

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7657727号

(P7657727)

(45)発行日 令和7年4月7日(2025.4.7)

(24)登録日 令和7年3月28日(2025.3.28)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 14/135 (2006.01)

C 0 7 K 14/135

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/45 (2006.01)

C 1 2 N 15/45

Z N A

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

A 6 1 K 39/12 (2006.01)

A 6 1 K 39/12

請求項の数 35 (全33頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-558831(P2021-558831)

(86)(22)出願日 令和2年4月1日(2020.4.1)

(65)公表番号 特表2022-525431(P2022-525431
A)

(43)公表日 令和4年5月13日(2022.5.13)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/026198

(87)国際公開番号 WO2020/205986

(87)国際公開日 令和2年10月8日(2020.10.8)

審査請求日 令和5年3月3日(2023.3.3)

(31)優先権主張番号 62/828,302

(32)優先日 平成31年4月2日(2019.4.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 504456798

サノファイ

S A N O F I

フランス国75017パリ、アヴェニ
ユ・ドゥ・ラ・グランデ・アルメ46

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100216105

弁理士 守安 智

(72)発明者 カート・スワンソン

アメリカ合衆国ニュージャージー州08

807、ブリッジウォーター、メールコ

ード55エー505エー、コーポレ

ートドライブ55

(72)発明者 チー・ジェン・ウェイ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗原性多量体呼吸器合胞体ウイルスポリペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

3つ以上のRSV Gcc単量体と少なくとも1つの多量体形成ドメインを含む抗原性
RSV Gポリペプチドであって、

ここで、前記ポリペプチドはフェリチンを含まず、および／または前記ポリペプチドは
一本鎖ポリペプチドであり、

ここで、前記ポリペプチドは、a) A株のRSV Gcc単量体のみ；b) B株のRSV
Gcc単量体のみ；またはc) A株およびB株のRSV Gcc単量体を含み、

a. ここで、A株由来のRSV Gcc単量体は、

i. 配列番号3と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列、または

ii. C末端のリジン(K)を有しない配列番号3と少なくとも90%の同一性を
有するアミノ酸配列を含み、

b. ここで、B株のRSV Gcc単量体は、配列番号10と少なくとも90%の同
一性を有するアミノ酸配列を含み、

ここで、前記ポリペプチドは配列番号4、6および14のいずれか1つのアミノ酸配列に
対する少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、前記ポリペプチド。

【請求項2】

A株のRSV Gcc単量体が、配列番号3のアミノ酸配列、またはC末端のリジン(K)
を有しない配列番号3のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の抗原性RSV Gポ
リペプチド。

【請求項 3】

B株のRSV Gcc単量体は、配列番号10のアミノ酸配列を含む、請求項1または2に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 4】

RSV Gcc単量体を3、4、5、6、7、8、9または10個含む、請求項1に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 5】

A株のRSV Gcc単量体を3つ以上含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 6】

B株のRSV Gcc単量体を3つ以上含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 7】

A株のRSV Gcc単量体を少なくとも1つおよびB株のRSV Gcc単量体を少なくとも1つ含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 8】

ポリペプチドは、三量体、四量体または六量体に集合している、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 9】

A株のRSV Gcc単量体3つを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 10】

B株のRSV Gcc単量体3つを含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 11】

A株のRSV Gcc単量体3つおよびB株のRSV Gcc単量体3つを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号4、6および14のいずれか1つのアミノ酸配列と、少なくとも1つの多量体形成ドメインを含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 13】

多量体形成ドメインを1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 14】

多量体形成ドメインがfold onドメインである、請求項1～13のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 15】

多量体形成ドメインが、配列番号13のアミノ酸配列を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 16】

多量体形成ドメインが、配列番号11のアミノ酸配列を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 17】

A株のGcc単量体2つおよびB株のGcc単量体2つを含む、請求項7に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 18】

A株およびB株の単量体が、一本鎖において交互に入れ替わる、請求項17に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

配列番号 4、6 および 14 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対する 95 %、98 %、99 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 20】

1 つの多量体形成ドメイン、1 つの A 株の RSV G c c 単量体、および 1 つの B 株の RSV G c c 単量体を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 21】

多量体形成ドメインが、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 20 のいずれか 1 項に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 22】

配列番号 14 に対する 98 %、99 % または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 11、13、15、または 19 のいずれか 1 項に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 23】

宿主細胞における RSV G ポリペプチドの発現時に G c c 粒子を形成することが可能な、請求項 1 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 24】

粒子であり、該粒子が六量体である、請求項 23 に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 25】

RSV G c c 単量体を少なくとも 3 つコードするポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 1 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 26】

ポリヌクレオチドが、RSV G c c 単量体 3 つまたは 4 つをコードする、請求項 25 に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 27】

ポリヌクレオチドが、A 株の G c c 単量体 2 つおよび B 株の G c c 単量体 2 つをコードする、請求項 25 または 26 に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 28】

ポリヌクレオチドが、A 株の G c c 単量体 2 つおよび B 株の G c c 単量体 2 つを交互にコードする、請求項 27 に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 29】

RSV に対する免疫応答を誘発し、および／または RSV 感染症から対象を防御することが可能な、請求項 1 ～ 28 のいずれか 1 項に記載の抗原性 RSV G ポリペプチド。

【請求項 30】

請求項 1 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の抗原性 RSV G ポリペプチドを含む医薬組成物であって、薬学的に許容される担体をさらに含む、前記医薬組成物。

【請求項 31】

RSV に対する免疫応答を誘発するか、または RSV 感染症から対象を防御する方法における使用のための、請求項 30 に記載の医薬組成物。

【請求項 32】

対象がヒトである、請求項 30 または 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

請求項 1 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の抗原性 RSV G ポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 34】

核酸が mRNA である、請求項 33 に記載の核酸。

【請求項 35】

請求項 33 または 34 に記載の核酸を含む、キット。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願では、2019年4月2日申請の米国特許仮出願第62／828，302号の優先権の利益を主張し、この全体を参照によって組み入れる。

【0002】

本出願は、ASCIIフォーマットにより電子的に提出された配列表を含み、この全体を参照によって本明細書に組み入れる。2020年3月30日に作成された、このASCIIコピーは、2020-04-01_01121-0042-00PCT_ST25.txtと名付けられ、55.9KBのサイズである。

【背景技術】

【0003】

ワクチン学の分野における多くの功績にもかかわらず、生命を脅かす多くの感染性疾患からヒトを防御するための新たな突破口が必要とされている。現在の多くの認可されたワクチンは、弱毒化した生病原体または不活化死滅病原体を生成する10年以上前の技術に依存しており、これは、固有の安全性への懸念を有し、多くの場合、短期間で弱い免疫応答のみを刺激するため、複数回用量の投与を必要とする。遺伝子および生物化学工学の進歩により、困難な疾患標的に対する治療薬の開発が可能となったが、ワクチン学の分野へのこのような適用は、完全には実現されていない。組換えポリペプチド技術により、現在、最適な抗原のデザインが可能となっている。加えて、ナノ粒子により、最適な抗原提示および標的薬物送達の可能性がますます実証されてきている。複数の抗原が結合したナノ粒子は、分子カーゴの多価ディスプレイによりもたらされる結合親和力、およびナノスケールサイズにより閥門をさらに効率的に通過する能力が向上していることが示されている。インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）ポリペプチドに融合させたヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*／*H. pylori*）フェリチンナノ粒子により、抗原安定性の向上および免疫原性の増大がマウスインフルエンザモデルにおいて可能となっている（（非特許文献1）を参照）。この融合ポリペプチドは、種々の前臨床モデルにおいて、アジュバントとともに使用した場合、八面体対称性ナノ粒子に自己集合し、三量体HAスパイク8つを提示して頑強な免疫応答をもたらした。

【0004】

呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、乳児における重篤な呼吸器疾患の主因であり、高齢者における呼吸器疾患の主原因である。数十年にわたる研究にもかかわらず、ワクチンの必要性は、満たされていないままである。ワクチンの必要性は明白であるが、ホルマリン不活化RSVウイルスを使用する臨床試験により、RSV感染後、乳児において疾患がさらに重篤となった1960年代に、RSVワクチンの開発は、行き詰った。（非特許文献2）を参照されたい。さらに最近では、融合後の立体構造内にRSV F抗原を使用する臨床プログラムにおいて、成人における十分な有効性を導き出すことができなかった。（非特許文献3）を参照されたい。

【0005】

RSV Gは、いくつかのO-グリコシル化部位を含む1番目および最後から3番目の分子を有する、ほとんど構造不定のポリペプチドである。RSV Gの外部ドメインは、哺乳類細胞において発現する場合、質量ではアミノ酸よりもグリカンが多い。また、これらの隣接領域は、保存が不十分であることから、G高頻度可変領域と名付けられている。対照的に、Gの中央領域は、2つの主要なRSV株であるAおよびB株の間でかなり良好に保存されている。したがって、このドメインは、RSV G中央保存領域（Gcc）と呼ばれている。

【0006】

Gcc領域は、疎水性および高プロリン配列により安定化されるループ構造である近位領域、ならびに2つのジスルフィド結合により結びついて、いわゆる「シスチン縄」を形成する2つのらせんからなる遠位領域にさらに細分される。この遠位シスチン縄は、H

10

20

30

40

50

A E細胞上のC X 3 C受容体に対するウイルスの結合モチーフであると実証されているC X 3 Cモチーフを含む。近位領域は、十分に特性決定された、R S V Gの中和エピトープである1 3 1-2 Gエピトープのみを内部に有する。完全なR S V G c cの構造は存在しないが、2つの構造領域によって、遠位領域のすぐ近くに近位領域を配置する高三次構造が形成されることがデータにより示唆され、したがって、N A b 1 3 1-2 GがC X 3 C部位を立体的に遮断することにより、ウイルスのC X 3 C R受容体への結合が阻害可能であるという理由が説明される。

【0007】

G c c単独は、アミノ酸およそ30個のドメインの小さいサイズを考慮すると、不十分な免疫原である。発明者らは、このドメインをペプチドとして合成し、フェリチンナノ粒子に化学的にコンジュゲートして、バイオコンジュゲートG c c-NPを形成可能であることをこれまでに実証した。この主要な抗原は、H A E中和アッセイにおいて観察されるように、強力な中和応答を誘発する。その上、抗原は、免疫を潜在的に攪乱する高頻度可変領域を欠き、これによりG外部ドメインは、不十分なワクチン候補となっている。

【0008】

ここで、R S V Gポリペプチドに關与する、一連の新たなポリペプチド、ナノ粒子、組成物、方法および使用を提示する。G c cペプチドを多量体抗原として提示するポリペプチドを含む、新規のR S V Gポリペプチドを生成した。R S V A株（A2実験室株）およびR S V B株（B1実験室株）の両方由来のG c cポリペプチドを利用して、広範な防御範囲をもたらした。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【文献】K a n e k i y oら、N a t u r e 4 9 9 : 1 0 2 ~ 1 0 6 (2 0 1 3)

【文献】H u r w i t z (2 0 1 1) E x p e r t R e v V a c c i n e s 1 0 (1 0) : 1 4 1 5 ~ 1 4 3 3

【文献】F a l o o nら(2 0 1 7) J I D 2 1 6 : 1 3 6 2 ~ 1 3 7 0

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本開示の目的は、上に考察する利点の1つもしくはそれ以上をもたらすか、または有用な選択肢を公に少なくとももたらすことが可能な組成物、キット、方法および使用を提供することである。

【0011】

一部の実施形態では、R S V G c c単量体を3つ以上含む抗原性R S V Gポリペプチドであって、フェリチンを含まない、ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、一本鎖である。

