

(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)

A 6 1 P

31/16 (2006.01)

C 0 7 K

14/11 (2006.01)

C 1 2 N

5/10 (2006.01)

C 1 2 N

7/01 (2006.01)

F I

A 6 1 K

39/145

A 6 1 P

31/16

C 0 7 K

14/11

C 1 2 N

5/10

C 1 2 N

7/01

Z N A

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)

審査番号

不服2022-17772(P2022-17772/J  
1)

審査請求日

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

(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 ロ  
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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 異種エプトープ及び／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断されるように、ただし、いかなる動物のプロテアーゼによっても切断されないように修飾されており、且つ、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、HAタンパク質のステムエプトープが、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、該ステムエプトープは、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プロテアーゼ切断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プロテアーゼ切断部位によって置換されているか、又は切断部位のN末端アルギニンのみが前記TEVプロテアーゼ切断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が切断されている、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。

【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。

20

【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13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 Influenza Hemagglutinin with Heterologous Epitopes and/or Altered Maturation Cleavage Sites 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照により組み込まれる。

【0002】

配列表の参照による組み込み

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758252000140 Seq List.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、その全てが参照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、改変された異種エプーブ及び/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。

(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; NA b、中和抗体; b NA b、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; c DNA、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; BmNPV、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); BIIC、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); 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; PBS、リン酸緩衝生理食塩水。)

【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ソードは、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/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。

【0005】

10

20

30

40

50

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 (bNAbs) 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bNAbsの大部分は、HA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、HA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 (HA) 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HAが約500分子あると推定される。HA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、HAがインフルエンザ系統の宿主範囲を決定する。

【0007】

HAは、HA0と呼ばれる単鎖前駆体として小胞体中で合成される (Stevens, Jら、Science (2006) 312: 404~410)。HA0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、HA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。HA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。HA0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 (MCS) 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、HA1及びHA2からなる成熟型に変換される。HA1は、HA0のより大きなN末端部分であり、HA2は、より小さなC末端部分である。HA2は、短いC末端細胞内尾部を有する膜貫通領域を有し、HAを膜に係留する。各々の成熟HAは、約45 kDaのHA1と、約25 kDaのHA2を含む、全部で約70 kDaの分子量を有する。多くのインフルエンザの系統由来のHAの細胞外部分の原子構造が決定されている。成熟HAの構造モデルを図1に示す。HA0又は成熟型のいずれかとしての全てのHA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HA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HA1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HA2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、HA1とHA2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ヘリックスからなる。各々のHA単量体は、約13 kDaの分子量の全炭水化物又はHA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。HA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 (Veit, Mら、J. Virol (1991) 65: 2491~2500)。

【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HA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HA)。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産生の困難性のために大部分が失敗している (Krammer, F及びPalese, P. Curr Opin Virol (2013) 3: 521~530; Eckert, D. M及びKay, M. S., PNAS (2010) 107: 13563~13564)。HA2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)。HA2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、H3のHAに基づいた別のHA2コンストラクト (HA6) 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 (Bommakanti, Gら、PNAS (2010) 107: 13701 ~ 13706)。HA6は、マウスにおいて非常に免疫原性であり、相同のインフルエンザ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、HA6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。HA2とステムドメイン中のHA1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 (Steel, Jら、mBio (2010) 1: e00018 ~ 10)。免疫原は、相同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のHAに対して交差反応性である抗血清を誘発した。HA6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H1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WO2014/191435 \_\_A1)。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H5ウイ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H5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H1N1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H5N1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 (Ellebedy, A. Hら、PNAS (2014) 111: 13133 ~ 13138; Nachbagauer, Rら、J Virol (2014) 88: 13260 ~ 13268; Whittle, 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、H6、H9、又はH5球状頭部ドメイン、及びH1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 (Picca, 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ができることを示唆する。

10

20

#### 【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の相同の抗原部位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、MDC K (メイディン・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の相同の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。

30

#### 【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の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けさせることである。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ができることを示唆する。

40

#### 【0016】

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を産生した。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 ( 1 9 9 4 ) 1 2 : 7 5 3 ~ 7 6 0 ; 米国特許U . S . 5 , 5 9 1 , 8 2 3 \_ A ; L i , S ら、J . V i r o l ( 1 9 9 3 ) 6 7 : 6 6 5 9 ~ 6 6 6 6 )。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】

【0 0 1 7】

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、並びにその産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】

【0 0 1 8】

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。

【0 0 1 9】

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。

【0 0 2 0】

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】

【 0 0 2 1 】

【図 1】図 1 は、A / カリフォルニア / 0 7 / 2 0 0 9、ブタ起源インフルエンザ A ウイルス H 1 N 1 系統 ( P D B : 3 L Z G ) の成熟 H A の細胞外部分の 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 H A のペプチド配列は、親の野生型 ( W T ) H 1 の H A コンストラクトを作製するのに使用する。図 1 A は、1 つの H A 単量体をリボン描画とし、他の 2 つを骨格描画とする H A 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。H A 1 は明るい影のリボンとして示され、H A 2 は暗い影のリボンとして示される。図 1 B は、H A 1 及び H A 2 の位置、並びに H A 1 及び H A 2 の N 末端及び C 末端を有する単一の H A 単量体を示す。融合ペプチドは丸で囲まれる。

10

【図 2】図 2 は、A / カリフォルニア / 0 7 / 2 0 0 9 の H 1 の H A 単量体に対してマッピングして、H 3 の H A の免疫優性抗原部位のおよその位置を示す。図 2 A は、図 1 のようにリボン描画を示す。H 3 の H A 免疫優性抗原部位 A、B、C、D、及び E を暗い影で示す。図 2 B は、膜から遠位の球状頭部ドメインの上の図 2 A の上面図である。

【図 3】図 3 は、A / カリフォルニア / 0 7 / 2 0 0 9 の H 1 の H A 単量体に対してマッピングして、H 1 の H A の免疫優性抗原部位のおよその位置を示す。図 3 A は、図 1 のようにリボン描画を示す。H 1 の H A 免疫優性抗原部位 C a 1、C a 2、C b、S a、及び S b を暗い影で示す。図 3 B は、膜から遠位の球状頭部ドメインの上部である図 3 A 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。

20

【図 4】図 4 は、H 1 の H A コンストラクトの模式的な設計を示す。図 4 A は、コンストラクトの核酸の特徴の模式図である。サブクロニングのための制限部位の位置は標識される。図 4 B は、図 4 A 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。G P 6 7 s s は、N 末端における G P 6 7 分泌シグナル (シグナルペプチド) を表す。H A 1 は、H A の H A 1 を表す。M C S は、H A 1 の一部である H A 成熟切断部位を表す。H A 2 は、H A の H A 2 を表す。T E V は T E V 切断部位を表す。F o l d o n は F o l d o n 配列を表す。H i s は、C 末端における 1 0 - ヒスチジンタグ ( 1 0 × H i s - t a g ) を表す。

30

【図 5】図 5 は、H A 球状頭部ドメインにおいて異種エプ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 ( W T ) を、H 3 ( A / 愛知 / 2 / 1 9 6 8 H 3 N 2 ) 及び H 1 ( A / プエルトリコ / 8 / 1 9 3 4 H 1 N 1 ) の H A 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 H A 0 ナンバリングに基づいて右側に標識する。成熟切断部位 ( M C S ) を、矢印及び垂直線で示す。H 3 の H A の免疫優性抗原部位 A、B、C、D、及び E を H 3 配列の上にマークする。免疫優性抗原部位 C a 1、C a 2、C b、S a、及び S b を H 1 配列の下にマークする。W T 中の下線を付した配列は、配列の下に示す相同のエプ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 ( M C S ) の下に示す。広域中和抗体 ( b N A b ) に対する天然の免疫優性抗原部位、F I 6、1 C 9、及び C R 8 0 2 0 を配列の上の線によってそれぞれマークする。

40

【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 C R 8 0 2 0 エプトープを有する H A 単量体のモデルを示す。H A 単量体は図 1 のようにリボン描画で示す。複合 C R 8 0 2 0 エプ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 C R 8 0 2 0 エプトープをまた暗い影で示す。図 6 A は、C R 8 0 2 0 S a 4 のモデルを示す。図 6 B は、C R 8 0 2 0 C a のモデルを示す。

【図 7】図 7 は、本発明に記載される H A 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 S F 9 細胞の細胞培地を採集し、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 で洗浄して結合しないタンパク質を除去した。N i - N T A 樹脂に結合したタンパク質を C

50



oomassie (登録商標) 染色を伴う SDS-PAGE (図 7A、B、C、及び D) 又は抗 His ウェスタンブロット (図 7E) で解析した。矢印は全長 HA0 を示す。

