

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6564367号  
(P6564367)

(45) 発行日 令和1年8月21日(2019.8.21)

(24) 登録日 令和1年8月2日(2019.8.2)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/155
A 6 1 K 39/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/10
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14

請求項の数 10 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-532351 (P2016-532351)
(86) (22) 出願日	平成26年8月4日(2014.8.4)
(65) 公表番号	特表2016-527294 (P2016-527294A)
(43) 公表日	平成28年9月8日(2016.9.8)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/066756
(87) 国際公開番号	W02015/018806
(87) 国際公開日	平成27年2月12日(2015.2.12)
審査請求日	平成29年7月24日(2017.7.24)
(31) 優先権主張番号	1313990.2
(32) 優先日	平成25年8月5日(2013.8.5)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)
(31) 優先権主張番号	1401883.2
(32) 優先日	平成26年2月4日(2014.2.4)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)

(73) 特許権者	305060279 グラクソスミスクライン バイオリジカル ズ ソシエテ アノニム ベルギー ベー-1330 リクセンサー ル リュ ドランスティテュ 89
(74) 代理人	110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
(72) 発明者	ステフ、アン-ミュリエル カナダ国 エイチ7ブイ 3エス8 ケベ ック、ラヴァル、カルティエ ブールバ ード ウェスト 525、アイディー バイ オメディカル コーポレーション オブ ケベック

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 併用免疫原性組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルス (Respiratory Syncytial Virus) (RSV) 抗原と少なくとも1つの百日咳菌 (Bordetella pertussis) 抗原とを含む併用免疫原性組成物であって、前記少なくとも1つのRSV抗原がF<sub>2</sub>ドメイン及びF<sub>1</sub>ドメインを含みかつFタンパク質の融合前立体構造を安定させる少なくとも1つの修飾を含む組換え可溶性Fタンパク質類似体であり、前記少なくとも1つの修飾が、前記組換えFタンパク質類似体のF<sub>1</sub>ドメインのC末端へのヘテロタンパク質多量体化ドメインの付加を含み、前記少なくとも1つの百日咳菌抗原が、パータシストキソイド (PT)、糸状赤血球凝集素 (FHA) およびパータクチン (PRN) である無細胞パータシス (Pa) 抗原を含む、前記併用免疫原性組成物。

【請求項2】

前記Pa抗原が、

i . 2 ~ 10 μg、例えば正確に又はおよそ8 μgのPT、

ii . 2 ~ 10 μg、例えば正確に又はおよそ8 μgのFHA、及び

iii . 0 . 5 ~ 4 μg、例えば正確に又はおよそ2 . 5 μgのPRN

を含む、請求項1に記載の併用免疫原性組成物。

【請求項3】

少なくとも1つのアジュバントをさらに含み、これが任意でアルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウム又はリン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、3D-MPL、QS21

、C p G含有オリゴデオキシヌクレオチドアジュバント及び水中油型エマルションの群から選択される、請求項1又は2に記載の併用免疫原性組成物。

【請求項4】

医薬に使用するための、請求項1から3のいずれか一項に記載の併用免疫原性組成物。

【請求項5】

対象におけるRSV及び百日咳菌による感染又はRSV及び百日咳菌に関連する疾患の予防又は処置のための、請求項1から3のいずれか一項に記載の併用免疫原性組成物。

【請求項6】

前記併用免疫原性組成物が、対象に単回用量レジメンとして投与するためのものである、請求項4若しくは5に記載の併用免疫原性組成物。

10

【請求項7】

前記対象が、哺乳動物、例えば、新生児、乳児、小児、青年、成人及び高齢者の群から選択されるヒトである、請求項5に記載の併用免疫原性組成物。

【請求項8】

前記対象が青年者であり、前記対象が10～18歳の間であり、前記併用免疫原性組成物が1度だけ投与するためのものである、請求項7に記載の併用免疫原性組成物。

【請求項9】

前記対象が、場合によってはヒトの、在胎児を有する妊婦である、請求項5に記載の併用免疫原性組成物。

【請求項10】

20

前記併用免疫原性組成物が前記妊婦に妊娠1回につき1度だけ投与するためのものである、請求項9に記載の併用免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

本開示は、免疫学の分野に関する。より詳細には、本開示は、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)及び百日咳菌(*Bordetella pertussis*)に特異的な免疫応答を惹起するための組成物及び方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

ヒト呼吸器合胞体ウイルス(Human Respiratory Syncytial Virus)(RSV)は、6ヶ月未満の乳児及び妊娠35週以下の未熟児における下気道感染症(LRTI)の最も一般的な世界的な病因である。RSV疾患のスペクトルには、鼻炎及び耳炎から肺炎及び細気管支炎までの幅広い呼吸器症状が含まれ、後の2つの疾患は、考慮すべき罹患率及び死亡率と関連している。ヒトのみがRSVに感染することが知られている。汚染した鼻分泌物からのウイルスの広がりには多量の呼吸器液滴を介して生じるので、感染した個人又は汚染した表面との密接な接触が伝播には必要とされる。RSVは、おもちゃや他の物体上で数時間生き残り、そのことが、病院での、特に小児科病棟でのRSV感染の高い比率を説明している。

40

【0003】

RSVに関して推定される世界の年間の感染及び死亡は、それぞれ6400万人及び160,000人であると概算される。米国のみでは、RSVは、年間18,000～75,000人の入院と90～1900人の死亡に関連していると概算される。温帯気候では、RSVは細気管支炎及び肺炎などの急性LRTIの年々の冬期流行の原因として文書で十分に裏付けられている。米国では、ほぼ全員の小児が2歳までにRSVに感染している。健常な小児におけるRSV関連のLRTIの発生率は、2歳までの1000人の小児当たり37人(6ヶ月未満の乳児1000人当たり45人)であると算出され、小児1000人当たり6人に入院のリスクがあると算出された。発生は、心肺疾患を持つ子供及び未熟児で高く、彼らは、米国でのRSV関連での入院のほぼ半数を構成する。RSVが原因

50

で生じるさらに重篤なLRTIを経験する小児は、後に小児喘息の高い発生を招くことになる。これらの研究は、重篤なLRTI患者及びその後遺症を持つ患者を介護するコストが相当なものである先進国にてRSVワクチン及びその使用の幅広いニーズを明らかにしている。RSVはまた高齢者におけるインフルエンザ様疾患の罹患率の重要な原因としてみます認識されている。

#### 【0004】

百日咳菌は、乳児及び若齢小児において重篤になり得る呼吸器疾患である百日咳の病原体である。WHOの推定は、2008年に、世界中で百日咳の約1,600万の症例が生じ、195,000人の小児がこの疾患により死亡したと示唆する。数十年間にわたりワクチンが利用可能であり、世界のワクチン接種は、2008年に約687,000件の死亡を予防したと推定される(WHO)。

10

#### 【0005】

この疾患の臨床経過は、速い咳の発作及びそれに続く吸気努力を特徴とし、しばしば、特徴的な「ぜいぜい」という音を伴う。重度の症例において、酸素喪失が、脳損傷をもたらし得る。しかし、最も多い合併症は、続発性肺炎である。抗生物質による処置が利用できるが、疾患が診断された時点までに、細菌の毒素は、しばしば重度の損傷を引き起こしている。従って、この疾患の予防は、極めて重要であり、それ故、ワクチン接種の開発は、重要な関心事である。百日咳菌に対するワクチンの第一世代は、熱処理、ホルマリン若しくは他の手段によって殺傷された細菌全体で構成される全細胞ワクチンであった。これらは、1950年代及び1960年代に多くの国に導入され、百日咳の発生の低減に成功した。

20

#### 【0006】

全細胞百日咳菌ワクチンによる問題は、それらに関連する高レベルの反応原性である。この問題は、高度に精製された百日咳菌タンパク質(通常は少なくともパータシストキソイド(PT、その毒性を消すために化学的に処理されたか若しくは遺伝子改変されたパータシストキシン)及び糸状赤血球凝集素(FHA)であって、しばしば、69kDタンパク質であるパータクチン(PRN)と一緒にあり、幾つかの場合において、2型及び3型の線毛(FIM2及び3)をさらに含む)を含む無細胞パータシスワクチンの開発によって対処される。これらの無細胞ワクチンは、一般的に、全細胞ワクチンよりも反応原性がずっと低く、多くの国のワクチン接種プログラムに採用されている。しかしながら、USにおいて1980年代初期から百日咳の報告症例が全体的に増加傾向にあり(1955年以降のどの年よりも2012年においてより多くの症例が報告された)、近年では多くの国において大流行が広く報道されており、そのため無細胞ワクチンにより惹起された防御が、全細胞ワクチンにより付与された防御よりも持続性が低いと推論されている。そのような小児期免疫後の免疫の低下は、青年及び成人がこの高伝染性の疾患の保有宿主となりうることを意味する。これにより、2~3カ月における小児ワクチン接種の開始前に、新生児には生後最初の数カ月に特定のリスクが生じる。

30

#### 【0007】

脆弱な新生児を防御するための戦略には、「家に閉じこもる(cocooning)」、すなわち新生児と接触する可能性のある青年及び成人(分娩後女性を含む)のワクチン接種が含まれるが、妊娠女性のワクチン接種(母体免疫)が現在数か国で推奨されており、それにより抗百日咳抗体が胎盤により移行して、乳児が直接ワクチン接種を受けるまで防御を提供する。新生児の出生時ワクチン接種もまた臨床試験で評価されている。

40

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

百日咳菌ワクチン接種は十分に確立しているが、健康な集団及びリスクのある集団において持続性の防御免疫応答を惹起する、安全且つ有効なRSVワクチンを生産するための種々の試みにも拘らず、RSV感染を予防する目的のため、及び/又はRSV疾患を低減するか若しくは予防する目的のためのワクチンとして、安全且つ有効であることが証明さ

50

れたと評価された候補は、現在までに存在しない。従って、RSV及び百日咳菌の両方の感染並びに新生児及び小さい乳児に特に危険を及ぼす関連疾患に対する防御を付与する併用（混合）ワクチンについての、満たされない需要が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

#### 概要

本開示は、RSV及び百日咳菌（本明細書中、「パータシス」と称することもある）の両方の感染及び/又は疾患に対して防御を惹起することができる併用免疫原性組成物（例えばワクチン）に関する。より具体的には、本開示は、RSVの組換えFタンパク質類似体を百日咳菌無細胞（Pa）又は全細胞（Pw）抗原と共に含む組成物、並びに、特に新生児及び母体免疫に関する、その使用に関する。また、少なくとも1つの免疫原性組成物中の組換えRSV Fタンパク質類似体と百日咳菌抗原を妊婦に投与し、それによってRSV及び百日咳に対して防御的な母性抗体の胎盤を介した移行によって生後の新生児の防御を達成することによる、RSV及び百日咳菌によって引き起こされる疾患から乳児を防御するためのワクチンレジメン、方法及び免疫原性組成物の使用を開示する。この少なくとも1つの免疫原性組成物は、本明細書に開示するようなRSV-百日咳菌混合組成物であってもよい。そのような母体免疫に有用なキットも開示する。

10

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1Aは、RSV Fタンパク質の構造的特徴を強調した概略図である。図1Bは、例示的なRSV融合前F（PreF）抗原の概略図である。

20

【図2】図2は、実施例1において行ったモルモット実験についての研究設計を示す。

【図3】図3は、モルモット後代をRSVによってチャレンジした後の、実施例1の結果を示す。

【図4】図4は、実施例1におけるモルモットモデルにおける中和抗体応答の時間経過を示す。

【図5】図5A及びBは、RSV+百日咳菌混合ワクチンによる免疫の後のRSVチャレンジ感染に対する中和力価及び防御を示すグラフである（実施例2）。

【図6】図6A及びBは、RSV+百日咳菌混合ワクチンによる免疫の後の百日咳菌によるチャレンジに対する血清抗体力価及び防御を示すグラフである（実施例3）。

30

【図7】図7A及びBは、RSVでプライミングした雌親をRSV+百日咳菌混合ワクチンで母体免疫した後のモルモットの雌親及び仔における中和力価を示すグラフである（実施例4）。

【図8】図8は、RSVでプライミングした雌親をRSV+百日咳菌混合ワクチンで母体免疫した後のモルモットの仔のRSVチャレンジ感染に対する防御を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

#### 詳細な説明

##### 序論

RSV感染を防ぐワクチンの開発は、宿主の免疫応答が疾患の病態形成で役割を担うと思われるという事実によって複雑になっている。1960年代の初期の研究は、ホルマリンで不活化したRSVワクチンを接種した小児は、接種しなかった対照の被験者に比べてウイルスへのその後の暴露に際してさらに重篤な疾患に罹ることを示した。これらの初期の試験は、ワクチン接種者の80%の入院と2人の死亡を生じた。重症度が増した疾患は動物モデルで再現され、不適切なレベルの血清中和抗体、局所免疫の欠如、及び肺好酸球とIL-4及びIL-5サイトカインの高い産生による2型ヘルパーT細胞様（Th2）の免疫応答の過剰な誘導の結果であると考えられる。それに対して、RSV感染に対して防御する功を奏したワクチンは、IL-2及び - インターフェロン（IFN）の産生を特徴とするTh1に偏った免疫応答を誘導する。

40

【0012】

50

R S Vに対する許容ワクチンの以前の不在において、百日咳に対する免疫は十分に確立されているが、R S V及び百日咳菌感染及び/又は疾患に対して防御を付与することができる併用ワクチンを研究する機会はなかった。これらの感染性因子が新生児及び幼い乳児（百日咳菌の場合、小児ワクチン接種スケジュールにより刺激される完全な防御がまだ構築される前）に最も有意なリスクをもたらす、また高齢者にも危険が存在するため、単回注射で両方のワクチンの送達を可能にする併用免疫原性組成物は、受容者の快適性、ワクチンスケジュールの順守、費用効率、並びに他のワクチンの免疫スケジュールの機会の確保の点で有利でありうる。

#### 【0013】

本開示は、R S V及び百日咳菌の両方の感染又はそれに関連する疾患を防御する併用免疫原性組成物（例えばワクチン）、並びに、特にこれらの病原体に関して罹病及び死に関する最も高い発生率及び重篤度が見出されている集団である新生児及び幼い乳児の防御において、それを使用する方法に関する。このような層の防御は挑戦を提示する。幼い乳児、特に未熟児で生まれた乳児は、未成熟な免疫系を有し得る。非常に幼い乳児において、ワクチン接種による母性抗体の干渉の可能性もまた存在する。過去において、R S Vに対する幼い乳児のワクチン接種によるR S V疾患の増大の問題、並びに、自然感染及び免疫によって惹起された免疫の漸減から生じるチャレンジの問題があった。百日咳菌抗原含有ワクチンによる母体免疫は、（母体免疫していない母親からの新生児と比較して）新生児において抗百日咳菌抗体力価を増大することが示されており（例えば、Gall et al (2011), Am J Obstet Gynecol, 204:334.e1-5、参照により本明細書に組み入れる）、このような母体免疫が数か国において現在推奨されている。開示された併用組成物を使用する開示の免疫方法に加えて、本開示はさらに、R S V抗原と百日咳菌抗原の併用（開示のR S V - 百日咳菌併用免疫原性組成物の使用を含む）で妊娠雌を免疫することにより、新生児及び幼い乳児を防御するための、ワクチンレジメン、方法及び免疫原性組成物の使用を記載する。これらの抗原は、好ましくは、胎盤を介して在胎児に移行する抗体を惹起し、生後並びにR S V及び百日咳菌によって引き起こされる感染及び重度の疾患の危険期を通じて続く、乳児の受動免疫防御をもたらす。

#### 【0014】

本開示の1つの態様は、少なくとも1つのR S V抗原と少なくとも1つの百日咳菌抗原とを含む併用免疫原性組成物であって、少なくとも1つの百日咳菌抗原が少なくとも1つの無細胞パーティシス（P a）抗原を含む又は全細胞（P w）抗原を含む、前記併用免疫原性組成物に関する。

#### 【0015】

特に、本開示は、少なくとも1つのR S V抗原が組換え可溶性Fタンパク質類似体である併用免疫原性組成物を提供する。融合後立体構造（「P o s t F」）で安定化したF類似体又は立体構造に関して不安定なF類似体を用いることができる。Fタンパク質類似体は、Fタンパク質の融合前立体構造を安定させる少なくとも1つの修飾を含む融合前F、すなわち「P r e F」抗原であることが有利である。

#### 【0016】

特定の実施形態において、併用免疫原性組成物の少なくとも1つの百日咳菌抗原は、パーティシストキソイド（P T）、糸状赤血球凝集素（F H A）、パーティクチン（P R N）、2型線毛（F I M 2）及び3型線毛（F I M 3）からなる群より選択される少なくとも1つのP a抗原を含む。このようなP aワクチンは当技術分野で周知である。

#### 【0017】

別の実施形態において、少なくとも1つの百日咳菌抗原はP w抗原を含み、P wワクチンは当技術分野で周知である。本明細書において使用する「全細胞（P w）抗原」という用語は、不活性化百日咳菌細胞（これは当然ながら、厳密には多数の異なる抗原を含む）を意味し、したがって、P wワクチンと同じである。

#### 【0018】

特定の実施形態において、開示される併用免疫原性組成物は、薬学的に許容される担体又

10

20

30

40

50

は担体、例えばバッファー（緩衝剤）などを含む。追加的に又はあるいは、免疫原性組成物は、アジュバントを含んでもよく、アジュバントとしては、例えば3D-MPL、QS21（例えば無毒化形態）、水中油型エマルジョン（例えば、トコフェロールなどの免疫刺激性分子を含む又は含まない）、無機塩、例えばアルミニウム塩（ミョウバン、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウムなど）及びリン酸カルシウム、あるいはこれらの組み合わせが挙げられる。

【0019】

特定の実施形態において、開示される併用免疫原性組成物は、さらに、RSV及び百日咳菌以外の少なくとも1つの病原性生物由来の少なくとも1つの抗原を含む。詳細には、この少なくとも1つの病原性生物は、ジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheriae*）、

10

【0020】

他の態様において、本開示は、RSV及び百日咳菌感染/疾患の予防及び/又は処置のための開示された併用免疫原性組成物の使用に関する。したがって、本明細書には、免疫学的に有効な量の上記併用免疫原性組成物を対象に投与することを含む、RSV及び百日咳菌に対する免疫応答を惹起する方法が開示される。

【0021】

さらなる態様において、本開示は、医薬に使用するための、特に対象におけるRSV及び百日咳菌による感染又はRSV及び百日咳菌に関連する疾患の予防又は処置のための、開示された併用免疫原性組成物に関する。

20

【0022】

別の態様において、本開示は、RSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から乳児を防御するためのワクチン接種レジメンに関し、このワクチン接種レジメンは、

RSV及び百日咳菌の両方に特異的な体液性免疫応答を追加刺激（ブースト）することができる少なくとも1種の免疫原性組成物を、在胎児を有する妊婦に投与することを含み、この少なくとも1種の免疫原性組成物は、Fタンパク質類似体を含む組換えRSV抗原及び少なくとも1つの百日咳菌抗原を含み、

30

ここで、この少なくとも1種の免疫原性組成物によって妊婦において惹起された又は増大したRSV特異的抗体の少なくとも1つのサブセット及び百日咳菌特異的抗体の少なくとも1つのサブセットが、胎盤を介して在胎児に移行し、それによって、RSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から乳児が防御される。

【0023】

一態様では、RSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から乳児を防御する方法を開示し、この方法は、

RSV及び百日咳菌の両方に特異的な体液性免疫応答を追加刺激（ブースト）することができる少なくとも1種の免疫原性組成物を在胎児を有する妊婦に投与することを含み、少なくとも1種の免疫原性組成物は、Fタンパク質類似体を含む組換えRSV抗原及び少なくとも1つの百日咳菌抗原を含み、

40

この少なくとも1種の免疫原性組成物によって妊婦において惹起された又は増大したRSV特異的抗体の少なくとも1つのサブセット及び百日咳菌特異的抗体の少なくとも1つのサブセットは、胎盤を介して在胎児に移行し、それによって、この乳児がRSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から防御される。

【0024】

本開示の別の態様は、RSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患からの乳児の防御に使用するための、Fタンパク質類似体を含む組換えRSV抗原及び少なくとも1つの百日咳菌抗原を含む1つ又は複数の免疫原性組成物に関し、この免疫原性組成物

50

は、妊婦への投与のために製剤化され、この免疫原性組成物は、RSV及び百日咳菌の両方に特異的な体液性免疫応答を追加刺激（ブースト）することができ、この免疫原性組成物によって妊婦において追加刺激されるRSV特異的抗体の少なくとも1つのサブセット及び百日咳菌特異的抗体の少なくとも1つのサブセットは、胎盤を介して在胎児に移行し、それによって、この乳児がRSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から防御される。

【0025】

別の態様において、妊婦への投与のために製剤化された複数の免疫原性組成物を含むキットを開示し、このキットは、

(a) RSVに特異的な体液性免疫応答を誘導する、惹起する又は追加刺激することができるFタンパク質類似体を含む第1の免疫原性組成物、並びに

(b) 百日咳菌に特異的な体液性応答を誘導する、惹起する又は追加刺激することができる少なくとも1つの百日咳菌抗原を含む第2の免疫原性組成物

を含み、妊婦への投与の際、第1及び第2の免疫原性組成物は、RSV特異的抗体の少なくとも1つのサブセット、及び百日咳菌特異的抗体の少なくとも1つのサブセットを、誘導する、惹起する又は追加刺激し、これらの抗体は、胎盤を介して妊婦の在胎児に移行し、それによってRSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患に対して乳児が防御される。

【0026】

用語

本開示の種々の実施形態の検討を円滑にするために、以下に用語の説明を提供する。本開示の文脈で追加の用語及び説明を提供することもある。

【0027】

特に説明されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語はすべて本開示が属する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。分子生物学での一般用語の定義は、Benjamin Lewin, *Genes V*, Oxford University Pressより出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd. より出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 及びRobert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc.より出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見い出すことができる。

【0028】

単数用語「a」、「an」及び「the」は文脈が明瞭に示さない限り、複数の指示対象を含む。同様に、語「又は」は、文脈が明瞭に示さない限り、「及び」を含む。用語「複数の」は、2以上を指す。核酸又はポリペプチドに対して与えられる塩基のサイズ、アミノ酸のサイズはすべて、及び分子量又は分子質量はすべて近似であり、説明のために提供されることを理解されたい。さらに、抗原のような物質の濃度又はレベルに関して与えられる数値限定は近似であることが意図される。従って、濃度が少なくとも(たとえば)200 pgであると示される場合、濃度は少なくともおよそ(又は「約」又は「~」)200 pgであると理解される。

【0029】

本明細書で記載されるものに類似の又は均等の方法及び物質が本開示の実施又は試験で使用され得るが、好適な方法及び物質は以下に記載される。用語「comprises」は「includes」を意味する。従って、文脈が必要としない限り、用語「comprises」及びその変形「comprise」及び「comprising」は、言及された化合物若しくは組成物(たとえば、核酸、ポリペプチド、抗原)若しくは工程、又は化合物若しくは工程の群の包含を暗示するように理解されるが、他の化合物、組成物、工程、又はそれらの群の排除を暗示しないように理解される。略記「e.g.」はラテン語の*exempli gratia*に由来し、本明細書では非限定例を指すように使用される。従って、略記「e.g.」は用語「たとえば」と同義である。

【0030】

10

20

30

40

50

用語「Fタンパク質」又は「融合タンパク質」又は「Fタンパク質ポリペプチド」又は「融合タンパク質ポリペプチド」は、RSVの融合タンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部又は一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指す。多数のRSVの融合タンパク質が記載されており、当業者に公知である。WO2008/114149は、例示的なFタンパク質の変異体（たとえば、天然に存在する変異体）を示している。

【0031】

「Fタンパク質類似体」とは、Fタンパク質の構造又は機能を改変する修飾を含んでいるが、Fタンパク質の免疫学的性質を保持しており、その結果、Fタンパク質類似体に対して生起された免疫応答が天然Fタンパク質を認識することになるようなFタンパク質を指す。WO2010/149745（参照によりその全文を本明細書に組み入れる）は、例示的なFタンパク質類似体を示している。WO2011/008974（参照によりその全文を本明細書に組み入れる）もまた例示的なFタンパク質類似体を示している。Fタンパク質類似体としては、例えばFタンパク質の融合前立体構造を安定化させる少なくとも1つの修飾を含み、一般的には可溶性の（すなわち膜に結合しない）PreF抗原が挙げられる。Fタンパク質類似体としてはまた、RSV Fタンパク質の融合後立体構造をとる融合後F（postF）抗原、好ましくはそのような立体構造で安定化されたものが挙げられる。F類似体としてはさらに、中間の立体構造をとるFタンパク質、好ましくはそのような立体構造で安定化されたものが挙げられる。このような代替物もまた一般的に可溶性である。

【0032】

核酸又はポリペプチド（たとえば、RSVのF又はGタンパク質の核酸又はポリペプチド、あるいはF類似体核酸又はポリペプチド）を指す場合の「変異体」は、参照の核酸又はポリペプチドとは異なる核酸又はポリペプチドである。通常、変異体と参照の核酸又はポリペプチドとの間の差異は、該参照に比べて比率的に少数の差異を構成する。

【0033】

ポリペプチド又はタンパク質の「ドメイン」は、ポリペプチド又はタンパク質の中で構造的に定義された要素である。たとえば、「三量体化ドメイン」は、ポリペプチドの三量体への集合を促進するポリペプチド内のアミノ酸配列である。たとえば、三量体化ドメインは他の三量体化ドメイン（同一の又は異なるアミノ酸配列を持つ追加のポリペプチドのもの）との会合を介して三量体への集合を促進することができる。この用語は、そのようなペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指すのにも使用される。

【0034】

用語「天然の」及び「天然に存在する」は、天然のままと同一状態で存在する、たとえばタンパク質、ポリペプチド、又は核酸のような要素を指す。すなわち、要素は人工的に修飾されていない。この開示の文脈で、たとえば、RSVの天然に存在する株又は分離株から得られるような、RSVタンパク質又はポリペプチドの多数の天然の/天然に存在する変異体があることが理解されるであろう。WO2008114149（参照によりその全文が本明細書に組み入れられる）は、例示的なRSV株、タンパク質及びポリペプチドを含んでおり、例えば図4を参照されたい。

【0035】

用語「ポリペプチド」は、モノマーがアミド結合を介して互いに連結されるアミノ酸残基であるポリマーを指す。用語「ポリペプチド」又は「タンパク質」は本明細書で使用されるとき、アミノ酸配列を包含し、糖タンパク質のような修飾された配列を含むことが意図される。用語「ポリペプチド」は特に、組換え的に又は合成的に製造されるものと同様に天然に存在するタンパク質を包含することが意図される。用語「断片」は、ポリペプチドに関して、ポリペプチドの一部（すなわち、部分配列）を指す。用語「免疫原性断片」は、完全長の参照のタンパク質又はポリペプチドの少なくとも1つの優勢な免疫原性エピトープを保持するポリペプチドのあらゆる断片を指す。ポリペプチド内の方向は、個々のアミノ酸のアミノ部分とカルボキシ部分の方向によって定義される、N末端からC末端方向に向かうものとして一般に言及される。ポリペプチドは、N末端又はアミノ末端からC

10

20

30

40

50

末端又はカルボキシ末端に向かって翻訳される。

【 0 0 3 6 】

「シグナルペプチド」は、新しく合成された分泌タンパク質又は膜タンパク質を、膜、たとえば小胞体の膜へと及びそれを通過することを指示する短いアミノ酸配列（たとえば、およそ18～25アミノ酸の長さ）である。シグナルペプチドはポリペプチドのN末端に位置することが多いが、普遍的ではなく、タンパク質が膜を通過した後、シグナルペプチダーゼによって切断されることが多い。シグナル配列は通常、3つの一般的な特徴：N末端の極性塩基性領域（n-領域）、疎水性コア及び親水性c-領域を含有する。

【 0 0 3 7 】

用語「ポリヌクレオチド」及び「核酸配列」は、少なくとも10塩基の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド又はいずれかのヌクレオチドの修飾された形態であり得る。該用語は、DNAの一本鎖形態及び二本鎖形態を含む。「単離されたポリヌクレオチド」とは、それが由来する生物の天然に存在するゲノムにおいて直接隣接する（一方は5'末端で一方は3'末端）コード配列の双方と直接隣接しないポリヌクレオチドを意味する。一実施形態では、ポリヌクレオチドはポリペプチドをコードする。核酸の5'及び3'の方向は、個々のヌクレオチド単位の接続性を参照して定義され、デオキシリボース（又はリボース）糖環の炭素部分に従って指定される。ポリヌクレオチド配列の情報（コード）内容は5'から3'の方向で読み取られる。

【 0 0 3 8 】

「組換え」核酸は、天然に存在しない配列を有し、又は配列の2つの分離した断片の人工的な組み合わせによって作製された配列を有するものである。この人工的な組み合わせは、化学的な合成によって、又は、さらに一般的には、たとえば、遺伝子操作技法による核酸の単離された断片の人工的な操作によって達成することができる。「組換え」タンパク質は、たとえば、細菌細胞又は真核細胞のような宿主細胞に導入された異種（たとえば、組換え）の核酸によってコードされるものである。核酸は、導入された核酸によってコードされるタンパク質を発現することが可能であるシグナルを有する発現ベクターに導入することができ、又は核酸は宿主細胞の染色体に組み込むことができる。

【 0 0 3 9 】

用語「異種の（ヘテロ）」は、核酸、ポリペプチド又は別の細胞成分に関して、通常天然に見出されない場合、及び/又は異なる供給源若しくは種を起源とする成分が存在することを示す。

【 0 0 4 0 】

用語「精製」（たとえば、病原体又は病原体を含有する組成物に関して）は、望ましくない存在を組成物から取り除く工程を指す。精製は相対的な用語であり、微量な望ましくない成分のすべてが組成物から取り除かれることを必要としない。ワクチン生産の文脈では、精製は、たとえば、遠心、透析、イオン交換クロマトグラフィ、及びサイズ排除クロマトグラフィ、アフィニティ精製又は沈殿のようなプロセスを含む。従って、用語「精製された」は、絶対的な純度を必要とせず、むしろ、それは相対的な用語として意図される。従って、たとえば、精製された核酸又はタンパク質の調製物は、一般的な環境、たとえば、細胞内又は生化学的な反応器における核酸又はタンパク質よりも特定の核酸又はタンパク質が濃縮されるものである。実質的に純粋な核酸又はタンパク質の調製物は、所望の核酸が、調製物の全核酸含量の少なくとも50%を表すように精製することができる。特定の実施形態では、実質的に純粋な核酸又はタンパク質は、調製物の全核酸又はタンパク質含量の少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%以上を表す。

【 0 0 4 1 】

「単離された」生物構成成分（たとえば、核酸分子、タンパク質又は細胞小器官）は、構成成分、たとえば、そのほかの染色体の及び染色体外のDNA及びRNA、タンパク質及び細胞小器官が天然に存在する生物の細胞におけるそのほかの生物構成成分から実質的

10

20

30

40

50

に分離され、又は精製されている。「単離された」核酸及びタンパク質は、標準の精製方法によって精製された核酸及びタンパク質を含む。該用語はまた、宿主細胞における組換え発現によって調製される核酸及びタンパク質、並びに化学的に合成される核酸及びタンパク質も包含する。

【0042】

「抗原」は、対象に注射される、吸収される又はさもなければ導入される組成物を含む、対象にて抗体の産生及び/又はT細胞反応を刺激することができる化合物、組成物又は物質である。用語「抗原」は、関連する抗原性エピトープすべてを含む。用語「エピトープ」又は「抗原決定基」は、B細胞及び/又はT細胞が応答する抗原の部位を指す。「優勢な抗原性エピトープ」又は「優勢なエピトープ」は、それに対して機能的に有意な宿主の免疫応答、たとえば、抗体反応又はT細胞反応が為されるエピトープである。従って、病原体に対する防御免疫応答に関して、優勢な抗原性エピトープは、宿主の免疫系によって認識されると病原体が原因で生じる疾患からの防御を生じる抗原性部分である。用語「T細胞エピトープ」は、適切なMHC分子に結合すると、T細胞によって(T細胞受容体を介して)特異的に結合されるエピトープを指す。「B細胞エピトープ」は、抗体(又はB細胞受容体分子)によって特異的に結合されるエピトープである。

10

【0043】

「アジュバント」は、非抗原特異的に免疫応答の産生を高める物質である。一般的なアジュバントには、抗原が吸着した鉱物(ミョウバン、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム)の懸濁液;油中水型及び水中油型(及びその変異体、二重エマルジョン及びリパーシブルエマルジョンを含む)を含むエマルジョン、リポ糖、リポ多糖、免疫刺激性核酸(たとえば、CpGオリゴヌクレオチド)、リボソーム、Toll様受容体作動薬(特に、TLR2、TLR4、TLR7/8、及びTLR9作動薬)、並びにそのような成分の種々の組み合わせが挙げられる。

20

【0044】

「抗体」又は「免疫グロブリン」は、抗原に特異的に結合する4つのポリペプチドから構成される血漿タンパク質である。抗体分子は、ジスルフィド結合によって互いに保持される2つの重鎖ポリペプチド及び2つの軽鎖ポリペプチド(又はそれらの複数)から構成される。ヒトでは、抗体は、5つのアイソタイプ又はクラス、すなわちIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEに定義され、IgG抗体はさらに4つのサブクラス(IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>及びIgG<sub>4</sub>)に分けることができる。「中和」抗体は、ウイルスの感染性を阻害することができる抗体である。例えば、RSVに特異的な中和抗体は、RSVの感染性を阻害又は低下させることができる。

