(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0023601
(43) 공개일자 2025년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/155* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/155 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7003905(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년03월13일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2022-7033808
원출원일자(국제) 2014년03월13일
심사청구일자 2022년09월28일
(85) 번역문제출일자 2025년02월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/026714
(87) 국제공개번호 WO 2014/160463
국제공개일자 2014년10월02일
(30) 우선권주장
61/780,910 2013년03월13일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리프리젠티드 바이 더 세크러테리, 디파트먼트 오브 헬쓰 앤드 휴먼 서비씨즈
미국, 메릴랜드 20892, 베서스다, 엠에스 7788, 스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 내셔널 인스티튜즈 오브 헬스, 오피스 오브 테크놀로지 트랜스퍼
(72) 발명자
췽, 피터, 디.
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 4508, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
그라함, 바니, 에스.
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 2502, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

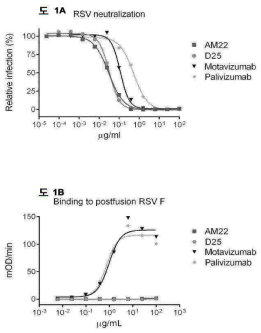
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **선융합(prefusion) RSV F 단백질 및 이의 용도**

(57) 요 약

선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 호흡기세포융합바이러스 (RSV) 항원을 개시한다. 또한 항원을 암호화하는 핵산 및 항원을 생성하는 방법을 개시한다. 개체에서 면역반응을 생성하는 유전자를 위한 방법을 개시한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 개체에게 치료적 유효량의 항원을 투여하여 개체에서 RSV 감염을 치료하거나 또는 방지하기 위한 방법이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 31/14 (2018.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2760/18522 (2013.01)
C12N 2760/18523 (2013.01)
C12N 2760/18534 (2013.01)

(72) 발명자
맥렐란, 제이슨, 에스.
미국, 뉴햄프셔주 03755, 하노버, 룸 302비, 베일 빌딩7200
조이스, 마이클, 고든
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 4504, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
카네키요, 마사루
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 2613비, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
장, 바오산
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 4609비, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
보잉톤, 제프리
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 4502, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
게오르기예프, 이블린, 스테파노프
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 4512, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
판세라, 마리
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 4609비, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
소토, 친퀘
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 4510, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
스리바트산, 산제이
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 4609비, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
스튜어트-존스, 기욤
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,룸 4508, 빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
첸, 레이
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
첸, 맨
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
추앙, 그우-유
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디
골만, 제이슨
미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디

(30) 우선권주장
61/857,613 2013년07월23일 미국(US)
61/798,389 2013년03월15일 미국(US)
61/863,909 2013년08월09일 미국(US)

오펙, 길라드

미국, 메릴랜드주 20850, 록빌, 샤디 그로브, 빌딩 2, 3127에이

사스트리, 말리카

미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 룸 비1-더블유30, 엠에스씨 2062 빌딩 31, 센터 드라이브 31

양, 용핑

미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디

저우, 통킹

미국, 메릴랜드주 20892, 베데스다, 콘벤트 드라이브 40,빌딩 40, 엔아이에이치/엔아이에이아이디

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 분리된 면역원:

선융합 입체형태(prefusion conformation) 에서 재조합 RSV F 단백질을 안정시키는 원천(native) F 단백질과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 재조합 RSV F 단백질 또는 그의 세포외 도메인(extracellular domain);

여기서 하나 이상의 아미노산 치환은 선융합 입체형태에서 재조합 RSV F 단백질을 안정시키는 비천연 (non-native) 디설파이드 결합(disulfide bond)을 도입하기 위한 시스테인 치환을 포함하고; 여기서 시스테인 치환은 서열번호 124로 제시되는 참조 RSV F 단백질 서열에서 R SV F 위치 137-216 또는 461-513 중 하나에서 첫 번째 시스테인 치환 및 RSV F 위치 26-61, 77-97 또는 271-460 중 하나에서 두 번째 시스테인 치환을 포함하고,

여기서 첫 번째 및 두 번째 시스테인의 RSV F 위치는 표 1에 제공된 구조 좌표(structural coordinate)에 의해 제시된 3차원 구조에서 2.0 내지 5.5 옹스트롬(angstrom)의 Cβ-Cβ 거리를 가짐.

청구항 2

제1항에 있어서, 시스테인 치환은 RSV F 위치 137-216 중 하나에서 첫 번째 시스테인 치환 및 RSV F 위치 26-61 중 하나에서 두 번째 시스테인 치환을 포함하는 것인, 면역원.

청구항 3

제1항에 있어서, 재조합 RSV F 단백질은 인간 서브타입 A 또는 서브타입 B, 또는 소 RSV F 단백질인, 면역원.

청구항 4

제1항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환은 S155C 및 S290C 치환을 포함하는 것인, 면역원.

청구항 5

제4항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환은 S190F 및 V207L 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것인, 면역원.

청구항 6

제1항에 있어서, 재조합 RSV F 단백질은 단일 사슬 RSV F 단백질이고, F_2 폴리펩티드와 F_1 폴리펩티드는 이종(heterologous) 펩티드 링커로 연결되거나, 또는 직접적으로 연결된 것인, 면역원.

청구항 7

제6항에 있어서,

F_2 폴리펩티드의 위치 105는 Gly-Ser 링커에 의해 F_1 폴리펩티드의 위치 145에 연결되거나;

F_2 폴리펩티드의 위치 103은 F_1 엑토도메인의 위치 145에 직접 연결된 것인, 면역원.

청구항 8

제1항에 있어서, 재조합 RSV F 단백질은 하기를 포함하는 것인, 면역원:

A149C와 Y458C 치환 사이의 프로토머간(inter-protomer) 디설피드 결합;

N183C와 N428C 치환 사이의 프로토머간 디설피드 결합 ,및 RSV F 단백질은 위치 182/183 사이에 G 삽입을 추가로 포함함; 또는

T369C와 T455C 치환 사이의 프로토머간 디설피드 결합.

청구항 9

제1항에 있어서, 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 371, 372 또는 373의 각각 잔기 26-109 및 137-513, 각각 잔기 26-103 및 145-513또는 각각 잔기 26-105 및 145-513 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 F_2 폴리펩티드 및 F_1 폴리펩티드를 포함하는 것인, 면역원.

청구항 10

제1항에 있어서, 재조합 RSV F 단백질 또는 그의 세포외 도메인의 중합체(multimer)를 포함하는, 면역원.

청구항 11

제1항에 있어서, 재조합 RSV F 단백질의 세포외 도메인을 포함하는, 면역원.

청구항 12

제11항에 있어서, 재조합 RSV F 단백질의 세포외 도메인은 C-말단 삼량체화(trimerization) 도메인에 연결된 것인, 면역원.

청구항 13

제12항에 있어서, 삼량체화 도메인은 폴돈(foldon) 도메인인, 면역원.

청구항 14

제1항에 있어서, 재조합 RSV F 단백질을 포함하는, 면역원.

청구항 15

제1항에 있어서, 여기서:

(a) 재조합 RSV F 단백질은 RSV F 위치 481및 489 사이 또는 RSV F 위치 509 및 510 사이에 디설피드 결합을 포함하지 않음;

(b) 재조합 RSV F 단백질은 RSV F 위치 481, 489, 509, 510 또는 이들의 조합에 시스테인 잔기를 포함하지

않음;

(c) (a) 및 (b)의 조합인 것인, 면역원.

청구항 16

제1항의 면역원을 포함하는 바이러스-유사 입자 (virus-like particle).

청구항 17

제1항의 면역원을 포함하는 단백질 나노입자 (protein nanoparticle).

청구항 18

제1항의 면역원을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 핵산 분자는 mRNA인, 핵산 분자.

청구항 20

제18항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 22

제20항의 벡터를 포함하는 분리된 숙주 세포.

청구항 23

유효량의 제1항의 면역원 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 면역원성 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련출원

[0002] 본 명세서는 2013년 3월 13일 출원된 미국 가출원 번호 61/780,910, 2013년 3월 15일 출원된 번호 61/798,389, 2013년 7월 23일 출원된 번호 61/857,613 및 2013년 8월 9일 출원된 번호 61/863,909의 우선권을 주장하여, 본 명세서에 전체적으로 참조로써 통합된다

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 호흡기 세포 융합 바이러스(respiratory syncytial virus; RSV)에 대한 면역 반응의 유발 및 검출을

위한, 이들 용도의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 호흡기 세포 융합 바이러스(RSV)는 Paramyxoviridae 과(family), Pneumovirus 속(genus)에서 외피 비분절형 음성가닥(non-segmented negative-strand) RNA 바이러스이다. 이는 첫 삶을 사는 어린이들 사이에서 모세기관지염 및 폐렴의 가장 흔한 원인이다. RSV는 또한 특히 노인 또는 손상된 심장, 폐, 또는 면역 시스템을 가진 이들 사이에서, 모든 연령에서 일어날 수 있는 심각한 기도 질환을 포함하여 반복 감염이 발생한다. 최근 수동 예방 접종은 특히 기관지폐형성이상증(bronchopulmonary dysplasia), 또는 선천성 심장 질환을 가진 미숙아 또는 유아에서, RSV 감염에 의한 심각한 질병을 방지하기 위해 사용된다. 최근의 치료는 RSV-중화항체, RSV 퓨전(F) 단백질의 24-아미노산, 선형, 구조적인 에피토프에 결합하는 Palivizumab(SYNAGIS®; MedImmune, Inc.)의 투여를 포함한다.

[0006] 사실상, RSV F 단백질은 초기에 F0으로 지정된 단일 폴리펩티드 전구체로 표현된다. F0은 소포체에서 삼량체화(trimerize)하여, F1, F2 및 Pep27 폴리펩티드를 생성하는 두 보존 부위에서 세포의 퓨린 유사 프로테아제(furin-like protease)에 의해 처리된다. Pep27 폴리펩티드는 절제되고 성숙한 F 단백질의 일부를 형성하지 않는다. F2 폴리펩티드는 F0 전구체의 C-말단 부분에서 유래하고 ~24 아미노산 세포질 꼬리와 연결되어 막관통영역(transmembrane domain)을 통해 막에서 성숙한 F 단백질을 고정한다. F2-F1 이질이형체(heterodimer)의 세 프로토머(protomer)는, 바이러스 및 타겟 세포막을 융합하는 구조적인 변화를 겪게하는 안정적인 선융합(prefusion)의 형태를 채택하는, 성숙한 F 단백질을 형성하기 위해 조립한다. RSV 엔트리에서 필수적인 역할로 인해, RSV F 단백질은 중화 항체의 타겟 및 백신 개발의 대상이다; 그러나, 다른 RSV 항원과 같이, RSV F 단백질 기반의 백신의 개발 전 노력은 실패로 입증되었다.

발명의 내용

[0007] 본 발명에 기재된 바와 같이, RSV F 단백질 선융합(pre-fusion) 형태의 삼차원적 구조가 밝혀졌다. 본 발명은, 막 원위 정점(membrane distal apex)에 독특한 항원 부위("antigenic siteΦ")를 제시하는 선융합(prefusion) 형태의 RSV F의 원자 레벨의 세부사항을 처음으로 밝혔다. 참조로써 선융합 F의 삼차원적 구조를 이용하여, 안정화된 선융합 F("PreF" 항원)의 형태는 조작되고 구축되며, 동물 모델에서 RSV 도전에 대항하여 보호를 제공하는, 우선적 RSV F 단백질 기반의 면역원을 획득하는 것보다 수 배 높은 RSV 중화 면역 반응을 발생시키는데 사용된다. 예를 들어, PreF 항원은 RSV를 위한 잠재적인 백신 및 진단 분자로써 모두 사용될 수 있다.

[0008] 선융합 구조에 있어서 안정화된 분리된 재조합 RSV 단백질뿐만 아니라, 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 몇 실시예에 있어서, 상기 RSV F 단백질은 D25, 5C4, AM22, 및/또는 MPE8 항체와 같이 선융합 특이적 항체에 특이적으로 결합할 수 있는, 선융합 구조에 있어서 안정적이다. 몇 실시예에 있어서, 상기 RSV F 단백질은 서열번호 370과 같이, RSV F 단백질 서열의 잔기 62-69 및 196-209를 포함하는 항원 부위 Φ를 포함한다. 몇 실시예에 있어서, 면역원은 항체의 부재 하에서 적어도 24시간 동안 생리적 pH의 인산염 완충 식염수 20℃에서 배양한 후 항체에 특이적으로 결합할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 면역원은 집단에서 적어도 90%의 면역원이 선융합 특이적 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 수용액에 용해될 때 균일한 집단을 형성할 수 있다.

[0009] 일부 실시형태에서, F2 및 F1 폴리펩티드는 RSV F 위치 62-69 및 169-209를 각각 포함하고, F2 폴리펩티드는 RSV F 위치 26-109의 8-84 잔기를 포함하거나 구성하고, F1 폴리펩티드는 RSV F 위치 137-529의 14-393 잔기를 포함하거나 구성하며, 여기서 RSV F 위치는 서열번호 124에 기재된 참조 F0 폴리펩티드의 아미노산 서열에 해당한다.

[0010] 몇 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 예를 들어 선융합 형태에서 F 단백질(F1 폴리펩티드의 N-말단 지역을 포함)의 막 말단부를 안정화하는, 선융합 형태에서 단백질을 안정화하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 아미노산 치환은 비 천연 이황화 결합(non-natural disulfide bond)을 도입하거나 공동 충진(cavity-filling) 아미노산 치환일 수 있다. 몇 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은, 선융합 형태에서 단백질을 안정화하는 비 천연 이황화 결합을 형성하는 S155C 및 S290C 치환을 포함한다; 즉, 하나 또는 그 이상의 선융합 특이적 항체에 특이적으로 결합하는, 및/또는 항원부위Φ와 같은 항원부위를 제시하는 형태에서, RSV F 단백질의 선융합이 아닌 후융합 형태에서 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 재조합 RSV F 단백질은 위치 190, 위치 207, 또는 위치 190 및 207에서 F, L, W, Y, H, 또는 M 치환을 포함할 수 있다. 하나의 비 제한

적인 예에서, 상기 재조합 RSV F 단백질은 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환을 포함한다("DSCav1"로 지칭).

[0011] 추가의 실시형태에서, 상기 재조합 RSV F 단백질은, F 폴리펩티드의 막 원위 영역을 안정화하는 변형과 함께, F1 폴리펩티드의 C 말단에의 하나 또는 그 이상의 변형체(절단 및 아미노산 치환과 같은)를 포함할 수 있고, 선융합 형태에서 재조합 F 단백질의 안정화를 증가시킬 수 있다. 변형의 예로는 삼량체화 도메인(foldon 도메인과 같은) F1 폴리펩티드의 결합 또는 인터프로모터 이황화 결합을 형성할 수 있는 F1 폴리펩티드(예를 들어 위치 512 및 513)의 C 말단 구역에서 하나 또는 그 이상의 시스테인 잔기 도입을 포함할 수 있다.

[0012] PreF 항원은 단백질 나노입자, 또는 바이러스-유사 입자에 포함될 수 있다. PreF 항원을 암호화하는 핵산 분자가 본 명세서 개시된다. 일부 실시형태에서, 상기 PreF 항원은 단쇄 RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0013] 추가적인 실시예는 RSV F 위치 62-69 및 196-209를 포함하는, 선융합 특이적 항체에 특이적으로 결합하는 에피토프 스캐폴드 단백질, 또는 이들의 이종 스캐폴드 단백질에 연결된 원형 치환체(circular permutant)를 포함한다.

[0014] PreF 항원, 단백질 나노입자, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물이 본 발명에서 제시된다. 상기 조성물은 개체에 투여하기 적합한 약학적 조성물일 수 있으며, 단위 투여형태로 담길 수 있다. 상기 조성물은 보조제(adjuvant)를 포함할 수 있다.

[0015] 개체에게서 RSV 감염을 치료, 억제 또는 예방을 위한 방법으로써, 개체에서 면역 반응을 생성하는 방법이 개시되어 있다. 일부 방법의 실시형태에서, 인간 또는 소와 같은 개체에는, 개시된 항원 및/또는 상기 항원을 암호화하는 핵산 분자의 유효량이 투여된다. 어떤 실시형태에서, 상기 방법은 개체에서 Th1 편향 면역 반응을 유도하기 위해 선택된 보조제를 포함하는 면역원성 조성물의 투여를 포함한다. 추가적인 실시형태에서, 상기 방법은 개시된 변형과 함께 선융합 형태에서 안정화된 인간 아형 A 및 인간 아형 B RSV F 단백질을 이용하여, 초기 부스트(prime boost) 면역화를 포함한다. RSV로 감염된 개체에서 항체에 결합한 RSV를 검출 또는 분리하는 방법이 본 발명에 개시된다. 어떤 실시형태에서, 상기 재조합 RSV F 단백질은 다클론성 혈청 반응에서 타겟 항체를 검출하고 정량하기 위해 사용될 수 있다.

[0016] 실시형태에서 전술한 목적, 특징, 및 이점은 첨부된 도면을 참조하여 다음의 상세한 설명으로부터 보다 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1A-1C는 선융합 RSV F 삼량체 복합체에서 RSV 중화, F 당단백질 인식, 및 인간 항체 D25의 크리스탈 구조를 도시화한 그래프 및 도표 세트이다. 상기 RSV F의 선융합 형태는 준 안정상태이고, 후융합 상태에 채택이 용이한 가용성 형태로 발현될 때, D25를 포함한 잠재적 항체의 수는 새롭게 나타난 선융합 F 당단백질의 상단 항원 부위에 결합한다. (A) 심각한 RSV 질병을 방지하기 위한 FDA에 승인된 예방적 항체인 palivizumab를 포함하는 항체에 의한 RSV 중화. (B) 효소 결합 면역 흡착법(ELASA)를 이용한 후융합 F 당단백질에 결합한 항체 측정. (C) 리본 형태의 D25-RSV F 삼량체 구조 및 분자 표면 묘사(surface representation). F 당단백질 삼량체의 하나의 프로모터는 리본으로써 표시된다. 분자 표면은 다른 두 F 프로모터에 대해 표시된다. 리본으로 표시된 D 프로모터에 결합된 상기 D25 Fab는 또한 어두운 회색 음영의 중쇄 및 밝은 회색 음영의 경쇄와 함께, 리본 묘사로 표현된다. 다른 D25 Fab는 같은 음영이지만, 표면 묘사에 나타내었다.

도 2A 및 2B는 RSV F의 구조적 재배열을 나타내는 RSV 이차 구조와 정렬된 도표 및 서열의 세트 부분이다. 바이러스-세포 엔트리를 중재하기 위해, RSV F 당단백질은 준 안정적인 선융합 형태에서 안정적인 후융합 형태로 전환한다. (A) 선융합 및 후융합 구조. 도 1C에 나타낸 바와 같은 음영으로 외부 이미지는 선융합(왼쪽) 및 후융합(오른쪽) 삼량체 구조를 나타내었다. 스틱으로 나타나는 복합 글리칸은, 성숙한 단백질에서 나타나는 세 개의 N-결합 글리코실화 부위 각각에 모델링된다. 내부 이미지는 리본 묘사에서 단일 RSV F 프로모터를 나타낸다. (B) RSV F 서열 및 이차 구조. N-결합 글리코실화의 부위 및 검은 삼각형에 의해 강조된 항원 부위가 표시되고, 아래로 화살표가 퓨린(furin) 분열 부위의 위치를 표시한다. 이차 구조는 α-나선을 나타내는 실린더 및 β-가닥을 나타내는 화살표로 표시된 서열(서열번호 370)에 나타낸다. 무질서된 또는 누락된 잔기는 "X"로 나타내고, 회색 음영으로 나타낸 선융합 및 후융합 형태 사이의 5Å 이상 이동된 잔기는 박스로 표시되었다.

도 3A-3C는 D25와 RSV F의 인터페이스를 나타내는 도표 및 서열 정렬의 세트를 나타낸다. 항체 D25는 선융합 F

삼량체의 정점에서 두 프로모터에 걸친 사차 에피토프에 결합한다. (A) D25 및 RSV F 사이의 인터페이스의 근접. D25와 상호작용하는 F 잔기의 사이트 체인은 스틱으로 표시된다. 산소원자는 밝은 회색의 음영 및 질소 원자는 어두운 회색 음영으로 나타내었다. 수소 결합은 점선으로 그어 표시하였다. 두 이미지는 수직 축으로 90° 회전된 것에 관련된다. (B) 선융합 및 후융합 F 분자에서 D25 에피토프의 위치 및 형태. D25 인터페이스에서의 RSV F 잔기를 나타낸다. 극성의 α4 및 $\alpha5_{post}$를 N- 및 C-말단 단편에 표시됨과 함께 화살표로 표시되었다. (C) D25에 의한 인식 영역에서 F 잔기의 서열 보존. 인간 RSV 아형 B(hRSV/B) 또는 h/RSV/A와 다른 소의 RSV(bRSV)에 밑줄로 표시하였다. 엑토도메인(Ectodomain)은 F 잔기 26-109 및 137-524로써 정의된다.

도 4A-4D는 항원 부위 Φ에 관한 그래프 및 디지털 이미지 시리즈이다. 매우 효과적인 RSV-중화 항체는 선융합 F 삼량체의 막-말단 정점 위치를 타겟으로 한다. (A) RSV에 감염된 세포에 결합한 D25를 차단하는 항체의 능력은 항체 농도의 함수로써 측정하였다. (B) 음성 착색 전자 현미경 검사를 통한 RSV F/Fab 복합체의 분석: (왼쪽) 10Å 해상도로 여과하고, F-삼량 공동을 포함하도록 슬라이스된 RSV F + D25 Fab의 결정 구조를 통해 12Å 슬라이스의 재투영. (가운데) RSV f + D25 Fab의 263 입자의 평균 정렬. (오른쪽) RSV F + AM22 Fab의 550 입자의 평균 전렬. 가운데 패널의 스케일 바는 50Å. 항원 부위 Φ를 타겟으로 하는 항체 및 다른 항원 부위를 타겟으로 하는 F-특이적 항체에 대한 (C) 퓨전 억제 활성 및 (D) 부착 억제 활성. 부착 억제 분석을 위해, 헤파린을 양성 대조군으로 사용하였다.

도 5는 RSV F 및 D25의 복합체를 발현하기 위해 사용되는 방법을 설명하는 개략도를 도시한다. RSV F(+) Fd (F 원형)을 발현하는 플라스미드, D25 경쇄(L 원형), 및 D25 중쇄(경첩 영역에서 스탑 코돈이 있거나 또는 없는, H 원형)은 현탁액에서 동시에 HEK293 세포에 형질감염시켰다. 또는, RSV F(+) Fd 플라스미드는 형질전환 3시간 후 세포에 정제된 D25 Fab 또는 lgG를 첨가와 함께 감염되었다. 최상의 수율이 F 및 D25 Fab 동시 발현에 의해 얻어졌다(세포 리터당 ~1.0 mg의 정제 복합물).

도 6은 RSV F에 결합된 D25와 선융합 PIV5 F의 비교를 나타낸 리본 도표의 세트를 나타낸 것이다. RSV F(+) Fd(왼쪽) 및 PIV5 F-GCNt(오른쪽)에 결합한 D25d의 리본 묘사. ~12%의 서열 상동성을 가짐에도 불구하고, 두 단백질 사이의 이차 구조 요소의 우수한 동의가 있다. 가장 현저한 차이점 중 하나는 도 7에 나타낸 바와 같이, 퓨전 펩티드(F1 소단위의 N-말단)의 위치이다. 상기 PIV5 F 구조는 세 도메인: Ⅰ, Ⅱ 및 Ⅲ(Yin et al., Nature, 439, 38 (2006))으로 구성되는 것으로 설명되었다. 도메인 Ⅲ은 막 말단 엽(membrane distal lobe)으로 불리는 반면, 도메인 Ⅰ 및 Ⅱ는 중앙 배럴(central barrel) 및 막 인접 엽(membrane proximal lobe)를 포함한다. 상기 개시된 쪼개신 PIV5 구조는 PDB ID: 4GIP(Welch et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 109, 16672 (2012))로부터 생성되었다.

도 7은 타입 1 선융합 바이러스 당단백질을 나타내는 도표의 시리즈를 나타낸 것이다. RSV F, RSV 5F(PDB ID: 4GIP (Welch *et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 109, 16672 (2012)), 인플루엔자 HA(PDB ID: 2HMG; Wilson *et al., Nature,* 289, 366 (1981)) 및 에볼라 GP(PDB ID: 3CSY; Lee *et al., Nature,* 454, 177 (2008))의 선융합 구조를 분자 표면으로써 나타내었으며, 각 프로모터를 다른 색깔로 나타내었다. 하단에는, F2(RSV 및 PIV5) 또는 HA1(Flu)의 C-말단 잔기에 대해 구형으로 표시되고, 융합 펩티드의 N-말단 잔기에 대해 구형으로 표시되었다. RSV 및 PIV5는 모두 파라믹소바이러스(paramyxoviruse)이며, 이들의 F 단백질은 ~12%의 서열 상동성을 공유한다. 에볼라 GP는 타입 Ⅰ 융합 단백질이지만, 이는 GP2에서 자유 N-말단 융합 단백질이 결여되어 있고, 대신에 타입 Ⅱ 및 타입 Ⅲ 융합 단백질에서 일반적으로 보여지는 내부 융합 고리(loop)를 포함한다. 따라서, 에볼라 GP는 융합 단백질 비교로부터 생략하였다.

도 8은 LgG 및 Fab에 의한 RSV 중화에 관한 그래프 세트이다. D25, AM22 및 모타비주맵(Motavizumab)은 lgG 또는 Fab와 같이 RSVfmf 중화한다. 모타비주맵 플롯(plot)을 위한 x-축(x-axis)은 다른 것들과 다르다는 것에 주의한다.

도 9는 RSV F 당단백에서 항원성 부위의 특성을 나타낸 일련의 도표 및 그래프이다. 항원성 부위 Φ에 직접적인 항체만이 특이적으로 선융합 형태에 결합하며 뛰어난 중화 효과를 가진다. (A) 부위 Φ에서, AM22 및 D25를 위한 중화 곡선과 함께, 선융합 RSV F 삼량체에 결합하는 단일 D25 Fab의 이미지가 도시된다. 사이트 Ⅰ에서, 화살표가 탈출한 돌연변이체 Pro389(Lopez *et al., J. Virol.*, 72, 6922 (1998))를 가리킨다. 중화 곡선은 항체 131-2a에 대해 표시되었다. 항체 2F(Magro *et al., J. Virol.*, 84, 7970 (2010))와 마찬가지로, 항체 131-2a는 바이러스의 오직 ~50%를 중화한다. 항원 사이트 Ⅱ 및 Ⅳ에서, F 구조의 선융합 및 후융합(McLellan *et al., J. Virol.*, 85, 7788 (2011))에 결합하는 모타비주맵(사이트 Ⅱ) 및 101F(사이트 Ⅳ)의 모델은 항체-펩티드 구조(McLellan e*t al., J. Virol.*, 84, 12236 (2010); McLellan *et al., Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17,

248 (2010))의 좌표를 사용하여 만들어진다.

도 10은 S155C 및 S290C 아미노산 치환 및 F1의 C-말단에 연결된 Foldon 도메인으로 만들어진 재조합 RSV F 단백질의 발현을 도식화한 폴리아크릴아미드 젤의 이미지를 나타낸 것이며, S155C 및 S290C 간의 이황화 결합이 RSV F 단백질의 선융합 형태를 형성할 수 있다는 것을 도식화한 도표의 세트이다.

도 11은 S155C 및 S290C 아미노산 치환 및 F1의 C-말단에 연결된 Foldon 도메인으로 만들어진 재조합 RSV F 단백질을 이용하여 ELISA 및 젤 여과 분석의 결과를 보여주는 그래프 세트를 나타낸것이다. ELISA 데이터는 S155C/S290C 구조가 RSV F 선융합 특이적 항체에 의해 특이적으로 결합하는 것을 나타낸다. 젤 여과 프로파일은 S155C/S290C 구조가 오직 삼량체로써만 존재하며, 반면에 응집체 및 로제트(aggregates 및 rosettes)는 S155C/S290C 치환이 결여된 컨트롤 RSV F 구조체의 용액에서 형성된다.

도 12는 S155C 및 S290C 아미노산 치환 및 F1의 C-말단에 연결된 Foldon 도메인으로 만들어진 재조합 RSV F 단백질의 음성 착색 전자 현미경 이미지를 나타내었다. 상기 이미지 하단의 큰 패널은 개별 입자의 2D 평균이다. 상기 결과는 S155C/S290C 구조가 선융합 형태에서 안정하다는 것을 나타낸다.

도 13-14는 마우스에 기본(native) RSV, 포르말린으로 불황성화된 RSV(FI-RSV), S155C 및 S290C 아미노산 치환 및 F1의 C-말단에 연결된 Foldon 도메인으로 만들어진 재조합 RSV F 단백질(선융합 F), 또는 후융합 형태에서 안정화된 RSV F 단백질 구조(후융합 RSV)를 투여한 중화 항체 반응을 나타낸 그래프의 세트를 나타낸다. 상기 5주 및 7주에서의 후기-초기 면역 항체 반응을 나타내었다.

도 15는 S155C 및 S290C 치환에 의한 선융합 형태에서 안정화된 수용성 재조합 RSV F 단백질의 결정을 디지털 이미지로 나타낸 것이다. 왼쪽, 표준 밝은 이미지; 오른쪽, 자외선 이미지, 불황성 단백질. 수용성 완충 용액으로부터 결정 형성은 이러한 단백질인 용액에서 주로 균일하다는 것을 증명한다.

도 16은 조작된 이황화 결합 돌연변이 S155C 및 S290C("DS"), 공동-충진 돌연변이 S190F 및 V207L("Cav1"), 및 첨부된 C-말단 이종 삼량 도메인(Fd)에 의해 안정화된 항원(RSV_A F(+)FdTHS)을 기초로 한 RSV F 단백질의 디자인을 나타낸 것이다. D25-결합 RSV F 구조는 핑크 및 황갈색으로 분자 표면을 표시한 두 프로모터 및 리본으로 표시한 세 번째 프로모터와 함께 나타내었다. 선융합 및 후융합 형태 사이의 5Å보다 더 이동한 F1의 N- 및 C-말단 잔기를 나타내었다. 삽인된 도는 공간을 충전한 공동 돌연변이 S190F 및 V207L("Cav1"이라 지칭) 뿐만 아니라 잔기 S155C 및S290C("DS"라 지칭) 사이의 조작된 이황화 결합을 나타낸다. T4 파지 피브리틴 삼량화 도메인(T4 phage fibritin trimerization domain)의 모델은 후융합 삼량체의 기초에서 나타내었다. 상기 RSV F 단백질은 인간 RSV 아형 A에서의 S155C 및 S290C, S190F 및 V207L 치환, 및 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1이라 지칭된, 첨부된 C-말단 이종 Foldon 도메인을 포함한다. 균일한 삼량체로써 충분히 안정적인 정제가 불가능하지만, D25 인식과 호환이 되는 돌연변이를 블랙 스틱 리프레젠테이션에 표식 및 나타내었다.

도 17은 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 항원 특성을 나타내었다. 고정된 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1와의 상호작용하는 수용성 D25, AM22, 5C4, 101F, 모타비주맵, 및 팔리비주맵 Fab(Palivizumab Fab)의 연합 및 해리(association 및 dissociation)는 OctetRED 384™ instrument (ForteBio, Melno Park, CA)을 이용하여 측정하였다. 각 항체에 대한 평형 해리 상수(Equilibrium dissociation constants)를 나타내었다.

도 18은 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 크기 배체 크로마토그래피를 나타내었다. 태그를 제거하기 위한 트롬빈 절단 후, 정제된 단백질은 16/70 Superose 6 크기배제 컬럼(size exclusion column)을 통해 통과시켰다. 용출 부피는 당화 삼량체로 일치하였다.

도 19는 DS, CAv1 또는 DSCav1 개조에 의해 안정화된 RSV_A F(+)FdTHS 변이체의 항원 및 물리적 특성을 나열하는 표를 나타낸다. 가장 왼쪽 열은 RSV F 변형을 나타내고, 나머지 열은 일시적으로 발현되는 플라스미드, 다양한 항원 사이트에 대한 항원성, 그리고 다양한 온도, pH, 및 삼투압에서 배양 1시간 후, 또는 10회 사이클에서의 동결-융해 후 D25-결합(분획물 양으로 제공된) 유지로부터 얻는 수율을 포함하여, 다양한 특성을 제공한다. 상기 DSCav1 변이체는 DS 또는 Cav1 변종 중 하나보다, 온도, pH, 삼투압 및 동결-융해의 극단에 노출된 후의 D25-반응성의 높은 유지에 의해 정의된 것과 같이, 향상된 물리적 안정성과 함께 항원성 부위Φ 인식을 유지한다.

도 20은 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 3.1Å 결정 구조의 리본 묘사를 나타낸 것이다. 두꺼운 리본은 B-팩터 증가에 해당한다. 안정화 변이체임에도 불구하고, 삼량체 정점에서 항원성 부위 Φ는 상단한 유연성을 유지한다.

도 21은 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1와 RSV-F에 결합한 D25와 비교를 나타낸 것이다. RSV F에 결합한 D25의 리본

묘사로 중첩된, RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 리본 묘사는, 흰색으로 표시하였다(PDB ID 4JHW). 상기 이미지는 수직 축에 대해 90° 회전과 관련된다.

도 22는 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 구조에 있어서 안정화 변이를 나타낸다. 1σ로 윤곽된 $2F_0$-F_c 전자 밀도와 함께 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 결정 구조의 공-막대 묘사는 메쉬로 표현된다. 이러한 이미지는 공동-충전 Phe 190 잔기(오른쪽) 뿐만 아니라 시스테인 잔기 155 및 290(왼쪽) 사이의 이황화 결합에 해당하는 전자 밀도를 관찰하였다.

도 23은 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 마우스 면역원성을 나타낸다. 그룹 당 10 마리의 CB6 마우스는 폴리 I:C 보조제 50 ㎍와 함께 혼합된 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 단백질 10 ㎍으로 접종하였다. 접종은 0 및 3주에 발생하였고, 5주 및 7주의 혈청은 RSV 아형 A(RSV_A) 및 B(RSV_B)의 중화를 위해 테스트되었다. 평균 값은 수평라인으로 표시되었다.

도 24는 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 비-인간 영장류(non-human primate; NHP) 면역원성을 나타낸다. 그룹 당 4 마리의 RSV-naive 붉은털 원숭이는 폴리 I:C 보조제 500 ㎍과 함께 혼합된 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 단백질 50 ㎍으로 접종하였다. 접종은 0 및 4주에 발생하였고, 6주의 혈청은 RSV 아형 A(왼) 및 B(오른)의 중화를 위해 테스트되었다. 평균 값은 수평 라인으로 표시되었다.

도 24A-25C는 발현 벡터의 플라스미드 지도를 나타낸다. (A) C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위, 6x His 태그 및 Strep 태그 Ⅱ에 융합된, S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 A로부터 재조합 RSV F 단백질 발현을 위한 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 paH 발현 벡터(서열번호 384)의 지도. (B) C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위, 6x His 태그 및 Strep 태그 Ⅱ에 융합된, S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 B(strainB)로부터 재조합 RSV F 단백질 발현을 위한 RSV_B (B1) F(+)FdTHS DSCav1 paH 발현 벡터(서열번호 386)의 지도. (C) C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위, 6x His 태그 및 Strep 태그 Ⅱ에 융합된, S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 B(strain 18537)로부터 재조합 RSV F 단백질 발현을 위한 RSV_B (18537) F(+)FdTHS DSCav1 paH 발현 벡터(서열번호 388)의 지도.

도 26A-26D는 RSV에 대한백신 디자인을 기초로 한 구조를 나타낸 것이다: ㅅ수퍼사이트 패러다임(persite paradigm). (A) RSV에 의한 자연적인 감염은 바이러스 중화 역가의 범위에서 다양한 항체를 유도한다. (B) 자연스럽게 유도된 에피토프, 높은 잠재 항체의 집단은 바이러스 취약점의 수퍼사이트(supersite)를 정의한다. 보여지는 것은 RSV F 삼량체의 정점의 에피토프에서 인식하는 잠재적 중화 항체 D25의 항원-결합 단편이다. 삼량체 정점에서 공간적으로 중복되는 에피토프는 AM22 및 5C4 항체에 의해 인식되며, 이는 D25와 같은 중화 특성을 공유한다. 이러한 중복된 에피토프는 RSV 취약점의 supersite로써 항원 사이트 Φ로 정의된다. (C) 타겟 수퍼사이트의 선택 후, 디자인의 반복 과정, 항원 및 물리적 특성, 원자 수준 구조 결정, 및 타겟 수퍼사이트를 암호화하는 백신 항원의 최적화를 기초로 한 구조를 허용하는 면역원성 평가. (D) 높은 보호력의 항체를 자연스럽게 끌어내는 바이러스 취약점의 수퍼사이트 때문에, "수퍼사이트 면역원"으로의 면역은 서브도미넌트 또는 비-잠재적 중화 항체에 의해 인식되는 바이러스성 부위에 기초한 면역원보다 쉽게 보호 반응을 이끌어 낼 수 있다.

도 27은 RSV F가 안정화된 수용성 삼량체 사이트Φ의 디자인을 나타낸다. T4 피브리틴-삼량 도메인(foldon)을 포함하는 RSV F의 100개 이상의 변이체는 항원 사이트 Φ 유지를 안정하게 디자인한다. 보여지는 것은 모델 foldon으로 결합 형성된 이들의 D25에서 RSV F 삼량체의 구조이다. 상기 삼량체는 밝은 회색 황갈색, 핑크로 음영된 분자 표면으로 나타낸 두 프로모터, 및 리본으로 표시된 세번째 프로모터로 나타낸다. 상기 리본은 선융합 및 후융합 사이에 상대적으로 고정된 부위를 화이트로 음영하고, 반면에 선융합 및 후융합 형성 사이에 5 Å이상 이동한 N- 및 C- 말단은 어두운 회색으로 음영되었다. 발현 및 초기 D25 인식이 호환되지만, 균일한 삼량체로써 정제를 하는데 충분히 안정하지 못한 돌연변이는 표시되고 검은 스틱 묘사로 나타내었다. 도식은 항원 사이트 Φ(도 31)를 안정적으로 유지하는 모든 DS, Cav1 및 TriC 변이체의 스틱 묘사에서 안정화 변이의 클로즈업을 나타낸다.

도 28A-28C는 항원 사이트 Φ를 유지하도록 설계된, RSV F 삼량체의 구조를 나타낸다. (A-C) 안정화 변이(DS, Cav1, DS-Cav1, 및 DS-Cav1-TriC) 따라, 그리고 격자(입방 및 정방) 및 결정화 pH에 의해 표시된, RSV F 변이체의 여섯 구조를 나타낸다. (A) RSV F 삼량체는 원자 이동 요인에 따라 색깔표시된, Cα-웜 묘사에서 표시된다. 누락된 영역은 점선으로 표시된다. 이는 C-말단 막-인접 지역에서 일어나며, 반면에 DS-Cav1-TriC 구조(맨 오른쪽)에서 제외하고, foldon 모티브는 보여지지 않는다. DS 구조에 있어서, 헤드 영역에 두 개의 루프는

또한 무질서하다. (B) RSV F 프로모터의 항원 사이트 Φ는 회색의 RSV F에 결합한 D25 및 표시되는 다른 변종의 구조와 함께 리본 도표에 표시된다. 안정화 돌연변이는 라벨되고 스틱 묘사로 나타낸다. (C) 원자 수준의 세부 사항은 어두운 회색의 선융합 및 후융합 형성을 변화하는 RSV F 지역, 및 밝은 회색으로 일정하게 유지하는 지역으로, 스틱 묘사에서 나타난다. 돌연변이를 안정화하기 위한 안정화 탄소 원자가 표시된다. Cav1(pH5.5) 및 DS-Cav1(pH5.5)에서 신규한 특성은 황산 이온 및 융합 펩티드와 함께 F2 펩티드의 C-말단의 상호작용을 포함하여 관찰되었다. DS-Cav1-TriC 구조에 있어서, D486H-E487Q-F488W-D489H 돌연변이는 삼량 축을 중심으로 두 이웃하는 프로모터와 상호작용한다.

도 29A-29B는 조작된 RSV F 삼량체의 면역원성에 관한 결과를 나타낸다. 항원 사이트 Φ를 안정하게 나타내게 개조된 RSV F 단백질은 후융합 F에 의해 유도된 것 보다 상당히 더 높은 중화 역가를 유도한다. (A) 10 ㎍의 RSV F로 접종된 마우스의 혈청의 중화 역가(왼쪽). 항체 AM22 또는 D25에 의해 결합된 RSV F뿐만 아니라 후융합 F는 마우스 당 20 ㎍으로 접종된다(오른쪽). 기하 평균은 수평선으로 나타내었다. (B) 50 ㎍의 RSV F로 접종된 붉은 철 원숭이의 혈청의 중화 역가. 기하 평균은 수평선으로 나타내었다. 보로 임계값은 점섬으로 표시하고, p-값은 DS-Cav1에 대한 후융합을 위해 제공되었다.

도 30A-30D는 면역원성과의 상관관계에 있어서 안정화된 RSV F의 항원 사이트 Φ의 어떤 물리적, 구조 및 항원 특성이 있는지 나타내었다. (A) 면역원성에 대한 사이트 Φ의 물리적 안정성. 도표는 도 31에서 D25 유지 활성의 7 특정에 의해 결정된 것과 같이 정보 전달 물리적 안정성은 평균 측정되고(가로축) 도 29로부터 보호 활성의 RSV를 유도하기 위해 비교되었다(세로축). (B) 면역원성에 대한 사이트 Φ의 구조적 모방. 도표는 정보 전송을 나타낸다. 구조적 모방(가로축)은 D25의 10Å 내에서 모든 원자에 대한 상이한 구조(도 28) 및 RSV-F에 결합된 D25 사이의 rmsd이다. 이는 도 29(세로축)에서 유도된 RSV 보로 활성과 비교된다. (c) 접종된 원숭이의 혈청의 항원 분석. 고정된 DS-Cav1(왼쪽) 또는 후융합 F(오른쪽)에의 혈청의 결합은 직저적으로 측정되고(블랭크, 블랙바) 또는 초과된 후융합 F(어두운 회색 바) 또는 DS-Cav1(밝은 회색 바)와 함께 배양 후 측정된다. 네 마리의 원숭이 혈청의 평균 반응은 표준편차에 대한 오차 막대와 함께 그래프화 된다. (D) NHP 혈청의 면역원성 및 항원성의 상관관계. 각 그룹의 네 원숭이 혈청의 평균 중화 활성은 DS-Cav1 및 후융합 F에의 결합 반응의 비율에 대해 구획되었다.

도 31A-31B는 RSV F 단백질 면역원의 항원 및 물리적 특성의 결과를 나타낸 표이다. #삼량 상태에 대해 측정되지만, 삼량 상태로 정제될 수 없는 경우, 지배적인 올리고머 종의 올리고머 상태. 총 수율이 <0.1 mg/l 이면, 올리고머 상태는 측정되지 않는다(N.D.). *수율은 특정 올리고머 상태에 대해 표시된다. >1000 nM = 1 μM Fab 농도에서 결합하지 않음. N/A = 해당 사항 없음.

도 32는 선융합 및 후융합 RSV F 구조에 있어서 S155 및 S290의 위치를 나타낸다. 세린 잔기 155 및 290의 β-카본은 RSV F 구조에 결합한 D25에서 4.4Å 떨어져 있고 후융합 구조에서 124.2Å 떨어져 있다. 돌연변이 S155C 및 S290C("DS"라 불림)은 선융합 형태에서 구조를 억제한다.

도 33A-33C 안정화된 F 단백질의 음성 염색을 나타낸다. A) 및 B)는 DS 및 DS-Cav1에 대한 음성 염석된 표본의 대표 필드를 나타낸다. 상기 단백질은 DS 및 DSCav1 각각에서 관찰된, 후-F 형성의 <1% 및 <0.1%로 높게 균질화 된다. 후-F 형성의 예는 검은 화살표로 표시된다. Bar = 50 nm. 2D 입자 평균은 두 배의 배율에서 상단 오른쪽 코너에서 도표로 나타낸다. Bar = 5 nm. C)는 F+D25 복합체의 평균과 함께 2D 평균의 비교를 나타낸다(McLellan et al. 2013). Bar = 5 nm. 도 34는 조 배양 상청액의 ESLISA를 기초로 한 항체 D25는 정제된 올리고머 RSV F 당단백 변이체의 수율과 관련됨을 나타낸다(Spearman R = 0.7752 및 P 값 = 0.0041). 293 Expi 세포에 의한 RSV F 당단백 생산은 수합 후 4℃에서 1주일 동안 조 배양 상층액의 D25 ELISA에 의해 측정되며, 순수 올리고머 RSV F 당단백 변이체의 수율과 연관됨을 확인하였다(표 1).

도 35는 정제된 RSV F 당단백 변이체의 수율과 대비하여 조 배양 상층액의 ELISAdp 기초한 항체 모타비주맵을 나타낸다. (A) 293 Expi 세포에 의한 RSV F 당단백 생산은 4℃에서 즉각적으로 수확하고 수확 1주일 후(B)의 조 배양 상층액의 모타비주맵 ELISA에 의해 측정된다. ELISA 데이터는 스트렙탁틴(streptactin) 친화력(affinity) 후 RSV F 당단백 변이체의 수율에 대하여 분획하였다. 흥미롭게도, 세 단백질, RSV F(+) Fd 및 두 변이체 F137W-F140W 및 T357C-N371C는 모타비주맥 ELISA에 의해 높은 발현자로써 특정되었으나 큰 스케일의 정제 후에는 수율이 낮다(종 축을 따라 표시된 점).

도 36은 크기 배제 크로마토그래피를 이용한 개조된 RSV F 당단백의 특성을 나타낸다. RSV F 변이체, a: Cav1; b: Cav1-TriC; c: DS-Cav1-TriC; d: F488W; e: DS-Cav1; f: TriC, g: DS-TriC; h: DS; 구형 삼량체 단백질(globular trimeric protein)의 용출 프로파일을 나타내는 반면에, RSV F variants i: S190F-V296F; j: K87F-

V90L; k: V207L-V220L; l: V178N; m: S403C-T420C; n: I506K; o: V185E; p: F137W-F140W- F488W; q: D486H-E487Q-D489H 높은 올리고머 종의 용출 프로파일을 나타낸다. 알려진 분자량의 단백질 스탠다드는 크로마토그램에 기초하여 표시되었다.

도 37은 상기로부터 보여진 항원 사이트Φ를 나타낸다. 상기 보이지 않는 DS의 영역은 점선으로 표시되었다.

도 38A-38B는 비-인간 영장류 접종에 대해 면역원 보조 복합체의 항원 특성에 대한 결과를 나타낸다. (A) RSV F 후융합, DS 및 DS-Cav1 샘플 반응성은 0일 및 4주(B)에서 폴리 I:C 및 NHP 접종과 함께 면역원 제제를 3시간보다 적게 1 μM D25 항원 결합 단편에 대하여 특정하였다.

도 39A-39B는 접종된 마우스 및 붉은털 원숭이의 혈청의 항원 분석을 나타낸다. A) 다양하게 안정화된 RSV F 변이체로 접종된 마우스의 혈청은 고정된 DS-Cav1에 결합하기 위해 측정되었고 직접적으로 또는 사이트 Φ 또는 사이트 II 반응을 측정하기 위한 초과된 D25 또는 모타비주맵 항원 결합 절편과 함께 배양 후의 DS-Cav1를 측정하였다. B) 붉은 털 원숭이의 혈청은 고정된 DS-Cav1 또는 후융합 RSV F 변이체에 결합하기 위해 측정되었으며 또느 D25 또는 모타비주맵 항원 결합 단편을 차단하였다. 상기 동물 혈청의 평균 반응을 표준편차에 대한 오차막대와 함께 나타내었다.

도 40은 결정학상의 데이터 수집 및 정제 통계를 나타낸다.

도 41은 DS 치환체와 함께 RSV 아형 B 구조체를 이용한 효과를 나타내며, TLR4 효능제(agonist)를 포함하는 보조제가 안정화 F 단백질과 함께 작동할 수 있음을 보여준다. CB6F1/J 마우스를 50 ㎕의 Ribi (Ribi adjuvant system, Sigma)로 제제화 된 안정화된 선융합 F의 DS S155C/S290C 버전 10 ㎍로 접종하였다. 마우스는 아형 A 구조체(서열번호 185), 아형 B 구조체(서열번호 1479) 둘 중 하나, 또는 둘다(각각 10 ㎍)을 0주 및 3주에 접종되었다. 타임 포인트 5주차에서(2차 주입 후 2주), 혈청은 중화 분석을 위해 얻었다. 본 실험에서 얻은 두 주요 결과는, 1) preFA-DS 및 preFB-DS는 RSV 아형 A에 대항하여 같은 레벨의 중화 활성을 유도하는 반면에, preFB-DS는 RSV 아형 B에 대항한 preFB-DS보다 높은 레벨의 중화 활성을 유도한다. 이러한 제안은 RSV 아형 B 구조체를 이용하여 아형 A 구조체보다 더 나은 크로스-중화 반응을 가질 수 있거나 각각의 아형에서의 요소를 포함하는 RSV F의 하이브리드 버젼이 선호될 수 있다. 2) Ribi 보강제는 TLR4 효능제 및 상업적 보조제의 대표적인 어떤 것인 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 오일 인 워터(oil-in-water) 에멀젼이다. 이러한 데이타는 폴리I:C (TLR3 효능제), 백신 항원으로써 안정화된 선융합 F 단백질과 함께 작용하는 TLR4 효능제를 포함하는 보조제 추가를 보여준다.

도 42는 안정화된 선융합 F가 폴리I:C 뿐만 아니라 백번(alum)으로 제형화될 수 있고 항원 사이트 Φ에 반응하는 항체에 의해 부여된 면역원성을 보유한다는 것을 보여준다. BALB/c 마우스는 아형 A로부터 유도되고 백반(aluminum hydroxide gel 10 mg/ml, Brenntag, Frederikssund, Denmark) 또는 폴리I:C로 제형화된 안정화된 선융합 F의 DS S155C/S290C 버젼의 20 ㎍으로 접종하였다. 마우스는 0 및 3주에 접종되었고, 5주의 타임 포인트(2차 주사 후 2주)에서, 중화 분석을 위해 혈청을 획득하였다.

도 43은 여러 다른 RSV scF 디자인과 관련된 변수를 포함하는, 선융합-안정화된 단쇄 RSV F(scF) 항원을 위한 예시적인 설계 방식을 도시하는 개략도이다. RSV scF no.9(BZGJ9 DS-Cav1; 서열번호 669)에 해당하는 디자인 요소는 어두운 회색으로 표시되었다.

도 44A 및 44B은 단쇄 RSV F 구조체 no.9(scF no. 9; BZGJ9 DSCav1; 서열번호 669)의 디자인을 도시화하였다. 번호는 후술하는 각종 성분의 잔기 위치를 나타낸다. (A) 도 44B(위)에 나타낸 바와 같이 퓨린이 절단된 RSV F(+) 당단백, foldon 삼량체 도메인(회색 타원형)을 보여주는 RSV scF no.9(아래), 및 F2(왼쪽) 및 F1(오른쪽)의 폴리펩티드 백본 브리징 인공 링커(회색 사각형)의 개략도. (B) 모델로써 선융합 안정화된 RSV F(+) 구조를 이용한 RSV scF no. 9 디자인을 위한 구조 기준(PBD ID: 4MMV, 본 명세서에 참조로 인용). RSV F(+)는 카툰 묘사로 나타내었으며 foldon 삼량체 도메인은 구형의 묘사로 나타내었다. 왼쪽에 보여지는 것은 블랙, 그레이, 및 화이트의 컬러로 표시된 세 프로모터와 함께, 선융합 안정화된 RSV F(+) 삼량이다. 오른쪽에 보여지는 것은 F1(중간 회색), F2(어두운 회색), 퓨전 펩티드(표시), 및 foldon 삼량 도메인(밝은 그레이, 표시)를 나타내는 단일 ESV F(+) 프로모터이다. 상기 도표는 스틱 묘사에서 퓨전 펩티드를 나타내며, 잔기 104 및 147에 결합한 유연한 링커 서열(점선)의 위치를 나타낸다.

도 45는 HEK293-F 세포에서 발현된 개조된 단쇄 RSV F 구조체의 디자인, 올리고머 상태 및 생산 수율에 대한 표를 나타내었다. RSV F 구조체 no. 9 DSCav1 (scF no. 9; BZGJ9 DSCav1; 서열번호 669), RSV F 구조체 no. 10 DSCav1 (scF no. 10; BZGJ10 DSCav1; 서열번호 670) RSV F 구조체 no. 11 DSCav1 (scF no. 11; BZGJ11

DSCav1; 서열번호 671)를 표시하였다. GSGNIGLGG (서열번호 364), GSGGNGIGLGG (서열번호 359), GSGNVLGG (서열번호 361), 및 GSGNVGLGG (서열번호 362)를 포함하는 링커 서열이 제공된다. (%) 선융합 안정화 돌연변이는 다음을 포함한다: S155C 및 S290C (DS); S190F 및 V207L (Cav1); 추가 돌연변이 없음(a). 모든 변형체는 점 돌연변이 L373R을 포함한다. (==) 삼량체 도메인은 다음을 포함한다: L512C 및 L513C (CC); D486C, E487P, 및 F489C (CPC). (#) 변이체는 종종 크기 크로마토그래피상에서 올리고머 상태의 혼합물에 존재하는 것이 발견된다. 측정가능한 삼량체 분획이 관찰된 경우, 올리고머 상태는 "삼량(Trimer)"로 표시된다. 삼량체 분획이 관찰되지 않은 경우, 우세한 종의 올리고머 상태가 제공된다. 크기 크로마토그래피에 앞서 총 생산량이 <0.1 mg/L라면, 올리고머 상태는 측정되지 않는다(N.D.). 올리고머 상태가 크기 배재 크로마토그래피에 의해 구별할 수 없으며, 올리고머 상태는 "합계(Aggregate)"로 표시된다. (*) 보여지는 수율은 포스트-StrepTag 정제를 계산하고 특정한 올리고머 상태에 대해 나열된다. (Φ) HEK 293F 수율은 scF 구조체에서 보여지는 Expi293F 발현 수율 및 Freestyle293F 발현 수율 사이의 관측된 비에 의거하여 추정된다(~2:1).

도 46A 및 46B는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 가공된 단쇄 RSV F 당단백의 특성을 나타내는 일련의 그래프이다. (A) RSV scF 변이체(scF no. 3, 4, 6, 8 부터 11) 및 안정화 변이 DS-Cav1를 포함하는 RSV F(+)의 크기 배재 프로파일. 단쇄 구조체는 HEK293F 세포에서 발현되며 F(+)DS-Cav1는 Expi 293-F 세포에서 발현된다. F(+) DS-Cav1 및 scF no. 3 DS-Cav1, no. 4 DS-Cav1, no. 6 DS-Cav1, 및 no. 9 DS-Cav1은 구형 삼량체 단백질의 용출 프로파일 특성을 나타내는 반면, scF no. 11 DSCav1는 구형 단량체 단백질의 용출 프로파일 특성을 나타낸다. RSV scF no. 8 DS-Cav1 및 scF no. 10 DS-Cav1는 두 단량체 및 삼량체 종의 이종 혼합물을 제안하는 용출 프로파일을 나타낸다. (B) 상이한 안정화 변이를 포함하는 RSV F(+) DS-Cav1 및 RSV scF no. 9 크기 배재 프로파일. F(+) DS-Cav1, 및 scF no. 9 Cav1은 Expi 293-F 세포에서 발현되고 나머지 scF no. 9 변이체는 HEK293F 세포에서 발현된다. scF no. 9 변이체의 용출 프로파일에서의 약간의 편차는 scF no. 9가 삼량체 F(+)보다 분자량이 더 높다는 것을 제안한다. 별표는 정제 태그가 젤 여과 이전에 절단된 것을 나타낸다.

도 47은 RSV scF no. 9 DS-Cav1의 항원 특성의 결과를 요약한 표이다.

도 48은 RSV scF no. 9 DS-Cav1의 삼차원 구조를 위한 결정학의 데이터 및 정제 통계를 나타내는 표이다.

도 49A 및 49B는 RSV scF no. 9 DS-Cav1 삼량체의 결정 구조에 대한 일련의 도표를 나타낸다. 카툰 묘사(어두운 회색)에 표시된 프로모터의 방향은 일정하게 유지된다. 굵은 점선은 결정 구조에서는 보이지 않는 막-근위 영역에 위치하는 C-말단 foldon 모티프를 나타낸다. (A) 카툰 묘사 및 리본 묘사에서 프로모터와 함께 표시되고(어두운 회색), 분자 표면 묘사(밝은 회색)으로 표시된 RSV scF no. 9 DS-Cav1 삼량체. 도표는 막대 묘사에서 모두, "GS" scF no. 9 링커 루프(표시) 및 보조제 프로모터(어두운 회색)의 확대를 보여준다. (B) RSV scF no. 9 DS-Cav1 구조에서 선융합 안정화 변이. DS 및 Cav1 선융합 안정화 변이는 막대 묘사에 표시 및 나타내었다.

도 50은 카툰 묘사에서 모두 나타낸, F(+) DS-Cav1 구조(밝은 회색; rmsd = 0.839Å) 및 F(+) 구조체에 결합한 D25(어두운 회색; rmsd = 0.534Å)와 함께 RSV scF no. 9 DS-Cav1(중간 회색)의 구조적 배열을 도시한 도표이다. 도표는 scF no. 9 링커 루프 및 F(+) DS-Cav1 구조체의 퓨전 펩티드의 클로즈업, 및 F(+) 구조체에 결합한 D25를 나타낸다.

도 51은 RSV scF no. 9 DS-Cav1의 결정 구조를 이용하여 RSV scF 디자인 no. 3, 4, 6, 8-11의 비교를 도식화한 도표를 나타낸다. 굵은 점선은 C-말단 foldon 모티브를 나타낸다. RSV scF no. 9 DS-Cav1 프로모터는 카툰 묘사에서 나타내었다(어두운 회색). 도표는 잔기 105(F2) 및 145(F1)와 결합한 막대 묘사에서 "GS" scF no. 9 링커 루프의 확대를 보여준다. scF 디자인 no. 3, 4, 6 및 8(얇은 점선)을 위한 링커 서열의 예측된 위치는 scF no. 9 DS-Cav1 삼량체 구조에서 매핑된다. 링커 및 포인트 잔기 위치는 근사값이다.

도 52는 StrepTag 정제 후 SDS-PAGE 젤 전기영동에 의해 특성화된 개조된 단쇄 RSV F 당단백의 특성에 관한 일련의 디지털 이미지를 나타낸다. RSV scF 구조체는 HEK293F 세포에서 발현되고 His6-tag 및 StrepTag 친화 크로마토그래프에 의해 정제된다.

도 53은 구조제를 가리키기 위한 5주 중화 데이터를 제공하는 일련의 그래프 및 표를 나타낸다(10 동물/그룹). 동물당 주 1 및 주 3에서 10 ㎍ 단백질 + 50 ㎍ 폴리I:C를 접종하였다.

도 54는 RSV scF no. 9 (서열번호 669)의 삼차원 구조에서 RSV F 위치 101 에서 프롤린(Proline) 잔기를 강조한 리본 및 막대 도표이다. 상기 구조는 단쇄 링커 영역은 프롤린 101을 제거하거나 또는 링커 잔기 및 인접 잔기를 짧게/변이함으로써향상될 수 있음을 나타낸다.

도 55는 BZG J9-1 내지 BZG J9-10 구조체로 생성되는 scF no. 9 구조체 (서열번호 669)의 변형을 도시하는 그래프 및 서열 정렬이다. 상기 서열 정렬은 서열번호 698-707의 RSV F 잔기 97-159 각각에 해당하는 BZG J9-1 내지 BZG J9-10 서열을 보여준다. 이러한 구조체는 Expi 세포에서 발현되고 젤 여과(왼쪽)에 의해 평가된다.

도 56은 페리틴(ferritin) 단위체 scF no.9에서 F1 폴리펩티드의 C-말단을 연결하여 ㅅ생성된 F no. 9 단백질을 포함하는 페리틴 나노입자를 나타내는 일련의 그래프 및 도이다. 상기 구초제는 "BZGJ9-DS-Cav1-LongLink-Ferritin"로 명명하였으며 서열번호 1429가 제공되었다.

도 57은 RSV F DS-Cav1과 비교하여 BZGJ9-DS-Cav1-LongLink-Ferritin의 물리적 안정성을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 58A-58C는 상이한 선융합 안정화 RSV F 단백질의 면역원성을 나타내는 일련의 그래프 및 표이다. RSV F DSCav1 (서열번호 371), BZGJ9-DS-Cav1-LongLink-Ferritin (서열번호 1429), 및 scF no. 9 (BZGJ9 DS-Cav1, 서열번호 669) 세 구조체가 테스트 되었다. 8.26-11.34 kg 무게의 인도 출신의 히말라야 원숭이는 0주 때 동물 당 50 ㎍ 단백질 + 500 ㎍ Ribi, 4주 째의 부스트에서 동물 당 50 ㎍ 단백질 + 500 ㎍ Ribi를 면역원과 함께 근육 내 주사하였다; 면역원성은 3.5주에 측정하였다.

도 59A 및 59B는 DSCav1 돌연변이(서열번호 372)와 함께 B18537 균주로부터 RSV F 단백질의 삼차원 구조를 나타내는 일련의 도표이다. (A) RSV F 프로모터의 카툰 묘사. (B) 표면 및 리본 묘사에서 보여진 추가적인 프로모터와 함께 퓨전 당단백의 삼량체 형태.

도 60A-60D는 DSCav1 치환과 함께 RSV B18537 F 당단백의 원자 레벨 상세를 도식화하는 일련의 이미지이며, 상기 DSCav1 치환이 RSV F 당단백 B 아형에서 안정화된 항원 사이트Φ로 도입될 수 있음을 보여준다. (A) DS-Cav1 변이를 강조표시하였다. (B) 삼량체 정점에 위치한 항원 사이트 Φ은 어두운 회색으로 막대 묘사에 나타내었다. (C) 형성을 위한 퓨전 펩티드 및 β가닥 15, 16 및 19 사이의 상호 작용 및 상호 프로토머릭(inter-protomeric)을 시트로 연장하였다. (D) F2 C-말단 및 퓨전 펩티드 사이의 상호작용.

도 61A 및 61B은 DSCav1 치환과 함께 RSV B18537 퓨전 당단백의 항원 특성을 도식화하는 일련의 그래프 및 디지털 이미지이다. (A) 원형의 사이트 특이적 항체의 바이오레이어 간섭계(Biolayer Interferometry) 측정은 각 Fab 분자의 시리즈 희석에 의해 수행되었고 고정화된 B18537 F DSCav1 단백질의 연결 및 해리 속도가 측정되었다. (B) 균주 B18537 및 A2로부터 항원 사이트Φ의 구조적 비교. 두 균주 간의 상이한 잔기가 노출된 표면은 표시되었다.

도 62A 및 62B는 DSCav1와 함께 RSV 균주 B18537 F 단백질의 정제를 도식화하는 그래프이다. A. 용출 분획(환원 및 비환원) 및 StrepTagⅡ 친화 정제 후 통과된 분획의 SDS-PAGE. B. Superdex-200 크기 배제 컬럼 상에서 120 ml의 GFB 버퍼로 RSV B18537 F 당단백의 젤 여과.

도 63-68은 RSV F의 막 근위 로브의 안정성을 유지하는 C-말단 삼량체 재조합 없이 선융합 형성에서 안정화된 삼량체 재조합 RSV F 단백질의 디자인 및 생산을 도시화한 것이다. C-말단 삼량체화 도메인 대신에, 이황화 결합 링은 치환된 α10 나선의 아미노산에 대한 시스테인 잔기에 의한 F1 폴리펩티드의 C-말단으로 도입된다.

도 69A-69E는 지정된 재조합 RSV F 변이를 위한 ELISA 데이타를 나타내는 일련의 표이다. RSV F 변이(서열번호 859-1018)의 발현 및 항원 안정성. 이러한 RSV F 변이를 암호화하는 DNA를 재조합 RSV F 단백질이 세포로부터 세포 배지로 분비되는 조건 하에서 96 웰 포맷의 세포로 형질 감염되었다. 분비 시스템을 입력하고 분비되는 단백질을 일으키는 리더 서열을 포함하는 각 구조체. 상기 배지는 원심분리하여 상등액은 사이트 Φ 특이적 항체 D25 및 사이트 Ⅱ 특이적 항체 모타비주맵("Mota", 도 69A-69E)에 결합하는 항원에 대한 테스트에 사용된다. 0일에서 D25 및 Mota 결합(조건 1 및 2), 70℃에서 배양 후 0일에서 D25 및 Mota 결합(조건 3 및 4), 및 4℃에서 1주일 후 D25 및 Mota 결합(조건 5 및 6)이 테스트 되었다. Foldon 도메인과 함께 DSCav1 구조체를 대조군으로 사용하였다. 각 구조체에 대한 특이적 항원성은 도 69A-69E에 제공되며, 테스트된 조건은 헤더 행에 설명되어 있다.

도 70A-70E는 RSV F 항원 사이트 Φ 면역원을 생성하기 위한 다양한 설계 전략을 나타내는 일련의 모식도이다. 항원 사이트 Φ는 선융합 RSV F 나선 α4 및 각 프로모터의 나선 α1에 대한 N-말단 루프의 외면에 있는 D25 인식 사이트를 포함한다. 면역원 표면에 있는 분리된 사이트 Φ 에피토프를 제시하기위한 다섯 방법이 사용되었다: A) 순환전치(즉, 설계 용이성 및 안정성의 이유로 사이트 Φ 세그먼트의 접속을 변경하는 이차 구조 링커를

변경), B) 작은 스캐폴드 단백질로 사이트 Φ의 통합, C) 선융합 RSV F 컨텍스트에서 관찰된 네이티브 사이트 Φ 삼량화에 맞는 원형 치환 또는 스캐폴드 사이트 Φ의 삼량화(왼쪽 패널과 같이), D) 사이트 Φ 폴드의 안정성을 추가하기 위한 도메인 Ⅲ 모두를 포함하고 E) 추가적인 면역원성을 위한 나노입자 플랫폼에서의 A-D의 통합.

도 71은 지정된 조건에서 ELISA에 의해 사이트 Φ 특이적 항체 D25, AN22 및 5C4에 대한 항원성을 디자인하고 제작하고 시험한 최사안의 사이트 Φ 면역원의 요약이다. 표는 각 설계 범주 내에서 사이트 Φ 면역원의 수를 나타내며, 적어도 1.5의 ELISA 결과를 생산하였다.

도 72A-72F은 D25, AN22 또는 5C4 항체에 결합하는 최소 사이트Φ 구조체를 가리키는 ELISA 데이타를 보여주는 일련의 표이다. 테스트 조건은 4℃에서 0 및 1주 후 D25 결합(조건 1 및 2), 60℃(조건 3), 70℃(조건 4), 80℃(조건 5), 90℃(조건 6) 또는 100℃(조건 7)에서 1시간 후 D25 결합, 4℃에서 2주 후 AM22 결합(조건 8), 1주에서 5C4 결합(조건 9)를 포함한다. 70℃에서 1시간 후 D25, AM22 및 D25 결합의 평균 또한 나타내었다(조건 10). ELISA 점수 ≥1.5는 어두운 회색으로 표시되었고; 0.5-1.5 점수는 밝은 회색으로 표시하였다.

도 73은 안정화된 선융합 F 아형 A 또는 B 또는 둘 다의 DS 버젼의 접종을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 74는 DSCav1 항체 반응이 두 용량에서 0 및 4주에서 접종한 후의 마우스에서 튼튼함을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 75는 마우스에서 DS 접종이 RSV 감염을 방지할 수 있음을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 76은 마우스 후 접종에서 DS 접종이 타입 2 사이토카인 반응을 유도하지 않는 것을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 77은 DSCav1에 대한 중화 면역 반응이 0 및 4주에서 DS-Cav1 또는 DS를 미리 접종시킨 비인간 영장류에서 3번의 복용 후 신장되고 지속되는 것을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 78은 DS-CAV1가 효과적으로 명반 제형화 및 면역원성을 유지하는 것을 나타내는 그래프이다.

도 79는 비 인간 영장류에서 명반은 DSCav1에 대한 효과적인 보조제임을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 80은 단백질 부스트 프라이밍으로써 또는 하나의 유전자 기반 벡터로부터 발현될 때 DS-CAV1sms 면역원성이 있음을 나타내는 그래프이다.

도 81은 DS-Cav1 RSV F 아형 A 또는 B가 비 인간 영장류에서 야생형 F 단백질의 유전자 기반의 전달을 이용한 프라임 접종(prime immunization)을 높일 수 있음을 나타내는 일련의 그래프 및 표이다.

도 82는 DS-Cav1 RSV F 아형 A 또는 B가 비 인간 영장류에서 준비한 rAd-F(A)WT을 향상시키는 것을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 83은 안정화된 선융합 F 아형 A 또는 B 또는 둘다의 DS 버젼의 접종이 RSV의 모든 아형에 대한 중화 활성을 유도하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 84는 변경된 글리코실화가 안정화된 선융합 F의 면역원성을 저감시키는 것을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] **서열 목록**

[0020] 37C.F.R.1.822에서와 같이, 서열목록에 기재된 핵산 및 아미노산 서열은 뉴클레오티드 염기를 위해 표준 문자 약어, 및 아미노산을 위한 세 문자코드를 사용하여 나타내었다. 각 핵산 서열의 한 가닥이 도시되어 있지만, 보여지는 가작에 대한 그 어떤 참조에 의해 포함됨으로써 상보 가닥이 이해된다. 서열 목록은 2014년 3월 12일에 생성된 "Sequence.txt" (~3.2 MB)라는 파일 이름의 형태로, ASCⅡ 텍스트 파일로써 제출되었으며, 본 명세서에 참고로 인용되었다. 첨부된 서열 목록:

[0021] 서열번호: 1-128은 RSV type A로부터의 네이티브 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다.

[0022] 서열번호: 129-177은 RSV type B로부터의 네이티브 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다.

[0023] 서열번호: 178-184은 bovine RSV로부터의 네이티브 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다.

[0024] 서열번호: 185-350은 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다.

[0025] 서열번호: 351은 T4 fibritin Foldon 도메인의 아미노산 서열이다.

[0026] 서열번호: 352 및 355-365은 펩티드 링커의 아미노산 서열이다.

[0027] 서열번호: 353은 Helicobacter pylori ferritin 단백질(GENBANK® Accession No. EJB64322.1, incorporated by reference herein as present in the database on February 28, 2013)의 아미노산 서열이다.

[0028] 서열번호: 354은 encapsulin 단백질(GENBANK® Accession No. YP_001738186.1, incorporated by reference herein as present in the database on February 28, 2013)의 아미노산 서열이다.

[0029] 서열번호: 366 및 367은 각각 AM22 mAb의 VH 및 VL 아미노산 서열이다.

[0030] 서열번호: 368 및 369은 각각 D25 mAb의 VH 및 VL 아미노산 서열이다.

[0031] 서열번호: 370은 P03420 서열과 비교하여 P102A, I379V, 및 M447V 치환을 포함하는 원형 A2 균주(GENBANK accession No. P03420, incorporated by reference herein as present in the database on February 28, 2012)의 재조합 RSV F0 단백질 변이 아미노산 서열이다.

[0033] *

[0034] *서열번호: 371은 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 A로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다. 변이된 네 잔기, 및 C-말단 부속기는 밑줄로 표시하였다.

[0035] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPA
TNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAV**C**KVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT**F**KVLDLKNYIDKQLL
PI**L**NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIM**C**IIKEEVLAYVVQLPLY
GVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVIT
SLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD
ELL<u>SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVPRGSHHHHHHSAWSHPQFEK</u> (RSV_A F(+)FdTHS DSCav1)

[0036] 서열번호: 372는 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 B로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다. 변이된 네 잔기, 및 C-말단 부속기는 밑줄로 표시하였다.

[0037] MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPA
ANNRARREAPQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGIAV**C**KVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLT**F**KVLDLKNYINNQLL
PI**L**NQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIM**C**IIKEEVLAYVVQLPIY
GVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVIT
SLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGKNLYVKGEPIINYYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSD
ELL<u>SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVPRGSHHHHHHSAWSHPQFEK</u> (RSV_B F(+)FdTHS DSCav1)

[0038] 서열번호: 373는 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 bovine RSV로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다. 변이된 네 잔기, 및 C-말단 부속기는 밑줄로 표시하였다.

[0039] MAATAMRMIISIIFISTYMTHITLCQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVVTIELSKIQKNVCKSTDSKVKLIKQELERYNNAVIELQSLMQNEPA
SFSRAKRGIPELIHYTRNSTKRFYGLMGKKRKRRFLGFLLGIGSAIASGVAV**C**KVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLT**F**KVLDLKNYIDKELL
PK**L**NNHDCRISNIETVIEFQQKNNRLLEIAREFSVNAGITTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIM**C**VVKEEVIAYVVQLPIY
GVIDTPCWKLHTSPLCTTDNKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPTDVNLCNTDIFNTKYDCKIMTSKTDISSSVIT
SIGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGKALYIKGEPIINYYDPLVFPSDEFDASIAQVNAKINQSLAFIRRSD
ELL<u>SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVPRGSHHHHHHSAWSHPQFEK</u> (bRSV F(+)FdTHS DSCav1)

[0040] 서열번호: 374는 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 A로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다. 변이된 세 잔기, 및 C-말단 부속기는 밑줄로 표시하였다.

[0041] 서열번호: 375는 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 B로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다(RSV_B F(+)FdTHS DSS190F).

[0042] 서열번호: 376는 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 bovine RSV로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다(bRSV F(+)FdTHS DSS190F).

[0043] 서열번호: 377은 C-말단 ferritin 도메인과 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 RSV A로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다(RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 Ferritin).

[0044] 서열번호: 378은 C-말단 ferritin 도메인과 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 RSV B로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다(RSV_B F(+)FdTHS DSCav1 ferritin).

[0045] 서열번호: 379은 C-말단 ferritin 도메인과 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 bRSV로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다(bRSV F(+)FdTHS DSCav1 ferritin).

[0046] 서열번호: 380은 C-말단 ferritin 도메인과 융합된 S155C, S290C, S190F 아미노산 치환을 포함하는 RSV A로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다(RSV_A F(+)FdTHS DSS190F Ferritin).

[0047] 서열번호: 381은 C-말단 ferritin 도메인과 융합된 S155C, S290C, S190F 아미노산 치환을 포함하는 RSV B로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다(RSV_B F(+)FdTHS DSS190F ferritin).

[0048] 서열번호: 382는 C-말단 ferritin 도메인과 융합된 S155C, S290C, S190F 아미노산 치환을 포함하는 bRSV로부터의 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다(bRSV F(+)FdTHS DSS190F ferritin).

[0049] 서열번호: 383은 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 A로부터의 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 예시적인 염기서열이다(DNA encoding RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 expressed from VRC3798).

[0050] 서열번호: 384은 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 A로부터의 재조합 RSV F 단백질을 발현하기 위한 발현 벡터의 염기서열이다(RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 paH vector; VRC3798).

[0051] 서열번호: 385은 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 B(strain B1)로부터의 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 예시적인 염기서열이다(DNA encoding RSV_B (B1) F(+)FdTHS DSCav1; expressed from VRC3764).

[0052] 서열번호: 386은 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 B(strain B1)로부터의 재조합 RSV F 단백질을 발현하기 위한 발현 벡터의 염기서열이다(RSV_B (B1) F(+)FdTHS DSCav1 paH vector; VRC3764).

[0053] 서열번호: 387은 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 B(Strain 18537)로부터의 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 예시적인 염기서열이다(DNA encoding RSV_B F(+)FdTHS DSCav1; expressed from VRC3799).

[0054] 서열번호: 388은 C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site), 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 B(Strain 18537)로부터의 재조합 RSV F 단백질을 발현하기 위한 발현 벡터의 염기서열이다(RSV_B F(+)FdTHS DSCav1 paH vector; VRC3799).

[0055] 서열번호: 389-693은 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질의 아미노산서열이다.

[0056] 서열번호: 694-697는 변형된 Foldon 도메인 폴리펩티드의 아미노산 서열이다.

[0057] 서열번호: 698-697은 변형된 Foldon 도메인 폴리펩티드의 아미노산 서열이다.

[0058] 서열번호: 698-828, 1429-1442 및 1474-1478은 단쇄 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다.

[0059] 서열번호: 829-1025 및 1456-1468은 절단된 foldon 도메인에 연결된, 또는 foldon 도메인에 연결되지 않은 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다.

[0060] 서열번호: 1026은 선융합-안정화 치환 없이 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다.

[0061] 서열번호: 901-968는 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질의 아미노산 서열이다.

[0062] 서열번호: 1027-1088 및 1099-1428는 실시예 14에서 서술한 최소 사이트 Φ 면역원의 아미노산 서열이다.

[0064] **구조상 좌표**

[0065] D25 Fab에 의해 결합된 RSV F 단백질의 결정 구조의 원자 좌표는 2013년 3월 13일 출원된 미국 가출원 번호 No. 61/780,910의 표 1에 열거되어 있으며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다. 이러한 D25 Fab에 의해 결합된 RSV F 단백질의 결정 구조의 원자 좌표는 또한 단백질 데이터 뱅그 Accession No. 4JHW로 기탁되었으며, 이는 2013년 5월 1일의 데이타베이스로써 본 명세서에 참조로 인용된다.

[0067] **상세 설명**

[0068] RSV F 당단백질은 바이러스 및 세포막의 융합을 촉진하는 타입 I 퓨전 단백질이다(Walsh 및 Hruska, J. Virol., 47, 171 (1983)). 초기 합성 후 RSV F는 숙주 세포의 세포막과의 접촉 후에 고도로 안정된 후융합(postfusion) 입체 구조에 구조적 재배열 동안 방출되는 폴딩 에너지를 저장 준 안정 선융합(prefusion) 입체 구조를 채용하고 있다. RSV F 단백질에서의 세 개의 항원 사이트(Ⅰ, Ⅱ 및 Ⅳ)가 중화 활성을 유도하는 것으로 나타났으며(Arbiza et al., J. Gen. Virol., 73, 2225 (1992); Lopez et al., J. Virol., 72, 6922 (1998); Lopez et al., J. Virol., 64, 927 (1990)), 모든 것은 구조적 및 물리학 연구에 의해 결정되는 RSV F 단백질의 후융합 형태에서 존재한다 (McLellan et al., J. Virol., 85, 7788 (2011); Swanson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 108, 9619 (2011)). 그러나, 후융합 RSV F와 함께 인간 혈청의 흡수는 RSV F의 선융합 형태가 새로운 중화 항원 사이트를 가지고 있다는 것을 시사하며, F-특이적으로 중화 활성의 대부분을 제거하지 못한다(Magro et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109, 3089 (2012)).

[0069] 본 명세서에 개시되기 전, 수용성 선융합 RSV F 단백질의 균질한 준비는 불가능하고, 선융합 F 구조의 결정 및 새로운 선융합 F-특이적 항원 사이트의 식별을 배재하였다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, RSV F 단백질 특이적 항체는 RSVfmf 중화하는 것으로 나타났으나, 후융합 RSV F에 특이적으로 결합하지 못하며, 이러한 항체에 의해 인식되는 선융합 F의 삼차 구조를 얻었다. 본 명세서에 개시된 결과는 RSV F의 선융합 형태 및 현저하게 강력한 RSV 선융합 F 중화 항체의 범주에 대한 중화 매커니즘을 최초로 공개한다. 참조로써 선융합 F 의 삼차원 구조를 이용하여, 안정화 형태의 선융합 F("PreF" 항원)이 생성되고 이전의 RSV F 단백질 기반의 면연원으로 얻은 것보다 배는 더 큰 RSV 중화 면역 반응을 생성하기 위해 사용되었다.

[0070] **Ⅰ. 용어**

[0071] 특별히 언급하지 않는 한, 기술적인 용어는 기존의 용도에 따라 사용된다. 분자생물학의 일반적인 용어의 정의는 Benjamin Lewin, Genes VII(Oxford University Press, 1999; Kendrew et al. (eds.)), The Encyclopedia of Molecular Biology(Blackwell Science Ltd., 1994; 및 Robert A. Meyers (ed.)), Molecular Biology 및 Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference(VCH Publishers, Inc., 1995) 등의 유사한 문헌에서 찾을 수 있다.

[0072] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an", 및 "the"은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한 복수 뿐 아니라 단수를 지칭한다. 예를 들어, 용어 "an 항원"은 단수 또는 복수의 항원을 포함하고 "적어도 하나의 항원" 구문에 동등한 것으로 간주될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "comprises"는 "includes"를 의미한다. 따라서 "항원을 포함하는"의 의미는 다른 요소를 제외라지 않고 "항원을 포함하여"를 의미한다. 이는 핵산 또는 폴리펩타이드에 대한 주어진 임의의 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기, 및 모든 분자량 또는 분자 질량 값은 추정, 및 달리 언급하지 않는 한, 설명적인 목적을 위해 제공되는 것으로 이해되어야한다. 많은 방법 및 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 물질이 사용될 수 있지만, 특히 적합한 방법 및 물질은 본원에 기재

되어있다. 상충하는 경우, 용어의 설명을 포함하는 본 명세서가 우선 할 것이다. 또한, 재료, 방법 및 예는 예시적인 것이며 제한하지 않도록 의도된다. 다양한 실시 예들의 검토를 용이하게 하기 위해, 용어의 다음 설명이 제공된다:

[0073] **5C4:** RSV F 단백질의 후융합 형태에는 결합하지 않으며, RSV F 단백질의 선융합 형태에 특이적으로 결합하는 중화 모노클로날 항체. 5C4 항체는 서열번호 1470 및 1471로 기재된 각각의 아미노산 서열과 함께 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 포함한다. McLellan et al., Science, 340(6136):1113-7, 2013에서 설명된 대로, 5C4는 후융합 형태가 아닌 선융합 형태에서 RSV F 단백질에서 발견된 사차 에피토프에 특이적으로 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 5C4는 본 명세서에 기재된 PreF 항원에 특이적으로 결합한다.

[0074] 5C4 중쇄(Heavy Chain) 가변 도메인(Variable Domain):

[0075] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTFFHWVKQRPEQGLEWIGRIDPADGHTKYDPKFQGKATITADTSSN

[0076] TAFLQLSSLTSVDTAVYYCATTITAVVPTPYNAMDYWGQGTSVTVSS(서열번호: 1470)

[0077] 5C4 Kappa 경쇄(Light Chain) 가변도메인(Variable Domain):

[0078] DIVLTQSPASLAVSLGQRTTISCRASESVDSFDNSFIHWYQQKPGQPPKLLIFLASSLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQSNEDPFTF GSGTKLEIK (서열번호: 1471)

[0079] **보조제(Adjuvant):** 비히클(vehicle)을 항원성을 향상시키기 위해 사용하였다. 항원 흡착 상태인 미네랄 현탁액(백반, 수산화 알루미늄 또는 인산); 또는 워터 인 오일(water-in-oil) 에멀젼, 예를들어 항원 용액이 미네랄 오일에서 유상으로 존재하고(Freund incomplete adjuvant), 때때로 항원성(항원의 분해 억제 및/또는 대식세포의 유입을 야기)을 향상시키기 위해 죽은 마이코박테리아를 포함한다(Freund's complete adjuvant). 면역 자극 올리고뉴클레오티드(CpG 모티프를 포함하는 것과 같은)는 또한 보조제로써 사용될 수 있다. 보조제는 보조 자극 분자와 같은, 생물학적 분자("생물학적 보조제")를 포함한다. 대표적인 보조제는 IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L, 4-1BBL 및 TLR-9 작용제와 같은 toll-like receptor (TLR) agonists 등을 들 수 있다. 본 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 사람은 보조제에 익숙하다(Singh (ed.) Vaccine Adjuvants 및 Delivery Systems. Wiley-Interscience, 2007). 보조제는 개시된 PreF 항원과 조합하여 사용할 수 있다.

[0080] **투여(Administration):** 선택한 경로를 통한 대상에게로의 조성물의 투여. 투여는 국부적 또는 전신적이 될 수 있다. 예를 들어, 선택된 경로가 정맥 내인 경우, 조성물(개시된 면역원을 포함하는 조성물과 같은)은 환자의 정맥에 조성물을 도입하여 투여된다.

[0081] **제제(Agent):** 끝 또는 결과를 달성하는데 유용한 모든 물질 또는 물질의 조합; 예를 들면, 대상체에서 RSV 감염을 억제하기 위한 유용한 물질 또는 물질의 조합. 제제는 예컨대, 단백질, 핵산 분자, 화합물, 작은 분자, 유기 화합물, 무기 화합물, 또는 재조합 바이러스와 같은 관심 있는 다른 분자를 포함한다. 제제는 치료제(예: 항-RSV 제제와 같은), 진단제 또는 약제를 포함할 수 있다. 일부 실시 예에서, 제제는 폴리펩티드 제제(RSV 면역 원성 폴리펩티드와 같은), 또는 항 바이러스제이다. 당업자는 특정 제제가 하나 이상의 결과를 달성하기 위해 유용할 수 있음을 이해할 것이다.

[0082] **AM22:** RSV F 단백질의 선융합 형태에 특이적으로 결합하지만, RSV F 단백질의 후융합 형태에는 결합하지 않는 중화 모노클로날 항체. AM22 단백질 및 핵산 서열은, 예를 들면, AM22 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열이 본원에 인용되어 있는 U.S. Pat. App. Pub. No. 2012/0070446에 공지되어 있다. 실시예 1에 기술 된 바와 같이, AM22는 후융합 형태에는 아닌, 선융합 형태의 RSV F 단백질에서 발견된 위치를 포함하여 에피토프(항원 사이트 Φ를 포함)에 특이적으로 결합한다. 이 에피토프는 RSV F 위치 62-69 및 196-209에 포함되고, 선융합 형태에서 RSV F 단백질의 막 말단 정점에 위치한다(도 2B 및 9A). 본 명세서 이전에는 AM22가 선융합 형태에 대해 특이적인 것이 알려지지 않았다. 몇몇 실시 예에서, AM22 항체는 특이적으로 본원에 개시된 PreF 항원에 결합한다.

[0083] **아미노산치환:** 다른 아미노산 또는 아미노산의 결실과 함께 항원에서 하나의 아미노산의 치환. 어떤 실시형태에서, 항원의 아미노산은 동형 단백질로부터의 아미노산으로 치환된다.

[0084] **동물:** 예를 들어 포유동물을 포함하는 카테고리의 살아있는 다세포 척추 동물 또는 무척추 동물 유기체. 포유류라는 용어는 인간 및 비 인간 포유 동물 모두를 포함한다. 유사하게, 용어 "개체"는 비 인간 영장류와 같은 사람 및 동물 둘을 개체로 포함한다. 따라서, 개체에 대한 투여는 인간 개체에 투여를 포함할 수 있다. 수의

학 개체의 비 제한적인 예로는, 길들여진 동물(예컨대 개와 고양이 등), 가축(예를 들면, 소, 말, 돼지, 양, 염소 등), 및 실험용 동물(예, 마우스, 토끼, 래트, 기니아 피그, 및 비 인간 영장류)를 포함한다.

[0085] **항체:** RSV F 단백질 또는 이들의 항원 단편과 같은 분해물질(항원 또는 면역원과 같은)에 특이적으로 결합하고 인식하는, 자연에서 면역 글로불린 유전자에 의해 많이 암호화되는 폴리펩티드 또는 면역 글로불린 유전자, 또는 그의 단편. 면역 글로불린 유전자는 무수한 면역 글로불린 가변 영역 유전자 뿐만 아니라, 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론 및 뮤 불변 영역 유전자를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "항체"는, 재조합 DNA 방법론을 이용하여 전체 항체의 변형에 의해 새로이 합성에 의해 제조된, 예를 들어 항체 단편을 포함한다.

[0086] 예를 들어, 항체는 본래 면역 글로불린 및 잘 특징지어진 항체 단편의 수로서 존재한다. 예를 들어, RSV F 단백질에 결합하는 Fabs, Fvs, 및 단쇄 Fvs (SCFvs)가, RSV F 단백질 고유의 결합제이다. 이는 Fab' 단편, F(AB)'2 단편, 단쇄 Fv 단백질("scFv"), 및 이황화 안정화 Fv 단백질("dsFv")과 같은, 당 업계에 공지된 본래의 면역 글로불린과 변형과 그 부분을 포함한다. scFv 단백질은 면역 글로불린의 경쇄 가변 영역 및 면역글로불린의 중쇄 가변영역은, dsFvs에서 사슬이 사슬 연결을 안정화하기 위한 이황화 결합을 도입하기 위해 변형된 반면에, 링커에 의해 결합된 퓨전 단백질이다. 용어는 또한 키메라 항체(예 : 인간화된 쥐의 항체 등), 이종 항체(예 : 이중 특이성 항체)와 같은 유전적으로 조작된 형태를 포함한다. 또한, Pierce Catalog 및 Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997를 참고한다.

[0087] 항체 단편은 다음과 같이 정의한다: (1) Fab, 그대로의 경쇄 및 하나의 중쇄의 일부를 얻기 위해 효소 파파인으로 전체 항체를 절단함으로써 생산되는 항체 분자의 일가 항원 결합 단편을 포함하는 단편; (2) Fab', 본래의 경쇄 및 중쇄의 일부를 얻기 위해 환원 후, 펩신으로 전체 항체를 처리함으로써 얻어지는 항체 분자의 단편, 두 Fab' 단편이 항체 분자당 얻어진다; (3) (Fab')2, 후속 환원 없이 효소 펩신으로 전체 항체를 처리한 후 얻어지는 항체의 단편; (4) F(ab')2, en 이황화 결합에 의해 함께 결합된 두 Fab' 단편의 이합체; (5) Fv, en 개의 사슬로써 발현되는 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함하는 유전적으로 조작된 단편; 및 (6) 단쇄 항체("SCA"), 유전적으로 융합된 단쇄 분자로써 적합한 폴리펩티드 링커에 의해 연결된 중쇄 가변영역, 경쇄 가변영역을 포함하는 유전적으로 조작된 분자.

[0088] 일반적으로, 자연적으로 발생하는 면역글로불린은 이황화 결합에 의해 상호 연결된 중쇄(H) 및 경쇄(L)를 가진다. 여기에 두 유형의 경쇄, 람다(λ) 및 카파(κ)가 있다. 여기에 항체 분자: IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE의 기능적 활성을 측정하는 5개의 주요 경쇄 클래스(또는 이소타입)이 있다. 개시된 항체는 바뀔 수 있다.

[0089] 각 중쇄 및 경쇄는 일정한 영역 및 가변영역을 포함한다("도메인"으로 알려진 영역). 몇몇 실시형태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 항원에 특이적으로 결합한다. 추가적인 실시형태에서, 오직 중쇄 가변 도메인이 요구된다. 예를 들어, 자연적으로 일어나는 중쇄 만으로 구성되 낙타과(camelid) 항체는 경쇄의 부재에서 기능적이고 안정적이다(Hamers-Casterman et al., Nature, 363:446-448, 1993; Sheriff et al., Nat. Struct. Biol., 3:733-736, 1996). 경쇄 및 중쇄 가변 도메인은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDRs"로 불리는 세 개의 가변영역에 의해 중단된, "프레임워크(framework)" 영역을 포함한다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health 및 Human Services, 1991). 상이한 경쇄 및 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 상대적으로 종 내에서 보존된다. 경쇄 및 중쇄 성분의 프레임워크 영역으로 결합된, 항체의 프레임워크 영역은 위치를 제공하고 삼차원 공간에서 CDR을 정렬한다.

[0090] CDRdms 주로 항원의 에피토프에 결합할 책임이 있다. 주어진 CDR의 아미노산 서열 경계는, Kabat et al.("Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991; "Kabat" numbering scheme), Al-Lazikani et al., (JMB 273,927-948, 1997; "Chothia" numbering scheme), 및 Lefranc, et al. ("IMGT unique numbering for immunoglobulin 및 T cell receptor variable domains 및 Ig superfamily V-like domains," Dev. Comp. Immunol., 27:55-77, 2003; "IMGT" numbering scheme)을 포함하여, 쉽게 잘 알려진 기법 중 임의의 것을 사용할 수 있다.

[0091] 각 사슬의 CDR은 전형적으로 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (N-말단에서 C-말단까지)라 불리며, 특정 CDR이 위치하는 사슬에 의해 전형적으로 식별된다. 따라서, VH CDR3는 그것이 발견되는 항체의 중쇄 가변 도메인에 위치하는 반면에, VL CDR1은 그것이 발견되는 항체의 경쇄 가변 도메인으로부터의 CDR1이다. 경쇄 CDR은 때때로 CDR L1, CDR L2, 및 CDR L3으로 칭한다. 중쇄 CDR은 때때로 CDR H1, CDR H2, 및 CDR H3로 치징된다.

[0092] **Antigen:** 동물에 주입되거나 흡수되는 조성물을 포함하여, 동물에서 방체 또는 R 세포 반응의 생산을 자극할

수 있는 화합물, 조성물 또는 물질. 항원은 본 명세서에 개시된 재조합 RSV F 단백질과 같은, 이종 항원에 의해 유도된 이들을 포함하여, 특이적 체액성 또는 세포성 면역의 생산과 함께 반응한다.

[0093] 항원의 예는, 이에 한정되는 것은 아니나, 폴리펩티드, 펩티드, 지질, 다당류, 이들의 조합(예를 들어 클리코펩티드) 및 면역 세포에 의해 인식되는 이들과 같은 항원 결정기를 포함하는 핵산을 포함한다. 어떤 실시예에서, 항원은 RSV과 같은 관심 병원체로부터 유도된 펩티드를 포함한다. 구체적인 실시예에서, 항원은 선융합 형태에서 안정화되는 변형된 RSV F 단백질을 포함하는 항원과 같은, RSV로부터 유도된다. "에피토프" 또는 "항원 결정 인자"는 B 및/또는 T 세포가 반응하는 항원의 영역을 말한다.

[0094] **항-RSV 제제:** 복제 또는 감염 세포로부터 RSV를 특이적으로 억제하는 제제. 항 RSV 제제의 비 제한적인 예는 단량 항체 팔리비주맵(SYNAGIS®; Medimmune, Inc.) 및 작은 분자 항 바이러스 약물 리바비린(Warrick Pharmaceuticals, Inc.)을 포함한다.

[0095] **원자 좌표 또는 구조 좌표(atomic Coordinates or Structure coordinates):** 항원, 또는 항체와의 복합체 항원과 같은 원자(scattering centers) 에 의한 X선의 단색 빔의 회절에서 얻은 패턴에 관련된 수학 방정식으로부터 유도된 수학 좌표. 일부 실시예에서 항원은 결정상 RSV F 단백질(예를 들어, 선융합 특이적 항체에 결합함으로써, 또는 변형 안정의 도입에 의해서, 선융합 형태에서 안정화된)일 수 있다. 회절 데이터는 결정의 반복 단위의 전자 밀도 맵을 계산하는데 사용한다. 전자 밀도 지도는 결정의 단위 세포 내에서 개별 원자의 위치를 설정하는데 사용된다. 하나의 예에서, "구조 좌표" 용어는 결정 형태에서 RSV F 단백질의 원자에 의해, X 선의 단색 빔의 회절에서 얻어진 패턴과 관련된 수학 방적식으로부터 유도된 데카르트 좌표(Cartesian coordinates)를 말한다.

[0096] 당업자는 X 선 결정학에 의해 결정된 구조 좌표의 세트는 오류가 없는 것이 아니다라는 것을 알 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 백본 원자를 사용하여 중첩될 때 약 0.75 또는 약 0.5 또는 약 0.25 옹스트롬과 같이, 약 1.0 옹스트롬보다 적은 단백질 백본 원자(N, Cα, C 및 O)의 평균 제곱근 편차를 가지는 구조 좌표의 어떤 세트는 (반대의 명시적 진술의 부재 하에) 동일한 것을 간주한다.

[0097] **공동 충전 아미노산 치환(Cavity-filling amino acid substitution):** 예를 들어, RSV F 단백질에 존재하는 공동, 또는 RSV F 단백질 프로모터 사이의 공동과 같은 RSV F 단백질의 단백질 중신 내에 공동을 채우는 아미노산 치환. 공동은 아미노산 또는 아미노산 측쇄가 존재하지 않는 접힌 단백질 내의 본질적인 공극이다. 몇 실시예에서, 공동 충전 아미노산 치환은 후융합 형태로 전환한 후 붕괴(예를 들어 부피 감소)하는 RSV F 단백질 선융합 형태의 중심에 존재하는 RSV F 단백질에서 공동을 채우기 위해 도입된다.

[0098] **원형의 치환체(Circular Permutant):** 초기 서열의 서로 다른 영역의 상대적인 순서가 변경될 수 있도록 변형된 단백질 삼차 구조의 다른 영역들 사이의 연결에서, 변형된 재조합 단백질은 변형되지만, 삼차 구조에서의 영역의 위치가 유지된다. 예를 들어, 4 가닥 평행 시트와, N 및 C 말단 및 연결성을 가지는 가닥 A, B, C 및 D에서,

[0099] N 말단-가닥 A- 링커- 가닥 B- 링커- 가닥 C- 링커- 가닥 D- C 말단,

[0100] 가닥 사이를 연결하는 링커로 변경함으로써 4 가닥, A, B, C 및 D의 원형 치환체는 변경된 N 및 C 말단 치환을 포함할 수 있다:

[0101] N 말단-가닥 C- 링커- 가닥 D- 링커- 가닥 A- 링커- 가닥 B- C 말단

[0102] 보존된 N 말단 치환:

[0103] N 말단-가닥 A- 링커- 가닥 D- 링커- 가닥 C- 링커- 가닥 B- C 말단

[0104] 보존된 C 말단 치환:

[0105] N 말단-가닥 C- 링커- 가닥 B- 링커- 가닥 A- 링커- 가닥 D- C 말단,

[0106] **접촉(Contacting):** 직접적인 물리적 관계; 고체 및 액체 형태로 모두 포함된다. 접촉은 하나의 분자 및 다른 분자, 예를 들어 항체와 같은 다른 폴리펩티드에 접촉하는, 항원과 같은 하나의 폴리펩티드의 표면의 아미노산, 사이의 접촉을 포함한다. 접촉은 또한 선택된 루트에 의해 개체에 개시된 항원의 투여를 포함한다.

[0107] **컨트롤(Control):** 참조 표준(reference standard). 일부 실시형태에서, 컨트롤은 건강한 환자로부터 얻은 음성 대조군 샘플이다. 다른 실시형태에서는, 컨트롤은 RSV 감염 진단을 받은 환자로부터 얻은 양성 대조군 샘플

이다. 다른 실시형태에서, 컨트롤은 기록제어 또는 표준 기준 값 또는 값의 범위이다(예컨데 이전에 테스트된 컨트롤 샘플, 예를들면 예후 또는 결과가 알려진 RSV 환자의 그룹, 또는 기준 또는 정상값을 나타내는 샘플의 그룹).

[0108] 시험 샘플 및 컨트롤 간의 차이는 증가할 수 있거나 반대로 감소할 수 있다. 상기 차이는 질적 차이 또는 양적 차이일 수 있으며, 예를 들어 통계적으로 유의적인 차이일 수 있다. 어떤 실시예에서, 차이는 컨트롤에 비교하여 약 5%, 예를 들어 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 약 150%, 약 200%, 약 250%, 약 300%, 약 350%, 약 400%, 약 500%, 또는 500% 이상, 증가 또는 감소한다.

[0109] **D25:** RSV F 단백질의 후융한 형태가 아닌 RSV F 단백질의 선융합 형태에서 특이적으로 결합하는 중화 단일 클론 항체(neutralizing monoclonal antibody). 예를 들어, D25 단백질 및 핵산 서열은 알려져 있으며, D25 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 미국 특허 번호 2010/0239593에 기재되어 있으며, 본 명세서에 참조로 인용되었다(Kwakkenbos et al., Nat. Med., 16:123-128, 2009). 실시예 1에 나타낸 것과 같이, D25는 후융합 형태가 아닌, 선융합 형태의 RSV F 단백질에서 발견되는 네 요소의 에피토프(항원 사이트Φ 포함)에 특이적으로 결합한다. 이러한 에피토프는 RSV F 포지션 62-69 및 196-209 내에서 포함되며, 선융합 형태에서 RSV F 단백질의 막말단 정점에 위치한다(도 2B 및 9A). 본 명세서 이전에 D25는 RSV F 단백질의 선융합 형태에 대해 특이적이라는 것을 알지 못하였다. 여러 실시형태에서, 항체 D25는 본 명세서에 기재된 PreF 항원에 특이적으로 결합한다.

[0110] **하향 변이체(Degenerate variant) 및 보존 변이체(conservative variant):** 유전자 코드의 결과처럼 하향된 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드. 예를 들어, 개시된 항원, 또는 개시된 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 유전자 코드의 결과로써 하향된 서열을 포함한다. 20개의 자연 아미노산은 하나 이상의 코톤에 의해 대부분 특정된다. 따라서, 모든 하향 뉴클레오티드 서열은 뉴클레오티느 서열에 의해 암호화되는 항원에 결합하는 항원 또는 항체의 아미노산 서열이 변하지 않는 이상 포함된다. 유전자 코드의 하향성으로 인해, 많은 수의 기능적으로 동일한 핵산은 다수의 특정 폴리펩티드를 암호화한다. 예를 들어, 코돈 CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, 및 AGG는 모두 아미노산 아르기닌(arginine)을 암호화한다. 따라서, 아르기닌이 서열을 암호화하는 단백질 내에서 특정화되는 모든 포지션에서, 상기 코돈은 암호화된 단백질 변경 없이 해당하는 기술된 코논의 어떡 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변형은 "침묵 변형"이며, 이는 보존적 변형의 한 종류이다. 본 명세서의 폴리펩티드를 암호화하는 각 핵산 서열은 모든 가능한 침묵 변형을 설명한다. 기술 중 하나는, 핵산에서 각 코돈(메티오닌을 나타내는 유일한 코돈인 AUG을 제외)은 표준 기술에 의해 기능적으로 동일한 분자를 생성하도록 변형될 수 있다는 것을 인식할 수 있다. 따라서, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 각 "침묵 변형"은 각 기술된 서열에서 내포된다.

[0111] 당업자는 암호화된 서열에서 아미노산 또는 작은 비율의 아미노산을 변경, 추가, 또는 삭제하는 각각의 치환, 결실, 또는 추가는 화학적으로 유사한 아미노산과 함께 아미노산의 치환을 초래하는 변형에서 보존적인 변형이라는 것을 인식한다.

[0112] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 아미노산 치환은 당업계에 잘 알려져 있다. 다음의 여섯 그룹 각각은 다른 하나를 위한 보존적인 치환인 아미노산을 포함한다:

[0113] 1) 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T);

[0114] 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);

[0115] 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);

[0116] 4) 아르기닌 (R), 라이신 (K);

[0117] 5) 이소루이신 (I), 루이신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 및

[0118] 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W).

[0119] 단백질 내의 모든 잔기 포지션이 다른 "보존적인" 치환을 용인하지는 않는다. 예를 들어, 아미노산 잔기가 타겟 에피토프에의 항체의 특이적 결합과 같은 활성을 방해할 수 있는 다른 보존적인 치환임에도, 단백질의 기능에의 필수적이라면 타겟 에피토프 내에서 보전적인 변이에 의해 파괴될 수 있다.

[0120] **에피토프(Epitope):** 항원 결정기. 이는 특이적 면역 반응을 유도하는 항원 분자의 특정 화학적 그룹 또는 펩티드 서열이며, 예를 들어 에피토프는 B 및/또는 T 세포 반응에의 항원의 영역이다. 항체는 특정 항원

에피토프, 예를 들어 RSV F 단백질의 선융합 형태에서 존재하는 D25 E또는 AM22 에피토프와 같은 RSV F 단백질의 에피토프에 결합한다.

[0121] 에피토프는 네 형태로 접힌 단백질에 의해 나란히 놓인, 인접한 아미노산 또는 인접하지 않은 아미노산으로부터 각각 형성될 수 있다. 인접한 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변형 용매에 노출에 의해 유지되는 반면에 네 형태의 접힘에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 처리에서 손실된다. 에피토프는 전형적으로 적어도 3, 및 고유 공간적 형태에서 더욱 일반적으로는 적어도 5, 적어도 9 또는 적어도 8-10 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간 형태를 결정하는 방법은 예를 들어, x선 결정학 및 핵 자기공명을 포함한다. 에피토프는 또한, N-결합 글리코실화와 같은 아미노산의 번역 후 변형을 포함한다.

[0122] 하나의 실시형태에서, R 세포는 에피토프가 MHC 분자와 함께 제시되는 에피토프에 반응한다. 에피토프는 단백질의 네 가지 폴딩에 의해 나란히 존재하는 인접하는 아미노산 또는 인접하지 않은 아미노산으로부터 모두 형성될 수 있다. 연속된 아미노산으로 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 노출에서 유지되지만 반면에 네 가지 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매의 처리에서 손실된다. 에피토프는 전형적으로 적어도 3, 및 더욱 일반적으로는 고유한 공간 형태에서 적어도 5, 적어도 9, 또는 적어도 8-10 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간 형성을 결정하는 방법은 예를 들어, X 선 결정한 및 핵 자기공명을 포함한다.

[0123] "타겟 에피토프"는 단일 클론 항체와 같이, 관심 항테에 특이적으로 결합하는 항원에의 특정 에피토프이다. 어떤 실시예에서, 타겟 에피토프는 타겟 에피토프가 관심의 항체에 접촉되는 것을 결정하는 아미노산 잔기에 의해 선택될 수 있는 타겟 에피토프와 같이, 관심의 항체에 접촉하는 아미노산 잔기를 포함한다.

[0124] **유효량:** PreF 항원 또는 PreF 항원을 암호화하는 핵산과 같은 제제의 양 또는 RSV F 단백질의 면역 반응과 같은 원하는 반응을 일으키기에 충분한 다른 제제, 또는 RSV 감염과 같은 컨디션 또는 질병의 사이 또는 증상의 감소 또는 제거. 예를 들어, 이는 바이러스 복제를 억제하거나 바이러스 감염의 외측 증상의 변경의 측정 가능한 필요 양일 수 있다. 일반적으로, 이러한 양은 바이러스(예를 들어 RSV) 복제 또는 감염을 측정할 수 있을 정도로 충분할 양이다. 개체에 투여하는 경우, 투여량은 일반적으로 바이러스 복제의 생체 외 억제를 달성(기 위해 보여지는 표적 조직 농도(예를 들어 호흡지 조직에서)를 달성하는데 사용된다. 어떤 실시예에서, "유효량"은 하나 또는 그 이상의 증상 및/또는 RSV 감염과 같은 장애 또는 질환 중 어떤 것의 근본 원인의 처리이다. 하나의 예에서, 유효량은 치료 유효량이다. 하나의 예에서, 유효한 양은 RSV 감염과 관련된 하나 또는 그 이상의 사인 또는 증상과 같은, 현상으로부터 특정 질환 또는 컨디션의 하나 또는 그 이상의 사인 또는 증상을 치료하는 양이다.

[0125] **발현:** 핵산의 단백질로의 전환. 단백질은 발현될 것이고 그리고 세포 사이에 남겨지고, 세포 표면 막의 구성요소가 될 것이다. 혹은 세포 외 기질 안으로 혹은 매질 안으로 분비될 것이다.

[0126] **발현 컨트롤 서열:** 이종성 핵산 서열의 발현을 조절하는 핵산 서열은 어느 것이 동작 가능하도록 연결된다. 발현 조절 서열에 작동 발현 조절 서열은 제어 및 핵산 서열의 적절한 번역으로, 전사를 조절하고 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 따라서, 발현 조절 서열은 mRNA가 적절한 번역을 허용하도록 적절한 프로모터, 인핸서, 전사 터미네이터, 인트론에 대한 단백질을 코딩하는 유전자, 스 플라이싱된 신호의 앞에 시작 코돈 (ATG), 그 유전자의 정확한 리딩 프레임의 유지를 포함할 수있다, 및 코돈을 중지한다. 용어 "컨트롤 서열"은 최소한 그 존재 성분 발현에 영향을 미칠 수 있으며, 포함하도록 의도되고, 추가적인 예컨대 그의 존재 유리한 성분, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다. 발현 조절 서열은 프로모터를 포함할 수 있다.

[0127] 프로모터는 직접 전사에 충분한 최소한의 서열이다. 또한 포함된 외부 신호 또는 대리인에 의해, 특정 세포 유형에 대한 프로모터에 의존하는 유전자 발현 제어 조직 특 적 또는 유도 렌더링하기에 충분 그 프로모터 요소는; 이러한 요소들은 유전자의 5 '또는 3'영역에 위치할 수 있다. 모두 제정 및 유도성 프로모터가 포함되어 있다(Bitter et al., Methods in Enzymology 153:516-544, 1987). 박테리아 시스템에서 복제할 때 예를 들어, 이러한 박테리오파지 람다, PLAC, ptrp, PTAC (ptrp-된 lac 하이브리드 프로모터) 등의 PL 프로모터와 같은 유도가 사용될 수 있다. 포유 동물 세포 시스템에서 복제할 때, 일 실시예에서, 프로모터 (예 : 메탈 로티 오네 인 프로모터) 또는 (상기 아데노 바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터와 같은 레트로바이러스 긴 말단 반복과 같은) 포유 동물 바이러스로부터 포유 동물 세포의 게놈으로부터 유래 사용될 수 있다. 재조합 DNA 합성 기술에 의해 생산 촉진제는 핵산 서열의 전사를 제공하는 데 사용될 수 있다.

[0128] 폴리뉴클레오티드는 숙주의 유전자 서열의 삽입을 용이하게 효율적으로 전사 프로모터 서열을 포함하는 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 발현 벡터는 통상적으로 복제 프로모터의 원점뿐만 아니라, 형질 전환된 세포 표현형의

선택을 허용 특정 핵산 서열을 포함한다.

[0129] **페리틴(Ferritin)**: 철을 저장하고 제어 된 방식으로 방출하는 단백질. 단백질은 거의 모든 살아있는 유기체에 의해 생성된다. 페리틴은 어떤 경우에는 24 단백질 서브 유닛으로 구성 구상 단백질 복합체에 어셈블된다. 어떤 실시예에서, 페리틴 등 선융합 구제엇 안정화된 개시된 RSV F 단백질 항원으로, RSV 항원, 예를 들어 그 표면에 항원을 제시하는 나노 입자를 형성하는데 사용된다.

[0130] **Foldon domain**: 천연 삼량체 구조를 형성하는 아미노산 서열. 어떤 실시 예에서, Foldon 도메인은 항원이 삼량체를 형성되도록 선융합 형태에서 안정화된 개시된 RSV F 단백질 항원의 아미노산 서열에 포함될 수 있다. 하나의 실시 예에서, Foldon 도메인은 서열번호 351(GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTF)로 항 T4 Foldon 도메인이다. 여러 실시 예는 절단을 위해 이용될 수 Foldon 도메인에 인접 트롬빈 쪼개짐 사이트의 혼입에 의해, 예를 들면, 정제된 단백질로부터 절단될 수 있는 Foldon 도메인을 포함한다.

[0131] **당단백(Glycoprotein; gp)**: 공유 폴리펩티드 측쇄에 부착된 올리고 사카라이드 쇄 (글리 칸)을 포함 단백질. 탄수화물 cotranslational 또는 번역 후 단백질 변형에 부착된다. 이 프로세스는 당질로서 알려져 있다. 세포 외로 연장되는 부분이 단백질, 세포 외 부분은 종종 글리코실화된다. 당 단백질은 종종 세포-세포 상호 작용에서 중요한 역할을 하는 세포막 단백질이다. 어떤 실시 예에서 당 단백질은 이러한 형태의 선융합 또는 이의 면역 원성 단편에 안정 RSV F 단백질 항원으로서 RSV 당 단백질이다.

[0132] **Glycosylation site**: 폴리펩타이트 표면의 아미노산 시퀀스, 단백질과같은, 그것은 글리칸의 부착에 도움을 준다. N-linked Glycosylation site는 NS(S/T)의 세쌍둥이 시퀀스이다. N은 아스파라긴, X는 프롤린을 제외한 어떤 잔존물, (S/T)는 세린 혹은 쎄로닌 잔존물이다. 글리칸은 다당류 혹은 올리고당이다. 글리칸을 또한 당단백, 당지질, 프로테오글리간과 같은 glycoconjugate의 탄수화물 비율을 언급하는데 사용된다.

[0133] **상동 단백질**: 2 종 이상 또는 2 종 이상 또는 바이러스 균주에 유사한 구조와 기능을 갖는 바이러스 균주, 예를 들면, 유사한 구조 및 기능을 갖는 단백질, 단백질. 예를 들어 RSV에서 RSV F 단백질은 소 RSV에서 RSV F 단백질에 상동 단백질이다. 상동 단백질과 유사한 단백질 접힘 특성을 공유하고 구조적 동족체를 생각할 수 있다.

[0134] 상동성 단백질은 통상적으로, 예컨대, 적어도 80 %, 적어도 90 %, 적어도 91 %, 적어도 92 %, 적어도 93 %, 적어도 94 %, 또는 95 % 이상으로, 서열 보존 적어도 96 %, 적어도 97 %, 적어도 98 %, 또는 적어도 99 %의 서열 보존하고, 서열 동일성의 높은 수준을 가지고, 예컨대, 적어도 80 %, 적어도 90 %, 적어도 91 %, 적어도 92 %, 적어도 93 %, 적어도 94 %, 적어도 95 %, 적어도 96 %, 적어도 97 %, 적어도 98 %, 또는 99 % 이상의 서열 동일성을 가진다.

[0135] **숙주 세포**: 세포는 벡터가 전파될 수 있고, 그 DNA는 발현된다. 세포는 원핵 또는 진핵수 있다. 또한, 이 용어는 대상 숙주 세포 중 자손을 포함한다. 이는 복제 중에 돌연변이가 일어날 수 있기 때문에 모든 자손은 부모 세포와 동일하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 그러나, 용어 "숙주 세포"를 사용하는 경우 자손이 포함되어 있습니다.

[0136] **면역원**: 단백질 또는 그와 같은 병원체 감염되거나 감염될 위험 포유류로 포유류에서 면역 반응을 유도할 수 있는 이들의 부분. 면역원의 관리 보호 면역 및/또는 관심의 병원체에 대한 능동적인 면역으로 이어질 수 있다. 몇 가지 예에서, 면역원은 개시된 PreF 항원이 포함되어 있다.

[0137] **면역반응**: 자극에 B 세포, T 세포 또는 단핵구와 같은 면역계의 세포의 반응. 일 실시 예에서, 반응은 특정 항원 ("항원 특이적 반응")에 대해 특정된다. 일 실시 예에서, 면역 반응은 CD4+ 반응 또는 CD8+ 반응과 같은 T 세포 반응이다. 다른 실시 예에서, 반응은 B 세포 반응이며, 특이적 항체의 생산을 초래한다.

[0138] "Th1" 편향된 면역 반응은 분비 존재 또는 IL-2와 IFN-γ하여, 따라서 IL-2와 IFN-γ를 생성하고, CD4+ T 헬퍼 세포의 존재를 특징으로 한다. 대조적으로, "TH2" 편향 면역 반응은 IL-4, IL-5 및 IL-13을 생산하는 CD4+ 헬퍼 세포의 우세 특징으로한다.

[0139] **면역원성 조성물**: 이러한 항원에 대한 항원, 또는 (예컨대 항체의 생산과 같은) 측정 B 세포 반응을 발현하는 바이러스에 대한 CTL 측정 가능한 반응으로, 면역 반응을 유도하는 항원을 포함하는 조성물. 이와 같이, 면역원성 조성물은 하나 이상의 (예를 들어, 폴리펩티드 항원) 항원 또는 항원성 에피토프를 포함한다. 면역 원성 조성물은 또한 유도 또는 부형제, 담체 및/또는 보조제와 같은 면역 반응을 향상시킬 수 있는 하나 이상의 추가 성분을 포함할 수 있다. 특정 예에서, 면역 원성 조성물은 병원균에 의해 유도되는 증상 또는 상태에 대하여

피사체를 보호 면역 반응을 유도하기 위해 투여된다. 일부의 경우, 병원균에 의한 증상 또는 질병의 병원체에 피사체의 노출 후 (RSV, 예) 병원체의 복제를 억제함으로써 억제 (또는 감소되거나, 개선)된다. 일 예에서, "면역 원성 조성물" RSV F 단백질을 발현하는 바이러스에 대한 측정 CTL 반응을 유도 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하거나, RSV에 대해 (예컨대 항체의 생산과 같은) 측정 B 세포 반응을 유도 F 단백질을 유도한다. 또한 상기와 같은 항원을 발현하는 데 사용할 수 있는 핵산과 같은 항원을 코딩하는 핵산 절연을 말한다(따라서, 이 폴리펩타이드에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 사용될 수 있다).

[0140] 시험관 내 사용하기 위한, 면역 원성 조성물은 항원을 암호화하는 항원 또는 핵산을 포함할 수 있다. 생체 내에서 사용하기 위한, 면역 원성 조성물은 단백질, 면역 원성 펩티드 또는 약학적으로 허용 가능한 담체에 핵산, 및/또는 기타 제제를 전형적으로 포함한다. 이러한 선융합 형태 또는 선융합 형태에서 안정화된 개시된 RSV F 단백질을 코딩하는 핵산 안정화 개시 RSV F 단백질로서 특정 펩티드는 용이 관측 행사 및 예술 의한 CTL 또는 B 세포 반응을 유도하는 인식능력에 대해 분석 시험할 수 있다. 면역 원성 조성물은 또한 당업자에게 공지된 보조제를 포함할 수 있다.

[0141] **면역학적 반응 조건:** 실질적으로 다른 모든 항원에 결합하는 특정 항원에 대해 제기 항체 및/또는 실질적으로 배제하고,보다 검출 가능하게 더 큰 정도에 그 항원에 결합할 수 있도록 조건에 대한 참조를 포함합니다. 면역학적 반응 조건은 항체 결합 반응의 형식에 의존하며, 일반적으로 면역 학적 프로토콜 또는 생체 내에서 발생하는 이러한 조건에서 이용들이다. 방법에 사용되는 면역 학적 반응 조건은 살아있는 포유류 또는 포유류 세포 내부 전형 (온도, 삼투압, 산도 등) 조건에 대한 참조를 포함 "생리적 조건"이다. 그것은 어떤 기관이 극단적인 조건이 적용됩니다 것을 인식되고 있지만, 인트라 생명체의 세포 내 환경이 정상적으로 (더 일반적으로 pH를 6.5-7.5의 pH 8.0, 그러한 pH가 6.0에서와 같은)의 pH 7에 관한 것입니다, 주된 용매로서 물을 포함, 0℃ 위 50 ℃ 이하의 온도에서 존재한다. 삼투압은 세포 생존 및 증식을 지지하는 범위이다.

[0142] **면역학적 프로브:** 인간 환자에서 혈청을 포함한 특정 에피토프 또는 항원에 대해 유도되는 혈청으로부터 항체의 선택을 위해 사용될 수있다 분자. 어떤 실시 예에서, 선융합 형태에서 안정화된 개시된 RSV F 단백질의 입체 구조에서 선융합 RSV F 단백질에 특이적인 항체의 양성 및 음성 선택 양쪽에 면역 프로브로서 사용될 수 있다.

[0143] **면역학적 표면:** 면역의 표면은 그것의 표면의 특징을 결정짓는 것을 포함한다. 예를 들자면 3차원의 형태 그리고 표면전하. 단백질 및 항체가 모두 결합할 때 몇 가지 예는 면역 원성의 표면 은 예를 들어, 중화 항체 등의 항체와 접촉하는 단백질 또는 펩타이드 의 표면에 아미노산에 의해 정의된다. 표적 에피토프는 면역 원성 표면을 포함한다. 면역 원성 표면 항원 표면과 동의어이다.

[0144] **질병의 억제 또는 치료:** 이러한 RSV 감염과 같은 질병에 대한 위험에 피사체, 예를 들면, 질환 또는 상태의 발달을 억제. "치료"가 개발을 시작한 후 질환이나 병적 상태의 징후 또는 증상을 개선시키는 치료 개입을 의미한다. 질환 또는 병리 상태를 참조하여 용어 "의한 개선은"치료 중 관찰 유익한 효과를 말한다. 유리한 효과는 감염 대상에 질병의 임상적 증상의 발생이 지연, 일부 또는 질병, 질병의 느린 진행, 개선의 모든 임상적 증상의 심각도의 감소에 의해, 예를 들면, 입증 될 수 있는 전체 상태 또는 환자의 안녕, 또는 특정 질병에 특정한 기술 분야에 잘 알려진 다른 파라미터에 의해 증명될 수 있다. "예방적" 치료 병리 현상의 위험을 감소시키는 목적으로 질병의 징후 또는 전시에만 초기 징후를 나타내지 않는 대상체에게 투여 치료이다.

[0145] 용어 "감소"는, 기준 제제에 비해서 정량적 제제의 투여 후 반응 또는 상태가 상대적으로 이전에 비해 감소되는 경우에 관련된 용어이다. 유사하게, 용어 "방지한다"는 반드시 그렇게 만큼 반응 또는 상태 중 적어도 하나의 특성이 제거되어, 에이전트가 완전히 반응 또는 증상을 제거한다는 것을 의미하지는 않는다. 따라서, 병리학적 감염 또는 반응을 감소 또는 예방하는 면역원성 조성물, 예를 들어 바이러스성 질환 향상된 백신은, 감염 또는 반응을 방지할 수 있지만, 필수적으로 완전히 오랫동안 감염 또는 반응을 제거하지 못하고, 이러한 감염 또는 반응을 잴 수 없을 정도로 적어지며, 감염 또는 반응에 의한 제제의 부재, 또는 비교를 위한 기준 제제에서 약 70 %까지로, 약 50 % 이상, 또는 약 80 %, 또는 심지어 약 90 % (즉, 10 % 이하 임) 감소한다.

[0146] **Isolated:**

[0147] **K_d:** 이러한 폴리펩티드-리간드 상호 작용 또는 항체-항원 상호 작용으로, 주어진 상호 작용에 대한 해리 상수. 예를 들어, 항체 (예를 들면 D25와 같은)와 항원 (예 : RSV F 단백질과 같은)의 이분자 상호 작용의 경우, 복합체의 농도로 나눈 이분자 상호 작용의 개별 성분의 농도이다. 항체의 Kd를 결정하는 방법 : 항원 상호 작용은 이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 사람에게 익숙하다.

[0148] **라벨:** 다른 분자에 직접 또는 간접적으로 접합 된 검출 가능한 화합물 또는 조성물은 그 분자의 검출을 용이하

게 한다. 라벨의 비 제한적인 예는 형광성 태그, 효소 적 결합, 방사성 동위 원소를 포함한다. 몇 가지 예에서, 공지된 PreF 항원은 검출 가능한 표지fh 표시되어 있다. 어떤 실시 예에서, 라벨은 개시 또는 항원을 암호화하는 핵산 등의 항원에 부착된다.

[0149] **링커:** 예를 들어, 하나의 연속된 분자에 두 개 이상의 분자를 연결하는 데 사용될 수 있는 관능성 분자는 면역원성 폴리펩티드 캐리어 분자를 연결. 펩티드 링커의 비 제한적인 예는 $(G_4S)_1$, $(G_4S)_2$, 또는 $(G_4S)_3$ 펩티드 링커를 포함한다.

[0150] 용어 "conjugating" "joining" "bonding" 또는 "linking" 은 하나의 연속 분자에 두 개의 분자를 만들기 위해 참조할 수 있다; 예를 들어, 하나의 연속으로 두 개의 다른 폴리펩티드 폴리펩티드 연결, 또는 본원에 개시된 바와 같은 공유 된 재조합 RSV F 단백질과 같은 면역 원성 폴리펩티드 담체 분자 또는 기타 분자를 부착. 링크 중 하나를 화학 물질 또는 재조합 방법으로 할 수 있다. "화학 수단" 면역 원성 폴리 펩타이드 잔기 및 하나의 분자를 형성하는 두 개의 분자 사이에 형성된 공유 결합이 되도록 담체 분자 사이에서, 예를 들면, 반응을 말한다.

[0151] **MPE8:** 구체적 아니지만 RSV F 단백질의 포스트 융합 형태로, RSV F 단백질의 입체 구조 prefusion 결합 중화 모노클로 날 항체.

[0152] 코르티 등(Nature, 501(7467)439-443, 2013, incorporated by reference herein in its entirety)에서 설명한 바와 같이 MPE8 항체는 RSV F 단백질의 후융합이 아닌 선융합 형태에서 발견되는 에피토프에 결합한다. MPE8 에피토프는 항원 사이트 Φ의 일부가 아니다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열은 서열번호 1472 및 1473 각각에서 기재되는 것과 같다.

[0153] **네이티브 항원 또는 네이티프 서열:** 예를 들어, 선택적인 돌연변이에 의해 변형되지 않은 항원 또는 시퀀스, 선택적 돌연변이 표적 에피토프 항원의 항원 성을 집중한다. 천연 항원 또는 천연 서열은 야생형 항원 또는 야생형 서열로 언급된다.

[0154] **Nucleic acid:** 뉴클레오티드 단위로 구성된 중합체는 자연스럽게 구조적 변형을 발생하는 포스 포디 에스테르 결합, 관련 통해 연결 (리보 뉴클레오티드는 데 옥시 리보 뉴클레오티드는 자연적 구조적 변형 및 이의 합성 비 천연 유사체를 발생하는 관), 및 이의 합성 비 천연 유사체. 따라서, 이 용어는 염기, 예를 들면 제한 없이 같은 뉴클레오티드 및 이들 간의 결합 비 천연 합성 유사체를 포함하는 중합체, 포스포로 티오 에이트, phosphoramidates, 메틸포스포네이트, 키랄-메틸포스 포 네이트, 2-O- 메틸을 포함 리보 뉴클레오티드, 펩티 - 핵산 (PNAS) 등을 포함한다. 이러한 폴리 뉴클레오티드는 자동 DNA 합성기를 사용하여, 예를 들면, 합성할 수 있다. 용어 "올리고 뉴클레오타이드"는 일반적으로 약 50 뉴클레오티드보다 일반적으로 더 큰, 짧은 폴리 뉴클레오티드를 의미하지 않습니다. 이는 뉴클레오티드 서열이 DNA 서열(즉, A, T, G, C)에 의해 표시되는 경우, 이것은 또한 "U"는 "T."를 대체하는 RNA 서열(즉, A, U, G, C) 을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0155] "뉴클레오티드"(PNA를 들면 피리 미딘, 퓨린 또는 이의 합성 유사체, 또는 펩티드 핵산에있는 아미노산에 연결된 베이스, 같은 당에 연결된 베이스를 포함하는 단량체를 포함하며 이에 한정되지 않는다). 염기는 폴리 뉴클레오티드에서 하나의 모노머이다. 뉴클레오티드 서열이 폴리뉴클레오티드의 염기 서열을 의미한다.

[0156] 종래 표기법 뉴클레오티드 서열을 기재하는데 사용된다: 단일 가닥 핵산 서열의 왼쪽 말단은 5 '말단이고; 이중 가닥의 뉴클레오티드 서열의 왼쪽 방향은 5 '방향으로서 언급된다. 초기 RNA 전 사체의 뉴클레오티드의 5 '내지 3'첨가 방향은 전사 방향이라고 한다. 그 DNA로부터 전사된 mRNA의 동일 서열을 갖는 DNA 가닥상의 서열과의 5'- 말단에 5 '위치되는, "코딩 가닥"의 mRNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥이라 RNA 전 사체는 다음과 같이 언급된다 "상류 서열;"RNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥상의 서열 3이다 부호화 RNA 전 사체의 3 '말단에'는 다음과 같이 언급된다 "하류 서열."

[0157] "cDNA" 중 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 mRNA와 상보 또는 동일 DNA를 의미한다.

[0158] "인코딩"은 뉴클레오타이드의 소정의 시퀀스를 갖는 다른 중합체와 생물학적 과정에서 고분자의 합성을위한 템플릿으로서 역할을 하는 이러한 유전자의 cDNA 또는 mRNA의 같은 폴리 뉴클레오티드의 뉴클레오티드의 특정 서열의 고유의 특성을 의미 (예를 들어, rRNA의,의 tRNA 및 mRNA의) 또는 아미노산 서열의 정의 및 생물학적 성질로 인해 발생. 전사 및 그 유전자에 의해 생성된 mRNA의 번역은 세포 또는 기타 생물학적 시스템에서 단백질을 생산하는 경우, 즉, 유전자는 단백질을 암호화한다. mRNA의 서열과 동일하며 일반적으로 서열 목록에서 제공되고, 유전자 또는 cDNA를 전사를위한 주형으로 사용되는, 스트랜드 비 코딩 뉴클레오타이드 서열 있는 암호화 쇄

모두가 단백질을 코드로 지칭 될 수 있다 또는 유전자 또는 cDNA를 다른 제품. 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열"은 서로의 축퇴 버전이며, 즉 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 단백질과 RNA를 인코딩은 인트론 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 어떤 실시 예에서, 핵산은 개시된 PreF 항원을 암호화한다.