【0012】

一部の実施形態では、Gポリペプチドが、粒子（例えば、多量体）として提示されるG c cポリペプチドである、抗原性R S V Gポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、G c c A株1つおよびG c c B株1つを含む二量体は、NまたはC末端のf o l d o nタグと遺伝的に融合させる。それが発現する細胞、例えば、大腸菌（E . c o l i）によるリフォールディング時に、f o l d o nタグが三量体形成して、生じる粒子がG c cポリペプチドの6つのコピー（A株3つおよびB株3つ）を提示する。これは本明細書において「G c c B 1-A 2-f o l d o n」または「G c c六量体」とも呼ぶ。一部の実施形態では、4つのG c cペプチド（任意の順で、NからC末端にB 1、A 2、B 1およびA 2を含む）は、高グルタミン酸リンカーと遺伝的に融合させてG c cペプチドの可溶性四量体（本明細書において「G c c四量体」とも呼ぶ）を生成する。G c c四量体は、多量体形成ドメインを欠き、このため粒子を形成しない。

【課題を解決するための手段】

【0013】

さらなる実施形態を、次のように本明細書において開示する。

実施形態01. RSV Gcc単量体を3つ以上含む抗原性RSV Gポリペプチドであって、フェリチンを含まない、ポリペプチド。

実施形態02. 一本鎖である、実施形態1に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態03. RSV Gcc単量体を3つ以上含む、抗原性RSV G一本鎖ポリペプチド。

実施形態04. Gcc単量体を3、4、5、6、7、8、9または10個含む、実施形態1～3のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態05. a) A株のGcc単量体のみ；b) B株のGcc単量体のみ；またはc) A株およびB株のGcc単量体を含む、実施形態1～4のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態06. A株のGcc単量体を3つ以上含む、実施形態1～5のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態07. B株のGcc単量体を3つ以上含む、実施形態1～6のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態08. A株のGcc単量体を少なくとも1つおよびB株のGcc単量体を少なくとも1つ含む、実施形態1～7のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態09. 三量体、四量体または六量体である、実施形態1～8のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態10. A株のGcc単量体3つを含む、実施形態1～9のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態11. B株のGcc単量体3つを含む、実施形態1～10のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態12. A株のGcc単量体3つおよびB株のGcc単量体3つを含む、実施形態1～11のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態13. 多量体形成ドメインを含む、実施形態1～12のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態14. 多量体形成ドメインを1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個含む、実施形態1～13のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態15. 多量体形成ドメインがfold onである、実施形態13または14に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態16. 多量体形成ドメインが、配列番号9を含む、実施形態13または14に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態16. 1. 多量体形成ドメインが、配列番号13を含む、実施形態13または14に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態17. A株のGcc単量体2つおよびB株のGcc単量体2つを含む、実施形態1～16. 1のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態18. A株およびB株の単量体が、一本鎖において交互に入れ替わる、実施形態17に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態19. 配列番号4～8のいずれか1つに対する80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態1～18のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態20. RSV Gcc単量体を少なくとも2つおよび多量体形成ドメインを少なくとも1つ；またはRSV Gcc単量体を少なくとも3つコードするポリヌクレオチドによりコードされる、実施形態1～19のいずれか1項に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

実施形態21. RSV Gcc単量体を少なくとも2つおよび多量体形成ドメインを少なくとも1つコードするポリヌクレオチドによりコードされる、実施形態20に記載の抗原性RSV Gポリペプチド。

10

20

30

40

50

実施形態 22. G c c 単量体の少なくとも 1 つが A 株由来であり、G c c 単量体の少なくとも 1 つが B 株由来である、実施形態 21 に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 23. A 株由来の R S V G c c をコードするポリヌクレオチドが：

a. 配列番号 3 と同一のアミノ酸配列；または

b. C 末端の K を有しない配列番号 3 と同一のアミノ酸配列；または

c. 配列番号 4 のアミノ酸 2 ～ 42 と同一のアミノ酸配列

をコードする、実施形態 20 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 24. B 株由来の R S V G c c をコードするポリヌクレオチドが：

a. 配列番号 10 と同一のアミノ酸配列；または

b. 配列番号 8 のアミノ酸 10 ～ 51 と同一のアミノ酸配列

をコードする、実施形態 20 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 25. 多量体形成ドメインをコードするポリヌクレオチドが：

a. 配列番号 11；または

b. 配列番号 7 のアミノ酸 132 ～ 175

と同一のアミノ酸配列をコードする、実施形態 20 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 25. 1. 配列番号 14 に対する 80%、85%、90%、95%、98%、99% または 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 13、15、16. 1、19 または 22 のいずれか 1 項に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 26. 宿主細胞におけるポリヌクレオチドの発現時に G c c 粒子を形成することが可能な、実施形態 20 ～ 25. 1 のいずれか 1 項に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 27. ポリペプチドが粒子であり、粒子が六量体である、実施形態 26 に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 28. 六量体が、R S V G c c A 株単量体 3 つおよび R S V G c c B 株単量体 3 つを含む、実施形態 26 に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 29. R S V G c c 単量体を少なくとも 3 つコードするポリヌクレオチドによりコードされる、実施形態 20 に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 30. ポリヌクレオチドが、R S V G c c 単量体 4 つをコードする、実施形態 29 に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 31. ポリヌクレオチドが、A 株の G c c 単量体 2 つおよび B 株の G c c 単量体 2 つをコードする、実施形態 30 に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 32. ポリヌクレオチドが、A 株の G c c 単量体 2 つおよび B 株の G c c 単量体 2 つを交互にコードする、実施形態 31 に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 33. R S V に対する免疫応答を誘発し、および／または R S V 感染症から対象を防御することが可能な、実施形態 1 ～ 32 のいずれか 1 項に記載の抗原性 R S V G ポリペプチド。

実施形態 34. 薬学的に許容される担体をさらに含む、実施形態 1 ～ 33 のいずれか 1 項に記載の抗原性 R S V G ポリペプチドを含む組成物。

実施形態 35. R S V に対する免疫応答を誘発するか、または R S V 感染症から対象を防御する方法における使用のための、実施形態 1 ～ 34 のいずれか 1 項に記載の抗原性 R S V G ポリペプチドまたは組成物。

実施形態 36. 実施形態 1 ～ 34 のいずれか 1 項に記載の抗原性 R S V G ポリペプチドまたは組成物を対象に投与する工程を含む、R S V に対する免疫応答を誘発するか、または R S V 感染症から対象を防御する方法。

実施形態 37. 対象がヒトである、実施形態 34 に記載の抗原性 R S V G ポリペプチドもしくは組成物、または実施形態 36 に記載の方法。

実施形態 38. 場合により、mRNA である、実施形態 1 ～ 33 のいずれか 1 項に記載の

10

20

30

40

50

抗原性 R S V G ポリペプチドをコードする核酸。

【0014】

追加の目的および利点は、以下の説明において部分的に記載され、この説明から部分的に明らかとなるか、または実行により知ることができる。目的および利点は、添付の特許請求の範囲において特に指摘する要素および組合せにより、実現および達成される。

【0015】

前述の概要および以下の発明を実施するための形態の両方は、単なる例示および説明であり、特許請求の範囲の制限ではないことが理解される。

【0016】

本明細書に組み入れ、本明細書の一部を構成する添付の図面は、いくつかの実施形態を例示し、この説明とともに、本明細書に記載の原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1A～Bは、フェリチンナノ粒子にコンジュゲートする R S V G 中央ドメインペプチド (G c c) の特性決定を示す図である。(図1A) R S V G 中央ドメイン (配列番号12) をフェリチンナノ粒子ヘクリックコンジュゲートして G c c - N P 抗原が形成されることを示すクーマシー染色 S D S - P A G E ゲルである。(図1B) G c c - N P の構造モデルである。

【図2】図2A～Cは、例となる R S V キメラ抗原を示す図である。(図2A) 1つの B 1 株 G c c ペプチド配列を A 2 株 G c c ペプチド配列と融合させた後、三量体形成 f o l d o n タグと融合させた。タンデム G c c ペプチドは、f o l d o n タグにより三量体形成し、これにより G c c ペプチドの6つのコピーを提示する、仮説的フォールド構築物のモデル構造を提示する。「B 1 - A 2 - f o l d o n」とも呼ぶ。(図2B) それぞれ A および B 株由来の G c c ペプチド配列の2つのコピーを四量体キメラポリペプチドの形成において (場合により A 2 - B 1 - A 2 - B 1 の順で) 融合させる。B 1 - A 2 - f o l d o n とは異なり、この構築物は、高三次構造へのフォールディングを必要としない。(図2C) A 2 株 G c c ペプチドの1つのコピーを N 末端の α 粒子プロトマーに融合させ、一方、B 1 株 G c c ペプチドの1つのコピーを C 末端に融合させる。 α プロトマーが、表面上に提示される G c c ペプチドの多数のコピーと粒子核を形成する、仮説的フォールド構造のモデル構造を示す。

【図3-1】図3A～Cは、低用量 (0.5 μ g) の R S V G 抗原により誘発された中和抗体力価を示す図である。(図3A) 第2の免疫化から2週間後 (2 w p 2) に採取した血清から A F 0 3 を用いて構築した G 抗原による免疫化によって誘発された R S V A 株 H A E 中和力価である。ナイーブ血清および過免疫血清による中和応答を陰性および陽性対照としてそれぞれ示す。各グラフでは、免疫化において使用した免疫原を x 軸の下に示す。(図3B) 第3の免疫化から2週間後に採取した血清から A F 0 3 を用いて構築した G 抗原による免疫化によって誘発された R S V A 株 H A E 中和力価である。対照血清および免疫原を表示する。(図3C) 第3の免疫化から2週間後に採取した血清から A F 0 3 を用いて構築した G 抗原による免疫化によって誘発された R S V B 株 H A E 中和力価である。対照血清および免疫原を表示する。

【図3-2】図3-1の続き。

【図4】図4A～Bは、R S V G 抗原により誘発された R S V A 2 株抗原結合抗体応答を示す図である。(図4A) 高用量 (5 μ g) の R S V G キメラ抗原により誘発され、第2の注射から2週間後 (淡灰色の箱形) および第3の注射から2週間後 (濃灰色の箱形) に測定した、G c c A 2 株に対して誘発された G c c 結合抗体応答である。ナイーブマウス血清応答を陰性対照として示す。免疫原は、x 軸の下に表示する。(図4B) 低用量 (0.5 μ g) の R S V G キメラ抗原により誘発され、第2の注射から2週間後 (淡灰色の箱形) および第3の注射から2週間後 (濃灰色の箱形) に測定した、G c c A 2 株に対して誘発された G c c 結合抗体応答である。ナイーブマウス血清および免疫原を上記のように表示する。

【図5】図5A～Bは、RSV G抗原により誘発されたRSV B1株抗原結合抗体応答を示す図である。(図5A)高用量(5 μ g)のRSV Gキメラ抗原により誘発され、第2の注射から2週間後(淡灰色の箱形)および第3の注射から2週間後(濃灰色の箱形)に測定した、GccB1株に対して誘発されたGcc結合抗体応答である。ナীবマウス血清応答を陰性対照として示す。免疫原をx軸の下に表示する。(図5B)低用量(0.5 μ g)のRSV Gキメラ抗原により誘発され、第2の注射から2週間後(淡灰色の箱形)および第3の注射から2週間後(濃灰色の箱形)に測定した、GccB1株に対して誘発されたGcc結合抗体応答である。ナীবマウス血清および免疫原を上記のように表示する。

【図6】図6Aは、実施例5に記載する抗体結合実験の略図である。図6Bは、参照抗原(円)および配列番号14の構築物(四角)による実施例5に記載する抗体結合実験の結果を示す図である。破線は、ブランクの基線シグナルを示す。縦軸および横軸の単位は、それぞれLog OD単位(UDO)およびLog AU/mLである(AU:任意単位)。

