

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-514132

(P2015-514132A)

(43) 公表日 平成27年5月18日(2015.5.18)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 39/155 (2006.01)	A 61 K 39/155	4 B 02 4
C 07 K 14/135 (2006.01)	C 07 K 14/135	Z N A 4 C 08 4
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 4 C 08 5
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 H 04 5
A 61 P 31/14 (2006.01)	A 61 P 31/14	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 124 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-505881 (P2015-505881)	(71) 出願人	500429103 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバ シティ オブ ペンシルバニア アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191 04-6283, フィラデルフィア, チェスナット ストリート 3160, スイート 200
(86) (22) 出願日	平成25年4月10日 (2013.4.10)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成26年11月26日 (2014.11.26)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/036008	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 國際公開番号	W02013/155205	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 國際公開日	平成25年10月17日 (2013.10.17)		
(31) 優先権主張番号	61/622,279		
(32) 優先日	平成24年4月10日 (2012.4.10)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

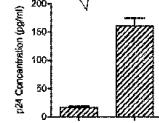
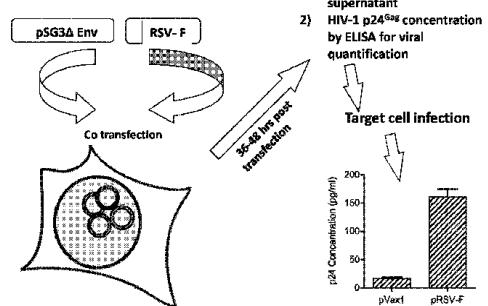
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト呼吸器合胞体ウイルスコンセンサス抗原、核酸構築物、およびそれらから作製されるワクチン、ならびにその使用方法

(57) 【要約】

R S V 免疫原をコードする 1 つ以上の核酸配列を含む核酸分子および組成物が開示される。コンセンサス R S V F タンパク質またはその免疫原フラグメントをコードする配列、R S V G (A) タンパク質またはその免疫原フラグメントをコードする配列、および R S V G (B) タンパク質またはその免疫原フラグメントをコードする配列を含む核酸が、開示される。1 つの配列、2 つの配列の組み合わせ、または 3 つの配列全てを含む組成物が開示される。コード配列は、シグナルペプチドをコードする機能的に結合しているコード配列を任意に含む。ケモカイン C C 2 0 および / もしくはコンセンサス R S V M 2 - 1 タンパク質、またはこれらの免疫原フラグメントを含む核酸分子および組成物も、開示される。免疫調節法、および R S V に対して免疫応答を誘導する方法が開示される。R S V 感染を予防する方法、および R S V に感染した個体を治療する方法が開示される。

【選択図】図 12

Figure 12
RSV-Fusion Pseudo viral production in 293T cells

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下からなる群から選択される、RSV免疫原をコードする1つ以上の核酸配列を含む組成物：

a) RSV F免疫原をコードする核酸コード配列であって、前記RSV F免疫原をコードする前記核酸コード配列が、

配列番号2をコードする核酸配列であって、配列番号2をコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

少なくとも115個以上のアミノ酸である配列番号2のフラグメントをコードする核酸配列であって、配列番号2の前記フラグメントをコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードし、配列番号2に少なくとも98%の相同性があるそのタンパク質をコードするコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、および

少なくとも115個以上のアミノ酸である配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントをコードする核酸配列であって、配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質の前記フラグメントをコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

からなる群から選択される、核酸コード配列、

b) RSV Ga免疫原をコードする核酸コード配列であって、前記RSV Ga免疫原をコードする前記核酸コード配列が、

配列番号6をコードする核酸配列であって、配列番号6をコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

、

少なくとも125個以上のアミノ酸である配列番号6のフラグメントをコードする核酸配列であって、配列番号6の前記フラグメントをコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

配列番号6に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードし、配列番号6に少なくとも98%の相同性があるそのタンパク質をコードするコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、および

少なくとも125個以上のアミノ酸である配列番号6に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントをコードする核酸配列であって、配列番号6に少なくとも98%の相同性があるタンパク質の前記フラグメントをコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

からなる群から選択される、核酸コード配列、

および

c) RSV Gb免疫原をコードする核酸コード配列であって、前記RSV Gb免疫原をコードする前記核酸コード配列が、

配列番号8をコードする核酸配列であって、配列番号8をコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

、

少なくとも125個以上のアミノ酸である配列番号8のフラグメントをコードする核酸配列であって、配列番号8の前記フラグメントをコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

配列番号8に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードし、配列番号8に少なくとも98%の相同性があるそのタンパク質をコードするコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、および

少なくとも125個以上のアミノ酸である配列番号8に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントをコードする核酸配列であって、配列番号8に少なくとも

10

20

30

40

50

98%の相同性があるタンパク質の前記フラグメントをコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、からなる群から選択される、核酸コード配列。

【請求項2】

以下からなる群から選択される、RSV免疫原をコードする1つ以上の核酸配列を含む、請求項1に記載の組成物：

a) RSV F免疫原をコードする核酸コード配列であって、前記RSV F免疫原をコードする前記核酸コード配列が、

配列番号1を含み、配列番号1に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

少なくとも115個以上のアミノ酸をコードする配列番号1のフラグメントを含み、配列番号1に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

配列番号1に少なくとも98%の相同性があり、配列番号1に少なくとも98%の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、および

少なくとも115個以上のアミノ酸をコードする配列番号1に少なくとも98%の相同性がある核酸配列のフラグメントであって、配列番号1に少なくとも98%の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

からなる群から選択される、核酸コード配列、

b) RSV Ga免疫原をコードする核酸コード配列であって、前記RSV Ga免疫原をコードする前記核酸コード配列が、

配列番号5を含み、配列番号5に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

少なくとも125個以上のアミノ酸をコードする配列番号5のフラグメントを含み、配列番号5に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

配列番号5に少なくとも98%の相同性があり、配列番号5に少なくとも98%の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、および

少なくとも125個以上のアミノ酸をコードする配列番号5に少なくとも98%の相同性がある核酸配列のフラグメントであって、配列番号5に少なくとも98%の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

からなる群から選択される、核酸コード配列、

および

c) RSV Gb免疫原をコードする核酸コード配列であって、前記RSV Gb免疫原をコードする前記核酸コード配列が、

配列番号7を含み、配列番号7に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

少なくとも125個以上のアミノ酸をコードする配列番号7のフラグメントを含み、配列番号7に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

配列番号7に少なくとも98%の相同性があり、配列番号7に少なくとも98%の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、および

少なくとも125個以上のアミノ酸をコードする配列番号7に少なくとも98%の相同性がある核酸配列のフラグメントであって、配列番号7に少なくとも98%の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチド

10

20

30

40

50

をコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、
からなる群から選択される、核酸コード配列。

【請求項 3】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物：
 a) 配列番号 2 を含み、配列番号 2 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V F 免疫原をコードする核酸コード配列、
 b) 配列番号 6 を含み、配列番号 6 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V G a 免疫原をコードする核酸コード配列、
 および
 c) 配列番号 8 を含み、配列番号 8 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V G b 免疫原をコードする核酸コード配列。

【請求項 4】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 に記載の組成物：
 a) R S V F 免疫原をコードする核酸コード配列であって、配列番号 1 を含み、配列番号 1 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸コード配列、
 b) R S V G a 免疫原をコードする核酸コード配列であって、配列番号 5 を含み、配列番号 5 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸コード配列、
 および
 c) R S V G b 免疫原をコードする核酸コード配列であって、配列番号 7 を含み、配列番号 7 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸コード配列。

【請求項 5】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 に記載の組成物：
 a) 配列番号 1 0 をコードする核酸配列、
 b) 配列番号 1 4 をコードする核酸配列、
 および
 c) 配列番号 1 6 をコードする核酸配列。

【請求項 6】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 に記載の組成物：
 a) 配列番号 9 を含む核酸配列、
 b) 配列番号 1 3 を含む核酸配列、
 および
 c) 配列番号 1 5 を含む核酸配列、
 からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 7】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物：
 a) 少なくとも 3 4 5 個以上のアミノ酸を有する配列番号 2 のフラグメントを含み、かつ配列番号 2 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 3 4 5 個以上のアミノ酸を有する配列番号 2 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質のフラグメントを含み、かつ配列番号 2 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質をコードする核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V F 免疫原をコードする核酸コード配列、
 b) 少なくとも 2 0 0 個以上のアミノ酸を有する配列番号 6 のフラグメントを含み、かつ、配列番号 6 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 2 0 0 個以上のアミノ酸を有する配列番号 6 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質のフラグメントを含み、かつ配列番号 6 に少なくとも 9 8 % 相同性があるタンパク質をコードする核酸配列の前記フラグメントのコード配列に

10

20

30

40

50

機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V G a 免疫原をコードする核酸コード配列、
および、

c) 少なくとも 200 個以上のアミノ酸を有する配列番号 8 のフラグメントを含み、かつ、配列番号 8 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 200 個以上のアミノ酸を有する配列番号 8 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質のフラグメントを含み、かつ配列番号 8 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質をコードする核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V G b 免疫原をコードする核酸コード配列。

10

【請求項 8】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 7 に記載の組成物：
a) 少なくとも 345 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 1 のフラグメントを含み、かつ配列番号 1 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 345 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 1 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含み、かつ配列番号 1 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列を含む、 R S V F 免疫原をコードする核酸コード配列、

20

b) 少なくとも 200 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 5 のフラグメントを含み、かつ配列番号 5 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 125 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 5 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含み、かつ配列番号 5 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V G a 免疫原をコードする核酸コード配列、

および

c) 少なくとも 200 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 7 のフラグメントを含み、かつ配列番号 7 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 200 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 7 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含み、かつ配列番号 7 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V G b 免疫原をコードする核酸コード配列。

30

【請求項 9】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物：

a) 少なくとも 550 個以上のアミノ酸を有する配列番号 2 のフラグメントを含み、かつ配列番号 2 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 550 個以上のアミノ酸を有する配列番号 2 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質のフラグメントを含み、かつ配列番号 2 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質をコードする核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V F 免疫原をコードする核酸コード配列、

40

b) 少なくとも 270 個以上のアミノ酸を有する配列番号 6 のフラグメントを含み、かつ配列番号 6 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 270 個以上のアミノ酸を有する配列番号 6 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質のフラグメントを含み、かつ配列番号 6 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質をコードする核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 R S V G a 免疫原をコードする核酸コード配列、

50

および

c) 少なくとも 270 個以上のアミノ酸を有する配列番号 8 のフラグメントを含み、かつ配列番号 8 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 270 個以上のアミノ酸を有する配列番号 8 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質のフラグメントを含み、かつ配列番号 8 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質をコードする核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 RSV Gb 免疫原をコードする核酸コード配列。

【請求項 10】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 9 に記載の組成物 : 10

a) 少なくとも 550 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 1 のフラグメントを含み、かつ配列番号 1 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 550 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 1 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含み、かつ配列番号 1 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列を含む、 RSV F 免疫原をコードする核酸コード配列、

b) 少なくとも 270 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 5 のフラグメントを含み、かつ配列番号 5 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 270 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 5 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含み、かつ配列番号 5 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 RSV Ga 免疫原をコードする核酸コード配列、 20

および

c) 少なくとも 270 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 7 のフラグメントを含み、かつ配列番号 7 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも 270 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 7 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含み、かつ配列番号 7 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、 RSV Gb 免疫原をコードする核酸コード配列。 30

【請求項 11】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物 :

a) 配列番号 2 に少なくとも 99 % の相同性がある RSV F 免疫原をコードし、配列番号 2 に少なくとも 99 % の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸コード配列、

b) 配列番号 6 に少なくとも 99 % の相同性がある RSV Ga 免疫原をコードし、配列番号 6 に少なくとも 98 % の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸コード配列、 40

および

c) 配列番号 8 に少なくとも 99 % の相同性がある RSV Gb 免疫原をコードし、配列番号 8 に少なくとも 98 % の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸コード配列。

【請求項 12】

以下からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 11 に記載の組成物 :

a) RSV F 免疫原をコードする核酸コード配列であって、配列番号 1 に少なくとも 99 % の相同性があり、配列番号 1 に少なくとも 99 % の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸コー 50

ド配列、

b) RSV G_a免疫原をコードする核酸コード配列であって、配列番5に少なくとも99%の相同性があり、配列番号5に少なくとも98%の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸コード配列、

および

c) RSV G_b免疫原をコードする核酸コード配列であって、配列番7に少なくとも99%の相同性があり、配列番号7に少なくとも98%の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸コード配列。

10

【請求項13】

以下からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項1に記載の組成物：

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV G_a免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV G_b免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV G_a免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV G_b免疫原をコードする核酸コード配列、

20

RSV G_a免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV G_b免疫原をコードする核酸コード配列、ならびに

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、RSV G_a免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV G_b免疫原をコードする核酸コード配列。

【請求項14】

CCL20をコードする核酸コード配列を更に含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項15】

電気泳動の使用による個体への送達のために製剤化される、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項16】

IL-12、IL-15、およびIL-28からなる群から選択される1つ以上のタンパク質をコードする核酸配列を更に含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項17】

前記1つ以上の核酸コード配列が、1つ以上のプラスミドの一部である、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項18】

前記1つ以上の核酸コード配列のそれぞれが、別々のプラスミドに組み込まれるもの一部である、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項19】

RSVに対する免疫応答を誘導する方法であって、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物を、個体に、前記個体に免疫反応を誘導する有効量で投与することを含む、方法。

40

【請求項20】

RSVが診断された個体を治療する方法であって、治療有効量の請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物を個体に投与することを含む、方法。

【請求項21】

個体のRSV感染を予防する方法であって、予防有効量の請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物を個体に投与することを含む、方法。

【請求項22】

50

配列番号 2、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 14、および配列番号 16 からなる群から選択されるタンパク質。

【請求項 23】

R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸コード配列を含む組成物であって、前記 R S V M 2 - 1 免疫原をコードする前記核酸コード配列が、

配列番号 4 をコードする核酸配列であって、配列番号 4 をコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

少なくとも 25 個以上のアミノ酸である配列番号 4 のフラグメントをコードする核酸配列であって、配列番号 4 の前記フラグメントをコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

配列番号 4 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質をコードする核酸配列であって、配列番号 4 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質をコードするコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、および

少なくとも 25 個以上のアミノ酸である配列番号 4 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質のフラグメントをコードする核酸配列であって、配列番号 4 に少なくとも 98 % の相同性があるタンパク質の前記フラグメントをコードする前記配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、からなる群から選択される、組成物。

【請求項 24】

R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸コード配列を含み、前記 R S V M 2 - 1 免疫原をコードする前記核酸コード配列が、

配列番号 3 を含む核酸配列であって、配列番号 3 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

少なくとも 25 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 3 のフラグメントを含む核酸配列であって、配列番号 3 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、

配列番号 3 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列であって、配列番号 3 に少なくとも 98 % の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列、および

少なくとも 25 個以上のアミノ酸をコードする配列番号 3 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列のフラグメントであって、配列番号 3 に少なくとも 98 % の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、核酸配列のフラグメント、からなる群から選択される、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

配列番号 4 を含み、配列番号 4 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸コード配列を含む、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 26】

R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸コード配列を含み、前記コード配列が、配列番号 3 を含み、配列番号 3 に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

配列番号 12 をコードする核酸配列を含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 28】

配列番号 11 を含む核酸配列を含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 29】

少なくとも 130 個以上のアミノ酸を有する配列番号 4 のフラグメントを含み、配列番

10

20

30

40

50

号4に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも130個以上のアミノ酸を有する配列番号4に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントを含み、かつ配列番号4に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードする核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、RSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列を含む、請求項23に記載の組成物。

【請求項30】

少なくとも130個以上のアミノ酸をコードする配列番号3のフラグメントを含み、かつ配列番号3に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも130個以上のアミノ酸をコードする配列番号3に少なくとも98%の相同性がある核酸配列のフラグメントを含み、かつ配列番号3に少なくとも98%の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、RSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列を含む、請求項29に記載の組成物。

10

【請求項31】

少なくとも165個以上のアミノ酸を有する配列番号4のフラグメントを含み、かつ、配列番号4に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも165個以上のアミノ酸を有する配列番号4に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントを含み、かつ配列番号4に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードする核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、RSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列を含む、請求項23に記載の組成物。

20

【請求項32】

少なくとも165個以上のアミノ酸をコードする配列番号3のフラグメントを含み、かつ配列番号3に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むか、または少なくとも165個以上のアミノ酸をコードする配列番号3に少なくとも98%の相同性がある核酸配列のフラグメントを含み、かつ配列番号3に少なくとも98%の相同性がある核酸配列の前記フラグメントのコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、RSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列を含む、請求項31に記載の組成物。

30

【請求項33】

配列番号4に少なくとも99%の相同性があるRSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列を含み、配列番号4に少なくとも99%の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、請求項23に記載の組成物。

40

【請求項34】

RSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列を含み、前記コード配列が、配列番号3に少なくとも99%の相同性があり、配列番号3に少なくとも99%の相同性があるコード配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含む、請求項33に記載の組成物。

【請求項35】

以下からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項23に記載の組成物：

RSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV Ga免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV M2 - 1免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV Gb免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、RSV M2 - 1免疫原をコードする

50

核酸コード配列、および R S V G a 免疫原をコードする核酸コード配列、

R S V F 免疫原をコードする核酸コード配列、R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸コード配列、および R S V G b 免疫原をコードする核酸コード配列、

R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸コード配列、R S V G a 免疫原をコードする核酸コード配列、および R S V G b 免疫原をコードする核酸コード配列、ならびに

R S V F 免疫原をコードする核酸コード配列、R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸コード配列、R S V G a 免疫原をコードする核酸コード配列、および R S V G b 免疫原をコードする核酸コード配列。

【請求項 3 6】

C C L 2 0 をコードする核酸コード配列を更に含む、請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項 3 7】

電気泳動の使用による個体への送達のために製剤化される、請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 8】

I L - 1 2 、 I L - 1 5 、および I L - 2 8 からなる群から選択される 1 つ以上のタンパク質をコードする核酸配列を更に含む、請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記 1 つ以上の核酸コード配列が、1 つ以上のプラスミドの一部である、請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 4 0】

前記 1 つ以上の核酸コード配列のそれぞれが、別々のプラスミドに組み込まれるもの的一部である、請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 1】

R S V に対して免疫応答を誘導する方法であって、請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物を、個体に、前記個体に免疫反応を誘導する有効量で投与することを含む、方法。

【請求項 4 2】

R S V が診断された個体を治療する方法であって、治療有効量の請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物を個体に投与することを含む、方法。 30

【請求項 4 3】

個体の R S V 感染を予防する方法であって、予防有効量の請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物を個体に投与することを含む、方法。

【請求項 4 4】

配列番号 4 および配列番号 1 2 からなる群から選択されるタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、コンセンサス抗原呼吸器合胞体ウイルスタンパク質およびそれらをコードする核酸分子、そのようなタンパク質および / または核酸分子を含む改善された呼吸器合胞体ウイルスワクチン、ならびに免疫応答を誘導するため、および呼吸器合胞体ウイルス感染を予防するため、および / または呼吸器合胞体ウイルスに感染している個体を治療するためのワクチンの使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

本出願は、米国特許仮出願第 6 1 / 6 2 2 , 2 7 9 号の優先権を主張し、その全体が参考により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 3】

発明の背景

ヒト呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、乳児および幼児において上および下気道感染に最も一般的な原因である（未熟児は特に疾患にかかりやすい）。世界的には、RSVは世界中の乳児（特に、早産であり、慢性肺疾患または先天性心疾患を有するもの）および幼児における重篤な下気道感染の主な原因であり、入院小児の肺炎の原因の20～25%、および細気管支炎の原因の45～50%であること含む、様々な病気に関与している。米国では、RSV発明は、毎年およそ120,000人の入院および500人超の死亡者をもたらしている。1歳未満の個人群では、RSVは乳児ウイルス性死亡の主な原因であり、この個人群における死亡数は、インフルエンザ感染に起因する死亡数よりも10倍大きい。世界規模での年間罹患数および死亡数は、それぞれ6千4百万人および160,000人の死亡者と推定される。RSV関連医療費は、6億5千万ドル超／年であると推定される。10

【0004】

本質的に全ての小児が2歳になるまで感染を経験するが、重篤なRSV感染の最も多い年齢は、2～6か月齢である。大多数の感染は、平穏に解決する。しかし一部の小児において、感染は、小児を高齢になってから喘息および気道応答性亢進になりやすくし得る。自然RSV感染は、生涯免疫を付与せず、したがって、個人は繰り返し感染し得る。

【0005】

RSV感染は、高齢者および他の脆弱な個人群において有意な問題を生じる。高齢者においては、RSVはウイルス性死亡の二番目に多い原因である。被移植者および他の免疫無防備状態の個人群、ならびに囊胞性線維症を罹患している個人は、感染に起因する重篤な健康上の影響に対して脆弱である。20

【0006】

呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、インフルエンザ、ならびに流行性耳下腺炎および風疹を引き起こすもののような一般的な呼吸器ウイルスを含む科である、パラミクソウイルス科のエンベロープネガティブセンス一本鎖RNAウイルスである。全体でRSVは、11個の異なるタンパク質をコードする10個の遺伝子を有する。11個のRSVタンパク質には、I型インターフェロン活性を阻害するタンパク質である、1)タンパク質「NS1」および2)タンパク質「NS2」；ヌクレオカプシドを形成するRNAと会合するヌクレオカプシドタンパク質である、3)タンパク質「N」；タンパク質Lの補助因子である、4)タンパク質「P」；ウイルスアセンブリーに必要とされるマトリックスタンパク質である、5)タンパク質「M」；タンパク質Gおよびタンパク質Fとウイルスコートを形成するウイルス表面に発現する、6)タンパク質「SH」；高度にグリコシル化され、表面に発現し、ウイルス結合に関与し、グリコサミノグリカン（GAG）に結合する、7)タンパク質「G」；表面に発現し、ウイルス細胞膜融合体であり、融合を仲介して、細胞質へのウイルスの侵入を可能にする、8)タンパク質「F」；マトリックスタンパク質であり、延長因子である、9)タンパク質「M2-1」；マトリックスタンパク質であり、転写因子である、10)タンパク質「M2-2」、ならびにRNAポリメラーゼである、11)タンパク質「L」が含まれる。M2遺伝子は、重複オープンリーディングフレームにおいてタンパク質M2-1およびタンパク質M2-2の両方をコードする。一次CD8 T細胞エピトープは、M2遺伝子によりコードされる。ヒトRSVの2つの主なサブタイプがあり、AおよびBである。2つのサブタイプの主な差は、Gタンパク質内にある。30

【0007】

RSV感染は、多くの場合、免疫仲介病理およびウイルス仲介病理の両方をもたらす。一次RSV感染は、多くの場合、炎症誘導性気道閉鎖をもたらす急性細気管支炎を結果的に生じる。RSV F結合は、線毛上皮細胞の脱落、損なわれた肺からの排除、およびその結果としての二次感染をもたらすアポトーシスを誘導することが示されている。40

【0008】

残念ながら、甚大な努力にもかかわらず、RSVに対して利用可能な有効なワクチンが50

依然として存在しない。1966～1967年において、最初のRSVワクチン候補であるホルマリン不活性化ミョウバン沈殿RSV調合剤（FI-RSVワクチン）は、それに続く自然感染の際にワクチン接種された小児に疾患の増強をもたらした。ワクチン接種後の感染により引き起こされた疾患の増強により死亡した小児の肺の組織学的分析は、肺好酸球增多症を含む、広範囲の単核細胞浸潤を明らかにした。FI-RSVワクチンは、変性Fタンパク質のために中和活性のない結合抗体のみを生成し、CTL活性を誘導しなかった。

【009】

続く実験は、この増強された肺疾患が、CD4 T細胞による誇張されたTh2型サイトカイン応答、CD8 T細胞による不十分な細胞溶解性応答、および弱い中和抗体応答と関連することを示唆している。FI-RSVワクチン接種されたBALB/cおよびC57BL/6マウスのRSV感染は、RI-RSVワクチン接種小児に観察された疾患の増強をもたらした。Th2仲介免疫応答の特徴は、免疫化小児がワクチンによりTh2免疫応答のために初回刺激されたことを示唆した。Th2関連サイトカインのIL-5、IL-4、およびIL-13のレベルの増加、ならびにTh1関連サイトカインIL-12の減少したケモカインエオタキシンを示した。IL-4、IL-10、またはIL-13の枯渇は、RSV負荷後の疾患の増強に有意な減少をもたらした。

10

【0010】

生の弱毒化および不活性化全ウイルスワクチンも、保護に失敗した。候補ワクチンは、不十分に弱毒化された、または疾患を増強する潜在性を示した、のいずれかであった。1982年には、生の弱毒化RSVワクチンは、安全であるが、RSVの病気の予防には有効でないことが見いだされた。

20

【0011】

1983年には、B連鎖球菌疾患有すると考えられたが、実際はRSVに感染していた、ネイティブアメリカンの乳児の「ベイビーモース（Baby Moose）」が、IGIVを受けたときに偶発的に改善した。この結果は、RSV疾患におけるIGIVの研究を促した。1980年代中頃から1990年代には、RSVの病気の治療および予防のための標準的なIGIVの研究は、RSV疾患の予防における抗体の役割を確認した。

【0012】

1990年代の初めには、RSVワクチンの研究は、様々なサブユニット変種を使用して再開された。これらの試みは、疾患からの有意な保護を示すことに失敗した。

30

【0013】

1990年代中頃から2002年の初めまで、RSVにより引き起こされる重篤な気道疾患の予防のためのパリビズマブ（RSV-Fに特異的なモノクローナル抗体）の臨床試験は、肯定的な結果を生じた。2003年9月には、パリビズマブが、高危険度の小児におけるRSV関連疾患の予防に承認された。パリビズマブによる予防的治療は、疾患の重篤度の低減には有効であったが、治療に伴う高い費用に起因して、高危険度の患者にのみ推奨されている。

【0014】

過去の研究は、有効なRSVワクチンを生じることに失敗しているが、RSV感染に対する十分な保護を提供することにおける免疫応答の重要性を、説得力を持って実証した。研究は、RSV仲介疾患に対する保護における液性応答および抗体の重要性を支持する証拠を見いだした。肺におけるIgG抗体の存在は、ウイルス量の低減と直接的に相関し、重篤度の低いRSV疾患有する小児は、多くの場合、感染の前に有意に高いRSV抗体価を有する。融合タンパク質に対する抗体は、免疫の重要な相関物である。RSVに感染しなかった乳児は、感染した乳児より高い平均力価のIgGを有し、感染した乳児の母親より有意に高い母系RSV特異的IgG抗体レベルを有した母親から誕生した。保護を仲介する抗体の重要性は、なぜ未熟児がRSV感染の後に重篤な病気になる高い危険性があるかを説明する助けになる。母のIgGは、妊娠第三期になるまで効率的に移動しない。

40

【0015】

50

同様に、RSV感染に対して十分な保護を提供することにおける細胞免疫応答の重要性も、実証されている。T細胞欠乏の小児はウイルスの排除に困難を有し、後のRSV感染に、より高い感受性がある。動物による研究では、マウスにおけるCD8 T細胞のみの枯渇は、慢性感染をもたらさないが、ウイルス排除に遅延をもたらす。排除には、IFN-、FasL、TNF-が必要である。これらのうちのいずれかの欠乏は、ウイルス排除の遅延をもたらす。更に、VV-Gにより免疫化されたC57BL/6マウスは、RSV関連の増強された疾患を発生しなかったが、免疫化前のCD8 T細胞の枯渇は、疾患をもたらす。

【0016】

RSVに対して長期間の保護を誘導する、免疫原抗原を含むRSVワクチンの必要性が依然として存在する。RSVに対して大規模な予防ワクチン接種を可能にする、費用効率の高い送達系の必要性も存在する。RSVに感染した個体を治療する、追加的な治療剤の必要性も存在する。

10

【発明の概要】

【0017】

発明の概要

1つ以上のコンセンサスRSV免疫原をコードする1つ以上の核酸配列を含む核酸分子が、提供される。RSV免疫原には、コンセンサスRSV F免疫原、コンセンサスRSV-G(A)免疫原、およびコンセンサスRSV G(B)免疫原が含まれる。

20

【0018】

RSV免疫原をコードする1つ以上の核酸配列を含む組成物が提供される。核酸は、a) RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、b) RSV G a免疫原をコードする核酸コード配列、およびc) RSV G b免疫原をコードする核酸コード配列からなる群から選択される。

20

【0019】

幾つかの実施形態において、RSV F免疫原をコードする核酸コード配列は、配列番号2、配列番号2のフラグメント、配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質、および配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントからなる群から選択されるRSV F免疫原をコードする。それぞれの場合において、RSV F免疫原をコードする核酸コード配列は、配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むことができる。

30

【0020】

幾つかの実施形態において、RSV G a免疫原をコードする核酸コード配列は、配列番号6、配列番号6のフラグメント、配列番号6に少なくとも98%の相同性があるタンパク質、および配列番号6に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントからなる群から選択されるRSV G a免疫原をコードする。それぞれの場合において、RSV G a免疫原をコードする核酸コード配列は、配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むことができる。

30

【0021】

幾つかの実施形態において、RSV G b免疫原をコードする核酸コード配列は、配列番号8、配列番号8のフラグメント、配列番号8に少なくとも98%の相同性があるタンパク質、および配列番号8に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントからなる群から選択されるRSV G a免疫原をコードする。それぞれの場合において、RSV G b a免疫原をコードする核酸コード配列は、配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むことができる。

40

【0022】

幾つかの実施形態において、RSV F免疫原をコードする核酸コード配列は、配列番号1を含む核酸配列、配列番号1のフラグメントを含む核酸配列、配列番号1に少なくとも98%の相同性がある配列を含む核酸配列、および配列番号1に少なくとも98%の相同性がある配列のフラグメントを含む核酸配列からなる群から選択される。それぞれの場

50

合において、RSV F免疫原をコードする核酸コード配列は、配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むことができる。配列番号1に少なくとも98%の相同性がある配列を含む核酸配列は、好ましくは、配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードする。配列番号1に少なくとも98%の相同性がある配列のフラグメントを含む核酸配列は、好ましくは、配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントをコードする。

【0023】

幾つかの実施形態において、RSV Ga免疫原をコードする核酸コード配列は、配列番号5を含む核酸配列、配列番号5のフラグメントを含む核酸配列、配列番号5に少なくとも98%の相同性がある配列を含む核酸配列、および配列番号5に少なくとも98%の相同性がある配列のフラグメントを含む核酸配列からなる群から選択される。それぞれの場合において、RSV Ga免疫原をコードする核酸コード配列は、配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むことができる。配列番号5に少なくとも98%の相同性がある配列を含む核酸配列は、好ましくは、配列番号6に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードする。配列番号5に少なくとも98%の相同性がある配列のフラグメントを含む核酸配列は、好ましくは、配列番号6に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントをコードする。

10

【0024】

幾つかの実施形態において、RSV Gb免疫原をコードする核酸コード配列は、配列番号7を含む核酸配列、配列番号7のフラグメントを含む核酸配列、配列番号7に少なくとも98%の相同性がある配列を含む核酸配列、および配列番号7に少なくとも98%の相同性がある配列のフラグメントを含む核酸配列からなる群から選択される。それぞれの場合において、RSV Gba免疫原をコードする核酸コード配列は、配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むことができる。配列番号7に少なくとも98%の相同性がある配列を含む核酸配列は、好ましくは、配列番号8に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードする。配列番号7に少なくとも98%の相同性がある配列のフラグメントを含む核酸配列は、好ましくは、配列番号8に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントをコードする。

20

【0025】

幾つかの実施形態において、組成物は、配列番号10をコードする核酸配列、配列番号14をコードする核酸配列、および配列番号16をコードする核酸配列からなる群から選択される1つ以上の核酸配列を含む。

30

【0026】

幾つかの実施形態において、組成物は、配列番号9を含む核酸配列、配列番号13を含む核酸配列、および配列番号15を含む核酸配列からなる群から選択される1つ以上の核酸配列を含む。

【0027】

幾つかの実施形態において、組成物は、

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、

40

RSV Ga免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV Gb免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV Ga免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV Gb免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV Ga免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV Gb免疫原をコードする核酸コード配列、

RSV F免疫原をコードする核酸コード配列、RSV Ga免疫原をコードする核酸コード配列、およびRSV Gb免疫原をコードする核酸コード配列、
からなる群から選択される核酸配列を含む。

50

【0028】

組成物は、CCL20をコードする核酸コード配列を更に含み得る、および／または電気泳動の使用による個体への送達のために製剤化され得る、および／またはIL-12、IL-15、およびIL-28からなる群から選択される1つ以上のタンパク質をコードする核酸配列を更に含み得る。

【0029】

幾つかの実施形態において、1つ以上の核酸コード配列は、1つ以上のプラスミドの一部である。幾つかの実施形態において、1つ以上の核酸コード配列は、それぞれ別々のプラスミドに組み込まれる。

【0030】

RSVに対して免疫応答を誘導する方法であって、組成物を、個体に、前記個体に免疫反応を誘導する有効量で投与することを含む方法が、提供される。

10

【0031】

RSVが診断された個体を治療する方法であって、治療有効量の組成物を個体に投与することを含む方法が、提供される。

【0032】

個体のRSV感染を予防する方法であって、予防有効量の記載の組成物を個体に投与することを含む方法が、提供される。

【0033】

新規の「RSV F免疫原」、「RSV Ga免疫原」、および「RSV Gb免疫原」が提供される。幾つかの実施形態において、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号14、および配列番号16からなる群から選択されるタンパク質が提供される。

20

【0034】

ケモカインCCL20をコードする核酸コード配列を使用して免疫応答を調節する方法も、提供される。

【0035】

加えて、コンセンサスRSV M2-1免疫原をコードする核酸コード配列が、本明細書において提供される。幾つかの実施形態において、RSV M2-1免疫原をコードする核酸コード配列は、配列番号4、配列番号4のフラグメント、配列番号4に少なくとも98%の相同性があるタンパク質、および配列番号4に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントからなる群から選択されるRSV M2-1免疫原をコードする。それぞれの場合において、RSV M2-1免疫原をコードする核酸コード配列は、配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むことができる。

30

【0036】

幾つかの実施形態において、RSV M2-1免疫原をコードする核酸コード配列は、配列番号3を含む核酸配列、配列番号3のフラグメントを含む核酸配列、配列番号3に少なくとも98%の相同性がある配列を含む核酸配列、および配列番号3に少なくとも98%の相同性がある配列のフラグメントを含む核酸配列からなる群から選択される。それの場合において、RSV M2-1免疫原をコードする核酸コード配列は、配列に機能的に結合しているシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に更に含むことができる。配列番号3に少なくとも98%の相同性がある配列を含む核酸配列は、好ましくは、配列番号4に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードする。配列番号3に少なくとも98%の相同性がある配列のフラグメントを含む核酸配列は、好ましくは、配列番号4に少なくとも98%の相同性があるタンパク質のフラグメントをコードする。

40

【0037】

幾つかの実施形態において、配列番号12をコードする核酸配列を含む1つ以上の核酸配列を含む組成物が、提供される。

【0038】

50

幾つかの実施形態において、配列番号 1 1 を含む核酸配列を含む 1 つ以上の核酸配列を含む組成物が、提供される。

【0039】

幾つかの実施形態において、組成物は、RSV M2 - 1 免疫原をコードする核酸コード配列、RSV F 免疫原をコードする核酸コード配列および RSV M2 - 1 免疫原をコードする核酸配列、RSV M2 - 1 免疫原をコードする核酸配列および RSV Ga 免疫原をコードする核酸コード配列、RSV M2 - 1 免疫原をコードする核酸配列および RSV Gb 免疫原をコードする核酸コード配列、RSV F 免疫原をコードする核酸コード配列、RSV M2 - 1 免疫原をコードする核酸配列および RSV Gb 免疫原をコードする核酸コード配列、RSV M2 - 1 免疫原をコードする核酸配列および RSV Ga 免疫原をコードする核酸コード配列、RSV F 免疫原をコードする核酸コード配列、RSV M2 - 1 免疫原をコードする核酸配列および RSV Gb 免疫原をコードする核酸コード配列、RSV M2 - 1 免疫原をコードする核酸配列および RSV Ga 免疫原をコードする核酸コード配列および RSV Gb 免疫原をコードする核酸コード配列、ならびに RSV F 免疫原をコードする核酸コード配列、RSV M2 - 1 免疫原をコードする核酸配列、RSV Ga 免疫原をコードする核酸コード配列および RSV Gb 免疫原をコードする核酸コード配列からなる群から選択される核酸配列を含む。
10

【0040】

新規の「RSV M2 - 1」免疫原も提供される。幾つかの実施形態において、配列番号 4 および配列番号 12 からなる群から選択されるタンパク質が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図 1】RSV F タンパク質の系統樹を示し、コンセンサス RSV F タンパク質アミノ酸配列が、配列番号 2 に記載されている。

【図 2】RSV M2 - 1 タンパク質の系統樹を示し、コンセンサス RSV M2 - 1 タンパク質アミノ酸配列が、配列番号 4 に記載されている。

【図 3】RSV F ワクチンによる免疫化後の様々な時点での抗 RSV F タンパク質 IgG の結果を示す。

【図 4】RSV F ワクチンによる免疫化後の様々な時点での抗 RSV F タンパク質 IgA の結果を示す。

【図 5】最後の免疫化のおよそ 8 週間後の RSV - F ワクチンの異なる投与量による INFN - 産生を比較した結果を示す。
30

【図 6】脾臓における RSV - F + / - ケモカイン免疫化後の脾臓における INFN - + CD8 および CD4 T 細胞を比較した結果を示す。

【図 7】肺における RSV - F + / - ケモカイン免疫化後の脾臓における INFN - + CD8 および CD4 T 細胞を比較した結果を示す。

【図 8】血清における IgG の終点力価、および血清における IgG サブタイプ (IgG 1 対 IgG 2a) を比較した結果を示す。

【図 9】IgG 2a / IgG 1 比の比較を示す。

【図 10】TZM - BL 細胞 / 「ON」における Env - 偽型ウイルスを描写する。

【図 11】TZM - BL 細胞 / 「OFF」における Env - 假型ウイルスを描写する。

【図 12】293T 細胞における RSV 融合偽ウイルス産生を描写する。

【図 13】アッセイを使用する RSV - F 中和試験に使用された免疫化プロトコールを示す。

【図 14】異なる標的細胞における RSV - F 介感染の定量化データを示す。

【図 15】TZM - BL HeLa 細胞における RSV - F 中和活性の定量化データを示す。

【図 16】HeLa 細胞における RSV - F 偽ウイルスによる細胞死活性の定量化データを示す。

【図 17】実施された RSV - M2 投与量試験の免疫化スケジュールを示す。

【図 18】最後の免疫化の 1 週間後の RSV - M2 ワクチンの異なる投与量による INFN

10

20

30

40

50

- g 産生の比較を含む試験から収集したデータを示す。

【図 19】RSV-FワクチンのCCL20との組み合わせを評価するための免疫化スケジュールを描写する。

【図 20】最後の免疫化の1週間後の脾臓、肝臓、および肺のそれぞれにおける異なる投与量のCCL20によるIFN-g産生を比較したデータを含む試験データを示す。

【図 21】血清におけるIgGサブタイプ(IgG1対IgG2a)を比較したデータを示す。

【図 22A】図22A～22Cは、RSV-F、RSV-G(A)、およびRSV-G(B)構築物のプラスミド設計および構築を示す。図22Aは、RSV-F構築物のプラスミド設計および構築を示す。

10

【図 22B】図22A～22Cは、RSV-F、RSV-G(A)、およびRSV-G(B)構築物のプラスミド設計および構築を示す。図22Bは、RSV-G(A)構築物のプラスミド設計および構築を示す。

【図 22C】図22A～22Cは、RSV-F、RSV-G(A)、およびRSV-G(B)構築物のプラスミド設計および構築を示す。図22Cは、RSV-G(B)構築物のプラスミド設計および構築を示す。

【図 23】RSV-F、RSV-G(A)、およびRSV-G(B)構築物のインピトロ発現を確認する結果を示す。

【図 24】RSV-F投与量試験の免疫化スケジュールを示す。

【図 25】RSV-F投与量試験のIgGデータを示す。

20

【図 26】RSV-F投与量試験のIFN-データを示す。

【図 27】RSV-F偽中和試験の免疫化スケジュールを示す。

【図 28】RSV-F偽中和試験のデータを示す。

【図 29】HeLa細胞におけるRSV-F偽ウイルスによるアポトーシス細胞死活性の阻害を決定するための2つの比較データを示す。

【図 30】RSV-G(A)およびUSV-G(B)投与量試験の免疫化スケジュールを示す。

【図 31】RSV-G(A)およびUSV-G(B)投与量試験のRSV-G(A)のIgGデータを示す。

【図 32】RSV-G(A)およびUSV-G(B)投与量試験のRSV-G(A)のIgGデータを示す。

30

【図 33】マウス試験において単一ワクチンを使用したRSV予備中和試験の結果のまとめを示すチャートである。

【図 34】後のRSVウサギ試験設計を示す。

【図 35】RSV-Fに対して測定された液性免疫のRSVウサギ試験のデータを示す。

【図 36】RSV-Gに対して測定された液性免疫のRSVウサギ試験のデータを示す。

【図 37】試験で従ったRSV非ヒト靈長類試験設計を示す。

【図 38A】図38A～38Dは、RSV-Fに対して測定された液性免疫のRSV非ヒト靈長類試験のデータを示す。図38Aは、未処置動物においてRSV-Fに対して測定された液性免疫のデータを示す。

40

【図 38B】図38A～38Dは、RSV-Fに対して測定された液性免疫のRSV非ヒト靈長類試験のデータを示す。図38Bは、1つの部位にカクテルワクチンIMを受けた動物においてRSV-Fに対して測定された液性免疫のデータを示す。

【図 38C】図38A～38Dは、RSV-Fに対して測定された液性免疫のRSV非ヒト靈長類試験のデータを示す。図38Cは、1つの部位にカクテルワクチン+rhMECT構築物IMを受けた動物においてRSV-Fに対して測定された液性免疫のデータを示す。

【図 38D】図38A～38Dは、RSV-Fに対して測定された液性免疫のRSV非ヒト靈長類試験のデータを示す。図38Dは、1つの部位にカクテルワクチンIDを受けた動物においてRSV-Fに対して測定された液性免疫のデータを示す。

50

【図39A】図39A～39Dは、RSV-Gに対して測定された液性免疫のRSV非ヒト靈長類試験のデータを示す。図39Aは、未処置動物においてRSV-Gに対して測定された液性免疫のデータを示す。

【図39B】図39A～39Dは、RSV-Gに対して測定された液性免疫のRSV非ヒト靈長類試験のデータを示す。図39Bは、1つの部位にカクテルワクチンIMを受けた動物においてRSV-Gに対して測定された液性免疫のデータを示す。

【図39C】図39A～39Dは、RSV-Gに対して測定された液性免疫のRSV非ヒト靈長類試験のデータを示す。図39Cは、1つの部位にカクテルワクチン+rhMECT構築物IMを受けた動物においてRSV-Gに対して測定された液性免疫のデータを示す。
10

【図39D】図39A～39Dは、RSV-Gに対して測定された液性免疫のRSV非ヒト靈長類試験のデータを示す。図39Dは、1つの部位にカクテルワクチンIDを受けた動物においてRSV-Gに対して測定された液性免疫のデータを示す。

【図40】ウサギ比ヒト靈長類試験においてワクチンカクテルを使用したRSV予備中和試験の結果のまとめを示すチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0042】

好ましい態様の詳細な説明

本発明の一態様において、コンセンサス抗原は、以下のうちの1つ以上を有することを含む、改善された転写および翻訳を提供することが望ましい：転写を増加するための低いGC含有量のリーダー配列、mRNA安定およびコドン最適化、シス作用配列モチーフ（すなわち、内部TATA-ボックス）を可能な限り排除すること。
20

【0043】

本発明の幾つかの態様において、以下のうちの少なくとも1つを有することを含む、多数の菌株のわたる広範囲の免疫応答を生成するコンセンサス抗原を生成することが望ましい：全ての利用可能な全長配列の組み込み、それぞれの位置に最も一般的に生じるアミノ酸を利用するコンピューター生成配列、および菌株間の交差反応性の増加。

【0044】

添付の配列リストには、様々なRSV配列および実施形態である配列番号1～16が含まれる。
30

【0045】

配列番号1は、開始コドン(ATG)またはシグナルペプチドを有さないRSV-Fをコードするヌクレオチド配列を示す。

【0046】

配列番号2は、開始コドン(ATG)またはシグナルペプチドによりコードされるMetを有さないRSV-Fをコードするアミノ配列を示す。

【0047】

配列番号3は、開始コドン(ATG)またはシグナルペプチドを有さないRSV-M2-1をコードするヌクレオチド配列を示す。

【0048】

配列番号4は、開始コドン(ATG)またはシグナルペプチドによりコードされるMetを有さないRSV-M2-1をコードするアミノ配列を示す。
40

【0049】

配列番号5は、開始コドン(ATG)またはシグナルペプチドを有さないRSV-Gaをコードするヌクレオチド配列を示す。

【0050】

配列番号6は、開始コドン(ATG)またはシグナルペプチドによりコードされるMetを有さないRSV-Gaをコードするアミノ配列を示す。

【0051】

配列番号7は、開始コドン(ATG)またはシグナルペプチドを有さないRSV-Gb
50

をコードするヌクレオチド配列を示す。

【0052】

配列番号8は、開始コドン(A T G)またはシグナルペプチドによりコードされるMetを有さないRSV_Gbをコードするアミノ配列を示す。

【0053】

配列番号9は、IgEシグナルペプチドをコードする開始コドン(A T G) / 配列を含むRSV_Fをコードするヌクレオチド配列を示す。

【0054】

配列番号10は、開始コドン / IgEまたはシグナルペプチドによりコードされるMetを有するRSV_Fをコードするアミノ配列を示す。

10

【0055】

配列番号11は、IgEシグナルペプチドをコードする開始コドン(A T G) / 配列を含むRSV_M2-1をコードするヌクレオチド配列を示す。

【0056】

配列番号12は、開始コドン / IgEシグナルペプチドによりコードされるMetを有するRSV_M2-1をコードするアミノ配列を示す。

20

【0057】

配列番号13は、IgEシグナルペプチドをコードする開始コドン(A T G) / 配列を含むRSV_Gaをコードするヌクレオチド配列を示す。

【0058】

配列番号14は、開始コドン / IgEまたはシグナルペプチドによりコードされるMetを有するRSV_Gaをコードするアミノ配列を示す。

30

【0059】

配列番号15は、IgEシグナルペプチドをコードする開始コドン(A T G) / 配列を含むRSV_Gbをコードするヌクレオチド配列を示す。

【0060】

配列番号16は、開始コドン / IgEまたはシグナルペプチドによりコードされるMetを有するRSV_Gbをコードするアミノ配列を示す。

30

【0061】

添付の配列リストには、IgEシグナルペプチドのアミノ酸配列である配列番号17が含まれる。

【0062】

配列番号17は、IgEシグナルペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0063】

添付の配列リストには、様々なCCL20配列および実施形態である配列番号18~21が含まれる。

【0064】

配列番号18は、開始コドン(A T G)またはシグナルペプチドを有さないCCL20をコードするヌクレオチド配列を示す。

40

【0065】

配列番号19は、開始コドン(A T G)またはシグナルペプチドによりコードされるMetを有さないCCL20。

【0066】

配列番号20は、IgEシグナルペプチドをコードする開始コドン(A T G) / 配列を含むCCL20をコードするヌクレオチド配列を示す。

【0067】

配列番号21は、開始コドン / IgGシグナルペプチドによりコードされるMetを有するCCL20。

【0068】

添付の配列リストには、RSV免疫原から誘導されるアミノ酸配列である配列番号22

50

~ 3 1 が含まれる。

【 0 0 6 9 】

配列番号 2 2 は、 R S V F 免疫原の T 細胞エピトープである。

【 0 0 7 0 】

配列番号 2 3 は、 R S V F 免疫原の T 細胞エピトープである。

【 0 0 7 1 】

配列番号 2 4 は、 R S V F 免疫原の T 細胞エピトープである。

【 0 0 7 2 】

配列番号 2 5 は、 R S V F 免疫原の T 細胞エピトープである。

【 0 0 7 3 】

10

配列番号 2 6 は、 R S V F 免疫原プロテアーゼ切断部位である。

【 0 0 7 4 】

配列番号 2 7 は、 R S V F 免疫原プロテアーゼ切断部位である。

【 0 0 7 5 】

配列番号 2 8 は、 R S V F 免疫原融合ペプチドである。

【 0 0 7 6 】

配列番号 2 9 は、 パリビズマブの R S V F 免疫原結合部位である。

【 0 0 7 7 】

配列番号 3 0 は、 R S V M 2 - 1 免疫優性 T 細胞エピトープである。

【 0 0 7 8 】

20

配列番号 3 1 は、 R S V M 2 - 1 亜優性 T 細胞エピトープである。

【 0 0 7 9 】

本発明の幾つかの態様において、 R S V F 免疫原、 および R S V F 免疫原をコードする配列が提供される。本発明の幾つかの態様において、 R S V G a 免疫原、 および R S V G a 免疫原をコードする配列が提供される。本発明の幾つかの態様において、 R S V G b 免疫原、 および R S V G b 免疫原をコードする配列が提供される。 R S V F 免疫原をコードする配列、 R S V G a 免疫原をコードする配列、 および R S V G b 免疫原をコードする配列の組み合わせを含む組成物が提供され、 R S V F 免疫原をコードする配列、 R S V G a 免疫原をコードする配列、 および R S V G b 免疫原をコードする配列をそれぞれ含む。