30

【0045】

「免疫原性組成物」は、たとえば、RSV又は百日咳菌のような病原体に対して、特異的な免疫応答を惹起することが可能である、ヒト又は動物対象(たとえば、実験又は臨床設定で)に投与するのに好適な組成物である。そのようなものとして、免疫原性組成物は、1以上の抗原(たとえば、ポリペプチド抗原)又は抗原性エピトープを含む。免疫原性組成物はまた、たとえば、賦形剤、担体及び/又はアジュバントのような、免疫応答を惹起する又は高めることが可能である追加の1以上の成分を含むことができる。特定の例では、免疫原性組成物を投与して、病原体によって誘導される症状又は状態に対して対象を防御する免疫応答を惹起する。場合によっては、病原体により引き起こされる症状又は疾患は、病原体(例えばRSV又は百日咳菌)に対する対象の曝露に続く病原体の複製を阻害することによって防がれる(又は低減される若しくは改善される)。本開示の文脈では、用語、免疫原性組成物は、RSV及び/又は百日咳菌に対する防御的又は緩和的な免疫応答を惹起する目的で対象又は対象の集団への投与を意図される組成物(すなわち、ワクチン組成物又はワクチン)を包含することが理解されるであろう。本明細書において「併用免疫原性組成物」を使用する場合、これは、参照として、RSV及び百日咳菌抗原の両方を含む本明細書に開示の免疫原性組成物(RSV抗原を含むが百日咳菌抗原を含まない又はその逆の免疫原性組成物とは対照的である)を具体的に意図すると考えられる。

40

50

## 【 0 0 4 6 】

「免疫応答」は、免疫系の細胞、たとえば、B細胞、T細胞、又は単球の、病原体又は抗原（免疫原性組成物又はワクチンとして製剤化されている）などの刺激に対する応答である。免疫応答は、抗原特異的な中和抗体のような特異的な抗体の産生を生じるB細胞の応答であることができる。免疫応答は、たとえば、CD4<sup>+</sup>応答又はCD8<sup>+</sup>応答のようなT細胞の応答であることもできる。B細胞及びT細胞応答は、「細胞性」免疫応答の態様である。免疫応答はまた、抗体により媒介される「体液性」免疫応答であってもよい。場合によっては、応答は特定の抗原に特異的である（すなわち、「抗原特異的応答」）。抗原が病原体に由来するのであれば、抗原特異的応答は、「病原体特異的応答」である。「防御免疫応答」は、病原体の有害な機能又は活性を抑え、病原体による感染を低減し、あるいは病原体による感染の結果生じる症状（死亡を含む）を低減する免疫応答である。防御免疫応答は、たとえば、プラーク低減アッセイ若しくはELISA中和アッセイにおけるウイルス複製若しくはプラーク形成の阻害によって、又は生体内での病原体チャレンジに対する耐性を測定することによって測定することができる。免疫原性刺激、例えば病原体又は抗原（例えば免疫原性組成物又はワクチンとして製剤化されたもの）への対象の曝露は、該刺激に特異的な一次免疫応答を惹起し、すなわちその曝露が免疫応答を「プライミング」する。その後の該刺激に対する曝露、例えば免疫による曝露は、その特異的免疫応答の程度（若しくは持続期間、又は両方）を増大、すなわち「追加刺激（ブースト）」することができる。したがって、免疫原性組成物の投与による既に存在する免疫応答の「追加刺激（ブースト）」は、抗原（又は病原体）特異的応答の程度を増大する（例えば、抗体力価及び/又はアフィニティの増大により、抗原特異的B又はT細胞の頻度の増大により、成熟エフェクター機能の誘導により、あるいはこれらの任意の組み合わせにより）。

10

20

## 【 0 0 4 7 】

「Th1」に偏った免疫応答は、IL-2及びIFN- $\gamma$ を産生するのでIL-2及びIFN- $\gamma$ の分泌又は存在によるCD4<sup>+</sup>Tヘルパー細胞の存在を特徴とする。それに対して、「Th2」に偏った免疫応答は、IL-4、IL-5及びIL-13を産生するCD4<sup>+</sup>ヘルパー細胞の優勢を特徴とする。

## 【 0 0 4 8 】

「免疫学的に有効な量」は、組成物又は組成物中の抗原に対して対象にて免疫応答を惹起するのに使用される組成物（通常、免疫原性組成物）の量である。一般に、所望の結果は、病原体に対して対象を防御することが可能である又はそれに寄与する抗原特異的（たとえば、病原体特異的）免疫応答の産生である。しかしながら、病原体に対する防御免疫応答を得ることは、免疫原性組成物の複数の投与を必要とし得る。従って、本開示の文脈では、用語、免疫学的に有効な量は、前の又は後に続く投与との組み合わせで防御免疫応答を達成することに寄与する部分用量を包含する。

30

## 【 0 0 4 9 】

形容詞「薬学的に許容される」は、指示対象が対象（たとえば、ヒト又は動物対象）への投与に好適であることを指す。Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)は、免疫原性組成物を含む、治療用及び/又は予防用の組成物の薬学送達に好適な組成物及び製剤（希釈剤を含む）を記載している。

40

## 【 0 0 5 0 】

用語「調節する」は、免疫応答のような応答に関して、応答の発生、程度、持続期間又は特徴を変える又は変化させることを意味する。免疫応答を調節する剤は、その投与に続く免疫応答の発生、程度、持続期間又は特徴の少なくとも1つを変える、あるいは参照剤に比べて発生、程度、持続期間又は特徴の少なくとも1つを変える。

## 【 0 0 5 1 】

用語「低減（軽減、低下）する」は、剤の投与に続いて応答又は状態が定量的に低下する場合、又は参照剤に比べて剤の投与に続いてそれが低下する場合、剤が応答又は状態を

50

低減するように、相対的な用語である。同様に用語「防御する」は、応答又は状態の少なくとも1つの特徴が実質的に又は有意に低減又は除去される限り、剤が感染のリスク又は感染によって生じる疾患のリスクを完全に除去することを必ずしも意味しない。従って、感染又は疾患若しくはその症候を防御する又は低減する免疫原性組成物は、感染の発生若しくは重篤度又は疾患の発生若しくは重篤度が、剤の非存在下での又は参照剤と比べた感染又は応答の、たとえば、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%測定上低下する限り、すべての対象における感染又は疾患を防御又は除去することができるが、必ずしもそうでなくてもよい。

#### 【0052】

「対象」は、生きている多細胞の脊椎生物、例えば哺乳動物である。本開示の文脈では、対象は、たとえば、非ヒト動物、たとえば、マウス、コットンラット、モルモット、ウシ又は非ヒト霊長類のような実験用対象であり得る。或いは、対象はヒト対象であり得る。

#### 【0053】

##### RSV Fタンパク質類似体

特定の実施形態において、Fタンパク質類似体は、Fタンパク質の融合前立体構造を安定化させる少なくとも1つの修飾を含む、融合前F又は「PreF」抗原である。あるいは、融合後立体構造（「PostF」）において安定化されたF類似体、又は立体構造に関して不安定であるF類似体を使用してもよい。一般的に、Fタンパク質類似体（例えば、PreF、PostFなど）抗原は、膜貫通ドメインを欠き、可溶性であり、すなわち、（例えば、Fタンパク質類似体の発現及び精製を容易にするために）膜結合していない。

#### 【0054】

当該分野で広く受け入れられている用語及び指示を参照してRSV Fタンパク質の構造の詳細を本明細書で提供し、図1Aに模式的に示す。PreF抗原の例の概略図を図1Bに提供する。

#### 【0055】

例示的な実施形態において、Fタンパク質類似体は、N末端からC末端の方向で、RSV Fタンパク質ポリペプチドのF<sub>2</sub>ドメイン及びF<sub>1</sub>ドメインの少なくとも一部分若しくは実質的に全てを、必要に応じてヘテロ三量体化ドメインと共に含む。1つの実施形態において、F<sub>2</sub>ドメインとF<sub>1</sub>ドメインとの間にフーリン切断部位はない。特定の実施形態において、F<sub>2</sub>ドメインは、配列番号2の参照Fタンパク質前駆体ポリペプチド（F<sub>0</sub>）のアミノ酸26～105に対応するRSV Fタンパク質ポリペプチドの少なくとも一部分を含み、及び/又はF<sub>1</sub>ドメインは、配列番号2の参照Fタンパク質前駆体ポリペプチド（F<sub>0</sub>）のアミノ酸137～516に対応するRSV Fタンパク質ポリペプチドの少なくとも一部分を含む。

#### 【0056】

例えば、特定の実施形態において、Fタンパク質類似体は、以下の群から選択される：

- a) 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号18、配列番号20及び配列番号22の群から選択されるポリペプチドを含むポリペプチド、
- b) 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号17、配列番号19及び配列番号21の群から選択されるポリヌクレオチドによって、又は配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号17、配列番号19及び配列番号21の群から選択されるポリヌクレオチドに実質的にその全長にわたってストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列によってコードされ、天然に存在するRSV株に少なくとも部分的に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチド、
- c) 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号18、配列番号20及び配列番号22の群から選択されるポリペプチドに対し少なくとも95%の配列同一性を有し、天然に存在するRSV株に対応しないアミノ酸配列を含むポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【0057】

必要に応じて、Fタンパク質類似体は、シグナルペプチドをさらに含んでもよい。必要に応じて、Fタンパク質類似体は、「タグ」若しくは精製を容易にする配列、例えば、多ヒスチジン配列を、さらに含んでもよい。

## 【0058】

ヘテロ三量体化ドメインを含む実施形態において、このようなドメインは、コイルドコイルドメイン、例えばイソロイシンジッパーを含んでもよく、又は、別の三量体化ドメイン、例えば、バクテリオファージT4フィブリチン(fibritin)（「フォルドン(foldon)」）若しくはインフルエンザHAに由来するものを含んでもよい。

## 【0059】

特定の例示の実施形態において、Fタンパク質類似体は、以下から選択される少なくとも1つの修飾を含む：

- (i) グリコシル化を改変する修飾、
- (ii) 少なくとも1つの非フーリン切断部位を除去する修飾、
- (iii) pep27ドメインの1つ以上のアミノ酸を欠失させる修飾、並びに
- (iv) Fタンパク質細胞外ドメインの疎水性ドメインにおいて親水性アミノ酸を置換する又は付加する修飾。

## 【0060】

特定の実施形態において、Fタンパク質類似体は、ポリペプチドの多量体、例えば、ポリペプチドの三量体を含む。

## 【0061】

上述したように、特定の実施形態において、開示される併用免疫原性組成物の組換えRSV抗原は、融合(F)タンパク質類似体を含み、このFタンパク質類似体には、Fタンパク質の融合前立体構造、すなわち、宿主細胞の膜との融合に先立った成熟集合Fタンパク質の立体構造を安定化させるために修飾されている可溶性Fタンパク質ポリペプチドが含まれる。これらのFタンパク質類似体は、明瞭性と簡潔性の目的で、「PreF」又は「PreF抗原」と称する。WO2010/149745に記載及び例証されているような抗原は、改善された免疫的特徴を示し、生体内で対象に投与された場合に安全で高度に防御的である。RSV Fタンパク質は、本明細書で提供される教示に従って融合前立体構造を安定化させるために修飾できることが当業者によって理解されるであろう。従って、PreF抗原類似体の作出を導く原理の理解を円滑にするために、個々の構造的成分は、例示的なFタンパク質を参照して示し、そのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ、配列番号1及び2に提供する。同様に、該当する場合、例示的なGタンパク質を参照してGタンパク質抗原が説明されるが、そのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ、配列番号3及び4に提供する。

## 【0062】

Fタンパク質ポリペプチドの一次アミノ酸配列を参照して(図1A)、PreF抗原の構造的特徴を説明するために以下の用語を使用する。

## 【0063】

用語F<sub>0</sub>は、完全長の翻訳されたFタンパク質前駆体を指す。F<sub>0</sub>ポリペプチドは、pep27と命名された介在ペプチドによって分離されるF<sub>2</sub>ドメインとF<sub>1</sub>ドメインにさらに分割される。成熟の間に、F<sub>0</sub>ポリペプチドは、F<sub>2</sub>とF<sub>1</sub>と隣接pep27の間に配置されている2つのフーリン部位でタンパク分解切断を受ける。議論を確実にする目的で、F<sub>2</sub>ドメインは、アミノ酸1~109の少なくとも一部及び最大で全部を含み、F<sub>1</sub>ドメインの可溶性部分は、Fタンパク質のアミノ酸137~526の少なくとも一部及び全部までを含む。上で示したように、これらアミノ酸の位置(及び本明細書で指定される後に続くアミノ酸の位置すべて)は、配列番号2の例示的なFタンパク質前駆体ポリペプチド(F<sub>0</sub>)を参照して与えられる。

## 【0064】

融合前F(又は「PreF」)抗原は、RSV抗原がFタンパク質の融合前立体構造の

10

20

30

40

50

免疫優勢エピトープを少なくとも1つ保持するように、Fタンパク質の融合前立体構造を安定化させる少なくとも1つの修飾を含む可溶性（すなわち、膜に結合しない）Fタンパク質類似体である。可溶性Fタンパク質類似体は、RSVのFタンパク質のF<sub>2</sub>ドメインとF<sub>1</sub>ドメインを含む（が、RSVのFタンパク質の膜貫通ドメインを含まない）。例となる実施形態では、F<sub>2</sub>ドメインはFタンパク質のアミノ酸26～105を含み、F<sub>1</sub>ドメインはアミノ酸137～516を含む。しかしながら、安定化されたPreF抗原の三次元立体構造が維持される限り、さらに小さな部分を使用することもできる。同様に、追加の構造的成分が、三次元立体構造を破壊せず、あるいは抗原の安定性、産生若しくはプロセッシングに有害に影響せず、又は抗原の免疫原性を低下させない限り、追加の構造的成分（たとえば、融合ポリペプチド）を含むポリペプチドを、例となるF<sub>2</sub>ドメイン及びF<sub>1</sub>ドメインの代わりに使用することができる。F<sub>2</sub>ドメインとF<sub>1</sub>ドメインは、Fタンパク質類似体の成熟融合前立体構造への折り畳みと集合を複製するように設計されたN末端からC末端へ方向で位置づけられる。産生を高めるために、天然のFタンパク質のシグナルペプチド又は組換えPreF抗原が発現されるべき宿主細胞における産生と分泌を高めるように選択される異種シグナルペプチドのような分泌シグナルペプチドがF<sub>2</sub>ドメインに先行することができる。

10

## 【0065】

PreF抗原は、たとえば、1以上のアミノ酸の付加、欠失又は置換のような1以上の修飾を導入することによって安定化される（三量体の融合前立体構造において）。そのような安定化修飾の1つは、ヘテロ安定化ドメインを含むアミノ酸配列の付加である。例となる実施形態では、ヘテロ安定化ドメインは、タンパク質多量体化ドメインである。そのようなタンパク質多量体化ドメインの特に好適な一例は、そのようなドメインを有する複数のポリペプチドの三量体化を促進するイソロイシンジッパーのようなコイルドコイルドメインである。例となるイソロイシンジッパードメインを配列番号11に示す。通常、ヘテロ安定化ドメインは、F<sub>1</sub>ドメインのC末端に位置する。

20

## 【0066】

任意で、多量体化ドメインは、たとえば、配列GGのような短いアミノ酸リンカー配列を介してF<sub>1</sub>ドメインに接続される。リンカーはさらに長いリンカーであってもよい（たとえば、アミノ酸配列GGSGSGGS：配列番号14のような配列GGを含む）。PreF抗原の立体構造を破壊せずに本文脈で使用できる多数の構造的に中性のリンカーが当該技術で既知である。

30

## 【0067】

別の安定化修飾は、天然のF<sub>0</sub>タンパク質のF<sub>2</sub>ドメインとF<sub>1</sub>ドメインの間に位置するフーリン認識切断部位の除去である。プロテアーゼがPreFポリペプチドを構成ドメインに切断できないように、フーリン認識部位の1以上のアミノ酸を欠失させる又は置換することによって、105～109位及び133～136位に位置するフーリン認識部位の一方又は双方を除去することができる。任意で、介在pep27ペプチドを取り除く、又はたとえば、リンカーペプチドによって置き換えることもできる。さらに又は任意で、融合ペプチドの近傍での非フーリン切断部位（たとえば、112～113位でのメタロプロテイナーゼ部位）を取り除く又は置き換えることができる。

40

## 【0068】

安定化変異の別の例は、Fタンパク質の疎水性ドメインへの親水性アミノ酸の付加又は置換である。通常、疎水性領域にて、リジンのような荷電アミノ酸を付加する又はロイシンのような中性残基と置換する。たとえば、Fタンパク質の細胞外ドメインのHRBコイルドコイルドメイン内で親水性アミノ酸を付加する又は疎水性若しくは中性のアミノ酸と置換することができる。例証として、リジンのような荷電アミノ酸をFタンパク質の512位に存在するロイシンに対して置換することができる。代わりに又は加えて、Fタンパク質のHRAドメイン内で親水性アミノ酸を疎水性又は中性のアミノ酸に対して付加する又は置換することができる。たとえば、リジンのような1以上の荷電アミノ酸を105～106位にて又はその近傍に挿入することができる（たとえば、PreF抗原のアミノ酸

50

105と106の間のような参照配列番号2の残基105に対応するアミノ酸の後に)。任意で、HRAドメイン及びHRBドメインの双方にて親水性アミノ酸を付加又は置換することができる。或いは、PreF抗原の立体構造全体が有害に影響されない限り、1以上の疎水性残基を欠失することができる。

【0069】

さらに又は代わりに、PreF抗原のグリコシル化状況を変化させる1以上の修飾を行ってもよい。たとえば、アミノ酸残基500にて又はその周囲で(配列番号2に比べて)天然のRSVのFタンパク質に存在するグリコシル化部位における1以上のアミノ酸を欠失させて又は置換して(又はグリコシル化部位が破壊されるようにアミノ酸を付加することができる)、PreF抗原のグリコシル化状況を増減させることができる。たとえば、配列番号2の500~502位に対応するアミノ酸をNGS、NKS、NGT及びNKTから選択することができる。従って、特定の実施形態では、PreF抗原は、RSVのFタンパク質ポリペプチドのF<sub>2</sub>ドメイン(配列番号2のアミノ酸26~105に対応する)とF<sub>1</sub>ドメイン(配列番号2のアミノ酸137~516に対応する)を含む可溶性Fタンパク質類似体を含み、グリコシル化を変化させる少なくとも1つの修飾が導入されている。RSVのPreF抗原は通常、F<sub>2</sub>ドメインとF<sub>1</sub>ドメインの間に未変化の融合ペプチドを含む。任意で、PreF抗原はシグナルペプチドを含む。

10

【0070】

上で開示されたように、そのようなFタンパク質類似体は、以下から選択される少なくとも1つの修飾を含みうる：

20

- (i) ヘテロ三量体化ドメイン(たとえば、イソロイシンジッパードメインなど)を含むアミノ酸配列の付加、
- (ii) 少なくとも1つのフーリン切断部位の欠失、
- (iii) 少なくとも1つの非フーリン切断部位の欠失、
- (iv) pep27ドメインの1以上のアミノ酸の欠失、及び
- (v) Fタンパク質の細胞外ドメインの疎水性ドメインにおける親水性アミノ酸の少なくとも1つの置換又は付加。

【0071】

上で開示されたように、そのようなグリコシル化修飾されたRSVのPreF抗原は、多量体、たとえば、三量体を形成する。

30

【0072】

例となる実施形態では、グリコシル化修飾されたPreF抗原は、以下：

- (a) 配列番号22を含む又はそれから成るポリペプチド、
- (b) 配列番号21によってコードされるポリペプチド、又は配列番号21の実質的な全長にわたってストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、
- (c) 配列番号22と少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドの群から選択される。

【0073】

安定化修飾のいずれか及び/又はすべてを個々に及び/又は本明細書で開示されるそのほかの安定化修飾のいずれかとの組み合わせで用いてPreF抗原を作出することができる。例となる実施形態では、F<sub>2</sub>ドメインとF<sub>1</sub>ドメインの間に介在性フーリン切断部位を伴わず、F<sub>1</sub>ドメインのC末端に位置するヘテロ安定化ドメイン(たとえば、三量体化ドメイン)を伴ったF<sub>2</sub>ドメインとF<sub>1</sub>ドメインを含むポリペプチドを含むPreFタンパク質。特定の実施形態では、PreF抗原はまた、疎水性のHRA及び/又はHRBドメインへの親水性残基の1以上の付加及び/又は置換も含む。任意で、PreF抗原はたとえば、メタロプロテイナーゼ部位などの少なくとも1つの非フーリン切断部位の修飾を有する。

40

【0074】

PreF抗原は、任意により、RSVのGタンパク質の少なくとも免疫原性部分を含む

50

追加のポリペプチド成分を含んでもよい。すなわち、特定の実施形態では、PreF抗原はFタンパク質成分とGタンパク質成分の双方を含むキメラタンパク質である。Fタンパク質成分は、上記のPreF抗原のいずれかであることができ、Gタンパク質成分はRSVのGタンパク質の免疫学的に活性のある部分（全長までのGタンパク質、及び/又は全長のGタンパク質を含む）であるように選択される。例となる実施形態では、Gタンパク質ポリペプチドは、Gタンパク質（配列番号4で表されるGタンパク質の配列を参照してアミノ酸の位置が指定される）のアミノ酸149～229を含む。選択された部分がさらに大きなGタンパク質断片の優勢な免疫学的特性を保持する限り、Gタンパク質のさらに小さな部分又は断片を使用できることを当業者は十分に理解するであろう。特に、選択される断片は、およそ184～198位（例えばアミノ酸180～200）のアミノ酸の間の免疫学的に優勢なエピトープを保持し、免疫優勢エピトープを呈する安定な立体構造に折り畳み、集合するのに十分に長い。たとえば、およそアミノ酸128～およそアミノ酸229から、全長までのGタンパク質などのさらに長い断片も使用することができる。キメラタンパク質の文脈で、選択される断片が安定な立体構造に折り畳み、宿主細胞で組換え的に作製する場合、その作製、プロセッシング又は安定性を妨害しない限り。任意で、Gタンパク質成分は、たとえば、配列GGのような短いアミノ酸リンカー配列を介してFタンパク質成分に接続される。リンカーはさらに長いリンカーであり得る（たとえば、アミノ酸配列GSSGGSSGGSS：配列番号14）。PreF抗原の立体構造を破壊せずに本文脈で使用できる多数の構造的に中性のリンカーが当該技術で既知である。

10

## 【0075】

20

任意で、Gタンパク質成分は、RSV疾患の動物モデルで増強されたウイルス性疾患を軽減する又は予防する1以上のアミノ酸置換を含むことができる。すなわち、許容可能な動物モデル（たとえば、RSVのマウスモデル）から選択される対象に、PreF-Gキメラ抗原を含む免疫原性組成物を投与した場合、非修飾のGタンパク質を含有するワクチンを受け取った対照動物に比べて、対象がワクチン増強のウイルス性疾患（たとえば、好酸球増多、好中球増多）の症状を軽減又は無症状を示すように、Gタンパク質はアミノ酸置換を含むことができる。ワクチン増強のウイルス性疾患の軽減及び/又は予防は、免疫原性組成物がアジュバントの非存在下で投与された（しかし、たとえば、抗原が強いTh1誘導アジュバントの存在下で投与される場合ではない）場合、明らかであり得る。さらに、アミノ酸置換は、ヒト対象に投与された場合、ワクチン増強のウイルス性疾患を軽減

30

## 【0076】

任意で、上で記載されるPreF抗原は、精製の補助として役立つ追加の配列を含むことができる。一例はポリヒスチジンタグである。そのようなタグは所望であれば、最終産物から取り除くことができる。

## 【0077】

発現される場合、PreF抗原は、ポリペプチドの多量体を含む成熟タンパク質への分子内折り畳みと集合を受ける。好都合には、PreF抗原ポリペプチドは、成熟した、プロセッシングされたRSVのFタンパク質の融合前立体構造に似ている三量体を形成する。

40

## 【0078】

一部の実施形態では、免疫原性組成物は、PreF抗原（たとえば、配列番号6によって説明される例となる実施形態）と、Gタンパク質成分を含む第2のポリペプチドを含む。Gタンパク質成分は通常、Gタンパク質の少なくともアミノ酸149～229を含む。Gタンパク質のさらに小さな部分を使用することができるが、そのような断片は、少なくとも、アミノ酸184～198の免疫学的に優勢なエピトープを含むべきである。或いは、Gタンパク質は、任意で、たとえば、全長のGタンパク質又はキメラポリペプチドのようなさらに大きなタンパク質の要素として、アミノ酸128～229又は130～230のようなGタンパク質のさらに大きな部分を含むことができる。

## 【0079】

50

他の実施形態では、免疫原性組成物は、Gタンパク質成分（配列番号8及び10で説明される例となる実施形態）も含むキメラタンパク質であるPreF抗原を含む。そのようなキメラPreF（又はPreF-G）抗原のGタンパク質成分は、Gタンパク質の少なくともアミノ酸149～229を通常含む。上で示したように、免疫優勢エピトープが保持され、PreF-G抗原の立体構造が有害に影響されない限り、Gタンパク質のさらに小さな又はさらに大きな断片（たとえば、アミノ酸129～229又は130～230）も使用することができる。

【0080】

PreF抗原に関するさらなる詳細、及びこれらを使用する方法は、以下及び実施例において示す。

10

【0081】

本明細書に開示する組換えRSV抗原は、RSV Fタンパク質に由来し、免疫学的にその全体又は一部に相当する、Fタンパク質類似体である。それらは、Fタンパク質の構造又は機能を改変する1以上の修飾を含むが、Fタンパク質の免疫学的性質を保持し、結果として、Fタンパク質類似体に対して生起された免疫応答は天然のFタンパク質を認識し、したがってRSVを認識するものである。本明細書に記載するFタンパク質類似体は免疫原として有用である。

【0082】

本来は、RSV Fタンパク質は、F<sub>0</sub>と命名された単一のポリペプチド前駆体、長さ574のアミノ酸として発現される。生体内で、F<sub>0</sub>は、小胞体にてオリゴマー化し、2つの保存されたフーリンコンセンサス配列（フーリン切断部位）、RARR109（配列番号15）とRKRR136（配列番号16）にてフーリンプロテアーゼによってタンパク質分解処理を受けて、2つのジスルフィド結合断片から成るオリゴマーを生成する。これら断片の小さい方はF<sub>2</sub>と呼ばれ、F<sub>0</sub>前駆体のN末端部分を起源とする。大きい方のC末端F<sub>1</sub>断片は、24アミノ酸の細胞質尾部に隣接する疎水性アミノ酸の配列を介して膜にFタンパク質を固定する。3つのF<sub>2</sub>-F<sub>1</sub>二量体が会合して成熟Fタンパク質を形成し、それは、標的細胞膜との接触の際、立体構造変化を受けるきっかけとなる準安定的な前融合型（「融合前」）の立体構造を取る。この立体構造変化は、融合ペプチドとして知られる疎水性配列を露出させ、それは、宿主細胞の膜と会合し、標的細胞膜とのウイルス又は感染細胞の膜の融合を促進する。

20

30

【0083】

F<sub>1</sub>断片は、HRA及びHRBと命名され、それぞれ融合ペプチド及び膜貫通アンカードメインの近傍に位置する少なくとも2つの7個（heptad）反復ドメインを含有する。融合前立体構造では、F<sub>2</sub>-F<sub>1</sub>二量体は、球形の頭部と茎構造を形成し、そこでHRAドメインは球形の頭部における断片化（伸長した）立体構造にある。それに対して、HRBドメインは、頭部領域から伸びる三本鎖のコイルドコイルの茎を形成する。融合前から融合後立体構造への転移の間、HRAドメインは崩壊し、HRBドメインの近傍にもたらされ、逆平行の6らせん束を形成する。融合後の状態で、融合ペプチドと膜貫通ドメインは、並置されて膜の融合を促進する。

【0084】

上記で提供された立体構造の記載は、結晶学データの分子モデル化に基づくが、融合前と融合後立体構造の構造的な識別は、結晶学への手段なしでもモニターできる。たとえば、その技術的教示の目的で、参照によって本明細書に組み入れられるCalder et al., *Virology*, 271:122-131 (2000)及びMorton et al., *Virology*, 311:275-288によって明らかにされたように、電子顕微鏡を用いて融合前と融合後（あるいは前融合型と融合型と称される）の立体構造を区別することができる。また、その技術的教示の目的で、参照によって本明細書に組み入れられるConnolly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:17903-17908 (2006)により記載されたようなりボソーム会合アッセイによって融合前立体構造を融合型（融合後）立体構造から区別することができる。さらに、RSV Fタンパク質の融合前形態又は融合形態の一方又は他方に存在するが、他の形態には存在しない立体構造

40

50

エピトープを特異的に認識する抗体を用いて融合前の立体構造と融合型の立体構造を区別することができる。そのような立体構造のエピトープは、分子の表面における抗原決定基の優先的な曝露による。或いは、立体構造のエピトープは、直鎖ポリペプチドで隣接しないアミノ酸の並置から生じ得る。

【 0 0 8 5 】

典型的には、Fタンパク質類似体 ( P r e F、P o s t F など ) は、膜貫通ドメイン及び細胞質尾部を欠損し、Fタンパク質細胞外ドメイン又は可溶性Fタンパク質細胞外ドメインとも称されることがある。

【 0 0 8 6 】

Fタンパク質類似体には、Fタンパク質の融合前立体構造、すなわち、宿主細胞の膜との融合に先立った成熟集合Fタンパク質の立体構造を安定化させるために修飾されているFタンパク質ポリペプチドが含まれる。これらのFタンパク質類似体は、明瞭性と簡潔性の目的で、「P r e F 類似体」、「P r e F」又は「P r e F 抗原」と呼称され、一般的に可溶性である。本明細書で開示されるP r e F 類似体は、ヘテロ三量体ドメインの組み合わせによって改変されている可溶性Fタンパク質類似体が改善された免疫学的特徴を示し、生体内で対象に投与された場合に安全で高度に防御的であるという予期しない発見にその基礎を置く。例示的なP r e F 抗原は、W O 2 0 1 0 / 1 4 9 7 4 5 に開示されており、これをP r e F 抗原の例を提供する目的でその全文を参照により本明細書に組み入れる。

【 0 0 8 7 】

Fタンパク質類似体としてはまた、融合後Fタンパク質の立体構造を有し、P o s t F 抗原又は融合後抗原とも称されるFタンパク質ポリペプチドが含まれる。P o s t F 類似体はW O 2 0 1 1 / 0 0 8 9 7 4 ( 参照により本明細書に組み入れられる ) に記載されている。P o s t F 抗原は、天然の融合後Fタンパク質の構造又は機能を改変する少なくとも1つの修飾を含んでいる。

【 0 0 8 8 】

本明細書で開示されるP r e F 類似体は、発現されたタンパク質の集団にて、発現されたタンパク質の集団の実質的な部分が、前融合型 ( 融合前 ) の立体構造にあるように ( たとえば、構造的な及び / 若しくは熱動的なモデル化によって予測されるように又は上記で開示された方法の1以上によって評価されるように )、R S V Fタンパク質の融合前立体構造を安定化させ、維持するように設計される。Fタンパク質の融合前立体構造の主な免疫原性エピトープが、細胞環境又は細胞外環境 ( たとえば、生体内、例として対象への投与に続く生体内 ) へのP r e F 類似体の導入に続いて維持されるように、安定化する修飾は、天然 ( 又は合成 ) のFタンパク質、たとえば、配列番号2の例示的なFタンパク質のような天然の ( 又は合成の ) Fタンパク質に導入される。

【 0 0 8 9 】

先ず、F<sub>0</sub>ポリペプチドの膜アンカードメインを置き換えるためにヘテロ安定化ドメインを構築物のC末端に置くことができる。この安定化ドメインは、H R B の不安定性を代償し、融合前の配座異性体を安定化するのを助けると予測される。例示的な実施形態では、ヘテロ安定化ドメインはタンパク質多量体化ドメインである。そのようなタンパク質多量体化ドメインの特に好都合な一例は、三量体化ドメインである。例示的な三量体化ドメインは、コイルドコイルドメインを有する複数のポリペプチドの三量体への集合を促進するコイルドコイルに折り畳む。三量体化ドメインの例としては、インフルエンザヘマグルチニン、S A R S スパイク、H I V g p 4 1、修飾G C N 4、バクテリオファージT 4 フィブリチン及びA T C a s e 由来の三量体化ドメインが挙げられる。三量体化ドメインの好都合な一例は、イソロイシンジッパーである。例示的なイソロイシンジッパードメインは、Harbury et al. Science 262:1401-1407 (1993)によって記載された操作された酵母G C N 4 イソロイシン変異体である。好適なイソロイシンジッパードメインの1つの配列は配列番号11で表されるが、コイルドコイル安定化ドメインを形成する能力を保持するこの配列の変異体も同様に好適である。代替りの安定化コイルドコイル三量体化ドメイ

10

20

30

40

50

ンには、TRAF2 (GENBANK (登録商標) 登録番号 Q12933 [gi: 23503103]; アミノ酸 299-348); トロンボスポンジン1 (登録番号 P07996 [gi: 135717]; アミノ酸 291-314); Matrilin-4 (登録番号 O95460 [gi: 14548117]; アミノ酸 594-618); CMP (matrilin-1) (登録番号 NP\_002370 [gi: 4505111]; アミノ酸 463-496); HSF1 (登録番号 AAX42211 [gi: 61362386]; アミノ酸 165-191; 及び Cubilin (登録番号 NP\_001072 [gi: 4557503]; アミノ酸 104-138) が挙げられる。好適な三量体ドメインは、発現されたタンパク質の実質的な部分の三量体への集合を生じることが期待される。たとえば、三量体化ドメインを有する組換え PreF ポリペプチドの少なくとも 50% が三量体へと集合する (たとえば、AFF-MALS によって評価されるように)。通常、発現されたポリペプチドの少なくとも 60%、さらに好都合には少なくとも 70%、最も望ましくは少なくとも約 75% 又はそれ以上が三量体として存在する。