【発明を実施するための形態】

【0018】

単独で、またはアジュバントとともに別々の分子として投与する場合に抗原性である、抗原性RSV Gポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、抗原性RSV Gポリペプチドは、RSV Gcc単量体を3つ以上含む。一部の実施形態では、RSV Gポリペプチドは、フェリチンを含まない。一部の実施形態では、RSV Gポリペプチドは、一本鎖である。一部の実施形態では、RSV Gポリペプチドは、多量体形成ドメインを含む。一部の実施形態では、RSV Gポリペプチドは、粒子/多量体、例えば、三量体、四量体または六量体である。

【0019】

A. 定義

「Fポリペプチド」または「RSV Fポリペプチド」は、ウイルス侵入の間にウイルスエンベロープの宿主細胞膜との融合の駆動を司るRSVのポリペプチドを指す。

【0020】

「Gポリペプチド」または「RSV Gポリペプチド」は、本明細書において使用する場合、RSVのヒト気道上皮細胞との会合を司る結合ポリペプチドを指す。例となる野生型RSV Gアミノ酸配列を配列番号1として提供する。RSV Gポリペプチドは、細胞外に存在する外部ドメイン(RSV Gのアミノ酸およそ66～297(配列番号2))を含む。RSV Gの外部ドメイン内は、中央保存領域(GccまたはCCR、配列番号1のアミノ酸およそ151～193)である。RSV GのCCRは、CX3Cモチーフを含む。CX3Cモチーフは、GポリペプチドのCX3CR1受容体への結合を媒介する。

【0021】

「プロトマー」は、本明細書において使用する場合、オリゴマーポリペプチドの構造単位を指す。

【0022】

「フェリチン」または「フェリチンポリペプチド」は、本明細書において使用する場合、ヘリコバクター・ピロリフェリチン(配列番号208または209)またはパイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*/P. *furiosus*)フェリチン、イラクサキンウワバ(*Trichoplusia ni*/T. *ni*)フェリチンもしくはヒトフェリチンのような別のフェリチンに対する検出可能な配列同一性を有するポリペプチドを指し、これは、例えば、細胞内もしくは組織内に、鉄を貯蔵するか、または血流中に鉄を輸送するのに役立つ。このような例となるフェリチンとしては、重および軽鎖として知られる2つのポリペプチド鎖として生じるものが挙げられる(例えば、イラクサキンウワバおよびヒトフェリチン)。フェリチンは、完全長の天然に存在する配列の断片であり得る。

【0023】

本明細書において使用する場合、「単量体」は、他の分子と集合していない単一分子を

10

20

30

40

50

指す。

【0024】

本明細書において使用する場合、「粒子」または「多量体」は、自己集合した球状形態を指す。例となる「粒子」としては、多量体形成ドメインを含む構築物（例えば、foldon）が挙げられる。多量体形成ドメインは、分子の複数のコピーをまとめるように機能し得る。「粒子」および「多量体」は、区別する場合を除いて、本明細書において互換的に使用する。例となる粒子は、「GccB1-A2-foldon」であり、これは、六量体を形成する（GccB1の3つのコピーおよびGccA2の3つのコピー）。本明細書に記載する「Gcc四量体」は、自己集合した球状形態ではないため、「粒子／多量体」ではない。

10

【0025】

「RSV Gccポリペプチド」は、RSV Gccの単量体および粒子／多量体形態を含む。

【0026】

「免疫応答」は、本明細書において使用する場合、B細胞、T細胞、樹状細胞、マクロファージまたは多形核球のような免疫系の細胞の、抗原またはワクチンのような刺激に対する応答を指す。免疫応答は、宿主防御応答に関与する体の任意の細胞を含んでもよく、例えば、インターフェロンまたはサイトカインを分泌する上皮細胞を含む。免疫応答は、先天性および／または適応性免疫応答を含むが、これらに限定されない。本明細書において使用する場合、「防御免疫応答」は、感染症から対象を防御する（例えば、感染症を予防するか、または感染症に関連する疾患の発症を予防する）免疫応答を指す。免疫応答を測定する方法は、当技術分野において周知であり、例えば、リンパ球（例えば、BまたはT細胞）の増殖および／または活性、サイトカインまたはケモカインの分泌、炎症、抗体産生等の測定による方法を含む。「抗体応答」は、抗体が産生される免疫応答である。

20

【0027】

本明細書において使用する場合、「抗原」は、免疫応答を誘発する物質、および／または（例えば、MHC分子により提示される場合）T細胞受容体により、もしくは生物に曝露もしくは投与する場合、抗体（例えば、B細胞により産生される）に、結合する物質を指す。一部の実施形態では、抗原は、生物において液性応答（例えば、抗原特異的抗体の産生を含む）を誘発する。あるいは、または加えて、一部の実施形態では、抗原は、生物において細胞性応答（例えば、受容体が抗原と特異的に相互作用するT細胞に関与する）を誘発する。特定の抗原は、標的生物（例えば、マウス、ウサギ、霊長類、ヒト）の1つまたはいくつかのメンバーにおいて免疫応答を誘発し得るが、標的生物種のすべてのメンバーにおいてではない。一部の実施形態では、抗原は、標的生物種の少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%のメンバーにおいて免疫応答を誘発する。一部の実施形態では、抗原は、抗体および／またはT細胞受容体に結合し、生物において特定の生理学的応答を誘発する場合もあれば、しない場合もある。一部の実施形態では、例えば、抗原は、このような相互作用がin vivoで生じるか否かにかかわらず、抗体および／またはT細胞受容体にin vitroで結合する。一部の実施形態では、抗原は、異種免疫原により誘導されるものを含む、特異的な液性または細胞性免疫の産物と反応する。

30

【0028】

「アジュバント」は、本明細書において使用する場合、抗原に対する免疫応答を非特異的に増強する物質または溶媒を指す。アジュバントは、抗原が吸着する鉱物（例えば、ミョウバン、水酸化アルミニウムまたはリン酸塩）の懸濁液；抗原溶液を鉱物油または水中に乳化する油中水または水中油乳濁液（例えば、フロイント不完全アジュバント）を含み得るが、これらに限定されない。抗原性をさらに増強させるために、死滅させたマイコバクテリアを含むこともある（例えば、フロイント完全アジュバント）。また、免疫刺激オリゴヌクレオチド（例えば、CpGモチーフ）をアジュバントとして使用することができ

40

50

る（例えば、米国特許第6,194,388号；第6,207,646号；第6,214,806号；第6,218,371号；第6,239,116号；第6,339,068号；第6,406,705号；および第6,429,199号を参照）。また、アジュバントは、Toll様受容体（TLR）アゴニストのような生体分子および共刺激分子を含み得る。アジュバントは、組成物中に別々の分子として投与するか、または粒子に共有結合（コンジュゲート）させ得る。

【0029】

「抗原性RSV Gポリペプチド」は、RSVについて分子が抗原性である、十分な長さのRSV Gアミノ酸配列の全部または一部を含む、ポリペプチドを指すために本明細書において使用する。抗原性は、 α 配列のような異種配列をさらに含む構築物の一部である、RSV配列の特徴であり得る。つまり、RSV配列が、異種配列をさらに含む構築物の一部である場合、構築物は、異種配列を有しないRSV配列がそのように役立ち得るかどうかにかかわらず、抗RSV抗体を産生させる抗原として役立つことができれば十分である。

【0030】

「 α 配列」は、配列番号9の配列である。

【0031】

一部の実施形態では、「抗原性RSV G α ポリペプチド」は、配列番号6に対する少なくとも80%、85%、90%、95%、99%または100%の同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、抗原性RSV G α ポリペプチドは、RSV Gccおよび配列番号9、またはRSV Gccの多量体形成が可能な配列番号9の断片を含む、一本鎖ポリペプチドを含む。抗原性RSV G α ポリペプチドは、免疫刺激部分をさらに含み得る。抗原性は、より大きな構築物の一部である、RSV G配列の特徴であり得る。つまり、構築物は、 α （および該当する場合、免疫刺激部分）を有しないRSV Gポリペプチドがそのように役立ち得るかどうかにかかわらず、RSV Gポリペプチドに対する抗原として役立つことができれば十分である。しかし、明確化のために言えば、抗原性RSV Gポリペプチドは、 α 配列を含む必要はない。「抗原性RSV Gポリペプチド」は、抗原性RSV G α ポリペプチドまたは α 配列を含まない抗原性RSV Gポリペプチドのいずれかであり得るポリペプチドを指すために本明細書において使用する。

【0032】

本明細書において使用する場合、「対象」は、動物界の任意のメンバーを指す。一部の実施形態では、「対象」は、ヒトを指す。一部の実施形態では、「対象」は、非ヒト動物を指す。一部の実施形態では、対象は、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫および／または蠕虫を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、非ヒト対象は、哺乳類（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類および／またはブタ）である。一部の実施形態では、対象は、遺伝子導入動物、遺伝子改変動物、および／またはクローンであり得る。本発明の特定の実施形態では、対象は、成人、青少年または乳児である。一部の実施形態では、「個人」または「患者」の用語を使用し、「対象」と互換的であることを意図する。

【0033】

本明細書において使用する場合、「ワクチン接種」または「ワクチン接種する」の用語は、例えば、疾患を引き起こす物質に対する免疫応答の発生を意図する組成物の投与を指す。ワクチン接種では、疾患を引き起こす物質への曝露および／または1つもしくはそれ以上の症候の発生の前、間および／または後に、一部の実施形態では、物質への曝露の前、間および／または直後に、投与することができる。一部の実施形態では、ワクチン接種は、ワクチン接種組成物の、適切に時間間隔をあけた複数回の投与を含む。

【0034】

本開示では、所与の核酸配列またはアミノ酸配列のそれぞれ（参照配列）に対する、ある程度の同一性を有する配列を記載する。

【0035】

2つの核酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一のヌクレオチドの百分率を示す。
2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一のアミノ酸の百分率を示す。

【0036】

「%同一」、「%同一性」の用語または類似の用語は、特に、比較する配列間の最適アラインメントにおいて同一のヌクレオチドまたはアミノ酸の百分率を指すことを意図する。この百分率は、純粋に統計学的であり、2つの配列間の差は、必ずしもそうではないが、比較する配列の全長にわたってランダムに分布し得る。2つの配列の比較は、最適アラインメント後、セグメントまたは「比較ウインドウ」について、対応する配列の局所領域を同定するために、この配列を比較することにより通常行う。比較のための最適アラインメントは、手動で、またはSmith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482による局所相同性アルゴリズムを用いて、Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443による局所相同性アルゴリズムを用いて、Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2444による類似性検索アルゴリズムを用いて、もしくはこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータプログラム（Genetics Computer Group社、575 Science Drive, Madison, Wis.によるWisconsin Genetics Software PackageのGAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST NおよびTFAST A）を用いて実行し得る。

【0037】

同一性の百分率は、比較する配列が対応する同一位置の数を決定し、この数を比較する位置の数（例えば、参照配列における位置の数）で割り、この結果に100を掛けることにより得る。

【0038】

一部の実施形態では、同一性の程度は、参照配列の全長の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または約100%の領域について示す。例えば、参照核酸配列が200ヌクレオチドからなる場合、同一性の程度は、少なくとも約100、少なくとも約120、少なくとも約140、少なくとも約160、少なくとも約180または約200ヌクレオチドについて、一部の実施形態では、連続するヌクレオチドにおいて、示す。一部の実施形態では、同一性の程度は、参照配列の全長について示す。

【0039】

所与の核酸配列またはアミノ酸配列のそれぞれに対する特定の程度の同一性を有する核酸配列またはアミノ酸配列は、これらの所与の配列の少なくとも1つの機能特性を有し、例えば、および一部の場では、これらの所与の配列と機能的に等価であり得る。1つの重要な特性は、特に、対象に投与する場合、サイトカインとして作用する能力を含む。一部の実施形態では、所与の核酸配列またはアミノ酸配列に対する特定の程度の同一性を有する核酸配列またはアミノ酸配列は、これらの所与の配列と機能的に等価である。

