

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6643239号
(P6643239)

(45) 発行日 令和2年2月12日(2020.2.12)

(24) 登録日 令和2年1月8日(2020.1.8)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 39/215 (2006.01)	A 6 1 K 39/215	Z N A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	B
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
C O 7 K 14/165 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
C O 7 K 16/08 (2006.01)	C O 7 K 14/165	

請求項の数 19 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-544012 (P2016-544012)	(73) 特許権者	507301246 ノバボックス、インコーポレイテッド アメリカ合衆国、メリーランド州 208 78、ゲイザースバーグ、ファーストフイ ールド ロード 21
(86) (22) 出願日	平成26年9月19日 (2014.9.19)	(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(65) 公表番号	特表2016-536346 (P2016-536346A)	(74) 代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(43) 公表日	平成28年11月24日 (2016.11.24)	(74) 代理人	100117189 弁理士 江口 昭彦
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/056517	(74) 代理人	100134120 弁理士 内藤 和彦
(87) 国際公開番号	W02015/042373		
(87) 国際公開日	平成27年3月26日 (2015.3.26)		
審査請求日	平成29年8月22日 (2017.8.22)		
(31) 優先権主張番号	61/880,111		
(32) 優先日	平成25年9月19日 (2013.9.19)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫原性の中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) 組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) 抗原を含む MERS-CoV ナノ粒子であって、前記抗原が、三量体の形態の、バキュロウイルスで発現させた完全長スパイクポリペプチドからなり、前記スパイクポリペプチドが前記ナノ粒子中の唯一のポリペプチドである、ナノ粒子；及び

(ii) サポニン系アジュバント；

を含む免疫原性組成物であって、MERS-CoV に対する高親和性中和抗体を誘導することができる、免疫原性組成物。

【請求項2】

ナノ粒子がスパイクポリペプチドの三量体を少なくとも約5個～約30個含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

ナノ粒子がスパイクポリペプチドの三量体を少なくとも約10個～約20個含む、請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

ナノ粒子の濃度が少なくとも約20 μg/mL～約60 μg/mLである、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

ナノ粒子の濃度が少なくとも約30 μg/mL～約50 μg/mLである、請求項4に

記載の組成物。

【請求項 6】

スパイクポリペプチドが配列番号 2 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

スパイクポリペプチドが配列番号 2 からなる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物

。

【請求項 8】

高親和性抗体の製造方法であって、トランスジェニックウシまたはトランスジェニックウマである動物に、中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) 抗原を含む MERS-CoV ナノ粒子と、サポニン系アジュバントを含む免疫原性組成物であって、前記 抗原が、三量体の形態の、バキュロウイルスで発現させた完全長スパイクポリペプチドを含み、前記スパイクポリペプチドが前記ナノ粒子中の唯一のポリペプチドである、免疫原性組成物を投与する工程、前記動物から血清および/または血漿を採取する工程、ならびに血清および/または血漿から抗体を精製する工程、を含む方法。

10

【請求項 9】

ナノ粒子がスパイクポリペプチドの三量体を少なくとも約 5 個 ~ 約 30 個含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ナノ粒子がスパイクポリペプチドの三量体を少なくとも約 10 個 ~ 約 20 個含む、請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 11】

ナノ粒子の濃度が少なくとも約 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

ナノ粒子の濃度が少なくとも約 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

スパイクポリペプチドが配列番号 2 を含む、請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

スパイクポリペプチドが配列番号 2 からなる、請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載の方法

30

。

【請求項 15】

アジュバントの投与をさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 16】

アジュバントが、Montanide ISA 206、Quil A、アラム、フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントからなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

抗体の KD が 10^{-8} ~ 10^{-15} である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 18】

抗体の KD が 10^{-12} ~ 10^{-14} である、請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 19】

MERS 感染を治療するための医薬の製造における、請求項 8 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法で製造した高親和性抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

[0001] 本出願は、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる

50

、2013年9月19日出願の米国特許仮出願第61/880,111号の利益を主張するものである。

【0002】

電子的に提出されたテキストファイルについての記載

[0002] 本明細書と共に電子的に提出されたテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ読取可能フォーマットのコピー（ファイル名：NOVV-056/01WO_SeqList.txt、記録日：2014年9月18日、ファイルサイズ、17,384メガバイト）。

【背景技術】

【0003】

[0003] コロナウイルスは、ヒトなどの動物で疾患を引き起こす可能性がある。そのような疾患の1つの例は、SARS（重症急性呼吸器症候群）である。最近、ヒトの致死に関連する新しいコロナウイルスである中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）が出現した。MERS-CoVは、世界保健機関（WHO）により「世界的な健康に対する脅威（threat to global health）」であると同定され、中東およびヨーロッパの21カ国において報告されている。MERS-CoVは、感染した個体において重症呼吸窮迫および潜在的に腎不全を引き起こす、病原性が高い呼吸器ウイルスである[1, 2]。

【0004】

[0004] コロナウイルスは、それらのビリオンの表面にあるスパイク（S）糖タンパク質と宿主細胞にあるコロナウイルスのコグネイト受容体（例えば、肺細胞および腎臓細胞を含めた種々のヒト細胞に見いだされるジペプチジルペプチダーゼ4（DPP4））との相互作用によって細胞の膜に付着する。S糖タンパク質は、受容体結合性ドメイン（RBD）を含有するN末端S1ドメインとウイルス-細胞融合に関与するS2ドメインとからなる。MERS-CoV RBDは、コアドメインからなり、これはヒトDPP4タンパク質と共結晶化されて、DPP4のブレード4およびブレード5と相互作用することが示されている[11]。SARS-CoVを含めた他のコロナウイルスでは、*in vitro*においてRBDに対する抗体で中和し、ウイルスの成長を阻害することができる[12~14]。SARS-CoVのマウスモデルでは、ワクチンにより誘導され、受動的に移される中和抗体が肺の病理発生および死亡の阻害において有効であることが証明されている[15]。しかし、SARS-CoVに関して*in vitro*におけるヒト免疫細胞での抗体依存性感染増強（ADE）が報告されているが、*in vivo*におけるその臨床的意義は不明である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

[0005] 多くのウイルス性感染因子を予防および治療するために、ヒト回復期血漿および/または免疫グロブリンが有効に使用されている[16]。Public Health Englandおよびthe International Severe Acute Respiratory & Emerging Infection Consortium（ISARIC）により、中和抗体（回復期血漿を含める）を用いた受動免疫療法は優先的な試験が保証されるMERS-CoV治療アプローチであると同定された。しかし、親和性および結合活性が高い抗体を伴う抗病原体ヒト血漿および/または免疫グロブリンを多量に製造するためには、現在、回復期ヒトからの供与を受ける必要があることから、いくつかの文化的な理由、社会基盤や物流上の理由でこれらのヒト由来製品の広範にわたる利用可能性が限定される可能性がある。MERS-CoVを含めた感染因子を予防および治療するための特異的なヒトポリクローナル免疫グロブリンを迅速に製造するための代替的な手段が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

[0006] 本明細書には、中東呼吸器症候群（MERS-CoV）を引き起こすコロナウイルス（CoV）による感染に対する免疫応答をシミュレートするための組成物および方法が開示され

10

20

30

40

50

ている。本開示は、免疫原性であり、MERS-CoV感染に対する防御をもたらす組成物を提供する。有利には、当該組成物はMERS-CoVに対する中和抗体を誘導するものであり、ワクチンとして使用することができる。

【0007】

[0007] 本開示は、MERS-CoVにかかりやすい動物におけるウイルス感染に対する実質的な免疫を誘導する方法であって、MERS-CoVナノ粒子を含むワクチンを有効用量で少なくとも1回投与する工程を含む方法も提供する。一実施形態では、前記方法は、動物に前記ナノ粒子を経口投与、皮内投与、鼻腔内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、または皮下投与する工程を含む。

【0008】

[0008] 複数の態様では、ナノ粒子は、MERS-CoVタンパク質を1種類のみ含有する。特定の態様では、唯一のタンパク質はスパイク(S)タンパク質である。

【0009】

[0009] 一態様では、本開示は、MERS-CoVナノ粒子を含む免疫原性組成物であって、ナノ粒子がスパイクポリペプチドの三量体を少なくとも1つ含む免疫原性組成物を提供する。別の実施形態では、ナノ粒子はスパイクポリペプチドの三量体を少なくとも約5個～約30個含む。別の実施形態では、ナノ粒子はスパイクポリペプチドの三量体を少なくとも約10個～約20個含む。一実施形態では、ナノ粒子の濃度は少なくとも約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。別の実施形態では、ナノ粒子の濃度は少なくとも約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。さらなる実施形態では、スパイクポリペプチドは配列番号2を含む。さらに別の実施形態では、スパイクポリペプチドは配列番号2からなる。

【0010】

[0010] 別の態様では、本開示は、高親和性抗体の製造方法であって、動物に、スパイクポリペプチドの三量体を少なくとも1つ含むMERS-CoVナノ粒子を含む免疫原性組成物を投与する工程、動物から血清および/または血漿を採取する工程、ならびに血清および/または血漿から抗体を精製する工程を含む方法を提供する。一実施形態では、当該方法は、アジュバントの投与をさらに含む。さらなる実施形態では、アジュバントは、Montanide ISA 206、Quil A、アラム(Alum)、フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントからなる群から選択される。一実施形態では、動物はウシまたはウマである。さらなる実施形態では、ウシまたはウマ動物は、トランスジェニック動物である。

【0011】

[0011] 一実施形態では、ナノ粒子を用いて動物を免疫することによって産生される抗体のKDは 10^{-8} ～ 10^{-15} である。さらなる実施形態では、抗体のKDは約 10^{-12} ～ 10^{-14} または約 10^{-13} ～ 10^{-14} である。

【0012】

[0012] さらに別の態様では、本開示は、本方法によって製造される精製された高親和性抗体をヒト対象にさらに投与することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】[0013]コロナウイルス構造を示す図である。

【図2】[0014]本明細書に開示されている方法を実施することによって得られるワクチン粒子を示す図である。

【図3】[0015]それぞれ抗MERS抗体および抗SARS抗体による、本明細書に開示されているMERS-CoVナノ粒子VLPおよびSARS-CoVナノ粒子VLPへの抗体の結合を示す図である。

【図4】[0016]明細書に開示されているMERS-CoVナノ粒子VLPおよびSARS-CoVナノ粒子VLPの電子顕微鏡写真である。

【図5】[0017]本明細書に開示されているMERS-CoVナノ粒子VLPおよびSAR

10

20

30

40

50

S CoV ナノ粒子 VLP についての、異なる期間、異なる用量、かつ、アジュバントを用いた場合と用いない場合の免疫プロトコルを示す図である。

【図 6】[0018]本明細書に開示されている方法を実施することによって得られるワクチン粒子を示す図である。26nm のタンパク質 - タンパク質ミセルの三量体に集合した MER S スパイクタンパク質が示されている。

【図 7】[0019]本明細書に開示されている MER S CoV VLP および S A R S CoV ナノ粒子 VLP でマウスを免疫した後の中和結果を示す図である。Matrix M アジュバントが特に有効である。

【図 8】[0020]コドン最適化 MER S CoV スパイクヌクレオチド配列を示す図である。

10

【図 9】[0021]MER S CoV スパイクアミノ酸配列を示す図である。

【図 10】[0022]図 10A ~ C は、MER S スパイクタンパク質特異的抗体産生および E L I S A 力価を示す図である。図 10A は、ワクチン接種戦略を示す図である (v はワクチン接種数を示し、例えば、v 1 は 1 回目のワクチン接種を示し、v 2 は 2 回目のワクチン接種を示す、など)。図 10B は、E L I S A によって測定される、免疫期間にわたる個々の T c 動物由来の血清試料における組換え MER S - C o V スパイクタンパク質に対する抗体価を示すグラフである。力価値 (単位 / m l) は、O D 4 5 0 読み取りがブランクよりも 2 . 5 倍高くなる血清試料の最高希釈度と定義される。図 10C は、S A B - 3 0 0 および S A B - 3 0 1 の組換え M R S - C o V スパイクタンパク質に対する抗体価を示すグラフである。力価活性値 (単位 / m g) は、O D 4 5 0 読み取りがブランクよりも 2 . 5 倍高くなる抗体 1 m g の最高希釈度と定義される。

