

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-517440
(P2016-517440A)

(43) 公表日 平成28年6月16日 (2016.6.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/155	4 B 0 6 5
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	4 H 0 4 5
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A	
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-503052 (P2016-503052)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014.3.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月16日 (2015.11.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/029297
 (87) 国際公開番号 W02014/144756
 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014.9.18)
 (31) 優先権主張番号 61/802, 240
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515260014
 ブイエルピー バイオテック, インコーポ
 レイテッド
 アメリカ合衆国, 9 2 1 2 1 カリフォル
 ニア州, サンディエゴ, メリーフィールド
 ロウ 3 2 1 0
 (71) 出願人 504333972
 メディミュン, エルエルシー
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーラン
 ド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミ
 ュン ウエイ
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人HARAKENZO WOR
 LD PATENT & TRADEMA
 RK

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パリピズマブエピトープベースのウイルス様粒子

(57) 【要約】

本開示は、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) に対する抗体反応を誘発するための免疫原に広く関する。より詳細には、本開示は RSV F タンパク質を含んでいるウイルス様粒子 (VLP)、ならびにその使用方法に関する。呼吸器合胞体ウイルス (RSV) は乳児および幼児における下気道疾患の主要な要因であり (Hall et al., NEJM, 360:5888-598, 2009; and Nair et al., Lancet, 375:1545-1555, 2010)、この若年の集団を防御するためのワクチンは優先度が高いものである。

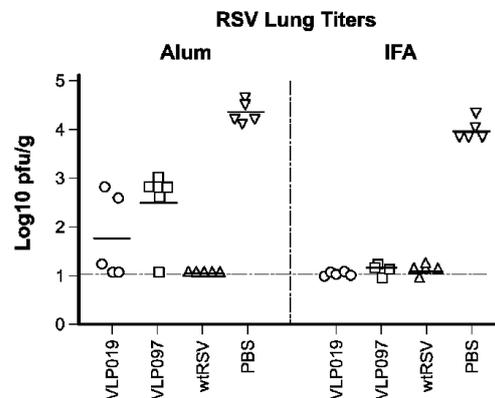


FIG. 9

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスのコア抗原を含んでいる抗原組成物であって、当該ハイブリッドコア抗原は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）Fのポリペプチドおよびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質であり、上記融合タンパク質はハイブリッドウイルス様粒子（VLP）として会合可能である、抗原組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗原組成物およびアジュバントを含んでいる、ワクチン。

【請求項 3】

有効量の、請求項 1 に記載の抗原組成物を哺乳類に投与する工程を包含している、RSV 反応性の抗体反応を誘発させる方法。

【請求項 4】

最初の免疫化および一回以上のそれに続く免疫化を包含する好適なワクチン投与計画に従って、請求項 2 に記載の有効量の上記ワクチンを上記哺乳類に投与する工程を包含している、それを必要とする哺乳類における、RSV 感染を低減させるためまたは RSV 疾患を予防するための、方法。

【請求項 5】

以下を包含する、抗 RSV 抗体をスクリーニングするための方法：

a) ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原への抗体またはその断片の結合を測定する工程であって、当該ハイブリッドコア抗原は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）F ポリペプチドおよびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質であり、上記融合タンパク質は、ハイブリッドウイルス様粒子（VLP）として会合している工程、および

b) RSV F ポリペプチドを欠いているウッドチャックヘパドナウイルス VLP への抗体またはその断片の結合を測定する工程、および

c) 上記抗体またはその断片が上記ハイブリッド VLP に結合しているが、上記 RSV F ポリペプチドを欠いている上記ウッドチャックヘパドナウイルス VLP には結合していない場合に、上記抗体またはその断片が上記 RSV F ポリペプチドに特異的であると決定する工程。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔関連する出願への相互参照〕

本願は、本願明細書にその全文が参照によって援用されている、2013年3月15日に出願された米国仮出願第 61/802,240 号の優先権を主張する。

【0002】

〔技術分野〕

本開示は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）に対する抗体反応を誘発するための免疫原に広く関する。より詳細には、本開示は RSV F タンパク質を含んでいるウイルス様粒子（VLP）、ならびにその使用方法に関する。

【0003】

〔背景技術〕

呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は乳児および幼児における下気道疾患の主要な要因であり（Hall et al., NEJM, 360:5888-598, 2009; and Nair et al., Lancet, 375:1545-1555, 2010）、この若年の集団を防御するためのワクチンは優先度が高いものである。RSV ワクチンの開発は、ホルマリン不活性化全粒子ワクチン（FI-RSV）のワクチン接種後の亢進性呼吸器疾患（enhanced respiratory disease、ERD）の発生によって妨げられている（Fulginiti et al., Am J Epidemiol, 89:435-448, 1969; Kapikian et al., Am J Epidemiol, 89:405-421, 1969; and Kim et al., Am J Epidemiol, 89:422-434,

10

20

30

40

50

1969)。特に、乳児および小児に投与される F I - R S V は、R S V 感染に対し防御しておらず、それに続く R S V の流行期の中に R S V の感染に続く重症の呼吸器疾患のリスクが実際に増加していた。ワクチン誘導性の E R D は、R S V 感染の動物モデルにおいてくり返され、このことによって、ゆがめられた T h 2 T 細胞反応および非機能的な抗 R S V 抗体（すなわち、低結合活性、非中和性、非機能阻害性および非防御性）の防御が E R D の発症へ関与する重要な因子であり、R S V ワクチンの候補の開発において回避されるべきであるという、一般的に受け入れられている見解が導かれている。

【 0 0 0 4 】

以下を含む多数の S V ワクチンの候補が次々と開発されてきた：低温死滅を伴う (cp) 生ワクチン、温度感受性 (ts) 変異体；欠失変異を有する組み換えウイルス recombinant virus with deletion mutations (S H、N S I または N S 2)；およびそれらの組み合わせ。一般的に、これらの生ワクチンは臨床試験において、残存した毒性、遺伝的な不安定性、および/または不十分な免疫原性を示した (Schickli et al., Human Vaccines, 5:582-591, 2009; Wright et al., J Infect Dis, 182:1331-1342, 2000; and Karron et al., J Infect Dis, 191:1093-1104, 2005)。また、サブユニットワクチン (精製した F 糖タンパク質 (Groothuis et al., J Infect Dis, 177:467-469, 1998)、組み換えキメラ F / G 糖タンパク質 (Prince et al., J Virol, 77:13256-13160, 2003)、F 糖タンパク質および G 糖タンパク質をコードしているプラスミド D N A (Bembridge et al., J Gen Virol, 81:2519-2523, 2000; and Li et al., Virology, 269:54-65, 2000) および G タンパク質ペプチド (De Waal et al., Vaccine, 22:915-922, 2004) が挙げられる) が開発された。しかし、非複製型の R S V ワクチンの候補は、免疫学的に未処置の乳児において試験されておらず、F I - R S V 試験が失敗していたために、動物モデルにおいて強制的な安全性プロファイルを必要とするであろう。さらに、R S V の F 糖タンパク質 (Murphy et al., Vaccine, 8:497-502, 1990) および G 糖タンパク質 (Hancock et al., J Virol, 70:7783-7791, 1996; and Johnson et al., J Virol, 72:2871-2880, 1998) は、E R D を誘導することが報告されている。

【 0 0 0 5 】

したがって、当技術分野では、R V 中和抗体を誘発するための、より良好な安全性プロファイルを有する免疫原を必要としている。特に、E R D 誘導のリスクが低減した、R S V 免疫原が望まれる。

【 0 0 0 6 】

〔 発明の概要 〕

本開示は、呼吸器合胞体ウイルス (R S V) に対する抗体反応を誘発するための免疫原に広く関する。より詳細には、本開示は R S V F タンパク質を含んでいるウイルス様粒子 (V L P)、ならびにその使用方法に関する。

【 0 0 0 7 】

本開示は、ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスのコア抗原を含んでいる抗原組成物であって、当該ハイブリッドコア抗原は、呼吸器合胞体ウイルス (R S V) F のポリペプチドおよびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質であり、当該融合タンパク質はハイブリッドウイルス様粒子 (V L P) として会合可能である、抗原組成物を提供する。いくつかの実施形態において、R S V F ポリペプチドはパリピズマブのエピトープである (例えば、パリピズマブによって結合可能)。いくつかの実施形態において、R S V F ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 3、配列番号 86 ~ 111 のうちの 1 つを含んでいるか、配列番号 86 ~ 111 のうちの 1 つと少なくとも 95 % 同一である。さらなる実施形態において、R S V F ポリペプチドは、20 ~ 60 アミノ酸の長さであるか、20 ~ 30、40 または 50 アミノ酸の間の任意の整数の長さであり得る。いくつかの実施形態において、R S V F ポリペプチドは、配列番号 1 に従って番号付けされている N 末端、44、71、72、73、74、75、76、77、78、81、82、83、84、85、92、149 および C 末端からなる群から選択されるウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原中の位置に挿入される。他の実施形態に

において、RSV Fポリペプチドは、N末端、74、81、82、149およびC末端からなる群から選択されるウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原中の位置に挿入される。いくつかの実施形態において、ハイブリッドコア抗原のアミノ酸配列は、配列番号7～85のうちの一つを含んでいるか、配列番号7～85のうちの一つと少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPはパリピズマブに結合する。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは、パリピズマブに結合する、および/またはVLP018、VLP019、VLP023、VLP027、VLP033、VLP045、VLP046、VLP048、VLP049、VLP050、VLP052、VLP053、VLP059、VLP060、VLP061、VLP062、VLP063、VLP064、VLP068、VLP072、VLP074、VLP075、VLP076、VLP078、VLP080、VLP087、VLP088、VLP089、VLP090、VLP091、VLP092、VLP093、VLP094、VLP095、VLP096、VLP097、VLP098、VLP099、VLP111、VLP112、VLP113、VLP120、VLP123、VLP124、VLP125、VLP128、VLP129、VLP130、VLP131、VLP132、VLP133、VLP134およびVLP135からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは高力価の、抗RSV Fタンパク質IgG反応を誘発する。さらなる実施形態において、ハイブリッドVLPは、高力価の、抗RSV Fタンパク質IgG反応を誘発する、および/またはVLP018、VLP019、VLP023、VLP027、VLP033、VLP045、VLP046、VLP048、VLP049、VLP050、VLP052、VLP053、VLP059、VLP060、VLP061、VLP062、VLP063、VLP064、VLP068、VLP072、VLP073、VLP074、VLP075、VLP076、VLP078、VLP080、VLP087、VLP088、VLP089、VLP090、VLP091、VLP092、VLP093、VLP094、VLP095、VLP096、VLP097、VLP098、VLP099、VLP111、VLP112、VLP113、VLP120、VLP123、VLP124、VLP125、VLP128、VLP129、VLP130、VLP131、VLP132、VLP133、VLP134およびVLP135からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは、測定可能な、RSVのサブタイプAに対する中和抗体反応およびRSVのサブタイプAに対する防御免疫反応のうちの一つまたは両方を誘発する。さらなる実施形態において、ハイブリッドVLPは、測定可能な、RSVのサブタイプAに対する中和抗体反応およびRSVのサブタイプAに対する防御免疫反応のうちの一つまたは両方を誘発する、および/またはVLP018、VLP019、VLP049、VLP050、VLP052、VLP059、VLP060、VLP062、VLP074、VLP075、VLP078、VLP080、VLP087、VLP088、VLP090、VLP091、VLP093、VLP096、VLP097、VLP098、VLP113、VLP123、VLP128、VLP130、VLP131、VLP132、VLP133、VLP134およびVLP135からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは、測定可能な、RSVのサブタイプAに対する中和抗体反応およびRSVのサブタイプAに対する防御免疫反応を誘発する。さらなる実施形態において、ハイブリッドVLPは、RSVサブタイプAに対する高力価の中和抗体反応までの中間を誘発する、および/またはVLP018、VLP019、VLP049、VLP059、VLP060、VLP074、VLP075、VLP078、VLP080、VLP087、VLP088、VLP093、VLP097、VLP123、VLP128、VLP130、VLP131、VLP132およびVLP135からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは、RSVサブタイプAの感染からの高レベルの防御までの中間を誘発する。さらなる実施形態において、ハイブリッドVLPは、RSVサブタイプAの感染からの高レベルの防御までの中間を誘発する、および/またはVLP018、VLP019、VLP049、VLP050、VLP059、VLP060、VLP062、VLP

P074、VLP075、VLP078、VLP080、VLP087、VLP088、VLP090、VLP093およびVLP096からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは、VLP019、VLP049、VLP075、VLP080、VLP087、VLP090、VLP093、VLP097、VLP123、VLP128、VLP131、VLP132およびVLP135からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは、2つ、3つ、4つまたは5つの異なるハイブリッドVLPの組み合わせを含んでいる。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは、単一のハイブリッドVLPとして会合可能な2つ、3つ、4つまたは5つの異なる融合タンパク質を含んでいる。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは、単一のハイブリッドVLPとして会合可能な2つ、3つ、4つまたは5つの異なる融合タンパク質を含んでいる。いくつかの実施形態において、ハイブリッドVLPは、VLP018、VLP019、VLP023、VLP027、VLP033、VLP045、VLP046、VLP048、VLP049、VLP050、VLP052、VLP053、VLP059、VLP060、VLP061、VLP062、VLP063、VLP064、VLP068、VLP072、VLP074、VLP075、VLP076、VLP078、VLP080、VLP087、VLP088、VLP089、VLP090、VLP091、VLP092、VLP093、VLP094、VLP095、VLP096、VLP097、VLP098、VLP099、VLP111、VLP112、VLP113、VLP120、VLP123、VLP124、VLP125、VLP128、VLP129、VLP130、VLP131、VLP132、VLP133、VLP134およびVLP135からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、RSV Fタンパク質の1つ、2つまたは3つ以上のコピーを含んでいる。さらなる実施形態において、RSV Fタンパク質のそれぞれのコピーは、ウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原中の異なる位置に挿入される。さらなる実施形態において、RSV Fタンパク質の2つまたは3つのコピーは、ウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原中の単一の位置にタンデムで挿入されている。また、いくつかの実施形態において本開示は、本開示の抗原組成物およびアジュバントを含んでいるワクチンを提供する。

【0008】

さらなる実施形態において、本開示は、哺乳類の、有効量の本開示の抗原組成物を投与する工程を包含する、免疫反応を誘発させるための方法を提供する。簡潔には、抗原組成物は、ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスのコア抗原を含んでおり、当該ハイブリッドコア抗原は、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)Fのポリペプチドおよびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質であり、当該融合タンパク質はハイブリッドウイルス様粒子(VLP)として会合可能である。いくつかの実施形態において、RSV Fタンパク質は、パリピズマブのエピトープを含んでいる(例えばパリピズマブによって結合可能)。当該方法に使用するための種々のハイブリッドコア抗原は、前述の段落の概要に詳細に記載されている。いくつかの実施形態において、免疫反応はRSV反応性の抗体反応を含んでいる。いくつかの実施形態において、本開示は、最初の免疫化およびそれに続く一回以上の免疫化を包含する、好適なワクチン投与計画に従って、本開示の有効量の抗原組成物(例えばワクチン)を哺乳類に投与する工程を包含している、それを必要とする哺乳類における、RSVを低減させるためまたはRSV疾患を予防するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、哺乳類はヒトである。いくつかの実施形態において、ヒトは乳児である(早期の小児期の免疫化方法に対して)。いくつかの実施形態において、ヒトは、妊娠している女性である(妊婦の免疫化方法に対して)。いくつかの実施形態において、本開示は仔を有している妊娠している女性に有効量の抗原組成物を投与して、妊娠している女性のRSV特異的な抗体を増加させる、RSV感染またはRSV疾患に対して仔を防御する方法であって、当該特異的な抗体の部分は、妊娠期間中に女性の胎盤を介して仔へ移送され、および/または誕生後の仔への母乳を介して移送され、それによりRSV感染またはRSV疾患に対して仔を防御する方法を提供

10

20

30

40

50

する。仔は胎児（例えば胎児）、新生児（例えば1か月未満の新生児）または乳児（例えば12か月齢までのもの）である。いくつかの実施形態において、RSV特異的な抗体は、誕生時またはその後の仔の血清において検出可能である。いくつかの実施形態において、RSV特異的な抗体は、IgG抗体を含んでいる。いくつかの実施形態において、RSV特異的な抗体は、RSV中和抗体である。いくつかの実施形態において、RSV感染に対する仔の防御は、RSVに感染した仔と比較してRSVへの曝露後に仔の鼻分泌物中のRSV力価を低減させることを包含している。いくつかの実施形態において、RSV感染に対する仔の防御は、RSV誘導性の細気管支炎を有する仔と比較してRSVによる下気道感染症の発生率または重症度を低減させることを包含する。いくつかの局面において、連続する免疫化は、1回の免疫追加内である。ほかの局面において、連続する免疫化は2

10

20

30

40

50

【0009】

さらなる実施形態において、本開示は、以下を包含する、抗RSV抗体をスクリーニングするための方法を提供する：a)ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原への抗体またはその断片の結合を測定する工程であって、ハイブリッドコア抗原は呼吸器合胞体ウイルス(RSV)Fポリペプチドおよびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質であり、当該融合タンパク質はハイブリッドウイルス様粒子(VLP)として会合している工程、およびb)RSV Fポリペプチドを欠いているウッドチャックヘパドナウイルスVLPへの抗体またはその断片の結合を測定する工程、およびc)上記抗体またはその断片が上記ハイブリッドVLPに結合しているがRSV Fポリペプチドを欠いている上記ウッドチャックヘパドナウイルスVLPには結合していない場合に、上記抗体またはその断片が上記RSV Fポリペプチドに特異的であると決定する工程。いくつかの実施形態において、RSV Fポリペプチドはパリビズマブのエピトープである（例えば、パリビズマブによって結合可能）。当該方法に使用するための種々のハイブリッドコア抗原は、前述の段落の概要に詳細に記載されている。

【0010】

さらに、本開示は、ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原をコードしているポリヌクレオチドであって、当該ハイブリッドコア抗原は、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)Fのポリペプチドおよびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質である、ポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、RSV Fポリペプチドはパリビズマブのエピトープである（例えば、パリビズマブによって結合可能）。当該方法に使用するための種々のハイブリッドコア抗原は、前述の段落の概要に詳細に記載されている。さらなる実施形態において、本開示は、プロモーターとの作動可能な組み合わせにおいて本明細書に記載されているポリヌクレオチドを含んでいる発現構築物を提供する。さらなる実施形態において、本開示は、本明細書に記載されている発現構築物を含んでいる発現ベクターを提供する。さらなる実施形態において、本開示は、本明細書に記載されている発現ベクターを含んでいる宿主細胞を提供する。

【0011】

〔図面の簡単な説明〕

図1は、エピトープ挿入に対する位置的な耐性を図示している、ウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原(WHcAg)の概略図を示す。丸は以下の位置を含む粒子会合に耐性である挿入位置を示す：1(N末端)、44、71、72、73、74、75、76、77、78、81、82、83、84、85、92および187(C-末端)。149番目の残基(150~188番目の残基を欠いている)においてランケートされたWHcAgのC末端もまた、粒子の会合に耐性である。対照的に、四角は以下の位置を含む粒子会合に非耐性である：21、66、79、80、86および91。位置の番号付けは、配列番号1として記載されている全長のWHcAgアミノ酸配列に基づいている。149番目の位置においてランケートされているWHcAgは、配列番号2として記載されている。RSV F²⁵⁴⁻²⁷⁷エピトープ(配列番号3)は、この図においてWHcAgの78番目の位置に挿入されている。

【 0 0 1 2 】

図 2 は、ハイブリッド (W H c A g - R S V) ウイルス様粒子 (V L P) 試験のフローチャートを示している。

【 0 0 1 3 】

図 3 A は、パリビズマブへの結合に対する固相の抗原としてのハイブリッド W H c A g - R S V の抗原性を示している。図 3 B は、R S V F タンパク質へ結合するパリビズマブの阻害剤としての溶液中のハイブリッド V L P の抗原性を示している。

【 0 0 1 4 】

図 4 A ~ 4 D は、4 つの R S V 反応性モノクローナル抗体への結合に対する固相の抗原としてのハイブリッド W H c A g - R S V V L P の抗原性を示している。

10

【 0 0 1 5 】

図 5 は、ハイブリッド W H c A g - R S V V L P が R S V のパリビズマブ中和を阻害可能であることを示している。

【 0 0 1 6 】

図 6 A は、ハイブリッド W H c A g - R S V V L P の免疫原性を示している。図 6 B は、ハイブリッド W H c A g - R S V V L P に対する抗体が固相の R S V 組み換え F (r F) タンパク質へのパリビズマブの結合を阻害可能であることを示している。

【 0 0 1 7 】

図 7 A および図 7 B は、ハイブリッド W H c A g - R S V V L P の免疫原性を示している。図 7 C および図 7 D はハイブリッド W H c A g - R S V V L P の防御効果を示している。

20

【 0 0 1 8 】

図 8 A ~ 図 8 F は、V L P 0 1 9 血清による R S V - A、R S V - B およびパリビズマブエスケープ変異体 (M A R M S 2 7 5 F) の中和を示している。熱不活性化した血清またはパリビズマブの希釈液を 1 0 0 ~ 2 0 0 P F U の R S V と混合し、ブランクアッセイによって力価を測定する前に 1 時間インキュベートした。抗 V L P 1 9 血清は、野生型の R S V A 2 (図 8 A)、いくつかの近年の R S V A の臨床的な単離物 (図 8 B) 2 つの R S V B の臨床的な単離物 (図 8 C および図 8 D) およびいくつかの抗体エスケープ変異体 (図 8 E および図 8 F) を中和した。