【0040】

本明細書において使用する場合、「キット」の用語は、1つまたはそれ以上の化合物または組成物のような関連化合物、および溶剤、溶液、緩衝液、説明書または乾燥剤のような1つまたはそれ以上の関連物質のパッケージングされたセットを指す。

【0041】

B. 抗原性RSV Gポリペプチド

RSV G c cポリペプチドを3つ以上含むRSV Gポリペプチドを本明細書において提供する。一部の実施形態では、G c cポリペプチドは、G c c単量体である。一部の実施形態では、RSV G c c単量体を3つ以上含むRSV Gポリペプチドであって、フェリチンを含まない、ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、抗原性RSV Gポリペプチドは、一本鎖として提供し、この場合、一本鎖は、RSV G c c単量体を3つ以上含む。RSV G c cポリペプチド／単量体は、RSV G c cの全配列またはRSV

G c cの一部を含み得る。一部の実施形態では、R S V G c cは、最後のアミノ酸1つ、2つまたは3つを欠いている。一部の実施形態では、R S V G c cは、最後のアミノ酸（例えば、配列番号3のN末端のK）を欠いている。R S V G c cポリペプチドは、例えば、配列番号3のアミノ酸番号7におけるNからSへの置換のように、野生型配列（配列番号3）と比較して修飾を含み得る。

【0042】

一部の実施形態では、R S V G c cポリペプチドは、R S V A株（UniProtKB/Swiss-Prot:P27022.1；配列番号1）に由来する。一部の実施形態では、R S V G c cポリペプチドは、R S V B株（UniProtKB/Swiss-Prot:O36633.1；配列番号226）に由来する。一部の実施形態では、A株由来のR S V G c cポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、A株由来のR S V G c cポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸を含み、この場合、配列番号3の末端Kは、存在しない。一部の実施形態では、A株由来のR S V G c cポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸2～42を含む。一部の実施形態では、B株由来のR S V G c cポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、B株由来のR S V G c cポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸10～51を含む。

10

【0043】

一部の実施形態では、R S V G c cポリペプチドは、G c c領域（R S V G（配列番号1）のアミノ酸151～193）の全部または一部を含む。一部の実施形態では、R S V Gポリペプチドは、C X 3 Cモチーフを含む。一部の実施形態では、R S V Gポリペプチドは、C X 3 C R 1受容体に結合する。

20

【0044】

一部の実施形態では、R S V Gポリペプチドは、グリコシル化されない。例えば、R S V Gポリペプチドは、NまたはS/T残基の切断または変異（例えば、それぞれQまたはAへ）のいずれか、またはこれらの組合せのため、N X S/T Xグリコシル化部位を欠き得る。

【0045】

一部の実施形態では、R S V Gポリペプチドは、G c c単量体を3、4、5、6、7、8、9または10個含む。一部の実施形態では、R S V Gポリペプチドは、G c c単量体を1～2、1～5、1～10、1～20、1～25、1～30、1～40、1～50、1～60、1～70、1～80、1～90、1～100または1～120個含む。一部の実施形態では、R S V Gポリペプチドは、G c c単量体3つを含む。一部の実施形態では、R S V Gポリペプチドは、G c c単量体6つを含む。一部の実施形態では、R S V Gポリペプチドは、G c c単量体120個を含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、A株のG c c単量体のみを含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、B株のG c c単量体のみを含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、A株およびB株のG c c単量体を含む。

30

【0046】

一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、A株のG c c単量体を3つ以上含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、B株のG c c単量体を3つ以上含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、A株のG c c単量体を少なくとも1つおよびB株のG c c単量体を少なくとも1つ含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、A株のG c c単量体1つおよびB株のG c c単量体1つを含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、ともにA株由来のG c c単量体2つを含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、ともにB株由来のG c c単量体2つを含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、一本鎖である。

40

【0047】

一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、A株のG c c単量体3つを含む。一部の実施形態では、抗原性R S V Gポリペプチドは、B株のG c c単量体3つを

50

含む。一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、A 株の G c c 単量体 3 つおよび B 株の G c c 単量体 3 つを含む。

【0048】

一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、三量体、四量体または六量体である。一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、四量体である。一部の実施形態では、三量体、四量体または六量体は、一本鎖ポリペプチドである。一部の実施形態では、三量体、四量体または六量体は、粒子を形成しない一本鎖ポリペプチドである。一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、G c c 単量体 4 つを含む四量体である。一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、A 株の単量体 2 つおよび B 株の単量体 2 つの G c c 単量体 4 つを含む四量体である。一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、A 株の単量体 2 つおよび B 株の単量体 2 つの G c c 単量体 4 つを含む四量体であり、この場合、ポリペプチドは、一本鎖であり、粒子を形成しない。一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸を含む四量体である。一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列と 85 %、90 %、95 % または 99 % 同一のアミノ酸配列を含む四量体である。

10

【0049】

1. R S V G 粒子

一部の実施形態では、R S V G ポリペプチド粒子または多量体を提供する。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチド粒子または多量体を提供し、この場合、粒子は、フェリチンを含まない。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチド一本鎖粒子または多量体を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載の R S V G ポリペプチドのいずれか、および多量体形成ドメインを含む、R S V G ポリペプチド粒子または多量体を提供する。一部の実施形態では、R S V G 粒子は、多量体形成ドメインを 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個含む。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、多量体形成ドメインを 1 ~ 2、1 ~ 5、1 ~ 10、1 ~ 20、1 ~ 25、1 ~ 30、1 ~ 40、1 ~ 50、1 ~ 60、1 ~ 70、1 ~ 80、1 ~ 90、1 ~ 100 または 1 ~ 120 個含む。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、G c c 多量体形成ドメイン 3 つを含む。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、G c c 多量体形成ドメイン 6 つを含む。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、G c c 多量体形成ドメイン 120 個を含む。

20

【0050】

一部の実施形態では、R S V G 粒子は、多量体形成ドメイン 1 つを含む。一部の実施形態では、多量体形成ドメインは、自己集合する、当技術分野において公知の任意のドメインである。一部の実施形態では、多量体形成ドメインは、fold on ドメインである。一部の実施形態では、配列番号 11 または配列番号 11 の一部を含む fold on ドメインは、自己集合可能である。一部の実施形態では、fold on ドメインは、配列番号 11 と 80 %、90 %、95 % または 99 % 同一の配列を含み、この場合、fold on は、自己集合可能である。配列番号 11 の例となる一部は、配列番号 13 として提供する。一部の実施形態では、fold on ドメインは、配列番号 13 と 80 %、90 %、95 % または 99 % 同一の配列を含み、この場合、fold on は、自己集合可能である。一部の実施形態では、fold on ドメインは、配列番号 13 の配列を含むか、またはこれからなる。

30

40

【0051】

一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸（配列番号 11 の fold on を有する B1-A2 fold on）に対する少なくとも 85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % または 99.5 % の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、配列番号 4 の配列を含む。一部の実施形態では、抗原性 R S V G ポリペプチドは、配列番号 14 のアミノ酸（配列番号 13 の fold on を有する B1-A2 fold on）に対する少なくとも 85 %、90 %、

50

95%、97%、98%、99%または99.5%の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、RSV Gポリペプチドは、配列番号14の配列を含む。

【0052】

一部の実施形態では、抗原性RSV Gポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸（A2-A2 foldon）に対する少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、99%または99.5%の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、RSV Gポリペプチドは、配列番号7の配列を含む。

【0053】

一部の実施形態では、抗原性RSV Gポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸（B1-B1 foldon）に対する少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、99%または99.5%の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、RSV Gポリペプチドは、配列番号8の配列を含む。

【0054】

一部の実施形態では、RSV G粒子は、抗原性RSV G α 粒子である。例えば、RSV Gポリペプチドは、A株、B株またはAおよびBの両株由来のRSV Gccを含む本明細書に記載の一本鎖ポリペプチド、ならびに完全または部分的 α 配列を含み得る。一部の実施形態では、抗原性RSV Gポリペプチドは、配列番号6（ α 粒子）に対する少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、99%または99.5%の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、RSV Gポリペプチドは、配列番号6の配列を含む。一部の実施形態では、抗原性 α 粒子は、自己集合可能である。一部の実施形態では、抗原性 α 粒子は、RSV Gcc、および配列番号9と80%、90%、95%または99%同一の配列を含み、この場合、粒子は、自己集合可能である。一部の実施形態では、抗原性 α 粒子は、1粒子あたり60コピーの粒子プロトマーを提示し、この場合、2つのGcc（場合により、A株1つおよびB株1つ）は、多量体形成することによりGccおよそ120個が提示され、免疫認識のために利用可能となる。

【0055】

一部の実施形態では、RSVポリペプチドは、一本鎖構築物であり、例えば、単一ポリペプチドとして表す。

【0056】

一部の実施形態では、RSV Gccは、野生型配列と比較して単一アミノ酸の置換を含む。一部の実施形態では、RSV Gccは、野生型配列と比較して2つ以上の単一アミノ酸の置換、例えば、2、3、4、5または6個の置換を含む。例となる野生型配列は、配列番号3である。

【0057】

C. リンカー

一部の実施形態では、存在する場合、リンカーは、RSV単量体および／または多量体形成ドメインのアミノ酸配列を分離する。任意のリンカーを使用し得る。一部の実施形態では、リンカーは、抗原性RSV Gポリペプチドの発現を融合ポリペプチドとして促進し得る（例えば、単一オープンリーディングフレームから）ペプチドリンカーである。一部の実施形態では、リンカーは、グリシン-セリンリンカーである。一部の実施形態では、グリシン-セリンリンカーは、GS、GGGS（配列番号15）、2XGGGS（すなわち、GGGS GGGS）（配列番号16）または5XGGGS（配列番号17）である。

【0058】

一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸2、3、4、5、6、7、8、9または10個の長さである。一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸約2~4、2~6、2~8、2~10、2~12または2~14個の長さである。一部の実施形態では、リンカーは、少なくともアミノ酸15個の長さである。一部の実施形態では、リンカーは、少なくともアミノ酸25個の長さである。一部の実施形態では、リンカーは、少なくともアミノ酸30個の長さである。一部の実施形態では、リンカーは、少なくともアミノ酸35個の長さである。一部の実施形態では、リンカーは、少なくともアミノ酸40個の長さである。

。一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸60個以下の長さである。一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸50個以下の長さである。一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸約16、28、40、46または47個の長さである。一部の実施形態では、リンカーは、可動性である。

【0059】

一部の実施形態では、リンカーは、グリシン（G）および／またはセリン（S）のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、リンカーは、グリシン（G）、セリン（S）、アスパラギン（N）および／またはアラニン（A）のアミノ酸、ならびに場合により、上に考察するようにシステインを含むか、またはこれらからなる。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号222に対する少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、GGGSGGGSGGGSG（配列番号220）、GSGSGSGNSSASSSGASSGGASGGSGGGSG（配列番号221）、GSGSGASSGASASSGSSNGSGSGSGSNSSASSSGASSGGASGGSGGGSG（配列番号222）またはGSを含む。一部の実施形態では、リンカーは、FR1（配列番号223）またはFR2（配列番号224）を含む。

10

【0060】

一部の実施形態では、構築物は、リンカーを含まない。一部の実施形態では、構築物は、リンカー1つを含む。一部の実施形態では、構築物は、リンカーを2つまたは3つ以上含む。一部の実施形態では、構築物は、存在する場合、リンカーを各単量体間ならびに単量体および多量体形成ドメインの間に含む。

20

【0061】

D. 組成物；ワクチン接種のための使用および方法

一部の実施形態では、本発明では、RSVによる感染症に対して対象を免疫する方法を提供する。本発明では、対象においてRSVに対する免疫応答を誘発する方法をさらに提供する。一部の実施形態では、方法は、有効量の本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与する工程を含む。一部の実施形態では、方法は、有効量の本明細書に記載の抗原性RSVポリペプチド、抗原性RSVG粒子または抗原性RSV α 粒子を対象に投与する工程を含む。