20

【図 11A】[0023]蛍光低下中和アッセイの結果を示すグラフである。ワクチン接種したウシ血清を F R N T ₅₀ アッセイによって中和について試験した。検出される MER S - C o V を 5 0 % 阻害するために必要な血清の質量 (μ g) を各試料についてグラフにした。MER S - C o V を血清の希釈物で前処理した後に感染を定量化した。感染後、細胞を固定し、抗スパイク抗体で標識して、モック血清と比較して細胞の 5 0 % のみが感染するレベルを定量化した。

【図 11B】蛍光低下中和アッセイの結果を示すグラフである。S A B - 3 0 0 および S A B - 3 0 1 について、ペロ細胞における MER S - C o V の感染を阻害するそれらの能力についてアッセイした F R N T ₅₀ アッセイ結果を示すグラフである。これらの F R N T ₅₀ アッセイでは抗原アフィニティ精製したウサギ抗スパイク抗体を陽性対照として使用した。統計：ガウス分布を仮定したウエルチ補正を伴う対応のない T 検定。有意差は認められなかった。バーは 9 5 % C I である。

30

【図 12】[0024]図 12A ~ B は、MER S - C o V 中和アッセイを示すグラフである。図 12A は、S A B - 3 0 0 および S A B - 3 0 1 を、MER S - C o V を中和するそれらの能力について T C I D ₅₀ アッセイによって試験し、陰性対照の精製 h I g G と比較したウイルス力価のパーセントとしてグラフにしたものである。百分率が高いほど感染の阻害が低いことを意味する。図 12B は、MER S - C o V に対する S A B - 3 0 0 および S A B - 3 0 1 の抗体依存性感染増強を示すグラフである。感染後 4 8 時間の時点で S A B - 3 0 0 および S A B - 3 0 1 と一緒にプレインキュベートした MER S - C o V 由来の R N A を MER S - C o V 特異的転写物の量についてアッセイし、モック試料と比較した倍率変化としてグラフにした。n . s . は有意でないことを意味する。

40

【図 13】[0025]図 13A ~ B は、i n v i v o における MER S - C o V 複製の阻害を示すグラフである。MER S - C o V 感染の 1 2 時間前に S A B - 3 0 0 (図 13A) または S A B - 3 0 1 (図 13B) を、A d 5 - h D P P 4 を形質導入した B A L B / c マウス (6 週齢、雌) の腹腔内に移した。次いで、マウスに 1×10^5 P F U の MER S - C o V を鼻腔内に感染させた。示されている時点で肺におけるウイルス力価を測定した。力価は、組織 1 g 当たりの P F U として表されている。n = マウス 3 匹 / 群 / 時点。無処置群と比較して * P < 0 . 0 5 ; 対照 A b 群と比較して P < 0 . 0 5 。

【図 14】[0026]MER S - C o V S タンパク質とウシ T c 由来ヒト I g G の結合カイ

50

ネティクスを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

[0027] 「a(1つの)」、「an(1つの)」、および「the(その)」などの単数形が本出願全体を通して便宜上使用されているが、文脈または明示的な記載により別段示されていないならば、単数形は複数を包含することが意図されていることが理解されるべきである。さらに、本明細書で言及されているあらゆる学术论文、特許、特許出願、刊行物などはその全体があらゆる目的に関して参照により本明細書に組み込まれることが理解されるべきである。数値範囲は全て、数値範囲内の個々の数値全てを包含するものと理解されるべきであり、個々の数値全てが個別に列挙されているものと解釈されるべきである。10
同じ成分または性質を対象とする全ての範囲の終点が含まれ、それぞれ独立に組合せ可能であるものとする。

【0015】

[0028] 「約」とは、参照値と実質的に同じ効果を有するか、または実質的に同じ結果をもたらす全ての値を含む。したがって、「約」という用語により包含される範囲は、この用語が使用される文脈、例えば、参照値と関連するパラメータに応じて変動する。したがって、文脈に応じて、「約」とは、例えば、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、または $\pm 1\%$ 未満を意味し得る。重要なことに、「約」という用語が先行する参照値の列挙は全て、参照値のみの列挙でもあることが意図されている。20

【0016】

[0029] 本明細書で使用される場合、「バキュロウイルス」という用語は、baculoviridaeとしても公知であり、節足動物のエンベロープを有するDNAウイルスの科を指し、そのメンバーは、挿入断片細胞培養物において組換えタンパク質を産生させるための発現ベクターとして使用することができる。ピリオンは、環状高次コイル二本鎖DNAの分子を含有する($M_r 54 \times 10^6 \sim 154 \times 10^6$)1つまたは複数の桿状ヌクレオカプシドを含有する。ベクターとして使用されるウイルスは、一般に、Autographa californica核多角体病ウイルス(NVP)である。導入された遺伝子の発現は、通常はウイルスが感染細胞に埋め込む大きな核封入物の多角体タンパク質成分の発現を調節する強力なプロモーターの制御下に置かれる。30

【0017】

[0030] 本明細書で使用される場合、「由来する」という用語は、起源または供給源を指し、天然に存在する分子、組換え分子、精製されていない分子、または精製された分子を含み得る。30

【0018】

[0031] 本明細書で使用される場合、「高分子タンパク質の構造」という用語は、1つまたは複数のタンパク質の構成または配置を指す。

【0019】

[0032] 本明細書で使用される場合、「ワクチン」という用語は、死滅させたもしくは弱めた病原体の調製物、または病原体に対する抗体もしくは免疫の形成を誘導するために使用される由来する抗原性決定因子の調製物を指す。ワクチンは、疾患、例えば、MERSCoVウイルスによって引き起こされるMERSCoVウイルス、またはSARSCoVウイルスによって引き起こされるSARSに対する免疫をもたらすために供給される。本開示は、免疫原性であり、防御をもたらすワクチン組成物を提供する。さらに、「ワクチン」という用語は、防御免疫、すなわち、感染に付随する疾患の重症度を低下させるための免疫を生じさせるために脊椎動物に投与される免疫原(例えば、ナノ粒子VLP)の懸濁液または溶液も指す。40

【0020】

[0033] 本明細書で使用される場合、「実質的な免疫」という用語は、ナノ粒子を脊椎動物に投与すると、前記脊椎動物において免疫系が誘導され、それにより前記脊椎動物における感染の予防、感染の好転またはウイルス感染に関連する少なくとも1つの症状の軽減50

がもたらされる免疫応答を指す。

【 0 0 2 1 】

[0034] 本明細書で使用される場合、「アジュバント」という用語は、製剤中に特定の免疫原（例えば、ナノ粒子VLP）と組み合わせて使用すると、結果として得られる免疫応答を増強するかまたは他の点で変更もしくは改変する化合物を指す。免疫応答の改変としては、抗体による免疫応答と細胞性免疫応答のいずれかまたは両方の特異性の強化または拡大が挙げられる。免疫応答の改変は、ある特定の抗原に特異的な免疫応答を低下させることまたは抑制することも意味し得る。

【 0 0 2 2 】

[0035] 本明細書で使用される場合、「免疫刺激物質」という用語は、体の独自の化学メッセンジャー（サイトカイン）を介して免疫応答を増強する化合物を指す。これらの分子は、免疫賦活活性、免疫強化活性、および炎症促進活性を有する種々のサイトカイン、リンフォカインおよびケモカイン、例えば、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13）；増殖因子（例えば、顆粒球-マクロファージ（GM）-コロニー刺激因子（CSF））；ならびに、マクロファージ炎症性因子、Flt3リガンド、B7.1；B7.2などの他の免疫賦活分子などを含む。免疫賦活分子は、ナノ粒子VLPと同じ製剤において投与することもでき、別々に投与することもできる。タンパク質またはタンパク質をコードする発現ベクターのいずれかを、免疫賦活効果を生じさせるために投与することができる。

【 0 0 2 3 】

[0036] 本明細書で使用される場合、「有効用量」とは、一般に、免疫を誘導するため、ウイルス感染を予防するおよび/もしくは好転させるため、または感染の少なくとも1つの症状を軽減するために、ならびに/または別の用量のナノ粒子の有効性を増強するために十分なナノ粒子の量を指す。有効用量とは、感染の発症を遅延させるかまたは最小限にするために十分なナノ粒子の量を指し得る。有効用量は、感染の治療または管理において治療的利益をもたらすナノ粒子の量も指し得る。さらに、有効用量は、ウイルス感染の治療または管理において治療的利益をもたらす、ナノ粒子単独に関する量、または他の療法と組み合わせた量である。有効用量は、その後のウイルスへの曝露に対する対象（例えば、ヒト）の固有の免疫応答を増強するために十分な量でもあり得る。免疫のレベルは、例えば、中和性の分泌抗体および/または血清抗体の量を、例えば、ブランク中和、補体結合、酵素結合免疫吸着、またはマイクロ中和アッセイによって測定することによってモニターすることができる。ワクチンの場合では、「有効用量」とは、疾患を予防するかまたは疾患の重症度を低下させるものである。

【 0 0 2 4 】

[0037] 本明細書で使用される場合、「実質的に防御的な抗体応答」という用語は、脊椎動物（例えば、ヒト）によって示される、感染を予防するもしくは好転させるか、または少なくとも1つのその症状を軽減する、ウイルスに対する抗体により媒介される免疫応答を指す。ナノ粒子により、抗体、例えば、ウイルスが細胞に侵入するのを遮断する、前記ウイルスの複製をウイルスに結合することによって遮断する、かつ/または宿主細胞を感染および破壊から保護する中和抗体の産生が刺激され得る。

【 0 0 2 5 】

[0038] 本明細書で使用される場合、「実質的に防御的な細胞性応答」という用語は、脊椎動物（例えば、ヒト）によって示される、感染を予防するもしくは好転させるか、または少なくとも1つのその症状を軽減する、ウイルスに対するT-リンパ球および/または他の白血球により媒介される免疫応答を指す。細胞性免疫の1つの重要な態様には、細胞傷害性T細胞（「CTL」）による抗原特異的応答が伴う。CTLは、主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）によりコードされるタンパク質と会合して提示され、細胞の表面上に発現するペプチド抗原に対する特異性を有する。CTLにより、細胞内微生物の破壊、またはそのような微生物に感染した細胞の溶解の誘導および促進が補助される。細胞性免疫の別の態様には、ヘルパーT細胞による抗原特異的応答が伴う。ヘルパーT細胞は、MHC

10

20

30

40

50

分子と会合したペプチド抗原を表面にディスプレイしている細胞に対する非特異的エフェクター細胞の機能が刺激され、その活性に焦点が合わせられるように作用する。「細胞性免疫応答」とは、CD4+T細胞およびCD8+T細胞から得られた細胞を含めた、活性化されたT細胞および/または他の白血球によって産生されるサイトカイン、ケモカインおよび他のそのような分子の産生も指す。

【0026】

[0039] 本明細書で使用される場合、「集団全体ベースでの実質的な免疫」という用語は、集団内の個体に投与されたナノ粒子による結果としての免疫を指す。前記集団内の前記個体における免疫により、前記個体における感染の予防、好転、またはウイルス感染に関連する少なくとも1つの症状の軽減がもたらされ、前記ウイルスが集団内の他の個体に蔓延するのが予防される。集団という用語は、個体（例えば、学童、高齢者、健康な個体など）の群と定義され、地域（例えば、特定の都市、学校、地区、職場、国、州など）を含み得る。

10

【0027】

[0040] 本明細書で使用される場合、「抗原性製剤」または「抗原性組成物」という用語は、脊椎動物、特に哺乳動物に投与すると免疫応答が誘導される調製物を指す。

【0028】

[0041] 本明細書で使用される場合、「脊椎動物」または「対象」または「患者」という用語は、これだけに限定することなく、ヒトならびにチンパンジーおよび他の類人猿およびサル種などの非ヒト霊長類を含めた他の霊長類を含む、cordata亜門の任意のメンバーを指す。ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマなどの農場動物；例えば、イヌおよびネコなどの飼育哺乳動物；マウス、ラットおよびモルモットなどのげっ歯類を含めた実験動物；ニワトリ、シチメンチョウおよび他のキジ類の鳥類、アヒル、ガチョウなどの家禽、野鳥および鴉鳥を含めた鳥類も非限定的な例である。「哺乳動物」および「動物」という用語がこの定義に含まれる。成体と新生児の個体のどちらも包含されるものとする。

