

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7560938号**  
**(P7560938)**

(45)発行日 令和6年10月3日(2024.10.3)

(24)登録日 令和6年9月25日(2024.9.25)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	39/145 (2006.01)	F I	A 6 1 K	39/145
A 6 1 P	31/16 (2006.01)		A 6 1 P	31/16
C 0 7 K	14/11 (2006.01)		C 0 7 K	14/11
C 1 2 N	5/10 (2006.01)		C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	7/01 (2006.01)		C 1 2 N	7/01

請求項の数 15 (全65頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2018-540112(P2018-540112)
(86)(22)出願日	平成29年2月2日(2017.2.2)
(65)公表番号	特表2019-506168(P2019-506168)
	A)
(43)公表日	平成31年3月7日(2019.3.7)
(86)国際出願番号	PCT/US2017/016251
(87)国際公開番号	WO2017/136575
(87)国際公開日	平成29年8月10日(2017.8.10)
審査請求日	令和2年2月3日(2020.2.3)
審判番号	不服2022-17772(P2022-17772/J 1)
審判請求日	令和4年11月7日(2022.11.7)
(31)優先権主張番号	62/290,894
(32)優先日	平成28年2月3日(2016.2.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関	最終頁に続く

(73)特許権者	518268754 シージー ディスカバリー インコーポレ イテッド C G D I S C O V E R Y , I N C . アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォル ニア州, サンディエゴ, スイート 3 0 8 - 2 2 9 , カーメル マウンテン 口 ード 4 6 5 3
(74)代理人	110002572 弁理士法人平木国際特許事務所
(72)発明者	ルオ, チュン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 3 2 0 サンディエゴ フェアポート ウ エイ 4 8 3 8 シージー ディスカバリー インコーポレイテッド内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 異種エピトープ及び / 又は改変された成熟切断部位を有するインフルエンザヘマグルチニンの組成物

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

修飾インフルエンザウイルスを含むワクチンであって、前記ウイルスは、インフルエンザヘマグルチニン(HA)タンパク質を含み、該HAタンパク質の成熟切断部位(MCS)が、タバコエッチウイルス(TEV)プロテアーゼにより切斷されるように、ただし、いかなる動物のプロテアーゼによつても切斷されないように修飾されており、且つ、切斷されたときに、HA2のN末端におけるグリシンが保持され、HAタンパク質のステムエピトープが、前記HAタンパク質の球状頭部ドメインにおける1つ又は複数の免疫優性領域に挿入されているか、又は前記領域を置換しており、ここで、該ステムエピトープは、前記球状頭部ドメインと同じインフルエンザウイルス株におけるHAタンパク質のステムドメインに由来するものである、前記ワクチン。

**【請求項 2】**

前記MCSの全体が前記TEVプロテアーゼ切斷部位によって置換されているか、又は前記MCSの幾つかの残基が前記TEVプロテアーゼ切斷部位によって置換されているか、又は切斷部位のN末端アルギニンのみが前記TEVプロテアーゼ切斷部位によって置換されている、請求項1記載の修飾インフルエンザウイルスを含むワクチン。

**【請求項 3】**

前記修飾MCSが切斷されている、請求項1又は2記載の修飾インフルエンザウイルスを含むワクチン。

**【請求項 4】**

前記ステムエピトープは、インフルエンザウイルスに対する広域中和抗体(bnAb)によって認識される、請求項1～3のいずれか1項記載の修飾インフルエンザウイルスを含むワクチン。

【請求項5】

インフルエンザに対する抗体を生成する方法において使用するための、請求項1～4のいずれか1項記載の修飾インフルエンザウイルスを含むワクチン。

【請求項6】

インフルエンザHAタンパク質の少なくとも有効部分をコードする核酸であって、そのMCSをコードするヌクレオチド配列が、いかなる動物のプロテアーゼによっては切断可能ではない、タバコエッチウイルス(TEV)プロテアーゼ切断部位をコードするように修飾されており、切断されたときに、HA2のN末端におけるグリシンが保持され、且つ、HAタンパク質のステムエピトープが、前記HAタンパク質の球状頭部ドメインにおける1つ又は複数の免疫優性領域に挿入されているか、又は前記領域を置換してあり、ここで、該ステムエピトープは、前記球状頭部ドメインと同じインフルエンザウイルス株におけるHAタンパク質のステムドメインに由来するものである、前記核酸。

10

【請求項7】

前記HAタンパク質のステムエピトープが前記HAタンパク質の前記球状頭部ドメインにおける免疫優性領域に挿入されているか、又は前記領域を置換している、請求項6記載の核酸。

20

【請求項8】

前記HAタンパク質の前記球状頭部ドメインの複数の免疫優性領域が前記同じインフルエンザウイルス株のHAタンパク質のステムエピトープを含むように修飾されている、請求項7記載の核酸。

【請求項9】

前記ステムエピトープは、インフルエンザウイルスに対する広域中和抗体(bnAb)によって認識される、請求項7又は8記載の核酸。

【請求項10】

修飾ウイルス又はウイルス様粒子(VLP)を生産する組換え宿主細胞であって、前記ウイルス又はVLPが、請求項6～9のいずれか1項記載の核酸によってコードされたHAタンパク質の少なくとも有効部分を含む、前記組換え宿主細胞。

30

【請求項11】

修飾HAタンパク質を含むウイルス又はVLPを調製する方法であって、前記核酸が発現する条件下で請求項10記載の組換え宿主細胞を培養することと、前記HAタンパク質の少なくとも有効部分を含む前記ウイルス又はVLPを回収することとを含む、前記方法。

【請求項12】

インフルエンザウイルスの修飾HAタンパク質であって、HAタンパク質のステムエピトープが、前記HAタンパク質の球状頭部ドメインにおける1つ又は複数の免疫優性領域に挿入されているか、又は前記領域を置換しており、ここで、前記ステムエピトープは、前記球状頭部ドメインと同じインフルエンザウイルス株におけるHAタンパク質のステムドメインに由来するものであり、且つ、前記ステムエピトープは、インフルエンザウイルスに対する広域中和抗体(bnAb)によって認識されるものである、前記HAタンパク質。

40

【請求項13】

前記修飾HAタンパク質が生ウイルス又は弱毒ウイルス中に、或いはウイルス様粒子(VLP)中に含有される、請求項12記載の修飾HAタンパク質。

【請求項14】

前記修飾HAタンパク質を対象に投与することを含む、対象において、インフルエンザに対する抗体を生成する方法において使用するための、請求項12記載の修飾HAタンパク質。

【請求項15】

前記生ウイルス若しくは弱毒ウイルス又はVLPを対象に投与することを含む、対象にお

50

いて、インフルエンザに対する抗体を生成する方法において使用するための、請求項 1\_3記載の修飾HAタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年2月3日出願の「Compositions of Influe  
nza Hemagglutinin with Heterologous Epito  
pes and/or Altered Maturation Cleavage Si  
tes and Methods of Use Thereof」と題された米国仮特許  
出願第62/290,894号の優先権を主張し、その内容はその全てが参考により組み  
込まれる。  
10

【0002】

配列表の参考による組み込み

本出願は、電子フォーマットでの配列表と共に出願される。配列表は、2017年1月  
30日に作成された173,061バイトのサイズの758252000140SeqL  
ist.TXTと題されるファイルとして提供される。配列表の電子フォーマット中の情  
報は、その全てが参考により組み込まれる。

【0003】

本発明は、免疫学及びウイルス学の分野のものである。より詳細には、改変された異種  
エピトープ及び／又は改変された成熟切断部位を有する組換えインフルエンザヘマグルチ  
ニン(HA)タンパク質の組成物に関する。  
20

(次の略語を適用する。 HA、ヘマグルチニン； NA、ノイラミニダーゼ； NAb、中和  
抗体； bNAb、広域中和抗体； TEV、タバコエッチウイルス； DNA、デオキシリボ  
核酸； cDNA、相補的DNA； RNA、リボ核酸； kb、キロベース； kDa、キロダ  
ルトン； CHO細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞； HEK293細胞、ヒト胎児腎  
臓293細胞； VLP、ウイルス様粒子； BEVS、バキュロウイルス発現ベクター系；  
AcNPV、Autographa californica核多角体病ウイルス； Bm  
NPV、Bombyx mori核多角体病ウイルス； TIPS、無力価感染細胞の保存  
及びスケールアップ(Titerless Infected-cells Preservation and Scale up)； BIC、バキュロウイルス感染昆虫細胞；  
PCR、ポリメラーゼ連鎖反応； FBS、ウシ胎仔血清； PDB、蛋白質構造データバン  
ク、ワールドワイドウェブ上の([rcsb.org/pdb/home/home.do](http://rcsb.org/pdb/home/home.do))； MOI、感染多重度； MCS、成熟切断部位； HPAI、高病原性トリインフルエン  
ザ； HI、HA阻害； WT、野生型； TIV、三価不活化インフルエンザワクチン； PB  
S、リン酸緩衝生理食塩水。 )  
30

【背景技術】

【0004】

インフルエンザは、「インフル(flu)」として一般に知られ、ヒト又は人畜共通の  
インフルエンザウイルスの感染によって引き起こされる感染性呼吸器疾患である。インフ  
ルエンザのアウトブレイクは、毎年、「インフルシーズン」として一般に知られる各年の  
寒い月に発生する。インフルエンザ感染のほとんどの症状は軽症であるが、これらの毎年の  
エピデミックは、世界中で300万～500万件の重度の病気と50万人までの死亡を  
引き起こす(ワールドワイドウェブ上の[who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/](http://who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/)の世界保健機関：Influenza(Seasonal))。各々の世紀において、インフルエンザウイルスが人口の大部分に感染し、  
世界中で顕著な罹患率と死亡率をもたらす、複数のインフルエンザパンデミックが存在す  
る。世界人口の3～5%を殺した1918年のスペインかぜパンデミックは、歴史上最も  
致命的なパンデミックである。  
40

【0005】

### ステムドメイン反応性抗体を誘発する現在の戦略

全てのインフルエンザウイルスに対する広域中和抗体（b N A b）の誘発は、インフルワクチン設計の究極の目的であった。単離したb N A bの大部分は、H Aステムドメインの保存されたエピトープを認識する。しかしながら、自然のインフルエンザウイルス感染又は現在のインフルワクチンに誘発される抗体は、H A球状頭部ドメインの受容体結合部位を取り囲む抗原部位を、それらの抗原部位の免疫優性のために、主に認識する。それらの抗体は、インフルエンザウイルス系統間でのそれらの抗原部位の高変異性の結果、概して系統特異的である。したがって、現在のインフルワクチンは、インフルウイルスに対する普遍的な免疫を誘導しない。

#### 【0006】

ヘマグルチニン（H A）は、内在性膜糖タンパク質である。それは、インフルエンザウイルスの脂質二重層エンベロープ中の最も豊富なタンパク質である。ビリオン表面上にH Aが約500分子あると推定される。H Aは、ウイルスの宿主細胞への吸着及び侵入に必要とされる唯一のタンパク質である。それは宿主細胞受容体に結合し、ビリオン脂質エンベロープと宿主細胞膜との融合を可能にする。その宿主細胞受容体に結合する能力を通じて、H Aがインフルエンザ系統の宿主範囲を決定する。

#### 【0007】

H Aは、H A0と呼ばれる单鎖前駆体として小胞体中で合成される（S t e v e n s , J ら、S c i e n c e ( 2 0 0 6 ) 3 1 2 : 4 0 4 ~ 4 1 0 ）。H A0前駆体は、そのN末端にシグナルペプチドを、そのC末端に膜アンカー配列を有する。N末端シグナルペプチドは、H Aが宿主細胞膜を横断して輸送され、宿主細胞膜に係留されるプロセスの最中に除去される。H Aは、小胞体中の同一のサブユニットの三量体に組み立てられ、次いで、ゴルジネットワークを介して細胞表面に移出される。H A0は、特異的な宿主のトリプシン様プロテアーゼによって成熟切断部位（M C S）のC末端で切断され、2つのジスルフィド結合で連結されるポリペプチド、H A1及びH A2からなる成熟型に変換される。H A1は、H A0のより大きなN末端部分であり、H A2は、より小さなC末端部分である。H A2は、短いC末端細胞内尾部を有する膜貫通領域を有し、H Aを膜に係留する。各々の成熟H Aは、約45kDaのH A1と、約25kDaのH A2を含む、全部で約70kDaの分子量を有する。多くのインフルエンザの系統由来のH Aの細胞外部分の原子構造が決定されている。成熟H Aの構造モデルを図1に示す。H A0又は成熟型のいずれかとしての全てのH Aは、幹上に球状頭部を有する同じ全体的な三量体構造を有する。各々のH A単量体は、単一の短い親水性細胞質尾部を有するC末端膜貫通領域によって膜に係留される。

#### 【0008】

球状頭部ドメインは、全てH A1から作製され、免疫優性エピトープを含有する。ステムドメインは、ほぼH A2から作製され、免疫学的に亜優性である保存された領域を含有する。球状頭部ドメインは、そのコアにおいて、表面ループとヘリックスを含む8ストランドのシート構造を有する。膜近位のステムドメインは、H A1とH A2の両方からの残基の三重コイルドコイル構造の左手スーパーへリックスからなる。各々のH A単量体は、約13kDaの分子量の全炭水化物又はH Aの全分子量の19%を有する複数のグリコシル化部位を有する。多くのグリコシル化は、膜表面近辺のステムドメイン中にある。H Aはまた、細胞質尾部上のシステイン残基のパルミトイル化によっても修飾される（V e i t , M ら、J . V i r o l ( 1 9 9 1 ) 6 5 : 2 4 9 1 ~ 2 5 0 0 ）。

#### 【0009】

球状頭部ドメインの免疫優性を回避するために、球状頭部ドメインを有さないH Aステムドメインに基づいて免疫原が設計されている（除頭部H A）。これらの試みは、適切な三次元構造を有するそのような分子の產生の困難性のために大部分が失敗している（K r a m m e r , F 及びP a l e s e , P . Curr Opin Virol ( 2 0 1 3 ) 3 : 5 2 1 ~ 5 3 0 ; E c k e r t , D . M 及びK a y , M . S . 、 P N A S ( 2 0 1 0 ) 1 0 7 : 1 3 5 6 3 ~ 1 3 5 6 4 ）。H A2それ自体は、その最も安定な融合後の低pH誘

10

20

30

40

50

導立体構造へとフォールディングする可溶型として大腸菌( *E. coli* )において発現されている( Chen , J ら、 PNAS ( 1995 ) 92 : 12205 ~ 12209 )。 HA 2 の低 pH 立体構造を不安定化させるよう設計された変異を組み込むことによって、 H 3 の HA に基づいた別の HA 2 コンストラクト( HA 6 )が大腸菌において発現され、所望の中性 pH 融合前立体構造へと再フォールディングした( Bomma kanti , G ら、 PNAS ( 2010 ) 107 : 13701 ~ 13706 )。 HA 6 は、マウスにおいて非常に免疫原性であり、相同的のインフルエンザ A ウイルスの感染に対してマウスを防御した。しかしながら、 HA 6 免疫化マウスからの血清は、インビトロにおいてウイルスを中和できず、これは球状頭部ドメインを認識する抗体のウイルス中和活性を検出するのみのアッセイの限界によるものであり得る。 HA 2 とステムドメイン中の HA 1 領域を有する別の「除頭部」 HA ステムドメインコンストラクトが記載されている( Steele , J ら、 mBio ( 2010 ) 1 : e00018 ~ 10 )。免疫原は、相同的のインフルエンザ接種に対してマウスを防御し、同じグループ由来の相同的 HA に対して交差反応性である抗血清を誘発した。 HA 6 と同様に、抗血清は、インビトロの中和活性を示さなかった。これらの設計は全て、免疫優性領域を排除することによるタンパク質最小化に基づく。

#### 【 0010 】

最近、構造に基づく合理的設計及びコンストラクトライブラリーの反復する bNAb 選択によって、安定な三量体である H 1 の HA 幹のみの免疫原( 除頭部ミニ HA )が作製された( Impagliazzo , A ら、 Science ( 2015 ) 349 : 1301 ~ 1306 ; Yassing , H. , M ら、 Nat Med ( 2015 ) 21 : 1065 ~ 1070 ; 特許出願 WO 2014 / 191435 \_ A 1 )。これらの幹のみのミニ HA 免疫原は、予想通りの HA ステムドメインに対する抗体を誘発した。これらのミニ HA 免疫原によって免疫されたマウス及びフェレットは、高病原性の H 5 ウィルスの致死性の接種から防御された。さらに、ミニ HA 免疫原はカニクイザルにおいて H 5 中和抗体を誘発した。これらのミニ HA 免疫原は、それらの特異的な bNAbs への結合によって選択された。長期の反復する bNAb 選択プロセスは、異なる型の bNAb に対して繰り返されることを必要とする。 bNAb エピトープの立体構造は、これらのミニ HA 免疫原において保存されていたが、全体的な構造は天然 HA のステムドメインとは異なっていた。これらの構造変化により、これらの除頭部ミニ HA 免疫原はインフルエンザウイルス又はインフルエンザウイルス様粒子( VLP )に組み立てられる可能性は低い。さらに、これらの除頭部ミニ HA 免疫原は、宿主細胞結合のための受容体結合部位を有さない。

#### 【 0011 】

ステムドメインに対する宿主の免疫応答を導くためにキメラ HA が設計されている。パンデミックの H 1 N 1 感染によって誘導された多くの中和抗体は、複数のインフルエンザ系統の HA ステムドメイン及び球状頭部ドメインにおけるエピトープに対して広域で交差反応性であった( Wrammert , J ら、 J. Exp Med ( 2011 ) 208 : 181 ~ 193 )。ヒトの中で循環性でない H 5 N 1 インフルエンザ系統由来の HA ( グループ 1 の HA )による免疫は、グループ 1 循環性季節性系統に対する HA 幹特異的応答を顕著に増加させた( Elibeedy , A. H ら、 PNAS ( 2014 ) 111 : 13133 ~ 13138 ; Nachbagauer , R ら、 J. Virol ( 2014 ) 88 : 13260 ~ 13268 ; Whittie , J. R. R ら、 J. Virol ( 2014 ) 88 : 4047 ~ 4057 )。 1957 年、 1968 年、及び 2009 年におけるパンデミックのインフルエンザウイルス系統の各々の出現の後、ヒト集団において、既存の季節性ウイルス系統が新規のパンデミック系統によって置き換わった。

#### 【 0012 】

多様な球状頭部ドメインを有する新規のパンデミックのインフルエンザウイルス系統への曝露が、ステムドメインにおいて保存されたエピトープに対する親和性成熟したメモリー応答を導くと仮説が立てられた( Palese , P 及び Wang , T. T. , mBio ( 2011 ) 2 : e00150 ~ 11 )。この仮説を支持して、 H 6 、 H 9 、又は H 5 球状頭部ドメイン、及び H 1 ステムドメインの、操作された組換えキメラ HA は、高力価の

10

20

30

40

50

幹特異的中和抗体を生成した (Pica, N ら、PNAS (2012) 109: 2573 ~ 2578; Krammer, F ら、J. Virol (2013) 87: 6542 ~ 6550)。これらの場合において、H1のHAの球状頭部ドメインは、ヒト集団の大部分がナイーブである同じグループ1のHA由来のH6、H9、又はH5の球状頭部ドメインによって置換された。これらの置換は、HA1のシステイン52とシステイン277の間のH1のHA配列を、H6、H9、又はH5の対応する配列と置換することによって作製された。システイン52とシステイン277は、球状頭部ドメインとステムドメインの間のヒンジ領域においてジスルフィド結合を形成する。同様のキメラHAがH3ステムドメインを用いて作製され、グループ2インフルエンザ系統に対するワクチンを開発した (Krammer, F ら、J. Virol (2014) 88: 2340 ~ 2343; Margine, I ら、J. Virol (2013) 87: 10435 ~ 10446)。これらのキメラHAによって動物を免疫することは、ウイルスのそれぞれのグループに対する広域中和活性を有する幹特異的抗体を誘導した。ヒト集団は、循環性H1(グループ1)、H3(グループ2)、及びインフルエンザBウイルス系統に対する既存の免疫を有する。キメラHAによるワクチン接種は、循環性系統のHA及びキメラHAに共通のステムドメインに対する抗体レベルをブーストする。ヒトがナイーブであるキメラHA上の新規球状頭部ドメインに対して、一次応答のみが誘導された。それに続く、同じステムドメインを有するが、異なる頭部ドメインを有する第2のキメラHAによるブーストは、幹特異的抗体レベルをさらに増加した。結果は、球状頭部ドメインにおける免疫優性エピトープに対する宿主の曝露の変化が、ステムドメインにおける免疫亜優性エピトープに対する広域の防御的免疫応答を増加させることを示唆する。

#### 【0013】

A / WSN / 33 (H1N1) ヘマグルチニンの抗原部位Bの6個のアミノ酸ループは、A / 日本 / 57 (H2N2) 及び A / 香港 / 8 / 68 (H3N2) 由来の HA の相同的抗原部位B残基によって置換することができる (Li, S ら、J. Virol (1992) 66: 399 ~ 404)。この置換は、HAの受容体結合機能と干渉しない。これらのキメラHAを有する組換えインフルエンザウイルスは、MDCK(マイディン・ダービー・イヌ腎臓上皮細胞)細胞培養において複製された。A / WSN / 33 (H1N1) 及び A / 香港 / 8 / 68 (H3N2) のキメラHAを有するウイルスは、A / WSN / 33 (H1N1) と A / 香港 / 8 / 68 (H3N2) の両方に対する抗体を誘導した。これらの結果は、HAの免疫優性抗原部位を、異なる系統由来の他の HA の相同的対応する免疫優性抗原部位によって置換することができることを示唆する。これらの置換は、生じるキメラHAの光源特異性を変化させる。

#### 【0014】

したがって、上述の段落において、1つのインフルエンザ系統における免疫優性エピトープは、別の系統由来の相同的免疫優性エピトープによって置換された。

#### 【0015】

別の戦略は、免疫優性エピトープを抑制し、宿主の免疫応答をステムドメインに向かせることである。球状頭部ドメインにおける免疫優性抗原部位は、高グリコシル化のためのさらなるグリコシル化部位の導入によって、遮蔽することができる (Eggink, D ら、J. Virol (2014) 88: 699 ~ 704、特許出願 US 2014 / 0004149\_A1)。球状頭部ドメインの高グリコシル化は、幹反応性抗体の結合親和性を変化させなかった。高グリコシル化 HA によるマウスの免疫は、高力価の幹反応性抗体、並びに異なる季節性ウイルスの接種における罹患率及び死亡率に対する防御を誘導した。特許出願 US 2013 / 0315929\_A1 は、球状頭部ドメインの免疫優性エピトープを、それらのエピトープのいくつかの残基をエピトープの一部である可能性の低い他のアミノ酸と置換することによって抑制する別の方法を開示した。結果は、球状頭部ドメインにおける免疫優性エピトープを遮蔽することが、ステムドメインにおける免疫亜優性エピトープに対する広域の防御的免疫応答を増加させることを示唆する。

#### 【0016】

10

20

30

40

50

外来エピトープを提示するための担体としての H A

インフルエンザ H A は、 H I V - 1 エンベロープタンパク質の V 3 ループのエピトープのための担体として使用されている。 H I V - 1 エンベロープタンパク質由来の 1 2 ~ 2 2 の長さの残基の免疫優性エピトープペプチドの、部位 A 又は部位 B のいずれかの H A 免疫優性抗原部位への挿入は、球状頭部ドメイン中に個々の H I V - 1 エピトープを有するキメラ H A を產生した。部位 A 及び部位 B の残基は全く除去されなかった。免疫原性 H I V - 1 エピトープは、その部位に挿入された。キメラ H A は、動物において、 H I V - 1 の V 3 - ループエピトープに対する免疫応答を誘導した (K a l y a n , N . K ら、 V a c c i n e (1994) 12 : 753 ~ 760 ; 米国特許 U . S . 5 , 591 , 823 - A ; L i , S ら、 J . V i r o l (1993) 67 : 6659 ~ 6666 ) 。非常に低い用量のキメラ H A が、挿入されたエピトープに対して特異的な抗体を誘導するのに十分であったため、挿入されたエピトープの免疫原性は H A によって増強されるように見えた。これらの結果は、 H A 以外のタンパク質由来の免疫優性の外来エピトープを、 H A の免疫優性抗原部位へと挿入できることを示唆する。挿入された外来の免疫優性エピトープを有するこれらのキメラ H A 分子は、挿入された外来の免疫優性エピトープに対する免疫応答を誘導できる。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0017】

本発明は、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質の修飾型、それを含有するワクチン、ウイルス様粒子、及びウイルス、並びにその產生のための組換え方法及び物質に関する。概して、これらの修飾は、抗体の生成及び / 又は H A タンパク質のステムドメイン中の成熟切断部位 (M C S) の修飾のための、代替エピトープによる、 H A タンパク質の球状頭部ドメインの免疫優性領域の置換を含む。 M C S と融合ペプチドの間で H A 0 を切断して H A 2 の遊離 N 末端を生成することは、細胞侵入のために必須である。動物のプロテアーゼによる切断を防ぐために M C S を改変することによって、 M C S が既に切断されているウイルスのウイルスが増幅できる宿主細胞の感染を可能にするが、その子孫は感染しない。したがって、免疫優性部位を占めるものを含む任意のエピトープの存在は、子孫のウイルスによる宿主のさらなる感染なしに増幅する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0018】

一態様において、本発明は、修飾 H A 又はそれを含有するウイルス若しくはウイルス様粒子を含むインフルワクチンであって、 H A タンパク質の免疫優性領域が、この領域に挿入されている、同じインフルエンザ系統又は別のインフルエンザ系統の保存された代替エピトープを含有する、インフルワクチンに関する。これは、その天然の位置において免疫優性である挿入された代替エピトープのより成功した免疫原性形態を提供する。代替エピトープは、他の H A の球状頭部ドメインに由来しないものである。典型的に、代替エピトープは、 H A ステムドメイン、又は M 2 のような非 H A インフルエンザタンパク質に由来する。

#### 【0019】

別の態様において、本発明は、動物のプロテアーゼによって切断されない M C S を含有するように修飾されている修飾インフルエンザウイルス (ワクチンとしてもまた使用できる)に関する。上述のように、これは、ウイルスの感染型を生じることなくウイルスの増幅を可能にする。そのようなウイルスは、1つ以上の免疫優性領域を、インフルエンザエピトープ、又は、例えば他のウイルス、細菌、若しくは腫瘍関連抗原に特徴的なエピトープを含む外来エピトープであってよい代替又は異種のエピトープで置換することによってさらに修飾できる。

#### 【0020】

さらに他の態様において、本発明は、修飾 H A タンパク質のタンパク質、ウイルス又はウイルス様粒子を調製するための組換え物質及び方法、並びにそれらのタンパク質、ウイ