[0159] **작동가능하게 연결된:** 첫 번째 핵산 서열이 제 2 핵산 서열과 기능적 관계로 배치 될 때 제 핵산 서열에 작동 가능 번째 핵산 서열에 연결된다. 프로모터는 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우, 예를 들어, 프로모터는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로 작동 가능하게 연결된 DNA 서열이 인접하고, 필요한 경우 같은 독서 프레임에 두 개의 단백질 코딩 영역에 가입하는 방법이다.

[0160] **선융합 특정 항체:** 특히 선융합의 형태에 RSV F 단백질에 결합하지만, 특별히하지 않는 항체는 포스트 융합 형태의 RSV F 단백질에 결합한다. 대표적인 선융합 특정 항체는 D25, AM22, 5C4 및 MPE8 항체를 포함한다.

[0161] **폴리펩티드:** 길이에 관계없이 (예를 들어, 글리코 실화 또는 인산화 등) 번역 후 변형의 아미노산 중 어느 체인. "폴리펩티드"는 천연 아미노산 중합체 및 비 - 자연 발생 아미노산 중합체 발생 포함할 뿐만 아니라 하나 이상의 아미노산 잔기는 예를 들어, 대응하는 인공 화학적 유사체 비 천연 아미노산 산 중합체를 아미노 적용 천연 아미노산을 발생한다. "잔기"는 아미드 결합 또는 아미드 결합에 의해 폴리펩티드 유사체에 결합 된 아미노산 또는 아미노산 유사체를 의미한다. 폴리펩티드는 아미노 말단 (N- 말단) 말단과 카복시 말단 (C- 말단) 단부를 갖는다. "폴리펩티드"는 펩티드 또는 단백질과 상호 교환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하며, 본 명세서에서 서로 바꾸어 사용된다.

[0162] 아미노산 잔기 중 하나의 연속적인 폴리펩티드 쇄 여러 폴리펩티드를 포함 할 수 있다. 예를 들면, RSV F0 폴리펩티드가 N 말단 신호 펩티드, 폴리펩티드 F2, pep27 폴리펩티드 및 F1 외 도메인, 막 횡단 도메인 및 세포질 꼬리를 포함 F1 폴리펩티드를 포함한다. 또한, 몇몇 실시 예에서, 재조합 RSV F 단백질은 단일 사슬 펩티드 링커에 의해 RSV F1 폴리펩티드에 연결된 RSV F2 폴리펩티드를 포함 RSV F 단백질이다.

[0163] 많은 경우에, 폴리펩티드는 특정한 입체 구조에 주름, 표면에 노출된 아미노산 잔기 및 비-표면-노출된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일부 경우에 단백질은 기능 유닛으로 폴딩 여러 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, RSV F 단백질은 다량 체 단백질에 trimerize F1/F2 이종이 구성된다. "표면에 노출된 아미노산 잔기는 "단백질이 용액에 있을 때 그들은 용제를 접촉할 수 있도록, 예를 들어, 단백질의 표면에 어느 정도의 노광이 그 아미노산이다. 대조적으로, 비-표면 -노출된 아미노산은 단백질 용액에 있을 때 그들이 용액과 접촉하지 않는 한 되도록 단백질의 표면에 노출되지 않는 이들 아미노산 잔기이다. 일부 실시 예에서, 비 -표면 -노출된 아미노산 잔기는 단백질 코어의 일부이다.

[0164] "단백질 코어는"용액에서 물 분자의 형태로 실질적으로 용매로서, 용매 노출 자유 등이다 접힌 단백질의 내부이다. 전형적으로, 단백질 코어는 주로 소수성 또는 비극성 아미노산으로 구성된다. 어떤 실시 예에서, 단백질은 예를 코어 아스파르트 산, 글루탐산, 아르기닌 및/또는 리신을 위해, 아미노산을 하전 함유할 수 있다. 보상되지 않은 충전 된 아미노산의 포함은 불안정 단백질을 초래할 수 단백질 코어 (보상 청구 아미노 염다리의 형태 일 수있다). 즉, 단백질 코어에서 보상되지 않은 충전 된 아미노산 없이 다음 낮은 Tm은 단백질과 유사한 단백질이다. 다른 예에서, 단백질은 코어 단백질 코어 내의 공동을 가질 수 있다. 공동 본질적 아미노산 또는 아미노산 측쇄가 없는 접힌 단백질 내에 보이드이다. 이러한 공동은 또한 공동 없이 유사한 단백질에 대해 단백질을 불안정하게 할 수 있다. 단백질 안정화 된 형태를 생성할 때, 따라서, 그것은 야생형 단백질에 존재하는 공동을 채우기 위하여 코어 내에 아미노산 잔기를 대체하는 것이 유리할 수 있다.

[0165] 펩타이드, 폴리 펩타이드 또는 단백질의 아미노산은 일반적으로 화학적으로 아미드 결합 (CONH)를 통해 함께 결합되어 있다. 또한, 아미노산은 다른 화학적 결합에 의해 함께 결합 될 수 있다. 예를 들어 아미노산 또는 아미노산 아날로그는 CH_2NH-, $-CH_2S$-, $-CH_2-CH_2$ -, -CH=CH-- (cis and trans), $-COCH_2$ --, $-CH(OH)CH_2$-, 및 $-CHH_2SO$-를 포함한다(These and others can be found in Spatola, in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (March 1983), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications (general review); Morley, Trends Pharm Sci pp. 463-468, 1980; Hudson, et al., Int J Pept Prot Res 14:177-185, 1979; Spatola et al. Life Sci 38:1243-1249, 1986; Harm J. Chem. Soc Perkin Trans. 1307-314, 1982; Almquist et al. J. Med. Chem. 23:1392-1398, 1980; Jennings-White et al. Tetrahedron Lett 23:2533, 1982; Holladay et al. Tetrahedron. Lett 24:4401-4404, 1983; and Hruby Life Sci 31:189-199, 1982.).

[0166] **펩티드 변형:** 이러한 선융합 형태에서 안정화된 개시된 RSV F 단백질과 같은 펩티드는, 네이티브 RSV 단백질 서열과 비교하여 아미노산 치환을 포함하는, 예를 들면, 수정, 또는 화학 본질적으로 동일한 활성을 갖는 유도체를 제조하는 기술 및 다양한 의한 수 변성 형태로 펩티드 및 임의로 다른 바람직한 특성을 갖는. 예를 들어, 카르복시 말단 또는 측쇄 여부 단백질의 카르 복실 산기는, 약학 적으로 허용 가능한 양이온의 염 형태로 제공되거나 C_1-C_{16} 에스테르를 형성하는 에스테르 화, 또는 화학식 I의 아마이드로 전환 될 수 있다 NR1R2 상기 R1 및 R2는 각각 독립적으로 H 또는 C_1-C_{16} 알킬, 또는 5- 또는 6- 원 고리로서, 헤테로 사이 클릭 고리를 형성하도록 결합. 펩티드의 아미노기, 아미노 말단 또는 측쇄는, 약학적으로 허용 가능한 산 부가 염 형태로 존재할 수 있는지 여부 등의 HCl, HBr로 아세트산, 벤조산, 톨루엔 술폰산, 말레 산, 타르타르산 등의 유기 염, 또는 C_1-C_{16} 알킬 또는 디 알킬 아미노 또는 아미드로 추가로 변환하도록 수정될 수 있다.

[0167] 펩티드 측쇄의 하이드 록실 그룹은 C1-C16 알콕시 또는 잘 인식 기법을 사용하여 C_1-C_{16} 에스테르로 전환 될 수 있다. 펩티드 측쇄의 페닐 및 페놀 고리는 F, Cl, Br 또는 I와 같은 또는 C_1-C_{16} 알킬, C_1-C_{16} 알콕시, 카르복실 산 및 에스테르 또는 아미드와 함께 하나 이상의 할로겐 원자로 치환 될 수있다 이러한 카복실산. 펩티드 측쇄의 메틸렌 기는 동종의 C_2-C_4 알킬 렌으로 연장될 수 있다. 티올은 아세트 아미드와 같은 기뿐만 아니라 인식 보호기의 숫자 중 어느 하나에 의해 보호될 수 있다.

[0168] **약학적으로 허용가능한 담체:** 본 발명에 유용한 약학적으로 허용가능한 담체는 일반적이다. Remington's Pharmaceutical Sciences,by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition(1975)에, 이들 단백질, 바이러스 또는 벡터, 및 추가적인 약학적 제제(pharmaceutical agents)에 결합하는 하나 또는 그 이상의 치료상의 화합물 또는 분자, 단백질 또는 항체의 약학적 전달(delivery)에 적합한 조성물 및 제형이 나타나 있다.

[0169] 일반적으로, 담체의 본질은 이용된 투약의 특정한 방법에 의존적이다. 예를 들어, 비경구의 제형(parenteral formulations)은 일반적으로 물, 생리식염수(physiological saline), 평형 염류액(balanced salt solution), 물과 같은 덱스트로오스(aqueous dextrose), 글리세롤(glycerol) 및 운송수단(vehicle)과 같이 약학적으로 및 생물학적으로 허용가능한 유동체(fluids)를 포함하는 주사할 수 있는 유동체로 구성된다. 고체 조성물[예를 들어, 가루(powder), 약(pill), 정제(tablet), 또는 캡슐(capsule) 형]을 위해, 종래의 비-독성(non-toxic) 고체 담체는 예를 들어, 만니톨(mannitol), 락토오즈(lactose), 녹말(starch)의 약학적 품질(pharmaceutical grades), 또는 스테아린산마그네슘(magnesium stearate)을 포함한다. 생물학적-본질의 담체에 더하여, 투약 되기 위한 약학적 조성물은 젖은(wetting) 또는 유화성의(emulsifying) 제제, 보존료(preservatives), 및 pH 완충제(buffering agents) 및 예를 들어, 초산 나트륨(sodium acetate) 또는 솔비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate)와 같은 비-독성 보조물질(auxiliary substances)을 소량(minor amount)으로 포함할 수 있다.

[0170] **초기 부스트 면역접종(Prime-boost vaccination):** 개체 초기 면역 원성 조성물 (부스터 백신)를 투여 한 다음 제 면역 원성 조성물 (프라이머 백신)의 면역 요법을 포함한 투여는 면역 반응을 유도한다. 프라이머 백신 및/또는 부스터 백신은 면역 반응이 전달되는 항원을 발현 (예컨대 바이러스 벡터, RNA, 또는 DNA 벡터로서) 벡터를 포함한다. 부스터 백신 접종 후 프라이머 대상체에게 투여된다; 당업자 프라이머 백신 투여 및 부스터 백신 사이의 적절한 시간 간격을 이해할 것이고, 그러한 시간대의 예는 본원에 개시되어있다. 일부 실시 예에서, 프라이머 백신 접종 백신, 또는 둘 모두의 프라이머 및 백신 접종 백신은 아쥬반트를 추가적으로 포함한다. 하나의 비 제한적인 예에서, 프라이머는 DNA 백신 기반 백신 (또는 유전자 전달에 기초한 다른 백신)이고, 부스터 백신 소단위 단백질 또는 단백질 나노 입자 기반 백신이다.

[0171] **단백질 나노입자:** 다중 서브 유니트 단백질 계 다면체 형상 구조물. 핵산, 보철 기, 유기 및 무기 화합물이다: 각각의 서브 유닛은 임의로 다음의 하나 또는 여러 특징들, 또는 단백질 (예를 들어 글리코 실화 폴리펩티드) 폴리펩티드로 구성하고 있다. 비 제한적인 단백질 나노입자를 페티린 나오입자(Zhang, Y. Int. J. Mol. Sci., 12:5406-5421, 2011), 엔캡슐린 나노입자(Sutter et al., Nature Struct. and Mol. Biol., 15:939-947, 2008), Sulfur Oxygenase Reductase (SOR) 나노입자(see, e.g., Urich et al., Science, 311:996-1000, 2006, incorporated by reference herein), lumazine synthase 나노입자(see, e.g., Zhang et al., J. Mol. Biol., 306: 1099-1114, 2001) 또는 pyruvate dehydrogenase 나노입자 (see, e.g., Izard et al., PNAS 96: 1240-1245, 1999, incorporated by reference herein)를 포함한다.

[0172] **재조합**: 재조합 핵산은 자연적으로 발생 또는 시퀀스의 두 개의 다른 분리 된 세그먼트의 인공 조합에 의해 이루어집니다 순서를 가지고 있지 않은 서열을 갖는 것입니다. 이 인공 조합, 또는 보다 일반적으로, 핵산의 고

립 세그먼트 인위적인 조작에 의해, 예를 들면, 유전 공학 기법에 의해 화학 합성에 의해 달성될 수 있다. 재조합 단백질은 자연적으로 발생 또는 시퀀스의 두 개의 다른 분리 된 세그먼트의 인공 조합에 의해 이루어집니다 순서를 가지고 있지 않은 서열을 갖는 것입니다. 몇몇 구체 예에서, 재조합 단백질은 이러한 박테리아 또는 진핵 세포와 같은 숙주 세포 내로 도입된 핵산 (예, 재조합 용) 이종 의해 인코딩된다. 핵산 도입 된 핵산 또는 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현할 수 있는 신호를 갖는 발현 벡터가 숙주 세포의 염색체에 통합될 수 있는 상, 예를 들면, 도입될 수 있다.

[0173] **아미노산 치환의 채충전(Repacking amino acid substitution)**: 단백질 내에서, 예를 들어 소수성 상호작용 또는 수소 결합 형성을 향상시킴으로써, 또는 인접한 잔기의 불리한 또는 반발의 상호작용을 감소시킴으로써, 예를 들어 유사한 대전된 잔기의 클러스터를 제거함으로써, 인접한 잔기의 상호작용을 감소시키는 아미노산 치환. 여러 실시예에서, 재충전 아미노산 치환은 RSV F 단백질 선융합 형태에서 인접한 잔기의 상호작용을 증가시키기 위해 도입되며, 이는 RSV F 후융합 형태에서 근접하지 않다. 전형적으로 아미노산 치환의 도입은 RSV F 단백질의 선융합 형태의 T_m을 증가시키며, RSV F 단백질의 후융합 형태의 T_m을 감소시킨다.

[0174] **호흡기 세포 융합 바이러스(Respiratory Syncytial Virus; RSV)**: Paramyxoviridae 과의 외피 비 세그먼트 음성-센스 단일 가닥 RNA 바이러스. 이는 삶의 첫 해에서 어린이들 사이의 모세기관지염(bronchiolitis) 및 폐렴의 가장 흔한 원인이며, 3세의 거의 모든 어린들에게 감염된다. RSV는 특히 노인이나 손상된 심장, 폐, 또는 면역 시스템과 그 사이에, 모든 연령에서 발생할 수 있는 심각한 기도 질환을 포함하여 반복 감염이 발생합니다. 미국에서는 RSV 모세기관지염은 유아의 입원과 천식의 주요 원인과 어린 시절에 걸쳐 천명의 주요 원인이다(Shay et al., JAMA, 282, 1440 (1999); Hall et al., N. Engl. J. Med., 360, 588 (2009)). 전 세계적으로, RSV는 66,000-199,000 사망 다섯 살 미만의 어린이 매년에 대한 책임(Nair et al., Lancet, 375, 1545 (2010))., 1 개월에 한 살 - 말라리아를 제외한 다른 하나의 병원체에 비해 유아 중 사망의 6.7 %를 차지한다 (Lozano et al., Lancet, 380, 2095 (2013)).

[0175] RSV 지놈은 ~15,000 길이의 뉴클레오티드이며, 당단백질 SH, G 및 F를 포함하는, 11 단백질을 암호화하는 10 유전자를 포함한다. 상기 F 단백질은 세포질 내로 바이러스의 진입을 허용하고 또한 융합체(syncytia)의 형성을 촉진하는, 융합을 매개한다. 인간 RSV 균주의, G 당단백의 항원성 차이에 기초하여, 두 아형, A 및 B 아형이 설명되었다. bovine RSV를 포함하여, 다른 종에 대한 RSV 균주는 알려져 있다. RSV 균주 서열의 eovyd는 당업자에게 공지되어 있다. 또한, 인간의 RSV 감염의 몇 모델은, 가축에서 bRSV 감염의 사용과 같은 종 특이적 RSV에 감염된 모델 유기체 뿐만 아니라 hRSV에 감염된 모델 유기체를 포함하여, 가능하다(Bern et al., Am J, Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 301: L148-L156, 2011).

[0176] 직접 형관 항체 검출(DFA), 크로마토그래픽 신속 항원 검출, 및 RT PCR을 이용한 바이러스성 RNA의 검출을 이용하여 RSV 감염을 진단하는 다양한 방법이 공지되어 있다. 바이러스 양의 정량화는 플라크 분석법 항원 포획 효소 면역 측정법 (EIA), 또는 PCR에 의해, 예를 들면, 결정될 수 있다. 항체 수준의 정량화는 특정 아형의 중화 또는 ELISA 분석에 의해 수행될 수 있다. 최근 RSV 치료는 RSV F 단백질(Johnson et al., J. Infect. Dis., 176, 1215 (1997); Beeler 및 van Wyke Coelingh, J. Virol., 63, 2941 (1989))을 인식하고 심각한 병의 발생을 감소(The IMpact-RSV Study Group, Pediatrics, 102, 531 (1998))하는 단일클론 항체 팔리비주맵(SYNAGIS®)의 수동적 투여이다(Nam 및 Kun (Eds.). Respiratory Syncytial Virus: Prevention, Diagnosis 및 Treatment. Nova Biomedical Nova Science Publisher, 2011; 및 Cane (Ed.) Respiratory Syncytial Virus. Elsevier Science, 2007.).

[0177] 인간 아형 A, 인간 아형 B, 및 bovine 아형을 포함하는, RSV의 여러 아형이 있다. RSV의 아형 내에서, 각 아형의 개별 균주가 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 서열번호 1-128은, 고도의 상동성을 가지는(하기 표 3에 나타낸 바와 같이) 많은 아형 A RSV의 균주를 위한 RSV F 단백질 서열을 포함한다.

[0178] **RSV 융합(F) 단백질**: 바이러스 및 세포막의 융합을 촉진하는 RSV 외피(envelope) 당단백질. 자연에서, RSV F 단백질은 초기에 길이 약 574 아미노산의 단일 폴리펩티드 전구체로써 합성되며, 이는 F0이다. F0은, 신호 펩티드(약, F0의 첫 25 잔기)가 가수분해되는, 소포제에 직접적으로 지역화되는 N-말단 신호 펩티드를 포함한다. 잔존하는 F0 잔기는, 두 개의 보존된 퓨린 컨센서스 절단 서열(F0 포지션 109 및 136; 예를 들어, $RARR_{109}$ (서열번호 124, 잔기 106-109) 및 $RKRR_{136}$ (서열번호 124, 잔기 133-136))에서 F1 및 F2인 두 이황화 결합 단편을 생성하기 위해, 세포 프로테아제에 의해 다시 처리된 삼량체를 형성하기 위해 올리고머화한다. 이러한 단편의 작은, F2는 F0 전구체의 N-말단 부분으로부터 유래하며, 대략 F0의 잔기 26-109를 포함한다. 이러한 단편의 큰,

F1은 C-말단의 세포 외/내강 영역(~ 잔기 137-524), 트랜스멤브레인 도메인(~잔기 525-550), 및 세포질 도메인(~잔기 551-574)을 포함하여, F0 전구체의 C-말단 부분(대략 잔기 137-574)을 포함한다.

[0179] 세 개의 F2-F1 프로모터는, 타겟 세포 막에 접촉하는 형태 변화("후융합" 형태)를 거치도록 트리거된 "안정 "선융합" 형태를 채택하는, 성숙한 F 단백질에서 올리고머화된다. 이러한 구조적 변화가 F1 폴리펩티드의 N-말단에 위치한 융합 단백질로써 알려진 소수성 서열에 노출되며, 이는 숙주 세포막과 관련되며 바이러스 막, 또는 표적 세포막에 감염된 세포의 융합을 촉진한다.

[0180] RSV F 단백질의 항원 사이트에 특이적으로 결합하는 중화 항체의 수는 확인되었다. 이는 항원 사이트 I(잔기 P389 중심)에 결합하는 단일 클론 항체 131-2a 및 2F를 포함하고; 항원 사이트 II(잔기 254-277 중심)에 결합하는 단일 클론 항체 말리비주맵 및 모타비주맵; 및 항원 사이트 IV(잔기 429-437 중심)에 결합하는 단일 클론 항체 101F 및 mAb19를 포함한다.

[0181] **단쇄 RSV F 단백질:** RSV F1 폴리펩티드 및 RSV F2 폴리펩티드를 포함하는 단쇄로써 발현되는 재조합 RSV F 단백질. 상기 단쇄 RSV F 단백질은 RSV F 단백질 엑토도메인을 형성하기 위해 삼량화된다. 단쇄 RSV F 단백질은 RSV F 단백질의pep27 폴리펩티드 측부의 퓨린 절단 사이트를 포함하지 않는다; 따라서, 세포 내에서 생성될 때, F0 폴리펩티드는 F2 및 F1 폴리펩티드로 분해되지 않는다. 일부 실시형태에서, 단쇄 RSV F 단백질은 pep27 폴리펩티드 및 융합 펩티드 두 퓨린 절단 사이트의 결실을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 포지션 103 또는 105는 단쇄 구조체를 생성하기 위해 RSV 단백질의 포지션 145에 연결된다. 여러 실시형태에서, F1 및 F2 폴리펩티드의 나머지 부분은 펩티드 링커와 같은 링커에 의해 결합된다.

[0182] **RSV F_0 폴리펩티드 (F_0):** F1 세포외 도메인, 트랜스멤브레인 도메인 및 세포질 꼬리를 포함하는, N-말단 신호 펩티드, F2 폴리펩티드, pep27 폴리펩티드, 및 F1 폴리펩티드의 아미노산을 포함하는, RSV F 단백질의 전구체. 네이티브 F0 폴리펩티드는 신호 서열 절단 사이트, 및 두 퓨린 절단 사이트(예를 들어, 대략 F0 포지션 109 및 136; RARR109 (서열번호 124, 잔기 106-109) 및 RKRR136 (서열번호 124, 잔기 133-136)에서 단백질 분해 가공되며, F1 및 F2 단편을 생성한다. 많은 다른 RSV 서브그룹으로부터의 F0 폴리펩티드의 예로는, 예를 들어, 서열번호 1-128, 129-177, 및 178-184 각각으로 기재되는, A, B 및 bovine 서브그룹은 공지되어 있다.

[0183] **RSV F_1 폴리펩티드 (F_1):** RSV F 단백질의 펩티드 사슬. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "F1 폴리펩티드"는, 예를 들어, RSV F 단백질의 선융합 형태에서 재조합 F 단백질(변형된 F1 폴리펩티드를 포함)을 안정화하기 위해 설계된 변형과 같이, 네이티브 서열로부터의 변형(예를 들어, 아미노산 치환, 삽입 또는 결실)을 포함하는 네이티브 F1 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드 모두를 지칭한다. 네이티브 F1은 대략 RSV F0 전구체의 잔기 137-574를 포함하며, (N 말단에서 C 말단까지) 세포 외/내강 영역(~ 잔기 137-524), 트랜스멤브레인 도메인(~잔기 525-550), 및 세포질 도메인(~잔기 551-574)을 포함한다. 여러 실시형태는, 예를 들어 트랜스멤브레인 및 세포질 도메인이 결여된 F1 폴리펩티드와 같은, 네이티브 F1 폴리펩티로부터 변형된 F1 폴리펩티드를 포함하며, 및/또는 선융합 형태에서 재조합 F 단백질(F1 폴리펩티드를 포함하는)을 안정화하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 하나의 실시예에서, 개시된 RSV F 단백질은 트랜스멤브레인 및 세포질 도메인이 결실된 F1 폴리펩티드를 포함하며, 포지션 155 및 290에서 시스테인 치환을 포함한다. 다른 실시예에서, 개시된 RSV F 단백질은 트랜스멤브레인 및 세포질 도메인이 결실된 F1 폴리펩티드를 포함하며, 포지션 155 및 290에서 시스테인 치환을 포함하며, 포지션 190에서 페닐알라닌 치환을 포함한다. 다른 실시예에서, 개시된 RSV F 단백질은 트랜스멤브레인 및 세포질 도메인이 결실된 F1 폴리펩티드를 포함하며, 포지션 155 및 290에서 시스테인 치환을 포함하며, 포지션 190에서 페닐알라닌 치환을 포함하고, 포지션 207에서 루이신 치환을 포함한다. 여러 실시형태에서, F1 폴리펩티드는 삼량체 도메인에의 C-말단 연결을 포함한다. 네이티브 F1 서열의 많은 예는 서열번호 1-184의 대략 포지션 137-524에서 기재되는 것으로 알려진다.

[0184] **RSV F_2 폴리펩티드 (F_2):** RSV F 단백질의 펩티드 사슬. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "F2 폴리펩티드"는, 예를 들어, RSV F 단백질의 선융합 형태에서 재조합 F 단백질(변형된 F2 폴리펩티드를 포함)을 안정화하기 위해 설계된 변형과 같이, 네이티브 서열로부터의 변형(예를 들어, 아미노산 치환)을 포함하는 네이티브 F2 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드 모두를 지칭한다. 네이티브 F2는 RSV F0 전구체의 대략 잔기 26-109를 포함한다. 네이티브 RSV F 단백질에서, 상기 F2 폴리펩티드는 두 이황화 결합에 의해 F1 폴리펩티드에 연결된다. 네이티브 F2 서열의 많은 예로는 서열번호 1-184의 대략 포지션 26-109에 기재된 것으로 알려져 있다.

[0185] **RSV pep27 폴리펩티드 (pep27):** RSV F 단백질의 성숙 동안에 F0 전구체로부터 절단된 27 아미노산 폴리펩티드. pep27은 F1 및 F2 폴리펩티드를 생성하기 위해 F 단백질 성숙 동안에 세포 프로테아제에 의해 절단된 두 퓨린

절단 사이트에 의해 측면에 있다. 네이티브 pep27 서열의 예는 서열번호 1-184의 포지션 110-136에 개시된 것으로 알려져 있다.

[0186] **RSV F 단백질 선융합 형태(prefusion conformation)**: 분비 시스템에서 후융합 형태로 RSV F의 전환에 이르게 하는 융해 이벤트를 트리거링 하기에 앞서 성숙한 RSV F 단백질로의 처리를 함으로써 채택된 구조적 형태. 선융합 형태에서 대표적인 RSV F 단백질의 삼차원 구조는 본 명세서에 개시되었으며(실시예 1) 선융합 특이적 항체 D25에 의해 결합된 선융합 형태에서 대표적인 RSV F 단백질의 구조 좌표는 표 1에 개시되었다. 본 명세서에 도시된 바와 같이, RSV F의 선융합 형태는, 어떤 유의한 차이를 통해 다른 paramyxoviruses의 선융합 형태로 전체 구조에서 유사하다(예를 들어 PIV, 도 7). 선융합 상태에서, RSV F 단백질은 막 원위 정점("항원 사이트 Φ", 실시예 1)에서 항원 사이트를 포함하며, 이는 RSV F 잔기 62-69 및 196-209를 포함하며, 또한 D25 및 AM22 항체의 에피토프를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은, 예를들어 D25 또는 AM22 항체와 같이 하원 사이트Φ 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체와 같이, RSV F 단백질의 선융합 형태에 특이적인 항체에 의해 특이적으로 결합할 수 있다. 추가적인 선융합 특이적 항체는 5C4 및 MPE8를 포함한다.

[0187] **RSV F 단백질 후융합 형태(postfusion conformation)**: 구조적 향태는 선융합 형태가 아닌 RSV F 단백질에 의해 채택되었으며, 여기서 RSV F 단백질의 N- 및 C-말단은 안정적인 coil-coil에 인접해 있다. RSV F 단백질의 후융합 형태는 원자 수준에서 설명되었다(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011; Swanson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 108, 9619, 2011; 및 structural coordinates deposited PDB Accession No. 3RRR; 각각은 본 명세서에 참고로 인용되었다). RSV F 단백질의 후융합 형태는 PIV5 단백질을 포함하여, 잘 알려진 다른 paramyxovirus 당단백질과 유사하다. 후융합 형태에서, RSV F 단백질은 항원 사이트 Φ를 포함하지 않으며, 따라서 D25 에피토프를 포함하지 않고 D25 또는 AM22에 의해 특이적으로 결합하지 않는다. RSV 후융합 형태는, 예를 들어 세포 맴브레인에 F 단백질의 융합 다음에 발생한다. 상기 발현될 때, 후융합 형태로 접을 수 있는, RSV F 단백질의 서열은 서열번호 1469로 제공된다.

[0188] **보수된 항원(Resurfaced antigen) 또는 보수된 면역원(resurfaced immunogen)**: 표적 에피토프에 외측 또는 외부 아미노산 잔기에서 야생형 항원으로부터 유도된 폴리펩티드 면역원은 선택된 표적 에피토프에 항원의 면역원성을 주목하여 체계적으로 변이된다. 어떤 실시예에서, 보수된 항원은 항원성-은폐 면역원(antigenically-cloaked immunogen) 또는 항원성-은폐 항원(antigenically-cloaked antigen)이라 한다.

[0189] **평균 제곱근 편차(Root mean square deviation; RMSD)**: 산술의 제곱근 평균으로부터 편차의 제곱의 의미. 몇 실시예에서, RMSD는 삼차원 구조의 구조적 좌표로부터의 편차 또는 변화를 표현하는 방법으로 사용된다. 이 수는 통상적으로 등가 Cα원자 간의 평균 제곱 거리의 제곱근으로서, 두 구조의 최적 중첩 후에 계산된다. 일부 실시예에서, 기준 입체 구조는 하기 표 1에 본 명세서에서 단일 클론 항체에 결합 D25 RSV F 단백질의 구조적 좌표를 포함한다.

[0190] **서열 동일성/유사성**: 두 개 이상의 핵산 서열, 또는 둘 이상의 아미노산 서열 간의 동일성/유사성은 서열 사이의 동일성 또는 유사성의 관점에서 표현된다. 서열 동일성 백분율은 동일성의 관점에서 측정될 수 있다; 비율이 높을수록 동일한 순서이다. 표준 방법을 사용하여 정렬할 때 핵산 또는 아미노산 서열의 동종(Homologs) 또는 orthologs는 서열 동일성/유사성이 비교적 높은 수준을 갖는다.

[0191] 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다. 다양한프로그램 및 정렬 알고리즘을 나타낸다:Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; 및 Pearson et al., Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990, 이는 서열 정렬 방법 및 동성 계산의 상세한 고려를 나타낸다.

[0192] 일단 정렬 일치의 숫자가 동일한 염기 또는 아미노산 잔기가 양쪽 서열에서 존재하는 위치 수를 계수함으로써 결정된다. 퍼센트 서열 동일성은 어느 식별 시퀀스에 기재된 서열의 길이 또는 굴절 길이가 일치하는 개수를 나눔으로써 결정(확인된 서열에 기재된 서열로부터 예컨대 100 개의 연속 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기), 이후 100에 의해 생성된 값을 곱하였다. 예를 들어, 1554 개의 아미노산을 갖는 테스트 서열과 정렬시 1166 매치하는 펩티드 서열은 테스트 서열과75.0 %가 동일하다(1166 ÷ 1554 * 100 = 75.0). 퍼센트 서열 동일성은 가장 가까운 열번째로 간주한다. 예를 들어, 75.11, 75.12, 75.13, 및 75.14는 75.1로 간주하는 반면, 75.15,

75.16, 75.17, 75.18, 및 75.19는 75.2로 간주한다. 길이 값은 항상 정수가 된다.

[0193] NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990)은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) 및 인터넷을 포함하여, 여러 소스로부터 가능하며, 서열 분석 프로그램 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx과 연결에서 사용할 수 있다. 이 프로그램을 사용하여 서열의 신원을 확인하는 방법에 대한 설명은 인터넷에서 NCBI 웹 사이트에서 사용할 수 있다.

[0194] 동족체 및 폴리펩티드의 변이체는 전형적으로 적어도 75%의 점유율에 의해, 예를 들어 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 관심있는 아미노산 서열과 전체 길이에 걸쳐 계산된 서열 상동성에 의해 특징지어진다. 참소 서열과의 더 큰 유사성을 가진 단백질은 본 방법에 의해 측정될 때 퍼센트 상동성이 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 98%, 또는 약 99%과 같은 서열 상동성을 나타낼 것이다. 전체 서열보다 적은 서열 동일성, 동족체가 비교되고 있고 변이체는 전형적으로 10 내지 20 개 아미노산의 짧은 창에서 적어도 80%의 서열 동일성을 보유하며, 적어도 85% 또는 적어도 90% 또는 95 %는 참조 서열과 그들의 유사성에 따라 서열 상동성을 가질 수 있다. 슛 윈도우를 통해 시퀀스의 정체성을 결정하는 방법은 인터넷에서 NCBI 웹 사이트에서 구할 수 있다. 당업자는 이러한 서열 동일성 범위가 단지 안내를 위해 제공되고 있다는 것을 알 것이다; 그것은 강력하게 중요한 동족체가 제공하는 범위를 벗어나는 것을 얻을 수 있다는 것을 전적으로 가능하다.

[0195] 핵산 서열의 서열 비교를 위해, 통상적으로 하나의 서열은 테스트 서열을 비교하기 위해, 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 테스트 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력되고, 서브 좌표가 필요한 경우 지정되고, 서열 알고리즘 프로그램 변수를 지정한다. 기본 프로그램 매개 변수가 사용된다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다. 비교를 위한 서열의 최적 배열은 the local homology algorithm of Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, by the search for similarity method of Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 by manual alignment 및 visual inspection (see, e.g.,Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed, Cold Spring Harbor, New York, 2012) 및 Ausubel et al. (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, through supplement 104, 2013)에 의해 수행될 수 있다. 유용한 알고리즘의 하나의 예를 PILEUP이다. PILEUP는 Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360, 1987의 진보적인 정렬 방법의 단순화를 이용한다. PILEUP를 이용하여, 참조 서열은 다음의 파라미터를 이용하여 서열 동일성 (%)의 관계를 결정하기 위해 다른 테스트 서열에 비교된다: default gap weight (3.00), default gap length weight (0.10), 및 weighted end gaps. PILEUP은 GCG 서열 분석 소프트웨어 패키지, 예를 들어 7.0 버전(Devereaux et al., Nuc. Acids Res. 12:387-395, 1984)로부터 얻을 수 있다.

[0196] 백분율 서열 동일성과 서열 유사성을 결정하기 위한 적합한 알고리즘의 다른 예는 Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990 및 Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1977에서 설명하고 있는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 생명 공학 정보를 위한 국립 센터 (ncbi.nlm.nih.gov)를 통해 공개적으로 사용할 수 있다. (뉴클레오티드 서열에 대한) BLASTN 프로그램은 디폴트로 10 (50), 기대치 (E), M = 5 (11), 정렬 (B)의 워드 길이 (W), N = -4, 및 양 스트랜드의 비교를 사용한다. (아미노산 서열에 대한) BLASTP 프로그램은 디폴트 단어 길이 (W) 3, 10의 기대치 (E), 및 BLOSUM62 채점 매트릭스로서 이용한다(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989). 올리고 뉴클레오티드의 길이는 최대 약 100 뉴클레오티드 염기의 선형 폴리 뉴클레오티드 순서다.

[0197] 두 개의 핵산 사이의 서열 유사성의 다른 표지는 혼성화 할 수 있는 능력이다. 더 비슷한 두 핵산 서열이고, 보다 엄격한 조건이 되는 이들은 혼성화한다. 하이브리드 조건의 엄격한 순서에 의존하고 다른 환경 요인에 따라 다르다. 따라서, 특히 엄격도 초래 혼성화 조건 선택과 혼성화 하는 핵산 서열의 조성 및 길이의 혼성화 방법의 성질에 따라 다양할 것이다. 세척 시간도 엄격 영향 비록 일반적 혼성화 온도 및 이온 강도 (특히 Na^{+} 및/또는 Mg^{++} 농도) 혼성화 완충액이 혼성화 엄격성을 결정한다. 일반적으로, 엄격한 조건은 한정된 이온 강도 pH에서 특이 서열에 대한 열 융점 (T_m)보다 약 5℃, 20℃로 낮아지도록 선택된다. 이 T_m은 표적 서열의 50%가 완벽 매치 프로브에 혼성화하는 (정의된 이온 강도 및 pH가 이하)의 온도이다. 핵산 혼성화 및 stringencies의

계산을 위한 조건은, 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I: Theory 및 Nucleic Acid Preparation, Laboratory Techniques in Biochemistry 및 Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993; 및 Ausubel et al. Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999에서 찾을 수 있다.

[0198] 본원에 사용된 바와 같이, "80% 이상의 동일성"는 "적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 지정된 기준 서열에 100% 동일성을 지칭한다.

[0199] **신호 펩티드(Signal Peptide):** 짧은 아미노산 서열 (예를 들어, 길이가 약 1,825 개의 아미노산)과 새로 멤브레인 또는 멤브레인을 통하여 분비 단백질 합성을 지시한다(예를 들어, 소포체 막). 신호 펩티드는 일반적으로 폴리펩티드의 N 말단에 위치한 폴리펩티드 및 멤브레인을 넘은 후에 신호 펩티다제에 의해 제거된다. 신호 펩티드 서열은 전형적으로 세 가지 일반적인 구조적 특징을 포함한다: N 말단 극성 염기성 영역 (N-영역), 소수성 코어 및 친수성 (C 영역). 예시적인 신호 펩티드 서열은 서열번호 1-182 (A, B, 및 bovine RSV에서 RSV F 단백질의 신호 펩티드)의 잔기 1-25로 기재된다.

[0200] **특이적 결합:** 항체의 형성을 참조할 때 항원 단백질 복합체, 단백질 및 다른 생물의 이종 집단의 존재하에 (예당 단백질) 표적 단백질, 펩타이드, 또는 폴리 사카라이드의 존재를 결정하는 결합 반응을 말한다. 따라서, 지정 조건 하에서, 항체 (예컨대 RSV F에 대한 병원체의 표면에 존재하는 항원으로서) 특정 표적 단백질, 펩티드 또는 사카라이드에 우선적으로 결합하고, 샘플이나 주제에 존재하는 다른 단백질 또는 다당류에 상당한 양으로 결합하지 않는다. 구체적으로 (특히 항원 사이트 Φ에 결합하는 항체) RSV F 단백질의 선융합의 형태로 결합하는 항체는 특히 RSV F 단백질의 후융합의 형태로 결합하지 않는다. 특이적인 결합은 당 업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 항체에 대한 참조로써: 항원 또는 Fab: 항원 또는 항체에 특이적으로 결합하는 항원 복합체는 10^{-6} 몰 미만의 Kd를 (또는 겉보기 Kd를)가지며, 약 10^{-7} 몰, 10^{-8} 이하 어금니, 10^{-9}, 또는 약 10^{-10} 몰보다 적은 양을 가진다.

[0202] *

[0203] ***가용성 단백질:** 실온에서 수성 액체에 용해시키고 용해 가능한 남은 단백질. 단백질의 용해도는 수성 액체 중 단백질의 농도, 예를 들어 염, 단백질 농도에 대한 액체, 액체 중의 다른 용질의 농도의 버퍼링 조건 및 액체의 열에 따라 달라질 수 있다. 몇 실시형태에서, 가용성 단백질을 실온에서 인산염 완충 염수 (PH 7.4)에서 적어도 0.5 ㎎/㎖의 농도로 용해하고, 적어도 48 시간 동안 용해된 상태로 유지한 것이다.

[0204] **치료제:** 환자에게 적절히 투여되는 경우 원하는 치료 또는 예방 효과를 유도할 수 있는 등의 핵산 분자와 같은 화합물, 소분자, 또는 다른 조성물.

[0205] **유효한 양의 약학적으로 유효한 양:** 이러한 개시된 항원 또는 개시된 항원을 함유하는 면역 원성 조성물로서, 치료(예방 포함), 질환 또는 질병의 임의의 증후를 감소 및/또는 개선, 예를 들면 예방, 억제, 및/또는 RSV 감염 치료하기에 충분하다. 일부 실시형태에서, 치료학적 유효량이 감소 또는 RSV 감염과 같은 질병의 증상을 제거하기에 충분하다. 예를 들어, 이것은 필요한 양이 바이러스 복제를 억제하거나 잴 바이러스 감염 증상의 외측을 변경할 수 있다. 일반적으로, 이 양은 잴 복제 또는 감염 (예: RSV의 경우) 바이러스를 억제하는 것으로 충분할 것이다. 환자에게 투여하는 경우, 투여 량은 일반적으로 바이러스 복제의 억제를 시험 관내에서 달성이 도시된 표적 조직 농도를 달성하는 데 사용된다. 또한 면역 원성 조성물의 다수의 투여를 필요로 할 수 병원체에 대한 보호 면역 반응을 얻을 수 있는 것을 알 수 있다. 따라서, 치료 학적 유효량은 보호 면역 반응을 달성하기에 이전 또는 이후의 투여와 조합하여 투여 기여 부분을 포함한다.

[0206] **Transmembrane domain:** 세포 또는 바이러스 또는 바이러스 유사 입자의 지질 이중층으로, 지질 이중층에 삽입된 아미노산 서열. 트랜스멤브레인 도메인은 막에 항원을 고정하는데 사용될 수 있다. 어떤 실시예에서 트랜스멤브레인 도메인은 RSV F 단백질 막 횡단 도메인이다. 대표적인 RSV F 막 횡단 도메인은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 친숙하고, 본원에 제공된다. 예를 들어, 대표적인 RSV F 트랜스멤브레인 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 1-183의 대fir 포지션 525-550으로 제공된다.

[0207] **형질전환:** 형질 전환된 세포는 핵산 분자가 분자 생물학 기술에 의해 도입 된 세포이다. 본 명세서에서 사용되

는 용어 변환은 핵산 분자는 바이러스 벡터와 함께 형질 전환, 플라스미드 벡터로 변환하고, 전기 천공, 리포펙션에 의해 DNA를 도입하고, 입자 총 가속 포함한 이러한 세포에 도입될 수 있는 모든 기술을 포함한다.

[0208] **백신:** 개체의 예방 또는 치료 면역 반응을 유도하는 약제 학적 조성물. 어떤 경우, 면역 반응은 방어 면역 반응이다. 전형적으로, 백신은 예를 들어, 바이러스 성 병원체의 병원체 항원에 대한 항원 특이적 면역 반응을 유도하는, 또는 병리학적 증상과 상관 셀룰러 구성에 관한 것이다. 백신 (예, 핵산 등 개시된 항원을 코딩하는) 뉴클레오티드 (예 : 항원으로서 개시) 펩티드 또는 폴리펩티드, 바이러스, 세포 또는 세포의 하나 이상의 성분을 포함 할 수 있다.

[0209] **벡터:** 형질 전환된 숙주 세포를 생산하는 숙주 세포 내로 도입으로 핵산 분자. 재조합 DNA 벡터는 재조합 DNA를 갖는 벡터이다. 벡터는 복제 원점으로서 숙주 세포에서 복제를 허용하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자 및 당해 분야에 공지된 다른 유전적 요소를 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 적어도 하나 이상의 바이러스로부터 유래 된 어떤 핵산 서열을 갖는 재조합 DNA 벡터이다.

[0210] 바이러스 게놈의 하나 이상의 영역의 보완이 필요 복제 결핍 바이러스 벡터는 적어도 하나의 복제에 필수적인 유전자 기능, 예를 들어, 결과로서, 복제 결핍 필요했다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 통상적으로 숙주 세포의 치료 방법 동안에 바이러스 벡터에 의해 감염될 수 있는 인간 환자에서 특히 복제하지 않도록 한다. 복제-결함 바이러스 벡터 및 그 사용을 위한 시스템의 예는 당해 분야에 공지되어 있다; 예를 들어 복제-결함 LCMV 벡터 (미국 특허 2010/0297172) 및 복제 결함 아데노바이러스 벡터(PCT 출원번호 WO2000/00628).

[0211] **바이러스:** 본질적 바이러스 코트 단백질에 의해 둘러싸인 핵산의 코어로 구성되며, 살아있는 세포의 내부에만 복제하는 능력을 가진다. "바이러스 복제는" 적어도 하나의 바이러스 생활주기의 발생에 추가 바이러스의 생산이다. 바이러스는 세포가 바이러스에 의해 결정된 방식으로 동작하도록 유발 숙주 세포의 정상적인 기능을 파괴할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 감염은 사이토카인 생산, 또는 감염되지 않은 세포는 일반적으로 그렇게 하지 않는 사이토카인, 세포에 반응을 초래할 수 있다. 어떤 실시예에서, 바이러스는 병원체이다.

[0212] **바이러스 유사(Virus-like) 입자 (VLP):** 여러 가지 바이러스 중 어느 유래의 비 복제하는 바이러스 쉘. VLP는 일반적으로 하나 이상의 바이러스 단백질로 구성되지만 캡시드, 코트, 쉘, 표면 및/또는 외피 단백질, 또는 이러한 단백질로부터 유도된 입자 형성 폴리 펩타이드로서 언급된 단백질에 한정되지 않는다. VLP를 적절한 발현계에서 단백질의 재조합 발현에 자발적으로 형성할 수 있다. 특정 VLP를 제조하는 방법은 당 업계에 공지되어 있다. 바이러스 단백질의 재조합 발현 VLP를 다음의 존재는 이러한 전자 현미경, 생물리학적 특성, 등과 같이 당 업계에 공지 된 종래의 기술을 사용하여 검출할 수 있다. 또한, VLP를 공지 기술, 예를 들면, 밀도 구배 원심 분리에 의해 단리 및 밀도 특성 밴딩에 의해 식별될 수 있다.

[0214] ## Ⅱ. 다양한 실시형태에 대한 설명

[0215] RSV F 단백질이 이의 선융합 및 후융합 형태 사이의 극적인 구조적 재배열을 겪는 것이 본원에 개시된다(하기 실시예 1 참조). 도 2B에 나타낸 바와 같이, 선융합 형태(도 2A에 나타낸 막 말단 로브 부분에 해당)에서 F1 폴리펩티드의 N-말단 영역은 α2, α3, β3, β4 및 α4를 가리키는 나선 및 베타 시트 구조를 포함하는 반면에, 후융합 형태에서 F1 폴리펩티드의 N-말단의 영역에 해당하는 것은 연장된 α5 나선 구조를 포함한다. 나아가, 선융합 형태(도 2A에서 나타낸 막 말단 로브 부분에 해당)에서 F1 폴리펩티드의 C-말단 영역은 β22, α9 및 β23으로 표시된 베타 시트를 포함하는 반면에, 후융합 형태 구조에서 F1 폴리펩티드의 C-말단 영역에 해당하는 것은 연장된 α10 나선 구조를 포함한다. 따라서, 이의 선융합 형태에서 RSV F 단백질의 막 말단 및 막 근위 로브는 이의 후융합 형태에서 RSV F 단백질의 해당하는 영역으로부터 부재한 몇 개의 구분되는 구조 요소를 포함한다. 이러한 영역에 해당하는 아미노산 위치(및 서열)은 도 2에 회색으로 표시하였으며, F1 폴리펩티드의 137-216, 및 461-513 위치를 포함한다.

[0216] RSV F 단백질 항원은 "PreF 항원" 이라는 이름으로 선융합 형태에서 안정화되거나 "고정"된 상태로 제공된다. 구조 유도 설계를 이용하여, RSV F1 및 F2 폴리펩티드의 위치는, 선융합 형태부터 후융합 형태까지 RSV F 단백질의 전이를 방해하거나 방지하기 위해 변이(즉, 아미노산 치환)의 대상이 된다. 이러한 항원은 예를 들어, RSV F 단백질에 대한 중화 반응을 유도하기 위한 면역원으로써 유용성을 가진다.

[0218] ### *A. 네이티브 RSV F 단백질*

[0219] 이러한 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및 방법 뿐만 아니라, 상이한 RSV 그룹으로부터의 네이티브 RSV F 단백질은 공지되어 있다. 예를 들어, 여러 아형 A, B 및 bovine 전구체 RSV F0 단백질의 서열이 서열번호 1-184로 제공된다. GenInfo Identifier (gi) 및 이러한 각각의 서열의 해당하는 수탁번호 뿐만 아니라 RSV 그룹에 해당하는 것도 표 3에 제공된다.

[0220] [표 3] 대표적인 아형 A, B 및 bovine RSV F 단백질 서열

표 3

[0221]

서열 번호	Subtype	Accession	서열 번호	Subtype	Accession
1	A	>gi|113472470|gb|ABI35685.1	93	A	>gi|346683047|gb|AEO45919.1
2	A	>gi|46405966|gb|AAS93651.1	94	A	>gi|46405974|gb|AAS93655.1
3	A	>gi|346682949|gb|AEO45830.1	95	A	>gi|46405976|gb|AAS93656.1
4	A	>gi|392301680|gb|AFM55244.1	96	A	>gi|346683069|gb|AEO45939.1
5	A	>gi|392301896|gb|AFM55442.1	97	A	>gi|1353201|sp|P11209.2
6	A	>gi|392301692|gb|AFM55255.1	98	A	>gi|1912295|gb|AAC57027.1
7	A	>gi|392301728|gb|AFM55288.1	99	A	>gi|9629375|ref|NP_044596.1
8	A	>gi|392976459|gb|AFM95385.1	100	A	>gi|21263086|gb|AAM44851.1
9	A	>gi|392976475|gb|AFM95400.1	101	A	>gi|417346951|gb|AFX60127.1
10	A	>gi|21689583|gb|AAM68157.1	102	A	>gi|417347009|gb|AFX60156.1
11	A	>gi|21689587|gb|AAM68160.1	103	A	>gi|29290043|gb|AAO72325.1
12	A	>gi|346682981|gb|AEO45859.1	104	A	>gi|138252|sp|P12568.1
13	A	>gi|352962949|gb|AEQ63444.1	105	A	>gi|226438|prf||1512372A
14	A	>gi|353441614|gb|AEQ98752.1	106	A	>gi|37674744|gb|AAQ97026.1
15	A	>gi|392301740|gb|AFM55299.1	107	A	>gi|37674754|gb|AAQ97031.1
16	A	>gi|346682971|gb|AEO45850.1	108	A	>gi|37674746|gb|AAQ97027.1
17	A	>gi|346682992|gb|AEO45869.1	109	A	>gi|37674748|gb|AAQ97028.1
18	A	>gi|346683003|gb|AEO45879.1	110	A	>gi|37674750|gb|AAQ97029.1
19	A	>gi|346683036|gb|AEO45909.1	111	A	>gi|37674752|gb|AAQ97030.1
20	A	>gi|21689579|gb|AAM68154.1	112	A	>gi|146738079|gb|ABQ42594.1
21	A	>gi|326578296|gb|ADZ95777.1	113	A	>gi|403379|emb|CAA81295.1
22	A	>gi|330470871|gb|AEC32087.1	114	A	>gi|226838116|gb|ACO83302.1
23	A	>gi|346683058|gb|AEO45929.1	115	A	>gi|326578304|gb|ADZ95781.1
24	A	>gi|392301644|gb|AFM55211.1	116	A	>gi|326578306|gb|ADZ95782.1
25	A	>gi|392301656|gb|AFM55222.1	117	A	>gi|326578308|gb|ADZ95783.1
26	A	>gi|392301776|gb|AFM55332.1	118	A	>gi|326578310|gb|ADZ95784.1
27	A	>gi|46405962|gb|AAS93649.1	119	A	>gi|326578312|gb|ADZ95785.1
28	A	>gi|326578298|gb|ADZ95778.1	120	A	>gi|60549171|gb|AAX23994.1
29	A	>gi|392301872|gb|AFM55420.1	121	A	>gi|226838109|gb|ACO83297.1
30	A	>gi|346682960|gb|AEO45840.1	122	A	>gi|352962877|gb|AEQ63378.1
31	A	>gi|346683080|gb|AEO45949.1	123	A	>gi|346683014|gb|AEO45889.1
32	A	>gi|227299|prf||1701388A/1-574	124	A	>gi|138251|sp|P03420.1|
33	A	>gi|352962996|gb|AEQ63487.1	125	A	>gi|1695263|gb|AAC55970.1
34	A	>gi|352963032|gb|AEQ63520.1	126	A	>gi|61211|emb|CAA26143.1
35	A	>gi|46405970|gb|AAS93653.1	127	A	>gi|226838114|gb|ACO83301.1
36	A	>gi|392976437|gb|AFM95365.1	128	A	>gi|352963080|gb|AEQ63564.1
37	A	>gi|392976449|gb|AFM95376.1	129	B	>gi|109689536|dbj|BAE96918.1
38	A	>gi|352962805|gb|AEQ63312.1	130	B	>gi|380235900|gb|AFD34266.1
39	A	>gi|346340362|gb|AEO23051.1	131	B	>gi|401712638|gb|AFP99059.1
40	A	>gi|352962829|gb|AEQ63334.1	132	B	>gi|401712648|gb|AFP99064.1
41	A	>gi|352962865|gb|AEQ63367.1	133	B	>gi|380235886|gb|AFD34259.1
42	A	>gi|392302028|gb|AFM55563.1	134	B	>gi|326578302|gb|ADZ95780.1
43	A	>gi|392302016|gb|AFM55552.1	135	B	>gi|326578294|gb|ADZ95776.1
44	A	>gi|417346971|gb|AFX60137.1	136	B	>gi|326578300|gb|ADZ95779.1
45	A	>gi|417347051|gb|AFX60173.1	137	B	>gi|380235892|gb|AFD34262.1
46	A	>gi|392301812|gb|AFM55365.1	138	B	>gi|46405984|gb|AAS93660.1
47	A	>gi|29290039|gb|AAO72323.1	139	B	>gi|46405986|gb|AAS93661.1
48	A	>gi|29290041|gb|AAO72324.1	140	B	>gi|46405990|gb|AAS93663.1

49	A	>gi|262479010|gb|ACY68435.1	141	B	>gi|46405992|gb|AAS93664.1
50	A	>gi|330470867|gb|AEC32085.1	142	B	>gi|345121421|gb|AEN74946.1
51	A	>gi|392301704|gb|AFM55266.1	143	B	>gi|417347137|gb|AFX60215.1
52	A	>gi|392301716|gb|AFM55277.1	144	B	>gi|380235888|gb|AFD34260.1
53	A	>gi|392301800|gb|AFM55354.1	145	B	>gi|346340378|gb|AEO23054.1
54	A	>gi|345548062|gb|AEO12131.1	146	B	>gi|384872848|gb|AFI25262.1
55	A	>gi|346340367|gb|AEO23052.1	147	B	>gi|380235890|gb|AFD34261.1
56	A	>gi|352962889|gb|AEQ63389.1	148	B	>gi|46405978|gb|AAS93657.1
57	A	>gi|353441606|gb|AEQ98748.1	149	B	>gi|46405982|gb|AAS93659.1
58	A	>gi|353441604|gb|AEQ98747.1	150	B	>gi|352963104|gb|AEQ63586.1
59	A	>gi|353441608|gb|AEQ98749.1	151	B	>gi|352963128|gb|AEQ63608.1
60	A	>gi|353441616|gb|AEQ98753.1	152	B	>gi|352963164|gb|AEQ63641.1
61	A	>gi|353441620|gb|AEQ98755.1	153	B	>gi|46405996|gb|AAS93666.1
62	A	>gi|353441624|gb|AEQ98757.1	154	B	>gi|417347131|gb|AFX60212.1
63	A	>gi|409905594|gb|AFV46409.1	155	B	>gi|417347135|gb|AFX60214.1
64	A	>gi|409905610|gb|AFV46417.1	156	B	>gi|417347145|gb|AFX60219.1
65	A	>gi|417346953|gb|AFX60128.1	157	B	>gi|380235898|gb|AFD34265.1
66	A	>gi|417347079|gb|AFX60187.1	158	B	>gi|352963116|gb|AEQ63597.1
67	A	>gi|417346955|gb|AFX60129.1	159	B	>gi|401712640|gb|AFP99060.1
68	A	>gi|417346967|gb|AFX60135.1	160	B	>gi|352963152|gb|AEQ63630.1
69	A	>gi|417346979|gb|AFX60141.1	161	B	>gi|401712642|gb|AFP99061.1
70	A	>gi|417346993|gb|AFX60148.1	162	B	>gi|417347133|gb|AFX60213.1
71	A	>gi|417346999|gb|AFX60151.1	163	B	>gi|417347147|gb|AFX60220.1
72	A	>gi|417347043|gb|AFX60169.1	164	B	>gi|417347151|gb|AFX60222.1
73	A	>gi|417347105|gb|AFX60200.1	165	B	>gi|417347169|gb|AFX60231.1
74	A	>gi|417347107|gb|AFX60201.1	166	B	>gi|417347171|gb|AFX60232.1
75	A	>gi|392301788|gb|AFM55343.1	167	B	>gi|417347175|gb|AFX60234.1
76	A	>gi|409905578|gb|AFV46401.1	168	B	>gi|46405988|gb|AAS93662.1
77	A	>gi|409905596|gb|AFV46410.1	169	B	>gi|138250|sp|P13843.1
78	A	>gi|353441622|gb|AEQ98756.1	170	B	>gi|2582041|gb|AAB82446.1
79	A	>gi|409905582|gb|AFV46403.1	171	B	>gi|9629206|ref|NP_056863.1
80	A	>gi|417347109|gb|AFX60202.1	172	B	>gi|38230490|gb|AAR14266.1
81	A	>gi|409905602|gb|AFV46413.1	173	B	>gi|326578292|gb|ADZ95775.1
82	A	>gi|409905604|gb|AFV46414.1	174	B	>gi|345121416|gb|AEN74944.1
83	A	>gi|417347121|gb|AFX60208.1	175	B	>gi|345121418|gb|AEN74945.1
84	A	>gi|409905614|gb|AFV46419.1	176	B	>gi|46405994|gb|AAS93665.1
85	A	>gi|409905616|gb|AFV46420.1	177	B	>gi|380235896|gb|AFD34264.1
86	A	>gi|417346973|gb|AFX60138.1	178	Bovine	>gi|138247|sp|P22167.1
87	A	>gi|417346997|gb|AFX60150.1	179	Bovine	>gi|3451386|emb|CAA76980.1
88	A	>gi|417347021|gb|AFX60162.1	180	Bovine	>gi|17939990|gb|AAL49399.1
89	A	>gi|417347085|gb|AFX60190.1	181	Bovine	>gi|9631275|ref|NP_048055.1
90	A	>gi|425706126|gb|AFX95851.1	182	Bovine	>gi|94384139|emb|CAI96787.1
91	A	>gi|392301836|gb|AFM55387.1	183	Bovine	>gi|425678|gb|AAB28458.1
92	A	>gi|392301992|gb|AFM55530.1	184	Bovine	>gi|17940002|gb|AAL49410.1

[0222] RSV F 단백질은 RSV 아형에 대하여 큰 서열 보존을 나타낸다(표 3에서, 아형 및 F 단백질 세그먼트에 걸쳐 평균 짝 서열 상동성을 보여준다). 예를 들어, RSV 아형 A 및 B는 90%의 서열 상동성을 공유하며, RSV 아형 A 및 B 각각은 bRSV F 단백질과 F0 전구체 분자를 걸쳐, 81% 서열 상동성을 공유한다. RSV 아형 내에서 F0 서열 상동성이 커진다; 예를 들어 RSV A, B, 및 bovine 아형 각각의 내에서, RSV F0 전구체 단백질은 ~98%의 서열 상동성을 가진다. 거의 모든 식별된 RSV F0 전구체 단백질은 약 574 아미노산 길이이며, 세포질 꼬리의 C-말단의 길이 때문에 전형적인 길이에서 다소의 차이를 가진다. RSV F 단백질에 걸친 서열 상동성은 표 4에 나타내었다:

[0223] [표 4] RSV F 단백질 서열 상동성

표 4

[0224]

RSV subtype	hRSV A (서열번호 1-128)	hRSV B (서열번호 129-177)	bRSV (서열번호 178-184)
F0 (positions 1-574)			
hRSV A (서열번호 1-128)	98%	-	-
hRSV B (서열번호 129-177)	90%	99%	-
Bovine RSV (서열번호 178-184)	81%	81%	98%
F2 (positions 26-109)			
hRSV A (서열번호 1-128)	98%	-	-
hRSV B (서열번호 129-177)	93%	99%	-
Bovine RSV (서열번호 178-184)	77%	77%	98%
F1 (positions 137-513)			
hRSV A (서열번호 1-128)	99%	-	-
hRSV B (서열번호 129-177)	95%	>99%	-
Bovine RSV (서열번호 178-184)	91%	92%	99%

[0225] RSV F 서열 보존의 관점에서, 본 기술 분야에서 통상의 지식을 가진자는 용이하게 다른 RSV 균주 아형 사이의 대응 RSV F 아미노산 위치를 식별하기 위해 서로 다른 고유 RSV F 서열 사이의 아미노산 위치를 비교할 수 있다. 예를 들어, 거의 모든 식별 된 고유의 RSV F0 전구체 단백질 걸쳐 furin 절단 부위가 동일한 아미노산 위치에 떨어진다. 따라서 균주 아형 걸쳐 RSV F 단백질 서열 보존은 RSV F 단백질에 특정 위치에서 아미노산의 비교를 위한 기준 RSV F 서열의 사용을 허용한다. 본 발명의 목적에서(문맥상 달리 표시되지 않는 한), RSV F 단백질의 아미노산 위치는 서열번호 124로 명시된 기준 F0 단백질 전구체 폴리펩티드를 참조하여 주어진다(GENBANK® Acc. No. P03420, incorporated by reference herein as present in GENBANK® on February 28, 2013).

B. PreF 항원

[0226] 격리된 항원은 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질("PreF 항원")을 포함하는 것으로 본원에 개시되어있다. PreF 항원은 면역 원성을 증가시키는 네이티브 형태에서 변형된 재조합 RSV F 단백질 또는 단편을 포함한다. 예를 들어, 개시된 재조합 RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화될 네이티브 RSV 서열로부터 변형되었다. 본 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 사람은 개시된 PreF 항원은 RSV(RSV A, RSV B, 또는 bovine RSV)를 척추 동물(예컨대, 인간 및 가축 등의 포유 동물과 같은)에서 면역 반응을 유도하기에 유용함을 이해할 것이다. 따라서, 여러 실시형태에서, 개시된 항원은 면역원이다.

[0227] D25 항체는 RSV F 단백질의 여러 프로모터를 포함하는 네 요소의 에피토프를 인식한다. 이러한 에피토프는 선융합 형태일 때, RSV F 당단백의 막 말단 정점에 위치한 항원 사이트("항원 사이트 Φ")내에 포함된다. 이러한 에피토프의 2차 구조 요소가 선융합 및 후융합 F 형태 사이에서 대부분 그래도 유지하는 반면에, 이들의 상대적인 방향은 선융합 및 후융합 형태에서 β2 가닥에 상대적으로 α4-나선 중심에서 ~180° 와 함께 주로 변화한다(도 3B). 전융합 및 후융합 형태 사이의 RSV F 단백질의 구조에서의 형태적 변화는 RSV F 단백질에 D25 에피토프의 존재를 결정한다. 따라서, 여러 실시형태에서, 선융합 형태 구조에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 PreF 항원은 항원에 대한 D25 단클론 항체의 특정한 결합을 측정함으로써 확인할 수 있다. 본 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 사람은 RSV F 단백질(예: AM22 항체 또는 5C4 항체)의 항원 사이트Φ에 특이적으로 결합하는 다른 항체를 적절히 다루고, 또는 선융합 특이적이지만 항원 사이트Φ에는 결합하지 않는(MPE8과 같은) 항체는 또한 선융합 형태에서 안정화된 RSV F 단백질을 포함하는 PreF 항원을 확인하는데 사용될 수 있다.

[0228] 따라서, 본 명세서에 개시된 PreF 항원은 특히 RSV F의 선융합의 형태가 아닌 후융합 형태에 대한 특이 항체에 의해 결합된다. 몇몇 실시형태에서, PreF 항원은 특히 D25 및/또는 AM22 항체에 의해 결합되며, RSV F 단백질의 선융합이 아닌 후융합 형태에 대한 특이적 항체이다(본원에 개시된 바와 같이). 몇몇 예에서, 선융합 특이 항체(D25 또는 AM22과 같은)는 특이적으로, 약 10^{-7}몰, 10^{-8} 몰 이하, 또는 10^{-9} 몰 이하와 같은, 약 10^{-6} 몰의 해리 상수와 함께 PreF 항원에 결합한다. 특이적인 결합은 당 업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 특이적 결합의 결정의 용이는 ELISA, immunocompetition, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance), 또는 다른 immunosorbant 분석법과 같은 루틴한 절차를 적용하여 이루어질 수 있다(Harlow 및 Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1999를 포함하여 많은 표준 서적에 개시되어 있다).

[0229] 다른 실시 예에서, PreF 항원은 RSV F 단백질의 후융합 형태에 결합하는 항체에 의해 특이적으로 결합하지 않는다. 예를 들어, 6 나선 번들에 특이적인 항체는 RSV F 단백질의 후융합 형태에서만 발견된다(Magro et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A., 109:3089-3094, 2012). 여러 실시형태에서, PreF 항원에 결합하는 RSV F 후융합 특이적 항체에 대한 해리상수는 적어도 10^{-5} 몰, 10^{-4} 몰, 또는 10^{-3}처럼, 10^{-5} 몰 보다 크다.

[0230] 몇 실시형태에서, 어느 PreF 항원은 RSV F 단백질 선융합 특이적 항체 결합 ㅎ형태(D25 또는 AM22 결합 형태)에서 RSV F 단백질 선융합 에피토프(D25 또는 AM22 에피토프와 같은)를 포함한다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 어떤 PreF 항원은 PreF 항원이 D25 또는 AM22에 의해 결합되지 않을 때, D25 또는 AM22 에피토프 결합 형태(즉, 표 1에 제시된 구조 좌표에 의해 정의된 형태)에서 에피토프를 포함하며, PreF 항원은 D25 또는 AM22 결합 형태에서 안정화된다. 개시된 PreF 항원이 RSV F 단백질 선융합 특이적 모노클로날 항체 결합 형태(D25 또는 AM22 결합 형태와 같은)에서 RSV F 단백질 선융합 에피토프(D25 또는 AM22 에피토프)를 포함하는지 여부를 결정하는 방법은 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람이라면 잘 알려져 있다(예를 들어, McLellan et al., Nature, 480:336-343, 2011; 및 U.S. Patent Application Publication No. 2010/0068217와 같은 참조가 본원에 인용되어 있다). 예를 들어, RSV F 단백질과의 복합체에서 개시된 D25 Fab 단편의 삼차원 구조는 개시된 임의의 PreF 항원의 삼차원 구조와 비교될 수 있다.

[0231] 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 사람은 개시된 PreF 항원은 항원의 구조적 좌표가 본원에 개시된 바와 같이 선융합 F 단백질들에 엄격하게 일치하지 않더라도 선융합 특정 모노클로 날 항체에 결합된 형태의 항원을 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 몇몇 실시 예에서, 개시된 임의의 PreF 항원은, RSV F 선융합 특이적 모노클로날 항체의 부재에서, 1.0, 0.75, 0.5, 0.45, 0.4, 0.35, 0.3 또는 0.25 Å/잔기보다 적은 이들의 좌표의 제곱편차(root mean square deviation; RMSD)와 함께 RSV F 선융합 특이적 모노클로날 항체와의 복합체에서, 구조적으로 상응하는 에피토프에 중첩될 수 있는 RSV F 선융합 특이적 에피토프(D25 또는 AM22 에피토프와 같은)를 포함하며, 여기서 RMSD는 적어도 세 개의 연속 아미노산을 위한 폴리펩티드 백본 원자 N, Cα, C, O에 걸쳐 측정된다.

[0232] 몇몇 실시형태에서, PreF 항원은 수용액에서 사용성이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 세제가 결여된 용액에서 가용성이다. 일부 실시형태에서, Pre F 항원은 적어도 0.5 mg/ml(적어도 1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2.0 mg/ml, 3.0 mg/ml, 4.0 mg/ml 또는 적어도 5.0 mg/ml)의 농도로 인산염 완충 식염수(pH 7.4)에 실온(섭씨 20-22)에서 용해하였으며 적어도 12시간(적어도 24 시간, 적어도 48 시간, 적어도 1주, 적어도 2주, 또는 그 이상의 시간)동안 용해된 상태로 유지하였다. 일 실시형태에서, 인산염 완충액은 pH 7.4에서 NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na_2HPO_4 (10 mM), KH_2PO_4 (1.8 mM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 인삼염 완충액은 상기에 추가적으로 $CaCl_2$ (1 mM) 및 $MgCl_2$ (0.5 mM)를 포함한다. 단백질은 시간이 지남에 따라 용액 중에 남아 있으면 당업자가 결정하는 방법을 잘 알고 있다. 예를 들어, 수용액에 용해된 단백질의 농도는 표준 방법을 사용하여 시간에 걸쳐 시험 될 수 있다.

[0233] 몇 실시형태에서, 개시된 임의의 PreF 항원은 개체에서 RSV에 대한 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있다. 몇 그러한 실시형태에서, 면역 반응의 유도는 RSV에 대한 중화 항체의 생산을 포함한다. 중화 활성에 대한 분석 방법은 당업자에게 공지 및 더 설명하고, 포함하지만, 플라크 중화 환원 (PRNT) 분석법, microneutralization 분석법(Anderson et al., J. Clin. Microbiol., 22: 1050-1052, 1985), 또는 세포 계측법 기반 분석(Chen et al., J. Immunol. Methods., 362:180-184, 2010)에 한정되는 아니다. 추가의 중화 분석은 본원에 기술되고, 이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 사람에게 익숙하다.

[0234] 일부 실시 예에서, PreF 항원 수용액에 용해하는 경우, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질의 집단을 형성하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 수용액은 예를 들면, 인산염 완충 식염수의 pH가 7.4로, 생리학적 pH일 수 있다. 일부 실시 예에서, 집단은 예를 들어, 모든 선융합 형태에서 안정화된 하나 이상의 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 균질한 집단이다. 일부 실시 예에서, 균일한 집단에서 예컨대 적어도 약 90%의 RSV F 단백질(적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%의 RSV F 단백질)는 선융합 형태에서 안정화된다. 일부 실시형태에서, 균일한 집단에서 예컨대 적어도 약 90%의 재조합 RSV F 단백질(적어도 약 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%의 재조합 RSV F 단백질)은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 결합되며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태를 포함한다(항원 사이트Φ). 이것은 특정 형태의 RSV F 단백질의 균질 집단은 변화를 포함하며, RSV F 단백질의 구조적 상태(단백질 변성 변형, 당화 상태 등)를 변경하지 않는다는 것이 이해될 것이다. 몇몇 구체 예에서, 재조합 RSV F 단백질의 집단은 시간이 지나도 균일하게 유지된다. 예를 들어, PreF 항원은 수용액에 용해될 때, 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어

도 48시간 적어도 1주 적어도 2주 또는 그 이상 동안 선융합 형태로 안정화된 재조합 RSV F 단백질의 집단을 형성하는 재조합 RSV F 단백질에 포함되어 있다.

[0235] 몇몇 실시 예에서, 분리된 PreF 항원은 실질적으로 후융합 형태의 RSV F 단백질로부터 분리된다. 따라서, PreF 항원은 예를 들어, 적어도 80% 분리되고, 적어도 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 심지어 99.9% 후융합 형태에서 RSV F 단백질로부터 분리된다. 몇몇 실시 예에서, PreF 항원은 또한 항원 부위Φ를 포함하지 않는는 RSV F 단백질로부터 분리 및/또는 특이적으로 선융합 특이적 모노클로날 항체(예를 들면 D25 또는 AM22과 같은)에 의해 결합된다. 예를 들어, PreF 항원은 항원 부위Φ를 포함하지 않는 RSV F 단백질로부터 적어도 80% 분리될 수 있고, 적어도 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 심지어 99.9% 분리 및/또는 선융합 특이적 모노클로날 항체(D25 또는 AM22)에 의해 특이적으로 결합하지 않는다.

[0236] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 수용액에서 하기와 같이 배양 후 재조합 RSV F 단백질을 포함하고, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질의 집단을 형성하고, 여기서 RSV F 단백질 선융합 특이적 항체에 특이적으로 결합하는 집단에서 적어도 70%(적어도 80%, 또는 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%)의 항원이 분리된다:

[0237] (a) 350 mM의 NaCl pH 7.0을 50℃에서 한 시간 동안 배양;

[0238] (b) 350 mM의 NaCl pH 3.5을 25℃에서 한 시간 동안 배양;

[0239] (c) 350 mM의 NaCl pH 10을 25℃에서 한 시간 동안 배양;

[0240] (d) 10 mM의 삼투압, pH 7.0을 25℃에서 한 시간 동안 배양;

[0241] (e) 3000 mM의 삼투압, pH 7.0을 25℃에서 한 시간 동안 배양;

[0242] (g) 둘 이상의 (a)-(e)의 조합; 또는

[0243] (a) 및 (b); (a) 및 (c); (a) 및 (d); (a) 및 (e); (b) 및 (d); (b) 및 (e); (c) 및 (d); (c) 및 (e); (a), (b), 및 (d); (a), (c), 및 (d); (a), (b), 및 (e); 또는 (a), (c), 및 (e)의 조합.

[0244] 다른 실시 예에서, PreF 항원은 수용액 중에서 배양할 때, 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질의 집단을 형성하고, 여기서 350 mM NaCL pH 7.0에서 10 번 동결-해동 사이클 후 선융합 특이적 항체에 특이적으로 결합하는 집단에서 적어도 60%(적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%) 항원이 분리된다.

[0245] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 후융합 형태에서 검출될 수 있는 RSV F 단백질을 포함하지 않는 균질 집단으로 제공된다. RSV F 단백질은 음성 염색 전자 현미경에 의해 검출 및/또는 후융합 항체에 의해 특이적으로 결합한다.

[0247] 1. 선융합 형태(prefusion conformation)에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질(Recombinant RSV F proteins)

[0248] 여기에 개시된 PreF 항원은 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하고 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함한다. F1 폴리펩티드, F2 폴리펩티드, 또는 둘 모두는 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질을 안정화시키는 적어도 하나의 변형(예를 들어, 아미노산 치환)을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, F2 및 F1 폴리펩티드는 펩티드 링커(예를 들어, 단쇄 RSV F 단백질을 포함한 실시 예에서)에 의해 연결되어있다. 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질의 안정화는 RSV F 선융합 특이적 모노클로날 항체(즉, 후융합 형태가 아닌 선융합 형태에서 RSV F 단백질에 특이적으로 결합하는 항체)에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 선융합 특이적 에피토프(즉, RSV F 단백질의 후융합이 아닌 선융합 형태에서 존재하는 에피토프)를 유지한다. 따라서, 개시된 PreF 항원은 특이적으로 선융합 ㅌ특이적 항체(예를 들면, D25 또는 AM22 항체)에 의해 결합, 및/또는 RSV의 F 선융합 특정 형태(항원 사이트Φ 같은)를 포함한다.

[0249] 어떤 실시형태에서, PreF 항원은 RSV A 바이러스로부터 F1 및/또는 F2 폴리펩티드, 예를 들어, 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질을 안정하게 변형하는, 서열번호 1-128, 또는 370의 하나로 제공되는 RSV F0 단백질로부터의 F1 및/또는 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 어떤 실시형태에서, PrsF 항원은 RSV B 바이러스로부터 F1 및/또는 F2 폴리펩티드, 예를 들어, 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질을 안정하게 변형하는, 서열번호 129-177의 하나로 제공되는 RSV F0 단백질로부터의 F1 및/또는 F2 폴리펩티드를 포함하는

재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 어떤 실시형태에서, PrsF 항원은 RSV bovine 바이러스로부터 F1 및/또는 F2 폴리펩티드, 예를 들어, 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질을 안정하게 변형하는, 서열번호 178-184의 하나로 제공되는 RSV F0 단백질로부터의 F1 및/또는 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 다른 RSV 아형으로부터의 F1 및/또는 F2 폴리펩티드가 사용될 수 있다. 재조합 RSV F 단백질은 PreF 항원이 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 유지하는 한, 아미노산 치환, 결실 또는 삽입, 글리코실화 및/또는 관련 없는 단백질(즉, 단백질 태그)과의 공유결합과 같은 네이티브 RSV 서열의 변형을 포함한다. 상이한 RSV 서브그룹으로부터의 RSV F 단백질뿐 아니라, 이와 같은 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및 상기 핵산 서열을 벡터로 조작 및 삽입하기 위한 방법이 본 발명에 개시되었으며 당업계에 공지되어 있다(Tan et al., PLOS one, 7: e51439, 2011; Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates 및 John Wiley & Sons, New York, N. Y. (1994)).

[0250] 어떤 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184중 어느 하나로 기재된, 예를 들어 서열번호 124, 네이티브 RSV F 단백질 서열의 적어도 아미노산 26-103 및 145-310 각각에 80% 상동하는 아미노산 서열을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드로 구성되거나 포함된다.

[0251] 어떤 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184중 어느 하나로 기재된, 예를 들어 서열번호 124, 네이티브 RSV F 단백질 서열의 적어도 아미노산 26-103 및 145-513 각각에 80% 상동하는(적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%) 아미노산 서열을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드로 구성되거나 포함된다.

[0252] 어떤 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184중 어느 하나로 기재된, 예를 들어 서열번호 124, 네이티브 RSV F 단백질 서열의 적어도 아미노산 26-103 및 145-529 각각에 80% 상동하는(적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%) 아미노산 서열을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드로 구성되거나 포함된다.

[0253] 어떤 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184중 어느 하나로 기재된, 예를 들어 서열번호 124, 네이티브 RSV F 단백질 서열의 적어도 아미노산 26-103 및 145-551 각각에 80% 상동하는(적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%) 아미노산 서열을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드로 구성되거나 포함된다.

[0254] 어떤 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 1-128 또는 370의 하나로 기재되는 RSV A 바이러스로부터의 RSV F1 및/또는 F2 폴리펩티드, 예를 들어, RSV F0 단백질로부터의 F1 및/또는 F2 폴리펩티드와 적어도 75%(예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함하는 F1 및/또는 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0255] 추가의 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 129-177의 하나로 기재되는 RSV B 바이러스로부터의 RSV F1 및/또는 F2 폴리펩티드, 예를 들어, RSV F0 단백질로부터의 F1 및/또는 F2 폴리펩티드와 적어도 75%(예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함하는 F1 및/또는 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0256] 추가의 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 178-184의 하나로 기재되는 RSV bovine 바이러스로부터의 RSV F1 및/또는 F2 폴리펩티드, 예를 들어, RSV F0 단백질로부터의 F1 및/또는 F2 폴리펩티드와 적어도 75%(예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함하는 F1 및/또는 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0257] 몇 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 위치 137-513과 같은 네이티브 F1 폴리펩티드 서열과 서열 상동성이 적어도 75%(예를 들어, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)를 가지는 어떤 폴리펩티드 서열을 포함하는, 서열번호 1-184 또는 370의 하나의 위치 137-513과 같은, 네이티브 F1 폴리펩티드 서열로부터 적어도 300 연속의 아미노산(예를 들어 적어도 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 또는 430 연속 아미노산)으로 구성되거나 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 C-말단에의 137-513, 또는 137 위치, 또는 트랜스멤브레인 도메인에의 137 위치와 같은 네이티브 F1 폴리펩티드 서열과 서열 상동성이 적어도 75%(예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)를 가지는 어떤 폴리펩티드 서열을 포함하는 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 C-말단에의 137-513, 137-481, 137-491 또는 137 위치, 또는 트랜스멤브레인 도메인 137 위치로 구성되거나 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 F 단백질을 포함한다. 본 기술분야에 통상의 지식을 가진 사람은 PreF 항원이 특이적으로 선융합 특이적 항체(예를 들면 D25 또는 AM22 항체)에 의해

결합되는 한 재조합 RSV F 단백질을 가지는 PreF 항원은 네이티브 F1 폴리펩티드 세포외 영역과 비교하여, N 또는 C 말단 절단(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 또는 그 이상의 아미노산의 삭제)과 함께 F1 폴리펩티드를 가질 수 있고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트 Φ)를 포함하는 것을 알 수 있을 것이다.

[0258] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 최대 길이, 예를 들어 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 또는 440 아미노산 보다 그 이상의 길이를 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. F1 폴리펩티드는 개시된 서열을 본질적으로 구성될 수 있고 포함될 수 있다. 개시된 연속된 F1 폴리펩티드 서열은 관련 없는 다른 서열의 끝에 서로 결합 될 수 있다.

[0259] 몇 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 위치 26-109와 같은 네이티브 F1 폴리펩티드 서열과 서열 상동성이 적어도 75%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 91%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)를 가지는 어떤 폴리펩티드 서열을 포함하는, 서열번호 1-184 또는 370의 하나의 위치 26-109와 같은, 네이티브 F2 폴리펩티드 서열로부터 적어도 60 연속의 아미노산(예를 들어 적어도 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108 또는 109 연속 아미노산)으로 구성되거나 포함하는 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 137-513 위치와 같은 네이티브 F2 폴리펩티드 서열과 서열 상동성이 적어도 75%(예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)를 가지는 어떤 폴리펩티드 서열을 포함하는 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 26-109 위치와 같은 네이티브 F2 폴리펩티드 서열로부터 70-109 연속 아미노산(예를 들어, 60-100, 75-95, 80-90, 75-85, 80-95, 81-89, 82-88, 83-87, 83-84, 또는 84-85 연속 아미노산)으로 구성되거나 포함하는 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 F 단백질을 포함한다.

[0260] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 최대 길이, 예를 들어 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87,. 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 아미노산보다 그 이상의 길이를 포함하는 F2 폴리펩티드를 포함한다. F2 폴리펩티드는 개시된 서열을 본질적으로 구성될 수 있고 포함될 수 있다. 개시된 연속된 F2 폴리펩티드 서열은 관련 없는 다른 서열(예를 들어, 비-RSV F2 단백질 서열, 비-RSV F 단백질 서열, 비-RSV, 비-바이러스성 외피, 또는 비-바이러스성 단백질 서열)의 끝에 서로 결합 될 수 있다.

[0261] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 위치 26-109와 같은 네이티브 F2 폴리펩티드 서열과 서열 상동성이 적어도 75%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 91%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)를 가지는 어떤 폴리펩티드 서열을 포함하는, 서열번호 1-184 또는 370의 하나의 위치 26-109와 같은, 네이티브 F2 폴리펩티드 서열로부터 적어도 60 연속의 아미노산(예를 들어 적어도 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108 또는 109 연속 아미노산)으로 구성되거나 포함하는 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 추가적으로 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 위치 137-513와 같은 네이티브 F1 폴리펩티드 서열과 서열 상동성이 적어도 75%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 91%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)를 가지는 어떤 폴리펩티드 서열을 포함하는, 서열번호 1-184 또는 370의 하나의 위치 137-513와 같은, 네이티브 F1 폴리펩티드 서열로부터 적어도 300 연속의 아미노산(예를 들어 적어도 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 또는 430 연속 아미노산)으로 구성되거나 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다.

[0262] 하나의 비 제한적인 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에 각각의 위치 26-109 및 137-513에 서열 상동성이 적어도 75%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 91%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)를 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는, 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 각각에 위치 26-17 및 137-513를 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0263] 전술한 바와 같이, RSV F 단백질은 F0 전구체 단백질로 초기 합성되며 진핵 세포 성숙 동안 멀티 사이트에서 절단된다. 따라서, 네이티브 RSV F 단백질은 F0 전구체 단백질의 N-말단 신호 펩티드 및 pep27 펩티드(또는 이의 일부)가 결여되어 있다. 여러 실시형태에서, 개시된 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 신호 펩티드(또는 이의 일부) 및/또는 pep27 펩티드(또는 이의 일부)를 포함하지 않는다. 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람은RSV F 신호 펩티드 및/또는 pep27 펩티드가 결여되어 있는 재조합 RSV F 단백질은 신포 펩티드 및 pep27 펩티드가 세포의 단백질 분해 효소에 의해 F0 전구체로부터 절단될 세포에서 재조합 F0 폴리펩티드를

발현함으로써 생성될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다.

[0264] 여러 실시예는, 예를 들어 개시된 재조합 RSV F 단백질의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 또는 그 이상을 포함하는 다량체인, 개시된 재조합 RSV F 단백질의 어떤 다량체를 포함하는 PreF 항원을 포함한다. 몇 실시형태에서, 개시된 재조합 RSV F 단백질의 어떤 것은 다량체를 형성하기 위해 또 다른 재조합 RSV F 단백질에 연결될 수 있다(즉, 펩티드 링커를 통해).

[0265] 어떤 변형이 단백질의 활성에 영향 없이 단백질의 아미노산 서열에서 만들어 질 수 있음을 본 기술분야에서 이해된다. 이러한 변형은 아미노산 잔기의 삽입, 아미노산 잔기의 결실, 및 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 이러한 서열에서의 변형은 변이가 자연스럽게 일어날 수 있으며 또는 본 기술분야에서 잘 알려진 유전 공학 기술을 이용하여 조작될 수 있다. 이러한 기술의 예는 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T et al., in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 9.31-9.57), 또는 in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6에서 찾을 수 있으며 본 발명에 참조로 인용되어 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 네이티브 RSV 서열에 대응하고 비교하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드, F2 폴리펩티드 또는 F1 및 F2 폴리펩티드 둘 다를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, F1 폴리펩티드, F2 폴리펩티드 또는 F1 및 F2 폴리펩티드 둘 다는 PreF 항원이 RSV F 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22)에 의해 특이적으로 결합하는, 서열번호 1-184 또는 370의 어떤 하나로 기재되는 네이티브 RSV 서열과 같은 네이티브 F1 폴리펩티드 서열과 비교하여 최대 20(예를 들어 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19) 아미노산 치환을 포함하며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어 항원 사이트Φ)를 포함한다. 추가적인 실시형태에서, F1 폴리펩티드, F2 폴리펩티드 또는 F1 및 F2 폴리펩티드 둘 다는 PreF 항원이 RSV F 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22)에 의해 특이적으로 결합하는, 서열번호 1-184 또는 370의 어떤 하나로 기재되는 네이티브 RSV 서열과 같은 네이티브 F1 폴리펩티드 서열과 비교하여 최대 20(예를 들어 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19) 아미노산 치환을 포함하며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어 항원 사이트Φ)를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서는 PreF 항원은 예를 들어, RSV F 단백질에서 존재하는 하나 이상의 핵 이행 신호를 제거하기 위해, 단백질 생산을 위한 단백질의 발현 증가에 대한 변형된 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 표준 절차를 사용하여, 부위 특이적, 비 제한적, 실시예, PCR을 이용하여, F1 또는 F2 폴리펩티드 서열을 암호화하는 염기서열(F1 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 F0 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열)의 조작은 이러한 변이체 생산에 사용된다. 대안적으로, F1 및 F2 폴리펩티드는 표준 방법을 이용하여 합성될 수 있다. 가장 간단한 변형은 유사한 생화학 성질을 가지는 아미노산에 대한 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 소위 보존적 치환(conservative 치환)은 생성된 단백질의 활성에서 최소 영향을 미칠 수 있다.

[0266] a. 변형 안정화한 막 말단(Membrane distal stabilizing modifications)

[0267] 본원에 개시된 바와 같이 RSV F 단백질은 이의 선융합 및 후융합 형태 사이의 구조적 재배열을 겪는다. 도 2B에 나타낸 바와 같이, 선융합 형태()에서 F1 폴리펩티드의 N-말단 영역은 표시된 α2, α3, β3, β4 및 α4 나선 및 베타 시트 구조를 포함하며, 여기서 후융합 구조에서 F1 폴리펩티드의 N-말단에 해당하는 영역은 연장된 α5 자선 구조-α2, α3, β3, β4, 및 α4 나선 및 베타 시트 구조가_부재인-를 포함한다. 또한, 선융합 형태(도 2A에 나타낸 바와 같이 막 근위 로브 부분에 해당하는)에서 F1 폴리펩티드의 C-말단 영역은 β22, α9, 및 β23 베타 시트 및 나선 구조를 포함하며, 여기서 후융합 형태에서 F1 폴리펩티드의 C-말단에_해당하는 영역은 연장된 α10 나선 구조 및 연장된 코일-β22, α9 및 β23 시크 및 나선 구조는 부재한다-을 포함한다. 따라서, 이의 선융합 형태에서 RSV F 단백질의 막 말단 및 막 전위는 후융합 형태에서 RSV F 단백질의 해당하는 영역으로부터 부재한 여러 구분되는 구조 요소를 포함한다.

[0268] RSV F 단백질의 선융합 및 후융합 형태에서 식별된 구조 특징으로 가이드되어, 선융합 형태에서 안정화된 RSV F 단백질의 여러 모드는 N-연결 글리코실화 사이트, 및 이의 조합을 유도하는 RSV F 단백질에서 잔기의 팩킹을 대신하여, RSV F 단백질 내에서 공동을 채우는 하나 또는 그 이상의 비 자연 이황화 결합을 유도하는 아미노산 치환을 포함하여 가능하다. 제공된 안정화 변형은 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질을 안정화하는 변형을 타켓으로 한다. 여러 실시형태에서, RSV F 단백질은 글루타르알데히드 가교와 같은, 예를 들어, RSV F 삼량체에 결합한 막의 글루타르알데히드 가교와 같은 비 특이적 가교에 의해 안정화되지 않는다.

[0269] 몇몇 비 제한적은 실시형태에서, PreF 항원은 이황화 결합의 유도에 의한 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 상기 재조합 RSV F 단백질은 S155C 및 S290C; G151C 및 I288C; A153C 및 K461C;

A149C 및 Y458C; G143C 및 S404S 치환; 또는 Y33C 또는 V469C 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 재조합 RSV F 단백질(F1 폴리펩티드의 C-말단에 연결된 Foldon 도메인)의 전구체 단백질의 비 제한적인 실시예는 본원에 개시된 서열번호 185, 189, 205, 207, 209 및 211이다. 다른 비 제한적인 실시형태에서, PreF 항원은 이황화 결합 및 하나 또는 그 이상의 공동 충전 치환의 도입에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 상기 재조합 RSV F 단백질은 S155C, S290C 치환, 및 위치 190 및/또는 207의 큰 소수성 잔기를 포함한다(S190F, S190W, 또는 S190L 치환, 및/또는 V207L, V207F, 또는 V207W 치환). 이러한 재조합 RSV F 전구체 단백질의 전구체 단백질(F1 폴리펩티드의 C-말단에 연결된 foldon 도메인을 포함)의 비 제한적인 실시예는 본원에 기재된 서열번호 371, 372, 373, 374, 375 및 376이다.

[0270] 본 명세서에 개시된 재조합 RSV F 단백질의 많은 서열은, 개체에 면역 반응을 유도하기 위한, RSV F 단백질의 기능의 본질이 아닌, 프로테아제 절단 사이트의 서열(예를 들어, 트롬빈 사이트), 단백질 태크(His tag, Strep Tag II, Avi tag, 등)을 포함한다. 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 사람은 서열을 인식하고, 적절한 경우, 태그 또는 프로테아제 절단 부위가 개시된 재조합 RSV F 단백질에 포함되지 않는 것을 이해할 것이다.

[0272] i. 비 자연 이황화 결합(Non-natural Disulfide Bonds)

[0273] 몇 실시형태에서 PreF 항원은 가교결합하는 시스테인 잔기의 쌍을 포함하는 적어도 하나의 비 자연 이황화 결합에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSC F 단백질을 포함한다. 비 자연적 이황화 결합은 네이티브 RSV F 단백질에서 일어나지 않고, 단백질 공학(비 자연적인 이황화 결합을 형성하는 하나 또는 그 이상의 치환된 시스테인을 포함하는 것에 의한)에 의해 유도된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 임의의 개시된 재조합 RSV F 단백질은 가교 결합하는 시스테인 잔기의 짝을 포함하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 이황화 결합의 어느 하나에 의해 선융합 형성에서 안정화된다. 하나의 특이적 비 제한적인 실시형태에서, 재조합 RSV 단백질은 가교 결합하는 시스테인 잔기의 단일 쌍에 의해 선융합 형태에서 안정화된다. 또 다른 비 제한적인 실시형태에서, 임의의 개시된 재조합 RSV F 단백질은 가교결합된 시스테인 잔기의 두 쌍에 의해 선융합 형태에서 안정화된다.

[0274] 이황화 결합을 형성하는 시스테인 잔기는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환에 의해 네이티브 RSV F 단백질 서열로 도입될 수 있다. 예를 들어, 어떤 실시형태에서, 단일 아미노산 치환은 네이티브 RSV F 단백질 서열에서 존재하는 시스테인 잔기와 함께 이황화 결합을 형성하는 시스테인으로 도입한다. 추가적인 실시형태에서, 두 개의 시스테인 잔기는 이황화 결합을 형성하기 위해 네이티브 RSV 서열로 도입된다. 선융합 형태에서 RSV F 단백질을 안정화하는 이황화 결합의 시스테인(또는 시스테인들)의 위치는 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 당업자라면 개시된 선융합 형태에서 RSV F 단백질의 구조, 및 이전에 밝혀진 후융합 형태에서 RSV F 단백질의 구조를 이용하여 쉽게 판단할 수 있을 것이다.

[0275] 예를 들어, 시스테인의 아미노산 위치는 전형적으로 RSV F 단백질의 선융합 형태에서 이황화 결합의 형성을 위한 충분히 가까운 거리에 있다. 이황화 결합 형성을 위해 서로가 충분히 가까운 거리 내에 있는 두 잔기를 결정하는 삼차 구조 데이터를 이용한 방법이 공지되어 있다(예를 들어, Peterson et al., Protein engineering, 12:535-548, 1999 및 Dombkowski, Bioinformatics, 19:1852-1853, 3002 (DISULFIDE BY DESIGN™에 공개), 이는 본원에 참고로 인용된다). 예를 들어, 잔기가 본원에 개시된 선융합 형태에서 RSV F 단백질의 삼차원 구조, 또는 DISULFIDEBYDESIGN™와 같은 소프트웨어를 기초로 하여 수동적으로 선택될 수 있고, 사용될 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 이황화 결합을 형성하기 위한 이상적인 거리는 일반적으로 Cα-Cα 거리에서 ~5.6Å, Sγ-Sγ 거리에서 ~2.02Å, 및 Cβ-Cβ 거리에서 3.5-4.25Å로 간주된다(최적의 rotomer). 본 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 사람은 이황화 결합의 도입을 위한 시스테인을 치환할 수 있는 삼차원 구조에서 잔기를 선택할 때 이러한 거리의 변화가 포함되어 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 일부 실시 예에서 선택된 잔기는 7.0Å 미만의 Cα-Cα 거리 및/또는 4.7Å 미만의 Cβ-Cβ 거리를 갖는다. 일부 실시형태에서 선택된 잔기는 2.0-8.0Å의 Cα-Cα 거리 및/또는 2.0-5.5Å의 Cβ-Cβ 거리를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 시스테인의 아미노산 위치는 후융합이 아닌, RSV F 단백질의 선융합 형태에서 이황화 결합의 형성을 위해 충분히 가까운 거리 내에 있다.

[0276] 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진자는 예를 들어 McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011, with structural coordinates deposited as PDB Accession No. 3RRR에 개시된 이미 공지된 후융합 구조와 표 1에 제공된 구조 좌표에 의해 개시된 선융합 구조를 비교함으로써 용이하게 RSV F 단백질의 선융합 및 후융합 형태 사이의 특정 아미노산의 상대적인 위치를 결정할 수 있다. 두 단백질 구조(선융합 및 후융합 RSV F 단백질의 삼

차 구조 사이) 사이의 특정 아미노산의 상대적 위치를 결정하는 방법은 알려져 있다. 예를 들어 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람은 두 구조를 비교하는 합성 방법이 알려져 있다(즉, LSQKAB 프로그램(Kabsch W. Acta. Cryst. A32 922-923 (1976)을 이용한 방법). 한 실시형태에서, 선융합 및 후융합 구조는 LSQKAB를 이용하여, PDB Accession No. 3RRR로 수탁된 구조 좌표에 의해 결정된 F 단백질 위치 26-60, 77-97, 220-322, 및 332-459와 함께, 두 구조 간의 특정 잔기의 편차를 동정하기 위해 선융합 및 후융합 구조에서 각 잔기를 위한 C α 원자 간의 간격을 비교하면서 표 1에 제공된 구조 좌표에 의해 결정된 F 단백질 위치 26-60, 77-97, 220-322, 및 332-459를 정렬하기 위해 합성할 수 있다.

[0277] 몇 실시형태에서, PreF 항원은 형태를 바꾸는 아미노산 위치로 도입하는 시스테인 및 선융합 및 후융합 구조 각각 사이에서 형태를 바꾸지 않는 아미노산 위치로 도입하는 시스테인 사이에 이황화 결합에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, 어떤 실시형태에서, PreF 항원은 시스테인 쌍을 도입하는 아미노산 치환을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 첫번째 시스테인은 RSV F 단백질 선융합 및 후융합 형태의 삼차원 구조 사이의 적어도 5 옹스트롬(적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10)의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation)를 가지는 RSV F 단백질의 아미노산 위치에 존재하며, 두 번째 시스테인은 RSV F 단백질 선융합 및 후융합 형태의 삼차원 구조 사이의 적어도 4 옹스트롬(적어도 3, 2 또는 1)의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation)를 가지는 RSV F 단백질의 아미노산 위치에 존재하고, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태를 포함한다(예를 들어 항원 사이트Φ).

[0278] 선융합 및 후융합 RSV F 구조의 비교에 기초하여, F1 아단위(각각의 잔기 137-216 및 461-513)의 N 및 C 말단에 위치하는, 큰 형태적 변화를 겪는 적어도 두 영역이 있다. 예를 들어, 도 2B에 나타낸 바와 같이, F1 폴리펩티드의 137-216 및 461-513 위치는 선융합 및 후융합 F 단백질 형태 사이의 구조적 재배열을 겪는 반면에, F1 폴리펩티드 217-460 위치는 상대적으로 변하지 않고 유지된다. 따라서, 어떤 실시형태에서, PreF 항원은 F1 폴리펩티드의 137-216 및 461-513의 위치의 하나의 첫 번째 시스테인, 그리고 F1 폴리펩티드 217-460의 하나의 두 번째 시스테인 간의 이황화 결합에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, PreF 항원은 F1 폴리펩티드의 137-216 및 461-513의 위치의 하나의 첫 번째 시스테인, 그리고 F2 폴리펩티드의 26-109 위치(예를 들어, 26-61 또는 77-97 위치의 하나)의 하나와 같은, F2 폴리펩티드의 위치에서 두 번째 시스테인 간의 이황화 결합에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0279] 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은, 선융합 및 후융합 구조 각각 사이에서 형태가 변하는 아미노산 위치로 도입되는 시스테인 사이의 이황화 결합에 의한 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 시스테인의 쌍을 도입하는 아미노산 치환을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 첫 번째 및 두 번째 시스테인은 RSV F 단백질 선융합 및 후융합 형태의 삼차원 구조 사이의 적어도 5 옹스트롬(적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10)의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation)를 가지는 RSV F 단백질의 아미노산 위치에 존재하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 에피토프를 포함한다(예를 들어 D25 또는 AM22 에피토프). 일부 실시형태에서, PreF 항원은 F1 폴리펩티드의 137-216 위치에 존재하는 첫 번째 및 두 번째 시스테인 사이의 이황화 결합에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, PreF 항원은 F1 폴리펩티드의 461-513 위치에 존재하는 첫 번째 및 두 번째 시스테인 사이의 이황화 결합에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, PreF 항원은 F1 폴리펩티드의 각각 137-216 및 461-513 위치에 존재하는 첫 번째 및 두 번째 시스테인 사이의 이황화 결합에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0280] 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진자는 용이하게 선융합 형태에서 RSV F 단백질의 삼차원 구조의 구조적 좌표, 및 후융합 형태에서 RSV F 단백질의 삼차원 구조의 구조적 좌표(Protein Databank Accession No. 3RRR에 기재된)를 이용하여 RSV F 단백질(및 두 형태 사이에 위치하는 임의의 다른)의 선융합 및 후융합 형태에서 특정 아미노산의 위치를 판단할 수 있다. 예를 들면, 이러한 비교 방법은 실시예 1에 기재되었다. 표 5는 시스테인 쌍 및 선융합 형태에서 RSV F 단백질을 안정화하는데 사용될 수 있는 아미노산 치환을 제공한다.

[0281] [표 5] 이황화 결합 안정화(Disulfide Bond Stabilization)를 위한 예시적인 시스테인 쌍(Cysteine Pairs)

표 5

[0282]

	시스테인 치환을 위한 F 단백질 잔기 쌍	서열번호 124에 해당하는 치환	서열번호
F1 치환 - 인트라 프로모터 이황화 결합			
1	155 및 290	S155C 및 S290C	185
2	151 및 288	G151C 및 I288C	189
3	137 및 337	F137C 및 T337C	213
4	397 및 487	T397C 및 E487C	247
5	138 및 353	L138C 및 P353C	257
6	341 및 352	W341C 및 F352C	267
7	403 및 420	S403C 및 T420C	268
8	319 및 413	S319C 및 I413C	269
9	401 및 417	D401C 및 Y417C	270
10	381 및 388	L381C 및 N388C	271
11	320 및 415	P320C 및 S415C	272
12	319 및 415	S319C 및 S415C	273
13	331 및 401	N331C 및 D401C	274
14	320 및 335	P320C 및 T335C	275
15	406 및 413	V406C 및 I413C	277
16	381 및 391	L381C 및 Y391C	278
17	357 및 371	T357C 및 N371C	279
18	403 및 417	S403C 및 Y417C	280
19	321 및 334	L321C 및 L334C	281
20	338 및 394	D338C 및 K394C	282
21	288 및 300	I288C 및 V300C	284
F2 및 F1 치환 - 인트라 프로모터 이황화 결합			
22	60 및 194	E60C 및 D194C	190
23	33 및 469	Y33C 및 V469C	211
24	54 및 154	T54C 및 V154C	212
25	59 및 192	I59C 및 V192C	246
26	46 및 311	S46C 및 T311C	276
27	48 및 308	L48C 및 V308C	283
28	30 및 410	E30C 및 L410C	285
F1 치환 - 인트라 프로모터 이황화 결합			
29	400 및 489	T400C 및 D489C	201
30	144 및 406	V144C 및 V406C	202
31	153 및 461	A153C 및 K461C	205
32	149 및 458	A149C 및 Y458C	207
33	143 및 404	G143C 및 S404S	209
34	346 및 454	S346C 및 N454C	244
35	399 및 494	K399C 및 Q494C	245
36	146 및 407	S146C 및 I407C	264
37	374 및 454	T374C 및 N454C	265
38	369 및 455	T369C 및 T455C	266
39	402 및 141	V402C 및 L141C	302
F2 및 F1 치환 - 인트라 프로모터 이황화 결합			
40	74 및 218	A74C 및 E218C	243
이황화 결합 방향에 아미노산 삽입			
41	145 및 460 (Inter), AA insertion between positions 146 및 147	S145C 및 460C; AA insertion between positions 146/147	338
42	183 및 423 (Inter), AAA insertion between positions 182 및 183	N183C 및 K423C; AAA insertion between positions 182/183	339
43	330 및 430 (Inter); CAA insertion between positions 329 및 330	A329C 및 S430C; 및 a CAA insertion between positions 329 및 330	340
조합			
44	155 및 290 (Intra); 및 402 및 141 (Inter)	S155C 및 S290C; 및 V402C 및 L141C	303
45	155 및 290(Intra); 및 74 및 218	S155C 및 S290C; 및 A74C 및 E218C	263

46	155 및 290 (Intra); 및 146 및 460 (Inter); G insertion between position 460 및 461	S155C 및 S290C; 및 S146C 및 N460C; G insertion between position 460 및 461	258
47	155 및 290 (Intra); 및 345 및 454(Inter); C insertion between positions 453 및 454	S155C 및 S290C; 및 N345C 및 N454G; C insertion between positions 453 및 454	259
48	155 및 290 (Intra); 및 374 및 454(Inter); C insertion between positions 453 및 454	S155C 및 S290C; 및 T374C 및 N454G; C insertion between positions 453 및 454	260
49	155 및 290 (Intra); 및 239 및 279(Inter); C insertion between positions 238 및 239	S155C 및 S290C; 및 S238G 및 Q279C; C insertion between positions 238 및 239	261
50	155 및 290 (Intra); 및 493 paired with C insertion between positions 329 및 330	S155C 및 S290C; 및 S493C paired with a C insertion between positions 329 및 330	262
51	183 및 428 (Inter), G insertion between positions 182 및 183	N183C 및 N428C; G insertion between positions 182 및 183	296
52	183 및 428 (Inter), C insertion between positions 427 및 428	N183C 및 N427G; C insertion between positions 427 및 428	297
53	155 및 290 (Intra); 및 183 및 428(Inter); G insertion between positions 182 및 183	S155C 및 S290C; 및 N183C 및 N428C; G insertion between positions 182 및 183	298
54	155 및 290 (Intra); 및 183 및 428(Inter); C insertion between positions 427 및 428	S155C 및 S290C; 및 N183C 및 N427G; C insertion between positions 427 및 428	299

[0283] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 5의 2 행의 하나 또는 그 이상의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 또는 54 열에서 열거한 RSV F 단백질에 위치한 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하는, 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10) 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태를 포함한다(예를 들어 항원 사이트Φ). 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 5의 3 행의 하나 또는 그 이상의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 또는 54 열에서 열거한 RSV F 단백질에 위치한 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하는, 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10) 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태를 포함한다(예를 들어 항원 사이트Φ). 표 5의 4열에 나열된 서열번호들은 신호 펩티드(signal peptide), F2 폴리펩티드(positions 26-109), pep27 폴리펩티드(positions 110-136), F1 폴리펩티드(positions 137-513), 삼량체 도메인(trimerization domain)(Foldon domain) 및 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site)(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185 위치 559-568))) 뿐만 아니라 나타내는 치환을 포함하는 아미노산 서열을 나타낸다.

[0284] 따라서, PreF 항원은 표 5의 4열의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 또는 54 열의 하나에서 나열된 서열번호와 같이, 표 5의 4행에 나열된 서열번호의 어느 하나에서 기재된 것처럼 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다. 예를 들어, PreF 항원은 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드는 표 5의 4열에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 또는 54 열의 하나에서 나열된 서열번호와 같이, 표 5의 4행에 나열된 서열번호의 어느 하나의 위치 26-109 및 137-513 각각으로 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0285] 다른 실시형태에서, PreF 항원은 표 5의 2행에서 하나 또는 그 이상의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21 열에서 열거된 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하는, 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10) 인트라

프로모터 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, PreF 항원은 표 5의 3행에서 하나 또는 그 이상의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21 열에서 열거된 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하는, 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10) 인트라 프로모터 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 이들 실시예 중 어느 하나에서, PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0286] 다른 실시형태에서, PreF 항원은 표 5의 2행에서 하나 또는 그 이상의 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28 열에서 열거된 F2 및 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하는, 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7) 인트라 프로모터 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, PreF 항원은 표 5의 3행에서 하나 또는 그 이상의 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28 열에서 열거된 F2 및 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하는, 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7) 인트라 프로모터 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 이들 실시예 중 어느 하나에서, PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0287] 다른 실시형태에서, PreF 항원은 표 5의 2행에서 하나 또는 그 이상의 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 또는 39열에서 열거된 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하는, 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10) 인트라 프로모터 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, PreF 항원은 표 5의 3행에서 하나 또는 그 이상의 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 또는 39열에서 열거된 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하는, 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10) 인트라 프로모터 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 이들 실시예 중 어느 하나에서, PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0288] 다른 실시형태에서, PreF 항원은 표 5의 40열의 2행에서 열거된 F2 및 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이의 인트라 프로모터 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, PreF 항원은 표 5의 40열의 3행에서 열거된 F2 및 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이의 인트라 프로모터 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 이들 실시예 중 어느 하나에서, PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0289] 일부 실시형태에서, 아미노산은 F 단백질 구조에서 잔기의 정렬을 조정하기 위해 F 단백질 서열로부터 삽입(또는 삭제)될 수 있으며, 이는 특정 잔기 쌍이 후융합 형태가 아닌 선융합 형태에서 인트라 또는 인트라 프로모터 이황화 결합을 형성하기 위해 충분히 가까운 거리 내에 있다. 몇 이러한 실시형태에서, PreF 항원은 표 5의 2행의 41, 42 또는 43 열의 하나 또는 그 이상에서 열거된, 아미노산 삽입 뿐만 아니라 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이에서 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, PreF 항원은 표 5의 3행의 41, 42 또는 43 열의 하나 또는 그 이상에서 열거된, 아미노산 삽입 뿐만 아니라 F1 폴리펩티드의 RSV F 위치에 위치한 시스테인 잔기 사이에서 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0290] 하나의 실시형태에서, PreF 항원은 S155C 및 S290C 치환과 함께 재조합 F1 폴리펩티드 단백질과 같은, F1 위치 155 및 290에서의 시스테인 간의 이황화 결합을 포함하는 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0291] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 5 또는 표 5b에 나열된 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합의 둘 또는 그 이상의 조합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다. 어떠한 조합이 선융합 형태에서 안정화된 RSV F 단백질의 결과를 나타내지 않는지 알 수 있다; 이러한 조합은 본 명세서에 개시된 방법, 예를 들면 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하는, 이와 같은 폴리펩티드를 포함하는 항원을 확인함으로써 확인할 수 있으며, 및/또는 RSV F 선융합 특정 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0292] 다른 실시형태에서, PreF 항원은 선융합 형태에서 F 단백질을 안정화시키는 비 자연 이황화 결합을 포함하는 재

조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 F 단백질은 표 5b의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 , 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16열의 하나에 나열된 치환을 포함하고, 여기서 시스테인 잔기는 비 자연 이황화 결합의 형성을 위한 F 단백질에 삽입된다. 이들 실시예 중 어느 하나에서, PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0293] 표 5b의 4행에 나열된 서열번호는 신호 펩티드(signal peptide), F2 폴리펩티드(positions 26-109), pep27 폴리펩티드(positions 110-136), F1 폴리펩티드(positions 137-513), 삼량체 도메인(trimerization domain)(Foldon domain) 및 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site)(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185 위치 559-568))) 뿐만 아니라 치환을 포함하는 아미노산 서열을 나타낸다. 따라서, 추가의 실시형태에서, PreF 항원은 표 5b의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16열의 하나에서 나열된 서열번호와 같이, 표 5b의 4행에 나열된 서열번호의 어느 하나에 기재된 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다. 예를 들어, PreF 항원은 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 F2 및 F1 폴리펩티드는표 5b의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16열의 하나에 기재된 서열번호와 같이, 표 5b의 4행에 기재된 서열번호의 어느 하나의 위치 26-109 및 137-513 각각으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0294] [표 5b] 대표적인 안정화된 F 단백질 치환(stabilized F protein 치환) 및 서열

[0295]

	설명	치환	서열번호
1	사슬 내 이황화	S238C, E92C	421
2	사슬 내 이황화	L193C, I59C	422
3	사슬 내 이황화	I59C, L297C	423
4	사슬 내 이황화	L297C, I292C	424
5	사슬 내 이황화	K176C, S190C	425
6	사슬 내 이황화	T189C, A177C	426
7	사슬 내 이황화	T58C, K191C	427
8	사슬 내 이황화	A424C, V450C	428
9	사슬 내 이황화	L171C, K191C	429
10	사슬 내 이황화	K176C, S190C	430
11	사슬 내 이황화	K77C, I217C	431
12	사슬 내 이황화	K427C, D448C	434
13	사슬 내 이황화	G151C, N302C	435
14	사슬 내 이황화	G151C, V300C	436
15	사슬 내 이황화	T189C, V56C	437
16	사슬 내 이황화	L171C, K191C	438

[0297] ii. 공동 충전 아미노산 치환(Cavity Filling Amino Acid 치환)

[0298] 후융합 RSV 단백질 구조(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011)와 RSV F 단백질의 선융합 형태의 구조(본 발명의 D25 Fab 복합체)의 비교는 후융합 형태로 전환하는 F를 위해 축소해야하는 선융합 형태에서 다양한 내부 공동 또는 주머니를 식별하였다. 이러한 공동은 표 6에 나열된 것들을 포함한다.

[0299] 따라서, 여러 실시형태에서, PreF 항원은 RSV F 단백질의 후융합 형태에서 축소된 내부 공동의 부피를 줄이는 아미노산을 도입하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, 공동은 이들의 작은 측쇄를 위한 큰 측쇄로 아미노산 치환을 통해 채워진다. 공동은 인트라 프로모터 공동일 수 있고, 또는 인트라 프로모터 공동이다. RSV F 공동의 하나의 예는 S190F 및 V207L 치환과 함께 이의 선융합 형태 RSV F 단백질에서 RSV 단백질을 안정화하기 위한 아미노산 치환을 채운다. 또 다른 실시형태에서, 공동은 S190F, S190L, S190W, S190H, S190M, 또는 S190Y 치환을 포함하는 이의 선융합 형태 RSV F 단백질에서 RSV 단백질을 안정화하기 위해 아미노산 치환을 채운다.

[0300] 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람이라면 적절한 공동을 식별하기 위해 RSV F단백질의 선융합 및 후융합 형태의 구조를 비교하여, 식별된 공동을 채우기 위한 아미노산 치환을 적절히 할 수 있다. 이러한 공동의 부피

를 줄이기 위한_대표적인 공동 및 아미노산 치환은 표 6에 개시되어 있다.

[0301] [표 6] 대표적인 공동 충전 아미노산 치환(cavity-filling amino acid substitution)

표 6

[0302]

열	공동(Cavity/Cavities)	아미노산 치환	서열번호
1	Ser190 및 Val207	190F 및 207L	191
2	Val207	207L 및 220L	193
3	Ser190 및 Val296	296F 및 190F	196
4	Ala153 및 Val207	220L 및 153W	197
5	Val207	203W	248
6	Ser190 및 Val207	83W 및 260W	192
7	Val296	58W 및 298L	195
8	Val190	87F 및 90L	194
9	Ser190	190F, 190L, 190W, 190H, 190M, 또는 190Y	

[0303] 표시된 공동은 공동을 채우기에 큰 잔기로 변형될 수 있는 공동에 인접한 작은 잔기에 의해 참조된다. 다른 잔기(하나 이외의 공동은 추후 명명됨)는 동일한 공동으로 채움으로써 변형될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 6의 2행에 열거된 하나 또는 그 이상의 공동의 부피를 줄이는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다. 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은 표 6의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 열에 열거된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.표 6에 나열된 서열번호들은 신호 펩티드, F2 폴리펩티드(위치 26-109), pep27 폴리펩티드(위치 110-136), F1 폴리펩티드(위치 137-513), 삼량체 도메인(a Foldon domain) 및 트롬빈 절단 사이트(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185의 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185의 위치 559-568))) 뿐만 아니라 표시된 치환을 포함하는 아미노산 서열을 나타낸다. 따라서, 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은 표 6의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8열에 열거된 어느 하나의 서열번호로 기재되는 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다. 예를 들어, PreF 항원은 표 6의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8열에 열거된 어느 하나의 서열번호로 기재된, 위치 26-109 및 137-513 각각에서 기재되는 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0304] 추가적인 실시형태에서, PreF 하원은 표 6b의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 또는 84열의 하나에 나열된 아미노산 치환을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0305] 표 6a에 나열된 서열번호들은 신호 펩티드, F2 폴리펩티드(위치 26-109), pep27 폴리펩티드(위치 110-136), F1 폴리펩티드(위치 137-513), 삼량체 도메인(a Foldon domain) 및 트롬빈 절단 사이트(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185의 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185의 위치 559-568))) 뿐만 아니라 표시된 치환을 포함하는 아미노산 서열을 나타낸다. 따라서, 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은 표 6b의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 또는 84열에 열거된 어느 하나의 서열번호로 기재되는 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태

(항원 사이트Φ)를 포함한다. 예를 들어, PreF 항원은 표 6b의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 또는 84열에 열거된 어느 하나의 서열번호로 기재된, 위치 26-109 및 137-513 각각에서 기재되는 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0306] [표 6b] 대표적인 공동 충전 아미노산 치환(cavity-filling amino acid substitution)

	설명	변이	서열번호
1	공동 충전(Cavity filling)	L23OF	391
2	공동 충전	L158F	392
3	공동 충전	L23OF, L158F	393
4	공동 충전	L2O3F	395
5	공동 충전	V187F	396
6	공동 충전	Y198F	397
7	공동 충전	Y198W	398
8	공동 충전	L2O4F	399
9	공동 충전	Y53F, L188F	400
10	공동 충전	V187F, L2O3F	401
11	공동 충전	Y198F, L2O3F	402
12	공동 충전	L141W	403
13	공동 충전	L142F	404
14	공동 충전	L142W	405
15	공동 충전	V144F	406
16	공동 충전	V144W	407
17	공동 충전	V9OF	408
18	공동 충전	L83F	409
19	공동 충전	V185F, T54A	410
20	공동 충전	I395F	411
21	공동 충전	V9OF, V185F, T54A	412
22	공동 충전	L83F, V9OF	413
23	공동 충전	L83F, V185F, T54A	414
24	공동 충전	L23OF, V9OF, I395F	415
25	공동 충전	I395F, V185F, T54A	416
26	공동 충전	L2O3F, V9OF, L23OF, L158F, S5O9F, I395F, V185F, T54A	417
27	공동 충전	I221Y	419
28	공동 충전	F14OW	439
29	공동 충전	F137W	440
30	공동 충전	S19OL, V192L	441

[0307]

[0308]

31	공통 충전	V187F, S190L, V192L	442
32	공통 충전	V187L, S190L, V192L	443
33	공통 충전	V185F V187L S190L V192L	444
34	공통 충전	V154L, V157L, V185L, V187L	445
35	공통 충전	V154L, V185L, V187L	446
36	공통 충전	V187F	447
37	공통 충전	T58L A298L	448
38	공통 충전	T58L V154L V185L V187L A298L	449
39	공통 충전	Y458W	450
40	공통 충전	L158F, I167A	451
41	공통 충전	L158W, I167A	452
42	공통 충전	L158F	453
	공통 충전	L158W	454
43	공통 충전	V56L, I167L, A298L	455
44	공통 충전	V56L, I167L, A298M	456
45	공통 충전	V56L, A167L	457
46	공통 충전	I167F	458
47	공통 충전	I167M	459
48	공통 충전	V154F	460
49	공통 충전	V56L, I167L, A298L, V154F	461
50	공통 충전	I199L, L203F	462
51	공통 충전	I199L, L203F, P205Q, I206T	463
52	공통 충전	I199L, L203F, P205E, I206K	464
53	공통 충전	I199L, L203F, V207F	465
54	공통 충전	I199L, L203F, P205Q, I206T, V207F	466
55	공통 충전	I199L, L203F, P205E, I206K, V207F	467
56	공통 충전	I199L, L203F, L83F	468
57	공통 충전	I199L, L203F, P205Q, I206T, L83F	469
58	공통 충전	I199L, L203F, P205E, I206K, L83F	470
59	공통 충전	I199L, L203F, S190L, V192L	471
60	공통 충전	I199L, L203F, P205Q, I206T, V187F, S190L, V192L	472
61	공통 충전	S55A, S190M, L203F, V207I, V296I	473

[0309]

62	공통 충전	Y53F, S55A, K176I, S190L, V207I, S259L, D263L, V296I	474
63	공통 충전	L158F, V207M, V296I	475
64	공통 충전	V56L, V207M, V296I	476
65	공통 충전	V56L, V207I, V296I	477
66	공통 충전	V56I, V207M, V296I	478
67	공통 충전	V154L, V207M, V296I	479
68	공통 충전	Y198F, V207I, T219W, V296I	480
69	공통 충전	Y198F, V207I, T219I, V296I	481
70	공통 충전	Y198F, V207M, T219W, V296I	482
71	공통 충전	Y198F, V207M, T219I, V296I	483
72	공통 충전	Y198F, V207M, T219L, V296I	484
73	공통 충전	S190Y	432
74	공통 충전	S190W	433
75	공통 충전	I206F, V207M, T219V, V296I	487
76	공통 충전	Y198F, V207M, T219L, K226M	488
77	공통 충전	Y198F, V207M, T219L, K226W	489
78	공통 충전	Y198F, V207M, T219L, K226L	490
79	공통 충전	L158F, L203F, V207I, V296I	497
80	공통 충전	F488W	498
81	공통 충전	F488R	499
82	Cavity filling test 207L	V207L	500
83	Cavity filling test 207L	S190F	501
84	공통 충전	S190M	502

[0311] iii. 치환 재충전(Repacking 치환)

[0312] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 하나 또는 그 이상의 재충전된 아미노산 치환에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 치환 재충전은 끌리는 상호작용(소수성 상호작용 또는 수소 결합 형성 등)을 증가시키거나, 단백질 내의 아미노산 사이의 반발 상호작용(유사 대전 잔기의 클러스터 간의 반발력)을 감소시킨다.

[0313] 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람이라면 본 명세서에 제공되 상호작용을 감소시키거나 증가시키기 위한 RSV F 단백질 잔기, 및 아미노산 치환 각각 간의 반발 및/또는 끌어당기는 상호작용의 적절한 사이트를 확인하기 위한 RSV F 단백질의 선융합 및 후융합 형태의 구조를 비교하는 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 개시된 선융합 형태에서 RSV F 단백질의 구조에서 반발 상호작용을 확인 및 이러한 반발 작용을 감소시키는 치환을 도입함으로써 이루어진다. 또는, RSV F 단백질은 RSV 단백질의 후융합 형태가 아닌, RSV F 단백질의 선융합 형태에서 RSV F단백질 잔기 간의 끌어들이는 상호작용을 증가시키는 치환을 포함한다. 대표적인 아미노산 치환은 표 7에서 제공된다.

[0314] [표 7] 아미노산 치환 재충전(Repacking Amino Acid 치환)

표 7

[0315]

열	치환	서열번호
1	I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	227
2	I64L, I79L, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, I214L	228
3	I64W, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	229
4	I79V, Y86F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	230
5	I64V, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199Y, L203F, V207L, I214L	231
6	I64F, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	232
7	I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, I199F, L203F, V207L, I214L	233
8	V56I, T58I, V164I, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, V296I, A298I	234
9	V56I, T58I, V164I, V179L, T189F, I291V, V296I, A298I	235
10	V56L, T58I, L158W, V164L, I167V, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, V296L	236
11	V56L, T58I, L158Y, V164L, I167V, V187I, T189F, I291V, V296L	237
12	V56I, T58W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, I291V, V296I	238
13	V56I, T58I, I64L, I79V, Y86W, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I, A298I	239
14	V56I, T58I, I79V, Y86F, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I, A298I	240
15	V56I, T58W, I64L, I79V, Y86W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I	241
16	V56I, T58W, I79V, Y86F, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I	242
17	D486N, E487Q, D489N, 및 S491A	249
18	D486H, E487Q, 및 D489H	250
19	T400V, D486L, E487L, 및 D489L	251
20	T400V, D486I, E487L, 및 D489I,	252
21	T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, 및 K498L	253
23	T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, 및 K498L	254
24	K399I, T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, E497L, 및 K498L	255
25	K399I, T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, E497L, 및 K498L	256
26	L375W, Y391F, 및 K394M	286
27	L375W, Y391F, 및 K394W	287
28	L375W, Y391F, K394M, D486N, E487Q, D489N, 및 S491A	288
29	L375W, Y391F, K394M, D486H, E487Q, 및 D489H	289
30	L375W, Y391F, K394W, D486N, E487Q, D489N, 및 S491A	290
31	L375W, Y391F, K394W, D486H, E487Q, 및 D489H	291
32	L375W, Y391F, K394M, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, 및 K498M	292
33	L375W, Y391F, K394M, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, 및 K498M	293
34	L375W, Y391F, K394W, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, 및 K498M	294
35	L375W, Y391F, K394W, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, 및 K498M	295
36	F137W 및 R339M	326
37	F137W 및 F140W	327
38	F137W, F140W, 및 F488W	328
39	D486N, E487Q, D489N, S491A, 및 F488W	329
40	D486H, E487Q, D489H, 및 F488W	330
41	T400V, D486L, E487L, D489L, 및 F488W	331
42	T400V, D486I, E487L, D489I, 및 F488W	332
43	D486N, E487Q, D489N, S491A, F137W, 및 F140W	333

44	D486H, E487Q, D489H, F137W, 및 F140W	334
45	T400V, D486L, E487L, D489L, F137W, 및 F140W	335
46	L375W, Y391F, K394M, F137W, 및 F140W	336
47	L375W, Y391F, K394M, F137W, F140W, 및 R339M	337

[0316] 따라서, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 7의 2행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 또는 47열의 하나에 나열된 아미노산 치환을 포함한 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.표 7에 나열된 서열번호들은 신호 펩티드, F2 폴리펩티드(위치 26-109), pep27 폴리펩티드(위치 110-136), F1 폴리펩티드(위치 137-513), 삼량체 도메인(a Foldon domain) 및 트롬빈 절단 사이트(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185의 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185의 위치 559-568))) 뿐만 아니라 표시된 치환을 포함하는 아미노산 서열을 나타낸다. 따라서, 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은 표 7의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 또는 47열에 열거된 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다. 예를 들어, PreF 항원은 표 7의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 또는 47열에 열거된 어느 하나의 서열번호로 기재된, 위치 26-109 및 137-513 각각에서 기재되는 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.여러 실시예는 상기 나열된 아미노산 치환의 조합을 포함한다.

[0318] iv. N-결합 글리코실화 사이트(N-Linked Glycosylation Sites)

[0319] 후융합 RSV F 단백질(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011)과 RSV F 단백질의 선융합 형태의 구조(본 명세서에 기재된 D25 및 AM22 복합체)의 비교는, 후융합 RSV F 형태(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011)에서 용제에 접근 불가능한 것이 아닌, 본 명세서에 기재된 선융합 RSV F 형태에서 용제에 접근 가능한 RSV F 단백질의 다양한 영역을 확인하였다.

[0320] 따라서, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 후융합 RSV F 형태(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011)에서 용제에 접근 불가능한 것이 아닌, 본 명세서에 기재된 선융합 RSV F 형태에서 용제에 접근 가능한 위치에서 N-결합 글리코실화 사이트를 도입하는 아미노산 치환을 초함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 이러한 아미노산 치환은 후융합 상태에 적응할 단백질을 위해 요구되는 에너지를 증가시킴으로써 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질을 안정화한다.

[0321] N-결합 글리코실화 사이트를 생성하기 위해, Asn-X-Ser/Thr (여기서 X는 Pro 를 제외한 임의의 아미노산) 서열이 도입되기 위해 요구된다. 이는 네이티브 Asn 잔기의 C-말단에 Ser/Thr 아미노산 두 잔기의 치환, 또는 네이티브 Ser/Thr 잔기의 N-말단dp Asn 아미노산 두 잔기의 치환, 또는 하나의 프롤린이 아닌 아미노산(non-proline)에 의해 분리된 Asn 및 Ser/Thr 모두의 치환에 의해 완성된다. 따라서, 여러 실시형태에서 본 명세서에 개시된 임의의 재조합 RSV F 단백질은 글리코실화된다. 예를 들어, RSV F 단백질은 McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011에 개시된 RSV F의 후융한 형태에서 용제 접근 불가능한 것이 아닌 본 명세서에 개시된 선융합 RSV F 형태에서 용제 접근 가능한 RSV F 단백질에서, N-결합 글리코실화 사이트를 도입하는 아미노산 치환을 포함한다. 대표적인 N-결합 글리코실화 사이트 변이는 표 8에서 제공된다.