20

【0029】

ナノ粒子VLP

[0042] ワクチン開発の目標のうちの1つは、病原体に対する免疫系を刺激するが、それ自体は感染性ではないワクチン製造することである。このため、ワクチンでの全ビリオンの使用はより遠ざけられ、最小限の組成物への傾向がある。しかし、これらの最小限の組成物にはそれら自体の障害が存在し、具体的には、多くの場合、免疫原性が低下し、免疫応答を後押しするアジュバントおよび系の使用が必要になる。ネイティブなウイルスタンパク質を含むナノ粒子により、細胞に侵入し、免疫応答を刺激するウイルスの天然の能力を利用する免疫の手段がもたらされる。

30

【0030】

[0043] 本明細書に開示されているナノ粒子は、特定の型のウイルス様粒子（VLP）である。ナノ粒子はウイルスタンパク質を含有するが、いかなるウイルス遺伝子材料も含有せず、したがって、それ自体は感染性ではない。ナノ粒子は、組換えにより製造されたウイルスタンパク質の自己集合によって形成され、特に有用な免疫応答を刺激する。理論に束縛されることなく、サイズ、反復構造、および粒子の性質が強力な免疫応答に寄与すると考えられる。特に、アジュバントが存在しなくても強力な免疫応答を得ることができる。

40

【0031】

ナノ粒子構造

[0044] ナノ粒子は、ポリマーの形態に配置されたウイルスカプシドまたはコートタンパク質などのウイルスタンパク質を含有する。一般には、ポリマーは少なくともウイルスタンパク質の三量体である。他の態様では、ポリマーは、ウイルスタンパク質の単量体を3個超含有し得る。例えば、ポリマーは、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の単量体単位を含有し得る（4-mer、5-mer、6-merなどと称される）。特定の態様では、ポリマーは集合して高次構造になり得る。したがって、例えば、ナノ粒子は、少なくとも約3個のポリマー、少なくとも約5個のポリマー、少なくとも約10個

50

のポリマー、少なくとも約15個のポリマー、少なくとも約20個のポリマー、または少なくとも約30個のポリマーを含有し得る。特定の態様では、ナノ粒子は、約5~15個のポリマー、約5~20個のポリマー、または約5~30個のポリマーを含有する。さらに他の態様では、ナノ粒子は、約5~200個のポリマー、約10~200個のポリマーまたは約10~50個のポリマーを含有する。したがって、特定の例では、ナノ粒子は、約5~約20個の三量体を含有し得る。

【0032】

[0045] 一般に、タンパク質の濃度を上昇させることによって、より複雑な高次構造を得ることができる。一実施例では、低濃度のタンパク質により、約5個のポリマーを含むナノ粒子がもたらされ、高濃度のタンパク質(例えば、30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)により、約10~20個のポリマーを含むナノ粒子がもたらされる。1つの非限定的な例では、ナノ粒子の濃度は少なくとも約10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。具体的には、ナノ粒子の濃度は約10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~約1 mg/mL 、または約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~約500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~約100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~約50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり得る。

【0033】

ナノ粒子タンパク質

[0046] 本明細書に開示されているナノ粒子は、これだけに限定されないが、スパイク(S)タンパク質、膜(M)タンパク質、ヌクレオカプシド(N)タンパク質、およびエンベロープ(E)タンパク質、またはこれらの組合せを含めた任意のMER S - C o Vタンパク質を含み得る。タンパク質は、任意のMER S - C o V株、クレード、または種から得ることができるか、またはそれに由来してよい。ナノ粒子は、1つまたは複数のMER S - C o V分離株、株、クレード、および/または種に由来する1つまたは複数のタンパク質を含み得る。一実施形態では、タンパク質はMER S - C o VのJ o r d a n - N 3 / 2 0 1 2株(GenBank KC776174.1)から得られるかまたはそれに由来する。別の実施形態では、タンパク質はMER S - C o VのM u n i c h _ 2 0 1 3株から得られるかまたはそれに由来する。別の実施形態では、タンパク質はMER S - C o VのA l - H a s a _ 1 _ 2 0 1 3株から得られるかまたはそれに由来する。ナノ粒子を構成するタンパク質はまた、これだけに限定されないが、H a f r - A l - b a t i n _ 1 _ 2 0 1 3株、B i s h a _ 1 _ 2 0 1 2株、Q a t a r _ 3 _ 2 0 1 3株、C a m e l _ E g y p t _ 2 0 1 3株、MER S - C o VクレードAウイルス、MER S - C o VクレードBウイルス、密接に関連するHKU4およびHKU5 b a tコロナウイルス株、および/または他の密接に関連するコロナウイルスを含めた種々の他の供給源に由来してよいかまたはそれから得ることができる。MER S - C o Vタンパク質は、i n v i t r oにおいて合成的にまたは組換えによって製造することもできる。一実施形態では、タンパク質は、S f 9細胞などの昆虫細胞において組換えによって製造する。

【0034】

[0047] 一実施形態では、ポリマーは、1つまたは複数の異なる型のMER S - C o Vタンパク質を含み得る。さらなる実施形態では、ポリマーは、単一の型のMER S - C o Vタンパク質を含む。好ましい実施形態では、ポリマーは、スパイクタンパク質のみを含む。別の実施形態では、ポリマー内のタンパク質はスパイクタンパク質からなる。さらなる実施形態では、ナノ粒子は、膜タンパク質またはヌクレオカプシドタンパク質を含有しない。さらに別の実施形態では、ナノ粒子は、いかなるウイルス核酸配列も含まない。

【0035】

[0048] 一実施形態では、ナノ粒子は、スパイクタンパク質またはその断片を含む。さらに別の実施形態では、ナノ粒子は、スパイクタンパク質の三量体、またはその断片を含む。別の実施形態では、ナノ粒子は、配列番号1によりコードされるスパイクタンパク質のポリマーを少なくとも1つ含む。別の実施形態では、ナノ粒子は、配列番号2を含むスパ

10

20

30

40

50

イクタンパク質のポリマーを少なくとも1つ含む。別の実施形態では、ナノ粒子は、配列番号2からなるスパイクタンパク質のポリマーを少なくとも1つ含む。さらなる実施形態では、ナノ粒子は、スパイクタンパク質の受容体結合性ドメイン(RBD)のポリマーを少なくとも1つ含む。

【0036】

[0049] ナノ粒子は、当技術分野に記載のとおり(例えば、全ての目的に関して本明細書に組み込まれる、2010年9月23日に公開されたUS20100239617に記載のとおり)調製することができる。例えばクローニング、変異、細胞培養などの、本開示に適用可能な分子生物学的技法が記載されている一般的なテキストとしては、BergerおよびKimmel、Guide to Molecular Cloning Techniques、Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrookら、Molecular Cloning - A Laboratory Manual (第3版)、1~3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.、2000(「Sambrook」)およびCurrent Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubelら編、Current Protocols、a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc.およびJohn Wiley & Sons, Inc. (「Ausubel」)が挙げられる。これらのテキストには、変異誘発、ベクター、プロモーターの使用ならびにタンパク質のクローニングおよび変異に関連する多くの他の関連性のある主題が記載されている。したがって、本開示は、ナノ粒子上またはナノ粒子中に発現するタンパク質の特性を改善または変更するための、タンパク質工学および組換えDNA技術の公知の方法の使用も包含する。これらとしては、これだけに限定されないが、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、相同組換え(DNAシャッフリング)、ウラシルを含有する鋳型を使用した変異誘発、オリゴヌクレオチド指向性変異誘発、ホスホロチオエート修飾DNA変異誘発、ギャップ挿入2重鎖DNAを使用した変異誘発などが挙げられる。追加的な適切な方法としては、点ミスマッチ修復、修復欠損宿主株を使用した変異誘発、制限選択および制限精製、欠失変異誘発、全遺伝子合成による変異誘発、二本鎖破壊修復などが挙げられる。例えばキメラ構築を伴う変異誘発も本開示に包含される。一実施形態では、変異誘発は、天然に存在する分子または変更されたまたは変異した天然に存在する分子などに関する公知の情報、例えば、配列、配列の比較、物理特性、結晶構造によって手引きされ得る。

【0037】

MERSスパイクタンパク質

[0050] 適切なスパイクタンパク質またはその断片は、MERS-CoV分離株、株、クレード、および/または配列から得られるかまたはそれに由来する。あるいは、これらは、組換えによってまたは合成的に製造することができる。例えば、適切なMERS-CoVアミノ酸配列は、GenBank受託番号AGN70962に開示されている(図9(配列番号2))。一実施形態では、スパイクタンパク質またはその断片は、Al-Hasa MERS-CoV株から得られる。

【0038】

[0051] 本開示は、MERS-CoVタンパク質のバリエントを提供する。バリエントは、構成タンパク質のアミノ酸配列中に変更を含有し得る。「バリエント」という用語は、ポリペプチドに関しては、参照配列に対して1つまたは複数のアミノ酸が変更されたアミノ酸配列を指す。バリエントは、置換アミノ酸が同様の構造的または化学的性質を有する「保存的」変化、例えば、ロイシンのイソロイシンによる置き換えを有し得る。あるいは、バリエントは「非保存的」変化、例えば、グリシンのトリプトファンによる置き換えを有し得る。類似した軽微な変形は、アミノ酸の欠失または挿入、またはその両方も含み得る。どのアミノ酸残基を、生物学的または免疫学的活性を排除することなく置換、挿入、

10

20

30

40

50

または欠失させることができるかの決定の手引きは、当技術分野で周知のコンピュータプログラム、例えば、DNA STARソフトウェアを使用して見いだすことができる。

【0039】

[0052] 天然のバリエーションは、抗原ドリフトに起因して生じ得る。抗原ドリフトは、時間と共に継続的に起こるウイルスタンパク質の小さな変化である。したがって、特定のMERS-CoVウイルス株に感染したヒトでは、そのウイルスに対する抗体が生じ、新しいウイルス株が出現すると、古い株に対する抗体によって新しいウイルスはもはや認識されず、再感染が起こり得る。これらの天然に存在するMERS-CoVタンパク質およびRBDバリエーションは、本明細書に記載のナノ粒子を製造するために使用することができる。

【0040】

[0053] 一部の実施形態では、変異は、サイレント置換、付加または欠失が生じるが、コードされるタンパク質の性質もしくは活性またはタンパク質がどのように作られるかは変化しない変更を含む。ヌクレオチドバリエーションは、種々の理由で、例えば、特定の宿主に対してコドン発現を最適化する（ヒトmRNAのコドンをSf9細胞などの昆虫細胞に好まれるコドンに変化させる）ために製造することができる。あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開第2005/0118191号を参照されたい。特定の態様では、好ましいタンパク質は、図8（配列番号1）に示されているものなどのコドン最適化ヌクレオチド配列によりコードされるものである。核酸およびポリペプチドは、図8および図9に示されている配列（配列番号1および配列番号2）と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。

【0041】

[0054] さらに、正しいコード領域がクローニングされており、いかなる望ましくない変異も含有されていないことを確実にするために、ヌクレオチドの配列決定を行うことができる。ヌクレオチドは、任意の細胞において発現させるために発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）にサブクローニングすることができる。上記は、ウイルスタンパク質をどのようにクローニングすることができるかの例の1つにすぎない。当業者には、追加的な方法が利用可能であり、可能であることが理解される。

【0042】

[0055] 本開示は、ナノ粒子製造の効率を上昇させる構築物および方法も提供する。例えば、タンパク質の発現を増加させるために、タンパク質から切断部位を除去する。他の方法は、輸送をより効率的にするためのリーダー配列の付加を含む。例えば、異種シグナル配列をMERSタンパク質と融合することができる。一実施形態では、シグナル配列は昆虫細胞の遺伝子に由来するものであってよい。別の実施形態では、シグナルペプチドは、バキュロウイルスの発現系において効率的に働くキチナーゼシグナル配列である。他の実施形態では、タンパク質間でリーダー配列を交換することにより、より良好なタンパク質輸送がもたらされ得る。

