

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7088841号

(P7088841)

(45)発行日 令和4年6月21日(2022.6.21)

(24)登録日 令和4年6月13日(2022.6.13)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/155(2006.01)

A 6 1 K 39/155

A 6 1 K 38/16 (2006.01)

A 6 1 K 38/16

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P 31/12

C 0 7 K 14/115(2006.01)

C 0 7 K 14/115

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

Z N A

請求項の数 3 (全25頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-552227(P2018-552227)

(86)(22)出願日 平成29年4月4日(2017.4.4)

(65)公表番号 特表2019-513377(P2019-513377
A)

(43)公表日 令和1年5月30日(2019.5.30)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/057962

(87)国際公開番号 WO2017/174568

(87)国際公開日 平成29年10月12日(2017.10.12)

審査請求日 令和2年3月9日(2020.3.9)

(31)優先権主張番号 16163810.1

(32)優先日 平成28年4月5日(2016.4.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

前置審査

(73)特許権者 516257833

ヤンセン ファッシンズ アンド プリベ
ンション ベーフェー
JANSSEN VACCINES &
PREVENTION B. V.
オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン
アルヒメーデスウェッハ 4

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100095360

弁理士 片山 英二

(74)代理人 100093676

弁理士 小林 純子

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 安定化された可溶性融合前 R S V F タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R S V 感染の予防に使用するための、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、組換え融合前呼吸器合胞体ウイルス (R S V) 融合 (F) タンパク質を含む組成物。

【請求項 2】

前記融合前コンフォメーション F タンパク質に特異的な少なくとも 1 種のエピトープを含み、前記少なくとも 1 種のエピトープは、配列番号 4 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 5 の重鎖 C D R 2 領域、配列番号 6 の重鎖 C D R 3 領域および配列番号 7 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 8 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 9 の軽鎖 C D R 3 領域を含む融合前特異的モノクローナル抗体、ならびに／または配列番号 10 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 11 の重鎖 C D R 2 領域、配列番号 12 の重鎖 C D R 3 領域および配列番号 13 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 14 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 15 の軽鎖 C D R 3 領域を含む融合前特異的モノクローナル抗体によって認識される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記タンパク質は三量体である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は医薬の分野に関する。本発明は、特に、組換え融合前 R S V F タンパク質、および、例えばワクチンとしてのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、毎年約200,000人の小児死亡の原因であると考えられている気道の伝染性が高い小児病原体である。2歳未満の小児では、RSVは呼吸器感染症による入院の約50%を占め、入院のピークは月齢2～4ヶ月で生じる。ほとんどすべての小児が2歳までにRSV感染を経験し、生涯にわたる反復感染は自然免疫の低さに起因すると報告されている。高齢者では、RSV疾患の負担は、一般的なインフルエンザA感染によって引き起こされるものと類似している。

【0003】

宿主細胞に感染するために、RSVは、インフルエンザウイルスおよびHIVなどの他のエンベロープウイルスのように、宿主細胞膜とウイルス膜の融合を必要とする。RSVの場合、保存的な融合タンパク質（RSV Fタンパク質）が、ウイルスと宿主細胞の細胞膜を融合させる。パラミクソウイルス研究に基づく現行のモデルでは、RSV Fタンパク質は、最初に、「融合前」コンフォメーションにフォールディングする。準安定な構造が、安定化する中和抗体Fabフラグメントとの複合体で最近解明された（McLellan et al., Science 340 (6136): 1113-7, 2013）。細胞侵入中に、融合前コンフォメーションは、リフォールディングし、その「融合後」コンフォメーションにコンフォメーション変化する（McLellan, J. Virol 85 (15): 7788-96, 2010; Swanson, PNAS 108 (23): 9619-24, 2011）。したがって、RSV Fタンパク質は、準安定な形態（融合前コンフォメーション）に最初フォールディングすることにより、不可逆的なタンパク質リフォールディングと膜並置を連結することによる膜融合を駆動する準安定なタンパク質であり、これは、その後、よりエネルギーの低いコンフォメーションへの不連続的／段階的なコンフォメーション変化を起こす。これらの観察は、融合前および融合後のRSV Fタンパク質が抗原的に異なることを示唆する（Calder, L. J. et al. Virology 271, 122-131 (2000)）。RSV-Fの電子顕微鏡から、融合前と融合後のF三量体との間に大きな構造的差異が存在することが明らかであり、これは結晶学によって最近確認されており（McLellan J. S. et al. Science 340 (6136): 1113-7 (2013) およびMcLellan J. S. et al. Science 342 (6158): 592-8 (2013)）、RSV陽性個体の血清中の中和抗体のほとんどが融合前Fに結合していることが示された（Ngwuta et al., Science Translational Medicine, 7 (309): 309ra162, 1-9）。

【0004】

RSV感染に対するワクチンは、現在入手可能ではなく、所望されている。RSV Fタンパク質に基づくワクチン候補は、例えば安定性、純度、再現性、および効力に関する問題のために失敗している。上記の指摘のように、結晶構造から、融合前状態と融合後状態との間にコンフォメーションの大きな変化があることが明らかになっている。再配列の規模から、RSV-Fの融合後コンフォメーションに対する抗体の一部しか、ウイルス表面上で融合前スパイクの生得コンフォメーションと交差反応できないことが示唆された。したがって、RSVに対するワクチンを作製する努力が、RSV Fタンパク質の融合前形態を含有するワクチンの開発に集中している（例えば、国際公開第20101149745号パンフレット、国際公開第2010/1149743号パンフレット、国際公開第2009/1079796号パンフレット、国際公開第2012/158613号パンフレットを参照）。しかしながら、これらの努力によっても、ヒトで試験するための候補として使用することができる安定な融合前RSV Fタンパク質を得るまでに至っていない。

【0005】

したがって、RSVに対する効果的なワクチンおよびワクチン接種方法、特に融合前コンフォメーション状態のRSV Fタンパク質を含むワクチンおよび方法が依然として要望されている。本発明は、RSVに対するそのようなワクチンおよび安全で効果的にワクチ

10

20

30

40

50

ン接種するための方法を提供することを目的とする。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は安定な組換え融合前呼吸器合胞体ウイルス（RSV）融合（F）タンパク質、すなわち、融合前コンフォメーションで安定化された可溶性形態（すなわち、膜に結合していない）組換えRSV Fタンパク質を提供するものであり、このRSV Fタンパク質は、配列番号1、配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列またはその断片を含む。

【0007】

ある実施形態では、RSV Fタンパク質またはその断片は融合前コンフォメーションのFタンパク質に特異的な少なくとも1つのエпитープを含み、その少なくとも1つのエпитープは、配列番号4の重鎖CDR1領域、配列番号5重鎖CDR2領域、配列番号6の重鎖CDR3領域および配列番号7の軽鎖CDR1領域、配列番号8の軽鎖CDR2領域、および配列番号9の軽鎖CDR3領域を含む融合前特異的モノクローナル抗体、ならびに／または配列番号10の重鎖CDR1領域、配列番号11の重鎖CDR2領域、配列番号12の重鎖CDR3領域および配列番号13の軽鎖CDR1領域、配列番号14の軽鎖CDR2領域、および配列番号15の軽鎖CDR3領域を含む融合前特異的モノクローナル抗体によって認識される。

【0008】

ある実施形態では、RSV Fタンパク質は三量体である。

【0009】

本発明はまた、本発明による融合前RSV Fタンパク質またはその断片をコードする核酸分子、およびそのような核酸分子を含むベクターを提供する。

【0010】

本発明はまた、前記RSV融合前Fタンパク質（またはその断片）を含む組成物、好ましくは免疫原性組成物、前記RSV融合前Fタンパク質をコードする核酸分子、およびRSV Fタンパク質に対する免疫応答の誘導におけるその使用、特にワクチンとしてのその使用に関する。本発明はまた、対象に抗呼吸器合胞体ウイルス（RSV）免疫応答を誘導するための方法であって、有効量の融合前RSV Fタンパク質、前記RSV Fタンパク質をコードする核酸分子、および／または前記核酸分子を含むベクターを対象に投与することを含む方法に関する。好ましくは、誘導される免疫応答は、RSVに対する中和抗体および／またはRSVに対する防御免疫を特徴とする。特定の態様では、本発明は、対象に抗呼吸器合胞体ウイルス（RSV）Fタンパク質中和抗体を誘導するための方法であって、融合前RSV Fタンパク質、前記RSV Fタンパク質をコードする核酸分子、および／または前記核酸分子を含むベクターを含む有効量の免疫原性組成物を対象に投与することを含む方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】 RSV F変異体の模式図。SCDM—本鎖二重変異体、SCTM—本鎖三重変異体、PRQM—プロセシングされた四重変異体およびPRPM—プロセシングされた五重変異体。分泌タンパク質を、シグナルペプチドおよびp27断片なしで示す。F1およびF2ドメイン、ならびに融合ペプチド（FP）、フィブリチン三量化ドメイン（フォルドン）、およびF2とF1の間の一本鎖タンパク質のリンカー（GSGSG）が示されている。3つの安定化変異（N67I、S215PおよびD386N）（黒の菱形）。循環株に対する抗原マッチを改善するための2つの変異（K66EおよびI76V）（灰色の菱形）。残基の位置は、シグナルペプチドを含む完全長野生型タンパク質におけるように番号付けされている。