【図 8】図 8 は、本発明で使用する精製 HA 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 SF9 細胞の細胞培地を採集し、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 で洗浄した。結合したタンパク質をイミダゾールで溶出し、Coomassie (登録商標) 染色を伴う SDS-PAGE で解析した。矢印は全長 HA0 を示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明は、HA 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。

【0023】

HA0 のプロテアーゼ切断は、インフルエンザ A ウイ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 HA 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 (Kido, H ら、J. Biol. Chem. (1992) 267: 13573~13579; Peitsch, C ら、J. Virol. (2014) 88: 282~291; Zhirnov, O., P ら、J. Virol. (2002) 76: 8682~8689)。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 Clara 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 Clara である。HA0 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イルスの感染を呼吸器系及び肺に制限する。

【0024】

HA 成熟に関与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 (MCS) は HA1 の C 末端に位置し、MCS の C 末端における切断は感染性に必須である。

【0025】

H5 及び H7 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 (Stieneke Grober, A ら、EMBO J. (1992) 11: 2407~2414; Maines, T. R ら、J. Virol. (2005) 79: 11788~11800)。多くの高病原性のトリインフルエンザ (HPAI) サブタイプは、H5 及び H7 である。ヒトにおける HPAI 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イルスのものよりも高かった (Morens, D. M ら、Nature (2012) 486: 335~340)。MCS 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。

【0026】

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イルスの HA 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 HA 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 (Steinhauer, D. A., Virus. Virol. (1999) 258: 1~20; Taubenberger, J. K., PNAS (1998) 95: 9713~9715)。ヒトインフルエンザウイルスの 1918 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 (NA) を使用して HA 切断のためのプラスミノゲンを動員する (Goto, H 及び Kaw

10

20

30

40

50

aoka, Y. PNAS (1998) 95:10224~10228; Chaipan, Cら、J. Virol (2009) 83:3200~3211)。

【0027】

HA0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HA2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HAの成熟型である。HA0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。HAの前駆体と成熟型の両方がビリオン表面に存在する。HA0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。

【0028】

HA2のN末端12残基は「融合ペプチド」と呼ばれる(Skehelら、Biochem Soc Trans (2001) 29:623~626)。融合ペプチドは、疎水性配列を有する。HA0において、MC5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、HA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HAの融合能は、エンドソームのpH、すなわち特定のインフルエンザウイルス系統に応じてpH5~6において活性化される。低pHにおけるHA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HA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RNA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。

【0029】

HAは、インフルエンザウイルス系統の宿主範囲を決定する。HA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HAは、SA<sub>2,6Gal</sub>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HAは、SA<sub>2,3Gal</sub>に結合する。ヒトは主にSA<sub>2,6Gal</sub>シアリルオリゴ糖を有し、鳥類は主にSA<sub>2,3Gal</sub>シアリルオリゴ糖を有する。図3に概略的に示すように、HA上の宿主受容体結合部位は、排他的にHA1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HAの受容体特異性は、良く分析されている。SA<sub>2,6Gal</sub>又はSA<sub>2,3Gal</sub>の認識に関与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示されている(Rogers, G.Nら、Nature (1983) 304:76~78)。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、HA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(Glaser, Lら、J. Virol (2005) 79:11533~11536)。系統A/南カリフォルニア/1/18のHAは、ヒト細胞受容体SA<sub>2,6Gal</sub>へと優先的に結合するが、一方で系統A/ニューヨーク/1/18のHAは、ヒト細胞受容体SA<sub>2,6Gal</sub>とトリ細胞受容体SA<sub>2,3Gal</sub>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。

【0030】

HA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H5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HA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(Imai, Mら、Nature (2012) 486:420~428; Herfst, Sら、Science (2012) 336:1534~1541; Chen, L-Mら、Virol (2012) 422:105~113; Russell, C.Aら、Science (2012) 336:1541~1547)。他の変化と共に、H5のHA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H5ウイ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

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、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Skehel, J. J., Ann Rev Biochem (1987) 6: 365~394)。

#### 【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. Virol (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

40

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。まとめると、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示した(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/PR/8/34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(Caton, 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なる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(Ellebedy, 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(GITNKVNSVIEK)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(Ekier, 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ウイ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MCS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、MCS及びHA0中の融合ペプチドの残基を認識する(Corti, 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、MCS及び融合ペプチドの大部分からなるRKKRGLFGAIAAGFIE、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KESTQKAIDGVITNKVNS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MCS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ウイルスを阻害する。

#### 【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、GLFGAIAAGF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](http://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ウイ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ウイ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に調査された。切断の結合の両側におけるMCS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ウイルスの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ウイ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 V<sub>H</sub>1 - 69 生殖細胞系列抗体重鎖を使用する bNAb に属する。別の V<sub>H</sub>1 - 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 ) 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、EGTGQA) 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 ウイルスの 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; Wrammert, 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、免疫学的にナীবである者よりも、普遍的な応答を開始するのにより苦勞する可能性がある。

#### 【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; Pielaak, R. M及びChou, J. J., Biochim 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いくらか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) 3: 102~115)。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. Vir

10

20

30

40

50

o 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 ( P a r k , 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、ワクチンとしての他のインフルエンザタンパク質及びインフルエンザ B ウイルスの 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 ウイ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 ) 。

【 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。

【 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。

【 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。

【 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。

10

20

30

40

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 の免疫垂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垂優性エピトープのペプチドによって置換される。これらの免疫垂優性エピトープは、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。

## 【 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。

## 【 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 】

1 1 9 ~ 1 2 2 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、1 2 4 ~ 1 2 5 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 1 3 7 ~ 1 4 2 の残基の H A G A K S は、主要な免疫優性部位である。1 5 3 ~ 1 6 4 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 1 5 3 ~ 1 5 7 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 1 8 4 ~ 1 9 5 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。

## 【 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 2 1 3 ~ 2 2 4 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trand 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。

## 【 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

10

20

30

40

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く、これらの任意の位置に挿入することができる。

#### 【0061】

bNA bであるCR8020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、CR8020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 of 最外部のストランド(H3のHAのHA2の30～36の残基、EGTGQA A、配列番号26)、及び融合ペプチドのC末端部分(H3のHAのHA2の15～19の残基、EGMID、配列番号25)からなる2つの主要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CR8020エピトープEGMIDYE G T G Q A A (配列番号27)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CR8020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bNA b、1C9エピトープは、ステムドメインに存在するHA2のN末端における融合ペプチドである。GIFGAIAGFIEG (配列番号36)の修飾1C9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。I1C9と表されるこの修飾1C9ペプチドは、bNA bである1C9によって認識されるH5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I1C9融合ペプチドは、ブタH1のHA並びにいくつかのH6及びH9ウイルスのHAに存在する。このI1C9ペプチドは、異なる免疫優性部位に配置する。抗原部位にI1C9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】

bNA bであるFI6のエピトープは、HA前駆体HA0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FI6エピトープペプチドRKKRGLFGAIAAGFIEは、HA0の成熟切断部位及び融合ペプチドである。別のFI6ペプチドKESTQKAIDGVTNKVNSは、HA2におけるコイルドコイル構造を有する。これら2つのFI6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。FI6エピトープペプチドRKKRGLFGAIAAGFIEを、153～164の残基のSa部位に配置し、コイルドコイルFI6エピトープペプチドKESTQKAIDGVTNKVNSを、184～195の残基のSb部位に配置する。別のコンストラクトにおいてFI6エピトープペプチドRKKRGLFGAIAAGFIEをSa部位に配置するが、第2のFI6エピトープペプチドを有さない。

30

#### 【0064】

多くのbNA 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、M2タンパク質の細胞外ドメインのペプチド(M2eペプチド)である。M2eペプチドは、インフルエンザAウイルスの間で保存され、低変異性である。インフルエンザAウイルスとインフルエンザBウイルスに由来するM2eペプチドは異なっているが、M2eペプチドはまた、インフルエンザBウイ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わせる。いくつかの実施形態において、人工ペプチドは、bNA bとの相互作用のための残基、及びHA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。

【 0 0 6 7 】

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。

【 0 0 6 8 】

修飾された成熟切断部位を有する H A

10

本発明は、H A 成熟切断部位 ( M C S ) 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 M C S 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な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。この特異的なプロテア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。

20

【 0 0 6 9 】

H 1 の H A 分子はしばしば、M C S 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 M C S 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 M C S による天然の H 1 の M C S 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 ( K o n g , W - p ら、P N A S ( 2 0 0 6 ) 1 0 3 : 1 5 9 8 7 ~ 1 5 9 9 1 ) 。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 M C S は、H 5 の H A の M C S 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 M C S 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。

30

【 0 0 7 0 】

改変された M C S 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 M C S は、別の H A 由来の M C S 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 M C S と H A の天然 M C S の置換を含む。好ましい実施形態において、H 1 の H A の天然の M C S は、H 5 の H A の M C S 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。