【0062】

一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたは粒子のいずれか1つまたはそれ以上、および薬学的に許容される溶媒、アジュバントまたは賦形剤を含む組成物を提供する。

30

【0063】

一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド、粒子または組成物は、ヒトのような対象に投与して、RSVにより生じる感染症に対して免疫する。一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド、ナノ粒子または組成物は、ヒトのような対象に投与して、RSVによる将来の感染症に対する防御免疫応答を発生させる。一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド、ナノ粒子または組成物のいずれか1つまたはそれ以上は、RSVにより生じる感染症に対する免疫における使用のために提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド、ナノ粒子または組成物のいずれか1つまたはそれ以上は、RSVによる将来の感染症に対する防御免疫応答の発生における使用のために提供する。一部の実施形態では、防御免疫応答により、RSVによる感染症、肺炎、細気管支炎または喘息の罹患率が低下する。

40

【0064】

一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載のRSVGポリペプチドを含む。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載のRSVG粒子を含む。

【0065】

一部の実施形態では、本明細書に記載のRSVGポリペプチドを含む組成物は、後融合RSVFポリペプチドまたはGcc-NPによる免疫化と比較して、RSVに対する

50

優れた中和応答を誘発する。一部の実施形態では、本明細書に記載のRSV Gポリペプチド（例えば、本明細書に記載のRSV Gポリペプチドを含むポリペプチドまたは粒子）による免疫化により、Gcc-NPによる免疫化と比較して、RSV Gに対する高力価の抗体が誘発される。一部の実施形態では、本明細書に記載のRSV Gポリペプチドによる免疫化により、GccまたはGcc-NPの単量体1つまたは2つによる免疫化と比較して、RSV Gに対する総抗体が高い割合で誘発される。本明細書に記載のRSV抗原による免疫化によって、後融合RSV Fによる免疫化と比較して、RSVに対するより良い防御がもたらされ得る。

【0066】

一部の実施形態では、Gcc単量体を3つ以上含むRSV Gポリペプチド、および本明細書に記載のGcc粒子を含む組成物は、RSVに対する中和応答を誘発する。

10

【0067】

一部の実施形態では、Gcc単量体を3つ以上含むRSV Gポリペプチド、および本明細書に記載のGcc粒子を含む組成物は、RSVに対する防御の向上、例えば、Gcc単量体を3つ以上含まない組成物よりも高い中和力価をもたらす。

【0068】

1. 対象

一部の実施形態では、対象は、哺乳類である。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0069】

20

一部の実施形態では、対象は、成人（18歳以上）である。一部の実施形態では、対象は、小児または青少年（18歳未満）である。一部の実施形態では、対象は、高齢者（61歳以上）である。一部の実施形態では、対象は、非高齢の成人（18歳以上および60歳以下）である。

【0070】

一部の実施形態では、2回以上の投与により組成物を対象に投与する。一部の実施形態では、ブースター投与により、免疫応答が向上する。

【0071】

一部の実施形態では、抗原性ポリペプチドのいずれか1つもしくはそれ以上、または本明細書に記載の組成物は、霊長類（例えば、サル（例えば、アカゲザルまたはカニクイザルのようなマカク）または類人猿のような非ヒト霊長類）のような哺乳類、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）または家畜哺乳類（例えば、イヌ、ウサギ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ラクダまたはロバ）における使用のためのものである。一部の実施形態では、抗原性ポリペプチドのいずれか1つもしくはそれ以上、または本明細書に記載の組成物は、家禽（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ホロホロチョウまたはハクチョウ）のような鳥類における使用のためのものである。

30

【0072】

2. アジュバント

本明細書に記載するように、アジュバントはまた、本明細書に記載の抗原性RSV Gポリペプチドおよび粒子とともに対象に投与し得る。一部の実施形態では、ポリペプチドおよび粒子とのアジュバントの投与により、アジュバントを用いないポリペプチドまたは粒子の単独投与と比較して、対象においてRSVポリペプチドに対する高力価の抗体がもたらされる。アジュバントは、抗原性ポリペプチドに対する免疫応答をより早期に、より強力に、またはより持続的に促進し得る。

40

【0073】

一部の実施形態では、組成物は、アジュバントを1つ含む。一部の実施形態では、組成物は、アジュバントを2つ以上含む。一部の実施形態では、組成物は、アジュバントを含まない。

【0074】

一部の実施形態では、アジュバントは、アルミニウムを含む。一部の実施形態では、ア

50

ジュバントは、リン酸アルミニウムである。一部の実施形態では、アジュバントは、ミョウバン (Al hydrogel '85 2%; Brenntag 社 - Cat # 21645-51-2) である。

【0075】

一部の実施形態では、アジュバントは、有機アジュバントである。一部の実施形態では、アジュバントは、油性アジュバントである。一部の実施形態では、アジュバントは、水中油ナノ乳濁液を含む。

【0076】

一部の実施形態では、アジュバントは、スクアレンを含む。一部の実施形態では、スクアレンを含むアジュバントは、Rib i (Sigma adjuvant system Cat # S6322-1 v l)、Addavax (商標) MF59、AS03 または AF03 である (米国特許第 9703095 号を参照)。一部の実施形態では、スクアレンを含むアジュバントは、ナノ乳濁液である。

【0077】

一部の実施形態では、アジュバントは、ポリアクリル酸ポリマー (PAA) を含む。一部の実施形態では、PAA を含むアジュバントは、SPA09 である (WO 第 2017218819 号を参照)。

【0078】

一部の実施形態では、アジュバントは、非代謝型油を含む。一部の実施形態では、アジュバントは、不完全フロイントアジュバント (IFA) である。

【0079】

一部の実施形態では、アジュバントは、非代謝型油および死滅させた結核菌 (Mycobacterium tuberculosis) を含む。一部の実施形態では、アジュバントは、完全フロイントアジュバント (CFA) である。

【0080】

一部の実施形態では、アジュバントは、リポ多糖である。一部の実施形態では、アジュバントは、モノホスホリル A (MPL または MPLA) である。

【0081】

3. 医薬組成物

種々の実施形態では、本明細書に記載の抗原性 RSV G ポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、医薬組成物は、病原体に対する防御免疫応答のような免疫応答を誘発することが可能な免疫原性組成物 (例えば、ワクチン) である。

【0082】

例えば、一部の実施形態では、医薬組成物は、次: (1) RSV G c c 単量体を 3 つ以上含む抗原性 RSV G ポリペプチド; (2) 抗原性 α ポリペプチド; (3) 抗原性 RSV G 粒子; または (4) 抗原性 RSV 粒子もしくは非粒子三量体、四量体もしくは六量体の 1 つまたはそれ以上を含み得る。一部の実施形態では、医薬組成物は、RSV G c c 単量体を 3 つ以上含む抗原性 RSV G ポリペプチドを含む。

【0083】

一部の実施形態では、本発明において、本明細書に記載の抗原性ポリペプチドと関連する抗体または他の物質を含む医薬組成物を提供する。実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の抗原性ポリペプチドに結合および/または競合する抗体を含む。あるいは、抗体は、本明細書に記載の抗原性ポリペプチドの RSV ポリペプチド成分を含むウイルス粒子を認識し得る。

【0084】

一部の実施形態では、本明細書に記載する医薬組成物は、単独で、または免疫応答を増強する物質の 1 つまたはそれ以上、例えば、上記のアジュバントと組み合わせて投与する。一部の実施形態では、医薬組成物は、上記のアジュバントをさらに含む。

【0085】

一部の実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体または賦形剤をさらに含

10

20

30

40

50

む。本明細書において使用する場合、「担体」の用語は、希釈剤、アジュバント、賦形剤または医薬組成物をともに投与する溶媒を指す。例となる実施形態では、担体は、例えば、水および油のような滅菌液を含んでもよく、例えば、ピーナツ油、ダイズ油、鉱物油、ゴマ油等のような石油、動物、植物または合成起源の油を含む。一部の実施形態では、担体は、1つまたはそれ以上の固体成分であるか、またはこれを含む。また、薬学的に許容される担体は、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、グリセリン、エタノールおよびこれらの組合せを含むが、これらに限定されない。本明細書において使用する場合、賦形剤は、例えば、所望の粘稠性または安定化作用をもたらすか、またはこれに寄与するために、医薬組成物に含み得る任意の非治療薬である。適する医薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセリン、タルク、塩化ナトリウム、乾燥粉ミルク、グリセリン、プロピレン、グリコール、水、エタノール等を含むが、これらに限定されない。種々の実施形態では、医薬組成物は、無菌である。

10

【0086】

一部の実施形態では、医薬組成物は、少量の湿潤剤もしくは乳化剤またはpH緩衝剤を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、安定化剤、緩衝液または保存剤のような多様な添加剤のいずれかを含み得る。加えて、補助剤、安定化剤、増粘剤、平滑剤および着色剤を含み得る。

【0087】

種々の実施形態では、医薬組成物は、所望の任意の投与方法に適するように製剤化し得る。例えば、医薬組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、液滴、錠剤、丸剤、小丸剤、カプセル、液体を含むカプセル、ゼラチンカプセル、粉剤、持続放出製剤、坐剤、乳濁液、エアロゾル、スプレー、懸濁液、凍結乾燥粉末、凍結懸濁液、乾燥粉末の形態、または使用に適する他の任意の形態をとり得る。医薬品の製剤化および製造における概論は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に見出すことができ；参照によって本明細書に組み入れる。

20

【0088】

医薬組成物は、任意の投与経路を介して投与することができる。投与経路は、例えば、経口、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、粘膜、硬膜外、舌下、鼻腔内、脳内、腔内、経皮、直腸、気管内注入、気管支注入、吸入によるか、または局所的投与経路を含む。投与は、局所的または全身的であり得る。一部の実施形態では、投与は、経口的に行う。別の実施形態では、投与は、非経口注射による。投与方法は、医師の判断に委ねられ得る。

30

【0089】

一部の実施形態では、医薬組成物は、非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内および皮下）に適する。このような組成物は、例えば、溶液、懸濁液、分散液、乳濁液等として製剤化することができる。また、これらは、滅菌固体組成物（例えば、凍結乾燥組成物）の形態で製造してもよく、使用直前に滅菌注射用媒体中に溶解または懸濁することができる。例えば、非経口投与は、注射により達成することができる。このような実施形態では、注射液は、従来の形態、すなわち、液体の溶液もしくは懸濁液、注射前の液体中の溶液もしくは懸濁液に適する固体形態として、または乳濁液のいずれかとして調製する。一部の実施形態では、注射用溶液および懸濁液は、滅菌粉末、凍結乾燥粉末または顆粒から調製する。

40

【0090】

さらなる実施形態では、医薬組成物は、吸入による送達のために（例えば、肺および呼吸器系への直接送達のために）製剤化する。例えば、組成物は、点鼻薬または他の公知の任意のエアロゾル製剤の形態をとり得る。一部の実施形態では、吸入またはエアロゾル送達のための製剤は、複数の粒子を含む。一部の実施形態では、このような製剤は、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12または約1

50

3 ミクロンの平均粒子径を有し得る。一部の実施形態では、吸入またはエアロゾル送達のための製剤は、乾燥粉末として製剤化する。一部の実施形態では、吸入またはエアロゾル送達のための製剤は、例えば、湿潤剤を含有させることにより湿潤粉末として製剤化する。一部の実施形態では、湿潤剤は、水、食塩水または生理学的 pH の他の液体からなる群から選択される。

【0091】

一部の実施形態では、本発明による医薬組成物は、液滴として鼻腔または頬側口腔に投与する。一部の実施形態では、用量は、複数の滴下（例えば、1～100、1～50、1～20、1～10、1～5 滴等）を含み得る。