【 0 0 1 9 】

図 9 は、マウスにおけるアルミニウムおよび不完全フロインドアジュバント中のハイブリッド W H c A g - R S V V L P の防御効果の比較を示している。

30

【 0 0 2 0 】

図 1 0 は、V L P の電子顕微鏡写真を示している。極低温電子顕微鏡解析を、P B S 中のパリビズマブ F a b でインキュベートした W H c A g、V L P - 1 9 および V L P - 1 9 において行った。サンプルを液体エタン中でガラス化し、NanoImaging Services, Inc において、FEI Tecnai T12 電子顕微鏡でイメージングした。

【 0 0 2 1 】

図 1 1 A ~ 図 1 1 D は、W H c A g および W H c A g と比較した、V L P 1 9 のインビトロ解析の結果を図示している (レーン 1、3 および 5) ; および W H c A g (2、4 および 6)。総タンパク質を、Sypro Ruby stain によって可視化した (レーン 1 および 2)。ウェスタンブロットは、抗 W H c A b (レーン 3 および 4) または抗 R S V F パリビズマブ (レーン 5 および 6) で検出した。図 1 1 B において、E L I S A プレートをパリビズマブの希釈液でインキュベートする前に V L P - 1 9、s F または W H c A g でコーティングした。図 1 1 C において、E L I S A プレートを、1 0 0 n g / m l のパリビズマブと混合した競合剤 (V L P - 1 9、s F または W H c A g) の希釈液でインキュベートする前に、s F でコーティングした。図 1 1 D において、ヒト血漿の希釈液でインキュベートする前に V L P - 1 9、s F または W H c A g でコーティングした。すべての E L I S A アッセイについて、結合した I g G を H R P コンジュゲートした抗ヒト I g G A b、それに続くテトラメチルベンジジンを用いたインキュベーションによって検出した。反

40

50

応を 0.1 N の HCl で停止させ、光学濃度 (OD) を 450 nm において読み取った。各 ELISA アッセイを 3 連で行い、示されたデータは単一のアッセイを示している。

【0022】

図 12A ~ 図 12C は、VLP19 を用いた免疫化によって曝露からマウスが防御され、中和 Ab および F 特異的 IgG が誘発されることを示している。BALB/c マウス (n = 5) を 0 日目および 14 日目に不完全フロインドアジュバント (IFA) または) PBS 単独の何れかにおいて調合した 40 μg の VLP19 の 100 μL を投与するか、または 0 日目に 10⁶ PFU の野生型 RSV A2 で感染させた。28 日目に、血清をサンプリングし、マウスを 10⁶ PFU の野生型 RSV A2 で曝露した。32 日目に肺を回収した。図 12B は、熱不活性化血清の RSV マイクロ中和力価を示す。図 12C は、ELISA によって決定された sF 特異的な IgG の力価の血清を示す。各動物に対するデータポイントは平均を通った線で示されている。T-test は、p 値を決定するために行われ、“ns” は、“有意差なし”を示している。示したデータは IFA による免疫化からのものであった。独自のアジュバントを用いた免疫化により、類似の結果を得た。

10

【0023】

図 13A および図 13B は、マウス抗 VLP10 血清が、RSV を中和し、sF への結合に対してパリビズマブと競合することを図示している。図 13A は、パリビズマブと比較した、VLP19 免疫化マウスから得た熱不活性化血清を用いて行った RSV の PRNT 中和アッセイの結果を示している。図 13B は、VLP19 免疫化マウスから得た血清が、sF への結合に対してパリビズマブと競合することを示している。ELISA プレートを、sF でコーティングし、ネガティブコントロールの血清か抗 VLP19 血清の何れかの希釈液と混合した一定量のパリビズマブの混合物とインキュベートした。結合したパリビズマブを HRP コンジュゲートした抗ヒト Ab で検出した。洗浄の後、色を 0.1 N HCl を伴うテトラメチルベンジジンで発色させた。光学濃度を 450 nm において読み取り、% 阻害をネガティブコントロールとの比較によって算出した。示したデータは 3 回の独立した実験の典型例である。

20

【0024】

図 14A および図 14B はアジュバントの非存在下において投与された VLP19 の免疫原性および有効性を示している。3 つの B10xB10.S F1 マウスの群は第 0 週および第 6 週目に PBS 中の VLP19 の、示された投与によって腹腔内に免疫化した。マウスを出血させ、貯めた血清を試験した。図 14A は、抗 VLP19 血清の抗 RSV タンパク質の IgG 力価を示している。図 14B は、抗 VLP19 血清の RSV 中和力価を示している。

30

【0025】

〔発明の詳細な説明〕

本開示は、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) に対する抗体反応を誘発するための免疫原に広く関する。より詳細には、本開示は RSV F タンパク質を含んでいるウイルス様粒子 (VLP)、ならびにその使用方法に関する。

【0026】

(パリビズマブエピトープ)

全ウイルスまたは RSV サブユニットへの選択的なアプローチは、当該全ウイルスまたは RSV サブユニットへの防御的免疫反応が産生され得る、RSV タンパク質またはペプチドの重要な中和の同定に關与する。1980 年代後半に、RSV の融合タンパク質 (F) に対するマウスのモノクローナル抗体が、広範な RSV 株への強力な RSV 中和能を有することが見いだされた (Beeler et al., J Virol, 63:2941-2945, 1989)。強く中和されているマウスの Mab 1129 は、続いてヒト化され、パリビズマブと命名された。パリビズマブ (MedImmune, LLC によって製造された SYNAGIS RSV F タンパク質阻害剤のモノクローナル抗体 (Gaithersburg, MD)) の受動的な移送は、RSV によって生じる重症の下気道疾患の予防のための小児の受動免疫化として、米国食品医薬品局によって承認された。詳細には、SYNAGIS の安全性および有効性は、気管支肺形成異常を有する小児、未熟児 (36 週未満の妊娠期間中の誕生)、および重症の先天的な心疾患

40

50

を有する小児において確立された。パリビズマブは、RSVの融合(F)タンパク質と結合し、遺伝的なサブタイプAおよびBの両方を中和する(Blanco et al., Hum Vaccine, 6:482-492, 2012)。

【0027】

パリビズマブの使用は一般的な集団または成人へ拡大されておらず、予防的には有効であるが、治療的には有効ではなかった。抗体予防法は高コストであるために、米国は、大多数の高リスクの乳児へのこの薬剤を投与する唯一の国家である。したがって、活性化ワクチンはRSVの抑制に望ましい。

【0028】

パリビズマブの投与がRSV疾患の発生を減少させることができるため、パリビズマブによって標的化したエピトープは、防御免疫反応を誘発し得る抗原を持続すると考えられる(Impact-RSV Study Group, Pediatrics, 102:531-537, 1998; Meissner et al., Am Acad Ped News, 30:1, 2009; and Wu et al., Curr Top Microbiol Immunol, 317:103-123, 2008)。パリビズマブによって標的化される抗原は大規模に研究されているが、全長のRSV Fにおいてその提示を正確に模倣する形態において配列を発現することには困難性がある。以前に、パリビズマブの結合サイトはサイトAまたはサイトIIに関してFの連続する領域であることが決定された。防御的免疫反応を誘発可能なペプチドワクチンを産生する試みがなされた。F²⁵⁵⁻²⁷⁵を含んでいる、種々の21-残基、41-残基および61-残基のペプチドが試験された(Lopez et al., J Gen Virol, 74:2567-2577, 1993)。スカシガイヘモシアニン結合ペプチドは、マウスにおいてペプチドを認識する抗体を生成できたが、血清は全長のFタンパク質を不十分に認識したのみであり、RSVウイルスを中和しなかった。これらの結果は、ペプチドワクチンとの関連においてではなく、ネイティブのFとの関連における高次構造を必要とすることを示唆している。

【0029】

さらに近年、RSV FのサイトAに対するMabを中和する他のRSVである、Mab19を用いて、ペプチドライブラリーがスクリーニングされた(Chargelegue et al., Immunology Letters, 57:15-17, 1997)。8merがはしかウイルス由来のThエピトープと結合され、樹脂中で調合された場合、マウスにおいて中和抗体を誘発した。ワクチンは、野生型のRSV曝露力価において77倍の減少を示した(Chargelegue et al., J Virol, 72:2040-2046, 1998)。興味深いことに、ミモトープはネイティブRSVのFタンパク質と配列相動性を有していなかった。

【0030】

RSV Fタンパク質エピトープの種々の担体への融合を伴う限定的な成功例の報告があった。詳細には、F²⁵⁵⁻²⁷⁸がTh1バイアスによって粘膜反応を誘発することができるアジュバントであるコレラトキシンに融合された。不完全フロイントアジュバントにおける融合タンパク質の3回の投与による鼻腔内の免疫化したマウスの80%は、野生型のRSVによる曝露から防御された(Singh et al., Viral Immunol, 20:261-275, 2007)。他の群は、ヒトパピローマウイルスのL1カプシドタンパク質から構成されるキャプソマーにおける同一のFタンパク質エピトープを発現した。キャプソマーは、RSV Fタンパク質に対する抗体によって認識され、Fタンパク質特異的抗体は、免疫化マウスから得た血清において検出されたが、免疫血清はRSVを中和することができず、RSV防御データは報告されなかった(Murata et al., Virol J, 20:261-275, 2007)。

【0031】

エピトープのスカフォールドは、RSV Fタンパク質のモタビズマブエピトープを示すために設計された。ペプチドのスカフォールドは、重要な結合サイトの予測された構造および曝露を維持しているように思われ、免疫化マウスから得た血清はFタンパク質結合活性を有していたが、血清はRSVを中和することができなかった(McLellan et al., J Mol Biol, 409:853-866, 2011; and WO 2011/050168of McLellan et al.)。

【0032】

本開示の革新的な手法は、受動的に投与されたパリビズマブが、それに続くRSVの曝

10

20

30

40

50

露においてE R Dの要因となることなく重症のR S V疾患から乳児を防御するという観察において拡大する。このことは、E R Dに関連するT h 2反応を誘導することなく中和抗体反応の誘発を含むR S Vワクチンの開発についての報告された目標と一致する (Graham et al., Immunol Rev, 239:149-166, 2011)。パリビズマブによって認識されたR S V F糖タンパク質におけるB細胞のサイトAエピトープは、ヘリックス - ループ - ヘリックスの構造的にはあるが24残基 (F²⁵⁴ - 277) 連続的配列として十分に性質決定されている (Beeler, J Virol, 63:2941-2945, 1989; Lopez et al., J Gen Virol, 74:2567-2577, 1993; and Arbiza et al., J Gen Virol, 73:2225-2234, 1992)。全長のR S V Fタンパク質におおけるパリビズマブエピトープと結合するM a bは24残基のペプチドと6000倍以下で良好に結合する (McLellan et al., Nat Struct Biol, 17:248-250, 2009) が、このことは、エピトープの構造的な性質を示している。さらに、エピトープはネイティブの3量体中のサブユニットの境界面に位置しているが、このことは、なぜそのような強力で中和するエピトープがR S V株に非常に高く保存されているのかということの説明し得るものであり、インタクトのウイルスにおける半潜在性のエピトープを構成し得る。

10

【0033】

(ウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原 (W H c A g))

W H c A gは一つには、多量体の自己会合ウイルス様粒子であるために、担体として選択された。コア粒子の基本サブユニットは、直径約34nmの240個のサブユニットの粒子上の構造に自然に会合する、21kDaのポリペプチドのモノマーである。ヘパドナコア粒子の3次構造および4次構造が解明されており (Conway et al., Nature, 386:91-94, 1997) 図1に概略的に示されている。W H c A gにおける免疫優性B細胞のエピトープは、6~82番目のアミノ酸の周辺に局在し (Schodel et al., J Exp Med, 180:1037-1046, 1994)、隣接するヘリックスを結合しているループを形成している。この観察は、H B c A gの76~82番目のループ領域中に挿入されている異種抗原がN末端またはC末端に挿入されている抗原よりも著しく抗原性および免疫原性であって、重要なことには、ネイティブのタンパク質の関連における抗原よりも免疫原性であったことと一致している (Schodel et al., J Virol, 66:106-114, 1992)。

20

【0034】

本開示の手法は、一般的に、W H c A g V L P担体にパリビズマブのエピトープを含むポリペプチドを挿入することであり、当該担体は、合成ペプチドよりも著しく免疫原性のマトリックスアレイの形式においてV L Pごとにパリビズマブの多数の複製を運搬する。本開示の組成物および方法は、高価かつ労力を要する受動的なパリビズマブの免疫化に対して、活性化した免疫化によりパリビズマブ様中和抗体を誘発することに関する。この目標は、パリビズマブのエピトープは立体配置的であり、挿入されたエピトープはインタクトのR S Vに示される抗原性の構造に近似しなければならないため、実際的には挑戦的なものであることを示した。このことは、R S V中和抗体を誘発するのに好適な方法においては、他の担体 (いわゆるエピトープのスカーフォールドなど) におけるF²⁵⁴~277を提示するための失敗した試みを説明し得る。

30

【0035】

しかし、本明細書に示されているように、本開示は、パリビズマブに結合し、高力価の中和抗体を誘発し、R S V曝露からマウスを効果的に防御する、多数のW H c A g R S V V L Pの設計および産生を可能にした。理論に縛られることなく、本成功は、W H c A g担体の免疫優性ドメインはパリビズマブのエピトープのものに匹敵するヘリックス - ループ - ヘリックスを有するという事実には部分的には起因しているかもしれない。

40

【0036】

組み合わせの技術

V L P遺伝子への異種のエピトープ配列の挿入に内在する問題は、このような操作が自己会合性を消滅させ得ることである。この会合の問題は非常に深刻であり、H B c A gまたは他のV L P技術 (例えば、ヒトパピローマウイルスのL Iタンパク質およびQ ファ

50

ージ)について研究しているいくつかのグループは、組み換え法によって粒子中にエピトープを挿入するよりも、VLPへ外来にエピトープを化学的に結合させて、至適化させている。異種抗原を化学的にコンジュゲートさせる必要性は、組み換え技術の発展によって回避された(Billaud et al., J Virol, 79:13656-13666, 2005)。このことは、キメラ粒子の所望の会合ならびに多数のさらなる改良の同定に伴う、WHcAgのC末端17個の異なる挿入部位および28個の改変体を決定することによって達成された(例えば、米国特許7,144,712号;米国特許7,320,795号および米国特許7,883,843号を参照のこと)。粗細菌可溶化液を用いて、発現レベル、VLPの会合および挿入物の免疫原性を測定する、ELISAベースのスクリーニングシステムが開発され、大きな労働力を要する、十分に発現および/または会合しないハイブリッドVLPに対して精製工程を用いる必要性が回避された。

10

【0037】

2~7変異体および表Iに列挙されているいくつかの変異体を、mWHcAg特異的な免疫原性および/または免疫原性を低下させるように設計した。新規な改変したWHcAg担体のプラットフォームは、RSVFエピトープの提示に有益なシステムを提供する。

【0038】

【表1】

表I. 抗原性および/または免疫原性に影響するWHcAg変異

20

名称	説明
Δ1	WHcAg/免疫優性ループ中の異種抗原の挿入物
Δ2	WHcAg/L21A, D26A, L27A, N28A, A29V, V31A 置換
Δ3	WHcAg/N136P, A137P 置換
Δ4	WHcAg/C61S 置換
Δ5	WHcAg/異種抗原による62~85、65~88または64~87番目の残基の置換
Δ6	WHcAg/R150A, R151A, R152A, R156A, R159A, R162A, R163A, R164A, R169A, R170A, R171A, R177A, R178A, R179A, R180A 置換
Δ6.1	WHcAg/R150A, R151A, R152A, R156A, R159A, R162A, R163A, R164A, R169A, R170A, R171A 置換
Δ7	WHcAg/N75A, I76A, T77A, S78A, E79A, Q80A, V81A, R82A, T83A 置換
Δ7.1	WHcAg/N75A, I76S, T77S, S78E, E79L, Q80E, V81L, R82E, T83L 置換

30

【0039】

融合タンパク質およびハイブリッド粒子の開発

図1に図示されているように、ループ領域(76~82番目の位置)ならびにループの外側の多数のRSVFタンパク質の挿入部位がWHcAgによって耐性であった。候補のFタンパク質エピトープが好結果のパリビズマブ抗体のエピトーププロファイルに基づいて開発された。本開示のハイブリッドVLPは、表IIに記載されているように、いくつかのカテゴリにグループ分けすることができる。

40

【0040】

【表 2】

表II. ハイブリッド、WHcAg-hAg VLPのカテゴリー

カテゴリー	説明
標準	免疫優性ループ中の78番目に挿入された異種ポリペプチド (例えばVLP019)
エピトープ改変型	異種ポリペプチドに影響を与える変化 (例えばVLP090)
担体改変	WHcAg担体に影響を与える変化 (例えばVLP049)
リンカー改変型	異種のポリペプチドのリンカーの付加または欠失 (例えばVLP050)
変異部位型	WHcAg担体の78番目以外の会合耐性の位置における異種ポリペプチドの挿入 (例えばVLP033)
置換	WHcAg担体の残基の異種ポリペプチドによる置換 (例えばVLP0123)

10

【0041】

ハイブリッドWHcAg RSV VLPの抗原性および免疫原性の性質決定

A. 抗原性

免疫原性の試験の前に、ハイブリッドWHcAg RSV VLPを、発現、粒子会合性、およびRSV特異的抗体 (例えばパリビズマブ) への結合能について性質決定した。細菌可溶化液中のハイブリッドVLPを検出するために用いた同一の捕捉ELISAシステムを、精製した粒子に用いることが可能である。簡潔には、粒子の会合性および抗体結合性をELISAによってアッセイした。SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングを、各候補のハイブリッド種のサイズおよび抗原性を評価するために用い得る。

20

【0042】

B. 免疫原性

ハイブリッドVLPの免疫反応を評価する。抗挿入物、抗タンパク質および抗WHcAg抗体のエンドポイント力価に加え、抗体の正確な特異性、アイソタイプの分布、抗体の持続性および抗体の親和性のうちの1つ以上を監視する。これらのアッセイの例は以下に記載されている。免疫反応を種々の哺乳類の種 (例えばマウスおよびコットンラットのようなかげっ歯類、非ヒトの霊長類、ヒトなど) においてインビトロで試験する。

【0043】

(組成物)

本開示の組成物は、ハイブリッドウッドチャックヘパドナコア抗原またはハイブリッドコア抗原をコードしているポリヌクレオチドを含んでおり、当該ハイブリッドコア抗原は、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) Fのポリペプチドおよびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質であり、当該融合タンパク質はハイブリッドウイルス様粒子 (VLP) として会合可能である。いくつかの実施形態において、RSV Fポリペプチドはパリビズマブのエピトープを含んでいる (例えば、パリビズマブによって結合可能)。好ましい実施形態において、組成物は、抗原性の組成物である。いくつかの実施形態において、組成物は薬学的に許容可能な担体をさらに含んでいる。“担体”という用語は、その中で、ハイブリッドコア抗原または抗原をコードしているポリヌクレオチドが哺乳類の対象に投与される、ビヒクルを指す。担体という用語は、希釈剤、賦形剤、アジュバントおよびそれらの組み合わせを包含する。薬学的に許容可能な担体は当該技術分野においてよく知られている (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences by Martin, 1975を参照)。

30

40

【0044】

例示的な“希釈剤”としては、滅菌水、滅菌生理食塩水、および滅菌バッファー等の滅菌液が挙げられる。例示的な“賦形剤”は、挿入物質 (ポリマー (例えばポリエチレングリコール)、炭水化物 (例えば、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、セルロースなど) およびアルコール (例えばグリセロール、ソルビトール、キシリトールなど) が挙げられるがこれに限定されない) である。

50

【 0 0 4 5 】

アジュバントはそれらの作用の第一の機構に基づいて2つのクラスに広く分離される：抗原提示細胞（A P C）へ相互作用した抗原を標的とするワクチン運搬システム（例えばエマルジョン、ミクロ粒子、iscom、リポソームなど）；および内生の免疫反応を直接活性化する免疫賦活アジュバント（例えば、LPS、MLP、CpGなど）。W H c A gプラットフォームは、抗原特異的B細胞および他の最初のA P C並びに抗原特異的B細胞を助ける有効なT細胞を標的化する運搬システムを提供する。簡潔には、ネイティブの休止B細胞におけるB 7 . 1およびB 7 . 2の共刺激分子発現の誘導のための、交差結合性膜免疫グロブリン（m I g）の利点によって、抗原特異的なB細胞を直接活性化することにより免疫賦活活性アジュバントとして機能する（Millich et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:14648-14653, 1997）。ヘパドナコア粒子は、T L R 7リガンドとして作用するs s R N Aを結合する、プロタミン様配列を含む（Lee et al., J Immunol, 182:6670-6681, 2009）。