[0322] [표 8] 대표적인 N-결합 글리코실화(N-linked glycosylation)

표 8

[0323]

열	N-결합된 글리코실화 사이트 위치	대표 치환	대표 서열번호
1	506	I506N 및 K508T	198

2	175	A177S	199
3	178	V178N	200
4	276	V278T	203
5	476	Y478T	204
6	185	V185N 및 V187T	214
7	160	L160N 및 G162S	215
8	503	L503N 및 F505S	216
9	157	V157N	217

[0324] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9의) F1 폴리펩티드 위치 506, 175, 178, 276, 476, 185, 160, 503, 또는 157의 N-결합 글리코실화 사이트에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다. 예를 들어, F1 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9의) F1 폴리펩티드 위치 506, 175, 178, 276, 476, 185, 160, 503, 또는 157의 N-결합 글리코실화 사이트를 도입하는 아미노산 치환을 포함한다. 표 8에 나열된 서열번호들은 신호 펩티드, F2 폴리펩티드(위치 26-109), pep27 폴리펩티드(위치 110-136), F1 폴리펩티드(위치 137-513), 삼량체 도메인(a Foldon domain) 및 트롬빈 절단 사이트(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185의 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185의 위치 559-568))) 뿐만 아니라 표시된 치환을 포함하는 아미노산 서열을 나타낸다. 일부 실시형태에서 PreF 항원은 N-결합 글리코실화 사이트 위치 506에 도입하기 위한 I506N 및 K508T 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 N-결합 글리코실화 사이트 위치 175에 도입하기 위한 A177S 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 N-결합 글리코실화 사이트 위치 178에 도입하기 위한 V178N 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 N-결합 글리코실화 사이트 위치 276에 도입하기 위한 V278T 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 N-결합 글리코실화 사이트 위치 476에 도입하기 위한 Y478T 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 N-결합 글리코실화 사이트 위치 185에 도입하기 위한 V185N 및 V187T 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 N-결합 글리코실화 사이트 위치 160에 도입하기 위한 L160N 및 G162S 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 N-결합 글리코실화 사이트 위치 503에 도입하기 위한 L503N 및 F505S 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 N-결합 글리코실화 사이트 위치 157에 도입하기 위한 V157N 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함한다. 이들 어떤 실시예 중 하나에서, PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.추가적인 실시형태에서, F1 폴리펩티드는 서열번호 198 (N-결합 글리코실화 사이트 위치 506); 서열번호 199 (N-결합 글리코실화 사이트 위치 175); 서열번호 200 (N-결합 글리코실화 사이트 위치 178); 서열번호 203 (N-결합 글리코실화 사이트 위치 276); 서열번호 204 (N-결합 글리코실화 사이트 위치 476); 서열번호 214 (N-결합 글리코실화 사이트 위치 185); 서열번호 215 (N-결합 글리코실화 사이트 위치 160); 서열번호 216 (N-결합 글리코실화 사이트 위치 503); or 서열번호 217 (N-결합 글리코실화 사이트 위치 157)의 잔기 137-513을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0325] 글리코실화된 폴리펩티드 제조 방법은 본 명세서에 개시되었으며 본 기술분야에 통상의 지식을 가진 사람이라면 익숙하다. 예를 들어, 이와 같은 방법은 미국 특허 No. 2007/0224211, No. 7,029,872; 7,834,159, 7,807,405, Wang 및 Lomino, ACS Chem. Biol., 7:110-122, 2011, 및 Nettleship et al., Methods Mol. Biol, 498:245-263, 2009에 기술되어 있으며, 본원에 각각 참고로 인용되어 있다. 일부 실시형태에서, 글리코실화된 PreF 항원은 HEK293 세포 또는, GnTI$^{-/-}$ 세포(ATCC® No. CRL-3022)와 같은 이들의 유도체와 같이, 포유 동물 세포에서 재조합 RSV F 단백질의 발현에 의해 생산된다. 일부 실시형태에서, RSV F 단백질 항원은, 예를 들어, 하이브리드 글리칸의 생산을 촉진하기 위해, 글리코실화 기계의 특정 측면을 억제하기 위해 스와이소닌(swainsonine)이 추가된 배지에서의 HEK293 세포 또는 이들의 유도체와 같은 포유 동물의 세포에서 RSV F 단백질 항원 발현을 통해 생산된다.

[0326] 몇몇 실시형태에서, 상기 F1 폴리펩티드는 표 8에 나열된 두개 또는 그 이상의 N-결합 글리코실화 사이트를 포함한다.

[0328] v. 대표적인 안정화 변형(Exemplary stabilizing modifications)

[0329] 본 기술분야의 당업자들은 PreF 항원이, 하나 또는 그 이상의 이황화 결합을 도입, RSV F 단백질의 공동 충전, RSV F 단백질에서 잔기의 충전 변경, N-결합 글리코실화 사이트 도입하는 아미노산 치환의 조합과 같은, 본 명세서에 기재된 안정화된 아미노산 치환의 하나 또는 그 이상의 조합에 의해 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함할 수 있음을 알 수 있다. 예를 들어, 몇 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 RSV F 단백질 내에 공동을 충전하는 이황화 결합을 도입하는 아미노산 치환을 포함한다.

[0330] 일부 실시형태에서, 선융합 형태에서 안덩화된 재조합 RSV F 단백질은 시스테인 쌍의 위치 155 및 290 사이의 이황화 결합, 및 공동 충전 아미노산 치환 위치 190을 포함하거나; 시스테인 짝 위치 155 및 290 사이의 이황화 결합, 공동 충전 아미노산 치환 위치 190, 및 공동 충전 아미노산 치환 위치 207을 포함한다. 예를 들어, 위치 190 및/또는 위치 207에서 공동 충전 치환은 큰 방향족 또는 소수성 아미노산 치환(티로신(tyrosine), 루이신(leucine), 페닐알라닌(phenylalanine), 히스티딘(histidine), 또는 트립토판(tryptophan))일 수 있다.

[0331] 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, 및 190F 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, 및 S190W 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, 및 S190L 아미노산 치환을 포함한다.

[0332] 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190W, 및 V207L 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190L, 및 V207L 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190F, 및 V207F 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190W, 및 V207F 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190L, 및 V207F 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190F, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190W, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190L, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다.

[0333] 몇 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 인간 RSV A 아형, 인간 RSV B 아형, 또는 bovine RSV로부터의 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 안정화된 치환의 상기 조합의 하나를 포함하는 것을 포함한다.

[0334] 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, 및 S190F 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, 및 S190W 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, 및 S190L 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, 및 S190H 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, 및 S190M 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, 및 S190Y 아미노산 치환을 포함한다.

[0335] 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV

F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190W, 및 V207L 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190L, 및 V207L 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190H, 및 V207L 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190M, 및 V207L 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190Y, 및 V207L 아미노산 치환을 포함한다.

[0336] 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190F, 및 V207F 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190W, 및 V207F 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190L, 및 V207F 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190H, 및 V207F 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190M, 및 V207F 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190Y, 및 V207F 아미노산 치환을 포함한다.

[0337] 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190F, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190W, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190L, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190H, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190M, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190Y, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다.

[0338] 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190F, V207L, 및 F488W 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-513을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하며, 나아가 S155C, S290C, S190F, 및 F488W 아미노산 치환을 포함한다.

[0339] 어떤 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호 371 (RSV A with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 372 (RSV B with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 373 (bovine

RSV with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 374 (RSV A with S155C, S290C, 및 S190F 치환), 서열번호 375 (RSV B with S155C, S290C, 및 S190F 치환); 또는 서열번호 376 (bovine RSV with S155C, S290C, 및 S190F 치환)의 위치 26-109 및 137-513 각각을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함한다.

[0340] 어떤 실시형태에서, PreF 항원은 표 8b의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 또는 54열의 하나에서 나열된 아미노산 치환을 포함하는 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 안정화된 RSV F 단백질은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합될 수 있고, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0341] [표 8b] C-말단 트롬빈 절단 Foldon 도메인(C-terminal thrombin-cleavable Foldon domain)과 함께 및 없는 대표적인 재조합 RSV F 단백질 치환 및 서열

[0342]

	설명	변이	Foldon 도메인 없는 서열번호	트롬빈 절단 Foldon 도메인 서열번호
1	DSCav1 + Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + L503E/I506K	503	552
2	DSCav1 + Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + L503E/I506K/F505W	504	553
3	DSCav1 + Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + L503E/I506K/L230F/L158F	505	554
4	DSCav1 + Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + L503E/I506K/S509F/F505W/L230F/L158F	506	555
5	DSCav1 + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/	507	556
6	DSCav1 + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	508	557
7	DSCav1 + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	509	558
8	DSCav1 + ds	(S155C, S290, S190F, V207L) + (L512C/L513C)	510	559
9	DSCav1 + ds + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + (L512C/L513C) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/	511	560

17	DSCav1 + ds + cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + L512C/L513C + F505W + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/	519	568
18	DSCav1 + ds + cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + L512C/L513C + F505W + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	520	569
19	DSCav1 + ds + cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + L512C/L513C + F505W + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	521	570
20	DSCav1 + Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + I506K/S509F/L83F/V90F	522	571
21	DSCav1 + Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + I506K/S509F/L83F/V90F/L230F/L158F	523	572
22	DSCav1 + Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + I506K/S509F/F505W/L83F/V90F/L230F/V185F/T54A	524	573
23	DSCav1 + Cavity filling	(S155C, S290, S190F, V207L) + L83F/V90F/L230F/I395F	525	574
24	DSCav1 + Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290, S190F, V207L) + I506K/S509F/F505W/L83F/V90F/L230F/L158F/I395F/V185F/T54A	526	575
25	DS + S190F + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations	S190F, S155C, S290C, F488W, L513C, A514E, I515C	527	576
26	DS + S190F + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations	S190F, S155C, S290C, F488W, L513C, A514E, G515E, 516C	528	577

[0343]

27	DS + S190F + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations	S190F, S155C, S290C, F488W, L512C, L513E, A514C	529	578
28	DS + S190F + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations	S190F, S155C, S290C, F488W, L512C, L513E, A514E, G515C	530	579
29	DS + S190F + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations plus 2 extra intrachain disulfides	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, A514E, I515C	531	580
30	DS + S190F + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations plus 2 extra intrachain disulfides	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, A514E, G515E, 516C	532	581
31	DS + S190F + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations plus 2 extra intrachain disulfides	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514C	533	582
32	DS + S190F + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations plus 2 extra intrachain disulfides	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514E, G515C	534	583
33	DS + S190F + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations plus 2 extra intrachain disulfide 및 1 extra interchain disulfide	K77C, I217C, S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, L514E, A515C	535	584

[0344]

34	DS + S19OF + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations plus 2 extra intrachain disulfide 및 1 extra interchain disulfide	K77C, I217C, S19OF, S155C, S29OC, A424C, V45OC, L171C, K191C, F488W, L513C, L514E, A515E, G516C	536	585
35	DS + S19OF + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations plus 2 extra intrachain disulfide 및 1 extra interchain disulfide	K77C, I217C, S19OF, S155C, S29OC, A424C, V45OC, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514C	537	586
36	DS + S19OF + F488W + Disulfide stabilization of C-term plus more mutations plus 2 extra intrachain disulfide 및 1 extra interchain disulfide	K77C, I217C, S19OF, S155C, S29OC, A424C, V45OC, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514E, G515C	538	587
37	DS + C-term stabilization cysteine ring	(S155C, S29OC) + L513C, 514E, 515C	539	588
38	DS + C-term stabilization cysteine ring	(S155C, S29OC) + L513C, 514E, 515E, 516C	540	589
39	DS + C-term stabilization cysteine ring	(S155C, S29OC) + L512C, 513E, 514C	541	590
40	DS + C-term stabilization cysteine ring	(S155C, S29OC) + L512C, 513E, 514E, 515C	542	591
41	DSCav1 + 512/513ds + end at residue 513	(S155C, S29OC, S19OF, V2O7L) + (L512C/L513C)	543	592
42	DSCav1 + end at residue 492	(S155C, S29OC, S19OF, V2O7L) + 486DEF to CPC	544	593
43	DSCav1	(S155C, S29OC, S19OF, V2O7L)		601
44	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + L512F	672	683

[0345]

45	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + L513F	673	684
46	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + L512F, L513F	674	685
47	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + L512Y, L513Y	675	686
48	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + L512F, L513Y	676	687
49	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + L512W, L513W	677	688
50	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + L5132W, L513Y	678	689
51	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + S5O9W	679	690
52	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + S5O9F	680	691
53	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + S5O9W, L512F	681	692
54	DSCav1 with C-terminal cavity filling mutations	S155C, S29OC, S19OF, V2O7L + S5O9W, L512F, L513F	682	693

[0346]

[0347] 표 8에 나열된 서열번호들은 표시된 치환, 신호 펩티드, F2 폴리펩티드(위치 26-109), pep27 폴리펩티드(위치 110-136), F1 폴리펩티드(위치 137-513), 및 트롬빈 절단 사이트(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185의 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185의 위치 559-568))), 또는 트롬빈 절단 사이트(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)), 삼량체 도메인(a Foldon domain), 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185의 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185의 위치 559-568)))를 포함하는 아미노산 서열을 나타낸다. 따라서, 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은 표 8b의 5행(절단가능한 Foldon 도메인) 또는 4행(Foldon 도메인 없이)의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50, 51, 52, 53, 또는 54열의 하나의 서열번호에서 기재되는 F1 폴리펩티드(예를 들어, 약 위치 137-513) 및 F2 폴리펩티드(예를 들어, 약 위치 26-109)를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0348] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 8c의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13열의 하나에 기재된 아미노산 치환을 포함하는 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 상기 안정화된 RSV F 단백질은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합되며, 및/또는 RSV 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0349] 표 8c에 나열된 서열번호들은 표시된 치환, 신호 펩티드, F2 폴리펩티드(위치 26-109), pep27 폴리펩티드(위치 110-136), F1 폴리펩티드(위치 137-513), 및 트롬빈 절단 사이트(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185의 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185의 위치 559-568)))를 포함하는 아미노산 서열을 나타낸다. 따라서, 추가의 실시형태에서, PreF 항원은 표 8c의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13열의 하나의 서열번호에서 기재된 F1 폴리펩티드(예를 들어, 약 위치 137-513) 및 F2 폴리펩티드(예를 들어, 약 위치 26-109)를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0350] [표 8c] 대표적인 재조합 RSV F 단백질 치환 및 서열

	설명	치환	서열 번호
1	Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	L503E/I506K/S509F	389
2	Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	L503E/I506K/S509F/F505W	390
3	Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	L503E/I506K/S509F/L230F/L158F	394
4	Interchain disulfide	Q279C, S238C	418
5	Cavity filling/hydrophobic patch	Q501F	420
6	cavity filling + replace hydrophilic	E82V/V207M/N227L/V296I	485
7	cavity filling + replace hydrophilic	E82V/V207I/N227L/V296I	486
8	cavity filling + prevent helix formation	L158F/Y198F/V207M/S215G/N216P/T219L	491
9	cavity filling + prevent helix formation	L158F/Y198F/V207M/S213G/S215G/T219L	492
10	cavity filling + replace hydrophilic	V56L/E82V/L203F/V207M/N227L/L230F/V296I	493
11	cavity filling + replace hydrophilic	E82V/L158F/L203F/V207M/N227L/L230F/V296I	494
12	cavity filling + replace hydrophilic	E82V/L203F/V207M/K226M/N227L/L230F/V296I	495
13	Disulfide + cavity filling	L203F/V207I/S180C/S186C/V296I	496

[0351]

[0353] b. 변형을 안정화 하는 막 근위(Membrane proximal stabilizing modifications)

[0354] 몇 실시형태에서, PreF 항원은 재조합 RSV F 단백질의 막 고정 형태를 포함한다(예를 들어, 트랜스멤브레인 도메인). 다른 실시형태에서, PreF 항원은 재조합 RSV F 단백질의 가용성 형태를 포함한다(예를 들어, 트랜스멤브레인 도메인 또는 다른 멤브레인 앵커 없이). 후술하는 것을 포함하는, 수용성 또는 멤브레인에 고정된 재조합 RSV F 단백질을 생성하기 위한 몇 상이한 방법이 있음을 알 수 있다. 예로써 삼량체화 도메인의 도입, F1의 C-말단 영역을 안정화하는 이황화 결합을 형성할 수 있는 시스테인 쌍의 도입, 및 트렌스멤브레인의 도입을 포함한다(예를 들어, PreF 항원이 고정된 멤브레인을 포함하는 적용방법).

[0355] 또한, 본 명세서에 개시된 바와 같이, 후융합 RSV F 단백질 구조(예를 들어, PDB Accession No. 3RRR로 기탁되어 McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011에 기재된)와 D25 Fab 복합체에서 RSV F 단백질 구조(선융합 형태)의 비교는 막 근위 및 막 말단 로브 모두에서 선융합 및 후융합 형태 사이의 재배열 구조를 나타낸다. 여러 실시예는 RSV F 단백질 선융합 형태의 막 근위 로브의 안정화를 RHI하는 변형을 포함한다. 이러한 변형은, 선융합 형태에서 재조합 RSV F 단백질을 안정화하는 것이 엄격하게 필요하지 않지만, 몇몇의 경우에서, 이들은

상기 기술한 바와 같이 변형을 안정화하는 다른 선융합과 함께 조합된다.

[0357] i. 삼량 도메인(Trimerization Domain)

[0358] 몇몇 실시형태에서, PreF 항원은 삼량체화 도메인과 연결되며, 예를 들어, PreF 항원은 이의 C-말단의 삼량체와 도메인과 연결된 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 삼량체화 도메인은 재조합 RSV F 단백질에서 세 개의 F1/F2 모노머의 삼량체화를 촉진한다. 다양한 외생의 다량체화 도메인은 수용성 재조합 단백질의 안정된 삼량을 촉진한다: GCN4 루이신 지퍼(Harbury et al. 1993 Science 262:1401-1407), 폐 계면 단백질의 삼량체화 모티프(Hoppe et al. 1994 FEBS Lett 344:191-195), 콜라겐(McAlinden et al. 2003 J Biol Chem 278:42200-42207), 및 파지 T4 피브리틴 Foldon(Miroshnikov et al. 1998 Protein Eng 11:329-414), 이들 중 어떤 것은, PreF 항원이 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하는 한, 재조합 F 단백질의 삼량체화를 촉진하기 위해 PreF 항원에서 F1 폴리펩티드로 연결될 수 있으며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태를 포함한다(예를 들어, 항원 사이트Φ).

[0359] 어떤 실시형태에서, PreF 항원은 GCN4 루이신 지퍼 도메인(leucine zipper domain)에 연결될 수 있으며, 예를 들어 PreF 항원은 C-말단에 연결된 GCN4 루이신 지퍼 도메인과 함께 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함할 수 있다. 특정 예에서, GCN4 루이신 지퍼 도메인은 본 명세서에 기재된 구초제의 CSGJ 시리즈에서 제공된다.

[0360] 어떤 실시형태에서, PreF 항원은 Foldon 도메인에 연결될 수 있으며, 예를 들어, PreF 항원은 C-말달에 연결된 Foldon 도메인과 함께 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, Foldon 도메인은 아미노산 서열 GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTF (서열번호 351)과 같은, T4 피브리틴 Foldon 도메인이며, 이는 β-프로펠러 형태를 채택하고, 자율적인 방식으로 접히고 삼량화될 수 있다(Tao et al. 1997 Structure 5:789-798).

[0361] 구체적인 어떤 실시형태에서, PreF 항원은 T4 피브리틴 Foldon 도메인에 연결된 재조합 RSV F 단백질을 포함하고, 서열번호 185, 189-303, 또는 371-376의 하나에서 기재되는 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함한다. 전형적으로, 이종 다량화 도메인은 예를 들어, 아미노산 링커, 서열 GG와 같은 링커를 통해 F1 폴리펩티드에 연결된다. 상기 링커는 긴 링커(예를 들어, 서열 GG, 아미노산 서열: GGSGGSGGS; 서열번호 352를 포함하는)가 될 수 있다. 다양한 평태적으로 중성인 링커는 당업계에 공지되어 있으며, PreF 항원의 형태를 방해하지 않으면서 이러한 맥락에서 사용될 수 있다. 일부 실시예는 이에 한정되지 않으나, F1 폴리펩티드 및 Foldon 도메인 간의 트롬빈 사이트와 같은 F1 폴리펩티드로부터 Foldon 도메인을 제거하기 위한 프로테아제 절단 사이트를 포함한다.

[0362] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 섹션 Ⅱ.B.1.a에 나열된 변형의 어느 하나와 같이 조합된 상기의 열거된 삼량체화 도메인 변형의 어느 하나를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 PreF 항원은 표 5의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 또는 51열의 하나에 기재된 하나 또는 그 이상의 이황화 결합 변형, 및/또는 표 6의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8열의 하나에서 기재된 하나 또는 그 이상의 공동 충전 변형, 및/또는 표 7의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 또는 47열의 하나에서 기재된 하나 또는 그 이상의 재충전 변형, 및/또는 표 8의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9열의 하나에서 기재된 하나 또는 그 이상의 글리코실화 변형과 조합에서 상기 기재된 삼량체화 도메인 변형의 어느 것을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 EH는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트 Φ)를 포함한다.

[0363] 일부 실시형태에서, PreF 항원은, 시스테인 쌍 위치 155 및 290 사이의 이황화 결합, 및 위치 190에서 공동 충전 아미노산 치환을 포함하는; 또는 시스테인 쌍 위치 155 및 290 사이의 이황화 결합, 위치 190에서 공동 충전 아미노산 치환, 및 위치 207에서 공동 충전 아미노산 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드에 연결된 상기 나열된 삼량체화 도메인 변형의 어느 하나를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0364] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 S155C, S290C, 및 S190F 아미노산 치환, S155C, S290C, 및 S190W 아미노산 치환, 또는 S155C, S290C, 및 S190L 아미노산 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드에 연결된 상기 기재된 삼량체화 도

메인 변형의 어느 하나를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, PreF 항원은 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W, 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190L, 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190F, 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W, 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190L, 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190F, 및 V207W 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W, 및 V207W 아미노산 치환, 또는 S155C, S290C, S190L, 및 V207W 아미노산 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드에 연결된 상기 기재된 삼량체화 도메인 변형의 어느 하나를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0365] 예를 들어, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 서열번호 185, 서열번호 189, 서열번호 201, 서열번호 202, 서열번호 205,서열번호 207,서열번호 209,서열번호 213,서열번호 244,서열번호 245,서열번호 247,서열번호 257,서열번호 264, 서열번호 265,서열번호 266,서열번호 267,서열번호 268,서열번호 269, 서열번호 270,서열번호 271,서열번호 272,서열번호 273,서열번호 274,서열번호 275,서열번호 277,서열번호 278,서열번호 279,서열번호 280,서열번호 281, 서열번호 282, 서열번호 284, 서열번호 302, 서열번호 303, 서열번호 190, 서열번호 211, 서열번호 212, 서열번호 243, 서열번호 246, 서열번호 276, 서열번호 283, 서열번호 285, 또는 서열번호 263의 어느 하나에서 각각 위치 26-109 및 137-544에 기재된 아미노산 서열을 포함하거나; 서열번호 258, 서열번호 259, 서열번호 260, 서열번호 261, 서열번호 262, 서열번호 296, 서열번호 297, 서열번호 298, 또는 서열번호 299의 어느 하나의 위치 26-109 및 137-545 각각에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22)에 특이적으로 결합하며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0366] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 foldon 도메인과 연결된 F1 폴리펩티드는 서열번호 371 (S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환된 RSV A), 서열번호 372 (S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환된 RSV B), 서열번호 373 (S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환된 bovine RSV), 서열번호 374 (S155C, S290C, 및 S190F 치환된 RSV A), 서열번호 375 (S155C, S290C, 및 S190F 치환된 RSV B); 또는 서열번호 376 (S155C, S290C, 및 S190F 치환된 bovine RSV)의 어느 하나에서 위치 26-109 및 137-544로 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22)에 특이적으로 결합하며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0367] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 인간 RSV A 아형, 인간 RSV B 아형, 또는 bovine RSV로부터의 F1 폴리펩티드 및 F2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 상기 기재된 삼량체화 변형으리 어느 하나와 연결되며, F1 폴리펩티드는 또는 본 명세서에 기재된 안정화된 변형(예를 들어, S155C, S290C, 및 S190F 치환, 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환과 같은 상기 안정화된 치환의 조합의 하나)의 어느 하나를 추가적으로 포함한다.

[0368] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F단백질을 포함하며, 하나 또는 그 이상의 공동 충전 아미노산 치환 및 Foldon 도메인을 포함하며, 여기서 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 서열번호 191, 서열번호 193 , 서열번호 196, 서열번호 197, 서열번호 248, 서열번호 192, 서열번호 195, or 서열번호 194의 어느 하나에서 위치 26-109 및 137-544 각각에서 기재되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22)에 특이적으로 결합하며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0369] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F단백질을 포함하며, 하나 또는 그 이상의 재충전 아미노산 치환 및 foldon 도메인을 포함하며, 여기서 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 서열번호 249, 서열번호 250, 서열번호 251, 서열번호 252, 서열번호 253, 서열번호 254, 서열번호 255, 서열번호 256, 서열번호 288, 서열번호 289, 서열번호 290, 서열번호 291, 서열번호 292, 서열번호 293, 서열번호 294, 서열번호 295, 서열번호 296, 서열번호 297, 서열번호 326, 서열번호 327, 서열번호 328, 서열번호 329, 서열번호 330, 서열번호 331, 서열번호 332, 서열번호 333, 서열번호 334, 서열번호 335, 서열번호 336, 또는 서열번호 337의 어느 하나에서 위치 26-109 및 137-544 각각에서 기재되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22)에 특이적으로 결합하며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0370] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F단백질을 포함하며, 하나 또는 그 이상의 N-결합 글리코실화 사이트 및 Foldon 도메인을 포함하며, 여기서 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴

리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 서열번호 198, 서열번호 199, 서열번호 200, 서열번호 203, 서열번호 204, 서열번호 214, 서열번호 215, 서열번호 216, 또는 서열번호 217로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 서열번호에서 위치 26-109 및 137-544 각각에서 기재되는 아미노산 서열을 포함하고; 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22)에 특이적으로 결합하며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0371] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 5b의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16열의 하나에 기재된 아미노산 치환을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서, 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 Foldon 도메인에 결합ehlsek. 일부 실시예는, 예를 들어 트롬빈 절단 사이트와 같은 F1 폴리펩티드로부터 Foldon 도메인을 제거하기 위한 프로테아제 절단 사이트를 포함한다.

[0372] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하여, RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F단백질을 포함하며, 여기서 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 표 5b의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16열의 하나에서 기재된 서열번호의 하나에서 위치 26-109 및 137-544 각각에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 여러 실시형태에서, Foldon 도메인에 연결된 F1 폴리펩티드는 한정되지는 않지만 F1 폴리펩티드 및 Foldon 도메인 사이의 트롬빈 사이트와 같은 프로테아제 절단 사이트를 추가적으로 포함한다.

[0373] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 6b의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 또는 84열의 하나에서 나열된 아미노산 치환을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 Foldon 도메인에 결합된다.

[0374] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하여, RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F단백질을 포함하며, 여기서 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 표 6b의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 또는 84열의 하나에서 기재된 서열번호의 하나에서 위치 26-109 및 137-544 각각에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0375] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하고, 여기서 상기 재조합 RSV F 단백질은 표 8b의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50, 51, 52, 53, 또는 54열의 하나에 나열된 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 Foldon 도메인에 연결된다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하여, RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F단백질을 포함하며, 여기서 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 표 8b의 5행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 또는 54열의 하나에서 나열된 서열번호의 하나의 위치 26-109 및 137-544 각각에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 서열은 F1 폴리펩티드 및 Foldon 도메인 산이의 트롬빈 절단 사이트를 포함한다.

[0376] 다른 실시형태에서, PreF 항원은 RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F단백질을 포함하며, 여기서 상기 재조합 RSV F 단백질은 표 8c의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13열에 기재된 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩티드는 Foldon 도메인에 결합한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하여, RSV F 단백질 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F단백질을 포함하며, 여기서 Foldon 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 표 8c의 4행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13열의 하나에서 나열된 서열번호의 하나의 위치 26-109 및 137-544 각각에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0377] 변형된 Foldon 도메인은, 예를 들어, GYIPEAPRDGQCYVRCDGEWVLLSTF (서열번호 694), GYIPECPRDGQAYVCKDGEWVLLSTF (서열번호 695), GYIPEAPRDGQCYCRKDGEWVLLSTF (서열번호 696), or

GYIPEAPRDGQACVRKDGECVLLSTF (서열번호 697)로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 Foldon 도메인으로 사용될 수 있다. 이러한 변형된 Foldon 도메인은 안정화된 이황화 결합의 형성을 위한 두 개의 시스테인 잔기를 추가한 아미노산 치환을 포함한다. 대표적인 변형된 Foldon 도메인과 결합된 DSCav1 아미노산 치환을 포함하는 RSV F 단백질 서열은 서열번호 651, 서열번호 652, 서열번호 653, 및 서열번호 654으로 기재된 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 기재된 재조합 RSV F단백질의 어느 것은 본 명세서에 기재된 변형된 Foldon 도메인으로 결합할 수 있다.

[0379] ii. 이황화 결합(Disulfide Bonds)

[0380] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 재조합 RSV F 단백질의 막 근위 로브를 안정화하는데 사용하는 하나 또는 그 이상의 이황화 결합을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 이황화 결합을 형성하는 시스테인 잔기는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환에 의해 재조합 RSV F 단백질로 도입될 수 있다.

[0381] 선융합 형태에서 RSV F 단백질의 막 근위 로브의 안정화를 위한 이황화 결합의 시스테인(또는 시스테인 들)의 위치는 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 용의하게 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이황화 결합의 링은 α10 나선의 아미노산을 위한 시스테인 잔기의 치환에 의해 F1 폴레펩티드의 C-말단으로 도입된다. 코일-코일(coil-coil)을 위한 세 개의 RSV F 엑토도메인(Ectodomain) α10 나선은 단백질의 막 근위 부분을 안정화한다. 세포에서 발현될 때, 인터 프로모터 이황화 결합은, 근접한 세 α10 나선을 "locking"하기 때문에 α10 나선으로 도입된 시스테인 사이에서 형성하고 선융합에서 후융합 형태까지 막 근위 도메인의 이동을 방지한다. RSV F 단백질의 α10 나선은 트랜스멤브레인 도메인(잔기 529)의 잔기 492를 포함한다.

[0382] 일부 실시형태에서, PreF 항원은, RSV F 포지션 486 및 487에 위치하는 시스테인 잔기 사이, 또는 RSV F 포지션 512 및 513에 위치하는 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트Φ)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 F1 폴리펩티드는 D486C 및 E487C 치환, L512C 및 L513C 치환, 또는 D486C, E487C, L512C, 및 L513C 치환를 각각 포함한다.

[0383] 일부 실시형태에서, 아미노산은, 특정 잔기 쌍이 이황화 결합을 형성하도록 충분히 가까운 거리 내에 있으며, F 단백질 구조에서 잔기의 정렬을 맞추기 위해 F 단백질 서열로부터 삽입(또는 삭제)될 수 있다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 포지션 486 및 487 사이에 삽입된 프롤린과 함께, 486 및 487에 위치한 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(즉, D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어 항원 사이트Φ)를 포함한다. 일부 실시형태에서, F1 폴리펩티드는 D486C 및 E487C 치환 및, 486 및 487 위치 사이의 프롤린 삽입을 포함한다.

[0384] 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은, 포지션 493에 위치하는 시스테인 잔기 및 포지션 329 및 330 사이에 삽입된 시스테인 사이의 이황화 결합을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트Φ)를 포함한다. 일부 실시형태에서, F1 폴리펩티드는 S493C 치환 및, 포지션 329 및 330 사이에 삽입된 시스테인 잔기를 포함한다.

[0385] 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은, 포지션 493에 위치하는 시스테인 잔기 및 포지션 329 및 330 사이에 삽입된 시스테인 사이의 이황화 결합을 포함하고, 추가적으로 잔기 492 및 493 사이에 삽입된 시스테인 잔기를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트Φ)를 포함한다. 일부 실시형태에서, F1 폴리펩티드는 S493C 치환, 포지션 329 및 330 사이에 삽입된 시스테인 잔기, 및 잔기 492 및 493 사이의 삽입된 글라이신을 포함한다.

[0386] 추가적인 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 포지션 525 및 526, 512 및 513, 및/또는 519 및 520의 α10 나선에서 시스테인 치환을 포함하며, 이는 F1 폴리펩티드의 C-말단 영역을 안정화하기 위한 인터프로토머 이황화 결합을 형성할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 표 23에 나열한 "모티프"의 어떤 것을 포함할 수 있다. 추가적인 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은, 추가적으로 이러한 서열에서 포함된 정제 태그 및 삼량체화 도메인 포함 없이, 서열번호 829-1025 또는 1456-1468의 어느 하나에 기재된 아미노산 서열과 비교하여 적어도 80%(적어도 90%, 적어도 95% 적어도 98% 동일)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0387] 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 포지션 512로부터 연장된 C-말단, CCHNVNAGKSTTN (서열번호 844의

잔기 512-524) 또는 CCHNVNACCSTTN (서열번호 849의 잔기 X-Y)의 하나로 기재된 아미노산 서열; 또는 CCHNVNACCSTTNICCTT (서열번호 853의 잔기 512-529)을 포함한다.

[0388] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 섹션 Ⅱ.B.1.a에 나열한 안정화 변형의 어떤 것과 함께 조합한, RSV F 단백질의 막 근위 로브를 안정화하기 위한 상기 이황화 결합 변형의 어떤 것을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 5의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 또는 51의, 또는 표 5b에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16열의, 또는 하나에서 나열된 이황화 결합 치환과 함께, 또는 표 6의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8열의, 또는 표 6b의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 또는 84열의 하나에서 나열된 공동 충전 치환과 함께, 또는 표 7의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 또는 47열의 하나에서 나열된 재충전 치환, 또는 표 8의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9열의 하나에서 나열된 글리코실화 변형, 또는 표 8b의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50, 51, 52, 53, 또는 54열에 나열된 치환, 또는 표 8c의 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13열에서 열거된 치환과 함께 조합된 상기 나열된 RSV F 단백질의 RSV F 단백질의 막 근위 로브를 안정화하기 위한 상기 이황화 결합 변형의 어떤 것을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0389] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 상기 나열한 RSV F 단백질의 막 근위 로브를 안정화하기 위한 이황화 결합 변형의 어떤 것을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며 위치 155 및 290에서의 시스테인 쌍, 및 위치 190에서 공동 충전 아미노산 치환 사이의 이황화 결합; 또는 위치 155 및 290에서의 시스테인 쌍, 위치 190에서의 공동 충전 아미노산 치환, 및 위치 207에서의 공동 아미노산 치환 사이의 이황화 결합을 포함하는 F1 폴리펩티드를 추가적으로 포함한다.

[0390] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 상기 나열한 RSV F 단백질의 막 근위 로브를 안정화하기 위한 이황화 결합 변형의 어떤 것을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며 S155C, S290C, 및 S190F 아미노산 치환, S155C, S290C, 및 S190W 아미노산 치환, 또는 S155C, S290C, 및 S190L 아미노산 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 추가적으로 포함한다. 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은 상기 나열한 RSV F 단백질의 막 근위 로브를 안정화하기 위한 이황화 결합 변형의 어떤 것을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W, 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190L, 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190F, 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W, 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190L, 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190F, 및 V207W 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W, 및 V207W 아미노산 치환, or S155C, S290C, S190L, 및 V207W 아미노산 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 추가적으로 포함한다.

[0391] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 서열번호 371 (RSV A with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 372 (RSV B with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 373 (bovine RSV with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 374 (RSV A with S155C, S290C, 및 S190F 치환), 서열번호 375 (RSV B with S155C, S290C, 및 S190F 치환); 또는 서열번호 376 (bovine RSV with S155C, S290C, 및 S190F 치환)의 어느 하나의 위치 26-109 및 137-513 각각으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 재조합 RSV F 단백질은 상기 나열된 RSV F 단백질의 막 근위 로브를 안정화하는 이황화 결합 변형의 어느 것을 추가적으로 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0392] 몇 실시형태에서, PreF 항원은 인간 RSV A 아령, 인간 RSV B 아형 또는 bovine RSV를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 재조합 RSV F 단백질은 추가적으로 상기 나열된 RSV F 단백질의 막 근위 로브를 안정화하는 이황화 결합 변형의 어느 것을 포함하며, 또한 여기서 F1 폴리펩티드는 추가적으로 본 명세서에 기재

된 안정화 변형(S155C, S290C, 및 S190F 치환, 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환과 같은 치환을 안정화하는 상기 조합의 하나)의 어느 것을 포함한다.

[0394] iii. 트랜스멤브레인 도메인(Transmembrane Domains)

[0395] 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 F1 폴리펩티드와 연결된 트랜스멤브레인 도메인을 포함한다(예를 들어, PreF 항원에 고정된 멤브레인을 포함하는 적용). 예를 들어, 트랜스멤브레인 서열의 존재는 멤브레인 소포(membrane vesicle) 제조로써 발현에 유용한다. 상기 트렌스멤브레인 도메인은, S155C/S290C 시스테인 치환과 함께 F1 단백질과 같이 상기 언급된 변형을 안정화하는 어떤 것을 포함하는 F1 단백질에 결합할 수 있다. 추가적으로, 트렌스멤브레인 도메인은 RSV F1 세포질 꼬리에 추가적으로 연결될 수 있다. 신호 펩티드, F1 폴리펩티드(포지션 26-109), pep27 폴리펩티드(포지션 110-136), F1 폴리펩티드(포지션 137-513), RSV 트랜스멤브레인 도메인을 포함하는 대표예들은 서열번호 323 (시토졸(cytosolic) 도메인 없이) 및 서열번호 324 (시토졸 도메인과 함께)로 제공된다.

[0396] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 구역 Ⅱ.B.1a에 나열된 안정화 변형의 어떤 것과 함께 조합된, 트랜스멤브레인 도메인에 열결된 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, PreF 항원은 트랜스멤브레인 도메인에 연결된 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 또한 표 5의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 또는 51열 또는 표 5b의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16열의 하나에서 나열된 이황화 결합 치환, 또는 표 6의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8열 또는 표 6b 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 또는 84열의 하나에서 나열된 공동 충전 치환, 또는 표 7의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 또는 47열의 하나에서 나열된 재충전 치환, 또는 표 8의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9열에 나열된 글리코실화 변형, 또는 표 8b 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50, 51, 52, 53, 또는 54열에 나열된 치환, 또는 표 8c 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13열에 나열된 치환을 추가적으로 포함하여, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트 Φ)를 포함한다.

[0397] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 트랜스멤브레인 도메인과 연결된 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 추가적으로 포지션 155 및 290의 시스테인의 쌍 및 포지션 190의 공동 충전 아미노산 치환 사이의 이황화 결합; 또는 포지션 155 및 290의 시스테인 쌍, 포지션 190의 공동 충전 아미노산 치환, 포지션 207의 공동 충전 아미노산 치환 사이의 이황화 결합을 포함한다.

[0398] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 트랜스멤브레인 도메인과 연결된 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 추가적으로 S155C, S290C, 및 S190F 아미노산 치환, S155C, S290C, 및 S190W 아미노산 치환, 또는 S155C, S290C, 및 S190L 아미노산 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, PreF 항원은 트랜스멤브레인 도메인과 연결된 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 추가적으로 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W, 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190L, 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190F, 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W, 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190L, 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190F, 및 V207W 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W, 및 V207W 아미노산 치환, 또는 S155C, S290C, S190L, 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다.

[0399] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 트랜스멤브레인 도메인과 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 트랜스멤브레인 도메인에 연결된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 서열번호 371 (RSV A with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 372 (RSV B with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 373 (bovine RSV with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 374

(RSV A with S155C, S290C, 및 S190F 치환), 서열번호 375 (RSV B with S155C, S290C, 및 S190F 치환); 또는 서열번호 376 (bovine RSV with S155C, S290C, 및 S190F 치환)의 어느 하나의 위치 26-109 및 137-513에서 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트Φ)를 포함한다.

[0400] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 인간 RSV A 아형, 인간 RSV B 아형 또는 bovine RSV를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 상기 나열된 트랜스멤브레인의 어느 하나에 연결되고, F1 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 안정화 변형의 어느 하나를 추가적으로 포함한다(S155C, S290C, 및 S190F 치환, 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환과 같은 치환을 안정화하는 상기 조합의 하나).

[0402] iv. 공동 충전 치환(Cavity filling 치환)

[0403] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 재조합 RSV F 단백질의 막 근위 로브를 안정화하는데 사용되는 하나 또는 그 이상의 공동 충전 치환을 포함하는 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 V207L 및 L512F; L513F; L512F 및 L513F; L512Y 및 L513Y; L512F 및 L513Y; L512W 및 L513W; L5132W 및 L513Y; S509W; S509F; S509W 및 L512F; 또는 S509W, L512F 및 L513F 치환과 함께 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하며, 여기서 PreF 항원은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트Φ)를 포함한다. 치환과 함께한 대표적인 서열은 서열번호 672-682를 포함한다.

[0405] c. 항원 사이트(Antigenic sites)

[0406] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 포함하며 항원 사이트Φ 이외의 공지된 항원 사이트를 제거하기 위한 변형을 추가적으로 포함한다. 예를 들어, 재조합 RSV F 단백질을 항원 사이트 Ⅰ, Ⅱ 또는 Ⅳ를 방해하는 변형을 포함한다. 이러한 변형은 예를 들어, 이러한 사이트에 대해 특이적인 항체의 결합에 의해 식별될 수 있다.

[0407] 일부 실시형태에서, 항원은 항원 사이트 Φ를 제거하기 위한 변형을 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 것으로 제공된다. 이러한 항원은 예를 들어 컨트롤 시약과 같이 유용하다. 항원 사이트 Φ 및/또는 항원 사이트 Ⅱ를 제거하는 대표적인 변형은 표 8c1에 나열되었다.

[0408] [표 8c1] 대표적인 재조합 RSV F 단백질 치환 및 서열

	설명	치환	서열번호
1	knock out site Φ binding	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T +Avi-tag	655
2	knock out site II binding	Q270T +Avi-tag	656
3	knock out site II binding	N268R/K272E +Avitag	657
4	knock out site Φ binding	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T +Avi-tag	658
5	knock out site II binding	Q270T +Avi-tag	659
6	knock out site II binding	N268R/K272E +Avitag	660
7	knock out site Φ 및 II binding	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T, Q270T+Avi-tag	661
8	knock out site Φ 및 II binding	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T,N268R/K272E+Avi-tag	662
9	knock out site Φ 및 II binding	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T, Q270T+Avi-tag	663
10	knock out site Φ 및 II binding	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T,N268R/K272E+Avi-tag	664

[0409]

[0410] d. 단쇄 RSV F 단백질(Single Chain RSV F proteins)

[0411] 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 단쇄 RSV F 단백질이며, 이는 RSV F1 폴리펩티드 및 RSV F2 폴리펩티드를 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 본 명세서에 개시된 단쇄 RSV F 단백질은 퓨린 절단 사이

트 측면의 RSV F 단백질의 pop27 폴리펩티드를 포함하지 않으며; 따라서, 세포 내에서 생산될 때, F 폴리펩티드는 F1 및 F2 폴리펩티드로 분해하지 않는다. 일부 실시형태에서, F1 및 F2 폴리펩티드의 나머지 부분은 펩티드 링커와 같은 링커에 의해 결합된다.

[0412] 일부 실시형태에서, F2, pep27, 및 F1 서열을 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬은 생성된다. 단쇄 RSV F 단백질은 pep27 서열을 포함할 수 있으며, 또는 상기 서열은 제거될 수 있다. 또한, pep27 서열이 제거된 대표예에서, 링커(예를 들어 펩티드 링커)는 재조합 단쇄 RSV F 단백질에서 F2 및 F1 폴리펩티드 사이에 배치될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단괘 RSV F 단백질은 두 퓨린 절단 사이트, pep27 폴리펩티드, 및 융합 펩티드를 제거하는 RSV F 포지션 98-149 또는 106-149의 제거를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단쇄 RSV 단백질은 RSV F 포지션 98-136, 98-144, 98-149, 106-136, 104-144, 또는 106-144를 포함한다.

[0413] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 안정화 변이(예를 들어, 섹션 (B.1.a)에서 (b.1.c)까지)는 단쇄 RSV F 단백질에서 포함될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 단쇄 RSV F 단백질은 S155C 및 S290C 치환; S155C, S290C 및 S190F 치환, 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, PreF 항원은 표 8d 3행의 1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7열의 하나에서 나열된 아미노산 치환을 포함하는 선융합 형태에서 안정화된 단쇄 형태에서 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 안정화된 RSV F 단백질은 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트 Φ)를 포함한다.

[0414] 대표적인 서열은 표 8d에 기재되었다. 표 8d에 나열된 서열번호들은 표시된 치환, F2 폴리펩티드(위치 26-109), pep27 폴리펩티드(위치 110-136), F1 폴리펩티드(위치 137-513), 및 트롬빈 절단 부위(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185의 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185의 위치 559-568))) 또는 트롬빈 절단 부위(LVPRGS (서열번호 185의 위치 547-552)), 삼량체화 도메인(Foldon domain) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호 185의 위치 553-558)) 및 Strep Tag II (SAWSHPQFEK (서열번호 185의 위치 559-568)))를 포함하는 아미노산 서열로 기재된다. 따라서, 추가적인 실시형태에서, PreF 항원은 표 8d 4행(Foldon 도메인 없이) 또는 5행(절단 가능한 Foldon 도메인과 함께)의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, or 14열의 하나에서 나열된 서열번호로 기재되는, F1 폴리펩티드(예를 들어, 위치 137-513) 및 F2 폴리펩티드(예를 들어, 위치 26-109)를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 추가적인 대표적인 단쇄 RSV F 단백질 변이 및 서열은, 예를 들어 표 8e(34-43열) 및 표 18에 개시되어 있다.

[0415] [표 8d] 단쇄 재조합 RSV F 단백질

	설명	변이	Foldon 도메인 없는 서열번호	트롬빈 절단 Foldon 도메인 서열번호
1	Single chain DS	S155C, S290C	545	594
2	Single chain Cav1	S190F, V207L	546	595
3	Single chain F488W	F488W	547	596
4	Single chain DSCav1	(S155C, S290, S190F, V207L)	548	597
5	Single chain DS + F488W	(S155C, S290C) + F488W	549	598
6	Single chain Cav1 + F488W	(S190F, V207L) + F488W	550	599
7	Single chain DSCav1 + F488W	(S155C, S290, S190F, V207L) + F488W	551	600
8	add cav1 to SEQ ID NO: 320 single chain	add cav1 to SEQ ID NO: 320 single chain	665	
9	add cav1, F488W to SEQ ID NO: 320] single chain	add cav1, F488W to SEQ ID NO: 320] single chain	666	
10	add cav1 to SEQ ID NO: 319 single chain	add cav1 to SEQ ID NO: 319 single chain	667	
11	add cav1 F488W to SEQ ID NO: 319 single chain	add cav1 F488W to SEQ ID NO: 319 single chain	668	
12	single chain with improved linker	155C, S290C, S190F, V207L, GS linker between 105/145		669 (not a cleavable Foldon)
13	single chain with improved linker	155C, S290C, GS linker between residue 105 to 145	670	
14	single chain with improved linker	155C, S290C, GS linker between residue 105 to 145	671	

[0416]

[0418] 선융합 형태에서 안정화되는 추가적인 단쇄 RSV F 단백질의 서열은 비분해성 Foldon 도메인과 함께, 절단성 Foldon 도메인과 함께, 및 단백질 나노입자 단위와 결합되는 단쇄 RSV F 단백질을 포함하며, 표 19에 개시되었다

[0420] 2. 최소 사이트 Φ면역원(Minimal Site Φ Immunogens)

[0421] RSV F의 사이트 Φ 에피토프는 삼량 스파이크(spike)의 정점에 위치하며 세 개의 중화항체 D25, AM22 및 5C4에 의해 인식된 영역을 포함한다. 보다 구체적으로, RSV F/D25 복합체의 결정 구조에 의해 묘사된 것처럼, 이러한 에피토프는 나선 α(잔기 196-209)의 외부 표면 및 α2 및 α1 사이의 인접한 루프(잔기 63-68)을 포함한다. 본 명세서에서 제공되는 면역원은 RSV F 단백질의 최소 측면을 포함하며, 예를 들어, RSV에 대한 면역 반응을 유도하고 항체를 인식 또는 검출하기 위한 프로브로써 RSV F 단백질 항체에 특이적으로 결합하기 위한 사용에 유용하다. 따라서, 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은 RSV에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 필요한 최소한의 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, RSV F 단백질은 표 20에서 기재되는 서열에 적어도 80% 상동성을 가지는 아미노산을 포함하거나 구성된다. 추가적인 실시형태에서, 재조합 RSV F 단백질은, 예를 들어 서열번호 1027-1052로 기재되는, 표 20에서 기재되는 항원 사이트Φ의 원형의 치환체(circular permutation)를 포함한다.

[0422] 최소한의 에피토프 영역은 항원 형성에서 에피토프를 안정화하는 스캐폴드 단백질에 연결될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 나열된 최소 사이트 Φ 항원이 어느 것은 2KNO, 2A90, 2W59, 3U2E, 2VJ1, 1CHD, 1PQZ, 또는 2MOE 스캐폴드 단백질(scaffold protein)에 결합 될 수 있다. PDB 데이타베이스에 위치하는 특이적 서열에 대한 참조 식별자가 있으며, 2014년 3월 11일 데이타베이스에서 존재하는 것처럼 본 명세서에 참고로 인용되었다. 스캐폴드 단백질에 연결된 최소 사이트 Φ 항원의 특이적 예는 표 20에 개시되었다.

[0423] 최소 사이트 Φ 항원의 어느 것은, 예를 들어 단백질 나노 입자를 발생하기 위한 페리틴 유닛 또는 루마진(lumazine) 합성 유닛과 같은 단백질 나노입자 유닛에 결합 될 수 있다. 단백질 나노입자 유닛에 결합된 최소 사이트 Φ 항원의 특이적인 예는 표 21에 개시되었다.

[0424] 일부 실시형태에서, PreF 항원은 선융합 특이적 형태에서 RSV F 단백질 선융합 특이적 에피토프를 포함하는 에피토프 스캐폴드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 에피토프 스캐폴드 단백질은 본 명세서에 개시된 것처럼, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질의 어떤 것을 포함한다. 선융합 특이적 에피토프는, 에피토프 스캐폴드 단백질을 포함하는 PreF 항원이 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 의해 특이적으로 결합하고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어, 항원 사이트Φ)를 포함하는 한, 스캐폴드 단백질 어디에나(N-말단, C-말단 또는 내부 루프) 삽입될 수 있다.

[0425] 스캐폴드를 식별하고 선택하기 위한 방법은 본 명세서에 개시되어 있으며 본 기술분야의 당업자에세 공지되어 있다. 예를 들어, 중첩(superposition), 그래프팅(grafting) 및 에피토프 스태폴드의 드 노보(de novo) 설계의 방법은 본 명세서에 참고로 인용된 미국 특허 출원 공보 No. 2010/0068217에 개시되어 있다.

[0426] "중첩(superposition)" 에피토프 스캐폴드는 타겟 에피토프-본 "중첩 영역"에서 백본 원자는 이들의 좌표의 최소 평균 제곱근 편차(RMSD)와 같이 타겟 에피토프에 구조적으로 중첩될 수 있다-와 같은 유사 형태로 노출된 세그먼트를 가지는 스캐폴드 단백질을 기초로 한다. 적합한 스캐폴드는 단백질 결정 구조의 라이브러리를 통해 계산적인 검색에 의해 확인된다; 에피토프 스캐폴드는, 중첩 영역 및 항체와의 충돌 또는 다른 상호작용을 방지하기 위한 스캐폴드의 주위 표면에서 추가적인 변형을 만듬으로써 에피토프 잔기를 넣음으로써 설계된다.

[0427] "그래프팅(grafting)" 에피토프 스캐폴드는 타겟 에피토프의 결정화 형태를 가진 노출된 세그먼트의 보충을 수용할 수 있는 스캐폴드 단백질을 이용한다. 모든 단백질 결정 구조를 통한 계산적인 검색을 통해 밝혀진 각각의 적절한 스캐폴드를 위해, 노출된 세그먼트는 타겟 에피토프에 의해 교체되고 주변 측쇄는 삽입된 에피토프를 수용 및 안정화하기 위해 재설계(변형)된다. 마지막으로, 중첩 에피토프 스캐폴드와 함께, 변형은 항체와의 충돌 또는 다른 상호작용을 막기 위해, 스캐폴드 및 외부 에피토프의 표면에서 만들어진다. 그래프팅 스캐폴드는 교체된 세그먼트 및 삽입된 에피토프가 이들의 N-말단 및 C-말단 사이의 유사한 번역 및 회전 변환을 가지는 것을 요구하고, 주변 펩티드 백본이 삽입된 에피토프와 충돌하지 않는다. 그래프팅 및 중첩 간의 한가지 차이점은, 중첩은 작은 구조적 편차를 허용하는 반면에, 그래프팅은 에피토프 형태를 모방하려 시도한다는 것이다.

[0428] "드 노보(de novo)" 에피토프 스캐폴드는 최적의 에피토프의 결정화 형태를 제공하기 위해 처음부터 전산적으로 설계되었다. 이러한 방법은 새로운 폴드(Kuhlman, B. et al. 2003 Science 302:1364-1368)의 전산 설계를 기초로 한다. 드 노보는, 모두가 사이즈 면에서 최소이고 따라서 원하지 않는 에피토프를 제공하지 않고, 열 또는 화학적 변성에 대한 안정성이 높은 면역원의 설계를 허용한다.

[0429] 스캐폴드는 이종 스캐폴드가 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 네이티브 스캐폴드 단백질(에피토프의 삽입 없이)은 바이러스성 외막 단백질이 아니다. 추가적인 실시형태에서, 상기 스캐폴드 단백질은 RSV 단백질이 아니다. 또한 추가적인 실시형태에서, 상기 스캐폴드 단백질은 바이러스성 단백질이 아니다.

[0430] 추가적인 실시형태에서, 에피토프 스캐폴드 단백질은 서열번호 341-343의 어느 하나로 기재되는 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 341-343이 어느 하나에 적어도 80% 서열 상동성()을 가지는 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 에피토프 스캐폴드 단백질은 특이적으로 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체)에 결합하며, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어 항원 사이트Φ)를 포함한다. 추가적인 실시형태에서, RSV F 단백질은 서열번호 341-343의 어느 하나이며, 여기서 RSV F 단백질의 아미노산 서열은 최고 20 아미노산 치환을 가지고, 또한 여기서 상기 에피토프 스캐폴드 단백질은 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체)에 특이적으로 결합하며, 및/또는 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 해당하는 결합의 부재에서 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어 항원 사이트Φ)를 포함한다. 대안적으로, 상기 폴니펩티드는 아미노산 치환을 가지지 않거나, 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19를 가질 수 있다.

[0431] 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은, 에피토프 스캐폴드 단백질이 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체)에 특이적으로 결합하며, 및/또는 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 해당하는 결합의 부재에서 RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어 항원 사이트Φ)를 포함하는 한, 스캐폴드 어느 곳에서도 포함할 수 있다. 특정 에피토프 스캐폴든 단백질이 특이적으로 선융합 특이적 항체()에 결합하는 것을 확인하기 위한 방법은 본 명세서에 개시되어 있으며, 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 국제 출원 공개 번호 WO 2006/091455 및 WO 2005/111621). 또한, 항체-항원 복합체의 형태는 항체 특이적 항원을 검출 및/또는 정량하기 위한 종래의 면역 분석 포맷을 포함하는 잘 정의된 진단 분석의 수를 이용하여 분석될 수 있다. 이러한 분석은, 예를 들어, 효소 면역, 즉 ELISA, 세포 기반 분석, 유동 세포 계측법, 방사선 면역 측정법 및 면역 조직 화학 염색을 포함한다. 다수의 경쟁 및 비 경쟁 단백질 결합 분석은 당업계에 공지되어 있으며 다수 시판 중이다. 특정 에피토프 스캐폴드 단백질이 선융합 특이적 항체(D25 또는 AM22 항체)에 해당하는 결합의

부재에서, RSV F 선융합 특이적 형태(예를 들어 항원 사이트Φ)를 포함하는지 결합하기 위한 방법은 본 명세서에 개시되어 있으며 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0433] 3. 바이러스 유사 입자(Virus-Like Particles)

[0434] 본 발명의 일실시태양에 의하면, prefusion conformation(선융합 형태)로 안정화된 것으로서 개시된(disclosed) 재조합RSV F단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자(virus-like particle, VLP)를 제공한다. VLP는 복제에 필요한 바이러스 구성체(viral components)에 결함이 있어 매우 약독화된 형태로 제공된다. VLP는 개체에 투여되었을 때 RSV에 대한 면역반응을 유도할 수 있는 폴리펩티드(예를 들어, prefusion conformation(선융합 형태)로 안정화된 재조합 RSV F단백질)를 제시할 수 있다. 바이러스 유사 입자와 이의 제조방법은 통상의 기술자에게 알려져 있고, 인간 파필로마바이러스(human papillomavirus)인 HIV(Kang et al., Biol. Chem. 380: 353-64 (1999)), 셈리키-삼림열 바이러스(Notka et al., Biol. Chem. 380: 341-52 (1999)), 인간 폴리오마바이러스(Goldmann et al., J. Virol. 73: 4465-9 (1999)), 로타바이러스(Jiang et al., Vaccine 17: 1005-13 (1999)), 파보바이러스 (Casal, Biotechnology 및 Applied Biochemistry, Vol 29, Part 2, pp 141-150 (1999)), 개 파보파이러스(Hurtado et al., J. Virol. 70: 5422-9 (1996)), 간염E 바이러스(Li et al., J. Virol. 71: 7207-13 (1997)) 및 뉴캐슬병 바이러스를 포함한 여러 바이러스 유래의 바이러스성 단백질도 알려져 있다. 예를 들어, RSV항원을 포함하는 키메라VLP는 뉴캐슬병 바이러스 유래 VLP일 수 있다. 뉴캐슬병 유래의 VLP는 마우스의 RSV에 대한 면역반응을 중화시키는 것으로 확인된 바 있다. 배지 내에서의 그러한 VLPs의 형성은 특정한 적정 기술로도 감지할 수 있는데, 그러한 적정 기술로는 예를 들면 전자현미경 기법, dynamic light scattering (DLS), 선택적 크로마토그래피 분리(예를 들어, 이온 교환, 소수성 상호작용, 및/또는 size exclusion chromatographic separation) 및 밀도경사 원심분리 등이 있다.

[0435] 본 발명의 다른 실시태양에 의하면, 바이러스 유사 입자는 F2 폴리펩티드와 막투과 도메인에 연결된 F1폴리펩티드와 같은, F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 상기 F1 폴리펩티드는 155번째 위치와 290번째 위치에 있는 시스테인 한쌍의 이황화 결합 및 190번째 위치에서의 충진 아미노산 치환(cavity-filling amino acid substitution)을 포함하거나, 155번째 위치와 290번째 위치에 있는 시스테인 한쌍의 이황화 결합과 190번째 위치에서의 충진 아미노산 치환(cavity-filling amino acid substitution) 및 207번째 위치의 190번째 위치에서의 충진 아미노산 치환(cavity-filling amino acid substitution)을 포함한다.

[0436] 본 발명의 다른 실시태양에 의하면, 바이러스 유사 입자는 F2 폴리펩티드와 막투과 도메인에 연결된 F1폴리펩티드와 같은, F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데, 상기 F1 폴리펩티드는 S155C와 S290C 및 S190F의 아미노산 치환, S155C와 S290C 및 S190W의 아미노산 치환 또는 S155C와 S290C 및 S190L의 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시태양에 의하면, 바이러스 유사 입자는 F2 폴리펩티드와 막투과 도메인에 연결된 F1폴리펩티드와 같은, F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데, 상기 F1 폴리펩티드는 S155C와 S290C와 S190F 및 V207L의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190W 및 V207L의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190L 및 V207L의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190F 및 V207F의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190W및 V207F의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190L V207F의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190F 및 V207W의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190W 및 V207W의 아미노산 치환, 또는 S155C와 S290C와 S190L 및 V207W의 아미노산 치환을 포함한다.

[0437] 본 발명의 또다른 실시태양에 의하면, 바이러스 유사 입자는 F2 폴리펩티드와 막투과 도메인에 연결된 F1폴리펩티드와 같은, F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데, 상기 F2 폴리펩티드와 F1 폴리펩티드는 26 내지 109번째 및 137 내지513번째 위치의 아미노산 서열이 각각 서열번호 371 (S155C, S290C, S190F 및 V207L의 치환이 있는 RSV A), 서열번호 372 (S155C, S290C, S190F 및 V207L의 치환이 있는 RSV B), 서열번호 373(S155C, S290C, S190F 및V207L의 치환이 있는 소의 RSV), 서열번호 374(S155C, S290C 및 S190F의 치환이 있는 RSV A), 서열번호 375(S155C, S290C, 및 S190F의 치환이 있는 RSV B), 서열번호 376(S155C, S290C, 및 S190F의 치환이 있는 소의 RSV) 중에서 어느 하나로 나타나는 아미노산을 포함한다.

[0438] 여러 실시태양을 통해, 바이러스 유사 입자는 F2 폴리펩티드와 막투과 도메인에 연결된 F1폴리펩티드와 같은, F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데, 상기 F1 및 F2 폴리펩티드는 인간 RSV A 아류형(subtype), 인간 RSV B 아류형 또는 소의 RSV에서 유래하며, F1 폴리펩티드는 여기 기재된 어떠한 안정화 변이도 포함할 수 있다(예를 들어, S155C와 S290C 및 S190F의 치환 또는 S155C와 S290C와 S190F 및 V207L의 치환과 같은 상기 안정화 치환의 복합 중 어느 하나).

[0440] 4. 단백질 나노 입자(Protein Nanoparticles)

[0441] 본 발명의 한 실시태양에 의하면, 본 발명은 prefusion conformation(선융합 형태)로 안정화된 것으로서 개시된(disclosed) 재조합RSV F단백질을 하나 또는 그 이상 포함하는 단백질 나노입자를 제공한다. 여기서 단백질 나노입자는 특히 선융합-특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체) 에 의해 결합된다. 상기 단백질 나노입자는 상기 재조합RSV F단백질과 함께 또는 항원 위치Φ 같은 RSV F 선융합 특이적 형태를 포함하거나, RSV F 선융합 특이적 형태만 포함할 수도 있다. 나노입자로는 각각의 페리틴 단백질(ferritin proteins), 엔캡슐린 단백질(encapsulin proteins), SOR 단백질(SOR proteins)을 모노머 소단위의 조합으로 하여 구성된 페리틴 나노입자(ferritin nanoparticles), 엔캡슐린 나노입자(encapsulin nanoparticles), Sulfur Oxygenase Reductase (SOR) 나노입자가 있으나 이에 한정되지는 않는다. prefusion conformation(선융합 형태)로 안정화된 재조합RSV F단백질을 포함하는 단백질 나노입자를 제조하기 위해, 항원은 페리틴 단백질, 엔캡슐린 단백질, SOR 단백질과 같은 소단위에 연결된다. 적정 조건 하에서 융합 단백질은 나노입자로 자가조립(self-assemble)된다.

[0442] 페리틴 나노입자와 이의 면역적 사용(예를 들어, 인플루엔자 항원에 대한 면역)은 종래 기술로 개시되어 있다(예를 들어, e.g., Kanekiyo et al., Nature, 499:102-106, 2013, incorporated by reference herein in its entirety).

[0443] 본 발명의 일 실시태양에 의하면, prefusion conformation(선융합 형태)로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질은 페리틴 폴리펩티드 또는 다른 페리틴 폴리펩티드 간의 하이브리드에 연결되어 페리틴 단백질 나노입자를 형성하게 된다. 여기서 페리틴 나노입자는 특히 선융합-특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체)에 의해 결합되거나 항원 위치 Φ 처럼 RSV F 선융합 특이적 형태를 포함하는데, 선융합-특이적 항체 결합 및 RSV F 선융합 특이적 형태를 둘다 포함하기도 한다. 페리틴은 구모양의 단백질인데 모든 동물, 세균, 식물에서 발견되며 주로 수화 철 이온과 양성자를 미네랄화된 핵으로 또는 핵으로부터 수송함으로써 다핵성 $Fe(III)_2O_3$ 형성의 속도와 위치를 조절하는 역할을 한다. 페리틴의 구모양 형태는 모노머 소단위로 구성되는데 이 소단위는 분자량이 거의 17 내지 20 kDa인 폴리펩티드이다. 그러한 모노머 소단위의 일 예는 서열번호 353으로 나타난다. 각 모노머 소단위는 나선형 묶음의 위상을 가지는데 그 나선형 묶음은 네개의 역평행 나선형 모티프를 포함하고, 이는 4개의 나선형 묶음의 긴축에 직각으로 놓인 5개 더 짧은 나선(C-말단 나선)을 가진다. 관례에 따라, 각각의 나선은 N-말단으로부터 각각 A, B, C, D 및 E라고 명하였다. N-말단 서열은 캡시드 세접힘(capsid three-fold) 축에 인접하여 위치하고 그 표면에 까지 연장된다. E 나선은 C-말단의 네접힘(four-fold) 축에 뭉쳐 있으며 캡시드 핵까지 연장된다. 그렇게 뭉쳐진 결과 캡시드 표면에 두 개의 구멍이 생긴다. 이러한 구멍은 캡시드 안팎으로 철 수화물을 분산시키는 지점이 되는 것으로 생각된다. 하기의 생산방법에 의하면, 이러한 단량체 소단위 단백질은 구모양의 페리틴 단백질로 자가 조립된다. 따라서, 페리틴 단백질의 구모양 형태는 24개의 단량체, 소단위 단백질로 구성되고, 432 개의 대칭을 가지는 캡시드 같은 구조를 가진다. 페리틴 나노입자를 제작하는 방법은 통상의 기술자에게 알려져 있고 본 명세서에도 기재되어 있다(예를 들어, 본 발명에는 Zhang, Int. J. Mol. Sci., 12:5406-5421, 2011의 페리틴 나노입자 제작방법 전체가 포함되어 있다).

[0444] 본 발명의 일 실시태양에 의하면, 페리틴 폴리펩티드는 *E.coli* 페리틴, 헬리코박터 파일로리 페리틴, human light chain 페리틴, 황소개구리 페리틴, 또는 이들의 하이브리드(예를 들어, *E.coli*-인간 하이브리드 체인(hybrid chain), E.coli-황소개구리 하이브리드 체인(hybrid chain), 인간-황소개구리 하이브리드 체인(hybrid chain 등)이다. prefusion conformation(선융합 형태)로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질 항원으로 이용되는 페리틴 폴리펩티드의 아미노산과 이를 암호화하는 핵산의 바람직한 서열은 GenBank에서 확인이 가능하다. 예를 들면, GenBank 등록번호 ZP_03085328, ZP_06990637, EJB64322.1, AAA35832, NP_000137 AAA49532, AAA49525, AAA49524 및 AAA49523이 그것인데, 2013년 2월 28일부터 이용가능한 것으로서 본 명세서에 포함하여 기재하였다. 본 발명의 일 실시태양에 의하면, prefusion conformation(선융합 형태)로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질은 페리틴 단백질에 연결되는데, 그 페리틴 단백질은 아미노산 서열의 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 97%)가 서열번호 353으로 표시되는 아미노산과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. prefusion conformation(선융합 형태)로 안정화된 것으로서 페리틴 단백질에 연결된 재조합 RSV F 단백질의 어떤 실시태양은 서열번호 350으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0445] 본 발명의 다른 실시태양에 의하면, 페리틴 폴리펩티드는 서열번호 353으로 표시되는 페리틴 폴리펩티드와 같은

헬리코박서 파일로리 페리틴이고, C31S, C31A 또는 C31V 과 같은 31번째 자리의 시스테인 잔기의 치환을 포함한다. 개시된 재조합 RSV F 단백질(예를 들어, S155C과 S290C 및 S190F의 치환, 또는 S155C과 S290C과 S190F 및 V207L의 치환이 있는 RSV F 폴리펩티드)은 서열번호 353으로 표시되는 페리틴 폴리펩티드와 같은 헬리코박터 파일로리 페리틴에 연결될 수 있으며, 헬리코박터 파일로리는 페리틴 폴리펩티드의 31번째 자리의 시스테인 잔기의 치환을 포함한다.

[0446] 본 발명의 다른 실시태양에 의하면, 페리틴 단백질 나노입자는 F2 폴리펩티드와 F1폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함한다. 여기서 F1폴리펩티드는 페리틴 단백질과 연결되는데, F1폴리펩티드는 155와 290번째 위치의 시스테인 한 쌍간 이황화결합, 190번째 위치의 충진 아미노산 치환(cavity-filling amino acid substitution)을 포함하거나 155와 290번째 위치의 시스테인 한 쌍간 이황화결합, 190번째 위치의 충진 아미노산 치환(cavity-filling amino acid substitution) 및 207번째 위치의 충진 아미노산 치환(cavity-filling amino acid substitution)을 포함한다.

[0447] 본 발명의 다른 실시태양에 의하면, 페리틴 단백질 나노입자는 F2 폴리펩티드와 F1폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데 여기서 F1폴리펩티드는 페리틴 단백질과 연결되며, F1폴리펩티드는 S155C와 S290C 및 S190F의 아미노산 치환, S155C와 S290C 및 S190W의 아미노산 치환, 또는S155C와 S290C 및 S190L의 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시태양에 의하면, 페리틴 단백질 나노입자는 F2 폴리펩티드와 F1폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데 여기서 F1폴리펩티드는 페리틴 단백질과 연결되며, F1폴리펩티드는 S155C와 S290C와 S190F 및 V207L의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190W 및 V207L의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190L 및 V207L의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190F 및 V207F의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190W 및 V207F의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190L 및 V207F의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190F 및 V207W의 아미노산 치환, S155C와 S290C와 S190W 및 V207W의 아미노산 치환 또는 S155C와 S290C와 S190L 및 V207W의 아미노산 치환을 포함한다.

[0448] 본 발명의 페리틴 나노입자에 위치한 RSV F 단백질은 인간 아류형(subtype) A, 인간 아류형 B 또는 소의 RSV F 단백질을 포함할 수 있고, 선융합 안정화를 위해 본 발명의 설명에 기재된 치환을 포함할 수 있다.

[0449] 본 발명의 일 실시태양에 의하면, 페리틴 단백질 나노입자는 F2 폴리펩티드와 F1폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데 여기서 F1폴리펩티드는 페리틴 단백질과 연결되며, F2 폴리펩티드와 F1 폴리펩티드는 아미노산 서열 중 26 내지 19 및 137 내지 513 위치의 서열이 각각 서열번호 371(S155C, S290C, S190F 및 V207L의 치환이 있는 RSV A), 서열번호 372 (S155C, S290C, S190F 및V207L의 치환이 있는 RSV B), 서열번호 373(S155C, S290C, S190F 및 V207L의 치환이 있는 소의 RSV), 서열번호 374 (S155C, S290C, 및 S190F의 치환이 있는 RSV A), 서열번호 375 (S155C, S290C, 및 S190F의 치환이 있는 RSV B), 서열번호 376(S155C, S290C, 및 S190F의 치환이 있는 소의 RSV) 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0450] 여러 실시태양에 의하면, 페리틴 단백질 나노입자는 인간RSV A 아류형(subtype), 인간 RSV B 아류형(subtype), 또는 소의 RSV에서 유래하는 F2 폴리펩티드와 F1폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데, 여기서 F1 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 안정화 변이(예를 들어, one of the above combinations of stabilizing substitutions S155C와 S290C 및 S190F의 치환 또는 S155C와 S290C와 S190F 및 V207L의 치환과 같은 안정화 치환의 상기 조합 중 어느 하나)의 어떠한 것도 포함할 수 있다.

[0451] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 페리틴 나노입자는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데, 여기서 F1 폴리펩티드는 페리틴 단백질에 연결되고, F2 폴리펩티드 및 페리틴 단백질에 연결된 F1 폴리펩티드는 26 내지 109 및 137 내지 679 위치의 아미노산 서열이 각각 서열번호 377(C-말단 페리틴 도메인에 S155C, S290C, S190F 및 V207L의 아미노산 치환이 있는 RSV A) 또는 서열번호 378 내지 382 중 어느 하나로 나타나는 아미노산 서열을 포함한다.

[0452] 본 발명의 다른 실시태양에 의하면, 페리틴 나노입자는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데, 여기서 F1 폴리펩티드는 페리틴 단백질에 연결되고, F2 폴리펩티드와 페리틴에 연결된 F1 폴리펩티드는 표 8e의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8 , 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 또는 49열의 3번째 칸에 나열된 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시태양에 의하면, 페리틴 나노입자는 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는데, 여기서 F1 폴리펩티드는 페리틴 단백질에 연결되고, F2 폴리펩티드와 페리틴에 연결된 F1 폴리펩티드는 표 8e의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8 , 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34,

35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 또는 49열의 4번째 칸에 나열된 서열번호로 표시되는 F1 및 F2 폴리펩티드의 아미노산 서열을 포함한다. 표 8e에 나열된 서열번호 602 내지 217, 620 내지 634 및 645 내지 650은, 상응하는 F 단백질이 진핵세포에서 만들어질 때의 단백질 가수분해 과정에 의해 제거되는, pep27 폴리펩티드 서열과 신호 서열(signal sequence) 뿐만 아니라 C-말단 단백질 표지(tag)를 포함하는 것이 적절할 것이다.

[0453] [표 8e] 페리틴 나노입자 생산을 위한 RSV F 단백질 변이 및 서열의 예시

열	설명	치환/변형	서열 번호
1	Cavity filling	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L230F	602
2	Cavity filling	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L158F	603
3	Cavity filling	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L230F/L158F	604
4	DSCav1 + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/	605
5	DSCav1+ replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290C, S190F, V207L) + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	606
6	DSCav1 + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/F477K /L481Q/V482K/L503Q/I506K	607
7	Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L158F/L230F/L83F/V90F/I506K/I395F/V185F/T 54A	608
8	Cavity filling + replace exposed hydrophobic residues	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L83F/V90F/I506K	609
9	DS-S190F with C-terminal Cys ring1	S190F, S155C, S290C, F488W, L513C, A514E, I515C	610
10	DS-S190F with C-terminal Cys ring2	S190F, S155C, S290C, F488W, L513C, A514E, G515E, 516C	611
11	DS-S190F with C-terminal Cys ring3	S190F, S155C, S290C, F488W, L512C, L513E, A514C	612
12	DS-S190F with C-terminal Cys ring4	S190F, S155C, S290C, F488W, L512C, L513E, A514E, G515C	613
13	DS-S190F with Foldon	S190F, S155C, S290C, F488W, Foldon	614
14	DS-S190F with 1 extra disulfide bridge with Foldon	S190F, S155C, S290C, L171C, K191C, F488W, Foldon	615
15	DS-S190F with 2 extra disulfide bridges with Foldon	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, Foldon	616

[0454]

[0455]

16	DS-S190F with 3 extra disulfide bridges with Foldon	K77C, I217C, S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, Foldon	617
17	Single chain 및 shorten F protein to end at residue 513	Single chain F with (S155C, S290C, S190F, V207L)	618
18	Single chain 및 shorten F protein to end at residue 492	Single chain F with(S155C, S290C, S190F, V207L)	619
19	Disulfide	ferritin: S29C/C31S/V68C	620
20	Disulfide	ferritin: C31S/A115C/H128C	621
21	Disulfide + cavity filling	L158F/L203F/V296I; Ferritin: S29C/C31S/V68C/A115C/H128C	622
22	Disulfide + cavity filling	Y198F/T219L/K226M; ferritin: C31S/A115C/H128C	623
23	Disulfide + cavity filling	E82V/K226M/N227L/V296I; ferritin: C31S/A115C/H128C	624
24	Improved purification of DSCav1 Ferritin particles	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 및 DYKDDDDKGG insertion at N-terminus of F	625
25	Improved purification of DSCav1 Ferritin particles	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 및 QHHHHHHGG insertion at N-terminus F	626
26	Improved purification of DSCav1 Ferritin particles	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 및 QHHHHHHHGG insertion at N-terminus F	627
27	Improved purification of DSCav1 Ferritin particles	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 및 GGHHHHHHGG insertion at residue 327 of F	628
28	Improved purification of DSCav1 Ferritin particles	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 및 GGHHHHHHHHGG insertion at residue 327 of F	629
29	Improved purification of DSCav1 Ferritin particles	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 및 HHHHH insertion at residue 323 of F	630
30	Improved purification of DSCav1 Ferritin particles	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 및 QSAWSHPQFEKHHHHHHGGLVPRGSGG insertion at N-terminus of F	631
31	Improved purification of DSCav1 Ferritin particles	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 및 QSAWSHPQFEKHHHHHHGGLVPRGSGG insertion at N-terminus of F	632

32	Longer linker between RSV F DSCav1 및 Ferritin	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 10 aa linker to Ferritin	633
33	Longer linker between RSV F DSCav1 및 Ferritin	(S155C, S290C, S190F, V207L) + N500Q + 10 aa linker to Ferritin	634
34	single chain end at residue 513, longer linker	DS-Cav1 single chain with longer linker	635
35	single chain end at residue 492 longer linker	DS-Cav1 single chain with longer linker	636
36	single chain end at residue 513, N500Q remove glycan	DS-Cav1 single chain with N500Q	637
37	single chain end at residue 513, longer linker N500Q remove glycan	DS-Cav1 single chain with longer linker N500Q	638
38	single chain RSV F DS-Cav1 및 Ferritin	S155C, S290C, S190F, V207L single chain N105-G145 linkGS	639
39	single chain RSV F DS-Cav1 및 Ferritin end at 492	S155C, S290C, S190F, V207L, N500Q single chain end at 492 N105-G145 linkGS	640
40	single chain RSV F DS-Cav1 및 Ferritin longer linker	S155C, S290C, S190F, V207L single chain N105-G145 + 10 aa linker to Ferritin	641
41	single chain RSV F DS-Cav1 및 Ferritin end at 492 longer linker	S155C, S290C, S190F, V207L, N500Q single chain end at 492 N105-G145 + 10 aa linker to Ferritin	642
42	single chain RSV F DS-Cav1 및 Ferritin 및 remove N500 glycan	S155C, S290C, S190F, V207L, N500Q single chain N105-G145 linkGS	643
43	single chain RSV F DS-Cav1 및 Ferritin longer linker 및 remove N500 glycan	S155C, S290C, S190F, V207L, N500Q single chain N105-G145 + 10 aa linker to Ferritin	644
44	DS-cav1 + exposed hydrophobic + 10 aa linker	DS-cav1 + L16OK/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/ + 10 aa linker	645

[0456]

45	DS-cav1 + exposed hydrophobic + 10 aa linker	DS-cav1 + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K + 10 aa linker	646
46	DS-cav1 + exposed hydrophobic + 10 aa linker	DS-cav1 + L16OK/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/F477K /L481Q/V482K/L503Q/I506K + 10 aa linker	647
47	DS-cav1 + exposed hydrophobic + 10 aa linker +N500 glycan removal	DS-cav1 + L16OK/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/ + 10 aa linker +N500Q	648
48	DS-cav1 + exposed hydrophobic + 10 aa linker +N500 glycan removal	DS-cav1 + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K + 10 aa linker +N500Q	649
49	DS-cav1 + exposed hydrophobic + 10 aa linker +N500 glycan removal	DS-cav1 + L16OK/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/F477K /L481Q/V482K/L503Q/I506K + 10 aa linker +N500Q	650

[0457]

[0459] 본 발명의 또 다른 실시태양에 따르면, prefusion conformation(선융합 형태)로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질은 엔캡슐린(encapsulin) 나노입자를 형성하기 위해 엔캡슐린 폴리펩티드(encapsulin polypeptide)에 연결된다. 여기서 엔캡슐린 나노입자는 특히 선융합-특이 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체)에 의해 결합되고 항원위치(antigenic site) Φ 같은 RSV F 선융합 특이체 형성을 포함하는데, 선융합-특이 항체에 의한 결합 또는 선융합 특이체 형성 중 하나만 해당되기도 한다. 엔캡슐린 단백질은, 덩어리 효소의 최소 부분으로서 기능하는 큰 단백질 조합체(assemblies)를 형성하는 리노신 유사 단백질(linocin-like proteins)로 알려진 세균성 단백질의 보존된 군(family)이다. 엔캡슐린 조합체(assembly)는 단량체 소단위로 구성되는데, 그 소단위는 분자량이 거의 30 kDa에 이르는 폴리펩티드이다. 그러한 단량체 소단위의 서열의 한 예는 서열번호 354로 표시된다. 하기의 생산방법에 따르면, 단량체 소단위는 구모양의 엔캡슐린 조합체로 자가조립(self-assemble)되는데 이는 60개의 단량체 소단위를 포함한다. 엔캡슐린 나노입자를 제조하는 방법은 통상의 기술자에게 알려져 있고, 본 명세서에도 기재되어 있다(예를 들면, 본 명세서에 포함된 Sutter et al.,

Nature Struct. 및 Mol. Biol., 15:939-947, 2008). 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 엔캡슐린 폴리펩티드는 *E.coli*, *Thermotogamaritime* 엔캡슐린과 같은 세균성 엔캡슐린이다. 선융합 형태로 안정화된 것으로서 개시된 RSV F 단백질 항원과 함께 사용될 엔캡슐린 서열의 한 예는 서열번호 354로 표시된다.

[0460] 또 다른 실시형태에 따르면, 선융합 형태로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질은 황 산소첨가효소 환원효소(Sulfer Oxygenase Reductase, SOR) 폴리펩티드에 연결되어 SOR 나노입자를 형성한다. SOR 나노입자는 특히 선융합-특이 항체(예를 들어, D25 or AM22 항체)에 의해 결합되어 있고 RSV F 선융합 특이 형성체(항원위치 Φ)를 포함하기도 하며, RSV F 선융합 특이 형성체만 포함할 수도 있다. SOR 단백질은 미생물 단백질이다(예를 들어 호열호산성 아르케온(archeon)으로서 24개의 소단위 단백질의 조합체를 형성하는 아키디아누스 암비발렌스(Acidianus ambivalens)에서 유래하는 단백질). SOR을 제조하는 방법은 본 발명의 명세서에도 포함되어 있듯이 통상의 기술자에게 알려져 있다(예를 들어, Urich et al., Science, 311:996-1000, 2006). 선융합 형태로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질이고 SOR 단백질에 연결된 것의 특정 실시예로는 서열번호 344 및 서열번호 345로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0461] 또 다른 실시태양에 의하면, 선융합 형태로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질은 루머진 합성효소(Lumazine synthase) 폴리펩티드에 연결되어 루머진 합성효소 나노입자를 형성한다. 루머진 나노입자는 특히 선융합-특이 항체(예를 들어, D25 or AM22 항체)에 의해 결합되어 있고 RSV F 선융합 특이 형성체(항원위치 Φ)를 포함하기도 하며, RSV F 선융합 특이 형성체만 포함할 수도 있다. 선융합 형태로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질이고 루머진 합성효소 단백질에 연결된 것의 특정 실시예로는 서열번호 346 내지 348로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0462] 또 다른 실시태양에 의하면, 선융합 형태로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질은 피루브산 탈수소효소(pyruvate dehydrogenase) 폴리펩티드에 연결되어 피루브산 탈수소효소 나노입자를 형성한다. 피루브산 탈수소효소 나노입자는 특히 선융합-특이 항체(예를 들어, D25 or AM22 항체)에 의해 결합되어 있고 RSV F 선융합 특이 형성체(항원위치 Φ)를 포함하기도 하며, RSV F 선융합 특이 형성체만 포함할 수도 있다. 선융합 형태로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질이고 피루브산 탈수소효소 단백질에 연결된 것의 특정 실시예로는 서열번호 349로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0463] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 선융합 형태로 안정화된 것으로서 개시된 재조합 RSV F 단백질은 페리틴의 N 또는 C 말단, 엔캡슐린, SOR, 루머진 합성효소, 또는 피루브산 탈수소효소(pyruvate dehydrogenase) 단백질에, 예를 들면 Ser-Gly 링커와 같은 링커로 연결된다. 그러한 구조물이 HEK293 자유형 세포주에서 만들어지면, 융합 단백질은 세포에서 분비되어서 나노입자로 자가조립(self-assembly)된다. 상기 나노입자는 공지된 기술, 예를 들어 크기 배제(SUPEROSE® 6) 크로마토그래피에 이어서 Mono Q(음이온 교환)의 여러 몇 가지 다른 크로마토그래피 절차에 의해 정제될 수 있다.

[0464] 본 발명의 여러 실시태양에 의하면, 본 발명은 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루머진 합성효소, 피루브산 탈수소효소 단백질 또는 이들의 어느 일정 부분의 단량체 소단위로서 구모양 단백질 형태로 자가 조립(self-assembly)될 수 있는 것을 포함한다. 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루머진 합성효소 또는 피루브산 탈수소효소 단백질의 단량체 소단위에서 얻은 아미노산 서열도, 단량체 소단위가 그 표면에 선융합 형태로 안정화된 본 발명의 재조합 RSV F 단백질을 발현하는 나노입자로 자가 조립될 수 있는 한, 선융합 형태로 안정화된 본 발명의 재조합 RSV F 단백질과 함께 융합 단백질 생산에 사용될 수 있다.

[0465] 융합 단백질은 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루머진 합성효소 또는 피루브산 탈수소효소 단백질의 단량체 소단위 폴리펩티드 서열 전체를 전부 포함할 필요는 없다. 단량체 소단위 폴리펩티드의 일부분 또는 일정 구역이라도 단량체 소단위를 구모양의 단백질 형태로 자가 조립시킬 수 있는 아미노산 서열을 포함하는 한 사용될 수 있다.

[0466] 일부 실시형태에서, 단량체 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루메진 합성효소 또는 피루브산 탈수소효소 서브유닛의 아미노산 서열로의 변이 제조는 유용하게 쓰일 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질의 유익한 특성(예를 들어, 반감기)를 수득하기 위해 효소 인식 사이트 또는 글리코실화 사이트와 같은 사이트 변경에 유용하게 쓰일 수 있다.

[0467] 이는 개시된 페리틴, 덴켑슐린, SOR, 루메진 합성효소 또는 피루브산 탈수소효소 단백질의 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질의 어떤 융합은, 개시된 융합 단백질의 선융합 형태 부분에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 단량체 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루메진 합성효소 또는 피부르산 탈수소효소 서브유닛을 구형 단백질로 자가 조립되는 것을 방해하지 않고, 융합 단백질의 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루메진 합성효소 또는 피부르산 탈수소효소 단백질 부분은 RSV에의 면역 반응을 제거하기 위해 선융합 형태의 능력에 방해하지 않는 것과 같이

되어야 한다. 일부 실시형태에서, 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루메진 합성효소 또는 피부르산 탈수소효소 비율 및 선융합 형태에서 안정화된 개시된 재조합 RSV F 단백질은 서로의 부분의 활성에 영향을 주지 않으며 직접적으로 접합 될 수 있다. 다른 실시형태에서, 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루메진 합성효소 또는 피부르산 탈수소효소 단백질 및 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은 링커(스페이서라고도 불림) 서열을 이용하여 접합된다. 상기 링커 서열은 융합 단백질의 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루메진 합성효소 또는 피부르산 탈수소효소 부분 및 융합 단백질의 선융합 형태 부분에서 안정화된 재시된 재조합 RSV F 단백질로 서로에 대해 설계되고, 이러한 융합 단백질은 나노입자로 조립할 수 있는 능력을 유지하고, RSV 에 대한 면역 반응을 유도한다. 일부 실시형태에서, 링커 서열은 아미노산을 포함한다. 사용에 바람직한 아미노산은 작은 측쇄 및/또는 하전되지 않는 것이다. 이러한 아미노산은 적절한 폴딩 및 융합 단백질의 활성에 방해가 거의 없다. 따라서, 링커 서열 사용에 바람직한 아미노산은 세린, 글라이신 및 알라닌의 단독 또는 조합이다. 이러한 링커 서열의 하나의 예는 SGG이다. 아미노산은 필요에 따라 첨가되거나 감소 될 수 있다. 당업자는 단백질 나노입자의 구조에 적합한 링커 서열을 결정할 수 있다.

[0468] 특정 실시형태에서, 상기 단백질 나노입자는 100 내지 5000 kDa, 예를 들면, 약 500 내지 4600 kDa의 분자량을 가진다. 일부 실시형태에서, 단백질 나노입자가 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F단백질을 포함할 때, 페리틴 나노입자는 약 650 kDa의 분자량을 가지며, 엔캡슐린 나노입자는 약 2100 kDa 분자량, SOR 나노입자는 약 1000 kDa의 분자량, 루메진 합성효소 나노입자는 약 4000 kDa 분자량, 및 피부르산 탈수소효소 나노입자는 약 4600 kDa의 분자량은 가진다.

[0469] 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루메진 합성효소 또는 피부르산 탈수소효소 단백질과 결합된, 개시된 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질은, 페리틴 나노입자, 엔캡슐린 나노입자, SOR 나노입자, 루메진 합성효소 나노입자 및 피부르산 탈수소효소 나노입자 각각으로 이름지어지는 멀티 서브유닛 단백질 나노입자로 자가 조립될 수 있다. 상기 나노입자는 선융합 형태에서 안정화된 개시된 재조합 RSV F 단백질은, 선융합 형태에서 안정화된 개시된 재조합 RSV F 단백질을 포함하지 않는 네이티브 페리틴, 엔캡슐린, SOR, 루메진 합성효소 또는 피부르산 탈수소효소 나노입자와 같이 실질적으로 동일한 구조적 특성을 가진다. 즉, 이들은 24, 60, 24, 60, or 60 서브유닛(각각)을 포함하며 해당하는 유사한 대칭성을 가지고 있다. 선융합 형태에서 안정화된 개시된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 단량체 서브유닛 구조의 나노입자의 경우에서, 이러한 나노입자는 특이적으로 선융합 특이적 항체(예를 들어, D25 또는 AM22 항체)에 의해 결합되고, 및/또는 RSV F 선융합 특이적 형태(항원 사이트 Φ)를 포함한다.

[0471] ***C. 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(Polynucleotides Encoding Antigens)***

[0472] 개시된 PreF 항원(예를 들어, 선융합 형태에서 안정화딘 재조합 RSV F 단백질, 또는 에피토프 스캐폴드 단백질, 또는 이러한 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자 또는 단백질 나노입자)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 항원을 암호화하는 DNA, cDNA 및 RNA 서열을 포함한다.

[0473] 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화하며, 여기서 상기 전구체 F0 폴리펩티드는 신호 펩티드, F2 폴리펩티드, Pep27 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드 N-말단부터 C-말단까지 포함한다. 일부 실시형태에서, Pep27 폴리펩티드는 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 포지션 110-136으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 아미노산 포지션은 서열번호 124로 기재되는 참조 F0 폴리펩티드의 아미노산 서열에 상응한다. 일부 실시형태에서, 신호 펩티드는 서열번호 1-184 또는 370의 어느 하나의 포지션 1-25로 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 참조 F0 폴리펩티드의 아미노산 서열에 해당하는 아미노산 포지션은 서열번호 124로 기재된다.

[0474] 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화하며, 여기서 전구체 F0 폴리펩티드는 서열번호 185, 또는 189-303의 어느 하나로 기재되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화하며, 여기서 전구체 F0 폴리펩티드는 서열번호 185, 또는 189-303의 어느 하나의 잔기 1-513으로 기재되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0475] 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화하며, 여기서

F1 폴리펩티드는 포지션 155 및 209에서의 시스테인 짝, 및 포지션 190에서의 공동 충전 아미노산 치환 사이의 이황화 결합; 또는 포지션 155 및 290에서의 시스테인 짝, 포지션 190에서의 공동 충전 아미노산 치환, 및 포지션 207에서의 공동 충전 아미노산 치환 사이의 이황화 결합을 포함한다.

[0476] 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, 및 S190F 아미노산 치환, S155C, S290C, 및 S190W 아미노산 치환, 또는 S155C, S290C, 및 S190L 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190L 및 V207L 아미노산 치환, S155C, S290C, S190F 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190L 및 V207F 아미노산 치환, S155C, S290C, S190F 및 V207W 아미노산 치환, S155C, S290C, S190W 및 V207W 아미노산 치환, 또는 S155C, S290C, S190L 및 V207W 아미노산 치환을 포함한다.

[0477] 어떤 실시형태에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화하며, 여기서 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 서열번호 371 (RSV A with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 372 (RSV B with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 373 (bovine RSV with S155C, S290C, S190F 및 V207L 치환), 서열번호 374 (RSV A with S155C, S290C, 및 S190F 치환), 서열번호 375 (RSV B with S155C, S290C, 및 S190F 치환); 또는 서열번호 376 (bovine RSV with S155C, S290C, 및 S190F 치환)의 어느 하나의 포지션 26-109 및 137-513 각각으로 기재되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0478] 몇 실시형태에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 인간 RSV A 아형, 인간 RSV B 안형, 또는 bovine RSV로부터 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 안정화 변형(예를 들어, S155C, S290C, 및 S190F 치환, 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환과 같은 안정화 치환의 상기 조합의 하나)의 어느 것을 포함한다.

[0479] 하나의 비 제한적인 예에서, 핵산 분자는 적절한 세포에서 발현되었을 때 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드를 포함하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 개시된 PreF 항원으로 가공되는, 전구체 F0 폴리펩티드를 암호화하며, 여기서 F1 폴리펩티드는 페리틴 단백질에 결합되며, 여기서 페리틴 단백질에 결합된 F2 폴리펩티드 및 F1 폴리펩티드는 서열번호 377 (C-말단 페리틴 도메인과 함께, S155C, S290C, S190F, V207L 아미노산 치환을 포함하는 RSV A), 또는 서열번호 378-382의 포지션 26-109 및 137-679 각각으로 기재되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0480] 하나의 비 제한적인 실시 예에서, 핵산 분자는 서열번호 383(C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 사이트, 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된, S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 A로부터의 RSV F 단백질)으로 기재되는 서열을 포함한다.

[0481] 다른 비 제한적인 실시 예에서, 핵산 분자는 발현 벡터이며, 서열번호 384(C-말단 Foldon 도메인, 트롬빈 절단 사이트, 6xHis tag 및 StrepTag II와 융합된, S155C, S290C, S190F 및 V207L 아미노산 치환을 포함하는 인간 아형 A로부터의 RSV F 단백질)로 기재되는 서열을 포함한다.

[0482] 본 발명의 핵산을 벡터로 조작 및 삽입을 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition,Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, 및 Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates 및 John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1994).

[0483] PreF 항원()을 암호화하는 핵산은, 예를 들면 중합효소 연쇄 반응(PCR), 라이게이즈 연쇄 반응(LCR), 전사 기초의 증폭 시스템(TAS), 자가 유지 서열 복제 시스템(3SR) 및 Qβ 리플리케이스 증폭 시스템(Qβ)과 같은 인비트로 방법에 의해 클로닝 또는 증폭될 수 있다. 예를 들어, 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 분자의 DNA에 기초한 프라이머를 이용하여 cDNA의 중합 효소 연쇄 반응에 의해 분리될 수 있다. 클로닝의 다양성 및 체외 증폭 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. PCR 방법은 예를 들어, 미국 특허 No. 4,683,195; Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263, 1987; 및 Erlich, ed.,PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989)에 잘 기술되어 있다. 폴리뉴클레티드는 엄격한 혼성화 조건 하에서 목적으로 하는 폴리뉴클

레오티드의 서열로부터 선택되는 프로브와 함께 지노믹 또는 cDNA 라이브러리를 스크리닝함으로써 분리될 수 있다.

[0484] PreF 항원(선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSC F 단백질, 또는 에피토프 스캐폴드 단백질, 또는 이러한 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자 또는 단백질 입자)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 벡터로, 독자적으로 복제하는 플라스미드 또는 바이러스로 또는 진행 생물 또는 원핵 생물의 지노믹 DNA로 통합시키는, 또는 다른 서열에 독립적인 분리된 분자(예를 들어, cDNA)로 존재하는 재조합 DNA를 포함한다. 상기 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 변형된 형태의 다른 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 용어는 DNA의 단일 및 이중 형태를 포함한다.

[0485] PreF 항원(선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질, 또는 에피토프 스캐폴드 단백질, 또는 이러한 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자 또는 단백질 나노입자)을 암호화하는 DNA 서열은 적절한 숙주 세포로 DNA 전사에 의해 생체 외에서 발현될 수 있다. 상기 세포는 원핵 또는 진핵 일 수 있다. 상기 용어는 개체 숙주 세포의 어떤 자손을 포함한다. 복제 중 변이가 일어날 수 있기 때문에 모든 자손은 부모 세포와 동일하지 않을 수 있다. 외부 DNA를 숙주에서 연속적으로 유지하는 것을 의미하는 안정된 전사의 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0486] PreF 항원(선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질, 또는 에피토프 스캐폴드 단백질, 또는 이러한 단백질을 포함하는 바이러스 유사 단백질 또는 단백질 나노입자)을 암호화하는 폴리튜클레오티드 서열은 발현 컨트롤 서열에 영향적으로 결합될 수 있다. 암호화하는 서열에 영향적으로 연결된 발현 컨드롤 서열은 암화화 서열의 발현이 발현 컨트롤 서열과 호환 조건 하에서 달성되도록 연결된다. 상기 발현 컨트롤 서열은, 이에 한정되는 것은 아니나, 적절한 프로모터, 인핸서, 전사 터미네이터, 단백질을 암호화하는 유전자의 앞에 있는 개시 코돈(예를 들어, ATG), 인트론을 위한 스플라이싱 신호, mRNA의 적절한 번역을 허용하는 유전자의 정확한 리딩 프레임의 보수, 및 스탑 코돈을 포함한다.

[0487] 숙주는 미생물, 효모, 곤충 및 포유 동물 유기체를 포함할 수 있다. 원핵 또는 진핵의 바이러스DNA 서열을 가지는 DNA 서열 발현의 방법은 당업계에 공지되어 있다. 적절한 숙주 세포의 비 제한적인 예로는 박테리아, 고세균류, 곤충, 곰팡이(예를 들어 효모), 식물 및 동물 세포(예를 들어, 인간과 같은 포유동물 세포)를 포함한다. 사용예의 세포는 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella typhimurium*, SF9 세포, C129 세포, 293 세포, Neurospora, 및 불명의 포유동물 골수세포 및 림프 세포주를 포함한다. 배양에서 포유동물 세포의 전파를 위한 기술은 잘 알려져 있다(Jakoby 및 Pastan (eds), 1979, Cell Culture. Methods in Enzymology, volume 58, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, N.Y.). 일반적으로 사용되는 포유동물 숙주 세포주의 예는, 높은 발현을 제공하고 글리코실화 패턴, 또는 다른 특성이 설계된 세포와 같은 세포주가 사용될 수 있지만, VERO 및 HeLa 세포, CHO 세포, 및 WI38, BHK, 및 COS 세포주이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 HEK293 세포 또는 GnTI-/- cells (ATCC® No. CRL-3022)와 같은 이의 유도체를 포함한다.

[0488] 재조합 DNA를 이용한 숙주 세포의 형질 전환은 당업자에게 잘 알려진 바와 같이 종래 기술에 의해 수행될 수 있다. 숙주가, 제한되는 것은 아니지만, E. coli와 같은 원핵생물인 경우, DNA를 흡수하기 용이한 컴피턴트세포는, 당업계에 공지된 절파를 이용하여 $CaCl_2$ 방법에 의해 처리된 지수 성장기 후에 수확한 세포로부터 제조될 수 있다. 대안적으로 $MgCl_2$ 또는 RbCl가 사용될 수 있다. 형질전환은 원하는 경우, 숙주 세포의 원형질체 형성 후 수행하거나, 전기 천공에 의해 수행될 수 있다.

[0489] 숙주가 진핵세포인 경우, 인산 칼슘 공침, 미세주입, 전기 천공, 리포좀에서 매입된 플라스미드의 삽입과 같은 종래의 기계적인 절차, 또는 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 진핵세포는 개시된 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열, 및 단순 포진 티미딘 키나아제 유전자와 같은 선택 가능한 표현형을 암호화하는 외부 DNA 분자와 함께 동시 형질전환될 수 있다. 다른 방법은 일시적으로 진핵 세포를 감염 또는 형질전환하고 단백질을 발현하기 위해, 진시미안 바이러스 40 (SV40) 또는 bovine papilloma 바이러스와 같은 진행 바이러스 벡터를 이용하는 것이다(Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982).

[0491] ***D. 바이러스 벡터(Viral Vectors)***

[0492] 선융합 형태에서 안정화되는 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 바이러스 벡터, 예를 들어, 숙주

세포에서 항원을 발현하기 위해, 또는 본 명세서에 개시된 것처럼 개체의 접종을 위해 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 바이러스성 벡터는 초기-부스트 백신 접종(prime-boost vaccination)의 일부로써 개체에 투여된다. 몇 실시형태에서, 상기 바이러스성 벡터는 초기-부스트 백신 접종에서 사용하기 위해 초기 백신 또는 부스터 백신와 같은 백신에서 포함된다.

[0493] 일부 실시예에서, 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 바이러스성 벡터는 복제-가능(replication-competent)이 될 수 있다. 예를 들어, 바이러스성 벡터는 숙주 세포에서 바이러스 복제를 억제하지 않는 바이러스 지놈에서 변이(예를 들어, PreF 항원을 암호화하는 핵산의 삽입)를 가진다. 바이러스성 벡터는 또한 조건적으로 복제-가능(replication-competent)이 될 수 있다. 다른 예에서, 바이러스성 벡터는 숙주에서 복제-결핍(replication-deficient)이다.

[0494] 몇 실시형태에서, 선융합 형태에서 안정화되는 재조합 RSV F 단백질은호흡기를 통해 이동될 수 있는 바이러스성 벡터에 의해 발현된다. 예를 들어, bovine parainfluenza 바이러스(BPIV) 벡터(예를 들어, BPIV-1, BPIV-2, 또는 BPV-3 vector) 또는 human PIV 벡터와 같은 paramyxovirus (PIV) 벡터, metapneumovirus (MPV) 벡터, Sendia 바이러스 벡터, 또는 measles 바이러스 벡터가 개시된 항원을 발현하는데 쓰인다. RSV F 및 hPIV 단백질(MEDI-534)을 발현하는 BPIV3 바이러스성 벡터는 최근 RSV 백신으로써 임상 시험 대상이다. 항원 발현을 위한 paramyxovirus (PIV) 벡터의 예는 당업계에 잘 알려져 있다(미국 특허 2012/0045471, 2011/0212488, 2010/0297730, 2010/0278813, 2010/0167270, 2010/0119547, 2009/0263883, 2009/0017517, 2009/0004722, 2008/0096263, 2006/0216700, 2005/0147623, 2005/0142148, 2005/0019891, 2004/0208895, 2004/0005545, 2003/0232061, 2003/0095987, 및 2003/0072773; 이들 각각은 본원에 참고로 인용되었다). 다른 실시예에서, 뉴캐슬 질병 바이러스 벡터는 개시된 항원을 발현하기 위해 사용된다(McGinnes et al., J. Virol., 85: 366-377, 2011, describing RSV F 및 G proteins expressed on Newcastle disease like particles, 참조로 인용). 다른 실시예에서, 센다이 바이러스 벡터는 개시된 항원을 발현하는데 쓰인다(Jones et al., Vaccine, 30:959-968, 2012, which discloses use of a Sendai virus-based RSV vaccine to induce an immune response in primates).

[0495] 추가적인 바이러스 벡터는 폴리오마 바이러스(polyoma), 예를 들어, SV40 (Madzak et al., 1992, J. Gen. Virol., 73:15331536), 아데노바이러스(Berkner, 1992, Cur. Top. Microbiol. Immunol., 158:39-6; Berliner et al., 1988, Bio Techniques, 6:616-629; Gorziglia et al., 1992, J. Virol., 66:4407-4412; Quantin et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:2581-2584; Rosenfeld et al., 1992, Cell, 68:143-155; Wilkinson et al., 1992, Nucl. Acids Res., 20:2233-2239; Stratford-Perricaudet et al., 1990, Hum. Gene Ther., 1:241-256), vaccinia virus (Mackett et al., 1992, Biotechnology, 24:495-499), 아데노 관련 바이러스(Muzyczka, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:91-123; On et al., 1990, Gene, 89:279-282), HSV 및 EBV 및 CMV를 포함하는 헤르페스 바이러스(Margolskee, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:67-90; Johnson et al., 1992, J. Virol., 66:29522965; Fink et al., 1992, Hum. Gene Ther. 3:11-19; Breakfield et al., 1987, Mol. Neurobiol., 1:337-371; Fresse et al., 1990, Biochem. Pharmacol., 40:2189-2199), Sindbis 바이러스(H. Herweijer et al., 1995, Human Gene Therapy 6:1161-1167; U.S. Pat. Nos. 5,091,309 및 5,2217,879), 알파바이러스(S. Schlesinger, 1993, Trends Biotechnol. 11:18-22; I. Frolov et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11371-11377) 및 조류(Brandyopadhyay et al., 1984, Mol. Cell Biol., 4:749-754; Petropouplos et al., 1992, J. Virol., 66:3391-3397), 쥐과 (Miller, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:1-24; Miller et al., 1985, Mol. Cell Biol., 5:431-437; Sorge et al., 1984, Mol. Cell Biol., 4:1730-1737; Mann et al., 1985, J. Virol., 54:401-407), 및 인간 유래(Page et al., 1990, J. Virol., 64:5370-5276; Buchschalcher et al., 1992, J. Virol., 66:2731-2739)의 레트로바이러스를 포함하는 개시된 항원의 발현을 위해 사용될 수 있다. 베큘로 바이러스(Autographa californica multinuclear polyhedrosis virus; AcMNPV) 벡터는 당해 분야에 공지되어 있으며, 상업적인 출처(PharMingen, San Diego, Calif.; Protein Sciences Corp., Meriden, Conn.; Stratagene, La Jolla, Calif.)에서 획득할 수 있다. 추가적인 바이러스성 벡터는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람에게 익숙하다.

[0496] 몇 실시예에서, 본 명세서에 개시된 상기 방법 및 조성물은 선융합 형태에서 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 발현하는 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 다양한 유래, 서브타입, 또는 서브타입의 혼합으로부터의 아데노바이러스는 아데노바이러스성 벡터를 위한 바이러스성 지놈의 소스로써 사용될 수 있다. 비 인간 아데노바이러스(유인원, 침팬지, 고릴라, 조류, 개, 양, 또는 소 아데노바이러스)는 아데노바이러스성 벡터를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 원숭이 아데노바이러스(simian adenovirus)는 아데노바이러스성 벡터의 바이러스

지놈의 소스로써 사용될 수 있다. 유인원 아데노바이러스는 1, 3, 7, 11, 16, 18, 19, 20, 27, 33, 38, 39, 48, 49, 50 또는 임의의 다른 유인원 아데노바이러스 혈정형(serotype)이 될 수 있다. 유인원 아데노바이러스는 SV, SAdV, SAV 또는 sAV와 같이 당업계에 공지된 임의의 약어를 사용하여 지칭될 수 있다. 일부 실시예에서, 유인원 아데노바이러스 벡터는 혈청형 3, 7, 11, 16, 18, 19, 20, 27, 33, 38, 또는 39의 유인원 아데노바이러스 벡터이다. 하나의 예에서, 침팬지 혈청형 C Ad3 벡터가 사용된다(Peruzzi et al., Vaccine, 27:1293-1300, 2009). 인간 아데노바이러스는 아데노바이러스 벡터를 위한 바이러스 지놈의 원천으로써 사용될 수 있다. 인간 아데노바이러스는 바이러스 하위 그룹 또는 혈청형이 될 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스는 하위 그룹 A(혈청형 12, 18, 및 31), 서브 그룹 B(혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 및 50), 서브 그룹 C(혈청형 1, 2, 5, 및 6), 서브 그룹 D(혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36-39, 및 42-48), 서브 그룹 E(혈청형 4), 서브 그룹 F(혈청형 40 및 41), 분류되지 않은 혈청군(혈청형 49 및 51) 또는 다른 어떤 아데노바이러스 형청형이 될 수 있다. 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람은 복제 및 결핍 아데노바이러스 벡터(단독으로 멀티로 복제 결핍 아데노바이러스 벡터를 포함)에 익숙하다. 다중 복제-결핍 아데노바이러스 벡터를 포함하여, 복제-결핍 아데노바이러스 벡터의 예는 미국 특허 제 5,837,511; 5,851,806; 5,994,106; 6,127,175; 6,482,616; 및 7,195,896, 및 국제 특허 출원 번호 WO 94/28152, WO 95/02697, WO 95/16772, WO 95/34671, WO 96/22378, WO 97/12986, WO 97/21826, 및 WO 03/022311에 개시되어 있다.

[0498] ***E. 조성물***

[0499] 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 및 핵산 분자는 치료(therapeutic) 및 예방(prophylactic) 제제를 포함하는, 약학적 조성물에 포함될 수 있고, 하나 또는 그 이상의 보강제, 및 항바이러스 약물과 같은, 선택적으로, 다른 치료 성분과 함께 혼합될 수 있다. 몇가지 실시형태에서, 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자의 하나 또는 그 이상을 포함하는 조성물은 면역원 조성물이다. 상기 조성물은 본 명세서에서 개시된와 같이 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 임의의 PreF 항원(본 명세서에서 개시된 바와 같이 임의의 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 단백질 나노입자와 같은), 본 명세서에서 개시된와 같이 임의의 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 바이러스-같은 입자, 본 명세서에서 개시된 바와 같이 임의의 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 또는 본 명세서에서 개시된 바와 같이 임의의 재조합 RSV F 단백질을 암호화하거나 또는 포함하는 벡터를 포함할 수 있다.

[0500] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 본 명세서에서 개시된 임의의 대체(S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 첫 번째 분리된 항원을 포함하고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형(subtype) A RSV F 단백질, 및 본 명세서에서 개시된 임의의 대체(S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 두번째 분리된 항원에 기반하고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형 B RSV F 단백질에 기반된다.

[0501] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 본 명세서에서 개시된 임의의 대체 (S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 첫번째 단백질 나노입자를 포함하고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형 A RSV F 단백질, 및 본 명세서에서 개시된 임의의 대체(S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 두번째 단백질 나노입자에 기반되고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형 B RSV F 단백질에 기반된다.

[0502] 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에서 개시된 임의의 대체 (S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 첫번째 바이러스 벡터를 포함하고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형 A RSV F 단백질, 및 본 명세서에서 개시된 임의의 대체(S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 두번째 바이러스 벡터에 기반되고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형 B RSV F 단백질에 기반된다.

[0503] 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에서 개시된 임의의 대체(S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 첫번째 바이러스-같은 입자를 포함하고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형 A RSV F 단백질, 및 본

명세서에서 개시된 임의의 대체(S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 두번째 바이러스-같은 입자에 기반되고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형 B RSV F 단백질에 기반된다.

[0504] 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에서 개시된 임의의 대체(S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 첫번째 핵산 분자 (발현 벡터와 같은)를 포함하고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형 A RSV F 단백질, 및 본 명세서에서 개시된 임의의 대체(S155C, S290C, 및 S190F 대체 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체와 같은)에 의해 선융합 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 두번째 핵산 분자 (발현 벡터와 같은)에 기반되고, 상기 안정된 RSV F 단백질은 하위유형 B RSV F 단백질에 기반된다.

[0505] 상기 약학적 조성물은 당업계의 숙련자에게 알려진 다양한 투여 모드, 예를 들면, 비강(nasal), 폐(pulmonary), 근육내(intramuscular), 피하(subcutaneous), 정맥내(intravenous), 복강내(intraperitoneal), 또는 비경구(parenteral) 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0506] 조성물을 제조하기 위하여, 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자는 접합체(conjugate)의 분산을 위한 베이스 또는 비히클뿐만아니라, 다양한 약학적으로 허용가능한 첨가제와 혼합될 수 있다. 원하는 첨가제는 아르기닌(arginine), 소듐 하이드록사이드(sodium hydroxide), 글라이신(glycine), 염산(hydrochloric acid), 시트르산(citric acid), 등과 같은 pH 조절제를 포함하나, 제한하지 않는다. 추가적으로, 국소 마취약(anesthetics) (예를 들면, 벤질알코올(benzyl alcohol)), 등장제(isotonizing agent)(예를 들면, 소듐클로라이드, 만니톨(mannitol), 소르비톨(sorbitol)), 흡수 억제제(adsorption inhibitors) (예를 들면, TWEEN® 80), 용해도 증강제(solubility enhancing agent) (예를 들면, 사이클로덱스트린(cyclodextrins) 및 이의 유도체), 안정제(stabilizers) (예를 들면, 혈청 알부민), 및 환원제(reducing agent) (예를 들면, 글루타치온(glutathione))이 포함될 수 있다. 당업계에 잘 알려진 많은 다른 적합한 보강제 중에서, 알루미늄 하이드록시와 같은 보강제(ALHYDROGEL®, Brenntag Biosector, Copenhagen, Denmark 및 AMPHOGEL®, Wyeth Laboratories, Madison, NJ로부터 이용할 수 있는), Freund's 보강제, MPL™(3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; Corixa, Hamilton, IN), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA) TLR 작용제(agonists) (TLR-9 작용제와 같은)은 조성물에 포함될 수 있다.

[0507] 조성물이 액체일 때, 일치(unity)로서 얻어진 0.9% (w/v) 생리식염수의 강직성(tonicity)에 참조로서 측정되는 바와 같이, 제제의 강직성(tonicity)은 실질적, 비가역 조직 손상이 투여 위치에서 유도되지 않을 값에서 통상적으로 조정된다. 일반적으로, 용액의 강직성(tonicity)은 약 0.5 내지 약 2.0, 또는 약 0.8 내지 약 1.7와 같은, 약 0.3 내지 약 3.0의 값으로 조정된다.

[0508] 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자는 분산 항원에 용량을 가지는 친수성 화합물, 및 임의의 원하는 첨가제를 포함할 수 있는, 베이스 또는 비히클에서 분산될 수 있다. 베이스는 폴리카르복실산(polycarboxylic acids)의 공중합체(copolymers) 또는 다른 단량체(monomers) (예를 들면, 메틸메트아크릴레이트(methyl (meth)acrylate), 아크릴 산(acrylic acid) 등)을 가지는 카르복실 무수물(carboxylic anhydrides), 폴리비닐 아세테이트(polyvinyl acetate), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(polvinylpyrrolidone)와 같은 친수성 비닐 폴리머, 하이드록시메틸셀룰로오스(hydroxymethylcellulose), 하이드록시프로필셀룰로오스(hydroxypropylcellulose) 등과 같은 셀룰로오스 유도체(cellulose 유도체s), 및 키토산(chitosan), 콜라젠(collagen), 소듐 알기네이트(sodium alginate), 젤라틴(gelatin), 하이룰론산(hyaluronic acid)와 같은 자연 폴리머(natural polymers), 및 이의 비독성 금속을 포함하나 제한하지 않는, 적합한 화합물의 넓은 범위로부터 선택될 수 있다. 종종, 생물 분해 가능서이 있는 폴리머는 베이스 또는 비히클, 예를 들면, 폴리락트산(polylactic acid), 폴리(락트산-글리코산)중합체(poly(lactic acid-glycolic acid) copolymer), 폴리하이드록시 부트릭산(polyhydroxybutyric acid), 폴리(하이드록시 부트릭산-글리코산)공중합체(poly(hydroxybutyric acid-glycolic acid) copolymer) 및 이의 혼합물로서 선택된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 폴리글리세린 지방산 에스테르(polyglycerin fatty acid esters), 수크로오스 지방산 에스테르(sucrose fatty acid esters) 등과 같은 합성 지방산 에스테르(fatty acid esters)은 비히클로서 수행될 수 있다. 친수성 중합체 및 다른 비히클은 단독 또는 조합으로 사용될 수 있고, 증강된 구조의 온전성은 부분적 크리스탈화, 이온결합(ionic bonding), 교차결합(cross-linking) 등에 의해 비히클에 부여될 수 있다. 비히클은 예를 들면, 점막 표면에 직접적 적용을 위하여, 유체(fluid) 또는 점성(viscous) 용액, 젤(gels), 페이스트(pastes), 분말, 마이크로스피어(microspheres) 및 필름(films)을 포함하는, 다양한 형태로서 제공될 수 있다.

[0509] 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자는 다양한 방법에 따라 베이스 또는 비히클과 혼합될 수 있고, 항원의 배출은 확산(diffusion), 비히클의 붕괴(disintegration), 또는 물 채널(water channels)의 연관된 형성으로 될 수 있다. 일부 상황에서, 개시된 항원, 또는 항원을 암호화하는, 발현하거나 또는 포함하는 핵산 또는 바이러스 벡터는 적합한 폴리머, 예를 들면, 이소부틸 2-시아노아크릴에트(isobutyl 2-cyanoacrylate)(예를 들면, Michael et al., J. Pharmacy Pharmacol. 43:1-5, 1991를 참조)로부터 제조된 마이크로스피어(microspheres) 또는 나노캡슐(nanocapsules)에서 분산되고, 연장된 시간에 걸쳐 지연된 운반 및 생체활성을 산출하는, 생체적합한 분산 배지에서 분산된다.

[0510] 약학적 조성물은 pH adjusting 및 buffering 제제, 강직성(tonicity) adjusting 제제, wetting 제제 등, 예를 들면, 소듐 아세테이트, 소듐 락테이트, 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 칼슘 클로라이드(calcium chloride), 소르비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate), 및 트리에탄올아민 올레이트(triethanolamine oleate)과 같은 대략 생리적(physiological) 조건에 요구되는 바와 같이 허용가능한 비히클 물질로서 포함할 수 있다. 고체 조성물을 위하여, 종래의 비독성 약학적으로 허용가능한 비히클은 예를 들면, 약학적 등급의 만니톨, 전분, 마그네슘 스테아레아트(magnesium stearate), 소듐 사카린(sodium saccharin), 탈크(talcum), 셀룰로오스(cellulose), 글루코오스(glucose), 수크로오스(sucrose), 마그네슘 카보네이트(magnesium carbonate), 등을 포함하는 것을 사용될 수 있다.

[0511] 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자 투여를 위한 약학적 조성물은 높은 농도의 유효성분을 위한 적합한 용액, 마이크로에멀젼(microemulsion), 또는 다른 정렬된 구조로서 제조될 수 있다. 비히클은 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 등), 및 적합한 이의 혼합물을 포함하는, 용매 또는 분산 배지일 수 있다. 용액을 위한 적절한 유체성(fluidity)은 예를 들면, 레시틴(lecithin)과 같은 코팅의 사용에 의해, 흩어지게 힐 수 있는 제제의 경우에서 원하는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제(surfactants)의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에서, 등장제, 예를 들면, 조성물에서 슈가(sugars), 만니톨(mannitol) 및 소르비톨, 또는 소듐 클로라이드와 같은 폴리알코올을 포함하는 것이 바람직하다. 개시된 항원의 연장된 흡수는 흡수, 예를 들면, 모노스테아레이트 염(monostearate salts) 및 젤라틴(gelatin)를 지연하는 제제를 조성물에 포함하여 초래할 수 있다.

[0512] 특정 실시형태에서, 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자는 시간-방출 제제(time-release formulation)의 형식으로 투여될 수 있다, 예를 들면 느리게 방출되는 중합체를 포함하는 조성물이 있다. 상기 조성물들은 빠른 방출에 대하여 보호할 수 있는 운반체와 함께 만들어질 수 있다, 예를 들면 폴리머와 같은 방출 조절형 운반체(a controlled release vehicle), 마이크로캡슐에 넣어진 운반 시스템 또는 바이오접착성 젤(bioadhesive gel)이 있다. 공개된 다양한 조성물에서 지속적인 운반은, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 하이드로겔(aluminum monostearate hydrogels) 및 젤라틴(gelatin) 같이 흡수를 지연시키는 조성물을 포함하여 이루어질 수 있다. 방출 조절형 제제가 요구될 때, 방출 조절형 바인더(controlled release binders)는 용도에 적합하도록 활성물질에 활성이 없으면서, 개시된 항원 및/또는 다른 생물학적인 활성물질의 일부로 포함될 수 있는 임의의 생체 적합한 방출 조절형 물질을 포함할 수 있다. 수많은 물질들이 당해 기술분야에 알려져 있다. 유용한 방출 조절형 바인더에는 운반된 후(예를 들면, 점막 표면, 또는 체액의 존재 안에서)에 생리적 조건하에서 서서히 대사되는 물질들이 있다. 적절한 바인더는 서서히 방출되는 제재에 이용하기 위하여 당업계에 잘 알려진 생체적합한 중합체 및 공중합체를 포함하나 여기에 제한하지는 않는다. 이러한 생체적합한 화합물은 독성이 없고, 주위조직에 비활성이며, 비강 자극(nasal irritation), 면역 반응, 염증 등과 같은 현저하고 부정적인 부작용을 유발하지 않는다. 그들은 생체적합하고 신체에서 쉽게 제거될 수 있는 대사산물로 분해된다. 치료 단백질의 운반 조절을 위한 수많은 시스템이 잘 알려져 있다(예를 들면, 미국 특허 제5,055,303; 미국 특허 제5,188,837; 미국 특허 제4,235,871; 미국 특허 제4,501,728; 미국 특허 제4,837,028; 미국 특허 제4,957,735; 및 미국 특허 제5,019,369; 미국 특허 제5,055,303; 미국 특허 제5,514,670; 미국 특허 제5,413,797; 미국 특허 제5,268,164; 미국 특허 제5,004,697; 미국 특허 제4,902,505; 미국 특허 제5,506,206; 미국 특허 제5,271,961; 미국 특허 제5,254,342; 및 미국 특허 제5,534,496).

[0513] 사용을 위한 예시적인 폴리머 물질은 가수분해될 수 있는 에스터 결합(ester linkages)을 가지고 있는 공중합체적 및 단일중합체적 폴리에스터에서 유래한 고분자 매트리스(polymeric matrices)를 포함하나 여기에 제한하지 않는다. 이것들의 많은 수가 생분해가능하며 독성이 없거나 적은 산물로 분해되는 물질인 것으로 당해 기술에 알려져 있다. 예시적인 폴리머는 폴리글리코산(polyglycolic acids) 및 폴리락트산(polylactic acids), 폴리(DL-lactic acid-co-glycolic acid)), 폴리(D-lactic acid-co-glycolic acid), 및 폴리(L-lactic acid-co-glycolic acid)을 포함한다. 다른 유용한 생분해성 또는 생체부식성(bioerodable) 중합체는 폴리(epsilon-

caprolactone), 폴리(epsilon-aprolactone-CO-lactic acid), 폴리(epsilon-aprolactone-CO-glycolic acid), 폴리(beta-hydroxy butyric acid), 폴리(alkyl-2-cyanoacrilate)와 같은 중합체, 하이드로젤, 폴리(hydroxyethyl methacrylate), 폴리아마이드(polyamides), 폴리(amino acids)(예를 들면, L-루신(L-leucine), 글루탐산(glutamic acid), L-아스파라긴산(L-aspartic acid) 등), 폴리(ester urea), 폴리(2-hydroxyethyl DL-aspartamide), 폴리아세탈 폴리머(polyacetal polymers), 폴리오르소에스테르(polyorthoesters), 폴리카보네이트(polycarbonate), 폴리말레아마이드(polymaleamides), 폴리사카라이드(polysaccharides), 및 이의 공중합체(copolymers)들을 포함하나 이에 제한하지 않는다. 상기 제재들을 제조하기 위한 많은 방법들이 당해 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다(예를 들면, 지연된 및 조절된 배출 약물 운반 시스템, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978). 다른 유용한 제재들은 방출 조절형 마이크로캡슐(U.S. Patent Nos. 4,652,441 및 4,917,893), 마이크로캡슐 및 다른 제재들을 만드는데 유용한 젖산-글리콜산 공중합체(lactic acid-glycolic acid copolymers)(U.S. Patent Nos. 4,677,191 및 4,728,721) 및 수용성 펩타이드를 위한 지연-방출 조성물(미국 특허 제 4,675,189)을 포함한다.

[0514] 약학적 조성물은 통상적으로 제조, 저장 및 사용의 조건하에서 살균 및 안정하다. 살균 용액은 필요에 따라, 하나 또는 여기에 열거된 성분들의 조합이 적절한 용매에 요구되는 양에 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자들을 도입하여 멸균 여과한 후에 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산은 개시된 항원 및/또는 다른 생물학적 활성제를 기본적인 분산 배지 및 여기에 열거된 것들로부터 요구되는 다른 성분들을 포함하고 있는 살균 운반체에 도입하여 제조된다. 살균 분말의 경우에, 제조 방법은 개시된 항원의 분말 및 이의 이전의 살균-여과된 용액으로부터 임의의 추가적으로 요구되는 성분을 낼 수 있는 진공 건조 및 냉동-건조를 포함한다. 미생물의 활동의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤(parabens), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀(phenol), 소르빅산(sorbic acid), 티메로살(thimerosal) 등에 의해 이루어질 수 있다.

[0515] 투여가능한 조성물을 준비하는 실제적인 방법은 당해 기술분야에 있어 ㅌ토통상의 기술자에게 잘 알려져 있거나 또는 명백하며 *Remingtons Pharmaceutical Science*, 19th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvani, 1995.와 같은 출판물에 더욱 자세하게 설명되어 있다.

[0516] 몇가지 실시형태에서, 조성물은 보강제를 포함한다. 당업계의 일반적인 기술을 가진 사람은 예를 들면, 면역원 조성물(immunogenic composition)에 포함될 수 있는 것과 같은 보강제에 익숙하다. 몇가지 실시형태에서, 보강제는 보강제 및 개시된 항원, 또는 핵산 또는 항원을 코딩, 발현 또는 포함하는 바이러스 벡터를 포함하고 있는 면역원 조성물을 개체에 투여하였을 때 Th1에 편향된 면역 반응을 끌어낼 수 있는 것들이 선택된다.

[0517] 한가지 적합한 보강제는 비독성의 박테리아 지질다당류 유도체(bacterial lipopolysaccharide derivative)이다. 지질 A의 적합한 비독성 유도체의 일예는, 모노포스포릴 지질 A(monophosphoryl lipid A) 또는 더 특정하게는 3-탈아실화 모노포스포릴 지질 A(3-Deacylated monophoshoryl lipid A)(3D-MPL)이다. 예를 들면, 미국 특허 제4,436,727; 제4,877,611; 제4,866,034 및 4,912,094이다. 3D-MPL은 주로 인터페론-y(IFN-y)(Th1) 표현형을 가지는 CD4+ T 세포 반응을 촉진한다. 3D-MPL은 GB2220211 A에 개시된 방법에 따라 생산될 수 있다. 화학적으로 그것은 3, 4, 4 또는 6의 아실화된 체인을 가지는 3-탈아실화 모노포스포릴 지질 A의 혼합물이다. 조성물에서, 작은 입자 3D-MPL은 사용될 수 있다. 작은 입자 3D-MPL은 0.22 ㎛ 필터를 통하여 살균-여과될 수 있는 크기를 가지는 입자이다. 그러한 제조 방법은 WO94/21292에 설명되어 있다.

[0518] 다른 실시형태에서, 미국특허 제 6,005,099호 및 유럽 특허 제 0 729 473 B1에 설명된 것처럼 지질 다당류는 β(1-6) 글루코사민 이당류(glucosamine disaccharide)일 수 있다. 당업계의 통상의 기술자는 상기 참조의 내용에 기초하여 3D-MPL과 같은 지질다당류를 쉽게 생산할 수 있을 것이다. 이전에 언급했던 면역자극제(immunostimulants)(LPS 또는 MPL 또는 3D-MPL의 구조와 유사한 것들)에 추가적으로, MPL의 상기 구조의 하위부분인 아실화된 단당류 및 이당류의 유도체들 역시 적합한 보강제이다.

[0519] 몇 가지 실시형태에서, 톨유사수용체(Toll-like receptor, TLR) 작용제(agonist)는 보강제로 사용된다. 예를 들면 개시된 PreF 항원은 RSV에 대한 면역반응의 중화를 끌어내기 위하여 사용되는 면역원 조성물에서 TLR 작용제와 조합될 수 있다. 예를 들면, TLR 작용제는 TLR-4 작용제와 같은 지질 A의 합성 유도체(예를 들면, WO 95/14026, 및 WO 01/46127) 및 알킬 글루코사미니드 인산(alkyl Glucosaminide phosphate)(AGP; 예를 들면, WO 98/50399 또는 미국 특허 제 6,303,347; 6,764,840)일 수 있다. 다른 적합한 TLR-4 리간드는, 예를 들면, 그람 음성 박테리아에서 유래한 지질다당류 및 이의 유도체, 또는 이의 단편, 특히 LPS의 비독성 유도체(3D-MPL과 같이)와 같이 TLR-4를 통한 신호 반응을 유발할 수 있다. 다른 적합한 TLR 작용제는 하기의 것들이 있다: 열충격 단백질(heat shock protein, HSP) 10, 60, 65, 70, 75 또는 90; 계면활성 단백질 A(surfactant protein A),

히알루로난 올리고당(hyluronan oligosaccharides), 헤파란 황산염(heparan sulphate) 단편, 피브로넥틴(fibronectin) 단편, 피브리노겐(fibrinogen) 펩타이드 및 베타-디펜신-2(β-defensin-2), 및 무라밀 디펩티드(muramyl dipeptide, MDP). 하나의 실시형태에서 TLR 작용제는 HSP 60, 70 또는 90이다. 다른 적합한 TLR-4 리간드는 WO 2003/011223 및 WO 2003/099195에 tjfuad되어 있다.

[0520] 추가의 TLR 작용제(TLR 신호 경로를 통하여 신호 반응을 유발할 수 있는 물질과 같은 것) 또한 TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 및/또는 TLR9의 작용제와 같이 보강제로서 유용하다. 따라서, 일 실시형태에서, 조성물은 하기로 구성되는 군에서 선택되는 보강제를 추가적으로 포함한다: TLR-1 작용제, TLR-2 작용제, TLR-3 작용제, TLR-4 작용제, TLR-5 작용제, TLR-6 작용제, TLR-7 작용제, TLR-8 작용제, TLR-9 작용제, 또는 이의 조합.

[0521] 일 실시형태에서, TLR 작용제는 TLR-1을 통하여 신호 반응을 유발할 수 있는 것들을 이용한다, 예를 들어 하기에서 하나 또는 그 이상: 트리-아실화된 리포펩타이드(Tri-acylated lipopeptides, LPs); 페놀-용해성 모듈린(phenol-soluble modulin); 결핵균(Mycobacterium tuberculosis) LP; S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-L-ys(4)--OH, 박테리아 당단백질의 아실환된 아미노말단을 모방한 트리하이드로클로라이드(trihydrochloride) (Pam3Cys) 및 보렐리아 부르그도르페리(Borrelia burgdorferi)로부터 유래한 OspA LP. 다른 실시형태에서, TLR 작용제는 TLR-2를 통하여 신호 반응을 유발할 수 있는 것들을 이용한다, 예를 들어 당단백질, 펩티도글리칸(peptidoglycan), 결핵균, 보렐리아 부르그도르페리 또는 매독 유래의 박테리아 리포펩타이드의 하나 또는 그 이상; 황색포도상 구균(Staphylococcus aureus)를 포함하는 종에서 유래한 펩티도글리칸; 리포타이콴(lipoteichoic acids), 만누론산(mannuronic acids), 느나이세리아 포린(Neisseria porins), 박테리아 섬모(bacterial fimbriae), 예르시나 병독성 인자(Yersina virulence factor), 거대세포바이러스 입자(CMV virions), 홍역 혈구응집소(measles haemagglutinin), 및 효모(yeast)에서 유래한 지모산(zymosan). 일부 실시형태에서, TLR 작용제는 TLR-3를 통하여 신호 반응을 유발할 수 있는 것들을 이용한다, 예를 들어 이중가닥 RNA (dsRNA), 또는 폴리이노시닉-폴리시티딜산(polyinosinic-polycytidylic acid)(Poly IC), 바이러스 감염과 관련있는 분자 핵산의 하나 또는 그 이상. 추가 실시형태에서, TLR 작용제는 TLR-5를 통하여 신호 반응을 유발할 수 있는 것들을 이용한다, 예를 들어 박테리아 플라젤린(flagellin). 추가 실시형태에서, TLR 작용제는 TLR-6를 통하여 신호 반응을 유발할 수 있는 것들을 이용한다, 예를 들어 마이코박테리아 당단백질(mycobacterial lipoprotein), 디-아실화된 LP, 및 페놀-용해성 모듈린의 하나 또는 그 이상. 추가 TLR6 작용제는 WO 2003/043572에 설명되어 있다. 실시형태에서, TLR 작용제는 TLR-7를 통하여 신호 반응을 유발할 수 있는 것들을 이용한다, 예를 들어 단일가닥 RNA(ssRNA), 록소리빈(loxoribine), N7 및 C8 위치에서 구아노신 아날로그(guanosine analogue), 또는 이미다조퀴놀린(imidazoquinoline) 화합물, 또는 이의 유도체의 하나 또는 그 이상. 일 실시형태에서, 작용제는 이미퀴모드(imiquimod)이다. 추가적으로 TLR7 작용제는 WO 2002/085905에 설명되어 있다. 일부 실시형태에서, TLR 작용제는 TLR-8을 통하여 신호 반응을 유발할 수 있는 것들을 이용한다. 적절하게, TLR-8을 통하여 신호 반응을 유발할 수 있는 TLR 작용제는 단일가닥 RNA, 항-바이러스 활성이 있는 이미다조퀴놀린(imidazoquinoline) 분자, 예를 들면 레시퀴모드(resiquimod)(R848); 레시퀴모드는 또한 TLR-7에 의해 인식될 수 있다. 여기에 사용할 수 있는 다른 TLR-8 작용제는 WO 2004/071459에 설명되어 있다.

[0522] 추가 실시형태에서, 보강제는 TLR-9를 통하여 신호 반응을 유도할 수 있는 작용제를 포함한다. 예를 들면, 보강제는 HSP90, 박테리아 또는 바이러스 DNA, 및/또는 비메틸화된(unmethylated) CpG 뉴클레오티드(예를 들면, CpG oligonucleotide)를 포함한다. 예를 들면, CpG-포함 올리고뉴클레오티드는 대부분 Th1 반응을 유도한다. 상기 올리고뉴클레오티드는 잘 알려져 있으며 예를 들면, WO 95/26204, WO 96/02555, WO 99/33488 및 미국 특허 제 5,278,302, 5,666,153, 6,008,200 및 5,856,462에 잘 설명되어 있다. 따라서, 개시된 조성물에서 보강제로 사용되는 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 디뉴클레오티드 CpG 모티프를 가지고 있는 올리고뉴클레오티드와 같이, CpG를 가지고 있는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 혼합된 인터뉴클레오티드 링키지(internucleotide linkages) 또한 포함된다.

[0523] 항원, 또는 핵산 또는 항원을 코딩, 발현 또는 포함하는 바이러스 벡터와 같이 면역원 조성물에 사용될 수 있는 다른 보강제는, 예를 들면 독자적으로 또는 3D-MPL, 또는 여기에 개시된 다른 보강제와 조합하여 사용될 수 있는 것은 Q21과 같은 사포닌(saponin)이다. 일부 실시예에서, 사포닌은 보강제로서 사용된다, 예를 들면, PreF 항원의 전신 투여. 보강제로서 사포닌의 사용(예를 들면, Quil A의 사용, 남부 미국 나무 퀼라자 사포나리아 몰리나의 잎에서 유래)은 당업계의 숙련자에게 익숙하다(예를 들면, 미국 US 5,057,540 및 EP 0 362 279 Bl. EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). TQS21 및 QS17(Quil A의 HPLC 정제 분획)과 같은 용혈성 사포닌은 잠재적 시스템 보강제로 알려져 있으며, 미국 특허 제 5,057,540 및 EP 0 362 279 B1에 이들의 생산이 개시되어

있다.

[0524] 보강제는 또한 알루미늄 또는 칼슘염, 특히 알루미늄 하이드록사이드, 인산 알루미늄(aluminum phosphate) 및 인산 칼슘(calcium phosphate)과 같은 미네랄 염(mineral salts)을 포함한다.

[0525] 조성물에 사용하기 위한 적절한 Th1 편향된 보강제의 다른 클래스는 외막 단백질-기반 면역자극 조성물(outer membrane proteins (OMP)-based immunostimulatory compositions)을 포함한다. 외막 단백질-기반 면역자극 조성물은 특히 점막 보강제(mucosal adjuvants)로서, 예를 들면 비강내(intranasal) 투여에 적합하다. 외막 단백질-기반 면역자극 조성물은 예를 들면, 나이세리아(Neisseria) 종과 같이, 운반체 또는 박테리아 또는 바이러스 항원(예를 들면, 미국 특허 제 5,726,292; 미국 특허 4,707,543)과 같은 면역원 조성물로 이용되는, 그람-음성 박테리아에서 유래한 (OMPs, 일부 포린 포함) 준비의 속이다. 추가적으로, 프로테아좀(proteosomes)은 운반체 또는 약 20 nm to 약 800 nm의 운반체-유사 OMP 클러스터로 자가-조립하는 능력이 있으며, 비공유적으로 포함, 협력, 연관(예를 들면, 정전기적으로 또는 소수성으로)하거나, 또는 그렇지않으면 단백질 항원(Ags), 특히 소수성 모이에티(moiety)를 가지는 항원과 협력한다. 프로테아좀은, 예를 들면, 당업계에 설명된 방법(예를 들면, 미국 특허 제 5,726,292 또는 미국 특허 5,985,284; 2003/0044425.)에 따라 만들어질 수 있다.

[0526] 프로테아좀은 수막염균(Neisseria meningitidis)으로부터 화학적으로 추출된 외막 단백질(대부분 클래스 4 OMP로 알려진 포린 A 및 B)로 주로 구성되며, 세제에 의하여 용액 상태로 유지된다(Lowell G H. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In: Levine M M, Woodrow G C, Kaper J B, Cobon G S, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206). 프로테아좀은 여기에 개시된 PreF 폴리펩타이드를 포함하는, 바이러스 소스에서 유래한 정제된 또는 재조합 단백질과 같은 다양한 항원으로 만들어 질 수 있다. 세제의 점진적 제거는 약 100-200 nm 직경의 미립자로 된 소수성 복합체의 형성을 가능하게 한다(Lowell G H. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In: Levine M M, Woodrow G C, Kaper J B, Cobon G S, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206).

[0527] 서로 상이한 보강제의 조합은 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자를 조성물에 사용할 수 있게 한다. 예를 들면, 이미 언급했듯이, QS21은 3D-MPL과 함께 만들어질 수 있다. QS21:3D-MPL의 비율은 통상적으로 1:10 에서 10:1의 순서; 예를 들면 1:5 에서 5:1, 및 자주 실질적으로 1:1이다. 통상적으로, 비율은 2.5:1 에서 1:1 3D-MPL:QS21(예를 들면 AS01(GlaxoSmithKline))의 범위 안에 있다. 다른 조합 보강제 제제는 3D-MPL 및 알루미늄 하이드록사이드와 같은 알루미늄염(예를 들면 AS04 (GlaxoSmithKline)을 포함한다. 조합하여 제조되었을 때, 이 조합은 항원-특이적 Th1 면역 반응을 증대시킬 수 있다.

[0528] 일부 경우에, 보강제 제제는 칼슘 또는 알루미늄 염, 예를 들면 인산 칼슘, 인산 알루미늄 또는 알루미늄 하이드록사이드와 같은 미네랄 염이다. 일부 실시형태에서, 보강제는 예를 들면 수중 유형 에멀전(oil-in-water emulsion)(예를 들면 MF59(Novartis) 또는 AS03 (GlaxoSmithKline))과 같은 오일 및 물 에멀전(water emulsion)을 포함한다. 수중 유형 에멀전의 일 예로는 수용성 운반체에 있는 스쿠알렌(squalene)과 같은 대사가능한 오일, 예를 들면, 알파-토코페롤처럼 토코페롤과 같은 토콜, 및 소르비탄 트리올레이트(sorbitan trioleate)(Span 85) 또는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(polyoxyethelene sorbitan monooleate)(Tween 80)와 같은 계면활성제들이 있다.

[0529] 약학적 조성물은 통상적으로치료적으로 유효한 양의 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자를 포함하고 있으며, 통상의 기술에 의하여 제조될 수 있다. 인간 개체에 투여하는 것을 포함하는, 면역원 조성물의 제조는, 일반적으로 Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978에 설명되어 있다. 리포좀(liposomes) 내에 넣는 것은, 예를 들면, Fullerton에 의하여, 미국 특허 제4,235,877호에 설명되어 있다. 단백질을 거대분자로 접합하는 것은, 예를 들면, Likhite에 의한 미국 특허 제4,372,945 및 Armor 등에 의한 미국 특허 제4,474,757에 개시되어 있다. 통상적으로, 면역원 조성물의 각 용량에서 항원의 양은 중요하면서, 현저한 부작용없이 면역반응을 유도할 수 있는 양으로, 선택되어 진다.

[0530] 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자의 양은 예를 들면, 쓰이고 있는 특정 항원, 투약의 경로 및 계획, 및 대상 집단에 따라 다양하다. 통상적으로, 각 인간 투여 용량은 약 1 ㎍에서 약 100 ㎍과 같이, 예를 들면, 약 1 ㎍에서 약 50 ㎍과 같이, 약 1 ㎍과 같이, 약 2 ㎍과 같이, 약 5 ㎍과 같이, 약 10 ㎍과 같이, 약 15 ㎍과 같이, 약 20 ㎍과 같이, 약 25 ㎍과 같이, 약 30 ㎍과 같이, 약 40 ㎍과 같이, 또는 약 50 ㎍과 같이, 1-1000 ㎍의 단백질로 이루어진다. 면역원 조성물에 활용될 수 있는 양은 개체 집단(예를 들면, 유아 또는 연

장자)에 기반하여 선택된다. 특정 조성물의 최적의 양은 개체에서 항체 역가 및 다른 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의하여 확인될 수 있다. 면역원 조성물에서 치료적으로 유용한 항원의 양은 단일 용량 투여에 의하면 면역 반응을 유도하는데 비효과적이나, 예를 들면 프라임-부스트 투여 프로토콜(prime-boost administration protocol)과 같이 여러 번 투여하였을 때 효과적인 양을 포함할 수 있다.

[0531] 몇몇 실시예에서, 인간에서 RSV에 대한 면역반응을 끌어내기 위한 약학적 조성물은 유아(예를 들면, 출생에서 1살 사이 유아, 0에서 6개월 사이 유아, 초기 용량의 나이) 또는 나이든 환자 개체(예를 들어 65세 의상의 개체)에 투여하기 위하여 치료적으로 유용한 양의 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분사를 포함한다. 이러한 다른 응용에 따라 달라질 수 있는 보강제의 선택, 및 최적 보강제 및 각 상황에 맞는 농도는 당업계의 기술자에 의하여 경험적으로 결정될 수 있는 것으로 인정되고 있다.

[0532] 특정 실시형태에서, 약학적 조성물은 RSV 감염을 막거나 감소시키는 백신이다. 일부 실시형태에서, 면역원 조성물은 RSV 감염에 따르는 병리학적 반응을 막거나 감소시키는 백신이다. 선택적으로, 개시된 PreF 항원, 바이러스 벡터, 또는 핵산 분자를 포함하는 약학적 조성물은 RSV보다 병원성 생물체의 적어도 하나의 추가 항원과 함께 만들어진다. 예를 들어, 병원성 생물체란 호흡 기도의 병원균(예를 들면 호흡기 감염을 일으키는 바이러스 또는 박테리아)일 수 있다. 특정 예에서, 약학적 조성물은 예를 들면 인플루엔자 또는 파라인플루엔자와 같이 호흡 기도의 감염을 유발하는 바이러스처럼 RSV보다 병원성 생물체에서 유래한 항원을 포함한다. 다른 실시형태에서, 추가 항원은 투여를 촉진하거나 수많은 감염성 생물에 대응하여 개체를 보호하기 위하여 요구되는 접종의 수를 감소시키는 것으로 선택된다. 예를 들면, 항원은 인플루엔자, B형 간염(hepatitis B), 디프테리아(diphtheria), 파상풍(tetanus), 백일해(pertussis), 헤모필루스 인플루엔자(Hemophilus influenza), 폴리오바이러스(poliovirus), 연쇄상구균(Streptococcus) 또는 폐렴균(Pneumococcus), 다른 것들 사이에서 유도될 수 있다.

[0534] ***F. 치료의 방법***

[0535] 몇 가지 실시형태에서, 개시된 PreF 항원, 또는 핵산 또는 PreF 항원을 암호화, 발현 또는 포함하는 바이러스 벡터는 개체에서 RSV에 대한 면역반응을 유도하기 위해 이용된다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 개시된 PreF 항원, 또는 핵산 또는 PreF 항원을 암호화, 발현 또는 포함하는 바이러스 벡터를 포함하는 면역원 조성물의 치료적으로 유효한 양은, RSV에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 개체에 투여될 수 있다.

[0536] 본 명세서에 개시된 것에 따르면, 개시된 PreF 항원, 또는 핵산 또는 PreF 항원을 암호화, 발현 또는 포함하는 바이러스 벡터를 포함하는 면역원 조성물의 예방적으로 또는 치료적으로 유효한 양은, 임시로 그러한 치료가 필요하거나 개체에서 RSV 감염을 방지, 저해, 및/또는 개선하기에 충분한 조건하에 있는 개체에 투여된다. 면역원 조성물은 예를 들면, RSV F 단백질과 같이, RSV 항원에 대하여 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로 개체에 투여된다.

[0537] 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 조성물은 선융합 입체구조(prefusion conformation)를 통하여 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 첫번째 재조합 RSV F 단백질, 및 선융합 입체구조를 통하여 안정화된 아형 B RSV F 단백질인인 두번째 재조합 RSV F 단백질을 포함한다(또는 암호화한다). 몇 가지 실시형태에서, 개체에 투여되는 조성물은 선융합 입체구조를 통하여 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 첫번째 재조합 RSV F 단백질 및, 선융합 입체구조를 통하여 안정화된 아형 B RSV F 단백질인인 두번째 재조합 RSV F 단백질의 혼합물(예를 들면 약 1:1, 1:2, 2:1, 2:3, 3:2, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1, 3:5, 5:3, 1:5, 5:1, 5:7, 7:5 혼합물)을 포함한다.

[0538] 일부 실시형태에서 개체에 투여되는 조성물은 여기에 개시된 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환) 중 임의의 것에 의하여 선융합 입체구조로 안정화되고, 아형 A RSV F 단백질을 기반으로 하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 첫 번째 단백질 나노입자(nanoparticle), 및 여기에 개시된 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환) 중 임의의 것에 의하여 선융합 입체구조로 안정화되고, 아형 B RSV F 단백질을 기반으로 하는 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 두 번째 단백질 나노입자를 포함한다.

[0539] 일부 실시형태에서 개체에 투여되는 조성물은 여기에 개시된 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환) 중 임의의 것에 의하여 선융합 입체구조로 안정화되고, 아형 A RSV F 단백질을 기반으로 하는 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 첫 번째 핵산 분자(예를 들면 발현 벡터), 및 여기에 개시된 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환) 중 임의의 것

에 의하여 선융합 입체구조로 안정화되고, 아형 B RSV F 단백질을 기반으로 하는 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 두 번째 핵산 분자(예를 들면 발현 벡터)를 포함한다.

[0540] 일부 실시형태에서, 여기에 개시된 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환) 중 임의의 것에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 RSV F 단백질을 함유하는 페리틴(ferritin) 나노입자를 포함하는 조성물은 개체에 투여된다. 일부 실시형태에서 개체에 투여되는 조성물은 여기에 개시된 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환) 중 임의의 것에 의하여 선융합 입체구조로 안정화되고, 아형 A RSV F 단백질을 기반으로 하는 재조합 RSV F 단백질을 함유하는 첫 번째 페리틴 나노입자, 및 여기에 개시된 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환) 중 임의의 것에 의하여 선융합 입체구조로 안정화되고, 아형 B RSV F 단백질을 기반으로 하는 재조합 RSV F 단백질을 함유하는 두 번째 페리틴 나노입자를 포함한다. 바이러스 항원을 함유하는 페리틴 나노 입자를 만드는 방법 및 그들의 예방접종 목적의 사용(예를 들면, 인플루엔자 항원에 대한 예방접종)은 당업계에 개시되어 있다(예를 들면, Kanekiyo 등, Nature, 499:102-106, 2013, 전체가 본 명세서에 참조로 있음).

[0541] 일부 실시형태에서, RSV 감염이 있거나, 예를 들면, 노출 또는 RSV 노출에 대한 가능성 때문에 감염이 진행될 위험성이 있는 개체가 치료를 위해 선택된다. 개시된 치료 조성물의 치료적으로 유효한 양을 투여한 후에, 개체는 RSV 감염, RSV 감염과 관련있는 증상들, 또는 모두에 대해 모니터될 수 있다. 거의 모든 인간이 3살 정도에 RSV에 감염되기 때문에, 전체 출생 집단(cohort)이 면역에 대해 관련 있는 집단에 해당한다. 이것은, 예를 들면, 출생 후부터 6개월 사이, 6개월부터 5살 사이, 항체의 수동 전달을 통하여 유아를 보호하고자 하는 임신한 여성(또는 가임기 여성), 새로 출생하거나 또는 출생 예정의 유아를 가진 가족들, 및 50세 이상의 개체에서 어느 때에나 최적 면역 계획(immunization regimen)을 시작함으로 이루어질 수 있다.

[0542] 조산, 기관지폐형성장애, 선천적 심장 질환을 가지는 아이들을 포함한 현저한 징후들(예를 들면 입원) 및 RSV 감염의 위험성이 큰 개체들이 심각한 질병에 가장 취약하다. 아토피 또는 아토피의 가족력이 있는 사람들이 유아기 동안의 심각한 질병과 관련되어 있다. 유아기 및 성인기 동안, 질병은 점차 완화되나 하부기도 질환과 관련있으며 일반적으로 부비동염(sinusitis)을 동반한다. 질병의 심각성은 자활능력이 떨어지는 연장자들(예를 들면, 65세 이상의 인간)에서 증가한다. 심각한 질병은 또한 심각한 복합 면역결핍 질병을 가지거나 골수 또는 폐 이식 후의 사람들에서도 일어난다. (예를 들면, Shay *et al.*, JAMA,282:1440?6, 1999; Hall *et al.*, N Engl J Med. 2009;360:588?598; Glezen *et al.*, *Am J Dis Child.*, 1986;140:543?546; and Graham, Immunol. Rev., 239:149-166, 2011, 각각은 본 명세서에 참조로 포함되어 있음). 따라서, 상기 개체들은 개시된 PreF 항원, 또는 핵산 또는 PreF 항원을 암호화, 발현 또는 포함하는 바이러스 벡터를 투여하기 위하여 선택될 수 있다.

[0543] 여기에 개시된 방법 및 조성물에 따라 치료하는 일반적 개체들은 인간, 뿐만 아니라 비인간 영장류 및 소와 같은 다른 동물들을 포함한다. 여기에 개시된 방법, 위험 인자를 스크리닝하는 방법에 따라 치료 또는 예방하기 위한 개체를 확인하는 방법은 개체에서 표적되거나 또는 의심되는 질병 또는 증상, 또는 존재하는 질병 또는 증상의 상태를 결정하는 것과 관련이 있다. 상기 스크리닝 방법은 환경적, 가족적, 직업적, 또는 표적되거나 또는 의심되는 질병 또는 증상과 연관이 있는 다른 위험 요소들, 뿐만 아니라 RSV 감염을 감지 및/또는 특정하기 위하여 당업계에 잘 알려져 있고 이용하고 있는 다양한 ELISA 및 다른 면역분석(immunoassay) 방법들과 같이 진단 방법을 결정하는 종래의 워크업(work-ups)을 포함한다. 상기 및 다른 일상적 방법은 임상의사가 여기에 개시된 방법 및 약학적 조성물을 이용하여 치료가 필요한 환자들을 선택할 수 있도록 한다. 면역원 조성물은 독립적인 예방 또는 치료 프로그램으로, 또는 다른 치료에 후속, 부속 또는 조합하는 치료 프로그램으로서 투여될 수 있다.

[0544] 면역원 조성물은 백신 프로토콜 또는 조합 제재와 조직화하여 이용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 조합 면역원 조성물 및 동등한 면역 프로토콜은 RSV F 단백질에 대한 면역 반응처럼, RSV 항원에 대한 면역 반응을 각각 일으킬 수 있는 별도의 면역원 또는 제재를 채택할 수 있다. RSV 항원에 대하여 면역 반응을 일으킬 수 있는 별도의 면역원 조성물은 단일 면역 스텝으로 개체에 투여되는 다가(polyvalent) 면역원 조성물과 결합할 수 있고, 또는 동등한 면역 프로토콜에 따라 개별적으로(단가 면역원 조성물에서) 투여될 수 있다.

[0545] 면역원 조성물의 투여는 예방 또는 치료 목적으로 이루어질 수 있다. 예방 목적일 때, 면역원 조성물은 임의의 증상, 예를 들어 감염에 대비하여, 미리 제공될 수 있다. 면역원 조성물의 예방 목적 투여는 임의의 다음 감염을 막거나 개선하는 역할을 할 수 있다. 치료 목적일 때, 면역원 조성물은 감염 또는 질병의 증상의 개시에 또는 그 후에, 예를 들면 RSV 감염 증상의 시작 후에, 또는 RSV 감염의 진단 후에 제공될 수 있다. 면역원 조성

물은 그러므로 바이러스에 대한 노출 또는 잠재적 노출, 또는 감염의 실제 개시 후에 나타나는 감염 및/또는 관련된 질병 증상들의 예상되는 심각성, 지속성 또는 규모를 지연시키기 위하여 RSV의 예상했던 노출에 앞서 제공될 수 있다.

[0546] 투여는 병원성 감염을, 예를 들면, 감염을 저해하거나 및/또는 감염의 신호 및/또는 증상을 감소시키는 것, 치료하거나 막을 수 있도록 충분한 면역 반응을 유도한다. 이러한 용도에 효과적은 양이란 질병의 심각성, 개체 건강의 일반적인 상태, 개체 면역 시스템의 강인성에 의존한다. 개시된 면역원 조성물의 치료적으로 유효한 양이란 개체 증상의 선명 정도 또는 의사 도는 다른 검증된 관찰자에 의한 객관적으로 확인가능한 개선 정도에 의해 제공되는 것이다.

[0547] 예방 및 치료 목적을 위하여, 면역원 조성물은 연장된 기간, 또는 반복적인 투여 프로토콜(예를 들여, 시간마다, 날마다, 또는 주마다, 반복적인 투여 프로토콜)에 따라 지속적인 전달(예를 들면, 지속적인 피부를 통한, 점막 또는 정맥을 통한 전달)에 의하여 단일 볼루스(bolus) 전달로 투여될 수 있다. 치료적으로 유효한 양의 면역원 조성물은 여기에 나와 있는 표적되는 질병 또는 상태와 연관있는 하나 또는 그 이상의 증상 또는 확인 가능한 상태를 완화시키는 의학적으로 중요한 결과를 낼 수 있는 장기적인 예방 또는 치료 계획 내에서 반복적인 양으로 제공될 수 있다. 이 텍스트에서 유효한 용량의 결정은 통상적으로 인간 임상 시도에 후속하는 동물 모델 연구에 기반하며 개체에서 표적되는 질병의 증상 또는 상태의 발병 또는 심각성을 현저학 감소시킬 수 있는 투여 프로토콜에 따른다. 이러한 고려에 적합한 모델은, 예를 들면, 쥣과(murine), 래트(rat), 돼지(porcine), 고양이(feline), 족제비(ferret), 비인간 영장류, 및 당업계에 알려진 다른 허용가능한 동물 모델을 포함한다. 대안적으로, 효과적인 용량은 시험관(in vitro) 모델(예를 들면, 면역학적 및 조직학적 실험)을 이용하여 결정될 수 있다. 상기 모델을 이용하는 경우, 면역원 조성물의 치료적으로 유효한 양(예를 들면, 필요한 면역 반응을 유도하는 데 효과적이거나 또는 표적되는 질병의 하나 또는 그 이상의 증상을 완화하는 데 효과적인 양)을 투여하기 위하여 적절한 농도 및 양을 결정할 때 단지 일반적인 계산 및 조정만이 필요하다. 다른 실시형태에서, 면역원 조성물의 유효한 양 또는 유효한 용량은 단지, 여기에 개시된, 치료 또는 진단 목적으로, 질병 또는 상태와 연관있는 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성을 억제 또는 활성화시키는 것일 수 있다.

[0548] 하나의 실시형태에서, 적절한 예방접종은 하나 또는 그 이상의 면역원 조성물, 첫 번째 접종 후 몇 주 후에 약 2개, 약 3개에서 8개, 또는 약 4개 이상 투여되는 두 번째 접종과 함께 적어도 3개의 개별 접종을 포함한다. 일반적으로, 세 번째 접종은 두 번째 접종 후 몇 달 후, 특정 실시형태에서, 첫 번째 접종 후에 5개월 이상, 첫 번째 접종 후에 6개월에서 약 2년 이상, 또는 첫 번째 접종 후에 8개월에서 약 1년 사이에 이루어진다. 세 번째 이상의 주기적인 접종은 개체의 면역 기억(immune memory)을 높이는 것이 바람직하다. 제형, 용량, 계획 및 기타 같은 종류와 같은, 백신 파라미터의 적절성은 개체로부터 혈청 표본을 취하거나 예방접종 프로그램 동안에 항체 타이터(titers)를 실험하여 결정될 수 있다. 만약 상기 관찰이 백신이 차선이라고 보여진다면, 개체는 면역원 조성물을 추가로 투여하여 신장될 수 있으며, 백신 파라미터는 면역 반응을 강화시키는 것으로 예상되는 방향으로 변형될 수 있다. 몇 가지 부스트(boosts)가 고려될 수 있으며, 각각의 부스터는 동일하거나 또는 다른 PreF 항원을 포함할 수 있다.

[0549] 프라임-부스트(prime-boost) 프로토콜을 위하여, 프라임은 단일 용량 또는 다수 용량, 예를 들면 2개 용량, 3개 용량, 4개 용량, 5개 용량, 6개 용량으로 투여될 수 있으며 또는 개체에 하루이상, 일주이상 또는 한달 이상 투여될 수 있다. 부스트는 예를 들면 2개에서 6개 용량과 같이 단일 또는 다수 용량으로 투여될 수 있으며, 또는 개체에 하루 이상, 한주 이상, 한달 이상 투여될 수 있다. 다수 부스트는 1개에서 5개, 또는 그 이상 정도로 선택될 수 있다. 서로 다른 용량은 순차적인 접종의 연속으로 이용될 수 있다. 예를 들면 상대적으로 많은 양의 첫 번째 접종 및 상대적으로 적은 양의 부스트. 특정 항원 표면에 대한 면역 반응은 여기에 개시된 면역원 조성물을 하나 또는 그 이상 접종하여 만들어 질 수 있다.

[0550] 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 프라임 조성물은 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 포함(암호화)하며, 개체에 투여되는 부스트 조성물은 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 포함(암호화)한다. 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 프라임 조성물은 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 포함(암호화)하며, 개체에 투여되는 부스트 조성물은 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 포함(암호화)한다.

[0551] 일부 실시형태에서, 방법은 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 A RSV F 단백질 및 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 B RSV F 단백질을 포함하는 조성물을 한 번, 또는 한 번 이상(프라임-부스트 프로토콜과 같

이) 주입의 일련으로 투여하는 것을 포함한다.

[0552] 일부 실시형태에서, 방법은 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 A RSV F 단백질을 함유하는 페리틴 나노입자 및 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 B RSV F 단백질을 함유하는 페리틴 나노입자를 포함하는 조성물을 한 번, 또는 한 번 이상(프라임-부스트 프로토콜과 같이) 주입의 일련으로 투여하는 것을 포함한다.

[0553] 일부 실시형태에서, 방법은 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 A RSV F 단백질을 암호화하는 벡터 및 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 B RSV F 단백질을 암호화하는 벡터를 포함하는 조성물을 한 번, 또는 한 번 이상(프라임-부스트 프로토콜과 같이) 주입의 일련으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 A RSV F 단백질 및 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 B RSV F 단백질을 함유하는 조성물, 및/또는 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 A RSV F 단백질을 함유하는 페리틴 나노입자 및 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 B RSV F 단백질을 함유하는 페리틴 나노입자를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0554] 일부 실시형태에서, 방법은 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 A RSV F 단백질을 암호화하는 핵산 분자 및 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 B RSV F 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 조성물을 한 번, 또는 한 번 이상(프라임-부스트 프로토콜과 같이) 주입의 일련으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 A RSV F 단백질 및 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 B RSV F 단백질을 함유하는 조성물, 및/또는 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 A RSV F 단백질을 함유하는 페리틴 나노입자 및 선융합 입체구조로 안정화된 재조합 아형 B RSV F 단백질을 함유하는 페리틴 나노입자를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0555] 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 프라임 및 부스트 조성물 각각은 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 첫 번째 재조합 RSV F 단백질 및 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 두 번째 재조합 RSV F 단백질을 포함(또는 암호화)한다. 몇몇 실시형태에서, 개체에 투여되는 프라임 및 부스트 조성물 각각은 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 첫 번째 재조합 RSV F 단백질 및 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 두 번째 재조합 RSV F 단백질의 혼합물(예를 들면 약 1:1, 1:2, 2:1, 2:3, 3:2, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1, 3:5, 5:3, 1:5, 5:1, 5:7, 7:5 혼합)을 포함(또는 암호화)한다.

[0556] 일부 실시형태에서 개체에 투여되는 프라임 및 부스트 조성물 각각은 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질 및 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 두 번째 재조합 RSV F 단백질을 포함한다.

[0557] 일부 실시형태에서 개체에 투여되는 프라임 및 부스트 조성물 각각은 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 핵산 분자 및 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을을 암호화하는 핵산 분자를 포함한다.

[0558] 일부 실시형태에서 개체에 투여되는 프라임 및 부스트 조성물 각각은 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 함유하는 첫 번째 단백질 나노입자(예를 들면 페리틴 나노입자) 및 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 함유하는 두 번째 단백질 나노입자(예를 들면 페리틴 나노입자)를 포함한다.

[0559] 일부 실시형태에서 개체에 투여되는 프라임 및 부스트 조성물 각각은 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 함유 또는 암호화하는 벡터 및 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 함유 또는 암호화하는 벡터를 포함한다.

[0560] 일부 실시형태에서 개체에 투여되는 프라임 조성물은 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F

단백질인 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 첫 번째 핵산 분자(예를 들면 DNA 플라스미드 발현 벡터) 및 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 두 번째 핵산 분자(예를 들면 DNA 플라스미드 발현 벡터) 포함하며, 개체에 투여되는 부스트 조성물은 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 A RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 함유하는 첫 번째 단백질 나노입자(예를 들면 페리틴 나노입자) 및 본 명세서에 개시된 임의의 치환(예를 들면 S155C, S290C, 및 S190F 치환 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 치환)에 의하여 선융합 입체구조로 안정화된 아형 B RSV F 단백질인 재조합 RSV F 단백질을 암호화하는 두 번째 단백질 나노입자(예를 들면 페리틴 나노입자)를 포함한다.

[0561] DNA 플라스미드 프라임 및 페리틴 나노입자 부스트를 이용하는 예방접종 프로토콜은 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, Wei et al., Science, 329(5995):1060-4, 2010, 전체가 본 명세서에 참조로 포함되어 있음).

[0562] 면역원 조성물의 실제 용량은 예를 들면 질병의 조짐 및 개체의 특정 상태(예를 들면, 개체의 나이, 크기, 건강 정도, 증상의 범위, 감수성 요인 및 기타 등), 투여의 시간 및 경로, 동시에 투여되는 다른 약물 또는 치료, 뿐만 아니라 개체에서 바람직한 활성 또는 생물학적 반응을 끌어내기 위한 면역원 조성물의 특정 약리학과 같은 요인들에 따라 다양하다. 용량 요법(dosage regimens)은 최적의 예방 또는 치료 결과를 내기 위하여 조절될 수 있다. 앞에 설명된 용어 리스트에 설명된 것처럼, 유효한 양이란 의학적 용어로 치료적으로 유용한 효과가 개시된 항원 및/또는 다른 생물학적으로 활성이 있는 물질의 임의의 독성 또는 유해한 부작용을 능가하는 것을 말한다.

[0563] 개시된 방법 및 면역원 조성물의 범위 내에서 개시된 PreF 항원의 치료적으로 유효한 양의 제한없는 범위는 체중당 약 0.0001 mg/kg에서 약 10 mg/kg, 예를 들면 체중당 약 0.01 mg/kg, 약 0.02 mg/kg, 약 0.03 mg/kg, 약 0.04 mg/kg, 약 0.05 mg/kg, 약 0.06 mg/kg, 약 0.07 mg/kg, 약 0.08 mg/kg, 약 0.09 mg/kg, 약 0.1 mg/kg, 약 0.2 mg/kg, 약 0.3 mg/kg, 약 0.4 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 0.6 mg/kg, 약 0.7 mg/kg, 약 0.8 mg/kg, 약 0.9 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.5 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg, 예를 들면 체중당 0.01 mg/kg에서 약 1 mg/kg, 체중당 약 0.05 mg/kg에서약 5 mg/kg, 체중당 약 0.2 mg/kg에서 약 2mg/kg, 또는 체중당 약 1.0 mg/kg에서 약 10 mg/kg이다.

[0564] 일부 실시형태에서, 어린이, 성인, 연장자 등을 위하여 정해진 개시된 PreF 항원, 또는 핵산 분자 또는 PreF 항원을 암호화, 발현 또는 함유하는 바이러스 벡터의 용량은, 약 1-300 μg과 같이, 예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 또는 약 300 μg의 PreF 항원, 또는 핵산 분자 또는 PreF 항원을 암호화, 발현 또는 함유하는 바이러스 벡터를 포함한다.

[0565] 복용의 용량 및 횟수는 예를 들어, 성인 또는 임의의 시기에 RSV 감염 또는 예방접종에 의하여 미리 준비된 것과 같은 조건에 달려있으며, 단일 투여로도 충분한 부스터가 될 수 있다. 순수한 유아에서, 일부 실시예에서, 적어도 2번, 예를 들어, 적어도 3번 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서 연례의 부스트는 예를 들어, 연례의 인플루엔자 백신과 같이 일 년마다 한 번씩 연장인 개체(예를 들면, 60세 이상의 인간)에게 투여된다. 적절한 조성물을 제조하는 방법은 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있거나 또는 자명하며 *Remingtons Pharmaceutical Sciences*, 19th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1995와 같은 출판물에 자세하게 묘사되어 있다.

[0566] 복용량은 표적 장소(예를 들면, 전신 순환)에서 원하는 농도를 유지하고자 하는 의사에 따라 다양해 질 수 있다. 높거나 또는 낮은 농도는 예를 들면, 피부, 직장, 구강, 폐, 또는 비강을 통하는 것 대 정맥 또는 피하 전달과 같은 전달의 방법에 따라 선택될 수 있다. 복용량은 예를 들면, 폐내 스프레이 대 입자, 구강 지연 방출 대 미립자 주사 또는 경피 전달 제재, 및 기타와 같이 투여된 제재의 방출 속도에 기초하여 조절될 수 있다. 동일한 혈청 농도 수준에 도달하기 위하여, 예를 들면, 방출 속도가 5 나노몰랄(nanomolar)(표준 조건하에서)인 늦은-방출 입자는 방출 속도가 10 나노몰랄인 입자의 용량보다 두 배 투여해야 한다.

[0567] 개시된 면역원 조성물의 투여에, 개체의 면역 시스템은 RSV F 단백질의 선융합 입체구조에 특이적인 항체를 생산함으로써 면역원 조성물에 반응한다. 상기와 같은 반응은 면역원 조성물의 효과적인 용량이 전달되었다는 것을 의미한다.

[0568] 몇몇 실시형태에서, 개시된 면역원 조성물과 함께 단백질, 펩타이드, 항체, 및 예를 들면 항-RSV 제재와 같은

다른 항바이러스 제재를 투여하는 것이 유리할 수 있다. 항-RSV 제재의 제한없는 예시는 단일클론 항체 팔리비주맙(palivizumab) (SYNAGIS®®; Medimmune, Inc.) 및 작은 분자 항-바이러스 약물 리바비린(ribavirin)(많은 소스에 의해 생산될 수 있음, 예를 들면, Warrick Pharmaceuticals, Inc.)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 면역원 조성물은 다른 항-RSV 제재와 동시에 투여된다. 특정 실시형태에서, 면역원 조성물은 다른 항-RSV 제재와 순차적으로 투여된다, 예를 들면 다른 제재의 전이나 또는 후. 당업계의 통상의 기술자는 순차적 투여가 예를 들면, 시간마다, 날마다, 주마다, 날마다, 또는 심지어 일년 후의 적절한 주기 후에 즉시 투여하는 것을 의미한다는 것을 잘 알고 있을 것이다.

[0569] 다른 실시형태에서, 개시된 PreF 항원을 암호화하는 핵산을 함유하는 약학적 조성물의 치료적으로 유효한 양은 면역 반응을 일으키기 위하여 투여된다. 하나의 특정에, 제한없는 실시예로, 개시된 항원을 암호화하는 핵산의 치료적으로 유효한 양은 RSV 감염을 치료 또는 방지 또는 억제하기 위하여 개체에 투여된다.

[0570] 핵산의 투여에 대한 한가지 접근은 예를 들면, 포유류 발현 플라스미드와 같이 플라스미드 DNA로 직접적인 예방접종을 하는 것이다. 상기에 언급한 바와 같이, 개시된 항원을 암호화하는 핵산 서열은 분자의 발현을 증가시키기 위하여 프로모터의 조절 아래에 위치할 수 있다. 다른 접근은 RNA(예를 들면 Nonviral delivery of self-amplifying RNAvaccines, see e.g., Geall et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 109:14604-9, 2012)를 이용할 수 있다.

[0571] 핵산 구조물(constructs)에 의한 예방접종은 당업계에 잘 알려져 있으며, 잘 교시되어 있다, 예를 들면, 미국 특허 제5,643,578(세포-매개 또는 채액성 반응을 유도하기 위하여 의도한 항원을 암호화하는 DNA를 도입하여 척추동물을 면역화하는 방법을 개시하고 있음), 및 미국 특허 제5,593,972 및 미국 특허 제5,817,637 (발현을 가능하게 하는 조절 서열에 항원을 암호화하는 핵산 서열을 적절하게 연결하는 것을 개시하고 있음). 미국 특허 제5,880,103호는 면역원 펩타이드(immunogenic peptides)을 암호화하는 핵산 또는 다른 항원을 개체에 전달하는 몇몇 방법을 개시하고 있다. 상기 방법은 핵산(또는 그것의 합성 펩타이드)의 리포좀 전달, 및 면역-자극 구조체, 또는 ISCOMS™구조체, 콜레스테롤 및 Quil A™(사포닌)의 혼합에 의하여 자발적으로 형성되는 30-40 nm 크기의 음성 전하를 가지는 케이지-유사 구조체를 포함한다. 방어적 면역력은 톡소플라스모시스(toxoplasmosis) 및 엡스테인-바 바이러스-유도성 종양(Epstein-Barr virus-induced tumors)을 포함하여, 항원의 전달체로서 ISCOMS™을 이용하는 다양한 실험적 감염 모델에 의하여 만들어져 왔다(Mowat and Donachie, *Immunol. Today* 12:383, 1991). ISCOMS™에서 캡슐화된 1 ㎍보다 낮은 항원의 복용은 클래스 I 매개 CTL 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Takahashi *et al.*, *Nature* 344:873, 1990).

[0572] 예방접종을 위하여 핵산을 이용하는 다른 접근에서, 개시된 항원은 약화된 바이러스 호스트 또는 벡터 또는 박테리아 벡터에 의하여 발현될 수 있다. 재조합 우두 바이러스(vaccinia virus), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노-의존 바이러스(adeno-associated virus, AAV), 헤르페스 바이러스(herpes virus), 레트로바이러스(retrovirus), 세포거대바이러스(cytomegalovirus) 또는 다른 바이러스 벡터들이, 그렇게 함으로써 CTL 반응을 유도하기 위하여, 펩타이드 또는 단백질을 발현하는 것에 이용된다. 예를 들면, 미국 특허 제제 4,722,848. BCG (Bacillus Calmette Guerin)에 개시되어 있는 우두 벡터 및 면역접종 프로토콜에 유용한 방법들은 펩타이드의 박현을 위한 다른 벡터들을 제공한다(Stover, *Nature* 351:456-460, 1991).

[0573] 한 실시형태에서, 개시된 PreF 항원을 암호화하는 핵산은 세포로 직접적으로 도입된다. 예를 들면, 핵산 분자는 표준 방법에 따라 금 마이크로스피어(microspheres)에 적재될 수 있으며 Bio-Rad's Helios™ Gene Gun과 같은 장치에 의하여 피부로 도입될 수 있다. 핵산 분자는 강한 프로모터의 조절 아래에 있는 '무방비 상태'일 수 있다. 통상적으로, 비록 전이에 근접한 조직을 포함한, 다른 장소로 직접적으로 주입될 수 있다고 하더라도, DNA는 근육에 주입된다. 주입의 용량은 일반적으로 약 0.5 ㎍/㎏에서 약 50 ㎎/㎏이며, 통상적으로 약 0.005 ㎎/㎏에서 약 5 ㎎/㎏이다(예를 들면, 미국 특허 제5,589,466).

[0574] 상기 제공된 치료방법에 추가하여, 임의의 개시된 PreF 항원은, 예를 들면, 혈청학적 감시(serosurveillance)와 같이, 항원 특이적인 면역진단 시약(Immunodiagnostic reagent)을 만들기 위하여 이용될 수 있다. 면역진단 시약은 여기에 개시된 임의의 항원으로부터 만들어질 수 있다. 예를 들면, 개시된 항원인 경우에, RSV에 대한 혈청 항체의 존재는 , 예를 들어 RSV 감염 및/또는 RSV 단백질의 선융합 입체구조에 특이적으로 결합하는 항체의 존재를 감지하는 것과 같이 여기에 개시된 분리된 항원을 이용하여 모니터링된다.

[0575] 일반적으로, 방법은 개체로부터 샘플, 예를 들어, 여기에 개시된 선융합 입체구조로 안정화된 하나 또는 그 이

상의 RSV F 단백질 항원을 가진 개체로부터 혈액에 제한되지는 않음, 혈청, 혈장, 소변 또는 가래(sputun) 샘플을 수집하는 것 및 개시된 면역원에 대한 항체의 결합을 감지하는 것을 포함한다. 결합은 샘플의 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 표지된 2차 항체를 포함하여 당업계의 통상의 기술자에게 알려진 임의의 수단에 의하여 감지될 수 있다. 표지는 방사능, 효소 표지, 및 형광 표지를 포함한다.

[0576] 추가적으로, 선융합 RSV F 결합 항체의 감지는 개시된 항원의 예방접종에 대한 개체의 반응이 모니터될 수 있도록 허용한다. 다른 실시형태에서, 선융합 RSV F 항체의 타이터는 결정된다. 결합은 샘플의 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 표지된 2차 항체를 포함하여 당업계의 통상의 기술자에게 알려진 임의의 알려진 수단에 의하여 감지될 수 있다. 표지는 방사능, 효소 표지, 및 형광 표지를 포함한다. 다른 실시형태에서, 개시된 면역원은 개체 또는 개체에서 얻은 생물학적 샘플에 존재하는 항체를 분리하기 위하여 이용된다.

[0578] ***G. 키트***

[0579] 또한, 예를 들면, 개체에서 RSV 감염을 치료하거나 또는 방지하는, 또는 개체의 혈청에서 RSV F 단백질 선융합(prefusion) 특정 항체의 존재를 검출하기 위한 키트가 제공된다. 키트는 항원을 암호화하는, 발현하거나 또는 포함하는 하나 또는 그 이상의 PreF 항원, 또는 핵산 또는 바이러스 벡터를 통상적으로 포함할 것이다.

[0580] 키트는 용기 및 용기와 관련된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병(bottles, 바이알, 시린지(syringes), 등을 포함한다. 용기는 유리(glass) 또는 플라스틱(plastic)과 같은 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 용기는 통상적으로 RSV 감염을 치료하거나 또는 방지하기 위하여 효과적인, 하나 또는 그 이상의 개시된 PreF 항원, 또는 항원을 암호화하는, 발현하거나 또는 포함하는 핵산 또는 바이러스 벡터를 포함하는 조성물을 붙잡는다. 몇가지 실시형태에서 용기는 살균 접근 포트(예를 들면 용기는 정맥내(intravenous) 용액 박 또는 피하 주입 바늘(hypodermic 주사 needle)에 의해 뚫는 스탑퍼(stopper pierceable)를 가지는 바이알일 수 있다). 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 특정 증상을 치료하는데사용된다는 것을 나타낸다.

[0581] 라벨 또는 패키지 삽입물은 PreF 항원의 사용을 위한 지침서, 예를 들면, RSV 감염을 치료하거나 또는 방지하는 방법에서, 항원을 암호화하는, 발현하거나 또는 포함하는 핵산 또는 바이러스 벡터를 통상적으로 추가적으로 포함한다. 패키지 삽입물은 지침, 사용량, 용량, 투여, 사용금지사유에 대한 정보 및/또는 상기 치료 산물의 사용을 걱정하는 경고를 포함하는 치료 생성물의 상업적 패키지에 포함되는 고객용 지침서를 포함한다. 교육용 물질은 전자형태(컴퓨터 디스켓 또는 컴팩트 디스켓(compact disk)와 같은)로 쓰여질 수 있고, 육안용(비디오 파일(video files)과 같은)일 수 있다. 또한, 키트는 키트가 디자인되는 특정 작용을 용이하기 위한 추가 구성요소를 포함할 수 있다. 키트는 특정 방법의 연습에 일상적으로 사용되는 버퍼 및 다른 시약을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 키트 및 적절한 내용은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0583] ***H. 특정 실시형태***

[0584] 추가 실시형태는 자체 전문으로서 본 명세서 참조에 의해 특정적으로 포함된, 2013년 8월 8일에 출원된 우선권 미국 가출원 제 61/863,909호의 페이지 135-158 상에 섹션 H에 개시된다.

[0585] 조항 1. 하기를 포함하는 분리된 면역원:

[0586] RSV F 선융합-특정 항체에 특정적으로 결합하는 선융합(prefusion) 입체형태에서 재조합 RSV F 단백질을 안정시키는 원천 RSV F 단백질과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 대체를 포함하는 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편, 상기 항체는 후-융합 입체형태(post-fusion conformation)에서 RSV F 단백질과 결합하지 않는다.

[0587] 조항 2. 면역원은 항체의 부재에서 적어도 24시간 동안 생리적(physiological) pH의 인산염완충식염수에서 20℃에서 배양 후 항체에 결합하고, 여기서 항체는 후-융합 입체형태(post-fusion conformation)에서 RSV F 단백질과 결합한다.

[0588] 조항 3. 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편의 선융합 입체형태는 선융합-특정 항체에 특정적으로 결합하는 항원 위치 Ø를 포함하고, 상기 항원 위치 Ø는 서열번호: 1-184의 하나로서 제시되는 원천 RSV F 단백질 서열의 잔기 62-69 및 196-209을 포함하는 조항 1 또는 조항 2의 면역원.

[0589] 조항 4. 상기 면역원은 D25, AM22, 5C4, 또는 MPE8 선융합(prefusion) 항체에 특정적으로 결합하는 조항 1-3의

임의의 면역원.

[0590] 조항 5. 상기 원천 RSV F 단백질은 인간 하위유형 A, 인간 하위유형 B, 또는 소 RSV F 단백질인 조항 1-4의 임의의 면역원.

[0591] 조항 6. 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 F_1 폴리펩타이드 및 F_2 폴리펩타이드를 포함하고, 선택적으로 Pep27 폴리펩타이드 또는 이의 일부를 포함하지 않는 조항 1-5의 임의의 면역원.

[0592] 조항 7. 상기 F_2 및 F_1 폴리펩타이드는 각각 RSV F 위치 62-69 및 196-209를 포함하고, 여기서:

[0593] F_2 폴리펩타이드는 RSV F 위치 26-109의 8-84 잔기를 포함하거나 또는 구성하고; 및

[0594] F_1 폴리펩타이드는 RSV F 위치 137-529의 14-393 잔기를 포함하거나 또는 구성하고,

[0595] 상기 RSV F 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당되는 조항 6의 면역원.

[0596] 조항 8. F2폴리펩타이드의 C-말단 잔기 및 F1 폴리펩타이드의 N-말단 잔기는 각각, RSV F 위치 97 및 137; 97 및 145; 97 및 150; 102 및 144; 102 및 145; 102 및 146; 102 및 147; 103 및 144; 103 및 145; 103 및 146; 103 및 147; 104 및 144; 104 및 145; 104 및 146; 104 및 147; 105 및 144; 105 및 145; 105 및 146; 105 및 147; 또는 105 및 150을 포함하는 조항 7의 면역원.

[0597] 조항 9. 상기 F2 및 F1 폴리펩타이드는 RSV F 위치의 하기를 각각 포함하거나 구성하는 조항 7의 면역원: 26-109 및 137-513; 26-107 및 137-513; 26-107 및 145-513; 26-105 및 137-513; 26-105 및 145-513; 26-103 및 145-513; 26-109 및 137-529; 26-107 및 137-529; 26-107 및 145-529; 26-105 및 137-529; 26-105 및 145-529; 26-103 및 145-529; 46-103 및 147-310; 46-104 및 146-310; 50-96 및 149-306; 51-103 및 146-307; 51-103 및 139-307; 50-105 및 146-306; 또는 53-97 및 148 to 하나 of 305-320.

[0598] 조항 10. 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 1-184의 어느 하나로서 제시되는 원천 RSV F 단백질 서열의 각각, 아미노산 26-103 및 145-310에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드를 포함하거나 또는 구성하는 이전 청구항의 임의의 면역원.

[0599] 조항 11. 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 124의 각각, 아미노산 26-103 및 145-310에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 F2 폴리펩타이드 및 F1 폴리펩타이드를 포함하거나 또는 구성하는 이전 청구항의 임의의 면역원.

[0600] 조항 12. 서열번호: 124의 각각, 아미노산 26-103 및 145-513에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드를 포함하거나 또는 구성하는 이전 청구항의 임의의 면역원.

[0601] 조항 13. 서열번호: 124의 각각, 아미노산 26-103 및 145-529에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드를 포함하거나 또는 구성하는 이전 청구항의 임의의 면역원.

[0602] 조항 14. 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 124의 각각, 아미노산 26-103 및 145-551에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드를 포함하거나 또는 구성하는 이전 청구항의 임의의 면역원.

[0603] 조항 15. 상기 재조합 RSV F 단백질은 단일 사슬 RSV F 단백질이고 F2 및 F1 폴리펩타이드는 이종(heterologous) 펩타이드 링커에 의해 연결되거나, 또는 직접적으로 연결된 이전 청구항의 임의의 면역원.

[0604] 조항 16. 상기 F2 폴리펩타이드의 위치 105는 Gly-Ser 링커에 의해 F_1 폴리펩타이드의 위치 145에 연결되거나; 또는

[0605] F2 폴리펩타이드의 위치 103은 F1 폴리펩타이드의 위치 145에 직접적으로 연결된 조항 15의 면역원.

[0606] 조항 17. 상기 이종(heterologous) 펩타이드 링커는 서열번호: 356-365 또는 1443-1453의 하나로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 G, S, GG, GS, SG, GGG, 또는 GSG 링커인 조항 15 또는 조항 16의 면역원.

[0607] 조항 18. 상기 재조합 RSV F 단백질은 하기에 의해 RSV F 단백질 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 이전

조항의 어느 하나의 분리된 면역원:

[0608] (a) 시스테인(cysteines)의 쌍 사이에 첫번째 디설피드 결합(disulfide bond);

[0609] (b) 구멍(cavity)-채우는 아미노산 대체;

[0610] (c) 재포장 아미노산 대체;

[0611] (d) N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 위치;

[0612] (e) (a) - (d)의 2개 또는 그 이상의 조합; 또는

[0613] (f) (a) 및 (b)의 조합.

[0614] 조항 19. 상기 시스테인(cysteines)의 쌍은 첫번째 시스테인 및 두번째 시스테인을 포함하고, 상기

[0615] 첫번째 시스테인(cysteine) 및 두번째 시스테인(cysteine)은 F_1 폴리펩타이드의 위치 137-216에 있고;

[0616] 첫번째 시스테인 및 두번째 시스테인은 F_1 폴리펩타이드의 위치 461-513에 있거나; 또는

[0617] 첫번째 시스테인 및 두번째 시스테인은 F_1 폴리펩타이드의 각각, 위치 137-216 및 461-513이 있고; 및

[0618] 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당되는 조항 18의 분리된 면역원.

[0619] 조항 20. 상기 첫번째 시스테인은 RSV F 위치 137-216의 하나에 아미노산 대체에 의해 도입되고, 두번째 시스테인은 RSV F 위치 271-460의 하나에 아미노산 대체에 의해 도입되는 조항 18의 면역원.

[0620] 조항 21. 상기 시스테인의 쌍은 Cα 탄소 및 Cβ 탄소를 각각 포함하는 첫번째 시스테인 및 두번째 시스테인을 포함하는 조항 19 또는 조항 20의 면역원, 상기:

[0621] (a) 첫번째 시스테인(cysteine)은 RSV F 위치 137-216 또는 461-513의 하나에 아미노산 대체에 의해 도입되고 및 두번째 시스테인은 RSV F 위치 26-61, 77-97, 또는 271-460의 하나에 아미노산 대체에 의해 도입되고; 및

[0622] (b) 첫번째 시스테인의 위치의 Cα 탄소는 두번째 시스테인의 위치의 Cα탄소로부터 2.0-8.0 옹스트롱(angstroms)로부터이고, 및/또는 첫번째 시스테인의 위치의 Cβ 탄소는 표 1에서 제공된 구조 조정(structural coordinates)에 의해 제시되는 3차(three dimensional) 구조에서, 각각 Cβ 탄소를 위해 최적의 로토머(rotomer)를 사용하여 두번째 시스테인의 위치의 Cβ 탄소로부터 2.0-5.5 옹스트롱로부터 이다.

[0623] 조항 22. 상기 시스테인의 쌍은 Cα 탄소 및 Cβ 탄소를 각각 포함하는, 첫번째 시스테인 및 두번째 시스테인을 포함하고, 상기:

[0624] (a) 첫번째 시스테인(cysteine) 및 두번째 시스테인(cysteine)은 RSV F 위치 137-216 또는 RSV F 위치 461-513에 아미노산 대체에 의해 도입되거나; 또는 첫번째 시스테인은 RSV F 위치 137-216에 아미노산 대체의해 도입되고, 두번째 시스테인은 RSV F 위치 461-513에 아미노산 대체에 의해 도입되고; 및

[0625] (b) 첫번째 시스테인의 위치의 Cα 탄소는 두번째 시스테인의 위치의 Cα탄소로부터 2.0-8.0 옹스트롱(angstroms)로부터이고, 및/또는 첫번째 시스테인의 위치의 Cβ 탄소는 표 1에서 제공된 구조 조정(structural coordinates)에 의해 제시되는 3차(three dimensional) 구조에서, 각각 Cβ 탄소를 위해 최적의 로토머(rotomer)를 사용하여 두번째 시스테인의 위치의 Cβ 탄소로부터 2.0-5.5 옹스트롱로부터인 조항 19 또는 조항 20의 면역원.

[0626] 조항 23. 디설피드 결합(disulfide bond)은 프로모터 내(intra-promoter) 또는 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합을 포함하는 조항 18의 면역원.

[0627] 조항 24. 상기 비자연적 디설피드 결합은

[0628] RSV F 위치 155와 290; 151와 288; 137와 337; 397와 487; 138와 353; 341 와 352; 403와 420; 319와 413; 401와 417; 381와 388; 320와 415; 319와 415; 331 와 401; 320와 335; 406와 413; 381와 391; 357와 371; 403와 417; 321와 334; 338 와 394; 288와 300; 60와 194; 33와 469; 54와 154; 59와 192; 46와 311; 48와 308; 또는 30와 410 사이에 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합;

[0629] RSV F 위치 400와 489; 144와 406; 153와 461; 149와 458; 143와 404; 346 와 454; 399와 494; 146와 407; 374와 454; 369와 455; 402와 141; 74와 218; 183 와 428을 포함하고, 재조합 RSV F 단백질은 위치 182/183사이에 G 삽입을 포함하고; 183 및 428사이의 내부-프로모터 디설피드 결합, 재조합 RSV F 단백질은 위치 427/428사이에 C 삽입을 포함하고; 145 및 460, 재조합 RSV F 단백질은 위치 146/147사이에 AA 삽입을 포함하고; 183및 423, 재조합 RSV F 단백질은 위치 182/183사이에 AAA 삽입을 포함하고; 또는 330 및 430, 재조합 RSV F 단백질은 위치 182/183 사이에 AAA 삽입을 포함하거나; 또는 330 및 430, 및 재조합 RSV F 단백질은 위치 329/330 사이에 CAA 삽입을 포함하고;

[0630] RSV F 위치 155와 290사이의 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합(disulfide bond), 및 상기 재조합 RSV F 단백질은 RSV F 위치 74와 218사이에 비자연적 디설피드 결합; 141와 402; 146와 460, 및 460/461사이에 G 삽입; 345 및 454, 및 위치 453/454 C 삽입; 374 및 454, 및 위치 453/454사이에 C 삽입; 239 및 279, 및 238/239사이에 C 삽입; 330 및 493, 및 위치 329/330 사이에 C 삽입; 183 및 428, 및 위치 182/183 사이에 G 삽입; 또는 183 및 428, 및 위치 427/428사이에 C 삽입을 포함하는 조항 23의 면역원.

[0631] 조항 25. 재조합 RSV F 단백질은:

[0632] 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합, 및 하기의 대체 세트의 하나 또는 그 이상: S155C 및 S290C; G151C 및 I288C; F137C 및 T337C; T397C 및 E487C; L138C 및 P353C; W341C 및 F352C; S403C 및 T420C; S319C 및 I413C; D401C 및 Y417C; L381C 및 N388C; P320C 및 S415C; S319C 및 S415C; N331C 및 D401C; P320C 및 T335C; V406C 및 I413C; L381C 및 Y391C; T357C 및 N371C; S403C 및 Y417C; L321C 및 L334C; D338C 및 K394C; I288C 및 V300C; E60C 및 D194C; Y33C 및 V469C; T54C 및 V154C; I59C 및 V192C; S46C 및 T311C; L48C 및 V308C; E30C 및 L410C; 또는

[0633] 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합(disulfide bond), 및 하기의 대체 세트의 하나 또는 그 이상: T400C 및 D489C; V144C 및 V406C; A153C 및 K461C; A149C 및 Y458C; G143C 및 S404C; S346C 및 N454C; K399C 및 Q494C; S146C 및 I407C; T374C 및 N454C; T369C 및 T455C; 또는 V402C 및 L141C; A74C 및 E218C; S155C, S290C, L141C, 및 V402C; S155C, S290C, A74C, 및 E218C; N183C 및 N428C, 및 위치 182/183사이에 G 삽입; N183C 및 N427G, 및 위치 427/428사이에 C 삽입; S145C 및 460C; 및 위치 146/147사이에 AA 삽입; N183C 및 K423C, 및 위치 182/183사이에 AAA 삽입; A329C 및 S430C, 및 위치 329/330사이에 CAA 삽입; 또는

[0634] RSV F 위치 155 및 290사이에 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합(disulfide bond) 및 추가 비자연적 디설피드 결합(disulfide bond), S155C 및 S290C 대체, 및 하기의 세트의 아미노산 대체의 하나 또는 그 이상: S146C, 및 N460C, 및 위치 460/461사이에 G 삽입; N345C, 및 N454G, 및 위치 453/454사이에 C 삽입; T374C, 및 N454G, 및 위치 453/454사이에 C 삽입; S238G, 및 Q279C, 및 위치 238/239사이에 C 삽입; 및 S493C, 및 위치 329/330사이에 C 삽입; N183C, 및 N428C; 및 위치 182/183사이에 G 삽입; 또는 N183C, 및 N427G; 및 위치 427/428C 삽입을 포함하는 조항 23의 면역원.

[0635] 조항 26. 상기 재조합 RSV F 단백질은 하기를 포함하는 조항 23의 면역원.

[0636] 서열번호: 185, 189, 201, 202, 205, 207, 209, 213, 244, 245, 247,257-262, 264-275, 277-282, 284, 296-299, 302, 303, 338-340의 하나의 잔기 137-513로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 F_1 폴리펩타이드; 또는

[0637] 서열번호: 190, 211, 212, 243, 246, 263, 276, 283, 285의 하나의 각각, 잔기 26-109 및 137-513로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드.

[0638] 상기 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당되는 아미노산 위치.

[0639] 조항 27. 상기 비자연적 디설피드 결합은 RSV F 위치 155와 290사이에 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합을 포함하는 조항 23의 면역원.

[0640] 조항 28. 상기 재조합 RSV F 단백질은 S155C 및 S290C 대체를 포함하는 조항 23의 면역원.

[0641] 조항 29. 조항 23의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 185의, 잔기 26-109 및 137-513, 잔기 26-103 및 145-513, 또는 잔기 26-105 및 145-513에 적어도 80% 독자성(identity)을 포함하는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 구성한다.

[0642] 조항 30. 위치 190, 위치 207, 또는 위치 190 및 207에서 F, L, W, Y, H, 또는 M 대체를 포함하는 구멍

(cavity)-채우는 아미노산 대체를 포함하는, 조항 18-29의 임의의 면역원.

[0643] 조항 31. 190F; 190L; 190W; 190Y; 190H; 190M; 190F 및 207L; 190F 및 207F; 190F 및 207W; 190L 및 207L; 190L 및 207F; 190L 및 207W; 190W 및 207L; 190W 및 207F; 190W 및 207W; 190Y 및 207L; 190Y 및 207F; 190Y 및 207W; 190H 및 207L; 190H 및 207F; 190H 및 207W; 190M 및 207L; 190M 및 207F; 190M 및 207W; 207L 및 220L; 296F 및 190F; 220L 및 153W; 203W; 83W 및 260W; 58W 및 298L; 또는 87F 및 90L의 하나를 포함하는 구멍(cavity)-채우는 아미노산 대체를 포함하는, 조항 18-29의 임의의 면역원.

[0644] 조항 32. 조항 31의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 191, 193, 196-197 또는 248의 하나의 위치 137-513, 또는 서열번호: 192, 195, 또는 194의 하나의 위치 26-109 및 137-513를 포함한다.

[0645] 조항 33. 조항 30의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 191의, 잔기 26-109 및 137-513, 잔기 26-103 및 145-513, 또는 잔기 26-105 및 145-513에 적어도 80% 독자성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 구성한다.

[0646] 조항 34. 조항 18의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 위치 155 및 290에서 시스테인(cysteine) 대체 사이에 비자연적 디설피드 결합, 및 위치 190, 위치 207, 또는 위치 190 및 207에서 구멍(cavity) 채우는 F, L, W, Y, H, 또는 M 대체를 포함한다.

[0647] 조항 35. 조항 18의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 S155C, S290C, 및 S190F 대체, 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체를 포함한다.

[0648] 조항 36. 조항 18의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 185 (DS, 하위유형 A), 371 (DS-Cav1, 하위유형 A), 372 (DSCav1, 하위유형 B), 373 (DSCav1, bovine), 374 (DS S190F, 하위유형 A), 375 (DS, S190F, 하위유형 B), 또는 376 (DS, S190F, 소)의 하나의 각각 잔기 26-109 및 137-513, 또는 각각 26-103 및 145-513, 또는 각각 26-105 및 145-513에 적어도 80% 독자성(identity)을 포함하는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 구성한다

[0649] 조항 37. 조항 18의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 재포장 아미노산 대체에 의해 RSV F 단백질 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정되고, 상기 F_1 폴리펩타이드는 하기의 하나로 제시되는 아미노산 대체를 포함한다: 64L, 79V, 86W, 193V, 195F, 198F, 199F, 203F, 207L, 및 214L; 64L, 79L, 86W, 193V, 195F, 198F, 199F, 203F, 및 214L; 64W, 79V, 86W, 193V, 195F, 198F, 199F, 203F, 207L, 및 214L; 79V, 86F, 193V, 195F, 198F, 199F, 203F, 207L, 및 214L; 64V, 79V, 86W, 193V, 195F, 198F, 199Y, 203F, 207L, 및 214L; 64F, 79V, 86W, 193V, 195F, 198F, 199F, 203F, 207L, 및 214L; 64L, 79V, 86W, 193V, 195F, 199F, 203F, 207L, 및 214L; 56I, 58I, 164I, 171I, 179L, 181F, 187I, 291V, 296I, 및 298I; 56I, 58I, 164I, 179L, 189F, 291V, 296I, 및 298I; 56L, 58I, 158W, 164L, 167V, 171I, 179L, 181F, 187I, 291V, 및 296L; 56L, 58I, 158Y, 164L, 167V, 187I, 189F, 291V, 및 296L; 56I, 58W, 164I, 167F, 171I, 179L, 181V, 187I, 291V, 및 296I; 56I, 58I, 64L, 79V, 86W, 164I, 179L, 189F, 193V, 195F, 198F, 199F, 203F, 207L, 214L, 291V, 296I, 및 298I; 56I, 58I, 79V, 86F, 164I, 179L, 189F, 193V, 195F, 198F, 199F, 203F, 207L, 214L, 291V, 296I, 및 298I; 56I, 58W, 64L, 79V, 86W, 164I, 167F, 171I, 179L, 181V, 187I, 193V, 195F, 198F, 199F, 203F, 207L, 214L, 291V, 및 296I; 56I, 58W, 79V, 86F, 164I, 167F, 171I, 179L, 181V, 187I, 193V, 195F, 198F, 199F, 203F, 207L, 214L, 291V, 및 296I; 486N, 487Q, 489N, 및 491A; 486H, 487Q, 및 489H; 400V, 486L, 487L, 및 489L; 400V, 486I, 487L, 및 489I; 400V, 485I, 486L, 487L, 489L, 494L, 및 498L; 400V, 485I, 486I, 487L, 489I, 494L, 및 498L; 399I, 400V, 485I, 486L, 487L, 489L, 494L, 497L, 및 498L; 399I, 400V, 485I, 486I, 487L, 489I, 494L, 497L, 및 498L; 375W, 391F, 및 394M; 375W, 391F, 및 394W; 375W, 391F, 394M, 486N, 487Q, 489N, 및 491A; 375W, 391F, 394M, 486H, 487Q, 및 489H; 375W, 391F, 394W, 486N, 487Q, 489N, 및 491A; 375W, 391F, 394W, 486H, 487Q, 및 489H; 375W, 391F, 394M, 400V, 486L, 487L, 489L, 494L, 및 498M; 375W, 391F, 394M, 400V, 486I, 487L, 489I, 494L, 및 498M; 375W, 391F, 394W, 400V, 486L, 487L, 489L, 494L, 및 498M; 375W, 391F, 394W, 400V, 486I, 487L, 489I, 494L, 및 498M; 137W 및 339M; 137W 및 140W; 137W, 140W, 및 488W; 486N, 487Q, 489N, 491A, 및 488W; 486H, 487Q, 489H, 및 488W; 400V, 486L, 487L, 489L, 및 488W; 400V, 486I, 487L, 489I, 및 488W; 486N, 487Q, 489N, 491A, 137W, 및 140W; 486H, 487Q, 489H, 137W, 및 140W; 400V, 486L, 487L, 489L, 137W, 및 140W; 375W, 391F, 394M, 137W, 및 140W; 또는 375W, 391F, 394M, 137W, 140W, 및 339M 대체; 및 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0650] 조항 38. 조항 37의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질는 재포장 아미노산 대체에 의해 RSV F 단백질 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정되고, 상기 F1 폴리펩타이드는 하기의 하나에서 제시되는 아미노산 대체를 포함한다: I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, 및 I214L; I64L, I79L, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, 및 I214L; I64W, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, 및 I214L; I79V, Y86F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, 및 I214L; I64V, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199Y, L203F, V207L, 및 I214L; I64F, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, 및 I214L; I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, I199F, L203F, V207L, 및 I214L; V56I, T58I, V164I, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, V296I, 및 A298I; V56I, T58I, V164I, V179L, T189F, I291V, V296I, 및 A298I; V56L, T58I, L158W, V164L, I167V, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, 및 V296L; V56L, T58I, L158Y, V164L, I167V, V187I, T189F, I291V, 및 V296L; V56I, T58W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, I291V, 및 V296I; V56I, T58I, I64L, I79V, Y86W, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I, 및 A298I; V56I, T58I, I79V, Y86F, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I, 및 A298I; V56I, T58W, I64L, I79V, Y86W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, 및 V296I; V56I, T58W, I79V, Y86F, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, 및 V296I; D486N, E487Q, D489N, 및 S491A; D486H, E487Q, 및 D489H; T400V, D486L, E487L, 및 D489L; T400V, D486I, E487L, 및 D489I; T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, 및 K498L; T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, 및 K498L; K399I, T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, E497L, 및 K498L; K399I, T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, E497L, 및 K498L; L375W, Y391F, 및 K394M; L375W, Y391F, 및 K394W; L375W, Y391F, K394M, D486N, E487Q, D489N, 및 S491A; L375W, Y391F, K394M, D486H, E487Q, 및 D489H; L375W, Y391F, K394W, D486N, E487Q, D489N, 및 S491A; L375W, Y391F, K394W, D486H, E487Q, 및 D489H; L375W, Y391F, K394M, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, 및 K498M; L375W, Y391F, K394M, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, 및 K498M; L375W, Y391F, K394W, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, 및 K498M; L375W, Y391F, K394W, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, 및 K498M; F137W 및 R339M; F137W 및 F140W; F137W, F140W, 및 F488W; D486N, E487Q, D489N, S491A, 및 F488W; D486H, E487Q, D489H, 및 F488W; T400V, D486L, E487L, D489L, 및 F488W; T400V, D486I, E487L, D489I, 및 F488W; D486N, E487Q, D489N, S491A, F137W, 및 F140W; D486H, E487Q, D489H, F137W, 및 F140W; T400V, D486L, E487L, D489L, F137W, 및 F140W; L375W, Y391F, K394M, F137W, 및 F140W; 또는 L375W, Y391F, K394M, F137W, F140W, 및 R339M; 및 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0651] 조항 39. 조항 38의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 재포장 아미노산 대체에 의해 RSV F 단백질 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정되고, 상기 F1 폴리펩타이드는 서열번호: 227-242, 249-256, 286-295, 또는 326-337의 하나의 위치 137-513를 포함한다.

[0652] 조항 40. 임의의 조항 18-39의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 위치에 의해 RSV F 단백질 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정되고, 상기 N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 위치는 F1 폴리펩타이드 위치 506, 175, 178, 276, 476, 185, 160, 503, 157, 또는 이의 2개 또는 그 이상의 조합의 하나에 있다.

[0653] 조항 41. 조항 40의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 (a) I506N 및 K508T; (b) A177S; (c) V178N; (d) V278T; (e) Y478T; (f) V185N 및 V187T; (g) L160N 및 G162S; (h) L503N 및 F505S; (i) V157N; (j) 또는 (a)-(j)의 2개 또는 그 이상의 조합의 하나를 포함하고; 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0654] 조항 42. 조항 41의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 위치에 의해 RSV F 단백질 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정되고, 상기 F1 폴리펩타이드는 서열번호: 198-200, 203-204, 214-217의 하나의 위치 137-513를 포함한다.

[0655] 조항 43. 조항 18의 어느 하나의 면역원, 상기 RSV F 단백질 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질은 하기의 하나로서 제시되는 아미노산 대체를 포함한다:

[0656] S238C 및 E92C; L193C 및 I59C; I59C 및 L297C; L297C 및 I292C; K176C 및 S190C; T189C 및 A177C; T58C 및 K191C; A424C 및 V450C; L171C 및 K191C; K176C 및 S190C; K77C 및 I217C; K427C 및 D448C; G151C 및 N302C;

G151C 및 V300C; T189C 및 V56C; L171C 및 K191C; L230F; L158F; L230F 및 L158F; L203F; V187F; Y198F; Y198W; L204F; Y53F 및 L188F; V187F 및 L203F; Y198F 및 L203F; L141W; L142F; L142W; V144F; V144W; V90F; L83F; V185F 및 T54A; I395F; V90F, V185F, 및 T54A; L83F 및 V90F; L83F, V185F, 및 T54A; L230F, V90F, 및 I395F; I395F, V185F, 및 T54A; L203F, V90F, L230F, L158F, S509F, I395F, V185F, 및 T54A; I221Y; F140W; F137W; S190L 및 V192L; V187F, S190L, 및 V192L; V187L, S190L, 및 V192L; V185F, V187L, S190L, 및 V192L; V154L, V157L, V185L, 및 V187L; V154L, V185L, 및 V187L; V187F; T58L A298L; T58L, V154L, V185L, V187L, 및 A298L; Y458W; L158F 및 I167A; L158W 및 I167A; L158F; L158W; V56L, I167L, 및 A298L; V56L, I167L, 및 A298M; V56L 및 A167L; I167F; I167M; V154F; V56L, I167L, A298L, 및 V154F; I199L, L203F; I199L, L203F, P205Q, 및 I206T; I199L, L203F, P205E, 및 I206K; I199L, L203F, 및 V207F; I199L, L203F, P205Q, I206T, 및 V207F; I199L, L203F, P205E, I206K, 및 V207F; I199L, L203F, 및 L83F; I199L, L203F, P205Q, I206T, 및 L83F; I199L, L203F, P205E, I206K, 및 L83F; I199L, L203F, S190L, 및 V192L; I199L, L203F, P205Q, I206T, V187F, 및 S190L, V192L; S55A, S190M, L203F, V207I, 및 V296I; Y53F, S55A, K176I, S190L, V207I, S259L, D263L, 및 V296I; L158F, V207M, 및 V296I; V56L, V207M, 및 V296I; V56L, V207I, 및 V296I; V56I, V207M ,and V296I; V154L, V207M, 및 V296I; Y198F, V207I, T219W, 및 V296I; Y198F, V207I, T219I, 및 V296I; Y198F, V207M, T219W, 및 V296I; 198F, V207M, T219I, 및 V296I; Y198F, V207M, T219L, 및 V296I; S190Y; S190W; I206F, V207M, T219V, 및 V296I; Y198F, V207M, T219L, 및 K226M; Y198F, V207M, T219L, 및 K226W; Y198F, V207M, T219L, 및 K226L; L158F, L203F, V207I, 및 V296I; F488W; F488R; V207L; S190F; S190M; L503E, I506K, 및 S509F; L503E, I506K, S509F, 및 F505W; L503E, I506K, S509F, L230F, 및 L158F; Q279C, 및 S238C; Q501F; E82V, V207M, N227L, 및 V296I; E82V, V207I, N227L, 및 V296I; L158F, Y198F, V207M, S215G, N216P, 및 T219L; L158F, Y198F, V207M, S213G, S215G, 및 T219L; V56L, E82V, L203F, V207M, N227L, L230F, 및 V296I; E82V, L158F, L203F, V207M, N227L, L230F, 및 V296I; E82V, L203F, V207M, K226M, N227L, L230F, 및 V296I; 또는 L203F, V207I, S180C, S186C, 및 V296I;

[0657] 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0658] 조항 44. 조항 18의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은

[0659] S155C 및 S290C 대체를 포함하고, 추가적으로 하기의 대체 세트 하나를 포함한다: L513C, 514E, 및 515C; L513C, 514E, 515E, 및 516C; L512C, 513E, 및 514C; 또는 L512C, 513E, 514E, 및 515C;

[0660] S155C, S290C, 및 S190F 대체포함하고, 추가적으로 하기의 대체 세트 하나를 포함한다: F488W, L513C, A514E, 및 I515C; F488W, L513C, A514E, G515E, 및 516C; F488W, L512C, L513E, 및 A514C; F488W, L512C, L513E, A514E, 및 G515C; A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, A514E, 및 I515C; A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, A514E, G515E, 및 516C; A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, 및 A514C; A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514E, 및 G515C; K77C, I217C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, L514E, 및 A515C; K77C, I217C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, L514E, 및 A515E; K77C, I217C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, 및 A514C; 또는 K77C, I217C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514E, 및 G515C;

[0661] S155C, S290, S190F, 및 V207L 대체를 포함하고, 추가적으로 하기의 대체 세트 하나를 포함한다: L503E, 및 I506K; L503E, I506K, 및 F505W; L503E, I506K, L230F, 및 L158F; L503E, I506K, S509F, F505W, L230F, 및 L158F; L160K, V178T, L258K, V384T, I431S, 및 L467Q; F477K, L481Q, V482K, L503Q, 및 I506K; L160K, V178T, L258K, V384T, I431S, L467Q, F477K, L481Q, V482K, L503Q, 및 I506K; L512C, 및 L513C; L512C, L513C, L160K, V178T, L258K, V384T, I431S, 및 L467Q; L512C, L513C, F477K, L481Q, V482K, L503Q, 및 I506K; L512C, L513C, L160K, V178T, L258K, V384T, I431S, L467Q, F477K, L481Q, V482K, L503Q, 및 I506K; F505W; F505W L160K, V178T, L258K, V384T, I431S, 및 L467Q; F505W F477K, L481Q, V482K, L503Q, 및 I506K; F505W L160K, V178T, L258K, V384T, I431S, L467Q, F477K, L481Q, V482K, L503Q, 및 I506K; L512C, L513C, 및 F505W; L512C, L513C F505W L160K, V178T, L258K, V384T, I431S, 및 L467Q; L512C, L513C F505W F477K, L481Q, V482K, L503Q, 및 I506K; L512C, L513C F505W L160K, V178T, L258K, V384T, I431S, L467Q, F477K, L481Q, V482K, L503Q, 및 I506K; I506K, S509F, L83F, 및 V90F; I506K, S509F, L83F, V90F, L230F, 및 L158F; I506K, S509F, F505W, L83F, V90F, L230F, V185F, 및 T54A; L83F, V90F, L230F, 및 I395F; I506K, S509F, F505W, L83F, V90F, L230F, L158F, I395F, V185F, 및 T54A; L512C, 및 L513C; 또는 486DEF 내지 CPC, 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0662] 조항 45. 조항 18의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 RSV F 단백질 선융합에서 안정되고 서열번호: 338-433, 434-544, 672-682의 하나의, 각각, 위치 26-109 및 137-513로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 F_2 및 F_1 폴리펩타이드를 포함한다.

[0663] 조항 46. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 하기의 하나로 제시되는 아미노산 대체를 포함한다

[0665] 표 5b (새로운 사이사슬 디설피드(interchain disulfides))의 열(rows) 1-16;

[0666] 표 6b (새로운 구멍(cavity) 채우는)의 열(rows) 1-84;

[0667] 표 8b (DSCav-1로 새로운 조합)의 열(rows) 1-54; 또는

[0668] 표 8c (새로운 구멍(cavity) 채우는 + 소수성 잔기에 노출된 대체)의 열(rows) 1-13; 및

[0669] 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0670] 조항 47. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 단일 사슬 단백질이고 서열번호: 698-828 또는 1474-1478의 어느 하나에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0671] 조항 48. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 단일 사슬 단백질이고 선택적으로 해당 서열번호에 열거된 단백질 태그 또는 리더 서열없이, 서열번호: 698-828 또는 1474-1478의 어느 하나에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0672] 조항 49. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 접히는(foldon) 도메인 및 재조합 RSV F 단백질 사이에 프로테아제 절단 위치를 추가적으로 포함하는, 삼량체화(trimerization) 도메인을 포함한다.

[0673] 조항 50. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 829-1025의 하나에 해당하는 표 23의 열(row)에 열거된 아미노산 대체를 포함한다.

[0674] 조항 51. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 969-1025의 하나에 해당하는 표 23의 열(row)에 열거된 아미노산 대체를 포함한다.

[0675] 조항 52. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 면역원은 하기의 아미노산 대체의 하나 또는 그 이상을 포함한다: DSCav1-F137C, 및 R339C; DSCav1- F137C 및 T337C; DSCav1-G139C 및 Q354C; F137C, R339C; F137C, T337C; G139C, Q354C; L260F; L260W; L260Y; L260R; L188F; L188W; L188Y; L188R; I57F; I57W; I57R; L252F; L252W; L252R; V192F; V192W; V192R; S150C 및 Y458C; A149C 및 N460C; S146C, 및 N460C; A149C 및 Y458C; V220F; V220W; V220M; T219F; T219M; T219W; T219R; I221F; I221Y; I221W; Q224D 및 , L78K; V278F Q279F N277D 및 , S99K; Q361F; V402F; T400F; T400W; H486F; H486W; I217F; I217Y; I217W; F190V; K226L; T58I, 및 A298M; F190V 및 K226L; F190V, 및 T58I, A298M; K226L, T58I, 및 A298M; T58I, A298M, F190V 및 K226L, 및 선택적으로 S155C 및 S290C 대체, 또는 S155C, S290C, S190F 및 V207L 대체를 추가적으로 포함한다.

[0676] 조항 53. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 면역원은 서열번호: 829-102의 하나의 아미노산 서열에, 선택적으로 해당 서열번호에서 열거된 단백질 태그 또는 리더 서열없이, 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다

[0677] 조항 54. 조항 53의 어느 하나의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 접히는(foldon) 도메인 및 재조합 RSV F 단백질 사이에 프로테아제 절단 위치를 추가적으로 포함하는, 삼량체화(trimerization) 도메인을 포함한다.

[0678] 조항 55. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 901-968의 하나에 해당하는 표 24의 열에 열거된 아미노산 대체를 포함한다.

[0679] 조항 56. 조항 1-18의 어느 하나의 면역원, 상기 면역원은 선택적으로 해당 서열번호에서 열거된 단백질 태그 또는 리더 서열없이, 서열번호: 901-968의 하나의 아미노산 서열에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0680] 조항 57. 조항 7의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 서열번호: 1-184의 어느 하나에서 제시되는 것으로서 하기의 RSV F_2 및 F_1 위치에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 구성된다:

[0681] (a) 각각 56-97 및 189-211; (b) 각각 58-97 및 192-242; (c) 각각 59-97 및 194-240; (d) 각각 60-75 및 193-218; (e) 각각 60-94 및 192-229; (f) 각각 60-94 및 192-232; (g) 각각 60-94 및 193-237; (h) 각각 60-95 및 192-240; (i) 각각 60-96 및 192-239; (j) 각각 60-97 및 192-242; (k) 각각 60-97 및 194-239; (l) 각각 61-96 및 192-235; (m) 각각 61-96 및 192-240; (n) 각각 62-69 및 196-209; 또는 (o) (a) - (m)의 어느 하나에서 열거된 F_2 및 F_1 위치의 순환순열(permutation), 상기 RSV F2 및 F1 위치는 이종(heterologous) 링커에 의해 경합된다.

[0682] 조항 58. 조항 7의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 서열번호: 1-184의 어느 하나에서 제시되는 것으로서 하기의 RSV F_2 및 F_1 위치에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 구성한다:

[0683] (a) 각각 46-103 및 147-310; (b) 각각 46-104 및 146-310; (c) 각각 50-96 및 149-306; (d) 각각 51-103 및 146-307; (e) 각각 51-103 및 139-307; (f) 각각 50-105 및 146-306; (g) 305-320의 하나에 53-97 및 148; (h) (a) - (g)의 어느 하나에 열거된 F_2 및 F_1 위치의 순환순열(circular permutation), 상기 RSV F2 및 F1 위치는 이종(heterologous) 링커에 의해 결합되거나 직접적으로 연결된다.

[0684] 조항 59. 조항 57 또는 58의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 표 20에 열거된 최소 위치 Ø 면역원의 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0685] 조항 60. 조항 57 또는 58의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 서열번호: 1027-1218의 하나의 아미노산 서열에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0686] 조항 61. 조항 57 또는 58의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 선택적으로 해당 서열번호에 열거된 단백질 태그 또는 리더 서열없이, 서열번호: 1027-1218의 하나의 아미노산 서열에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0687] 조항 62. 조항 58-61의 임의의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 위치 155 및 290에서 시스테인(cysteine) 대체, 위치 190, 위치 207, 또는 위치 190 및 207에서 F, L, W, Y, H, 또는 M 대체를 포함한다.

[0688] 조항 63. 조항 58-61의 임의의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 S155C 및 S290C 대체; S155C, S290C, 및 S190F 대체, 또는 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체를 포함한다.

[0689] 조항 64. 조항 58-61의 임의의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 서열번호: 1027-1218의 어느 하나의 F_1-링커-F_2서열 또는 F_2-링커- F_1 서열을 포함하거나 또는 구성한다.

[0690] 조항 65. 조항 57-64의 임의의 면역원, 상기 이종(heterologous) 링커는 서열번호: 1443-1455, 또는 G, S, GG, GS, SG, GGG, 또는 GSG 링커의 어느 하나로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 구성한다.

[0691] 조항 66. 임의의 이전 조항의 면역원, 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편의 멀티머(multimer)를 포함한다.

[0692] 조항 67. 임의의 이전 조항의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 스캐폴드 단백질에 연결된다.

[0693] 조항 68. 조항 1-56의 임의의 면역원, 상기 F1 폴리펩타이드는 RSV 위치 492로부터 위치 510-529의 하나까지를 포함하는 RSV α10 헬릭스를 포함하고, 상기 F1 폴리펩타이드는 비자연적 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합(disulfide bond)를 형성하는 적어도 2개 시스테인(cysteine) 대체를 포함한다.

[0694] 조항 69. 조항 68의 면역원, F_1 폴리펩타이드의 위치 512-524는 CCHNVNAGKSTTN (서열번호: 844잔기 512-524) 또는 CCHNVNACCSTTN (서열번호: 849의 잔기 X-Y)로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하고; 또는 F1 폴리펩타이드의 위치 512-529는 CCHNVNACCSTTNICCTT (서열번호: 853의 잔기 512-529)로서 제시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0695] 조항 70. 이전 조항의 어느 하나의 분리된 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 F1 위치에서 교차연결된 시스테인(cysteines)의 쌍을 포함하는 추가 디설피드 결합(disulfide bond)을 추가적으로 포함한다:

[0696] (a) 486 및 487;

[0697] (b) 512 및 513;

[0698] (c) 519 및 520;

[0699] (d) 526 및 527;

[0700] (e) 486 및 487, 상기 F1 폴리펩타이드는 위치 486 및 487위치 사이에 끼워넣은 P를 추가적으로 포함한다;

[0701] (f) 330 및 493; 상기 F1 폴리펩타이드는 위치 329와 330 사이에 위치 C 삽입 사이에 끼워넣은 C를 추가적으로 포함한다; 또는

[0702] (g) 330 및 493; 상기 F1 폴리펩타이드는 위치 329와 330 사이에 끼워넣은 C, 및 위치 492와 493 사이에 위치 G 삽입을 추가적으로 포함한다;

[0703] 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0704] 조항 71. 임의의 이전 조항의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편 또는 항원결정기 스캐폴드 단백질은 삼량체화(trimerization) 도메인에 연결된다.

[0705] 조항 72. 조항 71의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질의 F1 폴리펩타이드의 C-말단은 삼량체화(trimerization) 도메인에 연결된다.

[0706] 조항 73. 조항 71 또는 조항 72의 면역원, 상기 삼량체화 도메인은 접히는(foldon) 도메인이다.

[0707] 조항 74. 임의의 조항 71-73의 면역원, F_1 폴리펩티드 및 삼량체화 도메인 사이에 프로테아제 절단 위치를 추가적으로 포함한다.

[0708] 조항 75. 조항 74의 면역원, 프로테아제 절단 위치와 삼량체화 도메인 사이에 트랜스멤브린 도메인을 추가적으로 포함한다.

[0709] 조항 76. 조항 75의 분리된 면역원, 상기 RSV F 단백질은 하기에 의해 F 단백질 선융합 입체형태에서 안정된다

[0710] (a) 디설피드 결합(disulfide bond), 접히는(foldon) 도메인에 연결된 상기 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드는 서열번호: 185, 189, 190, 201, 202, 205,207,209,211, 212, 213,244,245,247,257,258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,277,278,279,280,281, 282, 284, 302, 303, 243, 246, 276, 283, 285,296, 297, 298, 또는 299의 어느 하나의, 각각, 위치 26-109 및 137-544로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하고;

[0711] (b) 구멍(cavity)-채우는 아미노산 대체, 접히는(foldon) 도메인에 연결된 상기 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드는 서열번호: 191, 193, 196, 197, 248, 192, 195, 또는 194의 어느 하나의, 각각, 위치 26-109 및 137-544로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하고;

[0712] (c) 재포장 아미노산 대체, 접히는(foldon) 도메인에 연결된 상기 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드는 서열번호: 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 또는 337의 어느 하나의, 각각, 위치 26-109 및 137-544로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하거나; 또는

[0713] (d) N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 위치, 접히는(foldon) 도메인에 연결된 상기 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드는 서열번호: 198, 199, 200, 203, 204, 214, 215, 216, 또는 217로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열번호의 어느 하나의, 각각, 위치 26-109 및 137-544로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하고;

[0714] (e) 디설피드 결합(disulfide bond) 및 구멍(cavity) 채우는 대체, 접히는(foldon) 도메인에 연결된 상기 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드는 서열번호: 371, 372, 373, 374, 375, 376로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열번호의 어느 하나의, 각각, 위치 26-109 및 137-544로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하고; 및

[0715] 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0716] 조항 77. 조항 75의 분리된 면역원, 접히는(foldon) 도메인에 연결된 상기 F_2 폴리펩타이드 및 F_1 폴리펩타이드는 서열번호: 552; 553; 554; 555; 556; 557; 558; 559; 560; 561; 562; 563; 564; 565; 566; 567; 568; 569; 570; 571; 572; 573; 574; 575; 576; 577; 578; 579; 580; 581; 582; 583; 584; 585; 586; 587; 588; 589; 590; 591; 592; 593; 및 601; 683; 684; 685; 686; 687; 688; 689; 690; 691; 692; 또는 693의 어느 하나의,

각각, 위치 26-109 및 137-548로서 제시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0717] 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0718] 조항 78. 이전 조항의 어느 하나의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편 또는 항원결정기 스캐폴드 단백질은 단백질 나노입자 서브유닛(subunit)에 연결된다.

[0719] 조항 79. 조항 78의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편 또는 항원결정기 스캐폴드 단백질의 C-말단은 단백질 나노입자 서브유닛(subunit)에 연결된다.

[0720] 조항 80. 조항 78 또는 조항 79의 면역원, 상기 단백질 나노입자 서브유닛(subunit)은 페리틴(ferritin), 인캡슐린(encapsulin), 설파 옥시제나제 리덕테아제(Sulfur Oxygenase Reductase (SOR)), 루마진 신타아제(lumazine synthase), 또는 피루베이트 디하이드로제나제(pyruvate dehydrogenase) 나노입자 서브유닛이다.

[0721] 조항 81. 조항 78의 면역원, 여기서:

[0722] 상기 페리틴(ferritin) 나노입자 서브유닛은 서열번호: 350의 잔기 517-679에 적어도 80% 서열 독자성(identity)을 가지는 아미노산 서열을 포함하고, 선택적으로 페리틴 폴리펩타이드에 있는 C31S, C31A 또는 C31V 대체를 포함하고;

[0723] 상기 SOR 서브유닛은 서열번호: 344 또는 서열번호: 345의 잔기 516-825에 적어도 80% 서열 독자성(identity)을 가지는 아미노산 서열을 포함하고;

[0724] 상기 루마진 신타아제(lumazine synthase)서브유닛은 서열번호: 346 또는 서열번호: 348의 잔기 517-670, 또는 서열번호: 347의 잔기 517-669에 적어도 80% 서열 독자성(identity)을 가지는 아미노산 서열을 포함하고; 또는

[0725] 상기 피루베이트 디하이드로제나제 신타제(pyruvate dehydrogenase synthase) 서브유닛은 서열번호: 349의 잔기 516-757에 적어도 80% 서열 독자성을 가지는 아미노산 서열 포함한다.

[0726] 조항 82. 조항 78의 면역원, 서열번호: 827-828 또는 1429-1442의 하나에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 페리틴(ferritin) 서브유닛에 연결된 단일 사슬 RSV F 단백질을 포함한다.

[0727] 조항 83. 조항 78의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 나노입자 서브유닛에 연결되고, 표 21에 열거된 바와 같이 단백질 나노입자에 연결된 최소 위치 Ø 면역원의 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0728] 조항 84. 조항 78의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 나노입자 서브유닛에 연결되고, 서열번호: 1219-1428의 하나의 아미노산 서열에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0729] 조항 85. 조항 78의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질, 또는 이의 단편은 나노입자 서브유닛에 연결되고, 선택적으로 해당 서열번호에서 열거된 단백질 태그 또는 리더 서열없이, 서열번호: 1219-1428의 하나의 아미노산 서열에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0730] 조항 86. 임의의 이전 조항의 면역원, 상기 재조합 RSV F 단백질은 상온에서 생리적(physiological) pH에서 인산염완충식염수에서 삼량체(trimer)를 형성한다.

[0731] 조항 87. 임의의 이전 조항의 면역원, 상기 면역원은 수용성 용액에서 배양될 때 동질적 면역원 수를 형성하고, 용액에서 배양되는 면역원의 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 및/또는 적어도 95%는 하기의 이후에 선융합-특정 항체에 특정적으로 결합한다:

[0732] (a) 50℃에서 350 mM NaCl pH 7.0에서, 1 시간 동안 배양;

[0733] (b) 25℃에서 350 mM NaCl pH 3.5에서, 1 시간 동안 배양;

[0734] (c) 25℃에서 350 mM NaCl pH 10에서, 1 시간 동안 배양;

[0735] (d) 25℃에서 10 mM 삼투압 농도(osmolarity), pH 7.0에서, 1 시간 동안 배양;

[0736] (e) 25℃에서 3000 mM 삼투압 농도(osmolarity), pH 7.0, 1 시간 동안 배양 in; 또는

[0737] (f) 350 mM NaCl pH 7.0에서 10회 냉동-해동 사이클; 또는

[0738] (g) (a)-(f)의 2개 또는 그 이상의 조합; 여기서

[0739] 면역원은 선융합-특정 항체의 부재에서 용액에서 배양된다.

[0740] 조항 88. 임의의 이전 조항의 면역원, 여기서:

[0741] (a) 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 RSV F 위치 481와 489 사이에, 또는 RSV F 위치 509 및 510 사이에 디설피드 결합을 포함하지 않는다;

[0742] (b) 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편은 RSV F 위치 481, 489, 509, 510 또는 이의 조합에서 시스테인(cysteine) 잔기를 포함하지 않는다;

[0743] (c) (a) 및 (b)의 조합.

[0744] 조항 89. 조항 1-70의 어느 하나의 분리된 면역원, 상기 F1 폴리펩타이드의 C-말단은 트랜스멤브린 도메인에 연결된다.

[0745] 조항 90. 조항 89의 분리된 면역원, 상기 트랜스멤브린 도메인은 RSV F 트랜스멤브린 도메인이다.

[0746] 조항 91. 조항 89 또는 90의 분리된 면역원, 트랜스멤브린 도메인의 상기 C-말단은 RSV F 세포질 도메인에 연결된다.

[0747] 조항 92. 이전 조항의 어느 하나의 분리된 면역원, 상기 면역원은 비특정

[0748] 교차연결(crosslinking)에 의해 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정되지않는다.

[0749] 조항 93. 조항 1-70의 어느 하나의 면역원을 포함하는 바이러스-같은 입자.

[0750] 조항 94. 조항 1-85d의 어느 하나의 면역원을 포함하는 단백질 나노입자.

[0751] 조항 95. 조항 94의 단백질 나노입자, 상기 단백질 나노입자는 페리틴(ferritin) 나노입자, 인캡슐린(encapsulin) 나노입자, 설파 옥시제나제 리덕테아제(Sulfur Oxygenase Reductase (SOR)) 나노입자, 루마진 신타아제(lumazine synthase)나노입자 또는 피루베이트 디하이드로제나제(pyruvate dehydrogenase) 나노입자이다.

[0752] 조항 96. 조항 1-92의 어느 하나의, 면역원, 상기 단일 항체 D25 또는 AM22의 Fab는 1 μM 또는 미만의 Kd로 면역원, the 바이러스-같은 입자, 또는 단백질 나노입자에 특정적으로 결합한다.

[0753] 조항 97. 조항 1-85의 어느 하나의 분리된 면역원, 상기 면역원은 단일 항체 D25의 부재에서 2.0 A/잔기 미만의 이들의 조정의 평균평방근편차(root mean square 이탈 (RMSD))을 가지는 표 1에서 제시되는 원자 조정에 의해 정의된 바와 같이 단일 항체 D25와 함께 복합체에서 서열번호: 370의 잔기 62-69 및 196-209를 포함하는 D25 항원결정기의 3차 구조에 구조적으로 덧붙일 수 있는 , 3차 구조를 포함하는 D25 항원결정기를 포함하고, 상기 RMSD는 적어도 3개 연속적 아미노산에 대해, 폴리펩타이드 백본 원자(backbone atoms) N, Cα, C, O 상에서 측정된다.

[0754] 조항 98. 조항 1-92의 어느 하나의 분리된 면역원을 암호화하는 핵산 분자.

[0755] 조항 99. 조항 98의 핵산 분자, 상기 핵산 분자는 면역원의 전구체 단백질를 암호화한다.

[0756] 조항 100. 조항 99의 핵산 분자, 상기 전구체 단백질은 N- 부터 C-말단까지, 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드, Pep27 폴리펩타이드, 및 F1 폴리펩타이드를 포함한다.

[0757] 조항 101. 조항 100의 핵산 분자, 상기 Pep27 폴리펩타이드는 서열번호: 1-184 또는 370의 어느 하나의 위치 110-136로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0758] 조항 102. 조항 10의 핵산 분자, 상기 단일 펩타이드는 서열번호: 1-184 또는 370의 어느 하나의 위치 1-25로서 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 아미노산 위치는 서열번호: 124로서 제시되는 참조 F_0 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당된다.

[0759] 조항 103. 코돈(codon)은 인간 또는 소(bovine) 세포에서 발현을 위해 최적화된다.

[0760] 조항 104. 프로모터(promoter)에 사용가능하게 연결되는 조항 99-103의 어느 하나의 핵산 분자.

[0761] 조항 105. 조항 104의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

[0762] 조항 106. 상기 벡터는 바이러스 벡터인 조항 105의 벡터.

[0763] 조항 107. 조항 106d의 바이러스 벡터, 상기 바이러스 벡터는 소(bovine) 파라인플루엔자 바이러스 벡터, 인간 파라인플루엔자 바이러스 벡터, 뉴캐슬(Newcastle) 질병 바이러스 벡터, 센다이(Sendai) 바이러스 벡터, 홍역(measles) 바이러스 벡터, 약화된 RSV 벡터, 파라믹소바이러스(paramyxovirus) 벡터, 아데노바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터, 베네스 웰라형 마뇌염(Venezuelan equine encephalitis) 벡터, 셈리키 삼림바이러스(Semliki Forest virus) 벡터, 신드비스바이러스(Sindbis virus) 벡터, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터, 폭스바이러스(pox virus) 벡터, 라브도 바이러스(rhabdovirus) 벡터, 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus) 벡터, 피코르나바이러스(picornovirus) 벡터, 또는 헤르페스바이러스(herpesvirus) 벡터이다.

[0764] 조항 108. 상기 벡터는 박테리아(bacterial) 벡터인 조항 106의 벡터.

[0765] 조항 109. 조항 108의 박테리아(bacterial) 벡터, 상기 박테리아 벡터는 미코박테리아(mycobacterial) 벡터, 살모넬라(salmonella) 벡터, 시겔라(shigella) 벡터, 리스테리아 모노시토젠(Listeria monocytogenes) 벡터, 또는 락토바실러스(lactobacillus) 벡터이다.

[0766] 조항 110. 서열번호: 383, 서열번호: 384, 서열번호: 385, 또는 서열번호: 386로서 제시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 조항 98-109의 어느 하나의 핵산 분자 또는 벡터.

[0767] 조항 111. 조항 105-110의 어느 하나의 벡터를 포함하는 분리된 숙주세포.

[0768] 조항 112. 조항 1-110의 어느 하나의 면역원, 바이러스-같은 입자, 단백질 나노입자, 핵산 분자, 또는 벡터의 유효량; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 면역원 조성물

[0769] 조항 113. 보강제를 추가적으로 포함하는 조항 112의 면역원 조성물.

[0770] 조항 114. 상기 보강제는 백반(alum), an 수중 유적형(oil-in water) 조성물, MF59, AS01, AS03, AS04, MPL, QS21, CpG 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide), TLR7 작용제(agonist), TLR4 작용제(agonist), 또는 이의 2개 또는 그 이상의 조합인 조항 113의 면역원 조성물.

[0771] 조항 115. 상기 보강제는 Th1 면역반응을 촉진하는 조항 113의 면역원 조성물.

[0772] 조항 116. 면역원에 특정적으로 결합하는 RSV F 선융합(prefusion) 특정 항체를 추가적으로 포함하는 조항 112의 임의의 면역원 조성물.

[0773] 조항 117. RSV F 단백질 하위유형 A 및 B에 기반되는 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편의 혼합물을 포함하는, 조항 112의 어느 하나의 면역원 조성물.

[0774] 조항 118. 상기 인간 하위유형 A RSV F 단백질 S155C, S290C, 및 S190F 대체를 포함하고, 및 인간 하위유형 B RSV F 단백질은 S155C, S290C, 및 S190F 대체포함하거나; 또는

[0775] 인간 하위유형 A RSV F 단백질은 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체를 포함하고, 및 인간 하위유형 B RSV F 단백질은 S155C, S290C, S190F, 및 V207L 대체를 포함하는 조항 117의 면역원 조성물.

[0776] 조항 119. 면역반응을 생성하기 위하여 조항 112-118의 어느 하나의 면역원 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 RSV F에 대해 면역반응을 생성하는 방법.

[0777] 조항 120. 상기 면역반응은 Th1 면역반응을 포함하는 조항 119의 방법.

[0778] 조항 121. 조항 112-120의 어느 하나의 면역원 조성물의 치료적 유효량을 개체에게 투여하여, 개체에서 RSV 감염을 치료하거나 또는 방지하는 것을 포함하는, 개체에서 RSV 감염을 치료하거나 또는 방지하는 방법.

[0779] 조항 122. 면역원 조성물의 주된-상승(prime-boost) 투여를 포함하는, 조항 119-121의 어느 하나의 방법.

[0780] 조항 123. 상기 주되고(prime) 상승된(boost)은 RSV F 단백질 하위유형 A 및 B에 기반되는 재조합 RSV F 단백질 또는 이의 단편 또는 핵산 분자 또는 단백질 나노입자의 혼합물의 투여를 포함하는 조항 122의 방법.

[0781] 조항 124. 하기를 포함하는, 항체에 결합하는 RSV F를 검출하거나 또는 부닐하는 방법:

[0782] 조항 1-110 중 어느 하나의 면역원, 바이러스-같은 입자, 또는 단백질 나노입자의 유효량을 제공하는 단계;

[0783] 개체로부터의 생체시료(biological 시료)를 재조합 RSV F 단백질 또는 단백질 나노입자와 항체에 결합하는 RSV

F 사이에 면역 복합체(immune 복합체)를 형성하기 위한 충분한 조건하에서 재조합 RSV F 단백질 또는 단백질 나노입자와 접촉하는 단계; 및

[0784] 상기 개체에서 면역 복합체(immune 복합체)를 검출하여, 항체에 결합하는 RSV F를 검출하거나 또는 분리하는 단계.

[0785] 조항 125. 상기 개체는 RSV 감염 위험이 있거나 또는 RSV 감염을 가지고 있는 조항 119-124의 어느 하나의 방법.

[0786] 조항 126. 상기 RSV 감염은 인간 RSV 하위유형 A, 인간 RSV 하위유형 B, 또는 소 RSV 감염인 조항 125의 방법.

[0787] 조항 127. 상기 개체는 인간 또는 가축(veterinary) 개체인 조항 119-126의 어느 하나의 방법.

[0788] 조항 128. 조항 1-110의 어느 하나의 면역원, 바이러스-같은 입자, 단백질 나노입자, 핵산 분자, 벡터, 숙주세포, 또는 면역원 조성물; 및 키트를 사용하기 위한 지침서(instructions)를 포함하는 키트.

[0790] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 하기를 참조:

[0791] "서열번호: 1-184의 어느 하나"는 "서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 서열번호: 24, 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 서열번호: 39, 서열번호: 40, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 서열번호: 46, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 서열번호: 51, 서열번호: 52, 서열번호: 53, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 59, 서열번호: 60, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63, 서열번호: 64, 서열번호: 65, 서열번호: 66, 서열번호: 67, 서열번호: 68, 서열번호: 69, 서열번호: 70, 서열번호: 71, 서열번호: 72, 서열번호: 73, 서열번호: 74, 서열번호: 75, 서열번호: 76, 서열번호: 77, 서열번호: 78, 서열번호: 79, 서열번호: 80, 서열번호: 81, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84, 서열번호: 85, 서열번호: 86, 서열번호: 87, 서열번호: 88, 서열번호: 89, 서열번호: 90, 서열번호: 91, 서열번호: 92, 서열번호: 93, 서열번호: 94, 서열번호: 95, 서열번호: 96, 서열번호: 97, 서열번호: 98, 서열번호: 99, 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 104, 서열번호: 105, 서열번호: 106, 서열번호: 107, 서열번호: 108, 서열번호: 109, 서열번호: 110, 서열번호: 111, 서열번호: 112, 서열번호: 113, 서열번호: 114, 서열번호: 115, 서열번호: 116, 서열번호: 117, 서열번호: 118, 서열번호: 119, 서열번호: 120, 서열번호: 121, 서열번호: 122, 서열번호: 123, 서열번호: 124, 서열번호: 125, 서열번호: 126, 서열번호: 127, 서열번호: 128, 서열번호: 129, 서열번호: 130, 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 133, 서열번호: 134, 서열번호: 135, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 서열번호: 140, 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148, 서열번호: 149, 서열번호: 150, 서열번호: 151, 서열번호: 152, 서열번호: 153, 서열번호: 154, 서열번호: 155, 서열번호: 156, 서열번호: 157, 서열번호: 158, 서열번호: 159, 서열번호: 160, 서열번호: 161, 서열번호: 162, 서열번호: 163, 서열번호: 164, 서열번호: 165, 서열번호: 166, 서열번호: 167, 서열번호: 168, 서열번호: 169, 서열번호: 170, 서열번호: 171, 서열번호: 172, 서열번호: 173, 서열번호: 174, 서열번호: 175, 서열번호: 176, 서열번호: 177, 서열번호: 178, 서열번호: 179, 서열번호: 180, 서열번호: 181, 서열번호: 182, 서열번호: 183, 또는 서열번호: 184"를 언급한다.

[0792] "서열번호: 698-828"는 "서열번호: 699, 서열번호: 700, 서열번호: 701, 서열번호: 702, 서열번호: 703, 서열번호: 704, 서열번호: 705, 서열번호: 706, 서열번호: 707, 서열번호: 708, 서열번호: 709, 서열번호: 710, 서열번호: 711, 서열번호: 712, 서열번호: 713, 서열번호: 714, 서열번호: 715, 서열번호: 716, 서열번호: 717, 서열번호: 718, 서열번호: 719, 서열번호: 720, 서열번호: 721, 서열번호: 722, 서열번호: 723, 서열번호: 724, 서열번호: 725, 서열번호: 726, 서열번호: 727, 서열번호: 728, 서열번호: 729, 서열번호: 730, 서열번호: 731, 서열번호: 732, 서열번호: 733, 서열번호: 734, 서열번호: 735, 서열번호: 736, 서열번호: 737, 서열번호: 738, 서열번호: 739, 서열번호: 740, 서열번호: 741, 서열번호: 742, 서열번호: 743, 서열번호: 744, 서열번호: 745, 서열번호: 746, 서열번호: 747, 서열번호: 748, 서열번호: 749, 서열번호:

750, 서열번호: 751, 서열번호: 752, 서열번호: 753, 서열번호: 754, 서열번호: 755, 서열번호: 756, 서열번호: 757, 서열번호: 758, 서열번호: 759, 서열번호: 760, 서열번호: 761, 서열번호: 762, 서열번호: 763, 서열번호: 764, 서열번호: 765, 서열번호: 766, 서열번호: 767, 서열번호: 768, 서열번호: 769, 서열번호: 770, 서열번호: 771, 서열번호: 772, 서열번호: 773, 서열번호: 774, 서열번호: 775, 서열번호: 776, 서열번호: 777, 서열번호: 778, 서열번호: 779, 서열번호: 780, 서열번호: 781, 서열번호: 782, 서열번호: 783, 서열번호: 784, 서열번호: 785, 서열번호: 786, 서열번호: 787, 서열번호: 788, 서열번호: 789, 서열번호: 790, 서열번호: 791, 서열번호: 792, 서열번호: 793, 서열번호: 794, 서열번호: 795, 서열번호: 796, 서열번호: 797, 서열번호: 798, 서열번호: 799, 서열번호: 800, 서열번호: 801, 서열번호: 802, 서열번호: 803, 서열번호: 804, 서열번호: 805, 서열번호: 806, 서열번호: 807, 서열번호: 808, 서열번호: 809, 서열번호: 810, 서열번호: 811, 서열번호: 812, 서열번호: 813, 서열번호: 814, 서열번호: 815, 서열번호: 816, 서열번호: 817, 서열번호: 818, 서열번호: 819, 서열번호: 820, 서열번호: 821, 서열번호: 822, 서열번호: 823, 서열번호: 824, 서열번호: 825, 서열번호: 826, 서열번호: 827, 또는 서열번호: 828의 어느 하나(any 하나 of)"를 언급한다.

[0793] "서열번호: 1474-1478"는 "서열번호: 1474, 서열번호: 1475, 서열번호: 1476, 서열번호: 1477, 또는 서열번호: 1478의 어느 하나(any 하나 of)"를 언급한다.

[0794] "서열번호: 829-1025"는 "서열번호: 829, 서열번호: 830, 서열번호: 831, 서열번호: 832, 서열번호: 833, 서열번호: 834, 서열번호: 835, 서열번호: 836, 서열번호: 837, 서열번호: 838, 서열번호: 839, 서열번호: 840, 서열번호: 841, 서열번호: 842, 서열번호: 843, 서열번호: 844, 서열번호: 845, 서열번호: 846, 서열번호: 847, 서열번호: 848, 서열번호: 849, 서열번호: 850, 서열번호: 851, 서열번호: 852, 서열번호: 853, 서열번호: 854, 서열번호: 855, 서열번호: 856, 서열번호: 857, 서열번호: 858, 서열번호: 859, 서열번호: 860, 서열번호: 861, 서열번호: 862, 서열번호: 863, 서열번호: 864, 서열번호: 865, 서열번호: 866, 서열번호: 867, 서열번호: 868, 서열번호: 869, 서열번호: 870, 서열번호: 871, 서열번호: 872, 서열번호: 873, 서열번호: 874, 서열번호: 875, 서열번호: 876, 서열번호: 877, 서열번호: 878, 서열번호: 879, 서열번호: 880, 서열번호: 881, 서열번호: 882, 서열번호: 883, 서열번호: 884, 서열번호: 885, 서열번호: 886, 서열번호: 887, 서열번호: 888, 서열번호: 889, 서열번호: 890, 서열번호: 891, 서열번호: 892, 서열번호: 893, 서열번호: 894, 서열번호: 895, 서열번호: 896, 서열번호: 897, 서열번호: 898, 서열번호: 899, 서열번호: 900, 서열번호: 901, 서열번호: 902, 서열번호: 903, 서열번호: 904, 서열번호: 905, 서열번호: 906, 서열번호: 907, 서열번호: 908, 서열번호: 909, 서열번호: 910, 서열번호: 911, 서열번호: 912, 서열번호: 913, 서열번호: 914, 서열번호: 915, 서열번호: 916, 서열번호: 917, 서열번호: 918, 서열번호: 919, 서열번호: 920, 서열번호: 921, 서열번호: 922, 서열번호: 923, 서열번호: 924, 서열번호: 925, 서열번호: 926, 서열번호: 927, 서열번호: 928, 서열번호: 929, 서열번호: 930, 서열번호: 931, 서열번호: 932, 서열번호: 933, 서열번호: 934, 서열번호: 935, 서열번호: 936, 서열번호: 937, 서열번호: 938, 서열번호: 939, 서열번호: 940, 서열번호: 941, 서열번호: 942, 서열번호: 943, 서열번호: 944, 서열번호: 945, 서열번호: 946, 서열번호: 947, 서열번호: 948, 서열번호: 949, 서열번호: 950, 서열번호: 951, 서열번호: 952, 서열번호: 953, 서열번호: 954, 서열번호: 955, 서열번호: 956, 서열번호: 957, 서열번호: 958, 서열번호: 959, 서열번호: 960, 서열번호: 961, 서열번호: 962, 서열번호: 963, 서열번호: 964, 서열번호: 965, 서열번호: 966, 서열번호: 967, 서열번호: 968, 서열번호: 969, 서열번호: 970, 서열번호: 971, 서열번호: 972, 서열번호: 973, 서열번호: 974, 서열번호: 975, 서열번호: 976, 서열번호: 977, 서열번호: 978, 서열번호: 979, 서열번호: 980, 서열번호: 981, 서열번호: 982, 서열번호: 983, 서열번호: 984, 서열번호: 985, 서열번호: 986, 서열번호: 987, 서열번호: 988, 서열번호: 989, 서열번호: 990, 서열번호: 991, 서열번호: 992, 서열번호: 993, 서열번호: 994, 서열번호: 995, 서열번호: 996, 서열번호: 997, 서열번호: 998, 서열번호: 999, 서열번호: 1000, 서열번호: 1001, 서열번호: 1002, 서열번호: 1003, 서열번호: 1004, 서열번호: 1005, 서열번호: 1006, 서열번호: 1007, 서열번호: 1008, 서열번호: 1009, 서열번호: 1010, 서열번호: 1011, 서열번호: 1012, 서열번호: 1013, 서열번호: 1014, 서열번호: 1015, 서열번호: 1016, 서열번호: 1017, 서열번호: 1018, 서열번호: 1019, 서열번호: 1020, 서열번호: 1021, 서열번호: 1022, 서열번호: 1023, 서열번호: 1024, 또는 서열번호: 1025의 어느 하나"를 언급한다

[0795] "서열번호: 969-1025"는 "서열번호: 969, 서열번호: 970, 서열번호: 971, 서열번호: 972, 서열번호: 973, 서열번호: 974, 서열번호: 975, 서열번호: 976, 서열번호: 977, 서열번호: 978, 서열번호: 979, 서열번호: 980, 서열번호: 981, 서열번호: 982, 서열번호: 983, 서열번호: 984, 서열번호: 985, 서열번호: 986, 서열번호: 987, 서열번호: 988, 서열번호: 989, 서열번호: 990, 서열번호: 991, 서열번호: 992, 서열번호: 993,

서열번호: 994, 서열번호: 995, 서열번호: 996, 서열번호: 997, 서열번호: 998, 서열번호: 999, 서열번호: 1000, 서열번호: 1001, 서열번호: 1002, 서열번호: 1003, 서열번호: 1004, 서열번호: 1005, 서열번호: 1006, 서열번호: 1007, 서열번호: 1008, 서열번호: 1009, 서열번호: 1010, 서열번호: 1011, 서열번호: 1012, 서열번호: 1013, 서열번호: 1014, 서열번호: 1015, 서열번호: 1016, 서열번호: 1017, 서열번호: 1018, 서열번호: 1019, 서열번호: 1020, 서열번호: 1021, 서열번호: 1022, 서열번호: 1023, 서열번호: 1024, 또는 서열번호: 1025의 어느 하나(any 하나 of)"를 언급한다.

[0796] "서열번호: 901-968"은 "서열번호: 901, 서열번호: 902, 서열번호: 903, 서열번호: 904, 서열번호: 905, 서열번호: 906, 서열번호: 907, 서열번호: 908, 서열번호: 909, 서열번호: 910, 서열번호: 911, 서열번호: 912, 서열번호: 913, 서열번호: 914, 서열번호: 915, 서열번호: 916, 서열번호: 917, 서열번호: 918, 서열번호: 919, 서열번호: 920, 서열번호: 921, 서열번호: 922, 서열번호: 923, 서열번호: 924, 서열번호: 925, 서열번호: 926, 서열번호: 927, 서열번호: 928, 서열번호: 929, 서열번호: 930, 서열번호: 931, 서열번호: 932, 서열번호: 933, 서열번호: 934, 서열번호: 935, 서열번호: 936, 서열번호: 937, 서열번호: 938, 서열번호: 939, 서열번호: 940, 서열번호: 941, 서열번호: 942, 서열번호: 943, 서열번호: 944, 서열번호: 945, 서열번호: 946, 서열번호: 947, 서열번호: 948, 서열번호: 949, 서열번호: 950, 서열번호: 951, 서열번호: 952, 서열번호: 953, 서열번호: 954, 서열번호: 955, 서열번호: 956, 서열번호: 957, 서열번호: 958, 서열번호: 959, 서열번호: 960, 서열번호: 961, 서열번호: 962, 서열번호: 963, 서열번호: 964, 서열번호: 965, 서열번호: 966, 서열번호: 967, 또는 서열번호: 968의 어느 하나"를 언급한다.

[0797] "서열번호: 1027-1218"는 "서열번호: 1027, 서열번호: 1028, 서열번호: 1029, 서열번호: 1030, 서열번호: 1031, 서열번호: 1032, 서열번호: 1033, 서열번호: 1034, 서열번호: 1035, 서열번호: 1036, 서열번호: 1037, 서열번호: 1038, 서열번호: 1039, 서열번호: 1040, 서열번호: 1041, 서열번호: 1042, 서열번호: 1043, 서열번호: 1044, 서열번호: 1045, 서열번호: 1046, 서열번호: 1047, 서열번호: 1048, 서열번호: 1049, 서열번호: 1050, 서열번호: 1051, 서열번호: 1052, 서열번호: 1053, 서열번호: 1054, 서열번호: 1055, 서열번호: 1056, 서열번호: 1057, 서열번호: 1058, 서열번호: 1059, 서열번호: 1060, 서열번호: 1061, 서열번호: 1062, 서열번호: 1063, 서열번호: 1064, 서열번호: 1065, 서열번호: 1066, 서열번호: 1067, 서열번호: 1068, 서열번호: 1069, 서열번호: 1070, 서열번호: 1071, 서열번호: 1072, 서열번호: 1073, 서열번호: 1074, 서열번호: 1075, 서열번호: 1076, 서열번호: 1077, 서열번호: 1078, 서열번호: 1079, 서열번호: 1080, 서열번호: 1081, 서열번호: 1082, 서열번호: 1083, 서열번호: 1084, 서열번호: 1085, 서열번호: 1086, 서열번호: 1087, 서열번호: 1088, 서열번호: 1099, 서열번호: 1100, 서열번호: 1101, 서열번호: 1102, 서열번호: 1103, 서열번호: 1104, 서열번호: 1105, 서열번호: 1106, 서열번호: 1107, 서열번호: 1108, 서열번호: 1109, 서열번호: 1110, 서열번호: 1111, 서열번호: 1112, 서열번호: 1113, 서열번호: 1114, 서열번호: 1115, 서열번호: 1116, 서열번호: 1117, 서열번호: 1118, 서열번호: 1119, 서열번호: 1120, 서열번호: 1121, 서열번호: 1122, 서열번호: 1123, 서열번호: 1124, 서열번호: 1125, 서열번호: 1126, 서열번호: 1127, 서열번호: 1128, 서열번호: 1129, 서열번호: 1130, 서열번호: 1131, 서열번호: 1132, 서열번호: 1133, 서열번호: 1134, 서열번호: 1135, 서열번호: 1136, 서열번호: 1137, 서열번호: 1138, 서열번호: 1139, 서열번호: 1140, 서열번호: 1141, 서열번호: 1142, 서열번호: 1143, 서열번호: 1144, 서열번호: 1145, 서열번호: 1146, 서열번호: 1147, 서열번호: 1148, 서열번호: 1149, 서열번호: 1150, 서열번호: 1151, 서열번호: 1152, 서열번호: 1153, 서열번호: 1154, 서열번호: 1155, 서열번호: 1156, 서열번호: 1157, 서열번호: 1158, 서열번호: 1159, 서열번호: 1160, 서열번호: 1161, 서열번호: 1162, 서열번호: 1163, 서열번호: 1164, 서열번호: 1165, 서열번호: 1166, 서열번호: 1167, 서열번호: 1168, 서열번호: 1169, 서열번호: 1170, 서열번호: 1171, 서열번호: 1172, 서열번호: 1173, 서열번호: 1174, 서열번호: 1175, 서열번호: 1176, 서열번호: 1177, 서열번호: 1178, 서열번호: 1179, 서열번호: 1180, 서열번호: 1181, 서열번호: 1182, 서열번호: 1183, 서열번호: 1184, 서열번호: 1185, 서열번호: 1186, 서열번호: 1187, 서열번호: 1188, 서열번호: 1189, 서열번호: 1190, 서열번호: 1191, 서열번호: 1192, 서열번호: 1193, 서열번호: 1194, 서열번호: 1195, 서열번호: 1196, 서열번호: 1197, 서열번호: 1198, 서열번호: 1199, 서열번호: 1200, 서열번호: 1201, 서열번호: 1202, 서열번호: 1203, 서열번호: 1204, 서열번호: 1205, 서열번호: 1206, 서열번호: 1207, 서열번호: 1208, 서열번호: 1209, 서열번호: 1210, 서열번호: 1211, 서열번호: 1212, 서열번호: 1213, 서열번호: 1214, 서열번호: 1215, 서열번호: 1216, 서열번호: 1217, 또는 서열번호: 1218의 어느 하나(any 하나 of)"를 언급한다.

[0798] "서열번호: 1429-1442"는 "서열번호: 1429, 서열번호: 1430, 서열번호: 1431, 서열번호: 1432, 서열번호: 1433, 서열번호: 1434, 서열번호: 1435, 서열번호: 1436, 서열번호: 1437, 서열번호: 1438, 서열번호: 1439,

서열번호: 1440, 서열번호: 1441, 또는 서열번호: 1442의 어느 하나(any 하나 of)"를 언급한다.

[0799] "서열번호: 1219-1428"는 서열번호: 1219, 서열번호: 1220, 서열번호: 1221, 서열번호: 1222, 서열번호: 1223, 서열번호: 1224, 서열번호: 1225, 서열번호: 1226, 서열번호: 1227, 서열번호: 1228, 서열번호: 1229, 서열번호: 1230, 서열번호: 1231, 서열번호: 1232, 서열번호: 1233, 서열번호: 1234, 서열번호: 1235, 서열번호: 1236, 서열번호: 1237, 서열번호: 1238, 서열번호: 1239, 서열번호: 1240, 서열번호: 1241, 서열번호: 1242, 서열번호: 1243, 서열번호: 1244, 서열번호: 1245, 서열번호: 1246, 서열번호: 1247, 서열번호: 1248, 서열번호: 1249, 서열번호: 1250, 서열번호: 1251, 서열번호: 1252, 서열번호: 1253, 서열번호: 1254, 서열번호: 1255, 서열번호: 1256, 서열번호: 1257, 서열번호: 1258, 서열번호: 1259, 서열번호: 1260, 서열번호: 1261, 서열번호: 1262, 서열번호: 1263, 서열번호: 1264, 서열번호: 1265, 서열번호: 1266, 서열번호: 1267, 서열번호: 1268, 서열번호: 1269, 서열번호: 1270, 서열번호: 1271, 서열번호: 1272, 서열번호: 1273, 서열번호: 1274, 서열번호: 1275, 서열번호: 1276, 서열번호: 1277, 서열번호: 1278, 서열번호: 1279, 서열번호: 1280, 서열번호: 1281, 서열번호: 1282, 서열번호: 1283, 서열번호: 1284, 서열번호: 1285, 서열번호: 1286, 서열번호: 1287, 서열번호: 1288, 서열번호: 1289, 서열번호: 1290, 서열번호: 1291, 서열번호: 1292, 서열번호: 1293, 서열번호: 1294, 서열번호: 1295, 서열번호: 1296, 서열번호: 1297, 서열번호: 1298, 서열번호: 1299, 서열번호: 1300, 서열번호: 1301, 서열번호: 1302, 서열번호: 1303, 서열번호: 1304, 서열번호: 1305, 서열번호: 1306, 서열번호: 1307, 서열번호: 1308, 서열번호: 1309, 서열번호: 1310, 서열번호: 1311, 서열번호: 1312, 서열번호: 1313, 서열번호: 1314, 서열번호: 1315, 서열번호: 1316, 서열번호: 1317, 서열번호: 1318, 서열번호: 1319, 서열번호: 1320, 서열번호: 1321, 서열번호: 1322, 서열번호: 1323, 서열번호: 1324, 서열번호: 1325, 서열번호: 1326, 서열번호: 1327, 서열번호: 1328, 서열번호: 1329, 서열번호: 1330, 서열번호: 1331, 서열번호: 1332, 서열번호: 1333, 서열번호: 1334, 서열번호: 1335, 서열번호: 1336, 서열번호: 1337, 서열번호: 1338, 서열번호: 1339, 서열번호: 1340, 서열번호: 1341, 서열번호: 1342, 서열번호: 1343, 서열번호: 1344, 서열번호: 1345, 서열번호: 1346, 서열번호: 1347, 서열번호: 1348, 서열번호: 1349, 서열번호: 1350, 서열번호: 1351, 서열번호: 1352, 서열번호: 1353, 서열번호: 1354, 서열번호: 1355, 서열번호: 1356, 서열번호: 1357, 서열번호: 1358, 서열번호: 1359, 서열번호: 1360, 서열번호: 1361, 서열번호: 1362, 서열번호: 1363, 서열번호: 1364, 서열번호: 1365, 서열번호: 1366, 서열번호: 1367, 서열번호: 1368, 서열번호: 1369, 서열번호: 1370, 서열번호: 1371, 서열번호: 1372, 서열번호: 1373, 서열번호: 1374, 서열번호: 1375, 서열번호: 1376, 서열번호: 1377, 서열번호: 1378, 서열번호: 1379, 서열번호: 1380, 서열번호: 1381, 서열번호: 1382, 서열번호: 1383, 서열번호: 1384, 서열번호: 1385, 서열번호: 1386, 서열번호: 1387, 서열번호: 1388, 서열번호: 1389, 서열번호: 1390, 서열번호: 1391, 서열번호: 1392, 서열번호: 1393, 서열번호: 1394, 서열번호: 1395, 서열번호: 1396, 서열번호: 1397, 서열번호: 1398, 서열번호: 1399, 서열번호: 1400, 서열번호: 1401, 서열번호: 1402, 서열번호: 1403, 서열번호: 1404, 서열번호: 1405, 서열번호: 1406, 서열번호: 1407, 서열번호: 1408, 서열번호: 1409, 서열번호: 1410, 서열번호: 1411, 서열번호: 1412, 서열번호: 1413, 서열번호: 1414, 서열번호: 1415, 서열번호: 1416, 서열번호: 1417, 서열번호: 1418, 서열번호: 1419, 서열번호: 1420, 서열번호: 1421, 서열번호: 1422, 서열번호: 1423, 서열번호: 1424, 서열번호: 1425, 서열번호: 1426, 서열번호: 1427, 또는 서열번호: 1428의 어느 하나를 언급한다.

[0800] 일부 실시형태에서, 개시된 재조합 RSV F 단백질은 서열번호: 185, 서열번호: 186, 서열번호: 187, 서열번호: 188, 서열번호: 189, 서열번호: 190, 서열번호: 191, 서열번호: 192, 서열번호: 193, 서열번호: 194, 서열번호: 195, 서열번호: 196, 서열번호: 197, 서열번호: 198, 서열번호: 199, 서열번호: 200, 서열번호: 201, 서열번호: 202, 서열번호: 203, 서열번호: 204, 서열번호: 205, 서열번호: 206, 서열번호: 207, 서열번호: 208, 서열번호: 209, 서열번호: 210, 서열번호: 211, 서열번호: 212, 서열번호: 213, 서열번호: 214, 서열번호: 215, 서열번호: 216, 서열번호: 217, 서열번호: 218, 서열번호: 219, 서열번호: 220, 서열번호: 221, 서열번호: 222, 서열번호: 223, 서열번호: 224, 서열번호: 225, 서열번호: 226, 서열번호: 227, 서열번호: 228, 서열번호: 229, 서열번호: 230, 서열번호: 231, 서열번호: 232, 서열번호: 233, 서열번호: 234, 서열번호: 235, 서열번호: 236, 서열번호: 237, 서열번호: 238, 서열번호: 239, 서열번호: 240, 서열번호: 241, 서열번호: 242, 서열번호: 243, 서열번호: 244, 서열번호: 245, 서열번호: 246, 서열번호: 247, 서열번호: 248, 서열번호: 249, 서열번호: 250, 서열번호: 251, 서열번호: 252, 서열번호: 253, 서열번호: 254, 서열번호: 255, 서열번호: 256, 서열번호: 257, 서열번호: 258, 서열번호: 259, 서열번호: 260, 서열번호: 261, 서열번호: 262, 서열번호: 263, 서열번호: 264, 서열번호: 265, 서열번호: 266, 서열번호: 267, 서열번호: 268, 서열번호: 269, 서열번호: 270, 서열번호: 271, 서열번호: 272, 서열번호: 273, 서열번호: 274, 서열번호: 275, 서열번호: 276, 서열번호: 277, 서열번호: 278, 서열번호:

279, 서열번호: 280, 서열번호: 281, 서열번호: 282, 서열번호: 283, 서열번호: 284, 서열번호: 285, 서열번호: 286, 서열번호: 287, 서열번호: 288, 서열번호: 289, 서열번호: 290, 서열번호: 291, 서열번호: 292, 서열번호: 293, 서열번호: 294, 서열번호: 295, 서열번호: 296, 서열번호: 297, 서열번호: 298, 서열번호: 299, 서열번호: 300, 서열번호: 301, 서열번호: 302, 서열번호: 303, 서열번호: 304, 서열번호: 305, 서열번호: 306, 서열번호: 307, 서열번호: 308, 서열번호: 309, 서열번호: 310, 서열번호: 311, 서열번호: 312, 서열번호: 313, 서열번호: 314, 서열번호: 315, 서열번호: 316, 서열번호: 317, 서열번호: 318, 서열번호: 319, 서열번호: 320, 서열번호: 321, 서열번호: 322, 서열번호: 323, 서열번호: 324, 서열번호: 325, 서열번호: 326, 서열번호: 327, 서열번호: 328, 서열번호: 329, 서열번호: 330, 서열번호: 331, 서열번호: 332, 서열번호: 333, 서열번호: 334, 서열번호: 335, 서열번호: 336, 서열번호: 337, 서열번호: 338, 서열번호: 339, 서열번호: 340, 서열번호: 341, 서열번호: 342, 서열번호: 343, 서열번호: 344, 서열번호: 345, 서열번호: 346, 서열번호: 347, 서열번호: 348, 서열번호: 349, 서열번호: 350, 서열번호: 371, 서열번호: 372, 서열번호: 373, 서열번호: 374, 서열번호: 375, 서열번호: 376, 서열번호: 377, 서열번호: 378, 서열번호: 379, 서열번호: 380, 서열번호: 381, 서열번호: 382, 서열번호: 390, 서열번호: 391, 서열번호: 392, 서열번호: 393, 서열번호: 394, 서열번호: 395, 서열번호: 396, 서열번호: 397, 서열번호: 398, 서열번호: 399, 서열번호: 400, 서열번호: 401, 서열번호: 402, 서열번호: 403, 서열번호: 404, 서열번호: 405, 서열번호: 406, 서열번호: 407, 서열번호: 408, 서열번호: 409, 서열번호: 410, 서열번호: 411, 서열번호: 412, 서열번호: 413, 서열번호: 414, 서열번호: 415, 서열번호: 416, 서열번호: 417, 서열번호: 418, 서열번호: 419, 서열번호: 420, 서열번호: 421, 서열번호: 422, 서열번호: 423, 서열번호: 424, 서열번호: 425, 서열번호: 426, 서열번호: 427, 서열번호: 428, 서열번호: 429, 서열번호: 430, 서열번호: 431, 서열번호: 432, 서열번호: 433, 서열번호: 434, 서열번호: 435, 서열번호: 436, 서열번호: 437, 서열번호: 438, 서열번호: 439, 서열번호: 440, 서열번호: 441, 서열번호: 442, 서열번호: 443, 서열번호: 444, 서열번호: 445, 서열번호: 446, 서열번호: 447, 서열번호: 448, 서열번호: 449, 서열번호: 450, 서열번호: 451, 서열번호: 452, 서열번호: 453, 서열번호: 454, 서열번호: 455, 서열번호: 456, 서열번호: 457, 서열번호: 458, 서열번호: 459, 서열번호: 460, 서열번호: 461, 서열번호: 462, 서열번호: 463, 서열번호: 464, 서열번호: 465, 서열번호: 466, 서열번호: 467, 서열번호: 468, 서열번호: 469, 서열번호: 470, 서열번호: 471, 서열번호: 472, 서열번호: 473, 서열번호: 474, 서열번호: 475, 서열번호: 476, 서열번호: 477, 서열번호: 478, 서열번호: 479, 서열번호: 480, 서열번호: 481, 서열번호: 482, 서열번호: 483, 서열번호: 484, 서열번호: 485, 서열번호: 486, 서열번호: 487, 서열번호: 488, 서열번호: 489, 서열번호: 490, 서열번호: 491, 서열번호: 492, 서열번호: 493, 서열번호: 494, 서열번호: 495, 서열번호: 496, 서열번호: 497, 서열번호: 498, 서열번호: 499, 서열번호: 500, 서열번호: 501, 서열번호: 502, 서열번호: 503, 서열번호: 504, 서열번호: 505, 서열번호: 506, 서열번호: 507, 서열번호: 508, 서열번호: 509, 서열번호: 510, 서열번호: 511, 서열번호: 512, 서열번호: 513, 서열번호: 514, 서열번호: 515, 서열번호: 516, 서열번호: 517, 서열번호: 518, 서열번호: 519, 서열번호: 520, 서열번호: 521, 서열번호: 522, 서열번호: 523, 서열번호: 524, 서열번호: 525, 서열번호: 526, 서열번호: 527, 서열번호: 528, 서열번호: 529, 서열번호: 530, 서열번호: 531, 서열번호: 532, 서열번호: 533, 서열번호: 534, 서열번호: 535, 서열번호: 536, 서열번호: 537, 서열번호: 538, 서열번호: 539, 서열번호: 540, 서열번호: 541, 서열번호: 542, 서열번호: 543, 서열번호: 544, 서열번호: 545, 서열번호: 546, 서열번호: 547, 서열번호: 548, 서열번호: 549, 서열번호: 550, 서열번호: 551, 서열번호: 552, 서열번호: 553, 서열번호: 554, 서열번호: 555, 서열번호: 556, 서열번호: 557, 서열번호: 558, 서열번호: 559, 서열번호: 560, 서열번호: 561, 서열번호: 562, 서열번호: 563, 서열번호: 564, 서열번호: 565, 서열번호: 566, 서열번호: 567, 서열번호: 568, 서열번호: 569, 서열번호: 570, 서열번호: 571, 서열번호: 572, 서열번호: 573, 서열번호: 574, 서열번호: 575, 서열번호: 576, 서열번호: 577, 서열번호: 578, 서열번호: 579, 서열번호: 580, 서열번호: 581, 서열번호: 582, 서열번호: 583, 서열번호: 584, 서열번호: 585, 서열번호: 586, 서열번호: 587, 서열번호: 588, 서열번호: 589, 서열번호: 590, 서열번호: 591, 서열번호: 592, 서열번호: 593, 서열번호: 594, 서열번호: 595, 서열번호: 596, 서열번호: 597, 서열번호: 598, 서열번호: 599, 서열번호: 600, 서열번호: 601, 서열번호: 602, 서열번호: 603, 서열번호: 604, 서열번호: 605, 서열번호: 606, 서열번호: 607, 서열번호: 608, 서열번호: 609, 서열번호: 610, 서열번호: 611, 서열번호: 612, 서열번호: 613, 서열번호: 614, 서열번호: 615, 서열번호: 616, 서열번호: 617, 서열번호: 618, 서열번호: 619, 서열번호: 620, 서열번호: 621, 서열번호: 622, 서열번호: 623, 서열번호: 624, 서열번호: 625, 서열번호: 626, 서열번호: 627, 서열번호: 628, 서열번호: 629, 서열번호: 630, 서열번호: 631, 서열번호: 632, 서열번호: 633, 서열번호: 634, 서열번호: 635, 서열번호: 636, 서열번호: 637,

서열번호: 638, 서열번호: 639, 서열번호: 640, 서열번호: 641, 서열번호: 642, 서열번호: 643, 서열번호: 644, 서열번호: 645, 서열번호: 646, 서열번호: 647, 서열번호: 648, 서열번호: 649, 서열번호: 650, 서열번호: 651, 서열번호: 652, 서열번호: 653, 서열번호: 654, 서열번호: 655, 서열번호: 656, 서열번호: 657, 서열번호: 658, 서열번호: 659, 서열번호: 660, 서열번호: 661, 서열번호: 662, 서열번호: 663, 서열번호: 664, 서열번호: 665, 서열번호: 666, 서열번호: 667, 서열번호: 668, 서열번호: 669, 서열번호: 670, 서열번호: 671, 서열번호: 672, 서열번호: 673, 서열번호: 674, 서열번호: 675, 서열번호: 676, 서열번호: 677, 서열번호: 678, 서열번호: 679, 서열번호: 680, 서열번호: 681, 서열번호: 682, 서열번호: 683, 서열번호: 684, 서열번호: 685, 서열번호: 686, 서열번호: 687, 서열번호: 688, 서열번호: 689, 서열번호: 690, 서열번호: 691, 서열번호: 692, 서열번호: 693, 서열번호: 698, 서열번호: 699, 서열번호: 700, 서열번호: 701, 서열번호: 702, 서열번호: 703, 서열번호: 704, 서열번호: 705, 서열번호: 706, 서열번호: 707, 서열번호: 708, 서열번호: 709, 서열번호: 710, 서열번호: 711, 서열번호: 712, 서열번호: 713, 서열번호: 714, 서열번호: 715, 서열번호: 716, 서열번호: 717, 서열번호: 718, 서열번호: 719, 서열번호: 720, 서열번호: 721, 서열번호: 722, 서열번호: 723, 서열번호: 724, 서열번호: 725, 서열번호: 726, 서열번호: 727, 서열번호: 728, 서열번호: 729, 서열번호: 730, 서열번호: 731, 서열번호: 732, 서열번호: 733, 서열번호: 734, 서열번호: 735, 서열번호: 736, 서열번호: 737, 서열번호: 738, 서열번호: 739, 서열번호: 740, 서열번호: 741, 서열번호: 742, 서열번호: 743, 서열번호: 744, 서열번호: 745, 서열번호: 746, 서열번호: 747, 서열번호: 748, 서열번호: 749, 서열번호: 750, 서열번호: 751, 서열번호: 752, 서열번호: 753, 서열번호: 754, 서열번호: 755, 서열번호: 756, 서열번호: 757, 서열번호: 758, 서열번호: 759, 서열번호: 760, 서열번호: 761, 서열번호: 762, 서열번호: 763, 서열번호: 764, 서열번호: 765, 서열번호: 766, 서열번호: 767, 서열번호: 768, 서열번호: 769, 서열번호: 770, 서열번호: 771, 서열번호: 772, 서열번호: 773, 서열번호: 774, 서열번호: 775, 서열번호: 776, 서열번호: 777, 서열번호: 778, 서열번호: 779, 서열번호: 780, 서열번호: 781, 서열번호: 782, 서열번호: 783, 서열번호: 784, 서열번호: 785, 서열번호: 786, 서열번호: 787, 서열번호: 788, 서열번호: 789, 서열번호: 790, 서열번호: 791, 서열번호: 792, 서열번호: 793, 서열번호: 794, 서열번호: 795, 서열번호: 796, 서열번호: 797, 서열번호: 798, 서열번호: 799, 서열번호: 800, 서열번호: 801, 서열번호: 802, 서열번호: 803, 서열번호: 804, 서열번호: 805, 서열번호: 806, 서열번호: 807, 서열번호: 808, 서열번호: 809, 서열번호: 810, 서열번호: 811, 서열번호: 812, 서열번호: 813, 서열번호: 814, 서열번호: 815, 서열번호: 816, 서열번호: 817, 서열번호: 818, 서열번호: 819, 서열번호: 820, 서열번호: 821, 서열번호: 822, 서열번호: 823, 서열번호: 824, 서열번호: 825, 서열번호: 826, 서열번호: 827, 서열번호: 828, 서열번호: 829, 서열번호: 830, 서열번호: 831, 서열번호: 832, 서열번호: 833, 서열번호: 834, 서열번호: 835, 서열번호: 836, 서열번호: 837, 서열번호: 838, 서열번호: 839, 서열번호: 840, 서열번호: 841, 서열번호: 842, 서열번호: 843, 서열번호: 844, 서열번호: 845, 서열번호: 846, 서열번호: 847, 서열번호: 848, 서열번호: 849, 서열번호: 850, 서열번호: 851, 서열번호: 852, 서열번호: 853, 서열번호: 854, 서열번호: 855, 서열번호: 856, 서열번호: 857, 서열번호: 858, 서열번호: 859, 서열번호: 860, 서열번호: 861, 서열번호: 862, 서열번호: 863, 서열번호: 864, 서열번호: 865, 서열번호: 866, 서열번호: 867, 서열번호: 868, 서열번호: 869, 서열번호: 870, 서열번호: 871, 서열번호: 872, 서열번호: 873, 서열번호: 874, 서열번호: 875, 서열번호: 876, 서열번호: 877, 서열번호: 878, 서열번호: 879, 서열번호: 880, 서열번호: 881, 서열번호: 882, 서열번호: 883, 서열번호: 884, 서열번호: 885, 서열번호: 886, 서열번호: 887, 서열번호: 888, 서열번호: 889, 서열번호: 890, 서열번호: 891, 서열번호: 892, 서열번호: 893, 서열번호: 894, 서열번호: 895, 서열번호: 896, 서열번호: 897, 서열번호: 898, 서열번호: 899, 서열번호: 900, 서열번호: 901, 서열번호: 902, 서열번호: 903, 서열번호: 904, 서열번호: 905, 서열번호: 906, 서열번호: 907, 서열번호: 908, 서열번호: 909, 서열번호: 910, 서열번호: 911, 서열번호: 912, 서열번호: 913, 서열번호: 914, 서열번호: 915, 서열번호: 916, 서열번호: 917, 서열번호: 918, 서열번호: 919, 서열번호: 920, 서열번호: 921, 서열번호: 922, 서열번호: 923, 서열번호: 924, 서열번호: 925, 서열번호: 926, 서열번호: 927, 서열번호: 928, 서열번호: 929, 서열번호: 930, 서열번호: 931, 서열번호: 932, 서열번호: 933, 서열번호: 934, 서열번호: 935, 서열번호: 936, 서열번호: 937, 서열번호: 938, 서열번호: 939, 서열번호: 940, 서열번호: 941, 서열번호: 942, 서열번호: 943, 서열번호: 944, 서열번호: 945, 서열번호: 946, 서열번호: 947, 서열번호: 948, 서열번호: 949, 서열번호: 950, 서열번호: 951, 서열번호: 952, 서열번호: 953, 서열번호: 954, 서열번호: 955, 서열번호: 956, 서열번호: 957, 서열번호: 958, 서열번호: 959, 서열번호: 960, 서열번호: 961, 서열번호: 962, 서열번호: 963, 서열번호: 964, 서열번호: 965, 서열번호: 966, 서열번호: 967, 서열번호: 968, 서열번호: 969, 서열번호: 970, 서열번호: 971, 서열번호: 972, 서열번호:

973, 서열번호: 974, 서열번호: 975, 서열번호: 976, 서열번호: 977, 서열번호: 978, 서열번호: 979, 서열번호: 980, 서열번호: 981, 서열번호: 982, 서열번호: 983, 서열번호: 984, 서열번호: 985, 서열번호: 986, 서열번호: 987, 서열번호: 988, 서열번호: 989, 서열번호: 990, 서열번호: 991, 서열번호: 992, 서열번호: 993, 서열번호: 994, 서열번호: 995, 서열번호: 996, 서열번호: 997, 서열번호: 998, 서열번호: 999, 서열번호: 1000, 서열번호: 1001, 서열번호: 1002, 서열번호: 1003, 서열번호: 1004, 서열번호: 1005, 서열번호: 1006, 서열번호: 1007, 서열번호: 1008, 서열번호: 1009, 서열번호: 1010, 서열번호: 1011, 서열번호: 1012, 서열번호: 1013, 서열번호: 1014, 서열번호: 1015, 서열번호: 1016, 서열번호: 1017, 서열번호: 1018, 서열번호: 1019, 서열번호: 1020, 서열번호: 1021, 서열번호: 1022, 서열번호: 1023, 서열번호: 1024, 서열번호: 1025, 서열번호: 1026, 서열번호: 1027, 서열번호: 1028, 서열번호: 1029, 서열번호: 1030, 서열번호: 1031, 서열번호: 1032, 서열번호: 1033, 서열번호: 1034, 서열번호: 1035, 서열번호: 1036, 서열번호: 1037, 서열번호: 1038, 서열번호: 1039, 서열번호: 1040, 서열번호: 1041, 서열번호: 1042, 서열번호: 1043, 서열번호: 1044, 서열번호: 1045, 서열번호: 1046, 서열번호: 1047, 서열번호: 1048, 서열번호: 1049, 서열번호: 1050, 서열번호: 1051, 서열번호: 1052, 서열번호: 1053, 서열번호: 1054, 서열번호: 1055, 서열번호: 1056, 서열번호: 1057, 서열번호: 1058, 서열번호: 1059, 서열번호: 1060, 서열번호: 1061, 서열번호: 1062, 서열번호: 1063, 서열번호: 1064, 서열번호: 1065, 서열번호: 1066, 서열번호: 1067, 서열번호: 1068, 서열번호: 1069, 서열번호: 1070, 서열번호: 1071, 서열번호: 1072, 서열번호: 1073, 서열번호: 1074, 서열번호: 1075, 서열번호: 1076, 서열번호: 1077, 서열번호: 1078, 서열번호: 1079, 서열번호: 1080, 서열번호: 1081, 서열번호: 1082, 서열번호: 1083, 서열번호: 1084, 서열번호: 1085, 서열번호: 1086, 서열번호: 1087, 서열번호: 1088, 서열번호: 1099, 서열번호: 1100, 서열번호: 1101, 서열번호: 1102, 서열번호: 1103, 서열번호: 1104, 서열번호: 1105, 서열번호: 1106, 서열번호: 1107, 서열번호: 1108, 서열번호: 1109, 서열번호: 1110, 서열번호: 1111, 서열번호: 1112, 서열번호: 1113, 서열번호: 1114, 서열번호: 1115, 서열번호: 1116, 서열번호: 1117, 서열번호: 1118, 서열번호: 1119, 서열번호: 1120, 서열번호: 1121, 서열번호: 1122, 서열번호: 1123, 서열번호: 1124, 서열번호: 1125, 서열번호: 1126, 서열번호: 1127, 서열번호: 1128, 서열번호: 1129, 서열번호: 1130, 서열번호: 1131, 서열번호: 1132, 서열번호: 1133, 서열번호: 1134, 서열번호: 1135, 서열번호: 1136, 서열번호: 1137, 서열번호: 1138, 서열번호: 1139, 서열번호: 1140, 서열번호: 1141, 서열번호: 1142, 서열번호: 1143, 서열번호: 1144, 서열번호: 1145, 서열번호: 1146, 서열번호: 1147, 서열번호: 1148, 서열번호: 1149, 서열번호: 1150, 서열번호: 1151, 서열번호: 1152, 서열번호: 1153, 서열번호: 1154, 서열번호: 1155, 서열번호: 1156, 서열번호: 1157, 서열번호: 1158, 서열번호: 1159, 서열번호: 1160, 서열번호: 1161, 서열번호: 1162, 서열번호: 1163, 서열번호: 1164, 서열번호: 1165, 서열번호: 1166, 서열번호: 1167, 서열번호: 1168, 서열번호: 1169, 서열번호: 1170, 서열번호: 1171, 서열번호: 1172, 서열번호: 1173, 서열번호: 1174, 서열번호: 1175, 서열번호: 1176, 서열번호: 1177, 서열번호: 1178, 서열번호: 1179, 서열번호: 1180, 서열번호: 1181, 서열번호: 1182, 서열번호: 1183, 서열번호: 1184, 서열번호: 1185, 서열번호: 1186, 서열번호: 1187, 서열번호: 1188, 서열번호: 1189, 서열번호: 1190, 서열번호: 1191, 서열번호: 1192, 서열번호: 1193, 서열번호: 1194, 서열번호: 1195, 서열번호: 1196, 서열번호: 1197, 서열번호: 1198, 서열번호: 1199, 서열번호: 1200, 서열번호: 1201, 서열번호: 1202, 서열번호: 1203, 서열번호: 1204, 서열번호: 1205, 서열번호: 1206, 서열번호: 1207, 서열번호: 1208, 서열번호: 1209, 서열번호: 1210, 서열번호: 1211, 서열번호: 1212, 서열번호: 1213, 서열번호: 1214, 서열번호: 1215, 서열번호: 1216, 서열번호: 1217, 서열번호: 1218, 서열번호: 1219, 서열번호: 1220, 서열번호: 1221, 서열번호: 1222, 서열번호: 1223, 서열번호: 1224, 서열번호: 1225, 서열번호: 1226, 서열번호: 1227, 서열번호: 1228, 서열번호: 1229, 서열번호: 1230, 서열번호: 1231, 서열번호: 1232, 서열번호: 1233, 서열번호: 1234, 서열번호: 1235, 서열번호: 1236, 서열번호: 1237, 서열번호: 1238, 서열번호: 1239, 서열번호: 1240, 서열번호: 1241, 서열번호: 1242, 서열번호: 1243, 서열번호: 1244, 서열번호: 1245, 서열번호: 1246, 서열번호: 1247, 서열번호: 1248, 서열번호: 1249, 서열번호: 1250, 서열번호: 1251, 서열번호: 1252, 서열번호: 1253, 서열번호: 1254, 서열번호: 1255, 서열번호: 1256, 서열번호: 1257, 서열번호: 1258, 서열번호: 1259, 서열번호: 1260, 서열번호: 1261, 서열번호: 1262, 서열번호: 1263, 서열번호: 1264, 서열번호: 1265, 서열번호: 1266, 서열번호: 1267, 서열번호: 1268, 서열번호: 1269, 서열번호: 1270, 서열번호: 1271, 서열번호: 1272, 서열번호: 1273, 서열번호: 1274, 서열번호: 1275, 서열번호: 1276, 서열번호: 1277, 서열번호: 1278, 서열번호: 1279, 서열번호: 1280, 서열번호: 1281, 서열번호: 1282, 서열번호: 1283, 서열번호: 1284, 서열번호: 1285, 서열번호: 1286, 서열번호: 1287, 서열번호: 1288, 서열번호: 1289, 서열번호: 1290, 서열번호: 1291, 서열번호: 1292, 서열번호: 1293, 서열번호: 1294, 서열번호: 1295, 서열번호: 1296, 서열번호: 1297, 서열번호: 1298, 서열번호: 1299, 서열번호: 1300, 서열번호: 1301, 서열번호: 1302, 서열번호: 1303, 서열번호: 1304, 서열번호: 1305, 서열번호: 1306, 서열번호:

1307, 서열번호: 1308, 서열번호: 1309, 서열번호: 1310, 서열번호: 1311, 서열번호: 1312, 서열번호: 1313, 서열번호: 1314, 서열번호: 1315, 서열번호: 1316, 서열번호: 1317, 서열번호: 1318, 서열번호: 1319, 서열번호: 1320, 서열번호: 1321, 서열번호: 1322, 서열번호: 1323, 서열번호: 1324, 서열번호: 1325, 서열번호: 1326, 서열번호: 1327, 서열번호: 1328, 서열번호: 1329, 서열번호: 1330, 서열번호: 1331, 서열번호: 1332, 서열번호: 1333, 서열번호: 1334, 서열번호: 1335, 서열번호: 1336, 서열번호: 1337, 서열번호: 1338, 서열번호: 1339, 서열번호: 1340, 서열번호: 1341, 서열번호: 1342, 서열번호: 1343, 서열번호: 1344, 서열번호: 1345, 서열번호: 1346, 서열번호: 1347, 서열번호: 1348, 서열번호: 1349, 서열번호: 1350, 서열번호: 1351, 서열번호: 1352, 서열번호: 1353, 서열번호: 1354, 서열번호: 1355, 서열번호: 1356, 서열번호: 1357, 서열번호: 1358, 서열번호: 1359, 서열번호: 1360, 서열번호: 1361, 서열번호: 1362, 서열번호: 1363, 서열번호: 1364, 서열번호: 1365, 서열번호: 1366, 서열번호: 1367, 서열번호: 1368, 서열번호: 1369, 서열번호: 1370, 서열번호: 1371, 서열번호: 1372, 서열번호: 1373, 서열번호: 1374, 서열번호: 1375, 서열번호: 1376, 서열번호: 1377, 서열번호: 1378, 서열번호: 1379, 서열번호: 1380, 서열번호: 1381, 서열번호: 1382, 서열번호: 1383, 서열번호: 1384, 서열번호: 1385, 서열번호: 1386, 서열번호: 1387, 서열번호: 1388, 서열번호: 1389, 서열번호: 1390, 서열번호: 1391, 서열번호: 1392, 서열번호: 1393, 서열번호: 1394, 서열번호: 1395, 서열번호: 1396, 서열번호: 1397, 서열번호: 1398, 서열번호: 1399, 서열번호: 1400, 서열번호: 1401, 서열번호: 1402, 서열번호: 1403, 서열번호: 1404, 서열번호: 1405, 서열번호: 1406, 서열번호: 1407, 서열번호: 1408, 서열번호: 1409, 서열번호: 1410, 서열번호: 1411, 서열번호: 1412, 서열번호: 1413, 서열번호: 1414, 서열번호: 1415, 서열번호: 1416, 서열번호: 1417, 서열번호: 1418, 서열번호: 1419, 서열번호: 1420, 서열번호: 1421, 서열번호: 1422, 서열번호: 1423, 서열번호: 1424, 서열번호: 1425, 서열번호: 1426, 서열번호: 1427, 서열번호: 1428, 서열번호: 1429, 서열번호: 1430, 서열번호: 1431, 서열번호: 1432, 서열번호: 1433, 서열번호: 1434, 서열번호: 1435, 서열번호: 1436, 서열번호: 1437, 서열번호: 1438, 서열번호: 1439, 서열번호: 1440, 서열번호: 1441, 서열번호: 1442, 서열번호: 1456, 서열번호: 1457, 서열번호: 1458, 서열번호: 1459, 서열번호: 1460, 서열번호: 1461, 서열번호: 1462, 서열번호: 1463, 서열번호: 1464, 서열번호: 1465, 서열번호: 1466, 서열번호: 1467, 서열번호: 1468, 서열번호: 1474, 서열번호: 1475, 서열번호: 1476, 서열번호: 1477, 또는 서열번호: 1478 (“서열 세트 F”)의 어느 하나에 적어도 80% (적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%, 또는 100%와 같은) 일치하는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 재조합 RSV F 폴리펩타이드는 RSV F 선융합(prefusion) 특정 항체 (D25와 같은)에 특정적으로 결합하고 및/또는 RSV F 선융합(prefusion) 특정 항원 위치 (항원 위치 Ø와 같은)를 포함한다. 몇가지 실시형태에서 면역원은 항체에 특정적으로 결합허거나 또는 24 시간 동안 20℃에서 pH 7.4 PBS 에서 배양 후에 항원 위치를 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 RSV F 폴리펩타이드는 서열 세트 F로부터 서열의 하나를 포함하고, 20 개(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19까지와 같은) 아미노산 대체(보존적 아미노산 대체와 같은)를 추가적으로 포함하고, 상기 재조합 RSV F 폴리펩타이드는 RSV F 선융합 특정 항체(D25와 같은)에 특정적으로 결합하고 및/또는 RSV F 선융합(prefusion) 특정 항원 위치 (항원 위치 Ø와 같은)를 포함한다. 당업계의 숙련자는 상기 열거된 서열이 리더 서열, 정제 태그, 정제 태그 삼량체화(trimerization) 도메인을 제거하기 위한 프로테아제 절단 위치, 단백질 나노입자 서브유닛(subunit) 도메인 또는 재조합 RSV F 단백질에 비연관된 다른 서열을 포함할 수 있다는 것을 감사할 것이다. 몇가지 실시형태에서, 본 명세서에서 제공된 면역원은 상기 서열의 하나의 재조합 RSV F 단백질을 포함하나 리더 서열, 정제 태그, 정제 태그 삼량체화(trimerization) 도메인을 제거하기 위한 프로테아제 절단 위치, 단백질 나노입자 서브유닛(subunit) 도메인 또는 재조합 RSV F 단백질에 비연관된 다른 서열을 포함하지 않는다. 또한 상기 단백질 서열을 암호화하는 핵산 분자는 개체에서 RSV에 대해 면역반응을 생성하기 위하여, 또는 개체에서 RSV 감염을 방지하거나 또는 치료하기 위하여 재조합 RSV F 단백질을 사용하는 방법으로서 제공된다.

[0802] **III. 실시예**

[0803] 하기의 실시예는 특정 실시형태의 특정한 특성을 성명하는 것을 제공하나, 본 청구항의 범위는 예를 든 특성에 제한되어서는 안된다.

[0804] **실시예 1**

[0805] **인간 항체에 결합된 호흡기 세포융합(Respiratory Syncytial) 바이러스 선융합(prefusion) F 삼량체(trimer)**

[0806] 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus(RSV)) 융합 (F) 글리코단백질(글리코단백질)의 선융합

(prefusion) 입체형태는 인간 혈청에서 대부분의 RSV-중화하는 항체의 표적이나, 자체의 준안전성(metastability)은 특징을 저해한다. 이러한 장애물을 극복하기 위하여, F의 후융합(postfusion) 입체형태에 결합하지 않고 예방 항체 팔리비주맙(palivizumab) (Synagis®)보다 >10-배 이상 강력한 항체가 확인되었다. F 글리코단백질을 가지는 복합체에서, 상기 항체, D25의 하나에 대하여 공동-크리스탈 구조는 D25가 자체의 선융합(prefusion) 상태에서 잠그는 것을 드러냈다. 선융합(prefusion) 및 후융합(postfusion) F 입체형태의 비교는 RSV 진입을 매개하도록 요구되는 재배열을 정의한다. D25-F 글리코단백질 구조는 선융합-특정 및 성질에서 4차인 F 글리코단백질의 꼭대기에서, 새로운 위치-의-취약성, 항원 위치 Ø를 드러낸다.

[0807] 항원 위치 Ø의 정의를 따라, 선융합(prefusion) RSV F 삼량체(trimer) 구조는, 개선된 백신 항원의 디자인 및 RSV-유도된 질병의 소극적 방지를 위한 새로운 접근을 안내를 가능하게 한다. 흡기세포융합바이러스(RSV)는 아주 흔하고, 3세 연령의 거의 모든 어린이를 감염시킨다(Glezen et al., Am. J. Dis. Child., 140, 543 (1986)). 미국에서, RSV 세기관지염은 영유아가 입원하는 원인 및 천식 및 유아기에 걸쳐 천명(wheezing)의 주요 원인을 유도한다(Shay et al., JAMA, 282, 1440 (1999); Hall et al., N. Engl. J. Med., 360, 588 (2009)). 세계적으로, RSV는 5세 연령 이하의 어린이에 대해 매년 66,000-199,000 사망에 책임이 있고(Nair et al., Lancet, 375, 1545 (2010)), 및 영유아 1 개월 내지 1 세 연령 중에-말라리아를 제외한 임의의 다른 단일 병원균 이상 7% 사망의 이유가 된다(Lozano et al., Lancet, 380, 2095 (2013)). 단지 이용할 수 있는 조정은 RSV 융합 (F) 글리코 단백질을 인식하고 심각한 질병의 발생정도를 감소시키는(The IMpact-RSV Study 군, Pediatrics, 102, 531 (1998)), 허가받은 단일 항체 팔리비주맙(palivizumab) (Synagis®)의 수동적 투여이다(Johnson et al., J. Infect. Dis., 176, 1215 (1997); Beeler 및 van Wyke Coelingh, J. Virol., 63, 2941 (1989)). RSV F-특정 항체가 질병에 대한 보호할 수 있는 임상 증거는 더 나은 항체를 위한 조사(Collarini et al., J. Immunol., 183, 6338 (2009); Wu et al., J. Mol. Biol., 368, 652 (2007); Kwakkenbos et al., Nat. Med., 16, 123 (2010)) 및 효과적 백신을 개발시키기 위한 혼신의 노력을 유발시킨다(Graham, Immunol. Rev., 239, 149 (2011)).

[0808] RSV F 글리코 단백질은 바이러스 및 세포내 멤브린의 융합을 용이하게 한다(Walsh 및 Hruska, J. Virol., 47, 171 (1983)); 이것은 높은 안정한 후융합(postfusion) 입체형태에 구조의 재배열 동안에 배출되는, 폴딩 에너지를 저장하는 준안전성 선융합(prefusion) 입체형태를 가지는, 유형 I 융합 단백질이다. 개 항원 위치(I, II, 및 IV)는 활성을 중화하는 것을 유도하는 것으로 발견되었고 (Arbiza et al., J. Gen. Virol., 73, 2225 (1992); Lopez et al., J. Virol., 72, 6922 (1998); Lopez et al., J. Virol., 64, 927 (1990)), 모두는 구조적 및 생물리적 연구에 의해 결정되는 것으로서 후융합 F 형태에 존재한다(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788 (2011); Swanson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 108, 9619 (2011)). 그러나, 후융합(postfusion) F를 가지는 인간 혈청의 흡수는 대다수의 F-특정 중화하는 활성을 제거하는 것을 실패하고, 이것은 선융합(prefusion)형태가 신규 중화하는 항원 위치를 정착할 수 있다는 것을 제시한다(Magro et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109, 3089 (2012)). 엄청난 노력에도 불구하고, 수용성 선융합(prefusion) RSV F의 동질적 제조는 얻어지 않았다. 따라서, 선융합(prefusion) F 구조 및 신규 F-특정 항원 위치의 확인은 항체 및 백신의 새로운 예방 및 치료 개발을 위한 떠오르는 우선이 되었다. 상기 목적으로 선상에서, RSV를 중화할 수 있으나 후융합(postfusion) F에 결합하지 않는 F-특정 항체가 확인되었고, 상기 항체에 의해 인식된 RSV F의 구조가 정의되었다. 상기 결과는 RSV F의 선융합(prefusion) 입체형태, 현저한 강력한 항체의 카테고리를 위한 중성화 기전, 및 개선된 항체-기반 치료의 표적으로서 수행하고 효과적 백신 항원의 개발의 기초를 제공하는 선융합-특정 항원 위치를 위한 원자-수준의 세부사항을 드러낸다.

[0809] 2개의 인간항체-D25 및 AM22-는 RSV F를 중화하는데 팔리비주맙(palivizumab) (도 1A)보다 ~ 50-배 더욱 강력한 것으로 결정되었고, 이것은 후융합(postfusion) 입체형태에서 안정된 RSV F 수용성 형태에 결합하지 않는다(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788 (2011)) (도 1B). D25 및 AM22는 이전의 개시되었다(Kwakkenbos et al., Nat. Med., 16, 123 (2010); 미국 Pat. Pub. 2010/0239593; 미국 Pat. Pub. 2012/0070446). RSV F의 후융합(postfusion)형태에 결합하는 D25 및 AM22의 부족성은 상기 항체가 준안전성 선융합(prefusion) 입체형태를 인식할 수 있다는 것을 제시한다.

[0810] 구조적 노력은 인간 항체, AM22 및 D25에 촛점된다. 96-웰 마이크로 적정농도 플레이트 발현 포맷(Pancera et al., PLoS One. 2013;8(2):e55701, 2013, 본 명세서의 참조에 의해 혼합됨)은 Ni2+-NTA ELISA 플레이트 상의 세포 상등액으로부터 포착된 RSV F 글리코단백질 변이(variants)의 패늘에 상기 항체의 스크린 결합에 사용되었다. C-말단 피브리틴 삼량체화(fibritin trimerization) 도메인에 융합된 RSV F 잔기 1-513를 포함하는, F 글리코단백질 구성체 (RSV F(+) Fd)에 결합하는 항체를 테스트하였다(Frank et al., J. Mol. Biol., 308, 1081

(2001)). 그러나, 복합체는 정제된 RSV F(+) Fd를 정제된 D25 또는 AM22 항체로 혼합하여 형성하지 않았다. 수용성 F 글리코 단백질의 정제는 준안전성 선융합(prefusion) 상태를 촉발하는 것으로 결정되었다(Chaiwatpongsakorn et al., J. Virol., 85, 3968 (2011)); 상기 불안정성을 극복하기 위하여, 선융합(prefusion) 상태에서 F를 잡기 위하여 RSV F(+) Fd를 발현하는 세포는 항원-결합하는 단편 (Fabs) 또는 면역글로불린과 같이 배양되었다(후자는 힌지 영역에 HRV3C 프로테아제-절단 위치가 있음(McLellan et al., Nature 480, 336, (2011)). 대안적으로, RSV F(+) Fd를 발현하는 세포는 항체-중쇄 및 -경쇄를 암호화하는 별도의 DNA-발현 카세트와 공동형질감염하였다(도 5). D25-F 글리코단백질 복합체의 최적의 발현은 D25 Fab를 암호화하는 DNA를 RSV F(+) Fd를 암호화하는 DNA와 공동형질감염으로부터 얻었다; 타당한 복합체 산출은 수용성 Fab의 첨가로부터 관찰되었다.

[0811] 크리스탈화(crystallization)은 단독 또는 RSV F(+) Fd를 가지는 복합체로 Fab D25 및 AM22를 위하여 스크린되었다. 1.6 A 해상도에 대한 X선 회절 데이타는 자체로 Fab D25의 6각형(hexagonal) 크리스탈 상에서 얻었고, 상기 구조는 분자 교체에 의해 풀었고 24.5/25.7 % (표 9)의 Rcryst/Rfree에 정제되었다. 3.6 A 해상도에 대한 데이타는 RSV F (+) Fd를 가지는 복합체에서 Fab D25의 입방(cubic) 크리스탈 상에서 얻었고, 상기 구조는 비결합된 D25 구조 및 이전의 결정된 후융합(postfusion) RSV F 구조의 일부를 사용하여 금 유도체로부터 단서를 따라, 수색모델로서 분자 교체하여 풀었다(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788 (2011); Swanson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 108, 9619 (2011)). 복합체의 구조는 21.3/26.7%의 Rcryst/Rfree로 정제되었다(도 1C) (표 9).

[0812] RSV F 글리코단백질의 하나의 분자에 결합된 하나의 D25 Fab의 복합체는 입방(cubic) 격자(lattice)의 비대칭 유닛으로 존재한다. 3개-배 격자(lattice) 대칭은 2,098 $Å^2$의 광범위한 RSV F 삼량체(trimeric) 경계면을 생성하기 위하여 2개 다른 D25-RSV F 복합체에 위치된다. 지속적 전자밀도는 성숙 F 글리코 단백질의 F_2 및 F_1 서브유닛(subunits) (각각 N- 및 C-말단 단편에 해당)을 형성하기 위하여 F_0 전구체의 단백질 가수 분해의 절단에 의해 제거된 27개 아미노산 단편을 포함하는 잔기 98-136를 제외한, 잔기 26 내지 513에 대해 관찰되었다. N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation)의 3개 위치는 아스파라기닌(asparagine) 잔기 27, 70 및 500 에서 전자밀도로 검출되었다(도 2A).

[0813] 전반적으로, D25-결합되 RSV F 구조는 7-가닥 역평행 오픈-엔드 베럴(barrel)의 양쪽 끝, 2개 엽(lobes) 사이에 연장된 2개 가닥(β2 및 β7), 70 Å 에 걸친 및 모든 엽(lobes) 및 중심 베럴(barrel)의 완전한 일부를 형성하는 수소-결합에서 포장된 2개 엽(lobes)을 구성한다. F_2 N-말단 및 F_1 C-말단을 포함하는, 멤브린-몸 중심에 가까운 엽(lobe)은 3개의 층으로 된 β-샌드위치(3중(triple) layered β-샌드위치) 및 3개 헬릭스(helices) (α8, α9 및 α10)로 구성된다. 헬릭스 α10 은 바이러스 멤브린을 연장하고 피브린(fibrin) 삼량체화(trimerization) 도메인이 첨부되는 것으로 나타내는 헬릭스의 부분을 형성한다. 바이러스 멤브린로부터 대략 90 Å, 멤브린-먼 부위 엽(lobe)은 3개-가닥 역평행 시트 및 β-헤어핀 (β3+β4) 주위에 팩되는(packed), 7개의 헬릭스를 구성한다. 광범위한 프로모터 사이(inter-promoter) 접촉은 삼량체(trimeric) 구조, 특정적으로 F1 서브유닛의 소수성 N-말단(또한 융합 펩타이드로서 알려진)를 안정시키는 것을 나타내고, 이는 이웃하는 프로모터의 멤브린-몸 중심에 가까운 엽으로부터 3중(triple) β-샌드위치에 의해 받쳐진다. 삼량체(trimer)의 속이 빈 구멍(cavity)내에 포함된, 융합 펩타이드는 대략 10 A 지름인 프로토머 사이에 원통형 열림(clylindrical opening)을 통하여 표면-노출된 α2 및 α3 헬릭스에 연결되고; 상기 열림(opening)은 기폭(triggering)동안에 융합 펩타이드를 위한 출구 경로(exit path)로서 사용될 수 있다.

[0814] D25-결합된 F 글리코단백질의 구조는 관련된 파라인플루엔자 바이러스 5 (PIV5) F 글리코단백질의 선융합(prefusion) 구조를 닮았다(Welch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109, 16672 (2012); Yin et al., Nature, 439, 38 (2006)) (도 6 및 7). 따라서 D25-결합된 RSV 형태는 선융합(prefusion) 입체형태에 있는 것으로 나타난다(도 2). 선- 및 후-융합 사이에 구조적 재배열을 정의하기위하여, D25-결합된 RSV 형태 F를 최근에 결정된, 자체의 후융합(postfusion) 입체형태와 비교하였다(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788 (2011); Swanson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 108, 9619 (2011).

[0815] RSV F의 선- 및 후-융합 입체형태는 대략 50% 길게 (170 Å) 연장된 원뿔에 110 Å의 높이를 가지는 비교적 단단한 타원체 유형의(oval-shaped) 구조로부터, 전반적 모양에서 극적인 변화를 드러낸다. 입체형태에서 상기 두드러진 변화에도 불고하고, F 글리코단백질 2차 및 3차 구조의 대다수는 2개 구조 사이에 2Å Cα 이탈 미만을 나타내는 215 잔기를 가지는, 모든 선- 및 후-융합 상태에서 보존된다(도 2A,B). 두드러지는 입체형태 변화의 2개 영역이 발생한다. 상기 멤브린-먼 부위 엽(lobe)에서, 융합 펩타이드 및 5개의 2차 구조 요소(α2,

α3, β3, β4, 및 α4)는 융합 펩타이드에 의해 자체의 N-말단에서 캡된(capped)(to aid in 명확성을 돕기 위해서, 후융합(postfusion) 구조의 2차 구조 요소는 “post” 아래첨자로 라벨됨), 100Å 길이 이상의 단일 연장된 후융합(postfusion) 헬릭스 ($\alpha5_{post}$)를 형성하기 위하여 α5-헬릭스와 결합된다. 멤브린-몸 중심에 가까운 엽(lobe)에서, 3중(triple) β-샌드위치의 단독 평행 가닥(β22) - β1에 수소결합한 선융합(prefusion) 구조에서 - $\alpha5_{post}$-헬릭스와 결합하기 위해 선융합(prefusion) α10-헬릭스를 허용하여 해결한다(unravels). 통합하면, $\alpha5_{post}$ 및 $\alpha10_{post}$ 헬릭스는 후융합(postfusion) 입체형태에서 유형 I 융합 단백질의 코일드-코일(coiled-coil) 구조 특성을 형성하기 위하여 F1 N- 및 C-말단을 병렬한다(Colman 및 Lawrence, Nat. Rev. Mol. 세포 Biol., 4, 309 (2003)). 전반적으로, α10 헬릭스의 일부는 선- 및 후-융합 입체형태 사이에 170 Å 이상 이동한다.

[0816] 이전의 보고된 프로테아제-절단된, 선융합(prefusion) 유형 I 구조 of 인플루엔자 헤마글루티닌(hemagglutinin) (Wilson et al., Nature, 289, 366 (1981)), Ebola GP (Lee et al., Nature, 454, 177 (2008)) 및 PIV5 F(Welch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109, 16672 (2012))과 비교하면, RSV 융합 펩타이드의 위치는 헤마글루티닌의 것과 가장 유사하고(도 7), 이것은 PIV5 및 RSV가 모두 파라믹소바이러스(paramyxovirus)인 것이 놀랍다. RSV F 융합 펩타이드는 속이 빈 삼량체(trimer) 구멍(cavity)의 중심에 묻혀있고, 마지막 육안 F2 잔기로부터 40 Å 이상 위치된다. 상기는 융합 펩타이드의 실질적 구조의 재배열이 F_0 전구체가 F_1/F_2를 생성하기 위하여 퓨린(furin)-같은 숙주 프로테아제에 의해 절단된 후에 밸생한다는 것을 제시한다. 추가적으로, 극적인 구조의 재배열은 멤브린-몸 중심에 가까운 및 멤브린-먼 부위 엽 모두에서 전- 과 후-융합 입체형태 사이에 발생하고, 이는 RSV F의 선융합(prefusion) 입체형태의 안정하는데 어려운 통찰을 제공한다.

[0817] C-말단에 GCN4-삼량체화(trimerization) 모티프를 첨가하여 단독으로 선융합(prefusion) 상태에서 안정될 수 있는, PIV5 F 및 인간 메타뉴모바이러스 F(Metapneumovirus F)와 다르게(Yin et al., Nature, 439, 38 (2006); Wen et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 19, 461 (2012)), 선융합(prefusion) RSV F 입체형태는 멤브린-몸 중심에 가까운 엽(lobe)(피브리틴(fibritin) 삼량체화(trimerization)를 첨가하여 완성됨) 도메인 (Frank et al., J. Mol. Biol., 308, 1081 (2001)) 및 멤브린-먼 부위 엽(lobe)(D25 항체의 결합을 통하여 발생하는) 모두의 안정화를 요구한다.

[0818] D25 항체는 RSV F 글리코단백질의 멤브린-먼 부위 꼭대기를 인식한다(도 1C). 이것은 하나의 프로모터 (RSV 상에 묻힌 상호-표면적의 638 A2를 포함) 및 동일한 프로모터 (373 A2) 및 이웃하는 프로모터 (112 A2) 모두에 결합하는 D25-경쇄와 상호작용하는 D25-중쇄 사슬을 가지는, 4차 항원결정기에 결합한다(도 3A). RSV F 접촉은 α4-헬릭스 (F1 잔기 196-210) 간섭하고 가닥 β2 및 헬릭스 α1 사이의 루프(loop)에 있는 F2 잔기 63, 65, 66 및 68를 가지는 분자사이(intermolecular) 수소결합 을 형성하는 중쇄 사슬 세번째 CDR (CDR H3)을 가지는, D25의 6개 상보성 결정(complementarity-determining) 루프(loop)의 5개에 의해 만들어진다. D25 항원결정기의 2차 구조의 요소는 대부분 변하지 않는 반면에, 상대적 오리엔테이션은 선- 및 후-융합 입체형태에서 가닥 β2에 관하여 ~180° 회전하여 α4-헬릭스와 같이, 실질적으로 변화한다(도 3B). 상기 구조의 재배열은 후융합(postfusion) F 분자에 결합하는 D25의 실패를 설명하고 삼량체 F 글리코단백질 복합체의 선융합(prefusion) 입체형태를 안정하여 멤브린 융합을 억제하는 D25를 제시한다. 비록 인간 RSV A 및 B 하위유형으로부터 F 단백질이 서열 (447/472 또는 성숙 F2/F1 엑토도메인을 포함하는 94.7% 은 알려진 하위유형 사이에서 일치한다)에서 높게 연관되어 있다 하더라도, RSV-서열 variation (F_2에 있는 잔기 67 및 74, 및 F_1에 있는 잔기 200, 201, 209, 및 213) 의 6개 자연적으로 관찰된 위치는 D25에 의해 결합된 영역에 있다(도 3C). 유사하게, 인간 RSV F 하위유형 A의 성숙 엑토도메인과 일치하지 않는 소 RSV F의 56개 아미노산 중에서, 13개는 상기 동일한 영역에서 발견되었다(도 3C). 따라서, 선융합(prefusion) RSV F 구조의 꼭대기에 있는, D25 항원결정기는 면역압력하일 수 있고 하위유형-특정 면역의 결정기로서 작용할 수 있다(Chambers et al., J. Gen. Virol., 73, 1717 (1992)). 예를 들면, 서열 분석에 기반하여, F 글리코단백질에 있는 루프(loop) 영역은 면역압력하일 수 있는 파라믹소비리데 패밀리(Paramyxoviridae family) 내에 존재하는 것을 예측할 수 있다(Chambers et al., J. Gen. Virol., 73, 1717 (1992)). RSV 하위-군 특정 단일 항체의 결합은 F1 잔기 200와 216 사이의 위치-직접 돌연변이에 의해 영향을 받을 수 있고(Connor et al., J. Med. Virol., 63, 168 (2001)), 비록 a 특정 항원결정기가 정의되지 않았지만, F1 잔기 205-225를 포함하는 펩타이드는 래빗에서 활성을 중화하는 것을 유도할 수 있음을 나타낸다Corvaisier et al., Arch. Virol., 142, 1073 (1997)).

[0819] 다른 RSV-중화하는 항체에 의해 인식된 항원결정기에 관하여 D25 항원결정기의 연관성을 이해하기 위하여, RSV-감염되 세포에 결합하는 D25를 위한 경쟁은 테스트되었다(도 4A). 특히, AM22는 RSV F 결합을 위해 D25와 겯쟁

하고, 이는 동일한 항원 위치를 인식한다는 것을 제시한다. 상기 항체에 의해 인식된 위치를 추가적으로 정의하기 위하여, Fab-RSV F 복합체 상의 음성 계통 EM이 수행되었다. Fab D25-RSV F 복합체의 EM 이미지는 Fab D25-RSV F의 크리스탈 구조, 및 Fab AM22-RSV F의 EM 이미지를 닮았다(도 4B). 함께, 상기 결과는 항체 D25 및 AM22가 "항원 위치 Ø(antigenic site Ø)"으로 명칭된, 동일하거나 또는 높은 관련된 항원 위치를 인식한다는 것을 제시한다.

[0820] 항원 위치 Ø를 인식하는 항체를 특징화하기 위하여, 이들의 기능적 성질이 조사되었다. 이것의 이상한 잠재성 및 선융합-특정에 추가로(도 1A), 항체는 후-부착을 첨가할 때 모든 3개 항체는 융합을 강하게 억제하였고(도 4C), 및 모든 3개는 세포-표면 부착을 잠글 수 없었고(도 4D), 이는 RSV F 수용체가 상기 3개 항체에 의해 잠그지 않는 F상의 영역에 결합한다는 것을 제시한다. 관련된 인간 메타퓨모바이러스 F 단백질(metapneumovirus F protein)에 관련된 수용체-결합하는 도메인은 D25-결합에 의해 잠그지 않는 선융합(prefusion) RSV F 삼량체의 측면에서, 중심 베럴(barrel)의 루프(loop)의 팁에서 잔기인, RSV F 잔기 361-363에 해당하는 RGD 모티프(Cseke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 106, 1566 (2009))이다. 비록 상기 항체는 항원 위치 Ø을 포함하는 모든 F2 및 F1의 영역은 헤파린 결합에 기여하는 것으로 알려진(Feldman et al., J. Virol., 74, 6442 (2000); Crim et al., J. Virol., 81, 261 (2007)) 부착을 방지하지 않으나, 상기 영역은 G 글리코단백질 및 F의 다른 영역과 접촉하여 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans) 상의 헤파린 설페이트 부분(heparin sulfate moieties)에 비-특정 부착에 기여할 수 있는 것을 기능한다. 마지막으로, AM22 및 D25 항체는 Fab 및 면역글로불린 내용(munoglobulin contexts)모두에서 유사성을 중화시키고(도 8), 이 결합력(avidity)은 일부 인플루엔자-바이러스 항체를 위하여 하는 것으로서 우성적 역할을 하지 않는다는 것을 나타낸다(Ekiert et al., Nature, 489, 526 (2012)). 전반적으로, 나눈 결합하는-특정성 및 D25 및 AM22의 중화 형태는 상기 성질이 항원 위치 Ø을 인식하는 항체의 특성일 수 있다는 것을 제시한다. 반대로, 중화 활성 (sites I, II, 및 IV)과 관련된 RSV F에 다른 항원 위치를 인식하는 항체의 아무것도 중화하는 잠재성의 유사한 성질 및 선융합(prefusion) F 특정성을 나누지 않는다(도 9A-9B). 4차 어셈블리(위치는 RSV 프로토머에 의해 나뉜다), 항원 변이(RSV F의 최대의 가변 일부의 하나이다), 및 글리칸 차폐(glycan shielding) (Asn70에 부착된 N-연결된 글리칸은 선융합(prefusion) F 삼량체의 꼭대기에 있다)를 마스킹(masking)하는 입체형태를 포함하는 다수 기전에 의해 면역 인식으로부터 부분적으로 차폐된 항원 위치 Ø에도 불구하고(준안전성 선융합(prefusion) 상태에서 단지 존재한다), 모든 3개 선융합-특정 항체는 유사한 항원결정기를 표적하는 것 같다. 선융합(prefusion) F 삼량체의 꼭대기에서 항원 위치 Ø의 위치는, 비록 다른 선융합-특정 항원 위치가 베제될 수 없지만 자연적 RSV 감염에 의해 유도된 인간 혈청에서 대부분 중화 활성이 RSV F(Magro et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109, 3089 (2012)의 선융합(prefusion)형태에 대하여 직접적인 관찰을 설명할 수 있는, 복잡한 바이러스 표면에 심지어 쉽게 접근가능해야만 한다. 항원 위치 Ø에 대한 항체의 높은 잠재력은 신생아에서 RSV-유도된 질병의 소극적 예방을 발달 시킬수 있다는 것을 제시한다. 또한, 백신-기반 선융합-특정 항체 유도성은 RSV F의 선융합(prefusion)형태의 안정화에 의해 보조될 수 있고, 아마도 디설피드 결합을 가지는 RSV F 변이체의 구조-기반 디자인을 통하여 F 구조의 이동(mobile) 및 부동(immobile) 일부를 연결하여 용이하게 한다. 선융합(prefusion)-안정된 F는 항원 위치 Ø뿐만아니라 이전의 특징화된 중화 항원결정기 모두를 포함한다는 것을 나타낸다. 따라서 D25-RSV F 구조의 정의는 RSV-유도된 질병을 방지하기 위하여 다수 새로운 접근의 기초를 제공한다.

[0822] **물질 및 방법**

[0823] **바이러스 및 세포**. 바이러스 재고는 이전의 설명된 것으로서 제조되고 유지되었다(Graham et al., J. Med. Virol., 26, 153 (1988)) RSV-발현하거나 Green Fluorescent 단백질 (GFP) RSV-GFP was 구성체ed as previously reported (Hallak et al., Virology. 271, 264 (2000)). 유동세포(flow cytometry)-기반 중화 및 융합 분석에 사용된 RSV-GFP 재고의 적정농도는 2.5×10^{7} pfu/ml이었다. 부착 분석(부착 assay)에 사용된 RSV A2 재고의 적정농도는 1.02×10^{8} pfu/ml이었다. HEp-2 세포를 0% 소 태아 혈청 (10% EMEM)을 포함하는 이글스 최소 필수(Eagle's 최소 essential) 배지에서 유지하였고 글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신으로 부충하였다.

[0824] **항체 발현 플라스미드의 제작**. 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA는 인간 발현을 위해 코돈-최적화되었고 합성되었다. AM22 및 D25 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 인-프레임(in-frame) 인간 불변 도메인(중쇄 사슬을 위한 IgG1 및 경쇄를 위한 카파)을 포함하는 pVRC8400 발현 플라스미드로 서브클론되었다. AM22 및 D25 중

쇄 사슬 발현 플라스미드의 변이(variants)는 HRV3C 프로테아제 위치 (GLEVLFQGP; 서열번호: 355) 또는 힌지 영역으로 스탑 코돈(stop codon)을 삽입하여 만들어진다.

[0825] **항체 및 Fab 단편의 발현 및 정제.** 항체를 4-5 일 동안 37℃에서 현탁액에서 HEK293F 세포로 중쇄 및 경쇄 플라스미드의 일시적 공동-형질감염하여 발현하였다. 세포 상등액을 단백질 A 아가로우즈에 넘기고, 결합된 항체를 PBS로 세척하고 IgG 용출버퍼로 1 M Tris-HCl pH 8.0의 1/10th 부피로 용출하였다. AM22 및 D25 Fab는 IgG를 Lys-C로 분해하여 만들었다. 분해는 완전한 프로테아제 억제제 칵테일 타블렛을 첨가하여 억제하였고, Fc 단편을 제거하기 위하여 Fab 및 Fc 혼합물을 단백질 A 아가로우즈에 다시 패스하였다. 컬럼을 통하여 흐른 Fab는 크기 배제 크로마토그래프로 추가적으로 정제되었다.

[0826] **RSV 중성화 분석(neutralization assays).** 항체-매개된 중화는 유동세포(flow cytometry) 중성화 분석(neutralization assay)으로 측정되었다(Chen et al., J. Immunol. 방법, 362, 180 (2010). 간단히, HEp-2 세포는 RSV-GFP로 감염되었고 감염은 유동세포(flow cytometry)에 의해 감염 후 18 시간에 GFP 발현의 기능으로서 모니터되었다. 데이타는 커브 피팅(curve fitting), 및 비선형회귀(non-linear regression) (GraphPad Prism, GraphPad 소프트웨어 Inc., San Diego CA)로 분석되었다.

[0827] **후융합(postfusion) RSV F-결합하는 분석.** 후융합(postfusion) 입체형태에 있는 정제된, 수용성 RSV F 단백질은 설명된 바와 같이 제조되었다(McLellan et al., J. Virol., 85, 7788 (2011). 키네틱 ELISA는 이전에 설명된 것처럼 후융합(postfusion) RSV F에 단일 항체의 결합을 테스트하는데 사용되었다. 간단히, 96-웰 Ni2+-NTA-코팅된 플레이트(ThermoFisher Scientific)는 상온에서 1 시간동안 100 ㎕후융합(postfusion) RSV F (1 ㎍/ml)으로 코팅되었다. 희석된 항체의 100 ㎕는 각각 웰에 참가되었고 상온에서 1 시간동안 배양되었다. 결합된 항체를 상온에서 1 시간 동안 100 ㎕ HRP-접합체(conjugated) 고우트 항-마우스 IgG 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 또는 HRP-접합체 항-인간 IgG (Santa Cruz Biolotechnology, Inc, Santa Cruz, CA)로 플레이트에서 배양하여 검출하였다. 그런다음, Super AquaBlue ELISA 기질 (eBioscience, San Diego CA) 의 100 ㎕를 각각 웰에 첨가하고 플레이트를 Dynex Technologies 마이크로플레이트 reader를 사용하여 405nm에서 즉시 읽었다(Chantilly, VA). 단계 사이에, 플레이트를 PBS-T로 세척하였다.

[0828] **비결합된 D25 Fab의 크리스탈화 및 X-선 데이타 모음.** 크리스탈화 조건은 Cartesian Honeybee crystallization 로봇을 사용하여 스크린되었고, 초기 크리스탈은 저장 용액(22% (w/v) PEG 4000, 0.1 M 소듐 아세테이트 pH 4.6)의 0.2 ㎕를 가지는 D25 Fab의 0.2 ㎕를 혼합하여 20℃에서 드롭을 앉히는 증기 확산(diffusion) 방법으로 성장되었다. 크리스탈은 2:1 비율로서 단백질 및 저장 용액을 혼합하여 드롭을 매다는 것을 수동적으로 재생산하였다. 크리스탈은 27.5% (w/v) PEG 4000, 0.1 M 소듐 아세테이트 pH 4.5, 및 15% (v/v) 2R,3R-butanediol의 액체 질소에서 신선하게 냉동되었다. 1.6 A에 대한 X-선 회절 데이타는 SER-CAT beamline ID-22에서 1.00 Å의 파장에서 수득되었다(Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory).

[0829] **비결합된 D25 Fab의 구조 결정 및 정제.** X-선 회절 데이타는 HKL2000 suite로 통합되고 축척되었다(Otwinowski and Minor, in 방법s Enzymol. (Academic Press, vol. 276, pp. 307-326, 1997)), 및 수색모델로서 PDB ID: 3GBM (Ekiert et al., Science, 324, 246 (2009)) 및 3IDX (Chen et al., Science, 326, 1123 (2009)) 로부터 Ig 도메인을 사용하여 분자 교체 용액을 PHASER을 사용하여 얻었다(McCoy et al., J. Appl. crystallogr., 40, 658 (2007)). 수동 모델 빌딩은 COOT을 사용하여 수행되었고(Emsley et al., Acta *Crystallogr* D Biol *Crystallogr*, 66, 486 (2010)), 각각의 위치, TLS 파라미터, 및 각각의 B-인자는 PHENIX에서 수행되었다(Adams et al., Acta *Crystallogr* D Biol *Crystallogr*, 66, 213 (2010)). D25 가변 도메인을 위한 전자밀도는 우수하고, 그러나 불변 도메인을 위한 전자밀도는 약하고, 가능하면 팔꿈치 각도에서 유연성의 결과이다. 최종 데이타 수득 및 정제 통계는 표 8에서 존재된다.

[0830] **D25 Fab를 가지는 복합체에서 RSV F(+) Fd의 발현 및 정제.** RSV F (+) Fd 단백질 구성체는 발현을 증강시키기 위하여 3개 자연적으로 발생하는 대체 (P102A, I379V, 및 M447V)을 가지는 A2 계통(strain) (accession P03420)로부터 유래된다. C-말단 T4 피브리틴(fibritin) 삼량체화(trimerization) 모티프 (Frank et al., J. Mol. Biol., 308, 1081 (2001)), 트롬빈(thrombin) 위치, 6x His-tag, 및 스트렙tagII 을 가지는 RSV F 잔기 1-513을 암호화하는 포유류 코돈-최적화되 유전자는 합성되었고 pLEXm로부터 유래된 포유류 발현 벡터로 서브클론되었다(Aricescu et al., Acta *Crystallogr* D Biol *Crystallogr*, 62, 1243 (2006)). RSV F(+) Fd를 발현하는 플라스미드, D25 경쇄, 및 D25 중쇄 사슬 (힌지 영역에서 스탑 코돈(stop codon)이 있거나 또는 없는)을 현탁액에서 HEK293 GnTI-/- 세포로 동시에 형질감염하였다(Reeves et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99,

13419 (2002)). 대안적으로, 단지 RSV F(+) Fd 플라스미드는 형질감염 후 3 시간에 GnTI-/- 세포로 첨가된 정제되D25 Fab로, 형질감염될 수 있다. 4-5 일 후에, 세포 상등액을 수확하고, 원심분리하고, 여과하고 농축하였다. 복합체를 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 및 250 mM 이미다졸(imidazole) pH 8.0로 구성되는 용출버퍼를 사용하여 Ni2+-NTA 레진 (Qiagen, Valencia, CA)을 경유하여 초기에 정제하였다. 복합체는 농축되고 제조사의 지침에 따라 StrepTactin 레진에 대해 추가적으로 정제되었다(Novagen, Darmstadt, Germany). His 및 스트렙 태그를 제거하기 위하여 트롬빈(thrombin) 프로테아제 (Novagen)로 밤사이 배양후에, D25 Fab 초과는 2 mM Tris-HCl pH 7.5, 350 mM NaCl, 및 0.02% NaN3의 러닝버퍼로 Superose6 젤 여과 컬럼 (GE Healthcare) 에서 정제된, 복합체에 첨가하였다. 용출된 복합체는 동등한 부피의 물로 희석되었고 ~5 mg/ml로 농축되었다. 유사한 절차가 AM22 Fab 복합체를 발현 및 정제하는데 사용되었다.

[0831] **D25 Fab를 가지는 RSV F(+) Fd의 크리스탈화 및 X-선 데이타 수득.** 초기 크리스탈은 D25 Fab에 결합된 RSV F(+) Fd의 0.1 ㎕를 저장 용액 (40% (w/v) PEG 400, 5% (w/v) PEG 3350, 및 0.1 M 소듐 아세테이트 pH 5.5)의 0.1 ㎕와 혼합하여 20℃에서 시팅 드롭(sitting drops)의 증기 확산(diffusion) 방법으로 성장되었다(Majeed et al., 구조, 11, 1061 (2003)). 크리스탈은 매달린 드롭(hanging drops)에서 수동적으로 재생되었고, 3.6 Å로 회절된 크리스탈은 30% (w/v) PEG 400, 3.75% (w/v) PEG 3350, 0.1 M HEPES pH 7.5, 및 1% (v/v) 1,2-butanediol을 포함하는 저장 용액을 사용하여 성장하였다. 크리스탈은 드롭(drop)으로부터 크리오스트림(cryostream)으로 직접적으로 이동되고, X-선 회절 데이타는 SER-CAT beamline ID-22에서 1.00 Å의 파장에서 간접적으로 수득되었다.

[0832] **D25 Fab를 가지는 복합체에서 RSV F(+)Fd의 구조 결정 및 정제.** X-선 회절 데이타는 HKL2000 suite으로 통합 및 축척되었고(Otwinowski and Minor, in 방법s Enzymol. (Academic Press, vol. 276, pp. 307-326, 1997)), 분자 교체 용액을 비결합된 D25 Fab 구조 및 수색모델로서 후융합(postfusion) RSV F 구조(PDB ID: 3RRR, McLellan et al., J. Virol., 85, 7788 (2011))로부터 잔기 29-42, 49-60, 78-98, 219-306, 313-322, 333-343, 및 376-459를 사용하여 PHASER (McCoy et al., J. Appl. crystallogr., 40, 658 (2007))에 의해 얻었다. NaAuCl4 유도체로부터 6 위치는 알려진 반응 측쇄에 맵되었다(mapped)(F 잔기 Met97/His159, Met264/Met274, His317, 및 Met396; D25 중쇄 사슬 잔기 Met19/His82 및 His 59). 수동 모델 빌딩은 첫번째 지어진 2차 구조 요소를 가지는, COOT (Emsley et al., Acta Crystallogr D Biol crystallogr, 66, 486 (2010))를 사용하여 수행되었다. 각각의 위치, TLS 파라미터, 및 각각의 B-인자의 정제(refinement)는 비결합된 D25 Fab 구조, 및 정제 동안에 참조 모델로서 후융합(postfusion) RSV F 구조의 일부를 사용하여, PHENIX (Adams et al., Acta *Crystallogr* D Biol *crystallogr*, 66, 213 (2010))에서 수행되었다. 성숙 단백질에서 모든 RSV F 잔기는 Met97에 대한 F_2 C-말단에서 잔기를 제외하고 지어졌다. 최종 데이타 수득 및 정제 통계는 표 9에존재한다.

[0833] **RSV F 경쟁 결합 분석.** 항체의 경쟁 결합은 RSV 감염된 HEp-2 세포에서 수행되었다. HEp-2 세포는 18-20 시간 동안 RSV의 3 MOI (감염의 다양성)으로 감염되었다. 감염 후에, 세포는 세포 분리 용액(Cellstripper, 배지 tech Inc., Herndon, VA)을 사용하여 분리되었고, 및 PBS로 세척되었다. 세포를 PBS에서 96-웰 U-바닥 플레이트에서 5 $\times 10^4$ /웰로 분주하였다. 단일 항체 AM22, D25, 및 101F는 100 ㎍/ml의 농도에서 시작하여 희석되었고, HEp-2 세포로 첨가되었다. 30 분 후에 Alexa 488 접합된 D25의 100 ul를 1 ㎍/ml의 농도에서 첨가되었고 1 시간 동안 4℃에서 배양되었다. 세포를 PBS로 한번 세척하였고 0.5% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정하였다. 세포에 D25-Alexa 488의 결합은 세포유동 분석flow cytomery (LSR II 기구, Becton Dickinson, San Jose, CA)으로 측정되었다. 데이타는 FlowJo 소프트웨어, 버젼 8.5 (Tree Star, San Carlos, CA)을 사용하여 분석되었다.

[0834] **음성 계통 전자현미경(electron microscopy) 분석.** 시료를 신선하게 glow-비하전된(discharged) 탄소-코팅된 그리드(carbon-coated grids)로 흡수시키고, 물로 짧게 린스하고, 신선하게 만든 0.75% uranyl formate로 염색하였다. 이미지는 Eagle CCD 카메라가 있는 FEI T20 마이크로스코프 상에 기록되었다. 이미지 분석 및 2D 편균은 Bsoft(Heymann 및 Belnap, J. Struct. Biol., 157, 3 (2007) 및 EMAN (Ludtke et al., J. Struct. Biol., 128, 82 (1999))로 수행되었다.

[0835] **RSV 바이러스-to-세포 융합 분석.** RSV 바이러스-to-cell 융합을 억제하기 위한 항체의 능력은 이전의 설명으로서 측정되었다(McLellan et al., J. Virol., 84, 12236 (2010)). 간단히, HEp-2 세포를 96-웰 플레이트에 분주하고, 37℃에서 24 시간 동안 배양하고, 분석 전에 1 시간 동안 4℃에서 냉각시킨다. RSV-GFP를 4℃에서 미리-차갑게(chilled) 세포에 첨가하였고, 그런다음 비결합된 바이러스를 제거하기 위하여 세포를 찬(cold) PBS에서 세척하였다. 연속적으로-희석된 항체를 차거운 세포에 첨가되었고 18 시간동안 37℃로 이동되기 전에, 4℃에서

1 시간 동안 배양되었다. 배양 후에, 세포를 트립신화시키고, 0.5% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)에서 고정하였고, GFP-발현 세포의 빈번도를 결정하기 위하여 유동세포분석(flow cytometry)으로 분석되었다.

[0836] **RSV 부착 억제 분석.** 세포에 RSV 부착을 억제하는 항체 능력은 이전의 설명으로서 측정되었다(McLellan et al., J. Virol., 84, 12236 (2010)). 간단히, HEp-2 세포를 배지로 분산하였고, 찬(cold) PBS에서 세척하였고, 96-웰 v-바닥 플레이트에 분주하였고, 사용하기 전에 4℃에서 1 시간동안 차갑게 하였다. 항체 및 헤파린, 알려진 RSV 부착 억제제는 연속 희석으로 분포되었고, 37℃에서 1 시간동안 RSV A2 계통(strain) 바이러스로 혼합하였다. 차거운 세포로부터 배지를 원심분리 후에 제거하였고 바이러스 또는 바이러스의 혼합물 및 시약을 차거운 세포에 첨가하였고 4℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 비결합된 바이러스를 제거하기 위하여 세포를 차거운 PBS에서 세척하였고, 0.5% 파라포름알데하이드로 고정하였다. 세포 상에 결합된 바이러스는 FITC-접합된 고우트 항-RSV 항체로 검출되었다. 세포를 차거운 PBS로 세척하였고 유동세포분석(flow cytometry)으로 평가하였다. 결합된 바이러스의 중간 형광 강도(Median fluorescence intensities)는 FlowJo 소프트웨어, 버젼 8.5 (Tree Star, San Carlos, CA)로 분석되었다.

[0838] [표 9] 크리스탈로그래프 데이타 수득 및 정제 통계.

[0839]

	D25 Fab	D25 Fab + RSV F
Data collection		
Space group	$P6_122$	$P2_13$
Cell constants		
a, b, c (Å)	108.7, 108.7, 139.9	152.3, 152.3, 152.390.0,
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0
Wavelength (Å)	1.00	1.00
Resolution (Å)	50.0-1.6 (1.63-1.60)	50.0-3.6 (3.73-3.60)
R_{merge}	11.2 (68.0)	12.7 (81.4)
$I / \sigma I$	27.3 (2.1)	16.4 (2.0)
Completeness (%)	98.3 (86.1)	99.6 (99.3)
Redundancy	11.0 (5.3)	6.5 (5.2)
Refinement		
Resolution (Å)	35.4-1.6 (1.62-1.60)	42.2-3.6 (3.88-3.60)
Unique reflections	63,360 (2,241)	13,877 (2,742)
R_{work} / R_{free} (%)	24.1/25.5	21.3/26.7
No. atoms		
Protein	3,305	6,778
Ligand/ion	0	0
Water	270	0
B-factors (Å^2)		
Protein	53.0	128.1
Ligand/ion	-	-
Water	44.1	-
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.007	0.003
Bond angles (°)	1.20	0.91
Ramachandran		
Favored (%)	96.5	92.0
Allowed (%)	3.0	7.3
Outliers (%)	0.5	0.7

[0841] **실시예 2**

[0842] **RSV F 단백질의 안정화**

[0843] 이 실시예는 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 실시예 RSV F 단백질의 디자인을 설명한다. 후융합(postfusion) RSV F 단백질의 구조(예를 들면, in McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011, with coordinates deposited as PDB Accession No. 3RRR에서 개시됨)와 비교하여 D25 Fab를 가지는 복합체(예를 들

면, 선융합(prefusion) 입체형태에서)에서 RSV F 단백질의 크리스탈 구조는 멤브린-몸 중심에 가까운 및 멤브린-먼 부위 엽(lobes) 모두에서 선- 및 후-융합 입체형태 사이에 극적인 구조의 재배열을 나타내고, 이는 RSV F의 선융합(prefusion) 입체형태의 안정화에 대하여 지침을 제공한다. 선- 및 후-융합 RSV F 구조의 비교에 기반하여, 큰 입체형태 변화를 하는, F_1 서브유닛의 N- 및 C-말단에 위치된, 2개 영역이 있다. 예를 들면, 도 2에 설명된 바와 같이, F_1 폴리펩타이드의 위치 137-216 및 461-513는 전-및 후- F 단백질 입체형태 사이에 구조의 재배열을 거치는 반면에, F_1 폴리펩타이드의 위치 271-460은 상대적으로 변화하지 않는다. 실시예는 자체의 선융합(prefusion) 입체형태에서 RSV F 단백질을 안정하는 몇개 전략을 설명한다.

[0844] 항원 위치 Ø의 구성요소이고 항체 D25에 결합에 포함된, F1의 N-말단 영역을 안정하기 위하여, 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합의 도입, 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합, 구멍(cavity) 채우는 아미노산 대체, 재포장 대체, N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 위치의 도입, 및 이의 조합을 포함하는, 다양한 전략이 디자인되었다.

[0846] 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합

[0847] 후융합(postfusion)가 아닌, 선융합(prefusion) 입체형태에서 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합(disulfide bond)을 형성하는 충분히 가까운 거리 내에 있는 개 시스테인(cysteine) 잔기의 도입은 선융합 입체형태에서 F 단백질을 잠글수 있다. 내부-분자 디설피드 결합은 삼량체(trimer) 내의 단일 F2/F1 프로모터 내에 형성될 수 있고, 따라서 3개 프로토머와 함께 교차결합(cross-link) 하지 않는다. 특정적으로, 디설피드 결합은 입체형태를 변화하는 영역과 선- 및 후-융합 구조에서 입체형태를 변화하지 않는 영역 사이에 형성되는 디설피드 결합은 선융합(prefusion) 입체형태에서 단백질을 잠거야만 한다. 하나의 실시예는 Ser155가 입체형태를 변화시키는 영역에 위치된, S155C/S290C 돌연변이체의 것인 반면, Ser290은 입체형태를 변화시키지 않는 영역에 있다. 추가적으로, F1 위치 137-216 내에 위치된 2개 잔기, 또는 F1 위치 137-216 내에 하나의 잔기 및 F1 위치 461-513내에 두번째와 같은 입체형태를 모두 변화시키는 2개 영역사이에 디설피드 결합은 선융합(prefusion) 입체형태에서 단백질을 충분히 잠글수 있다.

[0848] 만약 시스테인이 해당 잔기 쌍 위치에서 도입된다면 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합을 형성하기 위하여, 상기 설명된 방법을 사용하여, RSV F 단백질의 잔기의 몇 개 쌍은 후융합(postfusion) 입체형태가 아닌, 선융합(prefusion) 입체형태에서 근접한 충분히 가까운 되도록 결정된다. 상기 위치에서 시스테인(cysteine) 잔기를 도입하는데 필요되는 서열번호: 1에 대한 해당 아미노산 대체뿐만아니라, 상기 잔기 쌍은 표 10에 지시된다. 또한 표 10은 지시된 대체를 포함하는 서열번호, 및 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드(위치 26-109), pep27 폴리펩타이드(위치 110-136), F1 폴리펩타이드(위치 137-513), 삼량체화(trimerization) 도메인 (접히는(foldon) 도메인) 및 트롬빈(thrombin) 절단 위치 (LVPRGS (서열번호: 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그(his-tag (HHHHHH (서열번호: 185의 위치 553-558)) 및 스트렙 태그 II (SAWSHPQFEK (서열번호: 185의 위치 559-568)df 포함하는 해당 전구체 F0 구성체를 열거한다.

[0850] [표 10] 프로모터 내(intra-promoter) 디설피드 결합(disulfide bond) 안정화를 위한 교차결합된 시스테인(cysteine) 쌍의 실시예

[0851]

시스테인 대체를 위한 F 단백질 잔기 쌍	서열번호 1에 해당하는 A. A. 대체	서열번호
F_1 Substitutions		
155 and 290	S155C and S290C	185
151 and 288	G151C and I288C	189
137 and 337	F137C and T337C	213
397 and 487	T397C and E487C	247
138 and 353	L138C and P353C	257
341 and 352	W341C and F352C	267
403 and 420	S403C and T420C	268
319 and 413	S319C and I413C	269
401 and 417	D401C and Y417C	270
381 and 388	L381C and N388C	271
320 and 415	P320C and S415C	272
319 and 415	S319C and S415C	273
331 and 401	N331C and D401C	274
320 and 335	P320C and T335C	275
406 and 413	V406C and I413C	277
381 and 391	L381C and Y391C	278
357 and 371	T357C and N371C	279
403 and 417	S403C and Y417C	280
321 and 334	L321C and L334C	281
338 and 394	D338C and K394C	282
288 and 300	I288C and V300C	284
F_2 and F_1 Substitutions		
60 and 194	E60C and D194C	190
33 and 469	Y33C and V469C	211
54 and 154	T54C and V154C	212
59 and 192	I59C and V192C	246
46 and 311	S46C and T311C	276
48 and 308	L48C and V308C	283
30 and 410	E30C and L410C	285

[0853] 분자사이에 있는 디설피드 결합

[0854] 후융합(postfusion)가 아닌, 선융합(prefusion)에서 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합을 형성하는데 충분히 가까운 거리 내에 있는 2개 시스테인(cysteine) 잔기의 도입은 선융합(prefusion) 입체형태에서 F 단백질을 잠글 수 있다. 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합은 삼량체 내에 인접한 프로토머 사이에 형성될 수 있고, 따라서 3개 프로모터와 함께 교차결합될 수 있다. 특정적으로, 디설피드 결합은 선- 및 후-융합 구조에서 입체형태를 변화시키는 영역과 입체형태를 변화시키지 않는 영역 사이에 형성된 디설피드 결합은 선융합(prefusion) 입체형태에서 단백질을 잠그어야만 한다. 하나의 실시예는 Ala153이 입체형태를 변화시키는 영역에 위치된, A153C/K461C 돌연변이체의 것인 반면에, Lys461은 입체형태를 변화시키지 않는 영역에 있다. 추가적으로, F1 위치 137-216 내에 위치된 2개 잔기, 또는 F1 위치 461-513 내에 위치된 2개 잔기, 또는 F1 위치 137-216 내에 하나의 잔기 및 F1 위치 461-513내에 두번째와 같은, 입체형태를 모두 변화시키는 2개 영역 사이에 디설피드 결합의 형성은 선융합(prefusion) 입체형태에서 단백질을 잠그는데 충분할 수 있다.

[0855] 만약 시스테인이 해당 잔기 쌍 위치에서 도입된다면 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합을 형성하기 위하여, 상기 설명된 방법을 사용하여, RSV F 단백질의 잔기의 몇 개 쌍은 후-융합 입체형태가 아닌, 선융합(prefusion) 입체형태에서 충분히 근접한 가까운 결정된다. 상기 위치에서 시스테인을 도입하는데 필요되는 해당 아미노산 대체뿐만아니라, 상기 잔기 쌍은 표 11에 지시된다. 또한 표 11은 지시된 대체를 포함하는 서열번호, 및 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드 (위치 26-109), pep27 폴리펩타이드 (위치 110-136), F1 폴리펩타이드 (위치 137-513), 삼량체화(trimerization) 도메인 (접히는(foldon) 도메인) 및 트롬빈(thrombin) 절단 위치 (LVPRGS (서열번호: 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그 (his-tag (HHHHHH (서열번호: 185의 위치 553-558)) 및 스트렙 태그 II (SAWSHPQFEK (서열번호: 185의 위치 559-568)를 포함하는 해당 전구체 F_0 구성체를

열거한다.

[0857] [표 11] 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합(disulfide bond) 안정화를 위한 실시예 교차결합된 시스테인 쌍

[0858]

F protein Residue pair(s)	A.A. substitutions corresponding to SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO
F_1 Substitutions		
400 and 489	T400C and D489C	201
144 and 406	V144C and V406C	202
153 and 461	A153C and K461C	205
149 and 458	A149C and Y458C	207
143 and 404	G143C and S404S	209
346 and 454	S346C and N454C	244
399 and 494	K399C and Q494C	245
146 and 407	S146C and I407C	264
374 and 454	T374C and N454C	265
369 and 455	T369C and T455C	266
402 and 141	V402C and L141C	302
F_2 and F_1 Substitutions		
74 and 218	A74C and E218C	243

[0860] 추가적으로, 본 명세서에서 설명된 다수의 안정하는 돌연변이는 하나 이상의 안정하는 돌연변이를 포함하는 PreF 항원을 생성하도록 혼합될 수 있다. 내부- 또는 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합을 형성하는 첫번째 및 두번째 잔기 쌍을 포함하는 상기 구성체의 실시예는 표 12에 제공된다. 또한 표 12는 지시된 대체를 포함하는 서열번호, 및 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드 (위치 26-109), pep27 폴리펩타이드 (위치 110-136), F1 폴리펩타이드 (위치 137-513), 삼량체화(trimerization) 도메인 (접히는(foldon) 도메인) 및 트롬빈(thrombin) 절단 위치 (LVPRGS (서열번호: 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그 (his-tag (HHHHHH (서열번호: 185의 위치 553-558)) 및 스트렙 태그 II (SAWSHPQFEK (서열번호: 185의 위치 559-568)를 포함하는 해당 전구체 F_0 구성체를 열거한다.

[0862] [표 12] 내부- 및 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합(disulfide bond) 안정화의 조합을 위한 교차결합된 시스테인(cysteine) 쌍의 실시예

[0863]

F protein Residue pair(s)	Substitutions corresponding to SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO
155 and 290 (Intra); and 402 and 141 (Inter)	S155C and S290C; and V402C and L141C	303
155 and 290(Intra); and 74 and 218	S155C and S290C; and A74C and E218C	263

[0865] 추가적으로, 아미노산은 상기에서 논의된 바와 같이, 특정 잔기 쌍이 후융합(postfusion)이 아닌, 선융합(prefusion)에서 내부- 또는 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합을 형성하는데 충분히 가까운 거리 내에 있는 것과 같이, F 단백질 구조에서 잔기 정렬을 조정하기 위하여 F 단백질 서열로부터 삽입 (또는 삭제)될 수 있고, 이는 선융합(prefusion) 입체형태에서 F 단백질을 안정할 것이다. 상기 수정의 실시예는 표 13에 제공된다. 표 13은 지시된 대체를 포함하는 서열번호, 및 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드 (위치 26-109), pep27 폴리펩타이드 (위치 110-136), F1 폴리펩타이드 (위치 137-513), 삼량체화(trimerization) 도메인 (접히는(foldon) 도메인) 및 트롬빈(thrombin) 절단 위치 (LVPRGS (서열번호: 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그 (his-tag (HHHHHH (서열번호: 185의 위치 553-558)) 및 스트렙 태그 II (SAWSHPQFEK (서열번호: 185의 위치

559-568)))를 포함하는 해당 전구체 F_0 구성체를 또한 열거한다.

[0867] [표 13] 사이-내부-프로모터(inter-intra-promoter) 디설피드 결합(disulfide bonds), 또는 이의 조합을 받아들이는 F 단백질을 지향하기 위한 아미노산 삽입 사용.

[0868]

F protein Residue pair(s)	Substitutions corresponding to SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO
155 and 290 (Intra); and 146 and 460 (Inter); G insertion between position 460/461	S155C and S290C; and S146C and N460C; G insertion between position 460/461	258
155 and 290 (Intra); and 345 and 454(Inter); C insertion between positions 453/454	S155C and S290C; and N345C and N454G; C insertion between positions 453/454	259
155 and 290 (Intra); and 374 and 454(Inter); C insertion between positions 453/454	S155C and S290C; and T374C and N454G; C insertion between positions 453/454	260
155 and 290 (Intra); and 239 and 279(Inter); C insertion between positions 238/239	S155C and S290C; and S238G and Q279C; C insertion between positions 238/239	261
155 and 290 (Intra); and 493 paired with C insertion between positions 329/330	S155C and S290C; and S493C paired with a C insertion between positions 329/330	262
183 and 428 (Inter), G insertion between positions 182/183	N183C and N428C; G insertion between positions 182/183	296
183 and 428 (Inter), C insertion between positions 427/428	N183C and N427G; C insertion between positions 427/428	297
155 and 290 (Intra); and 183 and 428(Inter); G insertion between positions 182/183	S155C and S290C; and N183C and N428C; G insertion between positions 182/183	298
155 and 290 (Intra); and 183 and 428(Inter); C insertion between positions 427/428	S155C and S290C; and N183C and N427G; C insertion between positions 427/428	299
145 and 460 (Inter), AA insertion between positions 146/147	S145C and 460C; AA insertion between positions 146/147	338
183 and 423 (Inter), AAA insertion between positions 182/183	N183C and K423C; AAA insertion between positions 182/183	339
330 and 430 (Inter); CAA insertion between positions 329/330	A329C and S430C; and a CAA insertion between positions 329/330	340

[0870] 구멍(cavity)-채우는 대체

[0871] 후융합(postfusion) RSV F 단백질의 구조와 비교된 D25 Fab를 가지는 복합체에서 RSV F 단백질의 크리스탈 구조(예를 들면, 선융합(prefusion) 입체형태에서)의 비교(예를 들면, McLellan *et al.*, *J. Virol.*, 85, 7788, 2011; structural coordinates of the RSV F protein in 자체 postfusion conformation are deposited in the Protein Data Bank (PDB) as PDB Accession No. 3RRR에서 개시된)는 F가 후융합(postfusion) 입체형태로 전이(transition)해야만 하는 선융합(prefusion) 입체형태에서 몇 개 내부 구멍 또는 포켓을 확인한다. 상기 구멍은 표 14에 열거된다. 따라서, 상기 내부 구멍을 채우는 것은 후융합(postfusion) 입체형태로 전이(transition)를 방지하여 선융합(prefusion) 상태에서 F를 안정시킨다. 구멍은 작은 측쇄를 가지는 것을 위하여 큰 측쇄를 가지는 아미노산을 대체하여 채운다.

[0872] 구멍은 프로모터 내(intra-promoter) 구멍, 또는 프로모터 사이(inter-promoter) 구멍일 수 있다. 선융합(prefusion) 입체형태에서 RSV 단백질을 안정시키는 RSV F 구멍(cavity)-채우는 수정의 하나의 실시예는 S190F/V207L 돌연변이체이다.

[0873] 상기 전략을 사용하여, 몇개 구멍(cavity) 채우는 수정은 선융합(prefusion) 입체형태에서 RSV F 단백질을 안정시키는 것으로 확인되었다. 상기 수정은 표 14에 나타냈다. 또한 표 14는 지시된 대체를 포함하는 서열번호, 및 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드 (위치 26-109), pep27 폴리펩타이드 (위치 110-136), F1 폴리펩타이드 (위치 137-513), a 삼량체화(trimerization) 도메인 (a 접히는(foldon) 도메인) 및 트롬빈(thrombin) 절단 위치 (LVPRGS (위치 547-552 of 서열번호: 185)) 및 정제 태그 (his-tag (HHHHHH (위치 553-558 of 서열번호: 185)) 및 스트렙 태그 II (SAWSHPQFEK (위치 559-568 of 서열번호: 185)))를 포함하는 해당 전구체 F_0 구성체를 열거한다.

[0875] [표 14] 구멍(cavity)-채우는 아미노산 대체예

Cavity	A.A. Substitutions	SEQ ID NO:
Ser190 and Val207	190F and 207L	191
Val207	207L and 220L	193
Ser190 and Val296	296F and 190F	196
Ala153 and Val207	220L and 153W	197
Val207	203W	248
Ser190 and Val207	83W and 260W	192
Val296	58W and 298L	195
Val90	87F and 90L	194

[0876]

[0878] 지시된 구멍은 구멍(cavity)을 채우기 위하여 큰 잔기에 돌연변이될 수 있는 구멍에 인접해 있는 작은 잔기로 언급된다. 다른 잔기 (구멍이 후에 명명된 것 이외에) 는 동일한 구멍을 채우기 위하여 또한 돌연변이될 수 있다는 것을 이해될 것이다.

[0879]

[0880] 재포장 대체

[0881] 추가적으로, RSV F 단백질의 선융합(prefusion) 입체형태는 소수성 상호작용 또는 수소-결합 형성을 증강하는 것과 같은, 이웃하는 잔기의 상호작용을 증가하여 안정될 수 있다. 추가적으로, RSV F 단백질의 선융합(prefusion) 입체형태는 선융합(prefusion) 입체형태의 준안전성(metastability)을 유도하는 이웃하는 잔기의 불리한 또는 반발적 상호작용을 감소하여 안정될 수 있다. 상기는 유사하게 하전된(charged) 잔기의 클러스터를 제거하여 완성될 수 있다. 상기 수정의 실시예는 표 15에 나타낸다. 또한 표 15는 지시된 대체를 포함하는 서열번호, 및 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드 (위치 26-109), pep27 폴리펩타이드 (위치 110-136), F1 폴리펩타이드 (위치 137-513), 삼량체화(trimerization) 도메인 (접히는(foldon) 도메인) 및 트롬빈(thrombin) 절단 위치 (LVPRGS (서열번호: 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그 (his-tag (HHHHHH (서열번호: 185의 위치 553-558)) 및 스트렙 태그 II (SAWSHPQFEK (서열번호: 185의 위치 559-568)))를 포함하는 해당 전구체 F_0 구성체를 열거한다.

[0883] [표 15] 재포장 아미노산 대체

Substitutions	SEQ ID NO
I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	227
I64L, I79L, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, I214L	228
I64W, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	229
I79V, Y86F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	230
I64V, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199Y, L203F, V207L, I214L	231
I64F, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	232
I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, I199F, L203F, V207L, I214L	233
V56I, T58I, V164I, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, V296I, A298I	234
V56I, T58I, V164I, V179L, T189F, I291V, V296I, A298I	235
V56L, T58I, L158W, V164L, I167V, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, V296L	236
V56L, T58I, L158Y, V164L, I167V, V187I, T189F, I291V, V296L	237
V56I, T58W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, I291V, V296I	238
V56I, T58I, I64L, I79V, Y86W, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I, A298I	239
V56I, T58I, I79V, Y86F, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I, A298I	240
V56I, T58W, I64L, I79V, Y86W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I	241
V56I, T58W, I79V, Y86F, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I	242
D486N, E487Q, D489N, and S491A	249
D486H, E487Q, and D489H	250
T400V, D486L, E487L, and D489L	251
T400V, D486I, E487L, and D489I,	252
T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, and K498L	253
T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, and K498L	254
K399I, T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, E497L, and K498L	255
K399I, T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, E497L, and K498L	256
L375W, Y391F, and K394M	286
L375W, Y391F, and K394W	287
L375W, Y391F, K394M, D486N, E487Q, D489N, and S491A	288
L375W, Y391F, K394M, D486H, E487Q, and D489H	289
L375W, Y391F, K394W, D486N, E487Q, D489N, and S491A	290
L375W, Y391F, K394W, D486H, E487Q, and D489H	291
L375W, Y391F, K394M, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, and K498M	292
L375W, Y391F, K394M, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, and K498M	293
L375W, Y391F, K394W, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, and K498M	294
L375W, Y391F, K394W, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, and K498M	295
F137W and R339M	326
F137W and F140W	327
F137W, F140W, and F488W	328
D486N, E487Q, D489N, S491A, and F488W	329
D486H, E487Q, D489H, and F488W	330
T400V, D486L, E487L, D489L, and F488W	331
T400V, D486I, E487L, D489I, and F488W	332
D486N, E487Q, D489N, S491A, F137W, and F140W	333
D486H, E487Q, D489H, F137W, and F140W	334
T400V, D486L, E487L, D489L, F137W, and F140W	335
L375W, Y391F, K394M, F137W, and F140W or	336
L375W, Y391F, K394M, F137W, F140W, and R339M	337

[0884]

[0886] 글리코실레이션(Glycosylation) 돌연변이

[0887] 추가적으로, 선융합(prefusion) RSV F 입체형태에서 용매-접근가능한지만, 후융합(postfusion) RSV F 입체형태에서 용매-비접근가능한 N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 위치의 도입은 후융합(postfusion) 상태의 채택을 방지하여 선융합(prefusion) 상태에서 RSV F를 안정시킬 수 있다. N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 위치를 만들기 위하여, 서열 Asn-X-Ser/Thr (X가 Pro를 제외한 임의의 아미노산)이 도입될 수 있다. 상기는 원천 Asn 잔기에 대해 Ser/Thr 아미노산 2개 잔기 C-말단의 대체에 의해, 또는 원천 Ser/Thr 잔기에 대해 Asn 아미노산 2개 잔기 N-말단의 대체에 의해, 또는 허나의 비-프롤린 아미노산에 의해 분리된 모든 Asn 및 Ser/Thr 잔기의 대체에 의해 완성될 수 있다.

[0888] 상기 전략을 사용하여, 선융합(prefusion) RSV F 입체형태에서 용매-접근가능하지만 후융합(postfusion) RSV F 입체형태에서 용매-비접근가능한 N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 위치를 위한 몇개 위치가

확인되었다. 상기 수정은 표 16에 나타낸다. 표 16은 지시된 대체를 포함하는 서열번호, 및 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드 (위치 26-109), pep27 폴리펩타이드 (위치 110-136), F1 폴리펩타이드 (위치 137-513), 삼량체화 (trimerization) 도메인 (접히는(foldon) 도메인) 및 트롬빈(thrombin) 절단 위치 (LVPRGS (서열번호: 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그 (his-tag (HHHHHH (서열번호: 185의 위치 553-558)) 및 스트렙 태그 II (SAWSHPQFEK (서열번호: 185의 위치 559-568)))를 포함하는 해당 전구체 F_0 구성체를 열거한다.

[0890] [표 16] N-연결된 글리코실레이션(Glycosylation) 실시예

[0891]

N-linked glycosylation position	Exemplary substitutions	Exemplary SEQ ID NO
506	I506N and K508T	198
175	A177S	199
178	V178N	200
276	V278T	203
476	Y478T	204
185	V185N and V187T	214
160	L160N and G162S	215
503	L503N and a F505S	216
157	V157N	217

[0893] **실시예 3**

[0894] **PreF 항원의 멤브린 몸 중심에 가까운 엽(lobe) 안정화**

[0895] 상기에서 논의된 바와 같이, 후융합(postfusion) RSV F 단백질의 구조((disclosed, 예를 들면, in McLellan et al., J. Virol., 85, 7788, 2011, with coordinates deposited as PDB Accession No. 3RRR))와 비교하여 D25 Fab를 가지는 복합체에서 RSV F 단백질의 크리스탈 구조(예를 들면 선융합(prefusion) 입체형태)는 멤브린-먼 부위 엽(lobe)에서 선- 및 후-융합 입체형태 사이에 극적인 구조의 재배열을 나타낸다. 선- 및 후-융합 RSV F 구조의 비교에 기반하여, F1 서브유닛의 N- 및 C-말단에서 위치된, 큰 입체형태 변화로 가는, 2개 영역이 있다. 예를 들면, 도 2에서 설명된 바와 같이, F_1 폴리펩타이드의 위치 137-216 및 461-513는 선- 및 후- F 단백질 입체형태 사이에 구조 재배열을 가는 반면에, F_1 폴리펩타이드의 위치 271-460는 상대적으로 변화하지 않는다. 이 실시예는 F_1의 C-말단 영역을 안정하는 몇개 전략을 설명하고, 이는 RSV F 단백질의 엽(lobe)에 몸 중심에 가까운 멤브린을 포함한다. 삼량체화(trimerization) 도메인 (상기에서 논의된 바와 같이)의 도입, F_1의 C-말단 영역을 안정시키는 디설피드 결합을 형성할 수 있는 시스테인(cysteine) 쌍의 도입, 및 트랜스멤브린 도메인의 도입(예를 들면, 멤브린-결합되 PreF 항원을 포함하는 적용을 위한)을 포함하는, 다양한 전략이 확인되었다.

[0897] 디설피드 결합

[0898] F 단백질의 엽(lobe)에 몸 중심에 가까운 멤브린을 안정하는 하나의 전략은 F_1의 C-말단 일부를 안정시키는(예를 들면, 수용성 PreF 항원을 포함하는 적용을 위한) 디설피드 결합을 도입하는 하나 또는 그 이상 시스테인(cysteine) 대체를 도입하는 것이다. 상기 전략은 본 명세서에서 제공된 임의의 안정화 수정, 예를 들면, S155C/S290C 시스테인(cysteine) 대체를 가지는 F_1 단백질과 같은, 실시예 2에서 설명된 것으로 혼합될 수 있다. 하나의 전략은 선융합(prefusion) 입체형태에서 F_1 단백질의 C-말단 영역을 링크하는 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합을 형성하는데 충분히 가까운 거리 내에 있는 2개 시스테인의 도입을 포함한다. 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합은 삼량체 내에 인접한 프로토머 사이에 형성될 수 있고, 따라서 3개 프로토머 함께 교차결합(cross-link)할 수 있다. 상기 설명된 방법을 사용하여, RSV F 단백질의 잔기의 몇개 쌍은 만약 시스테인이 해당 잔기 쌍 위치에 도입된다면 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합을 형성하기 위하여, 선융합(prefusion) 입체형태에서 근접한 충분히 가깝도록 결정된다.

[0899] 멤브린 몸 중심에 가까운 엽(lobe)을 안정하는 디설피드 결합을 생성하도록 도입될 수 있는 시스테인(cysteine) 대체의 실시예는 잔기 쌍에서 시스테인(cysteine) 대체를 포함한다:

[0900] (a) 486 및 487

[0901] (b) 486 및 487; 위치 486/487 사이에 P 삽입을 가지는

[0902] (c) 512 및 513

[0903] (d) 493; 329/330사이에 C 삽입

[0904] (e) 493; 329/330사이에 C 삽입, 및 492/493사이에 G 삽입

[0905] 추가적으로, F1 폴리펩타이드의 길이는 C-말단 시스테인(cysteine) 쌍의 위치에 의존하여, 다양할 수 있다.

[0906] 예를 들면, F1 폴리펩타이드는 F1 폴리펩타이드로부터 α10 헬릭스를 제거하는, 위치 137-481을 포함할 수 있다. 추가 설명뿐만아니라, 상기 잔기 쌍에서 시스테인을 포함하는 수정을 포함하는 구성체의 실시예는 표 17에 열거된다. 표 17은 지시된 대체를 포함하는 서열번호, 및 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드 (위치 26-109), pep27 폴리펩타이드 (위치 110-136), F1 폴리펩타이드 (다양한 위치를 가지는)를 또한 포함하는 해당 전구체 F0 구성체를 열거한다.

[0909] [표 17] F 단백질의 멤브린 몸 중심에 가까운 엽을 안정시키는 디설피드 결합

Substitutions/insertion	Description	F_1 positions	SEQ ID NO
D486C/E487C; S155C/S290C	The D486C and E487C mutant allows inter-protomer disulfide bond formation while the S155C/S290C mutations stabilize the prefusion format, this construct does not have a Foldon or alpha-10 helix.	137-481	304
S155C/S290C; D486C/E487C; P insertion between positions 486/487	The D486C and E487C mutant should allow inter-protomer disulfide bond formation while the S155C/S290C mutations stabilize the prefusion format, this construct does not have a Foldon or alpha-10 helix.	137-481	305
N183C/N428C; D486C/E487C; G insertion between 182/183	The D486C and E487C mutant should allow inter-protomer disulfide bond formation while the 183C and 428C mutations stabilize the prefusion format. This construct removes the Foldon sequence and the alpha-10 sequence.	137-481	306
N183C/K427G; C insertion between 247/428; D486C/E487C P; insertion between positions 486/487	The D486C and E487C mutant should allow inter-protomer disulfide bond formation while the 183C and 428C mutations stabilize the prefusion format. This construct removes the Foldon sequence and the alpha-10 sequence.	137-481	307
V402C/L141C; L512C/L513C	The 141C and 402C stabilize the prefusion form by locking down the fusion peptide. While the 512C and 513C create an inter-protomer disulfide bond; this construct does not have a foldon domain.	1-513	308
S155C/S290C; V402C/L141C L512C/L513C	The 141C and 402C stabilize the prefusion form by locking down the fusion peptide in conjunction with the S155C/S290C. While the 512C and 513C create an inter-protomer disulfide bond, the foldon sequence is removed.	1-513	309
S155C/S290C; S493C; C insertion between 329/330	Removal of the "foldon" and the facilitation of intermolecular disulfide bond stabilization while the S155C/S290C mutations stabilize the prefusion format	137-491	310
S155C/S290C; S493C; C insertion between 329/330; G insertion between 492/493	Removal of the "foldon" and the facilitation of intermolecular disulfide bond stabilization while the S155C/S290C mutations stabilize the prefusion format	137-491	311

[0910]

[0912] 트랜스멤브린 도메인

[0913] F 단백질의 멤브린 몸 중심에 가까운 엽(lobe)을 안정시키는 다른 전략은 예를 들면, 멤브린 고정된 PreF 항원을 포함하는 적용을 위한, F1 단백질 상의 트랜스멤브린 도메인을 포함하는 것이다. 예를 들면, 트랜스멤브린 서열의 존재는 멤브린 비히클 제조를 위하여 트랜스멤브린 단백질로서 발현에 유용하다. 트랜스멤브린 도메인은 본 명세서에서 제공된 임의의 안정 돌연변이, 예를 들면, S155C/S290C 시스테인(cysteine) 대체를 가지는 F_1 단백질과 같은, 실시예 2에서 설명된 것을 포함하는 F_1 단백질에 연결될 수 있다. 추가적으로, 트랜스멤브린 도메인은 RSV F_1 세포질 꼬리에 추가적으로 연결되 수 있다. 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드 (위치 26-109), pep27 폴리펩타이드 (위치 110-136), F_1 폴리펩타이드 (위치 137-513), RSV 트랜스멤브린 도메인을 포함하는 전구체 F_0 구성체의 실시예는 서열번호: 323 (세포질 도메인 없이) 및 324 (세포질 도메인을 가지는)로서 제공된다.

[0915] **실시예 4**

[0916] **단일 사슬 PreF 항원**

[0917] 상기 실시예는 F2/F1 이질이합체(heterodimer) 대신에, F 단백질 프로모터가 단일 폴리펩타이드 사슬로서 형성되는 것과 같은, 원천 퓨린(furin) 절단 위치가 부족한 재조합 RSV F 단백질을 설명한다.

[0918] 표 18은 2개 퓨린(furin) 절단 위치, pep27 폴리펩타이드, 및 융합 펩타이드를 제거하는, F 위치 98-149의 결실을 포함하는 몇개 단일 사슬 PreF 항원을 열거한다. F_1 및 F_2 폴리펩타이드의 남아있는 일부는 링커에 의해 결합된다. 추가적으로, 몇개 전략은 상기 실시예 2 및 3에서 설명된 전략 사용을 포함하는, 선융합(prefusion) 입체형태에서 단일 사슬 구성체를 안정하는 수행될 수 있다. 표 18은 지시된 대체를 포함하는 서열번호, 및 단일 펩타이드, F2 폴리펩타이드 (위치 26-109), pep27 폴리펩타이드 (위치 110-136), F1 폴리펩타이드 (with varying 위치)를 포함하는 해당 전구체 F_0 구성체를 또한 열거한다.

[0920] [표 18] 단일 사슬 PreF 항원

Substitutions	Discussion	F2/F_1 Linker	C-term Stabilization	SEQ ID NO
S155C/S290C L373R Δ98-149	(A) The rationale for this construct is to create a single chain RSV fusion molecule, remove the nucleus localization signal (L373R), and the fusion peptide (, while the S155C/S290C mutations stabilize the prefusion format	GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 356)	Foldon	313
S155C/S290C L373R Δ98-149	Same as (A)	GSGNWGLGG (SEQ ID NO: 357)	Foldon	314
S155C/S290C L373R Δ98-149	Same as (A)	GSGNIGLGG (SEQ ID NO: 358)	Foldon	315
S155C/S290C L373R Δ98-149	Same as (A)	GSGGNGIGLGG (SEQ ID NO: 359)	Foldon	316
S155C/S290C L373R Δ98-149	Same as (A)	GSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 360)	Foldon	317
S155C/S290C L373R Δ98-149	Same as (A)	GSGNVLGG (SEQ ID NO: 361)	Foldon	318
S155C/S290C L373R Δ98-149	(B) The rationale for this construct is to create a single chain RSV fusion molecule, remove the nucleus localization signal, and the fusion peptide and also the alpha 10 helix and Foldon, while the S155C/S290C mutations stabilize the prefusion format	GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 362)	D486C/E487C; P insertion between positions 486/487	319
S155C/S290C/ L373R Δ98-149	Same as (B)	GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 363)	L512C/L513C	320
S155C/S290CL373R Δ98-149	Same as (A)	GSGNIGLGG (SEQ ID NO: 364)	TM	322

[0921]

[0923] **실시예 5**

[0924] **디설피드 결합(disulfide bond) 및 a 삼량체화(trimerization) 도메인으로 안정된 RSV F 단백질**

[0925] 상기 실시예는 디설피드 결합(disulfide bond) 및 a 삼량체화(trimerization) 도메인으로 안정된 RSV F 단백질의 생성을 설명한다. 도 10에 설명된 바와 같이, 위치 155 및 290 에서 세린(serine) 잔기(라본 다이아그램(ribbon diagrams)에서 화살표(arrows) 및 붉은색강조로 지시됨)는 RSV F 단백질의 후 융합 입체형태가 아닌, RSV F 단백질의 선융합(prefusion) 입체형태에서 서로 인접한다. 추가적으로, 상기 잔기의 측쇄는 다른 하나로 향하여 지향된다. 그러나, 세린(serine) 155에 인접한 잔기의 측쇄, 발린(valine) 154 및 라이신(lysine) 156은 세린(serine) 290의 측쇄로부터 멀리 지향된다. 상기 결과의 견해에서, 재조합 RSV F 단백질은 S155C 및 S290C 대체로 구성된다. 155/290 구성체에서 시스테인(cysteine) 잔기는 선융합(prefusion) 입체형태에서 재조합 RSV F 단백질, 그러나 위치 154 또는 156 (대신에 위치 155)에서 시스테인의 혼합인, 안정하는 디설피드 결합을 생성하는 것을 실패할 것이다.

[0926] 원천 RSV F_0 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자는 RSVF(+)FdTHS S155C, S290C, 및 서열번호: 185로서 제시되는 불리우는 RSV F 단백질을 암호화하는 표준 분자 생물 기술을 사용하여 돌연변이되었다:

[0927] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPA TNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVCKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLL PIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCIIKEEVLAYVVQLPLY GVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVIT SLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD ELL<u>SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL</u><u>GGLVPRGSHHHHHHSAWSHPQFEK</u> (서열번호: 185).

[0928] RSVF(+)FdTHS S155C, S290C는 단일 펩타이드 (잔기 1-25), F2 폴리펩타이드 (잔기 26-109), Pep27 폴리펩타이

드 (잔기 (110-136), F1 폴리펩타이드 (잔기 137-513), 접히는(foldon) 도메인 (잔기 514-544), 및 트롬빈 (thrombin) 절단 위치 (LVPRGS (서열번호: 185의 위치 547-552)) 및 정제 태그 (his-tag (HHHHHH (서열번호: 185의 위치 553-558)) 및 스트렙 태그 II (SAWSHPQFEK (서열번호: 185의 위치 559-568)))를 포함한다. 대조군 구성체는 S155C 대체 대신에 V154C 또는 K156C으로 생성되었다. 세포에서 발현될 때, RSVF(+)FdTHS S155C, S290C는 안정한 수용성 RSV F 단백질로서 진행되고 발현된다; 그러나, 154/290 또는 156/290 대체를 가지는 대조군 구성체는 발현을 실패하였다(likely because they failed to 접히는(수용성 입체형태에서 접히는(fold) 것은 실패하기 때문인 것 같은) (도 10 참조).

[0929] RSVF(+)FdTHS S155C, S290C 구성체는 131-2a 항체 (선- 및 후-융합 RSV F 입체형태 상에서 존재하는, 항원 위치 I에 결합하는), 모타비주맙(motavizumab) 및 팔리비주맙(palivizumab) (선- 및 후-융합 RSV F 입체형태에서 존재하는, 항원 위치 II에 결합하는), 및 101F 항체 (선- 및 후-융합 RSV F 입체형태에서 존재하는, 항원 위치 IV에 결합하는)뿐만아니라, 선융합(prefusion) 특정 항체 AM22 및 D25에 결합하는 항체를 위해 정제되고 테스트되었다. 도 11 (왼쪽 그래프)에 나타낸 바와 같이, 상기 항체의 모두는 정제된 RSVF(+)FdTHS S155C, S290C 구성체에 특정적으로 결합된 상기 항체의 모두는 RSVF(+)FdTHS S155C, S290C가 선융합(prefusion) 입체형태를 유지하는 것을 나타낸다. 결과는 구성체가 RSV F의 선- 및 후-융합 입체형태의 모두에 일반적인 위치 I, II 및 IV를 유지하는 것을 추가적으로 나타낸다. 정제된 RSVF(+)FdTHS S155C, S290C가 삼량체 입체형태에 있다는 것을 나타내기 위하여, 상기 구성체는 크기-배제 크로마토그래피 컬럼에 걸쳐 넘겼다. 도 11 (오른쪽 그래프)에서 나타낸 바와 같이 정제된 RSVF(+)FdTHS S155C, S290C의 제조는 삼량체 F 단백질의 분자량에 해당하는 단일 피크로 용출된다. 반대로, 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 것으로 예상되지 않는 S155C 및 S290C 대체를 부족한 대조군 구성체의 제조는 트리거된(triggered) F 단백질 및 응집체(aggregates)의 로제테(rosettes)의 존재를 나타내고, 대조군 구성체는 동질적으로 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정하지 않은 것을 나타낸다.

[0930] RSVF(+)FdTHS S155C, S290C 구성체가 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된다는 것을 추가적으로 확인하기 위하여, 전자현미경(electron microscopy) 연구가 수행되었고(도 12), RSVF(+)FdTHS S155C, S290C가 RSV F의 선융합(prefusion) 입체형태의 것과 유사한 모양, 및 후융합(postfusion) F 단백질 (오른쪽 image, Martin et al., J. Gen. Virol., 2006로부터 오른쪽 이미지)의 것으로부터 현저히 상이한 모양을 가지는 동질적으로 구조의 수를 형성한다.

[0931] 크리스탈로그래프 연구는 정제된 RSVF(+)FdTHS S155C, S290C가 용액에서 동질적인 것을 나타내기 위하여 수행되었다. 수용성 용액에서 크리스탈 형성은 용액에서 단백질의 균질성을 위한 엄격한 테스트이다. 도 15는 0.2 M lithium sulfate, 1.64 M Na/K 타르타르산염(tartrate) 및 0.1 M CHES, pH 9.5를 포함하는 수용성 버퍼에서 정제된 RSVF(+)FdTHS S155C, S290C에 의해 형성된 크리스탈 그림을 나타낸다.

[0933] **실시예 6**

[0934] **PreF 항원을 사용하여 면역반응을 중화하는 도입**

[0935] 상기 실시예는 개체에서 면역반응을 중화하는 RSV를 유도하는 PreF 항원의 사용을 설명한다.

[0936] 8주 연령 병원균-없는 CB6F1/J 마우스 (Jackson Labs)를 각각 10중 5 군으로 나눴고, 하기의 요법으로 면역되었다:

[0937] 1) $5x10^6$ pfu 내부비강(nasal)에서 살아있는 RSV A2 (RSV);

[0938] 2) 근육내(intramuscularly) (IM) 포르말린-비활성된 백반(alum)-침전된 RSV(FI-RSV);

[0939] 3) 폴리I:C 50 ㎍ IM에서 안정된 선융합(prefusion) RSV F (RSVF(+)FdTHS S155C, S290C; 선융합 F);

[0940] 4) 폴리I:C 50 ㎍ IM에서 후융합(postfusion) RSV F 삼량체(trimer) (후융합 RSV) 20 ㎍; 및

[0942] 군 1 (살아있는 RSV)은 시간 0에서 한번 감염되었고, 모든 다른 군은 0 및 3 주에서 면역되었다. 혈청은 두번째 IM 주사 후 2주인 5 주 또는 RSV 감염 후 5주에서 얻었다. 중화 활성은 하기의 방법으로 결정되었다: 혈청은 1:10로부터 1:40960까지 4배 희석으로서 분배되었고, 계통(strain) A2 (하위유형 A) 또는 18537 (하위유형 B) 및 Katushka 형광 단백질로부터 원형의 F 유전자를 발현하는 재조합 mKate-RSV의 동등한 부피로 혼합되었고,

1 시간 동안 37 ℃에서 배양되었다. 그런다음, 각각 혈청 희석/바이러스 혼합물의 50 ㎕를 384-웰 검은 광학 바닥 플레이트의 각각 웰에서 30 ㎕ MEM (minimal essential 배지)에서 $1.5x10^4$의 농도로 분주된 HEp-2 세포로 첨가하였고, Ex 588 nm 및 Em 635 nm에서 분광 광도계 분석전에 20-22 시간 동안 배양되었다(SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, Sunnyvale, CA 94089). 각각의 샘플을 위한 IC50는 GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA)을 사용하여 커브 피팅(curve fitting) 및 비-직선 회귀(non-linear regression)로 계산되었다. P 값은 Student's T-테스트에 의해 결정되었다. RSV 중화 측정을 위한 상기 방법은 유동세포(flow cytometry) 분석 대신에 형광 플레이트 리더(fluorescent 플레이트-reader)로 읽어내기를 제외하고는, 실질적으로 이전의 설명된 것에서 수행되었다(참조, 예를 들면, Chen et al. J. Immunol. Methods., 362:180-184, 2010, incorporated by reference herein).

[0943] 상기 분석을 사용하여, 일반적으로 상기 ~100 EC_{50} 항체 반응은 보호되는 것으로 간주된다. 도 13 및 14에 나타낸 바와 같이, 선융합(prefusion) 입체형태 (RSV F (RSVF(+)FdTHS S155C, S290C)에서 안정된 RSV F 단백질이 투여된 마우스는 후융합(postfusion) 입체형태에서 RSV F 단백질이 투여된 마우스에 의해 생성된 것보다 ~15-배 큰 RSV A에 중화하는 면역반응, 및 후융합(postfusion) 입체형태에서 RSV F 단백질이 투여된 마우스에 의해 생성된 것보다 ~5-배 큰 RSV B에 대한 반응을 생성하였다. 도 13은 후-초기 예방접종 5 주 후에 결과를 나타내고, 도 14는 예방접종 후 7 주후에 결과를 나타낸다. IC_{50} 값을 유도하는 평균은 도 13 및 14에서 나타낸다. RSVF(+)FdTHS S155C, S290C 구성체로서 놀라지 않는 RSV A 및 B 하위군 사이에 중화 차이는 RSV A 하위군으로부터 F 단백질로부터 유래된다. RSV B 계통(strain) 로부터 유래된 해당 구성체를 가지는 예방접종은 RSV B에 대하여 더욱 특정한 중화 혈청을 생성할수 있다(도 41 참조). 추가적으로, 안정된 선융합(prefusion) F은 폴리I:C 뿐만아니라 백반(alum)으로 제조될 수 있고 항원 위치 Ø에 대해 항체 반응에 의해 수여된 면역원을 유지한다. BALB/c 마우스를 하위유형 A 로부터 유래된 안정된 선융합(prefusion) F의 DS S155C/S290C 버젼의 20 ㎍으로 면역되었고 백반(alum) (aluminum hydroxide gel 10 mg/ml, Brenntag, Frederikssund, Denmark) 또는 폴리I:C로 제조되었다. 마우스를 0 및 3 주, 및 5 주 시간 포인트(2 주 후에 두번째 주사)에서 접종하였고, 혈청을 중성화 분석(neutralization assay)을 위하여 얻었다(참조 도 42). 결과는 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 RSV F 단백질을 가지는 예방접종이 RSV에 대하여 보호 면역반응을 생성한다는 것을 나타낸다.

[0945] **실시예 7**

[0946] **개시된 항원을 가지는 개체의 치료**

[0947] 상기 실시예는 개시된 PreF 항원, 또는 PreF 항원을 암호화하는, 발현하거나 또는 포함하는 핵산 또는 바이러스 벡터의 하나 또는 그 이상의 투여에 의해 RSV 감염을 가지는 위험에 있거나 가지는 치료에 사용될 수 있는 방법을 설명한다.

[0948] 특정 실시예에서, 방법은 RSV 감염을 가지는(예를 들면 RSV에 대해 약화된 면역, 생리적(physiological) 상태, 또는 노출에 기인한) 위험에서 또는 가지는 것으로 여겨지는, 가지는 개체를 스크리닝하는 것을 포함한다. 알려지지 않은 감염 상태의 개체는 이들이 감염되었는지 아닌지를, 당업자에게 잘 알려진 예를 들면 혈청진단 테스트, 물리적 검사, 효소-연결된 면역 흡착 분석 (ELISA), 방사선 스크리닝 또는 다른 진단 기술을 사용하여 검사할 수 있다. 일부 실시예에서, 개체는 RSV 감염을 가지거나 또는 RSV 감염을 얻는 위험에 있는 것으로 선택된다. 개체는 RSV 감염을 가진 것으로 발견되고(또는 알려지고) 따라서 개시된 PreF 항원, 또는 PreF 항원을 암호화하는, 발현하거나 또는 포함하는 핵산 또는 바이러스 벡터를 투여하여 치료된다. 개체는 RSV 감염을 발달시키는 위험인 사람, 예를 들면, the 연장자, 면역 시스템이 손상된 사람(the immunocompromised) 및 영유아와 같은 매우 어린 사람에서 선택될 수 있다.

[0949] 치료를 위하여 선택된 개체는 개시된 PreF 항원의 치료 양으로 투여될 수 있다. PreF 항원을 포함하는 면역원 조성물은 0.1 ㎍/kg 체중 내지 약 1 ㎍/kg 체중, 용량 당 0.1 ㎍/kg 체중 내지 약 10 ㎍/kg 체중, 용량 당 1 ㎍/kg 체중 - 100 ㎍/kg 체중, 용량 당 100 ㎍/kg 체중 - 500 ㎍/kg, 또는 용량 또는 심지어 더 큰 당 500 ㎍/kg 체중 - 1000 ㎍/kg 체중과 같은, 용량 당 0.1 ㎍/kg 체중 to 약 1 mg/kg 체중의 용량에서 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, PreF 항원의 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 약 100 ㎍은 단일 용량으로 개체에 투여되는 면역원 조성물에 포함된다. 면역원 조성물은 몇개 용량, 예를 들면 지속적으로, 매일(daily), 주로, 또는 개월로 투여될 수 있다. 투여 모두는 비강(nasal) 투여와 같은, 당업계에서 임의로 사용될 수 있다. 개체에 투여되는 제제의 양은 임상의사에 의해 결정될수 있고, 치료되는 특정 개체에 의존된다. 특정 실시예

양은 본 명세서에서 제공된다(그러나 개시는 상기 용량에 제한되지 않는다).

[0951] **실시예 8**

[0952] **디설피드 결합(disulfide bond), 구멍(cavity) 채우는 대체, 및 삼량체화(trimerization) 도메인으로 안정된 RSV F 단백질**

[0953] 상기 실시예는 디설피드 결합(disulfide bond) 및 a 삼량체화(trimerization) 도메인으로 안정된 RSV F 단백질의 생성을 설명한다.

[0954] 도 16은 F_1 폴리펩타이드 F 단백질의 C-말단에 첨부된 조작된(engineered) 디설피드 결합(disulfide bond) 돌연변이 S155C 및 S290C ("DS" 불리는), 구멍(cavity)-채우는 돌연변이 S190F 및 V207L ("Cav1" 불리는), 및 이종(heterologous) 삼량체화(trimerization) 도메인에 의해 안정된 재조합 RSV F 단백질의 디자인을 나타낸다. 묘사된 3차 구조는 D25-결합되 RSV F 구조이고, 분홍및 tan으로 색깔된 분자 표면, 및 리본(ribbons)로서 나타낸 세번째 프로모터로서 나타낸 프로토머의 2개로 나타낸다. 선 및 후융합(postfusion) 입체형태 사이에 5Å이상 움직이는 F_1의 N- 및 C-말단 잔기를 나타냈다. 덧붙인것(insets)은 공간-채우는 구멍(cavity) 돌연변이 S190F 및 V207L뿐만아니라, 잔기 S155C 및 S290C 사이에 조작된(engineered) 디설피드 결합을 나타낸다. T4 파지(phage)피브리틴(fibritin) 삼량체화(trimerization) 도메인의 모델은 선융합 삼량체의 베이스에서 나타낸다. 인간 RSV 하위유형 A에서 S155C, S290C, S190F 및 V207L (Cav1) 대체를 포함하는 RSV F 단백질, 및 첨부된 C-말단 이종(heterologous) 접히는(foldon) 도메인은, 실시예 1 및 5에서 설명된 방법을 사용하여 발현되 및 정제되었고, RSV_A F(+)FdTHS DSCav1라고 불렀다. RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 항원 특징은 도 17에 나타냈다. 고정된 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1를 가지는 수용성 D25, AM22, 5C4, 101F, 모타비주맙(motavizumab), 및 팔리비주맙(palivizumab) Fab의 연합 및 해리 비율은 OctetRED 384™ 기구 (ForteBio, Melno Park, CA)을 사용하여 측정되었다. 각각 항체를 위한 평형 분리 상수가 제공되었다. RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 순도는 크기 배제 크로마토그래프에 의해 설명된다(도 18). 태그를 제거한 후에, 트롬빈(thrombin) 절단 후에 정제된 단백질은, 16/70 Superose 6 크기 배제 컬럼에 걸쳐 패스하였다. 용출 부피는 글리코실화된(glycosylated) 삼량체로 구성된다. DS, Cav1 또는 DSCav1 돌연변이에 의해 안정된 RSV_A F(+)FdTHS 변이체의 다양한 온도(350 mM NaCl pH 7.0, 에서 50℃, 70℃, 또는 90℃), pHs (25℃에서, 350 mM NaCl pH 3.5 또는 pH 10), 및 삼투압(osmolality) (10 mM 또는 3000 mM 삼투압 농도(osmolarity), pH 7.0, 에서 25℃), 또는 냉동-해동의 10 사이클 (350 mM NaCl pH 7.0에서)에서, 1 시간의 배양후에 D25-결합하는(분획 양으로서 제공되는) 보유 및 다양한 항원 위치에 대한 항원성, 일시적으로 발현되는 플라스미드로부터 산출을 포함하는, 항원 및 물리적 특성을 도 19에 나타냈다. DSCav1 변이체(variant)는 극도의 온도, pH, 삼투압(osmolality) 및 냉동-해동, DS 또는 Cav1 변이에 노출 후에 D25-재활성의 높은 보유에 의해 판단되는 것으로서, 개선된 물리적 안정성을 가지는, 항원 위치 Ø 인식을 유지한다.

[0955] DSCav1 돌연변이체의 구조 성질을 조사하기 위하여, RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 3차 구조를 X-선 크리스탈로그래프를 사용하여 결정하였다. 도 20은 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 3.1 Å 크리스탈 구조의 리본 대표를 나타낸다. 따뜻한 색 및 두꺼운 리본은 B-인자를 증가시키는데 해당된다. 돌연변이를 안정시키는 것에도 불구하고, 삼량체(trimer) 꼭대기에서 항원 위치 Ø는 현저한 유연서을 유지한다. 도 21은 D25-결합된 RSV F의 구조에 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1의 구조의 비교를 나타낸다. 도 22는 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 구조에서 안정 돌연변이를 강조한다. 구멍(cavity)-채우는 Phe190 잔기 (오른쪽)뿐만아니라, 시스테인(cysteine) 잔기 155 및 290 (왼쪽) 사이에 디설피드 결합에 해당하는 관찰된 전자밀도는 상기 수정이 크리스탈에 존재한다는 것을 나타낸다.

[0956] RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 구성체의 면역원성을 결정하기 위하여, 마우스 및 비인간 영장류는 상기 구성체로 접종되었고 접종되 동물로부터 얻은 혈청은 RSV의 중화에 대해 테스트되었다(도 23 및 24). 마우스는 면역되었고, 얻어진 혈청의 중화 활성은 상기 실시예 6에서 설명된 것으로서, 테스트되었다. 간단히, 군 당 CB6 마우스는 폴리 I:C 보강제의 50 ㎍ 으로 혼합된 지시된 RSV F 단백질의 10 ㎍으로 면역되었다. 예방접종은 0 및 3 주에서 발생되었고, 5 주 및 7 주로부터 혈청은 RSV 하위유형 A (RSV_A) 및 B (RSV_B)의 중화에 대해 테스트되었다. 평균값은 수평의 붉은색 선에 의해 지시된다. 8.76-14.68 kg 무게가지는 인도 기원(Indian origin)의 Macaca mulatta 동물은 0주 및 4주에서 면역원으로 주사되었다. 혈액을 6 주까지 매 다른 주(every other week)에 수득하였다. 군 당 4개 RSV-naive rhesus macaques는 폴리 I:C 보강제의 500 ㎍ 으로 혼합된 지시된 RSV F 단백질의 50 ㎍ 으로 근육내 면역되었다. 예방접종은 0 및 4 주에서 발생되었고, 6주로부터 혈청은 RSV 하위유형 A

(왼쪽) 및 B (오른쪽)의 중화에 대해 테스트되었다. 평균값은 수평의 붉은색 선에 의해 지시된다. 함께 합하여, 상기 결과는 RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 구성체가 마우스 및 비인간 영장류에서 중화 반응을 성공적으로 생성하는 것을 나타낸다.

[0958] **실시예 9**

[0959] **호흡기세포융합바이러스를 위한 융합 글리코단백질 백신의 구조-기반 디자인**

[0960] **Abstract.** 호흡기세포융합바이러스 (RSV)는 5세 연령 하의 어린이에 대해 입원 원인을 유도한다. RSV에 대하여 보호체액반응(protective humoral response)을 유도하기 위하여, 상기 위치가 자연적 감염에 의해 유도되는 높은 강력한 RSV-중화하는 항체의 주요 타겟인 것과 같이, 노력은 항원 위치 Ø, 융합 (F) 글리코단백질의 선융합(prefusion) 상태에 특정한 준안전성 위치에 촛점을 맞춘다. 극도의 pH 및 온도에 항원 위치 Ø가 보존된 안정된 F 버젼을 조작하기 위하여 구조-기반 디자인이 사용되었다. 6개 안정된-F 크리스탈 구조가 도입된 시스테인(cysteine) 잔기 및 채우는 소수성 구멍을 위한 원자-수준 세부사항을 제고하였고 미묘하게 상이한 "선융합(prefusion)" F 입체형태를 드러냈다. 모두 마우스 및 비인간 영장류에서- RSV F의 위치 Ø-안정된 변이로 예방접종은 자체의 후융합(postfusion) 상태에서 RSV F에 의해 유도되는 것 보다 3-15-배 높은 RSV-특정 중화하는 활성을 유도한다. 따라서 초대형 바이러스 취약성 존재하기 위한 원자-수준 디자인은 백신 발달 상에 변형의 영향을 가질 수 있다.

[0961] **도입.** 호흡기세포융합바이러스 (RSV)는 어린이 1개월-1년 연령에서 6.7% 사망에 책임이 있는 것으로 평가되고 인플루엔자 바이러스로 감염하여 원인이 되는 것과 비교한 수준에서 연장자에서 초과 사망의 원인이 된다. 비록 RSV 감염이 보호 면역을 완전히 유도하지 안지만, RSV 융합 (F) 글리코단백질에 대한 항체는 F-직접적 항체, 팔리비주맙(palivizumab) (Synagis®)를 가지는 소극적 예방에 의해 나타낸 것으로서 인간에서 심각한 질병을 방지할 수 있다.

[0962] 팔리비주맙(palivizumab)의 증명된 성공은 보호 RSV F-직접 항체를 유도하는 것에서 목적된 백신 노력에 박차를 단다. 상기 노력은 적어도 2개 입체형태를 가정하는 유형 I 융합 단백질, RSV F의 구조 다양성에 의해 복잡하게 된다: 준안전성 선융합(prefusion) 상태 및 안정한 후융합(postfusion) 상태. 모두 상태는 팔리비주맙(palivizumab)의 것을 포함하는, 중화 항체에 의해 표적되는 항원결정기를 나누고 후융합(postfusion) RSV F는 백신 후보로서 개발된다. 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 자연적 감염에 의해 유도되는 RSV-중화하는 항체의 우성 표적은 RSV의 선융합(prefusion) 입체형태 상에서 주요 잔기로 발견되었고, AM22와 같은 항체, 및 D25는 (참조, 예를 들면, 미국 12/600,950, 및 미국 12/898,325) 선융합(prefusion) - 팔리비주맙보다 실질적으로 더욱 강력한 - 선융합(prefusion) RSV F 삼량체의 멤브린-먼 부위 꼭대기에서 위치된, 선융합 F에 특정한 준안전성 위치, 표적 항원 위치 Ø으로 발견되었다.

[0963] 상기 강력한 항체를 유도하는 것을 증강하기 위하여, RSV F의 조작된(engineered) 수용성 변이는 항원 위치 Ø에 안정적 노출하도록 디자인되었다. 상기 변이는 항원적으로 및 크리스탈로그래프로 모두 특징화되고, 마우스 및 비인간 영장류에서 면역원성에 대해 테스트되었다. 결과는 디자인, 항원성, 구조, 및 면역원성 사이에 상호작용으로 통찰을 제공하였고 적절한 항원표적이 보존 및 존재하도록 구조-기반 조작이 어떻게 보호체액반응의 유도에 변화 영향을 가질수 있는지 나타낸다.

[0964] 본 명세서에 설명된 구조-기반 백신 전략은 4 단계 전략을 포함한다: (1) 강력한 중화 활성을 가지는 항체에 의해 표적되는 초대형 바이러스 취약성을 확인하는 것, (2) 대표 항체를 가지는 복합체에서 초대형 구조를 결정하기, (3) 인식 항체의 부재에서 초대형의 안정한 표현을 조작하기, 및 (4) 초대형으로 존재하는 조작된(engineered) 항원의 예방접종을 통하여 높은 적정농도 보호 반응을 유도하는 것(도 26).

[0966] **RSV F 항원의 조작**

[0967] 유별나게 강력한 RSV-중화 항체에 의해 인식때문에, 항원 위치 Ø는 표적 초대형으로서 선택된다; D25 항체를 가지는 복합체에서 자체 구조는 본 명세서에서 설명된다(도 26B). 위치 Ø에 안정적으로 존재하는 RSV F의 변이를 조작하기 위하여, D25에 결합된 RSV F의 구조는 분석되었다. 기계론적으로, 단백질 입체형태를 안정하는 다수의 방법이 있다. 의심받을 만한 자체 인식없이 위치 Ø을 안정시키는 기전은 RSV F 엑토도메인의 C-말단에 첨부된(McLellan et al., J. Virol. 85, 7788 (2011)) T4-파지(phage) 피브리틴(fibritin) 삼량체화

(trimerization) 도메인 (“foldon”) 으로 상기 조합으로 테스트되었다(Efimov et al., J Mol Biol 242, 470 (1994); Boudko et al., European journal of biochemistry / FEBS 269, 833 (2002)).

[0968] 시스테인(cysteine) 쌍 도입은 표적 입체형태, 그러나 대안적 입체형태에서 넓게 분리되는에 것에서 디설피드 결합을 형성하는 것을 예상된 구조를 안정적으로 선별하는 하나의 방법이다. 세린(serine) 잔기 155 및 290의 탄소는 D25-결합되 RSV F 구조에서 4.4 Å 떨어져 있고(참조 실시예 1) 후융합(postfusion) 구조에서 124.2 Å떨어져 있다(McLellan et al., J. Virol. 85, 7788 (2011; 상기 설명된 및 see 도 27 및 32). “DS”러고 불리는, S155C-S290C 이중 돌연변이체는 보유된 항원 위치 Ø, 1.4 mg/L에서 발현되는, 안정한 RSV F 삼량체를 형성하고, 음성 계통 EM에 의해 판단되는 것으로서 동질적이다(상기 설명된; 도 31, 도 33 참조). 선- 및 후융합(postfusion) 상태 모두(예를 들면 S403C 및 T420C)와 양립할 수 있는 RSV F의 영역 사이에 것과 같은, 다른 시스테인 수정은 항원 위치 Ø를 안정 하지 않는다(도 31). 다수의 강력한 사이-서브유닛(inter-subunit) 이중 시스테인 수정은 또한 테스트되었고; 그러나, 테스트된 사이-서브유닛(subunit) 이중 시스테인 대체의 어느것도 0.1 mg/L 이상 발현되지 않았다.

[0969] 구멍(cavity)-채우는 소수성 대체는 선별 입체형태를 안정하는 다른 수단을 제공한다. D25-결합된 RSV F 구조는 선- 및 후융합(postfusion) F 상태에서 다른 영역에 인접해 있는 RSV F의 D25-결합된 입체형태에 고유한 소수성 구멍에 대해 분석하였다. 다수의 구멍은 D25의 결합하는 위치에 가까운, 선융합(prefusion) 구조의 멤브린-먼 부위 “head”에서 확인되었고, 상기 구멍을 채우기 위하여 소수성 변형을 모델되었다. S190F 및 V207L 변형은 최소 분쟁으로 일반적인 측쇄 입체형태를 채택하였고, 반면에 K87F, V90L, V220L 및 V296F 변형은 낮은 입체의 적합성을 나타냈다. 변화하는 쌍을 가지는 채우는 상기 구멍은 평가되었다. “Cav1”로 명명된 S190F-V207L 쌍은(도 27), 안정한 RSV F 삼량체를 형성하고, 2.2 mg/L에서 발현되고, 항원 위치 Ø를 보유하였다(retained) (도 31). 그 동안에, K87F-V90L, S190F-V296F 및 V207L-V220L 변이체(variants)는 D25 인식의 증강된 보유, 그러나 RSV F 삼량체의 0.1 mg/l 산출 미만을 나타냈다(도 31).

[0970] 선융합 RSV F의 중심을 향하여 다른 구멍은 융합 펩타이드, 삼량체(trimer) 축, 및 잔기 Asp486, Glu487, 및 Asp489을 포하하는 산 부분(acidic patch)에 가깝다. 다수의 구멍(cavity)-채우는 변형은 F137W, F140W, 및 F488W을 포함하여 모델되고, D486H, E487Q, 및 D489H의 조합으로 상기 변형을 분석하였다(도 31). 테스트된 6개 조합 중에서, 단지 2개 (F488W 및 D486H-E487Q-F488W-D489H)가 0.1 mg/l보다 큰 정제된 RSV F 삼량체 수준에서 발현되었고 D25 인식을 보유하였다. D486H-E487Q-F488W-D489H 변이(variant)는 “TriC”로 디자인되고, 안정한 RSV F 삼량체를 형성하고, 0.8 mg/l에서 발현되고, 항원 위치 Ø를 보유하였다(도 31, 도 27).

[0971] 항원 위치 Ø의 보존에서 후융합(postfusion) 입체형태를 불안정하는 영향이 또한 테스트되었다. F의 후융합(postfusion) 입체형태가 아닌 선융합을 양립할 수 있는 N-연결된 글리칸을 도입하는 것으로 예측된, V178N은 안정 항원 위치 Ø를 나타나는 것같지 않고, 글루탐산(glutamic acid) 또는 라이신(lysine)을 후융합(postfusion) 6개-헬릭스 번들의 내부로 위치하는, 역시 V185E 또는 I506K도 나타나지 않는 것 같다(도 31). 상기 돌연변이는 “triggered”되나 후융합(postfusion) 입체형태를 채택하지 않는, RSV F의 일부 중간 입체형태에서 초래하는 것 같다. 모두에서, 100 RSV F 변이 이상은 구성되었고, 96-웰 형질감염 포맷에서 발현되고(Pancera et al., PLoS 하나 8, e55701 (2013)), D25 및 모타비주맙(motavizumab)에 결합하기 위해 ELISA에 의해 테스트되었다. 15개 구성체는 D25 결합과 양립할 수 있고, 4℃에서 적어도 7 일동안 D25 인식을 보유한 6개, 및 상기의 3개는 항원 위치 Ø를 보유된 동질적 삼량체로 정제될 수 있다(도 31). 전반적으로, 강한 상관관계가 96-웰 상등액에서 4℃에서 적어도 7 일동안 D25 결합의 보유 와 큰 규모 발현 및 정제로부터 정제된 삼량체 사이에 관찰되었다(도 34).

[0974] ***위치 Ø 안정성의 조합 최적화**

[0975] DS, Cav1, 및 TriC 변이는 다양한 물리적 및 항원적 성질을 나타냈다. DS 변이(variant)는 극도의 pH 및 온도에 최소한 안정하였으나, 삼량체 상태에서는 더욱 영구적으로 안정되었고, 반면에 응집하기 위하여 삼량체(trimer)로부터 불변 교환은 Cav1 및 TriC에 대해서 관찰되었다. RSV F의 더욱 최적의 변이(variant)가 DS, Cav1, 및 TriC를 조합하여 얻을 수 있는지 평가하기 위해서, 모든 조합이 만들어졌다.

[0976] 조합은 극도의 물리적에 대해 D25 재활성의 보유를 일반적으로 개선한다. 따라서, 예를 들면, 모든 조합은 50℃ 또는 pH 10.0에서 배양에 대해 개선된 안정성을 나타냈다. 그러나, TriC에 의해 나타나는 냉동-해동에 대한

낮은 내성은 Cav1-TriC 및 DS-Cav1-TriC 모두에서 관찰되었다. 전반적으로, DS-Cav1 조합은 삼량체(trimer) 산출 면에서 최적 및 극도의 of 온도, pH, 삼투압(osmolality), 및 냉동-해동에 대해 물리적 안정성을 나타냈고(도 31, Fig 35), 음성 계통 EM에 의해 판단으로서 동질적이었다(도 33).

[0978] **크리스탈로그래프 분석**

[0979] 원자-수준 피드백을 제공하기 위하여, 위치 Ø의 크리스탈 구조- RSV F의 안정된 변이를 결정하였다(도 28). DS, Cav1, DS-Cav1 및 DS-Cav1-TriC 변이체 모두는 유사한 1.5 M 타르타르산염(tartrate) pH 9.5 조건에서 크리스탈화되고, 상기 입방(cubic) 크리스탈은 각각 3.1 Å, 3.1 Å, 3.8 Å 및 2.8 Å 해상도에 X-선을 회절하였다(도 40). 분자 교체 용액을 수색모델로서 D25-결합된 RSV F 구조를 사용하여 얻었고, 상기는 크리스탈로그래프 3배(threefold)을 따라 정렬된 삼량체 F 축으로, 비대칭 유닛에서 단일 RSV F 프로모터를 드러냈다. Cav1의 4각형(Tetragonal) 크리스탈 및 DS-Cav1의 입방(cubic) 크리스탈을 1.7 M 암모늄 설페이트 pH 5.5 조건로부터 얻었고, 상기는 각각 2.4 Å 및 3.0 Å의 해상도에 대하여 회절하였다(도 40). 분자 교체는 비대칭 유닛에서 전체 RSV F 삼량체(trimer)를 가지고 타르타르산염(tartrate) 입방(cubic) 격자와 높게 관련된 4각형(Tetragonal) 격자(lattice)를 드러냈다. 전반적으로 상기 구조는 D25-결합된 입체형태에서 실질적으로 조작된(engineered) RSV F 변이체를 드러냈다(조작된(engineered) RSV F 변이체는 0.68-1.5 Å 사이에 D25-결합되 입체형태로부터 및 대략 30 Å의 후융합(postfusion) 입체형태로부터 C-root mean square deviation을 가졌다).

[0980] 비록 DS 변이 (도 28, 가장 왼쪽 컬럼)의 구조가 후융합(postfusion) 상태에 기폭(triggering)을 크게 방지하는 디설피드 결합을 정말로 형성하는 155 및 290에서 시스테인(cysteine) 치환된 잔기를 가지는, 수용성 삼량체로서 안정하지만, 항원 위치 Ø을 포함하는, SV F 삼량체 멤브린-먼 부위 일부의 대다수는 상이한 입체형태에서 혼란되거나(잔기 63-72 및 169-216) 또는 상이한 입체형태였다. 따라서, 예를 들면, DS 구조에 있는 잔기 160-168은 턴(turn)을 형성하고 25-결합된 F 구조에서 α3-헬릭스로서 개시하는 대신에 α2-헬릭스를 연장하였다(도 28B, 가장 왼쪽 패늘). DS 구조 와 D25-결합된 RSV F 구조 사이에 차이에 대한 하나의 비제한적 설명은 크리스탈화된 DS가 결합 D25와 결합하지 않는 입체형태로 있다는 것이다. 전반적으로 DS 변이는 삼량체 구멍(trimeric cavity)의 내부에서 융합 펩타이드를 포함하는, RSV F의 선융합(prefusion) 상태의 많은 특성을 보유하였다.

[0981] DS와 비교하면, Cav1 구조 (도 28, 두번째 및 세번째 컬럼)은 명확히 정의된 α3-헬릭스, β3/β4 헤어핀, 및 α4-헬릭스를 가지는, 멤브린-먼 부위 꼭대기에서 더욱 순서되었다. S190F 대체를 포함하는 잔기 137-202는 D25-결합된 F 구조와 비교하였을 때, 0.6 Å의 Cα-rmsd를 가졌다. 구조 순서의 높은 정도는 D25-결합된 F 구조에서 관찰된 구멍을 채우는 S190F 돌연변이에 기인하는 것 같고, 잔기 Ile57, Lys176, Val192, Glu256, Ser259 및 Leu260로 van der Waal's 접촉이 증가하였다. Cav1에서 다른 구멍(cavity)-채우는 돌연변이, V207L,는 Pro205 근처 뒤틀린 α4-헬릭스의 C-말단 일부를 가지고 2개 크리스탈화 조건에서 구별되는 입체형태를 채택하는 D25-결합된 F 구조와 비교하여 5.5Å 이동하였다(도 28B, 왼쪽으로부터 두번째 및 세번째 패늘).

[0982] 4각형(Tetragonal) 크리스탈 격자(lattice)에서 Cav1 구조의 두드러지는 특성은 F2의 C-말단이고, 이것은 Cav1가 아닌, D25-결합된 F 구조에서 비정렬되어있고, 융합 펩타이드을 끼고 삼량체(trimeric) 구멍으로 터널을 뚫는다. 흥미롭게도, C-말단은 퓨린(furin) 위치 (Arg106-Ala107-Arg108-Arg109)의 절단 후에 예상되는 것으로서, Arg109가 아닌 Ala107로 끝난다. Cav1 구조에서, Arg106의 양전하는 정렬된 설페이트이온(ordered sulfate ion)에 의해 오프셋(offset)이다(도 28C). 생물학적으로, F2 C-말단의 내부 위치는 선융합(prefusion) F 입체형태의 기폭(triggering) 에서 역할을 한다.

[0983] 2개 4각형(Tetragonal) 크리스탈로부터 DS-Cav1 구조의 비교는 단지 최소 차이를 드러낸 Cav1의 것을 형성한다(도 28, 오른쪽로부터 두번째 및 세번째 컬럼)(암모늄 설페이트 조건에서 성장하는 Cav1와 DS-Cav1 사이의 잔기에 대한 0.86 Å의 Cαrmsd ; 입방(cubic) 격자(lattice)에서 447 잔기에 대한 0.47의 Cαrmsd). 가장 큰 차이는 잔기 64-73 및 203-216에서 특정적으로 항원 위치 Ø를 포함하는, RSV F 꼭대기에서 발생하였다. 특히, 원자 이동성(mobility) (B-factor)은 아마도 본질적(intrinsic) 위치 Ø 유연성을 가리키는, 위치 Ø-안정된 변이의 노두에 대해 꼭대기 영역에서 가장 높다. 그러나, 흥미롭게도, 위치 Ø는 D25에 의해 결합될 때 전반적으로 및 국소 RSV F 입체형태 모두를 안정하기 위하여 D25의 능력을 드러낸다.

[0984] DS-Cav1-TriC 3중(triple) 조합(도 28, 오른쪽 컬럼에서 먼)의 구조는 다른 Cav1-포함하는 RSV F 변이(variant) 구조에 유사성에 높다. 그러나, 전자밀도에서 하나 차이는 T4-fibritin 삼량체화(trimerization)

도메인(Stetefeld et al., Structure 11, 339 (2003))의 면적에 해당되는, 멤브린-몸 중심에 가까운 영역에서 약한 농도의 지출에 해당되고, 이것은 D25-결합 구조를 포함하는, 이 도메인인 포함된 다른 크리스탈화된 RSV F 구조에서 육안으로 보이지 않는다. 포장에서 작은 구조의 차이는 DS-Cav1-TriC 안정된 RSV F와 this 삼량체화(trimerization) 도메인사이에 상호작용에서 차이보다 우선, 이 도메인의 부분적 순서에 대하여 허용하는 것 같다(다른 입방(cubic) 변이에 관하여 DS-Cav1-TriC 크리스탈의 자체 증가된 회절 제한에 대하여 해명할 수 있다).

[0985] 잔기 486-489의 TriC 변형의 기간에서, 중요한 F488W 대체는 RSV F 삼량체(trimer)의 이웃하는 프로토머의 F488W 대체에 대하여 직접적으로 팩되었다(packed). Trp488의 인돌(indole) 측쇄는 삼량체(trimer) 꼭대대기를 향하여 지적되고 융합 펩타이드의 140Phe의 측쇄를 가지는 고리-무더기(ring-stacking) 상호작용을 형성한다(도 28C, 오른쪽 패늘에 떨어진). 임의의 Phe488-포함하는 구조에서 관찰되지 않은, 융합 펩타이드 상호작용은 선융합(prefusion) 삼량체(trimer) 구멍으로부터 융합 펩타이드의 추출물을 억제하는 것 같고, RSV F의 선융합(prefusion) 상태를 안정하는 F488W 변형의 능력에 대한 합리적인 구조를 제공한다(도 31).

[0987] **항원 위치 Ø-안정된 RSV F의 면역원성**

[0988]

Name	Concept	Back-ground		Mutations	SEQ ID NO
Non-cleavable Foldon					
BZGJ9-1	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			G linker between residue 105 to 145	698
BZGJ9-2	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			GG linker between residue 105 to 145	699
BZGJ9-3	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			GQG linker between residue 105 to 145	700
BZGJ9-4	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			GGSG (Seq_1443) linker between residue 105 to 145	701
BZGJ9-5	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			GGSG (Seq_1443) linker between residue 105 to 145	702
BZGJ9-6	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			GGSG (Seq_1443) linker between residue 105 to 145	703
BZGJ9-7	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			GGSGGS (Seq_1444) linker between residue 105 to 145	704
BZGJ9-8	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			GGSGGSG (Seq_1445) linker between residue 105 to 145	705
BZGJ9-9	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			Fusion of residue 103 to 145	706
BZGJ9-10	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			GS linker between residue 103 to 145	707
Cleavable Foldon					
scRSVF9aCCextxFd	Inter-DS	BZGJ9a (SeqID 669 w/o DSCav1 mut.)	xFd	512CChnvnagkstt	708
scRSVF9aC485C494xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	485C, 494C	709

scRSVF9aC519C520extxFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	512LLhnvnaCCstt	710
scRSVF9aC99C362xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	99C, 362C	711
scRSVF9aC99C361xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	99C, 361C	712
scRSVF9aC153C461xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	153C, 461C	713
scRSVF9aC102C359xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	102C, 359C	714
scRSV F 9axFd	xFd	BZGJ9a	xFd	512LLSAI	715
scRSV F 9aextxFd	xFd	BZGJ9a	xFd	512LLhnvnagkstt	716
Ferritin Particles - No Foldon					
OpFer1	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	S190V	717
OpFer2	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	K226L	718
OpFer3	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	T58I, A298M	719
OpFer4	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	S190V, K226L	720
OpFer5	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	S190V, T58I, A298M	721
OpFer6	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	K226L, T58I, A298M	722
OpFer7	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	T58I, A298M, S190V, K226L	723
OpFer8	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	Cav1	724
OpFer9	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	NoMutationsSC9a	725
OpFer10	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	S190V with optimized coil coil - 8aa linker	726
OpFer11	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	S190V With CC and optimized coiled coil - 8aa linker	727
OpFer12	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	S190V FIRKSDELLSAIGGYIPSAPSGSG-Fer	728
OpFer13	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	S190V SC-Foldon-8aa-Fer	729
OpFer14	ES of RSV F	BZGJ9a	Fer	S190V optimized leader	730
Non-cleavable Foldon					
OpFd1	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	S190V	731
OpFd2	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	K226L	732
OpFd3	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	T58I, A298M	733
OpFd4	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	S190V, K226L	734
OpFd5	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	S190V, T58I, A298M	735
OpFd6	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	K226L, T58I, A298M	736
OpFd7	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	T58I, A298M, S190V, K226L	737

[0989]

[0990]

OpFd8	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	S190F, V207L	738
OpFd9	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	NoMutationsSC9a	739
OpFd10	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	S190V with optimized coil coil	740
OpFd11	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	S190V With CC and optimized coiled coil	741
OpFd14	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	S190V optimized leader	742
OpFd14	ES of RSV F	BZGJ9a	Fd	S190V optimized leader	743
Cleavable Foldon					
scRSVF9a 74C218C xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	74C, 218C	744
scRSVF9a 146C460C xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	146C, 460C	745
scRSVF9a 149C458C xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	149C, 458C	746
scRSVF9a 374C454C xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	374C, 454C	747
scRSVF 74C218C xFd	Inter-DS	SEQ_669 (BZGJ9 DSCav1)	xFd	74C, 218C	748
scRSVF 146C460C xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	146C, 460C	749
scRSVF 149C458C xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	149C, 458C	750
scRSVF 374C454C xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	374C, 454C	751
scRSVF9 C485C494xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	485C, 494C	752
scRSVF9 C519C520extxFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	519C, 520C	753
scRSVF9 C99C362xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	99C, 362C	754
scRSVF9 C99C361xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	99C, 361C	755
scRSVF9 C153C461xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	153C, 461C	756
scRSVF9 C102C359xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	102C, 359C	757
Non-Cleavable Foldon					

BZGJ9pi I217W	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	I217W	758
BZGJ9pi I221W	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	I221W	759
BZGJ9pi D486F	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	H486F	760
BZGJ9pi T400F	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	T400F	761
BZGJ9pi V278F	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	V278F	762
BZGJ9pi Q224D,L78K	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	Q224D, L78K	763
BZGJ9pi I217W, I221W	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	I217W, I221W	764
BZGJ9pi I217W, I221W, L78F	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	I217W, I221W, L78F	765
GSJscINT_1	SC RSV F	DSCAV1	Fd	F2 linked to full fusion peptide by (Gly)n linker	766
GSJscINT_2	SC RSV F	DSCAV2	Fd	F2 linked to full fusion peptide by (Gly)n linker	767
GSJscINT_3	SC RSV F	DSCAV3	Fd	F2 linked to full fusion peptide by (Gly)n linker	768
GSJscINT_2 F488W	SC RSV F	DSCAV4	Fd	F2 linked to full fusion peptide by (Gly)n linker	769
GSJscINT_1 Q354A	SC RSV F	DSCAV5	Fd	F2 linked to full fusion peptide by (Gly)n linker	770
GSJscINT_MBE	SC RSV F	DSCAV6	Fd	F2 linked to full fusion peptide by (Gly)n linker	771
GSJscINT_2 F488Wsh	SC RSV F	DSCAV7	Fd	F2 linked to full fusion peptide by (Gly)n linker	772
GSJscINT_1 F488Wsh	SC RSV F	DSCAV8	Fd	F2 linked to full fusion peptide by (Gly)n linker	773
BZGJ9-11	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GS linker between 102 to 145	774

[0991]

BZGJ9-12	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GS linker between 101 to 145	775
BZGJ9-13	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GS linker between 100 to 145	776
BZGJ9-14	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GS linker between 99 to 145	777
BZGJ9-15	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GS linker between 98 to 145	778
BZGJ9-16	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GS linker between 97 to 145	779
BZGJ9-17	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GGSG linker between 103 to 145	780
BZGJ9-18	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GGSGG linker between 103 to 145	781
BZGJ9-19	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GGSGGSG linker between 103 to 145	782
BZGJ9-20	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	GGSGN linker between 103 to 145	783
BZGJ9-21	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	N linker between 102 to 145	784
BZGJ9-22	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	ISSTSAIGS linker between 96 to 145	785
BZGJ9-23	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	VTSTSAIGS linker between 96 to 145	786
BZGJ9-24	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	NSALSAIGS linker between 96 to 145	787
BZGJ9-25	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	ISSTTSTGS linker between 96 to 145	788
BZGJ9-26	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	VTSTTSTGS linker between 96 to 145	789
BZGJ9-27	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	NSALSSTGS linker between 96 to 145	790
BZGJ9-28	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	ISSTSAIVGGS linker between 96 to 145	791
BZGJ9-29	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	VTSTSAITGGS linker between 96 to 145	792

[0992]

[0993]

BZGJ9-30	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	NSALSATGGS linker between 96 to 145	793
BZGJ9-31	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	LISSTTSTVGGS linker between 96 to 145	794
BZGJ9-32	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	VTSTTSTTGGS linker between 96 to 145	795
BZGJ9-33	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	NSALSSTGGS linker between 96 to 145	796
Lumazine Synthase Particles					
BZGJ10-DSCav1-LS	Monomer RSV F SC on LS		LS	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	797
BZGJ10-DSCav1 DEF-LS	Monomer RSV F SC on LS		LS	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	798
BZGJ11-DSCav1-LS	Monomer RSV F SC on LS		LS	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	799
BZGJ11-DSCav1-SS-LS	Monomer RSV F SC on LS		LS	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	800
Non-cleavable Foldon, with Pep27					
A2-PP1	SC w/o furin sites to maintain pep27		Fd	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	801
B18537-PP1	SC w/o furin sites to maintain pep27		Fd	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	802
A2-DS-Cav1-PP1	SC w/o furin sites to maintain pep27		Fd	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	803
B18537 DS-Cav1-PP1	SC w/o furin sites to maintain pep27		Fd	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	804
A2-DS-Cav1-PP1-dFold	SC w/o furin sites to maintain pep27		Fd	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	805
B18537 DS-Cav1-PP1-dFold	SC w/o furin sites to maintain pep27		Fd	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	806

A2-DS-Cav1-PP1-GCN4	SC w/o furin sites to maintain pep27		Fd	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	807
B18537 DS-Cav1-PP1-GCN4	SC w/o furin sites to maintain pep27		Fd	SEKS Furin site I and SEKSGS Furin site II	808
BZGJ9-dscav1 N155Q	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL		Fd	Removal of introduced glycan site on BZGJ9-DS-Cav1 (SEQ ID:669 located in the linker region on Asn 105	809
BZGJ9-DS-Cav1-FerritinHis	Add Histidines to Ferr to improve expression and purification		Fd	Introduction of six His residues to the Ferritin molecule to enable purification of RSV F molecules in the Ferritin context without using His-tag or Strep-Tag sequences.	810
Additional constructs					
B18537-BZGJ9-9	B18537 strain		Fd	Single chain RSV F subtype B (strain B18537)with direct fusion of residue 103 to 145	811
B18537-BZGJ9-10	B18537 strain		Fd	Single chain RSV F subtype B (strain B18537)with GS linker between residue 103 to 145	812
B1-BZGJ9-9	B1 strain		Fd	Single chain RSV F subtype B (strain B1) with direct fusion of residue 103 to 145	813
B1-BZGJ9-10	B1 strain		Fd	Single chain RSV F subtype B (strain B)with	814

[0994]

				GS linker between residue 103 to 145	
BZGJ9ext-9			xFd	Single chain RSV F DS-Cav1 (BZGJ9 #669)with direct fusion of residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the Thrombin-His-Strep tags.	815
BZGJ9ext-10			xFd	Single chain RSV F DS-Cav1 (BZGJ9 #669)with GS linker between residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the Thrombin-His-Strep tags.	816
B18537-BZGJ9ext-9	B18537 strain		xFd	Single chain RSV F DS-Cav1 (subtype B (strain B18537) with direct fusion of residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the Thrombin-His-Strep tags.	817
B18537-BZGJ9ext-10	B18537 strain		xFd	Single chain RSV F DS-Cav1 (subtype B (strain B18537) with GS linker between residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after	818

[0995]

				L513 and prior to the Thrombin-His-Strep tags.	
B1-BZGJ9ext-9	B1 strain		xFd	Single chain RSV F DS-Cav1 (subtype B (strain B1) with direct fusion of residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the Thrombin-His-Strep tags.	819
B1-BZGJ9ext-10	B1 strain		xFd	Single chain RSV F DS-Cav1 (subtype B (strain B1) with GS linker between residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the Thrombin-His-Strep tags.	820
BZGJ9extxFd-9				Single chain RSV F DS-Cav1 (BZGJ9 #669)with direct fusion of residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the cleavable Foldon and Thrombin-His-Strep tags.	821

[0996]

BZGJ9extxFd-10				Single chain RSV F DS-Cav1 (BZGJ9 #669)with GS linker between residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the cleavable Foldon and Thrombin-His-Strep tags.	822
B18537-BZGJ9extxFd-9	B18537 strain			Single chain RSV F DS-Cav1 (subtype B (strain B18537) with direct fusion of residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the cleavable Foldon and Thrombin-His-Strep tags.	823
B18537-BZGJ9extxFd-10	B18537 strain			Single chain RSV F DS-Cav1 (subtype B (strain B18537) with GS linker between residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the cleavable Foldon and Thrombin-His-Strep tags.	824

[0997]

B1-BZGJ9extxFd-9	B1 strain			Single chain RSV F DS-Cav1 (subtype B (strain B1) with direct fusion of residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the cleavable Foldon and Thrombin-His-Strep tags.	825
B1-BZGJ9extxFd-10	B1 strain			Single chain RSV F DS-Cav1 (subtype B (strain B1) with GS linker between residue 103 to 145 and an elongation of the C-terminus adding residues hnvnagkstt after L513 and prior to the Thrombin-His-Strep tags.	826
BZGJ9-CS1				Single chain RSV F with linker MTSVLHRFDTDAF between 96 and 150	1474
BZGJ9-CS2				Single chain RSV F with linker MTSVLWFGDTDAFA between 96 and 150	1475
BZGJ9-10-GSJCCtail5xFd			xFd	Single chain RSV F based on sequence #707 with C-terminalsequence CChnvnaqksttnGGLVPRGS encoding disulphide bonds and cleavable foldon	1476

[0998]

BZGJ9-10-GSJCCtail6xFd			xFd	Single chain RSV F based on sequence #707 with C-terminalsequence LLhnvnaCCsttnGGLVPRGS encoding disulphide bonds and cleavable foldon	1477
BZGJ9-10-GSJCCtail9xFd			xFd	Single chain RSV F based on sequence #707 with C-terminal sequence CChnvnaCCsttnGGLVPRGS encoding disulphide bonds and cleavable foldon	1478
BZGJ9-9-DS-Cav1-Ferritin				RSV F single chain BZGJ9-9 (#706) with Fusion of residue 103 to 145in the Ferritin context	827

[0999]

				residue 103 to 145in the Ferritin context	
BZGJ9-10-DS-Cav1-Ferritin				RSV F single chain BZGJ9-10 (#707) GS linker between residue 103 to 145	828
BZGJ9-DS-Cav1-LongLink-Ferritin				RSV F single chain BZGJ9 (#669) in the Ferritin context with a long linker from the RSV F C-terminus to the Ferritin N-terminus	1429
BZGJ9-9-DS-Cav1-LongLink-Ferritin				RSV F single chain BZGJ9-9 (#706) with Fusion of residue 103 to 145 in the Ferritin context with a long linker from RSV C-terminus to Ferritin N-terminus	1430
BZGJ9-10-DS-Cav1-LongLink-Ferritin				RSV F single chain BZGJ9-10 (#707) GS linker between residue 103 to 145 in the Ferritin context with a long linker from RSV C-terminus to Ferritin N-terminus	1431
BZGJ9-DS-Cav1-LongLinkFerritinHis	Add Histidines to Ferr to improve expression and purification			RSV F single chain BZGJ9 (#669) in the Ferritin context with a long linker from the RSV F C-terminus to the Ferritin N-terminus with added histidines to the Ferritin molecule to	1432

[1001]

				facilitate purification of Ferritin nanoparticles without the use of His or Strep-tags.	
BZGJ9-IG1	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			ARLLGSGSG linker from 96 to 147	1433
BZGJ9-IG2	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			ARLLGGSG linker from 96 to 147	1434
BZGJ9-IG3	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			ARLLGGSG linker from 96 to 148	1435
BZGJ9-IG4	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			LARLLGSG linker from 96 to 147	1436
BZGJ9-IG5	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			mqstGGSG linker from 96 to 147	1437
BZGJ9-IG6	SC BZGJ9-DS-Cav1 w/IL			aqstGGSG linker from 96 to 147	1438
B18537-BZGJ9-9-LongLink-Ferritin	B18537 strain			RSV F single chain BZGJ9-9 (#811) with Fusion of residue 103 to 145 in the Ferritin context with a long linker from RSV C-terminus to Ferritin N-terminus	1439
B18537-BZGJ9-10-LongLink-Ferritin	B18537 strain			RSV F single chain BZGJ9-10 (#812) GS linker between residue 103 to 145 in the Ferritin context with a long linker from RSV C-terminus to Ferritin N-terminus	1440

[1002]

B1-BZGJ9-9-LongLink-Ferritin	B1 strain			RSV F single chain BZGJ9-9 (#813) with Fusion of residue 103 to 145 in the Ferritin context with a long linker from RSV C-terminus to Ferritin N-terminus	1441
B1-BZGJ9-10-LongLink-Ferritin	B1 strain			RSV F single chain BZGJ9-10 (#814) GS linker between residue 103 to 145 in the Ferritin context with a long linker from RSV C-terminus to Ferritin N-terminus	1442

[1003]

[1004] 단백질 산출은 몇 개의 재조합 F 단백질의 계산되었고 표 27 하기에 나타냈다.

[1005] [표 27] 재조합 RSV F 단백질 발현의 산출

[1006]

Construct Name	Yield (mg/L)	SEQ ID NO
scRSVF9aCCextxFd	12.7	708
scRSVF9aC485C494xFd	4.1	709
scRSVF9aC419C420extxFd	11.4	710
scRSVF9aC99C362xFd	2.2	711
scRSVF9axFd	15.7	715
scRSVF9aextxFd	29.6	716
GSJscINT_1	0.84	766
GSJscINT_3	0.9	768

[1008] **실시예 11**

[1009] **DSCav1 돌연변이를 가지는 B18537 계통(strain)으로부터 RSV F 단백질의 구조**

[1010] 상기 실시예는 RSV 하위유형을 가로질러 DSCav1 대체를 안정시키는 RSV 단백질의 유사성을 설명한다. DSCav1 대체는 B18537 계통(strain)로부터 RSV F 단백질로 도입되었다. C-말단 접히는(foldon) 도메인을 포함하는, 얻어진 재조합 단백질의 3차 구조는 상기 설명된 것과 같은 유사한 방법을 사용하여 해결되었다. 도 59-62에 나타낸 바와 같이, DSCav1 대체는 선융합(prefusion) 특정 항체에 특정적으로 결합하는 하위유형 B 백그라운드 상에 DSCav1 돌연변이체를 생성하기 위하여 항원 위치 Ø를 안정하는 RSV F 글리코단백질 B 하위유형으로 성공적으로 도입될 수 있다. 하기의, 표 25는 RSV F 하위유형 B 상에 DSCav1 상에 크리스탈로그래프 데이타의 요약을 제공한다.

[1012] [표 25] DSCav1 하위유형 B를 관여하는 크리스탈로그래프 데이타

	RSV B18537 F
PDB accession code	
Data collection	
Space group	$P4_132$
Cell constants	
a, *b*, *c* (Å)	167.9, 167.9, 167.9
a, b, g (°)	90, 90, 90
Wavelength (Å)	1.00
Resolution (Å)	50.0-1.94 (2.01-1.94)
R_{merge}	10 (78.8)
I / sI	11.96 (1.12)
Completeness (%)	95.9 (79.7)
Redundancy	4.0 (2.4)
Refinement	
Resolution (Å)	1.94
Unique reflections	57,616
R_{work} / R_{free} (%)	18.71/21.52
No. atoms	
Protein	3552
Ligand/ion	5
Water	401
B-factors (Å^2)	
Protein	46.2
Ligand/ion	78.3
Water	53.2
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.009
Bond angles (°)	1.17
Ramachandran	
Favored regions (%)	96.18
Allowed regions (%)	3.82
Disallowed regions (%)	0

[1013]

[1015] **실시예 12**

[1016] **삼량체화(trimerization) 도메인 없이 재조합 RSV F 단백질의 디자인 및 생성**

[1017] 상기 실시예는 RSV F 단백질의 멤브린 몸 중심에 가까운 엽(lobe)의 안정성을 유지하기 위하여 C-말단 삼량체화(trimerization) 도메인을 포함하지 않는 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 재조합 RSV F 단백질의 디자인 및 생성을 설명한다.

[1018] 간단히, C-말단 삼량체화(trimerization) 도메인의 위치에서, 디설피드 결합의 링(ring)은 α10 헬릭스의 아미노산을 위한 시스테인(cysteine) 잔기를 대체하여 F_1 폴리펩타이드의 C-말단으로 도입된다. coil-coil을 위한 RSV F엑토도메인의 3개 α10 헬릭스는 단백질의 멤브린 몸 중심에 가까운 일부를 안정시킨다. 세포에서 발현될 때, 시스테인 사이에 프로모터 사이(inter-promoter) 디설피드 결합 형태는 α10 헬릭스로 도입되고, 따라서 가까운 근접에서 3개 α10 헬릭스를 "잠그다(locking)"고, 선-내지 후-융합 입체형태로부터 멤브린 몸 중심에 가까운 도메인의 이동을 방지한다. RSV F 단백질의 α10 헬릭스는 트랜스멤브린 도메인 (residue 529)에 잔기 492를 포함한다.

[1019] 상기 실시예에서, 시스테인(cysteine) 링(ring)을 안정하는 재조합 RSV F 단백질은 삼량체화(trimerization) 도메인을 포함하는 재조합 단백질로서 초기 발현된다. 삼량체화(trimerization) 도메인은 단백질 가수 분해적으로 제거되고 이후 초기 발현될 수 있다. 절단은 RSV F 단백질의 정제 전에, 후에, 또는 동안에 수행될 수 있다. 현재 우리는 12 시간 동안 상온에서 트롬빈(thrombin) 분해하고 크기-배제 크로마토그래프에 의해 RSV F 단백질로부터 접히는(foldon)의 분리하여, C-말단 His6 및 스트렙II 태그를 경유하여 tendem Ni2+ IMAC 및 스트렙tactin 고정 단계를 사용하여 RSV F 단백질을 정제한다. 이온 교환에 의해 절단된 RSV F 단백질을 정제하는 것이 가능하다.

[1020] 도 63-68은 젤 여과 결과 및 하기에 열거된 디자인과 같이 삼량체화(trimerization) 도메인없이 환원되거나 비환원된 몇개의 재조합 F 단백질의 PAGE 분석의 코마시에 블루 염색을 나타낸다. 표 22는 지시된 구성체의 항원 및 물리적 특성을 제공하고, 이것은 위치 525 및 526 (CC꼬리4xFd), 512 및 513 (CC꼬리5xFd), 519 및 520 (CC꼬리6xFd), 및 512 및 512 (CCLongxFd)에서 α10 헬릭스에서 DSCav1 대체, 및 시스테인(cysteine) 대체를 포함하는, 지시된 구성체의 항원 및 물리적 특성을 제공한다. 각각 구성체를 위한 해당 서열번호는 도 66에서 나타낸다.

[1022] [표 22] 조작된(engineered) RSV F 글리코단백질 변이의 항원 및 물리적 특성

	Physical characterization (Fractional D25 reactivity)						
	1 hour incubation Temp (°)		pH		Osmolality (mM)		10 times Freeze-thaw
Construct	50	70	3.5	10	10	3000	
GSJ CCtail 4x Fd Uncleaved	0.9	0.5	0.9	0.9	1.0	.08	0.3
GSJ CC tail 4x Fd Cleaved	0.9	0.4	0.9	1.0	1.0	0.7	0.4
GSJ CC tail 5x Fd Uncleaved	0.9	0.6	0.9	1.0	1.0	0.7	0.2
GSJ CC tail 5x Fd Cleaved	0.9	0.2	0.9	1.0	1.0	1.0	0.2
GSJ CCtail 6x Fd Uncleaved	0.9	0.4	0.9	0.9	1.0	0.7	0.2
GSJ CC tail6 xFd Cleaved	1.0	0.3	0.9	0.9	1.0	0.7	0.3
GSJ CC tail Long xFd Unleaved	0.9	0.1	0.7	0.8	0.8	0.6	0.1
GSJ CC tail Long xFd Cleaved	1.0	0.3	0.9	1.0	1.0	0.8	0.2

[1023]

[1024]

[1025] 삼량체화(trimerization) 도메인이 없거나, 또는 절단가능한 삼량체화(trimerization) 도메인을 가지는 몇가지 RSV F 단백질 서열은 디자인 접근의 표시 뿐만아니라, 표 23에서 열거된 서열번호로 제공된다. 명칭, α10 시스테인(cysteine) 링, C-말단 접히는(foldon) 또는 절단가능한 접히는(foldon)의 존재 또는 부재, 백그라운드 서열 (예를 들면, "DSCAV1" 구성체는 DSCav1 대체를 포함하는 것을 나타낸다), 디자인 컨셉트, 및 해당 서열번호가 지시된다. 표 23에서, 하기의 두문자어(acronyms)가 사용되었다: DSCAV1: S155C, S290C, S190F, V207L 대체; Op - Optimized coil coil; OpCC - Optimized Coil Coil with disulfides; InterC - Interprotomer disulfide at C-terminal helix; Multi-InterC - Multiple interprotomer disulfide stabilization; ECC: Enhanced coil-coil stability; FP-CC: Fusion peptide Cys bridge; 190P: 190 pocket alternative amino acid; Fd (non-cleavable Foldon), xFd (cleavable foldon), N (no Foldon); CFM: Cavity Filling mutation; ICFM: Interface cavity filling mutations

[1026] 표 23에 열거된 절단가능한 삼량체화(trimerization) 도메인이 없거나 또는 가지는 재조합 RSV F 단백질은 단백질이 실시예 9에서 상기 설명된 바와 같이 세포 배지에서 세포로부터 배출되는 경우인 조건하에서 세포에서 발현되었다. 각각 구성체는 분비 시스템으로 진입하고 및 배출되는 단백질을 일으키는 리더 서열을 포함한다.

배지는 원심분리되고 상등액은 위치 Ø 특정 항체 D25및 the 위치 II 특정 항체 모타비주맙(motavizumab)에 결합하는지 항원성 테스트를 위해 사용되었다(“Mota”, 도 69A-69E). 테스트된 조건은 0일에 결합하는 D25 및 Mota(조건 1 및 2), 1 시간 동안 70℃에서 배양 후에 0일에 결합하는 D25 및 Mota(조건 3 및 4), 및 4℃에서 1주후에 결합하는 D25 및 Mota(조건 5 및 6)를 포함한다. 대조군은 접히는(foldon) 도메인을 가지는 DSCav1 구성체이다. 각각 구성체에 대한 특정 항원성 데이타는 도 69A-69E에 제공된다(테스트된 조건은 헤더 열(header rows)에서 표시된다).

[1028] [표 23] 삼량체화(trimerization) 도메인이 부족하거나 또는 삼량체화(trimerization) 도메인을 절단할 수 있는 프로테아제를 가지는 재조합 RSV F 단백질.

구성체 명칭	모티프	C-Term	백그라운드	디자인 컨셉트	서열 번호
CS/GSJ ext2Opti1	512LLhnvnagLstVnimLttVI	N	DSCAV1	Op	829
CS/GSJ ext2Opti2	512LLhnvnagLstVnKmLttVI	N	DSCAV1	Op	830
CS/GSJ ext2Opti3	512LLhnvnKkLstVnKmLttVI	N	DSCAV1	Op	831
CS/GSJ ext2OpCC1	512CChnvnagLstVnKmLttVI	N	DSCAV1	OpCC	832
CS/GSJ ext2OpCC2	512LLhnvnaCCstVnKmLttVI	N	DSCAV1	OpCC	833
CS/GSJ ext2OpCC3	512LLhnvnagLstVnKCCttVI	N	DSCAV1	OpCC	834
CS/GSJ ext2OpCC4	512FQNAVESTINTLQTTLEAVAQAI	N	DSCAV1	Op	835
CS/GSJ GCN4cc1	512IEDKIEEILSKQYHIENEIARCC	N	DSCAV1	OpCC	836
CS/GSJ GCN4cc2	512CCDKIEEILSKQYHIENEIARIK	N	DSCAV1	OpCC	837
CS/GSJ CartOp	512LLhnvnagLstVnKmLttVIKcc	N	DSCAV1	OpCC	838
GSJ CClongxFd	512CCHNVNAGKSGG	xFd	DSCAV1	InterC	839
GSJ CCtail1xFd	512CChnvnagksttnimitt	xFd	DSCAV1	InterC	840
GSJ CCtail2xFd	512LLhnvnaCCsttnimitt	xFd	DSCAV1	InterC	841
GSJ CCtail3xFd	512LLhnvnagksttniCCtt	xFd	DSCAV1	InterC	842
GSJ CCtail4xFd	512LLhnvnagksttnCCitt	xFd	DSCAV1	InterC	843
GSJ CCtail5xFd	512CChnvnagksttn	xFd	DSCAV1	InterC	844
GSJ CCtail6xFd	512LLhnvnaCCsttn	xFd	DSCAV1	InterC	845
GSJ CCtail7xFd	512LLhnvnagksttn	xFd	DSCAV1	Extended C-terminal helix	846

[1029]

GSJ CCtail8xFd	512LLhnvnagksttnimitt	xFd	DSCAV1	Extended C-terminal helix	847
GSJ CCtail9.1xFd	512CChnvnaCCsttnimitt	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	848
GSJ CCtail9xFd	512CChnvnaCCsttn	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	849
GSJ CCtail10xFd	485C494C 512Cchnvnagksttn	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	850
GSJ CCtail11xFd	485C494C 512CchnvnaCCsttn	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	851
Tail11 s_ds_F505W_oxFd	SeqID 566 + 485C494C 512CchnvnaCCsttn	xFd	SeqID 566 (Based on DSCav1)	Multi-InterC	852
GSJ CCtail12xFd	512CChnvnaCCsttniCCtt	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	853
GSJ CCtail13xFd	485C494C 512CchnvnaCCsttniCCtt	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	854
GSJ CCtail14xFd	SeqID 566 + 485C494C 512CchnvnaCCsttniCCtt	xFd	SeqID 566 (Based on DSCav1)	Multi-InterC	855
GSJ CCtail15xFd	SeqID 566 + 485C494C 512CchnvnaCCsttn	xFd	SeqID 566 (Based on DSCav1)	Multi-InterC	856
GSJ CCtail16xFd	SeqID 566 + 485C494C 512CchnvnaGKsttniCCtt	xFd	SeqID 566 (Based on DSCav1)	Multi-InterC	857
GSJT11	DSCav1-S509W, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	858
GSJT12	DSCav1-S509F, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	859
GSJT13	DSCav1- L512F, L513C, 514E, 515C	N	DSCAV1	ECC	860
GSJT14	DSCav1-S509W, L513C, 514E, 515C	N	DSCAV1	ECC	861
GSJT15	DSCav1-S509F, L513C, 514E, 515C	N	DSCAV1	ECC	862
GSJT16	DSCav1-S509W, L512F, L513C, 514E, 515C	N	DSCAV1	ECC	863
GSJT17	DSCav1- L512F, L513C, 514E, 515E, 516C	N	DSCAV1	ECC	864
GSJT18	DSCav1-S509W, L513C, 514E, 515E, 516C	N	DSCAV1	ECC	865
GSJT19	DSCav1-S509F, L513C, 514E, 515E, 516C	N	DSCAV1	ECC	866
GSJT20	DSCav1-S509W, L512F, L513C, 514E, 515E, 516C	N	DSCAV1	ECC	867
GSJT21	DSCav1- L512C, L513E, 514C	N	DSCAV1	ECC	868
GSJT22	DSCav1- L512C, L513E, 514E, 516C	N	DSCAV1	ECC	869
GSJT23	DSCav1- A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	870

[1030]

GSJT24	DSCav1-L512T, L513E	N	DSCAV1	ECC	871
GSJT25	DSCav1-L512T, L513E, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	872
GSJT26	DSCav1-L512S, L513E	N	DSCAV1	ECC	873
GSJT27	DSCav1-L512S, L513E, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	874
GSJT28	DSCav1-L512S, L513D	N	DSCAV1	ECC	875
GSJT29	DSCav1-L512S, L513D, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	876
GSJT30	DSCav1-L512F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	877
GSJT31	DSCav1-L513F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	878
GSJT32	DSCav1-L512F, L513F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	879
GSJT33	DSCav1-L512Y, L513Y, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	880
GSJT34	DSCav1-L512F, L513Y, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	881
GSJT35	DSCav1-L512W, L513W, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	882
GSJT36	DSCav1-L5132W, L513Y, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	883
GSJT37	DSCav1-S509W, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	884
GSJT38	DSCav1-S509F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	885
GSJT39	DSCav1-S509W, L512F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	886
GSJT40	DSCav1-S509W, L512F, L513F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	887
GSJT41	DSCav1-S509F, L512A, L513A, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	888
GSJT42	DSCav1-S509W, L512A, L513A, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	889
GSJT43	DSCav1-F505W, I506W, S509F, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	890
GSJT44	DSCav1-F505W, I506W, S509F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	891
GSJT45	DSCav1-F505W, I506W, S509F, L512S, L513E, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	892
GSJT46	DSCav1-F505W, I506W, S509F, L512A, L513A, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	893
GSJT47	DSCav1-F505K, I506D, S509F, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	894

[1031]

GSJT48	DSCav1- F505K, I506D, S509F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	895
GSJT49	DSCav1- F505K, I506D, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	896
GSJT50	DSCav1- F505K, I506D, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	897
GSJT51	DSCav1- F505K, I506D, L512A, L513A, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	898
GSJT52	DSCav1- F505K, I506D, L512S, L513E, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	899
GSJT53	DSCav1- F505K, I506D, L512S, L513D, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	900
GSJ-FP1	DSCav1-F137C, R339C	Fd	DSCAV1	FP-CC	969
GSJ-FP2	DSCav1- F137C, T337C	Fd	DSCAV1	FP-CC	970
GSJ-FP3	DSCav1-G139C, Q354C	Fd	DSCAV1	FP-CC	971
GSJ-FP4	F137C, R339C	Fd	DSCAV1	FP-CC	972
GSJ-FP5	F137C, T337C	Fd	DSCAV1	FP-CC	973
GSJ-FP6	G139C, Q354C	Fd	DSCAV1	FP-CC	974
GSJ-190P1	L260F	Fd	DSCAV1	190P	975
GSJ-190P2	L260W	Fd	DSCAV1	190P	976
GSJ-190P3	L260Y	Fd	DSCAV1	190P	977
GSJ-190P4	L260R	Fd	DSCAV1	190P	978
GSJ-190P5	L188F	Fd	DSCAV1	190P	979
GSJ-190P6	L188W	Fd	DSCAV1	190P	980
GSJ-190P7	L188Y	Fd	DSCAV1	190P	981
GSJ-190P8	L188R	Fd	DSCAV1	190P	982
GSJ-190P9	I57F	Fd	DSCAV1	190P	983
GSJ-190P10	I57W	Fd	DSCAV1	190P	984
GSJ-190P11	I57R	Fd	DSCAV1	190P	985
GSJ-190P12	L252F	Fd	DSCAV1	190P	986
GSJ-190P13	L252W	Fd	DSCAV1	190P	987
GSJ-190P14	L252R	Fd	DSCAV1	190P	988
GSJ-190P15	V192F	Fd	DSCAV1	190P	989
GSJ-190P16	V192W	Fd	DSCAV1	190P	990
GSJ-190P17	V192R	Fd	DSCAV1	190P	991
GSJ-DS1	S150C, Y458C	Fd	DSCAV1	Stabilizing Disulfides	992

[1032]

GSJ-DS2	A149C, N460C	Fd	DSCAV1	Stabilizing Disulfides	993
GSJ-DS3	S146C, N460C	Fd	DSCAV1	Stabilizing Disulfides	994
GSJ-DS4	A149C, Y458C	Fd	DSCAV1	Stabilizing Disulfides	995
GJ-3-1	V220F	Fd	DSCAV1	CFM	996
GJ-3-2	V220W	Fd	DSCAV1	CFM	997
GJ-3-3	V220M	Fd	DSCAV1	CFM	998
GJ-3-4	T219F	Fd	DSCAV1	CFM	999
GJ-3-5	T219M	Fd	DSCAV1	CFM	1000
GJ-3-6	T219W	Fd	DSCAV1	CFM	1001
GJ-3-7	T219R	Fd	DSCAV1	CFM	1002
GSJ-Int-FdF-1	I221F	Fd	DSCAV1	ICFM	1003
GSJ-Int-FdF-2	I221Y	Fd	DSCAV1	ICFM	1004
GSJ-Int-FdF-3	I221W	Fd	DSCAV1	ICFM	1005
GSJ-Int-FdF-4	Q224D, L78K	Fd	DSCAV1	ICFM	1006
GSJ-Int-FdF-5	V278F	Fd	DSCAV1	ICFM	1007
GSJ-Int-FdF-6	Q279F	Fd	DSCAV1	ICFM	1008
GSJ-Int-FdF-7	N277D, S99K	Fd	DSCAV1	ICFM	1009
GSJ-Int-FdF-8	Q361F	Fd	DSCAV1	ICFM	1010
GSJ-Int-FdF-9	V402F	Fd	DSCAV1	ICFM	1011
GSJ-Int-FdF-10	T400F	Fd	DSCAV1	ICFM	1012
GSJ-Int-FdF-11	T400W	Fd	DSCAV1	ICFM	1013
GSJ-Int-FdF-12	H486F	Fd	DSCAV1	ICFM	1014
GSJ-Int-FdF-13	H486W	Fd	DSCAV1	ICFM	1015
GSJ-Int-FdF-14	I217F	Fd	DSCAV1	ICFM	1016
GSJ-Int-FdF-15	I217Y	Fd	DSCAV1	ICFM	1017
GSJ-Int-FdF-16	I217W	Fd	DSCAV1	ICFM	1018
DSCav1OpFd1	F190V	Fd	DSCAV1	Enhanced stability of DSCav1	1019
DSCav1OpFd2	K226L	Fd	DSCAV1	Enhanced stability of DSCav1	1020

[1033]

[1034]

DSCav1OpFd3	T58I, A298M	Fd	DSCAV1	Enhanced stability of DSCav1	1021
DSCav1OpFd4	F190V, K226L	Fd	DSCAV1	Enhanced stability of DSCav1	1022
DSCav1OpFd5	F190V, T58I, A298M	Fd	DSCAV1	Enhanced stability of DSCav1	1023
DSCav1OpFd6	K226L, T58I, A298M	Fd	DSCAV1	Enhanced stability of DSCav1	1024
DSCav1OpFd7	T58I, A298M, F190V, K226L	Fd	DSCAV1	Enhanced stability of DSCav1	1025
CSGSJ1		xFd	DSCAV1	Engineered alpha 10 coil coil with GCN4 internal motifs	1456
CSGSJ2		xFd	DSCAV1	Engineered alpha 10 coil coil with GCN4 internal motifs	1457
CSGSJ3		xFd	DSCAV1	Engineered alpha 10 coil coil with GCN4 internal motifs	1458
CSGSJ4		xFd	DSCAV1	Engineered alpha 10 coil coil with GCN4 internal motifs	1459

CSGSJ5		xFd	DSCAV1	Engineered alpha 10 coil coil with GCN4 internal motifs	1460
CSGSJ6		xFd	DSCAV1	Engineered alpha 10 coil coil with GCN4 internal motifs	1461
CSGSJ7		xFd	DSCAV1	Engineered alpha 10 coil coil with GCN4 internal motifs	1462
BZGJ9-10-TMCC1		xFd	DSCAV1	single chain F, alpha10 disulfide, Furin site, Foldon, TM region	1463
BZGJ9-10-TMCC2		xFd	DSCAV1	single chain F, alpha10 disulfide, Furin site, Foldon, TM region	1464
GSJCCTail9-TMCC1		xFd	DSCAV1	F, alpha10 disulfide, Furin site, Foldon, TM region	1465
GSJCCTail9-TMCC2		xFd	DSCAV1	F, alpha10 disulfide, Furin site, Foldon, TM region	1466
GSJCCTail9-TMCC3		xFd	DSCAV1	F, alpha10 disulfide, Furin site, TM region	1467
GSJCCTail9-TMCC4		xFd	DSCAV1	F, alpha10 disulfide, Furin site, TM region	1468

[1035]

[1036] 단백질의 산출은 재조합 F 단백질의 몇개에 대하여 계산되었고, 표 26에 하기에 나타냈다.

[1038] [표 26] 재조합 RSV F 단백질 발현의 산출

디자인 명칭	산출 mg/L	서열번호
CS/GSJ ext2OpCC1	0.39	832
CS/GSJ ext2OpCC2	0.33	833
CS/GSJ ext2OpCC3	0.72	834
CS/GSJ ext2OpCC4	0.48	835
CS/GSJ GCN4cc1	2.85	836
CS/GSJ GCN4cc2	0.75	837
CS/GSJ CartOp	0.36	838
GSJ CClongxFd	6.3	839
GSJ CCtail1xFd	1.05	840
GSJ CCtail2xFd	0.33	841
GSJ CCtail3xFd	0.99	842
GSJ CCtail4xFd	1.53	843
GSJ CCtail5xFd	2.13	844
GSJ CCtail6xFd	1.65	845
CSGSJ7	0.66	1462
GSJ 1Cav1 13	8	913
JCB GSJ 4	8	942
JCB GSJ 5	8	943

[1039]

[1041] **실시예 13**

[1042] **RSV F 엑토도메인의브린 먼 부위 일부를 안정화하는 추가 돌연변이**

[1043] 이 실시예는 자체 선융합(prefusion) 입체형태에서 단백질을 안정하는 RSV F에 만들어진 추가 돌연변이를 설명한다.

[1044] 삼량체화(trimerization) 도메인이 없는 몇 가지 RSV F 단백질 서열은 디자인되고 디자인 접근의 표시뿐만아니라, 표 24에 열거된 서열번호에서 제공된다. 명칭, 서열번호: 1026에 관하여 돌연변이, C-말단 접히는(foldon) 도메인의 존재 또는 부재, 백그라운드 서열 (예를 들면, "WT" 야생형 RSV F를 나타낸다), 디자인 컨셉트, 및 해당 서열번호가 지시된다. 표 24에 열거된 C-말단 삼량체화 도메인을 가지는 재조합 RSV F 단백질은 단백질이 세포 배지에서 세포로부터 배출되는 조건하의 세포에서 발현된다. 각각 구성체는 실시예 9에서 상기 설명된 바와 같이 단백질이 분비 시스템으로 진입하고 배출되도록 하게 하는 리더 서열을 포함한다. 그런다음 배지는 원심분리되고 상등액은 위치 Ø 특정 항체 D25 및 위치 II 특정 항체 모타비주맙(motavizumab) ("Mota", 도 69A-69E)에 결합하는 항원성 테스트에 사용되었다. 테스트된 조건은 0 일에 결합하는 D25 및 Mota (조건 1 및 2), 1 시간동안 70℃에서 배양 후에 0 일에 결합하는 D25 및 Mota(조건 3 및 4), 및 4℃에서 1 주후에 결합하는 D25 및 Mota(조건 5 및 6)을 포함한다. 대조군은 접히는(foldon) 도메인을 가지는 DSCav1 구성체이다. 각각 구성체에 대한 특정 항원성 데이타는 도 69A-69E에 제공된다(테스트된 조건은 헤더 열(header rows)에 표시된다).

[1046] [표 24] 접히는(foldon) 도메인으로 새로운 안정화

구성체 명칭	서열번호 1026에 관한 돌연변이	C-Term	백그리운드	디자인 컨셉트	서열번호
GSJ 1Cav1 1	S190W	Fd	WT	S190 AA Scan	901
GSJ 1Cav1 2	S190L	Fd	WT	S190 AA Scan	902
GSJ 1Cav1 3	S190R	Fd	WT	S190 AA Scan	903
GSJ 1Cav1 4	S190E	Fd	WT	S190 AA Scan	904
GSJ 1Cav1 5	S190A	Fd	WT	S190 AA Scan	905
GSJ 1Cav1 6	S190Q	Fd	WT	S190 AA Scan	906
GSJ 1Cav1 7	S190Y	Fd	WT	S190 AA Scan	907
GSJ 1Cav1 8	S190G	Fd	WT	S190 AA Scan	908
GSJ 1Cav1 9	S190P	Fd	WT	S190 AA Scan	909
GSJ 1Cav1 10	S190I	Fd	WT	S190 AA Scan	910
GSJ 1Cav1 11	S190T	Fd	WT	S190 AA Scan	911
GSJ 1Cav1 12	S190C	Fd	WT	S190 AA Scan	912
GSJ 1Cav1 13	S190V	Fd	WT	S190 AA Scan	913
GSJ 1Cav1 14	S190D	Fd	WT	S190 AA Scan	914
GSJ 1Cav1 15	S190N	Fd	WT	S190 AA Scan	915
GSJ 1Cav1 16	S190H	Fd	WT	S190 AA Scan	916
GSJ 1Cav1 17	S190K	Fd	WT	S190 AA Scan	917
GSJ 1Cav1 18	DS V207L	Fd	WT	S190 AA Scan	918
GSJ 1Cav1 19	DS S190F	Fd	WT	S190 AA Scan	919
GSJ 1Cav1 20	V207G	Fd	WT	S190 AA Scan	920
GSJ 1Cav1 21	V207A	Fd	WT	S190 AA Scan	921
GSJ 1Cav1 22	V207S	Fd	WT	S190 AA Scan	922
GSJ 1Cav1 23	V207T	Fd	WT	S190 AA Scan	923
GSJ 1Cav1 24	V207C	Fd	WT	S190 AA Scan	924
GSJ 1Cav1 25	V207L	Fd	WT	S190 AA Scan	925
GSJ 1Cav1 26	V207I	Fd	WT	S190 AA Scan	926
GSJ 1Cav1 27	V207M	Fd	WT	S190 AA Scan	927
GSJ 1Cav1 28	V207P	Fd	WT	S190 AA Scan	928
GSJ 1Cav1 29	V207F	Fd	WT	S190 AA Scan	929
GSJ 1Cav1 30	V207Y	Fd	WT	S190 AA Scan	930
GSJ 1Cav1 31	V207W	Fd	WT	S190 AA Scan	931
GSJ 1Cav1 32	V207D	Fd	WT	S190 AA Scan	932
GSJ 1Cav1 33	V207E	Fd	WT	S190 AA Scan	933
GSJ 1Cav1 34	V207N	Fd	WT	S190 AA Scan	934
GSJ 1Cav1 35	V207Q	Fd	WT	S190 AA Scan	935
GSJ 1Cav1 36	V207H	Fd	WT	S190 AA Scan	936
GSJ 1Cav1 37	V207K	Fd	WT	S190 AA Scan	937
GSJ 1Cav1 38	V207R	Fd	WT	S190 AA Scan	938
JCB GSJ 1	Y198F	Fd	WT	Probing JCB16/18/24 residues	939
JCB GSJ 2	T219L	Fd	WT	Probing JCB16/18/24 residues	940

[1047]

JCB GSJ 3	V296I	Fd	WT	Probing JCB16/18/24 residues	941
JCB GSJ 4	K226M	Fd	WT	Probing JCB16/18/24 residues	942
JCB GSJ 5	K226L	Fd	WT	Probing JCB16/18/24 residues	943
IG1-V192M	V192M	Fd	WT		944
IG2-A298M_RSVF(+)FdTHS-paH	A298M	Fd	WT		945
IG2-T58I_A298M	T58I_A298M	Fd	WT		946
IG2-T58I_V192F_A298I_RSVF(+)FdTHS-paH	T58I, V192F, A298I	Fd	WT		947
IG2-T58I_V192M_A298I_RSVF(+)FdTHS-paH	T58I, V192M, A298I	Fd	WT		948
i167m-a298m	I167M, A298M	Fd	WT		949
i167m-l181m	I167M, L181M	Fd	WT		950
i199f	I199F	Fd	WT		951
i57c-s190c	I57C, S190C	Fd	WT		952
ig2-t58l-a298m	T58L, A298M	Fd	WT		953
ig2-t58m	T58M	Fd	WT		954
ig2-t58m-a298i	T58M, A298I	Fd	WT		955
ig2-t58m-a298L	T58M, A298L	Fd	WT		956
ig2-v192c-ins192-193-g-e256c	V192C, G insertion 192/193, E256C	Fd	WT		957
rsv f ths_s_f505w_o_s509f	ths_s_F505W_o_S509F	N	WT		958
rsv f ths_s_f505w_s509f	ths_s_F505W_S509F	N	WT		959
t58i-a298i	T58I, A298I	Fd	WT		960
t58m-a298m	T58M, A298M	Fd	WT		961
v179l-t189f	V179L, T189F	Fd	WT		962
v192f	V192F	Fd	WT		963
v192f-l252a	V192F, L252A	Fd	WT		964
v56m-i167m-l181m	V56M, I167M, L181M	Fd	WT		965
v56m-i167m-v296m	V56M, I167M, V296M	Fd	WT		966
v56m-l181f	V56M, L181F	Fd	WT		967
w52c-s150c	W52C, S150C	Fd	WT		968

[1048]

[1050] **실시예 14**

[1051] **최소 위치 Ø 면역원(Immunogens)**

[1052] RSV F의 위치 Ø 항원결정기는 삼량체 스파이크(trimer 스파이크)의 꼭대기에 위치되고 항체 D25, AM22 및 5C4를 중화하는 3개에 의해 인식되는 영역을 포함한다. 더욱 특정적으로, RSV F/D25 복합체 크리스탈 구조에 의해 기술되는 것으로서, 상기 항원결정기는 헬릭스 α4 (잔기 196-210)의 외부 표면 및 β2 및 α1 사이에 인접한 루프(loop) (잔기 63-68)를 포함한다. 상기 실시예는 최소 서로 접한 잔기 단독으로 위치 Ø에 존재하는 항원의 디자인 및 특징을 설명하고, 이것은 위치 Ø 면역반응을 유도하는 데 사용할 수 있고 전장 선융합 안정된 RSV F 삼량체보다 생성하는데 더욱 비용 효과적일 수 있다.

[1054] **최소 위치 Ø RSV F 면역원의 디자인을 위한 일반적 컨셉트**

[1055] 최소 위치 Ø 면역원은 4개 주요 디자인 컨셉트를 활용하는데 디자인되었다: 순환 순열(circular permutation),

스캐폴드 순환 순열(scaffolded 순환 permutation), 도메인 III 면역원, 및 다중체화(multimerization).

[1056] 순환 순열(circular permutation)은 구성요소 부분의 공간 지향을 유지하는 반면, 단백질 구조 내에 원천 연결을 변형을 포함한다. 최소 위치 Ø 항원결정기 구성요소s α4 및 the β2-α1 루프(loop)는 RSV F1 내에 2개 별도의 루프(loop) 세그멘트의 각각 부분이다. 안정한 위치 Ø 폴드(folds)를 만들기 위하여, 2개 루프(loop) 세그멘트는 2개 상이한 기능적 순서에서 짧은 유연한 아미노산 링커로 연결되고, 그리하여 위치 Ø 항원결정기 각각의, 2개 별도의 폴드르 만든다(도 70A).

[1057] 스캐폴드 순환 순열을 만들기 위하여, 순환 순열 위치 Ø 단백질의 짧은 유연한 링커는 단순 아미노산 링커보다 큰 안정성을 강력하게 제공하는 다른 단백질로부터 작은 엄격한 세그멘트에 의해 교체된다(도 70B).

[1058] 도메인 III (잔기 50-306)는 위치 Ø 항원결정기를 포함하는 RSV F 단백질의 대략 250 아미노산의 큰 도메인이다(참조 도 70D). 위치 Ø를 둘러싼 도메인 III 잔기는 면역원에 현저한 추가적 산란하게 하는 표면 항원결정기를 첨가하지 않는 반면 위치 Ø에 추가적으로 구조의 안정성을 제공한다. 도메인 III는 융합 펩타이드에 노출하는 잔기 136와 137 사이에 자연적 퓨린(furin) 절단 위치를 포함한다. 도메인 III는 riginal N- 및 C-말단 또는 도메인 III를 연결하고 절단 위치에서 새로운 N- 및 C-말단을 만들기 위하여 아미노산 링커로 절단 위치를 교체하거나 또는 순환순열을 수행하기 위하여 추가적으로 안정될 수 있다. 상기 방법의 모두는 다양한 도메인 III 면역원을 안정하는데 활용된다.

[1059] 마지막으로, 위치 Ø 면역원은 면역원성을 증강하기 위하여 멀티머화된다(도 70D 및 70E). 삼량체화(trimerization)는 선-융합 RSV F 바이러스 스파이크에서 관찰된 원천 삼량체를 모방하는데 활용되고 24머 및 60머외 같은 큰 정의된 올리고머(oligomers)는 면역원성을 특정적으로 증강하기 위하여 활용된다. 구성체 사이에 디설피드 결합을 도입하여, 또는 아미노산 링커를 사용하여 이중체(dimers) 또는 삼량체로서 함께 구성체를 공유결합하여 또는 아미노산 링커를 사용하여 다중체화(multimerization) 도메인에 구성체를 연결하여 완성된다. 일부 구성체는 상기 전략의 조합을 활용한다. 사용된 가장 작은 다중체화(multimerization) 도메인은 가장 작은 다중체화(multimerization) 도메인이었고 가장 큰것은 60머였다(예를 들면 루마진 신타제(lumazine synthase)). 또한 펜타머(pentamers), 12머 및 24머가 사용되었다.

[1060] 상기 기술된 주요 디자인 컨셉트에 추가로, 면역원은 디설피드 결합 첨가, 구멍(cavity) 채우는 돌연변이, 표면 소수성의 감소, 하전된(charged) 표면 잔기의 첨가, 및 addition of N-연결된 글리칸의 첨가 및 강력한ially 유연한 영역의 절단(truncation)을 포함하는 몇 개 다른 방법을 사용하여 안정된다. 몇개 최소 위치 Ø 면역원의 리스팅은 디자인 접근의 표시뿐만아니라, 표 20(위치 Ø 비입자 면역원) 및 21(단백질 나노입자 상의 위치 Ø 면역원)에서 제공된다. 명칭, 컨셉트, RSV F 단백질의 잔기, 스캐폴드 또는 다른 첨가된 단백질, 및 해당 서열 번호는 지시된다. 표 20 및 21에서, 하기의 두문자어(acronyms)가 사용되었다: SØ: minimal 위치 Ø; CP: 순환 permutation; DS: Disulfide; CAV: cavity filling; Charge: Adding charged residues; SC: single chain; TD3: tandem domain III domain; D3: domain III; RH: Reduce Hydrophobicity; Fd: T4 Fd trimerization domain; CCMPTD: chicken cartilage matrix protein trimerization domain; MTQ-CC: MTQ coiled coil trimerization motif; CXVIII: Collagen XVIII trimerization domain; 2MOE: Miz-1 zinc finger 6 (2MOE) scaffold; ATCase: aspartate carbamoyltransferase (ATCase) trimerization domain (1GQ3); GCN4: GCN4 trimerization domain; Fer: Ferritin; Dps: Microbacterium Arborescens Dps; LS: A. aeolicus Lumazine Synthase; Thr: thrombin; EH: exposed hydrophobic; HCP1: P. aeruginosa hcp1 (1y12)

[1061] 최소 위치 Ø 면역원은 실시예 9에서 상기 설명된 바와 같이 조직 배양 배지로 최소 위치 Ø 면역원의 배출을 초래하는 시스템을 사용하여 세포에서 발현된다. 배지는 원심분리되고 상등액은 ELISA에 의해 위치 Ø 특정 항체 D25, AN22 및 5C4에 결합하는 항원성 테스트에 사용되었다(도 72A-72F). 테스트된 조건은 4℃에서 0 및 1 주후에 결합하는 D25(조건 1 및 2), 60℃(증상 3), 70℃ (증상 4), 80℃ (증상 5), 90℃ (증상 6), 또는 100℃ (증상 7)에서 1시간 후에 결합하는 D25, 4℃ 에서 2 주후에 결합하는 AM22 (증상 8), 4℃ 0 주에서 결합하는 5C4 (증상 9)를 포함한다. 0℃에서 1 시간 후에 결합하는 D25, AM22, 및 D25의 평균은

[1062] 70℃에서 1 시간후에 결합하는 D25, AM22, 및 D25의 평균은 (증상 10)에 나타냈다. 항원성 데이타의 요약은 각각 디자인 카테고리 내에 떨어지는 위치 Ø 면역원의 수를 나타내고 적어도 1.5의 ELISA 결과를 생성되는 도 71에 제공된다. 각각 구성체를 위한 특정 항원성 데이타는 도 72A-72F에 제공된다(테스트된 조건은 헤더 열에 표시하였다). 결과는 최소 위치 Ø 면역원이 선융합(prefusion) 특정 항체에 특정적으로 결합한다는 것을 나타낸다; 및 따라서, 항원 위치 Ø에 대해 개체에서 면역반응을 유도하는 것이 유용하다. 추가적으로, 결과는 최소 위치 Ø 구성체가 시료로부터 RSV F 선융합(prefusion) 특정 항체를 분리 및 검출하기 위하여 프로브로서 사

용될 수 있다.

[1063] 항원성 데이타에 기반하여, 초기 구성체 중 14개가 면역반응을 생성하기 위하여 동물 모델에서 평가, 및 추가 물리적 및 구조의 특징을 위한 대표로서 선택된다. 14 개를 선택하는 매트릭은 D25 (주1), AM22 (주 2) 및 70 정도에서 1 시간 후에 D25를위한 ELISA의 평균을 나타내는 구성체를 선별하는 것이 포함된다. 각각 카테고리를 위해 선택된 몇개 매우 유사한 구성체를 방지하기 위하여, 카테고리 각각은 추가적 카테고리로 하위분류되었다 (괄호안의 서열번호):

[1065] **카테고리 1: 단량체(monomers):**

[1066] 위치 Ø 순환 순열(permutation): TZ-13 (354567-108) Avg: 3.18 (서열번호: 1040)

[1067] 위치 Ø 순환 순열(permutation) with scaffold: JG_2KN0 (354567-417) Avg: 3.00 (서열번호: 1053)

[1068] 도메인 III: E-CP_RBD51-307_14mutDS-Cav1_THS (354567-273) Avg: 3.17 (서열번호: 1156)

[1069] 도메인 III dimer: GSJnh4-TWIN (354567-693) Avg: 3.06 (서열번호: 1194)

[1071] **카테고리 2: 삼량체(trimers):**

[1072] 위치 Ø 순환 순열(permutation): TZ-19 (354567-126) Avg: 3.08 (서열번호: 1106)

[1073] 도메인 III (two are tied): RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon (354567-210) Avg: 3.08 (서열번호: 1170), 및 MS_08 (354567-447) Avg: 3.08 (서열번호: 1188)

[1074] 도메인 III dimer: GSJnh4Fd-TWIN (354567-705) Avg: 3.01 (서열번호: 1212)

[1076] **카테고리 3: multivalent 단량체(monomers):**

[1077] 페리틴(ferritin) 상의 위치 Ø 순환 순열(permutation): 2m0e-resurf1-Ferritin (354567-621) Avg: 2.81 (서열번호: 1276)

[1078] 페리틴(ferritin) 상의 도메인 III: GSJnh2F (354567-471) Avg: 3.10 (서열번호: 1220)

[1079] 비-페리틴 올리고머(non-ferritin oligomer) 상의 단량체: LS1-E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1_THS (354567-315) Avg: 2.72 (서열번호: 1281)

[1080] 추가: MP11 (354567-642) Avg: 3.05 (서열번호: 1263)

[1082] **카테고리 4: 다가 삼량체(multivalent trimer)s:**

[1083] 나노입자 상의 도메인 III(2): GSJnh2Fd-F (354567-483) Avg: 2.57 (서열번호: 1266), 및 GSJnh4Fd-F (354567-489) Avg: 2.02 (서열번호: 1268)

[1085] [표 20] 최소 위치 Ø 면역원 (단백질 나노입자가 아님)

Name	Concept	Region of RSVF (residue #s)	scaffold or other added protein	SEQ ID NO
Circular permutation of site Ø (26)				
JCB_01	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	APGG linker (Seq_1454)	1027
JCB_02	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	APGG (Seq_1454)linker, DS	1028
JCB_03	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	APGG(Seq_1454) linker, DS	1029
JCB_04	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	AGSG(Seq_1455) linker	1030
JCB_05	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	AGSG (Seq_1455)linker, DS	1031
JCB_06	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	AGSG (Seq_1455)linker, DS	1032
JCB_07	CP-SØ+CAV	60-94, 192-229	GSG linker	1033
JCB_08	CP-SØ+CAV	60-94, 192-229	GSG linker, DS	1034
JCB_09	CP-SØ+CAV	60-94, 192-229	GSG linker, DS	1035
TZ-09	CP-SØ+DS+CAV+glycan	192-242, 60-97	GGSGSGG (Seq_1446)linker	1036
TZ-10	CP-SØ+DS+CAV+charge	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446)linker	1037
TZ-11	shorter CP-SØ+DS+CAV+charge	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1038
TZ-12	CP-SØ+DS+CAV+charge	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1039
TZ-13	CP-SØ+DS+CAV+glycan	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1040
TZ-14	CP-SØ+DS+CAV+glycan	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1041
RSVF(+)THS_me	CP-SØ	62-69 - ggsgggggsgggsg(Seq_1447) - 196-212	Ggsggggsgggsg (Seq_1447) linker	1042

[1086]

RSVF(+)THS_me_hp1	CP-SØ	62-69 - ggsgggggsgggsg(Seq_1447) - 196-212	ggsgggggsgggsg(Seq_1447) linker	1043
RSVF(+)THS_me_ds	CP-SØ	62-69 - ggsgggggsgggsg(Seq_1447) - 196-212	ggsgggggsgggsg (Seq_1447) linker	1044
RSVF(+)THS_me_hp1_ds	CP-SØ	62-69 - ggsgggggsgggsg(Seq_1447) - 196-212	ggsgggggsgggsg (Seq_1447) linker	1045
JG_circ1	CP-SØ	60-94, 193-237	GGSGG (Seq_1448) linker	1046
JG_circ1_ds	CP-SØ+DS	60-94, 193-237	GGSGG(Seq_1448) linker	1047
JG_circ1_delK	CP-SØ+deletion	60-94, 193-237	GGSGG(Seq_1448) linker	1048
JG_circ1_sol_ds	CP-SØ+DS	60-94, 193-237	GGSGG(Seq_1448) linker	1049
JG_circ1_sol	CP-SØ	60-94, 193-237	GGSGG(Seq_1448) linker	1050
JG_Circ2	CP-SØ	60-75, 193-218	GGSGG(Seq_1448) linker	1051
JG_Circ2_sol	CP-SØ	60-75, 193-218	GGSGG(Seq_1448) linker	1052
Circular permutation with scaffold connection (19)				
JG_2KNO	CP-SØ+section of TENC1 (2KNO) scaffold	60-75, 193-218	GGSGGSG (Seq_1445) linker and TENC1 (2KNO) scaffold	1053
Site_0_2a90_1_GYC	CP-SØ+CAV+RH+section of 2A90 scaffold	61-96, 192-235	WWE domain fragment (2A90)	1054
Site_0_2a90_2_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 2A90 scaffold	61-96, 192-235	WWE domain fragment (2A90)	1055
Site_0_2a90_3_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 2A90 scaffold	61-96, 192-235	WWE domain fragment (2A90)	1056
Site_0_2w59_1_GYC	CP-S0+CAV+RH+section of 2W59 scaffold	60-96, 193-238	IgY fragment (2W59)	1057
Site_0_2w59_2_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 2W59 scaffold	60-96, 193-238	IgY fragment (2W59)	1058
Site_0_2w59_3_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 2W59 scaffold	60-96, 193-238	IgY fragment (2W59)	1059
Site_0_3u2e_1_GYC	CP-S0+CAV+RH+section of 3U2E scaffold	61-96, 192-238	EAL domain fragment (3U2E)	1060

[1087]

Site_0_3u2e_2_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 3U2E scaffold	61-96, 192-238	EAL domain fragment (3U2E)	1061
Site_0_3u2e_3_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 3U2E scaffold	61-96, 192-238	EAL domain fragment (3U2E)	1062
Site_0_2vj1_1_GYC	CP-S0+CAV+RH+section of 2VJ1 scaffold	61-96, 192-240	SARS proteinase fragment (2VJ1)	1063
Site_0_2vj1_2_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 2VJ1 scaffold	61-96, 192-240	SARS proteinase fragment (2VJ1)	1064
Site_0_2vj1_3_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 2VJ1 scaffold	61-96, 192-240	SARS proteinase fragment (2VJ1)	1065
Site_0_1chd_1_GYC	CP-S0+CAV+RH+section of 1CHD scaffold	60-95, 192-240	CheB methylesterase fragment (1CHD)	1066
Site_0_1chd_2_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 1CHD scaffold	60-95, 192-240	CheB methylesterase fragment (1CHD)	1067
Site_0_1chd_3_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 1CHD scaffold	60-95, 192-240	CheB methylesterase fragment (1CHD)	1068
Site_0_1pqz_1_GYC	CP-S0+CAV+RH+section of 1PQZ scaffold	60-96, 192-239	Immunomodulatory protein M144 fragment (1PQZ)	1069
Site_0_1pqz_2_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 1PQZ scaffold	60-96, 192-239	Immunomodulatory protein M144 fragment (1PQZ)	1070
Site_0_1pqz_3_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 1PQZ scaffold	60-96, 192-239	Immunomodulatory protein M144 fragment (1PQZ)	1071
Circular permutation of site Ø with trimer (39)				
JCB_10	CP-SØ+CAV+GCN4	60-94, 192-232	APGG linker, GCN4	1072
JCB_11	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	APGG linker, GCN4	1073
JCB_12	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	APGG linker, GCN4	1074
JCB_13	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	APGG linker, GCN4	1075
JCB_14	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	APGG linker, GCN4	1076
JCB_15	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	APGG linker, GCN4	1077
JCB_16	CP-SØ+CAV+GCN4	60-94, 192-229	GSG linker, GCN4	1078
JCB_17	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	GSG linker, DS, GCN4	1079
JCB_18	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	GSG linker, DS, GCN4	1080
JCB_19	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	GSG linker, GCN4	1081

[1088]

JCB_20	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	GSG linker, DS, GCN4	1082
JCB_21	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	GSG linker, DS, GCN4	1083
TZ-01	CP-SØ+interchain DS	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1084
TZ-02	CP-SØ+interchain DS+CAV	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1085
TZ-03	CP-SØ+interchain DS+CAV	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1086
TZ-04	CP-SØ+interchain DS+CAV	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1087
TZ-05	CP-SØ+interchain DS+CAV+charge	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1088
TZ-06	CP-SØ+interchain DS+CAV+charge	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1099
TZ-07	CP-SØ+interchain DS+CAV+glycan	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1100
TZ-08	CP-SØ+interchain DS+CAV+glycan	192-242, 60-97	GGSGSGG(Seq_1446) linker	1101
TZ-15	CP-SØ+DS+CXVIII	58-97, 192-242	GGSGSGSG(Seq_1449)linker, CXVIII	1102
TZ-16	CP-SØ+DS+CAV+CXVIII	58-97, 192-242	GGSGSGSG(Seq_1449) linker, CXVIII	1103
TZ-17	CP-SØ+DS+CAV+CXVIII	58-97, 192-242	GGSGSGSG(Seq_1449) linker, CXVIII	1104
TZ-18	CP-SØ+DS+CAV+CXVIII	58-97, 192-242	GGSGSGSG(Seq_1449) linker, CXVIII	1105
TZ-19	CP-SØ+DS+CAV+charge+glycan+CXVIII	58-97, 192-242	GGSGSGSG(Seq_1449) linker, CXVIII	1106
TZ-20	CP-SØ+DS+CAV+charge+glycan+CXVIII	58-97, 192-242	GGSGSGSG(Seq_1449) linker, CXVIII	1107
AO_1	sc CP-SØ trimers	60-97, 194-239	multiple glycine linkers	1108
AO_2	sc CP-SØ trimers	60-97, 194-239	multiple glycine linkers	1109
AO_3	sc CP-SØ trimers	60-97, 194-239	multiple glycine linkers	1110
AO_4	sc CP-SØ trimers	60-97, 194-239	multiple glycine linkers	1111
AO_5	sc CP-SØ trimers	60-97, 194-239	multiple glycine linkers	1112
AO_6	sc CP-SØ trimers	60-97, 194-239	multiple glycine linkers	1113
AO_7	CP-SØ+N-terminal Fd	60-97, 194-239	Glycine linkers and Fd	1114
AO_8	CP-SØ+C-terminal Fd	60-97, 194-239	Glycine linkers and Fd	1115
AO_9	CP-SØ+C-terminal ATCase	60-97, 194-239	E coli ATCase trimerization domain	1116
MP5	CP-SØ+Fd	56-97 GG - 189-211	GG linker and Fd	1117

[1089]

MP6	CP-SØ+Fd	56-97 G 189-211	GG linker and Fd	1118
MP7	CP-SØ+GCN4ization domain	56-97 GG 189-211	GG linker and GCN4ization domain	1119
MP8	CP-SØ+ C-terminal ATCase	56-97 G- ATCAse-189-211	ATCase	1120
Site Ø minimal epitope on a scaffold (6)				
2m0e-resurf1	Minimal SØ on 2M0E		2M0E	1121
2m0e-resurf2	Minimal SØ on 2M0E		2M0E	1122
2m0e-resurf3	Minimal SØ on 2M0E		2M0E	1123
2M0E_r04	Minimal SØ on 2M0E	196-212	2M0E	1124
2M0E_r05	Minimal SØ on 2M0E	196-212	2M0E	1125
2M0E_r06	Minimal SØ on 2M0E	196-212	2M0E	1126
Domain III (42)				
RBD51-307 11mut DS-Cav1	D3+DS+RH	51-307		1127
RBD51-307 11mut DS-Cav1 2sug	D3+DS+RH, add glycans	51-307		1128
RBD51-304 11mut DS-Cav1 3sug	D3+DS+RH, add glycans	51-304		1129
RBD51-307 10mut DS-Cav1	D3+reduce hydrophobicity	51-307		1130
RBD51-307 10mut DS-Cav1 2sug	D3+RH, add glycans	51-307		1131
RBD51-304 10mut DS-Cav1 3sug	D3+RH, add glycans	51-304		1132
CP RBD51-307 11mut DS-Cav1	CP-D3+DS, RH	51-307		1133
CP RBD51-307 11mut DS-Cav1 2sug	CP-D3+DS, RH	51-307		1134
CP RBD51-304 11mut DS-Cav1 3sug	CP-D3+DS, RH	51-304		1135
CP RBD51-307 10mut DS-Cav1	CP-D3, RH	51-307		1136
CP RBD51-307 10mut DS-Cav1 2sug	CP-D3, RH, add glycans	51-307		1137
CP RBD51-304 10mut DS-Cav1 3sug	CP-D3, RH, add glycans	51-304		1138
JCB_28	D3+CAV	50-96, 149-306	GSGGGSG(Seq_1450) linker	1139
JCB_29	D3+CAV	50-96, 149-306	GSGGGSG(Seq_1450) linker	1140
RSVF(+)THS_s_to	CP-D3+DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1141

[1090]

RSVF(+)THS_s_to_hp2	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1142
RSVF(+)THS_s_to_hp12	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1143
RSVF(+)THS_s_to_hp2_I221F	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1144
RSVF(+)THS_s_to_hp2_ds	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1145
RSVF(+)THS_s_to_hp23	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1146
RSVF(+)THS_s_to_hp123	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1147
RSVF(+)THS_s_to A102C-A241C	CP-D3+DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1148
RSVF(+)THS_s_to_hp2 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1149
RSVF(+)THS_s_to_hp12 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1150
RSVF(+)THS_s_to_hp2_I221F A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1151
RSVF(+)THS_s_to_hp2_ds A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1152
RSVF(+)THS_s_to_hp23 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1153

[1091]

RSVF(+)THS_s_to_hp123 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1154
RSVF(+)THS_s_to_hp1234 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1155
E-CP_RBD51-307_14mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1		GG linker	1156
E-RBD51-307_14mut_DS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1			1157
RSVF(+)THS_s_to_hp1234 A102C-A241C K196C-E60C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105	GGSGG(Seq_1448) linker	1158
E-CP_RBD51-307_14mutDS-Cav1_THS K196C-E60C	CP-D3, RH + DS-Cav1		GG linker	1159
E-RBD51-307_14mut_DS-Cav1_THS K196C-E60C	CP-D3, RH + DS-Cav1			1160
E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1		GG linker	1161
E-RBD51-307_11mut_DS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1			1162
E-CP_RBD51-307_11mut-K196C-E60C-DS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1		GG linker	1163
E-RBD51-307_11mut-K196C-E60C-DS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1			1164
GSJnh1	Truncated D3	46-310	GG linker	1165
GSJnh2	Truncated D3	46-310	GG linker	1166
GSJnh3	Truncated D3	51-305	GG linker	1167
GSJnh4	Truncated D3	51-305	GSG linker	1168
Domain III with trimer (22)				
RSVF(+)THS_s_to_foldon	CP-D3+DS-Cav1+Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1169
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1170

[1092]

RSVF(+)THS_s_to_hp12_foldon	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1171
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_I221F	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1172
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_ds	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1173
RSVF(+)THS_s_to_foldon A102C-A241C	CP-D3+DS-Cav1+Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1174
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon A102C-A241C	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1175
RSVF(+)THS_s_to_hp12_foldon A102C-A241C	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1176
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_I221F A102C-A241C	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1177
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_ds A102C-A241C	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers and Fd	1178
GSJnhFd1	Truncated D3+Fd		Fd	1179
GSJnhFd2	Truncated D3+Fd		Fd	1180
MS_01	D3+C-terminal CCMPTD	51-103, 146-307	GGPGG(Seq_1451) linker turn, C-terminal CCMPTD	1181

[1093]

MS_02	D3+C-terminal CCMPTD	51-103, 146-307	GGPGG(Seq_1451) turn, longer linker, C-terminal CCMPTD	1182
MS_03	D3+N-terminal CCMPTD	51-103, 139-307	GGPGG(Seq_1451) turn, C-terminal CCMPTD	1183
MS_04	D3+N-terminal CCMPTD	51-103, 137-307	GGPGG(Seq_1451) turn plus fusion peptide, C-terminal CCMPTD	1184
MS_05	D3+N-terminal CCMPTD	51-103, 146-307	GGPGG(Seq_1451) turn, C-terminal CCMPTD	1185
MS_06	CP-D3, C-terminal MTQ-CC	51-103, 146-307	GGPGG(Seq_1451) turn, C-terminal MTQ-CC	1186
MS_07	CP-D3, C-terminal MTQ-CC	51-103, 146-307	GGPGG(Seq_1451) turn, longer linker, C-terminal MTQ-CC	1187
MS_08	CP-D3, N-terminal MTQ-CC	51-103, 146-307	GGPGG(Seq_1451) turn, C-terminal MTQ-CC	1188
MS_09	CP-D3, N-terminal MTQ-CC	51-103, 139-307	GGPGG(Seq_1451) turn plus fusion peptide, C-terminal MTQ-CC	1189
MS_10	CP-D3, N-terminal MTQ-CC	51-103, 139-307	GGPGG(Seq_1451) turn plus fusion peptide, C-terminal MTQ-CC	1190
Tandem domain III (18)				
GSJnh1-TWIN	TD3	(47-307, 103GG147)GSG(47-307, 103GG147)	Glycine linkers	1191
GSJnh2-TWIN	TD3	(47-307, 104GSG146)GSG(47-307, 104GSG146)	Glycine linkers	1192
GSJnh3-TWIN	TD3	(51-305, 103GG147)GSG(51-305, 103GG147)	Glycine linkers	1193
GSJnh4-TWIN	TD3	(51-305, 104GSG146)GSG(51-305, 104GSG146)	Glycine linkers	1194

[1095]

GSJnh1-TWINLg	TD3	(47-307, 103GG147)GGGSGGGG(47-307, 103GG147)	Glycine linkers	1195
GSJnh2-TWINLg	TD3	(47-307, 104GSG146)GGGSGGGG(47-307, 104GSG146)	Glycine linkers	1196
GSJnh3-TWINLg	TD3	(51-305, 103GG147)GGGSGGGG(51-305, 103GG147)	Glycine linkers	1197
GSJnh4-TWINLg	TD3	(51-305, 104GSG146)GGGSGGGG(51-305, 104GSG146)	Glycine linkers	1198
LC-DH01	CP-TD3+long linker	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGGSGGG(Seq_1452)linker	1199
LC-DH02	CP-TD3+long linker+DS	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGGSGGG(Seq_1452) linker	1200
LC-DH03	CP-TD3+short linker	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGG (Seq_1453)linker	1201
LC-DH04	CP-TD3+short linker	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGG(Seq_1453) linker	1202
LC-DH05	LM leader+CP-TD3+short linker	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGG(Seq_1453) linker	1203
LC-DH06	LM leader+CP-TD3+short linker+DS	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGG (Seq_1453)linker	1204
LC-DH07	LM leader+CP-TD3+long linker	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGGSGGG (Seq_1452)linker	1205
LC-DH08	LM leader+CP-TD3+long linker+DS	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGGSGGG(Seq_1452) linker	1206
LC-DH09	LM leader+CP-TD3+long linker+Arg	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGG(Seq_1453) linker	1207
LC-DH10	LM leader+CP-TD3+long linker+Arg+DS	145-306, 52-96	GGGSGGGSGGG(Seq_1453) linker	1208
Tandem domain III with a trimer (10)				
GSJnh1Fd-TWIN	TD3+Fd	(47-307, 103GG147)GG-Fd-GG(47-307, 103GG147)	Glycine linkers	1209
GSJnh2Fd-TWIN	TD3+Fd	(47-307, 104GSG146)GG-Fd-GG(47-307, 104GSG146)	Glycine linkers	1210
GSJnh3Fd-TWIN	TD3+Fd	(51-305, 103GG147)GG-Fd-GG(51-305, 103GG147)	Glycine linkers	1211

[1096]

GSJnh4Fd-TWIN	TD3+Fd	(51-305, 104GSG146)GG-Fd-GG(51-305, 104GSG146)	Glycine linkers	1212
GSJnhFd3a TWIN	TD3+Fd	(F1/GSG/F2/Fd/ F1/GSG/F2/Thbn/H/S)	Glycine linkers	1213
GSJnhFd3b TWIN	TD3+Fd	(H/S/Thbn/F1/GSG/F2/Fd/ F1/GSG/F2)	Glycine linkers	1214
GSJnh1-TWINGFd	TD3+Fd	(47-307, 103Fd147)GSGGSG(47-307, 103GG147)	Glycine linkers	1215
GSJnh2-TWINGFd	TD3+Fd	(47-307, 104Fd146)GSGGSG(47-307, 104GSG146)	Glycine linkers	1216
GSJnh1-TWINFdG	TD3+Fd	(47-307, 103Fd147)GSGGSG(47-307, 103GG147)	Glycine linkers	1217
GSJnh2-TWINFdG	TD3+Fd	(47-307, 104Fd146)GSGGSG(47-307, 104GSG146)	Glycine linkers	1218

[1097]

[1099] [표 21] 단백질 나노입자 상의 최소 위치 Ø 면역원

Construct name	Concept	Particle	RSV F Region (residue #s)	scaffold or other added protein	His tag (N, I or C)	SEQ ID NO
Domain III on ferritin (45)						
GSJnh1F	TD3+Fer	Fer	46-103 GG 147-310	GG linker, C-terminal Fer	N-H8-Strep-GG-Thr-GGS	1219
GSJnh2F	TD3+Fer	Fer	46-104 GSG 146-310	GSG linker, C-term. Fer	N-H8-Strep-GG-Thr-GGS	1220
GSJnh3F	TD3+Fer	Fer	51-103 GG 147-305	GG linker, C-term. Fer	N-H8-Strep-GG-Thr-GGS	1221
GSJnh4F	TD3+Fer	Fer	51-104 GSG 146-305	GSG linker, C-term. Fer	N-H8-Strep-GG-Thr-GGS	1222
TK_01	CP-SØ+DS+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1223
TK_02	CP-SØ+DS+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1224
TK_03	CP-SØ+DS+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1225
TK_04	CP-SØ+DS+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1226
TK_05	CP-SØ+CAV+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1227
TK_06	CP-SØ+CAV+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1228

[1100]

TK_07	CP-SØ+CAV+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1229
TK_08	CP-SØ+CAV+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1230
TK_09	CP-SØ+CAV+DS+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1231
TK_10	CP-SØ+CAV+DS+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1232
TK_11	CP-SØ+CAV+DS+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1233
TK_12	CP-SØ+CAV+DS+DPS	Dps	59-97,194-240	Dps	N-H6-Thr	1234
TK_13	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-305	Fer	N-H6-Thr	1235
TK_14	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-306	Fer	N-H6-Thr	1236
TK_15	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-307	Fer	N-H6-Thr	1237
TK_16	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-308	Fer	N-H6-Thr	1238
TK_17	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-309	Fer	N-H6-Thr	1239
TK_18	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-310	Fer	N-H6-Thr	1240
TK_19	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-311	Fer	N-H6-Thr	1241
TK_20	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-312	Fer	N-H6-Thr	1242
TK_21	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-313	Fer	N-H6-Thr	1243
TK_22	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-314	Fer	N-H6-Thr	1244
TK_23	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-315	Fer	N-H6-Thr	1245
TK_24	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-316	Fer	N-H6-Thr	1246
TK_25	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-317	Fer	N-H6-Thr	1247
TK_26	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-318	Fer	N-H6-Thr	1248
TK_27	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-319	Fer	N-H6-Thr	1249
TK_28	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97,148-320	Fer	N-H6-Thr	1250
TK_29	D3+DS+RH+Fer	Fer	53-104,145-307	Fer	N-H6-Thr	1251
TK_30	D3+DS+RH+Fer	Fer	53-104,145-307	Fer	N-H6-Thr	1252
RSVF(+)THS_s_to+Fer_3ln	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -sgg- Fer	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1253
RSVF(+)THS_s_to_hp2+Fer_3ln	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -sgg- Fer	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1254
RSVF(+)THS_s_to+Fer_5ln	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1255

[1101]

			50-105 - ggsgg(Seq_1448)-Fer			
RSVF(+)THS_s_to_hp2+Fer_5ln	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 - ggsgg(Seq_1448)-Fer	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1256
RSVF(+)THS_s_to_hp12+Fer_5ln	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 - ggsgg(Seq_1448)-Fer	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1257
RSVF(+)THS_s_to_hp2+Fer_3ln_I221F	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -sgg- Fer	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1258
RSVF(+)THS_s_to_hp2+Fer_5ln_I221F	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 - ggsgg(Seq_1448)-Fer	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1259
MP1	D3+Cav+Fer	Fer	50-306 GSG	Glycine linker, Fer	N-Strep-H8-Thr	1260
MP2	D3+Cav+Fer	Fer	50-306 GGSGG(Seq_1448)	Glycine linker, Fer	N-Strep-H8-Thr	1261
MP10	D3+Fer	Fer	SC-GGSGG(Seq_1448)	Glycine linker, Fer	N-Strep-H8-Thr	1262
MP11	D3+Fer	Fer	SC-GGSGG(Seq_1448)	Glycine linker, Fer	N-Strep-H8-Thr	1263
	Minimal epitope with trimer on ferritin (1)					
MP9	Minimal CP-SØ+ATCase trimerization domain+Fer	Fer	56-76 G-ATCase-G-189-211GGSGG (Seq_1448)	Fer	N-Strep-H8-Thr	1264
	Domain III with trimer on ferritin (4)					

[1102]

GSJnh1Fd-F	Truncated sc D3+Fd+Fer	Fer	46-310	103GG147, C-term. Fd-Fer	N-H8StrepGG-Thr-GGS	1265
GSJnh2Fd-F	Truncated sc D3+Fd+Fer	Fer	46-310	104GSG146, C-term. Fd-Fer	N-H8StrepGG-Thr-GGS	1266
GSJnh3Fd-F	Truncated sc D3+Fd+Fer	Fer	51-305	103GG147, C-term. Fd-Fer	C-term. H8StrepGG-Thr-GGS	1267
GSJnh4Fd-F	Truncated sc D3+Fd+Fer	Fer	51-305	104GSG146, C-term. Fd-Fer	C-term. H8StrepGG-Thr-GGS	1268
Minimal epitope on ferritin (10)						
JCB_22	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	PGG linker, Fer	N-H6-HRV3C	1269
JCB_23	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	PGG linker, Fer	N-H6-HRV3C	1270
JCB_24	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	PGG linker, Fer	N-H6-HRV3C	1271
JCB_25	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	GSG linker, Fer	N-H6-HRV3C	1272
JCB_26	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	GSG linker, Fer	N-H6-HRV3C	1273
JCB_27	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	GSG linker, Fer	N-H6-HRV3C	1274
2m0e-resurf1-Fer	Minimal SØ on a 2M0E+Fer	Fer		Miz-1 zinc finger 6 (2M0E) fragment+Fer	N-Strep, H6, Thr	1275
2m0e-resurf1-Fer	Minimal SØ on a 2M0E+Fer	Fer		Miz-1 zinc finger 6 (2M0E) fragment+Fer	N-Strep, H6, Thr	1276
MP3	CP-SØ+Fer	Fer	56-97 GG 189-240 GSG	GG linker+Fer	N-Strep-H8-Thr	1277
MP4	CP-SØ+Fer	Fer	same as MP3 with GGSGG(Seq_1448)	GGSGG (Seq_1448)linker+Fer	N-Strep-H8-Thr	1278
Minimal epitope on LS (2)						
2m0e-resurf1-LS	Minimal SØ on a 2M0E+LS	LS		LS	C-term. Thr H6-strep	1279
2m0e-resurf1-1y12	Minimal SØ on a 2M0E+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1280
Domain III on LS (2)						

[1103]

LS1-E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+LS	LS		LS	N-Strep, H6, Thr	1281
LS2-E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+LS	LS		LS	N-Strep, H6, Thr	1282
Domain III on hcp1 (4)						
1y12- E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1283
1y12- E-RBD51-307_11mut_DS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1284
1y12- E-CP_RBD51-307_14mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1285
1y12- E-RBD51-307_14mut_DS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1286
Monomers on ferritin (40)						
JCB_1_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-232	APGG linker+Fer	N-Strep-H8-Thr	1287
JCB_2_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-232	APGG linker, DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1288
JCB_5_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-232	AGSG linker, DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1289
JCB_7_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-229	GSG linker+Fer	N-Strep-H8-Thr	1290
JCB_8_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-229	GSG linker, DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1291
JCB_28_GSGGGSG_ferr	D3+CAV+Fer	Fer	53-96, 149-304	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1292
TZ_09r_GGSG_ferr	CP-SØ+DS+CAV+glycan+Fer	Fer	192-242, 60-97	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1293
TZ_12r_GGSG_Ferr	CP-SØ+DS+CAV+charge+Fer	Fer	192-242, 60-97	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1294
TZ_13r_GGSG_Ferr	CP-SØ+DS+CAV+glycan+Fer	Fer	192-242, 60-97	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1295
TZ_14r_GGG_Ferr	CP-SØ+DS+CAV+glycan+Fer	Fer	192-242, 60-97	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1296

[1104]

Site_0_1chd_3_GYC_GGSGGSGGSGGSGGG_ferr	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 1CHD scaffold+Fer	Fer	60-95, 192-240	CheB methylesterase fragment (1CHD)+Fer	N-Strep-H8-Thr	1297
JG_circ1_sol_ds_ferr	CP-SØ+DS+Fer	Fer	60-94, 193-237	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1298
JG_2KNO_ferr	CP-SØ+section of TENC1 (2KNO) scaffold+Fer	Fer	60-75, 193-218	Glycine linkers+TENC1 (2KNO) scaffold+Fer	N-Strep-H8-Thr	1299
JG_Circ2_ferr	CP-SØ+Fer	Fer	60-75, 193-218	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1300
JG_Circ2_sol_Ferr	CP-SØ+Fer	Fer	60-75, 193-218	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1301
GSJnh2-Fer	Truncated sc D3	Fer	46-310	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1302
GSJnh3-Fer	Truncated sc D3	Fer	51-305	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1303
GSJnh4-Fer	Truncated sc D3	Fer	51-305	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1304
GSJnh2-TWIN-Fer	TD3	Fer	47-307, 47-307	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1305
GSJnh3-TWIN-Fer	TD3	Fer	51-305, 51-305	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1306
GSJnh4-TWIN-Fer	TD3	Fer	51-305, 51-305	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1307
GSJnh2Fd-TWIN-Fer	TD3 with Fd	Fer	47-307, 47-307	Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N- H8-Strep-Thr	1308
GSJnh4Fd-TWIN-Fer	TD3 with Fd	Fer	51-305, 51-305	Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N- H8-Strep-Thr	1309
GSJnhFd2-Fer	TD3 with Fd	Fer		Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N- H8-Strep-Thr	1310
GSJnh2-TWINLg-Fer	TD3	Fer	47-307, 47-307	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1311
GSJnh3-TWINLg-Fer	TD3	Fer	51-305, 51-305	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1312
GSJnh4-TWINLg-Fer	TD3	Fer	51-305, 51-305	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1313

[1105]

RSVF(+)THS_s_to A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1314
RSVF(+)THS_s_to_foldon A102C-A241C_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1315
RSVF(+)THS_s_to_hp12 A102C-A241C_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1316
RSVF(+)THS_s_to_hp123 A102C-A241C_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1317
RSVF(+)THS_s_to_hp1234 A102C-A241C_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1318
RSVF(+)THS_s_to_hp123_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1319
RSVF(+)THS_s_to_hp2 A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1320
RSVF(+)THS_s_to_hp23 A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1321
RSVF(+)THS_s_to_hp23_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1322
RSVF(+)THS_s_to_hp2_ds A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1323
RSVF(+)THS_s_to_hp2_ds_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 -ggsgg-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1324
RSVF(+)THS_s_to_hp2_I221F A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1325

[1106]

C-Trimer Fer: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSG	CP-SØ+Fer	Fer		Glycine linker+Fer	N- Leader-Strep-HISx6-Thr	1326
Monomers on LS (44)						
JCB_1_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-232	APGG linker+LS	C-term. Thr, Strep, and H8	1327
JCB_2_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-232	APGG linker, DS+LS	C-term. Thr, Strep, and H8	1328
JCB_5_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-232	AGSG linker, DS+LS	C-term. Thr, Strep, and H8	1329
JCB_7_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-229	GSG linker+LS	C-term. Thr, Strep, and H8	1330
JCB_8_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-229	GSG linker, DS+LS	C-term. Thr, Strep, and H8	1331
JCB_28_GSGGSG_LS	D3+CAV+LS	LS	53-96, 149-304	Glycine linkers+LS	C-term. Thr, Strep, and H8	1332
TZ_12r_GGSGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+charge+LS	LS	192-242, 60-97	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1333
TZ_13r_GGSGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+glycan+LS	LS	192-242, 60-97	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1334
TZ_14r_GGSGSG_LS	CP-SØ+DS+CAV+glycan+LS	LS	192-242, 60-97	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1335
Site_0_1chd_3_GYC_GGSGGSGGSGGSGGG_LS	CP-SØ+CAV+RH+DS+section of 1CHD scaffold+LS	LS	60-95, 192-240	CheB methylesterase fragment (1CHD)+LS	C-term. Thr-H6Strep	1336
JG_circ1_sol_ds_LS	CP-SØ+DS+LS	LS	60-94, 193-237	Glycine linkers+LS	C-Thr-His-Strep	1337
JG_2KNO_LS	CP-SØ+section of TENC1 (2KNO) scaffold+LS	LS	60-75, 193-218	Glycine linkers+TENC1 (2KNO) scaffold+Fer	C-Thr-His-Strep	1338

[1107]

JG_Circ2_LS	CP-SØ+LS	LS	60-75, 193-218	Glycine linkers+LS	C-Thr-His-Strep	1339
JG_Circ2_sol_LS	CP-SØ+LS	LS	60-75, 193-218	Glycine linkers+LS	C-Thr-His-Strep	1340
GSJnh2-LS	Truncated sc D3	LS	46-310	Glycine linkers, LS	N- H8-Strep-Thr	1341
GSJnh3-LS	Truncated sc D3	LS	51-305	Glycine linkers, LS	N- H8-Strep-Thr	1342
GSJnh4-LS	Truncated sc D3	LS	51-305	Glycine linkers, LS	N- H8-Strep-Thr	1343
GSJnh2-TWIN-LS	TD3	LS	47-307, 47-307	Glycine linkers, LS	N- H8-Strep-Thr	1344
GSJnh3-TWIN-LS	TD3	LS	51-305, 51-305	Glycine linkers, LS	N- H8-Strep-Thr	1345
GSJnh4-TWIN-LS	TD3	LS	51-305, 51-305	Glycine linkers, LS	N- H8-Strep-Thr	1346
GSJnh2Fd-TWIN-LS	TD3 with Fd	LS	47-307, 47-307	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N- H8-Strep-Thr	1347
GSJnh4Fd-TWIN-LS	TD3 with Fd	LS	51-305, 51-305	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N- H8-Strep-Thr	1348
GSJnhFd2-LS	TD3 with Fd	LS		Glycine linkers+T4 Fd+LS	N- H8-Strep-Thr	1349
GSJnh2-TWINLg-LS	TD3	LS	47-307, 47-307	Glycine linkers, LS	N- H8-Strep-Thr	1350
GSJnh3-TWINLg-LS	TD3	LS	51-305, 51-305	Glycine linkers, LS	N- H8-Strep-Thr	1351
GSJnh4-TWINLg-LS	TD3	LS	51-305, 51-305	Glycine linkers, LS	N- H8-Strep-Thr	1352
RSVF(+)THS_s_to_gagggsggsggsggg_ls	CP D3 + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1353
RSVF(+)THS_s_to_hp2_gagggsggsggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1354

[1108]

RSVF(+)THS_s_to_hp12_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1355
RSVF(+)THS_s_to_hp2_I221F_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1356
RSVF(+)THS_s_to_A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1357
RSVF(+)THS_s_to_hp12_A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1358
RSVF(+)THS_s_to_hp123_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1359
RSVF(+)THS_s_to_hp123_A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1360
RSVF(+)THS_s_to_hp1234_A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1361
RSVF(+)THS_s_to_hp2_A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1362
RSVF(+)THS_s_to_hp2_ds_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1363
RSVF(+)THS_s_to_hp2_ds_A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1364
RSVF(+)THS_s_to_hp2_I221F_A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1365

[1109]

			50-105 -ggsggsg (Seq_1445) - Fd			
RSVF(+)THS_s_to_hp23_gagggsggsggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1366
RSVF(+)THS_s_to_hp23 A102C-A241C_gagggsggsggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1367
C-Trimer LS: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG	CP-SØ+LS	LS		Glycine linker+LS	N- Leader-Strep-HISx6-Thr	1368
C-Trimer LS: leader-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-LS-Thr-HISx6-Strep:	CP-SØ+LS	LS		Glycine linker+LS	C-Leader-Thr-H6-Strep	1369
Trimers on ferritin (30)						
JCB_13_GSGGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+DS+GCN4+Fer	Fer	60-94, 192-232	APGG linker, GCN4, inter-DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1370
JCB_19_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+DS+GCN4+Fer	Fer	60-94, 192-229	GSG linker, GCN4, inter-DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1371
TZ_05_GGSG_ferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+charge+Fer	Fer	192-242, 60-97	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1372
TZ_08r_GGSG_ferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+glycan+Fer	Fer	192-242, 60-97	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1373
TZ_15_GGSG_3Hferr	CP-SØ+interchain DS+CXVIII+Fer	Fer	58-97, 192-242	Glycine linkers+CXVIII+Fer	N-Strep-H8-Thr	1374
TZ_16_GGSG_3Hferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+CXVIII+Fer	Fer	58-97, 192-242	Glycine linkers+CXVIII+Fer	N-Strep-H8-Thr	1375
TZ_17_GGSGSG_3Hferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+CXVIII+Fer	Fer	58-97, 192-242	Glycine linkers+CXVIII+Fer	N-Strep-H8-Thr	1376
TZ_19_GGSGSGG_3Hferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+charge+glycan+CXVIII+Fer	Fer	58-97, 192-242	Glycine linkers+CXVIII+Fer	N-Strep-H8-Thr	1377
TZ_19_GGSGG_ferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+charge+glycan+Fer	Fer	58-97, 192-242	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1378
TZ_20_GGSGSGG_3Hferr	CP-SØ+DS+CAV+charge+glycan+CXVIII+Fer	Fer	58-97, 192-242	Glycine linkers+CXVIII+Fer	N-Strep-H8-Thr	1379

[1110]

MS_03_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	D3+N-term. CCMPTD+Fer	Fer	51-103, 139-307	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1380
MS_05_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	D3+N-term. CCMPTD+Fer	Fer	51-103, 146-307	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1381
MS_07_ GSGGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	CP-D3, C-term. MTQ-CC+Fer	Fer	51-103, 146-307	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1382
MS_08_ GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	CP-D3, C-term. MTQ-CC+Fer	Fer	51-103, 146-307	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1383
MS_09_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	CP-D3, C-term. MTQ-CC+Fer	Fer	51-103, 139-307	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-Thr	1384
GSUnh2-Fer A74C E218C	Truncated sc D3, interchain DS	Fer	46-310	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1385
GSUnh3-Fer A74C E218C	Truncated sc D3, interchain DS	Fer	51-305	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1386
GSUnh4-Fer A74C E218C	Truncated sc D3, interchain DS	Fer	51-305	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1387
GSUnh4-TWIN-Fer A74C E218C	TD3, interchain DS	Fer	51-305, 51-305	Glycine linkers, Fer	N- H8-Strep-Thr	1388
RSVF(+)THS_s_to_foldon_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1389
RSVF(+)THS_s_to_hp12_foldon A102C-A241C_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1390
RSVF(+)THS_s_to_hp12_foldon_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1391
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon A102C-A241C_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1392

[1111]

RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_ds A102C-A241C_ggsgggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105	Glycine linkers, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1393
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_ds_ggsgggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1394
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_ggsgggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1395
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_I221F A102C-A241C_ggsgggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1396
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_I221F_ggsgggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1397
C-Trimer 1GQ3-Fer: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGGSG-1GQ3- GGSGGGSGGGSGGGSG-Fer	CP-SØ+C-term. ATCase+Fer	Fer		Glycine linkers+ATCase (1GQ3)+Fer	N- Leader-Strep-HISx6-Thr	1398
C-Trimer 1GQ3-Fer: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3- GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG-Fer	CP-SØ+C-term. ATCase+Fer	Fer		Glycine linkers+ATCase (1GQ3)+Fer	N- Leader-Strep-HISx6-Thr	1399
Trimers on LS (30)						
JCB_13_GSGGGSG_LS	CP-SØ+CAV+DS+GCN4+LS	LS	60-94, 192-232	APGG linker, GCN4, inter-DS+LS	C-term. Thr, Strep, and H8	1400
JCB_19_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+DS+GCN4+LS	LS	60-94, 192-229	GSG linker, GCN4, inter-DS+LS	C-term. Thr, Strep, and H8	1401
TZ_05_GSGGGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+charge+LS	LS	192-242, 60-97	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1402
TZ_08r_GGSGGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+glycan+LS	LS	192-242, 60-97	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1403

[1112]

TZ_09r_GGSGGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+glycan+LS	LS	192-242, 60-97	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1404
TZ_15_GGG-LS	CP-SØ+DS+LS	LS	58-97, 192-242	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1405
TZ_16_GGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+LS	LS	58-97, 192-242	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1406
TZ_17_GGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+LS	LS	58-97, 192-242	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1407
TZ_19_GGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+charge+glycan+LS	LS	58-97, 192-242	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1408
TZ_20_GGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+charge+glycan+LS	LS	58-97, 192-242	Glycine linkers+LS	N-Strep-H8-Thr	1409
MS_03_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	D3+N-term. CCMPTD+LS	LS	51-103, 139-307	Glycine linkers+CCMPTD+LS	N-Strep-H8-Thr	1410
MS_05_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	D3+N-term. CCMPTD+LS	LS	51-103, 146-307	Glycine linkers+CCMPTD+LS	N-Strep-H8-Thr	1411
MS_07_ GSGGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	CP-D3, C-term. MTQ-CC+LS	LS	51-103, 146-307	Glycine linkers+CCMPTD+LS	N-Strep-H8-Thr	1412
MS_08_ GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	CP-D3, C-term. MTQ-CC+LS	LS	51-103, 146-307	Glycine linkers+CCMPTD+LS	N-Strep-H8-Thr	1413
MS_09_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	CP-D3, C-term. MTQ-CC+LS	LS	51-103, 139-307	Glycine linkers+CCMPTD+LS	N-Strep-H8-Thrombin	1414
RSVF(+)THS_s_to_foldon_gagggsggsggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105+Fd	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1415
RSVF(+)THS_s_to_foldon A102C-A241C_gagggsggsggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105+Fd	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1416
RSVF(+)THS_s_to_hp12_foldon_gagggsggsggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105+Fd	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1417
RSVF(+)THS_s_to_hp12_foldon A102C-A241C_gagggsggsggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsggsg(Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1418

[1113]

RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105+Fd	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1419
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1420
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_ds_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1421
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_ds A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1422
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_I221F_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105 -ggsgggsg (Seq_1445) - Fd	Glycine linkers+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1423
RSVF(+)THS_s_to_hp2_foldon_I221F A102C-A241C_gagggsgggsgggsggg_ls	CP D3 + EH + DS-Cav1+Fd	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448)-50-105+Fd	Glycine linkers, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1424
C-Trimer 1GQ3- LS_60mer: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3- GGSGGGSGGGSGGGSG-LS	CP-SØ+C-term. ATCase +LS	LS		Glycine linkers+E coli ATCase (1GQ3)+LS	N- Leader-Strep-HISx6-Thr	1425
C-Trimer 1GQ3- LS_60mer: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3-GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG-LS	CP-SØ+C-term. ATCase +LS	LS		Glycine linkers+E coli ATCase (1GQ3)+LS	N- Leader-Strep-HISx6-Thr	1426
C-Trimer 1GQ3- LS_60mer: leader-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3- GGSGGGSGGGSGGGSG-LS-Thr-HISx6-Strep	CP-SØ+C-term. ATCase +LS	LS		Glycine linkers+E coli ATCase (1GQ3)+LS	C-Leader-Thr-H6-Strep	1427
C-Trimer 1GQ3- LS_60mer: leader-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3-GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG-LS-Thr-HISx6-Strep	CP-SØ+C-term. ATCase +LS	LS		Glycine linkers+E coli ATCase (1GQ3)+LS	C-Leader-Thr-H6-Strep	1428

[1114]

[1116] **실시예 15**

[1117] **선융합(prefusion) 안정된 F 단백질의 면역원성**

[1118] 분석의 연속(상기 제공된 것에 추가적으로)은 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 본 명세서에서 제공된 재조합 RSV F 단백질의 면역원성을 나타내는 것을 수행한다. 결과는 선융합(prefusion) 입체형태에서 안정된 제공된 재조합 RSV F 단백질은 다수 동물 모델에서 면역반응을 유도하고 미래 바이러스 도전에 대하여 면역반응 보호를 추가적으로 유도하는 것을 나타낸다.

[1120] 도 73-84에서, 달리 지시되지 않으면, 상기 실시예에서, 참조는 하기의 재조합 RSV F 단백질로 만들어진다:

[1121] DS (하위유형 A) = RSV A2 F(+)FdTHS S155C, S290C (서열번호: 185)

[1122] DS (하위유형 B) = RSV B18537 F(+)FdTHS S155C, S290C (서열번호: 1479)

[1123] DS-Cav1 (하위유형 A) = RSV A2 F(+)FdTHS S155C, S290C, S190F, V207L (서열번호: 371)

[1124] DS-Cav1 (하위유형 B) = RSV B18537 F(+)FdTHS S155C, S290C, S190F, V207L (서열번호: 372)

[1125] 후융합(postfusion) F (하위유형 A) = RSV A2 F(+) dFPTHS

[1126] 도 73은, 보강제로서 Ribi를 사용하여, DS-Cav1의 단일 사슬 버젼은 IM이 작은 것을 유도하지만 단일 용량 후에 rhesus macaques에서 2 주 후에 중화 항체 반응을 검출하는 것에 주어진 페리틴(ferritin) 나노입자의 맥락에서 존재되는 DS-Cav1의 단일 사슬 버젼을 설명한다. 상기 작으나 하나의 용량 후에 반응을 검출 할 수 있는 것에 기반하여 두번째 용량으로 급속 후에 현저한 중화하는 항체 반응이 유도될 것이다. 하기에 설명된, 마우스에서 2 용량 후에 Ribi로 제조된 페리틴(ferritin) 나노입자에 존재되는 절단된 DS 안정된 선융합(prefusion) F 삼량체의 2 mcg의 면역원성과 일치한다.

[1127] 도 74에 설명된 바와 같이, 안정된 선융합의 DS 버젼에 마우스 (CB6F1/J) 면역반응은 0주 및 3주 상에 폴리 ICLC의 50 mcg에서 DS F의 20 mcg 으로 면역된 마우스에서 유도된다. 중화 활성은 12 주 이상의 DS 면역된 마우스에서 높은 수준을 유지한다.

[1128] 도 75에 설명된 바와 같이, DS (하위유형 A) = RSV A2 F(+)FdTHS S155C, S290C (서열번호: 185)로 예방접종은 동물 모델에서 RSV 감염을 방지할 수 있다. 마우스는 0주 및 3주에서 안정된 F 단백질 (서열번호: 185)의 DS 버젼을 가지는 IM으로 면역되었다. 마우스는 마지막 백신 후에 4 개월, 19 주에 동질성 RSV A2 바이러스의 10e7으로 내부비강으로 도전되었다. 5 일에 폐 및 코는 조직에서 로드된 바이러스를 측정하기 위해 제거되었다. 결과는 선융합(prefusion) F의 DS 버젼으로 면역된 마우스는 폐 또는 코에서 바이러스를 검출하지 않는다는 것을 나타낸다.

[1129] 추가적으로, DS (하위유형 A) = RSV A2 F(+)FdTHS S155C, S290C (서열번호: 185)로 투여된 마우스는 면역원에 유형 2 사이토카인 반응을 진행하지 않는다. 사이토카인 내용은 5일에 폐 및 코 상등액에서 측정된 후 대조군 (PBS), 야생형 RSV (RSV), 포르말린 비활성된 RSV (FIRSV), DS (서열번호: 185; "선-융합 F), 또는 안정된 후 융합 F 구성체 (후-융합 F)으로 초기 예방접종되었다. 주요 감염이 진행되는 마우스는 예상되는 바와 같이 IFN-감마 및 MIP-1알파의 현저한 수준을 가졌다. FI-RSV 면역된 마우스는 유형 2 사이토카인 (IL-4, IL-5, 및 IL-13) 및 백신-증강된 질병과 관련된 반응의 통상적 상피 손상 (IL-6) 과 관련된 사이토카인의 현저한 수준을 가졌다. 선융합(prefusion) F (DS)으로 면역된 마우스는 효과적이고조절 반응과 관련되어 IFN-감마 및 IL-10의 보통 수준 및 병이 없고 체중 손실이 없는 것을 가졌다.

[1130] 재조합 RSV F DSCav1 단백질 (서열번호: 371)로 면역된 비인간 영장류 모델로부터 혈청의 중화 활성은 3-용량 예방접종의 코스로 분석되었다(도 77). 군 당 4 마리, Rhesus macaques는 하위유형 A 서열에 기반되고 폴리 ICLC로 제조된 DS-Cav1 선융합(prefusion) F (서열번호: 371) 또는 후융합(postfusion) F 로 50 mcg IM로 0 주 및 4 주에서 2회 면역되었다. 26주에, 모든 군은 폴리 ICLC로 제조된 DS-Cav1 선융합의 50 mcg IM으로 기폭되었다(boosted). DS-Cav1의 2 용량 후에, 현저한 중화 활성은 5 개월 이상 동안 보호 한계점 이상을 유도하고 및 지연시켰다. 후융합(postfusion) F는 면역원이었고 2 용량 후에 중화 활성을 검출하는 것을 유도하였으나, 보호 한계점 이상 단지 일시적이었다. 선융합(prefusion) F 안정된 DS-Cav1의 세번째 용량을 가지는 후융합(postfusion) F 군을 기폭(Boosting)하는 것은 두번째 용량 후에 얻어진 상기 중화 활성을 일으키는 것을 초래하였다. 동질 하위유형 A에 대하여 세번째 용량 중화 활성 후에 븕은색 박스된 영역(boxed areas)에 줄친 10 주 이상 동안 안정하게 유지되었다.

[1131] DSCav1 구성체가 백반(alum)으로 제조될 수 있다는 것을 나타내기 위하여, 정제된 DSCav1 (서열번호: 371)을 다양한 비율에서 백반(alum) 항드록사이드 젤 또는 백반(alum) 포스페이트 젤로 혼합하였다. BALB/c 마우스는 0 주 및 3 주에서 백반(alum) (알루미늄 하이드록사이드 젤 또는 알루미늄 포스페이트 젤)으로 제조된 안정 선융합(prefusion) F의 DS-Cav1 버젼의 10 mcg을 가지는 IM으로 면역되었다. 단백질:alum wt:wt 비율은 1:1 및 1:10 사이에 다양항다. 모든 제제는 면역원이었다(도 78). 추가적으로, DSCav1 예방접종을 우하여 보강제로서 백반(alum)의 사용을 비인간 영장류 모델에서 나타냈다(도 79). Rhesus macaques를 정제된 DS 단백질로 0, 4, 및 26주에서 면역되었다(서열번호: 185). 0 및 4 주사제는 폴리 ICLC에서 제조된 안정된 RSV 선융합(prefusion) F (50 mcg)의 DS 버젼으로 구성된다. 26주 기폭(boost)은 알루미늄 포스페이트 젤에서 제조되었다. 따라서 백반(alum)은 NHP에서 안정된 선융합(prefusion) F를 위한 효과적인 보강제이다.

[1132] 다른 예방접종 프로토콜이 DSCav1으로 효과적인 면역반응을 유도하는데 효과적인것을 나타내기 위하여, 마우스를 DSCav1를 발현하는 유전자 -기반 벡터으로 면역하였고, RSV F에 대한 얻어진 면역반응은 평가되었다(도 80). CB6F1/J 마우스는 0 및 3 주에서 F의 야생형 버젼을 발현하는 재조합 아데노바이러스 세로타입 5 벡터로 면역되거나 또는 3주에서 백반(alum)에서 제조된 DS-Cav1의 10 mcg으로 기폭(boosted)되고 preF 멤브린 고정된 (non-secreted)의 DS-Cav1 버젼을 발현하는 rAd5로 0주에서 면역되었다. 백반(alum)에서 DS-Cav1로 기폭된 rAd5-preF 준비된(primed) 마우스는 유전자 -기반에 의해 운반된 선융합(prefusion) F가 면역원이고 후속적 단백질 기폭을 위한 주요성이 일수 있는 것을 나타내는 단지 2개 용량 의 단백질로 주어진 마우스만큼 중화항체를 생산하였다.

[1133] 추가적으로, DSCav1 단백질은 야생형 (WT) RSV F에 대해 면역반응을 기폭(boosting)하는데 효과적이다(도 81). 기폭전에 2년 이상 RSV F (하위유형 A)의 WT 버젼을 발현하는 재조합 아데노바이러스 벡터로 면역된 비인간 영장류는 백반(alum)에서 제조된 DS-Cav1 하위유형 A 또는 하위유형 B의 단일 50 mcg 용량으로 기폭되었다. 중화 활성 기폭 후에 2주는 하위유형 A 및 B DS-Cav1 단백질 모두에 의해 현저하게 증가되었다 (도 81-82).

[1134] 안정된 F의 DS (S155C, S290C) 버젼의 교차-하위유형 효과성을 나타내기 위하여, CB6F1/J 마우스는 0 주 및 3 주에서 Ribi에서 제조된 DS의 10 mcg을 가지는 IM 면역되었다(도 83). 중화 항체는 하위유형 A 및 B 바이러스 모두에 대한 A (서열번호: 185) 및 B (서열번호: 1479) 하위유형 단백질 모두에 의해 유도되었다. A 및 B 모두를 받는 군은 총 단백질 20 mcg을 받았다.

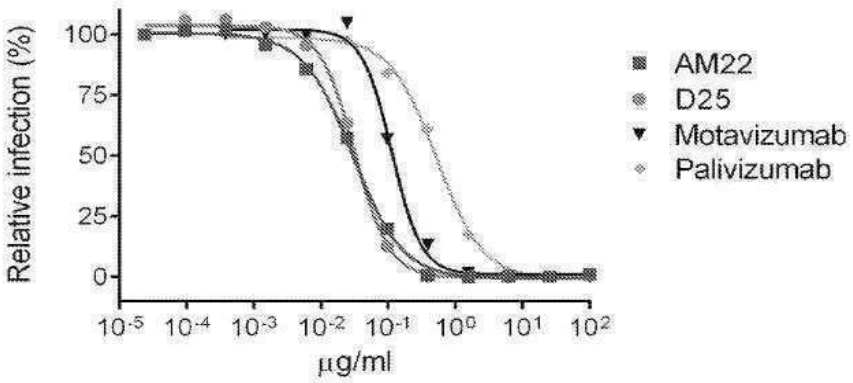
[1135] 도 84는 글리코실레이션(Glycosylation) of RSV F 단백질 변형이 자체 면역원성을 감소시키다는 것을 설명한다. BALB/c 마우스는 0 및 3주에서 폴리 IC에서 제조된 안정된 선융합(prefusion) F의 DS 버젼의 10 mcg으로 면역되었다. F 구성체는 글리코시다제(glycosidases)로 치료되거나 또는 돌연변이체 버젼은 N27 및 N70에서 글리코실레이션(Glycosylation) 위치를 글리코실레이션을 제거하기 위하여 만들어졌다. F 단백질은 만약 N500 글리코실레이션(Glycosylation)이 돌연변이된다면 생성될 수 었다는 것은 이 위치에서 글리코실레이션(Glycosylation)이 발현에 대하여 요구되는 것을 제시한다. 중화 활성은 F의 임의의 글리코실레이션(Glycosylation) 변이에 의해 면역된 마우스에서 5 주 (solid bars) 및 7주 (hatched bars) 에서 검출되었다. 그러나, 글리코실레이션(Glycosylation) 변형은 안정된 선융합(prefusion) F의 원래 DS 버젼과 비교하여 면역원성 감소하는 것을 나타낸다. **** = P<0.0001.

[1137] 설명된 방법 또는 조성물의 정확한 세부사항이 설명된 실시형태의 정신으로부터 출발없이 다양할 수 있거나 또는 수정될 수 있다는 것은 명백할 것이다. 우리는 하기의 청구항의 정신 및 범위 내에 있는 모든 수정 및 변형을 청구한다.

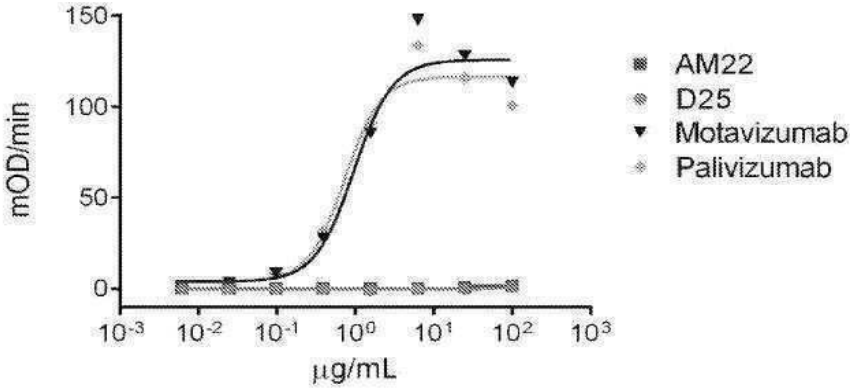
도면

도면1a

도 1A RSV neutralization

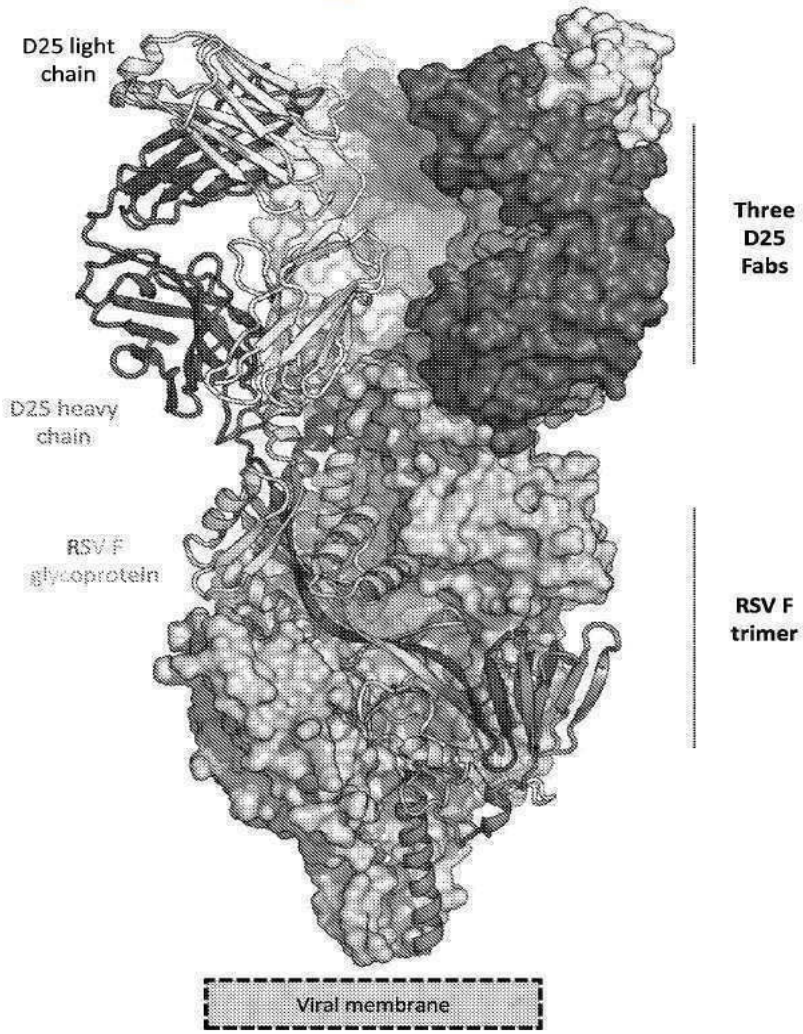


도 1B
Binding to postfusion RSV F

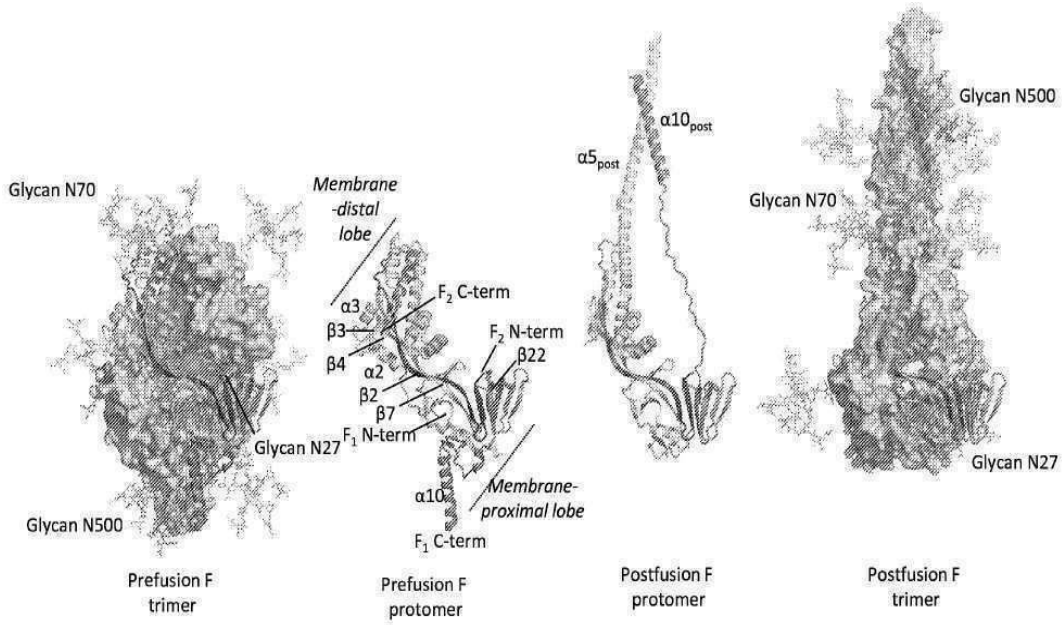


도면1c

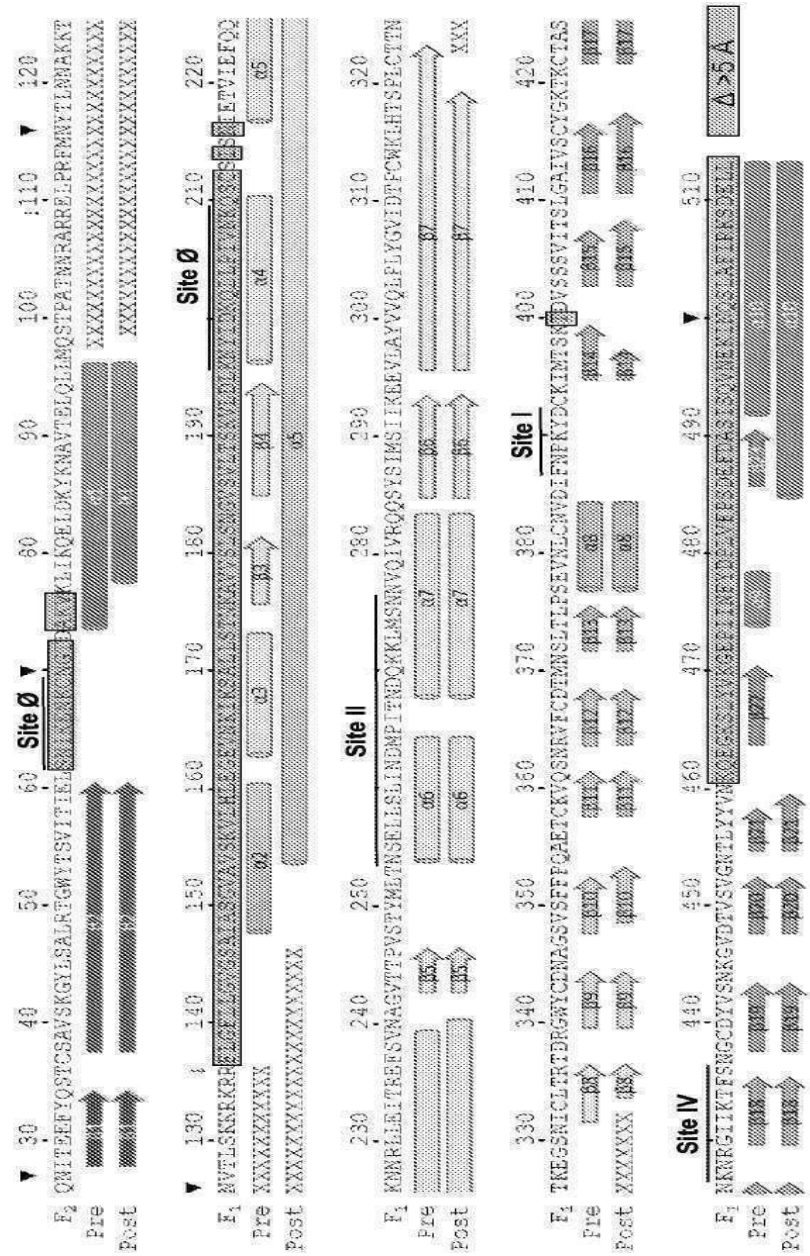
도 1C



도면2a

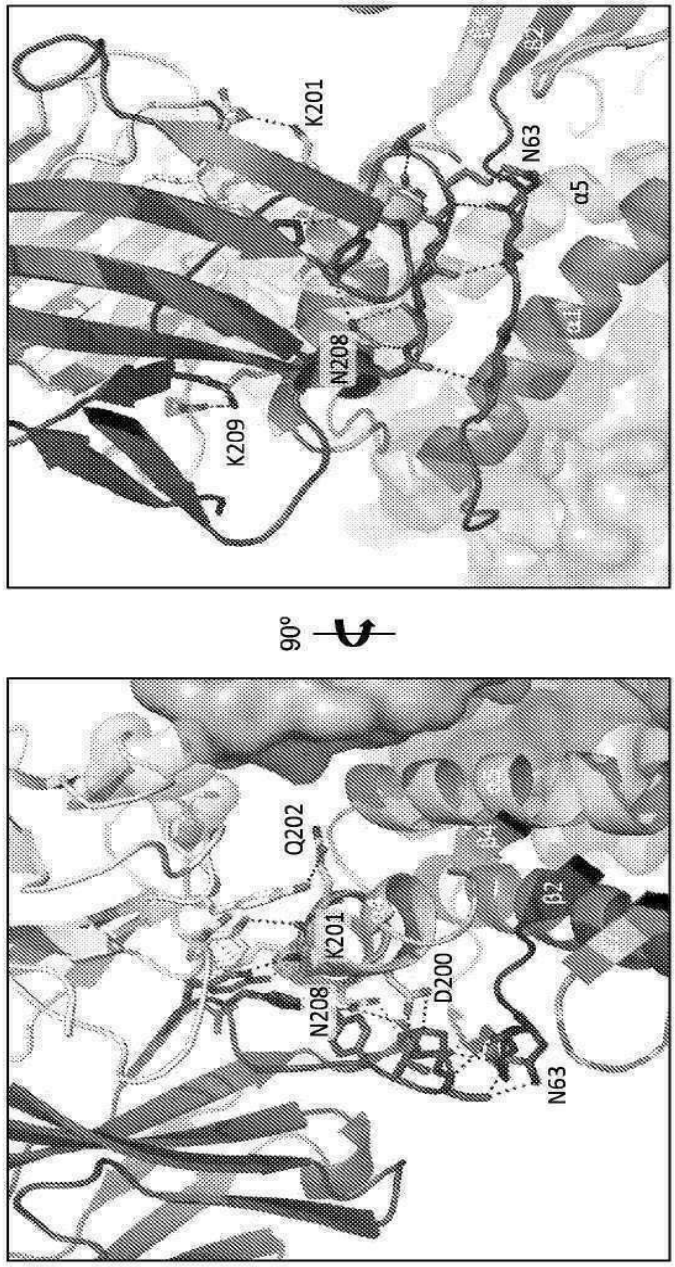


도면2b

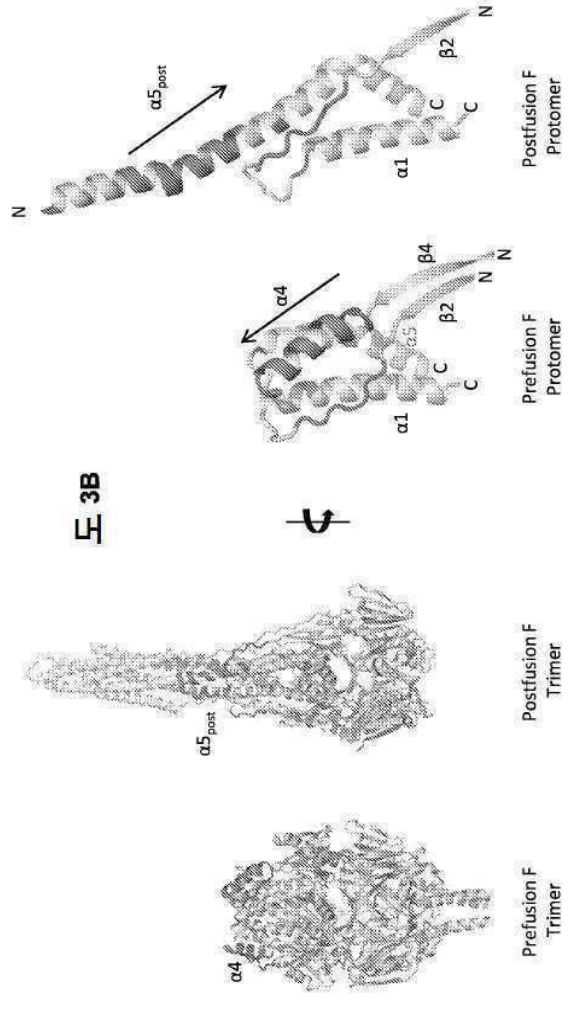

Site Ø
Site Ø
Site II
Site I
Site IV
Pre
Post
α1
α2
α3
α4
α5
α6
α7
α8
β1
β2
β3
β4
β5
β6
β7
β8
Δ>5 A

도면3a

도 3A



도면3b

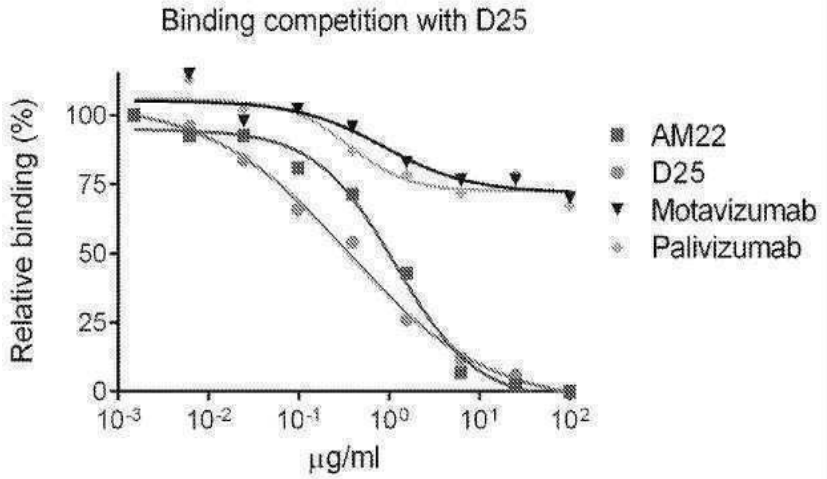


도 3C

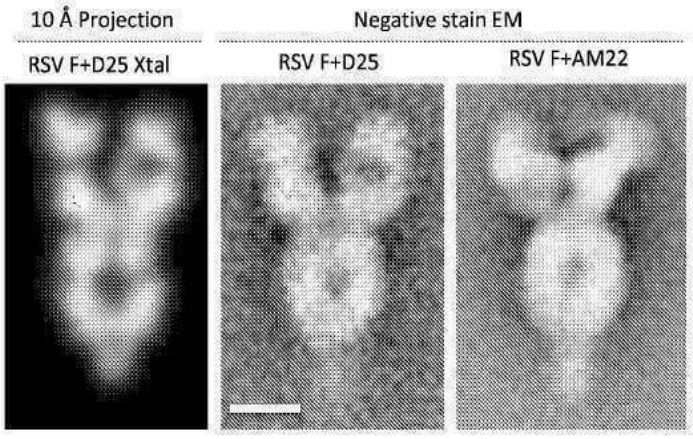
	F2	F1	Identity with hRSV/A ectodomain epitope region	non-epitope	Changes within epitope
hRSV/A	63-NIKENKCNGTDA-74	200-DKQLLPIVNKQSCS-213			
hRSV/B	63-NIKEIKCNGTDL-74	200-NNQLLPIVNKQSCS-213	30/36 (77%)	427/446 (95.7%)	6/25 (24%)
hRSV	63-[I/L]NVKCTEL-74	200-DKQLLPIVNKQSCS-213	13/26 (50%)	403/446 (90.4%)	13/56 (23%)

도면4a

도 4A

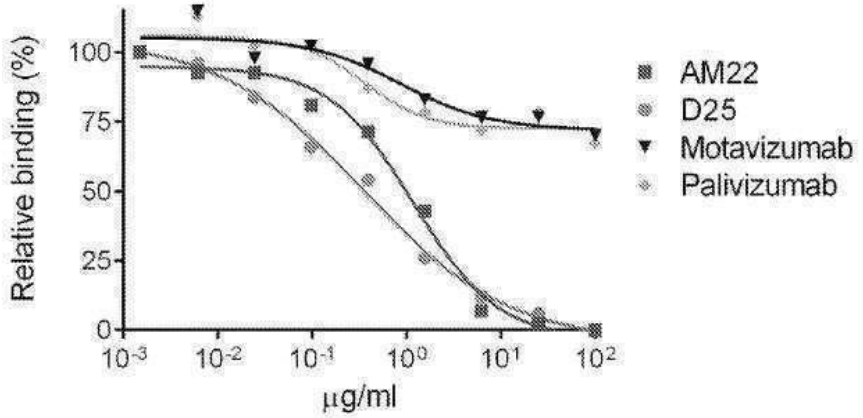

Binding competition with D25
Relative binding (%)
100
75
50
25
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
μg/ml
AM22
D25
Motavizumab
Palivizumab

도 4B

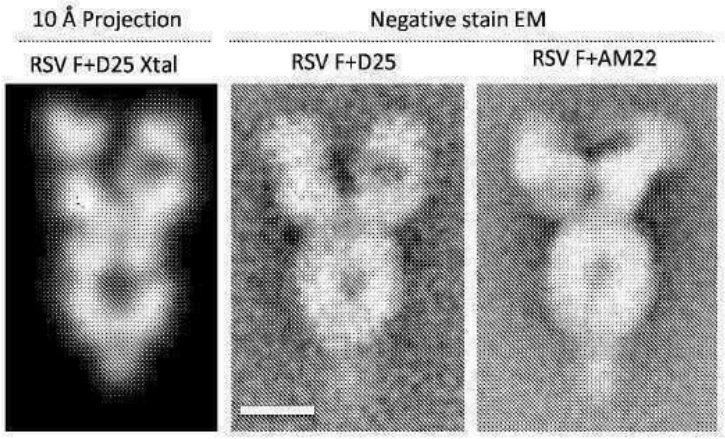

10 Å Projection
Negative stain EM
RSV F+D25 Xtal
RSV F+D25
RSV F+AM22

도면4c

도 4A

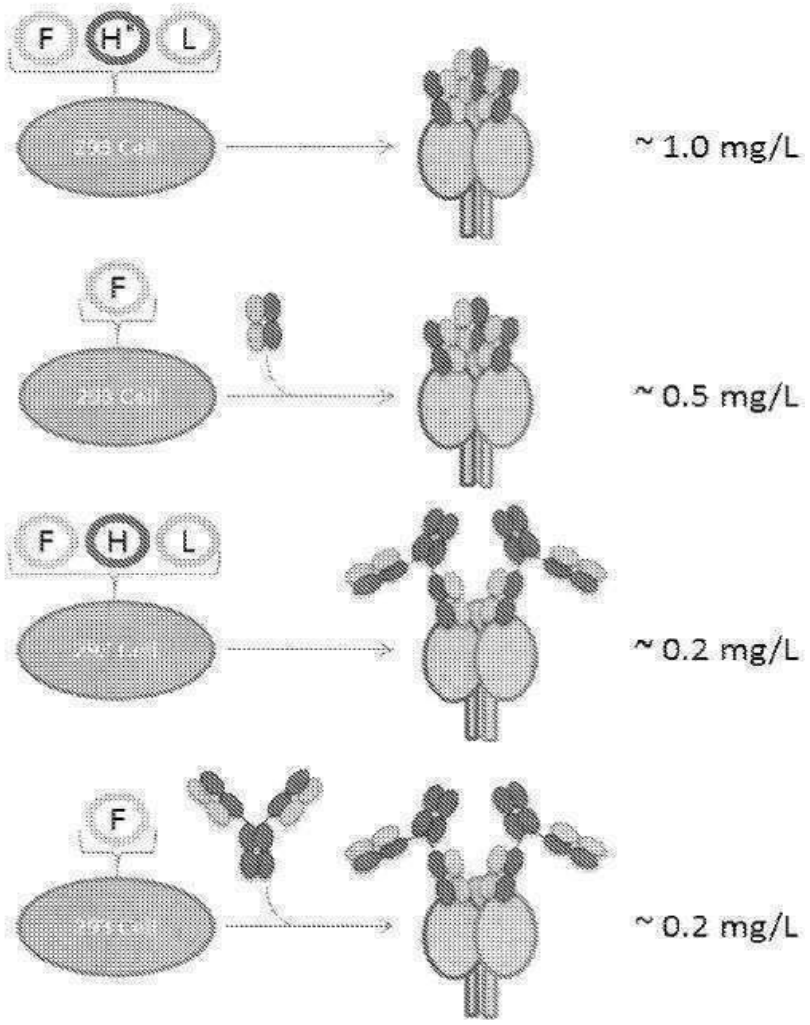

Binding competition with D25
Relative binding (%)
100
75
50
25
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
μg/ml
AM22
D25
Motavizumab
Palivizumab

도 4B

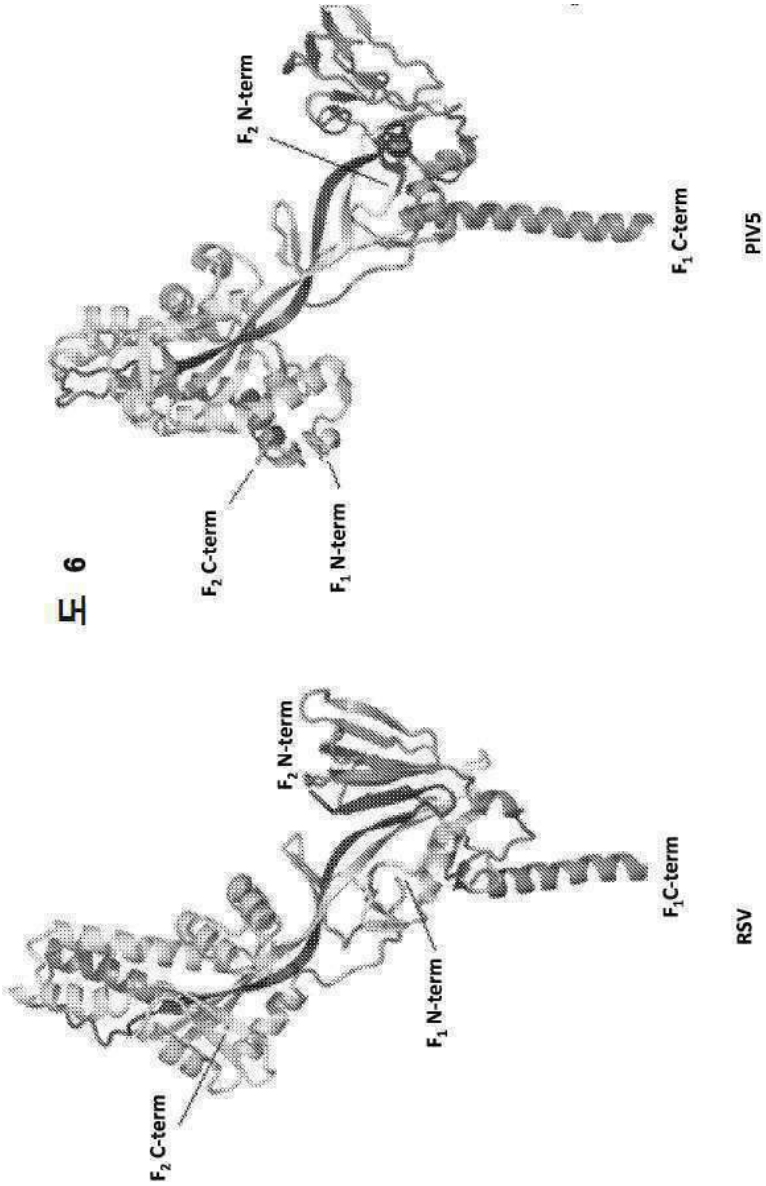

10 Å Projection
Negative stain EM
RSV F+D25 Xtal
RSV F+D25
RSV F+AM22

도면5

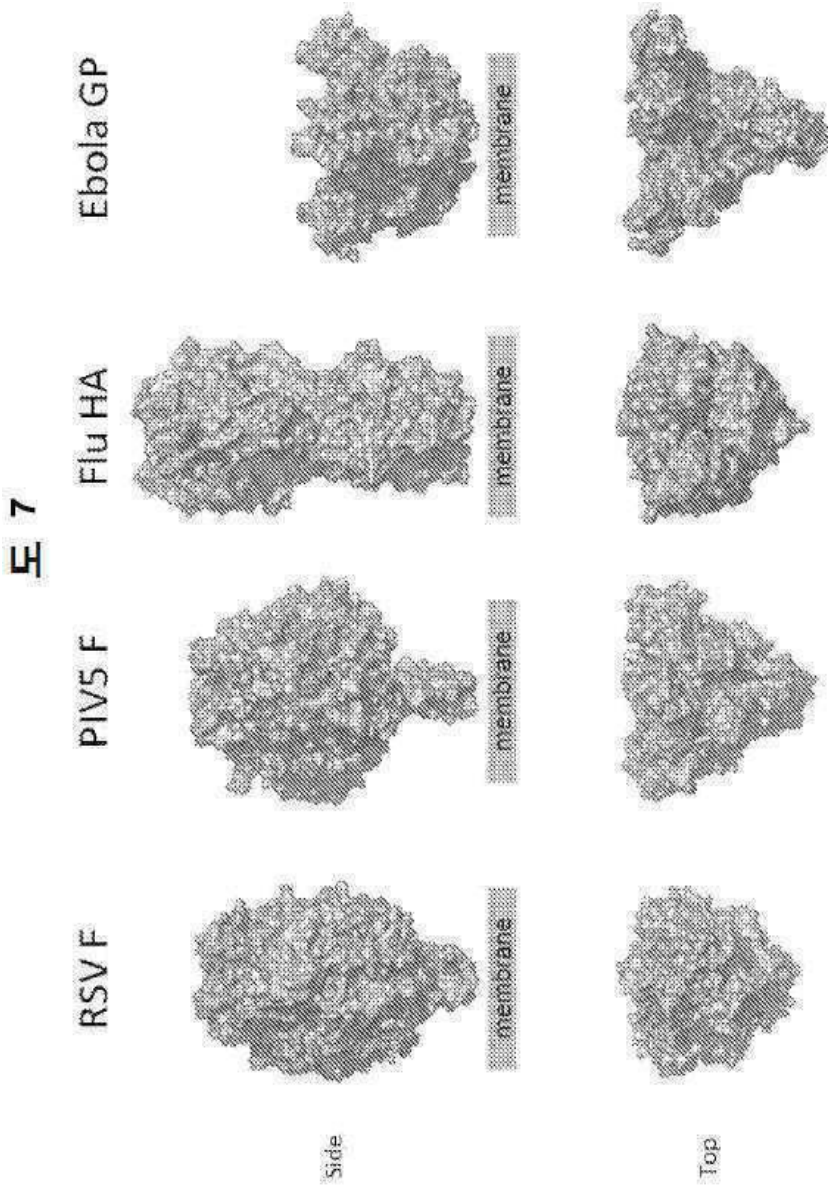
FIG. 5



도면6

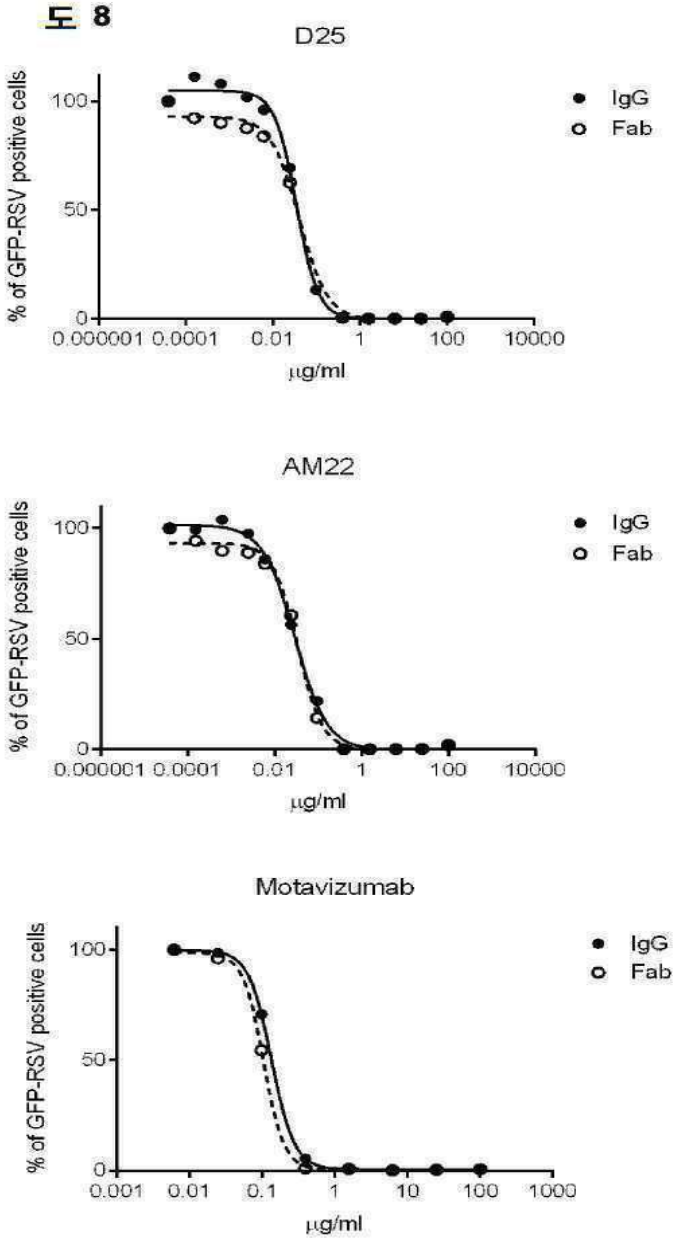

도 6
F2 N-term
F2 C-term
F1 N-term
F1 C-term
PIV5
F2 N-term
F2 C-term
F1 N-term
F1C-term
RSV

도면7



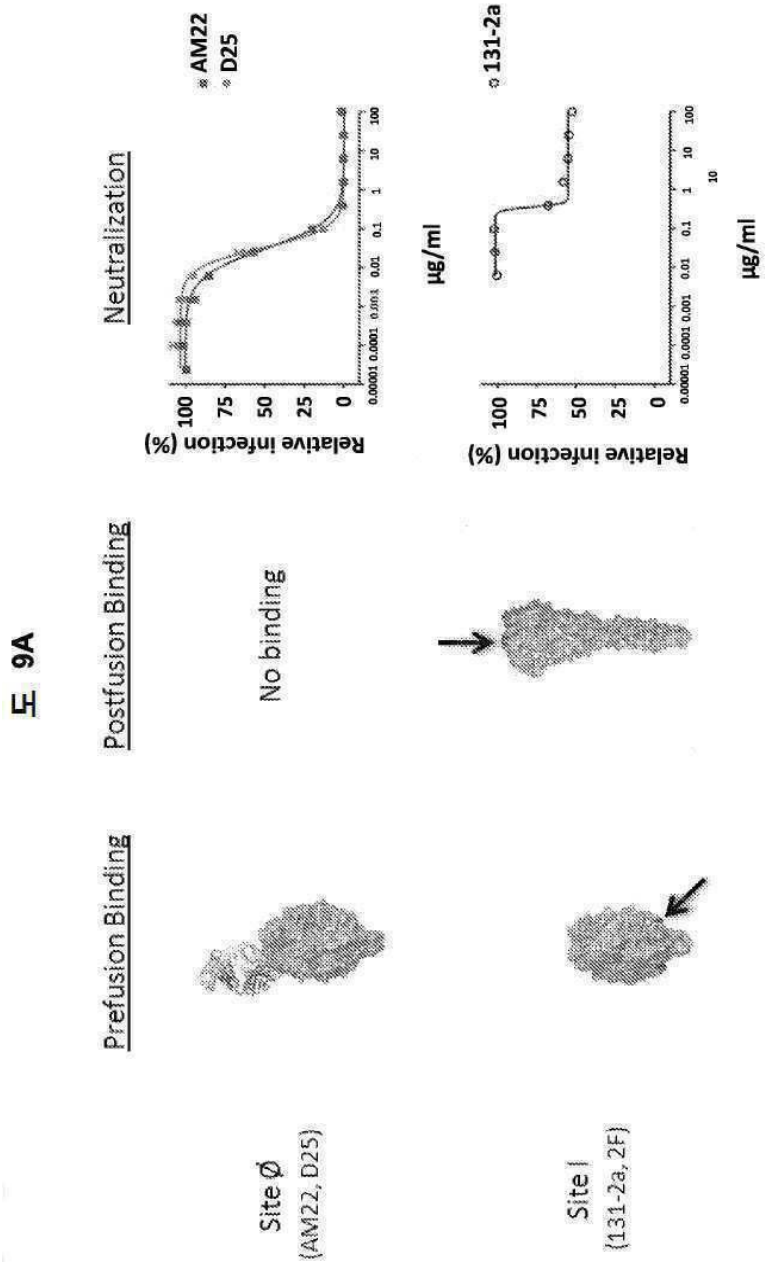
도면8

도 8

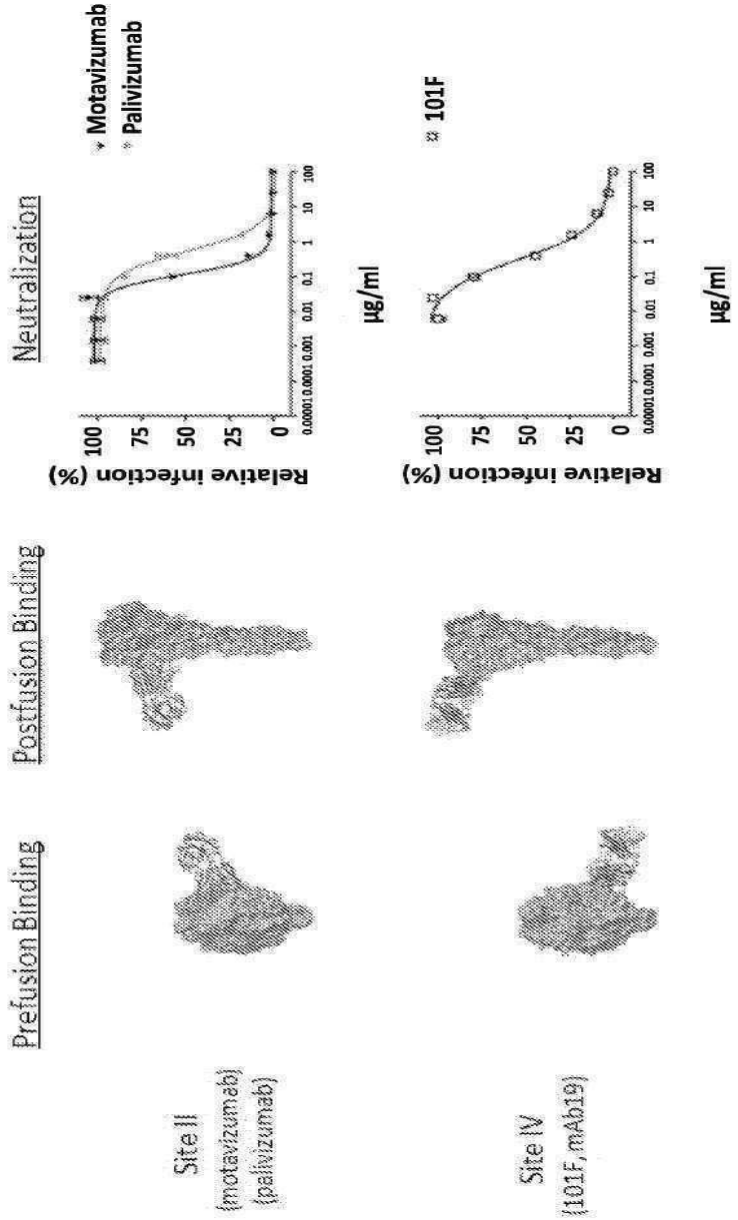

D25
% of GFP-RSV positive cells
100
50
0
0.000001 0.0001 0.01 1 100 10000
μg/ml
IgG
Fab
AM22
% of GFP-RSV positive cells
100
50
0
0.000001 0.0001 0.01 1 100 10000
μg/ml
IgG
Fab
Motavizumab
% of GFP-RSV positive cells
100
50
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
μg/ml
IgG
Fab

도면9a

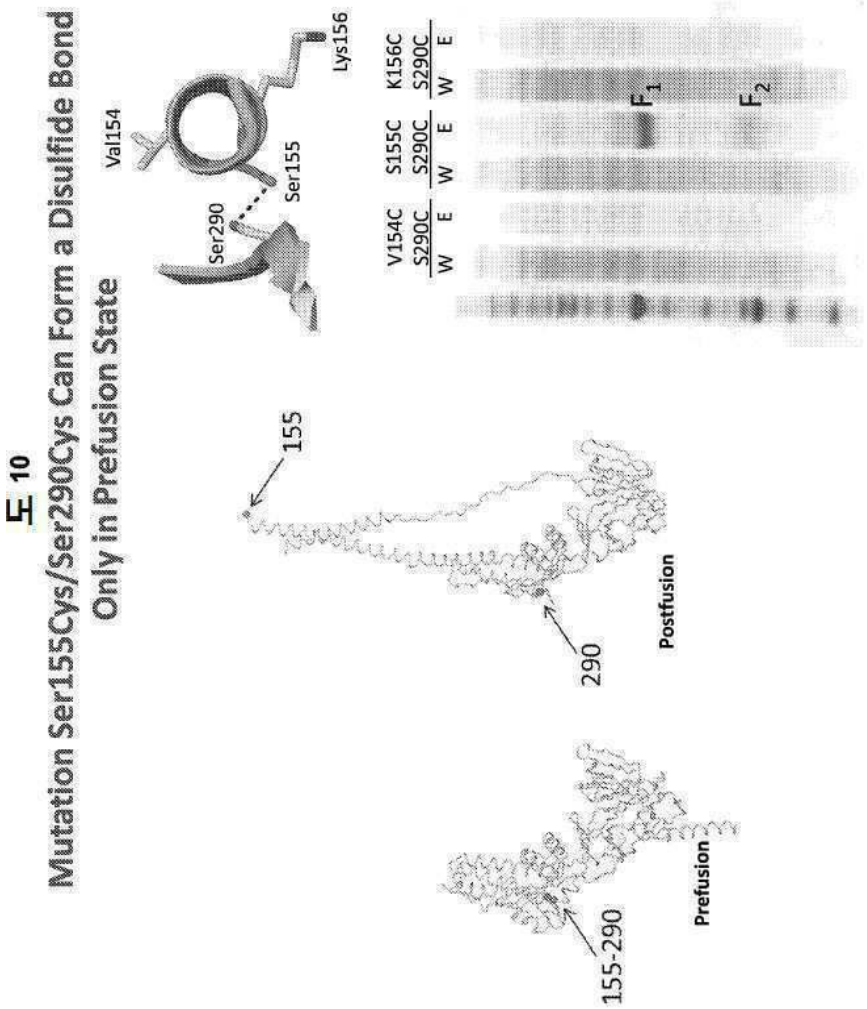
도 9A


Prefusion Binding
Postfusion Binding
Neutralization
Site Ø
(AM22, D25)
No binding
AM22
D25
Relative infection (%)
µg/ml
Site I
(131-2a, 2F)
131-2a
Relative infection (%)
µg/ml

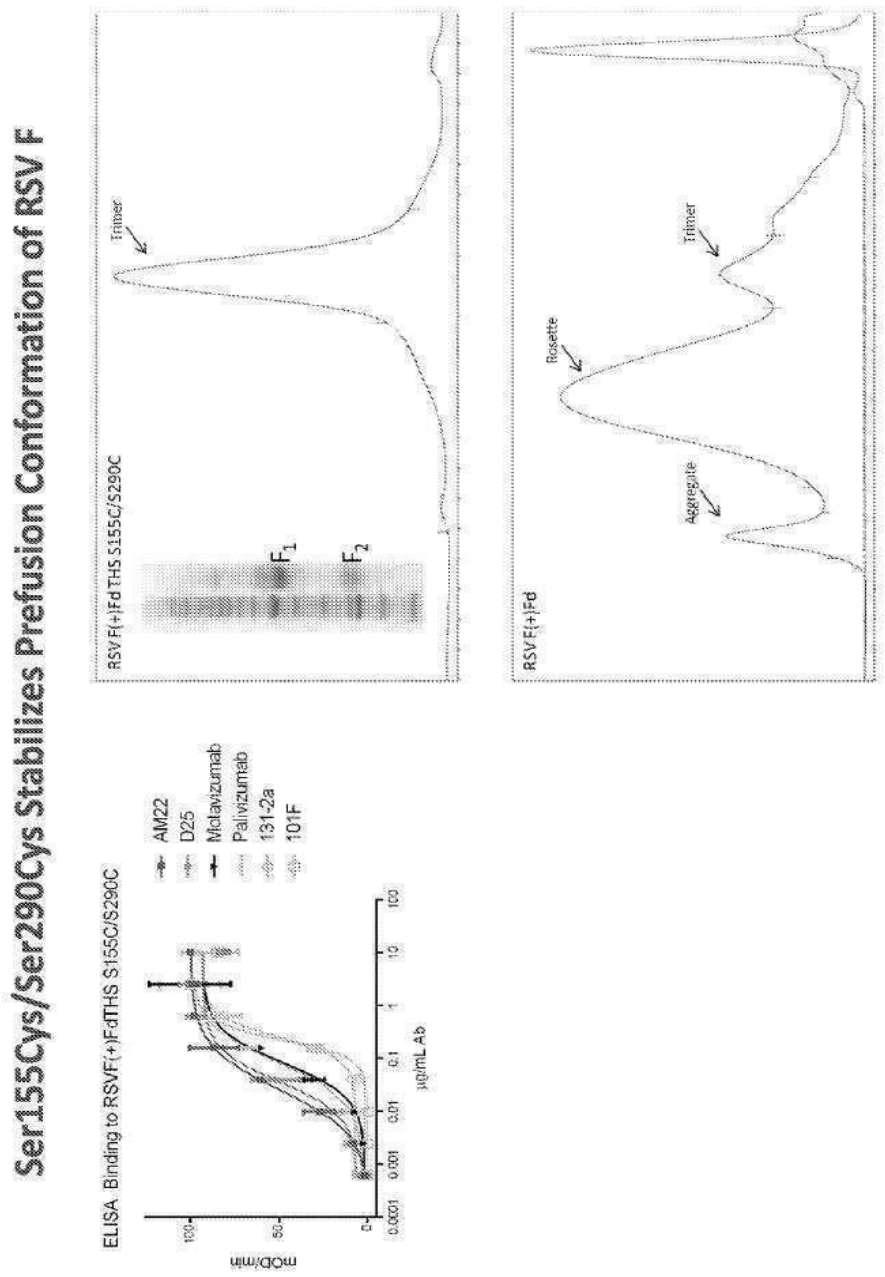
도면9b


Prefusion Binding
Postfusion Binding
Neutralization
Site II
(motavizumab)
(palivizumab)
Site IV
(101F, mAb19)
Motavizumab
Palivizumab
101F
Relative infection (%)
100
75
50
25
0
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
μg/ml

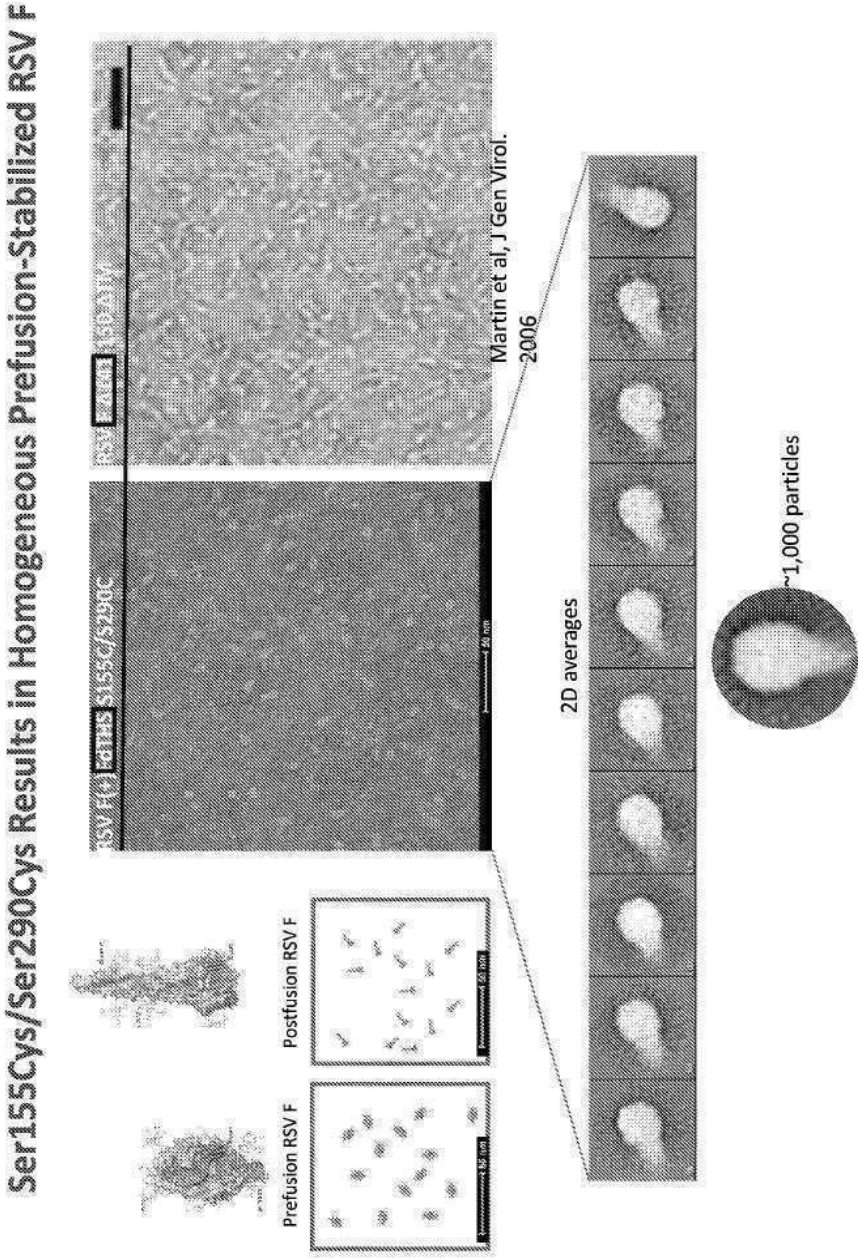
도면10


도 10
Mutation Ser155Cys/Ser290Cys Can Form a Disulfide Bond Only in Prefusion State
Val154
Ser290
Ser155
Lys156
V154C S290C W E
S155C S290C W E
K156C S290C W E
F1
F2
155
290
Postfusion
155-290
Prefusion

도면11


Ser155Cys/Ser290Cys Stabilizes Prefusion Conformation of RSV F
RSV F(+)Fd THS S155C/S290C
Trimer
F_1
F_2
RSV F(+)Fd
Rosette
Aggregate
Trimer
ELISA Binding to RSVF(+)FdTHS S155C/S290C
AM22
D25
Motavizumab
Palivizumab
131-2a
101F
mOD/min
μg/mL Ab

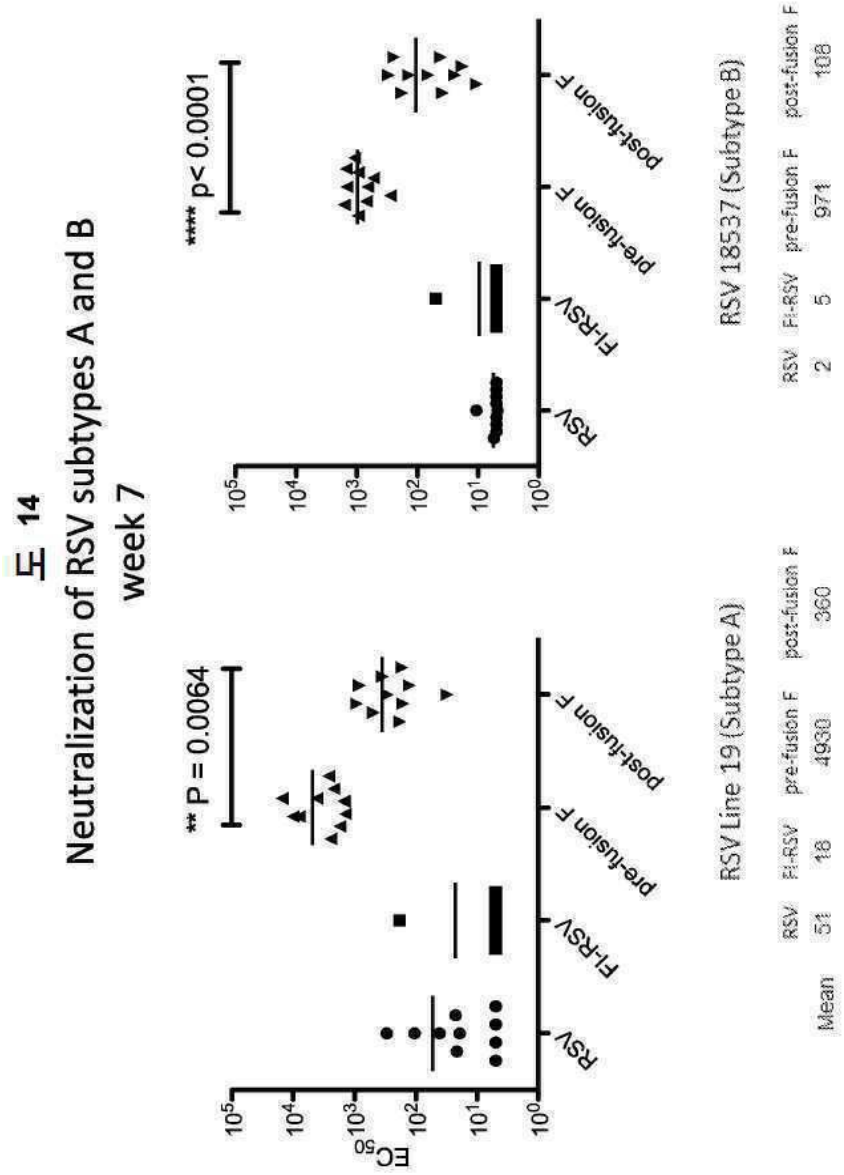
도면12


Ser155Cys/Ser290Cys Results in Homogeneous Prefusion-Stabilized RSV F
Prefusion RSV F
Postfusion RSV F
Martin et al, J Gen Virol. 2006
2D averages
~1,000 particles

도면13

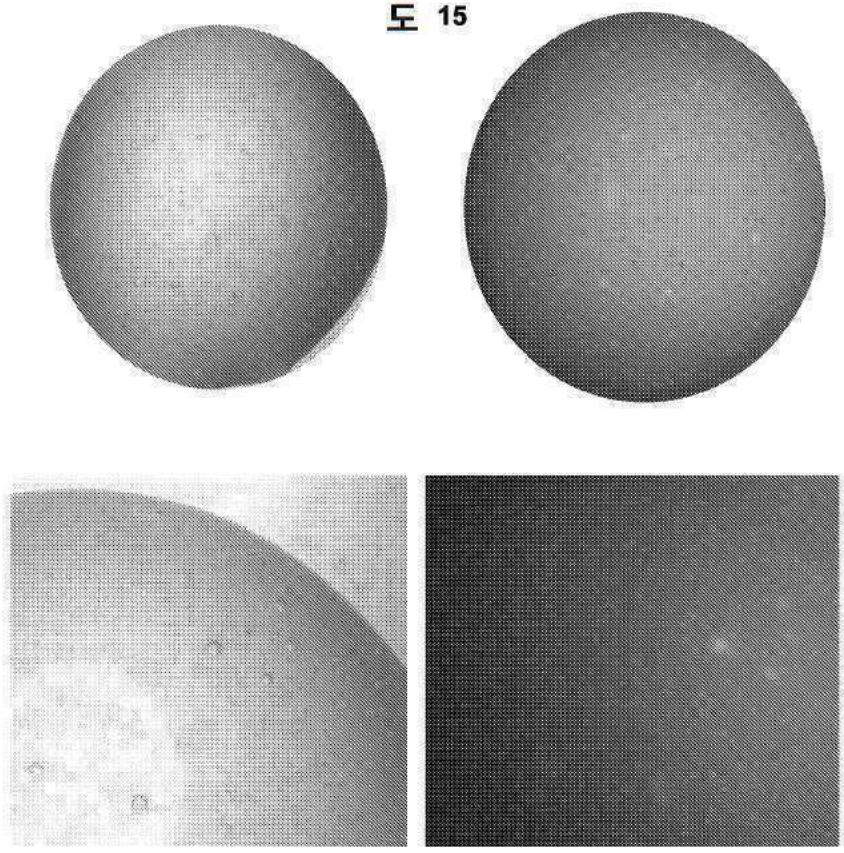
도 13
Neutralization of RSV subtypes A and B
Week 5
Subtype A
Subtype B
*** p= 0.0004
** p=0.009
EC50
RSV
Fl-RSV
Pre-fusion F
Post-fusion F
RSV Line 19 (Subtype A)
RSV Fl-RSV pre-fusion F post-fusion F
Mean 0 7 3143 198
RSV 18537 (Subtype B)
RSV Fl-RSV pre-fusion F post-fusion F
0 0 1066 230

도면14


도 14
Neutralization of RSV subtypes A and B
week 7
** P = 0.0064
**** p< 0.0001
EC50
RSV
Fl-RSV
pre-fusion F
post-fusion F
RSV Line 19 (Subtype A)
RSV 18537 (Subtype B)
RSV Fl-RSV pre-fusion F post-fusion F
Mean 51 18 4930 360
RSV Fl-RSV pre-fusion F post-fusion F
2 5 971 108

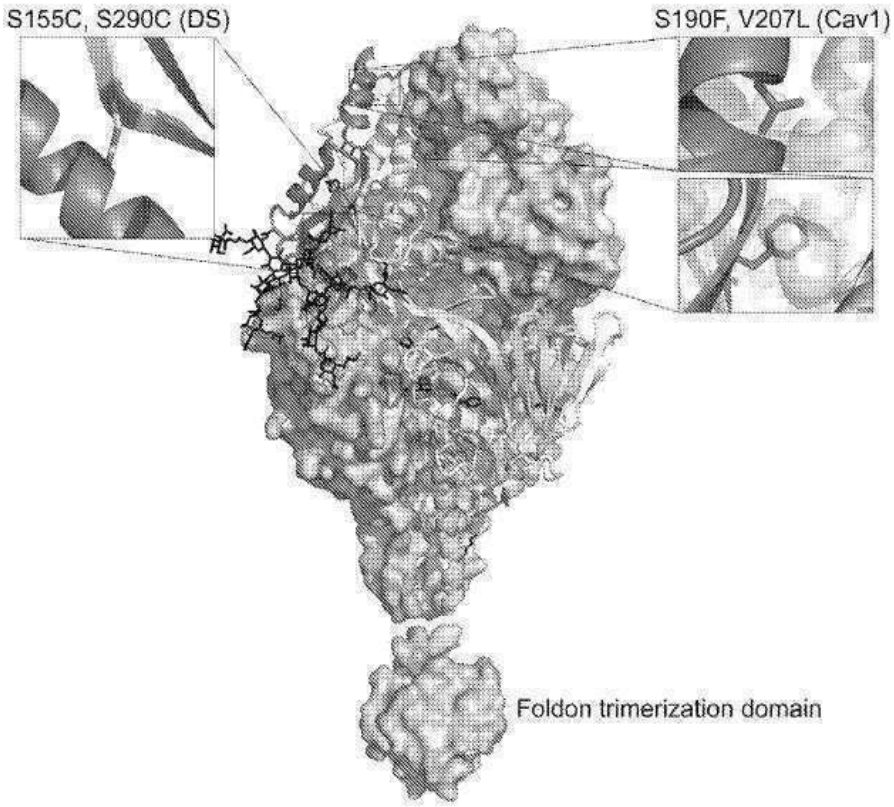
도면15

도 15



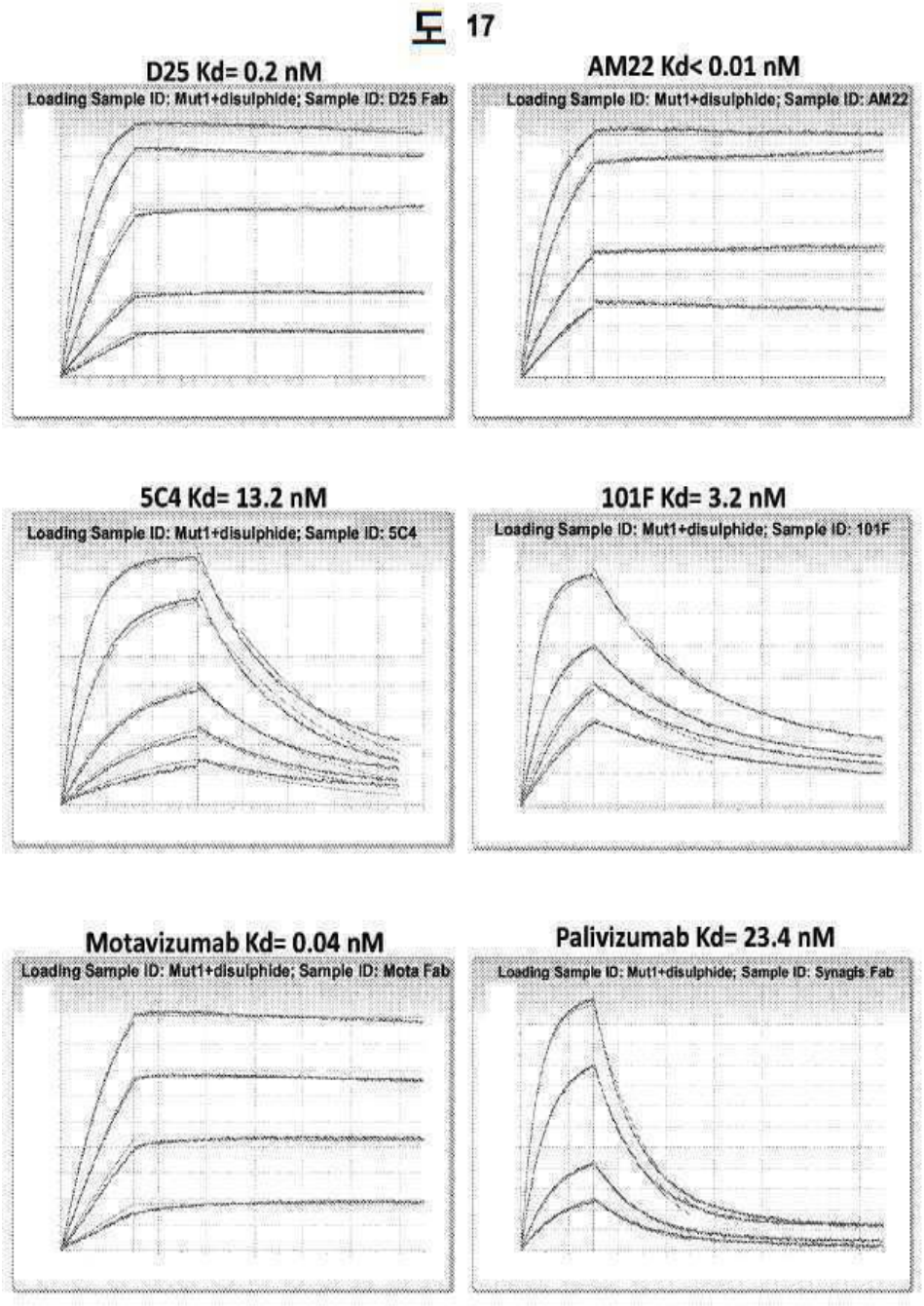
도면16

도 16

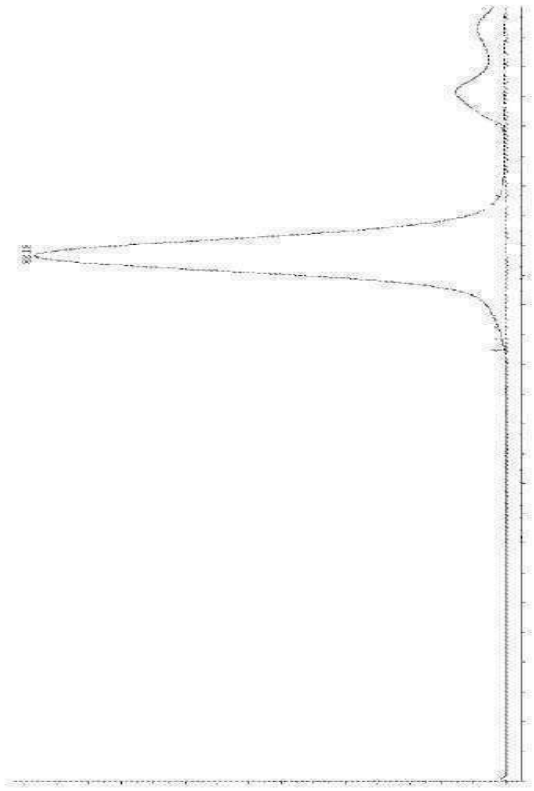

S155C, S290C (DS)
S190F, V207L (Cav1)
Foldon trimerization domain

도면17

도 17


D25 Kd= 0.2 nM
Loading Sample ID: Mut1+disulphide; Sample ID: D25 Fab
AM22 Kd< 0.01 nM
Loading Sample ID: Mut1+disulphide; Sample ID: AM22
5C4 Kd= 13.2 nM
Loading Sample ID: Mut1+disulphide; Sample ID: 5C4
101F Kd= 3.2 nM
Loading Sample ID: Mut1+disulphide; Sample ID: 101F
Motavizumab Kd= 0.04 nM
Loading Sample ID: Mut1+disulphide; Sample ID: Mota Fab
Palivizumab Kd= 23.4 nM
Loading Sample ID: Mut1+disulphide; Sample ID: Synagis Fab

도면18



도 18

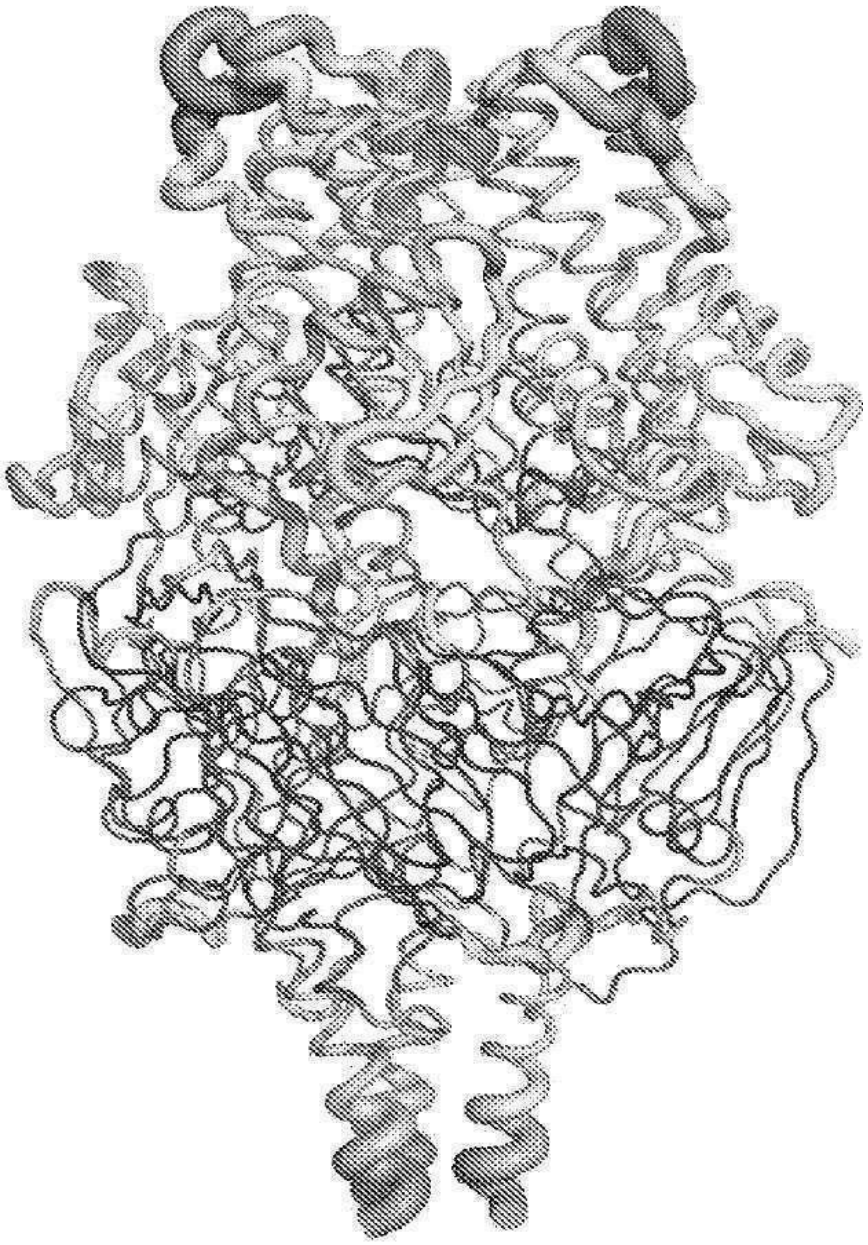
도면19

도 19

RSV F variant	Yield (mg/L)*	Antibody K_D value (nM)							Physical characterization (fractional D25 reactivity)										
		Site Ø		Site I		Site II		Site IV	Temp (°)			pH			Osmolality (mM)			Freeze-Thaw
		D25	AM22	5C4	131-2a	Paliv	Mota	101F	50	70	90	3.5	10.0		10	3000		
S155C, S290C (DS)	1.4	0.3	<0.01	35.4	3.4	2.8	0.04	2.2	0.3	0	0	0.1	0.8		1.3	0.8		0.3
S190F, V207L (Cav1)	2.2	0.23	<0.10	9.31	>1000	42.90	<0.01	2.94	0.8	0.1	0.1	0.7	0.8		1.0	0.7		0.6
DSCav1	1.9	0.2	<0.01	13.2	>1000	23.4	0.04	3.2	0.9	0	0	0.8	0.9		1.0	0.8		0.7

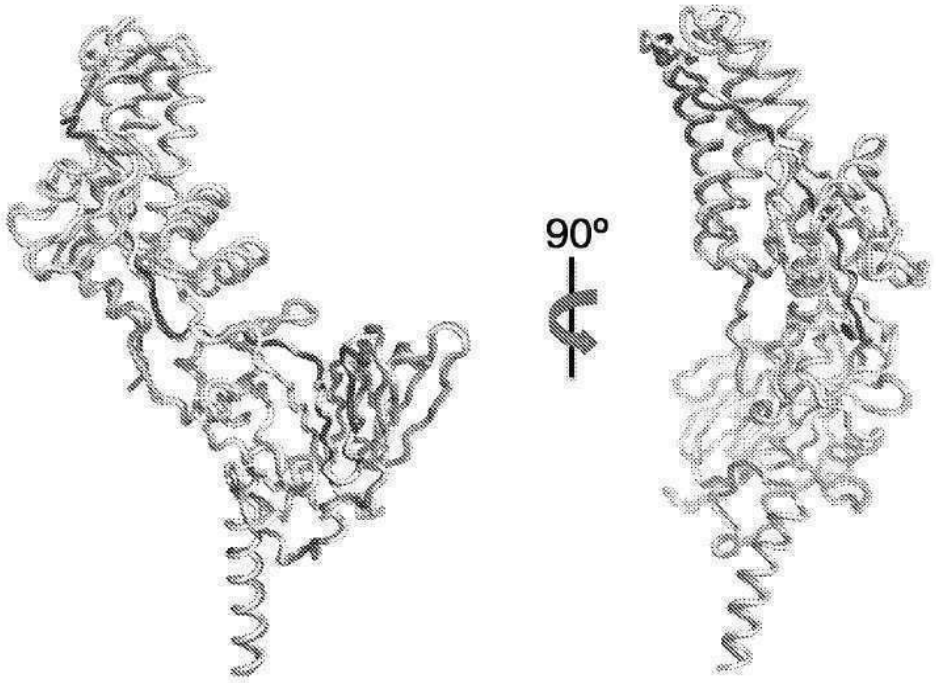
*Yield is shown for trimeric fraction
>1000 nM = no binding at 1 μM Fab concentration

도면20



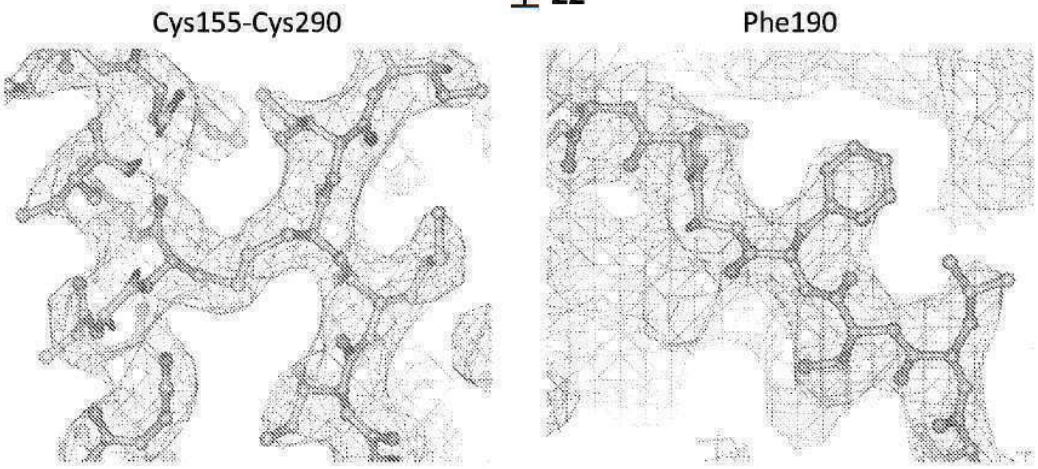
도면21

도 21



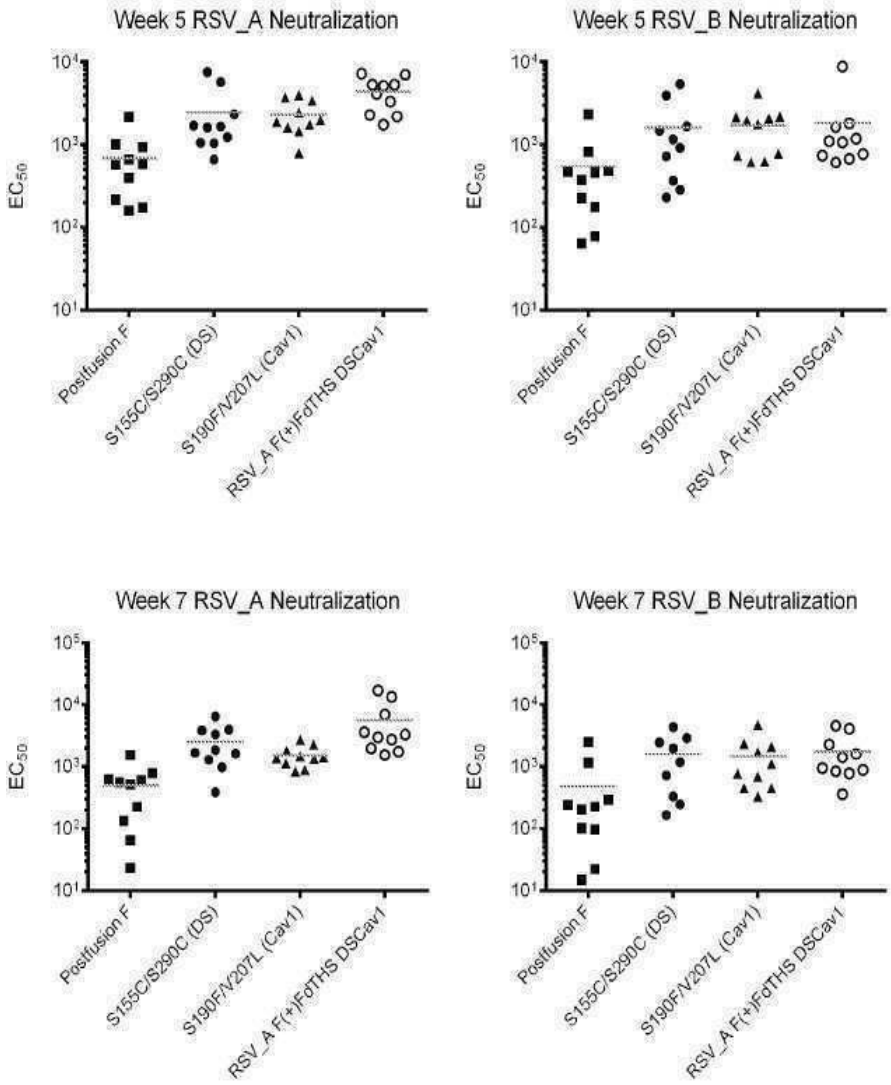
도면22

도 22



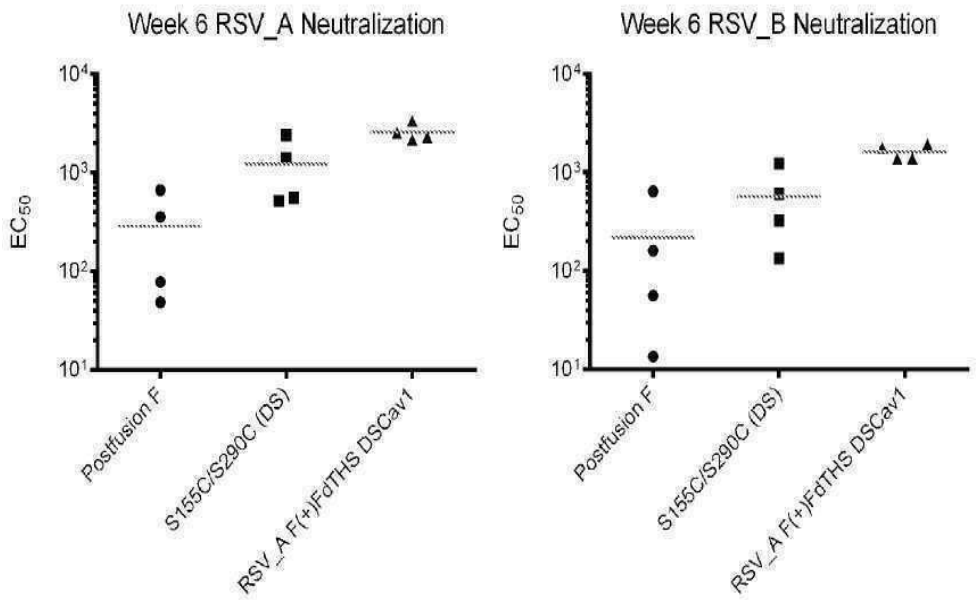
도면23

도 23


Week 5 RSV_A Neutralization
Week 5 RSV_B Neutralization
Week 7 RSV_A Neutralization
Week 7 RSV_B Neutralization
EC50
Postfusion F
S155C/S290C (DS)
S190F/V207L (Cav1)
RSV_A F(+)FdTHS DSCav1

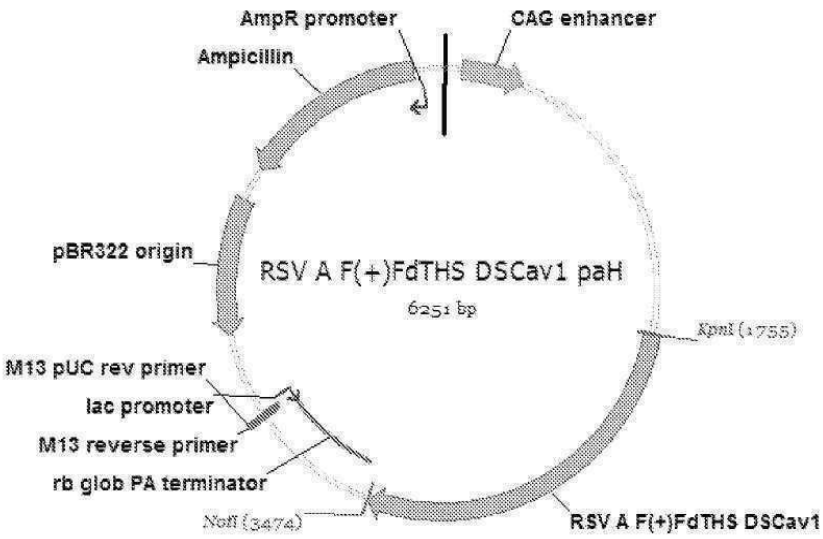
도면24

도 24



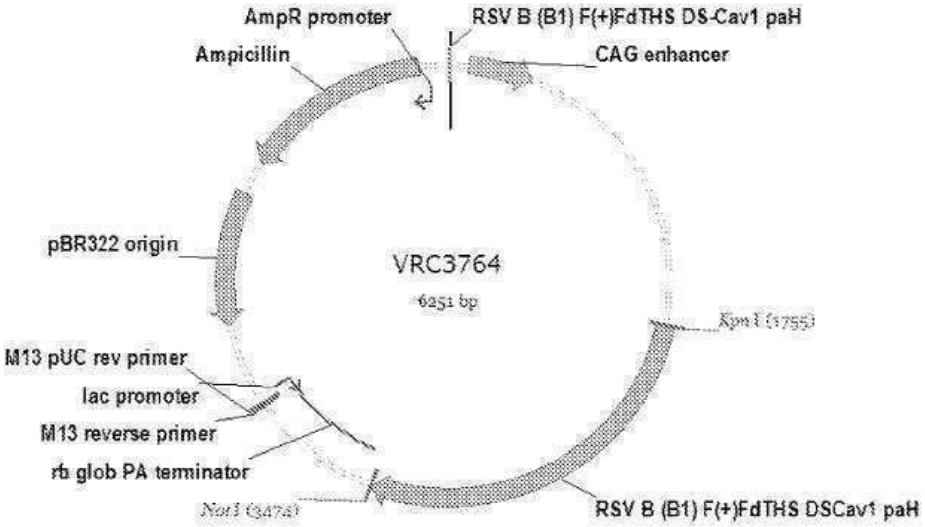
도면25a

도 25A

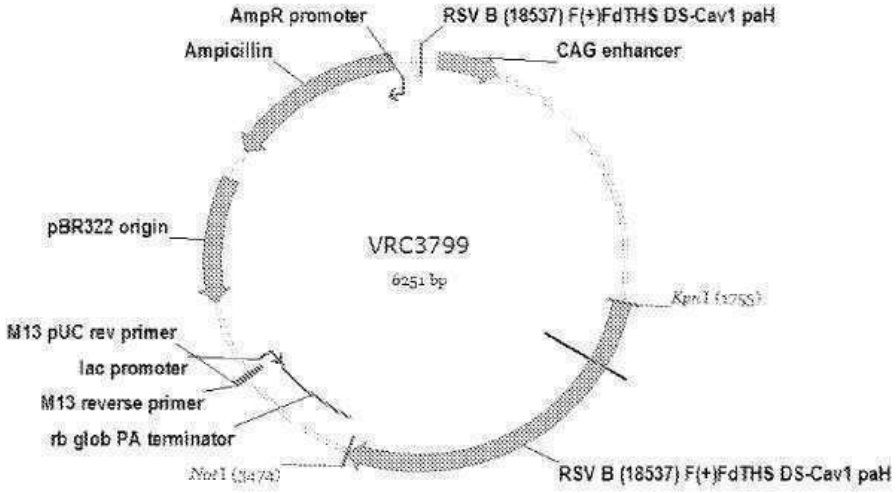


도면25b

도 25B



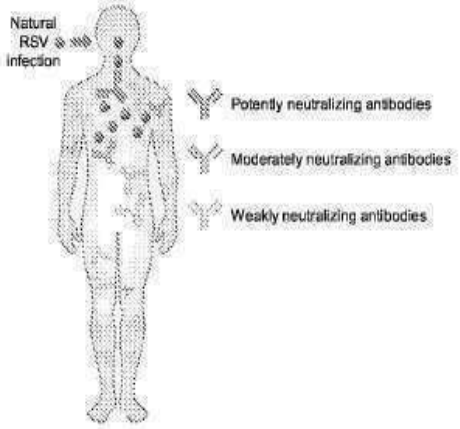
도 25C



도면26

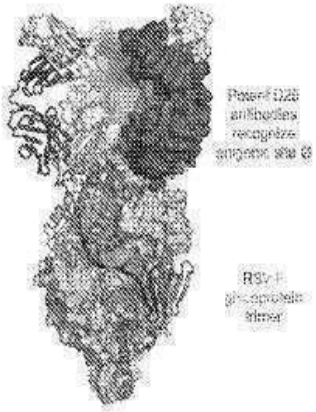
도 26A

Characterization of protective responses elicited by natural infection

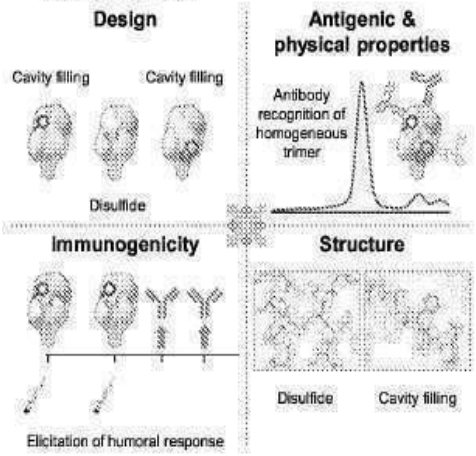


도 26B

Structural definition of a supersite of viral vulnerability

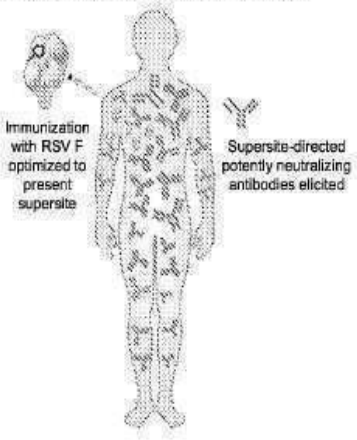


Information matrix for structure-based vaccine design



도 26C

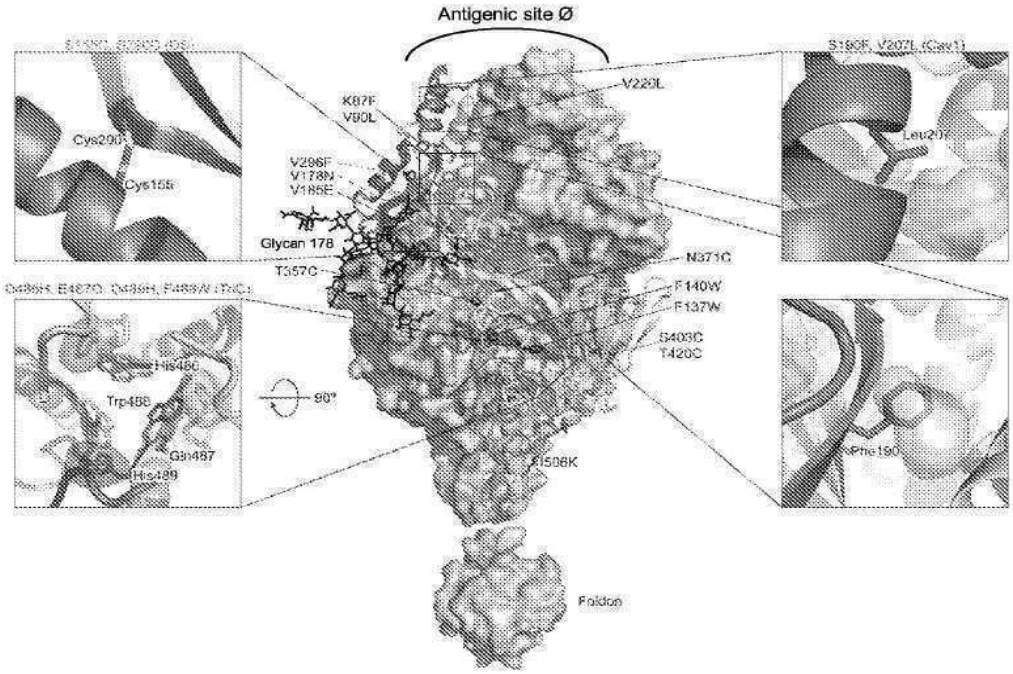
Elicitation of protective responses with a supersite immunogen



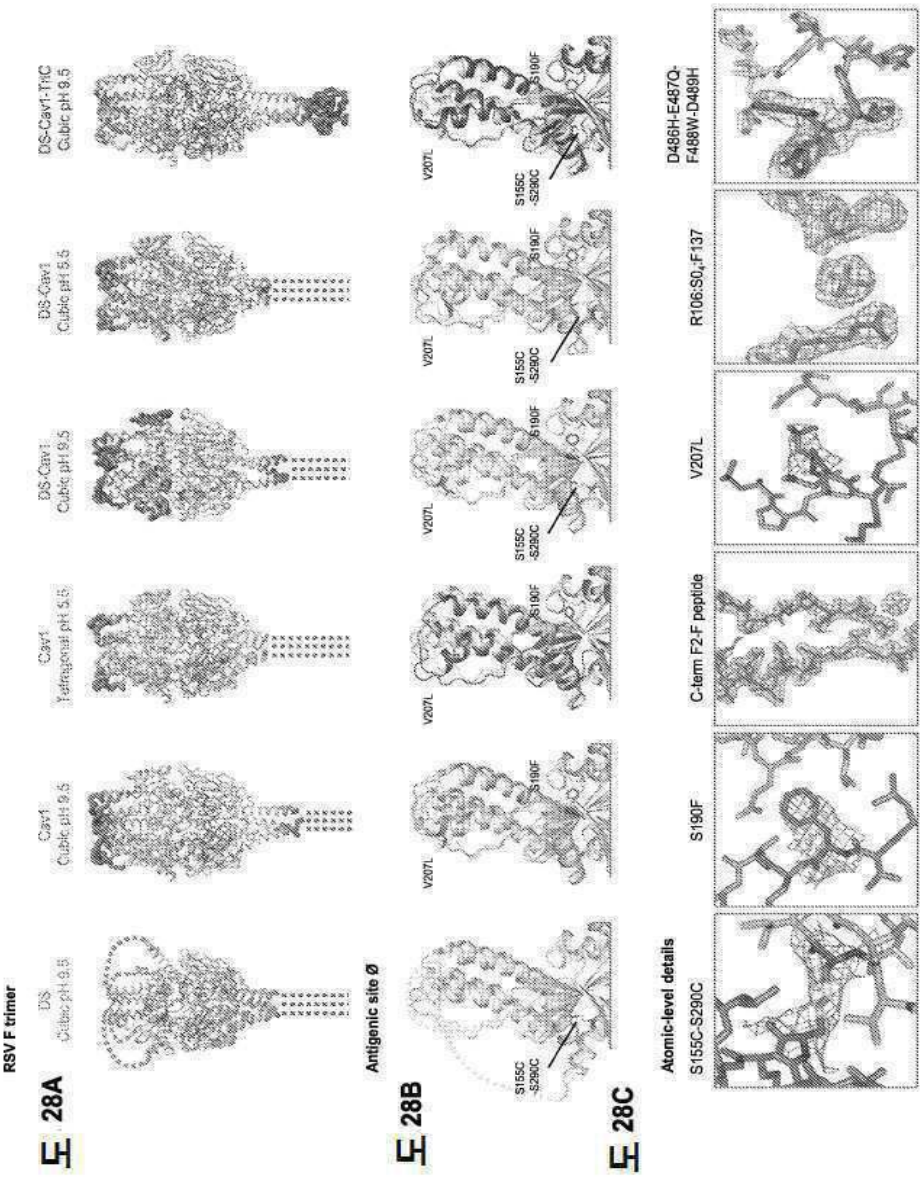
도 26D

도면27

도 27

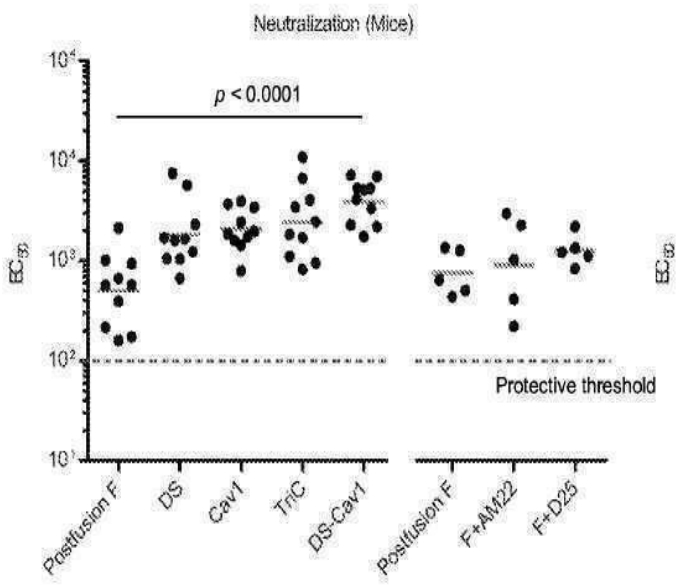

Antigenic site Ø
K87F
V90L
V220L
V296F
V178N
V185E
Glycan 178
T357C
N371C
F140W
F137W
S403C
T420C
S150K
Foldon
Cys200
Cys155
Leu207
Phe190
His480
Trp486
Gln487
His489
90°

도면28

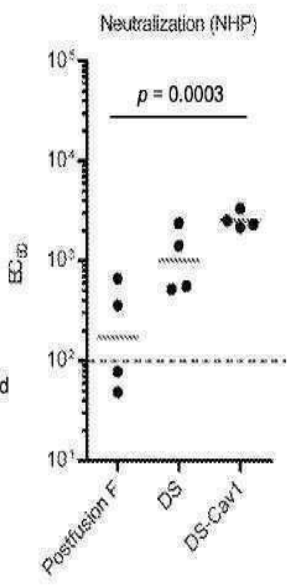

RSV F trimer
DS
Cubic pH 9.5
Cav1
Cubic pH 9.5
Cav1
Tetragonal pH 5.5
DS-Cav1
Cubic pH 9.5
DS-Cav1
Cubic pH 5.5
DS-Cav1-TriC
Cubic pH 9.5
도 28A
Antigenic site Ø
S155C
-S290C
V207L
S190F
도 28B
Atomic-level details
S155C-S290C
S190F
C-term F2-F peptide
V207L
R106:S0$_{-2}$:F137
D486H-E487Q-
F488W-D489H
도 28C

도면29

도 29A

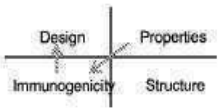


도 29B

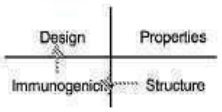


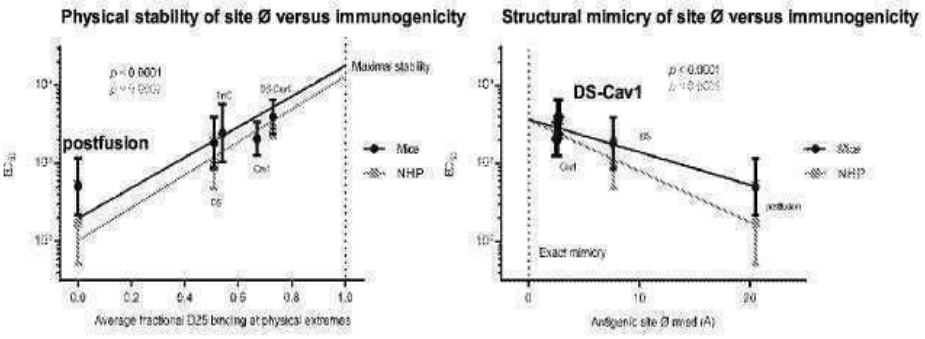
도면30

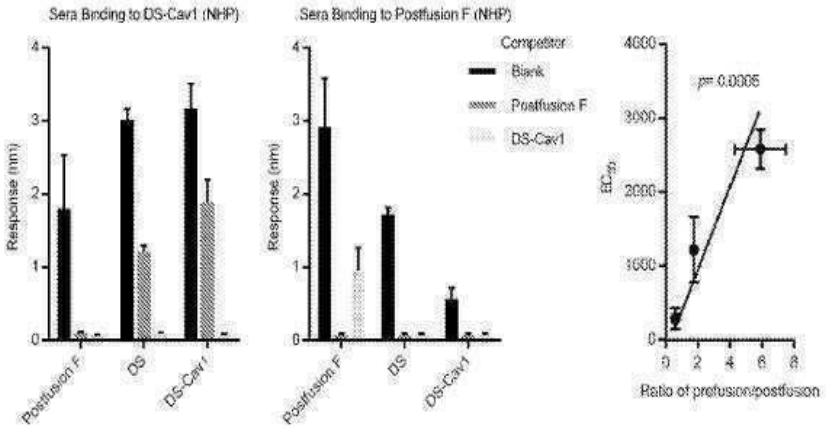
도 30A



도 30B







도 30C

도 30D

도면31a

도 31A

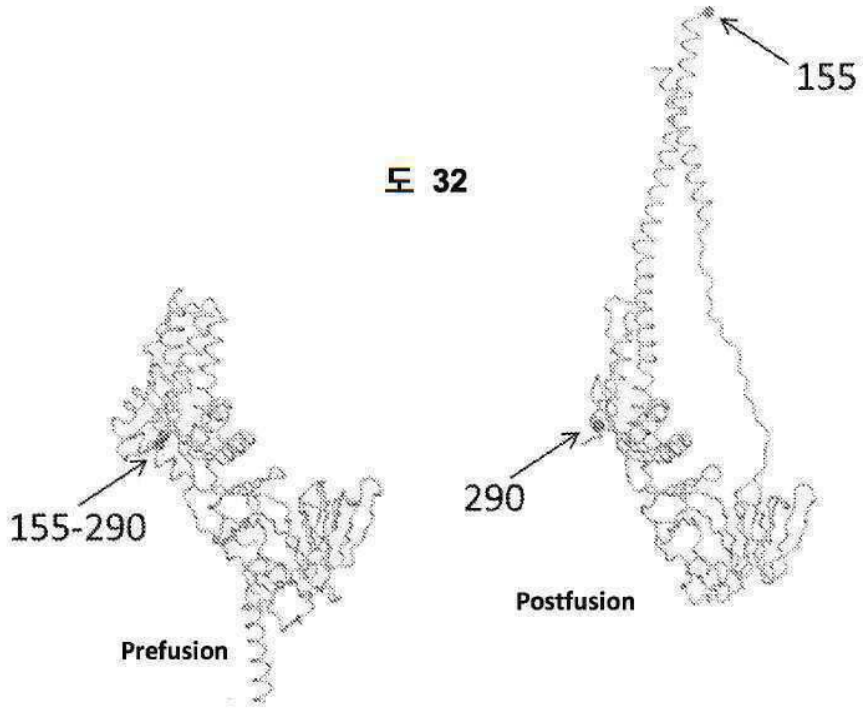
RSV F variant	Oligomeric state#	Yield (mg/L)*	Antibody K_D value (nM)						
			Site Ø			Site I	Site II		Site IV
			D25	AM22	5C4	131-2a	Paliv	Mota	101 F
K87F, V90L	Aggregate	0.3	>1000	>1000	>1000	7.6	1.66	0.17	1.57
F137W, F140W	N.D.	<0.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F137W, F140W, F488W	N.D.	<0.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S155C, S290C (DS)	Trimer	1.4	0.3	<0.01	35.4	3.4	2.8	0.04	2.2
V178N	Aggregate	<0.1	>1000	>1000	>1000	7.18	3.13	0.11	1.64
V185E	Aggregate	<0.1	>1000	>1000	>1000	3.53	1.70	0.11	1.64
S190F, V207L (Cav1)	Trimer	2.2	0.23	<0.10	9.31	>1000	42.90	<0.01	2.94
S190F, V296F (Cav2)	Aggregate	0.4	>1000	>1000	>1000	4.17	1.67	<0.01	1.59
V207L, V220L (Cav3)	Aggregate	0.4	>1000	>1000	>1000	2.79	0.99	0.01	0.69
T357C, N371C	N.D.	<0.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S403C, T420C	Aggregate	0.3	>1000	>1000	>1000	3.05	3.31	0.05	1.85
D486H, E487Q, D489H	Aggregate	0.1	>1000	>1000	>1000	>1000	9.5	0.57	12.7
D486H, E487Q, D489H, F488W (TriC)	Trimer	0.8	0.01	1.0	33.6	>1000	30.7	0.5	4.0
F488W	Trimer	1.7	0.09	0.25	26.89	>1000	31.6	0.1	4.74
I506K	Aggregate	<0.1	>1000	>1000	>1000	4.55	1.71	0.05	1.39
[illegible]									
DS, Cav1	Trimer	1.9	0.2	<0.01	13.2	>1000	23.4	0.04	3.2
[illegible]	Trimer	0.6	0.17	<0.01	33		4.8	0.05	3.1
Cav1, TriC	Trimer	0.2	0.99	0.086	5.1	>1000	32.28	0.17	3.09
[illegible]									
DS, Cav1, TriC	Trimer	1.3	0.17	0.02	17.8	[illegible]	19.72	0.10	3.17

도면31b

도 31B

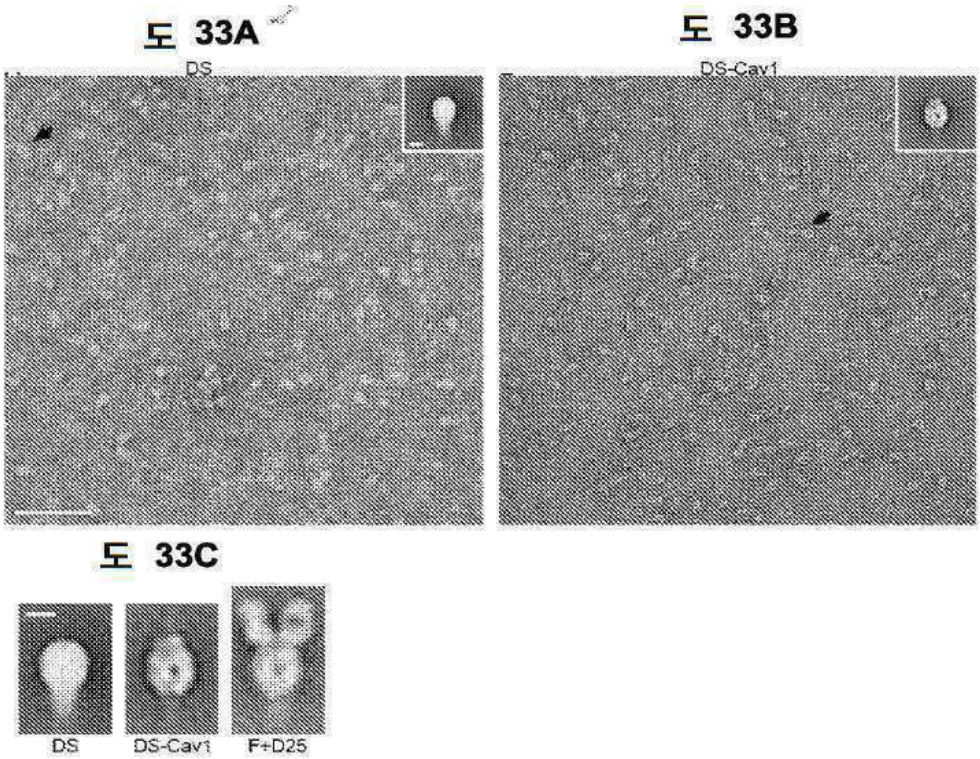
RSV F variant	Physical characterization (fractional D25 reactivity)							
	Temp (°)			pH		Osmolality (mM)		Freeze-Thaw
	50	70	90	3.5	10.0	10	3000	10x
K87F, V90L	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F137W, F140W	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F137W, F140W, F488W	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S155C, S290C (DS)	0.3	0	0	0.1	0.8	1.3	0.8	0.3
V178N	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
V185E	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S190F, V207L (Cav1)	0.8	0.1	0.1	0.7	0.8	1.0	0.7	0.6
S190F, V296F (Cav2)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
V207L, V220L (Cav3)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
T357C, N371C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S403C, T420C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
D488H, E487Q, D489H	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
D486H, E487Q, D489H, F488W (TriC)	0.8	0.1	0.1	0.1	0.8	1.3	0.6	0.1
F488W	0.9	0.1	0	0.1	0.7	1.1	0.5	0
I506K	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Doubles								
DS, Cav1	0.9	0	0	0.8	0.9	1.0	0.8	0.7
DS, TriC	0.9	0	0	0.3	0.9	0.5	0.9	0.5
Cav1, TriC	0.9	0.1	0.1	0.3	0.8	0.6	0.5	0
Triple								
DS, Cav1, TriC	0.9	0.1	0.1	0.6	0.9	0.6	0.6	0

도면32



도 32

도면33

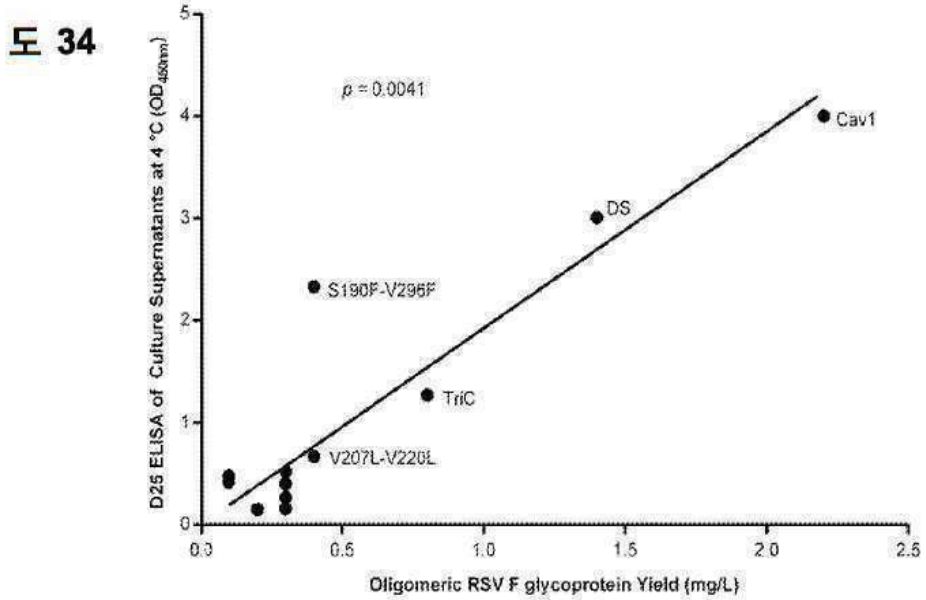


도 33A

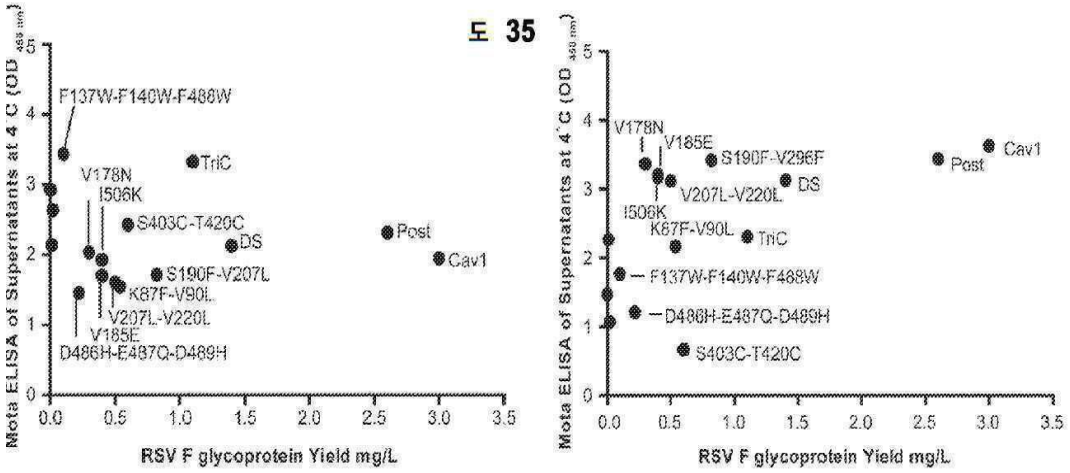
도 33B

도 33C

도면34


도 34
p = 0.0041
Cav1
DS
S190F-V296F
TriC
V207L-V220L
D25 ELISA of Culture Supernatants at 4 °C (OD450nm)
Oligomeric RSV F glycoprotein Yield (mg/L)

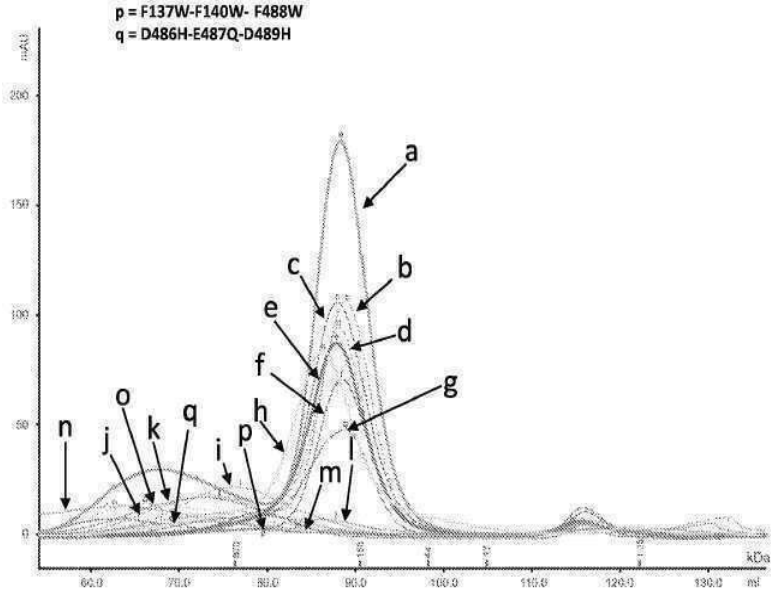
도면35


도 35
F137W-F140W-F486W
TriC
V178N
I506K
S403C-T420C
DS
Post
Cav1
S190F-V207L
K87F-V90L
V207L-V220L
V185E
D486H-E487Q-D489H
Mota ELISA of Supernatants at 4 °C (OD
RSV F glycoprotein Yield mg/L
V178N
V185E
S190F-V296F
Post
Cav1
V207L-V220L
DS
I506K
K87F-V90L
TriC
F137W-F140W-F486W
D486H-E487Q-D489H
S403C-T420C
Mota ELISA of Supernatants at 4 °C (OD
RSV F glycoprotein Yield mg/L

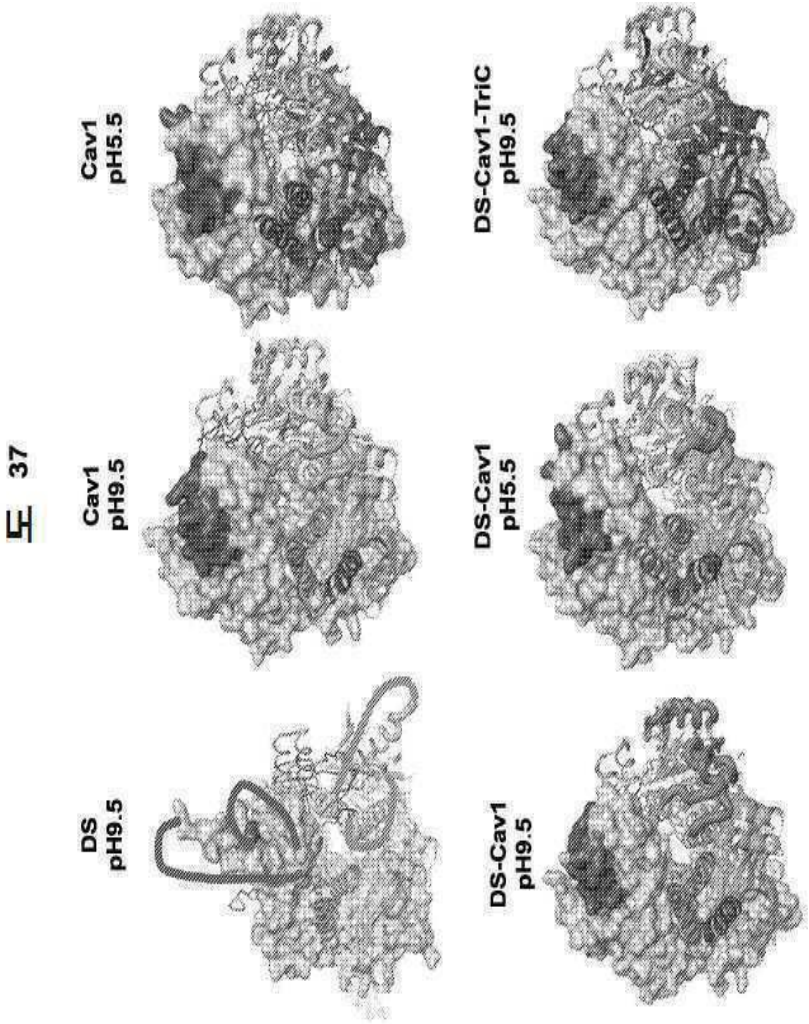
도면36

a = Cav1
b = Cav1-TriC
c = DS-Cav1-TriC
d = F488W
e = DS-Cav1
f = TriC
g = DS-TriC
h = DS
i = S190F-V296F
j = K87F-V90L
k = V207L-V220L
l = V178N
m = S403C-T420C
n = I506K
o = V185E
p = F137W-F140W- F488W
q = D486H-E487Q-D489H

도 36

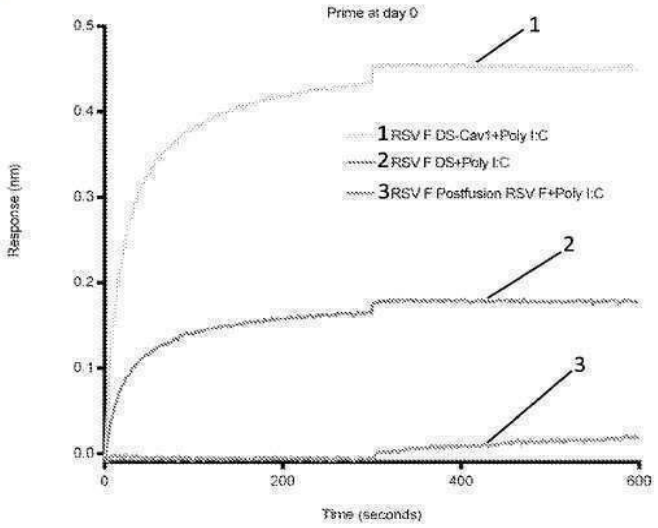


도면37

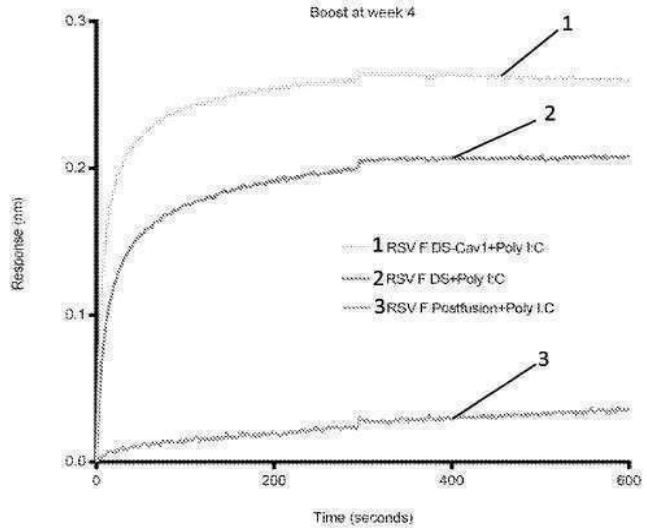

도 37
Cav1
pH5.5
DS-Cav1-TriC
pH9.5
Cav1
pH9.5
DS-Cav1
pH5.5
DS
pH9.5
DS-Cav1
pH9.5

도면38

도 38A

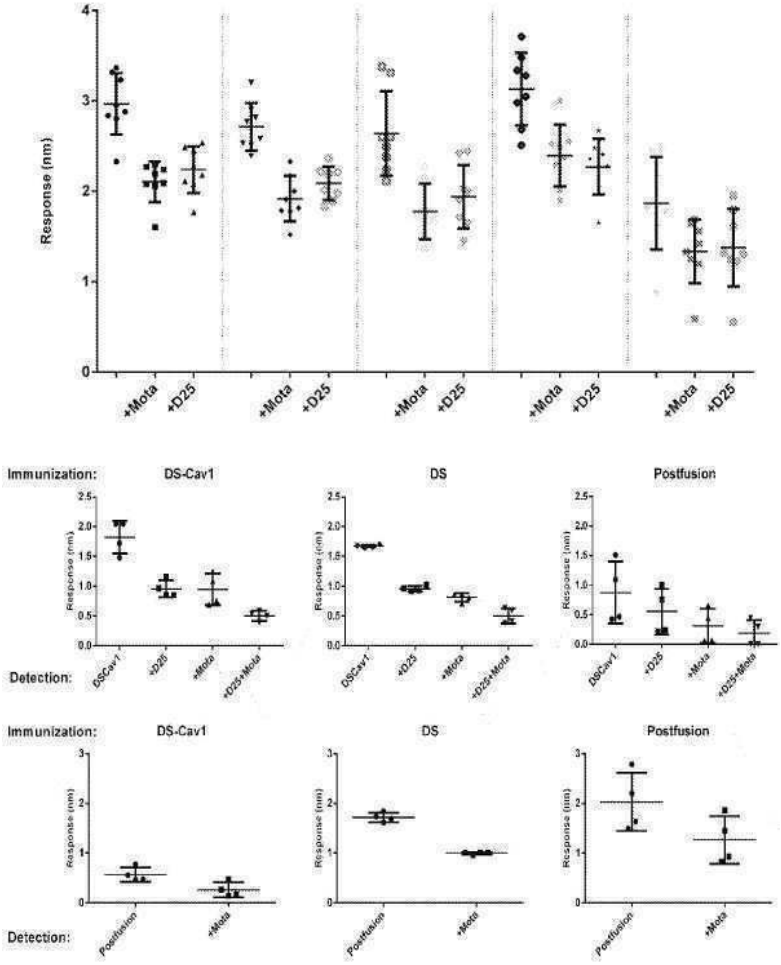


도 38B



도면39

도 39A



도 39B

도면40

Table S1. Crystallographic data collection and refinement statistics

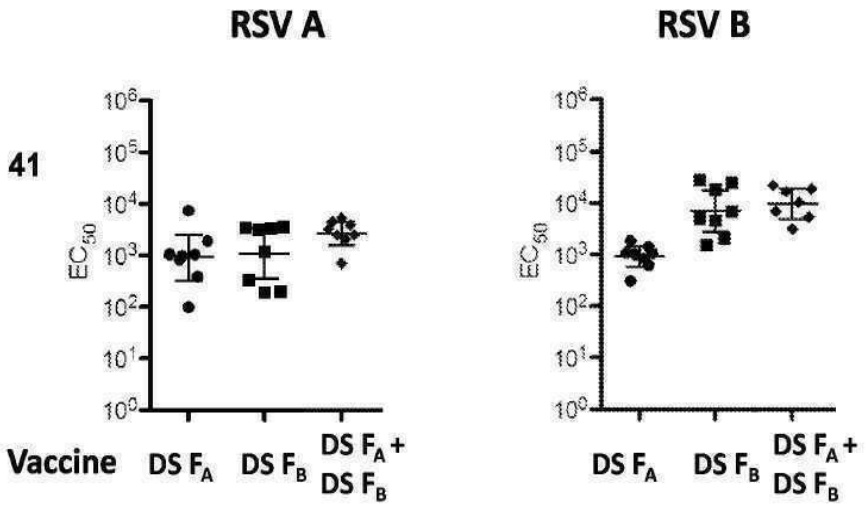
	DS (pH9.5)	Cav1 (pH9.5)		Cav1 (pH5.5)	DS-Cav1 (pH9.5)		DS-Cav1 (pH5.5)	DS-Cav1-PaC (pH9.5)
Data collection								
Space group	$P4_32$	$P4_32$	$P4_212$	$P4_32$	$P4_32$	$P4_32$	$P4_32$	
Cell constants								
a, b, c (Å)	168.4, 168.4, 168.4	170.9, 170.9, 170.9	170.7, 170.7, 169.9	168.6, 168.6, 168.6	168.6, 168.6, 168.6	170.4, 170.4, 170.4		
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0		
Wavelength (Å)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
Resolution (Å)	50-3.25 (3.31-3.25)	50-3.1 (3.21-3.1)	50-2.40 (2.49-2.40)	50-3.85 (3.99-3.85)	50-3.0 (3.11-3.0)	50-2.8 (2.90-2.80)		
R_{meas}	14.8 (64.3)	20.3 (70.7)	11.1 (59.8)	21.4 (95.3)	13.6 (79.3)	13.0 (92.6)		
$I / \sigma I$	14.8 (2.2)	11.8 (1.5)	12.6 (2.1)	9.1 (1.2)	22.4 (2.2)	42.9 (1.8)		
Completeness (%)	99.6 (96.4)	99.1 (91.7)	95.6 (97.7)	98.5 (89.9)	99.8 (98.1)	99.9 (99.4)		
Redundancy	8.3 (4.1)	11.7 (3.8)	4.4 (4.0)	8.1 (4.3)	16.3 (7.5)	12.6 (6.2)		
Refinement								
Resolution (Å)	3.25	3.10	2.40	3.85	3.00	2.80		
Unique reflections	13,345	15,925	90,779	8,287	16,999	21,005		
R_{work}, R_{free} (%)	23.7, 27.4	20.6, 23.7	18.7, 21.4	24.7, 28.6	18.6, 23.9	22.5, 25.9		
No. atoms								
Protein	3033	3546	10,421	3523	3526	3771		
Ligand/ion	30	-	70	-	156	-		
Water	0	59	522	-	108	69		
B-factors (Å^2)								
Protein	75.1	114.9	56.4	198.7	76.3	106.9		
Ligand/ion	136.4	-	101.5	-	155.8	-		
Water	-	87.6	48.5	-	63.4	80.0		
R.m.s. deviations								
Bond lengths (Å)	0.008	0.012	0.003	0.011	0.010	0.005		
Bond angles (°)	1.35	1.24	0.84	1.67	1.42	0.93		
Ramachandran								
Favored regions (%)	95.8	95.3	95.1	93.4	93.3	96.2		
Allowed regions (%)	3.9	4.3	4.5	5.3	6.0	3.3		
Disallowed regions (%)	0.3	0.4	0.4	1.5	0.7	0.5		

Values in parentheses are for highest-resolution shell

도 40

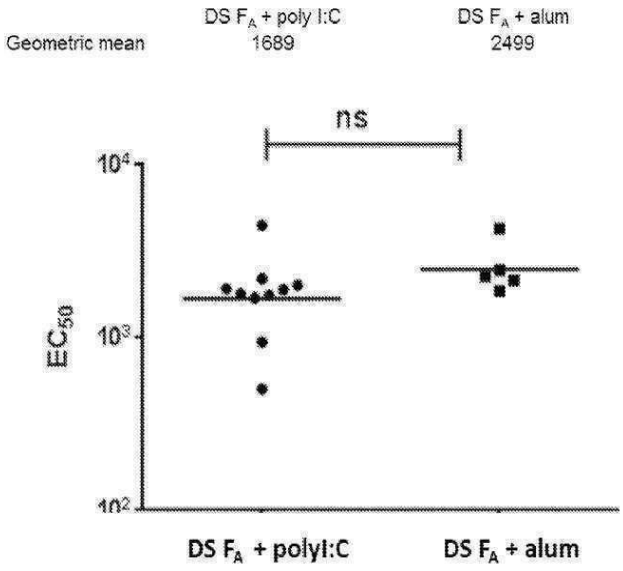
도면41

FIG. 41



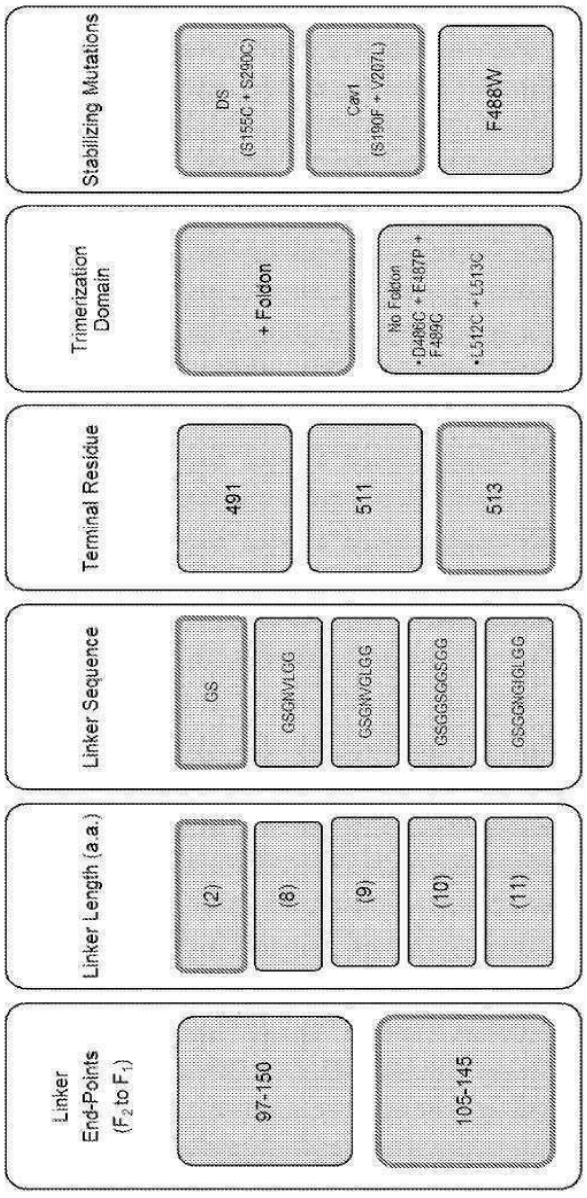
도면42

FIG. 42



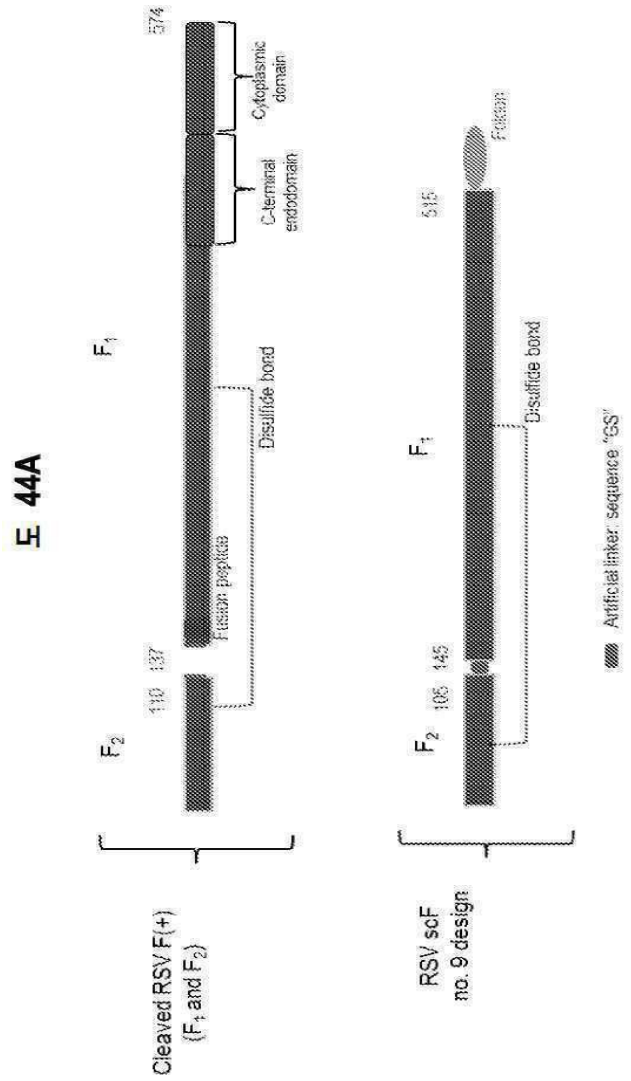
도면43

도 43

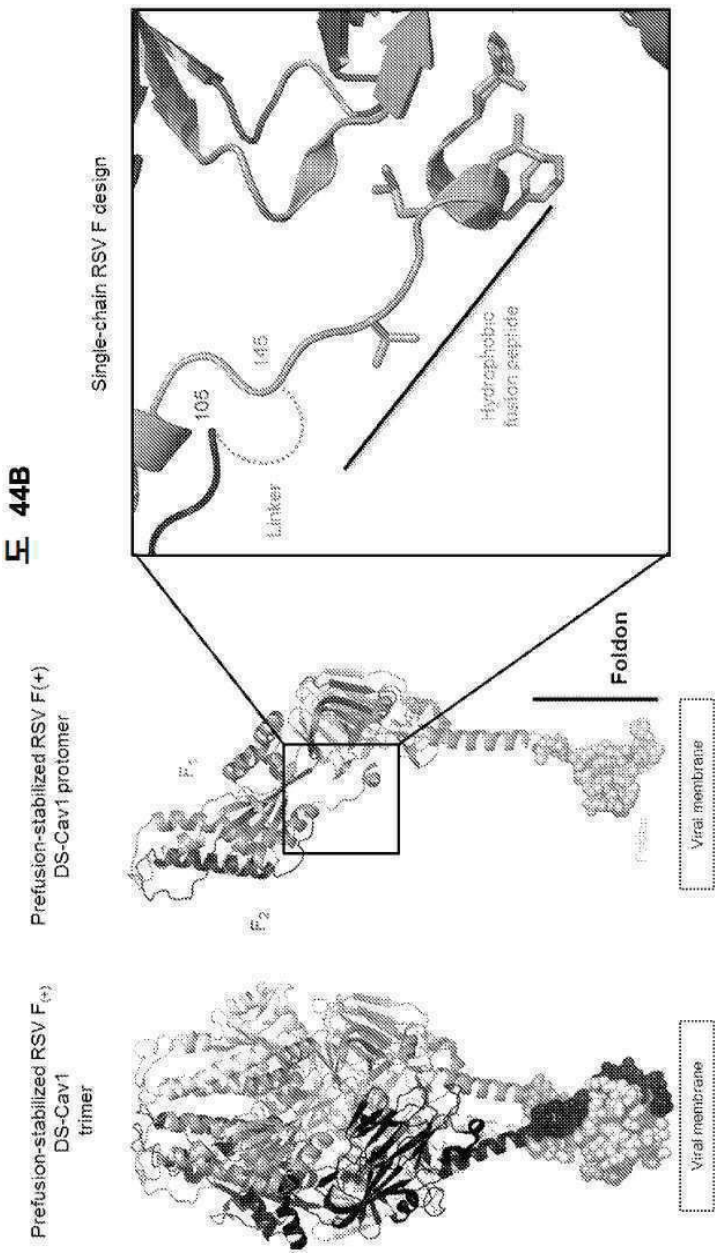

Linker End-Points (F_2 to F_1)
97-150
105-145
Linker Length (a.a.)
(2)
(8)
(9)
(10)
(11)
Linker Sequence
GS
GSGNVLGG
GSGNVGLGG
GSGGSGGSGG
GSGGNGILGG
Terminal Residue
491
511
513
Trimerization Domain
+ Foldon
No Foldon
•D486C + E487P + F488C
•L512C + L513C
Stabilizing Mutations
DS
(S155C + S290C)
Cav1
(S190F + V207L)
F488W

도면44a

도 44A


Cleaved RSV F(+)
(F1 and F2)
F2
F1
110
137
Fusion peptide
Disulfide bond
C-terminal endodomain
Cytoplasmic domain
574
RSV soF
no. 9 design
F2
F1
105
145
Disulfide bond
Foldon
515
Artificial linker sequence "GS"

도면44b


도 44B
Prefusion-stabilized RSV F(+)
DS-Cav1 protomer
Prefusion-stabilized RSV F(+)
DS-Cav1
trimer
Single-chain RSV F design
105
145
Linker
Hydrophobic
fusion peptide
Foldon
Viral membrane
Viral membrane

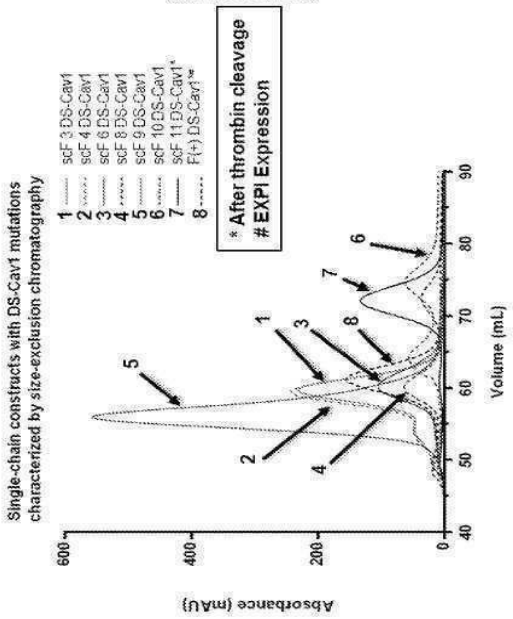
도면45

도 45

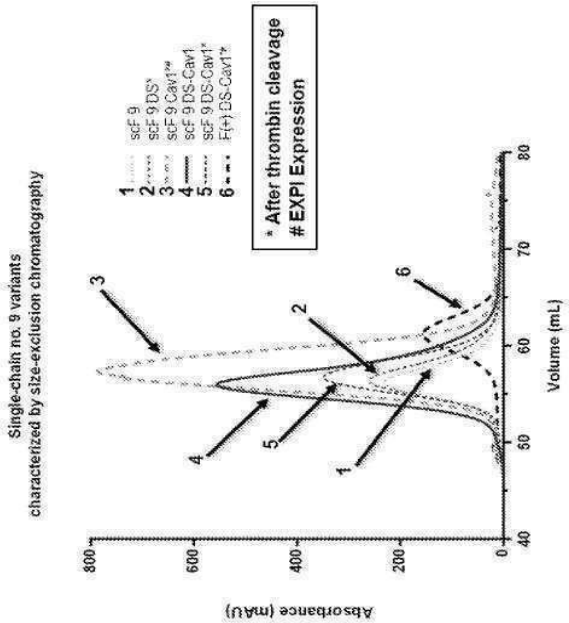
Construct	Fusion Stabilization		Linker length				Production	
	Variant	Trimerization domain	C-terminal residue	Linker end points	Linker length	Linker sequence	Oligomeric state	Yield (mg/L)
3	DS-Cav1	Foldon	513	97-150	9	GSGNIDLGG	Trimer	2.8
4	DS	Foldon	513	97-150	11	GSGGNRGIDLGG	N.D.	N.D.
	DS-Cav1		513	97-150	11	GSGGNRGIDLGG	Trimer	3.4
	a		513	97-150	11	GSGGNRGIDLGG	N.D.	N.D.
6	DS		513	97-150	8	GSGRVLGG	N.D.	N.D.
	DS-Cav1		513	97-150	8	GSGRVLGG	Trimer	1.0
7	DS	CPC	491	97-150	9	GSGNVGLGG	N.D.	N.D.
	Cav1	CPC	491	97-150	9	GSGNVGLGG	Aggregate	0.45
	DS-Cav1	CPC	491	97-150	9	GSGNVGLGG	Aggregate	0.3
8	DS	CC	511	97-150	9	GSGNVGLGG	Monomer	0.6
					9		Trimer	0.5
	DS-Cav1	CC	511	97-150	9	GSGNVGLGG	Monomer	0.8
					2		Trimer	1.0
	DS-Cav1	None	511	97-150	2	GSGRVGLGG	Monomer	0.5
					2		Trimer	0.8
9	DS-Cav1	Foldon	513	105-145	2	GS	Trimer	3.1
	a	Foldon	513	105-145	2	GS	Trimer	4.8
	DS	Foldon	513	105-145	2	GS	Trimer	4.3
	Cav1	Foldon	513	105-145	2	GS	Trimer	5.8
10	DS	CPC	491	105-145	2	GS	Monomer	0.3
							Trimer	0.4
	DS-Cav1	CPC	491	105-145	2	GS	Monomer	0.5
							Trimer	0.5
11	DS	CC	513	105-145	2	GS	Monomer	0.8
	Cav1	CC	513	105-145	2	GS	Monomer	1.0

도면46

도 46A



도 46B



도면47

도 47

Construct	Variant	Antibody K_D value (nM)								
		Site Ø			Site II[$]			Site IV		
		D25	AM22	5C4	Paliv	Mota	101F			
F(+)	DS-Cav1	0.15	<0.01	13	23	0.04	3.2			
scF no. 9	DS-Cav1	0.06	0.1	6.0	4.0	8.9	2.7			

$ Palivizumab (Paliv); Motavizumab (Mota)

도면48

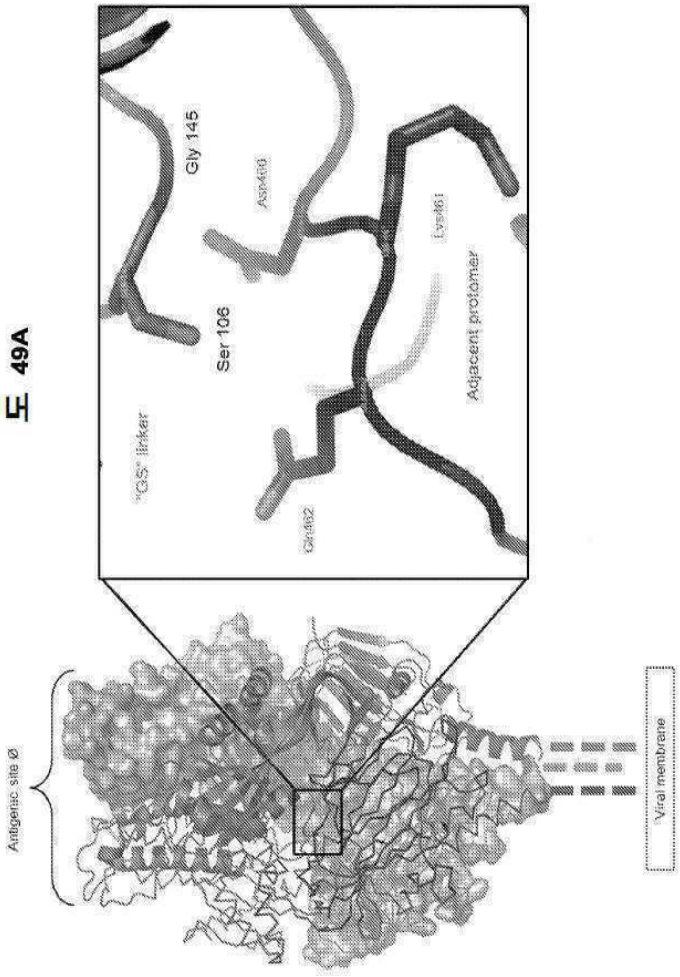
도 48

Data collection and refinement	Single-chain RSV F no. 9 DS-Cav1
Space group	$P\,4_1\,3\,2$
Resolution (Å)	50-3.21 (3.36-3.21)
$I / \sigma I$	2.84
No. reflections	521334
Unique reflections	76368
Completeness (%)	98
Average redundancy	4.3
R_{work} / R_{free} (%)	19.3 / 23.9

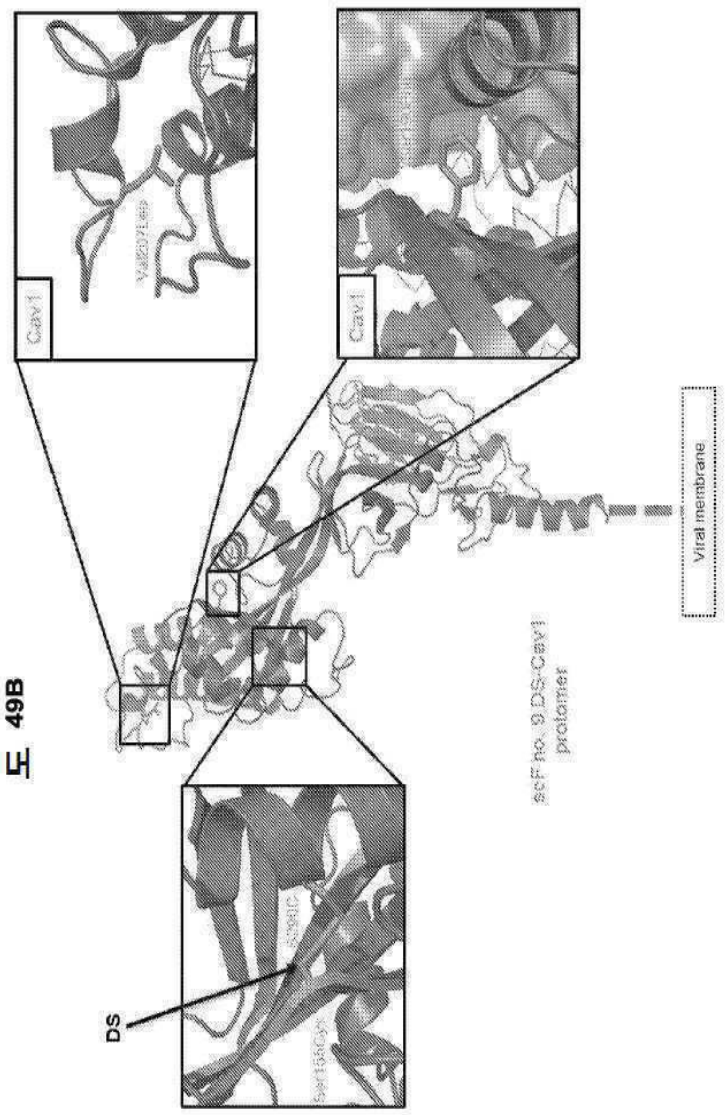
$R = \Sigma hkl||Fobs| - |Fcalc||/\Sigma hkl|Fobs|$.
R_{free} is calculated from 5% of the reflections excluded from refinement.

도면49a

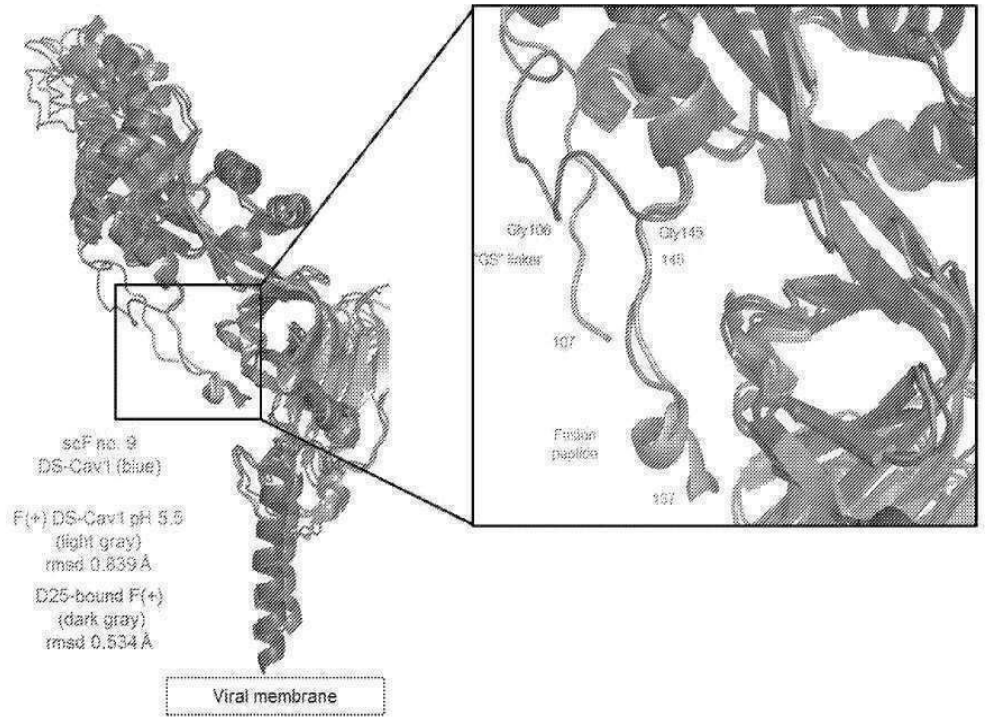
도 49A


Gly 145
Asp4616
Lys461
Ser 106
Adjacent protomer
"GS" linker
Glu4662
Antigenic site Ø
Viral membrane

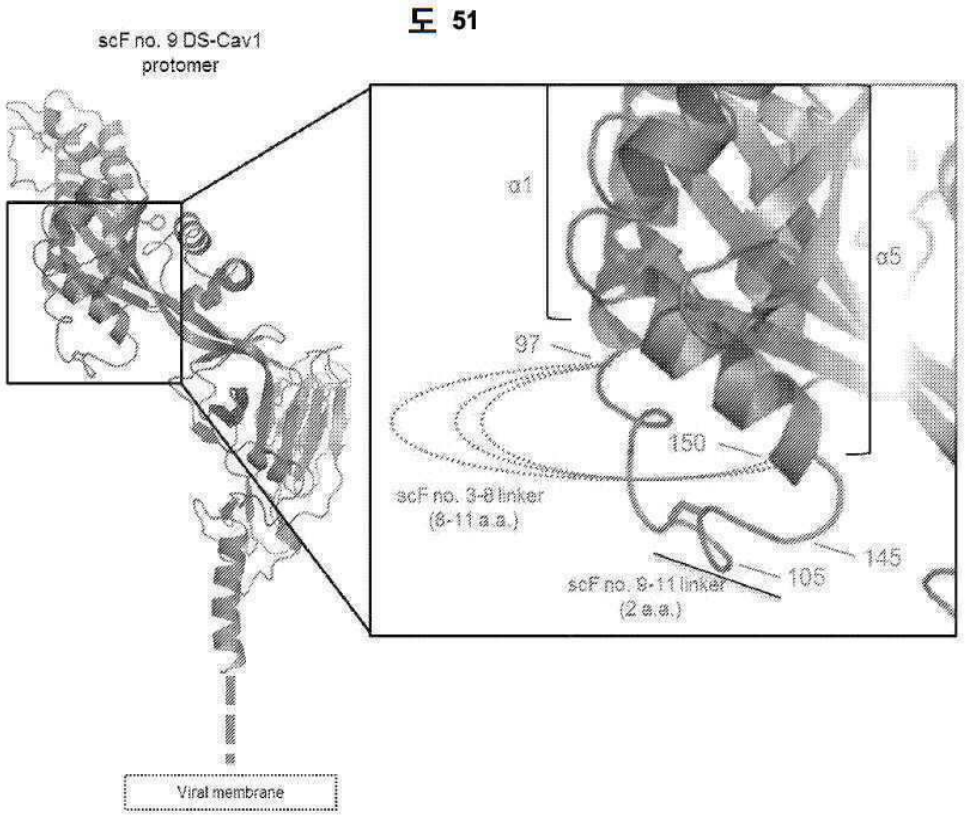
도면49b


도 49B
Cav1
Val207Leu
Cav1
Viral membrane
scFv no. 9.DS-Cav1
protomer
DS
Ser156Cys

도면50

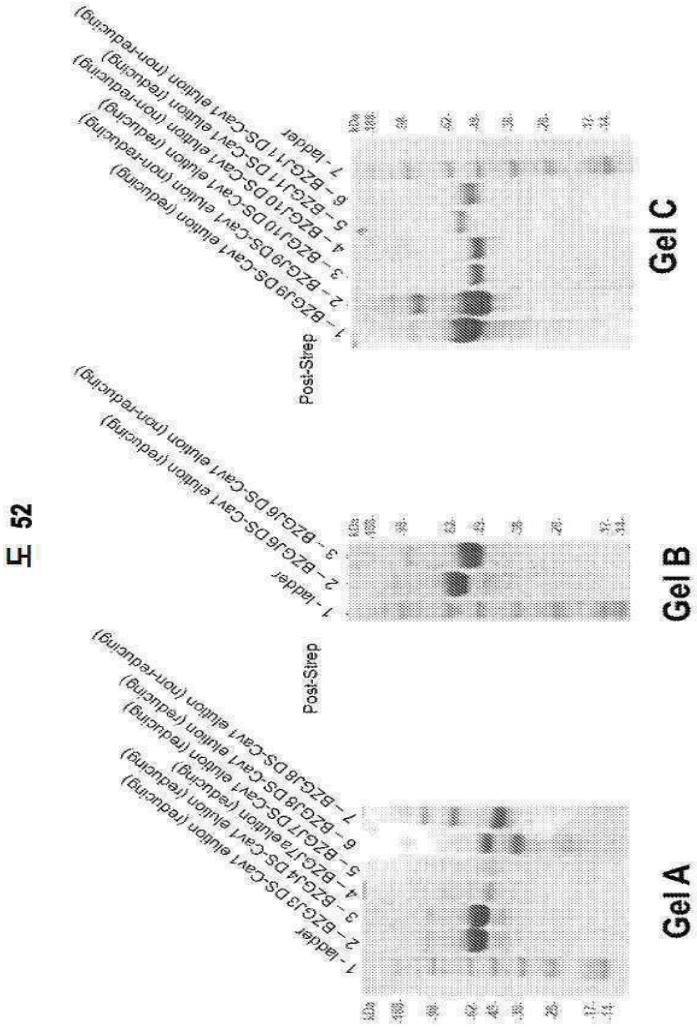

Gly106
GS' linker
Gly145
146
107
Fusion peptide
197
scF no. 9
DS-Cav1 (blue)
F(+) DS-Cav1 pH 5.5
(light gray)
rmsd 0.839 Å
D25-bound F(+)
(dark gray)
rmsd 0.534 Å
Viral membrane

도면51


도 51
scF no. 9 DS-Cav1
protomer
α1
α5
97
150
scF no. 3-8 linker
(8-11 a.a.)
145
105
scF no. 8-11 linker
(2 a.a.)
Viral membrane

도면52

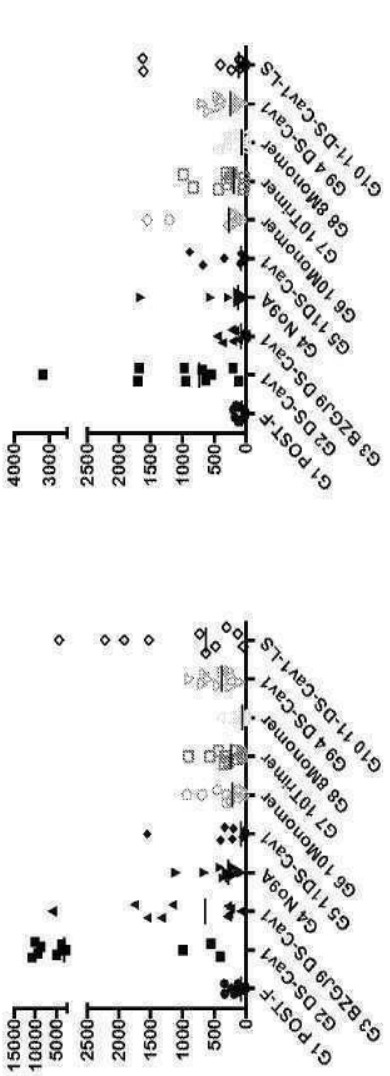
도 52


Gel A
Post-Strep
1 - ladder
2 – BZG J5 DS-CavT elution (reducing)
3 – BZG J4 DS-CavT elution (reducing)
4 – BZG J7a elution (reducing)
5 – BZG J7 DS-CavT elution (reducing)
6 – BZG J8 DS-CavT elution (reducing)
7 – BZG J6 DS-CavT elution (non-reducing)
Gel B
Post-Strep
1 - ladder
2 – BZG J6 DS-CavT elution (reducing)
3 – BZG J6 DS-CavT elution (non-reducing)
Gel C
Post-Strep
1 – BZG J9 DS-CavT elution (reducing)
2 – BZG J9 DS-CavT elution (non-reducing)
3 – BZG J10 DS-CavT elution (reducing)
4 – BZG J10 DS-CavT elution (non-reducing)
5 – BZG J11 DS-CavT elution (reducing)
6 – BZG J11 DS-CavT elution (non-reducing)
7 - ladder

도면53

도 53 Week 5 neutralization data 10 animals/group

Immunizations at Week 0 and Week 3 with 10 ug protein + 50 ug Poly I:C per animal



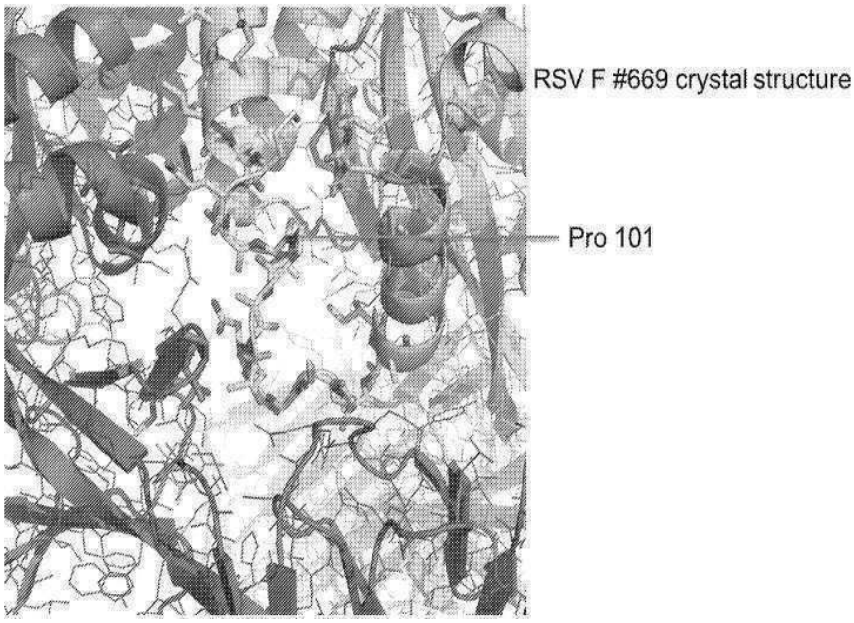
Summary	POST-F	DS-Cavt	BZGJ9 DS-Cavt	BZGJ9A	BZGJ11 DS-Cavt	BZGJ10 Monomer	BZGJ0 Trimer	BZGJ8 Monomer	BZGJ4 DS-Cavt	BZGJ11 DS-Cavt-LS
Mean	151.1	5690	1,736	269.5	211.9	129.3	265.5	116.2	448.4	1,288
Geometric mean	92.96	3190	618.8	279.9	79.16	229	245	90.88	378.9	697.7

Summary	POST-F	DS-Cavt	BZGJ9 DS-Cavt	BZGJ9A	BZGJ11 DS-Cavt	BZGJ10 Monomer	BZGJ0 Trimer	BZGJ8 Monomer	BZGJ4 DS-Cavt	BZGJ11 DS-Cavt-LS
Mean	94.51	1070	186.5	305.2	223.6	445.7	344.4	166.7	316.1	420.6
Geometric mean	61.97	727.8	78.77	320.5	78.37	338.9	193	69.75	259.8	112.9

도면54

FIG. 54

Single chain linker region may be improved by removing Proline 101 or shortening/mutating the linker residues and adjacent residues



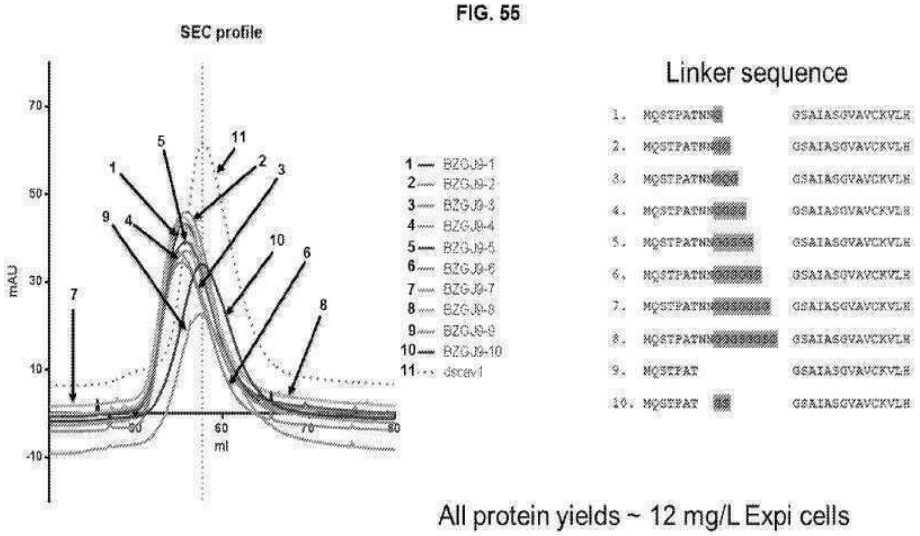
도면55

도 55

Further improvement of Single Chain (SC) #669 and assessment by gel-filtration

Superose 6 (120 ml column)

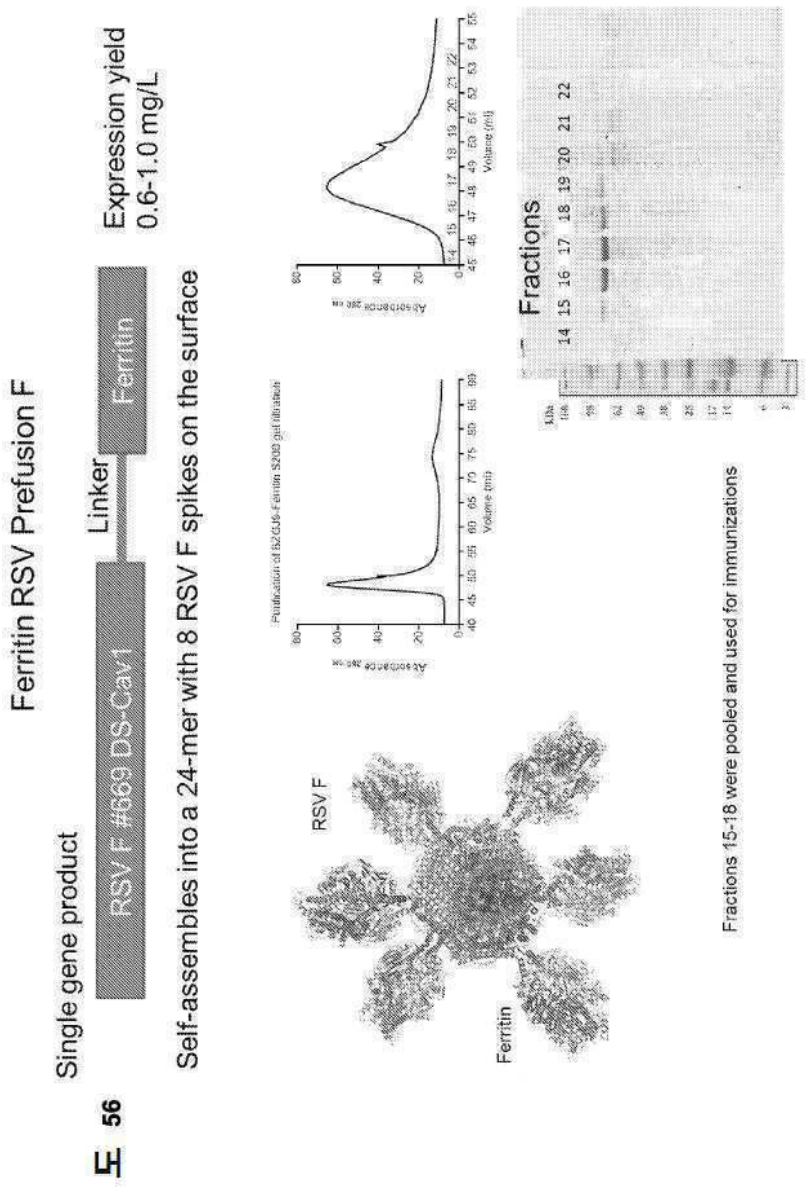
FIG. 55



All protein yields ~ 12 mg/L Expi cells

Removing residues 104NN105 results in improved trimer species

도면56

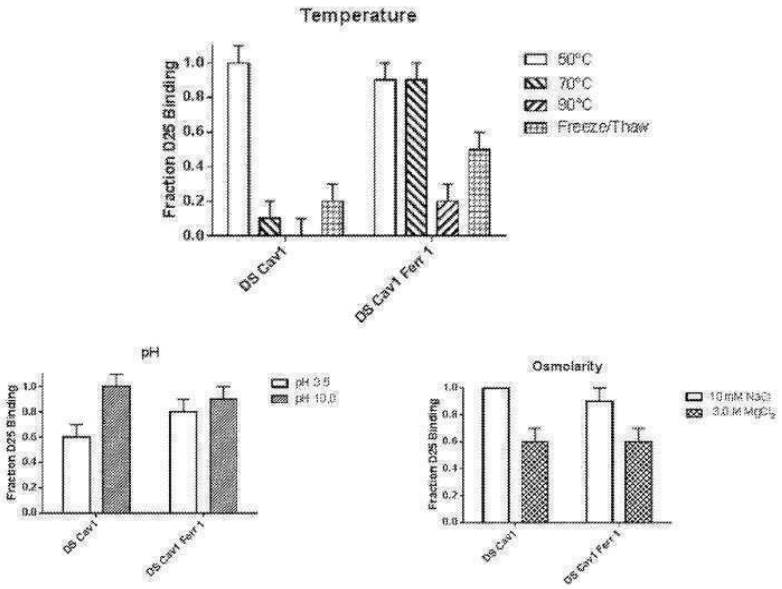

Ferritin RSV Prefusion F
Single gene product
RSV F #669 DS-Cav1
Linker
Ferritin
Expression yield
0.6-1.0 mg/L
Self-assembles into a 24-mer with 8 RSV F spikes on the surface
RSV F
Ferritin
Fractions
14 15 16 17 18 19 20 21 22
Fractions 15-18 were pooled and used for immunizations

도 56

도면57

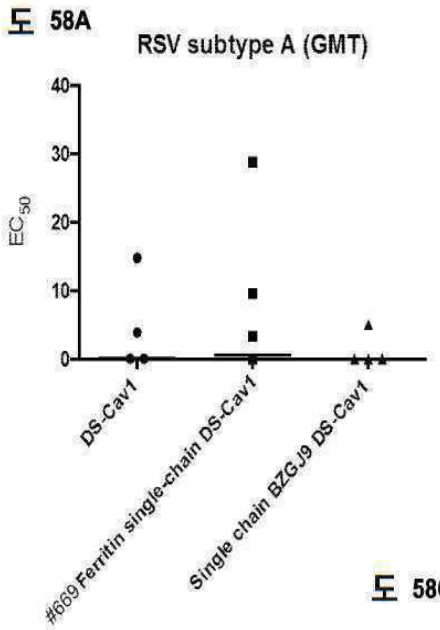
Physical stability of #669 linked to Ferritin compared to RSV F DS-Cav1

도 57

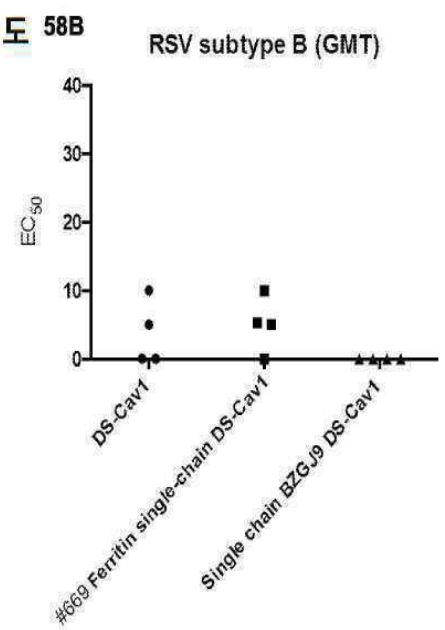


도면58

도 58A



도 58B



도 58C

	DS-Cav1	Ferritin single-chain DS-Cav1	Single chain BZGJ9 DS-Cav1
Number of values	4	4	4
Mean	4.666	10.41	1.25
Std. Deviation	6.974	12.86	2.5
Std. Error of Mean	3.487	6.431	1.25
Geometric mean	0.2038	0.5074	0.0002659

도면59

FIG. 59A

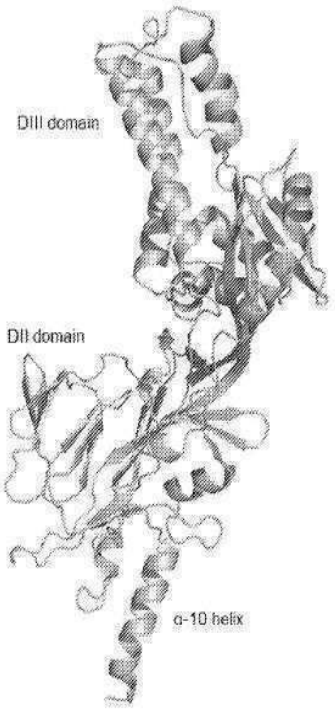
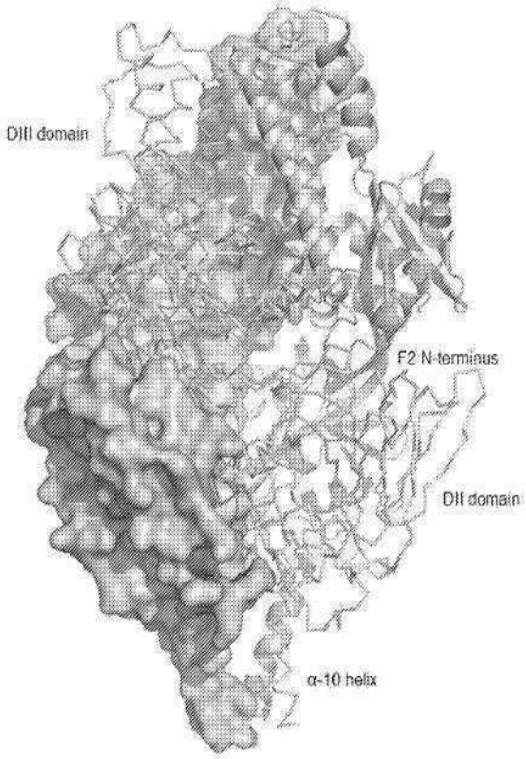
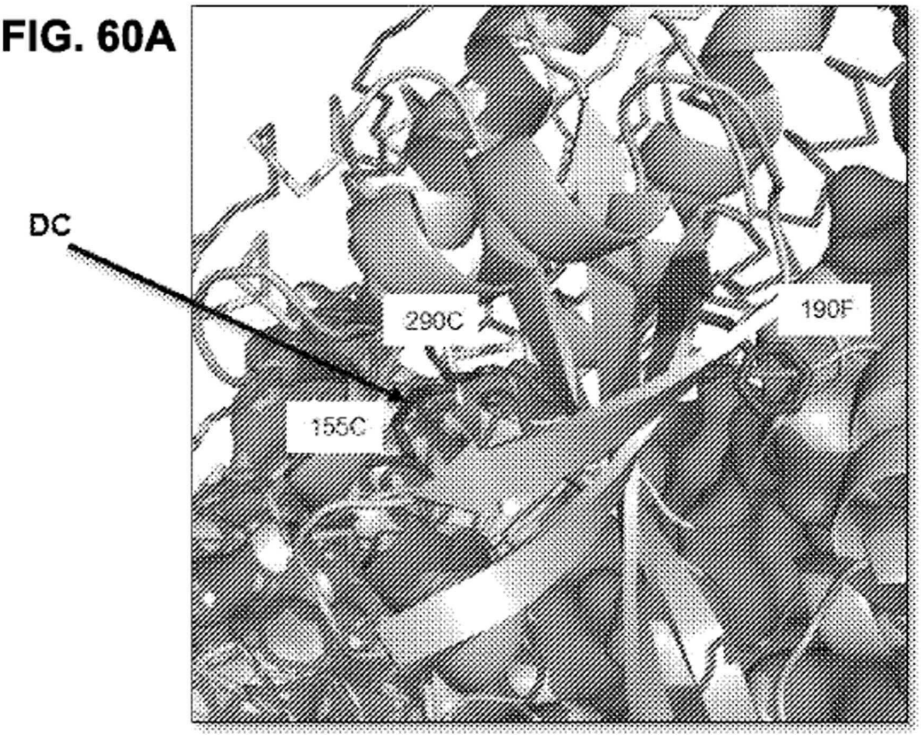


FIG. 59B



도면60a

FIG. 60A



도면60b

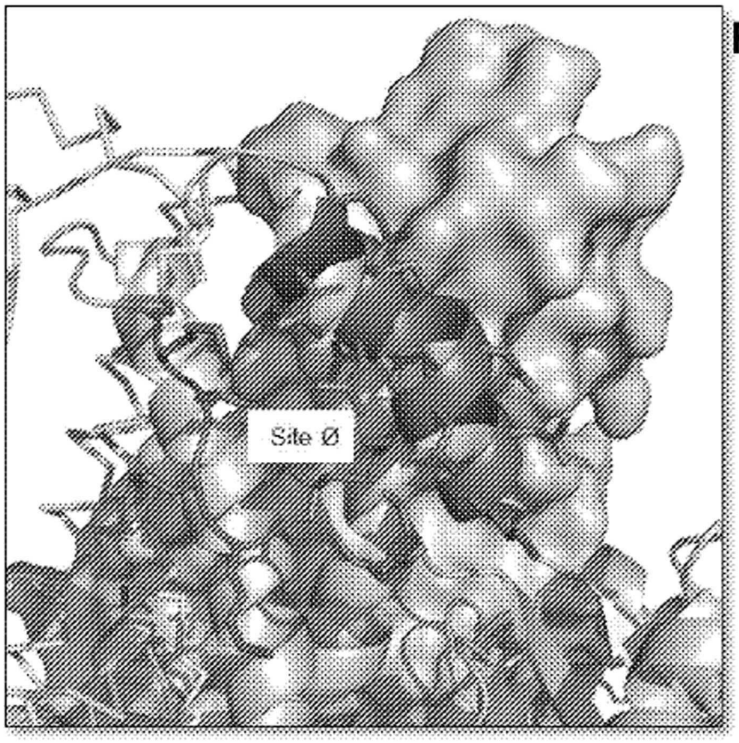
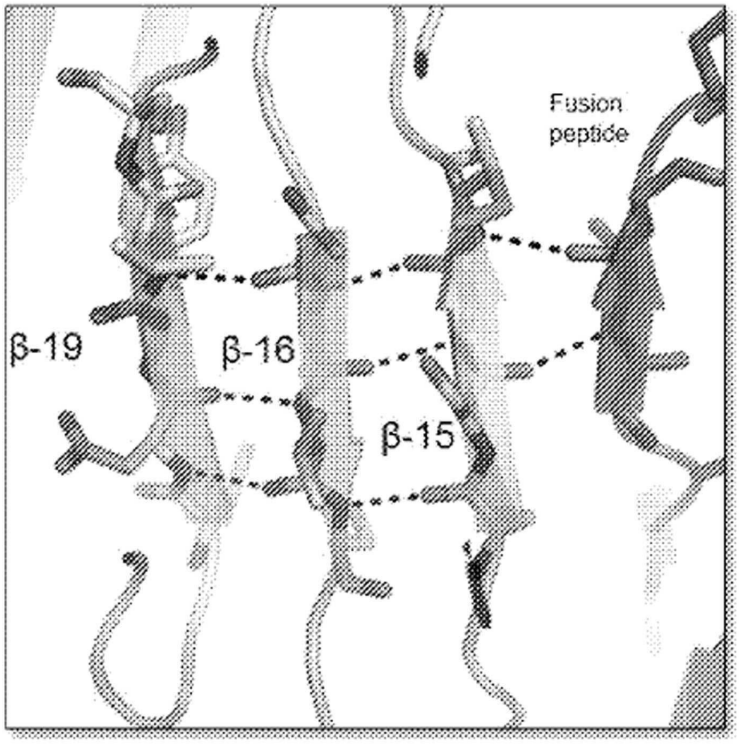


FIG. 60B

도면60c

FIG. 60C



도면60d

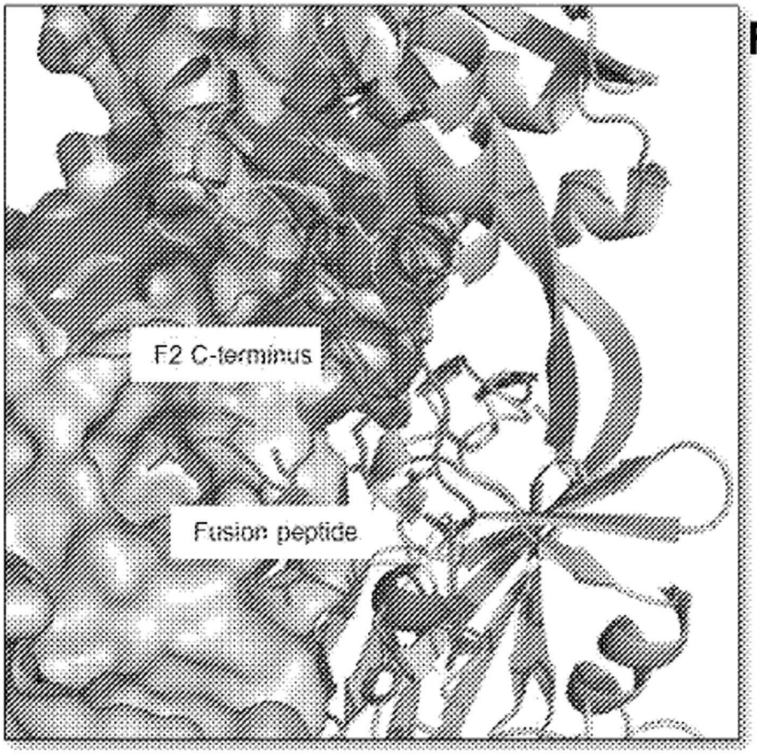
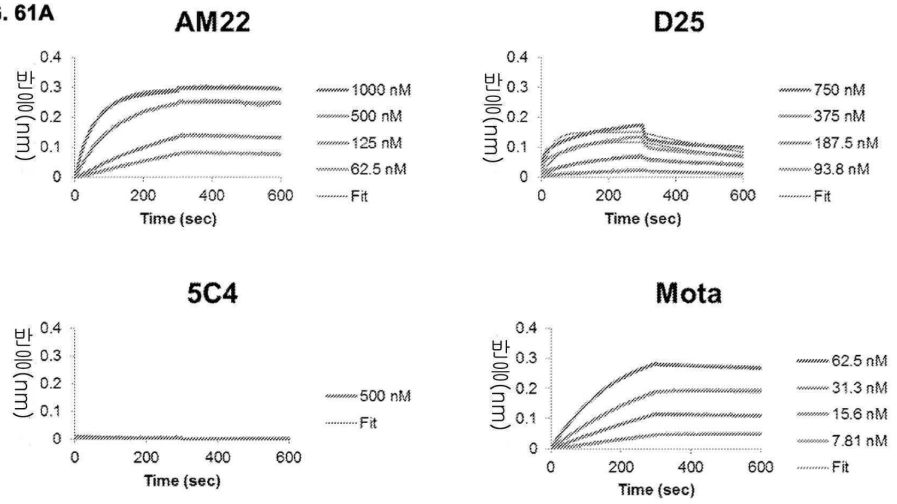


FIG. 60D

도면61a

FIG. 61A



Antibody	KD (nM)	KD Error (nM)
AM22 Fab	<0.001	0.312
D25 Fab	**37.1**	**0.776**
Mota Fab	0.862	0.049
5C4 Fab	0	0

도면61b

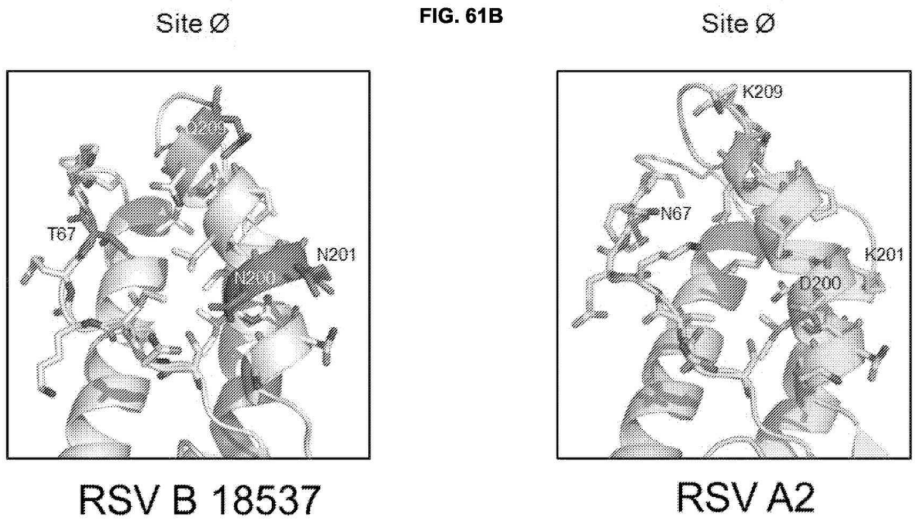
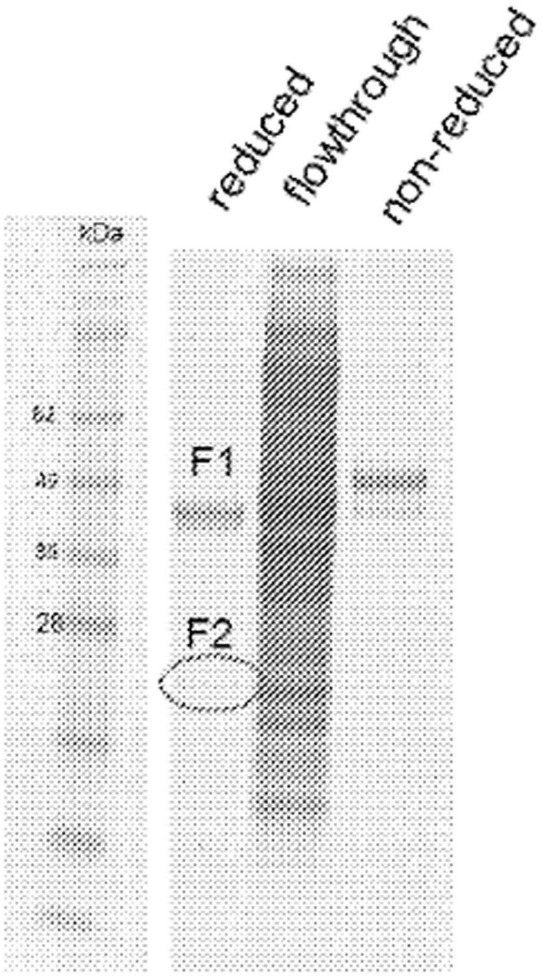
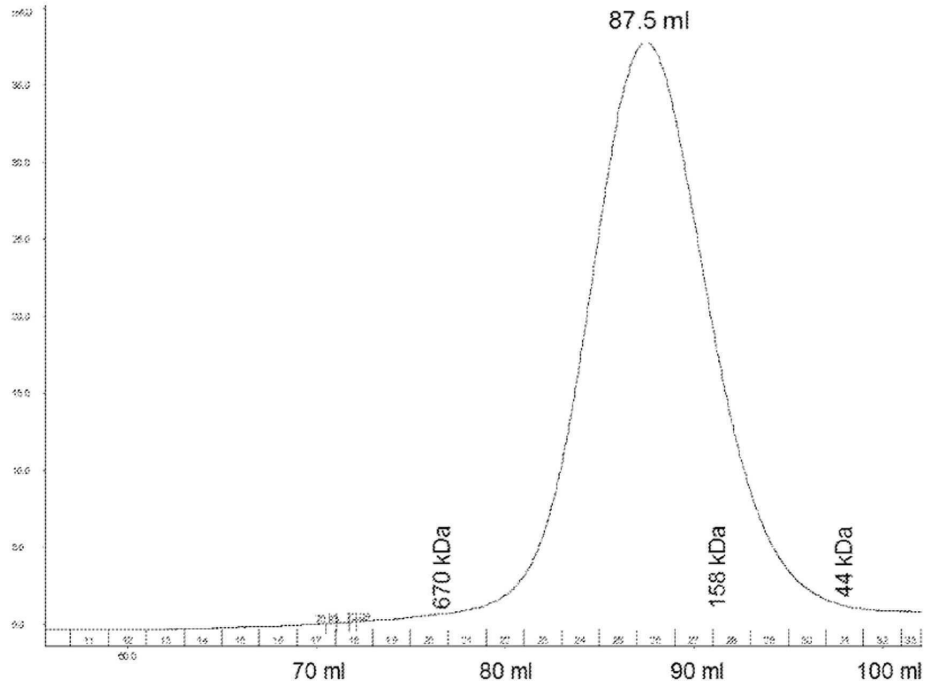


FIG. 61B

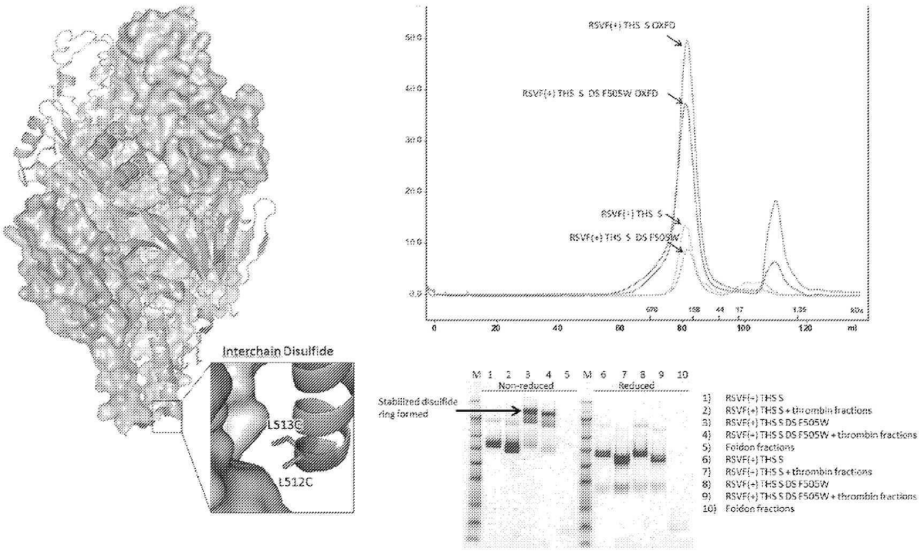
도면62a



도면62b

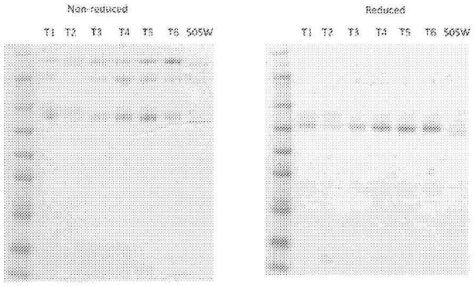

87.5 ml
670 kDa
158 kDa
44 kDa
70 ml
80 ml
90 ml
100 ml

도면63


Interchain Disulfide
L513C
L512C
RSVF(+) THS S OXFD
RSVF(+) THS S DS F505W OXFD
RSVF(-) THS S
RSVF(+) THS S DS F505W
Stabilized disulfide ring formed
Non-reduced
Reduced
1) RSVF(-) THS S
2) RSVF(+) THS S + thrombin fractions
3) RSVF(+) THS S DS F505W
4) RSVF(+) THS S DS F505W + thrombin fractions
5) Foldon fractions
6) RSVF(+) THS S
7) RSVF(-) THS S + thrombin fractions
8) RSVF(+) THS S DS F505W
9) RSVF(+) THS S DS F505W + thrombin fractions
10) Foldon fractions

도면64

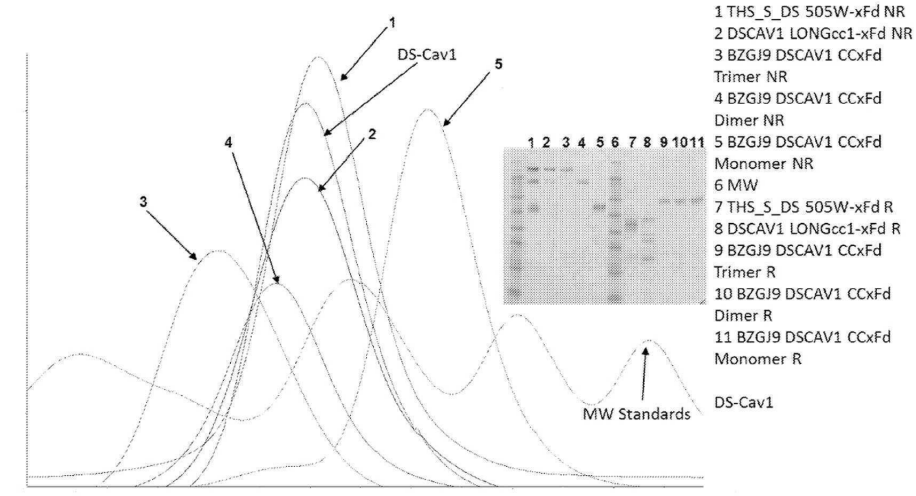
GSJCCTail1-6xFd 및 DS F205W 포스트-스트렙택틴(post-streptactin)



Construct	mg	mg/L	Motif between 511 and cleavable foldon	SEQ ID NO:
GSJCCtail1xFd	1.05	1.05	CChnvnagksttnimitt	840
GSJCCtail2xFd	0.33	0.33	LLhnvnaCCsttnimitt	841
GSJCCtail3xFd	0.99	0.99	LLhnvnagksttniCCtt	842
GSJCCtail4xFd	1.53	1.53	LLhnvnagksttnCCitt	843
GSJCCtail5xFd	2.13	2.13	CChnvnagksttn	844
GSJCCtail6xFd	1.65	1.65	LLhnvnaCCsttn	845
RSVF + THS S DS F505W OXFD	0.81	0.81	CC	

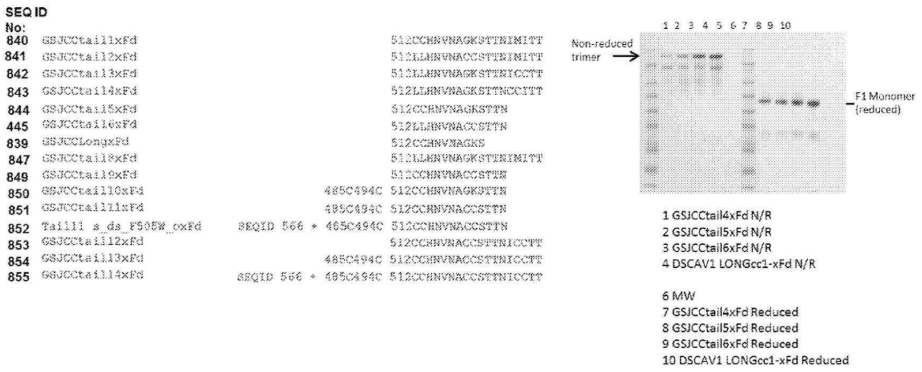
도면65

FIG. 65 RSV F 단백질의 젤 필터레이션 프로파일



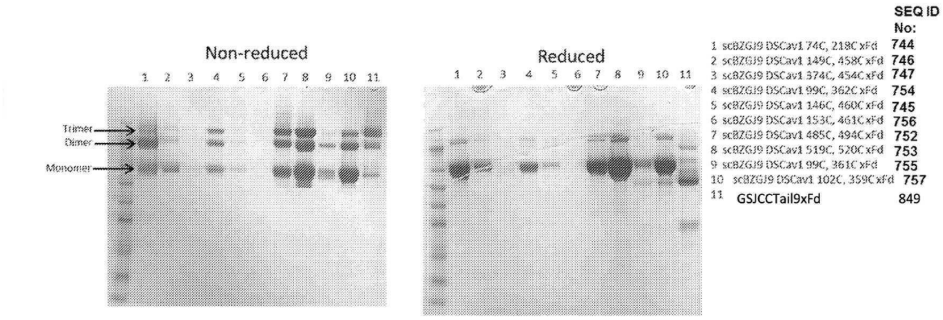
도면66

폴돈(foldon)의 제거 후에 F 단백질 삼량체를 안정화시키는 인터프로모터 이황화물



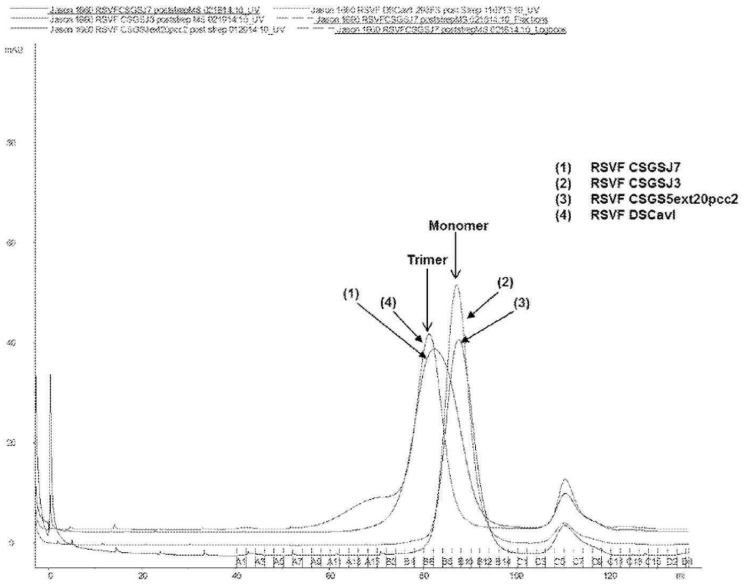
도면67

단일 사슬 및 DS Cav1 포맷에서 프로모터 인터페이스의 이황화물 스크리닝



도면68

단일 또는 삼중 피크 형성을 나타내는
CSGSJ(no foldon) 단백질 및 DS Cav1의 비교



도면69a

		Condition					
	SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
GS-CAV1 control		2.9722	2.629	0.079	2.456	2.6019	3.0766
GSJ 1Cav1 1	901	2.9351	2.9999	0.0598	2.494	1.8186	3.0448
GSJ 1Cav1 2	902	2.8747	2.8486	0.0934	2.721	2.9776	2.9101
GSJ 1Cav1 3	903	2.6728	2.9517	0.0604	2.267	3.0676	3.0533
GSJ 1Cav1 4	904	2.7302	2.9117	0.0881	1.532	0.0919	2.529
GSJ 1Cav1 5	905	2.984	2.9964	0.0619	2.331	2.0369	3.0638
GSJ 1Cav1 6	906	3.0059	3.0236	0.0601	2.28	0.3496	2.8567
GSJ 1Cav1 7	907	2.9835	3.049	0.0896	2.557	3.0614	3.1202
GSJ 1Cav1 8	908	1.5173	2.151	0.0533	0.622	0.1222	1.2086
GSJ 1Cav1 9	909	0.0664	0.1252	1.4155	0.071	0.0666	0.2809
GSJ 1Cav1 10	910	2.926	3.0756	0.075	2.455	3.0581	3.0857
GSJ 1Cav1 11	911	2.964	3.049	0.0642	2.473	3.0623	3.0621
GSJ 1Cav1 12	912	2.728	2.9347	0.081	1.685	1.8661	2.9011
GSJ 1Cav1 13	913	2.9295	3.093	0.0718	2.491	3.0264	3.0539
GSJ 1Cav1 14	914	0.074	0.1171	0.0865	0.11	0.058	1.9179
GSJ 1Cav1 15	915	2.8859	2.9177	0.0566	2.248	0.1957	2.8554
GSJ 1Cav1 16	916	2.9717	3.0962	0.0931	2.524	0.699	2.9627
GSJ 1Cav1 17	917	2.9605	3.1047	0.0891	2.147	0.6287	2.9251
GSJ 1Cav1 18	918	2.961	2.9848	0.1134	2.34	2.8975	3.0765
GSJ 1Cav1 20	920	2.7496	2.9874	0.0728	2.379	0.1579	2.8809
GSJ 1Cav1 21	921	2.6721	2.9258	0.0535	2.28	0.1022	2.6841
GSJ 1Cav1 22	922	2.5434	2.8613	0.072	2.168	0.1202	2.8014
GSJ 1Cav1 23	923	2.9054	3.0166	0.0689	2.378	0.1273	2.7775
GSJ 1Cav1 24	924	2.6291	2.7995	2.0139	2.754	0.2752	2.8836
GSJ 1Cav1 25	925	3.1039	3.1097	0.1162	2.192	0.369	3.1036
GSJ 1Cav1 26	926	3.0762	3.0849	0.1055	2.268	0.4974	3.0849
GSJ 1Cav1 27	927	3.0306	3.0256	0.0626	2.322	0.3391	2.6006
GSJ 1Cav1 28	928	0.8729	2.3566	0.0761	1.891	0.082	2.2764
GSJ 1Cav1 29	929	2.7403	3.1072	0.0572	2.309	1.8155	2.86
GSJ 1Cav1 30	930	2.7915	2.928	0.0764	2.2	0.1129	2.7988
GSJ 1Cav1 31	931	2.8768	2.997	0.0716	2.22	0.2543	2.8772
GSJ 1Cav1 32	932	2.7305	2.9971	0.1275	2.826	0.097	2.9904
GSJ 1Cav1 33	933	2.6077	2.7011	0.0517	2.664	0.0884	2.6223
GSJ 1Cav1 34	934	2.9916	2.9784	0.0619	2.387	0.1185	2.9995
GSJ 1Cav1 35	935	2.6504	2.8824	0.0603	2.253	0.0877	2.7379
GSJ 1Cav1 36	936	2.9615	2.9404	0.0976	2.19	0.1221	2.8266
GSJ 1Cav1 37	937	2.9057	2.9104	0.08	2.092	0.0919	2.75
GSJ 1Cav1 38	938	2.7011	2.858	0.0559	1.923	0.0572	2.481
JCB GSJ 1	939	2.9562	2.8762	0.0532	2.551	0.8961	2.9355

도면69b

	SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
JCB GSJ 2	940	2.9514	2.8462	0.0988	2.103	0.1986	2.7551
JCB GSJ 3	941	3.0163	2.9573	0.1007	2.717	1.9165	2.0545
JCB GSJ 4	942	2.9577	2.9605	0.0842	2.239	0.861	3.0062
JCB GSJ 5	943	2.9765	2.9654	0.0783	2.059	0.0692	2.9373
IG1-V192M	944	0.0622	0.1164	0.053	0.146	0.0632	0.3497
IG2-A298M_RSVF(+)FdTHS-paH	945	3.053	3.0139	0.1081	2.686	0.3677	0.0677
IG2-T58I_A298M	946	3.0122	2.9796	0.0866	2.645	2.7714	2.9833
IG2-T58I_V192F_A298I_RSVF(+)FdTHS-paH	947	0.0912	0.0934	0.0882	0.127	0.0734	0.1541
IG2-T58I_V192M_A298I_RSVF(+)FdTHS-paH	948	0.0908	0.1119	0.0825	0.11	0.0832	0.7888
i167m-a298m	949	0.0995	0.3355	0.0492	0.345	0.0628	0.7184
i167m-l181m	950	0.0579	0.2538	0.052	0.367	0.0772	0.6506
i199f	951	2.9468	2.7464	0.4405	2.429	0.2993	2.7677
i57c-s190c	952	0.2652	0.5291	0.0661	0.094	0.0725	0.461
ig2-t58l-a298m	953	1.0703	1.5305	0.0717	0.552	0.1018	1.2218
ig2-t58m	954	3.0988	2.9985	0.1685	2.792	0.797	2.0626
ig2-t58m-a298i	955	2.9471	2.8545	0.056	2.765	0.8859	2.8106
ig2-t58m-a298L	956	3.038	2.9793	0.0879	2.795	2.0598	2.0514
ig2-v192c-ins192-193-g-e256c	957	0.0696	0.1069	0.0556	0.11	0.0852	0.3724
rsv f ths_s_f505w_o_s509f	958	2.1277	2.6243	0.1037	1.738	2.3049	2.6123
rsv f ths_s_f505w_s509f	959	1.3529	1.6774	0.1193	0.159	1.4003	2.3193
t58i-a298i	960	2.6436	2.6535	0.0875	2.243	0.2619	2.5531
t58m-a298m	961	2.8387	2.715	0.1073	2.712	2.0659	2.9156
v179l-t189f	962	0.856	1.2011	0.0499	0.824	0.0621	0.9012
v192f	963	0.053	0.178	0.0816	0.186	0.0699	0.318
v192f-l252a	964	0.0515	0.0803	0.1396	0.074	0.0663	0.3239
v56m-i167m-l181m	965	0.0464	0.0855	0.062	0.071	0.0549	0.4488
v56m-i167m-v296m	966	0.0521	0.1116	0.0754	0.111	0.0518	0.4902
v56m-l181f	967	0.0511	0.1818	0.1008	0.475	0.0612	0.4797
w52c-s150c	968	0.1112	0.2253	0.0782	0.103	0.08	0.3329
GSJT12	859	2.8696	1.9726	0.0574	0.166	1.7859	2.3914
GSJT13	860	1.4253	1.7736	0.0572	0.144	2.8428	2.2702
GSJT14	861	2.2306	2.3344	0.0737	0.422	1.9983	2.4307
GSJT15	862	1.5401	1.7335	0.0752	0.114	1.744	2.2568
GSJT16	863	1.3708	1.6618	0.062	0.093	1.8552	2.3271
GSJT17	864	1.2053	1.5253	0.0702	0.103	1.5698	2.2757
GSJT18	865	1.181	1.5089	0.1298	0.272	1.1712	2.1623

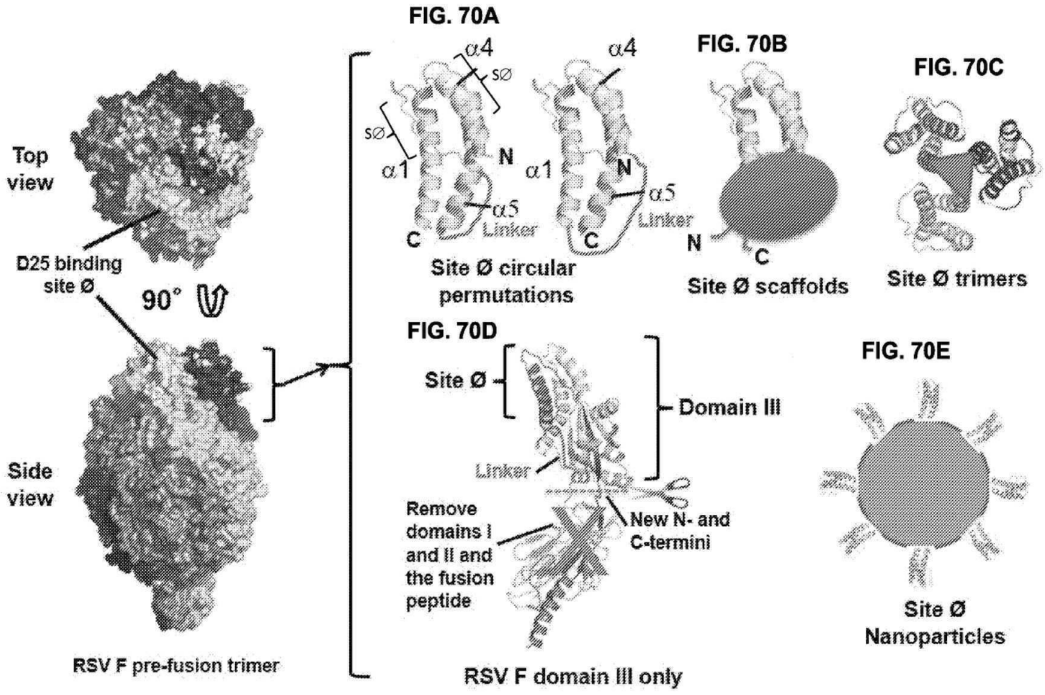
도면69c

	SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
GSJT19	866	0.9276	1.2456	0.0869	0.161	0.9697	1.9834
GSJT20	867	0.934	1.3047	0.0527	0.154	0.9109	2.03
GSJT21	868	1.1944	1.4919	0.1448	0.159	1.3432	2.125
GSJT22	869	2.549	2.556	0.0687	0.594	2.2967	2.62
GSJT23	870	1.0262	1.3655	0.0679	0.257	1.1962	2.1363
GSJT24	871	2.9093	2.1459	0.0885	0.255	1.8613	2.2506
GSJT25	872	0.8893	1.43	0.0981	0.361	0.8439	1.9158
GSJT26	873	2.6387	2.0503	0.0532	0.421	1.6024	2.2094
GSJT27	874	1.0373	1.4579	0.0577	0.419	0.8234	1.9723
GSJT28	875	2.92	2.0962	0.0566	0.346	1.8645	2.2098
GSJT29	876	1.1084	1.5343	0.0723	0.408	0.8422	1.942
GSJT30	877	1.5348	1.9793	0.1053	0.354	1.6207	2.4172
GSJT31	878	2.7044	2.1351	0.0569	0.284	1.7527	2.3003
GSJT32	879	2.5763	1.9587	0.0518	0.296	1.6872	2.2152
GSJT33	880	2.677	1.9659	0.0586	0.228	1.5347	2.1997
GSJT34	881	2.5105	1.9678	0.0968	0.388	1.7569	2.372
GSJT35	882	2.91	2.1785	0.0773	0.34	1.7139	2.2963
GSJT36	883	2.6632	1.9904	0.0934	0.296	1.6547	2.1937
GSJT37	884	2.6236	1.9141	0.0612	0.342	1.7499	2.4074
GSJT38	885	2.5627	2.0942	0.0588	0.13	1.7619	2.4227
GSJT39	886	2.8508	2.07	0.0611	0.113	1.6841	2.425
GSJT40	887	2.576	1.8917	0.0645	0.177	1.6654	2.3938
GSJT41	888	2.5413	1.824	0.081	0.151	1.6104	2.3815
GSJT42	889	2.1909	2.252	0.068	0.352	1.9041	2.3642
GSJT43	890	2.6024	2.0164	0.0559	0.378	1.6314	2.4296
GSJT44	891	1.3943	1.6933	0.0751	0.141	1.3954	2.2111
GSJT45	892	2.8489	1.9654	0.0623	0.144	1.9211	2.4907
GSJT46	893	2.7633	2.0335	0.0673	0.231	1.39	2.2563
GSJT47	894	2.1206	2.2091	0.0566	0.318	1.9513	2.4835
GSJT48	895	2.8802	2.1433	0.0875	0.682	1.6569	2.3015
GSJT49	896	2.8774	2.1642	0.0609	0.437	1.6532	2.3864
GSJT50	897	2.6151	1.998	0.0735	0.508	1.6005	2.2291
GSJT51	898	2.0185	2.2042	0.056	0.668	1.5597	2.2347
GSJT52	899	2.7021	2.2572	0.0635	0.791	1.4597	2.4123
GSJT53	900	2.625	1.899	0.0666	0.482	1.3792	2.3026
GSJ-FP1	969	2.7611	2.1208	0.2051	0.399	1.9289	2.4804
GSJ-FP2	970	2.365	2.4107	0.1963	0.515	2.2613	2.6545
GSJ-FP3	971	0.126	0.234	0.0566	0.09	0.34	1.2832
GSJ-FP4	972	0.1049	0.1701	0.0785	0.084	0.1021	0.6274
GSJ-FP5	973	0.0891	0.178	0.0531	0.119	0.1454	0.5375

도면69d

	SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
GSJ-FP6	974	0.0634	0.0904	0.0525	0.066	0.0822	0.5962
GSJ-190P1	975	0.8047	1.1312	0.0688	0.182	0.1205	0.6337
GSJ-190P2	976	0.0573	0.0813	0.0523	0.065	0.0735	0.6404
GSJ-190P3	977	0.0739	0.1148	0.0516	0.07	0.0653	0.3209
GSJ-190P4	978	0.0924	0.093	0.0536	0.062	0.0807	0.2631
GSJ-190P5	979	2.7832	2.8717	0.0679	2.014	0.0989	2.6646
GSJ-190P6	980	2.8847	2.9283	0.0697	2.401	0.4255	2.9114
GSJ-190P7	981	2.6563	2.9739	0.0745	2.392	0.5633	2.9135
GSJ-190P8	982	2.1674	2.6693	0.1063	2.27	0.175	2.6601
GSJ-190P9	983	0.0745	0.2046	0.0878	0.394	0.0654	0.7136
GSJ-190P10	984	0.0601	0.2007	0.061	0.069	0.0564	0.4225
GSJ-190P11	985	0.0699	0.0992	0.0595	0.107	0.0723	0.3176
GSJ-190P12	986	0.0709	0.1044	0.0528	0.061	0.0895	2.1543
GSJ-190P13	987	0.0592	0.1057	0.0475	0.083	0.0885	0.2632
GSJ-190P14	988	0.0583	0.0955	0.0468	0.058	0.0895	0.31
GSJ-190P15	989	0.0539	0.1363	0.0486	0.233	0.0695	0.3087
GSJ-190P16	990	0.0656	0.1091	0.1299	0.173	0.0791	0.492
GSJ-190P17	991	0.0583	0.1179	0.0502	0.092	0.0981	0.292
GSJ-DS1	992	0.0598	0.1296	0.0476	0.087	0.0823	0.3217
GSJ-DS2	993	0.0517	0.0942	0.0487	0.068	0.0698	0.2403
GSJ-DS3	994	0.0514	0.104	0.0714	0.084	0.0673	0.2739
GSJ-DS4	995	0.0562	0.1153	0.0542	0.08	0.0685	0.2281
GJ-3-1	996	2.6141	2.91	0.0528	2.225	0.2481	2.5224
GJ-3-2	997	2.4351	2.6384	0.0597	1.349	0.0674	1.9371
GJ-3-3	998	2.6454	2.1696	0.0777	1.264	0.102	2.6298
GJ-3-4	999	0.5157	1.3561	0.0551	1.246	0.168	1.837
GJ-3-5	1000	2.5829	2.8132	0.0606	1.904	0.2602	2.5274
GJ-3-6	1001	0.0791	0.772	0.046	1.231	0.0677	1.7194
GJ-3-7	1002	0.6065	1.8109	0.0927	1.621	0.0625	1.8797
GSJ-Int-FdF-1	1003	2.4736	2.1439	0.0467	0.395	2.6527	1.9662
GSJ-Int-FdF-2	1004	2.6225	2.0812	0.0824	0.195	2.7008	2.1449
GSJ-Int-FdF-3	1005	2.7662	1.8727	0.0537	0.222	2.7458	2.2908
GSJ-Int-FdF-4	1006	0.7215	1.0353	0.0522	0.095	0.6795	1.4721
GSJ-Int-FdF-5	1007	1.3574	1.6888	0.0555	0.119	1.1065	1.8092
GSJ-Int-FdF-6	1008	0.7496	1.0469	0.052	0.081	0.6161	1.285
GSJ-Int-FdF-7	1009	0.6324	0.7985	0.1179	0.15	0.5634	1.3309
GSJ-Int-FdF-8	1010	1.4654	1.8779	0.0997	1.153	1.352	2.1494
GSJ-Int-FdF-9	1011	1.4669	1.8242	0.147	0.159	1.4619	2.4152
GSJ-Int-FdF-10	1012	2.695	2.0029	0.0532	0.624	2.5524	2.1743
GSJ-Int-FdF-11	1013	1.7456	1.8869	0.0512	0.173	1.3535	2.0465

도면70



도면71

RSV F 항원성 사이트 Φ 면역원

- **249 immunogens expressed and evaluated antigenically:**

  26 Circularly permutated site Ø monomers
  25 Circularly permutated scaffolded site Ø monomers
  39 Trimerized circularly permutated site Ø
  11 Circularly permutated site Ø monomer nanoparticles
  1 Circularly permutated site Ø trimer on ferritin nanoparticles
  52 Domain III constructs
  12 Trimerized domain III constructs
  18 Circularly permutated domain III dimers
  10 Circularly permutated trimerized domain III dimers
  51 Domain III on nanoparticles
  4 Trimerized domain III nanoparticles

- **Antigenic readout**

  D25 binding at 0 and 1 week at 4°C
  D25 binding after 1 hr. at 60°C, 70°C, 80°C, 90°C and 100°C
  AM22 and 5C4 binding

- **Summary of antigenicity results (ELISA ≥ 1.5):**

Immunogens designed	D25 wk 0 4C	D25 wk 1 4C	D25 1hr 60C	D25 1hr 70C	D25 1 hr 80C	D25 1hr 90C	D25 1 hr 100C	AM22 wk2 4C	5C4 wk 0 4C
Monomers (121)	54	49	45	49	21	9	10	54	44
Trimers (61)	36	31	40	28	13	4	6	42	42
Monomers on nanoparticles (63)	20	12	20	12	0	0	0	28	23
Trimers on nanoparticles (4)	0	2	1	2	0	0	0	4	4

도면72a

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Con	1.7749	2.4048	1.3312	0.063	0.0546	0.0611	ND	2.7359	2.6353	1.784
Con	1.828	0.1536	0.1846	0.051	0.0596	0.0907	ND	0.915	ND	0.373
Circular permutation of site 0 (26)										
1027	0.994	0.7916	0.4133	2.795	1.2895	0.7806	ND	0.3243	0.1245	1.305
1028	0.2347	0.1646	0.0961	1.508	2.7552	0.7053	ND	0.4055	0.0814	0.693
1029	0.0597	0.0619	0.0531	0.055	0.0652	0.0583	ND	0.1138	0.0892	0.077
1030	1.0318	0.6279	0.4113	0.959	1.8999	0.4427	ND	1.1626	0.0856	0.916
1031	0.3199	0.3181	0.1695	2.678	2.5867	1.4001	1.9429	0.8191	0.0751	1.272
1032	0.0661	0.0616	0.0562	0.067	0.0791	0.065	ND	0.1363	0.0932	0.088
1033	1.3594	0.849	0.4444	2.711	2.1708	2.3041	1.8722	0.2756	0.0867	1.279
1034	0.5424	0.6069	0.1407	2.364	2.4148	1.5628	2.7661	0.1339	0.0842	1.035
1035	0.071	0.0661	0.0564	0.076	0.084	0.1459	ND	0.0943	0.1136	0.079
1036	2.3736	2.1015	1.5353	2.232	2.2364	0.1381	ND	3.0121	0.075	2.448
1037	2.5576	1.4036	1.4876	0.434	0.3958	0.4036	ND	2.0542	0.1077	1.297
1038	2.7399	1.6952	1.376	0.629	0.0524	0.333	ND	2.1779	0.0858	1.501
1039	3.0073	2.9769	2.9504	2.7	0.2338	0.2418	ND	3.1817	0.1113	2.955
1040	3.1199	3.2391	3.1501	3.045	0.0559	2.6247	2.9345	3.2581	0.0604	3.181
1041	3.071	2.901	2.9543	2.749	0.4102	0.8312	1.6908	3.1578	0.0613	2.946
1042	0.0777	0.071	0.085	0.052	0.0859	0.0496	ND	0.2679	0.0933	0.130
1043	0.0564	0.0648	0.0617	0.051	0.0819	0.0485	ND	0.1483	0.187	0.088
1044	0.053	0.0523	0.0574	0.049	0.0847	0.0498	ND	0.0832	0.1699	0.061
1045	0.0491	0.0571	0.0561	0.046	0.074	0.0468	ND	0.1178	0.2204	0.074
1046	0.0719	0.1451	0.218	0.145	2.3869	2.879	ND	2.3759	2.9197	0.889
1047	0.0786	0.0507	0.2224	0.051	0.1093	0.4426	ND	1.1171	0.9184	0.406
1048	0.0855	0.2682	0.0826	0.268	1.6515	2.2777	ND	2.15	0.1436	0.895
1049	0.856	2.8029	0.2993	2.803	2.9675	2.6586	1.2757	0.3899	0.1003	1.999
1050	0.0607	0.4221	0.1522	0.422	0.6564	2.8585	ND	0.2904	0.1102	0.378
1051	0.1055	1.9886	0.1805	1.989	2.6382	2.9702	1.2262	0.4197	0.1127	1.466
1052	2.578	2.7939	2.9126	2.794	2.6478	2.7466	2.4677	2.7874	3.1874	2.792
Circular permutation with scaffold connection (19)										
1053	2.6067	3.1472	2.6489	3.187	3.1226	2.9381	3.2121	2.6379	3.0295	3.004
1054	0.0728	0.0849	0.0929	0.063	0.0677	0.0465	ND	0.3494	0.0902	0.166
1055	0.5403	0.3211	0.3096	0.249	0.1933	0.0526	ND	1.0104	0.1344	0.527
1056	2.1951	1.5791	1.9417	0.304	0.1792	0.0586	ND	2.122	0.0816	1.335
1057	0.7436	0.3687	0.4128	0.083	0.085	0.0479	ND	0.4357	0.0715	0.296
1058	0.0633	0.0816	0.06	0.058	0.085	0.0521	ND	0.1304	0.0744	0.090
1059	0.0641	0.065	0.0717	0.054	0.0648	0.0546	ND	0.2744	0.1045	0.131
1060	2.114	1.8611	2.0583	1.006	0.0925	0.0498	ND	3.0043	2.5961	1.957
1061	0.0754	0.0712	0.0716	0.058	0.0682	0.0505	ND	0.2135	0.1304	0.114
1062	0.4145	0.1479	0.1602	0.133	0.1876	0.0542	ND	0.5636	0.1938	0.281
1063	0.085	0.0982	0.0661	0.069	0.0828	0.0496	ND	0.343	0.0841	0.170
1064	0.0541	0.0569	0.0632	0.052	0.1114	0.0567	ND	0.105	0.0799	0.071
1065	0.0562	0.214	0.0571	0.06	0.0848	0.0641	ND	0.1566	0.0759	0.144
1066	0.0676	0.0694	0.0521	0.061	0.1022	0.0507	ND	0.09	0.0813	0.073
1067	0.0492	0.0514	0.0566	0.049	0.0677	0.0552	ND	0.1413	0.0937	0.080
1068	2.8614	2.9114	2.9171	2.57	0.2665	0.082	ND	3.0391	2.9598	2.839
1069	0.07	0.0696	0.0656	0.054	0.0758	0.0499	ND	0.2169	0.1646	0.113
1070	0.0523	0.0527	0.0546	0.05	0.079	0.0473	ND	0.1313	0.1131	0.078
1071	0.0448	0.0484	0.0913	0.046	0.0703	0.049	ND	0.1503	0.0733	0.082

도면72b

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Circular permutation of site 0 with trimer (39)										
1072	0.3581	0.4078	0.7423	0.481	1.1851	1.6631	ND	0.3298	0.0868	0.406
1073	1.9818	1.8505	2.1982	1.327	2.7424	1.9532	1.2363	1.1248	0.0861	1.434
1074	0.1814	0.2503	0.3292	0.114	0.2837	0.1077	ND	0.2319	0.0806	0.199
1075	2.6516	2.6792	2.9403	2.791	3.2015	2.8639	1.2468	0.4305	0.0997	1.967
1076	1.902	1.3076	2.0732	1.305	2.4359	1.4035	1.0783	0.1298	0.0862	0.914
1077	1.472	0.825	1.9265	1.15	1.732	0.5228	ND	0.2167	0.0854	0.731
1078	0.8158	0.2163	0.8631	0.306	1.9185	1.2613	ND	0.099	0.0767	0.207
1079	1.7333	1.5428	2.3436	1.409	2.2722	1.6603	2.7799	1.4647	0.107	1.472
1080	0.4502	0.2953	0.4333	0.187	0.3934	0.1679	ND	0.218	0.0819	0.233
1081	2.8737	2.478	2.903	2.634	3.1623	2.9098	1.0618	0.3779	0.1206	1.839
1082	0.3473	0.3027	0.5607	0.371	0.8177	0.4034	ND	0.0757	0.0815	0.250
1083	0.4663	0.2718	0.8992	0.42	0.9627	0.2882	ND	0.0854	0.079	0.259
1084	0.3509	0.363	0.2706	0.519	0.4042	0.0582	ND	1.3032	0.0717	0.728
1085	0.1433	0.1191	0.2362	0.365	0.3129	0.0557	ND	0.9482	0.1128	0.477
1086	0.3671	0.2472	0.5002	0.551	0.4468	0.0653	ND	1.64	0.0853	0.813
1087	0.0741	0.0731	0.0846	0.11	0.1371	0.0512	ND	0.263	0.1618	0.149
1088	2.4789	1.9043	2.1211	2.153	2.5609	0.2414	ND	2.8283	0.0775	2.295
1099	1.6689	0.8883	1.2592	1.073	1.3876	0.1011	ND	1.5505	0.078	1.171
1100	1.1362	0.5942	0.7754	0.682	0.9898	0.0765	ND	2.0515	0.0844	1.109
1101	2.0625	1.5285	1.6158	1.016	2.2267	0.1205	ND	2.8305	0.0928	2.092
1102	3.0514	2.9073	2.8972	3.923	2.3869	0.0829	ND	3.1173	0.0746	2.649
1103	2.8736	2.9112	2.7143	1.609	0.1093	0.0562	ND	3.0905	0.0686	2.537
1104	2.9502	3.0009	2.6871	2.894	1.6518	0.0737	ND	3.0888	0.0638	2.981
1105	2.1426	1.7548	2.2434	0.969	0.0737	0.0519	ND	2.6865	0.1038	1.804
1106	3.0297	3.0961	3.0603	2.995	1.4528	0.0601	ND	3.1595	0.0849	3.080
1107	3.0488	3.0707	3.0183	2.941	0.5496	0.0541	ND	2.7789	0.1179	2.930
1108	0.0592	0.057	0.0537	0.057	0.0462	0.1491	ND	0.6247	0.1318	0.246
1109	0.0814	0.0709	0.0718	0.071	0.1027	0.5605	ND	0.464	0.1334	0.202
1110	0.0477	0.0615	0.0575	0.062	0.1888	0.1249	ND	0.5142	0.1537	0.212
1111	0.051	0.0559	0.0564	0.056	0.0935	0.2652	ND	0.6155	0.1604	0.242
1112	0.0533	0.0513	0.0547	0.051	0.0655	0.1411	ND	0.5763	0.1488	0.226
1113	0.0713	0.0623	0.0659	0.062	0.1656	0.2525	ND	0.5906	0.1695	0.238
1114	0.0546	0.0528	0.1484	0.053	0.0823	0.7941	ND	0.7087	0.1844	0.271
1115	0.1118	0.0548	0.1034	0.055	0.0533	1.0703	ND	1.9905	0.1999	0.700
1116	3.1518	2.908	2.7587	2.908	0.5106	0.0828	ND	2.8276	3.2044	2.881
1117	0.0632	0.0606	0.0677	0.061	0.0582	0.2678	ND	0.523	0.1354	0.215
1118	0.0821	0.1203	0.11	0.12	0.0819	0.091	ND	0.4687	0.109	0.236
1119	0.0581	0.0587	0.0563	0.059	0.0614	0.0524	ND	0.2851	0.1118	0.134
1120	0.0555	0.0518	0.0592	0.052	0.0595	0.0498	ND	0.2154	0.1156	0.106
Site 0 minimal epitope on a scaffold (6)										
1121	0.0588	0.0565	0.0558	0.057	0.1035	0.0593	ND	0.2015	0.0825	0.105
1122	0.0567	0.0579	0.0597	0.058	0.0997	0.0629	ND	0.1782	0.1011	0.098
1123	0.0535	0.0527	0.1198	0.053	0.1266	0.0767	ND	0.1795	0.1359	0.095
1124	0.0547	0.1717	0.6951	0.172	0.0968	0.054	ND	1.0895	1.644	0.478
1125	0.0498	0.0523	0.0699	0.048	0.0803	0.0618	ND	0.623	0.1274	0.241
1126	0.0467	0.0511	0.0507	0.055	0.0846	0.0602	ND	0.1205	0.1162	0.075
Domain III (42)										
1127	2.1467	2.1859	ND	1.798	ND	ND	ND	ND	ND	ND

도면72c

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1128	1.8913	1.3526	ND	0.182	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1129	0.1181	0.1009	ND	0.067	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1130	2.2316	1.9026	ND	0.568	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1131	1.4158	0.9357	ND	0.208	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1132	0.1072	0.1636	ND	0.075	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1133	2.6967	2.8256	ND	2.963	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1134	1.6943	1.3663	ND	0.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1135	0.2983	0.2993	ND	0.11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1136	2.9005	2.8267	ND	2.192	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1137	0.9978	1.1904	ND	0.28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1138	0.5312	0.7704	ND	0.305	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1139	2.0259	2.061	2.0601	1.869	0.1128	0.0592	ND	2.1613	2.0734	2.031
1140	0.1182	0.2949	0.1563	0.094	0.0826	0.0517	ND	1.2182	1.5279	0.536
1141	2.6559	2.541	2.333	2.562	0.2226	0.0622	ND	3.1111	2.6692	2.738
1142	2.6619	2.8995	2.6202	2.636	0.2683	0.0536	ND	3.0737	2.7379	2.869
1143	2.7804	2.8597	2.5537	2.192	0.8527	0.224	ND	3.1262	2.4711	2.726
1144	2.8499	3.0864	3.0743	2.745	0.3977	0.1391	ND	3.11	3.0637	2.981
1145	2.7881	2.6366	2.7459	2.572	1.7732	0.0521	ND	3.1076	3.0516	2.772
1146	3.1125	3.1088	2.954	1.907	1.0453	0.1286	ND	3.2298	3.0826	2.775
1147	2.9579	3.2076	2.9367	2.183	2.0782	1.13	2.1693	3.2534	2.9833	2.881
1148	2.8403	2.8971	2.8098	2.579	0.7371	0.3829	ND	1.4542	2.8212	2.319
1149	2.7887	2.9015	2.6135	2.551	0.5153	0.2845	ND	3.1136	2.7058	2.855
1150	2.7865	2.8564	2.5003	1.659	0.4836	0.075	ND	3.0944	2.6091	2.604
1151	2.8132	3.0253	3.0237	2.782	0.9838	0.0662	ND	3.1032	3.09	2.976
1152	2.7824	2.5105	2.7218	2.334	1.4915	0.0614	ND	3.0998	3.0544	2.648
1153	3.1439	3.1697	3.0513	2.713	0.8313	0.2322	ND	3.1979	3.1925	3.027
1154	3.0847	3.1601	3.0265	2.585	1.2956	0.224	ND	2.48	3.1664	2.762
1155	2.6643	3.0609	3.0251	2.738	1.5185	0.2005	ND	3.1526	3.0995	2.984
1156	3.0902	3.1989	3.0963	3.081	2.0275	0.7406	ND	3.2932	3.1654	3.171
1157	3.04	3.2543	3.1566	2.806	1.0701	0.1974	ND	3.2477	3.0829	3.103
1158	1.81	1.0186	0.9501	0.208	0.3739	0.0864	ND	2.804	1.671	1.344
1159	2.626	2.8175	2.61	2.662	1.6898	0.1447	ND	3.421	2.9622	3.003
1160	2.0769	2.899	2.1299	0.076	1.5914	0.1097	ND	2.6298	3.054	1.949
1161	2.8665	3.2047	3.1615	3.205	2.8295	0.8036	ND	2.6699	3.2611	3.100
1162	2.7123	3.1619	2.9949	3.162	2.6819	0.1987	ND	2.8523	3.2335	3.059
1163	2.323	3.1019	2.6147	3.102	1.3027	0.2541	ND	2.8146	3.2003	3.006
1164	0.5076	2.8125	2.1352	2.613	1.778	0.1256	ND	2.6194	3.0376	2.815
1165	2.5424	1.285	2.0791	1.285	0.0445	0.0903	ND	2.6442	3.057	1.805
1166	2.4763	3.0629	3.023	3.063	0.1207	0.0893	ND	2.9292	3.1297	3.018
1167	2.3672	1.7565	2.6717	1.759	0.0664	0.0703	ND	2.6358	3.209	2.114
1168	2.5499	2.9419	3.0947	2.942	0.1674	0.0705	ND	2.8555	3.1965	2.913
Domain III with trimer (22)										
1169	2.9067	3.1665	3.0545	3.03	1.0033	0.1147	ND	2.9382	2.8127	2.965
1170	2.8871	3.1103	2.9567	2.985	1.3358	0.4711	ND	3.1746	2.8526	3.058
1171	2.9036	3.0151	2.7308	2.766	2.2186	1.3086	2.2226	3.1102	2.9257	2.964
1172	2.8697	3.0289	2.7027	2.946	0.7138	0.1834	ND	3.1221	2.6216	3.034
1173	2.9601	3.0572	3.0328	2.947	1.2007	0.1174	ND	3.0641	3.0356	3.023
1174	2.9753	3.1399	3.0062	2.911	0.4101	0.0565	ND	0.8609	3.0055	2.301
1175	2.8914	3.0532	2.8612	2.755	0.3803	0.0639	ND	1.2822	2.9703	2.263
1176	2.8284	3.0866	2.7402	2.878	0.4938	0.1352	ND	3.1426	2.9844	2.769

도면72d

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1177	2.9084	2.9269	2.696	2.992	0.2782	0.0624	ND	3.1119	2.9926	2.883
1178	2.9339	3.0762	2.7639	2.965	1.7852	0.0711	ND	3.1215	3.2297	3.048
1179	2.8755	0.0982	3.1576	0.098	0.0688	0.0638	ND	2.9749	3.2621	1.057
1180	2.8439	2.7472	3.1025	2.747	0.1038	0.0698	ND	3.0339	3.2278	2.843
1181	2.6167	1.392	2.9138	1.392	0.2403	0.1386	ND	2.7881	3.2213	1.857
1182	2.5762	1.3382	2.8281	1.338	0.2278	0.1296	ND	2.7143	3.2032	1.797
1183	2.8026	2.1708	2.5487	2.171	0.0668	0.0524	ND	2.7349	3.0949	2.359
1184	0.0549	0.0533	0.0805	0.053	0.0519	0.0585	ND	0.7682	0.3922	0.292
1185	2.1649	3.0455	2.8212	3.049	0.1002	0.0551	ND	2.7643	3.1423	2.954
1186	2.4898	1.4644	3.0314	1.464	0.2314	0.1102	ND	2.7745	3.2544	1.888
1187	2.6496	1.568	3.0259	1.568	0.2269	0.1206	ND	2.7462	3.2885	1.975
1188	2.7761	3.2268	3.006	3.227	0.1278	0.0592	ND	2.788	3.2753	3.081
1189	2.4998	2.7034	2.7576	2.703	0.1162	0.0614	ND	2.7434	3.2517	2.717
1190	0.4011	0.1884	0.7964	0.188	0.0616	0.0521	ND	2.375	2.4944	0.917
Tandem domain III (18)										
1191	1.8368	0.8202	2.2607	0.82	0.0574	0.0618	ND	2.8501	3.1526	1.497
1192	2.5446	3.1211	2.7713	3.121	0.0691	0.0734	ND	2.8646	3.2782	3.036
1193	2.6237	2.5042	2.662	2.505	0.0583	0.0726	ND	2.9049	3.2067	2.638
1194	2.748	3.1383	2.5969	3.138	0.1009	0.066	ND	2.9005	3.1854	3.059
1195	1.5986	1.0687	1.9038	1.069	0.0794	0.0514	ND	2.6989	3.0144	1.612
1196	2.7203	3.0435	2.7253	3.044	0.0762	0.0593	ND	2.7855	3.174	2.958
1197	2.5364	2.7383	2.451	2.738	0.0576	0.0473	ND	2.7646	3.1412	2.747
1198	2.291	3.0722	2.4519	3.072	0.1422	0.0503	ND	2.7156	3.1633	2.954
1199	0.0522	0.0518	0.0592	0.052	0.053	0.0455	ND	0.4433	0.1375	0.182
1200	2.5794	0.5879	2.4456	0.588	0.2308	0.0942	ND	2.6989	3.1526	1.292
1201	0.0699	0.0527	0.0626	0.053	0.0475	0.0547	ND	0.2363	0.1469	0.114
1202	0.5592	0.1981	1.4615	0.198	0.0562	0.051	ND	2.5259	2.8032	0.974
1203	0.0815	0.0506	0.0973	0.051	0.04	0.0528	ND	0.301	0.2133	0.134
1204	0.1143	0.7387	0.3154	0.739	0.3958	0.0577	ND	2.1174	1.2797	1.198
1205	0.0526	0.049	0.1158	0.049	0.0524	0.0464	ND	0.1603	0.1179	0.086
1206	0.0978	0.6093	0.1909	0.609	0.2338	0.0493	ND	1.5509	0.9296	0.923
1207	0.0591	0.052	0.0893	0.052	0.0559	0.0465	ND	0.3483	0.1432	0.151
1208	0.1188	0.5431	0.2391	0.543	0.4102	0.0467	ND	1.9059	1.5241	0.997
Tandem domain III with a trimer (10)										
1209	0.6093	0.0806	0.8155	0.081	0.0438	0.0938	ND	2.7016	2.5006	0.954
1210	1.3484	2.4624	2.2393	2.462	0.0624	0.0769	ND	2.9038	3.0104	2.618
1211	1.2145	0.7313	2.302	0.731	0.0648	0.0658	ND	2.9505	3.0609	1.471
1212	2.494	3.0396	2.9877	3.04	0.0758	0.065	ND	2.9579	3.1809	3.012
1213	2.3155	0.8101	2.5949	0.81	0.0712	0.0731	ND	2.9564	3.2252	1.526
1214	2.6101	1.4694	2.7332	0.056	0.0612	0.049	ND	2.7111	3.1491	1.412
1215	0.2802	0.0612	0.346	0.061	0.0687	0.046	ND	2.414	2.3453	0.845
1216	0.4552	0.1039	0.9587	0.104	0.0634	0.0464	ND	2.503	2.7455	0.904
1217	0.264	0.065	1.9952	0.065	0.0577	0.0622	ND	2.2431	2.1756	0.791
1218	0.4957	0.1884	0.8309	0.188	0.0491	0.0521	ND	2.4509	2.6429	0.956

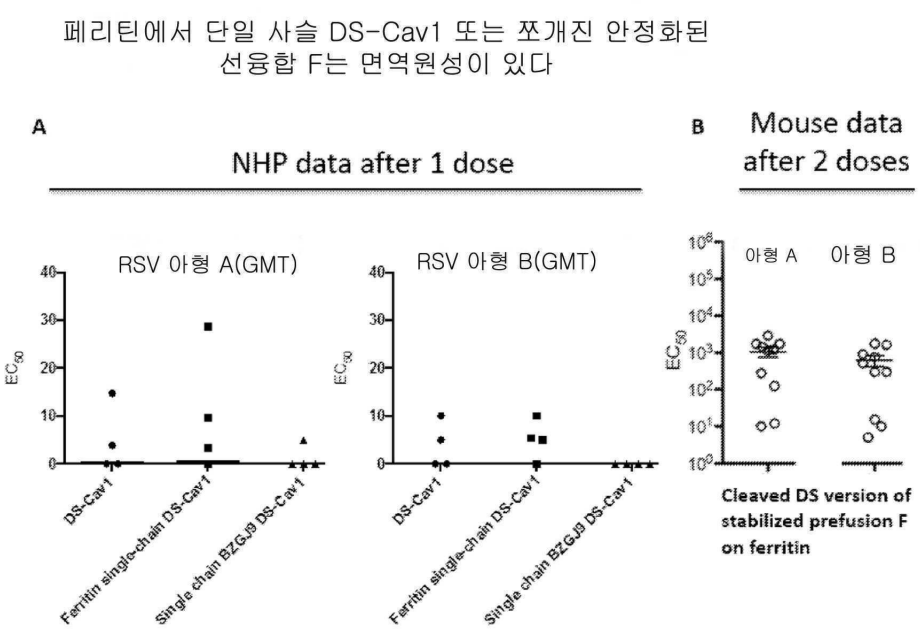
도면72e

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
	1.7749	2.4642	1.331	0.0628	0.0546	0.0611	ND	2.7959	2.6353	1.754
	1.928	0.1536	0.185	0.051	0.0596	0.0907	ND	0.915	ND	0.373
Domain III on ferritin (45)										
1219	2.6389	2.8119	2.726	2.8119	0.065	0.0473	ND	2.7713	3.2062	2.5984
1220	2.7353	3.2496	2.909	3.2496	0.3082	0.0755	ND	2.8063	3.2815	3.1018
1221	2.6214	2.8132	2.767	2.8132	0.1323	0.0531	ND	2.7568	3.2087	2.7944
1222	2.6679	2.8848	2.541	2.8848	0.2636	0.0577	ND	2.7639	3.1706	2.8445
1223	0.0612	0.0736	0.061	0.0736	0.0735	0.0813	ND	0.7882	0.1386	0.3118
1224	0.0565	0.0708	0.052	0.0708	0.0824	0.1425	ND	0.6484	0.1213	0.2633
1225	0.0694	0.0861	0.064	0.0861	0.0815	0.0829	ND	0.7931	0.1601	0.3218
1226	0.0584	0.0614	0.061	0.0614	0.0698	0.108	ND	0.8759	0.1194	0.3329
1227	0.055	0.0566	0.057	0.0566	0.0655	0.0654	ND	0.6022	0.1469	0.2385
1228	0.0546	0.0591	0.052	0.0591	0.062	0.1387	ND	0.3552	0.1366	0.1578
1229	0.1014	0.1232	0.144	0.1232	0.0653	0.0543	ND	1.557	0.5376	0.6011
1230	0.1051	0.1351	0.105	0.1351	0.059	0.0605	ND	1.1219	0.2913	0.4640
1231	0.0566	0.057	0.058	0.057	0.0745	0.1529	ND	0.6168	0.1501	0.2436
1232	0.056	0.061	0.066	0.061	0.076	0.1061	ND	0.5295	0.1523	0.2172
1233	0.0722	0.0668	0.063	0.0668	0.0734	0.0919	ND	0.8361	0.2903	0.3232
1234	0.0856	0.0682	0.086	0.0682	0.0703	0.0575	ND	1.164	0.3927	0.4335
1235	0.0565	0.0688	0.058	0.0688	0.0713	0.0547	ND	0.648	0.2045	0.2619
1236	0.0905	0.0981	0.1	0.0981	0.0712	0.1001	ND	1.4816	0.4691	0.5593
1237	0.1075	0.1501	0.14	0.1501	0.0741	0.0547	ND	1.5077	0.5662	0.6026
1238	0.1118	0.1694	0.13	0.1694	0.0762	0.0534	ND	1.5024	0.5431	0.6137
1239	0.0961	0.0877	0.115	0.0877	0.0755	0.051	ND	1.4138	0.5617	0.5297
1240	0.074	0.0465	0.048	0.0465	0.0672	0.0468	ND	0.7411	0.2309	0.2780
1241	0.0637	0.0613	0.054	0.0613	0.0706	0.0534	ND	0.5896	0.2442	0.2374
1242	0.0801	0.0551	0.066	0.0551	0.0687	0.0501	ND	1.185	0.3432	0.4317
1243	0.0489	0.0743	0.052	0.0743	0.0702	0.0585	ND	0.4026	0.1753	0.1837
1244	0.0658	0.0898	0.088	0.0898	0.0849	0.0886	ND	1.1825	0.3517	0.4540
1245	0.0437	0.0525	0.05	0.0525	0.0899	0.0621	ND	0.354	0.198	0.1530
1246	0.0915	0.1202	0.121	0.1202	0.0835	0.0683	ND	1.4024	0.5728	0.5476
1247	0.0519	0.054	0.053	0.054	0.0869	0.056	ND	0.3511	0.2163	0.1530
1248	0.0538	0.0529	0.05	0.0529	0.085	0.0533	ND	0.6254	0.2197	0.2437
1249	0.054	0.0604	0.071	0.0604	0.0727	0.0638	ND	0.2686	0.1958	0.1298
1250	0.0498	0.052	0.05	0.052	0.0783	0.061	ND	0.4175	0.2043	0.1738
1251	0.7164	0.0893	1.281	0.0893	0.1008	0.0816	ND	2.6239	2.2949	0.9395
1252	0.4948	0.0911	1.178	0.0911	0.328	0.1121	ND	2.6141	2.3564	0.9321
1253	2.9674	2.0803	2.457	2.0803	0.0885	0.1008	ND	2.9133	3.1799	2.1580
1254	2.538	2.2194	3.09	2.2194	0.0897	0.0923	ND	2.835	3.1713	2.4379
1255	2.8665	2.7791	3.148	2.7791	0.0871	0.0778	ND	2.9032	3.227	2.8205
1256	2.8432	1.2219	3.19	1.2219	0.0949	0.0832	ND	2.8499	3.2365	1.7646
1257	3.0299	0.5965	3.112	0.5965	0.1684	0.1345	ND	2.8652	3.2205	1.3527
1258	3.1963	0.7303	3.162	0.7303	0.0687	0.0793	ND	2.8689	3.2227	1.4432
1259	3.0929	0.9592	2.962	0.9592	0.0654	0.0825	ND	2.8042	3.2544	1.5742
1260	0.0859	0.0482	0.068	0.0482	0.0762	0.1101	ND	1.5692	0.4392	0.5552
1261	0.0694	0.0545	0.075	0.0545	0.0549	0.0839	ND	1.4616	0.4449	0.6575
1262	2.5715	3.0539	2.394	3.0539	0.6392	0.084	ND	2.6932	3.1093	3.0001
1263	2.9839	3.0974	3.084	3.0974	0.845	0.1029	ND	2.9696	3.2732	3.0548

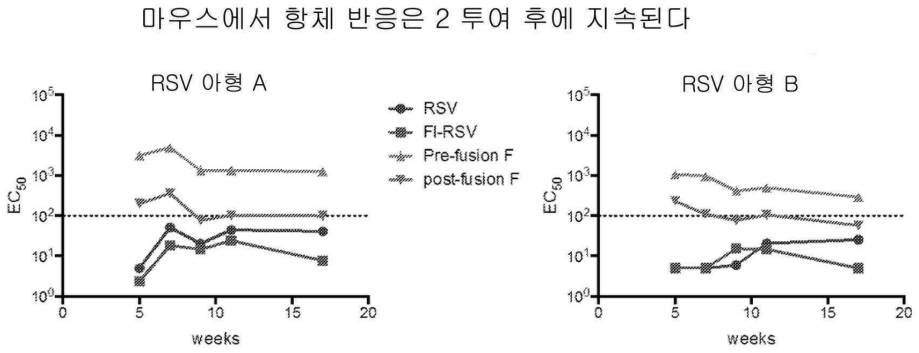
도면72f

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Minimal epitope with trimer on ferritin (1)										
1264	0.0742	0.0546	0.069	0.0546	0.0842	0.2906	ND	0.5426	0.161	0.2173
Domain III with trimer on ferritin (4)										
1265	0.5925	0.1983	0.864	0.1983	0.047	0.0535	ND	2.436	2.5114	0.9442
1266	1.6402	2.5261	2.263	2.5253	0.097	0.0591	ND	2.671	3.0447	2.8739
1267	0.8118	0.6634	1.349	0.6634	0.0617	0.0524	ND	2.4671	2.7241	1.2646
1268	0.9489	1.784	1.533	1.784	0.0972	0.0509	ND	2.5067	2.8226	2.0249
Minimal epitope on LS (2)										
1269	0.0636	0.0609	0.087	0.0609	0.0805	0.1106	ND	0.5099	0.1762	0.2106
1270	0.0575	0.0568	0.078	0.0568	0.2386	0.1018	ND	0.7801	0.1876	0.2979
1271	0.0578	0.1292	0.051	0.1292	0.0464	0.0994	ND	0.916	0.1568	0.3915
1272	0.0673	0.0555	0.06	0.0555	0.051	0.1013	ND	0.6001	0.1717	0.2370
1273	0.0645	0.0667	0.063	0.0667	0.0972	0.1059	ND	0.3102	0.152	0.1479
1274	0.0583	0.0493	0.057	0.0493	0.0716	0.1201	ND	0.4213	0.1671	0.1733
1275	1.4152	1.3084	1.816	1.3084	0.0853	0.0692	ND	2.5677	2.8052	1.7282
1276	1.0125	2.8056	2.334	2.8056	0.2304	0.1167	ND	2.6154	3.222	2.8059
1277	0.0467	0.0755	0.05	0.0755	0.0683	0.0682	ND	0.9456	0.1632	0.3655
1278	0.0511	0.0563	0.052	0.0563	0.0586	0.0705	ND	0.6354	0.1483	0.2493
Minimal epitope on ferritin (10)										
1279	0.4585	0.3412	0.516	0.3412	0.0572	0.0542	ND	2.6056	1.4897	0.8960
1280	0.0868	0.0545	0.074	0.0545	0.0569	0.0485	ND	0.5017	0.1722	0.2036
Domain III on LS (2)										
1281	3.005	3.0075	3.039	2.2394	1.0938	0.2008	ND	2.8081	3.2029	2.7150
1282	2.6491	2.162	2.756	2.7791	0.1031	0.0552	ND	2.7139	3.101	2.9537
Domain III on hcp1 (4)										
1283	2.6693	1.3892	2.374	1.2219	0.3614	0.1108	ND	2.7009	3.2143	1.7973
1284	1.9742	1.3049	1.746	0.5965	0.124	0.0564	ND	2.7153	3.2268	1.5389
1285	2.0274	0.5993	2.258	0.7303	0.212	0.0755	ND	2.7217	3.2638	1.3504
1286	2.1559	0.6031	1.512	0.9592	0.0736	0.0595	ND	2.7465	3.2466	1.4363

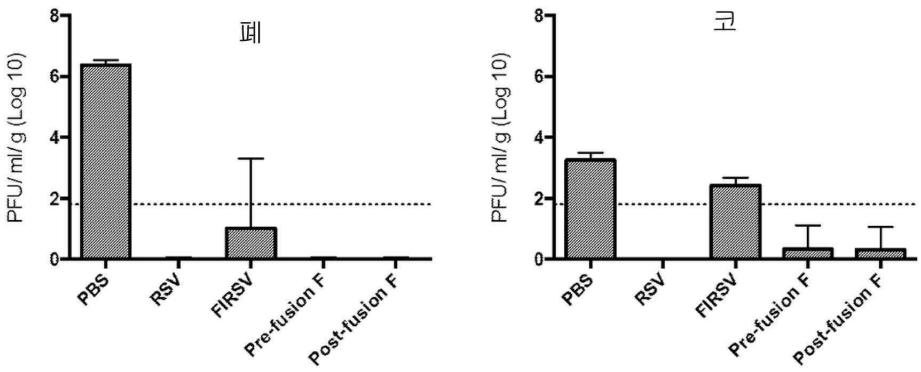
도면73



도면74

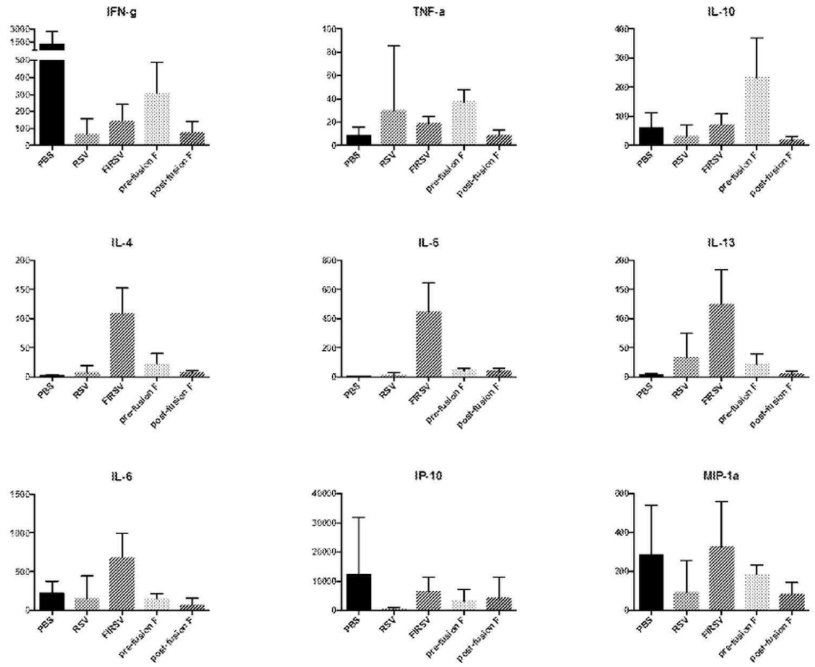

마우스에서 항체 반응은 2 투여 후에 지속된다
RSV 아형 A
RSV 아형 B
RSV
FI-RSV
Pre-fusion F
post-fusion F
EC50
weeks

도면75


마우스에서 DS 접종은 RSV 감염을 방지할 수 있다
폐
코
PFU/ml/g (Log 10)
PBS
RSV
FIRSV
Pre-fusion F
Post-fusion F

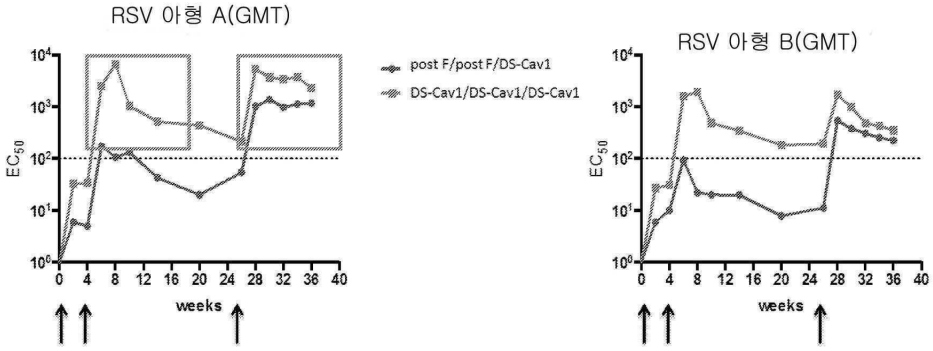
도면76

마우스 후 접종에서 DS 접종은 타입 2 사이토카인 반응을 유도하지 않는다

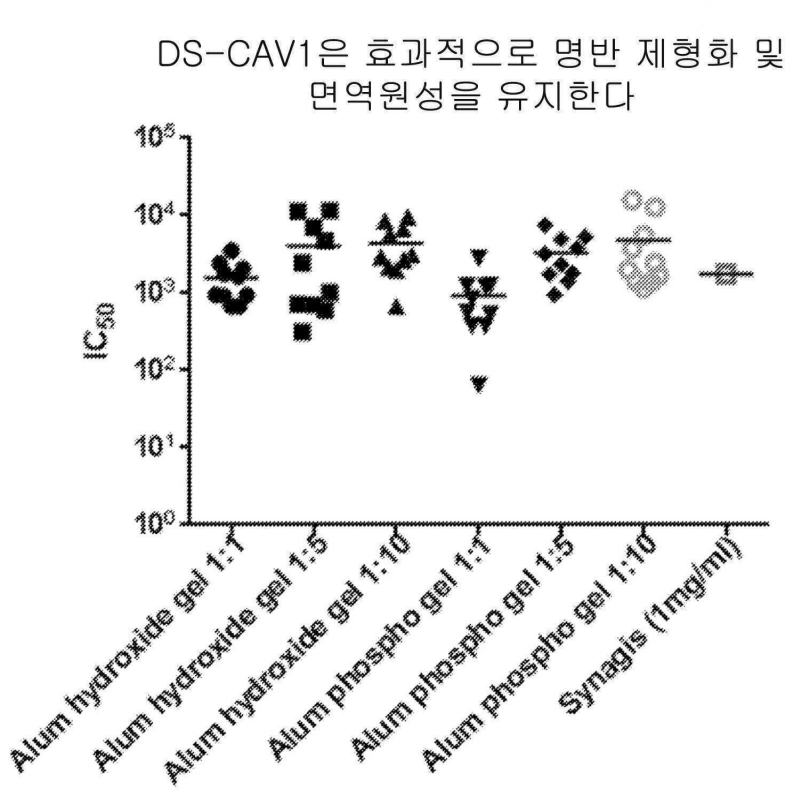


도면77

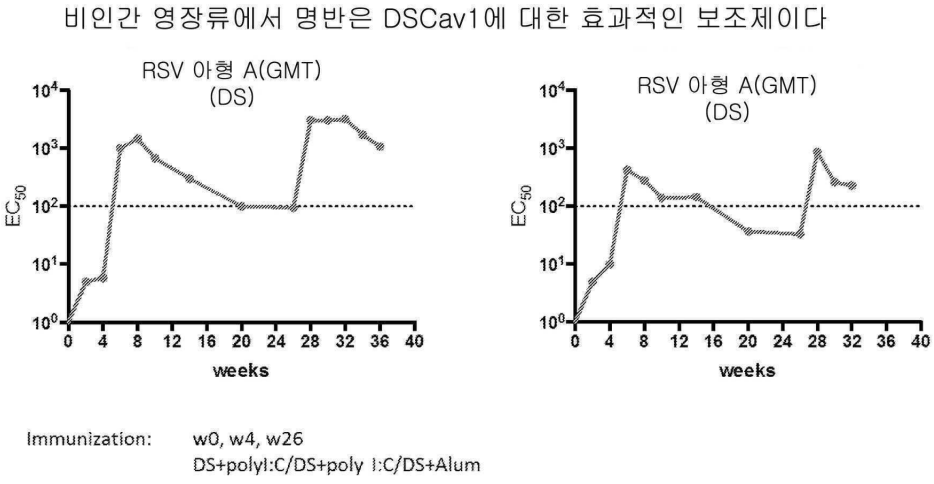
비인간 영장류에서 3번의 복용 후 중화 활성이
신장되고 유지된다



도면78

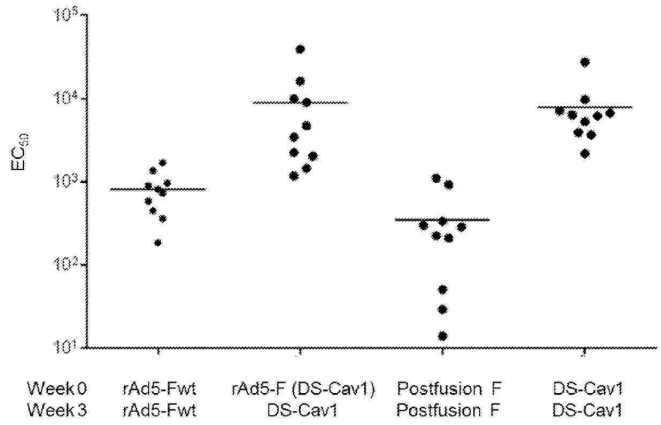

DS-CAV1은 효과적으로 명반 제형화 및
면역원성을 유지한다
IC50
Alum hydroxide gel 1:1
Alum hydroxide gel 1:5
Alum hydroxide gel 1:10
Alum phospho gel 1:1
Alum phospho gel 1:5
Alum phospho gel 1:10
Synagis (1mg/ml)

도면79


비인간 영장류에서 명반은 DSCav1에 대한 효과적인 보조제이다
RSV 아형 A(GMT)
(DS)
EC50
weeks
RSV 아형 A(GMT)
(DS)
EC50
weeks
Immunization: w0, w4, w26
DS+polyI:C/DS+poly I:C/DS+Alum

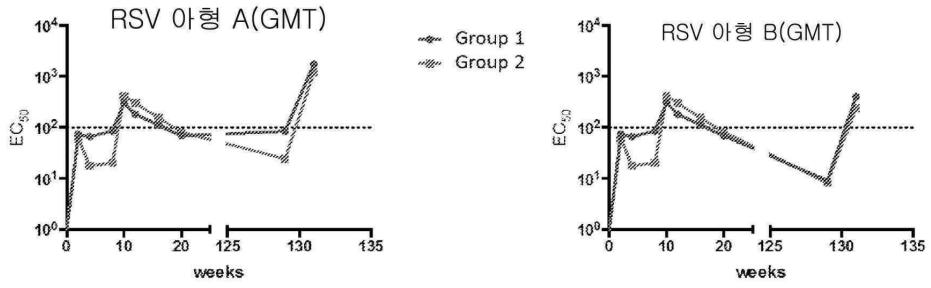
도면80

단백질 부스트 프라이밍으로써 또는 하나의 유전자 기반 벡터로부터 발현될 때 DS-CAV1은 면역원성이 있다



도면81

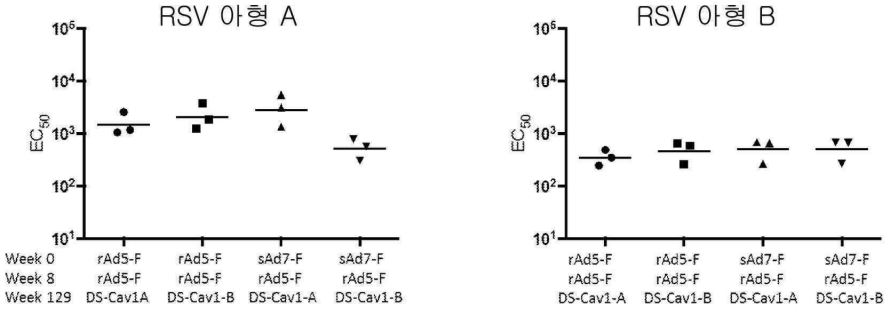
DS-Cav1 RSV F 아형 A 또는 B는 비인간 영장류에서 야생형 F 단백질의 유전자 기반의 전달을 이용한 프라임 접종을 높일 수 있다



Group	N	Week 0	Week 8	Week 129
1	6	rAd5-F	rAd5-F	DS-Cav1-A in alum
				DS-Cav1-B in alum
2	6	sAd7-F	rAd5-F	DS-Cav1-A in alum
				DS-Cav1-B in alum

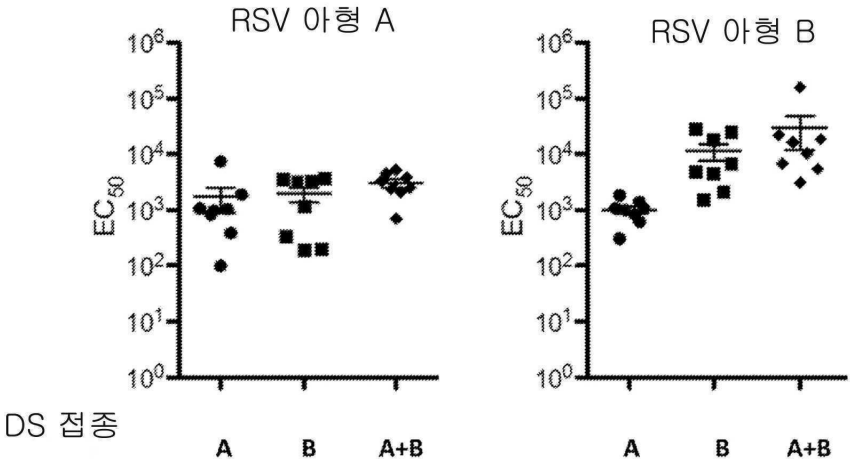
도면82

DS-Cav1 RSV F 아형 A 또는 B는 비인간 영장류에서 야생형 F 단백질의 유전자 기반의 전달을 이용한 프라임 접종을 높일 수 있다



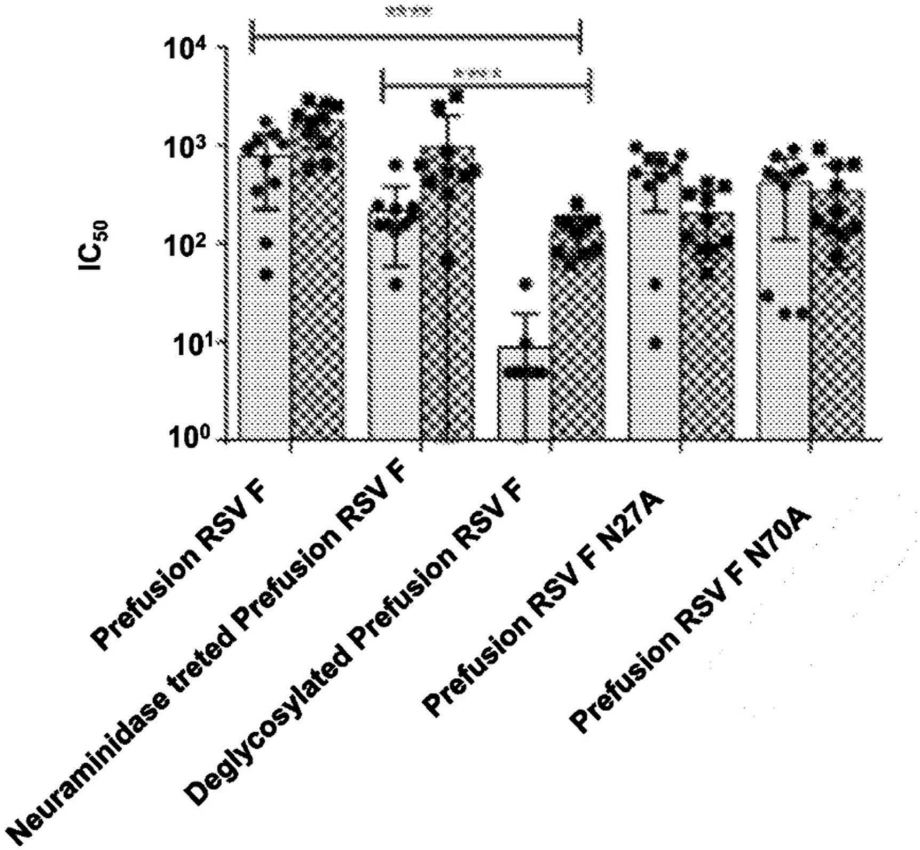
도면83

안정화된 선융합 F 아형 A 또는 B 또는 둘다의 DS 버전의 접종이
RSV의 모든 아형에 대한 중화 활성을 유도한다



도면84

변경된 글리코실화는 안정화된
선융합 F의 면역원성을 저감시킨다



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.