40

【 0 0 7 1 】

第 X a 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。トロンピン切断部位もまた、切断の結合の C 末端側にグリシン ( G ) を有する。トロンピン切断の後、新規の N 末端のグリシン ( G ) が生成される。全てのこれら

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HA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(TEV)のTEVプロテアーゼは、ENLYFQG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。TEV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、HA成熟後のHA2のN末端の残基と同じである。天然HAのMCSと異なり、TEV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、HAのMCS全体が、TEV切断部位によって置換されるか、又はMCSのいくつかの残基がTEV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TEV切断部位によって置換される。TEV切断部位によって置換されるMCSを有するHA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HA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MCSを切断するTEVプロテアーゼの存在において、前記修飾HAは、成熟し、HA1及び融合ペプチドの天然N末端を有するHA2へと変換される。成熟修飾組換えHA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。TEV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HAは、未切断のHA0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HAの膜融合を防ぐ。感染した宿主細胞において産生される子孫のHAタンパク質は、宿主中のTEVプロテアーゼの欠損のためにHA0として残り、成熟機能型へとプロセッシングされない。新規に作製されたHA0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

HAの球状ドメインの抗原部位の変更及びHAのステムドメインのMCS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HA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HA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HAは、HAの球状頭部ドメインの抗原部位を置換するM2eペプチド及びMCSとしてTEV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H1のHAは、HAの球状頭部ドメインの抗原部位を置換するM2eペプチド及びH1の天然のMCSの代わりにH5のMCSを有する。

30

#### 【0075】

##### 産生方法

修飾HAの産生のために、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HA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HA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。HA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HA細胞外ドメインのC末端に配置し、その後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タグを配置する。組換えHA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HA0として、又はHA2のN末端に野生型融合ペプチドを有するHA1及びHA2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HAは、野生型HAのように三量体を形成する。

40

#### 【0076】

50

設計された組換えインフルエンザHA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HA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HA断片の交換を促進するために、合成されたHA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アーゼ部位、foldon配列、及びC末端Hisタグを有する合成されたHA遺伝子は、よく確立されたプロトコ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HA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、HA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、HA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、HA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HEK293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HA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産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産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ウイルスは、HAタンパク質を置換するインフルエンザCウイルス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HA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-pra、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)。

#### 【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пит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HA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。

#### 【0085】

##### 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* of 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WO2010/012780 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。

#### 【0086】

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、バキュロウイルスポ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なではない、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同トランスフェクションされる。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、Gateway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

nologies)。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(Bac-to-Bac System、Life Technologies)。pFastBacに基づくトランスファーベクターは、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む(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(PCR)によって容易に確認できる。

#### 【0087】

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(FBS)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(BIIC)として保管されている(Wasilko, D. Jら、Prot Exp Purif (2009) 65: 122~132)。感染昆虫細胞は、それらが溶解する前にBIIC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。BIIC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BIIC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。

#### 【0088】

BEVS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(Spodoptera frugiperda)由来のSF9及びSF21細胞、並びにイラクサギンウワバ(Trichoplusia ni)由来のHi5又はT.ni細胞である。カイコ(Bombyx mori)、ハチノスツヅリガ(Galleria mellonella)、及びマイマイガ(Lymantria dispar)の種由来の他の昆虫細胞もまた使用されている。SF9、SF21、及びHi5(又はT.ni)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(WAVE Bioreactor Systems - Cell culture procedures, GE Healthcare)。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。

#### 【0089】

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。SF9、SF21、及びHi5(又はT.ni)細胞は、BEVS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りよく発現する可能性がある。いくつかの報告は、Hi5(又はT.ni)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(MOI)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



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MOIの決定はウイルス増幅及びBEVS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TIPS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。TIPS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、MOI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、TIPS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HAは、タバコスズメガ (*Heliothis 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】

BEVSは、タンパク質複合体及びVLP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VLP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VLP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、PLOS ONE (2008) 3: e1501)。

#### 【0094】

バキュロウイルス発現のためのHAトランスファーベクター

BEVS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DNA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GP67シグナル配列である。Signal Sequence Database (ワールドワイドウェブで [signalpeptide.de/index.php](http://signalpeptide.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ッ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。MKTIIALSYIFCLVFA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、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。

10

#### 【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ファーベクターの特徴は、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、トランスファーベクタ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ファーベクターの設計を可能にする。

20

#### 【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、トランスファーベクターは、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、トロンピン切断部位を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、トロンピン切断によって除去できる。HA発現トランスファーベクターの同様の設計が、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)。

30

#### 【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ロイジンジッパー配列の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)。

40

#### 【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

50

プチド（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。

#### 【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取り出す。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ブロットを介して、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産生されている（Ｍｅｎａ，Ｉら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ（１９９６）７０：５０１６～５０２４；Ｃｈｅｎ，Ｂ．Ｊら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ（２００７）８１：７１１１～７１２３）。

#### 【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；Ｄｕｋｋｉｐａｔｉａ．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ス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カ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ィルスストックは、タンパク質発現のためのＣＨＯ又はＨＥＫ２９３細胞に哺乳動物発現カ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。

#### 【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産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産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。

#### 【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ためのもの

10

20

30

40

50

と同じ設計及びアミノ酸配列を有する。コドンはCHO細胞発現又はHEK293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。HA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IL2シグナルペプチド、組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)シグナルペプチド、及びSignal Sequence Database(ワールドワイドウェブでsignalpeptide.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、mRNA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、エピソード複製のためのSV40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pUC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、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、hEF1-HTLVプロモーター、伸長因子-1(EF-1)コアプロモーター、並びにヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)1型の長い末端反復のRセグメント及びU5配列の一部(R-U5')、又はMPromDb(ワールドワイドウェブでmpromdb.wistar.upenn.edu/に位置するMammalian Promoter Database)、又はEukaryotic Promoter Database(ワールドワイドウェブでepd.vital-it.ch/に位置するEPD)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。

#### 【0104】

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(HA)タンパク質であって、前記HA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(HA)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(VLP)中に含有される、(1)に記載の修飾HA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(MCS)をさらに含む、(2)に記載の修飾HAタンパク質。

(4) 前記修飾されたMCS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HA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HA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M2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HAタンパク質。

(6) 前記HA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HA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HAタンパク質。

(8) (1)~(4)のいずれかに記載の修飾HA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MCSを含有するように修飾されているインフルエンザHAタンパク質を含む修飾インフルエンザウイルス。

(10) 前記MCS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。

(11) 前記HA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。

(12) 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、(11)

10

20

30

40

50

に記載の修飾インフルエンザウイルス。

( 1 3 ) 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、( 1 1 ) に記載の修飾インフルエンザウイルス。

( 1 4 ) 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、( 1 3 ) に記載の修飾インフルエンザウイルス。

( 1 5 ) 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。

( 1 6 ) 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、( 1 5 ) に記載の修飾 H A タンパク質。

( 1 7 ) 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。

( 1 8 ) 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。

( 1 9 ) 所望の抗原に対する抗体を生成する方法であって、( 9 ) ~ ( 1 4 ) 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。

( 2 0 ) 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。

( 2 1 ) 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、( 2 0 ) に記載の核酸。

( 2 2 ) 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、( 2 0 ) に記載の核酸。

( 2 3 ) 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、( 2 1 ) に記載の核酸。

( 2 4 ) 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。

( 2 5 ) 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、( 2 4 ) に記載の核酸。

( 2 6 ) 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、( 2 5 ) に記載の核酸。

( 2 7 ) ( 2 0 ) ~ ( 2 6 ) 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。

( 2 8 ) ( 2 7 ) に記載の核酸を含有する組換え宿主細胞。

( 2 9 ) ( 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を含む方法。

( 3 0 ) ( 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を含む方法。

( 3 1 ) ( 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を含む方法。

10

( 3 2 ) ( 1 1 ) 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を含む方法。

( 3 3 ) 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( 2 0 ) ~ ( 2 7 ) のいずれかに記載の核酸を投与することを含む方法。

20

( 3 4 ) 前記核酸を対象に投与することを含む、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、( 2 0 ) ~ ( 2 7 ) のいずれかに記載の核酸。

( 3 5 ) 所望の抗原に対する抗体を生成する方法であって、( 2 0 ) ~ ( 2 7 ) のいずれかに記載の核酸を対象に投与することを含む方法。

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のトランスファーベクターの構築

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は図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( 1 0 × H i s タグ) に融合する。このベクターはH 1 W Tと呼ばれる。

30

##### 【0106】

2009年インフルエンザワクチン産生として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) プタ起源インフルエンザウイルスH 1 N 1系統であるA / カリフォルニア / 0 7 / 2 0 0 9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: C 3 W 5 X 2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、G P 6 7シグナルペプチドM V S A I V L Y V L L A A A H S A F A ( 配列番号2 ) によって置換される。Stevens, Jら、Science( 2 0 0 6 ) 3 1 2 : 4 0 4 ~ 4 1 0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、I L A I Y S T V A S S L V L V V S L G A I S F W M C Sの配列を有するC末端膜貫通( T M ) ドメイン、及びH AのN G S L Q C R I C Iの配列を有する細胞内ドメインが、T E V切断部位( 配列番号4 ) 、後に続くf o l d o n ( 配列番

