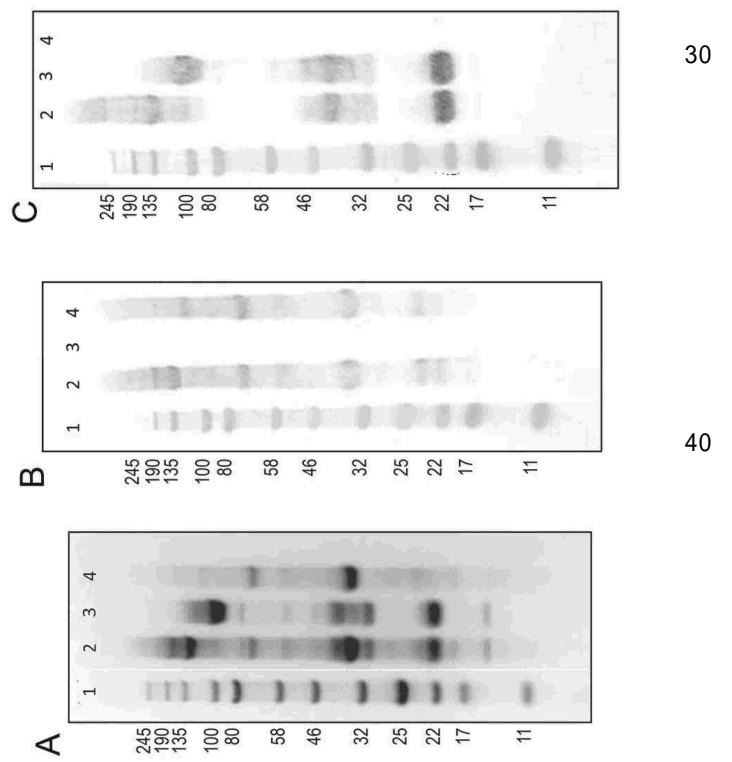
【 図 2 】



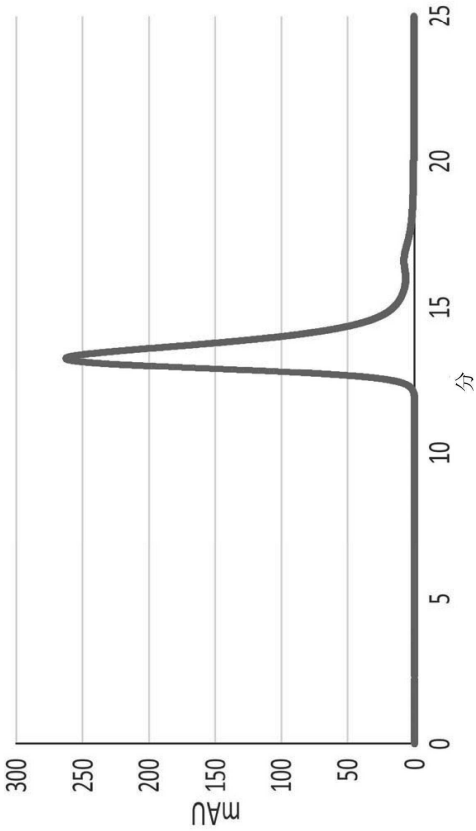
【 図 3 】



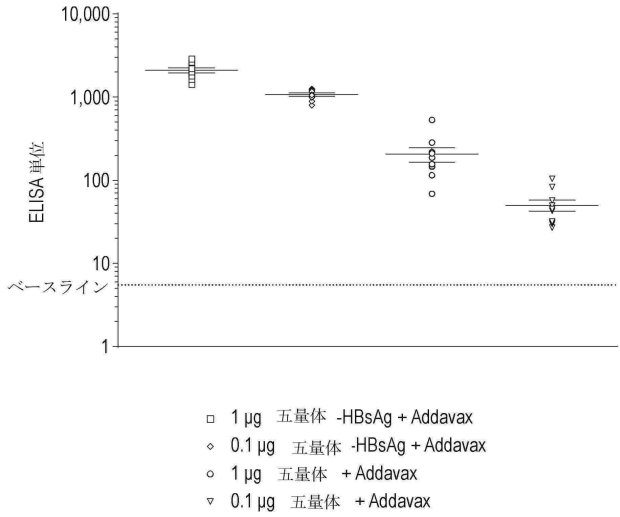
【 図 4 】



【 図 5 】



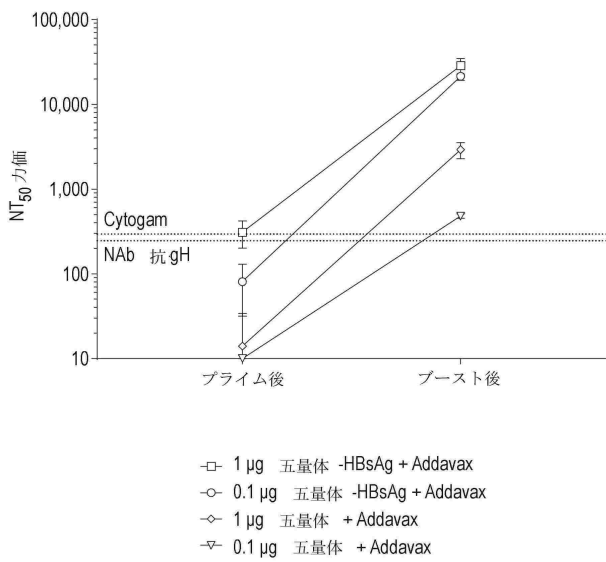
【 図 6 】



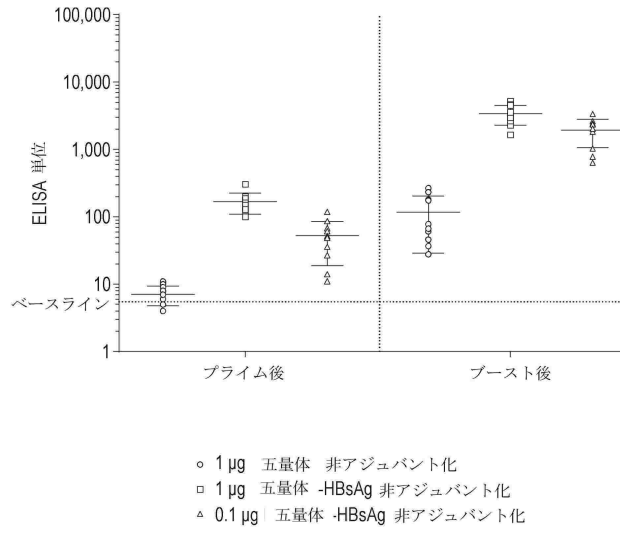
10

20

【 図 7 】



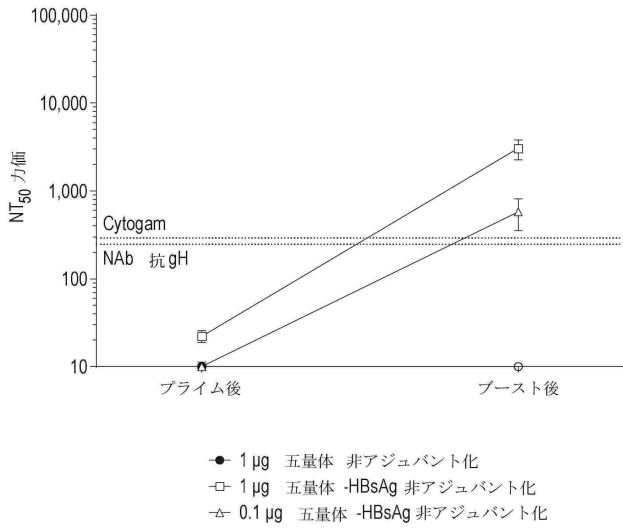
【 図 8 】



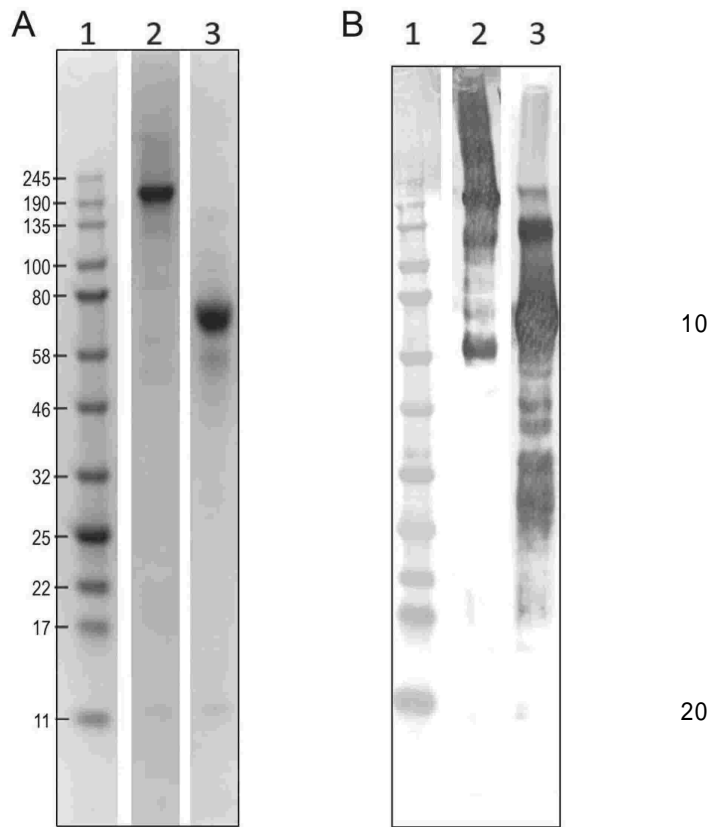
30

40

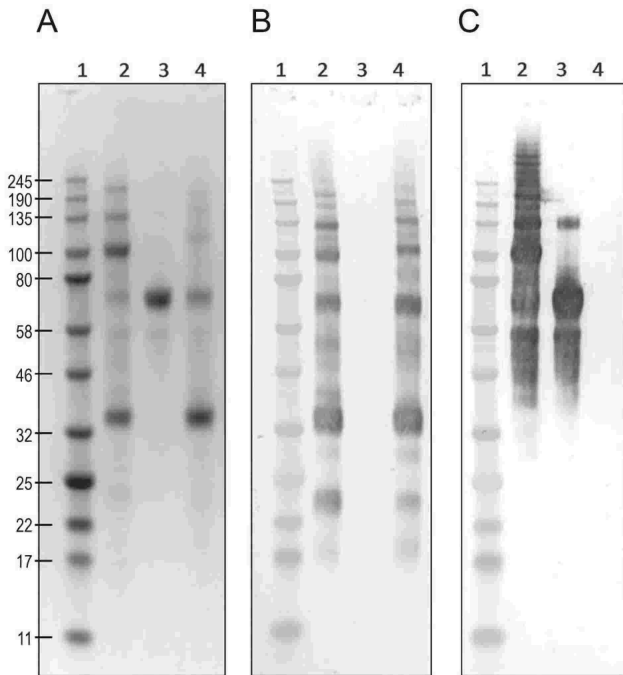
【 図 9 】



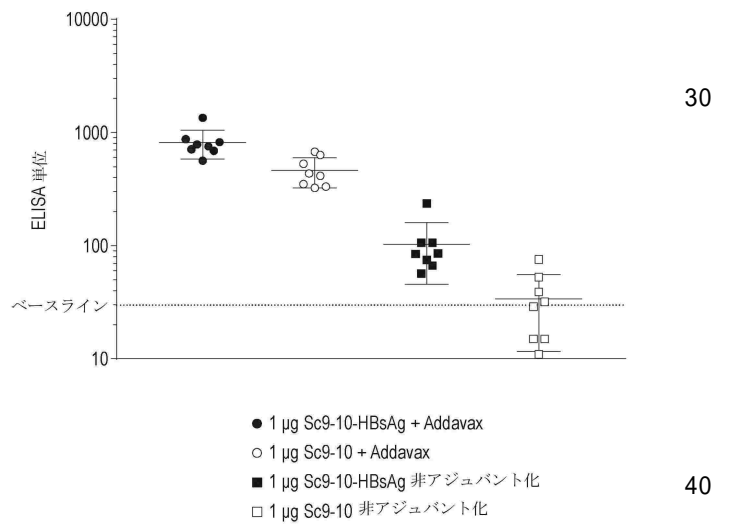
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【配列表】

2024156964000001.app

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年9月5日(2024.9.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

明細書に記載の発明。

10

【外国語明細書】

2024156964000018.pdf

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 37/04 (2006.01)
 C 0 7 K 19/00 (2006.01)
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)
 C 1 2 N 15/62 (2006.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 14/045 (2006.01)
 C 0 7 K 14/08 (2006.01)
 C 1 2 N 15/40 (2006.01)
 C 1 2 N 15/38 (2006.01)

F I

A 6 1 P 37/04
 C 0 7 K 19/00
 C 1 2 P 21/02 C
 C 1 2 N 15/62 Z
 C 1 2 N 15/63 Z
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 K 39/385
 A 6 1 K 39/00 Z N A
 C 0 7 K 14/045
 C 0 7 K 14/08
 C 1 2 N 15/40
 C 1 2 N 15/38

(72)発明者

ビスワス, スミ

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 2ジェイズビー, オックスフォード・ビジネス・パーク・ノース, アウレック・アイシゴニス・ウェイ, ザ・クオラム 7600, ケア・オブ・スパイバイオテック・リミテッド

(72)発明者

ジン, ジン

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 2ジェイズビー, オックスフォード・ビジネス・パーク・ノース, アウレック・アイシゴニス・ウェイ, ザ・クオラム 7600, ケア・オブ・スパイバイオテック・リミテッド

(72)発明者

ダブズ, レベッカ・アリス

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 2ジェイズビー, オックスフォード・ビジネス・パーク・ノース, アウレック・アイシゴニス・ウェイ, ザ・クオラム 7600, ケア・オブ・スパイバイオテック・リミテッド

(72)発明者

ラベール, ジュヌビエーブ・マリー・カトリーヌ

イギリス国 オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス4 2ジェイズビー, オックスフォード・ビジネス・パーク・ノース, アウレック・アイシゴニス・ウェイ, ザ・クオラム 7600, ケア・オブ・スパイバイオテック・リミテッド