10

【 0 0 4 6 】

（ A . 従来のアジュバントおよび分子アジュバント ）

アジュバントはW H c A g運搬システムを用いた場合は必要ではないが、本開示のいくつかの実施形態では、従来のアジュバントおよび/または分子アジュバントを用いる。詳細には、生理食塩水中の免疫化は効果的に抗挿入物抗体の産生を誘発する。しかし、非炎症剤（ミネラルオイル、スクアレンおよびアルミニウム塩（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなど）など）における調合物は免疫原性を向上させる。重要なことに、W H c A gの投与は、いずれのアジュバントを用いるかを考慮することなく4つすべてのI g Gアイソタイプの産生をもたらした。C p Gモチーフの包含もまた、最初の反応を増強させた。さらに、R i b i調合物などの抗炎症アジュバントの使用は非炎症剤から得たもの以下の有益性であり、このことは、アジュバントの有益性は、非特異的な炎症からよりも、貯蔵効果から生じるものであることを示している。したがって、コアプラットフォームは、アプリケーションおよび所望の抗体の質に依存してアジュバントなしまたは非炎症性アジュバントなしで用いられる。本開示のいくつかの実施形態において、I F Aは、マウスの研究において用いられるがアルミニウムまたはスクアレンはヒトの研究に用いられる。生理食塩水中の単回用量におけるハイブリッドW H c A g粒子を輸送するための好ましい例において、分子アジュバントが用いられる。多数の分子アジュバントが、標的B細胞または他のA P Cを標的化するための共に刺激物質をもたらすことによって、内生の免疫および適応性免疫の間のギャップを橋渡しするために用いられる。

20

30

【 0 0 4 7 】

B . 他の分子アジュバント

マウスのC D 4 0 L（6 5 5および4 7 0核酸のバージョンの両方）をコードしている遺伝子は、W H c A gのC末端においてこれらのリガンドを発現するために、好結果で用いられた（国際公開第W O 2 0 0 5 / 0 1 1 5 7 1号公報を参照のこと）。さらに、ハイブリッドW H c A g - C D 4 0 L粒子を用いたマウスの免疫化は、W h c A g粒子によるマウスの免疫化よりも、高いコア抗体力価の生成を生じる。しかし、所望の収量より低い、精製した粒子しか得られなかった。従って、1 0 0 %未満のC D 4 0 L融合ポリペプチドを含んでいるモザイク粒子は、この問題を解決ために製造される。W H c A g中に挿入された、C 3 d断片、B A F FおよびL A G - 3を含む他の分子アジュバントは、C末端に挿入されたときに内在化する傾向を有する。したがって、分子アジュバントのタンデムリピートが、内在化を阻止するために用いられる。あるいは、コア粒子の会合ドメインとD N A / R N A結合領域の間にあるW H c A gのいわゆるヒンジ領域中に種々の変異がC末端配列の内在化を防ぐために作られる。しかし、内在化は、A P C / B細胞膜において機能する、C D 4 0 L、C 3 d、B A F FおよびL A G - 3などのこれらの分子アジュバントに対して問題を示す。対照的に、C p G D Nなどの分子アジュバントの内在化は、細胞質の受容体のレベルにおいて機能する、これらの種類のアジュバントとして問題にはならない。

40

50

【 0 0 4 8 】

他の種類の分子アジュバントまたは免疫エンハンサーは、CD4 + T細胞エピトープ、好ましくは、大半のCD4 + T細胞（CD4 + T細胞の50%を超える、好ましくは60%を超えるより好ましくは70%を超える、最も好ましくは80%より大きいなど）に認識される、“普遍的な”CD4 + T細胞エピトープのハイブリッドコア粒子中の包含物である。一実施形態において普遍的な”CD4 + T細胞エピトープは、ヒトMHCクラスII分子の変種に結合し、ヘルパーT細胞を刺激することができる。別の実施形態において、普遍的なCD4 + T細胞エピトープは、当該抗原にヒトの集団が、天然の感染またはワクチン接種の何れかによって頻繁に曝露される抗原に好ましくは由来する（Falugi et al., Eur J Immunol, 31:3816-3824, 2001）。多数の当該普遍的なCD4 + T細胞のエピトープは、以下に記載されているがこれらに限定されない：破傷風毒素（TT）632～651番目の残基；TTの950～969番目の残基；TTの947～967番目の残基、TTの830～843番目の残基、TTの1084～1099番目の残基、TTの1174～1189番目の残基（Demotz et al., Eur J Immunol, 23:425-432, 1993）；ジフテリア毒素（DT）271～290番目の残基；DT321～340番目の残基；DT331～350番目の残基；DT411～430番目の残基；DT351～370番目の残基；DT431～450番目の残基（Diethelm-Okita et al., J Infect Dis, 1818:1001-1009, 2000）；Plasmodium falciparum circumsporozoite（CSP）321～345番目の残基およびCSP378～395番目の残基（Hammer et al., Cell, 74:197-203, 1993）；B型肝炎B抗原（HBsAg）19～33番目の残基（Greenstein et al., J Immunol, 148:3970-3977, 1992）；インフルエンザヘマグルチニン307～319番目の残基；インフルエンザマトリックス17-31番目の残基（Alexander et al., J Immunol, 164:1625-1633, 2000）およびはしかウイルスvirus fusion protein（MV F）288～302番目の残基（Dakappagari et al., J Immunol, 170:4242-4253, 2003）。

10

20

【 0 0 4 9 】

（免疫反応を誘導する方法）

本開示は、それを必要とする動物において、免疫反応を誘発する方法であって、有効量の、ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスのコア抗原を含んでいる抗原組成物を投与する工程を包含しており、当該ハイブリッドコア抗原は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）Fのポリペプチド（例えばパリビズマブエピトープ）およびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質であり、上記融合タンパク質はハイブリッドウイルス様粒子（VLP）として会合可能である、方法を提供する。また、本開示によって、提供されるのは、それを必要とする動物において、免疫反応を誘発する方法であって、有効量の、ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスのコア抗原をコードしているポリヌクレオチドを含んでいる、抗原組成物を動物へ投与得する工程を包含しており、当該ハイブリッドコア抗原は、RSV Fポリペプチド（例えばパリビズマブエピトープ）およびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質であり、上記融合タンパク質はハイブリッドウイルス様粒子（VLP）として会合可能である、方法を提供する。

30

【 0 0 5 0 】

本開示の方法によって上昇する免疫反応は、抗体反応、好ましくは中和抗体反応、好ましくは防御抗体反応を広く包含する。抗原性組成物の投与（免疫化またはワクチン接種）後の抗体反応を評価する方法は、当該技術分野においてよく知られている。いくつかの実施形態において、免疫反応はT細胞を介する反応（例えば、RSV F特異的反応（増殖反応、サイトカイン反応など）を含む。好ましい実施形態において、免疫反応は、B細胞反応およびT細胞反応の両方を含んでいる。抗原性組成物は、多数の好適な方法（筋肉内注射、皮下注射、および皮内投与）において投与され得る。投与のさらなる様式としては、鼻腔内投与および経口投与が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【 0 0 5 1 】

抗原性組成物は、妊娠している女性を包含している小児および成人の両方の処置に用いられ得る。したがって、対象は、1歳、1～5歳、5～15歳、15～55歳、または少

50

なくとも55歳未満であり得る。ワクチンを受容するための好ましい対象は、高齢者（例えば55歳を超える、60歳を超える、好ましくは65歳を超える）および若年者（例えば、6歳未満、1～5歳未満、1歳未満）である。

【0052】

投与は、単回投与または複数回投与の投与計画であり得る。複数回投与は、最初の免疫投与計画および/または追加免疫の免疫化投与計画において用いられ得る。複数回投与の投与計画において種々の用量が同一または異なる経路によって与えられ得る（例えば、腸管外プライムおよび粘膜ブースト、粘膜プライムおよび腸管外ブーストなど）。1回以上投薬の投与（典型的に2回の投与）は、免疫学的に感受性の高い対象または反応低下の対象の集団において特に有効である（例えば糖尿病患者、慢性腎疾患を有する対象など）。複数回の投与は典型的に少なくとも1週間間隔をあけて投与される（、例えば約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間、およびその類似。好ましくは複数回投与は、1か月、2か月、3か月、4か月または5か月間隔で投与される。本開示の抗原組成物は、他のワクチンを実質的に同時に（例えば同一の医療的な診察または医療従事者の訪問の間）患者に投与され得る。

10

【0053】

一般的に抗原性組成物の各用量におけるタンパク質の量は、対象における著しい逆の副作用の要因となることなく、対象における免疫反応を誘導するのに有効な量として選択される。好ましくは、誘発される免疫反応は、中和抗体であり、好ましくは防御免疫反応である。この関連における防御は、対象が感染に対して完全に防御されることを必ずしも意味しておらず、対象が疾患（特に、異種抗原に対応する病原に関連する重症の疾患）の症状の進行から防御することを意味する。

20

【0054】

ハイブリッドコア抗原（例えばVLP）の量は、どの抗原組成物が用いられるかに依存して異なる。一般的に、各ヒトの用量は、1～1500 μ g（約1 μ g～約1000 μ g、例えば、約1 μ g～約500 μ gまたは約1 μ g～約100 μ g）のタンパク質（例えば、ハイブリッドコア抗原）を含むことが予測される。いくつかの実施形態において、タンパク質の量は、下限値が上限未満である場合に、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240または250 μ gの下限値および1000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300または250 μ gの独立して選択される上限値を有する任意の範囲内である。一般的にヒトの用量は、0.1ml～1mlの用量内であり、好ましくは0.25ml～0.5mlの用量内である。免疫原性組成物中に使用される量は、対象の集団に基づいて選択される。特定の組成物に対する適切な量は、対象における抗体力価および他の反応（例えば、抗原誘導性のサイトカインの分泌）の観察に關与する標準的な研究によって確認され得る。最初のワクチン接種に続いて、対象は、約4～12週間において追加免疫を受けることができる。

30

【0055】

（キット）

また、本開示によって提供されるのは、ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスのコア抗原を含んでいるキットおよびウッドチャックのヘパドナウイルスのコア抗原であって、当該ハイブリッドコア抗原は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）Fのポリペプチド（例えばパリピズマブエピトープ）およびウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原を含んでいる融合タンパク質であり、上記融合タンパク質はハイブリッドウイルス様粒子（VLP）として会合可能であり、当該コア抗原はRSV Fポリペプチドを欠損している。いくつかの実施形態において、キットはRSV Fポリペプチド特異的抗体を測定するための指示書をさらに含む。いくつかの実施形態において、抗体はハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスのコア抗原を含んでいる抗原組成物によって免疫化された対象の血液サンプルから得た血清において存在する。

40

50

【 0 0 5 6 】

本明細書に用いられるとき、“指示書”という用語は、抗体力価の測定のためのキットに含まれる試薬（例えばハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスのコア抗原）を用いるための指示を指す。いくつかの実施形態において指示書は、インビトロの診断用製品の表示において米国食品医薬品局（FDA）によって要求される、意図した使用の記載を含んでいる。FDAは、インビトロ診断薬を医療用具として分類しており、510（k）の手順を通じて承認され得る。510（k）下でアプリケーションにおいて要求される情報は以下を含んでいる：1）インビトロ診断薬の名称（商業用または商標登録された名称、一般名称または通常の名義、および装置の分類名が挙げられる）；2）製品の意図された使用；3）適用可能な場合、510（k）陳述書を提出している所有者または操作者の設定登録番号；FD&C Actの部局513、もし既知である場合は、その適切な小委員会下で設置された分類またはもし所有者または操作者が、装置が当該部局下で分類されないと決定した場合は、インビトロ診断製品がそのように分類されないという決定およびその根拠の陳述書；4）適用可能な場合、写真または技術図面を含む、インビトロ診断製品その意図された使用および使用のための指示を説明するのに十分な、提案された表示、表示および公示、；5）陳述を支持するためのデータが付随された、装置が、米国における商業的な分配において比較可能な他のインビトロ診断製品と類似するおよび/または異なることを示す陳述書；6）実質的に同等の決定に基づく、安全性および効果の510（k）の要約；または実質的な同等性についてのFDAの知見を支持する、510（k）の安全性および効果の情報が、文書による要求の30日以内に任意の人に利用可能となるという陳述書；7）陳述者が、その最大限の知見に対し、販売前の告知において提出されたすべてのデータおよび情報は事実かつ正確であり、重要な事実が削除されていないと考えるという陳述書；および8）実質的な同等性の決定をするために、FDAにとっての必要性を要求されたインビトロ診断製品に関する任意の追加情報。

10

20

【 0 0 5 7 】

〔定義〕

本明細書において用いられるとき、単数形「“1つの”（a、anおよびthe）」は、他に示していなければ複数の参照を包含する。たとえば、“1つの（an）”賦形剤は1つ以上の賦形剤を包含する。“複数（plurality）”という用語は2つ以上を指す。

30

【 0 0 5 8 】

本明細書において用いられるとき、“含んでいる（包含している）（comprising）”という語句は無制限であり、当該実施形態がさらなる要素を含み得ることを示している。対照的に、“からなる（consisting of）”という語句は、限定されており、当該実施形態は追加の要素を含まないことを示している（トレースの不純物を除く）。“本質的に～からなる（consisting essentially of）”という語句は、部分的に限定されており、当該実施形態は当該実施形態の基本的な性質と実質的に変更しない要素を含んでいる。

40

【 0 0 5 9 】

本開示の実施は、他に示していなければ、当技術分野の技術範囲である、分子生物学の従来技術（組み換え技術を包含する）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学を用いるであろう。当該技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (Freshney, 1987); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow et al., 1988); and Current Protocols in Immunology (Coligan et al., eds., 1991)等の文献において十分に説明されている。

40

【 0 0 6 0 】

“Fタンパク質” “融合タンパク質” および “Fポリペプチド” という用語は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）RSV融合糖タンパク質を指す。多数のRSV Fタンパク質が記載され、当業者に知られている。典型的なFタンパク質はGENBANK アクセッション

50

番号AAB59858.1.に記載されている。

【0061】

本明細書において用いられるとき、“ウイルス様粒子”および“VLP”は、ウイルスに類似している構造を指す。本開示のVLPはウイルスのゲノムを欠損しており、それゆえに非感染性である。本開示の好ましいVLPはウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原(WHcAg)VLPである。

【0062】

ヘパドナウイルスコア抗原に関して“ハイブリッド”および“キメラ”という用語は、ヘパドナウイルスおよび無関係の抗原の融合タンパク質を指す(配列番号3、86~114のうちの一つ以上およびそのバリエーション)などのRSVFポリペプチド)。例えば、

10

【0063】

核酸またはポリペプチドに対して“異種の(heterologous)”という用語は、成分が、通常天然に見いだされない場合および/または異なる資源または種に由来する場合に生じること示す。

【0064】

“有効量”または“十分な量”の物質は有益または所望の結果(臨床結果が挙げられる)に影響するのに必要な量であり、“有効量”は適用される状況に依存する。免疫原性組成物を投与する状況において有効量は十分な抗原(例えば、ハイブリッド、WHcAg-RSVFVLP)を含み、免疫反応(好ましくは測定可能なレベルのRSV中和抗体)を誘発する。有効量は一回以上の投薬において投与され得る。

20

【0065】

免疫原性組成物に関して本明細書に用いられるとき、“用量(dose)”という用語は任意の一回において対象に摂取される(投与または受容される)の測定された部分を指す。

【0066】

値に関して本明細書に用いられるとき、“約”という用語はその値の90%~110%を包含する(例えば約20μgのVLPは18μg~22μgのVLPを指す)。

【0067】

本明細書において用いられるとき、“免疫化”という用語は、抗原に対する生物の反応が増大し、感染へのその抵抗能または回復能が向上することを指す。

30

【0068】

本明細書において用いられるとき、“ワクチン接種”という用語は、生物の体内へのワクチンの導入を指す。

【0069】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチド(例えばRSVFポリヌクレオチドまたはポリペプチド)を指す場合、“バリエーション”という用語は、参照のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。通常、バリエーションと参照との相違は、参照と比較して比較的少数の相違を構成する(例えば、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一)。いくつかの実施形態において、本開示はVLPのWHcAgまたはRSVF部分のうちの一つまたは両方において、少なくとも一つの付加、挿入または置換を有する、ハイブリッドWHcAg-RSVFVLPを提供する。

40

【0070】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに関して用いられる場合、“野生型”という用語は、天然に生じる資源から単離されたときそのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの性質を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。野生型のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、集団において最も頻りに観察されるものであり、それゆえ“正常の(normal)形態のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとして任意に設計される。

50

【 0 0 7 1 】

アミノ酸は、共通の側鎖の特性によってグループ分けされ得る：疎水性の (Met、Ala、Val、Leu、Ile)；中性親水性 (Cys、Ser、Thr、Asn、Gln)；酸性 (Asp、Glu)；塩基性 (His、Lys、Arg)；芳香族 (Trp、Tyr、Phe)；および配向性 (Gly、Pro)。側鎖の特性による他のグループ分けは以下のとおりである：脂肪族 (グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン)；脂肪族 - ヒドロキシル (セリンおよびスレオニン)；アミド (アスパラギンおよびグルタミン)；芳香族 (フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン)；酸性 (グルタミン酸およびアスパラギン酸)；塩基性 (リジン、アルギニンおよびヒスチジン)；硫黄 (システインおよびメチオニン)；および環状 (プロリン) いくつかの実施形態において、アミノ酸の置換は同一の分類の他のメンバーに対する一つの分類のメンバーの交換に関する保存的な置換である。別の実施形態においてアミノ酸の置換は異なる分類のメンバーに対する一つの分類のメンバーの交換に関する非保存的な置換である。

10

【 0 0 7 2 】

2つの配列間のパーセント同一性は、2つの配列の最適のアライメントに導入される必要がある、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮して、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。配列の比較に対して、典型的に一つの配列が参照配列として働き、それにテスト配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および参照配列はコンピュータに入力され、必要な場合は配列の候補が設計され、配列アルゴリズムのパラメータが設計される。デフォルトのプログラムパラメータが使用されてもよく、または、選択的なパラメータが設計されてもよい。配列比較アルゴリズムは続いて、プログラムパラメータに基づいた参照配列と比較した試験配列についてのパーセント配列同一性を計算する。同一性について2つの配列を比較する場合、配列は連続的である必要はないが、任意のギャップは、全体のパーセント同一性を低下させるペナルティを当該配列にもたらす。blastnについては、デフォルトのパラメータはGapオープニングペナルティ = 5でありギャップ拡張ペナルティ = 2である。blastpについては、デフォルトのパラメータはオープニングペナルティ = 11およびGap拡張ペナルティ = 1である。

20

【 0 0 7 3 】

“組み換え”核酸は天然には生じない配列であるか、2つの、そうでなければ分離したセグメントの配列の組み合わせによって作製される。この人工的な組み合わせは化学合成またはより一般的には、核酸の単離したセグメントの人工的な操作によって成し遂げられる (例えば、遺伝子工学技術による)。“組み換え”タンパク質は、宿主細胞 (細菌細胞または真核細胞など) に導入された異種 (例えば組み換え) 核酸によってコードされている。核酸は、導入された核酸によってコードされているタンパク質を発現可能なシグナルを有している発現ベクターにおいて導入され得るか、核酸は宿主参謀の染色体にくみ込まれ得る。

30

【 0 0 7 4 】

“抗原”は、対象中の抗体および/またはT細胞反応の産生を刺激可能な化合物、組成物または物質であり、対象中へ注入されるか、吸収されるか、またはその他の場合は対象中に導入される組成物が挙げられる。“抗原”という用語は、すべての関連する抗原性のエピトープを含んでいる。“エピトープ”または“抗原決定基”という用語は、当該部位にB細胞および/またはT細胞が反応するための部位を指す。“優性抗原エピトープ”または“優性エピトープ”は、当該エピトープに機能的に重要な宿主免疫反応 (例えば抗体反応またはT細胞反応) が作られるエピトープである。したがって、病原に対する防御的な免疫反応に関して、優性抗原エピトープは、病原によって引き起こされる疾患からの防御をもたらす宿主免疫システムによって認識される場合、それらの抗原部分である。“T細胞エピトープ”という用語は適切なMHC分子に結合される場合に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 (または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。

40

【 0 0 7 5 】

50

“アジュバント”は、抗原を含む組成物に添加される場合に、曝露を受けた受容者において抗原への免疫反応を非特異的に向上または増強する物質を指す。一般的なアジュバントとしては、当該無機物の上に抗原が吸着される無機物（アルミニウム、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムの懸濁物が挙げられる）；乳剤（油状物中の水および水中の油状物が挙げられる）（およびそのバリエーション（複乳剤および可逆性乳剤を含む）、リポサッカライド、免疫賦活性核酸（CpGオリゴヌクレオチド等）、リポソーム、Toll様受容体アンタゴニスト（特にTLR2、TLR4、TLR7/8およびTLR9アゴニスト）および当該成分の種々の組み合わせが挙げられる。

【0076】

“抗体”または“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な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結合されている、互いに2つの重鎖ポリペプチドおよび2つの軽鎖ポリペプチド（またはその複合体）からなる。ヒトにおいて抗体は5つのアイソタイプまたはクラス：IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEで定義されている。IgG抗体は4つのサブクラスにさらに分類され得る（IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4）。“中和”抗体はウイルスの感染性を阻害可能な抗体である。したがって、RSV特異的な中和抗体はRSVの感染性を阻害されるか低減させることが可能である。

【0077】

“免疫原性”の組成物は、特異的な免疫反応を誘発可能なRSV等の例えば病原に対するヒトまたは動物の対象への投与に好適な物質の組成物である（例えば実験的または臨床的な設定における）。したがって、免疫原性組成物は、1つ以上の抗原（例えばポリペプチド抗原）または抗原性のエピトープを含む。免疫原性の組成物は免疫反応を誘発または向上させることが可能な1つ以上の成分（賦形剤、担体および/またはアジュバント等）を含んでいてもよい。特定の例において免疫原性組成物は病原によって誘導される症状または状態に対して対象を防御する免疫反応を誘発させるために投与される。いくつかの場合において、病原によって生じる症状または疾患は病原への対象の曝露に続いて病原（例えばRSV）の複製の阻害によって予防（または低減もしくは改善）される。本開示の関連において、免疫原性組成物という用語はRSVに対して防御的または対症的な免疫反応を誘発させる目的のための、対象または対象の集団への投与を意図される（すなわち、ワクチン組成物またはワクチン）。

【0078】

“免疫反応”は、免疫システムの細胞（B細胞、T細胞または単球等）の、病原または抗原等の刺激への反応である（例えば免疫原性組成物またはワクチンとして調合された）。免疫反応は、抗原特異的な中和抗体等の特異的な抗体の産生を生じる、B細胞反応であり得る。免疫反応は、CD4+反応またはCD8+反応等のT細胞反応であり得る。B細胞およびT細胞反応は“細胞性”免疫反応の側面である。免疫反応は、抗体によって仲介される“体液性”免疫反応であり得る。いくつかの場合において反応は特定の抗原に特異的である（すなわち、“抗原特異的反応”）。抗原が病原由来である場合、抗原特異的反応は“病原特異的反応”である。“防御免疫反応”は、病原による感染から生じる、有害な機能または病原の活性を阻害するか、病原による感染を減少させるか、症状（死を包含する）を低減させる免疫反応である。防御免疫反応は、例えば、溶血斑減少アッセイまたはELISA融和アッセイにおけるウイルスの複製またはプラークの形成の阻害によって、またはインビボにおける病原体の攻撃への耐性を測定することによって測定され得る。免疫刺激物質（例えば病原または抗原（例えば免疫原性の組成物またはワクチンとして調合された））への対象の曝露は刺激物質に対する特異的な最初の免疫反応を誘発する。すなわち、曝露は免疫反応を“開始させる（prime）”。続く刺激物質への曝露（例えば免疫化）は、特異的な免疫反応の程度（または持続期間または両方）を増加または“追加（boost）”させ得る。したがって、免疫原性組成物を投与することによって既存の免疫反応を“追加すること（boosting）”は、抗原（または病原性）特異的反応の程度を（例えば、抗体力価および/または親和性を増加させることによって、B細胞またはT細胞特異

10

20

30

40

50

的な抗原の頻度を増加させることによって、成熟エフェクターの機能を誘導することによってまたはそれらの任意の組み合わせによって）、増加する。

【0079】

“減少（低減）する”という用語は反応または状態が薬剤の投与に伴って定量的に減少した場合、または参照の薬剤と比較して当該薬剤の投与に伴ってそれが減少した場合に、薬剤が反応または状態が低減したという、相対的な用語である。同様に、“防御する”という用語は、反応または状態の少なくとも1つの性質が実質的にまたは著しく低減されるまたは排除される限り、薬剤が感染によって生じる感染または疾患のリスクを完全に排除するというを必ずしも意味するものではない。したがって、感染または疾患またはそれらの症状に対して防御するまたは低減する、免疫原性の組成物は、疾患の感染の発生もしくは重症度、または疾患の発生または重症度が、薬剤の非存在下または参照薬剤との比較において、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約50%、例えば、測定可能に低減される限り、すべての対象における感染または疾患を必ずしも予防または排除するものではない。特定の例において減少とは低気道感染（LRTI）または発生または重症のLRTIの発生またはRSV疾患による入院またはRSVによって生じる疾患の重症度に関する。

10

【0080】

“対象”は、生体の多細胞の脊椎動物の生物である。本開示の文脈において、対象は、非ヒトの動物（例えばマウス、ラットまたは非ヒトの霊長類など）の実験対象であり得る。あるいは対象はヒト対象であり得る。

20

【0081】

核酸またはタンパク質に関して用いられる場合、“に由来する”または“～の”という用語は、その配列が対象の生物のものと実質的に同一であることを示している。

【0082】

生物学的な機能（例えば酵素活性、化合物の産生、タンパク質の発現など）に関して用いられるとき“増加する”“減少する”“減少”という用語は、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも75%、および最も好ましくは少なくとも90%の、機能における測定可能な損失を指す。機能に依存して減少は10%～100%であり得る。“実質的な減少”という用語およびその類似の用語は、少なくとも50%、75%、90%、95%または100%の減少を指す。

30

【0083】

生物学的な機能（例えば酵素活性、化合物の産生、タンパク質の発現など）に関して用いられるとき“増加する”“上昇する”“上昇”という用語は、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも75%、および最も好ましくは少なくとも90%の、機能における測定可能な増加を指す。機能に依存して上昇は10%～100%、少なくとも10倍、100倍、または1000倍～1000倍、1000倍またはそれ以上であり得る。“実質的な上昇”という用語およびその類似の用語は、少なくとも50%、75%、90%、95%または100%の上昇を指す。

【0084】

本明細書で用いられるとき、“単離した”および“精製した”という用語は天然に会合した少なくとも1つの成分から除去されている（例えばその元の環境から除去された）物質を指す。組み換えタンパク質に関して用いられるとき“単離された”という用語は、タンパク質を産生した細菌の培養培地から除去されたタンパク質を指す。当該単離されたタンパク質としては、外来の化合物（例えば培養培地、細菌の成分など）がないものである。

40

【0085】

〔実施例〕

略語：BSA（ウシ血清アルブミン）；ELISA（酵素結合免疫吸着測定法）；ERD（亢進性呼吸器疾患）；FI（ホルマリン不活性化）；IFA（不完全風呂インドアジュバント）；MAbまたはmAb（モノクローナル抗体）；OD（光学濃度）；PBS

50

(リン酸緩衝液) ; p f u または P F U (ブランク形成ユニット) ; P R N T (ブランク減少中和力価) ; R S V (呼吸器合胞体ウイルス) ; s F (可溶性 R S V F タンパク質) ; V L P (ウイルス様粒子) ; および W H c A g (ウッドチャックヘパドナコア抗原) 。

【 0 0 8 6 】

(実施例 1 - ハイブリッドウッドチャックヘパドナウイルスコア抗原 - 呼吸器合胞体ウイルス F ポリペプチドウイルス様粒子)

本実施例は、ハイブリッド W h c A g V L P の産生および性質決定のための典型的な方法を提供する。簡潔には、W h c A g - R S V V L P を、治療用の R S V モノクローナル抗体の公知および推測されたエピトープから構築した。ハイブリッド V L P を、抗原性および免疫原性について試験した。また、ハイブリッド V L P を R S V - 中和抗体を誘発する能力について試験した。

10

【 0 0 8 7 】

(材料および方法)

組み換えハイブリッド W H c A g 粒子の構築および発現。ウッドチャック肝炎ウイルスのゲノムは以前に記載されている (Cohen et al., Virology, 162:12-20, 1998), GENBA NK Accession No. NC_004107 (配列番号 4)。W H c A g 全長 (188 アミノ酸) を L a c オペロンプロモーターの制御下で p U C - W H c A g ベクターから発現させた。R S V F の配列を、単独の酵素切断部位をまたは重複オリゴヌクレオチド含むように設計して、p U C - W H c A g ベクターに R S V 配列を挿入した (Billaud et al., J Virol, 79:13656-13666, 2005; and Billaud et al., Vaccine 25:1593-1606, 2007)。R S V 融合配列および R S V 置換配列については、重複するオリゴヌクレオチドを用いて P C R によって挿入を行った。76、78、81 および 82 番目の位置に挿入された V L P については、制限酵素切断部位 E c o R I および X h o I を用い、異種のポリペプチドの挿入物を配置している N 末端および C 末端リンカーを包含させた。したがって、本開示の V L P の標準的なリンカーの組み合わせは、G I L E - X n - 1 であり、ここで、X は任意のアミノ酸であり、n は 60 以下である (配列番号 5)。74 番目の位置に挿入された V L P については、存在している S a c I の制限酵素切断部位を用いた。C 末端の融合は、連結部分にアスパラギン酸およびイソロイシンを付加する E c o R V 制限酵素切断部位を付与することによって行った。N 末端の融合は、W L W G リンカーの上流の N c o I 制限酵素切断部位を付加することによって行った (配列番号 6)。

20

30

【 0 0 8 8 】

いくつかのハイブリッド W H c A G - R S V V L P を全長 (配列番号 1) またはトランケートした W H c A G コア (配列番号 2) において構築し、他のものは改変を含んでいる全長またはトランケートした W H c A G コアにおいて構築した。いくつかの W H c A g の改変は、米国特許第 7,320,795 号において以前に記載されている。他の W H c A g の改変は、担体特異的な抗原性を低減するように作製され、

2 - W H c A g、 3 - W H c A g、 4 - W H c A g、 5 - W H c A g、 6 - W H c A g、 6.1 - W H c A g、 7 - W H c A g および 7.1 - W H c A g (表 I において上記されている。) を含んでいる。

40

【 0 0 8 9 】

プラスミドを製造業者のプロトコルに従ってコンピテント TOP10 または DH5alpha E. coli 宿主細胞に化学的に形質転換した。細菌を一晩増殖させ、リゾチーム塩溶液中で可溶化し、30 分間 20,000 x G で遠心することによって分離した。得られた上清を 25% 硫酸アンモニウムによる冷却中で一晩沈殿させた。可溶化液を、各 V L P の 3 つの特性 : 1) W H c A G の 129 ~ 140 番目の残基中のエピトープに対して特異的な、2221 M A b の使用による、W H c A g ポリペプチドのタンパク質発現 (Institute for Immunology, Tokyo University, Japan) ; 2) W H c A g における立体配置的エピトープに対して特異的な抗体を用いた粒子会合性 ; および 3) パリビズマブの使用による R S V サイト A のエピトープの提示および正しい構造 ; を評価するために設計された、捕捉酵素結合

50

免疫吸着測定法 (ELISA) においてスクリーニングした。捕捉抗体はペプチド特異的であり抗体の検出と非競合的であった。3つの特性についてポジティブであった構築物を、ヒドロキシアパタイトおよびそれに続くSEPHAROSE 4Bカラムでゲル濾過クロマトグラフィーによるさらなる精製のために選択した。各ハイブリッドのサイズおよび抗原性、WHcAg-RSV Fタンパク質をSDS-PAGEおよびウェスタンブロットティングで確認した。収率は全般に75 mg/Lを超えた。ハイブリッドWHcAg-RSV VLPであるVLP-19は極低温電子顕微鏡によっても評価した。

【0090】

ELISAアッセイ。高結合ELISAプレート (Costar) を10 μ g/mlのペプチド、1 μ g/mlのVLPまたは0.2 μ g/mlの可溶性のRSV F (sF) で一晩コーティングした。さらなる試験において、ELISAプレートをポジティブコントロールとして、0.2 μ g/mlの試験VLP、VLP-19、可溶性のRSV F (sF) で一晩コーティングするか、またはネガティブコントロールとしてWHcAgで一晩コーティングした。プレートをSuperBlock (Thermoscientific) またはPBS中の3% BSAでブロックした。5倍希釈のマウス抗血清またはパリビズマブ (1 mg/mlにおいて開始している) または2倍希釈のヒト血清サンプルを作製し、ウェルあたり50 μ lをプレートに1時間注入した。さらなる試験において、パリビズマブまたはヒト血漿サンプルを、SuperBlock中で2倍希釈し、1時間プレートに注入した。PBSバッファー中の0.5% Tween 20で4回洗浄後、1:5000で希釈されたHRP-コンジュゲート2次抗ヒトIgG Abまたは抗マウスIgGを1時間注入した。洗浄後、ウェルあたり100 μ lのテトラメチルベンジジン (Sigma) で色を発色させた。反応をウェルあたり100 μ lの0.1N HClの添加によって停止し、450 nmにおける光学濃度 (OD) をELISAプレートリーダーで読み取った。sFコートしたウェルについてのODは1.5~2.5の間であった。IgGアイソタイプの解析に対し、種々のIgGアイソタイプ特異的2次抗体を用いた。

10

20

【0091】

VLPを用いた競合ELISAアッセイについて、100 ng/mlの一定濃度のパリビズマブを5倍または2倍希釈のVLP (例えばVLP19、WHcAg担体またはsF) と混合し、混合物をELISAのウェルに注入した。検出を、HRPコンジュゲート抗ヒト抗体を用いて行い、パリビズマブへの結合を検出した。データを阻害%としてプロットした。マウス血清ELISAアッセイに対し、2倍希釈のマウス血清をPBS中の3% BSAにおいて調製した。エンドポイント力価をブランクの2倍以上上昇したODを有する最も高い希釈として算出した。抗VLP血清を用いた競合ELISAに対し、5倍または2倍希釈の抗VLP19またはコントロールの血清を10 ng/mlのパリビズマブと混合して、sFコートしたELISAプレートに注入した。検出をHRPコンジュゲート抗ヒト抗体を用いて行った。結合パーセントの計算について、0.5 μ g/mlのパリビズマブを注入した、VLPコートしたウェルとsFコートしたウェルとを比較した。sFコートしたウェルに対するODを100%に設定し、VLPコートしたウェルに対するODを100%マークと相対して算出した。

30

【0092】

SDS-PAGEおよびウェスタンブロットティング。1 μ gの物質を、12%のSDS PAGE TRISグリッセルで分離し、Sypro Ruby (Invitrogen) で染色した。複製のゲルをPVD膜 (Invitrogen) に転写し、パリビズマブ (MedImmune) およびそれに続くHRPコンジュゲート抗ヒトAb (Dako) または抗WHcウサギAb (VLP Biotech) およびそれに続くHRPコンジュゲート抗ウサギAHRP (Dako) の何れかで調査した。シグナルを電気化学発光溶液 (Thermoscientific) で検出した。バンドをGE ImageQuant LAS 4000 analyzerで視覚化した。

40

【0093】

電子顕微鏡 (EM)。NanoImaging Services, Inc.において、極低温電子顕微鏡解析を、PBSバッファー中のパリビズマブFabを有するWHcAg、VLP-19およびV

50

LP-19で行った。パリビズマブ Fab を Immunopure Fab kit (Thermoscientific) を用いて生成した。20 μ L の 1.0 mg/ml の VLP-19 を PBS バッファ中の 1.0 mg/l における Fab 20 μ L と混合し、EM 解析の前に室温で4時間インキュベートした。間欠には、3 μ L のサンプルバッファの液滴を400メッシュの銅の格子上の穴の開いた炭素フィルムに置き、液体エタン中でガラス化させた。格子を、 < 170 C における FEI Eagle 4k X 4k CCD カメラを備えた、120 eV で操作する、FEI Tecnai T12 電子顕微鏡を用いたイメージングの前に液体窒素下で保存した。

【0094】

マウス免疫化および曝露。え免疫原性試験について、B10xB10.S F1 マウスを IFA 中で乳化した 20 μ g の VLP によって、腹腔内で免疫化し、IFA 中の 10 μ g で8週目に増加させた。RSV の曝露実験について、Balb/c マウスを 250 μ g のアルミニウムを有する 100 μ g の VLP、0.5% の水中の油状物を有する 40 μ g VLP のエマルジョンまたは IFA 中で乳化した 20 μ g VLP で、0日目および14日目に腹腔内で免疫化した。28日目に、血清を回収し、マウスを鼻腔内経路で 10 μ l 中の 10^6 PFU の野生型 RSV (wt RSV) を曝露した。曝露の4日後に、肺組織を回収し、計量し、ブランクアッセイによって力価測定した。

【0095】

さらなる試験において、メスの Balb/c マウス 6~8 週齢を無作為に5つのコホートに分類し、IACUC の手順にしたがって、MedImmune における動物保護施設において連続的に番号付けした。0日目および14日目において、50 μ l の Imject IFA (Pierce) 中の、50 μ l の試験する VLP 40 μ g または PBS ので、筋肉内で免疫化した。最後のコホートのマウスに、0日目に 100 μ l において鼻腔内経路で、単回用量の 10^6 PFU の wt RSV を投与した。28日目に血清を回収し、マウスを 100 μ l において鼻腔内経路で 10^6 PFU の wt RSV - A2 を曝露した。曝露の4日後に、肺組織を回収し、氷上に保持し、計量し、取得の3時間以内に 2ml の optiMEM 中で破碎した。5分間の 1500 rpm における低速遠心の後、肺の上清をブランクアッセイによって力価測定した。

【0096】

正常な分布および予測された 0.5 以下の標準偏差を有するため、5個体のマウスを各コホートに包含させ、5つのデータはおよそ $4 \log_{10}$ PFU/g のプラシーボの力価と比較して、RSV の肺の力価を 2 以上の \log_{10} の減少によって、VLP の免疫化によって生じる防御かどうかを識別するのに十分であることが予測される。

【0097】

別個の試験において、35個体のマウスを独自のアジュバント中で調合した 20 μ g / 用量の VLP 19 で2週間間隔における4回投与で免疫化した。最終的な投与の2週間後、血清をすべてのマウスから回収し、混合した。

【0098】

コットンラットの免疫化および曝露。コットンラットの RSV 曝露実験について、動物を 250 μ g のアルミニウムを含む 0.5 μ g の sF タンパク質、250 μ g のアルミニウムまたは PBS を含む 100 μ g の VLP 19 で0、4および7週目に筋肉内に免疫化した。10週目に血清を回収し、コットンラットを鼻腔内経路の 10 μ l 中の、 10^6 PFU の野生型の RSV で曝露した。曝露の4日後に肺組織を回収し、計量し、ブランクアッセイによって力価測定した。

【0099】

RSV ブランクアッセイ。肺サンプル中のウイルスの希釈を optiMEM 中で作製した。10倍希釈、100倍希釈および1000倍希釈のウイルスを、単層の Vero 細胞 TC6 - ウェルプレートに注入した。Vero 細胞は、ATCC から購入し、MedImmune の細胞培養施設においてマイコプラズマについて試験した。1時間後、接種物をメチルセルロース添加培地 (200 μ g/ml のストレプトマイシン [Gibco] を含む、2% のウシ胎児血清、4 mM の L - グルタミンおよび 200 U のペニシリンを添加した、2XL 1

10

20

30

40

50

5 / E M E M [SAFC]と1 : 1で混合した2 %メチルセルロース)で置換し、4 ~ 5日間35 でインキュベートした。外層を吸引し、細胞をやぎ抗RSV抗体(Chemicon 1128)、それに続くHRPコンジュゲート抗やぎ抗体(Dako)で免疫染色した。赤色のブランクを3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール(Dako)で発色させた。力価をユニット(PFU) / グラムの肺組織を形成しているブランクとして記録した。

【0100】

RSV PRNT中和アッセイ。血清を50分間56 で熱不活性化した。血清の希釈液をoptiMEM中で150PFU(100 ~ 200PFU)のRSVと合わせ、Tc6ウェルプレート中の80%コンフルエントの単層のVerocell細胞に注入する前に1時間35 でインキュベートした。細胞を1時間、血清 - ウイルス混合物でインキュベートした。接種物を吸引し、細胞をメチルセルロース添加培地で表面を覆い、5日間インキュベートし、やぎ抗RSV抗体(Chemicon 1128)およびそれに続く、HRPコンジュゲート抗やぎ抗体(Dako)で免疫染色した。赤色のブランクを3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール(Dako)で発色させた。ブランク減少中和力価(PRNT)を、血清の非存在下でインキュベートしたコントロールと比較して50%のRSVが中和された希釈液として算出した。

10

【0101】

RSVマイクロ中和アッセイ。血清を50分間56 で熱不活性化させた。血清の希釈液を、500PFUのGFP - 発現RSV(RSV/GFP)と混合し、3連で96ウェルのプレート中の単層のVerocell細胞に注入する前に1時間33 でインキュベートした。22時間インキュベーション後、蛍光フォーカスユニット(FFU)をIsocyt imagerによって列挙した。報告された中和力価は50%の入力RSV/GFPウイルスが中和された補間希釈である。

20

【0102】

(結果)

多数のハイブリッドWHcAg - RSV VLPを設計し試験した。異種タンパク質の担体としてのWHcAg構造(B細胞エプトープを含んでいるRSVF断片等)の概略図が図1として示されている。免疫原性のWHc - RSV VLPを選択するための典型的な方法のグローチャートを図2として示しており、結果は表1 ~ 10に列挙している。本開示の開発の間に設計され試験されたハイブリッドWHcAg - RSV VLPの概要は表1 - 1Aに示されている。結合せず、ssRNAキャプシド形成した(例えばTLR7アジュバント)ハイブリッドVLPは以下を包含する: VLP018、VLP021、VLP029、VLP031、VLP041、VLP046、VLP051、VLP078、VLP081およびVLP087。ハイブリッドVLPのRSV Fポリペプチド挿入物の概要は表1 - Bとして示されている。

30

【0103】

【表3】

表1-0. ハイブリッド、WHcAg-RSV VLP 概要

タスク	選択基準	結果
設計	WHcAg+RSVFエピトープ	79個設計された
構築物	会合、収量および安定性	55個会合した
抗原性	パリビズマブがVLPに結合する	54個がパリビズマブに結合された
免疫原性	血清がrFタンパク質に結合する	52個が高力価の抗体を誘発した
RSV中和抗体*	マイクロ中和試験	20個が高力価の中和抗体までの中間を誘発した
RSVからの防御**	10 ⁶ PFUのRSV A2株を用いて免疫化マウスに免疫試験する	18個が防御高レベルの中間を示した

*RSV中和力価は平均のLog2値に基づいて分類した：

高いは7以上；および中間は7未満および5以上。

**防御はRSVの肺の力価においてlog10によって定義されている。

高いは2以上；および中間は2未満および1以上。

【0104】

10

20

【表4】

表1-1A. ハイブリッド、WHcAg-RSV VLPの説明[^]

VLP番号	配列番号	挿入	位置	担体Δ	E ⁺ ト-フ ⁺ Δ	リンカーΔ
VLP018	7	RSV1	78	C-トランケート	-	-
VLP019	8	RSV1	78	-	-	-
VLP020	9	RSV2	N末端	-	34-mer	+
VLP021	10	RSV2	N末端	-	34-mer	+
VLP021.1	11	RSV2	N末端	C-トランケート	34-mer	+
VLP023	12	RSV2	78	-	34-mer	+
VLP025	13	RSV1 small	65/84	Δ66-83	34-mer	-
VLP027	14	RSV3.1	78	-	39-mer	-
VLP028	15	RSV4	C末端	-	63-mer	-
VLP029	16	RSV4	C末端	Δ6	63-mer	-
VLP030	17	RSV4	N末端	-	63-mer	+
VLP031	18	RSV4	N末端	C-トランケート	63-mer	+
VLP032	19	RSV3.2	78	-	44-mer	-
VLP033	20	RSV3.2	81	-	44-mer	-
VLP034	21	RSV4	C末端	Δ6.1	63-mer	-
VLP041	22	RSV2	78	C-トランケート	34-mer	-
VLP042	23	RSV2	81	-	34-mer	-
VLP043	24	RSV2	78	Δ2	34-mer	-
VLP044	25	RSV2	78	-	35-mer	-
VLP045	26	RSV1	N末端	-	-	+
VLP046	27	RSV1	N末端	C-トランケート	-	+
VLP047	28	RSV1	74	-	-	+
VLP048	29	RSV1	81	-	-	-
VLP049	30	RSV1	78	Δ2	-	-
VLP050	31	RSV2	81	-	34-mer	+
VLP051	32	RSV2	78	C-トランケート	34-mer	+
VLP052	33	RSV2	78	Δ2	34-mer	+
VLP053	34	RSV2	78	-	34-mer	+
VLP059	35	RSV1B	78融合	-	-	+
VLP060	36	RSV5	78融合	-	21-mer	+
VLP061	37	RSV1	74	Δ7	-	+
VLP062	38	RSV1	74	Δ7.1	-	+
VLP063	39	RSV2	78	-	34-mer	+
VLP064	40	RSV6	78	-	ループ	+
VLP068	41	RSV7	78	-	ループ	+
VLP069	42	RSV8	78	-	ループ	+
VLP072	43	RSV1	76	-	-	-
VLP073	44	RSV1	82	-	-	-
VLP074	45	RSV1A	78	-	-	+
VLP075	46	RSV1B	78	-	-	+
VLP076	47	RSV1C	78	-	-	+
VLP077	48	RSV1 scram2	78	-	スクランブル	-
VLP078	49	RSV1	78	Δ6	-	-
VLP079	50	RSV1	78	Δ6.1	-	-
VLP080	51	RSV1	78	C-トランケート	-	-
VLP081	52	RSV1	78	C-トランケート	-	-
VLP087	53	RSV1	78	C-トランケート	-	-
VLP088	54	RSV1	78	Δ3	-	-

10

20

30

40

VLP番号	配列番号	挿入	位置	担体Δ	エピトープΔ	リンカーΔ
VLP089	55	RSV9	78	-	-	+
VLP090	56	RSV10	78	-	N262H	-
VLP091	57	RSV11	78	-	ループ	+
VLP092	58	RSV12	78	-	ループ	+
VLP093	59	RSV1	78	Δ4	-	-
VLP094	60	RSV13	78融合	-	+1N	+
VLP095	61	RSV14	78融合	-	+2N	+
VLP096	62	RSV15	78融合	-	+3N	+
VLP097	63	RSV16	78融合	-	+1C	+
VLP098	64	RSV17	78融合	-	+2C	+
VLP099	65	RSV18	78融合	-	+3C	+
VLP111	66	RSV1B	74/80融合	Δ75-79	-	+
VLP112	67	RSV13	74/80融合	Δ75-79	+1N	+
VLP113	68	RSV16	74/80融合	Δ75-79	+1C	+
VLP114	69	RSV19	74/80融合	Δ75-79	+1N +1C	+
VLP120	70	RSV1B	61/86	Δ5	-	+
VLP121	71	RSV1B	62/87	Δ5	-	+
VLP122	72	RSV1B	63/88	Δ5	-	+
VLP123	73	RSV1B	64/89	Δ5	-	+
VLP124	74	RSV5	63/87	Δ5	21mer	+
VLP125	75	RSV1B	61/86	Δ4/Δ5	-	+
VLP126	76	RSV1B	62/87	Δ4/Δ5	-	+
VLP127	77	RSV1B	63/88	Δ4/Δ5	-	+
VLP128	78	RSV1B	64/89	Δ4/Δ5	-	+
VLP129	79	RSV5	63/87	Δ4/Δ5	21-mer	+
VLP130	80	RSV1B	78	-	-	+
VLP131	81	RSV1B	78	-	-	+
VLP132	82	RSV1B	78	-	-	+
VLP133	83	RSV1B	78	-	-	+
VLP134	84	RSV1B	78	-	-	+
VLP135	85	RSV1B	78	-	-	+

^担体、エピトープおよびリンカーの改変は標準のハイブリッドWHcAgとの比較において記載されている：全長のWHcAgの免疫優性ループ(76番目~82番目までの残基)中に挿入されているGILE-hAg-L。(-)は標準のハイブリッドWHcAgを参照して変化させていないことを示している。

【 0 1 0 5 】

10

20

30

【表5】

表1-1B. リンカーありまたはなしのRSV Fタンパク質挿入物[^]

名称	N末端 リンカー	RSV F配列	C末端 リンカー	配列番号
RSVA		NSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN		3
RSVB		NSELLSLINDMPIITNDQKKLMS SN		86
MARM S275F		NSELLSLINDMPIITNDQKKLM F NN		87
RSV1	GILE	NSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	L	88
RSV1A	(GILE) A	NSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	L	89
RSV1B	(GILE)	NSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	L	90
RSV1C	GILE E	NSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	EEL	91
RSV1scram2	GILE	IKQSLMTDSLSPNNLNNDIKLEM	L	92
RSV1 small	(GILE)	SELLSLINDMPIITNDQKKLMS	(L)	93
RSV2	GIL(E)	TYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVR	L	94
RSV3.1	GIL(E)	VNAGVTPVS TYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	L	95
RSV3.2	GIL(E)	VNAGVTPVS TYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVR	L	96
RSV4	GIL(E)	SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVS TYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	L	97
RSV5	(GILE)	ELLSLINDMPIITNDQKKLMSN	(L)	98
RSV6	GIL(E)	NSELLSLINDLPASNDQKKLMSNN	L	99
RSV7	GIL(E)	NSELLSLINDAPAANDQKKLMSNN	L	100
RSV8	GIL(E)	NSELLSLINDAAAANDQKKLMSNN	L	101
RSV9	GIL PE	NSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	PEL	102
RSV10	GILE	NSELLSLIHDMPIITNDQKKLMSNN	L	103
RSV11	GIL(E)	NSELLSLINDMPAANDQKKLMSNN	L	104
RSV12	GIL(E)	NSELLSLINDAPASNDQKKLMSNN	L	105
RSV13	(GILE)	TNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	(L)	106
RSV14	(GILE)	LTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	(L)	107
RSV15	(GILE)	MLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNN	(L)	108
RSV16	(GILE)	NSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNV	(L)	109
RSV17	(GILE)	NSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQ	(L)	110
RSV18	(GILE)	NSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQI	(L)	110
RSV19	(GILE)	TNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNV	(L)	111
MARM S275L		NSELLSLINDMPIITNDQKKLM L NN		112
MARM K272E		NSELLSLINDMPIITNDQ EL MFNN		113
MARM K272Q		NSELLSLINDMPIITNDQ QL MSNN		114

[^]標準的なリンカーの組み合わせはGILE-Xn-Lであり、Xはアミノ酸であり、nは60以下である(配列番号5)。欠失させた残基は括弧()内に示されており、付加させた残基は、太字で示されている。

【0106】

大多数のハイブリッドWHcAg-RSV VLPは効果的に会合した。試みられたハイブリッドWHcAg-RSV VLPの70%は、種々の改変の大部分によって発現および会合した。本開示の開発の間に設計し、試験したハイブリッドWHcAg-RSV VLPの性質の概要は表1-1Cとして示されている。

【0107】

10

20

30

40

【表 6】

表1-1C. ハイブリッド、WHcAg-RSV VLPの性質^

VLP番号	VLP会合	MAb結合	抗RSV-F IgG力価	中和力価	防御
VLP018	+	+	高	中	中
VLP019	+	+	高	高	高/中
VLP020	-	na	na	na	na
VLP021	-	na	na	na	na
VLP021.1	-	na	na	na	na
VLP023	+	+	高	0	nd
VLP025	-	na	na	na	na
VLP027	+	+	高	0	nd
VLP028	-	na	na	na	na

VLP番号	VLP会合	MAb結合	抗RSV-F IgG力価	中和力価	防御
VLP029	-	na	na	na	na
VLP030	-	na	na	na	na
VLP031	-	na	na	na	na
VLP032	-	na	na	na	na
VLP033	+	+	高	中	nd
VLP034	-	na	na	na	na
VLP041	-	na	na	na	na
VLP042	-	na	na	na	na
VLP043	-	na	na	na	na
VLP044	-	na	na	na	na
VLP045	+	+	高	0	0
VLP046	+	+	高	0	0
VLP047	-	na	na	na	na
VLP048	+	+	高	nd	0
VLP049	+	+	高	中	高
VLP050	+	+	高	低	中
VLP051	-	na	na	na	na
VLP052	+	+	高	低	中
VLP053	+	+	nd	nd	nd
VLP059	+	+	高	中	中
VLP060	+	+	高	中	中
VLP061	+	+	高	nd	nd
VLP062	+	+	高	低	中
VLP063	+	+	高	0	0
VLP064	+	+	高	0	0
VLP068	+	+	高	0	0
VLP069	-	na	na	na	na
VLP072	+	+	高	nd	低
VLP073	+	0	高	nd	0
VLP074	+	+	高	中	中
VLP075	+	+	高	高	高
VLP076	+	+	高	0	0
VLP077	+	0	0	0	0
VLP078	+	+	高	中	中
VLP079	-	na	na	na	na
VLP080	+	+	高	中	高
VLP081	-	na	na	na	na
VLP087	+	+	高	高	高
VLP088	+	+	高	中	中
VLP089	+	+	高	0	低
VLP090	+	+	高	低	高
VLP091	+	+	高	低	低
VLP092	+	+	高	0	0
VLP093	+	+	高	高	高(マウス)
VLP094	+	+	高	0	0
VLP095	+	+	高	0	0
VLP096	+	+	高	低	中
VLP097	+	+	高	高	中
VLP098	+	+	高	0	低
VLP099	+	+	高	0	0
VLP111	+	+	高	0	0

10

20

30

40

VLP番号	VLP会合	MAb結合	抗RSV-F IgG力価	中和力価	防御
VLP112	+	+	高	0	0
VLP113	+	+	高	0	低
VLP114	-	na	na	na	na
VLP120	+	+	高	0	nd
VLP121	-	na	na	na	na
VLP122	-	na	na	na	na
VLP123	+	+	高	高	nd
VLP124	+	+	高	0	nd
VLP125	+	+	高	0	nd
VLP126	-	na	na	na	na
VLP127	-	na	na	na	na
VLP128	+	+	高	高	nd
VLP129	+	+	高	0	nd
VLP130	+	+	高	中	nd
VLP131	+	+	高	高	nd
VLP132	+	+	高	高	nd
VLP133	+	+	高	低	nd
VLP134	+	+	高	低	nd
VLP135	+	+	高	高	nd

説明:na、適用不可、および、nd、未検出。

VLP会合:(+)十分な会合、または、(-)不十分な会合。

抗RSV-F IgG力価(log2):高は1以上、中は1.0~10、

低は0.5~1.0および0は0.5未満。

【0108】

パリビズマブの結合に対するハイブリッドVLPの抗原性。精製したハイブリッドVLPを2つの方法によってパリビズマブに対する抗原性について試験した。図3Aに示す異なる有効性にもかかわらず、パリビズマブは、固相のハイブリッドVLPのすべてに実質的に結合した。パリビズマブは、VLP19並びにインタクトRSV組み換えF(rF)タンパク質に結合した。しかし、パリビズマブは、24アミノ酸の挿入物を含んでいるrFタンパク質およびハイブリッドVLPと比較してF²⁵⁴⁻²⁷⁷24アミノ酸のペプチドには非常にわずかにしか結合しなかった。このことは、正しいパリビズマブのエピトープの構造の必要性を示している。また、このアッセイによって、RSVのB細胞エピトープを正しく提示するためのハイブリッドVLPの能力が示された。また、正しい構造はrRSV曝露したヒトFタンパク質およびVLP19に由来したヒト血漿におけるIgGが同様に結合するという事実によっても示されている(表1-2)。ネイティブのタンパク質と同様の結合効果を有するRSV rFタンパク質由来のパリビズマブエピトープを模倣するためのハイブリッドWHcAg-RSV VLPの能力は、これらのVLPは転園に感染した個体並びにRSV Fタンパク質を含むワクチンを受けた個体のパリビズマブ様の抗体反応の測定において使用するために利用され得る。

【0109】

【表7】

表1-2. ヒト血漿による、rFタンパク質およびハイブリッドmWHcAg-RSV VLPの認識

	ELISAエンドポイント力価 (log2)	
	若年成人 (20~30歳) n=19	高齢者 (65~85歳) n=23
抗原/血漿		
RSV rF タンパク質	12.8 ± 1.5	12.7 ± 2.2
VLP019	11.4 ± 1.1	11.1 ± 1.4

【0110】

図3Bに示されているように、溶液中のハイブリッドVLPもまたパリビズマブに効果的に結合し、比較的低濃度のハイブリッドVLPにおいて固相のrFタンパク質の結合からパリビズマブを阻害した(8~40ng/mlにおいて50%の阻害)。図4A~Dに示されているようにいくつかの他のRSV M a bは、固相のハイブリッドVLPに結合した。図5において示されているように、多数のハイブリッドWHcAg-RSV VLPもまた、パリビズマブのRSV中和活性を阻害可能である。

【0111】

マウスにおけるハイブリッドVLPの免疫原性。すべてのハイブリッドVLPはマウスにおいて免疫原性であり、不完全フロイントアジュバント(IFA)中の20μgのVLPを用いた免疫化は、種々のレベルの24アミノ酸のペプチドに結合する抗F²⁵⁴₂₇₇抗体を誘発した。しかし、より重要なことには図6Aに示されているように、10μgのVLPによる単回の免疫追加後に $2.5 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^6$ のエンドポイント希釈を有するインタクトのrFタンパク質と結合した。抗F抗体は、等しいまたは高いIgG2a対IgG1の比率から構成されていた。rFタンパク質におけるパリビズマブエピトープに対するVLP抗血清の正確な特異性を測定するために、抗VLP抗血清を固相のrFタンパク質に結合するパリビズマブをブロックする能力を試験した。図6Bに示されているように、1:1000の希釈率でパリビズマブの結合を50%阻害する抗VLP18血清および抗VLP19血清の能力は、インタクトrFタンパク質への結合に対するパリビズマブとの競合可能なパリビズマブ様抗体を含んでいたことを示している。ほとんどのハイブリッドVLPに対する抗血清八、様々な程度についてのrFタンパク質へのパリビズマブ結合の阻害を実証した。全長のWHcAg VLPの78番目の残基に挿入されたRSV F²⁵⁴~²⁷⁷を含んでおり、ssRNA(TLR7リガンド)をキャプシド形成している、VLP19は、以下に記載されているように、RSV感染に対して高レベルの防御を誘発することを示した。

【0112】

WHcAg VLPはその表面においてRSV F²⁵⁴~²⁷⁷番目のアミノ酸を提示する。極低温顕微鏡解析をVLP19を視覚的に性質決定するために行った。5,2000Xの拡大において、挿入物を保持している粒子は、空の担体のWHcAg粒子と比較して、粗い表面の外観を有していた(図10)。Nanoimaging Services (La Jolla, CA)によって行われた平均化によって、表面は球状のおよそ29nmの直径の粒子の表面から2~4nm伸長したスパイクによって均一に被覆されていた。スパイクが実際に適切な構造において24merを含んでいたかどうか決定するために、パリビズマブFabをVLPに結合し、電子顕微鏡解析を再び行った、その結果得られた画像(図10)は、VLPの表面のスパイクに結合しているパリビズマブのFabと一致している。これらの結果は、RSVのFタンパク質の254~277番目のアミノ酸を包含している24merは、完全に形成されたWHcAg VLPの表面に良好に発現されたことを証明している。

【0113】

SDS-PAGEおよびウェスタンブロット解析をVLP19および担体WHcAgにおいて行った。タンパク質を視覚化するためのSDS-PAGEの染色によって、VLP19の単量体および空のWHcAgの担体それぞれに対する約25kDおよび約22kDのバンドは、VLP19の単量体が予測されたサイズの挿入物を含んでいることを証明している(図11、レーン1および2)。PVDf膜への転写の後、VLP19およびWHcAgの両方は、WHcAgに対するウサギポリクローナル抗血清によって認識された(図11Aレーン3および4)が、VLP19のみがパリビズマブによって認識された(図11A、レーン5および6)。

【0114】

競合ELISAアッセイによって、ELISAプレートに結合する固相および溶液におけるVLP19を認識するためのパリビズマブの能力を試験した。ダイレクトELISAおよび競合ELISAの形式の両方において、VLPに対するパリビズマブの結合曲線は、精製された組み換え可溶性RSV F(sF)について得られたものに匹敵していた(

10

20

30

40

50

図 1 1 B および図 1 1 C)。まとめると、これらのデータは、パリピズマブ特異的 R S V F 2 5 4 ~ 2 7 7 エピトープの抗原性は V L P 1 9 の関連において維持されることを示している。

【 0 1 1 5 】

ヒト I g G は V L P を認識する。V L P 1 9 に提示される R S V F アミノ酸 2 5 ~ 2 7 7 のエピトープは、天然の R S V 感染の間に存在するエピトープに抗原的に関係するのかどうかを決定するために、E L I S A によって、ヒト血漿を、V L P 1 9 に対して特異的な抗体に対して試験した。ほとんどすべての人々が、2 歳までに R S V に対して血清反応陽性であり、生涯を通じて再曝露されるため、正常なヒトの血漿に R S V 抗体を含んでいる (Walsh and Falsey, J Med Virol, 73:295-299, 2004)。4 2 個体の成人の血漿サンプルにおけるヒト I g G は、V L P 1 9 に効果的に結合した (表 1 ~ 2 および図 1 1 D)。s F は、V L P 1 9 よりも多様な F 特異的エピトープを有しているが、E L I S A において、s F に対するエンドポイントは V L P 1 9 と比較した場合 2 log 2 未満高かった。したがって R S V 感染に対する反応において上昇するヒト I g G は V L P 1 9 において発現されるとき F 2 5 4 ~ 2 6 6 エピトープを効果的に認識する。

10

【 0 1 1 6 】

R S V 中和抗体を誘発するハイブリッド V L P の能力。すべての会合したハイブリッド V L P は、高力価の I g 抗 r F タンパク質抗体を誘発したが、ハイブリッド V L P は、図 7 A ~ 図 7 C に示されているように、高力価の R S V 特異的中和抗体の誘発能において劇的に異なる。この実験において、マウスを免疫化し、アルミニウム調合物における 1 0 0 μ g のハイブリッド V L P で 1 回免疫追加した。免疫追加後、血清を r F タンパク質に結合する I g G についての E L I S A (図 7 A)、T h 1 および T h 2 様抗体の測定としての抗 r F タンパク質の I g G アイソタイプの分布 (図 7 B)、および中和抗体を測定するための R S V プラーク減少マイクロ中和アッセイ (図 7 C) によって試験した。

20

【 0 1 1 7 】

ほとんどの V L P は、すべてのマウス / 群における高レベルの I g G、r F タンパク質結合抗体 (図 7 A) にもかかわらず、各群のマウスと半数以下のみにおいて顕著な中和抗体を誘発した (図 7 C)。すべてのハイブリッド V L P は、比較的バランス化した T h 1 / T h 2 様反応を誘発した (図 7 B)。[I g G 抗 G タンパク質] / [中和抗 R S V] 抗体の比率は、ほとんどの抗 V L P 血清において非常に高く、このことは、機能的な中和抗体は、わずかな抗挿入物反応を示し得ることを示していた。しかし、ハイブリッド V L P 様 V L P 9 3 は、このハイブリッド V L P が、注入したマウスの 1 0 0 % において高い中和ならびに高い I g G 結合抗体を誘発することができるという点において、例外を示している。このことは中和活性ならびに E L I S A による g G 結合のスクリーニングの重要性を示している。ハイブリッド V L P の免疫学的プロファイルの概要は、表 1 - 3 および表 1 - 4 に示されている (^ 説明 : nd、実施していない。平均中和力価 (log 2) : 高 > 7、中 5 ~ 7、低 4 ~ 5、または 0 = 検出限界以下 ; 平均防御 (R S V 肺力価における l o g 1 0 の減少) : 高 > 2 . 0、中 1 . 0 ~ 2 . 0、低 0 . 5 ~ 1 . 0 または nd = 実施していない ; および * = T L R 7 リガンドに結合しない V L P)。

30

【 0 1 1 8 】

40

【表 8】

表1-3. 高い中和抗体力価および/またはRSVの曝露からの防御を誘発させるVLP[^]

VLP	中和力価	防御	性質
VLP019	高	高	標準:78番目の位置における24merの挿入物
VLP049	中	高	Δ2を有する標準
VLP075	高	高	リンカーから欠失させた(E)を有する標準
VLP080	中	高	149番目の後ろを変異させたWHcAgのC末端を有する標準
VLP087*	中	高	152番目の後ろを変異させたWHcAgのC末端を有する標準
VLP090	低	高	N262H RSVの点変異を有する標準
VLP093	高	高	Δ4を有する標準
VLP097	高	中	RSVのC末端においてリンカーおよびバリンを有していない標準
VLP123	高	nd	Δ5
VLP128	高	nd	Δ5およびΔ4
VLP131	高	nd	G_L リンカーのみを有する標準
VLP132	高	nd	I_L リンカーのみを有する標準
VLP135	高	nd	GIL_V リンカーのみを有する標準

10

20

【 0 1 1 9 】

【表 9】

表1-4. 中間～低い中和抗体力価および/またはRSVの曝露からの防御を誘発させるVLP[△]

VLP	中和力価	防御	性質
VLP018*	中	中	149番目の後ろを変異させたWHcAgのC末端を有する標準
VLP050	低	中	81番目の位置にN末端9アミノ酸を挿入した34merの挿入物
VLP052	低	中	△2の78番目の位置にC末端9アミノ酸のリンカーを有する34merの挿入物
VLP059	中	中	リンカーを有していない標準
VLP060	中	中	21merの挿入物を有し、リンカーを有していない標準
VLP062	低	中	△7.1の74番目の位置における24merの挿入物
VLP074	中	中	リンカー中に(E)→Aを有する標準
VLP078	中	中	△6を有する標準
VLP088	中	中	△3を有する標準
VLP091	低	低	I266A/T267AのRSVエピトープの点変異を有する標準
VLP096	低	中	リンカーおよび3個の追加のFタンパク質残基を有していない標準
VLP098	0	低	リンカーおよび2個の追加のFタンパク質残基を有していない標準
VLP113	0	低	リンカーおよび1個の追加のFタンパク質残基を有していないWHc △74-80
VLP130	中	nd	G_L リンカーのみを有する標準
VLP133	低	nd	IL_L リンカーのみを有する標準
VLP134	低	nd	C末端リンカーからLを欠失させた標準

10

20

30

【0120】

RSV曝露に対してマウスを防御するハイブリッドVLPの能力。免疫化したマウスはまた、最終的な採血の2週間後に 10^5 PFUのRSVで曝露した。破碎した肺から得たRSVの回復をインピボにおけるハイブリッドVLPの免疫化の防御潜在能力の測定としてブラックアッセイによって決定した(図7D)。ブラシーボと比較した $2 \log 10$ の肺におけるRSV力価の減少は非常に重要であると考えられた。標準的なVLP19は、4/5マウスにおけるRSV肺力価の $2 \log 10$ の減少を誘発し、VLP87は、50%のマウスにおいて完全な防御(RSVが検出されなかった)、および残りの50%のマウスにおいて $2 \log 10$ の減少を誘発した。VLP90は、4/5マウスにおいて完全な防御を誘発した。VLP128を除いて最も高い中和抗体反応を誘発したVLP93は、RSV曝露から100%のマウスを防御し、これは、野生型のRSVによって誘発されるレベルの防御と等しかった(図7D)。

40

【0121】

さらにVLP019抗血清は、RSV-A、RSV-Bおよびパリピズマブエスケープ変異体(MARM S275F)を中和することを見出した。抗血清またはパリピズマブの希釈液を100~200PFUのRSVウイルス(相補なし)と混合し、1時間インキュベートし、ブラックアッセイによって力価測定した。図8Aは、RSVA2の中和を示しており、図8Bは、いくつかのRSBA株の中和を示しており、図8Cは、RSVB15の中和を示しており、図8Dは、RSVB77の中和を示しており、図8Eはパリピズ

50

マブエスケープ変異体 (MARM S 2 7 5 F) を中和を示しており、図 8 F は、さらなるエスケープ変異体の中和を示している。挿入物の領域における R S V F タンパク質のアミノ酸配列は、以下の通りである：R S V - A (配列番号 3) ; R S V B (配列番号 8 6) ; および R S V M A R M S 2 7 5 F (配列番号 8 7)。これらの結果は、高 V L P 0 1 9 抗血清のポリクローナルの性質の例示である。2 つ以上の異なるハイブリッド W H c A g R S V V L P の使用は、より広い範囲へポリクローナル反応の多様性を増大させるはずである。

【 0 1 2 2 】

R S V 曝露に対するコットンラットを防御するための V L P 1 9 の能力。表 1 - 5 に示すように、アルミニウム中の V L P 1 9 で免疫化した 7 個体のコットンラットのうち 4 個体が R S V 防御に対して顕著な防御を示した。7 個体中の 3 個体のラットがポジティブコントロールの R S V F タンパク質を用いて免疫化したラットと同レベルの防御 (R S V 力価 < 1 . 0 l o g 1 0) を示したことに留意されたい。このことは、R S V F タンパク質が多数の中和 B 細胞エピトープを含んでいるが V L P 1 9 は単一の R S V F タンパク質 B 細胞エピトープ (例えばパリビズマブエピトープ) のみを含んでいることが知られていることを考慮すると、驚くべきことである。また、中和力価は防御に相関したが全体の抗 R S V F タンパク質力価は相関しなかったことに留意されたい。種々のハイブリッド W H c A g - R S V V L P による免疫化したマウスにおいて観察された変化と同様に、中和 / 防御においてラット間の変化が存在していた。このことは、コットンラットにおける抗 W H c A g 、抗 R S V F タンパク質および抗 R S V F ペプチドはそれほど不安定ではないという点で際立っている。

【 0 1 2 3 】

【表 1 0】

表1-5. ラットにおける抗体の力価およびRSV曝露からの防御のレベル

VLP	抗WHcAg (Log2)	抗RSV F (Log2)	抗ペプチド (Log2)	中和力価 (Log2)	肺の力価 (Log10)
VLP19+アルミニウム					
1	16	15	15	0	5.0
2	16	15	16	10	0.8
3	18	16	16	0	4.2
4	16	17	16	13	0.9
5	18	15	16	8	0.9
6	17	15	15	5	4.8
7	18	16	16	6	2.2
合計	7/7	7/7	7/7	5/7	4/7*
RSV rF+アルミニウム					
1	0	18	0	11	1.0
2	0	19	0	12	0.9
3	0	19	0	12	0.9
合計	0/3	3/3	0/3	3/3	3/3*
PBS+アルミニウム					
1	0	0	0	0	4.9
2	0	0	0	0	5.0
3	0	0	0	0	5.1
合計	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

*は2log10以上のRSVの肺の力価における減少として規定された防御を示す。

【 0 1 2 4 】

第 1 のハイブリッド V L P を 2 回投与した場合に中和抗体非反応体であった個体が、一

度に第2の(異なる)ハイブリッドVLPを投与した場合に中和抗体反応体となるかどうかを決定するためにマウスにおいて小試験を行った。表1-6に示されているように、すべての非反応体は、単一のVLP19の追加免疫を受容後に反応体となった。このことは異なるWHcAG担体の関連において異なる構造を考慮する同一の24merのエピトープと一致している。さらに、2つ以上のWHxcAg RSV VLPの組み合わせは対象内の変化を阻止すること有益である。このことは、非交系の個体(例えばヒト対象)の集団を免疫化する場合に重要な懸念事項である。

【0125】

【表11】

表1-6. 単一のVLP019の増加は中和抗体反応を誘発させる

第1回目および 第2回目の免疫化	第2回目の免疫化後の中和力価	第3回目(VLP019) 免疫化後の中和力価
VLP074	0	10
VLP078 #1	0	30
VLP078 #2	10	90
VLP080	10	30
VLP087	0	26
VLP088	0	35

10

20

【0126】

防御効果における対象内の変化を軽減する他の方法は、免疫化のためにアルミニウムより強力なアジュバントを使用することである。図9に示しているように、IFA中のVLP019またはVLP097の何れかで免疫化したマウスの100%がRSV曝露に対して防御された。この防御のレベルは野生型RSVによって誘発される防御のレベルと同等である。

【0127】

VLP19は防御を誘発する。Balb/cマウスを不完全フロイントアジュバント(IFA)を用いて調合した40 μ gのVLP19の2回投与で免疫化し、ネガティブコントロール群およびポジティブコントロール群にいずれも、PBS単独か、生体の野生型RSVA2の一回の鼻腔内投与を行った。2回目の投与の2週間後、血清をIgG抗体およびRSV中和について解析し、続いてマウスを10⁶PFUの野生型RSVA2に曝露した。曝露4日後のマウスの肺の力価(log₁₀ PFU/g)は、それぞれ、プラシーボ群において3.9+/-0.2であり、野生型RSV群およびVLP19群に対してそれぞれ1.1+/-0.1および0.9+/-0.1であった(図12A)。曝露の当日における血清中のRSVマイクロ中和力価は、野生型RSVに感染した、およびVLP19で免疫化したマウスに対してそれぞれ、6.7 +/- 0.4および7.7 +/- 1.2 log₂であり、統計学的に異ならなかった(p=0.2)(図12B)。sF特異的IgG力価は両方の群に対して高く、野生型RSVに感染した、およびVLP19で免疫化したマウスに対してそれぞれ、16.8 +/- 0.8および17.6 +/- 0.0 log₂を測定した(図12C)。したがって、VLP19の2回投与によるマウスの免疫化は、肺力価における100倍の減少およびRSVA2による感染後のマウスと同様の血清中和およびRSVF特異的IgG力価を誘発した。調査試験をIFAを用いて行っている一方で、同時にVLP19を生理食塩水中で注入した。VLP19によって誘発される抗Fタンパク質AbおよびRSV中和Ab力価をアジュバント依存性に対して抗原投与量依存性であることを決定した(図14Aおよび図14B)。

30

40

【0128】

抗VLP19血清は広範に中和する。RSVブランク減少中和アッセイを抗VLP19マウス血清およびパリビズマブの2倍希釈液を用いて行った。抗VLP19血清については、IC50によって測定されるRSV中和力価が7.2 log₂であり、これは血清の

50

およそ 1 : 150 希釈に対応している (図 13A)。パリビズマブについては、IC50 の点によって測定される PRNT は約 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度であった。したがって、抗 VLP10 血清は、このインビトロアッセイにおいて約 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のパリビズマブと同等の中和性能を示した。

【0129】

抗 VLP19 血清をさらに評価し、いくつかの RSV A および B の臨床的な単離物ならびにパリビズマブ抗体耐性変異体 (MARMS) S275F および S275L を中和することを見出した (図 8A ~ 8F)。しかし、抗 VLP19 血清は、K272Q MARM または K272E MARM を中和しなかった。これらの結果は、抗 VLP19 のポリクローナルの性質およびパリビズマブと比較して正確な特異性における相違を例証している。

10

【0130】

抗 VLP 抗体およびパリビズマブが RSV F タンパク質における同一のエピトープに関するものであるかどうか調べるために、競合 ELISA を行った。ELISA プレートを sF でコーティングした。VLP19 免疫化マウスから得た血清またはネガティブコントロールの血清の希釈液を一定濃度のパリビズマブと混合し、sF コート下プレートに結合させた。結合したパリビズマブを測定した。抗 VLP19 血清は、sF への結合に対してパリビズマブと競合した (図 13B)。抗 VLP19 血清に対する結合曲線の IC50 は $10 \log 2$ であり、一回の抗血清投与および 2 回の抗血清投与後に対してそれぞれ $10 \log 2$ および $13 \log 2$ であり、追加免疫後のパリビズマブ競合抗体の力価における増加を示唆していた。

20

【0131】

VLP19 挿入物の配向の効果。エピトープ RSV F 254 ~ 277 はヘリックス - ループ - ヘリックスモチーフおよびヘリックスとモタビズマブとの間の接点を有しており、抗パリビズマブ由来の抗体が記載されている (McLellan et al., Nat Struct Mol Biol, 17:248-250, 2010)。この研究は、2つのヘリックスの相関する配向が RSV F エピトープの正しい提示に不可欠であることを示唆している。VLP19 挿入物のヘリックスが好ましい提示において拘束される場合、挿入物と VLP との間のアミノ酸は、挿入物への抗体反応に影響することが予測される。RSV F エピトープは C 末端において 3つの残基まで漸増的に伸長され、得られた VLP 構築物について機能的な抗 RSV 反応を誘発するためのそれらの能力を試験した。3つの残基は、ヘリックスのおおよそ一巡りを理論的に包含する。

30

【0132】

VLP19 は、記載されている通り、WHcAg 遺伝子に標的配列をクローニングするために用いられる制限酵素切断部位を調整するために 24mer の挿入物を配置するリンカー領域を有している。この VLP のセットについて、リンカー領域を、RSV F エピトープのアルファヘリックスを WHcAG のものより近くに並列させるために、最初に除去した。続いて挿入された RSV F エピトープを C 末端における 1つ、2つまたは 3つのアミノ酸で伸長した。得られた VLP をインビトロにおけるパリビズマブの結合およびインビボにおける防御および免疫原性について試験した (表 1 - 7)。短いリンカー領域の除去によっては、類似した RSV の sF 特異的 IGG 力価が得られた (VLP59 対 VLP19) が、VLP を検出するためのパリビズマブの能力は低下し、防御および中和力価が低下した。挿入物の C 末端への 1 残基の付加 (VLP97) は、VLP を検出するためのパリビズマブの能力を増大させ、VLP59 と比較して防御を向上させた。しかし、挿入物の C 末端への 2 残基の付加 (VLP98) は、VLP を検出するためのパリビズマブの能力を低下させ、曝露への防御を低下させた。血清の RSV 中和および sF 特異的な IGG 力価も、VLP98 に対して低かった。最後に、3つの残基の付加 (VLP99) は wt RSV A2 による曝露からの防御を誘発する能力を消滅させた。特に、インビトロにおける VLP99 を検出するためのパリビズマブの能力は高かった (95%) が、VLP99 は wt RSV A2 による曝露からマウスを防御することができなかった。VLP

40

50

P 9 9 については、パリビズマブ結合は、当該モチーフが、インビボにおいては達成されないインビトロの構造を誘導することが可能であり得る。V L P 9 9 はマウスにおいて s F 特異的な A b 誘発することができたが、抗 V L P 9 9 血清は R S V を中和することができなかった。

【 0 1 3 3 】

まとめると、これらの結果は、ヘリックス - ループ - ヘリックスモチーフにおける互いに関連するヘリックスの配向が、R S V F エピトープが防御免疫反応を誘発させる形式で V L P を提示するために当該 R S V F エピトープにとって不可欠であることを示している。また、これらの結果は、パリビズマブによって検出される能力および中和抗体を誘発するための能力の両方に影響する提示においてわずかな相違を有する V L P の中の特異的挿入物によってわずかしが影響されないことを示している。さらに、V L P 1 9、V L P 9 8 および V L P 9 9 の比較は、パリビズマブの結合が R S V 中和反応を誘発する能力に必ずしも関連しないことを証明している。

【 0 1 3 4 】

【表 1 2】

表1-7. 改変したVLPの性質

免疫原	改変	インビトロで結合しているパリビズマブ (sF=100%)	曝露後のRSVの肺の力価 (log10 +/- SD PFU/g)	RSV中和力価 (log2 +/- SD)	sF特異的なIgG力価 (log2 +/- SD)
グリーホ挿入物なし	NA	NA	3.9 +/- 0.2	LOD*	LOD**
VLP-19 F 254-277	リンカーが含まれている	100%	0.9 +/- 0.1	7.7 +/- 1.2	17.2 +/- 0.5
VLP-59 F 254-277	リンカーが除去されている	83%	2.0 +/- 1.0	5.2 +/- 3.4	17.0 +/- 0.9
VLP-97 F 254-278	リンカーが除去されている (+1)	112%	1.1 +/- 0.1	6.9 +/- 2.8	17.2 +/- 0.5
VLP-98 F 254-279	リンカーが除去されている (+2)	47%	2.8 +/- 1.0	3.9 +/- 1.4	13.4 +/- 1.6
VLP-99 F 254-280	リンカーが除去されている (+3)	95%	3.8 +/- 0.3	LOD*	16.4 +/- 0.4

*LOD=3.3log2; および**LOD=8.6log2。この実験は、IFA(データを示した)を用いて一回、同様の結果を得た独自のアジュバントを用いて一回行われた。

【 0 1 3 5 】

結論。多数の興味深い観察がなされた。まず、全 R S V I g G 力価は、R S V 中和力価と関連しなかった。一方、高力価の抗 F タンパク質 I g G を誘発したすべての V L P は、2 4 % のハイブリッド V L P のみが中間 ~ 高力価 R S V 中和抗体を誘発した。第 2 に、R S V 中和抗体を誘発した V L P 間でも、同系交配のげっ歯類系統の使用にも関わらず著しい動物間の変種が存在した。R S V の曝露に対して大多数 (8 0 ~ 1 0 0 %) の免疫化動物を防御するためのいくつかのハイブリッド V L P (例えば V L P 0 9 3 および V L P 9 0) の能力は、パリビズマブエピトープがハイブリッドの W H c A g R S V の V L P のサブセットにおいて野生型の R S V と類似している構造をとることを示している。この発見は、好適な免疫原を同定するためのハイブリッド V L P のライブラリーのスクリーニングの有用性を裏付けるものである。

【 0 1 3 6 】

さらに、異なるハイブリッド V L P の組み合わせ、ならびに単一のモザイク V L P 中で会合する異なる融合タンパク質は、R S V ワクチンの候補において好ましいと考えられる

。さらに、V L P 0 1 2 8におけるものような、複合的に改変された単一のV L Pにおける改変の統合は、非反応体の頻度を低下させるために好ましいと考えられる。V L Pの組み合わせおよび統合は、相当する抗挿入物および抗担体抗体力価による広範な、機能的な抗体反応を誘発するための抗原組成物の産生を可能にする。

【 0 1 3 7 】

本明細書に記載されているR S Vワクチンの設計の手法は、不可欠な二次構造が維持されるようにV L Pにおけるエピトープを提示した。W H c A g V L Pの免疫優性領域において提示されるアミノ酸2 5 4 ~ 2 7 7を包含するV L P 1 9による免疫化は、野生型R S V A 2を曝露したマウスにおける肺の力価における1 0 0 0倍の低減をもたらし、R S V Fへの結合に対しパリビズマブと競合する中和抗体を誘発した。本開示の開発の間に決定された通り、エピトープは、抗原的に正しいものであり得る（例えば、Fに対する抗体によって認識され、Fを認識する抗体を誘発し得る）が、それにもかかわらず中和A b（例えば、R S Vを中和しない、R S V Fを誘発する抗体）を産生することに失敗する。このことは、R S V Fアミノ酸2 5 4 ~ 2 7 8または2 5 4 ~ 2 8 0をそれぞれ包含するV L P 9 7およびおよび9 9にもっともよく例示されている。パリビズマブが両方のV L Pに同様に結合する一方で、V L P 9 7は強力なR S V中和反応を産生しマウスを防御するが、V L P 9 9は検出可能なR S V中和力価を誘発することに失敗し、防御を示さなかった。この観察は、Fエピトープスカフォールドが免疫原に結合するA bを誘発した場合でさえ、正しいR S V F 2 5 4 ~ 2 7 8の構造が中和A b反応を誘発するとは限らなかったという近年の報告と一致する（Correia et al., Nature, 2014 epub ahead of print, doi: 10.1038/nature12966）。

10

20

【 0 1 3 8 】

本明細書に提供されているのは、中和抗体を産生し、R S V感染に対する防御を提供するために選択されたキメラV L Pの能力の機能的な解析である。これは、R S V F 2 5 4 ~ 2 7 7のみを提示する組み換えエピトープ集束型免疫原によって得られた強力な中和およびR S V曝露からの防御の初めての実証を示すものであると考えられる。この達成はまた、特異的な構造を必要とするエピトープの提示へのW H c A g V L P技術の適用を拡大する。複数の防御的V L Pの生成は、W H c A gの組み合わせ技術の力を例示する。さらに、予備的な証明は、種々のV L Pによって誘発される中和抗体は、F 2 5 4 ~ F 2 7 7エピトープに対する正確な特異性において異なることを示している。したがって、複数のV L Pの混合はエピトープベースのワクチンによって誘発される中和抗体の多様性を増加させる手段であり得る。

30

【 0 1 3 9 】

W H c A g V L Pは、F 2 5 4 ~ 2 7 7エピトープに対するプラットフォームとして唯一好適であり得る。W H c A gにおける免疫優性のスパイクは、両方とも、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造を有しているという点においてF 2 5 4 ~ 2 7 7エピトープに構造的に類似している。W H c A gプラットフォームに対し開発された組み合わせの技術によって、V L PにおけるF 2 5 4 ~ 2 7 7エピトープの2次構造を再生するための実験に基づいた手法が可能となる。また、W H c A gは、感受性の高いワクチン受容者において亢進性呼吸器疾患（E R D）の誘導の可能性を低減することによって利点を提供する。非中和F特異的な抗体は、E R Dに関与する（Graham, Immunological Reviews, 239:149-166, 2011）。単一の中和エピトープの標的化は、Fタンパク質の非サイトAエピトープに対する非中和抗体の産生の機会を除去する。T h 1バイアスおよびT o l l様受容体（T L R）7の刺激もまた、E R Dを阻止することを助け、防御抗体の産生に寄与する（Delgado et al., Nature Medicine, 15:34-41, 2008）。W H c A g V L Pは、T L R 7アゴニストとして作用するキャプシド形成したs s R N Aのアジュバント効果によって強化される、T h 1介在抗体のアイソタイプを誘発する（Lee et al., J Immunol, 182:6670-6681, 2009）; and Milich et al., J Virol, 71:2192-2201, 1997）。さらに、R S V Fエピトープを有するW H c A g V L Pは、亢進性呼吸器疾患（E R D）に関与するR S V Fタンパク質特異的T細胞を準備（prime）させない（Graham, supra, 2011）。実用的

40

50

な事項として、WHcAgVLPは、安価で製造でき、細菌において、十分に組み換えられており、非常に熱安定性であり、第一世界の外部での使用に対し実用的な技術を形成するものである。したがって、WHcAg/RSVFハイブリッドVLPの手法は、世界にRSVワクチンの開発の可能性を提供する。

【0140】

【表13】

配列番号1

>全長のWHcAg

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNLALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SEQVRTIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGG
ARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

10

配列番号2

>トランケートしたWHcAg

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNLALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SEQVRTIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVI

配列番号3

>パリビズマブエピトープ(RSV F)

NSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNN

配列番号4

>WHVゲノム

1 aattcgggac ataccacgtg gtttagttcc gcctcaaact ccaacaaatc gagatcaagg
61 gagaaagcct actcctccaa ctccacctct aagagatact caccctccact taactatgaa
121 aaatcagact tttcatctcc aggggttcgt agacggatta cgagacttga caacaacgga
181 acgccaacac aatgcctatg gagatccttt tacaacacta agcctcgcgg ttcctactgt
241 atccaccata ttgtctctc cctcgacgac tggggacct gcactgtcac cggagatgtc
301 accatcaagt ctctaggac tcctcgcagg attacagggt gtgtatttct tgtggacaaa
361 aatcctaaca atagctcaga atctagattg gtggtggact tctctcagtt tccaggggg
421 cataccagag tgcactggcc aaaattcgca gttccaaact tgcaaacact tgccaacctc
481 ctgtccacca acttgcaatg gctttcgttg gatgtatctg cggcgtttta tcatatacct
541 attagtctctg ctgctgtgcc tcatctctt gttggttctc ctggactgga aaggtttaat
601 acctgtctgt cctcttcaac ccacaacaga aacaacagtc aattgcagac aatgcacaat
661 ctctgcacaa gacatgtata ctctcctta ctggtgtgtg ttaaaaccta cggcaggaaa
721 ttgcaactgtg tggcccatcc ctctcatctg ggcttttagga aattacctat gggagtgggc
781 cttagccctg tctctctggc tcaatttact agtgcccttg ctcaaatggt taggaggaat
841 ttccctcatt gcgtggtttt tgcttatatg gatgatttgg ttttgggggc ccgcaacttct
901 gagcatctta ccgcaattta ttcccattt ttgtctgatt ttcttgattt gggatatacat
961 ttgaatgtca ataaaaacaaa atgggtggggc aatcatctac atttcatggg atagtgtgatt
1021 actagttoag gtgtattgcc acaagacaaa catgtaaga aaatttcccg ttatttggcg
1081 tctgttctctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tggatttctt
1141 aactatggtg ctcccttttac gctatgtgga tacgctgctt taatgccttt gtatcatgct
1201 attacttccc gtacggcttt cattttctcc tccttgata aatcctgggt gctgtctctt
1261 tatgaggagt tgtggccctg tgtcaggcaa cgtggcgtgg tgtgcaactg gtttgtgac
1321 gcaaccccca ctggttgggg cattgccacc acctatcaac tcctttccg cactttcgc
1381 tccccctcc ctattgccac ggccggaactc attgcgcct gccttgcccg ctgctggaca
1441 gggctcggc tgttgggcac tgacaattcc gtggtgtgtg cggggaagct gacgtccttt
1501 ccattgctgc tcgcctgtgt tgccaactgg attctgcgcg ggaogtctt ctgctacgtc
1561 ccttcggccc tcaatccage ggaccttctt tcccggggc tgctgcccgt tctgcccct
1621 ctcccgctc ttgccttcg ccctcagacg agtcggatct ccctttgggc cgctccccg
1681 cctgtttcgc ctgcgctcc ggtccgtgtt gcttggctct cacctgtgca gaattgcaa
1741 ccatggattc caccgtgaac tttgtctcct ggcatgcaaa tcgtcaactt ggcatgcaa
1801 gtaaggacct ttggactcct tatataaaag atcaattatt aactaaatgg gaggagggca
1861 gcattgatcc tagattatca atatttgtat taggaggctg taggcataaa tgcattgac
1921 tctcgttaacc atgtatcttt ttcaacctgt ccttgttttt gcctgtgttc catgtcctac
1981 ttttcaagcc tccaagctgt gccttgatg gctttggggc atggacatag atccctataa
2041 agaatttgggt tcatcttate agttgttgaa ttttcttctt ttggacttct ttcctgacct
2101 taatgctttg gtggacactg ctactgcctt gtatgaagaa gagtaacag gttaggaca
2161 ttgctctccg caccatacag ctattagaca agcttttagta tgctgggatg aattaactaa
2221 attgatagct tggatgagct ctaacataac ttctgaacaa gtaagaacaa tcatagtaaa
2281 tcatgtcaat gatacctggg gacttaagggt gagacaaagt ttatggtttc atttgtcatg
2341 tctcactttt ggacaacata cagttcaaga attttttagta agttttggag tatggatcag
2401 aactccagct ccatatagac ctctaattgc acccattctc tcgactcttc cggaacatac
2461 agtcattagg agaagaggag gtgcaagagc ttctagggtc cccagaagac gcactccctc
2521 tcctcgcagg agaagatctc aatcaccgcg tcgcagacgc tctcaatctc catctgcaaa

20

30

40

2581 ctgctgatct tcaatgggta cataaaacta atgctattac aggtctttac tctaaccaag
 2641 ctgctcagtt caatccgcat tggattcaac ctgagtttcc tgaacttcat ttacataatg
 2701 atttaattca aaaattgcaa cagtattttg gtcctttgac tataaatgaa aagagaaaat
 2761 tgcaattaaa ttttcctgcc agatttttcc ccaaagctac taaatatttc cctttaatta
 2821 aaggcataaa aaacaattat cctaattttg ctttagaaca tttctttgct accgcaaatt
 2881 atttgtggac tttatgggaa gctggaattt tgtatttaag gaagaatcaa acaactttga
 2941 cttttaaagg taaaccatat tcttgggaac acagacagct agtgaacat aatgggcaac
 3001 aacataaaaag tcaccttcaa tccagacaaa atagcagcat ggtggcctgc agtgggcact
 3061 tattacacaa ccacttatcc tcagaatcag tcagtgttcc aaccaggaat ttatcaaaaa
 3121 acatctctga taaatcccaa aaatcaacaa gaactggact ctgttcttat aaacagatac
 3181 aaacagatag actggaacac ttggcaagga tttcctgtgg atcaaaaatt accattggtc
 3241 agcagggatc ctccccaaa accttatata aatcaatcag ctcaaacttt cgaatcaaaa
 3301 cctgggccta taatagtcc cgg

10

【 0 1 4 1 】

【 表 1 4 】

配列番号5

>リンカーの組み合わせ

GILE-Xn-Lであって、

Xは任意のアミノ酸であり、nは60以下である

配列番号6

>リンカー

WLWG

配列番号7~85=WHcAg-RSV融合タンパク質

20

>VLP018 (195 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
 SGILENSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVW
 IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAGRSPSQSPSSANC

>VLP019 (217 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
 SGILENSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVW
 IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRANSANC

>VLP020 (230 アミノ酸)

MGTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRWLWGAMDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTAT
 ALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNITSEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQ
 HTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRANSANC

30

>VLP021 (229 アミノ酸)

MGTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRWLWGAMDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATA
 LYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNITSEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQ
 TVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRANSANC

>VLP021.1 (208 アミノ酸)

MGTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRWLWGAMDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATA
 LYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNITSEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQ
 TVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAGRSPSQSPSSRESQC

>VLP023 (246 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
 SGILGGGGGGGETYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVREGGGGGGGGLEQVRTIIIVNHVNDTWGLK
 VRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRR
 QSPRRRRSQSPSANC

40

>VLP025 (191 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELSELLSLINDMPI
 ITNDQKKLMSIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIR
 RGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRANSANC

【 0 1 4 2 】

【表 1 5】

>VLP027 (232 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILEVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFLHLSCLTF
GQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP028 (253 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFLHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGG
ARASRSPRRGTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANCDISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNS
ELLSLINDMPITNDQKKLMSNN

>VLP029 (253 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFLHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAAGG
AAASASPAAATPSPAAARSQSPAAAASQSPSANCDISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNS
ELLSLINDMPITNDQKKLMSNN

>VLP030 (258 アミノ酸)

MVSNIEVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLWGAMDIDPYK
EFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNITSEQVRTII
IVNHVNDTWGLKVRQSLWFLHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSP
RRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP031 (237 アミノ酸)

MVSNIEVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLWGAMDIDPYK
EFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNITSEQVRTII
IVNHVNDTWGLKVRQSLWFLHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAGRSPSQSPSQ
SRESQC

>VLP032 (238 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILEVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRELEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFH
LSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRR
QSPSANC

>VLP033 (239 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SEQVGILEVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRELEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWF
HLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRR
SQSPSANC

>VLP034 (253 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFLHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAAGG
AAASASPAAATPSPAAARSQSPRRRRSQSPSANCDISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNS
ELLSLINDMPITNDQKKLMSNN

>VLP041 (206 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILETYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRELEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFLHLSCLTFGQHT
VQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAGRSPSQSPSQSANC

>VLP042 (229 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SEQVGILETYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRELEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFLHLSCLTFGQHT
TVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP043 (228 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPADFFPAAAVLADTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILETYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRELEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFLHLSCLTFGQHT
VQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

【 0 1 4 3】

10

20

30

40

【表 1 6】

>VLP044 (228 アミノ酸)
 MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIT
 SGILETYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRELEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTV
 QEFLVSGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

>VLP045 (219 アミノ酸)
 MGNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNLWGAMDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGRE
 HCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSGV
 WIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

>VLP046 (198 アミノ酸)
 MGNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNLWGAMDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGRE
 HCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNITSEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSGV
 WIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAGRSPSQSPSQSRESQC

10

>VLP047 (215 アミノ酸)
 MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNSE
 LLSLINDMPI TNDQKKLMSNNASSNITSEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSGVWIR
 TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

>VLP048 (218 アミノ酸)
 MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIT
 SEQVGI LENSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNLERTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSGV
 WIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

>VLP049 (217 アミノ酸)
 MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPADFFPAAAVLADTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIT
 SGILENSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSGV
 WIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

20

>VLP050 (238 アミノ酸)
 MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIT
 SEQVGI LGGGGSGGGGETYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRELERTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFH
 LSCLTFGQHTVQEFLVSGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRS
 QSPSANC

>VLP051 (215 アミノ酸)
 MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNII
 SGILETYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVREGGGGSGGGGLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFH
 LSCLTFGQHTVQEFLVSGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAGRSPSQSPSQSSANC

30

>VLP052 (237 アミノ酸)
 MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPADFFPAAAVLADTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIT
 SGILETYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVREGGGGSGGGGLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFH
 LSCLTFGQHTVQEFLVSGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQ
 SPSANC

>VLP053 (237 アミノ酸)
 MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIT
 SGILGGGGSGGGGETYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRELEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFH
 LSCLTFGQHTVQEFLVSGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQ
 SPSANC

>VLP059 (212 アミノ酸)
 MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIT
 SNESELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSGVWIRTPA
 PYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

40

【表 17】

>VLP060 (209 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYR
PPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP061 (215 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNASSAAAAAAAIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP062 (215 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNASSELELELELEIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

10

>VLP063 (237 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
SGILETYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVREGGGGGGLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHL
SCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQ
SPSANC

>VLP064 (216 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
SGILNSELLSLINDLPASNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWI
RTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP068 (216 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
SGILNSELLSLINDAPAANDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWI
RTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

20

>VLP069 (216 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
SGILNSELLSLINDAAAANDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWI
RTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP072 (218 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIG
ILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLETSEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGV
WIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

30

>VLP073 (218 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
SEQVRGILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLETIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGV
WIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP074 (217 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
SGILANSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVW
IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP075 (216 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
SGILNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWI
RTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

40

>VLP076 (220 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWSSNIT
SGILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNELEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFG
VWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

【 0 1 4 5 】

【表 1 8】

>VLP077 (217 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILEIKQSLMTDSLSNPNLNNDIKLEMLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVW
IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

>VLP078 (217 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVW
IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAAGGAAASASPAATPSPAARSQSPAAAASQSPSANC

>VLP079 (217 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVW
IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIAAAGGAAASASPAATPSPAARSQSPRRRSQSPSANC

10

>VLP080 (212 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVW
IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIDIDYINKLQNTITSDWTPCTVSRRRRSQSPRRR

>VLP081 (204 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVW
IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIDIDYINKLQNTITSDWTPCTVSRRRR

>VLP087 (191 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVW
IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASQSANC

20

>VLP088 (217 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVW
IRTPAPYRPPPPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

>VLP089 (220 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILPENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNPELEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSF
GVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

>VLP090 (216 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILNSELLSLIHDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWI
RTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

30

>VLP091 (216 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILNSELLSLINDMPAANDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWI
RTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

>VLP092 (216 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILNSELLSLINDAPASNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWI
RTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

40

>VLP093 (217 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVSWDELTKLIAMSSNIT
SGILENSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVW
IRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSPSANC

【 0 1 4 6 】

【表 19】

>VLP094 (213 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
STNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNEQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
APYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP095 (214 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNEQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
PAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP096 (215 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNEQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

10

>VLP097 (213 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNVEQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
APYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP098 (214 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQEQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
PAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP099 (215 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIEQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

20

>VLP111 (207 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNSE
LLSLINDMPI TNDQKKLMSNNQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
PAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP112 (208 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSSTNS
ELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
PNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP113 (208 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNSE
LLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
PNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

30

>VLP114 (209 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSSTNS
ELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQVRTI IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
PPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP120 (188 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCNSELLSLINDMPI TND
QKKLMSNNVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
PAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP121 (188 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCNSELLSLINDMPI TND
QKKLMSNNVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRT
PAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

40

【 0 1 4 7 】

【表 20】

>VLP122 (188 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDNSELLSLINDMPIT
NDQKKLMSNNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGG
ARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP123 (188 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDNSELLSLINDMPIT
NDQKKLMSNNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGG
ARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP124 (186 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELLESLINDMPITND
QKKLMSNNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGAR
ASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

10

>VLP125 (188 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVSNSELLSLINDMPITND
QKKLMSNNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGG
ARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP126 (188 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVSWNSELLSLINDMPITN
DQKKLMSNNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGG
ARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP127 (188 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVSWDNSELLSLINDMPIT
NDQKKLMSNNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGG
ARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

20

>VLP128 (188 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVSWDNSELLSLINDMPI
TNDQKKLMSNNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGG
ARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP129 (186 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVSWDELLESLINDMPI
TNDQKKLMSNNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGAR
ASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP130 (215 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGINSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

30

>VLP131 (214 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP132 (214 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SINSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

40

>VLP133 (215 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SILNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNLEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

【 0 1 4 8 】

【表 2 1】

>VLP134 (215 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDLTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILNSELLSLINDMPIINDQKKLMSNNEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
TPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

>VLP135 (216 アミノ酸)

MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDLTATALYEEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNIT
SGILNSELLSLINDMPIINDQKKLMSNNEQVRTIIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFVLSFGVWIR
RTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

配列番号86~114=表1-BのRSV Fポリペプチド挿入物

10

【図面の簡単な説明】

【0149】

【図1】図1は、エピトープ挿入に対する位置的な耐性を図示している、ウッドチャックへパドナウイルスコア抗原(WHcAg)の概略図を示す。丸は以下の位置を含む粒子会合に耐性である挿入位置を示す：1(N末端)、44、71、72、73、74、75、76、77、78、81、82、83、84、85、92および187(C-末端)。149番目の残基(150~188番目の残基を欠いている)においてトランケートされたWHcAgのC末端もまた、粒子の会合に耐性である。対照的に、四角は以下の位置を含む粒子会合に非耐性である：21、66、79、80、86および91。位置の番号付けは、配列番号1として記載されている全長のWHcAgアミノ酸配列に基づいている。149番目の位置においてトランケートされているWHcAgは、配列番号2として記載されている。RSVF²⁵⁴⁻²⁷⁷エピトープ(配列番号3)は、この図においてWHcAgの78番目の位置に挿入されている。

20

【図2】図2は、ハイブリッド(WHcAg-RSV)ウイルス様粒子(VLP)試験のフローチャートを示している。

【図3】図3Aは、パリビズマブへの結合に対する固相の抗原としてのハイブリッドWHcAg-RSVの抗原性を示している。図3Bは、RSVFタンパク質へ結合するパリビズマブの阻害剤としての溶液中のハイブリッドVLPの抗原性を示している。

【図4】図4A~4Dは、4つのRSV反応性モノクローナル抗体への結合に対する固相の抗原としてのハイブリッドWHcAg-RSV VLPの抗原性を示している。

30

【図5】図5は、ハイブリッドWHcAg-RSV VLPがRSVのパリビズマブ中和を阻害可能であることを示している。

【図6】図6Aは、ハイブリッドWHcAg-RSV VLPの免疫原性を示している。図6Bは、ハイブリッドWHcAg-RSV VLPに対する抗体が固相のRSV組み換えF(rF)タンパク質へのパリビズマブの結合を阻害可能であることを示している。

【図7】図7Aおよび図7Bは、ハイブリッドWHcAg-RSV VLPの免疫原性を示している。図7Cおよび図7DはハイブリッドWHcAg-RSV VLPの防御効果を示している。

【図8】図8A~図8Fは、VLP019血清によるRSV-A、RSV-Bおよびパリビズマブエスケープ変異体(MARM S275F)の中和を示している。熱不活性化した血清またはパリビズマブの希釈液を100~200PFUのRSVと混合し、ブランクアッセイによって力価を測定する前に1時間インキュベートした。抗VLP19血清は、野生型のRSV A2(図8A)、いくつかの近年のRSV Aの臨床的な単離物(図8B)2つのRSV Bの臨床的な単離物(図8Cおよび図8D)およびいくつかの抗体エスケープ変異体(図8Eおよび図8F)を中和した。

40

【図9】図9は、マウスにおけるアルミニウムおよび不完全フロインドアジュバント中のハイブリッドWHcAg-RSV VLPの防御効果の比較を示している。

【図10】図10は、VLPの電子顕微鏡写真を示している。極低温電子顕微鏡解析を、PBS中のパリビズマブFabでインキュベートしたWHcAg、VLP-19およびVLP-19において行った。サンプルを液体エタン中でガラス化し、NanoImaging Servic

50

es, Inc において、FEI Tecnai T12電子顕微鏡でイメージングした。

【図11】図11A～図11Dは、WHcAgおよびWHcAgと比較した、VLP19のインビトロ解析の結果を図示している(レーン1、3および5);およびWHcAg(2、4および6)。総タンパク質を、Sypro Ruby stainによって可視化した(レーン1および2)。ウェスタンブロットは、抗WHcAb(レーン3および4)または抗RSVFパリビズマブ(レーン5および6)で検出した。図11Bにおいて、ELISAプレートをパリビズマブの希釈液でインキュベートする前にVLP-19、sFまたはWHcAgでコーティングした。図11Cにおいて、ELISAプレートを、100ng/mlのパリビズマブと混合した競合剤(VLP-19、sFまたはWHcAg)の希釈液でインキュベートする前に、sFでコーティングした。図11Dにおいて、ヒト血漿の希釈液でインキュベートする前にVLP-19、sFまたはWHcAgでコーティングした。すべてのELISAアッセイについて、結合したIgGをHRPコンジュゲートした抗ヒトIgGAb、それに続くテトラメチルベンジジンを用いたインキュベーションによって検出した。反応を0.1NのHClで停止させ、光学濃度(OD)を450nmにおいて読み取った。各ELISAアッセイを3連で行い、示されたデータは単一のアッセイを示している。

10

【図12】図12A～図12Cは、VLP19を用いた免疫化によって曝露からマウスが防御され、中和AbおよびF特異的IgGが誘発されることを示している。BALB/cマウス(n=5)を0日目および14日目に不完全フロインドアジュバント(IFA)または)PBS単独の何れかにおいて調合した40μgのVLP19の100μLを投与するか、または0日目に10⁶PFUの野生型RSVA2で感染させた。28日目に、血清をサンプリングし、マウスを10⁶PFUの野生型RSVA2で曝露した。32日目に肺を回収した。図12Bは、熱不活性化血清のRSVマイクロ中和力価を示す。図12Cは、ELISAによって決定されたsF特異的なIgGの力価の血清を示す。各動物に対するデータポイントは平均を通った線で示されている。T-testは、p値を決定するために行われ、“ns”は、“有意差なし”を示している。示したデータはIFAによる免疫化からのものであった。独自のアジュバントを用いた免疫化により、類似の結果を得た。

20

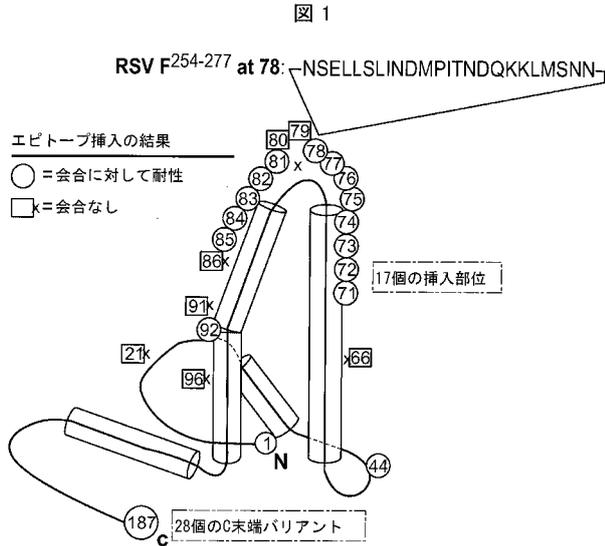
【図13】図13Aおよび図13Bは、マウス抗VLP10血清が、RSVを中和し、sFへの結合に対してパリビズマブと競合することを図示している。図13Aは、パリビズマブと比較した、VLP19免疫化マウスから得た熱不活性化血清を用いて行ったRSVのPRNT中和アッセイの結果を示している。図13Bは、VLP19免疫化マウスから得た血清が、sFへの結合に対してパリビズマブと競合することを示している。ELISAプレートを、sFでコーティングし、ネガティブコントロールの血清か抗VLP19血清の何れかの希釈液と混合した一定量のパリビズマブの混合物とインキュベートした。結合したパリビズマブをHRPコンジュゲートした抗ヒトAbで検出した。洗浄の後、色を0.1N HClを伴うテトラメチルベンジジンで発色させた。光学濃度を450nmにおいて読み取り、%阻害をネガティブコントロールとの比較によって算出した。示したデータは3回の独立した実験の典型例である。

30

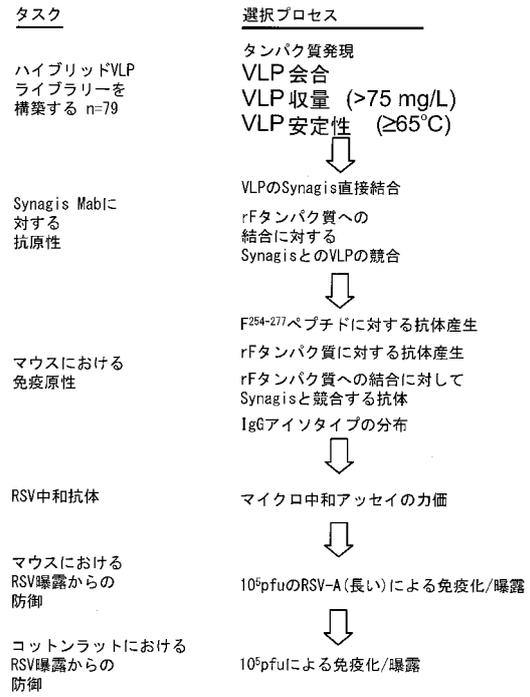
【図14】図14Aおよび図14Bはアジュバントの非存在下において投与されたVLP19の免疫原性および有効性を示している。3つのB10xB10.S F1マウスの群は第0週および第6週目にPBS中のVLP19の、示された投与によって腹腔内に免疫化した。マウスを出血させ、貯めた血清を試験した。図14Aは、抗VLP19血清の抗RSVタンパク質のIgG力価を示している。図14Bは、抗VLP19血清のRSV中和力価を示している。

40

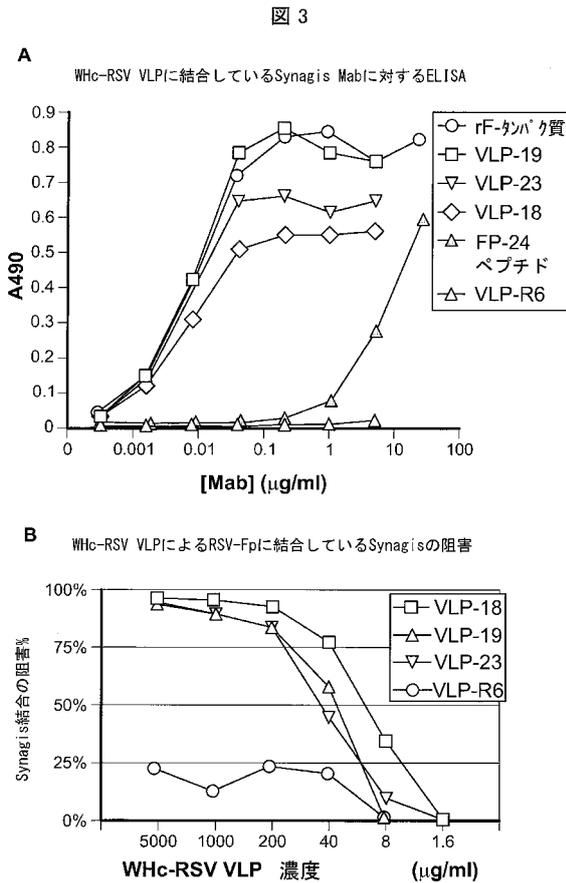
【 図 1 】



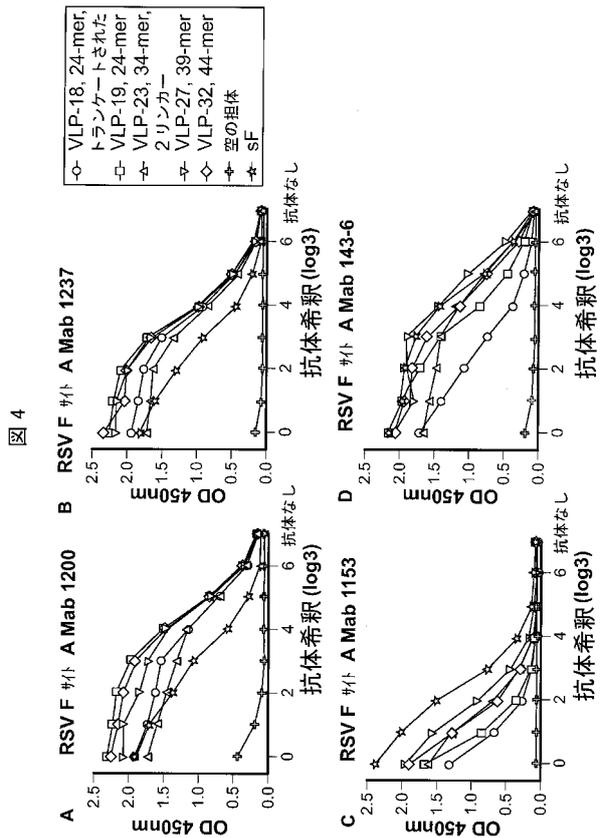
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

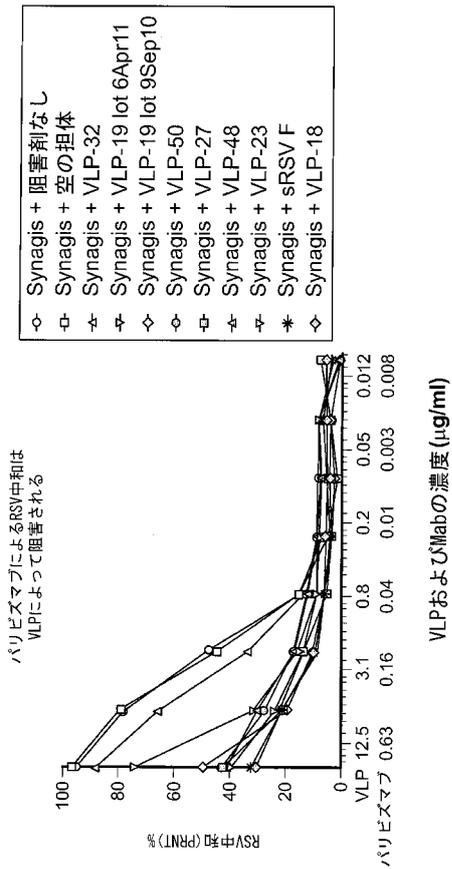


図 5

ハリスズマブによるRSV中和はVLPによって阻害される

【 図 7 】

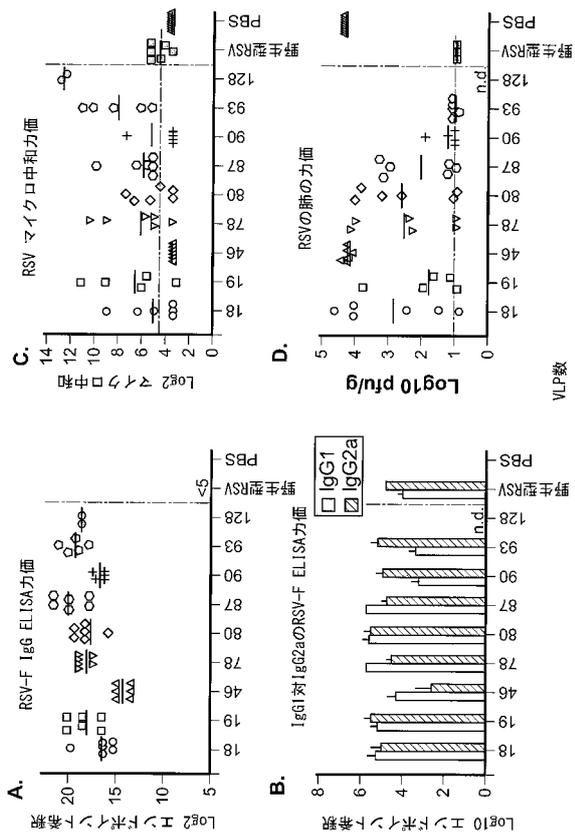


図 7

【 図 6 】

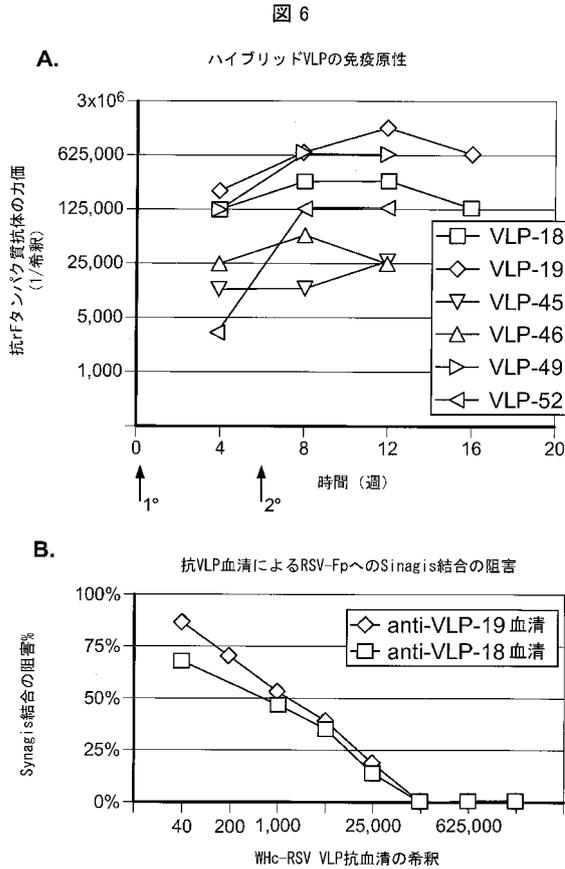


図 6

【 図 8 】

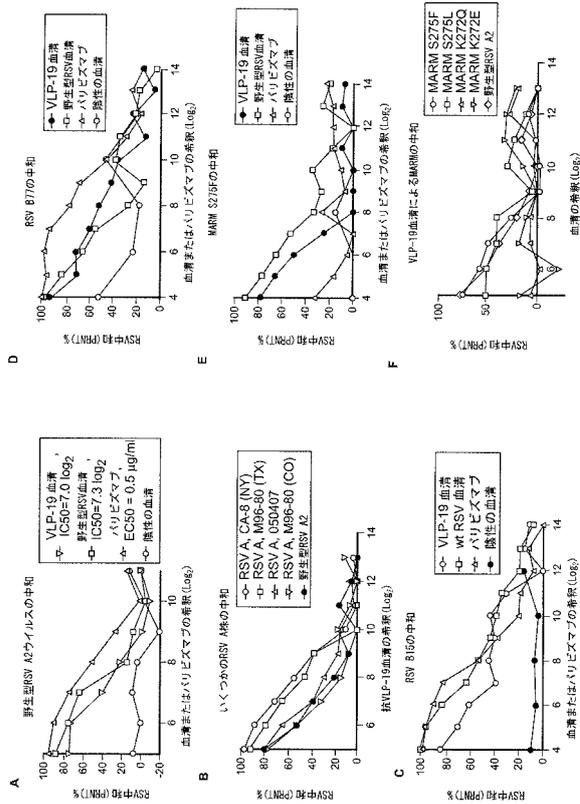
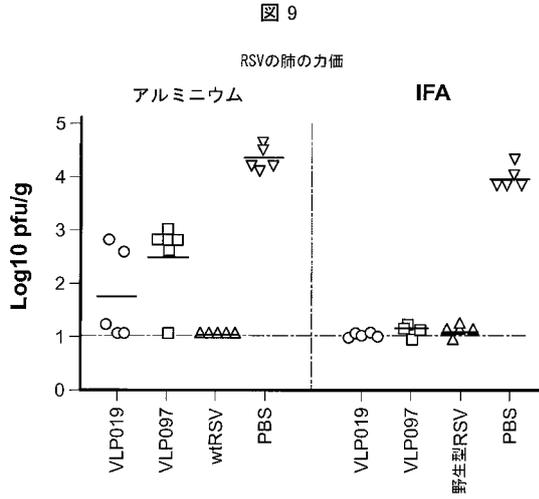
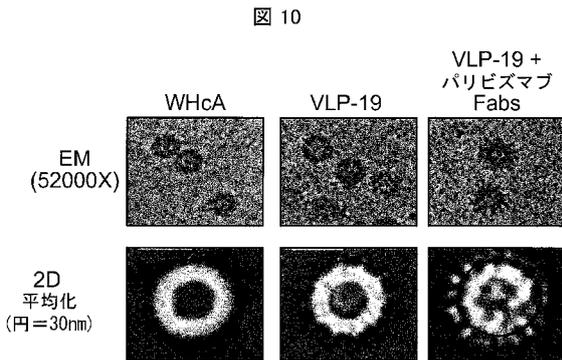


図 8

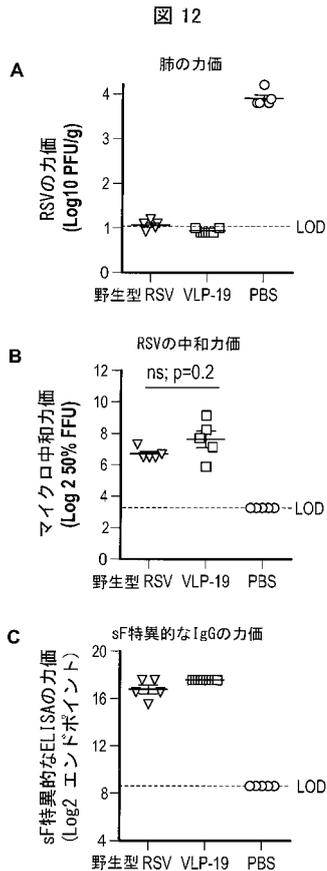
【 図 9 】



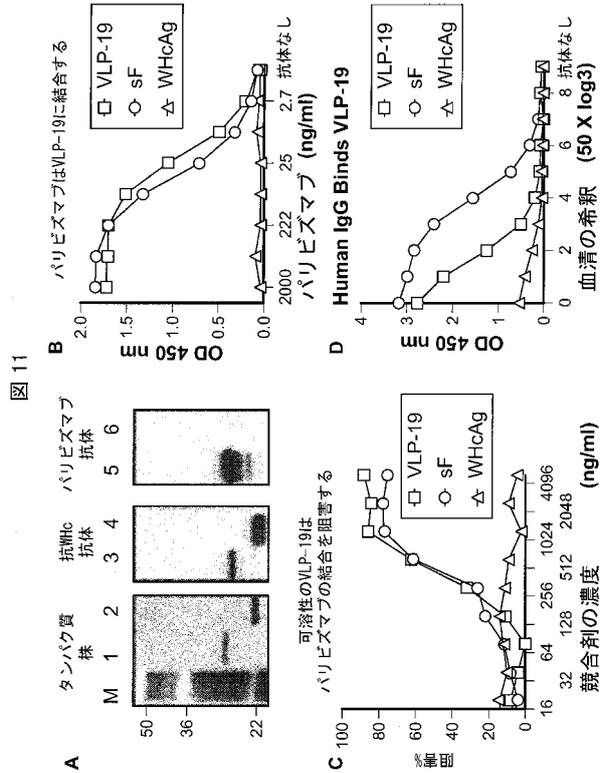
【 図 10 】



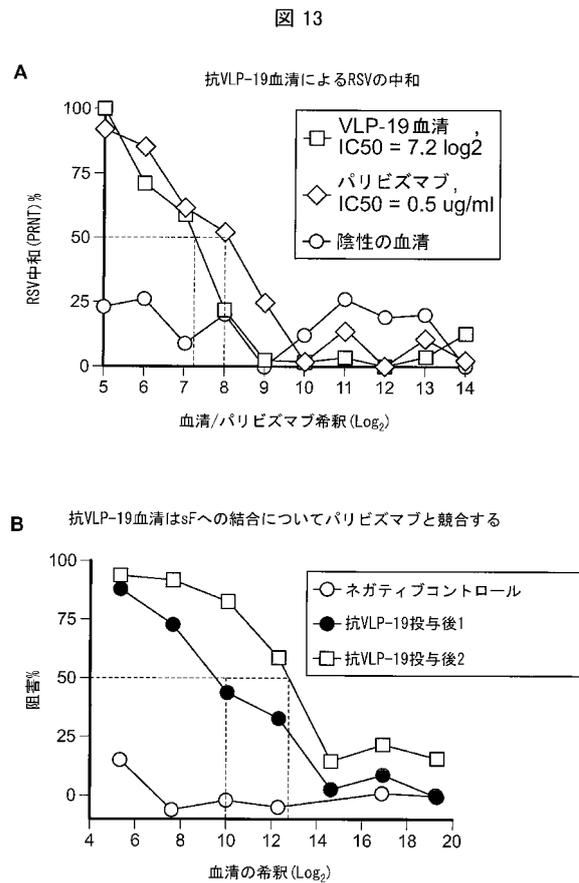
【 図 12 】



【 図 11 】

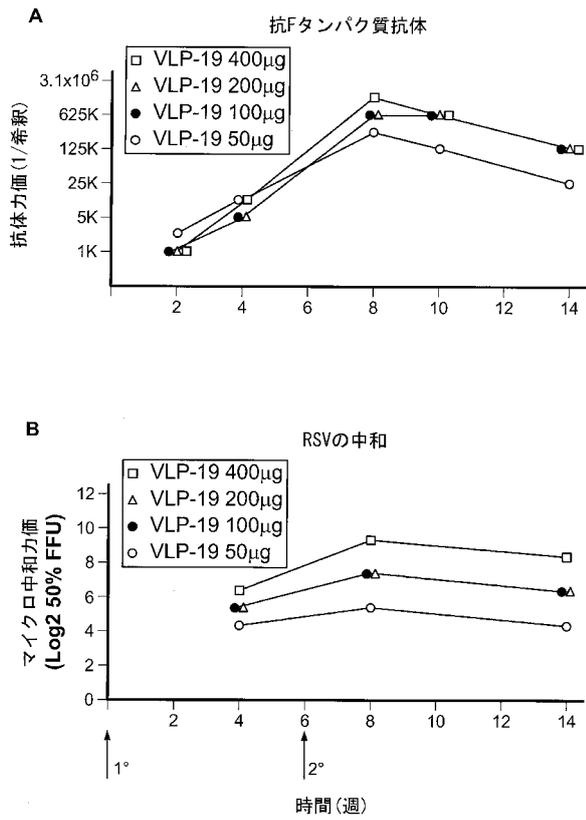


【 図 13 】



【 図 1 4 】

図 14



【 配 列 表 】

2016517440000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/029297
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/12 (2014.01) USPC - 435/69.7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/12; C07K14/005, 14/02, 14/135; C12N 15/63, 15/86 (2014.01) USPC - 435/69.1, 69.7, 320.1; 536/23.1, 23.4 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12N 2760/18522, 2760/18523, 2760/18534, 2760/18541, 2800/22 (2014.06) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,231,884 B1 (BIRKETT) 15 May 2001 (15.05.2001) entire document	1-5
Y	US 2011/0177117 A1 (BLAIS et al) 21 July 2011 (21.07.2011) entire document	1-4
Y	US 2011/0206724 A1 (MILICH et al) 25 August 2011 (25.08.2011) entire document	5
A	US 2011/0250237 A1 (O'HAGAN et al) 13 October 2011 (13.10.2011) entire document	1-5
A	WO 2012/103496 A2 (TANG et al) 02 August 2012 (02.08.2012) entire document	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 July 2014		Date of mailing of the international search report 08 AUG 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 0 7 K 14/02 (2006.01) C 0 7 K 14/02

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ミリッチ, デイヴィッド, アール.
 アメリカ合衆国, 9 2 0 2 5 カリフォルニア州, エスコンディード, スカイ ハイ ロード 1
 5 4 3 4

(72) 発明者 ウィテカー, デイヴィッド, シー.
 アメリカ合衆国, 9 2 1 1 7 カリフォルニア州, サンディエゴ, コンラッド アベニュー 3 7
 4 1

(72) 発明者 シクリ, ジェーン, エイチ.
 アメリカ合衆国, 8 0 4 4 3 コロラド州, フリスコ, ノース シックス アベニュー 2 8 0

F ターム(参考) 4B065 AA95X CA44

4C085 AA03 BA57 CC08 EE01 EE06

4H045 BA10 BA17 BA18 BA19 BA20 BA41 CA01 DA86 EA20