30

【 0 0 8 0 】

R S V M 2 - 1 免疫原、 および R S V M 2 - 1 免疫原をコードする配列も提供され、 単独で、 または他のタンパク質および / もしくは核酸配列と組み合わせて使用され得る。

【 0 0 8 1 】

1 . 定義

本明細書において使用される用語は、 特定の実施形態を記載するだけの目的であり、 限定的であることを意図しない。明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるとき、 単数形「 a 」、 「 a n 」、 および「 t h e 」は、 特に文脈から明白に示されない限り、 複数の対象を含む。

40

【 0 0 8 2 】

本明細書における数値範囲の列挙では、 同じ程度の正確さでその間に介在するそれぞれの数が、 明確に考慮される。例えば、 6 ~ 9 の範囲では、 7 および 8 の数が 6 および 9 に加えて考慮され、 6 . 0 ~ 7 . 0 の範囲では、 6 . 0 、 6 . 1 、 6 . 2 、 6 . 3 、 6 . 4 、 6 . 5 、 6 . 6 、 6 . 7 、 6 . 8 、 6 . 9 、 および 7 . 0 の数が明確に考慮される。

【 0 0 8 3 】

a . アジュvant

「アジュvant」は、 本明細書で使用されるとき、 本明細書に記載されている D N A プラスミドワクチンに添加されて、 D N A プラスミドおよび本明細書以降に記載されるコード核酸配列によりコードされる 1 つ以上の呼吸器合胞体ウイルス（ R S V ）抗原性

50

を増強する任意の分子を意味し得る。

【0084】

b . 抗体

「抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgD、もしくはIgEの部類の抗体、またはFab、F(ab)2、Fdが含まれるそのフラグメント、フラグメント、もしくは誘導体、ならびに一本鎖抗体、二特異性抗体、二重特異性抗体、二官能性抗体、およびその誘導体を意味し得る。抗体は、哺乳動物の血清試料から単離された抗体、ポリクローナル抗体、親和精製抗体、または所望のエピトープもしくはそれから誘導される配列に対して十分な結合特異性を示すそれらの混合物であり得る。

【0085】

c . コード配列

「コード配列」または「コードする核酸」は、本明細書で使用されるとき、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸（RNAまたはDNA分子）を意味し得る。コード配列は、核酸が投与される個体または哺乳動物の細胞において発現を指示することができるプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む、調節エレメントに機能的に結合している開始および終結シグナルを更に含み得る。

【0086】

幾つかの実施形態において、配列番号2に記載されている、コンセンサスRSV-F免疫原のアミノ酸配列のコード配列は、配列番号1である。そのようなコード配列は、N末端メチオニン、またはIgEもしくはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドをコードする開始コドンを任意に更に含むことができる。配列番号10は、IgEシグナルペプチド（配列番号17）を有する配列番号2に対応する。配列番号9は配列番号10をコードする。

【0087】

幾つかの実施形態において、配列番号6に記載されている、コンセンサスRSV-Ga免疫原のアミノ酸配列のコード配列は、配列番号5である。そのようなコード配列は、N末端メチオニン、またはIgEもしくはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドをコードする開始コドンを任意に更に含むことができる。配列番号14は、IgEシグナルペプチド（配列番号17）を有する配列番号6に対応する。配列番号13は配列番号14をコードする。

【0088】

幾つかの実施形態において、配列番号8に記載されている、コンセンサスRSV-Gb免疫原のアミノ酸配列のコード配列は、配列番号7である。そのようなコード配列は、N末端メチオニン、またはIgEもしくはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドをコードする開始コドンを任意に更に含むことができる。配列番号16は、IgEシグナルペプチド（配列番号17）を有する配列番号8に対応する。配列番号15は配列番号16をコードする。

【0089】

配列番号4に記載されているコンセンサスRSV-M2-1免疫原のアミノ酸配列をコードする、配列番号3のコード配列も提供される。そのようなコード配列は、N末端メチオニン、またはIgEもしくはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドをコードする開始コドンを任意に更に含むことができる。配列番号12は、IgEシグナルペプチド（配列番号17）を有する配列番号4に対応する。配列番号11は配列番号12をコードする。

【0090】

d . 補体

「補体」または「相補」は、本明細書で使用されるとき、核酸が、核酸分子のヌクレオチドまたはヌクレオチド類縁体の間のワトソン・クリック（例えば、A-T/UおよびC-G）またはフーグスティーン塩基対を意味し得ることを意味する。

【0091】

10

20

30

40

50

e. コンセンサスまたはコンセンサス配列

「コンセンサス」または「コンセンサス配列」は、本明細書で使用されるとき、特定の RSV 抗原の多数のサブタイプまたは血清型に対して広範囲の免疫を誘導するために使用され得る、特定の RSV 抗原の多数のサブタイプの整列の分析に基づいて構築された、合成核酸配列または対応するポリペプチド配列を意味し得る。コンセンサス RSV 抗原は、タンパク質 F、タンパク質 G、およびタンパク質 M2 のコンセンサスアミノ酸配列を含むことができる。コンセンサスアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列も、提供される。また、融合タンパク質のような合成抗原は、コンセンサス配列（またはコンセンサス抗原）を含むように操作され得る。

【0092】

10

コンセンサス RSV F 抗原のアミノ酸配列は、配列番号 2 に記載されている。そのような配列は、N 末端メチオニン、または IgE もしくは IgG シグナルペプチドのようなシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 10 は、IgE シグナルペプチド（配列番号 17）を有する配列番号 2 に対応する。

【0093】

コンセンサス RSV Ga 抗原のアミノ酸配列は、配列番号 6 に記載されている。そのような配列は、N 末端メチオニン、または IgE もしくは IgG シグナルペプチドのようなシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 14 は、IgE シグナルペプチド（配列番号 17）を有する配列番号 6 に対応する。

【0094】

20

コンセンサス RSV Gb 抗原のアミノ酸配列は、配列番号 8 に記載されている。そのような配列は、N 末端メチオニン、または IgE もしくは IgG シグナルペプチドのようなシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 16 は、IgE シグナルペプチド（配列番号 17）を有する配列番号 8 に対応する。

【0095】

配列番号 4 に記載されているコンセンサス RSV M2-1 抗原のアミノ酸配列も提供される。そのような配列は、N 末端メチオニン、または IgE もしくは IgG シグナルペプチドのようなシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 12 は、IgE シグナルペプチド（配列番号 17）を有する配列番号 4 に対応する。

【0096】

30

f. 定電流

「定電流」は、本明細書で使用されるとき、組織または前記組織を画定する細胞が、その組織に送達される電気パルスの持続時間にわたって受ける、または経験する電流を定義すること。電気パルスは、本明細書に記載されている電気穿孔装置から送達される。この電流は、前記組織に電気パルスの寿命にわたって一定のアンペア数で留まり、それは、本明細書において提供される電気穿孔装置が、好ましくは瞬時のフィードバックを有するフィードバック要素を有するからである。フィードバック要素は、パルスの持続時間の全体にわたって組織（または細胞）の抵抗を測定すること、ならびに電流が同じ組織において電気パルスの全体にわたって（数マイクロ秒台）、およびパルス毎に一定のままであるよう、電気穿孔装置に電気エネルギー出力を変更させる（例えば、電圧を増加させる）ことができる。幾つかの実施形態において、フィードバック要素は、制御装置を含む。

40

【0097】

g. 電流フィードバックまたはフィードバック

「電流フィードバック」または「フィードバック」は、本明細書で使用されるとき、交換可能に使用することができ、提供される電気穿孔装置の能動的応答を意味することができ、それは、電極の間の組織中の電流を測定すること、および電流を一定レベルに維持するため、EP 装置により送達されたエネルギー出力をそれに応じて変えることを含む。この一定レベルは、パルス系列または電気処理を開始する前に、使用者により予め設定される。フィードバックは、電気穿孔装置の電気穿孔構成要素、例えば制御装置により達成することができ、それは、その電気回路が、電極の間の組織中の電流を連続的にモニターす

50

ること、ならびにモニターされた電流（または組織内の電流）を比較して、電流を予め設定する、およびモニターされた電流を予め設定されたレベルに維持するためにエネルギー出力調整を連続的に行うことができるからである。フィードバックループは、アナログ閉ループフィートバックであるので、瞬時であり得る。

【0098】

h. 分散電流

「分散電流」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に記載されている電気穿孔装置の様々な針電極配列から送達される電流のパターンを意味し得、パターンは、電気穿孔される組織の任意の領域における電気穿孔関連熱ストレスの発生を最小限にする、または排除する。

10

【0099】

i. 電気穿孔

「電気穿孔」、「電気透過処理（electro-permeabilization）」または「電気動力学的促進（electrokinetic enhancement）」（「EP」）は、本明細書で交換可能に使用されるとき、生体膜内の微視的経路（細孔）を誘導するための膜貫通電界パルスの使用を意味し得、それらの存在は、プラスミド、オリゴヌクレオチド、siRNA、薬剤、イオン、および水のような生体分子が細胞膜の一方の側から他方の側に通過することを可能にする。

【0100】

j. フィードバック機構

「フィードバック機構」は、本明細書で使用されるとき、ソフトウェアまたはハードウェア（もしくはファームウェア）のいずれかにより実施されるプロセスを意味し得、このプロセスは、所望の組織のインピーダンスを（エネルギーパルスの送達の前、間、および／または後に）受け、現在の値、好ましくは電流と比較し、送達されるエネルギーのパルスを調整して、予め設定された値を達成する。フィードバック機構は、アナログ閉ループ回路により実施することができる。

20

【0101】

k. フラグメント

「フラグメント」は、特定のRSV抗原を認識することによって、哺乳動物においてRSVに対して免疫応答を誘発することができる、RSV免疫原のポリペプチドフラグメントを意味し得る。RSV免疫原は、それぞれの場合に、シグナルペプチドおよび／または1位にメチオニンを有する、または有さない、RSV F免疫原、RSV M2-1免疫原、RSV Ga免疫原、RSV Gb免疫原の本明細書に記載されているコンセンサス配列、それぞれの場合にシグナルペプチド、および／または1位にメチオニンを有する、または有さない、本明細書に記載されているコンセンサス配列に98%以上の相同性があるタンパク質、本明細書に記載されているコンセンサス配列に99%以上の相同性があるタンパク質、および本明細書に記載されているコンセンサス配列と100%同一であるタンパク質を指す。フラグメントは、例えば、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチド（配列番号17）またはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドに結合しているRSV免疫原のフラグメントを含んでも、含まなくてもよい。

30

【0102】

RSV Fコンセンサス免疫原のフラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチドおよび／または1位にメチオニンを有する、または有さない、配列番号2、配列番号10、本明細書に記載されているRSV Fコンセンサス免疫原配列に98%以上の相同性があるタンパク質、本明細書に記載されているRSV Fコンセンサス免疫原配列に99%以上の相同性があるタンパク質、または本明細書に記載されているコンセンサス配列に100%同一であるRSV Fコンセンサス免疫原、のフラグメントであり得る。そのようなフラグメントは、付加された非RSVシグナルペプチドを除いて、本明細書に記載されている特定の全長RSV Fコンセンサス免疫原配列の長さの、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60

40

50

%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の割合を含むことができる。フラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチド、および／または1位のメチオニンを有する、または有さない、本明細書に記載されているRSV-Fコンセンサス免疫原の配列に98%以上、または99%以上の相同性がある、およびそのような配列と100%同一である、ポリペプチドのフラグメントを指す。フラグメントは、RSV-Fコンセンサス免疫原に98%以上の相同性、99%以上の相同性がある、または100%同一であるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。幾つかの実施形態において、RSV-F免疫原のフラグメントは、配列番号2のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチド(配列番号17)またはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドに結合している配列番号2のフラグメントを含むことができる。したがって、幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号17を含む配列番号10のフラグメントである。フラグメントは、N末端メチオニンに結合している配列番号2のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、配列番号2に98%以上または99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントも指す。フラグメントは、配列番号2に98%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号2に98%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号2に99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号2に98%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。RSV-F免疫原は、575個のアミノ酸である。幾つかの実施形態において、そのフラグメントは、115個以上のアミノ酸の長さ、163個以上、230個以上、288個以上、345個以上、403個以上、460個以上、515個以上、520個以上、525個以上、530個以上、535個以上、540個以上、545個以上、550個以上、555個以上、560個以上、565個以上、570個以上、574個以上の長さであり得る。ポリペプチドフラグメントは、140個未満のアミノ酸、190個未満、250個未満、283個未満、300個未満、365個未満、425個未満、495個未満、518個未満、523個未満、528個未満、533個未満、547個未満、552個未満、563個未満、または572個未満の長さであり得る。フラグメントは、N末端メチオニン、および／または免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEもしくはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを更に含むことができる。N末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドは、574アミノ酸またはより小さいそのフラグメントに結合し得る。N末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドは、574アミノ酸に98%の相同性があるポリペプチド、または574アミノ酸配列に98%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る。N末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドは、574アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチド、または574アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る。相同性の程度を計算するとき、ポリペプチドは配列番号2またはそのフラグメントを必要があり、N末端メチオニンおよび／または任意のシグナルペプチドは、そのような計算に含まれない。シグナルペプチドの配列は、相同性の決定に使用されない。したがって、例えば、配列番号10は、配列番号17のシグナルペプチドに機能的に結合している配列番号2を含むが、配列番号10は、配列番号2には不在であるシグナルペプチドにもかかわらず、配列番号2のフラグメントに100%の相同性がある配列番号2のフラグメン

10

20

30

40

50

トを含む。したがって、配列番号2のフラグメントに少なくとも98%の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むタンパク質は、少なくとも115個のアミノ酸であり、かつ例えばシグナルペプチドに任意に結合し得る、配列番号2のフラグメントに少なくとも98%の相同性があるポリペプチドのフラグメントである、タンパク質を指すことが意図される。配列番号22、配列番号23、配列番号24、および配列番号25は、配列番号2に記載されているRSV-F免疫原のT細胞エピトープに対応する。幾つかの実施形態において、フラグメントは、これらの配列、またはこれらに98%以上もしくは99%以上の相同性がある配列の1つ以上の全てまたは一部を含む。配列番号26および配列番号27は、RSV-F免疫原プロテアーゼ切断部位である。配列番号28は、RSV-F免疫原融合ペプチドである。配列番号29は、バリビズマブのRSV-F免疫原結合部位である。

【0103】

RSV-Gaコンセンサス免疫原のフラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチドおよび/または1位にメチオニンを有する、または有さない、配列番号6、配列番号14、本明細書に記載されているRSV-Gaコンセンサス免疫原配列に98%以上の相同性があるタンパク質、本明細書に記載されているRSV-Gaコンセンサス免疫原配列に99%以上の相同性があるタンパク質、または本明細書に記載されているコンセンサス配列に100%同一であるRSV-Gaコンセンサス免疫原、のフラグメントであり得る。そのようなフラグメントは、付加された非RSVシグナルペプチドを除いて、本明細書に記載されている特定の全長RSV-Gaコンセンサス免疫原配列の長さの、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の割合を含むことができる含むことができる。フラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチド、および/または1位のメチオニンを有する、または有さない、本明細書に記載されているRSV-Gaコンセンサス免疫原の配列に98%以上、または99%以上の相同性がある、およびそのような配列と100%同一である、ポリペプチドのフラグメントを指す。フラグメントは、RSV-Gaコンセンサス免疫原に98%以上の相同性、99%以上の相同性がある、または100%同一であるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。幾つかの実施形態において、RSV-Ga免疫原のフラグメントは、配列番号6のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチド(配列番号17)またはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドに結合している配列番号6のフラグメントを含むことができる。したがって、幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号17を含む配列番号14のフラグメントである。フラグメントは、N末端メチオニンに結合している配列番号6のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、配列番号6に98%以上または99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントも指す。フラグメントは、配列番号6に98%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号6に99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号6に98%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号6に99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。RSV-Ga免疫原は、N末端メチオニンおよび/またはシグナルペプチドを除いた、297個のアミノ酸である。幾つかの実施形態において、

10

20

30

40

50

て、そのフラグメントは、125個以上のアミノ酸の長さ、130個以上、140個以上、150個以上、160個以上、170個以上、180個以上、190個以上、200個以上、210個以上、220個以上、230個以上、240個以上、250個以上、260個以上、270個以上、280個以上、285個以上、290個以上、295個以上の長さであり得る。ポリペプチドフラグメントは、135個未満のアミノ酸、145個未満、155個未満、165個未満、175個未満、185個未満、195個未満、205個未満、215個未満、225個未満、235個未満、245個未満、255個未満、265個未満、275個未満、285個未満、288個未満、292個未満、または296個未満の長さであり得る。フラグメントは、N末端メチオニン、および/または免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEもしくはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを更に含むことができる。N末端メチオニンおよび/またはシグナルペプチドは、296アミノ酸またはより小さいそのフラグメントに結合し得る。N末端メチオニンおよび/またはシグナルペプチドは、296アミノ酸に98%の相同性があるポリペプチド、または296アミノ酸配列に98%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る。N末端メチオニンおよび/またはシグナルペプチドは、296アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチド、または296アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る。相同性の程度を計算するとき、ポリペプチドは配列番号6またはそのフラグメントを必要があり、N末端メチオニンおよび/または任意のシグナルペプチドは、そのような計算に含まれない。シグナルペプチドの配列は、相同性の決定に使用されない。したがって、例えば、配列番号14は、配列番号17のシグナルペプチドに機能的に結合している配列番号6を含むが、配列番号14は、配列番号6には不在であるシグナルペプチドにもかかわらず、配列番号6のフラグメントに100%の相同性がある配列番号6のフラグメントを含む。したがって、配列番号6のフラグメントに少なくとも98%の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むタンパク質は、少なくとも125個のアミノ酸であり、かつ例えばシグナルペプチドに任意に結合し得る、配列番号6のフラグメントに少なくとも98%の相同性があるポリペプチドのフラグメントである、タンパク質を指すことが意図される。

【0104】

それぞれの場合にシグナルペプチド、および/または1位のメチオニンを有する、または有さない、配列番号8、配列番号16、本明細書に開示されているRSV Gbコンセンサス免疫原配列に98%以上の相同性があるタンパク質、本明細書に開示されているRSV Gbコンセンサス免疫原配列に99%以上の相同性があるタンパク質、および本明細書に開示されているコンセンサス免疫原配列と100%同一であるRSV Gbコンセンサス免疫原に開示されているもののような、RSV Gbコンセンサス免疫原のフラグメントは、付加された任意の非RSVシグナルペプチドを除いて、本明細書に記載されている特定の全長RSV Gbコンセンサス免疫原配列の長さの、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の割合を含むことができる。フラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチド、および/または1位のメチオニンを有する、または有さない、本明細書に記載されているRSV Gbコンセンサス免疫原の配列に98%以上、または99%以上の相同性がある、およびそのような配列と100%同一である、ポリペプチドのフラグメントを指す。フラグメントは、RSV Gbコンセンサス免疫原に98%以上の相同性、99%以上の相同性がある、または100%同一であるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。幾つかの実施形態において、RSV Gb免疫原のフラグメントは、配列番号8のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチド(配列番号17)またはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドに結合して

10

20

30

40

50

いる配列番号 8 のフラグメントを含むことができる。したがって、幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号 17 を含む配列番号 16 のフラグメントである。フラグメントは、N 末端メチオニンに結合している配列番号 8 のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、配列番号 8 に 98 % 以上または 99 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントも指す。フラグメントは、配列番号 8 に 98 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 8 に 99 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 8 に 98 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 8 に 99 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。R S V G b 免疫原は、N 末端メチオニンおよび / またはシグナルペプチドを除いて、291 個のアミノ酸である。幾つかの実施形態において、そのフラグメントは、125 個以上のアミノ酸の長さ、130 個以上、140 個以上、150 個以上、160 個以上、170 個以上、180 個以上、190 個以上、200 個以上、210 個以上、220 個以上、230 個以上、240 個以上、250 個以上、260 個以上、270 個以上、280 個以上、285 個以上、288 個以上の長さであり得る。ポリペプチドフラグメントは、135 個未満のアミノ酸、145 個未満、155 個未満、165 個未満、175 個未満、185 個未満、195 個未満、205 個未満、215 個未満、225 個未満、235 個未満、245 個未満、255 未満、265 個未満、275 個未満、285 個未満、288 個未満、290 個未満の長さであり得る。フラグメントは、N 末端メチオニン、および / または免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば Ig E もしくは Ig G シグナルペプチドのようなシグナルペプチドを更に含むことができる。N 末端メチオニンおよび / またはシグナルペプチドは、290 アミノ酸またはより小さいそのフラグメントに結合し得る。N 末端メチオニンおよび / またはシグナルペプチドは、290 アミノ酸に 98 % の相同性があるポリペプチド、または 290 アミノ酸配列に 98 % の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る。N 末端メチオニンおよび / またはシグナルペプチドは 290 アミノ酸配列に 99 % の相同性があるポリペプチド、または 290 アミノ酸配列に 99 % の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る。相同性の程度を計算するとき、ポリペプチドは配列番号 6 またはそのフラグメントを必要があり、N 末端メチオニンおよび / または任意のシグナルペプチドは、そのような計算に含まれない。シグナルペプチドの配列は、相同性の決定に使用されない。したがって、例えば、配列番号 16 は、配列番号 17 のシグナルペプチドに機能的に結合している配列番号 8 を含むが、配列番号 16 は、配列番号 8 には不在であるシグナルペプチドにもかかわらず、配列番号 8 のフラグメントに 100 % の相同性がある配列番号 8 のフラグメントを含む。したがって、配列番号 8 のフラグメントに少なくとも 98 % の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むタンパク質は、少なくとも 125 個のアミノ酸であり、かつ例えばシグナルペプチドに任意に結合し得る、配列番号 8 のフラグメントに少なくとも 98 % の相同性があるポリペプチドのフラグメントである、タンパク質を指すことが意図される。

【 0105 】

加えて、R S V M 2 - 1 コンセンサス免疫原のフラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチドおよび / または 1 位にメチオニンを有する、または有さない、配列番号 4、配列番号 12、本明細書に記載されている R S V M 2 - 1 コンセンサス免疫原配列に 98 % 以上の相同性があるタンパク質、本明細書に記載されている R S V M 2 - 1 コンセンサス免疫原配列に 99 % 以上の相同性があるタンパク質、または本明細書に記載されているコンセンサス配列に 100 % 同一である R S V M 2 - 1 コンセンサス免疫原、のフラグメントであり得る。そのようなフラグメントは、付加された非 R S V シグナルペ

10

20

30

40

50

プチドを除いて、本明細書に記載されている特定の全長 R S V M 2 - 1 コンセンサス免疫原配列の長さの、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の割合を含むことができる含むことができる。フラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチド、および／または1位のメチオニンを有する、または有さない、本明細書に記載されている R S V M 2 - 1 コンセンサス免疫原の配列に98%以上、または99%以上の相同性がある、およびそのような配列と100%同一である、ポリペプチドのフラグメントを指す。

フラグメントは、R S V M 2 - 1 コンセンサス免疫原に98%以上の相同性、99%以上の相同性がある、または100%同一であるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。幾つかの実施形態において、R S V M 2 - 1 免疫原のフラグメントは、配列番号4のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチド（配列番号17）またはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドに結合している配列番号4のフラグメントを含むことができる。したがって、幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号17を含む配列番号12のフラグメントである。フラグメントは、N末端メチオニンに結合している配列番号4のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、配列番号4に98%以上または99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントも指す。フラグメントは、配列番号4に98%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号4に99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号4に98%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号4に99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。R S V

M 2 - 1 免疫原は、195個のアミノ酸である。幾つかの実施形態において、そのフラグメントは、25個以上のアミノ酸の長さ、30個以上、40個以上、50個以上、60個以上、70個以上、80個以上、90個以上、100個以上、110個以上、120個以上、130個以上、140個以上、150個以上、160個以上、170個以上、180個以上、184個以上、190個以上、193個以上の長さであり得る。ポリペプチドフラグメントは、35個未満のアミノ酸、45個未満、55個未満、65個未満、75個未満、85個未満、95個未満、105個未満、115個未満、125個未満、135個未満、145個未満、155個未満、165個未満、175個未満、185個未満、188個未満、192個未満、または194個未満の長さであり得る。フラグメントは、N末端メチオニン、および／または免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEもしくはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを更に含むことができる。N末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドは、194アミノ酸またはより小さいそのフラグメントに結合し得る。N末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドは、194アミノ酸に98%の相同性があるポリペプチド、または194アミノ酸配列に98%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る。N末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドは194アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチド、または194アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る。相同性の程度を計算するとき、ポリペプチドは配列番号4またはそのフラグメントを必要があり、N末端メチオニンおよび／または任意のシグナルペプチドは、そのような計算に含まれない。シグナルペプチドの配列は、相同性の決定に使用されない。し

10

20

30

40

50

たがって、例えば、配列番号 12 は、配列番号 17 のシグナルペプチドに機能的に結合している配列番号 4 を含むが、配列番号 12 は、配列番号 4 には不在であるシグナルペプチドにもかかわらず、配列番号 4 のフラグメントに 100% の相同性がある配列番号 4 のフラグメントを含む。したがって、配列番号 4 のフラグメントに少なくとも 98% の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むタンパク質は、少なくとも 25 個のアミノ酸であり、かつ例えはシグナルペプチドに任意に結合し得る、配列番号 4 のフラグメントに少なくとも 98% の相同性があるポリペプチドのフラグメントである、タンパク質を指すことが意図される。配列番号 30 は、配列番号 4 に記載されている RSV M2 - 1 免疫原の免疫優性 T 細胞エピトープに対応する。配列番号 31 は、配列番号 4 に記載されている RSV M2 - 1 免疫原の免疫優性 T 細胞エピトープに対応する亜優性 T 細胞エピトープを意味する。幾つかの実施形態において、フラグメントは、これらの配列、またはこれらに 98% 以上もしくは 99% 以上の相同性がある配列の 1 つ以上の全てまたは一部を含む。

10

【0106】

「フラグメント」は、上に記載された RSV 免疫原フラグメント、すなわち RSV F 免疫原、RSV M2 - 1 免疫原、RSV Ga 免疫原、RSV Gb 免疫原をコードする核酸フラグメントも意味することができ、それぞれの場合にシグナルペプチドおよび / または 1 位にメチオニンを有する、または有さず、本明細書に記載されているコンセンサス配列、それぞれの場合にシグナルペプチド、および / または 1 位にメチオニンを有する、または有さない、本明細書に記載されているコンセンサス配列に 98% 以上の相同性があるタンパク質、本明細書に記載されているコンセンサス配列に 99% 以上の相同性があるタンパク質、および本明細書に記載されているコンセンサス配列と 100% 同一であるタンパク質であり得る。フラグメントは、例えば、N 末端メチオニン（すなわち、開始コドン）のコード配列に、または免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば IgE シグナルペプチド（配列番号 17）もしくは IgG シグナルペプチドのようなシグナルペプチドをコードするコード配列に結合している RSV 免疫原をコードする核酸のフラグメントを含んでも、含まなくてもよい。RSV 免疫原をコードするコード配列のフラグメントは、付加された非 RSV シグナルペプチドをコードする任意のコード配列を除いて、本明細書に記載されている特定の全長 RSV 免疫原配列のコード配列の長さの、20% 以上、25% 以上、30% 以上、35% 以上、40% 以上、45% 以上、50% 以上、55% 以上、60% 以上、65% 以上、70% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、91% 以上、92% 以上、93% 以上、94% 以上、95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、99% 以上の割合を含むことができる。フラグメントは、本明細書に記載されている RSV 免疫原の配列に 98% 以上または 99% 以上の相同性があるポリペプチドをコードするコード配列のフラグメントも指す。フラグメントは、98% 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントを含むことができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。

20

【0107】

幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号 1 に 98% 以上の相同性がある核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号 1 に 99% 以上の相同性がある核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号 1 のフラグメントである。本明細書に記載されているポリペプチドフラグメントをコードする核酸配列が、明示的に開示されていることが意図され、すなわち、ペプチドフラグメントのサイズおよび相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、ペプチドフラグメントのサイズおよび相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列のフラグメントは、配列番号 1 のフラグメントである。例えば配列番号 1 または配列番号 9 のように、それぞれの場合にシグナルペプチド、および / または 1 位のメチオニンを有する、または有さない、配列番号 2、配列番号 10、本明細書に開示されている RSV F コンセンサス免疫原配列

30

40

50

に 98 % 以上の相同性があるタンパク質、本明細書に開示されている RSV F コンセンサス免疫原配列に 99 % 以上の相同性があるタンパク質、および本明細書に開示されているコンセンサス免疫原配列と 100 % 同一である RSV F コンセンサス免疫原に開示されているもののような、RSV F コンセンサス免疫原をコードするコード配列のフラグメントは、付加された任意の非 RSV シグナルペプチドを除いて、本明細書に記載されている特定の全長 RSV F コンセンサス免疫原配列の長さの、20 % 以上、25 % 以上、30 % 以上、35 % 以上、40 % 以上、45 % 以上、50 % 以上、55 % 以上、60 % 以上、65 % 以上、70 % 以上、75 % 以上、80 % 以上、85 % 以上、90 % 以上、91 % 以上、92 % 以上、93 % 以上、94 % 以上、95 % 以上、96 % 以上、97 % 以上、98 % 以上、99 % 以上の割合を含むことができる。フラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチド、および / または 1 位のメチオニンを有する、または有さない、本明細書に記載されている RSV F コンセンサス免疫原の配列に 98 % 以上、または 99 % 以上の相同性がある、およびそのような配列と 100 % 同一である、ポリペプチドのフラグメントをコードすることができる。フラグメントは、RSV F コンセンサス免疫原に 98 % 以上の相同性、99 % 以上の相同性がある、または 100 % 同一であるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。幾つかの実施形態において、RSV F 免疫原をコードするフラグメントは、配列番号 2 のフラグメントをコードすること、および配列番号 1 のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば IgE シグナルペプチド（配列番号 17）または IgG シグナルペプチドのようなシグナルペプチドに結合している配列番号 2 のフラグメントをコードすることができる。したがって、幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号 17 を含む配列番号 10 のフラグメントであり、配列番号 9 によりコードされ得る。フラグメントは、開始コドンに結合している配列番号 1 のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、配列番号 2 に 98 % 以上または 99 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントもコードする。フラグメントは、配列番号 2 に 98 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 2 に 99 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 2 に 98 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 2 に 99 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 1 に 98 % 以上または 99 % 以上の相同性があり得る。フラグメントは、配列番号 1 に 98 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 1 に 99 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 1 に 98 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 1 に 99 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。それぞれの場合に開始コドンまたはシグナルペプチドをコードするコード配列を有する、または有さない、配列番号 1 のフラグメント、配列番号 1 に 98 % 以上の相同性がある核酸配列のフラグメント、および配列番号 1 に 99 % 以上の相同性がある核酸配列のフラグメントは、115 個以上のアミノ酸の長さ、163 個以上、230 個以上、288 個以上、345 個以上、403 個以上、460 個以上、515 個以上、520 個以上、525 個以上、530 個以上、535 個以上、540 個以

10

20

30

40

50

上、545個以上、550個以上、555個以上、560個以上、565個以上、570個以上、574個以上の長さであり得るRSV-F免疫原のフラグメントをコードすることができる。ポリペプチドフラグメントは、140個未満のアミノ酸、190個未満、250個未満、283個未満、300個未満、365個未満、425個未満、495個未満、518個未満、523個未満、528個未満、533個未満、547個未満、552個未満、563個未満、または572個未満の長さであり得る。フラグメントは、N末端メチオニン、および／または免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEもしくはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを更にコードすることができる。N末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドは、574アミノ酸またはより小さいそのフラグメントをコードする核酸配列に結合し得る。フラグメントは、574アミノ酸に98%の相同性があるポリペプチド、または574アミノ酸配列に98%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得るN末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドをコードすることができる。フラグメントは、574アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチド、または574アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得るN末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドをコードすることができる。相同性の程度を計算するとき、ポリペプチドは配列番号2またはそのフラグメントを必要があり、N末端メチオニンおよび／または任意のシグナルペプチドは、そのような計算に含まれない。シグナルペプチドの配列は、相同性の決定に使用されない。したがって、例えば、配列番号7は、配列番号17のシグナルペプチドをコードするコード配列に機能的に結合している配列番号1を含むが、配列番号7は、配列番号1には不在であるシグナルペプチドにもかかわらず、配列番号1のフラグメントに100%の相同性がある配列番号1のフラグメントを含む。配列番号22、配列番号23、配列番号24、および配列番号25は、配列番号2に記載されているRSV-F免疫原のT細胞エピトープに対応する。幾つかの実施形態において、フラグメントは、これらの配列、または配列番号1のフラグメントを含むこれらに98%以上もしくは99%以上の相同性がある配列、または配列番号1に98%以上もしくは99%以上の相同性がある配列の1つ以上の全て、または一部をコードするコード配列を含む。
10
20
20

【0108】

幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号5に98%以上の相同性がある核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号5に99%以上の相同性がある核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号5のフラグメントである。本明細書に記載されているポリペプチドフラグメントをコードする核酸配列が、明示的に開示されていることが意図され、すなわち、ペプチドフラグメントのサイズおよび相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、ペプチドフラグメントのサイズおよび相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列のフラグメントは、配列番号5のフラグメントである。例えば配列番号5または配列番号13のように、それぞれの場合にシグナルペプチド、および／または1位のメチオニンを有する、または有さない、配列番号6、配列番号14、本明細書に開示されているRSV-Gaコンセンサス免疫原配列に98%以上の相同性があるタンパク質、本明細書に開示されているRSV-Gaコンセンサス免疫原配列に99%以上の相同性があるタンパク質、および本明細書に開示されているコンセンサス免疫原配列と100%同一であるRSV-Gaコンセンサス免疫原に開示されているもののような、RSV-Gaコンセンサス免疫原をコードするコード配列のフラグメントは、付加された任意の非RSVシグナルペプチドを除いて、本明細書に記載されている特定の全長RSV-Gaコンセンサス免疫原配列の長さの、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の割合を含むことができる。フラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチド、および／または1位のメチオニンを有する、または有
30
40
50

さない、本明細書に記載されている R S V G a コンセンサス免疫原の配列に 98 % 以上、または 99 % 以上の相同性がある、およびそのような配列と 100 % 同一である、ポリペプチドのフラグメントをコードすることができる。フラグメントは、R S V G a コンセンサス免疫原に 98 % 以上の相同性、99 % 以上の相同性がある、または 100 % 同一であるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。幾つかの実施形態において、R S V G a 免疫原をコードするフラグメントは、配列番号 6 のフラグメントをコードすること、および配列番号 5 のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば I g E シグナルペプチド（配列番号 17）または I g G シグナルペプチドのようなシグナルペプチドに結合している配列番号 6 のフラグメントをコードすることができる。したがって、幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号 17 を含む配列番号 14 のフラグメントであり、配列番号 13 によりコードされ得る。フラグメントは、開始コドンに結合している配列番号 5 のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、配列番号 6 に 98 % 以上または 99 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントもコードする。フラグメントは、配列番号 6 に 98 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 6 に 98 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 6 に 99 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 5 に 98 % 以上または 99 % 以上の相同性があり得る。フラグメントは、配列番号 5 に 98 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 5 に 99 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 5 に 98 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 5 に 99 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。それぞれの場合に開始コドンまたはシグナルペプチドをコードするコード配列を有する、または有さない、配列番号 5 のフラグメント、配列番号 5 に 98 % 以上の相同性がある核酸配列のフラグメント、および配列番号 5 に 99 % 以上の相同性がある核酸配列のフラグメントは、幾つかの実施形態において、そのフラグメントが、125 個以上のアミノ酸の長さ、130 個以上、140 個以上、150 個以上、160 個以上、170 個以上、180 個以上、190 個以上、200 個以上、210 個以上、220 個以上、230 個以上、240 個以上、250 個以上、260 個以上、270 個以上、280 個以上、285 個以上、290 個以上、295 個以上の長さであり得る R S V G a 免疫原のフラグメントをコードすることができる。ポリペプチドフラグメントは、135 個未満のアミノ酸、145 個未満、155 個未満、165 個未満、175 個未満、185 個未満、195 個未満、205 個未満、215 個未満、225 個未満、235 個未満、245 個未満、255 個未満、265 個未満、275 個未満、285 個未満、288 個未満、292 個未満、または 296 個未満の長さであり得る。フラグメントは、N 末端メチオニン、および / または免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば I g E もしくは I g G シグナルペプチドのようなシグナルペプチドを更にコードすることができる。N 末端メチオニンおよび / またはシグナルペプチドは、296 アミノ酸またはより小さいそのフラグメントをコードする核酸配列に結合し得る。フラグメン

10

20

30

40

50

トは、296アミノ酸に98%の相同性があるポリペプチド、または296アミノ酸配列に98%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得るN末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドをコードすることができる。フラグメントは、296アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチド、または296アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得るN末端メチオニンおよび／またはシグナルペプチドをコードすることができる。相同性の程度を計算するとき、ポリペプチドは配列番号6またはそのフラグメントを必要があり、N末端メチオニンおよび／または任意のシグナルペプチドは、そのような計算に含まれない。シグナルペプチドの配列は、相同性の決定に使用されない。したがって、例えば、配列番号13は、配列番号17のシグナルペプチドをコードするコード配列に機能的に結合している配列番号5を含むが、配列番号13は、配列番号5には不在であるシグナルペプチドにもかかわらず、配列番号5のフラグメントに100%の相同性がある配列番号5のフラグメントを含む。

【0109】

幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号7に98%以上の相同性がある核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号7に99%以上の相同性がある核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号7のフラグメントである。本明細書に記載されているポリペプチドフラグメントをコードする核酸配列が、明示的に開示されていることが意図され、すなわち、ペプチドフラグメントのサイズおよび相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、ペプチドフラグメントのサイズおよび相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列のフラグメントは、配列番号7のフラグメントである。例えば配列番号7または配列番号15のように、それぞれの場合にシグナルペプチド、および／または1位のメチオニンを有する、または有さない、配列番号8、配列番号16、本明細書に開示されているRSV Gbコンセンサス免疫原配列に98%以上の相同性があるタンパク質、本明細書に開示されているRSV Gbコンセンサス免疫原配列に99%以上の相同性があるタンパク質、および本明細書に開示されているコンセンサス免疫原配列と100%同一であるRSV Gbコンセンサス免疫原に開示されているもののような、RSV Gbコンセンサス免疫原をコードするコード配列のフラグメントは、付加された任意の非RSVシグナルペプチドを除いて、本明細書に記載されている特定の全長RSV Gbコンセンサス免疫原配列の長さの、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の割合を含むことができる。フラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチド、および／または1位のメチオニンを有する、または有さない、本明細書に記載されているRSV Gbコンセンサス免疫原の配列に98%以上、または99%以上の相同性がある、およびそのような配列と100%同一である、ポリペプチドのフラグメントをコードすることができる。フラグメントは、RSV Gbコンセンサス免疫原に98%以上の相同性、99%以上の相同性がある、または100%同一であるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。幾つかの実施形態において、RSV Gb免疫原をコードするフラグメントは、配列番号8のフラグメントをコードすること、および配列番号7のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチド（配列番号17）またはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドに結合している配列番号8のフラグメントをコードすることができる。したがって、幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号17を含む配列番号16のフラグメントであり、配列番号15によりコードされ得る。フラグメントは、開始コドンに結合している配列番号7のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、配

10

20

30

40

50

列番号 8 に 9 8 % 以上または 9 9 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントもコードする。フラグメントは、配列番号 8 に 9 8 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 8 に 9 9 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 8 に 9 8 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 8 に 9 9 % 以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 7 に 9 8 % 以上または 9 9 % 以上の相同性があり得る。フラグメントは、配列番号 7 に 9 8 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 7 に 9 9 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号 7 に 9 8 % 以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない N 末端メチオニンを追加的に含むことができる。それぞれの場合に開始コドンまたはシグナルペプチドをコードするコード配列を有する、または有さない、配列番号 7 のフラグメント、配列番号 7 に 9 8 % 以上の相同性がある核酸配列のフラグメント、および配列番号 7 に 9 9 % 以上の相同性がある核酸配列のフラグメントは、幾つかの実施形態において、そのフラグメントが、1 2 5 個以上のアミノ酸の長さ、1 3 0 個以上、1 4 0 個以上、1 5 0 個以上、1 6 0 個以上、1 7 0 個以上、1 8 0 個以上、1 9 0 個以上、2 0 0 個以上、2 1 0 個以上、2 2 0 個以上、2 3 0 個以上、2 4 0 個以上、2 5 0 個以上、2 6 0 個以上、2 7 0 個以上、2 8 0 個以上、2 8 5 個以上、2 8 8 個以上の長さであり得る R S V G b 免疫原のフラグメントをコードすることができる。ポリペプチドフラグメントは、1 3 5 個未満のアミノ酸、1 4 5 個未満、1 5 5 個未満、1 6 5 個未満、1 7 5 個未満、1 8 5 個未満、1 9 5 個未満、2 0 5 個未満、2 1 5 個未満、2 2 5 個未満、2 3 5 個未満、2 4 5 個未満、2 5 5 未満、2 6 5 個未満、2 7 5 個未満、2 8 5 個未満、2 8 8 個未満、2 9 0 個未満の長さであり得る。フラグメントは、N 末端メチオニン、および / または免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば I g E もしくは I g G シグナルペプチドのようなシグナルペプチドを更にコードすることができる。N 末端メチオニンおよび / またはシグナルペプチドは、2 9 0 アミノ酸またはより小さいそのフラグメントをコードする核酸配列に結合し得る。フラグメントは、2 9 0 アミノ酸に 9 8 % の相同性があるポリペプチド、または 2 9 0 アミノ酸配列に 9 8 % の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る N 末端メチオニンおよび / またはシグナルペプチドをコードすることができる。フラグメントは、2 9 0 アミノ酸配列に 9 9 % の相同性があるポリペプチド、または 2 9 0 アミノ酸配列に 9 9 % の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得る N 末端メチオニンおよび / またはシグナルペプチドをコードすることができる。相同性の程度を計算するとき、ポリペプチドは配列番号 8 またはそのフラグメントを必要があり、N 末端メチオニンおよび / または任意のシグナルペプチドは、そのような計算に含まれない。シグナルペプチドの配列は、相同性的決定に使用されない。したがって、例えば、配列番号 1 5 は、配列番号 1 7 のシグナルペプチドをコードするコード配列に機能的に結合している配列番号 7 を含むが、配列番号 1 5 は、配列番号 7 には不在であるシグナルペプチドにもかかわらず、配列番号 7 のフラグメントに 1 0 0 % の相同性がある配列番号 7 のフラグメントを含む。

【 0 1 1 0 】

配列番号 3 に 9 8 % 以上の相同性がある核酸配列のフラグメントを含む R S V M 2 -

10

20

30

40

50

1に関する配列も、提供される。幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号3に99%以上の相同性がある核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号3のフラグメントである。本明細書に記載されているポリペプチドフラグメントをコードする核酸配列が、明示的に開示されていることが意図され、すなわち、ペプチドフラグメントのサイズおよび相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列のフラグメントである。幾つかの実施形態において、ペプチドフラグメントのサイズおよび相同性を有するタンパク質をコードする核酸配列のフラグメントは、配列番号3のフラグメントである。例えば配列番号3または配列番号11のように、それぞれの場合にシグナルペプチド、および/または1位のメチオニンを有する、または有さない、配列番号4、配列番号12、本明細書に開示されているRSV M2-1コンセンサス免疫原配列に98%以上の相同性があるタンパク質、本明細書に開示されているRSV M2-1コンセンサス免疫原配列に99%以上の相同性があるタンパク質、および本明細書に開示されているコンセンサス免疫原配列と100%同一であるRSV M2-1コンセンサス免疫原に開示されているもののような、RSV M2-1コンセンサス免疫原をコードするコード配列のフラグメントは、付加された任意の非RSVシグナルペプチドを除いて、本明細書に記載されている特定の全長RSV M2-1コンセンサス免疫原配列の長さの、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の割合を含むことができる。フラグメントは、それぞれの場合に、シグナルペプチド、および/または1位のメチオニンを有する、または有さない、本明細書に記載されているRSV M2-1コンセンサス免疫原の配列に98%以上、または99%以上の相同性がある、およびそのような配列と100%同一である、ポリペプチドのフラグメントをコードすることができる。フラグメントは、RSV M2-1コンセンサス免疫原に98%以上の相同性、99%以上の相同性がある、または100%同一であるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。幾つかの実施形態において、RSV M2-1免疫原をコードするフラグメントは、配列番号4のフラグメントをコードすること、および配列番号3のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチド(配列番号17)またはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドに結合している配列番号4のフラグメントをコードすることができる。したがって、幾つかの実施形態において、フラグメントは、配列番号17を含む配列番号12のフラグメントであり、配列番号11によりコードされ得る。フラグメントは、開始コドンに結合している配列番号3のフラグメントを含むことができる。フラグメントは、配列番号4に98%以上または99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントもコードする。フラグメントは、配列番号4に98%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号4に99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号4に98%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号4に99%以上の相同性があるポリペプチドのフラグメントをコードすることができ、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号3に98%以上または99%以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号3に98%以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。

10

20

30

40

50

3に99%以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号3に98%以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。フラグメントは、配列番号3に99%以上の相同性があり得、相同性の率を計算するときに含まれないN末端メチオニンを追加的に含むことができる。それぞれの場合に開始コドンまたはシグナルペプチドをコードするコード配列を有する、または有さない、配列番号3のフラグメント、配列番号3に98%以上の相同性がある核酸配列のフラグメント、および配列番号3に99%以上の相同性がある核酸配列のフラグメントは、幾つかの実施形態において、そのフラグメントが、25個以上のアミノ酸の長さ、30個以上、40個以上、50個以上、60個以上、70個以上、80個以上、90個以上、100個以上、110個以上、120個以上、130個以上、140個以上、150個以上、160個以上、170個以上、180個以上、184個以上、190個以上、193個以上の長さであり得るRSV M2-1免疫原のフラグメントをコードすることができる。ポリペプチドフラグメントは、35個未満のアミノ酸、45個未満、55個未満、65個未満、75個未満、85個未満、95個未満、105個未満、115個未満、125個未満、135個未満、145個未満、155個未満、165個未満、175個未満、185個未満、188個未満、192個未満、または194個未満の長さであり得る。フラグメントは、N末端メチオニン、および/または免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEもしくはIgGシグナルペプチドのようなシグナルペプチドを更にコードすることができる。N末端メチオニンおよび/またはシグナルペプチドは、194アミノ酸またはより小さいそのフラグメントをコードする核酸配列に結合し得る。フラグメントは、194アミノ酸に98%の相同性があるポリペプチド、または194アミノ酸配列に98%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得るN末端メチオニンおよび/またはシグナルペプチドをコードすることができる。フラグメントは、194アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチド、または194アミノ酸配列に99%の相同性があるポリペプチドのより小さいフラグメントに結合し得るN末端メチオニンおよび/またはシグナルペプチドをコードすることができる。相同性の程度を計算するとき、ポリペプチドは配列番号4またはそのフラグメントを必要があり、N末端メチオニンおよび/または任意のシグナルペプチドは、そのような計算に含まれない。シグナルペプチドの配列は、相同性の決定に使用されない。したがって、例えば、配列番号9は、配列番号17のシグナルペプチドをコードするコード配列に機能的に結合している配列番号3を含むが、配列番号9は、配列番号3には不在であるシグナルペプチドにもかかわらず、配列番号3のフラグメントに100%の相同性がある配列番号3のフラグメントを含む。配列番号30は、配列番号4に記載されているRSV M2-1免疫原の免疫優性T細胞エピトープに対応する。配列番号311は、配列番号4に記載されているRSV M2-1免疫原の免疫優性T細胞エピトープに対応する亜優性T細胞エピトープを意味する。幾つかの実施形態において、フラグメントは、これらの配列、または配列番号3のフラグメントを含むこれらに98%以上もしくは99%以上の相同性がある配列、または配列番号3に98%以上もしくは99%以上の相同性がある配列の1つ以上の全て、または一部をコードするコード配列を含む。