【0092】

この医薬組成物は、所望のアウトカムを達成するのに適切な任意の用量で投与し得る。一部の実施形態では、所望のアウトカムは、組成物中に存在する抗原性粒子中に存在する RSV ポリペプチドのソースに対する持続性の適応性免疫応答の誘導である。一部の実施形態では、所望のアウトカムは、1 つまたはそれ以上の感染症候の発生の強度、重症度、頻度の低下および／または遅延である。一部の実施形態では、所望のアウトカムは、感染症の阻害または予防である。必要とされる用量は、対象の種、年齢、体重および全身状態、予防または治療する感染症の重症度、使用する特定の組成物、ならびにこの投与方法に応じて対象により異なる。

【0093】

一部の実施形態では、本発明による医薬組成物は、単回または複数回用量で投与する。一部の実施形態では、医薬組成物は、異なる日に投与する複数回用量で投与する（例えば、プライム・ブーストワクチン接種戦略）。一部の実施形態では、医薬組成物は、ブースター投与計画の一部として投与する。

【0094】

種々の実施形態では、医薬組成物は、1 つまたはそれ以上の追加の治療薬と同時投与する。同時投与では、これらの投与のタイミングが、医薬組成物中の追加の治療薬および活性成分（複数可）の薬理的活性が時間的に重複するようなタイミングであり、このため複合的治療作用を発揮する場合、同時に投与する治療薬を必要としない。一般には、各薬剤は、その薬剤のために決定した用量およびタイムスケジュールで投与する。

【0095】

4. 核酸／mRNA

また、本明細書に記載の抗原性ポリペプチドまたは粒子をコードする核酸を提供する。一部の実施形態では、核酸は、mRNA である。翻訳を経てポリペプチドを生じることが可能な任意の核酸は、本開示の目的のための mRNA であると考えられる。

【0096】

5. キット

また、本明細書に記載の抗原性ポリペプチド、核酸、抗原性粒子、組成物または医薬組成物を 1 つまたはそれ以上含むキットを本明細書において提供する。一部の実施形態では、キットは、溶剤、溶液、緩衝液、説明書または乾燥剤の 1 つまたはそれ以上をさらに含む。

【0097】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1(配列表):配列の説明

説明	配列	配列番号
天然 RSV G A 株 UniProtKB/Swiss- Prot:P27022.1	MSKNKQRTAKTLERTWDTLNLHLLFISSCLYKLNLSVAQITLSILAMIISTSLIIVAIIFIASANHKIT STTTIIQDATNQIKNTTPTYLTONPQLGISPNPSDIISLITILDSTTPGVKSTIQSTTVGKNTTITQ AQENKPTTKQRQNKPPKPNNDHFHFEVFNVPSCISCSNNPTCWAICKRIPNKKPGKRTTTTKTKKTPKPT TKKGPKPQTTKSKEAPTTPTEPTINTTKNIITTLTTSNTRNPELTSQMETFHSSTSEGNPSPSQVS ITSEYPSQFSSPPNTPR	1
RSV G 外部ドメイ ン、残基 66～297	NHKVTLTIAIQDATSQIKNTTPTYLQDPQLGISFNSLSEITSQTTTILASTTPGVKSNLQPTTTPVKNTTITQIQPSKPTTKQ RQNKPPNPNNDHFHFEVFNVPSCISCSNNPTCWAICKRIPNKKPGKRTTTTKTKKPTTKKDKHKPQTTKPEVPTTKPTEEPT INTTKNIITTLTNNITGNPKLTSQMETFHSSTSEGNLSPSQVSTTSEHPSPSSPPNTRQ	2
RSV Gcc(中央保存領 域)A2 株 残基 151 ～193.Murata ら (2010)Vaccine28: 6242～6246 の図 1 に記載	RQNKPPNPNNDHFHFEVFNVPSCISCSNNPTCWAICKRIPNKK	3
RSV GccB1-A2- foldon 株キメラ配列	MEESESGGRKNPPKKPKDDYHFEVFNVPSCICGNNQLCKSICKTIPNKKEEEESESGGrnkpps kpnndfhfevfnc sicsnnptcwaickripnkkeessgsgsgsgsgsgsgsgsaigyipeaprdggayvrkdgevwllstflgsglevlfq gplehhhhh	4
RSV Gcc 四量体、 A2-B1-A2-B1 株キ メラ	Mrqnkpps kpnndfhfevfncsicsnnptcwaickripnkRKNPPKKPKDDYHFEVFNVPSCICGNNQLCKSICKTIPNKK rqnkpps kpnndfhfevfncsicsnnptcwaickripnkRKNPPKKPKDDYHFEVFNVPSCICGNNQLCKSICKTIPNKK	5
RSV GccA2-α-B1 キメラ粒子	MEESESGGrnkpps kpnndfhfevfncsicsnnptcwaickripnkEEEESESGSGSWEWNNAKWDEWINDQNDWRE DWQAWRDDWAYWTLTWRYGELYSLRIARRVEELRLQLLRHENRMVLIQFVRALSMQARRLESKEEEEESESGGRKNPPKK PKDDYHFEVFNVPSCICGNNQLCKSICKTIPNKKEESESGG	6

10

20

30

40

50

【表 3】

bfp フェリチン- N19Q/C31S/K79C	ESQVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNPVQLTSSAPEHC FEGLTQIFQKAYEHEQHSINNIIVDHAISKDHAIFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKS RKS	204
bfp フェリチン- N19Q/C31S/S100C	ESQVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNPVQLTSSAPEHC FEGLTQIFQKAYEHEQHSINNIIVDHAISKDHAIFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKS RKS	205
bfp フェリチン- N19Q/C31S/S111C	ESQVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNPVQLTSSAPEHC FEGLTQIFQKAYEHEQHSINNIIVDHAISKDHAIFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKS RKS	206
bfp フェリチン- N19Q/C31S/E12C	ESQVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNPVQLTSSAPEHC FEGLTQIFQKAYEHEQHSINNIIVDHAISKDHAIFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKS RKS	207
ウシガエルリンカーを 有する例となるヘリコ バクター・ピロリフエ リチン	ESQVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNPVQLTSSAPEHC FEGLTQIFQKAYEHEQHSINNIIVDHAISKDHAIFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKS RKS	208
例となる野生型ヘリコ バクター・ピロリフエ リチン (GenBankAccessio nAA06160.1)(ウシ ガエルリンカーまたは N末端のMetを有し ない)	LSKDIITKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNPVQLTSSAPEHC FEGLTQIFQKAYEHEQHSINNIIVDHAISKDHAIFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKS RKS	209
CpG (ISS-1018) イラクサキエンウバ 重鎖フェリチン	TGACTGTGAACGTTCCGAGATGA TQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNMRQIQMEVGASLOYLAMGAHFSKDVNRPQFAQLFFDAASEEREHAMKLIIEYLIMRGELT NDVSSLLQVRPPTRSSWKGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDSEFNHYHLVDYLTGDFLEEQYKQORDLAGKASTLKKL MDRHEALGEF TFDKKLLGIDV	210 211
イラクサキエンウバ 軽鎖フェリチン	ADTCYNDVALDCGITSLSALPRCNAVYGEYSGHGNVATELOQYAKLHLERSYDYLLSAAFYNNQTNRAGFSKLFKKLSDEAWS KTIDIIKHVTKRGDKMNFQDSTMTKTERKNYTAENHELEALAKALDTQKELAEAFYIHTREATNSQHLHDPEIAQYLEEFIED HAEKIRTLAGHTSDLKKFITANNGHDLSLALYVFDEVILQKTV	212
パイロコッカス・フリ オサスフェリチン	MLSERMLKALNDQNLRELYSAYLYFAMAAYFEDLGLGEGFANMMKQAQEEIEIGHALRFYNY IYDRNGRVELDEIPKPKWESEPLKAEAAEYEHKEFTSKSIYELAAAEKDYSTRAFL EWFINEQVEEEASVKIILDKLFAKDSQPQILFMLDKELSARAPKLPGLIMQGGG	213

10

20

30

40

50

【表 4】

ヒト重鎖フェリチン	MTTASTQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASVYLSMSYYFDDDDVALKNFAKYFLHQSHEEREHAELMKLQNRGGRIFLQD IKKPCDDWESGNAMECALHLEKNVQSSLELHKLATDKNDPHLCDFTIETHYLNQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYL FDKHTLGDSDQES	214
ヒト軽鎖フェリチン (シグナルペプチドに 下線を引く)	MDSKGSQKGRLLLLLVSNLLLPQGVASSQIRQNYSTDEAAVNSLVNLYLQASYLYLSGLFYFDRDDVALEGVSHFFRELA EEKREGYERLLKMQNRGGRALFQDIKKPAEDWGTTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD	215
アクイフェックス・エ オリカス (Aquifex aeolicus) 由来のル マジンシンターゼ	MQIYEGKLTAEGLRFGIWRFRFHALVDRLEVEGALDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGA TPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITPGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSATEMANLIFKSLR	216
ウシガエルリンカー	ESQVRQOF	217
システイン-トロロニ ン-His リンカー (シ ステインに二重下線を 引く)	CLVPRGSLHHHHH	218
大腸菌 6,7-ジメチル -8-リビチルマジン シンターゼ	MNIIEANVATPARVAITIAIFNNFTINDSLLEGALDALKRIGQVKDENITVVVPGAYELPLAAGALAKTKYDAVIALGTVIRG GTAHFEYVAGGASNGLAHVAQDSEIPVAFGLVTESIEQAIERAGTKAGNKGAEAALTALEMINVLKAICA	219
アミノ酸 16 個のリン カー	GGGGGGGGGGGGGG	220
アミノ酸 28 個のリン カー	GGSGSGNSASSGASGGGGGGSG	221
アミノ酸 46 個のリン カー	GGSGSASGASASGSGSGSGSGNSASSGASGGSGGGSGGGSG	222
FR1	GGSGSASAEAAAKEAAKAGGGSGG	223
FR2	GGSGSASAEAAAKEAAKAGGGSGG	224
使用せず		225
天然 RSV G B 株 UniProtKB/Swiss- Prot:O36633.1	MSKHQRTARTLEKTWDTLNHLIVISSCLYRLNLKSLAQIALSVLAMIISTSLIAAIIIFIISANHKVT LTVTVTQTIKNHTEKNITTYLTQVPPERVSSSKQPTTSPHITSATTSFNTKSETHHTTAQTKGRITTS TQTNKPSKPKRLKNPKPKPKDDYHFEVENFVPCISCGNNQLCKSICKTIPSNKPKKPKTKPTNKPTTKT TNKRDPTPAKTTKETTNTNPKKPTLTTERDTSTSSSTVLDTTTLEHTIQQOSLHSTTPENTPNSTQT PTASEPSTNSIQNTQSHA	226

【0098】

本記載および例となる実施形態は、制限として解釈されるべきではない。本明細書および添付の特許請求の範囲の目的では、他に指示しない限り、量、百分率または比率／割合を表すすべての数、および本明細書および特許請求の範囲において使用する他の数値は、すべての場合において「約」の用語により、これらがまだそのように修飾されていない範囲で修飾されるものとして理解されるべきである。「約」は、記載する対象の特性に実質的には影響しない、例えば、10%、5%、2%または1%以内の変動の程度を示す。したがって、これに反して指示しない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に記載する数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変動し得る近似値である。少

10

20

30

40

50

なくとも、また本特許請求の範囲の等価物の学説の出願を制限しようとするためでもなく、各数的パラメータは、報告する有効桁の数を踏まえて通常の丸め手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