【0043】

[0056] MERS-CoVタンパク質またはその断片をコードする適切なベクターを使用することができる。ベクターは、例えば、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターであってよい。一実施形態では、ベクターは組換えバキュロウイルスベクターである。遺伝子をコードする構築物および/またはベクターは適切なプロモーターに作動可能に連結しているべきであり、例えば、AcMNPVポリヘドリンプロモーター（または他のバキュロウイルス）、ファージラムダPLプロモーター、E. coli lac、phoAおよびtacプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーターなどが非限定的な例である。他の適切なプロモーターは宿主細胞および/または所望の発現率に応じて当業者に公知である。発現構築物は、転写開始、終結のための部位、および、転写領域内に、翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含有する。構築物によって発現される転写物のコード部分は、最初に翻訳開始コドン、翻訳されるポリペプチドの最後に適切に位置づけ

10

20

30

40

50

られた終結コドンを含むことが好ましい。

【0044】

[0057] 発現ベクターは、少なくとも1つの選択マーカーを含むことが好ましい。そのようなマーカーとしては、真核細胞培養物に関してはジヒドロ葉酸レダクターゼ、G418またはネオマイシン耐性、ならびに*E. coli*および他の細菌における培養に関してはテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。好ましいベクターとしては、バキュロウイルス、ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アビポックスウイルス、カナリアポックスウイルス、鶏痘ウイルス、アライグマ痘ウイルス（*raccoonpox virus*）、豚痘ウイルスなど）、アデノウイルス（例えば、イヌアデノウイルス）、ヘルペスウイルス、およびレトロウイルスなどのウイルスベクターがある。細菌ベクターも使用することができる。例示的な細菌ベクターとしては、pQE70、pQE60およびpQE-9、pBluescriptベクター、Phagescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5が挙げられる。好ましい真核生物のベクターとしては、pFastBac1 pWINEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG、pSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVLがある。他の適切なベクターは当業者には容易に明らかになる。

10

【0045】

[0058] ベクター、例えば、MERS-CoVポリヌクレオチドを含むベクターは、当技術分野で周知の方法に従って宿主細胞にトランスフェクトすることができる。例えば、真核細胞への核酸の導入は、リン酸カルシウム共沈澱、電気穿孔、微量注射、リポフェクション、およびポリアミントランスフェクション試薬を使用するトランスフェクションによるものであってよい。一実施形態では、前記ベクターは組換えバキュロウイルスである。

20

【0046】

[0059] 上に開示されているものなどの組換えベクターを真核細胞および/または原核細胞のトランスフェクト、感染、または形質転換のために使用することができ、真核細胞および/または原核細胞においてタンパク質を発現させることができる。真核生物宿主細胞としては酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、トリ宿主細胞、植物宿主細胞、*C. elegans*（または線形動物）宿主細胞および哺乳動物宿主細胞がある。昆虫細胞の非限定的な例は、*Spodoptera frugiperda* (Sf)細胞、例えば、Sf9、Sf21、*Trichoplusia ni*細胞、例えば、High Five細胞、および*Drosophila S2*細胞である。真菌（酵母を含む）宿主細胞の例は、*S. cerevisiae*、*Kluyveromyces lactis* (K. lactis)、*C. albicans*および*C. glabrata*を含めた*Candida*の種、*Aspergillus nidulans*、*Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*)、*Pichia pastoris*、ならびに*Yarrowia lipolytica*である。哺乳動物細胞の例は、COS細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、マウスL細胞、LNCaP細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト胎児由来腎臓(HEK)細胞、およびアフリカミドリザル細胞、CV1細胞、HeLa細胞、MDCK細胞、VeroおよびHep-2細胞である。*Xenopus laevis*卵母細胞、または両生類起源の他の細胞も使用することができる。原核生物宿主細胞としては、細菌細胞、例えば、*E. coli*、*B. subtilis*、およびマイコバクテリアが挙げられる。

30

40

【0047】

[0060] ナノ粒子を産生するように操作した細胞を成長させる方法としては、これだけに限定されないが、回分細胞培養技法、流加細胞培養技法、連続細胞培養技法および灌流細胞培養技法が挙げられる。細胞培養とは、細胞を繁殖させ、精製および単離するためにタンパク質（例えば、組換えタンパク質）を発現させる、バイオリアクター（発酵チャンバー）における細胞の成長および繁殖を意味する。一般には、細胞培養は、バイオリアクター中、無菌、制御された温度および大気条件下で実施する。バイオリアクターは、細胞を

50

温度、雰囲気、攪拌および/またはpHをモニターすることができるものなどの環境条件下で培養するために使用されるチャンバーである。一実施形態では、前記バイオリアクターはステンレス鋼チャンバーである。別の実施形態では、前記バイオリアクターは、予め滅菌したプラスチックバッグ（例えば、Cell bag（登録商標）、Wave Biotech、Bridgewater、NJ）である。他の実施形態では、前記予め滅菌したプラスチックバッグは約50L~1000Lのバッグである。

【0048】

[0061] 次いで、ナノ粒子を、勾配遠心分離、例えば、塩化セシウム、スクロースおよびイオジキサノール、ならびに、例えばイオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーを含めた標準の精製技法によるものなどの、ナノ粒子の完全性が保存される方法を使用して単離することができる。

10

【0049】

[0062] 以下は、ナノ粒子をどのように作出し、単離し、精製することができるかの例である。通常、ナノ粒子は、ナノ粒子を作るように操作された組換え細胞株により、前記細胞を細胞培養物中で成長させた際に産生される。

【0050】

[0063] 例えば、ナノ粒子の産生は、Sf9細胞（感染させていない）を振とうフラスコに播種し、細胞を増大させ、細胞が成長し、増加するにしたがってスケールアップする（例えば、125mlのフラスコから50LのWave bagに）ことによって開始させることができる。細胞を成長させるために使用する培地を適切な細胞株に対して配合する（無血清培地、例えば、昆虫培地ExCell-420、JRHが好ましい）。次に、前記細胞に組換えバキュロウイルスを効率が最大である感染多重度（例えば、細胞当たり約1~約3プラーク形成単位）で感染させる。感染が起こったら、タンパク質がウイルスゲノムから発現され、ナノ粒子VLPに自己集合し、感染のおよそ24~72時間後に細胞から分泌される。通常、感染は、細胞が成長の中間対数期（1ml当たり細胞 $4 \sim 8 \times 10^6$ 個）にあり、少なくとも約90%生存可能である場合が最も効率的である。

20

【0051】

[0064] あるいは、ナノ粒子は、例えば、宿主細胞（例えば、Sf9）細胞にMERS-CoVタンパク質または目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む組換えバキュロウイルスを感染させることによって産生させることができる。感染細胞をインキュベートし、回収する。界面活性剤を使用してMERS-CoVタンパク質（例えばスパイクタンパク質）を細胞膜から抽出する。次いで、タンパク質を自然に集合させて構造（例えば、三量体）を形成させ、次いで、精製する。精製の間界面活性剤を除去することにより、タンパク質が多重構造を含むナノ粒子などの高次構造（例えば、タンパク質三量体を含むタンパク質-タンパク質ミセル状ナノ粒子（micellar nanoparticle））を形成することが可能になる。一般に、ナノ粒子中の構造の数は、タンパク質の濃度に影響され、タンパク質の濃度が高いほど、構造の数が多い（例えば、三量体）ナノ粒子がもたらされる。

30

【0052】

[0065] 感染のおよそ48~96時間後、細胞培養培地中のナノ粒子VLPのレベルがほぼ最大であるが広範囲にわたる細胞溶解が起こる前にナノ粒子を回収することができる。回収時のSf9細胞の密度および生存能力は、色素排除アッセイによって示されるとおり、1ml当たり細胞約 0.5×10^6 個~1ml当たり細胞約 1.5×10^6 個、少なくとも20%の生存能力であり得る。次に、培地を取り出し、清澄化する。望ましくない凝集を回避するために、NaClを培地に約0.4~約1.0M、好ましくは約0.5Mの濃度まで添加することができる。ナノ粒子を含有する細胞培養培地からの細胞および細胞の壊死組織片の除去は、使い捨ての、予め滅菌した中空繊維0.5 μ mまたは1.00 μ mフィルターカートリッジまたは同様のデバイスを用いたタンジェンシャルフロー濾過（TFF）によって実現することができる。

40

【0053】

50

[0066] 次に、清澄化した培養培地中のナノ粒子を、使い捨ての、予め滅菌した500,000分子量カットオフ中空繊維カートリッジを使用した限外濾過によって濃縮することができる。濃縮したナノ粒子を、10体積、pH7.0~8.0の、0.5MのNaClを含有するリン酸緩衝食塩水(PBS)に対してダイアフィルトレーションして残留培地成分を除去することができる。

【0054】

[0067] 濃縮し、ダイアフィルトレーションしたナノ粒子を、0.5MのNaClを伴うPBS緩衝液、pH7.2中20%~60%不連続スクロース勾配で、約4~約10、6,500xgで18時間遠心分離によってさらに精製することができる。通常、ナノ粒子VLPは、約30%~約40%スクロースまたは界面(20%および60%ステップ勾配において)で、勾配から回収することができる区別可能な可視バンドを形成し、保管することができる。この産物を、精製プロセスの次の工程のために、調製物中200mMのNaClを含むように希釈することができる。この産物は、ナノ粒子VLPを含有し、また、インタクトなバキュロウイルス粒子を含有し得る。

10

【0055】

[0068] ナノ粒子のさらなる精製を陰イオン交換クロマトグラフィー、または44%等密度スクロースクッション遠心分離することによって実現することができる。陰イオン交換クロマトグラフィーでは、スクロース勾配(上記を参照されたい)からの試料を、陰イオンを用いた媒体を含有するカラム(例えば、Matrix Fractogel EMD TMAE)にローディングし、ナノ粒子と他の混入物(例えば、バキュロウイルスおよびDNA/RNA)を分離することができる塩勾配(約0.2M~約1.0MのNaCl)によって溶出させる。スクロースクッション法では、ナノ粒子を含む試料を44%スクロースクッションに添加し、30,000gで約18時間遠心分離する。ナノ粒子は44%スクロースの上部にバンドを形成するが、バキュロウイルスは底部に沈殿し、他の混入タンパク質は上部の0%スクロース層に留まる。ナノ粒子のピークまたはバンドを収集する。

20

【0056】

[0069] 所望であれば、インタクトなバキュロウイルスを不活化することができる。不活化は、化学的方法、例えば、ホルマリンまたはプロピルラクトン(BPL)によって実現することができる。インタクトなバキュロウイルスの除去および/または不活化は、大部分を、上に例示されている当技術分野で公知の選択的沈殿およびクロマトグラフィー法を使用することによって実現することもできる。不活化の方法は、ナノ粒子を含有する試料を0.2%のBPL中、約25~約27で3時間インキュベートすることを含む。バキュロウイルスは、ナノ粒子を含有する試料を0.05%BPL、4で3日間、次いで、37で1時間インキュベートすることによっても不活化することができる。

30

【0057】

[0070] 不活化/除去工程の後、ナノ粒子を含む産物を別のダイアフィルタレーション工程に供して不活化工程に由来するあらゆる試薬および/またはあらゆる残留スクロースを除去すること、およびナノ粒子を所望の緩衝液(例えばPBS)中に入れることができる。ナノ粒子を含む溶液は、当技術分野で公知の方法(例えば、濾過滅菌)によって滅菌し、冷蔵庫または冷凍装置内で保管することができる。

40

【0058】

[0071] 上記の技法は、種々の規模にわたって実施することができる。例えば、T-フラスコ、振とうフラスコ、スピナピンから、工業的なサイズのバイオリクターに至るまで。バイオリクターは、ステンレス鋼の槽または予め滅菌したプラスチックバッグ(例えば、Wave Biotech、Bridgewater、NJによりシステム販売されている)のいずれも含み得る。当業者には、自身の目的のために何が最も望ましいかが分かる。