【0111】

I. 同一

「同一」または「同一性」は、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において本明細書で使用されるとき、配列が、特定の領域にわたって同じである残基の特定の率(%)を有することを意味し得る。率(%)は、2つの配列を最適に整列すること、2つの配列を特定の領域にわたって比較すること、同一残基が両方の配列に発生してマッチした位置の数を生じる、位置の数を決定すること、マッチした位置の数を、特定の領域内の位置の総数で割ること、および結果に100を掛けて、配列同一性の率(%)を生じることによって、計算することができる。2つの配列が異なる長さである、または整列が1つ以上の付着末端を生じ、特定の比較領域が、単一配列のみを含む場合、単一配列の残基は、

10

20

30

40

50

計算の分母に含まれるが、分子には含まれない。DNAおよびRNAを比較すると、チミン(T)およびウラシル(U)は、同等であると考慮することができる。同一性は、手作業により、またはBLASTもしくはBLAST2.0のようなコンピューター配列アルゴリズムを使用して実施することができる。

【0112】

m. インピーダンス

「インピーダンス」は、本明細書で使用されるとき、フィードバック機構を考察する場合に使用することができ、オームの法則に従って電流値に変換することができ、したがって、予め設定された電流との比較を可能にする。

【0113】

n. 免疫応答

「免疫応答」は、本明細書で使用されるとき、提供されたDNAプラスミドワクチンを介した1つ以上のRSVコンセンサス抗原の導入に応答した宿主の免疫系、例えば哺乳動物の免疫系の活性化を意味し得る。免疫応答は、細胞性もしくは液性応答、またはその両方の形態であり得る。

【0114】

o. 核酸

「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、本明細書で使用されるとき、一緒に共有結合している少なくとも2つのヌクレオチドを意味し得る。一本鎖の描写は、相補鎖の配列も定義する。したがって、核酸は、描写される一本鎖の相補鎖も包含する。核酸の多くの変種を、所定の核酸と同じ目的で使用することができる。したがって、核酸は、実質的に同一の核酸およびその相補体も包含する。一本鎖は、厳密なハイブリッド形成条件下で標的配列とハイブリッド形成することができるプローブを提供する。したがって、核酸は、厳密ハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成するプローブも包含する。

【0115】

核酸は、一本鎖もしくは二本鎖であり得る、または二本鎖と一本鎖の配列の両方の部分を含有し得る。核酸は、ゲノムおよびcDNAの両方のDNA、RNA、またはハイブリッドであり得、ここで核酸は、デオキシリボ-およびリボ-ヌクレオチドの組み合わせ、ならびにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチンヒポキサンチン、イソシトシン、およびイソグアニンを含む塩基の組み合わせを含有し得る。核酸は、化学合成法により、または組み換え法により得ることができる。

【0116】

p. 機能的に連結する

「機能的に連結する」は、本明細書で使用されるとき、遺伝子の発現が、空間的に連結しているプロモーターの制御下にあることを意味し得る。プロモーターは、その制御下の遺伝子の5' (上流) または3' (下流) に位置することができる。プロモーターと遺伝子との間隔は、プロモーターが誘導される遺伝子における、プロモーターと、それが制御する遺伝子との間隔とほぼ同じであり得る。当該技術において知られているように、この間隔の変動は、プロモーター機能を失うことなく適応され得る。

【0117】

q. プロモーター

「プロモーター」は、本明細書で使用されるとき、細胞において核酸の発現を付与する、活性化する、または増強することができる合成的または天然に誘導される分子を意味し得る。プロモーターは、1つ以上の特定の転写調節配列を含み、発現を更に増強すること、ならびに/またはその空間的発現および/もしくは時間的発現を変更することができる。プロモーターは、遠位エンハンサーまたはリプレッサー要素も含むことができ、これらは、転写の開始部位から数千塩基対まで位置することができる。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、および動物を含む供給源から誘導することができる。プロモーターは、遺伝子成分の発現を構造的に、あるいは発現が生じる細胞、組織、もしくは

10

20

30

40

50

臓器に関して、または発現が生じる発生段階に関して、または生理的ストレス、病原体、金属イオン、もしくは誘導剤のような外部刺激に応答して、差別的に調節することができる。プロモーターの代表例には、バクテリオファージ T 7 プロモーター、バクテリオファージ T 3 プロモーター、S P 6 プロモーター、l a c オペレータープロモーター、t a c プロモーター、S V 4 0 後期プロモーター、S V 4 0 初期プロモーター、R S V - L T R プロモーター、C M V I E プロモーター、S V 4 0 初期プロモーターまたはS V 4 0 後期プロモーター、およびC M V I E プロモーターが含まれる。

【0118】

r . 厳密なハイブリッド形成条件

「厳密なハイブリッド形成条件」は、本明細書で使用されるとき、核酸の複合混合物におけるように、第1の核酸配列（例えば、プローブ）が第2の核酸配列（例えば、標的）とハイブリッド形成する条件を意味し得る。厳密な条件は、配列依存性であり、異なる状況において異なる。厳密な条件は、確定されたイオン強度のpHで特定の配列の熱融点(T_m)よりも約5～10 低くなるように選択することができる。 T_m は、標的に相補的なプローブの50%が標的配列と平衡（標的配列が T_m で過剰に存在するので、50%のプローブが平衡を占める）にハイブリッド形成する（確定されたイオン強度、pH、および核濃度下での）温度であり得る。厳密な条件は、塩濃度が、pH 7.0～8.3で約0.01～1.0Mのナトリウムイオン濃度のような約1.0M未満のナトリウムイオン（または他の塩）であり、温度が、短プローブ（例えば、約10～50個のヌクレオチド）では少なくとも約30、長プローブ（例えば、約50個を超えるヌクレオチド）では少なくとも約60 であるものであり得る。厳密な条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加により達成することもできる。選択的または特定的なハイブリッド形成では、陽性シグナルは、バックグラウンドハイブリッド形成の少なくとも2～10倍であり得る。例示的な厳密なハイブリッド形成条件には、以下が含まれる：50%ホルムアミド、5×S S C、および1%S D S、42 でのインキュベーション、または5×S S C、1%S D S、65 でのインキュベーションと、0.2×S S Cでの洗浄および65 での0.1%S D S。

10

20

30

40

【0119】

s . 実質的に相補的

「実質的に相補的」は、本明細書で使用されるとき、第1の配列が第2の配列の補体と、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、90個、95個、100個、またはそれ以上のヌクレオチドもしくはアミノ酸の領域にわたって、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一であること、あるいは2つの配列が厳密なハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成することを意味し得る。

【0120】

t . 実質的に同一

「実質的に同一」は、本明細書で使用されるとき、第1の配列および第2の配列が、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、またはそれ以上のヌクレオチドもしくはアミノ酸の領域にわたって、あるいは第1の配列が第2の配列の補体と実質的に相補的である場合、核酸に関して、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一であることを意味し得る。

【0121】

u . 変種

「変種」は、核酸に関して本明細書で使用されるとき、(i)基準ヌクレオチド配列の

50

一部もしくはフラグメント、(i i) 基準ヌクレオチド配列の補体もしくはその一部、(i i i) 基準核酸もしくはその補体と実質的に同一である核酸、または(i v) 厳密な条件下、基準核酸、その補体もしくはそれと実質的に同一の配列とハブリッド形成する核酸を意味する。

【 0 1 2 2 】

「変種」は、ペプチドまたはポリペプチドに関して、アミノ酸の挿入、欠失、または保存置換によりアミノ酸配列が異なるが、少なくとも1つの生物学的活性を保持する。変種は、少なくとも1つの生物学的活性を保持するアミノ酸配列を有する基準タンパク質と実質的に同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質も意味し得る。アミノ酸の保存置換、すなわち、アミノ酸を同様の特性(例えば、親水性、荷電領域の程度および分布)の異なるアミノ酸と代えることは、典型的には僅かな修正を伴って、当該技術において認識されている。これらの僅かな修正は、部分的には、当該技術において理解されているようにアミノ酸の疎水性親水性指標を考慮することにより確認することができる。 Kyte et al . , J . Mol . Biol . 157 : 105 - 132 (1982) 。アミノ酸の疎水性親水性指標は、その疎水性および電荷の考慮に基づいている。同様の疎水性親水性指標のアミノ酸を置換して、依然としてタンパク質機能を保持できることは、当該技術において知られている。1つの態様において、±2の疎水性親水性指標を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性を使用して、タンパク質が生物学的活性を保持することをもたらす置換を明らかにすることもできる。ペプチドの文脈におけるアミノ酸の親水性の考慮は、抗原性および免疫原性と十分相關することが報告されている有用な測度である、ペプチドの最大局所平均親水性の計算を可能にする。米国特許第4,554,101号は参考により完全に本明細書に組み込まれる。同様の親水性値を有するアミノ酸の置換は、ペプチドが生物学的活性、例えば免疫原性を保持することをもたらすことができ、このことは当該技術において理解されている。置換は、互いに±2以内の親水性値を有するアミノ酸で実施することができる。アミノ酸の疎水性指標と親水性値の両方は、そのアミノ酸の特定の側鎖により影響を受ける。その観察と一致して、生物学的機能に匹敵するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、大きさ、および他の特性により明らかなように、アミノ酸、特にこれらのアミノ酸の側鎖の相対的な類似性に依存していることが理解される。

【 0 1 2 3 】

v . ベクター

本明細書で使用される「ベクター」は、複製の起点を含有する核酸配列を意味し得る。ベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、細菌人工染色体、または酵母人工染色体であり得る。ベクターは、DNAまたはRNAベクターであり得る。ベクターは、自己複製染色体外ベクター、または宿主ゲノムに組み込まれるベクターのいずれかであり得る。

【 0 1 2 4 】

2 . RSVタンパク質

RSVタンパク質が本明細書において提供され、本明細書において「RSV免疫原」とも呼ばれ、RSVに対して免疫応答を誘発することができるコンセンサス抗原である。3つのコンセンサスRSV免疫原は、RSV F免疫原、ならびに本明細書においてRSV Ga免疫原およびRSV Gb免疫原と呼ばれているRSV G免疫原の2つの形態である。2つのRSV G免疫原形態は、RSV Gタンパク質の多様性に起因して提供される。幾つかの実施形態において、RSV免疫原は、免疫グロブリンタンパク質、例えばIgEシグナルペプチド(配列番号17)またはIgGシグナルペプチドのような異なるタンパク質からのシグナルペプチドを含むことができる。RSV免疫原には、RSV F免疫原、RSV Ga免疫原およびRSV Gb免疫原が含まれる。RSV M2-1にに対して免疫応答を誘発することができるコンセンサス抗原である「RSV免疫原」が、本明細書において提供され、すなわち、免疫グロブリンタンパク質、例えばIgEシグナルペプチド(配列番号17)またはIgGシグナルペプチドのような異なるタンパク質からのシグナルペプチドを任意に含み得るRSV M2-1免疫原である。

【 0 1 2 5 】

10

20

30

40

50

「 R S V F 免疫原」は、配列番号 2 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質を指す。 R S V F 免疫原は、配列番号 2 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むことができる。 R S V F 免疫原は、配列番号 2 の免疫原性フラグメントを含むことができる。それぞれの場合において、免疫原性フラグメントは、配列番号 1 7 のようにシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 2 の免疫原性フラグメントおよび配列番号 1 7 のシグナルペプチドを含む R S V F 免疫原は、配列番号 1 7 を含む配列番号 1 0 の免疫原性フラグメントであり得る。 R S V F 免疫原は、配列番号 2 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質を含むことができ、幾つかの実施形態では、配列番号 2 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質を含むことができる。 R S V F 免疫原は、配列番号 2 を含むことができる。それぞれの場合において、 R S V F 免疫原は、配列番号 1 7 のようにシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 2 および配列番号 1 7 のシグナルペプチドを含む R S V F 免疫原は、配列番号 1 0 を含むことができる。

10

【 0 1 2 6 】

「 R S V G a 免疫原」は、配列番号 6 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質を指す。 R S V G a 免疫原は、配列番号 6 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むことができる。 R S V G a 免疫原は、配列番号 6 の免疫原性フラグメントを含むことができる。それぞれの場合において、免疫原性フラグメントは、配列番号 1 7 のようにシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 6 の免疫原性フラグメントおよび配列番号 1 7 のシグナルペプチドを含む R S V G a 免疫原は、配列番号 1 7 を含む配列番号 1 4 の免疫原性フラグメントであり得る。 R S V G a 免疫原は、配列番号 6 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質を含むことができ、幾つかの実施形態では、配列番号 6 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質を含むことができる。 R S V G a 免疫原は、配列番号 6 を含むことができる。それぞれの場合において、 R S V G a 免疫原は、配列番号 1 7 のようにシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 6 および配列番号 1 7 のシグナルペプチドを含む R S V G a 免疫原は、配列番号 1 4 を含むことができる。

20

【 0 1 2 7 】

「 R S V G b 免疫原」は、配列番号 8 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質を指す。 R S V G b 免疫原は、配列番号 8 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むことができる。 R S V G b 免疫原は、配列番号 8 の免疫原性フラグメントを含むことができる。それぞれの場合において、免疫原性フラグメントは、配列番号 1 7 のようにシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 8 の免疫原性フラグメントおよび配列番号 1 7 のシグナルペプチドを含む R S V G b 免疫原は、配列番号 1 7 を含む配列番号 1 6 の免疫原性フラグメントであり得る。 R S V G b 免疫原は、配列番号 8 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質を含むことができ、幾つかの実施形態では、配列番号 8 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質を含むことができる。 R S V G b 免疫原は、配列番号 8 を含むことができる。それぞれの場合において、 R S V G b 免疫原は、配列番号 1 7 のようにシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 8 および配列番号 1 7 のシグナルペプチドを含む R S V G b 免疫原は、配列番号 1 6 を含むことができる。

30

【 0 1 2 8 】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載されている 2 つ以上の R S V タンパク質セットの組み合わせを含む融合タンパク質が、提供される。例えば、融合タンパク質は、配列番号 2 もしくはその免疫原性フラグメント、および配列番号 6 もしくはその免疫原性フラグメント；配列番号 2 もしくはその免疫原性フラグメント、および配列番号 8 もしくはその免疫原性フラグメント；または配列番号 6 もしくはその免疫原性フラグメント、および配列番号 8 もしくはその免疫原性フラグメントを含むことができる。融合タンパク質は

40

50

、配列番号 2 またはその免疫原性フラグメント、配列番号 6 またはその免疫原性フラグメント、および配列番号 8 またはその免疫原性フラグメントを含むことができる。あるいは、1つ以上の上記融合タンパク質は、配列番号 2 または免疫原性フラグメントに対応する上記に記載された融合タンパク質の部分の代わりに、配列番号 2 またはその免疫原性フラグメントに少なくとも 98% または少なくとも 99% の相同性がある配列を含むことができる。同様に、1つ以上の上記融合タンパク質は、配列番号 6 または免疫原性フラグメントに対応する上記に記載された融合タンパク質の部分の代わりに、配列番号 6 またはその免疫原性フラグメントに少なくとも 98% または少なくとも 99% の相同性がある配列を含むことができる、ならびに / あるいは 1つ以上の上記融合タンパク質は、配列番号 8 または免疫原性フラグメントに対応する上記に記載された融合タンパク質の部分の代わりに、配列番号 8 またはその免疫原性フラグメントに少なくとも 98% または少なくとも 99% の相同性がある配列を含むことができる。融合タンパク質は、コンセンサスタンパク質、および / またはコンセンサスタンパク質のフラグメント、および / またはコンセンサスタンパク質の変種、および / または変種コンセンサスタンパク質のフラグメントの組み合わせを含むことができる。コンセンサスタンパク質、および / またはコンセンサスタンパク質のフラグメント、および / またはコンセンサスタンパク質の変種、および / または変種コンセンサスタンパク質のフラグメントは、互いに隣接して直接結合され得る、またはその間のスペーザーまたは1つ以上のアミノ酸により結合され得る。幾つかの実施形態において、空間は、タンパク質分解性切断部位であり得る。幾つかの実施形態において、空間は、ワクチンが投与されること、および取り込まれることが意図される細胞において見いだされるプロテアーゼにより認識されるタンパク質分解性切断部位であり得る。

【 0 1 2 9 】

「 R S V M 2 - 1 免疫原」は、配列番号 4 に少なくとも 98% の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質を意味する。R S V M 2 - 1 免疫原は、配列番号 4 に少なくとも 99% の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むことができる。R S V M 2 - 1 免疫原は、配列番号 4 の免疫原性フラグメントを含むことができる。それぞれの場合において、免疫原性フラグメントは、配列番号 17 のようにシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 4 の免疫原性フラグメントおよび配列番号 17 のシグナルペプチドを含む R S V M 2 - 1 免疫原は、配列番号 17 を含む配列番号 12 の免疫原性フラグメントであり得る。R S V M 2 - 1 免疫原は、配列番号 4 に少なくとも 98% の相同性があるタンパク質を含むことができ、幾つかの実施形態では、配列番号 4 に少なくとも 99% の相同性があるタンパク質を含むことができる。R S V M 2 - 1 免疫原は、配列番号 4 を含むことができる。それぞれの場合において、R S V M 2 - 1 免疫原は、配列番号 17 のようにシグナルペプチドを任意に更に含むことができる。配列番号 4 および配列番号 17 のシグナルペプチドを含む R S V M 2 - 1 免疫原は、配列番号 12 を含むことができる。幾つかの実施形態において、本明細書に記載されている R S V M 2 - 1 と別の R S V 免疫原のタンパク質セットの組み合わせを含む融合タンパク質が、提供される。例えば、融合タンパク質は、配列番号 2 もしくはその免疫原性フラグメント、および配列番号 4 もしくはその免疫原性フラグメント；配列番号 4 もしくはその免疫原性フラグメント、および配列番号 6 もしくはその免疫原性フラグメント；配列番号 4 もしくはその免疫原性フラグメント、および配列番号 8 もしくはその免疫原性フラグメント；または配列番号 6 もしくはその免疫原性フラグメント、および配列番号 8 もしくはその免疫原性フラグメントを含むことができる。融合タンパク質は、配列番号 4 またはその免疫原性フラグメントを含むことができる。あるいは、1つ以上の上記融合タンパク質は、配列番号 4 または免疫原性フラグメントに対応する上記に記載された融合タンパク質の部分の代わりに、配列番号 4 またはその免疫原性フラグメントに少なくとも 98% または少なくとも 99% の相同性がある配列を含むことができる。

【 0 1 3 0 】

3 . R S V タンパク質をコードするコード配列

本明細書に記載されている「 R S V 免疫原」をコードする核酸配列が、本明細書におい

10

20

30

40

50

て提供される。核酸配列を含む核酸分子の投与は、細胞に取り込まれ、発現すると、RSVに対して広範囲の免疫応答ともたらす。RSV免疫原のコード配列が提供され、すなわち、RSV F免疫原をコードする核酸配列、RSV Ga免疫原をコードする核酸配列、およびRSV Gb免疫原をコードする核酸配列、ならびにRSV M2-1免疫原をコードする核酸配列である。幾つかの実施形態において、RSV免疫原をコードする核酸配列は、免疫グロブリンタンパク質、例えばIgEシグナルペプチド(配列番号17)またはIgGシグナルペプチドのような異なるタンパク質からのシグナルペプチドをコードする核酸配列を含むことができる。

【0131】

RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号2に少なくとも99%の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号2の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。それぞれの場合において、免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードする核酸配列は、配列番号17をコードする核酸配列のような、シグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号2の免疫原性フラグメントおよび配列番号17のシグナルペプチドを含むタンパク質をコードすることができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号17を含む配列番号10の免疫原性フラグメントであり得るタンパク質をコードすることができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードすることができ、幾つかの実施形態では、配列番号2に少なくとも99%の相同性があるタンパク質をコードすることができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号2を含むタンパク質をコードすることができる。それぞれの場合において、RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号17のようなシグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号2および配列番号17のシグナルペプチドを含むタンパク質をコードすることができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号10を含むタンパク質をコードすることができる。

【0132】

RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号1に少なくとも98%の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができる。配列番号1に少なくとも98%の相同性がある核酸配列は、配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質をコードする。フラグメントは、配列番号2に少なくとも98%の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする。幾つかの実施形態において、RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号1に少なくとも98%の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができ、ここで核酸配列は、配列番号2に少なくとも99%の相同性があるタンパク質をコードし、幾つかの実施形態において、核酸配列は、配列番号2を含むタンパク質をコードし、核酸配列のフラグメントは、配列番号2の免疫原性フラグメントのような、配列番号2に少なくとも99%の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする。幾つかのそのような実施形態において、RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号1に、幾つかの実施形態では配列番号1のフラグメントに少なくとも99%の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができる。幾つかの実施形態において、RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号17のようなシグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号2のフラグメントおよび配列番号17のシグナルペプチドをコードするコード配列を含むことができる。RSV F免疫原をコードする核酸配列は、配列番号17のシグナルペプチドをコードするコード配列を含む配列番号9のフラグメントを含むことができる。

【0133】

10

20

30

40

50

R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。それぞれの場合において、免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードする核酸配列は、配列番号 1 7 をコードする核酸配列のような、シグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 の免疫原性フラグメントおよび配列番号 1 7 のシグナルペプチドを含むタンパク質をコードすることができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 1 7 を含む配列番号 1 4 の免疫原性フラグメントであり得るタンパク質をコードすることができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質をコードすることができ、幾つかの実施形態では、配列番号 6 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質をコードすることができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 を含むタンパク質をコードすることができる。それぞれの場合において、R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 1 7 のようなシグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 および配列番号 1 7 のシグナルペプチドを含むタンパク質をコードすることができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 1 4 を含むタンパク質をコードすることができる。

10

20

30

40

【 0 1 3 4 】

R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 5 に少なくとも 9 8 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができる。配列番号 5 に少なくとも 9 8 % の相同性がある核酸配列は、配列番号 6 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質をコードする。フラグメントは、配列番号 6 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする。幾つかの実施形態において、R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 5 に少なくとも 9 8 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができ、ここで核酸配列は、配列番号 6 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質をコードし、幾つかの実施形態において、核酸配列は、配列番号 6 を含むタンパク質をコードし、核酸配列のフラグメントは、配列番号 6 の免疫原性フラグメントのような、配列番号 6 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする。幾つかのそのような実施形態において、R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 5 に、幾つかの実施形態では配列番号 5 のフラグメントに少なくとも 9 9 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができる。幾つかの実施形態において、R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 1 7 のようなシグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 のフラグメントおよび配列番号 1 7 のシグナルペプチドをコードするコード配列を含むことができる。R S V G a 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 1 7 のシグナルペプチドをコードするコード配列を含む配列番号 1 3 のフラグメントを含むことができる。

40

【 0 1 3 5 】

R S V G b 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 8 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。R S V G b 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 8 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。R S V G b 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 8 の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。それぞれの場合において、免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードする核酸配列は、配列番号 1 7 をコードする核酸配列のような、シグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。R S V G b 免

50

疫原をコードする核酸配列は、配列番号 8 の免疫原性フラグメントおよび配列番号 17 のシグナルペプチドを含むタンパク質をコードすることができる。RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 17 を含む配列番号 16 の免疫原性フラグメントであり得るタンパク質をコードすることができる。RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 8 に少なくとも 98% の相同性があるタンパク質をコードすることができ、幾つかの実施形態では、配列番号 8 に少なくとも 99% の相同性があるタンパク質をコードすることができる。RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 8 を含むタンパク質をコードすることができる。それぞれの場合において、RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 17 のようなシグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 8 および配列番号 17 のシグナルペプチドを含むタンパク質をコードすることができる。RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 16 を含むタンパク質をコードすることができる。

10

20

30

40

50

【0136】

RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 7 に少なくとも 98% の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができる。配列番号 7 に少なくとも 98% の相同性がある核酸配列は、配列番号 8 に少なくとも 98% の相同性があるタンパク質をコードする。フラグメントは、配列番号 8 に少なくとも 98% の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする。幾つかの実施形態において、RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 7 に少なくとも 98% の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができ、ここで核酸配列は、配列番号 8 に少なくとも 99% の相同性があるタンパク質をコードし、幾つかの実施形態において、核酸配列は、配列番号 8 を含むタンパク質をコードし、核酸配列のフラグメントは、配列番号 8 の免疫原性フラグメントのような、配列番号 8 に少なくとも 99% の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする。幾つかのそのような実施形態において、RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 7 に、幾つかの実施形態では配列番号 7 のフラグメントに少なくとも 99% の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができる。幾つかの実施形態において、RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 17 のようなシグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 8 のフラグメントおよび配列番号 17 のシグナルペプチドをコードするコード配列を含むことができる。RSV Gb 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 17 のシグナルペプチドをコードするコード配列を含む配列番号 15 のフラグメントを含むことができる。

【0137】

RSV M2-1 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 4 に少なくとも 98% の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。RSV M2-1 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 4 に少なくとも 99% の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。RSV M2-1 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 4 の免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードすることができる。それぞれの場合において、免疫原性フラグメントを含むタンパク質をコードする核酸配列は、配列番号 17 をコードする核酸配列のような、シグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。RSV M2-1 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 4 の免疫原性フラグメントおよび配列番号 17 のシグナルペプチドを含むタンパク質をコードすることができる。RSV

F 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 17 を含む配列番号 12 の免疫原性フラグメントであり得るタンパク質をコードすることができる。RSV M2-1 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 4 に少なくとも 98% の相同性があるタンパク質をコードすることができ、幾つかの実施形態では、配列番号 4 に少なくとも 99% の相同性があるタンパク質をコードすることができる。RSV M2-1 疫原をコードする核酸配列は、配列番号 4 を含むタンパク質をコードすることができる。それぞれの場合において、RS

V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 1 7 のようなシグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。 R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 4 および配列番号 1 7 のシグナルペプチドを含むタンパク質をコードすることができる。 R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 1 2 を含むタンパク質をコードすることができる。

【 0 1 3 8 】

R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 3 に少なくとも 9 8 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができる。配列番号 3 に少なくとも 9 8 % の相同性がある核酸配列は、配列番号 4 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質をコードする。フラグメントは、配列番号 4 に少なくとも 9 8 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする。幾つかの実施形態において、R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 3 に少なくとも 9 8 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができ、ここで核酸配列は、配列番号 4 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質をコードし、幾つかの実施形態において、核酸配列は、配列番号 4 を含むタンパク質をコードし、核酸配列のフラグメントは、配列番号 4 の免疫原性フラグメントのような、配列番号 4 に少なくとも 9 9 % の相同性があるタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする。幾つかのそのような実施形態において、R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 3 に、幾つかの実施形態では配列番号 3 のフラグメントに少なくとも 9 9 % の相同性がある核酸配列のフラグメントを含むことができる。幾つかの実施形態において、R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 1 7 のようなシグナルペプチドをコードする核酸配列を任意に更に含むことができる。 R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 4 のフラグメントおよび配列番号 1 7 のシグナルペプチドをコードするコード配列を含むことができる。 R S V M 2 - 1 免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 1 7 のシグナルペプチドをコードするコード配列を含む配列番号 1 1 のフラグメンを含むことができる。

10

20

30

【 0 1 3 9 】

コード配列は、本明細書に記載されている 2 つ以上の R S V タンパク質セットの組み合わせを含む融合タンパク質をコードすることができる。コード配列は、コンセンサスタンパク質、および / またはコンセンサスタンパク質のフラグメント、および / またはコンセンサスタンパク質の変種、および / または変種コンセンサスタンパク質のフラグメントの組み合わせを含む融合タンパク質をコードすることができる。コンセンサスタンパク質、および / またはコンセンサスタンパク質のフラグメント、および / またはコンセンサスタンパク質の変種、および / または変種コンセンサスタンパク質のフラグメントは、互いに隣接して直接結合され得る、またはその間のスペーザーまたは 1 つ以上のアミノ酸により結合され得る。幾つかの実施形態において、空間は、タンパク質分解性切断部位であり得る。幾つかの実施形態において、空間は、ワクチンが投与されること、および取り込まれることが意図される細胞において見いだされるプロテアーゼにより認識されるタンパク質分解性切断部位であり得る。

40

【 0 1 4 0 】

幾つかの実施形態において、コード配列は、本明細書に記載されている 2 つ以上の R S V タンパク質セットの組み合わせを含む融合タンパク質をコードする、例えば、コード配列は、配列番号 2 またはその免疫原フラグメント、および配列番号 4 またはその免疫原性フラグメント、例えば、配列番号 1 またはその免疫原性フラグメントコードフラグメント、および配列番号 3 またはその免疫原性フラグメントコードフラグメント；配列番号 2 またはその免疫原性フラグメント、および配列番号 6 またはその免疫原性フラグメント、例えば、配列番号 1 またはその免疫原性フラグメントコードフラグメント、および配列番号 5 またはその免疫原性フラグメントコードフラグメント；配列番号 2 またはその免疫原性フラグメント、および配列番号 8 またはその免疫原性フラグメント、例えば、配列番号 1 またはその免疫原性フラグメントコードフラグメント、および配列番号 7 またはその免疫原性フラグメントコードフラグメント；配列番号 4 またはその免疫原性フラグメント、お

50

ドする部分に対応する上記に記載された融合タンパク質のコード配列の部分の代わりに、配列番号 4 の免疫原性フラグメントに少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の相同性がある配列番号 3 またはそのフラグメントに、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の相同性がある配列を含むことができる。1つ以上の上記融合タンパク質をコードするコード配列は、配列番号 6 または免疫原性フラグメントをコードする部分に対応する上記に記載された融合タンパク質のコード配列の部分の代わりに、配列番号 6 の免疫原性フラグメントに少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の相同性がある配列番号 5 またはそのフラグメントに、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の相同性がある配列を含むことができる。1つ以上の上記融合タンパク質をコードするコード配列は、配列番号 8 または免疫原性フラグメントをコードする部分に対応する上記に記載された融合タンパク質のコード配列の部分の代わりに、配列番号 8 の免疫原性フラグメントに少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の相同性がある配列番号 7 またはそのフラグメントに、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の相同性がある配列を含むことができる。融合タンパク質は、コンセンサスタンパク質、および / またはコンセンサスタンパク質のフラグメント、および / またはコンセンサスタンパク質の変種、および / または変種コンセンサスタンパク質のフラグメントの組み合わせを含むことができる。コンセンサスタンパク質、および / またはコンセンサスタンパク質のフラグメント、および / またはコンセンサスタンパク質の変種、および / または変種コンセンサスタンパク質のフラグメントは、互いに隣接して直接結合され得る、またはその間のスペーザーまたは1つ以上のアミノ酸により結合され得る。幾つかの実施形態において、空間は、タンパク質分解性切断部位であり得る。幾つかの実施形態において、空間は、ワクチンが投与されること、および取り込まれることが意図される細胞において見いだされるプロテアーゼにより認識されるタンパク質分解性切断部位であり得る。
10

【 0 1 4 1 】

4 . プラスミド

哺乳動物において免疫応答を誘発するのに有効な量で哺乳動物の細胞内に1つ以上のRSVタンパク質を発現することができるベクターが、本明細書において提供される。ベクターは、1つ以上のRSV抗原をコードする異種核酸を含むことができる。ベクターはプラスミドであり得る。プラスミドは、細胞を、RSV抗原をコードする核酸により細胞を形質移入するのに有用であり得、形質転換された宿主細胞は培養され、RSV抗原の発現が生じる条件下で維持される。
20

【 0 1 4 2 】

プラスミドは、RSVに対して免疫応答を誘発することができる合成のコンセンサス抗原をコードし、かつ以下の3つのタンパク質のF、GA、Gb、そのようなタンパク質のフラグメント、そのようなタンパク質の変種、変種のフラグメント、またはコンセンサスタンパク質、および / もしくはコンセンサスタンパク質のフラグメント、および / もしくはコンセンサスタンパク質の変種、および / もしくは変種コンセンサスタンパク質のフラグメントの組み合わせから作製される融合タンパク質のそれぞれに対して提供されるコード配列を含む、上で開示された様々なRSVタンパク質の1つ以上をコードする核酸配列を含むことができる。プラスミドは、RSV M2 - 1、そのようなタンパク質のフラグメント、そのようなタンパク質の変種、変種のフラグメント、またはコンセンサスタンパク質、および / もしくはコンセンサスタンパク質のフラグメント、および / もしくはコンセンサスタンパク質の変種、および / もしくは変種コンセンサスタンパク質のフラグメントの組み合わせから作製される融合タンパク質に対して免疫応答を誘発することができる合成のコンセンサス抗原をコードするコード配列を含む、上で開示されたなRSV M2 - 1タンパク質をコードする核酸配列を含むことができる。
30

【 0 1 4 3 】

单一のプラスミドは、单一のRSV免疫原のコード配列、2つのRSV免疫原のコード配列、または3つのRSV免疫原のコード配列を含有することができる。幾つかの実施形態において、4番目のRSV免疫原のコード配列が提供され得る。单一のプラスミドは、
40

R S V F 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V G a 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V G b 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V F 疫原のコード配列およびR S V G a 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V F 疫原のコード配列およびR S V G b 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V G a 疫原のコード配列およびR S V G b 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V F 疫原のコード配列、R S V G a 疫原のコード配列、およびR S V G b 疫原のコード配列を含有することができる。

【0144】

10

R S V M 2 - 1 コード配列が提供される場合、単一のプラスミドは、R S V M 2 - 1 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V F 疫原のコード配列およびR S V M 2 - 1 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V M 2 - 1 疫原のコード配列およびR S V G a 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V M 2 - 1 疫原のコード配列およびR S V G b 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V F 疫原のコード配列、R S V M 2 - 1 疫原のコード配列、およびR S V G a 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V F 疫原のコード配列、R S V M 2 - 1 疫原のコード配列、およびR S V G b 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V F 疫原のコード配列、R S V G a 疫原のコード配列、およびR S V G b 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V F 疫原のコード配列、R S V M 2 - 1 疫原のコード配列、R S V G a 疫原のコード配列、およびR S V G b 疫原のコード配列を含有することができる。単一のプラスミドは、R S V F 疫原のコード配列、R S V G a 疫原のコード配列、およびR S V G b 疫原のコード配列を含有することができる。

20

【0145】

幾つかの実施形態において、プラスミドは、CCR20のみをコードする、またはこれらのプラスミドのうちの1つの一部としてコードするコード配列を含むことができる。同様に、プラスミドは、IL-12、IL-15、および/またはIL-28のコード配列を更に含むことができる。

【0146】

30

プラスミドは、コード配列の上流にあり得る開始コドン、およびコード配列の下流にあり得る終止コドンを更に含むことができる。開始および終結コドンは、抗原コード配列と共にフレーム内にあり得る。

【0147】

プラスミドは、コード配列に機能的に結合しているプロモーターも含むことができる。コード配列と機能的に結合しているプロモーターは、シミアンウイルス40(SV40)のプロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)長末端反復(LTR)プロモーターのようなヒト免疫不全ウイルス(HIV)プロモーター、モロニーウィルスプロモーター、トリ白血病ウイルス(ALV)プロモーター、サイトメガウイルス(CMV)プロモーター、例はCMV最初期プロモーター、エピスタイン・バーウィルス(EBV)プロモーター、またはラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターであり得る。プロモーターは、また、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチニン、またはヒトメタロチオネインのようなヒト遺伝子からのプロモーターであり得る。プロモーターは、また、天然または合成の筋肉または皮膚特異的プロモーターのような組織特異的プロモーターであり得る。そのようなプロモーターの例は、米国特許出願公開第20040175727号に記載されており、その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0148】

プラスミドは、コード配列の下流にあり得るポリアデニル化シグナルを含むこともできる。ポリアデニル化シグナルは、SV40ポリアデニル化シグナル、LTRポリアデニル

50

化シグナル、ウシ成長ホルモン(b G H)ポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン(h G H)ポリアデニル化シグナル、またはヒト グロブリンポリアデニル化シグナルであり得る。 S V 4 0 ポリアデニル化シグナルは、 p C E P 4 プラスミド(I n v i t r o g e n , San Diego , CA)からのポリアデニル化シグナルであり得る。

【 0 1 4 9 】

プラスミドは、コード配列の上流にエンハンサーを含むこともできる。エンハンサーは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチニン、または C M V 、 F M D V 、 R S V 、もしくは E B V のうちの 1 つのようなウイルスエンハンサーであり得る。ポリヌクレオチド機能の増強は、米国特許第 5 , 9 3 9 , 9 7 2 号、同第 5 , 9 6 2 , 4 2 8 号、および国際公開公報第 9 4 / 0 1 6 7 3 7 号に記載されており、それぞれの内容は参照により完全に組み込まれる。10

【 0 1 5 0 】

プラスミドは、プラスミド染色体外性を維持し、かつ細胞内にプラスミドの複数のコピーを産生するため、哺乳類の複製の起点を含むこともできる。プラスミドは、エプスタイン・バーウィルスの複製の起点を含むことができる I n v i t r o g e n (San Diego , CA)からの p V A X 1 、 p C E P 4 、または p R E P 4 、および組み込みなしで高コピー-エピソーム複製を生じることができる核抗原 E B N A - 1 コード領域であり得る。プラスミドの主鎖は、 p A V 0 2 4 2 であり得る。プラスミドは、複製欠損アデノウイルス型 5 (A d 5) プラスミドであり得る。20

【 0 1 5 1 】

プラスミド、プラスミドが投与される細胞における遺伝子発現に十分に適切であり得る調節配列を含むこともできる。コード配列は、宿主細胞におけるコード配列のより効率的な転写を可能にし得るコドンを含むことができる。20

【 0 1 5 2 】

コード配列は、 I g リーダー配列を含むことができる。リーダー配列は、コード配列の 5 であり得る。この配列でコードされるコンセンサス抗原は、 N 末端 I g リーダー、続いてコンセンサス抗原タンパク質を含むことができる。 N 末端 I g リーダーは、 I G E または I g G であり得る。30

【 0 1 5 3 】

プラスミドは、エシェリキア・コリ(大腸菌)におけるタンパク質産生に使用することができる p S E 4 2 0 (I n v i t r o g e n , San Diego , Calif)であり得る。プラスミドは、酵母のサッカロマイセス・セレビシエ株におけるタンパク質産生に使用することができる p Y E S 2 (I n v i t r o g e n , San Diego , Calif)でもあり得る。プラスミドは、昆虫細胞におけるタンパク質産生に使用することができる、 M A X B A C (商標) 完全バキュロウイルス発現系(I n v i t r o g e n , San Diego , Calif .)でもあり得る。プラスミドは、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞のような哺乳類細胞におけるタンパク質産生に使用することができる、 p c D N A I または p c D N A 3 (I n v i t r o g e n , San Diego , Calif .)でもあり得る。30

【 0 1 5 4 】

5. 組成物

核酸分子を含む組成物が提供される。組成物は、単一のプラスミドのような単一の核酸分子の複数のコピー、2つ以上の異なるプラスミドのような2つ以上の異なる核酸分子の複数のコピーを含むことができる。例えば、組成物は、複数の2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個、またはそれ以上の異なる核酸分子を含むことができる。そのような組成物は、複数の、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個、またはそれ以上の異なるプラスミドを含むことができる。40

【 0 1 5 5 】

組成物は、単一の R S V 免疫原のコード配列、2つの R S V 免疫原のコード配列、または3つの R S V 免疫原のコード配列を集合的に含有する、プラスミドのような核酸分子を50

含むことができる。幾つかの実施形態において、4番目のRSV免疫原のコード配列が提供され得る。

【0156】

2つのRSV免疫原のコード配列を含む組成物は、単一のプラスミドのような単一の核酸分子上であり得る、または組成物は、一方の核酸分子が1つのRSV免疫原のコード配列を含み、他方の核酸分子が異なるRSV免疫原のコード配列を含む2つの異なるプラスミドのような、2つの異なる核酸分子を含むことができる。同様に、3つのRSV免疫原のコード配列を含む組成物は、単一のプラスミドのような単一の核酸分子、2つの異なる核酸分子、または3つの異なる核酸分子を含むことができる。同様に、4つのRSV免疫原のコード配列を含む組成物は、単一のプラスミドのような単一の核酸分子、2つの異なる核酸分子、3つの異なる核酸分子、または4つの異なる核酸分子を含むことができる。

【0157】

幾つかの実施形態において、組成物は、RSV F免疫原、RSV G_a免疫原、またはRSV G_b免疫原のような1つのRSV免疫原をコードする複数の単一核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、組成物は、RSV F免疫原とRSV G_a免疫原、RSV F免疫原とRSV G_b免疫原、およびRSV G_a免疫原とRSV G_b免疫原のような2つのRSV免疫原をコードする単一のプラスミドのような複数の単一核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、組成物は、RSV G_a免疫原、RSV F免疫原、およびRSV G_b免疫原のような3つのRSV免疫原をコードする単一のプラスミドのような複数の単一核酸分子を含む。

【0158】

幾つかの実施形態において、組成物は、異なる核酸分子が異なるRSV免疫原の単一の異なるコード配列をそれぞれ含み、異なる核酸分子の対が、RSV F免疫原とRSV G_a免疫原、RSV F免疫原とRSV G_b免疫原、およびRSV G_a免疫原とRSV G_b免疫原を含む、2つのプラスミドのような、複数の2つの異なる核酸分子を含む。

【0159】

幾つかの実施形態において、組成物は、3つの異なるRSV免疫原のコード配列を集合的に含む、2つのプラスミドのような、複数の2つの異なる核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、1つのものはRSV F免疫原およびRSV G_a免疫原をコードし、第2のものはRSV G_b免疫原をコードする。幾つかの実施形態において、1つのものはRSV F免疫原およびRSV G_b免疫原をコードし、第2のものはRSV G_a免疫原をコードする。幾つかの実施形態において、1つのものはG_a免疫原およびRSV G_b免疫原をコードし、第2のものはRSV F免疫原をコードする。

【0160】

幾つかの実施形態において、組成物は、RSV M2-1免疫原をコードする複数の単一核酸分子を含む。

【0161】

RSV M2-1のコード配列が提供される幾つかの実施形態において、組成物は、RSV F免疫原とRSV M2-1免疫原、RSV M2-1免疫原とRSV G_a免疫原、およびRSV M2-1免疫原とRSV G_b免疫原のような2つのRSV免疫原をコードする単一のプラスミドのような、複数の単一核酸分子を含む。

【0162】

RSV M2-1のコード配列が提供される幾つかの実施形態において、RSV F免疫原、RSV M2-1免疫原、およびRSV G_a免疫原、RSV F免疫原、RSV M2-1免疫原、およびRSV G_b免疫原、RSV M2-1免疫原、およびRSV G_a免疫原、およびRSV G_b免疫原のような3つのRSV免疫原をコードする単一のプラスミドのような、複数の単一核酸分子。幾つかの実施形態において、組成物は、RSV F免疫原、RSV M2-1免疫原、RSV G_a免疫原、およびRSV G_b免疫原のような3つのRSV免疫原をコードする単一のプラスミドのような複数の単一核酸分子

10

20

30

40

50

を含む。

【0163】

R S V M 2 - 1 のコード配列が提供される幾つかの実施形態において、組成物は、異なる核酸分子が異なる R S V 免疫原の単一の異なるコード配列をそれぞれ含み、異なる核酸分子の対が、R S V F 免疫原と R S V M 2 - 1 免疫原、R S V M 2 - 1 免疫原と R S V G a 免疫原、および R S V M 2 - 1 免疫原と R S V G b 免疫原を含む、2つのプラスミドのような複数の2つの異なる核酸分子を含む。

【0164】

R S V M 2 - 1 のコード配列が提供される幾つかの実施形態において、組成物は、3つの異なる R S V 免疫原のコード配列を集合的に含むか、または1つが R S V M 2 - 1 である、2つのプラスミドのような複数の2つの異なる核酸分子を含む。実施形態は、1つの核酸分子が R S V F 免疫原および R S V M 2 - 1 免疫原をコードし、第2が、R S V G a 免疫原をコードする、1つの核酸分子が R S V F 免疫原および R S V M 2 - 1 免疫原をコードし、第2が R S V G b 免疫原をコードする、1つが R S V F 免疫原および R S V G a 免疫原をコードし、第2が R S V M 2 - 1 免疫原をコードする、1つが R S V F 免疫原および R S V G b 免疫原をコードし、第2が R S V M 2 - 1 免疫原をコードする、1つが R S V M 2 - 1 免疫原および R S V G a 免疫原をコードし、第2が R S V F 免疫原をコードする、1つが R S V M 2 - 1 免疫原および R S V G b 免疫原をコードし、第2が R S V F 免疫原をコードする、1つが R S V M 2 - 1 免疫原および R S V G b 免疫原をコードし、第2が R S V G a 免疫原をコードする、ならびに1つが G a 免疫原および R S V G b 免疫原をコードし、第2が R S V M 2 - 1 免疫原をコードすることからなる群から選択され得る。
10

【0165】

R S V M 2 - 1 のコード配列が提供される幾つかの実施形態において、組成物は、4つの異なる R S V 免疫原のコード配列を集合的に含む2つのプラスミドのような複数の2つの異なる核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、1つの核酸分子は、R S F F 免疫原をコードし、第2は、R S V M 2 - 1 免疫原、R S V G a 免疫原、および R S V G b 免疫原コードする、1つの核酸は、R S V M 2 - 1 免疫原をコードし、第2は、R S V F 免疫原、R S V G a 免疫原、および R S V G b 免疫原をコードする、1つは、R S F G a 免疫原をコードし、第2は、R S V F 免疫原、R S V M 2 - 1 免疫原、および R S V G b 免疫原をコードし、1つは、R S V G b 免疫原をコードし、第2は、R S V F 免疫原、R S V M 2 - 1 免疫原、および R S V G a 免疫原をコードする、1つは、R S V F および R S V M 2 - 1 免疫原をコードし、第2は、R S V G a 免疫原および R S V G b 免疫原をコードする、1つは、R S V F および R S V G b 免疫原をコードし、R S V G a 免疫原をコードし、第2は、R S V M 2 - 1 免疫原および R S V G b 免疫原をコードする、ならびに1つは R S V F および R S V G b 免疫原をコードし、第2は R S V M 2 - 1 免疫原および R S V G a 免疫原をコードする。幾つかの実施形態において、組成物は、3つの異なる R S V 免疫原のコード配列を集合的に含む、3つのプラスミドのような、複数の3つの異なる核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、1つの核酸分子は、R S V F 免疫原をコードし、1つは、R S V M 2 - 1 免疫原をコードし、第3は、R S V G a 免疫原をコードする、1つの核酸分子は、R S V F 免疫原をコードし、1つは、R S V G b 免疫原をコードする、1つの核酸分子は、R S V F 免疫原をコードし、1つは、R S V G a 免疫原をコードし、第3は、R S V G b 免疫原をコードする。幾つかの実施形態において、組成物は、4つの異なる R S V 免疫原のコード配列を集合的に含む、3つのプラスミドのような、複数の3つの異なる核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、1つの核酸分子は、R S V F 免疫原をコードし、第2は R S V M 2 - 1 免疫原をコードし、第3は、R S V G a 免疫原および
30
40
50