【0099】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用する場合、単数形の「a」、「an」および「the」ならびに任意の単語の単数形の任意の使用は、一参照対象に明示的かつ明解に制限しない限り、複数の参照対象を含むことに留意されたい。本明細書において使用する場合、「含む」の用語およびこの文法的変形は、非制限であることを意図しており、リストにおける項目の列挙は、リストの項目に置換または追加可能な他の類似の項目を排除することを意図しない。

【実施例】

【0100】

以下の実施例は、開示する特定の実施形態を例示するために提供するものであり、本開示の範囲の制限として決して解釈されるべきではない。

【0101】

1. キメラRSV G抗原の調製

RSV Gキメラポリペプチド（すなわち、B1-A2-foldon（配列番号4）、Gcc四量体A2-B1-A2-B1（配列番号5）およびA2- α -B1粒子（配列番号6））をコードするベクターは、Genscript社によって、IPTG誘導発現プロモーターを内部に有するpET28大腸菌発現ベクターを使用して合成した。抗原のモデル構造は、図2A-Cに示す。A2- α -B1粒子は、プロトマ-60種を含み、それぞれが、Gccエピトープ提示の場合約120例についてA2GccおよびB1Gccを含むと予想される。キメラポリペプチドは、当技術分野における標準的方法を使用して、大腸菌において発現させた。簡潔には、BL21DE3大腸菌細胞を、適切なベクターにより形質転換し、0.1%のカナマイシンを有するLBブロス中37℃で増殖させ（典型的には、発現量1リットル）、細胞密度が約0.5~0.8の吸光度単位（UV600）となると0.1%のIPTGにより誘導した。培養物は、一晚（およそ16時間）18℃で放置してポリペプチドを発現させた。細胞を遠心分離により回収し、細胞ペレットをPBS30mL中に再懸濁して超音波処理した。試料を30分4,000rpmで遠心分離し、上清を廃棄して封入体を保持し、4Mの尿素30mL中に再懸濁した後、超音波処理した。試料をもう一度遠心分離し、RSV G構築物を含む上清を、PBS4リットルに対して一晚透析した。次いで、可溶性の試料を0.22 μ mのMillex-GPフィルターを使用して濾過し、透明な上清を得てポリペプチドを精製した。

【0102】

HISタグ化構築物（すなわち、B1-A2-foldon（配列番号4））は、Nikkyレーションによって、GE HealthcareHISTRAPカラムを使用し、イミダゾールの勾配により溶出して最初に精製した。非HISタグ化構築物（すなわち、Gcc四量体A2-B1-A2-B1（配列番号5）およびA2- α -B1粒子（配列番号6））は、イオン交換GE HealthcareHiTrapQカラムを使用して、NaCl溶出により最初に精製した。RSV G構築物を含む画分を、逆相HPLCによりKinetex5uC18 100Aカラムを使用してさらに精製し、構築物をさらに精製してエンドトキシンを減少させた。最終的に、RSV G構築物は、サイズ排除精製によって、GE HealthcareSuperdexP200カラムを使用し、Tris緩衝食塩水移動相により精製した。当技術分野において典型であるように、純度は、SDS-PAGEゲルにより判断し、濃度は、UV280の吸収により判断した。

【0103】

フェリチンナノ粒子が、RSV G中央ドメイン抗原の免疫原性の向上に使用可能であることを実証するために、発明者らは、Gccペプチド（配列番号12）をフェリチンナノ粒子に化学的にコンジュゲートする方法を開発した。S111C変異を内部に有する本明細書に記載のフェリチン（配列番号206）は、NHS基を介してN末端に結合するP

10

20

30

40

50

E G 4 リンカー上のマレイミド基により合成した G c c ペプチド（配列番号 1 2）とコンジュゲートさせることができる。N 末端のマレイミドを有する G c c ペプチドを合成し、Peptides International 社（Louisville, KY, USA）によって HPLC 精製した。マレイミド-G c c 抗原をフェリチン S 1 1 1 C 粒子に加えると、マレイミドは、遊離のシステインにコンジュゲートして G c c -NP を形成し、これは、クーマシー染色 SDS-PAGE ゲルにより観察することができる。コンジュゲーションは、典型的に 5 0 % ~ 9 0 % 効率的であるが（図 1 A を参照）、G c c ペプチドフェリチンナノ粒子のモデル（1 0 0 % コンジュゲート）を図 1 B に示す。

【0104】

2. RSV G 抗原に対する中和抗体応答の *in vivo* での特性決定

マウスにおける RSV G 抗原に対する *in vivo* での応答を評価するために、0、3 および 6 週目に特定用量の RSV 抗原で、高用量（5 μ g）または低用量（0.5 μ g）のいずれかの抗原を用いて、雌の BALB/c マウスを筋肉内投与により免疫した。他に注記しない限り、RSV 抗原は、ベッドサイド混合戦略により、AF03 を用いて補強した。つまり、50 μ l を各後肢へ注射する直前に、適切なポリペプチド溶液 50 μ l を Sanofi アジュバント AF03（スクアレンをベースとする乳濁液；Klucknerら、J PharmSci. 2012 Dec；101（12）：4490~500 を参照）50 μ l と混合した。免疫化による有害作用は、観察されなかった。第 1 の免疫化の 1 日前および各注射から少なくとも 2 週間後（すなわち、2、5 および 8 週目）に血液を採取した。他に特定しない限り、指示するデータは、第 3 の注射から 2 週間後（8 週目、2 w p 3 としても表す）のものであった。典型的には、免疫前動物（ナイーブとして表す）由来の血清を、第 2 の注射から 2 週間後（post-2 または 2 w p 2）または第 3 の注射から 2 週間後（post-3rd または 2 w p 3）に解析した。

【0105】

HAE 中和アッセイでは、血清を 30 分間 56℃ で熱不活化した。4 倍段階希釈による一連の不活化血清を、PneumaCult（商標）-ALI 10X Supplement（StemCell Technologies 社；05003）および 1% の抗菌／抗真菌剤（hence media 社）を添加した PneumaCult（商標）-ALI 基礎培地（StemCell Technologies 社；05002）により作製した。RSV ウイルスストックを血清希釈物と 1：1 で混合し、1.5 時間 37℃ でインキュベートした。次いで、ウイルス-血清混合物を、完全分化 HAE 細胞を 1 ウェルあたり 50 μ l 含む 24 ウェルプレートに加え、1 時間 37℃、5% CO₂ でインキュベートした。インキュベーション後、接種材料を除去し、ウェルを 2 回、培養液で洗浄して非結合ウイルスを除去し、さらに 20 時間 37℃、5% CO₂ でインキュベートした。mKate（TagFP635）レポーターを発現する RSV を感染させた培養物における感染事象を蛍光顕微鏡上で計数した。

【0106】

mKate レポーターを発現しない RSV による感染（RSV B 株の中和）を検出するために、偽重層上皮を培養液で広範に洗浄して粘液を除去し、次いで、4% のパラホルムアルデヒドにより 30 分間室温で固定し、0.25% の Triton X-100 で 30 分間透過処理し、2% の FBS を添加した DMEM により 1 時間 37℃ でブロッキングした。ブロッキング溶液は、2% の FBS を添加した DMEM により 1：200 で希釈したマウス抗 RSV モノクローナル Ab 混合物（Millipore 社；MAB858-4）1 ウェルあたり 100 μ l と交換し、プレートを 37℃ で 2 時間インキュベートした。次いで、プレートを 0.05% の Tween 20 を添加した PBS により 3 回洗浄した。2% の FBS を添加した DMEM により 1：200 で希釈したヤギ抗マウス IgG（H+L）（Invitrogen 社；A11001）100 μ l を 1 ウェル毎に加え、プレートを一晚 4℃ でインキュベートした。翌朝、プレートを 0.05% の Tween 20 を添加した PBS で 3 回洗浄し、蛍光シグナルを ProLong Gold AntiFade with DAPI（ThermoFisher Scientific 社；P36935）に

より安定化して蛍光顕微鏡上で計数した。中和抗体力価は、60%低下するエンドポイントにおいて判定した。

【0107】

3. RSV G抗原に対する結合抗体応答の*in vivo*での特性決定

抗Gcc結合では、C末端のHISタグを有するGccペプチドの三量体形成二量体を、上記と同様にOctetの先端に使用した。His₆タグ化Gcc (A2株) 六量体 (配列番号7) またはHis₆タグ化Gcc (B1株) 六量体 (配列番号8) を、抗ペンタHIS (HIS1K) センサーの先端 (ForTEBio #18-5122) に400秒間、事前にロードし、捕捉してほぼ飽和に到達させた。次いで、バイオセンサーの先端を90秒間Octet洗浄緩衝液中で平衡化した後、希釈した血清を300秒間、会合させた。会合曲線の最終応答を、Octet Data Analysis HT10.0ソフトウェアを使用して測定し、応答に希釈係数 (100または300) を掛けて最終応答の報告を得た。

【0108】

RSV G抗原がGcc結合免疫応答を誘発するかどうかを判定するために、上記のとおり免疫化した血清を、Gcc A2六量体 (配列番号7) またはGcc B1六量体 (配列番号8) に結合するこれらの能力について試験した。高用量 (図4Aおよび図5A) および低用量 (図4Bおよび図5B) におけるGcc結合応答を、第2の免疫化から2週間後および第3の免疫化から2週間後に試験した。A2株 (図4A~B) およびB1株 (図5A~B) の両方では、すべての抗原は、ナイーブマウスの血清と比較して結合応答を誘発した。すべての時点および用量において、B1-A2-fold onは、Gcc四量体またはGcc-NPと比較してGcc A株に対する優れた結合応答を誘発した。各時点において、高用量のA2-α-B1は、高用量のB1-A2-fold onと類似の結合応答を誘発したが、低用量のA2-α-B1は、低用量のB1-A2-fold onと比較してGcc A株の結合応答の低下を誘発した (図4A~B)。

【0109】

すべての時点における高用量のB1-A2-fold on、A1B2A1B2四量体およびA2-α-B1は、高用量のGcc-NPと比較してGcc B株に対する優れた結合応答を誘発した (図5A)。各時点において、低用量のA2-α-B1およびB1-A2-fold onは、低用量のGcc-NPおよびA1B2A1B2四量体よりも優れたGcc B1結合を誘発した (図5B)。

【0110】

4. ヒト細胞における応答

ヒト細胞における応答を誘発するPre-F-NP抗原およびGcc-NP抗原の能力を実証するために、MIMICプラットフォームによる実験を実施した。MIMICプラットフォームは、曝露時に抗原特異的先天性および適応性応答を迅速かつ再現可能に生成可能なヒト自己免疫細胞単独からなる。これまでの研究では、HBV、破傷風トキソイド、モノクローナル抗体、YF-VAXおよびB型インフルエンザ細胞応答のような多種多様な標的に対する*in vivo*での免疫プロファイルを再現するMIMIC系の能力を実証している。ヒトB細胞において、Gcc-NPがGccペプチド単独よりも優れたG抗体応答を誘発することを実証するために、ヒト細胞をGccペプチド単独またはナノ粒子にコンジュゲートしたGccペプチド (Gcc-NP) で処理した。Gcc-NPは、優れたG結合抗体応答を誘発した。したがって、Gccエピトープを含む粒子が、ヒト免疫化において免疫応答を誘発することが予想される。

【0111】

5. Gcc抗原に対する抗体結合の特性決定

配列番号14の配列を有するキメラGcc-fold onポリペプチドへの抗体結合を、二重サンドイッチELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ) を使用して評価した。