【0059】

医薬製剤またはワクチン製剤および投与

[0072] 本発明で有用な医薬組成物は、任意の適切な希釈剤または賦形剤を含めた薬学的に許容される担体を含有し、薬学的に許容される担体とは、それ自体は組成物を受ける脊

50

椎動物に有害な免疫応答の発生を誘導しない任意の医薬品を含み、また、過度の毒性を伴わずにナノ粒子と一緒に投与することができるものである。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という用語は、連邦もしくは州政府の規制当局による認可を受けたものであるか、または米国薬局方、欧州薬局方、もしくは他の脊椎動物、より詳細にはヒトにおける使用に関して一般に認識されている薬局方に列挙されているものであることを意味する。

【0060】

[0073] 一般に、ナノ粒子は、MERS-CoVウイルスの1種または複数種の株に対する免疫応答を刺激するために十分な、有効な量または数量（上で定義された）で投与する。これらの組成物は、脊椎動物における防御免疫応答を誘導するためのワクチンおよび/または抗原性組成物として使用することができる。組成物は、異なるポリマー種を有するナノ粒子を含有してよい。例えば、組成物は、主に三量体を含有し、残りは異なるポリマーで構成されていてよい。一実施形態では、MERS-CoVウイルスの1種または複数種の株に対する免疫応答を刺激するために有効量で投与されるナノ粒子は、MERS-CoVタンパク質の三量体を少なくとも約5~100個、少なくとも約10~90個、少なくとも約20~50個、少なくとも約10~30個、または少なくとも約10~20個含む。別の組成物の実施形態では、投与されるナノ粒子は、スパイクタンパク質またはその断片（例えばRBDなど）の三量体を少なくとも約5~100個、少なくとも約10~90個、少なくとも約20~50個、少なくとも約10~30個、または少なくとも約10~20個含む。

10

20

【0061】

[0074] ある非限定的態様において、ナノ粒子の濃度は、少なくとも約10 µg/mL、約20 µg/mL、約30 µg/mL、約40 µg/mL、約50 µg/mL、約60 µg/mL、約100 µg/mL、約200 µg/mLまたは約500 µg/mLである。特定の態様において、ナノ粒子の濃度は約10 µg/mL~約1 mg/mL、または約20 µg/mL~約500 µg/mL、または約30 µg/mL~約100 µg/mL、または約30 µg/mL~約50 µg/mLである。

【0062】

[0075] 他の例では、組成物は、5-mer~6-merなどの高次ナノ粒子を含有してよい。特定の態様では、組成物は、少なくとも70%の5-mer~6-mer、少なくとも80%の5-mer~6-mer、または少なくとも90%の5-mer~6-merを含有する。他の態様では、組成物は、少なくとも70%の5-mer~6-mer、少なくとも80%の5-mer~6-mer、または少なくとも90%の5-mer~6-merを含有する。

30

【0063】

[0076] 一実施形態では、本明細書に開示されている医薬製剤は、MERS-CoVタンパク質、多くの場合にはスパイクタンパク質と、薬学的に許容される担体または賦形剤を含むナノ粒子を含む。

【0064】

[0077] 他の実施形態では、組成物は、異なるMERS株MERS-CoVタンパク質、またはRBDバリエーションなどのバリエーションを含有するナノ粒子を含有してよい。そのような組成物は、多数の異なる株に対する免疫をもたらすために投与することができる。ある態様では、組成物は、第1の株、第2の株、第3の株に対して免疫応答をもたらすためのナノ粒子を含有してよい。別の態様では、ナノ粒子により、4種、5種または6種の株に対して免疫応答をもたらすことができる。別の実施形態では、医薬製剤は、ナノ粒子を投与した動物において産生された高親和性抗体を精製したものを含む。

40

【0065】

[0078] 薬学的に許容される担体としては、これだけに限定されないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、滅菌等張性水性緩衝液、およびこれらの組合せが挙げられる。薬学的に許容される担体、希釈剤、および他の賦形剤の詳細な

50

考察は Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co. N.J. 現行版) に示されている。製剤は投与形式に適するものであるべきである。好ましい実施形態では、製剤は、ヒトへの投与に適するものであり、滅菌されており、非微粒子状であり、かつ/または非発熱性であることが好ましい。

【0066】

[0079] 所望であれば、組成物は、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤も含有してよい。組成物は、再構成に適した凍結乾燥粉末などの固体の形態、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、ピル、カプセル剤、持続放出製剤、または散剤であってよい。経口用製剤は、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準の担体を含んでよい。

10

【0067】

[0080] 本開示は、免疫原性ワクチン製剤の成分のうちの1つまたは複数を詰めた1つまたは複数の容器を含む医薬パックまたは医薬キットも提供する。好ましい実施形態では、キットは、容器を2つ含み、一方はナノ粒子を含有し、他方はアジュバントを含有する。そのような容器には、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売の規制を行う政府当局によって規定された形式の、ヒトへの投与に関する製造、使用または販売の当局による認可を示す通知が付随してよい。

【0068】

[0081] 製剤は、組成物の数量が示されたアンブルまたはサシェなどの密封容器に包装されていてよい。一実施形態では、組成物は液体として供給され、別の実施形態では、密封容器に入った乾燥し滅菌した凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物であり、例えば水または生理食塩水を用いて対象に投与するために適した濃度に再構成することができるものとして供給される。組成物は、好ましくは、約1 μ g、約5 μ g、約10 μ g、約20 μ g、約25 μ g、約30 μ g、約50 μ g、約100 μ g、約125 μ g、約150 μ g、または約200 μ gの単位投薬量で密封容器に入った乾燥し滅菌した凍結乾燥粉末であることが好ましい。あるいは、組成物の単位投薬量は、約1 μ g未満(例えば、約0.08 μ g、約0.04 μ g、約0.2 μ g、約0.4 μ g、約0.8 μ g、約0.5 μ g未満、約0.25 μ g未満、または約0.1 μ g未満)、または約125 μ g超、(例えば、約150 μ g超、約250 μ g超、または約500 μ g超)である。これらの用量は、総ナノ粒子として、またはMERS-CoVタンパク質(例えばスパイクタンパク質、またはその断片)の μ gとして測定することができる。ナノ粒子組成物は、凍結乾燥粉末から再構成してから約12時間以内、好ましくは約6時間以内、約5時間以内、約3時間以内、または約1時間以内に投与されるべきである。

20

30

【0069】

[0082] 代替の実施形態では、ナノ粒子組成物は、ナノ粒子組成物の数量および濃度が示された密封容器に入った液体の形態で供給される。液体の形態のナノ粒子組成物は、密封容器中、少なくとも約50 μ g/ml、より好ましくは少なくとも約100 μ g/ml、少なくとも約200 μ g/ml、少なくとも500 μ g/ml、または少なくとも1mg/mlで供給されることが好ましい。

【0070】

40

[0083] ナノ粒子は、MERS-CoVに対する免疫応答を引き出すために動物に投与することができる。一実施形態では、動物はMERS-CoVに感染しやすい。一実施形態では、動物はヒトである。ナノ粒子の投与により、少なくとも1種のMERS-CoV株、分離株、クレード、および/または種に対して実質的な免疫が引き出されることが好ましい。一実施形態では、ナノ粒子の投与により、少なくとも2種超のMERS-CoV株、分離株、クレード、および/または種に対して実質的な免疫が引き出される。さらなる実施形態では、ナノ粒子の投与により、別のコロナウイルスに対して実質的な免疫が引き出される。一般には、用量は、例えば、年齢、健康状態、体重、性別、食事、投与時間、および他の臨床的因子に基づいて、この範囲内で調整することができる。

【0071】

50

[0084] したがって、本明細書には、対象に対するウイルス感染または少なくとも1つのその症状に対する実質的な免疫を誘導するワクチンまたは抗原性組成物を製剤化する方法であって、前記製剤に有効用量のナノ粒子を添加することを含む方法が開示されている。

【0072】

[0085] 単回投薬で実質的な免疫が刺激されることが好ましいが、所望の効果を実現するために、追加的な投薬を同じ経路または異なる経路によって行うことができる。新生児および乳児では、例えば、十分な免疫のレベルを引き出すために多数回の投与が必要になる場合がある。感染に対する防御を十分なレベルで維持するために必要に応じて、小児期全体を通して周期的に投与を継続することができる。同様に、例えば、健康管理従事者、デイケア従事者、低年齢の小児の家族、高齢者、および心肺機能が損なわれている個体などの、繰り返し感染または重篤な感染に特にかかりやすい成体では、防御免疫応答を確立し、かつ/または維持するために多数回の免疫が必要になる場合がある。誘導される免疫のレベルは、例えば、中和性の分泌抗体および血清抗体の量を測定することによってモニターすることができ、所望のレベルの防御を引き出し、それを維持するために必要に応じて投薬量を調整することまたはワクチン接種を繰り返すことができる。

10

【0073】

[0086] したがって、一実施形態では、対象におけるウイルス感染または少なくとも1つのその症状に対する実質的な免疫を誘導するための方法は、少なくとも1種のナノ粒子を有効用量で投与する工程を含み、ナノ粒子は、MERS CoVスパイクタンパク質またはその断片を含む三量体を少なくとも1つ含む。他の態様では、ナノ粒子は、MERS CoVスパイクタンパク質またはその断片から本質的になる三量体を少なくとも1つ含む。実際に、スパイクタンパク質は三量体および/またはナノ粒子中の唯一のタンパク質であり得る。

20

【0074】

[0087] ナノ粒子を含む組成物（ワクチンおよび/または抗原性製剤）を投与する方法としては、これだけに限定されないが、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、静脈内および皮下）、硬膜外、および粘膜（例えば、鼻腔内および経口または肺経路または坐剤による）が挙げられる。特定の実施形態では、本開示の組成物は、筋肉内に、静脈内に、皮下に、経皮的に、または皮内に投与される。組成物は、任意の都合のよい経路によって、例えば、注入またはボーラス注射によって、上皮または皮膚粘膜（例えば、口腔粘膜、結腸、結膜、上咽頭、中咽頭、膣、尿道、膀胱および腸粘膜など）の内層を通じた吸収によって投与することができ、また、他の生物活性のある薬剤と一緒に投与することができる。一部の実施形態では、ナノ粒子を含む組成物の投与の鼻腔内または他の粘膜経路により、他の投与経路よりも実質的に高い抗体または他の免疫応答が誘導され得る。別の実施形態では、ナノ粒子を含む組成物の投与の鼻腔内または他の粘膜経路により、ウイルスの他の株に対する交差防御を誘導する抗体または他の免疫応答が誘導され得る。投与は全身性であっても局所的であってもよい。予防的なワクチン製剤は、例えば、針とシリンジ、または無針注射デバイスを使用して皮下注射または筋肉内注射によって全身投与する。あるいは、ワクチン製剤は、鼻腔内に、滴下、大粒子エアロゾル（約10ミクロン超）、または上気道への噴霧のいずれかによって投与する。上記の送達経路のいずれによっても免疫応答がもたらされるが、鼻腔内投与により、ウイルスの侵入部位において粘膜免疫が引き出されるといふ付加利益が付与される。

30

40

【0075】

[0088] さらに別の実施形態では、免疫した部位において免疫応答を引き出すために、ワクチンおよび/または抗原性製剤を粘膜組織が標的となるように投与する。例えば、特定の粘膜を標的とする性質を有するアジュバントを含有する組成物の経口投与を使用することによって腸管関連リンパ組織（GALT）などの粘膜組織を免疫の標的とすることができる。鼻咽頭リンパ組織（NALT）および気管支関連リンパ組織（BALT）などの追加的な粘膜組織も標的とすることができる。

【0076】

50

[0089] ワクチンおよび/または抗原性製剤は、投薬スケジュールどおりに投与すること、例えば、ワクチン組成物を最初に投与し、その後、追加刺激投与を行うこともできる。特定の実施形態では、組成物の2回目の投薬は、最初の投与の2週間～1年後、好ましくは約1カ月後、約2カ月後、約3カ月後、約4カ月後、約5カ月後から約6カ月までのどこかで行う。さらに、2回目の投薬後、最初の投与の約3カ月～約2年後、またはさらに後、好ましくは約4カ月、約5カ月、または約6カ月、または約7カ月～約1年後に3回目の投薬を行うことができる。3回目の投薬は、2回目の投薬後に対象の血清および/または尿または粘膜からの分泌物において特定の免疫グロブリンが検出されないか、または低レベルである場合に、任意選択により行うことができる。好ましい実施形態では、2回目の投薬を最初の投与の約1カ月後に行い、3回目の投薬を最初の投与の約6カ月後に行う。別の実施形態では、2回目の投薬を最初の投与の約6カ月後に行う。

10

【0077】

[0090] 別の実施形態では、ナノ粒子を併用療法の一部として投与することができる。例えば、ナノ粒子を他の免疫原性組成物および/または抗ウイルス薬と一緒に製剤化することができる。

【0078】

[0091] 医薬製剤の投薬量は、当業者が、例えば、まず予防的または治療的な免疫応答を引き出すために有効な用量を、例えば、ウイルス特異的免疫グロブリンの血清力価を測定することによって、または血清試料、または尿試料、または粘膜からの分泌物中の抗体の阻害比を測定することによって同定することにより、容易に決定することができる。前記投薬量は動物試験から決定することができる。

20

【0079】

[0092] さらに、当業者がヒトに対する好ましい有効用量を決定するために、ヒト臨床試験を実施することができる。そのような臨床試験は、日常的なものであり、当技術分野で周知である。使用する正確な用量は投与経路にも左右される。有効用量は、*in vitro*においてまたは動物試験系において得られる用量反応曲線から推定することができる。

【0080】

[0093] 同じく当技術分野で周知のとおり、アジュバントとして公知の免疫応答の非特異的な刺激物質を使用することによって、特定の組成物の免疫原性を増強することができる。アジュバントは、未知の抗原に対する免疫の全般的な増大を促進するために実験的に使用されている(例えば、米国特許第4,877,611号)。アジュバントは何年にもわたって応答を刺激するために免疫プロトコールで使用されており、したがって、アジュバントは当業者には周知である。いくつかのアジュバントは抗原の提示のされ方に影響を及ぼす。例えば、アラムによってタンパク質抗原が沈殿すると免疫応答が増大する。また、抗原の乳化により抗原提示の持続時間が延長される。アジュバントを含めることができる。適切なアジュバントとしては、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Vogelら、「A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (第2版)」に記載されているものが挙げられる。

30

【0081】

[0094] 他の例示的なアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント(死滅させた *Mycobacterium tuberculosis* を含有する免疫応答の非特異的な刺激物質)、不完全フロイントアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。他のアジュバントは、GMCSF、BCG、水酸化アルミニウム、thur-MDPおよびnor-MDPなどのMDP化合物、CGP(MTP-PE)、リピドA、Montanide ISA206、およびモノホスホリルリピドA(MPL)を含む。2%スクアレン/Tween 80エマルジョン中に細菌から抽出された3つの成分、MPL、トレハロースジミコレート(TDM)および細胞壁の骨格(CWS)を含有するRIBIも意図されている。MF-59、Novasomes(登録商標)、MHC抗原も使用することができる。

40

50

【 0 0 8 2 】

[0095] ある実施形態では、アジュバントは、脂質二重層を含まない大きな非結晶中心腔の周囲の水層によって分離された実質的に球状のシェルの形態に配置された約2～10個の二重層を有する少重膜脂質小胞(paucilamellar lipid vesicle)である。少重膜脂質小胞は、非特異的な刺激物質として、抗原の担体として、追加的なアジュバントの担体として、およびこれらの組合せのいくつかのやり方で免疫応答が刺激されるように作用し得る。少重膜脂質小胞は、例えば、ワクチンが、抗原を予め形成された小胞と混合することによって調製されたものであり、したがって、抗原が小胞の細胞外に留まっている場合に、非特異的な免疫賦活物質としての機能を果たす。抗原を小胞の中心腔に封入することにより、小胞は免疫賦活物質として、および抗原の担体としての両方の働きをする。別の実施形態では、小胞は、主に非リン脂質小胞でできている。他の実施形態では、小胞はNovasomesである。Novasomes(登録商標)は約100nm～約500nmの範囲の少重膜非リン脂質小胞である。Novasomes(登録商標)はBrig 72、コレステロール、オレイン酸およびスクアレンを含む。Novasomesは、抗原に対する有効なアジュバントであることが示されている(それらの全体があらゆる目的に関して参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,629,021号、同第6,387,373号、および同第4,911,928号を参照されたい)。

10

【 0 0 8 3 】

[0096] 一態様では、アジュバント効果は、リン酸緩衝生理食塩水中約0.05～約0.1%溶液で使用されるアラムなどの薬剤の使用によって実現される。あるいは、ナノ粒子は、約0.25%溶液として使用される糖(Carbopol(登録商標))の合成ポリマーとの混和物として作出することができる。いくつかのアジュバント、例えば、細菌から得たある特定の有機分子は、抗原にではなく宿主に作用する。例は、ムラミルジペプチド(N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン[MDP])、細菌ペプチドグリカンである。他の実施形態では、ヘモシアニンおよびヘモエリトリンを使用することもできる。ある特定の実施形態ではキーホールリンペット(KLH)由来のヘモシアニンの使用が好ましいが、他の軟体動物および節足動物のヘモシアニンおよびヘモエリトリンも使用することができる。

20

【 0 0 8 4 】

[0097] 種々の多糖アジュバントも使用することができる。例えば、マウスの抗体応答における種々の肺炎球菌多糖アジュバントの使用が記載されている(Yinら、1989)。示されているとおり、最適な応答を生じるか、または他の点で抑制を生じさせない用量を使用すべきである(Yinら、1989)。脱アセチル化キチンを含めたキチンおよびキトサンなどの多糖のポリアミン変種が特に好ましい。別の実施形態では、ムラミルジペプチドの親油性二糖-トリペプチド誘導体がホスファチジルコリンおよびホスファチジルグリセロールから形成される人工的なリポソームにおける使用に関して記載されている。

30

【 0 0 8 5 】

[0098] 他の適切なアジュバントとしては、両親媒性表面活性剤、例えば、サポニンおよびQS21(Cambridge Biotech)などの誘導体が挙げられる。サポニン系アジュバントとしては、マトリックスAおよびマトリックスCを単独で含有するものおよびそれらを組み合わせて含有するものが挙げられる。例示的な適切なサポニン系アジュバントは、あらゆる目的に関して参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第、20120107353号および同第20110081378号に記載されている。

40

【 0 0 8 6 】

[0099] 非イオン性ブロック共重合体界面活性物質(Rabinovichら、1994)も使用することができる。アジュバントの別の有用な群はオリゴヌクレオチドである(Yamamotoら、1988)。ある特定の実施形態で使用することができる他のアジュバントはQuil Aおよびレンチネン(lentinen)である。

【 0 0 8 7 】

[00100] アジュバントの別の群は、米国特許第4,866,034号の不純物を取り除

50

いた無毒化内毒素などの無毒化内毒素である。これらの不純物を取り除いた無毒化内毒素は脊椎動物においてアジュバント応答を生じさせるのに有効である。当然、無毒化内毒素は、マルチアジュバント (multi-adjuvant) 製剤を調製するために他のアジュバントと組み合わせることができる。例えば、米国特許第 4, 435, 386 号に記載のとおり、無毒化内毒素とトレハロースジミコレートの組合せが特に意図されている。無毒化内毒素とトレハロースジミコレートおよび内毒素糖脂質の組合せ (米国特許第 4, 505, 899 号)、同様に、米国特許第 4, 436, 727 号、同第 4, 436, 728 号および同第 4, 505, 900 号に記載のとおり、無毒化内毒素と細胞壁の骨格 (CWS) または CWS およびトレハロースジミコレートとの組合せも意図されている。米国特許第 4, 520, 019 号に記載のとおり、無毒化内毒素を伴わない CWS とトレハロースジミコレートのみの組合せも有用であると考えられている。

10

【0088】

[00101] とりわけアルキルリゾリン脂質 (ALP) ; BCG ; およびビオチン (ビオチン化誘導体を含む) を含め、ワクチンとコンジュゲートすることができる種々のアジュバントは当業者には分かる。使用が特に意図されているある特定のアジュバントはグラム細胞由来のテイコ酸である。これらとしては、リポテイコ酸 (LTA)、リビートルテイコ酸 (RTA) およびグリセロールテイコ酸 (GTA) が挙げられる。それらの合成対応物の活性型も使用することができる (Takadaら、1995)。

【0089】

[00102] 種々のアジュバントを、たとえヒトにおいて一般に使用されていないものであっても、それでも他の脊椎動物において、例えば、抗体を生じさせることまたはその後活性化 T 細胞を得ることが望まれる場合に使用することができる。例えば非照射腫瘍細胞を使用すると起こり得る、アジュバントまたは細胞のいずれかに起因する可能性がある毒性または他の有害作用はそのような状況では重要ではない。

20

【0090】

[00103] 免疫応答を誘導する別の方法は、ナノ粒子を「免疫賦活物質」と一緒に製剤化することによって実現することができる。これらは、免疫系の応答を増大させる体の独自の化学メッセンジャー (サイトカイン) である。免疫賦活物質としては、これだけに限定されないが、免疫賦活性、免疫強化活性、および炎症促進活性を有する種々のサイトカイン、リンフォカインおよびケモカイン、例えば、インターロイキン (例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13) など ; 増殖因子 (例えば、顆粒球 - マクロファージ (GM) - コロニー刺激因子 (CSF)) ; ならびに他の免疫賦活性分子、例えば、マクロファージ炎症性因子、Flt3 リガンド、B7.1 ; B7.2 などが挙げられる。免疫賦活性分子は、ナノ粒子と同じ製剤において投与することもでき、別々に投与することもできる。タンパク質またはタンパク質をコードする発現ベクターのいずれかを、免疫賦活性効果を生じさせるために投与することができる。

30

【0091】

[00104] アラムは、下限値 : 約 0.2 μ g、約 0.4 μ g、約 0.6 μ g、約 0.8 μ g、約 1 μ g、約 2 μ g、約 3 μ g、約 4 μ g、約 5 μ g、約 6 μ g、約 7 μ g、約 9 μ g、約 10 μ g、約 15 μ g、約 20 μ g、約 25 μ g、約 30 μ g、約 35 μ g、40 μ g、約 45 μ g、約 50 μ g、約 60 μ g、約 70 μ g、約 80 μ g、約 90 μ g、約 100 μ g、約 110 μ g、約 120 μ g、約 130 μ g、約 140 μ g、または約 150 μ g の範囲で存在し得る。アラムは、上限値 : 約 10 μ g、約 15 μ g、約 20 μ g、約 25 μ g、約 30 μ g、約 35 μ g、40 μ g、約 45 μ g、約 50 μ g、約 60 μ g、約 70 μ g、約 80 μ g、約 90 μ g、約 100 μ g、約 110 μ g、約 120 μ g、約 130 μ g、約 140 μ g、約 150 μ g または約 200 μ g の範囲で存在し得る。特定の態様において、アラムの範囲は、約 80 μ g ~ 約 120 μ g または約 100 μ g ~ 約 120 μ g である。

40

【0092】

[00105] サポニン系アジュバントは、下限値 : 約 0.2 μ g、約 0.4 μ g、約 0.6

50

μg 、約 $0.8 \mu\text{g}$ 、約 $1 \mu\text{g}$ 、約 $2 \mu\text{g}$ 、約 $3 \mu\text{g}$ 、約 $4 \mu\text{g}$ 、約 $5 \mu\text{g}$ 、約 $6 \mu\text{g}$ 、約 $7 \mu\text{g}$ 、約 $9 \mu\text{g}$ 、約 $10 \mu\text{g}$ 、約 $15 \mu\text{g}$ 、約 $20 \mu\text{g}$ 、約 $25 \mu\text{g}$ または約 $30 \mu\text{g}$ の範囲で存在し得る。サポニン系アジュバントは、上限値：約 $10 \mu\text{g}$ 、約 $15 \mu\text{g}$ 、約 $20 \mu\text{g}$ 、約 $25 \mu\text{g}$ 、約 $30 \mu\text{g}$ 、約 $35 \mu\text{g}$ 、 $40 \mu\text{g}$ 、約 $45 \mu\text{g}$ 、約 $50 \mu\text{g}$ 、約 $60 \mu\text{g}$ 、約 $70 \mu\text{g}$ 、約 $80 \mu\text{g}$ 、約 $90 \mu\text{g}$ 、約 $100 \mu\text{g}$ 、約 $110 \mu\text{g}$ 、約 $120 \mu\text{g}$ 、約 $130 \mu\text{g}$ 、約 $140 \mu\text{g}$ 、約 $150 \mu\text{g}$ または約 $200 \mu\text{g}$ の範囲で存在し得る。特定の態様において、サポニン系アジュバントの範囲は、約 $5 \mu\text{g}$ ~ 約 $20 \mu\text{g}$ または約 $1 \mu\text{g}$ ~ 約 $10 \mu\text{g}$ である。