R S V G b 疫原をコードする、1つの核酸分子は、R S V F 疫原をコードし、第2は、R S V G a 疫原をコードし、第3は、R S V M 2 - 1 疫原およびR S V G b 疫原をコードする、1つの核酸分子は、R S V F 疫原をコードし、第2は、R S V G b 疫原をコードし、第3は、R S V M 2 - 1 疫原およびR S V G a 疫原をコードする、1つの核酸分子は、R S V M 2 - 1 疫原をコードし、第2は、R S V G a 疫原をコードし、第3は、R S V F 疫原およびR S V G b 疫原をコードする、1つの核酸分子は、R S V M 2 - 1 疫原をコードし、第2は、R S V G b 疫原をコードし、第3は、R S V F 疫原およびR S V G a 疫原をコードする、ならびに1つはR S V G a 疫原をコードし、第2は、R S V G b 疫原をコードし、第3は、R S V F 疫原およびR S V M 2 - 1 をコードする。幾つかの実施形態において、組成物は、4つの異なるR S V 疫原のコード配列を集合的に含む、4つのプラスミドのような、複数の4つの異なる核酸分子を含み、すなわち、1つの核酸分子は、R S V F 疫原をコードし、第2は、R S V M 2 - 1 疫原をコードし、第3は、R S V G a 疫原をコードし、第4は、R S V G b 疫原をコードする。

10

【0166】

幾つかの実施形態において、組成物は、ケモカインC C L 2 0、I L - 1 2、I L - 1 5、および／またはI L - 2 8のコード配列を更に含む。ケモカインC C L 2 0、I L - 1 2、I L - 1 5、および／またはI L - 2 8のコード配列は、1つ以上のR S V 疫原のコード配列を含む1つ以上の核酸分子に含まれ得る。ケモカインC C L 2 0、I L - 1 2、I L - 1 5、および／またはI L - 2 8のコード配列は、別個のプラスミドのような別個の核酸分子に含まれ得る。

20

【0167】

6.ワクチン

哺乳動物においてR S V に対して免役応答を生成することができるワクチンが、本明細書により提供される。ワクチンは、上で考察されたそれぞれのプラスミドを含むことができる。ワクチンは、複数のプラスミドまたはそれらの組み合わせを含むことができる。ワクチンは、治療または予防免疫応答を誘導するために提供され得る。

30

【0168】

幾つかの実施形態において、ワクチンは、前のT h 2 関連病理発生に役割を果たさないよう、好ましくはT h 1 に偏向しており、中和に感受性がある環境において機能することができるべきである。好ましくは、生であるべきではない。

40

【0169】

ワクチンは、F、G a、およびG b、そのようなタンパク質のフラグメント、そのようなタンパク質の変種、変種のフラグメントからなる群から選択される1つ以上の疫原標的を送達するために使用することができる。複数の標的を送達する場合、ワクチンは、複数の組成物または単一の組成物を含むことができる。異なるタンパク質をコードする異なるプラスミドを含む単一のプラスミドまたは組成物における複数のタンパク質をコードするプラスミドを、使用することができる。幾つかの実施形態において、ワクチンは、M 2 、そのフラグメント、M 2 - 1 の変種、変種のフラグメントを単独で、またはF、G a、およびG b、そのようなタンパク質のフラグメント、そのようなタンパク質の変種、変種のフラグメントからなる群から選択される1つ以上の疫原標的と組み合わせて送達するために使用することができる。複数の標的を送達する場合、ワクチンは、複数の組成物または単一の組成物を含むことができる。異なるタンパク質をコードする異なるプラスミドを含む単一のプラスミドまたは組成物における複数のタンパク質をコードするプラスミドを、使用することができる。

【0170】

ワクチンは、薬学的に許容される賦形剤を更に含むことができる。薬学的に許容される賦形剤は、ビヒクリ、アジュバント、担体、または希釈剤としての機能分子であり得る。薬学的に許容される賦形剤は、免疫刺激複合体（I S C O M S）のような界面活性剤、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質Aを含むL P S 類縁体、ムラミルペプ

50

チド、キノン類縁体、スクアレンおよびスクアレンのような小胞、ヒアルロン酸、脂質、リポソーム、カルシウムイオン、ウイルス粒子、ポリアニオン、ポリカチオン、もしくはナノ粒子が含まれ得る形質移入促進剤、または他の既知の形質移入促進剤であり得る。

【0171】

形質移入促進剤は、ポリ-L-グルタミン酸(LGS)を含むポリアニオン、ポリカチオン、または脂質である。形質移入促進剤は、ポリ-L-グルタミン酸であり、より好ましくは、ポリ-L-グルタミン酸は6mg/ml未満の濃度でワクチンに存在する。形質移入促進剤は、免疫刺激複合体(ISCOMS)のような界面活性剤、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質Aを含むLPS類縁体、ムラミルペプチド、キノン類縁体、ならびにスクアレンおよびスクアレンのような小胞を含むことができ、ヒアルロン酸を遺伝子構築物と一緒に投与に使用することもできる。幾つかの実施形態において、DNAプラスミドワクチンは、脂質、レクチンリポソーム、もしくはDNAリポソーム混合物(例えば、国際公報第09324640号を参照すること)のような当該技術において既知の他のリポソームを含むリポソーム、カルシウムイオン、ウイルス粒子、ポリアニオン、ポリカチオン、もしくはナノ粒子のような形質移入促進剤、または他の既知の形質移入促進剤を含むこともできる。好ましくは、形質移入促進剤は、ポリ-L-グルタミン酸(LGS)を含むポリアニオン、ポリカチオン、または脂質である。ワクチン中の形質移入剤の濃度は、4mg/ml未満、2mg/ml未満、1mg/ml未満、0.750mg/ml未満、0.500mg/ml未満、0.250mg/ml未満、0.100mg/ml未満、0.050mg/ml未満、または0.010mg/ml未満である。

10

20

30

40

50

【0172】

薬学的に許容される賦形剤は1つ以上のアジュバントであり得る。アジュバントは、ワクチンにおいて、同じもしくは代替的なプラスミドに発現される、または上記のプラスミドと組み合わされたタンパク質として送達される、他の遺伝子であり得る。1つ以上のアジュバントは、CCL20、-インターフェロン(IFN-)、-インターフェロン(IFN-)、-インターフェロン、血小板由来増殖因子(PDGF)、TNF、TNF、GM-CSF、上皮増殖因子(EGF)、皮膚T細胞誘引性ケモカイン(C-TACK)、胸腺上皮発現ケモカイン(TECK)、粘膜関連上皮ケモカイン(MEC)、IL-12、欠失されたシグナル配列をコードするシグナル配列またはコード配列を有し、かつIgEからのもののような異なるシグナルペプチド、またはIgEからのもののような異なるシグナルペプチドをコードするコード配列を任意に含むIL-15を含む、IL-15、IL-28、MHC、CD80、CD86、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP-1、MIP-1、IL-8、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-18の突然変異形態、CD40、CD40L、血管増殖因子、線維芽細胞増殖因子、IL-7、神経増殖因子、血管内皮増殖因子、Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IKB、不活性NIK、SAPK、SAP-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANKLIGAND、OX40、OX40LIGAND、NKG2D、MICHA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2、およびこれらの機能性フラグメント、またはこれらの組み合わせからなる群から選択されるタンパク質および/またはタンパク質をコードする核酸分子であり得る。幾つかの実施形態において、アジュバントは、CCL-20、IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、MEC、またはRANTES

からなる群から選択される1つ以上のタンパク質および／またはタンパク質をコードする核酸分子であり得る。IL-12の構築物および配列の例は、PCT出願第PTC/US1997/019502号、ならびに対応する米国特許出願第08/956,865号および2011年12月12日に出願の米国特許仮出願第61/569600号に開示されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。IL-15の構築物および配列の例は、PCT出願第PTC/US04/18962号および対応する米国特許出願第10/560,650号、ならびにPCT出願第PTC/US07/00886号および対応する米国特許出願第12/160,766号、ならびにPCT出願第PTC/US10/048827号に開示されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。IL-28の構築物および配列の例は、PCT出願第PTC/US09/039648号および対応する米国特許出願第12/936,192号に開示されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。RANTESおよび他の構築物および配列の例は、PCT出願第PTC/US1999/004332号および対応する米国特許出願第09/622452号に開示されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。RANTESの構築物および配列の他の例は、PCT出願番号PTC/US11/024098号に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。RANTESおよび他の構築物および配列の例は、PCT出願第PTC/US1999/004332号および対応する米国特許出願第09/622452号に開示されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。RANTESの構築物および配列の他の例は、PCT出願番号PTC/US11/024098号に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。ケモカインのCTACK、TECK、およびMECの構築物および配列の例は、PCT出願第PTC/US2005/042231号および対応する米国特許出願第11/719/646号に開示されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。OX40および他の免疫調節剤の例は、米国特許出願第10/560,653号に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。DR5および他の免疫調節剤の例は、米国特許出願第09/622452号に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0173】

ワクチンは、1994年4月1日に出願の米国特許出願第021/579号に記載されている遺伝子ワクチン促進剤を更に含むことができる。

【0174】

ワクチンは、約1ナノグラムから100ミリグラム、約1マイクログラムから約10ミリグラム、または好ましくは約0.1マイクログラムから約10ミリグラム、またはより好ましくは約1ミリグラムから約2ミリグラムの量でコンセンサス抗原およびプラスミドを含むことができる。幾つかの好ましい実施形態において、本発明による薬学的組成物は、約5ナノグラムから約1000マイクログラムのDNAを含む。幾つかの好ましい実施形態において、薬学的組成物は、約10ナノグラムから約800マイクログラムのDNAを含有する。幾つかの好ましい実施形態において、薬学的組成物は、約0.1～約500マイクログラムのDNAを含有する。幾つかの好ましい実施形態において、薬学的組成物は、約1～約350マイクログラムのDNAを含有する。幾つかの好ましい実施形態において、薬学的組成物は、約25～約250マイクログラム、約100～約200マイクログラム、約1ナノグラムから100ミリグラム、約1マイクログラムから約10ミリグラム、約0.1マイクログラムから約10ミリグラム、約1ミリグラムから約2ミリグラム、約5ナノグラムから約1000マイクログラム、約10ナノグラムから約800マイクログラム、約0.1～約500マイクログラム、約1～約350マイクログラム、約25～約250マイクログラム、約100～約200マイクログラムのコンセンサス抗原およびそのプラスミドを含有する。

【0175】

ワクチンは、使用される投与様式に従って製剤化することができる。注射用ワクチンの薬学的組成物は、滅菌、発熱物質無含有、および粒子無含有であり得る。等張製剤または

10

20

30

40

50

液剤を使用することができる。等張のための添加剤には、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、およびラクトースが含まれ得る。ワクチンは、血管収縮剤を含むことができる。等張液剤には、リン酸緩衝食塩水が含まれ得る。ワクチンは、ゼラチンおよびアルブミンを含む安定剤を更に含むことができる。安定化は、製剤が室温または周囲温度で長時間安定であることを可能にし得、例えば、ワクチン製剤への LGS 、またはポリカチオンもしくはポリアニオンであり得る。

【0176】

7. ワクチンの送達方法

免疫応答が誘導され得る RSVへの特に有効な免疫原にするエピトープを含む、コンセンサス抗原の遺伝子構築物およびタンパク質を提供するワクチンを送達する方法が、本明細書において提供される。ワクチンを送達する、またはワクチン接種の方法は、治療的および予防的な免疫応答を誘導するために提供することができる。ワクチン接種の方法は、RSVに対する免疫応答を哺乳動物において生成することができる。ワクチンを個体に送達して、哺乳動物の免疫系の活性を調節し、免疫応答を増強することができる。ワクチンの送達は、細胞内で発現し、細胞の表面に送達され、その時点で免疫系が認識し、細胞性、液性、または細胞性および液性の応答を誘導する核酸分子としてのコンセンサス抗原の形質移入であり得る。ワクチンの送達は、上記に考察されたワクチンを哺乳動物に投与して、RSVに対する免疫応答を哺乳動物に誘導または誘発することに使用できる。

【0177】

哺乳動物の細胞へのワクチンおよびプラスミドの送達によって、形質移入細胞が発現し、ワクチンから注入されたそれぞれのプラスミドへコンセンサス抗原を分泌する。これらのタンパク質は、免疫系により外因性であると認識され、これらに対して抗体が作製される。抗体は、免疫系により維持され、後の RSV 感染への有効な応答を可能にする。

【0178】

ワクチンを哺乳動物に投与して、免疫応答を哺乳動物に誘発することができる。哺乳動物は、ヒト、靈長類、非ヒト靈長類、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、アンテロープ、バイソン、スイギュウ、バイソン、ウシ科、シカ、ハリネズミ、ゾウ、ラマ、アルパカ、マウス、ラット、およびニワトリであり得る。

【0179】

a. 併用治療

ワクチンは、CCL20、-インターフェロン、-インターフェロン、血小板由来増殖因子 (PDGF) 、TNF 、TNF 、GM-CSF 、上皮増殖因子 (EGF) 、皮膚T細胞誘引性ケモカイン (CTACK) 、胸腺上皮発現ケモカイン (TECK) 、粘膜関連上皮ケモカイン (MEC) 、IL-12 、欠失されたシグナル配列を有し、かつ IgE シグナルペプチドのような異なるシグナルペプチド任意に含む IL-15 を含む、IL-15 、MHC 、CD80 、CD86 、IL-28 、IL-1 、IL-2 、IL-4 、IL-5 、IL-6 、IL-10 、IL-18 、MCP-1 、MIP-1 、MIP-1 、IL-8 、RANTES 、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34 、GlyCAM-1 、MadCAM-1 、LFA-1 、VLA-1 、Mac-1 、p150.95 、PECAM 、ICAM-1 、ICAM-2 、ICAM-3 、CD2 、LFA-3 、M-CSF 、G-CSF 、IL-18 の突然変異形態、CD40 、CD40L 、血管増殖因子、線維芽細胞増殖因子、IL-7 、神経増殖因子、血管内皮増殖因子、Fas 、TNF受容体、Flt 、Apo-1 、p55 、WSL-1 、DR3 、TRAMP 、Apo-3 、AIR 、LARD 、NGRF 、DR4 、DR5 、KILLER 、TRAIL-R2 、TRICK2 、DR6 、カスパーゼICE 、Fos 、c-jun 、Sp-1 、Ap-1 、Ap-2 、p38 、p65 Rel 、MyD88 、IRAK 、TRAF6 、IKB 、不活性NIK 、SAP-K 、SAP-1 、JNK 、インターフェロン応答遺伝子、NFKB 、Bax 、TRAIL 、TRAILrec 、TRAILrecDRC5 、TRAIL-R3 、TRAIL-R4 、RANK 、RANK LIGAND 、Ox40 、Ox40 LIGAND 、NKG2D 、MICHA 、MICB 、NKG2A 、NKG2B 、NKG2C 、

10

20

30

40

50

NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2、およびこれらの機能性フラグメント、またはこれらの組み合わせをコードする、他のタンパク質および／または遺伝子と組み合わせて投与され得る。幾つかの実施形態において、ワクチンは、以下の核酸分子および／またはタンパク質の1つ以上と組み合わせて投与され、核酸分子は、CCL20、IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、MEC、およびRANTES、またはこれら機能性のフラグメントの1つ以上をコードするコード配列を含む核酸分子からなる群から選択され、タンパク質は、CCL02、IL-12タンパク質、IL-15タンパク質、IL-28タンパク質、CTACKタンパク質、TECKタンパク質、MEKタンパク質、もしくはRANTESタンパク質、またはこれらの機能性フラグメントからなる群から選択される。

10

【0180】

ワクチンは、経口、非経口、舌下、経皮、直腸内、経粘膜、局所、吸入、口腔内投与、胸膜内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、鞘内、および関節内、またはこれらの組み合わせを含む異なる経路で投与することができる。獣医学的使用では、組成物を、通常の獣医学の診療に適切に許容される製剤として投与することができる。獣医師は、特定の動物に最も適した投与レジメンおよび投与経路を容易に決定することができる。ワクチンは、伝統的なシリンジ、無針注射装置、「微粒子銃」、または電気穿孔（「EP」）、「流体力学法」、もしくは超音波のような他の物理的方法により投与することができる。

20

【0181】

ワクチンのプラスミドは、インピボ電気穿孔を用いるおよび用いないDNA注入（DNAワクチン接種とも呼ばれる）、組み換えアデノウイルス、組み換えアデノウイルス関連ウイルス、および組み換えワクシニアのようなリポソーム仲介、ナノ粒子促進組み換えベクターを含む幾つかの周知の技術により哺乳動物に送達することができる。コンセンサス抗原は、DNA注入を介し、インピボ電気穿孔を伴って送達することができる。

【0182】

b. 電気穿孔

ワクチンのプラスミドの電気穿孔を介したワクチンの投与は、細胞膜に可逆的細孔を形成させるのに有効なエネルギー・パルスを、哺乳動物の所望の組織に送達すように構成され得る電気穿孔装置を使用して達成することができ、好ましくは、エネルギー・パルスは、使用者により予め設定された電流入力に類似した定電流である。電気穿孔装置は、電気穿孔構成要素および電極アセンブリーまたはハンドルアセンブリーを含むことができる。電気穿孔構成要素は、制御装置、電流波形発生器、インピーダンス試験器、波形自動記録器、入力要素、状況報告要素、通信ポート、記憶装置構成要素、電源、および電源スイッチが含まれる、電気穿孔装置の様々な要素の1つ以上を含み、組み込むことができる。電気穿孔は、インピボ電気穿孔装置、例えば、CELLLECTRA EPシステム（VGX Pharmaceuticals, Blue Bell, PA）またはElgen電気穿孔機（Genetronics, San Diego, CA）を使用することにより達成され、プラスミドによる細胞の形質移入を促進することができる。

30

【0183】

電気穿孔構成要素は、電気穿孔装置の1つの要素として機能することができ、他の要素は、電気穿孔構成要素と通信する別個の要素（または構成要素）である。電気穿孔構成要素は、電気穿孔装置の1つを超える要素として機能することができ、これも、電気穿孔構成要素から離れている電気穿孔装置の他の要素と通信し得る。電気機械的または機械的な装置の一部として存在する電気穿孔装置の要素は、1つの装置として、または互いに通信する別個の要素として機能し得る要素として限定されることはない。電気穿孔構成要素は、所望の組織に定電流を生じるエネルギー・パルスを送達することができ、フィードバック機構を含む。電極アセンブリーは、空間を開けて配置された複数の電極を有する電極配列を含むことができ、ここで電極アセンブリーは、電気穿孔構成要素からのエネルギー・パルスを受け取り、これを、電極を介して所望の組織に送達する。複数の電極の少なくとも

40

50

1つは、エネルギーパルスの送達の間は中性であり、所望の組織においてインピーダンスを測定し、インピーダンスを電気穿孔構成要素に通信する。フィードバック機構は、測定されたインピーダンスを受け取ることができ、電気穿孔構成要素により送達されたエネルギーパルスを調整して、定電流を維持することができる。

【0184】

複数の電極が、分散パターンでエネルギーパルスを送達することができる。複数の電極は、プログラム化シーケンスによる電極の制御を介する分散パターンでエネルギーパルスを送達することができ、プログラム化シーケンスは、使用者により電気穿孔構成要素に入力される。プログラム化シーケンスは、シーケンスで送達された複数のパルスを含むことができ、複数のパルスのそれぞれのパルスは、インピーダンスを測定する1つの中性電極を有する少なくとも2つの活性電極により送達され、後から続く複数のパルスは、インピーダンスを測定する1つの中性電極を有する少なくとも2つの活性電極のうちの異なる1つにより送達される。

10

【0185】

フィードバック機構は、ハードウェアまたはソフトウェアのいずれかにより実施することができる。フィードバック機構は、アナログ閉ループ回路により実施することができる。フィードバックは、 $50\text{ }\mu\text{s}$ 、 $20\text{ }\mu\text{s}$ 、 $10\text{ }\mu\text{s}$ 、または $1\text{ }\mu\text{s}$ 毎に発生するが、好みしくはリアルタイムフィードバックまたは瞬時（すなわち、応答時間を決定する利用可能な技術により決定される、実質的な瞬時）である。中性電極は、所望の組織においてインピーダンスを測定し、インピーダンスをフィードバック機構に通信することができ、フィードバック機構は、インピーダンス応答し、エネルギーパルスを調整して、予め設定された電流と類似した値に定電流を維持する。フィードバック機構は、エネルギーパルスの送達の間に定電流を連続的または瞬時に維持することができる。

20

【0186】

本発明のDNAワクチンの送達を促進することができる電気穿孔装置および電気穿孔法の例には、Draghia-Akli, et al. による米国特許第7,245,963号、Smith, et al. による米国特許公開第2005/0052630号に記載されたものが含まれ、これらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。DNAワクチンの送達の促進に使用することができる他の電気穿孔装置および電気穿孔法には、2006年10月17日出願の米国特許仮出願第60/852,149号および2007年10月10日出願の同第60/978,982号の特許法119条(e)に基づく利益を主張する、2007年10月17日出願の同時係属および共有の米国特許出願第11/874072号において提供されたものが含まれ、これらは全て、その全体が参照により組み込まれる。

30

【0187】

Draghia-Akliらによる米国特許第7,245,963号は、身体または植物内の選択された組織の細胞への生体分子の導入を促進するためのモジュール式電極システムおよびこれらの使用を記載する。モジュール式電極システムは、複数の針電極、皮下注射針、プログラム可能定電流パルス制御装置から複数の針電極へ導電性インクを提供する電気コネクタ、および電源を含むことができる。操作者は、支持構造に装填された複数の針電極をつかみ、それらを身体または植物の選択された組織の中にしっかりと挿入することができる。次に生体分子が、選択された組織内に皮下注射針を介して送達される。プログラム可能定電流パルス制御装置を作動し、定電流電気パルスを複数の針電極に適用する。適用される定電流電気パルスは、複数の電極の間の細胞への生体分子の導入を促進する。米国特許第7,245,963号の全ての内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0188】

Smithらにより提出された米国特許公開第2005/0052630号は、身体または植物内の選択された組織の細胞への生体分子の導入を効果的に促進するために使用され得る電気穿孔装置を記載する。電気穿孔装置は、動作がソフトウェアまたはファームウ

50

エアにより特定される動電学的装置（「E K D 装置」）を含む。E K D 装置は、電極配列の間に一連のプログラム可能定電流パルスパターンを、使用者の制御およびパルスパラメーターの入力に基づいて生成し、電流波形データの記憶および取得を可能にする。電気穿孔装置は、また、針電極の配列を有する交換可能な電極ディスク、注入針の中央注入チャンネル、および取り外し可能なガイドディスクを含む。米国特許公開第2005/0052630号の全ての内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0189】

米国特許第7,245,963号および米国特許公開第2005/0052630号に記載されている電極配列および方法を、筋肉のような組織のみならず、他の組織または臓器の中にも深く侵入するように適合させることができる。電極配列の構成のため、（選択された生体分子を送達する）注入針も、標的臓器の中に完全に挿入され、注入は、電極により予め描かれた領域内の標的組織に対して垂直に施用される。米国特許第7,245,963号および米国特許公開第2005/0052630号に記載されている電極は、好ましくは長さが20mmであり、ゲージが21である。

10

【0190】

加えて、電気穿孔装置およびその使用を組み込む幾つかの実施形態において考慮されるように、以下の特許：1993年12月28日発行の米国特許第5,273,525号、2000年8月29日発行の米国特許第6,110,161号、2001年7月17日発行の同第6,261,281号、および2005年10月25日発行の同第6,958,060号、ならびに2005年9月6日発行の米国特許第6,939,862号に記載される電気穿孔装置が存在する。更に、様々な装置のいずれかを使用したDNAの送達に関する2004年2月24日発行の米国特許第6,697,669号、およびDNAを注入する方法を対象とする2008年2月5日発行の米国特許第7,328,064号に提供された主題を網羅する特許が、本明細書において考慮される。上記の特許は、その全体が参考により組み込まれる。

20

【0191】

c. DNAプラスミドの調製方法

本明細書で考察されているDNAワクチンを含むDNAプラスミドを調製する方法が、本明細書において提供される。DNAプラスミドは、哺乳類発現プラスミドへの最終サブクローニングステップの後、当該技術において既知の方法を使用して、大規模発酵タンク中の細胞培養物への接種に使用することができる。

30

【0192】

本発明のEP装置で使用されるDNAプラスミドは、既知の装置および技術の組み合わせを使用して製剤化および製造することができるが、好ましくは、これらは2007年5月23日出願の契約対象同時継続米国特許仮出願第60/939,792号に記載されている最適化プラスミド製造技術を使用して製造される。幾つかの例において、これらの研究に使用されたDNAプラスミドを、10mg/mL以上の濃度で製剤化することができる。製造技術は、また、契約対象特許である2007年7月3日出願の米国特許第7,238,522号に記載されているものを含む、米国特許出願第60/939792号に記載されているものに加えて、当業者に一般的に既知の様々な装置およびプロトコールを含む、または組み込む。上で参照された出願および特許である米国特許出願第60/939,792号および米国特許第7,238,522号は、それぞれその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【実施例】

【0193】

本発明は以下の実施例において更に説明される。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、例示のためにのみ提示されていることが理解されるべきである。上記の考察およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的な特長を確認することができ、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の様々な変更および修正を行って様々な用途および条件に適合させることができる。したがって、本明細書にお

50

いて示され、記載されているものに加えて、本発明の様々な変更が、前記の記載から当業者には明白となるであろう。そのような変更も、添付の特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

【0194】

実施例1

将来的にRSV感染の高い危険性のある個人数が連続的に増加すると予測されるので(例えば、年少乳児および高齢者)、RSV感染の効果的で経済的に対処できる治療を開発する緊急の必要性が存在する。免疫化の際に目的のコード化タンパク質を発現するように遺伝子操作された小型細菌プラスマドであるDNAワクチンは、効果的なRSVワクチンの設計に伴う多くの障害を回避することを助け得る、幾つかの大きな利点を提供する。例えば、臨床的に有意な病気および再感染を予防するため、ワクチンは、自然RSV感染のときに発生するものより大きく、長く持続する免疫を付与する必要がある。DNAワクチンは、多くのウイルスに対して、液性(例えば、中和抗体)と細胞性(例えば、細胞毒性Tリンパ球)の両方の免疫応答を誘発するのみならず、生涯にわたる免疫性も誘発することができる。加えて、RSVワクチン接種の主要な標的は、新生児および年少乳児である。新生児免疫系は機能的に未熟であり、したがって従来のワクチン(例えば、生の弱毒化または不活性化ウイルス)に対して弱い免疫応答しか発生しない。一方、DNAワクチンは、新生児動物モデルにおいて安全で免疫原性であることを示している。更に、免疫化の時点での母親抗体の存在は、様々な従来のワクチンへの免疫応答を抑制または阻害することが知られている。しかし、DNAワクチンでは、免疫化タンパク質は、ワクチン調合剤には存在せず、したがって母親抗体による直接的な不活性化には感受性がないはずである。

【0195】

現在、3つの主なRSVワクチンが臨床試験の初期またはほぼ初期段階にあり、1)生弱毒化RSV(MedImmune, Philadelphia, PA)、2)RSV Fおよび/またはGタンパク質を発現するセンダイウイルス(AmVac, Switzerland)、ならびに3)RSVのGタンパク質を含有するウイルス様粒子(Novaavax, Rockville, MD)である(<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=RSV&pg=1>)。これらの手法は、RSV感染の予防にある程度の効果を示しているが、そのようなワクチン設計に伴う本来的な不利益が存在する。例えば、生の弱毒化ウイルスの最大の問題は、発病力の復帰をもたらす弱毒化不足または突然変異であり、したがって、免疫無防備状態の個人に投与されるべきではない。全てのウイルスベクターにおける一般的な欠点は、宿主免疫反応であり、それは、ウイルスタンパク質の認識が中和抗体の生成をもたらし、そのことが後の免疫化の際にワクチンの効果を有意に低減し得るからである。最後に、RSVのGタンパク質は、RSVの2つのサブタイプのうちで非常に多様であり、したがって、Gタンパク質を標的にする任意のワクチンは、交差保護を提供する可能性が少ない。

【0196】

対照的に、DNAワクチンは、極めて免疫原性であること、および上記に記載されたワクチン手法に伴う多くの不利益を欠いていることが示されている。電気穿孔により送達されるとき、DNAワクチン免疫原性は更に改善される。DNAワクチンは、完全なセットより少ないウイルス成分を含有し、タンパク質サブユニットワクチンのように、宿主に発病力復帰または感染の危険性がなく、乳児および免疫無防備状態の個人の両方における使用で安全である。

【0197】

RSVの両方のサブタイプAおよびBのコンセンサス配列の使用は、ウイルスの両方の菌株に対する広範囲の保護を得るために基礎を提供する。そのような利点は、コンセンサスRSV DNAワクチンをさらに有益にし、過去に提案された任意の他の手法より潜在的に効果的にする。

【0198】

10

20

30

40

50

主な RSV タンパク質である融合体 (F) 、糖タンパク質 (Ga) 、および糖タンパク脂質 (G a) を、新たな RSV ワクチンの標的として選択した。第 2 のマトリックスタンパク質 (M 2) も評価のために選択した。上で記述されたように、F および G タンパク質は、表面に発現し、中和抗体の理想的な標的である。M 2 タンパク質は、主な免疫優性 C D 8 T 細胞エピトープを含有する。これらの RSV タンパク質のそれぞれにおいて、単一のコンセンサス配列を、RSV の両方のサブタイプ A および B では P U B M E D により提供されたアミノ酸配列に基づいて生成した（図 1 は、RSV - F タンパク質の系統樹を示し、コンセンサス RSV - F タンパク質アミノ酸配列は、配列番号 2 に記載されている。図 2 は、RSV - M 2 - 1 タンパク質の系統樹を示し、コンセンサス、RSV - M 2 - 1 タンパク質アミノ酸配列は、配列番号 4 に記載されている）。好みの実施形態では、コンセンサスタンパク質配列をコードするコドンおよび RNA 最適化 DNA 配列が產生され、電気穿孔により送達され得る DNA ワクチンを作製するために使用される。
10

【 0199 】

実施例 2

RSV コンセンサス F タンパク質の発現の成功を、免疫蛍光顕微鏡法および / またはウエスタンプロット分析により確認した。構築物を免疫化試験に使用した。

【 0200 】

マウスを、様々な投与量の異なる RSV - DNA ワクチン構築物により免疫化した。1 つの群は、対照として、DNA ワクチン主鎖プラスミド p V A X を受けた。1 つの群は、5 μg の用量のプラスミド RSV - F を受け、1 つの群は、15 μg の用量のプラスミド RSV - F を受け、1 つの群は、30 μg の用量のプラスミド RSV - F を受け、1 つの群は、60 μg の用量のプラスミド RSV - F を受けた。
20

【 0201 】

マウスを、電気穿孔により筋肉内へ 2 週間間隔で合計 3 回 (0、2、および 4 週目) の免疫化により免疫化した。マウスを、それぞれの免疫化の 2、4、6、および 12 週間後に出血させ、全 RSV - F タンパク質特異的 Ig G および Ig A 抗体を血清において測定した。図 3 は、免疫化 1 (すなわち、0 週目) 、免疫化 2 (すなわち、2 週目) 、および免疫化 3 (すなわち、4 週目) 後の抗 RSV - F タンパク質 Ig G を示す。図 4 は、免疫化 1 (すなわち、0 週目) 、免疫化 2 (すなわち、2 週目) 、および免疫化 3 (すなわち、4 週目) 後の抗 RSV - F タンパク質 Ig A を示す。マウスを 12 週目に殺処分した。血清中の全 Ig G と血清中の全 Ig A の比較に加えて、最終免疫化のおよそ 8 週間後の異なる投与量の RSV - F ワクチンによる IFN - 産生の比較を行った。
30

【 0202 】

RSV - F DNA ワクチンは、血清において Ig G および Ig A の両方を高いレベルで誘発した。応答は、全ての投与量試験において第 2 の免疫化の 2 週間後の早さで検出可能であった。誘発された抗体応答は、強く Th 1 偏向していると思われ、したがって、以前の RSV への Th 2 免疫応答の副作用に関する問題が回避される。RSV - F 特異的 C D 8 T 細胞が、最後の免疫化の 8 週間後においてさえも観察された。図 5 は、最後の免疫化のおよそ 8 週間後の RSV - F ワクチンの異なる投与量による IFN - 産生を比較した結果を示す。
40

【 0203 】

実施例 3

ケモカインは、近くの応答細胞において高い濃度勾配に向けての直接的な走化性を誘発することができる、細胞により分泌される、小型タンパク質のファミリーである。様々なグループが、ケモカインを免疫アジュバントとして使用する実現性について調査している。

【 0204 】

CCR10 に結合する CCL28 / MEC (粘膜関連上皮ケモカイン) は、腸、肺、乳房、および唾液腺の上皮細胞に発現する。以前の研究における粘膜ケモカインの使用は、全身免疫化の後に粘膜組織に良好な免疫応答を誘発して、免疫アジュバントとしての有用
50

性を示した。

【0205】

実験は、コンセンサスRSV-Fタンパク質DNAワクチン構築物のアジュバントとしてのCCL28遺伝子構築物の使用を試験するために実施した。、肝臓活性化制御ケモカイン(LARC)またはマクロファージ炎症性タンパク質-3(MIP3A)とも呼ばれる、CCL20をコードするヌクレオチド配列を含む遺伝子構築物も、コンセンサスRSV-Fタンパク質DNAワクチン構築物の可能なアジュバントとして試験した。

【0206】

RSV-Fの免疫化スケジュール+ケモカイン実験は、1群がRSV-F構築物のみを受け、1群がRSV-F構築物+CCL20構築物を受け、1群がRSV-F構築物+CCL28構築物を受ける、3群のマウスを利用した。マウスを、0週目、2週目、および4週目の合計3回免疫化した。マウスを、2週目、4週目、および5週目に出血させた。5週目にはマウスを腔内洗浄して、腔試料を収集し、殺処分した後、肺および脾臓を収集した。

【0207】

比較は、脾臓におけるRSV-F+/-ケモカイン免疫化後の脾臓(図6)およびRSV-F+/-ケモカイン免疫化後の肺(図7)におけるIFN- β +DC8およびCD4 T 細胞によって行った。

【0208】

血清中のIgG終点力値を測定し、血清中のIgGサブタイプ(IgG1対IgG2a)を比較した(図8)。IgG2a/IgG1比の比較も行った(図9)。

【0209】

CCL20およびCCL28ケモカインは、脾臓または肺のいずれにおいてもRSV-F-DNAワクチン接種後にCD8およびCD4 T 細胞免疫応答を増強したとは(IFN- β ICSに基づいて)思われなかつたが、ケモカイン構築物の投与量が不十分であつたかは不明である。

【0210】

CCL20免疫アジュバントを受けた動物は、RSV-F-DNAワクチン接種後にTh1免疫応答(一次IgG2a)への大きな偏向を示した。免疫応答をTh2から追い払い、Th1へ向けることは、RSV感染後のワクチン関連増強疾患を回避するために有用であり得る。

【0211】

実施例4

上に述べたように、CCL20をコードするコード配列の投与は、優先的なTh1免疫応答、およびTh2免疫応答から離れることをもたらす。CCL20投与の特性は、免疫療法、ならびにTh1免疫応答の増加からTh2免疫応答の減少へのシフトが望ましい他の標的のワクチンアジュバントの両方の文脈において有用であり得る。

【0212】

例えば、CCL20、またはCCL20をコードする核酸分子の投与は、Th2免疫応答により特徴付けられる自己免疫性疾患または炎症性状態を有する個体を治療するのに有用であり得る。本明細書において示されているTh2免疫応答を減少する能力は、例えばを含む特定の自己免疫性疾患または炎症性状態に関連するTh2免疫応答を低減するために使用され得る。

【0213】

加えて、CCL20を、本明細書に記載されているワクチンアジュバントとして、他の炎症性疾患、ならびに癌を標的にするワクチンと共に使用することができる。ワクチンアジュバントとしてのCCL20の使用に伴うTh1增加/Th2減少特性は、ワクチンにとって有用であり得る。配列番号18および配列番号20は、IgEシグナルペプチドをコードするコード配列を有する、および有さない、CCL20の高発現コード配列を含有する。幾つかの実施形態において、配列番号18は、開始コドンを更に含む。配列番号1

10

20

30

40

50

9および配列番号21は、IgEシグナルペプチドをコードするコード配列を有する、および有さない、CCL20のコンセンサス配列を含有する。幾つかの実施形態において、配列番号19は、N末端メチオニンを更に含む。

【0214】

実施例5

TZM-b1細胞のルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイは、分子クローンEnv偽型ウイルスによる1回感染に基づいている。TZM-b1(JC53-b1)は、CD4、CXCR4、およびCCR5を発現し、かつTat誘導性Lucおよび-Galレポーター遺伝子を含有する、遺伝子操作されたHeLa細胞系である。このアッセイは、1回感染での高い成功率、増大したアッセイ能力(2日アッセイ)、向上した精度(50%の中和を正確に測定する)、改善された基準化のレベル(安定した細胞系)、ならびに最適化および検証されたアッセイプラットフォームをもたらす。参照により本明細書に組み込まれる、Montefiori, D.C. (2004) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, 12.11.1-12.11.15は、このアッセイを記載した。

【0215】

図10は、TZM-BL細胞/「ON」におけるEnv-偽型ウイルスを描写する。

【0216】

図11は、TZM-BL細胞/「OFF」におけるEnv-偽型ウイルスを描写する。

【0217】

図12は、293T細胞におけるRSV融合偽ウイルス産生を描写する。

【0218】

図13は、このアッセイを使用するRSV-F中和試験に使用される免疫化プロトコールを示す。

【0219】

図14は、異なる標的細胞におけるRSV-F仲介感染の定量化データを示す。RSV-Fタンパク質を担持する偽型の感染性。偽型ウイルスをペレット化し、粒子量を、HIV-p24抗原を定量化することによって推定した。細胞を、偽型ウイルスにより、またはエンベロープを担持しない、10ngの粒状HIV-p24抗原を含有する多様な細胞系のパネルにより感染させた。感染の72時間後、細胞上澄み、およびp24抗原についてアッセイした。値は、三重のウエルの平均および標準偏差である。

【0220】

図15は、TZM-b1 HeLa細胞におけるRSV-F中和活性の定量化データを示す。データは、HIV-Luc/FMDV偽ウイルスが標的細胞に侵入し、標的細胞を感染することを遮断できる、DNAワクチン接種動物からのRSV-F免疫化血清試料において、ルシフェラーゼアッセイを使用して中和能力とRSV-Fとを比較した結果を示す。力価は、ウイルスの50%阻害を生じる血清の希釈度の逆数として定義される。ワクチン接種されたマウスからの血清試料の、HIV-1 Luc/RSV-Fの感染性を中和および遮断する能力、正常なマウス血清(NMS)におけるそのような遮断活性の不在。

【0221】

図16は、HeLa細胞におけるRSV-F偽ウイルスによる細胞死活性の定量化データを示す。結果は、コンセンサスRSV-F DNAプラスミドが、電気穿孔による3回のワクチン接種の後、マウスにおいて強力な液性および細胞性免疫応答を誘発することを示す。血清中の高レベルのRSV-F特異的IgGが、僅か5μgのDNAによる2回目の免疫化後の1週間の早さで観察された。細胞仲介免疫応答は、3回目の免疫化後の8週間もたってから検出され、RSV-F DNAワクチン接種後の免疫応答の長期間の持続性を示唆した。RSV-F DNA濃度の増加は、免疫応答の増加をもたらさなかった。RSV-F DNA+電気穿孔による3回のワクチン接種の後に生成された抗体は、偽ウイルス中和アッセイにより測定すると、感染を中和することができた。結果は、緩和され

10

20

30

40

50

た RSV - F は、標的細胞のアポトーシスを仲介したことも示した。

【0222】

実施例 6

図 17 は、実施された RSV - M2 投与量試験の免疫化スケジュールを示す。この試験から収集されたデータは、最後の免疫化のおよそ 1 週間後の RSV - M2 ワクチンの異なる投与量による IFN - g 産生の比較を含む（図 18）。結果は、コンセンサスに基づいた RSV - M2 DNA プラスマミドが、電気穿孔による 3 回のワクチン接種の後、マウスにおいて有意な細胞性免疫応答を誘発したことを示した。脾臓および肺の両方における RSV - M2 の免疫優性または亜優性エピトープのいずれかに特異的な高レベルの IFN - g + T 細胞が、観察された。最大免疫応答は、 $60 \mu\text{g}$ の DNA により観察された（しかし、応答は、 $10 \mu\text{g}$ の DNA により観察されたものよりさほど大きくなかった）。

【0223】

実施例 7

更なる試験が、DNA 免疫化後に粘膜免疫応答を増強する潜在的な免疫アジュバントとしての CCL20 を評価するために実施された。CCL20（生の活性化制御ケモカイン - LARC、マクロファージ炎症性タンパク質 3 - MIP3a）は、CCR6 に結合し、リンパ節、肝臓、虫垂、胎児の肺（低いレベルで胸腺、精巣、前立腺、および腸）に発現する。

【0224】

図 19 は、RSV - F ワクチンと CCL20 との組み合わせを評価するための免疫化スケジュールを描写する。

【0225】

図 20 は、最後の免疫化の 1 週間後の脾臓、肝臓、および肺のそれぞれにおける異なる投与量の CCL20 による IFN - g 産生を比較したデータを含む試験データを示す。

【0226】

図 21 は、血清における IgG サブタイプ（IgG1 対 IgG2a）を比較したデータを示す。

【0227】

結果は、CCL20 との同時免疫化が、RSV - F DNA 免疫化後に肺および肝臓の両方において細胞仲介免疫応答を増加しないことを示す。CCL20 は、DNA 免疫化後に生成された RSV - F 特異的 IgG 抗体を、Th1 アイソタイプに偏向すると思われる。RSV - F 免疫化単独と比較して、より少ない IgG1 およびより多い IgG2a が、CCL20 + RSV - F 同時免疫化後に血清において観察された。

【0228】

したがって、改善されたワクチン、粘膜免疫応答を含むそのような応答を誘導する、ならびに免疫原に対して、特に病原体および粘膜組織を介して宿主に侵入する他の作用物質に関連するものに対して個体を予防的および / または治療的に免疫化する改善された方法が、提供される。例えば感染体は、一般に、口腔粘膜、ならびに消化管、嗅と結膜の粘膜を含む気道、乳腺、および尿生殖路の他の粘膜を横断して宿主に侵入する。

【0229】

CCL20 およびその機能性フラグメントをコードする核酸と組み合わせて免疫原をコードする核酸配列を含む組成物が、提供される。組成物は、免疫原と、CCL20 およびその機能性フラグメントの両方をコードする単離核酸分子を含むことができ、ならびに / または CCL20 およびその機能性フラグメントの両方をコードする単離核酸分子と組み合わせて免疫原をコードする単離核酸分子を含む組成物。そのような組成物は、注射用医薬品として提供され得る。

【0230】

組成物は、免疫原に対して個体に免疫応答を誘導する方法であって、そのような組成物を個体に投与することを含む方法に使用され得る。

【0231】

10

20

30

40

50

調節エレメントに機能的に結合している免疫原をコードするヌクレオチド配列、および CCL20 またはその機能性配列をコードするヌクレオチド配列を含む組み換えワクチンが提供され、そのような組み換えワクチンを個体に投与することを含む、免疫原に対して個体に粘膜免疫応答を誘導する方法を含む免疫応答を誘導する方法も提供される。

【0232】

CCL20 またはその機能性フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む生の弱毒化病原体、ならびに生の弱毒化病原体を個体に投与することを含む、病原体に対して個人に粘膜免疫応答を誘導する方法を含む免疫応答を誘導する方法も、提供される。

【0233】

免疫原に対して個体に免疫応答を誘導する方法であって、前記個体に、CCL20 タンパク質またはその機能性フラグメントを、免疫原をコードする単離核酸分子、および / または免疫原をコードする組み換えワクチン、および / または免疫原を含むサブユニットワクチン、および / または生の弱毒化ワクチン、および / または死菌ワクチンと組み合わせて投与することを含む方法。CCL20 タンパク質またはその機能性フラグメントを、免疫原をコードする単離核酸分子、免疫原をコードする組み換えワクチン、免疫原を含むサブユニットワクチン、生の弱毒化ワクチン、および死菌ワクチンの 1 つ以上と組み合わせて含む、組成物。本明細書で使用されるとき、「CCL20 の機能性フラグメント」は、免疫原と一緒に送達される場合、免疫原がそのフラグメントなしで送達される場合に誘導される免疫応答と比較して改変された免疫応答を提供する、iCCL20 タンパク質のフラグメントを指すことが意図される。フラグメントは、一般に 10 個以上のアミノ酸の長さである。幾つかの実施形態において、CCL20 の機能性フラグメントは、特定の全長 CCL20 タンパク質の長さの、20 % 以上、25 % 以上、30 % 以上、35 % 以上、40 % 以上、45 % 以上、50 % 以上、55 % 以上、60 % 以上、65 % 以上、70 % 以上、75 % 以上、80 % 以上、85 % 以上、90 % 以上、91 % 以上、92 % 以上、93 % 以上、94 % 以上、95 % 以上、96 % 以上、97 % 以上、98 % 以上、99 % 以上の割合を含むことができる。

【0234】

免疫原と組み合わせて送達される場合、CCL20 およびその機能性フラグメント、ならびにその組み合わせは、免疫応答を調節する。したがって、これらのタンパク質の組み合わせは、治療的もしくは予防的免疫応答を誘導するために、DNA もしくはタンパク質に基づいたワクチンの成分として、または免疫応答を誘導するのに有用な組成物によって送達され得る。幾つかの実施形態において、免疫原を送達する手段は、DNA ワクチン、組み換えワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、弱毒化ワクチン、または死菌ワクチンである。幾つかの実施形態において、1 つ以上の CCL20 およびその機能性フラグメントを送達する手段は、DNA ワクチン、組み換えワクチン、または弱毒化ワクチンに含まれるコード配列の発現である。

【0235】

免疫応答は、抗原特異的抗体、ならびに / または抗原特異的 T および B 細胞の產生をもたらす。抗体および / または細胞に特異的な抗原は、感染に対して保護する、現存する感染を低減する、または排除する手段を提供する。またこれらを個体から単離することができ、能動免疫化プロトコール、免疫カラム、または試薬のような他の用途に使用することができる。

【0236】

幾つかの実施形態において、CCL20 は、組成物が全身に送達されるプロトコールであっても、粘膜免疫応答、特に、増加して IgG2a 応答および減少した IgG1 応答により特徴付けられる、増加した Th1 応答を誘導するのに有用である。DNA ワクチンまたは他のプラスミド手段のような免疫原と、DNA ワクチンまたは別の種類のワクチンのコード配列の一部のようなこれらのケモカインの 1 つ以上との同時免疫化は、特有のアジュバント特性を提供する。

【0237】

10

20

30

40

50

CCL20タンパク質、およびそれをコードするヌクレオチドは、多くの天然および合成の供給源から得ることができる。タンパク質が使用される幾つかの実施形態において、例えば、当業者は、周知の技術の使用により、例えばタンパク質に特異的に結合する抗体を含有する免疫カラムを使用して、天然供給源からCCL20タンパク質を単離することができる。あるいは、タンパク質は、電気泳動を使用して分離され、電気泳動マトリックスから単離され、例えば透析により精製されて、実質的に純粋なタンパク質を生じることができる。他の周知のタンパク質精製方法を用いて、単離された実質的に純粋なタンパク質を生じることができる。タンパク質が使用される幾つかの実施形態において、例えば、当業者は、周知の技術の使用により、CCL20およびその機能性フラグメントのいずれかをコードするDNA分子を、周知の発現形に使用される市販の発現ベクターに挿入する。天然供給源からタンパク質を単離すること、または組み換え技術によりタンパク質を產生することに加えて、自動ペプチド合成機を用いて、実質的に純粋な単離タンパク質を產生することができる。

10

【0238】

本発明の幾つかの実施形態によると、個体をアレルゲン、病原体、または異常な疾患関連細胞のような免疫原に対して予防的および/または治療的に免疫化する組成物および方法が、提供される。ワクチンは、生の弱毒化ワクチン、細胞ワクチン、組み換えワクチン、または核酸、もしくはDNAワクチンのような任意の種類のワクチンであり得る。免疫原、ならびに1つ以上のCCL20およびその機能性フラグメントをコードする核酸分子を送達することによって、ワクチンにより誘導される免疫応答は調節され得る。

20

【0239】

免疫原およびCCL20を送達する組成物、特に、調節エレメントに機能的に結合している1つ以上のCCL20およびその機能性フラグメントをコードするヌクレオチド配列を、調節エレメントに機能的に結合している免疫原をコードするヌクレオチド配列と組み合わせて含む1つ以上の核酸分子を含むものが、提供される。CCL20および免疫原をコードする核酸配列は、同じ分子または別個の分子のうちの1つであり得る。