【図2】 複数のアミノ酸置換を有するプロセシングされたRSV F PR-A2変異体のタンパク質発現レベルおよび融合前安定性。細胞培養上清におけるタンパク質発現レベル

10

20

30

40

50

を、トランスフェクションの72時間後に、CR9501およびCR9503（左のバー）による定量オクテット（Q-オクテット）、ならびに採取日および4℃での指示された期間の保存後の融合前特異的CR9501抗体に結合するRSV Fタンパク質の画分（右のバー）によって試験した。バーは2～4回の測定値の平均を表し、線は値の範囲を表す。

【図3】精製したRSV-Fタンパク質の融点（T_m）。各測定値は点で表されている。

【図4】K66EおよびI76Vアミノ酸による置換は、Fタンパク質発現レベルおよび融合前の安定性に影響を及ぼさなかった。細胞培養上清におけるタンパク質発現レベルを、トランスフェクションの96時間後に、CR9501およびCR9503（左のバー）によるQ-オクテット、ならびに採取日および4℃での指示された期間の保存後の融合前特異的CR9501抗体に結合するRSV Fタンパク質の画分（右のバー）によって試験した。バーは2回の測定値の平均を表し、線は値の範囲を表す。

【図5】CHO細胞培養上清におけるFタンパク質変異体の融合前安定性。細胞培養上清におけるタンパク質発現レベルを、トランスフェクションの96時間後に、CR9501およびCR9503によるQ-オクテット、ならびに採取日および4℃での指示された期間の保存後の融合前特異的CR9501抗体に結合するRSV Fタンパク質の画分によって試験した。バーは2回の測定値の平均を表し、線は値の範囲を表す。PRQM-N67I、S215P、K66EおよびI76Vを含むPR-A2；PRPM-N67I、S215P、K66E、I76VおよびD486Nを含むPR-A2。

【図6-1】本発明のRSV Fタンパク質は、pH5のCHO細胞培養上清中で無傷のままである。Fタンパク質変異体を含む細胞培養上清のpHをpH5に調整し、7日目に試料をプロテアーゼ阻害剤と共に、またはプロテアーゼ阻害剤なしでインキュベートした。試料を還元条件下、SDS-PAGEで分析した。各ゲルの第1レーンは分子量標準マーカーであり、標準タンパク質のサイズを示す。試料：1- 0日目の試料；2- 4℃でインキュベートした7日目の試料；3- 4℃でプロテアーゼ阻害剤と共にインキュベートした7日目の試料；4- 0日目の試料；5- 室温でインキュベートした7日目の試料；6- プロテアーゼ阻害剤と共に室温でインキュベートした7日目の試料；7- 0日目の試料；8- 37℃でインキュベートした7日目の試料；9- プロテアーゼ阻害剤と共に37℃でインキュベートした7日目の試料。プロセッシングされたタンパク質試料では、下のバンドはF1ドメインを表し、上のバンドは部分的にプロセッシングされたタンパク質（F1+p27）またはプロセッシングされていないタンパク質F1+F2を表す。一本鎖タンパク質試料では、バンドはF1+F2ドメインである。PRQM-N67I、S215P、K66EおよびI76Vを含むPR-A2；PRPM-N67I、S215P、K66E、I76VおよびD486Nを含むPR-A2。LNR：K683-065。

【図6-2】本発明のRSV Fタンパク質は、pH5のCHO細胞培養上清中で無傷のままである。Fタンパク質変異体を含む細胞培養上清のpHをpH5に調整し、7日目に試料をプロテアーゼ阻害剤と共に、またはプロテアーゼ阻害剤なしでインキュベートした。試料を還元条件下、SDS-PAGEで分析した。各ゲルの第1レーンは分子量標準マーカーであり、標準タンパク質のサイズを示す。試料：1- 0日目の試料；2- 4℃でインキュベートした7日目の試料；3- 4℃でプロテアーゼ阻害剤と共にインキュベートした7日目の試料；4- 0日目の試料；5- 室温でインキュベートした7日目の試料；6- プロテアーゼ阻害剤と共に室温でインキュベートした7日目の試料；7- 0日目の試料；8- 37℃でインキュベートした7日目の試料；9- プロテアーゼ阻害剤と共に37℃でインキュベートした7日目の試料。プロセッシングされたタンパク質試料では、下のバンドはF1ドメインを表し、上のバンドは部分的にプロセッシングされたタンパク質（F1+p27）またはプロセッシングされていないタンパク質F1+F2を表す。一本鎖タンパク質試料では、バンドはF1+F2ドメインである。PRQM-N67I、S215P、K66EおよびI76Vを含むPR-A2；PRPM-N67I、S215P、K66E、I76VおよびD486Nを含むPR-A2。LNR：K683-065。

【図6-3】本発明のRSV Fタンパク質は、pH5のCHO細胞培養上清中で無傷の

ままである。Fタンパク質変異体を含む細胞培養上清のpHをpH5に調整し、7日目に試料をプロテアーゼ阻害剤と共に、またはプロテアーゼ阻害剤なしでインキュベートした。試料を還元条件下、SDS-PAGEで分析した。各ゲルの第1レーンは分子量標準マーカーであり、標準タンパク質のサイズを示す。試料：1－0日目の試料；2－4℃でインキュベートした7日目の試料；3－4℃でプロテアーゼ阻害剤と共にインキュベートした7日目の試料；4－0日目の試料；5－室温でインキュベートした7日目の試料；6－プロテアーゼ阻害剤と共に室温でインキュベートした7日目の試料；7－0日目の試料；8－37℃でインキュベートした7日目の試料；9－プロテアーゼ阻害剤と共に37℃でインキュベートした7日目の試料。プロセッシングされたタンパク質試料では、下のバンドはF1ドメインを表し、上のバンドは部分的にプロセッシングされたタンパク質（F1+p27）またはプロセッシングされていないタンパク質F1+F2を表す。一本鎖タンパク質試料では、バンドはF1+F2ドメインである。PRQM-N67I、S215P、K66EおよびI76Vを含むPR-A2；PRPM-N67I、S215P、K66E、I76VおよびD486Nを含むPR-A2。LNR：K683-065。

【図7-1】CHO細胞培養上清におけるRSV Fタンパク質の温度安定性。上清試料を温度45～65℃で30分間熱処理した。試料中の融合前タンパク質の量を、CR9501抗体を用いたELISAで測定した。値を未処理試料（20℃）に対して正規化した。各タンパク質の曲線を個別に示し、すべての曲線の重ね合わせを示す（右下）。各点は反復測定を表す。2つのアッセイを、それぞれ2回の技術的反復により実施した。曲線は、非線形回帰可変勾配方程式（GraphPad Prism）を用いてフィッティングし、融点（Tm）をIC50値として計算した。PRQM-N67I、S215P、K66EおよびI76Vを含むPR-A2；PRPM-N67I、S215P、K66E、I76VおよびD486Nを含むPR-A2。

【図7-2】CHO細胞培養上清におけるRSV Fタンパク質の温度安定性。上清試料を温度45～65℃で30分間熱処理した。試料中の融合前タンパク質の量を、CR9501抗体を用いたELISAで測定した。値を未処理試料（20℃）に対して正規化した。各タンパク質の曲線を個別に示し、すべての曲線の重ね合わせを示す（右下）。各点は反復測定を表す。2つのアッセイを、それぞれ2回の技術的反復により実施した。曲線は、非線形回帰可変勾配方程式（GraphPad Prism）を用いてフィッティングし、融点（Tm）をIC50値として計算した。PRQM-N67I、S215P、K66EおよびI76Vを含むPR-A2；PRPM-N67I、S215P、K66E、I76VおよびD486Nを含むPR-A2。

【図7-3】CHO細胞培養上清におけるRSV Fタンパク質の温度安定性。上清試料を温度45～65℃で30分間熱処理した。試料中の融合前タンパク質の量を、CR9501抗体を用いたELISAで測定した。値を未処理試料（20℃）に対して正規化した。各タンパク質の曲線を個別に示し、すべての曲線の重ね合わせを示す（右下）。各点は反復測定を表す。2つのアッセイを、それぞれ2回の技術的反復により実施した。曲線は、非線形回帰可変勾配方程式（GraphPad Prism）を用いてフィッティングし、融点（Tm）をIC50値として計算した。PRQM-N67I、S215P、K66EおよびI76Vを含むPR-A2；PRPM-N67I、S215P、K66E、I76VおよびD486Nを含むPR-A2。

【図8-1】RSV A2のチャレンジから5日後の肺および鼻におけるRSV力価。RSV A2のチャレンジから5日後の肺（上のパネル）および鼻（下のパネル）におけるRSV力価。検出下限（LOD）を点線で示す。平均力価（組織1g当たりのlog10 pfu）を横棒で示す。Cochran-Mantel-Haenszel検定により、アジュバント添加PRPM群とアジュバント非添加PRPM群を用量で比較し、統計的な差を図に示す。i.m.：筋肉内；i.n.：鼻腔内。