【0093】

[00106] これらの用量はマウスに特に適しており、ヒトへの使用については典型的なマウスの体重 20g に対してヒト体重約 60Kg に基づいて調整することができる。

10

【0094】

抗MERS CoV免疫応答を刺激する方法

[00107] ナノ粒子は、MERS CoVウイルスに対する免疫または実質的な免疫が付与される免疫応答を刺激するための免疫原性組成物を調製するために有用である。粘膜免疫と細胞性免疫はどちらも感染および疾患に対する免疫に寄与し得る。上気道において局所的に分泌される抗体は自然感染に対する抵抗性の主要な因子である。分泌性免疫グロブリンA (sIgA) は上気道の防御に関与し、血清IgGは下気道の防御に関与する。感染によって誘導される免疫応答により、同じウイルスまたは抗原性が類似したウイルス株への再感染から保護される。本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫後に宿主において産生される抗体は、他者に投与し、それにより、当該対象における受動的な投与をもたらすこともできる。

20

【0095】

[00108] 本開示は、高親和性抗MERS-CoV抗体を産生させる方法を提供する。本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫によって産生される高親和性抗体は、MERS-CoVナノ粒子を含む免疫原性組成物を動物に投与し、動物から血清および/または血漿を採取し、血清および/または血漿から抗体を精製することによって製造される。一実施形態では、動物はヒトである。一実施形態では、動物はウシまたはウマである。別の実施形態では、ウシまたはウマ動物はトランスジェニックである。さらに別の実施形態では、トランスジェニックウシまたはウマ動物はヒト抗体を産生する。一実施形態では、当該方法は、アジュバントまたは免疫刺激化合物の投与をさらに含む。さらなる実施形態では、精製した高親和性抗体をヒト対象に投与する。一実施形態では、ヒト対象はMERS-CoV感染のリスクがある。

30

【0096】

[00109] ナノ粒子は、脊椎動物（例えば、ヒト）に投与されると、前記脊椎動物における実質的な免疫を誘導し得るものである。ナノ粒子に対する免疫応答から生じる実質的な免疫は、前記脊椎動物における感染から保護するもしくは好転させるかまたは少なくともウイルス感染の症状を軽減するものである。いくつかの場合には、前記脊椎動物が感染すると、前記感染は無症候性になる。応答は完全な防御応答でない可能性がある。この場合、前記脊椎動物がMERS CoVウイルスに感染すると、前記脊椎動物では免疫していない脊椎動物と比較して症状が軽減されるかまたは症状の持続時間が短くなる。

40

【0097】

[00110] 一実施形態では、本開示は、対象におけるウイルス感染または少なくとも1つのその症状に対する実質的な免疫を誘導する方法であって、少なくとも1種のナノ粒子を有効用量で投与する工程を含む方法を提供する。別の実施形態では、前記実質的な免疫の誘導により、MERS症状の持続時間が短縮される。別の実施形態では、対象におけるウイルス感染または少なくとも1つのその症状に対する実質的な免疫を誘導するための方法は、少なくとも1種のナノ粒子を有効用量で投与する工程を含む。別の実施形態では、前記対象は哺乳動物である。別の実施形態では、前記哺乳動物はヒトである。さらなる実施形態では、前記ナノ粒子は、アジュバントまたは免疫賦活物質と一緒に製剤化されている

50

。

【0098】

【00111】 複数の実施態様において、組成物中に存在する各抗原の用量は、約0.2 μg、約0.4 μg、約0.6 μg、約0.8 μg、約1 μg、約2 μg、約3 μg、約4 μg、約5 μg、約6 μg、約7 μg、約9 μg、約10 μg、約15 μg、約20 μg、約25 μg、約30 μg、約35 μg、40 μg、約45 μg、約50 μg、約60 μg、約70 μg、約80 μg、約90 μg、約100 μg、約110 μg、約120 μg、約130 μg、約140 μg、または約150 μgであり得る。例えば、量は、MERSSパイクタンパク質含量として測定することができる。例えば、1 μgのナノ粒子は、約1 μgのMERSSパイクタンパク質である。

10

【0099】

ナノ粒子を用いた免疫によって産生される抗体

【00112】 本明細書に開示されているナノ粒子は、宿主における高親和性抗MERSS-CoV抗体の産生を誘導するものである。これらの高親和性抗MERSS-CoV抗体では、従来する方法（例えば、ファージディスプレイ；Zhangら、2014参照）によって産生された抗MERSS-CoV抗体よりも高い親和性が実証される。

【0100】

【00113】 「親和性」という用語は、エピトープと抗体の抗原結合部位の間の相互作用の強度を指す。親和性は、例えば、以下の方程式を使用して決定することができる。

【0101】

【数1】

20

$$K_A = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab][Ag]}$$

【0102】

【00114】 式中、 K_A = 親和定数であり、 $[Ab]$ = 抗体上の占有されていない結合部位のモル濃度であり、 $[Ag]$ = 抗原上の占有されていない結合部位のモル濃度であり、 $[Ab-Ag]$ = 抗体-抗原複合体のモル濃度である。 K_A は、平衡に達した時点で抗体-抗原複合体がどのくらい存在するかを記載するものである。これが起こるまでにかかる時間は、拡散の速度に依存し、あらゆる抗体で同様である。しかし、高親和性抗体は、低親和性抗体よりも短い期間でより多くの量の抗原に結合する。産生される抗体の K_A （親和定数）は、変動し得、約 10^5 mol^{-1} ~ 約 10^{12} mol^{-1} の範囲またはそれ以上である。 K_A は、pH、温度、および緩衝液の組成を含めた因子による影響を受ける可能性がある。

30

【0103】

【00115】 産生される抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、均一であり、また単一のエピトープに対して選択的であるので、その親和性を正確に測定することができる。ポリクローナル抗体は不均一であり、いくつかのエピトープを認識する、親和性が異なる抗体の混合物を含有するので、平均親和性のみを決定することができる。

40

【0104】

【00116】 抗体親和性は、これだけに限定されないが、表面プラズモン共鳴（例えば、Biacore）などのバイオセンサーの使用を含めた、当技術分野において一般に使用される任意の手段を使用して測定することができる。共鳴単位は、可溶性リガンドと固定化した受容体（または可溶性抗体と固定化した抗原）の結合の程度に比例する。異なる既知濃度の受容体（抗体）およびリガンド（タンパク質抗原）を用いて平衡状態で結合の量を決定することにより、平衡定数（ K_A 、 K_D ）、ならびに解離および会合の速度（ k_{off} 、 k_{on} ）を算出

50

することが可能になる。

【0105】

[00117] 例えば、 K_D (平衡解離定数) は、抗体とその抗原との間の k_{off} / k_{on} 比である。 K_D および親和性は逆相関する (inversely related)。 K_D 値が低いほど (抗体濃度が低いほど)、抗体の親和性が高い。大多数の抗体は K_D 値が低マイクロモル (10^{-6}) からナノモル ($10^{-7} \sim 10^{-9}$) までの範囲に入る。高親和性抗体は、一般に、低ナノモル範囲 (10^{-9}) に入ると考えられており、非常に高親和性の抗体はピコモル (10^{-12}) 範囲またはそれよりも低い (例えば、 $10^{-13} \sim 10^{-14}$ の範囲) と考えられている。一実施形態では、本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫によって産生される抗体の K_D は、約 $10^{-6} \sim 10^{-15}$ 、約 $10^{-7} \sim 10^{-15}$ 、約 $10^{-8} \sim 10^{-15}$ 、および約 $10^{-9} \sim 10^{-15}$ 、約 $10^{-10} \sim 10^{-15}$ 、約 $10^{-11} \sim 10^{-15}$ 、約 $10^{-12} \sim 10^{-15}$ 、約 $10^{-13} \sim 10^{-14}$ 、約 $10^{-13} \sim 10^{-15}$ 、および約 $10^{-14} \sim 10^{-15}$ の範囲である。好ましい実施形態では、本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫によって産生される抗体の K_D は、約 $10^{-10} \sim 10^{-14}$ の範囲である。

10

【0106】

[00118] 本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫によって産生される抗体は解離の速度 (K_{off}) が低く、当該抗体が抗原と密接に結合することを示している。一実施形態では、本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫によって産生される抗体の K_{off} は、約 $10^{-3} M^{-1} \sim 10^{-13} M^{-1}$ 、約 $10^{-5} M^{-1} \sim 10^{-13} M^{-1}$ 、約 $10^{-6} M^{-1} \sim 10^{-13} M^{-1}$ 、約 $10^{-7} M^{-1} \sim 10^{-13} M^{-1}$ 、約 $10^{-8} M^{-1} \sim 10^{-13} M^{-1}$ 、約 $10^{-9} M^{-1} \sim 10^{-13} M^{-1}$ 、約 $10^{-10} M^{-1} \sim 10^{-13} M^{-1}$ 、約 $10^{-11} M^{-1} \sim 10^{-13} M^{-1}$ 、または約 $10^{-12} M^{-1} \sim 10^{-13} M^{-1}$ の範囲である。別の実施形態では、本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫によって産生される抗体の K_{off} は、約 $10^{-4} M^{-1} \sim 10^{-10} M^{-1}$ 、約 $10^{-4} M^{-1} \sim 10^{-9} M^{-1}$ 、または約 $10^{-4} M^{-1} \sim 10^{-8} M^{-1}$ の範囲である。

20

【0107】

[00119] 本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫によって産生される抗体は会合の速度 (K_{on}) が高く、当該抗体が抗原と密接に結合することを示している。一実施形態では、本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫によって産生される抗体の K_{on} は、約 $10^3 M \sim 10^8 M$ 、約 $10^4 M \sim 10^7 M$ 、約 $10^4 M \sim 10^6 M$ 、約 $10^4 M \sim 10^5 M$ 、約 $10^5 M \sim 10^7 M$ 、または約 $10^5 M \sim 10^6 M$ の範囲である。

30

【0108】

[00120] 本明細書に開示されているナノ粒子を用いた免疫によって産生される抗体は、MERS-CoV ウイルスを中和するものである。当該抗体は広範な中和抗体であり、1種または複数種の MERS-CoV ウイルス株、クレード、またはコロナウイルスを中和するものであり得るか、または、当該抗体はただ1つの MERS-CoV ウイルス株を中和するものであり得る。抗体の中和能力は、これだけに限定されないが、Fluorescence Reduction Neutralization Test (FRNT₅₀)、免疫した細胞から放出されるピリオンの量を測定する *in vitro* 細胞に基づくアッセイ、および免疫した動物における感染を測定する *in vivo* アッセイを含めた、当該技術分野において一般に使用される任意の手段によって測定することができる。

40

【0109】

[00121] 本開示を、限定するものと解釈されるべきではない以下の実施例によりさらに例示する。本出願全体を通して引用されている全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容、ならびに図面は、その全体があらゆる目的に関して参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

50

【0110】

実施例1

MERS CoVスパイクナノ粒子の製造

[00122] ナノ粒子は、Sf9細胞においてバキュロウイルスでMERS CoVスパイクタンパク質（図8および図9）を過剰発現させることによって産生される。精製後、スパイクタンパク質を含有するナノ粒子VLPは主に三量体の形態で回収された（図4および図6）。