10

20

30

40

50

ルス様粒子又は修飾ウイルスを使用する抗体を生成する方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、A / カリフォルニア / 07 / 2009、ブタ起源インフルエンザAウイルスH1N1系統(PDB: 3LZG)の成熟HAの細胞外部部分のX線結晶構造を示す。この構造は、本発明におけるコンストラクト設計を導くのに使用する。このHAのペプチド配列は、親の野生型(WT)H1のHAコンストラクトを作製するのに使用する。図1Aは、1つのHA単量体をリボン描画とし、他の2つを骨格描画とするHA三量体を示す。膜に対する方向、球状頭部ドメインの位置、及びステムドメインが示される。HA1は明るい影のリボンとして示され、HA2は暗い影のリボンとして示される。図1Bは、HA1及びHA2の位置、並びにHA1及びHA2のN末端及びC末端を有する単一のHA単量体を示す。融合ペプチドは丸で囲まれる。

【図2】図2は、A / カリフォルニア / 07 / 2009のH1のHA単量体に対してマッピングして、H3のHAの免疫優性抗原部位のおよその位置を示す。図2Aは、図1のようにリボン描画を示す。H3のHA免疫優性抗原部位A、B、C、D、及びEを暗い影で示す。図2Bは、膜から遠位の球状頭部ドメインの上の図2Aの上面図である。

【図3】図3は、A / カリフォルニア / 07 / 2009のH1のHA単量体に対してマッピングして、H1のHAの免疫優性抗原部位のおよその位置を示す。図3Aは、図1のようにリボン描画を示す。H1のHA免疫優性抗原部位Ca1、Ca2、Cb、Sa、及びSbを暗い影で示す。図3Bは、膜から遠位の球状頭部ドメインの上部である図3Aの上面図である。これらの免疫優性抗原部位の多くは、矢印で示す宿主細胞受容体結合部位を取り囲む。

【図4】図4は、H1のHAコンストラクトの模式的な設計を示す。図4Aは、コンストラクトの核酸の特徴の模式図である。サブクローニングのための制限部位の位置は標識される。図4Bは、図4Aに示す核酸に対する相対割合におけるコンストラクトのタンパク質の特徴の模式図である。GP67ssは、N末端におけるGP67分泌シグナル(シグナルペプチド)を表す。HA1は、HAのHA1を表す。MCSは、HA1の一部であるHA成熟切断部位を表す。HA2は、HAのHA2を表す。TEVはTEV切断部位を表す。FoldonはFoldon配列を表す。Hisは、C末端における10-ヒスチジンタグ(10×His-tag)を表す。

【図5】図5は、HA球状頭部ドメインにおいて異種エピトープが配置される位置と改変された成熟切断部位が存在する位置を示す。親のコンストラクトペプチド配列(WT)を、H3(A / 愛知 / 2 / 1968 H3N2)及びH1(A / プエルトリコ / 8 / 1934 H1N1)のHAの配列とアラインする。各々の配列のアミノ酸の位置を、シグナル配列除去後の第1の残基を1位としてHA0ナンバリングに基づいて右側に標識する。成熟切断部位(MCS)を、矢印及び垂直線で示す。H3のHAの免疫優性抗原部位A、B、C、D、及びEをH3配列の上にマークする。免疫優性抗原部位Ca1、Ca2、Cb、Sa、及びSbをH1配列の下にマークする。WT中の下線を付した配列は、配列の下に示す相同的エピトープによって置換される。改変された成熟切断部位は、成熟切断部位(MCS)の下に示す。広域中和抗体(bNAb)に対する天然の免疫優性抗原部位、F16、1C9、及びCR8020を配列の上の線によってそれぞれマークする。

【図6】図6は、球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位に配置される複合CR8020エピトープを有するHA単量体のモデルを示す。HA単量体は図1のようにリボン描画で示す。複合CR8020エピトープによって置換される免疫優性抗原部位を暗い影で示す。ステムドメイン中の元の天然CR8020エピトープをまた暗い影で示す。図6Aは、CR8020Sa4のモデルを示す。図6Bは、CR8020Caのモデルを示す。

【図7】図7は、本発明に記載されるHAコンストラクトの発現データを示す。示したコンストラクトの組換えバキュロウイルスを感染させたSF9細胞の細胞培地を採取し、Ni-NTA樹脂(Niブルダウン)によって捕捉した。Ni-NTA樹脂を1×PBSで洗浄して結合しないタンパク質を除去した。Ni-NTA樹脂に結合したタンパク質をC

10

20

30

40

50

o o m a s s i e (登録商標) 染色を伴う S D S - P A G E (図 7 A、B、C、及び D ) 又は抗 H i s ウエスタンプロット (図 7 E ) で解析した。矢印は全長 H A 0 を示す。

【図 8】図 8 は、本発明で使用される精製 H A コンストラクトを示す。示したコンストラクトの組換えバキュロウイルスを感染させた S F 9 細胞の細胞培地を採取し、 N i - N T A 樹脂 ( N i プルダウン ) によって捕捉した。 N i - N T A 樹脂を 1 × P B S で洗浄した。結合したタンパク質をイミダゾールで溶出し、 C o o m a s s i e (登録商標) 染色を伴う S D S - P A G E で解析した。矢印は全長 H A 0 を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【 0 0 2 2 】

本発明は、 H A タンパク質の修飾に関するため、上に提供されるものに加えてこのタンパク質及びその機能についてのさらなる記述は、有用であり得る。

##### 【 0 0 2 3 】

H A 0 のプロテアーゼ切断は、インフルエンザ A ウィルスの感染性に不可欠である。宿主におけるこれらのプロテアーゼの分布は、組織向性、及びそのために病原性の決定因子の一つである。単一の成熟切断部位を有する H A の大部分を切断するいくつかのトリプシン様プロテアーゼは、呼吸器系及び肺において同定されている ( K i d o , H ら、 J . B i o l C h e m ( 1 9 9 2 ) 2 6 7 : 1 3 5 7 3 ~ 1 3 5 7 9 ; P e i t s c h , C ら、 J . V i r o l ( 2 0 1 4 ) 8 8 : 2 8 2 ~ 2 9 1 ; Z h i r n o v , O . , P ら、 J . V i r o l ( 2 0 0 2 ) 7 6 : 8 6 8 2 ~ 8 6 8 9 ) 。これらのプロテアーゼはセリンプロテアーゼである。それらの 1 つは、ラット気管支上皮の C l a r a 細胞において最初に単離されたトリプシン様プロテアーゼ C l a r a である。 H A 0 を切断するこれらのプロテアーゼの狭い組織分布は、哺乳動物におけるインフルエンザウィルスの感染を呼吸器系及び肺に制限する。

##### 【 0 0 2 4 】

H A 成熟に関するプロテアーゼは未だよく分析されていない。トリプシンのように、これらのタンパク質は、アルギニン ( R ) 又はリシン ( K ) のような塩基性残基の C 末端側のペプチド結合を切断する。成熟切断部位 ( M C S ) は H A 1 の C 末端に位置し、 M C S の C 末端における切断は感染性に必須である。

##### 【 0 0 2 5 】

H 5 及び H 7 サブタイプの成熟切断部位における多塩基性配列は、フリン及びサブチリシン型プロテアーゼのような広範囲の細胞プロテアーゼによる切断感受性をもたらし、これは哺乳動物におけるこれらのウイルスの広範囲の組織向性及び高い病原性と相関する ( S t i e n e k e G r o b e r , A ら、 E M B O J ( 1 9 9 2 ) 1 1 : 2 4 0 7 ~ 2 4 1 4 ; M a i n e s , T . R ら、 J . V i r o l ( 2 0 0 5 ) 7 9 : 1 1 7 8 8 ~ 1 1 8 0 0 ) 。多くの高病原性のトリインフルエンザ ( H P A I ) サブタイプは、 H 5 及び H 7 である。ヒトにおける H P A I アウトブレイクの際、報告された致死率は、パンデミック及び季節性のインフルエンザウィルスのものよりも高かった ( M o r e n s , D . M ら、 N a t u r e ( 2 0 1 2 ) 4 8 6 : 3 3 5 ~ 3 4 0 ) 。 M C S におけるこれらの多塩基性配列は、鳥類の複数の器官におけるウイルス複製ももたらし、これらの鳥類における高い死亡率を生じる。

##### 【 0 0 2 6 】

季節性インフルウイルス及び非病原性鳥類インフルエンザウィルスの H A は、呼吸器及び肺における特異的なプロテアーゼによって細胞外で切断され、これはそれらの組織向性を限定する。一方で、高病原性のウイルスの H A は、遍在的に存在するプロテアーゼによって細胞内で切断される。これらの高病原性のウイルスは、全身感染を引き起こす様々な組織において多サイクル複製する ( S t e i n h a u e r , D . A . , V i r u s . V i r o l ( 1 9 9 9 ) 2 5 8 : 1 ~ 2 0 ; T a u b e n b e r g e r , J . K . , P N A S ( 1 9 9 8 ) 9 5 : 9 7 1 3 ~ 9 7 1 5 ) 。ヒトインフルエンザウィルスの 1 9 1 8 年のパンデミック系統はまた、幅広い細胞プロテアーゼを利用し、そのノイラミニダーゼ ( N A ) を使用して H A 切断のためのプラスミノーゲンを動員する ( G o t o , H 及び K a w

10

20

30

40

50

a o k a , Y . P N A S ( 1 9 9 8 ) 9 5 : 1 0 2 2 4 ~ 1 0 2 2 8 ; C h a i p a n , C ら、 J . V i r o l ( 2 0 0 9 ) 8 3 : 3 2 0 0 ~ 3 2 1 1 ) 。

### 【 0 0 2 7 】

H A 0 の切断は、ビリオンの宿主細胞との融合に必須である、新規の遊離N末端を有するH A 2 を生成する。切断型は、受容体結合及び膜融合の完全な機能を有するH A の成熟型である。H A 0 は受容体に結合する能力を有するが、膜融合を媒介しない。H A の前駆体と成熟型の両方がビリオン表面に存在する。H A 0 のみを有するウイルスは、融合活性を有さず、感染を引き起こさない。

### 【 0 0 2 8 】

H A 2 のN末端12残基は「融合ペプチド」と呼ばれる ( S k e h e l ら、 B i o c h e m S o c T r a n s ( 2 0 0 1 ) 2 9 : 6 2 3 ~ 6 2 6 ) 。融合ペプチドは、疎水性配列を有する。H A 0 において、M C S 及び融合ペプチドは表面ループを形成する。切断後、新規に生成するN末端融合ペプチドは、H A 三量体の境界面に挿入される。宿主細胞受容体への結合に続き、付着したインフルエンザビリオンは、宿主細胞によってエンドソームに取り込まれる。成熟H A の融合能は、エンドソームのp H 、すなわち特定のインフルエンザウイルス系統に応じてp H 5 ~ 6 において活性化される。低p H におけるH A 構造の大規模な変化は、融合ペプチドの細胞膜に向かう追放をもたらす。宿主エンドソーム膜への融合ペプチドの挿入は、周りを囲む宿主エンドソーム膜とH A のC末端膜係留領域を含有するウイルス膜との融合をもたらす。融合は、ウイルスR N A セグメントを宿主細胞の細胞質へと放出し、ウイルス複製が起きる宿主細胞核へと侵入させる。

### 【 0 0 2 9 】

H A は、インフルエンザウイルス系統の宿主範囲を決定する。H A は、宿主細胞表面の糖タンパク質及び糖脂質の末端のシアル酸に結合する。ヒトインフルエンザウイルス系統由来のH A は、S A 2 , 6 G a 1 を末端とするシアリルオリゴ糖へとほとんど排他的に結合するが、一方でトリ及びウマインフルエンザ系統由来のH A は、S A 2 , 3 G a 1 に結合する。ヒトは主にS A 2 , 6 G a 1 シアリルオリゴ糖を有し、鳥類は主にS A 2 , 3 G a 1 シアリルオリゴ糖を有する。図3に概略的に示すように、H A 上の宿主受容体結合部位は、排他的にH A 1 から作製される球状頭部ドメインに位置する。インフルエンザウイルスH A の受容体特異性は、良く分析されている。S A 2 , 6 G a 1 又はS A 2 , 3 G a 1 の認識に関するアミノ酸残基はマッピングされている。受容体結合ポケットにおける単一のアミノ酸残基置換が受容体結合特異性を変化させることができることが示されている ( R o g e r s , G . N ら、 N a t u r e ( 1 9 8 3 ) 3 0 4 : 7 6 ~ 7 8 ) 。1918年のインフルエンザパンデミックウイルスの異なる単離系統は、H A の受容体結合部位における単一のアミノ酸置換の結果として異なる受容体結合特異性を有した ( G l a s e r , L ら、 J . V i r o l ( 2 0 0 5 ) 7 9 : 1 1 5 3 3 ~ 1 1 5 3 6 ) 。系統A / 南カロライナ / 1 / 1 8 のH A は、ヒト細胞受容体S A 2 , 6 G a 1 へと優先的に結合するが、一方で系統A / ニューヨーク / 1 / 1 8 のH A は、ヒト細胞受容体S A 2 , 6 G a 1 とトリ細胞受容体S A 2 , 3 G a 1 の両方に結合し、インフルエンザウイルスの宿主適応の動的性質を明らかにする。

### 【 0 0 3 0 】

H A の受容体結合部位における単一の変異は、トリからヒトへと受容体結合特異性を変化させるが、ヒトにおけるH 5 トリインフルエンザウイルス系統の効率的な伝染は、受容体結合部位外のH A におけるいくつかの他の変化及び他のインフルエンザタンパク質における変化を必要とする ( I m a i , M ら、 N a t u r e ( 2 0 1 2 ) 4 8 6 : 4 2 0 ~ 4 2 8 ; H e r f s t , S ら、 S c i e n c e ( 2 0 1 2 ) 3 3 6 : 1 5 3 4 ~ 1 5 4 1 ; C h e n , L - M ら、 V i r o l ( 2 0 1 2 ) 4 2 2 : 1 0 5 ~ 1 1 3 ; R u s s e l l , C . A ら、 S c i e n c e ( 2 0 1 2 ) 3 3 6 : 1 5 4 1 ~ 1 5 4 7 ) 。他の変化と共に、H 5 のH A におけるわずか4個のアミノ酸置換は、呼吸飛沫を介したフェレット間の変異トリH 5 ウィルスの伝染を可能にするのに十分である。種を超えるインフルエンザウイルスの伝染の理解に加えて、これらの研究は、ユニバーサルインフルエンザワクチン候

10

20

30

40

50

補を評価するのに使用できるような、非哺乳動物インフルエンザウイルスの哺乳動物における伝染を研究する実験手順を確立した。

#### 【0031】

##### 抗インフル抗体及びHAの抗原部位の説明

インフルエンザウイルスの脂質二重層エンベロープの最も豊富なタンパク質として、HAはインフルエンザウイルスの主要な抗原であり、中和抗体の一次エピトープを保持する。ほとんどのヒト抗インフル抗体はHA及びNAに対するものである。ワクチン接種により誘発される60%のインフルエンザ反応性抗体は、HAに反応する(Wrammert, Jら、Nature (2008) 453: 667~671)。HA反応抗体の大部分は、球状頭部ドメイン中の受容体結合部位を取り囲む抗原部位を認識する。これらの抗体のいくつかはウイルス中和抗体である。概して、これらの中和抗体(NAb)は、宿主細胞へのHA結合と干渉し、HA阻害(HI)活性を示す。概して、これらは、これらの抗原部位の高変異性のために系統特異性であり、したがって、大いに所望される広域中和活性を欠いている(Wang, T.T及びPalese, P.、Nat Struct Mol Biol (2009) 16: 233~234)。

10

#### 【0032】

インフルエンザウイルスの広範な感染は、ウイルスのその抗原特性を改変する能力の結果である。インフルエンザウイルスの抗原特性の変化は、エラーを起こしやすいウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼ複合体によるウイルスゲノムの低忠実度複製の結果である。高い変異率は、抗原ドリフト、すなわちHAの抗原特性の漸進的变化をもたらす。抗原ドリフトは、全ての型のインフルエンザウイルスにおいて起きる。HA遺伝子の配列解析は、サイレント核酸配列変化はHA遺伝子全体にわたって広がるが、アミノ酸配列の変化の大部分はHA1に位置することを示す(Palese, P及びYoung, J.F.、Science (1982) 215: 1468~1474)。HA2はHA1よりも保存されている。

20

#### 【0033】

ウイルスゲノムのセグメント化された性質はまた、2種の異なる系統のウイルスが宿主に同時に共感染するときに、ウイルスゲノムセグメントの再構築をもたらす。ウイルスの新規系統は、抗原シフト、すなわちHAの抗原特性の突然の変化をもたらす、異なるウイルス表面タンパク質のこの再構築から出現する。抗原シフトは、インフルエンザAウイルスにのみ起こる。抗原ドリフト及び抗原シフトは、インフルエンザウイルスが、既存の抗体による中和から逃れることを可能にする。

30

#### 【0034】

##### H3インフルエンザ

35年以上前に決定されたインフルエンザHAの最初の詳細な構造は、HAの抗体結合部位を明らかにし、抗原ドリフト及び抗原シフトの分子的な説明を提示する(Wilson, I.Aら、Nature (1981) 289: 366~373; Wiley, D.Cら、Nature (1981) 289: 373~378; Wiley, D.C及びSkel, J.J.、Ann Rev Biochem (1987) 6: 365~394)。

40

#### 【0035】

抗原的に異なるウイルスのHA配列の比較は、H3のHA、すなわちグループ2サブタイプHAの球状頭部ドメインにおける免疫優性抗原部位を同定した。H3のHAの免疫優性抗原部位の記載は、他者によって実証された(Both, G.Wら、J.Virology (1983) 48: 52~60)。HA構造におけるこれらの抗原部位のおよその位置は、図2に概略的に示す。これらの抗原部位の配列の位置は図5に示す。部位Aは、A / 愛知 / 2 / 1968 H3N2系統のHAの133~148の残基の表面ループに位置する(図5のH3のようにナンバリング)。140ループとして知られるこのループは、球状頭部ドメインから突出し、受容体結合ポケットの下部の縁上にある。部位Bは、球状頭部ドメインの頂部上に位置し、受容体結合ポケットの上部の縁に沿った187~196の残基の表面ヘリックス及び155~160の残基の近接表面ループを含む。部位CはCys

50

52とCys277の間のジスルフィド結合を取り囲む。Cys52を中心とするループ(46~55の残基)とCys277を中心とするループ(271~280の残基)の交差が、球状頭部ドメインとステムドメインの間のヒンジにおける隆起を形成する。部位Dは、HA三量体のHA単量体サブユニット間の境界領域にある。それは、球状頭部ドメインのコアにおける8ストランドのシート構造中の200~214の残基の2つのストランドを中心とする。他のストランドのターンにおける残基は、部位Dの一部でもあり得る。部位Dは、HA三量体境界面において最も埋め込まれている。部位Dがいかに抗原部位として機能するかは明らかではない。部位Eは、球状頭部ドメインの側面において部位Aと部位Cの間に位置し、62~63の残基の表面ループ、78~83の残基、及び8ストランドシートの端部上の119~122の残基のストランドから作製される。まとると、部位Eのこれらの残基は、球状頭部ドメインの側部上の連続表面を形成する。1968年~2003年の期間中に出現したインフルエンザウイルスのアミノ酸置換及び抗原特性の比較は、主要な抗原変化に関与する置換は、部位A及び部位Bに排他的に位置したことを見た(Smith, D. Jら、Science(2004)305:371~376; Koel, B. Fら、Science(2013)342:976~979)。部位C、D、及びEにおける置換は、小規模の抗原変化を引き起こすように見えた。結果は、ほとんどの系統特異的中和抗体が、球状頭部ドメインの受容体結合部位の辺縁にある部位A及び部位Bに結合することを示唆する。

#### 【0036】

##### H1インフルエンザ

抗原的に異なる、ウイルス系統A / P R / 8 / 3 4 のグループ1のH1のHAの遺伝解析は、球状頭部ドメインにおける異なる抗原部位を同定し、Ca1、Ca2、Cb、Sa、及びSb部位と名付けた(Catton, A. Jら、Cell(1982)31:417~427; Gerhard, Wら、Nature(1981)290:713~717)。HA構造におけるこれらの抗原部位のおよその位置は、図3に概略的に示す。これらの抗原部位の配列の位置は図5に示す。Ca1部位は、8ストランドのシート構造のストランドのターンに位置する。165~169の残基のターンの1つ(図5のH1のようにナンバリング)は表面に露出する。Ca1部位の207の残基は、H3のHAの部位Dに対応する2つのストランドを接続するターンにある。H1のHAのCa1部位は、概してH3のHAの部位Dに対応する。Ca2部位はまた、一次構造において分離するが三次構造において一緒に2つのセグメントから作製される。Ca2の1つのセグメントは、H3のHAの部位Aの位置に対応する136~141の残基の表面ループ中にある。Ca2の別のセグメントは長い表面ループ上の220~221の残基から作製される。Ca2部位は、HA単量体の球状頭部ドメインにおけるCa1の逆側にあるが、HA三量体の別のHA単量体のCa1部位に近接する。1つのHA単量体のCa1部位は、三量体構造の別のHA単量体のCa2部位と連続表面を形成する。Cb部位は、8ストランドのシート構造に隣接する表面ループを形成する70~75の残基の直鎖状エピトープである。それは、H3のHAの部位Eに対応する。部位Sa及びSbは、H3のHAの部位Bに対応するサブサイトとみなすことができる。154~163の残基の部位Saは、H3のHAの部位Bループに対応するループと重複する。Sa部位の別のセグメントは、124~125の残基のターンに近接する。部位SbはH3のHAの部位Bのヘリックスに対応し、主としてヘリックスの188~194の残基を有する。

#### 【0037】

##### 広域中和抗体及び保存エピトープ

天然インフルエンザウイルス感染又は三価不活化インフルエンザワクチン(TIV)によるワクチン接種もまた、膜近位のステムドメインに大部分が位置する保存HAエピトープに対する低レベルの抗体を誘発する(E11ebddy, A. Hら、PNAS(2014)111:13133~13138)。これらの抗体は、インフルエンザウイルスの多くの系統間で保存されたエピトープを認識する。いくつかの系統に対する防御を提供するものは、広域中和抗体と呼ばれる(bNAb)。概して、これらのbNAbは、HA阻害

10

20

30

40

50

活性を有さず、宿主細胞表面受容体に対する HA の結合を防がない。最初の系統間抗体である C179 は、20 年以上前に分析されている (Okuno, Yら、J. Virol. (1993) 67: 2552~2558)。それは、H1 と H2 系統の間で保存されている、HA1 の 318~322 の残基の立体構造エピトープ (TGLRN)、及び HA2 の 47~58 の残基のエピトープ (GINTNKVNNSVIEK) を認識する。C179 は、HA の融合活性を阻害し、したがって、ウイルス中和をもたらす。

#### 【0038】

多くの bNAb が、インフルエンザウイルスに感染した患者において検出されるか、又は単離されている (Ekiert, D.C 及び Wilson, I.A.、Curr Opin Virol (2012) 2: 134~141)。bNAb は、グループ 1、グループ 2、又はグループ 1 とグループ 2 の両方のインフルエンザ A ウィルスを中和することが実証されている。bNAb によって認識される抗原エピトープの多くは、同定され、分析されている。これらのエピトープは、HA 配列の直鎖状セグメントか HA 配列の複数の直鎖状セグメントを有する立体構造エピトープのいずれかである。bNAb に対するエピトープの多くは、HA タンパク質のより低変異性のステムドメインに位置する。これらのエピトープは、これに限定するものではないが、融合タンパク質及び M-CS 周辺のペプチド配列を含む。

#### 【0039】

多くの bNAb 及びそれらのエピトープは、構造的に分析されている。例えば、bNAb である FI6 は、M-CS 及び HA0 中の融合ペプチドの残基を認識する (Coratti, Dら、Science (2011) 333: 850~856)。HA のペプチドマッピングは、FI6 のエピトープとして、M-CS 及び融合ペプチドの大部分からなる RKKRG LFGAIAGFIE、並びに HA2 におけるヘリックスコイルドコイルペプチドの KESTQKAIDGVTNKVNS である、2つのペプチドを同定した。提案された FI6 の中和メカニズムは、膜融合の阻害すること、及びプロテアーゼの HA0 の M-CS へのアクセスを遮断することにより HA 成熟の防止することである。別の bNAb である F10 は、HA の成熟型における融合ペプチド近辺の立体構造エピトープを認識する (Su, J ら、Nat Struct Mol Biol (2009) 16: 265~273)。F10 は、恐らく膜融合を防止することによって全てのグループ 1 インフルエンザ A ウィルスを阻害する。

#### 【0040】

モノクローナル bNAb である 1C9 は、インビトロで細胞融合を阻害する (米国特許第 8,540,995 号; Prabhu, N ら、J. Virol. (2009) 83: 2553~2562)。1C9 は、GLFGAIAGF の直鎖状エピトープ、すなわち HPAI である H5N1 の H5 の HA2 の融合ペプチドの N 末端を認識する (免疫エピトープデータベースウェブアドレス: iedb.org / assay\_details.php?assayId=1599077)。1C9 は、マウスにおいて高病原性トリインフルエンザ (HPAI) H5N1 ウィルスによる感染に対する防御を示す。モノクローナル bNAb はまた、メモリー B 細胞より単離されている (Hu, W ら、Virol (2013) 435: 320~328)。これらのモノクローナル抗体のいくつかは、2009 年のパンデミック H1N1 インフルエンザウイルス由来の HA2 の FIEGGWTGMVDGWYGYHH の直鎖状エピトープを認識する。このエピトープは、融合ペプチドの 1C9 エピトープに対して C 末端側である。HA 融合ペプチドの 14 残基の配列は、インフルエンザ A 及び B ウィルスを超えて高度に保存されている。

#### 【0041】

HA 融合ペプチドの保存された性質は、ユニバーサルインフルエンザワクチンを開発するため調査された。切断の結合の両側における M-CS 及び HA2 の融合ペプチドを含有し、HA1 の最後の 9 アミノ酸残基を含むインフルエンザ B ウィルスの HA0 の高度に保存された配列に基づいた、ペプチドコンジュゲートワクチンは、抗原的に異なる系統のインフルエンザ B ウィルスのウイルス系統による致死性の接種に対して防御的な免疫応答を

10

20

30

40

50

誘発した (Bianchi, Eら、J. Virol (2005) 79: 7380~7388)。

#### 【0042】

モノクローナル bNAb である CR6261 は、HA2 ヘリックス A 及びステムドメインの HA1 残基における高度に保存された領域を認識する (Ekiert, D.C. ら、Science (2009) 324: 246~251)。CR6261 は、融合後の立体構造への HA の転換を防止することによってグループ 1 インフルエンザウイルスを中和する。CR6261 は、同じ VH1-69 生殖細胞系列抗体重鎖を使用する bNAb に属する。別の VH1-69 モノクローナル抗体である CR8020 は、グループ 2 インフルエンザウイルスを中和する。CR8020 は、膜に対して至近距離 (約 15~20 Å) のステムドメインの基部で HA に結合し、HIV の gp41 サブユニット由来の膜近位外部領域 (MPER) を認識する HIV に対する抗体に類似する (Ekiert, D.C. ら、Science (2011) 333: 843~850)。CR8020 エピトープの 2 つの主要な構成要素は、融合ペプチドの C 末端部分 (H3 の HA2 の 15~19 の残基、EGMID)、及びステムドメインの基部近辺の 5 ストランドシートの最外部のストランド (H3 の HA2 の 30~36 の残基、EGTGQAA) からなる。これら 2 つの構成要素は、H3 の一次構造において 10 残基離れている。HA のステムドメインに結合する大部分の bNAb は、インフルエンザ A ウィルスの HA のグループ 1 (H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、及び H16) 又はグループ 2 (H3、H4、H7、H10、H14、及び H15) のいずれかを中和する。これらの抗体は、宿主細胞への HA の結合を阻害しないが、ウイルス膜と宿主細胞膜の融合を防止できる。10  
20