40

50

号5)、及び10×Hisタグ(配列番号6)によって置換され、つまり、GAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGHHHHHHHH(配列番号3)となった。foldonは、組換えHAを安定化し、一方で10×Hisタグは、細胞培地からのHAの精製を促進する。foldon及び10×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、ClaI部位、NsiI部位、及びBamHI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、NcoI部位とHindIII部位の間でpFastBacプラスミドにサブクロニングされた。ClaIとNsiI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。NsiIとBamHI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。

#### 【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NsiI-BamHI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ClaI-NsiI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シーケンシングによって確認した。

#### 【実施例2】

#### 【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NsiIとBamHI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】

10

20

30

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 P S I Q S R G を、E N L Y F Q G 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 I P S I Q S R G を、TEV 切断部位を含有させる S P E N L Y F Q G 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 (Q S R) 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 との部位の間に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ヌクレ



オチド配列によって修飾された。

【 0 1 1 6 】

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、H A 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 H A 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。

【 0 1 1 7 】

【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。

【 0 1 1 8 】

これらの修飾の位置は図 5 に例示する。

【 0 1 1 9 】

13 アミノ酸残基の複合CR8020エピトープペプチドは、抗原部位Ca2近辺の12残基EIAIRPKVRDQEの表面ループを置換した。複合CR8020エピトープペプチド置換を有するClaI - NsiI断片が合成され、H1H5csのClaIとNsiIとの部位の間にサブクロニングされ、H1H5cs - CR8020Ca (配列番号24)と表されるHAコンストラクトを生成した。H1TEV2 - CR8020Ca (配列番号29)を作製するために、H1H5cs - CR8020CaのClaI - NsiI断片を単離して、H1TEV2のClaIとNsiIとの部位の間にサブクロニングした。

#### 【0120】

コンストラクトH1TEV2 - CR8020Sa3 (配列番号31)は、球状頭部ドメインの頂部上のH3のHAの部位Bループに対応する、Sa部位の1つの残基KKGNSを置換する複合CR8020エピトープペプチドを有する。CR8020修飾を有するClaI - NsiI断片が合成され、H1TEV2のClaIとNsiIとの部位の間にサブクロニングされ、H1TEV2 - CR8020Sa3と表されるHAコンストラクトを生成した。

10

#### 【0121】

コンストラクトH1TEV2 - CR8020Sa4 (配列番号33)は、Sa部位の1つの近辺の残基KTSのヘリカル構造を置換する複合CR8020エピトープペプチドを有する。この位置は、HA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。CR8020修飾を有するClaI - NsiI断片が合成され、H1TEV2のClaIとNsiIとの部位の間にサブクロニングされ、H1TEV2 - CR8020Sa4と表されるHAコンストラクトを生成した。

20

#### 【0122】

コンストラクトCR8020Sa4及びCR8020CaのHA単量体のモデルを図6に示す。各々のHA単量体は、球状頭部ドメインの複合CR8020エピトープペプチド及びステムドメインの天然CR8020エピトープを有する。

#### 【0123】

GIFGAIAGFIEGのI1C9エピトープペプチド (配列番号36)を有するいくつかのHAコンストラクトが作製された。1つのコンストラクトH1TEV2 - I1C9Ca1 (配列番号35)は、Ca2部位近辺の217~224の残基のRPKVRDQEを置換するI1C9ペプチドを有する。別のコンストラクトH1H5cs - I1C9Ca (配列番号46)は、Ca2の213~224の残基のより長いペプチドEIAIRPKVRDQEを置換するI1C9ペプチドを有する。他のコンストラクトは、H3のHAの部位Aに対応するCa2部位HAGAKS、Sa部位KKGNS、及びSa部位KTSを個別に置換するI1C9ペプチドを有する。変更を有するClaI - NsiI断片の各々が合成され、H1TEV2のClaIとNsiIとの部位の間にサブクロニングされ、それぞれH1TEV2 - I1C9Ca1 (配列番号35)、H1TEV2 - I1C9Ca2 (配列番号38)、H1TEV2 - I1C9Sa3 (配列番号40)、及びH1TEV2 - I1C9Sa4 (配列番号42)と表されるHAコンストラクトを生成した。I1C9Caの変更を有するClaI - NsiI断片が合成され、H1H5csのClaIとNsiIとの部位の間にサブクロニングされ、HAコンストラクトH1H5cs - I1C9Caを生成した。I1C9ペプチドはまた、同じ方法によって、H1H5cs - I1C9Sb (配列番号44)としてH1H5csコンストラクトのSb部位の残基TSADQQSLYQNAを置換した。Sb部位はH3のHAの部位Bヘリックスに対応する。

30

40

#### 【0124】

ClaI - NsiI断片は、Sa部位に配置されるFI6エピトープペプチドRKKRGLFGAIAGFIE (配列番号49)、及びSb部位に配置されるコイルドコイルFI6エピトープペプチドKESTQKAIDGVTNKVNS (配列番号50)によって合成された遺伝子であった。このFI6置換を有するClaI - NsiI断片は、H1H

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、それぞれコンストラクト H 1 H 5 c s - F I 6 S a b ( 配列番号 4 8 )、及び H 1 W T - F I 6 S a b ( 配列番号 5 2 ) 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 4 9 ) 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 5 4 ) 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 5 7 ) 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、それぞれコンストラクト H 1 H 5 c s - M 2 e C a ( 配列番号 5 6 )、及び H 1 H 5 c s - M 2 e S b ( 配列番号 5 9 ) 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 6 1 ) 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 に基づくトランスファー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、トランスファーベクターは大腸菌 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 DNA 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 ( - 4 0 ) 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 ウェ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フェクション試薬、又はポリエチレンジイミン ( P E I ) を使用して組換えバクミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの 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 5 0 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 ( R o c h e D i a g n o s t i c s 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/mlの密度の500ml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。

#### 【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。

#### 【0132】

組換えHAの発現を検出するために、通常は実施例5に記載されるような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ブ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ウェスタンブロット上の約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。

#### 【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。

#### 【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

10

20

30

40

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H1H5cs-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H1H5cs-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H1H5cs-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。

10

#### 【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優性bNaAb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認した。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】

20

#### 【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/mlの密度の50ml～1LのSF9細胞に、1～4ml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、ロティサリープ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。

30

#### 【0140】

##### 付録

##### インフルエンザウイルス、型及び宿主の説明

40

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、単一の種のウイルス、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、PB2、PB1、及びPAポリメラーゼ、ヘマグルチニン（HA）、核タンパク質（NP

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. & 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. & 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 ~ 120 nm の小粒子である (Webster, R. G. & 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プシドに包まれている。3 つのウイルスポ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産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. & 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ビリオンで 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ビリオンの 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 はパ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ビ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産生の間、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HA及びNA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HAサブタイプ、つまりH1～H18と、10のNAサブタイプ、つまりN1～N10が同定されている(Tong, Sら、PLoS Pathogens (2013) 9: e1003657)。インフルエンザAサブタイプの共通の命名法は、H1N1、H3N2、及びH7N9のようなHAサブタイプとNAサブタイプの異なる組合せに由来する(Bull World Health Organ (1980) 58: 585～591)。水鳥はサブタイプH1～H16とN1～N9の自然の保有宿主である。サブタイプH17N10及びH18N10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RNA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RNA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、H1N1、H2N2、及びH3N2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ウイルス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HA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：H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、及びH16。グループ2は、残りの6のサブタイプを占める：H3、H4、H7、H10、H14、及びH15。

#### 【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ウイルスと共循環してヒトにおけるエピソードを引き起こす。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HAの膨大な遺伝的変異と異なり、HA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、HA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RNA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HA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。

#### 【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。

40

#### 【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ウイルスの広範囲の循環を示唆する。インフルエンザCウイルスは、動物からも単離されている。インフルエンザCウイルスのヘマグルチニン - エステラーゼ - 融合 (H E F) タンパク質は、インフルエンザA及びBウイルスの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ウイルスのHAと異なり、インフルエンザCウイルスのH E Fは、細胞受容体として、末端9 - O - アセチル - N - アセチルノ イラミン酸 (9 - O - A c - N e u A c) を使用する (H e r r l e r , Gら、E M B O J . ( 1 9 8 5 ) 4 : 1 5 0 3 ~ 1 5 0 6 )。