20

【0240】

核酸分子は、DNA注入(DNAワクチン接種とも呼ばれる)、組み換えアデノウイルス、組み換えアデノウイルス関連ウイルス、および組み換えワクシニアのような組み換えベクターを含む幾つかの周知の技術のいずれかを使用して送達することができる。幾つかの実施形態において、DNAワクチンは、本明細書に記載されているように構築され、本明細書に記載されている電気穿孔を使用して送達される。本明細書に記載されているRSVワクチンの記載は、例えば、他の免疫原を伴うCCL20の使用に適用することができる。DNAワクチンは、米国特許第5,593,972号、同第5,739,118号、同第5,817,637号、同第5,830,876号、同第5,962,428号、同第5,981,505号、同第5,580,859号、同第5,703,055号、同第5,676,594号、およびこれらに引用されている先行出願に記載されており、これらは参照により完全に組み込まれる。これらの出願に記載されている送達プロトコールに加えて、DNAを送達する代替的な方法が、米国特許第4,945,050号および同第5,036,006号に記載されており、これらは両方とも参考により本明細書に組み込まれる。投与経路には、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、皮内、皮下、静脈内、動脈内、眼球内、および経口、ならびに局所、経皮、吸入もしくは坐剤、または膣、直腸、尿道、頸、および舌下組織の洗浄のような粘膜組織が含まれるが、これらに限定されない。好ましい投与経路には、筋肉内、腹腔内、皮内、および皮下注射が含まれる。幾つかの実施形態において、CCL20またはその機能性フラグメントをコードするヌクレオチド配列は、IgEシグナルペプチドを結合することができる。幾つかの実施形態において、免疫原は、病原体抗原、癌関連抗原、または自己免疫疾患に関連する細胞に結合している抗原である。本発明は、ウイルス、原核生物、ならびに単細胞病原性生物および多細胞寄生虫のような病原性真核生物、のような全ての病原体に対して個体を免疫化するために使用することができる。本発明は、細胞を感染し、かつウイルスのように被包性ではなく、淋菌、リステ

30

40

50

リア、およびシゲラのような原核生物ではないこれらの病原体に対して個体を免疫化するために特に有用である。加えて、本発明は、細胞内病原体である生活環の段階を含む原生動物病原体に対して個体を免疫化するためにも有用である。そのような病原体の例には以下が挙げられる。レトロウイルスのようなピコルナウイルス科属（感冒の50%の症例の原因）、エーテロウイルス（ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、およびA型肝炎ウイルスのようなヒトエンテロウイルスを含む）、ならびにアフトウイルス（獣医学、標的に抗原は、VP1、VP2、VP3、VP4、VPGを含む）。カルシウイルス科属のウイルスは、ウイルスのノーウォーク群（流行性胃腸炎の原因作用物質）が含まれる。トガウイルス科属のウイルスにはアルファウイルスが含まれる（例には、センリスウイルス、ロスリバーウイルス、および東部&西部ウマ脳炎が含まれる）。レオウイルスには、風疹ウイルスが含まれる。フラリビリドウ工科の例には、デング熱、黄熱、日本脳炎、セントルイス脳炎、およびダニ媒介脳炎ウイルスが含まれる。西ナイルウイルス（Genbank NC001563、AF533540、AF404757、AF404756、AF404755、AF404754、AF404753、AF481864、M12294、AF317203、AF196835、AF260969、AF260968、AF260967、AF206518、およびAF202541）。代表的な標的抗原：E NS5C。C型肝炎ウイルス。コロナウイルス科には、感染性気管支炎ウイルス、ブタ伝染性胃腸ウイルス、ブタ血球凝集性脳脊髄炎ウイルス、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス、ネコ腸コロナウイルス、イヌコロナウイルス、SARS関連コロナウイルス、感冒の約40症例の原因であるヒト呼吸器コロナウイルスが含まれる。EX. 224E、OC43。標的抗原：Mとも呼ばれるE1、またはSとも呼ばれるマトリックスタンパク質E2、またはB Eとも呼ばれるスパイクタンパク質E3、またはヘマグルチン、エルテロース糖タンパク質N、ヌクレオカプシド。ラブドウイルス科属には、狂犬病のようなベシリオウイルス、リッサウイルスが含まれる。標的抗原：Gタンパク質、Nタンパク質。フィロウイルス科には、（医療用）マープルグおよびエボラウイルスのような出血熱ウイルスが含まれる。パラミクソウイルス属には、流行性耳下腺炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルスのような科のパラミクソウイルス、風疹、イヌジステンバーのようなモルビリウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、オルソミクソウイルスのようなニューミンウイルスが含まれる。インフルエンザウイルス科には、ブニガウイルス、カリフォルニア脳炎、ラクロスウイルスのようなブニガウイルス科属、リフトバレー熱のようなフレボウイルス、ブレマラ、ヘマハジン熱ウイルス、ナイルウイルス、非指定ブニガウイルスのアレナウイルス科LCM、およびラッシ熱ウイルスのようなハンタウイルスが含まれる。レオウイルス科属には、レオウイルス、ロタウイルス、コロラドダニ熱、レボンボ、ウマ脳症、ブルータングのようなオルビウイルスが含まれる。レトロウイルス科亜科には、白血病ウイルス、HTLV1、およびHTLVIIのようなオンコリウイルス亜科、HIV、ネコ免疫不全ウイルス、および貧血ウイルスのようなレンチウイルス亜科が含まれる。スプマウイルス亜科バボバウイルス科亜科には、BKUおよびJCUウイルス、亜科バピローマウイルスのようなポリオ-マウイルスが含まれる。EX AD7、ARD、OB、275のようなアデノウイルス。バルボウイルス科には、ネコバルボウイルス、ネコパンロイコペニアウイルス、イヌバルボウイルス、ブタバルボウイルスが含まれる。ヘルペスウイルス科亜科には、アルファ属シンプレックスウイルスヘルペスウイルス科HSV I (Genbank X14112、NC001806)、HSV II (NC001798)、バリセロビニス、偽狂犬病、水痘帯状疱疹が含まれる。亜科ベータには、ヘルペスウイルス亜科HC MVのようなサイトメガロウイルス属が含まれる。ムロメガロウイルス亜科には、リンホクリプトウイルス属ガンマEBV (バーキットリンホ)、ヘルペスウイルス亜科が含まれる。ラジノウイルスポックスウイルス科亜科属痘瘡には、（天然痘）コードポックスウイルス亜科ワクシニア（ウシ痘）（バラポキシウイルス）、アウイポックスウイルス（Aujeszky virus）、カブリポックスウイルス、レポリポックスウイルスが含まれる。スイポックスウイルス亜科には、エンテモポックスウイルス亜科ヘバドナウイルス、B型肝炎ウイルス科非分類肝炎デルタウイルスが含まれる。細菌性病原体には、肺炎球菌、ブ

10

20

30

40

50

ドウ球菌、および連鎖球菌のような病原性グラム陽性球菌が含まれる。病原性グラム陽性球菌には、髄膜炎菌および淋菌が含まれる。病原性腸内グラム陽性桿菌には、腸内細菌科；シュードモナス、アシネットバクテリア、およびエイケネラ、類鼻疽；サーノネラ；細菌性赤痢；ヘモフィルス；軟性下疳；ブルセラ症；野兎病；エルシニア（パストレラ）；ストレプトバチルス・モルチリホルミス、およびスピリルム；リステリア・モノサイトゲネス；ブタ丹毒菌；ジフテリア、コレラ、炭疽；鼠径リンパ肉芽腫症（鼠径肉芽腫）；ならびにバルトネラ症が含まれる。病原性嫌気性細菌には、テタヌス、ポツリヌス、他のクロストリジウム、結核、ハンセン病、および他のマイコバクテリアが含まれる。病原性スピロヘータ症には、梅毒；トレポネーマ症；イチゴ種および地方病性梅毒；ならびにレプトスピラ症が含まれる。高等な病原性細菌および病原性真菌により引き起こされる他の感染には、放線菌症；ノカルジア症；クリプトコッカス症、プラストミセス症、ヒストプラズマ症、およびコクシジオイデス症；カンジダ症、アスペルギルス症、およびムコール症；スポロトリクム症；パラコクシジオドミコーシス、ペトリエリジオーシス、トルロブシス症、菌腫、および黒色真菌症；ならびに皮膚糸状菌症が含まれる。リケッチャ感染には、リケッチャおよびリケッチャ症が含まれる。マイコプラズマおよびクラルニジア感染の例には、マイコプラズマニューロノニア、鼠径リンパ肉芽腫症、オウム病、および周産期クラミジア感染症が含まれる。感染性真核生物、感染性原生動物、および蠕虫、ならびにこれらによる感染には、アメーバ症、マラリア、リーシュマニア症、トリパノソーマ症、トキソプラズマ症、ニューロノシスチス・カリニ、バベシア症、ジアルジア症、旋毛虫症、フィラリア症、住血吸虫症、線形動物、吸虫類または吸虫、および条虫類（条虫）感染が含まれる。病原性抗原に表示されたエピトープと少なくとも同一または実施的に類似しているエピトープを含むペプチドをコードするDNA配列を含むDNA構築物のようなワクチンを、作製することができる。幾つかの実施形態において、病原体に対して個体を免疫化する方法は、RSV、HIV、HSV、HCV、WNV、またはHBVに対して直接向けられる。

【0241】

過剰繁殖細胞に対して保護免疫応答を付与する方法は、過剰繁殖性疾患において特徴的である免疫原タンパク質として利用する。これらは、過剰繁殖性疾患に罹患している個体を治療するワクチン、および方法において有用である。過剰繁殖性疾患の例には、全形態の癌および乾癬が含まれる。過剰繁殖性疾患に対する標的タンパク質の例には、mb y、myc、fy nのような腫瘍遺伝子、ならびにbc r / ab l、ras、src、P53、neu、tr k、およびEGFRのような転座遺伝子によりコードされるタンパク質が含まれる。標的抗原としての腫瘍遺伝子の產生に加えて、抗癌治療および保護レジメンのための標的タンパク質は、B細胞リンパ腫により作製される抗体の可変領域、およびT細胞リンパ腫にT細胞受容体の可変領域を含み、幾つかの実施形態では、自己免疫疾患のための標的抗原も使用される。モノクローナル抗体17-I Aにより認識されるタンパク質、および葉酸結合タンパク質、またはPSAを含む、腫瘍細胞に高いレベルで見いだされるタンパク質のような他の腫瘍関連タンパク質が、標的タンパク質として使用され得る。

「自己」指向性抗体を生じる細胞受容体および細胞を含む自己免疫性と関連する標的に対して広範囲な保護免疫応答を付与することにより、自己免疫性疾患および症状を罹患する個体を治療する方法も、提供される。T細胞仲介自己免疫性疾患には、関節リウマチ（RA）、多発性硬化症（MS）、シェーグレン症候群、サルコイドーシス、インスリン依存性真性糖尿病（1DDM）、自己免疫性甲状腺炎、反応性関節炎、強直性脊椎炎、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、乾癬、血管炎、ウェグナー肉芽腫症、クローン病、および潰瘍性大腸炎が含まれる。これらの疾患のそれぞれは、内在性抗原に結合し、かつ自己免疫性疾患に関連する炎症性カスケードを開始するT細胞受容体によって特徴付けられる。T細胞の可変領域に対するワクチン接種は、これらのT細胞を排除するCTLを含む免疫応答を誘発するであろう。RAでは、疾患に関与するT細胞受容体（TCR）の幾つかの特異的な可変領域が特徴決定されている。これらのTCRには、V - 3、V - 14, 20、V - 17、およびV - 17が含まれる。したがって、これらのタンパク質の少な

10

20

30

40

50

くとも 1 つをコードする D N A 構築物によるワクチン接種は、 R A に関する T 細胞を標的にする免疫応答を誘発する。それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、 Howel l , M . D . , et al . , 1991 Proc . Nat . Acad . Sci . U S A 88 : 10921 - 10925 、 Pilliard , X . , et al , 1991 Sc ience 253 : 325 - 329 、 Williams , W . V . , et al . , 1992 J Clin . Invest . 90 : 326 - 333 を参考のこと。 M S では、疾患に関する T C R の幾つかの特異的な可変領域が特徴決定されている。これらの T C R には、 V f P および V - 10 が含まれる。したがって、これらのタンパク質の少なくとも 1 つをコードする D N A 構築物によるワクチン接種は、 M S に関する T 細胞を標的にする免疫応答を誘発する。それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、 Wucherpfennig , K . W . , et al . , 1990 Sc ience 248 : 1016 - 1019 、 Oksenberg , J . R . , et al , 1990 Nature 345 : 344 - 346 を参考のこと。強皮症では、疾患に関する T C R の幾つかの特異的な可変領域が特徴決定されている。これらの T C R には、 V - 6 、 V - g 、 V - 14 、ならびに V - 16 、 V - 3C 、 V - 7 、 V - 14 、 V - 15 、 V - 16 、 V - 28 、および V - 12 が含まれる。したがって、これらのタンパク質の少なくとも 1 つをコードする D N A 構築物によるワクチン接種は、強皮症に関する T 細胞を標的にする免疫応答を誘発する。 T 細胞仲介自己免疫性疾患に罹患している患者を治療するため、特に、 T C R の可変領域がまだ特徴決定されていない患者には、滑膜生検を実施することができる。 T 細胞が存在する試料を採取し、これらの T C R の可変領域を標準的な技術の使用により特定することができる。遺伝子ワクチンを、この情報を使用して調製することができる。 B 細胞仲介自己免疫性疾患には、ループス (S L E) 、グレーブス病、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、喘息、クリオグロブリン血症、原発硬化性胆管炎、および悪性貧血が含まれる。これらの疾患のそれぞれは、内在性抗原に結合し、かつ自己免疫性疾患に関連する炎症性カスケードを開始する抗体によって特徴付けられる。抗体の可変領域に対するワクチン接種は、抗体を産生するこれらの B 細胞を排除する C T L を含む免疫応答を誘発する。

【 0242 】

B 細胞仲介自己免疫性疾患を罹患している患者を治療するため、自己免疫性活性に関与している抗体の可変領域を特定しなければならない。生検を実施することができ、抗体が存在する炎症部位の試料を採取することができる。これらの抗体の可変領域を、標準的な技術を使用して特定することができる。遺伝子ワクチンは、この情報を使用して調製することができる。 S L E の場合では、 1 つの抗原は D N A であると考えられる。したがって、 S L E に対して免疫化された患者では、血清を抗 D N A 抗体についてスクリーンすることができ、血清において見いだされたそのような抗 D N A 抗体の可変領域をコードする D N A 構築物を含むワクチンを、調製することができる。 T C R および抗体の両方の可変領域における共通の構造的特徴は、良く知られている。特定の T C R または抗体をコードする D N A 配列は、一般に、 Kabat , et al 1987 Sequence of Proteins of Immunological Interest U . S . Department of Health and Human Services , Bethesda Md . に記載されているもののような、周知の方法に従って見いだすことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。加えて、抗体の機能性可変領域をクローニングする一般的な方法は、 Chaudhary , V . K . , et al , 1990 Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 87 : 1066 において見いだすことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【 0243 】

D N A ワクチンを改善するために C C L 20 タンパク質コード配列の発現可能形態を使用することに加えて、 C C L 20 タンパク質もしくはその機能性フラグメント、および / または C C L 20 もしくはその機能性フラグメントをコードするコード配列を含む、改善された弱毒化生ワクチン、改善された死菌ワクチン、および抗原とサブユニットをコード

10

20

30

40

50

する改善されたワクチン、ならびに糖タンパク質ワクチンが、提供される。弱毒化生ワクチン、外来抗原を送達する組換えベクターを使用するもの、サブユニットワクチン、および糖ワクチンの例は、米国特許第4,510,245号、同第4,797,368号、同第4,722,848号、同第4,790,987号、同第4,920,209号、同第5,017,487号、同第5,077,044号、同第5,110,587号、同第5,112,749号、同第5,174,993号、同第5,223,424号、同第5,225,336号、同第5,240,703号、同第5,242,829号、同第5,294,441号、同第5,294,548号、同第5,310,668号、同第5,387,744号、同第5,389,368号、同第5,424,065号、同第5,451,499号、同第5,453,364号、同第5,462,734号、同第5,470,734号、同第5,474,935号、同第5,482,713号、同第5,591,439号、同第5,643,579号、同第5,650,309号、同第5,698,202号、同第5,955,088号、同第6,034,298号、同第6,042,836号、同第6,156,319号、および同第6,589,529号に記載されており、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【0244】

実施例8

R S V 免疫原 F、G (A)、および G (B) のコンセンサス配列を使用して、中和免疫応答を得るために基礎を提供する。そのような利点は、コンセンサス R S V DNA ワクチンをさらに有益にし、過去に提案された任意の他の手法より潜在的に効果的にする。

【0245】

主な R S V タンパク質である融合体 (F)、糖タンパク質 (G a)、および糖タンパク脂質 (G a) を、新たな R S V ワクチンの標的として選択した。上で記述されたように、F および G タンパク質は、表面に発現し、中和抗体の理想的な標的である。コンセンサス R S V - F をコードおよび発現する配列を有するプラスミド、コンセンサス R S V - G (A) をコードおよび発現する配列を有するプラスミド、ならびに R S V - G (B) をコードおよび発現する配列を有するプラスミドを含む、DNA カクテルワクチンを調製した。個別のプラスミドとカクテルを試験に使用した。カクテルワクチンをウサギおよび非ヒト靈長類の試験に使用し、これらの試験の結果は、高レベルの中和免疫応答が誘導されることを示し、カクテルワクチンを、R S V 感染に対して保護することに特に価値がある予防および治療用途の両方に使用できることを唆している。

【0246】

図 22 A、図 22 B、および図 22 C に示されているように R S V - F、R S V - G (A)、および R S V - G (B) それぞれの単一の挿入プラスミドを、p V A X ベクターを使用して構築した。それぞれのプラスミドのコンセンサス配列を、p V A X ベクターの B a m H i と X h o I 部位の間にクローンした。得られたプラスミドは、4812 塩基対を有するプラスミドを産生するために p V A X にクローンされたコンセンサス R S V - F をコードする 1813 塩基対挿入物を含む p R S V - F、3944 塩基対を有するプラスミドを産生するために p V A X にクローンされたコンセンサス R S V - G (A) をコードする 945 塩基対挿入物を含む p R S V - G (A)、3929 塩基対を有するプラスミドを産生するために p V A X にクローンされたコンセンサス R S V - G (B) をコードする 930 塩基対挿入物を含む p R S V - G (B) であった。

【0247】

R S V - F、R S V - G (A)、および R S V - G (B) 構築物の発現を確認するため、R D 細胞を p R S V - F、p R S V - G (A)、および p R S V - G (B) によりそれぞれ形質移入した。免疫蛍光評価を、プールした免疫化ウサギ血清を使用して実施した。R S V 免疫原は、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) と化学的に結合させた抗 R S V 免疫原抗体を結合させることによって可視化した。D A P I を核対比染色として使用した。図 23 の結果は、p V A X により形質移入された R D 細胞が、F I T C 標識抗 R S V 免疫原抗体による免疫染色を示さなかったことを示す。

10

20

30

40

50

【0248】

R S V - F 投与量試験を、マウスを使用して行った。免疫化スケジュールを図24に示す。5群のマウスを使用した。第1の群は、p V A Xを注射した対照であった。第2の群には、5 μgのp R S V - F 構築物を注射した。第3の群には、15 μgのp R S V - F 構築物を注射した。第4の群には、30 μgのp R S V - F 構築物を注射した。第5の群には、60 μgのp R S V - F 構築物を注射した動物を、電気穿孔の使用により、0週目に第1の免疫化、2週目に第2の免疫化、および4週目に第3の免疫化の合計3回免疫化した。2週目に第1の収集、4週目に第2の収集、6週目に第3の収集、および12週目に第4の収集の合計4回、血清を収集し、I g Gを測定した。動物を12週目に殺処分し、脾臓を採取し、I F N - をE L I S P O Tにより測定した。

10

【0249】

図25は、血清中の総R S V - F I g Gと比較したR S V - F 投与量のデータを示す。第1の免疫化後、第2の免疫化後、および第3の免疫化後に収集された血清からのデータを示す。抗R S V - F I g Gを、10, 100, 1, 000、および10, 000の血清希釈の逆数で測定した。データは、p V A Xが、いかなる免疫化後にも抗体を誘導しなかったことを示す。データは、p R S V - F 構築物が、第1の免疫化後に抗体を誘導しなかったことを示す。データは、p R S V - F 構築物が、第2および第3の免疫化後に抗体を誘導したことを示す。

【0250】

図26は、最後の免疫化のおよそ8週間後のR S V - F ワクチン接種により誘導されたI F N - と比較した、R S V - F 投与量のデータを示す。データは、p V A Xおよび15 μgの平均用量のp R S V - F 構築物を注射した動物によるI F N - 産生(S F U / 106脾細胞)の比較を示す。

20

【0251】

R S V - F 偽中和試験を、マウスを使用して行った。免疫化スケジュールを図27に示す。マウスには、15 μgのp R S V - F 構築物で免疫化した。動物を、電気穿孔の使用により、0週目に第1の免疫化、2週目に第2の免疫化、および4週目に第3の免疫化の合計3回免疫化した。5週目に血清を収集し、中和アッセイを実施した。

【0252】

R S V - F 偽中和試験のデータを図28に示す。T Z M - b 1 H e L a 細胞におけるR S V - F 偽中和活性を定量化した。データは、H I V - L u c / R S V - F 偽ウイルスが標的細胞に侵入し、標的細胞を感染することを遮断できる、D N Aワクチン接種動物からのR S V - F 免疫化血清試料における、ルシフェラーゼアッセイを使用したR S V - F の中和能力の比較。力価は、ウイルスの50%阻害を生じる血清の希釈度の逆数として定義される。正常なマウス血清(N M S)において遮断活性の不在下でH I V - 1 L u c / R S V - F の感染性を中和および遮断する、ワクチン接種されたマウスからの血清試料の能力に注目すること。

30

【0253】

図29に示されているように、2つの比較を、p R S V - F (R S V - F 2 およびR S V - F 5)をワクチン接種した2匹の動物からの血清と、p V A Xワクチン接種動物からの血清とを使用して、H e L a 細胞におけるR S V - F 偽ウイルスによるアポトーシス細胞死活性の阻害を決定するために行った。それぞれの比較では、血清を1:1、1:10、1:100、および1:1000に希釈した。百分率で表した細胞死のレベルを決定し、p R S V - F をワクチン接種した動物の血清は、血清の存在下でR S V - F 偽ウイルスに曝露されたH e L a 細胞のアポトーシス細胞死を阻害したことを示した。

40

【0254】

R S V - G (A) およびR S V - G (B) 投与量試験を、マウスを使用して行った。免疫化スケジュールを図30に示す。6つの群のマウスを使用した。第1の群は、p V A Xを注射した対照であった。第2の群には、1 μgのp R S V - G (A) またはp R S V - G (B) 構築物を注射した。第3の群には、5 μgのp R S V - G (A) またはp R S V

50

- G (B) 構築物を注射した。第4の群には、 $10\text{ }\mu\text{g}$ の pRSV-G (A) または pRSV-G (B) 構築物を注射した。第5の群には、 $20\text{ }\mu\text{g}$ の pRSV-G (A) または pRSV-G (B) 構築物を注射した。第6の群には、 $40\text{ }\mu\text{g}$ の pRSV-G (A) または pRSV-G (B) 構築物を注射した。動物を、電気穿孔の使用により、0週目に第1の免疫化、2週目に第2の免疫化、および4週目に第3の免疫化の合計3回免疫化した。4週目に第1の収集および6週目に第2の収集の合計2回、血清を収集し、IgG を測定した。

【0255】

図31は、RSV (A) または RSV-G (B) 投与量試験における RSV-G (A) DNA 免疫化後の血清における IgG のデータを示す。血清中の総抗 RSV-G (A) IgG を、投与量試験において測定した。図31に x 軸に記載されているように、様々な用量で収集された血清のデータを示す。抗 RSV-G (A) IgG を、1 : 100 の血清希釈で測定した。

10

【0256】

図32は、RSV (A) または RSV-G (B) 投与量試験における RSV-G (B) DNA 免疫化後の血清における IgG のデータを示す。血清中の総抗 RSV-G (B) IgG を、投与量試験において測定した。図31に x 軸に記載されているように、様々な用量で収集された血清のデータを示す。抗 RSV-G (B) IgG を、1 : 100 の血清希釈で測定した。

20

【0257】

図33は、マウス試験において単一ワクチンを使用した RSV 予備中和試験の結果のまとめを示すチャートである。免疫化の3日後に収集された血清の中和力値を測定した。陰性血清を陰性対照として使用した。陽性対照には、抗 RSV モノクローナル抗体および抗 RSV ポリクローナル抗体が含まれた。中和力値を、対照において、ならびに pRSV-F をワクチン接種した2匹のマウス、pRSV-G (A) をワクチン接種した2匹のマウス、および pRSV-G (B) をワクチン接種した1匹のマウスからの血清において測定した。

20

【0258】

RSV ウサギ試験を設計し、実施した。RSV ウサギ試験設計を図34に示す。4匹の雌ニュージーランド白色 (NZW) ウサギを、pRSV-F、pRSV-G (A)、および pRSV-G (B) を含有するカクテルで免疫化した。それぞれの動物は、 $200\text{ }\mu\text{g}$ / プラスミドを最終 $100\text{ }\mu\text{l}$ 体積で受けた動物を、筋肉内 / 電気穿孔免疫化を使用して、合計4回免疫化した。第1の免疫化を0週目に行い、第2の免疫化を3週目に行い、第3の免疫化を6週目に行い、第4を9週目に行った。血液を、第2週（前出血、第1の免疫化の2週間前）、0週目（第1の免疫化前の前出血）、2週目、5週目、8週目、および13週目の6回、動物から収集した。血液を、ELISA およびウイルス中和アッセイを使用して分析した。

30

【0259】

ウサギ試験のデータを図35に示す。RSV-Fに対する液性応答を測定した。第2週および0週目に採取した前出血試料から、ならびに2週目、5週目、8週目、および13週目に採取した試料からの抗 RSV-F IgG。2週目には、試料が収集された動物を1回免疫化し、試料を免疫化の2週間後に収集した。5週目には、試料が収集された動物を2回免疫化し、試料を第2の免疫化の2週間後に収集した。8週目には、試料が収集された動物を3回免疫化し、試料を第3の免疫化の2週間後に収集した。13週目には、試料が収集された動物を4回免疫化し、試料を第4の免疫化の4週間後に収集した。

40

【0260】

ウサギ試験のデータを図36に示す。RSV-Gに対する液性応答を測定した。第2週および0週目に採取した前出血試料から、ならびに2週目、5週目、8週目、および13週目に採取した試料からの抗 RSV-G IgG。2週目には、試料が収集された動物を1回免疫化し、試料を免疫化の2週間後に収集した。5週目には、試料が収集された動物

50

を2回免疫化し、試料を第2の免疫化の2週間後に収集した。8週目には、試料が収集された動物を3回免疫化し、試料を第3の免疫化の2週間後に収集した。13週目には、試料が収集された動物を4回免疫化し、試料を第4の免疫化の4週間後に収集した。

【0261】

R S V 非ヒト靈長類試験を実施した。試験の目的は、非ヒト靈長類（N H P）にカクテルとして投与された単一挿入物 p D N A R S V ワクチンの液性免疫原性を評価することであった。また、試験は、ワクチンの複数部位送達、電気穿孔方法、およびアジュバントによる送達のような要因が液性応答の範囲を増加するかを評価および決定するために使用した。実験は、R S V - F、R S V - G (A)、およびR S V - G (B)に対して合成D N A ワクチンが高い力値の抗R S V 抗体を刺激するかを決定するため、R S V カクテルでワクチン接種した動物における特異的免疫応答を分析するため、ならびに生成された免疫応答に対するアジュバントおよび／または複数部位送達の効果を評価するために実施した。R S V 非ヒト靈長類試験設計を図37に示す。使用した非ヒト靈長類は、アカゲザルであった。試験では、15匹のアカゲザルを4群に分け、3群はそれぞれ4匹の動物を含有し、1群は3匹の動物を含有した。n = 4 の群は処理群であり、すなわち、これらをワクチン接種した。n = 3 の群は未処理群であり、対照として機能した。群を以下のように治療した。

10

群1 (n = 4) : それぞれの動物には、1 m g のR S V - F、1 m g のR S V - G (A)、1 m g のR S V - G (B)を混合し、1つの部位にI Mで送達するカクテルを投与した。

20

群2 (n = 4) : それぞれの動物には、1 m g のR S V - F、1 m g のR S V - G (A)、1 m g のR S V - G (B)、1 m g のr h M E Cを混合し、1つの部位にI Mで送達するカクテルを投与した。

群3 (n = 4) : それぞれの動物には、1 m g のR S V - F、1 m g のR S V - G (A)、1 m g のR S V - G (B)を1混じし、3つの部位にI Dで送達するカクテルを投与した。

群4 (n = 3) : それぞれの動物は、未処理であった。

30

動物を、電気穿孔免疫化を使用して合計3回免疫化した。第1の免疫化を1週目に行い、第2の免疫化を5週目に行い、第3の免疫化を13週目に行った。血液を、0週目（第1の免疫化前の前出血）、3週目、7週目、15週目、17週目、および18週目の6回、動物から収集した。血液を、E L I S A およびウイルス中和アッセイを使用して分析した。

30

【0262】

図38A～38Dは、R S V - Fに対して測定された液性免疫のR S V 非ヒト靈長類試験のデータを示す。図38Aは、未処置動物においてR S V - Fに対して測定された液性免疫のデータを示す。図38Bは、1つの部位にカクテルワクチンI Mを受けた動物においてR S V - Fに対して測定された液性免疫のデータを示す。図38Cは、1つの部位にカクテルワクチン+r h M E C構築物I Mを受けた動物においてR S V - Fに対して測定された液性免疫のデータを示す。図38Dは、1つの部位にカクテルワクチンI Dを受けた動物においてR S V - Fに対して測定された液性免疫のデータを示す。0週目に採取した前出血試料から、ならびに3週目、15週目、および18週目に採取した試料からの抗R S V - F IgG。3週目には、試料が収集された動物を1回免疫化し、試料を免疫化の2週間後に収集した。15週目には、試料が収集された動物を3回免疫化し、試料を第3の免疫化の2週間後に収集した。18週目には、試料が収集された動物を3回免疫化し、試料を第3の免疫化の5週間後に収集した。

40

【0263】

図39A～39Dは、R S V - Gに対して測定された液性免疫のR S V 非ヒト靈長類試験のデータを示す。図39Aは、未処置動物においてR S V - Gに対して測定された液性免疫のデータを示す。図39Bは、1つの部位にカクテルワクチンI Mを受けた動物にお

50

いて R S V - G に対して測定された液性免疫のデータを示す。図 3 9 C は、1つの部位にカクテルワクチン + r h M E C 構築物 I M を受けた動物において R S V - G に対して測定された液性免疫のデータを示す。図 3 9 D は、1つの部位にカクテルワクチン I D を受けた動物において R S V - G に対して測定された液性免疫のデータを示す。0週目に採取した前出血試料から、ならびに3週目、15週目、および18週目に採取した試料からの抗 R S V - G IgG。3週目には、試料が収集された動物を1回免疫化し、試料を免疫化の2週間後に収集した。15週目には、試料が収集された動物を3回免疫化し、試料を第3の免疫化の2週間後に収集した。18週目には、試料が収集された動物を3回免疫化し、試料を第3の免疫化の5週間後に収集した。

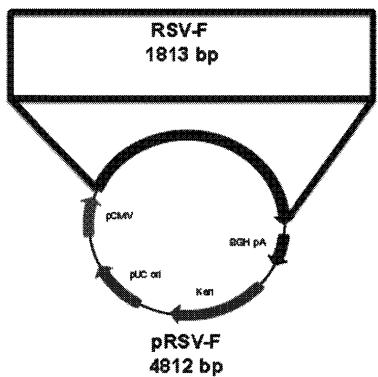
【0264】

10

図 4 0 は、ウサギ比ヒト靈長類試験においてワクチンカクテルを使用した R S V 予備中和試験の結果のまとめを示すチャートである。免疫化の3日後に収集された血清の中和力価を測定した。陰性血清を陰性対照として使用した。陽性対照には、抗 R S V モノクローナル抗体および抗 R S V ポリクローナル抗体が含まれた。中和力価を、対照において、ならびにカクテルワクチンでワクチン接種した2匹のウサギ、およびカクテルワクチンでワクチン接種した2匹の非ヒト靈長類からの血清において測定した。前出血したものからのデータは、ウサギおよび非ヒト靈長類における中和力価が、ワクチン接種後に生成されたことを示す。

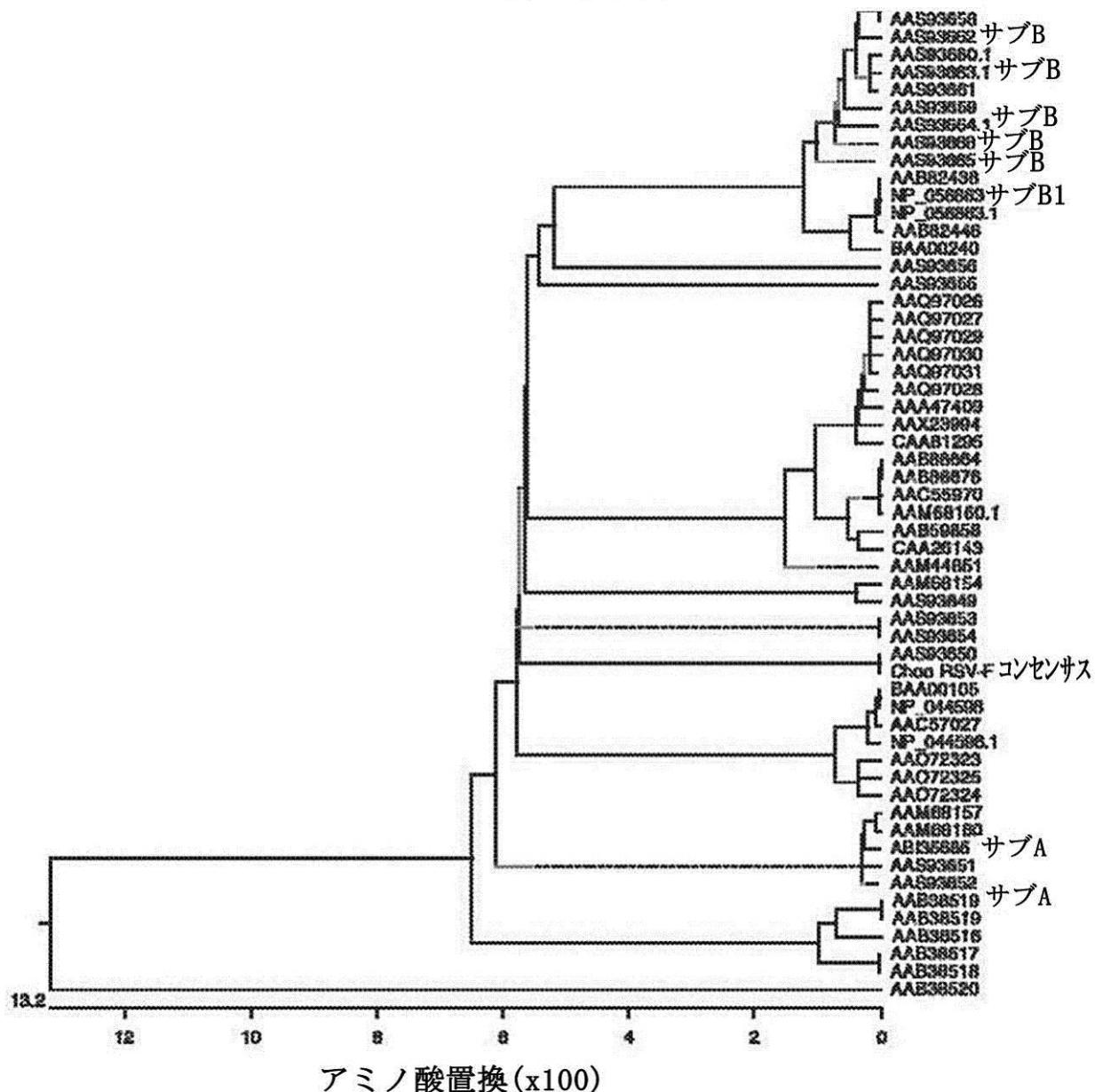
【図 22A】

Figure 22A



【 図 1 】

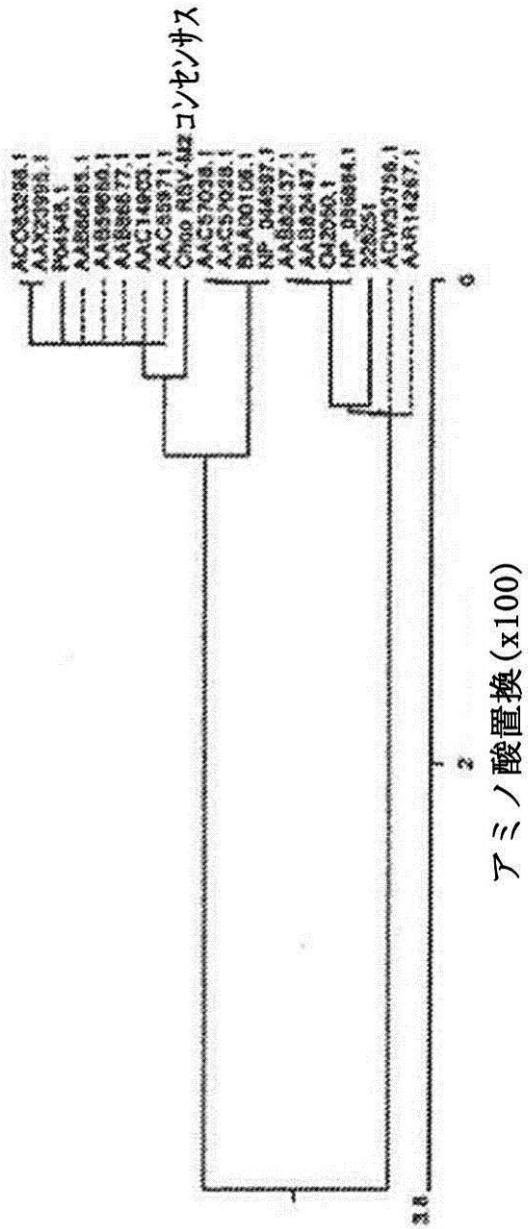
図1 RSV-Fタンパク質の系統樹



【図2】

RSV-M2 タンパク質の系統樹

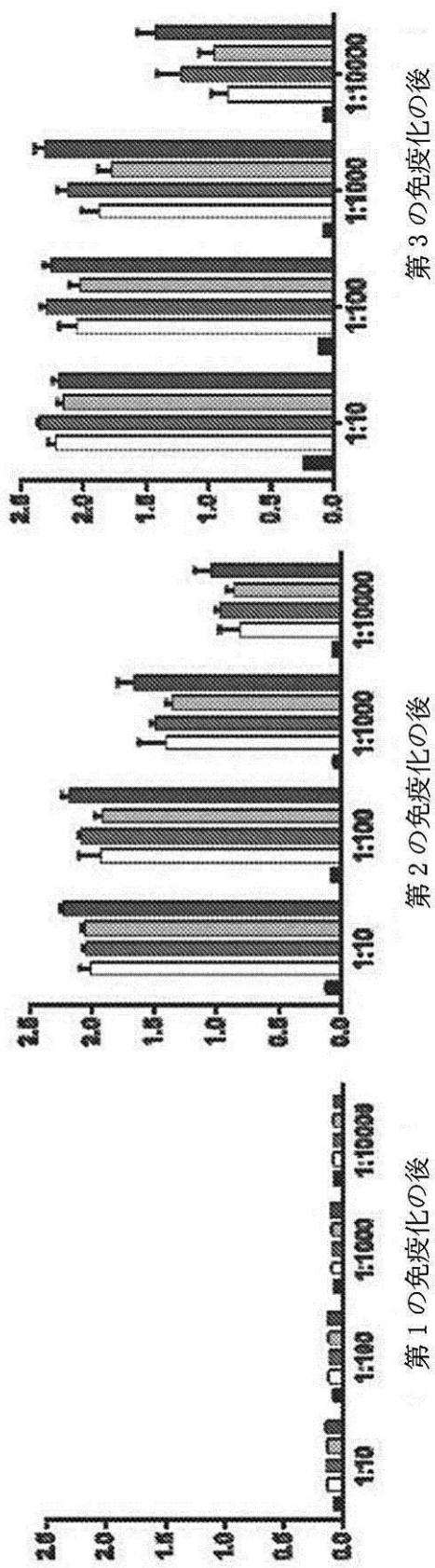
図2



【図3】

血清中の総抗 RSV-F タンパク質 IgG の比較

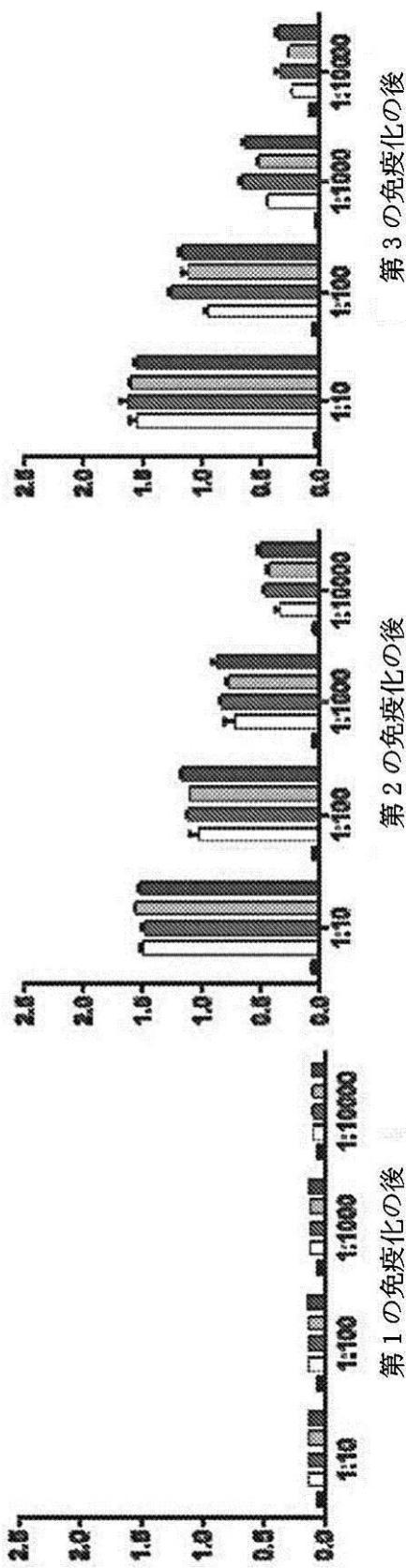
図3



【図4】

血清中の総抗RSV-Fタンパク質IgAの比較

図4



第1の免疫化の後
第2の免疫化の後
第3の免疫化の後

【図5】

最後の免疫化のはよそ 8 週間後での異なる投与量の RSV-F ワクチンの IFN- γ 產生の比較

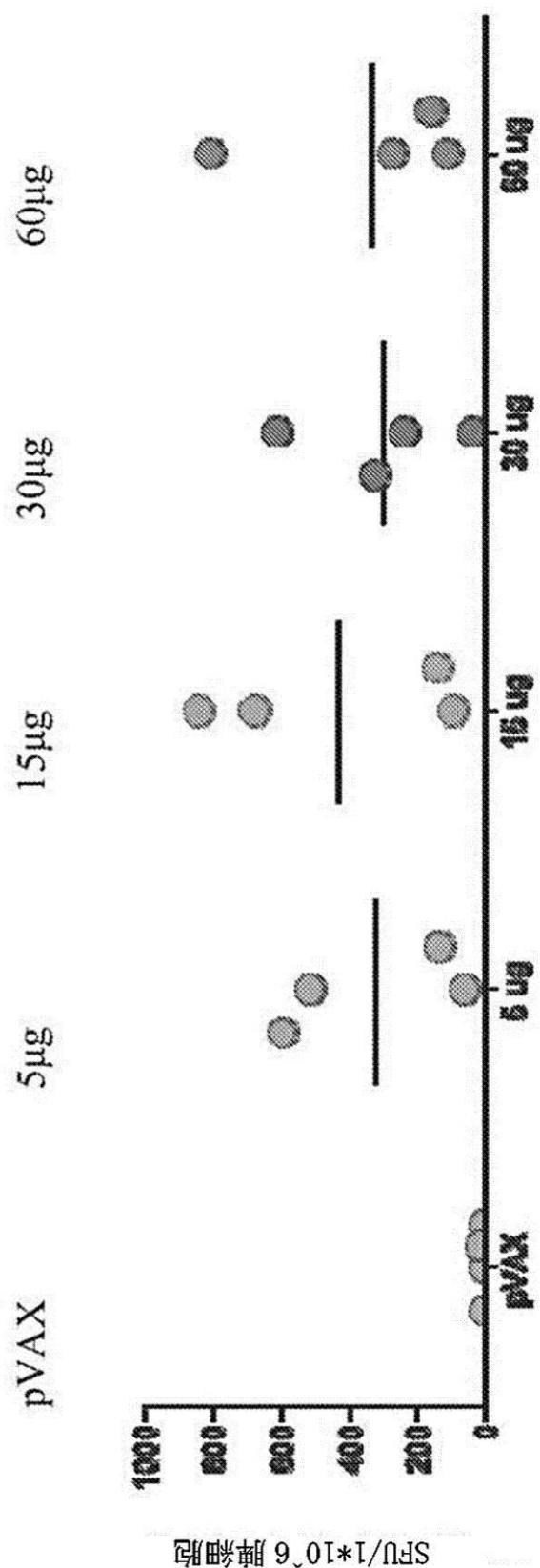


図5

【図6】

RSF-F+/-ケモカイン免疫化後の脾臓におけるIFN- γ +CD8またはCD4 T細胞の比較

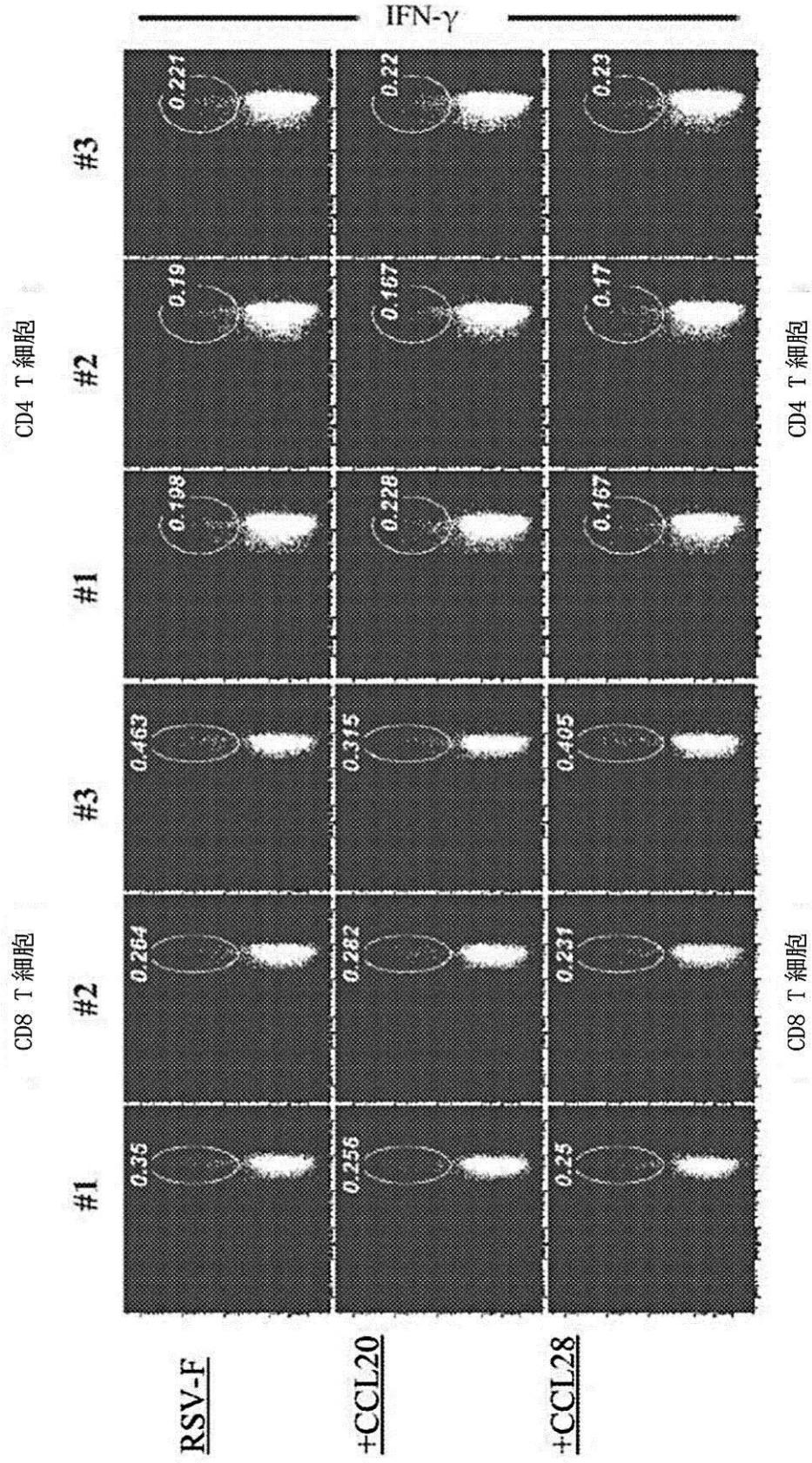


図6

【図 7】

RSF-F+/-ケモカイン免疫化後の肺における IFN- γ +CD8 または CD4 T 細胞の比較

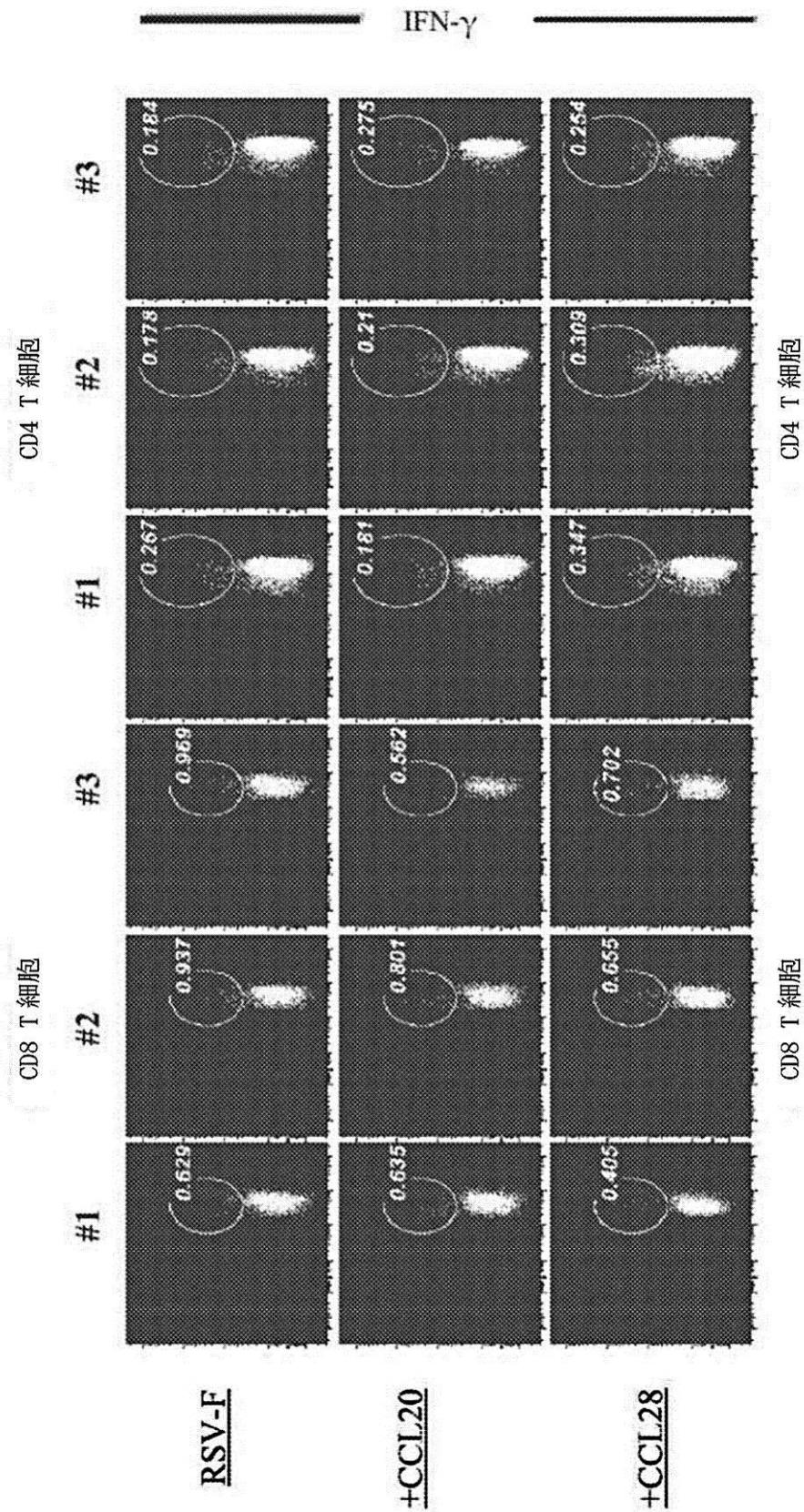
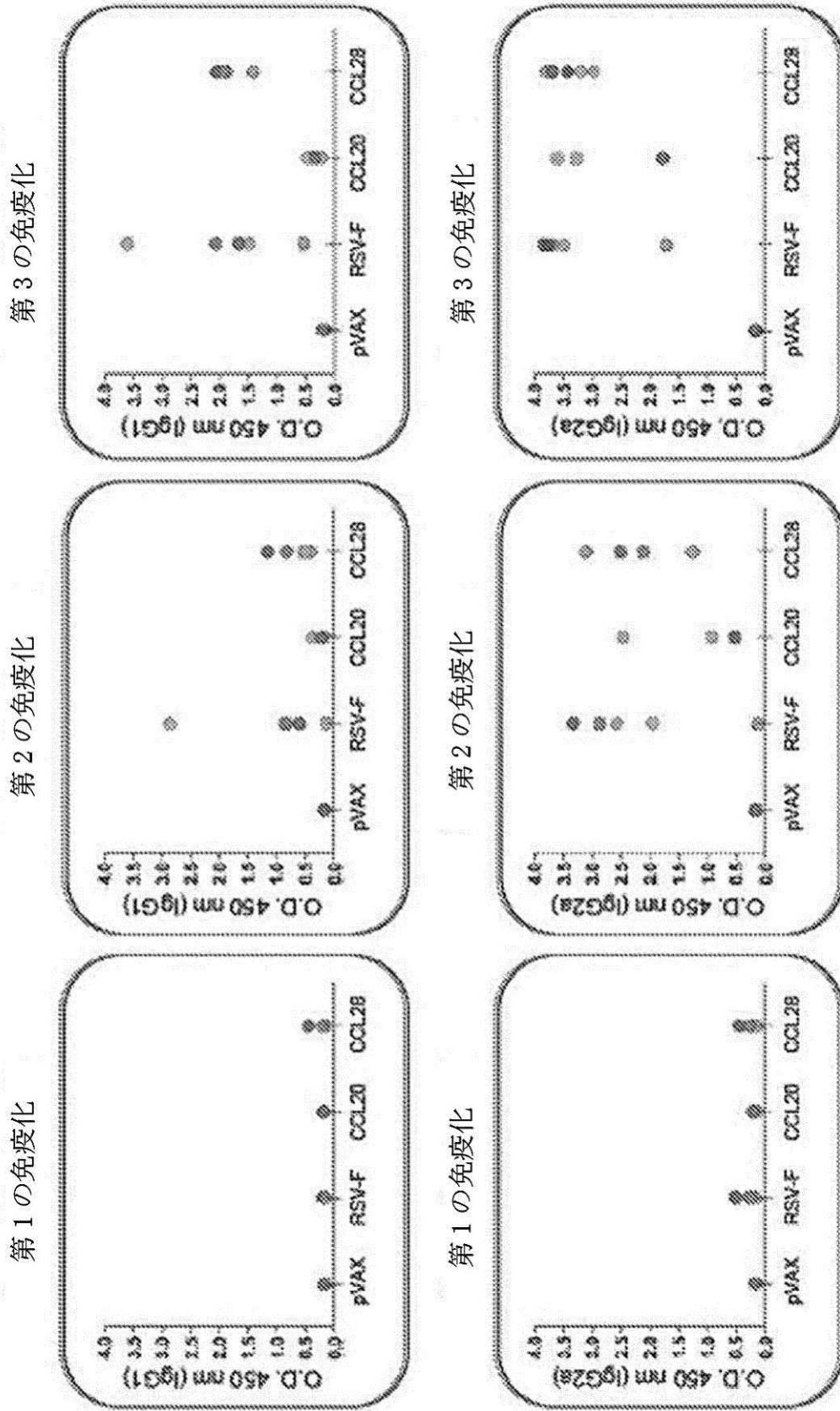


図 7

【図8】

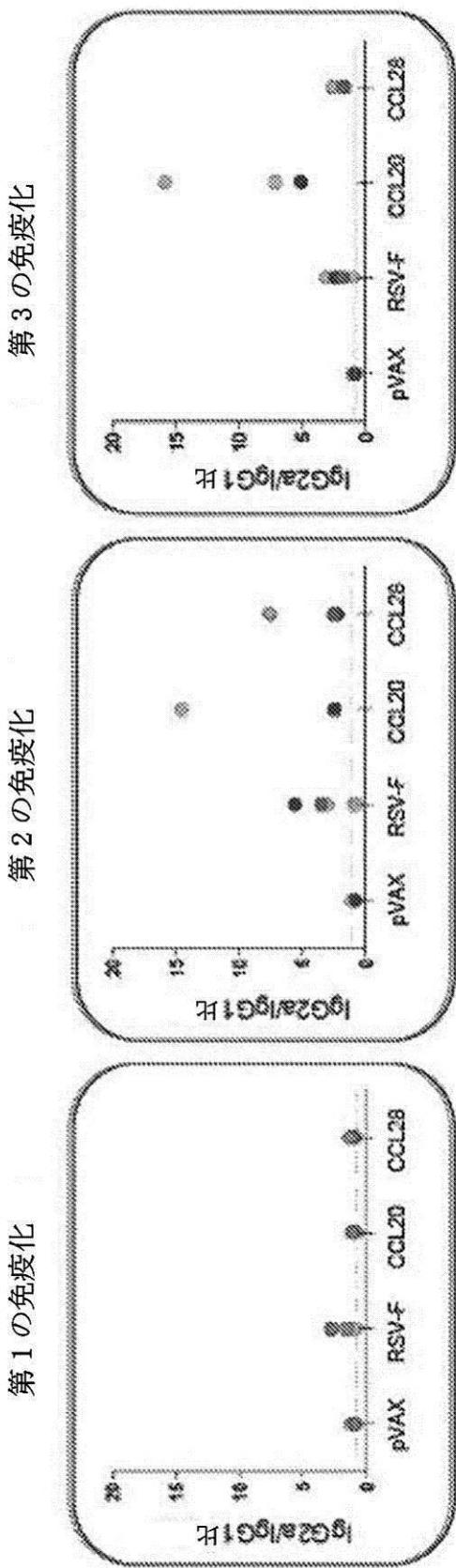
血清中の IFG サブタイプ(IgG1 対 IgG2a)の比較

図8

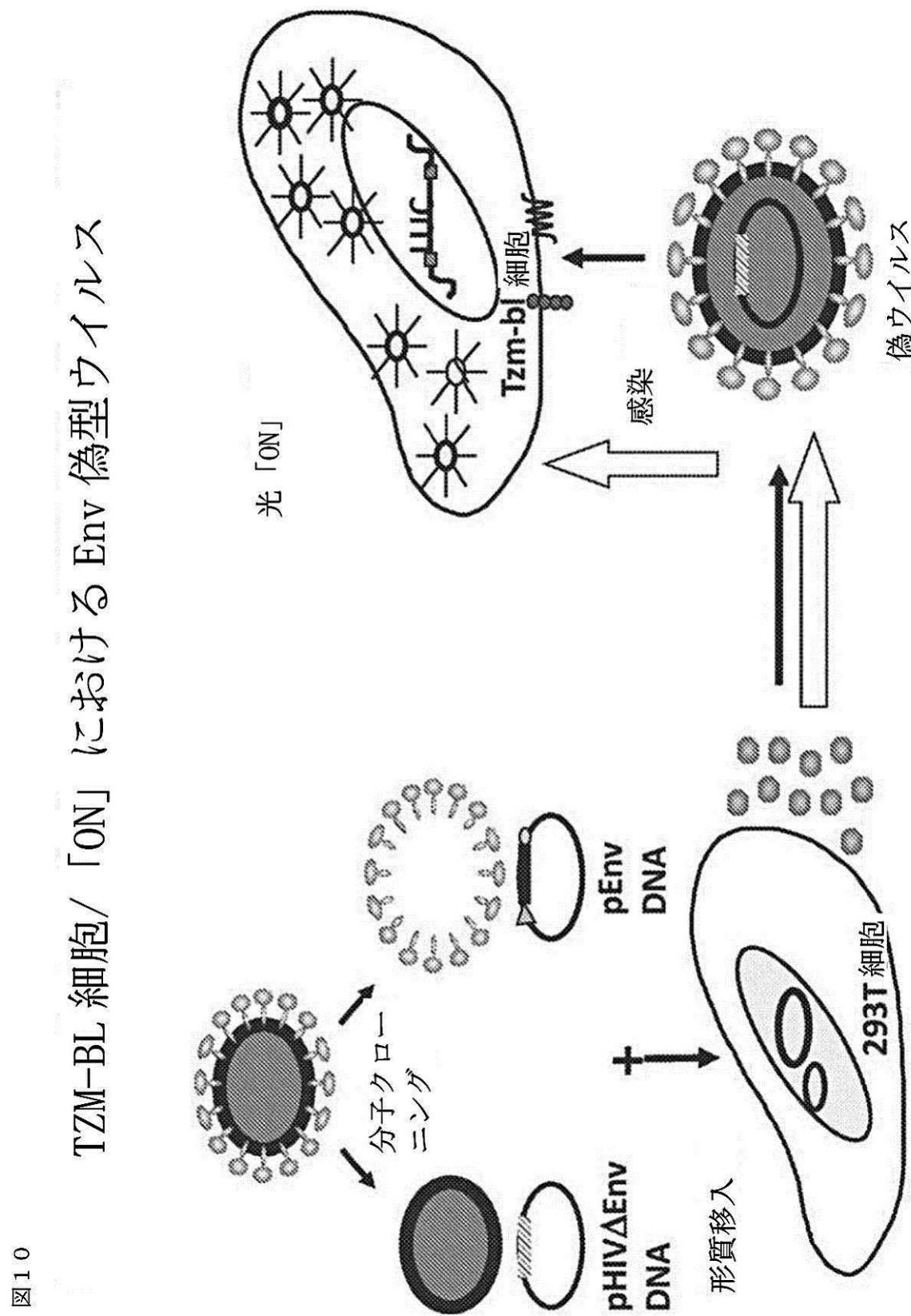


【図9】

IgG2a/IgG1比の比較
図9



【図 10】



【図 11】

TZM-BL 細胞 / 「OFF」における Env 偽型ウイルス

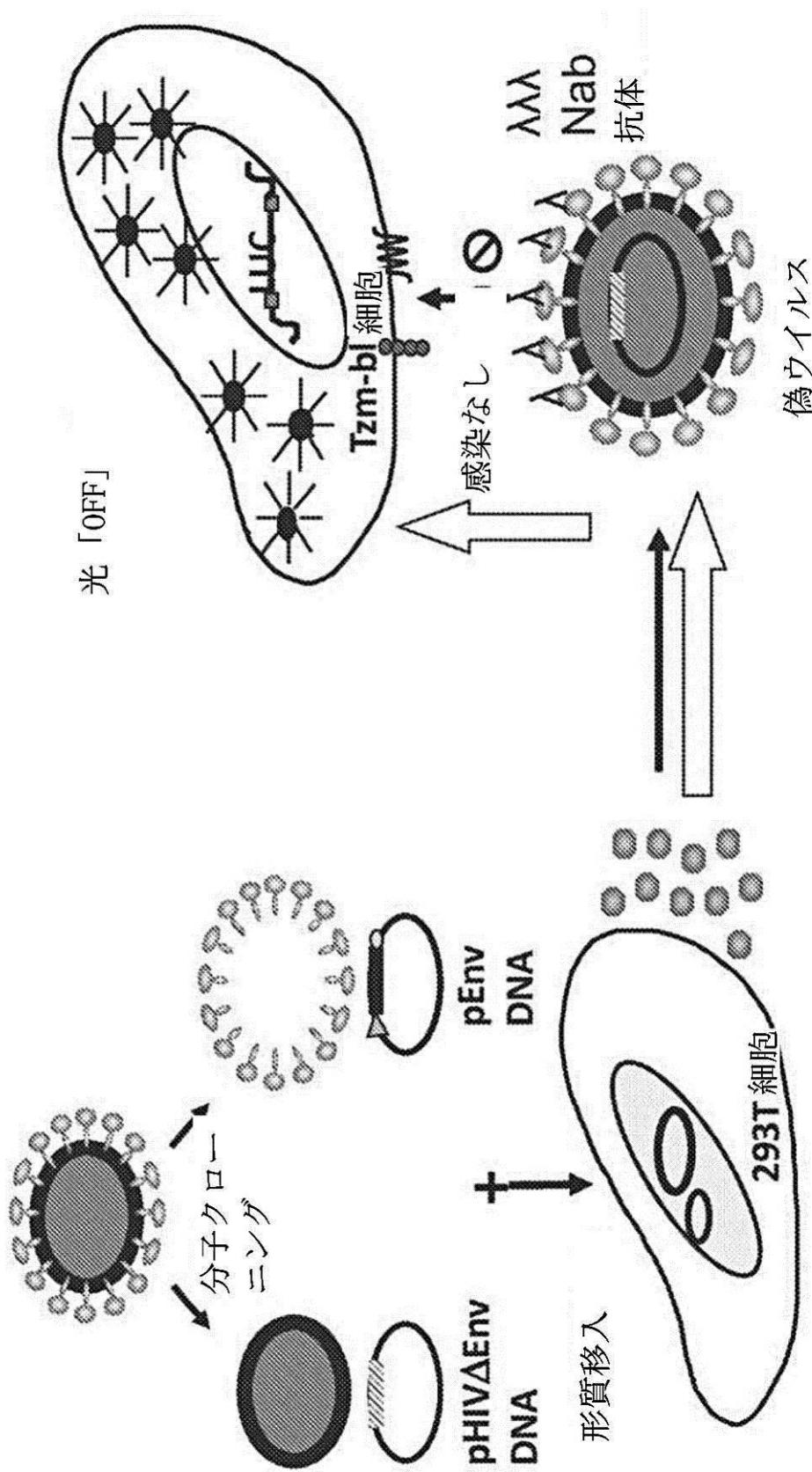


図11

【図 1 2】

293T 細胞における RSV 融合体偽ウイルス產生

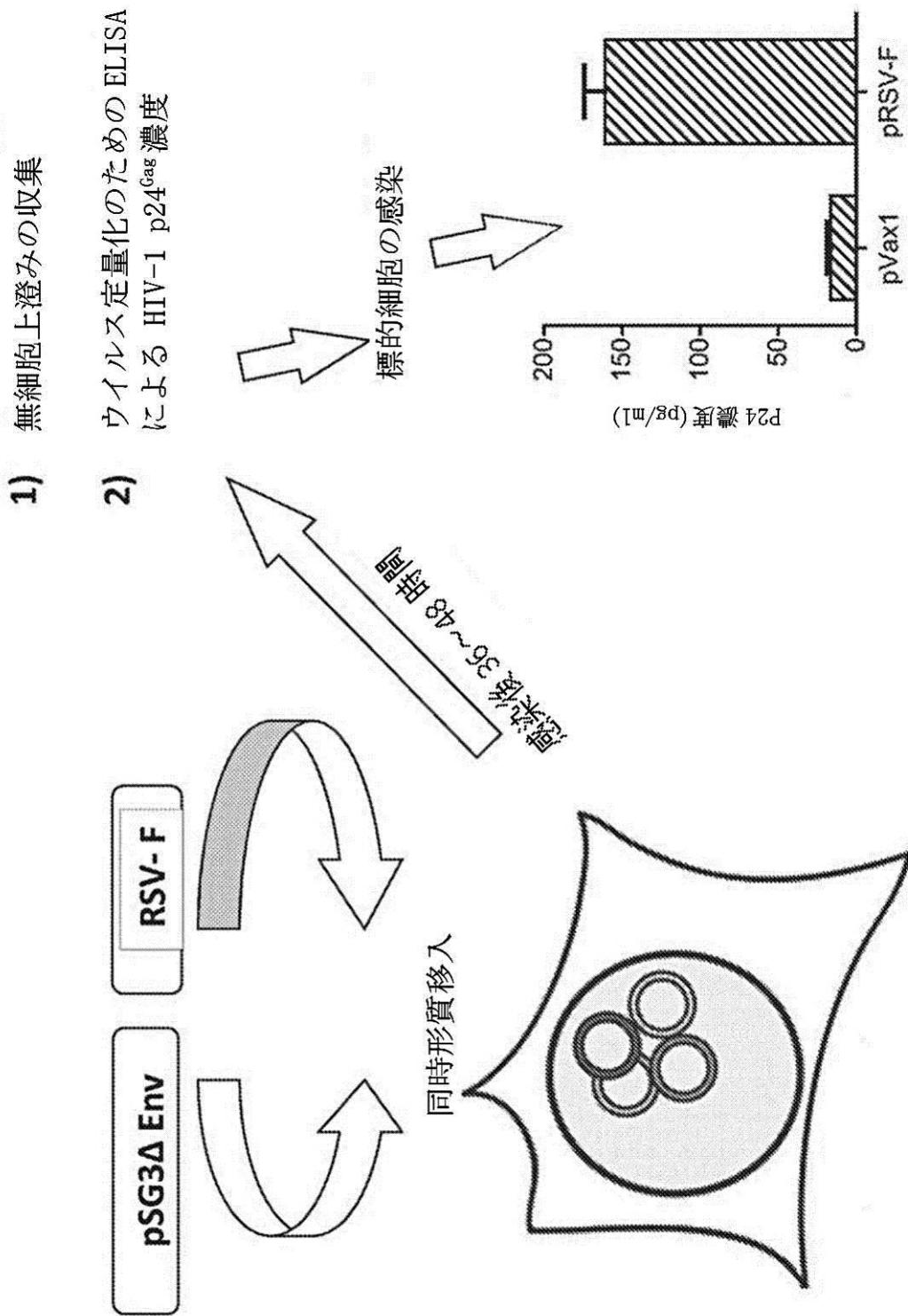
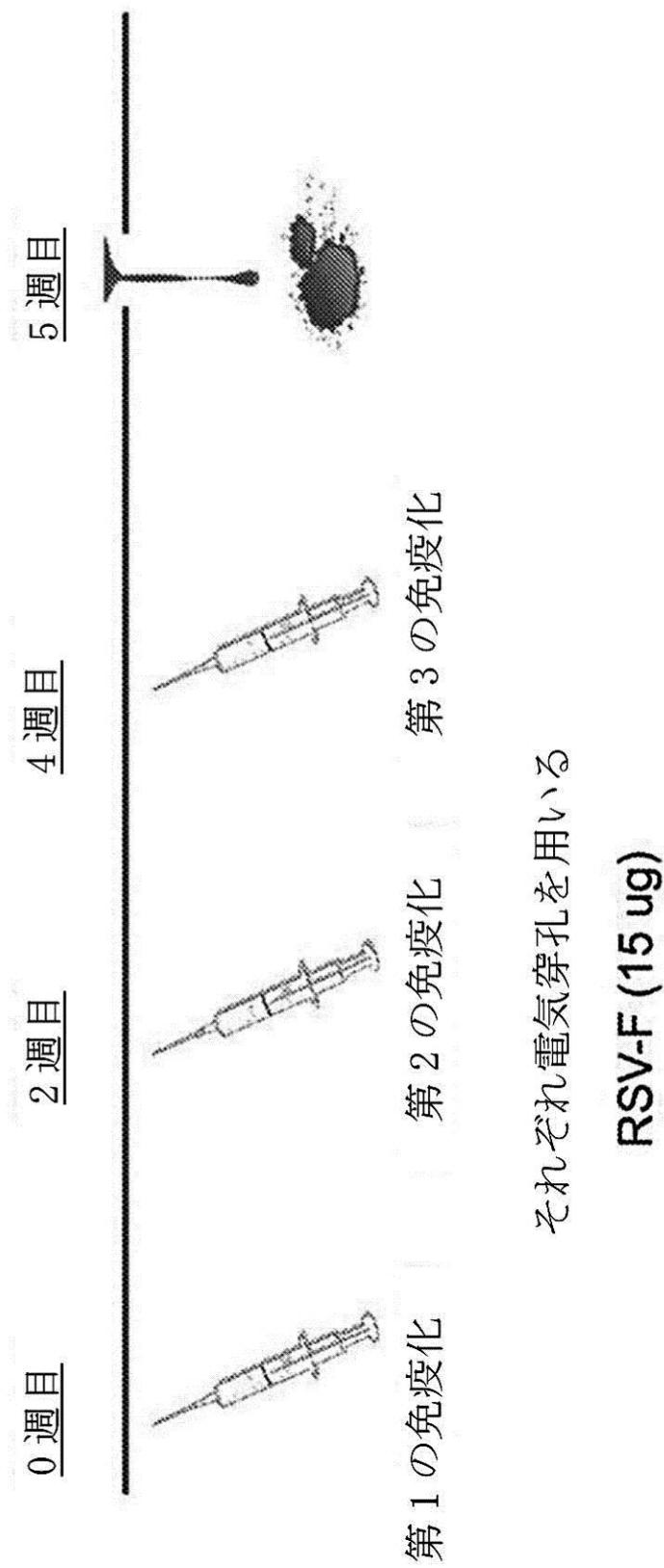


図 1 2

【図 13】
RSV-F 中和試験の免疫化スケジュール
図 1³

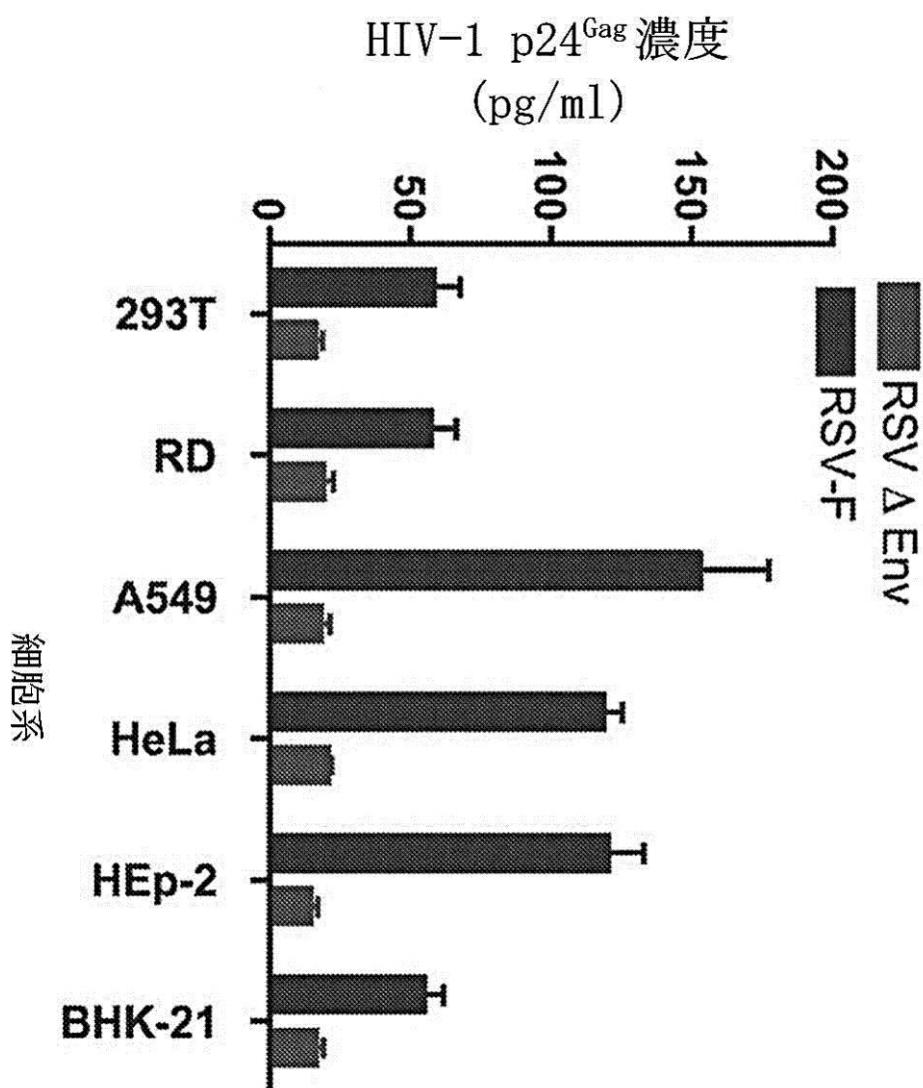
(血清を収集し、中和ア
ッセイを実施)



【図 14】

図 14

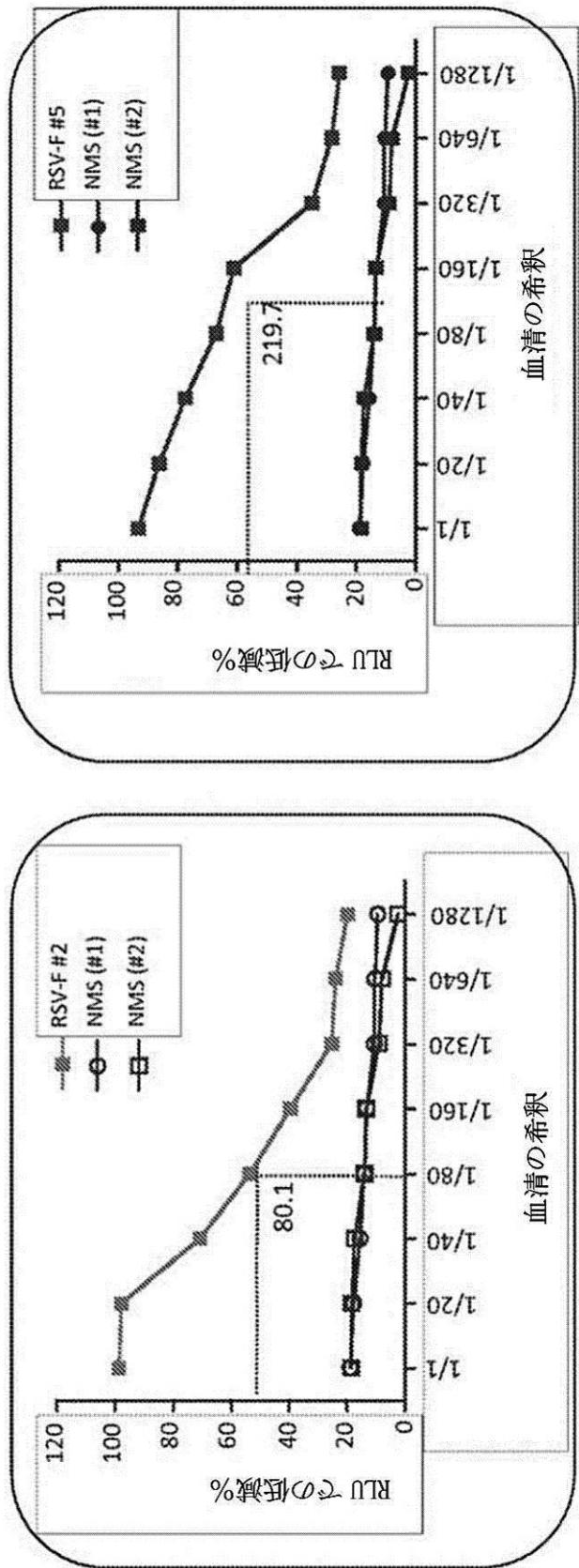
異なる標的細胞における RSV-F 仲介感染の定量化



【図 15】

TZM-bl HeLa 細胞における RSV-F 中和活性の定量化

図 15



【図 16】

HeLa 細胞における RSV-F 偽ウイルスによる細胞死活性の定量化

図 16

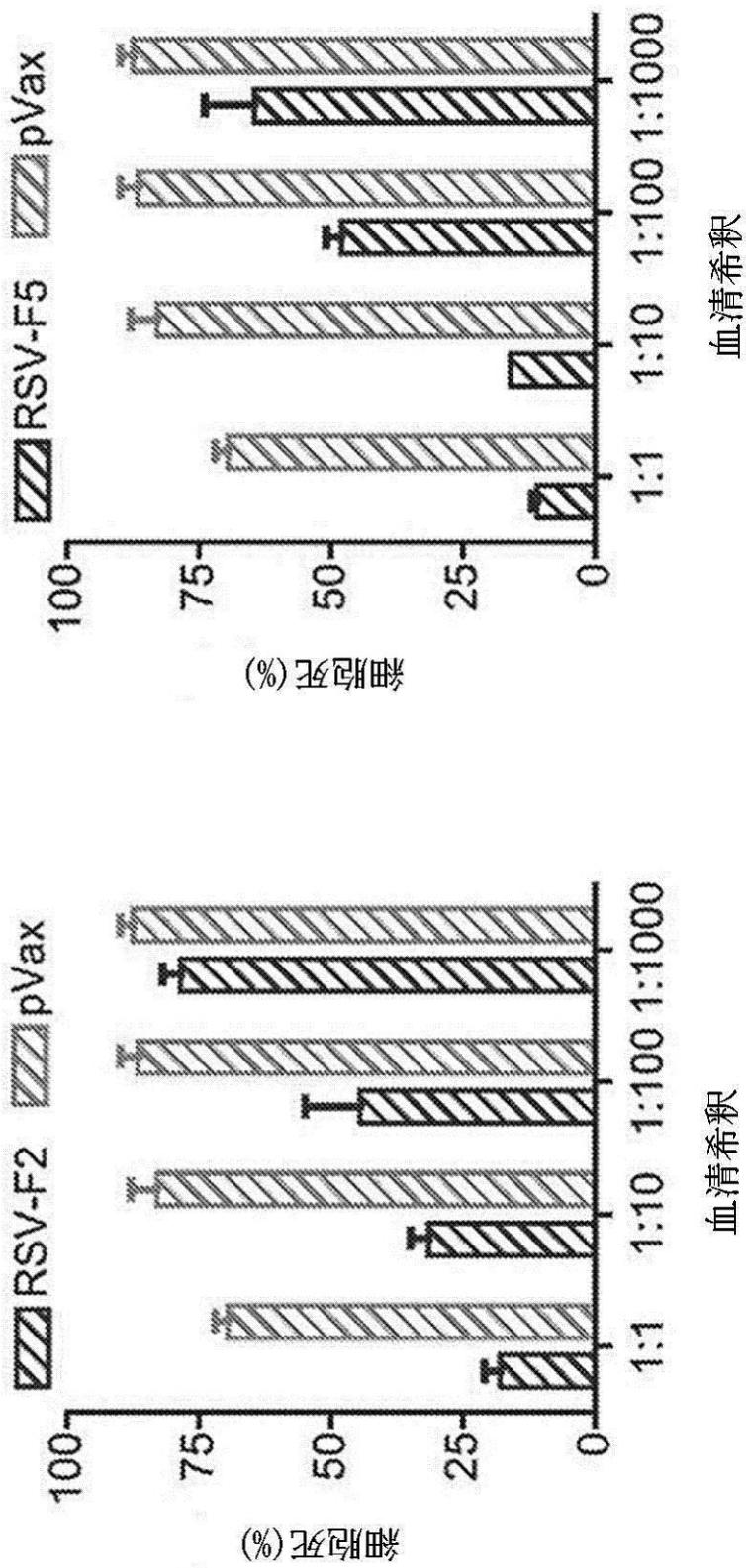
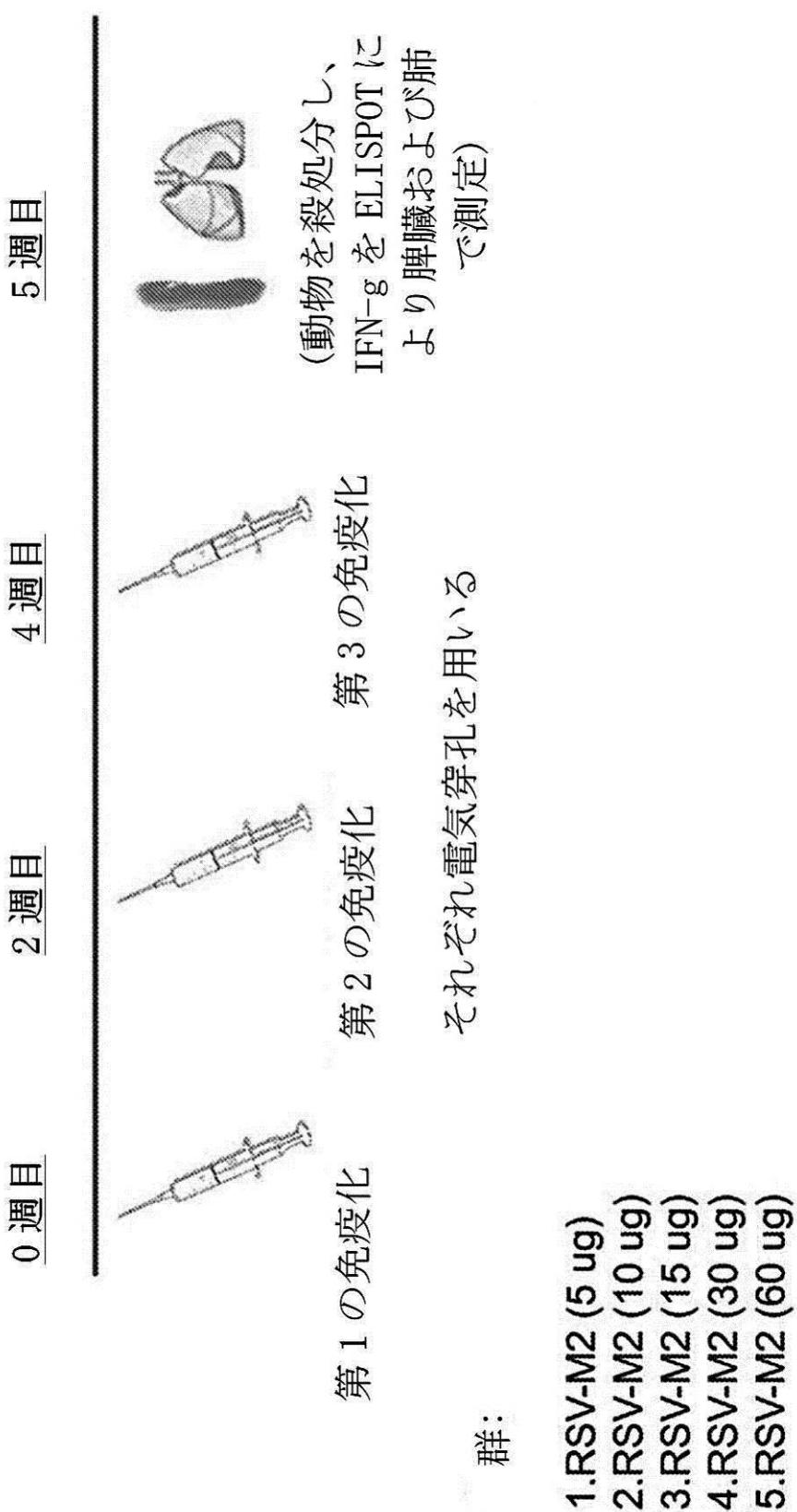


図17

RSV-M2 投与量試験の免疫化スケジュール



【図18】

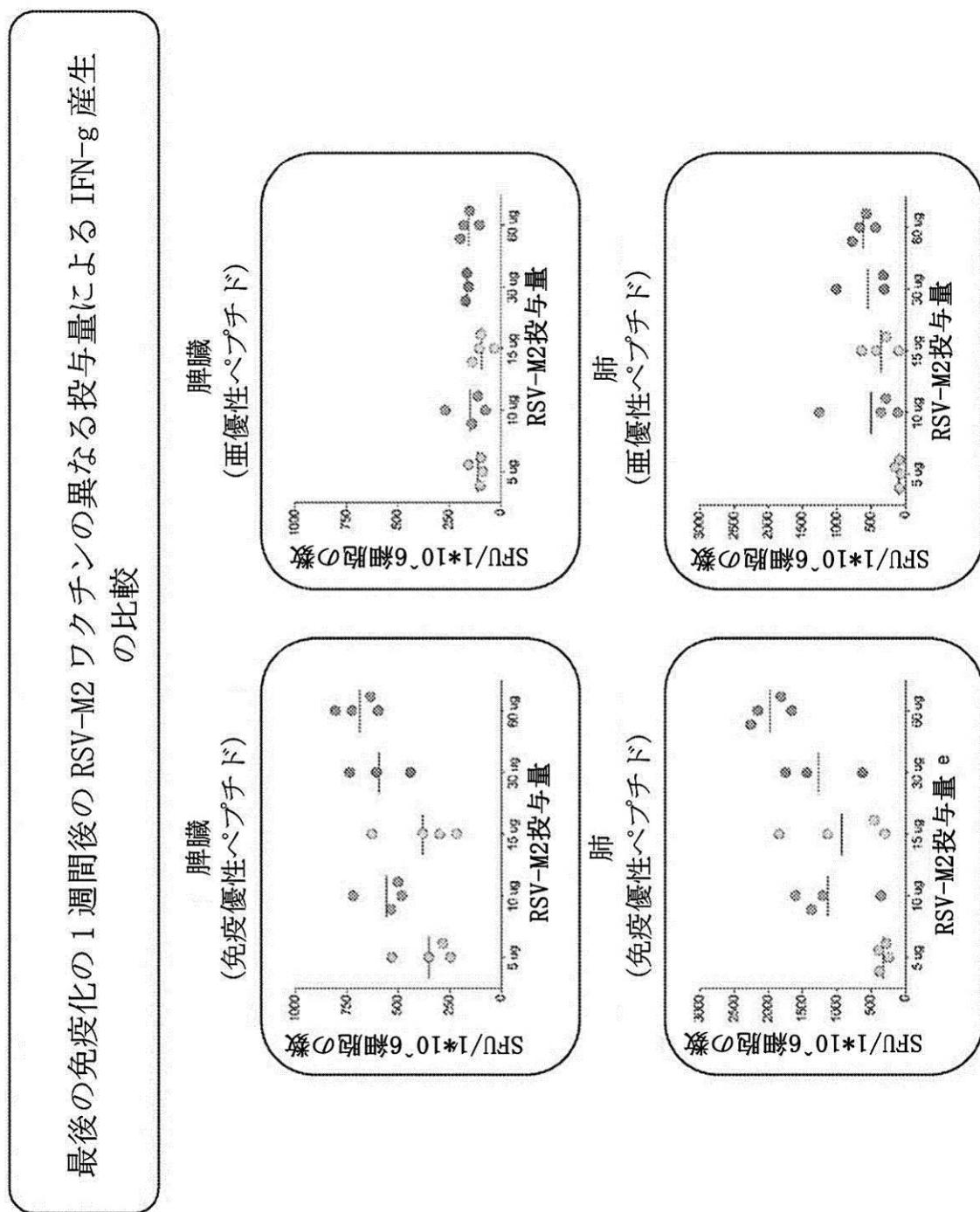
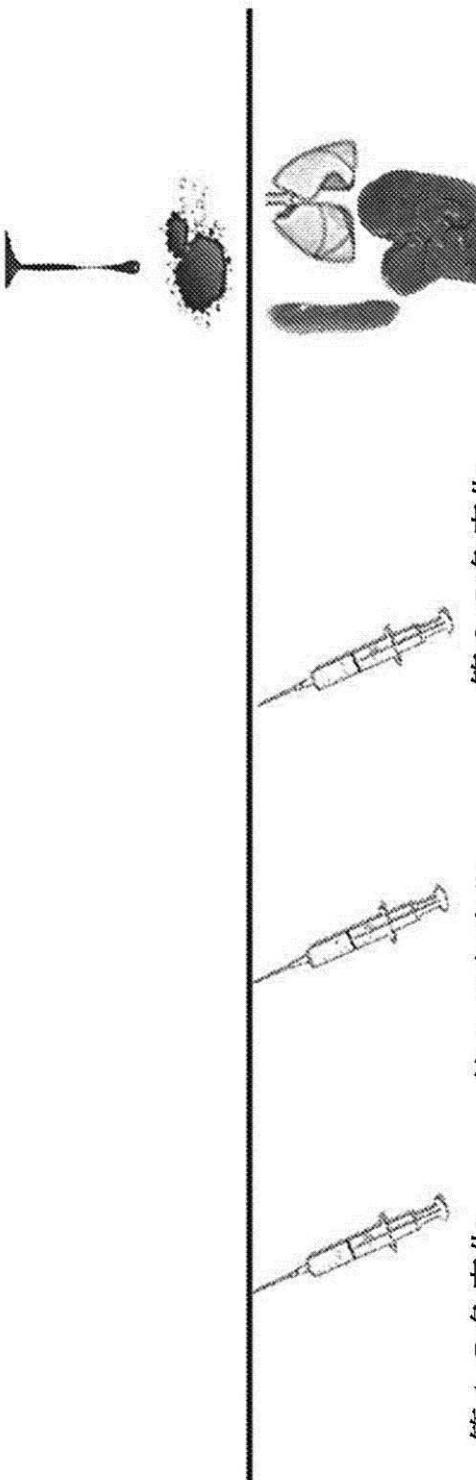


図18

RSV-F+CCL20 試験の免疫化スケジュール

(血清の収集および IgG の測定)

0週目2週目4週目5週目

第1の免疫化 第2の免疫化 第3の免疫化 第4の免疫化

それぞれ電気穿孔を用いる

(動物を殺処分
し、IFN-g を
ELISPOTにより
脾臓、肺、およ
び肝臓で測定)

群:

- 1.RSV-F (5 ug) 単独
- 2.RSV-F (5 ug) + CCL20 (5 ug)
- 3.RSV-F (5 ug) + CCL20 (10 ug)
- 4.RSV-F (5 ug) + CCL20 (15 ug)
- 5.RSV-F (5 ug) + CCL20 (30 ug)

【図 20】

最後の免疫化の 1 週間後の CCL20 の異なる投与量による IFN-g 産生の比較

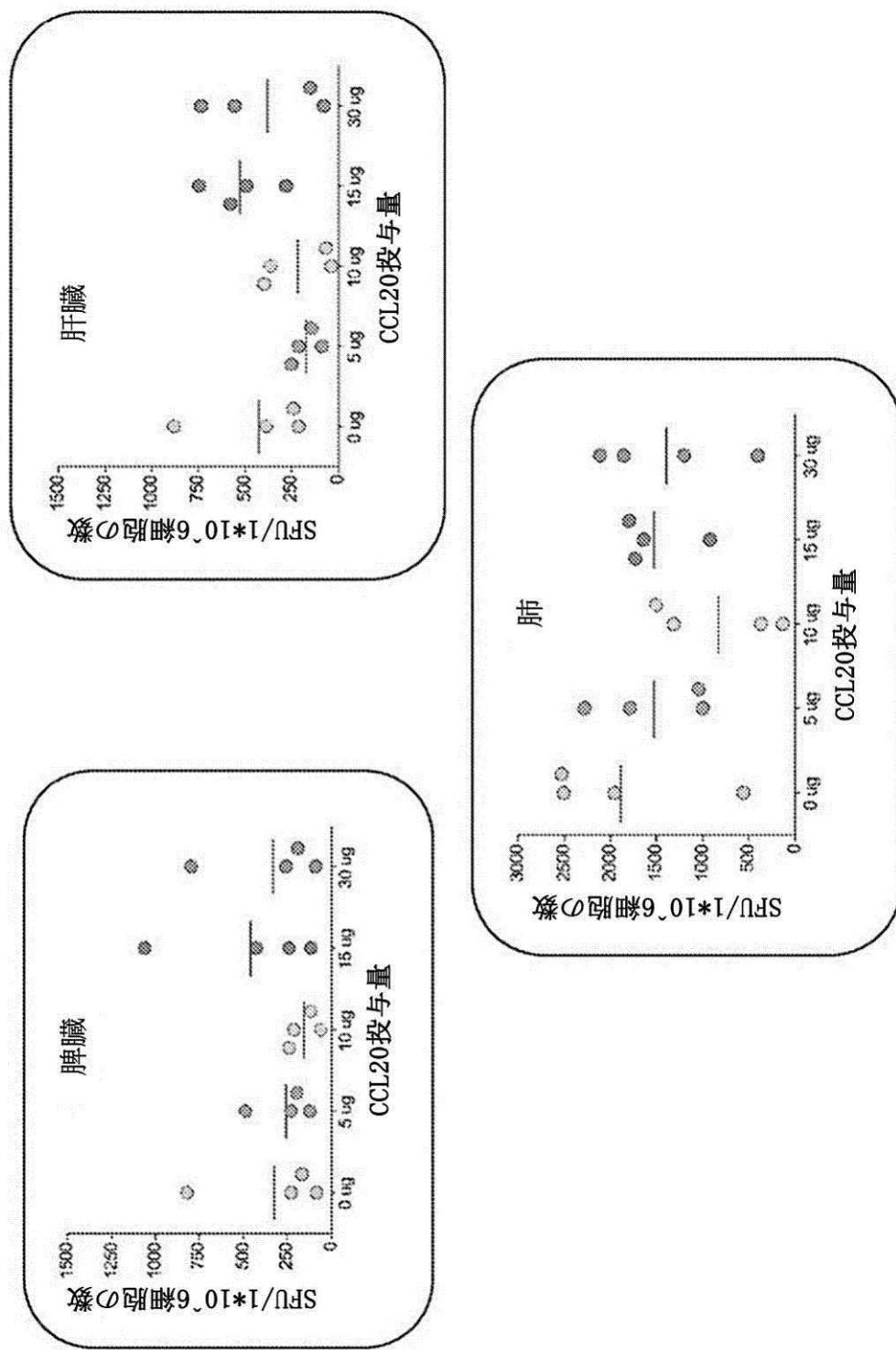


図 20

【図 2 1】

血清における IgG サブタイプ (IgG1 対 IgG2a) の比較

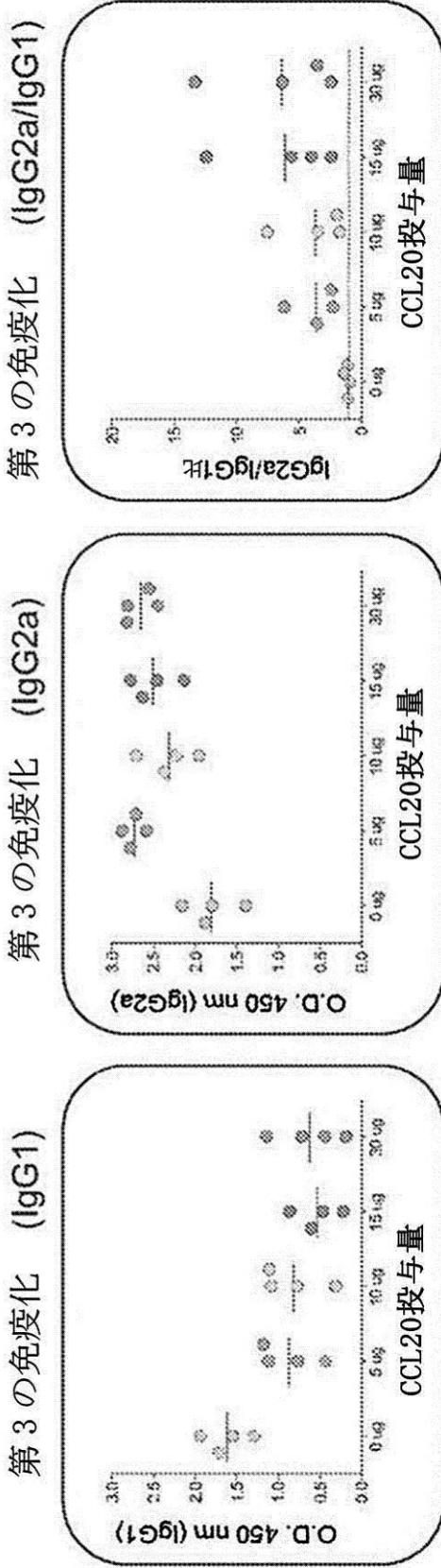
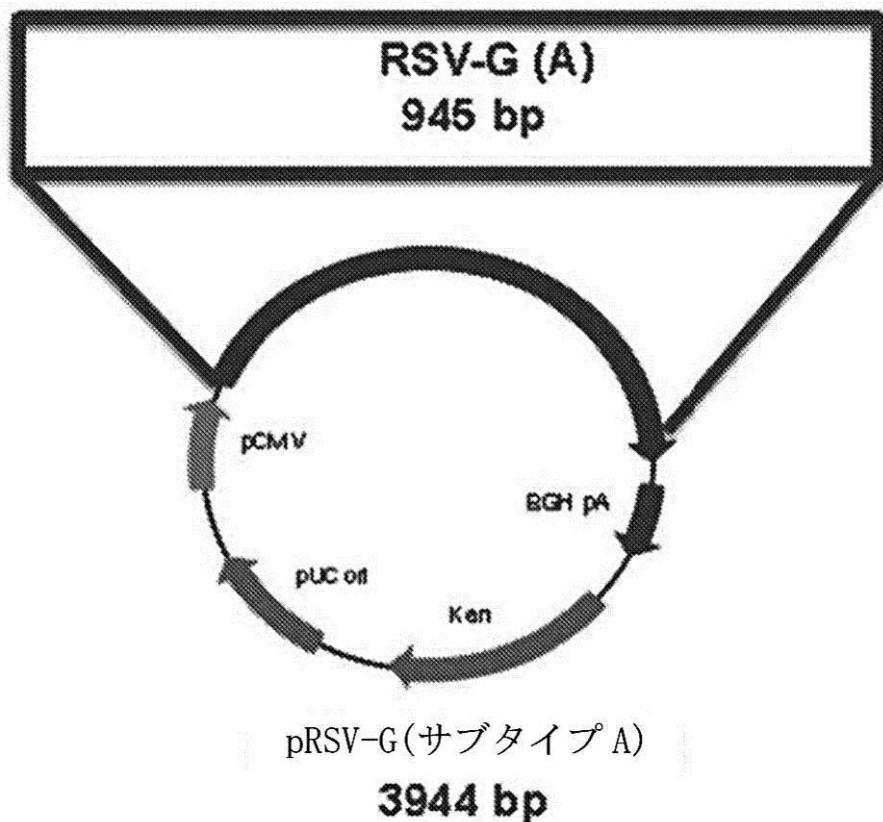


図 2 1

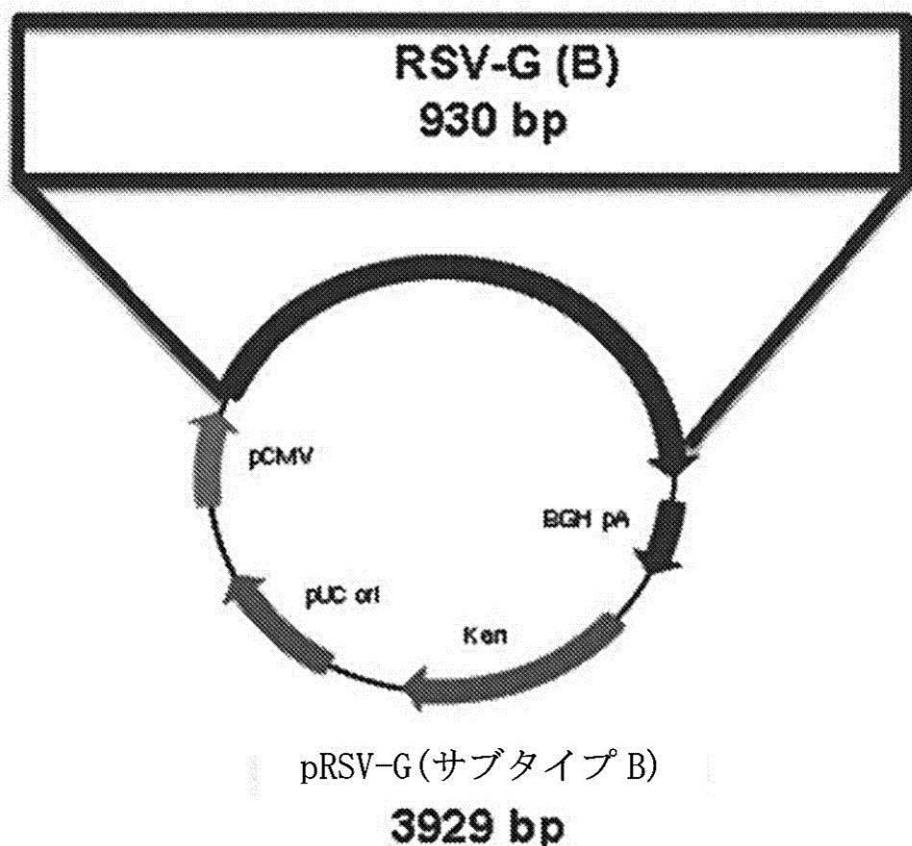
【図 2 2 B】

図 2 2 B



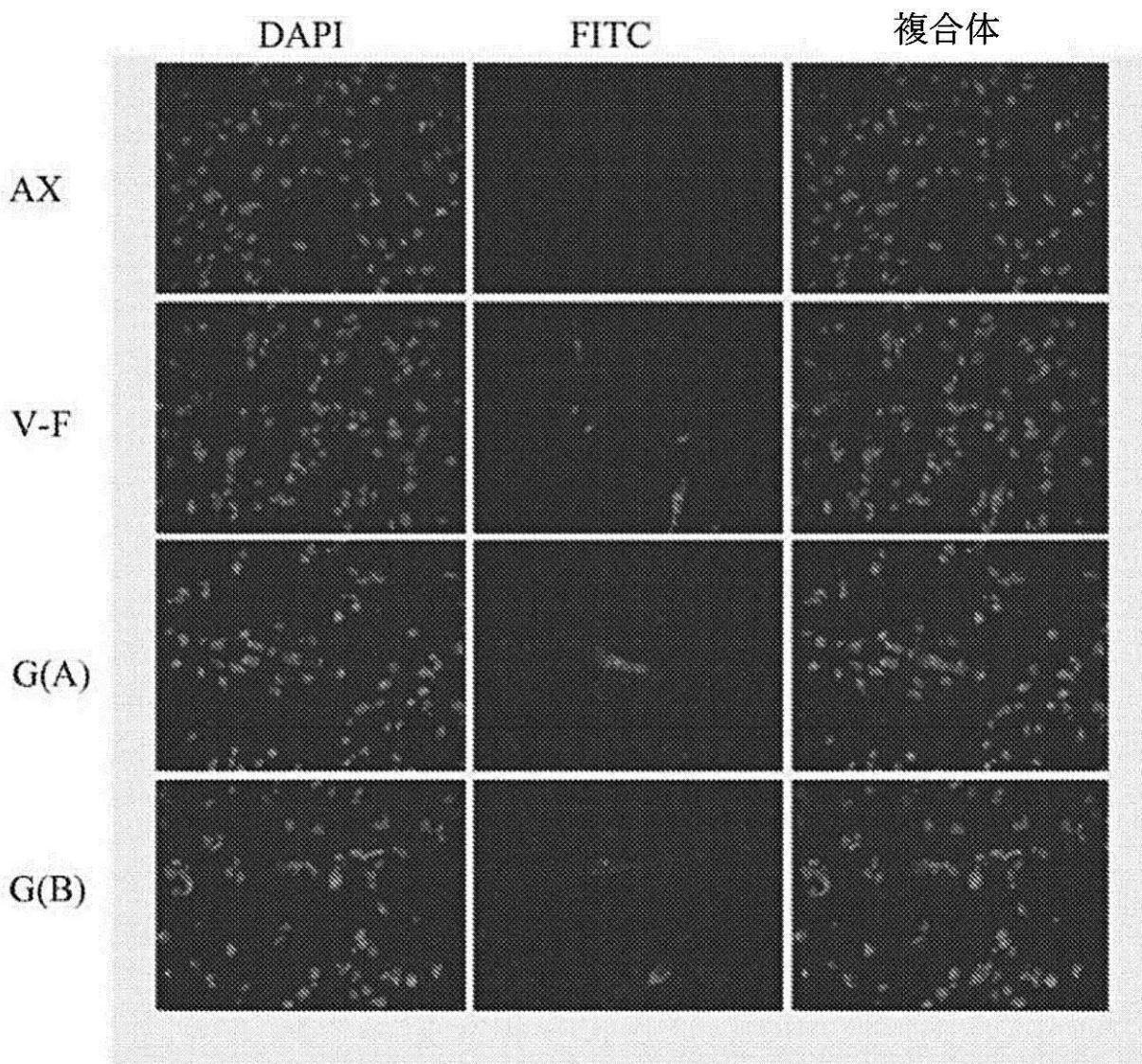
【図 2 2 C】

図 2 2 C



【図 2 3】

図 2 3



【図 24】

RSV-F 投与量試験の免疫化スケジュール

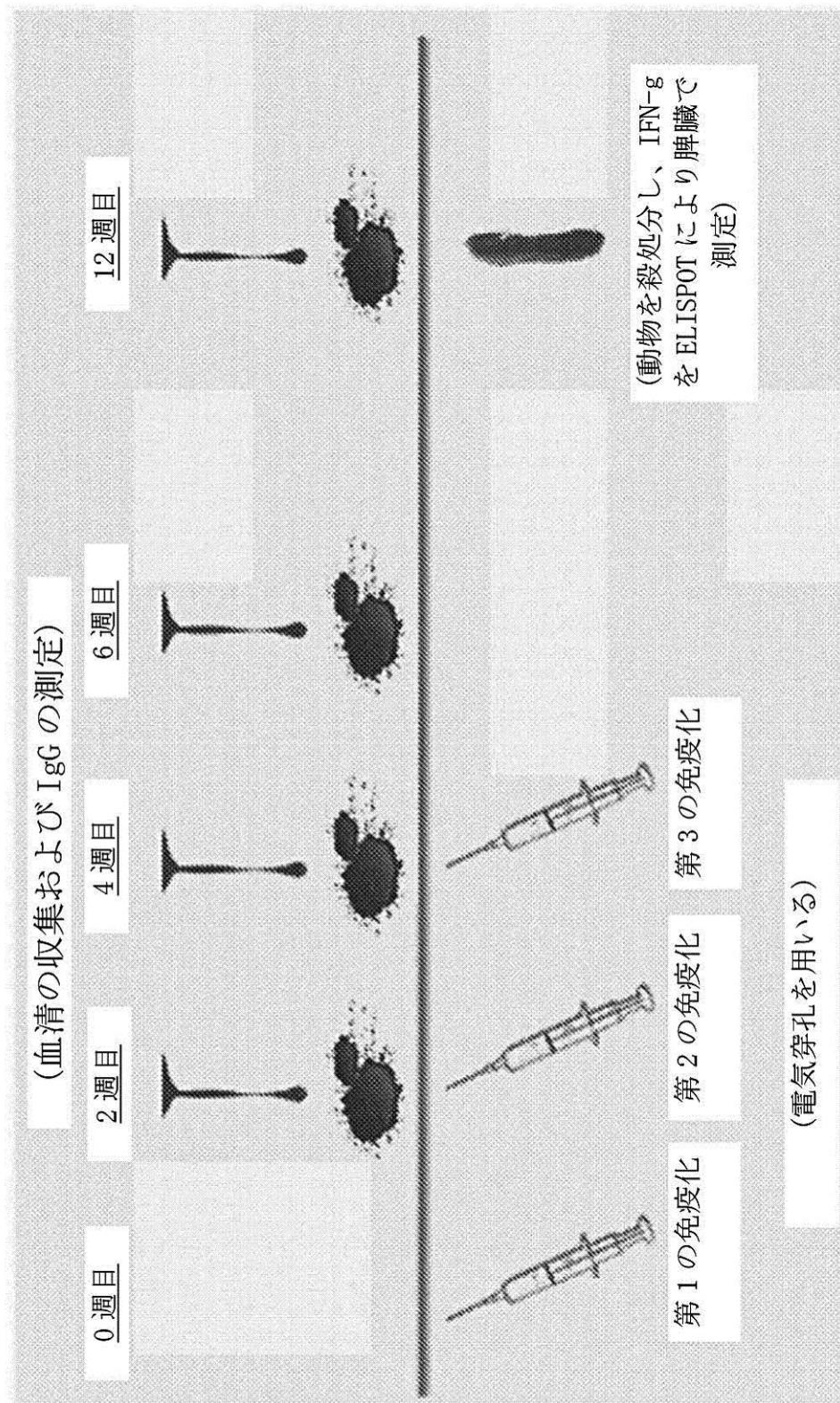
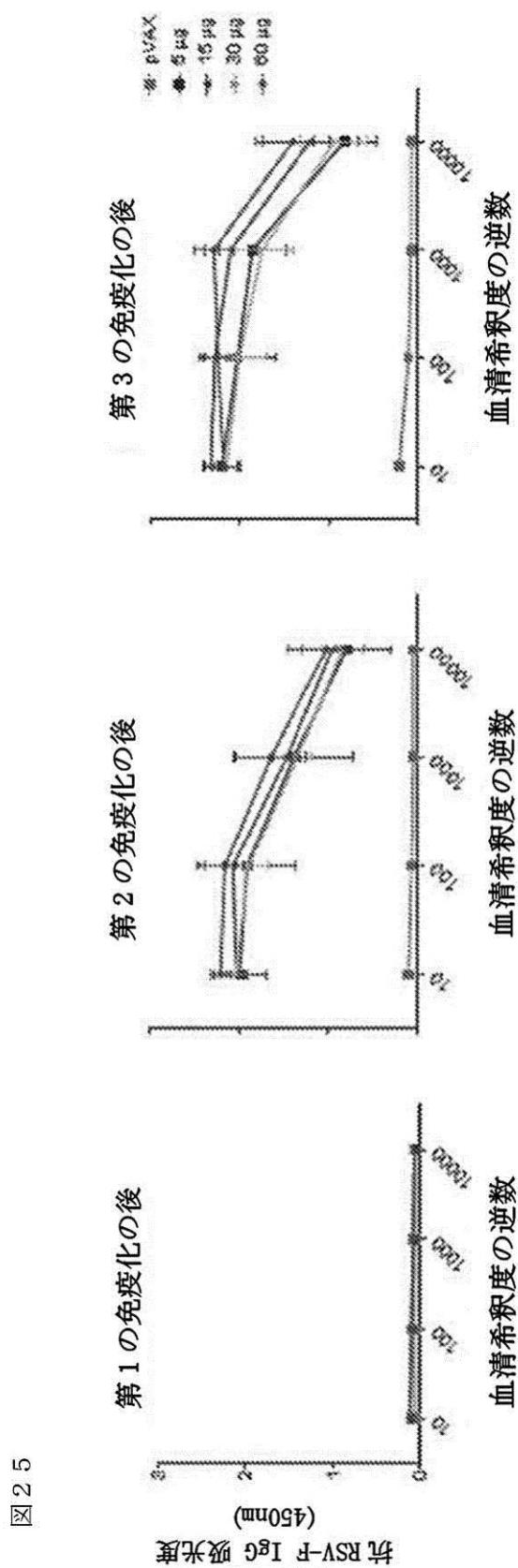


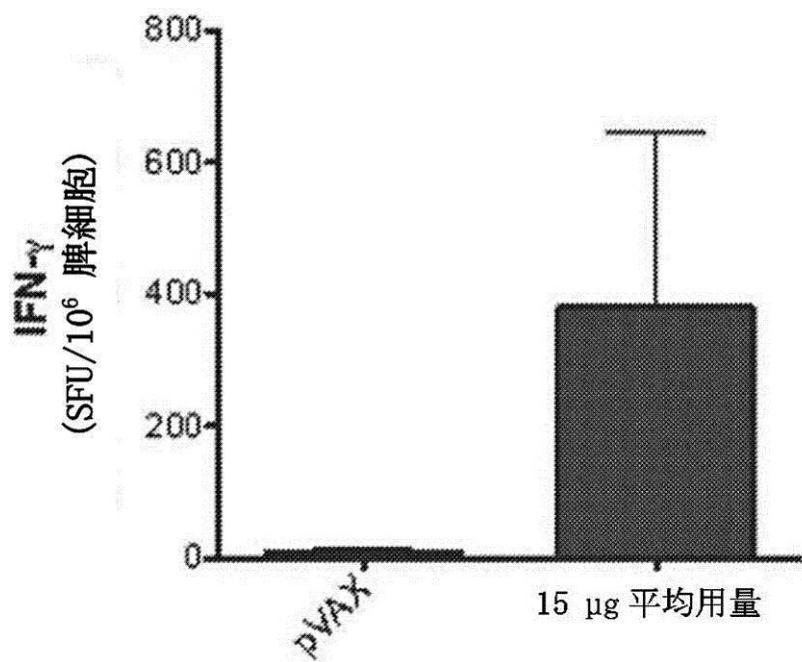
図 24

【図 25】



【図26】

図26



【図27】

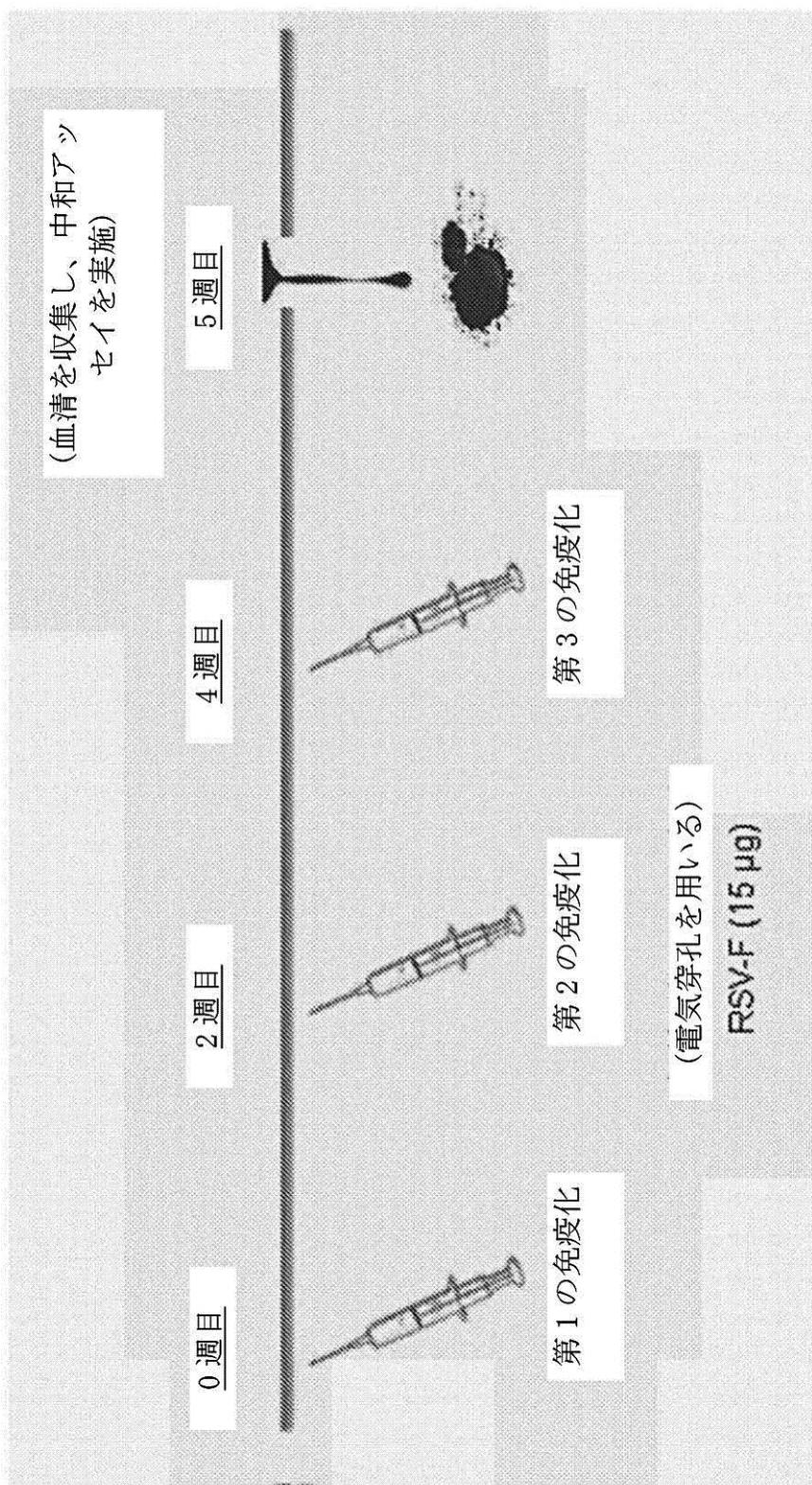
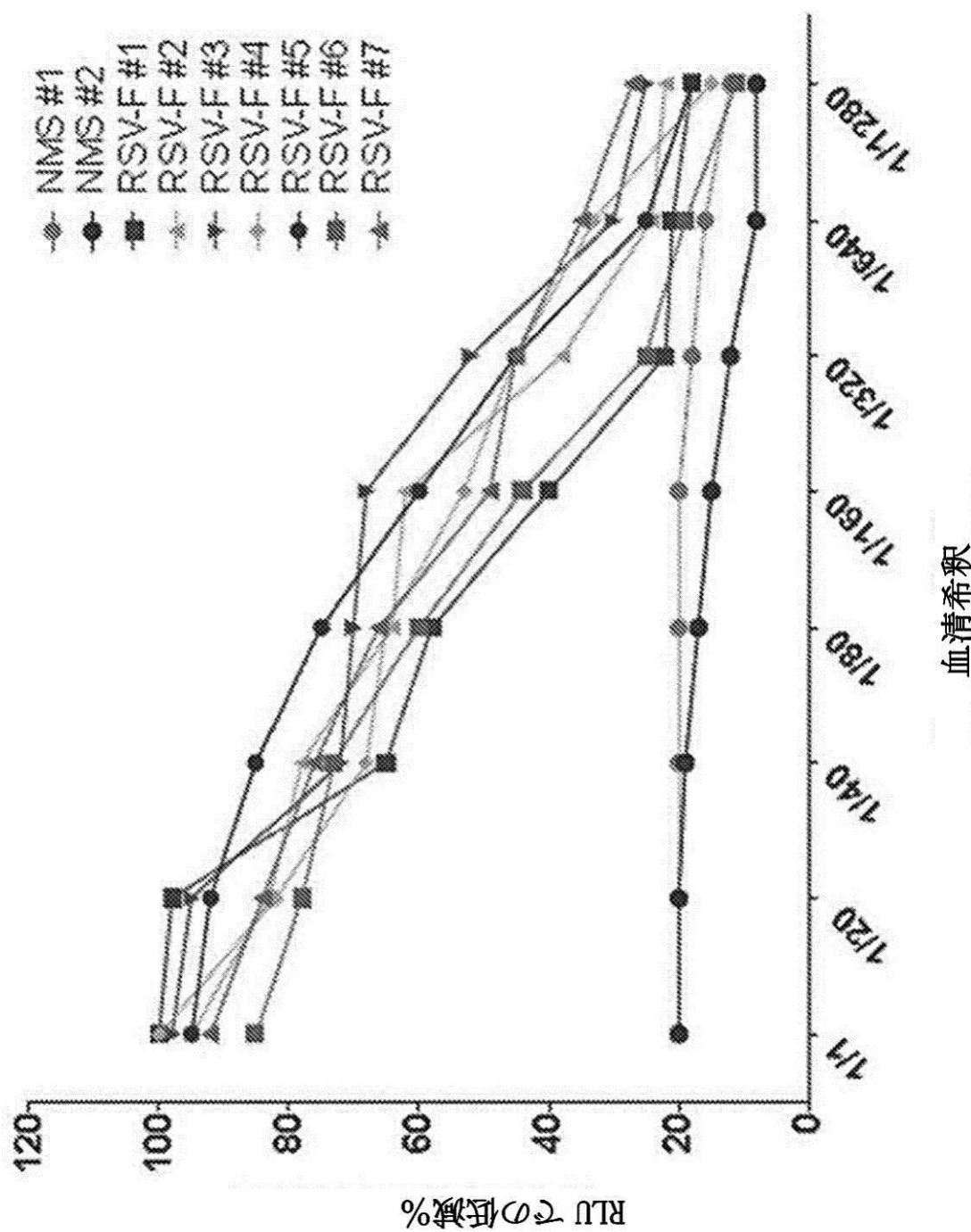


図27

【図28】



【図29】

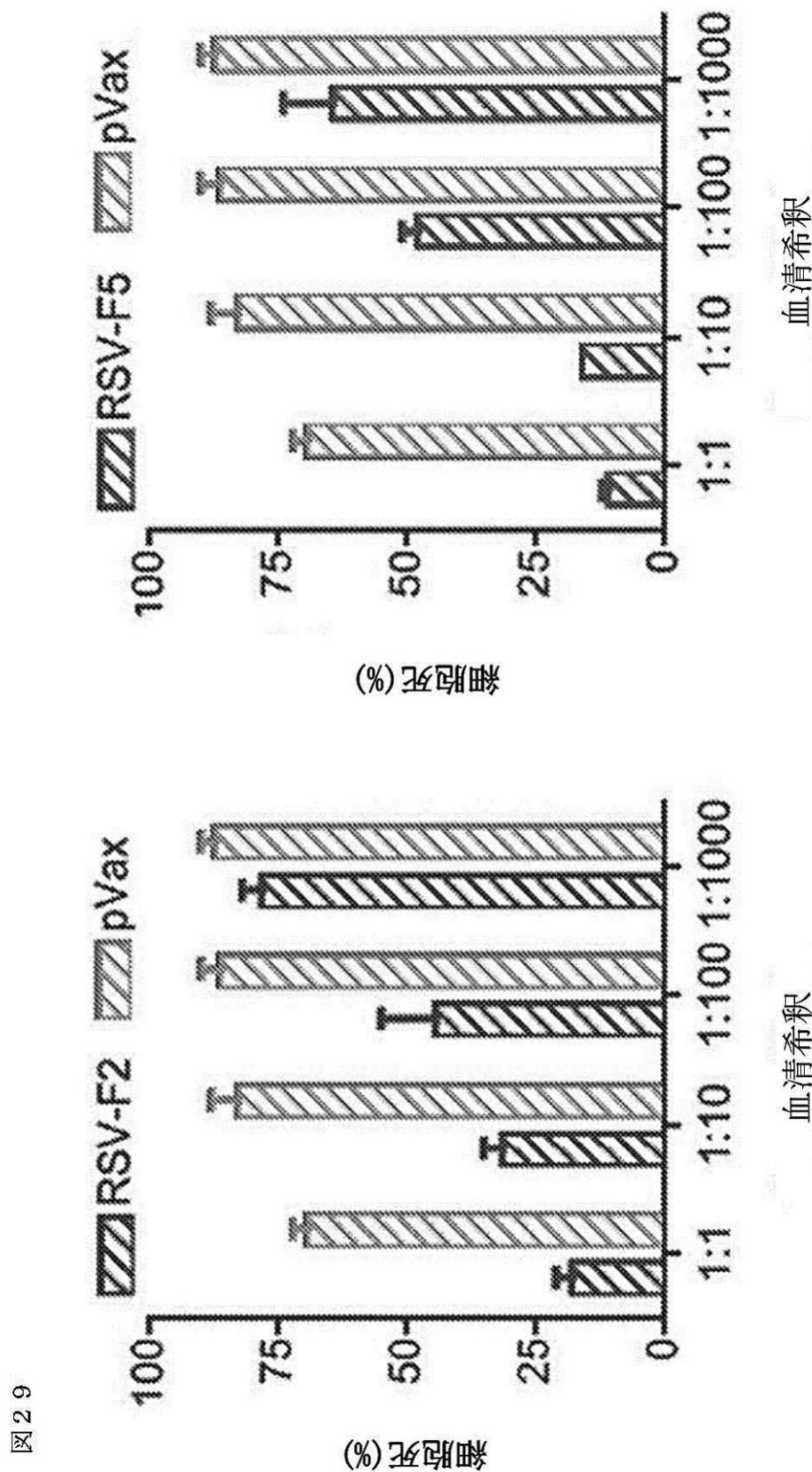
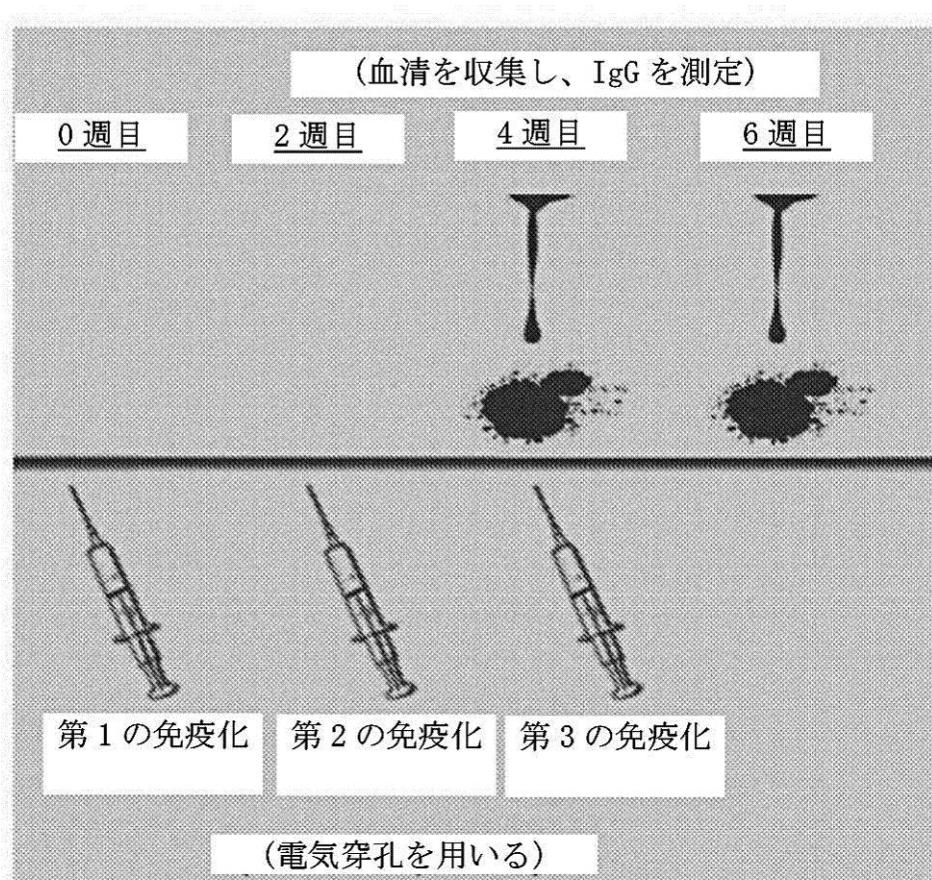


図29

【図 30】

図 30

RSV-G (A) および RSV-(B) 投与量試験の免疫化スケジュール



【図 3 1】

RSV-G (A) DNA 免疫化後の血清における総 IgG

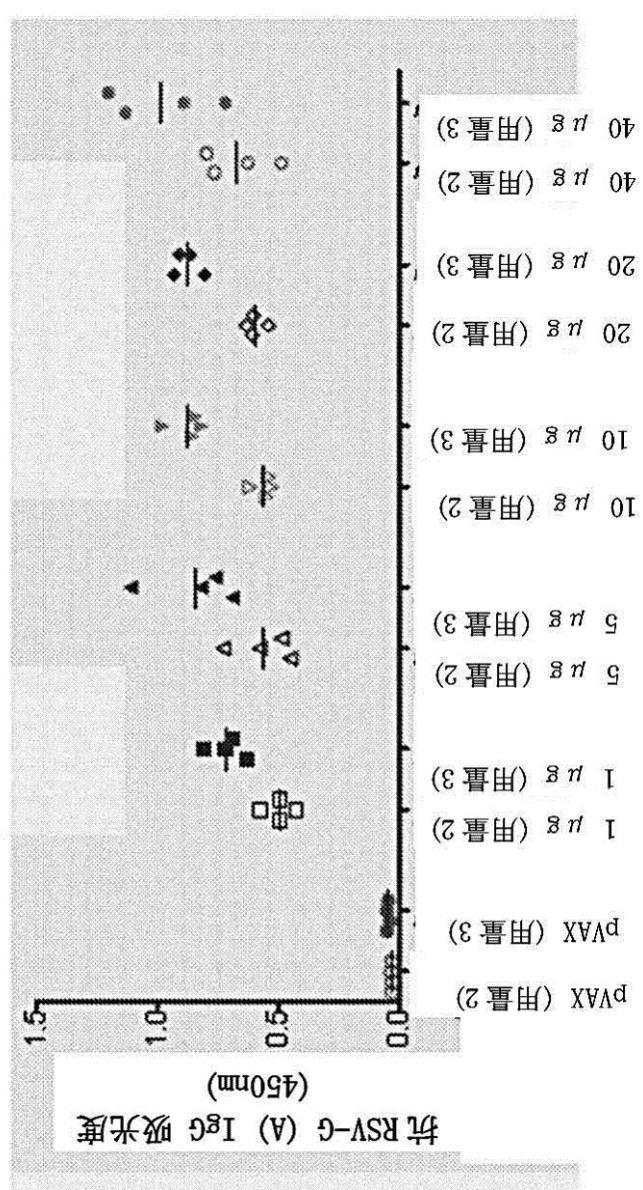


図 3 1

【図 3 2】

RSV-G(B)DNA 免疫化後の血清における総 IgG

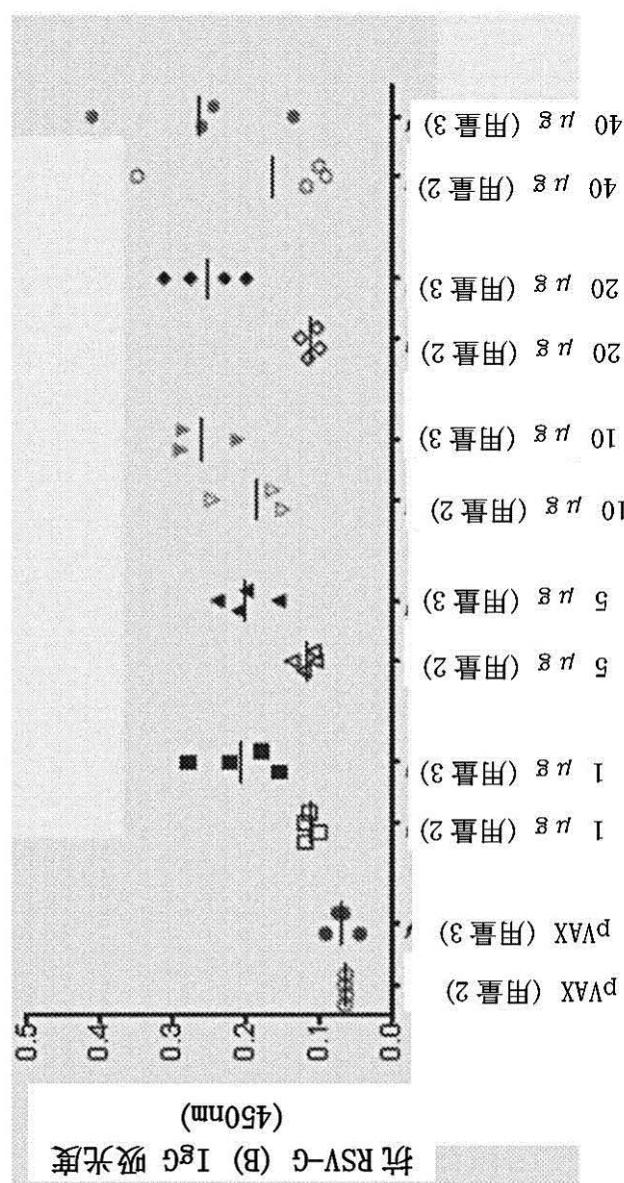
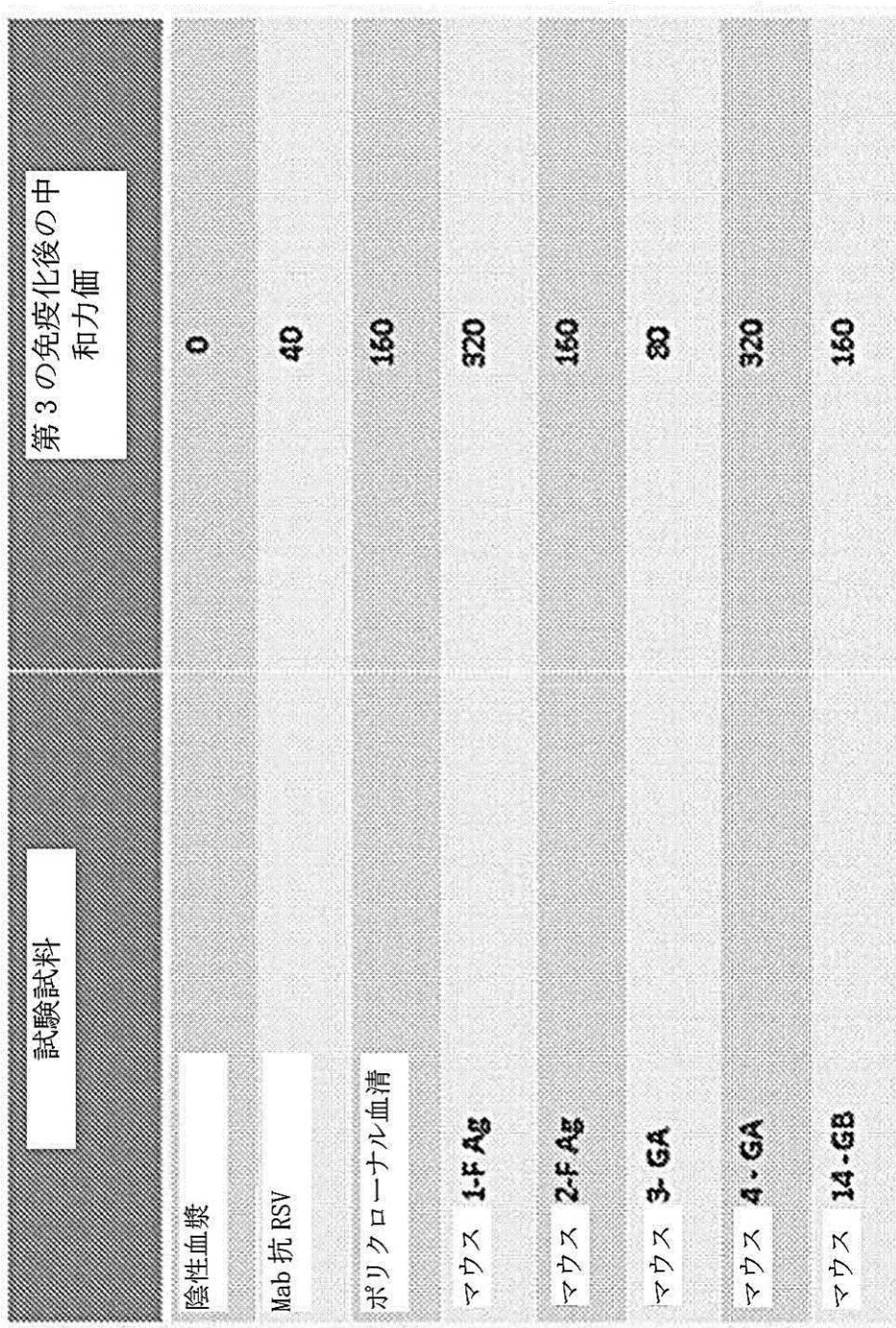


図 3 2

単一ワクチンマウス試験の予備中和の結果

【図33】



【図 3 4】

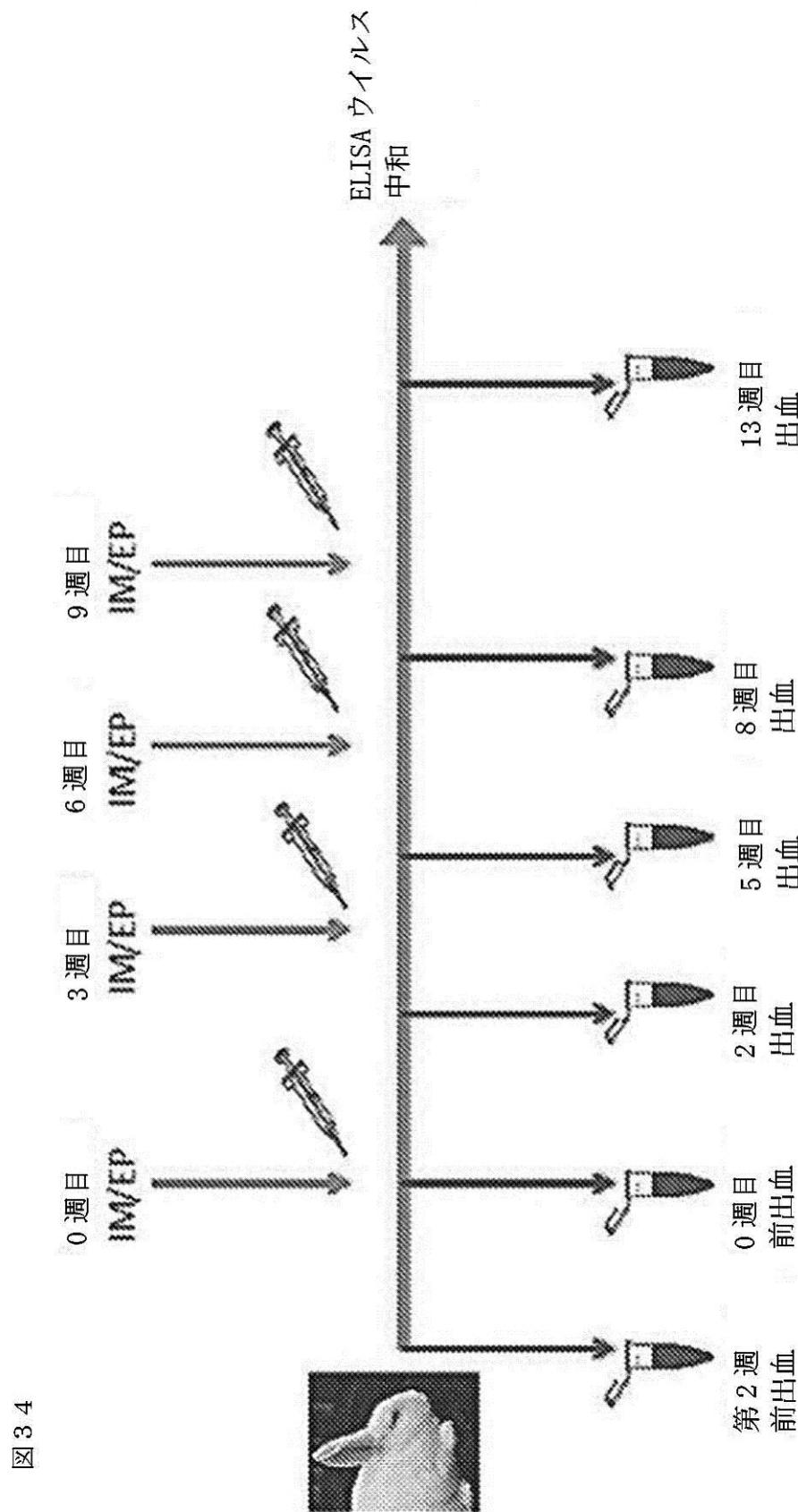


図 3 4

【図 35】

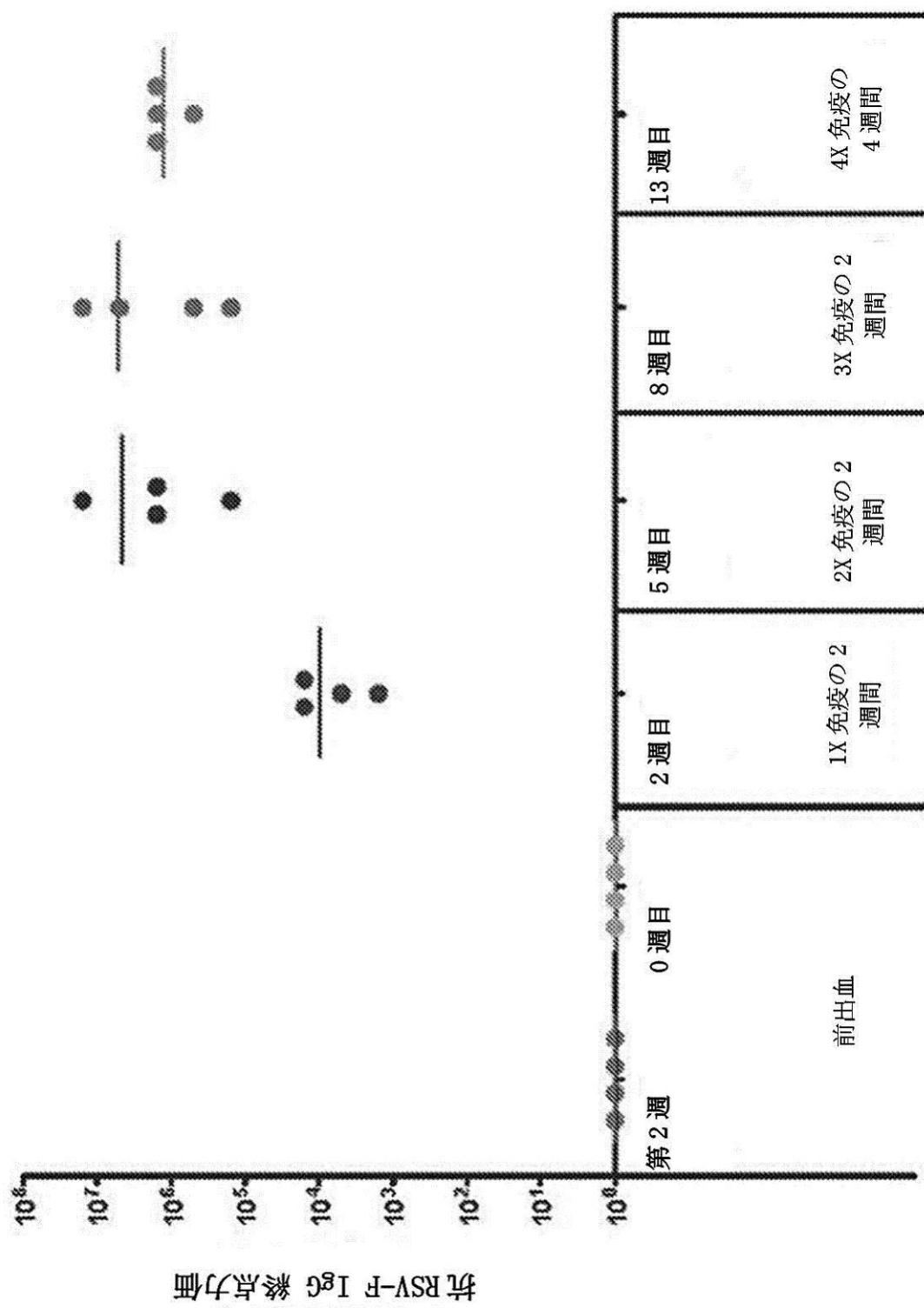


図 35

【図 3 6】

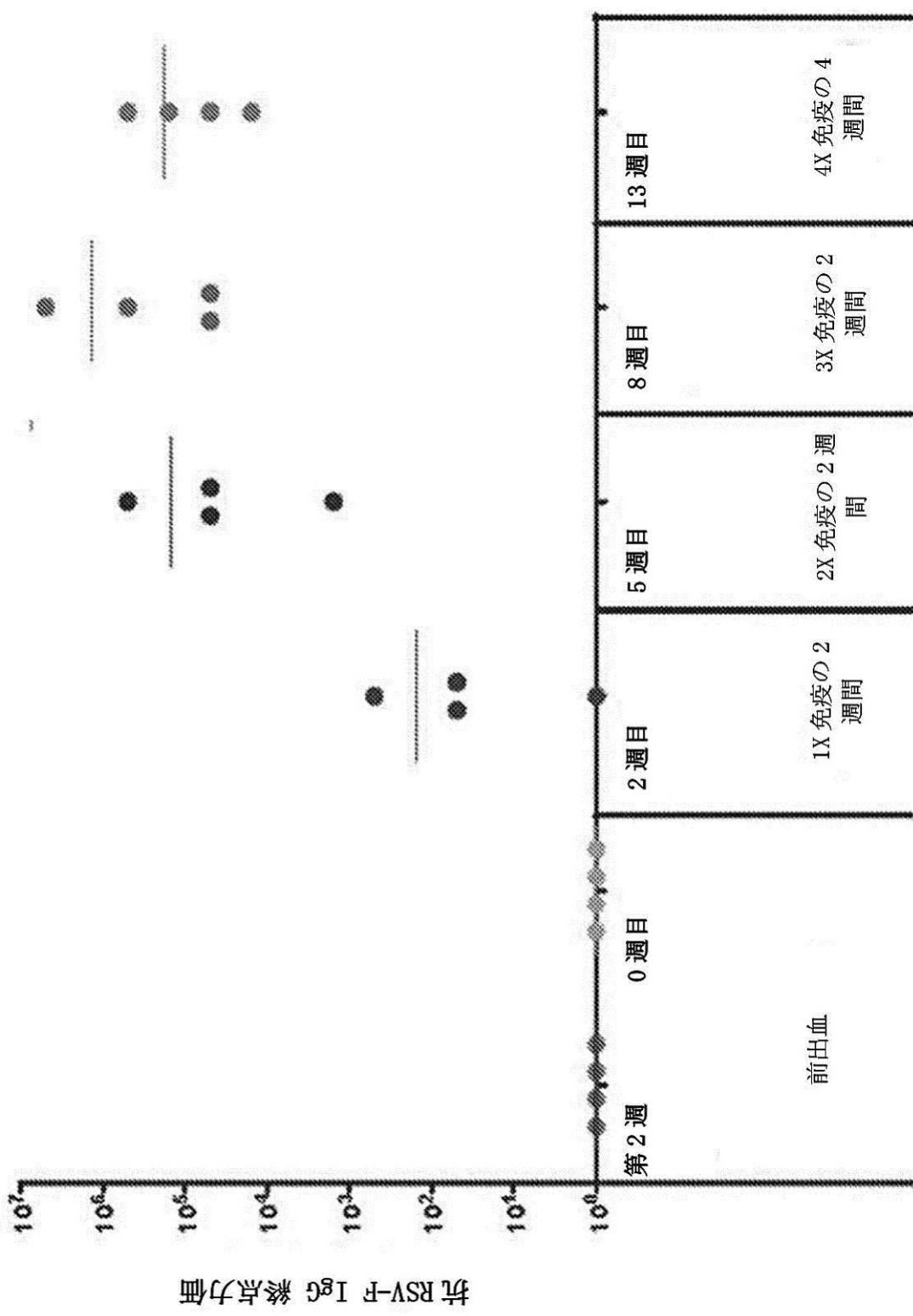


図 3 6

【図 37】

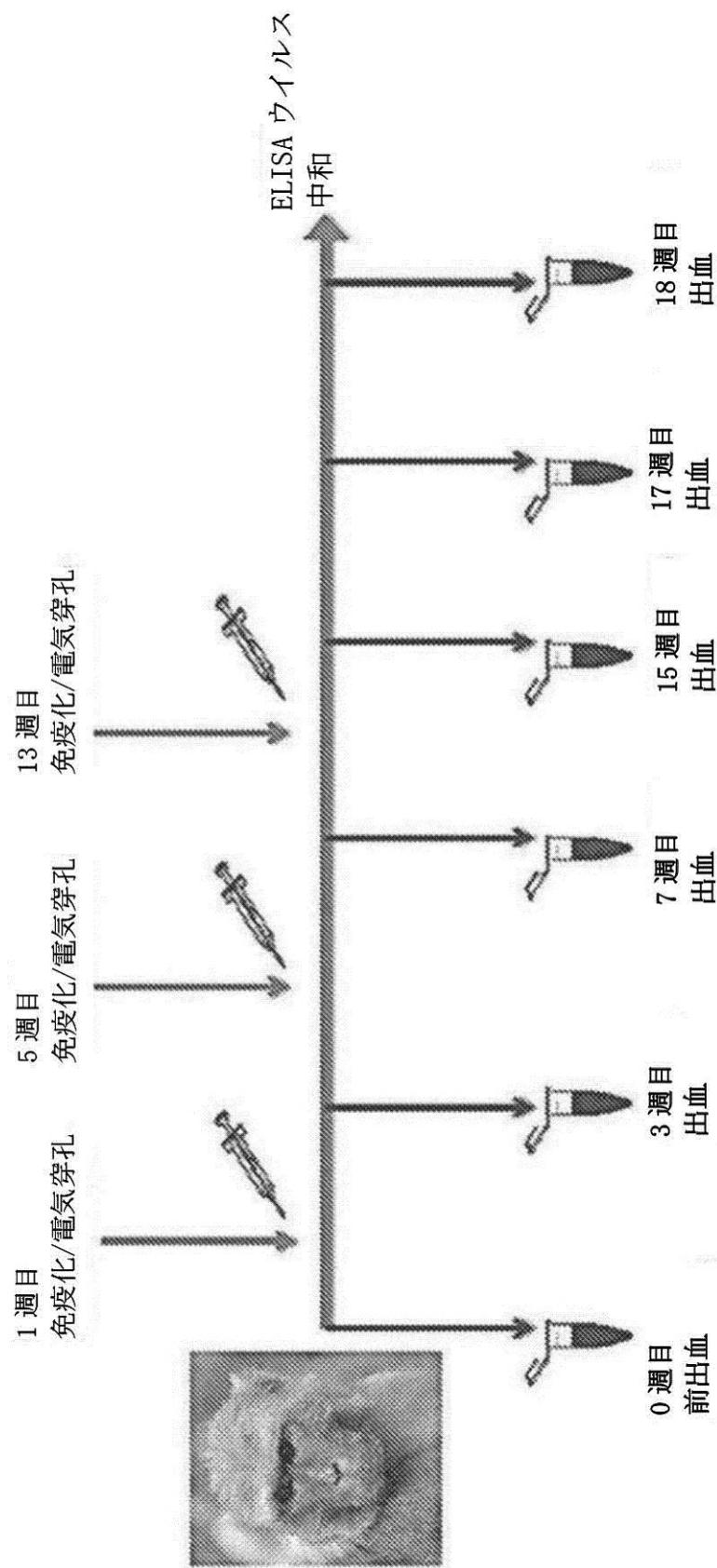
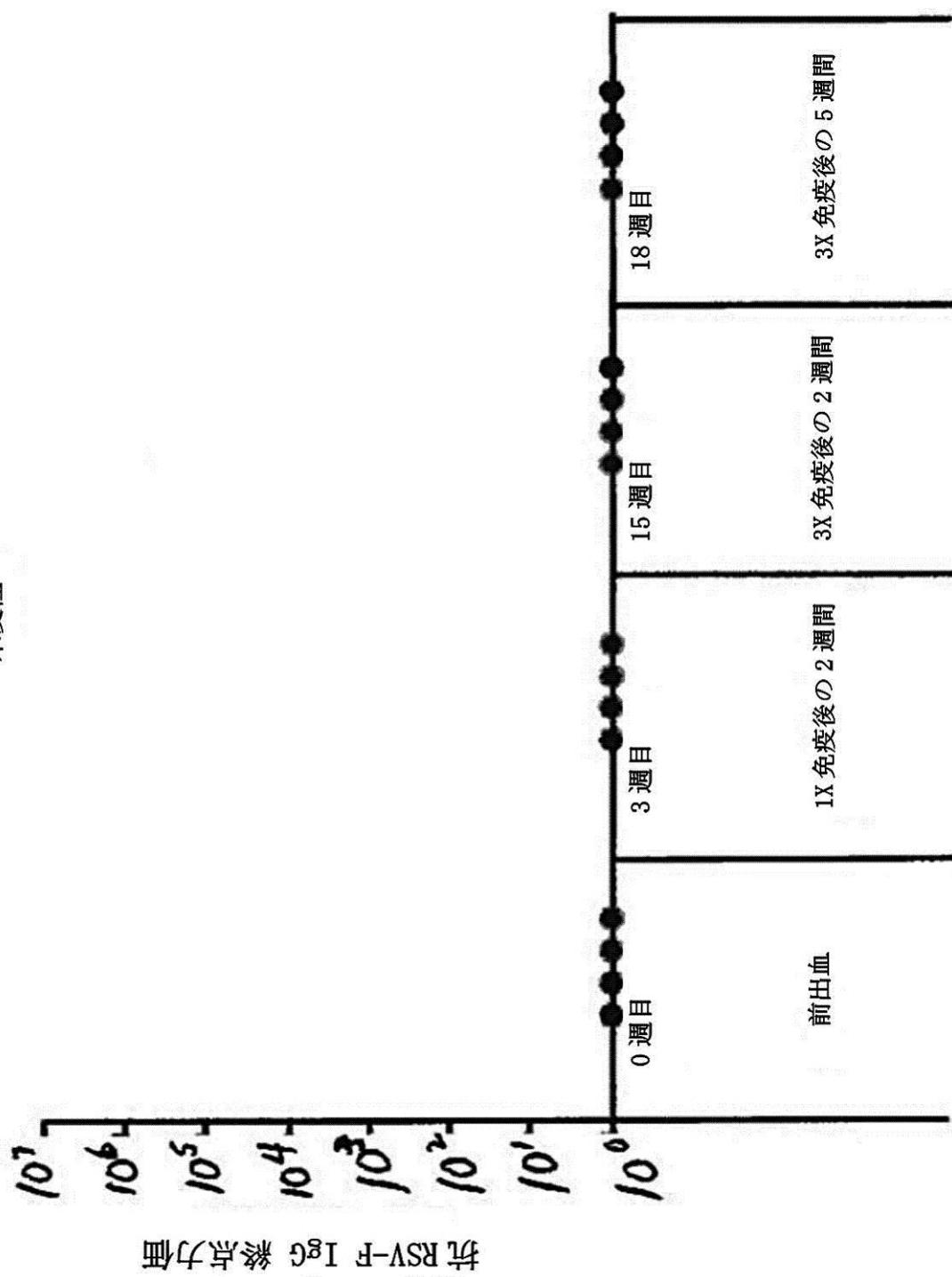


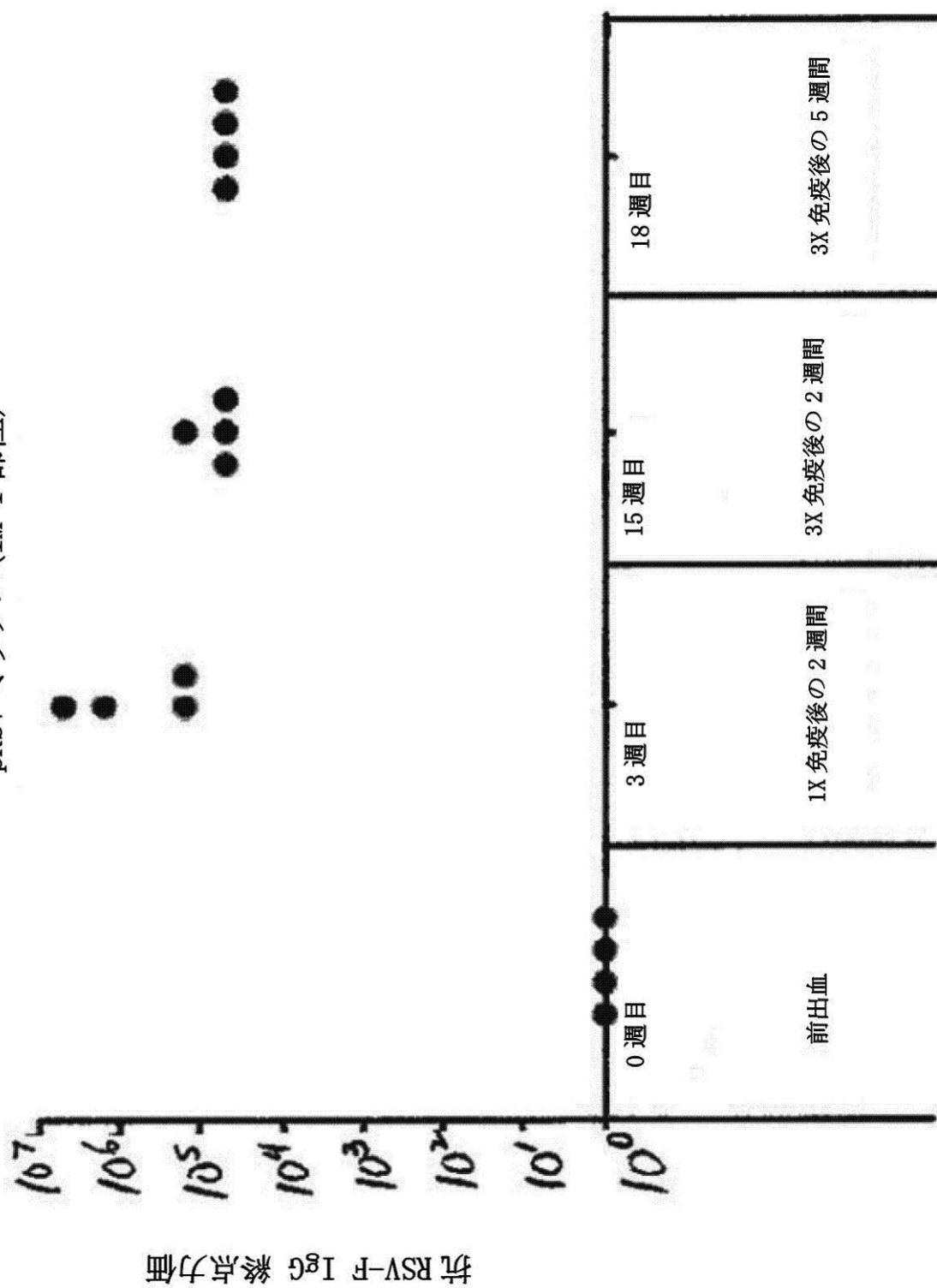
図 37

【図 3 8 A】

図 3 8 A
未変性

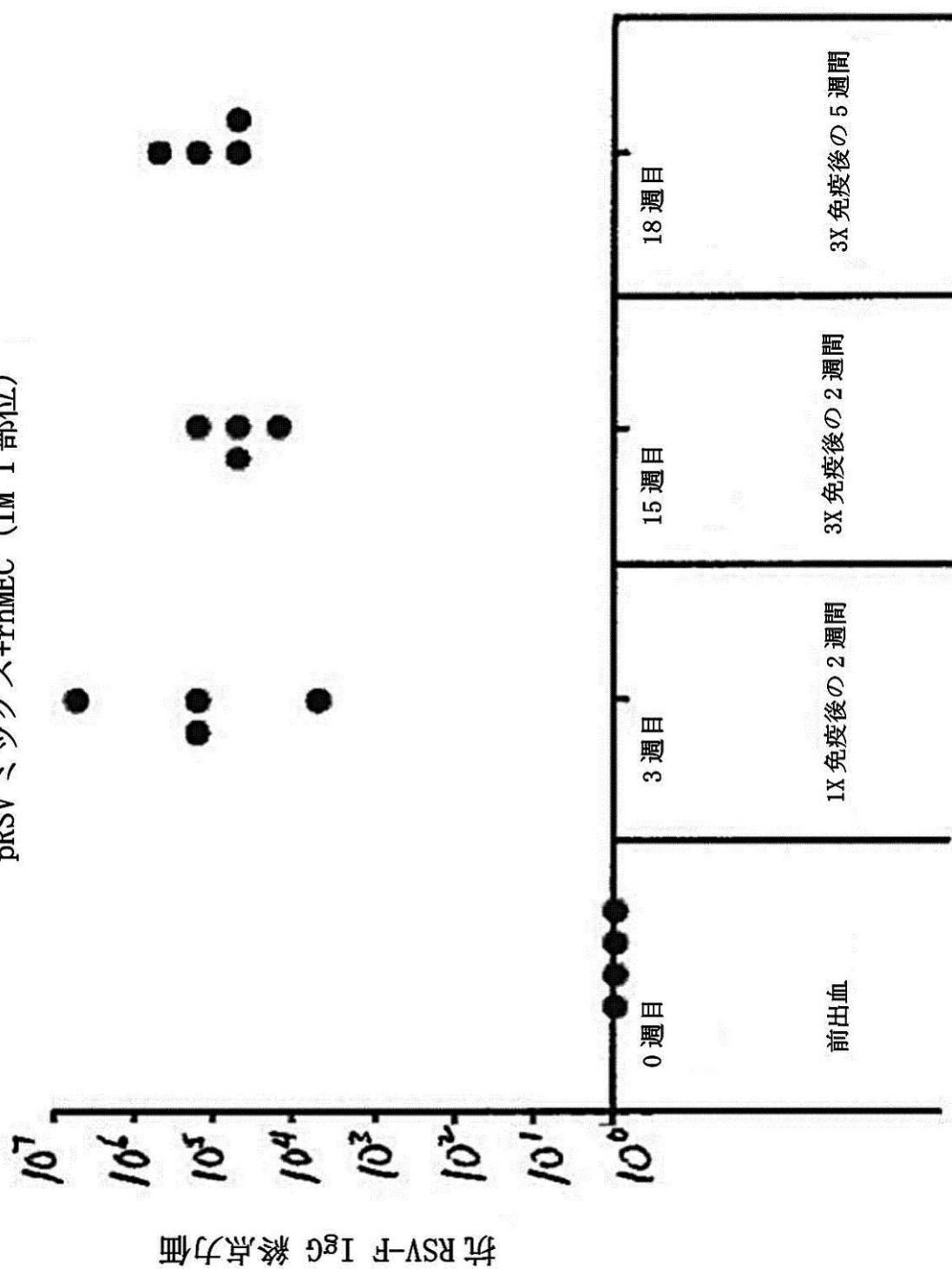
【図 3 8 B】

図 3 8 B
pRSV ミックス (IM 1 部位)



【図 3 8 C】

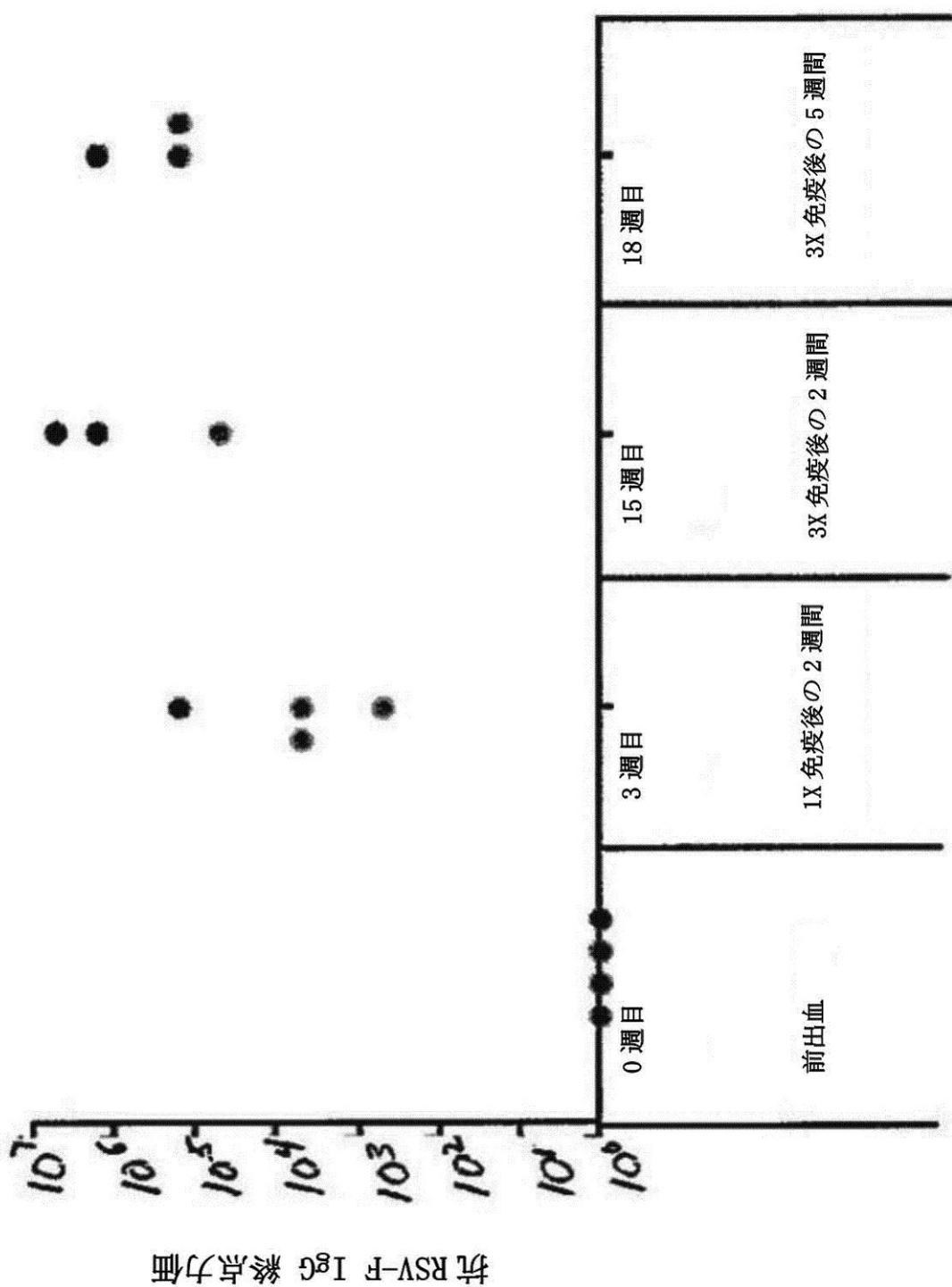
図 3 8 C
pRSV ミックス+rhMEC (IM 1 部位)



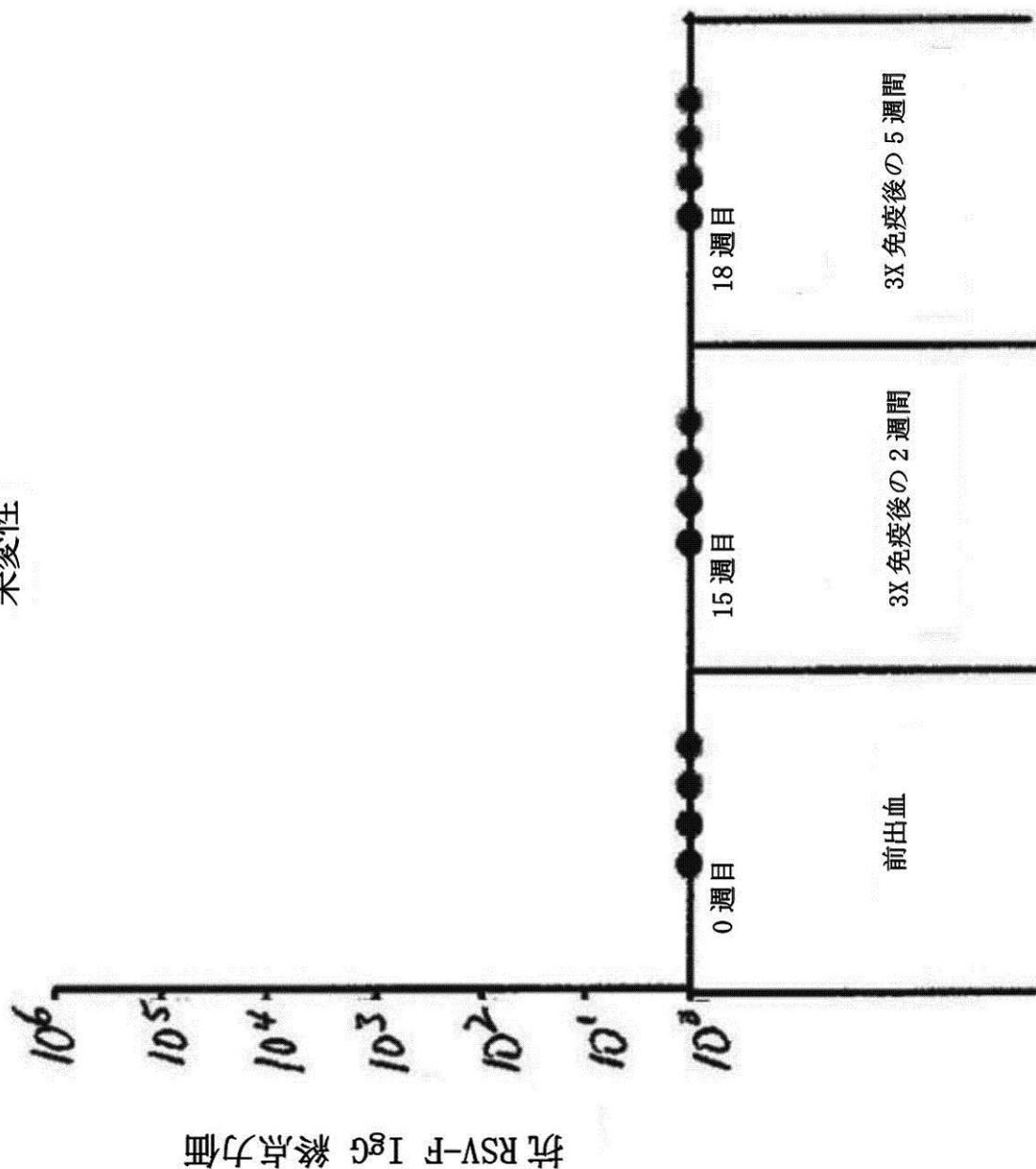
【図 3 8 D】

図 3 8 D

pRSV ミックス (ID 3 部位)

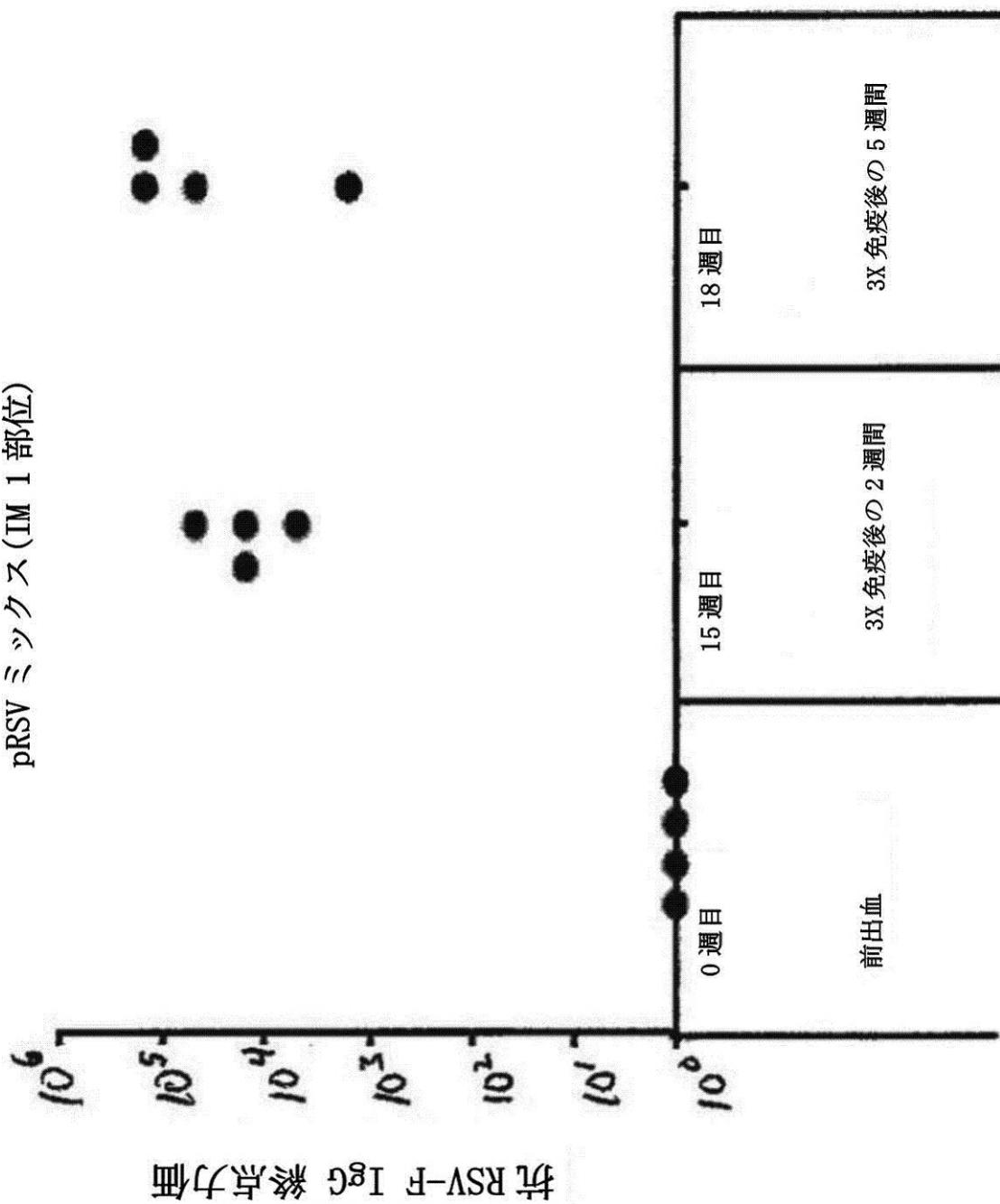


【図 39A】

図 39A
未変性

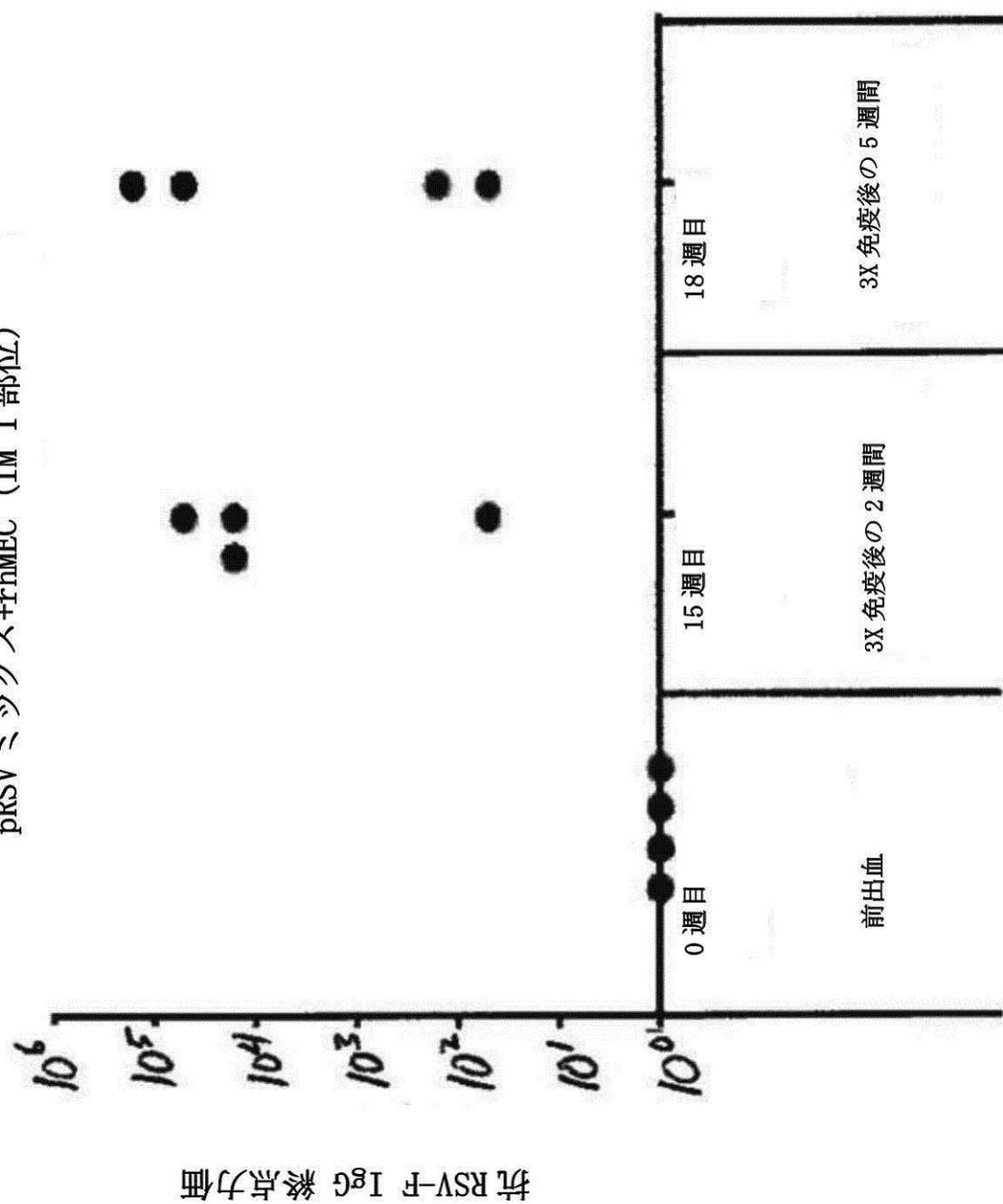
【図 3 9 B】

図 3 9 B
pRSV ミックス (IM 1 部位)



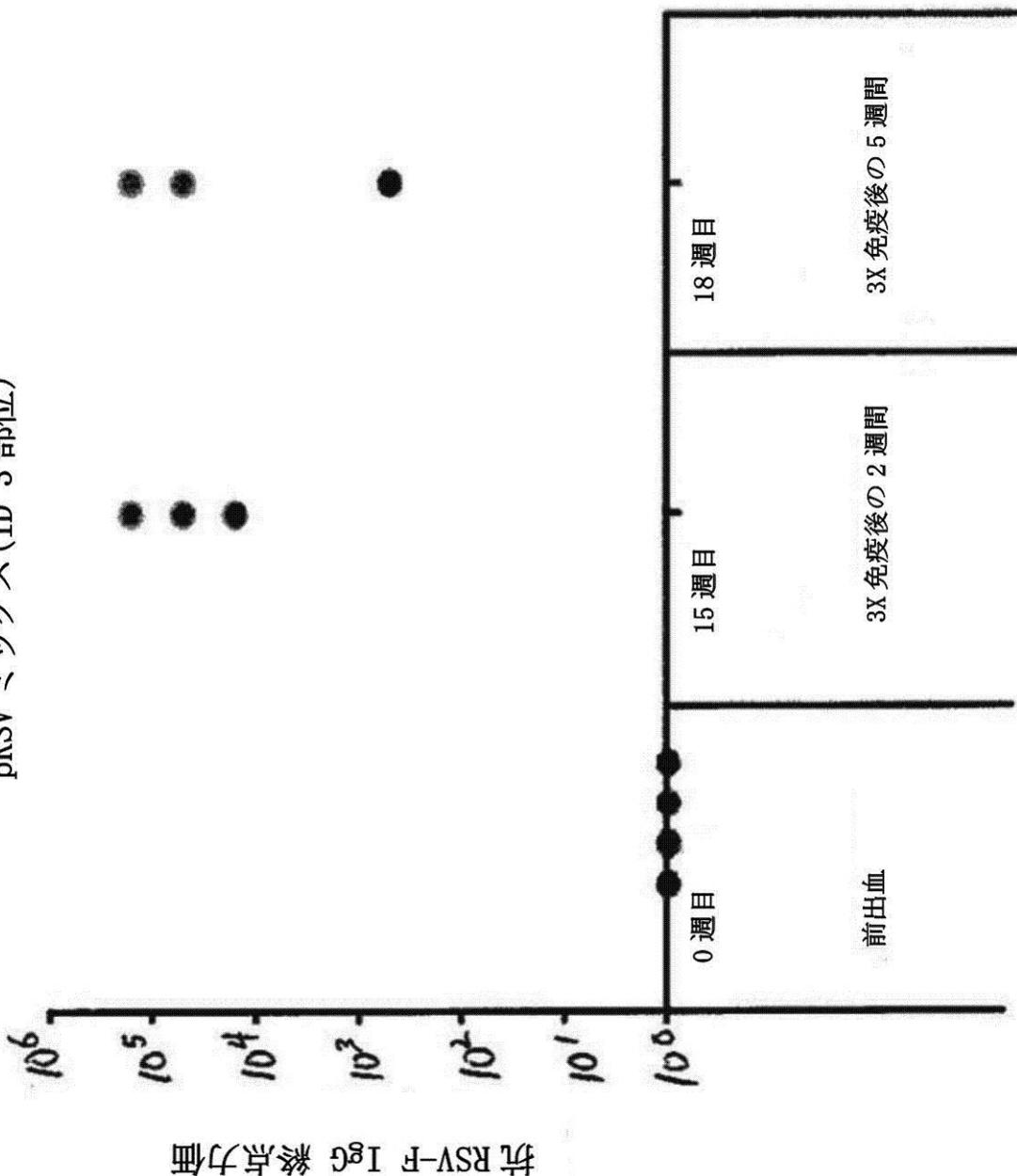
【図 3 9 C】

図 3 9 C
pRSV ミックサス+rhMEC (IM 1 部位)



【図 3 9 D】

図 3 9 D
pRSV ミックサス (ID 3 部位)



【図40】

ウサギおよび非ヒト靈長類試験におけるカクテルワクチンによる予備中和の結果

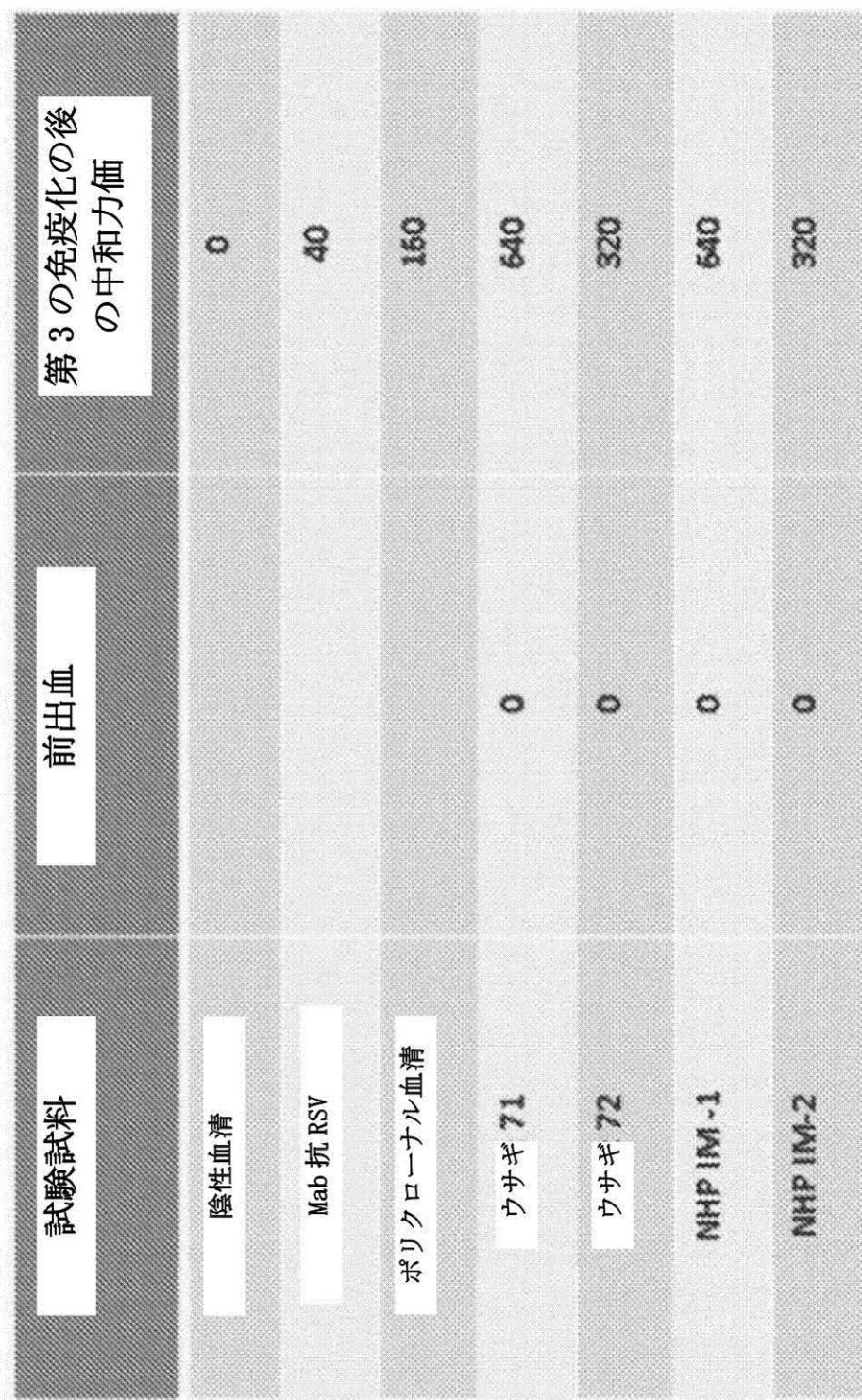


図40

【配列表】
2015514132000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/036006
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/135 (2013.01) USPC - 424/211.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/12, 39/155; A61P 31/14, 37/04; C07K 14/115, 14/135 (2013.01) USPC - 424/186.1, 199.1, 211.1; 435/69.1; 530/350		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: A61K 39/00, 39/155, 2039/5256; C07K 14/005, 14/135, 16/1027; C12N 2760/18522, 2760/18534		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Google Patents, Google, Pubmed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/114149 A2 (BLAIS et al) 25 September 2008 (25.09.2008) entire document	1-22
A	US 2011/0014220 A1 (CHOW et al) 20 January 2011 (20.01.2011) entire document	1-22
A	WO 2009/039178 A1 (KALERGIS et al) 26 March 2009 (26.03.2009) entire document	1-22
A	WO 2004/010935 A2 (YOUNG et al) 05 February 2004 (05.02.2004) entire document This document can be viewed by entering the doc number at the following url: http://worldwide.espacenet.com/numberSearch?locale=en_EP	1-22
P, Y	US 2012/0276142 A1 (WEINER et al) 01 November 2012 (01.11.2012) entire document	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 September 2013	Date of mailing of the international search report 20 SEP 2013	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
PCT/US2013/036008		
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:		
a. (means)	<input type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form	
b. (time)	<input checked="" type="checkbox"/> in the international application as filed <input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form <input type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purposes of search	
2. <input type="checkbox"/>	In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3. Additional comments:		
Specifically, SEQ ID NOs:1, 2, 9, and 10 were searched.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/036008

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Extra Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-22, limited to a composition comprising an RSV F immunogen, wherein the RSV F immunogen is selected to be SEQ ID NO:2, further comprising nucleic acid sequence SEQ ID NO:1 that encodes for SEQ ID NO:2; the composition further comprising the RSV F Immunogen of SEQ ID NO:2 operably linked to a signal peptide, wherein the RSV F Immunogen and signal peptide fusion protein is selected to be SEQ ID NO:10, encoded by nucleic acid sequence SEQ ID NO:9.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02

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

(74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74) 代理人 100150810
 弁理士 武居 良太郎
 (74) 代理人 100134784
 弁理士 中村 和美
 (72) 発明者 ディビッド ビー・ウェイナー
 アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19066, メリオン, ピーコン レーン 717
 (72) 発明者 ダニエル チュー
 アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19446, ランズデール, ダンレビー プレイス 796
 (72) 発明者 カルピア ムチュマニ
 アメリカ合衆国, ニュージャージー 08002, チェリー ヒル, アイビー レーン 52
 (72) 発明者 ニヤメケ オーベング - アジェイ
 アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19050, ランズダウン, スコットデール ロード 225
 エ - 509
 (72) 発明者 ベロニカ スコット
 アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19144, フィラデルフィア, ウエスト スクール ハウス
 レーン 437, アパートメント シー8
 F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA02 DA02 DA20 EA04 FA18
 4C084 AA02 AA13 BA44 DA12 DC50 MA02 MA16 MA52 MA56 MA57
 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 ZB331
 4C085 AA03 BA57 CC08 EE01 EE03 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08
 GG10
 4H045 AA11 BA10 CA01 DA86 EA31 FA74