【0112】

アッセイでは、RSV G糖タンパク質を捕捉抗体および検出抗体の間に捕捉した。こ

10

20

30

40

50

のELISAでは、検出抗体は、ビオチンで標識し、サンドイッチは、酵素コンジュゲートストレプトアビジンを使用して検出した（図6A）。

【0113】

Gccポリペプチドが適切な立体構造を有するかどうかを調査するために、Gccの立体構造エピトープを認識する021-2G Mab抗体（ヒト化精製抗プロテインGモノクローナル抗体、クローン[021-2G]、供給元RD Biotech社）を使用した。したがって、021-2G Mabの結合は、Gccポリペプチドがミスフォールドまたは分解されていないことを示す。検出抗体は、Lynx rapid plus biotin (type1) antibody conjugation kitビオチン（1型）（Biorad社ref LNK263B、LNK262BまたはLNK261B）またはビオチンEZlink sulfonHNS-LC-Biotin（ThermoScientific社ref 21327）のようなビオチン化キットを使用してビオチン化した精製抗プロテインGモノクローナル抗体（マウスIgG1、カップ）、クローン[131-2G]、供給元：Sigma社、ref：MAB858-2-5であった。

【0114】

結果は、図6Bに示し、配列番号14の配列を有するキメラGcc-foldonポリペプチドが、クローン[021-2G]を含む、Gccの立体構造エピトープを認識する使用した抗プロテインG抗体の両方により認識されたことを示す。この証拠は、キメラGcc-foldonポリペプチドが、天然RSVを認識する抗体を誘発するのに適切な立体構造を有するという結論と一致する。

【0115】

方法

アッセイを実施するために、次の工程を実施した。

【0116】

1 μ g/mlの021-2Gコーティング抗体溶液を1×PBSにより調製した。96ウェルプレートにわたって1ウェルあたり100 μ Lを分配した。プレートシーラーで覆った。

【0117】

密封したプレートを16時間～20時間、+5℃±3℃でインキュベートした。最大3か月間、 $\leq -70^\circ\text{C}$ で保存してもよい。プレートを解凍する場合：排水し、次いで、飽和を直接進めた。

【0118】

プレートを解凍して空にした。プレートにわたって飽和緩衝液（0.05%のポリソルベート20および1%の乳を有する1×PBS）200 μ L/ウェルを分配した。プレートシーラーで覆った。プレートをプレートインキュベータ内に置いた。少なくとも1時間、およそ+37℃でインキュベートした。

【0119】

プレートの3回の洗浄を洗浄緩衝液（0.05%のポリソルベート20を有する1×PBS（Sigma社P1379））により実施した。

【0120】

すべての希釈は、希釈緩衝液（0.05%のポリソルベート20および0.1%の乳を有する1×PBS）を用いて行った。

【0121】

foldonGcc-Hisタグ（非可溶性画分）、供給元：BTL社を参照抗原および内部対照として使用した。参照抗原および内部対照の希釈は、同一アリコートからの独立的な二つ組により行った。参照抗原および内部対照のために調製した希釈物は、ガラス製「溶血」型試験管または4.5mLのプラスチック製NUNCクライオチューブ内に作製した。

【0122】

2倍希釈による一連の参照、内部対照および試料を、96ウェルプレートに各100 μ

10

20

30

40

50

L 容量で調製した。また、希釈緩衝液のみを含むブランクウェル 2 つを調製した。プレートをプレートシーラーで密封した。プレートをプレートインキュベータ内に置いた。およそ 1 時間、およそ + 3 7 °C でインキュベートした。3 回の洗浄を洗浄緩衝液により実施した。

【 0 1 2 3 】

適切な濃度の検出抗体溶液を希釈緩衝液により調製した。プレートにわたって検出抗体溶液 1 0 0 μ L / ウェルを分配した。プレートをプレートシーラーで密封した。プレートをプレートインキュベータ内に置いた。およそ 1 時間、およそ + 3 7 °C でインキュベートした。3 回の洗浄を洗浄緩衝液により実施した。

【 0 1 2 4 】

適切な希釈緩衝液濃度のペルオキシダーゼと共役するウサギポリクローナル抗ヒト I g G 抗体の溶液を調製した。プレートにわたってコンジュゲート溶液 1 0 0 μ L / ウェルを分配した。プレートをプレートシーラーで密封した。プレートをプレートインキュベータ内に置いた。およそ 1 時間、およそ + 3 7 °C でインキュベートした。3 回の洗浄を洗浄緩衝液により実施した。

【 0 1 2 5 】

プレートにわたって T M B (すぐに使用可能な 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジンペルオキシダーゼ基質溶液) 1 0 0 μ L / ウェルを分配した。およそ 1 0 分間、室温の暗所で (例えば、ホイルで包んで) インキュベートした。1 N の H C l 溶液 1 0 0 μ L / ウェルを加えることにより反応を停止させた。プレートをプレートリーダーにより 4 5 0 および 6 2 0 n m で読み取った。2 つの測定値間の差として表される光学濃度 (O D) を測定して、9 6 ウェルプレートのプラスチックの吸収を考慮した。

【 0 1 2 6 】

相対活性の算出は、E u r o p e a n P h a r m a c o p o e i a の式 (5 . 3 . 3 項 : 平行線アッセイ) に関する適用における平行線法により行い、A R D E U : P L A 2 . 0 (平行線アッセイ) または S T E G M A N N 社により販売される等価物によるものを適格とする。L o g / L o g モデルを使用して、用量反応法則モデリングによる相対活性を算出する。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

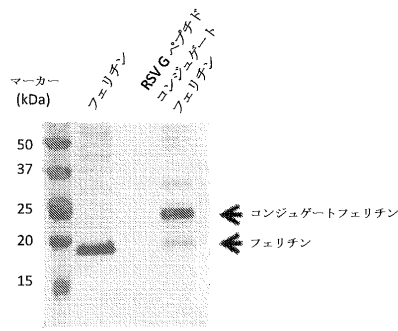


Figure 1A

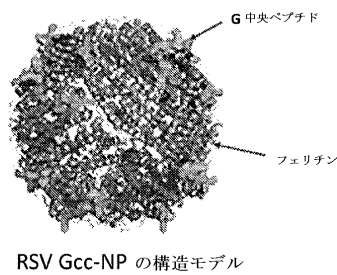


Figure 1B

【図 2】

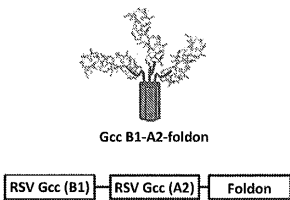


Figure 2A



Figure 2B

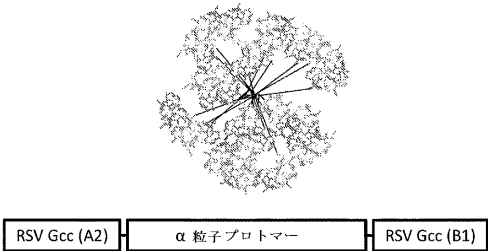


Figure 2C

【図 3 - 1】

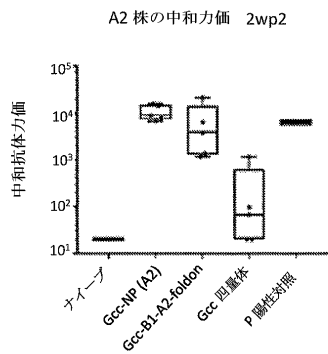


Figure 3A

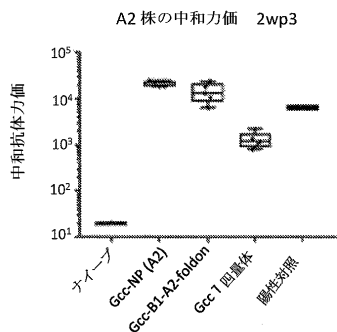


Figure 3B

【図 3 - 2】

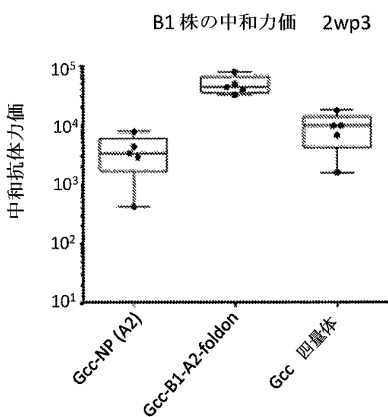


Figure 3C

10

20

30

40

50

【図 4】

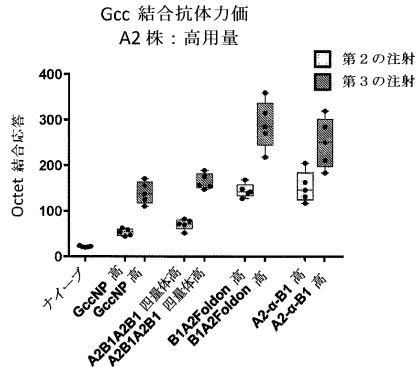


Figure 4A

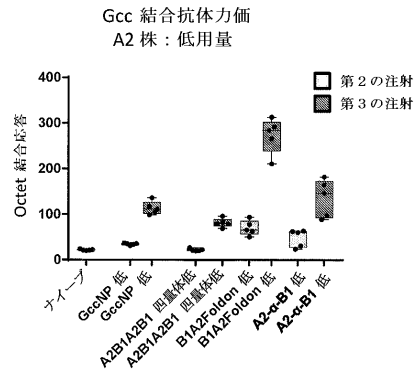


Figure 4B

【図 5】

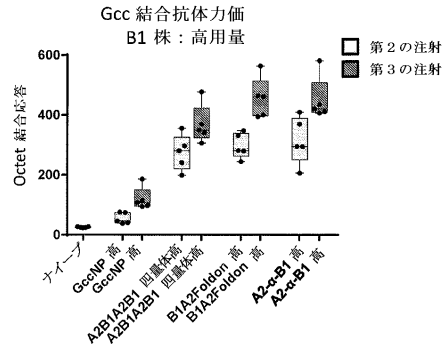


Figure 5A

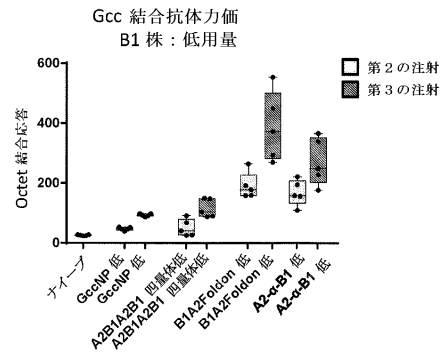


Figure 5B

【図 6】

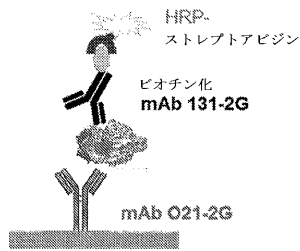


Figure 6A

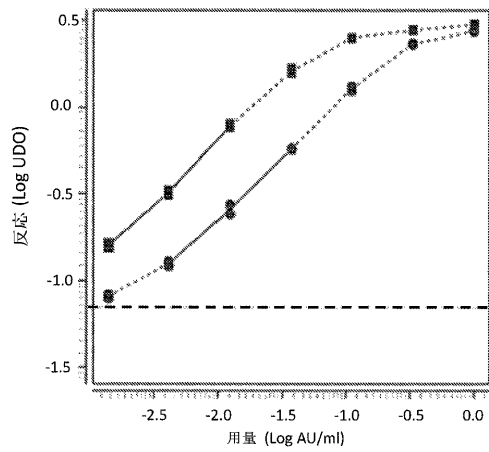


Figure 6B

10

20

30

40

50

【配列表】
0007657727000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 31/14

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード 5 5 エー
5 0 5 エー . コーポレートドライブ 5 5

(72)発明者 ゲイリー・ジェイ・ネーベル

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード 5 5 エー
5 0 5 エー . コーポレートドライブ 5 5

審査官 山内 達人

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 9 / 0 3 2 4 8 0 (WO, A 1)

特表 2 0 0 0 - 5 1 2 1 3 6 (JP, A)

Immunology Letters, 2016年, 179, pp.95-101

PLoS ONE, 2017年, 12(4):e0175384, pp.1-19

Vaccine, 2010年, 28, pp.6242-6246

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq