

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-134107

(P2018-134107A)

(43) 公開日 平成30年8月30日(2018.8.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/09 ZNAZ	4B065
C07K 14/11 (2006.01)	C07K 14/11	4C085
C12N 15/44 (2006.01)	C12N 15/44	4H045
C12N 15/62 (2006.01)	C12N 15/62 Z	
C12N 7/00 (2006.01)	C12N 7/00	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 143 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-89627 (P2018-89627)
 (22) 出願日 平成30年5月8日 (2018.5.8)
 (62) 分割の表示 特願2016-113966 (P2016-113966) の分割
 原出願日 平成22年3月30日 (2010.3.30)
 (31) 優先権主張番号 61/164,896
 (32) 優先日 平成21年3月30日 (2009.3.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/299,084
 (32) 優先日 平成22年1月28日 (2010.1.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511235962
 アイカーン スクール オブ メディシン
 アット マウント サイナイ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100
 29 ニューヨーク ワン グスタベ エ
 ル. レブイ プラセ
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 アニセ シー. ロウエン
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100
 25 ニューヨーク アプト. 8ディー
 ウエスト 93ルド ストリート 134

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルスワクチン及びその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】複数のインフルエンザ株と交差反応が可能である免疫応答を起こすために、宿主免疫系に1つ以上の比較的保存された抗原性領域を提示するのに有用であるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを提供する。

【解決手段】 a. 1~50の異種残基のリンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントを含むインフルエンザ血球凝集素HA1ドメイン；を含むポリペプチドであって、該HA1ドメインがb. インフルエンザ血球凝集素HA2ドメイン；と三次結合又は四次結合している、前記ポリペプチド。該ポリペプチドは、複数のインフルエンザ株に対して免疫応答を起こさせるのに有益であり得る。

【選択図】 図3

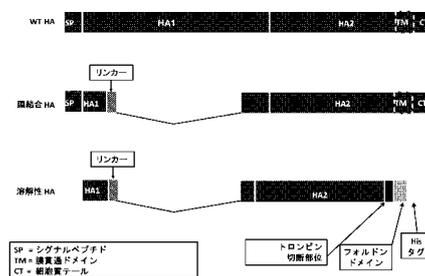


図3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. 1~50の異種残基のリンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントを含むインフルエンザ血球凝集素HA1ドメイン；を含むポリペプチドであって、該HA1ドメインが

b. インフルエンザ血球凝集素HA2ドメイン；

と三次結合又は四次結合している、前記ポリペプチド。

【請求項 2】

前記HA1ドメインが前記HA2ドメインに接触している、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記HA1のC末端ステムセグメントが前記HA2ドメインに共有結合している、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 4】

1RUZの対応するポリペプチドの三次構造又は四次構造から0~5 RMSの偏差を有する三次又は四次構造を有する、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 5】

インフルエンザ血球凝集素に結合することができる中和抗血清に選択的に結合する、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 6】

インフルエンザ球状ドメインを欠く、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記HA1ドメインのアミノ酸配列が、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15又はH16インフルエンザA型からのHA1の対応するドメインのアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記HA2ドメインのアミノ酸配列が、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15又はH16インフルエンザA型からのHA2のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 9】

前記HA2ドメインのアミノ酸配列が、H3インフルエンザA型からのHA2のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記HA2ドメインのアミノ酸配列が、H1インフルエンザA型からのHA2のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 11】

前記HA1のN末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、H3インフルエンザA型からのHA1の残基1~52と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 12】

前記HA1のC末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、H3インフルエンザA型からのHA1の残基277~328と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 13】

前記HA1のN末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、H1インフルエンザA型からのHA1の残基1~44と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記HA1のC末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、H1インフルエンザA型からのHA1の残基291～326と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項15】

前記HA2ドメインのアミノ酸配列が、インフルエンザB型からのHA2のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項16】

前記HA1ドメインのアミノ酸配列が、インフルエンザB型からのHA1の対応するドメインのアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である、請求項1記載のポリペプチド。

10

【請求項17】

前記HA1のN末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、インフルエンザB型からのHA1の残基1～80と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項18】

前記HA1のC末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、インフルエンザB型からのHA1の残基277～344と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項19】

前記HA1のN末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、インフルエンザB型からのHA1の残基1～50と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

20

【請求項20】

前記HA1のC末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、インフルエンザB型からのHA1の残基277～344と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項21】

前記HA1のN末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、インフルエンザB型からのHA1の残基1～66と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

30

【請求項22】

前記HA1のC末端ステムセグメントのアミノ酸配列が、インフルエンザB型からのHA1の残基271～344と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である配列からなる、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項23】

前記HA1のN末端ステムセグメントが、ジスルフィド架橋を介してHA1のC末端ステムセグメントのシステイン残基に共有結合しているシステイン残基を含む、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項24】

前記HA1のN末端ステムセグメントがアミノ酸配列 $A_{17}-A_{18}-(Xaa)_n-A_{38}$ (配列番号146)を含み、式中、

40

A_{17} は、Y又はHであり；

A_{18} は、H、L又はQであり；

$(Xaa)_n$ は、18～20アミノ酸残基の配列を表し；かつ

A_{38} は、H、S、Q、T又はNである；

請求項1記載のポリペプチド。

【請求項25】

前記HA1のC末端ステムセグメントがアミノ酸配列 $A_{291}-A_{292}$ を含み、式中、

A_{291} は、T、S、N、D、P又はKであり；かつ

50

A₂₉₂ は、L、M、K又はRである；
請求項1記載のポリペプチド。

【請求項26】

前記HA2ドメインがアミノ酸配列A₁₈-A₁₉-A₂₀-A₂₁を含み、式中、
A₁₈ は、V又はIであり；
A₁₉ は、D、N又はAであり；
A₂₀ は、Gであり；かつ
A₂₁ は、Wである；
請求項1記載のポリペプチド。

【請求項27】

前記HA2ドメインがアミノ酸配列A₃₈-A₃₉-A₄₀-A₄₁-A₄₂-A₄₃-A₄₄-A₄₅-A₄₆-A₄₇-A₄₈-A₄₉-A₅₀-A₅₁-A₅₂-A₅₃-A₅₄-A₅₅-A₅₆(配列番号149)を含み、式中、

A₃₈ は、K、Q、R、L又はYであり；
A₃₉ は、任意のアミノ酸残基であり；
A₄₀ は、任意のアミノ酸残基であり；
A₄₁ は、Tであり；
A₄₂ は、Qであり；
A₄₃ は、任意のアミノ酸残基であり；
A₄₄ は、Aであり；
A₄₅ は、Iであり；
A₄₆ は、Dであり；
A₄₇ は、任意のアミノ酸残基であり；
A₄₈ は、I、V又はMであり；
A₄₉ は、T、Q又はNであり；
A₅₀ は、任意のアミノ酸残基であり；
A₅₁ は、Kであり；
A₅₂ は、V又はLであり；
A₅₃ は、Nであり；
A₅₄ は、任意のアミノ酸残基であり；
A₅₅ は、V、I又はLであり；かつ
A₅₆ は、V又はIである；

請求項1記載のポリペプチド。

【請求項28】

前記リンカーが1~40、1~30残基、1~20残基、1~10残基、1~5残基、1~4残基、1~3残基、1~2残基又は1残基である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項29】

前記リンカーが、

【化1】

GG, PG, GGG, GGGG, GGGGG,

ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA, NAS及び直接結合

からなる群から選択される、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項30】

請求項1~29のいずれか一項記載のポリペプチドをコードする核酸。

【請求項31】

請求項30記載の核酸を発現する細胞。

【請求項32】

請求項30記載の核酸を発現するように改変されたゲノムを含むウイルス。

【請求項33】

請求項1~29のいずれか一項記載のポリペプチドを含むウイルス。

10

20

30

40

50

- 【請求項 3 4】
インフルエンザウイルスである、請求項32又は33記載のウイルス。
- 【請求項 3 5】
インフルエンザA型ウイルスである、請求項34記載のウイルス。
- 【請求項 3 6】
インフルエンザB型ウイルスである、請求項34記載のウイルス。
- 【請求項 3 7】
ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)(NDV)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus)(AAV)又はレトロウイルスである、請求項32又は33記載のウイルス。 10
- 【請求項 3 8】
不活化又はスプリットウイルスである、請求項33記載のウイルス。
- 【請求項 3 9】
不活化又はスプリットウイルスである、請求項34記載のウイルス。
- 【請求項 4 0】
請求項1～29のいずれか一項記載のポリペプチドを含むウイルス様粒子。
- 【請求項 4 1】
請求項1～29のいずれか一項記載のポリペプチドを含む免疫原性組成物。
- 【請求項 4 2】
請求項32記載のウイルス及び医薬として許容し得る担体を含む免疫原性組成物。 20
- 【請求項 4 3】
請求項33記載のウイルス及び医薬として許容し得る担体を含む免疫原性組成物。
- 【請求項 4 4】
請求項34記載のウイルスを含む免疫原性組成物。
- 【請求項 4 5】
請求項38記載のウイルス及び医薬として許容し得る担体を含む免疫原性組成物。
- 【請求項 4 6】
請求項39記載のウイルス及び医薬として許容し得る担体を含む免疫原性組成物。
- 【請求項 4 7】
アジュバントをさらに含む、請求項45記載の免疫原性組成物。 30
- 【請求項 4 8】
アジュバントをさらに含む、請求項46記載の免疫原性組成物。
- 【請求項 4 9】
請求項40記載のウイルス様粒子及び医薬として許容し得る担体を含む免疫原性組成物。
- 【請求項 5 0】
対象に請求項41記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、該対象を免疫化する方法。
- 【請求項 5 1】
対象に請求項43記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、該対象を免疫化する方法。 40
- 【請求項 5 2】
対象に請求項44記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、該対象を免疫化する方法。
- 【請求項 5 3】
対象に請求項45記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、該対象を免疫化する方法。
- 【請求項 5 4】
対象に請求項46記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、該対象を免疫化する方法。
- 【請求項 5 5】 50

対象に請求項47記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、該対象を免疫化する方法。

【請求項56】

対象に請求項48記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、該対象を免疫化する方法。

【請求項57】

対象に請求項49記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、該対象を免疫化する方法。

【請求項58】

前記対象がヒトである、請求項50記載の方法。

10

【請求項59】

前記対象がヒトである、請求項51記載の方法。

【請求項60】

前記対象がヒトである、請求項52記載の方法。

【請求項61】

前記対象がヒトである、請求項53記載の方法。

【請求項62】

前記対象がヒトである、請求項54記載の方法。

【請求項63】

前記対象がヒトである、請求項55記載の方法。

20

【請求項64】

前記対象がヒトである、請求項56記載の方法。

【請求項65】

前記対象がヒトである、請求項57記載の方法。

【請求項66】

前記免疫原性組成物を前記対象の筋内又は鼻腔内に投与する、請求項51記載の方法。

【請求項67】

対象に請求項41記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、インフルエンザウイルス疾患を予防する方法。

【請求項68】

30

対象に請求項41記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患を治療する方法。

【請求項69】

対象に請求項44記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、インフルエンザウイルス疾患を予防する方法。

【請求項70】

対象に請求項44記載の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む、インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患を治療する方法。

【請求項71】

前記対象がヒトである、請求項67記載の方法。

40

【請求項72】

前記対象がヒトである、請求項68記載の方法。

【請求項73】

前記対象がヒトである、請求項69記載の方法。

【請求項74】

前記対象がヒトである、請求項70記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2009年3月30日に本願の米国特許仮出願第61/164,896号及び2010年1月28日に

50

出願の米国特許仮出願第61/299,084号の優先権の利益を主張し、その各々は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) (NIH) 米国国立アレルギー感染病研究所 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) からの交付番号RC1 A1086061、NIHからの交付番号U54 A1057158、米国保健省 (United States Department of Health and Human Services) からの交付番号HHSN266200700010C、及びNIHからの交付番号U01 A1070469の下で、一部米国政府の援助で作られた。米国政府は、この発明に一定の権利を有することができる。

【0003】

(1. 序論)

本明細書では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、それを含む組成物、それを含むワクチン及びその使用方法が提供される。

【背景技術】

【0004】

(2. 背景)

インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス (Orthomyxoviridae) 科に属するエンペロープ型のRNAウイルスである (Palese及びShawの文献 (2007、オルソミクソウイルス科: ウイルス及びそれらの複製 (Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication)、5版フィールズのウイルス学 (Fields' Virology)、B.N. Fields、D. M. Knipe及びP.M. Howley編。Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins、Philadelphia, USA、p 1647-1689))。インフルエンザウイルスの天然の宿主は鳥類であるが、インフルエンザウイルス (鳥類起源のものを含む) は、ヒト及び他の動物宿主 (イヌ、ブタ、ウマ、海洋哺乳動物及びイタチ類) に感染すること及びそこで疾患を引き起こすこともできる。例えば、アジアで広がっているH5N1鳥インフルエンザウイルスは中国及びインドネシアのブタで見出されており、その宿主範囲を広げて、一般にインフルエンザA型に感受性であるとみなされていない (CIDRAP-鳥類のインフルエンザ: 農業及び野生生物での注意事項 (Avian Influenza: Agricultural and Wildlife Considerations)) ネコ、ヒョウ及びトラを含むようになってもいる。動物におけるインフルエンザウイルスによる感染の出現は、ヒト汎発性インフルエンザ株を発生させる可能性がある。

【0005】

インフルエンザA型及びB型ウイルスは主要なヒト病原体であり、無症状感染から死をもたらすこともある原発性ウイルス性肺炎まで程度が異なる呼吸器疾患を引き起こす。感染の臨床上的結果は、インフルエンザ株の病原性、並びに宿主の曝露、病歴、年齢及び免疫状態で異なる。季節性インフルエンザに起因する累積罹患率及び死亡率は、比較的高い発病率のためにかかなり高い。通常の季節では、インフルエンザは世界中で3,000,000~5,000,000の重度症例数及び最高500,000の死亡症例数を引き起こすことができる (World Health Organization (2003) インフルエンザ: 概要 (Influenza: Overview); <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>; 2003年3月)。米国では、インフルエンザウイルスは人口の概算10~15%に感染し (Glezen及びCouch RBの文献 (1978、1974~76年のヒューストン地域における大流行の狭間のインフルエンザ (Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-76)。N Engl J Med 298: 587-592); Foxらの文献 (1982、1975~1979年のシアトルの家庭におけるインフルエンザウイルスによる感染 (Influenza virus infections in Seattle families, 1975-1979)。II. 侵入された家庭での感染パターン並びに年齢及び先行抗体と感染及び関連疾患の出現との関係 (II. Pattern of infection in invaded households and relation of age and prior antibody to occurrence of infection and related illness)。Am J Epidemiol 116: 228-242))、毎年約30,000の死亡症例数に関連する (Thompson WWらの文献 (2003、米国におけるインフルエンザ及びRSウイルスに関連する死亡率 (Mortality Associated with Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the United States)。JAMA 289: 179-186); Belsheの文献 (2007、ワクチンに関する翻訳研究:

10

20

30

40

50

インフルエンザを例として(Translational research on vaccines: influenza as an example)。Clin Pharmacol Ther 82: 745-749)。

【0006】

毎年の流行に加えて、インフルエンザウイルスは数少ない大流行の原因である。例えば、インフルエンザA型ウイルスは、1918年、1957年、1968年及び2009年に起こったものなどの大流行を引き起こすことができる。主要なウイルス抗原、血球凝集素(hemagglutinin)(HA)に対する予め形成された免疫を欠くために、大流行インフルエンザは単一年に50%を超える人口に罹患させることができ、しばしば流行性インフルエンザよりも重度の疾患を引き起こす。苛酷な例は1918年の大流行であり、そこでは概算50,000,000~100,000,000人が死亡した(Johnson及びMuellerの文献(2002、アカウントの更新:1918~1920年の「スペインの」インフルエンザ大流行の世界全体の死亡率(Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918-1920 "Spanish" Influenza Pandemic)Bulletin of the History of Medicine 76: 105-115))。1990年代後期の高病原性鳥H5N1インフルエンザウイルスの出現以来(Claasらの文献(1998、高病原性鳥インフルエンザウイルスに関連するヒトインフルエンザA型H5N1ウイルス(Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus)。Lancet 351: 472-7))、それが次の大流行ウイルスであり得るとの懸念がある。

10

【0007】

インフルエンザウイルス感染から保護する有効な方法は、ワクチン接種を通してである;しかし、現在のワクチン接種手法は、循環している株とワクチンに含まれる分離株との間で良好な一致を達成することに依存する。そのような一致は、因子の組合せのために達成するのがしばしば困難である。第一に、インフルエンザウイルスは継続的に変化している:3~5年ごとに、インフルエンザA型ウイルスの優勢株は、既存の抗体応答を避けるために十分な抗原ドリフトを経た変異株によって入れ替わられる。したがってワクチン製剤に含まれるべき分離株は、World Health Organization (WHO)の共同研究センターの集中的な監視努力に基づいて毎年選択されなければならない。第二に、ワクチンの製造及び配布のために十分な時間を与えるために、株はインフルエンザシーズンの開始の約6カ月前に選択されなければならない。しばしば、ワクチン株選択委員会の予測は不正確であり、ワクチン接種の効力のかなりの低下をもたらす。

20

【0008】

インフルエンザA型ウイルスの新規サブタイプがヒト集団に入る可能性も、現在のワクチン接種戦略にかなりの難題となっている。インフルエンザウイルスのどのサブタイプ及び株が次の大流行をもたらすかを予測することが不可能であるので、大流行インフルエンザワクチンを調製するために現在の株特異的手法を用いることができない。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(3. 要旨)

一態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、本明細書に記載されるように球状ヘッドドメインを欠く。

40

【0010】

いかなる特定の作動理論によっても束縛されるものではないが、インフルエンザ血球凝集素の球状ヘッドドメインは1つ以上の高免疫原性領域を含むと考えられている。これらの高免疫原性領域は、宿主免疫応答を発生させ得る。しかし、高免疫原性領域は、インフルエンザウイルスの株によって異なり得る。本明細書で提示される実施態様は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインの残基が比較的保存され、免疫原性であること、及びこの領域に結合する抗体が中和性であってもよいことの発見に一部基づく。インフルエンザ血球凝集素の球状ヘッドドメインのすべて又は実質的にすべてを欠いているインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを用いて、ステムドメインポリペプチドの1つ

50

以上の保存されたエピトープに対して免疫応答を引き起こすことができる。球状ヘッドドメインの高免疫原性領域の除去は、ステムドメインポリペプチドの1つ以上のエピトープを宿主免疫系に曝露させ得る。さらに、特定の実施態様では、そこに存在するグリコシル化部位の変化を通してのインフルエンザ血球凝集素ステムドメインのグリコシル化の除去は、ステムドメインの保存領域を宿主免疫応答にとってよりアクセスしやすくすることができる。

【0011】

ステムドメインポリペプチドの1つ以上のエピトープが球状ヘッドドメインの高免疫原性領域よりも低い免疫原性である場合、ステムドメインポリペプチドでの球状ヘッドドメインが存在しないことは、ステムドメインポリペプチドの1つ以上のエピトープに対する免疫応答を起し得る。有利には、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドのアミノ酸配列は、ウイルスサブタイプ全域にわたって保存され、又は高度に保存され得るので、本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに対する免疫応答は、ステムドメインポリペプチドに対応するサブタイプ以外の1つ以上のウイルスサブタイプと交差反応し得る。したがって、本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、複数のインフルエンザウイルス株に対して免疫応答を起すことができる免疫原性組成物(例えばワクチン)に役立つことができる。

10

【0012】

いかなる理論によっても束縛されることなく、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、インフルエンザ血球凝集素の球状ヘッドドメインを欠き、インフルエンザ血球凝集素の融合前立体構造の安定性を維持するポリペプチドの発明者による発見の一部に基づく。一態様では、理論によって束縛されることなく、図1のインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドのA_p及びA_qと同定されたシステイン残基の維持が、インフルエンザ血球凝集素の軸領域の安定性を供与することを発明者は発見した。別の態様では、理論によって束縛されることなく、インフルエンザ血球凝集素ポリペプチドの融合前立体構造を維持するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、対象で保護効果を誘導するのにより有効であることを発明者は発見した。特定の態様では、融合前立体構造の安定性は、HA1 H17Y(H3番号付け)などの、特定の残基にアミノ酸置換を導入することによって付与することができる。

20

30

【0013】

(3.1 用語)

アミノ酸位置に関して用いられる場合、用語「約」又は「およその」は、配列中の特定のアミノ酸位置、又はN末端方向又はC末端方向の、そのアミノ酸位置から5、4、3、2又は1残基以内にある任意のアミノ酸を指す。

【0014】

本明細書で用いるように、数字と一緒に用いられる場合、用語「約」又は「およそ」は、参照される数字の1、5又は10%以内の任意の数字を指す。

【0015】

用語「アミノ酸配列同一性」は、1対の整列されるアミノ酸配列の間の、通常百分率で表される同一性又は類似性の程度を指す。同一性割合は、配列を整列させ、必要に応じて最大の配列相同性割合を達成するためにギャップを導入した後の、ペプチド中の対応するアミノ酸残基と同一である(すなわち、整列中の所与の位置のアミノ酸残基が同じ残基である)か又は類似している(すなわち、下で述べるように、整列中の所与の位置のアミノ酸置換が保存的な置換である)、候補配列中のアミノ酸残基の百分率である。配列の同一性及び類似性の百分率を含む配列相同性は、周知の技術である配列整列技術を用いて、好ましくはこの目的のために設計されたコンピュータアルゴリズムを前記コンピュータアルゴリズムのデフォルトパラメータを使用して、又はそれらを含むソフトウェアパッケージを用いて決定される。コンピュータアルゴリズム及びそのようなアルゴリズムを組み込んでいるソフトウェアパッケージの非限定例には、以下のものが含まれる。BLASTファミリー

40

50

のプログラムは、2つの配列の比較のために利用される数値計算用アルゴリズムの特定の非限定例を例示する(例えば、Karlin及びAltschulの文献、(1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268)(Karlin及びAltschulの文献、(1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877)のように修正された)、Altschulらの文献、(1990、J. Mol. Biol. 215:403-410)(NBLAST及びXBLASTを記載する)、Altschulらの文献、(1997、Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)(Gapped BLAST及びPSI-Blastを記載する)。別の特定の例はMyers及びMillerの文献(1988 CABIOS 4:11-17)のアルゴリズムであり、それはALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれ、GCG配列整列ソフトウェアパッケージの一部として入手可能である。別の特定例はFASTAプログラム(Pearson W.R.及びLipman D.J.の文献、(Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448, 1988))であり、Wisconsin Sequence Analysisパッケージの一部として入手可能である。さらなる例にはBESTFITが含まれ、それは、2つの配列の間で類似性の最良の単一の領域を見出すためにSmith及びWatermanの文献(Advances in Applied Mathematics, 2:482-489, 1981)の「ローカル相同性」アルゴリズムを用い、比較されている2つの配列の長さが異なる場合に好ましく;及びGAPが含まれ、それは、Neddleman及びWunschの文献(J. Mol. Biol. 48:443-354, 1970)のアルゴリズムに従って「最大類似性」を見出すことによって2つの配列を整列させ、2つの配列がおよそ同じ長さであり、整列が全長にわたって予想される場合に好ましい。

10

【0016】

「保存的置換」は、1つのクラスのアミノ酸の、同じクラスの別のアミノ酸による置換を指す。特定の実施態様では、保存的置換は、ポリペプチドの構造又は機能、又はその両方とも変化させない。保存的置換の目的のためのアミノ酸のクラスには、疎水性(Met, Ala, Val, Leu, Ile)、中性親水性(Cys, Ser, Thr)、酸性(Asp, Glu)、塩基性(Asn, Gln, His, Lys, Arg)、立体構造崩壊因子(Gly, Pro)、及び芳香族(Trp, Tyr, Phe)が含まれる。

20

【0017】

本明細書で用いるように、用語「疾患」及び「障害」は互換的に用いられて、対象の状態を指す。一部の実施態様では、状態はウイルス感染である。具体的な実施態様では、用語「疾患」は、細胞又は対象におけるウイルスの存在から生じる、或いはウイルスによる細胞又は対象への侵入による病理学的状態を指す。特定の実施態様では、状態は対象での疾患であり、その重症度は免疫原性組成物の投与を通して対象で免疫応答を誘導することによって低減される。

30

【0018】

本明細書で用いるように、対象への療法の投与との関連で用語「有効量」は、予防及び/又は治療効果(複数可)を有する療法の量を指す。特定の実施態様では、対象への療法の投与との関連で「有効量」は、以下の効果の1、2、3、4個又はそれ以上を達成するのに十分である療法の量を指す:(i)インフルエンザウイルス感染、それに付随する疾患又は症状の重症度を低減又は改善する;(ii)インフルエンザウイルス感染、それに付随する疾患又は症状の持続期間を短縮する;(iii)インフルエンザウイルス感染、それに付随する疾患又は症状の進行を予防する;(iv)インフルエンザウイルス感染、それに付随する疾患又は症状の退行をもたらす;(v)インフルエンザウイルス感染、それに付随する疾患又は症状の発達又は開始を予防する;(vi)インフルエンザウイルス感染、それに付随する疾患又は症状の再発を予防する;(vii)1つの細胞から別の細胞、1つの組織から別の組織、又は1つの器官から別の器官へのインフルエンザウイルスの伝播を低減又は予防する;(ix)1対象から別の対象へのインフルエンザウイルスの伝播を予防又は低減する;(x)インフルエンザウイルス感染に付随する器官不全を低減する;(xi)対象の入院を減少させる;(xii)入院期間を短縮する;(xiii)インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患を有する対象の生存を増加させる;(xiv)インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患を除去する;(xv)インフルエンザウイルスの複製を阻害又は低減する;(xvi)宿主細胞(複数可)へのインフルエンザウイルスの侵入を阻害又は低減する;(xviii)インフルエンザウイルスゲノムの複製を阻害又は低減する;(xix)インフルエンザウイルスタンパク質の合成を阻害又は低減する;(xx)インフルエンザウイルス粒子のアセンブリーを阻害又は低減する;(xxi)宿主細胞(

40

50

複数可)からのインフルエンザウイルス粒子の放出を阻害又は低減する;(xxii)インフルエンザウイルス力価を低下させる;及び/又は(xxiii)別の療法の予防又は治療効果(複数可)を増強又は改善する。

【0019】

特定の実施態様では、有効量はインフルエンザウイルス疾患からの完全な保護をもたらさないが、未処置の対象と比較してより低い力価又は少ない数のインフルエンザウイルスをもたらす。特定の実施態様では、有効量は、未処置の対象と比較して0.5倍、1倍、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、125倍、150倍、175倍、200倍、300倍、400倍、500倍、750倍、又は1,000倍又はそれ以上のインフルエンザウイルスの力価の低下をもたらす。一部の実施態様では、有効量は、未処置の対象と比較して約1log以上、約2log以上、約3log以上、約4log以上、約5log以上、約6log以上、約7log以上、約8log以上、約9log以上、約10log以上、1~3log、1~5log、1~8log、1~9log、2~10log、2~5log、2~7log、2~8log、2~9log、2~10log、3~5log、3~7log、3~8log、3~9log、4~6log、4~8log、4~9log、5~6log、5~7log、5~8log、5~9log、6~7log、6~8log、6~9log、7~8log、7~9log又は8~9logのインフルエンザウイルスの力価の低下をもたらす。インフルエンザウイルスの力価、数又は総負荷の減少の利点には、重症度のより低い感染症状、より少ない感染症状、及び感染に付随する疾患の長さの短縮が含まれるが、これらに限定されない。

【0020】

「血球凝集素」及び「HA」は、当業者に公知である任意の血球凝集素を指す。特定の実施態様では、血球凝集素はインフルエンザA型血球凝集素、インフルエンザB型血球凝集素又はインフルエンザC型血球凝集素などのインフルエンザ血球凝集素である。一般的な血球凝集素は、シグナルペプチド(本明細書では任意選択)、ステムドメイン、球状ヘッドドメイン、ルミナルドメイン(本明細書では任意選択)、膜貫通ドメイン(本明細書では任意選択)及び細胞質ドメイン(本明細書では任意選択)を含む、当業者に公知であるドメインを含む。特定の実施態様では、血球凝集素はHA0など単一のポリペプチド鎖からなる。特定の実施態様では、血球凝集素は、HA1及びHA2など、第四級結合の複数のポリペプチド鎖からなる。当業者は、未熟なHA0が切断されてシグナルペプチド(約20アミノ酸)を放出し、成熟した血球凝集素HA0を与えるであろうことを認識する。血球凝集素HA0は、別の部位で切断されて、HA1ポリペプチド(球状ヘッドドメイン及びステムドメインの一部を含む約320アミノ酸)及びHA2ポリペプチド(ステムドメインの残り、ルミナルドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを含む約220アミノ酸)を与え得る。特定の実施態様では、血球凝集素はシグナルペプチド、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを含む。特定の実施態様では、血球凝集素はシグナルペプチドを欠き、すなわち血球凝集素は成熟した血球凝集素である。特定の実施態様では、血球凝集素は膜貫通ドメイン又は細胞質ドメイン、又は両方とも欠く。本明細書で用いるように、用語「血球凝集素」及び「HA」は、シグナルペプチド切断、ジスルフィド結合形成、グリコシル化(例えば、N連結グリコシル化)、プロテアーゼ切断及び脂質修飾(例えばS-パルミトイル化)などの翻訳後プロセッシングによって修飾される血球凝集素ポリペプチドを包含する。

【0021】

「HA1のN末端ステムセグメント」は、インフルエンザ血球凝集素HA1ポリペプチドのステムドメインのアミノ末端部分に対応するポリペプチドセグメントを指す。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、HA1ドメインのアミノ酸 A_{N-term} から A_p までにはほぼ対応するアミノ酸残基からなる。 A_{N-term} は、当業者によって認識されているようにHA1のN末端アミノ酸である。 A_p は、HA1のC末端ステムセグメント中のシステイン残基とジスルフィド結合を形成する、又は形成することができる、HA1のN末端ステムセグメント中のシステイン残基である。残基 A_p は、図1のインフルエンザA型血球凝集素ポリペプチドで同定されている。例示的なHA1のN末端ステムセグメントを、本明細書に記載する。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、H3血球凝集素からのHA1のアミノ酸1~52にほぼ対応するアミノ酸残基からなる。なお、この番号付け方式では、1は、シグナルペプ

チドが除去されている成熟したHA0タンパク質のN末端アミノ酸を指す。

【0022】

「HA1のC末端ステムセグメント」は、インフルエンザ血球凝集素HA1ポリペプチドのステムドメインのカルボキシ末端部分に対応するポリペプチドセグメントを指す。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、HA1ドメインのアミノ酸A_qからA_{C-term}までにほぼ対応するアミノ酸残基からなる。A_qは、HA1のN末端ステムセグメント中のシステイン残基とジスルフィド結合を形成する、又は形成することができる、HA1のC末端ステムセグメント中のシステイン残基である。A_{C-term}は、当業者によって認識されているようにHA1ドメインのC末端アミノ酸である。残基A_qは、図1のインフルエンザA型血球凝集素ポリペプチドで同定されている。例示的なHA1のC末端ステムセグメントを、本明細書に記載する。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、H3血球凝集素からのHA1のアミノ酸277~346にほぼ対応するアミノ酸残基からなる。なお、この番号付け方式では、1は、シグナルペプチドが除去されている成熟したHA0タンパク質のN末端アミノ酸を指す。

10

【0023】

「HA2」は、当業者に公知であるインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドのHA2ドメインに対応するポリペプチドドメインを指す。特定の実施態様では、HA2は、ステムドメイン、ルミナルドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインからなる(例えば、その内容が引用によりその全体が組み込まれている、Scheiffleらの文献、(2007、EMBO J. 16(18):5501-5508)を参照)。特定の実施態様では、HA2は、ステムドメイン、ルミナルドメイン及び膜貫通ドメインからなる。特定の実施態様では、HA2は、ステムドメイン及びルミナルドメインからなる;そのような実施態様では、HA2は溶解性であり得る。特定の実施態様では、HA2はステムドメインからなる;そのような実施態様では、HA2は溶解性であり得る。

20

【0024】

本明細書で用いるように、ポリペプチド、核酸又はウイルスとの関連で用語「異種」は、天然で通常見出されないか、又は天然で対象のポリペプチド、核酸又はウイルスと通常関連していないポリペプチド、核酸又はウイルスをそれぞれ指す。例えば、「異種ポリペプチド」は、異なるウイルス、例えば異なるインフルエンザ株若しくはサブタイプ、又は無関係なウイルス又は異なる種に由来するポリペプチドを指すことができる。

【0025】

本明細書で用いるように、対象への2つ以上の療法の投与との関連で用語「併用」は、複数の療法(例えば、複数の予防剤及び/又は治療剤)の使用を指す。用語「併用」の使用は、療法が対象に投与される順序を制限しない。例えば、第一の療法(例えば、第一の予防薬又は治療剤)は、対象への第二の療法の投与の前に(例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週又は12週前に)、同時に、又は後に(例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週又は12週後に)投与されてもよい。

30

【0026】

本明細書で用いるように、用語「感染」は、細胞又は対象におけるウイルスによる侵入、その増殖及び/又は存在を意味する。一実施態様では、感染は「活性」感染、すなわちウイルスが細胞又は対象で複製しているものである。そのような感染は、ウイルスによって最初に感染する細胞、組織及び/又は器官からの、他の細胞、組織及び/又は器官へのウイルスの伝播を特徴とする。感染は、潜伏性の感染、すなわちウイルスが複製していないものであってもよい。特定の実施態様では、感染は、細胞又は対象におけるウイルスの存在から生じる、或いはウイルスによる細胞又は対象への侵入による病理学的状態を指す。

40

【0027】

本明細書で用いるように、用語「インフルエンザウイルス疾患」は、細胞又は対象におけるインフルエンザ(例えば、インフルエンザA型若しくはB型ウイルス)ウイルスの存在、或いは細胞又は対象へのインフルエンザウイルスによる侵入から生じる病理学的状態を指す。具体的な実施態様では、本用語はインフルエンザウイルスに起因する呼吸器疾患を指

50

す。

【0028】

本明細書で用いるように、句「IFN欠陥系」又は「IFN欠陥基体」は、IFNを生成しないか、又は低レベルのIFNを生成し(すなわち、同じ条件下でのIFNコンピテント系と比較して5~10%、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、60~70%、70~80%、80~90%又はそれ以上のIFN発現の低下)、IFNに応答しないか又はより非効率的に応答し、及び/或いはIFNによって誘導される1つ以上の抗ウイルス遺伝子の活性に欠陥のある系、例えば細胞、細胞系、及びブタ、マウス、ニワトリ、七面鳥、ウサギ、ラットなどの動物を指す。

【0029】

本明細書で用いるように、数値用語「log」は、 \log_{10} を指す。

10

【0030】

本明細書で用いるように、句「感染多重度」又は「MOI」は、感染細胞あたりの感染ウイルス粒子の平均数である。MOIは、加えた感染性ウイルス粒子の数(加えたml×PFU/ml)を、加えた細胞数(加えたml×細胞数/ml)で割ることによって決定される。

【0031】

本明細書で用いるように、用語「核酸」は、DNA分子(例えば、cDNA又はゲノムDNA)及びRNA分子(例えば、mRNA)及びヌクレオチド類似体を用いて生成されたDNA又はRNAの類似体を含むものとする。核酸は一本鎖又は二本鎖であってもよい。

【0032】

当業者に公知であるように、「ポリペプチド」は、アミド結合によって連結されるアミノ酸のポリマーを指す。本明細書で用いるように、本用語は、共有結合によるアミド結合によって連結される単一のポリペプチド鎖を指すことができる。本用語は、イオン接触、水素結合、ファンデルワールス接触及び疎水性接触などの非共有結合による相互作用によって結合する複数のポリペプチド鎖を指すこともできる。本用語は、例えばシグナルペプチド切断、ジスルフィド結合形成、グリコシル化(例えば、N連結グリコシル化)、プロテアーゼ切断及び脂質修飾(例えばS-パルミトイル化)などの翻訳後プロセッシングによって修飾されているポリペプチドを含むことを当業者は理解しよう。

20

【0033】

本明細書で用いるように、インフルエンザウイルス疾患を予防するための対象への療法(複数可)の投与との関連で用語「予防する」、「予防すること」及び「予防」は、療法又は療法の組合せの投与から生じる以下の効果の1つ以上を指す:(i)インフルエンザウイルス疾患又はその症状の発達又は開始の阻害;(ii)インフルエンザウイルス疾患又はそれに付随する症状の再発の阻害;及び(iii)インフルエンザウイルスの感染及び/又は複製の減少又は阻害。

30

【0034】

本明細書で用いるように、天然原材料、例えば細胞から得られるポリペプチド(抗体を含む)との関連で用いられる場合、用語「精製された」及び「単離された」は、天然原材料からの汚染物質、例えば土壌粒子、鉱物、環境からの化学物質、並びに/又は天然原材料からの細胞性物質、例えば、それらに限定されないが細胞片、細胞壁物質、膜、オルガネラ、細胞中に存在する核酸、炭水化物、タンパク質及び/若しくは脂質の大部分が実質的に含まれないポリペプチドを指す。したがって、単離されたポリペプチドには、細胞性物質及び/又は汚染物質の約30%、20%、10%、5%、2%又は1%(乾燥重量による)未満を有するポリペプチド調製物が含まれる。本明細書で用いるように、化学的に合成されるポリペプチド(抗体を含む)との関連で用いられる場合、用語「精製された」及び「単離された」は、ポリペプチドの合成に關与する化学前駆体又は他の化学物質が実質的に含まれないポリペプチドを指す。具体的な実施態様において、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、化学的に合成される。別の具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、単離される。

40

【0035】

本明細書で用いるように、ウイルスとの関連で用語「複製」、「ウイルスの複製」及び

50

「ウイルス複製」は、ウイルスの増殖をもたらすウイルスのライフサイクルの段階のうち、1つ以上又はすべてを指す。ウイルスのライフサイクルの工程には、それらに限定されないが、宿主細胞表面へのウイルス付着、宿主細胞への貫入又は侵入(例えば、受容体媒介性のエンドサイトーシス又は膜融合を通して)、脱外被(ウイルスカプシドがウイルス酵素又は宿主酵素によって除去、分解され、したがってウイルスゲノム核酸が放出される過程)、ゲノム複製、ウイルスメッセンジャーRNA(mRNA)の合成、ウイルスタンパク質合成、並びにゲノム複製のためのウイルスリボ核タンパク複合体のアセンブリー、ウイルス粒子のアセンブリー、ウイルスタンパク質の翻訳後修飾、及び溶解又は出芽による宿主細胞からの遊離、及び埋め込まれたウイルス糖タンパク質を含むリン脂質エンベロープの獲得が含まれる。一部の実施態様では、用語「複製」、「ウイルスの複製」及び「ウイルス複製」は、ウイルスゲノムの複製を指す。他の実施態様では、用語「複製」、「ウイルスの複製」及び「ウイルス複製」は、ウイルスタンパク質の合成を指す。

10

20

30

40

50

【0036】

「ステムドメインポリペプチド」は、血球凝集素のステムドメインを構成する1つ以上のポリペプチド鎖を含む、血球凝集素ポリペプチドの誘導体、例えば改変された誘導体を指す。ステムドメインポリペプチドは、単一のポリペプチド鎖、2つのポリペプチド鎖又はより多くのポリペプチド鎖であり得る。一般的に、ステムドメインポリペプチドは、単一のポリペプチド鎖(すなわち、血球凝集素HA0ポリペプチドのステムドメインに対応する)又は2つのポリペプチド鎖(すなわち、血球凝集素HA2ポリペプチドに結合している血球凝集素HA1ポリペプチドのステムドメインに対応する)である。特定の実施態様では、ステムドメインポリペプチドは、インフルエンザ血球凝集素に由来する。人工のステムドメインポリペプチドは、下記のように1つ以上のリンカーを含むことができる。

【0037】

本明細書で用いるように、用語「対象」又は「患者」は互換的に用いられ、動物(例えば、鳥、爬虫類及び哺乳動物)を指す。具体的な実施態様において、対象は鳥である。別の実施態様では、対象は、非霊長類(例えば、ラクダ、ロバ、シマウマ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ラット及びマウス)及び霊長類(例えば、サル、チンパンジー及びヒト)を含む哺乳動物である。特定の実施態様では、対象はヒト以外の動物である。一部の実施態様では、対象は畜産動物又はペットである。別の実施態様では、対象はヒトである。別の実施態様では、対象はヒト幼児である。別の実施態様では、対象はヒト児童である。別の実施態様では、対象はヒト成人である。別の実施態様では、対象はヒト高齢者である。別の実施態様では、対象は未熟なヒト幼児である。

【0038】

本明細書で用いるように、用語「未熟なヒト幼児」は、妊娠37週未満で生まれるヒト幼児を指す。

【0039】

本明細書で用いるように、用語「ヒト幼児」は、新生児から1歳までのヒトを指す。

【0040】

本明細書で用いるように、用語「ヒト児童」は、1歳から18歳までのヒトを指す。

【0041】

本明細書で用いるように、用語「ヒト成人」は、18歳以上のヒトを指す。

【0042】

本明細書で用いるように、用語「ヒト高齢者」は、65歳以上のヒトを指す。

【0043】

用語「三次構造」及び「四次構造」は、当業者によって理解される意味を有する。三次構造は、単一のポリペプチド鎖の三次元構造を指す。四次構造は、複数のポリペプチド鎖を有するポリペプチドの三次元構造を指す。

【0044】

本明細書で用いるように、用語「療法(複数)」及び「療法」は、ウイルス感染又はそれに付随する疾患若しくは症状の予防又は治療で用いることができる、任意のプロトコル(

複数可)、方法(複数可)、化合物(複数可)、組成物(複数可)、製剤(複数可)及び/又は剤(複数可)を指すことができる。特定の実施態様では、用語「療法(複数)」及び「療法」は、当業者に公知であるウイルス感染又はそれに付随する疾患若しくは症状の治療又は予防で有用な、生物学的療法、支持療法及び/又は他の療法を指す。一部の実施態様では、用語「療法」は、インフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸、インフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインポリペプチド、或いはインフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインポリペプチド若しくはインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸を含むベクター又は組成物を指す。一部の実施態様では、用語「療法」は、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチド又はインフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインポリペプチドに特異的に結合する抗体を指す。

10

【0045】

本明細書で用いるように、対象への療法(複数可)の投与との関連で用語「治療する」、「治療」及び「治療すること」は、療法又は療法の組合せの有益な又は治療的な効果を得るためにインフルエンザウイルス疾患を治療することを指す。具体的な実施態様では、そのような用語は、療法又は療法の組合せの投与から生じる以下の効果のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又はそれ以上を指す:(i)インフルエンザウイルス感染、又はそれに付随する疾患若しくは症状の重症度の低減又は改善;(ii)インフルエンザウイルス感染、又はそれに付随する疾患若しくは症状の持続期間の短縮;(iii)インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患若しくは症状の退行;(iv)インフルエンザウイルスの力価の低下;(v)インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患に付随する器官不全の低減;(vi)対象の入院の減少;(vii)入院期間の短縮;(viii)対象の生存の増加;(ix)インフルエンザウイルス感染、又はそれに付随する疾患若しくは症状の除去;(x)インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患若しくは症状の進行の阻害;(xi)細胞、組織、器官又は対象から別の細胞、組織、器官又は対象へのインフルエンザウイルスの伝播の予防;(xii)宿主細胞(複数可)へのインフルエンザウイルスの侵入の阻害又は低減;(xiii)インフルエンザウイルスゲノムの複製の阻害又は低減;(xiv)インフルエンザウイルスタンパク質の合成の阻害又は低減;(xv)宿主細胞(複数可)からのインフルエンザウイルス粒子の放出の阻害又は低減;並びに/或いは(xvi)別の療法の治療効果の強化又は改善。

20

【0046】

本明細書で用いるように、一部の実施態様では、ウイルスとの関連で句「野生型」は、一般的であり、天然に循環し、疾患の一般的な発生を起こすウイルスの型を指す。他の実施態様では、ウイルスとの関連で用語「野生型」は、親のウイルスを指す。

30

【図面の簡単な説明】

【0047】

(4. 図面の簡単な説明)

【図1】インフルエンザウイルスA型血球凝集素の16サブタイプの代表的な配列(それぞれ配列番号1~16)のCLUSTALWによる配列整列を示す図である。

【0048】

【図2】インフルエンザA型HK68-H3N2(配列番号3)及びPR8-H1N1(配列番号1)血球凝集素と整列させたインフルエンザウイルスB型血球凝集素の代表的な配列(配列番号17)のCLUSTALWによる配列整列を示す図である。

40

【0049】

【図3】野生型HA及びインフルエンザHAステムドメインポリペプチドをコードする例示的なヌクレオチド構築物を提供する図である。

【0050】

【図4】インフルエンザHAステムドメインポリペプチドの推定上の構造を提供する図である。

【0051】

【図5A】例示的なインフルエンザHAステムドメインポリペプチドのタンパク質発現を提

50

供する図である。

【図5B】例示的なインフルエンザHAステムドメインポリペプチドのタンパク質発現を提供する図である。

【0052】

【図6】ヌクレオチド(配列番号169)及びアミノ酸(配列番号170)配列を有するインフルエンザHAステムドメインポリペプチドを発現するための例示的な構築物を提供する図である。グリシンリンカーは下線を引かれている。

【0053】

【図7】ヌクレオチド(配列番号171)及びアミノ酸(配列番号172)配列を有するインフルエンザHAステムドメインポリペプチドを発現するための例示的な構築物を提供する図である。グリシンリンカーは下線を引かれている。

10

【0054】

【図8】ヌクレオチド(配列番号173)及びアミノ酸(配列番号174)配列を有するインフルエンザHAステムドメインポリペプチドを発現するための例示的な構築物を提供する図である。プロリン-グリシンリンカーは、下線を引かれている。

【0055】

【図9】ヌクレオチド(配列番号175)及びアミノ酸(配列番号176)配列を有するインフルエンザHAステムドメインポリペプチドを発現するための例示的な構築物を提供する図である。グリシンリンカー、トロンピン切断部位、フォルドン(foldon)ドメイン及びHISタグは、下線を引かれている。

20

【0056】

【図10A】ヘッドレスHA構築物の模式図である。(A)完全長インフルエンザウイルスHAタンパク質(上)及び一般化ヘッドレスHAタンパク質(下)の線状構造の模式図。PR8及びHK68 HA配列との関連で試験されたリンカーペプチドを示す。挿入されたアミノ酸を太字フォントで示し、本来のHA配列に存在するアミノ酸は標準フォントである。

【図10B】ヘッドレスHA構築物の模式図である。(B)PR8ウイルス(左パネル)及びHK68ウイルス(右パネル)の完全長及びヘッドレスのHAの折畳み構造の模式図。両方の場合、4Gリンカー架橋をもつヘッドレスHAを表す。HA1サブユニットは濃い灰色であり、HA2サブユニットは淡い灰色である。4Gリンカー配列の位置を、各パネルの矢印で示す。完全長HA構築物は、タンパク質データベース(Protein Database)(PDB):PR8 HA、PDB ID 1rvx及びHK68 HA、PDB ID 1mgnからダウンロードした。完全長HA座標を出発点として用いてヘッドレスHAの模式図を生成し、不連続な炭素アミノ酸鎖を閉じるために、4GループをヘッドレスHA炭素に手でドッキングした。最終像は、PyMol(Delano Scientific)によって生成した。

30

【0057】

【図11A】一時的にトランスフェクトされた細胞でのヘッドレスHA構築物の発現を示す図である。ヘッドレスHA構築物は、外因性トリプシンの不在下で、プラスミドトランスフェクションによって293T細胞で発現された。トランスフェクションの24時間後に、全細胞溶解物を調製して、SDS-PAGEとそれに続くウェスタンブロット法にかけた。ポリクローナル3951抗血清(PR8について)又はモノクローナル12D1(HK68について)を用いて、HAタンパク質を検出した。kDaの分子量マーカーは各プロットの左に示され、トランスフェクトされた構築物は適当なレーンの上で同定される。「モック」は、トランスフェクトされていない細胞を示す;「完全」は、完全長HAタンパク質を示す;ヘッドレスHA構築物については、HA1のN及びC末端鎖を架橋するアミノ酸配列を示す。太字の文字は挿入されたアミノ酸を示し、標準フォントの文字は野生型HAに存在する残基を表す。cys52からcys277にかけてのジスルフィド結合の領域では、野生型配列は以下の通りである。PR8:K50L51C52...C277N278T279K280。HK68:K50I51C52...C277I278S279E280。PR8に基づく構築物をパネル(A)に示し、HK68に基づく構築物をパネル(B)に示す。

40

【図11B】一時的にトランスフェクトされた細胞でのヘッドレスHA構築物の発現を示す図である。ヘッドレスHA構築物は、外因性トリプシンの不在下で、プラスミドトランスフ

50

エクシオンによって293T細胞で発現された。トランスフェクションの24時間後に、全細胞溶解物を調製して、SDS-PAGEとそれに続くウェスタンブロット法にかけた。ポリクローナル3951抗血清(PR8について)又はモノクローナル12D1(HK68について)を用いて、HAタンパク質を検出した。kDaの分子量マーカーは各プロットの左に示され、トランスフェクトされた構築物は適当なレーンの上で同定される。「モック」は、トランスフェクトされていない細胞を示す;「完全」は、完全長HAタンパク質を示す;ヘッドレスHA構築物については、HA1のN及びC末端鎖を架橋するアミノ酸配列を示す。太字の文字は挿入されたアミノ酸を示し、標準フォントの文字は野生型HAに存在する残基を表す。cys52からcys277にかけてのジスルフィド結合の領域では、野生型配列は以下の通りである。PR8:K50L51C52...C277N278T279K280。HK68:K50I51C52...C277I278S279E280。PR8に基づく構築物をパネル(A)に示し、HK68に基づく構築物をパネル(B)に示す。(B)では、完全長HK68 HA0タンパク質の分子量は、矢印で示す。

10

【0058】

【図12A】トランスフェクトされた細胞の表面のヘッドレスHAタンパク質の検出を示す図である。完全長及びヘッドレスHA構築物は、プラスミドトランスフェクションによって293T細胞で発現された。トランスフェクションの24時間後に、細胞をトリプシン処理し、ポリクローナル3951抗血清(PR8について)又はモノクローナル12D1(HK68について)を用いて細胞表面のHAタンパク質を染色してから、フローサイトメトリーによって分析した。(A)3951免疫血清で染色されたモックでトランスフェクトされた細胞を、pDZ PR8 HAでトランスフェクトされた細胞又はpCAGGS PR8 2G、4G若しくはPGヘッドレスHA構築物でトランスフェクトされた細胞と比較する。

20

【図12B】トランスフェクトされた細胞の表面のヘッドレスHAタンパク質の検出を示す図である。完全長及びヘッドレスHA構築物は、プラスミドトランスフェクションによって293T細胞で発現された。トランスフェクションの24時間後に、細胞をトリプシン処理し、ポリクローナル3951抗血清(PR8について)又はモノクローナル12D1(HK68について)を用いて細胞表面のHAタンパク質を染色してから、フローサイトメトリーによって分析した。(B)mAb 12D1で染色されたモックでトランスフェクトされた細胞を、pCAGGS HK68 HAでトランスフェクトされた細胞又はpCAGGS HK68 2G、4G若しくはPGヘッドレスHA構築物でトランスフェクトされた細胞と比較する。

30

【0059】

【図13A】ウイルス様粒子へのヘッドレスHAタンパク質の組込みを示す図である。pGag EGFPによるHA構築物の同時トランスフェクションによって生成されたVLPのHA含有量を、ウェスタンブロット法によって調査した。(A) PR8に基づくVLPを、ポリクローナル3951抗血清で探索した。バンドは、各プロットの右で特定されている。VLPは外因性トリプシンの存在下で生成され、HA0の切断をもたらし、HA1(ここでは可視化されない)及びHA2を生成したことに注意する。レーンより上のランプは、試料の1/3希釈を示す:各VLPについて、左レーンは293T細胞の3つの10cm皿の同等物から収集されたVLPを示し、右レーンは1つの10cm皿から収集されたVLPを示す。

40

【図13B】ウイルス様粒子へのヘッドレスHAタンパク質の組込みを示す図である。pGag EGFPによるHA構築物の同時トランスフェクションによって生成されたVLPのHA含有量を、ウェスタンブロット法によって調査した。(B) HK68に基づくタンパク質を、モノクローナル12D1で検出した。バンドは、各プロットの右で特定されている。VLPは外因性トリプシンの存在下で生成され、HA0の切断をもたらし、HA1(ここでは可視化されない)及びHA2を生成したことに注意する。レーンより上のランプは、試料の1/3希釈を示す:各VLPについて、左レーンは293T細胞の3つの10cm皿の同等物から収集されたVLPを示し、右レーンは1つの10cm皿から収集されたVLPを示す。

【0060】

【図14】ヘッドレスHA構築物によるマウスのワクチン接種は、死亡から保護することを示す図である。PR8ウイルスによる抗原投与の後のワクチン接種マウスの各群での平均体重減を示す。誤差バーは、標準偏差を表す。*は、マウスの死亡を示す。

50

【 0 0 6 1 】

【図 1 5 A】PR8 4GヘッドレスHAでワクチン接種されたマウスからの抗血清は、ELISAによる広い交差反応性を示す図である。血清が由来するワクチン群は、各カラムの最上位で特定され、用いたELISA基質は各段の右に示す。ワクチン接種されたマウスからの血清は、黒で塗りつぶした記号で示す。各マウスは、各パネルで同じである一意の記号によって表す。完全体PR8ウイルスに対するウサギ抗血清を灰色の空の三角形で示し、ナイーブなマウスから採取された血清試料を灰色の空の四角形で示す。マウス血清の、完全体PR8ウイルスへの反応性を示す。

【図 1 5 B】PR8 4GヘッドレスHAでワクチン接種されたマウスからの抗血清は、ELISAによる広い交差反応性を示す図である。血清が由来するワクチン群は、各カラムの最上位で特定され、用いたELISA基質は各段の右に示す。ワクチン接種されたマウスからの血清は、黒で塗りつぶした記号で示す。各マウスは、各パネルで同じである一意の記号によって表す。完全体PR8ウイルスに対するウサギ抗血清を灰色の空の三角形で示し、ナイーブなマウスから採取された血清試料を灰色の空の四角形で示す。マウス血清の、精製された組換えA/ニューカレドニア/20/1999 HAタンパク質への反応性を示す。

【図 1 5 C】PR8 4GヘッドレスHAでワクチン接種されたマウスからの抗血清は、ELISAによる広い交差反応性を示す図である。血清が由来するワクチン群は、各カラムの最上位で特定され、用いたELISA基質は各段の右に示す。ワクチン接種されたマウスからの血清は、黒で塗りつぶした記号で示す。各マウスは、各パネルで同じである一意の記号によって表す。完全体PR8ウイルスに対するウサギ抗血清を灰色の空の三角形で示し、ナイーブなマウスから採取された血清試料を灰色の空の四角形で示す。マウス血清の、精製された組換えA/カリフォルニア/04/2009 HAへの反応性を示す。

【図 1 5 D】PR8 4GヘッドレスHAでワクチン接種されたマウスからの抗血清は、ELISAによる広い交差反応性を示す図である。血清が由来するワクチン群は、各カラムの最上位で特定され、用いたELISA基質は各段の右に示す。ワクチン接種されたマウスからの血清は、黒で塗りつぶした記号で示す。各マウスは、各パネルで同じである一意の記号によって表す。完全体PR8ウイルスに対するウサギ抗血清を灰色の空の三角形で示し、ナイーブなマウスから採取された血清試料を灰色の空の四角形で示す。マウス血清の、精製された組換えA/シンガポール/1/1957 HAへの反応性を示す。

【図 1 5 E】PR8 4GヘッドレスHAでワクチン接種されたマウスからの抗血清は、ELISAによる広い交差反応性を示す図である。血清が由来するワクチン群は、各カラムの最上位で特定され、用いたELISA基質は各段の右に示す。ワクチン接種されたマウスからの血清は、黒で塗りつぶした記号で示す。各マウスは、各パネルで同じである一意の記号によって表す。完全体PR8ウイルスに対するウサギ抗血清を灰色の空の三角形で示し、ナイーブなマウスから採取された血清試料を灰色の空の四角形で示す。マウス血清の、精製された組換えA/ベトナム/1203/2004 HAへの反応性を示す。

【図 1 5 F】PR8 4GヘッドレスHAでワクチン接種されたマウスからの抗血清は、ELISAによる広い交差反応性を示す図である。血清が由来するワクチン群は、各カラムの最上位で特定され、用いたELISA基質は各段の右に示す。ワクチン接種されたマウスからの血清は、黒で塗りつぶした記号で示す。各マウスは、各パネルで同じである一意の記号によって表す。完全体PR8ウイルスに対するウサギ抗血清を灰色の空の三角形で示し、ナイーブなマウスから採取された血清試料を灰色の空の四角形で示す。マウス血清の、精製された組換えA/香港/1/1968 HAへの反応性を示す。

【 0 0 6 2 】

【図 1 6 A】代表的なヘッドレス分子の模式図である。(A)A/香港/68の血球凝集素タンパク質に基づくヘッドレスHA構築物であり、リンカー架橋はHA1ドメインのアミノ酸52から277の間に位置する。

【図 1 6 B】代表的なヘッドレス分子の模式図である。(B)A/PR/8/34の血球凝集素タンパク質に基づくヘッドレスHA構築物であり、リンカー架橋はHA1ドメインのアミノ酸46から276の間に位置する。

10

20

30

40

50

【0063】

【図17A】代表的なヘッドレス分子の一次タンパク質配列の模式図である。(A)A/香港/68の血球凝集素タンパク質に基づくヘッドレスHA構築物であり、リンカー架橋はHA1ドメインのアミノ酸52から277の間に位置する。

【図17B】代表的なヘッドレス分子の一次タンパク質配列の模式図である。(B)A/PR/8/34の血球凝集素タンパク質に基づくヘッドレスHA構築物であり、リンカー架橋はHA1ドメインのアミノ酸46から276の間に位置する。

【発明を実施するための形態】

【0064】

(5. 詳細な説明)

(5.1 ポリペプチド)

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。いかなる特定の作動理論によっても束縛されることを企図するものでないが、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、複数のインフルエンザ株と交差反応が可能である免疫応答を起こすために、宿主免疫系に1つ以上の比較的保存された抗原性領域を提示するのに有用であると考えられている。1つ以上の抗原性領域はインフルエンザ血球凝集素サブタイプ全体でよく保存されているので、そのような免疫応答は、完全長インフルエンザ血球凝集素ポリペプチドのいくつかのサブタイプと交差反応し得る。

【0065】

完全長インフルエンザ血球凝集素は、その球状ヘッドドメインでいくつかの高抗原性のセグメントを提示すると考えられている。これらの高抗原性セグメントは、宿主免疫系にとってよりアクセスしやすいか、又は構造がより免疫原性であるか、又はその両方であり得る。宿主免疫系は、インフルエンザ血球凝集素のステムドメインの1つ以上のエピトープと比較して、これらの高免疫原性セグメントに優先的に応答すると考えられている。さらに、インフルエンザ血球凝集素の球状ヘッドドメインはサブタイプ及びウイルス株にわたって変動し得るので、1つの球状ヘッドドメインサブタイプに対する免疫応答は、その球状ヘッドドメインの特異的高抗原性セグメントに限定され得る。異なる球状ヘッドドメインを有する株は、同じ免疫応答と交差反応しない可能性がある。このように、血球凝集素ポリペプチドを提示するワクチンの有効性は、ワクチンで提示される特定の株に限定され得る。したがって、所与の従来インフルエンザワクチンは、所与のインフルエンザ時期に病原性であることが予測されるインフルエンザ株に対してだけ有効であろう。

【0066】

有利には、本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、複数のインフルエンザ株に対して免疫応答を起こさせるのに有益であり得る。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、従来インフルエンザワクチンポリペプチドの高抗原性の変動する球状ヘッドドメインを一般に含まない。したがって、それらは球状ヘッドドメインの変動するセグメントに限定される免疫応答を起こさせるべきではない。代わりに、それらはインフルエンザ血球凝集素の比較的保存されたステムドメインの1つ以上のエピトープを提示する。このように、それらは、比較的保存されたエピトープをもつ複数のインフルエンザ株に対して宿主免疫応答を起こさせるために用いてよい。したがって、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、以下に詳細に記載される組成物、ワクチン及び方法で抗原としての用途を有する。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、任意の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15若しくは16個の公知のインフルエンザA型血球凝集素サブタイプ、又は後に同定されたインフルエンザA型血球凝集素サブタイプに対して宿主免疫応答を起こさせるのに役立つ。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、現在公知であるか後に同定される任意のインフルエンザB型血球凝集素サブタイプに対して宿主免疫応答を起こさせるのにも役立つ。

【0067】

一般に、本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド

10

20

30

40

50

は、インフルエンザ血球凝集素ポリペプチドのステムドメインを含むか又はそれから本質的になるポリペプチドである。インフルエンザ血球凝集素ポリペプチドのステムドメインは、当業者によって一般に認識されるステムドメインである。

【0068】

当業者に公知であるように、完全長インフルエンザ血球凝集素は、HA1ドメイン及びHA2ドメインを一般的に含む。ステムドメインは、HA1ドメインの2つのセグメント及びHA2ドメインの大部分又はすべてによって形成される。HA1ドメインの2つのセグメントは、一次配列では球状ヘッドドメインによって分離される。

【0069】

特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、インフルエンザ血球凝集素ポリペプチドの球状ヘッドドメインをほとんど又は全く含まない。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、当業者によって適するとみなされる任意の技術によってその球状ヘッドドメインが削除されているインフルエンザ血球凝集素である。

10

【0070】

特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、図1のA_p及びA_qとしてインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドで同定されたシステイン残基を維持する。特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、野生型インフルエンザウイルスの血球凝集素よりも低いpH(例えば、5.2未満、5.1未満、5.0未満、又は4.9未満、例えば4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0、3.9、3.8などのpH)でより高い安定性を有する。特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、野生型インフルエンザウイルスの血球凝集素よりも低いpHで、融合前立体構造から融合立体構造への立体配置の変化を経る。一部の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、低いpH(例えば、4.9~5.2、4.5~3.5、3.5~2.5、2.5~1.5、1.5~0.5のpH)でポリペプチドの安定性を増加させる、HA1 H17Y(H3番号付け)などの1つ以上のアミノ酸置換を含む。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの安定性は、例えばThoennesらの文献、(2008、Virology 370: 403-414)に記載のような、トリプシン消化に対する血球凝集素分子の感受性などの、当技術分野で公知である技術を用いて調査することができる。

20

30

【0071】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、下記の技術を含む、当業者に適するとみなされる任意の技術に従って調製することができる。特定の実施態様では、ステムドメインポリペプチドは、単離される。

【0072】

本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの一般的な一次構造は、HA1のN末端ステムセグメント、リンカー、HA1のC末端ステムセグメント及びHA2をこの順序で含む。一次配列は単一のポリペプチドによって形成され得るか、又はそれは複数のポリペプチドによって形成され得る。一般的に、単一のポリペプチドは、当業者によって適するとみなされる任意の技術によって発現される。単一のポリペプチドの実施態様では、HA1セグメント及びHA2は三次結合している。当業者に公知であるように、単一のHAポリペプチドは、適当な発現条件下で例えばプロテアーゼによって切断され、四次結合している2つのポリペプチドを生成し得る。切断は、一般的にHA1のC末端ステムセグメントとHA2との間にある。特定の実施態様では、複数のポリペプチド、例えば2つのポリペプチドのインフルエンザ血球凝集素ステムドメインが、本明細書で提供される。複数のポリペプチドの実施態様では、HA1セグメント及びHA2は四次結合している。

40

【0073】

特定の実施態様では、本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、単量体である。特定の実施態様では、本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、多量体である。特定の実施態様では、本

50

明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、三量体である。当業者は、本来のインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドはインビボで三量体形成ができること、及び本明細書で提供される特定のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは三量体形成ができることを認識する。下記の実施態様では、本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、三量体形成を促進するために三量体形成ドメインを含む。

【0074】

特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、シグナルペプチドを含む。一般的に、シグナルペプチドはポリペプチドの発現及び翻訳の間又は後に切断され、成熟したインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを生成する。シグナルペプチドは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの発現のために有利であり得る。特定の実施態様では、シグナルペプチドを欠く成熟インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドも、本明細書で提供される。

10

【0075】

インフルエンザ血球凝集素HA2は、ステムドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを一般的に含む。特定の実施態様では、HA2ステムドメイン、HA2ルミナルドメイン、HA2膜貫通ドメイン及びHA2細胞質ドメインを含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。そのようなインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、膜結合抗原として発現され得る。特定の実施態様では、HA2ステムドメイン、HA2ルミナルドメイン及びHA2膜貫通ドメインを含むが、一般的な細胞質ドメインの一部又は全部を欠くインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。そのようなインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、膜結合抗原として発現され得る。特定の実施態様では、HA2ステムドメイン及びHA2ルミナルドメインを含むが、HA2膜貫通ドメイン及びHA2細胞質ドメインの両方を欠くインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。そのようなインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、溶解性のポリペプチドとして有利に発現され得る。特定の実施態様では、HA2ステムドメインを含むが、HA2ルミナルドメイン、HA2膜貫通ドメイン及びHA2細胞質ドメインを欠くインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。そのようなインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、溶解性のポリペプチドとして有利に発現され得る。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、当業者に公知であるインフルエンザHA2ステムドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%のアミノ酸配列同一性を有する、HA2ステムドメインを含む。公知のインフルエンザA型及びインフルエンザB型血球凝集素からの例示的な公知のHA2ステムドメインを、下の表に提供する。

20

30

【0076】

最高10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1個のアミノ酸残基がHA2ステムドメインの一端又は両端から削除されている、HA2ステムドメインの欠失形を含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドも、本明細書で提供される。最高10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1個のアミノ酸残基が他のアミノ酸で保存的に置換されている、HA2ステムドメインの変更形を含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書でさらに提供される。欠失及び変更型のHA2ステムドメインを含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、さらに提供される。

40

【0077】

HA1のN末端ステムセグメントは、本明細書で提供される定義に基づいて当業者によって認識される、任意のHA1のN末端ステムセグメントであってもよい。一般的に、HA1のN末端ステムセグメントは、成熟したHA1(すなわち、シグナルペプチドを欠くHA1)のN末端アミノ酸からHA1の約52番目の残基の配列に位置するシステイン残基までからなるポリペプチドに対応する。本明細書でA_pと呼ばれるこのシステイン残基は、HA1のC末端のステムセグメントのシステイン残基とジスルフィド架橋を形成することが一般にできる。16個の代表

50

的なインフルエンザA型血球凝集素の配列を図1に示し、残基 A_p は各々で特定されている。

【0078】

特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、必ずしも精確に A_p (例えば、H3血球凝集素からのHA1サブユニットの Cys_{52})で終了せずに、 A_p の近くの配列及び構造の残基で終了する。例えば、特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、 A_{p-1} 、 A_{p-2} 、 A_{p-3} 又は A_{p-4} で終わる。他の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、 A_{p+1} 、 A_{p+2} 、 A_{p+3} 、 A_{p+4} 又は A_{p+5} で終わる。HA1のN末端ステムセグメントの末端は、生じる連結されたHA1ステムドメインが、下記のようにインフルエンザ血球凝集素ステムドメインに類似した三次元構造を形成することができるように、HA1のC末端ステムセグメントの末端及びリンカーと一緒に選択されるべきである。

10

【0079】

特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、当業者に公知であるインフルエンザHA1のN末端ステムセグメントと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%のアミノ酸配列同一性を有する、HA1のN末端ステムセグメントを含む。例示的な公知のHA1のN末端ステムセグメントを、下の表に提供する。

【0080】

最高10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1個のアミノ酸残基がHA1のN末端ステムセグメントの一端又は両端から削除されている、HA1のN末端ステムセグメントの欠失形を含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドも、本明細書で提供される。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントのC末端に1、2又は3個の残基が加えられる、HA1のN末端ステムセグメントの拡張形を含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される；これらの加えられる残基は、HA1のN末端ステムセグメントに隣接する球状ヘッドドメインのアミノ酸配列に由来してもよい。最高10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1個のアミノ酸残基が他のアミノ酸で保存的に置換されている、HA1のN末端ステムセグメントの変更形を含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書でさらに提供される。欠失及び変更型のHA1のN末端ステムセグメントを含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、さらに提供される

20

【0081】

HA1のC末端ステムセグメントは、本明細書で提供される定義に基づいて当業者によって認識される、任意のHA1のC末端ステムセグメントであってもよい。一般的に、HA1のC末端ステムセグメントは、HA1の約277番目の残基(H3番号付けを用いる)の配列に位置するシステイン残基からHA1のC末端アミノ酸までからなるポリペプチドに対応する。本明細書で A_q と呼ばれるこのシステイン残基は、HA1のN末端のステムセグメントのシステイン残基 A_p とジスルフィド架橋を形成することが一般にできる。16個の代表的なインフルエンザA型血球凝集素の配列を図1に示し、残基 A_q は各々で特定されている。

30

【0082】

特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、 A_q (例えば、H3血球凝集素からのHA1サブユニットの Cys_{277})から開始せずに、 A_q の近くの配列及び構造の残基から開始する。例えば、特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、 A_{q-1} 、 A_{q-2} 、 A_{q-3} 又は A_{q-4} から開始する。他の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、 A_{q+1} 、 A_{q+2} 、 A_{q+3} 、 A_{q+4} 又は A_{q+5} から開始する。HA1のN末端ステムセグメントの末端は、生じるHA1ステムドメインが、下記のようにインフルエンザ血球凝集素に類似した三次元構造を形成することができるように、HA1のC末端ステムセグメントの出発点及びリンカーと一緒に選択されるべきである。

40

【0083】

特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、当業者に公知であるインフルエンザHA1のC末端ステムセグメントと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%のアミノ酸配列同一性を有する、HA1のC末端ステムセグメントを含む。例示的な公知のHA1のC末端ステムセグメントを、下の表に提供する。

【0084】

50

特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-1} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-1} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-2} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-2} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-3} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-3} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-4} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-4} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-5} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-5} である。

【0085】

特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+1} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+1} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+2} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+2} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+3} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+3} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+4} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+4} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+5} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+5} である。

10

【0086】

特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-1} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+1} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-2} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+2} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-3} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+3} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-4} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+4} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p-5} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q+5} である。

20

【0087】

特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_p であり(すなわち、N末端ステムセグメントの末端はシステインである)、C末端ステムセグメントの出発点は A_q である(すなわち、C末端ステムセグメントの出発点はシステインである)。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+1} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-1} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+2} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-2} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+3} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-3} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+4} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-4} である。特定の実施態様では、N末端ステムセグメントの末端は A_{p+5} であり、C末端ステムセグメントの出発点は A_{q-5} である。

30

【0088】

最高10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1個のアミノ酸残基がHA1のC末端ステムセグメントの一端又は両端から削除されている、HA1のC末端ステムセグメントの欠失形を含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドも、本明細書で提供される。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントのN末端に1、2又は3個の残基が加えられる、HA1のC末端ステムセグメントの拡張形を含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され;これらの加えられる残基は、HA1のC末端ステムセグメントに隣接する球状ヘッドドメインのアミノ酸配列に由来してもよい。特定の実施態様では、1残基がC末端ステムセグメントに加えられる場合、1残基がN末端ステムセグメントに加えられ;2残基がC末端ステムセグメントに加えられる場合、2残基がN末端ステムセグメントに加えられ;3残基がC末端ステムセグメントに加えられる場合、3残基がN末端ステムセグメントに加えられる。最高10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1個のアミノ酸残基が他のアミノ酸で保存的に置換されている、HA1のC末端ステムセグメントの変更形を含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書でさらに提供される。欠失及び変更型のHA1のC末端ステムセグメントを含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、さらに提供される

40

50

【0089】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、当業者に公知であるか又は後に発見される任意のインフルエンザ血球凝集素に基づくことができる(すなわち、上に述べたように配列同一性を有することができる)。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、インフルエンザA型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16からなる群から選択されるインフルエンザA型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、以下に詳細に記載されるように、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、インフルエンザB型血球凝集素に基づく。

10

【0090】

HA1のN末端ステムセグメントは、当業者に公知であるか又は後に発見される任意のHA1のN末端ステムセグメントに基づくことができる(すなわち、上に述べたように配列同一性を有することができる)。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、インフルエンザA型HA1のN末端ステムセグメントに基づく。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16からなる群から選択されるインフルエンザA型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、配列番号34～49から選択される。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、各々1アミノ酸がそのC末端から欠失している配列番号34～49から選択される。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、各々2アミノ酸がそのC末端から欠失している配列番号34～49から選択される。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、各々3アミノ酸がそのC末端から欠失している配列番号34～49から選択される。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、各々4アミノ酸がそのC末端から欠失している配列番号34～49から選択される。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、各々5アミノ酸がそのC末端から欠失している配列番号34～49から選択される。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、配列番号177～224から選択される。

20

【0091】

HA1のC末端ステムセグメントは、当業者に公知であるか又は後に発見される任意のHA1のC末端ステムセグメントに基づくことができる(すなわち、上に述べたように配列同一性を有することができる)。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、インフルエンザA型HA1のC末端ステムセグメントに基づく。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16からなる群から選択されるインフルエンザA型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、配列番号50～65から選択される。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、各々1アミノ酸がそのN末端から欠失している配列番号50～65から選択される。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、各々2アミノ酸がそのN末端から欠失している配列番号50～65から選択される。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、各々3アミノ酸がそのN末端から欠失している配列番号50～65から選択される。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、各々4アミノ酸がそのN末端から欠失している配列番号50～65から選択される。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、各々5アミノ酸がそのN末端から欠失している配列番号50～65から選択される。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、配列番号226～273から選択される。

30

40

【0092】

HA2ステムドメインは、当業者に公知であるか又は後に発見される任意のHA2ステムドメインに基づくことができる(すなわち、上に述べたように配列同一性を有することができる)。特定の実施態様では、HA2ステムドメインは、インフルエンザA型HA2ステムドメインに基づく。特定の実施態様では、HA2ステムドメインは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16からなる群から選択されるインフルエンザ

50

A型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、HA2ステムドメインは、配列番号66～97から選択される。

【0093】

シグナルペプチドを含む実施態様では、シグナルペプチドは、当業者に公知である任意のインフルエンザウイルスシグナルペプチドに基づくことができる。特定の実施態様では、シグナルペプチドは、インフルエンザA型シグナルペプチドに基づく。特定の実施態様では、シグナルペプチドは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16からなる群から選択されるインフルエンザA型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、シグナルペプチドは、当業者に役立つとみなされる任意のシグナルペプチドであってよい。特定の実施態様では、シグナルペプチドは、配列番号18～33から選択される。

10

【0094】

ルミナルドメインを含む実施態様では、ルミナルドメインは当業者に公知である任意のインフルエンザルミナルドメインに基づくことができる。特定の実施態様では、ルミナルドメインは、インフルエンザA型ルミナルドメインに基づく。特定の実施態様では、HA2ルミナルドメインは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16からなる群から選択されるインフルエンザA型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、ルミナルドメインは、当業者に役立つとみなされる任意のルミナルドメインでもよい。特定の実施態様では、ルミナルドメインは、配列番号98～113から選択される。

【0095】

膜貫通ドメインを含む実施態様では、膜貫通ドメインは当業者に公知である任意のインフルエンザ膜貫通ドメインに基づくことができる。特定の実施態様では、膜貫通ドメインは、インフルエンザA型膜貫通ドメインに基づく。特定の実施態様では、HA2膜貫通ドメインは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16からなる群から選択されるインフルエンザA型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、膜貫通ドメインは、当業者に役立つとみなされる任意の膜貫通ドメインでもよい。特定の実施態様では、膜貫通ドメインは、配列番号114～129から選択される。

20

【0096】

細胞質ドメインを含む実施態様では、細胞質ドメインは当業者に公知である任意のインフルエンザ細胞質ドメインに基づくことができる。特定の実施態様では、細胞質ドメインは、インフルエンザA型細胞質ドメインに基づく。特定の実施態様では、HA2細胞質ドメインは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16からなる群から選択されるインフルエンザA型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、細胞質ドメインは、当業者に役立つとみなされる任意の細胞質ドメインであってよい。特定の実施態様では、細胞質ドメインは、配列番号130～145から選択される。

30

【0097】

特定の実施態様では、それらの部位のグリコシル化がポリペプチドのプロセッシング及び成熟の間に起こらないように、血球凝集素ステムドメインのグリコシル化部位の1つ以上は変更又は削除される。当業者は、インフルエンザHAが1つ以上のグリコシル化配列(例えば、Asn-Xaa-Ser/Thr/Cysであって、XaaはPro以外の任意のアミノ酸である)を一般的に含むことを認識する。特定の実施態様では、グリコシル化配列の1つ以上のアミノ酸残基は、グリコシル化配列を破壊するアミノ酸残基で保存的に置換される。特定の実施態様では、グリコシル化配列の1つ以上のアミノ酸残基は、グリコシル化配列を破壊する任意のアミノ酸残基で置換される。特定の実施態様では、グリコシル化配列の1つ以上のアスパラギン残基がアラニンで置換される。特定の実施態様では、H3血球凝集素の38位のアスパラギンは、アラニンに変更される。

40

【0098】

下の表1は、インフルエンザA型血球凝集素ポリペプチドのシグナルペプチド、HA1のN末端ステムセグメント、HA1のC末端ステムセグメント及びHA2ドメインを特定する。これらのシグナルペプチド、ステムセグメント及びドメインは、本明細書に記載されるポリペプ

50

チド及び方法で役立つ。

【表 1】

表1. 例示的なインフルエンザA型血球凝集素配列

HAサブタイプ (Genbank番号)	シグナル ペプチド	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
H1 PR8-H1N1 (EF467821.1)	MKAN LLVLL CALAA ADA [配列 番号18]	DTICIGYHANN STDTVDTVLE KNVTVTHSVN LLED SHNGKL C [配列番号34]	CNTKCQTPLG AINSSLPYQNI HPVTIGECPKY VRS AKLRMVT GLRNNPSIQSR [配列 番号50]	GLFGAIAGFIEGGW TGMIDGWYGYHHQ NEQGS GYAADQKST QNAINGITNKVNTVI EKMNIQFTA VGKEF NKLEKRMENLNKK VDDGFLDIWTYNAE LLVLENER TLDFH DSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFE FYHKCDNECMESVR NGTYDYPKYSEESK LNREKVDGVKLES MGIYQILAIYSTVAS SLVLLVSLGAISFW MCSNGSLQCRICI [配列番号66]
H2 (L11136)	MAIYY LILLFT AVRG [配列 番号19]	DQICIGYHSNN STEKVD TILER NVTVTHAQNI LEKTHNGKLC [配列番号35]	CETKCQTPLG AINTL P FHNV HPLTIGECPKY VKSERLVLAT GLRNV PQIESR [配列 番号51]	GLFGAIAGFIEGGW QG MIDGWYGYHHS NDQGS GYAADKEST QKAIDGITNRVNSVI EKMNTQFEAVGKEF SNLEKRL ENLNKKM EDGFLDVW TYNAE LLVLMENER TLDFH DSNVKNLYDRVRM QLRDNAKELGNGCF EFYHKCDDECMNS VKNGTYDYPKYEEE SKLNRNEIKGVKLS NMGVYQILAIYATV AGSLSLAIMIAGISL WMCSNGSLQCRICI [配列番号67]

10

20

30

40

HAサブタイプ (Genbank番号)	シグナル ペプチド	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
H3 HK68-H3N2 (EF409245) PDB: 1HGJ	MKTII ALSYIF CLALG [配列 番号20]	QDLPGNDNST ATLCLGHHAV PNGTLVKTITD DQIEVTNATEL VQSSSTGKIC [配列番号36]	CISECITPNGSI PNDKPFQNVN KITYGACPKY VKQNTLKLAT GMRNVPEKQT R [配列番号52]	GLFGAIAGFIENGW EGMIDGWYGFRHQ NSEGTGQAADLKST QAAIDQINGKLNRFI EKTNEKFHQIEKEFS EVEGRIQDLEKYVE DTKIDLWSYNAELL VALENQHTIDLTD EMNKLFEKTRRQLR ENAEDMGNGCFKIY HKCDNACIESIRNGT YDHDVYRDEALNN RFQIKGVELKSGYK DWILWISFAISCFL CVVLLGFIMWACQR GNIRCNICI [配列番号68]
H4 (D90302)	MLSIVI LFLLIA ENSS [配列 番号21]	QNYTGNPVIC MGHHAVANG TMVKTLADDQ VEVVTAQELV ESQNLPELC [配列番号37]	CVSKCHTDKG SLSTTKPFQNI SRIAVGDCPRY VKQGSLKLAT GMRNIPEKAS R [配列 番号53]	GLFGAIAGFIENGW QGLIDGWYGFRHQ NAEGTGTAADLKST QAAIDQINGKLNRLI EKTNDKYHQIEKEF EQVEGRIQDLENYV EDTKIDLWSYNAEL LVALENQHTIDVTD SEMNKLFERVRRQL RENAEDKGNGCFEI FHKCDNNCIESIRNG TYDHDYRDEAINN RFQIQGVKLTQGYK DIILWISFSISCFLV ALLAFILWACQNG NIRCQICI [配列番号69]

10

20

30

HAサブタイプ (Genbank番号)	シグナル ペプチド	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
H5 (X07826)	MERIV LLLAI VSLVK S [配列 番号22]	DQICIGYHAN KSTKQVDTIM EKNVTVTHAQ DILERTHNGKL C [配列番号38]	CDTKCQTPVG EINSSMPFHNI HPHTIGECPKY VKSDRLVLAT GLRNVPQRKK R [配列 番号54]	GLFGAIAGFIEGGW QGMVDGWYGYHH SNEQGSYAADKES TQKAIDGITNKVNSI IDKMNTRFEAVGKE FNNLERRVENLNKK MEDGFLDVWTYNV ELLVLMENERTLDF HDSNVNNLYDKVR LQLKDNARELNGC FEFYHKCDNECMES VRNGTYDYPQYSEE ARLNREEISGVKLES MGVYQILSIYSTVAS SLALAIMIAGLSFW MCSNGSLQCRICI [配列番号70]
H6 (D90303)	MIAIIV VAILA TAGRS [配列 番号23]	DKICIGYHAN NSTTQIDTILE KNVTVTHSVE LLENQKEERF C [配列番号39]	CDATCQTVAG VLRTNKTFQN VSPLWIGECPK YVKSESLRLA TGLRNVPQIET R [配列 番号55]	GLFGAIAGFIEGGW TGMIDGWYGYHHE NSQGSYAADREST QKAVDGITNKVNSII DKMNTQFEAVDHE FSNLERRIDNLNKR MEDGFLDVWTYNA ELLVLENERLTLDL HDANVKNLYERVK SQLRDNAMILGNGC FEFWHKCDDECMES VKNGTYDYPKYQD ESKLNQRQEIESVKLE SLGVYQILAIYSTVS SSLVLVGLIIVGLW MCSNGSMQCRICI [配列番号71]

10

20

30

HAサブタイプ (Genbank番号)	シグナル ペプチド	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
H7 (M24457)	MNTQI LVFAL VAVIP TNA [配列 番号24]	DKICLGHHAV SNGTKVNTLT ERGVEVVNAT ETVERTNIPKI C [配列番号40]	CEGECYHSGG TITSRLPFQIN SRAVGKCPRY VKQESLLLAT GMKNVPEPSK KRKKR [配列 番号56]	GLFGAIAGFIENGW EGLVDGWYGFRRHQ NAQGEGTAADYKS TQSAIDQITGKLNRL IEKTNQQFELIDNEF TEVEKQIGNLINWT KDSITEVWSYNAELI VAMENQHTIDLADS EMNRLYERVRKQL RENAEEDGTGCFEIF HKCDDDCMASIRNN TYDHSKYREEAMQ NRIQIDPVKLSSGYK DVILWFSFGASCFL LAIAMGLVFICVKN GNMRCTICI [配列番号72]
H8 (D90304)	MEKFI AIATL ASTNAY [配列 番号25]	DRICIGYQSNN STDTVNTLIEQ NVPVTQTMEL VETEKHPAYC [配列 番号41]	CNTKCQTYAG AINSSKPFQNA SRHYMGCEPK YVKKASRLA VGLRNTPSVEP R [配列 番号57]	GLFGAIAGFIEGGWS GMIDGWYGFHHSN SEGTGMAADQKST QEAIKTNKVNIV DKMNREFEVVNHEF SEVEKRINMINDKID DQIEDLWAYNAELL VLENQKTLDEHDS NVKNLFDEVKRRLS ANAIDAGNGCFDIL HKCDNECMETIKNG TYDHKEYEEEEAKLE RSKINGVKLEENTT YKILSIYSTVAASLC LAILIAGGLILGMQN GSCRCMFCI [配列番号73]

10

20

30

HAサブタイプ (Genbank番号)	シグナル ペプチド	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
H9 (D90305)	METK AIIAAL LMVTA ANA [配列 番号26]	DKICIGYQSTN STETVDTLTES NVPVTHTKEL LHTEHNGMLC [配列番号42]	CVVQCQTEKG GLNTTLPFHNI SKYAFGNCPK YVGKSLKLP VGLRNVPAVS SR [配列 番号58]	GLFGAIAGFIEGGWP GLVAGWYGFQHSN DQGVGMAADKGST QKAIDKITSKVNII DKMKNQYEVIDHEF NELEARLNMINNKI DDQIQDIWAYNAEL LVLLENQKTLDEHD ANVNNLYNKVKRA LGSNAVEDGNGCFE LYHKCDDQCMETIR NGTYDRQKYQESR LERQKIEGVKLESEG TYKILTIYSTVASSL VLAMGFAAFLFWA MSGNSCRNICI [配列番号74]
H10 (M21647)	MYKV VVIIAL LGAVK G [配列 番号27]	LDRICLGHHA VANGTIVKTL TNEQEEVTNA TETVESTNLN KLC [配列番号43]	CESKCFWRGG SINTKLPFQNL SPRTVGQCPK YVNQRSLLLA TGMRNVPEVV QGR [配列 番号59]	GLFGAIAGFIENGW EGMVDGWYGFRRHQ NAQGTGQAADYKS TQAAIDQITGKLNRL IEKTNTEFESIESEFS ETEHQIGNVINWTK DSITDIWTYNAELLV AMENQHTIDMADSE MLNLYERVRKQLR QNAEEDGKGCFEIY HTCDDSCMESIRNN TYDHSQYREEALLN RLNINPVKLSSGYK DIILWFSFGESCFVL LAVVMGLVFFCLKN GNMRCTICI [配列番号75]

10

20

30

HAサブタイプ (Genbank番号)	シグナル ペプチド	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
H11 (D90306)	MEKTL LFAAIF LCVKA [配列 番号28]	DEICIGYLSNN STDKVDTIEN NVTVTSSVEL VETEHTGSFC [配列番号44]	CSTKQCQTEIGG INTNKSFHNV HRNTIGDCPK YVNVKSLKLA TGPRNVPAIAS R [配列 番号60]	GLFGAIAGFIEGGWP GLINGWYGFQHRDE EGTGIAADKESTQK AIDQITSKVNIVDR MNTNFESVQHEFSEI EERINQLSKHVDDS VVDIWSYNAQLLVL LENEKTLDLHDSNV RNLHEKVRRLKD NAKDEGNGCFTFYH KCDNKCIERVRNGT YDHKEFEEESKINR QEIEGVKLDSSGNV YKILSIYSCIASSLVL AALIMGFMFWACS NGSCRCTICI [配列番号76]
H12 (D90307)	MEKFII LSTVL AASFA Y [配列 番号29]	DKICIGYQTNN STETVNTLSEQ NVPVTQVEEL VHRGIDPILC [配列番号45]	CVTECQLNEG VMNTSKPFQN TSKHVIGKCPK YIPSGSLKLA GLRNVPQVQD R [配列 番号61]	GLFGAIAGFIEGGWP GLVAGWYGFQHQ AEGTGIAADRSTQ RAIDNMQNKLNVI DKMNKQFEVNVHE FSEVESRINMINSKI DDQITDIWAYNAEL LVLENQKTLDEHD ANVRNLHDRVRRV LRENAIDTGDGCFEI LHKCDNNCMDTIRN GTYNHKEYEEESKI ERQKVNGVKLEENS TYKILSIYSSVASSL VLLMIIGGFIFGCQ NGNVRCTFCI [配列番号77]

10

20

30

HAサブタイプ (Genbank番号)	シグナル ペプチド	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
H13 (D90308)	MALN VIATL TLISVC VHA [配列 番号 30]	DRICVGYLSTN SSERVDTLLEN GVPVTSSIDLIE TNHTGTYC [配列番号46]	CNTKCQTSVG GINTNRTFQNI DKNALGDCPK YIKSGQLKLAT GLRNVPAISNR [配列 番号 62]	GLFGAIAGFIEGGWP GLINGWYGFQHQNE QGTGIAADKESTQK AIDQITTKINNIIDKM NGNYDSIRGEFNQV EKRINMLADRIDDA VTDIWSYNAKLLVL LENDKTLDMHDAN VKNLHEQVRRELKD NAIDEGNGCFELLH KCNDSCMETIRNGT YDHTEYAEESKLKR QEIDGIKLKSEDNVY KALSIYSCIASSVVL VGLILSFIMWACSSG NCRFNVC [配列番号78]
H14 (M35997)	MIALIL VALAL SHTAY S [配列 番号 31]	QITNGTTGNPII CLGHHAVENG TSVKTLTDNH VEVVS AKELV ETNHTDELC [配列番号47]	CTSPCLTDKGS IQSDKPFQNV RIAIGNCPKYV KQGSLMLATG MRNIPGKQAK [配列 番号 63]	GLFGAIAGFIENGW QGLIDGWYGFRHQ NAEGTGAADLKST QAAIDQINGKLNRLI EKTNEKYHQIEKEF EQVEGRIQDLEKYV EDTKIDLWSYNAEL LVALENQHTIDVTD SEMKNLFRVRRQL RENAEDQGNGCFEI FHQCDNNCIESIRNG TYDHNIYRDEAINN RIKINPVTLTMGYK DIILWISFSMSCFVF VALILGFVLWACQN GNIRCQICI [配列番号79]

10

20

30

HAサブタイプ (Genbank番号)	シグナル ペプチド	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
H15 (L43917)	MNTQI IVILVL GLSMV KS [配列 番号32]	DKICLGHHAV ANGTKVNTLT ERGVEVVNAT ETVEITGIDKV C [配列番号48]	CEGECFYSSG TINSPLPFQNI SRAVGKCPRY VKQSSLPLAL GMKNVPEKIR TR [配列 番号64]	GLFGAIAGFIENGW EGLIDGWYGFRHQ AQQGQTAADYKST QAAIDQITGKLNRLI EKTNKQFELIDNEFT EVEQQIGNVINWTR DSLTEIWSYNAELL VAMENQHTIDLADS EMNKLYERVRRQL RENAEEDGTGCFEIF HRCDDQCMESIRNN TYNHTEYRQEALQN RIMINPVKLSGGYKD VILWFSFGASCVML LAIAMGLIFMCVKN GNLRCTICI [配列番号80]
H16 (EU293865)	MMIK VLYFLI IVLGR YSKA [配列 番号33]	DKICIGYLSNN SSDTVDLTEN GVPVTSSVDL VETNHTGTYC [配列番号49]	CNTKCQTSLG GINTNKTFQNI ERNALGDCPK YIKSGQLKLAT GLRNVPSIGER [配列 番号65]	GLFGAIAGFIEGGWP GLINGWYGFQHQNE QGTGIAADKASTQK AINEITTKINNIIEKM NGNYDSIRGEFNQV EKINMLADRVDVA VTDIWSYNAKLLVL LENDRTLHLHDANV RNLHDQVKRALKS NAIDEGDGCFNLLH KCNDSCMETIRNGT YNHEDYREESQLKR QEIEGIKLTEDNVY KVLISYSCIASSIVLV GLILAFIMWACSNG SCRFNVC [配列番号81]

10

20

30

40

【 0 0 9 9 】

下の表1Aは、本明細書に記載されるポリペプチド及び方法のための、有益なHA1のN末端ステムセグメント及びHA1のC末端ステムセグメントを特定する。

【表 2】

表1A. 例示的なインフルエンザA型血球凝集素配列

HAサブタイプ (Genbank番号)	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端ステムセグメント
H1 PR8-H1N1 (EF467821.1) Cysなし	DTICIGYHANNSTDTVDT VLEKNVTVTHSVNLLD SHNGKL [配列番号177]	NTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGEC PKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSR [配列番号226]
H1 PR8-H1N1 (EF467821.1) Cys Δ1なし	DTICIGYHANNSTDTVDT VLEKNVTVTHSVNLLD SHNGKL [配列番号178]	TKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGEC PKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSR [配列番号227]
H1 PR8-H1N1 (EF467821.1) Cys Δ3なし	DTICIGYHANNSTDTVDT VLEKNVTVTHSVNLLD SHNGK [配列番号179]	KCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGEC PKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSR [配列番号228]
H1 PR8-H1N1 (EF467821.1) PR8-CON-A	DTICIGYHANNSTDTVDT VLEKNVTVTHSVNLLD SHNGKLCRLKC [配列番号309]	CKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGEC PKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRG [配列番号310]
H2 (L11136) Cysなし	DQICIGYHSNNSTEKVDI ILERNVTVTHAQNILEKT HNGKL [配列番号180]	ETKCQTPLGAINSTLTPFHNVHPLTIGEC PKYVKSERLVLATGLRNV PQIESR [配列番号229]
H2 (L11136) Cys Δ1なし	DQICIGYHSNNSTEKVDI ILERNVTVTHAQNILEKT HNGKL [配列番号181]	TKCQTPLGAINSTLTPFHNVHPLTIGEC PKYVKSERLVLATGLRNV PQIESR [配列番号230]
H2 (L11136) Cys Δ3なし	DQICIGYHSNNSTEKVDI ILERNVTVTHAQNILEKT HNGK [配列番号182]	KCQTPLGAINSTLTPFHNVHPLTIGEC PKYVKSERLVLATGLRNV PQIESR [配列番号231]
H3 HK68-H3N2 (EF409245) PDB: 1HGJ Cysなし	QDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIE VTNATELVQSSSTGKI [配列番号183]	ISECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGAC PKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTR [配列番号232]
H3 HK68-H3N2 (EF409245) PDB: 1HGJ Cys Δ1なし	QDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIE VTNATELVQSSSTGKI [配列番号184]	SECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACP PKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTR [配列番号233]

10

20

30

40

HAサブタイプ (Genbank番号)	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端ステムセグメント
H3 HK68-H3N2 (EF409245) PDB: 1HGJ No Cys Δ3なし	QDLPGNDNSTATLCLGH HAVPNGTLVKTITDDQIE VTNATELVQSSSTGK [配列番号185]	ECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACP KYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTR [配列番号234]
H3 HK68-H3N2 PDB: 1HGJ (EF409245) HK68-CON-A	STATLCLGHHAVPNGTL VKTITDDQIEVTNATELV QSSSTGKIC [配列番号308]	CISECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA CPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTR [配列番号52]
H4 (D90302) Cysなし	QNYTGPNVICMGHHA VANGTMVKTLLADDQVEV VTAQELVESQNLPEL [配列番号186]	VSKCHTDKGSLSSTTKPFQNISRIAVGD CPRYVKQGSLKLATGMRNIPEKASR [配列番号235]
H4 (D90302) Cys Δ1なし	QNYTGPNVICMGHHA VANGTMVKTLLADDQVEV VTAQELVESQNLPEL [配列番号187]	SKCHTDKGSLSSTTKPFQNISRIAVGDC PRYVKQGSLKLATGMRNIPEKASR [配列番号236]
H4 (D90302) Cys Δ3なし	QNYTGPNVICMGHHA VANGTMVKTLLADDQVEV VTAQELVESQNLPE [配列番号188]	KCHTDKGSLSSTTKPFQNISRIAVGD CPRYVKQGSLKLATGMRNIPEKASR [配列番号237]
H5 (X07826) Cysなし	DQICIGYHANKSTKQVD TIMEKNVTVTHAQDILE RTHNGKL [配列番号189]	DTKCQTPVGEINSSMPFHNIHPHTIGE CPKYVKSDDLVLATGLRNVPQRKKR [配列番号238]
H5 (X07826) Cys Δ1なし	DQICIGYHANKSTKQVD TIMEKNVTVTHAQDILE RTHNGKL [配列番号190]	TKCQTPVGEINSSMPFHNIHPHTIGECP KYVKSDDLVLATGLRNVPQRKKR [配列番号239]
H5 (X07826) Cys Δ3なし	DQICIGYHANKSTKQVD TIMEKNVTVTHAQDILE RTHNGK [配列番号191]	KCQTPVGEINSSMPFHNIHPHTIGECP KYVKSDDLVLATGLRNVPQRKKR [配列番号240]
H6 (D90303) Cysなし	DKICIGYHANNSTTQIDT ILEKNVTVTHSVELLENQ KEERF [配列番号192]	DATCQTVAGVLRNKTQNVSPWLIG ECPKYVKSESLRLATGLRNVPQIETR [配列番号241]
H6 (D90303) Cys Δ1なし	DKICIGYHANNSTTQIDT ILEKNVTVTHSVELLENQ KEERF [配列番号193]	ATCQTVAGVLRNKTQNVSPWLIGE CPKYVKSESLRLATGLRNVPQIETR [配列番号242]

10

20

30

40

HAサブタイプ (Genbank番号)	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端ステムセグメント
H6 (D90303) Cys Δ3なし	DKICIGYHANNSTTQIDT ILEKNVTVTHSVELLENQ KEER [配列番号194]	TCQTVAGVLRRTNKTFQNVSPLWIGEC PKYVKSESLRLATGLRNVPQIETR [配列番号243]
H7 (M24457) Cys なし	DKICLGHHAHSVNGTKVN TLTERGVEVVNATETVE RTNIPKI [配列番号195]	EGECYHSGGTITSRLPFQINNSRAVGK CPRYVKQESLLLATGMKNVPEPSKKR KKR [配列番号244]
H7 (M24457) Cys Δ1なし	DKICLGHHAHSVNGTKVN TLTERGVEVVNATETVE RTNIPKI [配列番号196]	GECYHSGGTITSRLPFQINNSRAVGKC PRYVKQESLLLATGMKNVPEPSKKR KR [配列番号245]
H7 (M24457) Cys Δ3なし	DKICLGHHAHSVNGTKVN TLTERGVEVVNATETVE RTNIPK [配列番号197]	ECYHSGGTITSRLPFQINNSRAVGKCP RYVKQESLLLATGMKNVPEPSKKR KR [配列番号246]
H8 (D90304) Cys なし	DRICIGYQSNNSTDTVNT LIEQNVPTQTMELVET EKHPAY [配列番号198]	NTKCQTYAGAINSSKPFQNASRHYMG ECPKYVKKASLRLAVGLRNTPSVEPR [配列番号247]
H8 (D90304) Cys Δ1なし	DRICIGYQSNNSTDTVNT LIEQNVPTQTMELVET EKHPAY [配列番号199]	TKCQTYAGAINSSKPFQNASRHYMGE CPKYVKKASLRLAVGLRNTPSVEPR [配列番号248]
H8 (D90304) Cys Δ3なし	DRICIGYQSNNSTDTVNT LIEQNVPTQTMELVET EKHPA [配列番号200]	KCQTYAGAINSSKPFQNASRHYMGEC PKYVKKASLRLAVGLRNTPSVEPR [配列番号249]
H9 (D90305) Cys なし	DKICIGYQSTNSTETVDT LTESNVPVTHTKELLHTE HNGML [配列番号201]	VVQCQTEKGGLNTTLPFHNISKYAFG NCPKYVGVKSLKLPVGLRNVPVAVSSR [配列番号250]
H9 (D90305) Cys Δ1なし	DKICIGYQSTNSTETVDT LTESNVPVTHTKELLHTE HNGML [配列番号202]	VQCQTEKGGLNTTLPFHNISKYAFGN CPKYVGVKSLKLPVGLRNVPVAVSSR [配列番号251]
H9 (D90305) Cys Δ3なし	DKICIGYQSTNSTETVDT LTESNVPVTHTKELLHTE HNGM [配列番号203]	QCQTEKGGLNTTLPFHNISKYAFGNCP KYVGVKSLKLPVGLRNVPVAVSSR [配列番号252]

10

20

30

40

HAサブタイプ (Genbank番号)	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント
H10 (M21647) Cys なし	LDRICLGHHAVANGTIV KTLTNEQEEVTNATETV ESTNLNKL [配列番号204]	ESKCFWRGGSINTKLPFQNLSPRTVGQ CPKYVNQRSLLLATGMRNVPEVVQGR R [配列番号253]
H10 (M21647) Cys Δ1なし	LDRICLGHHAVANGTIV KTLTNEQEEVTNATETV ESTNLNKL [配列番号205]	SKCFWRGGSINTKLPFQNLSPRTVGQC PKYVNQRSLLLATGMRNVPEVVQGR [配列番号254]
H10 (M21647) Cys Δ3なし	LDRICLGHHAVANGTIV KTLTNEQEEVTNATETV ESTNLNK [配列番号206]	KCFWRGGSINTKLPFQNLSPRTVGQCP KYVNQRSLLLATGMRNVPEVVQGR [配列番号255]
H11 (D90306) Cys なし	DEICIGYLSNNSTDKVDT IIENNVTVTSSVELVETE HTGSF [配列番号207]	STKCQTEIGGINTNKSFHNVHRNTIGD CPKYVNVKSLKLATGPRNVPAIASR [配列番号256]
H11 (D90306) Cys Δ1なし	DEICIGYLSNNSTDKVDT IIENNVTVTSSVELVETE HTGSF [配列番号208]	TKCQTEIGGINTNKSFHNVHRNTIGDC PKYVNVKSLKLATGPRNVPAIASR [配列番号257]
H11 (D90306) Cys Δ3なし	DEICIGYLSNNSTDKVDT IIENNVTVTSSVELVETE HTGS [配列番号209]	KCQTEIGGINTNKSFHNVHRNTIGDCP KYVNVKSLKLATGPRNVPAIASR [配列番号258]
H12 (D90307) Cys なし	DKICIGYQTNNSTETVNT LSEQNVPVTQVEELVHR GIDPIL [配列番号210]	VTECQLNEGVMNTSKPFQNTSKHYIG KCPKYIPSGSLKLAIGLRNVPQVQDR [配列番号259]
H12 (D90307) Cys Δ1なし	DKICIGYQTNNSTETVNT LSEQNVPVTQVEELVHR GIDPIL [配列番号211]	TECQLNEGVMNTSKPFQNTSKHYIGK CPKYIPSGSLKLAIGLRNVPQVQDR [配列番号260]
H12 (D90307) Cys Δ3なし	DKICIGYQTNNSTETVNT LSEQNVPVTQVEELVHR GIDPI [配列番号212]	ECQLNEGVMNTSKPFQNTSKHYIGKC PKYIPSGSLKLAIGLRNVPQVQDR [配列番号261]
H13 (D90308) Cys なし	DRICVGYLSTNSSERVDT LLENGVPVTSSIDIETN HTGTY [配列番号213]	NTKCQTSVGGINTNRTFQNIIDKNALG DCPKYIKSGQLKLATGLRNVP AISNR [配列番号262]

10

20

30

40

HAサブタイプ (Genbank番号)	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端ステムセグメント
H13 (D90308) Cys Δ1なし	DRICVGYLSTNSSERVDT LLENGVPVTSSIDLIETN HTGTY [配列番号214]	TKCQTSVGGINTNRTFQNIIDKKNALGD CPKYIKSGQLKLATGLRNVPAISNR [配列番号263]
H13 (D90308) Cys Δ3なし	DRICVGYLSTNSSERVDT LLENGVPVTSSIDLIETN HTGT [配列番号215]	KCQTSVGGINTNRTFQNIIDKKNALGDC PKYIKSGQLKLATGLRNVPAISNR [配列番号264]
H14 (M35997) Cys なし	QITNGTTGNPIICLGHHA VENGTSVKTLTDNHVEV VSAKELVETNHTDEL [配列番号216]	TSPCLTDKGSIQSDKPFQNVSRIGNC PKYVKQGSMLLATGMRNIPGKQAK [配列番号265]
H14 (M35997) Cys Δ1なし	QITNGTTGNPIICLGHHA VENGTSVKTLTDNHVEV VSAKELVETNHTDEL [配列番号217]	SPCLTDKGSIQSDKPFQNVSRIGNCP KYVKQGSMLLATGMRNIPGKQAK [配列番号266]
H14 (M35997) Cys Δ3なし	QITNGTTGNPIICLGHHA VENGTSVKTLTDNHVEV VSAKELVETNHTDE [配列番号218]	PCLTDKGSIQSDKPFQNVSRIGNCPK YVKQGSMLLATGMRNIPGKQAK [配列番号267]
H15 (L43917) Cysなし	DKICLGHHAVANGTKV NLTTERGVEVVNATETV EITGIDKV [配列番号219]	EGECFYSGGTINSPLPFQNIDSRAVGK CPRYVKQSSLPLALGMKNVPEKIRTR [配列番号268]
H15 (L43917) Cys Δ1なし	DKICLGHHAVANGTKV NLTTERGVEVVNATETV EITGIDKV [配列番号220]	GECFYSGGTINSPLPFQNIDSRAVGKC PRYVKQSSLPLALGMKNVPEKIRTR [配列番号269]
H15 (L43917) Cys Δ3なし	DKICLGHHAVANGTKV NLTTERGVEVVNATETV EITGIDK [配列番号221]	ECFYSGGTINSPLPFQNIDSRAVGKCP RYVKQSSLPLALGMKNVPEKIRTR [配列番号270]
H16 (EU293865) Cysなし	DKICIGYLSNNSSDTVDT LTENGVPVTSSVDLVET NHTGTY [配列番号222]	NTKCQTSLGGINTNKTFQNIERNALGD CPKYIKSGQLKLATGLRNVPSIGER [配列番号271]
H16 (EU293865) Cys Δ1なし	DKICIGYLSNNSSDTVDT LTENGVPVTSSVDLVET NHTGTY [配列番号223]	TKCQTSLGGINTNKTFQNIERNALGDC PKYIKSGQLKLATGLRNVPSIGER [配列番号272]

10

20

30

40

HAサブタイプ (Genbank番号)	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端ステムセグメント
H16 (EU293865) Cys Δ3なし	DKICIGYLSNNSSDTVDT LTENGVPVTSSVDLVET NHTGT [配列番号224]	KCQTSLGGINTNKTFQNIERNALGDCP KYIKSGQLKLATGLRNVPSIGER [配列番号273]

10

【 0 1 0 0 】

下の表2は、HA2ポリペプチドの推定上のステムドメイン、ルミナルドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを特定する。

【表3】

表2 例示的なインフルエンザA型血球凝集素配列

HA2ドメイン サブタイプ (Genbank番号)	ステムドメイン	ルミナル ドメイン	膜貫通 ドメイン	細胞質 ドメイン
H1 PR8-H1N1 (EF467821.1)	GLFGAIAGFIEGGWT GMIDGWYGYHHQNE QGSGYAADQKSTQN AINGITNKVNTVIEK MNIQFTA VGKEFNKL EKRMENLNKKVDDG FLDIWTYNAELLVLL ENERTLDFHDSNVKN LYEKVKSQKNNAK EIGNGCFEFYHKCDN ECMESVRNGTYDYP KYSEESKLNREKVDG VKLES [配列番号82]	MGIYQ [配列 番号98]	ILAIYSTVASSL VLLVSLGAISF WMCS [配列番号114]	NGSLQCRI CI [配列 番号130]
H2 (L11136)	GLFGAIAGFIEGGWQ GMIDGWYGYHHSND QGSGYAADKESTQK AIDGITNRVNSVIEK MNTQFEAVGKEFSNL EKRENLNKKMEDG FLDVWTYNAELLVL MENERTLDFHDSNV KNLYDRVRMQLRDN AKELGNGCFEFYHKC DDECMNSVKNGTYP YPKYEEESKLNREI KGVKLSN [配列番号83]	MGVYQ [配列 番号99]	ILAIYATVAGSL SLAIMIAGISLW MCS [配列番号115]	NGSLQCRI CI [配列 番号131]
H3 HK68-H3N2	GLFGAIAGFIENGWE GMIDGWYGFRRHONS	SGYKD	WILWISFAISCF LLCVVLLGFIM	RGNIRCNI CI

20

30

40

HA2ドメイン サブタイプ (Genbank番号)	ステムドメイン	ルミナル ドメイン	膜貫通 ドメイン	細胞質 ドメイン
(EF409245) PDB: 1HGJ	EGTGQAADLKSTQA AIDQINGKLNRVIEKT NEKFHQIEKEFSEVE GRIQDLEKYVEDTKI DLWSYNAELLVALE NQHTIDLTDSEMKNL FEKTRRQLRENAED MGNGCFKIYHKCDN ACIESIRNGTYDHDV YRDEALNNRFQIKGV ELK [配列番号84]	[配列 番号100]	WACQ [配列番号116]	[配列 番号132]
H4 (D90302)	GLFGAIAGFIENGWQ GLIDGWYGFRHQNA EGTGTAAADLKSTQA AIDQINGKLNRLIEKT NDKYHQIEKEFEQVE GRIQDLENYVEDTKI DLWSYNAELLVALE NQHTIDVTDSEMKNL FERVRRQLRENAEDK GNGCFEIFHKCDNNC IESIRNGTYDHDIYRD EAINNRFQIQGVKLT [配列番号85]	QGYKD [配列 番号101]	IILWISFSISCFL VALLAFILWA CQ [配列番号117]	NGNIRCQI CI [配列 番号133]
H5 (X07826)	GLFGAIAGFIEGGWQ GMVDGWYGYHHSN EQSGYAADKESTQ KAIDGITNKVNSIIDK MNTRFEAVGKEFNN LERRVENLNKKMED GFLDVWTYNVELLV LMENERTLDFHDSNV NNLYDKVRLQLKDN ARELGNGCFEFYHKC DNECMESVRNGTYD YPQYSEEARLNREEIS GVKLES [配列番号86]	MGVYQ [配列 番号102]	ILSIYSTVASSL ALAIMIAGLSF WMCS [配列番号118]	NGSLQCRI CI [配列 番号134]
H6 (D90303)	GLFGAIAGFIEGGWT GMIDGWYGYHHENS QSGYAADRESTQK AVDGITNKVNSIIDK MNTQFEAVDHEFSNL ERRIDNLNKRMEDGF LDVWTYNAELLVLL	LGVYQ [配列 番号103]	ILAIYSTVSSSL VLVGLIHAVGL WMCS [配列番号119]	NGSMQCR ICI [配列 番号135]

10

20

30

40

HA2ドメイン サブタイプ (Genbank番号)	ステムドメイン	ルミナル ドメイン	膜貫通 ドメイン	細胞質 ドメイン
	ENERTLDLHDANVK NLYERVKSQLRDNA MILGNGCFEFWHKC DDECMEVKNKGT YDYPKYQDES KLNQRQEI ESVKLES [配列番号87]			
H7 (M24457)	GLFGAIAGFIENGWE GLVDGWYGFRRHQA QGEGTAADYKSTQS AIDQITGKLNRLIEKT NQQFELIDNEFTEVE KQIGNLINWTKDSITE VWSYNAELIVAMEN QHTIDLADSEMRLY ERVRKQLRENAEED GTGCFEIFHKCDDDC MASIRNNTYDHSKYR EEAMQNRIQIDPVKL S [配列番号88]	SGYKD [配列 番号104]	VILWFSFGASCF LLAIAMGLVFI CVK [配列番号120]	NGNMRCT ICI [配列 番号136]
H8 (D90304)	GLFGAIAGFIEGGWS GMIDGWYGFHHSNS EGTGMAADQKSTQE AIDKITNKVNNIVDK MNREFEVVNHEFSEV EKRINMINDKIDDQIE DLWAYNAELLVLE NQKTLDEHDSNVKN LFDEVKRRLSANAID AGNGCFDILHKCDNE CMETIKNGTYDHKE YEEEAKLERSKINGV KLEE [配列番号89]	NTTYK [配列 番号105]	ILSIYSTVAASL CLAILIAGGLIL GMQ [配列番号121]	NGSCRCM FCI [配列 番号137]
H9 (D90305)	GLFGAIAGFIEGGWP GLVAGWYGFQHSND QGVGMAADKGSTQK AIDKITSKVNNIIDKM NKQYEVIDHEFNELE ARLNMINNKIDDQIQ DIWAYNAELLVLEN QKTLDEHDANVNNL YNKVKRALGSNAVE DGNGCFELYHKCDD QCMETIRNGTYDRQ	EGTYK [配列 番号106]	ILTIYSTVASSL VLAMGFAAFLF WAMS [配列番号122]	NGSCRCNI CI [配列 番号138]

10

20

30

40

HA2ドメイン サブタイプ (Genbank番号)	ステムドメイン	ルミナル ドメイン	膜貫通 ドメイン	細胞質 ドメイン
	KYQEESRLERQKIEG VKLES [配列番号90]			
H10 (M21647)	GLFGAIAGFIENGWE GMVDGWYGFRHQ AAGTGQAADYKSTQ AAIDQITGKLNRLIEK TNTEFESIESEFSETEH QIGNVINWTKDSITDI WTYNAELLVAMENQ HTIDMADSEMLNLYE RVRKQLRQNAEEDG KGCFEIYHTCDDSCM ESIRNNTYDHSQYRE EALLNRLNINPVKLS [配列番号91]	SGYKD [配列 番号 107]	IILWFSFGESCF VLLAVVMGLV FFCLK [配列番号123]	NGNMRCT ICI [配列 番号 139]
H11 (D90306)	GLFGAIAGFIEGGWP GLINGWYGFQHRDE EGTGIAADKESTQKA IDQITSKVNIVDRM NTNFESVQHEFSEIEE RINQLSKHVDDSVVD IWSYNAQLLVLENE KTLDLHDSNVRNLHE KVRMLKDNAKDEG NGCFTFYHKCDNKCI ERVRNGTYDHKEFEE ESKINRQEIEGVKLD S [配列番号92]	GNVYK [配列 番号 108]	ILSIYSCIASSLV LAALIMGFMFW ACS [配列番号124]	NGSCRCTI CI [配列 番号 140]
H12 (D90307)	GLFGAIAGFIEGGWP GLVAGWYGFQHQNA EGTGIAADRSTQRA IDNMQNKLNNVIDK MNKQFEVNNHEFSE VESRINMINSKIDDQI TDIWAYNAELLVLE NQKTLDEHDANVRN LHDRVRRVLRENAID TGDGCFEILHKCDNN CMDTIRNGTYNHKE YEEESKIERQKVNGV KLEE [配列番号93]	NSTYK [配列 番号 109]	ILSIYSSVASSLV LLMIIGGFIFG CQN [配列番号125]	GNVRCTF CI [配列 番号 141]
H13 (D90308)	GLFGAIAGFIEGGWP GLINGWYGFQHQNE	DNVYK [配列]	ALSIYSCIASSV VLVGLILSFIM	GNCRFNV CI

10

20

30

40

HA2ドメイン サブタイプ (Genbank番号)	ステムドメイン	ルミナル ドメイン	膜貫通 ドメイン	細胞質 ドメイン
	QGTGIAADKESTQKA IDQITTKINNIIDKMN GNYDSIRGEFNQVEK RINMLADRIDDAVTD IWSYNAKLLVLEND KTLDMHDANVKNLH EQVRRELKDNAIDEG NGCFELLHKCNDSC METIRNGTYDHTEYA EESKLLKRQEIDGIKLS E [配列番号94]	番号110]	WACSS [配列番号126]	[配列 番号142]
H14 (M35997)	GLFGAIAGFIENGWQ GLIDGWYGFRRHQNA EGTGTAAADLKSTQA AIDQINGKLNRLIEKT NEKYHQIEKEFEQVE GRIQDLEKYVEDTKI DLWSYNAELLVALE NQHTIDVTDSEMKNL FERVRRQLRENAEDQ GNGCFEIFHQCDNNC IESIRNGTYDHNIYRD EAINNRIKINPVTLT [配列番号95]	MGYKD [配列 番号111]	IILWISFSMSCF VFVALILGFVL WACQ [配列番号127]	NGNIRCQI CI [配列 番号143]
H15 (L43917)	GLFGAIAGFIENGWE GLIDGWYGFRRHQNA QGQGTAAADYKSTQA AIDQITGKLNRLIEKT NKQFELIDNEFTEVE QQIGNVINWTRDSL EIWSYNAELLVAME NQHTIDLADSEMKNL YERVRRQLRENAEED GTGCFEIFHRCDDQC MESIRNNTYNHTEYR QEALQNRIMINPVKLS S [配列番号96]	SGYKD [配列 番号112]	VILWFSFGASC VMLLAIAMGLI FMCVKN [配列番号128]	GNLRCTIC I [配列 番号144]
H16 (EU293865)	GLFGAIAGFIEGGWP GLINGWYGFQHQNE QGTGIAADKASTQKA INEITTKINNIIEKMNG NYDSIRGEFNQVEKR INMLADRVDVAVTDI WSYNAKLLVLEND	DNVYK [配列 番号113]	VLSIYSCIASIV LVGLILAFIMW ACS [配列番号129]	NGSCRFN VCI [配列 番号145]

10

20

30

40

HA2ドメイン サブタイプ (Genbank番号)	ステムドメイン	ルミナル ドメイン	膜貫通 ドメイン	細胞質 ドメイン
	RTLDLHDANVRNLH DQVKRALKSNAIDEG DGCFNLLHKCNDSC METIRNGTYNHEDYR EESQLKRQEIEGIKLLK TE [配列番号97]			

10

【 0 1 0 1 】

特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、インフルエンザ血球凝集素ポリペプチドの三次構造又は四次構造に、1つ以上の免疫原性エピトープを含む。

【 0 1 0 2 】

特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、アミノ酸配列 $A_{17}-A_{18}-(Xaa)_n-A_{38}$ (配列番号146)を含み、式中

A_{17} は、Y又はHであり；

A_{18} は、H、L又はQであり；

$(Xaa)_n$ は、18~20アミノ酸残基の配列を表し；

A_{38} は、H、S、Q、T又はNである。

20

【 0 1 0 3 】

特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、アミノ酸配列 $A_{291}-A_{292}$ (配列番号147)を含み、式中

A_{291} は、T、S、N、D、P又はKであり；

A_{292} は、L、M、K又はRである。

【 0 1 0 4 】

特定の実施態様では、HA2ドメインは、アミノ酸配列 $A_{18}-A_{19}-A_{20}-A_{21}$ (配列番号148)を含み、式中

A_{18} は、V又はIであり；

A_{19} は、D、N又はAであり；

A_{20} は、Gであり、

A_{21} は、Wである。

30

【 0 1 0 5 】

特定の実施態様では、HA2ドメインは、アミノ酸配列 $A_{38}-A_{39}-A_{40}-A_{41}-A_{42}-A_{43}-A_{44}-A_{45}-A_{46}-A_{47}-A_{48}-A_{49}-A_{50}-A_{51}-A_{52}-A_{53}-A_{54}-A_{55}-A_{56}$ (配列番号149)を含み、式中

A_{38} は、K、Q、R、L又はYであり；

A_{39} は、任意のアミノ酸残基であり；

A_{40} は、任意のアミノ酸残基であり；

A_{41} は、Tであり；

A_{42} は、Qであり；

A_{43} は、任意のアミノ酸残基であり；

A_{44} は、Aであり；

A_{45} は、Iであり；

A_{46} は、Dであり；

A_{47} は、任意のアミノ酸残基であり；

A_{48} は、I、V又はMであり；

A_{49} は、T、Q又はNであり；

40

50

A₅₀ は、任意のアミノ酸残基であり；
 A₅₁ は、Kであり；
 A₅₂ は、V又はLであり；
 A₅₃ は、Nであり；
 A₅₄ は、任意のアミノ酸残基であり；
 A₅₅ は、V、I又はLであり；
 A₅₆ は、V又はIである。

【0106】

特定の実施態様では、インフルエンザシステムドメインポリペプチドは、配列番号146～149から選択される2つのアミノ酸配列を含む。特定の実施態様では、インフルエンザシステムドメインポリペプチドは、配列番号146～149から選択される3つのアミノ酸配列を含む。特定の実施態様では、インフルエンザシステムドメインポリペプチドは、配列番号146～149から選択される4つのアミノ酸配列を含む。

10

【0107】

特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、インフルエンザB型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントは、下の表3に示す配列番号154～157から選択される。

【0108】

特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、インフルエンザB型血球凝集素に基づく。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、下の表3に示す配列番号158～159から選択される。

20

【0109】

特定の実施態様では、HA2ステムドメインは、インフルエンザB型血球凝集素に基づく。インフルエンザB型血球凝集素のN末端ステムセグメントの末端及びC末端ステムセグメントの末端の例示的な残基を、図2に示す。特定の実施態様では、HA2ステムドメインは、下の表3及び4に示す配列番号160による。

【0110】

特定の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメント及びインフルエンザB型ウイルスHA1のC末端セグメントの境界は、3対のアミノ酸残基:Arg₅₀及びSer₂₇₇;Ala₆₆及びTrp₂₇₁;並びにLys₈₀及びSer₂₇₇に関して定義される。残基番号は、プロテインデータバンク受託番号3BT6に記載のように、インフルエンザウイルスB型からのB-HAの番号付けに基づく。プロテインデータバンク受託番号3BT6のB-HAタンパク質のX線結晶構造に対応するアミノ酸配列を、代表的なH1及びH3アミノ酸配列と整列させ、それを図2に示す。3対の残基の位置は、図2で強調されてもいる。

30

【0111】

特定の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメントは、残基1(PDBファイル3BT6の場合のように、インフルエンザB型ウイルスHA1サブユニットの番号付けに基づく)から始まり、Arg₅₀で終わる。特定の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメントは、残基1から始まり、Ala₆₆で終わる。一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメントは、残基1から始まり、Lys₈₀で終わる。一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスN末端ステムセグメントは、残基1から始まり、Arg₈₀で終わる。

40

【0112】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメントは、表3に例示されるように、配列番号154～157のいずれか1つによるアミノ酸配列を有する。一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメントは、配列番号154～157のいずれか1つのアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一であるアミノ酸配列を有する。

【0113】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメントは、イ

50

ンフルエンザB型ウイルスHA1の残基1～50に対応するアミノ酸配列配列番号154と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一であるアミノ酸配列を有する。

【0114】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメントは、インフルエンザB型ウイルスHA1の残基1～66に対応するアミノ酸配列配列番号155と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一であるアミノ酸配列を有する。

【0115】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメントは、インフルエンザB型ウイルスHA1の残基1～80に対応するアミノ酸配列配列番号156と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一であるアミノ酸配列を有する。

10

【0116】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端ステムセグメントは、インフルエンザB型ウイルスHA1の残基1～80に対応するアミノ酸配列配列番号157と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一であるアミノ酸配列を有する。

【0117】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端ステムセグメントは、Ser₂₇₇残基若しくはTrp₂₇₁、又は他のインフルエンザB型ウイルスHAサブタイプの対応する残基から始まるアミノ酸配列を有する。

【0118】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端ステムセグメントは、表3に例示されるように、配列番号158～159のいずれか1つによるアミノ酸配列を有する。一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端ステムセグメントは、インフルエンザB型ウイルスHA1の残基277～344に対応する配列番号158と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端ステムセグメントは、インフルエンザB型ウイルスHA1の残基271～344に対応する配列番号159と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一であるアミノ酸配列を有する。

20

【0119】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端ステムセグメントは、残基276、残基275、残基274、残基273又は残基272から始まる。他の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端ステムセグメントは、残基278、残基279、残基280、残基281又は残基282から始まる。

30

【0120】

特定の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA2ドメインは、インフルエンザB型ウイルスHA1のN末端セグメント、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端セグメント、又は両方を通して、インフルエンザB型ウイルスHA1ドメインと三次結合又は四次結合している。

【0121】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端セグメント及びインフルエンザB型ウイルスHA2サブユニットは、共有結合している。例えば、そのC末端で(例えば、第二の配列の末端残基で)、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端セグメントは、そのような実施態様のインフルエンザB型ウイルスHA2ドメインに共有結合している。一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA1のC末端セグメント及びインフルエンザB型ウイルスHA2ドメインは、連続ポリペプチド鎖を形成する。

40

【0122】

一部の実施態様では、インフルエンザB型ウイルスHA2ドメインは、表3又は4に例示されるように、配列番号160又は161のアミノ酸配列を有する。一部の実施態様では、HA2ドメインのアミノ酸配列は、配列番号160～161のいずれか1つと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である。

【0123】

50

特定の実施態様では、インフルエンザB型ステムドメインポリペプチドは、シグナルペプチドを含む。シグナルペプチドは、本明細書に記載の任意のシグナルペプチドを含む、当業者に適するとみなされる任意のシグナルペプチドであってよい。特定の実施態様では、シグナルペプチドは、配列番号150～153のいずれかと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である。特定の実施態様では、シグナルペプチドは、配列番号150～153のいずれかによる。

【0124】

特定の実施態様では、インフルエンザB型ステムドメインポリペプチドは、ルミナルドメインを含む。ルミナルドメインは、本明細書に記載の任意のルミナルドメインを含む、当業者に適するとみなされる任意のルミナルドメインであってよい。特定の実施態様では、ルミナルドメインは、配列番号162と少なくとも60%又は80%同一である。特定の実施態様では、ルミナルドメインは、配列番号162による。

10

【0125】

特定の実施態様では、インフルエンザB型ステムドメインポリペプチドは、膜貫通ドメインを含む。膜貫通ドメインは、本明細書に記載の任意の膜貫通ドメインを含む、当業者に適するとみなされる任意の膜貫通ドメインであってよい。特定の実施態様では、膜貫通ドメインは、配列番号163と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である。特定の実施態様では、膜貫通ドメインは、配列番号163による。

【0126】

特定の実施態様では、インフルエンザB型ステムドメインポリペプチドは、細胞質ドメインを含む。細胞質ドメインは、本明細書に記載の任意の細胞質ドメインを含む、当業者に適するとみなされる任意の細胞質ドメインであってよい。特定の実施態様では、細胞質ドメインは、配列番号164と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%又は98%同一である。特定の実施態様では、細胞質ドメインは、配列番号164による。

20

【表4】

表3: 例示的なインフルエンザB型血球凝集素配列

HA構築物変異体	シグナルペプチド	HA1のN末端ステムセグメント	HA1のC末端ステムセグメント	HA2ドメイン
Arg50-Ser277	MKAIIVILMV VTSNA [配列番号150]	DRICTGITSSNS PHVVKTATQG EVNVTGVIPLT TTPTKSHFANL KGTETR [配列番号154]	SKVIKGSLLPI GEADCLHEKY GGLNKSKPYY TGEHAKAIGN CPIWVKTPLKL ANGTKYRPPA KLLKER [配列番号158]	GFFGAIAGFLEGG WEGMIAGWHGY TSHGAHGVAVAA DLKSTQEAINKIT KNLNSLSELEVKN LQRLSGAMDELH NEILELDEKVVDDL RADTISSQIELAVL LSNEGIINSEDEHL

30

40

HA 構築物 変異体	シグナルペプチド	HA1のN末端 ステムセグメント	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
				LALERKLLKMLG PSAVEIGNGCFET KHKCNQTCLDRI AAGTFDAGEFSLP TFDSLNTAASLN DDGLDNHTILLYY STAASSLAVTLMI AIFVVYMVSRDN VSCSICL [配列番号160]
Ala66- Trp271	MKAIIVILMV VTSNA [配列 番号 151]	DRICTGITSSNS PHVVKATATQG EVNVTGVIPLT TTPTKSHFANL KGTETRGKLC PKCLNCTDLD VA [配列 番号 155]	WCASGRSKVI KGSLPLIGEAD CLHEKYGGLN KSKPYTGEH AKAIGNCPIW VKTPLKLANG TKYRPPAKLL KER [配列 番号 159]	GFFGAIAGFLEGG WEGMIAGWHGY TSHGAHGVA VAA DLKSTQEAINKIT KNLNSLSELEVKN LQRLSGAMDELH NEILELDEKVDDL RADTISSQIELAVL LSNEGIINSEDEHL LALERKLLKMLG PSAVEIGNGCFET KHKCNQTCLDRI AAGTFDAGEFSLP TFDSLNTAASLN DDGLDNHTILLYY STAASSLAVTLMI AIFVVYMVSRDN VSCSICL [配列番号160]
Lys80- Ser277	MKAIIVILMV VTSNA [配列 番号 152]	DRICTGITSSNS PHVVKATATQG EVNVTGVIPLT TTPTKSHFANL KGTETRGKLC PKCLNCTDLD VALGRPCTG KIPSAK [配列 番号 156]	SKVIKGSPLI GEADCLHEKY GGLNKSPPYY TGEHAKAIGN CPIWVKTPLKL ANGTKYRPPA KLLKER [配列 番号 158]	GFFGAIAGFLEGG WEGMIAGWHGY TSHGAHGVA VAA DLKSTQEAINKIT KNLNSLSELEVKN LQRLSGAMDELH NEILELDEKVDDL RADTISSQIELAVL LSNEGIINSEDEHL LALERKLLKMLG PSAVEIGNGCFET KHKCNQTCLDRI AAGTFDAGEFSLP TFDSLNTAASLN DDGLDNHTILLYY STAASSLAVTLMI AIFVVYMVSRDN VSCSICL

10

20

30

40

HA構築物変異体	シグナルペプチド	HA1のN末端ステムセグメント	HA1のC末端ステムセグメント	HA2ドメイン
				[配列番号160]
Arg80-Ser277	MKAIIIVILMV VTSNA [配列番号 153]	DRICTGITSSNS PHVVKTATQG EVNVTGVIPLT TTPTKSHFANL KGTETRGLKLC PKCLNCTDL VALGRPCTG KIPSAR [配列番号 157]	SKVIKGSPLI GEADCLHEKY GGLNKSPPYY TGEHAKAIGN CPIWVKTPLKL ANGTKYRPPA KLLKER [配列番号 158]	GFFGAIAGFLEGG WEGMIAGWHGY TSHGAHGVA DLKSTQEAINKIT KNLNSLSELEVKN LQRLSGAMDELH NEILELDEKVDDL RADTISSQIELAVL LSNEGIINSEDEHL LALERKLLKMLG PSAVEIGNGCFET KHKCNQTCLDRI AAGTFDAGEFSLP TFDSL NITAASLN DDGLDNHTILLY STAASSLAVTLMI AIFVYVMVSRDN VSCSICL [配列番号160]

10

20

【 0 1 2 7 】

表4は、インフルエンザB型のHAの推定上のステムドメイン、ルミナルドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを提供する。

【 表 5 】

表4: 例示的なインフルエンザB型血球凝集素配列

HA2ドメインサブタイプ (Genbank番号)	ステムドメイン	ルミナルドメイン	膜貫通ドメイン	細胞質ドメイン
HA2 (AY096185)	GFFGAIAGFLEG GWEGMIAGWH GYTSHGAHGV AVAADLKSTQE AINKITKNLNSL SELEVKNLQRL SGAMDELHNEI LELDEKVDDL ADTISSQIELAV LLSNEGIINSE EHLALERKLL KMLGPSAVEIG NGCFETKHKCN QTCLDRIAAGT FDAGEFSLPTFD SLNITAASLND [配列番号 161]	DGLDN [配列番号 162]	HTILLYYSTAAS SLAVTLMIAIFV VYMV [配列番号 163]	SRDNVSCSIC L [配列番号 164]

30

40

50

【0128】

図1及び2に例示されるように、HA1のN末端ステムセグメントは、インフルエンザA型とインフルエンザB型との間で、さらにインフルエンザA型サブタイプにわたって配列同一性を共有する。同様に、HA1のC末端ステムセグメントも、インフルエンザA型とインフルエンザB型との間で、さらにインフルエンザA型サブタイプにわたって配列同一性を共有する。さらに、HA2ドメインも、インフルエンザA型とインフルエンザB型との間で、さらにインフルエンザA型サブタイプにわたって配列同一性を共有する。

【0129】

一部の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、複数のインフルエンザ株又はサブタイプからのセグメント及び/又はドメインを含むか又はそれらから本質的になるハイブリッドポリペプチドである。例えば、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、異なるインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプに由来するHA1のN末端及びHA1のC末端ステムセグメントを含んでもよい。一部の実施態様では、HA1のN末端ステムセグメントはインフルエンザA型ウイルスに由来するが、HA1のC末端ステムセグメントはインフルエンザB型ウイルスに由来する。同様に、HA2はインフルエンザA型ウイルスに由来してもよいが、HA1のN末端及び/又はC末端ステムセグメントはインフルエンザB型ウイルスに由来する。

10

【0130】

本発明の血球凝集素HAステムドメインポリペプチドを形成するために、表1~4に記載の配列エレメント又はその変異体の任意の組合せを用いることができることが理解されよう。

20

【0131】

本明細書で提供されるインフルエンザステムドメインポリペプチドでは、リンカーは、HA1のN末端ステムセグメントをHA1のC末端ステムセグメントに共有結合で接続する。特定の実施態様では、リンカーは直接結合である。特定の実施態様では、リンカーは、1個のアミノ酸残基、2個以下のアミノ酸残基、3個以下のアミノ酸残基、4個以下のアミノ酸残基、5個以下のアミノ酸残基、10個以下のアミノ酸残基、15個以下のアミノ酸残基、20個以下のアミノ酸残基、30個以下のアミノ酸残基、40個以下のアミノ酸残基、又は50個以下のアミノ酸残基を含むペプチドである。特定の実施態様では、リンカーペプチドは、50個以上のアミノ酸残基を含む。特定の実施態様では、リンカーは、球状ヘッドドメインを実質的に欠く。言い換えると、リンカーは、インフルエンザ球状ヘッドドメインのアミノ酸配列からの、10、9、8、7、6、5又は4個以下の隣接する連続したアミノ酸残基を含む。特定の実施態様では、リンカーは、

30

【化1】

Lys-Leu-Asn-Gly-Ser-Gly-Ile-Met-Lys-Thr-Glu-Gly-Thr-Leu-Glu-Asn (配列番号311)

以外である。特定の実施態様では、リンカーは、

【化2】

40

Asn-Asn-Ile-Asp-Thr or Lys-Leu-Asn-Gly-Ser-Gly-Ile-Met-Lys-Thr-Glu-Gly-Thr-Leu-Glu-Asn
(配列番号312)

以外である。特定の実施態様では、リンカーは、Asn-Asn-Ile-Asp-Thr (配列番号315) 以外である。

【0132】

特定の実施態様では、リンカーは、一方の末端がHA1のN末端ステムセグメントのC末端に共有結合で接続されている。リンカーペプチドはさらに、他方の末端がHA1のC末端ステ

50

ムセグメントのN末端に共有結合で接続されている。特定の実施態様では、共有結合の一方がアミド結合である。特定の実施態様では、両方の共有結合がアミド結合である。

【0133】

リンカーは、当業者によって適するとみなされる任意のリンカーでよい。特定の実施態様では、リンカーは、HA1のN末端ステムセグメント及びHA1のC末端ステムセグメントに基づいて選択される。これらの実施態様では、リンカーは、両方ともAccelrysから提供されるInsightII及びQuantaなどの分子モデリングプログラムで選択されてもよい。特定の実施態様では、リンカーは、当業者によって認識される血球凝集素ステムドメインの構造と一貫した、HA1のN末端ステムセグメント及びHA1のC末端ステムセグメントの構造的な整理を可能にする構造モチーフである。特定の実施態様では、リンカーは、候補リンカーのライブラリーから選択される。特定の実施態様では、ライブラリーは、European Molecular Biology Laboratory(EMBL)又はEuropean Bioinformatics Institute(EBI)のプロテインデータバンク(Protein Data Bank)(PDB)又は巨大分子構造データベースなどの公開データベース中の三次元ポリペプチド構造を含む。特定の実施態様では、ライブラリーは、両方ともAccelrysから提供されるInsightII及びQuantaなどの市販プログラムに付随する所有権の付いた三次元ポリペプチド構造を含む。さらに、リンカーを選択するために、タンパク質構造又は構造エレメントの任意のデータベース又は収集を用いることができる。タンパク質構造エレメントの例示的なデータベース又は収集には、それらに限定されないが、タンパク質の構造的分類(Structural Classification of Proteins)(SCOP、Cambridge Universityによって維持され、提供される);タンパク質ファミリーのデータベース(database of protein families)(Pfam、Wellcome Trust Sanger Instituteによって維持され、提供される);汎用タンパク質資源(Universal Protein Resource)(UniProt、UniProt Consortiumによって維持され、提供される);タンパク質ファミリーの総合資源(Integrated resource for protein families)(InterPro、EMBL-EBIによって維持され、提供される);クラス構造トポロジー相同スーパーファミリー(Class Architecture Topology Homologous superfamily)(CATH、University College LondonのInstitute of Structural and Molecular Biologyによって維持され、提供される);及び構造的に類似したタンパク質のファミリー(families of structurally similar proteins)(FSSP、EBIによって維持され、提供される)が含まれる。リンカーを選択するために、それらに限定されないがSCOP、CATH及びFSSPによって用いられるものを含む、当業者によって適するとみなされる任意のアルゴリズムを用いることができる。有用な例には、それらに限定されないが、Pymol(Delano Scientific LLC)、InsightII及びQuanta(両方ともAccelrysから)、MIDAS(University of California, San Francisco)、SwissPDB viewer(Swiss Institute of Bioinformatics)、TOP OFIT(Northeastern University)、CBSU LOOPP(Cornell University)及びSuperPose(University of Alberta, Edmonton)が含まれる。

【0134】

特定の実施態様では、リンカーは直接結合である。特定の実施態様では、リンカーは、Gly、Gly-Gly、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Gly及びGly-Gly-Gly-Gly-Glyからなる群から選択される。特定の実施態様では、リンカーは、Gly-Pro及びPro-Glyからなる群から選択される。特定の実施態様では、リンカーは、例えば配列

【化3】

ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)

を有する281ターンループである。

【0135】

特定の実施態様では、リンカーはグリコシル化配列を含む。特定の実施態様では、リンカーはAsn-Xaa-Ser/Thrによるアミノ酸配列を含み、式中、Xaaはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、Ser/Thrはセリン又はトレオニンである。特定の実施態様では、リンカー

はアミノ酸配列Asn-Ala-Serを含む。特定の実施態様では、リンカーはグリコシル化配列である。特定の実施態様では、リンカーはAsn-Xaa-Ser/Thrによるアミノ酸配列であり、式中、Xaaはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、Ser/Thrはセリン又はトレオニンである。特定の実施態様では、リンカーはアミノ酸配列Asn-Ala-Serである。

【0136】

特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、本来のインフルエンザ血球凝集素のステムドメインの三次元構造に類似している、三次元構造を形成することができる。構造類似性は、当業者によって適するとみなされる任意の技術に基づいて評価されてもよい。例えば、例えば非変性条件下での、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドと、本来のインフルエンザ血球凝集素を認識する中和抗体又は抗血清との反応は、構造類似性を示すことができる。有用な中和抗体又は抗血清は、例えば、Suiらの文献、(2009、Nat. Struct. Mol. Biol. 16(3):265-273)、Ekiertらの文献、(2009年2月26日、Science[DOI: 10.1126/science.1171491])、Wangらの文献(2010)「異なる血球凝集素による逐次的な免疫化に続くH3インフルエンザウイルスに対する広範囲防御モノクローナル抗体(Broadly Protective Monoclonal Antibodies against H3 Influenza Viruses following Sequential Immunization with Different Hemagglutinins)」、(PLOS Pathogens 6(2): 1-9)、及びKashyapらの文献、(2008、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(16):5986-5991)に記載され、その内容は引用により本明細書に完全に組み込まれている。特定の実施態様では、抗体又は抗血清は、血球凝集素の三次構造又は四次構造によって形成される非隣接エピトープ(すなわち、一次配列で隣接していない)と反応する抗体又は抗血清である。

10

20

【0137】

特定の実施態様では、構造類似性は、円二色性、ラマン分光法、NMR、3D NMR及びX線結晶学などの分光技術によって調査されてもよい。X線結晶学で測定される公知のインフルエンザ血球凝集素構造は、それらに限定されないが1HGJ(HA H3N2株)及び1RUZ(HA H1N1株)を含む、プロテインデータバンクファイルの構造座標に記載されている。

【0138】

特定の実施態様では、構造類似性は、2つの構造の対応する重層部分の間のRMS偏差によって評価される。意味のある重なりを生成するために、特定の実施態様では、少なくとも20個の対応する原子、25個の対応する原子、30個の対応する原子、40個の対応する原子、50個の対応する原子、60個の対応する原子、70個の対応する原子、80個の対応する原子、90個の対応する原子、100個の対応する原子、120個の対応する原子、150個の対応する原子、200個の対応する原子、又は250個の対応する原子の座標を用いて、RMS偏差を計算する。

30

【0139】

特定の実施態様では、RMS偏差を計算するために、アミノ酸骨格のすべての対応する原子の座標が用いられる。特定の実施態様では、RMS偏差を計算するために、アミノ酸骨格のすべての対応するアルファ炭素原子の座標が用いられる。特定の実施態様では、RMS偏差を計算するために、側鎖を含むすべての対応する同一残基の座標が用いられる。

【0140】

特定の実施態様では、RMS偏差を計算するために、HA1のN末端セグメントの対応する原子のすべて又は一部の座標が用いられる。特定の実施態様では、RMS偏差を計算するために、HA1のC末端セグメントの対応する原子のすべて又は一部の座標が用いられる。特定の実施態様では、RMS偏差を計算するために、HA1のN末端セグメント及びC末端セグメントの両方の対応する原子のすべて又は一部の座標が用いられる。特定の実施態様では、RMS偏差を計算するために、HA2ドメインの対応する原子のすべて又は一部の座標が用いられる。

40

【0141】

特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド及び公知のインフルエンザA型ウイルス血球凝集素ステムドメイン(例えば、1HGJ又は1RUZからの)

50

の対応する部分の構造間のRMS偏差は、5 以下、4 以下、3 以下、2.5 以下、2 以下、1.5 以下、1 以下、0.75 以下、0.5 以下、0.3 以下、0.2 以下又は0.1 以下である。構造的な重なり及び/又はRMS偏差の計算を実施するために、市販又はオープンソースのソフトウェアを用いてもよい。有用な例には、それらに限定されないが、Pymol(Delano Scientific LLC)、InsightII及びQuanta(両方ともAccelrysから)、MIDAS(University of California, San Francisco)、SwissPDB viewer(Swiss Institute of Bioinformatics)、TOPOFIT(Northeastern University)、CBSU LOOPP(Cornell University)及びSuperPose(University of Alberta, Edmonton)が含まれる。

【0142】

特定の実施態様では、本明細書で提供される任意のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、当業者に適するとみなされる1つ以上のポリペプチドドメインをさらに含むことができる。有用なポリペプチドドメインには、ポリペプチドの部分の精製、折畳み及び切断を促進するドメインが含まれる。例えば、Hisタグ(His-His-His-His-His-His、配列番号166)、FLAGエピトープ又は他の精製タグは、本明細書で提供されるポリペプチドの精製を促進することができる。バクテリオファージT4フィブリチンからのフォルドン、又は三量体形成ドメインは、本明細書で提供されるポリペプチドの三量体形成を促進することができる。フォルドンドメインは、当業者に公知である任意のフォルドン配列を有することができる(例えば、その内容が引用により本明細書に完全に組み込まれている、Papanikolopoulouらの文献、(2004、J. Biol. Chem. 279(10):8991-8998)を参照)。

。例には、

【化4】

GSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (配列番号167)

が含まれる。フォルドンドメインは、本明細書で提供される溶解性ポリペプチドの三量体形成を促進するために役立つことができる。ポリペプチドの一部の切断、例えば精製タグ又はフォルドンドメイン又は両方の切断を促進するために、切断部位を用いることができる。有用な切断部位には、トロンピン切断部位、例えば配列

【化5】

LVPRGSP (配列番号168)

を有するものが含まれる。

【0143】

特定の実施態様では、エラスターゼ切断部位を含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが提供される。当業者は、血球凝集素配列のHA1-HA2切断部位のアルギニン又はリジンをバリンで置換することによって、HA1とHA2との間の結合のトリプシン切断部位を、エラスターゼ切断部位に変異させることができることを認識する(例えば、Stechらの文献、(2005、Nature Med. 11(6):683-689)を参照)。したがって、C末端ステムセグメントのC末端(すなわち、HA1ドメインのC末端)にバリン置換を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、配列番号50~65又は158~159のいずれかを含むインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが本明細書で提供され、そこで、配列番号50~65又は158~159のC末端アミノ酸残基、例えばアルギニン又はリジンは、バリン残基で置換されている。

【0144】

特定の実施態様では、HA1とHA2との間の接合部がプロテアーゼ切断に抵抗性であることが予測される、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが本明細書で提供される。当業者は、HA1及びHA2にわたるArg-Gly配列がトリプシンの認識部位であり、血球凝集素活性化のために一般的に切断されることを認識するべきである。本明細書に記載されるステムドメインポリペプチドは活性化される必要がないので、プロテアーゼ切断に抵抗性であることが予測されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが

本明細書で提供される。特定の実施態様では、HA1及びHA2にわたるプロテアーゼ部位をプロテアーゼ切断に抵抗性である配列に変異させている、本明細書に記載の任意のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが提供される。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントのC末端残基がLys又はArg以外の任意の残基である、本明細書に記載の任意のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが提供される。特定の実施態様では、HA2ドメインのN末端残基がプロリンである、本明細書に記載の任意のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが提供される。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントのC末端残基がAlaであり、HA2ドメインのN末端残基もAlaである、本明細書に記載の任意のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが提供される。

10

【0145】

特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA2ステムドメインと結合関係にあるHA1のC末端ステムセグメントに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにHA2ステムドメインに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにHA2ステムドメインに共有結合している、HA1のN末端ステムセグメントに共有結合しているシグナルペプチドからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。

20

【0146】

特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA2ルミナルドメインに共有結合しているHA2ステムドメインと結合関係にあるHA1のC末端ステムセグメントに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにHA2ルミナルドメインに共有結合しているHA2ステムドメインに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにHA2ルミナルドメインに共有結合している、HA2ステムドメインに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントに共有結合しているシグナルペプチドからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。

30

【0147】

特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにトロンピン切断部位、フォールドドメイン及びHisタグに順番に共有結合しているHA2ステムドメインと結合関係にあるHA1のC末端ステムセグメントに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにトロンピン切断部位、フォールドドメイン及びHisタグに順番に共有結合しているHA2ステムドメインに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにトロンピン切断部位、フォールドドメイン及びHisタグに順番に共有結合しているHA2ステムドメインに共有結合している、HA1のN末端ステムセグメントに共有結合しているシグナルペプチドからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。

40

【0148】

特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにトロンピン切断部位、フォールドドメイン及びHisタグに順番に共有結合しているHA2ルミナルドメインに共有結合している

50

HA2ステムドメインと結合関係にあるHA1のC末端ステムセグメントに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにトロンピン切断部位、フォールドドメイン及びHisタグに順番に共有結合しているHA2ルミナルドメインに共有結合しているHA2ステムドメインに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにトロンピン切断部位、フォールドドメイン及びHisタグに順番に共有結合しているHA2ルミナルドメインに共有結合しているHA2ステムドメインに共有結合している、HA1のN末端ステムセグメントに共有結合しているシグナルペプチドからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。

10

【0149】

特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA2膜貫通ドメインに共有結合しているHA2ルミナルドメインにさらに共有結合しているHA2ステムドメインと結合関係にあるHA1のC末端ステムセグメントに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにHA2ルミナルドメインに共有結合しているHA2ステムドメインに共有結合し、さらにHA2膜貫通ドメインに共有結合している、HA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、リンカーに共有結合し、さらにHA1のC末端ステムセグメントに共有結合し、さらにHA2ルミナルドメインに共有結合しているHA2ステムドメインに共有結合し、さらにHA2膜貫通ドメインに共有結合している、HA1のN末端ステムセグメントに共有結合しているシグナルペプチドからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。

20

【0150】

特定の実施態様では、HA2細胞質ドメインに共有結合しているHA2膜貫通ドメインにさらに共有結合しているHA2ルミナルドメインにさらに共有結合しているHA2ステムドメインと結合関係にあるHA1のC末端ステムセグメントに共有結合しているリンカーにさらに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、HA2細胞質ドメインに共有結合しているHA2膜貫通ドメインにさらに共有結合しているHA2ルミナルドメインにさらに共有結合しているHA2ステムドメインに共有結合しているHA1のC末端ステムセグメントにさらに共有結合しているリンカーにさらに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。特定の実施態様では、HA2細胞質ドメインに共有結合しているHA2膜貫通ドメインにさらに共有結合しているHA2ルミナルドメインにさらに共有結合しているHA2ステムドメインに共有結合しているHA1のC末端ステムセグメントにさらに共有結合しているリンカーにさらに共有結合しているHA1のN末端ステムセグメントに共有結合しているシグナルペプチドからなるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供される。

30

40

【0151】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され：

- (配列番号34)-LL-(配列番号50)-(配列番号66)、
- (配列番号35)-LL-(配列番号51)-(配列番号67)、
- (配列番号36)-LL-(配列番号52)-(配列番号68)、
- (配列番号37)-LL-(配列番号53)-(配列番号69)、
- (配列番号38)-LL-(配列番号54)-(配列番号70)、

50

(配列番号39)-LL-(配列番号55)-(配列番号71)、
 (配列番号40)-LL-(配列番号56)-(配列番号72)、
 (配列番号41)-LL-(配列番号57)-(配列番号73)、
 (配列番号42)-LL-(配列番号58)-(配列番号74)、
 (配列番号43)-LL-(配列番号59)-(配列番号75)、
 (配列番号44)-LL-(配列番号60)-(配列番号76)、
 (配列番号45)-LL-(配列番号61)-(配列番号77)、
 (配列番号46)-LL-(配列番号62)-(配列番号78)、
 (配列番号47)-LL-(配列番号63)-(配列番号79)、
 (配列番号48)-LL-(配列番号64)-(配列番号80)、及び
 (配列番号49)-LL-(配列番号65)-(配列番号81)、

10

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは直接結合、Gly、Gly-Gly、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Gly、(Gly)_n(式中、ペプチドリンカーに柔軟性がある限り、*n*は任意数のグリシン残基である；特定の実施態様では、*n*は2、3、4、5、6又は7グリシン残基である)、Gly-Pro、

【化6】

ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)

20

及びAsn-Ala-Serからなる群から選択される。

【0152】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号34)-LL-(配列番号50)-(配列番号82)、
 (配列番号35)-LL-(配列番号51)-(配列番号83)、
 (配列番号36)-LL-(配列番号52)-(配列番号84)、
 (配列番号37)-LL-(配列番号53)-(配列番号85)、
 (配列番号38)-LL-(配列番号54)-(配列番号86)、
 (配列番号39)-LL-(配列番号55)-(配列番号87)、
 (配列番号40)-LL-(配列番号56)-(配列番号88)、
 (配列番号41)-LL-(配列番号57)-(配列番号89)、
 (配列番号42)-LL-(配列番号58)-(配列番号90)、
 (配列番号43)-LL-(配列番号59)-(配列番号91)、
 (配列番号44)-LL-(配列番号60)-(配列番号92)、
 (配列番号45)-LL-(配列番号61)-(配列番号93)、
 (配列番号46)-LL-(配列番号62)-(配列番号94)、
 (配列番号47)-LL-(配列番号63)-(配列番号95)、
 (配列番号48)-LL-(配列番号64)-(配列番号96)、及び
 (配列番号49)-LL-(配列番号65)-(配列番号97)、

30

40

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化7】

直接結合、Gly、Gly-Gly、

Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Gly、(Gly)_n、Gly-Pro、ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA

(配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

50

【 0 1 5 3 】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され：

(配列番号34)-LL-(配列番号50)-(配列番号82)-(配列番号98)、
 (配列番号35)-LL-(配列番号51)-(配列番号83)-(配列番号99)、
 (配列番号36)-LL-(配列番号52)-(配列番号84)-(配列番号100)、
 (配列番号37)-LL-(配列番号53)-(配列番号85)-(配列番号101)、
 (配列番号38)-LL-(配列番号54)-(配列番号86)-(配列番号102)、
 (配列番号39)-LL-(配列番号55)-(配列番号87)-(配列番号103)、
 (配列番号40)-LL-(配列番号56)-(配列番号88)-(配列番号104)、
 (配列番号41)-LL-(配列番号57)-(配列番号89)-(配列番号105)、
 (配列番号42)-LL-(配列番号58)-(配列番号90)-(配列番号106)、
 (配列番号43)-LL-(配列番号59)-(配列番号91)-(配列番号107)、
 (配列番号44)-LL-(配列番号60)-(配列番号92)-(配列番号108)、
 (配列番号45)-LL-(配列番号61)-(配列番号93)-(配列番号109)、
 (配列番号46)-LL-(配列番号62)-(配列番号94)-(配列番号110)、
 (配列番号47)-LL-(配列番号63)-(配列番号95)-(配列番号111)、
 (配列番号48)-LL-(配列番号64)-(配列番号96)-(配列番号112)、及び
 (配列番号49)-LL-(配列番号65)-(配列番号97)-(配列番号113)、

10

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

20

【化 8】

直接結合, Gly, Gly-Gly,

Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA

(配列番号165)及び Asn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【 0 1 5 4 】

30

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され：

(配列番号34)-LL-(配列番号50)-(配列番号82)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号35)-LL-(配列番号51)-(配列番号83)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号36)-LL-(配列番号52)-(配列番号84)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号37)-LL-(配列番号53)-(配列番号85)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号38)-LL-(配列番号54)-(配列番号86)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号39)-LL-(配列番号55)-(配列番号87)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号40)-LL-(配列番号56)-(配列番号88)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号41)-LL-(配列番号57)-(配列番号89)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号42)-LL-(配列番号58)-(配列番号90)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

40

50

(配列番号43)-LL-(配列番号59)-(配列番号91)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号44)-LL-(配列番号60)-(配列番号92)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号45)-LL-(配列番号61)-(配列番号93)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号46)-LL-(配列番号62)-(配列番号94)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号47)-LL-(配列番号63)-(配列番号95)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号48)-LL-(配列番号64)-(配列番号96)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、及び

(配列番号49)-LL-(配列番号65)-(配列番号97)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化9】

直接結合, Gly, Gly-Gly,

Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA

(配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【0155】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号34)-LL-(配列番号50)-(配列番号82)-(配列番号98)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号35)-LL-(配列番号51)-(配列番号83)-(配列番号99)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号36)-LL-(配列番号52)-(配列番号84)-(配列番号100)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号37)-LL-(配列番号53)-(配列番号85)-(配列番号101)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号38)-LL-(配列番号54)-(配列番号86)-(配列番号102)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号39)-LL-(配列番号55)-(配列番号87)-(配列番号103)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号40)-LL-(配列番号56)-(配列番号88)-(配列番号104)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号41)-LL-(配列番号57)-(配列番号89)-(配列番号105)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号42)-LL-(配列番号58)-(配列番号90)-(配列番号106)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号43)-LL-(配列番号59)-(配列番号91)-(配列番号107)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号44)-LL-(配列番号60)-(配列番号92)-(配列番号108)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号45)-LL-(配列番号61)-(配列番号93)-(配列番号109)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

10

20

30

40

50

67)-(配列番号166)、
 (配列番号46)-LL-(配列番号62)-(配列番号94)-(配列番号110)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号47)-LL-(配列番号63)-(配列番号95)-(配列番号111)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号48)-LL-(配列番号64)-(配列番号96)-(配列番号112)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、及び
 (配列番号49)-LL-(配列番号65)-(配列番号97)-(配列番号113)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、
 【化10】

10

直接結合, Gly, Gly-Gly,

Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA

(配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【0156】

20

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号177)-LL-(配列番号226)-(配列番号66)、
 (配列番号178)-LL-(配列番号227)-(配列番号66)、
 (配列番号179)-LL-(配列番号228)-(配列番号66)、
 (配列番号180)-LL-(配列番号229)-(配列番号67)、
 (配列番号181)-LL-(配列番号230)-(配列番号67)、
 (配列番号182)-LL-(配列番号231)-(配列番号67)、
 (配列番号183)-LL-(配列番号232)-(配列番号68)、
 (配列番号184)-LL-(配列番号233)-(配列番号68)、
 (配列番号185)-LL-(配列番号234)-(配列番号68)、
 (配列番号186)-LL-(配列番号235)-(配列番号69)、
 (配列番号187)-LL-(配列番号236)-(配列番号69)、
 (配列番号188)-LL-(配列番号237)-(配列番号69)、
 (配列番号189)-LL-(配列番号238)-(配列番号70)、
 (配列番号190)-LL-(配列番号239)-(配列番号70)、
 (配列番号191)-LL-(配列番号240)-(配列番号70)、
 (配列番号192)-LL-(配列番号241)-(配列番号71)、
 (配列番号193)-LL-(配列番号242)-(配列番号71)、
 (配列番号194)-LL-(配列番号243)-(配列番号71)、
 (配列番号195)-LL-(配列番号244)-(配列番号72)、
 (配列番号196)-LL-(配列番号245)-(配列番号72)、
 (配列番号197)-LL-(配列番号246)-(配列番号72)、
 (配列番号198)-LL-(配列番号247)-(配列番号73)、
 (配列番号199)-LL-(配列番号248)-(配列番号73)、
 (配列番号200)-LL-(配列番号249)-(配列番号73)、
 (配列番号201)-LL-(配列番号250)-(配列番号74)、
 (配列番号202)-LL-(配列番号251)-(配列番号74)、
 (配列番号203)-LL-(配列番号252)-(配列番号74)、
 (配列番号204)-LL-(配列番号253)-(配列番号75)、

30

40

50

(配列番号205)-LL-(配列番号254)-(配列番号75)、
 (配列番号206)-LL-(配列番号255)-(配列番号75)、
 (配列番号207)-LL-(配列番号256)-(配列番号76)、
 (配列番号208)-LL-(配列番号257)-(配列番号76)、
 (配列番号209)-LL-(配列番号258)-(配列番号76)、
 (配列番号210)-LL-(配列番号259)-(配列番号77)、
 (配列番号211)-LL-(配列番号260)-(配列番号77)、
 (配列番号212)-LL-(配列番号261)-(配列番号77)、
 (配列番号213)-LL-(配列番号262)-(配列番号78)、
 (配列番号214)-LL-(配列番号263)-(配列番号78)、
 (配列番号215)-LL-(配列番号264)-(配列番号78)、
 (配列番号216)-LL-(配列番号265)-(配列番号79)、
 (配列番号217)-LL-(配列番号266)-(配列番号79)、
 (配列番号218)-LL-(配列番号267)-(配列番号79)、
 (配列番号219)-LL-(配列番号268)-(配列番号80)、
 (配列番号220)-LL-(配列番号269)-(配列番号80)、
 (配列番号221)-LL-(配列番号270)-(配列番号80)、
 (配列番号222)-LL-(配列番号271)-(配列番号81)、
 (配列番号223)-LL-(配列番号272)-(配列番号81)、
 (配列番号224)-LL-(配列番号273)-(配列番号81)、
 (配列番号309)-LL-(配列番号310)-(配列番号66)、及び
 (配列番号308)-LL-(配列番号52)-(配列番号68)、

10

20

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、
 【化 1 1】

直接結合, Gly, Gly-Gly,

Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA

(配列番号NO:165)及び Asn-Ala-Ser

30

からなる群から選択される。

【 0 1 5 7 】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号160)、
 (配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号160)、
 (配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号160)、及び
 (配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号160)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、
 【化 1 2】

40

直接結合, Gly, Gly-Gly,

Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA

(配列番号165)及び Asn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【 0 1 5 8 】

50

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)、
 (配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)、
 (配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)、及び
 (配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、
 【化13】

10

直接結合, Gly, Gly-Gly,

Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA

(配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【0159】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号162)、
 (配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号162)、
 (配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号162)、及び
 (配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号162)、

20

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、
 【化14】

直接結合, Gly, Gly-Gly,

Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA

(配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

30

からなる群から選択される。

【0160】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、
 (配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、及び
 (配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

40

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化 1 5】

直接結合, Gly, Gly-Gly,
Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA
(配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【0 1 6 1】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号162)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号162)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号162)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、及び

(配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号162)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化 1 6】

直接結合, Gly, Gly-Gly,
Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA
(配列番号165)及び^{*}Asn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【0 1 6 2】

特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドは、

【化 1 7】

Thr-Gly- Leu-Arg-Asn (配列番号313)又は Gly-Ile-Thr-Asn-Lys-Val-Asn-Ser-Val-Ile-Glu-Lys
(配列番号314)

のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含まない。特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドは、

【化 1 8】

Thr- Gly- Leu-Arg-Asn (配列番号313)及び Gly-Ile-Thr-Asn-Lys-Val-Asn-Ser-Val-Ile-
Glu-Lys (配列番号314)

のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含まない。特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドは、

10

20

30

40

【化19】

Thr-Gly-Met-Arg-Asn (配列番号316) 又は Gln-Ile-Asn-Gly-Lys-
Leu-Asn-Arg-Leu-Ile-Glu-Lys (配列番号317)

のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含まない。特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドは、

【化20】

Thr-Gly-Met-Arg-Asn (配列番号316) 及び
Gln-Ile-Asn-Gly-Lys-Leu-Asn-Arg-Leu-Ile-Glu-Lys (配列番号317)

10

のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含まない。特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドは、

【化21】

Thr-Gly-Met-Arg-Asn
(配列番号316) 又は Gln-Ile-Asn-Gly-Lys-Leu-Asn-Arg-Val-Ile-Glu-Lys (配列番号318)

のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含まない。特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドは、

20

【化22】

Thr-Gly-Met-
Arg-Asn (配列番号316) 及び Gln-Ile-Asn-Gly-Lys-Leu-Asn-Arg-Val-Ile-Glu-Lys
(配列番号318)

のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含まない。

【0163】

特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドは、抗体C179(ハイブリドーマFERM BP-4517によって生成される;Takara Bio社(Otsu, Shiga, Japan)から販売されるクローン)及び抗体A13C(FERM BP-4516)によって認識及び結合されない。

30

【0164】

(5.2 インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸)

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸(複数)が、本明細書で提供される。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸(単数)が、本明細書で提供される。遺伝子コードの変性のために、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする任意の核酸が、本明細書に包含される。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを生成するために、HA1のN末端ステムセグメント、HA1のC末端ステムセグメント、HA2ドメイン、ルミナルドメイン、膜貫通ドメイン及び/又は細胞質ドメインをコードする天然に存在するインフルエンザウイルス核酸に対応する核酸が用いられる。

40

【0165】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズすることができる核酸も、本明細書で提供される。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸の断片にハイブリダイズすることができる核酸が、本明細書で提供される。他の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸の完全長にハイブリダイズすること

50

ができる核酸が、本明細書で提供される。核酸のためのハイブリダイゼーション条件の一般パラメータは、Sambrookらの文献、分子クローニング-研究室マニュアル(Molecular Cloning - A Laboratory Manual)(2版、1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(ニューヨーク)州(1989))及びAusubelらの文献、分子生物学の現在のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)(2巻、Current Protocols Publishing, New York(ニューヨーク)州(1994))に記載されている。ハイブリダイゼーションは、高いストリンジェンシー条件、中間のストリンジェンシー条件、又は低いストリンジェンシー条件の下で実施することができる。当業者は、低、中及び高のストリンジェンシー条件は、そのすべてが相互作用する複数の因子に左右され、問題の核酸にも依存することを理解しよう。例えば、高いストリンジェンシー条件は、核酸(複数可)の融点5 内の温度、低い塩濃度(例えば、250mM未満)及び高い共存溶媒濃度(例えば、1~20%の共存溶媒、例えばDMSO)を含むことができる。他方、低いストリンジェンシー条件は、核酸(複数可)の融点より10 を超えて低い温度、高い塩濃度(例えば、1000mMを超える)及び共存溶媒の非存在を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0166】

一部の実施態様では、インフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸は、単離される。特定の実施態様では、「単離された」核酸とは、核酸の天然原材料に存在する他の核酸分子から分離される核酸分子を指す。言い換えると、単離された核酸は、天然でそれに結合していない異種核酸を含むことができる。他の実施態様では、cDNA分子などの「単離された」核酸は、組換え技術によって生成される場合、他の細胞物質若しくは培地を実質的に存在させないか、又は化学的に合成される場合、化学物質前駆体若しくは他の化学物質を実質的に存在させないことができる。用語「細胞物質が実質的に存在しない」は、それが単離されるか又は組換えで生成される細胞の細胞成分から核酸が分離されている、核酸調製物を含む。したがって、細胞物質が実質的に存在しない核酸には、約30%、20%、10%又は5%(乾燥重量による)未満の他の核酸を有する核酸調製物が含まれる。用語「培地が実質的に存在しない」には、培地が調製物の容量の約50%、20%、10%又は5%未満である核酸調製物が含まれる。用語「化学物質前駆体又は他の化学物質が実質的に存在しない」には、核酸の合成に關与する化学物質前駆体又は他の化学物質から核酸が分離される調製物が含まれる。具体的な実施態様では、そのような核酸調製物は、約50%、30%、20%、10%、5%(乾燥重量による)未満の化学物質前駆体又は対象の核酸以外の化合物を有する。

【0167】

さらに、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの個々の成分をコードする核酸が、本明細書で提供される。具体的な実施態様では、HA1のN末端ステムセグメント、HA1のC末端ステムセグメント及び/又はHA2ドメインをコードする核酸が提供される。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの成分をコードする核酸は、当業者に公知である標準の分子生物学技術を用いて組み立てることができる。

【0168】

(5.3 インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの発現)

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸を含有する、発現ベクターを含むベクターが本明細書で提供される。具体的な実施態様において、ベクターは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸の発現を指示することができる発現ベクターである。発現ベクターの非限定例には、プラスミド及びウイルスベクター、例えば複製に欠陥のあるレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及びパキユロウイルスが含まれるが、これらに限定されない。

【0169】

一部の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの成分(例えば、HA1のN末端ステムセグメント、HA1のC末端ステムセグメント及び/又はHA2)をコードする発現ベクターが、本明細書で提供される。そのようなベクターは、1つ以上の宿主細胞で成分を発現させるために用いることができ、当業者に公知である技術を用いて成

分を単離し、リンカーに抱合化することができる。

【0170】

発現ベクターは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸を、宿主細胞での核酸の発現に適する形で含む。具体的な実施態様において、発現ベクターは、発現のために用いられる宿主細胞に基づいて選択される、発現させる核酸に機能的に結合している1つ以上の調節配列を含む。発現ベクターの中では、「機能的に結合している」は、対象の核酸が、核酸の発現(例えば、インビトロの転写/翻訳系で、又はベクターが宿主細胞に導入される場合は宿主細胞で)を可能にする方法で調節配列(複数可)に連結されることを意味するものとする。調節配列には、プロモーター、エンハンサー及び他の発現調節エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)が含まれる。調節配列には、多くの型の宿主細胞で核酸の構成的発現を指示するもの、特定の宿主細胞だけで核酸の発現を指示するもの(例えば、組織特異的調節配列)、及び特定の剤による刺激によって核酸の発現を指示するもの(例えば、誘導可能な調節配列)が含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、タンパク質の所望の発現レベルなどの因子に依存してもよいことを、当業者は理解しよう。用語「宿主細胞」は、核酸で形質転換又はトランスフェクトされる特定の対象細胞、及びそのような細胞の後代又は可能性のある後代を含むものとする。そのような細胞の後代は、後代で起こり得る突然変異若しくは環境の影響又は宿主細胞ゲノムへの核酸の組み込みのために、核酸で形質転換又はトランスフェクトされる親細胞と同一でなくてもよい。

10

【0171】

発現ベクターは、原核生物(例えば、大腸菌(*E. coli*))又は真核生物の細胞(例えば、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを用いる、例えば、引用により本明細書にその全体が組み込まれるTreanorらの文献(2007、*JAMA*、297(14):1577-1582)を参照)、酵母細胞、植物細胞、藻類又は哺乳動物細胞)を用いて、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの発現のために設計することができる。哺乳動物の宿主細胞の例には、Crucell Per.C6細胞、Vero細胞、CHO細胞、VERY細胞、BHK細胞、HeLa細胞、COS細胞、MDCK細胞、293細胞、3T3細胞又はWI38細胞が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施態様では、宿主細胞は、骨髄腫細胞、例えば、NS0細胞、45.6 TG1.7細胞、AF-2クローン9 B5細胞、AF-2クローン9B5細胞、J558L細胞、MOPC 315細胞、MPC-11細胞、NCI-H929細胞、NP細胞、NS0/1細胞、P3 NS1 Ag4細胞、P3/NS1/1-Ag4-1細胞、P3U1細胞、P3X63Ag8細胞、P3X63Ag8.653細胞、P3X63Ag8U.1細胞、RPMI 8226細胞、Sp20-Ag14細胞、U266B1細胞、X63A G8.653細胞、Y3.Ag.1.2.3細胞及びYO細胞である。昆虫細胞の非限定例には、Sf9、Sf21、キンウワバ(*Trichoplusia ni*)、スポドプテラ・フルジベルダ(*Spodoptera frugiperda*)及びカイコ(*Bombyx mori*)が含まれる。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの発現のために、哺乳動物の細胞培養系(例えばチャイニーズハムスター卵巣又はハムスター乳児腎臓細胞)が用いられる。別の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの発現のために、植物細胞培養系が用いられる。植物細胞培養系を利用するタンパク質の生成のための植物細胞及び方法については、例えば米国特許第7,504,560号;第6,770,799号;第6,551,820号;第6,136,320号;第6,034,298号;第5,914,935号;第5,612,487号;及び第5,484,719号並びに米国特許出願公開第2009/0208477号、第2009/0082548号、第2009/0053762号、第2008/0038232号、第2007/0275014号及び第2006/0204487号を参照されたい。

20

30

40

【0172】

発現ベクターは、従来の形質転換又はトランスフェクション技術を通して宿主細胞に導入することができる。そのような技術には、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション及びエレクトロポレーションが含まれるが、これらに限定されない。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするのに適する方法は、Sambrookらの文献、(1989、分子クローニング-研究室マニュアル(*Molecular Cloning - A Laboratory Manual*))、2版、Cold Spring Harbor Press, New York)及び他の研究室マニュアルで見出すことができる。特定の実施態様では、宿主細胞は

50

、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターで、一時的にトランスフェクトされる。他の実施態様では、宿主細胞は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターで、安定してトランスフェクトされる。

【0173】

哺乳動物細胞の安定したトランスフェクションのために、用いられる発現ベクター及びトランスフェクション技術によって、細胞の小分画だけが外来性DNAをそれらのゲノムに組み込むことができることが知られている。これらの成分を同定、選択するために、選択可能なマーカー(例えば、抗生物質耐性のための)をコードする核酸が、対象の核酸と一緒に宿主細胞に一般に導入される。選択可能なマーカーの例には、G418、ハイグロマイシン及びメトトレキセートなどの薬剤に耐性を付与するものが含まれる。導入された核酸で安定してトランスフェクトされた細胞は、薬剤選択によって同定することができる(例えば、選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存するが、他の細胞は死滅する)。

10

【0174】

宿主細胞を用いるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの組換え発現の代わりに、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターを、例えばT7プロモーター調節配列及びT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写、翻訳することができる。具体的な実施態様では、共役転写/翻訳系、例えばPromega TNT(登録商標)、又は転写及び翻訳に必要な成分を含む細胞溶解物若しくは細胞抽出物を、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを生成するために用いることができる。

20

【0175】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが生成されると、それは、タンパク質の単離又は精製のための当技術分野で公知である任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、親和性、特に特異的抗原への親和性、プロテインA及びサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差別的溶解性、或いはタンパク質の単離又は精製のための任意の他の標準技術によって単離又は精製することができる。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、熱ショックタンパク質(例えば、Hsp10、Hsp20、Hsp30、Hsp40、Hsp60、Hsp70、Hsp90又はHsp100)と一緒に又はそれ無しで、異種タンパク質、例えば主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex)(MHC)に抱合化されてもよい。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、B細胞(例えば、C3d)又はT細胞などの免疫細胞をインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの標的にさせるであろう、タンパク質などの免疫調節分子に抱合化されてもよい。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、先天性免疫系を刺激するタンパク質、例えばインターフェロン1型、アルファ、ベータ若しくはガンマインターフェロン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)(GM-CSF)などのコロニー刺激因子、インターロイキン(interleukin)(IL)-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor)(TNF)- α 、TNF β 、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40リガンド(CD40L)及び薬剤誘導可能なCD40(iCD40)に抱合化されてもよい。

30

40

【0176】

したがって、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを生成する方法が、本明細書で提供される。一実施態様では、本方法は、ポリペプチドが生成されるように適する培地で、ポリペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含む。一部の実施態様では、本方法は、ポリペプチドを培地又は宿主細胞から単離することをさらに含む。

【0177】

(5.4 インフルエンザウイルスベクター)

一態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むインフルエ

50

ンザウイルスが、本明細書で提供される。具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、インフルエンザウイルスのビリオンに組み込まれる。インフルエンザウイルスは、免疫細胞などの特定の細胞型をウイルスの標的にさせる部分に抱合化されてもよい。一部の実施態様では、インフルエンザウイルスのビリオンは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに加えて、異種ポリペプチドをそれらに組み込んでいるか又は発現する。異種ポリペプチドは、免疫増強活性を有するか、又は特定の細胞型をインフルエンザウイルスの標的にするポリペプチド、例えば特異的細胞型の上の抗原に結合する抗体、又は特異的細胞型の上の特異的受容体に結合するリガンドであってよい。

【0178】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むインフルエンザウイルスは、リバースジェネティクス及び無ヘルパープラスミドレスキューなどの当業者に公知である技術を用いて、ビリオンの生成の間にトランスでインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを供給することによって生成されてもよい。或いは、血球凝集素機能がトランスで提供されている、ウイルス感染に感受性である細胞でインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変されたゲノムを含む親のインフルエンザウイルスの複製は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む後代インフルエンザウイルスを生成する。

【0179】

別の態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変されたゲノムを含むインフルエンザウイルスが、本明細書で提供される。具体的な実施態様では、親のインフルエンザウイルスのゲノムは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードするように改変され、そのポリペプチドは後代インフルエンザウイルスによって発現される。別の具体的な実施態様では、親のインフルエンザウイルスのゲノムは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードするように改変され、そのポリペプチドは発現され、後代インフルエンザウイルスのビリオンに組み込まれる。したがって、親のインフルエンザウイルスの複製から生じる後代インフルエンザウイルスは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む。親のインフルエンザウイルスのビリオンには、インフルエンザウイルスの同じであるか異なる型、サブタイプ又は株に由来するインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドを組み込むこともできる。或いは、親のインフルエンザウイルスのビリオンには、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの活性(例えば、インフルエンザウイルス血球凝集素の受容体結合及び/又は融合誘導活性)の1つ以上と機能的に代わることができる部分を組み込むこともできる。特定の態様では、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの活性の1つ以上は、(i)インフルエンザウイルスとは異種であるポリペプチドの外部ドメインが、(ii)インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの膜貫通ドメイン又は膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインと融合した融合タンパク質によって提供される。具体的な実施態様では、親のインフルエンザウイルスのビリオンには、(i)インフルエンザウイルス以外の感染性因子の受容体結合/融合誘導性ポリペプチドの外部ドメインが、(ii)インフルエンザウイルス血球凝集素の膜貫通ドメイン又は膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインと融合した融合タンパク質を組み込むこともできる。インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの1つ以上の活性を提供する融合タンパク質、及びそのような融合タンパク質を発現するように改変されたインフルエンザウイルスの生成方法の記載については、例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、2007年6月7日に公開された国際特許出願公報国際公開第2007/064802号を参照されたい。

【0180】

一部の態様では、親のインフルエンザウイルスのビリオンは、異種ポリペプチドをそれらに組み込んでいる。特定の態様では、親のインフルエンザウイルスのゲノムは、異種ポリペプチド及びインフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードするように改変され、それらは後代インフルエンザウイルスによって発現される

10

20

30

40

50

。具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、異種ポリペプチド又は両方は、後代インフルエンザウイルスのビリオンに組み込まれる。

【0181】

異種ポリペプチドは、特定の細胞型をインフルエンザウイルスの標的にするポリペプチド、例えば特異的細胞型の上の抗原を認識する抗体、又は特異的細胞型の上の特異的受容体に結合するリガンドであってよい。一部の実施態様では、ターゲティングポリペプチドは、ウイルスの標的細胞認識機能に代わる。具体的な実施態様では、異種ポリペプチドは、インフルエンザウイルスが天然で感染するのと同じ細胞型を、インフルエンザウイルスの標的にさせる。他の具体的な実施態様では、異種ポリペプチドは、B細胞、T細胞、マクロファージ又は樹状細胞などの免疫細胞を、後代インフルエンザウイルスの標的にさせる。一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、樹状細胞(例えば、CD44など)などの抗原提示細胞の細胞特異的マーカーを認識して、結合する。一実施態様では、異種ポリペプチドは、樹状細胞をウイルスの標的にさせるDC-SIGNである。別の実施態様では、異種ポリペプチドは、免疫細胞をウイルスの標的にさせる抗体(例えば、単鎖抗体)であり、これは、インフルエンザウイルスビリオンに組み込まれるように、別のポリペプチド由来の膜貫通ドメインに融合されてもよい。一部の実施態様では、抗体は、CD20抗体、CD34抗体又はDEC-205に対する抗体である。ターゲティング機能のあるポリペプチドを発現するようにウイルスを改変する技術は、当技術分野で公知である。例えば、各々の内容が引用により本明細書にその全体が組み込まれる、Yangらの文献、(2006、PNAS103:11479-11484)及び2008年1月24日に公開された米国特許出願公開第20080019998号及び2007年1月25日に公開された第20070020238号を参照されたい。

10

20

【0182】

別の実施態様では、異種ポリペプチドは、ウイルス付着タンパク質である。その付着タンパク質(複数可)をこの態様で用いることができるウイルスの非限定例は、以下の群から選択されるウイルスである:ラッサ熱ウイルス、B型肝炎ウイルス、狂犬病ウイルス、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)(NDV)、レトロウイルス、例えばヒト免疫不全ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、アルファウイルス、例えばセムリキ森林ウイルス、ロス川ウイルス、及びアウラウイルス(E1、E2及びE3などの表面糖タンパク質を含む)、ボルナ病ウイルス、ハンターウイルス、フォーミーウイルス及びSARS-CoVウイルス。

30

【0183】

一実施態様では、デングウイルス(Dengue virus)(DV)Eタンパク質などの、フラビウイルス表面糖タンパク質を用いることができる。一部の実施態様では、アルファウイルスファミリーからのシンドビスウイルス糖タンパク質が用いられる(K. S. Wang、R. J. Kuhn、E. G. Strauss、S. Ou、J. H. Straussの文献(J. Virol. 66, 4992 (1992))。特定の実施態様では、異種ポリペプチドは、NDV HN若しくはFタンパク質;ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus)(HIV)gp160(又はその生成物、例えばgp41若しくはgp120);B型肝炎ウイルス表面抗原(hepatitis B virus surface antigen)(HBsAg);ヘルペスウイルスの糖タンパク質(例えば、gD、gE);又はポリオウイルスのVP1に由来する。

40

【0184】

別の実施態様では、異種ポリペプチドは、当技術分野で公知である任意の非ウイルスターゲティング系に由来する。特定の実施態様では、細胞内の細菌又は原生動物などの非ウイルス病原体のタンパク質が用いられる。一部の実施態様では、細菌ポリペプチドは、例えばクラミジア(*Chlamydia*)、リケッチア(*Rickettsia*)、コクセリア(*Coxelia*)、リステリア(*Listeria*)、ブルセラ(*Brucella*)又はレジオネラ(*Legionella*)によって提供される。一部の実施態様では、原生動物のポリペプチドは、例えば、マラリア原虫(*Plasmodia*)種、レーシュマニア属(*Leishmania*)の種、トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)又はトリパノソーマ・クルージ(*Trypanosoma cruzi*)によって提供される。他の例示的なターゲティング系は、本明細書にその全体が組み込まれる、Waehlerらの文献、(2007、「遺伝子治療のための標的ウイルスベクターを改変する(Engineering targeted viral vectors

50

for gene therapy)」、Nature Reviews Genetics 8: 573-587)に記載されている。

【0185】

特定の実施態様では、インフルエンザウイルスによって発現される異種ポリペプチドは、免疫増強(免疫活性化)活性を有する。免疫増強ポリペプチドの非限定例には、刺激分子、サイトカイン、ケモカイン、抗体及びFlit-3リガンドなどの他の剤が含まれるが、これらに限定されない。免疫増強活性のあるポリペプチドの具体例には、以下が含まれる:インターフェロン1型、アルファ、ベータ若しくはガンインターフェロン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)などのコロニー刺激因子、インターロイキン(IL)-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、TNF β 、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40リガンド(CD40L)及び薬剤誘導可能なCD40(iCD40)(例えば、引用により本明細書にその全体が組み込まれるHanks, B. A.らの文献(2005. Nat Med 11: 130-137)を参照されたい。)

【0186】

インフルエンザA型及びB型ウイルスのゲノムは8本(8)の一本鎖のマイナスセンスセグメントからなる(インフルエンザC型ウイルスは7本(7)の一本鎖のマイナスセンスセグメントからなる)ので、親インフルエンザウイルスのゲノムは、リバースジェネティクス及び無ヘルパープラスミドレスキューなどの当業者に公知である組換えセグメント及び技術を用いて、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド(及び任意の他のポリペプチド、例えば異種ポリペプチド)を発現するように改変されてもよい。一実施態様では、組換えセグメントは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに加えて、vRNAの適切な複製、転写及びパッケージングに必要とされる3'及び5'組込みシグナルをコードする核酸を含む(Fujiiらの文献(2003、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2002-2007);Zhengらの文献(1996、Virology 217:242-251)、両方とも引用により本明細書にその全体が組み込まれている)。具体的な実施態様では、組換えセグメントは、親インフルエンザウイルスと異なるか同じ型、サブタイプ又は株に由来するインフルエンザウイルスのセグメントの3'及び5'非コード及び/又は非翻訳配列を用いる。一部の実施態様では、組換えセグメントは、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの3'非コード領域、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの非翻訳領域、及びインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの5'非コード領域を含む。具体的な実施態様では、組換えセグメントは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドのHA1のN末端ステムセグメント、HA1のC末端ステムセグメント及び/又はHA2として、インフルエンザウイルスの型、サブタイプ又は株と同じ型、サブタイプ又は株であるインフルエンザウイルスのHAセグメントの3'及び5'非コード及び/又は非翻訳配列を含む。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする組換えセグメントは、親インフルエンザウイルスのHAセグメントに代わることができる。一部の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする組換えセグメントは、親インフルエンザウイルスのNS1遺伝子に代わることができる。一部の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする組換えセグメントは、親インフルエンザウイルスのNA遺伝子に代わることができる。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現させるために用いることができる例示的なインフルエンザウイルス株には、アナーバー/1/50、A/プエルトリコ/8/34、A/サウスダコタ/6/2007、A/ウルグアイ/716/2007、及びB/プリズペーン/60/2008が含まれる。

【0187】

一部の実施態様では、親インフルエンザウイルスのゲノムは、ニシストロン性である組換えセグメントを用いて、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変されてもよい。ニシストロン性技術は、リボソーム内部侵入部位(IRES)配列を用いることにより、複数のタンパク質のコード配列を単一のmRNAに改変することを可能にする。IRES配列はRNA分子へのリボソームの内部動員を指示し、キャップ非依存的に下流側翻訳を可能にする。簡潔には、1つのタンパク質のコード領域が、第二のタンパク質の読取り枠(ORF)に挿入される。挿入は、IRES及び適切な発現及び/又は機能に必要な任

意の非翻訳シグナル配列に連なる。挿入は、第二のタンパク質のORF、ポリアデニル化又は転写プロモーターを阻害してはならない(例えば、それぞれは引用により本明細書にその全体が組み込まれる、Garcia-Sastreらの文献(1994、J. Virol. 68:6254-6261)及びGarcia-Sastreらの文献(1994 Dev. Biol. Stand. 82:237-246)を参照)。例えば、それぞれは引用により本明細書にその全体が組み込まれる、米国特許第6,887,699号、米国特許第6,001,634号、米国特許第5,854,037号及び米国特許第5,820,871号も参照されたい。当技術分野で公知であるか本明細書に記載される任意のIRESを、本発明に従って用いることができる(例えば、BiP遺伝子のIRES、GenBankデータベースエントリHUMGRP78のヌクレオチド372~592;又は脳心筋炎ウイルス(encephalomyocarditis virus)(EMCV)のIRES、GenBankデータベースエントリCQ867238のヌクレオチド1430-2115)。したがって、特定の実施態様では、親インフルエンザウイルスは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド及び親インフルエンザウイルスによって発現される遺伝子などの別のポリペプチドを発現するニシストロン性RNAセグメントを含むように改変される。一部の実施態様では、親インフルエンザウイルス遺伝子は、HA遺伝子である。一部の実施態様では、親インフルエンザウイルス遺伝子は、NA遺伝子である。一部の実施態様では、親インフルエンザウイルス遺伝子は、NS1遺伝子である。

【0188】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むインフルエンザウイルス、及びインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変されたゲノムを含むインフルエンザウイルスを生成するために、当業者に公知である技術を用いることができる。例えば、そのようなインフルエンザウイルスを生成するために、リバーシジェネティクス技術を用いることができる。簡潔には、リバーシジェネティクス技術は、ウイルスポリメラーゼによる認識及び成熟ピリオンの生成に必要なパッケージングシグナルに必要不可欠である、マイナス鎖、ウイルスRNAの非コード領域を含む合成組換えウイルスRNAの調製を一般に含む。組換えRNAは、組換えDNA鋳型から合成され、精製されたウイルスポリメラーゼ複合体によってインビトロで再構成されて、細胞をトランスフェクトするために用いることができる組換えリボ核タンパク質(ribonucleoprotein)(RNP)を形成する。インビトロ又はインビボで合成RNAの転写の間にウイルスポリメラーゼタンパク質が存在する場合、より効率的なトランスフェクションが達成される。合成組換えRNPは、感染性ウイルス粒子に救出することができる。前述の技術は、1992年11月24日に公布された米国特許第5,166,057号;1998年12月29日に公布された米国特許第5,854,037号;1996年2月20日に公開された欧州特許公報欧州特許第0702085A1号;米国特許出願第09/152,845号;1997年4月3日に公開された国際特許公報国際公開第97/12032号;1996年11月7日に公開された国際公開第96/34625号;欧州特許公報欧州特許第A780475号;1999年1月21日に公開された国際公開第99/02657号;1998年11月26日に公開された国際公開第98/53078号;1998年1月22日に公開された国際公開第98/02530号;1999年4月1日に公開された国際公開第99/15672号;1998年4月2日に公開された国際公開第98/13501号;1997年2月20日に公開された国際公開第97/06270号;及び1997年6月25日に公開されたEPO 780 475A1に記載され、それぞれは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0189】

或いは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むインフルエンザウイルス、及びインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変されたゲノムを含むインフルエンザウイルスを生成するために、無ヘルパープラスミド技術を用いることができる。簡潔には、プラスミドベクターへのPCR生成物の挿入を可能にする特異な制限部位を含むプライマーによるPCRを用いて、ウイルスセグメントの完全長cDNAが増幅される(Flandorferらの文献(2003、J. Virol. 77:9116-9123;Nakayaらの文献(2001、J. Virol. 75: 11868-11873;その両方は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。プラスミドベクターは、正確なマイナスの(vRNAセンス)転写物が発現されるように設計される。例えば、正確なマイナスの(vRNAセンス)転写物がポリメラーゼIプロモーターから生成されるように、プラスミドベクターは、切り詰められたヒトRNAポリ

メラゼIプロモーターとデルタ型肝炎ウイルスリボザイム配列との間にPCR生成物を置くように設計されてもよい。各ウイルスセグメントを含む別個のプラスミドベクター並びに必要なウイルスタンパク質を含む発現ベクターを細胞にトランスフェクトして、組換えウイルス粒子の生成をもたらすことができる。別の実施例では、必要なウイルスタンパク質をコードするウイルスゲノムRNA及びmRNAの両方が発現されるプラスミドベクターを用いることができる。無ヘルパープラスミド技術の詳細な説明については、例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公報国際公開第01/04333号；米国特許第6,951,754号、第7,384,774号、第6,649,372号及び第7,312,064号；Fodorらの文献(1999、J. Virol. 73:9679-9682)；Quinlivanらの文献(2005、J. Virol. 79:8431-8439)；Hoffmannらの文献(2000、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6108-6113)；並びにNeumannらの文献(1999、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9345-9350)を参照されたい。

10

【0190】

本明細書に記載されるインフルエンザウイルスは、本明細書に記載される方法に従うこれらの使用を可能にする力価までウイルスを生育させる、任意の基質で増殖させることができる。一実施態様では、基質は、対応する野生株ウイルスで測定されるものに同等の力価までウイルスを生育させる。特定の実施態様では、基質は、インフルエンザウイルス又はHA機能が由来するウイルスに生物学的に関連しているものである。具体的な実施態様では、例えばNS1遺伝子での突然変異による弱毒化インフルエンザウイルスは、IFN欠損基質で増殖させることができる。例えば、適するIFN欠損基質は、インターフェロンを生成するか又はそれに応答するその能力に欠陥があるものであってよく、又はIFN欠損基質は、インターフェロン欠損増殖環境を必要とし得る任意数のウイルスの増殖のために用いることができる。例えば、それぞれの全内容は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、2003年6月3日に公布された米国特許第6,573,079号、2005年2月8日に公布された第6,852,522号、及び2009年2月24日に公布された第7,494,808号を参照されたい。

20

【0191】

本明細書に記載されるインフルエンザウイルスは、当業者に公知である任意の方法によって単離、精製することができる。一実施態様では、ウイルスは、一般的に周知の澄清手順、例えば密度勾配遠心分離及びカラムクロマトグラフィーによって細胞培養から取り出され、細胞成分から分離され、所望により、当業者に周知である手順、例えばブランクアッセイを用いてさらに精製することができる。

30

【0192】

特定の実施態様では、本明細書に記載されているように用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、インフルエンザA型ウイルスから得られるか又は誘導される。特定の実施態様では、本明細書に記載のように用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、単一のインフルエンザA型ウイルスサブタイプ又は株から得られるか又は誘導される。他の実施態様では、本明細書に記載のように用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、2つ以上のインフルエンザA型ウイルスサブタイプ又は株から得られるか又は誘導される。

40

【0193】

一部の実施態様では、本明細書に記載されているように用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、インフルエンザB型ウイルスから得られるか又は誘導される。特定の実施態様では、本明細書に記載のように用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、単一のインフルエンザB型ウイルスサブタイプ又は株から得られるか又は誘導される。他の実施態様では、本明細書に記載のように用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、2つ以上のインフルエンザB型ウイルスサブタイプ又は株から得られるか又は誘導される。他の実施態様では、本明細書に記載のよ

50

うに用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、インフルエンザA型及びインフルエンザB型ウイルスのサブタイプ又は株の組合せから得られるか又は誘導される。

【0194】

一部の実施態様では、本明細書に記載のように用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、インフルエンザC型ウイルスから得られるか又は誘導される。特定の実施態様では、本明細書に記載のように用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、単一のインフルエンザC型ウイルスサブタイプ又は株から得られるか又は誘導される。他の実施態様では、本明細書に記載のよう
10
うに用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、2つ以上のインフルエンザC型ウイルスサブタイプ又は株から得られるか又は誘導される。他の実施態様では、本明細書に記載のように用いるためのインフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルスのポリペプチド、遺伝子若しくはゲノムセグメントは、インフルエンザC型ウイルス及びインフルエンザA型ウイルス及び/又はインフルエンザB型ウイルスのサブタイプ又は株の組合せから得られるか又は誘導される。

【0195】

インフルエンザA型ウイルスの非限定例には、以下のものが含まれる：

サブタイプH10N4、サブタイプH10N5、サブタイプH10N7、サブタイプH10N8、サブタイプH1
20
0N9、サブタイプH11N1、サブタイプH11N13、サブタイプH11N2、サブタイプH11N4、サブ
タイプH11N6、サブタイプH11N8、サブタイプH11N9、サブタイプH12N1、サブタイプH12N4、
サブタイプH12N5、サブタイプH12N8、サブタイプH13N2、サブタイプH13N3、サブタイプH1
3N6、サブタイプH13N7、サブタイプH14N5、サブタイプH14N6、サブタイプH15N8、サブ
タイプH15N9、サブタイプH16N3、サブタイプH1N1、サブタイプH1N2、サブタイプH1N3、サブ
タイプH1N6、サブタイプH1N9、サブタイプH2N1、サブタイプH2N2、サブタイプH2N3、サブ
タイプH2N5、サブタイプH2N7、サブタイプH2N8、サブタイプH2N9、サブタイプH3N1、サブ
タイプH3N2、サブタイプH3N3、サブタイプH3N4、サブタイプH3N5、サブタイプH3N6、サブ
タイプH3N8、サブタイプH3N9、サブタイプH4N1、サブタイプH4N2、サブタイプH4N3、サブ
タイプH4N4、サブタイプH4N5、サブタイプH4N6、サブタイプH4N8、サブタイプH4N9、サブ
30
タイプH5N1、サブタイプH5N2、サブタイプH5N3、サブタイプH5N4、サブタイプH5N6、サブ
タイプH5N7、サブタイプH5N8、サブタイプH5N9、サブタイプH6N1、サブタイプH6N2、サブ
タイプH6N3、サブタイプH6N4、サブタイプH6N5、サブタイプH6N6、サブタイプH6N7、サブ
タイプH6N8、サブタイプH6N9、サブタイプH7N1、サブタイプH7N2、サブタイプH7N3、サブ
タイプH7N4、サブタイプH7N5、サブタイプH7N7、サブタイプH7N8、サブタイプH7N9、サブ
タイプH8N4、サブタイプH8N5、サブタイプH9N1、サブタイプH9N2、サブタイプH9N3、サブ
タイプH9N5、サブタイプH9N6、サブタイプH9N7、サブタイプH9N8、及びサブタイプH9N9。

【0196】

それらに限定されないが、インフルエンザA型ウイルスの株の具体例には以下のものが
40
含まれる：

A/sw/アイオワ/15/30(H1N1) ; A/WSN/33(H1N1) ; A/eq/ブラハ/1/56(H7N7) ; A/PR/8/34 ; A/マガ
モ/ポツダム/178-4/83(H2N2) ; A/セグロカモメ/DE/712/88(H16N3) ; A/sw/香港/168/1993(H1
N1) ; A/マガモ/アルバータ/211/98(H1N1) ; A/ハマドリ(shorebird)/デラウェア/168/06(H16
N3) ; A/sw/オランダ/25/80(H1N1) ; A/sw/ドイツ/2/81(H1N1) ; A/sw/ハノーバー/1/81(H1N1) ;
A/sw/ポツダム/1/81(H1N1) ; A/sw/ポツダム/15/81(H1N1) ; A/sw/ポツダム/268/81(H1N1) ; A/
sw/フィニステール/2899/82(H1N1) ; A/sw/ポツダム/35/82(H3N2) ; A/sw/コートダルモール/
3633/84(H3N2) ; A/sw/ヘント/1/84(H3N2) ; A/sw/オランダ/12/85(H1N1) ; A/sw/カレンツァイ
ン(Karrenzien)/2/87(H3N2) ; A/sw/シュヴェリーン/103/89(H1N1) ; A/七面鳥/ドイツ/3/91(
H1N1) ; A/sw/ドイツ/8533/91(H1N1) ; A/sw/ベルギー/220/92(H3N2) ; A/sw/ヘント/V230/92(H
1N1) ; A/sw/ライプチヒ/145/92(H3N2) ; A/sw/Re220/92hp(H3N2) ; A/sw/バークム/909/93(H3N
50

2); A/sw/ シュレースヴィヒホルシュタイン/1/93(H1N1); A/sw/ スコットランド/419440/94(H1N2); A/sw/ パークム/5/95(H1N1); A/sw/ ベスト(Best)/5C/96(H1N1); A/sw/ イングランド/17394/96(H1N2); A/sw/ イーナ/5/96(H3N2); A/sw/ ウーデンローデ/7C/96(H3N2); A/sw/ ローネ/1/97(H3N2); A/sw/ コートダルモール/790/97(H1N2); A/sw/ パークム/1362/98(H3N2); A/sw/ イタリア/1521/98(H1N2); A/sw/ イタリア/1553-2/98(H3N2); A/sw/ イタリア/1566/98(H1N1); A/sw/ イタリア/1589/98(H1N1); A/sw/ パークム/8602/99(H3N2); A/sw/ コートダルモール/604/99(H1N2); A/sw/ コートダルモール/1482/99(H1N1); A/sw/ ヘント/7625/99(H1N2); A/ 香港/1774/99(H3N2); A/sw/ 香港/5190/99(H3N2); A/sw/ 香港/5200/99(H3N2); A/sw/ 香港/5212/99(H3N2); A/sw/ イルエヴィレーヌ/1455/99(H1N1); A/sw/ イタリア/1654-1/99(H1N2); A/sw/ イタリア/2034/99(H1N1); A/sw/ イタリア/2064/99(H1N2); A/sw/ ベルリン/1578/00(H3N2); A/sw/ パークム/1832/00(H1N2); A/sw/ パークム/1833/00(H1N2); A/sw/ コートダルモール/800/00(H1N2); A/sw/ 香港/7982/00(H3N2); A/sw/ イタリア/1081/00(H1N2); A/sw/ ベルチヒ/2/01(H1N1); A/sw/ ベルチヒ/54/01(H3N2); A/sw/ 香港/9296/01(H3N2); A/sw/ 香港/9745/01(H3N2); A/sw/ スペイン/33601/01(H3N2); A/sw/ 香港/1144/02(H3N2); A/sw/ 香港/1197/02(H3N2); A/sw/ スペイン/39139/02(H3N2); A/sw/ スペイン/42386/02(H3N2); A/ スイス/8808/2002(H1N1); A/sw/ パークム/1769/03(H3N2); A/sw/ ピッセンドルフ/IDT1864/03(H3N2); A/sw/ エーレン(Ehren)/IDT2570/03(H1N2); A/sw/ ゲッシャー/IDT2702/03(H1N2); A/sw/ ハーゼリユンネ/2617/03hp(H1N1); A/sw/ レーニンゲン/IDT2530/03(H1N2); A/sw/ IVD/IDT2674/03(H1N2); A/sw/ ノルドキルヒェン/IDT1993/03(H3N2); A/sw/ ノルドヴァルデ/IDT2197/03(H1N2); A/sw/ ノルデン/IDT2308/03(H1N2); A/sw/ スペイン/50047/03(H1N1); A/sw/ スペイン/51915/03(H1N1); A/sw/ フェヒタ/2623/03(H1N1); A/sw/ ヴィスベク/IDT2869/03(H1N2); A/sw/ ヴァルターズドルフ/IDT2527/03(H1N2); A/sw/ ダム(Damme)/IDT2890/04(H3N2); A/sw/ ゲルダーン/IDT2888/04(H1N1); A/sw/ グランステット(Granstedt)/IDT3475/04(H1N2); A/sw/ グレーフェン/IDT2889/04(H1N1); A/sw/ ゲーテンスベルク/IDT2930/04(H1N2); A/sw/ ゲーテンスベルク/IDT2931/04(H1N2); A/sw/ ローネ/IDT3357/04(H3N2); A/sw/ ノルトルップ/IDT3685/04(H1N2); A/sw/ ゼーセン/IDT3055/04(H3N2); A/sw/ スペイン/53207/04(H1N1); A/sw/ スペイン/54008/04(H3N2); A/sw/ シュトルツェナウ/IDT3296/04(H1N2); A/sw/ ヴェーデル/IDT2965/04(H1N1); A/sw/ パートグリースバッハ/IDT4191/05(H3N2); A/sw/ クロップンブルク/IDT4777/05(H1N2); A/sw/ デートリンゲン/IDT3780/05(H1N2); A/sw/ デートリンゲン/IDT4735/05(H1N2); A/sw/ エックルハム/IDT5250/05(H3N2); A/sw/ ハーケンブレック(Harkenblek)/IDT4097/05(H3N2); A/sw/ ヘルツェン(Hertzen)/IDT4317/05(H3N2); A/sw/ クローゲル(Kroegel)/IDT4192/05(H1N1); A/sw/ ラエル/IDT3893/05(H1N1); A/sw/ ラエル/IDT4126/05(H3N2); A/sw/ メルツェン/IDT4114/05(H3N2); A/sw/ ミュスラリンゲン(Muesleringen)-S./IDT4263/05(H3N2); A/sw/ オスターホーフェン/IDT4004/05(H3N2); A/sw/ シュプレング(Sprengel)/IDT3805/05(H1N2); A/sw/ シュタットローン/IDT3853/05(H1N2); A/sw/ フォーグラルン(Voglarlarn)/IDT4096/05(H1N1); A/sw/ ヴォーラーシュト(Wohlerst)/IDT4093/05(H1N1); A/sw/ パートグリースバッハ/IDT5604/06(H1N1); A/sw/ ヘルツラケ/IDT5335/06(H3N2); A/sw/ ヘルツラケ/IDT5336/06(H3N2); A/sw/ ヘルツラケ/IDT5337/06(H3N2); 及びA/イノシシ/ドイツ/R169/2006(H3N2)。

【 0 1 9 7 】

それらに限定されないが、インフルエンザA型ウイルスの株の他の具体例には以下のものが含まれる：

A/トロント/3141/2009(H1N1); A/レーゲンスブルク/D6/2009(H1N1); A/バイエルン/62/2009(H1N1); A/バイエルン/62/2009(H1N1); A/ブランデンブルク/19/2009(H1N1); A/ブランデンブルク/20/2009(H1N1); A/連邦直轄区(Distrito Federal)/2611/2009(H1N1); A/マトグロソ/2329/2009(H1N1); A/サンパウロ/1454/2009(H1N1); A/サンパウロ/2233/2009(H1N1); A/ストックホルム/37/2009(H1N1); A/ストックホルム/41/2009(H1N1); A/ストックホルム/45/2009(H1N1); A/ブタ/アルパータ/OTH-33-1/2009(H1N1); A/ブタ/アルパータ/OTH-33-14/2009(H1N1); A/ブタ/アルパータ/OTH-33-2/2009(H1N1); A/ブタ/アルパータ/OTH-33-21/2009(H1N1); A/ブタ/アルパータ/OTH-33-22/2009(H1N1); A/ブタ/アルパータ/OTH-33-23/2009(H1N1); A/ブタ/アルパータ/OTH-33-24/2009(H1N1); A/ブタ/アルパータ/OTH-33-25/2009(H1N1)

;A/ブタ/アルバータ/OTH-33-3/2009(H1N1);A/ブタ/アルバータ/OTH-33-7/2009(H1N1);A/北京/502/2009(H1N1);A/フィレンツェ/10/2009(H1N1);A/香港/2369/2009(H1N1);A/イタリア/85/2009(H1N1);A/サントドミンゴ/572N/2009(H1N1);A/カタロニア/385/2009(H1N1);A/カタロニア/386/2009(H1N1);A/カタロニア/387/2009(H1N1);A/カタロニア/390/2009(H1N1);A/カタロニア/394/2009(H1N1);A/カタロニア/397/2009(H1N1);A/カタロニア/398/2009(H1N1);A/カタロニア/399/2009(H1N1);A/サンパウロ/2303/2009(H1N1);A/秋田/1/2009(H1N1);A/カストロ/JXP/2009(H1N1);A/福島/1/2009(H1N1);A/イスラエル/276/2009(H1N1);A/イスラエル/277/2009(H1N1);A/イスラエル/70/2009(H1N1);A/岩手/1/2009(H1N1);A/岩手/2/2009(H1N1);A/鹿児島/1/2009(H1N1);A/大阪/180/2009(H1N1);A/プエルトモンテ/Bio87/2009(H1N1);A/サンパウロ/2303/2009(H1N1);A/札幌/1/2009(H1N1);A/ストックホルム/30/2009(H1N1);A/ストックホルム/31/2009(H1N1);A/ストックホルム/32/2009(H1N1);A/ストックホルム/33/2009(H1N1);A/ストックホルム/34/2009(H1N1);A/ストックホルム/35/2009(H1N1);A/ストックホルム/36/2009(H1N1);A/ストックホルム/38/2009(H1N1);A/ストックホルム/39/2009(H1N1);A/ストックホルム/40/2009(H1N1);A/ストックホルム/42/2009(H1N1);A/ストックホルム/43/2009(H1N1);A/ストックホルム/44/2009(H1N1);A/宇都宮/2/2009(H1N1);A/WRAIR/0573N/2009(H1N1);及びA/浙江/DTID-ZJU01/2009(H1N1)。

【 0 1 9 8 】

インフルエンザB型ウイルスの非限定例には、以下のものが含まれる：

愛知/5/88株、秋田/27/2001株、秋田/5/2001株、アラスカ/16/2000株、アラスカ/1777/2005株、アルゼンチン/69/2001株、アリゾナ/146/2005株、アリゾナ/148/2005株、バンコク/163/90株、バンコク/34/99株、バンコク/460/03株、バンコク/54/99株、バルセロナ/215/03株、北京/15/84株、北京/184/93株、北京/243/97株、北京/43/75株、北京/5/76株、北京/76/98株、ベルギー/WV106/2002株、ベルギー/WV107/2002株、ベルギー/WV109/2002株、ベルギー/WV114/2002株、ベルギー/WV122/2002株、ボン/43株、ブラジル/952/2001株、ブカレスト/795/03株、ブエノスアイレス/161/00株)、ブエノスアイレス/9/95株、ブエノスアイレス/SW16/97株、ブエノスアイレス/VL518/99株、カナダ/464/2001株、カナダ/464/2002株、チャコ/366/00株、チャコ/R113/00株、済州/303/03株、千葉/447/98株、重慶/3/2000株、SA1タイ/2002臨床分離株、SA10タイ/2002臨床分離株、SA100フィリピン/2002臨床分離株、SA101フィリピン/2002臨床分離株、SA110フィリピン/2002臨床分離株)、SA112フィリピン/2002臨床分離株、SA113フィリピン/2002臨床分離株、SA114フィリピン/2002臨床分離株、SA2タイ/2002臨床分離株、SA20タイ/2002臨床分離株、SA38フィリピン/2002臨床分離株、SA39タイ/2002臨床分離株、SA99フィリピン/2002臨床分離株、CNIC/27/2001株、コロラド/2597/2004株、コルドバ/VA418/99株、チェコスロバキア/16/89株、チェコスロバキア/69/90株、ダエク/10/97株、ダエク/45/97株、ダエク/47/97株、ダエク/9/97株、B/Du/4/78株、B/ダーバン/39/98株、ダーバン/43/98株、ダーバン/44/98株、B/ダーバン/52/98株、ダーバン/55/98株、ダーバン/56/98株、イングランド/1716/2005株、イングランド/2054/2005株)、イングランド/23/04株、フィンランド/154/2002株、フィンランド/159/2002株、フィンランド/160/2002株、フィンランド/161/2002株、フィンランド/162/03株、フィンランド/162/2002株、フィンランド/162/91株、フィンランド/164/2003株、フィンランド/172/91株、フィンランド/173/2003株、フィンランド/176/2003株、フィンランド/184/91株、フィンランド/188/2003株、フィンランド/190/2003株、フィンランド/220/2003株、フィンランド/WV5/2002株、福建/36/82株、ジュネーブ/5079/03株、ジェノバ/11/02株、ジェノバ/2/02株、ジェノバ/21/02株、ジェノバ/54/02株、ジェノバ/55/02株、広東/05/94株、広東/08/93株、広東/5/94株、広東/55/89株、広東/8/93株、広州/7/97株、広州/86/92株、広州/87/92株、京畿/592/2005株、ハノーバー/2/90株、ハルビン/07/94株、ハワイ/10/2001株、ハワイ/1990/2004株、ハワイ/38/2001株、ハワイ/9/2001株、河北/19/94株、河北/3/94株)、河南/22/97株、広島/23/2001株、香港/110/99株、香港/1115/2002株、香港/112/2001株、香港/123/2001株、香港/1351/2002株、香港/1434/2002株、香港/147/99株、香港/156/99株、香港/157/99株、香港/22/2001株、香港/22/89株、香港/336/2001株、香港/666/2001株、香港/9/89株、ヒューストン/1/91株、ヒューストン

10

20

30

40

50

/1/96株、ヒューストン/2/96株、湖南/4/72株、茨城/2/85株、仁川(ncheon)/297/2005株、インド/3/89株、インド/77276/2001株、イスラエル/95/03株、イスラエル/WV187/2002株、日本/1224/2005株、江蘇/10/03株、ヨハネスブルク/1/99株、ヨハネスブルク/96/01株、門真/1076/99株、門真/122/99株、鹿児島/15/94株、カンザス/22992/99株、ハズコフ(Khazkov)/224/91株、神戸/1/2002株、高知/193/99株、ラツィオ/1/02株、リー/40株、レニングラード/129/91株、リスボン/2/90株)、ロサンゼルス/1/02株、ルサカ/270/99株、リヨン/1271/96株、マレーシア/83077/2001株、マプト/1/99株、マルデルプラタ/595/99株、メリーランド/1/01、メンフィス/1/01株、メンフィス/12/97-MA株、ミシガン/22572/99株、三重/1/93株、ミラノ/1/01株、ミンスク/318/90株、モスクワ/3/03株、名古屋/20/99株、南昌/1/00株、ナッシュビル/107/93株、ナッシュビル/45/91株、ネブラスカ/2/01株、オランダ/801/90株、オランダ/429/98株、ニューヨーク/1/2002株、NIB/48/90株、寧夏/45/83株、ノルウェー/1/84株、オマーン/16299/2001株、大阪/1059/97株、大阪/983/97-V2株、オスロ/1329/2002株、オスロ/1846/2002株、パナマ/45/90株、パリ/329/90株、パルマ/23/02株、パース/211/2001株、ペルー/1364/2004株、フィリピン/5072/2001株、釜山/270/99株、ケベック/173/98株、ケベック/465/98株、ケベック/7/01株、ローマ/1/03株、佐賀/S172/99株、ソウル/13/95株、ソウル/37/91株、山東/7/97株、上海/361/2002株)、滋賀/T30/98株、四川/379/99株、シンガポール/222/79株、スペイン/WV27/2002株、ストックホルム/10/90株、スイス/5441/90株、台湾/0409/00株、台湾/0722/02株、台湾/97271/2001株、テヘラン/80/02株、東京/6/98株、トリエステ/28/02株、ウランウデ/4/02株、イギリス/34304/99株、USSR/100/83株、ビクトリア/103/89株、ウィーン/1/99株、武漢/356/2000株、WV194/2002株、玄武/23/82株、山形/1311/2003株、山形/K500/2001株、アラスカ/12/96株、GA/86株、長崎/1/87株、東京/942/96株又はロチェスター/02/2001株。

10

20

30

40

50

【0199】

インフルエンザC型ウイルスの非限定例には、以下のものが含まれる：

愛知/1/81株、アンアーバー/1/50株、青森/74株、カリフォルニア/78株、イングランド/83株、ギリシア/79株、広島/246/2000株、広島/252/2000株、兵庫/1/83株、ヨハネスブルク/66株、神奈川/1/76株、京都/1/79株、ミシシッピ/80株、宮城/1/97株、宮城/5/2000株、宮城/9/96株、奈良/2/85株、ニュージャージー/76株、ブタ/北京/115/81株、埼玉/3/2000株)、静岡/79株、山形/2/98株、山形/6/2000株、山形/9/96株、ベルリン/1/85株、イングランド/892/8株、五大湖/1167/54株、JJ/50株、ブタ/北京/10/81株、PIG/北京/439/82)株、テラー(TAYLOR)/1233/47株及びC/山形/10/81株。

【0200】

特定の実施態様では、本明細書で提供されるインフルエンザウイルスは、弱毒化表現型を有する。具体的な実施態様では、弱毒化インフルエンザウイルスは、インフルエンザA型ウイルスに基づく。他の実施態様では、弱毒化インフルエンザウイルスは、インフルエンザB型ウイルスに基づく。さらに他の実施態様では、弱毒化インフルエンザウイルスは、インフルエンザC型ウイルスに基づく。他の実施態様では、弱毒化インフルエンザウイルスは、インフルエンザA型、インフルエンザB型及び/又はインフルエンザC型ウイルスの1つ以上の株又はサブタイプからの遺伝子又はゲノムセグメントを含むことができる。一部の実施態様では、弱毒化骨格ウイルスは、インフルエンザA型ウイルス及びインフルエンザB型ウイルスからの遺伝子を含む。

【0201】

具体的な実施態様では、ウイルスが少なくとも部分的に感染性を保持し、インビボで複製することができるが、非病原性である無症状レベルの感染をもたらす低い力価を生成することができるだけであるような、インフルエンザウイルスの弱毒化が望ましい。そのような弱毒化ウイルスは、ウイルス又はその免疫原性組成物が免疫応答を誘発するために対象に投与される、本明細書に記載の実施態様に特に適している。インフルエンザウイルスの弱毒化は、当技術分野で公知である任意の方法、例えば化学突然変異誘発によって生成されるウイルス突然変異体を選択すること、遺伝子操作によるゲノムの突然変異、弱毒化

された機能を有するセグメントを含む再組合せウイルスを選択すること、又は条件的ウイルス突然変異体(例えば、低温順応ウイルス)の選択によって達成することができる。或いは、天然に存在する弱毒化インフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスベクターのためのインフルエンザウイルス骨格として用いることができる。

【0202】

一実施態様では、インフルエンザウイルスは、本明細書に記載のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドで、親インフルエンザウイルスのHA遺伝子を置換することによって、少なくとも部分的に弱毒化することができる。一部の実施態様では、インフルエンザウイルスは、細胞のインターフェロン(IFN)応答に拮抗するウイルスの能力を損なわせる突然変異したNS1遺伝子を発現するようにインフルエンザウイルスを改変することによって、少なくとも部分的に弱毒化することができる。インフルエンザウイルスNS1遺伝子に導入することができる突然変異の種類の中には、欠失、置換、挿入及びそれらの組合せが含まれる。NS1遺伝子全体のどこにでも(例えば、N末端、C末端若しくはその間のどこか)及び/又はNS1遺伝子の調節エレメントに、1つ以上の突然変異を導入することができる。一実施態様では、弱毒化インフルエンザウイルスは、NS1のC末端から5個、好ましくは10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75、80、85、90、95、99、100、105、110、115、120、125、126、130、135、140、145、150、155、160、165、170若しくは175個のアミノ酸残基からなる欠失、又はC末端から5~170、25~170、50~170、100~170、100~160若しくは105~160個の間のアミノ酸残基の欠失をもたらすインフルエンザウイルスNS1遺伝子の突然変異を有するゲノムを含む。別の実施態様では、弱毒化インフルエンザウイルスは、それがアミノ酸残基1~130、アミノ酸残基1~126、アミノ酸残基1~120、アミノ酸残基1~115、アミノ酸残基1~110、アミノ酸残基1~100、アミノ酸残基1~99、アミノ酸残基1~95、アミノ酸残基1~85、アミノ酸残基1~83、アミノ酸残基1~80、アミノ酸残基1~75、アミノ酸残基1~73、アミノ酸残基1~70、アミノ酸残基1~65又はアミノ酸残基1~60のNS1タンパク質をコードするように、インフルエンザウイルスNS1遺伝子の突然変異を有するゲノムを含み、そこにおいて、N末端アミノ酸は、1番である。NS1突然変異及び突然変異したNS1を含むインフルエンザウイルスの例については、例えば、それぞれは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第6,468,544号及び第6,669,943号;並びにLiらの文献(1999、J. Infect. Dis. 179: 1132-1138)を参照されたい。

【0203】

(5.5 非インフルエンザウイルスベクター)

一態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む非インフルエンザウイルスが、本明細書で提供される。具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、非インフルエンザウイルスのビリオンに組み込まれる。非インフルエンザウイルスは、免疫細胞などの特定の細胞型をウイルスの標的にさせる部分に抱合化されてもよい。一部の実施態様では、非インフルエンザウイルスのビリオンは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに加えて、異種ポリペプチドをそれらに組み込んでいるか又は発現する。異種ポリペプチドは、免疫増強活性を有するか、又は特定の細胞型を非インフルエンザウイルスの標的にするポリペプチド、例えば特異的細胞型の上の抗原を認識する抗体、又は特異的細胞型の上の特異的受容体に結合するリガンドであってよい。そのような異種ポリペプチドの例については、上記セクション5.4を参照されたい。

【0204】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む非インフルエンザウイルスは、当業者に公知である技術を用いて、ビリオンの生成の間にトランスでインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを供給することによって生成されてもよい。或いは、血球凝集素機能がトランスで提供されている、ウイルス感染に感受性である細胞でインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変されたゲノムを含む親の非インフルエンザウイルスの複製は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメ

インポリペプチドを含む後代インフルエンザウイルスを生成する。

【0205】

それらに限定されないが天然に存在する株、変異体若しくは突然変異体、突然変異ウイルス、再配列株及び/又は遺伝子改変ウイルスを含む任意のウイルス型、サブタイプ又は株を、非インフルエンザウイルスベクターとして用いることができる。具体的な実施態様では、親の非インフルエンザウイルスは、天然に存在するウイルスでない。別の具体的な実施態様では、親の非インフルエンザウイルスは、遺伝子操作されたウイルスである。特定の実施態様では、本明細書に記載される膜結合インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの発現のためには、エンベロープ型ウイルスが好ましい。

【0206】

例示的な実施態様では、非インフルエンザウイルスベクターは、ニューカッスル病ウイルス(NDV)である。別の実施態様では、非インフルエンザウイルスベクターは、ワクシニアウイルスである。他の例示的な非限定実施態様では、非インフルエンザウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、B型肝炎ウイルス、レトロウイルス(例えばガンマレトロウイルス、例えばマウスステム細胞ウイルス(MSCV)ゲノム又はマウス白血病ウイルス(MLV)、例えばモロニーマウス白血病ウイルス、腫瘍レトロウイルス又はレンチウイルス)、アルファウイルス(例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス)、ラブドウイルス、例えば水疱性口内炎ウイルス又は乳頭腫ウイルス、ポックスウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、MVA-T7ベクター、又は鶏痘)、メタニューモウイルス、麻疹ウイルス、ヘルペスウイルス、例えば単純ヘルペスウイルス又はフォーミーウイルスである。例えば、それぞれは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、Lawrie及びTuminの文献(1993、Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109)(レトロウイルスベクター);Bettらの文献(1993、J. Virol. 67, 5911)(アデノウイルスベクター);Zhouらの文献(1994、J. Exp. Med. 179, 1867)(アデノ随伴ウイルスベクター);Dubenskyらの文献(1996、J. Virol. 70, 508-519)(ワクシニアウイルス及び鶏痘ウイルスを含む水痘ファミリーからのウイルスベクター並びにシンドビス及びセムリキ森林ウイルスに由来するものなどのアルファウイルス属からのウイルスベクター);米国特許第5,643,576号(ベネズエラウマ脳炎ウイルス);国際公開第96/34625号(VSV);Oheらの文献(1995、Human Gene Therapy 6, 325-333);Wooらの文献、国際公開第94/12629号;Xiao及びBrandsmaの文献(1996、Nucleic Acids. Res. 24、2630-2622)(乳頭腫ウイルス);並びにBukreyev及びCollinsの文献(2008、Curr Opin Mol Ther. 10:46-55)(NDV)を参照されたい。

【0207】

具体的な実施態様では、非インフルエンザウイルスベクターは、NDVである。任意のNDV型、サブタイプ又は株は、それらに限定されないが、天然に存在する株、変異体若しくは突然変異体、突然変異させたウイルス、再配列株及び/又は遺伝子操作されたウイルスを含む、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変される骨格の役目を果たすことができる。具体的な実施態様では、遺伝子操作のための骨格の役目を果たすNDVは、天然に存在する株である。特定の実施態様では、遺伝子操作のための骨格の役目を果たすNDVは、溶解性株である。他の実施態様では、遺伝子操作のための骨格の役目を果たすNDVは、非溶解性株である。特定の実施態様では、遺伝子操作のための骨格の役目を果たすNDVは、長潜伏期性株である。一部の実施態様では、遺伝子操作のための骨格の役目を果たすNDVは、中間毒力株である。他の実施態様では、遺伝子操作のための骨格の役目を果たすNDVは、短潜伏期性株である。NDV株の具体例には、73-T株、U1ster株、MTH-68株、Italien株、Hickman株、PV701株、Hitchner B1株、La Sota株、YG97株、MET95株及びF48E9株が含まれるが、これらに限定されない。具体的な実施態様では、遺伝子操作のための骨格の役目を果たすNDVは、Hitchner B1株である。別の具体的な実施態様では、遺伝子操作のための骨格の役目を果たすNDVは、La Sota株である。

【0208】

一実施態様では、非インフルエンザウイルスベクターのための骨格として用いられるNDVは、Fタンパク質の切断部位が1、2の追加のアルギニン残基を含むもので置換されている

10

20

30

40

50

修飾Fタンパク質を発現するように改変され、突然変異体切断部位はフリファミリーの普遍的に発現されるプロテアーゼによって活性化される。そのような修飾Fタンパク質を発現するNDVの具体例には、rNDV/F2aa及びrNDV/F3aaが含まれるが、これらに限定されない。突然変異した切断部位を有する修飾Fタンパク質を生成するためにNDVのFタンパク質に導入される突然変異の記載については、例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、Parkらの文献(2006、「二重特異性を有する改変されたウイルスワクチン構築物:鳥インフルエンザ及びニューカッスル病(Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: Avian influenza and Newcastle disease)。」PNAS USA 103: 8203-2808))を参照されたい。

【0209】

一実施態様では、非インフルエンザウイルスベクターは、ボックスウイルスである。ボックスウイルスベクターは、ワクチンベクターに適する配列を提供するボックスウイルス科の任意のメンバー、特にワクシニアウイルス又はトリボックスウイルス(例えば、カナリア痘ウイルス、鶏痘など)に基づくことができる。具体的な実施態様では、ボックスウイルスベクターは、ワクシニアウイルスベクターである。適するワクシニアウイルスには、Copenhagen(VC-2)株(Goebelらの文献(Virol 179: 247-266、1990);Johnsonらの文献(Virol. 196: 381-401、1993)、改変Copenhagen株(NYVAC)(米国特許第6,265,189号)、WYETH株及び改変Ankara(MVA)株(Antoineらの文献(Virol. 244: 365-396、1998))が含まれるが、これらに限定されない。他の適するボックスウイルスには、望ましい特性を提供し、高度に弱毒化されているALVAC及びTROVACベクターなどの鶏痘株が含まれる(例えば、米国特許第6,265,189号;Tartagliaらの文献、掲載書エイズ研究レビュー(AIDS Research Reviews)(Koffら編、3巻、Marcel Dekker, N. Y., 1993);及びTartagliaらの文献(1990、Reviews in Immunology 10: 13-30、1990)を参照)。

【0210】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現させるために非インフルエンザウイルスを改変する方法は、そのようなウイルスを弱毒化、増殖及び単離、精製する方法と同様に当技術分野で周知である。NDVベクターに関するそのような技術については、例えば、それぞれは引用によりその全体が組み込まれる、国際公報国際公開第01/04333号;米国特許第7,442,379号、第6,146,642号、第6,649,372号、第6,544,785後及び第7,384,774号;Swayneらの文献(2003、Avian Dis. 47: 1047-1050);及びSwayneらの文献(2001、J. Virol. 11868-11873)を参照されたい。ボックスウイルスに関するそのような技術については、例えば、Picciniらの文献(Methods of Enzymology 153: 545-563、1987);国際公報国際公開第96/11279号;米国特許第4,769,330号;米国特許第4,722,848号;米国特許第4,769,330号;米国特許第4,603,112号;米国特許第5,110,587号;米国特許第5,174,993号;欧州特許第83 286号;欧州特許第206 920号;Mayrらの文献(Infection 3: 6-14、1975);及びSutter及びMossの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10847-10851、1992)を参照されたい。特定の実施態様では、非インフルエンザウイルスは弱毒化される。

【0211】

特に対象への投与のための組成物で使用するために、非インフルエンザウイルスベクターの選択のための例示的な考慮事項は、安全性、低毒性、安定性、細胞型特異性及び免疫原性、特に非インフルエンザウイルスベクターによって発現されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの抗原性である。

【0212】

(5.6 ウイルス様粒子及びピロゾーム(virosome))

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、ウイルス様粒子(VLP)ベクターに組み込むことができる。VLPは、一般的にウイルスの構造タンパク質(複数可)に由来するウイルスポリペプチド(複数可)を一般に含む。一部の実施態様では、VLPは複製することができない。特定の実施態様では、VLPはウイルスの完全なゲノムを欠くことがあるか、又はウイルスのゲノムの一部を含むことがある。一部の実施態様では、VLPは細胞に感染することができない。一部の実施態様では、VLPは、それらの表面に当業者に公知

10

20

30

40

50

であるか又は本明細書に記載される1つ以上のウイルス(例えば、ウイルス表面糖タンパク質)又は非ウイルス(例えば、抗体若しくはタンパク質)標的部分を発現する。一部の実施態様では、VLPは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド及びHIV gagなどのウイルス構造タンパク質を含む。具体的な実施態様では、VLPは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、及び下記のセクション6.2の実施例2に記載のようなHIV gagポリペプチドを含む。

【0213】

組換えで生成されるVLPを生成して特徴づけるための方法が、インフルエンザウイルス(Brightらの文献(2007、Vaccine. 25:3871))、ヒトパピローマウイルス1型(Hagneseesらの文献(1991、J. Virol. 67:315))、ヒトパピローマウイルス16型(Kirnbauerらの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. (1992)89: 12180))、HIV-1(Hafferらの文献(1990、J. Virol. 64:2653))及びA型肝炎(Winokurの文献(1991、65:5029))を含むいくつかのウイルスに基づいて記載されており、それぞれはその全体が本明細書に組み込まれる。NDVタンパク質を含むVLPを発現させる方法が、Pantuaらの文献(2006、J. Virol. 80: 11062-11073)、及び2009年3月12日に公開された米国特許出願公開第20090068221号で提供され、それぞれはその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0214】

具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、ピロゾームに組み込むことができる。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むピロゾームは、当業者に公知である技術を用いて生成することができる。例えば、ピロゾームは、精製されたウイルスを破壊し、ゲノムを抽出し、ウイルスタンパク質(例えば、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド)及び脂質で粒子を再び組み立てて、ウイルスタンパク質を含む脂質粒子を形成することによって生成することができる。

20

【0215】

(5.7 細菌ベクター)

具体的な実施態様では、細菌は、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変することができる。インフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインの発現のために適する細菌には、リステリア(*Listeria*)、サルモネラ(*Salmonella*)、赤痢菌(*Shigella*)の種、ヒト結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、大腸菌(*E. coli*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、ウシ流産菌(*Brucella abortus*)、マルタ熱菌(*Brucella melitensis*)、ライム病ボレリア(*Borrelia burgdorferi*)及び野兎病菌(*Francisella tularensis*)が含まれるが、これらに限定されない。具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変される細菌は、弱毒化される。異種ポリペプチドを発現するように改変される細菌の生成技術は、当技術分野で公知であり、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの発現に適用することができる。例えば、それぞれは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、2008年10月9日に公開された米国特許出願公開第20080248066号、及び2007年9月6日に公開された米国特許出願公開第20070207171号を参照されたい。

30

【0216】

(5.8 植物及び藻類ベクター)

特定の実施態様では、植物(例えば、タバコ属(*Nicotiana*)の植物)は、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変することができる。具体的な実施態様では、植物は、当技術分野で公知である方法を用いて、アグロインフィルトレーション(agroinfiltration)方法によって、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変される。例えば、対象の遺伝子、例えば本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする遺伝子をコードする核酸が、アグロバクテリウム菌(*Agrobacterium*)の株に導入される。その後、株を液体培養で生育させ、生じた細菌を洗浄して緩衝液に懸濁させる。次に、アグロバクテリウム菌が対象の遺伝子を植物細胞の一部に形

40

50

質転換するように、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸を含むアグロバクテリウム菌に植物を曝露させる(例えば、注入又は浸水を通して)。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、次に植物によって一時的に発現され、当技術分野で公知であり、本明細書に記載される方法を用いて単離することができる。(具体例については、Shojiらの文献(2008、Vaccine, 26(23):2930~2934);及びD'Aoustらの文献(2008、J. Plant Biotechnology, 6(9):930-940)を参照)。具体的な実施態様では、植物はタバコ植物(すなわち、タバコ(Nicotiana tabacum))である。別の具体的な実施態様では、植物はタバコ植物の近縁種(例えば、ニコチアーナ・ベンタミアーナ(Nicotiana benthamiana))である。

【0217】

他の実施態様では、藻(例えば、クラミドモナス・レインハーディ(Chlamydomonas reinhardtii))は、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変することができる(例えばRasalaらの文献(2010、Plant Biotechnology Journal)(2010年3月7日にオンラインで発表された)を参照)。

【0218】

(5.9 インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに対する抗体の生成)

本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、又はそのような核酸若しくはポリペプチドを含むベクターは、インフルエンザに対して、例えばインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの軸領域に対して中和抗体を引き出すために用いることができる。具体的な実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、又はそのような核酸若しくはポリペプチドを含むベクターは、当業者に公知である技術(例えば、免疫アフィニティークロマトグラフィ、遠心分離、沈殿など)を用いて単離することができる抗体の生成を含む免疫応答を誘発するために、ヒト以外の対象(例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモットなど)に投与されてもよい。

【0219】

或いは、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、抗体ライブラリーから抗体をスクリーニングするために用いることができる。例えば、単離されたインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを固体支持体(例えば、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、ポリスチレンビーズ、アルミナゲル又は多糖、磁気ビーズ)に固定化し、抗体への結合性についてスクリーニングすることができる。代わりに、抗体を固体支持体に固定化し、単離されたインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドへの結合性についてスクリーニングすることができる。インフルエンザに血球凝集素ステムドメインに結合する抗体についてスクリーニングするために、任意のスクリーニングアッセイ、例えばパニングアッセイ、ELISA、表面プラズモン共鳴、又は当技術分野で公知である他の抗体スクリーニングアッセイを用いることができる。スクリーニングされる抗体ライブラリーは、市販の抗体ライブラリー、インビトロで生成されたライブラリー、又はインフルエンザに感染した個体から抗体を同定及びクローニング又は単離することによって得られたライブラリーでよい。特定の実施態様では、抗体ライブラリーは、インフルエンザウイルス大発生の生存者から生成される。抗体ライブラリーは、当技術分野で公知である方法に従って生成することができる。特定の実施態様では、抗体ライブラリーは、抗体をクローニングし、それらをファージディスプレイライブラリー又はファージミッドディスプレイライブラリーで用いることによって生成される。

【0220】

本明細書に記載される方法で同定される抗体は、当技術分野で公知であるか又は本明細書に記載されるバイオアッセイを用いて、中和活性及び自動反応性の欠陥について試験することができる。一実施態様では、ヒト以外の動物又は抗体ライブラリーから単離された抗体は、複数のインフルエンザサブタイプからの血球凝集素ポリペプチドを中和する。一

10

20

30

40

50

部の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸又はそのような核酸若しくはポリペプチドをコードするベクターを用いて導出又は同定される抗体は、インフルエンザH3ウイルスを中和する。一部の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸又はそのような核酸若しくはポリペプチドを含むベクターを用いて導出又は同定される抗体は、インフルエンザウイルスの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16又はそれ以上のサブタイプ又は株を中和する。一実施態様では、中和抗体は1つ以上のインフルエンザA型ウイルス及び1つ以上のインフルエンザB型ウイルスを中和する。特定の実施態様では、中和抗体は、CR6261、CR6325、CR6329、CR6307、CR6323、2A、D7、D8、F10、G17、H40、A66、D80、E88、E90、H98、C179(ハイブリドーマFERM BP-4517によって生成される;Takara Bio社(Otsu, Shiga, Japan)から販売されるクローン)、A13C(ハイブリドーマFERM BP-4516によって生成される)、又はEkier t DCらの文献(2009、高度に保存されたインフルエンザウイルスエピトープの抗体認識(Antibody Recognition of a Highly Conserved Influenza Virus Epitope)。Science(Science Expressに2009年2月26日に発表された));Kashyapらの文献(2008、トルコのH5N1鳥インフルエンザ大発生の生存者からの組合せ抗体ライブラリーはウイルス中和戦略を明らかにする(Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies)。Proc Natl Acad Sci US A 105: 5986-5991);Suiらの文献(2009、鳥及びヒトインフルエンザA型ウイルスの広範囲中和のための構造的及び機能的基礎(Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses)。Nat Struct Mol Biol 16: 265-273);米国特許第5,589,174号、第5,631,350号、第6,337,070号及び第6,720,409号;国際公報国際公開第2007/134237号として公開された国際出願PCT/US2007/068983;国際公報国際公開第2009/036157号として公開された国際出願PCT/US2008/075998;国際公報国際公開第2008/028946号として公開された国際出願PCT/EP2007/059356;及び国際公報国際公開第2009/079259号として公開された国際出願PCT/US2008/085876に記載された任意の他の抗体と同じエピトープでないか又はそれらに結合しない。他の実施態様では、中和抗体はWangらの文献(2010、「異なる血球凝集素による逐次免疫化の後のH3インフルエンザウイルスに対する広範囲防御モノクローナル抗体(Broadly Protective Monoclonal Antibodies against H3 Influenza Viruses following Sequential Immunization with Different Hemagglutinins)」PLOS Pathogens 6(2): 1-9)に記載される抗体でない。特定の実施態様では、中和抗体はIg VH 1-69セグメントを用いない。一部の実施態様では、抗原との中和抗体の相互作用は、重鎖によって排他的に媒介されない。

【0221】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、又はそのような核酸若しくはポリペプチドを含むベクターを用いて同定又は導出された抗体には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫活性部分、すなわち血球凝集素ポリペプチドに特異的に結合する抗原結合部位を含む分子が含まれる。免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂)又はサブクラスであってよい。抗体には、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド連結Fv(sdFv)及び抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本明細書に記載される方法を用いて導出又は同定される抗体に対する抗Id抗体を含む)、及び上記のいずれかのエピトープ結合性断片が含まれるが、これらに限定されない。

【0222】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸又はそのような核酸若しくはポリペプチドを含むベクターを用いて導出又は同定される抗体は、診断的イムノアッセイ、受動免疫療法及び抗イディオタイプ抗体の生成で用いることができる。受動免疫療法で用いられている前の抗体は、修飾されてもよく

、例えば、抗体はキメラ化又はヒト化されてもよい。キメラ化及びヒト化された抗体の生成に関するレビューについては、例えば、それぞれは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第4,444,887号及び第4,716,111号；並びに国際公報国際公開第98/46645号、国際公開第98/50433号、国際公開第98/24893号、国際公開第98/16654号、国際公開第96/34096号、国際公開第96/33735号及び国際公開第91/10741号を参照されたい。さらに、受動免疫療法で抗体を用いる前に、血球凝集素ポリペプチドを中和する抗体の能力及びポリペプチドに対する抗体の特異性を試験することができる。インフルエンザウイルス感染に起因する疾患の予防又は治療のための中和抗体の使用に関する議論については、下のセクション5.11を参照されたい。

【0223】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸又はそのような核酸若しくはポリペプチドを含むベクターを用いて導出又は同定される抗体は、療法の効果及び/又は疾患の進行を監視するために用いることができる。この目的のために、それらに限定されないが、少し例を挙げれば、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ及び免疫電気泳動アッセイなどの技術を用いる、競合的及び非競合的アッセイ系を含む、当技術分野で公知である任意のイムノアッセイ系を用いることができる。

【0224】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸又はそのような核酸若しくはポリペプチドを含むベクターを用いて導出又は同定される抗体は、抗イデオタイプ抗体の生成において用いることができる。抗イデオタイプ抗体は、インフルエンザの特定の抗原、例えば血球凝集素ポリペプチドの中和エピトープに結合する抗体の亜集団を生成するために、次に免疫化のために用いることができる(引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、Jerneの文献(1974、Ann. Immunol. (Paris) 125c:373);Jerneらの文献(1982、EMBO J. 1:234))。

【0225】

(5.10 インフルエンザ血球凝集素ステムドメインペプチドによる細胞の刺激)

別の態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドによって細胞を生体外で刺激する方法が、本明細書で提供される。そのような細胞、例えば樹状細胞は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに対する抗体を生成するためにインビトロで用いることができるか、又はそれ自体を、例えば当技術分野で公知である養子移入技術によって対象に投与してもよい。養子移入技術の記載については、例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、2008年1月24日に公開された米国特許出願公開第20080019998号を参照されたい。特定の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドによって生体外で刺激された細胞を対象に投与する場合、細胞は哺乳動物細胞(例えば、CB-1細胞)でない。

【0226】

非限定一実施例では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変されたベクター、例えばインフルエンザウイルスベクターは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現し、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対して免疫賦活特性を提示する樹状細胞(dendritic cell)(DC)を生成するために用いることができる。そのようなDCは記憶T細胞を増殖させるために用いることができ、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド特異的細胞傷害性Tリンパ球クローンを含む、T細胞の強力な刺激因子である。引用によりその全体が本明細書に組み込まれるStrobelらの文献(2000、Human Gene Therapy 11:2207-2218)を参照されたい。

【0227】

本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドを標的細胞、例えばDCに接触させ、標的細胞にポリペプチドを送達させる任意の方法で標的細胞に送達することができる。特定の実施態様では、本明細書に記載されるように、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは対象に送達される。そのような一部の実施態様では、ポリペプチドに接触させた細胞は、単離し、増殖させることができる。

【0228】

特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、インビトロで標的細胞に送達される。標的細胞にポリペプチドを送達するために、当業者に公知である技術を用いることができる。例えば、標的細胞を、組織培養プレート、チューブ又は他の容器中のポリペプチドと接触させることができる。ポリペプチドを培地で懸濁し、培養プレートのウェル、チューブ又は他の容器に加えることができる。ポリペプチドを含む培地は、細胞の平板培養の前に、又は細胞を平板培養した後に加えることができる。好ましくは、標的細胞は、ポリペプチドを細胞に接触させるのに十分な量の時間、ポリペプチドと一緒にインキュベートされる。特定の実施態様では、細胞はポリペプチドと一緒に約1時間以上、約5時間以上、約10時間以上、約12時間以上、約16時間以上、約24時間以上、約48時間以上、約1時間～約12時間、約3時間～約6時間、約6時間～約12時間、約12時間～約24時間、又は約24時間～約48時間インキュベートされる。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドがウイルス中にある特定の実施態様では、標的細胞を接触させることは細胞をウイルスに感染させることを含む。

10

【0229】

標的細胞は、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ及びモルモットを含む、任意の種からのものでよい。一部の実施態様では、標的細胞は健康対象又は要治療対象から得られるDCである。特定の実施態様では、標的細胞は、ポリペプチドへの免疫応答を刺激することが望ましい対象から得られるDCである。対象から細胞を得る方法は、当技術分野で周知である。

20

【0230】

(5.11 組成物)

本明細書に記載される核酸、ベクター、ポリペプチド、細菌、抗体又は細胞(本明細書では「活性化化合物」と呼ばれることもある)は、組成物に組み込むことができる。具体的な実施態様では、組成物は免疫原性組成物(例えば、ワクチン製剤)などの医薬組成物である。本明細書で提供される医薬組成物は、組成物を対象に投与させることができる任意の形であってよい。具体的な実施態様では、医薬組成物は、獣医及び/又はヒトでの投与に適する。組成物は、インフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法で用いることができる。

30

【0231】

一実施態様では、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物で、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む。別の実施態様では、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物で、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸を含む。別の実施態様では、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物で、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターを含む。別の実施態様では、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物で、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むインフルエンザウイルス又は非インフルエンザウイルスを含む。別の実施態様では、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物で、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変されたゲノムを有するインフルエンザウイルス又は非インフルエンザウイルスを含む。別の実施態様では、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物で、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むウイルス様粒子又はピロゾームを含む。別の実施態様では、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物で、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するか又は発現するように改変された細菌を含む。別の実施態

40

50

様では、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物で、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドで刺激された細胞を含む。

【0232】

一部の実施態様では、医薬組成物は、活性化化合物に加えて1つ以上の他の療法を含むことができる。

【0233】

本明細書で用いるように、用語「医薬として許容し得る」は、連邦又は州政府の規制機関に承認されているか、或いは米国薬局方、又は動物、より詳細にはヒトに用いるための他の一般に承認された薬局方に記載されていることを意味する。用語「担体」は、医薬組成物がそれと一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤又は媒体を指す。液体担体として、特に注射用溶液のために、食塩水及び水性デキストロス及びグリセロール溶液を使用することもできる。適する賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。適する薬用担体の例は、E. W. Martinによる「レミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」に記載されている。製剤は、投与様式に適するべきである。

10

【0234】

具体的な実施態様では、医薬組成物は、対象への意図された投与経路に適するように製剤化される。例えば、医薬組成物は、非経口、経口、皮内、経皮、結腸直腸、腹腔内、及び直腸投与に適するように製剤化することができる。具体的な実施態様では、医薬組成物は、静脈内、経口、腹腔内、鼻腔内、気管内、皮下、筋肉内、局所、皮内、経皮、又は肺投与のために製剤化されてもよい。

20

【0235】

特定の実施態様では、生物分解性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリエチレングリコール(PEG化)、ポリメタクリル酸メチルポリマー、ポリラクチド、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸を担体として用いることができる。一部の態様では、活性化化合物は、インプラント及びマイクロカプセル送達系を含む、制御放出製剤などの、体からの速やかな消失からの化合物の保護を強化する担体で調製される。そのような製剤の調製方法は、当業者にとって明らかとなる。リポソーム又はミセルを、医薬として許容し得る担体として用いることもできる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されているような、当業者に公知である方法によって調製することができる。特定の実施態様では、医薬組成物は1つ以上のアジュバントを含む。

30

【0236】

具体的な実施態様では、本明細書に記載される免疫原性組成物は、一価の製剤である。他の実施態様では、本明細書に記載される免疫原性組成物は、多価製剤である。一例では、多価製剤は、インフルエンザA型ウイルス血球凝集素ポリペプチドに由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現する1つ以上のベクター、及びインフルエンザB型ウイルス血球凝集素ポリペプチドに由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現する1つ以上のベクターを含む。別の実施例では、多価製剤は、インフルエンザA型ウイルスH3抗原に由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するベクター、及びインフルエンザA型ウイルスH1抗原に由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するベクターを含む。別の実施例では、多価製剤は、インフルエンザA型ウイルスH3抗原に由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するベクター、及びインフルエンザA型ウイルスH1抗原に由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するベクター、及びインフルエンザB型ウイルスHA抗原に由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するベクターを含む。特定の実施態様では、多価製剤は、単一のベクターを用いて発現される1つ以上の異なるインフルエンザ血球凝集素

40

50

ステムドメインポリペプチドを含むことができる。

【0237】

特定の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、保存剤、例えば水銀誘導体チメロサルをさらに含む。具体的な実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、0.001%~0.01%チメロサルを含む。他の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、保存剤を含まない。具体的な実施態様では、チメロサルは本明細書に記載される医薬組成物の製造中に用いられ、チメロサルは医薬組成物の生産の後に精製工程を通して除去され、すなわち、医薬組成物は極微量のチメロサルを含む(精製後には1用量につき<0.3µgの水銀;そのような医薬組成物は、チメロサル非含有製品とみなされる)。

【0238】

特定の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、卵タンパク質(例えば、オボアルブミン又は他の卵タンパク質)をさらに含む。本明細書に記載される医薬組成物中の卵タンパク質の量は、1mlの医薬組成物に、約0.0005~約1.2µgの卵タンパク質でよい。他の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、卵タンパク質を含まない。

【0239】

特定の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、それらに限定されないが、ゲンタマイシン、ネオマイシン、ポリミキシン(例えば、ポリミキシンB)及びカナマイシン、ストレプトマイシンを含む、1つ以上の抗微生物剤(例えば、抗生物質)をさらに含む。他の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、いかなる抗生物質も含まない。

【0240】

特定の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、ウイルスを不活化するために用いられる1つ以上の成分、例えば、ホルマリン又はホルムアルデヒド又は界面活性剤、例えばデオキシコール酸ナトリウム、オクトキシノール9(TritonX-100)及びオクトキシノール10をさらに含む。他の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、ウイルスを不活化するために用いられるいかなる成分も含まない。

【0241】

特定の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、ゼラチンをさらに含む。他の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、ゼラチンを含まない。

【0242】

特定の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、1つ以上の緩衝剤、例えばリン酸緩衝剤及びスクロースホスフェートグルタメート緩衝剤をさらに含む。他の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、緩衝剤を含まない。

【0243】

特定の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、1つ以上の塩、例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム及びアルミニウム塩(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ミョウバン(硫酸アルミニウムカリウム)又はそのようなアルミニウム塩の混合物)をさらに含む。他の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、塩を含まない。

【0244】

具体的な実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物は、低添加剤インフルエンザウイルスワクチンであり、すなわち本医薬組成物は、インフルエンザウイルスワクチンで通常見られる1つ以上の添加剤を含まない。低添加剤インフルエンザワクチンは、記載されている(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公報国際公開第09/001217号として公開された国際出願PCT/IB2008/002238を参照)。

【0245】

本明細書に記載される医薬組成物は、投与のための説明書と一緒に容器、パック又はディスプレイに含まれてもよい。

【0246】

本明細書に記載される医薬組成物は、使用前まで保存することができ、例えば本医薬組

10

20

30

40

50

成物は、冷凍で(例えば、約-20、若しくは約-70で);冷蔵条件で(例えば、約4で);又は室温で(インフルエンザワクチンを含む組成物を冷蔵なしで保存する方法については、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公報国際公開第07/110776号として公開された国際出願PCT/IB2007/001149を参照)保存することができる。

【0247】

特定の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物中の活性化化合物が、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するように改変された細胞である場合、医薬組成物中の細胞は哺乳動物細胞(例えば、CB-1細胞)でない。

【0248】

(5.11.1 サブユニットワクチン)

具体的な実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むサブユニットワクチンが、本明細書で提供される。一部の実施態様では、サブユニットワクチンは、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド及び1つ以上の表面糖タンパク質(例えば、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ)、他のターゲティング部分又はアジュバントを含む。具体的な実施態様では、サブユニットワクチンは、単一のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む。他の実施態様では、サブユニットワクチンは、2つ、3つ、4つ又はそれ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む。具体的な実施態様では、サブユニットワクチンで用いられるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド(複数可)は、膜結合性でない、すなわちそれは溶解性である。

【0249】

特定の実施態様では、1用量につき約10 μ g~約60 μ gの本明細書に記載される1つ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、約0.001%~0.01%チメロサル、約0.1 μ g~約1.0 μ g鶏卵タンパク質、約1.0 μ g~約5.0 μ gポリミキシン、約1.0 μ g~約5.0 μ gネオマイシン、約0.1 μ g~約0.5 μ gベータプロピオラクトン、及び約0.001~約0.05w/v%ノニルフェノールエトキシレートを含むサブユニットワクチンが、本明細書で提供される。

【0250】

具体的な実施態様では、本明細書で提供されるサブユニットワクチンは、45 μ gの本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド(複数可)、1.0 μ g以下の水銀(チメロサルから)、1.0 μ g以下の鶏卵タンパク質(すなわち、オボアルブミン)、3.75 μ g以下のポリミキシン及び2.5 μ g以下のネオマイシンを含む、0.5ml用量を含むか又はそれからなる。一部の実施態様では、本明細書で提供されるサブユニットワクチンは、1用量につき0.5 μ g以下のベータプロピオラクトン、及び0.015w/v%以下のノニルフェノールエトキシレートをさらに含むか又はそれらからなる。一部の実施態様では、0.5ml用量のサブユニットワクチンは、充填済み注射器にバックされる。

【0251】

具体的な実施態様では、本明細書で提供されるサブユニットワクチンは、45 μ gの本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド(複数可)、25.0 μ gの水銀(チメロサルから)、1.0 μ g以下の鶏卵タンパク質(すなわち、オボアルブミン)、3.75 μ g以下のポリミキシン及び2.5 μ g以下のネオマイシンを含む5.0mlの多用量バイアル(1用量につき0.5ml)からなる。一部の実施態様では、本明細書で提供されるサブユニットワクチンは、1用量につき0.5 μ g以下のベータプロピオラクトン、及び0.015w/v%以下のノニルフェノールエトキシレートをさらに含むか又はそれらからなる。

【0252】

具体的な実施態様では、サブユニットワクチンは、胚含有鶏卵で増殖させたインフルエンザウイルスを用いて調製される(すなわち、サブユニットワクチンの成分(例えば、血球凝集素ステムドメインポリペプチド)は、胚含有鶏卵で増殖させたウイルスから単離される)。別の具体的な実施態様では、サブユニットワクチンは、胚含有鶏卵で増殖させなかったインフルエンザウイルスを用いて調製される(すなわち、サブユニットワクチンの成

10

20

30

40

50

分(例えば、血球凝集素ステムドメインポリペプチド)は、胚含有鶏卵で増殖させなかったウイルスから単離される)。別の具体的な実施態様では、サブユニットワクチンは、哺乳動物細胞、例えば不死化ヒト細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公報国際公開第07/045674号として公開された国際出願PCT/EP2006/067566を参照)又はMDCK細胞などのイヌ腎臓細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公報国際公開第08/032219号として公開された国際出願PCT/IB2007/003536を参照)で増殖させたインフルエンザウイルスを用いて調製される(すなわち、サブユニットワクチンの成分(例えば、血球凝集素ステムドメインポリペプチド)は、哺乳動物細胞で増殖させたウイルスから単離される)。別の具体的な実施態様では、サブユニットワクチン中の血球凝集素ステムドメインポリペプチド(複数可)は、発現ベクター、例えばウイルスベクター、植物ベクター又は細菌ベクターを用いて調製される(すなわち、サブユニットワクチン中の血球凝集素ステムドメインポリペプチド(複数可)は、発現ベクターから取得/単離される)。

10

【0253】

(5.11.2 ウイルス生ワクチン)

一実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む生きているウイルスを含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が、本明細書で提供される。別の実施態様では、組成物を投与される対象で生成される後代ウイルスによって発現される、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードするように改変される生きているウイルスを含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が、本明細書で提供される。具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、膜結合性である。他の具体的な実施態様では、インフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインポリペプチドは膜結合性でない、すなわち溶解性である。特定の実施態様では、生きているウイルスは、上のセクション5.4に記載されるような、インフルエンザウイルスである。他の実施態様では、生きているウイルスは、上のセクション5.5に記載されるような、非インフルエンザウイルスである。一部の実施態様では、生きているウイルスは弱毒化される。一部の実施態様では、免疫原性組成物は、2つ、3つ、4つ又はそれ以上の異なるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むか又は発現するように改変される、2つ、3つ、4つ又はそれ以上の生きているウイルスを含む。

20

【0254】

特定の実施態様では、1用量につき、本明細書に記載される1つ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含有する約 10^5 ～約 10^{10} 蛍光焦点単位(FFU)の生きている弱毒化インフルエンザウイルス、約0.1～約0.5mgのグルタミン酸ナトリウム、約1.0～約5.0mgの加水分解ブタ(procine)ゼラチン、約1.0～約5.0mgアルギニン、約10～約15mgスクロース、約1.0～約5.0mg二塩基性リン酸カリウム、約0.5～約2.0mgリン酸二水素カリウム、及び約0.001～約0.05 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸ゲンタマイシンを含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が、本明細書で提供される。一部の実施態様では、免疫原性組成物(例えば、ワクチン)は、単一の0.2ml用量を含む充填済み噴霧器としてパックされる。

30

【0255】

具体的な実施態様では、1用量につき、本明細書に記載される1つ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含有する $10^{6.5}$ ～ $10^{7.5}$ FFUの生きている弱毒化インフルエンザウイルス、0.188mgグルタミン酸ナトリウム、2.0mg加水分解ブタゼラチン、2.42mgアルギニン、13.68mgスクロース、2.26mg二塩基性リン酸カリウム、0.96mgリン酸二水素カリウム、及び0.015 $\mu\text{g/ml}$ 未満の硫酸ゲンタマイシンを含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が、本明細書で提供される。一部の実施態様では、免疫原性組成物(例えば、ワクチン)は、単一の0.2ml用量を含む充填済み噴霧器としてパックされる。

40

【0256】

具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む生きているウイルスは、本明細書に記載される免疫原性組成物で使用する前に、胚含有鶏卵で増殖させる。別の具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメイン

50

ポリペプチドを含む生きているウイルスは、本明細書に記載される免疫原性組成物で使用する前に、胚含有鶏卵で増殖させない。別の具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む生きているウイルスは、本明細書に記載される免疫原性組成物で使用する前に、哺乳動物細胞、例えば不死化ヒト細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公報国際公開第07/045674号として公開された国際出願PCT/EP2006/067566を参照)、又はMDCK細胞などのイヌ腎臓細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公報国際公開第08/032219号として公開された国際出願PCT/IB2007/003536を参照)で増殖させる。

【0257】

対象でのウイルスの増殖は、自然感染で起こるものに類似した種類及び程度の長期刺激をもたらしことができ、したがってかなりの持続性免疫を付与するので、対象への投与のための生きているウイルスを含む免疫原性組成物が好ましいことがある。

【0258】

(5.11.3 不活化ウイルスワクチン)

一実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む不活化ウイルスを含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が、本明細書で提供される。具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは膜結合性である。特定の実施態様では、不活化ウイルスは、上のセクション5.4に記載されるような、インフルエンザウイルスである。他の実施態様では、不活化ウイルスは、上のセクション5.5に記載されるような、非インフルエンザウイルスである。一部の実施態様では、免疫原性組成物は、2つ、3つ、4つ又はそれ以上の異なるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む、2つ、3つ、4つ又はそれ以上の不活化ウイルスを含む。特定の実施態様では、不活化ウイルス免疫原性組成物は、1つ以上のアジュバントを含む。

【0259】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むウイルスを不活化するために、当業者に公知である技術を用いることができる。一般的な方法は、不活化のためにホルマリン、熱又は界面活性剤を用いる。例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,635,246号を参照されたい。他の方法には、米国特許第5,891,705号;第5,106,619号及び第4,693,981号に記載されるものが含まれ、それらは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0260】

特定の実施態様では、免疫原性組成物の各用量が、約15~約60 µgの本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、約1.0~約5.0mg塩化ナトリウム、約20~約100 µg一塩基リン酸ナトリウム、約100~約500 µgリン酸水素ナトリウム、約5~約30 µgリン酸二水素カリウム、約5~約30 µg塩化カリウム及び約0.5~約3.0 µg塩化カルシウムを含むように、不活化インフルエンザウイルスを含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が、本明細書で提供される。一部の実施態様では、免疫原性組成物(例えば、ワクチン)は、単一の0.25ml又は単一の0.5mlの用量としてパックされる。他の実施態様では、免疫原性組成物(例えば、ワクチン)は、多用量製剤としてパックされる。

【0261】

特定の実施態様では、免疫原性組成物の各用量が、約15~約60 µgの本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、約0.001%~0.01%チメロサル、約1.0~約5.0mg塩化ナトリウム、約20~約100 µg一塩基リン酸ナトリウム、約100~約500 µgリン酸水素ナトリウム、約5~約30 µgリン酸二水素カリウム、約5~約30 µg塩化カリウム及び約0.5~約3.0 µg塩化カルシウムを1用量に含むように、不活化インフルエンザウイルスを含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が、本明細書で提供される。一部の実施態様では、免疫原性組成物(例えば、ワクチン)は、単一の0.25ml又は単一の0.5mlの用量としてパックされる。他の実施態様では、免疫原性組成物(例えば、ワクチン)は、多用量製剤としてパックされる。

【0262】

10

20

30

40

50

具体的な実施態様では、本明細書で提供される免疫原性組成物(例えば、ワクチン)は、単一の0.25ml用量としてパックされ、1用量につき22.5 μ gの本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、2.05mg塩化ナトリウム、40 μ g一塩基リン酸ナトリウム、150 μ gリン酸水素ナトリウム、10 μ gリン酸二水素カリウム、10 μ g塩化カリウム及び0.75 μ g塩化カルシウムを含む。

【0263】

具体的な実施態様では、本明細書で提供される免疫原性組成物(例えば、ワクチン)は、単一の0.5ml用量としてパックされ、1用量につき45 μ gの本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、4.1mg塩化ナトリウム、80 μ g一塩基リン酸ナトリウム、300 μ gリン酸水素ナトリウム、20 μ gリン酸二水素カリウム、20 μ g塩化カリウム及び1.5 μ g塩化カルシウムを含む。

10

【0264】

具体的な実施態様では、免疫原性組成物(例えば、ワクチン)は、5.0mlのワクチン(1用量につき0.5ml)を含むかそれからなる多用量製剤としてパックされ、1用量につき24.5 μ gの水銀(チメロサルから)、45 μ gの本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、4.1mg塩化ナトリウム、80 μ g一塩基リン酸ナトリウム、300 μ gリン酸水素ナトリウム、20 μ gリン酸二水素カリウム、20 μ g塩化カリウム及び1.5 μ g塩化カルシウムを含む。

【0265】

具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む不活化ウイルスは、その不活化及び本明細書に記載される免疫原性組成物での後の使用前に、胚含有鶏卵で増殖させた。別の具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む不活化ウイルスは、その不活化及び本明細書に記載される免疫原性組成物での後の使用前に、胚含有鶏卵で増殖させなかった。別の具体的な実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む不活化ウイルスは、その不活化及び本明細書に記載される免疫原性組成物での後の使用前に、哺乳動物細胞、例えば不死化ヒト細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公報国際公開第07/045674号として公開された国際出願PCT/EP2006/067566を参照)、又はMDCK細胞などのイヌ腎臓細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公報国際公開第08/032219号として公開された国際出願PCT/IB2007/003536を参照)で増殖させた。

20

30

【0266】

(5.11.4 スプリットウイルスワクチン)

一実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む免疫原性組成物は、スプリットウイルスワクチンである。一部の実施態様では、スプリットウイルスワクチンは、2つ、3つ、4つ又はそれ以上の異なるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含む。特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、膜結合性である/あった。特定の実施態様では、スプリットウイルスワクチンは、1つ以上のアジュバントを含む。

【0267】

スプリットウイルスワクチンの生成技術は、当業者に公知である。非限定例として、インフルエンザウイルススプリットワクチンは、界面活性剤で破壊された不活化粒子を用いて調製することができる。本明細書に記載される方法による使用に応用することができるスプリットウイルスワクチンの一例は、筋肉内使用のためのFluzone(登録商標)インフルエンザウイルスワクチン(ゾーン精製、サブピリオン)であり、それは、胚含有鶏卵で増殖させたインフルエンザウイルスから調製される無菌懸濁剤として製剤化される。ウイルス含有液が収集され、ホルムアルデヒドで不活化される。インフルエンザウイルスは、連続流動遠心機を用いて、直線ショ糖密度勾配溶液で濃縮、精製される。次に、ウイルスは、非イオン性界面活性剤、オクトキシノール-9(Triton(登録商標)X-100-Union Carbide社の登録商標)を用いて化学的に破壊され、「スプリットウイルス」を生成する。次に、スプ

40

50

リットウイルスは化学手段によってさらに精製され、リン酸ナトリウム緩衝生理食塩液に懸濁される。

【0268】

特定の実施態様では、約10 µg ~ 約60 µgの本明細書に記載される1つ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、約0.01 ~ 約1.0mgオクトキシノール-10(TRITON X-100(登録商標))、約0.5 ~ 0.5mg -トコフェリルヒドロジェンスクシネート、約0.1 ~ 1.0mgポリソルベート80(Tween80)、約0.001 ~ 約0.003 µgヒドロコルチゾン、約0.05 ~ 約0.3 µg硫酸ゲンタマイシン(gentamicin)、約0.5 ~ 約2.0 µg鶏卵タンパク質(オボアルブミン)、約25 ~ 75 µgホルムアルデヒド及び約25 ~ 75 µgデオキシコール酸ナトリウムを含むスプリットウイルスワクチンが、本明細書で提供される。

10

【0269】

具体的な実施態様では、本明細書で提供されるスプリットウイルスワクチンは、45 µgの本明細書で提供されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド(複数可)、0.085mg以下のオクトキシノール-10(TRITON X-100(登録商標))、0.1mg以下の -トコフェリルヒドロジェンスクシネート、0.415mg以下のポリソルベート80(Tween80)、0.0016 µg以下のヒドロコルチゾン、0.15 µg以下の硫酸ゲンタマイシン、1.0以下の鶏卵タンパク質(オボアルブミン)、50 µg以下のホルムアルデヒド及び50 µg以下のデオキシコール酸ナトリウムを含む0.5ml用量を含むか又はそれからなる。一部の実施態様では、0.5ml用量のサブユニットワクチンは、充填済み注射器にバックされる。

20

【0270】

具体的な実施態様では、スプリットウイルスワクチンは、胚含有鶏卵で増殖させたインフルエンザウイルスを用いて調製される。別の具体的な実施態様では、スプリットウイルスワクチンは、胚含有鶏卵で増殖させなかったインフルエンザウイルスを用いて調製される。別の具体的な実施態様では、スプリットウイルスワクチンは、哺乳動物細胞、例えば不死化ヒト細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第07/045674号として公開された国際出願PCT/EP2006/067566を参照)、又はMDCK細胞などのイヌ腎臓細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第08/032219号として公開された国際出願PCT/IB2007/003536を参照)で増殖させたインフルエンザウイルスを用いて調製される。

30

【0271】

(5.11.5 アジュバント)

特定の実施態様では、本明細書に記載される組成物は、アジュバントを含むか、又はそれと併用投与される。本明細書に記載される組成物との併用投与のためのアジュバントは、前記組成物の投与の前、同時又は後に投与されてもよい。一部の実施態様では、用語「アジュバント」は、本明細書に記載される組成物と一緒に又はその一部として投与される場合、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドへの免疫応答を増強、強化及び/又はブーストするが、その化合物が単独で投与される場合にはポリペプチドに対する免疫応答を起こさせない化合物を指す。一部の実施態様では、アジュバントはポリペプチドへの免疫応答を起こさせ、アレルギー又は他の有害反応を起こさせない。アジュバントは、例えば、リンパ球動員、B及び/又はT細胞の刺激、並びにマクロファージの刺激を含むいくつかの機構によって、免疫応答を増強することができる。

40

【0272】

特定の実施態様では、アジュバントは、応答の定性的形態に影響するポリペプチドの立体配置的变化を引き起こすことなく、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに対する固有の応答を増強する。アジュバントの具体例には、アルミニウム塩(ミョウバン)(例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム及び硫酸アルミニウム)、3デ-0-アシル化-リン酸化リポドA(monophosphoryl lipid)(MPL)(英国特許第2220211号を参照)、MF59(Novartis)、AS03(GlaxoSmithKline)、AS04(GlaxoSmithKline)、ポリソルベート80(Tween 80; ICL Americas社)、イミダゾピリジン化合物(国際公報国際公開第2007/109812号として公開された国際出願PCT/US2007/064857を参照)、イミダゾキノキサリン化合物(

50

国際公報国際公開第2007/109813号として公開された国際出願PCT/US2007/064858を参照)及びサポニン、例えばQS21(Kensilらの文献、ワクチンの設計:サブユニット及びアジュバント手法(Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach)(Powell及びNewman編、Plenum Press、NY、1995);米国特許第5,057,540号を参照)が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施態様では、アジュバントは、フロイントアジュバント(完全又は不完全)である。他のアジュバントは、任意選択で一リン酸化リピドAなどの免疫賦活剤と組み合わせ、水中油乳濁液(例えばスクアレノール又は落花生油)である(Stouteらの文献(N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997))を参照)。別のアジュバントは、CpGである(Bioworld Today、1998年11月15日)。そのようなアジュバントは、他の特異的免疫賦活剤、例えばMPL若しくは3-DMP、QS21、重合体若しくは単量体のアミノ酸、例えばポリグルタミン酸若しくはポリリジン、又は上のセクション5.4に記載される他の免疫強化剤と一緒に、又はそれ無しで用いることができる。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの異なる製剤が異なるアジュバントを含むことができること、又は同じアジュバントを含むことができることを理解すべきである。

10

【0273】

(5.12 予防及び治療用途)

一態様では、活性化化合物、すなわち本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、そのようなポリペプチドを含むか又は発現するベクター(例えば、ウイルスベクター又は細菌)或いはそのようなポリペプチドで刺激された細胞を利用して対象で免疫応答を誘導する方法が、本明細書で提供される。具体的な実施態様では、対象でインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザウイルス血球凝集素ステムドメインポリペプチド又はその免疫原性組成物の有効量を投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸又はその免疫原性組成物の有効量を投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含有若しくは発現するウイルスベクター又はその免疫原性組成物の有効量を投与することを含む。さらに別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドで刺激された細胞又はその医薬組成物の有効量を投与することを含む。特定の実施態様では、本方法で用いられるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、哺乳動物細胞、植物細胞又は昆虫細胞に由来する精製されたインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドである。

20

30

【0274】

具体的な実施態様では、対象でインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載されるサブユニットワクチンを投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載されるウイルス生ワクチンを投与することを含む。特定の実施態様では、ウイルス生ワクチンは、弱毒化ウイルスを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される不活化ウイルスワクチンを投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載されるウイルス様粒子ワクチンを投与することを含む。別の実施態様では、イン

40

50

フルエンザ血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載されるピロゾームを投与することを含む。別の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するか若しくは発現するように改変された細菌又はその組成物を投与することを含む。特定の実施態様では、本方法で用いられるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、哺乳動物細胞、植物細胞又は昆虫細胞に由来する精製されたインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドである。

【0275】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルスのいかなるサブタイプ又は株に起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのにも有効である。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、1つのHA群(例えば、H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13及びH16を含む群1)に属し、他のHA群(例えば、H3、H4、H7、H10、H14及びH15を含む群2)に属さないインフルエンザウイルスのサブタイプに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効である。例えば、誘導される免疫応答は、H11、H13、H16、H9、H8、H12、H6、H1、H5及びH2からなるHA群に属するインフルエンザウイルスに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効であり得る。或いは、誘導される免疫応答は、H3、H4、H14、H10、H15及びH7からなるHA群に属するインフルエンザウイルスに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効であり得る。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルスの1、2、3、4又は5つのサブタイプに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効である。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルスの6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15のサブタイプに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効である。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルスの同じサブタイプ内の1つ以上の変異体に起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効である。

【0276】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、H1N1及びH2N2の両サブタイプに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効である。他の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、H1N1及びH2N2の両サブタイプに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効でない。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、H1N1、H2N2及びH3N2のサブタイプに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効である。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、H3N2サブタイプに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効である。他の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、H3N2サブタイプに起因するインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療するのに有効でない。

【0277】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルスのいかなるサブタイプ又は株に起因するインフルエンザウイルス疾患も予防及び/又は治療するのに有効である。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、1つのHA群に属し、他のHA群に属さないインフルエンザウイルスのサブタイプに起因するインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療するのに有効である。例えば、誘導される免疫応答は

、H11、H13、H16、H9、H8、H12、H6、H1、H5及びH2からなるHA群に属するインフルエンザウイルスに起因するインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療するのに有効であり得る。或いは、誘導される免疫応答は、H3、H4、H14、H10、H15及びH7からなるHA群に属するインフルエンザウイルスに起因するインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療するのに有効であり得る。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルスの1、2、3、4又は5つのサブタイプのいずれかに起因するインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療するのに有効である。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルスの6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15のサブタイプのいずれかに起因するインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療するのに有効である。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルスの同じサブタイプ内の1つ以上の変異体に起因するインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療するのに有効である。

10

【0278】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルス疾患/感染から生じる症状を低減するのに有効である。インフルエンザウイルス疾患/感染の症状には、体の痛み(特に関節及び咽喉)、発熱、吐き気、頭痛、炎症を起こした目、疲労、咽喉炎、赤くなった目又は皮膚、及び腹痛が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0279】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルス疾患/感染に罹っている対象の入院を低減するのに有効である。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物によって誘導される免疫応答は、インフルエンザウイルス疾患/感染に罹っている対象の入院期間を短縮するのに有効である。

【0280】

別の態様では、活性化化合物(例えば、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、そのようなポリペプチドを含むか若しくは発現するベクター、又はそのようなポリペプチドで刺激された細胞)或いは本明細書に記載される組成物を利用して対象でインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療する方法が、本明細書で提供される。一実施態様では、対象でインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、そのようなポリペプチドを含むか若しくは発現するベクター、又は上のいずれか1つの組成物を投与することを含む。具体的な実施態様では、対象でインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、サブユニットワクチン、ウイルス生ワクチン、不活化ウイルスワクチン、スプリットウイルスワクチン又はウイルス様粒子ワクチンを投与することを含む。

30

【0281】

別の態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、そのようなポリペプチドを含むか若しくは発現するベクター、又はそのようなポリペプチドで刺激された細胞を利用して対象でインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療する方法が、本明細書で提供される。具体的な実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド又はその免疫原性組成物の有効量を投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸又はその免疫原性組成物の有効量を投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予

40

50

防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含有若しくは発現するウイルスベクター又はその免疫原性組成物の有効量を投与することを含む。さらに別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドで刺激された細胞又はその医薬組成物の有効量を投与することを含む。

【0282】

具体的な実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載されるサブユニットワクチンを投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載されるウイルス生ワクチンを投与することを含む。特定の実施態様では、ウイルス生ワクチンは、弱毒化ウイルスを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される不活化ウイルスワクチンを投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載されるスプリットウイルスワクチンを投与することを含む。別の実施態様では、インフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載されるウイルス様粒子ワクチンを投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載されるピロゾームを投与することを含む。別の実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するか若しくは発現するように改変された細菌又はその組成物を投与することを含む。

【0283】

別の態様では、本明細書に記載される中和抗体を投与することによって、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療する方法が、本明細書で提供される。具体的な実施態様では、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される中和抗体、又はその医薬組成物の有効量を投与することを含む。特定の実施態様では、中和抗体はモノクローナル抗体である。特定の実施態様では、中和抗体は、CR6261、CR6325、CR6329、CR6307、CR6323、2A、D7、D8、F10、G17、H40、A66、D80、E88、E90、H98、C179(FERM BP-4517)、A13C(FERM BP-4516)、又はEkiert DCらの文献(2009、高度に保存されたインフルエンザウイルスエピトープの抗体認識(Antibody Recognition of a Highly Conserved Influenza Virus Epitope)。Science(2009年2月26日にScience Expressに発表された));Kashyapらの文献(2008、トルコのH5N1鳥インフルエンザ大発生の生存者からの組合せ抗体ライブラリーはウイルス中和戦略を明らかにする(Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies)。Proc Natl Acad Sci USA 105: 5986-5991);Suiらの文献(2009、鳥及びヒトインフルエンザA型ウイルスの広範囲中和のための構造的及び機能的基礎(Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses)。Nat Struct Mol Biol 16: 265-273);米国特許第5,589,174号、第5,631,350号、第6,337,070号及び第6,720,409号;国際公報国際公開第2007/134237号として公開された国際出願PCT/US2007/068983;国際公報国際公開第2009/036157号として公開された国際出願PCT/US2008/075998;国際公報国際公開第2008/028946号として公開された国際出願PCT/EP2007/059356;並びに国際公報国際公開第2009/079259号として公開された国際出願PCT/US2008/085876に記載されるいかなる他の抗体でない。他の実施態様では、中和抗体は、Wangらの文献(2010、「異なる血球凝集素による逐次的免疫化の後のH3インフルエンザウイルスに対する広範囲防御モノクローナル抗体(Broadly Protective Monoclonal Antibodies against H3 Influenza Viruses following Sequential Immunization with Different Hemagglutinins)」、PLOS Pathogens 6(2): 1-9)に記載される抗体でない。

【0284】

特定の実施態様では、本明細書で提供される、対象(例えば、ヒト又はヒト以外の動物)でインフルエンザウイルスによる疾患又は感染を予防又は治療する方法は、当業者に公知であって本明細書に記載されるインビボ及びインビトロアッセイによって測定されるように、対象でのインフルエンザウイルスの複製の減少をもたらす。一部の実施態様では、インフルエンザウイルスの複製は、約1log以上、約2log以上、約3log以上、約4log以上、約5log以上、約6log以上、約7log以上、約8log以上、約9log以上、約10log以上、1~3log、1~5log、1~8log、1~9log、2~10log、2~5log、2~7log、2log~8log、2~9log、2~10log、3~5log、3~7log、3~8log、3~9log、4~6log、4~8log、4~9log、5~6log、5~7log、5~8log、5~9log、6~7log、6~8log、6~9log、7~8log、7~9log又は8~9log 10

【0285】

(5.12.1 併用療法)

様々な態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、そのようなポリペプチドを含むか若しくは発現するベクター(例えば、ウイルスベクター若しくは細菌)、そのようなポリペプチドで刺激された細胞、又は中和抗体は、対象に対して1つ以上の他の療法(例えば、抗ウイルス、抗細菌若しくは免疫調節療法)と併用投与されてもよい。一部の実施態様では、本明細書に記載される医薬組成物(例えば、免疫原性組成物)は、対象に1つ以上の療法と併用投与されてもよい。1つ以上の他の療法は、インフルエンザウイルス疾患の治療若しくは予防に役立つことができるか、又はインフルエンザウイルス疾患に付随する症状若しくは状態を改善することができる。一部の実施態様では、1つ以上の他の療法は、鎮痛剤、解熱薬又は呼吸を楽にするか若しくは助ける療法である。特定の実施態様では、療法は、5分未満間隔、30分未満間隔、1時間間隔、約1時間間隔、約1~約2時間間隔、約2時間~約3時間間隔、約3時間~約4時間間隔、約4時間~約5時間間隔、約5時間~約6時間間隔、約6時間~約7時間間隔、約7時間~約8時間間隔、約8時間~約9時間間隔、約9時間~約10時間間隔、約10時間~約11時間間隔、約11時間~約12時間間隔、約12時間~18時間間隔、18時間~24時間間隔、24時間~36時間間隔、36時間~48時間間隔、48時間~52時間間隔、52時間~60時間間隔、60時間~72時間間隔、72時間~84時間間隔、84時間~96時間間隔又は96時間~120時間間隔で投与される。具体的な実施態様では、2つ以上の療法が、同じ患者訪問中に投与される。 20

【0286】

当業者に周知である任意の抗ウイルス剤を、本明細書に記載される活性化化合物又は医薬組成物と併用することができる。抗ウイルス剤の非限定例には、その受容体へのウイルスの付着、細胞内へのウイルスの内化、ウイルスの複製又は細胞からのウイルスの放出を阻害及び/又は低減させる、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質抗体、核酸分子、有機分子、無機分子、及び小分子が含まれる。詳細には、抗ウイルス剤には、それらに限定されないが、ヌクレオシド類似体(例えば、ジドブジン、アシクロビル、ガンシクロビル、ビダラビン、イドクスウリジン、トリフルリジン及びリバビリン)、フォスカーネット、アマンタジン、ペラミビル、リマンタジン、サキナビル、インジナビル、リトナビル、インターフェロン及び他のインターフェロン、AZT、ザナミビル(Relenza(登録商標))及びオセルタミビル(Tamiflu(登録商標))が含まれる。他の抗ウイルス剤には、インフルエンザウイルスワクチン、例えばFluarix(登録商標)(GlaxoSmithKline)、FluMist(登録商標)(MedImmune Vaccines)、Fluvirin(登録商標)(Chiron社)、Flulaval(登録商標)(GlaxoSmithKline)、Afluria(登録商標)(CSL Biotherapies社)、Agriflu(登録商標)(Novartis)又はFluzone(登録商標)(Aventis Pasteur)が含まれる。 40

【0287】

具体的な実施態様では、抗ウイルス剤はウイルス抗原に特異的である免疫調節剤である。特定の実施態様では、ウイルス抗原は、血球凝集素ポリペプチド以外のインフルエンザウイルスポリペプチドである。他の実施態様では、ウイルス抗原は、インフルエンザウイ 50

ルス血球凝集素ポリペプチドである。

【0288】

当業者に公知である任意の抗細菌剤を、本明細書に記載される活性化合物又は医薬組成物と併用することができる。抗細菌剤の非限定例には、アミカシン、アモキシシリン、アモキシシリン-クラブラン酸、アンホテリシンB、アンピシリン、アンピシリン(Ampicillin)-スルバクタム、アブラマイシン、アジスロマイシン、アズトレオナム、バシトラシン、ベンジルペニシリン、カスポファンギン、セファクロル、セファドロキシル、セファレキシン、セファロチン、セファゾリン、セフジニル、セフェピム、セフィキシム、セフメノキシム、セフォペラゾン、セフォペラゾン-スルバクタム、セフォタキシム、セフォキシチン、セフピロム、セフポドキシム、セフポドキシム-クラブラン酸、セフポドキシム-スルバクタム、セフプロジル、セフキノム、セフタジジム、セフチブテン(Ceftibutin)、セフチオフル、セフトピブロール、セフトリアキソン、セフロキシム、クロラムフェニコール、フロルフエニコール、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリナフロキサシン、クリンダマイシン、クロキサシリン、コリスチン、コトリモキサゾール(トリムトプリム/スルファメトキサゾール)、ダルババンシン、ダルフォプリスチン/キノプリスチン、ダプトマイシン、ジベカシン、ジクロキサシリン、ドリベネム、ドキシサイクリン、エンロフロキサシン、エルタベネム、エリスロマイシン、フルクロキサシリン、フルコナゾール、フルシトシン、ホスホマイシン、フシジン酸、ガレノキサシン、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、ゲンタマイシン、イミベネム、イトラコナゾール、カナマイシン、ケトコナゾール、レボフロキサシン、リンコマイシン、リネゾリド、ロラカルベフ、メルナム(アムジノシリン)、メロペネム、メトロニダゾール、メジオシリン、メズロシリン-スルバクタム、ミノサイクリン、モキシフロキサシン、ムピロシン、ナリジキシム酸、ネオマイシン、ネチルマイシン、ニトロフラントイン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オキサシリン、ペフロキサシン、ペニシリンV、ピペラシリン、ピペラシリン-スルバクタム、ピペラシリン-タゾバクタム、リファンピシン、ロキシスロマイシン、スパルフロキサシン、スペクチノマイシン、スピラマイシン、ストレプトマイシン、スルバクタム、スルファメトキサゾール、テイコプラニン、テラバンシン、テリスロマイシン、テモシリン、テトラサイクリン、チカルシリン、チカルシリン-クラブラン酸、チゲサイクリン、トブラマイシン、トリメトプリム、トロバフロキサシン、タイロシン、バンコマイシン、バージニアマイシン及びポリコナゾール。

10

20

30

【0289】

一部の実施態様では、併用療法は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、又はセクション5.2~5.7に記載の1つ以上のベクターによる能動免疫、及びセクション5.9に記載の1つ以上の中和抗体による受動免疫を含む。一部の実施態様では、併用療法は、セクション5.2~5.7に記載の1つ以上のベクターによる免疫化、及びセクション5.9に記載の細胞の投与(例えば、養子移入による)を含む。

【0290】

一部の実施態様では、併用療法は、セクション5.2~5.7に記載される2つ以上の異なるベクターの投与を含む。一例では、インフルエンザA型ウイルス血球凝集素ポリペプチドに由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現する1つ以上のベクター、及びインフルエンザB型ウイルス血球凝集素ポリペプチドに由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現する1つ以上のベクターが、併用投与される。一部の実施態様では、併用療法は、インフルエンザA型ウイルスH3抗原に由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するベクター、及びインフルエンザA型ウイルスH1抗原に由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するベクターの投与を含む。一部の実施態様では、併用療法は、インフルエンザA型ウイルスH3抗原に由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するベクター、インフルエンザA型ウイルスH1抗原に由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現するベクター、及びインフルエンザB型ウイルス血球凝集素ポリペプチドに由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポ

40

50

リペプチドを発現するベクターの投与を含む。

【0291】

一部の実施態様では、併用療法は、他のHA群(例えば、群2)の1、2、3又はそれ以上のHAサブタイプへの免疫応答を誘導する活性化化合物と組み合わせた、1つのHA群(例えば、群1)の1、2、3又はそれ以上のHAサブタイプへの免疫応答を誘導する活性化化合物による能動免疫を含む。

【0292】

一部の実施態様では、併用療法は、セクション5.1に記載の2つ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドによる能動免疫を含む。

【0293】

特定の実施態様では、併用療法は、インフルエンザA型ウイルスに由来する1、2又はそれ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、及びインフルエンザB型ウイルスに由来する1つ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドによる能動免疫を含む。

【0294】

(5.12.2 患者集団)

特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、ナイーブな対象、すなわち、インフルエンザウイルス感染に起因する疾患を有しないか、又はインフルエンザウイルス感染症に感染したことがなく、現在感染していない対象に投与することができる。一実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、インフルエンザウイルス感染を得る危険のあるナイーブな対象に投与される。一実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが免疫応答を誘導する、特定のインフルエンザウイルスに起因する疾患を有していないか、又は特定のインフルエンザウイルスに感染したことがなく、且つ感染していない対象に投与される。本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが免疫応答を誘導する、インフルエンザウイルス又はインフルエンザウイルスの別の型、サブタイプ若しくは株に感染している対象、及び/又は感染したことがある対象に投与されてもよい。

【0295】

特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、インフルエンザウイルス感染と診断された患者に投与される。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、症状が明らかになるか又は症状が重くなる前に(例えば、患者が入院を必要とする前に)、インフルエンザウイルス感染患者に投与される。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、その活性化化合物又は組成物のHAステムドメインポリペプチドが由来するインフルエンザウイルスのそれと異なる型のインフルエンザウイルスに感染しているか又はそれと診断された患者に投与される。

【0296】

特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドのそれと同じHA群に属するインフルエンザウイルスに感染し得る患者又はそれに感染している患者に投与される。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドのそれと同じサブタイプのインフルエンザウイルスに感染し得る患者又はそれに感染している患者に投与される。

【0297】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物を投与される対象は、動物である。特定の実施態様では、動物は鳥である。特定の実施態様では、動物はイヌである。特定の実施態様では、動物はネコである。特定の実施態様では、動物はウマである。特定の実施態様では、動物はウシである。特定の実施態様では、動物は哺乳動物、例えばウマ、ブタ、マウス又は霊長類、好ましくはヒトである。

【0298】

10

20

30

40

50

特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与される対象は、ヒト成体である。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与される対象は、50歳を超えるヒト成体である。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与される対象は、高齢のヒト成体である。

【0299】

特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与される対象は、ヒト児童である。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与される対象は、ヒト幼児である。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物が投与される対象は、月齢6カ月未満の幼児でない。具体的な実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与される対象は、2歳以下である。

10

【0300】

具体的な実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与される対象は、月齢6カ月を超えるあらゆる幼児又は児童、及び50歳を超えるあらゆる成体である。他の実施態様では、対象は妊娠個体である。別の実施態様では、対象は、インフルエンザ時期(例えば、11月から4月まで)の間に妊娠している可能性がある個体又は妊娠する個体である。具体的な実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与される対象は、1、2、3、4、5、6、7又は8週前に出産した女性である。

【0301】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与されるヒト対象は、インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス感染から生じる疾患の危険が高いあらゆる個体である(例えば、免疫障害又は免疫不全の個体)。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与されるヒト対象は、インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス感染から生じる疾患の危険が高い個体(例えば、免疫障害又は免疫抑制の個体)と近くで接触するあらゆる個体である。

20

【0302】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与されるヒト対象は、インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス感染から生じる合併症若しくは疾患への感受性を高めるあらゆる状態に影響される個体である。他の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物は、インフルエンザウイルス感染が、個体が影響されるか又はその危険がある別の状態の合併症を増加させる可能性を有する対象に投与される。特定の実施態様では、インフルエンザウイルス合併症への感受性を高めるそのような状態、又はその状態に付随する合併症をインフルエンザウイルスが増加させる状態は、例えば肺を侵す状態、例えば嚢胞性線維症、気腫、喘息又は細菌感染症(例えば、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)及びトラコーマ病原体(*Chlamydia trachomatis*)に起因する感染症);心血管疾患(例えば、先天性心臓疾患、うっ血心不全及び冠状動脈疾患);内分泌障害(例えば、糖尿病)、神経学的及びニューロン発達上の状態(例えば、脳、脊髄、末梢神経及び筋肉(例えば脳性麻痺、癲癇(発作疾患)、脳卒中、知的障害(例えば、精神遅滞)、筋ジストロフィー及び脊髄損傷)の障害)である。

30

【0303】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与されるヒト対象は、療養所などのグループホームに在住する個体である。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与されるヒト対象は、グループホーム、例えば療養所で勤務するか又はかなりの時間を過ごす。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与されるヒト対象は、医療従事者(例えば、医師又は看護師)である。一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与されるヒト対象は、喫煙者である。具体的な実施態様では、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与されるヒト対象は、免疫障害又は免疫抑制を起こしている。

40

【0304】

さらに、本明細書に記載される活性化合物又は組成物を投与することができる、インフ

50

ルエンザの合併症を発症する危険が高い対象には、以下の者が含まれる：合併症の危険が高い者にインフルエンザウイルスを伝染させることのできる個体、例えば、6カ月未満の幼児を含む家庭を含む、高リスクの個体のいる家の家族、6カ月未満の幼児と接触する個体、又は療養所若しくは他の長期療養施設に住む個体と接触する個体；肺、心臓又は循環の長期障害をもつ個体；代謝疾患(例えば、糖尿病)の個体；腎臓障害をもつ個体；血液障害(貧血又は鎌状赤血球症を含む)をもつ個体；弱くなった免疫系(医薬品、悪性腫瘍、例えば癌、臓器移植又はHIV感染に起因する免疫抑制を含む)の個体；長期アスピリン療法を投与され(したがって、インフルエンザに感染した場合、ライ症候群を起こす可能性の高い)児童。

【0305】

他の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物の投与の対象には、以下の、生後6カ月以上の健康な個体が含まれる：インフルエンザの大発生が起こり得る外国及び地域、例えば熱帯域及び4月から9月にかけての南半球に旅行する予定のある者；インフルエンザウイルスが循環している世界の地域からの者を含み得る大きな組織化観光団の一部として旅行する者；学校又は大学に通い、寄宿舎に住むか、又は施設環境に住む者；或いは、インフルエンザで病気になる危険を減らしたい者。

【0306】

一部の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物の投与が禁忌である対象には、インフルエンザワクチン接種が禁忌である以下のあらゆる個体が含まれる：生後6カ月未満の幼児；及び免疫原性製剤の生産で用いられる卵、卵製品又は他の成分に対してアナフィラキシー反応(ショックがしばしば続発する呼吸困難を引き起こすアレルギー反応)を経験した個体。特定の実施態様では、本明細書に記載される活性化化合物又は組成物の投与が、免疫原性製剤の生産で用いられる1つ以上の成分のために(例えば、卵又は卵製品の存在のために)禁忌である場合、活性化化合物又は組成物は、活性化化合物又は組成物の投与を禁忌にさせる成分を含まない方法で生産することができる(例えば、活性化化合物又は組成物は、卵又は卵製品を使わずに生産することができる)。

【0307】

一部の実施態様では、以下の患者集団の1つ以上にウイルス生ワクチンを投与しないことが望ましいであろう：高齢者；生後6カ月未満の幼児；妊娠個体；1歳未満の幼児；2歳未満の児童；3歳未満の児童；4歳未満の児童；5歳未満の児童；20歳未満の成体；25歳未満の成体；30歳未満の成体；35歳未満の成体；40歳未満の成体；45歳未満の成体；50歳未満の成体；70歳を超える高齢者；75歳を超える高齢者；80歳を超える高齢者；85歳を超える高齢者；90歳を超える高齢者；95歳を超える高齢者；その年齢層でのアスピリン及び野生型インフルエンザウイルス感染に関連する合併症のために、アスピリン又はアスピリン含有医薬品を投与されている児童及び若者(2~17歳)；喘息又は他の反応性気道疾患の病歴をもつ個体；重度のインフルエンザ感染の素因となることがある慢性の根底にある医学的状态をもつ個体；ギランバレー症候群の病歴をもつ個体；発熱を伴う急性の重大な疾患がある個体；又は中程度若しくは重度の病気である個体。そのような個体については、本明細書に記載される不活化ウイルスワクチン、スプリットウイルスワクチン、サブユニットワクチン、ピロゾーム、ウイルス様粒子又は非ウイルスベクターの投与が好ましいであろう。特定の実施態様では、ウイルス生ワクチンを投与されるのが好ましい対象には、2~17歳の健康な児童及び若者、並びに18~49歳の健康な成体が含まれてもよい。

【0308】

特定の実施態様では、生きているウイルスベクターを含む免疫原性製剤は、他のウイルス生ワクチンと同時に与えられない。

【0309】

(5.13 投与様式)

(5.13.1 送達経路)

本明細書に記載される活性化化合物又は組成物は、様々な経路によって対象に送達することができる。これらには、それらに限定されないが、鼻内、気管内、経口、皮内、筋肉内

10

20

30

40

50

、腹腔内、経皮、静脈内、結膜内及び皮下経路が含まれる。一部の実施態様では、組成物は局所投与のために、例えば皮膚への塗布のために製剤化される。具体的な実施態様では、投与経路は、鼻内、例えば鼻内噴霧の一部である。特定の実施態様では、組成物は、筋内投与のために製剤化される。一部の実施態様では、組成物は、皮下投与のために製剤化される。特定の実施態様では、組成物は、注射による投与のために製剤化されない。ウイルス生ワクチンのための具体的な実施態様では、ワクチンは、注射以外の経路による投与のために製剤化される。

【0310】

例えば抗原がウイルスベクター、ウイルス様粒子ベクター又は細菌ベクターである場合、ベクターが由来する骨格ウイルス又は細菌の天然の感染経路を通して免疫原性組成物を導入することが好ましいと考えられる。或いは、ポリペプチドが由来するインフルエンザウイルスの天然の感染経路を通して、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを導入することが好ましいと考えられる。激しい分泌性及び細胞性免疫応答を誘発する抗原、特にウイルスベクターの能力を、有利に用いることができる。例えば、ウイルスベクターによる呼吸器官の感染は、インフルエンザウイルスに対する同時保護を伴い、例えば泌尿器系で強い分泌性免疫応答を誘導することができる。さらに、好ましい実施態様では、任意の適する経路によって医薬組成物を肺に導入することが望ましいと考えられる。肺投与は、例えば、吸入器又はネブライザー、及び噴霧剤として用いるためのエアゾール化剤による製剤の使用によって採用することもできる。

10

【0311】

具体的な実施態様では、サブユニットワクチンは筋内に投与される。別の実施態様では、生きているインフルエンザウイルス又はNDV生ワクチンは、鼻腔内に投与される。別の実施態様では、不活化インフルエンザウイルスワクチン又はスプリットインフルエンザウイルスワクチンは、筋内に投与される。別の実施態様では、不活化NDVウイルスワクチン又はスプリットNDVウイルスワクチンは、筋内に投与される。別の実施態様では、ウイルス様粒子又はその組成物は、筋内に投与される。

20

【0312】

一部の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドによってインビトロで刺激された細胞は、当業者に公知である技術を用いて対象に導入(又は再導入)することができる。一部の実施態様では、細胞は真皮内に、真皮下に、又は末梢血流に導入されてもよい。一部の実施態様では、対象に導入される細胞は、有害な免疫応答を回避するために、好ましくはその対象に由来する細胞である。他の実施態様では、類似した免疫バックグラウンドを有するドナー宿主に由来する細胞も、用いることができる。有害な免疫原性応答を回避するように設計されるものを含む、他の細胞も用いることができる。

30

【0313】

(5.13.2 投与の薬量及び頻度)

インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患の治療及び/又は予防で有効である活性化合物又は組成物の量は、疾患の性質に依存し、標準の臨床技術で決定することができる。

40

【0314】

製剤で使用される正確な用量は、投与経路、及びそれに起因する感染又は疾患の重症度にも依存するので、臨床医の判断及び各対象の状況に従って決定されるべきである。例えば、有効量は、投与手段、標的部位、患者の生理的状态(年齢、体重、健康を含む)、患者がヒトであるか動物であるか、投与される他の医薬品、及び治療が予防的であるか治療的であるかによって異なってもよい。通常、患者はヒトであるが、遺伝子導入哺乳動物を含むヒト以外の哺乳動物を治療することもできる。治療薬量は、安全性及び有効性を最適化するために、最適に滴定される。

【0315】

特定の実施態様では、最適薬量範囲を特定するのに助けるために、インビトロアッセイ

50

が使用される。有効量は、インビトロ又は動物モデル試験系から誘導される、用量反応曲線から推定することができる。

【0316】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする核酸の例示的な用量の範囲は、患者につき約10ng~1g、100ng~100mg、1 μ g~10mg、又は30~300 μ gの核酸、例えばDNAである。

【0317】

特定の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド(例えば、スプリットウイルスクチン及びサブユニットワクチンで提供されるもの)の例示的な用量の範囲は、患者1キログラムにつき約5 μ g~100mg、15 μ g~50mg、15 μ g~25mg、15 μ g~10mg、15 μ g~5mg、15 μ g~1mg、15 μ g~100 μ g、15 μ g~75 μ g、5 μ g~50 μ g、10 μ g~50 μ g、15 μ g~45 μ g、20 μ g~40 μ g又は25~35 μ gである。他の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの例示的な用量の範囲は、1用量につき約1 μ g~50mg、5 μ g~50mg、1 μ g~100mg、5 μ g~100mg、15 μ g~50mg、15 μ g~25mg、15 μ g~10mg、15 μ g~5mg、15 μ g~1mg、15 μ g~100 μ g、15 μ g~75 μ g、5 μ g~50 μ g、10 μ g~50 μ g、15 μ g~45 μ g、20 μ g~40 μ g又は25~35 μ gのインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドである。

【0318】

感染性ウイルスベクターの用量は、1用量につきビリオン数が10~100個又はそれ以上の範囲で異なることができる。一部の実施態様では、ウイルスベクターの適する投薬量は、10²、5 \times 10²、10³、5 \times 10³、10⁴、5 \times 10⁴、10⁵、5 \times 10⁵、10⁶、5 \times 10⁶、10⁷、5 \times 10⁷、10⁸、5 \times 10⁸、1 \times 10⁹、5 \times 10⁹、1 \times 10¹⁰、5 \times 10¹⁰、1 \times 10¹¹、5 \times 10¹¹又は10¹²pfuであり、1回、2回、3回又はそれ以上、必要な頻度の間隔で対象に投与することができる。

【0319】

特定の実施態様では、VLPの例示的な用量の範囲は、患者1kgにつき約0.01 μ g~約100mg、約0.1 μ g~約100mg、約5 μ g~約100mg、約15 μ g~約50mg、約15 μ g~約25mg、約15 μ g~約10mg、約15 μ g~約5mg、約15 μ g~約1mg、約15 μ g~約100 μ g、約15 μ g~約75 μ g、約5 μ g~約50 μ g、約10 μ g~約50 μ g、約15 μ g~約45 μ g、約20 μ g~約40 μ g又は約25~約35 μ gである。他の実施態様では、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの例示的な用量の範囲は、1用量につき約1 μ g~約50mg、約5 μ g~約50mg、約1 μ g~約100mg、約5 μ g~約100mg、約15 μ g~約50mg、約15 μ g~約25mg、約15 μ g~約10mg、約15 μ g~約5mg、約15 μ g~約1mg、約15 μ g~約100 μ g、約15 μ g~約75 μ g、約5 μ g~約50 μ g、約10 μ g~約50 μ g、約15 μ g~約45 μ g、約20 μ g~約40 μ g又は約25~約35 μ gのインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドであり、1回、2回、3回又はそれ以上、必要な頻度の間隔で対象に投与することができる。

【0320】

一実施態様では、不活化ワクチンは、それが約5 μ g~約50 μ g、約10 μ g~約50 μ g、約15 μ g~約100 μ g、約15 μ g~約75 μ g、約15 μ g~約50 μ g、約15 μ g~約30 μ g、約20 μ g~約50 μ g、約25 μ g~約40 μ g、約25 μ g~約35 μ gのインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むように製剤化される。そのようなワクチンは、1つ以上の異なるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、例えばインフルエンザA型ウイルスに由来する1つ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド、及びインフルエンザB型ウイルスに由来する1つ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの組合せを含むことができる。一部の実施態様では、例えばA/H1N1、A/H3N2及びB血球凝集素ポリペプチドに由来するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、0.5mL用量が15 μ gの各インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを含むように製剤化される、三価不活化ワクチン(trivalent inactivated vaccine)(TIV)に含まれる。一実施態様では、弱毒化インフルエンザ生ワクチン(live attenuated influenza vaccine)(LAIV)は、0.2mL用量が少なくとも1つのインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現する3株からの生きている弱毒化インフルエンザウイル

スの $10^{6.5} \sim 7.5$ の蛍光焦点単位を含むように製剤化される。

【0321】

特定の実施態様では、活性化化合物又は組成物は、単一用量として1回、対象に投与される。特定の実施態様では、活性化化合物又は組成物は、単一用量として、続いて3~6週後に2回目の用量として対象に投与される。これらの実施態様に従って、2回目の接種に続いて6~12カ月間隔で、追加抗原刺激接種を対象に投与することができる。特定の実施態様では、追加抗原刺激接種は、異なる活性化化合物又は組成物を利用することができる。一部の実施態様では、同じ活性化化合物又は組成物の投与は繰り返されてもよく、投与は、少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2カ月、75日、3カ月又は少なくとも6カ月の間隔であることができる。特定の実施態様では、活性化化合物又は組成物は、単一用量として1年に1回対象に投与される。

10

【0322】

児童への投与のための具体的な実施態様では、少なくとも1カ月間隔で与えられる、活性化化合物又は組成物の2用量が児童に投与される。成体への投与のための具体的な実施態様では、単一用量が与えられる。別の実施態様では、少なくとも1カ月間隔で与えられる、活性化化合物又は組成物の2用量が成体に投与される。別の実施態様では、幼児(6カ月~9歳)は、最初は1カ月間隔で与えられる2用量で活性化化合物又は組成物を投与されてもよい。特定の実施態様では、ワクチン接種の初年度に1用量だけを投与された児童は、翌年には2用量を投与されるべきである。一部の実施態様では、インフルエンザワクチン、例えば本明細書に記載される免疫原性製剤を初めて投与される2~8歳の児童には、4週間隔で投与される2用量が好ましい。特定の実施態様では、生後6~35カ月の児童には、3歳を超える対象に好ましいであろう0.5mlと対照的に、半用量(0.25ml)が好ましいと考えられる。

20

【0323】

特定の実施態様では、活性化化合物又は組成物は、秋又は冬に、すなわち各半球のインフルエンザ時期の前又はその期間中に対象に投与される。一実施態様では、2回目の用量をインフルエンザシーズンのピークの前を与えることができるように、児童は、シーズンの初め、例えば9月遅く、又は10月前半に最初の用量を投与される。

【0324】

抗体による受動免疫については、投薬量は患者体重1kgにつき約0.0001~100mg、より一般的には0.01~5mgの範囲内である。例えば、投薬量は体重1kgにつき1mg若しくは10mg、又は1~10mgの範囲であってよく、換言すると、70kgの患者についてはそれぞれ70mg若しくは700mg、又は70~700mgの範囲であってよい。例示的な治療体系は、1年若しくは数年の間、又は数年間隔で、2週間ごとに1回、又は月に1回、又は3~6カ月ごとに1回の投与を必要とする。一部の方法では、異なる結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、その場合には、投与される各抗体の投薬量は指示される範囲内に入る。抗体は、通常複数の機会に投与される。単一の投薬の間隔は、毎週、毎月、又は毎年であってよい。患者でインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに対する抗体の血液レベルを測定することに示されるように、間隔は不規則であってよい。

30

【0325】

(5.14 生物検定)

(5.14.1 インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの活性を試験するためのアッセイ)

本明細書で開示されるベクターでインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの発現を試験するためのアッセイは、当技術分野で公知である任意のアッセイを用いて実行することができる。例えば、ウイルスベクターへの組込みについてのアッセイは、このセクション又はセクション5.4若しくは5.5に記載されるようにウイルスを生育させること、スクロースクッションを通す遠心分離によってウイルス粒子を精製すること、及び当技術分野で周知である方法を用いる、ウェスタンブロット法などのイムノアッセイによるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド発現についての以降の分析を含む

40

50

。

【0326】

一実施態様では、本明細書で開示されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、当技術分野で公知である抗体抗原相互作用のための任意のアッセイを用いて、ポリペプチドの軸領域などの、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに向けられる中和抗体に特異的に結合するその能力を試験することによって、適切な折畳み及び機能について分析される。そのようなアッセイに用いられる中和抗体には、例えば、Ekiertrらの文献(2009、Science Express、2009年2月26日);Kashyapらの文献(2008、Proc Natl Acad Sci USA 105: 5986-5991);Suiらの文献(2009、Nature Structural and Molecular Biology, 16:265-273);Wangらの文献(2010、PLOS Pathogens 6(2): 1-9);米国特許第5,589,174号、第5,631,350号、第6,337,070号及び第6,720,409号;国際公報国際公開第2007/134237号として公開された国際出願PCT/US2007/068983;国際公報国際公開第2009/036157号として公開された国際出願PCT/US2008/075998;国際公報国際公開第2008/028946号として公開された国際出願PCT/EP2007/059356;及び国際公報国際公開第2009/079259号として公開された国際出願PCT/US2008/085876に記載される中和抗体が含まれる。これらの抗体には、とりわけ、CR6261、CR6325、CR6329、CR6307、CR6323、2A、D7、D8、F10、G17、H40、A66、D80、E88、E90、H98、C179(FERM BP-4517)、A13C(FERM BP-4516)が含まれる。

10

【0327】

別の実施態様では、本明細書で開示されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、当技術分野で公知である任意の方法、例えばNMR、X線結晶学的方法、又は二次構造予測手法、例えば円二色性を用いるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドの構造又は立体構造の判定によって、適切な折畳みについて分析される。

20

【0328】

(5.14.2 インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを用いて生成される抗体の活性を試験するためのアッセイ)

本明細書に記載される抗体は、当業者に公知である様々な方法で特徴づけることができる(例えばELISA、表面プラズモン共鳴ディスプレイ(BIAcore)、ウェスタンブロット、免疫蛍光検査、免疫染色及び/又は微量中和アッセイ)。一部の実施態様では、抗体は、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチド、又は前記ポリペプチドを含むベクターに特異的に結合する能力について分析される。そのようなアッセイは、溶液(例えば、Houghtonの文献(1992、Bio/Techniques 13:412 421))、ビーズ(Lamの文献(1991、Nature 354:82 84))、チップ(Fodorの文献(1993、Nature 364:555 556))、細菌(米国特許第5,223,409号)、胞子(米国特許第5,571,698号;第5,403,484号;及び第5,223,409号)、プラスミド(Cullらの文献(1992、Proc Natl. Acad. Sci. USA 89:1865 1869))、又はファージ(Scott及びSmithの文献(1990、Science 249:386 390);Cwirllaらの文献(1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378 6382);及びFeliciの文献(1991、J. Mol. Biol. 222:301 310))で実施することができる(これらの引用文献の各々は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

30

。

【0329】

インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対する抗体の特異的結合、及び他の抗原との交差反応は、当技術分野で公知である任意の方法によって調査することができる。特異的結合及び交差反応を分析するために用いることができるイムノアッセイには、少し例を挙げれば、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法(enzyme linked immunosorbent assay))、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技術を用いる、競合的及び非競合的アッセイ系が含まれるが、これらに限定されない。そのようなアッセイは常用され、当技術分野で周知である(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ausubelら編の文献(1994、分子生物学における現在のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、1巻、John Wiley & Sons社、New York

40

50

)を参照)。

【0330】

インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対する抗体の結合親和性及び抗体抗原相互作用の解離速度は、競合結合アッセイによって判定することができる。競合結合アッセイの一例は、漸増する量の非標識抗原の存在下での標識抗原(例えば、 ^3H 又は ^{125}I)と対象の抗体とのインキュベーション、及び標識抗原に結合した抗体の検出を含むラジオイムノアッセイである。インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対する抗体の親和性及び結合解離速度は、スキャチャードプロット分析によるデータから判定することができる。二次抗体との競合も、ラジオイムノアッセイを用いて判定することができる。この場合、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドは、漸増する量の非標識二次抗体の存在下で、標識化合物(例えば、 ^3H 又は ^{125}I)に抱合させた試験抗体と一緒にインキュベートされる。

10

【0331】

特定の実施態様では、抗体結合親和性及び速度定数は、KinExA 3000システム(Sapidyne Instruments、Boise、ID)を用いて測定される。一部の実施態様では、表面プラズモン共鳴(例えば、BIAcore動態)解析が、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対する抗体の結合及び解離速度を測定するために用いられる。BIAcore動態解析は、それらの表面にインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドに対する固定化抗体を有するチップからのインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの結合及び解離を分析することを含む。一般的なBIAcore動態試験は、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドが固定されているセンサーチップ表面への、0.005%のTween20を含有するHBS緩衝液中の異なる濃度の250 μL の抗体試薬(mAb、Fab)の注入を含む。流速は、75 $\mu\text{L}/\text{分}$ で一定に保たれる。解離データは、必要に応じて15分間以上収集される。各注入/解離サイクルに続いて、結合抗体は、状況次第では他の再生剤が使用されるが、希酸、一般的に10~100mM HClの短い1分間の投入を用いて、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチド表面から切り離される。より具体的には、結合速度 k_{on} 及び解離速度 k_{off} の測定のために、ポリペプチドは、標準のアミン結合化学作用、すなわちEDC/NHS方法(EDC= N-ジエチルアミノプロピル)-カルボジイミド)を用いることにより、センサーチップ表面に直接固定化される。簡潔には、pH4又はpH5の10mM NaOAc中のポリペプチドの5~100nM溶液が調製され、約30~50RUの相当量のポリペプチドが固定化されるまで、EDC/NHS活性化表面に流される。この後、1MのEt-NH₂の注入によって、未反応の活性エステルが「キャップ」オフされる。参照目的のために、同一の固定化条件の下でポリペプチドが含まれないブランク表面が調製される。適当な表面が調製されると、抗体試薬の各々の適する希釈系がHBS/Tween-20で調製され、直列に連結されているポリペプチド及び参照細胞表面に流される。調製される抗体濃度の範囲は、平衡結合定数 K_D の推定値によって異なる。上に述べたように、結合抗体は適当な再生剤を用いて、各注入/解離サイクルの後に切り離される。

20

30

【0332】

抗体の中和活性は、当業者に公知である任意のアッセイを利用して測定することができる。本明細書に記載される抗体は、当業者に公知である技術を用いて、その宿主細胞受容体(すなわち、シアル酸)への、インフルエンザウイルス、又はインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドを含む任意の他の組成物(例えば、VLP、リボソーム若しくは界面活性剤抽出物)の結合を阻害するそれらの能力について分析することができる。例えば、インフルエンザウイルス受容体を発現する細胞は、抗体の存在下又は不在下でインフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドを含む組成物と接触させることができ、抗原の結合を阻害する抗体の能力は、例えばフローサイトメトリー又はシンチレーションアッセイで測定することができる。インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチド又は抗体を含む組成物は、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドを含む組成物と細胞受容体との間の相互作用の検出を可能にするために、放射性標識(例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 及び ^{125}I)又は蛍光標識(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒド及びフルオレサミン)などの検出

40

50

可能な化合物で標識することができる。或いは、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドのその受容体との結合を阻害する抗体の能力は、無細胞アッセイで測定することができる。例えば、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドを含む組成物を抗体と接触させることができ、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドを含む組成物の細胞受容体との結合を阻害する抗体の能力を測定することができる。具体的な実施態様では、抗体は固体支持体上に固定化され、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドを含む組成物は検出可能な化合物で標識される。或いは、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドを含む組成物は固体支持体上に固定化され、抗体は検出可能な化合物で標識される。特定の実施態様では、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの細胞受容体との結合を阻害する抗体の能力は、対照(例えば、インフルエンザウイルス血球凝集素ポリペプチドの細胞受容体との結合を阻害することが公知である抗体)と比較したときの抗体の結合阻害率を調査することによって測定される。

10

【0333】

他の実施態様では、本明細書に記載される方法で使用するのに適する抗体は、インフルエンザウイルスの受容体結合を阻害しないが、本明細書に記載されるアッセイにおいて中和することが見出される。一部の実施態様では、本明細書に記載される方法に従って使用するのに適する抗体は、当技術分野で公知であるか又は本明細書に記載されるアッセイにおいて、ウイルスと宿主膜との融合を低減又は阻害する。

【0334】

一実施態様では、ウイルスと宿主膜との融合は、リポーターを含むインフルエンザウイルス及びウイルスに感染することができる宿主細胞を用いるインビトロアッセイで分析される。リポーター活性が陰性対照(例えば、対照抗体の存在下又は抗体の不在下でのリポーター活性)と比較して阻害又は低減されている場合、抗体は融合を阻害する。

20

【0335】

一実施態様では、ウイルスと宿主膜との融合は、細胞融合のモデル系を用いて検出される。例示的な細胞融合アッセイでは、細胞(例えば、HeLa細胞)はインフルエンザ血球凝集素ポリペプチドをコードするプラスミドでトランスフェクトされ、抗体の存在下で血球凝集素ポリペプチド融合機能を可能にする緩衝液(例えば、pH5.0緩衝液)に接触及び曝露させられる。陰性対照(例えば、対照抗体の存在下又は抗体の不在下でのシンシチウム形成)と比較してそれがシンシチウム形成を低減又は阻害する場合、抗体は中和性である。

30

【0336】

他の実施態様では、ウイルスと宿主膜との融合は、インビトロのリポソームに基づくアッセイを用いて分析される。例示的なアッセイでは、宿主細胞受容体は、リポーターの半分を含むリポソームに再構成される。インフルエンザ血球凝集素ポリペプチドは、リポーターのもう半分を含む別のセットのリポソームに再構成される。2つのリポソーム集団を一緒に混合する場合、融合はリポーターの再構成、例えば比色定量的に検出することができる酵素反応によって検出される。抗体不在下で、又は対照抗体の存在下で行われるアッセイでのリポーター活性と比較して、リポーター活性が低減又は阻害される場合、抗体は融合を阻害する。特定の実施態様では、融合を阻害する抗体の能力は、対照の存在下での融合率と比較した、抗体の存在下での融合率を調査することによって測定される。

40

【0337】

(5.14.3 刺激された細胞の活性を試験するためのアッセイ)

本明細書に記載される方法に従って刺激される細胞は、例えば、対象のポリヌクレオチド又は遺伝子(複数可)の組込み、転写及び/又は発現、組み込まれる遺伝子の複製数並びに組込みの位置について分析することができる。そのような分析はいかなるときでも実施することができ、当技術分野で公知である任意の方法によって実施することができる。他の実施態様では、本明細書に記載されるインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドによる標的細胞の良好な刺激は、当技術分野で公知であるか又は本明細書に記載される方法を用いて、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに対する中和抗体の生成を検出することによって判定される。

50

【0338】

特定の実施態様では、刺激された細胞、例えばDCが投与される対象は、細胞の位置、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドをコードする、ベクターによって送達されるポリヌクレオチド若しくは遺伝子の発現、免疫応答の刺激(例えば、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに対する中和抗体の生成)について分析することができ、及び/又は当技術分野で公知であるか又は本明細書に記載される任意の方法によって、インフルエンザウイルス感染又はそれに関連する疾患に付随する症状について監視することができる。

【0339】

インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドのターゲッティングの特異性を測定するために、リポーターアッセイを用いることができる。例えば、骨髄細胞の混合集団を対象から得ること、及びインビトロで培養することができる。インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを骨髄細胞の混合集団に投与することができ、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドに関連するリポーター遺伝子の発現は、培養細胞で分析することができる。一部の実施態様では、混合細胞集団中の刺激された細胞の少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約60%、70%、80%又は90%、より好ましくは少なくとも約95%は、樹状細胞である。

10

【0340】

(5.14.4 抗ウイルス活性アッセイ)

本明細書に記載される抗体又はその組成物は、抗ウイルス活性についてインビトロで調査することができる。一実施態様では、抗体又はその組成物は、インフルエンザウイルスの増殖に及ぼすそれらの影響についてインビトロで試験される。インフルエンザウイルスの増殖は、当技術分野で公知であるか又は本明細書に記載される任意の方法(例えば細胞培養で)によって調査することができる。具体的な実施態様では、細胞は0.0005及び0.001、0.001及び0.01、0.01及び0.1、0.1及び1、若しくは1及び10のMOI、又は0.0005、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5若しくは10のMOIで感染させられ、追加された無血清培地と一緒にインキュベートされる。ウイルス力価は、血球凝集素ブランク、又は本明細書に記載される任意の他のウイルスアッセイによって上清で測定される。ウイルス力価を調査することができる細胞には、EFK-2細胞、Vero細胞、MDCK細胞、一次ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)、H292ヒト上皮細胞系及びHeLa細胞が含まれるが、これらに限定されない。インビトロアッセイには、当技術分野で周知であるか又は本明細書に記載される方法を用いて、インビトロの培養細胞で変化したウイルス複製(例えば、ブランク形成で測定される)、又はウイルスタンパク質の生成(例えば、ウェスタンブロット分析で測定される)、又はウイルスRNA(例えば、RT-PCR若しくはノーザンブロット分析で測定される)を測定するものが含まれる。

20

30

【0341】

非限定一実施例では、標的哺乳動物細胞系の単層を異なる量(例えば、3ブランク形成単位(pfu)又は5pfuの多重度)のウイルス(例えば、インフルエンザ)に感染させ、その後様々な希釈の抗体(例えば、0.1 µg/ml、1 µg/ml、5 µg/ml又は10 µg/ml)の存在下又は不在下で培養する。感染培養を感染から48時間後又は72時間後に収集し、適当な標的細胞系(例えば、Vero細胞)で、当技術分野で公知である標準のブランクアッセイによって滴定する。

40

【0342】

血球凝集アッセイの非限定実施例では、細胞を抗体と接触させ、同時に又はその後ウイルスに感染させ(例えば、1のMOIで)、ウイルスの複製を可能にする条件下で(例えば、20~24時間)ウイルスをインキュベートする。抗体は、好ましくは感染の全過程で存在する。次に、0.5%のニワトリ赤血球を用いて、ウイルスの複製及びウイルス粒子の放出が血球凝集アッセイで測定される。例えば、Kashyapらの文献(PNAS USA 105: 5986-5991)を参照されたい。一部の実施態様では、それがウイルス複製を、ウイルス力価の約75%の低下に相当する少なくとも2ウェルのHA低減させる場合、化合物はウイルス複製の阻害剤とみな

50

される。具体的な実施態様では、阻害剤は、このアッセイでウイルス力価を50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上又は95%以上低下させる。他の具体的な実施態様では、阻害剤は対象でインフルエンザウイルス力価の約1log以上、約2log以上、約3log以上、約4log以上、約5log以上、約6log以上、約7log以上、約8log以上、約9log以上、約10log以上、1~3log、1~5log、1~8log、1~9log、2~10log、2~5log、2~7log、2log~8log、2~9log、2~10log、3~5log、3~7log、3~8log、3~9log、4~6log、4~8log、4~9log、5~6log、5~7log、5~8log、5~9log、6~7log、6~8log、6~9log、7~8log、7~9log又は8~9logの低下をもたらす。インフルエンザウイルス力価のlog低下は、陰性対照と比較したもの、別の治療と比較したもの、又は抗体投与前の患者における力価と比較したものであってよい。

10

【0343】

(5.14.5 細胞傷害性アッセイ)

活性化化合物又はその組成物への曝露の後の細胞(感染又は未感染の)又は細胞系の生存度を調査し、こうして化合物又は組成物の細胞傷害性を測定するために、周知の技術である多くのアッセイを用いることができる。例えば、細胞増殖は、プロモデオキシウリジン(BrdU)の取込み(例えば、Hoshinoらの文献(1986、Int. J. Cancer 38, 369);Campanaらの文献(1988、J. Immunol. Meth. 107:79)を参照)、(3H)チミジン取込み(例えば、Chen, J.の文献(1996、Oncogene 13: 1395-403);Jeoung, J.の文献(1995、J. Biol. Chem. 270:18367-73)を参照)を測定することによって、細胞の直接計数によって、又は癌原遺伝子(例えば、fos、myc)などの既知の遺伝子の転写、翻訳若しくは活性の変化、若しくは細胞周期

20

【0344】

具体的な実施態様では、細胞生存度は、細胞内ATPレベルを測定するCellTiter-Gloアッセイキット(Promega)などの、当技術分野で標準であるアッセイを用いて、3日及び7日の期間で測定される。細胞ATPの低下は、細胞毒性を示す。別の具体的な実施態様では、細胞生存度は、ニュートラルレッド取込みアッセイで測定することができる。他の実施態様では、形態変化の目視には、肥大、粒状度、縁付きの細胞、膜状の外観、円形化、ウェル表面からの分離又は他の変化が含まれてもよい。これらの変化は、観察される細胞傷害性の程度に従って、T(100%毒性)、PVH(部分的毒性-非常に重い-80%)、PH(部分的毒性-重い-60%)、P(部分的毒性-40%)、Ps(部分的毒性-わずか-20%)又は0(無毒性-0%)の等級が与えられる。50%細胞阻害(細胞傷害)の濃度(IC₅₀)は、これらのデータの回帰分析で決定される。

30

40

【0345】

具体的な実施態様では、細胞傷害性アッセイで用いられる細胞は、一次細胞及び細胞系を含む動物細胞である。一部の実施態様では、細胞はヒト細胞である。特定の実施態様では、細胞傷害性は、以下の細胞系の1つ以上で調査される：U937、ヒト単球細胞系；一次末梢血単核細胞(PBMC)；Huh7、ヒト肝芽細胞腫細胞系；293T、ヒト胚性腎臓細胞系；及びTHP-1、単球細胞。特定の実施態様では、細胞傷害性は、以下の細胞系の1つ以上で調査される：MDCK、MEF、Huh 7.5、Detroit又はヒト気管気管支上皮(human tracheobronchial epithelial)(HTBE)細胞。

【0346】

活性化化合物又はその組成物は、動物モデルでインビボ毒性について試験することができ

50

る。例えば、活性化合物の活性を試験するために用いられる本明細書に記載の動物モデル及び/又は当技術分野で公知である他のものは、これらの化合物のインビボ毒性を測定するために用いることもできる。例えば、動物は、様々な濃度の活性化合物を投与される。その後、死亡率、体重減少若しくは体重増加の失敗、及び/又は組織損傷を示すことができる血清マーカーのレベル(例えば、一般組織損傷の指標としてのクレアチンホスホキナーゼレベル、可能な肝損傷の指標としてのグルタミン酸シュウ酸トランスアミナーゼ又はビルビン酸トランスアミナーゼのレベル)について、動物は経時的に監視される。これらのインビボアッセイは、投薬量に加えて様々な投与様式及び/又はレジメンの毒性を試験するために、応用されてもよい。

【0347】

活性化合物の毒性及び/又は効力は、例えばLD₅₀(集団の50%に致死的な用量)及びED₅₀(集団の50%で治療的に有効な用量)を測定するための、細胞培養又は実験動物における標準の薬学手順によって測定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療指数であり、それは、比LD₅₀/ED₅₀で表すことができる。大きな治療指数を示す活性化合物が好ましい。毒性副作用を示す活性化合物が用いられてもよいが、非感染細胞に対する潜在的な損傷を最小にし、それによって副作用を低減させるために、患部組織の部位をそのような剤の標的にする送達系を設計するように注意すべきである。

【0348】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られるデータは、ヒトで使用するための活性化合物の薬量範囲の処方用いることができる。好ましくは、そのような剤の投薬量は、ED₅₀を含み、ほとんど又は全く毒性のない循環濃度の範囲内にある。投薬量は、使用する剤形及び利用する投与経路によって、この範囲内で異なってもよい。本明細書に記載される方法で用いられるいかなる活性化合物についても、有効用量は最初に細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養で測定されるIC₅₀(すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、用量を動物モデルで処方することができる。ヒトでの有益な用量をより正確に決定するために、そのような情報を用いることができる。血漿レベルは、例えば、高性能液体クロマトグラフィーで測定することができる。投薬量の決定に関するさらなる情報が、本明細書で提供される。

【0349】

さらに、例えばウイルス感染又はそれに付随する状態若しくは症状を測定することによって、本明細書に記載される活性化合物及び組成物の予防及び/又は治療的な有用性を評価するために、当業者に公知である任意のアッセイを用いることができる。

【0350】

(5.14.6 インビボ抗ウイルス活性)

好ましくは、活性化合物及びその組成物は、ヒトで用いる前に所望の治療的又は予防的活性についてインビボで分析される。例えば、活性化合物又はその組成物及び/又は別の療法を投与することが好ましいかどうかを判定するために、インビボアッセイを用いることができる。例えば、インフルエンザウイルス疾患を予防するための活性化合物又はその組成物の使用を調査するために、動物がインフルエンザウイルスに感染する前に組成物を投与することができる。或いは、又はさらに、動物がインフルエンザウイルスに感染すると同時に、活性化合物又はその組成物を動物に投与することができる。インフルエンザウイルスによる感染又はそれに付随する疾患を治療するための活性化合物又はその組成物の使用を調査するために、動物をインフルエンザウイルスに感染させた後に化合物又は組成物を投与することができる。具体的な実施態様では、活性化合物又はその組成物は、動物に2回以上投与される。

【0351】

活性化合物及びその組成物は、それらに限定されないがラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ウサギ、モルモットなどを含む動物モデル系で、抗ウイルス活性について試験することができる。具体的な実施態様では、活性化合物及びその組成物は、マウスモデル系で試験される。そのようなモデル系は広く使われ、当業者

10

20

30

40

50

に周知である。具体的な実施態様では、活性化合物及びその組成物は、マウスモデル系で試験される。インフルエンザウイルスのための動物モデルの非限定例は、このセクションで提供される。

【0352】

一般に、動物をインフルエンザウイルスに感染させ、同時に又はその後、活性化合物又はその組成物、又はプラセボで治療する。或いは、動物は活性化合物又はその組成物又はプラセボで治療され、その後インフルエンザウイルスに感染させる。これらの動物から得られる試料(例えば、血清、尿、痰、精液、唾液、血漿又は組織試料)は、当技術分野で周知である方法、例えば変化したウイルス力価(例えば、プラーク形成で測定される)、ウイルスタンパク質の生成(例えば、ウェスタンブロット、ELISA又はフローサイトメトリー分析で測定される)又はウイルス核酸の生成(例えば、RT-PCR又はノーザンブロット分析で測定される)を測定するものを通して、ウイルス複製について試験することができる。組織試料中のウイルスの定量化のために、組織試料はリン酸緩衝食塩水(PBS)でホモジナイズされ、清澄化されたホモジネートの希釈液は、細胞(例えば、Vero、CEF又はMDCK細胞)の単層の上で37℃で1時間吸着される。他のアッセイでは、組織病理学的評価、好ましくは、ウイルスが感染の標的にすることが知られている器官(複数可)の評価が感染後に実施される。ウイルス特異的モノクローナル抗体を用いて、ウイルス免疫組織化学試験を実施することができる。

10

【0353】

ウイルスの病原性に及ぼす活性化合物又はその組成物の影響も、活性化合物又はその組成物が投与される感染対象におけるウイルスの力価、活性化合物又はその組成物が投与される感染対象の生存期間、活性化合物又はその組成物が投与される感染対象での免疫応答、活性化合物又はその組成物が投与される感染対象での症状の数、持続時間及び/又は重症度、並びに/或いは活性化合物又はその組成物が投与される感染対象での1つ以上の症状の開始までの時間が調査されるインビボアッセイを用いて測定することができる。そのような影響を測定するために、当業者に公知である技術を用いることができる。特定の実施態様では、活性化合物又はその組成物は、未処置の対象と比較して0.5倍、1倍、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、125倍、150倍、175倍、200倍、300倍、400倍、500倍、750倍、又は1,000倍又はそれ以上のインフルエンザウイルスの力価の低下をもたらす。一部の実施態様では、活性化合物又はその組成物は、未処置の対象と比較して約1log以上、約2log以上、約3log以上、約4log以上、約5log以上、約6log以上、約7log以上、約8log以上、約9log以上、約10log以上、1~3log、1~5log、1~8log、1~9log、2~10log、2~5log、2~7log、2log~8log、2~9log、2~10log、3~5log、3~7log、3~8log、3~9log、4~6log、4~8log、4~9log、5~6log、5~7log、5~8log、5~9log、6~7log、6~8log、6~9log、7~8log、7~9log又は8~9logのインフルエンザウイルスの力価の低下をもたらす。

20

30

【0354】

インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス剤の試験用に開発された、フェレット、マウス、モルモット、リスザル、マカク及びニワトリなどのインフルエンザウイルス動物モデルが、記載されている。例えば、Sidwellらの文献(Antiviral Res., 2000, 48: 1-16); Lowen A.C.らの文献(PNAS., 2006, 103: 9988-92);及びMcCauleyらの文献(Antiviral Res., 1995, 27: 179-186)及びRimmelzwannらの文献(Avian Diseases, 2003, 47:931-933)を参照されたい。インフルエンザのマウスモデルについては、インフルエンザ感染マウスに投与される活性化合物の抗ウイルス活性を分析するために用いることができるパラメータの非限定例には、肺炎関連死、血清1酸糖タンパク増加、動物体重、血球凝集素によって分析される肺ウイルス、プラークアッセイによって分析される肺ウイルス、及び肺の組織病理学的変化が含まれる。有意性を計算するために、統計解析が実行される(例えば、0.05以下のP値)。

40

【0355】

他のアッセイでは、動物モデル対象の感染後に、組織病理学的評価が実施される。上皮

50

の変化及び上皮下の炎症について、鼻甲介及び気管を調べることができる。大、中、小又は末端気管支梢での細気管支上皮の変化及び細気管支周囲の炎症について、肺を調べることができる。炎症性変化について肺胞も評価される。中気管支梢は、以下の通りに0~3+の尺度で等級分けされる:0(正常:繊毛性先端辺縁及び基底偽重層核を有する中~高円柱状上皮細胞が並ぶ;最小限の炎症);1+(輪郭が円柱状及び均一で増殖がわずかに増加した上皮層;多くの細胞で繊毛が変わらずに見られる);2+(減衰から顕著な増殖までの範囲の上皮層の顕著な変化;無秩序な細胞及び管腔境界で不規則な層輪郭);3+(上皮層は著しく破壊されて無秩序で、管腔には壊死性の細胞が見られる;一部の気管支梢は減衰され、他は顕著な反応性増殖)。

【0356】

気管は、以下の通りに0~2.5+の尺度で等級分けされる:0(正常:繊毛性先端辺縁、基底偽重層核を有する中~高円柱状上皮細胞が並ぶ。先端辺縁と核の間に明白な細胞質。時折の扁平上皮細胞を有する小病巣);1+(上皮層の局所の扁平上皮化生);2+(上皮層の大部分の散在性扁平上皮化生、繊毛は局所的に明白なことがある);2.5+(極めて少ない繊毛が明白である散在性の扁平上皮化生)。

【0357】

ウイルス特異的モノクローナル抗体(例えばNP-、N-又はHN特異的モノクローナル抗体)を用いて、ウイルス免疫組織化学が実施される。染色は、以下の通りに0~3+に等級分けされる:0(感染細胞がない);0.5+(わずかな感染細胞);1+(わずかな感染細胞、広く離れた個々の細胞として);1.5+(わずかな感染細胞、広く離れた単一体として、及び小クラスターで);2+(中程度の数の感染細胞、気管支梢、又は肺胞の小さな小葉下の病巣に並ぶ上皮層部分の、隣接細胞のクラスターを通常侵す);3+(多数の感染細胞、気管支梢の大部分の上皮層を侵すか、肺胞の大きな小葉下の病巣に広がる)。

【0358】

一例では、ウイルス感染動物モデルで肺病変を誘発して、感染を引き起こす能力が、野生株ウイルス及びモックウイルスを用いて比較される。肺病変は、目視検査によって健康である肺葉の百分率として調査することができる。ペントバルビタールの静脈内投与によって5日p.i.に動物を安楽死させ、それらの肺全体を取り出す。肉眼的病変に侵された各肺葉の表面の百分率を、視覚的に推定する。各動物の7肺葉の平均値を得るために、百分率を平均する。他のアッセイでは、ウイルスの負荷又は力価を測定するために、鼻スワブを検査することができる。感染後のウイルス負荷を測定するために、鼻スワブを検死の間にとることができる。

【0359】

一実施態様では、ウイルスは組織試料で定量化される。例えば、組織試料はリン酸緩衝食塩水(PBS)でホモジナイズされ、清澄化されたホモジネートの希釈液は、細胞(例えば、MDCK細胞)の単層の上において37℃で1時間吸着される。次に、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.01% DEAE-デキストラン、0.1% NaHCO₃及び1%寒天を含有する最小必須培地の溶液を感染単層に重層する。プラークを可視化することができるまで、プレートに2~3日インキュベートする。PR8感染試料からウイルスを滴定する組織培養感染量(TCID)アッセイを、以下の通りに実施する。96ウェルプレート中の細胞(例えば、MDCK細胞)の集密単層を、培地中の清澄化された組織ホモジネートの対数希釈液と一緒にインキュベートする。接種の2~3日後に、血球凝集アッセイ(HAアッセイ)によって、各ウェルからの0.05mlの一定量をウイルス増殖について調査する。

【0360】

(5.14.6.1.1 ヒトでのアッセイ)

一実施態様では、インフルエンザウイルスの複製を調節する活性化化合物又はその組成物が、感染ヒト対象で調査される。この実施態様に従って、活性化化合物又はその組成物がヒト対象に投与され、ウイルス複製に及ぼす活性化化合物又は組成物の影響は、例えば生体試料(例えば、血清又は血漿)中のウイルス又はウイルス核酸のレベルを分析することで測定される。ウイルス複製を変化させる活性化化合物又はその組成物は、対照で処置された対象

10

20

30

40

50

又は対象群でのウイルス複製レベルを、活性化化合物又はその組成物で処置された対象又は対象群でのそれと比較することによって特定することができる。或いはウイルス複製の変化は、活性化化合物又はその組成物の投与の前後に対象又は対象群でのウイルス複製レベルを比較することによって特定することができる。生体試料を得て、mRNA又はタンパク質の発現を分析するために、当業者に公知である技術を用いることができる。

【0361】

別の実施態様では、インフルエンザウイルス感染/疾患に付随する1つ以上の症状の重症度に及ぼす活性化化合物又はその組成物の影響が、感染対象で調査される。この実施態様に従って、活性化化合物又はその組成物又は対照が、インフルエンザウイルスに感染しているヒト対象に投与され、ウイルス感染の1つ以上の症状に及ぼす活性化化合物又は組成物の影響が測定される。1つ以上の症状を軽減させる活性化化合物又はその組成物は、対照で処置した対象を活性化化合物又は組成物で処置した対象と比較することによって特定することができる。別の実施態様では、活性化化合物又はその組成物が健康なヒト対象に投与され、ワクチンとしての効力について監視される(例えば、対象は、インフルエンザウイルス感染の症状の開始;対象に感染するインフルエンザウイルスの能力;及び/又はインフルエンザウイルス感染に付随する1つ以上の症状の軽減/不在について監視される)。活性化化合物又はその組成物がインフルエンザウイルス疾患に付随する1つ以上の症状を軽減させるかどうか判定するために、感染性疾患を熟知している医師に公知である技術を用いることができる。

10

【0362】

20

(5.15 キット)

本明細書で提供される1つ以上の活性化化合物などの、本明細書に記載される医薬組成物の成分の1つ以上を充填した1つ以上の容器を含む医薬パック又はキットが、本明細書で提供される。医薬又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定される形式での通知が、そのような容器(複数可)に任意選択で付随することができ、その通知は、ヒト投与のための製造、使用又は販売の機関による承認を反映する。

【0363】

本明細書に含まれるキットは、上記の方法で用いることができる。一実施態様では、キットは、本明細書に記載される活性化化合物、好ましくは1つ以上のインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを、1つ以上の容器に含む。特定の実施態様では、キットは、本明細書に記載されるワクチン、例えばスプリットウイルスワクチン、サブユニットワクチン、不活化インフルエンザウイルスワクチン又はインフルエンザウイルス生ワクチンを含む。

30

【実施例】

【0364】

(6. 実施例)

(6.1 実施例1:インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド)

この実施例は、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドを発現する構築物の生成を記載する。このインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、インフルエンザウイルス血球凝集素の球状ヘッドドメインを欠き、インフルエンザウイルス血球凝集素の軸領域の構造的完全性を維持する。インフルエンザウイルス血球凝集素の軸領域はインフルエンザウイルスの間で比較的保存されているので、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドは、異なるインフルエンザウイルスサブタイプ及び株からのインフルエンザウイルス血球凝集素と交差反応性である血球凝集素の軸領域に対して、中和抗体を誘導するはずである。

40

【0365】

図3は、インフルエンザA型HK68-H3N2からのインフルエンザHAステムドメインポリペプチドを発現させるための、2つの模式的ヌクレオチド構築物を表す。図3は、完全長インフルエンザHAを発現させるための構築物(WT HA)の模式図も表す。第一の構築物(「膜結合HA」)は、N末端及びC末端セグメント、リンカーペプチド並びにHA2ドメインをコードする又

50

クレオチド配列を提供する。第一の構築物は、膜貫通(TM)ドメイン及び細胞質内(CT)ドメインもコードする。第一の構築物は、シグナルペプチド(SP)もコードする。

【0366】

さらに、第二の構築物(「溶解性HA」)は、インフルエンザHAステムドメインポリペプチドの溶解性の形態を生成するために、SP、TM及びCTをコードしないヌクレオチド配列を提供する。第二の構築物は、HA2ドメインをコードする配列の後に、トロンピン切断部位、三量体形成ドメイン及びHisタグをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0367】

図4は、インフルエンザHAステムドメインポリペプチドの推定上の三次元構造での、リンカーペプチドの位置を例示する。

【0368】

(構築物:)

【0369】

構築物#1:インフルエンザHA1ドメインのアミノ酸53~276をコードするヌクレオチド配列が、完全長インフルエンザウイルスA/プエルトリコ/8/34(PR8; H1N1)血球凝集素から削除され、2つのグリシン残基(GG)をコードするリンカー配列によって置換された。図6は、ヌクレオチド(配列番号169)及びアミノ酸(配列番号170)両配列を有する、GGリンカーを有するPR8 HA構築物(PR8 HA GHD(2G))を提供する。完全長インフルエンザウイルスA/香港/1/68(HK68; H3N2)血球凝集素ポリペプチドを用いて類似した構築物を作製し(HK68 HA GHD(2G))、その構築物をpCAGGS発現ベクターに挿入した。PR8 HA GHD(2G)及びHK68 HA GHD(2G)構築物は、組換えインフルエンザウイルスの救出で使用するために、pPolIベクターに各々挿入した。

【0370】

構築物#2:インフルエンザHA1ドメインのアミノ酸53~276をコードするヌクレオチド配列が、完全長PR8血球凝集素から削除され、4つのグリシン残基(GGGG)をコードするリンカー配列によって置換された。図7は、ヌクレオチド(配列番号171)及びアミノ酸(配列番号172)両配列を有する、GGGGリンカーを有するPR8 HA構築物(PR8 HA GHD(4G))を提供する。完全長インフルエンザウイルスHK68、H3N2血球凝集素ポリペプチドを用いて、類似した構築物を作製した(HK68 HA GHD(4G))。PR8 HA GHD(4G)及びHK68 HA GHD(4G)構築物を、pCAGGS発現ベクターに各々挿入した。PR8 HA GHD(4G)及びHK68 HA GHD(4G)構築物は、組換えインフルエンザウイルスの救出で使用するために、pPolIベクターに各々挿入した。

【0371】

構築物#3:インフルエンザHA1ドメインのアミノ酸53~276をコードするヌクレオチド配列が、完全長PR8血球凝集素から削除され、直後にグリシン残基が続くプロリン残基(PG)をコードするリンカー配列によって置換された。図8は、ヌクレオチド(配列番号173)及びアミノ酸(配列番号174)両配列を有する、PGリンカーを有するPR8 HA構築物(PR8 HA GHD(PG))を提供する。完全長インフルエンザウイルスHK68、H3N2血球凝集素ポリペプチドを用いて、類似した構築物を作製した(HK68 HA GHD(PG))。PR8 HA GHD(PG)及びHK68 HA GHD(PG)構築物を、pCAGGS発現ベクターに各々挿入した。PR8 HA GHD(PG)及びHK68 HA GHD(PG)構築物は、組換えインフルエンザウイルスの救出で使用するために、pPolIベクターに各々挿入した。

【0372】

構築物#4:インフルエンザHA1ドメインのアミノ酸53~276をコードするヌクレオチド配列が、完全長PR8から削除され、4つのグリシン残基(GGGG)をコードするリンカー配列によって代わられる。図9は、ヌクレオチド(配列番号175)及びアミノ酸(配列番号176)両配列を有する、GGGGリンカーを有するPR8 HA構築物を提供する。図9のPR8 HA構築物は、インフルエンザHA2ドメインの後に、トロンピン切断部位、三量体形成のためのフォールドドメイン及びHIS₆タグもコードする。インフルエンザウイルスHK68、H3N2血球凝集素ポリペプチドを用いて、類似した構築物を作製することができる。

【0373】

10

20

30

40

50

(構築物の発現:)

【0374】

HK68 HA GHD(2G)構築物、PR8 HA GHD(4G)構築物、HK68 HA GHD(4G)構築物、PR8 HA GHD(PG)構築物又はHK68 HA GHD(PG)構築物を含むpCAGGS発現ベクターを、外因性トリプシンの不在下で293T細胞に一時的にトランスフェクトした。インフルエンザHAステムドメインポリペプチドHA GHDは、ヒト293T細胞培養で発現されることが分かった。トランスフェクションの24時間後に細胞を溶解し、溶解物をSDS-PAGEとそれに続くウェスタンブロット法にかけた。図5A及び5Bに示す各プロットの下に示すように、HK68インフルエンザA型ウイルスHA2調製物に対するウサギポリクローナル抗血清、又は複数のH3 HAタンパク質に対するマウスモノクローナルを一次抗体として用いた。

10

【0375】

図5Aに示すように、HK68インフルエンザA型ウイルスHA2調製物に対するポリクローナル抗体は、対照構築物(レーン2)によって発現される完全長HA0、並びにPR8 HA GHD(4G)構築物(レーン3)及びPR8 HA GHD(PG)構築物(レーン4)によって発現されるトランケーションされたHA0(HA0 GHD)を認識した。

【0376】

図5Bに示すように、複数のH3 HAタンパク質に対するモノクローナル抗体も、対照構築物(レーン2)によって発現される完全長HA0、並びにHK68 HA GHD(2G)構築物(レーン3)、HK68 HA GHD(4G)構築物(レーン4)及びHK68 HA GHD(PG)構築物(レーン5)によって発現されるトランケーションされたHA0(HA0 GHD)を認識した。

20

【0377】

(6.2 実施例2:保存された血球凝集軸領域に基づくインフルエンザウイルスワクチン)

この実施例は、死に対する完全な保護及び致死性のウイルス攻撃に続く疾患に対する部分保護を提供する免疫応答を誘導することにおける、インフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチド(本明細書では「ヘッドレスHA」と称することもある)ワクチンの有効性を記載する。

【0378】

(6.2.1 材料及び方法)

(プラスミド)

【0379】

pGag-EGFPは、Carol Carter、Stonybrook Universityの好意によって提供された(Hermida-Matsumoto, L. 及びM. D. Reshの文献。(2000、共焦画像化による原形質膜のヒト免疫不全ウイルス1型Gag及びEnvの局在化(Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging)。J Virol 74:8670-9))。pCAGGS発現プラスミドは、J. Miyazaki、Osaka Universityによって快く提供された(Miyazaki, J.、S. Takaki、K. Araki、F. Tashiro、A. Tominaga、K. Takatsu及びK. Yamamuraの文献。(1989、ニワトリ -アクチンプロモーターに基づく発現ベクター系は、インターロイキン5の有効生産を導く(Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5)。Gene 79:269-77))。プラスミドpDZ PR8 HA及びpDZ PR8 NAは、前に参考文献に記載されたように構築された(Quinlivan, M.、D. Zamarin、A. Garcia-Sastre、A. Cullinane、T. Chambers及びP. Paleseの文献。(2005、NS1タンパク質のトランケーションを通してのウマインフルエンザウイルスの弱毒化(Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein)。J Virol 79:8431-9))。pCAGGS HK68 HA及びpCAGGS HK68 NAの構築のために、ウイルス遺伝子を精製されたビリオンRNAから逆転写し(Transcriptor RT、Roche)、増幅させ(PFU turbo、Stratagene)、Wangら(Wang, S.、Q. Liu、J. Pu、Y. Li、L. Keleta、Y. W. Hu、J. Liu及びE. G. Brownの文献。(2008、インフルエンザA型ウイルス逆遺伝学のための簡略化組換え手法(Simplified recombinational approach for influenza A virus reverse genetics)。J Virol Methods 151:74-8))によって記載される組換えプロトコルに従ってベクターpPOL1にクローニングした(Fodor, E.、L. Devenish、O. G. En

30

40

50

gelhardt, P. Palese, G. G. Brownlee及びA. Garcia-Sastreの文献。(1999、組換えDNAからのインフルエンザA型ウイルスの救出(Rescue of influenza A virus from recombinant DNA)。J Virol 73:9679-82))。次に、適当な制限酵素部位を有するプライマーでタンパク質コード領域を増幅させ、Not1とNhe1部位の間のpCAGGSの複数のクローニング部位にサブクローニングした。切除又は融合PCR方法によって、ヘッドレスHA構築物を生成した。切除PCRは、pPOL1 PR8 HA又はpPOL1 HK68 HAプラスミドで実施した。生じたPCR生成物をライゲーションによって環状にし、次にヘッドレスHAの読取り枠をpCAGGSのNot1及びNhe1部位にサブクローニングした。融合PCRは、pDZ PR8 HA又はpCAGGS HK68プラスミド鋳型で実施し、生成物をpCAGGSのNot1及びNru1部位に挿入した。用いたプライマー配列は、以下の表5の通りである。

【表 6】

表5: 図10に記載されるヘッドレスHAの構築で用いられたプライマーの配列の要約

構築物	PCR 方法 ^a	上流側プライマー ^b	下流側プライマー ^c
PR8 2G	切除	ACATAGTTTCCGTTGTGGCTGTCTCCGAGC [配列番号 274]	GGAGGGCTGAACACGAAAGTGTCAAAACACCCCCTGGGAGCTATA AACA [配列番号 291]
PR8 4G	切除	ACATAGTTTCCGTTGTGGCTGTCTCCGAGC [配列番号 275]	GGAGGGGGAGGTTGTAAACGAAAGTGTCAAAACACCCCCTGGGA GCTATAAACA [配列番号 292]
PR8 PG	切除	ACATAGTTTCCGTTGTGGCTGTCTCCGAGC [配列番号 276]	CCAGGCTGTAAACACGAAAGTGTCAAAACACCCCCTGGGAGCTATA AACA [配列番号 293]
PR8 No Cys 1G	融合	TGACACTTCGTGTACCTAGTTTCCGTTGTGGCTG [配列番号 277]	GCTAACACGAAAGTGTCAAAACAC [配列番号 294]
PR8 No Cys 2G	融合	ACTTCGTGTTCCGCCTAGTTTCCGTTGTGGCTG [配列番号 278]	GGCGGAAACACGAAAGTGTCAAAACAC [配列番号 295]
PR8 No Cys 3G	融合	CGTGTACCTCCGCCTAGTTTCCGTTGTGGCTG [配列番号 279]	GGCGGAGGTAACACGAAAGTGTCAAAACAC [配列番号 296]
PR8 No Cys	融合	TGTTTGACACTTCGTGTTAGTTTCCGTTGTGGCTGTC [配列番号 280]	GCCACAACGGGAAAACATAAACACGAAAGTGTCAAAACACCC [配列番号 297]
PR8 No Cys Δ1	融合	GGTGTGACACTTCGTTAGTTTCCGTTGTGGCTGTC [配列番号 281]	GCCACAACGGGAAAACATAAACGAAAGTGTCAAAACACCCCCTG [配列番号 298]
PR8 No Cys Δ3	融合	AGGGGTGTTGACACTTTTCCGTTGTGGCTGTCTTC [配列番号 282]	ACAGCCACAACGGGAAAAGTGTCAAAACACCCCCTGGGA [配列番号 299]

10

20

30

40

PR8 No Cys NAS	融合	ACTTCGTGTTGGAGGCGTTTAGTTTTCCCGTTGTGGCTG [配列番号 283]	AACGCCCTCCAACACGAAAGTGTCAAACAC [配列番号 300]
HK68 2G	切除	GCUCUCAACGGGGAAAAUAUGCGGA [配列番号 284]	GGCTGTATTTCTGAATGCATCACTCC [配列番号 301]
HK68 4G	切除	GCUCUCAACGGGGAAAAUAUGGGAGGC [配列番号 285]	GGAGGTTGTATTTCTGAATGCATCACTCC [配列番号 302]
HK68 PG	切除	GCUCUCAACGGGGAAAAUAUGGCCA [配列番号 286]	GGCTGTATTTCTGAATGCATCACTCC [配列番号 303]
HK68 No Cys	融合	GAGTGATGCATTCAGAAAATATTTCCCGTTGAGGAGC [配列番号 287]	CCTCAACGGGGAAAAATAATTTCTGAATGCATCACTCCA [配列番号 304]
HK68 No Cys Δ1	融合	TGGAGTGAATGCATTCAGATATTTCCCGTTGAGGAGC [配列番号 288]	CCTCAACGGGGAAAAATACTGAATGCATCACTCCAAAT [配列番号 305]
HK68 No Cys Δ3	融合	ATTTGGAGTGAATGCATTTCCCGTTGAGGAGCTC [配列番号 289]	CTCCTCAACGGGGAAAAAAGAAATGCATCACTCCAAATGG [配列番号 306]
HK68 No Cys NAS	融合	TTCAGAAAATGGAGGCGTTATTTCCCGTTGAGGAG [配列番号 290]	AACGCCCTCCATTTCTGAATGCATCACTCC [配列番号 307]

10

20

30

40

^a 切除PCR方法では、欠失の標的である配列に連なるプライマーが、遺伝子の残り及びプラスミドベクターを増幅するために用いられる。したがって、下流側プライマーはPCR反応でフォワードプライマーであり、上流側プライマーはリバースプライマーである。介在配列を欠く線状断片が生成される。それをプライマーの1つの5'末端に加えることによ

50

って、短い外来配列を欠失部位に導入することができる。生成されると、対象の改変遺伝子を有する環状プラスミドを生成するために、PCR生成物は精製され、自己連結される。

融合PCR方法では、所望の生成物の2つの断片が独立にPCR増幅される。1つの断片は導入された突然変異の上流の配列に対応し、2つ目は突然変異の下流の配列に対応する。上流側断片は5'外側のプライマーと組み合わせて上流側プライマーを用いて増幅されるが、下流側断片は3'外側のプライマーと一緒に下流側プライマーを用いて生成される。突然変異の部位に導入されるヌクレオチド配列は、上流及び下流両方のプライマーへの組入れを通して両方の断片に加えられる。次に5'及び3'の外側のプライマーだけを用いて、以降のPCR反応で2つの断片を融合させる。すべてのPR8融合PCRのために用いられたPR8外側プライマーは、

【化23】

PR8 5': cgagctcatgaaggcaaacctactgg 及び PR8 3': cgcagatcttcagatgcatattctgcaact

であった。すべてのHK68融合PCRのために用いられHK68外側プライマーは、

【化24】

HK68 5'notI: ggaagcggccgcatgaagaccatcattgctttgag 及び HK68 3'nruI: gcggcgtcgcgatcaaatgcaatgttgacctaa

であった。

^b これらのプライマーは、切除及び融合の両PCR方法で突然変異部位のすぐ上流でアニールする。

^c これらのプライマーは、切除及び融合の両PCR方法で突然変異部位のすぐ下流でアニールする。

【0380】

(抗体)

【0381】

HK68 HA、A/アラバマ/1/1981(H3N2)HA及びA/北京/46/1992(H3N2)HAをコードするプラスミドDNAによるBalb/Cマウスの逐次的筋肉内免疫化、続いて完全体A/ワイオミング/03/2003(H3N2)ウイルスによる追加免疫によって、モノクローナル抗体(mAb)12D1を生成した。12D1 mAbの記載については、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、2009年5月26日及び2009年7月9日出願の米国特許仮出願第61/181,263号及び第61/224,302号を参照されたい。このmAbは複数のH3 HAタンパク質に結合し、HA2サブユニットにマッピングする。酸及びDTTによる処理によってHA1サブユニットが取り出されたPR8ウイルスに対して、ウサギポリクローナル血清3951が作製された(Graves, P. N., J. L. Schulman, J. F. Young及びP. Paleseの文献。(1983、血球凝集素のHA1サブユニットを欠くインフルエンザウイルスのサブウイルス粒子の調製:交差反応性HA2決定因子のアンマスキング(Preparation of influenza virus subviral particles lacking the HA1 subunit of hemagglutinin: unmasking of cross-reactive HA2 determinants). *Virology* 126: 106-16))。

【0382】

(細胞及びウイルス)

【0383】

293T細胞はATCCから得られ、10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum)(FBS;Clontech)を補ったダルベッコの改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagles medium)(DMEM;Gibco)で維持された。

【0384】

インフルエンザA型/プエルトリコ/8/1934(H1N1)ウイルスは、NCBIデータベースの受託番号AF389115~AF189122(A/プエルトリコ/8/34/マウントシナイ)によって規定される8つの遺伝子をコードするプラスミドを用いて、前述の通り逆遺伝学によって得られた(Steel, J., S. V. Burmakina, C. Thomas, E. Spackman, A. Garcia-Sastre, D. E. Swayne及びP. Paleseの文献。(2008、鳥インフルエンザウイルス及びニューカッスル病ウイルスのための組合せ卵内ワクチン(A combination in-ovo vaccine for avian influenza virus

10

20

30

40

50

and Newcastle disease virus)。Vaccine 26:522-31))。10～11日齢の胚含有鶏卵でウイルスを増殖させ、ブランクアッセイによって滴定した。

【0385】

(ウェスタンブロット法)

【0386】

HAに基づくタンパク質の発現レベルを調査するために、製造業者の説明書によってリポフェクトアミン2000(Invitrogen)を用いて、2 μ gの適当なプラスミドで293T細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、細胞を2 \times のタンパク質ローディング緩衝液(125mMトリス-HCl[pH6.8]、4%ドデシル硫酸ナトリウム、20%グリセロール、10% β -メルカプトエタノール及び0.1%ブロムフェノールブルー)に溶解した。溶解物を100で5分間加熱し、次に10%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜(Whatman社)に移した。VLP調製物中のHAに基づくタンパク質を検出するために、ペレットにされたVLPをリン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline)(PBS)に懸濁し、2 \times のタンパク質ローディング緩衝液との1:1の混合を通して溶解し、5分間沸騰させ、10%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜へ移した。次に、1:2000の希釈でmAb 12D1又は3951抗血清によって膜を精査した。

【0387】

(フローサイトメトリー分析)

【0388】

細胞表面でのHAに基づくタンパク質のレベルを調査するために、製造業者の説明書によってリポフェクトアミン2000(Invitrogen)を用いて、1 μ gの適当なプラスミドで293T細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞をトリプシン処理し、2% FBSを含むPBSに再懸濁させ、その後1/250希釈の3951抗血清又は1/200希釈のmAb 12D1により染色した。染色された細胞をベックマンCoulter Cytomics Fc 500フローサイトメーターで数え、結果をFlow Joソフトウェアで分析した。

【0389】

(ウイルス様粒子の生成)

【0390】

ウイルス様粒子の生成のために、6 $\times 10^6$ の293T細胞を10cm培養皿中の8mlの10% FBS含有DMEMに播種した。懸濁液中にある間に、製造業者の説明書に従って、細胞を所望のプラスミドDNAと4:1の比で組み合わせたリポフェクトアミン2000(Invitrogen)でトランスフェクトした。用いたプラスミドDNAの量は、以下の通りであった:GagのみのVLPについては、7.5 μ g pGagEGFPをトランスフェクトした;gag+PR8 4G VLPについては、4.5 μ gのpGagEGFPプラス4.5 μ gのpCAGGS PR8 4Gを用いた;Gag+HK68 4G VLPについては、4.5 μ gのpGagEGFPプラス4.5 μ gのpCAGGS HK68 4Gを用いた;及びGag+PR8 HA+PR8 NA VLPについては、3 μ gのpGagEGFPを、pDZ PR8 HA及びpDZ PR8 NAの各々の3 μ gと組み合わせた。トランスフェクションの6時間後、培地を、10% FBSを含有する新しいDMEM、又は3%ウシ血清アルブミン(Sigma)及び10 μ g/ml TPCK処理トリプシン(Sigma)を補ったOpti-MEM(Gibco)に変更した。NTE緩衝液(1M塩化ナトリウム、0.1Mトリス、0.01M EDTA、pH7.4)中の30%スクロースのクッションの上に清澄化させた細胞培養上清を重ね、SW28ローター(Beckman)により25,000rpm及び4で2時間遠心分離することによって、トランスフェクションの28時間後にVLPを収集した。ペレットをPBSに再懸濁し、HAタンパク含有量を、既知量の勾配の精製されたPR8又はHK68ウイルス(Palese, P.及びJ. L. Schulmanの文献。(1976、インフルエンザA型ウイルスのRNAパターンの差(Differences in RNA patterns of influenza A viruses)。J Virol 17:876-84)に記載されているように調製される)の連続希釈と平行して、ウェスタンブロット法によって調査した。図13に示すVLPは外因性トリプシンの存在下で生成されたが、マウスの追加免疫に用いられたものはトリプシンの添加なしで生成された。

【0391】

(マウスワクチン-抗原投与実験)

【0392】

10

20

30

40

50

最初は、プラスミドDNAの筋内投与及び直後に電気刺激を加えることによって、6~8週齢のC57BL/6雌マウス(Charles River Laboratories)にワクチン接種をした(TriGrid送達系、Ichor Medical Systems(Luxembourg, A., C. F. Evans及びD. Hannamanの文献。(2007、エレクトロポレーションに基づくDNA免疫化: クリニックへの移行(Electroporation-based DNA immunisation: translation to the clinic). *Expert Opin Biol Ther* 7: 1647-64); Luxembourg, A., D. Hannaman, E. Nolan, B. Ellefsen, G. Nakamura, L. Chau, O. Tellez, S. Little及びR. Bernardの文献。(2008、エレクトロポレーションによる炭疽DNAワクチンの強化(Potentiation of an anthrax DNA vaccine with electroporation). *Vaccine* 26:5216-22)). TriGrid電極配列の間隔は2.5mmであり、電場は6パルスに250V/cmの電極間隔の振幅で印加され、合計で、400ミリ秒間隔の間、印加される40ミリ秒の時間となる。各DNAワクチン接種は、37.5 µgのpGagEGFPを単独で、又は75 µgのpDZ PR8 HA、pCAGGS PR8 4G若しくはpCAGGS HK68 4Gとの組合せで含んだ。3週後に、同じ方法に従ってDNA追加免疫を実施した。DNAの2回目の用量の投与から5週後に、マウスをVLPで2回目の追加免疫をした。HA含有VLPについては、各マウスが約150ngのHAタンパク質を投与されるように、HA含有量を標準化した。腹腔内投与の前に、VLP懸濁液を完全フロイントアジュバント(Pierce)と1:1の比で合わせ、2つの連結注射器を複数回通過させることによって乳濁させた。VLP追加免疫の3週後に、総容量50 µl PBS中のPR8ウイルスの2 MLD50(50%マウス致死量(50% mouse lethal dose))の鼻腔内接種を通して、マウスに抗原投与した。体重を毎日監視し、それらの当初の体重の25%を超えて減少したマウスは屠殺し、死亡と評価した。

10

20

【0393】

(血清学的アッセイ)

【0394】

抗原投与の直前及び抗原投与の21日後に、マウスから血清を収集した。血球凝集の非特異的阻害剤を除去するために、前に記載の通りにトリプシン-熱-過ヨウ素酸塩処理を実施した(Lowen, A. C., J. Steel, S. Mubareka, E. Carnero, A. Garcia-Sastre及びP. Paleseの文献。(2009、モルモットモデルでのワクチン接種によるインフルエンザウイルスの宿主間伝搬のブロック(Blocking inter-host transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model). *J Virol.* 83: 2803-18)). 血球凝集阻止アッセイのために、各ワクチン接種群からの血清をプールした; ELISAのために、個々のマウスから収集された血清を、別々に評価した。前に記載の通りにHIアッセイを実施した(Lowen, A. C., J. Steel, S. Mubareka, E. Carnero, A. Garcia-Sastre及びP. Paleseの文献。(2009、モルモットモデルでのワクチン接種によるインフルエンザウイルスの宿主間伝搬のブロック(Blocking inter-host transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model). *J Virol.* 83: 2803-18)). ELISAのために、96ウェルプレート(Co-Star)を、1ウェルにつき0.25 µgのPR8ウイルス、又は1ウェルにつき0.1 µgのPBS中の精製組換えHAタンパク質でコーティングした。PR8ウイルスは、前述の通り30%スクロースクッションによる濃縮によって、尿膜腔液から調製した(Lowen, A. C., J. Steel, S. Mubareka, E. Carnero, A. Garcia-Sastre及びP. Paleseの文献。(2009、モルモットモデルでのワクチン接種によるインフルエンザウイルスの宿主間伝搬のブロック(Blocking inter-host transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model). *J Virol.* 83: 2803-18)). A/カリフォルニア/04/2009、A/ベトナム/1203/2004及びA/シンガポール/1/1957ウイルスの組換えHAタンパク質は、BEI Resourcesから得た; A/香港/1/1968のHAは、Ian Wilsonの好意によって贈られた; A/ニューカレドニア/20/99のHAは、Feldan-Bioから購入した。抗血清の5倍の連続希釈をプレートの上でインキュベートし、長時間の洗浄後、結合抗体をアルカリホスファターゼ連結抗マウスIgG抗体(Caltag)及びPNPP基質(Sigma)で検出した。各アッセイで、完全体PR8ウイルスに対するウサギ免疫血清が陽性対照として含まれ、ナイーブなC57BL/6マウスから得られた血清は陰性対照として含まれた。

30

40

【0395】

(6.2.2 結果)

50

(ヘッドレスHA構築物の設計及び構築)

【0396】

目標は、完全HA2ポリペプチド及び軸領域に寄与するHA1領域からなるが、HA1の球状ヘッドドメインを欠く免疫原を生成することであった。このことを目的にして、HA1のシステイン52及び277(H3番号付け)を連結する保存されたジスルフィド結合の存在に注目した。これらの2つのシステインが連なるループは球状ヘッドドメインの大部分を含むが、HA1のN末端51及びC末端52のアミノ酸はシステイン架橋から下流方向に延長して、軸領域に寄与する。HAの三次元の構造でのシステイン52及び277の近接性のために(Stevens, J., A. L. Corper, C. F. Basler, J. K. Taubenberger, P. Palese及びI. A. Wilsonの文献。(2004、絶滅した1918年のインフルエンザウイルスからの未切断のヒトH1血球凝集素の構造(Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza a virus)。Science 303: 1866-70)及び図10)、短いリンカーペプチドによる介在ループの置換は、分子の残りの折畳みを破壊しないだろうことが予測された。この原理に基づいて、ヘッドレスHA構築物団が設計された(図10)。

10

【0397】

第一に、2つのグリシン(2G)、4つのグリシン(4G)又はプロリン及びグリシン(PG)のリンカーペプチドをコードする配列を、アミノ酸53~276をコードするそれぞれのヌクレオチド配列の代わりに、A/プエルトリコ/8/1934(H1N1)(PR8)及びA/香港/1968(H3N2)(HK68)血球凝集素の読取り枠に挿入した。これらの3つのリンカーペプチドは、様々な柔軟性を有するように選択され、4Gが最も柔軟であり、PGが最も剛直であると予測された。この位置のジスルフィド結合の不在下でのリンカーの挿入が、より安定した生成物を産するかどうか試験するために、PR8 HAとの関係で3つのさらなる構築物を設計した: 1、2又は3個のグリシンをコードする配列を、アミノ酸52~277をコードする配列の代わりに挿入した(すなわち、システイン及び連結するループの両方を代えた)。グリコシル化がゴルジを通す輸送を改善することができるという仮説に基づいて、PR8及びHK68バックグラウンドでアミノ酸52~277の代わりにグリコシル化部位(NAS)の挿入も試験された。最後に、PR8及びHK68 HAの各々で、既存の野生型アミノ酸が直接連結する一連の3つの構築物を作製した: アミノ酸51~278、51~279又は50~280。軸領域を標的にする中和抗体の活性は同じ主系統群の中のHAサブタイプに限定されるようなので、H1(群1の代表)及びH3(群2の代表)HAとの関係で構築物を作製した(Ekiert, D. C., G. Bhabha, M. A. Elsliger, R. H. Friesen, M. Jongeneelen, M. Throsby, J. Goudsmit及びI. A. Wilsonの文献。(2009、高度に保存されたインフルエンザウイルスエピトープの抗体認識(Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope)。Science 324:246-51); Kashyap, A. K., J. Steel, A. F. Oner, M. A. Dillon, R. E. Swale, K. M. Wall, K. J. Perry, A. Faynboym, M. Ilhan, M. Horowitz, L. Horowitz, P. Palese, R. R. Bhatt及びR. A. Lernerの文献。(2008、トルコのH5N1鳥インフルエンザ大発生の生存者からの組合せ抗体ライブラリーは、ウイルス中和戦略を明らかにする(Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies)。Proc Natl Acad Sci USA 105:5986-91); Okuno, Y., Y. Isegawa, F. Sasao及びS. Uedaの文献。(1993、インフルエンザA型ウイルスH1及びH2株の血球凝集素の間で保存された共通の中和エピトープ(A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains)。J Virol 67:2552-8); 並びに、Sui, J., W. C. Hwang, S. Perez, G. Wei, D. Aird, L. M. Chen, E. Santelli, B. Svec, G. Cadwell, M. Ali, H. Wan, A. Murakami, A. Yammanuru, T. Han, N. J. Cox, L. A. Bankston, R. O. Donis, R. C. Liddington及びW. A. Marascoの文献。(2009、鳥及びヒトインフルエンザA型ウイルスの広範囲中和のための構造的及び機能的基礎(Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses)。Nat Struct Mol Biol 16:265-73))。

20

30

40

【0398】

これらの構築物を、下の表6に要約する。

50

【表7】

表6: 構築物要約

名称	HA1のN末端 ステムセグメント	リンカー	HA1のC末端 ステムセグメント	HA2ドメイン
PR8-2G	配列番号34	Gly-Gly	配列番号50	配列番号66
PR8-4G	配列番号34	Gly-Gly-Gly-Gly	配列番号50	配列番号66
PR8-PG	配列番号34	Pro-Gly	配列番号50	配列番号66
PR8-No Cys-1G	配列番号177	Gly	配列番号226	配列番号66
PR8-No Cys 2G	配列番号177	Gly-Gly	配列番号226	配列番号66
PR8-No Cys 3G	配列番号177	Gly-Gly-Gly	配列番号226	配列番号66
PR8-No Cys	配列番号177	直接結合	配列番号226	配列番号66
PR8-No Cys Δ1	配列番号178	直接結合	配列番号227	配列番号66
PR8-No Cys Δ3	配列番号179	直接結合	配列番号228	配列番号66
PR8-No Cys NAS	配列番号177	Asn-Ala-Ser	配列番号226	配列番号66
PR8-CON-A	配列番号309	Gly-Gly-Gly-Gly	配列番号310	配列番号66
HK68-2G	配列番号36	Gly-Gly	配列番号52	配列番号68
HK68-4G	配列番号36	Gly-Gly-Gly-Gly	配列番号52	配列番号68
HK68-PG	配列番号36	Pro-Gly	配列番号52	配列番号68
HK68-No Cys	配列番号183	直接結合	配列番号232	配列番号68
HK68-No Cys Δ1	配列番号184	直接結合	配列番号233	配列番号68
HK68-No Cys Δ3	配列番号185	直接結合	配列番号234	配列番号68
HK68-No Cys NAS	配列番号183	Asn-Ala-Ser	配列番号232	配列番号68
HK68-CON-A	配列番号308	Gly-Gly-Gly-Gly	配列番号52	配列番号68

10

20

30

40

50

【0399】

(トランスフェクトされた細胞培養でのヘッドレスHA構築物の発現)

【0400】

タンパク質の完全性及び安定性の予試験として、一時的にトランスフェクトされた細胞で発現されるヘッドレスHA構築物のレベルを、ウェスタンブロット法によって調査した。図11Aに示すように、PR8 HAタンパク質に基づくヘッドレスHA構築物は、トランスフェクションの24時間後に、対応する完全長タンパク質に同等のレベルまで発現された。試験した構築物のパネル中で、cys52及び277を保持し、リンカーペプチド2G、4G又はPGを有するものは、最も高い定常状態レベルを示した。HK68 HAとの関係では(図11B)、類似した結果が見られた: 試験したすべてのHK68ヘッドレスHAが、軸領域に特異的な抗体を用いて検出され、cys52とcys277との間の2G、4G又はPGリンカーを有するものが最も豊富であった。HK68及びPR8の両方で、最も豊富でない構築物は、アミノ酸50及び280の間に直接結合を有するもの、並びに挿入されたグリコシル化部位を有するものであった(図11)。

【0401】

ヘッドレスHA構築物も細胞表面へ輸送されていたかどうかを試験するために、HA2特異的抗体による表面染色に続いて、一時的にトランスフェクトされた293T細胞のFACS分析を実施した。ウェスタンブロット法によって高レベルを示した2G、4G及びPG構築物だけが、このアッセイで試験された。図12に示すように、3つのPR8及び3つのHK68に基づく構築物が検出され、ゴルジを通しての細胞表面への輸送が球状ヘッドドメインの除去によって阻害されなかったことを示した。ウェスタンブロット法又はFACSに基づくアッセイのいずれにおいても、3つのリンカー架橋の間に顕著な差を認めなかった。4Gリンカー架橋を有す

る構築物が、さらなる特性評価のために選択された。

【0402】

(ウイルス様粒子へのヘッドレスHAの組込み)

【0403】

ヘッドレスHA分子の機能のさらなる試験として、細胞表面から出芽してウイルス様粒子(VLP)を生成するそれらの能力を調査した。293T細胞でのヘッドレスHA構築物単独の一時的発現はVLP生成をもたらさないことが見出されたが、HIV Gagに基づく構築物による同時トランスフェクションは、ヘッドレスHA含有粒子の生成を実際にもたらした。具体的には、PR8又はHK68 4GヘッドレスHA構築物は、293T細胞でGag-EGFP(増強された緑色蛍光タンパク質)融合タンパク質と共発現された場合、30%スクロースクッションを通しての沈殿が可能で、ヘッドレスHAタンパク質を含む粒子が細胞培地に放出された(図13)。類似した結果が、外因性トリプシンの存在下(図13の場合)又は不在下で得られた。完全長HAタンパク質と異なって、及び球状ヘッドドメインの欠損に基づいて予想される通り、ヘッドレスHA含有粒子の放出は、ノイラミニダーゼ活性の存在に依存しないことが見出された。

10

【0404】

(PR8ヘッドレスHAによるワクチン接種は、マウスで同種抗原投与に対する保護を提供する)

【0405】

防御免疫応答を誘発するヘッドレスHA構築物によるワクチン接種の能力が、マウスモデルで評価された。マウスがプラスミドDNAを0日目及び21日目に投与され、VLP調製物がフロイントアジュバントと一緒に56日目に送達された、3用量ワクチンレジメンに従った。各DNAワクチンは、pGagEGFPを単独で、又は、完全長PR8 HA、PR8 4GヘッドレスHA若しくはHK68 4GヘッドレスHAをコードするタンパク質発現ベクターと一緒に含み、エレクトロポレーションで筋内に投与された。最終追加免疫のために、150ngのHA含有量のVLP調製物(又はGagのみのVLPの同等量)をフロイント完全アジュバントと合わせて、各マウスに腹腔内投与した。77日目に、マウスをPR8ウイルスで鼻腔内抗原投与し、その後10日間、罹患率及び死亡率について毎日監視した。Gagのみのワクチン接種群では、4匹中3匹のマウスは当初の体重の>25%を失い、したがって死亡と評価され、4番目の動物は15%の体重が減るのが見られた。対照的に、PR8 4GヘッドレスHAでワクチン接種されたすべてのマウスは生存し、最大で平均わずか6%の体重減少であった(図14)。

20

30

【0406】

(PR8ヘッドレスHAによるマウスのワクチン接種は、交差反応性抗血清を導く)

【0407】

インフルエンザウイルスHAタンパク質に対してワクチン接種をされたマウスから収集された血清の反応性を、血球凝集阻止(HAI)アッセイ及びELISAによって調査した。ワクチン構築物中の球状ヘッドドメインの不在に基づいて予想された通り、Gag単独、HK68 4GヘッドレスHA又はPR8 4GヘッドレスHAで免疫化したマウスからのプールされた血清は、抗原投与前のPR8ウイルスに対するHAI活性を示さなかった。対照的に、完全長PR8 HAワクチンを投与されたマウスから得られた抗原投与前血清、並びにすべての抗原投与後の血清は、HAIアッセイでPR8ウイルスに対して強く反応性であった(表7)。

40

【0408】

【表 8】

表 7. ヘッドレスHAワクチン接種マウスの免疫血清における
血球凝集阻止活性の欠如。

ワクチン	Gagのみの抗原投与前血清に対する増加倍率	
	抗原投与前	抗原投与後
Gagのみ	-	8
HK68 4G ヘッドレスHAプラスGag	1	8
PR8 4G ヘッドレスHAプラスGag	1	8
PR8 完全長HAプラスGag	≥128	≥128

10

【0409】

反応性の幅を評価するために、ELISAによって、HA基質団に対して抗原投与前血清が試験された(図15)。濃縮したPR8ピリオン(図15A)に対して、Gagのみ及びHK68 4G抗血清は、最低希釈(1:50)で低レベルのバックグラウンド活性だけを示したが、PR8完全長HAワクチン接種動物からの血清は、1:6250の希釈で陽性シグナルを与えた。PR8 4GヘッドレスHAに対する抗血清は、完全長HAに対するものよりも非力であったが、1:50の希釈で陽性反応を示した。近年の季節性H1N1(A/ニューカレドニア/20/1999; 図12B)及び2009年の大流行H1N1(A/カリフォルニア/04/2009; 図15C)インフルエンザウイルスに由来する組換えHAタンパク質に対して試験された場合、Gagのみ及びHK68 4G抗血清は陰性であったが、完全長PR8 HAを投与されたマウスからの血清は陰性であったか、又は低レベルの反応性を示した。これらの異種H1基質の上では、PR8 4G抗血清は最高レベルの反応性を示し、特に5匹中2匹のマウスからの血清が高い力価を証明した。類似した結果が、H2及びH5サブタイプの組換えHAタンパク質で見られた:A/シンガポール/1/1957(H2N2)及びA/ベトナム/1203/2004(H5N1)HAに対しては、PR8 4Gワクチン接種マウスに由来する血清が中から高の活性を示し、残りの群(完全長HAを含む)からの血清はほとんど陰性であった(図15D及び15E)。最後に、A/香港/1/1968(H3N2)のH3サブタイプHAに対しては、HK68 4G抗血清だけが陽性シグナルを生じた(図15F)。したがって、全体として、ヘッドレスPR8 HAでワクチン接種をしたマウスから得られた血清は、異種株に対して、完全長PR8 HAワクチン接種動物からの血清より高い活性を示した。PR8 4Gワクチン接種マウスの血清力価は、同種PR8ウイルスに対してよりも異種HAタンパク質に対して高いようであるが、用いた基質が異なるために(精製HA対完全体ウイルス)、直接比較をするべきでない。PR8 4G群の中で、特に2匹のマウスからの血清が、ELISAによって比較的高い力価を一貫して示した。これらの同じ2匹のマウスは疾患から完全に保護されたが、それらの3匹の残りの対応物はいずれも抗原投与の後に多少の体重減少を示した点で、これらの血清学的知見は保護データと相関した。

20

30

【0410】

(6.2.3 結論)

この実施例は、HAタンパク質の高免疫原性球状ヘッドを欠き、それによって免疫細胞に保存されたHA軸領域を提供するように設計されている、インフルエンザ血球凝集素(HA)ステムドメインポリペプチド(「ヘッドレスHA構築物」)を記載する。これらのヘッドレスHA構築物は、哺乳動物細胞で安定して発現させることができ、完全長HAポリペプチドに類似した方法で細胞表面を標的にさせることができる。プラスミドDNA及びVLPフォーマットのPR8に基づくHAステムドメインポリペプチドによるマウスの免疫化は、致死性の同種抗原投与の後の死亡に対する完全な保護、及び疾患からの部分的保護を提供した。

40

【0411】

血清学的分析は、完全長PR8 HAワクチンではなく、PR8 4GインフルエンザヘッドレスHA構築物が、群1のHAサブタイプの間で交差反応性である抗体を誘導したことを明らかにし

50

た。この知見は、立体的シールドを通して、又はタンパク質の膜遠位部分の免疫的優位に起因してのいずれかで、完全なHA分子の球状ヘッドドメインが免疫細胞によるSTEM領域の認識を阻害することを示唆する。これらのデータは、ヘッドレスHA構築物によるワクチン接種が、様々なインフルエンザ株に対して保護をもたらすことができることをさらに示唆する。

【0412】

(6.3 実施例3:異種ウイルスによる抗原投与)

上の実施例2に記載されるデータは、PR8ヘッドレスHA構築物でワクチン接種をしたマウスが、PR8ウイルスによる抗原投与から保護される(すなわち、同種抗原投与から保護される)ことを示す。これらのデータは、インフルエンザウイルス血球凝集素STEMドメインポリペプチド(本明細書では「ヘッドレスHA」と称することもある)が、ワクチンとして作用するために十分に免疫原性であることを示すが、達成される保護の幅に関する情報を提供しない。インフルエンザウイルス血球凝集素STEMドメインポリペプチドが、様々な異種ウイルスによる抗原投与から保護する免疫応答を導くことができるかどうかを試験するために、マウスは、5µgの精製されたインフルエンザウイルス血球凝集素STEMドメインポリペプチド、又は対照として完全体不活化インフルエンザウイルス調製物の意味で5µgの完全長HAの腹腔内注射を通してワクチン接種をされる。いずれの場合も、ワクチンは投与前にMF-59アジュバントと合わされる。ワクチン接種の3週後に、8匹のマウスの群が、表8に特定されるウイルス株の10MLD50(50%マウス致死量)により、鼻腔内接種で抗原投与される。マウスは、体重の変化及び死亡について抗原投与から14日後まで毎日監視される。インフルエンザウイルス血球凝集素STEMドメインポリペプチドワクチンは、従来の完全体不活化ウイルスワクチンと比較して、異種ウイルス抗原投与後の死亡及び疾患からの優れた保護を提供することが予想される。

【0413】

【表9】

表8. 抗原投与実験の概要

ワクチン	抗原投与ウイルス	マウスモデル ^a
PR8 4GヘッドレスHA	A/プエルトリコ/8/1934 (H1N1)	C57BL/6
	A/オランダ/602/2009 (新規H1N1)	DBA-2
	A/ベトナム/1203/2004 (H5N1) ^b	C57BL/6
PR8ウイルス	A/プエルトリコ/8/1934 (H1N1)	C57BL/6
	A/オランダ/602/2009 (新規H1N1)	DBA-2
	A/ベトナム/1203/2004 (H5N1)	C57BL/6
HK68 4GヘッドレスHA	X31 (H3N2)	DBA-2
	A/レア/ノースカロライナ 39482/1993 (H7N1)	DBA-2
X31 ^c ウイルス	X31 (H3N2)	DBA-2
	A/レア/ノースカロライナ 39482/1993 (H7N1)	DBA-2

^a 用いられる近交系マウスの系統は、抗原投与ウイルスの死亡率に基づく。より感受性であるDBA-2モデルでは、マウスに対して病原性のより低いウイルス株を用いなければならない。

^b 野生株ウイルスではなく、A/ベトナム/1203/04のHA及びNA遺伝子並びにPR8ウイルスからの残りの6つの遺伝子を有する再組合せウイルスが用いられる。さらに、このウイルスのHAセグメントの多塩基切断部位は、低病原性形に突然変異される。これらの変化は、HA

タンパク質の抗原性に影響しない。

° X31は、A/香港/1/1968(H3N2)ウイルスのHA及びNA遺伝子並びにPR8からの残りの6つの遺伝子を有するマウス順応ウイルスである。

【0414】

本明細書で引用されているすべての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物又は特許出願が引用により組み込まれることが具体的に及び個々に示されているかのように、引用により本明細書に組み込まれる。上の発明は理解の明快さの目的のために例示及び例として多少詳細に記載したが、本発明の教示に照らし、添付の請求項の精神又は範囲を逸脱することなく一定の変更及び修正をそれに加えることができることは、当分野の技術者にとって容易に明らかになる。

【図1A】

▼(成熟残基1)

H1 MKANLLVLLCALA-----AADATTICIGYHANSSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLH
H2 --MAIYVLLIIFPT-----AVKDDICIGYHNSSTKXVDTLERWTVTHAQNLLH
H3 MKTIIALSYIFLCLAGQDLPGMNSTATLCLGHHAANGTIVKTLDDQLEIVNATELQV
H4 MLSIVLFLIAEINS---SQNYTGNVPVICGHHAVANGTIVKTLDDQLEIVNATELQV
H5 --MERIVLLLAIVS-----LVKSDICIGYHANSKTKQVDTIEMKNVTVTHAQDILE
H6 --MAIYVAILAT-----AGSDKICIGYHANSSTQDITLLEKNVTVTHSVNLLH
H7 MNTQILNPAVAVIPFN-----ADKICLGHHAANGTIVKTLERWTVTHAQNLLH
H8 --MEKFAIAT-LAS-----TNAVDRICIGYHNSSTDTVNTLLEKQVPTQIMELVE
H9 --METKAIIAALLMWT-----AANADKICIGYQSTNSTETVDTLTSNVPVTHKELLH
H10 MYIVVVTIALLGAVGK-----LDRIICLGHHAANGTIVKTLTNEGEVVTNATVETE
H11 --MEKTLTFAIFP-----CVKADICIGYHNSSTKXVDTLERWTVTHSVNLLH
H12 --MEKFTLLSTVLA-----SFAVDKICIGYQSTNSTETVNTLSEQNVPTQVRELHV
H13 MALNVIATLLIS-V-----CVHADKICIGYVSTNSSESRVDTLLENGVPTVSSIDLE
H14 MIALILVALALSHATYSQIINTTNGPIICLGHHAANGTIVKTLTNEGEVVTNATVETE
H15 MNTQILNPAVAVIPFN-----ADKICLGHHAANGTIVKTLERWTVTHAQNLLH
H16 MMLKVLVYLLIIVLGR-----YKADKICIGYVSTNSSTETVDTLTSNVPVTHKELLH

▲(成熟残基1)

▼(残基Ap)

H1 DSHNGKLCRLKGIAPLQGLKQNIAGWLLGNPECDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H2 KTHNGKLCRLNGIPLELDGDCIAGWLLGNPECDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H3 SSSGKICNN-PRILLEDGDCIIEALLGDPHCDVFN-ETWDLPERKAFS-KCYYPD
H4 SQNLELPCFS-PLRLDQDQCTIINGALGSPGCDHLG-AEWDVPIERPAVD-TCYPPD
H5 RTHNGKLCSLNGVPLKLLRDCSVAGWLLGNPECDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H6 NQKBERPCKLKKAPLDLQCTIEGWLIGNPQCDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H7 RTMFKICSK-KRTTQDQDQCTIIEGWLIGNPQCDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H8 TEKHPAYCNTDLGAPLELDKCEIAVYIKGNPKCDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H9 TEHNGMLCATDGLHPLLDLCTIEGWLIGNPQCDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H10 STNMLKLCWK-GRSYKDLGNCHFPVGLIGTPVCDPHLT-GTWDTLIERENAI-AHCYPA
H11 TEHTGSPFCSINGKQPIELGDCIAGWLLGNPECDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H12 RGLDPIELCTELGSPVHLGDCIAGWLLGNPECDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H13 TNHTGTYSCLNGVSPVHLGDCIAGWLLGNPECDLLEPVREWSYIVETPNSENGICYPGD
H14 TNHTDELPCFS-PLKLDQDQCHLINGALGSPGCDLQD-TTWDVPIERTPAVD-TCYPPD
H15 ITGIDKVTCK-GKAVDLGSGCGLIITIGPQCDLHLH-FKADLLIERENSD-ICYPR
H16 TNHTGTYSCLNGIPELHGDGSEFGVIGNPSCATNINREWSYILEDPAENKFCYPGD

▲(残基Ap)

H1 FIDYEELRQLQSSVSSFERFEIFPKSSWPHNNTNGV-TAACSHE-GKSSPYRNLWLTB
H2 FNDYEELKHLSSVTHFEKVKLLPK-DRMTQHTTGG-GRACAVS-QNPSFPRNMWLTB
H3 VPDYASLRSLVAS-S-CLTELETEGFTW-TGVTQNGSNAACRGG-NPFSRLNWLTK
H4 VPDYQSLREILAN-N-GRPEIAEFGQ-VTKVQKSGGACRANV-DQFNLKWLTK
H5 FNDYEELKHLSSVTHFEKRIIPR-SASNDHASSGSSACVPI-GRSFLRNVVWLTK
H6 LNEVEELKALIGSERVERFEMFCK-STWTGDTSSGVTACRPN-SGSSFYRNLWLTB
H7 FVNEELRQILRG-S--GGIDRETGMFTY-SGIRTNQTTSAACRGG--SFPYADMWLLS
H8 VNEELRQILRG-S--GGIDRETGMFTY-SGIRTNQTTSAACRGG--SFPYADMWLLS
H9 VNEELRQILRG-S--GGIDRETGMFTY-SGIRTNQTTSAACRGG--SFPYADMWLLS
H10 TINEELRQILRG-S--GGIDRETGMFTY-SGIRTNQTTSAACRGG--SFPYADMWLLS
H11 LESEBELRQILRG-S--GGIDRETGMFTY-SGIRTNQTTSAACRGG--SFPYADMWLLS
H12 TINEELRQILRG-S--GGIDRETGMFTY-SGIRTNQTTSAACRGG--SFPYADMWLLS
H13 LNNWELRQILRG-S--GGIDRETGMFTY-SGIRTNQTTSAACRGG--SFPYADMWLLS
H14 VPDYQSLRSLVAS-S-CLTELETEGFTW-TGVTQNGSNAACRGG-NPFSRLNWLTK
H15 FTNEELRQILRG-S--GGIDRETGMFTY-SGIRTNQTTSAACRGG--SFPYADMWLLS
H16 LDNNGELRHLFSGVNSFRTELINE-SKWNVLD--GVTSACLDR-GASSFYRNLWLTB

H1 -K-EGSYPLKNSVYVKKGEVLLVWGHHPHNSKEQQLNQNENAVSVVSTSNYRRT
H2 -K-GSNYPVLAQSNYNTSGEMLIIVGWHHNDETEQRTLQYQVGTYSVIGTSLNKRIS
H3 S--GSTYVFLVMPNNDNFDRLVIGVHHPSTNQEQTSLVQSGRVTVSTRNSQSSII
H4 SD--GNVFLQNTKINWYDARLYVGVHHPSTNQEQTSLVQSGRVTVSTRNSQSSII
H5 -K-NNTYPTIKRYSYNTNDEDLILLGKIHHPNDAEQTKLYQNTPTVYVSGTSLNDRIS
H6 TK--SAAYSIKGANNYNTGQPLVYVGVHHPSTNQEQTSLVQSGRVTVSTRNSQSSII
H7 NTDNASFPQMTKSYNTRRESALVIGVHHPSTNQEQTSLVQSGRVTVSTRNSQSSII
H8 KE-PDYYDFNEGAVVANNEDDGIIFLWGHHPHPTDTEQTLTKYKANTLSSVTTNINRSPQ

図1A

【図1B】

H9 K--SNSYFQNAHYTNNERENILFMWGIHHPFDTEQDLYKNDATTSVTTEDINRFTK
H10 KTKGNFPQTTNTYRNTDASHLIIIGVHHPSTNQEQTSLVQSGRVTVSTRNSQSSII
H11 -Q-SGTYPVLAQSNYNTSGEMLIIVGWHHNDETEQRTLQYQVGTYSVIGTSLNKRIS
H12 K--SSGFPQMTKSYNTRRESALVIGVHHPSTNQEQTSLVQSGRVTVSTRNSQSSII
H13 -K-NTRYVPIKSYNTRRESALVIGVHHPSTNQEQTSLVQSGRVTVSTRNSQSSII
H14 AT--NGMYPVLAQSNYNTSGEMLIIVGWHHNDETEQRTLQYQVGTYSVIGTSLNKRIS
H15 SMNQVFPQMTKSYNTRRESALVIGVHHPSTNQEQTSLVQSGRVTVSTRNSQSSII
H16 -K-DEKYPVLAQSNYNTSGEMLIIVGWHHNDETEQRTLQYQVGTYSVIGTSLNKRIS

H1 PEIAERPKVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H2 PVIAERPKVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H3 PVIAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H4 PVIAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H5 PEIATRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H6 PEIATRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H7 PVIAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H8 PVIAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H9 PVIAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H10 PVIAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H11 PEIATRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H12 PVIAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H13 LETVAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H14 PVIAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H15 PVIAGRPVVDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEAQNLIAPIYAFALSRGFG-----S
H16 LEIETRII-DGQSRWMLTWLHHPGRIIFESSENGGLIAPRYGVIIEKSGT-----G

▼(残基Ap)

H1 GIITSNASMEH-CNTKQCTPLGAINSLPQYNIHPVTIGCEPKVRSKRLRMTGLRNP
H2 GIMKTEGLBN-CETKQCTPLGAINSLPQYNIHPVTIGCEPKVRSKRLRMTGLRNP
H3 SIMSSDAFIDT-CISECTIPNGSIPNDKFPQVWTKITVACPKVRSKRLRMTGLRNP
H4 TILNATLPIGS-CVSKCHDGLSITTPQNLISFRAVQDCEPRVYKRSKRLRMTGLRNP
H5 AVMKSLPIEN-CDATCQTVAGVLTMTKTPQVNSPLWIGCEPKVRSKRLRMTGLRNP
H6 MGIQSDVQDANCEGECYHSGGTITSLRFPQNIENRAVQDCEPRVYKRSKRLRMTGLRNP
H7 IIQNEDIFIGN-CNTKQCTPLGAINSLPQYNIHPVTIGCEPKVRSKRLRMTGLRNP
H8 ILKT-DLNLGN-CVUQCCTEKGGLMTLPHFNISKVAFGNCPKRVYKRSKRLRMTGLRNP
H9 LGIQSEALIDNSCESEKCFWRGSSINTLRFQNLSPRTVQGCQKPVNQRSLLATGMRNP
H10 KLFPSELNIES-CSTKQCTEIGGITNKSFHNVHRTIGCEPKVRSKRLRMTGLRNP
H11 ILKM-NLPMQZ-CVTEQLNBSGWNTPKFPQNTREYIGKCFKPIFGSSKRLRMTGLRNP
H12 RIFQSRIMSR-CNTKQCTPLGAINSLPQYNIHPVTIGCEPKVRSKRLRMTGLRNP
H13 TVLQSDKRIIS-CTSPCLDKGSIQSDKFPQVNSRATGNCPKVRSKRLRMTGLRNP
H14 LGIQSDAQIDESCCEGCFYSGGTTISLRFQNLISFRAVQDCEPRVYKRSKRLRMTGLRNP
H15 RIFQSGVRRAR-CNTKQCTPLGAINSLPQYNIHPVTIGCEPKVRSKRLRMTGLRNP
H16

▼(HA2 ドメイン開始)

H1 ----SISRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H2 ----QIESRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H3 ----EKQTRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H4 ----EKASRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H5 ----QRKRLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H6 ----QIETRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H7 EFSKRRKRLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H8 ----SVRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H9 ----AVSRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H10 ----EVVQGRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H11 ----AIASRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H12 ----QVQDRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H13 ----AISRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H14 ----GQAKRLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H15 ----EKIRTRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK
H16 ----SIBRGLFGAIAAGFIEGGWQGMIDGWYGHYHNEQSSGVAADKSTQAIIDGITNK

▲(HA2 ドメイン開始)

図1B

【 図 1 C 】

H1 VNTVIERMNIQFVAVGHEFNLEKREKREMLNKKVDDGFLDWTYNABELLVLENERQLDFH
H2 VNSVIERMNTQFVAVGHEFNLEKREKREMLNKKVDDGFLDWTYNABELLVLENERQLDFH
H3 LNRVIEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H4 LNRLEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H5 VNSIIDRMNTQFVAVGHEFNLEKREKREMLNKKVDDGFLDWTYNABELLVLENERQLDFH
H6 VNSIIDRMNTQFVAVGHEFNLEKREKREMLNKKVDDGFLDWTYNABELLVLENERQLDFH
H7 LNRLEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H8 VNSIIDRMNTQFVAVGHEFNLEKREKREMLNKKVDDGFLDWTYNABELLVLENERQLDFH
H9 VNSIIDRMNTQFVAVGHEFNLEKREKREMLNKKVDDGFLDWTYNABELLVLENERQLDFH
H10 LNRLEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H11 VNSIIDRMNTQFVAVGHEFNLEKREKREMLNKKVDDGFLDWTYNABELLVLENERQLDFH
H12 LNRVIEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H13 LNRLEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H14 LNRLEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H15 LNRLEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H16 VNTVIERMNTQFVAVGHEFNLEKREKREMLNKKVDDGFLDWTYNABELLVLENERQLDFH

H1 DSNVKNLYEKVKSQKLNKAKEIENGCFEPYHKCDNECMESVRNGTYDYKPYEESKLNRE
H2 DSNVKNLYEKVKSQKLNKAKEIENGCFEPYHKCDNECMESVRNGTYDYKPYEESKLNRE
H3 DSEMKNLFEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H4 DSEMKNLFEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H5 DSNVKNLYEKVKSQKLNKAKEIENGCFEPYHKCDNECMESVRNGTYDYKPYEESKLNRE
H6 DSNVKNLYEKVKSQKLNKAKEIENGCFEPYHKCDNECMESVRNGTYDYKPYEESKLNRE
H7 DSEMKNLFEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H8 DSNVKNLYEKVKSQKLNKAKEIENGCFEPYHKCDNECMESVRNGTYDYKPYEESKLNRE
H9 DANVNNLYKVRQLRENADQNGCFEIPHKCDNCCIESIRNGTYDHDYRDEALNRF
H10 DSEMKNLFEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H11 DSNVKNLYEKVKSQKLNKAKEIENGCFEPYHKCDNECMESVRNGTYDYKPYEESKLNRE
H12 DANVNNLYKVRQLRENADQNGCFEIPHKCDNCCIESIRNGTYDHDYRDEALNRF
H13 DANVNNLYKVRQLRENADQNGCFEIPHKCDNCCIESIRNGTYDHDYRDEALNRF
H14 DSEMKNLFEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H15 DSEMKNLFEKTRKFRHQIEKFEPSVEGRIQDLEKQVVDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
H16 DANVNNLYKVRQLRENADQNGCFEIPHKCDNCCIESIRNGTYDHDYRDEALNRF

H1 KVDGVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H2 EIKGVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H3 QIKGVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H4 QIKGVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H5 EISGVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H6 EISGVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H7 QIDPVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H8 KINGVLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H9 KINGVLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H10 NINPVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H11 EISGVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H12 KINGVLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H13 EIDGKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H14 KINPVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H15 NINPVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H16 EISGVKLESMG-IYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI

図 1C

【 図 2 】

H1 MK--ANLLVLLCALAAADAD-----TICIGYHANNSTFDVTVLEKRVIVHSYNVLEL
H3 MKFIALALSYIICLALGQDL#GNUNSTAFCLGHIAV#SGTLVFFIDQDLVFAAFELVQ
H8 MK--ALIVILMVVTSNADR-----ICTGITSSNS#VYV#KTAQGE#NV#FV#V#FLTF

▼(Cys52, HA1)
H1 DSHNGKLCRLK-----LAFQLQKCHIAAGLLGN#EFCDFLL#FVRSVSYLVET#NSENG-
H3 SSSYTGKICNNF-----HRIIDUGLDCFLIDALLGDFHCD-V#QNEIWDLE#VERSKAT#-
H8 FPKSHUNLKGTE#TRGKLC#KCLN#D#L#DVALG#R#K#IGKI#S#ARV#S#L#HEV#R#F#T#SGC
▲(Arg50, B-HA1) ▲(Ala66, B-HA1) ▲(Arg80, B-HA1)

H1 ICYFQDFIDYEELELRLQSSVSEI---ERPEI#F#F#S#F#H#I#N#G#V#A#A#C#-#E#G#S#S#L#R#
H3 NCIF#Y#D#V#D#Y#A#S#L#S#L#V#A#S#S#---F#L#E#I#P#E#F#W#G#F#Q#G#G#M#A#C#-#R#G#F#G#I#F#
H8 F#I#H#D#R#K#I#R#Q#L#W#L#K#G#V#E#I#H#L#S#I#H#V#I#N#L#A#F#G#F#Y#K#I#G#F#G#S#C#I#H#G#W#I#Y#

H1 NLLWLEKE-----GSYFKLNSYNNK#K#E#V#L#V#L#G#I#H#F#S#K#E#Q#N#L#Y#Q#N#A#Y#S#
H3 RLNL#T#K#S#G#-----S#Y#F#L#N#V#F#P#N#D#M#D#K#Y#I#G#V#H#S#F#N#Q#F#S#L#Y#Q#S#G#R#V#
H8 T#M#A#V#F#R#N#D#K#N#T#A#I#N#F#L#E#I#E#V#Y#I#C#T#E#G#D#Q#I#V#W#G#I#H#S#E#I#Q#M#A#K#Y#G#D#K#F#

H1 V#F#S#V#H#R#F#E#I#A#R#K#V#R#D#---Q#G#R#M#V#V#L#L#S#D#I#L#F#A#M#N#L#A#P#W#A#
H3 V#T#R#S#Q#S#I#F#N#I#G#S#P#V#R#G#---Q#S#R#S#I#W#T#V#K#S#D#L#V#I#N#S#H#L#A#P#R#Y#
H8 S#S#A#N#V#T#H#V#S#Q#I#G#F#N#Q#T#D#G#L#P#Q#S#R#I#V#D#W#K#S#G#T#I#L#Y#Q#R#I#L#P#K#V#
▲(Trp271)

H1 ALSGIGSGIIFSNASHIECNKCOIFLGAINSLLFYQNIIPVYIGECFKYVRSKALRMV
H3 KMRIGKSS-IMSSUAFLTCTISELIFNGSIFNDKFIQVVKI#Y#G#C#P#Y#K#M#F#L#K#L#
H8 C#A#S#G#S#K#V#-I#G#S#L#I#G#E#A#D#L#H#E#Y#G#L#N#K#S#F#Y#T#E#H#A#I#G#N#F#W#K#T#F#-L#K#L#
▲(Ser277, B-HA1)

▼(HA2 ドメイン開始)
H1 FGLPHE---SIQSHGLI#G#I#A#G#I#E#G#G#I#G#M#D#G#Y#H#H#Q#E#G#S#Y#A#A#Q#S#I#Q#A#I#
H3 I#G#M#N#V#---E#R#Q#I#G#L#I#G#I#A#G#I#E#G#G#I#G#M#D#G#Y#H#H#Q#E#G#S#Y#A#A#Q#S#I#Q#A#I#
H8 N#G#I#R#P#P#A#K#L#K#E#G#I#G#I#A#G#I#E#G#G#I#G#M#D#G#Y#H#H#Q#E#G#S#Y#A#A#Q#S#I#Q#A#I#
▲(B-HA2 ドメイン開始)

H1 NGI#F#E#N#V#I#E#K#N#I#Q#F#A#V#G#H#N#K#L#E#K#R#E#M#L#N#K#V#D#D#G#L#D#I#W#Y#N#A#E#L#L#V#L#E#
H3 D#Q#I#G#K#L#N#V#I#E#K#N#I#Q#F#A#V#G#H#N#K#L#E#K#R#E#M#L#N#K#V#D#D#G#L#D#I#W#Y#N#A#E#L#L#V#L#E#
H8 N#K#I#K#N#L#N#S#E#L#E#V#K#N#L#Q#L#S#G#M#D#E#L#H#E#I#L#E#D#E#V#D#L#R#D#I#S#S#Q#I#E#L#A#V#L#L#S#E#

H1 F#I#L#D#H#S#N#V#K#N#L#E#K#V#K#S#Q#K#N#K#A#I#G#N#C#I#F#E#Y#H#K#D#N#E#C#M#S#V#R#N#G#Y#D#Y#K#S#E#
H3 F#I#L#D#S#E#M#N#L#E#K#R#E#M#L#N#K#V#D#D#G#L#D#I#W#Y#N#A#E#L#L#V#L#E#
H8 G#I#N#S#E#D#H#L#L#E#K#L#K#M#L#G#S#A#V#I#G#N#C#I#F#E#Y#H#K#D#N#E#C#M#S#V#R#N#G#Y#D#Y#K#S#E#

H1 SKLNH-EKVDGKLESHGIYQLAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFPMCSNGSLQCRICI
H3 ALMNH-IQIKGVKLESGYKRWLLWLSFAISCI LLVYVLLGII-#M#A#C#R#G#N#I#R#M#C#I#
H8 I#E#S#L#I#A#S#L#N#D#G#L#W#I#L#L#L#Y#F#A#S#S#L#V#L#M#A#I#V#Y#V#S#R#W#S#S#I#C#L

図 2

【 図 3 】

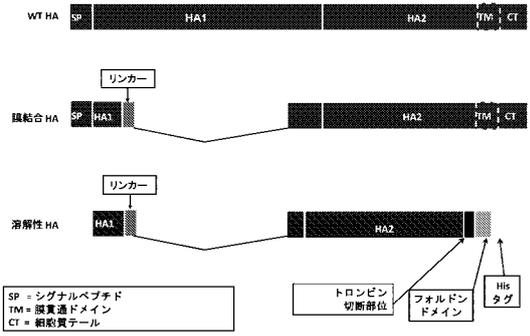


図 3

【 図 4 】

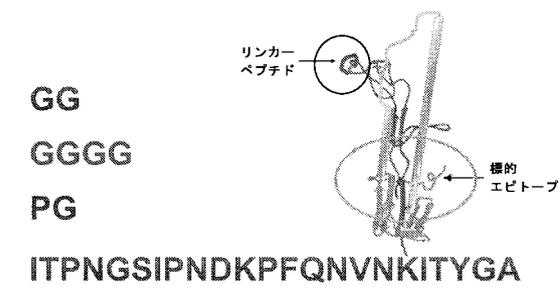


図 4

【 図 5 】

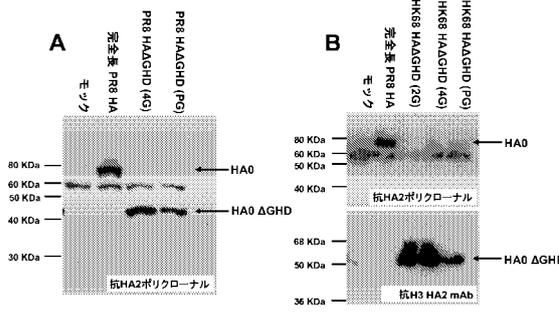


図 5

【 6 A 】

1 AGCAAAGCA GGGGAAAATA AAAACAACCA AAATGAAGGC AAACCTACTG
M K A N L L

51 GTCCTGTAA GTGCACTTGC AGCTGCAGAT GCAGACACAA TATGTATAGG
V L L S A L A A A D A D T I C I G

101 CTACCATGCG AACAAATCAA CCGACACTGT TGACACAGTA CTCGAGAAGA
Y H A N N S T D T V D T V L E K N

151 ATGTGACAGT GACACACTCT GTTAACCTGC TCGAAGACAG CCACAACGGA
V T V T H S V N L L E D S H N G

201 AAACATATGT GAGGCTGTAA CACGAAGTGT CAACACCCCC TGGGAGCTAT
K L C G G C N T K C Q T P L G A I

251 AAACAGCAGT CTCCTTACC AGAATATACA CCCAGTCACA ATAGGAGAGT
N S S L P Y Q N I H P V T I G E C

301 GCCCAAAATA CGTCAGGAGT GCCAAATGA GGTGGTTAC AGGACTAAGG
P K Y V R S A K L R M V T G L R

351 AACACTCCGT CCATTCATC CAGAGTCTA TTTGGAGCCA TTGCCGGTTT
N T P S I Q S R G L F G A I A G F

401 TATTGAAGGG GGATGGACTG GAATGATAGA TGGATGGTAT GGTATCATC
I E G G W T G M I D G W Y G Y H H

451 ATCAGAATGA ACAGGGATCA GGCTATGCAG CGGATCAAAA AAGCACACAA
Q N E Q G S G Y A A D Q K S T Q

501 AATGCCATTA ACGGGATTAC AAACAAGTG AACACTGTTA TCGAATAAAT
N A I N G I T N K V N T V I E K M

551 GAACATCAA TTCACAGCTG TGGTAAAGA ATTCAACAAA TTAGAAAAAA
N I Q F T A V G K E F N K L E K R

601 GGATGGAAAA TTAAATAAA AAAGTTGATG ATGGATTTCT GGACATTTGG
M E N L N K K V D D G F L D I W

651 ACATATAATG CAGAATGTT AGTTCTACTG GAAATGAAA GCACTCTGGA
T Y N A E L L V L L E N E R T L D

701 TTTCCATGAC TCAAATGTA AGAATCTGTA TGAGAAAGTA AAAAGCCAAT
F H D S N V K N L Y E K V K S Q L

751 TAAAGAATAA TGCCAAAGAA ATCGGAAATG GATGTTTTGA GTTCTACCAC
K N N A K E I G N G C F E F Y H

6A

【 6 B 】

801 AAGTGTGACA ATGAATGCAT GAAAAGTGA AGAATGGGA CTTATGATTA
K C D N E C M E S V R N G T Y D Y

851 TCCCAAATAT TCAGAAGAGT CAAAGTTGAA CAGGGAAAAG GTAGATGGAG
P K Y S E E S K L N R E K V D G V

901 TGAATTTGGA ATCAATGGGG ATCTATCAGA TTCTGGCGAT CTAICTCACT
K L E S M G I Y Q I L A I Y S T

951 GTCGCCAGTT CACTGGTGCT TTTGGTCTCC CTGGGGGCAA TCAGTTTCTG
V A S S L V L L V S L G A I S F W

1001 GATGTGTCTT AATGGATCTT TGCAGTGCAG AATATGCATC TGAGATTAGA
M C S N G S L Q C R I C I *

1051 ATTTAGAAA TATGAGGAAA AACACCCCTTG TTTCTACT

6B

【 7 A 】

1 AGCAAAGCA GGGGAAAATA AAAACAACCA AAATGAAGGC AAACCTACTG
M K A N L L

51 GTCCTGTAA GTGCACTTGC AGCTGCAGAT GCAGACACAA TATGTATAGG
V L L S A L A A A D A D T I C I G

101 CTACCATGCG AACAAATCAA CCGACACTGT TGACACAGTA CTCGAGAAGA
Y H A N N S T D T V D T V L E K N

151 ATGTGACAGT GACACACTCT GTTAACCTGC TCGAAGACAG CCACAACGGA
V T V T H S V N L L E D S H N G

201 AAACATATGT GAGGCTGTAA CACGAAGTGT CAACACCCCC TGGGAGCTAT
K L C G G C N T K C Q T P L G A I

251 AGCTATAAC AGCAGTCTCC CTTACCAGAA TATACACCCA GTCACAATAG
A I N S S L P Y Q N I H P V T I G

301 GAGAGTGCCC AAAATACGTC AGGAGTGCCA AATTGAGGAT GGTACAGGA
E C P K Y V R S A K L R M V T G

351 CTAAGGAACA CTCCTCCAT TCAATCCAGA GGTCTATTG GAGCCATTC
L R N T P S I Q S R G L F G A I A

401 CGGTTTTATT GAAGGGGGAT GGACTGGAAT GATAGATGGA TGGTATGGTT
G F I E G G W T G M I D G W Y G Y

451 ATCATCATCA GAATGAACAG GGATCAGGCT ATGCAGCGGA TCAAAAAGC
H H Q N E Q G S G Y A A D Q K S

501 ACACAAAATG CCATTAACGG GATTACAAC AAGGTGAACA CTGTTATCGA
T Q N A I N G I T N K V N T V I E

551 GAAAATGAAC ATTCAATTA CAGCTGTGGG TAAAGAATTC AACAAATAG
K M N I Q F T A V G K E F N K L E

601 AAAAAGGAT GAAAATTTA AATAAAAAG TTAGATGATG ATTTCTGGAC
K R M E N L N K K V D D G F L D

651 ATTTGGACAT ATAATGCAGA ATTGTTAGTT CTACTGGAAA ATGAAAGGAC
I W T Y N A E L L V L L E N E R T

701 TCTGGATTC CATGACTCAA ATGTGAAGAA TCTGTATGAG AAAGTAAAA
L D F H D S N V K N L Y E L K V K S

751 GCCAATTAAG GAATATGCC AAAGAATCG GAATGGATG TTTGAGTTC
Q L K N N A K E I G N G C F E F

7A

【 7 B 】

801 TACCACAAGT GTGACAATGA ATGCATGAA AGTGAAGAA ATGGGACTTA
Y H K C D N E C M E S V R N G T Y

851 TGATTATCCC AAATATTCAG AAGAGTCAA GTTGAACAGG GAAAAGGTAG
D Y P K Y S E E S K L N R E K V D

901 ATGGAGTGAA ATTGAATCA ATGGGGATCT ATCAGATICT GCGATCTAC
G V K L E S M G I Y Q I L A I Y

951 TCAACTGTGC CCAGTTCCT GGTGCTTTTG GTCTCCCTGG GGGCAATCAG
S T V A S S L V L L V S L G A I S

1001 TTTCTGGATG TGTCTAATG GATCTTTGCA GTCAGAATA TGCATCTGAG
F W M C S N G S L Q C R I C I *

1051 ATTAGAATTT CAGAAATATG AGGAAAACA CCCTTGTTC TACT

7B

【 8 A 】

1 AGCAAAAGCA GGGGAAAATA AAAACAACCA AAATGAAGCC AAACCTACTG
M K A N L L

51 GTCCTGTAA GTGCACTTGC AGCTGCAGAT GCAGACACAA TATGTATAGG
V L L S A L A A A D A D T I C I G

101 CTACCATGCG AACAATTCAA CCGACACTGT TGACACAGTA CTCGAGAAGA
Y H A N N S T D T V D T V L E K N

151 ATGTGACAGT GACACACTCT GTTAACTGTC TCGAAGACAG CCACAACGGA
V T V T H S V N L L E D S H N G

201 AAACATGATC CAGGCTGTAA CACGAAGTGT CAAACACCCC TGGGAGCTAT
K L C P G C N T K C Q T P L G A I

251 AAACAGCAGT CTCCTTACC AGAATATACA CCCAGTCACA ATAGGAGAGT
N S S L P Y Q N I H P V T I G E C

301 GCCCAAAATA CGTCAGGAGT GCCAAATTGA GGATGGTTAC AGGACTAAGG
P K Y V R S A K L R M V T G L R

351 AACACTCCGT CCATTCAATC CAGAGTCTA TTTGGAGCCA TTGCGGGTTT
N T P S I Q S R G L F G A I A G F

401 TATTGAAGGG GGATGGACTG GAATGATAGA TGGATGGTAT GGTATCATC
I E G G W T G M I D G W Y G Y H H

451 ATCAGAATGA ACAGGGATCA GGCTATGCGC CGGATCAAAA AAGCACACAA
Q N E Q G S G Y A A D Q K S T Q

501 AATGCCATTA ACGGGATTAC AAACAAGGTG AACACTGTTA TCGAGAAAAT
N A I N G I T N K V N T V I E K M

551 GAACATTCAA TTCACAGCTG TGGGTAAAGA ATTCAACAAA TTAGAAAAAA
N I Q F T A V G K E F N K L E K R

601 GGATGGAAAA TTTAAATAAA AAAGTTGATG ATGGATTCTT GGACATTTGG
M E N L N K K V D D G F L D I W

651 ACATATAATG CAGAATTGTT AGTTCTACTG GAAAATGAAA GGACTCTGGA
T Y N A E L L V L L E N E R T L D

701 TTTCCATGAC TCAAATGTGA AGAATCTGTA TGAGAAAGTA AAAAGCCAAT
F H D S N V K N L Y E K V K S Q L

751 TAAAGAATAA TGCCAAGAA ATCGGAAATG GATGTTTGA GTTCTACCAC
K N N A K E I G N G C F E F Y H

8A

【 8 B 】

801 AAGTGTGACA ATGAATGCAT GAAAGTGTA AGAATGGGA CTTATGATTA
K C D N E C M E S V R N G T Y D Y

851 TCCCAAATAT TCAGAAGAGT CAAAGTTGAA CAGGGAAAAG GTAGATGGAG
P K Y S E E S K L N R E K V D G V

901 TGAAATGGA ATCAATGGGG ATCTATCAGA TTCTGGCGAT CTACTCAACT
K L E S M G I Y Q I L A I Y S T

951 GTCGCCAGTT CACTGGTGCT TTTGGTCTCC CTGGGGGCAA TCAGTTTCTG
V A S S L V L L V S L G A I S F W

1001 GATGTGTTCT AATGGATCTT TGCAATGCGC AATATGCATC TGAGATTAGA
M C S N G S L Q C R I C I *

1051 ATTTTCAGAAA TATGAGGAAA AACACCCCTTG TTTTCTACT

8B

【 9 A 】

1 ATGGACACAA TATGTATAGG CTACCATGCG AACAATTCAA CCGCACTGT
M D T I C I G Y H A N N S T D T V

51 TGACACAGTA CTCGAGAAGA ATGTGACAGT GACACACTCT GTTAACTGCG
D T V L E K N V T V T H S V N L L

101 TCGAAGACAG CCACAACGGA AAACATATGTG GAGGCGGAGG TTGTAACAGG
E D S H N G K L C G G G C N T

151 AAGTGTCAAA CACCCCTGGG AGCTATAAAG AGCAGTCTCC CTTACCAGAA
K C Q T P L G A I N S S L P Y Q N

201 TATACACCCA GTCACAATAG GAGAGTGCCC AAAATACGTC AGGAGTGCCA
I H P V T I G E C P K Y V R S A K

251 AATTGAGGAT GGTACAGGA CTAAGGAACA CTCCTCCAT TCAATCCAGA
L R M V T G L R N T P S I Q S R

301 GGTCTATTTG GAGCCATTGC CGGTTTTATT GAAGGGGGAT GGAATGGAAT
G L F G A I A G F I E G G W T G M

351 GATAGATGGA TGGTATGGTT ATCATCATCA GAATGAACAG GGATCAGGCT
I D G W Y G Y H H Q N E Q G S G Y

401 ATGCAGCGGA TCAAAAAGC ACACAAAATG CCATTAACGG GATTACAAC
A A D Q K S T Q N A I N G I T N

451 AAGGTGAACA CTGTTATCGA GAAAATGAAC ATTCAATTCA CAGCTGTGGG
K V N T V I E K M N I Q F T A V G

501 TAAAGAATTC AACAAATTAG AAAAAAGGAT GGAATAATTA AATAAAAAAG
K E F N K L E K R M E N L N K K V

551 TTGATGATGG ATTTCTGGAC ATTTGGACAT ATAATGACA ATTGTAGTT
D D G F L D I W T Y N A E L L V

601 CTACTGGAAA ATGAAAGGAC TCTGGATTTT CATGACTCAA ATGTGAAGAA
L L E N E R T L D F H D S N V K N

651 TCTGTATGAG AAAGTAAAA GCCAATTAAG GAATAATGCC AAAGAAATCG
L Y E K V K S Q L K N N A K E I G

701 GAAATGGATG TTTTGAATTC TACCACAAGT GTGACAATGA ATGCATGGAA
N G C F E F Y H K C D N E C M E

751 AGTGTAAAGAA ATGGGACTTA TGATTATCCC AAATATTGAG AAGAGTCAAA
S V R N G T Y D Y P K Y S E E S K

9A

【 9 B 】

801 GTTGAACAGG GAAAAGGTAG ATGGAGTGGG TTCTCTGTTT CCGCGTGGTT
L N R E K V D G V R S L V P R G S

851 CTCGGGGTTC TGGTTACATC CCGGAAGCTC CGCGTGACGG TCAGGCTTAC
P G S G Y I P E A P R D G Q A Y

901 GTTCGTAAAG ACGGTGAATG GGTTCCTGCT TCTACCTTCC TGCACCACCA
V R K D G E W V L L S T F L H H H

951 CCACCACCAC TGA
H H H *

9B

【 図 1 0 】

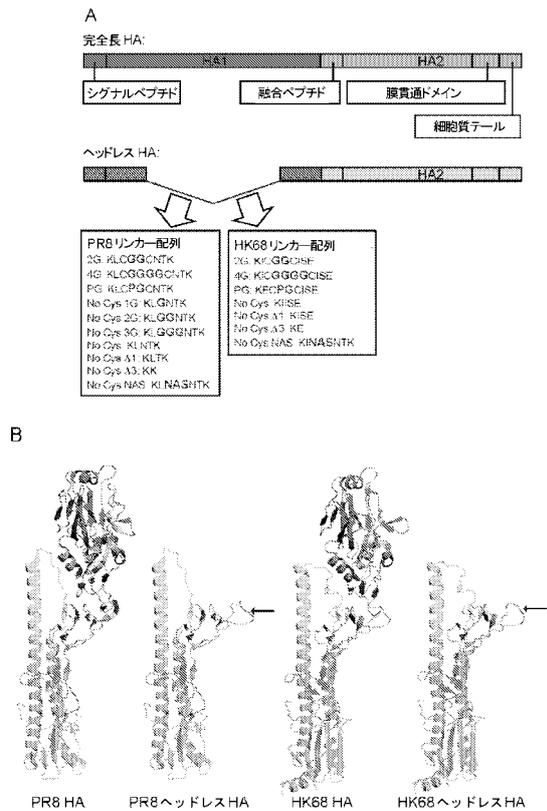


図 10A - 10B

【 図 1 1 】

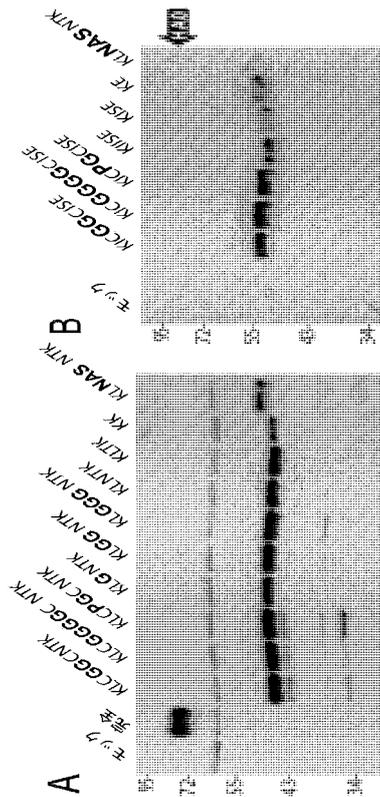


図 11A - 11B

【 図 1 2 】

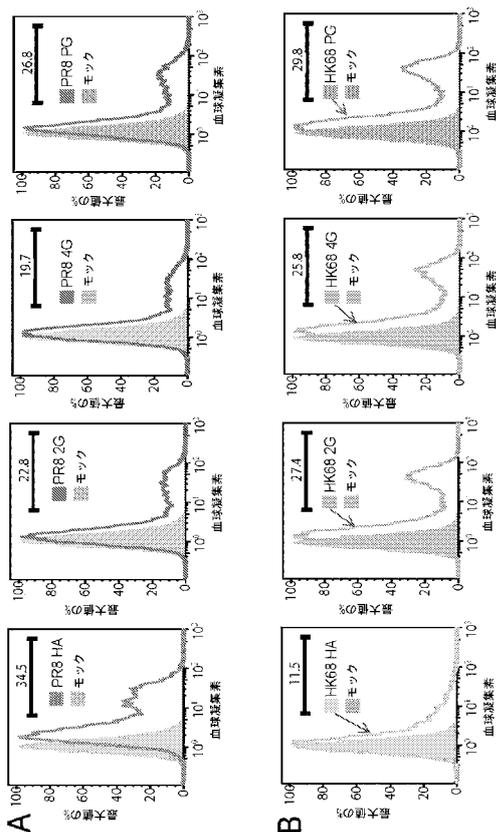


図 12A - 12B

【 図 1 3 】

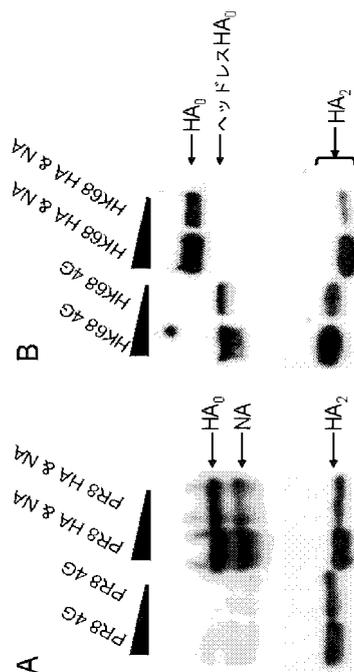


図 13A - 13B

【 図 1 4 】

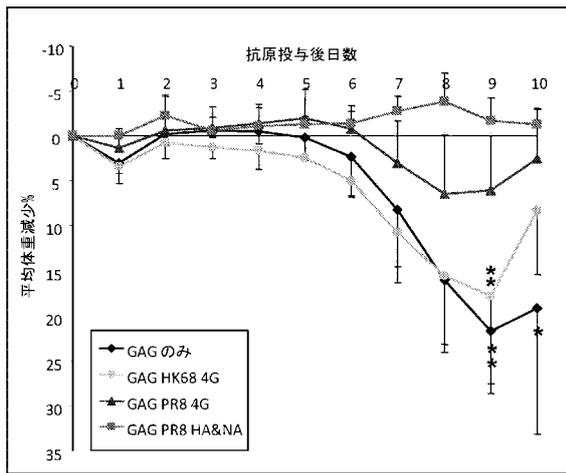


図 14

【 図 1 5 A - C 】

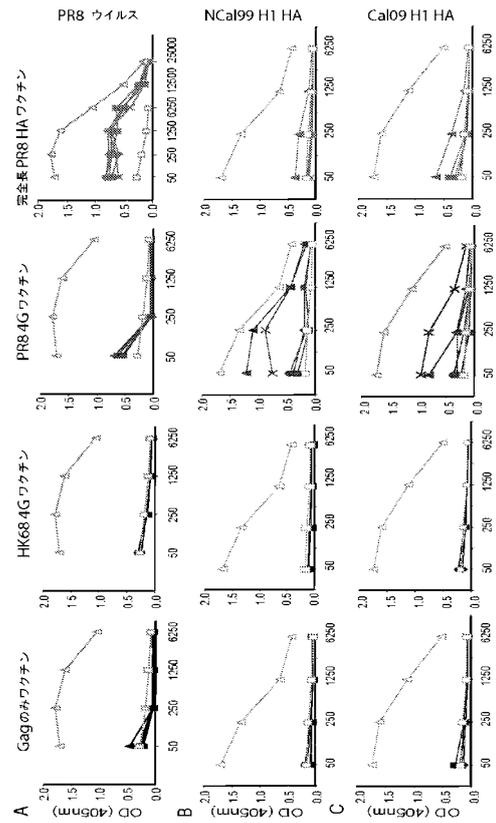


図 15A-15C

【 図 1 5 D - F 】

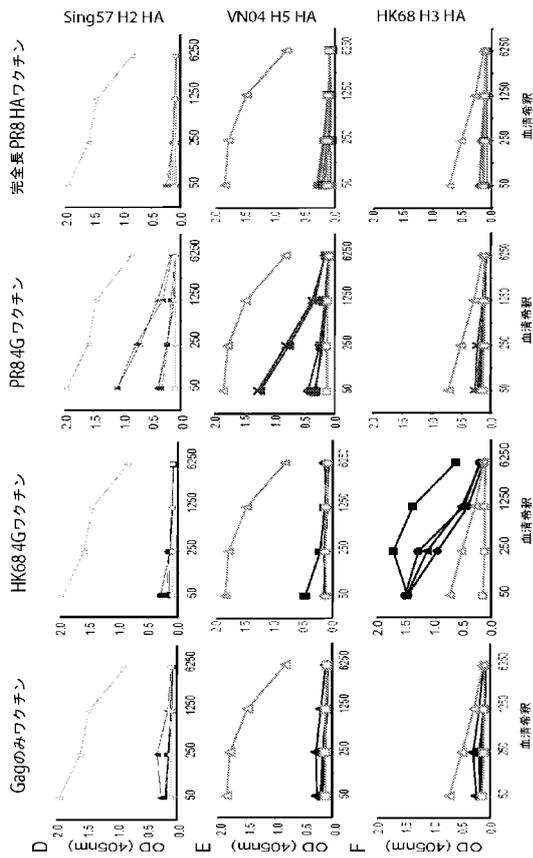


図 15D-15F

【 図 1 6 】

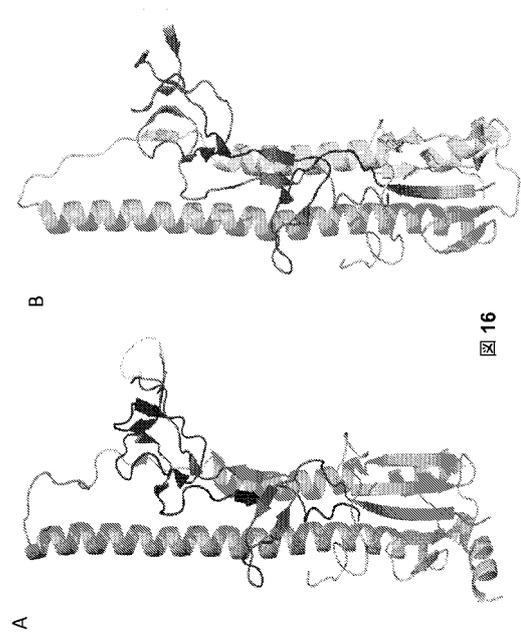


図 16

【 図 1 7 】

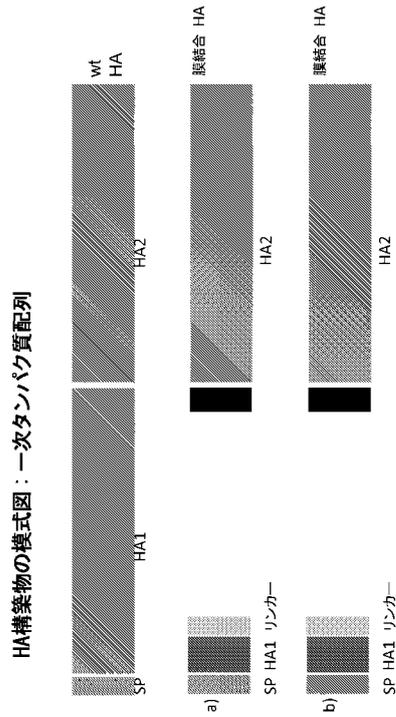


図 17

【 配列表 】

2018134107000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成30年6月5日(2018.6.5)

【 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 】

本願明細書に実質的に記載された、新規な物、方法及び製造方法。

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 0 2 2

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 0 2 2 】

「HA1のC末端ステムセグメント」は、インフルエンザ血球凝集素HA1ポリペプチドのステムドメインのカルボキシ末端部分に対応するポリペプチドセグメントを指す。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、HA1ドメインのアミノ酸 A_q から A_{C-term} までにほぼ対応するアミノ酸残基からなる。 A_q は、HA1のN末端ステムセグメント中のシステイン残基とジスルフィド結合を形成する、又は形成することができる、HA1のC末端ステムセグメント中のシステイン残基である。 A_{C-term} は、当業者によって認識されているようにHA1ドメインのC末端アミノ酸である。残基 A_q は、図1のインフルエンザA型血球凝集素ポリ

ペプチドで同定されている。例示的なHA1のC末端ステムセグメントを、本明細書に記載する。特定の実施態様では、HA1のC末端ステムセグメントは、H3血球凝集素からのHA1のアミノ酸277~329にほぼ対応するアミノ酸残基からなる。なお、この番号付け方式では、1は、シグナルペプチドが除去されている成熟したHA0タンパク質のN末端アミノ酸を指す。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0134

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0134】

特定の実施態様では、リンカーは直接結合である。特定の実施態様では、リンカーは、Gly、Gly-Gly、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号319）及びGly-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号320）からなる群から選択される。特定の実施態様では、リンカーは、Gly-Pro及びPro-Glyからなる群から選択される。特定の実施態様では、リンカーは、例えば配列【化3】

ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA（配列番号165）

を有する281ターンループである。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0152

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0152】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され：

(配列番号34)-LL-(配列番号50)-(配列番号82)、
 (配列番号35)-LL-(配列番号51)-(配列番号83)、
 (配列番号36)-LL-(配列番号52)-(配列番号84)、
 (配列番号37)-LL-(配列番号53)-(配列番号85)、
 (配列番号38)-LL-(配列番号54)-(配列番号86)、
 (配列番号39)-LL-(配列番号55)-(配列番号87)、
 (配列番号40)-LL-(配列番号56)-(配列番号88)、
 (配列番号41)-LL-(配列番号57)-(配列番号89)、
 (配列番号42)-LL-(配列番号58)-(配列番号90)、
 (配列番号43)-LL-(配列番号59)-(配列番号91)、
 (配列番号44)-LL-(配列番号60)-(配列番号92)、
 (配列番号45)-LL-(配列番号61)-(配列番号93)、
 (配列番号46)-LL-(配列番号62)-(配列番号94)、
 (配列番号47)-LL-(配列番号63)-(配列番号95)、
 (配列番号48)-LL-(配列番号64)-(配列番号96)、及び
 (配列番号49)-LL-(配列番号65)-(配列番号97)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化7】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),
(Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0153

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0153】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され：

(配列番号34)-LL-(配列番号50)-(配列番号82)-(配列番号98)、
(配列番号35)-LL-(配列番号51)-(配列番号83)-(配列番号99)、
(配列番号36)-LL-(配列番号52)-(配列番号84)-(配列番号100)、
(配列番号37)-LL-(配列番号53)-(配列番号85)-(配列番号101)、
(配列番号38)-LL-(配列番号54)-(配列番号86)-(配列番号102)、
(配列番号39)-LL-(配列番号55)-(配列番号87)-(配列番号103)、
(配列番号40)-LL-(配列番号56)-(配列番号88)-(配列番号104)、
(配列番号41)-LL-(配列番号57)-(配列番号89)-(配列番号105)、
(配列番号42)-LL-(配列番号58)-(配列番号90)-(配列番号106)、
(配列番号43)-LL-(配列番号59)-(配列番号91)-(配列番号107)、
(配列番号44)-LL-(配列番号60)-(配列番号92)-(配列番号108)、
(配列番号45)-LL-(配列番号61)-(配列番号93)-(配列番号109)、
(配列番号46)-LL-(配列番号62)-(配列番号94)-(配列番号110)、
(配列番号47)-LL-(配列番号63)-(配列番号95)-(配列番号111)、
(配列番号48)-LL-(配列番号64)-(配列番号96)-(配列番号112)、及び
(配列番号49)-LL-(配列番号65)-(配列番号97)-(配列番号113)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化8】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),
(Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0154

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0154】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球

凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され：

(配列番号34)-LL-(配列番号50)-(配列番号82)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号35)-LL-(配列番号51)-(配列番号83)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号36)-LL-(配列番号52)-(配列番号84)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号37)-LL-(配列番号53)-(配列番号85)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号38)-LL-(配列番号54)-(配列番号86)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号39)-LL-(配列番号55)-(配列番号87)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号40)-LL-(配列番号56)-(配列番号88)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号41)-LL-(配列番号57)-(配列番号89)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号42)-LL-(配列番号58)-(配列番号90)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号43)-LL-(配列番号59)-(配列番号91)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号44)-LL-(配列番号60)-(配列番号92)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号45)-LL-(配列番号61)-(配列番号93)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号46)-LL-(配列番号62)-(配列番号94)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号47)-LL-(配列番号63)-(配列番号95)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号48)-LL-(配列番号64)-(配列番号96)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、及び

(配列番号49)-LL-(配列番号65)-(配列番号97)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化9】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),

(Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0155

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0155】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され：

(配列番号34)-LL-(配列番号50)-(配列番号82)-(配列番号98)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号35)-LL-(配列番号51)-(配列番号83)-(配列番号99)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号36)-LL-(配列番号52)-(配列番号84)-(配列番号100)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号37)-LL-(配列番号53)-(配列番号85)-(配列番号101)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号38)-LL-(配列番号54)-(配列番号86)-(配列番号102)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号39)-LL-(配列番号55)-(配列番号87)-(配列番号103)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号40)-LL-(配列番号56)-(配列番号88)-(配列番号104)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号41)-LL-(配列番号57)-(配列番号89)-(配列番号105)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号42)-LL-(配列番号58)-(配列番号90)-(配列番号106)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号43)-LL-(配列番号59)-(配列番号91)-(配列番号107)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号44)-LL-(配列番号60)-(配列番号92)-(配列番号108)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号45)-LL-(配列番号61)-(配列番号93)-(配列番号109)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号46)-LL-(配列番号62)-(配列番号94)-(配列番号110)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号47)-LL-(配列番号63)-(配列番号95)-(配列番号111)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号48)-LL-(配列番号64)-(配列番号96)-(配列番号112)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、及び

(配列番号49)-LL-(配列番号65)-(配列番号97)-(配列番号113)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化10】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),

(Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0156

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 1 5 6 】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され：

(配列番号177)-LL-(配列番号226)-(配列番号66)、
(配列番号178)-LL-(配列番号227)-(配列番号66)、
(配列番号179)-LL-(配列番号228)-(配列番号66)、
(配列番号180)-LL-(配列番号229)-(配列番号67)、
(配列番号181)-LL-(配列番号230)-(配列番号67)、
(配列番号182)-LL-(配列番号231)-(配列番号67)、
(配列番号183)-LL-(配列番号232)-(配列番号68)、
(配列番号184)-LL-(配列番号233)-(配列番号68)、
(配列番号185)-LL-(配列番号234)-(配列番号68)、
(配列番号186)-LL-(配列番号235)-(配列番号69)、
(配列番号187)-LL-(配列番号236)-(配列番号69)、
(配列番号188)-LL-(配列番号237)-(配列番号69)、
(配列番号189)-LL-(配列番号238)-(配列番号70)、
(配列番号190)-LL-(配列番号239)-(配列番号70)、
(配列番号191)-LL-(配列番号240)-(配列番号70)、
(配列番号192)-LL-(配列番号241)-(配列番号71)、
(配列番号193)-LL-(配列番号242)-(配列番号71)、
(配列番号194)-LL-(配列番号243)-(配列番号71)、
(配列番号195)-LL-(配列番号244)-(配列番号72)、
(配列番号196)-LL-(配列番号245)-(配列番号72)、
(配列番号197)-LL-(配列番号246)-(配列番号72)、
(配列番号198)-LL-(配列番号247)-(配列番号73)、
(配列番号199)-LL-(配列番号248)-(配列番号73)、
(配列番号200)-LL-(配列番号249)-(配列番号73)、
(配列番号201)-LL-(配列番号250)-(配列番号74)、
(配列番号202)-LL-(配列番号251)-(配列番号74)、
(配列番号203)-LL-(配列番号252)-(配列番号74)、
(配列番号204)-LL-(配列番号253)-(配列番号75)、
(配列番号205)-LL-(配列番号254)-(配列番号75)、
(配列番号206)-LL-(配列番号255)-(配列番号75)、
(配列番号207)-LL-(配列番号256)-(配列番号76)、
(配列番号208)-LL-(配列番号257)-(配列番号76)、
(配列番号209)-LL-(配列番号258)-(配列番号76)、
(配列番号210)-LL-(配列番号259)-(配列番号77)、
(配列番号211)-LL-(配列番号260)-(配列番号77)、
(配列番号212)-LL-(配列番号261)-(配列番号77)、
(配列番号213)-LL-(配列番号262)-(配列番号78)、
(配列番号214)-LL-(配列番号263)-(配列番号78)、
(配列番号215)-LL-(配列番号264)-(配列番号78)、
(配列番号216)-LL-(配列番号265)-(配列番号79)、
(配列番号217)-LL-(配列番号266)-(配列番号79)、
(配列番号218)-LL-(配列番号267)-(配列番号79)、
(配列番号219)-LL-(配列番号268)-(配列番号80)、
(配列番号220)-LL-(配列番号269)-(配列番号80)、
(配列番号221)-LL-(配列番号270)-(配列番号80)、
(配列番号222)-LL-(配列番号271)-(配列番号81)、
(配列番号223)-LL-(配列番号272)-(配列番号81)、

(配列番号224)-LL-(配列番号273)-(配列番号81)、
 (配列番号309)-LL-(配列番号310)-(配列番号66)、及び
 (配列番号308)-LL-(配列番号52)-(配列番号68)、
 式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書
 に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有
 結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、
 【化 1 1】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),
 (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 7】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球
 凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号160)、
 (配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号160)、
 (配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号160)、及び
 (配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号160)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書
 に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有
 結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化 1 2】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),
 (Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 8】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球
 凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)、
 (配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)、
 (配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)、及び
 (配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書

に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、
【化13】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),
(Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0159

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0159】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号162)、

(配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号162)、

(配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号162)、及び

(配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号162)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化14】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),

(Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0160

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0160】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、及び

(配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)

号166)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、
【化15】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),

(Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0161

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0161】

特定の実施態様では、以下からなる群から選択される配列を有するインフルエンザ血球凝集素ステムドメインポリペプチドが、本明細書で提供され:

(配列番号154)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号162)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号155)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号162)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

(配列番号156)-LL-(配列番号158)-(配列番号161)-(配列番号162)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、及び

(配列番号157)-LL-(配列番号159)-(配列番号161)-(配列番号162)-(配列番号168)-(配列番号167)-(配列番号166)、

式中、上の各配列は本明細書に記載されるように隣接した配列に連結され、LLは本明細書に記載されるリンカーである。詳細には、HA1のC末端セグメントは、HA2ドメインに共有結合していても、又は非共有結合で連結していてもよい。特定の実施態様では、LLは、

【化16】

直接結合, Gly, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号 319),

(Gly)_n, Gly-Pro, ITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA (配列番号165)及びAsn-Ala-Ser

からなる群から選択される。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0409

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0409】

反応性の幅を評価するために、ELISAによって、HA基質団に対して抗原投与前血清が試験された(図15)。濃縮したPR8ピリオン(図15A)に対して、Gagのみ及びHK68 4G抗血清は、最低希釈(1:50)で低レベルのバックグラウンド活性だけを示したが、PR8完全長HAワクチン接種動物からの血清は、1:6250の希釈で陽性シグナルを与えた。PR8 4GヘッドレスHAに対する抗血清は、完全長HAに対するものよりも非力であったが、1:50の希釈で陽性反応を示した。近年の季節性H1N1(A/ニューカレドニア/20/1999; 図15B)及び2009年の大流行H1N1

(A/カリフォルニア/04/2009; 図15C) インフルエンザウイルスに由来する組換えHAタンパク質に対して試験された場合、Gagのみ及びHK68 4G抗血清は陰性であったが、完全長PR8 HAを投与されたマウスからの血清は陰性であったか、又は低レベルの反応性を示した。これらの異種H1基質の上では、PR8 4G抗血清は最高レベルの反応性を示し、特に5匹中2匹のマウスからの血清が高い力価を証明した。類似した結果が、H2及びH5サブタイプの組換えHAタンパク質で見られた:A/シンガポール/1/1957(H2N2)及びA/ベトナム/1203/2004(H5N1)HAに対しては、PR8 4Gワクチン接種マウスに由来する血清が中から高の活性を示し、残りの群(完全長HAを含む)からの血清はほとんど陰性であった(図15D及び15E)。最後に、A/香港/1/1968(H3N2)のH3サブタイプHAに対しては、HK68 4G抗血清だけが陽性シグナルを生じた(図15F)。したがって、全体として、ヘッドレスPR8 HAでワクチン接種をしたマウスから得られた血清は、異種株に対して、完全長PR8 HAワクチン接種動物からの血清より高い活性を示した。PR8 4Gワクチン接種マウスの血清力価は、同種PR8ウイルスに対してよりも異種HAタンパク質に対して高いようであるが、用いた基質が異なるために(精製HA対完全体ウイルス)、直接比較をするべきでない。PR8 4G群の中で、特に2匹のマウスからの血清が、ELISAによって比較的高い力価を一貫して示した。これらの同じ2匹のマウスは疾患から完全に保護されたが、それらの3匹の残りの対応物はいずれも抗原投与の後に多少の体重減少を示した点で、これらの血清学的知見は保護データと相関した。

【手続補正15】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図4】

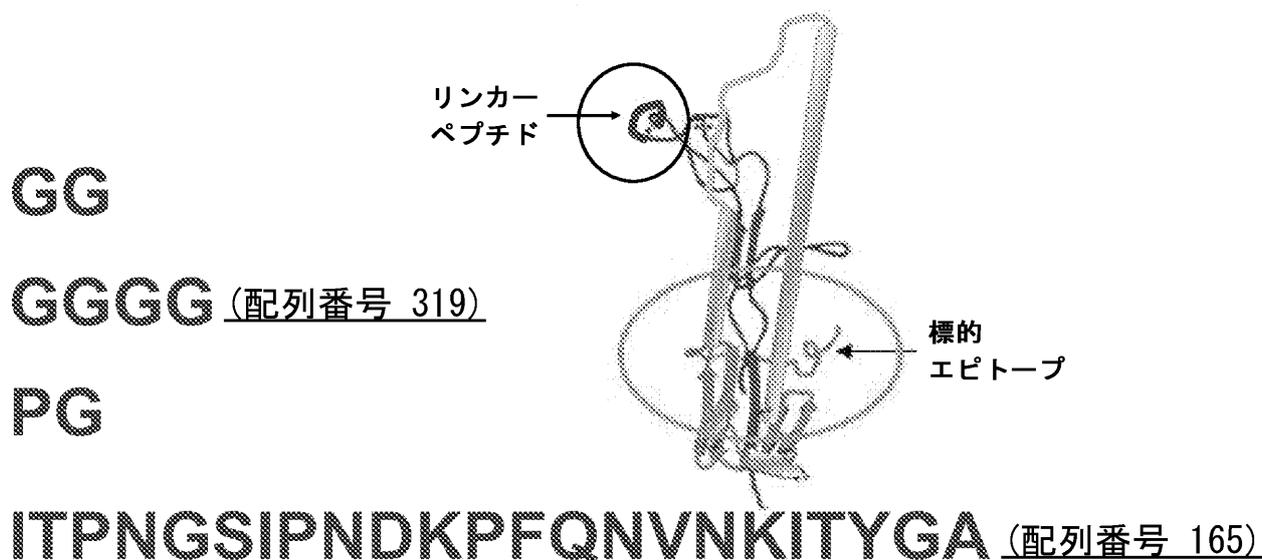


図4

【手続補正16】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図10

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図10】

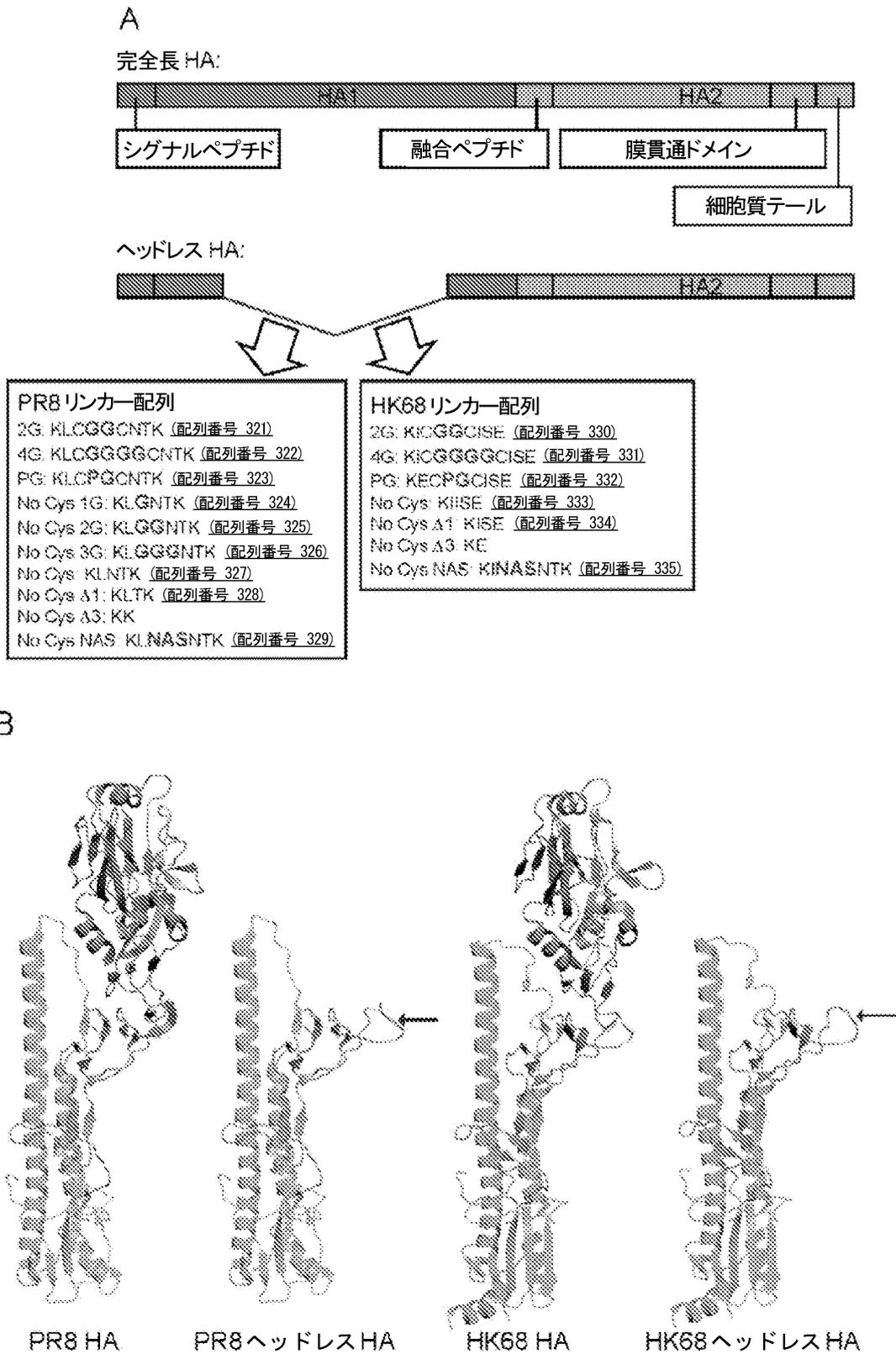


図 10A - 10B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<i>C 1 2 N</i>	<i>7/01</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>7/01</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/145</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/145</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>31/16</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>31/16</i>

(72)発明者 ジョフン ステエル
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 2 5 ニューヨーク アプト. 8ディー ウェスト 9
 3ルド ストリート 1 3 4

(72)発明者 アドルフォ ガルシアサストレ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 2 8 ニューヨーク アプト. 3ジー エアスト 9 6
 トフ ストリート 1 6

(72)発明者 ペテル パレセ
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 6 0 5 レオニア ヒグフウオオド アベニュー 4
 1 4

Fターム(参考) 4B065 AA95X AA95Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA45
 4C085 AA03 BA55 CC08 DD62 EE01 EE06 FF21 GG03 GG10
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA01 DA86 EA31 FA74 GA15

【外国語明細書】

2018134107000001.pdf