

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-533558

(P2012-533558A)

(43) 公表日 平成24年12月27日(2012.12.27)

| (51) Int.Cl.                         | F I                  | テーマコード (参考) |
|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| <b>C07K 14/115 (2006.01)</b>         | C O 7 K 14/115 Z N A | 4 B O 2 4   |
| <b>A61K 39/00 (2006.01)</b>          | A 6 1 K 39/00 H      | 4 B O 6 4   |
| <b>A61K 39/155 (2006.01)</b>         | A 6 1 K 39/155       | 4 C O 8 5   |
| <b>A61P 31/14 (2006.01)</b>          | A 6 1 P 31/14        | 4 H O 4 5   |
| <b>A61P 11/00 (2006.01)</b>          | A 6 1 P 11/00        |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 158 頁) 最終頁に続く |                      |             |

(21) 出願番号 特願2012-520789 (P2012-520789)  
 (86) (22) 出願日 平成22年7月15日 (2010. 7. 15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年3月6日 (2012. 3. 6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/042161  
 (87) 国際公開番号 W02011/008974  
 (87) 国際公開日 平成23年1月20日 (2011. 1. 20)  
 (31) 優先権主張番号 61/225, 805  
 (32) 優先日 平成21年7月15日 (2009. 7. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/294, 426  
 (32) 優先日 平成22年1月12日 (2010. 1. 12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991  
 ノバルティス アーゲー  
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ  
 35  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R S V F タンパク質組成物およびそれを作製するための方法

## (57) 【要約】

本発明は、R S V F タンパク質を含む免疫原性組成物、R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物の調製方法、ならびに特定の遺伝子操作型 R S V F タンパク質および該遺伝子操作型 R S V F タンパク質をコードする核酸に関する。該方法を用いて調製される組成物は、R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを、主要な、または単一の所望の形態およびコンフォメーションで含むものであり得る。また、本発明は R S V F に対する免疫応答の誘導方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アミノ酸 100 ~ 150 が配列番号 9、配列番号 12、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7；配列番号 8、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 91 または配列番号 92 のアミノ酸配列で置き換えられている 1 つ以上の R S ウイルス F ( R S V F ) ポリペプチドを含む免疫原性組成物。

## 【請求項 2】

前記 R S V F のアミノ酸 100 ~ 150 が配列番号 12 のアミノ酸配列で置き換えられている、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 3】

前記 R S V F のアミノ酸 100 ~ 150 が、配列番号 9、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7；配列番号 8、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 13 または配列番号 92 のアミノ酸配列で置き換えられている、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

10

## 【請求項 4】

アミノ酸 100 ~ 150 が配列番号 9 のアミノ酸配列で置き換えられている、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 5】

前記 R S V F が単量体、三量体、または単量体と三量体の組合せの形態である、請求項 1 または請求項 2 に記載の免疫原性組成物。

20

## 【請求項 6】

R S V F が単量体、三量体、ロゼットまたはその任意の組合せの形態である、請求項 3 または 4 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 7】

前記 R S V F ポリペプチドが、R S V - F エクトドメインを含む可溶性ポリペプチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 8】

前記 R S V F が、配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸 23 ~ 99 および 151 ~ 524 を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 9】

配列番号 49、配列番号 68、配列番号 71、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 55、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、配列番号 61、配列番号 62、配列番号 63、配列番号 64、配列番号 65、配列番号 66、配列番号 67、配列番号 69、配列番号 70、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 93、シグナルペプチドおよび / または H I S タグが削除されている前述のいずれかの配列、ならびにその組合せからなる群より選択されるポリペプチドを含む免疫原性組成物。

30

40

## 【請求項 10】

前記ポリペプチドが、シグナルペプチドおよび任意選択で H I S タグが削除されている配列番号 68 または配列番号 68 である、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 11】

前記ポリペプチドが、配列番号 49、配列番号 71、ならびにシグナルペプチドおよび任意選択で H I S タグが削除されている前述のいずれかの配列からなる群より選択される、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 12】

アジュバントをさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 13】

50

前記アジュバントが、アルミニウム塩、水中スクアレン型エマルジョン、ベンゾナフチリジン化合物、リン脂質化合物、小分子免疫増強物質および前述のものの任意の組合せからなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 4】

アミノ酸 1 0 0 ~ 1 5 0 が、配列番号 9、配列番号 1 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 9 1 または配列番号 9 2 のアミノ酸配列で置き換えられている、組換え R S V F ポリペプチド ( R S V F )。

【請求項 1 5】

前記 R S V F のアミノ酸 1 0 0 ~ 1 5 0 が配列番号 1 2 のアミノ酸配列で置き換えられている、請求項 1 4 に記載の組換え R S V F。

10

【請求項 1 6】

前記 R S V F のアミノ酸 1 0 0 ~ 1 5 0 が、配列番号 9、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7；配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 3 または配列番号 9 2 のアミノ酸配列で置き換えられている、請求項 1 5 に記載の組換え R S V F。

【請求項 1 7】

アミノ酸 1 0 0 ~ 1 5 0 が配列番号 9 のアミノ酸配列で置き換えられている、請求項 1 4 に記載の組換え R S V F。

【請求項 1 8】

単量体、三量体、または単量体と三量体の組合せの形態である、請求項 1 4 または 1 5 に記載の組換え R S V F。

20

【請求項 1 9】

単量体、三量体、三量体のロゼットまたはその組合せの形態である、請求項 1 6 または 1 7 に記載の組換え R S V F。

【請求項 2 0】

配列番号 4 9、配列番号 6 8、配列番号 7 1、配列番号 2 5、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 5、配列番号 3 7、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 5 0、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 5、配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 1、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 7、配列番号 6 9、配列番号 7 0、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、配列番号 8 8、配列番号 8 9、配列番号 9 3、シグナルペプチドおよび/または H I S タグが削除されている前述のいずれかの配列、ならびにその組合せからなる群より選択される組換えポリペプチド。

30

【請求項 2 1】

異種オリゴマー化ドメイン、エピトープ、またはシグナルペプチドをさらに含む、請求項 1 4 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 2 2】

前記異種オリゴマー化ドメインが、インフルエンザ血球凝集素由来の三量体化ドメイン、S A R S スパイク由来の三量体化ドメイン、または H I V g p 4 1、N a d A、修飾 G C N 4 もしくは A T C a s e 由来の三量体化ドメインを含む群から選択される、請求項 2 1 に記載の組換えポリペプチド。

40

【請求項 2 3】

請求項 1 4 ~ 2 1 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする単離された核酸。

【請求項 2 4】

自己複製 R N A 分子である、請求項 2 3 に記載の単離された核酸。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の自己複製 R N A 分子を含む免疫原性組成物。

50

## 【請求項 26】

送達系をさらに含む、請求項 25 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 27】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物を被験体に投与する工程を含む、被験体において R S V F に対する免疫応答を誘導する方法。

## 【請求項 28】

請求項 25 に記載の免疫原性組成物を被験体に投与する工程を含む、被験体において R S V F に対する免疫応答を誘導する方法。

## 【請求項 29】

切断型 R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物を作製するための方法であって、 10

a) 切断されると F<sub>1</sub> および F<sub>2</sub> サブユニットが生成されるプロテアーゼ切断部位を含む非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを準備する工程であって、該非切断型の可溶性の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は、改変型フリン切断部位を 106 ~ 109 位および 133 ~ 136 位に含み、該非切断型の可溶性の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドを非切断型で産生する細胞から得られる、工程；ならびに

b) 準備した該可溶性の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを、該プロテアーゼ切断部位で切断するプロテアーゼで切断し、それにより、切断型の可溶性の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物を生成させる工程 20

## 【請求項 30】

工程 b) において、準備した前記非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを、101 位付近 ~ 161 位付近の 1 つ以上の位置で切断する、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

準備した前記非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを、106 位付近 ~ 142 位付近の 1 つ以上の位置で切断する、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 32】

a) において準備する前記非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを精製する、請求項 29 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

## 【請求項 33】

a) において準備する前記非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドがインタクトな融合ペプチドを含むものである、請求項 29 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 34】

工程 b) での切断により、三量体のロゼットの形成がもたらされる、請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 35】

c) 前記三量体のロゼットを精製する工程をさらに含む、請求項 34 に記載の方法。 40

## 【請求項 36】

前記三量体のロゼットの精製がサイズ排除クロマトグラフィーを含む、請求項 35 に記載の方法。

## 【請求項 37】

a) において準備する前記非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドが改変型融合ペプチドを含むものである、請求項 29 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 38】

前記融合ペプチドの少なくとも一部分が、前記非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドにおいて欠失している、請求項 37 に記載の方法。 50

## 【請求項 39】

アミノ酸 137 ~ 153、アミノ酸 137 ~ 146、アミノ酸 137 ~ 145、またはアミノ酸 137 ~ 142 が前記融合ペプチドから欠失している、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 40】

工程 b) での切断により、三量体の形成がもたらされる、請求項 37 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 41】

c) 前記三量体を精製する工程をさらに含む、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記三量体の精製がサイズ排除クロマトグラフィーを含む、請求項 41 に記載の方法。

10

## 【請求項 43】

a) において準備する前記非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを、昆虫細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、酵母細胞、テトラヒメナ細胞またはその組合せにおいて発現させる、請求項 29 ~ 42 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 44】

a) において準備する前記非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを細胞馴化培養培地中で準備する、請求項 29 ~ 43 に記載の方法。

## 【請求項 45】

前記細胞馴化培養培地が、昆虫細胞馴化培養培地、哺乳動物細胞馴化培養培地およびその組合せからなる群より選択される、請求項 44 に記載の方法。

20

## 【請求項 46】

前記三量体のロゼットが、Furde1 および Del p 23 furde1 からなる群より選択される少なくとも 1 つのポリペプチドの F<sub>1</sub> および F<sub>2</sub> 断片を含む、請求項 29 ~ 36 および 41 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 47】

前記切断型 RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドに実質的に脂質とリポタンパク質が含まれていない、請求項 29 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 48】

請求項 29 ~ 47 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて作製された切断型 RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物。

30

## 【請求項 49】

免疫原性組成物である、請求項 48 に記載の組成物。

## 【請求項 50】

非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体または単量体と三量体の組合せを含む組成物を作製するための方法であって、

a) 非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備する工程であって、該非切断型の可溶性の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は改変型フリン切断部位を 106 ~ 109 位および 133 ~ 136 位に含み、該非切断型の可溶性の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドは該ポリペプチドを非切断型で産生する細胞から分泌される、工程；ならびに

40

b) 非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体または三量体を該生物学的材料から精製し、それにより該組成物を生成させる工程を含む、方法。

## 【請求項 51】

前記生物学的材料が、昆虫細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、哺乳動物細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、鳥類細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、酵母細胞の馴化培地または細胞溶解物、テトラヒメナ細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、およびその組合せからなる群より選択される、請求項 50 に記載の方法。

## 【請求項 52】

b) において、非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を

50

精製する、請求項 50 または 51 に記載の方法。

【請求項 53】

b) において、非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体を精製する、請求項 50 または 51 に記載の方法。

【請求項 54】

b) での精製がサイズ排除クロマトグラフィーを含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 55】

前記非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドが、改変型融合ペプチドをさらに含むものである、請求項 50 ~ 54 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 56】

前記可溶性の非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドが、furmt、furdel、Delp21 furx、Delp23 furx、Delp21 furdel、Delp23 furdel、および第 Xa 因子構築物からなる群より選択される少なくとも 1 つのポリペプチドを含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 57】

非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む前記組成物に実質的に脂質とリポタンパク質が含まれていない、請求項 50 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 58】

請求項 50 ~ 57 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて作製された可溶性の非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体または三量体を含む組成物。

【請求項 59】

免疫原性組成物である、請求項 58 に記載の組成物。

【請求項 60】

非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体または単量体と三量体の組合せを含む組成物を作製するための方法であって、

a) 非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備する工程であって、該非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は改変型リン切断部位を含み、101 位付近と 161 位付近との間に存在するリジン残基とアルギニン残基は欠失しているか、あるいはリジンもしくはアルギニンではないアミノ酸で置き換えられており、該 RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドを 101 位付近と 161 位付近との間を非切断の状態で産生する宿主細胞から得られ、該 RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドは 101 位付近と 161 位付近との間が切断されていない、工程；ならびに

b) 非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体または単量体と三量体の組合せを、該生物学的材料から精製する工程を含む、方法。

【請求項 61】

前記生物学的材料が、昆虫細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、哺乳動物細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、鳥類細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、酵母細胞の馴化培地または細胞溶解物、テトラヒメナ細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、およびその組合せからなる群より選択される、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

b) において、非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を精製する、請求項 60 または 61 に記載の方法。

【請求項 63】

b) において、非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体を精製する、請求項 60 または 61 に記載の方法。

【請求項 64】

b) において、非切断型の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体と

10

20

30

40

50

非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を精製する、請求項 6 0 または 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 5】

b) での精製がサイズ排除クロマトグラフィーを含む、請求項 6 0 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドが、改変型融合ペプチドをさらに含むものである、請求項 6 0 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドが、F u r x、F u r x R 1 1 3 Q K 1 2 3 N K 1 2 4 N、D e l p 2 1 f u r x および D e l p 2 3 f u r x からなる群より選択される少なくとも 1 つのポリペプチドを含む、請求項 6 0 に記載の方法。

10

【請求項 6 8】

非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む前記組成物に実質的に脂質とリポタンパク質が含まれていない、請求項 6 0 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 9】

請求項 6 0 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて作製された可溶性の非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物。

20

【請求項 7 0】

免疫原性組成物である、請求項 6 9 に記載の組成物。

【請求項 7 1】

切断型 R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体または単量体と三量体の組合せを含む組成物を作製するための方法であって、

a) 改変型融合ペプチドを含む切断型 R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備する工程；および

b) 切断型 R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを該生物学的材料から精製する工程

を含む、方法。

30

【請求項 7 2】

前記 R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドが、アミノ酸 1 3 7 ~ 1 5 2 付近が欠失しているか、アミノ酸 1 3 7 ~ 1 5 3 付近が欠失しているか、アミノ酸 1 3 7 ~ 1 4 5 付近が欠失しているか、アミノ酸 1 3 7 ~ 1 4 6 付近が欠失しているか、またはアミノ酸 1 3 7 ~ 1 4 2 付近が欠失しているアミノ酸配列を含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記生物学的材料が、昆虫細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、哺乳動物細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、鳥類細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、酵母細胞の馴化培地または細胞溶解物、テトラヒメナ細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、およびその組合せからなる群より選択される、請求項 7 1 または 7 2 に記載の方法。

40

【請求項 7 4】

b) において、切断型 R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を精製する、請求項 7 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5】

b) において、切断型 R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体を精製する、請求項 7 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 6】

b) において、切断型 R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体と切断型 R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を精製する、請求項 7 1 ~

50

73のいずれか1項に記載の方法。

【請求項77】

b)での精製がサイズ排除クロマトグラフィーを含む、請求項71～73のいずれか1項に記載の方法。

【請求項78】

前記非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドが、少なくとも融合ペプチド欠失ポリペプチドを含むものである、請求項71に記載の方法。

【請求項79】

非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む前記組成物に実質的に脂質とリポタンパク質が含まれていない、請求項71～78のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項80】

請求項71～79のいずれか1項に記載の方法を用いて作製された可溶性の非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物。

【請求項81】

免疫原性組成物である、請求項80に記載の組成物。

【請求項82】

RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物を作製するための方法であって、

a) 改変型フリン切断部位を133～136位に含むRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを準備する工程であって、該可溶性のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ペプチドを、136/137位が切断されていないがF<sub>1</sub>を含むサブユニットと会合しているF<sub>2</sub>断片の形態で産生する細胞から分泌される、工程；ならびに

20

b) 準備した該RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、RSV Fタンパク質のエクトドメインを101位と161位との間の部位で切断するプロテアーゼで切断し、それにより該組成物を生成させる工程を含む、方法。

【請求項83】

a)において準備する前記RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを精製する、請求項82に記載の方法。

30

【請求項84】

a)において準備する前記RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、昆虫細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、酵母細胞、テトラヒメナ細胞またはその組合せにおいて発現させる、請求項82または83に記載の方法。

【請求項85】

a)において準備する前記RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、細胞馴化培養培地、細胞抽出物またはその組合せにおいて準備する、請求項82～84のいずれか1項に記載の方法。

【請求項86】

前記RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、昆虫細胞馴化培養培地、哺乳動物細胞馴化培養培地、鳥類細胞馴化培養培地、酵母細胞馴化培養培地、テトラヒメナ細胞馴化培養培地およびその組合せからなる群より選択される細胞馴化培養培地において準備する、請求項85に記載の方法。

40

【請求項87】

前記RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドが少なくともC末端フリンポリペプチドを含む、請求項82～86のいずれか1項に記載の方法。

【請求項88】

b)において作製される前記切断型RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドに実質的に脂質とリポタンパク質が含まれていない、請求項82～87のいずれか1項に

50



記載の方法。

【請求項 89】

請求項 82 ~ 88 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて作製された切断型 RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物。

【請求項 90】

免疫原性組成物である、請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 91】

RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物を作製するための方法であって、

a) 改変型フリリン切断部位を 133 ~ 136 位に含む RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備する工程であって、該可溶性の RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ペプチドを、136 / 137 位が切断されていないが F<sub>1</sub> を含むサブユニットと会合している F<sub>2</sub> 断片の形態で産生する細胞から分泌され、ただし、該改変型フリリン切断部位はアミノ酸 131 ~ 134 の欠失ではないものとする、工程；ならびに

b) 該 RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを該生物学的材料から精製し、それにより該組成物を生成させる工程を含む、方法。

【請求項 92】

前記生物学的材料が、昆虫細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、哺乳動物細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、鳥類細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、酵母細胞の馴化培地または細胞溶解物、テトラヒメナ細胞の馴化培養培地または細胞溶解物、およびその組合せからなる群より選択される、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

b) において、RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体または単量体と三量体の組合せを精製する、請求項 91 または 92 に記載の方法。

【請求項 94】

b) での精製がサイズ排除クロマトグラフィーを含む、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

該 RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドが少なくとも C 末端フリリンポリペプチドを含む、請求項 91 ~ 94 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 96】

RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む前記組成物に実質的に脂質とリポタンパク質が含まれていない、請求項 91 ~ 95 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 97】

請求項 92 ~ 96 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて作製された RSV F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物。

【請求項 98】

免疫原性組成物である、請求項 97 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2009年7月15日に提出された米国特許出願番号 61 / 225, 805、および 2010年1月12日に提出された米国特許出願番号 61 / 294, 426 の利益を主張する。上記米国特許出願の全教示は、参照によって本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

RSウイルス (RSV) は、パラミクソウイルス科、ニューモウイルス属の、エンペロ

10

20

30

40

50

ープをもつ非分節型マイナス鎖RNAウイルスである。これは、生まれてから1年以内の子供の細気管支炎および肺炎の最も一般的な原因である。また、RSVは、重度の下気道疾患（これは、どの年齢でも起こり得、特に、高齢者または心臓、肺もしくは免疫機構に欠陥を有する人に起こり得る）などの反復感染も引き起こす。

#### 【0003】

宿主細胞に感染するために、パラミクソウイルス（RSVなど）は、エンベロープをもつ他のウイルス（インフルエンザウイルスおよびHIVなど）と同様、ウイルスの膜と宿主細胞の膜との融合を必要とする。RSVでは、保存された融合タンパク質（RSV F）が、不可逆的なタンパク質リフォールディングを膜の並置とカップリングさせることによりウイルス膜と細胞膜を融合させる。パラミクソウイルスの研究に基づいた現在のモデルでは、RSV Fタンパク質は、まず、フォールディングして準安定性の「融合前」コンフォメーションになる。細胞への侵入中、融合前コンフォメーションはリフォールディングとコンフォメーション変化を受け、安定な「融合後」コンフォメーションになる。

10

#### 【0004】

RSV Fタンパク質は、mRNAから、およそ574個のアミノ酸のF<sub>0</sub>と表示されるタンパク質に翻訳される。F<sub>0</sub>の翻訳後プロセッシングとしては、小胞体でのシグナルペプチダーゼによるN末端シグナルペプチドの除去が挙げられる。また、F<sub>0</sub>は、2つの部位（およそ109/110とおよそ136/137）で、トランス-ゴルジ体において細胞内プロテアーゼ（特に、フリリン）によって切断される。この切断により、短い介在配列の除去がもたらされ、F<sub>1</sub>（約50kDa；C末端；およそ残基137~574）およびF<sub>2</sub>（約20kDa；N末端；およそ残基1~109）と表示される2つのサブユニットが生成されるが、これらは互いに会合したままである。F<sub>1</sub>は、そのN末端に疎水性の融合ペプチドを含み、また、2つの両親媒性の7反復領域（HRAおよびHRB）も含む。HRAは該融合ペプチド付近に存在し、HRBは膜貫通ドメイン付近に存在する。ビリオン内では、3つのF<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>ヘテロ二量体がF<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>のホモ三量体としてアッセンブルされる。

20

#### 【0005】

現在入手可能なRSV感染に対するワクチンはないが、所望されている。ワクチンの作製に対する潜在的アプローチの1つは、精製RSV Fタンパク質を基にしたサブユニットワクチンである。しかしながら、このアプローチでは、精製RSV Fタンパク質は、経時的に安定な単一の形態およびコンフォメーションであり、ワクチンのロット間に一貫性があり、かつ簡便に精製されるものであることが望ましい。

30

#### 【0006】

RSV Fタンパク質を、例えば、膜貫通ドメインと細胞質テールの欠失によって切断型にすると、該タンパク質がエクトドメインとして発現されることが可能となり得、これにより可溶性となり得る。また、RSV Fタンパク質は、最初は単量体として翻訳されるが、この単量体は切断され、三量体にアッセンブルされる。RSV Fタンパク質が切断三量体の形態になると、疎水性の融合ペプチドが露出される。異なる三量体（例えば、可溶性のエクトドメインの三量体）上の露出された疎水性の融合ペプチドは互いに会合し、ロゼットの形成がもたらされ得る。また、疎水性の融合ペプチドは、例えば、可溶性の組換えRSV Fタンパク質を発現させるために使用した細胞に由来する脂質およびリポタンパク質とも会合し得る。RSV Fタンパク質のプロセッシング、構造およびリフォールディングの複雑性のため、精製された均一な免疫原性調製物を得ることは困難である。

40

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

したがって、改善されたRSV Fタンパク質組成物およびRSV Fタンパク質組成物の作製方法の必要性が存在している。

#### 【課題を解決するための手段】

50

## 【0008】

(発明の概要)

本発明は、1つ以上のRSV Fポリペプチドを含む免疫原性組成物、ならびに一部の特定の遺伝子操作型RSV Fタンパク質および該遺伝子操作型RSV Fタンパク質をコードする核酸に関する。

## 【0009】

一態様において、RSV Fタンパク質は可溶性である。例えば、RSV Fタンパク質は、膜貫通領域と細胞質テールが欠失したものであり得る。一部の態様では、可溶性のRSV Fは、1)一方または両方のリン切断部位に対する1つ以上の変異、2)融合ペプチドに対する1つ以上の変異、3)p27リンカーに対する1つ以上の変異、4)付加オリゴマー化配列を含むこと、および5)プロテアーゼ切断部位を提供する付加アミノ酸配列を含むこと、のうちの1つ以上を含むものである。付加的または代替的な態様において、RSV Fタンパク質は単量体、三量体、または単量体と三量体の組合せである。三量体は単分散型またはロゼットの形態であり得る。さらなる付加的または代替的な態様では、RSV Fタンパク質は融合前コンフォメーション、中間コンフォメーションまたは融合後コンフォメーションであり得る。

10

## 【0010】

一態様において、免疫原性組成物は、アミノ酸100~150が配列番号9、配列番号12、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7；配列番号8、配列番号10、配列番号11、配列番号13、配列番号91または配列番号92のアミノ酸配列で置き換えられた1つ以上のRSウイルスF(RSV F)ポリペプチドを含むものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性(例えば、エクトドメイン)である。

20

## 【0011】

別の態様では、免疫原性組成物は、RSV Fのアミノ酸100~150が配列番号12のアミノ酸配列で置き換えられたRSV Fポリペプチドを含むものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性(例えば、エクトドメイン)である。

## 【0012】

また別の態様では、免疫原性組成物は、RSV Fのアミノ酸100~150が配列番号9、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7；配列番号8、配列番号10、配列番号11、配列番号13、または配列番号92のアミノ酸配列で置き換えられたRSV Fポリペプチドを含むものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性(例えば、エクトドメイン)である。

30

## 【0013】

別の態様では、免疫原性組成物は、アミノ酸100~150が配列番号9のアミノ酸配列で置き換えられたRSV Fポリペプチドを含むものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性(例えば、エクトドメイン)である。

## 【0014】

別の態様では、免疫原性組成物は、RSV Fが配列番号1または配列番号2のアミノ酸23~99および151~524を含むRSV Fポリペプチドを含むものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性(例えば、エクトドメイン)である。

40

## 【0015】

一態様において、免疫原性組成物は、配列番号49、配列番号68、配列番号71、配列番号25、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号69、配列番

50

号70、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、および配列番号93からなる群より選択されるポリペプチドを含むものである。一部の実施形態では、シグナルペプチドおよび/またはHISタグが削除されている。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性（例えば、エクストドメイン）である。

【0016】

一態様において、免疫原性組成物は、配列番号68あるいはまたシグナルペプチドおよび任意選択でHISタグが削除された配列番号68を含むものである。

【0017】

別の態様では、免疫原性組成物は、配列番号49、配列番号71、ならびにシグナルペプチドおよび任意選択でHISタグが削除された前述のいずれかの配列からなる群より選択されるポリペプチドを含むものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性（例えば、エクストドメイン）である。

10

【0018】

好ましい実施形態では、免疫原性組成物にアジュバントを含める。アジュバントは、好ましくは、アルミニウム塩、水中スクアレン型エマルジョン（MF59など）、ベンゾナフチリジン化合物、リン脂質化合物（E6020など）、小分子免疫増強物質または前述のいずれかの任意の2つ以上の組合せである。

【0019】

本発明のまた別の態様は組換えRSV Fポリペプチドを含む。RSV Fは、単量体、三量体、三量体のロゼット、または単量体と三量体の組合せの形態であり得る。組換えポリペプチドは、異種オリゴマー化ドメイン、エピトープまたはシグナルペプチドを含むものであり得る。異種オリゴマー化ドメインは、好ましくは、インフルエンザ血球凝集素由来の三量体化ドメイン、SARSスパイク由来の三量体化ドメイン、またはHIV gp41、NadA、修飾GCN4もしくはATCase由来の三量体化ドメインである。

20

【0020】

一態様において、組換えRSV Fポリペプチドは、配列番号9、配列番号12、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号10、配列番号11、配列番号13、配列番号91または配列番号92のアミノ酸配列で置き換えられたアミノ酸100～150を有するものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性（例えば、エクストドメイン）である。

30

【0021】

別の態様では、組換えRSV Fポリペプチドは、配列番号12のアミノ酸配列で置き換えられたRSV Fのアミノ酸100～150を有するものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性（例えば、エクストドメイン）である。

【0022】

別の態様では、組換えRSV Fポリペプチドは、配列番号9、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7；配列番号8、配列番号10、配列番号11、配列番号13、または配列番号92のアミノ酸配列で置き換えられたRSV Fのアミノ酸100～150を有するものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性（例えば、エクストドメイン）である。

40

【0023】

また別の態様では、組換えRSV Fポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸配列で置き換えられたRSV Fのアミノ酸100～150を有するものである。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性（例えば、エクストドメイン）である。

【0024】

一態様において、該組換えポリペプチドは、配列番号49、配列番号68、配列番号71、配列番号25、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号48、配列番号47、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号

50

57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号69、配列番号70、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号93、およびその任意の組合せからなる群より選択される。任意選択で、シグナルペプチドおよび/またはHISタグが削除されている。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは可溶性（例えば、エクドメイン）である。

【0025】

さらに別の態様は、前述の任意のポリペプチドをコードする核酸を含む。該核酸は自己複製RNA分子であり得る。

【0026】

本発明の別の態様は、RSV Fポリペプチドをコードする自己複製RNAを含む免疫原性組成物である。免疫原性組成物は送達系を含むものであり得る。

【0027】

本発明の別の態様は、任意の該免疫原性組成物を投与することにより、RSV Fに対する免疫応答を誘導する方法を含む。

【0028】

本発明は、組成物の調製方法、およびRSV Fタンパク質（可溶性のRSV Fエクドメインポリペプチドなど）を含む組成物、例えば、免疫原性組成物に関する。RSV Fエクドメインポリペプチドは、単一の形態（非切断単量体、非切断三量体、切断三量体、または切断三量体のロゼットなど）であり得る。また、RSV Fエクドメインポリペプチドは、2つ以上の形態、例えば、平衡状態（非切断単量体と非切断三量体との平衡など）で存在している2つ以上の形態であってもよい。本発明により、いくつかの利点をもたらされる。例えば、免疫原性組成物中におけるRSV Fの単一の所望の形態の存在により、該組成物を被験体に投与した場合の免疫応答がより予測可能となり、ワクチンに処方した場合の安定性ならびに他の物理的および化学的特性が、より一貫性を有する。

【0029】

一態様において、本発明は、切断型のRSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドを含む組成物の作製方法である。該方法は、a)切断されるとF<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>断片が生成される1つ以上のプロテアーゼ切断部位を含む非切断型のRSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドを準備すること、ならびにb)該非切断型のRSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドを、該プロテアーゼ切断部位（1つまたは複数）を認識するプロテアーゼ（1つまたは複数）で切断することを含む。一般に、非切断型のRSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドのアミノ酸配列は改変型プリン切断部位を含み、該RSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドは、該ポリペプチドをアミノ酸101～アミノ酸161の位置において非切断の（例えば、106～109位および131～136位のプリン切断部位で切断されていない）状態で産生する宿主細胞から分泌される。一部の実施形態では、a)において準備する非切断型のRSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドを精製する。

【0030】

a)において準備する非切断型のRSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドは、インタクトな融合ペプチドを含むものであっても、改変型融合ペプチド（例えば、欠失型融合ペプチドまたは変異型融合ペプチド）を含むものであってもよい。a)において準備する非切断型のRSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドがインタクトな融合ペプチドを含むものである場合、工程b)での切断により、三量体のロゼットの形成がもたらされる。a)において準備する非切断型のRSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドが改変型融合ペプチドを含むものである場合、工程b)での切断により、三量体の形成がもたらされる。

【0031】

該方法は、さらに、非切断型のRSV Fタンパク質のエクドメインポリペプチドの

10

20

30

40

50

切断によって生成されるロゼットまたは三量体を精製する任意選択の工程を含むものであってもよい。好ましい実施形態では、該方法によって作製される切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドには実質的に脂質とリボタンパク質が含まれていない。

【0032】

別の態様では、本発明は、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体または単量体と三量体の組合せを含む組成物の作製方法である。該方法は、a)非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備すること；およびb)非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体または三量体を該生物学的材料から精製することを含む。一般に、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は改変型フリント切断部位を含み、該RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドをアミノ酸101～アミノ酸161の位置において非切断の（例えば、106～109位および131～136位のフリント切断部位で切断されていない）状態で産生する宿主細胞から分泌される。一部の実施形態では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は、さらに改変型トリプシン切断部位を含み、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、アミノ酸101とアミノ酸161との間の部位でトリプシンによって切断されない。他の実施形態では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は、さらに改変型融合ペプチドを含む。

10

20

【0033】

一部の実施形態では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を精製する。他の実施形態では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体を精製する。さらに他の実施形態では、非切断型RSV Fタンパク質のエクトドメインの単量体と三量体の混合物（これは動的平衡状態であり得る）を精製する。好ましい実施形態では、該方法によって作製される切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドには実質的に脂質とリボタンパク質が含まれていない。

【0034】

別の態様では、本発明は、切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体または単量体と三量体の組合せを含む組成物の作製方法である。該方法は、a)改変型融合ペプチドを含む切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備すること；およびb)切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを該生物学的材料から精製することを含む。

30

【0035】

一部の実施形態では、切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を精製する。他の実施形態では、切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体を精製する。さらに他の実施形態では、切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインの単量体と三量体の混合物（これは動的平衡状態であり得る）を精製する。好ましい実施形態では、該方法によって作製される切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドには、好ましくは、実質的に脂質とリボタンパク質が含まれていない。さらに別の実施形態では、改変型融合ペプチドを含む切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインの三量体を精製する。

40

【0036】

他の態様では、本発明は、本発明の方法を用いて作製される組成物、例えば、免疫原性組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、野生型RSV F（図1A）および膜貫通ドメインと細胞質テールを除去し、任意選択のHIS6-タグをC末端に付加したエクトドメイン構築物（図1B）の概略図を示す。明確にするため、残基の番号付けは、N末端シグナルペプチドから始まる

50

野生型 A 2 株 R S V F と関連させており、アミノ酸の欠失を含む構築物において改変されていない。概略図において、シグナル配列またはシグナルペプチドを表示している ( s p )。図 1 A は、R S V F タンパク質の概略図であり、シグナル配列またはシグナルペプチド ( S P )、p 2 7 リンカー領域、融合ペプチド ( F P )、H R A ドメイン ( H R A )、H R B ドメイン ( H R B )、膜貫通領域 ( T M )、および細胞質テール ( C T ) を示している。エクトドメインの C 末端結合部は種々 ( v e r y ) であり得る。図 1 B は、R S V F エクトドメイン構築物の一般的な概略図であり、図 1 A の概略図と共有の特徴を示し、任意選択の H I S<sub>6</sub>-タグ ( H I S TAG ) を含めている。フリン切断部位はアミノ酸位置 1 0 9 / 1 1 0 および 1 3 6 / 1 3 7 に存在している。図 1 C はまた、R S V F ( 野生型 ) ( 配列番号 1 0 8 )、ならびに一方または両方のフリン切断部位および / または融合ペプチド領域が変異または欠失したいくつかのタンパク質 ( F u r m t - 配列番号 3 ; F u r d e l - 配列番号 4 ; F u r x - 配列番号 6 ; F u r x R 1 1 3 Q , K 1 2 3 N , K 1 2 4 N - 配列番号 5 ; F u r x R 1 1 3 Q , K 1 2 3 Q , K 1 2 4 Q - 配列番号 9 2 ; D e l p 2 1 f u r x - 配列番号 7 ; D e l p 2 3 f u r x - 配列番号 8 ; D e l p 2 3 f u r d e l - 配列番号 9 ; N 末端フリン - 配列番号 1 0 ; C 末端フリン - 配列番号 1 1 ; 融合ペプチド欠失 1 - 配列番号 1 2 ; および第 X a 因子 - 配列番号 1 3 ) のアミノ酸 1 0 0 ~ 1 5 0 のアミノ酸配列を示す。図 1 C において、符号「 - 」は、その位置のアミノ酸が欠失していることを示す。

10

【図 2】図 2 は、R S V F ( 野生型 ) ( 配列番号 9 4 ) および付加プロテアーゼ切断部位を含むいくつかのタンパク質 ( 配列番号 9 5 ~ 1 0 0 ) のアミノ酸 4 8 8 位から T M 領域の開始点までのカルボキシ末端のアミノ酸配列を示す。図 2 において、符号「 - 」は、その位置にアミノ酸がないことを示す。

20

【図 3】図 3 は、サイズ排除クロマトグラフィーを用いた R S V F 単量体 ( 3 ) の精製を示すクロマトグラムおよび電気泳動ゲルの画像である。

【図 4 A】図 4 A ~ 4 F は、R S ウイルス F 糖タンパク質 ( R S V - F ) をコードしている p T 7 - T C 8 3 R - F L . R S V F ( A 3 1 7 ) 自己複製 R N A 分子をコードするプラスミドのヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 0 1 ) を示す。R S V - F をコードしているヌクレオチド配列に下線を付している。

【図 4 B】図 4 A ~ 4 F は、R S ウイルス F 糖タンパク質 ( R S V - F ) をコードしている p T 7 - T C 8 3 R - F L . R S V F ( A 3 1 7 ) 自己複製 R N A 分子をコードするプラスミドのヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 0 1 ) を示す。R S V - F をコードしているヌクレオチド配列に下線を付している。

30

【図 4 C】図 4 A ~ 4 F は、R S ウイルス F 糖タンパク質 ( R S V - F ) をコードしている p T 7 - T C 8 3 R - F L . R S V F ( A 3 1 7 ) 自己複製 R N A 分子をコードするプラスミドのヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 0 1 ) を示す。R S V - F をコードしているヌクレオチド配列に下線を付している。

【図 4 D】図 4 A ~ 4 F は、R S ウイルス F 糖タンパク質 ( R S V - F ) をコードしている p T 7 - T C 8 3 R - F L . R S V F ( A 3 1 7 ) 自己複製 R N A 分子をコードするプラスミドのヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 0 1 ) を示す。R S V - F をコードしているヌクレオチド配列に下線を付している。

40

【図 4 E】図 4 A ~ 4 F は、R S ウイルス F 糖タンパク質 ( R S V - F ) をコードしている p T 7 - T C 8 3 R - F L . R S V F ( A 3 1 7 ) 自己複製 R N A 分子をコードするプラスミドのヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 0 1 ) を示す。R S V - F をコードしているヌクレオチド配列に下線を付している。

【図 4 F】図 4 A ~ 4 F は、R S ウイルス F 糖タンパク質 ( R S V - F ) をコードしている p T 7 - T C 8 3 R - F L . R S V F ( A 3 1 7 ) 自己複製 R N A 分子をコードするプラスミドのヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 0 1 ) を示す。R S V - F をコードしているヌクレオチド配列に下線を付している。

【図 5】図 5 は、いくつかの R S V 株に由来する F タンパク質のアミノ酸配列のアラインメントである。アラインメントは、C o r p e t , N u c l e i c A c i d s R e s

50

earch, 1998, 16(22): 10881-10890に開示されたアルゴリズムを使用し、デフォルトパラメータ(Blossum 62シンボル比較表, ギャップオープンペナルティ: 12、ギャップ伸張ペナルティ)を用いて作製した。A2、A2株(アクセッション番号AF035006)のFタンパク質(配列番号102); CP52、CP52株(アクセッション番号AF013255)のFタンパク質(配列番号103); B、B株(アクセッション番号AF013254)のFタンパク質(配列番号104); long、long株(アクセッション番号AY911262)株のFタンパク質(配列番号105)、および18537株、18537株(アクセッション番号SwissProt P13843)のFタンパク質(配列番号106)。また、Fタンパク質配列のコンセンサスも示す(配列番号107)。

【図6】図6は、選択したRSV F抗原の精製のサイズ排除(SEC)クロマトグラムの関連領域を示す。表示した抗原を含む主成分ピークにアスタリスクを示し、Superdex P200 16/60カラム(GE Healthcare)の保持時間をミリリットルで示す。較正したカラムでは、47ml、65mlおよび77mlのおおよその保持時間は、それぞれ、カラムのボイドボリューム(void volume)、RSV F三量体の保持、およびRSV F単量体の保持に相当する。図6Aにおいて、非切断Del p23 Fur del (p23 Fur del)構築物は、およそ77mlにおいて単量体ピークから精製される。非切断Del p23 Fur del RSV F抗原をトリプシンで処理すると、タンパク質はロゼットを形成し得、これは、さらに、SECで、およそ47mlにおけるボイドボリューム中に移動する(図6B)。RSV F融合ペプチド欠失の切断三量体種は、三量体ピークからおよそ65mlの保持時間において精製される(図6C)が、非切断Del p21 Fur x構築物(p21 Fur x)は、単量体ピークからおよそ77mlにおいて精製される(図6D)。

【図7】図7は、選択したRSV F抗原の代表的なEM画像を示す。図7Aは、トリプシン処理前のRSV F p23(Del p23)のEM画像を示す。融合後三量体コンフォメーションと整合する図7Aの松葉杖形状は、常に非切断p23(Del p23)Fur del構築物で観察されるわけではない。p23(Del p23)Fur del構築物をトリプシンで処理し、SECカラムのボイドボリュームから精製し、EMによって観察すると、該タンパク質にロゼットコンフォメーションが採用されたことがわかる(図7B)。RSV F融合ペプチド欠失構築物をSECカラムの三量体ピークから精製すると、単分散型の松葉杖形状が観察され、融合後三量体と整合する(図7C)。図7Dに、p21(Del p21)fur x RSV F(モノマーと表示)、融合ペプチド欠失RSV F(三量体と表示したレーン)および精製RSV Fロゼット(ロゼットと表示)のいずれかの3つの調製物を示す。ゲルに、GE Full Range Standard(分子量標準をゲルの左側に表示している)のいくつかのレーンを含めるとともに、RSV F断片のおおよその保持時間をゲルの右側に示している。

【図8】図8A~8Cは、RSV Fエクトドメインポリペプチドの単量体(非切断p21(Del p21)fur x)、三量体のロゼット(切断p23(Del p23)Fur del)、および三量体(融合ペプチド欠失)がコットンラットにおいて免疫原性であることを示すグラフである。抗RSV F IgGおよび中和抗RSV抗体の血清力価を、1回目のワクチン接種の2週間後(2wp1)、1回目のワクチン接種の3週間後(3wp1)、および/または2回目のワクチン接種の2週間後(2wp2)に測定した。

【発明を実施するための形態】

【0038】

(発明の詳細な説明)

本発明は、RSウイルスF(RSV F)ポリペプチドおよび/またはタンパク質、RSV Fポリペプチドおよび/またはタンパク質を含む免疫原性組成物、RSV Fポリペプチドおよび/またはタンパク質の作製方法、ならびにRSV Fポリペプチドおよび/またはタンパク質を含む組成物、ならびにRSV Fポリペプチドおよび/またはタンパク質をコードする核酸に関する。

10

20

30

40

50



## 【0039】

一般に、免疫原性組成物は、有益な特徴、例えば、1) 融合前または中間(非融合後)コンフォメーションの安定化、2) 融合ペプチドの露出の低減または排除、3) 安定性の改善(例えば、凝集および/または分解の低減)、ならびに4) 活性なF1/F2ウイルスタンパク質により類似すること、のうちの1つ以上をもたらす変異(例えば、アミノ酸の置き換え、欠失または付加)を含むRSV Fポリペプチドおよび/またはタンパク質を含むものである。このような特徴により、免疫原性組成物および免疫原性組成物の製造に対して利点をもたらされる。例えば、本明細書に記載のように、RSV Fタンパク質の非融合後コンフォメーション(すなわち、融合前コンフォメーション、中間コンフォメーション)は、より良好な免疫原となり得、より良好な中和抗体応答が誘起され得る。例えば、フリン切断部位に変異または欠失を導入することにより融合ペプチドの露出を低減または排除すると、該ポリペプチドの疎水性が低減され、精製が容易になり、また、RSV Fタンパク質が該タンパク質の投与対象の被験体の細胞膜と会合することが低減または排除される。該タンパク質の安定性の改善により、該タンパク質の凝集傾向または分解傾向が減少した免疫原性組成物の作製が容易になり、これにより、該組成物を被験体に投与した場合、より予測可能な免疫応答をもたらされる。最後に、例えばp27リンカー領域の全部または一部の欠失によりF1/F2ウイルスタンパク質と類似させた変異型RSV Fポリペプチドまたはタンパク質では、より良好な中和抗体応答が誘起され得る。本発明の他の利点は本明細書に記載している。

10

## 【0040】

また、本発明は、RSV Fタンパク質、特にRSV Fエクトドメインポリペプチドを含む組成物の調製方法、およびRSV Fタンパク質を含む組成物、例えば、免疫原性組成物に関する。好ましくは、RSV Fエクトドメインポリペプチドは、単一の形態または既知の形態間での動的平衡状態である。

20

## 【0041】

(定義)

本明細書で用いる場合、「集団」とは、組成物において存在している1つより多くのRSV Fポリペプチドまたはタンパク質をいう。集団は、実質的に均質であってもよく(この場合、実質的にすべてのRSV Fポリペプチドまたはタンパク質が実質的に同じ(例えば、同じアミノ酸配列、同じコンフォメーション))、不均質であってもよく、所望の度合の均一性(homogeneity)を有する(例えば、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%のRSV Fポリペプチドまたはタンパク質が融合前コンフォメーションであるか、融合後コンフォメーションであるか、単量体であるか、三量体である)ものであってもよい。

30

## 【0042】

RSV Fタンパク質の「融合後コンフォメーション」は、3つのHRB領域と3つのHRA領域を含む6ヘリックスバンドルの存在を特徴とする三量体である。

## 【0043】

RSV Fタンパク質の「融合前コンフォメーション」は、3つのHRB領域を含む三重らせんを含む三量体を特徴とするコンフォメーションである。

40

## 【0044】

本明細書で用いる場合、「RSV Fエクトドメインポリペプチド」は、実質的に成熟RSV Fタンパク質の細胞外部分を含み、シグナルペプチド(例えば、アミノ酸1付近~アミノ酸524付近、またはアミノ酸22付近~アミノ酸524付近)は、ある場合またはない場合があるが、天然に存在するRSV Fタンパク質の膜貫通ドメインと細胞質テールが欠損しているRSV Fタンパク質のポリペプチドをいう。

## 【0045】

本明細書で用いる場合、「切断型RSV Fエクトドメインポリペプチド」は、101

50

/ 102 付近 ~ 160 / 161 付近の1つ以上の位置で切断されて2つのサブユニットが生成されており、一方のサブユニットがF<sub>1</sub>を含み、他方のサブユニットがF<sub>2</sub>を含むものであるRSV エクトドメインポリペプチドをいう。

【0046】

本明細書で用いる場合、「C末端側非切断型のRSV エクトドメインポリペプチド」は、101 / 102 付近 ~ 131 / 132 付近の1つ以上の位置で切断されているが、132 / 133 付近 ~ 160 / 161 付近の1つ以上の位置では切断されずに2つのサブユニットが生成されており、一方のサブユニットがF<sub>1</sub>を含み、他方のサブユニットがF<sub>2</sub>を含むものであるRSV エクトドメインポリペプチドをいう。

【0047】

本明細書で用いる場合、「非切断型RSV エクトドメインポリペプチド」は、101 / 102 付近 ~ 160 / 161 付近の1つ以上の位置で切断されていないRSV エクトドメインポリペプチドをいう。非切断型RSV エクトドメインポリペプチドは、例えば、単量体または三量体であり得る。

【0048】

本明細書で用いる場合、「融合ペプチド」はRSV エタンパク質のアミノ酸137 ~ 154をいう。

【0049】

本明細書で用いる場合、「改変型融合ペプチド」は、1つ以上のアミノ酸が独立して、置き換えられているか、または欠失している融合ペプチドをいう（例えば、137 ~ 154位の全部のアミノ酸の置き換えまたは欠失）。好ましくは、「改変型融合ペプチド」を含む切断型RSV エクトドメインポリペプチドはロゼットを形成しない。

【0050】

本明細書で用いる場合、「精製」タンパク質またはポリペプチドは、組換えもしくは合成により作製されたか、またはその天然の宿主によって産生されたタンパク質またはポリペプチドであって、組換え産生系もしくは合成作製系または天然宿主の他の成分から単離されており、組成物中に存在している他の巨大分子成分と比べた該タンパク質の量が、粗製調製物中に存在する量よりも実質的に高くなっているようなタンパク質またはポリペプチドである。一般に、精製タンパク質は、少なくとも約50%均一、より好ましくは少なくとも約75%均一、少なくとも約80%均一、少なくとも約85%均一、少なくとも約90%均一、少なくとも約95%均一または実質的に均一である。

【0051】

本明細書で用いる場合、「実質的に脂質とリポタンパク質が含まれていない」とは、タンパク質および/またはポリペプチド（例えば、RSV エポリペプチド）の純度をSDS PAGEゲルで観察し、全タンパク質含有量をUV280吸光度もしくはBCA分析のいずれかを用いて測定し、脂質とリポタンパク質含有量をPhospholipase Cアッセイ（Wako, コード番号433-36201）を用いて測定した場合、組成物、タンパク質およびポリペプチドに質量基準で少なくとも約95%脂質とリポタンパク質が含まれていないことをいう。

【0052】

本明細書で用いる場合、「改変型フリリン切断部位」は、天然に存在するRSV エタンパク質では、フリリンまたはフリリン様プロテアーゼによって認識されて切断されるが、1つ以上のアミノ酸の置き換え、1つ以上のアミノ酸の欠失、または1つ以上のアミノ酸の置き換えと1つ以上のアミノ酸の欠失の組合せを含む非切断型のRSV エタンパク質のエクトドメインポリペプチドではそうではない106 ~ 109位付近と133 ~ 136位付近のアミノ酸配列であり、改変型フリリン切断部位を含むRSV エクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドを改変型フリリン切断部位において非切断の状態で産生する細胞から分泌される。

【0053】

本発明における使用に適したRSV エタンパク質のエクトドメインの特徴を、A2株

10

20

30

40

50

由来の R S V F タンパク質の配列（配列番号 1）内のアミノ酸の位置で特定した具体的なアミノ酸に関して本明細書に記載している。R S V F タンパク質のエクトドメインは、A 2 株由来の F タンパク質のアミノ酸配列を有するものであっても、任意の他の所望の株由来の F タンパク質のアミノ酸配列を有するものであってもよい。A 2 株以外の株に由来する F タンパク質のエクトドメインが使用される場合、F タンパク質のアミノ酸は、A 2 株由来の F タンパク質の番号付けを参照して番号付けされ、必要に応じてギャップが挿入される。これは、任意の所望の R S V F タンパク質と、株 A 2（本明細書に A 2 株由来の F タンパク質について示したとおり）、C P 5 2 株、B 株、長鎖株、および 1 8 5 3 7 株の F タンパク質との配列アラインメントを行なうことにより行なわれ得る。図 5 参照。配列アラインメントは、好ましくは、Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16(22): 10881-10890 に開示されたアルゴリズムを使用し、デフォルトパラメータ（Blossum 62 シンボル比較表、ギャップオープンペナルティ：12、ギャップ伸張ペナルティ：2）を用いて得られる。

10

**【0054】**

本発明は、可溶性の R S V F ポリペプチドおよびタンパク質、ならびに可溶性の R S V F ポリペプチドおよびタンパク質を含む免疫原性組成物、ならびに可溶性の R S V F ポリペプチドおよびタンパク質をコードする核酸（例えば、自己複製 RNA 分子）を含む組成物を提供する。

**【0055】**

R S V F ポリペプチド（例えば、エクトドメインポリペプチド）は任意の所望の形態、例えば、単一の形態（非切断単量体、非切断三量体、切断三量体、または切断三量体のロゼットなど）であり得る。また、R S V F エクトドメインポリペプチドは、2 つ以上の形態、例えば、平衡状態（非切断単量体と非切断三量体との平衡など）で存在している 2 つ以上の形態であってもよい。本発明により、いくつかの利点をもたらされる。例えば、免疫原性組成物中における R S V の単一の所望の形態の存在、または既知の形態間での動的平衡により、処方、可溶性および安定性がより予測可能となり、該組成物を被験体に投与した場合の免疫応答がより予測可能となる。

20

**【0056】**

好ましくは、R S V F エクトドメインポリペプチドは、単一の形態（非切断単量体、非切断三量体、切断三量体、切断三量体のロゼットなど）であるか、またはかかる形態のサブセット間での動的平衡（例えば、非切断単量体と非切断三量体との平衡）状態である。

30

**【0057】**

本発明の一態様において、R S V F ポリペプチドおよびタンパク質は融合前コンフォメーションである。融合前コンフォメーションのエピトープの方が、天然ビリオンを認識して中和することができる抗体を、より良好に誘起できることがあり得る。

**【0058】**

本発明の一実施形態において、免疫原性組成物は、融合前コンフォメーションの R S ウイルス F 糖タンパク質の集団を含むものである。本発明の別の態様では、免疫原性組成物は、単離された R S V F 糖タンパク質の集団と比べて、融合後コンフォメーションが不利（disfavor）である R S ウイルス F 糖タンパク質の集団を含むものである。

40

**【0059】**

また、本発明は、R S ウイルス F 糖タンパク質の融合前または中間融合コンフォメーションでは存在するが、該糖タンパク質の融合後コンフォメーションでは存在しないエピトープをディスプレイするポリペプチドを含む免疫原性組成物を提供する。

**【0060】**

（F 糖タンパク質）

R S V の F 糖タンパク質は、ビリオンのエンベロープと宿主細胞の原形質膜とを融合させることによりウイルス侵入を指向する。これは、4 つの一般的なドメイン：N 末端 E R トランスロケーションシグナル配列（SS）、エクトドメイン（ED）、膜貫通ドメイン

50

(TM)、および細胞質テール(CT)を有するI型の1回貫通内在性膜タンパク質である。CTは、パルミトイル化システイン残基を1つ含む。Fタンパク質の配列は、RSV単離株間で高度に保存されているが、常に進化している(7)。ほとんどのパラミクソウイルスとは異なり、RSVのFタンパク質は、その他のウイルスタンパク質とは独立して侵入と合胞体形成を媒介し得る(通常、他のパラミクソウイルスではFに加えてHNが必要である)。

【0061】

hRSV F mRNAは、F<sub>0</sub>と表示される574個のアミノ酸の前駆タンパク質に翻訳され、これは、N末端に、小胞体でシグナルペプチダーゼによって除去されるシグナルペプチド配列を含む。F<sub>0</sub>は、トランス-ゴルジ体で細胞内プロテアーゼ(特に、フリ  
10  
ン)によって2つの部位(a.a.109/110と136/137)で切断されて短いグリコシル化介在配列が除去され、F<sub>1</sub>(約50kDa;C末端;残基137~574)およびF<sub>2</sub>(約20kDa;N末端;残基1~109)と表示される2つのサブユニットが生成する(例えば、図1参照)。F<sub>1</sub>は、そのN末端に疎水性の融合ペプチドを含み、また、2つの疎水性の7反復領域(HRAとHRB)も含む。HRAは該融合ペプチド付近に存在し、HRBは膜貫通ドメイン付近に存在する(例えば、図1参照)。ビリオン内では、F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>ヘテロ二量体がホモ三量体としてアセンブルされる。

【0062】

RSVは、単一の血清型として存在しているが、2つの抗原性の亜群:AとBを有する。この2つの群のF糖タンパク質は約90%同一である。A亜群、B亜群または両者の組  
20  
合せもしくはハイブリッドが本発明において使用され得る。一例の配列は、A亜群のものは配列番号1であり(A2株;GenBank GI:138251;Swiss Prot P03420)、B亜群のものは配列番号2である(18537株;GI:138250;Swiss Prot P13843)。配列番号1および配列番号2は、ともに574個のアミノ酸の配列である。A2株のシグナルペプチドはa.a.1~21であるが、18537株では1~22である。どちらも配列も、TMドメインは約a.a.530~550であるが、別の例では525~548であると報告されている。

【0063】

## 【化 1】

## 配列番号 1

1 MELLILKANAIITTLTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE 60  
 61 LSNIKENKCGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPPTNNRARRRELPRFMNYTLN 120  
 121 NAKKTNVTLKRRRFLGFLLVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKKSALLSTNKAVVS 180  
 181 LSNVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVN 240  
 241 AGVTPPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKMLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300  
 301 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKV 360  
 361 QSNRVFCDTMNSLTLPSSEINLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT 420  
 421 KCTASNKNRGIKFTFNGCDYVSNKGMVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDP 480  
 481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIVIVILLS 540  
 541 LIAVGLLLYCKARSTPVTLTKDQLSGINNIAFSN 574

10

## 配列番号 2

1 MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE 60  
 61 LSNIKETKCGTDTTKVLIKQELDKYKNAVTELOLLMQNTPAANNRARRREAPQYMMNYTIN 120  
 121 TTKNLNVSISKRRRFLGFLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKKNALLSTNKAVVS 180  
 181 LSNVSVLTSKVLDLKNIYINRLLPIVNVQSCRSISNIETVIEFQQMNSRLLLEITREFSVN 240  
 241 AGVTPPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKMLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300  
 301 VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV 360  
 361 QSNRVFCDTMNSLTLPSVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKT 420  
 421 KCTASNKNRGIKFTFNGCDYVSNKGMVDTVSVGNTLYVVKLEGKNLYVKGEPIINYDP 480  
 481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIVIVILLS 540  
 541 LIAIGLLLYCKAKNTPVTLTKDQLSGINNIAFSK 574

20

本発明では、任意の所望の R S V F アミノ酸配列（配列番号 1 もしくは 2 のアミノ酸配列、または配列番号 1 もしくは 2 と同一性を有する配列など）が使用され得る。典型的には、該配列は、配列番号 1 または 2 と少なくとも 75% の同一性を有するもの、例えば、配列番号 1 または 2 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% の同一性を有するものである。該配列は、R S V に天然に見られるものであってもよい。

30

## 【0064】

本発明で、全体または一部において F タンパク質のエクトドメインが使用される場合、これは、

(i) 配列番号 1 のアミノ酸 22 ~ 525 付近を含むポリペプチド

(ii) 配列番号 2 のアミノ酸 23 ~ 525 付近を含むポリペプチド

(iii) (i) または (ii) と少なくとも 75% の同一性（例えば、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% の同一性）を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド

(iv) (i)、(ii) または (iii) の断片を含むポリペプチド（ここで、該断片は少なくとも 1 つの F タンパク質エピトープを含む。該断片は、通常、少なくとも約 100 アミノ酸長、例えば、少なくとも約 150、少なくとも約 200、少なくとも約 250、少なくとも約 300、少なくとも約 350、少なくとも約 400、少なくとも約 450 アミノ酸長である）

40

を含むものであり得る。

## 【0065】

エクトドメインは、F<sub>0</sub> 形態（シグナルペプチドを有するか、または有しない）であってもよく、互いに会合している 2 つの別個のペプチド鎖（例えば、F<sub>1</sub> サブユニットと F<sub>2</sub> サブユニット）（例えば、該サブユニットはジスルフィド結合によって連結されたものであり得る）を含むものであってもよい。したがって、アミノ酸 101 ~ 約 161 付近の全体または一部（アミノ酸 110 ~ 136 など）がエクトドメインに存在していなくても

50

よい。したがって、エクトドメインは、全体または一部に、

(v) 第1のペプチド鎖が、配列番号1のアミノ酸22付近～アミノ酸101付近、または配列番号2のアミノ酸23付近～アミノ酸101付近と少なくとも75%の同一性(例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはさらに100%の同一性)を有するアミノ酸配列を含み、第2のペプチド鎖が、配列番号1のアミノ酸162付近～525付近、または配列番号2のアミノ酸162～525付近と少なくとも75%の同一性(例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはさらに100%の同一性)を有するアミノ酸配列を含む、第1のペプチド鎖、およびこの第1のポリペプチド鎖と会合している第2のペプチド鎖

(vi) 第1のペプチド鎖が、配列番号1のアミノ酸22付近～アミノ酸101付近、または配列番号2のアミノ酸23付近～アミノ酸109付近の断片を含むアミノ酸配列を含み、第2のペプチド鎖が、配列番号1のアミノ酸162付近～アミノ酸525付近、または配列番号2のアミノ酸161付近～アミノ酸525付近の断片を含む、第1のペプチド鎖、およびこの第1のポリペプチド鎖と会合している第2のペプチド鎖(該断片の一方または両方が少なくとも1つのFタンパク質エピトープを含む。第1のペプチド鎖の断片は、通常、少なくとも20アミノ酸長、例えば、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80アミノ酸長である。第2のペプチド鎖の断片は、通常、少なくとも100アミノ酸長、例えば、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも350、少なくとも400、少なくとも450アミノ酸長である)

(vii) (i)、(ii)、(iii)または(iv)のフリン消化によって得られ得る分子

を含むものであり得る。

#### 【0066】

したがって、本発明で使用されるアミノ酸配列は、RSV Fタンパク質において天然に見られるものであってもよく(例えば、TMとCT(配列番号1または2のアミノ酸522～574付近)が欠損している可溶性RSV Fタンパク質)、および/または天然RSV配列と比べて1つ以上(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個)の単一アミノ酸変異(挿入、欠失もしくは置換)を有するものであってもよい。例えば、Fタンパク質を、そのフリン切断配列が排除されるように変異させると、それにより細胞内プロセッシングが抑制されることが知られている。一部の特定の実施形態では、RSV Fタンパク質は、TMとCT(配列番号1または2のアミノ酸522～574付近)が欠損しており、天然RSV配列と比べて1つ以上(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個)の単一アミノ酸変異(挿入、欠失もしくは置換)を含むものである。

#### 【0067】

(フリン切断、トリプシン切断および融合ペプチドの変異)

RSV Fポリペプチドまたはタンパク質は、フリン切断部位(すなわち、配列番号1および2のアミノ酸109と136)の一方または両方での切断を妨げる1つ以上の変異を含むものであり得る。該変異により、可溶性の該ポリペプチドまたはタンパク質の凝集が抑制され、それにより精製が容易となり得、RSV Fタンパク質が細胞表面上で発現される場合(ウイルスレプリコン(例えば、アルファウイルスレプリコン粒子)からの発現によって)、またはRSV Fタンパク質がウイルス様粒子の成分である場合は、細胞-細胞融合が抑制され得る。このような変異はまた、単独または本明細書に記載の他の変異との組合せで、融合前コンフォメーションの該タンパク質を安定化させ得る。

#### 【0068】

10

20

30

40

50

好適なフリン切断変異の例としては、配列番号1または2のアミノ酸残基106~109を、RARK(配列番号77)、RARQ(配列番号78)、QAQN(配列番号79)、またはIEGR(配列番号80)で置き換えることが挙げられる。あるいはまたさらに、配列番号1または2のアミノ酸残基133~136を、RKKK(配列番号81)、R、QNN(配列番号82)、QQQR(配列番号83)またはIEGR(配列番号80)で置き換えてもよい(は、アミノ酸残基が欠失していることを示す)。このような変異を、所望により、p27領域(配列番号1または2のアミノ酸110~136)における変異、例えば、p27領域の全体または一部の欠失などの本明細書に記載の他の変異と組み合わせてもよい。

【0069】

10

このようなフリン切断変異を、所望により、トリプシン切断変異および融合ペプチドの変異などの本明細書に記載の他の変異と組み合わせてもよい。好適なトリプシン切断変異の例としては、配列番号1もしくは2の101位~161位付近の任意のリジンもしくはアルギニン残基の欠失、またはかかる任意のリジンもしくはアルギニン残基のリジンもしくはアルギニン以外のアミノ酸での置き換えが挙げられる。例えば、p27領域(配列番号1または2のアミノ酸110~136付近)内のリジンおよび/またはアルギニン残基を置換してもよく、欠失させてもよい(p27領域の全体または一部の欠失など)。

【0070】

フリン切断変異に対して代替的または付加的に、RSV Fポリペプチドまたはタンパク質は、融合ペプチド領域(配列番号1または2のアミノ酸137~153)に1つ以上の変異を含んでいてもよい。例えば、この領域の全体を欠失させてもよく、一部を欠失させてもよい。

20

【0071】

具体的な実施形態では、RSV Fポリペプチドまたはタンパク質(配列番号1、配列番号2など)のアミノ酸残基100~150またはその可溶性エクドメインの配列は、

【0072】

【化2】

(Furmt) TPATNNRARKELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKKKFLGFLGVSIAIAS (配列番号 3)

30

(Furdel) TPATNNRARQELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSK---RFLGFLGVSIAIAS (配列番号 4)

(Furx) TPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSQNQNQNFLGFLGVSIAIAS (配列番号 6)

(Furx R113Q, K123N, K124N) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAKKTNVTLSSQNQNQNFLGFLGVSIAIAS (配列番号 5)

(Furx R113Q, K123Q, K124Q) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAKKTNVTLSSQNQNQNFLGFLGVSIAIAS (配列番号 92)

40

(Delp21Furx) TPATNNQAQN-----QNQNQNFLGFLGVSIAIAS (配列番号 7)

(Delp23Furx) TPATNNQAQN-----QNQNQNFLGFLGVSIAIAS (配列番号 8)

【0073】

## 【化3】

(Delp21 furdel)TPATNNRARQ-----QNQQRFLGFLGFGVGSIAIAS  
(配列番号 109)

(Delp23furdel)TPATNNRARQ-----QQQRFLGFLGFGVGSIAIAS (配列番号9)

(N末端フリン ) TPATNNRARRELQPQFMNYTLNNAQQTNVTLNQNNQNFLGFLGFGVGSIAIAS (配列番号10)

(C末端フリン )TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSSKKRKRFLGFLGFGVGSIAIAS (配列番号11)

(融合ペプチド欠失 1) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKR-----SAIAS (配列番号 12),

(融合ペプチド欠失 2) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKR-----GVGSIAIAS (配列番号 91), または

(第 $\alpha$ 因子 ) TPATNNIEGRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKIEGRFLGFLGFGVGSIAIAS (配列番号13);

10

20

(ここで、符号「 - 」は、その位置のアミノ酸が欠失していることを示す)である。

## 【0074】

フリン切断および融合ペプチドの変異に対して付加的または代替的に、可溶性 R S V F ポリペプチドまたはタンパク質 (膜貫通領域と細胞質テールが欠損しているものなど) は、1つ以上のオリゴマー化配列を含むものであってもよい。オリゴマー化配列を存在させる場合、これは、好ましくは三量体化配列である。好適なオリゴマー化配列は、当該技術分野でよく知られており、例えば、酵母 G C N 4 ロイシンジッパータンパク質のコイルドコイル、バクテリオファージ T 4 のフィブリチン ( f i b r i t i n ) 由来の三量体化配列 (「フォルドン ( f o l d o n ) 」)、およびインフルエンザ H A の三量体ドメインが挙げられる。これらおよび他の好適なオリゴマー化配列を、本明細書において、より詳細に説明する。

30

## 【0075】

具体的な実施形態では、R S V F ポリペプチドまたはタンパク質のカルボキシ末端の配列は ( 4 8 0 位から始まる )、

## 【0076】

## 【化4】

(GCN) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNDKIEBILSKIYHIENEIARIKKLIGE  
(配列番号 14)

40

(HA) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNEKPFHQIEKEFSEVEGRIQDLEK (配列番号15)

## 【0077】



## 【化5】

(理想的ならせん ) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKIDELLHNIN (配列番号  
16)

(フォルドン 短 )

PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKIDELLHNVNGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

(配列番号 17); または

(フォルドン 長 )

PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKIDELLHNVNNKNDKSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLS

TFL (配列番号 18)

10

である。

## 【0078】

プリン切断変異、融合ペプチドの変異およびオリゴマー化配列の付加の任意の組合せに対して付加的または代替的に、膜貫通領域を含むRSV Fポリペプチドまたはタンパク質は、プロテアーゼ切断部位を提供する付加アミノ酸配列を含むものであってもよい。この型のRSV Fポリペプチドまたはタンパク質は、細胞表面上での発現によって作製され、適切なプロテアーゼを用いて該細胞表面から切断した後、可溶性形態で収集され得る。一般的に、プロテアーゼ切断部位を提供するアミノ酸配列は、膜貫通ドメインのアミノ末端(配列番号1または2のアミノ酸525)の約60アミノ酸以内、約50アミノ酸以内、約40アミノ酸以内、約30アミノ酸以内、約20アミノ酸以内、約10アミノ酸以内に、または実質的に隣接させて存在させる。市販のプロテアーゼによって切断される多くの適当なアミノ酸配列が当該技術分野でよく知られている。例えば、トロンピンは配列LVPR(配列番号75)を切断し、第Xa因子は配列IEGRを切断し、エンテロキナーゼは配列DDDDK(配列番号76)を切断する。このようなアミノ酸配列がRSV Fポリペプチドに導入され得る。具体的な実施形態では、RSV Fポリペプチドまたはタンパク質の配列は(488位から始まり、TM領域まで)、図2に示す配列である。

20

## 【0079】

本発明に従って使用される免疫原性ポリペプチドは、通常、単離されたもの、または精製されたものである。したがって、該ポリペプチドは、通常(あてはまる場合)自然界では一緒に見られる分子と会合していない。例えば、本発明で使用されるFタンパク質は、RSVビリオンの形態ではない(しかし、ピロソームまたはVLPなどの人工ビリオンの形態であってもよい)。

30

## 【0080】

ポリペプチドは、通常、組換え宿主系内での発現によって調製される。一般的に、該ポリペプチド(例えば、RSVエクトドメイン)は、該エクトドメインをコードする組換え構築物を適当な組換え宿主細胞内で発現させることによって作製されるが、任意の適当な方法が使用され得る。好適な組換え宿主細胞としては、例えば、昆虫細胞(例えば、*Aedes aegypti*、*Autographa californica*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda*、および*Trichoplusia ni*)、哺乳動物細胞(例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、および齧歯類(例えば、ハムスター))、鳥類細胞(例えば、ニワトリ、アヒル、およびガチョウ)、細菌(例えば、大腸菌、*Bacillus subtilis*、およびストレプトコッカス種)、酵母細胞(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、*Candida maltosa*、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces fragilis*、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia guillierimondii*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe*および*Yarrowia lipolytica*)、テトラヒメナ細胞(例えば、*Tetrahy*

40

50

ena thermophila) またはその組合せが挙げられる。多くの適当な昆虫細胞および哺乳動物細胞が当該技術分野でよく知られている。好適な昆虫細胞としては、例えば、Sf9細胞、Sf21細胞、Tn5細胞、Schneider S2細胞、およびHigh Five細胞(親Trichoplusia ni BTI-TN-5B1-4細胞系統に由来するクローン単離物(Invitrogen))が挙げられる。好適な哺乳動物細胞としては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト胚性腎細胞(HEK293細胞、典型的には、剪断アデノウイルス5型DNAで形質転換されたもの)、NIH-3T3細胞、293-T細胞、Vero細胞、HeLa細胞、PERC.6細胞(ACC寄託番号96022940)、HepG2細胞、MRC-5(ATCC CCL-171)、WI-38(ATCC CCL-75)、アカゲザル胎仔肺細胞(ATCC CL-160)、マディン-ダービーウシ腎(「MDBK」)細胞、マディン-ダービーイヌ腎(「MDCK」)細胞(例えば、MDCK(NBL2)、ATCC CCL34; またはMDCK 33016、DSM ACC 2219)、乳仔ハムスター腎(BHK)細胞(例えば、BHK21-F、HKCC細胞)などが挙げられる。好適な鳥類細胞としては、例えば、ニワトリ胚性幹細胞(例えば、EBx(登録商標)細胞)、ニワトリ胚性線維芽細胞、ニワトリ胚性生殖細胞、アヒル細胞(例えば、AGE1.CRおよびAGE1.CR.pIX細胞系統(ProBioGen)、これらは、例えば、Vaccine 27:4975-4982(2009)およびWO2005/042728に記載されている)、EB66細胞などが挙げられる。

#### 【0081】

好適な昆虫細胞発現系(バキュロウイルス系など)は当業者に知られており、例えば、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)に記載されている。バキュロウイルス/挿入(insert)細胞発現系のための材料および方法はキットの形態で、とりわけ、Invitrogen(San Diego CA)から市販されている。また、鳥類細胞発現系も当業者に知られており、例えば、米国特許第5,340,740号;同第5,656,479号;同第5,830,510号;同第6,114,168号;および同第6,500,668号;欧州特許番号EP0787180B;欧州特許出願番号EP03291813.8;WO03/043415;ならびにWO03/076601に記載されている。また、同様に、細菌発現系および哺乳動物細胞発現系も当該技術分野で知られており、例えば、Yeast Genetic Engineering(Barr編, 1989)(Butterworths, London)に記載されている。

#### 【0082】

RSV Fタンパク質のエクトドメインをコードする組換え構築物は、適当なベクターにおいて慣用的な方法を用いて調製され得る。昆虫細胞または哺乳動物細胞での組換えタンパク質の発現のためのいくつかの適当なベクターは、よく知られており、当該技術分野で慣用的である。好適なベクターは、いくつかの成分、例えば限定されないが、以下:複製起点;選択可能なマーカー遺伝子;1つ以上の発現制御エレメント(例えば、転写制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター)、および/または1つ以上の翻訳シグナル);ならびに選択した宿主細胞(例えば、哺乳動物起源のもの、または異種哺乳動物種もしくは非哺乳動物種由来のもの)の分泌経路への標的化のためのシグナル配列またはリーダー配列のうち1つ以上を含むものであり得る。例えば、昆虫細胞での発現のためには、適当なバキュロウイルス発現ベクター(pFastBac(Invitrogen)など)が組換えバキュロウイルス粒子の作製に使用される。バキュロウイルス粒子を増幅させ、組換えタンパク質を発現させるための昆虫細胞の感染に使用する。哺乳動物細胞での発現のためには、所望の哺乳動物宿主細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞)での該構築物の発現を駆動するベクターが使用される。

#### 【0083】

RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、任意の適当な方法を用いて精

製され得る。例えば、イムノアフィニティークロマトグラフィーによるRSV Fエクトドメインポリペプチド精製方法は、当該技術分野で知られている。Ruiz-Arguelloら, J. Gen. Virol., 85: 3677-3687 (2004)。所望のタンパク質の好適な精製方法、例えば、沈降および種々の型のクロマトグラフィー（疎水性相互作用、イオン交換、アフィニティ、キレートおよびサイズ排除など）は、当該技術分野でよく知られている。好適な精製スキームは、これらまたは他の適当な方法の2つ以上を用いて作成されたものであり得る。所望により、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドに、エピトプタグまたはHISタグなどの精製を容易にする「タグ」を含めてもよい。かかるタグ化ポリペプチドは、例えば、馴化培地から、キレートクロマトグラフィーまたはアフィニティークロマトグラフィーによって簡便に精製され得る。

10

## 【0084】

また、RSV Fポリペプチドは、インサイチュで、該ポリペプチドをコードする核酸を被験体の細胞内で発現させることによっても作製され得る。例えば、本明細書に記載の自己複製RNAの発現による。

## 【0085】

ポリペプチドは、RSV配列に加えて、さらなる配列を含んでよい。例えば、ポリペプチドには、精製を容易にする配列（例えば、ポリ-His配列）が含まれ得る。同様に、発現の目的で、Fタンパク質の天然リーダーペプチドを異なるペプチドで置換してもよい。例えば、参考文献6では、天然のペプチドの代わりにミツバチメリチンリーダーペプチドが使用されている。

20

## 【0086】

（ポリペプチドの形態とコンフォメーション）

本発明は、本明細書に開示したRSV Fポリペプチドおよびタンパク質の任意の形態およびコンフォメーションを含む免疫原性組成物を含む（本明細書に開示したRSV Fポリペプチドおよびタンパク質の形態およびコンフォメーションの任意の所望の組合せを含む）。RSV Fポリペプチドは単量体であり得るか、またはRSV Fタンパク質は、3つの該単量体ポリペプチドを含む三量体であり得る。三量体は、単分散型であってもよく、例えば個々の三量体（trimer）の融合ペプチド間の相互作用のため、ロゼットの形態であってもよい。免疫原性組成物は、単量体、三量体、単量体と三量体の組合せ（例えば、動的平衡状態）、三量体のロゼット、および前述のものの任意の組合せであるポリペプチドを含むものであり得る。また、本明細書においてさらに記載するように、RSV Fタンパク質は、融合後コンフォメーション、融合前コンフォメーション、または中間コンフォメーションであり得る。

30

## 【0087】

RSV Fタンパク質は、融合前コンフォメーション、融合後コンフォメーションまたは中間コンフォメーションであり得る。RSV Fタンパク質の「融合後コンフォメーション」は、天然RSV Fの低エネルギーコンフォメーションであると考えられており、3つのHRB領域と3つのHRA領域を含む6ヘリックスバンドルの存在を特徴とする三量体である。融合後コンフォメーションは、電子顕微鏡検査によると、特徴的な「松葉杖」または「ゴルフのティー」形状を有する。RSV Fタンパク質の「融合前コンフォメーション」は、3つのHRB領域を含むコイルドコイルを含む三量体を特徴とするコンフォメーションである。融合ペプチドは、融合前コンフォメーションでは露出されず、したがって、融合前コンフォメーションは、一般的にロゼットを形成せず、電子顕微鏡検査によると、「棒つきキャンディ」または「軸付きのボール」形状を有する。

40

## 【0088】

一部の態様では、RSV Fタンパク質は融合後コンフォメーションである。例えば、RSV Fタンパク質は、融合後コンフォメーションの単分散三量体の形態、または融合後三量体で構成されたロゼットの形態であり得る。

## 【0089】

一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは単量体である。一部の実施形態では、

50

R S V Fポリペプチドは三量体である。

【0090】

他の態様では、R S V Fタンパク質は融合前コンフォメーションである。なんら特定の理論に拘束されることを望まないが、R S V Fタンパク質の融合前コンフォメーションまたは中間形態には、天然のR S V ビリオン上に発現されたR S V Fタンパク質のものと同じエピトープが含まれ得、したがって、中和抗体の誘起に利点をもたらすと考えられる。

【0091】

本発明の一部の態様では、Fタンパク質の融合後コンフォメーションを不利にするポリペプチドが使用される。好ましくは、該ポリペプチド(全体または一部において)は、融合前コンフォメーションから融合後コンフォメーションへの変換において、融合前Fタンパク質のエピトープまたは中間コンフォメーションのエピトープをディスプレイする。このようなポリペプチドは、融合前状態の天然もしくは変異型Fタンパク質であってもよく、中間コンフォメーションの天然もしくは変異型Fタンパク質であってもよく、融合後コンフォメーションが不利になったか、もしくは優先的に排除された天然もしくは変異型タンパク質の集団であってもよい。一部の特定の場合では、該天然もしくは変異型タンパク質は、該ポリペプチドを前述の状態のうちの1つに維持することを補助する1つ以上のさらなる分子(融合前コンフォメーションまたは中間コンフォメーションに優先的に結合するモノクローナル抗体など)と合わされ得る。また、該ポリペプチドは天然Fタンパク質の誘導体であってもよい。かかる誘導体としては、天然Fタンパク質の1つ以上の断片を含むポリペプチド、天然Fタンパク質(またはその断片)と異種配列を含む融合ポリペプチド、および1つ以上の変異を有する天然Fタンパク質配列を含むポリペプチドが挙げられる。このような(または他の)修飾は融合後コンフォメーションを不利にするものであり得る。融合後コンフォメーションを不利にするための例示的なアプローチとしては、融合前コンフォメーションの安定化、中間コンフォメーションの安定化、融合後コンフォメーションの不安定化または融合後コンフォメーションをもたらす1つ以上の工程の活性化障壁の増大が挙げられる。

【0092】

別の実施形態では、本発明は、融合前コンフォメーションのFタンパク質または中間コンフォメーションのFタンパク質に特異的な少なくとも1つのエピトープをディスプレイするポリペプチドである。融合前コンフォメーションのFタンパク質または中間コンフォメーションのFタンパク質に特異的なエピトープは、融合後コンフォメーションでは提示されないエピトープである。該エピトープの少なくとも1つは安定的に提示されることが好ましく、例えば、該エピトープは、溶液中で、少なくとも12時間、少なくとも1日、少なくとも2日間、少なくとも4日間、少なくとも6日間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも4週間、または少なくとも6週間、安定的に提示される。

【0093】

かかるポリペプチドは、融合前状態、中間状態、または融合後状態が過少提示(underrepresented)状態もしくは単離された天然Fタンパク質の場合よりも割合が少ない集団状態の、天然もしくは変異型Fタンパク質であってもよく、天然Fタンパク質の誘導体であってもよい。かかる誘導体としては、天然Fタンパク質の1つ以上の断片を含むポリペプチド、天然Fタンパク質(またはその断片)と異種配列を含む融合ポリペプチド、および1つ以上の変異を有する天然Fタンパク質配列を含むポリペプチドが挙げられる。このような(または他の)修飾は、Fタンパク質のアミノ酸配列をその融合前コンフォメーションで安定化させるもの、Fタンパク質のアミノ酸配列を中間コンフォメーションで安定化させるもの、Fタンパク質のアミノ酸配列の融合後コンフォメーションを不安定化させるもの、Fタンパク質のアミノ酸配列の融合後コンフォメーションをもたらす遷移のエネルギー障壁を増大させるもの、または前述のものの2つ以上の組合せであり得る。

【0094】

10

20

30

40

50

Fタンパク質のTMおよび/またはCTドメインは融合前コンフォメーションの安定性に重要である(8)。したがって、これらのドメインは本発明の免疫原に有用に保持され得る。しかしながら、膜貫通ドメインを可溶性免疫原に含めないことが望ましい場合があり得るため、TMの機能性効果を他の手段によって得てもよい。例えば、パラインフルエンザウイルス5のFタンパク質の融合前および融合後の挙動がある程度詳細に試験されており(6)、著者は、EDの融合前構造を、異種三量体化ドメインをEDのC末端と融合させることにより安定化させた。

【0095】

(オリゴマー化ドメイン)

本発明の別の実施形態において、該組成物は、第1のドメインと第2のドメインを含み、(i)第1のドメインがRSV Fタンパク質(例えば、全体または一部におけるRSVエクトドメイン)を含み、(ii)第2のドメインが異種オリゴマー化ドメインを含むポリペプチド(例えば、組換えポリペプチド)を含むものであり得る。第2のドメインは該ポリペプチドのオリゴマー化を可能にし、それにより、第1のドメインが融合前状態または中間状態になることが助長される。該ポリペプチドは、好ましくはオリゴマーとして、特に三量体として存在する。

10

【0096】

種々のオリゴマー化ドメインが当業者に利用可能である。これは、複数のポリペプチドが会合して(通常、非共有結合により)オリゴマー(例えば、三量体)を形成できるように、他のポリペプチド(同じであれ異なるものであれ)のオリゴマー化ドメイン(同じであれ異なるものであれ)と相互作用し得る構造が形成され得るアミノ酸配列である。例えば、HIVのFタンパク質(すなわち、gp160)の三量体化は、これを、天然で安定な三量体である大腸菌アスパラギン酸トランスカルバモイラーゼ(ATCase)の触媒性サブユニットと融合させることにより行なわれる(9)。したがって、ATCaseのこのサブユニットは本発明で使用され得る。同様に、HIV(10)およびPIV5(6)のFタンパク質の三量体化は、そのエクトドメインをGCNtと融合させることにより得られている。したがって、本発明で使用されるオリゴマー化ドメインは、酵母GCN4のロイジンジッパータンパク質のコイルドコイルを含むものであってもよい(11)。インフルエンザAウイルス由来のHAタンパク質のエクトドメインの三量体化は、バクテリオファージT4のフィブリチンの三量体化配列(「フォルドン」)(GSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL-配列番号19)を使用することにより行なわれている(12)。したがって、本発明で使用されるオリゴマー化ドメインは、かかるフォルドンを含むものであってもよい。

20

30

【0097】

天然に存在するタンパク質オリゴマーは(ヘテロ-オリゴマーおよびホモ-オリゴマーのどちらも)、さまざまな異なる様式で、例えば、種々の単量体の $\alpha$ -シートの会合、種々の単量体の $\beta$ -らせんの会合、疎水性表面パッチの会合などによって会合している。タンパク質のオリゴマー化に関与している共通の構造モチーフの一例はコイルドコイルドメインである。コイル状の $\beta$ -らせん構造モチーフは、それ自体がコイルを形成することができ、2つ、3つ、4つ、または5つの $\beta$ -らせんが互いに巻き付いて、「コイルドコイル」として知られる左巻き超らせんが形成され得るが、人工の右巻き超らせんも設計されている(13~19)。コイルドコイルドメインの単純さのため、該ドメインは、規定のオリゴマー化状態を有するキメラタンパク質の設計によく使用される選択肢となっている(16)。

40

【0098】

コイルドコイル構造では、 $\beta$ -らせん同士が、各らせんの一方側に沿って無極性のストライプ(stripe)を形成する疎水性残基を介して相互作用するが、このストライプのどちらかの側で側鎖間の静電相互作用が安定化されることもあり得る。 $\beta$ -らせんのabcdefg7反復内では、該無極性ストライプは残基aとdの疎水性側鎖によって規定され、静電相互作用(あれば)は主に残基eとgに存在する。位置aは、最も高頻度には

50

L e u、I l eまたはA l aであり、位置dは、通常、L e uまたはA l aである。残基eおよびgは、多くの場合、G l uまたはG l nであり、また、位置gにはA r gとL y sもよく見られる。荷電残基は、一般的には位置b、cおよびfである。それは、これらの残基が溶媒と接触しているからである。しかしながら、この一般的な7パターンには例外があり、場合によっては、この7つの中にP r o残基が存在する。かかる例外は、通常、機能的有意性（例えば、一例として、Fタンパク質で起こるものなどのリフォールディングと再編成（r e a r r a n g e m e n t）を可能にするオリゴマー化ドメインの不安定化）を有するものである。

#### 【0099】

数百のコイルドコイルドメイン配列が当該技術分野で知られており、任意の適当な配列がオリゴマー化ドメインとして本発明で使用され得るが、該配列は、他のコイルドコイルドメインとオリゴマー化する能力を保持しているものであること、およびポリペプチド内において他のドメインの機能を破壊しないものであることを条件とする。細胞外に見られ（20）、かつ天然でオリゴマー化ドメインとしての機能を果たすコイルドコイルドメインを使用することが好ましい。天然のコイルドコイルドメインの使用の代替法として、人工のコイルドコイルドメインが使用され得る（21, 22）。コイルドコイルドメインが高度に反復性の構造であることによって、該ドメインは、各アミノ酸残基の主鎖部分がパラメータ化され得るため（残基の各主鎖部分を、独自の変数を有する一意的な単位として扱うのではなく）、特にコンピュータでのモデル設計を行ない易い。ドメイン（b）には、ロイシンジッパー配列またはアラニンジッパー配列が含まれ得る（23）。

#### 【0100】

本発明のポリペプチドに使用されるコイルドコイルドメインは、好ましくは、本発明のポリペプチドも三量体にアッセンブルされ得るように、三量体を形成するものである。好ましいコイルドコイルドメインは、細菌の膜貫通タンパク質から得られるものである。膜貫通タンパク質の好ましいサブセットは、アドヘシン（すなわち、他の細胞または表面への接着を媒介する細胞表面タンパク質）、特に、非線毛アドヘシン（例えば、オリゴマー化コイルドコイルアドヘシンまたは「Oca」ファミリーのもの）である。本発明で 사용되는具体的な配列としては、参考文献24に開示されたもの（*Yersinia enterocolitica* アドヘシンYadA、*Neisseria meningitidis* アドヘシンNadA、*Moraxella catarrhalis* 表面タンパク質UspA2）、および他のアドヘシン（例えば、*Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* 由来のHadAアドヘシンなど）（参考文献24の配列番号28～31および42～58）が挙げられる。また、真核生物の熱ショック転写因子は、別個に発現させることができるコイルドコイル三量体化ドメインを有し、したがって本発明で利用される。

#### 【0101】

コイルドコイル領域を有するポリペプチドのアミノ酸配列において、らせんの7反復の性質は、コイルドコイルドメインの境界は、ある程度の精度を伴って決定され得るが、コイルドコイル配置の終わりと言えらる厳密な残基は、絶対的な正確さを伴って知ることができないであろうことを意味する。しかし、絶対的精度の欠如は、常套的な試験によって、コイルドコイルに、必要かもしれない任意の特定のアミノ酸残基が必要とされるかどうかを実証され得るため、本発明を実施するのに問題ではない。そうであっても、本発明の基本的要件は、該ポリペプチドが他のコイルドコイルドメインと、該ポリペプチドにおける他のドメインの機能を破壊することなくオリゴマー化することが可能であるような様式で、コイルドコイルドメインが機能を果たすべきであるということのみであるため、本発明では、境界を絶対的精度を伴って知ることが必要とされない。

#### 【0102】

本発明で利用され得る別の種類のオリゴマー化ドメインは、コラーゲンヘリックスとして知られる左巻き三重らせんに見られるものである（25）。この三重らせん形成配列は、基本のトリペプチド反復配列<sup>1</sup> G l y - <sup>2</sup> X a a - <sup>3</sup> X a aを含み、ここで、<sup>2</sup> X a a

10

20

30

40

50

は、多くの場合、Proであり、<sup>3</sup>Xaaは、多くの場合、4-ヒドロキシプロリンである。このモチーフは「コラーゲン」らせんとして知られているが、コラーゲンだけでなく、多くのタンパク質にみられる。したがって、オリゴマー化ドメインは、複数の反復配列モチーフ<sup>1</sup>Gly-<sup>2</sup>Xaa-<sup>3</sup>Xaaを含む配列であってもよく、該モチーフがフォールディングして、他のポリペプチド鎖の対応するらせん構造とオリゴマー化し得るらせん構造が形成される。

【0103】

また、コラーゲンにより、別の種類のオリゴマー化ドメインも得られる。参考文献26には、X型コラーゲンの非コラーゲン性ドメイン1(NC1)にみられるモチーフが記載されており、このモチーフは、三重らせんなしの三量体および高次多量体の形成に使用され得る。この三量体会合体は、分子間ジスルフィド結合なしで高度に熱安定性である。したがって、オリゴマー化ドメインはNC1配列を含むものであってもよい。

10

【0104】

他のオリゴマー化ドメインは、オリゴマー-TMタンパク質の膜貫通ドメインに由来するものであり得る。このようなものは、通常、親油性であるため、TM領域の外側に位置する疎水性残基が荷電残基と置換され、可溶性ドメインがもたらされることがあり得る。かかるタンパク質工学による膜貫通ドメインの可溶化方法は当該技術分野で知られている(例えば、参考文献27)。

【0105】

また、この方法は、GCN4にも使用されており、ここでは、7反復の「a」および「d」の位置がイソロイシン(11)で置き換えられている:KQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA(配列番号20)。オリゴマー化ドメインにおける使用に好適なコイルドコイル配列は、通常、20~35アミノ酸長、例えば、23~30アミノ酸残基長のものである。

20

【0106】

本発明で使用されるオリゴマー化ドメインでは、一般的に、単量体間ジスルフィド結合の形成の必要なくオリゴマー構造が維持され得るが、本発明では、ジスルフィド連結単量体を含むオリゴマーを除外しない。

【0107】

融合前コンフォメーションのFタンパク質を安定化させるためのオリゴマー化ドメインの使用に対する代替法として、または該使用に加えて、変異が使用され得る。例えば、参考文献28には、シミアンウイルス5またはヘンドラウイルスのFタンパク質のF2サブユニットの保存領域における変異は、融合前コンフォメーションの安定性に影響し得ることが報告されている。

30

【0108】

また、一部の状況では、融合前コンフォメーションが有利となるように低pHが使用され得る。

【0109】

(HRBドメインの三量体の安定化)

本発明の別の好ましい態様では、Fタンパク質の融合後コンフォメーションは、HRBドメインの三量体の安定化によって不利となり得る。HRBドメインは、融合前形態およびおそらく中間形態の三重コイルドコイルを形成する。先のセクションで論考したように、コイルドコイルは、その単純さのため、タンパク質間の分子間相互作用のモデル系として、およびより広範な分子内相互作用(すなわち、三次フォールディング相互作用)のモデル系として広く研究されている。このような研究は、三量体コイルドコイル形態のHRBドメインを安定化させるために使用され得る方法の教示に有用である。一例として、7反復のa位および/またはd位の1つ以上の残基を、安定な三量体コイルドコイルの形成を有利にする残基(Ile残基など)で置き換えてもよい。また、好ましさは低い、e位とg位における不利であり得るイオン性相互作用を欠失させてもよく、またはe位とg位において有利となり得るイオン性相互作用を付加してもよい。

40

50

## 【0110】

操作するのに好ましいHRBドメインの領域は、P484～N517間の7反復である。変異の標的とするa残基とd残基の好ましい例は、F488、I492、V495、I499、S502、I506、S509、L512、およびV516である。セリン残基は、親水性残基が疎水性残基で置き換えられるとコイルドコイルの疎水性コアが安定化されるため特に好ましい。別の好ましい標的は、フェニルアラニンのコア内により良好に入れられる小さい疎水性残基（イソロイシンなど）での置き換えであり得る。

## 【0111】

（HRAドメインの三量体の不安定化）

本発明の別の好ましい態様では、Fタンパク質の融合後コンフォメーションは、HRAドメインの三量体の不安定化によって不利となり得る。HRAドメインは、融合後形態および場合によっては1つ以上の中間形態の三重コイルドコイルを形成する。一例として、7反復のa位および/またはd位の1つ以上の残基を、安定な三量体コイルドコイルの形成を不利にする残基で置き換えてもよい。また、好ましさは低いが、e位とg位における有利であり得るイオン性相互作用を欠失させてもよく、またはe位とg位において不利となり得るイオン性相互作用を付加してもよい。好ましくは、融合前形態および融合後形態のPIV5 Fタンパク質の入手可能な結晶構造に基づいてモデル設計され得るような、融合前コンフォメーションのHRAドメインの安定性に対する影響が最小限であるような変異が選択される。

10

## 【0112】

（他の修飾）

前述の修飾に加え、修飾は、さらに、融合前形態および融合後形態のPIV5 Fタンパク質の入手可能な結晶構造に基づいたhRSV Fタンパク質の分子モデル設計に基づいて設計され得る。融合後コンフォメーション（HRAおよびHRBドメインの6HBフォールド体など）を不安定化させる変異、または融合前コンフォメーション（融合前コンフォメーションのHRAフォールド体など）を安定化させる変異が行なわれ得る。また、融合後コンフォメーションに至る遷移のエネルギー障壁を増大させてもよい。当業者は、最初のコンフォメーションの安定化または最後のコンフォメーションの不安定化は、エネルギー障壁の増大効果を有することがあり得ることを認識するが、遷移自体に影響を及ぼす他の修飾を導入してもよい。

20

30

## 【0113】

さらなる一例として、HRBドメインのN末端のアミノ酸（a . a . 449～482付近、好ましくは、V459 - F483）は、HRBドメインが融合後コンフォメーションの6HBに参与し得るように、HRBドメインがFタンパク質三量体の一方側から他方側にシフトすることを可能にする「テザー（tether）」としての機能を果たす。このようなアミノ酸の1つ以上を欠失させると、Fタンパク質の融合後コンフォメーションの6HBフォールド体へのHRBドメインの参与が障害または明白に抑制される（図3参照）。また、テザーと融合前コンフォメーションのFタンパク質との間の相互作用を安定化すると、HRBドメインが6HBフォールド体に参与することが可能となるようにテザーが引き離されることが抑制され得る。行なわれ得る安定化変異の例は、テザーと、該テザーが融合前コンフォメーションで接触するFタンパク質部分との間のシステインブリッジである。

40

## 【0114】

また別の例は、融合前コンフォメーションのHRA（残基T50～Y306）の安定化である。この場合も、相同Fタンパク質の結晶構造に基づいて、疎水性コアは、埋もれた親水性またはイオン性の残基を類似した大きさの疎水性残基で置き換えることにより安定化され得る。また、システインブリッジを表面またはコア内に導入してもよい。また、リゾチーム変異型での広範な結晶構造分析で示されたように、その疎水性コアまたはタンパク質は比較的堅く、したがって、細孔の導入により予測どおりにリゾチーム変異型は不安定化された。同様に、融合前コンフォメーションのFタンパク質のコアを作り変えて（r

50



e packing) 任意の天然の細孔をなくすと、融合前形態または中間形態の F タンパク質が安定化され得、したがって、融合後コンフォメーションが不利となり得る。

【0115】

(組成物の調製方法)

本発明は、組成物の調製方法、および R S V F タンパク質を含む組成物、特に、可溶性の R S V F エクトドメインポリペプチドを含む組成物、例えば、免疫原性組成物に関する。好ましくは、R S V F エクトドメインポリペプチドは、単一の形態（非切断単量体、非切断三量体、切断三量体、切断三量体のロゼットなど）であるか、またはかかる形態のサブセット間での動的平衡（例えば、非切断単量体と非切断三量体との平衡）状態である。本発明により、いくつかの利点をもたらされる。例えば、本明細書に記載のように、本発明は、R S V F タンパク質の優性である所望の形態、もしくは R S V F タンパク質の単一の所望の形態（非切断単量体、非切断三量体、切断三量体、切断三量体のロゼットなど）、かかる形態のサブセット間での動的平衡（例えば、非切断単量体と非切断三量体との平衡）、または R S V F タンパク質の所望の形態の混合物を含む組成物の作製方法を提供する。このような型の組成物は、ワクチンの作製に使用され得る免疫原性組成物の作製など、さまざまな目的に使用され得る。免疫原性組成物中における R S V F の単一の所望の形態の存在、または既知の形態間での動的平衡の存在により、処方、可溶性および安定性がより予測可能となり、該組成物を被験体に投与した場合の免疫応答がより予測可能となる。

10

【0116】

R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを慣用的な組換え発現によって宿主細胞内で産生させた場合、該ポリペプチドは、培養培地中に分泌される前に、宿主細胞内での産生中に、109/110位付近と136/137位付近のプリン切断部位で切断される。宿主細胞によって該ポリペプチドが切断されると、R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドのリフォールディングが許容され、これにより、疎水性の融合ペプチドの露出がもたらされる。したがって、切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドは、露出された融合ペプチドの存在によって、ロゼットを形成し、宿主細胞および培養培地に由来する脂質およびリポタンパク質と会合する。実際、昆虫細胞において産生され、HIS<sub>6</sub>-タグによって精製された切断型 R S V F エクトドメインの電子顕微鏡検査では、該ポリペプチドが、融合後形態と整合する松葉杖形状を有し、残留細胞残屑と思われるものに結合していることが示された。したがって、ロゼットおよび他の形態の高純度調製物ならびに R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドの確認は、宿主細胞での慣用的な組換え発現では容易に得られないだろう。

20

30

【0117】

(切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドの作製方法)

一態様において、本発明は、切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物の調製方法である。一般に、該方法は、非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドを準備すること、次いで該ポリペプチドを切断し、F<sub>1</sub> サブユニットと F<sub>2</sub> サブユニットを生成させることを伴う。本明細書に記載のように、非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドは、夾雑している脂質とリポタンパク質から、適当な方法（サイズ排除クロマトグラフィーなど）を用いて容易に精製および分離され得る。なんら特定の理論に拘束されることを望まないが、疎水性の融合ペプチドは、非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドでは露出されておらず、したがって、非切断型ポリペプチドは、脂質/リポタンパク質夾雑物と会合しないと考えられる。本明細書においてさらに記載するように、非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインは、切断されると F<sub>1</sub> および F<sub>2</sub> サブユニットが生成され得、これらは、三量体、三量体のロゼット、または三量体と三量体のロゼットの混合物として精製され得る。

40

【0118】

非切断型の R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドは、任意の適当な方法

50

を用いて作製され得る。例えば、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドが産生されている時点では活性なフリンまたはフリン様プロテアーゼを含まない宿主細胞での組換え産生による。この産生方法を行なうのに、さまざまな方法、例えば、フリンまたはフリン様プロテアーゼの発現が抑制されるように変異した（条件付きで、または完全に「ノックアウト」の）組換え宿主細胞での産生、および例えば、RNA干渉または他の同様の方法を用いて、あるいは宿主細胞におけるフリンまたはフリン様プロテアーゼ活性を該プロテアーゼのインヒビターを用いて阻害し、宿主細胞でのフリンまたはフリン様プロテアーゼの発現を低減または抑制する種々の方法が使用され得る。

#### 【0119】

非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、好ましくは、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドが該ポリペプチドを非切断型で産生する宿主細胞によって分泌されるように、フリン切断部位のアミノ酸配列が改変されたRSV Fタンパク質のエクトドメインをコードする構築物の組換え発現によって作製される。非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、任意の適当な宿主細胞（昆虫細胞（例えば、*Aedes aegypti*、*Autographa californica*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda*、および*Trichoplusia ni*）、哺乳動物細胞（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、および齧歯類（例えば、ハムスター））、鳥類細胞（例えば、ニワトリ、アヒル、およびガチョウ）、細菌（例えば、大腸菌、*Bacillus subtilis*、およびストレプトコッカス種）、酵母細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、*Candida maltosa*、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces fragilis*、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia guilliermondii*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe*および*Yarrowia lipolytica*）、テトラヒメナ細胞（例えば、*Tetrahymena thermophila*）など、またはその組合せ）を用いて作製され得る。多くの適当な昆虫細胞および哺乳動物細胞が当該技術分野でよく知られている。好適な昆虫細胞としては、例えば、Sf9細胞、Sf21細胞、Tn5細胞、Schneider S2細胞、およびHigh Five細胞（親*Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4細胞系統に由来するクローン単離株（*In vitro* gen））が挙げられる。好適な哺乳動物細胞としては、例えば、チャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胚性腎細胞（HEK293細胞、典型的には、切断アデノウイルス5型DNAで形質転換されたもの）、NIH-3T3細胞、293-T細胞、Vero細胞、HeLa細胞、PERC.6細胞（EACC寄託番号96022940）、Hep G2細胞、MRC-5（ATCC CCL-171）、WI-38（ATCC CCL-75）、アカゲザル胎仔肺細胞（ATCC CL-160）、マディン-ダービーウシ腎（「MDBK」）細胞、マディン-ダービーイヌ腎（「MDCK」）細胞（例えば、MDCK（NBL2）、ATCC CCL34；またはMDCK 33016、DSM ACC 2219）、乳仔ハムスター腎（BHK）細胞（例えば、BHK21-F、HKCC細胞）などが挙げられる。好適な鳥類細胞としては、例えば、ニワトリ胚性幹細胞（例えば、EBx（登録商標）細胞）、ニワトリ胚性線維芽細胞、ニワトリ胚性生殖細胞、アヒル細胞（例えば、AGE1.CRおよびAGE1.CR.pIX細胞系統（ProBioGen）、これらは、例えば、Vaccine 27:4975-4982（2009）およびWO2005/042728に記載されている）、EB66細胞などが挙げられる。

#### 【0120】

好適な昆虫細胞発現系（バキュロウイルス系など）は当業者に知られており、例えば、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555（1987）に記載さ

10

20

30

40

50

れている。バキュロウイルスノ挿入細胞発現系のための材料および方法はキットの形態で、とりわけ、Invitrogen (San Diego CA) から市販されている。また、鳥類細胞発現系も当業者に知られており、例えば、米国特許第5,340,740号；同第5,656,479号；同第5,830,510号；同第6,114,168号；および同第6,500,668号；欧州特許番号EP0787180B；欧州特許出願番号EP03291813.8；WO03/043415；ならびにWO03/076601に記載されている。また、同様に、細菌発現系および哺乳動物細胞発現系も当該技術分野で知られており、例えば、Yeast Genetic Engineering (Barr編, 1989) (Butterworths, London) に記載されている。

10

## 【0121】

一般的に、非切断型RSV Fタンパク質のエクトドメインのアミノ酸配列は、109/110位付近と136/137位付近のリン切断部位での切断は抑制されるように改変されているが、切断されるとF<sub>1</sub>サブユニットとF<sub>2</sub>サブユニットが生成される天然に存在するかまたは導入のプロテアーゼ切断部位を含む。例えば、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、109/110位付近と136/137位付近のリン切断部位での切断が抑制されるように改変されたアミノ酸配列を有するが、101位付近～161位付近に1つ以上の天然に存在するかまたは導入のプロテアーゼ切断部位を含むものであり得る。

20

## 【0122】

非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドが宿主細胞によって産生および発現されることを可能にするさまざまな具体的なアミノ酸配列（例えば、109/110位付近と136/137位付近のリン切断部位で切断されないアミノ酸配列）が、当業者に容易に設計され、想定され得よう。一般に、109/110位付近と136/137位付近のリン切断部位の一部であるか、または該部位付近に存在している1つ以上のアミノ酸が独立して、置き換えられているか、または欠失している。RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの切断を抑制するのに適したアミノ酸置換および欠失がいくつか知られている。例えば、置換R108N、R109N、R108N/R109N（これらにより109/110での切断が抑止される）、および置換K131Qまたは131～134位のアミノ酸の欠失（これらにより136/137での切断が抑止される）が、Gonzalez-Reyesら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:9859-9864 (2001) に記載されている。アミノ酸置換R108N/R109N/K131Q/R133Q/R135Q/R136Qを含む非切断型RSV Fエクトドメインポリペプチドも記載されている。Ruiz-Arguelloら, J. Gen. Virol. 85:3677-687 (2004)。本明細書において詳細に記載しているように、宿主細胞から非切断型でのRSV Fエクトドメインポリペプチドの分泌をもたらすさらなるRSV Fタンパク質のアミノ酸配列は、改変型リン切断部位を含むもの、例えば、106～109位付近と133～136位付近のアミノ酸配列が改変されたものである。改変型リン切断部位には、106～109位付近での少なくとも1つのアミノ酸置換または欠失、および133～136位付近での少なくとも1つのアミノ酸置換または欠失が含まれる。

30

40

## 【0123】

同様に、切断されるとF<sub>1</sub>を含む第1のサブユニットとF<sub>2</sub>を含む第2のサブユニットが生成されるプロテアーゼ切断部位（例えば、天然に存在するかまたは導入）を含む非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのさまざまな具体的なアミノ酸配列が可能であり、容易に設計され、想定され得る。例えば、RSV Fタンパク質の101位付近～161位付近のアミノ酸配列にトリプシン切断部位を含めて、該トリプシン切断部位の1つ以上をトリプシンによって切断し、F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>サブユニットを生成させ得る。所望により、1つ以上の適当なプロテアーゼ認識部位を、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドに導入してもよい（例えば、101位付近～

50

161位付近)。導入されたプロテアーゼ認識部位は、F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>サブユニットが生成されるように、適切なプロテアーゼを用いて切断され得る。プロテアーゼ認識部位を非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列に導入する場合、該部位は、天然に存在するRSVFタンパク質のエクトドメインは切断しないプロテアーゼによって認識されるものであることが好ましい。

#### 【0124】

本発明のこの態様の方法は、a)切断されるとF<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>サブユニットが生成されるプロテアーゼ切断部位を含む非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドを準備すること、ならびにb)該非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、該プロテアーゼ切断部位を認識するプロテアーゼで切断することを含む。一般に、非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は改変型フリン切断部位を含み、該RSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドを106~109位付近と131~136位付近のフリン切断部位において非切断の状態で産生する宿主細胞から分泌される。

10

#### 【0125】

準備した非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドを所望の度合まで精製してもよい。例えば、準備した非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、実質的に未加工処理(例えば、未加工処理、もしくは清澄化のみ)の細胞溶解物、細胞ホモジネートまたは細胞馴化培養培地として、または一部もしくは実質的に精製された形態において、準備したものであり得る。具体的な例では、準備した非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、昆虫細胞馴化培地、哺乳動物細胞馴化培地、鳥類細胞馴化培地、酵母細胞馴化培地、テトラヒメナ細胞馴化培地、およびその組合せからなる群より選択される細胞馴化培養培地において準備したものである。

20

#### 【0126】

一般的に、準備した非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドを精製すること、例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または実質的に均質になるまで精製することが好ましい。本明細書に記載のように、非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドは脂質とリポタンパク質から容易に精製され得、一方で、慣用的に生成されるRSVFタンパク質の切断型形態は、脂質およびリポタンパク質夾雑物とともに共精製される(copurify)。したがって、精製された非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドを準備した場合、該方法を用いて、実質的に脂質またはリポタンパク質が含まれていない切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインを含む組成物が容易に作製され得る。

30

#### 【0127】

プロテアーゼを用いてポリペプチドを切断するための好適な方法は、よく知られており、当該技術分野で慣用的である。一般的に、切断対象のポリペプチドを十分な量のプロテアーゼと、該ポリペプチドの切断に適した条件(例えば、pH、ポリペプチドおよびプロテアーゼの濃度、温度)下で合わせる。多くの好適なプロテアーゼが市販されており、ポリペプチドの切断を行なうための好適な条件は、多くのプロテアーゼについてよく知られている。所望により、切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、プロテアーゼでの切断後に精製してもよい。

40

#### 【0128】

該方法の一例では、インタクトな融合ペプチドを含む非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチド(137~154位のアミノ酸のいずれも置換または欠失されていない非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドなど)を準備する。一部の実施形態では、準備した非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドを精製する。インタクトな融合ペプチドを含む準備した非切断型のRSVFタンパク質のエクトドメインポリペプチドを切断すると、切断により、切断型のRS

50

V Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体のロゼットの形成がもたらされる。所望により、ロゼットを、任意の適当な方法（サイズ排除クロマトグラフィーなど）を用いてさらに精製してもよい。

【0129】

該方法の別の例では、改変型融合ペプチドを含む非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド（アミノ137～152付近、アミノ酸137～153付近、アミノ酸137～145付近またはアミノ酸137～142付近が欠失している非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドなど）を準備する。また、他の適当な融合ペプチドの欠失も記載されている（137～146位のアミノ酸の欠失など）。Ruiz-Arguelloら, J. Gen. Virol., 85: 3677-3687 (2004)。

10

【0130】

一部の実施形態では、準備した非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを精製する。準備した非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを切断すると、切断により、切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの三量体の形成がもたらされる。所望により、三量体を、任意の適当な方法（サイズ排除クロマトグラフィーなど）を用いてさらに精製してもよい。

【0131】

該方法の具体的な例では、準備した非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、furdelおよびdel p23 furdel（例えば、均質なトリプシン切断性furdel、均質なトリプシン切断性del p23 furdel、またはトリプシン切断性furdelとトリプシン切断性del p23 furdelの混合物）からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドを含むものである。準備した非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、例えばトリプシンで切断すると、切断により、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの切断三量体、切断三量体のロゼット、または切断三量体と切断三量体のロゼットの組合せの形成がもたらされる。所望により、切断三量体および/または切断三量体のロゼットを、任意の適当な方法（サイズ排除クロマトグラフィーなど）を用いてさらに精製してもよい。

20

【0132】

（非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの作製方法）

30

別の態様では、本発明は、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物の調製方法である。一般に、該方法は、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料（細胞溶解物、細胞ホモジネートまたは細胞馴化培養培地など）を準備すること、および次いで、該非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを精製することを伴う。本明細書に記載のように、精製された非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体は自己会合して非切断三量体を形成することができること、および非切断単量体と非切断三量体の混合物または非切断単量体と非切断三量体との平衡が存在することを見い出した。なんら特定の理論に拘束されることを望まないが、該平衡は、単量体に有利に働くが、濃縮溶液中では三量体に該平衡がシフトすると考えられる。

40

【0133】

本発明のこの態様の方法は、a)非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料（細胞溶解物、細胞ホモジネートまたは細胞馴化培養培地など）を準備すること；およびb)非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体または単量体と三量体の組合せを、該生物学的材料から精製することを含む。一部の実施形態では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体を精製するか、または非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を精製するか、または単量体と三量体を精製する。

【0134】

一般に、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配

50

列は改変型フリリン切断部位を含み、該RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドを101位付近～161位付近（例えば、106～109位および131～136位のフリリン切断部位）において非切断の状態で産生する宿主細胞から分泌される。より具体的な例では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料は、furmt、furdel、delp21 furx、delp23 furx、delp21 furdel、delp23 furdel、および第Xa因子構築物（これは第Xa因子を用いて切断され得る）からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む。

#### 【0135】

一部の実施形態では、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は改変型フリリン切断部位を含み、101位付近と161位付近との間の他のプロテアーゼ切断部位（例えば、トリプシン切断部位）は、プロテアーゼ（例えば、トリプシン）切断が抑制されるように改変されているか、または欠失している。例えば、トリプシンは、リジン残基およびアルギニン残基の後を切断することがよく知られている。一部の特定の好ましい実施形態では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は改変型フリリン切断部位を含み、101位付近と161位付近との間に存在している1つ以上のリジンおよび/またはアルギニン残基（例えば、すべてのリジン残基とアルギニン残基）が欠失しているか、あるいはリジンもしくはアルギニンではないアミノ酸で置き換えられており、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドを101位付近と161位付近との間を非切断の状態で産生する宿主細胞から分泌され、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドはトリプシンによって101位付近と161位付近との間が切断されない。好ましくは、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの1mg/ml溶液（25mM Tris (pH7.5), 300mM NaCl中で希釈）を、1対1000容積のトリプシン溶液（25mM Tris (pH7.5), 300mM NaCl中で1mg/ml濃度に希釈したウシ血漿由来のトリプシン；消化反応物中の最終質量比は、トリプシン：RSV Fエクトドメインが0.001：1である；トリプシンは10～15 BAEU単位/mgタンパク質で使用）で37℃にて1時間処理した場合、トリプシンによって切断されない。

#### 【0136】

所望により、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド（例えば、改変型(alter)フリリン切断部位を含む該ポリペプチド、および改変型フリリン切断部位と改変型トリプシン切断部位を含むポリペプチド）は、さらに、改変型融合ペプチド（例えば、アミノ酸137～152付近が欠失しているか、アミノ酸137～154付近が欠失しているか、アミノ酸137～145付近が欠失しているか、またはアミノ酸137～142付近が欠失している非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドなど）を含むものであってもよい。また、他の適当な融合ペプチドの欠失も記載されている（137～146位のアミノ酸の欠失など）。Ruiz-Arguelloら, J. Gen. Virol., 85: 3677-3687 (2004)。

#### 【0137】

具体的な実施形態では、該方法は、a) 非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料（細胞溶解物、細胞ホモジネートまたは細胞馴化培養培地など）を準備すること（ここで、該非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列は改変型フリリン切断部位を含み、101位付近と161位付近との間に存在するリジン残基とアルギニン残基が欠失しているか、あるいはリジンもしくはアルギニンではないアミノ酸で置き換えられており、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドを101位付近と161位付近との間を非切断の状態で産生する宿主細胞から分泌され、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドはトリプシンによって101位付近と161位付近との間が切断されない）；およびb) 非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三

量体または単量体と三量体の組合せを、該生物学的材料から精製することを含む。

【0138】

より具体的な例では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料は、Furx、Furx R113Q K123N K124N、delp21 furxおよびdelp23 furxからなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む。

【0139】

他の具体的な実施形態では、該方法は、a) 融合ペプチドが変異した(例えば、該融合ペプチドの少なくとも一部分が欠失している)非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料(細胞溶解物、細胞ホモジネートまたは細胞馴化培養培地など)を準備すること;およびb) 非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを該生物学的材料から精製することを含む。非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは改変型フリン切断部位を含むものであり得、該RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドを101位付近~161位付近(例えば、106~109位および131~136位のフリン切断部位)において非切断の状態で産生する宿主細胞から分泌される。所望により、改変型フリン切断部位を有する非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、さらに、プロテアーゼ(例えば、トリプシン)切断が抑制されるように、101位付近と161位付近との間の他のプロテアーゼのための部位(例えば、トリプシン切断部位)の改変または欠失を含んでいる。例えば、101位付近と161位付近との間に存在している1つ以上のリジンおよび/またはアルギニン残基(例えば、すべてのリジン(Lysing)残基とアルギニン残基)が欠失しているか、あるいはリジンもしくはアルギニンではないアミノ酸で置き換えられており、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドはトリプシンによって101位付近と161位付近との間が切断されない。

10

20

【0140】

非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体および単量体と三量体の組合せを、所望の度合まで精製してもよい。一般的に、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体または三量体を、例えば、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または実質的に均質になるまで精製することが好ましい。本明細書に記載のように、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは脂質とリポタンパク質から、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーによって容易に精製され得る。したがって、該方法を用いて、切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、三量体、または単量体と三量体の組合せを含み、実質的に脂質とリポタンパク質が含まれていない組成物が容易に作製され得る。

30

【0141】

一例では、該方法は、昆虫細胞馴化培養培地、哺乳動物細胞馴化培養培地、鳥類細胞馴化培地、酵母細胞馴化培地、テトラヒメナ細胞馴化培地、またはその組合せを準備することを含む。一部の実施形態では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を精製する。他の実施形態では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体を精製する。他の実施形態では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体と三量体を精製する。

40

【0142】

(改変型融合ペプチドを有する切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの作製方法)

一態様において、本発明は、改変型融合ペプチドを含む切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物の調製方法である。改変型フリン切断部位を含まないRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを宿主細胞で発現させると、該ポリペプチドは一部において、宿主細胞が該ポリペプチドを109/110位付近と136/137位付近のフリン部位で切断し、F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>サブユニットを生成させる

50

ことによってプロセッシングされる。プロセッシングされたポリペプチドは培地中に分泌され、会合した $F_1 - F_2$ サブユニット（例えば、ジスルフィド結合性 $F_1$ および $F_2$ サブユニット）として収集され得、該サブユニットは、露出した融合ペプチドの凝集によって三量体のロゼットを形成することがあり得る。改変型融合ペプチドを含むRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、宿主細胞中で、会合した $F_1 - F_2$ サブユニットとして産生および分泌され得、好ましくは、ロゼットに凝集しないか、または脂質もしくはリポタンパク質夾雑物と凝集しないものである。なんら特定の理論に拘束されることを望まないが、該ポリペプチドは、改変型融合ペプチドが凝集を媒介しないため、ロゼットを形成しないか、または脂質およびリポタンパク質夾雑物と会合しないと考えられる。

10

#### 【0143】

本発明のこの態様の方法は、a)改変型融合ペプチド（例えば、該融合ペプチドの少なくとも一部分が欠失している）を含む切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料（細胞溶解物、細胞ホモジネートまたは細胞馴化培養培地など）を準備すること；およびb)切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを該生物学的材料から精製することを含む。精製された切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、切断三量体、切断三量体のロゼット、または切断三量体と切断三量体のロゼットの混合物として精製されたものであり得る。改変型融合ペプチドを含む好適なRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、109/110付近と136/137付近に切断可能なフリント切断部位を含み、さらに、本明細書に記載の改変型融合ペプチドを含むものである。例えば、アミノ酸137~152付近が欠失しているか、アミノ酸137~153付近が欠失しているか、アミノ酸137~145付近が欠失しているか、アミノ酸137~146付近が欠失しているか、またはアミノ酸137~142付近が欠失しているRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドが、該方法において使用され得る。具体的な例では、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料は、少なくとも融合ペプチド欠失1を含む。

20

#### 【0144】

切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド（例えば、切断三量体または切断三量体と切断三量体のロゼットの混合物）を所望の度合まで精製してもよい。一般的に、切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、例えば、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または実質的に均質になるまで精製することが好ましい。本明細書に記載のように、改変型融合ペプチドを含む切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは脂質とリポタンパク質から、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーによって容易に精製され得る。したがって、該方法を用いて、切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの三量体、切断三量体のロゼット、または切断三量体と切断三量体のロゼットの組合せを含み、実質的に脂質とリポタンパク質が含まれていない組成物が容易に作製され得る。

30

#### 【0145】

（C末端側フリント変異を有するRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの作製方法）

別の態様では、本発明は、C末端側非切断型のRSVエクトドメインポリペプチドを含む組成物の調製方法、および切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの調製方法である。なんら特定の理論に拘束されることを望まないが、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該タンパク質を産生する細胞によって、109/110位（position）付近のフリント切断部位で切断されるが136/137位付近のフリント切断部位では切断されず、培地中に、 $F_2$ サブユニットと会合した $F_1$ サブユニットとして分泌されると考えられる。さらに、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドでは疎水性の融合ペプチドは露出さ

40

50



れず、したがって、このC末端側非切断型のポリペプチドは脂質およびリポタンパク質夾雑物と会合しないと考えられる。本明細書においてさらに記載するように、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインをさらに切断し、アミノ末端が110位～161位付近であり、F<sub>2</sub>サブユニットと会合しているF<sub>1</sub>サブユニットを生成させてもよい。かかるF<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>サブユニットは、三量体、三量体のロゼット、または三量体と三量体のロゼットの混合物として精製され得る。

【0146】

一般的に、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインのアミノ酸配列は、136/137位付近のフリン切断部位での切断が抑制されるように改変されているが、切断されるとF<sub>1</sub>サブユニット（そのアミノ末端は110位～161位付近である）とF<sub>2</sub>サブユニットが生成される天然に存在するかまたは導入のプロテアーゼ切断部位を含む。例えば、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、136/137位付近のフリン切断部位での切断は抑制されるが、101位付近～161位付近に1つ以上の天然に存在するかまたは導入のプロテアーゼ切断部位を含むように改変されたアミノ酸配列を有するものであり得る。具体的な一例では、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインのアミノ酸配列は、136/137位付近のフリン切断部位での切断は抑制されるように改変されているが、109/110位付近に天然に存在するフリン切断部位を含む。

10

【0147】

C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドが宿主細胞によって産生および発現されることを可能にするさまざまな具体的なアミノ酸配列（例えば、136/137位付近のフリン切断部位で切断されないアミノ酸配列）が、当業者に容易に設計され、想定され得よう。一般に、136/137位付近のフリン切断部位の一部であるか、または該部位付近に存在している1つ以上のアミノ酸が独立して、置き換えられているか、または欠失している。136/137位付近での切断を抑制する好適なアミノ酸置換および欠失は、本明細書において記載している。例えば、置換K131Q、131～134位のアミノ酸の欠失、または置換K131Q/R133Q/R135Q/R136Q（これらは各々、136/137での切断を抑止するものである）が使用され得る。一部の特定の実施形態では、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、133～136位付近に少なくとも1つのアミノ酸置換または欠失を含むものである。

20

30

【0148】

同様に、切断されるとF<sub>1</sub>を含む第1のサブユニットとF<sub>2</sub>を含む第2のサブユニットが生成されるプロテアーゼ切断部位（例えば、天然に存在するかまたは導入）を含むC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのさまざまな具体的なアミノ酸配列が可能であり、容易に設計され、想定され得る。例えば、RSV Fタンパク質の101位付近～161位付近のアミノ酸配列にトリプシン切断部位を含め、該トリプシン切断部位の1つ以上をトリプシンによって切断し、F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>サブユニットを生成させ得る。所望により、1つ以上の適当なプロテアーゼ認識部位を、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドに導入してもよい（例えば、101位付近～161位付近）。導入されたプロテアーゼ認識部位は、F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>サブユニットが生成されるように、適切なプロテアーゼを用いて切断され得る。プロテアーゼ認識部位をC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列に導入する場合、該部位は、天然に存在するRSV Fタンパク質のエクトドメインは切断しないプロテアーゼによって認識されるものであることが好ましい。

40

【0149】

C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、任意の適当な方法を用いて作製され得る。好ましい方法は、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドが、該ポリペプチドを136/137位付近のフリン切断部位において非切断の状態で産生する宿主細胞によって分泌されるように、136/

50

137位付近のフリン切断部位のアミノ酸配列が改変されたRSV Fタンパク質のエクトドメインをコードする構築物の組換え発現によるものである。好ましくは、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ポリペプチドをF<sub>2</sub>サブユニットと会合しているF<sub>1</sub>サブユニットとして産生する宿主細胞によって分泌させ、ここで、F<sub>1</sub>サブユニットのアミノ末端は137位ではなく132位~161位付近である。C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、本明細書に記載の任意の適当な宿主細胞を用いて作製され得る。

#### 【0150】

本発明のこの態様の方法の1つは、a) 136/137位に改変型フリン切断部位を含むC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを準備すること(前記C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ペプチドを、136/137位において切断されていないがF<sub>1</sub>を含むサブユニットと会合しているF<sub>2</sub>断片の形態で産生する細胞から分泌される)、およびb) 準備したC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、RSV Fタンパク質のエクトドメインを101位と161位との間の部位で切断するプロテアーゼで切断し、それにより前記組成物を生成させることを含むものである。具体的な実施形態では、工程b)は、準備したC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、RSV Fタンパク質のエクトドメインを101~132位付近の間、または132~161位付近の間、または110~132位付近の間の部位で切断するプロテアーゼで切断することを含む。あるいはまたさらに、一部の実施形態では、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、136/137位に改変型フリン切断部位を含むものである(ただし、該改変型フリン切断部位はアミノ酸131~134の欠失ではないものとするものとする)。具体的な例では、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料は、少なくともN末端(-term)フリンポリペプチドを含む。

10

20

#### 【0151】

準備したC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを所望の度合まで精製してもよい。例えば、準備したC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、実質的に未加工処理(例えば、未加工処理、もしくは清澄化のみ)の細胞溶解物、細胞ホモジネートまたは細胞馴化培養培地において、または一部もしくは実質的に精製された形態において、準備したものであり得る。具体的な例では、準備したC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、昆虫細胞馴化培地、哺乳動物細胞馴化培地、鳥類細胞馴化培地、酵母細胞馴化培地、テトラヒメナ細胞馴化培地、およびその組合せからなる群より選択される細胞馴化培養培地中において準備する。

30

#### 【0152】

一般的に、準備したC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを精製すること、例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または実質的に均質になるまで精製することが好ましい。本明細書に記載のように、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは脂質とリポタンパク質から容易に精製され得、一方で、慣用的に生成されるRSV Fタンパク質の切断型形態は脂質およびリポタンパク質夾雑物とともに共精製される。したがって、精製されたC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを準備した場合、該方法を用いて、実質的に脂質またはリン脂質が含まれていない切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインを含む組成物が容易に作製され得る。

40

#### 【0153】

プロテアーゼを用いてポリペプチドを切断するための好適な方法は、よく知られており、当該技術分野で慣用的である。一般的に、切断対象のポリペプチドを十分な量のプロテアーゼと、該ポリペプチドの切断に適した条件(例えば、pH、ポリペプチドおよびプロ

50

テアーゼの濃度、温度)下で合わせる。多くの好適なプロテアーゼが市販されており、ポリペプチドの切断を行なうための好適な条件は、多くのプロテアーゼについてよく知られている。所望により、該RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、プロテアーゼでの切断後に精製してもよい。

【0154】

該方法の一例では、インタクトな融合ペプチドを含むC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド(137~154位のアミノ酸のいずれも置換または欠失されていないC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドなど)を準備する。該方法の別の例では、改変型融合ペプチドを含むC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド(アミノ137~152付近、アミノ酸137~153付近、アミノ酸137~145付近またはアミノ酸137~142付近が欠失しているC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドなど)を準備する。また、他の適当な融合ペプチドの欠失も記載されている(137~146位のアミノ酸の欠失など)。Ruiz-Arguello, J. Gen. Virol., 85: 3677-3687 (2004)。

10

【0155】

一部の実施形態では、準備したC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを精製する。準備した非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを切断すると、切断により、切断型RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの三量体の形成がもたらされる。所望により、三量体を、任意の適当な方法(サイズ排除クロマトグラフィーなど)を用いてさらに精製してもよい。

20

【0156】

該方法の具体的な例では、準備したC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、少なくともN末端側のリンポリペプチドを含むものである(図1)。準備したC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを、例えばトリプシンで切断すると、切断により、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの切断三量体、切断三量体のロゼット、または切断三量体と切断三量体のロゼットの組合せの形成がもたらされる。所望により、切断三量体および/または切断三量体のロゼットを、任意の適当な方法(サイズ排除クロマトグラフィーなど)を用いてさらに精製してもよい。

30

【0157】

本発明のこの態様の別の方法は、a)136/137位に改変型リン切断部位を含むC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料(細胞溶解物、細胞ホモジネートまたは細胞馴化培養培地など)を準備すること(前記可溶性のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、該ペプチドを、136/137位において切断されていないがF<sub>1</sub>を含むサブユニットと会合しているF<sub>2</sub>断片の形態で産生する細胞から分泌される(ただし、該改変型リン切断部位はアミノ酸131~134の欠失ではないものとする));およびb)C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを該生物学的材料から精製し、それにより組成物を生成させることを含む。好ましくは、F<sub>1</sub>サブユニットのアミノ末端は110位付近~132位付近である。より好ましくは、F<sub>1</sub>サブユニットのアミノ末端は110位付近である。F<sub>1</sub>サブユニットのアミノ末端が137位ではないことが特に好ましい。具体的な例では、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料は、少なくともN末端側のリンポリペプチドを含む。

40

【0158】

所望により、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、さらに、プロテアーゼ(例えば、トリプシン)切断が抑制されるように、101位付近と161位付近との間の他のプロテアーゼのための部位(例えば、トリプシン切断部位)の改変または欠失を含んでいる。例えば、101位付近と161位付近との間に存在している1つ以上のリジンおよび/またはアルギニン残基(例えば、すべてのリジン残基と

50

アルギニン残基)が欠失しているか、あるいはリジンもしくはアルギニンではないアミノ酸で置き換えられており、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドはトリプシンによって101位付近と161位付近との間が切断されない。C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、インタクトな融合ペプチドまたは改変型融合ペプチド(本明細書に記載している)を含むものであり得る。

#### 【0159】

C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド(例えば、単量体、三量体および単量体と三量体の組合せ)を、所望の度合まで精製してもよい。一般的に、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体または三量体を、例えば、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または実質的に均質になるまで精製することが好ましい。本明細書に記載のように、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは脂質およびリポタンパク質から、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーによって容易に精製され得る。したがって、該方法を用いて、実質的に脂質およびリポタンパク質が含まれていないC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド(例えば、単量体、三量体、または単量体と三量体の組合せ)を含む組成物が容易に作製され得る。該方法の具体的な例では、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、少なくともN末端側のリンポリペプチドを含むものである(図1)。

10

20

#### 【0160】

一例では、該方法は、昆虫細胞馴化培養培地、哺乳動物細胞馴化培養培地、鳥類細胞馴化培地、酵母細胞馴化培地、テトラヒメナ細胞馴化培地またはその組合せを準備することを含む。一部の実施形態では、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質(protein)のエクトドメインポリペプチド三量体を精製する。他の実施形態では、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体を精製する。他の実施形態では、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体と三量体を精製する。

#### 【0161】

(自己複製RNA)

本明細書に記載のRSV-Fポリペプチドは、該ポリペプチドをコードする組換え核酸を被験体の細胞で発現させることによって作製され得る。RSV-Fポリペプチドの生成をもたらすために被験体に投与され得る好ましい(preferred)核酸は自己複製RNA分子である。本発明の自己複製RNA分子は、RNAウイルスのゲノムRNAを基礎としているが、1つ以上の構造タンパク質をコードする遺伝子が欠損している。自己複製RNA分子は、翻訳されると、該自己複製RNAにコードされたRNAウイルスの非構造タンパク質と異種タンパク質を生成し得るものである。

30

#### 【0162】

自己複製RNAは、一般的に、ウイルスレプリカーゼ、ウイルスプロテアーゼ、ウイルスヘリカーゼおよび他の非構造ウイルスタンパク質からなる群より選択される少なくとも1つ以上の遺伝子を含み、また、5'-および3'末端シス活性複製配列、ならびに所望により、所望のアミノ酸配列(例えば、タンパク質、抗原)をコードする異種配列も含む。該異種配列の発現を指令するサブゲノムプロモーターを自己複製RNAに含めてもよい。所望により、該異種配列を、インフレームで他のコード領域と自己複製RNA内で融合させてもよく、および/または内部リボソーム侵入部位(IRES)の制御下にしてもよい。

40

#### 【0163】

本発明の自己複製RNA分子は、該自己複製RNA分子によって感染性ウイルス粒子の生成が誘導されない場合があるように設計され得る。これは、例えば、自己複製RNA内のウイルス粒子の生成に必要な構造タンパク質をコードしている1つ以上のウイルス遺伝

50

子を削除することによりなされ得る。例えば、自己複製RNA分子がアルファウイルス（シンドビス（Sinebis）ウイルス（SIN）、セムリキ森林ウイルスおよびベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEE）など）を基礎としているものである場合、ウイルスの構造タンパク質（キャプシドおよび/またはエンベローブ糖タンパク質など）をコードする1つ以上の遺伝子が削除され得る。所望により、本発明の自己複製RNA分子は、弱毒化されたか、もしくはビルレントな感染性ウイルス粒子の生成、または1ラウンドの後の感染が行なわれ得るウイルス粒子の生成が誘導されるように設計されることがあり得る。

【0164】

自己複製RNA分子は、脊椎動物細胞に送達されると、なんらタンパク質がなくても、自身（または自身のアンチセンスコピー）からの転写によって複数の娘RNAの生成をもたらすことができるものである。自己複製RNAは細胞への送達後、直接翻訳され得、この翻訳によりRNA依存性RNAポリメラーゼがもたらされ、次いで、これにより、送達されたRNAから転写物が生成される。したがって、送達されたRNAにより、複数の娘RNAの生成がもたらされる。この転写物は、送達されたRNAに対してアンチセンスであり、これ自体を翻訳して遺伝子産物のインサイチュ発現をもたらしてもよく、またはコードされたRSV-Fポリペプチドのインサイチュ発現をもたらすように翻訳される、送達RNAと同じセンスであるさらなる転写物を得るために転写されてもよい。

10

【0165】

自己複製を行なうのに適当な系の一例は、アルファウイルス系RNAレプリコンの使用である。このような+鎖レプリコンは、細胞への送達後に翻訳され、レプリカーゼ（またはレプリカーゼ-トランスクリプターゼ）が生成される。このレプリカーゼは自己切断して+鎖の送達RNAのゲノム-鎖コピーを生成させる複製複合体をもたらすポリタンパク質として翻訳される。このような-鎖転写物は、自身が転写されて、さらなる+鎖親RNAコピーがもたらされ、また、RSV-Fポリペプチドをコードするサブゲノム転写物ももたらされることもあり得る。したがって、サブゲノム転写物の翻訳により、感染細胞によるRSV-Fポリペプチドのインサイチュ発現がもたらされる。好適なアルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスなどに由来するレプリカーゼが使用されたものであり得る。

20

【0166】

したがって、好ましい自己複製RNA分子は、(i)自己複製RNA分子からRNAを転写することができるRNA依存性RNAポリメラーゼと、(ii)RSV-Fポリペプチドをコードしているものである。該ポリメラーゼは、例えば、アルファウイルスタンパク質nsP4を含むアルファウイルスのレプリカーゼであり得る。

30

【0167】

天然のアルファウイルスのゲノムは、非構造レプリカーゼポリタンパク質に加えて構造ビリオンタンパク質をコードしているが、アルファウイルス系の本発明の自己複製RNA分子はアルファウイルスの構造タンパク質をコードしていないことが好ましい。したがって、自己複製RNAは、細胞内で自身のゲノムRNAコピーの生成はもたらし得るが、RNA含有アルファウイルスのビリオンの生成はもたらさないものである。このようなビリオンが生成できないことは、野生型アルファウイルスとは異なり、自己複製RNA分子が感染性形態で永続的に存在しないであろうことを意味する。野生型ウイルスの永続的存在に必要なアルファウイルス構造タンパク質は、本発明の自己複製RNAには存在せず、代わりに、所望の遺伝子産物をコードする遺伝子（1つまたは複数）が採用されており、そのため、サブゲノム転写物は、アルファウイルスの構造ビリオンタンパク質ではなく所望の遺伝子産物をコードしている。

40

【0168】

したがって、本発明で有用な自己複製RNA分子は、2つのオープンリーディングフレームを有するものであり得る。第1（5'）のオープンリーディングフレームはレプリカーゼをコードしており；第2（3'）のオープンリーディングフレームはRSV-Fポリペプチドをコードしている。一部の実施形態では、該RNAは、例えば、さらなる所望の

50

遺伝子産物をコードするさらなる（下流）オープンリーディングフレームを有するものであり得る。自己複製RNA分子は、コードされたレプリカーゼと適合性である5'配列を有するものであってもよい。

【0169】

一態様において、自己複製RNA分子は、アルファウイルスに由来するもの、またはアルファウイルスが基礎であるものである。他の態様では、自己複製RNA分子は、アルファウイルス以外のウイルス、好ましくは、プラス鎖のRNAウイルス、より好ましくは、ピコルナウイルス、フラビウイルス、ルビウイルス、ペスチウイルス、ヘパチウイルス、カリシウイルス、またはコロナウイルスに由来するもの、または該ウイルスが基礎であるものである。好適な野生型アルファウイルス配列は、よく知られており、American Type Culture Collection (Rockville, Md) などの配列寄託機関から入手可能である。適当なアルファウイルスの代表的な例としては、アウラ (ATCC VR-368)、ベバルウイルス (ATCC VR-600, ATCC VR-1240)、カバソウ (Cabassou) (ATCC VR-922)、チクングニヤウイルス (ATCC VR-64, ATCC VR-1241)、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス (ATCC VR-65, ATCC VR-1242)、フォートモーガン (ATCC VR-924)、ゲタウイルス (ATCC VR-369, ATCC VR-1243)、Kyzylagach (ATCC VR-927)、マヤロ (ATCC VR-66)、マヤロウイルス (ATCC VR-1277)、ミドルバーグ (ATCC VR-370)、ムカンボウイルス (ATCC VR-580, ATCC VR-1244)、ヌドゥム (ATCC VR-371)、ピクスナウイルス (ATCC VR-372, ATCC VR-1245)、ロス川ウイルス (ATCC VR-373, ATCC VR-1246)、セムリキ森林 (ATCC VR-67, ATCC VR-1247)、シンドビスウイルス (ATCC VR-68, ATCC VR-1248)、トネート (Tonate) (ATCC VR-925)、トリニチ (Trinititi) (ATCC VR-469)、ウナ (ATCC VR-374)、ベネズエラウマ脳脊髄炎 (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532)、西部ウマ脳脊髄炎 (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252)、ワタロア (ATCC VR-926)、および Y-62-33 (ATCC VR-375) が挙げられる。

【0170】

自己複製RNAを送達系と結合させてもよい。自己複製RNAはアジュバントとともに、またはなしで投与され得る。

【0171】

(RNA送達系)

本発明の自己複製RNAは、裸のRNAでの送達、または脂質、ポリマーもしくは細胞内への侵入を容易にする他の化合物との組合せなどのさまざまなモダリティでの送達に適している。本発明の自己複製RNA分子は標的細胞または被験体に、任意の適当な手法を用いて、例えば、直接注射、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポフェクション、粒子銃 (biolytic) などによって導入され得る。また、自己複製RNA分子は細胞内に、受容体媒介性エンドサイトーシスによっても導入され得る。例えば、米国特許第6,090,619号; WuおよびWu, J. Biol. Chem., 263:14621 (1988); ならびに Curielら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8850 (1991) を参照のこと。例えば、米国特許第6,083,741号には、外因性核酸を哺乳動物細胞に、該核酸をポリカチオン部分 (例えば、3~100個のリジン残基を有するポリ-L-リジン) (該部分自体はインテグリン受容体結合部分 (例えば、配列 Arg-Gly-Asp を有する環状ペプチド) にカップリングされている) に会合させることにより導入することが開示されている。

【0172】

10

20

30

40

50

本発明の自己複製RNA分子を細胞内に両親媒性物質によって送達してもよい。例えば、米国特許第6,071,890号を参照のこと。典型的には、核酸分子はカチオン性両親媒性物質と複合体を形成し得る。該複合体は、哺乳動物細胞と接触すると該細胞に容易に取り込まれ得る。

#### 【0173】

自己複製RNAは、裸のRNAとして（例えば、単にRNAの水溶液として）送達してもよいが、細胞内への進入、また、その後の細胞間効果を向上させるため、自己複製RNAは、好ましくは、送達系（粒状またはエマルジョンの送達系など）と組み合わせて投与する。数多くの送達系がよく当業者に知られている。かかる送達系としては、例えば、リポソーム系送達（DebsおよびZhu（1993）WO93/24640；ManninoおよびGould-Fogerite（1988）BioTechniques 6（7）：682-691；Rose 米国特許第5,279,833号；Brigham（1991）WO91/06309；およびFelgnerら（1987）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84：7413-7414）、ならびにウイルスベクターの使用（例えば、アデノウイルス系（例えば、概説については、Bernsら（1995）Ann.NY Acad.Sci.772：95-104；Aliら（1994）Gene Ther.1：367-384；およびHaddadら（1995）Curr.Top.Microbiol.Immunol.199（Pt 3）：297-306参照）、パピロマウイルス系、レトロウイルス系（例えば、Buchscherら（1992）J.Virol.66（5）2731-2739；Johannら（1992）J.Virol.66（5）：1635-1640（1992）；Sommerfeltら（1990）Virol.176：58-59；Wilsonら（1989）J.Virol.63：2374-2378；Millerら（1991）J.Virol.65：2220-2224（1991）；Wong-Staalら（1994）PCT/US94/05700、ならびにRosenburgおよびFauci（1993）Fundamental Immunology,第3版 Paul（編）Raven Press,Ltd.,New Yorkおよびそこに挙げられた参考文献、ならびにYuら（1994）Gene Therapy（上掲）参照）、およびアデノ随伴ウイルスベクター（AAVベクターの概要については、Westら（1987）Virology 160：38-47；Carterら（1989）米国特許第4,797,368号；Carterら WO93/24641（1993）；Kotin（1994）Human Gene Therapy 5：793-801；Muzyczka（1994）J.Clin.Invest.94：1351およびSamulski（上掲）参照；また、Lebkowski,米国特許第5,173,414号；Tratschinら（1985）Mol.Cell Biol.5（11）：3251-3260；Tratschinら（1984）Mol.Cell Biol.,4：2072-2081；HermonatおよびMuzyczka（1984）Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81：6466-6470；McLaughlinら（1988）ならびにSamulskiら（1989）J.Virol.,63：03822-3828も参照のこと））などが挙げられる。

#### 【0174】

特に有用な3つの送達系は、(i)リポソーム、(ii)非毒性で生分解性のポリマー微粒子、(iii)カチオン性のサブミクロン水中油型エマルジョンである。

#### 【0175】

(リポソーム)

種々の両親媒性脂質は、水性環境において二重層を形成し、リポソームとしてRNA含有水性コアを被包し得るものである。このような脂質は、アニオン性、カチオン性または両性イオン性の親水性頭基を有するものであり得る。アニオン性リン脂質からのリポソームの形成は1960年代に始まっているが、カチオン性のリポソーム形成脂質は1990年代から研究されている。リン脂質はアニオン性のものもあれば、両性イオン性のものも

ある。好適な類型のリン脂質としては、限定されないが、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、およびホスファチジルグリセロールが挙げられ、有用なリン脂質の一例を表20に示す。有用なカチオン性脂質としては、限定されないが、ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DSDMA)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DODMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLindMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLenDMA)が挙げられる。両性イオン性脂質としては、限定されないが、アシル系両性イオン性脂質およびエーテル系両性イオン性脂質が挙げられる。有用な両性イオン性脂質の例は、DPPC、DOPCおよびドデシルホスホコリンである。脂質は飽和型であっても不飽和型であってもよい。

10

20

30

40

50

#### 【0176】

リポソームは、単一の脂質で形成されたものであってもよく、脂質混合物で形成されたものであってもよい。該混合物は、(i)アニオン性脂質の混合物、(ii)カチオン性脂質の混合物、(iii)両性イオン性脂質の混合物、(iv)アニオン性脂質とカチオン性脂質の混合物、(v)アニオン性脂質と両性イオン性脂質の混合物、(vi)両性イオン性脂質とカチオン性脂質の混合物、または(vii)アニオン性脂質、カチオン性脂質および両性イオン性脂質の混合物を含むものであり得る。同様に、該混合物は、飽和型の脂質と不飽和型の脂質の両方を含むものであってもよい。例えば、該混合物は、DSPC(両性イオン性、飽和型)、DLindMA(カチオン性、不飽和型)、および/またはDMPG(アニオン性、飽和型)を含むものであり得る。脂質混合物を使用する場合、混合物中のすべての成分脂質が両親媒性である必要はなく、例えば、1つ以上の両親媒性脂質がコレステロールと混合され得る。

#### 【0177】

脂質の親水性部分をペグ化(すなわち、ポリエチレングリコールの共有結合によって修飾)してもよい。この修飾により、リポソームの安定性が増大され、非特異的吸着が抑制され得る。例えば、脂質はPEGに、Heyesら(2005)J Controlled Release 107:276-287に開示されたものなどの手法を用いて結合体化され得る。

#### 【0178】

本実施例では、DSPC、DLindMA、PEG-DMPGおよびコレステロールの混合物を使用している。本発明の別の態様は、DSPC、DLindMA、PEG-DMGおよびコレステロールを含むリポソームである。このリポソームは、好ましくは、例えば、免疫原をコードするRNA(自己複製RNAなど)を被包する。

#### 【0179】

リポソームは、通常、3つの群:多重層小胞(MLV);小型単層小胞(SUV);および大型単層小胞(LUV)に分けられる。MLVは、各小胞内に複数の二重層を有し、いくつかの個別の水性区画を形成している。SUVとLUVは、水性コアを被包する単一の二重層を有し;SUVは、典型的には50nmの直径を有し、LUVは>50nmの直径を有する。本発明で有用なリポソームは、理想的には、50~220nmの範囲の直径を有するLUVである。異なる直径を有するLUVの集団を含む組成物では:(i)少なくとも80%(個数で)は20~220nmの範囲の直径を有するものであるのがよい、(ii)集団の平均直径( $Z_{av}$ ,強度で)は理想的には40~200nmの範囲である、および/または(iii)該直径は、<0.2の多分散度指数を有しているのがよい。

#### 【0180】

好適なリポソームを調製するための手法は当該技術分野でよく知られており、例えば、Liposomes: Methods and Protocols, 第1巻: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Prot



ocols. (Weissig 編). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X; Liposome Technology, 第I, II & III 巻 (Gregoriadis 編). Informa Healthcare, 2006; および Functional Polymer Colloids and Microparticles 第4巻 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (Arshady & Guyot 編). Citus Books, 2002 を参照されたい。有用な方法の一例は、(i) 脂質のエタノール性溶液 (ii) 核酸の水溶液および (iii) バッファーを混合した後、混合、平衡化、希釈および精製を行なうことを伴うものである (Heyesら (2005) J Controlled Release 107: 276 - 87)。

10

## 【0181】

RNA は、好ましくはリポソーム内に被包されており、そのため、リポソームは水性の RNA 含有コア周囲の外側層を構成している。この被包により、RNA が RNase 消化から保護されることがわかった。リポソームには、一部の RNA を外的に含めてもよいが (例えば、リポソームの表面上)、少なくとも半分 (理想的には、全部) の RNA を被包する。

## 【0182】

(ポリマー微粒子)

種々のポリマーは、微粒子を形成して RNA を被包または吸着することができる。実質的に非毒性のポリマーの使用は、レシピエントが安全に該粒子を受容できることを意味し、生分解性ポリマーの使用は、該粒子が送達後に代謝され、長期間の残存が回避され得ること意味する。また、有用なポリマーは滅菌性であり、医薬等級処方物の調製の一助となる。

20

## 【0183】

好適な非毒性で生分解性のポリマーとしては、限定されないが、ポリ( - ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリラクトン (例えば、ポリカプロラクトン)、ポリジオキサノン、ポリバレロラクトン、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリシアノアクリレート、チロシン由来ポリカーボネート、ポリビニル-ピロリジノンまたはポリエステル-アミド、およびその組合せが挙げられる。

## 【0184】

一部の実施形態では、該微粒子は、ポリ( - ヒドロキシ酸) (ポリ(ラクチド) (「PLA」) など)、ラクチドとグリコリドのコポリマー (ポリ(D, L-ラクチド-コグリコリド) (「PLG」) など)、および D, L-ラクチドとカプロラクトンのコポリマーで形成されたものである。有用な PLG ポリマーとしては、例えば、20:80~80:20 の範囲 (例えば、25:75、40:60、45:55、55:45、60:40、75:25) のラクチド/グリコリドモル比を有するものが挙げられる。有用な PLG ポリマーとしては、例えば、5,000~200,000 Da (例えば、10,000~100,000、20,000~70,000、40,000~50,000 Da) の分子量を有するものが挙げられる。

30

## 【0185】

該微粒子は、理想的には、0.02 μm~8 μm の範囲の直径を有するものである。異なる直径を有する微粒子の集団を含む組成物では、少なくとも 80% (個数で) が 0.03~7 μm の範囲の直径を有しているのがよい。

40

## 【0186】

好適な微粒子を調製するための手法は当該技術分野でよく知られており、例えば、Functional Polymer Colloids and Microparticles 第4巻 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (Arshady & Guyot 編). Citus Books, 2002; Polymers in Drug Delivery. (Uchegbu & Schatzlein 編). CRC Press, 2006. (特に、第7章) およ

50

び Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (Cohen & Bernstein 編). CRC Press, 1996 を参照されたい。RNA の吸着を助長するため、微粒子に、例えば、O'Hagan ら (2001) J Virology 75 : 9037 - 9043 ; および Singh ら (2003) Pharmaceutical Research 20 : 247 - 251 に開示されているようなカチオン性の界面活性剤および / または脂質を含めてもよい。ポリマー微粒子の代替的な作製様式は、例えば WO 2009 / 132206 に開示されているような、成形と硬化によるものである。

【0187】

本発明の微粒子は 40 ~ 100 mV のゼータ電位を有するものであり得る。RNA は微粒子に吸着され得、吸着は、該微粒子にカチオン性物質 (例えば、カチオン性脂質) を含めることにより助長される。

10

【0188】

(水中油型のカチオン性エマルジョン)

水中油型エマルジョンは、インフルエンザワクチンのアジュバントに関して知られている (例えば、FLUAD<sup>TM</sup> 製品中の MF59<sup>TM</sup> アジュバント、および PREPANDRIX<sup>TM</sup> 製品中の AS03 アジュバント)。本発明による RNA 送達では水中油型エマルジョンが利用され得る (ただし、該エマルジョンは 1 つ以上のカチオン性分子を含むものであるとする)。例えば、カチオン性脂質は、負電荷の RNA が結合され得るプラスの液滴表面を提供するために該エマルジョンに含められ得る。

20

【0189】

該エマルジョンには 1 つ以上の油が含まれる。好適な油 (1 つまたは複数) としては、例えば、動物 (魚類など) または植物供給源に由来するものが挙げられる。油は、理想的には、生分解性 (代謝可能) で生体適合性である。植物油の供給源としては堅果、種子および穀類が挙げられる。ピーナッツ油、ダイズ油、ココナッツ油およびオリーブ油は、最も一般的に入手可能であり、堅果油の例示である。例えば、ホホバ豆から得られるホホバ油も使用され得る。種子油としては、ベニバナ油、綿実油、ヒマワリ種子油、ゴマ種子油などが挙げられる。穀類の群では、コーン油が最も容易に入手可能であるが、他の穀粒 (例えば、コムギ、オートムギ、ライムギ、コメ、テフ、ライコムギなど) の油も使用され得る。グリセロールおよび 1, 2 - プロパンジオールの炭素数 6 ~ 10 の脂肪酸エステルは、種子油に天然に存在するものではないが、堅果油および種子油から出発する適切な物質の加水分解、分離およびエステル化によって調製され得る。哺乳動物の乳汁由来の脂肪および油は代謝可能であり、そのため使用され得る。分離、精製、ケン化および動物供給源から純粋な油を得るのに必要な他の手段のための手順は当該技術分野でよく知られている。

30

【0190】

ほとんどの魚は代謝可能な油を含んでおり、これは容易に収集され得る。例えば、タラ肝油、サメ肝油およびクジラ油 (鯨ろうなど) は、本明細書において使用され得るいくつかの魚油の例示である。いくつかの分枝鎖の油は、炭素数 5 のイソブレン単位で生化学的に合成され、一般的にテルペノイドと称される。また、スクアラン (スクアレンの飽和型類似体) も使用され得る。魚油 (スクアレンおよびスクアランを含む) は、市販の供給元から容易に入手可能であるか、または当該技術分野で知られた方法によって得られ得る。

40

【0191】

他の有用な油はトコフェロール (特に、スクアレンとの組合せ) である。エマルジョンの油相にトコフェロールを含める場合、  
、  
、  
、  
、  
または トコフェロールのいずれも使用され得るが、  
- トコフェロールが好ましい。D -  
- トコフェロールと DL -  
- トコフェロールのどちらも使用することができる。好ましい  
- トコフェロールは DL -  
- トコフェロールである。スクアレンとトコフェロール (例えば、DL -  
- トコフェロール) を含む油類の組合せを使用してもよい。

【0192】

50

好ましいエマルジョンは、スクアレン（分枝型不飽和テルペノイドのサメ肝油（ $C_{30}H_{50}$ ； $[(CH_3)_2C[=CHCH_2CH_2C(CH_3)]_2=CHCH_2-$ ] $_2$ ；2, 6, 10, 15, 19, 23 - ヘキサメチル - 2, 6, 10, 14, 18, 22 - テトラコサヘキサエン；CAS RN 7683 - 64 - 9）を含むものである。

【0193】

エマルジョンの油は、例えば、スクアレンと少なくとも1つのさらなる油の油類の組合せを含むものであってもよい。

【0194】

エマルジョンの水性成分は、ただの水（plain water）（例えば、w. f. i.）であってよく、さらなる成分（例えば、溶質）を含むものであってもよい。例えば、該水性成分は、バッファーを形成するための塩（例えば、クエン酸塩またはリン酸塩（ナトリウム塩など））を含むものであり得る。典型的なバッファーとしては、リン酸バッファー；Tris バッファー；ホウ酸バッファー；コハク酸バッファー；ヒスチジンバッファー；またはクエン酸バッファーが挙げられる。緩衝化された水相が好ましく、バッファーは、典型的には5 ~ 20 mMの範囲で含める。

【0195】

また、該エマルジョンにはカチオン性脂質も含まれる。好ましくは、この脂質は、エマルジョンの形成と安定化が助長され得るように界面活性剤である。有用なカチオン性脂質は、一般的に、生理学的条件下で正電荷の窒素原子を含むものである（例えば、第3級または第4級アミンとして）。この窒素は、両親媒性界面活性剤の親水性頭基に存在するものであり得る。有用なカチオン性脂質としては、限定されないが、1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、3' - [N - (N', N' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール)、ジメチルジオクタデシル - アンモニウム(DDA, 例えば、臭化物)、1, 2 - ジミリストイル - 3 - トリメチル - アンモニウムプロパン(DMTAP)、ジパルミトイル(C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン(DPTAP)、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン(DSTAP)が挙げられる。他の有用なカチオン性脂質は、塩化ベンザルコニウム(BAK)、塩化ベンゼトニウム、セトラミド(cetramide)（これは、テトラデシルトリメチルアンモニウムプロミドと、場合によっては、少量のドデシル(dedecyl)トリメチルアンモニウムプロミドおよびヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミドを含む)、セチルピリジニウムクロリド(CPC)、セチルトリメチルアンモニウムクロリド(CTAC)、N, N', N' - ポリオキシエチレン(10) - N - 獣脂 - 1, 3 - ジアミノプロパン、ドデシルトリメチルアンモニウムプロミド、ヘキサデシルトリメチル - アンモニウムプロミド、混合型アルキル - トリメチル - アンモニウムプロミド、ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド、ベンジルジメチルヘキサデシル - アンモニウムクロリド、ベンジルトリメチルアンモニウムメトキシド、セチルジメチルエチルアンモニウムプロミド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド(DDAB)、塩化メチルベンゼトニウム、塩化デカメトニウム、メチル混合型トリアルキルアンモニウムクロリド、メチルトリオクチルアンモニウムクロリド)、N, N - ジメチル - N - [2(2 - メチル - 4 - (1, 1, 3, 3 - テトラメチルブチル) - フェノキシ) - エトキシ)エチル] - ベンゼンメタ - ナミニウムクロリド(DEBDA)、ジアルキルジメチル(dimethyl)アンモニウム塩、[1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ) - プロピル] - N, N, N, トリメチルアンモニウムクロリド、1, 2 - ジアシル - 3 - (トリメチルアンモニオ)プロパン(アシル基 = ジミリストイル、ジパルミトイル、ジステアロイル、ジオレオイル)、1, 2 - ジアシル - 3 (ジメチルアンモニオ)プロパン(アシル基 = ジミリストイル、ジパルミトイル、ジステアロイル、ジオレオイル)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - (4' - トリメチル - アンモニオ)ブタノイル - sn - グリセロール、1, 2 - ジオレオイル 3 - スクシニル - sn - グリセロールコリンエステル、コレステリル(4' - トリメチルアンモニオ)ブタノエート)、N - アルキルピリジニウム塩（例えば、セチルピリジニウムプロミドおよびセチルピリジニウムクロリド）、N - アルキル

10

20

30

40

50

ピペリジニウム塩、二カチオン性のボラフォーム電解質 (C 1 2 M e 6 ; C 1 2 B U 6 )、ジアルキルグリセチルホスホリルコリン、リゾレシチン、L - ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、コレステロールヘミスクシネートコリンエステル、リポポリアミン、例えば限定されないが、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン ( D O G S )、ジパルミトイルホスファチジルエタノール - アミドスペルミン ( D P P E S )、リポポリ - L ( または D ) - リジン ( L P L L、L P D L )、ポリ ( L ( または D ) - リジンが N - グルタリルホスファチジルエタノールアミンに結合体化されたもの、ペンダントアミノ基を有するグルタミン酸ジドデシルエステル ( C G l u P h C n N )、ペンダントアミノ基を有するグルタミン酸ジテトラデシルエステル ( C 1 4 G I u C n N + )、コレステロールのカチオン性誘導体、例えば限定されないが、コレステリル - 3 - オキシスクシンアミドエチレントリメチルアンモニウム塩、コレステリル - 3 - オキシスクシンアミドエチレン - ジメチルアミン、コレステリル - 3 - カルボキシアミドエチレントリメチルアンモニウム塩、およびコレステリル - 3 - カルボキシアミドエチレンジメチルアミンである。他の有用なカチオン性脂質は、U S 2 0 0 8 / 0 0 8 5 8 7 0 および U S 2 0 0 8 / 0 0 5 7 0 8 0 ( これらは引用により本明細書に組み込まれる ) に記載されている。

10

## 【 0 1 9 6 】

カチオン性脂質は、好ましくは生分解性 ( 代謝可能 ) で生体適合性である。

## 【 0 1 9 7 】

油とカチオン性脂質に加え、該エマルジョンに、非イオン性界面活性剤および/または両性イオン性界面活性剤を含めてもよい。かかる界面活性剤としては、限定されないが、ポリオキシエチレンソルビタンエステル系界面活性剤 ( 一般的に、T w e e n と称される )、特に、ポリソルベート 2 0 およびポリソルベート 8 0 ; エチレンオキシド ( E O )、プロピレンオキシド ( P O ) および/またはブチレンオキシド ( B O ) のコポリマー ( D O W F A X <sup>T M</sup> の商標名で販売、線状 E O / P O ブロックコポリマーなど ) ; オクトキシノール ( これは、反復エトキシ ( オキシ - 1 , 2 - エタンジイル ) 基の数が種々であり得、オクトキシノール - 9 ( T r i t o n X - 1 0 0、または t - オクチルフェノキシポリエトキシエタノール ) が特に重要である ) ; ( オクチルフェノキシ ) ポリエトキシエタノール ( I G E P A L C A - 6 3 0 / N P - 4 0 ) ; リン脂質 ( ホスファチジルコリン ( レシチン ) など ) ; ラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪エーテル ( B r i j 界面活性剤として知られている ) ( トリエチレングリコールモノラウリルエーテル ( B r i j 3 0 ) など ) ; ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル ; ならびにソルビタンエステル ( 一般的に、S p a n として知られている ) ( ソルビタントリオレート ( S p a n 8 5 ) およびソルビタンモノラウレートなど ) が挙げられる。該エマルジョンに含めるのに好ましい界面活性剤は、ポリソルベート 8 0 ( T w e e n 8 0 ; ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート )、S p a n 8 5 ( ソルビタントリオレート )、レシチンおよび T r i t o n X - 1 0 0 である。

20

30

## 【 0 1 9 8 】

このような界面活性剤の混合物をエマルジョンに含めてもよい ( 例えば、T w e e n 8 0 / S p a n 8 5 の混合物、または T w e e n 8 0 / T r i t o n - X 1 0 0 の混合物 )。ポリオキシエチレンソルビタンエステル ( ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート ( T w e e n 8 0 ) など ) とオクトキシノール ( t - オクチルフェノキシ - ポリエトキシエタノール ( T r i t o n X - 1 0 0 ) など ) の組合せも好適である。別の有用な組合せは、ラウレス 9 + ポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび/またはオクトキシノールを含む。有用な混合物は、1 0 ~ 2 0 の範囲の H L B 値を有する界面活性剤 ( 例えば、1 5 . 0 の H L B を有するポリソルベート 8 0 ) と、1 ~ 1 0 の範囲の H L B 値を有する界面活性剤 ( 例えば、1 . 8 の H L B を有するソルビタントリオレート ) を含むものであり得る。

40

## 【 0 1 9 9 】

50

最終エマルジョン中の油の好ましい量（容積％）は2～20％、例えば、5～15％、6～14％、7～13％、8～12％である。約4～6％または約9～11％のスクアレイン含有量が特に有用である。

#### 【0200】

最終エマルジョン中の界面活性剤の好ましい量（重量％）は0.001％～8％である。例えば：ポリオキシエチレンソルビタンエステル（ポリソルベート80など）では、0.2～4％、特に、0.4～0.6％、0.45～0.55％、約0.5％または1.5～2％、1.8～2.2％、1.9～2.1％、約2％、または0.85～0.95％、または約1％であり；ソルビタンエステル（ソルビタントリオレートなど）では、0.02～2％、特に、約0.5％または約1％であり；オクチル-またはノニルフェノキシポリオキシエタノール（Triton X-100など）では、0.001～0.1％、特に、0.005～0.02％であり；ポリオキシエチレンエーテル（ラウレス9など）では、0.1～8％、好ましくは0.1～10％、特に、0.1～1％または約0.5％である。

10

#### 【0201】

油と界面活性剤の絶対量ならびにその比率は、エマルジョンが形成されていれば、広範な制限値の範囲内で種々であり得る。当業者は、所望のエマルジョンが得られるように成分の相対割合を容易に変化させることができるが、油と界面活性剤が4：1～5：1の重量比が典型的である（油が過剰）。

#### 【0202】

特に大型の動物において、エマルジョンの免疫賦活活性を確保するために重要なパラメータは油の液滴サイズ（直径）である。最も有効なエマルジョンはサブミクロン範囲の液滴サイズを有するものである。好適には、液滴サイズは50～750nmの範囲である。最も有用には、平均液滴サイズは250nm未満、例えば200nm未満、150nm未満である。平均液滴サイズは、有用には80～180nmの範囲である。理想的には、該エマルジョンの油の液滴の少なくとも80％（個数で）、好ましくは少なくとも90％が250nm未満の直径である。エマルジョンの平均液滴サイズおよびサイズ分布を測定するための装置は市販されている。典型的には、動的光散乱および/または単一粒子光学的検知の手法が使用される（例えば、Accusizer<sup>TM</sup>およびNicomp<sup>TM</sup>シリーズ（Particle Sizing Systems（Santa Barbara, USA）から入手可能な機器）、またはZetasizer<sup>TM</sup>機器（Malvern Instruments（UK）製）、またはParticle Size Distribution Analyzer機器（Horiba（京都, 日本）製））。

20

30

#### 【0203】

理想的には、液滴サイズ分布（個数で）は、極大値を2つ有するのではなく最大値を1つだけ有する、すなわち、平均（モード）の周囲に分布した液滴の単一の集団がみられるものである。好ましいエマルジョンは、<0.4（例えば、0.3、0.2またはそれ未満）の多分散性を有するものである。

#### 【0204】

サブミクロン液滴および狭いサイズ分布を有する好適なエマルジョンは、マイクロフルイダイゼーションの使用によって得られ得る。この手法では、投入成分の流れを幾何学的に固定されたチャンネルを介して高圧および高速度で推進させることにより平均油滴サイズが低減される。この流れはチャンネル壁、チャンバ壁および互いに接触する。その結果の剪断力、衝撃力およびキャピテーション力により、液滴サイズの低減が引き起こされる。マイクロフルイダイゼーション工程の反復は、所望の平均液滴サイズおよびサイズ分布を有するエマルジョンが得られるまで行なわれ得る。

40

#### 【0205】

マイクロフルイダイゼーションに対する代替法として、転相を引き起こす熱的方法が使用され得る。この方法でも、密集したサイズ分布を有するサブミクロンエマルジョンが得られ得る。

50

【0206】

好ましいエマルジョンは濾過滅菌されたものであり得、すなわち、その液滴を220nmフィルターに通したものであり得る。滅菌がもたらされるとともに、この手順により、該エマルジョン中の大きな液滴(あれば)も除去される。

【0207】

一部の特定の実施形態では、該エマルジョン中のカチオン性脂質はDOTAPである。このカチオン性の水中油型エマルジョンは、約0.5mg/ml~約25mg/mlのDOTAPを含むものであり得る。例えば、該カチオン性の水中油型エマルジョンはDOTAPを、約0.5mg/ml~約25mg/ml、約0.6mg/ml~約25mg/ml、約0.7mg/ml~約25mg/ml、約0.8mg/ml~約25mg/ml、約0.9mg/ml~約25mg/ml、約1.0mg/ml~約25mg/ml、約1.1mg/ml~約25mg/ml、約1.2mg/ml~約25mg/ml、約1.3mg/ml~約25mg/ml、約1.4mg/ml~約25mg/ml、約1.5mg/ml~約25mg/ml、約1.6mg/ml~約25mg/ml、約1.7mg/ml~約25mg/ml、約0.5mg/ml~約24mg/ml、約0.5mg/ml~約22mg/ml、約0.5mg/ml~約20mg/ml、約0.5mg/ml~約18mg/ml、約0.5mg/ml~約15mg/ml、約0.5mg/ml~約12mg/ml、約0.5mg/ml~約10mg/ml、約0.5mg/ml~約5mg/ml、約0.5mg/ml~約2mg/ml、約0.5mg/ml~約1.9mg/ml、約0.5mg/ml~約1.8mg/ml、約0.5mg/ml~約1.7mg/ml、約0.5mg/ml~約1.6mg/ml、約0.6mg/ml~約1.6mg/ml、約0.7mg/ml~約1.6mg/ml、約0.8mg/ml~約1.6mg/ml、約0.5mg/ml、約0.6mg/ml、約0.7mg/ml、約0.8mg/ml、約0.9mg/ml、約1.0mg/ml、約1.1mg/ml、約1.2mg/ml、約1.3mg/ml、約1.4mg/ml、約1.5mg/ml、約1.6mg/ml、約12mg/ml、約18mg/ml、約20mg/ml、約21.8mg/ml、約24mg/mlなどで含むものであり得る。例示的な実施形態では、該カチオン性の水中油型エマルジョンは、約0.8mg/ml~約1.6mg/ml(0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.4mg/mlまたは1.6mg/mlなど)のDOTAPを含むものである。

10

20

30

【0208】

一部の特定の実施形態では、カチオン性脂質はDCコレステロールである。このカチオン性の水中油型エマルジョンはDCコレステロールを、約0.1mg/ml~約5mg/ml DCコレステロールで含むものであり得る。例えば、該カチオン性の水中油型エマルジョンは、約0.1mg/ml~約5mg/ml、約0.2mg/ml~約5mg/ml、約0.3mg/ml~約5mg/ml、約0.4mg/ml~約5mg/ml、約0.5mg/ml~約5mg/ml、約0.62mg/ml~約5mg/ml、約1mg/ml~約5mg/ml、約1.5mg/ml~約5mg/ml、約2mg/ml~約5mg/ml、約2.46mg/ml~約5mg/ml、約3mg/ml~約5mg/ml、約3.5mg/ml~約5mg/ml、約4mg/ml~約5mg/ml、約4.5mg/ml~約5mg/ml、約0.1mg/ml~約4.92mg/ml、約0.1mg/ml~約4.5mg/ml、約0.1mg/ml~約4mg/ml、約0.1mg/ml~約3.5mg/ml、約0.1mg/ml~約3mg/ml、約0.1mg/ml~約2.46mg/ml、約0.1mg/ml~約2mg/ml、約0.1mg/ml~約1.5mg/ml、約0.1mg/ml~約1mg/ml、約0.1mg/ml~約0.62mg/ml、約0.15mg/ml、約0.3mg/ml、約0.6mg/ml、約0.62mg/ml、約0.9mg/ml、約1.2mg/ml、約2.46mg/ml、約4.92mg/mlなどのDCコレステロールを含むものであり得る。例示的な実施形態では、該カチオン性の水中油型エマルジョンは、約0.62mg/ml~約4.92mg/ml(2.46mg/mlなど)のDCコレステロールを含むものである。

40

50

## 【0209】

一部の特定の実施形態では、カチオン性脂質はDDAである。このカチオン性の水中油型エマルジョンは、約0.1mg/ml～約5mg/mlのDDAを含むものであり得る。例えば、該カチオン性の水中油型エマルジョンは、DDAを、約0.1mg/ml～約5mg/ml、約0.1mg/ml～約4.5mg/ml、約0.1mg/ml～約4mg/ml、約0.1mg/ml～約3.5mg/ml、約0.1mg/ml～約3mg/ml、約0.1mg/ml～約2.5mg/ml、約0.1mg/ml～約2mg/ml、約0.1mg/ml～約1.5mg/ml、約0.1mg/ml～約1.45mg/ml、約0.2mg/ml～約5mg/ml、約0.3mg/ml～約5mg/ml、約0.4mg/ml～約5mg/ml、約0.5mg/ml～約5mg/ml、約0.6mg/ml～約5mg/ml、約0.73mg/ml～約5mg/ml、約0.8mg/ml～約5mg/ml、約0.9mg/ml～約5mg/ml、約1.0mg/ml～約5mg/ml、約1.2mg/ml～約5mg/ml、約1.45mg/ml～約5mg/ml、約2mg/ml～約5mg/ml、約2.5mg/ml～約5mg/ml、約3mg/ml～約5mg/ml、約3.5mg/ml～約5mg/ml、約4mg/ml～約5mg/ml、約4.5mg/ml～約5mg/ml、約1.2mg/ml、約1.45mg/mlなどで含むものであり得る。あるいはまた、該カチオン性の水中油型エマルジョンは、DDAを、約20mg/ml、約21mg/ml、約21.5mg/ml、約21.6mg/ml、約25mg/mlで含むものであり得る。例示的な実施形態では、該カチオン性の水中油型エマルジョンは、約0.73mg/ml～約1.45mg/ml(1.45mg/mlなど)のDDAを含むものである。

10

20

## 【0210】

カテーテルまたは同様のデバイスを使用し、本発明の自己複製RNA分子を裸のRNAとして、または送達系と組み合わせて標的の器官または組織に送達してもよい。好適なカテーテルは、例えば、米国特許第4,186,745号；同第5,397,307号；同第5,547,472号；同第5,674,192号；および同第6,129,705号（これらはすべて、引用により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

## 【0211】

本発明は、RSV-Fポリペプチドをコードする自己複製RNA分子を送達し、例えば、単独または別の巨大分子との組合せで免疫応答を誘起させるための、該自己複製RNAを被包したかまたは吸着したリボソーム、ポリマー微粒子またはサブミクロンエマルジョン微粒子などの適当な送達系の使用を含む。本発明は、吸着および/または被包された自己複製RNA分子を有するリボソーム、微粒子およびサブミクロンエマルジョン、ならびにその組合せを含む。

30

## 【0212】

本実施例でさらに実証するように、リボソームおよびサブミクロンエマルジョン微粒子と会合させた自己複製RNA分子は、宿主細胞に有効に送達され得、自己複製RNAにコードされたタンパク質に対する免疫応答が誘導され得る。

## 【0213】

(免疫原性組成物)

本発明は免疫原性組成物を提供する。免疫原性組成物は、単一の活性化免疫原性因子を含むものであってもよく、いくつかの免疫原性因子を含むものであってもよい。例えば、免疫原性組成物は、単一の形態（例えば、単量体、三量体もしくはロゼット）または2つ以上の形態（例えば、単量体と三量体の混合物もしくは単量体と三量体の動的平衡）であるRSV-Fポリペプチドを含むものであり得る。免疫原性組成物は、RSV-Fポリペプチドをコードする自己複製RNAを含むものであり得、また、好ましくは、適当な送達系（リボソーム、ポリマー微粒子、水中油型エマルジョン、およびその組合せなど）も含む。

40

## 【0214】

また、本発明の免疫原性組成物に1つ以上の免疫調節剤を含めてもよい。好ましくは、

50

1つ以上の免疫調節剤は、1つ以上のアジュバント（例えば、2、3、4つまたはそれ以上のアジュバント）を含むものである。アジュバントとしては、T H 1アジュバントおよび/またはT H 2アジュバント（以下にさらに論考する）が挙げられ得る。

【0215】

別の実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、RSV-F糖タンパク質の融合前または中間コンフォメーションで存在するエピトープをディスプレイするが、糖タンパク質の融合後コンフォメーションではディスプレイしないポリペプチドを含むものである。

【0216】

別の実施形態では、本発明の免疫原性組成物は第1のポリペプチドと第2のポリペプチドを含み、第1のポリペプチドは、全体または一部においてRSV Fタンパク質を含み、第2のポリペプチドは異種オリゴマー化ドメインを含むものである。第1のポリペプチドはRSV Fタンパク質のエクトドメインを含むものであってもよい。第2のポリペプチドは、インフルエンザ血球凝集素由来の三量体化ドメイン、SARSスパイク由来の三量体化ドメイン、HIV gp41、NadA、修飾GCN4またはATCase由来の三量体化ドメインであり得る。

【0217】

一態様において、本発明は、本明細書に記載のように、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド、またはC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを準備し、該ポリペプチドを切断してF<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>サブユニットを生成させることにより作製される切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物である。

【0218】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のように、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備し、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、非切断三量体、または非切断単量体と非切断三量体の組合せ（例えば、混合物もしくは動的平衡）を該生物学的材料から精製することにより作製される非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体および/または単量体を含む組成物である。一部の実施形態では、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、106～109位付近と133～136位付近に改変型フリン切断部位を含み、所望により、さらに改変型融合ペプチドを含んでいてもよい。他の実施形態では、RSV Fタンパク質のエクトドメインは、106～109位付近と133～136位付近に改変型フリン切断部位、および101位付近と161位付近との間に改変型トリプシン切断部位を含み、所望により、さらに改変型融合ペプチドを含んでいてもよい。

【0219】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のように、C末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備し、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの単量体、非切断三量体、または非切断単量体と非切断三量体の組合せ（例えば、混合物もしくは動的平衡）を該生物学的材料から精製することにより作製されるC末端側非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体および/または単量体を含む組成物である。

【0220】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のように、改変型融合ペプチド（例えば、融合ペプチドの少なくとも一部分が欠失している）を含む切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備し、切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド三量体を該生物学的材料から精製することにより作製される切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物である。

【0221】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のように、改変型融合ペプチド（例えば、融合ペプチドの少なくとも一部分が欠失している）を含む非切断型のRSV Fタンパク質

10

20

30

40

50



のエクトドメインポリペプチドを含む生物学的材料を準備し、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド単量体を該生物学的材料から精製することにより作製される非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを含む組成物である。

**【0222】**

本発明の組成物は、好ましくは、ヒトなどの哺乳動物被験体への投与に適したものであり、1つ以上の薬学的に許容され得るキャリアおよび/または賦形剤、例えば、アジュバントを含む。かかる成分の十分な論考は参考文献29において得られ得る。該組成物は、一般的に水性形態である。該組成物が免疫原性組成物である場合、ヒトなどの哺乳動物に投与すると免疫応答が誘起される。免疫原性組成物は、哺乳動物を免疫化するためのワクチン処方物を調製するために使用され得る。

10

**【0223】**

免疫原性組成物は、単一の活性化免疫原性因子を含むものであってもよく、いくつかの免疫原性因子を含むものであってもよい。例えば、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、単一の形態（例えば、非切断単量体、切断単量体、非切断三量体、切断三量体、もしくは切断三量体のロゼット）または2つ以上の形態（例えば、非切断単量体と非切断三量体の混合物もしくは非切断単量体と非切断三量体との動的平衡）であり得る。また、該組成物は、RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドと、1つ以上の他のRSVタンパク質（例えば、Gタンパク質および/またはMタンパク質）を含むものであってもよく、および/または他の病原体由来の免疫原と合わせたものであってもよい。

20

**【0224】**

該組成物に、チオメルサルまたは2-フェノキシエタノールなどの保存料を含めてもよい。しかしながら、好ましくは、ワクチンは水銀系物質を実質的に含まない（すなわち、5 μg未満/ml）ようにすべきである（例えば、チオメルサルを含まない）。水銀を含まない免疫原性組成物がより好ましい。保存料を含まない免疫原性組成物は特に好ましい。

**【0225】**

張度を制御するため、ナトリウム塩などの生理学的塩を含めることが好ましい。塩化ナトリウム(NaCl)が好ましく、1~20 mg/mlで存在させ得る。存在させ得る他の塩としては、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二ナトリウム脱水物(dehydrate)、塩化マグネシウム、塩化カルシウムなどが挙げられる。

30

**【0226】**

該組成物は、一般的に、200 mOsm/kg~400 mOsm/kg、好ましくは240~360 mOsm/kgの重量オスモル濃度を有し、より好ましくは、290~310 mOsm/kgの範囲に含まれる。

**【0227】**

該組成物は、1つ以上のバッファーを含むものであってもよい。典型的なバッファーとしては、リン酸バッファー; Trisバッファー; ホウ酸バッファー; コハク酸バッファー; ヒスチジンバッファー（特に、水酸化アルミニウムアジュバントと一緒に）; またはクエン酸バッファーが挙げられる。バッファーは、典型的には5~20 mMの範囲で含める。該組成物のpHは、一般的に5.0~8.1、より典型的には6.0~8.0、例えば6.5~7.5、または7.0~7.8である。したがって、本発明の方法に、バッfering前のバルクワクチンのpHを調整する工程を含めてもよい。

40

**【0228】**

該組成物は好ましくは滅菌されたものである。該組成物は、好ましくは非発熱性である（例えば、<1 EU（エンドトキシン単位、標準的尺度）/用量、好ましくは<0.1 EU/用量を含む）。該組成物は、好ましくはグルテンを含まない。ヒト用ワクチンは、典型的には約0.5 mlの投薬容積で投与されるが、小児には半分の用量（すなわち、約0.25 ml）で投与され得る。

50

## 【0229】

(アジュバント)

RSV-F ポリペプチド (peptide) または RSV-F ポリペプチドをコードする核酸を含む本発明の組成物にはまた、該組成物を受ける患者において誘起される免疫応答 (体液性および/または細胞性) を増強する機能を果たし得る1つ以上のアジュバント (例えば、2、3、4つまたはそれ以上のアジュバント) を含めてもよい。アジュバントとしては、TH1アジュバントおよび/またはTH2アジュバントが挙げられ得る。本発明の組成物に使用され得るアジュバントとしては、限定されないが、以下のものが挙げられる。

## 【0230】

・無機質含有組成物。本発明におけるアジュバントとしての使用に適した無機質含有組成物は、カルシウム塩およびアルミニウム塩 (またはその混合物) などの無機塩類を含むものである。本発明は、無機塩類 (例えば、水酸化物 (例えば、オキシ水酸化物)、リン酸塩 (例えば、ヒドロキシリン酸塩、オルトリン酸塩)、硫酸塩など) または異なる無機質化合物の混合物を含み、該化合物は任意の適当な形態 (例えば、ゲル、結晶性、非晶質など) をとり、吸着が好ましい。カルシウム塩としては、リン酸カルシウム (例えば、参考文献38に開示された「CAP」粒子) が挙げられる。アルミニウム塩としては、水酸化物、リン酸塩、硫酸塩などが挙げられる。また、無機質含有組成物は、金属塩の粒子として処方されてもよい (39)。アルミニウム塩アジュバントは、以下に、より詳細に記載する。

## 【0231】

・油エマルジョン組成物 (さらなる詳細は下記参照)。本発明におけるアジュバントとしての使用に適した油エマルジョン組成物としては、スクアレン-水エマルジョン、例えば、MF59 (5%スクアレン、0.5% Tween 80 および 0.5% Span, マイクロフルイダイザーを用いてサブミクロン粒子に処方) が挙げられる。

## 【0232】

・サイトカイン誘発剤 (さらなる詳細は下記参照)。本発明における使用に適したサイトカイン誘発剤としては、tol1様受容体7 (TLR7) アゴニスト (例えば、WO2009/111337に開示されたベンゾナフチリジン化合物) が挙げられる。

## 【0233】

・サポニン (参考文献74第22章)、これは、広範な植物種の樹皮、葉、茎、根、さらには花にも見られるステロールグリコシドおよびトリテルペノイドグリコシドの異種群である。樹木 *Quillaja saponaria* Molina の樹皮由来のサポニンは、アジュバントとして広く研究されている。また、サポニンは、*Smilax ornata* (サルサパリラ)、*Gypsophylla paniculata* (ブライダルベール)、および *Saponaria officianalis* (ソープルート) から市販品として入手することもできる。サポニンアジュバント処方物としては、精製処方物 (QS21 など)、ならびに脂質処方物 (ISCOM など) が挙げられる。QS21 は、STIMULON (TM) として市販されている。サポニン組成物は、HPLC および RP-HPLC を用いて精製されたものである。このような手法が使用された具体的な精製画分は同定されている (例えば、QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B および QH-C)。好ましくは、サポニンは QS21 である。QS21 の作製方法は参考文献40に開示されている。また、サポニン処方物に、コレステロールなどのステロールを含めてもよい (41)。サポニンとコレステロールの組合せは、免疫賦活複合体 (ISCOM) を呼ばれる特殊な粒子を形成するために使用され得る (参考文献74の第23章)。また、ISCOMには、典型的には、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンなどのリン脂質も含まれる。任意の既知のサポニンが ISCOM に使用され得る。好ましくは、ISCOMは、QuilA、QHA および QHC のうちの1つ以上を含むものである。ISCOMは、参考文献41~43にさらに記載されている。任意選択で、ISCOMSは、さらなる洗浄剤を含まないものであり得る (44)。サ

10

20

30

40

50

ポニンベースのアジュバントの開発の概説については参考文献 45 および 46 を見るとよい。

【0234】

・脂肪アジュバント（さらなる詳細は下記参照）、例えば、水中油型エマルジョン、腸内細菌リポ多糖から誘導した修飾型天然リピドA、リン脂質化合物（合成リン脂質二量体 E6020 など）など。

【0235】

・細菌ADP-リボシル化毒素（例えば、大腸菌熱不安定性エンテロトキシン「LT」、コレラ毒素「CT」、または百日咳毒素「PT」）ならびにその無毒化誘導體（LT-K63 および LT-R72 として知られている変異型毒素（47）など）。無毒化ADP-リボシル化毒素の粘膜用アジュバントとしての使用は参考文献 48 に、非経口用アジュバントとしての使用は参考文献 49 に記載されている。

10

【0236】

・生体付着剤（bioadhesive）および粘膜付着剤（mucoadhesive）、例えば、エステル化ヒアルロン酸マイクロスフィア（50）またはキトサンおよびその誘導體（51）。

【0237】

・生分解性で非毒性の物質（例えば、ポリ（-ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトンなど）（ポリ（ラクチド-コグリコリド）が好ましい）で形成されており、任意選択で、負電荷の表面を有するように処理されたか（例えば、SDSで）または正電荷の表面を有するように処理された（例えば、CTABなどのカチオン性洗浄剤で）微粒子（すなわち、約100nm～約150μmの直径、より好ましくは約200nm～約30μmの直径、または約500nm～約10μmの直径の粒子）。

20

【0238】

・リポソーム（参考文献 74 の第 13 章および第 14 章）。アジュバントとしての使用に適したリポソーム処方物の例は、参考文献 52～54 に記載されている。

【0239】

・ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル（55）。かかる処方物は、さらに、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤とオクトキシノールの組合せ（56）ならびにポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはエステル界面活性剤と少なくとも1つのさらなる非イオン性界面活性剤（オクトキシノールなど）の組合せ（57）を含むものである。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル（ラウレス9）、ポリオキシエチレン-9-ステアリル（stearyl）エーテル、ポリオキシエチレン（thelylene）-8-ステアリルエーテル、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテルから選択される。

30

【0240】

・ムラミルペプチド、例えば、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン（「thr-MDP」）、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（nor-MDP）、N-アセチルグルコサミニル（glucosaminyl）-N-アセチルムラミル-L-Al-D-イソglu-L-Ala-ジバルミトキシプロピルアミド（「DTP-DPP」または「Theramide<sup>TM</sup>」）、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン（「MTP-PE」）。

40

【0241】

・第1のグラム陰性細菌から調製された外膜タンパク質プロテオソーム調製物と第2のグラム陰性細菌由来のリポ糖（liposaccharide）調製物の組合せ。ここで

50

外膜タンパク質プロテオソームとリボ糖調製物は、安定な非共有結合性アジュバント複合体を形成する。かかる複合体としては、「I V X - 9 0 8」( *Neisseria meningitidis* の外膜とリボ多糖で構成された複合体 ) が挙げられる。

【 0 2 4 2 】

・ポリオキシドニウムポリマー ( 5 8 , 5 9 ) または他の N - 酸化型ポリエチレン - ピペラジン誘導体。

【 0 2 4 3 】

・メチルイノシン 5 ' - ーリン酸 ( 「 M I M P 」 ) ( 6 0 ) 。

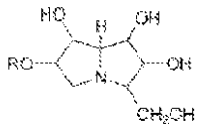
【 0 2 4 4 】

・ポリヒドロキシル化ピロリジジン化合物 ( 6 1 ) 、例えば、式：

10

【 0 2 4 5 】

【化 6 】



( 式中、R は、水素、直鎖または分枝鎖の非置換または置換された飽和型または不飽和のアシル、アルキル ( 例えば、シクロアルキル ) 、アルケニル、アルキニルおよびアール基を含む群から選択される )

を有するもの、またはその薬学的に許容され得る塩もしくは誘導体。例としては、限定されないが、カスアリン、カスアリン - 6 - D - グルコピラノース、3 - エピ - カスアリン、7 - エピ - カスアリン、3 , 7 - ジエピ - カスアリンなどが挙げられる。

20

【 0 2 4 6 】

・CD 1 d リガンド、例えば、 - グリコシルセラミド ( 6 2 ~ 6 9 ) ( 例えば、 - ガラクトシルセラミド ) 、フィトスフィンゴシン含有 - グリコシルセラミド、O C H 、 K R N 7 0 0 0 [ ( 2 S , 3 S , 4 R ) - 1 - O - ( - D - ガラクトピラノシル ) - 2 - ( N - ヘキサコサノイルアミノ ) - 1 , 3 , 4 - オクタデカントリオール ] 、 C R O N Y - 1 0 1 、 3 " - O - スルホ - ガラクトシルセラミドなど。

【 0 2 4 7 】

・イヌリン ( 7 0 ) またはその誘導体、例えば、アルガンムリン ( a l g a m m u l i n ) 。

30

【 0 2 4 8 】

・ピロソームおよびウイルス様粒子 ( V L P ) 。これらの構造物は、一般的に、ウイルス由来の 1 つ以上のタンパク質を含む ( 任意選択で、リン脂質と組合せられるかまたは処方される ) 。これらは、一般的に、非病原性および非複製性であり、一般的に、天然ウイルスゲノムを全く含まない。該ウイルスタンパク質は、組換え産生させたものであってもよく、完全なウイルスから単離したものであってもよい。ピロソームまたは V L P における使用に適したこのようなウイルスタンパク質としては、インフルエンザウイルス ( H A または N A など ) 、 B 型肝炎ウイルス ( コアまたはキャプシドタンパク質など ) 、 E 型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、シンドビスウイルス、ロタウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、ノーウォークウイルス、ヒトパピローマウイルス、H I V 、 R N A - フェージ、Q - フェージ ( コートタンパク質など ) 、 G A - フェージ、f r - フェージ、A P 2 0 5 フェージ、および T y ( レトロトランスポゾン T y タンパク質 p 1 など ) 由来のタンパク質が挙げられる。

40

【 0 2 4 9 】

これらおよび他のアジュバント活性物質は参考文献 7 4 および 7 5 に、より詳細に論考されている。

【 0 2 5 0 】

組成物は、2、3、4 つまたはそれ以上のアジュバントを含むものであってもよい。例えば、本発明の組成物は、好都合には、水中油型エマルジョンとサイトカイン誘発剤の両

50

方、もしくは無機質含有組成物とサイトカイン誘発剤の両方、もしくは2つの水中油型エマルジョンアジュバント、もしくは2つのベンゾナフチリジン化合物などを含むものであり得る。

【0251】

組成物中の抗原およびアジュバントは、典型的には混合された状態である。

【0252】

(油エマルジョンアジュバント)

本発明におけるアジュバントとしての使用に適した油エマルジョン組成物としては、スクアレン-水エマルジョン、例えば、MF59(5%スクアレン、0.5%Tween 80、および0.5%Span 85、マイクロフルイダイザーを用いてサブミクロン粒子に処方)が挙げられる。また、完全フロイントアジュバント(CFA)および不完全フロイントアジュバント(IFA)も使用され得る。

10

【0253】

種々の水中油型エマルジョンが知られており、これらは、典型的には少なくとも1つの油と少なくとも1つの界面活性剤を含み、油(1つまたは複数)および界面活性剤(1つまたは複数)は生分解性(代謝可能)で生体適合性である。該エマルジョン中の油滴は、一般的に5 $\mu$ m未満の直径であり、さらにはサブミクロン直径を有するものであってもよく、このような小サイズはマイクロフルイダイザーによって達成され、安定なエマルジョンが得られる。220nm未満のサイズを有する液滴は、濾過滅菌に供することができるため好ましい。

20

【0254】

本発明は、動物(例えば、魚)由来または植物供給源のものなどの油とともに使用され得る。植物油の供給源としては堅果、種子および穀類が挙げられる。ピーナッツ油、ダイズ油、ココナッツ油およびオリーブ油は、最も一般的に入手可能であり、堅果油の例示である。例えば、ホホバ豆から得られるホホバ油も使用され得る。種子油としては、ベニバナ油、綿実油、ヒマワリ種子油、ゴマ種子油などが挙げられる。穀類の群では、コーン油が最も容易に入手可能であるが、他の穀粒(例えば、コムギ、オートムギ、ライムギ、コメ、テフ、ライコムギなど)の油も使用され得る。グリセロールおよび1,2-プロパンジオールの炭素数6~10の脂肪酸エステルは、種子油に天然に存在するものではないが、堅果油および種子油から出発する適切な物質の加水分解、分離およびエステル化によって調製され得る。哺乳動物の乳汁由来の脂肪および油は代謝可能であり、したがって、本発明の実施において使用され得る。分離、精製、ケン化および動物供給源から純粋な油を得るのに必要な他の手段のための手順は当該技術分野でよく知られている。ほとんどの魚は代謝可能な油を含んでおり、これは容易に収集され得る。例えば、タラ肝油、サメ肝油およびクジラ油(鯨ろうなど)は、本明細書において使用され得るいくつかの魚油の例示である。いくつかの分枝鎖の油は、炭素数5のイソプレン単位で生化学的に合成され、一般的にテルペノイドと称される。サメ肝油は、スクアレンとして知られている分枝型の不飽和テルペノイド、2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエンを含み、これは本明細書において特に好ましい。また、スクアラン(スクアレンの飽和型類似体)も好ましい油である。魚油(スクアレンおよびスクアランを含む)は、市販の供給元から容易に入手可能であるが、または当該技術分野で知られた方法によって得られ得る。他の好ましい油はトコフェロールである(下記参照)。油の混合物を使用してもよい。

30

40

【0255】

界面活性剤は、その「HLB」(親水性/親油性バランス)によって分類され得る。本発明の好ましい界面活性剤は、少なくとも10、好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも16のHLBを有するものである。本発明は、界面活性剤、例えば限定されないが：ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(一般的に、Tweenと称される)、特に、ポリソルベート20およびポリソルベート80；エチレンオキシド(EO)、プロピレンオキシド(PO)および/またはブチレンオキシド(BO)のコポリ

50

マー（DOWFAX（TM）商標名で販売、線状EO/POブロックコポリマーなど）；オクトキシノール（これは、反復エトキシ（オキシ-1,2-エタンジイル）基の数が種々であり得、オクトキシノール-9（Triton X-100、またはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）が特に重要である）；（オクチルフェノキシ）ポリエトキシエタノール（IGEPAL CA-630/NP-40）；リン脂質（ホスファチジルコリン（レシチン）など）；ノニルフェノールエトキシラート（TERGITOL（TM）NPシリーズなど）；ラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪エーテル（Brig界面活性剤として知られている）（トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（Brig 30）など）；ならびにソルビタンエステル（一般的に、SPANとして知られている）、例えば、ソルビタントリオレート（Span 85）およびソルビタンモノラレートとともに使用され得る。非イオン性界面活性剤が好ましい。該エマルジョンに含めるのに好ましい界面活性剤は、TWEEN 80（TM）（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート）、Span 85（ソルビタントリオレート）、レシチンおよびTriton X-100である。

10

20

30

40

50

#### 【0256】

界面活性剤の混合物（例えば、TWEEN 80（TM）/Span 85の混合物）を使用してもよい。ポリオキシエチレンソルビタンエステル（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート（TWEEN 80（TM））など）とオクトキシノール（t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（Triton X-100）など）の組合せも好適である。別の有用な組合せは、ラウレス9+ポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび/またはオクトキシノールを含む。

#### 【0257】

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

#### 【0258】

本発明で有用な具体的な水中油型エマルジョンアジュバントとしては、限定されないが、以下のものが挙げられる。

#### 【0259】

・スクアレン、TWEEN 80（TM）およびSpan 85のサブミクロンエマルジョン。該エマルジョンの組成（容積で）は、約5%スクアレン、約0.5%ポリソルベート80および約0.5%Span 85であり得る。重量の観点では、この比率は、4.3%スクアレン、0.5%ポリソルベート80および0.48%Span 85となる。このアジュバントは「MF59」として知られており（71~73）、参考文献74の第10章および参考文献75の第12章に、より詳細に記載されている。MF59エマルジョンは、好都合には、クエン酸イオン（例えば、10mMクエン酸ナトリウムバッファ）を含む。

#### 【0260】

・スクアレン、トコフェロールおよびTWEEN 80（TM）のエマルジョン。該エマルジョンにリン酸緩衝生理食塩水を含めてもよい。また、Span 85（例えば、1%）および/またはレシチンを含めてもよい。このエマルジョンは、2~10%のスクアレン、2~10%のトコフェロールおよび0.3~3%のTWEEN 80（TM）を有するものであり得、スクアレン：トコフェロールの重量比は好ましくは<1である（この比率で、より安定なエマルジョンが得られるため）。スクアレンとTWEEN 80（TM）は約5：2の容積比で存在させ得る。かかるエマルジョンの一例は、TWEEN 80（TM）をPBSに溶解させて2%溶液を得、次いで、90mlのこの溶液を（5g

のDL-α-トコフェロールと5mlのスクアレン)の混合物と混合し、次いで、この混合物をマイクロフルイダイズすることにより作製されるものであり得る。得られるエマルジョンは、サブミクロン油滴(例えば、100~250nm、好ましくは約180nmの平均直径)を有するものであり得る。

【0261】

・スクアレン、トコフェロールおよびTriton洗浄剤(例えば、Triton X-100)のエマルジョン。また、該エマルジョンに3d-MPL(下記参照)を含めてもよい。該エマルジョンにリン酸バッファーを含めてもよい。

【0262】

・ポリソルベート(例えば、ポリソルベート80)、Triton洗浄剤(例えば、Triton X-100)およびトコフェロール(例えば、α-トコフェロールスクシネート)を含むエマルジョン。該エマルジョンは、これらの3成分を約75:11:10の質量比で含むものであり得(例えば、750μg/mlのポリソルベート80、110μg/mlのTriton X-100および100μg/mlのα-トコフェロールスクシネート)、これらの濃度は、抗原に由来する該成分の任意の寄与を含むはずである。また、該エマルジョンにスクアレンを含めてもよい。また、該エマルジョンに3d-MPL(下記参照)を含めてもよい。水相はリン酸バッファーを含むものであり得る。

10

【0263】

・スクアラン、ポリソルベート80およびポロキサマー401(「PLURONIC(TM)L121」)のエマルジョン。該エマルジョンは、リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)中で処方されたものであり得る。このエマルジョンは、ムラミルジペプチドのための有用な送達ビヒクルであり、「SAF-I」アジュバント(76)(0.05~1%のThr-MDP、5%のスクアラン、2.5%のプルロニックL121および0.2%ポリソルベート80)においてトレオニル-MDPとともに使用されている。また、該エマルジョンは、「AF」アジュバント(77)(5%のスクアラン、1.25%のプルロニックL121および0.2%ポリソルベート80)の場合のように、Thr-MDPなしで使用してもよい。マイクロフルイダイゼーションが好ましい。

20

【0264】

・スクアレン、水性溶媒、ポリオキシエチレンアルキルエーテル親水性非イオン性界面活性剤(例えば、ポリオキシエチレン(12)セトステアリルエーテル)および疎水性非イオン性界面活性剤(例えば、ソルビタンエステルまたはマンニドエステル(ソルビタンモノオレート(monoleate)または「Span 80」など))を含むエマルジョン。該エマルジョンは、好ましくは熱可逆性であり、および/または少なくとも90%(容積で)が200nm未満のサイズを有する油滴を有するものである。また、該エマルジョンに、アルジトール;凍結防止剤(例えば、ドデシルマルトシドおよび/またはスクロースなどの糖類);および/またはアルキルポリグリコシドのうちの1つ以上を含めてもよい。かかるエマルジョンは凍結乾燥させたものであってもよい。

30

【0265】

・0.5~50%の油、0.1~10%のリン脂質、および0.05~5%の非イオン性界面活性剤を有するエマルジョン。参考文献78に記載のように、好ましいリン脂質成分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリンおよびカルジオリピンである。サブミクロン液滴サイズが好都合である。

40

【0266】

・代謝可能ではない油(軽油など)と少なくとも1つの界面活性剤(レシチン、TWEEN 80(TM)またはSpan 80など)のサブミクロン水中油型エマルジョン。添加剤を含めてもよい(QuilAサポニン、コレステロール、サポニン-親油性物質結合体(参考文献79に記載された、脂肪族アミンをデスアシルサポニンにグルクロン酸のカルボキシル基を介して付加することによって作製されるGPI-0100など)、ジメチル(dimethyl)ジオクタデシルアンモニウムブロミドおよび/またはN,N-

50

ジオクタデシル - N , N - ビス ( 2 - ヒドロキシエチル ) プロパンジアミンなど ) 。

【 0 2 6 7 】

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

【 0 2 6 8 】

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

【 0 2 6 9 】

・ サポニン ( 例えば、Q u i l A または Q S 2 1 ) とステロール ( 例えば、コレステロール ) がらせん状ミセルとして会合しているエマルジョン ( 8 0 ) 。

【 0 2 7 0 】

該エマルジョンは、送達時に抗原と即席で混合され得る。したがって、アジュバントと抗原は、パッケージングまたは分配されたワクチンにおいて別々に維持され、使用時に最終処方物とするように準備されたものであり得る。抗原は、一般的に、2つの液体を混合することによって最終的にワクチンが調製されるように水性形態である。混合する2つの液体の容積比は種々であり得る ( 例えば、5 : 1 ~ 1 : 5 ) が、一般的には約 1 : 1 である。

【 0 2 7 1 】

( サイトカイン誘発剤 )

本発明の組成物に含めるためのサイトカイン誘発剤は、患者に投与されると、免疫機構によるサイトカイン ( 例えば、インターフェロンおよびインターロイキン ) の放出を誘起させることができるものである。好ましい薬剤は、インターフェロン - ; インターロイキン - 1 ; インターロイキン - 2 ; インターロイキン - 1 2 ; T N F - ; T N F - ; および G M - C S F の 1 つ以上の放出を誘起し得るものである。好ましい薬剤は、T h 1 - 型免疫応答に関連するサイトカイン、例えば、インターフェロン - 、T N F - 、インターロイキン - 2 の放出を誘起するものである。インターフェロン - とインターロイキン - 2 の両方の刺激が好ましい。

【 0 2 7 2 】

したがって、本発明の組成物を受ける結果、患者は、R S V F タンパク質で刺激されると所望のサイトカイン ( 1 つまたは複数 ) を抗原特異的様式で放出する T 細胞を有することになる。例えば、該患者の血液から精製した T 細胞は、インビトロで F タンパク質に曝露すると - インターフェロンを放出する。末梢血単核細胞 ( P B M C ) においてかかる応答を測定するための方法が当該技術分野で知られており、E L I S A 、 E L I S P O T 、 フローサイトメトリーおよびリアルタイム P C R が挙げられる。例えば、参考文献 8 1 には、破傷風トキソイドに対する抗原特異的 T 細胞媒介性免疫応答 ( 具体的には、 - インターフェロン応答 ) をモニタリングする試験が報告されており、抗原特異的 T T 誘発性応答を自発的応答と識別するには E L I S P O T が最も感度のよい方法であるが、再刺激効果を検出するには、フローサイトメトリーによる細胞質内サイトカインの検出が、最も効率的な方法であることが見い出されている。

【 0 2 7 3 】

好適なサイトカイン誘発剤としては、限定されないが、以下のものが挙げられる。

【 0 2 7 4 】

・ 免疫賦活性オリゴヌクレオチド、例えば、C p G モチーフ ( リン酸結合によってグアノシンに連結された非メチル化シトシンを含むジヌクレオチド配列 ) を含むもの、または二本鎖 R N A 、 またはパ lindro ム配列を含むオリゴヌクレオチド、またはポリ ( d G ) 配列を含むオリゴヌクレオチド。

【 0 2 7 5 】

・ 3 - O - 脱アシル化モノホスホリルリピド A ( 「 3 d M P L 」 , 「 M P L ( T M ) 」

10

20

30

40

50



としても知られている) (82 ~ 85)。

【0276】

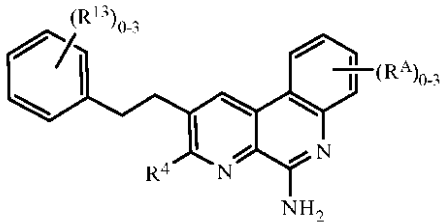
・イミダゾキノリン化合物、例えば、IMIQUIMOD (TM) (「R-837」) (86, 87)、RESIQUIMOD (TM) (「R-848」) (88)、およびその類似体；ならびにその塩(例えば、塩酸塩)。免疫賦活性イミダゾキノリンに関するさらなる詳細は、参考文献89~93を見るとよい。

【0277】

・ベンゾナフチリジン化合物、例えば：(a)式：

【0278】

【化7】



10

を有する化合物(式中：

R<sup>4</sup>は、H、ハロゲン、-C(O)OR<sup>7</sup>、-C(O)R<sup>7</sup>、-C(O)N(R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>)、-N(R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>)、-N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-NHN(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-SR<sup>7</sup>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR<sup>7</sup>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R<sup>7</sup>、-LR<sup>8</sup>、-LR<sup>10</sup>、-OLR<sup>8</sup>、-OLR<sup>10</sup>、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ハロアルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケン、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ハロアルコキシ、アリール、ヘテロアリール、C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>シクロアルキル、およびC<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>ヘテロシクロアルキルから選択され、ここで、R<sup>4</sup>のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ハロアルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケン、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ハロアルコキシ、アリール、ヘテロアリール、C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>シクロアルキル、およびC<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>ヘテロシクロアルキル基は各々、独立して、ハロゲン、-CN、-NO<sub>2</sub>、-R<sup>7</sup>、-OR<sup>8</sup>、-C(O)R<sup>8</sup>、-OC(O)R<sup>8</sup>、-C(O)OR<sup>8</sup>、-N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>、-OP(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>、-OP(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>、-C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>、-S(O)R<sup>8</sup>、-S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、および-NR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>から選択される1~3個の置換基で任意選択的に置換されており；

20

30

各Lは、独立して、結合、-(O(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>)<sub>t</sub>-、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルケニレンおよびC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキニレンから選択され、ここで、LのC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルケニレンおよびC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキニレンは各々、独立して、ハロゲン、-R<sup>8</sup>、-OR<sup>8</sup>、-N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>、-OP(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>、および-OP(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>から選択される1~4個の置換基で任意選択的に置換されており；

R<sup>7</sup>は、H、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アリール、ヘテロアリール、C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>シクロアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ハロアルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケン、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ハロアルコキシ、およびC<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>ヘテロシクロアルキルから選択され、ここで、R<sup>7</sup>のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アリール、ヘテロアリール、C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>シクロアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ハロアルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケン、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ハロアルコキシ、およびC<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>ヘテロシクロアルキル基は各々、1~3個のR<sup>13</sup>基で任意選択的に置換されており；

40

各R<sup>8</sup>は、独立して、H、-CH(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケン、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>シクロアルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>1</sub>

50

~ C<sub>6</sub> ヒドロキシアルキルおよび C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ハロアルコキシから選択され、ここで、R<sup>8</sup> の C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル、C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルケン、C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキン、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ヘテロアルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ハロアルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルコキシ、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> シクロアルキル、C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ヒドロキシアルキルおよび C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ハロアルコキシ基は各々、独立して、-CN、R<sup>11</sup>、-OR<sup>11</sup>、-SR<sup>11</sup>、-C(O)R<sup>11</sup>、-OC(O)R<sup>11</sup>、-C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-C(O)OR<sup>11</sup>、-NR<sup>9</sup>C(O)R<sup>11</sup>、-NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>、-NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-OR<sup>9</sup>、-OR<sup>10</sup>、-C(O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-C(O)NR<sup>11</sup>OH、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>11</sup>、-S(O)R<sup>11</sup>、-S(O)<sub>2</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-NR<sup>11</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>11</sup>、-P(O)(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub>、および -OP(O)(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub> から選択される 1 ~ 3 個の置換基で任意選択的に置換されており；

各 R<sup>9</sup> は、独立して、H、-C(O)R<sup>8</sup>、-C(O)OR<sup>8</sup>、-C(O)R<sup>10</sup>、-C(O)OR<sup>10</sup>、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>10</sup>、-C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ヘテロアルキルおよび C<sub>3</sub> ~ C<sub>6</sub> シクロアルキルから選択されるか、または各 R<sup>9</sup> は、独立して、結合している N と一緒に C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキルを形成する C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、該 C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキル環は、任意選択で、N、O および S から選択されるさらなるヘテロ原子を含み、ここで、R<sup>9</sup> の C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ヘテロアルキル、C<sub>3</sub> ~ C<sub>6</sub> シクロアルキル、または C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキル基は各々、独立して、-CN、R<sup>11</sup>、-OR<sup>11</sup>、-SR<sup>11</sup>、-C(O)R<sup>11</sup>、-OC(O)R<sup>11</sup>、-C(O)OR<sup>11</sup>、-NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-C(O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-C(O)NR<sup>11</sup>OH、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>11</sup>、-S(O)R<sup>11</sup>、-S(O)<sub>2</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-NR<sup>11</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>11</sup>、-P(O)(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub>、および -OP(O)(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub> から選択される 1 ~ 3 個の置換基で任意選択的に置換されており；

各 R<sup>10</sup> は、独立して、アリール、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> シクロアルキル、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキルおよびヘテロアリールから選択され、該アリール、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> シクロアルキル、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキルおよびヘテロアリール基は、ハロゲン、-R<sup>8</sup>、-OR<sup>8</sup>、-LR<sup>9</sup>、-LOR<sup>9</sup>、-N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-NR<sup>9</sup>C(O)R<sup>8</sup>、-NR<sup>9</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>、-CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>、-C(O)R<sup>8</sup> および -C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub> から選択される 1 ~ 3 個の置換基で任意選択的に置換されており；

R<sup>11</sup> と R<sup>12</sup> は、独立して、H、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ヘテロアルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ハロアルキル、アリール、ヘテロアリール、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> シクロアルキル、および C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキルから選択され、ここで、R<sup>11</sup> と R<sup>12</sup> の C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ヘテロアルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ハロアルキル、アリール、ヘテロアリール、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> シクロアルキル、および C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキル基は各々、独立して、ハロゲン、-CN、R<sup>8</sup>、-OR<sup>8</sup>、-C(O)R<sup>8</sup>、-OC(O)R<sup>8</sup>、-C(O)OR<sup>8</sup>、-N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-NR<sup>8</sup>C(O)R<sup>8</sup>、-NR<sup>8</sup>C(O)OR<sup>8</sup>、-C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキル、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>、-S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-NR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ハロアルキルおよび C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ハロアルコキシから選択される 1 ~ 3 個の置換基で任意選択的に置換されているか；

あるいは、R<sup>11</sup> と R<sup>12</sup> は各々、独立して、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、これらが結合している N 原子と一緒にあって、任意選択で N、O および S から選択されるさらなるヘテロ原子を含む任意選択的に置換された C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> ヘテロシクロアルキル環を形成しており；

各 R<sup>13</sup> は、独立して、ハロゲン、-CN、-LR<sup>9</sup>、-LOR<sup>9</sup>、-OLR<sup>9</sup>、-LR<sup>10</sup>、-LOR<sup>10</sup>、-OLR<sup>10</sup>、-LR<sup>8</sup>、-LOR<sup>8</sup>、-OLR<sup>8</sup>、-LSR<sup>8</sup>、-LSR<sup>10</sup>、-LC(O)R<sup>8</sup>、-OLC(O)R<sup>8</sup>、-LC(O)OR<sup>8</sup>、-LC(O)R<sup>10</sup>、-LOC(O)OR<sup>8</sup>、-LC(O)NR<sup>9</sup>R<sup>11</sup>、-LC(O)NR<sup>9</sup>R<sup>8</sup>、-LN(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-LNR<sup>9</sup>R<sup>8</sup>、-LNR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>、-LC(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-LS(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>、-LS(O)R<sup>8</sup>、-LC(O)NR<sup>8</sup>OH、-LNR<sup>9</sup>C(O)R<sup>8</sup>、-LNR<sup>9</sup>C(O)OR<sup>8</sup>、-LS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>、-OLS(O)<sub>2</sub>

$N(R^9)_2$ 、 $-LNR^9S(O)_2R^8$ 、 $-LC(O)NR^9LN(R^9)_2$ 、 $-LP(O)(OR^8)_2$ 、 $-LOP(O)(OR^8)_2$ 、 $-LP(O)(OR^{10})_2$  および  $-OLP(O)(OR^{10})_2$  から選択され；

各  $R^A$  は、独立して、 $-R^8$ 、 $-R^7$ 、 $-OR^7$ 、 $-OR^8$ 、 $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^8$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NR^9C(O)R^8$ 、 $-NR^9C(S)R^8$ 、 $-NR^9C(O)N(R^9)_2$ 、 $-NR^9C(S)N(R^9)_2$ 、 $-NR^9CO_2R^8$ 、 $-NR^9NR^9C(O)R^8$ 、 $-NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$ 、 $-NR^9NR^9CO_2R^8$ 、 $-C(O)C(O)R^8$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-(CH_2)_nCO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(S)R^8$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 $-C(S)N(R^9)_2$ 、 $-OC(O)N(R^9)_2$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-C(O)N(OR^8)R^8$ 、 $-C(NOR^8)R^8$ 、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)_3R^8$ 、 $-SO_2N(R^9)_2$ 、 $-S(O)R^8$ 、 $-NR^9SO_2N(R^9)_2$ 、 $-NR^9SO_2R^8$ 、 $-P(O)(OR^8)_2$ 、 $-OP(O)(OR^8)_2$ 、 $-P(O)(OR^{10})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{10})_2$ 、 $-N(OR^8)R^8$ 、 $-CH=CHCO_2R^8$ 、 $-C(=NH)-N(R^9)_2$ 、および  $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$  から選択されるか；あるいは環 A 上の 2 つの隣接する  $R^A$  置換基が、2 個までのヘテロ原子を環構成員として含む 5 ~ 6 員環を形成しており；

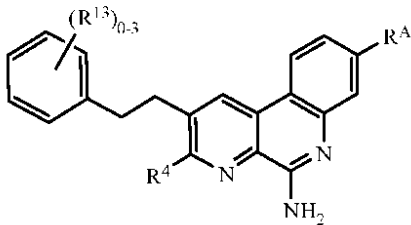
$n$  は、各出現において独立して、0、1、2、3、4、5、6、7 または 8 であり；

各  $m$  は、独立して、1、2、3、4、5 および 6 から選択され、

$t$  は、1、2、3、4、5、6、7 または 8 である)；(b) 式；

【0279】

【化 8】



を有する化合物 (式中；

$R^4$  は、H、ハロゲン、 $-C(O)OR^7$ 、 $-C(O)R^7$ 、 $-C(O)N(R^{11}R^{12})$ 、 $-N(R^{11}R^{12})$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NHN(R^9)_2$ 、 $-SR^7$ 、 $-(CH_2)_nOR^7$ 、 $-(CH_2)_nR^7$ 、 $-LR^8$ 、 $-LR^{10}$ 、 $-OLR^8$ 、 $-OLR^{10}$ 、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルキル、 $C_2 \sim C_8$  アルケン、 $C_2 \sim C_8$  アルキン、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルコキシ、アリーール、ヘテロアリーール、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、および  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキルから選択され、ここで、 $R^4$  の  $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルキル、 $C_2 \sim C_8$  アルケン、 $C_2 \sim C_8$  アルキン、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルコキシ、アリーール、ヘテロアリーール、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、および  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキル基は各々、独立して、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-R^7$ 、 $-OR^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-C(O)OR^8$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-P(O)(OR^8)_2$ 、 $-OP(O)(OR^8)_2$ 、 $-P(O)(OR^{10})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{10})_2$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)R^8$ 、 $-S(O)_2N(R^9)_2$ 、および  $-NR^9S(O)_2R^8$  から選択される 1 ~ 3 個の置換基で任意選択的に置換されており；

各  $L$  は、独立して、結合、 $-(O(CH_2)_m)_t-$ 、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_2 \sim C_6$  アルケニレンおよび  $C_2 \sim C_6$  アルキニレンから選択され、ここで、 $L$  の  $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_2 \sim C_6$  アルケニレンおよび  $C_2 \sim C_6$  アルキニレンは各々、独立して、ハロゲン、 $-R^8$ 、 $-OR^8$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-P(O)(OR^8)_2$ 、 $-OP(O)(OR^8)_2$ 、 $-P(O)(OR^{10})_2$ 、および  $-OP(O)(OR^{10})_2$  から選択され

10

20

30

40

50

る 1 ~ 4 個の置換基で任意選択的に置換されており；

$R^7$  は、H、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アリール、ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルキル、 $C_2 \sim C_8$  アルケン、 $C_2 \sim C_8$  アルキン、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルコキシ、および  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキルから選択され、ここで、 $R^7$  の  $C_1 \sim C_6$  アルキル、アリール、ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルキル、 $C_2 \sim C_8$  アルケン、 $C_2 \sim C_8$  アルキン、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルコキシ、および  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキル基は各々、1 ~ 3 個の  $R^{13}$  基で任意選択的に置換されており；

各  $R^8$  は、独立して、H、 $-CH(R^{10})_2$ 、 $C_1 \sim C_8$  アルキル、 $C_2 \sim C_8$  アルケン、 $C_2 \sim C_8$  アルキン、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、 $C_2 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヒドロキシアルキルおよび  $C_1 \sim C_6$  ハロアルコキシから選択され、ここで、 $R^8$  の  $C_1 \sim C_8$  アルキル、 $C_2 \sim C_8$  アルケン、 $C_2 \sim C_8$  アルキン、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  アルコキシ、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、 $C_2 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヒドロキシアルキルおよび  $C_1 \sim C_6$  ハロアルコキシ基は各々、独立して、 $-CN$ 、 $R^{11}$ 、 $-OR^{11}$ 、 $-SR^{11}$ 、 $-C(O)R^{11}$ 、 $-OC(O)R^{11}$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 $-C(O)OR^{11}$ 、 $-NR^9$ 、 $C(O)R^{11}$ 、 $-NR^9R^{10}$ 、 $-NR^{11}R^{12}$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-OR^9$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-C(O)NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)NR^{11}OH$ 、 $-S(O)_2R^{11}$ 、 $-S(O)R^{11}$ 、 $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$ 、 $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$ 、 $-P(O)(OR^{11})_2$ 、および  $-OP(O)(OR^{11})_2$  から選択される 1 ~ 3 個の置換基で任意選択的に置換されており；

各  $R^9$  は、独立して、H、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(O)OR^8$ 、 $-C(O)R^{10}$ 、 $-C(O)OR^{10}$ 、 $-S(O)_2R^{10}$ 、 $-C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキルおよび  $C_3 \sim C_6$  シクロアルキルから選択されるか、または各  $R^9$  は、独立して、結合している N と一緒に  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキルを形成する  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、該  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキル環は、任意選択で、N、O および S から選択されるさらなるヘテロ原子を含み、ここで、 $R^9$  の  $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、 $C_3 \sim C_6$  シクロアルキル、または  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキル基は各々、独立して、 $-CN$ 、 $R^{11}$ 、 $-OR^{11}$ 、 $-SR^{11}$ 、 $-C(O)R^{11}$ 、 $-OC(O)R^{11}$ 、 $-NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)NR^{11}OH$ 、 $-S(O)_2R^{11}$ 、 $-S(O)R^{11}$ 、 $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$ 、 $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$ 、 $-P(O)(OR^{11})_2$ 、および  $-OP(O)(OR^{11})_2$  から選択される 1 ~ 3 個の置換基で任意選択的に置換されており；

各  $R^{10}$  は、独立して、アリール、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、 $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキルおよびヘテロアリールから選択され、該アリール、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、 $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキルおよびヘテロアリール基は、ハロゲン、 $-R^8$ 、 $-OR^8$ 、 $-LR^9$ 、 $-LOR^9$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NR^9C(O)R^8$ 、 $-NR^9CO_2R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$  および  $-C(O)N(R^9)_2$  から選択される 1 ~ 3 個の置換基で任意選択的に置換されており；

$R^{11}$  と  $R^{12}$  は、独立して、H、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、および  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキルから選択され、ここで、 $R^{11}$  と  $R^{12}$  の  $C_1 \sim C_6$  アルキル、 $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$  シクロアルキル、および  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキル基は各々、独立して、ハロゲン、 $-CN$ 、 $R^8$ 、 $-OR^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-C(O)OR^8$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NR^8C(O)R^8$ 、 $-NR^8C(O)OR^8$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキル、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)$

10

20

30

40

50

$_2 N(R^9)_2$ 、 $-NR^9S(O)_2R^8$ 、 $C_1 \sim C_6$  ハロアルキルおよび  $C_1 \sim C_6$  ハロアルコキシから選択される 1 ~ 3 個の置換基で任意選択的に置換されているか；

あるいは、 $R^{11}$  と  $R^{12}$  は各々、独立して、 $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、これらが結合している N 原子と一緒に、任意選択で N、O および S から選択されるさらなるヘテロ原子を含む任意選択的に置換された  $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロアルキル環を形成しており；

各  $R^{13}$  は、独立して、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-LR^9$ 、 $-LOR^9$ 、 $-OLR^9$ 、 $-LR^{10}$ 、 $-LOR^{10}$ 、 $-OLR^{10}$ 、 $-LR^8$ 、 $-LOR^8$ 、 $-OLR^8$ 、 $-LSR^8$ 、 $-LSR^{10}$ 、 $-LC(O)R^8$ 、 $-OLC(O)R^8$ 、 $-LC(O)OR^8$ 、 $-LC(O)R^{10}$ 、 $-LOC(O)OR^8$ 、 $-LC(O)NR^9R^{11}$ 、 $-LC(O)NR^9R^8$ 、 $-LNR^9R^8$ 、 $-LNR^9R^{10}$ 、 $-LC(O)N(R^9)_2$ 、 $-LS(O)_2R^8$ 、 $-LS(O)R^8$ 、 $-LC(O)NR^8OH$ 、 $-LNR^9C(O)R^8$ 、 $-LNR^9C(O)OR^8$ 、 $LS(O)_2N(R^9)_2$ 、 $-OLS(O)_2N(R^9)_2$ 、 $-LNR^9S(O)_2R^8$ 、 $-LC(O)NR^9LN(R^9)_2$ 、 $-LP(O)(OR^8)_2$ 、 $-LOP(O)(OR^8)_2$ 、 $-LP(O)(OR^{10})_2$  および  $-OLP(O)(OR^{10})_2$  から選択され；

各  $R^A$  は、独立して、 $-R^8$ 、 $-R^7$ 、 $-OR^7$ 、 $-OR^8$ 、 $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^8$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NR^9C(O)R^8$ 、 $-NR^9C(S)R^8$ 、 $-NR^9C(O)N(R^9)_2$ 、 $-NR^9C(S)N(R^9)_2$ 、 $-NR^9CO_2R^8$ 、 $-NR^9NR^9C(O)R^8$ 、 $-NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$ 、 $-NR^9NR^9CO_2R^8$ 、 $-C(O)C(O)R^8$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-(CH_2)_nCO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(S)R^8$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 $-C(S)N(R^9)_2$ 、 $-OC(O)N(R^9)_2$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-C(O)N(OR^8)R^8$ 、 $-C(NOR^8)R^8$ 、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)_3R^8$ 、 $-SO_2N(R^9)_2$ 、 $-S(O)R^8$ 、 $-NR^9SO_2N(R^9)_2$ 、 $-NR^9SO_2R^8$ 、 $-P(O)(OR^8)_2$ 、 $-OP(O)(OR^8)_2$ 、 $-P(O)(OR^{10})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{10})_2$ 、 $-N(OR^8)R^8$ 、 $-CH=CHCO_2R^8$ 、 $-C(=NH)-N(R^9)_2$ 、および  $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$  から選択され；

n は、各出現において独立して、0、1、2、3、4、5、6、7 または 8 であり；

各 m は、独立して、1、2、3、4、5 および 6 から選択され、

t は、1、2、3、4、5、6、7 または 8 である)；または (c) 任意の (a) もしくは (b) の薬学的に許容され得る塩。他のベンゾナフチリジン化合物およびベンゾナフチリジン化合物の作製方法は、WO 2009 / 111337 に記載されている。ベンゾナフチリジン化合物またはその塩は、単独で、または 1 つ以上のさらなる化合物と組み合わせて使用され得る。例えば、ベンゾナフチリジン化合物は、水中油型エマルジョンまたは無機質含有組成物と組み合わせて使用され得る。具体的な一実施形態では、ベンゾナフチリジン化合物は、水中油型エマルジョン (例えば、MF 59 などのスクアレン - 水エマルジョン) または無機質含有組成物 (例えば、アルミニウム塩もしくはカルシウム塩などの無機塩 (s a l d)) と組み合わせて使用される。

【0280】

・チオセミカルバゾン化合物 (参考文献 94 に開示されたものなど)。また、活性化合物の処方、製造およびスクリーニングの方法が参考文献 94 に記載されている。チオセミカルバゾンは、TNF - などのサイトカインの産生のためのヒト末梢血単核細胞の刺激に特に有効である。

【0281】

・トリプタントリン化合物 (参考文献 95 に開示されたものなど)。また、活性化合物の処方、製造およびスクリーニングの方法が参考文献 95 に記載されている。チオセミカルバゾンは、TNF - などのサイトカインの産生のためのヒト末梢血単核細胞の刺激に特に有効である。

【0282】

10

20

30

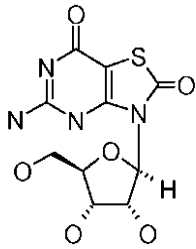
40

50

・ヌクレオシド類似体、例えば：(a) イソトラピン (ANA - 245 ; 7 - チア - 8 - オキソグアノシン) :

【0283】

【化9】

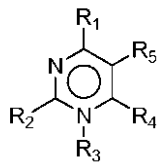


10

およびそのプロドラッグ；(b) ANA 975；(c) ANA - 025 - 1；(d) ANA 380；(e) 参考文献96～98に開示された化合物；(f) 式：

【0284】

【化10】



20

を有する化合物(式中：

R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>は各々、独立して、H、ハロ、-NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、-OH、C<sub>1</sub>～6アルコキシ、置換C<sub>1</sub>～6アルコキシ、ヘテロシクリル、置換ヘテロシクリル、C<sub>6</sub>～10アリール、置換C<sub>6</sub>～10アリール、C<sub>1</sub>～6アルキル、または置換C<sub>1</sub>～6アルキルであり；

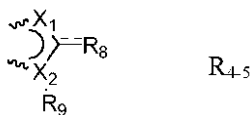
R<sub>3</sub>は、非存在、H、C<sub>1</sub>～6アルキル、置換C<sub>1</sub>～6アルキル、C<sub>6</sub>～10アリール、置換C<sub>6</sub>～10アリール、ヘテロシクリル、または置換ヘテロシクリルであり；

R<sub>4</sub>とR<sub>5</sub>は各々、独立して、H、ハロ、ヘテロシクリル、置換ヘテロシクリル、-C(O)-R<sub>d</sub>、C<sub>1</sub>～6アルキル、置換C<sub>1</sub>～6アルキルであるか、または一緒に結合して、R<sub>4-5</sub>のような5員環を形成しており；

【0285】

30

【化11】



結合は

【0286】

【数1】

~~~~

で示す結合において行なわれ、

40

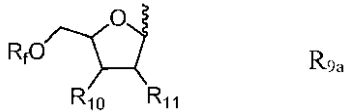
X<sub>1</sub>とX<sub>2</sub>は各々、独立して、N、C、OまたはSであり；

R<sub>8</sub>は、H、ハロ、-OH、C<sub>1</sub>～6アルキル、C<sub>2</sub>～6アルケニル、C<sub>2</sub>～6アルキニル、-OH、-NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-R<sub>c</sub>、-O-(C<sub>1</sub>～6アルキル)、-S(O)<sub>p</sub>R<sub>e</sub>、または-C(O)-R<sub>d</sub>であり；

R<sub>9</sub>は、H、C<sub>1</sub>～6アルキル、置換C<sub>1</sub>～6アルキル、ヘテロシクリル、置換ヘテロシクリルまたはR<sub>9a</sub>であり、ここで、R<sub>9a</sub>は：

【0287】

## 【化 1 2】



であり、

結合は

## 【0288】

## 【数 2】

~~~~~

で示す結合において行なわれ、

R<sub>10</sub>とR<sub>11</sub>は各々、独立して、H、ハロ、C<sub>1</sub>~6アルコキシ、置換C<sub>1</sub>~6アルコキシ、-NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、または-OHであり；

R<sub>a</sub>とR<sub>b</sub>は各々、独立して、H、C<sub>1</sub>~6アルキル、置換C<sub>1</sub>~6アルキル、-C(O)R<sub>d</sub>、C<sub>6</sub>~10アリールであり；

各R<sub>c</sub>は、独立して、H、ホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、C<sub>1</sub>~6アルキル、または置換C<sub>1</sub>~6アルキルであり；

各R<sub>d</sub>は、独立して、H、ハロ、C<sub>1</sub>~6アルキル、置換C<sub>1</sub>~6アルキル、C<sub>1</sub>~6アルコキシ、置換C<sub>1</sub>~6アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-NH(C<sub>1</sub>~6アルキル)、-NH(置換C<sub>1</sub>~6アルキル)、-N(C<sub>1</sub>~6アルキル)<sub>2</sub>、-N(置換C<sub>1</sub>~6アルキル)<sub>2</sub>、C<sub>6</sub>~10アリール、またはヘテロシクリルであり；

各R<sub>e</sub>は、独立して、H、C<sub>1</sub>~6アルキル、置換C<sub>1</sub>~6アルキル、C<sub>6</sub>~10アリール、置換C<sub>6</sub>~10アリール、ヘテロシクリル、または置換ヘテロシクリルであり；

各R<sub>f</sub>は、独立して、H、C<sub>1</sub>~6アルキル、置換C<sub>1</sub>~6アルキル、-C(O)R<sub>d</sub>、ホスフェート、ジホスフェート、またはトリホスフェートであり；

各nは、独立して、0、1、2または3であり；

各pは、独立して、0、1または2である；または(g)任意の(a)~(f)の薬学的に許容され得る塩、任意の(a)~(f)互変異性体、もしくは該互変異性体の薬学的に許容され得る塩。

## 【0289】

・ロキソリピン(7-アリル-8-オキソグアノシン)(99)。

## 【0290】

・参考文献100に開示された化合物、例えば：アシルピペラジン化合物、インドールジオン化合物、テトラヒド라이ソキノリン(THIQ)化合物、ベンゾシクロジオン化合物、アミノアザピニル化合物、アミノベンゾイミダゾールキノリノン(ABIQ)化合物(101, 102)、ヒドラフタルアミド(hydraphtalamide)化合物、ベンゾフェノン化合物、イソオキサゾール化合物、ステロール化合物、キナジリノン化合物、ピロール化合物(103)、アントラキノン化合物、キノキサリン化合物、トリアジン化合物、ピラザロピリミジン化合物、およびベンゾアゾール化合物(104)。

## 【0291】

・参考文献105に開示された化合物。

## 【0292】

・リン酸アミノアルキルグルコサミニド誘導体、例えば、RC-529(106, 107)。

## 【0293】

・ホスファゼン、例えば、参考文献108および109に記載のポリ[ジ(カルボキシラトフェノキシ)ホスファゼン](「PCPP」)など。

## 【0294】

・小分子免疫増強物質(SMIP)例えば：

N2-メチル-1-(2-メチルプロピル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン

10

20

30

40

50

- 2, 4 - ジアミン  
 N2, N2 - ジメチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ]  
 キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 N2 - エチル - N2 - メチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 N2 - メチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - N2 - プロピル - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 1 - (2 - メチルプロピル) - N2 - プロピル - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 N2 - ブチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 N2 - メチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - N2 - ペンチル - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 N2 - メチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - N2 - プロブ - 2 - エニル - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 1 - (2 - メチルプロピル) - 2 - [ (フェニルメチル) チオ ] - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 4 - アミン  
 1 - (2 - メチルプロピル) - 2 - (プロピルチオ) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 4 - アミン  
 2 - [ [ 4 - アミノ - 1 - (2 - メチルプロピル) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2 - イル ] (メチル) アミノ ] エタノール  
 酢酸 2 - [ [ 4 - アミノ - 1 - (2 - メチルプロピル) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2 - イル ] (メチル) アミノ ] エチル  
 4 - アミノ - 1 - (2 - メチルプロピル) - 1, 3 - ジヒドロ - 2 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2 - オン  
 N2 - ブチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - N4, N4 - ビス (フェニルメチル) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 N2 - ブチル - N2 - メチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - N4, N4 - ビス (フェニルメチル) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 N2 - メチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - N4, N4 - ビス (フェニルメチル) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 N2, N2 - ジメチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - N4, N4 - ビス (フェニルメチル) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン  
 1 - [ 4 - アミノ - 2 - [メチル (プロピル) アミノ] - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 1 - イル ] - 2 - メチルプロパン - 2 - オール  
 1 - [ 4 - アミノ - 2 - (プロピルアミノ) - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 1 - イル ] - 2 - メチルプロパン - 2 - オール  
 N4, N4 - ジベンジル - 1 - (2 - メトキシ - 2 - メチルプロピル) - N2 - プロピル - 1 H - イミダゾ [ 4, 5 - c ] キノリン - 2, 4 - ジアミン。

## 【 0 2 9 5 】

本発明における使用のためのサイトカイン誘発剤は、Toll様受容体 (TLR) のモデュレータおよび/またはアゴニストであり得る。例えば、該誘発剤は、ヒトTLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8および/またはTLR9タンパク質のうちの一つ以上のアゴニストであり得る。好ましい薬剤は、TLR4のアゴニスト (例えば、腸内細菌リポ多糖から誘導した修飾型天然リポドA、リン脂質化合物 (合成リン脂質二量体E6020など)、TLR7のアゴニスト (例えば、ベンゾナフチリジン、イミダゾキノリン) および/またはTLR9のアゴニスト (例えば、CpGオリゴヌクレオチド) である。このような薬剤は先天性免疫経路の活性化に有用である。

## 【 0 2 9 6 】



サイトカイン誘発剤は該組成物に、作製中の種々の段階で添加され得る。例えば、該誘発剤を抗原組成物中に存在させ、次いで、この混合物を水中油型エマルジョンに添加してもよい。代替法として、該誘発剤を水中油型エマルジョン中に存在させてもよく、この場合、該薬剤は、乳化前に該エマルジョン成分に添加され得るか、または乳化後に該エマルジョンに添加され得るかのいずれかである。同様に、該薬剤は該エマルジョンの液滴においてコアセルベート化してもよい。最終組成物中のサイトカイン誘発剤の位置および分布は、その親水性/親油性特性に依存し、例えば、該薬剤は、水相中、油相中および/または油と水の界面に存在し得る。

【0297】

サイトカイン誘発剤を別の薬剤（抗原（例えば、CRM197）など）に結合体化させてもよい。小分子のコンジュゲーション手法の一般的な概説は、参考文献110に示されている。代替法として、アジュバントをさらなる薬剤と、疎水性相互作用またはイオン性相互作用などによって非共有結合させてもよい。

10

【0298】

好ましいサイトカイン誘発剤は、(a)ベンゾナフチリジン化合物；(b)免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよび(c)3dMPLである。

【0299】

免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート修飾体などのヌクレオチドの修飾体/類似体を含むものであり得、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい(RNAを除く)。参考文献111、112および113に、可能な類似体置換（例えば、グアノシンの2'-デオキシ-7-デアザグアノシンでの置き換え）が開示されている。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は参考文献114~119に、さらに論考されている。CpG配列は、TLR9（モチーフGTCTTまたはTTCTTなど）に指向され得る(120)。CpG配列は、Th1免疫応答の誘導に特異的なものであってもよく(CpG-A ODN(オリゴデオキシヌクレオチドなど))、B細胞応答の誘導に、より特異的なものであってもよい(CpG-B ODNなど)。CpG-AおよびCpG-B ODNは参考文献121~123に論考されている。好ましくは、CpGはCpG-A ODNである。好ましくは、CpGオリゴヌクレオチドは、5'末端が受容体認識に利用可能となるように構築される。任意選択で、2つのCpGオリゴヌクレオチド配列をその3'末端で結合し、「イムノマー(immunomer)」を形成してもよい。例えば、参考文献120および124~126を参照のこと。有用なCpGアジュバントはCpG7909である(PROMUNE(TM)としても知られている(Coley Pharmaceutical Group, Inc.))。

20

30

【0300】

CpG配列の使用の代替法として、または該使用に加えてTpG配列が使用され得る(127)。このようなオリゴヌクレオチドは、非メチル化CpGモチーフを含まないものであり得る。

【0301】

免疫賦活性オリゴヌクレオチドはピリミジンリッチであり得る。例えば、これは、1つより多くの連続するチミジンヌクレオチド（例えば、参考文献127に開示されているようなTTTT）を含むものであり得、および/または>25%チミジン（例えば、>35%、>40%、>50%、>60%、>80%など）のヌクレオチド組成を有するものであり得る。例えば、これは、1つより多くの連続するシトシンヌクレオチド（例えば、参考文献127に開示されているようなCCCC）を含むものであり得、および/または>25%シトシン（例えば、>35%、>40%、>50%、>60%、>80%など）のヌクレオチド組成を有するものであり得る。このようなオリゴヌクレオチドは、非メチル化CpGモチーフを含まないものであり得る。

40

【0302】

免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、典型的には、少なくとも20個のヌクレオチドを含むものである。該オリゴヌクレオチドは100個より少ないヌクレオチドを含むものであ

50

り得る。

【0303】

3dMPL (3 脱 - O - アシル化モノホスホリルリピドAまたは3 - O - デスアシル - 4' - モノホスホリルリピドAとしても知られている)は、モノホスホリルリピドAの還元末端グルコサミンの3位が脱アシル化されているアジュバントである。3dMPLは、*Salmonella minnesota*の無ヘプトース (heptoseless) 変異型から調製されたものであり、リピドAと化学的に類似しているが、酸不安定性のホスホリル基と塩基不安定性のアシル基が欠損している。これは、単球/マクロファージシステムの細胞を活性化し、いくつかのサイトカイン (例えば、IL - 1、IL - 12、TNF - およびGM - CSF) の放出を刺激する (参考文献128も参照のこと)。3dMPLの調製は、最初に参考文献129で報告された。

10

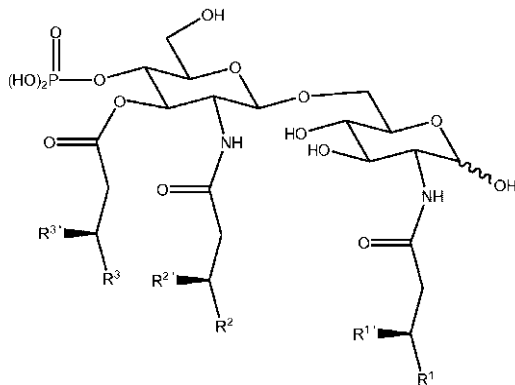
【0304】

3dMPLは、アシル化が異なる (例えば、3、4、5または6個のアシル鎖 (これらは異なる長さのものであってもよい) を有する) 関連分子の混合物の形態となり得る。2つのグルコサミン (2 - デオキシ - 2 - アミノ - グルコースとしても知られている) 単糖は、その2位の炭素 (すなわち、2位と2'位) でN - アシル化されており、また、3'位にもO - アシル化がみられる。炭素2に結合している基は、式 - NH - CO - CH<sub>2</sub> - CR<sup>1</sup>R<sup>1'</sup>を有する。炭素2'に結合している基は、式 - NH - CO - CH<sub>2</sub> - CR<sup>2</sup>R<sup>2'</sup>を有する。炭素3'に結合している基は、式 - O - CO - CH<sub>2</sub> - CR<sup>3</sup>R<sup>3'</sup>を有する。代表的な構造は：

20

【0305】

【化13】



30

である。

【0306】

基R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は各々、独立して - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - CH<sub>3</sub>である。nの値は、好ましくは8 ~ 16、より好ましくは9 ~ 12、最も好ましくは10である。

【0307】

基R<sup>1'</sup>、R<sup>2'</sup>およびR<sup>3'</sup>は各々、独立して、(a) - H ; (b) - OH ; または (c) - O - CO - R<sup>4</sup>であり得、ここで、R<sup>4</sup>は、- Hまたは - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - CH<sub>3</sub>のいずれかであり、mの値は、好ましくは8 ~ 16、より好ましくは10、12または14である。2位では、mは好ましくは14である。2'位では、mは好ましくは10である。3'位では、mは好ましくは12である。したがって、基R<sup>1'</sup>、R<sup>2'</sup>およびR<sup>3'</sup>は、好ましくは、ドデカン酸、テトラデカン酸またはヘキサデカン酸由来の - O - アシル基である。

40

【0308】

R<sup>1'</sup>、R<sup>2'</sup>およびR<sup>3'</sup>がすべて - Hである場合、3dMPLは3個だけアシル鎖を有する (2位、2'位および3'位の各々に1つ)。R<sup>1'</sup>、R<sup>2'</sup>およびR<sup>3'</sup>のうち2つだけが - Hである場合、3dMPLは4個のアシル鎖を有し得る。R<sup>1'</sup>、R<sup>2'</sup>およびR<sup>3'</sup>のうち1つだけが - Hである場合、3dMPLは5個のアシル鎖を有し得る

50

。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>のいずれも-Hではない場合、3dMPLは6個のアシル鎖を有し得る。本発明に従って使用される3dMPLアジュバントは、3～6個のアシル鎖を有するこれらの形態の混合物であってもよいが、6個のアシル鎖を有する3dMPLを混合物中に含めることが好ましく、特に、該ヘキサアシル鎖形態が全3dMPLの少なくとも10重量%（例えば、>20%、>30%、>40%、>50%またはそれ以上）を構成することを確実にすることが好ましい。6個のアシル鎖を有する3dMPLは、最も活性な形態のアジュバントであることがわかっている。

【0309】

したがって、本発明の組成物に含めるための3dMPLの最も好ましい形態は、以下に示す式(IV)を有するものである。

10

【0310】

3dMPLを混合物の形態で使用する場合、本発明の組成物における3dMPLの量または濃度に対する言及は、該混合物中の3dMPL種を合わせたものをいう。

【0311】

水性条件では、3dMPLは、異なるサイズ、例えば、直径<150nmまたは>500nmを有するミセル状の凝集体または粒子を形成し得る。これらのいずれかまたは両方が本発明で使用され得、よりよい粒子が常套的なアッセイによって選択され得る。小粒子（例えば、3dMPLの透明な水性懸濁物が得られるのに十分小さい）は、活性が優れているため(130)本発明による使用に好ましい。好ましい粒子は、220nm未満、より好ましくは、200nm未満または150nm未満または120nm未満の平均直径を有するものであり、さらには100nm未満の平均直径を有するものであってもよい。しかしながら、ほとんどの場合、平均直径が50nmより小さいことはない。このような粒子は、濾過滅菌に適するのに十分小さい。粒子の直径は、平均粒子直径が示される常套的な動的光散乱手法によって評価され得る。粒子がx nmの直径を有するという場合、一般的に、この平均付近に粒子の分布がみられるが、粒子の少なくとも50%（個数で）（例えば、>60%、>70%、>80%、>90%またはそれ以上）はx+25%の範囲内の直径を有する。

20

【0312】

3dMPLは、好都合には、水中油型エマルジョンと組み合わせて使用され得る。実質的にすべての3dMPLが該エマルジョンの水相中に存在し得る。

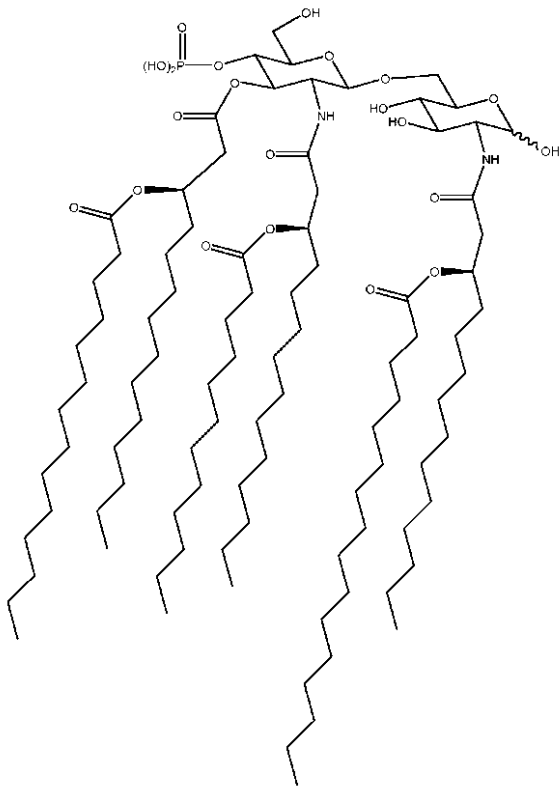
30

【0313】

3dMPLは、単独で、または1つ以上のさらなる化合物と組み合わせて使用され得る。例えば、3dMPLは、QS21サポニン(131)（例えば、水中油型エマルジョン中で(132)）、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、QS21と免疫賦活性オリゴヌクレオチドの両方、リン酸アルミニウム(133)、水酸化アルミニウム(134)、またはリン酸アルミニウムと水酸化アルミニウムの両方と組み合わせて使用されることが知られている。

【0314】

【化 1 4】



10

式 (IV)

20

( 脂肪アジュバント )

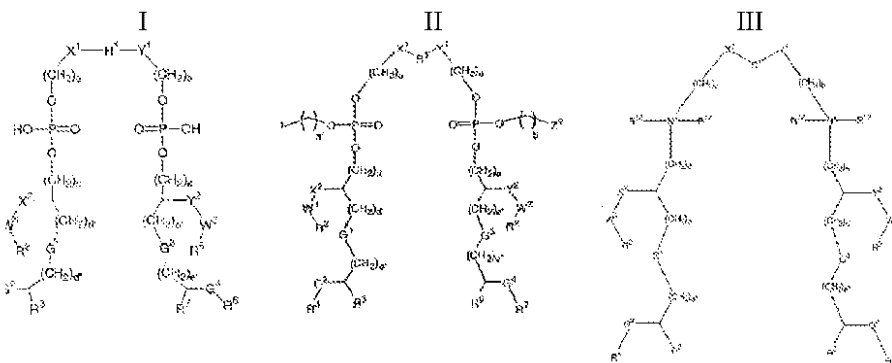
本発明で使用され得る脂肪アジュバントとしては、上記の水中油型エマルジョンが挙げられ、また、例えば、以下のものが挙げられる。

【 0 3 1 5】

・式 I、II もしくは III のリン脂質化合物またはその塩：

【 0 3 1 6】

【化 1 5】



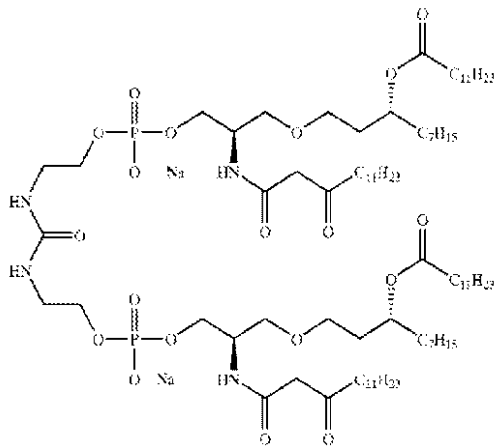
30

40

( 参考文献 1 3 5 に、「ER 8 0 3 0 5 8」、「ER 8 0 3 7 3 2」、「ER 8 0 4 0 5 3」、「ER 8 0 4 0 5 8」、「ER 8 0 4 0 5 9」、「ER 8 0 4 4 4 2」、「ER 8 0 4 6 8 0」、「ER 8 0 4 7 6 4」、ER 8 0 3 0 2 2 または「ER 8 0 4 0 5 7」、例えば：

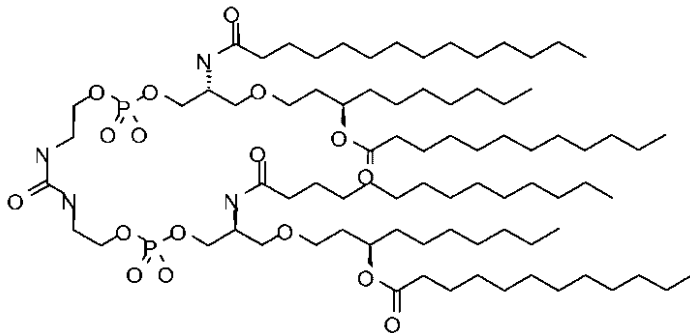
【 0 3 1 7】

## 【化 1 6】



ER804057

10



ER-803022.

20

などが規定されている)。ER804057はE6020とも称されている。式I、IIもしくはIIIのリン脂質化合物またはその塩は、単独で、または1つ以上のさらなる化合物と組み合わせて使用され得る。例えば、式I、IIもしくはIIIの化合物は、水中油型エマルジョンまたは無機質含有組成物と組み合わせて使用され得る。具体的な一実施形態では、E6020は、水中油型エマルジョン（例えば、MF59などのスクアレン-水エマルジョン）または無機質含有組成物（例えば、アルミニウム塩もしくはカルシウム塩などの無機塩）と組み合わせて使用される。

30

## 【0318】

・OM-174などの大腸菌由来のリピドAの誘導体（参考文献136および137に記載）。

## 【0319】

・カチオン性脂質と（通常、中性の）コリピド（co-lipid）の処方物、例えば、アミノプロピル-ジメチル-ミリストレイルオキシ-プロパンアミニウムブロミド-ジフィタノイルホスファチジル-エタノールアミン（「VAXFECTIN(TM）」）またはアミノプロピル-ジメチル-ビス-ドデシルオキシ-プロパンアミニウムブロミド-ジオレオイルホスファチジル-エタノールアミン（「GAP-DLRIE:DOPE」）。（+）-N-（3-アミノプロピル）-N,N-ジメチル-2,3-ビス（syn-9-テトラデセネイルオキシ）-1-プロパンアミニウム塩を含む処方物が好ましい（138）。

40

## 【0320】

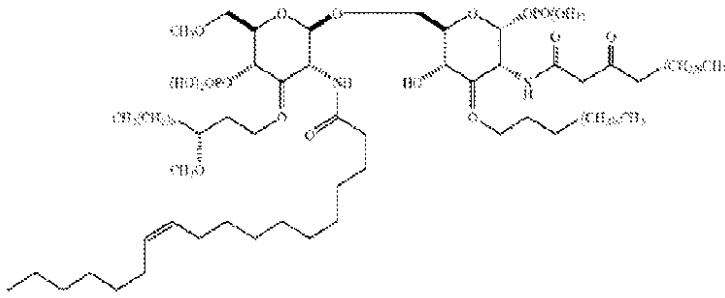
・3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA（上記参照）。

## 【0321】

・リン酸含有非環式主鎖に連結された脂質を含む化合物、例えば、TLR4アンタゴニストE5564：

## 【0322】

## 【化 17】



10

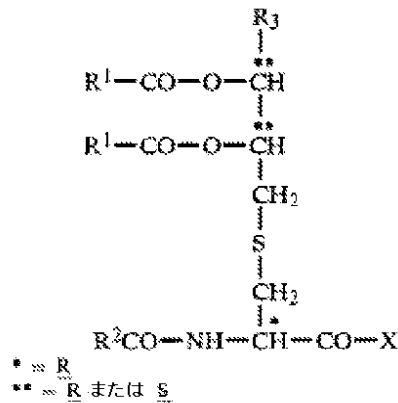
( 1 3 9 , 1 4 0 ) 。

## 【 0 3 2 3 】

・リポペプチド（すなわち、1つ以上の脂肪酸残基と2つ以上のアミノ酸残基を含む化合物）、例えば、グリセルシステインが基礎であるリポペプチド。かかるペプチドの具体例としては、下記の式：

## 【 0 3 2 4 】

## 【化 18】



20

の化合物が挙げられ、式中、 $R^1$  および  $R^2$  は各々、8 ~ 30、好ましくは 11 ~ 21 個の炭素原子（これも、酸素官能基で任意選択的に置換されている）を有する飽和または不飽和の脂肪族または脂肪族 - 脂環式混合型の炭化水素ラジカルを表し、 $R^3$  は、水素またはラジカル  $R^1-CO-O-CH_2-$ （式中、 $R^1$  は、上記のものと同じ意味を有する）を表し、 $X$  は、ペプチド結合によって結合され、かつ遊離のエステル化またはアミド化されたカルボキシ基を有するアミノ酸、または末端カルボキシ基が遊離のエステル化もしくはアミド化された形態である 2 ~ 10 個のアミノ酸のアミノ酸配列を表す。一部の特定の実施形態では、該アミノ酸配列は、D - アミノ酸、例えば、D - グルタミン酸（D - Glu）または D - -カルボキシ - グルタミン酸（D - Gla）を含む。

30

## 【 0 3 2 5 】

細菌リポペプチドは、一般的に、TLR6の関与を必要とすることなくTLR2を認識する（TLRは、協働的に機能を果たして種々の誘発因子の特異的認識をもたらし、TLR2 + TLR6は一緒になってペプチドグリカンを認識するが、TLR2はTLR6なしでリポペプチドを認識する）。該リポペプチドは、場合によっては、天然リポペプチドと合成リポペプチドに分類される。合成リポペプチドは、類似した挙動を示す傾向にあり、主にTLR2によって認識される。

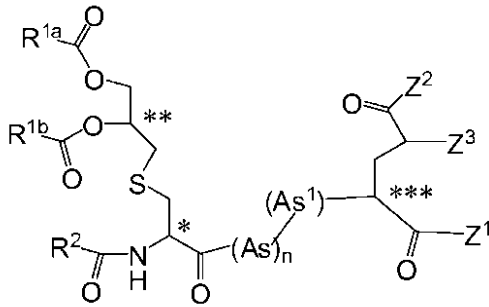
40

## 【 0 3 2 6 】

アジュバントとしての使用に適したリポペプチドとしては、式：

## 【 0 3 2 7 】

## 【化 1 9】



10

を有する化合物が挙げられ、式中、\* を表示したキラル中心と \* \* \* を表示したものは、ともに R 配置であり；

\* \* \* を表示したキラル中心は、R 配置または S 配置のいずれかであり；

各 R<sup>1a</sup> および R<sup>1b</sup> は、独立して、7 ~ 21 個の炭素原子を有し、酸素官能基で任意選択的に置換された脂肪族もしくは脂環式 - 脂肪族の炭化水素基であるか、または R<sup>1a</sup> と R<sup>1b</sup> の一方（両方ではない）が H であり；

R<sup>2</sup> は、1 ~ 21 個の炭素原子を有し、酸素官能基で任意選択的に置換された脂肪族または脂環式の炭化水素基であり；

n は、0 または 1 であり；

As は、- O - Kw - CO - または - NH - Kw - CO - （式中、Kw は、1 ~ 12 個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基である）のいずれかを表し；

20

As<sup>1</sup> は、D - または L - アミノ酸であり；

Z<sup>1</sup> および Z<sup>2</sup> は各々、独立して、- OH を表すか、あるいはアミノ - （低級アルカン） - スルホン酸の D - もしくは L - アミノ酸、または D - および L - アミノカルボン酸ならびにアミノ - 低級アルキル - スルホン酸から選択される 6 個までのアミノ酸を有するペプチドの N 末端ラジカルを表し；

Z<sup>3</sup> は、H または - CO - Z<sup>4</sup> であり、ここで、Z<sup>4</sup> は、- OH であるか、あるいは、アミノ - （低級アルカン） - スルホン酸の D - もしくは L - アミノ酸、または D - および L - アミノカルボン酸ならびにアミノ - 低級アルキル - スルホン酸から選択される 6 個までのアミノ酸を有するペプチドの N 末端ラジカル；またはかかる化合物のカルボン酸から形成されるエステルもしくはアミドであり、好適なアミドとしては、- NH<sub>2</sub> および NH（低級アルキル）が挙げられ、適当なエステルとしては、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルキルエステルが挙げられる（低級アルキルまたは低級アルカンは、本明細書で用いる場合、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> 直鎖または分枝鎖アルキルをいう）。

30

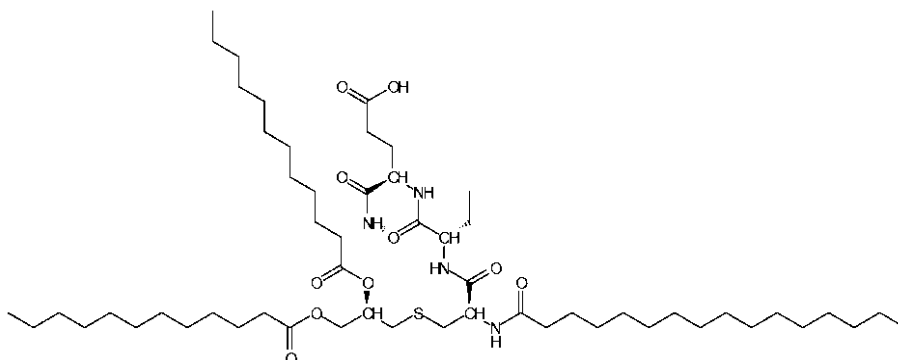
## 【0328】

かかる化合物は US 4,666,886 に、より詳細に記載されている。具体的な一実施形態では、該リポペプチドは、式：

## 【0329】

## 【化 20】

40



を有する。

50

## 【0330】

リポペプチド種の別の例は、LP40と称されるものであり、TLR2のアゴニストである。Akdisら, Eur. J. Immunology, 33: 2717-26 (2003)。

## 【0331】

これは、ムレインリポタンパク質と称される大腸菌由来の既知の類型のリポペプチドに関連している。ムレインリポペプチド (lipopeptide) と称される該タンパク質の一部の特定の部分分解生成物が、Hantkerら, Eur. J. Biochem., 34: 284-296 (1973) に記載されている。これは、N-アセチルムラミン酸に連結されたペプチドを含むものであり、したがって、ムラミルペプチド (これは、Baschangら, Tetrahedron, 45 (20): 6331-6360 (1989) に記載されている) に関連している。

10

## 【0332】

(アルミニウム塩アジュバント)

「水酸化アルミニウム」および「リン酸アルミニウム」として知られているアジュバントが使用され得る。この名称は慣用的であるが、便宜上、使用されているにすぎず、いずれも、存在している実際の化学物質の化合物の厳密な記述を示すものではない (例えば、参考文献74の第9章参照)。本発明では、一般にアジュバントとして使用されている任意の「水酸化物」または「リン酸塩」アジュバントが使用され得る。

## 【0333】

「水酸化アルミニウム」として知られているアジュバントは、典型的には、オキシ水酸化アルミニウム塩であり、これは、通常、少なくとも一部が結晶性である。オキシ水酸化アルミニウムは、式  $AlO(OH)$  で表され得、水酸化アルミニウム  $Al(OH)_3$  などの他のアルミニウム化合物と、赤外 (IR) 分光法によって、特に、 $1070\text{ cm}^{-1}$  における吸着バンドおよび  $3090 \sim 3100\text{ cm}^{-1}$  における強いショルダー (shoulder) の存在によって識別され得る (参考文献74第9章)。水酸化アルミニウムアジュバントの結晶化度は、半分の高さにおける回折バンド幅 (width of the diffraction band at half height (WHH)) に反映され、結晶性が不十分な粒子は、結晶子の大きさが小さいため、大きな線の広がりを示す。表面積は、WHHが増大するにつれて増大し、高いWHH値を有するアジュバントほど、大きな抗原吸着能を有することがわかっている。繊維状の形態構造 (例えば、透過電子顕微鏡写真において見られるようなもの) は、水酸化アルミニウムアジュバントに典型的である。水酸化アルミニウムアジュバントの  $pI$  は、典型的には約11であり、すなわち、アジュバント自体が生理学的  $pH$  で正の表面電荷を有する。水酸化アルミニウムアジュバントでは、 $1.8 \sim 2.6\text{ mg タンパク質 / mg } Al^{+++}$  ( $pH 7.4$ ) の吸着能が報告されている。

20

30

## 【0334】

「リン酸アルミニウム」として知られているアジュバントは、典型的には、ヒドロキシリン酸アルミニウムであり、多くの場合、少量の硫酸塩 (すなわち、ヒドロキシリン酸アルミニウム硫酸塩) も含まれる。これは沈降によって得られ得、沈降中の反応条件および濃度は、該塩におけるホスフェートでのヒドロキシルの置換の度合に影響を及ぼす。ヒドロキシリン酸塩は、一般的に  $0.3 \sim 1.2$  の  $PO_4 / Al$  モル比を有する。ヒドロキシリン酸塩は、ヒドロキシル基の存在によって、厳密な  $AlPO_4$  と識別され得る。例えば、 $3164\text{ cm}^{-1}$  におけるIRスペクトルバンド (例えば、 $200^\circ\text{C}$  まで加熱した場合) は、構造のヒドロキシルの存在を示す (参考文献74の第9章)。

40

## 【0335】

リン酸アルミニウムアジュバントの  $PO_4 / Al^{3+}$  モル比は、一般的に  $0.3 \sim 1.2$ 、好ましくは  $0.8 \sim 1.2$ 、より好ましくは  $0.95 + 0.1$  である。リン酸アルミニウムは、一般的に非晶質である (特に、ヒドロキシリン酸塩の場合)。典型的なアジュバントは、 $0.84 \sim 0.92$  の  $PO_4 / Al$  モル比を有する非晶質ヒドロキシリン酸ア

50



ルミニウムである ( $0.6 \text{ mg Al}^{3+} / \text{ml}$  で含まれる)。該リン酸アルミニウムは、一般的に粒状である (例えば、透過電子顕微鏡写真において見られるようなプレート様形態構造)。粒子の典型的な直径は、任意の抗原吸着後において  $0.5 \sim 20 \mu\text{m}$  の範囲 (例えば、約  $5 \sim 10 \mu\text{m}$ ) である。リン酸アルミニウムアジュバントでは、 $0.7 \sim 1.5 \text{ mg タンパク質} / \text{mg Al}^{+++}$  ( $\text{pH} 7.4$ ) の吸着能が報告されている。

#### 【0336】

リン酸アルミニウムのゼロ電荷点 (PZC) は、ホスフェートでのヒドロキシルの置換の度合に反比例し、この置換の度合は、沈降による塩の調製に使用される反応条件および反応物の濃度に応じて異なり得る。また、PZC は、溶液中の遊離リン酸イオン濃度を変えること (より多くのホスフェート = より酸性の PZC)、またはヒスチジンバッファーなどのバッファーを添加すること (PZC は、より塩基性となる) によっても変更される。本発明に従って使用されるリン酸アルミニウムは、一般的に  $4.0 \sim 7.0$ 、より好ましくは  $5.0 \sim 6.5$ 、例えば約  $5.7$  の PZC を有する。

10

#### 【0337】

本発明の組成物を調製するために使用されるアルミニウム塩の懸濁物には、バッファー (例えば、リン酸またはヒスチジンまたは *Tris* バッファー) を含めてもよいが、これは必ずしも必要なことではない。該懸濁物は、好ましくは滅菌されており、パイロジェンフリーである。該懸濁物は、例えば、 $1.0 \sim 20 \text{ mM}$ 、好ましくは  $5 \sim 15 \text{ mM}$ 、より好ましくは約  $10 \text{ mM}$  の濃度で存在する遊離の水性リン酸イオンを含むものであり得る。また、該懸濁物に塩化ナトリウムを含めてもよい。

20

#### 【0338】

本発明では、水酸化アルミニウムとリン酸アルミニウムの両方の混合物を使用してもよい。この場合、リン酸アルミニウムを水酸化物よりも多く、例えば、少なくとも  $2:1$  (例えば、 $> 5:1$ 、 $> 6:1$ 、 $> 7:1$ 、 $> 8:1$ 、 $> 9:1$  など) の重量比で存在させるのがよい。

#### 【0339】

患者への投与のための組成物中の  $\text{Al}^{+++}$  の濃度は、好ましくは、 $10 \text{ mg 未満} / \text{ml}$  (例えば、 $< 5 \text{ mg} / \text{ml}$ 、 $< 4 \text{ mg} / \text{ml}$ 、 $< 3 \text{ mg} / \text{ml}$ 、 $< 2 \text{ mg} / \text{ml}$ 、 $< 1 \text{ mg} / \text{ml}$  など) である。好ましい範囲は  $0.3 \sim 1 \text{ mg} / \text{ml}$  である。最大  $0.85 \text{ mg} / \text{用量}$  が好ましい。

30

#### 【0340】

1つ以上のアルミニウム塩アジュバントを含むとともに、アジュバント成分は、1つ以上のさらなるアジュバントまたは免疫賦活剤を含んでいてもよい。かかるさらなる成分としては、限定されないが、ベンゾナフチリジン化合物、3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドAアジュバント (「3d-MPL」)；および/または水中油型エマルジョンが挙げられる。3d-MPL は、3-脱-O-アシル化モノホスホリルリピドAまたは3-O-脱アシル-4'-モノホスホリルリピドAとも呼ばれている。この名称は、モノホスホリルリピドAの還元末端グルコサミンの3位が脱アシル化されていることを示す。これは、*Minnesota* の無ヘプトース変異型から調製されたものであり、リピドAと化学的に類似しているが、酸不安定性のホスホリル基と塩基不安定性のアシル基が欠損している。これは、単球/マクロファージ系統の細胞を活性化し、いくつかのサイトカイン (例えば、IL-1、IL-12、TNF- および GM-CSF) の放出を刺激する。3dMPLの調製は、最初に参考文献129で報告され、製品は、*Corixa Corporation* からMPL(TM)の名称で製造および販売されている。さらなる詳細は、参考文献82~85を見るとよい。

40

#### 【0341】

水酸化アルミニウムおよび/またはリン酸アルミニウムアジュバントの使用は、特に小児に有用であり、抗原は、一般的に該塩に吸着させる。また、水中スクアレン型エマルジョンは、特に高齢者に好ましい。有用なアジュバントの組合せとしては、CpGとアラム (alum)、またはレシキモドとアラムなどのTh1アジュバントとTh2アジュバン

50

トの組合せが挙げられる。リン酸アルミニウムと3dMPLの組合せが使用され得る。使用され得る他の組合せとしては、アラムおよびベンゾナフチリジン化合物またはSMIP、水中スクアレン型エマルジョン(MF59など)およびベンゾナフチリジン化合物またはSMIP、ならびにE6020および水中スクアレン型エマルジョン(MF59など)またはアラムが挙げられる。

【0342】

本発明の組成物は、細胞媒介性免疫応答ならびに体液性免疫応答の両方を誘起するものであってもよい。

【0343】

細胞媒介性免疫および体液性免疫を起こすか、および/または増強するためには、一般的に、T細胞、CD4細胞およびCD8細胞の2つの型が必要であると考えられている。CD8 T細胞は、CD8共受容体を発現し得るものであり、一般的に、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)と称される。CD8 T細胞は、MHCクラスI分子上にディスプレイされた抗原を認識すること、または該抗原と相互作用することができる。

10

【0344】

CD4 T細胞は、CD4共受容体を発現し得るものであり、一般的に、Tヘルパー細胞と称される。CD4 T細胞は、MHCクラスII分子に結合された抗原性ペプチドを認識することができる。MHCクラスII分子と相互作用すると、CD4細胞は、サイトカインなどの因子を分泌し得る。分泌されたこのようなサイトカインにより、B細胞、細胞傷害性T細胞、マクロファージ、および免疫応答に關与する他の細胞が活性化され得る。ヘルパーT細胞またはCD4+細胞は、さらに、2つの機能的に相違するサブセット：TH1表現型とTH2表現型(これらは、サイトカインおよびエフェクター機能が異なる)に分けられ得る。

20

【0345】

活性化型TH1細胞は、細胞性免疫を増強し(例えば、抗原特異的CTL生成の増大)、したがって、細胞内感染に対する応答に特に重要である。活性化型TH1細胞により、IL-2、IFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ のうちの一つ以上が分泌され得る。TH1免疫応答により、マクロファージ、NK(ナチュラルキラー)細胞およびCD8細胞傷害性T細胞(CTL)が活性化されることによって局所炎症反応がもたらされ得る。また、TH1免疫応答は、IL-12によってB細胞およびT細胞の増殖を刺激することによって免疫応答を拡張する機能を果たし得る。TH1に刺激されたB細胞によりIgG2aが分泌され得る。

30

【0346】

活性化型TH2細胞は抗体産生を増強し、したがって、細胞外感染に対する応答に重要である。活性化型TH2細胞により、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10のうちの一つ以上が分泌され得る。TH2免疫応答により、IgG1、IgE、IgAおよび記憶B細胞(将来の防御のため)の生成がもたらされ得る。

【0347】

増強された免疫応答は、増強されたTH1免疫応答およびTH2免疫応答のうちの一つ以上を含むものであり得る。

40

【0348】

TH1免疫応答は、CTLの増大、TH1免疫応答と関連している一つ以上のサイトカイン(IL-2、IFN- $\gamma$ 、およびTNF- $\alpha$ など)の増大、活性化マクロファージの増大、NK活性の増大、またはIgG2a生成の増大のうちの一つ以上を含むものであり得る。好ましくは、増強されたTH1免疫応答は、IgG2a生成の増大を含むものである。

【0349】

TH1免疫応答は、TH1アジュバントを用いて誘起され得る。TH1アジュバントは、一般的に、アジュバントなしでの抗原での免疫化と比べて、IgG2a生成のレベルの増大を誘起するものである。本発明における使用に適したTH1アジュバントとしては、

50

例えば、サポニン処方物、ピロソームおよびウイルス様粒子、腸内細菌リポ多糖（LPS）の非毒性誘導体、免疫賦活性オリゴヌクレオチドが挙げられ得る。免疫賦活性オリゴヌクレオチド（CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチドなど）は、本発明における使用に好ましいTH1アジュバントである。

【0350】

TH2免疫応答は、TH2免疫応答と関連している1つ以上のサイトカイン（IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10など）の増大、またはIgG1、IgE、IgAおよび記憶B細胞の生成の増大のうちの1つ以上を含むものであり得る。好ましくは、増強されたTH2免疫応答は、IgG1生成の増大を含むものである。

【0351】

TH2免疫応答は、TH2アジュバントを用いて誘起され得る。TH2アジュバントは、一般的に、アジュバントなしでの抗原での免疫化と比べて、IgG1生成のレベルの増大を誘起するものである。本発明における使用に適したTH2アジュバントとしては、例えば、無機質含有組成物、油エマルジョン、ならびにADP-リポシル化毒素およびその無毒化誘導体が挙げられる。無機質含有組成物（アルミニウム塩など）は、本発明における使用に好ましいTH2アジュバントである。

【0352】

組成物は、TH1アジュバントとTH2アジュバントの組合せを含むものであってもよい。好ましくは、かかる組成物により、アジュバントなしでの免疫化と比べて、TH1の増強およびTH2応答の増強、すなわち、IgG1生成とIgG2a生成の両方の増大が誘起される。さらにより好ましくは、TH1アジュバントとTH2アジュバントの組合せを含む組成物により、単一のアジュバントでの免疫化と比べて（すなわち、TH1アジュバント単独での免疫化、またはTH2アジュバント単独での免疫化と比べて）TH1の増大および/またはTH2免疫応答の増大が誘起される。

【0353】

免疫応答は、TH1免疫応答とTH2応答の一方であっても両方であってもよい。好ましくは、免疫応答により、TH1応答の増強とTH2応答の増強の一方または両方がもたらされる。

【0354】

増強される免疫応答は、全身性免疫応答と粘膜免疫応答の一方であっても両方であってもよい。好ましくは、免疫応答により、全身性免疫応答の増強と粘膜免疫応答の増強の一方または両方がもたらされる。好ましくは、粘膜免疫応答はTH2免疫応答である。好ましくは、粘膜免疫応答はIgA生成の増大を含むものである。

【0355】

（処置方法および投与）

本発明の組成物は哺乳動物への投与に適しており、本発明は、本発明の組成物（例えば、免疫原性組成物）を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において免疫応答を誘導する方法を提供する。該組成物（例えば、免疫原性組成物）は、哺乳動物を免疫化するためのワクチン処方物を作製するために使用され得る。哺乳動物は、典型的にはヒトであり、RSV Fタンパク質のエクトドメインは、典型的にはヒトRSV Fタンパク質のエクトドメインである。しかしながら、哺乳動物は、RSVに感染し易い任意の他の哺乳動物（ウシRSVに感染し得るウシなど）であり得る。例えば、免疫応答は、精製RSV Fタンパク質、アルファウイルス粒子または自己複製RNAの投与後に生じ得る。

【0356】

また、本発明は、医薬としての使用のための、例えば、RSV感染に対する患者の免疫化における使用のための本発明の組成物を提供する。

【0357】

また、本発明は、患者において免疫応答を起こすための医薬の製造における上記のポリペプチドの使用を提供する。

【0358】

10

20

30

40

50

このような方法および使用によって生じた免疫応答は、一般的に抗体応答、好ましくは防御的抗体応答を含むものである。RSVワクチン接種後の抗体応答の評価方法は当該技術分野でよく知られている。

【0359】

本発明の組成物は、いくつかの適当な様式で、例えば、筋肉内注射（例えば、腕または脚に）、皮下注射、鼻腔内投与、経口投与、皮内投与、経皮投与（transcutaneous administration）、経皮投与（transdermal administration）などで投与され得る。適切な投与経路は、哺乳動物の年齢、健康状態および他の特徴に依存する。医師は、これらおよび他の要素に基づいて適切な投与経路を決定することができよう。

10

【0360】

免疫原性組成物およびワクチン処方物は、小児と成人（妊娠女性を含む）のどちらを処置するためにも使用され得る。したがって、被験体は、1歳未満、1～5歳、5～15歳、15～55歳、または少なくとも55歳であり得る。該ワクチンを受けるのに好ましい被験体は、高齢者（例えば、>50歳、>60歳、好ましくは>65歳）、幼若者（例えば、<6歳、例えば4～6歳、<5歳）、および妊娠女性である。該ワクチンは、これらの群に対してのみ適しているのではなく、集団においてより一般的に使用され得る。

【0361】

処置は、単一用量スケジュールによるものであっても複数用量スケジュールによるものであってもよい。複数用量は、初回免疫化スケジュールおよび/または追加免疫化スケジュールにおいて使用され得る。複数用量スケジュールでは、種々の用量が同じかまたは異なる経路で与えられ得る（例えば、非経口での初回免疫と粘膜での追加免疫、粘膜での初回免疫と非経口での追加免疫など）。1より多くの用量（典型的には、2用量）での投与が、免疫学的にナイーブな患者に特に有用である。複数用量は、典型的には、少なくとも1週間あけて投与する（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間など）。

20

【0362】

本発明の組成物を用いて作製されるワクチン処方物を患者に、他のワクチンと実質的に同時に（例えば、同じ診察時、または医療専門家もしくはワクチン接種施設を訪れたとき）投与してもよい。

30

【0363】

（本発明のさらなる態様）

また、本発明は、第1のドメインと第2のドメインを含み、(i)第1のドメインが全体または一部においてRSVF糖タンパク質のエクトドメインを含み、(ii)第2のドメインが異種オリゴマー化ドメインを含むポリペプチド（例えば、組換えポリペプチド）を提供する。さらなる詳細は上記に示している。オリゴマー化ドメインに7配列（例えば、上記のGCNに由来する配列）が含まれている場合、これは、好ましくは、エクトドメインのHR2配列（存在する場合）と共に7反復相にある。

【0364】

また、本発明は、このポリペプチドをコードする核酸（例えば、DNA）を提供する。また、本発明は、かかる核酸を含むベクター、およびかかるベクターを含む宿主細胞を提供する。該ベクターは、例えば、組換え発現目的、核酸での免疫化などに使用され得る。

40

【0365】

また、本発明は、RSVF糖タンパク質のエクトドメインを含む分子であって、該分子の少なくとも50%（例えば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%または100%）のエクトドメインが融合前コンフォメーションで存在している分子を含む組成物を提供する。

【0366】

（他のウイルス）

ヒトRSVで使用されるのと同様に、本発明は、肺炎ウイルス科およびパラミクソウイ

50

ルス科の他の構成員、例えば限定されないが、ウシRSウイルス、パラインフルエンザウイルス1、パラインフルエンザウイルス2、パラインフルエンザウイルス3、およびパラインフルエンザウイルス5で使用され得る。

【0367】

したがって、本発明は、肺炎ウイルス科またはパラミクソウイルス科由来のF糖タンパク質を含み、該F糖タンパク質が融合前コンフォメーションである免疫原性組成物を提供する。

【0368】

また、本発明は、肺炎ウイルス科またはパラミクソウイルス科のF糖タンパク質の融合前コンフォメーションでは存在するが、該糖タンパク質の融合後コンフォメーションでは存在しないエピトープをディスプレイするポリペプチドを含む免疫原性組成物を提供する。

10

【0369】

また、本発明は、第1のドメインと第2のドメインを含み、(i)第1のドメインが全体または一部において肺炎ウイルス科またはパラミクソウイルス科のF糖タンパク質のエクトドメインを含み、(ii)第2のドメインが異種オリゴマー化ドメインを含むポリペプチドを提供する。

【0370】

また、本発明は、免疫化などにおける使用のための、このようなポリペプチドおよび組成物を提供する。

20

【0371】

また、本発明は、RSV F糖タンパク質のエクトドメインを含む分子であって、該分子の少なくとも50% (例えば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%または100%)のエクトドメインが融合前コンフォメーションまたは中間コンフォメーションで存在している分子を含む組成物を提供する。

【0372】

(RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド)

本発明の一部の実施形態において、特定のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドを使用するか、含めている。一部の該特定のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、100位付近~161位付近に改変されたアミノ酸配列を含むものである。いくつかの特定のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの100位~150位のアミノ酸配列を図1Cに示す。いくつかの特定のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのアミノ酸配列を本明細書に(例えば、実施例1に)示している。

30

【0373】

(一般)

用語「~を含む(comprising)」は、「~を含む(including)」ならびに「~からなる(consisting)」および「本質的に、~からなる(consisting essentially of)」を包含し、例えば、X「を含む(comprising)」組成物は、排他的にXからなるものであってもよく、さらなる何かを含むもの(例えば、X+Y)であってもよい。

40

【0374】

語句「本質的に」は「完全に」を排除せず、例えば、Yを「本質的に含まない」組成物は、完全にYを含まないものであってもよい。必要な場合、語句「本質的に」は本発明の定義から削除され得る。

【0375】

数値xに関する用語「約」は、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0376】

具体的な記載のない限り、2つ以上の成分を混合する工程を含む方法は、なんら特定の混合順を必要としない。したがって、成分は任意の順序で混合され得る。成分が3つある

50

場合、2つの成分が互いに合わされ得、次いで、この合わせたものが、第3の成分と合わされ得るなどである。

【0377】

動物（特に、ウシ）材料を細胞の培養に使用する場合、該材料は、伝染性の海綿状脳症（TSE）を有さない、特に、ウシ海綿状脳症（BSE）を有さない供給源から得たものであるべきである。概して、細胞を動物由来の物質の完全な非存在下で培養することが好ましい。

【0378】

化合物を身体に組成物の一部として投与する場合、該化合物を、代替的に適当なプロドラッグで置き換えてもよい。

10

【0379】

細胞基質を再集合（reassortment）または逆遺伝学手順に使用する場合、これは、好ましくは、ヒト用ワクチン作製における使用に承認されたものである（例えば、Ph Eur 概説5.2.3章）。

【0380】

ポリペプチド配列間の同一性は、好ましくは、ギャップオープンペナルティ = 12 およびギャップ伸張ペナルティ = 1 のパラメータでアフィンギャップ検索を使用し、MPSRCHプログラム（Oxford Molecular）において実行されるSmith-Waterman 同源性検索アルゴリズムによって判定する。

20

【0381】

【表1-1】

表1. リン脂質

|       |   |
|-------|---|
| DDPC  | 1,2-ジデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                 |
| DEPA  | 1,2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート                     |
| DEPC  | 1,2-エルコイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                  |
| DEPE  | 1,2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン            |
| DEPG  | 1,2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)] |
| DLOPC | 1,2-リノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                 |
| DLPA  | 1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート                     |

30

【0382】

## 【表 1 - 2】

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| DLPC             | 1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                     |    |
| DLPE             | 1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン                |    |
| DLPG             | 1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]     |    |
| DLPS             | 1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン                     |    |
| DMG              | 1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン                   |    |
| DMPA             | 1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート                        |    |
| DMPC             | 1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                    |    |
| DMPE             | 1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン               | 10 |
| DMPG             | 1, 2-ミリストイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]     |    |
| DMPS             | 1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン                    |    |
| DOPA             | 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート                         |    |
| DOPC             | 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                     |    |
| DOPE             | 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン                |    |
| DOPG             | 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]     |    |
| DOPS             | 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン                     |    |
| DPPA             | 1, 2-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート                        |    |
| DPPC             | 1, 2-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                    | 20 |
| DPPE             | 1, 2-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン               |    |
| DPPG             | 1, 2-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]    |    |
| DPPS             | 1, 2-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン                    |    |
| DPyPE            | 1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン                   |    |
| DSPA             | 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート                        |    |
| DSPC             | 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                    |    |
| DSPE             | 1, 2-ジステアロイル (diostearyl) -sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン |    |
| DSPG             | 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]    |    |
| DSPS             | 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン                    | 30 |
| EPC              | 卵PC  |    |
| HEPC             | 水素添加卵PC  |    |
| HSPC             | 高純度水素添加ダイズPC   |    |
| HSPC             | 水素添加ダイズPC  |    |
| LYSOPC MYRISTIC  | 1-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                        |    |
| LYSOPC PALMITIC  | 1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                        |    |
| LYSOPC STEARIC   | 1-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン                        |    |
| 乳汁スフィンゴミエリン MPPC | 1-ミリストイル, 2-パルミトイル-sn-グリセロ3-ホスファチジルコリン               |    |
| MSPC             | 1-ミリストイル, 2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン              | 40 |

## 【 0 3 8 3 】

## 【表 1 - 3】

|      |  |
|------|--|
| PMPC | 1-パルミトイル, 2-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン          |
| POPC | 1-パルミトイル, 2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン           |
| POPE | 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン       |
| POPG | 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール)...] |
| PSPC | 1-パルミトイル, 2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン          |
| SMPC | 1-ステアロイル, 2-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン          |
| SOPC | 1-ステアロイル, 2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン           |
| SPPC | 1-ステアロイル, 2-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン          |

10

## 【実施例】

## 【0384】

(実施例)

(実施例 1 - R S V F ポリペプチド)

この実施例では、ポリペプチド(例えば、シグナル配列を含むもの)のいくつかの例の配列、および本発明の R S V F ポリペプチドを発現するために使用され得る核酸配列を示す。ここに示すアミノ酸配列は、シグナルペプチドを含み、任意選択の C 末端リンカーおよび His タグ (G G S A G S G H H H H H (配列番号 90)) を含むものである。このようなポリペプチドを宿主細胞において産生させると、該ポリペプチドは、通常、該細胞によってプロセッシングされてシグナルペプチドが除去され、本明細書に記載のように、一部の該ポリペプチドは、例えば、非修飾フリン切断部位で切断される。本発明は、本明細書に開示した具体的な R S V F タンパク質のエクトドメインポリペプチドのあらゆる形態、例えば、シグナルペプチドが欠損している成熟形態、F<sub>1</sub> と F<sub>2</sub> を含むサブユニットに切断され得る形態、および任意選択の C 末端の His タグが欠損している形態を含む組成物を含む。以下の例は、本発明の範囲の例示にすぎず、したがって、なんら本発明の範囲を限定することを意図しない。

20

## 【0385】

野生型フリン切断の一例は R S V F 野生型切断型 H I S (配列番号 84) である。

## 【0386】

単量体として作製され得るポリペプチドの例としては、R S V F Fur x (配列番号 45); R S V F o l d f u r x 切断型 H I S (配列番号 88); R S V F Fur x R 1 1 3 Q K 1 2 3 N K 1 2 4 N 切断型 H I S (配列番号 89); R S V F d e l p 2 1 f u r x 切断型 H I S (配列番号 47); および R S V F d e l P 2 3 f u r x 切断型 H I S (配列番号 48) が挙げられる。

30

## 【0387】

三量体として作製され得るポリペプチドの例としては、R S V F N 末端フリン切断型 H I S (配列番号 85); R S V F 融合欠失切断型 H I S (配列番号 67); および R S V F 融合欠失 2 切断型 H I S (配列番号 68) が挙げられる。

## 【0388】

単量体または三量体のロゼットとして作製され得るポリペプチドの例としては、: R S V F f u r m t 切断型 H I S (配列番号 50); R S V F f u r d e l 切断型 H I S (配列番号 51); R S V F d e l P 2 1 f u r d e l 切断型 H I S (配列番号 86); および R S V F d e l P 2 3 f u r d e l 切断型 H I S (配列番号 49)、ならびに R S V F 第 X a 因子切断型 H I S (配列番号 52) が挙げられる。

40

## 【0389】

ロゼット形成がもたらされられると思われる野生型切断の一例は、R S V F C 末端フリン切断型 H I S (配列番号 87) である。

## 【0390】

(完全)

50



下記のポリペプチドは完全長の R S V F ポリペプチドである。

【 0 3 9 1 】

【 化 2 1 】

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN  
 121 NAKKTNVTLN KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS  
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPIVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN  
 241 AGVTPPVSTY MLTNSBLLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKBEVLAYV  
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLYYVN KQEGKSLYVK GEPINIFYDP  
 481 LVFSPDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS  
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLN KDQLSGINNI AFSN ( 配列番号 21)

10

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

【 0 3 9 2 】

【 化 2 2 】

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC  
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG  
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG  
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG  
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC  
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC  
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC  
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG  
 481 GAAGCGGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC  
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC  
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG  
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC  
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG

20

30

【 0 3 9 3 】

【 化 2 3 】

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGACGATC  
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG  
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC  
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC  
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGACCCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCA TCATCAACTT CTACGACCCC  
 1441 CTGGTGTTC CAGCGACGGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC  
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG  
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATGTGAT CCTGCTGTCT  
 1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTAAGTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC  
 1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACTGAAG ( 配列番号 22)

40

50

( 完全 H I S )

下記のポリペプチドは、完全長の R S V F ポリペプチド、続いてヘキサ - ヒスチジンタグを含む。

【 0 3 9 4 】

【 化 2 4 】

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTFPVSTY MLTNSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNSGGGAG SGHHHHHH ( 配列番号 23 )

```

10

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

【 0 3 9 5 】

【 化 2 5 】

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC

```

20

【 0 3 9 6 】

## 【化 2 6】

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC  
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC  
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG  
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC  
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC  
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCCTG  
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC  
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG  
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC  
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG  
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC  
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCCGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC  
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC  
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC  
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG  
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT  
 1621 CTGATTGCCG TGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC  
 1681 AAGGACCAGC TGTCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACAGCGGCGG CAGCGCCGGC  
 1741 TCTGGCCACC ACCACCATCA CCACTGAAG (配列番号 24)

10

20

## (完全プレHIS)

下記のポリペプチドは、RSVFポリペプチドのC末端に結合されたGCN4(下線)の三量体化ドメインを有する完全長のRSVFポリペプチド、続いてヘキサ-ヒスチジンタグを含む。

30

【0397】

## 【化 2 7】

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN  
 121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS  
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNKQ SCSISNIETV IBFQQKNNRL LEITREFSVN  
 241 AGVTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKBEVLAYV  
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP

40

【0398】

## 【化 2 8】

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIIVILLS  
 541 LIAVGLLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGRM KQIEDKIEEI LSKIIYHIENE  
 601 IARIKKLIGE SGGASGSGHH HHHH (配列番号 25)

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

【0399】

50

## 【化 2 9】

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC  
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG  
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG  
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG  
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC  
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC  
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC  
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG  
 481 GAAGCGGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC  
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC  
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG  
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC  
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG  
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC  
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG  
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC  
 961 CTGTGACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCCT CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC  
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGACCCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC  
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC  
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG  
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT  
 1621 CTGATTGCCG TGGCCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC  
 1681 AAGGACCAGC TGTCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCCGGATG  
 1741 AAGCAGATCG AGGACAAGAT CGAGGAAATC CTGAGCAAGA TCTACCACAT CGAGAACGAG  
 1801 ATCGCCCGGA TCAAGAAGCT GATCGGCGAA AGCGGCGGCT CTGCCGGAAG CGGCCACCAC  
 1861 CACCATCACC ACTGAAG (配列番号 26)

10

20

30

(完全プレHIS 2)

下記のポリペプチドは、RSV FポリペプチドのC末端に結合されたGCN4(下線)の三量体化ドメインを有する完全長のRSV Fポリペプチド、続いてヘキサ-ヒスチジンタグを含む。

【0400】

## 【化 3 0】

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN  
 121 NAKKTNVTLN KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS  
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPVINKQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN  
 241 AGVTPPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEVLAYV  
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLTYVYN KQEGKSLYVK GBPIINFYDP  
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIIVILLS  
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGSG RMKQIEDKIE EILSKIYHIE  
 601 NEIARIKKLI GESGGSAGSG HHHHHH (配列番号 27)

10

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

## 【 0 4 0 1】

## 【化 3 1】

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC  
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG  
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG  
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG  
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC  
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC  
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC  
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG  
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC  
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC  
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG  
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC  
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG  
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGACGATC  
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG  
 901 GTGACGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC  
 961 CTGTGACCCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGIGAAC

20

30

## 【 0 4 0 2】

## 【化 3 2】

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC  
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC  
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG  
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT  
 1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC  
 1681 AAGGACCAGC TGTCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGACAGCAG CGGCAGCGGC  
 1741 CGGATGAAGC AGATCGAGGA CAAGATCGAG GAAATCCTGA GCAAGATCTA CCACATCGAG  
 1801 AACGAGATCG CCCGGATCAA GAAGCTGATC GCGGAAAGCG GCGGCTCTGC CGGAAGCGGC  
 1861 CACCACCACC ATCACCCTG AAG (配列番号 28)

10

## (エクトH I S)

下記のポリペプチドは、R S V Fポリペプチドのエクトドメイン、続いてヘキサ - ヒスチジンタグを含む。

## 【0 4 0 3】

## 【化 3 3】

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EPHYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN  
 121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVKNKIKSA LLSTNKAVVS  
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPFVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN  
 241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKBEVLAYV  
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP  
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNSGG SAGSGHHHHH H  
 (配列番号 29)

20

30

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

## 【0 4 0 4】

## 【化 3 4】

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC  
 61 TGCTTCGCCA GCGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG  
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG  
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG  
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC  
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC  
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC  
 421 CTGCTGGGCG TGGGCGAGCG CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG

40

## 【0 4 0 5】

## 【化 3 5】

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC  
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC  
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG  
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC  
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG  
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC  
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG  
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC  
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC  
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC  
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC  
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TAGCGGCGGC  
 1561 AGCGCCGGCT CTGGCCACCA CCACCATCAC CACTGAAG (配列番号 30)

10

20

## (エクトプレHIS)

下記のポリペプチドは、RSVタンパク質のTMドメインが存在していた(a . a . 517から始まる)箇所の上流のRSV Fポリペプチド内に挿入されたGCN4(下線)の三量体化ドメインを有するRSV Fポリペプチドのエクトドメイン、続いてヘキサヒスチジンタグを含む。

【0406】

## 【化 3 6】

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EPHYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN  
 121 NAKKTNVTLN KKRKRFLGF LLGVSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS  
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IBFQQKNRL LEITREFSVN  
 241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKBEVLAYV  
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP  
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNDKI EEILSKIYHI ENEIARIKKL  
 541 IGESGGSAGS GHHHHHH (配列番号 31)

30

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

40

【0407】

## 【化 3 7】

1 ATGGA<sup>ACTGC</sup> TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC  
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG  
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG  
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG  
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC  
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC  
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC  
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG  
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC  
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC  
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG  
 661 ATCGAGTTC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC  
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG  
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC  
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG  
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC  
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC  
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC  
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC  
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGACAAGATC  
 1561 GAGGAAATCC TGAGCAAGAT CTACCACATC GAGAACGAGA TCGCCCGGAT CAAGAAGCTG  
 1621 ATCGGCGAAA GCGGCGGCTC TGCCGGAAGC GGCCACCACC ACCATCACCA CTGAAG

10

20

30

(配列番号 32)

## (完全プレハ H I S)

下記のポリペプチドは、RSV FポリペプチドのC末端に結合されたインフルエンザ血球凝集素ポリペプチド(下線)の融合後三量体化ドメインを有する完全長のRSV Fポリペプチド、続いてヘキサ - ヒスチジンタグを含む。

【0408】

## 【化 3 8】

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQ<sup>NITE</sup> EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE  
 61 L<sup>SNIKENKCN</sup> GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN  
 121 NAKKTNVTL<sup>S</sup> KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS  
 181 L<sup>SN</sup>GVSVLTS KVLDLK<sup>NYID</sup> KQLLPIV<sup>NKQ</sup> SCSISNIETV IEFQ<sup>QKNR</sup>L LEITREFSVN

40

【0409】



## 【化 3 9】

241 AGVTTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV  
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP  
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS  
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGNE KFHQIEKEFS EVEGRIQDLE  
 601 KSGGSAGSGH HHHHH (配列番号 33)

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

10

## 【0 4 1 0】

## 【化 4 0】

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC  
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG  
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG  
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG  
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC  
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC  
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC  
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG  
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC  
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC  
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG  
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC  
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG  
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC  
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG  
 901 GTGCAGCTGC CCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC  
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC  
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGACCCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCA TCATCAACTT CTACGACCCC  
 1441 CTGGTGTTC CACGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC  
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG  
 1561 AGCACCAACA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATGTGAT CCTGCTGTCT  
 1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC  
 1681 AAGGACCAGC TGTCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCAATGAG

20

30

40

## 【0 4 1 1】

## 【化 4 1】

1741 AAGTTCACC AGATCGAGAA AGAATTCAGC GAGGTGGAGG GCCGGATCCA GGACCTGGAA  
 1801 AAGAGCGGCG GCTCTGCCGG AAGCGGCCAC CACCACCATC ACCACTGAAG  
 (配列番号 34)

(エクトプレハ H I S)

下記のポリペプチドは、RSVタンパク質のTMドメインが存在していた(a . a . 5

50

17から始まる)箇所の上流のRSV Fポリペプチド内に挿入されたインフルエンザ血球凝集素ポリペプチド(下線)の融合後三量体化ドメインを有するRSV Fポリペプチドのエクトドメイン、続いてヘキサ - ヒスチジンタグを含む。

【0412】

【化42】

```

1  MELLILKANA  ITTILTAVTF  CFASGQNITE  EFYQSTCSAV  SKGYLSALRT  GWYTSVITIE
61  LSNIKENKCN  GTDAKVKLIK  QELDKYKNAV  TELQLLMQST  PATNNRARRE  LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN  KKRKRFLGF  LLGVGSAIAS  GVAVSKVLHL  EGEVNKIKSA  LLSTNKAVVS
181  LSNGVSVLTS  KVLDLKNIYD  KQLLPIVKNQ  SCSISNIETV  IEFQQKNRNL  LEITREFSVN
241  AGVTTPVSTY  MLTNSSELLS  LINDMPITNDQ  KKLMSNNVQI  VRQQSYSIMS  IIKEEVLAYV
301  VQLPLYGVID  TPCWKLHTSP  LCTTNTKEGS  NICLTRTRDRG  WYCDNAGSVS  FFPQAETCKV
361  QSNRVFCDTM  NSLTLPSEVN  LCNVDIFNPK  YDCKIMTSKT  DVSSSVITSL  GAIVSCYGKT
421  KCTASNKNRG  IIKTFPNGCD  YVSNKGVDTV  SVGNTRYVYV  KQEGKSLYVK  GEPIINFYDP
481  LVFPSDEFDA  SISQVNEKIN  QSLAFIRKSD  ELLHNVNEKF  HQIEKEFSEV  EGRIQDLEKS
541  GGSAGSGHHH  HHH (配列番号 35)

```

10

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

【0413】

【化43】

```

1  ATGGAAGTGC  TGATCTGAA  GGCCAACGCC  ATCACCACCA  TCCTGACCGC  CGTGACCTTC
61  TGCTTCGCCA  GCGGCCAGAA  CATCACCGAG  GAATCTTACC  AGAGCACCTG  CAGCGCCGTG
121  AGCAAGGGCT  ACCTGAGCGC  CCTGCGGACC  GGCTGGTACA  CCAGCGTGAT  CACCATCGAG
181  CTGTCCAACA  TCAAAGAAAA  CAAGTGCAAC  GGCACCGACG  CCAAGGTGAA  ACTGATCAAG
241  CAGGAAGTGG  ACAAGTACAA  GAACGCCGTG  ACCGAGCTGC  AGCTGCTGAT  GCAGAGCACC
301  CCCGCCACCA  ACAACCGGGC  CAGAAGAGAG  CTGCCCGGTT  TCATGAACTA  CACCCTGAAC
361  AACGCCAAGA  AAACCAACGT  GACCCTGAGC  AAGAAGCGGA  AGCGGCGGTT  CCTGGGCTTC
421  CTGCTGGGCG  TGGGCAGCGC  CATCGCCAGC  GGGGTGGCCG  TGTCCAAGGT  GCTGCACCTG
481  GAAGGCGAGG  TGAACAAGAT  CAAGTCCGCC  CTGCTGTCCA  CCAACAAGGC  CGTGGTGTCC
541  CTGAGCAACG  GCGTGAGCGT  GCTGACCAGC  AAGGTGCTGG  ATCTGAAGAA  CTACATCGAC
601  AAGCAGCTGC  TGCCCATCGT  GAACAAGCAG  AGCTGCAGCA  TCAGCAACAT  CGAGACCGTG
661  ATCGAGTTCC  AGCAGAAGAA  CAACCGGCTG  CTGAAATCA  CCCGGGAGTT  CAGCGTGAAC
721  GCCGGCGTGA  CCACCCCGT  GAGCACCTAC  ATGCTGACCA  ACAGCGAGCT  GCTGTCCCTG
781  ATCAATGACA  TGCCCATCAC  CAACGACCAG  AAAAAAGCTG  TGAGCAACAA  CGTGCAGATC
841  GTGCGGCAGC  AGAGCTACTC  CATCATGAGC  ATCATCAAAG  AAGAGGTGCT  GGCCTACGTG
901  GTGCAGCTGC  CCCTGTACGG  CGTGATCGAC  ACCCCCTGCT  GGAAGCTGCA  CACCAGCCCC

```

20

30

【0414】

## 【化 4 4】

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTCT CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC  
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC  
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC  
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGAGAAGTTC  
 1561 CACCAGATCG AGAAAGAATT CAGCGAGGTG GAGGGCCGGA TCCAGGACCT GGAAAAGAGC  
 1621 GCGGCTCTG CCGGAAGCGG CCACCACCAC CATCACCCT GAAG (配列番号 36)

10

## (完全 HRB HIS)

下記のポリペプチドは、HRBドメインを欠失させた完全長のRSVFポリペプチド、続いてヘキサ - ヒスチジンタグを含む。

## 【0 4 1 5】

## 【化 4 5】

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EPHYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRR LPRFMNYTLN  
 121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS  
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN  
 241 AGVTFPVSTY MLTNSLLESL INDMPTINDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKBEVLAYV  
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLYVYN KQEGKSLYVK GEPNIMITTI  
 481 IIVIIVILLS LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNMGGSHH HHHH

(配列番号 37)

20

30

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

## 【0 4 1 6】

## 【化 4 6】

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC  
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCAGG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG  
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG  
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG  
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC  
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC  
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC  
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG  
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC  
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC  
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG

40

## 【0 4 1 7】

## 【化 4 7】

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC  
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG  
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCGAGATC  
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG  
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC  
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCCGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC  
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGACCCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA ATATCATGAT CACCACAATC  
 1441 ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC  
 1501 AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC  
 1561 GCCTTCTCCA ACATGGGGGG TTCTCATCAT CATCATCATC ATTGAAG

(配列番号 38)

10

(エクト)

下記のポリペプチドは、R S V Fポリペプチドのエクトドメインのみを含む。

20

## 【0 4 1 8】

## 【化 4 8】

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN  
 121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS  
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPIVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN  
 241 AGVTPPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV  
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP  
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTN (配列番号 39)

30

下記の核酸配列は、前述のポリペプチド配列の最適化されたコード配列である。

## 【0 4 1 9】

## 【化 4 9】

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC  
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG  
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG  
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG  
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC  
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC

40

## 【0 4 2 0】

## 【化 5 0】

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC  
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG  
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC  
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC  
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG  
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC  
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG  
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC  
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG  
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC  
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCCGGGC  
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG  
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC  
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC  
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC  
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC  
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT  
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC  
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC  
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG  
 1561 AGCACCACCA ATTGAAG (配列番号 40)

10

20

## 【 0 4 2 1】

## 【化 5 1】

RSV F 完全長

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGF  
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ  
 SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
 KCTASNKNGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPDEFDA  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNIMITTTIIIVII VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLS  
 KDQLSGINNI AFSN (配列番号 41)

30

RSV F 切断 理想的なエンテロキナーゼ

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGF  
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ  
 SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS

40

## 【 0 4 2 2】

## 【化 5 2】

FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQBGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA  
SISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGDDDDDKGSGSGIMITTI I I V I I V I L L S L I A V  
GLL LYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (配列番号 42)

RSV F 切断 理想的なトロンピン

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITBEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTD AKV KLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKRKR RFLGF  
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVL DLKNYIDKQLLP I VNKQ  
SCSISNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYV VQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQBGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA  
SISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGLVPRGSGSGIMITTI I I V I I V I L L S L I A V G L  
L LYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (配列番号 43)

10

RSV F 切断 理想的な第 $\alpha$ 因子

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITBEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTD AKV KLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKRKR RFLGF  
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVL DLKNYIDKQLLP I VNKQ  
SCSISNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYV VQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQBGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA  
SISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGIEGRGSGSGIMITTI I I V I I V I L L S L I A V G L  
L LYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (配列番号 44)

20

RSV F furx 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITBEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTD AKV KLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SQNQNF LGF  
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVL DLKNYIDKQLLP I VNKQ  
SCSISNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYV VQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQBGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA  
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (配列番号 45)

30

RSV F furx R113Q, K123N, K124N 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITBEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTD AKV KLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAKKTNVTL SQNQNF LGF  
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVL DLKNYIDKQLLP I VNKQ

40

## 【 0 4 2 3 】

【化 5 3】

SCSISNIETVIEFQQKNNRLLBITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDAS  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 46)

RSV F furx R113Q, K123Q, K124Q 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVLIKQELDKYKNAVTEBLLQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSONQNQNFLGF  
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVKQ  
 SCSISNIETVIEFQQKNNRLLBITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDAS  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 93)

10

RSV F delP21 furx 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVLIKQELDKYKNAVTEBLLQLLMQSTPATNNQAQ-----  
 QNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYID  
 KQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLBITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQ  
 KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRG  
 WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSL  
 GAIIVSCYGKTCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPL  
 LVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号

20

47) (符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

RSV F delP23 furx 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVLIKQELDKYKNAVTEBLLQLLMQSTPATNNQAQ-----  
 QNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ  
 LLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLBITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKK  
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA  
 IVSCYGKTCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV  
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 48)

30

(符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

【 0 4 2 4 】

40

【化54】

RSV F delP23 furdel 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----  
 QQRFLLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQ  
 LLPIVKNQSCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKK  
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA  
 IVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV  
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 49)  
 (符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

10

RSV F furmt 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARKELEPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKRRKKKFLGF  
 LLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPIVKNQ  
 SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGK  
 TCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSPDEFDA  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 50)

20

RSV F furdel 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSK---  
 RFLGFLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPI  
 IVKNQSCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMS  
 NNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDN  
 AGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVS  
 CYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSP  
 DEFDAISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 51)  
 (符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

30

RSV F 第Xa因子切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNIEGRELEPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKIEGRFLGF  
 LLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPIVKNQ  
 SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS

40

【0425】



【化55】

FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLNCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGIKKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA  
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (配列番号 52)

RSV F 短リンカーフォルドン HIS

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRFLGF  
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ  
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS  
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLNCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGIKKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA  
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSAGSG  
HHHHH (配列番号 53)

10

RSV F 長リンカーフォルドン HIS

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRFLGF  
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ  
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS  
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLNCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGIKKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA  
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNNKNDKSGSYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLG  
GSAGSGHHHHH (配列番号 54)

20

RSV\_F\_エクト\_プレ\_his

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRFLGF  
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ  
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS  
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLNCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGIKKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA  
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH  
(配列番号 55)

30

ECTO PRE HA HIS

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRFLGF

40

【0426】

【化 5 6】

LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ  
 SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDAS  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKSGGSAGSGHHHHH (

配列番号 56)

RSV F ECTO Furx GCN HIS

10

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNANNTNVTLSONQNQNFLGF  
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ  
 SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDAS  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH

(配列番号 57)

RSV F ECTO delp21 GCN HIS

20

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN-----  
 QNQNQNFLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYID  
 KQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQ  
 KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRG  
 WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSL  
 GAIIVSCYGKTCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYD  
 PLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVN

DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH (配列番号 58)

(符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

30

RSV F ECTO delp23 Furx GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKIKQRIIDKYKNAVTRIQIIMQSTPATNNQAQN-----  
 QNQNQNFLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ  
 LLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK  
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLG  
 AIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV  
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVN

40

【 0 4 2 7 】

【化57】

DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH (配列番号 59)

(符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

RSV F ECTO del p23 Furdel GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTD AKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----
QQQRFLGFLGVSATASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQ
LLPIV NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKK
LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWY
CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
IVSCYGKTKCTASNKNGRIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV
FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN

10

DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH (配列番号 60)

(符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

RSV F 完全長 Furx

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTD AKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNANNTNVTL SQNQNF LFGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPIV NKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKT
KCTASNKNGRIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV FPSDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN

20

AGKSTTNIMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (配列番号 61)

RSV F 完全長 del p21

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTD AKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN-----
QNQNQNFLGFLGVSATASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYID
KQLLPIV NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQ
KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRG
WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSL
GAI VSCYGKTKCTASNKNGRIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDP
LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN

30

AGKSTTNIMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (配列番号 62) (符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

RSV F 完全長 p23 Furx GCN HIS

40

【0428】

【化58】

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TBEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQN-----  
 QNQNFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKKNYIDKQ  
 LLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKK  
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA  
 IVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV  
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVN

AGKSTTNIMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGLLTYCKARSTPVTLSKQDLSGINNIAFSN (配列番号

63) (符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

10

RSV F 完全長 p23 Furdel GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TBEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARQ-----  
 QQQRFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKKNYIDKQ  
 LLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKK  
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA  
 IVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV  
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVN

AGKSTTNIMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGLLTYCKARSTPVTLSKQDLSGINNIAFSN (配列番号

64) (符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

20

RSV F N末端フリン Furx 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TBEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTL SKKRKRFLGF  
 LLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKKNYIDKQLLPVIVNKQ  
 SCISISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTK  
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDA  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 65)

30

RSV F C末端フリン Furx 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TBEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARELPQFMNYTLNNAQQTNVTL SQNQNFLGF  
 LLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKKNYIDKQLLPVIVNKQ  
 SCISISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI

【0429】

40

【化 5 9】

VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA  
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (配列番号 66)

RSV F 融合欠失 1 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRSAIA  
SGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIET  
VIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQSYSIM  
SIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCK  
VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASNKNR  
GI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKI  
NQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (配列番号 67)

10

RSV F 融合欠失 2 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRGVGS  
AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISN  
IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSY  
SIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAE  
TCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASN  
KNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVN  
EKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (配列番号 68)

20

RSV F Furx 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNTVLSQNQNQNFLGF  
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQ  
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA  
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (配列番号 69)

30

RSV F Furx 切断型

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNTVLSQNQNQNFLGF  
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQ  
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI

40

【 0 4 3 0 】

【化60】

VRQQSYSIMSIIKBEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDFDA  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN (配列番号 70)

RSV F delP23 furdel 切断型 HIS なし (CHO細胞のため)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----  
 QQQRFLGFLLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ  
 LLPIVNKQSCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKK  
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKBEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA  
 IVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV  
 FPSDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN (配列番号 71)

10

(符号「-」は、この位置のアミノ酸が欠失していることを示す)

RSV F (Wt) 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKRKRFLGF  
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQ  
 SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKBEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDFDA  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 84)

20

RSV F old furx 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELQRFMNYTLNANNNTNVTL SQNQNFLGF  
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQ  
 SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI  
 VRQQSYSIMSIIKBEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDFDA  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 88)

30

RSV F Furx R113Q K123N K124N 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTL SQNQNFLGF  
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQ

40

【0431】

【化 6 1】

SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
 VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 89)

RSV F N末端フリン切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVELQLLMQSTPATNNRREL P QFMNYTLNNAQQTNVTL SQNQNF L G F  
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ  
 SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
 VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 85)

10

RSV F delP21 furdel 切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVELQLLMQSTPATNNRARQ-----  
 QNQQRFLGFLLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYID  
 KQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQ  
 KKLMSNNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRG  
 WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSL  
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDP  
 LVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号  
 86)

20

RSV F C末端フリン切断型 HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN  
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTL SKKRKR RFLGF  
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ  
 SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI  
 VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT  
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA  
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (配列番号 87)

30

( 実施例 2 - R S V F 構築物の発現および精製 )

膜貫通ドメインと細胞質テール領域が欠損しており、野生型フリン切断部位を有するか、またはフリン切断部位にロックアウト変異を有するかのいずれかであり、融合前安定化変異を有するか、または有しないかのいずれかである、RSV F ECTOおよび切断型の構築物を、pFastBacバキュロウイルス発現ベクター(Invitrogen)にクローニングした。これらの構築物のいくつかは、C末端フレキシブルリンカー、続いて、キレート精製で使用するHis6-タグ配列を含むものである。高力価バキュロウイルスストックの作製物はSf9昆虫細胞において継代した。Sf9、Tn5またはHigh Fiveいずれかの昆虫細胞を必要とされるバキュロウイルスに感染させることによりタンパク質を発現させ、感染の2~3日後に培地の上清を収集し、抗RSV Fまたは抗6HIS抗体を用いてウエスタンブロットでモニタリングした。

40

【0432】

昆虫細胞培地中に存在するフェリチンの有害効果によってキレート樹脂が損なわれることを排除するための2つの一般的なストラテジーのうちの一つにより、大規模発現培地を

50

濃縮/精製した。第1のアプローチは、およそ10~20リットルの昆虫発現培地をおよそ300mlまで、GE Healthcare HoloTubeファイバー濃縮カラムを用いて濃縮することであった。この濃縮混合物に硫酸銅を終濃度500 $\mu$ Mまで添加し、得られた溶液を5mlのHiTrapキレートカラムにロードした。次いで、結合されたHIS-タグ化タンパク質をカラムから、25mM Tris (pH7.5)、300mM NaClおよびイミダゾール勾配で溶出させた。

#### 【0433】

第2の精製戦略では、CuCl<sub>2</sub>を培地の上清に終濃度500 $\mu$ Mまで添加した。1リットルの各培地に、4ミリリットルのキレート樹脂 (Chelating Resin, BioRad) を添加し、スラリーを、セ氏4度で少なくとも30分間振盪させ、樹脂と培地を重力カラムによって分離した。樹脂を、カラムの10倍容積の平衡化バッファー (25mM Tris (pH7.5), 300mM NaCl) で洗浄し、Fタンパク質を、カラムの10倍容積の溶出バッファー (250mMのイミダゾールを含む平衡化バッファー) で溶出させた。溶出物を25mM Tris バッファー (pH7.5) に対して透析し、得られた溶液を、NiSO<sub>4</sub>を充填した5mlのHiTrapキレートカラムにロードし、25mM Tris (pH7.5)、300mM NaClおよびイミダゾール勾配で溶出させた。

10

#### 【0434】

イミダゾール勾配での溶出物は、いずれの場合も、抗6HISウエスタンおよびクマシーゲルを用いて評価した。純粋な構築物を含む画分を収集し、種々のバッファー/生理食塩水溶液に対して透析し、その後の分析のために、Millipore Centriprep Concentrators および/またはVivaspin濃縮ユニットを用いて濃縮した。また、本発明者らは、単分散 (monodisperced) RSV三量体がロゼットからさらに精製され得るサイズ排除精製プロトコルを開発した (後述)。

20

#### 【0435】

(RSV Fタンパク質のSEC分析)

融合前コンフォメーションで安定化される他のパラミクソウイルス融合タンパク質の文献に記載された特徴は、融合ペプチドが露出するように切断された場合であっても、融合後コンフォメーションで観察されるようなロゼットを形成しないことである。単純なサイズ排除クロマトグラフィー分析により、タンパク質の同定、およびタンパク質がロゼットを形成しているかどうかの判定が可能である。効率的な精製工程としても機能する2つの方法、HPLC-SECとFPLC-SECを開発した。

30

#### 【0436】

HPLC-SECは、BioRad SECカラム (18mm) を、25mM Tris (pH7.5)、300mM NaCl移動相とともに用いて行なった。BioRad HPLC-SEC標準物を用いて系を校正すると、本発明者らは、RSVロゼット (切断された融合後コンフォメーションを示す) は分析のカラムのポイドボリューム中に溶出されるが、RSV単分散三量体 (その後のEM分析により三量体と推定) は、およそ100kDaの見かけ分子量で溶出されることを見出した。

40

#### 【0437】

FPLC-SECは、16/60 Superdex 200カラムを、25mM Tris (pH7.5)、300mM NaCl移動相とともに用いてGE Healthcare FPLCにおいて行なった。GE Healthcare高分子量標準物を用いて系を校正すると、本発明者らは、RSVロゼットは分析のカラムのポイドボリューム中に溶出されるが、RSV単分散三量体は、およそ100kDaの見かけ分子量で溶出されることを見出した。

#### 【0438】

(RSV Fタンパク質の電子顕微鏡検査 (EM))

およそ50マイクログラム/mlのRSV F構築物のタンパク質溶液を、グロー放電炭素コートグリッド上に吸収させ、2%リンタングステン酸ナトリウム (pH7.0) ま

50



たは0.75%ギ酸ウラニル(非定量低pH)でネガティブ染色した。グリッドをTechnai SpiritまたはJOEL 1230透過電子顕微鏡にて、必要とされる解像度に応じて、80~120kVで20,000~150,000の倍率で操作して観察した。

【0439】

【表2】

表 2

| 構築物  | EMによる確認                               |
|--|---------------------------------------|
| RSV F ECTO HIS   | 主に ロゼット                               |
| RSV F Furdel ECTO (切断)   | 主に ロゼット                               |
| RSV F Delp23 Furdel 切断型<br>(非切断)                               | 三量体が観察される                             |
| RSV F 融合ペプチド欠失 1<br>切断型(非切断)                                   | 三量体                                   |
| RSV F Delp23 Furdel 切断型<br>(精製後、トリプシンによって切断)                   | 主に ロゼットで、一部が三量体                       |
| RSV F Delp23 Furdel 切断型<br>(ナノ脂質ディスクの存在下で、精製後、<br>トリプシンによって切断) | 非対称のロゼットであり、ロゼットの中心部<br>には明白なナノ脂質ディスク |

10

20

(実施例3 - 融合前および融合後RSV Fの検出)

RSV Fポリペプチドに対する修飾または付加分子によって融合後コンフォメーションが不利になるかどうかをアッセイするためにRSV Fタンパク質のコンフォメーションを調べるには、いくつかの方法が利用可能である。例としては、リポソーム会合、コンフォメーション特異的モノクローナル抗体(例えば、FACS、ELISAで使用されるものなど)、電子顕微鏡検査、コンフォメーション間のプロテアーゼ感度の差、ゲル濾過クロマトグラフィー、分析用超遠心分離、動的光散乱、重水素交換NMR実験、質量分析、円偏光二色性分光法、等温滴定型熱量測定、トリプトファン分光法、およびX線結晶学が挙げられる。

30

【0440】

(リポソーム会合)

リポソーム会合は、RSV Fタンパク質のコンフォメーションをアッセイするために使用され得る。RSV Fタンパク質の可溶性形態は、融合前コンフォメーションではリポソームと会合しないが、融合後コンフォメーションはリポソームと会合する。

【0441】

リポソームは、以下のようにして調製され得る：クロロホルム中、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、およびコレステロール(Avanti Polar Lipidsから入手可能)を8:2:5のモル比で混合する。クロロホルムをアルゴン下で蒸発させる。脂質フィルムが形成され、これを一晚真空乾燥させ、PBS中に総脂質40mMで再懸濁させる。5回の凍結-解凍サイクル後、脂質をボルテックスし、ミニエクストルーダー(Avanti Polar Lipidsから入手可能)を使用することにより、2つの100µmフィルターから21回押し出す。

40

【0442】

リポソームが調製されたら、リポソーム会合アッセイが行なわれ得る。試験対象の各試料について、試験する2µgのRSV Fポリペプチドを25ミリ単位のトリプシン(W

50

orthington Biochemicalから入手可能)で、100mMリン酸バッファー(pH7.1)中にて25で30分間切断する。切断後、40pgのダイズトリプシンインヒビター(Worthington Biochemicalから入手可能)を各試料に添加し、反応を終了させる。試料を60で30分間前処理し、これにより単離された天然RSFタンパク質において融合前形態から融合後形態へのコンフォメーションのシフトを誘導する。リポソーム(40μl/試料)とPBSを添加し(80μlの終容積)、試料を60で30分間インキュベートする。スクロースを50%の終濃度(500μlの終容積)まで添加する。試料に、各々500μlの40%スクロース、25%スクロースおよびPBSを重層し、TLS55ローターにて、49,000rpmで3時間、25にてスピンさせる。画分(500μl)を勾配の上部から収集する。タンパク質を0.5%Triton X-100中で可溶化させ、12.5%vol/volのトリクロ酢酸を使用することにより沈殿させる。ポリペプチドをSDS/PAGEによって分離し、PVD膜に移す。プロットを抗RSV Fモノクローナル抗体で調べる。

10

## 【0443】

(電子顕微鏡検査)

電子顕微鏡検査を使用し、RSV Fポリペプチドのコンフォメーションの分布をアッセイした。融合前形態のRSV Fポリペプチドは、長さが約12nmの「軸付きのボール」形状を有する。対照的に、融合後形態のRSV Fポリペプチドは、長さが約16nmの「ゴルフのティー」形状を有する。また、「ゴルフのティー」の細い末端における融合ペプチドは、凝集してロゼット構造を形成する。このように、電子顕微鏡検査は、形状が容易に識別可能なため、RSV Fポリペプチドの試料におけるコンフォメーションの分布をアッセイするために使用され得る。

20

## 【0444】

(実施例4 RSV Fエクトドメインの三量体およびロゼット)

膜貫通ドメインと細胞質テール領域が欠損しており、野生型フリン切断部位を有するか、あるいはフリン切断部位にノックアウト変異および/または融合ペプチドの変異(mutations mutations)を有するかのいずれかである、ポリペプチドをコードするRSV Fタンパク質のエクトドメイン構築物を、pFastBacバキュロウイルス発現ベクター(Invitrogen)にクローニングした。これらの構築物のいくつかは、C末端フレキシブルリンカー、続いて、キレート精製で使用するHis<sub>6</sub>-タグ配列を含むものである。高力価バキュロウイルスストックの作製はSf9昆虫細胞での継代によって達成した。Sf9、Tn5またはHigh Fiveいずれかの昆虫細胞を必要とされるバキュロウイルスに感染させることによりタンパク質を発現させ、感染の2~3日後に馴化培地の上清を収集した。タンパク質の産生を、抗RSV Fまたは抗HIS<sub>6</sub>抗体を用いてウエスタンプロットでモニタリングした。

30

## 【0445】

昆虫細胞培地中に存在するフェリチン(これは、キレート樹脂を損ない得る)の有害効果を排除するための2つの一般的なストラテジーのうちの1つを用いて、大規模発現培地を濃縮/精製した。第1のアプローチは、およそ10~20リットルの昆虫発現培地をおよそ300mlまで、GE Healthcare Hilo tubeファイバー濃縮カラムを用いて濃縮することであった。この濃縮混合物に硫酸銅を終濃度500μMまで添加し、得られた溶液を5mlのHiTrapキレートカラムにロードした。次いで、結合されたHIS-タグ化タンパク質をカラムから、25mM Tris(pH7.5)、300mM NaClおよびイミダゾール勾配で溶出させた。

40

## 【0446】

第2の精製ストラテジーでは、CuCl<sub>2</sub>を培地の上清に終濃度500μMまで添加した。1リットルの各培地に、およそ4~10ミリリットルのキレート樹脂(Cheating Resin, BioRad)を添加し、スラリーを、セ氏4度で少なくとも30分間振盪させ、樹脂と培地を重力カラムによって分離した。樹脂を、カラムのおよそ10

50

倍容積の平衡化バッファー（25 mM Tris (pH 7.5), 300 mM NaCl）で洗浄し、Fタンパク質のエクトドメインを、カラムのおよそ10倍容積の溶出バッファー（250 mMのイミダゾールを含む平衡化バッファー）で溶出させた。溶出物を25 mM Tris バッファー（pH 7.5）に対して透析し、得られた溶液を、NiSO<sub>4</sub>を充填した5 ml容Hitrapキレートカラムにロードした。結合されたタンパク質を、25 mM Tris (pH 7.5)、300 mM NaClおよびイミダゾール勾配で溶出させた。

【0447】

イミダゾール勾配での溶出物は、いずれの場合も、抗HIS<sub>6</sub>ウエスタンブロットおよび/またはクマシー染色SDS-PAGEゲルを用いて評価した。純粋な構築物を含む画分を収集し、種々のバッファー/生理食塩水溶液に対して透析し、その後の分析のために、Millipore Centriprep濃縮器および/またはVivaspin濃縮ユニットを用いて濃縮した。一部の場合では、単量体、三量体またはロゼットを、サイズ排除クロマトグラフィーを用いてさらに精製した。

10

【0448】

（RSV FエクトドメインのSEC分析および精製）

サイズ排除クロマトグラフィーを用いてRSV Fタンパク質のエクトドメインの単量体、三量体およびロゼットを精製し、分析した。また、この方法は、非切断型RSV Fタンパク質のエクトドメインが、宿主細胞または培地に由来する脂質/リボタンパク質夾雑物から精製されることを可能にした。効率的な精製工程としても機能し得る2つの方法、HPLC-SECとFPLC-SECを開発した。

20

【0449】

HPLC-SECは、Biorad SECカラム（18 mm）を、25 mM Tris (pH 7.5)、300 mM NaCl移動相とともに用いて行なった。Biorad HPLC-SEC標準物を用いて系を較正すると、本発明者らは、RSVロゼット（切断された融合後コンフォメーションを示す）は分析のカラムのポイドボリューム中に溶出されるが、RSV F単量体は、およそ75~85 kDaの見かけ分子量で溶出されることを見い出した。

【0450】

FPLC-SECは、16/60 Superdex 200カラムを、25 mM Tris (pH 7.5)、300 mM NaCl移動相とともに用いてGE Healthcare FPLCにおいて行なった。GE Healthcare高分子量標準物を用いて系を較正すると、本発明者らは、RSVロゼットは分析のカラムのポイドボリューム中に溶出されるが、RSV単分散三量体は、およそ140~160 kDaの見かけ分子量で溶出され、RSV F単量体は、およそ75~85 kDaの見かけ分子量で溶出されることを見い出した。

30

【0451】

精製には、FPLC-SEC法を使用し、1 mlの画分を収集した。

【0452】

（FurdelまたはDelp23 Furdel構築物のトリプシン切断による融合後ロゼットの形成）

40

一般に、Delp23 Furdel単量体のトリプシン消化は、重量で1:1000のトリプシン:RSV Fまたは1 mgのRSV F抗原に対して10~15 BAE E単位のトリプシンを用いて行なう。典型的な反応において、ウシ血漿由来のトリプシン（Sigma Aldrich, T8802:10,000~15,000 BAE E単位/mgのトリプシン）を25 mM Tris (pH 7.5), 300 mM NaCl中で1 mg/ml濃度に希釈した。RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの1 mg/ml溶液（25 mM Tris (pH 7.5), 300 mM NaCl中で希釈）を、1マイクロリットルのトリプシン溶液（最終質量比が0.001:1のトリプシン:RSV F、または各1ミリグラムのRSV Fに対しておよそ10~15 BAE E単

50

位のトリプシン)で、37にて1時間処理した。典型的には、切断反応の進行はSDS-PAGEゲルによってモニタリングした。トリプシンインヒビターを用いて切断反応を停止させた。切断されたRSV Fタンパク質を、サイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。

#### 【0453】

場合によっては、1:100容積の固定化トリプシンインヒビター(Sigma)または1マイクロリットルの1mMダイズトリプシンインヒビターを切断溶液に添加し、混合物を静かに振盪しながら室温でおよそ15~30分間インキュベートし、トリプシン反応を停止させた。マイクロ遠心分離機カラムを用いてインヒビター樹脂をタンパク質溶液から分離した。得られた溶液をSEC精製によって精製した。

10

#### 【0454】

(RSV Fタンパク質の電子顕微鏡検査(EM))

RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチド(およそ50マイクログラム/ml)を、グロー放電炭素コートグリッド上に吸収させ、2%リンタングステン酸ナトリウム(pH7.0)または0.75%ギ酸ウラニル(非定量低pH)でネガティブ染色した。グリッドをTechnai SpiritまたはJOEL 1230透過電子顕微鏡にて、必要とされる解像度に応じて、80~120kVで20,000~150,000の倍率で操作して観察した。

#### 【0455】

(リン脂質アッセイ)

このアッセイは、Wako Pure Chemical Industries, Ltd.のアッセイであるリン脂質Cコリンオキシダーゼ-DAOS法(カタログ番号433-36201)に基づいたものである。このアッセイプロトコルは、単に、該製造業者の一般的なプロトコルと比べて、アッセイで使用する物質の量が少なくなるように、および反応における試料の希釈が低減されるように変形したものである。RSV F試料の脂質含有量を測定するため、一瓶の着色試薬を一瓶のバッファーに溶解させることにより、着色試薬を作製する(着色試薬は4で1週間安定である)。300mg/dL(3mg/ml)のリン脂質標準物を蒸留水で1.5、1.0、0.75、0.5および0.25mg/mlに希釈する。標準物、水ブランクおよび試料反応物の各々について、マイクロ遠心分離機のチューブに、10μlの着色試薬と2μlの標準物、蒸留水(0mg/ml標準物)または試料のいずれかを添加する。反応物を短時間で遠心分離(centrifuge)して適正な混合を確実にし、チューブを37で15分間インキュベートする。各標準点について595nmにおける吸光度を記録し、標準曲線を作成する。各試料の595nmの吸光度を記録し、作成した較正曲線からリン脂質濃度を計算する。

20

30

#### 【0456】

(コットンラットにおける免疫原性)

単量体(非切断del p21 furx)、三量体のロゼット(切断del p23 furdel)、および三量体(融合ペプチド欠失)の形態のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの免疫原性を、コットンラット(Sigmodon hispidus)において2つの試験で決定した。試験1(図8Aおよび8B)では、10匹のコットンラット/群に、10μgの単量体またはロゼット(各々、水酸化アルミニウムに吸着させたもの)を筋肉内に、0日目と21日目にワクチン接種した。血清抗RSV Fタンパク質IgGおよびRSV中和抗体の力価を、1回目のワクチン接種の2週間後(2wp1)と2回目のワクチン接種の2週間後(2wp2)、または1回目のワクチン接種の3週間後(3wp1)と2回目のワクチン接種の2週間後(2wp2)に測定した。抗RSV Fタンパク質IgG(図8A)は、ELISAによって、RSV Fタンパク質コートプレートおよびホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体化ニワトリ抗コットンラットIgG検出抗体を用いて測定した。データを、個々のコットンラットのlog<sub>10</sub>幾何平均力価(GMT)+標準偏差で示す。RSVの中和力価(図8B)は、ブランク減少中和試験(PRNT)によって測定した。簡単には、熱不活性化した血清の希釈物をRS

40

50

V Longとともにブレインキュベートし、次いで、12ウェルプレート内のHEp-2細胞に接種した。2時間の感染後、接種材料を除去し、細胞にアガロースを重層した。5日後、ニュートラルレッド染色によってプラークを計数した。中和力価は、対照（血清なし）と比べて、ウェル1つ当たり少なくとも60%のプラーク数の減少をもたらす血清希釈度の逆数と定義する。データを、5匹のコットンラット/群の2つのプールの $\log_{10} \text{GMT} + \text{標準誤差}$ で示す。

【0457】

試験2（図8C）では、9匹のコットンラット/群を、筋肉内に、表示した用量の単量体、三量体またはロゼット（各々、水酸化アルミニウムに吸着させたもの）で免疫化した。血清抗RSV Fタンパク質IgGの力価を2wp1に上記のようにして測定した。

10

【0458】

（結果）

可溶性のRSV Fエクトドメイン（非変異型フリン切断部位を有する）は発現されたが、宿主細胞または培養培地に由来する脂質およびリポタンパク質不純物からサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製できなかった。このようなRSV FエクトドメインポリペプチドはSECカラムのポイドボリューム内に脂質およびリポタンパク質夾雑物とともに溶出される。

【0459】

フリン切断部位に変異を含むRSV Fエクトドメインポリペプチドを作製するための、いくつかの構築物（例えば、Furdel構築物）を調製した。図1参照。Furdel構築物の発現によって産生されたポリペプチドは細胞から、約65kDaの非切断種として分泌された。また、Furdel変異により、融合ペプチドの露出が抑制され、これによりロゼット形成が抑制される。その結果、可溶性のRSV F Furdelは、Superdex 200分取用（preparatory）カラムの包含ボリューム（included volume）中に移動し、脂質残屑（これは、ポイドボリューム中に溶出される）と昆虫タンパク質不純物の両方からの分離がもたらされる。このような結果は、フリン切断部位が変異したRSV Fエクトドメインポリペプチドが、SECによって精製され得る非切断ポリペプチドとして産生されることを示す。また、非切断型RSV Fの保持時間の分析は、該ポリペプチドが三量体ではなく単量体であることと整合した。

20

30

【0460】

RSV F furdelポリペプチドが単量体、三量体または単量体と三量体の混合物のいずれであるかを、分析用超遠心分離を用いてさらに評価した。SEC精製の単量体ピークから精製したタンパク質を使用し、分析用超遠心分離試験を行なった。非切断型RSV Fの沈降速度データにより、溶液中に2つの種を示唆するステップパターンが示された。沈降速度実験の分析により、非切断型RSV Fエクトドメインが、溶液中で単量体の大きな集団と見かけ上三量体の小さな集団を有することが示された。平衡実行データ（equilibrium run data）を収集し、データを理想的な単量体モデルまたは単量体-三量体平衡モデルのいずれかにフィットさせる試行を行なった。しかしながら、フィットの残差は不十分であり、特にタンパク質濃度が高いセルの底部に対して不十分であった。このような観察により、非切断型RSV Fエクトドメインポリペプチドは、高濃度で主に単量体であり、自己会合する少数集団（場合によっては三量体として）または凝集体を伴うことが示唆された。

40

【0461】

選択したRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドのさらなる分析を、サイズ排除（SEC）クロマトグラフィーを用いて行なった。図6A~6D。図6A~6Dにおいて、単量体、三量体または三量体のロゼットを含む主成分ピークをアスタリスクで示し、Superdex P200 16/60カラム（GE Healthcare）の保持時間をミリリットルで示す。校正したカラムでは、47ml、65mlおよび77mlのおおよその保持時間は、それぞれ、カラムのポイドボリューム、F三量体の保持、お

50

よび単量体の保持に相当する。図6Aにおいて、非切断Delp23 Furdel (p23 Furdel) 構築物を単量体ピークから精製した。非切断Delp23 Furdel RSV F抗原をトリプシンで処理すると、タンパク質はロゼットを形成し、これは、SECでポイドボリューム中に移動した(図6B)。RSV F融合ペプチド欠失の切断三量体種は、三量体ピークからおよそ65mlの保持時間において精製された(図6C)が、非切断Delp21 Furx構築物(p21 Furx)は、単量体ピークからおよそ77mlにおいて精製された(図6D)。

【0462】

非切断形態の、またはトリプシン切断後のいくつかのRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドをEMによって評価した。RSV F Furdelおよびdelp23 Furdel構築物は、フリン切断部位内に残っているアルギニン残基を有する。このようなアルギニンはトリプシン切断を受け易い。切断されると、非切断型F<sub>0</sub>種は、融合ペプチドが露出されるF<sub>1</sub>/F<sub>2</sub>種に変換された。EM分析により、トリプシン切断後、非切断型RSVエクトドメインは、その融合ペプチドのため、関連融合タンパク質で観察されたように三量体のロゼットを形成することが確認された。結果を表3に示すが、これは、非切断型のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドが切断されて三量体のロゼットを形成し得ることを示す。融合ペプチド欠失型構築物(これは、フリンによって切断される)では単分散三量体が形成された。図7A~7Dも参照のこと。好都合なことに、このようにして三量体のロゼットが生成すると、実質的に脂質残屑およびリポタンパク質が含まれていない三量体のロゼットがもたらされる。

10

20

【0463】

免疫原性試験の結果により、単量体(非切断delp21 furx)、三量体のロゼット(切断delp23 furdel)、および三量体(融合ペプチド欠失)の形態のRSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドは、コットンラット(Sigmodon hispidus)において免疫原性であり、中和抗体が誘導されることが示された。図8A~8C。

【0464】

【表 3】

| 表3   |   |
|--|---|
| 構築物  | EMによる確認   |
| RSV F 野生型エクトドメイン<br>(発現中、宿主細胞内で切断)               | 脂質残屑と会合した三量体のロゼット   |
| トリプシン切断性 Furdel<br>(精製単量体ピーク-非切断)                | 種々。単分散三量体を示す調製物もあれば、ネガティブ染色物質のEMによって視認できる物質がほとんど示されないものもある。 |
| トリプシン切断性 Furdel<br>(精製単量体ピーク-精製後にトリプシン切断)        | 三量体のロゼット  |
| トリプシン切断性 delp23 furdel<br>(精製単量体ピーク-非切断)         | 種々。単分散三量体を示す調製物もあれば、ネガティブ染色物質のEMによって視認できる物質がほとんど示されないものもある。 |
| トリプシン切断性 delp23 Furdel<br>(精製単量体ピーク-精製後にトリプシン切断) | 三量体のロゼット  |
| 切断融合ペプチド欠失<br>(精製単量体ピーク)                         | 単分散三量体  |

10

20

(実施例 5 - 昆虫細胞または CHO 細胞での RSV F サブユニット抗原の作製方法)  
(昆虫細胞からの RSV F 抗原の精製)

RSV F エクトドメインサブユニット、例えば、Delp21 Furx、Delp23 Furdel および融合ペプチド欠失の構築物を、HiFive 昆虫細胞 (Invitrogen) において、pFAST Bac バキュロウイルス系を用いて発現させた。RSV F サブユニットを大規模発現 (10 ~ 25 リットル) から、昆虫細胞培地中に存在するフェリチン夾雑物 (これは、キレート樹脂を損ない得る) の有害効果を少なくする 2 工程のキレート方法によって精製した。CuSO<sub>4</sub> を培地の上清に終濃度 500 μM まで添加した。およそ 10 ~ 20 ミリリットルのキレート樹脂 (Chelating Resin, BioRad) を 1 リットルの各培地に添加し、スラリーを 4 で少なくとも 30 分間振盪させ、重力カラムを用いて樹脂と培地を分離した。樹脂を、この樹脂のおよそ 2 倍容積の平衡化バッファー (25 mM Tris (pH 7.5), 300 mM NaCl) で洗浄し、F タンパク質のエクトドメインを、カラムのおよそ 2 倍容積の溶出バッファー (250 mM のイミダゾールを含む平衡化バッファー) で溶出させた。溶出物を 25 mM Tris バッファー (pH 7.5), 300 mM NaCl に対して透析し、得られた溶液を、NiSO<sub>4</sub> を充填した 5 ml の Hitrap キレートカラム (GE Healthcare) にロードした。結合されたタンパク質を、25 mM Tris (pH 7.5)、300 mM NaCl およびイミダゾール勾配で溶出させた。

30

40

【0465】

イミダゾール勾配での溶出物は、どちらの場合も、抗 HIS<sub>6</sub> ウエスタンブロットおよび / またはクマシー染色 SDS-PAGE ゲルを用いて評価した。純粋な構築物を含む画分を収集し、その後のサイズ排除クロマトグラフィーによる分析 / 精製のために、Millipore Centrprep 濃縮器および / または Vivaspin 濃縮ユニツ

50

トを用いておよそ1mg/mlまで濃縮した。

【0466】

(RSV FエクトドメインのSEC分析および精製)

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いてRSV Fタンパク質のエクトドメインの非切断単量体および切断三量体を精製し、分析した。また、この方法により、非切断型RSV Fタンパク質のエクトドメインが、宿主細胞または培地に由来する脂質およびリポタンパク質夾雑物から精製されることを可能にした。不純物のないロゼットを生成する場合、まず、非切断Delp23 Furdell構築物を単量体として精製し、続いて、プロテアーゼ処理し、SECを用いて再度精製して、均一なロゼットを精製した(下記参照)。効率的な精製工程としても機能し得る2つの方法、HPLC-SECとFPLC-SECを、RSV Fオリゴマー化の分析のために開発した。

10

【0467】

HPLC-SECは、Biorad SECカラム(18mm)を、25mM Tris(pH7.5)、300mM NaCl移動相とともに用いて行なった。Biorad HPLC-SEC標準物を用いて系を校正すると、本発明者らは、RSVロゼット(切断された融合後コンフォメーションを示す)は分析のカラムのポイドボリューム中に溶出されるが、RSV F単量体は、およそ75~85kDaの見かけ分子量で溶出されることを見い出した。

【0468】

FPLC-SECは、16/60 Superdex 200カラムを、25mM Tris(pH7.5)、300mM NaCl移動相とともに用いてGE Healthcare FPLCにおいて行なった。GE Healthcare高分子量標準物を用いて系を校正すると、本発明者らは、RSVロゼットは分析のカラムのポイドボリューム中に溶出されるが、RSV単分散三量体は、およそ140~160kDaの見かけ分子量で溶出され、RSV F単量体は、およそ75~85kDaの見かけ分子量で溶出されることを見い出した。RSV非切断Delp21 FurxまたはDelp23 Furdell(単量体)または融合ペプチド欠失(三量体)の精製では、0.5~2mlのおよそ1mg/mlのキレート精製物質を、平衡化したSuperdex P200 16/60カラムに0.5~2ml/分の流速でロードし、適切な画分を収集した。

20

【0469】

(Delp23 Furdell構築物のトリプシン切断による融合後ロゼットの形成)ウシ血漿由来のトリプシン(Sigma Aldrich, T8802:10,000~15,000 BAEU単位/mgのトリプシン)を25mM Tris(pH7.5)、300mM NaCl中で1mg/ml濃度に希釈した。RSV Fタンパク質のエクトドメインポリペプチドの1mg/ml溶液(25mM Tris(pH7.5)、300mM NaCl中で希釈)を、1マイクロリットルのトリプシン溶液(最終質量比が0.001:1のトリプシン:RSV F、または各1ミリグラムのRSV Fに対しておよそ10~15 BAEU単位のトリプシン)で、37にて1時間処理した。切断反応の進行はSDS-PAGEゲルによってモニタリングした。トリプシンインヒビター(Gibco製ダイズトリプシンインヒビター、トリプシンに対して等質量のインヒビターを使用)を用いて切断反応を停止させた。より高い効率で単量体をロゼットに変換させるためには、切断工程と、その後のロゼット精製との間にインキュベーション期間が必要であることがわかった。37で1~6時間のインキュベーション期間により、高いロゼット形成効率をもたらされることが示された。切断RSV Fタンパク質を、未変換単量体種からサイズ排除クロマトグラフィー(上記)を用いてさらに精製し、その場合、均一なロゼットがカラムのポイドボリューム画分中にて収集され得る。

30

40

【0470】

(CHO細胞からのRSV F抗原の精製)

RSV F融合ペプチド欠失構築物(これはHIS-タグを含まない)をカチオン精製によって精製した。発現させたRSV F三量体抗原を含むCHO材料を、GE Hea

50



lithcare製中空系カートリッジ濃縮システム(MWCO 10,000kDa)にて、元の容積のおよそ10分の1まで濃縮した。次いで、この濃縮液を、等容積の25mM酢酸ナトリウム(pH6.0)、25mM NaClで4回バッファー交換した。得られた溶液(酢酸/生理食塩水バッファー中に濃縮RSV F三量体を含むもの)を、酢酸/生理食塩水バッファーで平衡化しておいた充填済GE Healthcare HiTrap CMカラムにロードした。タンパク質をカラムから、25、150、250、500または1000mMいずれかのNaClを含む25mM酢酸バッファーの段階的勾配を用いて溶出させた(250mMおよび500mMのNaCl画分はバルク溶出物質を含む)。この物質を、上記のプロトコルと同様のSEC精製を用いてさらに精製してもよい。

10

## 【0471】

(実施例6-コットンラットにおけるRSV Fサブユニットの免疫原性)

各々、アラムまたはMF59を用いて処方したRSV-F三量体(RSV-F-融合-ペプチド-欠失-trunc)およびロゼット(RSV-F-del p23-fur del-trunc, 切断)サブユニットの免疫原性および防御能を、コットンラットモデルにおいて評価した。この試験でのELISAに使用した抗原は、RSV-F-融合-ペプチド-欠失-truncとした(表4)。中和は、感染性RSVであるLong株に対するものとした(表5)。組合せはすべて免疫原性であり、高力価のRSV-F特異的IgGおよびRSV中和抗体の応答が誘起され、これは、2回目のワクチン接種で高められ、経鼻RSVチャレンジからの防御がもたらされた。

20

## 【0472】

(方法)

(コットンラットのワクチン接種およびチャレンジ)

雌性コットンラット(Sigmodon hispidus)をHarlan Laboratoriesから取得した。動物群を筋肉内にて(i.m., 100µl)、表示したワクチンで0日目と21日目に免疫化した。血清試料を、最初の免疫化の3週間後(3wp1)と2回目の免疫化(immunization)の2週間後(2wp2)に収集した。免疫化した動物またはワクチン接種していない対照動物に、鼻腔内にて(i.n.), 1×10<sup>5</sup> pfuのRSV Longで、最後の免疫化の4週間後にチャレンジした。血液採取およびRSVチャレンジは、精密気化器を用いた3%イソフルランでの麻酔下で行なった。

30

## 【0473】

(RSV F特異的ELISA)

個々の血清試料を、RSV F特異的IgGの存在について酵素免疫測定法(ELISA)によってアッセイした。ELISAプレート(MaxiSorp 96ウェル, Nunc)を、1µg/mlの精製RSV F(融合-ペプチド欠失-trunc)(PBS中)で、4 にて一晚コートした。洗浄後(0.1% Tween-20含有PBS)、プレートをSuperblock Blocking Buffer(PBS中)(Thermo Scientific)で、37 にて少なくとも1.5時間ブロックした。次いで、このプレートを洗浄し、実験コットンラットまたは対照コットンラットの血清のアッセイ希釈剤(0.1% Tween-20と5%ヤギ血清含有PBS)での連続希釈物を添加し、プレートを37 で2時間インキュベートした。洗浄後、プレートを、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合体化ニワトリ抗コットンラットIgG(Immunology Consultants Laboratory, Inc, アッセイ希釈剤中で1:5,000に希釈)とともに37 で1時間インキュベートした。最後に、プレートを洗浄し、100µlのTMBペルオキシダーゼ基質溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc)を各ウェルに添加した。100µlの1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>の添加によって反応を停止し、プレートリーダーを用いて450nmにおける吸光度を読み取った。各血清試料について、血清希釈度の逆数の対数に対する光学密度(OD)のプロットを非線形回帰(GraphPad Prism)によ