【図8-2】RSV A2のチャレンジから5日後の肺および鼻におけるRSV力価。RSV A2のチャレンジから5日後の肺（上のパネル）および鼻（下のパネル）におけるRSV力価。検出下限（LOD）を点線で示す。平均力価（組織1g当たりのlog10

10

20

30

40

50

p f u) を横棒で示す。Cochran-Mantel-Haenszel 検定により、アジュバント添加 PRPM 群とアジュバント非添加 PRPM 群を用量で比較し、統計的な差を図に示す。i. m. : 筋肉内; i. n. : 鼻腔内。

【図 9】 プライミング後 49 日目のコットンラット血清中の RSV A Long に対する RSV 中和力価。プライミング後 49 日目のコットンラット血清における RSV A Long に対する RSV 中和力価 (IC50 (log2)) を、ELISA からの読み出しを用いて、決定した。各群の平均を水平棒で示す。検出限界 (LOD) を 3.0 (log2、破線で示す) に設定する。アジュバント添加とアジュバント非添加の PRPM により誘導された VNA 力価を ANOVA により用量で比較し、結果を図に示す。i. m. : 筋肉内; i. n. : 鼻腔内。

【発明を実施するための形態】

【0012】

呼吸器合胞体ウイルス (RSV) の融合タンパク質 (F) は、宿主細胞膜とウイルス膜の融合に関与し、感染に必要とされる。RSV F mRNA は F0 と呼ばれる 574 のアミノ酸前駆体タンパク質に翻訳され、これは小胞体中のシグナルペプチダーゼによって除去される N 末端の 26 アミノ酸からなるシグナルペプチド配列を含む。F0 は、トランスゴルジにおいて、細胞フーリン様プロテアーゼにより 2 つの部位 (アミノ酸残基 109 / 110 間および 136 / 137 間) で切断され、アミノ酸残基 110 ~ 136 を含む短いグリコシル化介在配列 (p27 領域とも呼ばれる) が除去され、F1 および F2 と称される 2 つのドメインまたはサブユニットが生成される。F1 ドメイン (アミノ酸残基 137 ~ 574) は、その N 末端に疎水性融合ペプチドを有し、C 末端に膜貫通 (TM) (アミノ酸残基 530 ~ 550) 領域および細胞質領域 (アミノ酸残基 551 ~ 574) を有する。F2 ドメイン (アミノ酸残基 27 ~ 109) は、2 つのジスルフィド架橋により F1 に共有結合する。F1-F2 ヘテロ二量体は、ビリオン中でホモ三量体として集合している。

【0013】

RSV 感染に対するワクチンは、現在入手可能ではないが所望されている。ワクチン製造に有望な 1 つのアプローチは、精製された RSV F タンパク質に基づくサブユニットワクチンである。しかしながら、このアプローチの場合、精製された RSV F タンパク質は、RSV F タンパク質の融合前状態のコンフォメーションに類似したコンフォメーションにあり、経時的に安定であり、かつ十分な量で製造できることが望ましい。加えて、サブユニットベースのワクチンの場合、RSV F タンパク質を、膜貫通 (TM) 領域および細胞質領域の欠失により短縮して、可溶性分泌型 F タンパク質 (sF) を生成させる必要がある。TM 領域は膜アンカリングおよび三量体形成を担うため、アンカーなしの可溶性 F タンパク質は、完全長タンパク質よりもかなり不安定であり、融合後最終状態に容易にリフォールディングするであろう。したがって、高い発現レベルおよび高い安定性を示す安定な融合前コンフォメーションの可溶性 F タンパク質を得るために、融合前コンフォメーションを安定化させる必要がある。

【0014】

融合前コンフォメーションの RSV F タンパク質を安定化するいくつかの変異は、既に国際公開第 2014 / 174018 号パンフレットおよび国際公開第 2014 / 202570 号パンフレットに記載されている。本発明による RSV F タンパク質は、2 つのさらなる変異と組み合わせ、先に記載された変異の特有かつ特異的なサブセットを含む。本発明によれば、本発明の変異のこの特有の組み合わせが、RSV F タンパク質発現レベルを増加させ、かつ融合前コンフォメーションの安定をもたらすことが示された。

【0015】

したがって、本発明は新規の安定な可溶性融合前 RSV F タンパク質、すなわち、融合前コンフォメーションで安定化された可溶性 RSV F タンパク質、またはその断片を提供する。本発明による RSV F タンパク質は、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0016】

本発明に至る研究では、前記の安定な可溶性融合前 R S V F タンパク質を得るために、ヘテロ三量体化ドメインと共に特有の変異の組み合わせを導入した。本発明の安定な融合前 R S V F タンパク質は、融合前コンフォメーションで存在する、すなわち、それらは、融合前コンフォメーション F タンパク質に特異的な少なくとも 1 つのエピトープを含む（示す）。融合前コンフォメーション F タンパク質に特異的なエピトープは、融合後コンフォメーションでは現れないエピトープである。いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、R S V F タンパク質の融合前コンフォメーションは、天然 R S V ビリオンで発現する R S V F タンパク質のものと同一エピトープを含有することができ、したがって、予防的中和抗体を誘発する利点を備え得ると考えられる。

【0017】

ある実施形態では、本発明の R S V 融合前 F タンパク質（またはその断片）は、配列番号 4 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 5 の重鎖 C D R 2 領域、配列番号 6 の重鎖 C D R 3 領域および配列番号 7 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 8 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 9 の軽鎖 C D R 3 領域（以下、C R 9 5 0 1 という）を含む融合前特異的モノクローナル抗体、ならびに／または配列番号 10 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 11 の重鎖 C D R 2 領域、配列番号 12 の重鎖 C D R 3 領域および配列番号 13 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 14 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 15 の軽鎖 C D R 3 領域（C R 9 5 0 2 という）を含む融合前特異的モノクローナル抗体により認識される、少なくとも 1 つのエピトープを含む。C R 9 5 0 1 および C R 9 5 0 2 は、それぞれ抗体 5 8 C 5 および 3 0 D 8 の重鎖および軽鎖可変領域を含み、したがって、それらの抗体の結合特異性を有するが、それらの抗体は、融合後コンフォメーションではなく、融合前コンフォメーションの R S V F タンパク質に特異的に結合することが以前より示されている（国際公開第 2 0 1 2 / 0 0 6 5 9 6 号パンフレットに開示されているように）。

【0018】

ある実施形態では、組換え融合前 R S V F タンパク質は三量体である。

【0019】

本出願の全体にわたって使用される場合、当該技術分野での慣例として、ヌクレオチド配列は、5' から 3' の方向で提示され、アミノ酸配列は、N 末端から C 末端の方向で提示される。

【0020】

上記のように、融合前 R S V F タンパク質の断片もまた、本発明に含まれる。断片はアミノ末端（例えば、シグナル配列を切断することにより）およびカルボキシ末端欠失のいずれかまたは両方から生じ得る。この断片は、F タンパク質の免疫学的に活性な断片、すなわち、対象に免疫応答を生じさせる部分を含むように選択され得る。これは、当業者にはすべてルーチン的である、インシリコ、インビトロ、および／またはインビボの方法を使用して容易に決定することができる。

【0021】

ある実施形態では、本発明によるコード化タンパク質は、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 のアミノ酸 1 ～ 2 6 に対応する、リーダー配列またはシグナルペプチドとも呼ばれるシグナル配列を含む。シグナル配列は、通常、分泌経路に向かう、新たに合成された大部分のタンパク質の N 末端に存在する短い（例えば、5 ～ 3 0 アミノ酸長）アミノ酸配列であり、一般に、シグナルペプチダーゼによって切断されて、遊離のシグナルペプチドと成熟タンパク質を生成する。

【0022】

ある実施形態では、本発明によるタンパク質はシグナル配列を含まない。

【0023】

本発明は、さらに、本発明による R S V 融合前 F タンパク質またはその断片をコードする核酸分子を提供する。

【0024】

好ましい実施形態では、本発明による R S V F タンパク質をコードする核酸分子は、哺

10

20

30

40

50

乳動物細胞、好ましくはヒト細胞における発現用にコドン最適化されている。コドン最適化の方法は既知であり、これまでに記述されている（例えば、国際公開第96/09378号パンフレット）。野生型配列と比べて少なくとも1つの好ましくないコドンがより好ましいコドンで置換される場合に、配列はコドン最適化されると考えられる。本明細書では、好ましくないコドンとは、生物において、同じアミノ酸をコードする別のコドンと比べて使用される頻度が低いコドンであり、より好ましいコドンとは、生物において、好ましくないコドンと比べて使用される頻度が高いコドンである。特定の生物におけるコドン使用の頻度は、コドン頻度表、例えば、<http://www.kazusa.or.jp/codon>に見出すことができる。好ましくは、2つ以上の好ましくないコドン、好ましくは、ほとんどまたはすべての好ましくないコドンが、より好ましいコドンに置き換えられる。好ましくは、生物で最も高頻度使用されるコドンがコドン最適化配列に使用される。好ましいコドンに置き換えられると、概して発現が高くなる。

【0025】

多くの異なるポリヌクレオチドおよび核酸分子が、遺伝子コードの縮重の結果として同じタンパク質をコードし得ることは当業者に理解されるであろう。また、当業者が慣例の技術を使用して、タンパク質を発現させることになる任意の特定の宿主生物のコドン使用を反映するように、核酸分子がコードするタンパク質配列に影響を及ぼさないヌクレオチド置換を行い得ることも、理解される。したがって、特に指定しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、相互の縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含んでも含まなくてもよい。

【0026】

核酸配列は、慣例の分子生物学技術を使用してクローン化することができ、またはDNA合成により新規に作製することができ、それは、DNA合成および／または分子クローニングの分野の事業を有するサービス会社（例えば、GeneArt、GenScript、Invitrogen、Eurofins）により、慣例の手順を使用して行われ得る。

【0027】

ある実施形態では、核酸分子は配列番号21、22または23のヌクレオチド配列を含む。

【0028】

本発明はまた、上記の核酸分子を含むベクターを提供する。したがって、ある実施形態では、本発明による核酸分子はベクターの一部である。このようなベクターは、当業者によく知られた方法により容易に操作することができ、例えば、原核細胞および／または真核細胞において複製できるように設計することができる。加えて、多くのベクターは、真核細胞の形質転換に使用することができ、そのような細胞のゲノムに全体としてまたは部分的に組み込まれ、その結果、そのゲノムに所望の核酸を含む安定な宿主細胞が得られる。使用されるベクターは、DNAのクローニングに適し、目的の核酸の転写に使用することができるものであれば、いかなるベクターでもよい。当業者は、好適な発現ベクターを選択し、本発明の核酸配列を機能的に挿入することができる。

【0029】

融合前RSV Fタンパク質をコードする核酸分子を含む宿主細胞もまた本発明の一部を形成する。融合前RSV Fタンパク質は、宿主細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、腫瘍細胞株、BHK細胞、ヒト細胞株、例えばHEK293細胞、PER.C6細胞、もしくは酵母、真菌、昆虫細胞など、またはトランスジェニック動物もしくはトランスジェニック植物における分子の発現を含む組換えDNA技術によって生成することができる。ある実施形態では、細胞は多細胞生物由来であり、ある実施形態では、細胞は脊椎動物または無脊椎動物起源である。ある実施形態では、細胞は哺乳動物細胞である。ある実施形態では、細胞はヒト細胞である。一般に、宿主細胞における、本発明の融合前RSV Fタンパク質などの組換えタンパク質の生成は、発現可能形式でそのタンパク質をコードする異種核酸分子の宿主細胞への導入、核酸分子の発現に資する条件

10

20

30

40

50

下での細胞の培養、および前記細胞におけるタンパク質発現を可能にすることを含む。発現可能形式でタンパク質をコードする核酸分子は、発現カセットの形態であってもよく、通常、エンハンサー、プロモーター、ポリアデニル化シグナルなど、核酸の発現をもたらすことができる配列を必要とする。当業者は、宿主細胞内での遺伝子の発現を得るのに様々なプロモーターが使用可能であることを認識している。プロモーターは構成的であっても調節的であってもよく、ウイルス、原核生物、もしくは真核生物の供給源を含む種々の供給源から入手すること、または人為的に設計することが可能である。

【0030】

細胞培養培地は種々のベンダーから入手可能であり、好適な培地は、宿主細胞が目的のタンパク質、ここでは融合前 RSV F タンパク質を発現するようにルーチン的に選択することができる。好適な培地は血清を含有しても含有しなくてもよい。

【0031】

「異種核酸分子」（本明細書では「導入遺伝子」とも呼ぶ）は、宿主細胞に天然には存在しない核酸分子である。それは、例えば、標準の分子生物学技術によりベクターに導入される。導入遺伝子は、一般に、発現制御配列と作動可能に連結される。これは、例えば、導入遺伝子をコードする核酸をプロモーターの制御下に置くことで実施され得る。さらなる調節配列を加えることもできる。導入遺伝子の発現のために多くのプロモーターが使用可能であり、それらは当業者に知られており、例えば、それらは、ウイルス、哺乳動物、合成のプロモーターなどを含んでもよい。真核細胞内での発現を得るのに好適なプロモーターの非限定的な例としては、CMV プロモーター（米国特許第 5,385,839 号明細書）、例えば CMV 最初期プロモーター、例えば CMV 最初期遺伝子エンハンサー／プロモーターからの nt. -735 ~ +95 を含むものが挙げられる。ポリアデニル化シグナル、例えばウシ成長ホルモンのポリ A シグナル（米国特許第 5,122,458 号明細書）を導入遺伝子の後に存在させることができる。あるいは、いくつかの広く使用されている発現ベクターが当該技術分野および商用供給源から入手可能であり、例えば、Invitrogen の pcDNA および pEF ベクター系列、BD Sciences の pMSCV および pTK-Hyg、Stratagene の pCMV-Script などがあり、これらは、目的のタンパク質を組換えにより発現させるために、または好適なプロモーターおよび／もしくは転写ターミネーター配列、ポリ A 配列などを得るために使用することができる。

【0032】

細胞培養は、付着細胞培養、例えば培養容器の表面またはマイクロキャリアに付着した細胞、および懸濁培養など、任意のタイプの細胞培養であってよい。大抵の大規模懸濁培養は、操作およびスケールアップが最も簡単であるため、バッチ法または流加法として操作される。最近では、灌流原理に基づく連続法がより一般的になりつつあり、また好適でもある。好適な培養培地も当業者に周知であり、一般に、商用供給源から大量に得ること、または標準プロトコルにしたがって注文生産することが可能である。培養は、例えば、バッチ、流加、連続システムなどを使用して、シャーレ、ローラーボトルまたはバイオリアクター内で行うことができる。細胞を培養する好適な条件は知られている（例えば、Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), および R. I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9) を参照）。

【0033】

本発明は、上記の融合前 RSV F タンパク質、および／または核酸分子、および／またはベクターを含む組成物をさらに提供する。したがって、本発明は、RSV F タンパク質の融合前コンフォメーションには存在するが、融合後コンフォメーションには存在しないエピトープを示す融合前 RSV F タンパク質またはその断片を含む組成物を提供する。本発明はまた、そのような融合前 RSV F タンパク質またはその断片をコードする核

10

20

30

40

50

酸分子および／またはベクターを含む組成物を提供する。組成物は、好ましくは、上記の融合前RSV Fタンパク質および／または核酸分子および／またはベクターを含む免疫原性組成物である。本発明はまた、RSV Fタンパク質に対する免疫応答を対象に誘導するための、安定化された融合前RSV Fタンパク質または本発明の前記RSV Fタンパク質をコードする核酸分子の使用を提供する。さらに、RSV Fタンパク質に対する免疫応答を対象に誘導するための方法であって、本発明による融合前RSV Fタンパク質および／または核酸分子および／またはベクターを対象に投与することを含む方法を提供する。また、RSV Fタンパク質に対する免疫応答を対象に誘導する際に使用するための、本発明による融合前RSV Fタンパク質、核酸分子および／またはベクターを提供する。さらに、RSV Fタンパク質に対する免疫応答を対象に誘導する際に使用する薬剤を製造するための、本発明による融合前RSV Fタンパク質および／または核酸分子および／またはベクターを提供する。

10

【0034】

本発明の融合前RSV Fタンパク質、核酸分子、またはベクターは、RSV感染の防止（予防）および／または治療に使用することができる。ある実施形態では、防止および／または治療は、RSV感染に罹りやすい患者群を標的にすることができる。そのような患者群としては、以下に限定されるものではないが、例えば、高齢者（例えば、50歳以上、60歳以上、および好ましくは65歳以上）、若齢者（例えば、5歳以下、1歳以下）、入院患者、および抗ウイルス性化合物で治療されたが、十分な抗ウイルス応答を示さなかった患者が挙げられる。

20

【0035】

本発明による融合前RSV Fタンパク質、核酸分子、および／またはベクターは、例えば、RSVを原因とする疾患もしくは病態の単独の治療および／または予防に、あるいは（既存または将来の）ワクチン、抗ウイルス剤および／またはモノクローナル抗体など、他の予防的治療および／または療法的治療と組み合わせて使用することができる。

【0036】

本発明は、本発明による融合前RSV Fタンパク質、核酸分子、および／またはベクターを利用して、対象のRSV感染を防止および／または治療するための方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、対象のRSV感染を防止および／または治療するための方法は、上記のような融合前RSV Fタンパク質、核酸分子、および／またはベクターの有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む。治療有効量は、RSVによる感染から生じる疾患または病態を防止、寛解および／または治療するのに効果のあるタンパク質、核酸分子、またはベクターの量を指す。防止は、RSVの伝播の阻害もしくは低減、またはRSVによる感染に関連した症状の1つもしくは複数の発症、進展、もしくは進行を阻害もしくは低減することを包含する。本明細書で使用される寛解は、目に見える、もしくは認知できる疾患の症状、ウイルス血症、またはインフルエンザ感染の他の任意の計測可能な徴候の低減を指し得る。

30

【0037】

ヒトなどの対象に投与するために、本発明は、本明細書に記載する融合前RSV Fタンパク質、核酸分子、および／またはベクターと、薬学的に許容される担体または賦形剤とを含む医薬組成物を使用することができる。この場合、「薬学的に許容される」という用語は、担体もしくは賦形剤が、使用する用量および濃度で、それらを投与する対象に望ましくない、または有害な効果を引き起こさないことを意味する。このような薬学的に許容される担体および賦形剤は、当該技術分野でよく知られている（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; および Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd

40

50

edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000] を参照)。RSV Fタンパク質または核酸分子は、凍結乾燥製剤を利用することも可能であり得るが、滅菌溶液として製剤化し、投与することが好ましい。滅菌溶液は、滅菌濾過または当該技術分野でそれ自体知られている他の方法によって調製される。その後、溶液は凍結乾燥されるか、または医薬投与容器に充填される。溶液のpHは一般に、pH 3.0～9.5、例えばpH 5.0～7.5の範囲である。RSV Fタンパク質は、通常、薬学的に許容される好適な緩衝剤を含む溶液中に存在し、組成物はまた塩を含有してもよい。任意選択により、アルブミンなどの安定剤が含まれ得る。ある実施形態では、洗浄剤が添加される。ある実施形態では、RSV Fタンパク質は注射剤に製剤化することができる。

10

【0038】

ある実施形態では、本発明による組成物は、1種または複数種のアジュバントをさらに含む。適用される抗原決定基に対する免疫応答をさらに高めるアジュバントは当該技術分野で知られている。「アジュバント」および「免疫刺激剤」という用語は、本明細書では同義的に使用され、免疫系の刺激を引き起こす1種または複数種の物質と定義される。これに関連して、アジュバントは、本発明のRSV Fタンパク質に対する免疫応答を増強するために使用される。好適なアジュバントの例としては、水酸化アルミニウムおよび／またはリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩；油－エマルジョン組成物（または水中油型組成物）、例えば、MF59などのスクアレン－水エマルジョン（例えば、国際公開第90/14837号パンフレットを参照）；サポニン製剤、例えばQS21および免疫刺激複合体（ISCOMS）など（例えば、米国特許第5,057,540号明細書；国際公開第90/03184号パンフレット、国際公開第96/11711号パンフレット、国際公開第2004/004762号パンフレット、国際公開第2005/002620号パンフレットを参照）；細菌または微生物の派生物（これらの例には、モノホスホリリピドA（MPL）、3-O-脱アシル化MPL（3dMPL）、CpG－モチーフ含有オリゴヌクレオチド、ADP－リボシル化細菌毒素またはその変異体、例えば大腸菌（E. coli）易熱性エンテロトキシンLT、コレラ毒素CTなどがある）；真核生物のタンパク質（例えば、抗体もしくはその断片（例えば、抗原自体またはCD1a、CD3、CD7、CD80に向けられたもの）および受容体へのリガンド（例えば、CD40L、GMCSF、GCSFなど）（これらは受容細胞と相互作用すると、免疫応答を刺激する））が挙げられる。ある実施形態では、本発明の組成物は、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カリウムアルミニウム、またはそれらの組み合わせの形態のアルミニウムを、1用量当たり0.05～5mg、例えば0.075～1.0mgのアルミニウム含有量の濃度で、アジュバントとして含む。

20

30

【0039】

融合前RSV Fタンパク質はまた、例えばポリマー、リポソーム、ビロソーム、ウイルス様粒子または自己集合性タンパク質粒子などのナノ粒子と組み合わせて、またはそれにコンジュゲートさせて投与することができる。融合前Fタンパク質は、アジュバンドを含む、または含まないナノ粒子と組み合わせるか、その中に封入するか、またはそれにコンジュゲートさせることができる。リポソーム内への封入は、例えば米国特許第4,235,877号明細書に記載されている。高分子へのコンジュゲーションは、例えば米国特許第4,372,945号明細書または米国特許第4,474,757号明細書に開示されている。

40

【0040】

他の実施形態では、組成物はアジュバントを含まない。

【0041】

ある実施形態では、本発明は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）に対するワクチンを作製する方法であって、本発明による組成物を準備する工程、およびそれを薬学的に許容される組成物中に製剤化する工程を含む方法を提供する。「ワクチン」という用語は、ある特定の病原体または疾患に対して対象にある程度の免疫を誘導するのに有効な活性成分を含

50

有する薬剤または組成物を指し、これにより、その病原体または疾患による感染に関連する症状の重症度、期間、または他の徴候が少なくとも低減（最大で完全消失）する。本発明では、ワクチンは、有効量の融合前RSV Fタンパク質、および／または融合前RSV Fタンパク質をコードする核酸分子、および／または前記核酸分子を含むベクターを含み、これにより、RSVのFタンパク質に対する免疫応答がもたらされる。これは、入院に至る重篤な下気道疾患を防止し、対象のRSV感染および複製による肺炎および細気管支炎などの合併症の頻度を低減する方法を提供する。本発明による「ワクチン」という用語は、それが医薬組成物であり、したがって、通常、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含むことを意味する。それは、さらなる活性成分を含んでも含まなくてもよい。ある実施形態では、それは、例えばRSVの他のタンパク質および／または他の感染因子に対する免疫応答を誘導する他の成分をさらに含む組み合わせワクチンであってもよい。さらなる活性成分の投与は、例えば、別個の投与によって行われても、本発明のワクチンとさらなる活性成分の組み合わせ製剤を投与することによって行われてもよい。

【0042】

組成物は、対象、例えばヒト対象に投与することができる。単回投与のための組成物中のRSV Fタンパク質の総用量は、例えば約0.01 μg～約10 mg、例えば1 μg～1 mg、例えば10 μg～100 μgとすることができる。推奨用量の決定は実験により行われ、当業者にはルーチンである。

【0043】

本発明による組成物の投与は、標準の投与経路を使用して実施することができる。非限定的実施形態としては、皮内投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、または例えば鼻腔内、口腔内などの粘膜投与などの非経口投与が挙げられる。一実施形態では、組成物は筋肉内注射により投与される。当業者は、ワクチン中の抗原に対する免疫応答を誘導するために、例えばワクチンなどの組成物を投与する様々な可能性を認識している。

【0044】

本明細書で使用する対象は、好ましくは哺乳動物、例えば、マウス、コットンラットなどのげっ歯類、または非ヒト霊長類、またはヒトである。対象は、好ましくは、ヒト対象である。

【0045】

タンパク質、核酸分子、ベクター、および／または組成物はまた、初回免疫としてまたは追加免疫として、同種または異種初回免疫－追加免疫レジメンで投与することができる。追加免疫ワクチン接種を実施する場合、通常、そのような追加免疫ワクチン接種は、最初に対象に組成物を投与した後（このような場合には「初回ワクチン接種」と呼ばれる）、1週～1年、好ましくは2週～4ヶ月のある時点で同じ対象に投与される。ある実施形態では、投与は初回免疫投与および少なくとも1回の追加免疫投与を含む。

【0046】

加えて、本発明のタンパク質は、例えば、本発明のタンパク質に結合可能な抗体が個体の血清中にあるか否かを確定することにより、個体の免疫状態を検査するための診断ツールとして使用することができる。したがって、本発明はまた、患者のRSV感染の存在を検出するためのインビトロ診断方法であって、a) 前記患者から得られた生体試料を本発明によるタンパク質と接触させる工程と、b) 抗体－タンパク質複合体の存在を検出する工程とを含む方法に関する。

本発明の様々な実施形態を以下に示す。

1. 配列番号1、配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、組換え融合前呼吸器合胞体ウイルス（RSV）融合（F）タンパク質。

2. 前記融合前コンフォメーションFタンパク質に特異的な少なくとも1種のエピトープを含み、前記少なくとも1種のエピトープは、配列番号4の重鎖CDR1領域、配列番号5の重鎖CDR2領域、配列番号6の重鎖CDR3領域および配列番号7の軽鎖CDR1領域、配列番号8の軽鎖CDR2領域、および配列番号9の軽鎖CDR3領域を含む融合前特異的モノクローナル抗体、ならびに／または配列番号10の重鎖CDR1領域、配列

10

20

30

40

50

番号 1 1 の重鎖 C D R 2 領域、配列番号 1 2 の重鎖 C D R 3 領域および配列番号 1 3 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 1 4 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 1 5 の軽鎖 C D R 3 領域を含む融合前特異的モノクローナル抗体によって認識される、上記 1 に記載の融合前 R S V F タンパク質またはその断片。

3. 前記タンパク質は三量体である、上記 1 または 2 に記載の融合前 R S V F タンパク質またはその断片。

4. 上記 1、2 または 3 に記載の融合前 R S V F タンパク質またはその断片をコードする核酸分子。

5. 前記核酸分子は哺乳動物細胞における発現用にコドン最適化されている、上記 4 に記載の核酸分子。

6. 配列番号 2 1、配列番号 2 2 および配列番号 2 3 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、上記 4 または 5 に記載の核酸分子。

7. 上記 4、5 または 6 に記載の核酸分子を含むベクター。

8. 上記 1、2 または 3 に記載の融合前 R S V F タンパク質またはその断片、上記 4、5 または 6 に記載の核酸分子、および／あるいは上記 7 に記載のベクターを含む組成物。

9. R S V F タンパク質に対する免疫応答の誘導に使用するための上記 8 に記載の組成物。

10. R S V 感染の予防および／または治療に使用するための上記 8 または 9 に記載の組成物。

11. 上記 1、2 または 3 に記載の融合前 R S V タンパク質またはその断片、上記 4、5 または 6 に記載の核酸分子、および／あるいは上記 7 に記載のベクターを含む R S V ワクチン。

【実施例】

【0047】

実施例 1：安定な融合前 R S V F タンパク質の生成

いくつかの融合前 R S V F タンパク質変異体を生成し、これを図 1 に模式的に示す。すべての候補は、R S V A 2 F 1 ドメインのアミノ酸残基 4 9 5 に連結した、フィブリン三量体化ドメイン（フォルドン）（G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D G E W V L L S T F L；配列番号 2 0）を含む。

【0048】

R S V F のプロセッシングバージョン（すなわち、p 2 7 領域を切断して除去したバージョン）では、N 6 7 I 置換は発現レベルおよび安定性の両方に対して最大の効果を有したが、完全に安定な融合前 F タンパク質は 6 7 および 2 1 5 の置換が組み合わされた場合にのみ得られ、2 0 倍の発現レベルの増加を生じた（図 2）。第三のアミノ酸置換を追加しても、発現レベルも 4℃における保存安定性で測定される安定性も改善されなかった。しかしながら、R S V F タンパク質を精製し、さらにキャラクタリゼーションを行うと、追加の第 3 の置換は、より厳密な温度安定性試験による（示差走査蛍光測定アッセイ D S F による）測定で、融合前 F タンパク質を有意に安定化させることが判明した（図 3）。

【0049】

先に報告された（国際公開第 2 0 1 4 / 1 7 4 0 1 8 号パンフレットおよび同第 2 0 1 4 / 2 0 2 5 7 0 号パンフレット）R S V F タンパク質変異体の親配列として使用された A 2 株は、頂点 K 6 6 および I 7 6）に 2 つの特有かつ稀な変異を蓄積した細胞株適合実験室株であるため、これらの 2 つの残基を天然の臨床分離株（K 6 6 E、I 7 6 V）にマッチするように変異させることを決定した。配列を天然のウイルス分離株により近づけるために、K 6 6 E および I 7 6 V 変異が、新たなプロセッシングされたタンパク質設計に含まれた。選択された安定化変異体で K 6 6 E + I 7 6 V 置換を試験し、これらのアミノ酸置換がタンパク質発現に対しても安定性に対しても負の影響を有しないことを示した。タンパク質は、細胞培養上清中で 2 週間を超えて安定であることが示された。F タンパク質の発現レベルに負の影響がないどころか、N 6 7 I、S 2 1 5 P、K 6 6 E および I 7 6 V 変異を有する R S V F 蛋白質は、N 6 7 I および S 2 1 5 P のみを有する蛋白質より

10

20

30

40

50

も高レベルで発現した（図４）。

【００５０】

N 6 7 I、S 2 1 5 P、K 6 6 EおよびI 7 6 V（プロセシングされた四重変異体をP R Q Mと命名）ならびにN 6 7 I、S 2 1 5 P、K 6 6 E、I 7 6 VおよびD 4 8 6 N（プロセシングされた五重変異体をP R P Mと命名）を有するプロセシングされたR S V Fタンパク質を精製し、さらにキャラクタリゼーションを行った。

【００５１】

浮遊H E K細胞（F r e e S t y l e 2 9 3 F）でR S V Fタンパク質の安定化変異のスクリーニングを行った。これらの細胞は単純なトランスフェクションプロトコルに適合しており、高レベルでタンパク質を発現するので、研究室で使用するのに便利である。大規模のG M Pタンパク質産生では、C H O細胞はしばしば選択される細胞系である。したがって、いくつかの好ましいFタンパク質設計の発現および安定性は、浮遊C H O細胞（F r e e S t y l e C H O - S）で試験した。C H O - S細胞はトランスフェクトするのが困難であり、したがって、全体的な発現レベルは、H E K細胞よりも低いと予想された。したがって、分析の間、本発明者らはタンパク質の相対的発現およびそれらの安定性に焦点を当てた。

【００５２】

５つのプロセシングされたタンパク質を試験用に選択した。５つの変異体はすべて、K 6 6 E、I 7 6 V、N 6 7 IおよびS 2 1 5 Pの置換を含んだ。上記のように、後者の２つは、融合前コンフォメーションのタンパク質を安定化するために必要であり；前者の２つは天然の分離株により近い配列とするために含めた（前節の記載のように）。これらのタンパク質は、追加の変異E 1 6 1 P、D 4 8 6 NおよびE 4 8 7 Qによって異なった。これらは、高い発現レベル、貯蔵安定性、および抗原性に対する影響の低さから選択された。すべてのタンパク質が、C H O細胞で発現し、同等の貯蔵安定性を有した。細胞培養上清中、4℃で２週間の保存した際、融合前コンフォメーションのR S V Fタンパク質は安定であった（図５）。また、C H O細胞培養上清中のR S V Fタンパク質のp H 5での安定性を試験した。図６に示すように、タンパク質試料を異なる温度で７日間インキュベートした後も分解は検出されなかった。

【００５３】

結論として、本発明のR S V Fタンパク質はC H O細胞で発現し、細胞培養上清中で安定であった。さらに、タンパク質の温度安定性を試験した。細胞培養上清を熱処理し、試料中の融合前タンパク質の量を、C R 9 5 0 1抗体を用いたE L I S Aで測定した（図７）。

【００５４】

D 4 8 6 Nを有する変異体（P R P Mタンパク質）は、温度ストレスに対して最も安定であった。K 4 9 8 R変異の追加は、最小量の修飾を有するタンパク質（P R Q M）と比較して利点を有さないようであった。E 1 6 1 P変異を有する変異体は、最も高い発現レベルを有した（データは示さず）。しかし、このアミノ酸置換の欠点は、残基1 6 1がタンパク質の表面に位置し、かつC R 9 5 0 1抗体に対するエピトープの縁に位置することであった。

【００５５】

したがって、本発明によれば、最小限必要な配列修飾を有するプロセシングされた融合前タンパク質として、P R P M（フィブリチンのフォルドン三量体化ドメインならびに変異N 6 7 I、S 2 1 5 P、K 6 6 E、I 7 6 VおよびD 4 8 6 Nを有するR S V Fタンパク質、配列番号１）およびP R Q M（フィブリチンのフォルドン三量体化ドメインならびにN 6 7 I、S 2 1 5 P、K 6 6 EおよびI 7 6 Vを有するR S V Fタンパク質、配列番号２）、ならびにP R Q M + S 4 6 GまたはP R P M + S 4 6 G変異体はすべて、前融合コンフォメーションで安定化され、高いT_mを有することが示された（表１）。S 4 6 G置換を有する後者の変異体は、有意に高い発現レベルを有する。

【００５６】

【表 1】

表1.

タンパク質 ID	凍結－解凍安定性	T _m (°C)
PRQM S46G	3 サイクルで安定、 5 サイクル後に凝集	56.2
PRPM S46G	5 サイクルで安定	63.6
PRPM	5 サイクルで安定	65.0

10

【0057】

実施例 2：アジュバントを併用するおよび併用しない P R P M によって誘導される免疫原性および防御

同種 R S V－A 2 チャレンジコottonラットモデルにおいて、アジュバントの存在下または非存在下での組換え P R P M タンパク質の免疫原性および予防の有効性を決定する実験を行った。0 日目および 2 8 日目に、2 用量の P R P M (5 および 0.5 μg) を、アジュバント非添加、または 100 μg A d j u p h o s をアジュバントとして添加して、動物に i. m. により免疫を付与した。4 9 日目に動物に 10⁵ (p f u) の R S V A 2 でチャレンジした。チャレンジの 5 日後に動物を 殺し、肺および鼻で力価を測定した。

20

【0058】

結果

アジュバントを添加した P R P M による免疫化は、鼻で無効であった 1 匹の動物を除いて、肺および鼻で完全な防御を誘導した。5 および 0.5 μg のアジュバント非添加 P R P M を接種された動物のほとんどは、肺および鼻で無効を示し、アジュバント添加タンパク質およびアジュバント非添加タンパク質を接種された群の間に有意差があった(図 8)。アジュバント化タンパク質は、非アジュバント化タンパク質と比較して、免疫から 4 9 日後に有意に高い V N A 力価を誘導した(図 9)。

【0059】

【表 2】

表 1.抗体配列

抗体	VH ドメイン	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
CR9501	配列番号 16 の アミノ酸 1-125	GASINSDNYYWT (配列番号 4)	HISYTGNTYYTPSLKS (配列番号 5)	CGAYVLISNCGWFDS (配列番号 6)
CR9502	配列番号 18 の アミノ酸 1-121	GFTFSGHTIA (配列番号 10)	WVSTNNGNTEYAQKIQG (配列番号 11)	EWLVMGGFAFDH (配列番号 12)

30

抗体	VL ドメイン	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
CR9501	配列番号 17 の アミノ酸 1-107	QASQDISTYLN (配列番号 7)	GASNLET (配列番号 8)	QQYQYLPYT (配列番号 9)
CR9502	配列番号 19 の アミノ酸 1-110	GANNIGSQNVH (配列番号 13)	DDRDRPS (配列番号 14)	QVWDSSRDQAVI (配列番号 15)

40

【0060】

配列

50

配列番号 1 : P R P M

【化 1】

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
 YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
 TNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBQSCSIPINIETVIEFQQKNNRLLE
 ITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
 IKEEVLAYVYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
 VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQE
 GKSLYVKGEPINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAP
 RDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL

10

配列番号 2 P R Q M

【化 2】

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
 YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
 TNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBQSCSIPINIETVIEFQQKNNRLLE
 ITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
 IKEEVLAYVYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
 VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQE
 GKSLYVKGEPINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAP
 RDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL

20

30

配列番号 3 P R P M + S 4 6 G

40

50

【化 3】

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
ELSNIKEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
TNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLE
ITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAP
RDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL

10

C R 9 5 0 1 重鎖（配列番号 1 6）：

【化 4】

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSNYWTWIRQRPGGGLEWIGHISYTG
NTYYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCGWFDS
WGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

20

C R 9 5 0 1 軽鎖（配列番号 1 7）：

【化 5】

EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVP
SRFTGSGYGTDFSVTISSLQPEDIATYYCQQYQYLPYTFAPGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

C R 9 5 0 2 重鎖（配列番号 1 8）：

【化 6】

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGQGLEWMGWVSTNNG
NTEYAQKIQGRVTMTMDTSTSTVYMELRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFAFDHW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC

40

C R 9 5 0 2 軽鎖（配列番号 1 9）：

50

【化 7】

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLVVYDDRDRPSG
 IPDRFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSRDQAVIFGGGTKLTVLGQPK
 AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

P R P M (配列番号 20) をコードするヌクレオチド配列：

【化 8】

10

ATGGAAGTCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTCGCCAGCG
 GCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGA
 GAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAAATCAAGTGCAACGGCACCG
 ACGCCAAGGTCAAGCTGATCAAGCAGGAACTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTG
 ATGCAGAGCACCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGACGCGAGCTGCCCCGGTTCATGAACTACACCCTGAAC
 AACGCCAAAAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTCTGGGCTTCTGCTGGGCGT
 GGGCTCTGCCATTGCTAGCGGCGTGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAA
 GAGCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAAGGT
 GCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAA
 CATCGAGACAGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATCACCCGCGAGTTCAGCGTGAA
 CGCTGGCGTGACCAACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATG
 CCCATCACCAACGACAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGCGGCAGCAGAGCTACTCCATC
 ATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCC
 TGCTGGAAGCTGCACACCAAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGG
 ACCGACCGGGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGCTCCGTGTCTTTCCACAGGCCGAGACATGCAAGGTGC
 AGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCGAAGTGAACCTGTGCAACGTGG
 ACATCTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGTCCAGCTCCGTGATCACCTC
 CCTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAA
 GACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGGTGGACACCGTGTCCGTGGGCAACACCCTGTA
 CTACGTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCT
 GGTGTTCCCCAGCAACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTT
 CATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGTCCGCCATCGGCGGCTACATCCCCGAGGCCCTAGAGATGGCCAGGC
 CTACGTGCGGAAGGACGGCGAGTGGGTGCTGCTGTCTACCTTCCTG

20

30

40

P R Q M (配列番号 21) をコードするヌクレオチド配列：

【化 9】

ATGGAAGTCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTCGCCAGCG
GCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGA
GAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAAATCAAGTGCAACGGCACCG
ACGCCAAGGTCAAGCTGATCAAGCAGGAAGTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTG
ATGCAGAGCACCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGACGCGAGTGCCCGGTTTCATGAACTACACCCTGAAC
AACGCCAAAAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTGGGCTTCCTGCTGGGCGT
GGGCTCTGCCATTGCTAGCGGCGTGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAA
GAGCGCCCTGCTGAGCACCACCAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAAGGT
GCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAA
CATCGAGACAGTGATCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATCACCCGCGAGTTCAGCGTGAA
CGCTGGCGTGACCACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATG
CCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGCGGCAGCAGAGCTACTCCATC
ATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGTGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCG
TGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGG
ACCGACCGGGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGCTCCGTGTCTTCTTCCACAGGCCGAGACATGCAAGGTGC
AGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCGAAGTGAACCTGTGCAACGTGG
ACATCTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGTCCAGCTCCGTGATCACCTC
CCTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAA
GACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGGTGGACACCGTGTCCGTGGGCAACACCCTGTA
CTACGTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCT
GGTGTTCCCCAGCGACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTT
CATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGTCCGCCATCGGCGGCTACATCCCCGAGGCCCTAGAGATGGCCAGGC
CTACGTGCGGAAGGACGGCGAGTGGGTGCTGCTGTCTACCTTCCTG

10

20

30

P R P M + S 4 6 G (配列番号 2 2) をコードするヌクレオチド配列:

40

50

【化 10】

ATGGAAGTCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTTGCCAGCG
GCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCCAAGGGCTATCTGGGCGCCCTGA
GAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAAGAAATCAAGTGCAACGGCACCG
ACGCCAAAAGTGAAGCTGATCAAGCAGGAACTGGACAAGTACAAGAATGCCGTGACCGAACTGCAGCTGCTGA
TGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGAAGAGAACTGCCCAGATTCATGAACTACACCCTGAACA
ACGCCAAAAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTGGGCTTTCTGCTGGGAGTG
GGAAGCGCCATTGCTAGCGGAGTGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAA
GAGCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTCTCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAAGGT
GCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAACAGCTGCTGCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAAC
ATCGAGACAGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATCACCCGCGAGTTCAGCGTGAAC
GCTGGCGTGACCACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGTCCCTGATCAACGACATGC
CCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGCAGCAGCAGAGCTACTCCATCA
TGAGCATTATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCTCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTG
CTGGAAGCTGCACACCAGCCCTCTGTGCACCACCAACACCAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGGACC
GACAGAGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGCTCCGTCTATTCTTTCCACAAGCCGAGACATGCAAGGTGCAGA
GCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCGAAGTGAATCTGTGCAACGTGGACAT
CTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAGACCGACGTGTCCAGCTCCGTGATCACAAGCCTG
GGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACC
TTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGGTGGACACCGTGTCTGTGGGCAACACCCTGTACTAC
GTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTG
TTCCCAGCAACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAAGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCA
GAAAGTCCGATGAGCTGCTGAGCGCCATCGGCGGCTACATCCCTGAGGCCCTAGAGATGGCCAGGCCTATG
TGCGGAAGGACGGCGAATGGGTGCTGCTGTCTACCTTTCTG

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

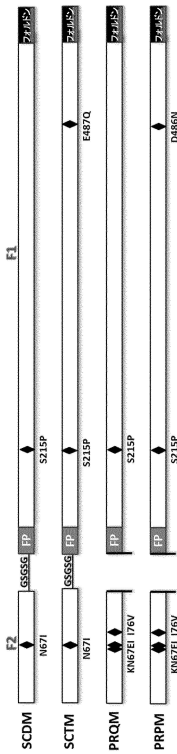


図 1

【図 2】

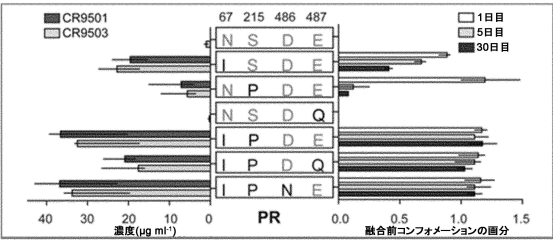


図 2

【図 3】

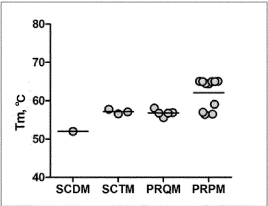


図 3

【図 4】

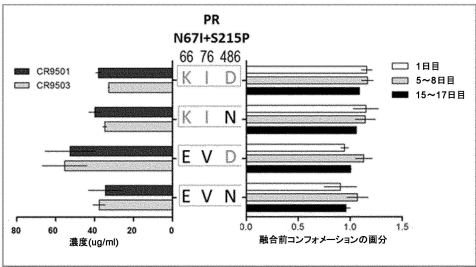


図 4

10

20

30

40

50

【図 5】

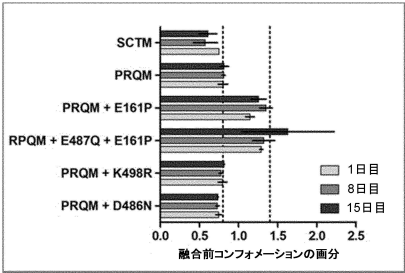
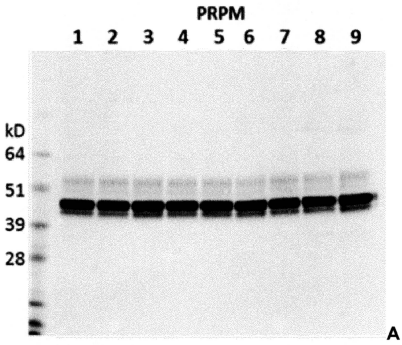
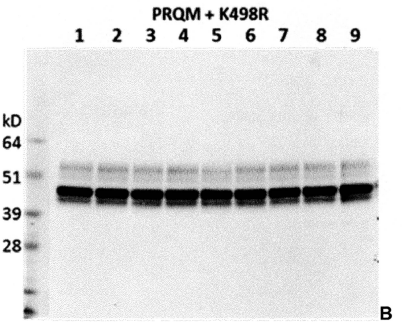


図5

【図 6 - 1】



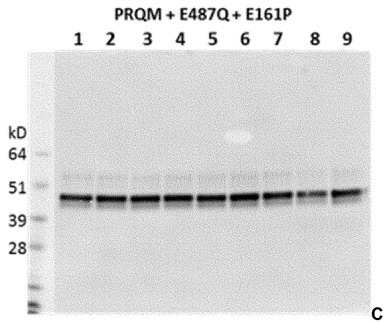
10



20

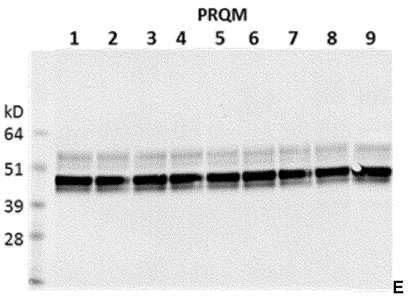
図 6

【図 6 - 2】



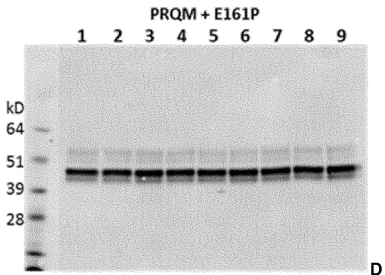
C

【図 6 - 3】

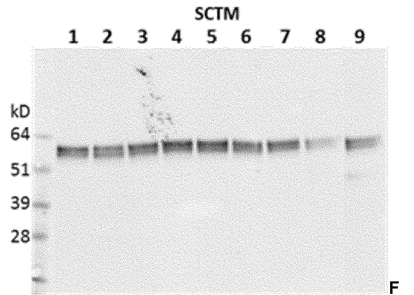


E

30



D



F

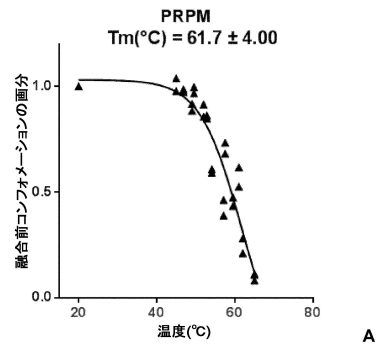
40

図 6 - 続き

図 6 - 続き

50

【図 7 - 1】



【図 7 - 2】

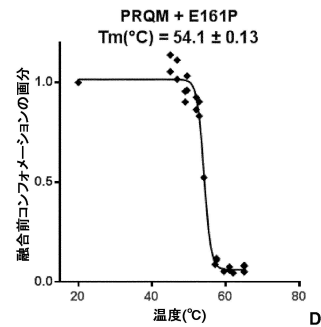
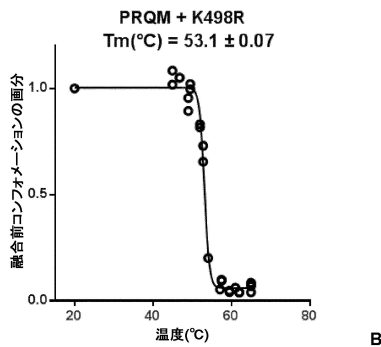
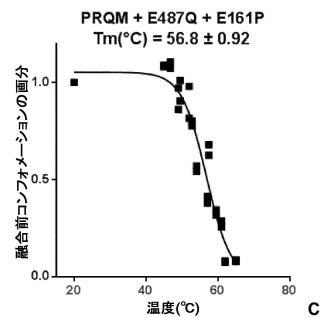


図 7

図 7. - 続き

【図 7 - 3】

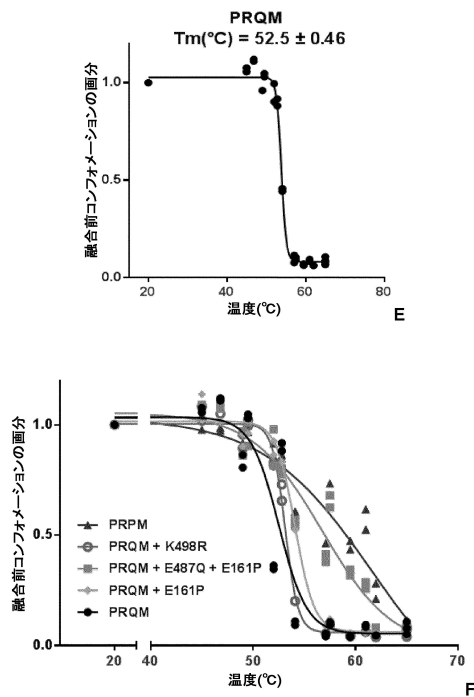
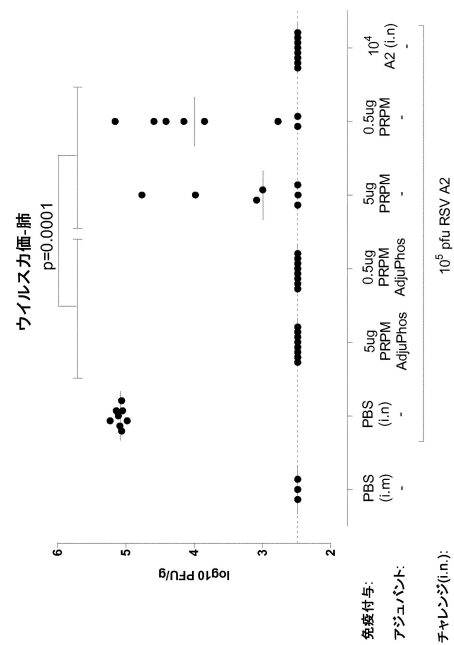


図 7. - 続き

【図 8 - 1】



10

20

30

40

50

【図 8 - 2】

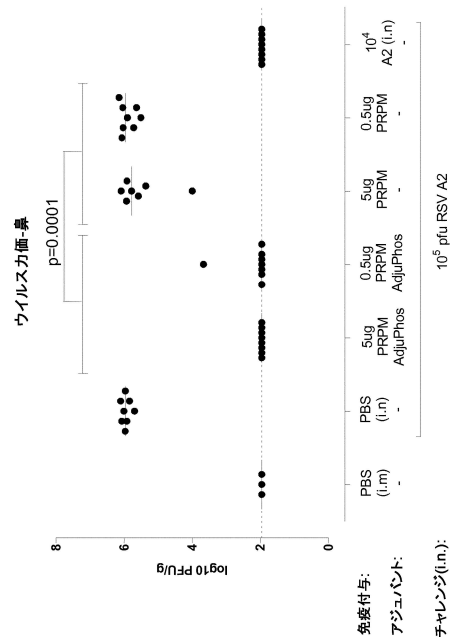


図 8 - 続き

【図 9】

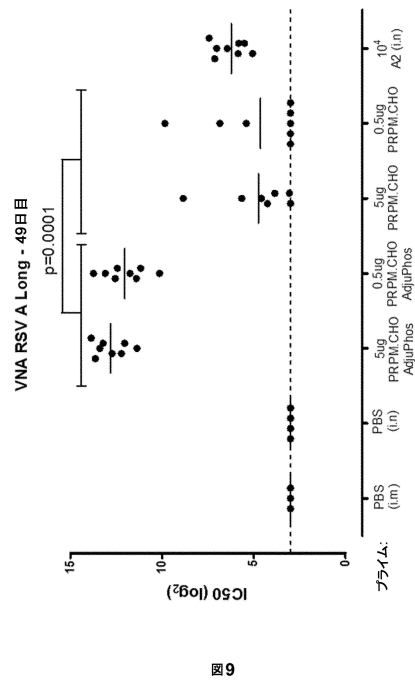


図 9

【配列表】

0007088841000001.xml

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/45 (2006.01)

C 1 2 N 15/45

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

(72)発明者 クラルプ, アンダース

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスヴェヒ 4-6

(72)発明者 ランゲディク, ヨハネス, ペトラス, マリア

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスヴェヒ 4-6

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 国際公開第2014/174018 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 1 5 5

A 6 1 K 3 8 / 1 6

A 6 1 P 3 1 / 1 2

C 0 7 K 1 4 / 1 1 5

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 4 5

C 1 2 N 1 5 / 6 2

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d