10

#### 【0090】

安定化変異の別の例は、F タンパク質の疎水性ドメインへの親水性アミノ酸の付加又は置換である。典型的には、荷電アミノ酸、例えばリジンを、疎水性領域において、付加する、又は該領域において中性残基、例えばロイシンと置換する。例えば、F タンパク質細胞外ドメインの HRB コイルドコイルドメイン内において、親水性アミノ酸を付加する、又は該ドメイン内の疎水性若しくは中性アミノ酸と置換する。例えば、荷電アミノ酸残基 (リジンなど) で、F タンパク質の 512 位に存在するロイシン (天然 F<sub>0</sub> ポリペプチドに対して; 配列番号 6 の例示的な PreF 類似体ポリペプチドの L482K) を置換することができる。あるいは、又はさらに、F タンパク質の HRA ドメイン内において、親水性アミノ酸を付加する、又は該ドメイン内の疎水性若しくは中性アミノ酸と置換する。例えば、1 以上の荷電アミノ酸 (リジンなど) を、PreF 類似体の 105 ~ 106 位に又はその近傍 (例えば、参照配列番号 2 の残基 105 に対応するアミノ酸の後ろ、例えばアミノ酸 105 と 106 の間など) に挿入することができる。任意により、HRA 及び HRB ドメインの両方において親水性アミノ酸を付加又は置換してもよい。あるいは、PreF 類似体の全体の立体構造が有害な影響を受けない限り、1 以上の疎水性残基を欠失してもよい。

20

#### 【0091】

第 2 に、pep27 を取り除くことができる。融合前状態での RSV F タンパク質の構造モデルの解析は、pep27 が、F<sub>1</sub> と F<sub>2</sub> の間で大きな非拘束ループを創ることを示唆している。このループは、融合前状態の安定化に寄与することはなく、フーリンによる天然タンパク質の切断に続いて取り除かれる。したがって、pep27 はまた融合後 (又は他の) 立体構造類似体を含む実施形態から取り除かれる。

30

#### 【0092】

第 3 に、(天然 F<sub>0</sub> タンパク質における F<sub>2</sub> ドメインと F<sub>1</sub> ドメインの間から) フーリン切断モチーフの一方又は双方を欠失させることができる。105 ~ 109 又は 106 ~ 109 位及び 133 ~ 136 位に位置するフーリン認識部位の一方又は両方を、フーリン認識部位の 1 以上のアミノ酸の欠失又は置換により、例えば 1 以上のアミノ酸の欠失、又は 1 以上のアミノ酸の置換、又は 1 以上の置換若しくは欠失の組み合わせにより除去することができる、あるいはプロテアーゼが PreF (又は他の F タンパク質類似体) ポリペプチドのその構成するドメインへの切断を不可能にするように修飾することによって除去することができる。任意により、介在 pep27 ペプチドもまた、例えばリンカーペプチドにより、除去又は置換することができる。さらに、又は場合により、融合ペプチドに近接する非フーリン切断部位 (例えば、112 ~ 113 位におけるメタロプロテイナーゼ部位) を除去又は置換してもよい。

40

#### 【0093】

したがって、本開示に係る方法及び使用において使用するための F タンパク質類似体は、1 以上の改変されたフーリン切断部位を有する非切断型の細胞外ドメインで得ることが

50

できる。そのようなFタンパク質類似体ポリペプチドは、それらをアミノ酸101～161の位置で切断されずに、例えば105～109位及び131～136位におけるフーリン切断部位において切断されずに分泌する宿主細胞において組換えにより産生される。特定の実施形態において、置換K131Q、131～134位におけるアミノ酸の欠失、あるいは置換K131Q又はR133Q又はR135Q又はR136Qは、136/137における切断を阻害するために使用される。

#### 【0094】

例示的な設計において、融合ペプチドはF<sub>2</sub>から切断されず、融合前の配座異性体の球形頭部からの放出を妨げ、すぐ近くの膜への接近性を妨げる。融合ペプチドと膜界面との間の相互作用が融合前状態の不安定性における主な課題であると予測される。融合プロセスの間、融合ペプチドと標的膜の間の相互作用は、球形頭部構造内からの融合ペプチドの曝露を生じ、融合前状態の不安定性を高め、融合後の配座異性体に折り畳む。この立体構造の変化によって膜融合のプロセスが可能になる。フーリン切断部位の一方又は両方の除去は、融合ペプチドのN末端部分への膜接近性を妨げ、融合前状態を安定化させると予測される。従って、本明細書で開示される例示的な実施形態では、フーリン切断モチーフの除去は、インタクトな融合ペプチドを含むPreF類似体を生じ、それは、プロセッシング及び集合の間又はそれに続いてフーリンによって切断されない。

#### 【0095】

任意で、たとえば、1以上のアミノ酸の置換によって、少なくとも1つの非フーリン切断部位を取り除いてもよい。たとえば、実験的証拠は、特定のメタロプロテイナーゼによる切断につながる条件下では、Fタンパク質類似体はアミノ酸110～118の近傍で切断され得る（たとえば、Fタンパク質類似体のアミノ酸112と113の間；配列番号2の参照Fタンパク質ポリペプチドの142位のロイシンと143位のグリシンの間で切断が生じる）。従って、この領域内での1以上のアミノ酸の修飾は、Fタンパク質類似体の切断を低下させ得る。たとえば、112位のロイシンは、たとえば、イソロイシン、グルタミン又はトリプトファン（配列番号20の例示的な実施形態で示されるような）のような異なるアミノ酸で置換することができる。代わりに又はさらに、113位のグリシンは、セリン又はアラニンによって置換することができる。さらなる実施形態において、Fタンパク質類似体はさらに改変型トリプシン切断部位を含み、Fタンパク質類似体は、アミノ酸101と161の間の位置でトリプシンにより切断されない。

#### 【0096】

任意で、Fタンパク質類似体は、（たとえば、天然のFタンパク質ポリペプチドに存在する1以上のグリコシル化部位でグリコシル化された分子の比率を上げる又は下げることによって、）グリコシル化のパターン又は状況を改変する1以上の修飾を含むことができる。たとえば、配列番号2の天然Fタンパク質ポリペプチドは、27位、70位及び500位（配列番号6の例示的なPreF類似体の27位、70位及び470位に対応する）でのアミノ酸にてグリコシル化されると予測される。一実施形態では、修飾は、500位のアミノ酸（N470と命名）でのグリコシル化部位の近傍に導入される。たとえば、500位（参照配列の500位、例示的なPreF類似体の470位へのアライメントに対応する）のアスパラギンの代わりにグルタミン（Q）のようなアミノ酸を置換することによってグリコシル化部位を取り除くことができる。好都合には、このグリコシル化部位でグリコシル化効率を高める修飾が導入される。好適な修飾の例には、500～502位にて以下のアミノ酸配列：NGS；NKS；NGT；NKTが挙げられる。興味深いことに、高いグリコシル化を生じるこのグリコシル化部位の修飾はまた実質的に高いPreF産生を生じることが見出された。従って、特定の実施形態では、PreF類似体は、参照PreF配列（配列番号2）のアミノ酸500に対応する位置で、たとえば、配列番号6によって例示されるPreF類似体の470位にて修飾されたグリコシル化部位を有する。好適な修飾には、参照Fタンパク質ポリペプチド配列の500～502位に対応するアミノ酸での、配列：NGS；NKS；NGT；NKTが挙げられる。「NGT」の修飾を含む例示的な実施形態のアミノ酸は、配列番号18にて提供される。当業者は、対応するN

10

20

30

40

50

G S、N K S 及び N K T 修飾についての同様の修飾を容易に決定することができる。そのような修飾は、本明細書で開示される安定化変異（たとえば、イソロイシンジッパードメインのようなヘテロコイルドコイルドメイン、及び/又は疎水性領域における修飾、及び/又は p e p 2 7 の除去、及び/又はフーリン切断部位の除去、及び/又は非フーリン切断部位の除去、及び/又は非フーリン切断部位の除去）のいずれかと好都合に組み合わせられる。たとえば、特定の一実施形態では、F タンパク質類似体は非フーリン切断部位を除去させる置換とグリコシル化を高める修飾を含む。例示的な P r e F 類似体配列は、配列番号 2 2（例示的な実施形態が、「N G T」の修飾と 1 1 2 位でのロイシンに代わるグルタミンの置換を含む）にて提供される。例えば、特定の例示的な実施形態において、グリコシル化修飾 P r e F 類似体は、

- a) 配列番号 2 2 を含む又はこれからなるポリペプチド；
- b) 配列番号 2 1 により又は配列番号 2 1 に対して実質的にその全長にわたってストリメンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；
- c) 配列番号 2 2 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するポリペプチドの群より選択される。

#### 【 0 0 9 7 】

さらに一般的には、本明細書で開示される安定化の修飾、たとえば、好ましくは可溶性 F タンパク質類似体の C 末端に位置する、たとえば、コイルドコイル（たとえば、イソロイシンジッパードメイン）のようなヘテロ安定化ドメインの付加；疎水性 H R B ドメインにおけるロイシンからリジンへのような残基の修飾；p e p 2 7 の除去；フーリン切断モチーフの一方又は双方の除去；非フーリン切断部位、例えばトリプシン切断部位などの除去；並びに/あるいはグリコシル化部位の修飾のいずれか 1 つを、ほかの安定化修飾の 1 以上との組み合わせにて（又は任意の所望の組み合わせで全部まで）採用することができる。たとえば、ヘテロコイルドコイル（又はそのほかのヘテロ安定化ドメイン）を単独で利用することができ、又は疎水性領域の修飾及び/又は p e p 2 7 の除去及び/又はフーリン切断部位の除去及び/又は非フーリン切断部位の除去及び/又は非フーリン切断部位の除去のいずれかと組み合わせる利用することができる。特定の特殊な実施形態では、F タンパク質類似体、例えば P r e F 類似体は、C 末端のコイルドコイル（イソロイシンジッパー）ドメイン、H R B 疎水性ドメインにおける安定化置換、及びフーリン切断部位の一方又は双方の除去を含む。そのような実施形態は、フーリン切断によって除去されないインタクトな融合ペプチドを含む。特定の一実施形態では、F タンパク質類似体はまた 5 0 0 位のアミノ酸にて修飾されたグリコシル化部位を含む。

#### 【 0 0 9 8 】

本明細書に記載する組成物及び方法のための F タンパク質類似体は、F タンパク質類似体（例えば P r e F 類似体、P o s t F 類似体、又は非切断型 F タンパク質細胞外ドメインなど）を含む生物学的材料を準備し、その類似体ポリペプチドの単量体若しくは多量体（例えば三量体）又はその混合物を生物学的材料から精製することを含む方法によって製造することができる。

#### 【 0 0 9 9 】

F タンパク質類似体は、ポリペプチド単量体若しくは三量体、又は平衡して存在しうる単量体と三量体の混合物の形態で存在することができる。単一形態の存在は、より予測可能な免疫応答及びより良好な安定性などの利点をもたらすだろう。

#### 【 0 1 0 0 】

したがって、一実施形態において、本開示に従って使用するための F タンパク質類似体は、単量体若しくは三量体又は単量体と三量体の混合物の形態で、実質的に脂質及びリポ多糖を含まない、精製された F タンパク質類似体である。

#### 【 0 1 0 1 】

F タンパク質ポリペプチドは、R S V の A 株若しくは R S V の B 株又はその変異株（上記と同義）の F タンパク質から選択することができる。特定の例示的な実施形態では、F

10

20

30

40

50

タンパク質ポリペプチドは、配列番号2で表されるFタンパク質である。本開示の理解を円滑にするために、アミノ酸残基の位置はすべて、株にかかわらず、例示的なFタンパク質のアミノ酸の位置（すなわち、対応するアミノ酸残基の位置）に関して与えられる。ほかのRSVのA株又はB株の匹敵するアミノ酸の位置は、容易に利用でき、周知のアライメントアルゴリズム（たとえば、BLAST、たとえば、デフォルトパラメータを用いて）を用いて例示的な配列と共に選択されたRSV株のアミノ酸配列をアライメントすることによって当業者であれば容易に決定することができる。異なるRSV株に由来するFタンパク質ポリペプチドの多数の追加の例は、WO2008/114149（RSV F及びGタンパク質配列の追加の例を提供する目的で参照によって本明細書に組み入れられる）に開示されている。別の変異体は、遺伝的ドリフトによって生じることができ、又は部位特異的若しくはランダム突然変異誘発を用いて人為的に作出することができ、又は2以上の既存の変異体の組換えによって作出することができる。そのような別の変異体も本明細書で開示される免疫原性組成物の文脈で用いられるFタンパク質類似体の文脈で好適である。

10

#### 【0102】

本明細書に記載する組成物及び方法に有用な別の実施形態において、組換えRSVタンパク質は、WO2011/008974（別のFタンパク質類似体を説明する目的で参照により本明細書に組み入れられる）に記載されるようなFタンパク質類似体である。例えば、WO2011/008974の図1及びWO2011/008974の実施例1に記載されるFタンパク質類似体を参照されたい。

20

#### 【0103】

Fタンパク質のF<sub>2</sub>及びF<sub>1</sub>ドメインの選択では、当業者は、F<sub>2</sub>及び/又はF<sub>1</sub>ドメイン全体を厳格に含む必要はないことを認識するであろう。通常、F<sub>2</sub>ドメインの部分配列（又は断片）を選択する場合、立体構造の考慮が重要である。従って、F<sub>2</sub>ドメインは通常、ポリペプチドの集合と安定性を促進するF<sub>2</sub>ドメインの部分を含む。特定の例示的な変異体では、F<sub>2</sub>ドメインはアミノ酸26～105を含む。しかしながら、長さのわずかな修飾（1以上のアミノ酸の付加又は欠失による）を有する変異体も可能である。

#### 【0104】

通常、F<sub>1</sub>ドメインの少なくとも部分配列（又は断片）は、Fタンパク質の免疫優勢エピトープを含む安定な立体構造を維持するように選択され、設計される。たとえば、アミノ酸262～275（パリビズマブ中和）及び423～436（Centocorのch101FMAb）の領域で中和抗体によって認識されるエピトープを含むF<sub>1</sub>ポリペプチドドメインの部分配列を選択することが一般に望ましい。さらに、たとえば、アミノ酸328～355の領域内でT細胞エピトープを含むことが望ましいこともあり、最も一般的には、F<sub>1</sub>サブユニット（たとえば、貫通アミノ酸262～436）の単一の連続部分として含み、しかし、エピトープは安定な立体構造を形成する不連続な要素としてこれらの免疫優勢エピトープを含む合成配列で保持され得る。従って、F<sub>1</sub>ドメインポリペプチドは、RSV Fタンパク質ポリペプチドの少なくともおよそアミノ酸262～436を含む。本明細書において提供する非限定的な一例では、F<sub>1</sub>ドメインは、天然Fタンパク質ポリペプチドのアミノ酸137～516を含む。当業者は、追加のさらに短い部分配列を熟練者の裁量で使用できることを認識するであろう。

30

40

#### 【0105】

立体構造の考慮に加えて、F<sub>2</sub>又はF<sub>1</sub>ドメインの部分配列を選択する場合（例えば、特定のPreF-G類似体のGタンパク質成分に関して以下で議論するように）、追加の免疫原性エピトープの包含に基づいて配列（たとえば、変異体、部分配列など）を選択することが望ましいこともある。たとえば、当該技術で既知の、たとえば、アンカーモチーフ又は神経網若しくは多項式決定のようなそのほかの方法を用いて、追加のT細胞エピトープを特定することができ、たとえば、RANKPEP（ウェブサイト：[mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html](http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html)で利用可能）；ProPredI（ウェブサイト：[imtech.res.in/raghava/propredI/index.html](http://imtech.res.in/raghava/propredI/index.html)で利用可能）；Bimas（ウェブサイト：[www-bima](http://www-bima)

50

s.dcrn.nih.gov/molbi/hla\_bind/index.htmlで利用可能) ; 及びSYFPEITHI ( ウェブサイト : syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htmで利用可能 ) を参照のこと。たとえば、アルゴリズムを用いてペプチドの「結合閾値」を決定し、特定の親和性でのMHC又は抗体結合の高い確率をそれらに与えるスコアを持つものを選択する。アルゴリズムは、特定の位置での特定のアミノ酸のMHC結合に対する効果、特定の位置での特定のアミノ酸の抗体結合に対する効果、又はモチーフを含有するペプチドの特定の置換の結合に対する効果のいずれかに基づく。免疫原性ペプチドの文脈の範囲内で、「保存された残基」は、ペプチドの特定の位置で無作為な分布で予想されるものより有意に高い頻度で出現するものである。アンカー残基はMHC分子との接触点を提供する保存された残基である。そのような予測方法で特定されるT細胞エピトープは、特定のMHCタンパク質への結合を測定することによって、及びMHCタンパク質の背景で提示される場合にはT細胞を刺激するその能力によって確認することができる。

10

## 【0106】

好都合には、Fタンパク質類似体、例えばPreF類似体(以下で議論されるPreF-G類似体など)、PostF類似体、又は他の立体構造類似体は、発現系に対応するシグナルペプチド、たとえば、哺乳類又はウイルスのシグナルペプチド、たとえば、RSV F<sub>0</sub>の天然シグナル配列(たとえば、配列番号2のアミノ酸1~25又は配列番号6のアミノ酸1~25)を含む。通常、シグナルペプチドは、組換え発現に選択される細胞に適合するように選択される。たとえば、バキュロウイルスのシグナルペプチド又はメリチンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドは、昆虫細胞における発現のために置換され得る。植物の発現系が好ましい場合には、好適な植物シグナルペプチドが当該技術で既知である。多数の例示的なシグナルペプチドが当該技術で既知であり(たとえば、多数のヒトのシグナルペプチドを記載しているZhang & Henzel, Protein Sci., 13:2819-2824 (2004)を参照)、古細菌、原核生物及び真核生物のシグナル配列を含むSPdbシグナルペプチドデータベース(<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>)にてカタログ化されている。任意で、先行の抗原のいずれかが追加の配列又はタグ、例えば精製を促進するHisタグなどを含んでもよい。

20

## 【0107】

任意で、Fタンパク質類似体(例えば、PreF若しくはPostF又は他の類似体)は追加の免疫原性成分を含むことができる。特定の特に好都合な実施形態では、Fタンパク質類似体はRSV Gタンパク質の抗原性成分を含む。PreF及びGの成分を有する例示的なキメラタンパク質には、以下のPreF\_\_V1(配列番号7及び8で表される)及びPreF\_\_V2(配列番号9及び10で表される)が挙げられる。

30

## 【0108】

PreF-G類似体では、Gタンパク質の抗原性部分(たとえば、アミノ酸残基149~229のような切断型Gタンパク質)を構築物のC末端に付加する。通常、Gタンパク質成分は、自由度のあるリンカー配列を介してFタンパク質成分に連結される。たとえば、例示的なPreF\_\_V1の設計では、Gタンパク質は、-GGSGGSGGS-リンカー(配列番号14)によってPreF成分に連結される。PreF\_\_V2の設計では、リンカーはさらに短い。-GGSGGSGGS-リンカー(配列番号14)の代わりに、PreF\_\_V2は2つのグリシン(-GG-)をリンカーに有する。

40

## 【0109】

存在する場合、Gタンパク質ポリペプチドドメインは、RSVのA株又はRSVのB株から選択されるGタンパク質のすべて又は一部を含むことができる。特定の例示的な実施形態では、Gタンパク質は、配列番号4で表されるGタンパク質である(又はそれと95%同一である)。好適なGタンパク質配列の別の例は、WO2008/114149(参照によって本明細書に組み入れられる)に見出すことができる。

## 【0110】

Gタンパク質ポリペプチド成分は、例えばアミノ酸183~197の領域で免疫優勢なT細胞エピトープを保持するGタンパク質の少なくとも部分配列(又は断片)、たとえば

50

、天然のGタンパク質のアミノ酸151～229、149～229又は128～229を含むGタンパク質の断片を含むように選択される。例示的な一実施形態では、Gタンパク質ポリペプチドは、天然のGタンパク質ポリペプチドのアミノ酸残基149～229の全部又は一部を含む、天然のGタンパク質ポリペプチドの部分配列（又は断片）である。当業者は、選択される部分が、Fタンパク質類似体の発現、折り畳み又はプロセッシングを構造的に不安定化又は破壊しない限り、Gタンパク質のさらに長い又は短い部分を使用できることを容易に十分に理解するであろう。任意で、ホルマリン不活化RSVワクチンと関連する好酸球増多を特徴とする増強された疾患を低減する及び/又は防ぐことが以前示された191位にて、Gタンパク質ドメインはアミノ酸置換を含む。天然に存在する及び置換された(N191A)Gタンパク質の特性の完全な記載は、例えば参照によって本明細書に組み入れられる米国特許公開第2005/0042230に見出すことができる。

10

#### 【0111】

あるいは、Fタンパク質類似体は、Gタンパク質成分を含む第2のポリペプチドをまた含有する免疫原性組成物中に製剤化されてもよい。Gタンパク質成分は典型的に、Gタンパク質の少なくともアミノ酸149～229を含む。Gタンパク質のより小さい部分を使用することもできるが、そのような断片には、最小限でも、アミノ酸184～198の免疫優勢エピトープが含まれる必要がある。あるいは、Gタンパク質は、Gタンパク質のより大きな部分、例えばアミノ酸128～229又は130～230、場合によりさらに大きいタンパク質の要素として、例えば全長Gタンパク質又はキメラポリペプチドを含んでもよい。

20

#### 【0112】

たとえば、天然に存在する株に対応する配列の選択に関して、1以上のドメインが、たとえば、A2若しくはLongと命名された一般の研究室単離株、又はそのほかの天然に存在する株若しくは単離株のようなRSVのA株又はB株に配列では対応し得る。RSVの多数の株が現在までに単離されている。GenBank及び/又はEMBLアクセッション番号により示される例示的な株はWO2008114149（本明細書に開示されるFタンパク質類似体を使用するのに好適なRSV Fの核酸及びポリペプチド配列を開示する目的で参照により本明細書に組み入れられる）に見出すことができる。RSVの別の株が単離される可能性があり、RSVの属に包含される。同様に、RSVの属は、天然に存在するもの（例えば以前に又はその後同定された株）から遺伝子ドリフト及び/又は組換えにより生じた変異株を包含する。

30

#### 【0113】

そのような天然に存在する及び単離される変異体に加えて、前述の配列と配列類似性を共有する操作された変異体もFタンパク質類似体、例えばPreF、PostF又は他の類似体（PreF-Gを含む）類似体の文脈で採用され得る。ポリペプチド（及び一般にヌクレオチド配列）に関してFタンパク質類似体ポリペプチド（及び以下に記載されるポリヌクレオチド配列）間の類似性は、配列同一性を参照して配列間での類似性という点で表現され得る。配列同一性は、同一性（又は類似性）比率という点で測定されることが多く；比率が高ければ高いほど、2つの配列の一次構造はより類似する。一般に、2つのアミノ酸（又はポリヌクレオチド）の配列の一次構造が似ていれば似ているほど、折り畳み及び集合の結果生じる高次構造も類似する。Fタンパク質、ポリペプチド（及びポリヌクレオチド）配列の変異体は通常、1又は少数のアミノ酸の欠失、付加又は置換を有するが、それでもなお、非常に高い比率でアミノ酸、一般にはそのポリヌクレオチド配列を共有する。さらに重要なことに、変異体は、本明細書で開示される参照配列の構造的な特性、従って立体構造の特性を保持する。

40

#### 【0114】

配列同一性を決定する方法は当該技術で周知であり、Fタンパク質類似体ポリペプチド、並びにそれをコードする核酸に適用可能である（たとえば、下記のように）。種々のプログラム及びアライメントアルゴリズムは、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Higgins and Sharp, G

50

ene 73:237, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151, 1989; Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881, 1988; 及び Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. US A 85:2444, 1988に記載されている。Altschul et al., Nature Genet. 6:119, 1994は、配列アライメント法と相同性算出の詳細な考察を提示している。NCBI ベーシックローカルアライメントサーチツール (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990) は、配列解析プログラム、blastp、blastn、blastx、tblastn及びtblastxと関連して使用するために、全米バイオテクノロジー情報センター (MD州、ベセスダ、NCBI) を含む幾つかの供給源、及びインターネットにて利用可能である。このプログラムを用いて配列同一性を決定する方法の記載はインターネットのNCBI ウェブサイトで利用可能である。

10

## 【0115】

一部の例では、Fタンパク質類似体は、それが由来する天然に存在する株のアミノ酸配列に比べて1以上のアミノ酸修飾を有する(たとえば、前述の安定化修飾に加えて)。そのような差異は、1以上のアミノ酸の付加、欠失又は置換であり得る。変異体は通常、アミノ酸残基の約1%又は2%又は5%又は10%又は15%又は20%以下が異なる。たとえば、変異体Fタンパク質類似体、例えばPreF若しくはPostF又は他の類似体ポリペプチド配列は、参照Fタンパク質配列(例えば、配列番号6、8、10、18、20及び/又は22のPreF類似体ポリペプチド配列)の関連する部分と比べて、1又は2又は5までの又は約10までの、又は約15までの、又は約50までの又は約100までのアミノ酸の差異を含み得る。従って、RSV F又はGタンパク質又はFタンパク質類似体の文脈では、変異体は、通常、参照タンパク質、例えばPreF類似体の場合には配列番号2、4、6、8、10、18、20及び/又は22に示される参照配列との、あるいは本明細書で開示される例示的なPreF類似体のいずれかとの、少なくとも80%、又は85%、さらに一般的には、少なくとも約90%以上、たとえば、95%又はさらに98%又は99%の配列同一性を共有する。本開示の特徴として含まれる別の変異体は、WO2008/114149で開示された天然に存在する変異体から選択されるヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の全部又は一部を含むFタンパク質類似体である。別の変異体は、遺伝的ドリフトによって生じることができ、又は部位特異的若しくはランダム突然変異誘発を用いて人為的に作出することができ、又は2以上の既存の変異体の組換えによって作出することができる。そのような別の変異体も本明細書で開示されるFタンパク質類似体抗原の文脈で好適である。たとえば、修飾は、得られるFタンパク質類似体の立体構造又は免疫原性エピトープを変化させない1以上のアミノ酸(たとえば、2つのアミノ酸、3つのアミノ酸、4つのアミノ酸、5つのアミノ酸、10までのアミノ酸、又はそれ以上)の置換であり得る。

20

30

## 【0116】

代わりに又はさらに、修飾は、1以上のアミノ酸の欠失及び/又は1以上のアミノ酸の付加を含むことができる。実際、所望であれば、1以上のポリペプチドドメインは、単一株に一致しないが、複数株、又はさらにRSVのウイルスポリペプチドの複数の株をアライメントすることによって推定されるコンセンサス配列に由来する成分の部分配列を含む合成ポリペプチドであり得る。特定の実施形態では、その後のプロセッシング又は精製を円滑にするタグを構成するアミノ酸配列の付加によって1以上のポリペプチドドメインが修飾される。そのようなタグは抗原性タグ、又はエピトープタグ、酵素タグ又はポリヒスチジンタグであり得る。通常、タグは、たとえば、抗原又は融合タンパク質のC末端又はN末端のようなタンパク質の一方又は他方の末端に位置する。

40

## 【0117】

本明細書に開示されるFタンパク質類似体(また適用可能であればG抗原も)は、組換えタンパク質の発現及び精製のための十分に確立された手順を用いて製造することができる。

## 【0118】

簡単に説明すると、Fタンパク質類似体をコードする組換え核酸を、ベクター及び宿主

50

細胞の選択に応じて、種々の周知の手法、例えばエレクトロポレーション、リポソーム媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、感染、トランスフェクションなどのいずれかにより宿主細胞に導入する。好ましい宿主細胞としては、原核（すなわち細菌）宿主細胞、例えば大腸菌、並びに多数の真核宿主細胞、例えば真菌（例として酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）及びピヒア・パストリス（*Pichia pastoris*））細胞、昆虫細胞、植物細胞、及び哺乳動物細胞（例えば3T3、COS、CHO、BHK、HEK293など）、又はBowesメラノーマ細胞が挙げられる。選択した宿主細胞における発現後、組換えFタンパク質類似体を当技術分野で周知の手法により単離及び/又は精製することができる。例示的な発現方法、並びにPreF類似体（PreF-G類似体など）をコードする核酸は、WO2010/149745（Fタンパク質類似体の発現及び精製のために好適な方法を提供する目的で本明細書に組み入れられる）に提供されている。

10

#### 【0119】

#### 百日咳菌抗原

開示される併用免疫原性組成物の特定の実施形態において、少なくとも1種の百日咳菌抗原は、パータシストキソイド（PT）、糸状赤血球凝集素（FHA）、パータクチン（PRN）、2型線毛（FIM2）及び3型線毛（FIM3）からなる群より選択される少なくとも1種のPa抗原を含む。この抗原は、部分的に若しくは高度に、精製される。

#### 【0120】

PTは、種々の方法で、例えば、（例えば、参照によって本明細書に組み込まれるWO91/12020において記載されるとおり）百日咳菌の培養からの毒素の精製とその後の化学的無毒化によって、又は代わりに、（例えば、PTの遺伝的改変を企図した開示の目的で参照によって本明細書に組み込まれるEP306318、EP322533、EP396964、EP322115、EP275689において記載されるとおり）PTの遺伝的無毒化類似体の精製によって、産生され得る。特定の実施形態において、PTは、遺伝的に無毒化される。より詳細には、遺伝的無毒化PTは、以下の置換のうち1つ又は両方を有する：R9K及びE129G。

20

#### 【0121】

開示される併用免疫原性組成物は、無細胞パータシス抗原であるPT、FHA、PRN、FIM2及びFIM3の任意の1つ、2つ、3つ、4つ若しくは5つを含み得る。より詳細には、前記組成物は、以下の組み合わせを含み得る：PT及びFHA；PT、FHA及びPRN；PT、FHA、PRN及びFIM2；PT、FHA、PRN及びFIM3；並びにPT、FHA、PRN、FIM2及びFIM3。

30

#### 【0122】

特定の実施形態において、PTは、2～50 $\mu$ g（例えば、1用量あたり正確に又はおよそ2.5若しくは3.2 $\mu$ g）、5～40 $\mu$ g（例えば、1用量あたり正確に又はおよそ5若しくは8 $\mu$ g）又は10～30 $\mu$ g（例えば、1用量あたり正確に又はおよそ20若しくは25 $\mu$ g）の量で使用される。

#### 【0123】

特定の実施形態において、FHAは、2～50 $\mu$ g（例えば、1用量あたり正確に又はおよそ2.5若しくは3.4.4 $\mu$ g）、5～40 $\mu$ g（例えば、1用量あたり正確に又はおよそ5若しくは8 $\mu$ g）又は10～30 $\mu$ g（例えば、1用量あたり正確に又はおよそ20若しくは25 $\mu$ g）の量で使用される。

40

#### 【0124】

特定の実施形態において、PRNは、0.5～20 $\mu$ g、0.8～15 $\mu$ g（例えば、1用量あたり正確に又はおよそ0.8若しくは1.6 $\mu$ g）又は2～10 $\mu$ g（例えば、1用量あたり正確に又はおよそ2.5若しくは3若しくは8 $\mu$ g）の量で使用される。

#### 【0125】

特定の実施形態において、FIM2及び/又はFIM3は、合わせて0.5～10 $\mu$ g（例えば、1用量あたり正確に又はおよそ0.8若しくは5 $\mu$ g）の量で使用される。

50

## 【 0 1 2 6 】

特定の実施形態において、併用免疫原性組成物は、P T及びF H Aを1用量あたり等量で、例えば、正確に又はおよそ8若しくは20若しくは25  $\mu$ gのいずれかで、含む。あるいは、併用免疫原性組成物は、P T及びF H Aを、それぞれ、正確に若しくはおよそ5及び2.5  $\mu$ g、又は正確に若しくはおよそ3.2及び34.4  $\mu$ g含む。さらなる実施形態において、免疫原性組成物は、P T、F H A及びP R Nを、それぞれ、1用量あたり正確に又はおよその量で、25 : 5 : 8  $\mu$ g ; 8 : 8 : 2.5  $\mu$ g ; 20 : 20 : 3  $\mu$ g ; 2.5 : 5 : 3  $\mu$ g ; 5 : 2.5 : 2.5  $\mu$ g ; 又は3.2 : 34.4 : 1.6  $\mu$ gで含む。

## 【 0 1 2 7 】

あるいは、又は上で議論したP a抗原のいずれかと組み合わせ、開示される併用免疫原性組成物は、(参照によって本明細書に組み込まれるW O 2 0 0 5 / 0 3 2 5 8 4及びMarr et al (2008), Vaccine, 26(34):4306-4311に記載されるとおり)百日咳菌「B r k A」タンパク質に由来する抗原を含み得る。

## 【 0 1 2 8 】

さらなる実施形態において、少なくとも1種のP a抗原は、参照によって本明細書に組み込まれるRoberts et al (2008), Vaccine, 26:4639-4646に開示されるとおり、百日咳菌から得られる外膜小胞(O M V)を含む。詳細には、このようなO M Vは、リポドA修飾酵素、例えば3-O-デアシラーゼ、例えばP a g L(参照によって本明細書に組み込まれるAsensio et al (2011), Vaccine, 29:1649-1656)を発現する組換え百日咳菌株に由来し得る。

## 【 0 1 2 9 】

別の実施形態において、少なくとも1種の百日咳菌抗原は、P w抗原を含む。P wは、水銀非含有方法を含む幾つかの公知の方法によって不活化され得る。このような方法としては、熱(例えば、55~65 若しくは56~60、5~60分間若しくは10~30分間にわたる、例えば、60、30分間にわたる)、ホルムアルデヒド(例えば、0.1%、37にて、24時間)、グルタルアルデヒド(例えば、0.05%、室温にて10分間)、アセトン-I(例えば、室温にて3回処理)若しくはアセトン-II(例えば、室温にて3回処理及び37にて4回目の処理)の不活化が挙げられる(例えば、Gupta et al., 1987, J. Biol. Stand. 15:87; Gupta et al., 1986, Vaccine, 4:185を参照されたい)。併用免疫原性組成物における使用に適した殺傷したP w抗原を調製する方法は、W O 9 3 / 2 4 1 4 8に開示されている。

## 【 0 1 3 0 】

より詳細には、併用免疫原性組成物は、5~50、7~40、9~35、11~30、13~25、15~21又はおよそ若しくは正確に20の1用量あたりの量(国際不透明単位、「I O U」で)にてP wを含む。

## 【 0 1 3 1 】

本開示に係るP w含有併用免疫原性組成物の特定の実施形態において、この組成物のP w成分は、低減した反応原性(reactogenicity)を惹起する。P wワクチンの反応原性(疼痛、熱、腫れなど)は、主に、細菌外膜由来の内毒素であるリポオリゴ糖(「L O S」、百日咳菌に関してリポ多糖(「L P S」)の同義語;「L O S」は、本明細書中で使用される)によって起こる。L O SのリポドA部分が主に関与する。(例えば上で議論した不活化手順によって産生されるような「伝統的な」P wワクチンに対して)より反応原性の低いP w含有ワクチンを製造するために、内毒素は、遺伝的に若しくは化学的に無毒化されるか、及び/又は外膜から抽出される。しかし、L O Sは免疫系の強力なアジュバントであるので、これは、P w抗原の免疫原性を実質的に損なわない方法で行われなければならない。

## 【 0 1 3 2 】

1つの実施形態において、開示される併用免疫原性組成物の少なくとも1種の百日咳菌抗原は、L O Sが遺伝的に若しくは化学的に無毒化されている及び/又は抽出されている

10

20

30

40

50

「低反応原性」Pw抗原を含む。例えば、Pw抗原は、LOSの化学的抽出を開示する目的で参照によって本明細書に組み込まれるWO2006/002502及びDias et al (2012), Human Vaccines & Immunotherapeutics, 9(2):339-348で開示されるように、ブタノールなどの有機溶媒及び水の混合物による処理を受け得る。

#### 【0133】

別の実施形態において、「低反応原性」は、低毒性LOSを産生するように遺伝的に操作された百日咳菌株からPw抗原を得ることによって、達成される。WO2006/065139(参照によって本明細書に組み込まれる)は、遺伝的3-O-脱アシル化及び百日咳菌LOSの無毒化により、少なくとも部分的に3-O-脱アシル化されたLOSを含む株を得る。併用免疫原性組成物の少なくとも1種の百日咳菌抗原は、従って、デ-O-アシラーゼなどのリポA修飾酵素を発現するように操作されている百日咳菌の株に由来するPw抗原であり得る。詳細には、このような株は、全て参照によって本明細書に組み込まれるWO2006/065139、並びにGeurtsen et al (2006), Infection and Immunity, 74(10):5574-5585及びGeurtsen et al (2007), Microbes and Infection, 9:1096-1103において開示されるとおり、PagLを発現し得る。代わりに、又はさらに、Pw抗原が由来する株は、天然に、又は操作の結果として、リポAリン酸基をグルコサミンで修飾する能力を欠く；C-3'位においてC10-OH若しくはC12-OHで置換されたリポAジグルコサミン骨格を有する；及び/又は末端ヘプトースを欠く分子LOS種を発現する。このような株、18~323は、Marr et al (2010), The Journal of Infectious Diseases, 202(12):1897-1906(参照によって本明細書に組み込まれる)において開示される。

#### 【0134】

##### 免疫原性組成物

本明細書に開示される併用免疫原性組成物は、典型的に薬学的に許容される担体又は賦形剤を含み、任意により追加の抗原を含んでもよい。

#### 【0135】

薬学的に許容される担体及び賦形剤は当業者に周知であり、当業者によって選択され得る。たとえば、担体又は賦形剤は好都合には緩衝液を含むことができる。任意で、担体又は賦形剤は、溶解性及び/又は安定性を安定化させる少なくとも1つの成分も含有する。可溶化剤/安定剤の例には界面活性剤、たとえば、ラウレルサルコシン及び/又はツイーン(Tween)が挙げられる。代替の可溶化剤/安定剤には、アルギニン及びガラス形成ポリオール(たとえば、スクロース、トレハロース等)が挙げられる。多数の薬学的に許容される担体及び/又は薬学的に許容される賦形剤が当該技術で既知であり、たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5th Edition (975)に記載されている。

#### 【0136】

従って、好適な賦形剤及び担体が当業者によって選択され、選択された投与経路によって対象に送達するために好適な製剤を製造することができる。

#### 【0137】

好適な賦形剤には、限定されないが、グリセロール、ポリエチレングリコール(PEG)、ソルビトール、トレハロース、N-ラウロイルサルコシンナトリウム塩、L-プロリン、非界面活性剤スルホベタイン、塩酸グアニジン、尿素、酸化トリメチルアミン、KCl、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>及びそのほかの二価のカチオン関連塩、ジチオスレイトール、ジチオエリトール、及びβ-メルカプトエタノールが挙げられる。そのほかの賦形剤は、界面活性剤(Tween 80、Tween 20、Triton X-100、NP-40、Emphigen BB、オクチルグルコシド、ラウロイルマルトシド、Zwittergent(両性洗浄剤)3-08、Zwittergent 3-0、Zwittergent 3-2、Zwittergent 3-4、Zwittergent 3-6、CHAPS、デオキシコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、臭化セチルトリメチルアンモニウムを含む)であり得る。

## 【0138】

任意で、開示される併用免疫原性組成物はアジュバントも含み、このアジュバントは開示されるワクチンレジメン、方法、使用及びキットでも使用することができる。RSV及び/又は百日咳菌感染に感受性の(又はリスクが高い)特定の年齢群の対象に併用免疫原性組成物を投与しようとする場合、対象及び対象の集団にて安全で且つ有効であるようにアジュバントを選択する。従って、高齢者対象(たとえば、65歳を超える対象)での投与用に併用免疫原性組成物を製剤化する場合、高齢者対象にて安全で且つ有効であるようにアジュバントを選択する。同様に、併用免疫原性組成物が、新生児又は乳児の対象(出生から2歳までの対象など)に投与することを意図される場合、新生児及び乳児にて安全で且つ有効であるようにアジュバントを選択する。新生児及び幼児における安全性と有効性のために選択されるアジュバントの場合、成人対象に通常投与される用量の希釈(たとえば、部分用量)であるアジュバントの用量を選択することができる。

10

## 【0139】

さらに、併用免疫原性組成物が投与される投与の経路を介して投与される場合、アジュバントは通常、免疫応答の所望の態様を高めるように選択される。たとえば、鼻内投与用に併用免疫原性組成物を製剤化する場合、プロテオソーム及びプロトリンが好都合なアジュバントである。それに対して、併用免疫原性組成物を筋肉内投与用に製剤化する場合、1以上の3D-MPL、スクアレノ(たとえば、QS21)、リポソーム及び/又は油と水のエマルションなどのアジュバントが好都合に選択される。

20

## 【0140】

RSV Fタンパク質類似体抗原との併用で使用するために好適なアジュバントの1つは、非毒性の細菌性リポ多糖誘導体である。リピドAの好適な非毒性誘導体の例は、モノホスホリルリピドA、又はさらに詳しくは3-脱アセチル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)である。3D-MPLは、MPLの名称のもとでGlaxoSmithKline Biologicals N.A.によって販売され、文書全体を通してMPL又は3D-MPLと呼ばれる。例えば米国特許第4,436,727;同第4,877,611号;同第4,866,034号及び同第4,912,094号を参照のこと。3D-MPLは、IFN-(Th1)表現型を持つCD4<sup>+</sup>T細胞の応答を促進する。3D-MPLは、GB2220211Aで開示された方法に従って製造することができる。化学的には、それは、3,4,5又は6のアシル化鎖を持つ3-脱アセチル化モノホスホリルリピドAの混合物である。本開示の組成物では、小粒子3D-MPLを使用することができる。小粒子3D-MPLは、0.22µmのフィルターを介して無菌濾過できるような粒度を有する。そのような調製物はWO94/21292に記載されている。

30

## 【0141】

3D-MPLなどのリポ多糖は、免疫原性組成物のヒト用量当たり1~50µgの量で使用することができる。そのような3D-MPLは、約25µgのレベルで、たとえば、20~30µgの間で、好適には21~29µgの間で、又は22~28µgの間で、又は23~27µgの間で、又は24~26µgの間で、又は25µgで使用することができる。別の実施形態では、免疫原性組成物のヒト用量は、約10µgのレベルで、たとえば、5~15µgの間で、好適には6~14µgの間で、たとえば、7~13µgの間で、又は8~12µgの間で、又は9~11µgの間で、又は10µgのレベルで3D-MPLを含む。さらなる実施形態では、免疫原性組成物のヒト用量は、約5µgのレベルで、たとえば、1~9µgの間で、又は2~8µgの間で、好適には3~7µgの間で、又は4µg又は5µgのレベルで3D-MPLを含む。

40

## 【0142】

他の実施形態では、リポ多糖は、米国特許第6,005,099号及び欧州特許第0729473B1号に記載されたように(1~6)グルコサミン二糖であり得る。当業者は、これらの参考文献の教示に基づいて3D-MPLのような種々のリポ多糖を容易に製造することができる。それにもかかわらず、これら参考文献のそれぞれは、参照によって本明細書に組み入れられる。前述の免疫賦活剤(LPS又はMPL又は3D-MPLに似

50

た構造の)に加えて、MPLの上記構造の一部であるアシル化された単糖及び二糖の誘導体も好適なアジュバントである。他の実施形態では、アジュバントはリピドAの合成誘導体であり、その一部は、TLR-4作動薬として記載され、OM174(2-デオキシ-6-*o*-[2-デオキシ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-4-*o*-ホスホノ-D-グルコピラノシル]-2-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-D-グルコピラノシルジヒドロゲノホスフェート)、(WO95/14026); OM294DP(3S, 9R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9(R)-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1, 10-ジオール、1, 10-ビス(ジヒドロゲノホスフェート)(WO99/64301及びWO00/0462); 及びOM197MP-AcDP(3S-, 9R)-3-(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1, 10-ジオール、1-ジヒドロゲノホスフェート10-(6-アミノヘキサノエート)(WO01/46127)が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0143】

使用することができるそのほかのTLR4リガンドは、たとえば、WO98/50399又は米国特許第6,303,347号で開示された(AGPの調製方法も開示されている)もののようなアルキルグルコサミニドホスフェート(AGPs)であり、好適には、RC527若しくはRC529、又は米国特許第6,764,840号で開示されたようなAGSの薬学上許容可能な塩である。一部のAGPはTLR4の作動薬であり、一部はTLR4の拮抗剤である。双方共アジュバントとして有用であると思われる。

#### 【0144】

TLR-4を介したシグナル伝達反応(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5)を起こすことが可能であるそのほかの好適なTLR-4リガンドは、たとえば、グラム陰性細菌由来するリポ多糖及びその誘導体又はその断片、特にLPSの非毒性誘導体(たとえば、3D-MPL)である。そのほかの好適なTLR作動薬は、熱ショックタンパク質(HSP)10、60、65、70、75又は90; サーフアクタントプロテインA、ヒアルロナンオリゴ糖、ヘパラン硫酸断片、フィブロネクチン断片、フィブリノーゲンペプチド及びb-デフェンシン-2、及びムラミルジペプチド(MDP)である。一実施形態では、TLR作動薬はHSP60, 70又は90である。ほかの好適なTLR-4リガンドは、WO2003/011223及びWO2003/099195に記載されており、たとえば、WO2003/011223の4~5ページ又はWO2003/099195の3~4ページで開示された化合物I、化合物II及び化合物III、特にER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057、ER804058、ER804059、ER804442、ER804680及びER804764としてWO2003/011223で開示されたそれら化合物である。たとえば、好適なTLR-4リガンドの1つはER804057である。

#### 【0145】

さらなるTLR作動薬もアジュバントとして有用である。用語「TLR作動薬(アゴニスト)」は、直接的なリガンドとして又は内因性若しくは外因性のリガンドの生成を介して間接的に、TLRシグナル伝達経路を介したシグナル伝達反応を起こすことが可能である剤を指す。そのような天然の又は合成のTLR作動薬は、代わりに又は追加のアジュバントとして使用することができる。アジュバント受容体としてのTLRの役割の手短な概説は、Kaisho及びAkira, Biochimica et Biophysica Acta 1589:1-13, 2002に提供されている。これらの潜在的なアジュバントには、TLR2、TLR3、TLR7、TLR8及びTLR9についての作動薬が挙げられるが、これらに限定されない。従って、一実施形態では、アジュバント及び併用免疫原性組成物はさらに、TLR-1作動薬、TLR-2作動薬、TLR-3作動薬、TLR-4作動薬、TLR-5作動薬、TLR-6作動薬、TLR-7作動薬、TLR-8作動薬、TLR-9作動薬又はこれらの組み合わせから成る群から選択されるアジュバントを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 6 】

本開示の一実施形態では、TLR-1を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬が使用される。好適には、TLR-1を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬は、トリアシル化リポペプチド(LPs)；フェノール可溶性モジュリン；結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)LP；S-(2,3-ビス(パルミトイルオキシ)-(2-RS)-プロピル)-N-パルミトイル-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH、細菌性リポタンパク質のアシル化アミノ末端を模倣するトリヒドロクロリド(Pam3Cys)LP及びボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)由来のOspA LPから選択される。

## 【 0 1 4 7 】

代替の実施形態では、TLR-2を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬が使用される。好適には、TLR-2を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬は、結核菌(*M. tuberculosis*)、B.ブルグドルフェリ(*B. burgdorferi*)又はトレポネーマ・パリダム(*T. pallidum*)に由来するリポタンパク質、ペプチドグリカン、細菌性リポペプチド；黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)を含む種に由来するペプチドグリカン；リポタイコ酸、マンヌロン酸、ナイセリアポリン、細菌性線毛、エルシニア毒性因子、CMVビリオン、麻疹血液凝集素及び酵母由来のザイモサンの1以上である。

## 【 0 1 4 8 】

代替の実施形態では、TLR-3を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬が使用される。好適には、TLR-3を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬は、二本鎖RNA(dsRNA)又はポリイノシン-ポリシチジン酸(ポリIC)、ウイルス感染に関連する分子核酸パターンである。

## 【 0 1 4 9 】

代替の実施形態では、TLR-5を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬が使用される。好適には、TLR-5を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬は、細菌性フラジェリンである。

## 【 0 1 5 0 】

代替の実施形態では、TLR-6を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬が使用される。好適には、TLR-6を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬は、マイクバクテリアリポタンパク質、ジアシル化LP、及びフェノール可溶性モジュリンである。別のTLR6作動薬はWO2003/043572に記載されている。

## 【 0 1 5 1 】

代替の実施形態では、TLR-7を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬が使用される。好適には、TLR-7を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬は、一本鎖RNA(ssRNA)、ロキソリピン、N7位及びC8位におけるグアノシン類似体、又はイミダゾキノリン化合物若しくはその誘導体である。一実施形態では、TLR作動薬はイミキモドである。さらなるTLR7作動薬はWO2002/085905に記載されている。

## 【 0 1 5 2 】

代替の実施形態では、TLR-8を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬が使用される。好適には、TLR-8を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬は、一本鎖RNA(ssRNA)、抗ウイルス活性を有するイミダゾキノリン分子、たとえば、レシキモド(R848)であり；レシキモドもTLR-7による認識が可能である。使用することができるそのほかのTLR-8作動薬には、WO2004/071459に記載されたものが挙げられる。

## 【 0 1 5 3 】

代替の実施形態では、TLR-9を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬が使用される。一実施形態では、TLR-9を介してシグナル伝達反応を起

10

20

30

40

50

こすことが可能であるTLR作動薬は、HSP90である。或いは、TLR-9を介してシグナル伝達反応を起こすことが可能であるTLR作動薬は、細菌性又はウイルス性のDNAであり、DNAは、特にCpGモチーフとして知られる配列の文脈にて非メチル化CpGヌクレオチドを含有する。CpGを含有するオリゴヌクレオチドはTh1反応を優勢に誘導する。そのようなオリゴヌクレオチドは周知であり、たとえば、WO96/02555、WO99/33488及び米国特許第6,008,200号及び同第5,856,462号に記載されている。好適には、CpGヌクレオチドはCpGオリゴヌクレオチドである。併用免疫原性組成物で使用するのに好適なオリゴヌクレオチドは、少なくとも3つ、好適には少なくとも6つ以上のヌクレオチドによって分離される2以上のジヌクレオチドCpGモチーフを任意で含有してもよいCpG含有オリゴヌクレオチドである。CpGモチーフは、グアニンヌクレオチドが後に続くシトシンヌクレオチドである。CpGオリゴヌクレオチドは通常、デオキシヌクレオチドである。特定の実施形態では、ホスホジエステル結合及びそのほかのヌクレオチド間結合が可能であるが、オリゴヌクレオチドにおけるヌクレオチド間はホスホロジチオエート結合又は好適にはホスホロチオエート結合である。また混合されたヌクレオチド間結合を伴うオリゴヌクレオチドも可能である。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド又はホスホロジチオエートを作製する方法は、米国特許第5,666,153号、同第5,278,302号及びWO95/26204に記載されている。

#### 【0154】

たとえば、開示された併用免疫原性組成物で並びにPreF類似体などのFタンパク質を含む開示されたワクチン接種レジメン、方法、使用及びキットと共に使用することができるそのほかのアジュバントは、それ自体に又は3D-MPL若しくは本明細書に記載する別のアジュバントとの組み合わせで、たとえば、QS21などのサポニンである。そのようなアジュバントは、典型的には百日咳菌抗原と共に使用されない（が所望の場合には使用してもよい）。

#### 【0155】

サポニンは、Lacaille-Dubois, M及びWagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 pp 363-386)にて教示されている。サポニンは、植物界及び海洋動物界に広く分布するステロイド又はトリテルペングリコシドである。サポニンは、振盪すると泡立つコロイド状水溶液を形成し、コレステロールを沈殿させることについて言及される。サポニンは細胞膜の近傍にあると、膜を破裂させる膜における孔様の構造を創る。赤血球の溶血はこの現象の例であり、それは、サポニンすべてではないが、特定のサポニンの特性である。

#### 【0156】

サポニンは、全身投与用のワクチンでアジュバントとして知られる。個々のサポニンのアジュバント活性と溶血活性は当該技術で広範に研究されている（Lacaille-Dubois及びWagner、上記）。たとえば、Quilla (南米の樹木Quillaja Saponaria Molinaの樹皮に由来する)及びその分画は米国特許第5,057,540号及び“Saponins as vaccine adjuvants”、Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55;及びEP0362279B1に記載されている。Quillaの分画を含む免疫刺激複合体（ISCOMS）と呼ばれる粒子状の構造は、溶血性であり、ワクチンの製造に使用されている（Morein, B., EP 0 109 942 B1; WO96/11711; WO96/33739）。溶血性のサポニンQS21及びQS17（QuillaのHPLC精製した分画）は、強力な全身性アジュバントとして記載されており、その製造方法は、米国特許第5,057,540号及びEP0362279B1に記載されており、それらは参照によって本明細書に組み入れられる。全身性ワクチン接種の研究で使用されているそのほかのサポニンには、Gypsophila及びSaponariaのような植物種に由来するものが挙げられる（Bomford et al., Vaccine, 10(9):572-577, 1992）。

#### 【0157】

QS21は、Quillaja Saponaria Molinaの樹皮に由来するHPLC精製した非毒性の

分画である。QS21の製造方法は、米国特許第5,057,540号に開示されている。QS21を含有する非反応原性のアジュバント製剤はWO96/33739に記載されている。前述の参考文献は参照によって本明細書に組み入れられる。QS21のような前記免疫学的に活性のあるサポニンは、併用免疫原性組成物のヒト用量当たり1~50 $\mu$ gの量で使用することができる。有利なことに、QS21は、約25 $\mu$ gのレベルで、たとえば、20~30 $\mu$ gの間で、好適には21~29 $\mu$ gの間で、又は22~28 $\mu$ gの間で、又は23~27 $\mu$ gの間で、又は24~26 $\mu$ gの間で、又は25 $\mu$ gで使用することができる。別の実施形態では、併用免疫原性組成物のヒト用量は、約10 $\mu$ gのレベルで、たとえば、5~15 $\mu$ gの間で、好適には6~14 $\mu$ gの間で、たとえば、7~13 $\mu$ gの間で、又は8~12 $\mu$ gの間で、又は9~11 $\mu$ gの間で、又は10 $\mu$ gのレベルでQS21を含む。さらなる実施形態では、併用免疫原性組成物のヒト用量は、約5 $\mu$ gのレベルで、たとえば、1~9 $\mu$ gの間で、又は2~8 $\mu$ gの間で、又は好適には3~7 $\mu$ g又は4~6 $\mu$ gの間で、又は5 $\mu$ gのレベルでQS21を含む。QS21とコレステロールを含むそのような製剤は、抗原と共に製剤化されると功を奏するアジュバントであることが示されている。従って、たとえば、QS21とコレステロールの組み合わせを含むアジュバントを伴った併用免疫原性組成物にてRSV Fタンパク質類似体ポリペプチドを好都合に採用することができる。

#### 【0158】

任意で、アジュバントはまた、たとえば、アルミニウム塩、特に水酸化アルミニウム若しくはリン酸アルミニウム、又はリン酸カルシウムなどの無機塩を含むことができる。たとえば、アルミニウム塩（たとえば、水酸化アルミニウム又は「ミョウバン」）との組み合わせで3D-MPLを含有するアジュバントは、ヒト対象に投与するためのRSV Fタンパク質類似体抗原を含有する併用免疫原性組成物での製剤化に好適である。あるいは、そのような無機塩アジュバントは、非無機塩アジュバントと併用する以外で用いてもよく、すなわち、併用免疫原性組成物は、無機塩アジュバント、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、及びリン酸カルシウムなどの1種のみ、又は2種以上でアジュバント添加してもよい。

#### 【0159】

RSV Fタンパク質類似体抗原と共に（そして場合により、所望であれば、精製無細胞百日咳菌タンパク質などのパーティシス抗原と共に）製剤化するのに使用するために好適なアジュバントの別のクラスには、OMPに基づく免疫賦活組成物が挙げられる。OMPに基づく免疫賦活組成物は、たとえば、鼻内投与用の粘膜アジュバントとして特に好適である。OMPに基づく免疫賦活組成物は、細菌性又はウイルス性の抗原のような免疫原のためのキャリアとして又は組成物にて有用である、たとえば、ナイセリア（*Neisseria*）種（たとえば、Lowell et al., *J. Exp. Med.* 167:658, 1988; Lowell et al., *Science* 240:800, 1988; Lynch et al., *Biophys. J.* 45:104, 1984; Lowell, "New Generation Vaccines" 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, p.193, 1997; 米国特許第5,726,292号; 同第4,707,543号を参照)のような、しかし、これらに限定されないグラム陰性細菌に由来する外膜タンパク質（一部のポリンなどのOMP）の調製物に属する。一部のOMPに基づく免疫賦活組成物は、「プロテオソーム」と呼ぶことができ、それは疎水性であり、ヒトでの使用に安全である。プロテオソームは、約20nm~約800nmの小胞又は小胞様のOMPクラスターに自己集合する能力を有し、タンパク質抗原（Ag）、特に疎水性部分を有する抗原と非共有性に取り込み、配位し、会合し（たとえば、静電的に又は疎水性に）、又はさもなければ共同する。多分子膜構造又は1以上のOMPの溶融球状OMP組成物などの小胞形態又は小胞様形態で外膜タンパク質を生じる任意の調製方法は、プロテオソームの定義の範囲内に含まれる。たとえば、当該技術（たとえば、米国特許第5,726,292号又は同第5,985,284号）に記載されたようにプロテオソームを調製することができる。プロテオソームはまた、OMPポリンを製造するのに使用される細菌（たとえば、ナイセリア種）を起源とする内因性のリポ多糖又はリポオリゴ糖（それぞれLPS又はLOS）を含有すること

10

20

30

40

50

ができ、それらは一般にOMP調製物全体の2%未満である。

【0160】

プロテオソームは髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) から化学的に抽出された外膜タンパク質 (OMP) (ほとんど、クラス4のOMPと同様にポリリンA及びB) から主として構成され、界面活性剤によって溶液中に維持される (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206)。プロテオソームは、たとえば、透析濾過又は従来の透析工程によって、本明細書で開示されるRSVFタンパク質ポリペプチドを含むウイルス供給源に由来する精製された又は組換えのタンパク質のような種々の抗原と共に、あるいは精製百日咳菌抗原性タンパク質と共に、製剤化することができる。界面活性剤を徐々に取り除くことによって約100~200nmの直径の粒子状疎水性の複合体を形成することができる (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206)。

10

【0161】

「プロテオソーム：LPS又はプロトリン」は、本明細書で使用されるとき、少なくとも1種のリポ多糖と、例えば外因性添加によって混合されてOMP-LPS組成物 (免疫賦活組成物として機能することができる) を提供するプロテオソームの調製物を指す。従って、OMP-LPS組成物は、(1)たとえば、髄膜炎菌のようなグラム陰性細菌から調製されるプロテオソームの外膜タンパク質調製物 (たとえば、プロジュバント) と(2)1以上のリポ糖の調製物を含む、プロトリンの2つの基本成分で構成することができる。リポオリゴ糖は、外因性であることができ (たとえば、OMPプロテオソーム調製物に天然に含有される)、外因性に調製されたリポオリゴ糖 (たとえば、OMP調製物とは異なった培養物又は微生物から調製された) と混合することができ又は組み合わせることができ、あるいはそれらの組み合わせであることができる。そのような外因性に添加されるLPSは、OMP調製物が作製されたのと同じグラム陰性細菌に由来することができ、又は異なったグラム陰性細菌に由来することができる。プロトリンはまた、任意で脂質、糖脂質、糖タンパク質、小分子等、及びそれらの組み合わせを含むことが理解されるべきである。プロトリンは、たとえば、米国特許出願公開第2003/0044425号に記載されたように調製することができる。

20

30

【0162】

上述のもののような異なるアジュバントの組み合わせも、Fタンパク質類似体、例えばPreF抗原など (そして場合により、所望であれば百日咳菌抗原) を含む組成物で使用することができる。たとえば、すでに言及したように、QS21を3D-MPLと一緒に製剤化することができる。QS21:3D-MPLの比率は通常、たとえば、1:5~5:1のような1:10~10:1の桁であり、実質的に1:1であることが多い。通常、比率は、2.5:1~1:3の3D-MPL:QS21の範囲である。別の組み合わせアジュバントの製剤には、3D-MPLと、たとえば、水酸化アルミニウムのようなアルミニウム塩が挙げられる。

40

【0163】

一部の例では、アジュバント製剤は、アルミニウム塩 (ミョウバン)、たとえば、リン酸アルミニウム若しくは水酸化アルミニウム、又はリン酸カルシウムなどの無機塩を含む。ミョウバンが、たとえば、3D-MPLとの組み合わせで存在する場合、量は通常、用量当たり、約100µg~1mgの間、たとえば、約100µg、又は約200µg~約750µg、たとえば、約500µgである。

【0164】

一部の実施形態では、アジュバントは、油と水のエマルション、たとえば、水中油型エマルションを含む。水中油型エマルションの一例は、水性キャリア中に代謝可能な油、たとえば、スクアレン、トコフェロールのようなトコール、たとえば、α-トコフェロール

50

、及びたとえば、トリオレイン酸ソルビタン（スパン 85（商標））又はモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン（ツイーン 80（商標））のような界面活性剤を含む。特定の実施形態では、水中油型エマルションは、追加の免疫賦活剤を含有しない（特に 3D-MPL のような非毒性リポド A 誘導體又は QS21 のようなサポニンを含有しない）。水性キャリアは、たとえば、リン酸緩衝生理食塩水であり得る。さらに、水中油型エマルションは、スパン 85 及び / 又はレシチン及び / 又はトリカプリリンを含有することができる。

#### 【0165】

別の実施形態では、併用免疫原性組成物は、水中油型エマルションを含み、場合によりさらなる免疫賦活剤を含んでもよく、前記水中油型エマルションは、0.5 ~ 10 mg の代謝可能な油（好適にはスクアレン）、0.5 ~ 11 mg のトコール（好適には、 $\alpha$ -トコフェロールのようなトコフェロール）及び 0.4 ~ 4 mg の乳化剤を含む。

10

#### 【0166】

特定の一実施形態では、アジュバント製剤は、水中油型エマルションのようなエマルション形態で調製された 3D-MPL を含む。場合によっては、エマルションは WO94/21292 で開示されたように直径 2  $\mu$ m 未満の小さな粒度を有する。たとえば、3D-MPL の粒子は、0.22  $\mu$ m の膜を介して滅菌濾過されるのに十分なくらい小さくてもよい（欧州特許第 0689454 号に記載されたように）。或いは、3D-MPL はリポソーム製剤に調製することができる。任意で、3D-MPL（又はその誘導體）を含有するアジュバントは、追加の免疫賦活成分も含む。

20

#### 【0167】

アジュバントは、免疫原性組成物が投与される集団にて安全で且つ有効であるように選択される。成人集団及び高齢者集団については、製剤は通常、乳児用製剤で通常見られるアジュバント成分より多くを含む。特にエマルションのような水中油型エマルションを用いた製剤は、たとえば、コレステロール、スクアレン、 $\alpha$ -トコフェロール及び / 又はたとえば、ツイーン 80 若しくはスパン 85 のような界面活性剤のような追加の成分を含むことができる。例となる製剤では、そのような成分は、以下の量：約 1 ~ 50 mg のコレステロール、2 ~ 10 % のスクアレン、2 ~ 10 % の  $\alpha$ -トコフェロール、0.3 ~ 3 % のツイーン 80 で存在することができる。通常、スクアレン： $\alpha$ -トコフェロールの比率は、これがさらに安定なエマルションを提供する場合、等しいか又は 1 未満である。場合によっては、製剤は安定剤も含有することができる。

30

#### 【0168】

RSV F タンパク質ポリペプチド抗原を含む併用免疫原性組成物を乳児に投与するために製剤化する場合、アジュバントの投与量は、乳児対象で有効であり、相対的に反応性ではないように決定される。一般に、乳児用製剤におけるアジュバントの投与量は、成人（たとえば、65 歳以上の成人）への投与で設計される製剤で使用されるものより低い（たとえば、用量は、成人に投与される製剤で提供される用量の部分であってもよい）。たとえば、3D-MPL の量は通常、用量当たり 1  $\mu$ g ~ 200  $\mu$ g、たとえば、10 ~ 100  $\mu$ g 又は 10 ~ 50  $\mu$ g の範囲である。乳児用量は通常、この範囲、たとえば、約 1  $\mu$ g ~ 約 50  $\mu$ g の低い方の端であり、たとえば、約 2  $\mu$ g、又は約 5  $\mu$ g、又は約 10  $\mu$ g、又は約 25  $\mu$ g まで又は約 50  $\mu$ g までである。通常、QS21 が製剤で使用される場合、この範囲は同程度である（及び上記比率に従って）。油と水のエマルション（たとえば、水中油型エマルション）の場合、小児又は乳児に提供されるアジュバントの用量は、成人対象に投与される用量の一部であり得る。種々の用量での例となる水中油型アジュバントとの組み合わせで Pre F 抗原を含有する免疫原性組成物の有効性の実証は WO2010/149745 に提供される。

40

#### 【0169】

母体免疫のための RSV F タンパク質類似体及び百日咳菌抗原を含有する（開示された併用免疫原性組成物を含む）組成物において、組成物は、強力な中和抗体応答を誘導するように設計される。母体は、既に RSV 及び百日咳菌に暴露されており、したがって、

50

既存のプライミングされた応答を有し得る。そのため、乳児に対する防御を提供する目的は、このプライミングされた応答を可能な限り有効に、そして高効率に胎盤を通過することができる I g G<sub>1</sub> などの抗体サブクラスに関して追加刺激（ブースト）し、乳児に防御を提供することである。これは、アジュバントを含まずに達成することができるし、又は無機塩のみ、特に水酸化アルミニウム（ミョウバン）、リン酸化アルミニウム又はリン酸カルシウムのみを含むアジュバントを含めて達成してもよい。あるいは、これは、水中油型エマルジョンアジュバント、又は I g G<sub>1</sub> サブクラスの抗体の産生を増強する別のアジュバントを用いて製剤化することにより達成してもよい。したがって、母体免疫に使用するための F タンパク質類似体は、好ましくは、無機塩、望ましくはミョウバンを用いて、又は水中油型エマルジョンアジュバントを用いて製剤化する。

10

**【 0 1 7 0 】**

この文脈において、アジュバントは、妊婦において安全でありかつ十分に許容されるように選択される。場合により、免疫原性組成物はまたミョウバン以外のアジュバントを含む。例えば、3D-MPL、スクアレン（例えば QS 2 1）、リポソーム、及び/又は水中油型エマルジョンの 1 種以上を含むアジュバントを選択することが好ましい。ただし、最終的な製剤が、プライミングされた雌において所望の特性を有する R S V 及び/又は百日咳菌特異的抗体（例えばサブクラスであり、中和機能を有するもの）の産生を増強するものとする。

**【 0 1 7 1 】**

選択されるアジュバントにかかわらず、最終製剤中の濃度は、標的集団で安全かつ有効であるように算出されることに留意すべきである。例えば、母体免疫の状況において、選択したアジュバントにかかわらず、最終製剤中の濃度は、妊娠雌の標的集団において安全かつ有効であるように計算される。

20

**【 0 1 7 2 】**

本明細書に開示される免疫原性組成物（すなわち併用免疫原性組成物）又は開示されるワクチン接種レジメン、方法、使用及びキットにおいて使用するための免疫原性組成物は通常、免疫防御量（又はその部分用量）の抗原を含有し、慣用的な技法により調製することができる。母体免疫の場合には、必要な量は、免疫された妊娠女性の乳児において免疫防御となるような抗体の受動移行をもたらす量である。ヒト対象への投与用のもを含む免疫原性組成物の調製は、一般に、Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, Powell and Newman 編, Plenum Press, 1995 . New Trends and Developments in Vaccines, Voller et al. 編, University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978 に記載されている。リポソーム内への封入は、Fullerton による米国特許第 4 , 2 3 5 , 8 7 7 号に記載されている。高分子へのタンパク質のコンジュゲートは、たとえば、Likhite による米国特許第 4 , 3 7 2 , 9 4 5 号及び Armor らによる同第 4 , 4 7 4 , 7 5 7 号に開示されている。

30

**【 0 1 7 3 】**

通常、免疫原性組成物の各用量における抗原（例えばタンパク質）の量は、典型的な対象にて重大な有害な副作用なしに免疫防御の応答を誘導する量として選択される。この文脈での免疫防御は、感染に対する完全な防御を必ずしも意味するものではなく；症状又は疾患、特に病原体に関連した重篤な疾患に対する防御を意味する。抗原の量は、どの特定の免疫原が採用されるかによって変化し得る。一般に、各ヒト用量は、1 ~ 1 0 0 0 µg の各タンパク質又は抗原、たとえば、約 1 µg ~ 約 1 0 0 µg、たとえば、約 1 µg ~ 約 5 0 µg、たとえば、約 1 µg、約 2 µg、約 5 µg、約 1 0 µg、約 1 5 µg、約 2 0 µg、約 2 5 µg、約 3 0 µg、約 4 0 µg、又は約 5 0 µg 又は約 6 0 µg を含むことが予想される。一般に、ヒト用量は 0 . 5 ml の容量である。したがって、本明細書において記載される使用及び方法のための組成物は、例えば 0 . 5 ml のヒト用量において 1 0 µg、又は 3 0 µg、又は 6 0 µg とすることができる。免疫原性組成物で利用される量は、対象集団（例えば、乳児又は高齢者又は妊娠女性）に基づいて選択される。特定の組成物の最適な量は、対象における抗体力価及びそのほかの応答の所見を含む標準的な検

40

50

討によって確定することができる。最初のワクチン接種後、約4～12週間で（又は母体免疫の場合には乳児の出産前の任意の時点で、好ましくは出産予定日の少なくとも2週間前又は少なくとも4週間前に）、対象に追加刺激（ブースト）を与えることができる。たとえば、免疫原性組成物を幼児対象に投与する場合、最初の接種とそれに続く接種は、この期間に投与される他のワクチンと適合するように投与することができる。

【0174】

さらなる製剤の詳細は、WO2010/149745において見出され得、これは、RSV Fタンパク質類似体、例えばPreF類似体を含む免疫原性組成物の製剤に関するさらなる詳細を提供する目的で、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0175】

特定の実施形態において、開示される併用免疫原性組成物は、さらに、RSV及び百日咳菌以外の少なくとも1つの病原性生物由来の少なくとも1つの抗原を含む。より詳細には、上記少なくとも1つの抗原は、ジフテリアトキソイド（D）、破傷風トキソイド（T）、B型肝炎表面抗原（HBsAg）、不活化ポリオウイルス（IPV）；キャリアタンパク質とコンジュゲートしたインフルエンザ菌b型（Hib）の莢膜糖；キャリアタンパク質とコンジュゲートした髄膜炎菌C型の莢膜糖（MenC）；キャリアタンパク質とコンジュゲートした髄膜炎菌Y型の莢膜糖（MenY）；キャリアタンパク質とコンジュゲートした髄膜炎菌A型の莢膜糖（MenA）；キャリアタンパク質とコンジュゲートした髄膜炎菌W型の莢膜糖（MenW）；及び髄膜炎菌B型由来の抗原（MenB）からなる群より選択され得る。

【0176】

百日咳菌抗原（Pa若しくはPw）をD及びT並びに、IPV、HBsAg、Hib及びコンジュゲート髄膜炎菌莢膜糖から選択されるものなどの種々の他の抗原の組み合わせと共に含む混合ワクチンは、当該分野で周知であり、例えば、製品Infanrix（商標）（例えば、DTPa-IPV-HBsAg-Hib）及びBoostrix（商標）（例えば、dTPa）である。このことに関して、WO93/024148、WO97/000697及びWO98/019702は、参照によって組み込まれ、WO02/00249は、DTPw-HepB-MenAC-Hib組成物を開示する。莢膜糖抗原に好適なキャリアタンパク質は当該分野で公知であり、例えばT、D、及びD誘導体CRM197が挙げられる。

【0177】

特定の併用免疫原性組成物は、少なくとも1つのRSV抗原及び少なくとも1つの百日咳菌抗原に加えて：D及びT；D、T及びIPV；D、T及びHBsAg；D、T及びHib；D、T、IPV及びHBsAg；D、T、IPV及びHib；D、T、HBsAg及びHib；又はD、T、IPV、HBsAg及びHibを含む。

【0178】

特定の実施形態において、Dは、1用量あたり1～10国際単位（IU）（例えば、正確に若しくはおよそ2IU）又は10～40IU（例えば、正確に若しくはおよそ20若しくは30IU）の量で、あるいは1～10リミットオブフロキュレーション（Limit of flocculation）（Lf単位）（例えば、正確に若しくはおよそ2若しくは2.5若しくは9Lf）又は10～30Lf（例えば、正確に若しくはおよそ15若しくは25Lf）の量で使用される。

【0179】

特定の実施形態において、Tは、1用量あたり10～30IU（例えば、正確に若しくはおよそ20IU）又は30～50IU（例えば、正確に若しくはおよそ40IU）又は1～15Lf（例えば、正確に若しくはおよそ5若しくは10Lf）の量で使用される。

【0180】

例示的な実施形態において、併用免疫原性組成物は、少なくとも1つのRSV抗原及び少なくとも1つの百日咳菌抗原に加えて、D及びTを、それぞれ、1用量あたり、正確に又はおよその量で：30：40IU；25：10Lf；20：40IU；15：5Lf；

10

20

30

40

50

2 : 2 0 I U ; 2 . 5 : 5 L f ; 2 : 5 L f ; 2 5 : 1 0 L f ; 9 : 5 L f 含む。例えば、このような組成物は、(少なくとも1つのRSV抗原に加えて)

- ( i ) 2 0 ~ 3 0 μ g、例えば、正確に又はおよそ25 μ gのPT、
  - ( i i ) 2 0 ~ 3 0 μ g、例えば、正確に又はおよそ25 μ gのFHA、
  - ( i i i ) 1 ~ 1 0 μ g、例えば、正確に又はおよそ3若しくは8 μ gのPRN、
  - ( i v ) 1 0 ~ 3 0 L f、例えば、正確に又はおよそ15若しくは25 L fのD、及び
  - ( v ) 1 ~ 1 5 L f、例えば、正確に又はおよそ5若しくは10 L fのT
- を含み得る。

#### 【0181】

別の例として、このような組成物は、(少なくとも1つのRSV抗原に加えて)

- ( i ) 2 ~ 1 0 μ g、例えば、正確に又はおよそ2.5若しくは8 μ gのPT、
  - ( i i ) 2 ~ 1 0 μ g、例えば、正確に又はおよそ5若しくは8 μ gのFHA、
  - ( i i i ) 0 . 5 ~ 4 μ g、例えば、2 ~ 3 μ g、例えば、正確に又はおよそ2.5又は3 μ gのPRN、
  - ( i v ) 1 ~ 1 0 L f、例えば、正確に又はおよそ2又は2.5又は9 L fのD、及び
  - ( v ) 1 ~ 1 5 L f、例えば、正確に又はおよそ5又は10 L fのT
- を、含み得る。

#### 【0182】

免疫原性組成物はさらに、追加の抗原、例えば別のRSV抗原(例えばWO2010/149745に記載のようなGタンパク質抗原)又はヒトメタニューモウイルス(hMPV)抗原、又はインフルエンザ抗原、又はストレプトコッカス(Streptococcus)若しくはニューモコッカス(Pneumococcus)由来の抗原を含んでもよい。WO2010/149743は、RSV抗原と併用することができるhMPV抗原の例を記載しており、hMPV抗原の例を提供する目的で参照により本明細書に組み入れる。

#### 【0183】

本明細書中で記載される母体免疫の実施形態は、RSV及び百日咳菌ワクチンの投与のために好適な経路を介して実施される。この経路としては、筋肉内、鼻腔内、若しくは皮膚投与が挙げられる。好ましくは、本明細書中で記載される母体免疫は、皮膚的に実施され、これは、この抗原が、皮膚の真皮及び/又は表皮に(例えば、皮内に)導入されることを意味する。特定の実施形態において、Fタンパク質類似体、例えばPreF抗原若しくはPostF抗原などを含む組換えRSV抗原及び/又は無細胞百日咳菌タンパク質若しくは全細胞百日咳菌を含む百日咳菌抗原が、妊婦に、皮膚的に若しくは皮内に送達される。特定の実施形態において、免疫原性組成物は、本明細書中で記載されるアジュバント、例えば、サポニン、例えば3D-MPL含有又は非含有のQS21と共に、皮膚送達若しくは皮内送達のために製剤化される。別の実施形態において、免疫原性組成物は、免疫刺激剤、例えばQS21若しくは3D-MPL含有若しくは非含有の、無機塩、例えば水酸化アルミニウム若しくはリン酸アルミニウム又はリン酸カルシウムと共に、皮膚送達若しくは皮内送達のために製剤化される。百日咳菌抗原は、典型的に、アルミニウム塩と組み合わせ製剤化され、そして必要に応じて、皮膚経路若しくは皮内経路によって投与され得る。必要に応じて、Fタンパク質類似体及び百日咳菌抗原は、本明細書に開示する併用免疫原性組成物において、例えば、免疫刺激剤、例えばQS21若しくは3D-MPL含有若しくは非含有の無機塩、例えば水酸化アルミニウム若しくはリン酸アルミニウム又はリン酸カルシウムの存在下で、皮膚送達若しくは皮内送達のために共製剤化される。

#### 【0184】

皮内経路を含む皮膚経路を介した送達は、筋肉内経路などの他の経路よりも低用量の抗原を必要とする、すなわちより低用量を可能にする場合がある。従って、皮膚送達若しくは皮内送達のための、低用量、例えば通常の筋肉内用量よりも低い用量、例えば通常の筋肉内用量の50%以下の少なくとも1種のRSV抗原と少なくとも1種の百日咳菌抗原、例えば、ヒトの1用量あたり50 μ g以下、又は20 μ g以下、又は10 μ g以下又は5 μ g以下でのFタンパク質類似体と、例えば、(さらなる抗原性成分含有若しくは非含有

10

20

30

40

50

で) 1 ~ 10  $\mu\text{g}$  の間の PT、1 ~ 10  $\mu\text{g}$  の間の FHA、0.5 ~ 4  $\mu\text{g}$  の間の PRN とを含む併用免疫原性組成物もまた、提供される。必要に応じて、皮膚送達若しくは皮内送達のための免疫原性組成物はまた、アジュバント、例えば、アルミニウム塩又は QS 2 1 若しくは 3D-MPL、又はこれらの組み合わせをも含む。

#### 【0185】

皮膚投与のためのデバイスとしては、短針デバイス(約1mmと約2mmとの間の長さの針を有する)が挙げられ、US 4, 886, 499、US 5, 190, 521、US 5, 328, 483、US 5, 527, 288、US 4, 270, 537、US 5, 015, 235、US 5, 141, 496、US 5, 417, 662 及び EP 1092444 に記載されるものである。皮膚ワクチンはまた、参照によって本明細書に組み込まれる WO 99/34850 において記載されるように、皮膚への針の有効な進入長さを制限するデバイス及びその機能的均等物によって投与され得る。液体ジェット注射器を介して又は角質層を貫き真皮に達するジェットを生み出す針を介して液体ワクチンを真皮に送達するジェット注射デバイスもまた、好適である。ジェット注射デバイスは、例えば、US 5, 480, 381、US 5, 599, 302、US 5, 334, 144、US 5, 993, 412、US 5, 649, 912、US 5, 569, 189、US 5, 704, 911、US 5, 383, 851、US 5, 893, 397、US 5, 466, 220、US 5, 339, 163、US 5, 312, 335、US 5, 503, 627、US 5, 064, 413、US 5, 520, 639、US 4, 596, 556、US 54, 790, 824、US 4, 941, 880、US 4, 940, 460、WO 97/37705 及び WO 97/13537 において記載される。

#### 【0186】

皮膚投与のためのデバイスとしてはまた、圧縮ガスを用いて粉末形態のワクチンを皮膚の外層を通して真皮へ加速させる弾道粉末/粒子送達デバイスが、挙げられる。さらに、慣用的なシリンジ(注射器)が、皮膚投与の古典的マントー法において使用され得る。しかし、慣用的シリンジの使用は、高度に熟練した技術者が必要であり、従って、高度に熟練した使用者がいなくても正確な送達を可能にするデバイスが好ましい。皮膚投与のためのさらなるデバイスとしては、本明細書中で記載される免疫原性組成物を含むパッチが挙げられる。皮膚送達パッチは、一般に、固体基板(例えば、閉塞性若しくは非閉塞性の外科用包帯)を備えた裏打ちプレートを備える。このようなパッチは、角質層に穴をあける微小突起を介して、真皮若しくは表皮に免疫原性組成物を送達する。微小突起は、一般に、100  $\mu\text{m}$  ~ 2 mm の間、例えば、200  $\mu\text{m}$  ~ 500  $\mu\text{m}$ 、300  $\mu\text{m}$  ~ 1 mm、100 ~ 200、200 ~ 300、300 ~ 400、400 ~ 500、500 ~ 600、600 ~ 700、700、800、800 ~ 900、100  $\mu\text{m}$  ~ 400  $\mu\text{m}$ 、詳細には、約 200  $\mu\text{m}$  ~ 300  $\mu\text{m}$  の間若しくは約 150  $\mu\text{m}$  ~ 250  $\mu\text{m}$  の間である。皮膚送達パッチは、一般に、複数の微小突起、例えば、2 ~ 5000 の間の微小針、例えば、1000 ~ 2000 の間の微小針を備える。微小突起は、角質層、表皮及び/又は真皮に穴をあけるために好適な任意の形状とすることができる。微小突起は、例えば、WO 2000/074765 及び WO 2000/074766 に開示されるような形状とすることができる。微小突起は、少なくとも 3 : 1 (高さ対直径に基づく)、少なくとも約 2 : 1 又は少なくとも約 1 : 1 の縦横比を有し得る。微小突起の1つの好適な形状は、多角形、例えば六角形若しくは菱形の形状の底を有する錐状である。他の可能性のある微小突起形状は、例えば、米国特許出願公開第 2004/0087992 号において示される。特定の実施形態において、微小突起は、基部に向かって太くなる形状を有する。アレイにおける微小突起の数は、典型的に、少なくとも約 100、少なくとも約 500、少なくとも約 1000、少なくとも約 1400、少なくとも約 1600、又は少なくとも約 2000 である。微小突起の面密度は、その小さなサイズを前提に、特に高くなくてもよいが、例えば、1  $\text{cm}^2$  あたりの微小突起の数は、少なくとも約 50、少なくとも約 250、少なくとも約 500、少なくとも約 750、少なくとも約 1000、又は少なくとも約 1500 であり得る。本開示の1つの実施形態において、併用免疫原性組成物は、宿主の皮膚上にパッチを置

いて5時間以内に、例えば、4時間、3時間、2時間、1時間若しくは30分間以内に、対象に送達される。特定の実施形態において、併用免疫原性組成物は、皮膚上にパッチを置いて20分間以内、例えば、30秒以内、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18若しくは19分間以内に送達される。

#### 【0187】

微小突起は、当業者に公知の任意の好適な材料で作られ得る。特定の実施形態において、微小突起の少なくとも一部、詳細には、微小突起の先端若しくは微小突起の最外層は、生分解性である。特定の実施形態において、微小突起の実質的に全てが生分解性である。用語「生分解性」は、本明細書中で用いられる場合、生分解のメカニズムにかかわらず、インピゴ使用（例えば、皮膚への挿入）の予測される条件下で分解性であることを意味する。生分解の例示的なメカニズムとしては、崩壊、分散、溶解、侵食、加水分解及び酵素分解が挙げられる。

10

#### 【0188】

抗原を含む微小突起の例は、WO2008/130587及びWO2009/048607に開示される。代謝可能微小針の製造の方法は、WO2008/130587及びWO2010/124255に開示される。抗原による微小突起のコーティングは、当業者に公知の任意の方法、例えば、WO06/055844、WO06/055799において開示される方法によって、実施され得る。

#### 【0189】

本明細書中で記載される方法及び使用における皮内送達を含む皮膚送達のために好適な送達デバイスとしては、皮内投与のための微小針デバイスであるBD Soluvia（商標）デバイス、Corium MicroCor（商標）パッチ送達システム、Georgia Tech微小針ワクチンパッチ、Nanopass微小針送達デバイス及びDebiotech Nanoproject（商標）微小針デバイスが挙げられる。また、本明細書中に記載される併用免疫原性組成物、必要に応じて無機塩、例えばミョウバン又はQS21若しくは3D-MPLあるいはこれらの組み合わせなどのアジュバントと共に製剤化された併用免疫原性組成物を含む、皮膚送達デバイス又は皮内送達デバイスもまた、提供される。

20

#### 【0190】

免疫学的に有効な量の併用免疫原性組成物を対象に投与することを含む、RSV及び百日咳菌に対する免疫応答を惹起する開示された方法に関して、RSV及び百日咳菌に対して惹起された免疫応答が、RSV及び百日咳菌への感染の発生を低減若しくは予防する、若しくは感染の重症度を低減する、及び/又はRSV及び百日咳菌への感染後の病的応答の発生を低減若しくは予防する、若しくは病的応答の重症度を低減する、防御免疫応答を含むことが有利である。このような惹起された免疫応答は追加刺激応答であることができる。さらに、開示された併用免疫原性組成物は、RSVとの接触後にウイルス性疾患を悪化させることなくこれを達成する。

30

#### 【0191】

併用免疫原性組成物は、たとえば、鼻内経路のような、上部気道の粘膜に抗原を直接接触させる経路を含む種々の経路を介して投与することができる。あるいは、たとえば、筋肉内投与経路などのさらに従来の投与経路を採用することができる。

40

#### 【0192】

したがって、併用免疫原性組成物は、本明細書では、医薬に使用するため、そして特に、ヒト対象におけるRSV及び百日咳菌による感染又はRSV及び百日咳菌に関連する疾患の予防又は処置のためであることが想定される。他の病原体に由来する抗原を含む特定の実施形態において、そのような予防又は処置は、かかる他の病原体にも及ぶ。

#### 【0193】

かかる方法及び使用の特定の実施形態において、対象はヒト対象である。このヒト対象は、新生児、乳児、小児、青年、成人及び高齢者の群から選択することができる。対象は

50

、在胎児を有する妊婦であってもよい。あるいは、対象は妊婦でなくてもよい。対象が新生児の場合、併用免疫原性組成物の投与は、出生後1日以内、又は1週間以内、又は1か月以内に行い得る。

【0194】

好ましい実施形態において、対象（好ましくはヒト対象）には、併用免疫原性組成物が、単回用量レジメンとして、すなわち所定の一連の用量の一部としてではない単独の用量として、投与される。用量は、他のワクチン、例えば小児免疫スケジュール等の免疫スケジュールの一部として、同時に投与してもよい。そのような単回用量の実施形態では、対象にはその対象の生存期間にわたって組成物の2以上の用量を投与してもよいが、これらの用量のそれぞれは、所望のレベルの防御を達成するために必要と考えられるさらなる予  
10  
定された用量を行うことなく投与されるという意味で、単独であり「単回」である。一実施形態において、併用免疫原性組成物は、10年以内、好ましくは5年以内に1回のみ  
の単回用量レジメンとして対象に投与される。一実施形態において、対象は10～18歳のヒト青年であり、併用免疫原性組成物が1度だけ（すなわち単回用量レジメンとして）投  
与される。別の実施形態において、対象はヒト妊婦であり、併用免疫原性組成物が妊娠1  
回につき1度だけ投与される、すなわち、妊婦は1回の妊娠エピソード期間に単回用量の  
組成物のみの投与を受ける。

【0195】

母体免疫

乳児をRSV及び百日咳菌によって引き起こされる疾患から防御する安全且つ有効なワ  
20  
クチンの開発における特定の挑戦は、最も高い発生並びに最も大きな罹病及び死亡が、非  
常に幼い乳児において存在することである。幼い乳児、特に未熟児で生まれた乳児は、未  
成熟な免疫系を有し得る。従って、幼い乳児をRSV及び百日咳菌（百日咳）疾患から防  
御することは重要である。また、胎盤を介して乳児に移行した抗体（「母性抗体」）の乳  
児のワクチン接種に対する干渉の可能性もあり、従って、乳児期のワクチン接種は、例  
えば、完全に防御的な中和抗体応答を惹起するために十分に有効ではない場合がある。

【0196】

一態様において、本開示は、RSV Fタンパク質の類似体及び無細胞若しくは全細胞  
百日咳菌抗原を含む安全且つ有効な免疫原性組成物によって妊婦を能動免疫することによ  
り、RSV及び百日咳菌によって引き起こされる疾患から幼い乳児を防御するために好適  
30  
な、ワクチン接種レジメン、方法及び免疫原性組成物の使用、並びにキットに関する。F  
タンパク質類似体は、好適に、RSVへの自然な曝露（若しくはこれに対する以前のワ  
クチン接種によって）以前にプライミングされた体液性応答の規模を追加刺激（ブースト）  
するか又は増大することによって、抗体（例えば、中和抗体）を惹起する。同様に、百  
日咳菌抗原は、百日咳菌への自然な曝露若しくはこれに対する以前のワクチン接種によ  
って以前にプライミングされた体液性応答の規模を追加刺激（ブースト）するか又は増大す  
ることによって、抗体を惹起する。Fタンパク質類似体及び百日咳菌抗原に  
40  
応答して産生された抗体は、胎盤を介して在胎児に移行し、生後に乳児に受動免疫防  
御をもたらす。RSV及び百日咳菌により引き起こされる感染及び重度の疾患の危険期  
を通して持続する（例えば、乳児のワクチン接種前は完全に防御される）。典型的には、この方法によって付与  
される受動免疫防御は、出生と少なくとも2ヶ月齢との間、例えば、約6ヶ月齢まで、又  
はなおそれより長くすら、持続する。

【0197】

すべてのそのような組成物は、強い抗体応答（例えば、中和抗体）を誘導するように設  
計される。妊婦は、典型的に、その人生で1回以上RSVに曝されているので、彼女らは  
、RSVに対する既存のプライミング応答を有する。成人までにRSV感染に曝される集  
団の割合は、本質的に100%である。百日咳に対して防御し予防するように設計された  
小児科免疫プログラムは、広まっている。しかし、広範な免疫にも拘らず、百日咳菌によ  
る自然感染もまた一般的である。従って、百日咳菌に対するプライミングもまた広まっ  
ている。従って、生後直後の乳児及びその後の重要な最初の数ヶ月にわたるRSV及び百日  
50

咳菌からの防御の提供は、これらのプライミング応答を、母親においてRSV及び百日咳菌に対し、好ましくは、胎盤を通り乳児に防御を提供することができる特定の抗体サブクラス(サブタイプ)、例えばIgG<sub>1</sub>に関して、できる限り有効に追加刺激して血清抗体応答(レベル)を増大することによって達成され得る。1つの実施形態において、本明細書中での使用のための免疫原性組成物は、アジュバントを含まないか、又は強いIgG<sub>1</sub>応答を支持するアジュバント、例えばアルミニウム塩などの無機塩、詳細には水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム若しくはリン酸カルシウムを含み得る。従って、特定の実施形態において、母体免疫における使用のための免疫原性組成物は、好ましくは、無機塩、好ましくはミョウバンと共に製剤化される。別の実施形態において、強いIgG<sub>1</sub>応答を支持するアジュバントは、水中油型エマルジョン、又はサポニン、例えばQS21(若しくはその無毒化形態)である。

10

**【0198】**

妊婦は、ヒト妊婦であり得、従って、乳児若しくは在胎児は、ヒト乳児であり得る。ヒト妊婦について、発生胎児の在胎齢は、最後の月経周期の開始から数える。受胎後の週数は、最後の月経周期の開始の14日後から数えられる。従って、ヒト妊婦は、受胎後24週といえる場合、最後の月経周期の開始の26週後、すなわち妊娠26週と同じである。妊娠が、生殖技術の補助によって達成されている場合、発生胎児の在胎の段階は、受胎の日の2週間前から計算される。

**【0199】**

用語「在胎児」は、本明細書中で使用される場合、妊婦の胎児すなわち発育中の胎児を意味する。用語「在胎齢」は、妊娠の週数、すなわち、最後の月経周期の開始からの週数を意味するように使用される。ヒトの妊娠は、典型的には、最後の月経の開始から約40週間であり、便宜上、3つの期に分けられ、前期は最後の月経周期の開始日から妊娠の13週目まで続き、中期は妊娠の14週目から27週目までに及び、そして後期は28週目から始まって出生まで続く。従って、後期は、受胎後26週で開始し、児の出生まで続く。

20

**【0200】**

用語「乳児」は、ヒトについて言う場合、0歳から2歳までである。本明細書中で記載される方法及び使用によって提供される防御は、乳児から2歳から11歳までの児童期、又は例えば2歳から5歳までの児童期の初期、又は、なお12歳から18歳までの青年期までについての防御を提供する可能性があってもよい。しかし、これは、特に、重度のRSV疾患及び百日咳の合併症に対し個体が最も脆弱である乳児期の間、特に生後から約6ヶ月齢までである。

30

**【0201】**

ヒト乳児は、生後数ヶ月の間、免疫学的に未成熟である。特に、未熟児で、例えば、妊娠35週齢より前に生まれた場合、病原体によって引き起こされる感染又は疾患を、同じ病原体に対して発達した免疫系が応答できるのと同じ方法で予防することができる免疫応答を起こすために十分に免疫系が発達していない。免疫学的に未成熟な乳児は、より発達した若しくは成熟した免疫系を有する乳児よりも、病原体によって引き起こされる感染及び疾患に罹り易い。ヒト乳児はまた、生理学的及び発達上の理由で、例えば、気道が小さく、児童及び成人よりも発達が低く未熟であるから、生後数ヶ月の間、LRTI(肺炎を含む)に対し増大した脆弱性を有し得る。これらの理由のために、本明細書中で、乳児期の最初の6ヶ月を、40週未満、又は38週未満、又は35週未満の在胎齢で失われた時間の量に従って、未熟乳児若しくは早産乳児について延長し得る。

40

**【0202】**

別の実施形態において、妊婦及びその乳児は、任意の種由来であってよく、例えば、これらは、上で「対象」と記載される。妊娠動物、例えば妊娠モルモット若しくは妊娠ウシは、受胎後の時間が、交尾からの時間で数えられる。ヒトにおいて、及び幾つかの動物、例えばモルモットにおいて、抗体は、母親から胎児へ胎盤を介して渡される。幾つかの抗体アイソタイプは、胎盤を通じて優先的に移行され得る。例えばヒトIgG<sub>1</sub>抗体は、胎

50

盤を通過して最も効率的に移行するアイソタイプである。実験動物、例えばモルモット及びマウスにおいて、サブクラスが存在するが、種々のサブクラスは、必ずしも同じ機能を果たす必要はなく、ヒトのサブクラスと動物のサブクラスとの間の直接関連性は、容易には作られ得ない。

#### 【 0 2 0 3 】

好ましくは、RSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染を阻害し、RSV及び百日咳菌疾患の発生又は重篤度を低減することによって乳児を防御することは、少なくとも、新生児期及び非常に若い乳児、例えば、乳児が、妊娠約40週齢以降に生まれた正産児であった場合に、例えば、生後最初の数週間、例えば生後1ヶ月又は2ヶ月、又は最初の3ヶ月、又は最初の4ヶ月、又は最初の5ヶ月、又は生後最初の6ヶ月、又はそれ以上に及ぶ。重度のRSV及び百日咳の影響に対し乳児がより脆弱ではなくなる最初の数ヶ月の後、RSV及び百日咳菌感染に対する防御は、減衰し得る。従って、致命的な防御は、最も必要とされる期間の間、提供される。早産の乳児の場合、好ましくは、防御は、出生からより長い期間、例えば、乳児の出生と妊娠35週になるまでの間の時間間隔と少なくとも同等のさらなる期間（すなわち、さらに約5週間）、又は妊娠38週になるまでの間の時間間隔と少なくとも同等のさらなる期間（すなわち、さらに約2週間）、又は出生時の乳児の妊娠（在胎）週数に応じてより長い期間、提供される。

#### 【 0 2 0 4 】

乳児の防御が、RSVによるか若しくは百日咳菌による感染に対する100%の防御を必ずしも意味しないことは、明らかである。感染又は疾患の発生及び重篤度の低減が存在する限り、防御が提供されたと認識される。乳児の防御は、好ましくは、RSV及び百日咳菌によって引き起こされる重度の疾患及び入院から乳児を防御することを含む。このように、本明細書中で開示される組成物及び方法は、百日咳菌及びRSVによって引き起こされる疾患、例えば下気道感染（LRTI）、肺炎若しくは他の症候若しくは疾患の、発生又は重篤度を低減する。例えば、RSVに関して、本明細書中で開示される免疫原性組成物の投与は、LRTIの発生を、（ワクチン接種した母親の乳児のコホートにおいて）ワクチン接種していない母の乳児と比較して、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は60~70%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、低減し得る。好ましくは、このような投与は、LRTIの重篤度を、ワクチン接種していない母の乳児の感染と比較して、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は60~70%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、低減する。好ましくは、このような投与は、重度のRSV疾患による入院の必要性を、このようなコホートにおいて、ワクチン接種していない母の乳児の感染と比較して、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は60~70%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、低減する。重度のLRTIによる入院の必要性があると考えられるか否か、又は特定のLRTIの症例が入院されるか否かは、国によって変動し得、従って、当該分野で周知の規定の臨床症候に従って判定されたLRTIの重篤度は、入院を必要とするものよりもよい程度であり得る。百日咳菌に関して、本明細書中で開示されるとおり無細胞若しくは全細胞のパーティシス抗原を含む免疫原性組成物の投与は、重度の疾患（例えば、肺炎及び/又は呼吸促進及び呼吸不全）の（ワクチン接種した母親の乳児のコホートにおいて）、ワクチン接種していない母の乳児の感染と比較して、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は60~70%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、発生を低減し得る。好ましくは、このような投与は、肺炎の重篤度を、ワクチン接種していない母の乳児の感染と比較して、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は60~70%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、低減する。好ましくは、このような投与は、パーティシスの重度の合併症による入院の必要性を、このようなコホートにおいて、ワクチン接種していない母の乳児の感染と比較して、少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は60~70%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、低減する。

10

20

30

40

50

## 【0205】

典型的には、有利な効果（特に出産前のリスクが高い妊娠）が妊娠後期の開始前に得ることができるが、ワクチン接種レジメン、方法、使用及びキットに従い、Fタンパク質類似体及び百日咳菌抗原は、妊娠（懐胎）の後期の間に、妊婦に投与される。母体免疫のタイミングは、母性抗体の産生及びこの母性抗体の胎児への移行が可能であるように設計される。従って、好ましくは、免疫と出生との間に、胎盤を通った母性抗体の最適な移行が可能であるために十分な時間が経過する。抗体移行は、ヒトにおいて、一般的に、妊娠の約25週から始まり、28週まで増大し、妊娠の約30週から最適となり、これを維持する。RSV Fタンパク質及び百日咳菌抗原（例えば、パータシストキソイド（PT）、糸状赤血球凝集素（FHA）、パータクチン（PRN）、2型線毛（FIM2）、3型線毛（FIM3）及びBrkAの1以上又は全細胞パータシス抗原）に対する母性抗体の胎児への有効な移行を可能にするために、本明細書中で記載される母体免疫と出生との間に、最低約2～4週間が必要であると考えられる。従って、母体免疫は、（最後の月経期間の開始から数えて）妊娠25週の後の任意の時点、例えば、妊娠25、26、27、28、29、30、31、32、33若しくは34週（受胎後23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35若しくは36週）若しくはそれ以降、又は妊娠38、37、36、35、34、33、32、31若しくは30週（受胎後36、35、34、33、32、31、29若しくは28週）若しくはそれ以前に、行われ得る。好ましくは、母体免疫は、妊娠26週～38週の間、例えば、28週～34週の間に行われる。

10

20

## 【0206】

好ましくは、母体免疫は、乳児の出産予定日よりも少なくとも2週間、又は少なくとも3週間、又は少なくとも4週間、又は少なくとも5週間、又は少なくとも6週間前に行われる。投与のタイミングは、早産の危険のある妊婦の場合、抗体の産生及び胎児への移行のための十分な時間を提供するために、調整する必要がある場合がある。

## 【0207】

好ましくは、RSV Fタンパク質類似体及び百日咳菌抗原（複数でもよい）又はそれらの製剤の単回用量（又は複数のそれぞれの単回用量）は、上述の期間の間に、妊婦に投与される。本明細書中で記載される、RSV及び百日咳菌に対する母体免疫は、RSV及び百日咳菌に対する既存の母体免疫についての「追加刺激（ブースト）」であると考えられ、これは、以前に、例えば自然曝露若しくはワクチン接種によってプライミングされたRSV及び百日咳菌に対する免疫応答を増大する。従って、単回用量のみが必要であると予測される。したがって、特にRSV抗原成分（例えば組換えタンパク質、例としてFタンパク質類似体など）と百日咳菌抗原成分とが単一（すなわち混合）免疫原性組成物中に共製剤化される場合の、本明細書に開示するレジメン、方法及び使用の好ましい実施形態において、RSV Fタンパク質類似体及び百日咳菌抗原は、単回用量（又はそれぞれ単回用量）レジメンとして投与される。言い換えると、1回の妊娠（妊娠エピソード）の間に、妊婦に、RSV Fタンパク質類似体及び百日咳菌抗原のそれぞれを1度だけ投与する。これは、併用（混合）免疫原性組成物に共製剤化する場合、該組成物が妊娠期間に1度だけ投与されることを意味する。第2の用量が投与される場合、これもまた、第1の用量についての投与期間内に、好ましくは、第1と第2の用量との間の時間間隔を、例えば、1～8週間、若しくは2～6週間、例えば、2週間若しくは4週間若しくは6週間あける。

30

40

## 【0208】

RSV Fタンパク質類似体及び百日咳菌抗原の妊婦への投与は、母性抗体力価の追加刺激をもたらす、例えば、好適にはIgG<sub>1</sub>サブクラスの、血清（例えば、中和）抗体の力価を増大する。母体において増大した抗体力価は、胎盤を通り、Fcレセプターによって媒介される能動輸送メカニズムを介して、例えば、絨毛膜絨毛の合胞栄養芽層において、中和エフェクター機能を有するRSV特異的抗体及び百日咳菌特異的抗体の在胎児への受動移行をもたらす。本明細書中で開示された免疫方法からもたらされたRSV特異的I

50

g G<sub>1</sub>抗体及び百日咳菌特異的 I g G<sub>1</sub>抗体の胎盤を通った輸送は、効率的であり、出生時若しくはそれに近い時期の乳児において、母体循環における力価と近い、それと同等若しくはそれを超える力価をもたらすと予想される。例えば、RSV特異的抗体の力価は、好ましくは、出生時に少なくとも30 µg/mLのレベルである。典型的には、正規産での健康な乳児の出生時において、この力価は、このレベル以上、例えば、40 µg/mL、50 µg/mL、60 µg/mL又はそれ以上、例えば75 µg/mL、80 µg/mL、90 µg/mL、100 µg/mL又は120 µg/mLまで若しくはそれ以上ですらあり得る。上記値は、個々の基準で、又は母平均基準とすることができる。出生時に観察される抗体のレベルが上記閾値を超え、出生後数か月間持続することが好ましい。

#### 【0209】

パータシス（例えば、PT）に特異的な抗体の力価は、典型的に、Meade et al., "Description and evaluation of serologic assays used in a multicenter trial of acellular pertussis vaccines", *Pediatrics* (1995) 96:570-5（参照により組み込まれる）に記載されるように、ELISAにより測定され、ELISA単位/mL（EU）で表される。簡潔にいうと、例えば、マイクロタイプレート（例えば、Immulon 2、VWR International、West Chester、PA、USA）を、標準量のPT、FHA、FIM若しくはPRNでコーティングする。血清の連続希釈物を、およそ2時間にわたって28にてインキュベートし、アルカリホスファターゼコンジュゲートヤギ抗ヒトI g Gの適当な希釈物を添加する。この反応を発色させ、そして405 nmにて読み取る。各特異的抗体の検出の下限を、各抗原についての連続希釈した参照物質の多重測定によって決定し、PT、FHA及びPRNについて1 ELISA単位（EU）を、そしてFIMについて2 EUを設定する。好ましくは、本明細書中で開示されるワクチン接種レジメン、方法、使用に従うか、又はキット内に含まれる、パータシス抗原を含む免疫原性組成物の投与の後に、パータシス特異的抗体力価は、出生時に少なくとも10 EUのレベルである。典型的には、この力価は、このレベル以上、例えば、20 EU、30 EU、40 EU、50 EU、60 EU、70 EU、80 EU、90 EU又は100 EU若しくはそれ以上であり得る。これらの値は、個々の基準で、又は母平均基準とすることができる。好ましくは、出生時に観察される抗体のレベルは、上述の閾値を超え、そして出生後数ヶ月にわたって持続する。

#### 【0210】

移行した抗RSV抗体のエフェクター機能、例えば、中和能力（中和力価）もまた評価することができ、そして、防御に相関する抗体の機能的属性の測定値を提供する。例えば、RSVの場合、特定の量の複製可能なRSVウイルス及び血清の所定の希釈物を、混合し、インキュベートする。次いで、このウイルス-血清反応混合物を、ウイルス複製に許容的な宿主細胞（例えば、HEp-2細胞）上に移し、細胞増殖及びウイルス複製に好適な条件下で、好適な時間にわたってインキュベートする。非中和ウイルスは、宿主細胞に感染し、そしてそこで複製することができる。このことは、細胞単層上に所定数のプラーク形成単位（PFU）の形成をもたらす、これは、蛍光色素をタグ付加した抗RSV抗体を用いて検出し得る。中和力価は、ウイルスに感染したのみで血清を含まない細胞単層と比較して、PFUにおける特定のレベルの阻害（例えば、50%阻害又は60%阻害）を誘導する血清希釈を計算することによって決定される。例えば、パリビズマブ抗体は、未処理ウイルス感染細胞と比較したRSV抗原の検出を50%低減させる抗体濃度として示される中和力価（50%有効濃度[EC50]）を、臨床的RSV A及びRSV B単離株に対し、それぞれ1 mLあたり0.65 µg（1 mLあたり平均0.75 ± 0.53 µg；n = 69，1 mLあたり0.07 ~ 2.89 µgの範囲）及び1 mLあたり0.28 µg（1 mLあたり平均0.35 ± 0.23 µg；n = 35，1 mLあたり0.03 ~ 0.88 µgの範囲）で有することが示されている。従って、特定の実施形態において、胎盤を介して在胎児へ移行する抗体の中和力価は、出生後の乳児において測定することができ、（集団中央値に基づき）RSV A株に対し少なくとも約0.50 µg/mL（例えば、少なくとも約0.65 µg/mL）又はそれを超えるEC50、及びRSV B株

10

20

30

40

50

に対し少なくとも約  $0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$  (例えば、少なくとも約  $0.35 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 又はそれを超える  $\text{EC}_{50}$  を有する。好ましくは、中和抗体力価は、出生後、数週間から数ヶ月にわたって、上述の閾値を上回り続ける。

#### 【0211】

所望の場合、パータシス毒素に特異的な抗体のトキシン中和エフェクター機能もまた、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞中和アッセイにおいて、例えば Gillenius et al., "The standardization of an assay for pertussis toxin and antitoxin in microplate culture of Chinese hamster ovary cells". J. Biol. Stand. (1985) 13: 61-66 (参照により組み込まれる) において記載されるように測定し得る。しかし、このアッセイにおける中和活性は、防御とあまり相関しない。

10

#### 【0212】

必要に応じて、本明細書中で開示されるワクチン接種レジメン、方法、使用及びキットに従い、RSV 及び百日咳菌に対する防御を、受動的に移行した母性抗体が防御を提供する間である出生後数ヶ月を超えて延長させるために、乳児は、RSV 及び/又は百日咳菌に特異的な後天的免疫応答を惹起するために、能動的に免疫されてもよい。乳児のこのような能動免疫は、RSV 抗原及び/又は百日咳菌抗原を含む 1 又はそれ以上の組成物を投与することによって、達成され得る。例えば、この (1 以上の) 組成物は、必要に応じて抗原により惹起される免疫応答を増大するためにアジュバントと共に製剤化された RSV F タンパク質類似体を含み得る。以前に RSV に曝されていない乳児への投与のために、F タンパク質類似体は、Th1 サイトカインプロファイルを提示する T 細胞の産生を特徴とする (又は Th1 及び Th2 サイトカインプロファイルを提示する T 細胞の平衡を特徴とする) 免疫応答を惹起するアジュバントと共に製剤化され得る。同様に、乳児は百日咳菌ワクチンで能動的に免疫してもよく、これは場合により、他の病原体に対する防御をも付与する混合ワクチンとして投与してもよい。

20

#### 【0213】

あるいは、RSV F タンパク質類似体又は他のタンパク質サブユニットワクチンを乳児に投与するよりむしろ、RSV に対して防御する後天的免疫応答を惹起する組成物は、弱毒化生ウイルスワクチン又は 1 以上の RSV 抗原 (例えば、F 抗原、G 抗原、N 抗原若しくは M2 抗原又はこれらの一部分) をコードする核酸を含み得る。例えば、核酸は、ベクター、例えば組換えウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、MVA ベクター、麻疹ベクターなどに存在させうる。例示的なウイルスベクターは、WO 2012/089231 に開示され、これは、1 以上の RSV 抗原をコードするウイルスベクターを含む免疫原性組成物を説明する目的で、本明細書中に組み込まれる。あるいは、核酸は、自己複製型核酸、例えば自己複製型 RNA、例えば、アルファウイルスレプリコンなどのウイルスレプリコンの形態で (例えば、ウイルス構造タンパク質と共にパッケージングされたウイルスレプリコン粒子の形態で) あってもよい。このような自己複製型 RNA レプリコンの例は、WO 2012/103361 に記載され、これは、RSV タンパク質をコードする RNA レプリコン及び免疫原性組成物としてのその製剤を開示する目的で、本明細書中に組み込まれる。

30

#### 【0214】

さらに、又はあるいは、百日咳菌抗原を含む 1 以上の組成物が、乳児に投与され得る。例えば、この組成物は、パータシストキソイド (PT)、糸状赤血球凝集素 (FHA)、パータクチン (PRN)、2 型線毛 (FIM2)、3 型線毛 (FIM3) 及び BrkA、又はこれらの組み合わせ (例えば、PT 及び FHA; PT、FHA 及び PRN; 又は PT、FHA、PRN 及び FIM2 と FIM3 のいずれか若しくは両方) からなる群より選択される無細胞パータシス抗原を含み得る (例えば、本明細書中で記載されるように PT が化学的に若しくは遺伝的にトキソイド化されている)。あるいは、組成物は本明細書中で記載されるように、全細胞パータシス抗原を含み得る。

40

#### 【0215】

本明細書に開示するワクチン接種レジメン、方法及び使用に関して、RSV 抗原成分 (

50

例えば、組換えタンパク質、例えばFタンパク質類似体)及び百日咳菌抗原成分は、本明細書に開示のように、単一の(すなわち混合)免疫原性組成物中に共製剤化される。あるいは、RSV抗原性成分及び百日咳菌抗原性成分は、2(又はそれ以上)の異なる免疫原性組成物中に製剤化され、これは、同時若しくは異なる時点で、例えば、種々の認可され且つ推奨された小児科免疫スケジュールに従って、投与され、また(本明細書に開示するように)キット中に存在し得る。

#### 【0216】

後天的RSV免疫応答及び/又は後天的百日咳菌免疫応答を惹起する組成物(複数でもよい)は、本明細書中で開示されるRSV及び百日咳菌免疫を妊娠中に受けた母に生まれた乳児に投与され、この組成物は、1回以上投与されてもよい。最初の投与は、出生時若しくはそれに近い時点であってもよく(例えば、出生日若しくはその翌日)、又は出生の1週間以内若しくは2週間以内であってもよい。あるいは、最初の投与は、出生の約4週間後、出生の約6週間後、出生の約2ヶ月後、出生の約3ヶ月後、出生の約4ヶ月後、又はそれ以降、例えば出生の約6ヶ月後、出生の約9ヶ月後、又は出生の約12ヶ月後であり得る。例えば、百日咳菌抗原(例えば、Pa若しくはPw)を含む組成物の場合、出生の約2、4及び6ヶ月後にワクチンを投与することが一般的である(さらなる用量を12~18ヶ月に、及び必要に応じて4~7歳の間に行う)。従って、1つの実施形態において、本開示は、その乳児を妊娠していた間にFタンパク質類似体及び百日咳菌抗原を含む免疫原性組成物を投与された女性に生まれた乳児に、RSV及び/又は百日咳菌に特異的な免疫応答を惹起する1以上の組成物を投与することにより、RSV及び百日咳菌によって引き起こされる疾患から乳児を防御するための方法を提供する。好ましくは、母体由来のRSV特異的抗体及び百日咳菌特異的抗体は、そのような乳児に投与された組成物中のそれぞれの抗原に対する乳児の免疫応答の阻害又は「鈍化」を媒介するものではない。

#### 【0217】

上述の通り、開示されるワクチンレジメン、方法及び使用に使用するための免疫原性組成物は、本明細書に記載されるRSV-百日咳菌混合(共製剤化)組成物であってもよいし、又はFタンパク質類似体と百日咳菌抗原を別個に提供する異なる組成物であってもよい。そのような「別個の」組成物は、キットとして提供することができる。これらは、同じ日に投与される(同時投与される)又は異なる日に投与される。

#### 【0218】

開示されるワクチン接種レジメン、方法及び使用において、乳児は免疫学的に未成熟でありうる。乳児は、6月齢未満、例えば2月齢未満など、例として1月齢未満、例えば新生児でありうる。

#### 【0219】

ある実施形態において、開示されるワクチン接種レジメン、方法及び使用の状況で妊婦に投与される少なくとも1つの免疫原性組成物は、妊娠26週以降、例として妊娠26~38週の間、例えば妊娠28~34週の間投与することができる。

#### 【0220】

かかるワクチン接種レジメン、方法及び使用の実施形態において、RSV特異的抗体の少なくとも1つのサブセットが、出生時の乳児の血清中で30µg/mL以上のレベルで検出可能であり、及び/又は百日咳特異的抗体の少なくとも1つのサブセットが、出生時の乳児の血清中で10 E L I S A 単位/mL(EU)以上のレベルで検出可能である。

#### 【0221】

特定の実施形態において、かかるワクチン接種レジメン、方法及び使用は、乳児においてRSV及び/又は百日咳菌に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する少なくとも1つの組成物を前記乳児に投与することをさらに含む。能動免疫応答がRSV及び百日咳菌の両方に対してプライミング又は誘導される場合、RSVに対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する少なくとも1つの組成物と百日咳菌に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する少なくとも1つの組成物は、同じ組成物であってもよいし、あるいは異なる組成物であってもよい。後者の場合、異なる組成物は同じ日に投与

10

20

30

40

50

してもよいし又は異なる日に投与してもよい。好ましくは、上記少なくとも1つの免疫原性組成物によって乳児においてプライミング又は誘導される能動免疫応答は、開示されるワクチンレジメン、方法及び使用に従って妊娠中に免疫されていない母の乳児において同じ組成物に応答して生起された能動免疫応答とは、臨床的に意義のある程度まで量的に異なるものではない。

【0222】

乳児においてRSV及びノ又は百日咳菌に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する少なくとも1つの組成物を乳児に投与する、開示されるワクチン接種レジメン、方法及び使用のそのような実施形態において、乳児に投与される少なくとも1つの組成物は、少なくとも1つのRSVタンパク質抗原又は抗原類似体をコードする、核酸、組換えウイルスベクター又はウイルスレプリコン粒子を含むことができる。上記少なくとも1つの組成物は、Fタンパク質類似体を含むRSV抗原を含んでもよい。

10

【0223】

本明細書では、妊婦への投与用に製剤化された複数の免疫原性組成物を含むキットであって、

(a) RSVに特異的な体液性免疫応答を誘導、惹起又は追加刺激することができる、Fタンパク質類似体を含む第一の免疫原性組成物と、

(b) 百日咳菌に特異的な体液性免疫応答を誘導、惹起又は追加刺激することができる、少なくとも1つの百日咳菌抗原を含む第二の免疫原性組成物と

を含み、妊婦に投与した際に、第一及び第二の免疫原性組成物がRSV特異的抗体の少なくとも1つのサブセット及び百日咳菌特異的抗体の少なくとも1つのサブセットを誘導、惹起又は追加刺激し、これらの抗体が胎盤を介して妊婦の在胎児に移行し、その結果、乳児がRSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から防御される、前記キットを開示する。好ましくは、上記キットのそれぞれの組成物は妊婦に妊娠1回につき1度だけ投与される。言い換えれば、1回の妊娠エピソードの間に、妊婦はキット組成物のそれぞれの単回用量のみの投与を受けることが好ましい。

20

【0224】

かかるキットでは、第一の免疫原性組成物のFタンパク質類似体及びノ又は第二の免疫原性組成物の少なくとも1つの百日咳菌抗原は、本明細書に記載した通りであり、開示された併用免疫原性組成物を説明する状況で開示がなされたものである。一実施形態において、第一の免疫原性組成物及びノ又は第二の免疫原性組成物は少なくとも1本の充填済み注射器内にある。かかる注射器は二室注射器とすることができる。

30

【0225】

本発明は、例えば以下の実施形態を包含する：

1. 少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルス (Respiratory Syncytial Virus) (RSV) 抗原と少なくとも1つの百日咳菌 (Bordetella pertussis) 抗原とを含む併用免疫原性組成物であって、前記少なくとも1つのRSV抗原が組換え可溶性Fタンパク質類似体であり、前記少なくとも1つの百日咳菌抗原が少なくとも1つの無細胞パーティシス (Pa) 抗原を含む又は全細胞 (Pw) 抗原を含む、前記併用免疫原性組成物。

2. 前記Fタンパク質類似体が、Fタンパク質の融合前立体構造を安定させる少なくとも1つの修飾を含むPreF抗原である、実施形態1に記載の併用免疫原性組成物。

40

3. 前記Fタンパク質類似体が、N末端からC末端へ方向に、RSV Fタンパク質ポリペプチドのF<sub>2</sub>ドメイン及びF<sub>1</sub>ドメイン、並びにヘテロ三量体化ドメインを含み、前記F<sub>2</sub>ドメインと前記F<sub>1</sub>ドメインの間にフーリン切断部位がない、実施形態1又は2に記載の併用免疫原性組成物。

4. 前記Fタンパク質類似体が、

(i) グリコシル化を改変する修飾、

(ii) 少なくとも1つの非フーリン切断部位を除去する修飾、

(iii) pep27ドメインの1つ以上のアミノ酸を欠失させる修飾、及び

(iv) Fタンパク質細胞外ドメインの疎水性ドメインにおいて親水性アミノ酸を置換

50

する又は付加する修飾

から選択される少なくとも1つの修飾を含む、実施形態1から3のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

5. 前記F<sub>2</sub>ドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体ポリペプチド(F<sub>0</sub>)のアミノ酸26~105に対応するRSV Fタンパク質ポリペプチドを含む、及び/又は前記F<sub>1</sub>ドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体ポリペプチド(F<sub>0</sub>)のアミノ酸137~516に対応するRSV Fタンパク質ポリペプチドを含む、実施形態3又は4に記載の併用免疫原性組成物。

6. 前記Fタンパク質類似体が、

i. 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号18、配列番号20及び配列番号22の群から選択されるポリペプチドを含むポリペプチド、

ii. 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号17、配列番号19及び配列番号21の群から選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、又は配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号17、配列番号19及び配列番号21の群から選択されるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下で実質的にその全長にわたってハイブリダイズするポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドであって、天然のRSV株に少なくとも一部は対応するアミノ酸配列を含む前記ポリペプチド、

iii. 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号18、配列番号20及び配列番号22の群から選択されるポリペプチドと少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドであって、天然のRSV株に対応しないアミノ酸配列を含む前記ポリペプチドの群から選択される、実施形態1に記載の併用免疫原性組成物。

7. 前記Fタンパク質類似体が、RSV Fタンパク質ポリペプチドのF<sub>2</sub>ドメイン及びF<sub>1</sub>ドメインを含み、前記Fタンパク質ポリペプチドが、グリコシル化を改変する少なくとも1つの修飾を含む、実施形態1に記載の併用免疫原性組成物。

8. 前記Fタンパク質類似体が、

(i) ヘテロ三量体化ドメインを含むアミノ酸配列の付加、

(ii) 少なくとも1つのフーリン切断部位の欠失、

(iii) 少なくとも1つの非フーリン切断部位の欠失、

(iv) pep27ドメインの1つ以上のアミノ酸の欠失、及び

(v) Fタンパク質細胞外ドメインの疎水性ドメインにおける親水性アミノ酸の少なくとも1つの置換又は付加

から選択される少なくとも1つの修飾を含む、実施形態7に記載の併用免疫原性組成物。

9. グリコシル化を改変する前記少なくとも1つの修飾が、配列番号2の位置500に対応するアミノ酸を含む及び/又は配列番号2の位置500に対応するアミノ酸に隣接する、1つ以上のアミノ酸の置換を含む、実施形態7又は8に記載の併用免疫原性組成物。

10. 配列番号2の位置500~502に対応するアミノ酸が、NGS、NKS、NGT、NKTから選択される、実施形態7から9のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

11. グリコシル化を改変する前記修飾が、配列番号2の位置500に対応するアミノ酸におけるグルタミンの置換を含む、実施形態7から10のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

12. 前記Fタンパク質類似体が、前記F<sub>2</sub>ドメインと前記F<sub>1</sub>ドメインの間にインタクト融合ペプチドを含む、実施形態7から11のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

13. 前記少なくとも1つの修飾が、ヘテロ三量体化ドメインを含むアミノ酸配列の付加を含む、実施形態7から12のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

14. 前記ヘテロ三量体化ドメインがF<sub>1</sub>ドメインのC末端に配置されている、実施形態13に記載の併用免疫原性組成物。

15. F<sub>2</sub>ドメイン及びF<sub>1</sub>ドメインを含み、介在するフーリン切断部位がない、実施形態7から14のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

16. 前記Fタンパク質類似体が集合して多量体、例えば三量体になる、実施形態7から15のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

17. 前記F<sub>2</sub>ドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体ポリペプチド(F<sub>0</sub>)のアミノ酸26~105に対応するRSV Fタンパク質ポリペプチドの少なくとも一部分を含む、実施形態7から16のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

18. 前記F<sub>1</sub>ドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体ポリペプチド(F<sub>0</sub>)のアミノ酸137~516に対応するRSV Fタンパク質ポリペプチドの少なくとも一部分を含む、実施形態7から17のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

19. 前記F<sub>2</sub>ドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体ポリペプチド(F<sub>0</sub>)のアミノ酸26~105に対応するRSV Fタンパク質ポリペプチドを含む、及び/又は前記F<sub>1</sub>ドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体ポリペプチド(F<sub>0</sub>)のアミノ酸137~516に対応するRSV Fタンパク質ポリペプチドを含む、実施形態7から18のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

10

20. 前記Fタンパク質類似体が、

i. 配列番号22を含むポリペプチド、

ii. 配列番号21によってコードされるポリペプチド、又は配列番号21にストリンジントな条件下で実質的にその全長にわたってハイブリダイズするポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

iii. 配列番号22と少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドの群より選択される、実施形態7から19のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

21. 前記F<sub>2</sub>ドメインが、前記RSV Fタンパク質ポリペプチドのアミノ酸1~105を含む、実施形態7から20のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

20

22. 前記F<sub>2</sub>ドメイン及び前記F<sub>1</sub>ドメインが、インタクト融合ペプチドと共に及び介在pep27ドメインなしで配置されている、実施形態7から21のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

23. 前記ヘテロ三量体化ドメインがコイルドコイルドメインを含む、又はイソロイシンジッパーを含む、実施形態8から22のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

24. 前記イソロイシンジッパードメインが、配列番号11のアミノ酸配列を含む、実施形態23に記載の併用免疫原性組成物。

25. 前記Fタンパク質類似体が、前記Fタンパク質細胞外ドメインの疎水性ドメインにおける親水性アミノ酸の少なくとも1つの置換又は付加を含む、実施形態7から24のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

30

26. 前記疎水性ドメインが前記Fタンパク質細胞外ドメインのHRBコイルドコイルドメインである、実施形態25に記載の併用免疫原性組成物。

27. 前記HRBコイルドコイルドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体(F<sub>0</sub>)のアミノ酸512に対応する位置において、中性残基に代わる荷電残基の置換を含む、実施形態26に記載の併用免疫原性組成物。

28. 前記HRBコイルドコイルドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体(F<sub>0</sub>)のアミノ酸512に対応する位置において、ロイシンに代わるリジン又はグルタミンの置換を含む、実施形態27に記載の併用免疫原性組成物。

29. 前記疎水性ドメインが前記Fタンパク質細胞外ドメインのHRAドメインである、実施形態25に記載の併用免疫原性組成物。

40

30. 前記HRAドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体(F<sub>0</sub>)のアミノ酸105に対応する位置の次に荷電残基の付加を含む、実施形態29に記載の併用免疫原性組成物。

31. 前記HRAドメインが、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体(F<sub>0</sub>)のアミノ酸105に対応する位置の次にリジンの付加を含む、実施形態30に記載の併用免疫原性組成物。

32. 前記Fタンパク質類似体が、前記Fタンパク質細胞外ドメインの前記HRAドメインにおける親水性アミノ酸の少なくとも第一の置換又は付加及び前記HRBドメインにおける親水性アミノ酸の少なくとも第二の置換又は付加を含む、実施形態25から31のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

50

33. 前記Fタンパク質類似体が、天然のFタンパク質前駆体(F<sub>0</sub>)中に存在するフーリン切断部位を除去する少なくとも1つのアミノ酸付加、欠失又は置換を含む、実施形態7から32のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

34. 前記Fタンパク質類似体が、配列番号2の基準Fタンパク質前駆体(F<sub>0</sub>)のアミノ酸105~109に対応する位置、アミノ酸133~136に対応する位置、又はアミノ酸105~109に対応する位置とアミノ酸133~136に対応する位置の両方におけるフーリン切断部位を除去するアミノ酸付加、欠失又は置換を含む、実施形態33に記載の併用免疫原性組成物。

35. 前記F<sub>1</sub>及びF<sub>2</sub>ポリペプチドドメインの配列がRSV A Long株に対応する、実施形態7から34のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

36. 前記少なくとも1つのRSV抗原がポリペプチドの多量体、例えば三量体を含む、実施形態7から35のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

37. 前記少なくとも1つのPa抗原が、パータシストキソイド(PT)、糸状赤血球凝集素(FHA)、パータクチン(PRN)、2型線毛(FIM2)、3型線毛(FIM3)及びBrkAからなる群より選択される、実施形態1から36のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

38. 前記PTが化学的にトキソイド化されている(toxoided)か、又は遺伝的にトキソイド化、例えば突然変異R9K及びE129Gの一方若しくは両方によってトキソイド化されている、実施形態37に記載の併用免疫原性組成物。

39. 前記少なくとも1つのPa抗原が、PTとFHAとを、PTとFHAとPRNとを、又はPTとFHAとPRNにFIM2及びFIM3のいずれか若しくは両方とを含む、実施形態37又は38に記載の併用免疫原性組成物。

40. i. 10~30 µg、例えば正確に又はおよそ25 µgのPT、

ii. 10~30 µg、例えば正確に又はおよそ25 µgのFHA

を含む、実施形態37から39のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

41. 2~10 µg、例えば正確に又はおよそ8 µgのPRNをさらに含む、実施形態40に記載の併用免疫原性組成物。

42. i. 10~30 µg、例えば正確に又はおよそ20 µgのPT、

ii. 10~30 µg、例えば正確に又はおよそ20 µgのFHA、

iii. 2~10 µg、例えば正確に又はおよそ3 µgのPRN、及び

iv. 1~10 µg、例えば正確に又はおよそ合計5 µgのFIM2とFIM3

を含む、実施形態37から39のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

43. i. 2~10 µg、例えば正確に又はおよそ8 µgのPT、

ii. 2~10 µg、例えば正確に又はおよそ8 µgのFHA、及び

iii. 0.5~4 µg、例えば正確に又はおよそ2.5 µgのPRN

を含む、実施形態37から39のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

44. i. 2~10 µg、例えば正確に又はおよそ2.5 µgのPT、

ii. 2~10 µg、例えば正確に又はおよそ5 µgのFHA、

iii. 0.5~4 µg、例えば正確に又はおよそ3 µgのPRN、及び

iv. 1~10 µg、例えば正確に又はおよそ合計5 µgのFIM2とFIM3

を含む、実施形態37から39のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

45. i. 2~5 µg、例えば正確に又はおよそ3.2 µgのPT、

ii. 25~40 µg、例えば正確に又はおよそ34.4 µgのFHA、

iii. 0.5~3 µg、例えば正確に又はおよそ1.6 µgのPRN、及び

iv. 0.5~1 µg、例えば正確に又はおよそ0.8 µgのFIM2

を含む、実施形態37から39のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

46. i. 2~10 µg、例えば正確に又はおよそ8 µgのPT、

ii. 1~4 µg、例えば正確に又はおよそ2.5 µgのFHA、及び

iii. 1~4 µg、例えば正確に又はおよそ2.5 µgのPRN

を含む、実施形態37から39のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

47. 前記少なくとも1つの百日咳菌抗原がPw抗原を含む、実施形態1から36のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

48. 前記Pw抗原が低減された内毒素含有量を有する、実施形態47に記載の併用免疫原性組成物。

49. 前記低減された内毒素含有量が、リポオリゴ糖(LOS)の化学的抽出によって達成される、又は内毒素産生の遺伝子操作によって、例えば、3-O-デアシラーゼの過発現若しくは異種発現を誘導するように内毒素産生を遺伝子操作することによって達成される、実施形態48に記載の併用免疫原性組成物。

50. 前記Pw抗原が、少なくとも部分的に3-O-脱アセチル化されたLOSを含む百日咳菌細胞を含む、実施形態47から49のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

51. 薬学的に許容される担体又は賦形剤をさらに含む、実施形態1から50のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

52. 前記担体又は賦形剤が緩衝剤を含む、実施形態51に記載の併用免疫原性組成物。

53. 少なくとも1つのアジュバントをさらに含む、実施形態1から52のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

54. 前記少なくとも1つのアジュバントが、アルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウム又はリン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、3D-MPL、QS21、CpG含有オリゴデオキシヌクレオチドアジュバント、及び水中油型エマルションの群から選択される少なくとも1つのアジュバントを含む、実施形態53に記載の併用免疫原性組成物。

55. 前記少なくとも1つのアジュバントが水酸化アルミニウムを含む、実施形態53又は54に記載の併用免疫原性組成物。

56. 前記少なくとも1つのアジュバントが水中油型エマルションを含む、実施形態53又は54に記載の併用免疫原性組成物。

57. 前記水中油型エマルションがヒト1用量あたり5mg未満のスクアレンを含む、実施形態56に記載の併用免疫原性組成物。

58. 前記水中油型エマルションがトコールを含む、実施形態56又は57に記載の併用免疫原性組成物。

59. 前記アジュバントが、新生児又は妊娠者への投与に適している、実施形態53に記載の併用免疫原性組成物。

60. アジュバントを含まない、実施形態1から52のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

61. RSV及び百日咳菌以外の病原性生物からの少なくとも1つの抗原をさらに含む、実施形態1から60のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

62. ジフテリアトキソイド(D)、破傷風トキソイド(T)、B型肝炎表面抗原(HBsAg)、不活化ポリオウイルス(IPV)、キャリアタンパク質とコンジュゲートしているインフルエンザ菌(H. influenzae) b型(Hib)の莢膜糖類、キャリアタンパク質とコンジュゲートしている髄膜炎菌(N. meningitidis) C型の莢膜糖類、キャリアタンパク質とコンジュゲートしている髄膜炎菌Y型の莢膜糖類、キャリアタンパク質とコンジュゲートしている髄膜炎菌A型の莢膜糖類、キャリアタンパク質とコンジュゲートしている髄膜炎菌W型の莢膜糖類、及び髄膜炎菌B型からの抗原からなる群より選択される1つ以上の抗原を含む、実施形態61に記載の併用免疫原性組成物。

63. DとT、DとTとIPV、DとTとHBsAg、DとTとHib、DとTとIPVとHBsAg、DとTとIPVとHib、DとTとHBsAgとHib、又はDとTとIPVとHBsAgとHibを含む、実施形態62に記載の併用免疫原性組成物。

64. 前記少なくとも1つのRSV抗原に加えて、

i. 20~30µg、例えば正確に又はおよそ25µgのPT、

ii. 20~30µg、例えば正確に又はおよそ25µgのFHA、

iii. 1~10µg、例えば正確に又はおよそ3又は8µgのPRN、

iv. 10~30Lf、例えば正確に又はおよそ15又は25LfのD、及び

v. 1~15Lf、例えば正確に又はおよそ5又は10LfのT

10

20

30

40

50

を含む、実施形態 6 2 又は 6 3 に記載の併用免疫原性組成物。

6 5 . 前記少なくとも 1 つの R S V 抗原に加えて、

i . 2 ~ 1 0 μ g、例えば正確に又はおよそ 2 . 5 又は 8 μ g の P T、

i i . 2 ~ 1 0 μ g、例えば正確に又はおよそ 5 又は 8 μ g の F H A、

i i i . 0 . 5 ~ 4 μ g、例えば 2 ~ 3 μ g、例えば正確に又はおよそ 2 . 5 又は 3 μ g の P R N、

i v . 1 ~ 1 0 L f、例えば正確に又はおよそ 2 又は 2 . 5 又は 9 L f の D、及び

v . 1 ~ 1 5 L f、例えば正確に又はおよそ 5 又は 1 0 L f の T

を含む、実施形態 6 2 又は 6 3 に記載の併用免疫原性組成物。

6 6 . 前記少なくとも 1 つの R S V 抗原が、F タンパク質の融合前立体構造を安定させる少なくとも 1 つの修飾を含む P r e F 抗原を含む、実施形態 4 0 から 4 6、6 4 又は 6 5 に記載の併用免疫原性組成物。

6 7 . アジュバントをさらに含まない、又は無機塩アジュバントをさらに含む、実施形態 6 6 に記載の併用免疫原性組成物。

6 8 . 実施形態 1 から 6 7 のいずれかに記載の併用免疫原性組成物を対象に投与することを含む、R S V 及び百日咳菌に対する免疫応答を惹起する方法。

6 9 . 前記組成物の投与が、R S V との接触後にウイルス性疾患を悪化させることなく R S V に対して特異的な免疫応答を惹起する、実施形態 6 8 に記載の方法。

7 0 . 前記惹起される免疫応答が追加刺激応答である、実施形態 6 8 又は 6 9 に記載の方法。

7 1 . R S V 及び百日咳菌に対する前記免疫応答が、R S V 及び百日咳菌への感染の発生を低減若しくは予防する、若しくは感染の重症度を低減する、及び / 又は R S V 及び百日咳菌への感染後の病的応答の発生を低減若しくは予防する、若しくは病的応答の重症度を低減する、防御免疫応答を含む、実施形態 6 9 から 7 0 のいずれかに記載の方法。

7 2 . 医薬に使用するための、実施形態 1 から 6 7 のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

7 3 . 対象における R S V 及び百日咳菌による感染又は R S V 及び百日咳菌に関連する疾患の予防又は処置のための、実施形態 1 から 6 7 のいずれかに記載の併用免疫原性組成物。

7 4 . 前記併用免疫原性組成物が、対象に単回用量レジメンとして投与される又は投与するためのものである、実施形態 6 8 から 7 1 のいずれかに記載の方法又は実施形態 7 2 若しくは 7 3 に記載の併用免疫原性組成物。

7 5 . 前記対象が、哺乳動物、例えば、新生児、乳児、小児、青年、成人及び高齢者の群から選択されるヒトである、実施形態 6 8 から 7 1 のいずれかに記載の方法又は実施形態 7 3 若しくは 7 4 に記載の併用免疫原性組成物。

7 6 . 前記対象が青年者であり、前記対象が 1 0 ~ 1 8 歳の間であり、前記併用免疫原性組成物が 1 度だけ投与される又は投与するためのものである、実施形態 7 5 に記載の方法又は併用免疫原性組成物。

7 7 . 前記対象が妊婦でない、実施形態 6 8 から 7 1 のいずれかに記載の方法又は実施形態 7 2 若しくは 7 3 に記載の併用免疫原性組成物。

7 8 . 前記対象が、場合によってはヒトの、在胎児を有する妊婦である、実施形態 6 8 から 7 1 のいずれかに記載の方法又は実施形態 7 2 若しくは 7 3 に記載の併用免疫原性組成物。

7 9 . 前記併用免疫原性組成物が前記妊婦に妊娠 1 回につき 1 度だけ投与される又は投与するためのものである、実施形態 7 8 に記載の方法又は併用免疫原性組成物。

8 0 . 乳児を R S V 及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から防御するワクチン接種レジメンであって、

F タンパク質類似体を含む組換え R S V 抗原と少なくとも 1 つの百日咳菌抗原とを含む、R S V と百日咳菌の両方に特異的な体液性免疫応答を追加刺激することができる、少なくとも 1 つの免疫原性組成物を、在胎児を有する妊婦に投与することを含み、

10

20

30

40

50

前記少なくとも1つの免疫原性組成物によって前記妊婦において惹起された又は増加した、RSV特異的抗体の少なくとも1つのサブセット及び百日咳菌特異的抗体の少なくとも1つのサブセットが、胎盤を介して前記在胎児に移行し、その結果、前記乳児がRSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から防御される、前記ワクチン接種レジメン。

81．乳児をRSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から防御する方法であって、

Fタンパク質類似体を含む組換えRSV抗原と少なくとも1つの百日咳菌抗原とを含む、RSVと百日咳菌の両方に特異的な体液性免疫応答を追加刺激することができる、少なくとも1つの免疫原性組成物を、在胎児を有する妊婦に投与することを含み、

前記少なくとも1つの免疫原性組成物によって前記妊婦において惹起された又は増加した、RSV特異的抗体の少なくとも1つのサブセット及び百日咳菌特異的抗体の少なくとも1つのサブセットが、胎盤を介して前記在胎児に移行し、その結果、前記乳児がRSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から防御される、前記方法。

82．RSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患からの乳児の防御に使用するための、Fタンパク質類似体を含む組換えRSV抗原と少なくとも1つのパータシス抗原とを含む、1種の免疫原性組成物又は複数の免疫原性組成物であって、妊婦への投与用に製剤化されており、RSVと百日咳菌の両方に特異的な体液性免疫応答を追加刺激することができる免疫原性組成物であり、前記免疫原性組成物によって前記妊婦において追加刺激されたRSV特異的抗体の少なくとも1つのサブセット及び百日咳菌特異的抗体の少なくとも1つのサブセットが胎盤を介して在胎児に移行し、その結果、前記乳児がRSV及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から防御される、上記免疫原性組成物。

83．Fタンパク質類似体を含む前記組換えRSV抗原と少なくとも1つの百日咳菌抗原とが、実施形態1から67のいずれかに記載した通りの併用免疫原性組成物である同じ免疫原性組成物に共製剤化される、実施形態80から82のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

84．前記免疫原性組成物が前記妊婦に妊娠1回につき1度だけ投与される、又は投与するためのものである、実施形態80から83のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

85．Fタンパク質類似体を含む前記組換えRSV抗原と少なくとも1つの百日咳菌抗原とが、2つの異なる免疫原性組成物に製剤化される、実施形態80から82のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

86．前記2つの異なる免疫原性組成物が同じ日に投与される（同時投与される）、実施形態85に記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

87．前記2つの異なる免疫原性組成物が異なる日に投与される、実施形態85に記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

88．前記Fタンパク質類似体の実施形態1から36のいずれかに記載した通りであり、前記少なくとも1つの百日咳菌抗原が実施形態37から50のいずれかに記載した通りである、実施形態85から87のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

89．前記妊婦がヒトである、実施形態80から88のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

90．前記乳児が免疫学的に未成熟である、実施形態80から89のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

91．前記乳児が6月齢未満である、実施形態80から90のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

92．前記乳児が2月齢未満、例えば1月齢未満、例えば新生児である、実施形態80から91のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

93．前記胎盤を介して移行するRSV特異的抗体及び/又は百日咳特異的抗体の少なくとも1つのサブセットが、IgG抗体、好ましくはIgG<sub>1</sub>抗体を含む、実施形態80か

10

20

30

40

50

ら 9 2 のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

9 4 . 前記胎盤を介して移行する R S V 特異的抗体の少なくとも 1 つのサブセットが中和抗体である、実施形態 8 0 から 9 3 のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

9 5 . R S V 特異的抗体の前記少なくとも 1 つのサブセットが、出生時の乳児の血清中で 3 0  $\mu$  g / m L 以上のレベルで検出可能である、実施形態 8 0 から 9 4 のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

9 6 . 百日咳特異的抗体の前記少なくとも 1 つのサブセットが、出生時の乳児の血清中で 1 0 E L I S A 単位 / m L ( E U ) 以上のレベルで検出可能である、実施形態 8 0 から 9 5 のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

9 7 . 前記乳児において R S V に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する少なくとも 1 つの組成物を前記乳児に投与することをさらに含む、実施形態 8 0 から 9 6 のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

9 8 . 前記乳児において百日咳菌に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する少なくとも 1 つの組成物を前記乳児に投与することをさらに含む、実施形態 8 0 から 9 7 のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

9 9 . R S V に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する少なくとも 1 つの組成物と百日咳菌に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する少なくとも 1 つの組成物とを前記乳児に投与することを含む、実施形態 9 7 又は 9 8 に記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

1 0 0 . R S V に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する前記少なくとも 1 つの組成物と百日咳菌に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する前記少なくとも 1 つの組成物とが同じ組成物である、実施形態 9 9 に記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

1 0 1 . R S V に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する前記少なくとも 1 つの組成物と百日咳菌に対する能動免疫応答をプライミングする又は誘導する前記少なくとも 1 つの組成物とが異なる組成物である、実施形態 9 9 に記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

1 0 2 . 前記異なる組成物が同じ又は異なる日に投与される、実施形態 1 0 1 に記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

1 0 3 . 前記乳児に投与される少なくとも 1 つの組成物が、F タンパク質類似体を含む R S V 抗原を含む、実施形態 9 7 から 1 0 1 に記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

1 0 4 . 前記乳児に投与される少なくとも 1 つの組成物が、少なくとも 1 つの R S V タンパク質抗原又は抗原類似体をコードする、核酸、組換えウイルスペクター又はウイルスレプリコン粒子を含む、実施形態 9 7 から 1 0 2 のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

1 0 5 . 前記少なくとも 1 つの免疫原性組成物が妊婦に妊娠 2 6 週以降に投与される、実施形態 8 0 から 1 0 4 のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

1 0 6 . 前記妊婦が妊娠 2 6 ~ 3 8 週の間、例えば妊娠 2 8 ~ 3 4 週の間である、実施形態 8 0 から 1 0 5 のいずれかに記載のワクチン接種レジメン、方法又は使用。

1 0 7 . 妊婦への投与用に製剤化された複数の免疫原性組成物を含むキットであって、  
( a ) R S V に特異的な体液性免疫応答を誘導、惹起又は追加刺激することができる、F タンパク質類似体を含む第一の免疫原性組成物と、

( b ) 百日咳菌に特異的な体液性応答を誘導、惹起又は追加刺激することができる、少なくとも 1 つの百日咳菌抗原を含む第二の免疫原性組成物と  
を含み、

妊婦に投与すると、第一及び第二の免疫原性組成物が R S V 特異的抗体の少なくとも 1 つのサブセット及び百日咳菌特異的抗体の少なくとも 1 つのサブセットを誘導、惹起又は追加刺激し、これらの抗体が胎盤を介して妊婦の在胎児に移行し、その結果、乳児が R S

10

20

30

40

50

V及び百日咳菌によって引き起こされる感染又は疾患から防御される、前記キット。

108. 前記第一の免疫原性組成物のFタンパク質類似体が実施形態1から36のいずれかに記載した通りである、実施形態107に記載のキット。

109. 前記第二の免疫原性組成物の少なくとも1つの百日咳菌抗原が実施形態37から50のいずれかに記載した通りである、実施形態107又は108に記載のキット。

110. 前記キットの関連特徴が実施形態83から101のいずれかに記載のワクチンレジメン、方法又は使用について定義した通りである、実施形態107から109のいずれかに記載のキット。

111. 前記第一の免疫原性組成物及び/又は前記第二の免疫原性組成物が少なくとも1本の充填済み注射器内にある、実施形態107から110のいずれかに記載のキット。

112. 前記充填済み注射器が二室注射器である、実施形態111に記載のキット。

113. 前記キットのそれぞれの組成物が前記妊婦に妊娠1回につき1度だけ投与するためのものである、実施形態107から112のいずれかに記載のキット。

特定の特別な特徴及び/又は実施形態を説明するために以下に実施例を提供する。これらの実施例は、記載される特別な特徴又は実施例に本発明を限定するように解釈されるべきではない。

#### 【実施例】

#### 【0226】

実施例全体において、使用したRSVワクチン(Pre-F)は、配列番号22に対応するタイプのグリコシル化修飾PreF抗原(すなわち、L112Q修飾と、配列番号2の500~502位に対応するアミノ酸の修飾(NGS、NKS、NGT及びNKTから選択される)とを含有する)を含む。

#### 【0227】

[実施例1] 概念の証明 - モルモットモデルにおけるRSV母体免疫

胎盤構造及びIgG移行が典型的げっ歯類モデルの場合よりもヒトに近いので、モルモットモデルを選択した(Pentsuk and van der Laan (2009) Birth Defects Research (part B) 86:328-344において概説される)。モルモットの相対的に長い妊娠期間(68日間)のため、妊娠の間の免疫及び免疫応答発生が可能になる。その生存期間を通してRSVに対する曝露を経験しており、RSVに対する免疫応答が事前に存在している妊婦のRSV免疫状態を模倣するために、雌モルモットを、ワクチン接種の6週間前若しくは10週間前のいずれかにおいて、生RSVでプライミングした(図2)。

#### 【0228】

雌モルモット(N=5/群)を、ワクチン接種の6週間前若しくは10週間前(およそ、交配の時点若しくは交配の4週間前)に、生RSVウイルス( $2.5 \times 10^5$  pfu)で鼻腔内プライミングした。2群は、プライミングしないままにした。妊娠雌を、妊娠の開始約6週間後に水酸化アルミニウムと混合した10µgのPreF抗原で免疫した。プライミングなしの1群の雌に、PBSを注射した。血清サンプルを、プライミング及び妊娠期間にわたって採取し、抗RSV結合及び中和抗体のレベルをモニタリングした。

#### 【0229】

後代(7~16日齢)を、生RSVで $1 \times 10^7$  pfuにて鼻腔内チャレンジした。チャレンジの4日後、肺を採取し、7葉に分割した。7葉のうち6葉においてウイルスを力価測定し、肺1グラムあたりの全ウイルス粒子を計算した。

#### 【0230】

結果を、図3及び図4にグラフで示す。

#### 【0231】

モルモットを6週間若しくは10週間前にプライミングしたかにかかわらず、ワクチン接種の日に同様のレベルの抗体が観察された(D70~75-ワクチン接種前)。プラトー力価に、プライミングの14日後に到達した。中和抗体力価は、プラトーに達した後、少なくとも約60日間、低下しなかった。従って、両時点でのプライミングは、このモデルにおいて等価であり、ヒトにおける母胎感染を模倣するために好適であった。

10

20

30

40

50

## 【0232】

モルモット後代における肺ウイルス負荷からの結果(図3)は、プライミング及びワクチン接種された母に生まれた後代は、プライミングなし/ワクチン接種なし母に生まれた後代と比較して、RSVチャレンジから防御されたことを示す。対照的に、プライミングなし/ワクチン接種した母に生まれた後代は、RSVチャレンジから防御されなかった。Steff et al (Proof of concept of the efficacy of a maternal RSV, recombinant F protein, vaccine for protection of offspring in the guinea pig model - poster 114, RSV Vaccines for the World conference, ポルトガル、ポルト、2013年10月14~16日)は、母体免疫後のモルモット仔における防御抗体レベルの誘導におけるPreF抗原の効力についてさらなるエビデンスを提供している。

10

## 【0233】

[実施例2] 混合ワクチンは、RSVによるチャレンジに対して防御する

本実施例は、RSV(Pre-F)及び百日咳菌抗原(PT、FHA及びPRN)を含む混合ワクチンによって惹起された、RSVに対する防御を実証する。2用量の混合Pa-RSVワクチンの免疫原性(中和抗体力価)を、Balb/cマウスモデルにおいて評価し、その後、鼻腔内RSVチャレンジを行って、混合ワクチンの効力を測定した。

## 【0234】

BALB/cマウスの群(n=14/群)を、表1に示される製剤により、3週間間隔で2回筋肉内に免疫した。

## 【0235】

## 【表1】

20

表1: RSVチャレンジの前に投与したワクチン製剤

ワクチン	PT (μg)	FHA (μg)	PRN (μg)	PreF (μg)	Al(OH) <sub>3</sub> (μg)	体積 (μL)	N
Pa-RSV w/ Al(OH) <sub>3</sub>	6.25	6.25	2	2	50	50	14
Pa-RSV	6.25	6.25	2	2	-	50	14
Pa 単独	6.25	6.25	2	-	50	50	14
RSV 単独	-	-	-	2	50	50	14

30

## 【0236】

全てのマウス由来の血清を、0日目(1回目免疫の前)、21日目(2回目免疫の前)及び35日目(2回目免疫の2週間後)に個別に採取し、RSV中和抗体の存在を、ブランク減少アッセイを用いて試験した。簡潔にいうと、各血清の連続希釈物を、RSV A Long(1ウェルあたり100pfuを標的化)と共に33にて20分間にわたってインキュベートした。インキュベーション後、ウイルス-血清混合物を、Vero細胞を予め植菌し、増殖培地を空にしておいたプレートに移した。各ウェル上に、一列の細胞を、ウイルスのみと共にインキュベートし(100%の感染性)、2ウェルにはウイルスも血清も与えなかった(細胞対照)。プレートを、33にて2時間にわたってインキュベートし、培地を除去し、そして0.5%CMC(低粘度カルボキシメチルセルロース)を含むRSV培地を全てのウェルに添加した。このプレートを、3日間33にてインキュベートした後、免疫蛍光染色した。

40

## 【0237】

染色のために、細胞単層を、PBSで洗浄し、そして1%パラホルムアルデヒドで固定した。RSV陽性細胞を、市販のヤギ抗RSV抗血清を用い、その後FITCにコンジュゲートしたウサギ抗ヤギIgGを用いて、検出した。1ウェルあたりの染色プラークの数

50

を、自動画像化システムを用いて計数した。各血清の中和抗体力価を、血清なしの対照と比較してプラークの数の60%の減少を起こす血清希釈の逆関数 ( $ED_{60}$ ) として決定した。結果を、図5Aに示す。

【0238】

A1(OH)<sub>3</sub>のアジュバントが添加されたPreFベースのワクチンは、鼻腔内RSVチャレンジからマウスを防御する。従って、この動物モデルは、肺におけるウイルスクリアランスを媒介するRSVワクチンの能力を研究するために有用である。次いで、単一ワクチン中の百日咳菌(P<sub>T</sub>、F<sub>H</sub>A及びP<sub>R</sub>N)抗原とRSV(PreF)抗原との組み合わせを、鼻腔内RSVチャレンジマウスモデルにおける防御有効性について試験した。2回目のワクチン投与の2週間後、マウスを、50 $\mu$ l(1つの鼻腔あたり25 $\mu$ L)の生RSV A Long株(約 $1.45 \times 10^6$  p<sub>f</sub>u/50 $\mu$ l)の点鼻によってチャレンジした。肺ウイルス負荷の評価のために、チャレンジの4日後、肺を採取した。チャレンジの4日後、マウスを安楽死させ、肺を、無菌的に採取し、個々に計量し、ホモジナイズした。各肺ホモジネートの連続希釈物(各8連)を、Vero細胞と共にインキュベートし、プラークを含むウェルを、植菌の6日後に免疫蛍光によって同定した。ウイルス力価を、TCID<sub>50</sub>計算のためにSpearman-Kärber法を用いて決定し、肺1グラムあたりで示した。使用した統計学的方法は、log<sub>10</sub>値における分散分析(ANOVA)である。

10

【0239】

結果を、図5Bに示す。予測されるとおり、A1(OH)<sub>3</sub>と混合した2 $\mu$ gのPreFは、Pa単独でワクチン接種したマウス(RSVチャレンジからの防御が予測されない対照群)と比較して、肺におけるウイルスクリアランスを効率的に促進した。PreF群における14匹のうち2匹の動物のみが、肺に検出可能なレベルのRSVを有し、他の12匹の動物ではRSVが検出可能ではなかった。Pa-RSV混合ワクチンは、14匹中1匹の動物のみが肺において検出可能なレベルのRSVを有し、残る13匹の動物においてRSVが検出不能であったことによって示されるとおり、RSVチャレンジに対しマウスを等しく防御することができた。全体で、PreF+A1(OH)<sub>3</sub>ワクチン又はPa抗原+PreF+A1(OH)<sub>3</sub>をワクチン接種した動物は、Pa単独でワクチン接種した対照動物よりも有意に低い肺ウイルス力価を有した( $P < 0.001$ )。アジュバントなしでPa抗原+PreFをワクチン接種した群において、肺ウイルス力価の有意な低下( $P < 0.001$ )があったが、しかし、全ての動物からの肺においてウイルスを定量したが、この群の動物に、RSVチャレンジに対して完全な防御を示した動物はなかった。

20

30

【0240】

チャレンジ動物モデルを用い、我々は、Pa-RSV混合ワクチンが、RSVワクチンと同等の、RSVに対する防御的な免疫応答を惹起することを示した。この免疫応答は、RSV中和抗体の産生に関連していた。

【0241】

[実施例3] 混合ワクチンは、百日咳菌によるチャレンジに対して防御する

本実施例は、RSV(Pre-F)及び百日咳菌抗原(P<sub>T</sub>、F<sub>H</sub>A及びP<sub>R</sub>N)を含む混合ワクチンによって惹起される、百日咳菌(*Bordetella Pertussis*)に対する防御を実証する。混合Pa-RSVワクチンの2用量の免疫原性(中和抗体力価)を、Balb/cモデルにおいて評価し、その後、感染性百日咳菌による鼻腔内チャレンジを行って、この混合ワクチンの有効性を測定した。

40

【0242】

BALB/cマウスの群( $n = 20$ /群)を、皮下2回、3週間間隔で、表2に示した製剤によって免疫した。

【0243】

## 【表 2】

表 2: 百日咳菌 (*B. pertussis*) チャレンジの前に投与したワクチン製剤

ワクチン	PT (μg)	FHA (μg)	PRN (μg)	PreF (μg)	Al(OH) <sub>3</sub> (μg)	体積 (μL)	N
DTPa (1/4 HD)	6.25	6.25	2		125	125	20
Pa 単独	6.25	6.25	2	-	50	50	20
Pa-RSV	6.25	6.25	2	2	50	50	20
RSV 単独	-	-	-	2	50	50	20

10

## 【 0 2 4 4 】

全てのマウス由来の血清を、2回目免疫の7日後 (d 28 - チャレンジの前日) に個別に採取し、そして抗PT抗体、抗FHA抗体及び抗PRN IgG抗体の存在について試験した。簡潔にいうと、96ウェルプレートを、炭酸重炭酸塩緩衝液 (50 mM) 中のFHA (2 μg/ml)、PT (2 μg/ml) 若しくはPRN (6 μg/ml) にてコーティングし、4 にて一晩インキュベートした。PBS - BSA 1% 緩衝液による飽和ステップの後、マウス血清を、1/100にPBS - BSA 0.2% Tween 0.05% 中で希釈し、そしてプレートのウェル内に、連続的に希釈した (12希釈、ステップ1/2)。ペルオキシダーゼと結合した抗マウスIgGを添加した (1/5000希釈)。ペルオキシダーゼ基質 (OPDA) 添加後、呈色反応を観察し、そして吸光度測定法 (波長: 490 ~ 620 nm) による読み取りの前に、HCL 1Mで停止した。各プレート上に加えた試験した各血清及び標準について、4パラメーターロジスティック曲線を、ODと希釈との間の関係に適合させた (Softmax pro)。これは、各サンプル力価の導出を、STD力価で示した。ワクチンによって誘導されたPa抗原 (PT、FHA及びPRN) に特異的な血清学的抗体応答を、Paワクチンにおいて見出される個別の抗原に対してワクチンが抗体応答を惹起する能力を示すものである (しかし決定的なものではない) と考える。図6Aは、2回の免疫後、DTPa、Pa単独及びPa-RSV混合がPT、FHA及びPRNに特異的なIgG応答を促進したことを示す。ワクチン接種しなかったマウス若しくはRSVワクチン接種したマウス由来の血清中で、抗原特異的抗体が検出されなかった (データは表示せず)。統計学的分析は、DTPa (Infanrix) 及びPa-RSV混合によって誘導された抗PT抗体応答と抗FHA抗体応答との間が同等であることを実証した。Pa単独及びPa-RSV混合ワクチンによって誘導された抗PRN特異的抗体の量もまた、統計学的に同等であり、このことは、RSV抗原の存在が、抗百日咳抗体応答の産生に干渉しなかったことを実証した。

20

30

## 【 0 2 4 5 】

防御を実証するために、追加刺激の1週間後、マウスを、50 μlの細菌懸濁液 (約  $5 \times 10^6$  CFU/50 μl) の左鼻腔への点鼻によってチャレンジした。各群5匹のマウスを、細菌チャレンジの2時間後、2日後、5日後及び8日後に、安楽死させた。肺を、無菌的に採取し、個別にホモジナイズした。肺細菌クリアランスを、Bordet - Gengouアガープレート上のコロニー増殖を計数することによって測定した。データを、各処置群における各採取時点について、1つの肺あたりのコロニー形成単位の数の平均 (CFU - log 10) に従って、プロットした。使用した統計学的方法は、異質分散モデルを用いた、2つの因子 (処置及び日) によるlog 10値に対する分散分析 (ANOVA) である。

40

## 【 0 2 4 6 】

このモデルにおいて、無細胞百日咳菌ワクチン (Pa) は、マウスを、細菌による鼻腔内チャレンジから防御する。従って、この動物モデルは、百日咳菌ベースのワクチンが肺

50

における細菌クリアランスを媒介する能力を研究するために、有用である。単一ワクチン中の百日咳菌（P T、F H A及びP R N）抗原及びR S V（P r e - F）抗原の組み合わせを、鼻腔内チャレンジマウスモデルにおける防御有効性について試験した。典型的結果を、図6 Bに図示する。予測どおり、調整したヒト用量（市販のD T P aワクチンI n f a n r i xの4分の1用量）は、ワクチン接種なしのマウスと比較して、細菌クリアランスを効果的に促進した。P a単独及びP a - R S V混合ワクチンはまた、両方とも、細菌消滅に導く防御免疫応答を惹起し得る。予測どおり、P r e - F R S Vワクチン単独では、この動物モデルを、百日咳菌から防御できなかった。

【0247】

これらの結果は、上の実施例2において実証されたように、動物モデルにおいて、P a - R S V混合ワクチンが、百日咳菌に対して及びR S Vに対して、防御免疫応答を惹起したことを実証する。この免疫応答は、無細胞P aワクチンにおいて見出される3つのサブユニット抗原（P T、F H A及びP R N）に対する特異的抗体の産生に関連していた。

【0248】

[実施例4] モルモットモデルにおいて、妊娠雌親への混合P a - R S Vワクチンの投与はR S Vチャレンジからの仔の防御に干渉しない

【0249】

雌モルモット（N = 5 / 群）を、生R S Vウイルス（800 p f u）で鼻腔内にプライミングした。一群はプライミングしなかった。プライミングの翌日に交配を開始した。以下のワクチンの1つで、妊娠雌をプライミング後4週及び7週で（2用量レジメン）又はプライミング後7週で（単回用量レジメン）免疫した：水酸化アルミニウム（100 µ g）と混合した10 µ gのP r e F抗原、水酸化アルミニウム（130 µ g）と混合した10 µ gのP r e F抗原 + D T a P抗原（5 L fジフテリアトキソイド、2 L f破傷風トキソイド、5 µ g F H A、5 µ g不活化百日咳毒素、1.6 µ g P R N）、又は水酸化アルミニウム（100 µ g）と混合したD T a P抗原のみ（上記と同量）。それぞれ1回又は2回免疫した雌について、1回目又は2回目の免疫の14日後（プライミング後63日目）に血清サンプルを採取した。この時点（仔の出生前1～6週）で、抗R S V中和抗体のレベルを測定した。

【0250】

出生後24～72時間以内に後代から血清サンプルを採取した。5～18日齢の仔に、生R S Vを $2 \times 10^6$  p f uで用いて鼻腔内にチャレンジした。チャレンジの4日後、肺を採取してホモジナイズした。肺ホモジネート中のウイルス力価を測定し、肺1 g当たりの総ウイルス粒子を算出した。

【0251】

結果を図7及び8のグラフに示す。

【0252】

D T a P抗原のみで1回又は2回ワクチン接種した雌親（図7 Aの群3及び6）におけるR S V中和抗体力価はそれぞれ316及び272であった。これは、D T a P抗原をワクチン接種した非プライミング雌親（図7 Aの群7）ではR S V中和応答が実際なかったことから、R S Vプライミングによって誘導された力価を表す。R S Vでプライミングされ、D T a P抗原のみで1回又は2回ワクチン接種した雌親からの仔は、R S V中和力価がそれぞれ425及び563（図7 Bの群3及び6）であり、生R S Vプライミングに起因して後代に移行した中和抗体のレベルを表している。これらの中和抗体力価は、仔においてR S Vチャレンジから完全な防御を誘導するのに十分であった（図8）。

【0253】

生R S Vプライミングと、P r e Fワクチンのみの単回用量（図7 Aの群1）又はP r e F及びD T a P抗原の混合用量（図7 Bの群2）のいずれかの後の雌親において誘導された中和抗体のレベルを比較すると、中和抗体力価に有意な差は観察されない。このことは、R S V中和抗体応答に対するD T a Pワクチンの干渉がないことを示す。仔の中和抗体力価についても同様の観察結果が得られる（図7 Bの群1と2を比較する）。しかし、

10

20

30

40

50

プライミングされた雌親が混合 P r e F 及び D T a P 抗原の 2 用量を受けた場合、この雌親における R S V 中和力価は、P r e F ワクチン接種のみの後に得られた力価よりも低かったが、この差は統計学的有意性には達しなかった（混合 P r e F - D T a P ワクチン対 P r e F 単独ワクチン後の力価はそれぞれ 8 3 2 対 1 5 9 0。図 7 A の群 4 及び 5）。2 用量の混合 P r e F - D T a P ワクチンで雌親にワクチン接種した場合の仔に移行した中和抗体のレベルは、P r e F 単独ワクチンで 2 回雌親にワクチン接種した場合に観察されたレベルよりも有意に低かった（併用 P r e F - D T a P ワクチン対 P r e F 単独ワクチン後の力価はそれぞれ 5 1 9 対 2 4 3 9。図 7 B の群 4 及び 5）。これらの結果は、単回用量の混合 D T a P - R S V ワクチンによる母体ワクチン接種が、仔に移行した R S V 中和抗体のレベルに干渉を生じないのに対し、混合 D T a P - R S V による 2 用量の母体ワ

10

【 0 2 5 4 】

モルモット子孫における肺ウイルス負荷からの結果（図 8）は、プライミングしワクチン接種した母に生まれた子孫が、雌親に使用したワクチンレジメンにかかわらず、R S V チャレンジから完全に防御されたことを示す。プライミングし D T a P 抗原単独（R S V 抗原なし）でワクチン接種した動物は、R S V チャレンジから完全に防御されたが、プライミングせず D T a P 抗原単独でワクチン接種した動物は防御されなかったという事実は、生 R S V によるプライミングが、プライミング後に使用するワクチンレジメンに関係なく、子孫に移行した抗体の防御レベルを誘導するのに十分であることを示唆している。2

20

【 0 2 5 5 】

配列表

配列番号1

RSV基準融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列

A2株 GenBankアクセス番号U50362

```

atggagtgctaatcctcaaagcaaatgcaattaccacaatcctcactgcagtcacatttgttttgcttctgggtcaaac
atcactgaagaat t t t atcaatcaacatgcagtagcagtagcaaggctatcttagtgctctgagaactggttggtaacc
agtggtataactatagat taagtaatacaaggaaaaaagtgtaatggaacagatgctaaggtaaaat tgataaacaag
aat tagataaaataaaaaatgctgtaacagaat tgcagttgctcatgcaaagcaccagcaacaaacaatcgagccagaa
gagaactaccaaggt t t atgaat t atacactcaaaaatgccaaaaaaccaatgtaacat taagcaagaaaaggaaaagaa
gatttcttgggt t t t t g t t a g g t g t t g g a t c t g c a a t c g c c a g t g g c g t g c t g t a t c t a a g g t c c t g c a c c t g a a g g g g a
agtgaacaagatcaaaagtgtctactatccacaacaaggctgtagtcagttatcaaatggagttagtgctt taaccag
caaagtgtagacctcaaaaactatataagaaaacaat t g t t a c c t a t t g t g a a c a a g c a a a g c t g c a g c a t a t c a a a t a t
agcaactgtatagagttccaacaaaagaacaacagactactagagat taccaggaat t t a g t g t t a a g c a g g t g t a a c t
acacctgtaagcacttacctgttaactaatagtgaaat t a t t g t c a t t a t c a a t g a t a t g c c t a t a a c a a a t g a t c a g a a
aag t a a t g t c c a a c a a t g t t c a a a t g t t a g a c a g c a a a g t t a c t c t a t c a t g t c c a t a a t a a a a g a g g a a g t c t t a g c a
tatgtgtacaat t a c c a c t a t a t g g t g t t a t a g a t a c a c c c t g t t g g a a a c t a c a c a c a t c c c c c t a t g t a c a c c a a c a
caaaagaaggg t c c a a c a t c t g t t t a a c a a g a a c t g a c a g a g g t g g t a c t g t g a c a a t g c a g g a t c a g t a t c t t t c t t c c
cacaagctgaaacatgtaaaagtaacaaatcgagtat t t t g t g a c a c a a t g a a c a g t t t a a c a t t a c c a a g t g a a g t a a
actctgcaatgttgacata t t c a a c c c c a a a t a t g a t t g t a a a a t t a t g a c t t c a a a a a c g a t g t a a g c a g c t c c g t t a t
cacatctctaggagccat t g t g t c a t g c t a t g g c a a a c a a a t g t a c a g c a t c c a a t a a a a a t c g t g g a a t c a t a a a g a c
at t t t c t a a c g g g t g c g a t a t g t a t c a a a t a a a g g g g t g g a c a c t g t g t c t g t a g g t a a c a c a t t a t a t t a t g t a a a a a g
caagaaggtaaaag t c t c t a t g t a a a a g g t g a a c c a a t a t a a a t t t c t a t g a c c c t t a g t a t t c c c c t c t g a t g a a t t t
gatgcatcaatatctcaagtcaacgagaagat taacagagcctagcatttat t c g t a a a t c c g a t g a a t t a t t a c a t a a t
gtaaatgctggtaatccaccataaatatcatgataactactataat t a t a g t g a t t a t a g t a a t a t g t t a t c t t a a t g t
ctgttgactgctcttatactgt a a g g c c a g a a g c a c a c c a g t c a c a c t a a g a a g a t c a a c t g a g t g g t a t a a a t a a t a
ttgcat t t a g t a a c t a a

```

30

40

50

【 0 2 5 6 】

配列番号2

RSV基準Fタンパク質前駆体F<sub>0</sub>のアミノ酸配列

A2株 GenBankアクセション番号AAB86664

Mellilkanaittltavtfcfasgqni teefyqstcsavskgylsalrtgwytsvit ielsnikenkngtdakvkl i k  
qeldkyknave lql lmqstpatnrrarrelprfmnyt lnnakktntv lskkrkr rrlgl l lgvgsaiasgvavskvlhl  
egevnikisallstnkavvs lsnvsv ltskvl d l kny idkql l pivnkqscs isniatviefqqknr lleitrefsvn  
agvttpvstym l nsel lsl indmpi tndqkklmsnnvqivrqqsysims iikeevlayvvqlplygvidtpcwklhtsp  
lctntkegsnicl trtdrgwycdnagsvsffpqaetckvqsnrvfcdtmnsl tlpsevn lcnvdi fnpkydckimtsk t  
dvsssvit slgaivscygtkctasnknrgi iktfngcdyvsnkgvdtvsvgn tlyyvnkqegkslyvkgepi infydp  
lvfpsdefdas isqvnekinqslafirkdel lhnvnagkstinimittiiivillsl iavgl llyckarstpv t l s  
kdqlsginniafsn

10

【 0 2 5 7 】

配列番号3

RSV基準Gタンパク質をコードするヌクレオチド配列

Long株

Atgtccaaaaacaaggaccaacgcaccgctaagacactagaaaagacctgggacactctcaatcatttat t at t catatc  
atcgggcttatataag taaatcttaaatctatagcacaatcacat t atccatctggcaatgataatctcaact t cac  
t tataat tacagccatc at at tcatagcctcggcaaaccacaaag t c a c a c t a a c a a c t g c a a t c a t a c a a g a t g c a a c a  
agccagatcaagaacacaaccccaacataacctcactcaggatcctcagcttggaatcagcttctccaatctgtctgaaat  
t acatcacaaccaccacatactagcttcaacaacaccaggagtcaagtcaaacc t g c a a c c c a c a a c a g t c a a g a c t a  
aaaacacaacaacaaccccaacacaacccagcaagcccactacaaaacaacgccaacaaaccaccaacaaacccaat  
aatgat t t t c a c t t c g a a g t g t t a a c t t t g t a c c c t g c a g c a t a t g c a g c a a c a a t c c a a c c t g c t g g g c t a t c t g c a a  
aagaa t a c c a a a c a a a a a a c c a g g a a g a a a a c c a c c a c c a a g c c t a c a a a a a a c c a a c c t t c a a g a c a c c a a a a a g  
atctcaaacctcaaaccactaaaccaaaggaagtaccaccaccaagcccacagaagagccaacatcaacaccacaaaa  
acaacatcacaactacactgctcaccaacaacaccacaggaatccaaaactcacaagtcaaatggaaaccttccactc  
aacctcctccgaaggcaatctaagcccttctcaagcttccacaacatccgagcaccatcacaacctcatctccacca  
acacaacacgcccagtag

20

【 0 2 5 8 】

配列番号4

RSV基準Gタンパク質のアミノ酸配列

MSKNKDQRTAKTLEKTWDTLNHLLF I S S G L Y K L N L K S I A Q I T L S I L A M I I S T S L I I T A I I F I A S A N H K V T L T T A I I Q D A T  
S Q I K N T T P T Y L T Q D P Q L G I S F S N L S E I T S Q T T T I L A S T T P G V K S N L Q P T T V K T K N T T T T Q T Q P S K P T T K Q R Q N K P P N K P N  
N D F H F E V F N F V P C S I C S N N P T C W A I C K R I P N K K P G K T T T K P T K K P T F K T T K D L K P Q T T K P K E V P T T K P T E E P T I N T T K  
T N I T T T L L T N N T T G N P K L T S Q M E T F H S T S S E G N L S P S Q V S T T S E H P S Q P S S P P N T T R Q

30

【 0 2 5 9 】

配列番号5

CHOのために最適化されたPreF類似体をコードするヌクレオチド配列

aagcttgccaccatggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccgccatcctggccgctgaccctgtgcttgc  
ctctcccagaacatcaccgaggagtctaccagttccactgctccgccgtgtccaagggtacctgtccgccc tgcgga  
ccggctggtagacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcaccgacgccaagggtg  
aagctgatacaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctgatgcagttccacctgcccac  
caacaacaagttctgggcttctgctgggctggtgctccgcatcgctccggcatcgccgtgagcaagggtgtgcacc  
tggagggcgagggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgtgtcc  
gtgtgacctccaaggtgtggaatctgaagaactacatcgacaagcagctgtgtccatctcgtgaacaagcagttctgtc  
catctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgtggagatcaccgaggttctccgtga  
acgcccggctgaccacccctgtgtccacctacatgtgaccaactccgagctgtgtccctgatcaacgacatgctatc  
accaacgaccagaaaaaac t g a t g t c c a a c a a c g t g c a g a t c g t g c g g c a g c a g t c c t a c a g c a t c a t g a g c a t c a t c a a  
ggaagaggtgtggcctacgtgggtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacaccccttctgtggaagctgcacacctccc  
ccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcttgaccggaccgaccggggctgggtactgcgacaacgcc

40

50

ggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagtccaaccgggtgttctcgacacacatgaactccct  
gacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtagcactgcaagatcatgaccagcaaga  
ccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctgggcgccaatcggtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgctccaac  
aagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtaggacaccgtgtccgtggg  
caacacactgtactacgtgaaataagcaggagggaagagccgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgacc  
ctctgggtgttcccttccgacgagttcgacgacctccatcagccaggtagaacgagaagatacaaccagtccctggccttcatc  
cggaagtcgacgagaagctgcaataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacga  
gatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggcctgataatctaga

【 0 2 6 0 】

配列番号6

10

PreF類似体のアミノ酸配列

MELLILKTNAITAIIAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIK  
QELDKYKSAVTELLMQSTPATNNKFLGFLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTS  
KVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLIETREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQ  
KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
FFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAVSCYGTKTCTASNKNRG  
IIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD  
EKLHNVEDKIEELSKIYHIENEIARIKKLIGEA

【 0 2 6 1 】

配列番号7

20

CHOのために最適化されたPreFG\_V1をコードするヌクレオチド配列

aagcttgccacatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcaccgccatcctggccgctgacctgtgcttgcg  
ctcctcccagaacatcacccaagagtctaccagtccacctgctccgccgtgtccaagggctacctgtccgcccgtcgga  
ccggctggtagacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaagaaaacaagtgcaacggcaccgacgccaaggtc  
aagctgatacaagcaggaactggacaagtagacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctgatgcagtagcccccgtccac  
caacaacaagaagtttctgggcttctgctgggctgggctccgccaatcgctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgc  
acctggaggggcgaggtgaacaagatacaagagcgccctgctgtccaccaacaaggcctgggtgctcctgtccaacggcggtg  
tccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgctatcgtagacaagcagctcctg  
ctccaatccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcacccgaggttctccg  
tgaacgcccggctgaccacccctgtgtccacctacatgctgacaaactccgagctgcttccctgatcaacgacatgctt  
atcaccaacgacccaaaaaagctgatgtccaacaacgtgcagatcgtagggcagcagctctacagcatcatgagcatcat  
caaggaagaagttcctggcctacgtcgtagcagctgcttctgtagggcgtgatcgacaccccttgcagggaagctgcacacct  
ccccctgtgcaccaccaacaccaagagggtccaacatctgctgaccggaccgaccggggctggtagctgcgacaac  
gccggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagtagcaaccgggtgttctgagacacatgaactc  
cctgacctgacctccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtagcactgcaagatcatgaccagca  
agaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctcccgggcgccaatcggtgtcctgctacggcaagaccaagtagcaccgctcc  
aacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtaggacaccgtgtccgt  
gggcaacacactgtactacgtgaaataagcaggaaggcaagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacg  
accctctgggtgttcccttccgacgagttcgacgacctccatcagccaggtagaacgagaagatacaaccagtccctggcctt  
atccggaagtcgacgagaagctgcaataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaa  
cgagatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggctggcggctctggcggcagcggcggctccaagcagcggcagaaca  
agcctcttaacaagcccaacaacgacttccacttccgaggtgttcaacttctgctgcttgcctcatctgctccaacaacct  
acctgctgggccaatctgcaagagaatccccacaagaagcctgggaagaaaaccaccaccaagcctaccaagaagcttac  
cttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccacaaagcctaaggaagtgccaaccaccaagcaccaccacctc  
accactgataatcta

【 0 2 6 2 】

配列番号8

40

CHOのためのPreFG\_V1ペプチド

MELLILKTNAITAIIAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIK  
QELDKYKSAVTELLMQSTPATNNKFLGFLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTS

50

SKVLDLKNYIDKQLLP|V NKQSCS|SN|ETV|EFQQKNNRLL|ETREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSL|NDMP|TND  
 QKKLMSNNVQ|VRQSYS|MS|I|KEEVLAYVVQLPLYGV|DTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSN|CLTRTRDRGWYCDNAGSV  
 SFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCN|D|FNPKYDCK|IMTSKTDVSSSV|TSLGA|VSCYGKTKCTASNKNR  
 GI|KTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI|INFYDPLVFPSEFDAS|SQVNEK|NQSLAF|RKS  
 DEKLHNVEDK|IEE|LSKIYHIENE|AR|KKL|GEAGSGSGSGSKQRQNKPPNPNDFHFEVFNFPVPCS|CSNNPTCWA  
 I|CKR|PNKPKGKTTTKPTTKPTFKTTKDHKPQTTKPKEVPTTK

【 0 2 6 3 】

配列番号9

CHOのためのPreFG\_V2をコードするヌクレオチド配列

aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcaccgccatcctggccgcgctgacctgtgcttcgc  
 ctctcccagaacatcaccgaagagtctaccagtcaccctgctccgcccgtgtccaagggtacctgtccgccctgcgga  
 ccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaagaaaacaagtgaacggcaccgacgccaaggtc  
 aagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctgatgcagtcacccccgtccac  
 caacaacaagaagttctgggcttctgctgggctgggctccgccatcgccctccggcatcgccgtgagcaagggtgctgc  
 acctggaggggcaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgtg  
 tccgtgctgacctccaagggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgctatcggtgaacaagcagtcctg  
 ctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccggcaggtctccg  
 tgaacgcccggctgaccacccctgtgtccacctacatgctgacaaactccgagctgctctccctgatcaacgacatgctt  
 atcaccacgaccaaataaagctgatgtccaacaacgtgcagatcgctgcccagcagctctacagcatcatgagcatcat  
 caaggaagaagctcctggcctacgtcgctgagctgctctgtacggcgtgatcgacaccccttgctggaagctgcacacct  
 ccccccgtgacaccaccaacaccaaagagggtccaacatctgctgacccggaccgaccggggctggtactgacgacaac  
 gccggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagctccaaccgggtgtctgacgacaccaagaactc  
 cctgacctgacctccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatctcaacccaagtacgactgcaagatcatgaccagca  
 agaccgagctgctccagcgtgatcacctcccgggcccacgtgctcctgctacggcaagaccaagtgaccggctcc  
 aacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtggacaccgtgtccgt  
 gggcaacacactgtactacgtgaaataagcaggaaggcaagacctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaactctacg  
 acctctgggtgtcccttccgacgagttcgacgacctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagctccctggccttc  
 atccggaagtcgacgagaagctgataaacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaa  
 cgagatcgcccggatcaagaagctgatcgggcagggctggcggcaagcagcggcagaacaagcctcctaacaagcccaaca  
 acgacttccacttccgaggtgttcaacttctgctgcttgcctcctgctccaacaacctaccgtgtgggccaactgcaag  
 agaatcccaacaagaagcctggcaagaaaaccaccaccaagcctaccaagaagcctaccttcaagaccaccaagaagga  
 ccacaagcctcagaccacaaagcctaaggaagtgccaccaccaagcaccaccacatcaccactgataatctat

【 0 2 6 4 】

配列番号10

CHOのためのPreFG\_V2ペプチド

MELL|LKTNA|ITA|LAAVTLCFASSQN|TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSV|IT|ELSN|KENKCN|GTD|AKV|K|K  
 QELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNKKFLGLLGVGSA|ASG|AVSKVLHLEGEV|NK|KSALLSTNKAVVSL|SNGVSVLT  
 SKVLDLKNYIDKQLLP|V NKQSCS|SN|ETV|EFQQKNNRLL|ETREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSL|NDMP|TND  
 QKKLMSNNVQ|VRQSYS|MS|I|KEEVLAYVVQLPLYGV|DTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSN|CLTRTRDRGWYCDNAGSV  
 SFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCN|D|FNPKYDCK|IMTSKTDVSSSV|TSLGA|VSCYGKTKCTASNKNR  
 GI|KTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI|INFYDPLVFPSEFDAS|SQVNEK|NQSLAF|RKS  
 DEKLHNVEDK|IEE|LSKIYHIENE|AR|KKL|GEAGGKQRQNKPPNPNDFHFEVFNFPVPCS|CSNNPTCWA|CKR|PN  
 KKGKKT|TTTKPTTKPTFKTTKDHKPQTTKPKEVPTTK

【 0 2 6 5 】

配列番号11

コイルドコイルの例 (イソロイシンジッパー)

EDKIEE|LSKIYHIENE|AR|IKKL|GEA

【 0 2 6 6 】

配列番号12

PreF抗原ポリヌクレオチド CHO2

10  
20  
30  
40  
50

atggagctgccatcctgaagaccaacgccatcaccaccaatcctcgccgcccgtgacctgtgcttcgccagcagccagaa  
 catcacggaggagtctaccagagcacgtgcagcggcgtgagcaagggtacctgagcgcgtgcgcacgggtggtaca  
 cgagcgtgatcacgatcgagctgagcaacatcaaggagaacaagtgaacggcacggacgcaagggtgaagctgatacaag  
 caggagctggacaagtaagagcgcgggtgacggagctgcagctgctgatgcagagcacgccggcgacgaacaacaagt  
 cctcggctcctgctggggcgtgggcagcgcgatcgcgagcggcatcgccgtgagcaaggctgctgcacctggagggcgagg  
 tgaacaagatacaagctccgcgctgctgagcacgaacaaggcggctcgtagcctgagcaacggcgtgagcgtgctgacgagc  
 aaggctgctgcacctgaagaactacatcgacaagcagctgctgccgatcgtagaacaagcagagctgcagcatcagcaacat  
 cgagaccgtgatcgagctccagcagaagaacaaccgctgctggagatcacgcgggagtctccgtgaacgcaggcgtga  
 cgacgccgtgctacgtacatgctgacgaacagcagctgctcagccgatcaacgacatgccgatcacgaacgaccag  
 aagaagctgatgagcaacaacgtgcagatcgtagcggcagcagctacagcatcatgagcatcatcaaggaggagggtgct  
 ggcatacgtggtagcgtgccgctgtacggcgtcatcgacacgccctgctggaagctgcacacgagcccgtgctgcacga  
 ccaacacgaaggagggcagcaacatcctgctgacgcggacggaccggggctggtagctgcgacaacgcgggcagctgagc  
 tctctccgctcgccggagagctgcaaggctgagagcaaccgctctctgcgacacgataaacagcctgacgctgccgag  
 cgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccgaagtagcactgcaagatcatgacgagcaagaccgatgtagca  
 gcagcgtgatcacgagcctcggcgcgatcgtagcgtctacggcaagacgaagtgacggcgagcaacaagaaccgcggc  
 atcatcaagacgttagcaacggctgcgactatgtgagcaacaaggcgtggacactgtgagcgtcggcaacacgctgta  
 ctacgtgaacaagcaggagggcaagaccgttagctgaaggcgagccgatcatcaactctacgaccgctcggttcc  
 cgagcgacgagctgcagcgcgagcatcagccaagtgaaacgagaagatacaaccagaccctggcgttcatccgcaagagcgac  
 gagaagctgcacaacgtggaggacaagatcgaggagatcctgagcaagatactaccacatcgagaacgagatcgcgcgcat  
 caagaagctgatcgggcaggcgcatcatcaccatcaccatgga

10  
20

【 0 2 6 7 】

配列番号13

PreF抗原ポリヌクレオチド（イントロンあり）

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacccccaatcctggccgcccgtgacctgtgcttcgcctcctcccagaa  
 catcacccgaggagtctaccagctccacctgctccgcccgtgtccaagggtacctgtccgcccgcggaccggctggtaca  
 cctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcacccgacgccaagggtgaagctgatacaag  
 caggagctggacaagtaagagcgcgggtgaccgaactccagctgctgatgcagctccaccccgccaccaacaacaagt  
 tctgggctcctgctggggcgtgggctccgccaatcgccctccggcatcgccgtgagcaaggtagctgctgggactgtgttc  
 cccttttttaataaaaagtataatctttaatgtatatacatatctcctgtatgtgacatgctttagactttgtt  
 tatcatgtgtttagggtgctgcacctggagggcgagggtgaacaagatacaagagcgcctgctgtccaccaacaaggcgtg  
 gtgtcccgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcc  
 tatcgtgaacaagcagctcctgctccaatcccaacatcgagaccgtgatcgagctccagcagaagaacaaccggctgctgg  
 agatcaccccgagttctccgtgaacgcggcgtgaccaccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctg  
 tcccgtatcaacgacatgccatcaccaacgaccagaaaaaacatgatgtccaacaacgtgcagatcgtagggcagcagctc  
 ctacagcatcatgagcatcatcaaggaagagggtgctggcctacgtggtagcagctgctctgtacggcgtgatcgacacc  
 ctgtcgggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggctccaacatcctgctgaccggaccgac  
 cggggctggtagctgcgacaacgccggctccgtgtcctctctccctctggccgagacctgcaaggctgagctccaaccgggt  
 gtctgcgacacatgaactcccgtgacctgacctccgaggtagacctgtgcaacatcgacatcttcaacccaagtag  
 actgcaagatcatgaccagcaagaccgagctgtcctccagcgtgatcacctcccggcgccatcggtgtcctgctacggc  
 aagaccaagtgaccgctccaacaagaaccggggaatcataagacctctccaacggctgcgactacgtgtccaataa  
 gggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggcaagaccgttagctgaaggggc  
 agcctatcatcaactctacgacctctgggtgttccctccgacgagctcgacgctccatcagccagggtgaacgagaag  
 atcaaccagctcccggccttcatccggaagctccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtc  
 caaaaatcaccacatcgagaacgagatcgcccggatcaagaagctgatcgggcaggccggagggtcaccaccaccaacc  
 actga

30  
40

【 0 2 6 8 】

配列番号14

合成リンカー配列

GGSGSGGS

【 0 2 6 9 】

50

配列番号15

フーリン切断部位

RARR

【 0 2 7 0 】

配列番号16

フーリン切断部位

RKRR

【 0 2 7 1 】

配列番号17

PreF\_NGTLをコードするヌクレオチド配列

10

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccgccatcctggccgccgtgacctgtgcttcgcctcctccagaa  
 catcaccgaggagtctaccagtcacctgctccgccgtgtccaagggctacctgtccgccctgctggaccggctggtaca  
 cctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaagggaaacaagtgaacggcaccgacgccaaggatgaagctgatacaag  
 caggagctggacaagtaacaagagcggctgaccgaactccagctgctgatgcagtcacccccgccaccaacaacaagt  
 tctgggcttctgctgggctgggctccgccatcgccctccggcatcgccgtgagcaagggtgtgcacctggagggcgagg  
 tgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtgggtgctccctgtccaacggcggtgctccgtgctgacctcc  
 aaggctgtggatctgaagaactacatcgacaagcagctgtgcctatcgatgaacaagcagctcctgctccatctccaacat  
 cgagaccgtgatcgagctccagcagaagaacaaccggctgtggagatcaccggcgagttctccgtgaacggcggtgga  
 ccacctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgtgtcccctgatcaacgacatgcttatcaccacgaccag  
 aaaaaactgatgtccaacaactgagatcgctggcgagcagctctacagcatcatgagcatcatcaaggaagagggtgt  
 ggctacgtgggtgcagctgcttctgtacggcgatcgacaccttctgtggaagctgcacacctccccctgtgcacca  
 ccaacaccaaggagggtccaacatctgctgaccggaccgaccggggctggtactgcgacaacgcccgtccgtgtcc  
 tcttccctctggccgagacctgcaaggctgcagctccaaccgggtgttctgcgacacctgaactccctgacctgcttcc  
 cgaggatgaacctgtgcaacatcgacatcttcaacccaagctacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgagctgtcct  
 ccagcgtgatcaccctccctgggcgccatcggtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgctccaacaagaaccgggga  
 atcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaaatagggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgta  
 ctacgtgaataagcaggagggaagacctgtacgtgaagggcgagccatcatcaacttctacgacctctgggtgttcc  
 ctccgacgagctcgacgctccaatcagccaggtgaacgagaagatcaacgggacctggccttcatccggaagctccgac  
 gagaagctgataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccggat  
 caagaagctgatcgggcaggcc

20

30

【 0 2 7 2 】

配列番号18

PreF\_NGTLのアミノ酸配列

MELLILKTAIITAIIAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIK  
 QELDKYKSAVTELLMQSTPATNNKFLGLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNVSVLTS  
 KVLDLKNIIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLIETREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQ  
 KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLTHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGTKTCTASKNRGI  
 IKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINGTLAFIRKSD  
 EKLHNVEDKIEELSKIYHIENEIARIKKLIGEA

40

【 0 2 7 3 】

配列番号19

PreF\_L112Qをコードするヌクレオチド配列

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccgccatcctggccgccgtgacctgtgcttcgcctcctccagaa  
 catcaccgaggagtctaccagtcacctgctccgccgtgtccaagggctacctgtccgccctgctggaccggctggtaca  
 cctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaagggaaacaagtgaacggcaccgacgccaaggatgaagctgatacaag  
 caggagctggacaagtaacaagagcggctgaccgaactccagctgctgatgcagtcacccccgccaccaacaacaagt  
 tctgggcttctgctgggctgggctccgccatcgccctccggcatcgccgtgagcaagggtgtgcacctggagggcgagg  
 tgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtgggtgctccctgtccaacggcggtgctccgtgctgacctcc  
 aaggctgtggatctgaagaactacatcgacaagcagctgtgcctatcgatgaacaagcagctcctgctccatctccaacat

50

cgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcacccgaggttctccgtgaacgccggcgtga  
 ccacccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgacctaccacacgaccag  
 aaaaaactgatgtccaacaactgcagatcgtgcccgcagcagctctacagcatcagagcatcatcaaggaagaggtgct  
 ggcttacgtggcgcagctgacctgttacggcgatcgacaccccttgctggaagctgcacacctccccctgtgacca  
 ccaacaccaaggagggtccaacatctgacctgacccggaccgaccggggctggtactgcgacaacgccggctccgtgtcc  
 tcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagttcaaccgggtgtctgacacacatgaactccctgacctgacctc  
 cgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaacccaagtacgactgcaagatcagaccagcaagaccgacgtgctcct  
 ccagcgtgatcacctccctggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgccccaacaagaaccgggga  
 atcatcaagaccttctccaacggctgacgactacgtgtccaa taagggcgaggacacctgtccgtgggcaacacac tga  
 ctacgtgaataagcaggagggaagacctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaactctacgacctctgggtgtcc  
 ctccgacgagttcgacgacctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtcctggcctcatccggaagtcgac  
 gagaagctgcaaacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaa tctaccacatcgagaacgagatcgcccggat  
 caagaagctgatcggcgaggcc

10

【 0 2 7 4 】

配列番号20

PreF\_L112Qのアミノ酸配列

MELLILKTNAITAIIAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNNGTDAKVKLIK  
 QELDKYKSAVTELLQMQSTPATNNKFLGFLQGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIK SALLSTNKAVVSLSNVSVLTS  
 KVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLIETREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQ  
 KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLTSPCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGTKTCTASNKNRG  
 IIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD  
 EKLHNVEDKIEELSKIYHIENEIARIKKLIGEA

20

【 0 2 7 5 】

配列番号21

PreF\_NGTL\_L112Qをコードするヌクレオチド配列

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacccgcatcctggccgcccgtgacctgtgcttcgacctcctcccagaa  
 catcaccgaggagttctaccagttccacctgctccgcccgtgtccaagggctacctgtccgcccgcggaccggctggtaca  
 cctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgcaacggcaccgacgccaaggtgaagctgatcaag  
 caggagctggacaagtaacaagagcggctgaccgaactccagctgctgatgcagctccacccctgccaccaacaacaagt  
 tctgggcttctcctgcagggcggtggctccgacctcgctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgagg  
 tgaacaagatcaagagcggctgctgtccaccaacaaggccgtgggtgctcctgtccaacggcggtgctccgtgctgacctcc  
 aaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgacctatcgtaacaagcagctcctgctccatctccaacat  
 cgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcacccgaggttctccgtgaacgccggcgtga  
 ccacccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgacctaccacacgaccag  
 aaaaaactgatgtccaacaactgcagatcgtgcccgcagcagctctacagcatcagagcatcatcaaggaagaggtgct  
 ggcttacgtggcgcagctgacctgttacggcgatcgacaccccttgctggaagctgcacacctccccctgtgacca  
 ccaacaccaaggagggtccaacatctgacctgacccggaccgaccggggctggtactgcgacaacgccggctccgtgtcc  
 tcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagttcaaccgggtgtctgacacacatgaactccctgacctgacctc  
 cgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaacccaagtacgactgcaagatcagaccagcaagaccgacgtgctcct  
 ccagcgtgatcacctccctggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgccccaacaagaaccgggga  
 atcatcaagaccttctccaacggctgacgactacgtgtccaa taagggcgaggacacctgtccgtgggcaacacac tga  
 ctacgtgaataagcaggagggaagacctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaactctacgacctctgggtgtcc  
 ctccgacgagttcgacgacctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccggacctggcctcatccggaagtcgac  
 gagaagctgcaaacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaa tctaccacatcgagaacgagatcgcccggat  
 caagaagctgatcggcgaggcc

30

40

【 0 2 7 6 】

配列番号22

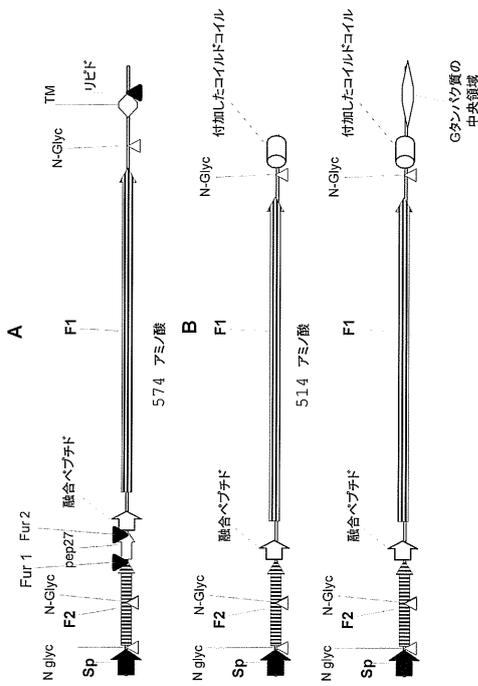
PreF\_NGTL\_L112Qのアミノ酸配列

MELLILKTNAITAIIAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNNGTDAKVKLIK

50

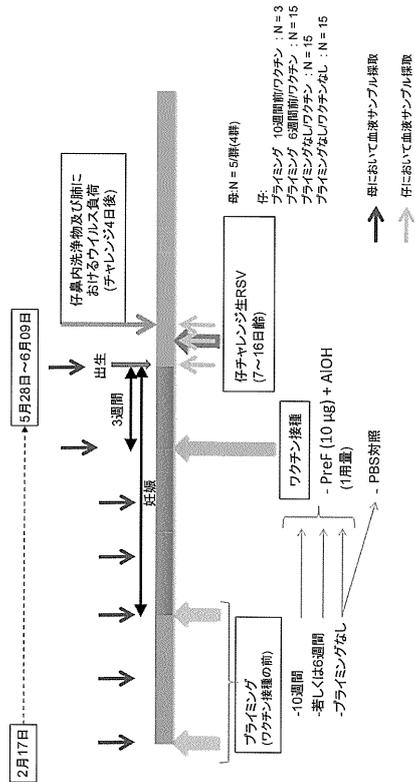
QELDKYKSAVTEQLQLMQSTPATNNKFLGFLQGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTS  
 KVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLIETREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQ  
 KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS  
 FFPLAETCKVQSNRVFCDTMSLTLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGTKKCTASNKNRG  
 IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPINFDPLVFPSEDFDASISQVNEKINGTLAFIRKSD  
 EKLHNVEDKIEELSKIYHIENEIARIKKLIGEA

【 図 1 】



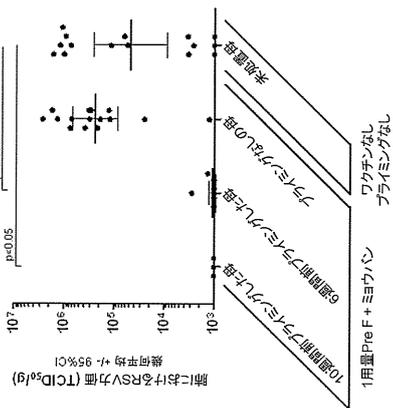
【 図 2 】

実施例1において実施されたモルモット実験についての研究設計



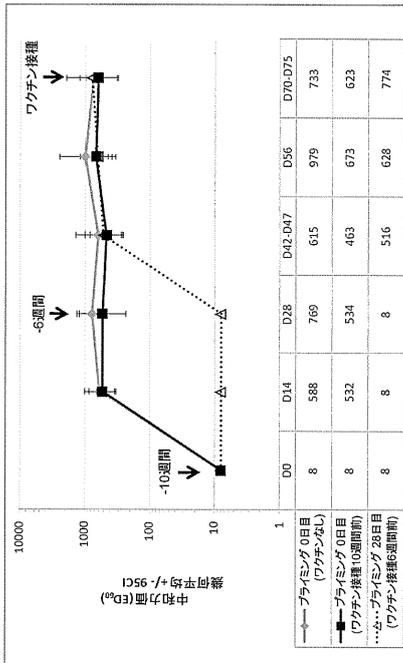
【図 3】

実施例1において実施したRSVチャレンジからのモルモット仔の防御

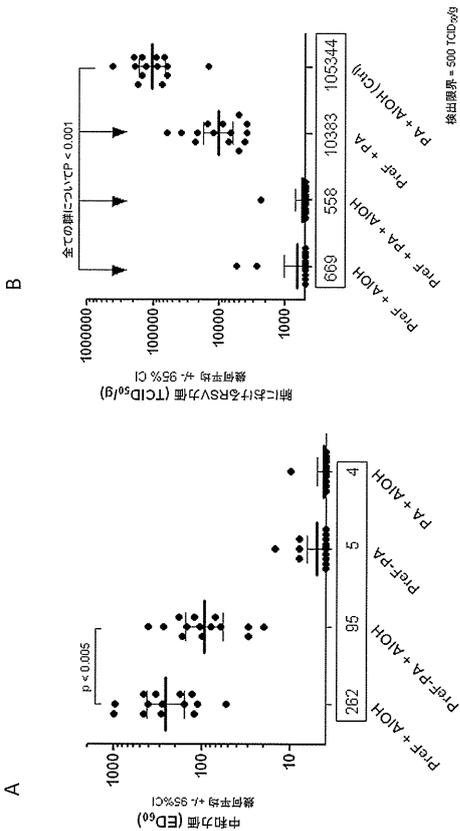


【図 4】

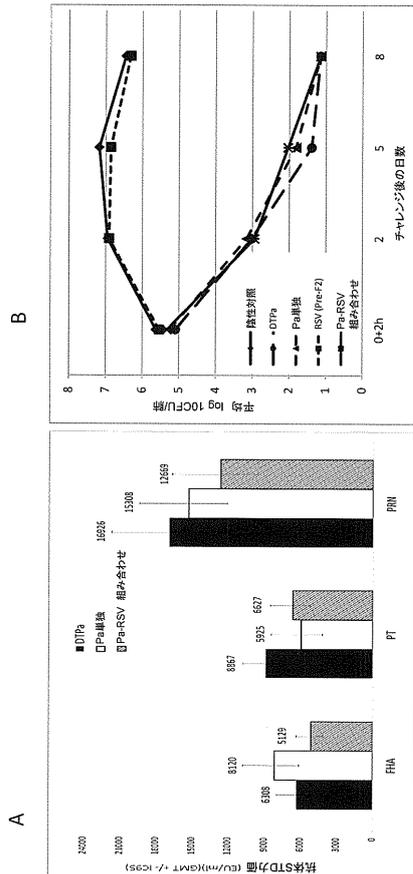
実施例1におけるモルモットモザルにおけるブライミン後(ワクチン接種前)の中和抗体応答の時間経過



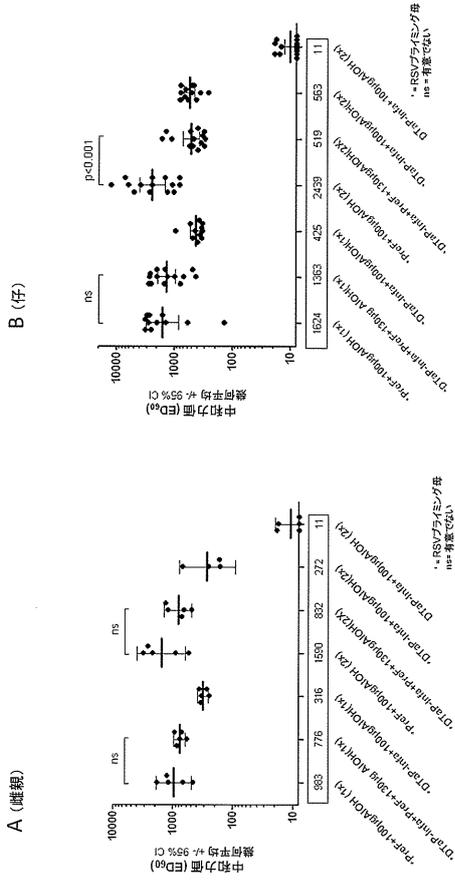
【図 5】



【図 6】



【 図 7 】

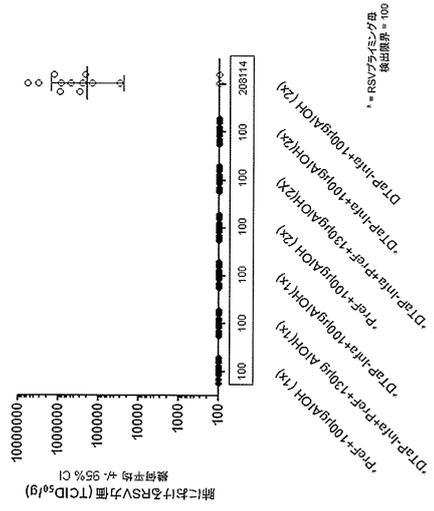


【 配列表 】

0006564367000001.app

【 図 8 】

実施例4において実施されたRSVチャレンジからのモルモット仔の防御



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
C 0 7 K	14/115	(2006.01)	C 0 7 K	14/115	Z N A
C 0 7 K	14/235	(2006.01)	C 0 7 K	14/235	
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	

## 前置審査

- (72)発明者 テーママン, ステファン ティー .  
ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72)発明者 トゥーサン, ジャン - フランソワ  
ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

審査官 菊池 美香

- (56)参考文献 特表2012-530504(JP,A)  
特表2012-506421(JP,A)  
国際公開第2005/032584(WO,A2)  
特表2015-525794(JP,A)  
Clinical Obstetrics and Gynecology, 2012年 6月  
, Vol. 55, No. 2, p474-486

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 1 5 5  
A 6 1 K 3 9 / 1 0  
A 6 1 K 3 9 / 3 9  
A 6 1 P 1 1 / 0 0  
A 6 1 P 3 1 / 0 4  
A 6 1 P 3 1 / 1 4  
C 0 7 K 1 4 / 1 1 5  
C 0 7 K 1 4 / 2 3 5  
C 1 2 N 1 5 / 0 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )