



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201617363 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 16 日

(21) 申請案號：104130047 (22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 09 月 11 日

(51) Int. Cl. : C07K14/135 (2006.01) C12N15/62 (2006.01)
 C12N15/45 (2006.01) A61K39/125 (2006.01)

(30) 優先權：2014/09/12 美國 62/049,705

(71) 申請人：R S V 公司 (美國) RSV CORPORATION (US)
 美國
 艾默瑞大學 (美國) EMORY UNIVERSITY (US)
 美國

(72) 發明人：斯特格曼 安東尼留斯 約翰內斯 亨德里克 STEGMANN, ANTONIUS
 JOHANNES HENDRIKUS (NL)；摩爾 馬汀 L MOORE, MARTIN L. (US)；洛佩
 茲 歐那 安 霍泰德 LOPEZ-ONA, ANNE HOTARD (US)；福蘭奇克 派翠克
 J FRENCHICK, PATRICK J. (US)

(74) 代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：13 共 65 頁

(54) 名稱

含呼吸道融合病毒系 19 融合蛋白的仿病毒顆粒及其用途

VIROSOMES CONTAINING RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS STRAIN LINE 19 FUSION
 PROTEIN AND USES THEREOF

(57) 摘要

本發明提供呼吸道融合病毒(RSV)疫苗，特別地，RSV 仿病毒顆粒以及相關的組成物及方法。

The invention provides Respiratory Syncytial Virus (RSV) vaccines and, in particular, RSV virosomes and related compositions and methods.

指定代表圖：

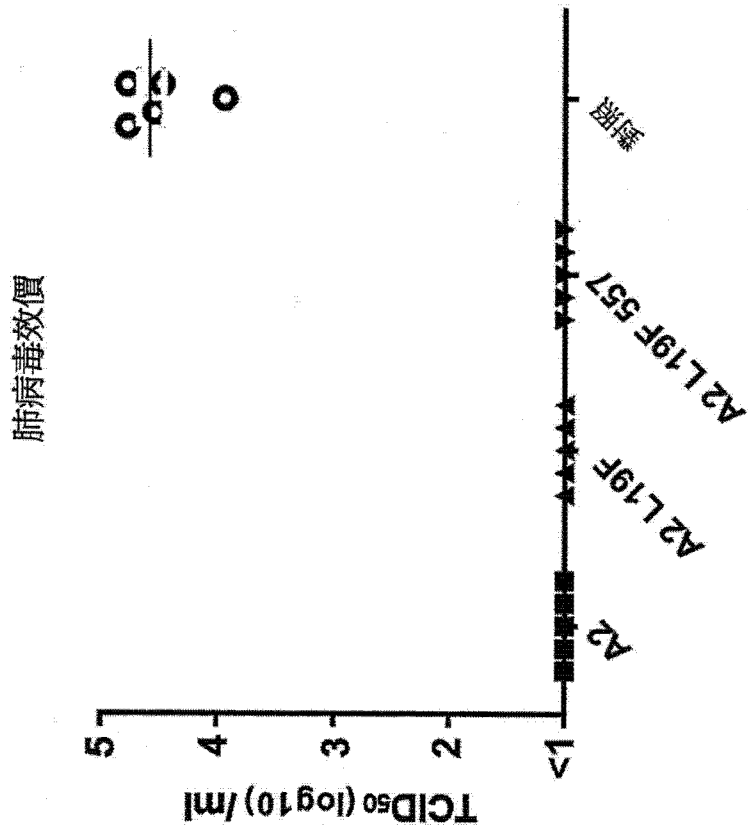


圖3

201617363

發明摘要

※ 申請案號：104130047
 ※ 申請日：104.9.11

※IPC 分類：C07K $\frac{14}{135}$ (2006.01)
 C12N $\frac{15}{62}$ $\frac{15}{45}$ (2006.01)
 A61K $\frac{39}{125}$ (2006.01)

【發明名稱】（中文/英文）

含呼吸道融合病毒系 19 融合蛋白的仿病毒顆粒及其用途

/Virosomes Containing Respiratory Syncytial Virus Strain Line

19 Fusion Protein and Uses Thereof

【中文】

本發明提供呼吸道融合病毒(RSV)疫苗，特別地，RSV 仿病毒顆粒以及相關的組成物及方法。

【英文】

The invention provides Respiratory Syncytial Virus (RSV) vaccines and, in particular, RSV virosomes and related compositions and methods.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 3。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：
無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 (中文/英文)

含呼吸道融合病毒系 19 融合蛋白的仿病毒顆粒及其用途
/Virosomes Containing Respiratory Syncytial Virus Strain Line
19 Fusion Protein and Uses Thereof

【技術領域】

【0001】本發明係關於呼吸道融合病毒(RSV)疫苗，特別是關於，RSV 仿病毒顆粒以及相關的組成物及方法。

【先前技術】

【0002】呼吸道融合病毒(RSV)為呼吸道病原，其感染所有年齡人類的肺。雖然多數的其他健康人類在僅罹患輕微症狀後典型地於 1 至 2 週由 RSV 感染復原，但於嬰孩及老人，例如具有慢性肺部疾病或心血管疾病者，則感染特別嚴重。確實地，於該等人類中，RSV 為住院以及甚至死亡的重要成因。

【0003】目前，對於 RSV 的治療沒有藥物獲得核准。一般而言，療法為支持性的，且可包括例如保濕法，利用靜脈內流體、濕化氧氣、機械通風及噴霧式氣管擴張劑。現今預防 RSV 感染的醫學方案限於使用帕利珠單抗 (Palivizumab) (Symagis®)，一種抗 RSV 的 F 糖蛋白的 IgG 單株抗體。帕利珠單抗的使用僅限於因為早產或其他醫學問題，例如先天性心臟疾病，而處於高風險的嬰孩。

【0004】沒有已核准對抗 RSV 的疫苗。基於死毒病毒(killed virus)以及次單元蛋白質的 RSV 疫苗的開發，已因相關於免疫

原性的充足性的課題以及增強的呼吸疾病(ERD)的誘發而受阻。關於後者，早期開發的 RSV 疫苗，包括福馬林失活 RSV 與明礬佐劑，通常有高百分比的經接種疫苗的嬰孩在後續天然 RSV 暴露時，造成 ERD 嚴重至足以需要住院。此疫苗的使用易造成二個死亡案例。對抗 RSV 之活的減毒及重組病毒疫苗的開發已面臨挑戰，舉例而言，過度減毒以及繼代的困難性，以及包括可能回復的潛在混擾因子(confounding factor)。

【0005】由於該等人類之 RSV 感染的潛在嚴重性，以及帕利珠單抗的使用限制，有需要對抗 RSV 感染的疫苗。

【發明內容】

【0006】本發明提供包括呼吸道融合病毒(RSV)系 19 的融合(F)蛋白的仿病毒顆粒(例如，具有序列編號:1 的胺基酸序列的蛋白質，或與具有序列編號:1 的胺基酸序列的蛋白質大於 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的蛋白質)。例如，該 F 蛋白質相對於序列編號:1 的序列可具有一或多個取代。例示性的取代包括，例如於序列編號:1 的 I557 的取代(例如，I557V 取代)。

【0007】此外，或替代地，相較於例如序列編號:1，該 F 蛋白質可具有取代於下列位置之一或多者(例如，二、三或四): 79、191、357 及 371(例如，M79I、R191K、K358T 及 Y371N)。於某些具體例中，該 F 蛋白質包括下述胺基酸之一或多者(例如，二或更多、三或更多): 於殘基 79 的甲硫胺酸(methionine)、於殘基 191 的精胺酸(arginine)、於殘基 357 的離胺酸(lysine)以及於殘基 371 的酪胺酸(tyrosine)。此外，或替代地，該 F

蛋白質可包括下述胺基酸之一或多者(例如，二、三、四、五、六、七、八、九或十)：於殘基 4 的脯胺酸(proline)、於殘基 16 的丙胺酸(alanine)、於殘基 25 的絲胺酸(serine)、於殘基 76 的纈胺酸(valine)、於殘基 103 的丙胺酸(alanine)、於殘基 122 的蘇胺酸(threonine)、於殘基 152 的異白胺酸(isoleucine)、於殘基 213 的精胺酸(arginine)、於殘基 515 的天冬醯胺(asparagine)以及於殘基 519 的甘胺酸(glycine)。前述所有具體例中，該 F 蛋白質不具有 RSV A2 株 F 蛋白質的完整序列。

【0008】該仿病毒顆粒可進一步包括 RSV 的 G 蛋白質，其為小的疏水性(SH)蛋白質，以及/或基質(M)蛋白質。本發明之仿病毒顆粒亦可包括萃取自 RSV 病毒株(例如，包括其中該 F 蛋白質係如本文所述經以 RSV 病毒系 19 的 F 蛋白質置換的 RSV 病毒株(例如 RSV 病毒株 A2)之 RSV 病毒株的嵌合性 RSV 病毒株)的膜的脂質及蛋白質。

【0009】該 F 蛋白質，如同存在於本發明的仿病毒顆粒，可實質上地呈融合前構型(pre-fusion conformation)。例如，藉由將該曲線的斜率相除所計算的該仿病毒顆粒的 5C4/帕利珠單抗的比例，可為至少 20%大於(如，至少 25%、30%、35%、40%、45%、50%或更大)由 RSV A2 株所產生的仿病毒顆粒的藉由將該曲線的斜率相除所計算的 5C4/帕利珠單抗的比例。

【0010】本發明的仿病毒顆粒亦可包括佐劑，如皂苷、PHAD(磷酸化六醯基雙糖)、3-D-PHAD(磷酸化六醯基雙糖的 3-O-去醯基衍生物)、3-O-D MPLA(單鄰醯基脂質 A 的 3-O-去醯基衍生物)或 MPLA(單鄰醯基脂質 A)。

【0011】此外，或替代地，仿病毒顆粒可進一步包括一或多種額外的脂質。例如，仿病毒顆粒可包括磷脂質如，舉例而言，磷脂醯膽鹼(PC)類(例如，一或多種合成的或本質純的 PC 類)及/或磷脂醯乙醇胺(PE)類(例如，一或多種合成的或本質純的 PE 類)。某些具體例中，一或多種合成的或本質純的 PC 類之至少一者及一或多種合成的或本質純的 PE 類之至少一者為仿病毒顆粒中僅有之非病毒磷脂質。再者，仿病毒顆粒可視需要包括固醇或固醇衍生物(例如，類固醇以比例為總添加磷脂質的 0 至 30 莫耳%(例如，5 至 30 莫耳%、10 至 25 莫耳%或約 20 莫耳%)。

【0012】PC 類及 PE 類可為，例如，莫耳比例 3:1 至 1:3(例如，介於 2:1 至 1:2、3:1 至 1:1、2:1 至 1:1、1:1 至 1:3 或 1:1 至 1:2)及/或含有具不飽和鍵之醯基鏈(例如，PC 及 PE 之醯基鏈之各者皆含有一不飽和鍵或醯基鏈中不飽和鍵的總數可為 4)。此外，或替代地，該醯基鏈可具有介於 14 至 18 個碳原子(例如，16 或 18 個碳原子)。

【0013】某些具體例中，本發明之仿病毒顆粒可包括一或多種(例如，二或多種)下述者：1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)、1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(PPPE)以及 1-棕櫚醯基-2-油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(PLPE)。該等具體例中，本發明之仿病毒顆粒可包括，例如，每 mg 病毒膜蛋白質約 400 至 450nmol 的 DOPC、約 800 至 900nmol 的 DOPE、約 250 至 350nmol 的 3-D-PHAD 及約 200 至 300nmol 的膽固醇。

【0014】本發明的仿病毒顆粒可包括佐劑(例如，合成佐劑)，該佐劑可包括存在比例為每 mg 病毒蛋白質之 0.01 至 2mg 佐劑(例如，比例為每 mg 病毒蛋白質之 0.1 至 2mg 佐劑、比例為每 mg 病毒蛋白質之 0.5 至 2mg 佐劑或比例為每 mg 病毒蛋白質約 1mg 佐劑)。總合成磷脂質對佐劑之莫耳比例可為，例如，介於 3 及 6 之間或介於 3.5 及 5 之間。某具體例中，總合成磷脂質對佐劑的莫耳比例介於 1.5 及 10 之間。

【0015】本發明之前述具體例之任一者中，仿病毒顆粒可具有，例如，具有低於 15%具有顆粒尺寸大於 150nm 且低於 15%小於 50nm 之介於 55 至 90nm 之間的眾數粒徑(modal diameter)的窄尺寸分布。

【0016】另一態樣中，本發明提供醫藥組成物(例如，疫苗)其含有本發明之任何仿病毒顆粒(例如，包括醫藥可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑及/或佐劑)。

【0017】本發明亦提供包括藉由對個體(例如，不具有 RSV 感染，但處於發展風險的個體)投藥本發明之醫藥組成物以於個體誘發對 RSV 的免疫應答的方法。

【0018】另一態樣中，本發明提供製造本發明之仿病毒顆粒的方法。該等方法包括(i)將包括 RSV 系 19F 的 F 蛋白質的 RSV 株(例如，含有其中 A2 F 蛋白質經以 RSV 系 19F 蛋白質置換之 RSV 株的嵌合 RSV)的病毒外膜溶解，以及(ii)於缺乏病毒核酸的情況下再組合病毒外膜。

【0019】又一態樣中，本發明特徵為本發明之仿病毒顆粒之使用作為醫藥用於誘發對 RSV 的免疫應答，使用於預防或

治療 RSV 感染的方法、及/或用於個體疫苗接種對抗 RSV。

【0020】關於「呼吸道融合病毒(RSV)系 19 的融合(F)蛋白質(RSV 系 19F 蛋白質、RSV L 19F 蛋白質或簡稱 L19F)」意指具有序列編號:1 的序列或實質胺基酸序列相同於(例如，大於 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%胺基酸序列相同性)序列編號:1 的序列(但不具有 RSV A2 F 蛋白質的序列)的蛋白質。RSV L19F 蛋白質可視需要包括，例如選自下述所成群組之一或多個取代：M79I、R191K、K371N 及 I557V(限制條件為其不具有 RSV A2 F 蛋白質的完整序列)。

【0021】應了解，例如，於 N-終端的殘基可能於純化過程中非期望地遺失，且因而 RSV L19F 蛋白質亦包括該等截短型。

【0022】用語「百分比(%)胺基酸序列相同性」相對於參考多肽序列係定義為，在對準序列及導入間隙後，以及視需要不考慮任何保留取代作為部分序列相同性時，候選序列中胺基酸殘基與參考多肽序列中胺基酸殘基相同的百分比。對於測定百分比胺基酸序列相同性的目的的對準可以所屬技術領域中的各種方法達成，舉例而言，使用公開可取得之之電腦軟體如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign(DNASTAR)軟體。所屬技術領域中具有通常知識者可決定用於對準序列之適合參數，包括魚香比較的序列的全長度中達成極大對準所需的任何演算法。例如，對於序列 A 的參考多肽，當與序列 B 的各種多肽比較時，百分比胺基酸序列相同性係計算為： $100 \times \frac{X}{Y}$ ，其中 X 為 A 與 B 之間相同配比所給分的胺基酸殘基的數，以及其中 Y 為 B 多肽序列中胺基酸殘基的總數。

【0023】關於使用於本文之「保留性胺基酸取代」，意指於胺基酸序列中，一個胺基酸以基於其側鏈的化學性質為相同家族的胺基酸中的另一個胺基酸置換。一般而言，經編碼的胺基酸可分為四個家族：酸性(天冬胺酸、麩胺酸)；鹼性(離胺酸、精胺酸、組胺酸)；非極性(丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)；及無電荷極性(甘胺酸、天冬醯胺、麩胺醯胺、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸)。苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸有時成群為芳族胺基酸。類似方式中，胺基酸亦可分別為下述群組：酸性(天冬胺酸、麩胺酸)、鹼性(離胺酸、精胺酸、組胺酸)；脂族(甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、絲胺酸、蘇胺酸)，視需要地嘶鞍酸及蘇胺酸分成群為脂族-羥基；芳族(苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸)；醯胺(天冬醯胺、麩胺醯胺)；以及含硫(半胱胺酸、甲硫胺酸)。

【0024】本發明提供數種優勢。例如，本發明之仿病毒顆粒，包括 RSV L19F 蛋白質，相較於包括 RSV A2F 蛋白質的仿病毒顆粒，誘發較高程度的中和抗體。此中和效價的增加由臨床觀點為重要的，因為對於接種疫苗的回應增加係相關於 RSV 相關及呼吸道疾病的減低可能性(參照，如 Falsey et al., *J. Infect. Dis.* 198: 1317-1326, 2008)。此外，本發明之仿病毒顆粒顯示增加的安定性，如本文所述，此為有用的，例如考慮包括該仿病毒顆粒的醫藥組成物的儲架壽命。一般而言，仿病毒顆粒的用途提供其他優勢。例如，仿病毒顆粒的製造不涉及化學品(例如，福馬林)的使用，該等化學品可能修改保護性抗原

決定基，造成減低的免疫原性以及可能造成 ERD(參照前文)。

【0025】本發明的其他特徵及優勢將由下文詳細的說明、實施例、圖式及申請專利範圍而顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0026】

圖 1 為三個圖的圖板其顯示藉由顆粒尺寸範圍由 0 至 400nm 的顆粒濃度(顆粒/ml)所測定之三個著名的病毒株所產生的仿病毒顆粒的尺寸分布。尺寸分布指名 RSV A2(頂圖)、RSV A2 L19F(底左圖)及 RSV A2 L19F I557V 突變株(底右圖)之仿病毒顆粒。

圖 2 為三個圖的圖板其顯示來自對於三個指定的病毒株各指定離心分液(Fr)所衍生之仿病毒顆粒的密度(g/ml; 三角形)、蛋白質濃度($\mu\text{g/ml}$; 正方形)以及磷酸鹽濃度(nmol/ml; 圓形)所測定之平衡密度梯度離心的結果。仿病毒顆粒係衍生自 RSV A2(頂圖)、RSV A2 L19F(底左圖)及 RSV A2 L19F I557V 突變株(底右圖)。

圖 3 係顯示藉由對於經對照(HNE)、A2 仿病毒顆粒、A2 L19F 仿病毒顆粒及 A2 L19F I557V 之仿病毒顆粒感染的小鼠的每毫升均質肺組織的 \log_{10} 轉形的 TCID₅₀ 所計算的 RSV 效價圖。

圖 4 係顯示在初次疫苗接種後 2 週自經對照(HNE)、A2 仿病毒顆粒、A2 L19F 仿病毒顆粒及 A2 L19F I557V 之仿病毒顆粒感染的小鼠的血清所計算之 \log_2 轉形的活體外中和效價圖。

圖 5 係顯示在第二次疫苗接種後 2 週自經對照(HNE)、A2

仿病毒顆粒、A2 L19F 仿病毒顆粒及 A2 L19F I557V 之仿病毒顆粒感染的小鼠的血清所計算之 \log_2 轉形的活體外中和效價圖。

圖 6 係顯示在第二次疫苗接種後 2 週對於經對照(HNE)、A2 仿病毒顆粒、A2 L19F 仿病毒顆粒及 A2 L19F I557V 之仿病毒顆粒感染的小鼠藉由 ELISA 所設定血清中 RSV-特異性 IgG 抗體的 \log_2 轉形的幾何平均效價(GMT)圖。

圖 7 係顯示在第二次疫苗接種後 2 週自經對照(HNE)、A2 仿病毒顆粒、A2 L19F 仿病毒顆粒及 A2 L19F I557V 之仿病毒顆粒感染的小鼠所收集的血清的表示為 $\mu\text{g/ml}$ 的 IgG1 同型的濃度圖。

圖 8 係顯示在第二次疫苗接種後 2 週自經對照(HNE)、A2 仿病毒顆粒、A2 L19F 仿病毒顆粒及 A2 L19F I557V 之仿病毒顆粒感染的小鼠所收集的血清的表示為 $\mu\text{g/ml}$ 的 IgG2A 同型的濃度圖。

圖 9 係顯示經對照(HNE)、A2 仿病毒顆粒、A2 L19F 仿病毒顆粒及 A2 L19F I557V 之仿病毒顆粒感染的小鼠於研究第 0 日(初次疫苗接種)、第 14 日(第二次疫苗接種+1 日)、第 30/31 日及第 35 日的體重圖。

圖 10 係顯示如於 492nm 所測定的吸收,其中 RSV 株 A2 F 蛋白質(A2)、RSV A2 L19F 蛋白質(19F)及 RSV A2 突變株 I557V 系 19F 蛋白質(557)以增加病毒濃度($\mu\text{g/ml}$)藉由 Synagis®抗體所測定之 ELISA 結果圖。

圖 11 係顯示如於 492nm 所測定的吸收,其中 RSV 株 A2 F

蛋白質(A2)、RSV A2 L19F 蛋白質(19F)及 RSV A2 突變株 I557V 系 19F 蛋白質(557)以增加病毒濃度($\mu\text{g/ml}$)藉由 5C4 抗體所測定之 ELISA 結果圖。

圖 12 係顯示如於 492nm 所測定的吸收，其中 RSV 株 A2 F 蛋白質(A2)、RSV A2 L19F 蛋白質(19F)及 RSV A2 突變株 I557V 系 19F 蛋白質(557)以增加仿病毒顆粒濃度($\mu\text{g/ml}$)藉由 5C4 抗體所測定之 ELISA 結果圖。

圖 13 係顯示如於 492nm 所測定的吸收，其中 RSV 株 A2 F 蛋白質(A2)、RSV A2 L19F 蛋白質(19F)及 RSV A2 突變株 I557V 系 19F 蛋白質(557)以增加仿病毒顆粒濃度($\mu\text{g/ml}$)藉由 Synagis®抗體所測定之 ELISA 結果圖。

【實施方式】

【0027】本發明提供包括呼吸道融合病毒(RSV)系 19(L19 蛋白質)的融合蛋白質的仿病毒顆粒、包括該等仿病毒顆粒的醫藥組成物以及使用及製造該等仿病毒顆粒及組成物的方法。視需要地，本發明之仿病毒顆粒的 RSV L19F 蛋白質包括一或多個取代(例如，I557V)，如下文中進一步解說。本發明之仿病毒顆粒、方法及組成物係本文所述，進一步如下文所述之 RSV 結構蛋白質的詳細說明。

呼吸道融合病毒(RSV)結構蛋白

【0028】RSV 包括於膜、融合蛋白質(F)、小的疏水性蛋白質(SH)及基質蛋白質(M)中或相關的四種蛋白質。本發明的具體例包括的仿病毒顆粒包含 RSV L19F 蛋白質，視需要與 RSV G 蛋白質、SH 蛋白質及 M 蛋白質(以及脂質成份，如下文所述)

之一者或多者組合。該 RSV G 蛋白質、SH 蛋白質及 M 蛋白質可為 RSV 系 19 者，或可為來自於儒 RSV A2 株之不同的 RSV 株者之一者或多者。關於後者的情況，該仿病毒顆粒可由嵌合 RSV 株製成，如其中 A2 F 序列係經以 RSV 系 19F 序列置換的 RSV A2 病毒。該嵌合物之實例係揭示於 Moore et al., J. Virol. 83(9): 4185-4194, 2009。

【0029】 EMBL FJ614814 之 RSV L19F 蛋白質序列係如下所述：

```

1      MELPILKANA ITTILAAVTF CFASSQNITE EFYQSTCSAV
41     SKGYLSALRT GWYTSVITIE LSNIKKKNKCN GTDAKVKLMK
81     QELDKYKNAV TELQLMQST PAANNRARRR LPRFMNYTLN
121    NTKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL
161    EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS LSNGVSVLTS RVLDLKNYID
201    KQLLPIVNKQ SCRISNIETV IEFQQKNRRL LEITREFSVN
241    AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI
281    VRQQSYSIMS IIEEVLAYV VQLPLYGVID TPCWKLHTSP
321    LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAEKCKV
361    QSNRVFCDTM YSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT
401    DVSSSVITSL GAIVSCYGKT KCTASNKNRG IIKTFSNLCD
441    YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481    LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK
521    STTNIMITTI IIVIIVILLS LIAVGLLLYC KARSTPITLS
561    KDQLSGINNI AFSN (序列編號:1)

```

【0030】如上所述者，該 RSV L19F 蛋白質，如包括於本發明之仿病毒顆粒者，可視需要包括一或多個取代突變。序列編號:1 的序列不同於 RSV 株 A2 的 F 蛋白質序列且經度(Long)於 5 個胺基酸位置(79、191、357、371 及 557；註解於序列中經下標及寬體； Moore et al., JVI 2009)。本發明包括 RSV L19F(如於本文所述仿病毒顆粒中)的用途，其包括該等胺基酸相對應於呈現於完整 RSV A2 株的胺基酸之該等胺基酸的一或多個取代，或保留性取代(限制條件為所得 F 蛋白質序列不為 RSV 株 A2 的 F 蛋白質序列)。因此，本發明包括 RSV L19F 的

用途，該 RSV L19F 具有於位置 557 的異白胺酸以纈胺酸 (I557V) 或例如丙胺酸、白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸化色胺酸取代；於位置 79 的甲硫胺酸以異白胺酸 (M79I) 或例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸或色胺酸取代；於位置 191 的精胺酸以離胺酸 (R191K) 或例如組胺酸、絲胺酸、天冬醯胺或麩胺醯胺取代；於位置 357 的離胺酸以蘇胺酸 (K357T) 或例如精胺酸、組胺酸取代；及/或於位置 371 的酪胺酸以天冬醯胺 (Y371N) 或例如甘胺酸、麩胺醯胺、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、苯丙胺酸或酪胺酸取代。RSV L19F 蛋白質可視需要包括於該等位置之一、二、三、四、或全部五個取代，或其任意組合，限制條件為所得 F 蛋白質序列不為 RSV 株 A2 的 F 蛋白質序列。突變可使用所屬技術領域中習知的方法製得，包括例如 Hotard et al., *Virology* 434(1): 129-136, 2012 所揭示之細菌人工染色體 (BAC) 為主的方法。

【0031】除了上文所述之取代突變之外，本發明可包括 RSV L19F 蛋白質的用途，該 RSV L19F 具有實質胺基酸序列相同於上文所述序列 (序列編號:1)，具有或不具有指定的取代，限制條件為該序列不為完整 RSV A2 F 蛋白質序列。因此，例如，使用於本發明之仿病毒顆粒的 RSV L19F 蛋白質可具有對上述序列 (序列編號:1；具有或不具有特定的取代) 為大於 80% 胺基酸序列相同性 (例如，大於 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%、或更大的序列相同性)，限制條件為所得 F 蛋白質序列不為完整 RSV A2F 蛋白質序列。對於序列變異性之基因座耐性株的選擇可藉由考慮，例如，不同病毒株

之已知結構及序列構型而進行(例如，考慮病毒株之間；參照例如，Johnson et al., J. Gen. Virol. 69: 2623-2628, 1988)，如同所屬技術領域中所能進行者。此外，融合能力的維持可藉由所屬技術領域習知的方法測定(例如，參照下文)。

【0032】 如上所述，本發明之仿病毒顆粒之改良的功效可能起因於，至少一部份，RSV L19F 蛋白質的融合前構型的增加的安定性。因此，本發明之特定具體例中，如上所述，例如，相較於 RSV A2 F 蛋白質之融合前構型，變異株 RSV L19F 蛋白質，維持增加的或實質的融合前構型。維持增加的融合前構型意指，例如，當於本發明所述分析中相較於含有 RSV A2F 的仿病毒顆粒時，例如維持 F 蛋白質之融合前構型至少 20%(例如，至少 25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多)。

【0033】 已發現對抗獨特於融合前形式中之 RSV-F 的單株抗體，如 C54、AM22 及 D25，且提供融合前構型測定中之手段(McLellan, J. S. et al., Science 2013, May 31; 340(6136): 1113)。其他抗體僅能測定融合前構型或不回應於構型變化的抗原決定基。藉由暴露於低滲透或高溫，RSV-F 可被引發構型變化為融合後構型。Synagis®(帕利珠單抗; Medimmune)為辨識呈示於多數 RSV 株的 F 蛋白質的構型-非依賴性抗原決定基的人源化小鼠單株抗體。5C4 為特異性辨識 RSV F 蛋白質的融合前構型的小鼠單株抗體。融合前相對於融合後的比例，或融合前相對於恆定的抗原決定基的比例，可使用於數量上地定量融合前構型。該等比例可經由如本發明所述之 ELISA 分析結果的比較而得知。例如，當根據實施例 2 所述方法測定時可顯現

5C4/帕利珠單抗比例大於 1 的蛋白質，如下所述，可藉由曲線斜率的相除而計算。融合亦可直接於融合分析中測量；病毒係經以螢光染料十八醯基若丹明(octadecylrhodamine)的自淬滅濃度標記，以及病毒與細胞的融合係藉由測量螢光去淬滅(fluorescence dequenching)而定量(Srinivasakuma, N. et al., J. Virol. 65(1991) 4063-69)。

【0034】 可包括於本發明之仿病毒顆粒的其他 RSV 結構蛋白質(與 RSV L19 F 一起，如本文所述)包括 RSV G 蛋白質、SH 蛋白質及/或 M 蛋白質。該等蛋白質可為來自 RSV 病毒系 19 或來自另一 RSV 株(例如，RSV 株 A2、株 A、Long 株、或 B 株)。於後者的情況中，其中非 F-蛋白質係來自非品系 19 RSV 株之本發明之仿病毒顆粒，如上所述，可由嵌合 RSV 株(例如，RSV A2 L19 F)產生。一特定實例中，本發明之仿病毒顆粒係由嵌合 RSV A2 L19 F 製程，具有包括 I557V 取代突變(亦即，RSV A2 L19 F I557V)。再者，除了天然發生的序列之外，包括於本發明之仿病毒顆粒的非 F 結構蛋白質，如上所述，可具有序列實質相同於天然發生的序列(參照，例如下文)。

【0035】 可包括於本發明之仿病毒顆粒之 RSV A2 蛋白質的例示性序列，與如本文所述之 RSV 系 19F 蛋白質，一起提供如下。

RSV A2 G 蛋白質(UniprotKB P03423)：

```

1   MSKNKDQRTA KTLERTWDTL NHLLFISSCL YKLNLSVAQ
41  ITLSILAMII STSLIIAII FIASANHKVT PTTAIIQDAT
81  SQIKNTTPTY LTQNPQLGIS PSNPSEITSQ ITTILASTTP
121 GVKSTLQSTT VKTKNTTTTQ TQPSKPTTKQ RQNKPPSKPN
161 NDFHFVFNF VPCSICSNP TCWAICKRIP NKKPGKTTT
201 KPTKKPTLKT TKKDPKPQTT KSKEVPTTKP TEEPTINTTK
241 TNIITLLTS NTTGNPELTS QMETFHSTSS EGNPSPSQVS
281 TTSEYPSQPS SPPNTPRQ (序列編號:2)

```

RSV A2 SH 蛋白質(UniprotKB P04852)

```

1   MENTSITIEF SSKFWPYFTL IHMITTIISL LIIISIMIAI
41  LNKLCYEVNF HNKTFELPRA RVNT (序列編號:3)

```

RSV A2 M 蛋白質(UniprotKB P03419)

```

1   METYVNLHE GSTYTAAVQY NVLEKDDPA SLTIWVPMFQ
41  SSMPADLLIK ELANVNILVK QISTPKGPSL RVMINSRSAV
81  LAQMPSKFTI CANVSLDERS KLAYDVTTTPC EIKACSLTCL
121 KSKNMLTTVK DLTMKTLNPT HDIIALCEFE NIVTSKKVII
161 PLYLRSISVR NKDLNTLENI TTTEFKNAIT NAKIIPYSGL
201 LLVITVTDNK GAFKYIKPQS QFIVDLGAYL EKESIYYVTT
241 NWKHTATRFA IKPMED (序列編號:4)

```

【0036】仿病毒顆粒

某些具體例中，仿病毒顆粒為含有病毒表面蛋白質(例如，來自具外膜病毒或其截短型或片段的醣蛋白及表面蛋白質)的脂質雙層物。因此，一般而言，仿病毒顆粒可被認為具外膜病毒之再組合膜。仿病毒顆粒可藉由以清潔劑(例如，C12E8、Triton X-100 或正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷)或短鏈磷脂質(例如，磷脂醯膽鹼或其衍生物，如 1,2-二庚醯基-*sn*-磷脂醯膽鹼(DHPC)和 1,2-二己醯基-*sn*-磷脂醯膽鹼(DCPC))自具外膜病毒萃取膜及蛋白質而製造。典型地，藉由離心自所萃取的蛋白質及脂質移除病毒核殼蛋白(nucleocapsid)。視需要地，其他成分(例如，佐劑、額外的脂質及/或膽固醇；視需要經溶解於包括清潔劑或短鏈磷脂質之溶液中)與所萃取的蛋白質及脂質混合。然後藉由，例如透析，移除清潔劑或短鏈磷脂質，由此允許之直雙層外膜的在組成及再形成。此造成包括所萃取的膜蛋

白質及脂質以及如上所述的任何額外的成分的仿病毒顆粒的形成。

【0037】 可使用於製造本發明之仿病毒顆粒的詳細方法係揭示於 WO 2004/071492; Stegmann et al., EMBO J. 6: 2651-2659, 1987; 及 Kamphuis et al., Plos One 7(5):e36812, 1-11, 2012, 其全部內容以參考方式併入本文。一特定實例中, 簡言之, 經純化的病毒係藉由離心形成小粒且溶解於包括 1,2-二己醯基-*sn*-磷脂醯膽鹼 (DCPC) 之緩衝液。然後藉由離心移除核殼蛋白 (nucleocapsid)。後續地, 卵磷脂醯膽鹼 (PC) 及卵磷脂醯乙醇胺 (PE) 呈例如 2:1 莫耳混合物, 係於玻璃管中蒸發成爲乾膜。然後, 包括所萃取的脂質及蛋白質之上清液添加至脂質混合物。視需要地, 佐劑或其他成分 (例如, 額外的脂質或膽固醇) 係溶解於 DCPC 且添加至蛋白質/脂質混合物, 培養後經過濾及透析以移除 DCPC, 導致仿病毒顆粒的形成 (Kamphuis et al., supra)。

【0038】 除了上述特定方法之外, 一般而言, 仿病毒顆粒可由任何整合膜蛋白質或外週膜蛋白質, 或接合至脂質錨的蛋白質予以組裝。仿病毒顆粒之主要特徵包括其爲尺寸足以爲免疫系統的噬菌細胞所取用的顆粒, 以及其密切地模仿天然病毒外膜的組成物、表面結構及功能活性 (特別是膜融合活性)。因此, 使用於製造仿病毒顆粒之來自病毒的脂質及整合膜蛋白質, 典型地, 將呈示於仿病毒顆粒膜。

【0039】 包括 RSV 系 19F 蛋白質 (如本文所述) 之本發明的仿病毒顆粒, 典型地將包括來自獲得其等之病毒的脂質 (例如, RSV L19、RSV A2 L19 F 或 RSV A2 L19 F I557V)。除了

該等脂質，仿病毒顆粒可視需要地併入其他成分如，例如，兩親(amphiphilic)佐劑(例如參照 WO 2004/110486)、其他脂質類(例如磷脂醯膽鹼(PC)類及/或磷脂醯乙醇胺(PE)類)、及/或固醇或其衍生物。爲了將該等其他成分併入本發明之仿病毒顆粒，且與前文所述一致，病毒係以清潔劑或短鏈磷脂質溶解，移除病毒核殼蛋白，然後視需要地溶解於相同的清潔劑或短鏈磷脂質之其他成分，添加至經融解的病毒膜。然後移除清潔劑或短鏈磷脂質，造成包括病毒膜蛋白質及脂質以及其他成分的仿病毒顆粒的形成。

【0040】 可依此方式併入至仿病毒顆粒中之佐劑的實例包括 MPLA(單磷醯基脂質 A)及 MPLA 衍生物(例如，3'-O-去醯基 MPLA、3D MPL™(3'-O-去醯基單磷醯基脂質 A)、MPLA 及 MPLA 衍生物的合成物(例如，磷醯基化六醯基雙糖(PHAD，其亦已知爲吡喃葡萄糖苷脂質 A 或 GLA)及 PHAD 的 3'-O-去醯基衍生物(3-D-PHAD))、皂苷(例如，OS21)、脂質化咪唑并喹啉(例如參照 WO 2010/048520 及 US 2011/0282061)、脂質化刺激肽(例如，Pam₃CSK₄ 及 L-18 胞壁醯二肽(L 18-MDP))及維生素 D 及維生素 D 衍生物。本文中 MPLA 的用途係揭示於，例如，WO 2004/110486; Stegmann et al., 如前文所述; 以及 Kamphois et al., 如前文所述。本文之仿病毒顆粒中 Pam₃CSK₄ 及 L18-MDP 的用途，係揭示於 Shafique et al., PlosOne 8(4):e61287, 1-12, 2013。

【0041】 除了病毒脂質外，本發明之功能性再組合病毒膜可包含來自其他來源的經純化脂質，例如，經純化脂質或合成脂質。其他脂質可於製備過程中添加至仿病毒顆粒膜。一般而

言，當添加類似於病毒來源脂質者或接近組裝病毒外膜之脂質組成物的脂質混合物時，仿病毒顆粒之融合活性係最適化地維持。因此，根據本發明，廣範圍的脂質可包含於病毒膜中。脂質群組包含中性及帶電荷之磷脂質、固醇衍生脂質及中性及帶電荷之合成脂質。因此，提供於具有融合活性之仿病毒顆粒之脂質組成物可為得自或可得自天然病毒膜之組成物。因而使用於本發明之脂質組成物包括僅由病毒天然脂質所組成之組成物、補充有來自其他來源的脂質之病毒天然脂質所組成之組成物、以及由各種來源之脂質所組成之組成物，其模仿天然病毒膜之脂質組成物。本發明之仿病毒顆粒可包含選自下列成群組之一種或多種脂質：陽離子性脂質、合成脂質、糖脂質、磷脂質、固醇及其等之衍生物。較佳脂質包括固醇如膽固醇，及磷脂質如磷醯脂膽鹼(PC)、鞘磷脂(SPM)、磷脂醯乙醇胺(PE)及磷脂醯絲胺酸(PS)。然而，亦可添加其他磷脂。該等包括，但不限於，磷脂醯甘油(PG)、磷脂醯酸(PA)、心脂(CL)及磷脂醯肌醇(PI)，具有變化的脂肪醯基組成物及天然及/或合成來源，及磷酸聯十六烷基酯。亦可添加神經醯胺及各種糖脂質，如腦苷酯及神經節苷酯。可併入至本發明之仿病毒顆粒之固醇衍生物的實例包括膽固醇半琥珀酸酯，植物固醇如羊毛甾醇、麥角固醇及維生素 D 與維生素 D 相關化合物。

【0042】 各種具體例中，本發明之仿病毒顆粒具有顯著小於 220nm 的眾數粒徑，以有助於過濾器滅菌。因此，本發明之仿病毒顆粒可具有範圍 40 至 200nm 的直徑(顆粒尺寸)，例如，自 50nm 至 100nm、和 70nm 至 130nm。各種實例中，RSV 仿

病毒顆粒具有均質尺寸分布為小於 10 至 15%具有顆粒尺寸大於 150nm 之仿病毒顆粒，以及小於 10 至 15%具有顆粒尺寸小於 50nm。因此，於各種實例中，眾數粒徑可為小於 90nm 或小於 85nm。例如眾數粒徑可為範圍 55 至 90nm、58 至 82nm、65 至 80nm、65 至 77nm、68 至 78nm、68 至 78nm 或 69 至 74nm。

【0043】 此段落之其餘部分揭示包括特定成分之仿病毒顆粒組成物，以特定量包括佐劑、脂質及膽固醇。此仿病毒顆粒組成物可使用於本文之 RSV 仿病毒顆粒，其包括 RSV 系 19 之 F 蛋白質(視需要包括如本文所揭示之取代(例如，I557V；參照前文))且視需要自包括其中 F 序列經以 RSV 系 19F 序列(視需要包括如本文所述之取代突變；例如 RSV A2 L19F I557V))之 RSV A2 之嵌合 RSV 製得。在如本文所述之含有 RSV L19 F 蛋白質之仿病毒顆粒的內容之外之此特定類型之仿病毒顆粒組成物之用途，不涵括於本發明。

【0044】 根據此實例之仿病毒顆粒包含：(i)萃取自 RSV 膜的脂質及蛋白質(具有為 RSV 系 19 F 的 F 蛋白質，如前文所述)；(ii)選自 PHAD 及 3-D-PHAD 所成群組之合成佐劑，較佳以每 mg 病毒蛋白質為 0.01 至 2mg 佐劑的比例；(iii)至少一種合成的或本質純的磷脂醯膽鹼(PC)類及至少一種合成的或本質純的磷脂醯乙醇胺(PE)以 3:1 至 1:3 的莫耳比例，特徵在於該醯基鏈具有介於 14 至 18 個碳原子，醯基鏈中的不飽和鍵總數為四，以及總合成磷脂質對佐劑的莫耳比例係介於 1.5 至 10；以及(iv)總添加磷脂質之 0 至 30 莫耳%的比例之固醇或固醇衍生物。

【0045】如使用於此實例，表示為「合成的或本質純的」意指外部性添加經定義品質、純度及化學結構之非病毒磷脂質。其不必意指萃取自天然來源之混合脂肪酸組成物之精純化或半純化的磷脂質，如組織衍生的、植物衍生的或卵衍生的 PC 及 PE。此實例之一具體例中，該合成的或本質純的 PC 類及 PE 類係跟據優良製造規範準則(cGMP)所製造。合成的或本質純著 PC 類及 PE 類為市售可取得，例如，得自 Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL。一具體例中，該至少一種合成的或本質純的 PC 類及至少一種合成的或本質純的 PE 類為該仿病毒顆粒中僅有的非病毒磷脂質。

【0046】當合成的 PE 及 PC 具有介於 14 至 18 個碳原子且醯基鏈中不飽和鍵的總數為四時，具有所期望性質的 RSV 仿病毒顆粒係根據此實例製得。較佳地，PC 及 PE 皆含有具有不飽和鍵的醯基鏈。醯基鏈可為單不飽和或二不飽和。由其減少可能氧化的觀點，較佳為單不飽和醯基鏈。例如，提供一種 RSV 仿病毒顆粒(具有 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)其中 PC 及 PE 之各醯基鏈皆含有一不飽和鍵。一具體例中，PC 類及/或 PE 類為對稱的磷脂質，亦即，包含於甘油主幹的 *sn*-1 及 *sn*-2 位置相同的醯基鏈。雖然設想二種或更多種不同的合成的 PC 類及/或 PE 類的摻混物，根據本發明此實例之 RSV 仿病毒顆粒(包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)典型包含一種合成的或本質純的 PC 類及一種合成的或本質純的 PE 類。

【0047】一具體例中，合成的 PC 及/或 PE 中的醯基鏈具有 16 或 18 個碳原子，較佳為 18 個碳原子。較佳地，PC 及 PE

之醯基鏈中的碳原子總數為至少 70。若碳原子總數為 72 則可獲得非常優異的結果。

【0048】 以包含選自下列群組之一種或多種之 RSV 仿病毒顆粒獲得優異的結果：1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)、1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二棕櫚醯基-*sn*-甘油-磷酸乙醇胺(PPPE)以及 1-棕櫚醯基-2-油醯基-*sn*-甘油-磷酸乙醇胺(PLPE)。較佳地，提供 RSV 仿病毒顆粒(包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)，包含由合成的 DOPC、DOPE、PLPE 及 PLPC 所成群組選出之二者或更多者。

【0049】 一特定態樣中，RSV 仿病毒顆粒(包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)包含由合成的 DOPC 所組成的合成的 PC 及由 DOPE 所組成的合成的 PE。

【0050】 本發明之此實例之改良的 RSV 仿病毒顆粒(包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)，係再特徵化於合成的或本質純的 PC 類及合成的或本質純的 PE 類之間的莫耳比例係介於 3:1 至 1:3。較佳地，該比例介於 2:1 至 1:2。

【0051】 一具體例中，合成的 PC 係使用量為等於或超過合成的 PE 的使用量。因此，提供 RSV 仿病毒顆粒(包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)包含合成的 PC 類及合成的 PE 類以莫耳比例介於 3:1 至 1:1，較佳為 2:1 至 1:1。一特定態樣中，PC 存在超過 PE，例如以莫耳比例介於 3:1 至多達 1:1，較佳為 2:1 至多達 1:1。

【0052】 另一較佳具體例中，合成的 PC 係使用量為等於或少於合成的 PE 的使用量。因此，提供 RSV 仿病毒顆粒(包括

RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)包含合成的 PC 類及合成的 PE 類以莫耳比例介於 1:1 至 1:3，較佳為 1:1 至 2:1。特定較佳態樣中，PE 存在超過 PC，例如以莫耳比例介於 3:1 至多達 1:1，較佳為 2:1 至多達 1:1。

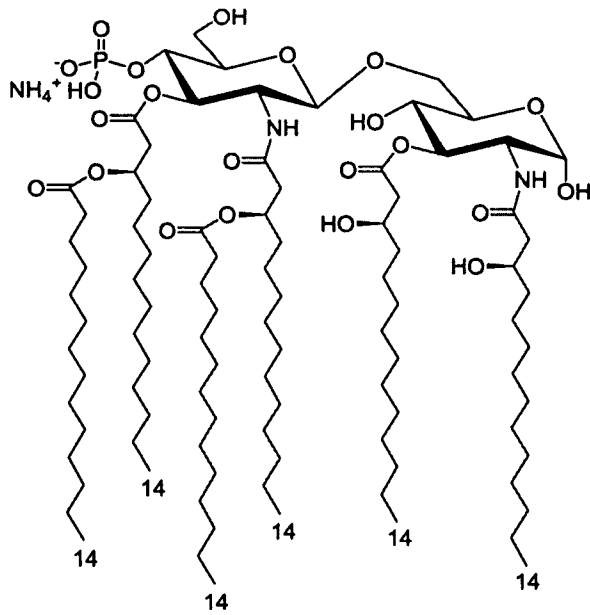
【0053】進一步的分病毒脂質的添加可增強仿病毒顆粒之一種或多種期望的性質。例如，可添加膽固醇以增加仿病毒顆粒之儲存安定性。一具體例中，RSV 仿病毒顆粒(包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)包含以總添加磷脂質之 5 至 30 莫耳 % 範圍的膽固醇，較佳為 10 至 25 莫耳 %，更佳為約 20 莫耳 %。較佳具體例中，仿病毒顆粒包含 DOPC、DOPE 及膽固醇，較佳為其中 DOPE 係存在超過，例如至少 1.5 倍的 DOPC。

【0054】已發現總合成的磷脂質對於合成的佐劑的莫耳比例介於 1.5 至 10 係相關於根據本發明實例之 RSV 仿病毒顆粒之性質。當比例介於 3 至 6，較佳介於 3.5 至 5，可獲得優良結果。特定態樣中，比例介於 3.4 至 4.5，如 3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4 或 4.5。

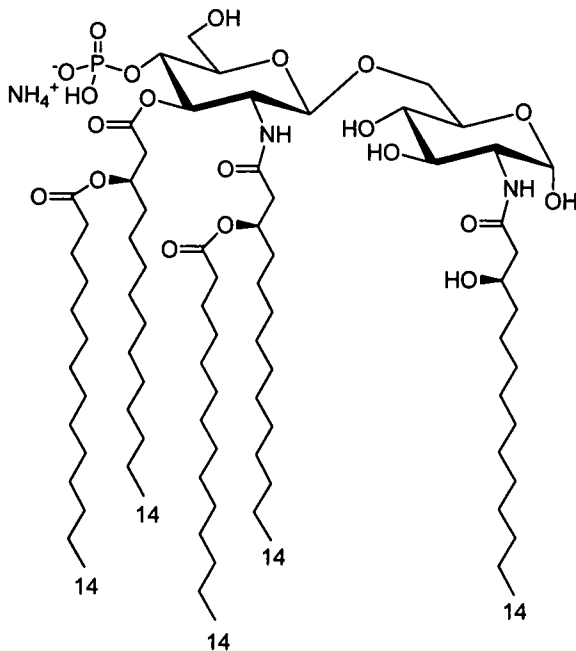
【0055】本發明之此實例之 RSV 仿病毒顆粒(包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)係特徵化於存在合成的佐劑其選自 PHAD(磷酸化六醯基雙糖)及其 3-O-去醯基衍生物，3-D-PHAD。二者皆為所屬技術領域習知之合成的 TLR-4 促效劑。PHAD 亦為所屬技術領域指稱吡喃葡萄糖苷脂質 A 或 GLA。參照 Lousada-Dietrich et al., *Vaccine*. 2011 Apr 12; 29(17): 3284-92。

【0056】一具體例中，RSV 仿病毒顆粒含有 PHAD，其具有

下述結構(名稱 14 表示各醯基鏈中碳原子之總數)：



【0057】較佳具體例中，仿病毒顆粒含有 3-D-PHAD 其具有下述結構：



【0058】合成的佐劑係使用於本發明此實例之 RSV 仿病毒顆粒(包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述)較佳以每 mg 病毒蛋白質為 0.01 至 2mg 的比例，更佳以每 mg 病毒蛋白質為 0.5 至 2mg 的比例，例如約每 mg 病毒蛋白質約 1mg，視需要地與總合成磷脂質對佐劑的莫耳比例係介於 3 至 6，較佳介於 3.5 至 5。

【0059】 特定具體例中，本發明此實例之 RSV 仿病毒顆粒 (包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述) 包含每 mg 病毒膜蛋白質約 400 至 450nmol DOPC、約 800 至 900nmol DOPE、約 250 至 350nmol 3-DPHAD 及約 200 至 300nmol 膽固醇。

【0060】 醫藥組成物及方法

本發明亦提供醫藥組成物 (例如，疫苗)，其含有本發明之一或多種仿病毒顆粒 (包括 RSV 系 19F 蛋白質，如本文所述) 以及醫藥可接受載劑、稀釋劑、賦形劑及 / 或佐劑。依藥可接受安定劑、滲透劑、緩衝劑、分散劑等亦可包括於本發明之醫藥組成物中。使用的形式取決於投藥及治療應用的目的。醫藥組成物可包括適用於遞送仿病毒顆粒至患者的任何相容的、非毒性的物質。

【0061】 使用於本文之用語「醫藥可接受」，係關於化合物、組分、材料、組成物、劑型等，於經深思熟慮之醫療決定 (sound medical judgment) 範疇中，其係適合使用於與有疑問對象 (例如，人類) 的組織接觸而無過度的毒性、刺激性、過敏回應或其他有問題的併發症，有相稱的合理利弊比例 (benefit/risk ratio)。各載劑、稀釋劑、賦形劑等亦必需就意義而言為「可接受」於相容於調配物之其他組分。合適的載劑、稀釋劑、賦形劑等，以及其使用方法，可見於標準醫藥文件，例如，*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990; 及 *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th edition, 2005，其各者全文對於所有目的以參考方式併入本文。

【0062】基於或部分基於醫藥組成物遞送的途徑而選擇調配物。本發明之醫藥組成物可藉由可接受途徑遞送，例如，黏膜途徑(例如，鼻內、肺內或口內)以及非腸道途徑(例如，藉由肌肉內、血管內(例如，靜脈內或動脈內)或腹膜內注射)。

【0063】調配物可適合於液體、溶液(例如，水性、飛水性)、懸浮液(例如，水性、非水性)、乳化物(例如，水中油型、油中水型)、酏劑、糖漿、舐劑、膠囊(包括，例如硬及軟明膠膠囊)、藥餅(cachet)、丸劑、安瓿、大藥丸、栓劑、子宮劑、酹劑、凝膠、貼劑、軟膏、乳劑、洗劑、油劑、發泡劑、噴霧劑或氣霧劑，而可為所述技術領域中具有通常知識者予以選擇。

【0064】適合用於鼻內投藥的調配物，其載劑為液體，可以鼻內噴灑、鼻內滴劑或噴霧器氣霧劑的形式投藥。用於鼻內遞送之醫藥可接受載劑可例舉含有吳俊畫舫病毒顆粒、水、緩衝生理鹽溶液、甘油、聚山梨醇酯 20、cremophor EL、辛/癸甘油酯之粉劑且可經緩衝以提供中性 pH 環境。

【0065】適合用於肺投藥的調配物(例如，藉由吸入或吸氣療法)包括存在為自經壓包裝之氣霧噴灑形式者，利用合適的推進劑，如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯-四氟乙烷、二氧化碳或其他合適的氣體。

【0066】適合用於非腸道內投藥的調配物(例如，藉由肌肉內、血管內或腹膜內注射)，包括水性或非水性、等張性、無熱原性、無菌液體(例如，溶液、懸浮液)，其中仿病毒顆粒係經懸浮於或其他方法而提供。該液體可額外地含有其他醫藥可接受組分，如抗氧化劑、緩衝劑、防腐劑、安定劑、抑菌劑、

懸浮劑、增稠劑、及賦予調配物與意圖的接受者的血液(或其他相關體液)為等張的溶質。賦形劑的實例包括，例如水、醇類、多元醇類、甘油、蔬菜油等。使用於該調配物之合適的等張載劑的實例包括氯化鈉注射物、林格氏液或乳酸化林格氏注射物。

【0067】 調配物可存在為單一劑量或多劑量之密封容器中，例如，安瓿及小瓶，且可儲存於冷凍乾燥(凍乾)條件，而於使用即刻之前僅需要添加無菌液體載劑，例如，注射用水。

【0068】 對於經口投藥，仿病毒顆粒可以液體劑型投藥，如醃劑、糖漿及懸浮液。用於經口投藥之液體劑型可含有賦形劑如著色劑及矯味劑以增加患者可接受度。

【0069】 如上所註明，佐劑可視需要地包括於本發明之仿病毒顆粒的膜。此外，佐劑可視需要地包括於包括有仿病毒顆粒之醫藥組成物，但於仿病毒顆粒膜之外側。對於此目的之佐劑可基於，例如，欲使用之投藥途徑而選擇。例示性佐劑包括鋁鹽(例如，硫酸鋁鉀、明礬、磷酸鋁、羥基磷酸鋁及氫氧化鋁)、免疫刺激基質(例如，含有液體及膽固醇複合物的皂苷)、CpG 寡核甘酸、3D-MPL、MF-59、QS21、胞壁醯基二肽、MPLA 及相關形式與衍生物(參照前文)以及聚磷嗪(polyphosphazine)。

【0070】 欲投藥至如人類之個體的仿病毒顆粒的合適量，可由所屬技術領域中具有通常知識者予以測定。典型地，於單一劑量中投予約 1-100 μ g 抗原蛋白質，例如 15-50 μ g 抗原蛋白質。如人類患者之個體，可以單一劑量治療，或者視需要地以

多劑量治療。於多劑量的情況中，合適的療程可由所屬技術領域中具有通常知識者所決定。於各種實例中，治療療程可包括 2 至 10 劑量(例如，3 至 4 劑量)，各以各劑量彼此分開為 1 至 4 日或 1 至 2 週，此乃取決於患者的狀況(例如，無論患者具有現存的 RSV 感染(以及其嚴重程度)或患者係預防性地處理)。

【0071】 可根據本發明的方法治療的個體包括由所屬技術領域中具有通常知識者所決定的需要此治療的人類患者。該等患者的實例包括

(i) 高齡患者，超過約 65 歲，具有或不具有潛在心臟或呼吸道疾患；

(ii) 患者，超過約 50 歲，具有潛在心臟或呼吸道疾患；

(iii) 婦女或妊娠者，預防出生後 4 至 6 個月的嬰兒感染；

(iv) 小於 6 個月的嬰兒；

(v) 約 6 至 12 個月的嬰兒；

(vi) 約 12 個月至 5 歲的兒童；以及

(vii) 免疫減退患者。

【實施例】

【0072】 於下述實施例中，係使用序列編號:1 之 RSV L19 F，如所指示，具有及不具有取代突變(I557V)。

【0073】 實施例 1：動物試驗

此實施例敘述調查衍生自三個不同 RSV 株：RSV-A2、RSV-A2 系 19F 及 RSV-A2 系 19F I557V 的仿病毒顆粒疫苗的研究。該仿病毒顆粒疫苗係皆以 3-去醯基-磷醯基化六醯基雙糖(3D PHAD)予以佐劑化。該仿病毒顆粒以每 2 週間隔於經接

種疫苗的小鼠中比較。在以 RSV 病毒挑戰後的經接種疫苗的小鼠的保護以及經接種疫苗後的免疫應答(中和抗體效價)，係以相較於陰性對照組(載劑)予以評估。

【0074】方法及材料

仿病毒顆粒的製備

切向流過濾(tangential flow filtration; TFF)管柱(GE UFP-30-C-MMOA1, 26cm², 30 kDa 截流)，經保存於 20%乙醇，係以於之前使用於濃縮病毒的無菌磷酸鹽緩衝溶液(PBS 不具有 Ca²⁺及 Mg²⁺)沖洗。

28 小瓶(約 39 ml)的 RSV-A2 經快速融解，藉由 TFF 濃縮且相對於 30 毫升磷酸鹽緩衝溶液(PBS)透濾至體積 3.4 毫升。15 小瓶(約 22.5 ml)的 RSV-A2 系 19F 同樣地濃縮至 3.7 ml。10 小瓶(約 15 ml)的 RSV-A2 系 19F I557V 同樣地濃縮至體積 3.2 ml。蛋白質濃度根據 Bradford 測定為 1.8 mg/ml(RSV-A2)、0.81 mg/ml(RSV-A2 系 19F)及 1.25 mg/ml(RSV-A2 系 19F I557V)。為了製造仿病毒顆粒，170 μ l 的 DCPC 溶液添加至 1.7 ml RSV-A2；411 μ l 的 DCPC 溶液添加至 3.7 ml RSV-A2 系 19F；以及 356 μ l 的 DCPC 溶液添加至 3.2 ml RSV-A2 系 19F I557V。

【0075】於冰上 30 分鐘後，樣品於桌上型 S100 AT 4 轉子(Sorvall discovery M120-SE 桌上型離心基)以 40,000rpm 旋轉 30 分鐘。收集上清液，經由 0.1 μ m 的 Pall Acrodics 過濾器過濾，且觀察到含有 2.3 mg/ml 的 RSV-A2；0.57 mg/ml 的 RSV-A2 系 19F；以及 0.83 mg/ml 的 RSV-A2 系 19F I557V。

【0076】由 DOPC、DOPE、3D PHAD 及膽固醇(皆自 Avanti

Polar Lipids 取得)之混合物製備之乾脂質膜以每 mg 的病毒上清液蛋白質含有 425 nmol 的 DOPC、850nmol 的 DOPE、300nmol 的 3D PHAD 及 255nmol 膽固醇。該膜具體地含有如下述之脂質：

- 溶液 1：對於 RSV-A2 上清液：

995nmol DOPC、1989nmol DOPE、702nmol 3D PHAD、597nmol 膽固醇

- 溶液 2：對於 RSV-A2 系 19F 上清液：

850nmol DOPC、1700nmol DOPE、600nmol 3D PHAD、510nmol 膽固醇

- 溶液 3：對於 RSV-A2 系 19F I557V 上清液：1063nmol

DOPC、2125nmol DOPE、750nmol 3D PHAD、638nmol 膽固醇

脂質膜於玻璃管壁上藉由以氫氣蒸發溶劑(氯仿/甲醇)，接著於真空乾燥器中 30 分鐘。

【0077】 藉由以 HNE 緩衝液(5mM HEPES, 145mM 氯化鈉、1mM 乙二胺-四乙酸(EDTA)、pH 7.4, 含有 50IU 盤尼西林及 50 μ g/ml 鏈黴素)稀釋 DCPC 的 500mM 母液(stock)以製備 100mM DCPC 溶液。200 μ l 的 DCPC 溶液添加至各摹，且將管浸入熱的自來水中 30 至 60 秒。所有溶液中可觀察到某些混濁。添加病毒上清液後，振混溶液，於冰上培養 15 分鐘，且經由 Whatman FP30 的 0.22 μ m 過濾器過濾。所有溶液於過濾前與過濾後皆呈現少許混濁。然後將溶液注射至經伽瑪射線無菌化之透析匣 slide-a-lyzer(Thermo, 10kDa 截流, 尺寸 0.5 至 3ml) 且於 4 $^{\circ}$ C 對 6 \times 2L 的 PBS 透析 48 小時。然後，所有溶液皆於 4 $^{\circ}$ C 對 HNE 緩衝液透析隔夜後收集。Bradford 蛋白質測定(Biorad)

對於溶液 1 產生 1.2mg(於 1.63ml 中)；對於溶液 2 為 1.2mg(於 3.66ml 中)；以及對於溶液 3 為 2.1mg(於 4.6ml 中)。自各溶液取 $2 \times 75 \mu\text{g}$ 保持冷藏直到動物試驗開始(4 至 10°C)。

【0078】顆粒尺寸分部係藉由 Nanosign®測量儀予以評估。所有分析皆使用保存於 4 至 10°C 的樣品，於 Nanosign® LM-10 儀器使用 405nm 雷射，軟體 3 版(beta)，快門設定至 1200 且增感(gain)至 500，閾值於 20°C 為「自動」，以 Peliter 冷卻/加熱調控而藉由單一顆粒追蹤而完成。仿病毒顆粒稀釋物係於 HNE 緩衝液中製成以使得介於 10 及 100 個顆粒可見於觀察腔室中。因此，絕對顆粒數無法於溶液之間比較。每個樣品累積 10 次的 90 秒觀察，總計約 50,000 測量追蹤長度。結果對於有線追蹤長度予以調整。樣品黏度假定為 1.00cP。

【0079】仿病毒顆粒的樣品係藉由於 HNE 緩衝液中之 10-60%蔗糖梯度的平衡密度梯度離心予以分析。樣品於 Sorvall AH650 轉子中於 50,000rpm 旋轉 64 小時又 30 分鐘，且來自梯度的樣品分析蛋白質(Bradford 分析；Bio-Rad)、磷酸鹽及密度(藉由折射計)。

【0080】測試動度、組指派、劑量程度及投藥

六組雌性 Balb/c 小鼠(6 至 8 週齡)於第 2 日及第 13 日接受仿病毒顆粒(每劑量 $5 \mu\text{g}$ 蛋白質)組成物以及對照組成物。更具體地，動物以 3 至 4.5%異氟烷/ O_2 麻醉以進行投藥。蛋白質濃度以 HNE 調整為每 $50 \mu\text{l}$ 為 $5 \mu\text{g}$ 之 IM 注射物。仿病毒顆粒組成物以及對照組成物係呈 IM 注射物以每肢 $25 \mu\text{g}$ (總計 $5 \mu\text{g}$ 蛋白質)投藥至二小腿肌。表 1 說明治療排程。

表 1. 治療排程

治療/過程	前 1 日	研究日數				
		0	13	30**	31**	35
一般健康*	×	×	×	×	×	×
重量測定		×	×	×	×	×
麻醉		×	×	×	×	×
接種疫苗		×	×			
血液採樣		×	×	×	×	×
試驗性挑戰					×	
組織採樣						×
終末期處死				×		×

* 一般健康係於各研究日偵測(第 1 日直至第 35 日)

** 於第 30 日，自各組的 5 隻小鼠進行終止且收集血液用於中和

【0081】血液及血清樣品

來自研究動物的血清係使用於不同時間點測量總免疫球蛋白 G(IgG)、IgG1、IgG2a 及病毒微中和效價。血液樣品係於接種疫苗前之第 0 日及第 13 日、第 30 日自欲終止的動物藉由下顎採血法 (submandibular bleeding) 或眼眶穿刺 (retro-orbital puncture) 收集血液用於中和抗體測定，以及於第 31 日以 RSV 挑戰前收集血液。於終末期處死當日(第 35 日)，自後腔大靜脈 (posterior vena cava) 收集血液。於試驗步驟過程中使血液於室溫凝固且置於冰箱。離心凝固的血液樣品且自所有樣品分取血清且於聚丙烯管中深凍保存於 $<-10^{\circ}\text{C}$ 。

【0082】肺樣品及病毒滴定

於第 35 日，自各研究組的總計 5 隻動物採收、處理及計數肺。肺的右葉使用於 RSV 病毒效價的測定。更具體地，由第 35 日處死的動物採收的肺無菌地移除右葉，然後肺組織使用自動化 Potter 均質機 Polytron-Aggregate H(Thomas

Scientific, Swedesboro, NJ, USA)均質化於 1ml 之含有 2%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培養基。肺均質物於 4°C 以 1,400rpm 離心 10 分鐘，以及上清液稀釋為 1:5 起始稀釋物，以 TCID₅₀ 方法使用於測定病毒效價。

【0083】統計分析

統計分析係以 GraphPad Prism 5.00(GraphPad Software, San Diego, California, USA)進行。統計顯著性係使用 Mann-Whitney U 測試予以評估。P 值 0.05 或更低係考慮為代表統計顯著差異。

【0084】結果

仿病毒顆粒尺寸及尺寸分布

圖 1 顯示仿病毒顆粒的尺寸分部介於 0 至 400nm，表二總結模態呎吋、標準偏差以及顆粒>150nm 的百分比。仿病毒顆粒的平衡密度梯度離心分析的結果示於圖 2。

表 2. 模態尺寸、標準偏差以及顆粒>150nm 的百分比

顆粒尺寸	RSV-A2	RSV-A2 系 19F	RSV-A2 系 19F I557V
5 至 155nm	97%	100%	97%
155 至 405nm	3%	0%	3%

病毒效價

病毒效價係由來自每組 5 隻小鼠的肺均質物上清液的分取液測定。圖 3 顯示挑戰(第 35 日)後四天的肺病毒效價。效價係顯示為如同藉由 TCID₅₀ 所測定之 50%終點效價。所有仿病毒顆粒疫苗調配物皆觀察到保護活病毒挑戰，而對照組小鼠未受到保護。接受對照物的組所觀察到的病毒效價，相對於接受疫苗的所有組的效價，顯著較高。此研究中藉由仿病毒顆粒疫苗

所賦予的保護之間沒有差異。統計分析係使用雙側 Mann Whitney U test 進行。

活體外中和

來自每組個別小鼠的血清係藉由病毒中和分析抗-RSV 抗體。第一次接種疫苗後 2 週及後續接種疫苗後 2 週的中和抗體效價(\log_2)係分別顯示於圖 4 及圖 5。統計分析係使用雙側 Mann Whitney U test 進行。

【0085】 相較於接受 RSV-A2 仿病毒顆粒的小鼠，接受衍生自 RSV-A2 L 19F($p<0.01$)或 RSV-A2 L 19F I557V($p<0.001$)的仿病毒顆粒的小鼠，觀察到顯著較高程度的初次接種疫苗後 2 週病毒中和抗體效價(\log_2)。對於 RSV-A2 L 19F 仿病毒顆粒以及 RSV-A2 L 19F I557V 仿病毒顆粒，平均中和效價分別為 2.5 ± 1.4 以及 3.4 ± 1.6 。對衍生自 RSV-A2 仿病毒顆粒的仿病毒顆粒，平均效價為 0.32 ± 0.70 。來自對照小鼠的血清未顯示可偵測的中和活性。

【0086】 第二次接種疫苗後 2 週，接受仿病毒顆粒疫苗的所有小鼠顯示中和抗體效價(\log_2)。相較於所有其他組，接受衍生自 RSV-A2 L 19F 或 RSV-A2 L 19F I557V 之仿病毒顆粒之小鼠中，效價顯著較高($p<0.001$)。對於衍生自 RSV-A2 L 19F 及 RSV-A2 L 19F I557V 之仿病毒顆粒的平均中和抗體效價為類似的(分別為 9.0 ± 0.6 以及 9.19 ± 0.70)。對於 RSV-A2 仿病毒顆粒的平均效價為 6.61 ± 0.86 。

【0087】 此四週研究的整個歷程中，於所有接種疫苗的動物中觀察到中和抗體效價的增加。雖然接受 RSV-A2 L 19F 仿

病毒顆粒(8/10)或 RSV-A2 L 19F I557V 仿病毒顆粒(9/10)的動物之多數者顯示第 1 次接種疫苗後 2 週的早期增加，接受 RSV-A2 仿病毒顆粒的動物(1/10)則僅有少數具有於中和抗體的早期增加。在第 2 次接種疫苗後，中和抗體進一步地於所有動物中增加。對於 RSV-A2 L 19F 仿病毒顆粒，在第 2 次接種疫苗後的增加(所有效價為 \log_2)為 2.5 ± 4.5 至 9.0 ± 0.6 ；以及對於 RSV-A2 L 19F I557V 仿病毒顆粒為 3.4 ± 6.4 至 9.19 ± 0.71 。對於接受 RSV-A2 仿病毒顆粒的動物，所觀察到的中和抗體效價的增加為 0.54 ± 0.93 至 6.1 ± 0.9 。於二時間點，接種疫苗 1 及接種疫苗 2 後的 14 日，對於以 RSV-A2 L 19F 及 RSV-A2 L 19F I557V 接種疫苗的動物，觀察到最高的中和抗體效價。

【0088】 ELISA

RSV 特異性血清 IgG

來自各別小鼠的血清係於第二次接種疫苗後 2 週(第 30/31 日)藉由 ELISA 分析抗-RSV 抗體。對於 RSV-特異性總 IgG 之幾何平均效價(GMT) \pm 標準偏差(SD)係於第二次接種疫苗後獲得。統計分細細使用雙側 Mann Whitney U test 進行。

【0089】 RSV-特異性 IgG 效價係於接受 RSV 疫苗的所有動物中觀察到，而對照動物在第二次接種疫苗後 2 週顯示無 RSV-特異性 IgG 效價(圖 6)。對於接受仿病毒顆粒疫苗的組的效價(\log_{10})範圍於 4.3 ± 0.79 至 5.48 ± 0.24 之間。於接受 RSV-A2 L 19F 仿病毒顆粒及 RSV-A2 L 19F I557V 仿病毒顆粒的動物中觀察到最高及類似的 GMT(分別為 5.32 ± 0.19 及 5.4 ± 0.24)。相較於接受 RSV-A2 仿病毒顆粒之組的效價，來自該二組的效價顯著較高。

【0090】 RSV-特異性 IgG 同型回應

RSV-特異性 IgG 同型濃度係於每組 10 隻小鼠中於第二次接種疫苗後 2 週(第 30/31 日)測定。RSV-特異性 IgG1 及 IgG2a 抗體的濃度係分別顯示於圖 7 及圖 8，且表示為 $\mu\text{g/ml}$ 血清。統計分析係使用雙側 Mann Whitney U test 進行。

【0091】 圖 7 顯示相較於對照組，於接種疫苗的所有組中，在第二次接種疫苗後 2 週增加 IgG1 抗體。對於接受 RSV-A2 仿病毒顆粒的動物的平均效價($\mu\text{g/ml}$)為 5.27 ± 3.86 。於接種疫苗 RSV-A2 L 19F 仿病毒顆粒或 RSV-A2 L 19F I557V 仿病毒顆粒的動物中觀察到最高 GMT，但組中有大的變化(分別為 11.08 ± 12.87 及 15.04 ± 12.00)。相較於接受 RSV-A2 仿病毒顆粒的動物，於接受 RSV-A2 L 19F I557V 仿病毒顆粒的動物中觀察到 IgG1 效價的顯著差異($p<0.05$)。

【0092】 圖 8 顯示第二次接種疫苗後 2 週的 IgG2a 濃度。接受仿病毒顆粒的所有組顯示增加的效價而於組中具有大的變化，但對照小鼠顯示無增加。於接種疫苗 RSV-A2 L 19F 仿病毒顆粒(30.19 ± 13.85)或 RSV-A2 L 19F I557V 仿病毒顆粒(28.64 ± 13.28)的動物中觀察到最高 GMT($\mu\text{g/ml}$)。然而，於該二組中個別小鼠效價的範圍高(分別為 12.36 至 54.32 及 13.91 至 55.37，對於接受 RSV-A2 仿病毒顆粒的動物的 IgG2 效價為 18.13 ± 9.996 ，對於 RSV-A2 L 19F 仿病毒顆粒為 30.19 ± 13.85 ，以及對於 RSV-A2 L 19F I557V 為 28.64 ± 13.28)。

【0093】 臨床觀察

動物於第 0、14、30/31 及 35 日稱重(圖 9)。於每日的一

般健康檢查及稱重期間，即使於病毒挑戰後未觀察到變化。來自不同組的所有小鼠在二次的接種疫苗投藥後的各期間增加重量。在接受 HNE 對照的動物中觀察到挑戰後的最小重量損失。於研究過程中沒有研究動物死亡或處於垂死階段。所有動物存活直到終末期步驟日(第 30 日或第 35 日)。

【0094】 結論

相較於衍生自 A2 病毒的仿病毒顆粒所誘發的程度，衍生自 L 19F A2 病毒或 L 19F I557V A2 病毒的仿病毒顆粒，誘發較高程度的中和抗體及 ELISA 血清 IgG。本研究中接種疫苗組的任一者中對於一般健康及體重變化沒有觀察到不良效果。

【0095】 實施例 2：RSV-F 蛋白質安定性

如上所述，Synagis®(帕利珠單抗；Medimmune)為人源化小鼠單株抗體，其辨識呈示於多數 RSV 病毒株的 F 蛋白質的構型非依賴性抗原決定基。5C4 為特異性地辨識 RSV F 蛋白質的融合前構型的小鼠單株抗體。帕利珠單抗係使用於定量完整病毒中的 F 蛋白質，以及 5C4 對帕利珠單抗的比例係使用於測定城市於融合前構型的 F 蛋白質的相對濃度。

【0096】 96 孔 ELISA 盤(Greiner 高結合)係以於包覆緩衝液(0.2M 碳酸氫鈉/碳酸鈉，pH 9.6)中之兔子-抗-RSV 血清的 1:100 稀釋物於 4°C 進行包覆隔夜。該等盤以林酸鹽緩衝的生理鹽水溶液(PBS，不含 Ca^{2+} 及 Mg^{2+})清洗且於室溫(RT)以於包覆緩衝液中的 2%牛血清白蛋白(BSA)封阻 1 小時後以 PBS 清洗。自 RSV 病毒株 A2、19F 及 I557V、或由該等病毒株所產生的仿病毒顆粒(如實施例 1 中所揭示的製備及組成物)之經純化的病毒

母液的序列 2 被稀釋物(於 PBS 中)，施用至該等盤。於室溫培育 1.5 小時後，盤以 PBS 清洗且於室溫以每孔 100 μ l 的 4 μ g/ml 帕利珠單抗或 4 μ g/ml 的 5C4 於具有 1%BSA 的 PBS 中培育 1.5 小時。該等盤以 PBS 清洗且分別以偶合至辣根過氧化酶(HRP)的抗體餘 PBS 中的 1:2000 稀釋物培育：對於帕利珠單抗及 5C4 分別為山羊-抗人類-HRP 及山羊-抗小鼠 HRP(二者皆得自 Bethyl Labs)。於室溫培育 1 小時後，再次清洗該等盤且以鄰-苯基-二胺(OPD)顯影。30 分鐘後反應以 H₂SO₄ 停止，以及於 ELISA 讀盤儀讀取 492nm 吸收值。吸收相對於病毒蛋白質濃度的作圖係顯示為帕利珠單抗(圖 10)及 5C4(圖 11)。線表示符合數據點的半對數；對於所有符合， r^2 為 >0.95 ，I557V(0.92)除外。係對於 C54(圖 12)及帕利珠單抗(圖 13)作圖吸收相對仿病毒顆粒蛋白質濃度。

【0097】表 3 顯示藉由曲線斜率地分界所計算的 5C4/帕利珠單抗的比例，或藉由擬合 50 μ g/ml 蛋白質濃度所計算的吸收。該等數據顯示由 RSV I557V 及 RSV 19F 所製成之仿病毒顆粒中的 RSV F 蛋白質的融合前形式有增加的安定性。二個月歷程期間的重複測定顯示於仿病毒顆粒之 5C4 抗原決定基的安定性。

表 3. 5C4/帕利珠單抗的比例

樣品	5C4/帕利珠單抗(斜率)
RSV A2 病毒	0.71
RSV I557V 病毒	0.89
RSV 19F 病毒	0.88
RSV A2 仿病毒顆粒	0.71
RSS I557V 仿病毒顆粒	1.39
RSV 19F 仿病毒顆粒	1.08

【0098】 其他具體例

雖然本發明已連結其特定具體例予以說明，應了解能進一步修改以及本申請意欲涵蓋本發明之任何變化、用途或適用下述，一般而言，本發明之準則且包括該等遠離本揭露但仍為所屬技術領域中具有通常知識者可了解為附屬於本發明且可根據本發明所揭示的主要特徵予以應用。

【0099】 本說明中所述及之所有文獻及專利申請案皆以相同內容參考方式併入本文如同每個獨立的文獻或專利申請案係具體地且各別地指稱為以其全部內容參考方式併入本文。

【0100】 如本文所述，本發明不包括該等不包括 RSV 系 19F 蛋白質之仿病毒顆粒、組成物及其相關方法(不論具有序列編號:1 的序列、相對於序列編號:1 具有或多個取代突變的序列或具有實質序列相同於序列編號:1 的序列(視需要具取代之者)，如本文所述者)。

【0101】 本文所使用之符號形式，如「一」及「該」，除非文中具體指稱，否則不排除表示對應之多數形式。類似地，多數語詞的使用不排除表示對應單一形式。

【0102】 其他具體例係包含於下述申請專利範圍的範疇。

【符號說明】

無。

序列表

<110> RSV 公司(RSV Corporation)
 艾默瑞大學(Emory University)

<120> 含呼吸道融合病毒系 19 融合蛋白的仿病毒顆粒及其用途

<130> 51011-003TW2

<150> US 62/049,705
 <151> 2014-09-12

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> respiratory syncytial virus

<400> 1

Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Lys Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Met Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Arg Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Lys Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Tyr Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Ile Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 565 570

<210> 2

<211> 298

<212> PRT

<213> respiratory syncytial virus

<400> 2

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Arg Thr
 1 5 10 15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys
 20 25 30

Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
 35 40 45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
 50 55 60

Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
 65 70 75 80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln
 85 90 95

Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr
 100 105 110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser
 115 120 125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
 130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn
 145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
 165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
 180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu
 195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu
 210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
 225 230 235 240

Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro
 245 250 255

Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
 260 265 270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln
 275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln
 290 295

<210> 3
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> respiratory syncytial virus

<400> 3

Met Glu Asn Thr Ser Ile Thr Ile Glu Phe Ser Ser Lys Phe Trp Pro
 1 5 10 15

Tyr Phe Thr Leu Ile His Met Ile Thr Thr Ile Ile Ser Leu Leu Ile
 20 25 30

Ile Ile Ser Ile Met Ile Ala Ile Leu Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn
 35 40 45

Val Phe His Asn Lys Thr Phe Glu Leu Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr
 50 55 60

<210> 4
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> respiratory syncytial virus

<400> 4

Met Glu Thr Tyr Val Asn Lys Leu His Glu Gly Ser Thr Tyr Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Val Gln Tyr Asn Val Leu Glu Lys Asp Asp Asp Pro Ala Ser Leu
 20 25 30

Thr Ile Trp Val Pro Met Phe Gln Ser Ser Met Pro Ala Asp Leu Leu
 35 40 45

Ile Lys Glu Leu Ala Asn Val Asn Ile Leu Val Lys Gln Ile Ser Thr
 50 55 60

Pro Lys Gly Pro Ser Leu Arg Val Met Ile Asn Ser Arg Ser Ala Val
65 70 75 80

Leu Ala Gln Met Pro Ser Lys Phe Thr Ile Cys Ala Asn Val Ser Leu
85 90 95

Asp Glu Arg Ser Lys Leu Ala Tyr Asp Val Thr Thr Pro Cys Glu Ile
100 105 110

Lys Ala Cys Ser Leu Thr Cys Leu Lys Ser Lys Asn Met Leu Thr Thr
115 120 125

Val Lys Asp Leu Thr Met Lys Thr Leu Asn Pro Thr His Asp Ile Ile
130 135 140

Ala Leu Cys Glu Phe Glu Asn Ile Val Thr Ser Lys Lys Val Ile Ile
145 150 155 160

Pro Thr Tyr Leu Arg Ser Ile Ser Val Arg Asn Lys Asp Leu Asn Thr
165 170 175

Leu Glu Asn Ile Thr Thr Thr Glu Phe Lys Asn Ala Ile Thr Asn Ala
180 185 190

Lys Ile Ile Pro Tyr Ser Gly Leu Leu Leu Val Ile Thr Val Thr Asp
195 200 205

Asn Lys Gly Ala Phe Lys Tyr Ile Lys Pro Gln Ser Gln Phe Ile Val
210 215 220

Asp Leu Gly Ala Tyr Leu Glu Lys Glu Ser Ile Tyr Tyr Val Thr Thr
225 230 235 240

Asn Trp Lys His Thr Ala Thr Arg Phe Ala Ile Lys Pro Met Glu Asp
245 250 255

申請專利範圍

1. 一種仿病毒顆粒，其包含呼吸道融合病毒(RSV)系 19 的融合(F)蛋白。
2. 如申請專利範圍第 1 項之仿病毒顆粒，更包含 RSV 之 G 蛋白質、小的疏水性(SH)蛋白質或基質(M)蛋白質。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之仿病毒顆粒，其中，該 F 蛋白質包含至少一種取代突變。
4. 如申請專利範圍第 3 項之仿病毒顆粒，其中，該取代突變包含於 I557 的胺基酸取代。
5. 如申請專利範圍第 4 項之仿病毒顆粒，其中，該取代為 I557V 胺基酸取代。
6. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之仿病毒顆粒，其中，該 F 蛋白質的胺基酸序列包含下述胺基酸之一或多者：於殘基 79 的甲硫胺酸、於殘基 191 的精胺酸、於殘基 357 的離胺酸以及於殘基 371 的酪胺酸。
7. 如申請專利範圍第 6 項之仿病毒顆粒，其中，該 F 蛋白質的胺基酸序列包含下述胺基酸之二或多者：於殘基 79 的甲硫胺酸、於殘基 191 的精胺酸、於殘基 357 的離胺酸以及於殘基 371 的酪胺酸。
8. 如申請專利範圍第 7 項之仿病毒顆粒，其中，該 F 蛋白質的胺基酸序列包含下述胺基酸之三或多者：於殘基 79 的甲硫胺酸、於殘基 191 的精胺酸、於殘基 357 的離胺酸以及於殘基 371 的酪胺酸。
9. 如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之仿病毒顆粒，其中，

該 F 蛋白質的胺基酸序列包含下述胺基酸之一或多者：於殘基 4 的脯胺酸、於殘基 16 的丙胺酸、於殘基 25 的絲胺酸、於殘基 76 的纈胺酸、於殘基 103 的丙胺酸、於殘基 122 的蘇胺酸、於殘基 152 的異白胺酸、於殘基 213 的精胺酸、於殘基 515 的天冬醯胺以及於殘基 519 的甘胺酸。

10. 如申請專利範圍第 9 項之仿病毒顆粒，其中，該 F 蛋白質的胺基酸序列包含下述胺基酸：於殘基 4 的脯胺酸、於殘基 16 的丙胺酸、於殘基 25 的絲胺酸、於殘基 76 的纈胺酸、於殘基 103 的丙胺酸、於殘基 122 的蘇胺酸、於殘基 152 的異白胺酸、於殘基 213 的精胺酸、於殘基 515 的天冬醯胺以及於殘基 519 的甘胺酸。
11. 如申請專利範圍第 1 至 10 項中任一項之仿病毒顆粒，其中，該仿病毒顆粒包含萃取自 RSV 株的膜的脂質及蛋白質。
12. 如申請專利範圍第 11 項之仿病毒顆粒，其中，萃取出該脂質及蛋白質之 RSV 株為嵌合 RSV 株，該嵌合 RSV 株包含 F 蛋白質經 RSV 系 19F 蛋白質置換的 RSV 株。
13. 如申請專利範圍第 11 項之仿病毒顆粒，其中，萃取出該脂質及蛋白質之 RSV 株為嵌合 RSV 株，該嵌合 RSV 株包含 A2 F 蛋白質經 RSV 系 19F 蛋白質置換的 RSV A2 株。
14. 如申請專利範圍第 1 至 13 項中任一項之仿病毒顆粒，其中，該 F 蛋白質實質上為融合前構型 (pre-fusion conformation)。
15. 如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項之仿病毒顆粒，其中，該仿病毒顆粒的 5C4/帕利珠單抗 (Palivizumab) 比例大

於來自 RSV A2 株所產生的仿病毒顆粒的 5C4/帕利珠單抗 (Palivizumab) 比例至少 20%，該 5C4/帕利珠單抗 (Palivizumab) 比例是由曲線斜率的相除而計算。

16. 如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項之仿病毒顆粒，其中，該 F 蛋白質包含選自下列所成群組之至少一種取代突變：M79I、R191K、K357T 及 Y371N。
17. 如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之仿病毒顆粒，更包含佐劑。
18. 如申請專利範圍第 17 項之仿病毒顆粒，其中，該佐劑係選自下列所成群組：皂苷、PHAD(磷酸化六醯基雙糖)、3-D-PHAD(磷酸化六醯基雙糖的 3-O-去醯基衍生物)、3-O-D MPLA(單鄰醯基脂質 A 的 3-O-去醯基衍生物)及 MPLA(單鄰醯基脂質 A)。
19. 如申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項之仿病毒顆粒，更包含磷脂醯膽鹼(PC)類、磷脂醯乙醇胺(PE)類、及/或固醇或固醇衍生物。
20. 如申請專利範圍第 1、2、6 至 15 或 17 至 19 項中任一項之仿病毒顆粒，其中，該 F 蛋白質包含序列編號:1 的序列。
21. 如申請專利範圍第 1 至 15 或 17 至 19 項中任一項之仿病毒顆粒，其中，該 F 蛋白質包含具有於 I557 的取代的序列編號:1 的序列。
22. 如申請專利範圍第 21 項之仿病毒顆粒，其中，該於 I557 的取代為 I557V。
23. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 22 項中任

一項之仿病毒顆粒，以及醫藥可接受載劑、稀釋劑、賦形劑及/或佐劑。

24. 一種於個體誘發對 RSV 之免疫應答的方法，該方法包含對該個體投藥如申請專利範圍第 23 項之醫藥組成物。
25. 如申請專利範圍第 24 項之方法，其中，該個體未受 RSV 感染，但處於發展 RSV 感染的風險。
26. 一種於個體降低 RSV 的感染及/或複製的方法，該方法包含對該個體投藥如申請專利範圍第 23 項之醫藥組成物。
27. 如申請專利範圍第 24 至 26 項中任一項之方法，其中，該個體為人類個體。
28. 一種製造如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之仿病毒顆粒的方法，該方法包含(i)將包含 RSV 系 19 的 F 蛋白質的 RSV 株的病毒外膜溶解，以及(ii)於缺乏病毒核酸的情況下再組成該病毒外膜。
29. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中，經溶解之該病毒外膜為嵌合 RSV 的病毒外膜，該嵌合 RSV 包含 A2 F 蛋白質經 RSV 系 19F 蛋白質置換之 RSV 株 A2。
30. 如申請專利範圍第 28 項或第 29 項之方法，其中，該 RSV 系 19F 蛋白質包含 I557V 胺基酸取代。
31. 一種申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之仿病毒顆粒的用途，其係使用作為醫藥。
32. 一種申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之仿病毒顆粒的用途，其係用於誘發對 RSV 的免疫應答。
33. 一種申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之仿病毒顆粒的用途。

途，其係用於預防或治療 RSV 感染的方法。

34. 一種申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之仿病毒顆粒的用途，其係用於個體疫苗接種對抗 RSV。

圖式

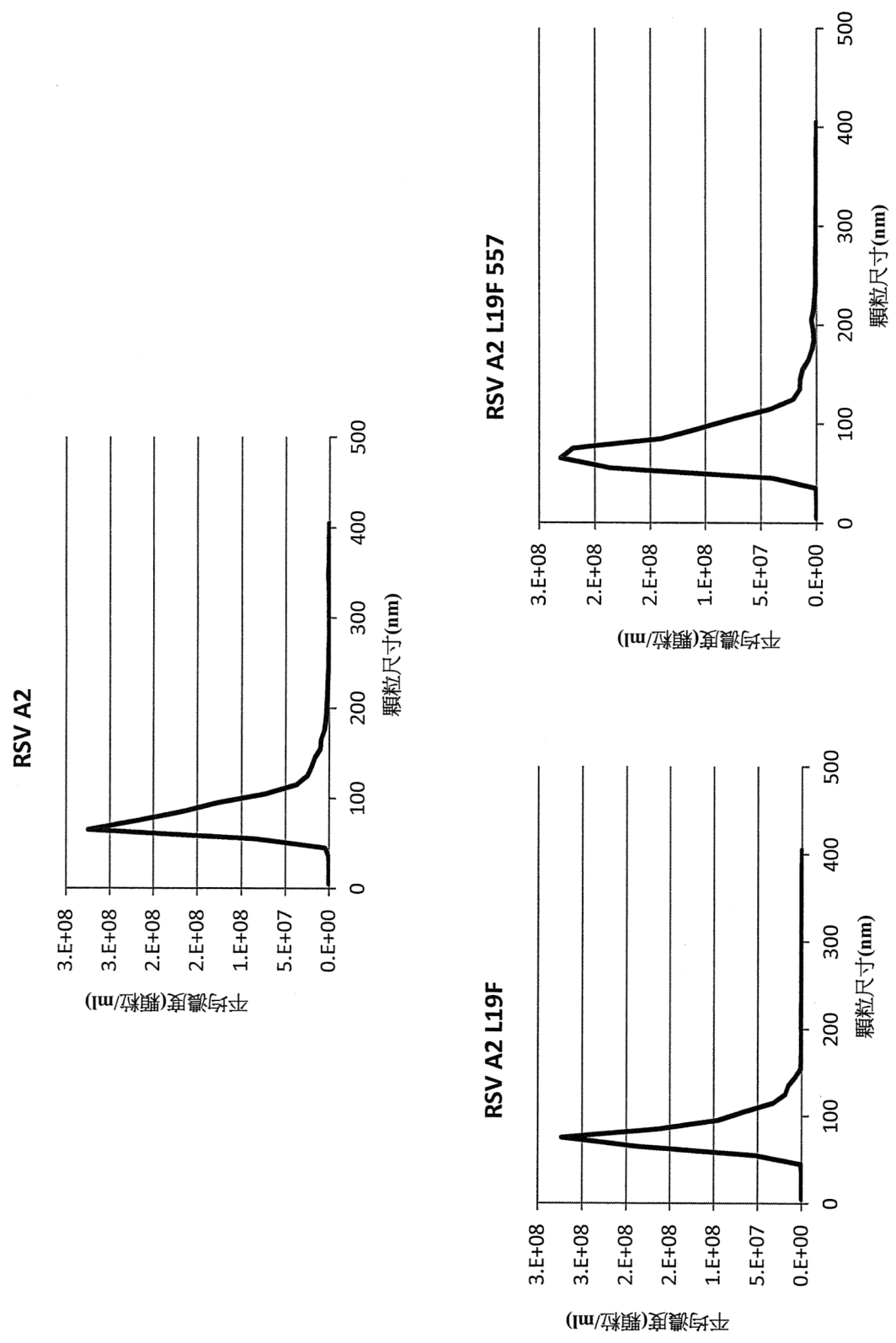


圖 1

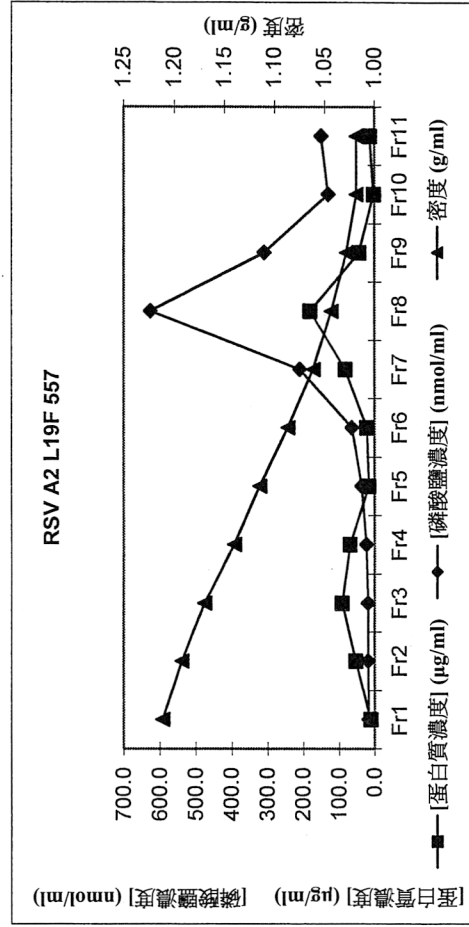
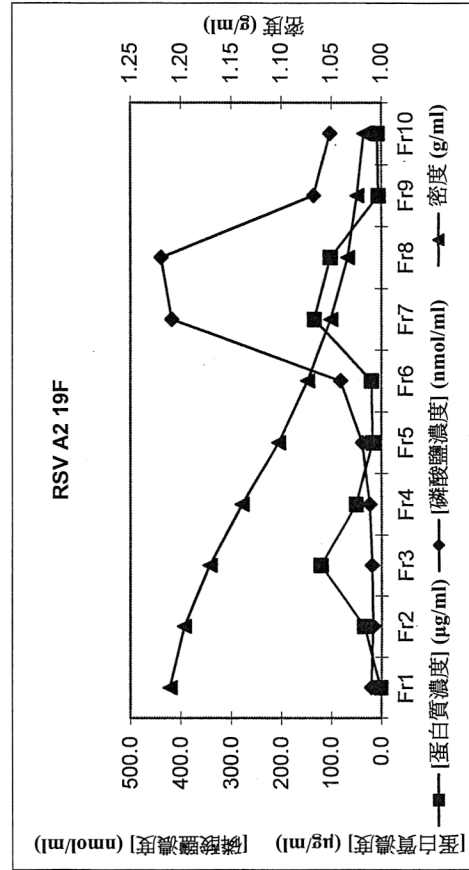
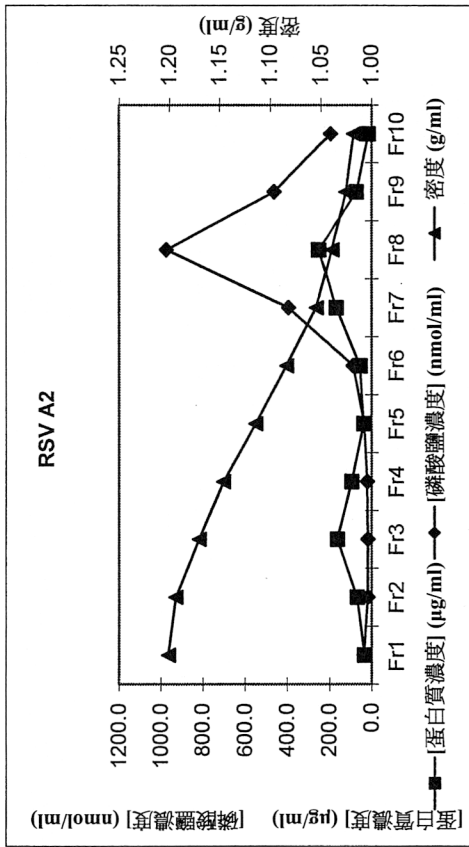


圖2

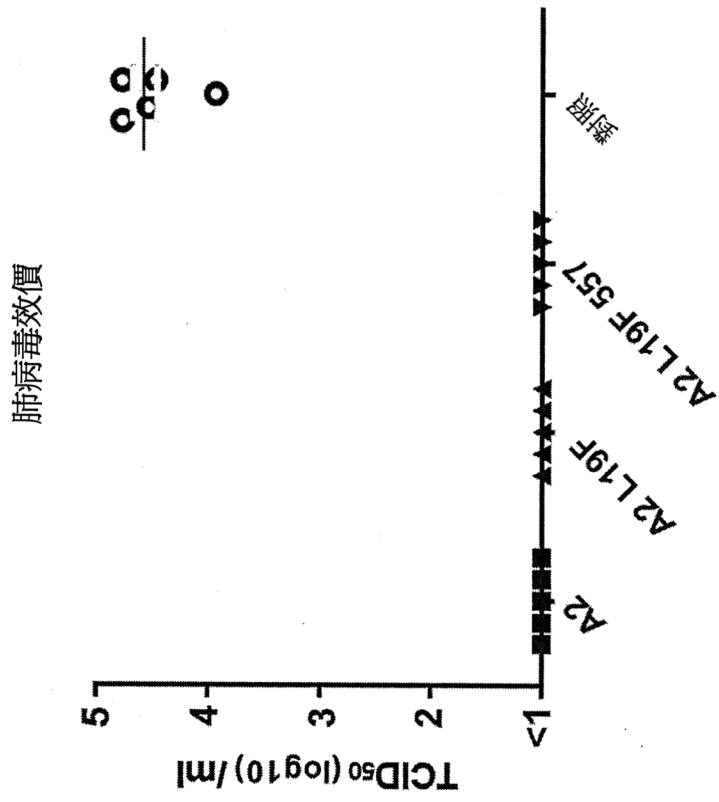


圖3

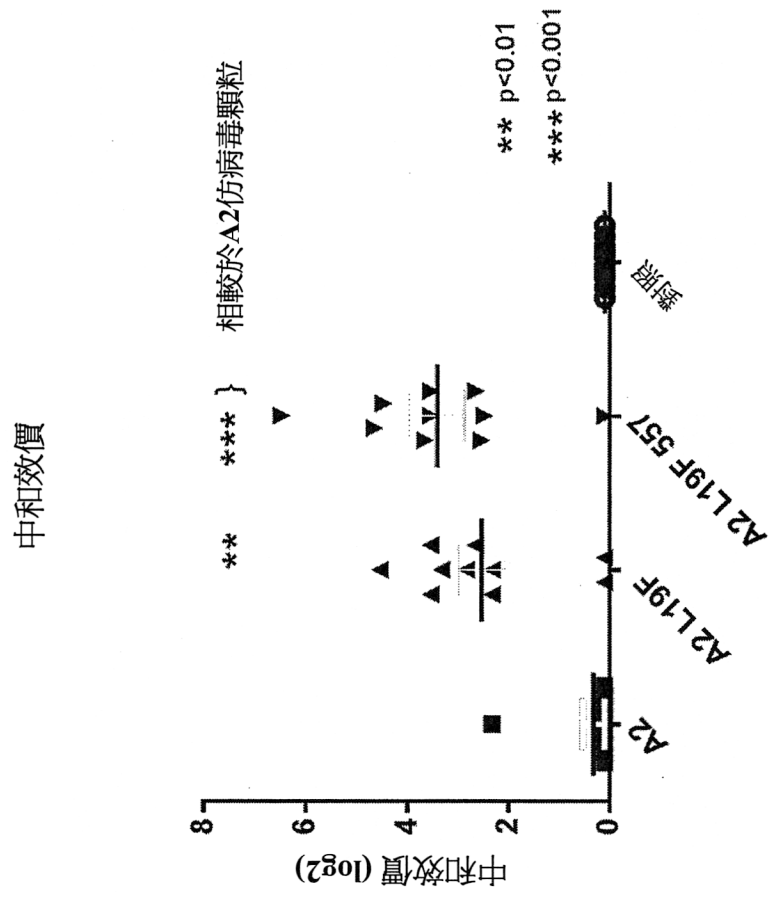


圖4

挑戰前中和效價

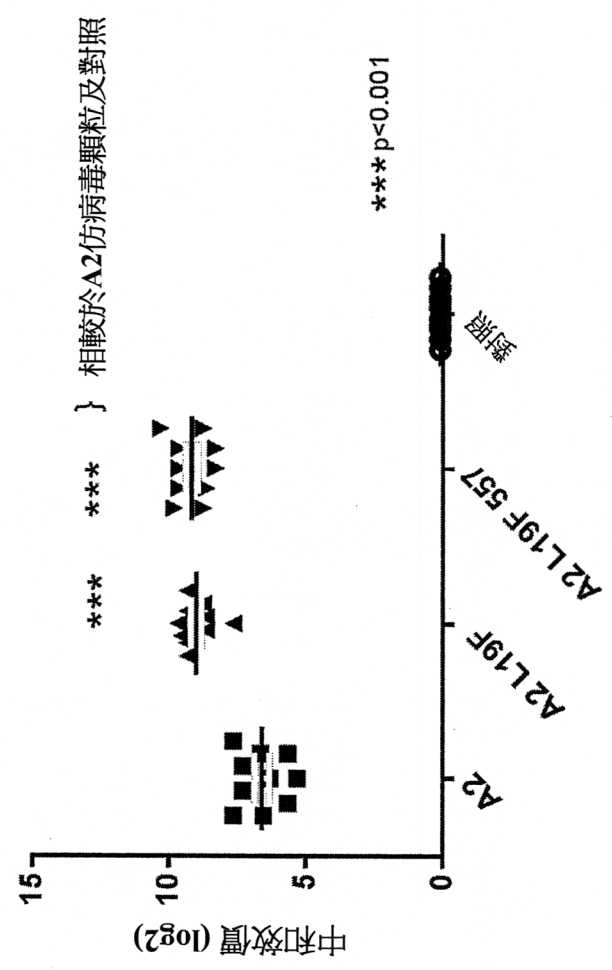


圖5

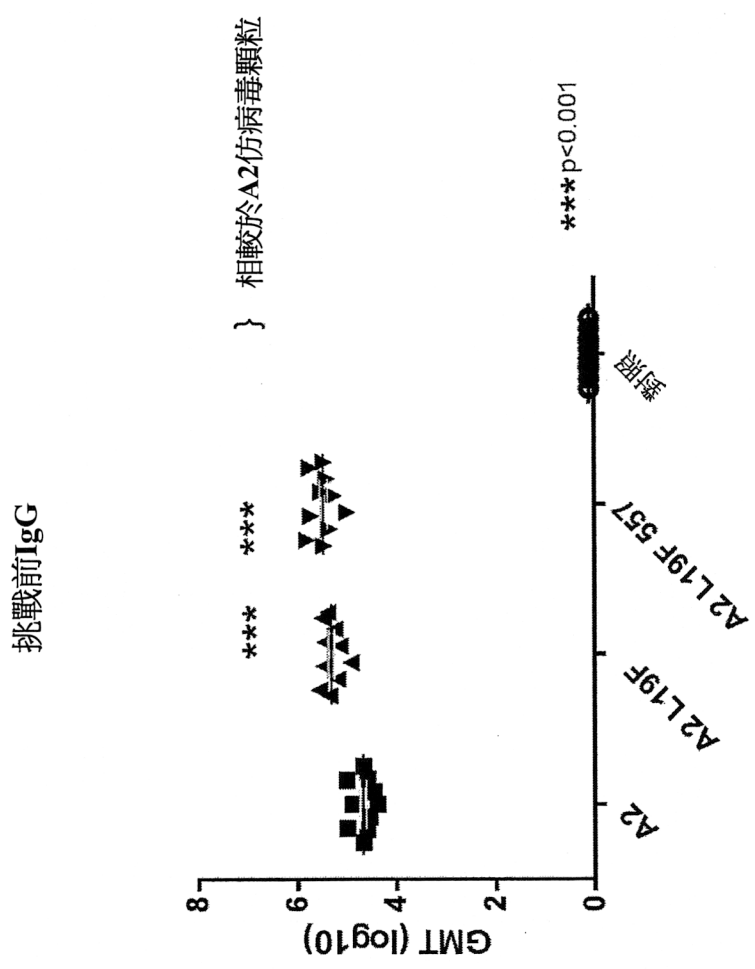


圖6

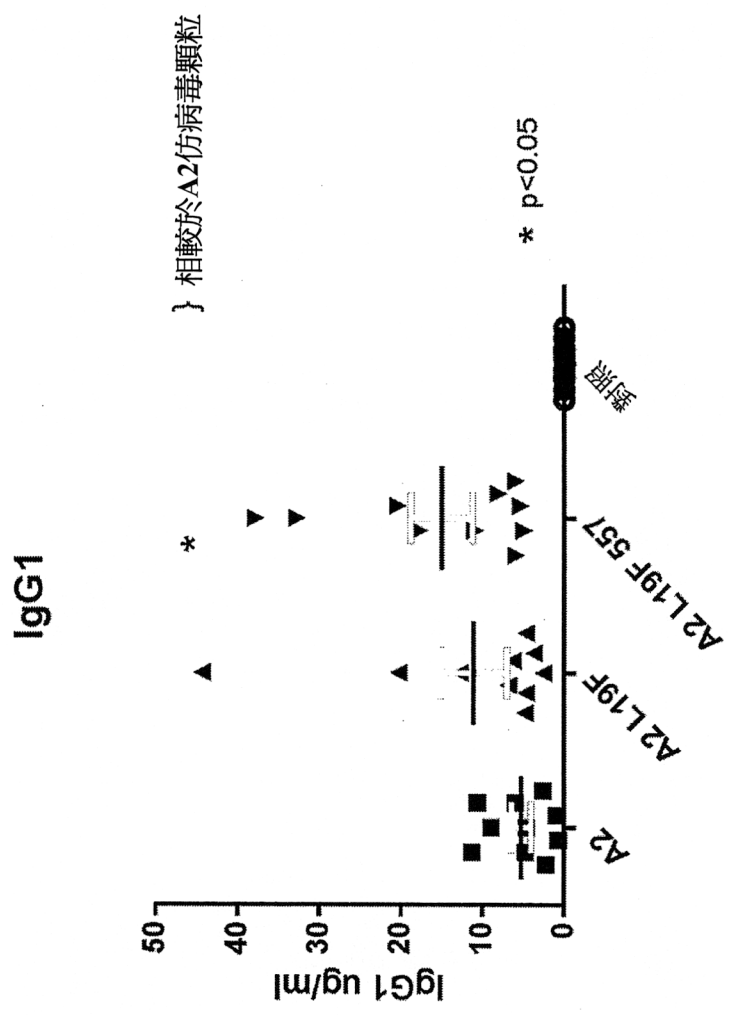


圖7

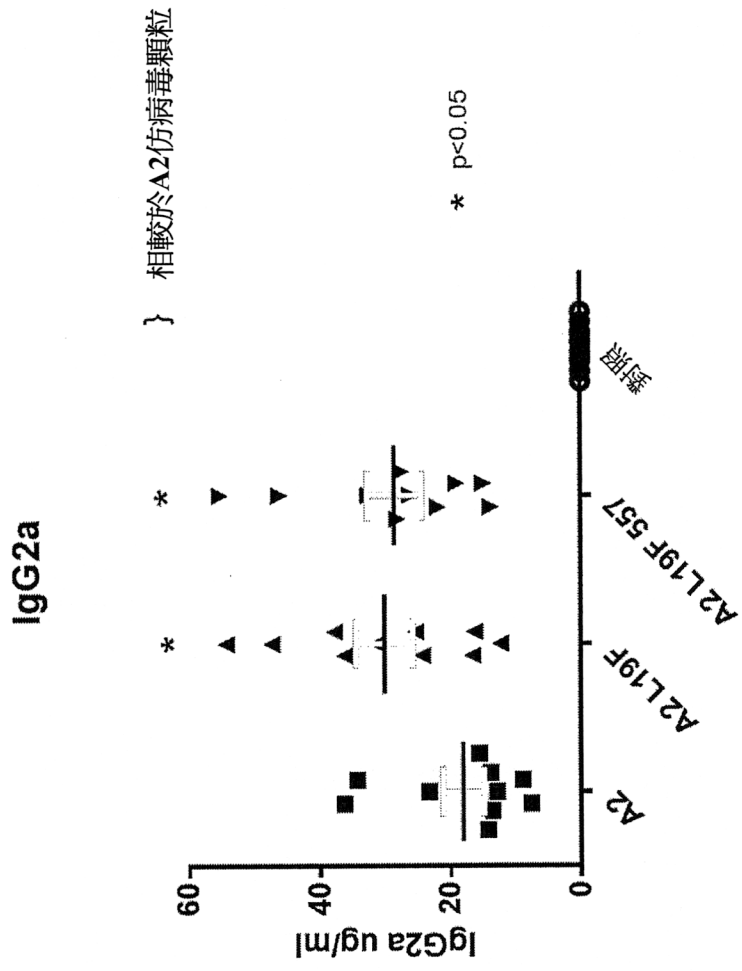


圖 8

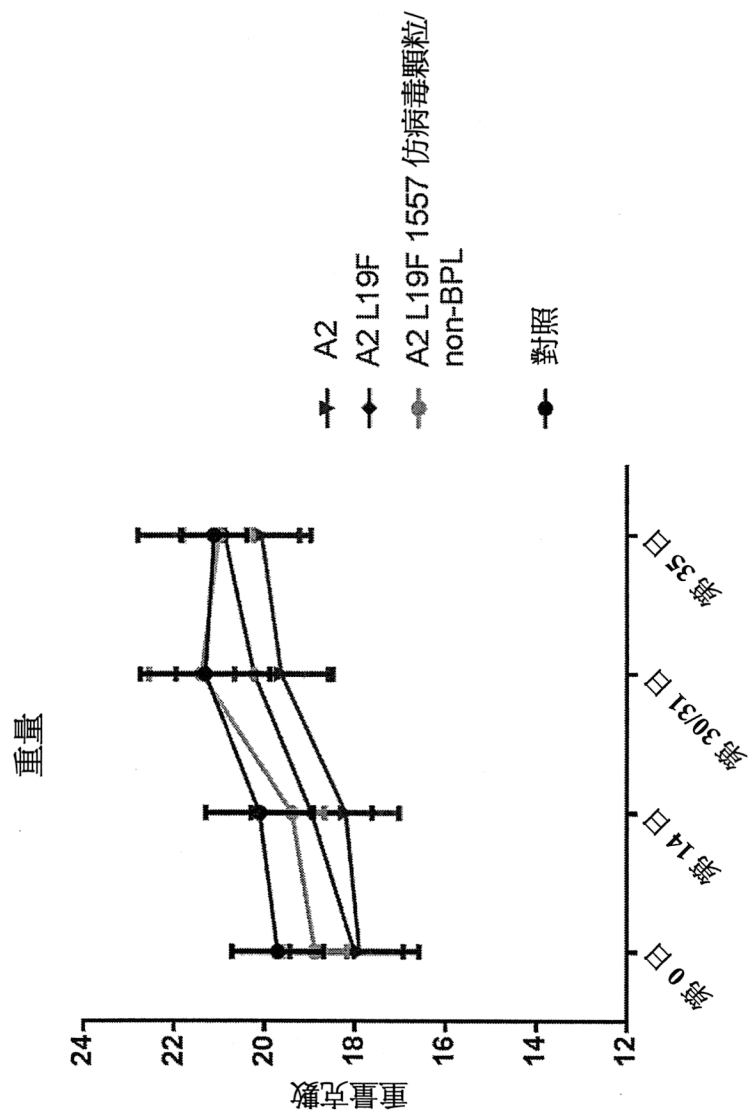


圖9

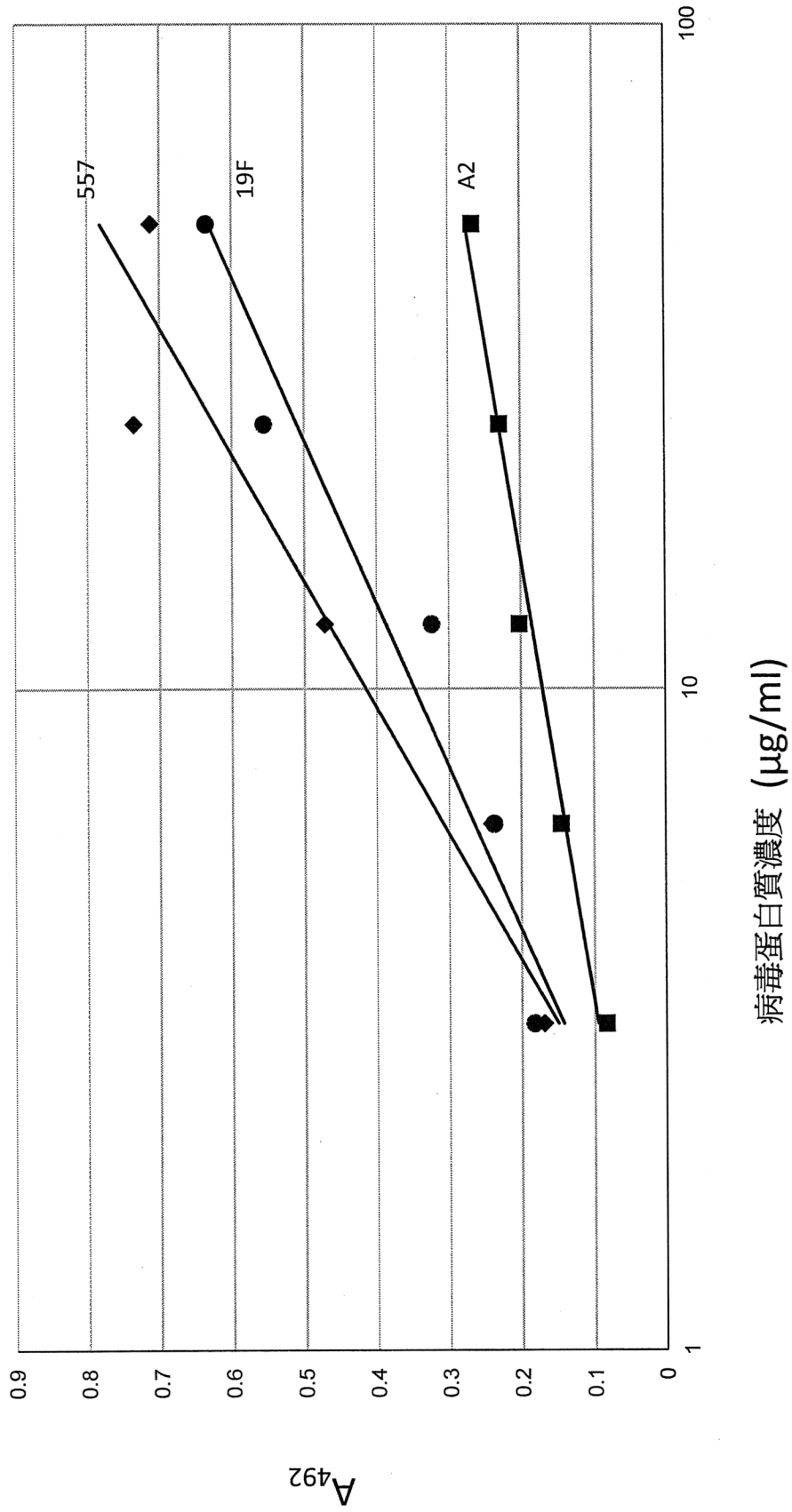


圖10

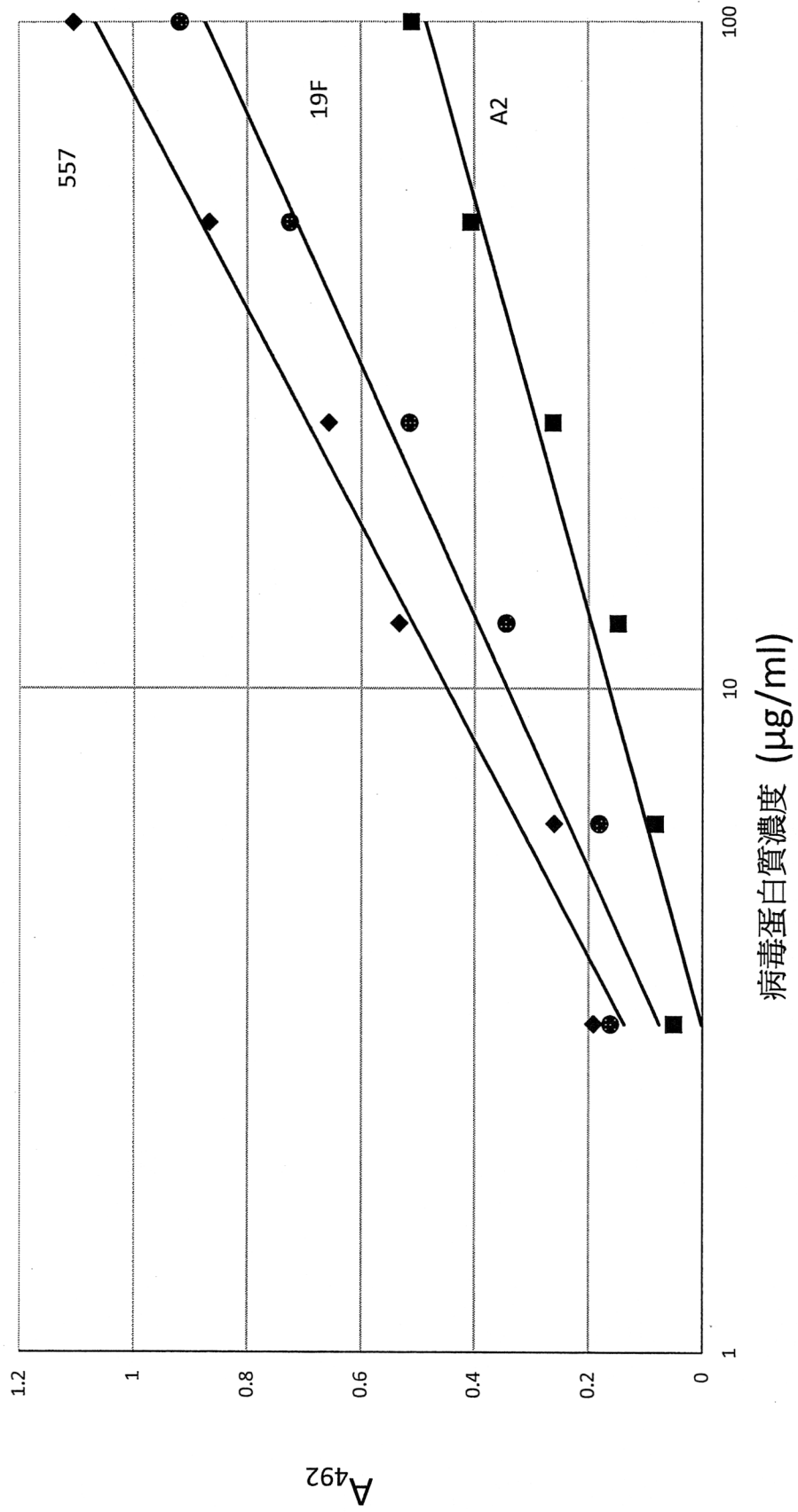


圖11

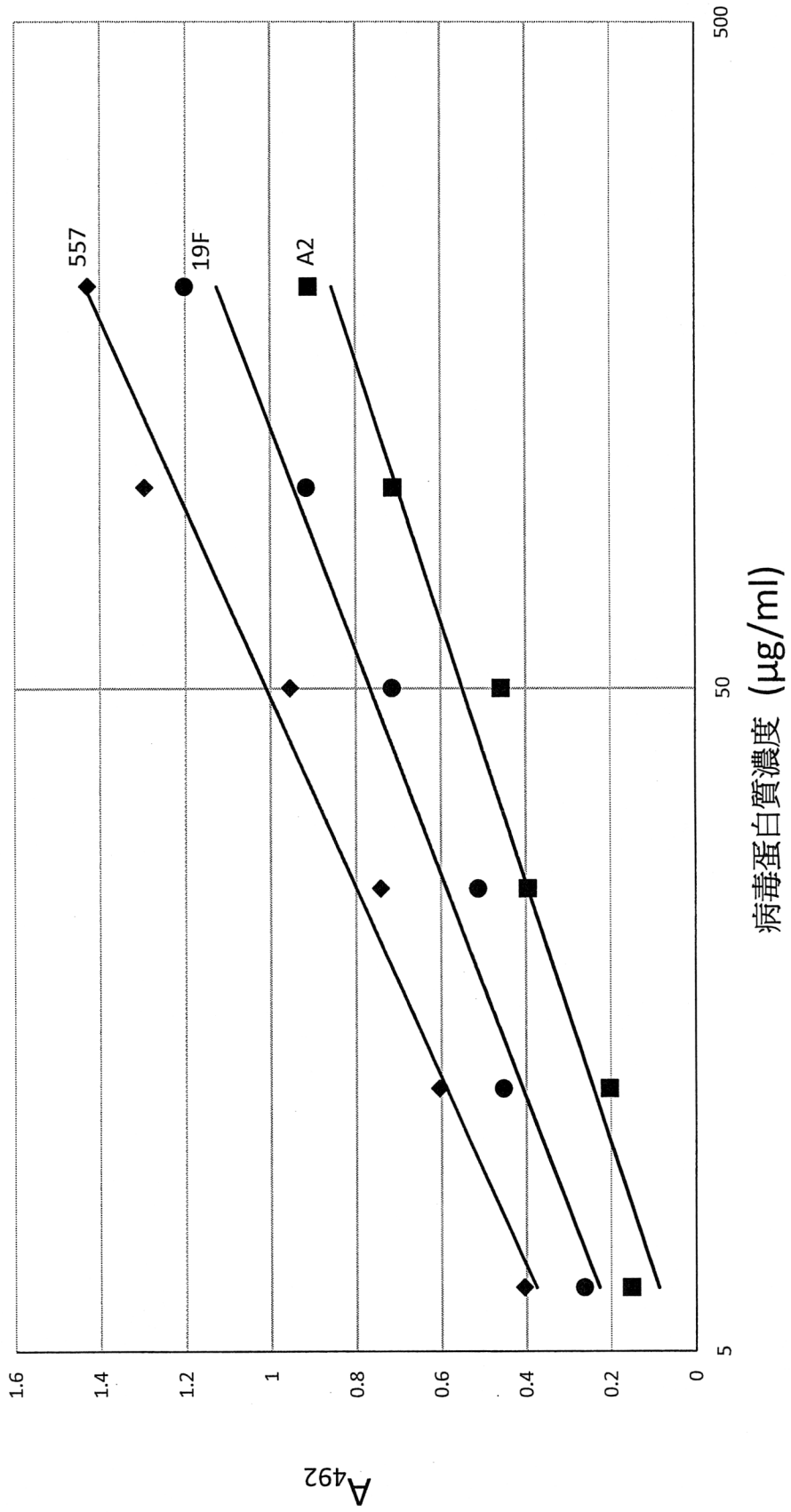


圖12

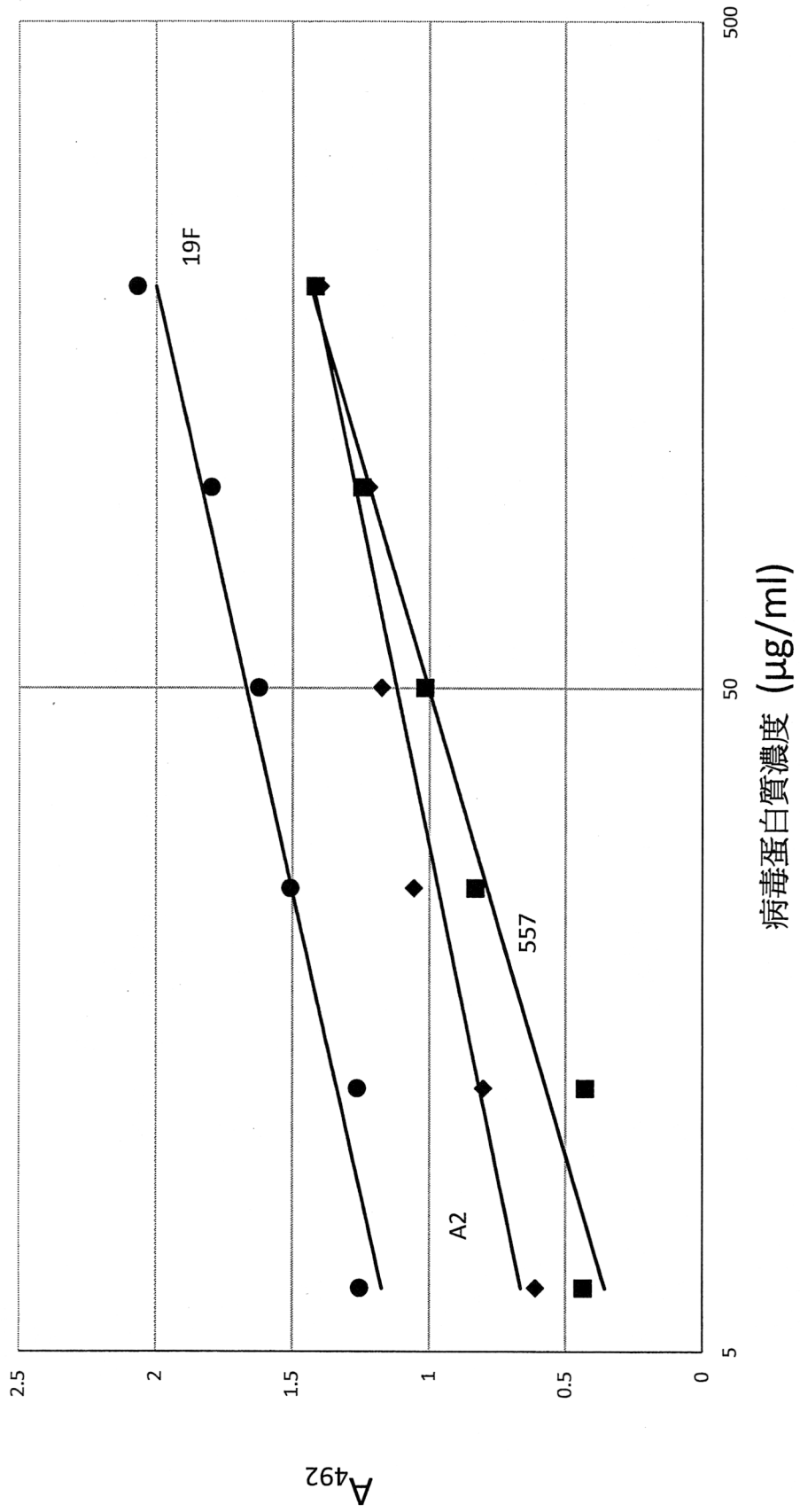


圖13