#### 【0043】

HA 受容体結合部位は、球状頭部ドメインの頂部におけるポケットである (Wilson, I.A. ら、Nature (1981) 289: 366~373; Wiley, D.C. 及び Skehel, J.J.、Ann Rev Biochem (1987) 56: 365~394)。このポケットは、多くのインフルエンザ系統を超えて高度に保存されているアミノ酸残基によって形成されている。ポケットの縁は、上述される H3 の部位 A 及び部位 B のような免疫優性抗原部位によって形成される。健常ヒト対象からのヒトモノクローナル抗体 (mAb) のクローニングは、H1、H2、及び H3 系統由来の HA の球状頭部ドメインにおける受容体結合部位の至近距離にある保存された残基を認識する bNAb を同定した (Krause, J.C. ら、J. Virol (2011) 85: 10905~10908; Krause, J.C. ら、J. Virol (2012) 86: 6334~6340)。構造研究は、これらの bNAb の少なくとも一部が受容体結合ポケットに対するシアル酸の相互作用を模倣することを明らかにした (Whittle, J.R. R. ら、PNAS (2011) 108: 14216~14221; Ekiert, D.C. ら、Nature (2012) 489: 526~532)。30

#### 【0044】

幹反応性抗体は、自然感染においてまれであり、現在の季節性インフルワクチンによる免疫においてさらに少ない。これらの抗体のサブセットのみが中和抗体である。ステムドメインの保存された性質のため、中和抗体の大部分は bNAb である。現在、ヒト対象から作製された抗体ライブラリーからのクローニングは、これらのまれな広域中和幹反応性抗体を日常的に同定することができる (Kashyap, A.K. ら、PNAS (2008) 105: 5986~5991; Wrammer, J. ら、Nature (2008) 453: 667~671)。これらの幹反応性抗体のまれな出現は、これらのステムドメインのエピトープが免疫亜優性である一方で、大部分の抗体が導かれる球状頭部ドメインのエピトープが免疫優性であるという仮説を導く (Krammer, F. 及び Palese, P.、Nature Rev Drug Disc (2015) 14: 167~182)。流行している季節性インフルワクチンに対する繰り返される曝露又は季節性インフルワクチンによる免疫は、球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位に対する抗体の産生をもたらす。球状頭部ドメインの免疫優性エピトープの存在が、二次応答をステムドメインから離れ40  
50

させる傾向をもたらすことが示唆されている (Russell, C. J., N Engl J Med (2011) 365: 1541~1542)。現在の系統に感染するか又はそれに対してワクチン接種した個体は、免疫学的にナイーブである者よりも、普遍的な応答を開始するのにより苦労する可能性がある。

#### 【0045】

##### M2タンパク質及びそのエピトープ

M2は、ウイルスエンベロープにホモ四量体のプロトンチャネルを形成する1回膜貫通タンパク質である (Lamb, R. Aら、Cell (1985) 40: 627~633; Pielak, R. M及びChou, J. J.、Biophys Acta. (2011) 1808: 522~529)。それは、ウイルスエンベロープにおいて、HAと比べてはるかに低い存在量 (1:10~1:100の比のM2:HA) で存在する。M2プロトンチャネルの機能は、ウイルスタンパク質を宿主細胞のサイトゾルへと放出するためにウイルス内部のpHを調節すること、及び細胞表面へのHAの輸送のためにゴルジ体腔のpHを調節することに重要である。インフルエンザAウイルスM2 (AM2) タンパク質は、M2eとして知られる1~23の残基の細胞外N末端ドメイン、24~46の残基の膜貫通(TM)ドメイン、及び47~97の残基の細胞内C末端ドメインを含む97残基を有する。4つのM2分子からのTMドメインは、細胞侵入の間のウイルス膜を横断するpH、並びにウイルス構築及び退出の間の感染した細胞のトランスゴルジ膜を横断するpHを調節するpH感受性プロトンチャネルとして機能する4ヘリックスバンドルを形成する。大きな細胞質ドメインは、ビリオン内殻のM1タンパク質との会合を介して安定な四量体形成のために重要であり、ウイルス構築における役割を果たす。プロトンチャネル機能に必須であるTMドメインにおけるHXXXW配列モチーフを除いて、インフルエンザA、B、及びCウイルスのM2タンパク質は、配列相同性をほとんど全く共有しない。しかしながら、AM2の10個のN末端細胞外残基は、全てのインフルエンザAウイルスにおいて保存されている。

#### 【0046】

インフルエンザAウイルスのM2 (AM2) は、AM2プロトンチャネルを遮断する抗ウイルス薬アマンタジン及びリマンタジンの標的である。プロトンチャネルの閉状態を安定化させる薬物リマンタジンは、チャネルドメインのC末端近辺の脂質に面したポケットに結合する。アマンタジンは、インフルエンザAウイルスに対するが、インフルエンザBウイルスに対してではない活性を有する抗ウイルス薬である。これらのチャネル遮断薬の使用は、AM2のチャネルドメインにおける変異の結果としての広範な薬物耐性のために、中止されている。これらの変異の多くは、野生型 (WT) ウイルスよりも伝染しにくいくらい弱毒化したウイルスを生じる。これらの薬物耐性変異は、薬物選択圧の非存在下においてWTへと戻ることができる。

#### 【0047】

M2タンパク質は、インフルエンザウイルスに感染した宿主細胞表面に豊富に発現している内在性膜タンパク質である (Lamb, R. Aら、Cell (1985) 40: 627~633)。M2が、インフルエンザウイルスに応答する細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) のための細胞表面抗原であることが示唆された。インフルエンザAウイルスの感染は、M2に対する低力価の抗体を誘発するのみである (Feng, J.ら、Virology (2006) 3102~115)。M2eの高度な構造保存は、部分的に不十分なM2e特異的抗体応答の結果であり得、したがって、変化への圧力が存在しない可能性がある。抗M2抗体応答は、M2タンパク質に対する既存の抗体を有する個体の間でより強固であった (Zhong, W.ら、J. Infect Dis (2014) 209: 986~994)。2009年パンデミックH1N1インフルエンザAウイルスの感染の結果として誘導される抗M2抗体は、季節性インフルエンザAウイルスのM2タンパク質に対して交差反応性であった。抗M2e抗体によるマウスの処理は、疾患の進行を顕著に遅延させ、M2eエスケープ変異体の単離をもたらし、インフルエンザAウイルス感染に対するワクチンとしてM2eを使用する可能性を示唆した (Zharikova, D.ら、J. Virol.

10

20

30

40

50

○ 1 ( 2 0 0 5 ) 7 9 : 6 6 4 4 ~ 6 6 5 4 ) 。

【 0 0 4 8 】

M 2 e と H A の融合に基づく D N A ワクチンが記載されている ( Park , K . S ら、 V a c c i n e ( 2 0 1 1 ) 2 9 : 5 4 8 1 ~ 5 4 8 7 ) 。融合タンパク質は、互いの間の 2 0 残基のリンカーを介して H A タンパク質の N 末端に位置する、 1 つのヒト M 2 e ペプチドと 1 つのトリ M 2 e ペプチドとを有する。コードされた M 2 e - H A 融合タンパク質の発現を確認した。 M 2 e - H A 融合 D N A ワクチンにより免疫されたマウスは、 M 2 e に対する増強した T 細胞応答を示し、異種トリインフルエンザウイルスの致死性接種からの完全な防御を示した。

【 0 0 4 9 】

*M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s* の H S P 7 0 ( m H S P 7 0 ) タンパク質の C 末端へと遺伝的に融合された M 2 e の 4 つのタンデムリピートからなる組換え融合タンパク質は、マウスにおいて複数の系統のインフルエンザウイルスに対する防御を示した ( E b r a h i m i , S . M ら、 V i r o l o g y ( 2 0 1 2 ) 4 3 0 : 6 3 ~ 7 2 ) 。 M 2 e ペプチド、 S L L T E V E T P I R N E W G C R C N D S S D は、ワクチンとして他のインフルエンザタンパク質及びインフルエンザ B ウィルスの M 2 e の相同体である B M 2 からのペプチドと共にカチオン性リポソーム送達ビヒクルへとコンジュゲートされた ( 特許出願 U S 2 0 1 0 / 0 8 6 5 8 4 \_ A 1 ) 。ワクチンは、マウスにおいて M 2 e に対する免疫応答を誘発した。ワクチンを含有する M 2 e ペプチドによりワクチン接種されたマウスは、致死性のインフルエンザウイルス接種から防御された。 M 2 e の V L P を補充した不活化インフルエンザワクチンは、マウスにおいて、抗原的に異なるインフルエンザ A ウィルスに対する改善された、長期間にわたる交差防御を付与した ( S o n g , J - M ら、 P N A S ( 2 0 1 1 ) 1 0 8 : 7 5 7 ~ 7 6 1 ) 。

10

【 0 0 5 0 】

免疫優性領域の修飾

本発明は、 H A の球状頭部ドメインの免疫優性領域を代替エピトープによって置換するか、又はそこに代替エピトープを挿入することにより生じる、宿主免疫応答をこれらのエピトープに導くための、遺伝的に修飾された組換えインフルエンザヘマグルチニン ( H A ) 遺伝子及びタンパク質を含む。これらのエピトープのいくつかは H A に対する b N A b によって認識される。本発明はまた、修飾 M C S を有する修飾 H A タンパク質及び遺伝子、並びにこれらの修飾の組合せに関する。

20

【 0 0 5 1 】

一実施形態において、修飾組換え H A は、 M 2 タンパク質の細胞外ドメイン ( M 2 e ) によって置換された球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位を有するか、又は M 2 e が免疫優性抗原部位に挿入されている。

30

【 0 0 5 2 】

H A タンパク質の三次元構造に導かれ、特定の表面ペプチド又は免疫優性領域のそのような表面ペプチドが、同じ H A の他の領域の異種ペプチド若しくはいくつかの異種ペプチドによって、又は別のサブタイプ若しくは系統のインフルエンザウイルスの H A 由来の異種ペプチド若しくはいくつかの異種ペプチドによって置換される。これらの異種ペプチドは、免疫優性領域に挿入されてもよい。さらに、 H A の特定の表面ペプチド又は複数のペプチドは、 H A に関連しない他のタンパク質由来の異種ペプチドによって置換されるか、又はそのようなペプチドがその中に挿入される。これらの異種ペプチドは、天然タンパク質又は人工的に設計されたもののいずれかである。それらは、既知の抗体によって認識されないものであり得る。

40

【 0 0 5 3 】

H A の免疫優性領域は、 H A の球状頭部ドメインの表面上にある。これらの修飾される表面領域は、表面露出ヘリックス、ストランド又はループである。これらの表面領域は、好ましくは、免疫優性抗原部位及びエピトープであるか、又はそのような抗原部位及びエピトープの一部であるか、又はそのような抗原部位及びエピトープに隣接する。

50

**【 0 0 5 4 】**

いくつかの実施形態において、H A 球状頭部ドメインの免疫優性領域は、H A に対するb N A b によって認識されるH A の免疫亜優性エピトープのペプチドによって置換される。他の実施形態において、H A 球状頭部ドメインの免疫優性領域は、インフルエンザウイルスのグループを中和する抗体によって認識される免疫亜優性エピトープのペプチドによって置換される。これらの免疫亜優性エピトープは、H A ステムドメインから選択されるか、又はH A 融合ペプチド若しくはH A 成熟切断部位を含む。

**【 0 0 5 5 】**

本発明の組換え修飾H A タンパク質は、組換え野生型H A と同様のレベルで細胞培養において発現され、細胞培地へと分泌される。これらの設計は、これに限定されるものではないが、ヒトに感染するインフルエンザウイルス、並びに他の哺乳動物及び鳥類に感染するインフルエンザを含む、インフルエンザA、B、及びCウイルスの全ての系統の任意のインフルエンザH A に適用可能である。一実施形態において、これらの修飾H A タンパク質は、ヒト又は動物におけるインフルエンザウイルス感染に対するワクチンを作製するための免疫原として使用できる。

10

**【 0 0 5 6 】**

これらの免疫優性領域を部位特異的変異導入によって変更してもよい。抗原部位の溶媒露出残基は、H A タンパク質の三次元構造によって同定される。抗原部位の溶媒露出残基又はいくつかの溶媒露出残基は、部位特異的変異導入によって変更するか、又はこれらの残基の特異的な変更を含有するペプチドと置換される。新規の部位は、元の部位と同じ二次構造を有する。

20

**【 0 0 5 7 】**

異種エピトープによって置換された抗原部位を有する例示的H A

図3に示すH A 構造に基づいて、H A のいくつかの位置を選択して、球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位を例えばH A のステムドメイン由来の異種ペプチドによって置換することの実現可能性を示す。

**【 0 0 5 8 】**

119～122の残基のペプチドK T S S (図5のW T のようにナンバリング)は、124～125の残基のS a 部位近辺の表面露出ヘリカル構造である。S a 部位は、H A 三量体の球状頭部ドメインの側面上にあり、受容体結合部位から離れている。この部位における修飾は、受容体結合部位の変化を起こしにくく、そのため修飾H A による宿主受容体結合に変化を起こしにくい。4残基ペプチドK T S S は、ステムドメインのb N A b エピトープによって置換される。H 3 のH A の部位A に対応するC a 2 部位の137～142の残基のH A G A K S は、主要な免疫優性部位である。153～164の残基のK K G N S Y P K L S K S は、H 3 のH A の部位B に対応するS a 部位の表面ループである。このペプチドのN末端部分である153～157の残基のK K G N S は、いくつかのコンストラクトにおいて置換されている。S b 部位の184～195の残基のT S A D Q Q S L Y Q N A は、H A 球状頭部ドメインの頂部でヘリックスを形成する。

30

**【 0 0 5 9 】**

S a 部位の表面ループ及びS b 部位のヘリックスは、H A の球状頭部ドメインにおいて互いに近接し、H 3 の部位B に対応する。S a 部位とS b 部位は共に、ループ及びヘリックス構造を有する立体構造エピトープを提供できる。しかしながら、これらの部位が受容体結合部位近辺にあるため、これらのペプチドの置換は受容体結合部位を破壊する可能性がある。C a 2 部位の213～224の残基のE I A I R P K V R D Q E は、2つのH A 単量体間の境界面近辺のループである。このループは、H 3 のH A の部位D に対応する、近接するH A 単量体のストランドとの接点を有する。ループの一部は表面露出である。C a 2 部位はこのペプチド内に位置する。いくつかのコンストラクトにおいて、このペプチドは部分的に置換される。

40

**【 0 0 6 0 】**

さらに、異種ペプチドは、図5に示す任意の他の抗原部位に又はその近辺に、及び図1

50

～図3に示す表面ループ又はヘリックスに又はその近辺に配置することができる。さらに、異種ペプチドは、抗原部位の残基の欠失が全くななく、これらの任意の位置に挿入することができる。

#### 【0061】

b N A b である C R 8 0 2 0 エピトープはステムドメインに位置する。図5及び図6に示すように、C R 8 0 2 0 エピトープは、ステムドメインの基部近辺の5ストランドシートの最外部のストランド(H 3 の H A の H A 2 の 3 0 ~ 3 6 の残基、E G T G Q A A、配列番号 2 6 )、及び融合ペプチドの C 末端部分(H 3 の H A の H A 2 の 1 5 ~ 1 9 の残基、E G M I D、配列番号 2 5 )からなる2つの主な構成要素を有する。これらの2つの構成要素は、一次構造において、10アミノ酸残基によって分離されている。複合体 C R 8 0 2 0 エピトープ E G M I D Y E G T G Q A A(配列番号 2 7 )は、2つのエピトープの構成要素がチロシン(Y)によって連結されるように設計される。この複合体 C R 8 0 2 0 エピトープは、免疫優性部位を置換するための異種ペプチドとして使用される。10

#### 【0062】

別の b N A b 、1 C 9 エピトープは、ステムドメインに存在する H A 2 の N 末端における融合ペプチドである。G I F G A I A G F I E G(配列番号 3 6 )の修飾 1 C 9 エピトープペプチドは、免疫優性部位において提示されるためのペプチドとして設計された。I 1 C 9 と表されるこの修飾 1 C 9 ペプチドは、b N A b である 1 C 9 によって認識される H 5 融合ペプチドの2位におけるロイシン(L)のイソロイシン(I)置換を有する。この I 1 C 9 融合ペプチドは、ブタ H 1 の H A 並びにいくつかの H 6 及び H 9 ウィルスの H A に存在する。この I 1 C 9 ペプチドは、異なる免疫優性部位に配置する。抗原部位に I 1 C 9 を位置のシフトを伴って有する複数のコンストラクトが作製された。20

#### 【0063】

b N A b である F I 6 のエピトープは、H A 前駆体 H A 0 の三次元構造上の連続表面を形成するが、一次構造において分離している2つのペプチドを含有する立体構造エピトープである(図5)。1つのF I 6 エピトープペプチド R K K R G L F G A I A G F I E は、H A 0 の成熟切断部位及び融合ペプチドである。別のF I 6 ペプチド K E S T Q K A I D G V T N K V N S は、H A 2 におけるコイルドコイル構造を有する。これら2つのF I 6 エピトープペプチドを球状頭部ドメインに配置するコンストラクトが作製されている。F I 6 エピトープペプチド R K K R G L F G A I A G F I E を、1 5 3 ~ 1 6 4 の残基の S a 部位に配置し、コイルドコイル F I 6 エピトープペプチド K E S T Q K A I D G V T N K V N S を、1 8 4 ~ 1 9 5 の残基の S b 部位に配置する。別のコンストラクトにおいて F I 6 エピトープペプチド R K K R G L F G A I A G F I E を S a 部位に配置するが、第2のF I 6 エピトープペプチドを有さない。30

#### 【0064】

多くの b N A b エピトープは分析されている。それらの任意のものは、上述のように、球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位若しくは表面ループに、又はその近辺に配置することができる。

#### 【0065】

他の実施形態において、異種ペプチドは、M 2 タンパク質の細胞外ドメインのペプチド(M 2 e ペプチド)である。M 2 e ペプチドは、インフルエンザ A ウィルスの間で保存され、低変異性である。インフルエンザ A ウィルスとインフルエンザ B ウィルスに由来する M 2 e ペプチドは異なっているが、M 2 e ペプチドはまた、インフルエンザ B ウィルスの間で保存され、低変異性である。40

#### 【0066】

いくつかの実施形態において、異種ペプチドは、部位特異的変異導入によって免疫優性抗原部位に特異的な変更をもたらす人工的に設計されたペプチドである。いくつかの実施形態において、人工ペプチドは、免疫優性抗原部位及び異種ペプチドの所望の特徴を組み合せる。いくつかの実施形態において、人工ペプチドは、b N A b との相互作用のための残基、及び H A 球状頭部ドメインの三次元構造の維持のための元の免疫優性抗原部位の残50

基を有する。これらの人工ペプチドは、H A三次元構造に基づいて合理的に設計されるか、又はランダムに生成したペプチドのライブラリーをスクリーニングをすることによるかのいずれかである。

#### 【0067】

バキュロウイルス発現系又は哺乳動物発現系を使用して発現するための、M 2 e ペプチド S L L T E V E T P T R N G W E C K C S D S をC a 2 部位又はS b 部位のいずれかに配置するコンストラクトを作製している。M 2 e ペプチドは、異なるインフルエンザ系統由来の配列の一致に基づいてさらに最適化できる。

#### 【0068】

##### 修飾された成熟切断部位を有する H A

本発明は、H A 成熟切断部位 (MCS) のプロテアーゼ感受性を変更して生じるH A を異なるクラスのプロテアーゼに感受性にし、かつ、インフルエンザウイルスの全ての系統の天然のH A 成熟切断部位を切断するそれらのトリプシン様プロテアーゼに耐性にする実施形態を含む。改変されたMCSは、インフルエンザウイルスの既知の天然宿主に存在しない特異的なプロテアーゼによって認識されるように設計される。これは、生じるH A をインフルエンザウイルスの全ての天然宿主における成熟に耐性にする。この改変された成熟切断部位を認識するこの特異的プロテアーゼの存在において、これらの生じるH A は、切断されてH A 1 及びH A 2 を含有する成熟型になる。この特異的プロテーゼの存在下で生じるH A から作製される組換えインフルエンザウイルスは、成熟H A を形成し、天然のインフルエンザ宿主に感染するようになる。しかしながら、感染した天然宿主において複製したウイルス子孫は、天然宿主における適切なプロテアーゼの欠損により感染性ではない。

10

#### 【0069】

H 1 のH A 分子はしばしば、MCS中に単一の塩基性残基を有する。この単一の塩基性残基は通常、切断の結合に対してN末端側のアルギニン (R) 残基である。H 1 のH A のMCSにおけるアルギニン (R) 又はリシン (K) のような複数の塩基性残基の付加は、修飾H A を含有する組換えインフルエンザウイルスの感染性を増加する。多塩基性残基を含有するH 5 のMCSによる天然のH 1 のMCSの置換は、修飾H A を含有する組換えインフルエンザウイルスの感染性を増加する (Kong, W-pら、PNAS (2006) 30 103 : 15987 ~ 15991)。これらの多塩基性残基は、多くの細胞内トリプシン様プロテアーゼにより感受性である。いくつかの実施形態において、H 1 のH A のMCSは、H 5 のH A のMCS又は多塩基性残基と置換することによって修飾される。H 1 のH A のMCSはまた、H A 1 の最後の残基 (アルギニン) とH A 2 の最初の残基 (グリシン) の間に多塩基性残基を挿入することによって修飾される。

20

#### 【0070】

改変されたMCS配列を有する遺伝的に修飾された組換えインフルエンザH A 遺伝子及びタンパク質もさらに開示される。天然MCSは、別のH A由来のMCSの配列によって置換される。前記変更は、恐らくは生じるH Aを未同定の宿主プロテアーゼによる成熟切断に対してより感受性にすることによって、より感染性の組換えインフルエンザウイルスをもたらすことが知られている異なるH A由来の別のMCSとH Aの天然MCSの置換を含む。好みしい実施形態において、H 1 のH Aの天然のMCSは、H 5 のH AのMCSによって置換されるか、又はアルギニン (R) 及びリシン (K) の多塩基残基によって置換される。

30

#### 【0071】

第Xa因子及びエンテロキナーゼのようないくつかの哺乳動物プロテアーゼは、切断の結合のN末端側に完全に位置する、それらのそれぞれの対応する切断認識部位を有する。それらの切断認識部位はまた、天然のH A 成熟切断部位を置換するのに使用できる。天然H Aの場合のように、これらのプロテアーゼ切断部位の切断の結合のC末端側はグリシン (G) である。トロンビン切断部位もまた、切断の結合のC末端側にグリシン (G) を有する。トロンビン切断の後、新規のN末端のグリシン (G) が生成される。全てのこれら

40

50

のプロテアーゼは、多くの天然のインフルエンザ宿主中に存在する。しかしながら、これらのプロテアーゼは通常、組換えH A 産生のために使用される細胞培地又は細胞株に存在しないか、又は痕跡量で存在するかのいずれかである。

#### 【0072】

タバコエッチウイルス(T E V)のT E Vプロテアーゼは、E N L Y F Q Gの切断部位を認識し、グルタミン酸(Q)とグリシン(G)の間を切断する。T E Vプロテアーゼによって生成される遊離N末端はグリシン(G)であり、H A成熟後のH A 2のN末端の残基と同じである。天然H AのM C Sと異なり、T E V切断部位には塩基性残基が存在しない。いくつかの実施形態において、H AのM C S全体が、T E V切断部位によって置換されるか、又はM C Sのいくつかの残基がT E V切断部位によって置換されるか、又は例えば切断の結合のN末端側のアルギニン(R)のみがT E V切断部位によって置換される。T E V切断部位によって置換されるM C Sを有するH Aコンストラクトは、バキュロウイルス発現系又は哺乳動物発現系を使用して発現され、野生型H Aと同じレベルで発現するコンストラクトが同定されている。10

#### 【0073】

修飾M C Sを切断するT E Vプロテアーゼの存在において、前記修飾H Aは、成熟し、H A 1及び融合ペプチドの天然N末端を有するH A 2へと変換される。成熟修飾組換えH Aは、対応する宿主細胞受容体に結合する能力を有し、膜融合する。T E Vプロテアーゼの非存在において、新規の合成された前記修飾H Aは、未切断のH A 0前駆体として残る。融合ペプチドの遊離N末端の欠損は、前記H Aの膜融合を防ぐ。感染した宿主細胞において產生される子孫のH Aタンパク質は、宿主中のT E Vプロテアーゼの欠損のためにH A 0として残り、成熟機能型へとプロセシングされない。新規に作製されたH A 0を有するウイルスは、膜融合の能力を有さず、したがって非感染性である。20

#### 【0074】

##### 抗原部位と成熟切断部位の組合せ

H Aの球状ドメインの抗原部位の変更及びH AのステムドメインのM C Sの変更は、任意の種類の組合せであり得る。特定の異種ペプチドは、異なる改変された成熟切断部位を有するH Aタンパク質の球状頭部ドメインの抗原部位へと導入できる。さらに、2つ以上の異種ペプチドを、異なる抗原部位で単一のH Aタンパク質に導入することができる。一実施形態において、遺伝的に修飾された組換えインフルエンザH Aは、H Aの球状頭部ドメインの抗原部位を置換するM 2 eペプチド及びM C SとしてT E Vプロテアーゼ部位を有する。別の実施形態において、遺伝的に修飾された組換えインフルエンザH 1のH Aは、H Aの球状頭部ドメインの抗原部位を置換するM 2 eペプチド及びH 1の天然のM C Sの代わりにH 5のM C Sを有する。30

#### 【0075】

##### 產生方法

修飾H Aの產生のために、タンパク質は、内在性膜タンパク質ではなく、又は細胞膜若しくは細胞表面に付着せずに、細胞から細胞培地へと可溶型として分泌させる。いくつかの実施形態において、天然のH Aシグナル配列を、昆虫細胞及び哺乳動物細胞における分泌のために使用する。他の実施形態において、天然のH Aシグナル配列を、昆虫細胞における分泌のために昆虫細胞シグナル配列によって、又は哺乳動物細胞における分泌のために哺乳動物シグナル配列によって置換する。H A膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインの代わりに、プロテアーゼ切断部位をH A細胞外ドメインのC末端に配置し、その後にH A三量体の安定化のためのバクテリオファージT 4フィブリチン由来の「f o l d o n」配列、及び精製を促進するためのC末端H i sタグを配置する。組換えH Aタンパク質は、シグナル配列の除去された全長の未切断の前駆体H A 0として、又はH A 2のN末端に野生型融合ペプチドを有するH A 1及びH A 2サブユニットを含有する成熟型としてのいずれかで作製される。好ましい実施形態において、最終的に精製された遺伝的に修飾されたH Aは、野生型H Aのように三量体を形成する。40

#### 【0076】

10

20

30

40

50

設計された組換えインフルエンザ H A の遺伝子は新規遺伝子合成によって作製される。遺伝子合成技術は、よく確立されており、広範囲にレビューされている (Kosuri, S 及び Church, G. M.、Nat Methods (2014) 11: 499~507)。10 kb 超の長さの遺伝子は、商業的供給者によって日常的に作製されている。遺伝子合成は、特定の H A 配列を修飾する能力、及び発現宿主又は特定の遺伝的操作の必要性に応じたコドン最適化の機会を提供する。異なるコンストラクト間の H A 断片の交換を促進するために、合成された H A 遺伝子の特定の位置に制限部位を設計する。シグナル配列並びにプロテーゼ部位、f o l d o n 配列、及び C 末端 H i s タグを有する合成された H A 遺伝子は、よく確立されたプロトコールによってバキュロウイルスゲノムへと組み込まれ、修飾 H A タンパク質の発現がバキュロウイルスポリヘドリンプロモーターによって導かれるようにする。他の実施形態において、H A 遺伝子の同じセットは、哺乳動物細胞における発現のための哺乳動物発現ベクターにクローニングされる。

#### 【0077】

いくつかの実施形態において、H A コンストラクトは、バキュロウイルスベクターを使用する昆虫細胞における発現のためにコドン最適化される。他の実施形態において、H A コンストラクトは、これに限定されるものではないが、CHO 細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）及び HEK 293 細胞（ヒト胎児腎臓 293 細胞）を含む哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化される。任意の生物のためのコドン最適化は、DNASTAR, Inc. (3801 Regent Street, Madison, WI 53705 USA) からの Lasergene ソフトウェアパッケージのような市販のソフトウェア、OPTIMIZER（ワールドワイドウェブで genomes.urv.es / OPTIMIZER / に位置する）のようなオンラインウェブサーバーを使用して、又はそれらの独自のアルゴリズムを使用する遺伝子合成サービス供給者によって日常的に実施される。コドン最適化は、G / C 含量、潜在的なスプライス部位及び RNA 不安定化配列要素の排除、並びに安定した RNA 二次構造の回避を考慮する。コドンはまた、Codon Usage Database（ワールドワイドウェブで kazusa.or.jp / codon / に位置する）に基づいて手動で調整される。コドンの縮退のために、遺伝子配列は、コードされるアミノ酸配列を変化させずに変更できる。制限部位は、アミノ酸配列を変化させずにコドンを変更することによって特定の位置に導入される。これらの方法のいずれかを使用して、特定の生物に対するコドン最適化を含むか、又は含まない遺伝子配列は、コンピューターアルゴリズムを使用して、又は手動でタンパク質配列の逆翻訳によって日常的に生成される。

#### 【0078】

他の実施形態は、TEV プロテアーゼ認識部位に変更した MCS を有する遺伝的に修飾された H A 遺伝子から組換え非感染性インフルエンザウイルスを、確立された細胞培養法を使用して作製する方法を含む。ヘルパーウイルスを使用することを含むか、又は含まずに、RNA セグメント又はクローニングされた cDNA を含むプラスミドからのインフルエンザウイルスの產生を可能にする逆遺伝学系が開発されている (Luytjes, W ら、Cell (1989) 59: 1107~1113; Neumann, G ら、PNAS (1999) 96: 9345~9350; Fodor, E ら、J. Virol (1999) 73: 9679~9682; de Wit, E ら、J. Gen Virol (2007) 88: 1281~1287)。感染性インフルエンザウイルスは、インフルエンザ RNA セグメント又はインフルエンザ RNA の cDNA を有するプラスミドによる哺乳動物細胞の一過性トランスフェクションによって作製される。細胞培地より単離されるこれらのウイルスは、ワクチンを作製するための生感染性インフルエンザウイルスを产生するために発育鶏卵に感染させるために使用される。インフルエンザ RNA セグメントのいくつかは、外来遺伝子によって置換される。組換えインフルエンザ A ウィルスは、H A タンパク質を置換するインフルエンザ C ウィルス HEF タンパク質を使用して作製されている (Gao, Q ら、J. Virol (2008) 82: 6419~6426)。これらの実施形態において、修飾 H A の cDNA 又は RNA は、標準的な分子技法及び遺伝子合成によって作

10

20

30

40

50

製される、他の7つのインフルエンザRNA又は他の7つのRNAセグメントのcDNAと共に哺乳動物細胞へと共トランスフェクションされる。確立された方法又は同様の方法を使用して、複数の同一の又は異なるHAタンパク質を単一のビリオンにパッケージすることができる(Uraki, Rら、J. Virol (2013) 87: 7874~7881)。

#### 【0079】

遺伝的に修飾されたHA遺伝子から組換え感染性インフルエンザウイルスを作製する方法は、上述のような確立された細胞培養法を使用する。これらの実施形態において、H5のHAのMCS又はMCSにおける多塩基性配列によって遺伝的に修飾されたHA遺伝子は、上述のような標準的な逆遺伝学系によって作製される、他の7つのインフルエンザRNA又は他の7つのRNAセグメントのcDNAと共に哺乳動物細胞へと共トランスフェクションされる。これらの修飾された成熟切断部位は、インフルエンザの天然宿主又は細胞培養におけるHA成熟の効率を高める(Kong, W-pら、PNAS (2006) 103: 15987~15991)。成熟機能性HAタンパク質は、宿主細胞に結合して宿主細胞膜と融合する能力を有する。

10

#### 【0080】

他の実施形態は、哺乳動物細胞において、昆虫細胞において、及び植物細胞において確立された細胞培養法を使用して遺伝的に修飾されたHA遺伝子から組換えインフルエンザウイルス様粒子(VLP)を作製する方法を含む(Chen, B.Jら、J. Virol (2007) 81: 7111~7123; Smith, G.Eら、Vaccine (2013) 31: 4305~4313; D'Aoust, M.Aら、Plant Biotech (2010) 8: 607~619)。

20

#### 【0081】

他の実施形態は、確立された方法を使用して、遺伝的に修飾されたHA遺伝子からDNAワクチンを作製する方法を含む(Jiang, Yら、Antiviral Res (2007) 75: 234~241; Alexander, Jら、Vaccine (2010) 28: 664~672; Rao, S.Sら、PLoS ONE (2010) 5: e9812)。

30

#### 【0082】

本明細書において開示される発現結果は、H1のHAのMCSは、生じるHAの発現に影響をもたらすことなく修飾できることを示す。H5のHAMCS又は多塩基性MCSを有するコンストラクトは、野生型のH1のHAと同じレベルで発現することを実証している。さらに、HAのMCSは、塩基性残基を全く含まないTEVプロテアーゼ切断部位によって置換される。TEVプロテアーゼ切断部位の位置を変化させることによって、野生型H1のHAと同じレベルで発現する、MCSとしてTEV切断部位を有するコンストラクトが作製されている。

30

#### 【0083】

発現結果は、HA1の球状頭部ドメインにおける抗原部位の多くを、同じHA又は異なるHAのステムドメイン由来の異種ペプチドによって置換できることをさらに示す。コンストラクトのいくつかが野生型HAと同じレベルで発現する一方で、他のコンストラクトははるかに少なく発現する。異種ペプチドの性質及び球状頭部ドメインにおける異種ペプチドの位置が、各々の生じるHAコンストラクトの発現レベルに顕著な影響をもたらす。より多くのコンストラクトを作製して、最も最適な発現コンストラクトを同定するために同じ様式でそれらの発現について試験することができる。

40

#### 【0084】

さらに、組換えHAは、HA球状頭部ドメインのある一定の免疫優性抗原部位のインフルエンザM2タンパク質由来のM2eエピトープによる置換によって作製される。おそらく、他のインフルエンザタンパク質の任意のエピトープが、HA球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位を置換するための置換ペプチドとして役立ち得る。さらに、異種置換ペプチドが、インフルエンザウイルスに関連しない別のタンパク質由来であり得る。置換ペプチ

50

ドの天然の構造的特徴を維持し、かつ宿主免疫系に置換ペプチドを提示することが可能である H A 球状頭部ドメインの特定の抗原部位が、置換ペプチドのために選択できる。

#### 【 0 0 8 5 】

##### バキュロウイルス発現系

約 30 年前のその導入(米国特許第 4 , 745 , 051 号; Summers, M. D 及び Smith, G. E. 、(1987) *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures* . Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 )から、バキュロウイルス発現ベクター系(BEVS)は、細胞内タンパク質、膜タンパク質、及び分泌タンパク質を含む、多くの異なる型のヒト及びウイルスタンパク質の発現に使用されている。BEVS はウイルス様粒子(VLP)を産生するのに使用されている。BEVS は、真核生物発現系であり、哺乳動物細胞に類似したタンパク質の翻訳後修飾を提供する昆虫細胞を宿主として使用する(The Baculoviruses の Jarvis, D. L. 、「Baculovirus Expression Vectors」、Miller, L. K 編(1997) 389 ~ 420 ページ Plenum Press, New York)。Autographa californica 核多角体病ウイルス(ACNPV)に基づく BEVS はよく確立されている。組換えバキュロウイルスを産生するための多くの市販のキットが入手可能である。BEVS は、米国において流通する組換えワクチンを産生するために成功裏に使用されている。2つの FDA に承認されたワクチン、子宮頸がんに対する非感染性ウイルス様粒子(VLP)の形態の組換えヒトパピローマウイルス二価(タイプ 16 及び 18)ワクチンである Cervarix (商標)(特許出願 WO 2010 / 012780 A1)、並びにインフルエンザに対する、膜結合ヘマグルチニン前駆体(HA0)から作製される三価インフルエンザワクチンである Flublok (登録商標)(米国特許第 5 , 762 , 939 (A) 号及び米国特許第 5 , 858 , 368 (A) 号)が BEVS を使用して産生されている。

#### 【 0 0 8 6 】

BEVS を使用して標的タンパク質を発現するために、標的タンパク質をコードする目的の遺伝子を、バキュロウイルスピリヘドリン遺伝子に隣接するバキュロウイルス配列を含有する大腸菌プラスミドであるトランスファーベクターへと最初にサブクローニングする。ポリヘドリンは、細胞培養におけるバキュロウイルス増殖に必要ではない、野生型バキュロウイルスにおいて豊富なウイルスタンパク質である。トランスファーベクターは大腸菌において増殖し、標準的な分子生物学的技法を使用して単離する(Sambrook, J ら、(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor)。目的の遺伝子を有するトランスファーベクターを、大腸菌又は昆虫細胞のいずれかにおいてバキュロウイルスゲノム DNA と組み換えて、組換えバキュロウイルスゲノムを産生する。組換えバキュロウイルスゲノムは、組換えバキュロウイルスの産生及び標的タンパク質の発現を導く。元の方法は、トランスファーベクターのポリヘドリン遺伝子に隣接する同じ配列と昆虫細胞におけるウイルスゲノム DNA との間の相同組換えに依拠する。単離したトランスファーベクター DNA は、バキュロウイルスゲノム DNA と共に昆虫細胞に共トランسفエクションされる。組換えバキュロウイルスは、ポリヘドリンの欠損のために選択される。Clontech からの BacPAK (商標) Baculovirus Expression System 及び Millipore からの BacMagic (商標) System のような現在の市販のキットは、組換えなしに生存可能なウイルスを産生しない直鎖状バキュロウイルスゲノム DNA を使用する。これらのキットは高効率かつ非組換えウイルスの少ない混入での組換えバキュロウイルスの産生を可能にする。ウイルスゲノムに対する組換えもまた、Getaway 組換え反応を使用してインビトロで作製できる(BaculoDirect (商標) Baculovirus Expression System, Life Tech

10

20

30

40

50

n o l o g i e s )。組換えウイルスを作製する別 の方法は、大腸菌における部位特異的転移を介する( B a c - t o - B a c S y s t e m 、 L i f e T e c h n o l o g i e s )。 p F a s t B a c に基づくトランスファーべクターは、大腸菌においてバクミド(バキュロウイルスのゲノムを含有する大きなプラスミド)を作製するトランスポゾンを含有する(米国特許第5,348,886号)。目的の遺伝子のバクミドへの組換えは、昆虫細胞へのバクミドのトランスフェクションの前に、ポリメラーゼ連鎖反応( P C R )によって容易に確認できる。

#### 【 0 0 8 7 】

組換えバキュロウイルスは昆虫細胞培養において増殖する。少量のウイルスを昆虫細胞に感染させるために使用する。数日後、増幅したウイルスを含有する馴化培地をウイルスストックとして採集する。この増幅プロセスは、しばしば、大量のウイルスストックを生成するために数回繰り返される。ウイルスストックは、日常的に、数ヶ月、さらには数年間、冷蔵庫で暗所に保管される。5 ~ 10 %のウシ胎仔血清( F B S )のウイルスストックへの補充は、ウイルスストックを保存するために使用され、保存期間を延ばすと考えられている。ウイルスストックはしばしば、長期間の保管のために-70で凍結される。ウイルスはまた、増幅され、バキュロウイルス感染昆虫細胞( B I I C )として保管されている( W a s i l k o , D . J ら、 P r o t E x p P u r i f ( 2 0 0 9 ) 6 5 : 1 2 2 ~ 1 3 2 )。感染昆虫細胞は、それらが溶解する前に B I I C ストックとして採集され、標準的な細胞凍結手順に従って凍結される。 B I I C ストックは、液体窒素中か、又は、-60 ~ -85 の超低温で長期間保管され、タンパク質発現のために昆虫細胞に感染させるウイルスストックとして使用される。凍結 B I I C ストックは、液体形態のウイルスストックよりもより長い保管期間を提供する。

10

#### 【 0 0 8 8 】

B E V S に一般的に使用される昆虫細胞株は、ツマジロクサヨトウ( S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a )由来の S F 9 及び S F 2 1 細胞、並びにイラクサギンウワバ( T r i c h o p l u s i a n i )由来の H i 5 又は T . n i 細胞である。カイコ( B o m b y x m o r i )、ハチノスツヅリガ( G a l l e r i a m e l l o n e l l a )、及びマイマイガ( L y m a n t r i a d i s p a r )の種由来の他の昆虫細胞もまた使用されている。 S F 9 、 S F 2 1 、及び H i 5 ( 又は T . n i ) 細胞は、無血清培地中の懸濁培養に適応している。これらの細胞株及び培地は、多くの商業的供給源より入手可能である。これらの細胞株の細胞培養は、22 ~ 28 の温度範囲でガスの補充のない周囲大気中の振とうインキュベーター内で1又は2リットルまでの小容量で振とうフラスコ中で日常的に維持される。細胞培養は、攪拌タンクバイオリアクター又は一回使用バイオリアクターでスケールアップされる。バイオリアクター中の大規模昆虫細胞培養のための条件は、よく確立されている( W A V E B i o r e a c t o r S y s t e m s - C e l l c u l t u r e p r o c e d u r e s . G E H e a l t h c a r e )。大規模昆虫細胞培養において細胞密度を増加させるために酸素の補充もまた日常的に使用される。

20

#### 【 0 0 8 9 】

標的タンパク質の発現を最適化するために特定の標的タンパク質の発現のための一連の条件が、ウイルス対細胞比及び感染後採集時間を変動させて異なる細胞株を使用して試験される。 S F 9 、 S F 2 1 、及び H i 5 ( 又は T . n i ) 細胞は、 B E V S タンパク質発現のために使用される最も一般的な細胞株である。標的タンパク質は、細胞株の1つにおいて他においてよりもよく発現する可能性がある。いくつかの報告は、 H i 5 ( 又は T . n i ) 細胞が、ある分泌タンパク質のより多い発現をもたらすことを示す。感染多重度( M O I )として一般的に知られるウイルス対細胞比は、標的タンパク質発現のための最良の感染条件を決定するために試験される。培養サンプルは、感染後の様々な時点において採取される。細胞と馴化培地とは、遠心分離又はろ過によって分離される。タンパク質発現レベルは、標準的な方法によって決定される。培養は、細胞密度、細胞生存率、及び細胞サイズについてモニターされ、これらは、細胞増殖及び培養状態についての情報を提供する。グルコースレベル、溶存酸素、及び培養物の pH は、培地中の栄養素の消費に

30

40

50

関してしばしばモニターされる。最良の標的タンパク質発現を導く条件は、タンパク質の大規模産生のために選択される。

#### 【0090】

ウイルスストックの力価及びM O I の決定はウイルス増幅及びB E V S を使用するタンパク質発現のための感染条件を決定するために広く使用されるが、上述のT I P S 法は、ウイルス増幅及びタンパク質発現のための最良の感染条件を決定するより迅速な方法を提供する。昆虫細胞は組換えバキュロウイルスによる感染後にサイズを増大する。細胞分裂もまた感染後停止する。組換えバキュロウイルスは感染後約48時間で細胞溶解を引き起こす。細胞分裂は、培養の細胞密度として細胞を計数することによりモニターされる。細胞溶解は、培養中の生細胞及び死細胞を計数することによる細胞生存率としてモニターされる。生存可能な細胞のサイズは細胞直径として測定される。細胞密度、細胞生存率、及び生存可能な細胞のサイズは、多数のモデルの細胞計数装置によって日常的に測定される。細胞密度及び細胞生存率はまた、血球計算板を使用して手動で測定できる。まとめると、細胞密度、細胞生存率、及び生存可能な細胞のサイズは、感染動態に関する情報を提供する。T I P S 法は、特定のウイルスストックを使用する特定の標的タンパク質の発現のための最適な条件を決定するために感染動態を使用する。それは、M O I 計算のためのウイルス力価の時間のかかる測定を排除する。一定したウイルス増幅及びタンパク質発現は、T I P S 法を使用して日常的に達成される。

10

#### 【0091】

昆虫細胞に加えて、組換えバキュロウイルスを感染した生昆虫が、多くの分泌タンパク質及び膜タンパク質を発現するのに使用されている。成熟H A は、タバコスズメガ(He liothis virescens)の幼虫において発現されている(Kuroda, Kら、J. Virol. (1989) 63: 1677~1685)。

20

#### 【0092】

カイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)のような他の型のバキュロウイルスに基づく発現系もまた開発されている。BmNPVは、より狭い宿主範囲を有し、野外で害虫として増殖することはない点でAcNPVより良好な生物学的安全性プロファイルを有し得る。BmNPVに基づくバキュロウイルス発現系は、細胞培養及びカイコの幼虫において機能性タンパク質を発現するのに使用されている(Maeda, Sら、Nature (1985) 315: 592~594)。

30

#### 【0093】

B E V S は、タンパク質複合体及びV L P を産生するために日常的に使用されている。複数のタンパク質の発現のために2つ以上の遺伝子が単一のベクターにクローニングされる。各々が単一のタンパク質の発現を導く2つ以上のウイルスストックが、タンパク質複合体又はV L P を産生するために昆虫細胞を共感染するのに使用される。インフルエンザV L P は、バキュロウイルス発現系を使用して作製されている(Bright, R. Aら、P L o S ONE (2008) 3: e1501)。

#### 【0094】

##### バキュロウイルス発現のためのH A トランスファーベクター

B E V S を使用して発現される遺伝子は一般的に、バキュロウイルス誘導昆虫細胞死の前にタンパク質発現を導くバキュロウイルスの強力な後期のプロモーターであるポリヘドリンプロモーターの制御下にある。他の初期又は後期プロモーターもまたタンパク質発現のために使用される。細胞培地に組換え標的タンパク質を昆虫細胞によって分泌させるために、シグナルペプチドをコードするD N A セグメントが目的の遺伝子の5'末端にインフレームで操作される。2つの昆虫細胞で一般的に使用されるシグナルペプチドは、ミツバチメリチンシグナル配列、又はAcNPVエンベロープ表面糖タンパク質G P 67シグナル配列である。Signal Sequence Database(ワールドワイドウェブでsignal peptide.de/index.phpに位置する)は、多くの他の考慮し得るシグナルペプチドを列挙する。分泌後、シグナルペプチドはシグナルペプチドをプロセシングする細胞プロテアーゼによって除去される。インフルエンザウイルスは

40

50

昆虫ウイルスではないが、HAシグナルペプチドは、BEVSにおいて、組換えタンパク質の分泌又は膜挿入のための分泌シグナルペプチドとして使用されている。MKTIIA L S Y I F C L V F AのHAシグナルペプチドは、昆虫細胞における組換え膜貫通Gプロテイン共役受容体(GPCR)の発現に一般的に使用される(Rosenbaum, D. Mら、Science(2007)318:1266~1273; Zou, Yら、PLoS One(2012)7:e46039)。HAは、その天然のシグナルペプチドを使用して昆虫細胞で発現されている。その特定の場合において、全発現は昆虫細胞シグナルペプチドを使用するものよりも低いが、発現したHAは、HA1及びHA2を含有する成熟型であった(米国特許第5,858,368(A)号)。HAシグナルペプチドは、HA間で保存されていない。例えば、上述のHAシグナルペプチドは、配列番号7のH1のHAシグナルペプチドとは異なる。HAシグナルペプチドの実験に基づく選択は、昆虫細胞におけるHA発現を改善する可能性がある。

#### 【0095】

Bac-to-Bacシステム又はGatewayシステム(Life Technologies)を使用して相同組換えを介して組換えバキュロウイルスを作製するための市販のベクターは入手可能である。プロモーター及びシグナル配列のようなこれらのトランスマーカーの特徴は、標準的な分子生物学的技法によってカスタマイズすることができる。現在では、トランスマーカー全体を遺伝子合成によって完全に合成することができる。遺伝子合成は、特定の配列及び特徴を有するトランスマーカーの設計を可能にする。

#### 【0096】

BEVSを使用してインフルエンザHAを発現する方法は、実験室規模においてよく確立されている(Stevens, Jら、Science(2004)303:1866~1870)。例えば、トランスマーカーは、ポリヘドリンプロモーターの制御下に1918年インフルエンザウイルス由来のHAを含有する。1918年インフルエンザウイルスHA発現コンストラクトは、分泌のために、N末端のHAシグナルペプチドの代わりにGP67シグナルペプチドを有する。膜貫通ドメインの代わりに、トロンビン切断部位をHA細胞外ドメインのC末端に導入し、その後にHA三量体の安定化のためのバクテリオファージT4フィブリチン由来の「foldon」配列、及び精製を促進するためのC末端Hisタグを導入する。foldon配列及びHisタグは、トロンビン切断によって除去できる。HA発現トランスマーカーの同様の設計が、インフルエンザの多くの系統に由来する異なるHAを発現するのに使用されている(Stevens, Jら、Science(2006)312:404~410; Xu, Rら、Science(2010)328:357~360; Whittle, J.R.Rら、PNAS(2011)108:14216~14221)。

#### 【0097】

foldonに加えて、他の三量体化ドメインを組換えHAの三量体を安定化させるのに使用できる。例えば、熱安定性HIV-1糖タンパク質41(gp41)三量体化ドメイン、又はGCN4ロイシンジッパー配列の31残基の最初の16残基が、短縮HAコンストラクトの三量体化を助けるのに使用される(Impagliazzo, Aら、Science(2015)349:1301~1306; Yassing, H.Mら、Nat Med(2015)21:1065~1070)。

#### 【0098】

米国特許第5,762,939(A)号、米国特許第5,858,368(A)号、及び米国特許第6,245,532(B1)号に開示されるように、膜貫通ドメイン及び細胞内部ドメインを有するインフルエンザAとインフルエンザBとの両方のウイルス由来の組換えHA前駆体(HA0)が、商業的規模においてBEVSを使用して作製されている。これらの組換えHAタンパク質は、インフルエンザワクチンとしてFDAの承認を取得しているFlublok(登録商標)における成分である。Flublok(登録商標)中のHA0は、HAシグナルペプチドを置換するバキュロウイルスキチナーゼシグナルペ

チド(61Kシグナルペプチドと呼ばれる)を使用して作製されている。組換えHAは、昆虫細胞の膜周縁に会合する。それは、界面活性剤を使用して膜より抽出され、さらに精製される。

#### 【0099】

##### 哺乳動物発現

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞及びヒト胎児腎臓293(HEK293)細胞が、組換えタンパク質の一過性トランスフェクション遺伝子発現のために一般的に使用される哺乳動物細胞宿主である。CHO細胞とHEK293細胞の両方は、懸濁細胞株及び接着細胞株を有する。これらの細胞は、FBSを含むか又は含まない培地において日常的に培養される。FBSを含まずに細胞を培養するとき、既知組成培地がしばしば使用される。全ての懸濁及び接着細胞株をHA又は他の分泌タンパク質を発現するのに使用できる。

10

#### 【0100】

一過性トランスフェクションは、タンパク質発現のためにDNAを細胞に導入するためのよく確立された方法である。多くの市販のトランスフェクション試薬が入手可能である。バキュロウイルス発現のための発現最適化プロセスと同様に、標準的な方法を使用するタンパク質発現の解析のために、トランスフェクション後に培地サンプルを定期的に採取する。HAタンパク質は、HAコンストラクト中のHisタグ、又は多くが市販される抗HA抗体を使用するウェスタンプロットを介して、親和性捕捉によって容易に検出できる。タンパク質発現は通常、トランスフェクション後約48時間で開始し、トランスフェクション後数日にわたって増加し得る。標的タンパク質の発現を増加するために、トランスフェクション後にサプリメントをしばしば添加する。アフリカミドリザル腎組織由来の線維芽細胞様細胞株であるCOS-1のような他の哺乳動物細胞株もまたHA発現に使用されている。インフルエンザVLPは、10個のインフルエンザウイルスがコードするタンパク質の全てのcDNAを含有する複数のプラスミドの共トランスフェクションによって產生されている(Mena, Iら、J. Virol (1996) 70: 5016~5024; Chen, B. Jら、J. Virol (2007) 81: 7111~7123)。

20

#### 【0101】

哺乳動物細胞に遺伝子を送達する別の方法は、哺乳動物細胞へのバキュロウイルス遺伝子トランスファーのためのBacMamとして知られる組換えバキュロウイルスを使用する(Boyce, F. M及びBucher, N. L.、PNAS (1996) 93: 2348~2352; Dukkipati, Aら、Protein Expr Purif (2008) 62: 160~170)。バキュロウイルスは、哺乳動物細胞におけるトランジーン発現のためのバキュロウイルス発現ベクターに哺乳動物発現力セットを組み込むことによって修飾されている。組換えBacMamバキュロウイルスは、バキュロウイルス産生のための標準的な方法によって生成される。増幅した組換えBacMamバキュロウイルスウイルスストックは、タンパク質発現のためのCHO又はHEK293細胞に哺乳動物発現力セットの送達のために、CHO又はHEK293培養へと添加される。BacMamプラットフォームは、大量の哺乳動物細胞の形質導入を容易にする。

30

#### 【0102】

哺乳動物細胞にトランスフェクトされた遺伝子発現ベクターは、標的タンパク質の発現のための安定細胞株を確立するために細胞染色体に組み込むことができる。安定なCHO細胞株は、モノクローナル抗体のような治療用生物製剤の产生のための最も一般的な宿主である。この技術は、治療用タンパク質及びワクチンの大規模产生によく適している。安定細胞株の確立のために、発現ベクターをトランスフェクションした細胞は、発現ベクター上の選択マーカーに基づいた選択に供される。標的遺伝子の複数のコピーがしばしば、安定細胞株のゲノムに組み込まれる。

40

#### 【0103】

##### 哺乳動物発現のためのHAベクター

哺乳動物発現のためのHA発現コンストラクトは、バキュロウイルス発現のもの

50

と同じ設計及びアミノ酸配列を有する。コドンは C H O 細胞発現又は H E K 2 9 3 細胞発現のために最適化される。バキュロウイルスコドンはまた、哺乳動物細胞においてよく機能し、逆もまた真である。H A シグナルペプチドは、哺乳動物発現系において組換えタンパク質の分泌又は膜挿入のためのシグナルペプチドとして使用されている。他の一般的に使用される哺乳動物シグナルペプチドは、ヒト I L 2 シグナルペプチド、組織プラスミノーゲン活性化因子( t P A )シグナルペプチド、及び Signal Sequence Database (ワールドワイドウェブで signal peptide . de / index . php に位置する)に見られる他の多くのシグナルペプチドを含む。多くの哺乳動物発現ベクターが市販される。各々のベクターは通常、高レベル発現のためのエンハンサー・プロモーター、m R N A 安定性のためのポリアデニル化シグナル及び転写終結配列、エピソーム複製のための S V 4 0 起点、選択及び大腸菌における維持のための抗生剤耐性遺伝子及び p U C 起点を有する。哺乳動物発現において一般的に使用されるプロモーターは、C M V (サイトメガロウイルス)プロモーター、h E F 1 - H T L V プロモーター、伸長因子-1 (E F - 1) コアプロモーター、並びにヒトT細胞白血病ウイルス (H T L V ) 1型の長い末端反復の R セグメント及び U 5 配列の一部 (R - U 5') 、又は M P r o m D b (ワールドワイドウェブで promodb . wistar . upenn . edu / に位置する Mammalian Promoter Database )、又は E u k a r y o t i c Promoter Database (ワールドワイドウェブで epd . vital - i t . ch / に位置する E P D ) に見られる他のプロモーターを含む複合プロモーターを含む。トランスファーベクターはしばしば、安定な細胞株を生成するために別の選択マーカーを有する。

#### 【 0 1 0 4 】

以下、本発明の実施形態を示す。

( 1 ) インフルエンザ A 又は B の修飾ヘマグルチニン ( H A ) タンパク質であって、前記 H A タンパク質の免疫優性領域が、保存された代替インフルエンザエピトープを、前記領域への挿入により含有するか、又は前記領域を前記インフルエンザの保存された代替エピトープで置換することにより含有する、修飾ヘマグルチニン ( H A ) タンパク質。

( 2 ) 生ウイルス若しくは弱毒ウイルス中に、又はウイルス様粒子 ( V L P ) 中に含有される、( 1 ) に記載の修飾 H A タンパク質。

( 3 ) 生ウイルス中に含有され、動物のプロテアーゼによって切断されない修飾された成熟切断部位 ( M C S ) をさらに含む、( 2 ) に記載の修飾 H A タンパク質。

( 4 ) 前記修飾された M C S が、適切なプロテアーゼによって切断されている、( 3 ) に記載の修飾 H A タンパク質。

( 5 ) 前記インフルエンザの代替エピトープが、インフルエンザ H A タンパク質のステムドメイン由来のエピトープであるか、又は M 2 インフルエンザタンパク質のエピトープである、( 1 ) ~ ( 4 ) のいずれかに記載の修飾 H A タンパク質。

( 6 ) 前記 H A タンパク質の 1 つ以上の免疫優性領域が、代替インフルエンザエピトープを含有するように修飾されている、( 1 ) ~ ( 4 ) のいずれかに記載の修飾 H A タンパク質。

( 7 ) 前記 1 つ以上の免疫優性領域の各々に含有される前記代替インフルエンザエピトープの少なくとも一部が互いに異なる、( 6 ) に記載の修飾 H A タンパク質。

( 8 ) ( 1 ) ~ ( 4 ) のいずれかに記載の修飾 H A タンパク質を含むインフルワクチン。

( 9 ) 動物のプロテアーゼによって切断されない M C S を含有するように修飾されているインフルエンザ H A タンパク質を含む修飾インフルエンザウイルス。

( 1 0 ) 前記 M C S が、適切なプロテアーゼによって切断されている、( 9 ) に記載の修飾インフルエンザウイルス。

( 1 1 ) 前記 H A タンパク質が、少なくとも 1 つの免疫優性領域中に異種免疫原エピトープをさらに含有する、( 9 ) に記載の修飾インフルエンザウイルス。

( 1 2 ) 前記異種免疫原エピトープが、腫瘍関連抗原のものであるか、又はインフルエンザ以外のウイルスのエピトープ若しくは代替インフルエンザエピトープである、( 1 1 )

10

20

30

40

50

に記載の修飾インフルエンザウイルス。

(13) 前記H Aタンパク質の1つ以上の免疫優性領域が、異種エピトープを含有するように修飾されている、(11)に記載の修飾インフルエンザウイルス。

(14) 前記1つ以上の免疫優性領域の各々に含有される前記異種エピトープの少なくとも一部が互いに異なる、(13)に記載の修飾インフルエンザウイルス。

(15) 動物のプロテアーゼによって切断されないM C Sを含有し、かつ、少なくとも1つの免疫優性領域に挿入されているか、又は当該領域を置換する異種免疫原エピトープをさらに含有するように修飾されている、修飾H Aタンパク質。

(16) 前記M C Sが適切なプロテアーゼによって切断されており、かつ/又は前記異種免疫原エピトープが、腫瘍関連抗原のものであるか、又はインフルエンザ以外のウイルスのエピトープ若しくは代替インフルエンザエピトープである、(15)に記載の修飾H Aタンパク質。

(17) インフルに対する抗体を生成する方法であって、非ヒト対象に(8)に記載のインフルワクチンを投与することを含む方法。

(18) 前記ワクチンを対象に投与することを含む、対象をインフルに対して防御する方法において使用するための、(8)に記載のインフルワクチン。

(19) 所望の抗原に対する抗体を生成する方法であって、(9)～(14)のいずれかに記載の修飾インフルエンザウイルスを対象に投与することを含む方法。

(20) インフルエンザH Aタンパク質の少なくとも有効部分をコードする核酸であって、インフルエンザタンパク質の代替エピトープをコードするヌクレオチド配列が、前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードするヌクレオチド配列に挿入されているか、又は前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードするヌクレオチド配列を置換している、核酸。

(21) 前記M C Sをコードするヌクレオチド配列が、動物のプロテアーゼによって切断されないM C Sをコードするように修飾されている、(20)に記載の核酸。

(22) 前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードする1つ以上の領域が、代替インフルエンザエピトープをコードするヌクレオチド配列を含有するように修飾されている、(20)に記載の核酸。

(23) 前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードする1つ以上の領域が、代替インフルエンザエピトープをコードするヌクレオチド配列を含有するように修飾されている、(21)に記載の核酸。

(24) インフルエンザH Aタンパク質の少なくとも有効部分をコードする核酸であって、M C Sをコードするヌクレオチド配列が、動物のプロテアーゼによって切断されないM C Sをコードするように修飾されている、核酸。

(25) 異種エピトープをコードするヌクレオチド配列が、前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードするヌクレオチド配列に挿入されているか、又は前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードするヌクレオチド配列を置換している、(24)に記載の核酸。

(26) 前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードする1つ以上の領域が、異種エピトープをコードするヌクレオチド配列を含有するように修飾されている、(25)に記載の核酸。

(27) (20)～(26)のいずれかに記載のヌクレオチド配列をコードし、組換え宿主細胞において発現する核酸。

(28) (27)に記載の核酸を含有する組換え宿主細胞。

(29) (1)に記載の修飾H Aタンパク質を調製する方法であって、インフルエンザタンパク質の代替エピトープをコードするヌクレオチド配列が前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードするヌクレオチド配列に挿入されているか又は前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードするヌクレオチド配列を置換している、インフルエンザH Aタンパク質の少なくとも有効部分をコードする核酸を含む組換え宿主細胞を、前記核酸が発現する条件下で培養することと、修飾H Aタンパク質を回収することとを含む方法。

(30) (3)に記載の修飾H Aタンパク質を調製する方法であって、インフルエンザタンパク質の代替エピトープをコードするヌクレオチド配列が前記H Aタンパク質の免疫優

10

20

30

40

50

性領域をコードするヌクレオチド配列に挿入されているか又は前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードするヌクレオチド配列を置換しており、かつ、前記M C Sをコードするヌクレオチド配列が動物のプロテアーゼによって切断されないM C Sをコードするように修飾されている、インフルエンザH Aタンパク質の少なくとも有効部分をコードする核酸を含む組換え宿主細胞を、前記核酸が発現する条件下で培養することと、修飾H Aタンパク質を回収することとを含む方法。

(31)(9)に記載の修飾インフルエンザウイルスを調製する方法であって、前記M C Sをコードするヌクレオチド配列が動物のプロテアーゼによって切断されないM C Sをコードするように修飾されている、インフルエンザH Aタンパク質の少なくとも有効部分をコードする核酸を含む組換え宿主細胞を、前記核酸が発現する条件下で培養することと、修飾インフルエンザウイルスを回収することとを含む方法。

10

(32)(11)に記載の修飾インフルエンザウイルスを調製する方法であって、前記M C Sをコードするヌクレオチド配列が動物のプロテアーゼによって切断されないM C Sをコードするように修飾され、かつ、前記H Aタンパク質の免疫優性領域をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列が異種エピトープをコードするヌクレオチド配列を含有するように修飾されている、インフルエンザH Aタンパク質の少なくとも有効部分をコードする核酸を含む組換え宿主細胞を、前記核酸が発現する条件下で培養することと、修飾インフルエンザウイルスを回収することとを含む方法。

(33)インフルエンザに対する抗体を生成する方法であって、非ヒト対象に(20)～(27)のいずれかに記載の核酸を投与することとを含む方法。

20

(34)前記核酸を対象に投与することとを含む、対象をインフルエンザに対して防御する方法において使用するための、(20)～(27)のいずれかに記載の核酸。

(35)所望の抗原に対する抗体を生成する方法であって、(20)～(27)のいずれかに記載の核酸を対象に投与することとを含む方法。

次の実施例は、これに限定されるものではないが、本発明を例示するために提供される。

#### 【実施例1】

#### 【0105】

##### 組換えバキュロウイルス産生のためのH 1のH Aのトランスマーカーの構築

この実施例において、本発明の修飾H Aタンパク質を調製するために修飾することができる親プラスミドが記載される。このプラスミドの基本的な概要是図4に示し、そこでは、バキュロウイルスにおける発現のための標準的なプラスミドへの挿入は、そのような挿入のための制限部位によって囲まれ、H Aタンパク質のM C Sの置換及びH Aの球状頭部ドメインの免疫優性領域の置換を可能にする制限部位が存在する。コードされたタンパク質は、精製後に挿入されたプロテアーゼ切断部位のおかげで除去することのできる、精製のための10個のヒスチジンの親和性タグ(10×Hisタグ)に融合する。このベクターはH 1 WTと呼ばれる。

30

#### 【0106】

2009年インフルエンザワクチンとしてWHOによって推奨される(ワールドワイドウェブでwho.int/csr/resources/publications/swineflu/vaccine\_recommendations/en/において述べられるように)ブタ起源インフルエンザAウイルスH 1 N 1系統であるA / カリフォルニア / 07 / 2009のH A配列(配列番号1)を、異種ペプチドを組み込むための親配列として使用した。このH A配列はUniProt:C3W5X2の受託番号を有する。全てのコンストラクトは、図4に概略的に例示されるものと同じ設計を有する。N末端H Aシグナルペプチド(配列番号7)は、GP67シグナルペプチドMVSAIVLYVLLAAAAHSAFA(配列番号2)によって置換される。Stevens, Jら、Science(2006)312:404～410によって最初に記載されたH Aコンストラクトに基づいて、ILAIFYSTVASSLVLVVSLGAIISFWMCSの配列を有するC末端膜貫通(TM)ドメイン、及びH AのNGSLQCRICの配列を有する細胞内ドメインが、TEV切断部位(配列番号4)、後に続くfoldon(配列番

40

50

号 5 )、及び  $10 \times$  His タグ(配列番号 6)によって置換され、つまり、GAENLY  
FQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVL LSTFLGHHHHHHHH  
HHH(配列番号 3)となった。foldonは、組換え HA を安定化し、一方で  $10 \times$   
His タグは、細胞培地からの HA の精製を促進する。foldon 及び  $10 \times$  His タグは、  
HA 配列と foldon 配列との間に位置する TEV 切断部位を認識する TEV プロテアーゼ  
によって除去できる。遺伝子は、バキュロウイルス発現のためにコドン最適化  
され、標準的な方法によって合成された(GENEWIZ, South Plainfield,  
NJ 07080, USA)。

#### 【0107】

図 4 に概略的に示されるように、間隔を空けた特有の制限部位、Cla I 部位、Nsi I 部位、及び Bam H I 部位が、配列変更及びスワッピングを促進するために HA 配列に導入された。生じるコンストラクト、「H1WT」と表される GP67 - H1WT - TEV - foldon - 10His(配列番号 9)は、Nco I 部位と Hind III 部位の間で pFastBac プラスミドにサブクローニングされた。Cla I と Nsi I との部位の間の配列は、球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位の大部分をコードする。Nsi I と Bam H I との部位の間の配列は MCS をコードする。H1WT コンストラクトの発現は、バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターの制御下にある。生じるプラスミドは、A / カリフォルニア / 07 / 2009 の組換え野生型 HA の発現のためのトランスファーベクターである。H1WT コンストラクトは、そこから遺伝的に修飾された HA コンストラクトが作製される親コンストラクトである。

10

#### 【0108】

異種ペプチドを有する遺伝的に修飾された HA を作製するために、H1WT の野生型断片を、上述の制限部位を使用して HA に対する特定の変更をコードする合成 DNA 断片と置換した。MCS を修飾するために、H1WT の Nsi I - Bam H I 断片を、改変された成熟切断部位をコードする DNA 断片によって置換した。HA1 球状頭部ドメインの抗原部位を変更するために、H1WT の Cla I - Nsi I 断片を、異種ペプチドを有する改変抗原部位をコードする DNA 断片によって置換した。成熟切断部位と抗原部位の異なる組合せを有するコンストラクトが、異なるプラスミドの制限断片の単純な交換によって作製された。生じるコンストラクトは DNA シークエンシングによって確認した。

20

#### 【実施例 2】

30

#### 【0109】

修飾された成熟切断部位を有する H1 の HA コンストラクトの設計及び構築

この実施例において、MCS を囲む Nsi I と Bam H I との制限部位の間の H1WT のセグメントが、この MCS を修飾する代替配列によって置換される。いくつかの例において、TEV 切断部位が修飾された MCS に含まれる。

#### 【0110】

修飾された成熟切断部位は、実施例 1 に記載される H1 の HA のトランスファーベクターへと導入された。修飾された成熟切断部位を有するコンストラクトは表 1 に列挙する。

#### 【0111】

40

50

## 【表1】

表1 改変された成熟切断部位を有するH1のHAコンストラクトのリスト

リスト番号	コンストラクト名	コンストラクトの記載	配列番号
	H1MCS <sup>a</sup>	GP67ss-H1MCS-TEV-foldon-10His <sup>b</sup>	
1	H1WT <sup>c</sup>	GP67ss-H1WT-TEV-foldon-10His	配列番号 9
2	H1H5cs	GP67ss-H1H5cs-TEV-foldon-10His	配列番号 11
3	H1R5cs	GP67ss-H1R5cs-TEV-foldon-10His	配列番号 14
4	H1IR5cs	GP67ss-H1IR5cs-TEV-foldon-10His	配列番号 16
5	H1TEV1	GP67ss-H1TEV1-TEV-foldon-10His	配列番号 18
6	H1TEV2	GP67ss-H1TEV2-TEV-foldon-10His	配列番号 20
7	H1TEV3	GP67ss-H1TEV3-TEV-foldon-10His	配列番号 22

<sup>a</sup> コンストラクト名は成熟切断部位に基づく。H1はH1のHAを表す。MCSは成熟切断部位を表す。

<sup>b</sup> コンストラクトはそれらの配列特徴によって記載される。GP67ssはGP67シグナル配列を表す。TEV-foldon-10Hisは、TEV切断部位、foldon配列、及びコンストラクトのC末端の10×Hisタグの配列を表す。コンストラクトの概略図は図4に示す。

<sup>c</sup> H1WTは、天然のMCSを有する野生型H1のHAコンストラクトである。

## 【0112】

これらの修飾の位置は図5に例示する。

## 【0113】

コンストラクトH1H5cs(配列番号11)は、野生型のH1のHAのMCS(配列番号9)をH5のMCS(配列番号12)によって置換させる。コンストラクトH1R5cs(配列番号14)は、野生型のH1のMCSを5個のアルギニンによって置換させる。コンストラクトH1IR5cs(配列番号16)は、全ての天然のHA1残基を維持しつつHA1とHA2との配列の間に挿入された4個のアルギニンを有する。変更を有するNsiI-BamHI断片が合成され、野生型断片を置換するためにH1WTのNsiIとBamHIとの部位の間にサブクローニングされた。

## 【0114】

H1のHAのMCSが塩基性残基を全く含有しないTEV切断部位へと修飾できるかどうかを試験するために、H1のHAのMCSにおける残基の数を変更していくつかのコンストラクトが作製された。コンストラクトH1TEV1(配列番号18)は、H1のHAのMCSにおける7残基PSIQSRGを、ENLYFQGの7残基のTEV切断部位(配列番号4)によって置換させる。コンストラクトH1TEV2(配列番号20)は、H1のHAのMCSにおける8残基IPSIQSRGを、TEV切断部位を含有させるSPENLYFQGによって置換させる。コンストラクトH1TEV3(配列番号22)は、H1のHAのMCSにおける最後の3残基(QSR)を、TEV切断部位によって置換させる。

## 【実施例3】

## 【0115】

球状頭部ドメインに異種エピトープを有するH1のHAコンストラクトの設計及び構築この実施例において、基本プラスミド及び修飾MCSを有するプラスミドは、ClaIとNsiIとの部位の間で様々な免疫優性部位が異種エピトープと置換された代替スクレ

10

20

30

40

50

オチド配列によって修飾された。

【0116】

異種エピトープは実施例1及び実施例2に記載されるコンストラクトに導入された。異種エピトープは、HA球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位近辺に挿入されるか、又はHA球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位を置換した。修飾抗原部位を有するコンストラクトは表2に列挙する。

【0117】

【表2】

表2 球状頭部ドメインの修飾免疫優性抗原部位を有するH1のHAコンストラクトのリスト

リスト番号	コンストラクト名	コンストラクトの記載	配列番号
	H1MCS-AS <sup>a</sup>	GP67ss-H1MCS - AS - TEV-foldon-10His <sup>b</sup>	
8	H1H5cs-CR8020Ca	GP67ss-H1H5cs-CR8020Ca-TEV-foldon-10His	配列番号 24
9	H1TEV2-CR8020Ca	GP67ss-H1TEV2-CR8020Ca-TEV-foldon-10His	配列番号 29
10	H1TEV2-CR8020Sa3	GP67ss-H1TEV2-CR8020Sa3-TEV-foldon-10His	配列番号 31
11	H1TEV2-CR8020Sa4	GP67ss-H1TEV2-CR8020Sa4-TEV-foldon-10His	配列番号 33
12	H1TEV2-I1C9Ca1	GP67ss-H1TEV2-I1C9Ca1-TEV-foldon-10His	配列番号 35
13	H1TEV2-I1C9Ca2	GP67ss-H1TEV2-I1C9Ca2-TEV-foldon-10His	配列番号 38
14	H1TEV2-I1C9Sa3	GP67ss-H1TEV2-I1C9Sa3-TEV-foldon-10His	配列番号 40
15	H1TEV2-I1C9Sa4	GP67ss-H1TEV2-I1C9Sa4-TEV-foldon-10His	配列番号 42
16	H1H5cs-I1C9Sb	GP67ss-H1H5cs-I1C9Sb-TEV-foldon-10His	配列番号 44
17	H1H5cs-I1C9Ca	GP67ss-H1H5cs-I1C9Ca-TEV-foldon-10His	配列番号 46
18	H1H5cs-FI6Sab	GP67ss-H1H5cs-FI6Sab-TEV-foldon-10His	配列番号 48
19	H1WT-FI6Sab	GP67ss-H1WT-FI6Sab-TEV-foldon-10His	配列番号 52
20	H1TEV1-FI6Sa	GP67ss-H1TEV1-FI6Sa-TEV-foldon-10His	配列番号 54
21	H1H5cs-M2eCa	GP67ss-H1H5cs-M2eCa2-TEV-foldon-10His	配列番号 56
22	H1H5cs-M2eSb	GP67ss-H1H5cs-M2eSb-TEV-foldon-10His	配列番号 59
23	H1TEV2-M2eCa	GP67ss-H1TEV2-M2eCa2-TEV-foldon-10His	配列番号 61

<sup>a</sup> コンストラクト名は成熟切断部位及び抗原部位修飾に基づく。H1はH1のHAを表す。MCSは成熟切断部位を表す。ASは、異種エピトープを有するH1のHAの球状頭部ドメインの改変免疫優性抗原部位を表す。各々のASは、異種エピトープ及び異種エピトープが配置されるH1のHA免疫優性抗原部位とによって示される。

<sup>b</sup> コンストラクトはそれらの配列特徴によって記載される。GP67ssはGP67シグナル配列を表す。TEV-foldon-10Hisは、TEV切断部位、foldon配列、及びコンストラクトのC末端の10×Hisタグを表す。コンストラクトの概略図は図4に示す。

【0118】

これらの修飾の位置は図5に例示する。

【0119】

13 アミノ酸残基の複合 C R 8 0 2 0 エピトープペプチドは、抗原部位 C a 2 近辺の 1 2 残基 E I A I R P K V R D Q E の表面ループを置換した。複合 C R 8 0 2 0 エピトープペプチド置換を有する C l a I - N s i I 断片が合成され、H 1 H 5 c s の C l a I と N s i I との部位の間にサブクローニングされ、H 1 H 5 c s - C R 8 0 2 0 C a (配列番号 24) と表される H A コンストラクトを生成した。H 1 T E V 2 - C R 8 0 2 0 C a (配列番号 29) を作製するために、H 1 H 5 c s - C R 8 0 2 0 C a の C l a I - N s i I 断片を単離して、H 1 T E V 2 の C l a I と N s i I との部位の間にサブクローニングした。

#### 【 0 1 2 0 】

コンストラクト H 1 T E V 2 - C R 8 0 2 0 S a 3 (配列番号 31) は、球状頭部ドメインの頂部上の H 3 の H A の部位 B ループに対応する、S a 部位の 1 つの残基 K K G N S を置換する複合 C R 8 0 2 0 エピトープペプチドを有する。C R 8 0 2 0 修飾を有する C l a I - N s i I 断片が合成され、H 1 T E V 2 の C l a I と N s i I との部位の間にサブクローニングされ、H 1 T E V 2 - C R 8 0 2 0 S a 3 と表される H A コンストラクトを生成した。

#### 【 0 1 2 1 】

コンストラクト H 1 T E V 2 - C R 8 0 2 0 S a 4 (配列番号 33) は、S a 部位の 1 つの近辺の残基 K T S S のヘリカル構造を置換する複合 C R 8 0 2 0 エピトープペプチドを有する。この位置は、H A 三量体の球状頭部ドメインの側面上にあり、受容体結合部位から離れている。そのような修飾は、受容体結合の変化を起こしにくい。C R 8 0 2 0 修飾を有する C l a I - N s i I 断片が合成され、H 1 T E V 2 の C l a I と N s i I との部位の間にサブクローニングされ、H 1 T E V 2 - C R 8 0 2 0 S a 4 と表される H A コンストラクトを生成した。

#### 【 0 1 2 2 】

コンストラクト C R 8 0 2 0 S a 4 及び C R 8 0 2 0 C a の H A 单量体のモデルを図 6 に示す。各々の H A 单量体は、球状頭部ドメインの複合 C R 8 0 2 0 エピトープペプチド及びステムドメインの天然 C R 8 0 2 0 エピトープを有する。

#### 【 0 1 2 3 】

G I F G A I A G F I E G の I 1 C 9 エピトープペプチド (配列番号 36) を有するいくつかの H A コンストラクトが作製された。1 つのコンストラクト H 1 T E V 2 - I 1 C 9 C a 1 (配列番号 35) は、C a 2 部位近辺の 2 1 7 ~ 2 2 4 の残基の R P K V R D Q E を置換する I 1 C 9 ペプチドを有する。別のコンストラクト H 1 H 5 c s - I 1 C 9 C a (配列番号 46) は、C a 2 の 2 1 3 ~ 2 2 4 の残基のより長いペプチド E I A I R P K V R D Q E を置換する I 1 C 9 ペプチドを有する。他のコンストラクトは、H 3 の H A の部位 A に対応する C a 2 部位 H A G A K S 、S a 部位 K K G N S 、及び S a 部位 K T S S を個別に置換する I 1 C 9 ペプチドを有する。変更を有する C l a I - N s i I 断片の各々が合成され、H 1 T E V 2 の C l a I と N s i I との部位の間にサブクローニングされ、それぞれ H 1 T E V 2 - I 1 C 9 C a 1 (配列番号 35) 、H 1 T E V 2 - I 1 C 9 C a 2 (配列番号 38) 、H 1 T E V 2 - 1 C 9 S a 3 (配列番号 40) 、及び H 1 T E V 2 - I 1 C 9 S a 4 (配列番号 42) と表される H A コンストラクトを生成した。I 1 C 9 C a の変更を有する C l a I - N s i I 断片が合成され、H 1 H 5 c s の C l a I と N s i I との部位の間にサブクローニングされ、H A コンストラクト H 1 H 5 c s - I 1 C 9 C a を生成した。I 1 C 9 ペプチドはまた、同じ方法によって、H 1 H 5 c s - I 1 C 9 S b (配列番号 44) として H 1 H 5 c s コンストラクトの S b 部位の残基 T S A D Q Q S L Y Q N A を置換した。S b 部位は H 3 の H A の部位 B ヘリックスに対応する。

#### 【 0 1 2 4 】

C l a I - N s i I 断片は、S a 部位に配置される F I 6 エピトープペプチド R K K R G L F G A I A G F I E (配列番号 49) 、及び S b 部位に配置されるコイルドコイル F I 6 エピトープペプチド K E S T Q K A I D G V T N K V N S (配列番号 50) によって合成された遺伝子であった。この F I 6 置換を有する C l a I - N s i I 断片は、H 1 H

10

20

30

40

50

5 c s 及び H 1 W T の C l a I と N s i I との部位の間にサブクローニングされ、それコンストラクト H 1 H 5 c s - F I 6 S a b (配列番号 48)、及び H 1 W T - F I 6 S a b (配列番号 52) を生じた。別の C l a I - N s i I 断片は、S a 部位に配置される F I 6 エピトープペプチド R K K R G L F G A I A G F I E (配列番号 49) によって合成された遺伝子であった。この断片は H 1 T E V 1 の C l a I - N s i I 断片を置換して、コンストラクト H 1 T E V 1 - F I 6 S a (配列番号 54) を生成した。

#### 【実施例 4】

##### 【0125】

球状頭部ドメインの抗原部位に M 2 e ペプチドを有する H 1 の H A コンストラクトの設計及び構築

この実施例において、同様に、C l a I - N s i I 断片のヌクレオチド配列が、C a 2 部位又は S b 部位の部分が M 2 e ペプチドをコードするヌクレオチド配列によって置換されたヌクレオチド配列によって置換された。M 2 e ペプチドを有するコンストラクトは表 2 に列挙する。これらの修飾の位置は図 5 に例示する。

##### 【0126】

遺伝子合成は、C a 2 部位の E I A I R P K V R D Q E を置換するか、又は S b 部位の残基 T S A D Q Q S L Y Q N A のヘリックスを置換する、M 2 e ペプチド (配列番号 57) を有する C l a I - N s i I 断片を生成した。M 2 e ペプチドを有する H A コンストラクトは、H 1 H 5 c s において最初に作製され、そこでは、H 1 H 5 c s の C l a I - N s i I 断片が個々の M 2 e ペプチドを含有する C l a I - N s i I 断片と置換され、それコンストラクト H 1 H 5 c s - M 2 e C a (配列番号 56)、及び H 1 H 5 c s - M 2 e S b (配列番号 59) を生じた。H 1 H 5 c s - M 2 e C a の C l a I - N s i I 断片を H 1 T E V 2 コンストラクトへと移送するために、H 1 H 5 c s - M 2 e C a の C l a I - N s i I 断片が単離され、H 1 T E V 2 の C l a I と N s i I との部位の間にサブクローニングされ、H 1 T E V 2 - M 2 e C a (配列番号 61) と名付けられるコンストラクトを生じた。

#### 【実施例 5】

##### 【0127】

B a c - t o - B a c バキュロウイルス発現系を使用する組換えバキュロウイルスの生成

この実施例は、実施例 1 ~ 4 で調製されるコンストラクトに含有される発現系を含む昆虫細胞を調製する技法を記載する。

##### 【0128】

組換えバキュロウイルスは、製造者の取扱説明書に従って、コンストラクトの p F a s t B a c に基づくトランスクレベクターから生成した (B a c - t o - B a c B a c u l o v i r u s E x p r e s s i o n S y s t e m s, L i f e T e c h n o l o g y, C a r l s b a d, C A, U S A)。簡潔に、トランスクレベクターは大腸菌 D H 1 0 B a c 化学的コンピテント細胞へと形質転換された。組換えバクミドを有する白いコロニーが B l u e - g a l を有するプレート上で選択された。バクミド D N A を、製造者の取扱説明書に従って標準的なアルカリ溶解ミニプレップ法によって単離した。組換えバクミドは、M 1 3 フォワード (-40) プライマー (G T T T T C C C A G T C A C G A C) 及び M 1 3 リバースプライマー (C A G G A A A C A G C T A T G A C) を使用して P C R によって同定された。組換えバクミドは、約 4 k b の P C R 産物をもたらした。

##### 【0129】

1 2 ウエルプレートに付着した S F 9 昆虫細胞に、C e l l f e c t i n (登録商標) 試薬、他の市販のトランスクレベクション試薬、又はポリエチレンイミン (P E I) を使用して組換えバクミドをトランスクレベクトした。トランスクレベクションの 4 ~ 7 日後、又は S F 9 細胞がウイルス感染によって増大するとき、細胞培地を P 0 ウイルスストックとして採集した。各々の P 0 ウイルスストックは、ウイルスを増幅するために振とうフラスコ中で  $2 \times 10^6$  細胞 / m l の密度の 50 m l の S F 9 細胞を感染させるのに使用した。培養は、C e d e x C e l l C o u n t e r (Roche Diagnostics C

10

20

30

40

50

orporatio、Indianapolis、IN、USA)を使用してモニターした。採集時間は、平均生存可能細胞サイズ及び細胞生存率によって決定した。感染後4～5日において、平均生存可能細胞サイズが、未感染細胞よりも4～7μm大きく、生存率が50～70%の範囲であったとき、細胞を遠心分離によって除去し、細胞培養上清を収集し、P1ウイルスストックとして暗所において4℃で保管した。しばしば、ウイルスストックは、滅菌を維持するために0.2μm滅菌フィルターによってろ過した。

#### 【0130】

ウイルスストックのさらなる増幅のために、 $2 \times 10^6$ 細胞/m<sup>2</sup>の密度の500m<sup>2</sup>のSF9細胞を250μlのP1ウイルスストックで感染させた。培養は、Cedex Cell Counterを使用してモニターした。感染後4～5日において、平均生存可能細胞サイズが、未感染細胞よりも4～7μm大きく、生存率が50～70%の範囲であったとき、細胞を遠心分離によって除去し、細胞培養上清を収集し、P2ウイルスストックとして暗所で4℃で保管した。しばしば、ウイルスストックは、滅菌を維持するために0.2μm滅菌フィルターによってろ過した。

10

#### 【実施例6】

#### 【0131】

組換えHAタンパク質の発現。

この実施例は、実施例1～4に記載される様々なコンストラクトの昆虫細胞での発現を実証する。特定のコンストラクトに応じて、様々なレベルの標的タンパク質発現が得られた。

20

#### 【0132】

組換えHAの発現を検出するために、通常は実施例5で記載されるようなP1又はP2ウイルスストックである組換えバキュロウイルスストックで感染させたSF9細胞の細胞培地を収集して、組換えHAの10×Hisタグを介した親和性捕捉のためにNi-NTA樹脂(Qiagen、Germantown、MD USA)と共にインキュベートした。Ni-NTA樹脂のリン酸緩衝生理食塩水(1×PBS)による洗浄の後、Ni-NTA樹脂を、SDS-PAGE又は抗His抗体を使用するウェスタンプロットによる解析のために、還元剤の存在下又は非存在下でゲルローディング緩衝液によって煮沸した。Coomassie(登録商標)染色ゲル又は抗Hisウェスタンプロット上の約63kDaのタンパク質バンドは、分泌した組換えHA全長タンパク質の発現を示す。

30

#### 【0133】

図7及び図8に示すように、親コンストラクトH1WTのH1のHAタンパク質の発現が予測通りに検出された。多塩基性残基、H1H5cs、H1R5cs、及びH1R5csの改変された成熟切断部位を有するHAタンパク質は、H1WTと同じレベルで発現した。H1のHAの成熟切断部位全体がTEV切断部位によって置換されたH1TEV1は、H1WTよりはるかに少なく発現した。成熟切断部位でより多くの天然残基を維持することによって、H1TEV2及びH1TEV3は、H1WTと比較して非常によく発現した(図7及び図8)。全ての置換が同じレベルで発現しなかった。コンストラクト中のTEV切断部位の位置を調整することによって、野生型HAのものの発現レベルを達成した。

#### 【0134】

図7及び図8にさらに示すように、異なる免疫優性抗原部位における同じ免疫亜優性bNAbエピトープの配置が、異なる発現レベルを生じた。Sa部位(H1TEV2-CR8020Sa4)又はCa2部位(H1H5cs-CR8020Ca)のいずれかに複合CR8020エピトープペプチドがあるコンストラクトは、野生型HAと同じレベルで発現したが、一方でH1TEV2-CR8020Sa3コンストラクトは良好に発現しない。したがって、異種エピトープ配置の正確な位置が、生じるHAの発現に重要であり得る。免疫亜優性bNAbエピトープの性質は、同様に生じるHAタンパク質の発現レベルにも影響をもたらし得る。

40

#### 【0135】

いくつかの抗原部位におけるI1C9エピトープの個々の配置はまた、生じるHAタン

50

パク質の異なるレベルの発現を示した(図7及び図8)。コンストラクトH1H5c s - I1C9Caは、コンストラクトH1TEV2 - I1C9Ca1よりも高い発現を示した。これら2つのコンストラクトにおけるI1C9エピトープペプチドによって置換される抗原部位におけるペプチド配列は少し異なる。MCSとしてTEV切断部位を有するこれらのコンストラクトと同様に、置換の位置が発現レベルに影響をもたらす。

#### 【0136】

Ca2部位にM2eペプチドを有するコンストラクト、つまりH1H5c s - M2eCa及びH1TEV2 - M2eCaは、成熟切断部位にもかかわらずH1WTと同様に良好な発現をもたらした(図7及び図8)。しかしながら、Sb部位にM2eペプチドを有するコンストラクトH1H5c s - M2eSbは良好に発現しなかった。Sb部位は、HAの適切なフォールディングに必要とされる可能性のあるヘリカル構造にある。

#### 【0137】

H1のHAコンストラクトの多くの成功した発現は、HA球状頭部ドメインの免疫優性抗原部位がステムドメイン由来の免疫亜優性bNAbエピトープによって、又はHAに関連しない別のタンパク質由来のM2eペプチドによって置換することができることを実証した。これらの結果は、球状頭部ドメインの可塑性を明らかにし、その球状頭部ドメインで異種エピトープを提示する機能性HAの作製の実現可能性を確証した。まとめると、実施例1～6は、異種エピトープ及び/又は改変されたMCSを有するHAを構築し、良好な発現を有する修飾HAを選択する方法を実証した。

#### 【実施例7】

#### 【0138】

##### 組換えHAタンパク質の精製

この実施例は、実施例1～4に記載される様々なコンストラクトの精製を実証する。

#### 【0139】

振とうフラスコ中で、 $2 \times 10^6$ 細胞/m lの密度の50m l～1LのSF9細胞に、1～4m lのP1又はP2ウイルスストック対1リットルの細胞の容量比で、バキュロウイルスストックを感染させた。培養は、Cedex Cell Counterを使用してモニターした。採取時間は、平均生存可能細胞サイズ及び細胞生存率によって決定した。感染後2～3日において、平均生存可能細胞サイズが、未感染細胞よりも4～7μm大きく、生存率が約80%であったとき、細胞を遠心分離によって除去し、細胞培養上清を収集し、4で保管した。細胞培養上清を、4で2～4時間、ロティサリーブラットフォーム上で揺らしつつNi-NTA樹脂とインキュベートした。Ni-NTA樹脂を、遠心分離によって収集し、1×PBSで洗浄した。洗浄したNi-NTA樹脂を、重力流動カラムに詰め、50mMイミダゾールを補充した1×PBSでさらに洗浄した。次いで、Ni-NTA樹脂を、1×PBS中の400mMイミダゾールで重力流動により溶出した。溶出したHAタンパク質を1×PBSに緩衝液交換し、限外ろ過で濃縮した。精製したHAタンパク質を、図8に示すようにSDS-PAGEで解析した。

#### 【0140】

##### 付録

##### インフルエンザウイルス、型及び宿主の説明

インフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスA、B、及びCの3つの属のオルソミクソウイルス科のウイルスからなる。各々の属は、单一の種のウイルス、つまりそれぞれインフルエンザA、B、及びCのウイルスのみを有する。インフルエンザA、B、及びCのウイルスはまた、それぞれA型、B型、及びC型インフルエンザウイルスと呼ばれる。インフルエンザウイルスは、エンベロープを有するマイナス鎖一本鎖RNAウイルスである。ウイルスゲノムは、分離したRNAセグメントにコードされる。インフルエンザA及びBウイルスの各々は、10個のタンパク質をコードする8個のRNAセグメントを有する。インフルエンザCウイルスの各々は、9個のタンパク質をコードする7個のRNAセグメントを有する。インフルエンザAウイルスの10個の分析されたタンパク質は、P B 2、P B 1、及びPAポリメラーゼ、ヘマグルチニン(HA)、核タンパク質(NP)

10

20

30

40

50

)、ノイラミニダーゼ(NA)、マトリクスタンパク質M1及びM2、非構造タンパク質NS1及びNS2である(Webster, R. Gら、Microbiol Rev(1992)56:152~179)。インフルエンザCウイルスは、HA及びNAの機能を組み合わせるヘマグルチニン-エステラーゼ-融合(HEF)タンパク質を有する(Herrler, Gら、J. Gen Virol(1988)69:839~846)。インフルエンザA、B、及びCのウイルスの分類は、それらのNP及びマトリクスタンパク質における抗原性の差異に基づく。

#### 【0141】

インフルエンザAウイルスは、ウイルスにコードされた膜タンパク質HA、NA、及びM2が点在する宿主由来脂質二重層エンベロープ、M1マトリクスタンパク質から作製される内殻、並びに中心の個々のRNAセグメントのウイルスゲノムのヌクレオカプシドからなる直径80~120nmの小粒子である(Webster, R. Gら、Microbiol Rev(1992)56:152~179)。RNAセグメントは、複数のNP分子によってゆるくキャップシドに包まれている。3つのウイルスピリメラーゼタンパク質(PB1、PB2、及びPA)の複合体は、ヌクレオカプシドの末端に位置する。全てのRNAセグメントは、感染性ウイルス粒子を產生するのに必要である。

#### 【0142】

ゲル電気泳動によって最も遅く移動するRNA種であるRNAセグメント1は、PB2 RNAポリメラーゼをコードする。RNAセグメント2は、同じRNA配列からの異なる読み枠を使用することによって、PB1 RNAポリメラーゼ、さらにPB1-N40及びPB1-F2タンパク質の2つの他の転写物をコードする。PB1-N40及びPB1-F2タンパク質は、宿主細胞アポトーシスを誘導する。RNAセグメント3は、PB1及びPB2と共にRNA依存性RNAポリメラーゼ複合体を形成するPA RNAポリメラーゼをコードする。RNAセグメント4は、インフルエンザビリオンの主要な表面抗原であるHAをコードする。各々のビリオンは、ビリオン表面上に均一に分布したスパイクとして現れる約500のHA分子を有する(Ruigrok, R. W. Hら、J. Gen Virol(1984)65:799~902; Murti, K. G及びWebster, R. G.、Virol(1986)149:36~43)。宿主受容体に結合して、HAは宿主範囲を決定する。RNAセグメント5はNP核タンパク質をコードする。NPはウイルスRNAをキャップシドで包み、宿主細胞核へと輸送される。NPは、昆虫細胞において豊富に合成され、インフルエンザウイルスピリオンで2番目に豊富なタンパク質である。それは宿主の細胞傷害性T細胞免疫応答の主要な標的である。RNAセグメント6は、インフルエンザウイルスピリオンの2番目の主要な表面抗原であるノイラミニダーゼ(NA)をコードする。NAは、糖タンパク質又は糖脂質由来の末端シアル酸を切断して、宿主細胞受容体からウイルス粒子を放出する酵素である。その機能はウイルス拡散に必要である。各々のビリオンはその表面上に約100個のNA分子を有する。NAは、四量体を形成し、ビリオンエンベロープの別個のパッチに位置する(Murti, K. G及びWebster, R. G.、Virol(1986)149:36~43)。RNAセグメント7はバイシストロニックであり、M1とM2の両方のマトリクスタンパク質をコードする。M1は、ビリオンエンベロープのすぐ下にビリオンヌクレオカプシドを取り囲む殻を形成し、インフルエンザウイルスピリオンにおいて最も豊富なタンパク質である。M2は、M1と同じ転写物の異なるスプライシング型より作製される。M2は、内在性膜タンパク質であり、宿主細胞におけるインフルエンザウイルスの產生の間、ゴルジネットワークのpHを制御するプロトンチャネルとして機能する。M2は、選択的スプライシング変異体M42によって部分的に置換できる。約3000個のマトリクスタンパク質分子が1つのビリオンを作製するのに必要とされる。RNAセグメント8は、ウイルス複製のための2つの非構造タンパク質NS1及びNS2をコードする。NS2は、NS1と異なる読み枠由来である。両方のタンパク質は、感染細胞において豊富であるが、子孫ビリオンに組み込まれない。

#### 【0143】

10

20

30

40

50

3つの属のインフルエンザウイルスの間で、インフルエンザAウイルスが最も悪性のヒト病原体であり、ヒトにおいて最も重度の疾患を引き起こす。インフルエンザAウイルスは、それらの表面糖タンパク質H A及びN Aの抗原特性に基づいてサブタイプに分類される。全部で18のH Aサブタイプ、つまりH 1～H 18と、10のN Aサブタイプ、つまりN 1～N 10が同定されている(Tong, Sら、P L o S P a t h o g e n s (2013) 9: e 1003657)。インフルエンザAサブタイプの共通の命名法は、H 1 N 1、H 3 N 2、及びH 7 N 9のようなH AサブタイプとN Aサブタイプの異なる組合せに由来する(Bu l l W o r l d H e a l t h O r g a n (1980) 58: 585～591)。水鳥はサブタイプH 1～H 16とN 1～N 9の自然の保有宿主である。サブタイプH 17 N 10及びH 18 N 10は、最近アメリカオオコウモリにおいて発見された。自然において、インフルエンザAウイルスのセグメント化したゲノムは、宿主が2つのサブタイプのインフルエンザAウイルスに共感染したときにR N Aセグメントの再集合を可能にする。2つの異なるサブタイプ由来のR N Aセグメントは、単一のビリオンにパッケージされ、新規サブタイプを産生することができる。インフルエンザAウイルスのこれらの多くのサブタイプのうち、H 1 N 1、H 2 N 2、及びH 3 N 2のみがヒトにおける効率的な伝染能力を発達させている。これら3つのサブタイプは、いわゆる季節性インフルエンザの流行しているウイルスサブタイプである。したがって、ヒト集団は多くのインフルエンザAウイルスに対して免疫学的にナイーブである。時に、他のサブタイプのインフルエンザAウイルスが種を超えてヒトに感染して高い致死率のパンデミックなアウトブレイクを引き起こす。

10

20

#### 【0144】

それらの系統学的関係に基づいて、インフルエンザAのH Aサブタイプは、2つの異なるグループにクラスター化される。グループ1は、16のサブタイプのうち10を含む：H 1、H 2、H 5、H 6、H 8、H 9、H 11、H 12、H 13、及びH 16。グループ2は、残りの6のサブタイプを占める：H 3、H 4、H 7、H 10、H 14、及びH 15。

#### 【0145】

インフルエンザBウイルスはインフルエンザAウイルスと抗原的に異なる。インフルエンザBウイルスは、インフルエンザAウイルスと共に循環してヒトにおけるエピデミックを引き起こす。インフルエンザBウイルスは、既知の動物保有宿主なしでヒトに安定して適応される。インフルエンザAウイルスのH Aの膨大な遺伝的変異と異なり、H A遺伝子の系統学的関係によって3つの系統が定義されているのにもかかわらず、H Aにおける単一の血清型のみがインフルエンザBウイルスにおいて報告されている。インフルエンザAとインフルエンザBのウイルスの間でR N Aセグメントの再集合の報告が存在していないので、インフルエンザBウイルスは、インフルエンザAウイルスと組換えをするように見えない。

30

#### 【0146】

インフルエンザAとBのウイルスの両方は、細胞受容体として宿主細胞表面上の末端シアル酸を使用する。両方の型のウイルスのH Aは、同じ構造的特徴を共有し、宿主細胞への侵入のためにシアル酸受容体へと結合する。

40

#### 【0147】

インフルエンザA及びインフルエンザBウイルスのサブタイプを、系統に更に分類する。インフルエンザA及びインフルエンザBのウイルスの多くの異なる系統が存在する。各々のインフルシーズンは、インフルエンザA及びBのウイルスの少数の系統によって占められ、それらは通常、前のインフルシーズンの系統とは遺伝的に異なる。単離系統として知られる異なる地理的位置又はインフルシーズンに単離された1つの系統のウイルスは、しばしば遺伝的な変更を有する。

#### 【0148】

インフルエンザCウイルスの感染は、一般的に無症候性であるか、又はほとんどが小児若しくは若年成人について軽度の病気を引き起こす。インフルエンザCウイルスは、散発的な症例と小規模の局所的なアウトブレイクと関連する。インフルエンザCウイルスは、

50

インフルエンザ A 及び B ウイルスよりもはるかに少ない疾患負荷を呈する。ヒト集団の大部分はセロコンバージョンを示し、ヒト集団におけるインフルエンザ C ウィルスの広範囲の循環を示唆する。インフルエンザ C ウィルスは、動物からも単離されている。インフルエンザ C ウィルスのヘマグロチニン - エステラーゼ - 融合 (HEF) タンパク質は、インフルエンザ A 及び B ウィルスの HA 及び NA の機能を組み合わせる。インフルエンザ A 及び B ウィルスの HA と異なり、インフルエンザ C ウィルスの HEF は、細胞受容体として、末端 9-O-アセチル-N-アセチルノイタミン酸 (9-O-Ac-NeuAc) を使用する (Herrler, G. et al., EMBO J. (1985) 4: 1503~1506)。

## 【0149】

10

## ウイルス感染プロセス及びライフサイクルの説明

インフルエンザウィルスは、呼吸飛沫又は胞子（感染性生物を運搬することのできる任意の対象又は物質）を介してヒトからヒトに拡散する。ウィルスは呼吸器の上皮細胞に感染する。細胞表面受容体に結合した後、付着したビリオンは、宿主細胞によってエンドソームに取り込まれ、そこでは低 pH が HA の立体構造変化を引き起こし、それは宿主細胞のその疎水性融合ペプチドの小胞膜への挿入をもたらし、ウィルスと小胞膜との融合を開始する。融合は、ビリオンの内容物を感染した細胞の細胞質に放出する。ウィルスのヌクレオキヤプシドは宿主細胞の核に移動し、それらの会合したポリメラーゼ複合体が、ウィルスタンパク質の翻訳のための mRNA の一次転写を開始する。同時に、宿主の mRNA の翻訳は遮断される。新規に合成されたウィルス RNA は、キャプシドに包まれ、ウィルス構造タンパク質が合成されて宿主細胞表面に輸送され、そこでそれらは宿主細胞膜に組み込まれる。インフルエンザウィルスは、気管支上皮細胞のような極性上皮細胞の頂端表面から肺の管腔内に出芽し、したがって、通常は好気性である (Roth, M. G. et al., PNAS (1979) 76: 6430~6434; Nayak, D. P. et al., Virus Res (2009) 143: 147~161)。ブタとヒトの間のインフルエンザウィルスの伝染は実証されている。個体が感染した後、免疫系はインフルエンザウィルスに対する抗体を作り出す。これは、生体の主な防御の源である。

20

SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO:1: Peptide sequence of HA of A/California/07/2009, a swine-origin influenza A virus H1N1 strain (UniProt:C3W5X2)

30

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLC  
KLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELRE  
QLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSK  
SYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQ  
EGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPK  
GAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRLGLFGAIAGFIEGGWTGMV  
DGWYGYHHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNNSIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRI  
ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNG  
CFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSL  
VLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

40

SEQ ID NO:2: Peptide sequence of GP67 secretion signal (GP67ss)

MVSAIVLYVLLAAAHSFA

SEQ ID NO:3: Peptide sequence of TEV cleavage site, foldon, and 10xHis-tag  
GAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:4: Peptide sequence of TEV cleavage site

ENLYFQG

SEQ ID NO:5: Peptide sequence of foldon

GSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

SEQ ID NO:6: Peptide sequence of 10xHis-tag

HHHHHHHHHH

50

SEQ ID NO:7: Peptide sequence of signal peptide of HA of A/California/07/2009 (UniProt:C3W5X2)

MKAILVVLLYTFATANA

SEQ ID NO:8: Peptide sequence of H1 HA maturation cleavage site (MCS)  
IPSIQSR

SEQ ID NO:9: Peptide sequence of GP67ss-H1WT-TEV-foldon 10His (H1WT)  
MVSAIVLYVLLAAAAHSFADTLCIGYHANNSTDVTVDLVEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKVTAAACPHAGAKSFYKNLILVKKGNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
DQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
TPKGAIANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRLFGAIAGFIEGGWT  
GMVDGWYGYHHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHL  
EKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLERNTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEI  
GNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENLYFQ  
GGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH

10

SEQ ID NO:10: Nucleotide sequence of GP67ss-H1WT-TEV-foldon 10His (H1WT)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGCATTCTGCCTTG  
CGGATACACTGTGATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATAACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAAATGG  
CAAGCTGTGAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
CTAACGACAAGCAGCTGGCTAACGATTCTAACAGGGAGTGACAGCCGCTGTCC  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCCTAACGCTAACAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTCTGT  
GGGAATCCACCACCCCTAGCACAAGCGCCATCGAGAGCCTGTACCGAGAACGCCAT  
GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAAGCAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCATTAAATACCAGCCTGCCCTCCAGAATA  
TTCACCCATTACCATCGCAAGTGTCTAACGATCTGAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGCATCCAGAGCAGAGGCCCTGTTGGAGCCATCGC  
CGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACC  
AGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGAC  
GAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTATCGAGAAAGATGAACACCCAGTTACAGCTGT  
GGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAACCTGAACAAGAAAGTGGAC  
GACGGCTTCCTGGATATTGGACCTACAATGCCAGCTGCTCGTGCCTGGAGAATGA  
GAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAACCC  
AGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTGAGTTCTACCACAAGTGT  
GACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCCTAACGATAGCGA  
GGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAAGAAC  
TATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCGTTCTGGTTACATCCCAGAAGCTCC  
GCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTAACAGACGGTAATGGGTTCTGCTGTACCTTCC  
TGGGTACCCATCATCACCAACCATCACCATCATCACTGATAAagctt

20

SEQ ID NO:11: Peptide sequence of GP67ss-H1H5cs-TEV-foldon 10His (H1H5cs)

MVSAIVLYVLLAAAAHSFADTLCIGYHANNSTDVTVDLVEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE

50

LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
DQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
TPKGAIINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGLFGAIAGFIEG  
GWTGMVDGWGYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEF  
NHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNN  
AKEIGNGCFFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAEN  
LYFQGGSGYIPEAPRDGGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:12: Peptide sequence of H5 maturation cleavage site

QRERRKKR

10

SEQ ID NO:13: Nucleotide sequence of GP67ss-H1H5cs-TEV-foldon 10His (H1H5cs)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATAACCGTGGATAACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAAGCACAAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGA  
CAGCCGCCTGTCC

20

CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCCTAACGCTGTCTAACAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGTGGTGTGCTGT  
GGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCATTAAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA

30

AGCCATCGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCT  
ATCACCAACCAGAACATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAAC  
GCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTAAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTT  
TACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAACATCGAGAACCTGAACAAGA  
AAAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTG  
GAGAATGAGAGAACCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAACGGT  
GAGAAGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTGAGTTCTACC  
ACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAG  
TATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCA  
CAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCG  
GAAGCTCCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTGTAAGACGGTGAAATGGGTTCTGCTGTC  
TACCTTCCTGGGTCAACCATCATCACCAACCATCACCATCATCACTGATAAagctt

SEQ ID NO:14: Peptide sequence of GP67ss-H1R5cs-TEV-foldon 10His (H1R5cs)

MVSAIVLYVLLAAAHSFADTLCIGYHANNSTDVTLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRLGVAPLHLGKCNIAWGILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
DQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
TPKGAIANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPRRRRGLFGAIAGFIEGGWT  
GMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHL

50

EKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEI  
GNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENLYFQ  
GGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO:15: Nucleotide sequence of GP67ss-H1R5cs-TEV-foldon 10His (H1 R5cs)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
CGGATACACTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATAACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT 10  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCAGAGAGATTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCTAACATCAGATTCTAACAGGGAGTGACAGCCGCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCCTAACAGCTGTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGTGGTCTGT  
GGGAATCCACCAACCTAGCACAAGCGCCATCGAGAGCCTGTACCGAGAACATGCCGAT  
GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACAGAAAAAGTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGAGAACATGAAATTACTACTGGACCCGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATT  
GCTATGGAGAGAACATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATAACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCATTAATACCAAGCCTGCCCTCCAGAATA 20  
TTCACCCCTATCACCATCGCAAGTGTCTAACAGTATGTGAAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGGAGACGCAGAACAGAGGGCTGTTGGAGGCCATCGC  
CGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACC  
AGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGAC  
GAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAACAGACACCCAGTTACAGCTGT  
GGCAAGGGAGTTCAACCACCTGGAGAACAGAACCTGAACAAAGAAAGTGGAC  
GACGGCTCCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTCTGGAGAACATGA  
GAGAACCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAAGAACCTGTACGAGAACAGTGGAGAAC  
AGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTGAGTTCTACCACAAGTGT  
GACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAAGAACGGCACCTACGACTACCCCTAACAGTATAGCGA 30  
GGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAAGAAC  
TATCAGGGCGCTAAAACCTGTATTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGAACAGCTCC  
CGGTGACGGTCAGGCTACGTTCGTAAAGACGGTGAATGGTTCTGCTGTACCTTCC  
TGGTCACCATCATCACCAACCACCATCACACTGATAAagctt

SEQ ID NO:16: Peptide sequence of GP67ss-H1IR5cs-TEV-foldon 10His (H1IR5cs)

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLICIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKVTAAACPAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQLYQNADAYVFVGSSRYSKFKPEDIAIRPKVR  
DQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCTTCQ 40  
TPKGAIANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRRRRGLFGAIAGFIEG  
GWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEF  
NHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNN  
AKEIGNGCFFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAEN  
LYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:17: Nucleotide sequence of GP67ss-H1IR5cs-TEV-foldon 10His (H1 IR5cs)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
CGGATACACTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATAACCGTGGATACAGTG 50

CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATTATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCC  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAACAG  
 CTACCCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAACAGTGTGGTGT  
 GGGAAATCCACCACCCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCGAGAACAG  
 GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACGACAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
 TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAACATTACTACTGGACCCCTGGTGGAAC  
 CTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATT  
 GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
 TAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGGCCATTAATACCAGCCTGCCCTCCAGAATA  
 TTCACCCCTATCACCATCGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGACCCAAGCTGAGACTG  
 GCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGCATCCAGAGCAGGAGACGCAGAACAG  
 TGGAGCCATGCCGGTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTAGC  
 GCTATCACCACCAAGAACCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACACAG  
 AACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTATCGAGAACATGAAACACCA  
 GTTTACAGCTGGCAAGGGAGTTCAACCACCTGGAGAACAGAACATCGAGAACCTGAACA  
 AGAAAGTGGACGACGGCTCCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGC  
 CTGGAGAATGAGAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACACCTGTACGAGAA  
 GGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGGAGATCGGCAACGGCTGCTTGAGTTCT  
 ACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCC  
 AAGTATAGCGAGGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAA  
 GCACAAGAACATCATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAGGGCGTTCTGGTTACATC  
 CCGGAAGCTCCCGGTGACGGTCAGGCTTACGTTCGAAAGACGGTGAAATGGTTCTGCT  
 GTCTACCTTCTGGTCACCATCATCACCAACCATCACCATCATCACTGATAAagctt  
 SEQ ID NO:18: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV1-TEV-foldon 10His (H1TEV1) 10  
 MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSSTDQQLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
 DQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
 TPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIEONLYFQGLFGAIAGFIEGGWT  
 GMVDGWWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHL  
 EKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEI  
 GNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENLYFQ  
 GGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH  
 SEQ ID NO:19: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV1-TEV-foldon 10His (H1  
 TEV1) 20  
 ccatGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTGATTGGCTACCAAGCCAACAATAGCACCGATACCGTGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATTATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCC  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAACAG  
 30  
 40  
 50

CTACCCCTAAGCTGTCTAACGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGTGGTGTGT  
GGGAATCCACCACCC TAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACAGAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTCCTAGATATGCATT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATAACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGGCCATTAATACCAGCCTGCCCTCCAGAATA  
TTCAC CCTATCACCATCGCAAGTGTCTAACGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATATCGAAAACCTGTATTTCAAGGCCTGTTGGAGCCATCGC  
CGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACC  
AGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGAC  
GAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTTACAGCTGT  
GGCAAGGAGTTAACCAACCTGGAGAAGAGAACCTGAACAAGAAAGTGGAC  
GACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTCCTGGAGAATGA  
GAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAC  
AGCTGAAGAACAAATGCCAACGGAGATCGCAACGGCTGCTTGAGTTCTACCAAGTGT  
GACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGA  
GGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTAAACTGAAAGCACAAGAAC  
TATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCC  
GCGTACGGTCAGGCTTACGTCGAAGACGGTGAATGGTTCTGCTGTACCTTCC  
TGGGTCAACCATCATCACCAACCATCACCATCACTGATAAagctt  
SEQ ID NO:20: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-TEV-foldon 10His (H1TEV2)  
MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLCLIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
DQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
TPKGAIANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRN S PENLYFQGLFGAIAGFIEGGW  
TGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNH  
LEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAK  
EIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENLY  
FQGGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHH  
SEQ ID NO:21: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-TEV-foldon 10His (H1  
TEV2)  
ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTGGCGGGCGGCATTCTGCCTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAAATGG  
CAAGCTGTGAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
CTAACGACAAGCAGCTGGCTAACGATTCTAACGAAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCCTAACGCTAACGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGTGGTCTGT  
GGGAATCCACCACCC TAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACAGAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTCCTAGATATGCATT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATAACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGGCCATTAATACCAGCCTGCCCTCCAGAATA  
10  
20  
30  
40  
50

TTCACCCATTACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTAAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
 GCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTATTTCAAGGCCTGTTGGAGCCAT  
 CGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGATGGCTGGTACGGCTATCACC  
 ACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATC  
 GACGAGATCACAAACAAGGTAAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTTACAGC  
 TGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGG  
 ACGACGGCTTCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTCTGGAGAAT  
 GAGAGAACCTGGACTACCACGACAGCAATGTAAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAG  
 CCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTGAGTTCTACCAAGT  
 GTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTAAAGAACGGCACCTACGACTACCCATAAGTATAGC  
 GAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTAAACTGGAAAGCACAAGAA  
 TCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGAAGCT  
 CCGCGTGAAGGTCAGGCTACGTTCGTAAGACGGTAAATGGGTTCTGCTGTACCTT  
 CCTGGGTCAACCACATCACCAACCACATCACTGATAAagctt

SEQ ID NO:22: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV3-TEV-foldon 10His (H1TEV3)

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLICIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
 DQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
 TPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIENLYFQGLFGAIAGFIEGG  
 WTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN  
 HLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNA  
 KEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENL  
 YFQGGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:23: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV3-TEV-foldon 10His (H1 TEV3)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTATTGGCTACCGCCAACAATAGCACCGATAACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTAAATCTGCTGGAGGATAACGACAATGG  
 CAAGCTGTAAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCTAACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTAAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCCTAACGCTCTAACGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTCTGT  
 GGGGAATCCACCACCCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCGAGATGCCGAT  
 GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACAGCAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
 TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAAC  
 CTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATT  
 GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
 TAATACCCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCATTAATACCGCTGCCCTCCAGAATA  
 TTCACCCATTACCATCGGCAAGTGTCTAACGTATGTAAAGAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
 GCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGCATCGAAACCTGTATTTCAAGGCCTGTTGG  
 AGCCATCGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGATGGCTGGTACGGCT  
 ATCACCAACAGAAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAGTCTACACAGAAC  
 GCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTAAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTT  
 TACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAAGA  
 AAGTGGACGACGGCTTCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTCTCCTG

10

20

30

40

50

GAGAATGAGAGAACCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGT  
 GAGAAGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGTTGAGTTCTACC  
 ACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAG  
 TATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGGAGATCGACGGCGTGAAGACTGGAAAGCA  
 CAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCG  
 GAAGCTCCGCGTGACGGCTACGTTCGTAAAGACGGTGAATGGTTCTGCTGTC  
 TACCTTCCTGGGTACCATCATCACCAACCACATCACTGATAAagctt

SEQ ID NO:24: Peptide sequence of GP67ss-H1H5cs-CR8020Ca-TEV-foldon 10 His (H1H5cs-CR8020Ca)

MVSAIVLYVLLAAAHSFADTLICIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE 10  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTAAACPAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEGMIDYEG  
TGQAAGRNMYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT  
CQTPKGAIANTSPLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGLFGAIAGFI  
 EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGK  
 EFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLK  
 NNAKEIGNGCFFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGA  
 ENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO:25: Peptide sequence of CR8020 epitope of HA2 residues 15 19 20  
 EGMID

SEQ ID NO:26: Peptide sequence of CR8020 epitope of HA2 residues 30-36  
 EGTGQAA

SEQ ID NO:27: Peptide sequence of composite C8020 epitope

EGMIDYEGTGQAA

SEQ ID NO:28: Nucleotide sequence of GP67ss-H1H5cs-CR8020Ca-TEV-foldon 10His (H1H5cs-CR8020Ca)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCAACGCCAACATAGCACCGATAACCGTGGATAACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG 30  
 CAAGCTGTGAAGCTGAGAGGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATTATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCTAACGATTCTAACAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCCTAACGCTCTAACGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGTGGTGTCTGT  
 GGGGAATCCACCAACCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCGAGATGCCGAT  
 GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAGTTCAAGCCTGAAGGCATGAT  
 TGATTACGAAGGCACAGGCCAGGCAGCCGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGG 40  
 AACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCA  
 TTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGA  
 CTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTCCAGA  
 ATATTACCCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAACAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGA  
 CTGGCTACCGGCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGAGAGACGCAAGAAGAGAGGGCTGTT  
 TGGAGCCATCGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTAG  
 GCTATCACCACCAAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAG  
 AACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCA  
 GTTACAGCTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACA  
 AGAAAGTGGACGACGGCTTCCCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGC 50

CTGGAGAATGAGAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAA  
 GGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTGAGTTCT  
 ACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCC  
 AAGTATAGCAGGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAA  
 GCACAAGAACATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCGTTCTGGTTACATC  
 CCGGAAGCTCCCGCGTACGGCTACGTTCGAAAGACGGTAATGGGTTCTGCT  
 GTCTACCTTCCTGGGTACCATCATCACCAACATCACACTGATAAAagctt  
 SEQ ID NO:29: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-CR8020Ca-TEV-foldon 10  
 His (H1TEV2-CR8020Ca)

MVSAIVLYVLLAAAAHSFADTLICIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE 10  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTAAACPAGAKSFYKNNLIWLVKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEGMIDYEG  
TGQAAGRNMYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT  
CQTPKGAIANTSPLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFGAIAGFIEG  
 GWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEF  
 NHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNN  
 AKEIGNGCFFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAEN  
 LYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:30: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-CR8020Ca-TEV-foldon 20  
 10His (H1TEV2-CR8020Ca)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATAACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCAcCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCC  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTAAGAACGGCAACAG 30  
 CTACCCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGTGGTGTCTGT  
 GGGGAATCCACCAACCTAGCaCaAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAAGATGCCGAT  
 GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACGAAAAAGTTCAAGCCTGAAGGCATGAT  
 TGATTACGAAGGCACAGGCCAGGCAGCCGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGG  
 AACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCA  
 TTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGA  
 CTGTAATACCACCTGTAGACACCTAACGGGCCATTAATACCAGCCTGCCCTCCAGA  
 ATATTACCCCTATCACCACGGCAAGTGTCTAACGAAACCTGTGAGGAGGAGATGGACCC  
 CTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTATTTCAAGGCCCTGGAG  
 CATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATC 40  
 ACCACCAAGAACATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAGTCTACACAGAACGCC  
 ATCGACGAGATCACAAACAAGGtGAACAGCGTGATCGAGAACAGATGAACACCCAGTTAC  
 AGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAACAGAGAATCGAGAACCTGAACAAAGAAAG  
 TGGACGACGGCTTCCTGGATATTGGACCTACAATGCCAGCTGCTCGTGCCTGGAG  
 AATGAGAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAACGGTGA  
 AAGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGCAACGGCTGCTTGAGTTCTACCA  
 AGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCCTAAGTAT  
 AGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAA  
 GAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCGTTCTGGTTACATCCCGGAA  
 GCTCCCGCGTGACGGTCAGGCTACGTTCGTAAAGACGGTAATGGGTTCTGCTGTCTAC 50

CTTCCTGGTCACCATCATCACCAACCACATCACTGATAAagctt

SEQ ID NO:31: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-CR8020Sa3-TEV-foldon 10His (H1TEV2-CR8020Sa3)

MVSAIVLYVLLAAAHSFADTLCIGYHANNSTDVTLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVEGMIDYEG  
TGQAAAYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFP  
EIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPV  
HDCNTTCQTPKGAIANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRN SPENLYFQGLFGA  
IAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFT 10  
AVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVR  
SQLKNNAKEIGNGC FEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRI  
YQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO:32: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-CR8020Sa3-TEV-foldon 10His (H1TEV2-CR8020Sa3)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGCATTCTGCCTTG  
CGGATACACTGTATTGGCTACCACGCCAACATAGCACCGATA CCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT 20  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCC  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGGAGGCATGATTGA  
TTACGAAGGCACAGGCCAGGCAGCCTACCCCTAACGCTGTCTAACGAGCTACATCACGACA  
AGGGCAAAGAACAGTGCTGGTGTGGGAATCCACCAACCCTAGCACAAGCGCCGATCAG  
CAGAGCCTGTACCGAGAACGCGATGCCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGAACAGCAA  
AAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAACATGA  
ATTACTACTGGACCCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGAAAT  
CTGGTGGTGCCTAGATATGCATTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTAT 30  
CTCTGATAACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCATTA  
ATACCAGCCTGCCCTTCCAGAACATTACCCCTATCACCATCGCAAGTGTCTAACGTAT  
GTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTA  
TTTCAAGGCCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGG  
TGGATGGCTGGTACGGCTATCACCAACAGAACGCGATCACAAACAAGGTGAAACAGCGTGTGCA  
CTGAAGTCTACACAGAACGCGATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAAACAGCGTGTGCA  
GAAGATGAACACCCAGTTACAGCTGTGGCAAGGGAGTTCAACCACCTGGAGAACAGAA  
TCGAGAACCTGAACAAGAACAGTGACGACGGCTCCTGGATATTGGACCTACAATGCC  
GAGCTGCTCGTGCCTGGAGAACATGAGAGAACCCCTGGACTACCACCGACAGCAATGTGAA  
GAACCTGTACGAGAACAGTGAGAACAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGGAGATCGGCAACG 40  
GCTGCTTGAGTTCTACCAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGC  
ACCTACGACTACCCCTAACGTATAGCGAGGAGGCCAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGG  
CGTGAAGACTGGAAAGCACAAGAACATCTACAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCG  
GTTCTGGTTACATCCCAGGAAAGCTCCCGCGTACGGTCAGGCTTACGTTGTAAAGACGGT  
GAATGGGTTCTGCTGTCTACCTCCTGGTCACCATCATCACACCACATCACCATCATCA  
CTGATAAAagctt

SEQ ID NO:33: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-CR8020Sa4-TEV-foldon 10His (H1TEV2-CR8020Sa4)

MVSAIVLYVLLAAAHSFADTLCIGYHANNSTDVTLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE 50

LREQLSSVSSFERFEIFPEGMIDYEGTGQAAWPNHDSNKGVTACPHAGAKSFYKNLIWL  
 VKKGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKFK  
 PEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP  
 VHDCNTTCQTPKGAIANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFG  
 AIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQF  
 TAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKV  
 RSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTR  
 IYQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDQAYVRKDGEWLLSTFLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO:34: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-CR8020Sa4-TEV-foldon 10His (H1TEV2-CR8020Sa4)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTATTGGCTACCACGCCAACATAAGCACCGATAACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCTGGCAGTCATCGATT  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTCCAGCTGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTGAAGGCATGATTGATTACGAAGGCACAGGCCAGGCAGCCTGGCTTAATCACGATTCT  
 AATAAGGGAGTGACAGCCCTGTCCTCATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCT  
 GATCTGGCTGGTGAAGAACAGGCAACAGCTACCCCTAACAGCTAACAGCTAACACG  
 ACAAGGGCAAAGAACAGCTGGTGTGGGAATCCACCCCTAGCACAAGCGCCGAT  
 CAGCAGAGCCTGTACCAAGAACAGCTGGTGTGGGAACCTGGCAGCAGCAGATAACAG  
 CAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAA  
 TGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAACCTGGCAGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGA  
 AATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCAT  
 TATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCAACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCA  
 TTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAAATATTCACCTATCACCATGGCAAGTGTCTTAAG  
 TATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCT  
 GTATTTCAAGGCCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAA  
 TGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACAGAACAGCTGGCAGGGATCCGGATATGCCGCC  
 GATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGAT  
 CGAGAAGATGAACACCCAGTTACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAACAG  
 GAATCGAGAACCTGAACAAAGAACAGTGGACGACGGCTCTGGATATTGGACCTACAAT  
 GCCGAGCTGCTCGTGCCTGGAGAACAGTGGACGACGGCTCTGGAGAACACCTGGACTACCACGACAGCAATGT  
 GAAGAACCTGTACGAGAACGGTGAGAACGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATGGC  
 AACGGCTGTTGAGTTCTACCACAAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAA  
 CGGCACCTACGACTACCCCTAACGTATAAGCGAGGAGGCCAGCTGAATAGAGAGGAGATCG  
 ACGCGTGAAACTGGAAAGCACAAGAACATCTACAGGGCGCTGAAACACCTGTATTTTCAG  
 GGCAGCTGGTTACATCCCAGCTCCCGCGTGAACGGTCAGGCTTACGTTCGTAAAGA  
 CGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCTGGTCACCATCATCACACCACCATCACCATC  
 ATCACTGATAAagctt

SEQ ID NO:35: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-I1C9Ca1-TEV-foldon 10His (H1TEV2-I1C9Ca1)

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLICIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIGIFGA  
IAGFIEGGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNT  
TCQTPKGAIANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFGAIAGFIE  
 GGWTGMVDGWYGYHHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKE

10

20

30

40

50

FNHLEKRIENLKKVDDGFLDIWTVNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKN  
NAKEIGNGCDEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGA  
NLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWLLSTFLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO:36: Peptide sequence of I1C9

GIFGAIAGFIEG

SEQ ID NO:37: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-I1C9Ca1-TEV-foldon 1  
0His (H1TEV2-I1C9Ca1)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
CGGATACACTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATAACCGTGGATAACAGTG  
CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCAGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
CTAAGACAAAGCAGCTGGCCTAACGATTCTAACAGAACCTGATCTGGCTGGTAAGAAGGGCAACAG  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCCTAACGCTCTAACAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAACGCTGGTCTGT  
GGGAATCCACCACCCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCGAGAACGCGAT  
GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAAGCAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TGGCATTTCGGCGCTATGCCGGCTTCAATTGAGGGAGGCAGAACATGAAATTACTACTGGA  
CCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCT  
AGATATGCATTGCTATGGAGAGAACATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATAACCC  
TGTGCACGACTGTAATACCAACCTGTCAGACACCTAACGGGCCATTAATACCAAGCCTGC  
CCTTCCAGAAATTACCCCTATCACCATCGCAAGTGTCTAACGATGTGAAGAGCACC  
AACGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAACACCTGTATTTCAAGGCCT  
GTTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGT  
ACGGCTATCACCAACAGAACATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAGTCTACA  
CAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGTACGAGAACGAC  
CCAGTTACAGCTGGCAAGGAGTTAACCAACCTGGAGAACGAGAACATGAGAACCTGA  
ACAAGAAAGTGGACGACGGCTTCTGGATATTGGACCTACAAATGCCGAGCTGCTCGT  
CTCCTGGAGAACGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGCAACGGCTGCTTGAGT  
GAAGGTGAGAACGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGCAACGGCTGCTTGAGT  
TCTACCACAAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTAC  
CCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAGAAC  
AAGCACAAGAACATCTACAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCGTTCTGGTTACA  
TCCCGGAAGCTCCCGTGAACGGTCAAGGCTACGTTCTAACGCGTGAATGGTTCTG  
CTGTCTACCTTCTGGTCACCATCATCACCAACCATCACACTGATAAagctt  
SEQ ID NO:38: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-I1C9Ca2-TEV-foldon 10Hi  
s (H1TEV2-I1C9Ca2)

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLICIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAKGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKVTAACAGIFGAIAGFIEGFYKNLILVVKK  
NSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAI  
RPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPYAFAMERNAGSGIIISDTPVHD  
NTTCQTPKGANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLR LATGLRNSPENLYFQGLFGAIAGF  
IEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVG  
KEFNHLEKRIENLKKVDDGFLDIWTVNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLK  
NNAKEIGNGCDEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGA  
ENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWLLSTFLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO:39: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-I1C9Ca2-TEV-foldon 1

10

20

30

40

50

0His (H1TEV2-I1C9Ca2)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATACCGTGGATAAGTG  
 CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCAGAACATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAAGCAGCTGGCCTAATCAGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCCT  
 GGCATTTCGGCCATCGCCGGCTTCATTGAGGGATTAAAGAACCTGATCTGGCT 10  
 GGTGAAGAAGGGCAACAGCTACCCAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCA  
 AAGAAGTGCTGGTGTGGGAATCCACCAACCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGC  
 CTGTACCAAGAACATGCCATGCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATACAGAAAAAGTT  
 CAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACT  
 ACTGGACCTGGTGGAACCTGGCAGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTG  
 GTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGA  
 TACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGGCCATTAAACCA  
 GCCTGCCCTTCCAGAATATTCAACCTATCACCATCGCAAGTGTCTAACAGTATGTGAAG  
 AGCACCAAGCTGAGACTGGTACCGGTTGAGAAATAGCCTGAAAACCTGTATTTCA  
 AGGCCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATG 20  
 GCTGGTACGGCTATCACCAACAGAACATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAG  
 TCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAAGGTGAACAGCGTGTGAGAAGAT  
 GAACACCCAGTTACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAACATCGAGA  
 ACCTGAACAAGAAAGTGACGACGGCTTCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTG  
 CTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCT  
 GTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGCAACGGCTGCT  
 TTGAGTTCTACCACAAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTAC  
 GACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCTGAA  
 ACTGGAAAGCACAAGAACATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGGGTTCTG  
 GTTACATCCCAGCTCCCGTGAACGGCTTACGTTGTAAGACGGTGAATGG 30  
 GTTCTGCTGTCTACCTCCTGGTCACCATCATCACCAACACCATCACACTGATA  
 Aaagctt

SEQ ID NO:40: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-I1C9Sa3-TEV-foldon 10His (H1TEV2-I1C9Sa3)

MVSAIVLYVLLAAAHSFADTLICIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVGIFGAIAGF  
IEGYPLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSSTDQQLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIA  
 IRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDC  
 NTTCQTPKGAIANTSPLFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQQLFGAIAGF 40  
 IEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVG  
 KEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLK  
 NNAKEIGNGCFFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGA  
 ENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:41: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-I1C9Sa3-TEV-foldon 10His (H1TEV2-I1C9Sa3)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATACCGTGGATAAGTG  
 CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG 50

GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCCTGCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGGCATTTCGGCGC  
 TATGCCGGCTTCATTGAGGGATACCCTAACGACTGTCTAACAGAGCTACATCAACGACAAGG  
 GCAAAGAAGTGCTGGTGCTGGGAATCCACCCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAG  
 AGCCTGTACCAGAACGCCATGCCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACAGAAAAA  
 GTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATT  
 ACTACTGGACCCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTG 10  
 GTGGTGCTTAGATATGCATTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTC  
 TGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCAACCTGTCAGACACCTAACGGCGCATTAAATA  
 CCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCAACCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAACGATGTG  
 AAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTATT  
 TCAAGGCCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGG  
 ATGGCTGGTACGGCTATCACCAACAGAACATGAGCAGGGATCGGATATGCCGCCGATCTG  
 AAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTATCGAGAA  
 GATGAACACCCAGTTACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAACAGAACATCG  
 AGAACCTGAACAAGAAAGTGGACGACGGCTTCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAG  
 CTGCTCGTGCCTGGAGAATGAGAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAA 20  
 CCTGTACGAGAAGGTGAGAACGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGAAACGGCT  
 GCTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACC  
 TACGACTACCCCTAACGTATAGCGAGGAGGCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGT  
 GAAACTGGAAAGCACAAAGAACATCTACAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCGTT  
 CTGGTTACATCCCGGAAGCTCCCGGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTAAAGACGGTGAA  
 TGGGTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGTCACCATCATCACCAACCATCACCATCACTG  
 ATAaagctt

SEQ ID NO:42: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-I1C9Sa4-TEV-foldon 10His (H1TEV2-I1C9Sa4) 30

MVSAIVLYVLLAAAHSFADTLICIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPGIFGAIAGFIEGWPNHDNSNKVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVK  
 KGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPE  
 IAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVH  
 DCNTTCQTPKGAIANTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFGAI  
 AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFT  
 AVGKEFNHLEKRIENLNKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVR  
 SQLKNNAKEIGNGCEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRI  
 YQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO:43: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-I1C9Sa4-TEV-foldon 10His (H1TEV2-I1C9Sa4) 40

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTGATTGGCTACCAAGCCAACAATAGCACCGATACCGTGAGTACAGTG  
 CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTGGCATTTCGCGCTATGCCGGCTTATTGAGGGATGCCATAATCACGATTCTAAT  
 AAGGGAGTGACAGCCGCTGTCCATGCCGGAGCCAAGTCCTTACAAGAACCTGAT 50

CTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAGCTACCCCTAAGCTGCTAAGAGCTACATCAACGACA  
 AGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGTGGGAATCCACCACCTAGCACAAGCGCCGATCAG  
 CAGAGCCTGTACCAGAATGCCGATGCCATTGTGTTGTGGGCAGCAGCAGATAACAGCAA  
 AAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGA  
 ATTACTACTGGACCCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAAT  
 CTGGTGGTGCCTAGATATGCATTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTAT  
 CTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAAGACACCTAACGGCGCCATT  
 ATACCAGCCTGCCCTTCAGAATATTCAACCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTAT  
 GTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGTACCGGCTTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTA  
 TTTCAAGGCCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGG 10  
 TGGATGGCTGGTACGGCTATCACCAACAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGAT  
 CTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTATCGA  
 GAAGATGAACACCCAGTTACAGCTGAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAA  
 TCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGGACGACGGCTCCTGGATATTGGACCTACAATGCC  
 GAGCTGCTCGTCCCTGGAGAATGAGAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAA  
 AACCTGTACGAGAACGGTGAAGAACAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATGGCAACG  
 GCTGCTTGAGTTCTACCACAAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGC  
 ACCTACGACTACCCCTAAGTATAGCAGGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGG  
 CGTAAACTGGAAAGCACAAGAATCTACAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAAGGGCG  
 GTTCTGGTTACATCCCGAAGCTCCCGTGAAGGCTTACGTTCAAGACGGT 20  
 GAATGGGTTCTGCTGTACCTCCTGGTCACCATCATCACCAACCATCACATCA  
 CTGATAAagctt  
 SEQ ID NO:44: Peptide sequence of GP67ss-H1H5cs-I1C9Sb-TEV-foldon 10His  
 (H1H5cs-I1C9Sb)  
 MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLICIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKVTAACTPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSGIFGAIAGFIEGDAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRD  
 QEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQT  
 PKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGLFGAIAGFIEGG 30  
 WTGMVDGWYGYHHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN  
 HLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNA  
 KEIGNGCFFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENL  
 YFQGGSGYIPEAPRDQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH  
 SEQ ID NO:45: Nucleotide sequence of GP67ss-H1H5cs-I1C9Sb-TEV-foldon 10  
 His (H1H5cs-I1C9Sb)  
 ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGGCGCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG 40  
 GCTGGATTCTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCTAACGATTCTAACAGGGAGTGACAGCCGCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCCTAACGCTGTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGTGGTGTGT  
 GGGGAATCCACCAACCTAGCGGCATTTCGGCGCTATGCCGGCTTCATGAGGGAGAT  
 GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACAGAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT 50  
 TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAAC  
 CTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATT

GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATAACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
TTCACCCATCACCATCGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGAGAGACGCAAGAAGAGAGAGGCCTGTTGG  
AGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCT  
ATCACCACCAAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAGTCTACACAGAAC  
GCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTT  
TACAGCTGTGGCAAGGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGA  
AAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCCTG  
GAGAATGAGAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAACGGT  
GAGAAGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGGAGATCGCAACGGCTGCTTGAGTTCTACC  
ACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAG  
TATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGGAGATCGACGGCGTGAACACTGGAAAGCA  
CAAGAACATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCG  
GAAGCTCCCGGTGACGGTCAAGCTACGTTGTAAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTC  
TACCTTCCTGGTCACCATCATCACCAACCACATCATCACTGATAAagctt

SEQ ID NO:46: Peptide sequence of GP67ss-H1H5cs-I1C9Ca-TEV-foldon 10His (H1H5cs-I1C9Ca)

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLICIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE 20  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPGIFGAIAGF  
IEGGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQT  
PKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGLFGAIAGFIEGG  
WTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN  
HLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNA  
KEIGNGCFFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENL  
YFQGGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:47: Nucleotide sequence of GP67ss-H1H5cs-I1C9Ca-TEV-foldon 10 His (H1H5cs- I1C9Ca)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
CGGATACACTGTATTGGCTACCAAGCCAACAATAGCACCGATACCGTGAGACTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAAATGG  
CAAGCTGTGAAGCTGAGAGGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTCC  
CTAACGACAAGCAGCTGGCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAACGGCAACAG  
CTACCCCTAACGCTAACATCAACGACAAGGGCAAAGAACAGTGTGGTGCTGT 40  
GGGAATCCACCAACCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAAGAACGCCGAT  
GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACAGCAAAAGTTCAAGCCTGGCATTTCGG  
CGCTATGCCGGCTTCATTGAGGGAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATAACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
TTCACCCATCACCATCGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGAGAGACGCAAGAACAGAGAGGCCTGTTGG  
AGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGcT  
ATCACCAACCAAGATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAGTCTACACAGAAC 50

GCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTT  
TACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAAGAGAACGAGACTACGAGAACCTGAACAAGA  
AAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTCCTG  
GAGAACGAGAGAACCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAACGAGT  
GAGAACGAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTGAGTTCTACC  
ACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAG  
TATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTAAAGACGGTAATGGTTCTGCTGTC  
CAAGAACATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCG  
GAAGCTCCCGTGACGGCTACGTTCGTAAAGACGGTAATGGTTCTGCTGTC  
TACCTTCCTGGTCACCATCATCACACCACCATCACACTGATAAagctt

10

SEQ ID NO:48: Peptide sequence of GP67ss-H1H5cs-FI6Sab-TEV-foldon 10His (H1H5cs-FI6Sab)

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLICIGYHANNSTDVTVDLKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTAAACPAGAKSFYKNLIWLVRKKRGLFG  
AIAGFIEYINDKGKEVLVLWGIHHPSKESTQKAIDGVTNKVNSDAYVFGSSRYSKKFKPE  
IAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVH  
DCNTTCQTPKGAIANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGLFG  
AIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQF  
TAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKV  
RSQLKNNAKEIGNGCIFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTR  
IYQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH

20

SEQ ID NO:49: Peptide sequence of maturation cleavage site of FI6 epitope RKKRGLFGAIAGFIE

SEQ ID NO:50: Peptide sequence of helix coiled-coil peptide of FI6 epitope KESTQKAIDGVTNKVNS

SEQ ID NO:51: Nucleotide sequence of GP67ss-H1H5cs-FI6Sab-TEV-foldon 10 His (H1H5cs-FI6Sab)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACATAGCACCGATAACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAAGAACGAGCTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATTGCCG  
GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAGACGCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCC  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAGAAAGAAGAGAGG  
CCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGC  
TGGTGTGTGGGAATCCACCAACCTAGCAAGGAGTCTACACAGAACGCCATTGATGGC  
GTTACAATAAGGTCAATTCTGATGCCATTGTGTTGTGGCAGCAGCAGATACAGCAA

30

AAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAACATGA  
ATTACTACTGGACCCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAAT  
CTGGTGGTGCCTAGATATGCATTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTAT  
CTCTGATAACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCATT  
ATACCAGCCTGCCCTTCCAGAACATTACCACTACACCACATCGCAAGTGTCTTAAGTAT  
GTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATGCCCTCAGAGGGAGAG  
ACGCAAGAACGAGAGAGGCCCTGTTGGAGGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCG  
GAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCAACAGAACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGT  
GCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGT  
GATCGAGAACGAGATGAACACCCAGTTACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGA

40

50

AGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTGGACCTAC  
 AATGCCGAGCTGCTCGTCCTGGAGAACCTGGACTACCACGACAGCAA  
 TGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAACGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCG  
 GCAACGGCTGCTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAG  
 AACGGCACCTACGACTACCCATAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGAT  
 CGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAAGAACATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTT  
 AGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCGTAA  
 GACGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTCCCTGGTCACCATCATCACACCACATACCA  
 TCATCACTGATAAagctt

SEQ ID NO:52: Peptide sequence of GP67ss-H1WT-FI6Sab-TEV-foldon 10His ( H1WT-FI6Sab) 10

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTL CIGYHANNSTD TVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIA G WILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHD SNKGVT AACPHAGAKSFYKNL IWLVRKKRGLFG  
AIAGFIEYINDKGKEVLVLWGIHHPSKESTQKAIDGVTNKVNSDAYVFVGSSRYSKKFKPE  
 IAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVH  
 DCNTTCQTPKGAI NTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQS RGLFGAIAG  
 FIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVN S VIEKMNTQFTAV  
 GKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIW TYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQ  
 KNNAKEIGNGC FEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQG 20  
 AENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO:53: Nucleotide sequence of GP67ss-H1WT-FI6Sab-TEV-foldon 10His ( H1WT-FI6Sab)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACATAGCACCGATA CC GTGGATAAGCACAATGG  
 CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCTGGCAGCTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTAGCGTGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC 30  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCCTGTCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAGAAAGAAGAGAGG  
 CCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGC  
 TGGTGTGTGGGAATCCACCA CCTAGCAAGGAGTCTACACAGAACGCCATTGATGGC  
 GTTACAAATAAGGTCAATTCTGATGCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATACAGCAA  
 AAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGT GAGAGATCAGGAAGGCAGAATGA  
 ATTACTACTGGACCCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAAT  
 CTGGTGGTGCCTAGATATGCATTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTAT  
 CTCTGATAACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAAGACACCTAACGGCGCCATT  
 ATACCAGCCTGCCCTCCAGAATATTCACCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTAT 40  
 GTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGCATCCAGAG  
 CAGAGGCCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGG  
 ATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAAGAATGAGCAGGGATCGGATATGCCGCCATCTG  
 AAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGTGAGAA  
 GATGAACACCCAGTTACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAAGAGAAATCG  
 AGAACCTGAACAAAGAAAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTGGACCTACAATGCCAG  
 CTGCTCGTGCTCCTGGAGAACATGAGAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAA  
 CCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCT  
 GCTTGAGTTCTACCACAAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACC  
 TACGACTACCCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGT 50

GAAACTGGAAAGCACAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAGGGCGGTT  
 CTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTACGGTCAGGCTTACGTTCTGAAAGACGGTGAA  
 TGGGTTCTGCTGTCTACCTCCTGGTCACCATCATCACCAACCACATCATCACTG  
 ATAAagctt

SEQ ID NO:54: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV1-FI6Sa-TEV-foldon 10His (H1TEV1-FI6Sa)

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLICIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTAAACPAGAKSFYKNLIWLV**RKKRGLFG**  
AIAGFIEGYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIR  
 PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCN  
 TTCQTPKGAIANTS LPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIENLYFQGLFGAIAGFIE  
 GGWTGMVDGWYGYHHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKE  
 FNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKN  
 NAKEIGNGCFFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAE  
 NLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWLLSTFLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO:55: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV1-FI6Sa-TEV-foldon 10H is (H1TEV1-FI6Sa)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTG  
 CGGATAACACTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATACCCTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCTGGCAGCTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTCCAGCTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCTAACGATTCTAACAGGAGTGACAGCCGCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAGAAAGAGAGAGG  
 CCTGTTGGCGCTATGCCGGCTTCATTGAGGGATACATCAACGACAAGGGCAAAGAAG  
 TGCTGGTGCTGGGAATCCACCAACCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTAC  
 CAGAATGCCGATGCCATTGTGTTGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAGTTCAAGCC  
 TGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGGAGAATGAATTACTACTGG  
 CCCTGGTGGAACCTGGCATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCT  
 AGATATGCATTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCC  
 TGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCATTAAATACCAGCCTGC  
 CCTTCCAGAAATTACCCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAACGAGACTGGTAC  
 AAGCTGAGACTGGCTACCGGCTGAGAAATATCGAAAACCTGTATTTCAAGGCCTGTT  
 TGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACG  
 GCTATCACCACCAAGTGGAGGATCCGGATATGCCGCGATCTGAAGTCTACACAG  
 AACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTATCGAGAAAGATGAACACCC  
 GTTACAGCTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACA  
 AGAAAGTGGACGACGGCTCCTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGC  
 CTGGAGAATGAGAGAACCCCTGGACTACCAACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTAC  
 GAGAA  
 GGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTGAGTTCT  
 ACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCC  
 AAGTATAGCGAGGAGGCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAGACTGGAA  
 GCACAAAGAATCTATCAGGGCGCTAAAACCTGTATTTCAAGGGCGGTTCTGGTTACATC  
 CCGGAAGCTCCGCGTACGGTCAGGCTTACGTTCTGAAAGACGGTGAATGGGTTCTGCT  
 GTCTACCTTCTGGTCACCATCATCACCAACCACATCACCATCATCACTGATAAagctt

SEQ ID NO:56: Peptide sequence of GP67ss-H1H5cs-M2eCa2-TEV-foldon 10His (H1H5cs-M2eCa)

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:57: Peptide sequence of M2e peptide

SLLTEVETPTRNGWECKCSDS

SEQ ID NO:58: Nucleotide sequence of GP67ss-H1H5cs-M2eCa2-TEV-foldon 10His (H1H5cs-M2eCa)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTGGCGGCCGGCGCATTCTGCCTTTCGGATAACTGTGACCGATACGGTGGAGGATAAGCACAAATGGCAAGCTGTGAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCGGCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTATATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTGAGAGATTGAGATCTTCCCTAAGACAAGCAGCTGCCCTAACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCTGTCCTCATGCCGGAGCCAAGTCTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTAAGAACGGCAACAGCTACCTAACGACAAGGGCAAAGAAGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGGAAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCGAGAACGGCAACAGGCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATACAGAAAAAGTTCAAGCCTCCCTGCTGACCGAGGTGGAGACCCCCACCAAGGAACGGCTGGAGTGCAAGTGCTCCGACTCCGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATAACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCAATTAATACCAGCCTGCCCTCCAGAATATTCACCCATCACCATGGCAAGTGTCTAACGAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGAGAGACGCAAGAACAGAGAGGGCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAACAGATGAAACACCCAGTTACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAACCTGAACAAAGAAAGTGGACGACGGCTTGGATATTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTCCTGGAGAATGAGAGAACCCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGACCGATCGAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTGGAGTTCTACCCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTAAGAACGGCACCTACGACTACCCCTAACGAGAATGAGAGAACAGCTGAGAAGAGGAGGCCAGCTGAATAGAGAGAGATCGACGGCGTAAACTGGAAAGCACAAGAACATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCCGTGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTAAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTACCTTCCCTGGGTACCCATCATCACCAACCACATACCATCATCACTGATAAaqctt

SEQ ID NO:59: Peptide sequence of GP67ss-H1H5cs-M2eSb-TEV-foldon 10His (H1H5cs-M2eSb)

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRLGVAPLHLGKCNIAKGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK

LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSSLLTEVETPTRNGWECKCSDSDAYVFGSSRYSKKFK  
 PEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP  
 VHDCNTTCQTPKGAINTSLPFQNIIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGL  
 FGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNT  
 QFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYE  
 KVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLES  
 TRIYQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWLLSTFLGHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:60: Nucleotide sequence of GP67ss-H1H5cs-M2eSb-TEV-foldon 10 His (H1H5cs-M2eSb)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCCGCATTCTGCCTTG 10  
 CGGATAACACTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATACGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAAATGG  
 CAAGCTGTGAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTAGCTGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAAGCAGCTGGCCTAACGATTAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTAAGAACGGCAACAG 20  
 CTACCCCTAACGCTGTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAACGCTGGTCTGT  
 GGGGAATCCACCAACCCCTAGCTCCCTGCTGACCGAGGTGGAGACCCCCACCAGGAACGGC  
 TGGGAGTGCAAGTGCTCCGACTCCGATGCCTATGTGTTGGCAGCAGCAGATACAG  
 CAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAA  
 TGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGA  
 AATCTGGTGGTGCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCAT  
 TATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAACGGCGCCA  
 TTAATACCAGCCTGCCCTCCAGAATATTCAACCTATCACCATCGCAAGTGTCTAACG 30  
 TATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGA  
 GAGACGCAAGAACGAGAGAGGGCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGA  
 CCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTACCAACCAGAACATGAGCAGGGATCCGGATAT  
 GCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAG  
 CGTGATCGAGAACGATGAACACCCAGTTACAGCTGTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGG 40  
 AGAACGAGAACCTGAACAAAGAAAGTGAGACGGCTTCCTGGATATTGGACC  
 TACAATGCCGAGCTGCTCGTGCCTGGAGAACCTGGACTACCGACAG  
 CAATGTGAAGAACCTGTACGAGAACGGTGAGAACGAGAACCTGGACTACACGACAG  
 ATCGGCAACGGCTGCTTGAGTTCTACCACAAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGT  
 GAAGAACGGCACCTACGACTACCCCTAACGACAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAG  
 AGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAAAGAACATCTACAGGGCGCTGAAAACCTGTAT  
 TTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCG  
 TAAAGACGGTGAAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCTGGTCACCATCATACCAACCACATC  
 ACCATCATCACTGATAAagctt

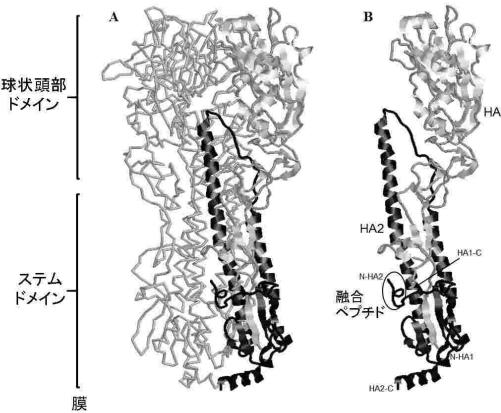
SEQ ID NO:61: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-M2eCa2-TEV-foldon 10His (H1TEV2-M2eCa)

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDNSKGVTACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSDQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPSLLTEVET  
PTRNGWECKCSDSGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP  
 VHDCNTTCQTPKGAINTSLPFQNIIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFG  
 AIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQF 50  
 TAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKV

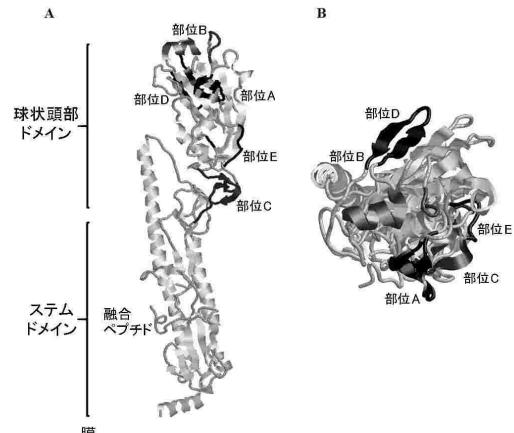
RSQLKNNNAKEIGNGCFFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTR  
 IYQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHH  
 SEQ ID NO:62: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-M2eCa2-TEV-foldon 1  
 0His (H1TEV2-M2eCa)  
 ccATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTGGCGGCGGCATTCTGCCTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAAATAGCACCGATAACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAACATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCACAATGGCACCTGTTACCCCTGGCAGCTTCATCGATTA 10  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCAGCGTCCAGCTTCAGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCCTGTCC  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAACGGCAACAG  
 CTACCCCTAACGCTGTCAGAGACTACATCAACGACAAGGGCAAAGAACAGTGTGGTGT  
 GGGGAATCCACCACCCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAAGAACGG  
 GCCTATGTGTTGTGGCAGCAGCAGATAACAGAAAAAGTTCAAGCCTCCCTGCTGAC  
 CGAGGTGGAGACCCCCCACCAGGAACGGCTGGAGTGCAAGTGCTCCGACTCCGGCAGAA  
 TGAATTACTACTGGACCCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTGAGGCCACCGGA  
 AATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCAT  
 TATCTCTGATAACCCCTGTGCACGACTGTAATACCAACCTGTCAGACACCTAACGGGCCA 20  
 TTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCCTATCACCATGGCAAGTGTCTTAAG  
 TATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCT  
 GTATTTCAAGGCCTGTTGGAGCCATGCCGGCTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAA  
 TGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCAAGAGAACAGTGGACGACGGCTCCTGGATATTG  
 GATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGtGAACACAGCGT  
 GAGAACAGATGAACACCCAGTTACAGCTGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGA 30  
 GAATCGAGAACCTGAACAAGAACAGTGGACGACGGCTCCTGGATATTGAGGACTACAAT  
 GCCGAGCTGCTCGTGCCTGGAGAACAGTGGAGGACTACCAAGCACAGCAATGTC  
 GAAGAACCTGTACGAGAACGGTGAGAACAGCTGAAGAACAAATGCCAACGGAGATCG  
 AACGGCTGTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAA  
 CGGCACCTACGACTACCCCTAACTAGTATAGCGAGGAGGCCAGCTGAATAGAGAGGAGATCG  
 ACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAAGAACATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTT  
 CAGGGCTTCTGGTTACATCCCAGCTCCCGTGCAGGCTACGTTCGTAAAGA 40  
 CGGTGAATGGTTCTGCTGTCTACCTTCGGTACCATCATCACCAACCATCACCATC  
 ATCACTGATAAagctt

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

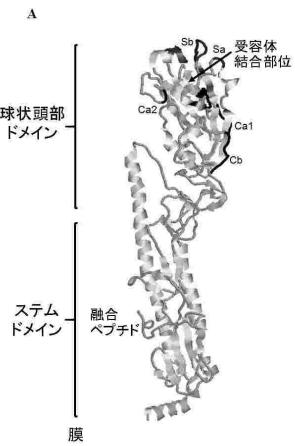
20

30

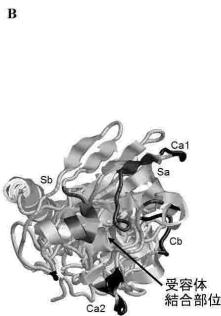
40

50

【図3】



【図4】

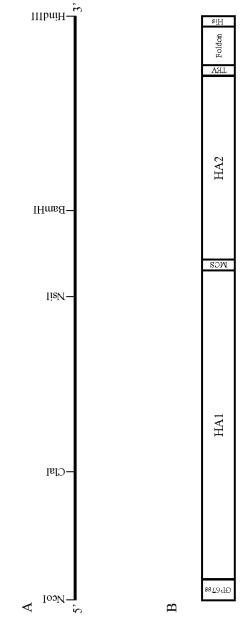


10

【 図 5 】

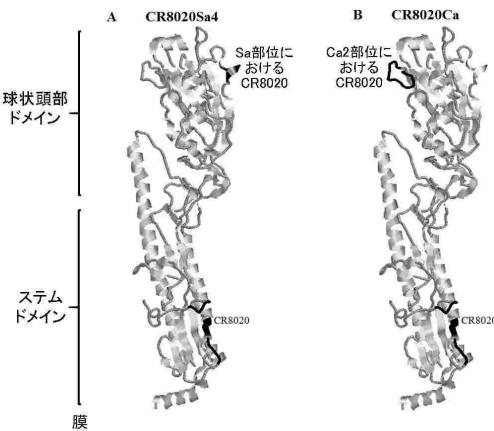
	E1.6	E1.6
	CEU20	CEU20
13. PİONİRTİYACAKPEKİONTİLATANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE 13. PİONİRTİYACAKPEKİONTİLATANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE	392	392
14. PİONİRTİYACAKPEKİONTİLATANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE 14. PİONİRTİYACAKPEKİONTİLATANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE	390	390
15. PİONİRTİYACAKPEKİONTİLATANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE 15. PİONİRTİYACAKPEKİONTİLATANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE	389	389
Hes. Res. İRSC TEV12, TEV3		
成績切符部 (NCS)		
13. HOKEFESVEGRİDÜZEKÝÝMDİTUR.İLALIYALİLENQİTTİDÜZENİGÇİTCİNACİLESİRİNTİDÜYER 13. HOKEFESVEGRİDÜZEKÝÝMDİTUR.İLALIYALİLENQİTTİDÜZENİGÇİTCİNACİLESİRİNTİDÜYER	492	492
14. TAVŞENELERLENKANAKDODGİLTANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE 14. TAVŞENELERLENKANAKDODGİLTANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE	490	490
15. TAVŞENELERLENKANAKDODGİLTANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE 15. TAVŞENELERLENKANAKDODGİLTANŞİNEPEKİOTİLATANŞİNE	489	489
DEAİNNERPOLİKİTLESG- YKD DEAİNNERPOLİKİTLESG- YKD	514	514
WT DEŞİLARDE DÖVÜSLERİTG WT DEŞİLARDE DÖVÜSLERİTG	512	512
BESTÜLKÜRE DÖVÜSLERİTG BESTÜLKÜRE DÖVÜSLERİTG	511	511

【 四 6 】



20

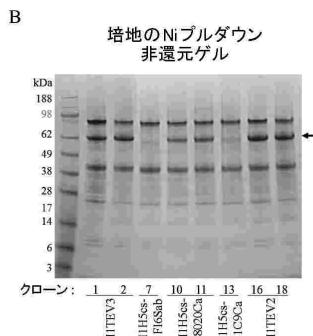
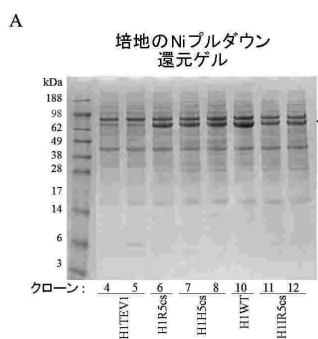
30



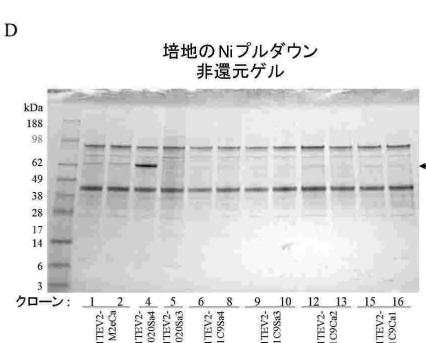
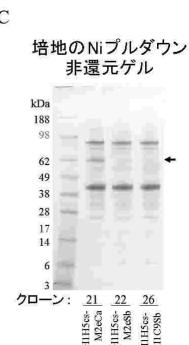
40

50

【図 7 A B】



【図 7 C D】

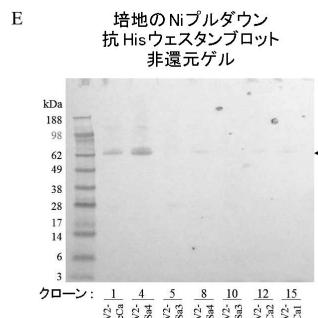


10

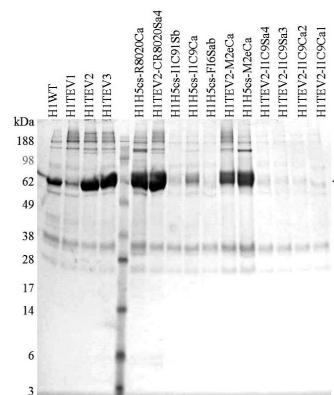
20

30

【図 7 E】



【図 8】



40

50

【配列表】

0007560938000001.app

10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 12 N	15/44 (2006.01)	F I	C 12 N	15/44
C 12 N	15/62 (2006.01)		C 12 N	15/62
C 12 P	21/02 (2006.01)		C 12 P	21/02

米国(US)

合議体

審判長 松波 由美子

審判官 富永 みどり

審判官 伊藤 幸司

## (56)参考文献

国際公開第2004/034956 (WO, A2)  
特開平5-262667 (JP, A)  
Science, (2011), 333, [6044], p. 843-850  
Proc. Natl. Acad. Sci., (1975), 72, [1], p. 9  
3-97  
PLoS ONE, (2011), 6, [1], Article.e16136 (p.  
1-10)

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K

C12N

Caplus / BIOSIS / MEDLINE / EMBASE (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)