40

50

って作成した。力価は、およそ 0.5 の OD での血清希釈度の逆数と定義した（プレートごとに含めた、規定の力価 1 : 2500 を有する RSV 感染コottonラット由来のプールした標準血清に対して標準化）。

【0474】

（マイクロ中和アッセイ）

血清試料を、中和抗体の存在についてマイクロ中和アッセイによって試験した。熱不活化（HI）-血清の2倍連続希釈物（5% HI - ウシ胎仔血清（FBS）含有PBS中）を、等容積のRSV Long株に添加した（事前におよそ115 PFU / 25 μl をもたらず力価にした）。血清/ウイルス混合物を37 ° および5% CO<sub>2</sub> で2時間インキュベートしてウイルス中和を行なわせ、次いで、25 μl のこの混合物（およそ115 PFU を含む）を、二連で、96 ウェルプレート内のHEp-2細胞のウェルに接種した。37 ° および5% CO<sub>2</sub> で2時間後、細胞に0.75% メチルセルロース / EMEM 5% HI - FBS を重層し、42時間インキュベートした。感染性ウイルス粒子の数を、免疫染色した後、自動計測することによるシンシチウム形成の検出によって測定した。中和力価は、対照（血清なし）と比べて、ウェル1つ当たり少なくとも60%のシンシチウム（syncytia）数の減少をもたらす血清希釈度の逆数と定義する。

10

【0475】

（ウイルス負荷）

肺内のウイルス負荷を、ブランクアッセイによって測定した。具体的には、RSV感染の5日後に肺を収集し、右側の肺葉の1つを、25% スクロースを含む2.5 ml のダルベッコ改変イーグル培地（DMEM, Invitrogen）中に入れ、組織ホモジナイザーで破壊した。この試料の無細胞上清を-80 ° で保存した。感染性ウイルスについてアッセイするため、清澄化した肺ホモジネートの希釈物（5% HI - FBS 含有PBS中）を、12ウェルプレート内のコンフルエントHEp-2細胞の単層に200 μl / ウェルの容積で接種した。定期的に静かに振盪しながら2時間後（37 ° , 5% CO<sub>2</sub> ）、接種材料を除去し、細胞に、1.5 ml の1.25% SeaPlaqueアガロース（Lonza）含有イーグル最小必須培地（EMEM, Lonza）（5% HI - FBS、グルタミンおよび抗生物質を補給）を重層した。3~4日間のインキュベーション後、細胞に、再度、1 ml の1.25% アガロース含有EMEM（Sigma）（0.1% ニュートラルレッド（Sigma）を含有する）を重層した。1日後、ライトボックスの補助を伴ってブランク計数した。

20

30

【0476】

ウイルス負荷を測定するための代替的な方法は、定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）である。ウイルス負荷は、既報（I. Borgら, Eur Respir J 2003; 21: 944-51）のRSV-F遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて（一部修正を伴って）qRT-PCRによって測定され得る。簡単には、RNAを、140 μl の清澄化肺ホモジネート、または既知のブランク形成単位（PFU）数のRSV（ブランクアッセイによって測定し、非感染動物由来の肺ホモジネート中で希釈する）から、RNeasyキット（Qiagen）を最終溶出容積100 μl のH<sub>2</sub>Oとともに用いて単離する。cDNAの合成とPCRを単一のチューブにおいて行ない、Superscript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCRキット（Invitrogen）を、5 μL の溶出RNA、10 μM の各プライマーおよび50 μM のプローブとともに使用する（プライマーおよびプローブはIntegrated DNA Technologies製）。フォワードプライマー：TTGGATCTGCAATCGCCA（配列番号72）。リバープライマー：CTTTTGATCTTGTTCACTTCTCCTTCT（配列番号73）。プローブ：5'-カルボキシフルオレセイン（FAM）-TGGCACTGCTGTATCTAAGGTCCTGCACT-テトラメチルカルボキシローダミン（TAMRA）-3'（配列番号74）。増幅および検出は、ABI Prism 7900HTまたは7500（Applied Biosystems）を用いて行なう。サイクル閾値（Ct）

40

50

は、各試料について、蛍光シグナルが、設定された閾値より上で最初に検出可能となるサイクル数と定義する。次いで、ウイルスRNAの規定コピー数の対数に対するCtの標準曲線に基づいて各試料のPFU当量を求める。

【0477】

(結果)

モデルとしてのコットンラットは、コットンラットとヒトとのRSV誘発性疾患における多くの類似性のため、RSVの病因および免疫の試験において広く使用されている。2つの重要な類似点は、中和抗体の有効性、およびホルマリン不活化RSVワクチン接種と関連する肺組織病理の増強である。また、コットンラットは、マウスなどの他の小動物よりもRSV感染に感染性である。

10

【0478】

本発明者らのRSV-Fサブユニットワクチンの免疫原性を評価するため、雌性コットンラット群に、各々、アラムまたはMF59のいずれかをを用いて処方した種々の用量の三量体(RSV-F-融合-ペプチド-欠失-trunc)またはロゼット(RSV-F-del p23-furdel-trunc, 切断)を筋肉内にワクチン接種した。すべての場合において、血清中でF特異的抗体と中和抗体の両方を誘導するのに、1回の免疫化で十分であった(最初のワクチン接種の3週間後(3wp1)に測定する場合)。初回から3週間後、すべてのコットンラットに同種の追加免疫化を施し、これにより、2週間後(2wp2)に測定した場合、F特異的IgGおよび中和抗体の有意な増大がもたらされた。一般的に、ロゼットの免疫原性は三量体のものと同等かまたはそれ以上であり、MF59処方物の方がアラム処方物よりも力価が高く、タンパク質用量が高いほど高い力価がもたらされるが、一部例外もみられた。

20

【0479】

該サブユニットワクチンの防御能を調べるため、2回目のワクチン接種の4週間後、すべてのコットンラットを経鼻経路によってRSVに感染させ、5日後、ブランクアッセイによって肺内のウイルス負荷を測定した。すべての場合において、ワクチン接種したコットンラットの肺内ウイルス負荷は、免疫化せずにチャレンジした対照動物よりも3桁超低減されており、サブユニットワクチン接種によりチャレンジからの防御がもたらされた。

【0480】

【表4-1】

30

表4:F特異的血清IgGの力価

|       |              | F特異的血清IgGの力価 <sup>a</sup> |        |        |        |
|-------|--------------|---------------------------|--------|--------|--------|
|       |              | アラム                       |        | MF59   |        |
| 血清の収集 | タンパク質の用量(μg) | 三量体                       | ロゼット   | 三量体    | ロゼット   |
| 3wp1  | 10           | 20276                     | 36841  | 10251  | 22415  |
|       | 1            | 18341                     | 20802  | 3712   | 28610  |
|       | 0.1          | 2698                      | 6896   | 1065   | 8293   |
| 2wp2  | 10           | 103670                    | 97174  | 130016 | 156144 |
|       | 1            | 142331                    | 102405 | 177441 | 299501 |
|       | 0.1          | 11581                     | 34354  | 50238  | 111099 |

40

<sup>a</sup> 個々のコットンラット(7~8匹/群)の幾何平均力価  
三量体免疫原はRSV-F-融合-ペプチド-欠失-truncとした  
ロゼット免疫原はRSV-F-del p23-furdel-trunc, 切断とした。

【0481】

## 【表 4 - A】

表4A:RSVチャレンジの5日後の肺内ウイルス力価<sup>a</sup>

| ワクチン接種    | タンパク質の用量 (μg) | ウイルス力価 <sup>b</sup> |
|-----------|---------------|---------------------|
| なし        | -             | 822760              |
| 三量体/アラム   | 10            | 546                 |
|           | 1             | 636                 |
|           | 0.1           | 903                 |
| ロゼット/アラム  | 10            | 305                 |
|           | 1             | 341                 |
|           | 0.1           | 548                 |
| 三量体/MF59  | 10            | 360                 |
|           | 1             | 301                 |
|           | 0.1           | 456                 |
| ロゼット/MF59 | 10            | 244                 |
|           | 1             | 257                 |
|           | 0.1           | 716                 |

10

<sup>a</sup>  $1 \times 10^5$  プラーク形成単位 (p f u) の R S V Long で鼻腔内チャレンジ

<sup>b</sup> チャレンジの5日後の p f u / グラム肺

20

7 ~ 8 匹の個々のコットンラット / 群の幾何平均力価

個々の動物が < 2 0 3 ( 検出限界 ) の力価を有した場合、力価 1 0 0 を割り当てた。

【 0 4 8 2 】

## 【表 5】

表5:RSV血清中和力価

| 血清の<br>収集 | タンパク質の用量<br>(μg) | RSV血清中和力価 <sup>a</sup> |      |      |      |
|-----------|------------------|------------------------|------|------|------|
|           |                  | アラム                    |      | MF59 |      |
|           |                  | 三量体                    | ロゼット | 三量体  | ロゼット |
| 3wp1      | 10               | 628                    | 1050 | 578  | 229  |
|           | 1                | 208                    | 633  | 165  | 205  |
|           | 0.1              | 57                     | 200  | 51   | 65   |
| 2wp2      | 10               | 3669                   | 4015 | 3983 | 3436 |
|           | 1                | 3369                   | 2844 | 5728 | 3940 |
|           | 0.1              | 744                    | 1902 | 2414 | 2093 |

30

<sup>a</sup> シンシチウムが 6 0 % 減少する中和力価

3 ~ 4 匹のコットンラット / 群の 2 つのプールの幾何平均力価。

【 0 4 8 3 】

( 実施例 7 - R S V R N A ワクチン )

( R N A 合成 )

40

アルファウイルスレプリコンをコードするプラスミド DNA ( 図 4 , 配列番号 7 7 ) を、インビトロでの RNA 合成のための鋳型として供した。この実験では、RSV の完全長の表面融合糖タンパク質 ( R S V - F ) を使用した ( 図 4 ) 。レプリコンが真核生物の細胞に送達されると、プラス鎖の RNA が翻訳されて 4 つの非構造タンパク質が生成され、これらが一緒になってゲノム RNA を複製させ、異種遺伝子産物をコードする大量のサブゲノム mRNA を転写した。アルファウイルスの構造タンパク質の発現の欠損のため、レプリコンは、感染性粒子の生成を誘導することができない。アルファウイルスの c DNA の上流のバクテリオファージ ( T 7 または S P 6 ) プロモーターにより、インビトロでのレプリコン RNA の合成が助長され、ポリ ( A ) - テイルのすぐ下流のデルタ肝炎ウイルス ( H D V ) リボザイムにより、その自己切断活性によって正しい 3 ' 末端が生成される

50

。

## 【0484】

H D V リボザイムの下流で適当な制限エンドヌクレアーゼによってプラスミドDNAを線形化した後、T7またはSP6バクテリオファージ由来DNA依存性RNAポリメラーゼを用いてインビトロでランオフ (run-off) 転写物を合成した。7.5 mM (T7 RNAポリメラーゼ) または5 mM (SP6 RNAポリメラーゼ) の各ヌクレオシド三リン酸 (ATP、CTP、GTPおよびUTP) の存在下、製造業者 (Ambion, Austin, TX) によって提供された使用説明書に従い、37 °Cにて2時間転写を行なった。転写後、鋳型DNAをTURBO DNase (Ambion, Austin, TX) で消化した。レプリコンRNAをLiClにより沈殿させ、ヌクレアーゼを含まない水中で再構成させた。転写後、ScriptCap m<sup>7</sup>G Capping System (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) をユーザーマニュアルの概説どおりに使用し、無キャップRNAにVaccinia Capping Enzyme (VCE) でキャッピングした。転写後にキャッピングしたRNAをLiClにより沈殿させ、ヌクレアーゼを含まない水中で再構成させた。260 nmにおける光学密度を測定することにより、RNA試料の濃度を求めた。インビトロ転写物の完全性を、変性アガロースゲル電気泳動によって確認した。

10

## 【0485】

(脂質ナノ粒子 (リボソーム) 処方物RV01 (01))

1, 2 - ジリノレイルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DlindMA) を、以前に公開された手順を用いて合成した [Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K., MacLachlan, I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *Journal of Controlled Release*, 107: 276 - 287 (2005)]。1, 2 - ジアステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC) は、Genzymeから購入した。コレステロールはSigma - Aldrich (St. Louis, MO) から取得した。1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (アンモニウム塩) (PEG DMG 2000)、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2000] (アンモニウム塩) は、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) から取得した。

20

30

## 【0486】

脂質の新鮮ストック溶液 (エタノール中) を調製した。37 mgのDlindMA、11.8 mgのDSPC、27.8 mgのコレステロールおよび8.07 mgのPEG DMG 2000を秤量し、7.55 mLのエタノールに溶解させた。調製したこの脂質の新鮮ストック溶液を37 °Cで約15分間、静かに振盪し、均質な混合物を形成した。次いで、755 µLのストックを1.245 mLのエタノールに添加し、2 mLの作業用脂質ストック溶液にした。この量の脂質を用いて、250 µgのRNAを有する8:1のN:P (窒素対ホスフェート) 比のLNPを形成した。DlindMA (カチオン性脂質) 上のプロトン化性 (protonatable) 窒素とRNA上のホスフェートがこの計算に使用される。1 µgの各自己複製RNA分子は3 nmolのアニオン性ホスフェートを含むものとし、1 µgの各DlindMAは1.6 nmolのカチオン性窒素を含むものとした。また、2 mLの作業用RNA溶液を、100 mMクエン酸バッファー (pH 6) (Teknova, Hollister, CA) 中約1 µg / µLのストック溶液から調製した。使用前に、バイアルのRNAse汚染を除去するため、3つの20 mLのガラスバイアル (攪拌バーを入れる) をRNase Away溶液 (Molecular BioProducts, San Diego, CA) ですすぎ洗浄し、大量のMilliQ水で洗浄した。バイアルの1つを作業用RNA溶液に、その他を脂質およびRNAミック

40

50

スの収集に使用した（後述どおり）。作業用の脂質溶液およびRNA溶液を37℃で10分間加熱した後、3ccのルアーロック式シリンジ（BD Medical, Franklin Lakes, NJ）内に充填した。2mLのクエン酸バッファー（pH6）を別の3ccのシリンジ内に充填した。RNAおよび脂質を内包したシリンジをTミキサー（PEEK™ 500µm ID連結, Idex Health Science, Oak Harbor, WA）に、FEPチューブ（[フッ素化エチレン-プロピレン] 2mm ID×3mm OD, Idex Health Science, Oak Harbor, WA）を用いて連結した。また、Tミキサーの排出口もFEPチューブ（2mm ID×3mm OD）とした。クエン酸バッファーを内包する3つ目のシリンジは、別のチューブ片（2mm ID×3mm OD）に連結した。次いで、シリンジポンプ（kdScientific, 型番KDS-220, Holliston, MA）を用いて、すべてのシリンジを7mL/分の流速で作動させた。チューブの排出口は、混合物が20mLのガラスバイアル内（攪拌を伴う）に収集されるように配置した。攪拌バーを取り出し、エタノール/水溶液を室温まで1時間、平衡化させた。4mLの混合物を5ccのシリンジ（BD Medical）内に充填し、該シリンジをFEPチューブ片（2mm ID×3mm OD, Idex Health Science, Oak Harbor, WA）に連結し、等しい長さのFEPチューブに連結した別の5ccのシリンジ内に、等量の100mMクエン酸バッファー（pH6）を充填した。この2つのシリンジを、シリンジポンプを用いて7mL/分の流速で作動させ、最終混合物を20mLのガラスバイアル内（攪拌を伴う）に収集した。次に、第2の混合工程から収集された混合物（リボソーム）をムスタングQメンブレン（アニオン性分子に結合して除去するアニオン交換支持体, Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USAから入手可能）に通した。リボソームを通す前、ムスタングメンブレンに、逐次、4mLの1M NaOH、4mLの1M NaClおよび10mLの100mMクエン酸バッファー（pH6）を通した。このムスタングフィルターに通す前、リボソームを37℃で10分間昇温させた。次に、リボソームを2mLまで濃縮し、10~15容積の1×PBS（Teknova製）に対して透析した（タンジェンシャルフロー濾過（TFF）システムを使用）後、最終生成物を収集した。TFFシステムおよび中空糸濾過膜は、Spectrum Labs（Rancho Dominguez, CA）から購入し、製造業者のガイドラインに従って使用した。100kDの孔径カットオフおよび8cm<sup>2</sup>の表面積を有するポリスルホン中空糸濾過膜（品番P/N: X1AB-100-20P）を使用した。インビトロおよびインビボ実験では、処方物を、必要とされるRNA濃度まで1×PBS（Teknova製）で希釈した。

#### 【0487】

（カチオン性エマルジョン17（CNE17）の調製方法）

スクアレン、ソルビタントリオレート（Span 85）、およびポリオキシ-エチレンソルビタンモノオレート（monoleate）（Tween 80）は、Sigma（St. Louis, MO, USA）から取得した。1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン（DOTAP）は、Lipoid（Ludwigs hafen Germany）から購入した。カチオン性ナノエマルジョン（CNE）は、既報（Ottら Journal of Controlled Release, 79（1-3）: 1-5（2002））の荷電MF59と同様にして、軽微な修正を伴って調製した。簡単には、油溶性成分（すなわち、スクアレン、span 85、カチオン性脂質、脂質界面活性剤）をピーカー内で合わせ、脂質成分をクロロホルム（CHCl<sub>3</sub>）またはジクロロメタン（DCM）に溶解させた。得られた脂質溶液を油+span 85に直接添加した。溶媒を換気フード内で室温にて2時間蒸発させた後、水相と合わせ、均一な供給材料を得るため、IKA T25ホモジナイザーを用いて24K RPMで試料をホモジナイズした。一次エマルジョンを、氷浴冷却コイルを有するMicrofluidizer M110SまたはM110PSホモジナイザーに、およそ15k~20k PSIのホモジナイゼーション圧で3~5回通した（Microfluidics, Ne

w t o n , M A )。該ユニットから 2 0 m l のバッチ試料を取り出し、4 で保存した。以下の表には、C N E 1 7 の組成が記載されている。

【 0 4 8 8 】

【表 6】

表6:CNE17の組成

| CNE   | カチオン性脂質 (+)  | mg/ml + 脂質 | 界面活性剤                         | スクアレン | バッファー/水                   |
|-------|--------------|------------|-------------------------------|-------|---------------------------|
| CNE17 | DOTAP (DCM中) | 1.40       | 0.5% SPAN 85<br>0.5% Tween 80 | 4.3%  | 10mM クエン酸<br>バッファー pH 6.5 |

10

(RNAの複合体化)

溶液中の窒素数をカチオン性脂質の濃度から計算した(例えば、DOTAPは1分子当たり、プロトン化され得る1個の窒素を有する)。RNA濃度を使用し、RNA1マイクログラム当たり3nmolのホスフェートの概算値を用いて溶液中のホスフェートの量を計算した。RNA:脂質の量を変更することによりN/P比が修正され得る。RNAをCNE17と、10:1の窒素/ホスフェート(N/P)比で複合体形成させた。このような値を用いて、RNAをRNaseを含まない水中で適切な濃度に希釈し、軽くボルテックスしながら直接、等容積のエマルジョンに添加した。この溶液を室温でおよそ2時間放置した。複合体が形成されたら、得られた溶液を、投与前に必要とされる濃度に希釈した。

20

【 0 4 8 9 】

(エレクトロポレーション)

エレクトロポレーションは、pDNAワクチンの送達に非常に有効な方法であり、この手法を用いて自己複製RNAを送達した。マウスをイソフルラン(isofluorane)下で麻酔し、両後脚を念入りに剃って処置対象の肢部領域を露出させた。30ul用量のワクチンを後肢の腓腹筋に、1/2ccのインスリンシリンジを用いて注射した。この筋肉を、Elgen(登録商標)DNA Delivery System(Inovio, San Diego)を用いてエレクトロポレーションした。機器パラメータは以下のとおり:60V,60ms毎に2パルスである。別の用量を第2肢に同様に送達した後、エレクトロポレーションした。

30

【 0 4 9 0 】

(ウイルスレプリコン粒子(VRP))

RNAワクチンを、レポーター遺伝子または抗原のインビボ発現を行なうための従来のRNAベクター系アプローチと比較するため、本発明者らは、BHK細胞において、Perririらに記載の方法によって産生させたウイルスレプリコン粒子(VRP)を用いた。この系では、抗原(またはレポーター遺伝子)レプリコンは、シンドビスウイルスの3'末端配列(3'UTR)とシンドビスウイルスパッケージングシグナル(PS)を含むように操作されたベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)ゲノム由来のアルファウイルスキメラレプリコン(VCR)からなるものとした(Perririらの図2参照)。このレプリコンを、乳仔ハムスター腎(BHK)細胞にシンドビスウイルスキャプシドと糖タンパク質の遺伝子をコードする欠陥性ヘルパーRNAとともに共エレクトロポレーションすることにより、VRP内にパッケージングした(Perririらの図2参照)。次いで、VRPを収集し、標準的な方法によって力価測定し(titrate)、動物に、培養液または他の等張性バッファー中にて接種した。Perriri S, Greer CE, Thudium K, Doe B, Legg H, Liu H, Romero RE, Tang Z, Bin Q, Dubensky TW, Jr.ら(2003)。ベネズエラウマ脳炎ウイルスおよびシンドビスウイルスに由来するアルファウイルスレプリコン粒子キメラは、強力な遺伝子ベースのワクチン送達ベクターである。J Virol 77:10394-10403。

40

50

## 【0491】

(RSV F三量体サブユニットワクチン)

RSV F三量体は、RSV Fエクトドメインを含み、融合ペプチド領域が欠失した(他の三量体との会合が抑制される)組換えタンパク質である。得られた構築物は、サイズ排除クロマトグラフィーによって観察されるように、均一な三量体を形成し、電子顕微鏡検査によって観察される融合後Fコンフォメーションと整合する、予測される表現型を有する。該タンパク質を昆虫細胞において発現させ、該構築物のC末端に融合させたHISタグによる精製、続いて、慣用的な手法を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。得られるタンパク質試料は95%より高い純度を示す。F-サブユニットワクチンのインビボ評価のため、100 $\mu$ g/mLの三量体タンパク質を、10mMヒスチジンバッファー(pH6.3)を用いて2mg/mLのアラムに吸着させ、150mMまで、塩化ナトリウムで等張に調整した。F-サブユニットタンパク質はアラムに、2~8で静かに攪拌しながら一晚吸着させた。最終ワクチンのpHおよび重量オスモル濃度は、6.5~7.5および240~360mOsm/kgを標的とした。ワクチンを、タンパク質吸着についてSDS-PAGE(Invitrogen Corporation, USA)によって、およびエンドトキシン含有量についてLALアッセイ(Charles River Laboratories, USA)によって特性評価した。免疫化前、ワクチンを静かに反転することによって混合した。

10

## 【0492】

(マウスでの免疫原性試験)

10匹の雌性BALB/cマウスの群(8~10週齢および体重約20グラム)を0日目と21日目に免疫化し、14、35および49日目に血液を採取した。すべての動物に対し、2つの後脚の四頭筋で注射し、各々、等容積(50 $\mu$ l/部位)で合計100 $\mu$ lのワクチンを与えた(10 $\mu$ gの抗原用量を送達)。T細胞応答の測定が必要なときは、35日目または49日目に脾臓を収集した。

20

## 【0493】

(コットンラットのワクチン接種およびチャレンジ)

雌性コットンラット(*Sigmodon hispidus*)をHarlan Laboratoriesから取得した。実験はすべて、Novartis動物保護使用委員会(Animal Care and Use Committee)の承認を得ており、上記委員会に従って行なった。動物の群を筋肉内にて(i.m., 100 $\mu$ l)、表示したワクチンで0日目と21日目に免疫化した。血清試料を、各免疫化の2週間後に収集した。免疫化した動物またはワクチン接種していない対照動物を、鼻腔内にて(i.n.)、 $1 \times 10^5$  PFUのRSVで、最後の免疫化の4週間後にチャレンジした。血液採取およびRSVチャレンジは、精密気化器を用いた3%イソフルランでの麻酔下で行なった。

30

## 【0494】

(マウスT細胞機能アッセイ)

(細胞内サイトカイン免疫蛍光アッセイ)

同一にワクチン接種したBALB/cマウスの2~5個の脾臓をプールし、培養のための単一の細胞懸濁物を調製した。各脾細胞プールについて、2つの抗原刺激培養物と2つの非刺激培養物を樹立した。抗原刺激培養物は、 $1 \times 10^6$ 個の脾細胞、RSV Fペプチド85-93( $1 \times 10^{-6}$  M)、RSV Fペプチド249-258( $1 \times 10^{-6}$  M)、RSV Fペプチド51-66( $1 \times 10^{-6}$  M)、抗CD28 mAb(1mcg/mL)、およびプレフェルジンA(1:1000)を含むものとした。非刺激培養物は、RSV Fペプチドを含めなかったこと以外は、刺激培養物と同一とした。37で6時間の培養後、培養物を免疫蛍光のために処理した。細胞を洗浄し、次いで、蛍光標識抗CD4および抗CD8モノクローナル抗体(mAb)で染色した。細胞を再度洗浄し、次いで、Cytotfix/cytopermで20分間固定した。次いで、固定された細胞をPerm洗浄バッファーで洗浄し、次いで、IFN-g、TNF-a、IL-2およびIL-5に特異的な蛍光標識mAbで染色した。染色細胞を洗浄し、次いで、LSR

40

50



IIフローサイトメーターで分析した。FlowJoソフトウェアを使用し、取得データを分析した。CD4+8-T細胞サブセットおよびCD8+4-T細胞サブセットを、別々に分析した。所与の試料の各サブセットについて、サイトカイン陽性細胞の%を決定した。RSV F抗原特異的T細胞の%は、抗原刺激培養物でのサイトカイン陽性細胞の%と非刺激培養物でのサイトカイン陽性細胞の%との差として計算した。標準的な方法(Statistical Methods, 第7版, G.W. SnedecorおよびW.G. Cochran)を使用し、抗原特異的細胞の%の95%信頼限界を決定した。

## 【0495】

(分泌サイトカインアッセイ)

分泌サイトカインアッセイのための培養物は、プレフェルジンAを除いたこと以外は細胞内サイトカイン免疫蛍光アッセイのものと同様とした。37℃で一晩培養後に培養上清を収集し、複数のサイトカインについて、Meso Scale Discovery製のマウスTh1/Th2サイトカインキットを用いて分析した。培養物ごとの各サイトカインの量を、製造業者により供給された精製組換えサイトカインを用いて作成された標準曲線から決定した。

10

## 【0496】

(RSV F特異的ELISA)

個々の血清試料を、RSV F特異的IgGの存在について酵素免疫測定法(ELISA)によってアッセイした。ELISAプレート(MaxiSorp 96ウェル, Nunc)を、1µg/mlの精製RSV F(del p23-fur del-trunc 非切断)(PBS中)で、4℃にて一晩コートした。洗浄後(0.1%Tween-20含有PBS)、プレートをSuperblock Blocking Buffer(PBS中)(Thermo Scientific)で、37℃にて少なくとも1.5時間ブロックした。次いで、このプレートを洗浄し、実験コトロンラットまたは対照コトロンラットの血清のアッセイ希釈剤(0.1%Tween-20と5%ヤギ血清含有PBS)での連続希釈物を添加し、プレートを37℃で2時間インキュベートした。洗浄後、プレートを、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合体化ニワトリ抗コトロンラットIgG(Immunology Consultants Laboratory, Inc, アッセイ希釈剤中で1:5,000に希釈)とともに37℃で1時間インキュベートした。最後に、プレートを洗浄し、100µlのTMBペルオキシダーゼ基質溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc)を各ウェルに添加した。100µlの1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>の添加によって反応を停止し、プレートリーダーを用いて450nmにおける吸光度を読み取った。各血清試料について、血清希釈度の逆数の対数に対する光学密度(OD)のプロットを非線形回帰(GraphPad Prism)によって作成した。力価は、およそ0.5のODでの血清希釈度の逆数と定義した(プレートごとに含めた、規定の力価1:2500を有するRSV感染コトロンラット由来のプールした標準血清に対して標準化)。

20

30

## 【0497】

(マイクロ中和アッセイ)

血清試料を、中和抗体の存在についてプラーク減少中和試験(PRNT)によって試験した。HI-血清の2倍連続希釈物(5%HI-FBS含有PBS中)を等容積のRSV Longに添加した(事前におよそ1:15 PFU/25µlをもたらす力価にした)。血清/ウイルス混合物を37℃および5%CO<sub>2</sub>で2時間インキュベートしてウイルス中和を行なわせ、次いで、25µlのこの混合物(およそ1:15 PFUを含む)を、二連で、96ウェルプレート内のHEp-2細胞のウェルに接種した。37℃および5%CO<sub>2</sub>で2時間後、細胞に0.75%メチルセルロース/EMEM 5%HI-FBSを重ねし、42時間インキュベートした。感染性ウイルス粒子の数を、免疫染色した後、自動計測することによるシンシチウム形成の検出によって決定した。中和力価は、対照(血清なし)と比べて、ウェル1つ当たり少なくとも60%のシンシチウム数の減少をもたらす血清希釈度の逆数と定義する。

40

50

## 【0498】

(ウイルス負荷)

肺内のウイルス負荷を、ブランクアッセイによって測定した。具体的には、RSV感染の5日後に肺を収集し、右側の肺葉の1つを、25%スクロースを含む2.5mlのダルベッコ改変イーグル培地(DMEM, Invitrogen)中に入れ、組織ホモジナイザーで破壊した。この試料の無細胞上清を-80℃で保存した。感染性ウイルスについてアッセイするため、清澄化した肺ホモジネートの希釈物(5%熱不活性化ウシ胎仔血清(HI-FBS)含有PBS中)を、12ウェルプレート内のコンフルエントHEp-2細胞の単層に200μl/ウェルの容積で接種した。定期的に静かに振盪しながら2時間後(37℃, 5%CO<sub>2</sub>)、接種材料を除去し、細胞に、1.5mlの1.25%SeaPlaqueアガロース(Lonza)含有イーグル最小必須培地(EMEM, Lonza)(5%HI-FBS、グルタミンおよび抗生物質を補給)を重層した。3~4日間のインキュベーション後、細胞に、再度、1mlの1.25%アガロース含有EMEM(Sigma)(0.1%ニュートラルレッド(Sigma)を含有する)を重層した。1日後、ライトボックスの補助を伴ってブランク計数した。

10

## 【0499】

(コットンラット肺病理)

RSVチャレンジの5日後、肺を収集し、各動物から4つの肺葉を収集し、穏やかな気管内滴注の後、液浸固定によって10%中性緩衝ホルマリン(NBF)で固定した。組織を、顕微鏡検査のために常套的に処理し、ヘマトキシリン&エオシン染色切片を調製した。所見を、以前に公開された基準[Prince GAら, 2001]の変形を用いて以下のパラメータ:細気管支周囲炎、肺胞炎、気管支炎、脈管周囲細胞浸潤および間質性肺炎について評価した。病変を4点の半定量的スケールで評価した。最小(+)変化は、1つまたは数個の小病巣を含むものとした;軽度(++)変化は、小~中くらいの大きさの病巣で構成されたものとした;中等度(+++)変化は、いくつものおよび/または中等度の大きさの病巣を含むものとした;顕著な(++++)変化は、広範にコンフルエントな病巣を示し、組織の大部分/全部が影響を受けたものとした。

20

## 【0500】

(実施例7)

(A-コットンラットRSVチャレンジ試験(CRIS14))

RSVの表面融合糖タンパク質(RSV-F)を発現するA317レプリコンをこの実験に使用した。コットンラット(*Sigmodon hispidus*)(8匹の動物/群)に、裸の自己複製RNA(A317, 1μgもしくは10μg)、LNPにおいて処方した自己複製RNA(RV01(01), A317, 0.1μgもしくは1μg)、RSV-Fを発現するVRP(5×10<sup>6</sup>IU)、F-三量体/アラムサブユニット(10μg)、またはホルマリン不活化RSVワクチン(5200 FI-pfu)で、0日目と21日目に、両側に筋肉内ワクチン接種(50μL/脚)を行なった。抗体分析のため、14日目(2wp1)と35日目(2wp2)に血清を収集した。すべての動物を、1×10<sup>5</sup>pfuのRSVで、鼻腔内に49日目にチャレンジし、ウイルス負荷および肺病理の決定のため、肺を54日目(5dpc)に収集した。

30

40

## 【0501】

(結果)

## 【0502】

## 【表 7】

表7: 14日目と35日目のF特異的血清IgGの力価

| ワクチン      | 用量                   | F 特異的 IgG |        |
|-----------|----------------------|-----------|--------|
|           |                      | 2wp1      | 2wp2   |
| A317      | 10 µg                | 198       | 1599   |
| A317      | 1 µg                 | 78        | 526    |
| CNE17     | 1 µg                 | 408       | 4918   |
| CNE17     | 0.1 µg               | 325       | 2512   |
| RV01(01)  | 1 µg                 | 531       | 4351   |
| RV01(01)  | 0.1 µg               | 134       | 1033   |
| VRP       | 5x10 <sup>6</sup> IU | 961       | 5864   |
| F 三量体/アラム | 10 µg                | 3526      | 111893 |
| FI-RSV    | 5200 FI-pfu          | 17        | 2074   |
| なし        |                      | 5         | 5      |

10

表 7 . 0 日 目 と 2 1 日 目 の 筋 肉 内 ワ ク チ ン 接 種 後 の コ ッ ト ン ラ ッ ト ( *S i g m o d o n h i s p i d u s* ) ( 8 匹 の 動 物 / 群 ) の F 特 異 的 血 清 I g G の 力 価 。 抗 体 分 析 の た め 、 1 4 日 目 ( 2 w p 1 ) と 3 5 日 目 ( 2 w p 2 ) に 血 清 を 収 集 し 、 4 9 日 目 に 、 す べ て の 動 物 を  $1 \times 10^5$  p f u の R S V で 鼻 腔 内 に チ ャ レ ン ジ し た 。 ウ イ ル ス 負 荷 お よ び 肺 病 理 の 決 定 の た め 、 5 4 日 目 ( 5 d p c ) に 肺 を 収 集 し た 。 デ ー タ を 、 8 匹 の 個 々 の コ ッ ト ン ラ ッ ト / 群 の 幾 何 平 均 力 価 で 示 す 。 個 々 の 動 物 が < 2 5 ( 検 出 限 界 ) の 力 価 を 有 し た 場 合 、 力 価 5 を 割 り 当 て た 。

20

【 0 5 0 3 】

## 【表 8】

表8: 14日目と35日目のRSV血清中和力価

| ワクチン     | 用量                   | PRNT60 |       |
|----------|----------------------|--------|-------|
|          |                      | 2wp1   | 2wp2  |
| A317     | 10 µg                | 78     | 240   |
| A317     | 1 µg                 | 58     | 70    |
| CNE17    | 1 µg                 | 91     | 269   |
| CNE17    | 0.1 µg               | 63     | 145   |
| RV01(01) | 1 µg                 | 103    | 667   |
| RV01(01) | 0.1 µg               | 46     | 130   |
| VRP      | 5x10 <sup>6</sup> IU | 149    | 683   |
| F三量体/アラム | 10 µg                | 142    | >5120 |
| FI-RSV   | 5200 FI-pfu          | 28     | 38    |
| なし       |                      | 30     | <20   |

30

表 8 . 0 日 目 と 2 1 日 目 の 筋 肉 内 ワ ク チ ン 接 種 後 の コ ッ ト ン ラ ッ ト ( *S i g m o d o n h i s p i d u s* ) ( 8 匹 の 動 物 / 群 ) の R S V 血 清 中 和 力 価 。 分 析 の た め 、 1 4 日 目 ( 2 w p 1 ) と 3 5 日 目 ( 2 w p 2 ) に 血 清 を 収 集 し た 。 デ ー タ を 6 0 % プ ラ ー ク 減 少 中 和 力 価 で 示 す 。 4 匹 の コ ッ ト ン ラ ッ ト / 群 の 2 つ の プ ー ル の 幾 何 平 均 力 価 。 個 々 の 動 物 が < 2 5 ( 検 出 限 界 ) の 力 価 を 有 し た 場 合 、 力 価 5 を 割 り 当 て た 。

40

【 0 5 0 4 】

## 【表 9】

表9:RSVチャレンジ5日後の肺のウイルス力価

| ワクチン        | 用量                   | pfu/g 肺<br>5dpc |
|-------------|----------------------|-----------------|
| A317        | 10 µg                | 397             |
| A317        | 1 µg                 | 659             |
| CNE17       | 1 µg                 | 414             |
| CNE17       | 0.1 µg               | 572             |
| RV01(01)    | 1 µg                 | 445             |
| RV01(01)    | 0.1 µg               | 716             |
| VRP         | 5x10 <sup>6</sup> IU | 359             |
| F三量体/アラム    | 10 µg                | 190             |
| FI-RSV      | 5200 FI-pfu          | 5248            |
| なし(チャレンジあり) |                      | 728618          |

10

表 9 : 0 日目と 2 1 日目の筋肉内ワクチン接種後のコットンラット ( *Sigmodon hispidus* ) ( 8 匹の動物 / 群 ) の R S V チャレンジ 5 日後の肺のウイルス力価。4 9 日目、すべての動物を  $1 \times 10^5$  pfu の R S V で鼻腔内にチャレンジした。ウイルス負荷および肺病理の決定のため、5 4 日目 ( 5 d p c ) に肺を収集した。データを、ブランクアッセイによって決定されたブランク形成単位 / グラム肺で示す。8 匹の個々のコットンラット / 群の幾何平均力価。個々の動物が < 2 0 0 ( 検出限界 ) の力価を有した場合、力価 1 0 0 を割り当てた。

20

【 0 5 0 5 】

## 【表 1 0】

表10:RSVチャレンジ5日後の肺の肺炎スコア

| ワクチン        | 用量                   | 表示の肺炎スコアを有するコットンラットの数 |   |   |   |   |
|-------------|----------------------|-----------------------|---|---|---|---|
|             |                      | 0                     | 1 | 2 | 3 | 4 |
| A3171       | 10 µg                | 8                     |   |   |   |   |
| A3171       | 1 µg                 | 8                     |   |   |   |   |
| CNE17       | 1 µg                 | 8                     |   |   |   |   |
| CNE17       | 0.1 µg               | 7                     | 1 |   |   |   |
| RV01(01)    | 1 µg                 | 6                     | 2 |   |   |   |
| RV01(01)    | 0.1 µg               | 8                     |   |   |   |   |
| VRP         | 5x10 <sup>6</sup> IU | 3                     | 4 | 1 |   |   |
| F三量体/アラム    | 10 µg                | 7                     | 1 |   |   |   |
| FI-RSV      | 5200 FI-pfu          | 1                     | 4 | 3 |   |   |
| なし(チャレンジあり) |                      | 5                     | 3 |   |   |   |

30

表 1 0 . 0 日目と 2 1 日目の筋肉内ワクチン接種後のコットンラット ( *Sigmodon hispidus* ) ( 8 匹の動物 / 群 ) の R S V チャレンジ 5 日後の肺の肺炎。4 9 日目、すべての動物を  $1 \times 10^5$  pfu の R S V で鼻腔内にチャレンジした。ウイルス負荷および肺病理の決定のため、5 4 日目 ( 5 d p c ) に肺を収集した。病変を 4 点の半定量的スケールで評価した。最小 ( 1 ) 変化は、1 つまたは数個の小病巣を含むものとした ; 軽度 ( 2 ) 変化は、小 ~ 中くらいの大きさの病巣で構成されたものとした ; 中等度 ( 3 ) 変化は、いくつものおよび / または中等度の大きさの病巣を含むものとした ; 顕著な ( 4 ) 変化は、広範にコンフルエントな病巣を示し、組織の大部分 / 全部が影響を受けたものとした。

40

【 0 5 0 6 】

( 結論 )

この試験の目的の 1 つは、コットンラット R S V モデルにおけるレプリコン RNA の免疫原性と防御能を調べることであった。別の目的は、ワクチンの免疫原性および有効性に対するリポソームおよび C N E 1 7 処方の効果の評価することであった。非処方レプリコン RNA では、1 回のワクチン接種後、血清 F 特異的 I g G および R S V 中和抗体が誘導され、この応答は 2 回目のワクチン接種により高まった。リポソームおよび C N E 1 7 処

50

方物は、このモデルにおいて同様に有効であり、2回目のワクチン接種後、1  $\mu$ g のレプリコンRNA に対する F 特異的 IgG の力価はおよそ 8 倍、および中和力価は 4 ~ 10 倍高まった（それぞれ、CNE17 およびリポソーム）。レプリコンRNA ワクチンはすべて、経鼻 RSV チャレンジからの防御をもたらし、5 日後に測定したとき、肺のウイルス負荷が 3 桁超低減された。リポソームを用いて処方された 1  $\mu$ g のレプリコンRNA によって生じる免疫応答の大きさおよび防御能は、 $5 \times 10^6$  個の VRP によって誘起される応答の 2 倍以内であった。アラムアジュバント含有三量体サブユニットでは、最も高い全抗 F IgG ELISA 力価が誘起され、最も高い中和力価が誘起され、この試験で試験したいずれのワクチン調製物でチャレンジしたときも、肺において RSV 力価からの最も大きな度合の防御が誘起された。

10

## 【0507】

（実施例 7B - RSV - F 免疫原性試験（10 - 1001））

RSV の表面融合糖タンパク質（RSV - F）を発現する A317 レプリコンをこの実験に使用した。BALB/c マウス（10 匹の動物 / 群）に、RSV - F 発現 VRP（ $1 \times 10^6$  IU）、裸の自己複製 RNA（A317, 1  $\mu$ g）、エレクトロポレーションを用いて送達する自己複製 RNA（A317, 10  $\mu$ g）、リポソームにおいて処方した自己複製 RNA（RV01（01）, A317, 0.1  $\mu$ g もしくは 1  $\mu$ g）および CNE17 を用いて処方した自己複製 RNA（A317, 0.1  $\mu$ g もしくは 1  $\mu$ g）で、0 日目と 21 日目に、両側に筋肉内ワクチン接種（50  $\mu$ L / 脚）を行なった。抗体分析のため、血清を、14 日目（2wp1）、35 日目（2wp2）および 49 日目（4wp2）に収集した。T 細胞分析のため、49 日目（4wp2）に 5 匹のマウス / 群から脾臓を収集した。

20

## 【0508】

（結果）

## 【0509】

## 【表 11】

表 11: 14 日目の F 特異的血清 IgG の力価

|            | 1 $\mu$ g<br>A317 | 0.1 $\mu$ g<br>RV01(01) | 1 $\mu$ g<br>RV01(01) | 0.1 $\mu$ g<br>CNE17 | 1 $\mu$ g<br>CNE17 | 10 $\mu$ g<br>A317+<br>EP | 1E6 IU<br>VRP |
|------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|---------------|
|            | 529               | 14385                   | 19299                 | 2429                 | 3373               | 5                         | 6041          |
|            | 1530              | 10713                   | 19170                 | 2060                 | 4417               | 88                        | 4912          |
|            | 2734              | 12756                   | 13860                 | 2012                 | 1927               | 964                       | 12923         |
|            | 2503              | 11546                   | 17352                 | 1887                 | 3597               | 7235                      | 7075          |
|            | 5539              | 15300                   | 22094                 | 3174                 | 5731               | 2558                      | 6829          |
|            | 1033              | 14072                   | 21213                 | 3904                 | 2852               | 5105                      | 4885          |
|            | 5110              | 18274                   | 17915                 | 1481                 | 3739               | 9806                      | 3680          |
|            | 1106              | 7873                    | 15659                 | 2345                 | 4904               | 2787                      | 9813          |
|            | 1493              | 17175                   | 6669                  | 3084                 | 3824               | 2576                      | 8631          |
|            | 3456              | 19730                   | 13259                 | 2497                 | 3004               | 1858                      | 6314          |
| <b>GMT</b> | <b>1980</b>       | <b>13731</b>            | <b>15903</b>          | <b>2398</b>          | <b>3590</b>        | <b>1180</b>               | <b>6685</b>   |

30

表 11 .（10 - 1001）筋肉内ワクチン接種の 14 日後のマウス（10 匹の動物 / 群）の F 特異的血清 IgG の力価。データを、個々のマウスの力価および 10 匹の個々のマウス / 群の幾何平均力価で示す。個々の動物が < 25（検出限界）の力価を有した場合、力価 5 を割り当てた。

40

## 【0510】

## 【表 1 2】

表12:35日目のF特異的血清IgGの力価

|            | 1 µg<br>A317 | 0.1 µg<br>RV01(01) | 1 µg<br>RV01(01) | 0.1 µg<br>CNE17 | 1 µg<br>CNE17 | 10 µg<br>A317+<br>EP | 1E6 IU<br>VRP |
|------------|--------------|--------------------|------------------|-----------------|---------------|----------------------|---------------|
|            | 958          | 128208             | 227021           | 48079           | 8473          | 14612                | 813045        |
|            | 12518        | 191729             | 212911           | 17589           | 58556         | 22805                | 365485        |
|            | 4839         | 315786             | 303987           | 8522            | 12053         | 32156                | 961601        |
|            | 10128        | 218147             | 335071           | 10985           | 20395         | 24090                | 349215        |
|            | 18451        | 225622             | 155893           | 30801           | 51514         | 31053                | 297526        |
|            | 9805         | 182693             | 519162           | 13372           | 26348         | 18105                | 207652        |
|            | 19154        | 185342             | 169332           | 5137            | 80686         | 23918                | 1580066       |
|            | 4490         | 82744              | 489441           | 47173           | 21014         | 9091                 | 900889        |
|            | 14674        | 190010             | 131361           | 78232           | 61076         | 21006                | 822285        |
|            | 15223        | 553164             | 254500           | 24135           | 25499         | 9835                 | 587121        |
| <b>GMT</b> | <b>8532</b>  | <b>201892</b>      | <b>253687</b>    | <b>20767</b>    | <b>29111</b>  | <b>19117</b>         | <b>579033</b> |

10

表 1 2 . ( 1 0 - 1 0 0 1 ) 0 日 目 と 2 1 日 目 の 筋 肉 内 ワ ク チ ン 接 種 後 の マ ウ ス ( 1 0 匹 の 動 物 / 群 ) の F 特 異 的 血 清 I g G の 力 価 。 抗 体 分 析 の た め 、 血 清 を 3 5 日 目 ( 2 w p 2 ) に 収 集 し た 。 デ ー タ を 、 個 々 の マ ウ ス の 力 価 お よ び 1 0 匹 の 個 々 の マ ウ ス / 群 の 幾 何 平 均 力 価 で 示 す 。 個 々 の 動 物 が < 2 5 ( 検 出 限 界 ) の 力 価 を 有 し た 場 合 、 力 価 5 を 割 り 当 て た 。

20

## 【 0 5 1 1 】

## 【表 1 3】

表13:49日目のF特異的血清IgGの力価

|            | 1 µg<br>A317 | 0.1 µg<br>RV01(01) | 1 µg<br>RV01(01) | 0.1 µg<br>CNE17 | 1 µg<br>CNE17 | 10 µg<br>A317+<br>EP | 1E6 IU<br>VRP |
|------------|--------------|--------------------|------------------|-----------------|---------------|----------------------|---------------|
|            | 1248         | 140407             | 133787           | 52747           | 34245         | 30388                | 366771        |
|            | 12441        | 155669             | 182995           | 29352           | 128030        | 20768                | 209400        |
|            | 4967         | 203059             | 211020           | 10857           | 17016         | 53763                | 360615        |
|            | 14536        | 134253             | 488698           | 28800           | 57250         | 28373                | 191475        |
|            | 31556        | 370726             | 158816           | 44613           | 76576         | 34318                | 139148        |
|            | 13815        | 184738             | 185184           | 20314           | 42357         | 35736                | 63839         |
|            | 20495        | 141644             | 103026           | 4546            | 101445        | 34611                | 192101        |
|            | 4800         | 76711              | 312096           | 27476           | 47285         | 10138                | 177858        |
|            | 19159        | 143275             | 139811           | 68386           | 55865         | 23958                | 130218        |
|            | 26836        | 479594             | 230331           | 24360           | 52871         | 13624                | 174378        |
| <b>GMT</b> | <b>10947</b> | <b>177168</b>      | <b>194350</b>    | <b>24891</b>    | <b>53615</b>  | <b>25888</b>         | <b>180420</b> |

30

表 1 3 . ( 1 0 - 1 0 0 1 ) 0 日 目 と 2 1 日 目 の 筋 肉 内 ワ ク チ ン 接 種 後 の マ ウ ス ( 1 0 匹 の 動 物 / 群 ) の F 特 異 的 血 清 I g G の 力 価 。 抗 体 分 析 の た め 、 血 清 を 4 9 日 目 ( 4 w p 2 ) に 収 集 し た 。 デ ー タ を 、 個 々 の マ ウ ス の 力 価 お よ び 1 0 匹 の 個 々 の マ ウ ス / 群 の 幾 何 平 均 力 価 で 示 す 。 個 々 の 動 物 が < 2 5 ( 検 出 限 界 ) の 力 価 を 有 し た 場 合 、 力 価 5 を 割 り 当 て た 。

40

## 【 0 5 1 2 】

## 【表 1 4】

表14:35日目のRSV血清中和力価

| A317,<br>1 $\mu$ g | RV01(01)<br>0.1 $\mu$ g | RV01(01)<br>1 $\mu$ g | CNE17<br>0.1 $\mu$ g | CNE17<br>1 $\mu$ g | VRP<br>1E6 IU |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|---------------|
| 2wp2               | 2wp2                    | 2wp2                  | 2wp2                 | 2wp2               | 2wp2          |
| NA                 | 143                     | 106                   | NA                   | NA                 | 265           |
| NA                 | 272                     | 62                    | NA                   | NA                 | 73            |
| NA                 | 294                     | <40                   | NA                   | NA                 | 77            |
| NA                 | 814                     | 334                   | NA                   | NA                 | 140           |
| NA                 | 67                      | 86                    | NA                   | NA                 | 290           |
| NA                 | 420                     | 125                   | NA                   | NA                 | 134           |
| NA                 | <40                     | 566                   | NA                   | NA                 | 466           |
| NA                 | 104                     | 292                   | NA                   | NA                 | 127           |
| NA                 | 241                     | <40                   | NA                   | NA                 | 75            |
| NA                 | 223                     | 44                    | NA                   | NA                 | 77            |
| <b>GMT</b>         | <b>NA</b>               | <b>96</b>             | <b>NA</b>            | <b>NA</b>          | <b>139</b>    |

10

表 1 4 : ( 1 0 - 1 0 0 1 ) 0 日 目 と 2 1 日 目 の 筋 肉 内 ワ ク チ ン 接 種 後 の マ ウ ス ( 1 0 匹 の 動 物 / 群 ) の R S V 血 清 中 和 力 価 。 分 析 の た め 、 3 5 日 目 ( 2 w p 2 ) に 血 清 を 収 集 し た 。 デ ー タ を 、 個 々 の マ ウ ス の 6 0 % プ ラ ー ク 減 少 中 和 力 価 お よ び 1 0 匹 の 個 々 の マ ウ ス / 群 の 幾 何 平 均 力 価 で 示 す 。 個 々 の 動 物 が < 4 0 ( 検 出 限 界 ) の 力 価 を 有 し た 場 合 、 力 価 2 0 を 割 り 当 て た 。 N A = ア ッ セ イ せ ず 。

20

## 【 0 5 1 3】

## 【表 1 5】

表15:49日目のRSV血清中和力価

| A317,<br>1 $\mu$ g | RV01(01)<br>0.1 $\mu$ g | RV01(01)<br>1 $\mu$ g | CNE17<br>0.1 $\mu$ g | CNE17<br>1 $\mu$ g | VRP<br>1E6 IU |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|---------------|
| 4wp2               | 4wp2                    | 4wp2                  | 4wp2                 | 4wp2               | 4wp2          |
| <40                | 194                     | 82                    | <40                  | <40                | 161           |
| <40                | 272                     | 165                   | <40                  | 70                 | 64            |
| <40                | 142                     | <40                   | <40                  | <40                | 126           |
| <40                | 881                     | 442                   | <40                  | 76                 | 151           |
| <40                | 61                      | 108                   | 42                   | 57                 | 194           |
| <40                | 426                     | 156                   | 52                   | <40                | 123           |
| <40                | 78                      | 814                   | <40                  | <40                | 1033          |
| <40                | <40                     | 291                   | 173                  | <40                | 174           |
| <40                | 246                     | 103                   | <40                  | <40                | 122           |
| <40                | 574                     | 396                   | <40                  | <40                | 76            |
| <b>GMT</b>         | <b>&lt;40</b>           | <b>231</b>            | <b>29</b>            | <b>29</b>          | <b>155</b>    |

30

表 1 5 : ( 1 0 - 1 0 0 1 ) 0 日 目 と 2 1 日 目 の 筋 肉 内 ワ ク チ ン 接 種 後 の マ ウ ス ( 1 0 匹 の 動 物 / 群 ) の R S V 血 清 中 和 力 価 。 分 析 の た め 、 4 9 日 目 ( 4 w p 2 ) に 血 清 を 収 集 し た 。 デ ー タ を 、 個 々 の マ ウ ス の 6 0 % プ ラ ー ク 減 少 中 和 力 価 お よ び 1 0 匹 の 個 々 の マ ウ ス / 群 の 幾 何 平 均 力 価 で 示 す 。 個 々 の 動 物 が < 4 0 ( 検 出 限 界 ) の 力 価 を 有 し た 場 合 、 力 価 2 0 を 割 り 当 て た 。 N A = ア ッ セ イ せ ず 。

40

## 【 0 5 1 4】

【表 16】

表16:49日目のT細胞応答

| 4wp2 脾臓 CD4 T<br>細胞応答 | CD4+CD8-脾臓 T 細胞: % サイトカイン陽性でRSV F51-66<br>ペプチド特異的 |                        |                 |                        |
|-----------------------|---|------------------------|-----------------|------------------------|
|                       | IFN $\gamma$ +                                    | IL2+                   | IL5+            | TNF $\alpha$ +         |
| VRP 1E6 IU            | <b>0.07</b> $\pm$ 0.06                            | 0.04 $\pm$ 0.05        | 0.00 $\pm$ 0.02 | <b>0.10</b> $\pm$ 0.04 |
| 1 $\mu$ g A317        | 0.00 $\pm$ 0.05                                   | <b>0.05</b> $\pm$ 0.04 | 0.00 $\pm$ 0.01 | <b>0.03</b> $\pm$ 0.02 |
| RV01(01) 1 $\mu$ g    | 0.04 $\pm$ 0.06                                   | <b>0.07</b> $\pm$ 0.05 | 0.00 $\pm$ 0.01 | <b>0.09</b> $\pm$ 0.03 |
| RV01(01) 0.1 $\mu$ g  | <b>0.06</b> $\pm$ 0.05                            | <b>0.08</b> $\pm$ 0.04 | 0.00 $\pm$ 0.01 | <b>0.10</b> $\pm$ 0.03 |
| CNE17 1 $\mu$ g       | 0.00 $\pm$ 0.05                                   | 0.04 $\pm$ 0.04        | 0.00 $\pm$ 0.01 | <b>0.05</b> $\pm$ 0.02 |
| CNE17 0.1 $\mu$ g     | 0.00 $\pm$ 0.05                                   | 0.02 $\pm$ 0.04        | 0.00 $\pm$ 0.01 | <b>0.02</b> $\pm$ 0.02 |
| 10 $\mu$ g vA317 + EP | 0.02 $\pm$ 0.06                                   | <b>0.04</b> $\pm$ 0.04 | 0.01 $\pm$ 0.01 | <b>0.05</b> $\pm$ 0.03 |
| なし                    | 0.04 $\pm$ 0.06                                   | 0.00 $\pm$ 0.05        | 0.00 $\pm$ 0.02 | 0.00 $\pm$ 0.01        |

10

表 16 . ( 1 0 - 1 0 0 1 ) 4 9 日 目 ( 4 w p 2 ) の R S V F 特 異 的 C D 4 + 脾 臓 T 細 胞 の 頻 度 。 正 味 の ( 抗 原 特 異 的 ) サ イ ト カ イ ン 陽 性 頻 度 ( % )  $\pm$  9 5 % 信 頼 半 区 間 ( h a l f - i n t e r v a l ) を 示 す 。 太 字 で 示 し た 正 味 の 頻 度 は 、 統 計 学 的 に 有 意 に > 0 で あ っ た 刺 激 応 答 を 示 す 。