#### 【 0 1 4 9 】

##### ウイルス感染プロセス及びライフサイクルの説明

インフルエンザウイルスは、呼吸飛沫又は孢子 (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。ウイ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、それは宿主細胞の疎水性融合ペプチドの小胞膜への挿入をもたらし、ウイ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。ウイルスのヌクレオキャ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、ウイ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イルスRNAは、キャプシドに包まれ、ウイ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。インフルエンザウイルスは、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 (R o t h , M . Gら、P N A S ( 1 9 7 9 ) 7 6 : 6 4 3 0 ~ 6 4 3 4 ; N a y a k , D . Pら、V i r u s R e s ( 2 0 0 9 ) 1 4 3 : 1 4 7 ~ 1 6 1 )。ブタとヒトの間のインフルエンザウイ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イ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。

##### 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)

MKAILVLLLYTFATANADTLTCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGLCK  
KLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELRE  
QLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVLKKGNSYPKLSK  
SYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQ  
EGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPK  
GAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAFGIEGGWTGMV  
DGWYGYHHQNEQSGGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRI  
ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNG  
CFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSL  
VLVVSLSGAISFWMCSSNGSLQCRICI

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFA

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

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

ENLYFQG

SEQ ID NO:5: Peptide sequence of foldon

GSYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

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

HHHHHHHHHHH

10

20

30

40

50



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

MKAILVLLLYTFATANA

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)

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
DQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
TPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWT  
GMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHL  
EKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEI  
GNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENLYFQ  
GGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

10

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

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCAACGCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
GGGGAATCCACCACCCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
TTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGCATCCAGAGCAGAGGCCTGTTTGGAGCCATCGC  
CGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACC  
AGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGAC  
GAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGT  
GGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGGAC  
GACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGA  
GAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCC  
AGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGT  
GACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGA  
GGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAGAATC  
TATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCC  
GCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCC  
TGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

20

30

40

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE

50

LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVLKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
 DQEGRMNYYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
 TPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGLFGAIAFGFIEG  
 GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEF  
 NHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNN  
 AKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAEN  
 LYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHH

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 (H1  
 H5cs)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACACGCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
 GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
 GCCTATGTGTTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
 TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAAC  
 CTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTT  
 GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
 TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
 TTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
 GCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGAGAGACGCAAGAAGAGAGGCCTGTTTGG  
 AGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCT  
 ATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAAC  
 GCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTT  
 TACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGA  
 AAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTG  
 GAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGT  
 GAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACC  
 ACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAG  
 TATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCA  
 CAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCG  
 GAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTC  
 TACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

20

30

40

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

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVLKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
 DQEGRMNYYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
 TPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPRRRRRGLFGAIAFGFIEGGWT  
 GMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHL

50

EKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEI  
GNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENLYFQ  
GGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHH

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

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTTGAGGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
TTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGGAGACGCAGAAGAGGCCTGTTTGGAGCCATCGC  
CGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACC  
AGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGAC  
GAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGT  
GGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGAGAC  
GACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGA  
GAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCC  
AGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGT  
GACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGA  
GGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAACTGGAAAGCACAAGAATC  
TATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCC  
GCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCC  
TGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

SEQ ID NO:16: Peptide sequence of GP67ss-H1R5cs-TEV-foldon 10His (H1R5cs)

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNH  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLKKGNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
DQEGRMNYYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
TPKGAINSTLPPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRRRRRGLFGAIAFGIEG  
GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEF  
NHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNN  
AKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAEN  
LYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:17: Nucleotide sequence of GP67ss-H1R5cs-TEV-foldon 10His (H1  
R5cs)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG

CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
 GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
 GCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
 TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAAC  
 CTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTT  
 GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
 TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
 TTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
 GCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGCATCCAGAGCAGGAGACGCAGAAGAGGCCTGTT  
 TGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACG  
 GCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAG  
 AACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCA  
 GTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACA  
 AGAAAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTC  
 CTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAA  
 GGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCT  
 ACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCT  
 AAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAA  
 GCACAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATC  
 CCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAAGACGGTGAATGGGTTCTGCT  
 GTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

10

20

SEQ ID NO:18: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV1-TEV-foldon 10His (H1TEV1)  
 MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
 DQEGRMNYYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
 TPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIENLYFQGLFGAIAGFIEGGWT  
 GMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHL  
 EKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEI  
 GNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENLYFQ  
 GSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGHHHHHHHHHH

30

SEQ ID NO:19: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV1-TEV-foldon 10His (H1  
 TEV1)

40

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG

50

CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTTGAGGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
TTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATATCGAAAACCTGTATTTTCAAGGCCTGTTTGGAGCCATCGC  
CGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACC  
AGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGAC  
GAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGT  
GGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGGAC  
GACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGA  
GAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCC  
AGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGT  
GACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGA  
GGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAGAATC  
TATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCC  
GCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCC  
TGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

10

20

SEQ ID NO:20: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-TEV-foldon 10His (H1TEV2)  
MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
DQEGRMNYYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
TPKGAINISLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYEQGLFGAIAAGFIEGGW  
TGMVDGWYGYHHQNEQGSgyAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNH  
LEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAK  
EIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENLY  
FQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

30

SEQ ID NO:21: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-TEV-foldon 10His (H1  
TEV2)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTTGAGGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA

40

50

TTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTATTTTCAAGGCCTGTTTGGAGCCAT  
CGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACC  
ACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATC  
GACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTTTACAGC  
TGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGG  
ACGACGGCTTCTGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAAT  
GAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAG  
CCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGT  
GTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGC  
GAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAAGAA  
TCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCT  
CCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTT  
CCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVR  
DQEGRMNYYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQ  
TPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIENLYFQGLFGAIAIGFIEGG  
WTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN  
HLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNNA  
KEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENL  
YFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

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

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGTCTGT  
GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
TTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGCATCGAAAACCTGTATTTTCAAGGCCTGTTTGG  
AGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCT  
ATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAAC  
GCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTT  
TACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGA  
AAGTGGACGACGGCTTCTGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTG

10

20

30

40

50

GAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGT  
 GAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACC  
 ACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAG  
 TATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCA  
 CAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCG  
 GAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTC  
 TACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEGMIDYEG  
 TGQAAGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT  
 CQTPKGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGLFGAIAGFI  
 EGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGK  
 EFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQK  
 NNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGA  
 ENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHH

10

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

20

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)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
 GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
 GCCTATGTGTTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAGGCATGAT  
 TGATTACGAAGGCACAGGCCAGGCAGCCGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGG  
 AACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCA  
 TTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGA  
 CTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGA  
 ATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAGCTGAGA  
 CTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGAGAGACGCAAGAAGAGAGGCCTGTT  
 TGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACG  
 GCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAG  
 AACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCA  
 GTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACA  
 AGAAAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTC

30

40

50

CTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAA  
GGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCT  
ACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCT  
AAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAA  
GCACAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTTCTGGTTACATC  
CCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCT  
GTCTACCTTCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAAaagctt

SEQ ID NO:29: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-CR8020Ca-TEV-foldon 10  
His (H1TEV2-CR8020Ca)

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEGMIDYEG  
TGQAAGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTT  
CQTPKGAINSTLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFGAIAFGIEG  
GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEF  
NHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDYHDSNVKNLYEKVRSQKNN  
AKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAEN  
LYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

10

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

20

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCcTCTGCAcCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
GGGGAATCCACCACCCTAGCaCaAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAGGCATGAT  
TGATTACGAAGGCACAGGCCAGGCAGCCGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGG  
AACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCA  
TTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGA  
CTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGA  
ATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGA  
CTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTATTTTCAAGGCCTGTTTGGAGC  
CATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATC  
ACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCC  
ATCGACGAGATCACAAACAAGGtGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTTTAC  
AGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAG  
TGGACGACGGCTTCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAG  
AATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAG  
AAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACA  
AGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAGTAT  
AGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAA  
GAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTTCAGGGCGGTTTCTGGTTACATCCGGAA  
GCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTAC

30

40

50



CTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVEGMIDYEG  
TGQAAYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHPSTSDAQQSLYQNADAYVFGSSRYSKFKP  
EIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPV  
HDCNTTCQTPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFGA  
IAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADLKSTQNAIDEITNKNVNSVIEKMNTQFT  
AVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVR  
SQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRI  
YQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

10

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

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGGCATGATTGA  
TTACGAAGGCACAGGCCAGGCAGCCTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACA  
AGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGTGGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAG  
CAGAGCCTGTACCAGAATGCCGATGCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAA  
AAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGA  
ATTACTACTGGACCCTGGTGAACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAAT  
CTGGTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTAT  
CTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTA  
ATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCCTAAGTAT  
GTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTA  
TTTTCAAGGCCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGG  
TGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGAT  
CTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGA  
GAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAA  
TCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGAGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCC  
GAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAA  
GAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACG  
GCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGC  
ACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGG  
CGTGAAACTGGAAAGCACAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCG  
GTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTTCGTAAAGACGGT  
GAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCA  
CTGATAAAaagctt

20

30

40

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE

50

LREQLSSVSSFERFEIFPEGMIDYEGTGQAAWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWL  
 VKKGNsyPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFK  
 PEIAIRPKVRDQEGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP  
 VHDCNTTCQTPKGAINSTLPPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFG  
 AIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQF  
 TAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKV  
 RSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTR  
 IYQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH  
 SEQ ID NO:34: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-CR8020Sa4-TEV-foldo  
 n 10His (H1TEV2-CR8020Sa4)

10

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTGAAGGCATGATTGATTACGAAGGCACAGGCCAGGCAGCCTGGCCTAATCACGATTCT  
 AATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCTCATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCT  
 GATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAGCTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACG  
 ACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGTCTGGGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGAT  
 CAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGATGCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAG  
 CAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAA  
 TGAATTACTACTGGACCCTGGTGAACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGGCCACCGGA  
 AATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCAT  
 TATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCA  
 TTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCCTAAG  
 TATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCT  
 GTATTTTCAAGGCCTGTTTGGAGGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAA  
 TGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCC  
 GATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGAT  
 CGAGAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGA  
 GAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGAGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAAT  
 GCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGT  
 GAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGC  
 AACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAA  
 CGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCG  
 ACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAG  
 GCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTTCGTAAAGA  
 CGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATC  
 ATCACTGATAAaagctt

20

30

40

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

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWL VKKGNsyPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIGIFGA  
 IAGFIEGGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNT  
 TCQTPKGAINSTLPPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFGAIAGFIE  
 GWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKE

50

FNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQ LKN  
 NAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAE  
 NLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

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)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
 GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
 GCCTATGTGTTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
 TGGCATTTCGCGCTATCGCCGGCTTCATTGAGGGAGGCAGAATGAATTACTACTGGA  
 CCCTGGTGGAACTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCT  
 AGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCC  
 TGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGC  
 CTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACC  
 AAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTATTTTCAAGGCCT  
 GTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGT  
 ACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACA  
 CAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACAC  
 CCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGA  
 ACAAGAAAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTG  
 CTCCTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGA  
 GAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGT  
 TCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTAC  
 CCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGA  
 AAGCACAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACA  
 TCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTTCGTAAAGACGGTGAATGGGTTCTG  
 CTGTCTACCTTCCTGGGTACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAagctt

SEQ ID NO:38: Peptide sequence of GP67ss-H1TEV2-I1C9Ca2-TEV-foldon 10His  
 s (H1TEV2-I1C9Ca2)

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHN  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPGIFGAIAGFIEGFYKNLIWL  
 VKKG NSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKFKPEIAI  
 RPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDC  
 NTTCTPKGAINSTLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFGAIAGF  
 IEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVG  
 KEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQ LKN  
 NNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGA  
 ENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

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

0His (H1TEV2-I1C9Ca2)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
GGCATTTCGGCGCTATCGCCGGCTTCATTGAGGGATTTTACAAGAACCTGATCTGGCT  
GGTGAAGAAGGGCAACAGCTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCA  
AAGAAGTGCTGGTGCTGTGGGGAATCCACCACCCTAGCACAAAGCGCCGATCAGCAGAGC  
CTGTACCAGAATGCCGATGCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTT  
CAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACT  
ACTGGACCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTG  
GTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGA  
TACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCA  
GCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCCTAAGTATGTGAAG  
AGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTATTTTCA  
AGGCCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATG  
GCTGGTACGGCTATCACCAACAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAG  
TCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGAT  
GAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGA  
ACCTGAACAAGAAAGTGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTG  
CTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCT  
GTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCT  
TTGAGTTCTACCACAAGTG TGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTAC  
GACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAA  
ACTGGAAAGCACAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTTCAGGGCGGTTCTG  
GTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGG  
GTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCAACCATCACCATCATCACTGATA  
Aagcctt

10

20

30

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVGIFGAIAGF  
IEGYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKFKFPEIA  
IRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDC  
NTTCQTPKGAINSTLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFGAIAGF  
IEGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVG  
KEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDYHDSNVKNLYEKVRSQLK  
NNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGA  
ENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

40

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

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG

50

GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGGGCATTTTCGGCGC  
 TATCGCCGGCTTCATTGAGGGATACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGG  
 GCAAAGAAGTGCTGGTGTGTGGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAG  
 AGCCTGTACCAGAATGCCGATGCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAA  
 GTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATT  
 ACTACTGGACCCTGGTGGAACTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTG  
 GTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTC  
 TGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATA  
 CCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCCTAAGTATGTG  
 AAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTATTT  
 TCAAGGCCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGG  
 ATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTG  
 AAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAA  
 GATGAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCG  
 AGAACCTGAACAAGAAAGTGAGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAG  
 CTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAA  
 CCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCT  
 GCTTTGAGTTCTACCACAAGTG TGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACC  
 TACGACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGT  
 GAAACTGGAAAGCACAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTTCAGGGCGGTT  
 CTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAA  
 TGGGTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTG  
 ATAAaagctt

10

20

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHN  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPGIFGAIAGFIEGWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLK  
 KGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYV FVGSSRYSKKFKPE  
 IAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPYAFAMERNAGSGIIISDTPVH  
 DCNTTCQTPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFGAI  
 AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFT  
 AVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVR  
 SQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRI  
 YQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

30

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

40

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTGGCATTTTTCGGCGCTATCGCCGGCTTCATTGAGGGATGGCCTAATCACGATTCTAAT  
 AAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCTCATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGAT

50

CTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAGCTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACA  
 AGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGTGGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAG  
 CAGAGCCTGTACCAGAATGCCGATGCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAA  
 AAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGA  
 ATTACTACTGGACCCTGGTGGAAACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAAT  
 CTGGTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTAT  
 CTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTA  
 ATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCCTAAGTAT  
 GTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCTGTA  
 TTTTCAAGGCCTGTTTGGAGCCATCGCCGGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGG  
 TGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGAT  
 CTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGA  
 GAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAA  
 TCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGAGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCC  
 GAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAA  
 GAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACG  
 GCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGC  
 ACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGG  
 CGTGAAACTGGAAAGCACAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCG  
 GTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTTCGTAAAGACGGT  
 GAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCA  
 CTGATAAaagctt

10

SEQ ID NO:44: Peptide sequence of GP67ss-H1H5cs-I1C9Sb-TEV-foldon 10His  
 (H1H5cs-I1C9Sb)

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSGIFGAIAGFIEGDAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRD  
 QEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTTCQT  
 PKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGLFGAIAGFIEGG  
 WTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN  
 HLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNNA  
 KEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENL  
 YFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

30

SEQ ID NO:45: Nucleotide sequence of GP67ss-H1H5cs-I1C9Sb-TEV-foldon 10  
 His (H1H5cs-I1C9Sb)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
 GGGGAATCCACCACCCTAGCGGCATTTTCGGCGCTATCGCCGGCTTCATtGAGGGAGAT  
 GCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCAT  
 TAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAAC  
 CTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTT

40

50

GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
TTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGAGAGACGCAAGAAGAGAGGCCTGTTTGG  
AGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCT  
ATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAAC  
GCCATCGACGAGATCACAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTT  
TACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGA  
AAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTG  
GAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGT  
GAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACC  
ACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAG  
TATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAACTGGAAAGCA  
CAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCG  
GAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTC  
TACCTTCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK  
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPGIFGAIAGE  
IEGGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQT  
PKGAINTSLPQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRRKRGLFGAIAGFIEGG  
WTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN  
HLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNA  
KEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAENL  
YFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

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

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTGGCATTTCGG  
CGCTATCGCCGGCTTCATTGAGGGAGGCAGAATGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAAAC  
CTGGCGATAAGATCACATTTGAGGGCACCGGAAATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTT  
GCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTG  
TAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATA  
TTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTG  
GCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGAGAGACGCAAGAAGAGAGGCCTGTTTGG  
AGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGcT  
ATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCtGAAGTCTACACAGAAC

10

20

30

40

50

GCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTT  
TACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGA  
AAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTG  
GAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGT  
GAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACC  
ACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAG  
TATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAAGCA  
CAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCG  
GAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTC  
TACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

10

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVRKKRGLFG  
AIAGFIEYINDKGKEVLVLWGIHHPSEKSTQKAIDGVTNKVNSDAYVFGSSRYSKKFKPE  
IAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPYAFAMERNAGSGIIISDTPVH  
DCNTTCQTPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGLFG  
AIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQF  
TAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKV  
RSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTR  
IYQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHHHHHH

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)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGGCGGGCGGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAGAAAGAAGAGAGG  
CCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGC  
TGGTGCTGTGGGGAATCCACCACCCTAGCAAGGAGTCTACACAGAAGGCCATTGATGGC  
GTTACAAATAAGGTCAATtCTGATGCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAA  
AAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGA  
ATTACTACTGGACCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAAT  
CTGGTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTAT  
CTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTA  
ATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTAT  
GTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGAGAG  
ACGCAAGAAGAGAGGCCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCG  
GAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCC  
GCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGT  
GATCGAGAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGA

30

40

50



AGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTAC  
AATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAA  
TGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCG  
GCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAG  
AACGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGAT  
CGACGGCGTGAAACTGGAAAGCACAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTC  
AGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTTCGTAA  
GACGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCA  
TCATCACTGATAAaagctt

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

10

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVRKKRGLFG  
AIAGFIEYINDKGKEVLVLWGIHHPSKESTQKAIDGVTNKVNSDAYV FVGSSRYSKKFKPE  
IAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPYAFAMERNAGSGIIISDTPVH  
DCNTTCQTPKGAINSTLPPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGA  
FIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAV  
GKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQ  
KNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQG  
AENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

20

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

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAGAAAGAAGAGAGG  
CCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGC  
TGGTGCTGTGGGGAATCCACCACCCTAGCAAGGAGTCTACACAGAAGGCCATTGATGGC  
GTTACAAATAAGGTCAATTCTGATGCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAA  
AAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAATGA  
ATTACTACTGGACCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAAT  
CTGGTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTAT  
CTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTA  
ATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCCTAAGTAT  
GTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATATCCCTAGCATCCAGAG  
CAGAGGCCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGG  
ATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTG  
AAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAA  
GATGAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCG  
AGAACCTGAACAAGAAAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAG  
CTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAA  
CCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCT  
GCTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACC  
TACGACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGT

30

40

50

GAAACTGGAAAGCACAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTT  
CTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAA  
TGGGTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTG  
ATAAaagctt

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNG  
KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVRKKRGLFG  
AIAGFIEGYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIR  
PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCN  
TTCQTPKGAINSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIENLYFQGLFGAIAAGFIE  
GGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKE  
FNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLN  
NAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQGAE  
NLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

10

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

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAGAAAGAAGAGAGG  
CCTGTTTCGGCGCTATCGCCGGCTTCATTGAGGGATACATCAACGACAAGGGCAAAGAAG  
TGCTGGTGCTGTGGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTAC  
CAGAAATGCCGATGCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCC  
TGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAAATGAATTACTACTGGA  
CCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGAAATCTGGTGGTGCCT  
AGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCATTATCTCTGATACCCC  
TGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCATTAATACCAGCCTGC  
CCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCTAAGTATGTGAAGAGCACC  
AAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATATCGAAAACCTGTATTTTCAAGGCCTGTT  
TGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAATGGTGGATGGCTGGTACG  
GCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCCGATCTGAAGTCTACACAG  
AACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCA  
GTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGAGAATCGAGAACCTGAACA  
AGAAAGTGGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACCTACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTC  
CTGGAGAATGAGAGAACCTGGACTACCACGACAGCAATGTGAAGAACCTGTACGAGAA  
GGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAAATGCCAAGGAGATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCT  
ACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAACGGCACCTACGACTACCCT  
AAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCGACGGCGTGAAACTGGAAA  
GCACAAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATC  
CCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTGTAAGACGGTGAATGGGTTCTGCT  
GTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATCATCACTGATAAaagctt

20

30

40

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

50

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPSLLTEVET  
PTRNGWECKCSDSGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP  
 VHDCNTTCQTPKGAINSTLPPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGL  
 FGAIAFGIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNT  
 QFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYE  
 KVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLES  
 TRIYQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

10

SEQ ID NO:57: Peptide sequence of M2e peptide

SLLTEVETPTRNGWECKCSDS

SEQ ID NO:58: Nucleotide sequence of GP67ss-H1H5cs-M2eCa2-TEV-foldon 1  
 0His (H1H5cs-M2eCa)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
 GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
 GCCTATGTGTTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTTCCCTGCTGAC  
 CGAGGTGGAGACCCCCACCAGGAACGGCTGGGAGTGCAAGTGCTCCGACTCCGGCAGAA  
 TGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAACTGGCGATAAGATCACATTTGAGGGCCACCGGA  
 AATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCAT  
 TATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCA  
 TTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCCTAAG  
 TATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGA  
 GAGACGCAAGAAGAGAGGCCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGA  
 CCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCAACAGAAATGAGCAGGGATCCGGATAT  
 GCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAG  
 CGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGG  
 AGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGGACGACGGCTTCTGGATATTTGGACC  
 TACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCTGGACTACCACGACAG  
 CAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAG  
 ATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGT  
 GAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGG  
 AGATCGACGGCGTGAACTGGAAAGCACAGAATCTATCAGGGCGCTGAAACCTGTAT  
 TTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTG  
 TAAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCTGGGTCAACCATCATCACCAACCATC  
 ACCATCATCACTGATAAaagctt

20

30

40

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

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLKKGNSYPK

50

LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSSLLTEVETPTRNGWECKCSDSDAYVFGSSRYSKKFK  
 PEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP  
 VHDCNTTCQTPKGAINSTLPPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPQRERRKKRGL  
 FGAIAFGIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNT  
 QFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYE  
 KVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLES  
 TRIYQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHHH

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

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTTTG  
 CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
 CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
 CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
 GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
 ATCGTGGAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
 CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTTCGAGATCTTCC  
 CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
 CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
 CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
 GGGGAATCCACCACCCTAGCTCCCTGCTGACCGAGGTGGAGACCCCCACCAGGAACGGC  
 TGGGAGTGCAAGTGCTCCGACTCCGATGCCTATGTGTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAG  
 CAAAAAGTTCAAGCCTGAAATTGCCATTAGACCCAAAGTGAGAGATCAGGAAGGCAGAA  
 TGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGGCCACCGGA  
 AATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCAT  
 TATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCA  
 TTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCCTAAG  
 TATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTCAGAGGGA  
 GAGACGCAAGAAGAGAGGCCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGA  
 CCGGAATGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATAT  
 GCCGCCGATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGTGAACAG  
 CGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGG  
 AGAAGAGAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGACGACGGCTTCCTGGATATTTGGACC  
 TACAATGCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCTGGACTACCACGACAG  
 CAATGTGAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAG  
 ATCGGCAACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGT  
 GAAGAACGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGG  
 AGATCGACGGCGTGAACTGGAAAGCACAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTAT  
 TTTCAGGGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTCTG  
 TAAAGACGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATC  
 ACCATCATCACTGATAAaagctt

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

MVSAIVLYVLLAAAHSAFADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNG  
 KLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEE  
 LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVLKKGNSYPK  
 LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPSLLTEVET  
 PTRNGWECKCSDSGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTP  
 VHDCNTTCQTPKGAINSTLPPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNSPENLYFQGLFG  
 AIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQF  
 TAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKV

RSQ LK NNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTR  
IYQGAENLYFQGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:62: Nucleotide sequence of GP67ss-H1TEV2-M2eCa2-TEV-foldon 1  
0His (H1TEV2-M2eCa)

ccATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTG  
CGGATACACTGTGTATTGGCTACCACGCCAACAATAGCACCGATACCGTGGATACAGTG  
CTGGAGAAGAATGTGACCGTGACCCACTCTGTGAATCTGCTGGAGGATAAGCACAATGG  
CAAGCTGTGTAAGCTGAGAGGAGTTGCCCTCTGCACCTGGGCAAATGTAATATTGCCG  
GCTGGATTCTGGGAAATCCTGAATGTGAAAGCCTGTCTACAGCCAGCAGCTGGTCTTAT  
ATCGTGGAACCCCTAGCAGCGACAATGGCACCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTA  
CGAGGAGCTGAGAGAACAGCTGTCTAGCGTGTCCAGCTTCGAGAGATTGAGATCTTCC  
CTAAGACAAGCAGCTGGCCTAATCACGATTCTAATAAGGGAGTGACAGCCGCCTGTCCT  
CATGCCGGAGCCAAGTCCTTTTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAG  
CTACCCTAAGCTGTCTAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAAGAAGTGCTGGTGCTGT  
GGGGAATCCACCACCCTAGCACAAGCGCCGATCAGCAGAGCCTGTACCAGAATGCCGAT  
GCCTATGTGTTTTGTGGGCAGCAGCAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCTTCCCTGCTGAC  
CGAGGTGGAGACCCCCACCAGGAACGGCTGGGAGTGCAAGTGCTCCGACTCCGGCAGAA  
TGAATTACTACTGGACCCTGGTGGAACCTGGCGATAAGATCACATTTGAGGCCACCGGA  
AATCTGGTGGTGCCTAGATATGCATTTGCTATGGAGAGAAATGCTGGCTCTGGCATCAT  
TATCTCTGATACCCCTGTGCACGACTGTAATACCACCTGTCAGACACCTAAGGGCGCCA  
TTAATACCAGCCTGCCCTTCCAGAATATTCACCCTATCACCATCGGCAAGTGTCCTAAG  
TATGTGAAGAGCACCAAGCTGAGACTGGCTACCGGTCTGAGAAATAGCCCTGAAAACCT  
GTATTTTCAAGGCCTGTTTGGAGCCATCGCCGGCTTTATTGAGGGAGGATGGACCGGAA  
TGGTGGATGGCTGGTACGGCTATCACCACCAGAATGAGCAGGGATCCGGATATGCCGCC  
GATCTGAAGTCTACACAGAACGCCATCGACGAGATCACAAACAAGGtGAACAGCGTGAT  
CGAGAAGATGAACACCCAGTTTACAGCTGTGGGCAAGGAGTTCAACCACCTGGAGAAGA  
GAATCGAGAACCTGAACAAGAAAGTGGACGACGGCTTCTGGATATTTGGACCTACAAT  
GCCGAGCTGCTCGTGCTCCTGGAGAATGAGAGAACCCTGGACTACCACGACAGCAATGT  
GAAGAACCTGTACGAGAAGGTGAGAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCAAGGAGATCGGC  
AACGGCTGCTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAACACCTGTATGGAGTCTGTGAAGAA  
CGGCACCTACGACTACCCTAAGTATAGCGAGGAGGCCAAGCTGAATAGAGAGGAGATCG  
ACGGCGTGAACTGGAAAGCACAGAATCTATCAGGGCGCTGAAAACCTGTATTTTCAG  
GGCGGTTCTGGTTACATCCCGGAAGCTCCGCGTGACGGTCAGGCTTACGTTTCGTAAAGA  
CGGTGAATGGGTTCTGCTGTCTACCTTCCTGGGTCACCATCATCACCACCATCACCATC  
ATCACTGATAAagctt

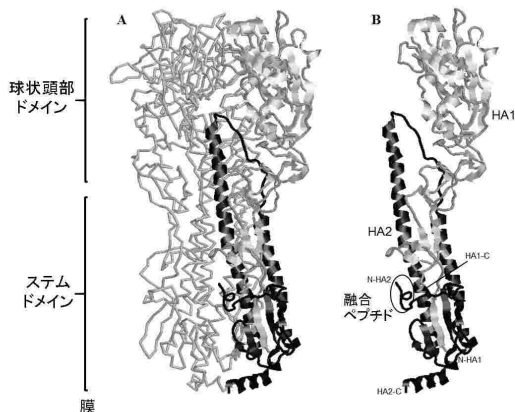
10

20

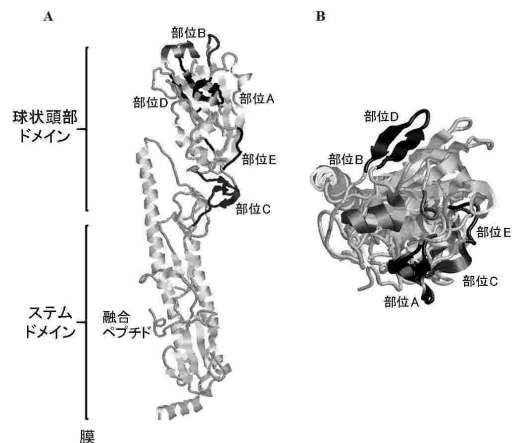
30

【図面】

【図 1】



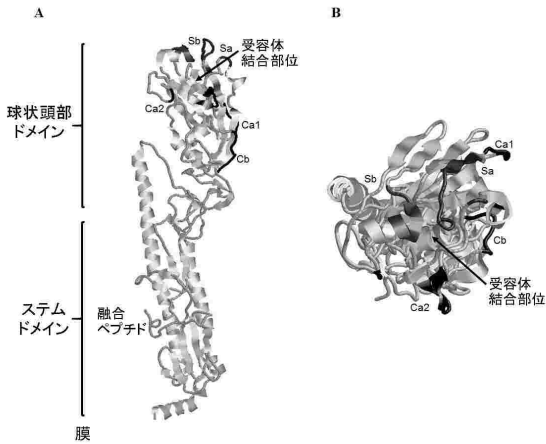
【図 2】



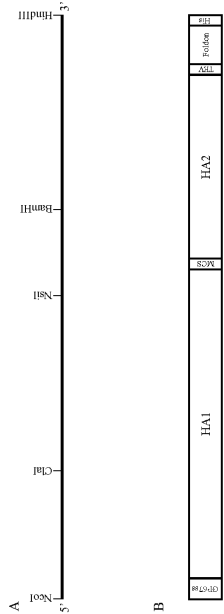
40

50

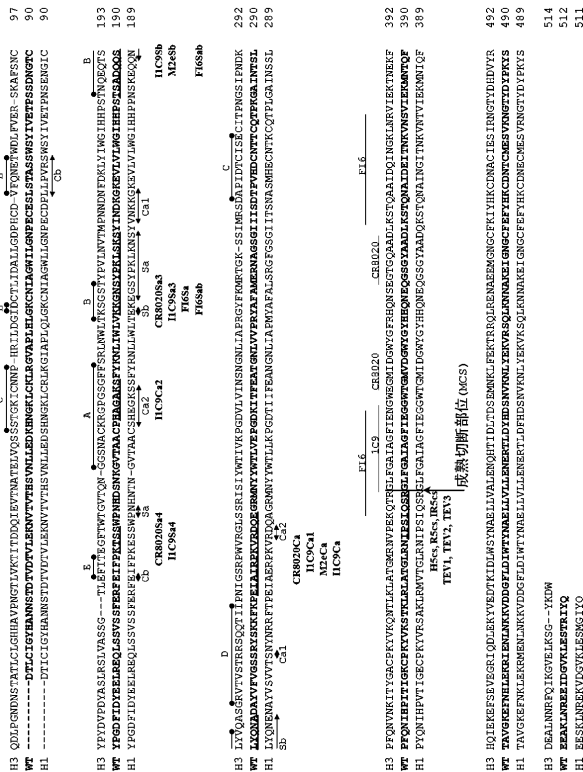
【図 3】



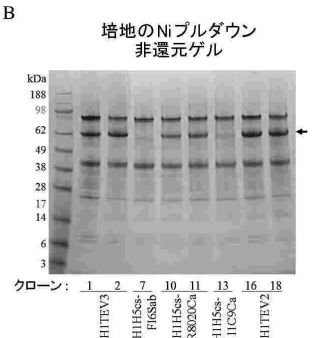
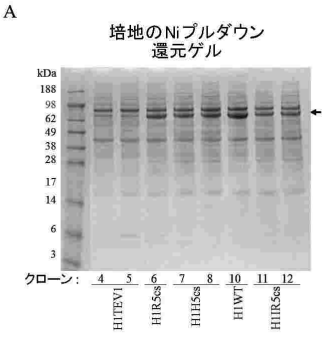
【図 4】



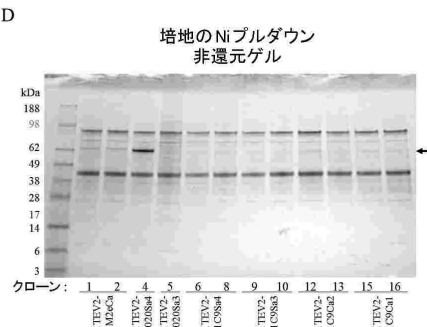
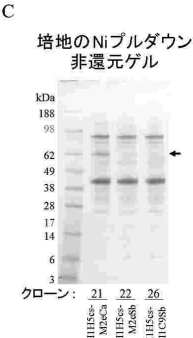
【図 5】



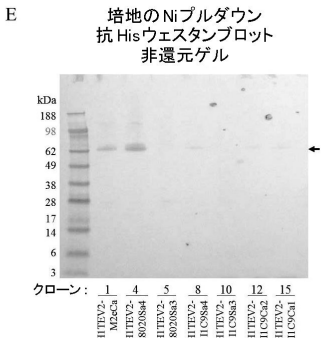
【図 7 A B】



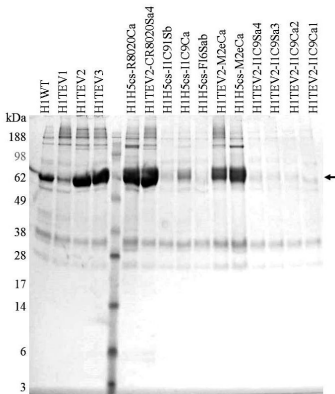
【図 7 C D】



【図 7 E】



【図 8】



10

20

30

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	F I			
C 1 2 N 15/44 (2006.01)	C 1 2 N	15/44		
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	

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.93-97  
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(JDreamII)