【 0 5 1 5 】

【表 17】

表17:49日目のT細胞応答

| 4wp2 脾臓 CD8 T<br>細胞応答 | CD8+CD4-脾臓 T 細胞: %<br>サイトカイン陽性でRSV FペプチドF85-93およびF249-258特異的 |                        |                  |                        |
|-----------------------|--|------------------------|------------------|------------------------|
|                       | IFN $\gamma$ +   | IL2+                   | IL5+             | TNF $\alpha$ +         |
| VRP 1E6 IU            | <b>3.48</b> $\pm$ 0.29                                       | <b>1.21</b> $\pm$ 0.18 | -0.03 $\pm$ 0.05 | <b>3.31</b> $\pm$ 0.28 |
| 1 $\mu$ g A317        | <b>0.74</b> $\pm$ 0.15                                       | <b>0.46</b> $\pm$ 0.11 | -0.03 $\pm$ 0.04 | <b>0.70</b> $\pm$ 0.14 |
| RV01(01) 1 $\mu$ g    | <b>3.69</b> $\pm$ 0.28                                       | <b>1.43</b> $\pm$ 0.18 | -0.01 $\pm$ 0.04 | <b>3.44</b> $\pm$ 0.27 |
| RV01(01) 0.1 $\mu$ g  | <b>2.52</b> $\pm$ 0.23                                       | <b>1.10</b> $\pm$ 0.15 | 0.03 $\pm$ 0.03  | <b>2.31</b> $\pm$ 0.22 |
| CNE17 1 $\mu$ g       | <b>1.25</b> $\pm$ 0.17                                       | <b>0.60</b> $\pm$ 0.12 | 0.01 $\pm$ 0.03  | <b>1.15</b> $\pm$ 0.16 |
| CNE17 0.1 $\mu$ g     | <b>0.89</b> $\pm$ 0.15                                       | <b>0.49</b> $\pm$ 0.11 | -0.03 $\pm$ 0.04 | <b>0.83</b> $\pm$ 0.14 |
| 10 $\mu$ g A317 + EP  | <b>0.85</b> $\pm$ 0.15                                       | <b>0.53</b> $\pm$ 0.11 | 0.01 $\pm$ 0.04  | <b>0.72</b> $\pm$ 0.15 |
| なし                    | 0.01 $\pm$ 0.07  | 0.00 $\pm$ 0.05        | -0.02 $\pm$ 0.05 | 0.02 $\pm$ 0.06        |

20

30

表 1 7 . ( 1 0 - 1 0 0 1 ) 4 9 日 目 ( 4 w p 2 ) の R S V F 特 異 的 C D 8 + 脾 臓 T 細 胞 の 頻 度 。 正 味 の ( 抗 原 特 異 的 ) サ イ ト カ イ ン 陽 性 頻 度 ( % )  $\pm$  9 5 % 信 頼 半 区 間 を 示 す 。 太 字 で 示 し た 正 味 の 頻 度 は 、 統 計 学 的 に 有 意 に > 0 で あ っ た 刺 激 応 答 を 示 す 。

【 0 5 1 6 】

( 結 論 )

リポソーム処方物では、裸のRNA対照と比べて、免疫原性（F特異的IgGの力価の増大によって決定（8～30倍の増大））、中和力価、ならびにCD4 T細胞応答およびCD8 T細胞応答が有意に増強された。驚いたことに、RV01(01)のF特異的IgGの力価と中和力価は、0.1および1.0  $\mu$ gの両方の用量において、VRP（ $1 \times 10^6$  IU）と同等であった。LNP処方物でのT細胞応答は、高用量ではVRP（ $1 \times 10^6$  IU）と同等であった。CNE17を用いた自己複製RNAの処方物では、裸のRNA対照と比べて、免疫原性（F特異的IgGの力価の増大によって決定（2～5倍の増大））、中和力価、ならびにCD4 T細胞応答およびCD8 T細胞応答が有意に増強された。RNAのエレクトロポレーションにより、裸のRNA対照と比べて免疫原性が増強されたが、リポソーム送達よりは有意に低かった。

40

【 0 5 1 7 】

( 実 施 例 7 C - R S V - F 免 疫 原 性 試 験 ( 1 0 - 1 0 1 8 ) )

R S V の 表 面 融 合 糖 タ ン プ ク 質 ( R S V - F ) を 発 現 する A 3 1 7 レ プ リ コ ン を こ の 実 験 に 使 用 し た 。 B A L B / c マ ウ ス ( 8 匹 の 動 物 / 群 ) に 、 R S V - F 発 現 V R P ( 1  $\times$

50



10<sup>6</sup> IU)、裸の自己複製RNA (A306, 1, 0.1, 0.01 µg) およびリポソームにおいて処方した自己複製RNA (RV01(01), 方法1 (A317, 10.0, 1.0, 0.1, 0.01 µg) を使用) で、0日目と21日目に、両側に筋肉内ワクチン接種 (50 µL / 脚) を行なった。抗体分析のため、血清を14日目 (2wp1) および (2wp2) に収集した。T細胞分析のため、49日目 (4wp2) に5匹のマウス / 群から脾臓を収集した。

【0518】

(結果)

RV01(01) リポソーム処方物は、多分散度指数が0.14で158 nmのZ平均粒子直径を有するものであり、被包効率は96%であった。14日目と35日目のF特異的血清IgGの力価を表18と19に示し、49日目のT細胞応答を表20と21に示す。

10

【0519】

【表18】

表18: 14日目と35日目のF特異的血清IgGの力価

| VRP        |             | A317         |           |             |          |            |          |           |
|------------|-------------|--------------|-----------|-------------|----------|------------|----------|-----------|
| 1E6 IU     |             | 1 µg         |           | 0.1 µg      |          | 0.01 µg    |          |           |
| 2wp1       | 2wp2        | 2wp1         | 2wp2      | 2wp1        | 2wp2     | 2wp1       | 2wp2     |           |
| 6334       | 39539       | 772          | 4687      | 5           | 2334     | 143        | 1377     |           |
| 1500       | 14895       | 5            | 142       | 5           | 161      | 5          | 333      |           |
| 5450       | 38252       | 109          | 2972      | 5           | 145      | 5          | 5        |           |
| 1835       | 12831       | 5            | 3674      | 5           | 97       | 5          | 5        |           |
| 2277       | 30326       | 5            | 5003      | 5           | 1077     | 5          | 175      |           |
| 2818       | 33437       | 663          | 8258      | 221         | 457      | 5          | 5        |           |
| 2405       | 22551       | 257          | 845       | 5           | 1558     | 5          | 456      |           |
| 2137       | 19179       | 5            | 1765      | 5           | 5        | 5          | 180      |           |
| <b>GMT</b> | <b>2735</b> | <b>24427</b> | <b>41</b> | <b>2144</b> | <b>8</b> | <b>259</b> | <b>8</b> | <b>73</b> |

20

表18: (10-1018) 0日目と21日目の筋肉内ワクチン接種後のマウス (8匹の動物 / 群) のF特異的血清IgGの力価。抗体分析のため、血清を14日目 (2wp1) と35日目 (2wp2) に収集した。データを、個々のマウスおよび8匹の個々のコントロール / 群の幾何平均力価で示す。個々の動物が < 25 (検出限界) の力価を有した場合、力価5を割り当てた。

30

【0520】

【表19】

表19: 14日目と35日目のF特異的血清IgGの力価

| RV01(01)   |             |              |             |              |             |              |            |             |
|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|------------|-------------|
| 10 µg      |             | 1 µg         |             | 0.1 µg       |             | 0.01 µg      |            |             |
| 2wp1       | 2wp2        | 2wp1         | 2wp2        | 2wp1         | 2wp2        | 2wp1         | 2wp2       |             |
| 5880       | 82689       | 7255         | 45018       | 4072         | 22174       | 619          | 2872       |             |
| 6126       | 42529       | 3009         | 22288       | 3974         | 27730       | 474          | 3603       |             |
| 8069       | 76263       | 5385         | 23561       | 3272         | 15328       | 914          | 2692       |             |
| 5966       | 108234      | 4148         | 53675       | 3968         | 24456       | 2011         | 11542      |             |
| 8590       | 57912       | 4210         | 37004       | 4950         | 13014       | 903          | 4684       |             |
| 7172       | 74162       | 2179         | 24179       | 2856         | 13694       | 1575         | 6720       |             |
| 8072       | 122796      | 1640         | 5994        | 4073         | 17849       | 438          | 16514      |             |
| 8706       | 83601       | 5725         | 28760       | 3797         | 17342       | 1058         | 13665      |             |
| <b>GMT</b> | <b>7235</b> | <b>77338</b> | <b>3783</b> | <b>25790</b> | <b>3826</b> | <b>18325</b> | <b>879</b> | <b>6235</b> |

40

表19: 23Aから継続。(10-1018) 0日目と21日目の筋肉内ワクチン接種後

50

のマウス（8匹の動物/群）のF特異的血清IgGの力価。抗体分析のため、血清を14日目（2wp1）と35日目（2wp2）に収集した。データを、個々の動物および8匹の個々のコットラット/群の幾何平均力価（GMT）で示す。個々の動物が<25（検出限界）の力価を有した場合、力価5を割り当てた。

【0521】

【表20】

表20:49日目のT細胞応答

| 4wp2<br>脾臓T細胞<br>応答 | CD4+CD8- 脾臓T細胞 :<br>サイトカイン陽性でRSV F51-66ペプチド特異的 % |                    |             |                    |
|---------------------|--|--------------------|-------------|--------------------|
|                     | IFNg+  | IL2+               | IL5+        | TNFa+              |
| VRP 1E6 IU          | 0.00 ± 0.02                                      | <b>0.07</b> ± 0.02 | 0.00 ± 0.01 | <b>0.07</b> ± 0.03 |
| 1 µg A317           | 0.01 ± 0.01                                      | <b>0.03</b> ± 0.02 | 0.00 ± 0.01 | <b>0.03</b> ± 0.02 |
| 0.1 µg A317         | 0.00 ± 0.01                                      | 0.01 ± 0.01        | 0.00 ± 0.00 | <b>0.01</b> ± 0.01 |
| 0.01 µg A317        | 0.00 ± 0.00                                      | <b>0.01</b> ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 | 0.00 ± 0.01        |
| RV01(01), 10 µg     | <b>0.02</b> ± 0.01                               | <b>0.05</b> ± 0.02 | 0.00 ± 0.00 | <b>0.06</b> ± 0.02 |
| RV01(01), 1 µg      | <b>0.03</b> ± 0.02                               | <b>0.08</b> ± 0.02 | 0.00 ± 0.01 | <b>0.09</b> ± 0.02 |
| RV01(01), 0.1 µg    | <b>0.02</b> ± 0.01                               | <b>0.03</b> ± 0.01 | 0.00 ± 0.01 | <b>0.03</b> ± 0.02 |
| RV01(01), 0.01 µg   | 0.00 ± 0.00                                      | <b>0.02</b> ± 0.02 | 0.01 ± 0.01 | <b>0.02</b> ± 0.02 |
| なし                  | 0.00 ± 0.00                                      | 0.00 ± 0.01        | 0.00 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01        |

表20.49日目（実験10-1018, 4wp2）のRSV F特異的CD4+脾臓T細胞の頻度。正味の（抗原特異的）サイトカイン陽性頻度（%）±95%信頼半区間を示す。太字で示した正味の頻度は、統計学的に有意に>0であった刺激応答を示す。

【0522】

【表21】

表21:49日目のT細胞応答

| 4wp2<br>脾臓T細胞<br>応答 | CD8+CD4- 脾臓T細胞 :<br>サイトカイン陽性でRSV FペプチドF85-93およびF249-258特異的 % |                    |             |                    |
|---------------------|--|--------------------|-------------|--------------------|
|                     | IFNg+  | IL2+               | IL5+        | TNFa+              |
| VRP 1E6 IU          | <b>2.45</b> ± 0.21   | <b>0.58</b> ± 0.10 | 0.00 ± 0.01 | <b>2.64</b> ± 0.21 |
| 1 µg A317           | <b>1.68</b> ± 0.17   | <b>0.45</b> ± 0.09 | 0.00 ± 0.02 | <b>1.75</b> ± 0.18 |
| 0.1 µg A317         | <b>0.21</b> ± 0.07   | <b>0.08</b> ± 0.04 | 0.01 ± 0.02 | <b>0.30</b> ± 0.08 |
| 0.01 µg A317        | <b>0.06</b> ± 0.05   | <b>0.05</b> ± 0.03 | 0.01 ± 0.02 | <b>0.16</b> ± 0.06 |
| RV01(01), 10 µg     | <b>3.32</b> ± 0.23   | <b>0.69</b> ± 0.11 | 0.00 ± 0.02 | <b>3.90</b> ± 0.25 |
| RV01(01), 1 µg      | <b>1.81</b> ± 0.17   | <b>0.59</b> ± 0.10 | 0.00 ± 0.02 | <b>2.04</b> ± 0.20 |
| RV01(01), 0.1 µg    | <b>0.91</b> ± 0.12   | <b>0.32</b> ± 0.07 | 0.00 ± 0.01 | <b>1.06</b> ± 0.14 |
| RV01(01), 0.01 µg   | <b>0.58</b> ± 0.10   | <b>0.33</b> ± 0.08 | 0.00 ± 0.01 | <b>0.64</b> ± 0.11 |
| なし                  | 0.01 ± 0.02  | 0.01 ± 0.01        | 0.00 ± 0.01 | 0.00 ± 0.05        |

表21.49日目（実験10-1018, 4wp2）のF特異的脾臓CD8+T細胞の頻度。正味の（抗原特異的）サイトカイン陽性頻度（%）±95%信頼半区間を示す。太字で示した正味の頻度は、統計学的に有意に>0であった刺激応答を示す。

【0523】

( 結論 )

リポソーム処方物では、裸のRNA対照と比べて、免疫原性（F特異的IgGの力価の増大によって判定）およびT細胞の頻度が有意に増強された。RV01（01）についてのF特異的IgGの力価およびCD8<sup>+</sup>T細胞の頻度は、10 $\mu$ gのRNA用量で、VRP群（1 $\times$ 10<sup>6</sup>IU）と比べて増強された。

【 0 5 2 4 】

( さらなる参考文献 )

以下の参考文献は、その全ての教示が、参照によって本明細書に援用される。

【 0 5 2 5 】

【 数 3 】

1. *Fields Virology*. 4th edition, 2001.
2. Snell *et al.* (1997) *Virus Genes* 14:63-72.
3. Bembridge *et al.* (1999) *J Virol* 73: 10086-10094.
4. Li *et al.* (1998) *J Exp Med* 188:681-688
5. US Patent No. 6,060,308.
6. Yin *et al.* (2006) *Nature* 439:38-45.
7. Kim *et al.* (2007) *J Med Virol* 79: 820-828.
8. Yin *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(26):9288-93.
9. Chen *et al.* (2004) *J Virol* 78:4508-16.
10. Yang *et al.* (2002) *J Virol* 76:4634-42.
11. Harbury *et al.* (1993) *Science* 262:1401-1407.
12. Stevens *et al.* (2004) *Science* 303:1866-70.
13. Burkhard *et al.* (2001) *Trends Cell Biol* 11:82-88.
14. Section 5.5.2 of *Proteins* by Creighton (ISBN 0-7167-2317-4).
15. Yu (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54:1113-1129.
16. Muller *et al.* (2000) *Methods Enzymol* 328:261-282.
17. Beck & Brodsky (1998) *J Struct Biol* 122:17-29.
18. Lupas (1996) *Trends Biochem Sci* 21:375-382.
19. Adamson *et al.* (1993) *Curr Opin Biotechnol* 4:428-347.
20. Kammerer (1997) *Matrix Biol* 15:555-568.
21. Chao *et al.* (1998) *J Chromatog B Biomed Sci Appl* 715:307-329.
22. Arndt *et al.* (2002) *Structure* 10:1235-1248.

10

20

30

40

【 0 5 2 6 】

## 【 数 4 】

23. Liu & Lu (2002) *J Biol Chem* 277:48708-48713.
24. WO2006/011060.
25. Section 5.5.3 of Proteins by Creighton (ISBN 0-7167-2317-4).
26. Zhang & Chen (1999) *J Biol Chem* 274:22409-22413.
27. Slovic *et al.* (2003) *Protein Sci* 12:337-348
28. Gardner & Dutch (2007) *J Virol* 81:8303-14. 10
29. Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
30. Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
31. Greenbaum *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
32. Zurbriggen *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
33. Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
34. Mann *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2425-9. 20
35. Halperin *et al.* (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
36. Herbert *et al.* (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
37. Chen *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2830-6.
38. US Patent No.6355271.
39. WO00/23105.
40. US Patent No. 5,057,540. 30
41. WO96/33739.
42. EP-A-0109942.
43. WO96/11711.
44. WO00/07621.
45. Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
46. Sjolander *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338. 40

## 【 0 5 2 7 】

## 【 数 5 】

47. Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
48. WO95/17211.
49. WO98/42375.
50. Singh *et al* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
51. WO99/27960.
52. US Patent No. 6,090,406. 10
53. US Patent No. 5,916,588.
54. EP-A-0626169.
55. WO99/52549.
56. WO01/21207.
57. WO01/21152.
58. Dyakonova *et al.* (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23. 20
59. FR-2859633.
60. Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
61. WO2004/064715.
62. De Libero *et al.* (2005) *Nature Reviews Immunology* 5:485-496
63. US Patent No.5,936,076.
64. Old *et al.*, *J Clin Investig*, 113:1631-1640
65. US2005/0192248 30
66. Yang *et al.* (2004) *Angew Chem Int Ed* 43:3818-3822
67. WO2005/102049.
68. Goffet *et al* (2004) *Am Chem Soc* 126:13602-13603
69. WO03/105769.
70. Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
71. WO90/14837. 40

## 【 0 5 2 8 】

## 【 数 6 】

72. Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
73. Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
74. *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
75. *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan. 10
76. Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
77. Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
78. WO95/1 1700.
79. US Patent No.6,080,725.
80. WO2005/0971 81.
81. Tassignon *et al.* (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98. 20
82. Myers *et al.* (1990) pages 145-156 of *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.
83. Ulrich (2000) Chapter 16 (pages 273-282) of reference 75.
84. Johnson *et al.* (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
85. Baldrick *et al.* (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
86. US Patent No. 4,680,338.
87. US Patent No. 4,988,815. 30
88. WO92/15582.
89. Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:57 1-577.
90. Wu *et al.* (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
91. Vasilakos *et al.* (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
92. US Patent Nos. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992,

## 【 0 5 2 9 】

## 【 数 7 】

6627640, 6664264, 6664265, 6667312, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088,  
6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000, and 6924293.

93. Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.

94. WO2004/060308.

95. WO2004/064759.

96. US Patent No. 6,924,271.

10

97. US2005/0070556.

98. US Patent No. 5,658,731.

99. US Patent No. 5,011,828.

100. WO2004/87 153.

101. US Patent No. 6,605,617.

102. WO02/18383.

20

103. WO2004/018455.

104. WO03/082272.

105. WO2006/002422.

106. Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

107. Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.

108. Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.

109. Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.

30

110. Thompson *et al.* (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.

111. Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.

112. WO02/26757.

113. WO99/62923.

114. Kricg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.

## 【 0 5 3 0 】

40

## 【 数 8 】

115. McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
116. WO98/40100.
117. US Patent No. 6,207,646.
118. US Patent No. 6,239,116.
119. US Patent No. 6,429,199. 10
120. Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3): 654-658.
121. Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
122. Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
123. WO01/95935.
124. Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
125. Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861. 20
126. WO03/035836.
127. WO01/22972.
128. Thompson *et al.* (2005) *J Leukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'.
129. UK patent application GB-A-22202 11.
130. WO94/21292.
131. WO94/00153. 30
132. WO95/17210.
133. WO96/26741.
134. WO93/19780.
135. WO03/011223.
136. Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-249 1.
137. Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842. 40

## 【 0 5 3 1 】

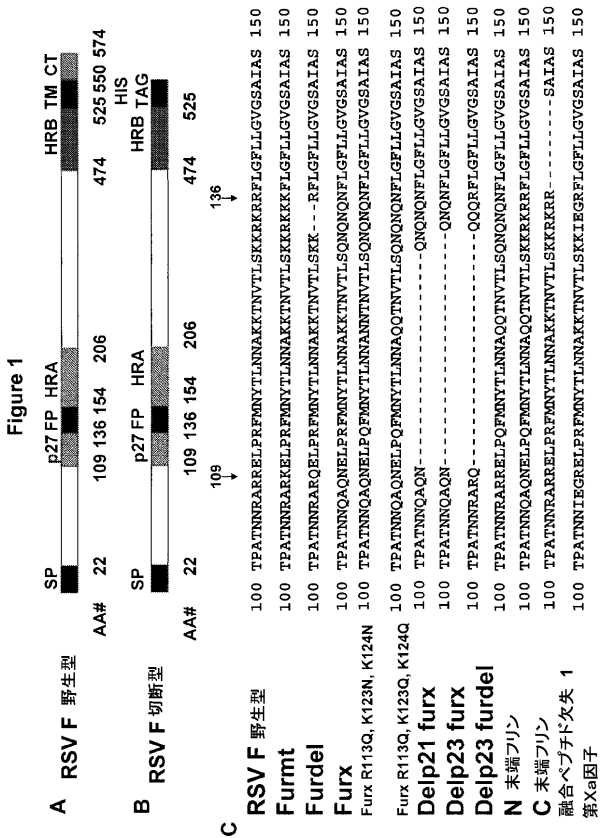
## 【 数 9 】

138. US Patent No. 6,586,409.
139. Wong *et al.* (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
140. US2005/0215517.

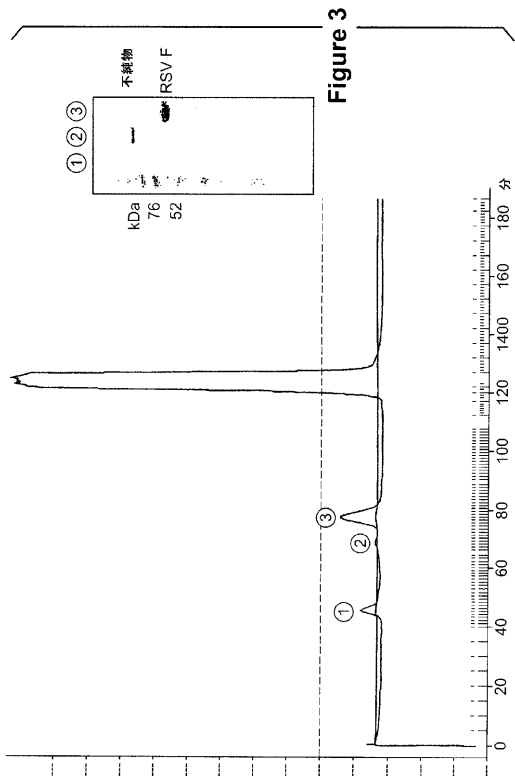
本明細書に引用された全ての文書の全教示は、本明細書により、参照によって本明細書に援用される。



【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】

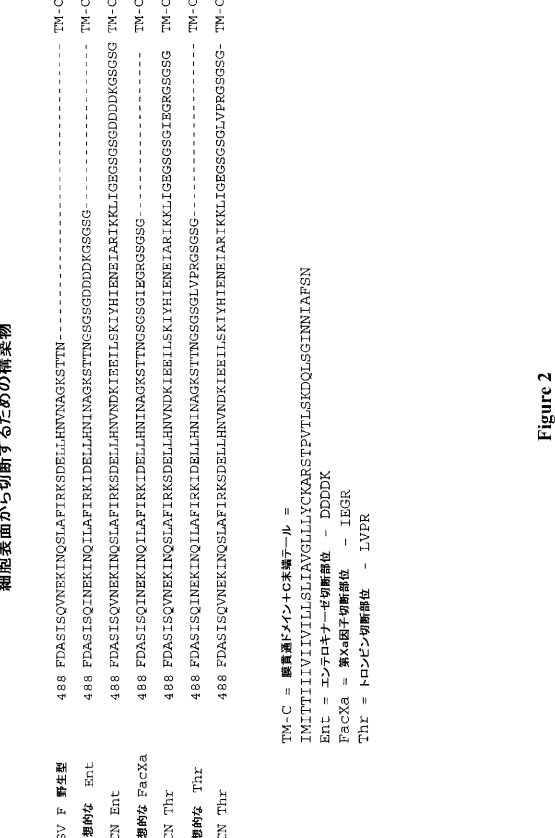


Figure 2

【 図 4 A 】

ATAGCGGGCGCATGAGAAAGCCGACCAATTAACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGA  
 GGAAGCAGCCGCAATCCTCAGAGCTTTCGACGGAGCTTCCCGCAGTTTGGAGTGAAGCCCAAGCAGGTC  
 ACTGATATGACCATGTAATGCGCAGGAGCGTTTCGCATCTGGCTTCAAAAATGATCGAAACGAGGTGG  
 ACCATCCGACACGATCCTTGACATGTAAGAGTGGCCCGCCGACAGATGATGTTCTAAGCACAAGTATCA  
 TTGTATCTGTCGATGAGATGTGGGAAAGTCCGACAGATGTTGATAAGTATCAACTAGCTGAAAGAA  
 AACTGTAAAGAAATACTGATAAGAAATGGCAAGAAATGAAGAGCTCCGCGCCGTCATGAGCGACC  
 CTGACCTGAAACTGAGACTATGTGCTCCAGCAGCAGAGTGTGTCGCTACGAGGCGCAAGTCCGCTGT  
 TTACAGGATGATATACGCGGTTGACGCGCAGCAGCTCTCTATCACCAAGCCAAATGAAGGAGTTAGAGTC  
 GCCTACTGATAGGCTTTGACACACCCCTTTTATGTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCATCATACT  
 CTACCAACTGGCCGACGAAACCGGTAAACCGCTCTGTAACATAGGCTATGAGCTATGAGTATGGA  
 CGGCTCACTGAGGGGATGTCCTTTAGAAAGAAATTTGAACCACTCCAAATGTTCTATCTCTCT  
 GTTGGCTCGACATCTACCCAGAGAGAGGACTTACTGAGGAGCTGGCACTCCGCTGTGATTTCACT  
 TACGTGCAAGCAAAATTAACAATGTCGCTGAGACTATAGTTAGTTGCAAGCGTACGTCGTTAAAG  
 AATAGCTATCAGTCCAGCGCTGATGGAAAGCTTTCAGGCTATGCTGCTAGACTGACCGCAGGGATTC  
 TTGTGCTCAAAGTACAGACACTTGAACGGGAGAGGGTCTCTTTCCGCTGTGACGATATGTCGAC  
 CTACATTTGTGACCAAAATGACTGACATACTGCAACAGATGTGCTAGTGGAGCAGCCGCAAAAATGCT  
 GGTGGCTCAACAGCGTATAGTCTCAACGCTCCGACCCAGAGAAACCAAAATCAATGAAAATATAC  
 CTTTTCGCTAGTGGCCAGGCAATTTGCTAGTGGCCAAAGAAATTAAGGAAGATCAAGAAATGAAA  
 GGCCACTAGGACTAGAGATAGACAGTTAGTATGAGGAGCTTTCAGGCTATGCTGCTAGACTGACCGCAGGGATTC  
 ATCTTATTAAGCCGCGGATACCAAAACCATCAAAAGTGAACAGGATTTCCACTCATCTGCTGTG  
 CCCAGGATAGGAGTAAACATTTGGAGATGGGCTGAGAAACAAGATCAGGAAATGTTAGAGGAGCACA  
 AGGAGCGTCACTCTCATTCGCGGAGAGCTACCAAGACTAAGTGCAGCAGGATGAGGCTAAGGA  
 GGTGGCTGAAGCGGAGGATTCGCGCAGCTCTACCACTTTGGCAGCTGATGTTAGAGGCGCACTCTG  
 GAAGCGATGTAGACTGTATGTTTACAAGAGCTGGGCGCGCTCAGTGGAGACCTCGTGGCTGATAA  
 AGTTACAGCTACGATGGGAGGACAGATCGCTCTTACGCTGCTTCTCCGAGGCTGATCTCAA  
 GAGTGAATAATCTTGCATCCACCTCTCGCTGAAAGTCAATGATGATAACACACTCTGGCGAAAA  
 GGGCTTATGCTGGACCAATCACTGTAAGTGTGGTCCGAGGAGATGCAATACCGTCCAGG  
 ACTTTCAAGCTGTGAAAGTCCACCACTTGTGTACAAGCAAGCTGAGTGTGTAACAGTACTCTGCA  
 CCAATTTGCCACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAAATTAACAATACTGCAAGCCAGCGAG  
 CACGAGCGGAATACCTGTACGACATCGACAGAAACAGTGGCTGAAGAAAGACTGACTCTGGCTAG  
 GGCTCACAGGCGAGCTGGTGGTCTCCATGAAATTCGCTACAGAGGATCTGAGAAACGACGACG  
 CGCTCTTACCAAGTCAACCAATAGGGGTGTATGGCTGCGAGGATCAGGCAAGTCTGGCATATTAAA  
 AGCGAGTCAACAAAAGATCTAGTGTGGCGCCAGAAAGAAATCTGTGAGAAATTAAGGGAGC  
 TCAAGAAATGAAAGGCTGGACCTCAATGCGAAGCTGGAGCTGAGCTGCTCTGAAAGTATGCAACA  
 CCCCCTAGAGACCTGATATTTGACAGGCTTTTGTCTGTCAAGTACTCTGAGGCGCTCATAGCC

FIG. 4A



【 図 4 F 】

GCGCAACGCAATTAATGTGAGTGTAGCTCACTACTTAGGCACCCAGGCTTTACACTTATGCTCCGGGCT  
 CGTATGTTGTGTGGAAATTTGAGCGGATTAACAATTTCAACAAGAAACAGCTATGACCAATGATTAGCGCA  
 AGCGCGCAATTAACCTCTCACTAAAGGGAACAAAGCTGGTATCCGGGCCACGGTATTAAGCACTCACTA  
 TAG

FIG. 4F

【 図 5 】

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130  
 CP92 HELLSRSHFLILINMLVLTSSMITEEPTVSTCSHRYFSRIKIGTATVSTIIEISNIEKICDITKIKLIGELDKYKAVTEQLLIMNTPHANRRRREPPVNTITTKLAPSSIS  
 18537株 HELLSRSHFLILINMLVLTSSMITEEPTVSTCSHRYFSRIKIGTATVSTIIEISNIEKICDITKIKLIGELDKYKAVTEQLLIMNTPHANRRRREPPVNTITTKLAPSSIS  
 R2 HELLSRSHFLILINMLVLTSSMITEEPTVSTCSHRYFSRIKIGTATVSTIIEISNIEKICDITKIKLIGELDKYKAVTEQLLIMNTPHANRRRREPPVNTITTKLAPSSIS  
 Long HELLSRSHFLILINMLVLTSSMITEEPTVSTCSHRYFSRIKIGTATVSTIIEISNIEKICDITKIKLIGELDKYKAVTEQLLIMNTPHANRRRREPPVNTITTKLAPSSIS  
 コンセンサス HELLSRSHFLILINMLVLTSSMITEEPTVSTCSHRYFSRIKIGTATVSTIIEISNIEKICDITKIKLIGELDKYKAVTEQLLIMNTPHANRRRREPPVNTITTKLAPSSIS  
 131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260  
 CP92 KRKRKRFGLFLOVGSATRSRYSKALHEEGVWKTORMLSTINRAYSLSNIGYSVLSKYLKRLKMTYMLLPYWDGSRISKGTIVYEFQWRSRLELIRFESSVNRVTPASTALINSELSL  
 B KRKRKRFGLFLOVGSATRSRYSKALHEEGVWKTORMLSTINRAYSLSNIGYSVLSKYLKRLKMTYMLLPYWDGSRISKGTIVYEFQWRSRLELIRFESSVNRVTPASTALINSELSL  
 18537株 KRKRKRFGLFLOVGSATRSRYSKALHEEGVWKTORMLSTINRAYSLSNIGYSVLSKYLKRLKMTYMLLPYWDGSRISKGTIVYEFQWRSRLELIRFESSVNRVTPASTALINSELSL  
 R2 KRKRKRFGLFLOVGSATRSRYSKALHEEGVWKTORMLSTINRAYSLSNIGYSVLSKYLKRLKMTYMLLPYWDGSRISKGTIVYEFQWRSRLELIRFESSVNRVTPASTALINSELSL  
 Long KRKRKRFGLFLOVGSATRSRYSKALHEEGVWKTORMLSTINRAYSLSNIGYSVLSKYLKRLKMTYMLLPYWDGSRISKGTIVYEFQWRSRLELIRFESSVNRVTPASTALINSELSL  
 コンセンサス KRKRKRFGLFLOVGSATRSRYSKALHEEGVWKTORMLSTINRAYSLSNIGYSVLSKYLKRLKMTYMLLPYWDGSRISKGTIVYEFQWRSRLELIRFESSVNRVTPASTALINSELSL  
 281 270 200 250 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390  
 CP92 INDPFTIHOOKLPSHWMLYQWSTIIEKIEVLIQYVQVPIYVYDTPDPKHSLSLCTIKKESGSDILPTDRGAYDHWGYSFFPARDICXYSKRVYCDTHRSLIPLPEVSLDNTDFRKR  
 18537株 INDPFTIHOOKLPSHWMLYQWSTIIEKIEVLIQYVQVPIYVYDTPDPKHSLSLCTIKKESGSDILPTDRGAYDHWGYSFFPARDICXYSKRVYCDTHRSLIPLPEVSLDNTDFRKR  
 R2 INDPFTIHOOKLPSHWMLYQWSTIIEKIEVLIQYVQVPIYVYDTPDPKHSLSLCTIKKESGSDILPTDRGAYDHWGYSFFPARDICXYSKRVYCDTHRSLIPLPEVSLDNTDFRKR  
 Long INDPFTIHOOKLPSHWMLYQWSTIIEKIEVLIQYVQVPIYVYDTPDPKHSLSLCTIKKESGSDILPTDRGAYDHWGYSFFPARDICXYSKRVYCDTHRSLIPLPEVSLDNTDFRKR  
 コンセンサス INDPFTIHOOKLPSHWMLYQWSTIIEKIEVLIQYVQVPIYVYDTPDPKHSLSLCTIKKESGSDILPTDRGAYDHWGYSFFPARDICXYSKRVYCDTHRSLIPLPEVSLDNTDFRKR  
 391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520  
 CP92 VQCKHTSKTIDSSVTSLSGRVSKKFKCTASRKRKGLIKTFSGGQVYKNGVDTVSGVHTLYYWKLEGRALYKGEPTLNYVRAVFPSEIDRISQVKEKNGRERFSSRSELINHWK  
 18537株 VQCKHTSKTIDSSVTSLSGRVSKKFKCTASRKRKGLIKTFSGGQVYKNGVDTVSGVHTLYYWKLEGRALYKGEPTLNYVRAVFPSEIDRISQVKEKNGRERFSSRSELINHWK  
 R2 VQCKHTSKTIDSSVTSLSGRVSKKFKCTASRKRKGLIKTFSGGQVYKNGVDTVSGVHTLYYWKLEGRALYKGEPTLNYVRAVFPSEIDRISQVKEKNGRERFSSRSELINHWK  
 Long VQCKHTSKTIDSSVTSLSGRVSKKFKCTASRKRKGLIKTFSGGQVYKNGVDTVSGVHTLYYWKLEGRALYKGEPTLNYVRAVFPSEIDRISQVKEKNGRERFSSRSELINHWK  
 コンセンサス VQCKHTSKTIDSSVTSLSGRVSKKFKCTASRKRKGLIKTFSGGQVYKNGVDTVSGVHTLYYWKLEGRALYKGEPTLNYVRAVFPSEIDRISQVKEKNGRERFSSRSELINHWK  
 521 530 540 550 560 570 574  
 CP92 STINHTITIIIVIVLLSLIRAGLLYKRRSPTVLSQQLSNNIRFSSK  
 18537株 STINHTITIIIVIVLLSLIRAGLLYKRRSPTVLSQQLSNNIRFSSK  
 R2 STINHTITIIIVIVLLSLIRAGLLYKRRSPTVLSQQLSNNIRFSSK  
 Long STINHTITIIIVIVLLSLIRAGLLYKRRSPTVLSQQLSNNIRFSSK  
 コンセンサス STINHTITIIIVIVLLSLIRAGLLYKRRSPTVLSQQLSNNIRFSSK

Figure 5

【 図 6 】

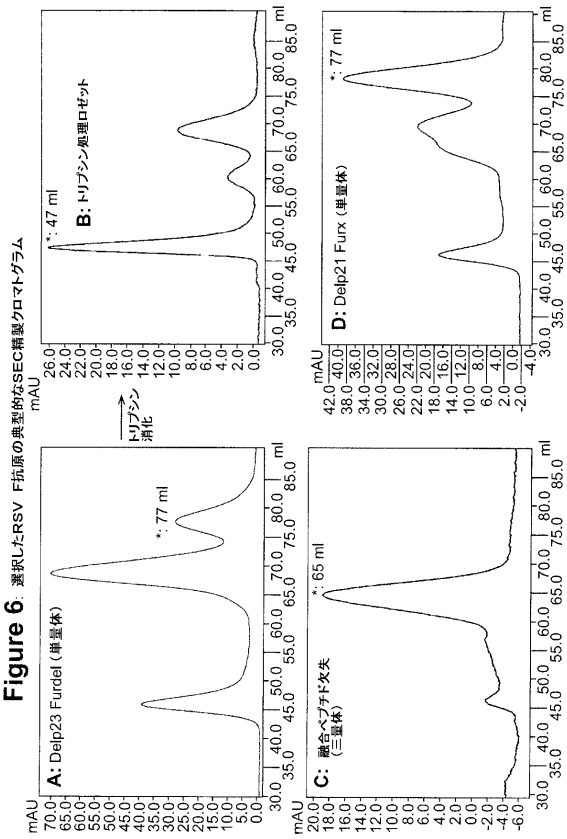


Figure 6: 選択したRSV F抗原の典型的なSEC精製プロマトグラム

【 図 8 】

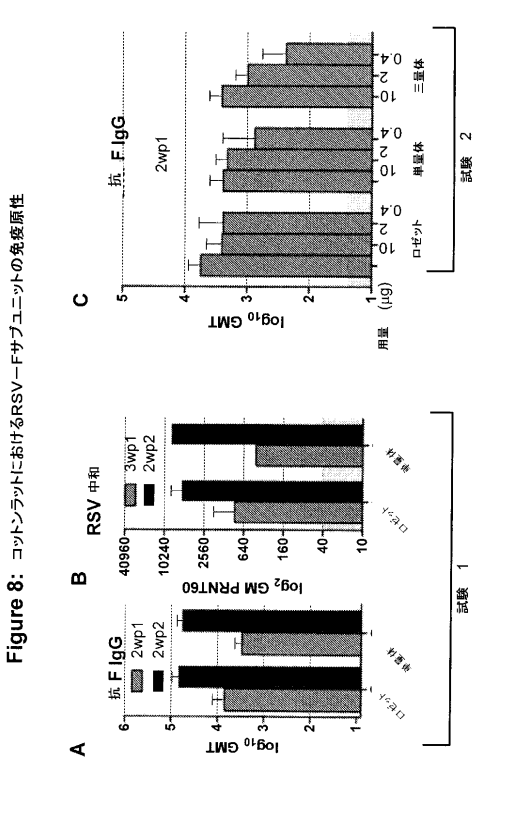
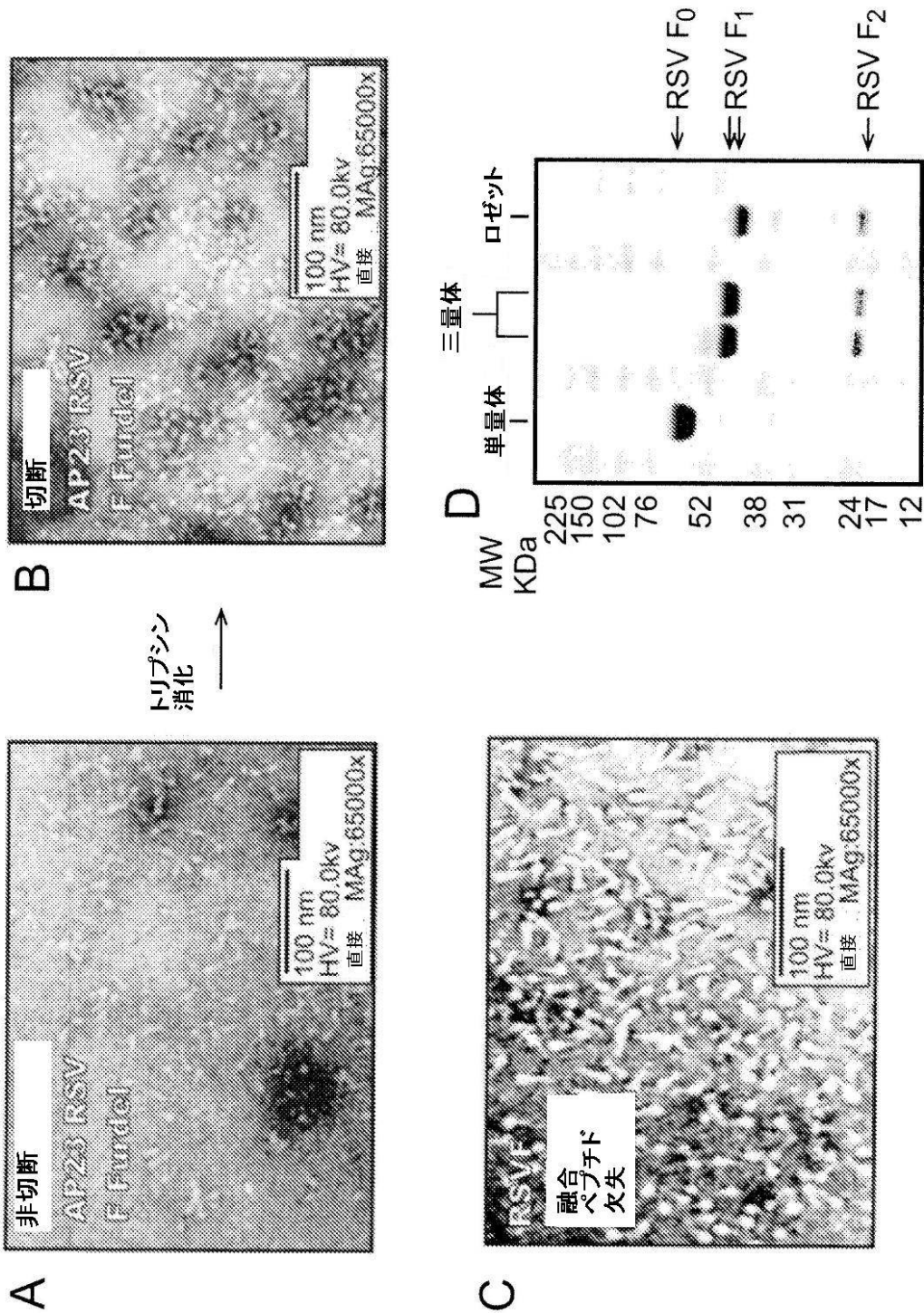


Figure 8: コットンラットにおけるRSV-Fサブユニットの免疫原性

【 図 7 】

Figure 7: RSV F抗原のEMおよびSDS-PAGE分析



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2010/042161

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>  |  |   |
|---|--|---|
| INV. A61K39/155 C07K14/135 C07K16/10<br>ADD.  |  |   |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>   |  |   |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K A61K  |  |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |  |   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data  |  |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |   |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
| X   | WO 2009/079796 A1 (ID BIOMEDICAL CORP OF QUEBEC [CA]; GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BAU) 2 July 2009 (2009-07-02)<br><br>claims 1-87; figures 1-7; examples 1-8<br>paragraphs [0015] - [0026]<br>paragraphs [0070] - [0080]<br>sequence 6<br><br>-----<br>-/-- | 1,3-8,<br>14,<br>16-19,<br>23-28  |
| <input checked="" type="checkbox"/>   | Further documents are listed in the continuation of Box C.   | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |
| * Special categories of cited documents :   |  |   |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed |  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.<br>"&" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>3 March 2011   |  | Date of mailing of the international search report<br><br>10/03/2011  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |  | Authorized officer<br><br>Cilensek, Zoran   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/042161

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                                   |
|--|---|-----------------------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.             |
| X  | ZIMMER GERT ET AL: "Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR109 and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture",<br>20020901,<br>vol. 76, no. 18,<br>1 September 2002 (2002-09-01), pages 9218-9224, XP009002025,<br>page 9222, right-hand column<br>page 9223; figures 1-4<br>-----                      | 1,3-8,<br>14,<br>16-19,<br>23-28  |
| X  | WO 03/083095 A1 (AKZO NOBEL NV [NL]; KEIL GUNTHER MICHAEL [DE])<br>9 October 2003 (2003-10-09)<br><br>examples 1-3<br>-----   | 1,3-8,<br>14,<br>16-19,<br>23-28  |
| X  | VALARCHER J -F ET AL: "Bovine respiratory syncytial virus lacking the virokinin or with a mutation in furin cleavage site RA(R/K)R-109 induces less pulmonary inflammation without impeding the induction of protective immunity in calves",<br>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY,<br>vol. 87, no. Part 6, June 2006 (2006-06),<br>pages 1659-1667, XP007915359,<br>ISSN: 0022-1317<br>figures 1-3; tables 1,2<br>----- | 1,3-8,<br>14,<br>16-19,<br>23-28  |
| X,P  | WO 2010/077717 A1 (NOVAVAX INC [US]; PUSHKO PETER [US]; WU YINGYUN [US]; MASSARE MICHAEL) 8 July 2010 (2010-07-08)<br><br>figures 1-22; examples 1-11<br>-----  | 1-8,<br>14-19,<br>23-28,<br>71-81 |
| X,P  | WO 2010/009277 A2 (NOVARTIS AG [CH]; O'HAGAN DEREK T [US]; GEALL ANDREW [US]; DORMITZER P) 21 January 2010 (2010-01-21)<br><br>paragraphs [0003] - [0013]; figure 18;<br>example 13; sequences 7,8<br>-----   | 1,3-8,<br>14,<br>16-19,<br>23-49  |
| A  | WO 2008/154456 A2 (NATIONWIDE CHILDREN S HOSPITAL [US]; PEEPLES MARK E [US]; KENNEDY MATT)<br>18 December 2008 (2008-12-18)<br>paragraph [0169]<br>-----<br>-/--  | 1,3-8,<br>14,<br>16-19,<br>23-28  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/042161

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |   |
|--|--|---|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                           |
| A  | <p>SUGRUE R J ET AL: "FURIN CLEAVAGE OF THE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS FUSION PROTEIN IS NOT A REQUIREMENT FOR ITS TRANSPORT TO THE SURFACE OF VIRUS-INFECTED CELLS", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 82, no. PART 06, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 1375-1386, XP001118929, ISSN: 0022-1317<br/>the whole document</p> <p>-----</p>                                     | 1,3-8,<br>14,<br>16-19,<br>23-28                |
| A  | <p>WO 2008/061243 A2 (NOVAVAX INC [US]; SMITH GALE [US]; PUSHKO PETER [US]; MASSARE MIKE [US]) 22 May 2008 (2008-05-22)<br/>example 8</p> <p>-----</p>   | 1,3-8,<br>14,<br>16-19,<br>23-28                |
| X  | <p>BEGONA RUIZ-ARGUELLO M ET AL:<br/>"Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 85, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 3677-3687, XP007917291, ISSN: 0022-1317, DOI: DOI:10.1099/VIR.0.80318-0<br/>figures 1-3</p> <p>-----</p> | 1,2,5-9,<br>11-15,<br>18-28,<br>71-81           |
| X  | <p>DIANA MART N ET AL: "Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 87, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 1649-1658, XP002600413, ISSN: 0022-1317, DOI: DOI:10.1099/VIR.0.81715-0<br/>figures 6,7</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>         | 1,2,5-8,<br>14,15,<br>18,19,<br>23-28,<br>71-81 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/042161

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| X  | ZIMMER G ET AL: "Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein: Cleavage at two furin consensus sequences",<br>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US,<br>vol. 276, no. 34,<br>24 August 2001 (2001-08-24), pages 31642-31650, XP002225142,<br>ISSN: 0021-9258, DOI:<br>DOI:10.1074/JBC.M102633200<br>page 31648, left-hand column, paragraph 1<br>- page 31650, left-hand column, paragraph 3<br>----- | 29-49                 |
| X  | GONZÁLEZ-REYES L ET AL: "Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion",<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US,<br>vol. 98, no. 17,<br>14 August 2001 (2001-08-14), page 9859,<br>XP002600414,<br>ISSN: 0027-8424, DOI:<br>DOI:10.1073/PNAS.151098198<br>figure 4<br>-----   | 29-49                 |
| X  | BEGONA RUIZ-ARGUELLO M ET AL: "Effect of Proteolytic Processing at Two Distinct Sites on Shape and Aggregation of an Anchorless Fusion Protein of Human Respiratory Syncytial Virus and Fate of the Intervening Segment",<br>VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US,<br>vol. 298, no. 2, 5 July 2002 (2002-07-05), pages 317-326, XP004469494,<br>ISSN: 0042-6822, DOI:<br>DOI:10.1006/VIRO.2002.1497<br>figures 2-6<br>-----  | 29-49                 |
| A  |   | 9,11-13,<br>20-28     |
| A  | SARMIENTO R E ET AL: "Characterization of a persistent respiratory syncytial virus showing a low-fusogenic activity associated to an impaired F protein",<br>VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL,<br>vol. 139, no. 1,<br>1 January 2009 (2009-01-01), pages 39-47,<br>XP025816706,<br>ISSN: 0168-1702, DOI:<br>DOI:10.1016/J.VIRUSRES.2008.10.007<br>[retrieved on 2008-12-09]<br>the whole document<br>-----   | 29-49                 |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2010/042161**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
2, 4, 15, 17, 29-49, 71-81(completely); 1, 3, 5-9, 11-14, 16  
18-28(partially)
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2010/ 042161

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 4, 17(completely); 1, 3, 5-8, 14, 16, 18, 19, 23-28(partially)

An immunogenic composition comprising one or more respiratory syncytial virus F (RSV F) polypeptides in which amino acids 100-150 are replaced with the amino acid sequence of SEQ ID NO:9. Subject-matter related thereto.

---

2. claims: 2, 15(completely); 1, 5-8, 14, 18, 19, 23-28(partially)

An immunogenic composition comprising one or more respiratory syncytial virus F (RSV F) polypeptides in which amino acids 100-150 are replaced with the amino acid sequence of SEQ ID NO:12. Subject-matter related thereto.

---

- 3-13. claims: 1, 3, 5-8, 14, 16, 18, 19, 23-28(all partially)

Idem as item 1, wherein the amino acid sequence is SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:91 or SEQ ID NO:92 respectively.

---

14. claims: 9, 11-13, 20-28(all partially)

An immunogenic composition comprising the polypeptide of SEQ ID NO:49. Subject-matter related thereto.

---

15. claims: 10(completely); 9, 11-13, 20-28(partially)

An immunogenic composition comprising the polypeptide of SEQ ID NO:68. Subject-matter related thereto.

---

- 16-56. claims: 9, 11-13, 20-28(all partially)

Idem as item 14 wherein the polypeptide is SEQ ID NO:71, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 or SEQ ID NO:93, respectively.

---

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

## 57. claims: 29-49

A method for producing a composition comprising cleaved RSV F protein ecto-domain polypeptides, the method comprising:  
a) providing uncleaved RSV F protein ecto-domain polypeptides that contain a protease cleavage site that when cleaved produces F and F2 subunits, the amino acid sequence of said uncleaved soluble RSV F protein ecto-domain polypeptides comprising altered furin cleavage sites at positions 106-109 and 133-136, and said uncleaved soluble RSV F protein ecto-domain polypeptides are obtained from a cell that produces them uncleaved; and  
b) cleaving the provided soluble RSV F protein ecto-domain polypeptides with a protease that cleaves said protease cleavage site, thereby producing a composition comprising cleaved soluble RSV F protein ecto-domain polypeptides.

---

## 58. claims: 50-59

A method for producing a composition comprising uncleaved RSV F protein ecto-domain polypeptide monomers, trimers or a combination of monomers and trimers, the method comprising:  
a) providing a biological material that contains uncleaved RSV F protein ecto-domain polypeptides, the amino acid sequence of said uncleaved soluble RSV F protein ecto-domain polypeptides comprising altered furin cleavage sites at positions 106-109 and 133-136, and said uncleaved soluble RSV F protein ecto-domain polypeptides are secreted from a cell that produces them uncleaved; and  
b) purifying uncleaved RSV F protein ecto-domain polypeptide monomers or trimers from the biological material, thereby producing the composition.

---

## 59. claims: 60-70

A method for producing a composition comprising uncleaved RSV F protein ecto-domain polypeptide monomers, trimers or a combination of monomers and trimers, the method comprising:  
a) providing a biological material that contains uncleaved RSV F protein ecto-domain polypeptides, wherein the amino acid sequence of the uncleaved RSV F protein ecto-domain polypeptide contains altered furin cleavage sites, lysine and arginine residues present between about position 101 and about position 161 are deleted or replaced with an amino acid that is not lysine or arginine, the RSV F protein ecto-domain polypeptides are obtained from a host cell that produces them uncleaved between about position 101 and about position 161, and the RSV F protein ecto-domain polypeptides are not cleaved between about position 101 and about position 161; and  
b) purifying uncleaved RSV F protein ecto-domain polypeptide monomers, trimers or a combination of monomers and trimers

International Application No. PCT/ US2010/ 042161

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

from the biological material.

---

**60. claims: 71-81**

A method for producing a composition comprising cleaved RSV F protein ecto-domain polypeptide monomers, trimers or a combination of monomers and trimers, the method comprising:  
a) providing biological material that contains cleaved RSV F protein ecto-domain polypeptides that contain an altered fusion peptide; and  
b) purifying cleaved RSV F protein ecto-domain polypeptides from the biological material.

---

**61. claims: 82-90**

A method for producing a composition comprising RSV F protein ecto-domain polypeptides, the method comprising:  
a) providing RSV F protein ecto-domain polypeptides that comprises an altered furin cleavage site at positions 133-136, and said soluble RSV F protein ecto-domain polypeptides are secreted from a cell that produces them in the form of an F2 fragment that is associated with a subunit that comprises F1 but is uncleaved at position 136/137; and  
b) cleaving the provided RSV F protein ecto-domain polypeptides with a protease that cleaves RSV F protein ecto-domain at a site between positions 101 and 161, thereby producing said composition.

---

**62. claims: 91-98**

A method for producing a composition comprising RSV F protein ecto-domain polypeptides, the method comprising:  
a) providing biological material that contains RSV F protein ecto-domain polypeptides that comprise an altered furin cleavage site at positions 133-136, and said soluble RSV F protein ecto-domain polypeptides are secreted from a cell that produces them in the form of an F2 fragment that is associated with a subunit that comprises F but is uncleaved at position 136/137, with the proviso that the altered furin cleavage site is not deletion of amino acids 131-134; and  
b) purifying the RSV F protein ecto-domain polypeptides from the biological material, thereby producing the composition.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/042161

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s)  | Publication date   |
|--|------------------|--|--|
| WO 2009079796 A1                       | 02-07-2009       | AU 2008340949 A1<br>CA 2710600 A1<br>CN 101952321 A<br>EP 2222710 A1<br>KR 20100109933 A<br>US 2010291147 A1 | 02-07-2009<br>02-07-2009<br>19-01-2011<br>01-09-2010<br>11-10-2010<br>18-11-2010 |
| WO 03083095 A1                         | 09-10-2003       | AU 2003227049 A1   | 13-10-2003   |
| WO 2010077717 A1                       | 08-07-2010       | US 2010239617 A1   | 23-09-2010   |
| WO 2010009277 A2                       | 21-01-2010       | CA 2730737 A1  | 21-01-2010   |
| WO 2008154456 A2                       | 18-12-2008       | EP 2164860 A2<br>US 2010261155 A1  | 24-03-2010<br>14-10-2010   |
| WO 2008061243 A2                       | 22-05-2008       | EP 2089515 A2<br>US 2008233150 A1  | 19-08-2009<br>25-09-2008   |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.  |           | F I     |       | テーマコード(参考) |
|---------------|-----------|---------|-------|------------|
| A 6 1 K 39/39 | (2006.01) | A 6 1 K | 39/39 |            |
| C 0 7 K 19/00 | (2006.01) | C 0 7 K | 19/00 |            |
| C 1 2 P 21/02 | (2006.01) | C 1 2 P | 21/02 | C          |
| C 0 7 K 1/14  | (2006.01) | C 0 7 K | 1/14  |            |
| C 1 2 N 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N | 15/09 | A          |

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

(72) 発明者 スワンソン, カート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, ピーオー ボックス 8097, アイピー サービスズ エム/エス エックス-100ビー, ノバルティス ヴァクシンス アンド ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 ドルミッチャー, フィリップ アール.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, ピーオー ボックス 8097, アイピー サービスズ エム/エス エックス-100ビー, ノバルティス ヴァクシンス アンド ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド 気付

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 CA20 DA02 EA02 GA11

4B064 AG32 CA10 CA19 CC24 CE10 DA01

4C085 AA03 AA38 BA57 BB11 CC08 DD62 DD86 FF02 FF12 FF17

FF24 FF30 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08 GG10

4H045 AA11 BA41 CA01 DA86 EA20 FA74 GA21