【0111】

実施例2

MERS CoVスパイクナノ粒子を使用した免疫応答の誘導

[00123] 図5に示されているとおり、VLPをマウスに投与した。45日の期間の最後に、マウスから血液を抽出して免疫応答を評価した。図7には、SARS CoVスパイクナノ粒子VLPまたはMERS CoVスパイクナノ粒子VLPのいずれかを投与したマウスについての中和抗体力価が示されている。アジュバントであるMatrix M1を使用することによって最も高い応答が得られた。

【0112】

実施例3

トランス染色体（transchromosomic）ウシにより産生される強力な抗MERS-CoVヒト免疫グロブリンにより、*in vivo*においてMERS-CoVが阻害される

[00124] ワクチン接種後にTcウシから得られた抗MERS CoV hIgG抗体および免疫グロブリンにより、*in vitro*および*in vivo*においてMERS CoVを中和できることを実証するために、3種の実験的なMERS CoVワクチンを3つの別々の群のTcウシに投与して、MERS CoVに対する高力価の中和抗体を誘導した。試験した第1のワクチンは、全死菌(whole killed) Jordan株（クレードA）MERS-CoVビリオン（WKV）ワクチンであり、第2ワクチンはAl-Hasa（クレードB）MERS-CoVスパイクナノ粒子（SN）ワクチンであり、第3のワクチンはAl-Hasa MERS-CoVスパイクタンパク質pDNAワクチンであった。pDNAワクチンは、*in vitro*アッセイにおいて免疫原性が低いことが見いだされ、さらなる評価は行わなかった（データは示していない）。しかし、WKV（SAB-300と称される）を用いてワクチン接種したTcウシおよびSN（SAB-301と称される）を用いてワクチン接種したTcウシ由来の回復期血清および高度に精製したhIgG免疫グロブリンはどちらも、*in vitro*においてウイルスを交差中和することができ、MERS-CoVのヒトラジB細胞への抗体依存性侵入を誘導せず、また、Ad5-hDPP4を形質導入したMERS-CoVのマウスモデルにおけるウイルス感染（Erasmus株）を急速に低下させた。

【0113】

方法および材料

動物試験

トランス染色体（Tc）ウシのクローニングおよび抗体産生

[00125] TcウシをMatsushitaら、PLoS One、2014.9(3): e90383頁、Sanoら、PLoS One、2013.8(10): e78119頁、およびKuroiwaら、Nat Biotechnol、2009.27(2): 173~81頁に記載のとおり製造した。簡単に述べると、この試験において使用するTcウシは、内在性ウシ免疫グロブリン遺伝子の三重ノックアウトについてホモ接合性であり（IGHM^{-/-} IGHML1^{-/-} IGL^{-/-}）、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座全体を含有するヒト第14染色体断片と、ヒト免疫グロブリンカッパー軽鎖遺伝子座全体を含有するヒト第2染色体断片とからなるヒト人工染色体（HAC）を有する。

【0114】

不活化全ビリオンの製造

[00126] ワクチン接種用の全不活化（whole inactivated）MERS-CoVビリオンを

10

20

30

40

50

、Jordan - N3 / 2012株 (GenBank KC776174.1) を感染させたVer o C C L - 81細胞から培地を収集することによって製造した。4 × 10⁸ PFUのMER S - Co Vを、コバルト線源を用いて線量が6 MRadになるまで照射した。材料を不活化について安全性試験した。照射通過材料においてMER S - Co Vに特異的なシグナルは検出されなかった。

【0115】

MER S - Co Vスパイクナノ粒子の製造

[00127] 精製Al - Has a株MER S - Co Vスパイクタンパク質ナノ粒子を、Col emanら、2014に記載のとおり製造した。簡単に述べると、1 ml当たり細胞2 ~ 3 × 10⁶個のSf9細胞に特定の組換えバキュロウイルスを感染させた。感染したSf9細胞を27 ± 2 で継続的に攪拌しながらインキュベートし、68 ~ 72 hpiにおいて4000 × gで15分遠心分離することによって回収した。非イオン性界面活性剤を用いて細胞膜からスパイクタンパク質を抽出し、10,000 × gで30分遠心分離することによって不溶性材料を除去した。陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーの組合せを使用してスパイクタンパク質集合体を精製した。精製中に大多数の界面活性剤を除去し、それにより、スパイクタンパク質三量体に高次タンパク質 - タンパク質ミセル状ナノ粒子を形成させた。精製スパイクナノ粒子を0.2ミクロンで濾過し、-80 で保管した。

10

【0116】

Tcウシへのワクチン接種

[00128] 図10Aに示されているとおり、群1のTcウシ3頭 (#2244 ; #2252および#2254) を、水中油エマルジョンとしてMontanide ISA25アジュバント (Seppic)、加えてサポニン由来免疫刺激薬Quil A (Accurate Chemicals) と一緒に製剤化した全死菌MER S - Co Vウイルス (WKV) を1 ~ 2 × 10⁸ PPF / 用量で用いて免疫した。群2のTcウシ2頭 (#2178および#2183) を、同様に水中油中水エマルジョンとしてMontanide ISA206アジュバント、加えてQuil Aと一緒に製剤化した組換えMER S - Co Vスパイクナノ粒子 (SN) を2 mg / 用量で用いて免疫した。両群のTcウシを3 ~ 4週間の間隔を空けて5回免疫した。

20

【0117】

アデノウイルス / hDPP4マウスにおけるin vivoでのMER S - Co Vによる攻撃試験

[00129] 形質導入されたhDPP4 BALB / cマウスにErasmus株MER S - Co Vを感染させた。簡単に述べると、BALB / cに陰性対照またはウシから採取した試験免疫グロブリン (SAB-300またはSAB-301) 100 μgまたは500 μgを腹腔内注射した。12時間後、マウスに総体積50 μlのMER S - Co V (1 × 10⁵ PFU) を鼻腔内感染させた。ウイルス力価を得るために、肺を取り出してPBS中に入れ、手動ホモジナイザーを使用してホモジナイズした。ペロ81細胞においてウイルスの力価測定を行った。ウイルス力価は、組織1 g当たりのMER S - Co VのPFUとして表される。

30

【0118】

結果および考察

Tc動物において産生される抗原特異的hIgGの評価

[00130] MER S - Co Vスパイクタンパク質に特異的なELISAを実施して、WKVまたはSNを用いた免疫後のTcウシ (図10B) ならびにSAB - 300およびSAB - 301 (図10C) における抗原特異的hIgG応答を評価した。ELISAの結果により、血清ならびにSAB - 300およびSAB - 301のどちらについても、2回目のワクチン接種 (V2) 時に口バスタなMER S - Co Vスパイク特異的hIgG応答が実証され、最後の免疫 (V5) まで高力価が維持された (図10)。このデータにより、MER S - Co Vタンパク質を標的とする高力価のhIgG抗体がWKVまたはSNを用いて免疫したTcウシで生成されたこと、および、どちらの免疫グロブリンの活性も精製後に

40

50

保持されることが示される。

【0119】

*in vitro*における、血清、SAB-300およびSAB-301によるMERS-CoVの中和

蛍光低下中和試験 - 50%低下 (FRNT₅₀)。

[00131] 2種の中和アッセイを実施して、*in vitro*におけるSAB-300およびSAB-301による中和の潜在性を同定した。ワクチン接種したウシ由来の血清、SAB-300、およびSAB-301を、*in vitro*においてMERS-CoVの感染を阻害するそれらの能力について蛍光低下中和試験 (FRNT₅₀) およびウイルス感染中和アッセイを使用してアッセイした。FRNTアッセイでは感染が蛍光を使用して報告され、ウイルス感染中和アッセイでは細胞の生存能力を使用して報告される。

10

【0120】

[00132] ワクチン接種したウシ由来の血清 (図11A)、ならびにSAB-300およびSAB-301 (図11B) に対してFRNT₅₀アッセイを実施した。ウシ#2244 V2で高力価の中和抗体が産生され、ウシ#2178および#2183由来のV2でも同様であった。等量の、陽性対照である抗原アフィニティ精製した抗スパイクウサギ抗体と比較して、TcウシV2血清は有意に中和性が高かった。このデータは、図10Bの抗原特異的ELISAの結果と一致する。次いで、ウシ#2244 V2由来の精製hIgGであるSAB-300、ならびに#2178および#2183のV2由来の精製hIgGであるSAB-301を同じFRNT₅₀アッセイで中和について試験した。データにより、SAB-300およびSAB-301により同様の高レベルの中和抗体力価が生じることが実証される (図11C)。等量の、陽性対照である抗原アフィニティ精製したウサギ抗スパイク抗体と比較して、精製hIgG調製物はどちらもMERS-CoVを中和するのに高度に有効であり、SAB-300とSAB-301がどちらも*in vitro*においてMERS-CoVの感染を阻害できることを実証している。

20

【0121】

[00133] さらに、SAB-300およびSAB-301により、ペロE6細胞で成長させたMERS-CoVの有意な中和が引き起こされたが、非特異的対照の血清には、ペロE6細胞のMERS-CoV感染に対する有意な効果はなかった (図12A)。SAB-300を用いて前処理したMERS-CoVを感染させた細胞から放出される感染性MERS-CoVのレベルはアッセイの検出限界未満であり、(158 TCID₅₀/ml; 図12A)、SAB-300が非常に強力な中和抗体であることを示している。SAB-301を用いて前処理したMERS-CoVを感染させた細胞から放出される感染性MERS-CoVのレベルは1:8000および1:16000以外の全ての希釈度でアッセイの検出限界未満であり (158 TCID₅₀/ml; 図12A)、血清SAB-301は強力な中和抗体であるが、SAB-300ほど阻害性が高くないことを示唆している。

30

【0122】

SAB-300およびSAB-301により、MERS-CoVの抗体増強は引き起こされない

40

[00134] 抗体が結合したMERS-CoVウイルスにより、通常は感染しない細胞へのピリオンの侵入が可能にならないことを実証するために、一般にはMERS-CoVが感染しない不死化ヒトB細胞株であるラジ細胞を試験して、抗MERS抗体の存在により、ウイルスRNAの転写および生ウイルスの放出が可能になり得るかどうかを調べた。ラジ細胞に、SAB-300およびSAB-301と一緒にブレインキュベートしたMERS-CoVを感染させた (図12B)。ウイルスmRNAのRT-PCRおよびTCID₅₀アッセイを感染の48時間後の培地に対して実施して感染を評価した。TCID₅₀アッセイでは、ラジ細胞から放出されたMERS-CoVを検出することはできず、当該細胞にMERS-CoVが感染しなかったことを示している。逆に、このアッセイにより、同様に処理した、一般にMERS-CoVが感染するペロE6細胞では感染の48時間後

50

に高レベルのウイルスが生じたことが見いだされた（データは示していない）。MERS-CoVをSAB-300およびSAB-301と一緒にプレインキュベートした後に感染させたラジ細胞においてMERS-CoV RNAが検出されるかどうかを決定するために、感染細胞からRNAを抽出し、MERS-CoVの新しく転写されたRNAに特異的なプライマー（リーダープライマー）を用いてTaqmanリアルタイムPCRによって分析した（図12B）。MERS-CoVを単独で感染させたラジ細胞、予めワクチン接種した血漿から精製した非特異的な陰性対照hIgGを感染させたラジ細胞、またはSAB-300もしくはSAB-301を用いて前処理したMERS-CoVを感染させた細胞におけるMERS-CoVの新しく転写されたウイルスRNA（リーダープライマーセット）の有意な検出はなかった。これらのデータにより、SAB-300またはSAB-301によるMERS-CoV感染の抗体依存性感染増強は引き起こされないことが実証される。

10

【0123】

*in vivo*におけるMERS-CoV複製の阻害

[00135] MERS-CoVのマウスモデルにおいてSAB-300およびSAB-301の有効性を試験した。マウスは、MERS-CoV非許容的であるが、MERS-CoV受容体であるヒトジペプチジルペプチダーゼ4（hDPP4）を発現するアデノウイルスを用いて形質導入すると許容的になり、ウイルスが複製される（Zhaoら、Proc Natl Acad Sci U S A、2014、111（13）：p. 4970-5）。Tc抗体の抗ウイルス活性を試験するために、BALB/cマウス（6～8週）に、PBS 75 μ l中Ad5-hDPP4を 2.5×10^8 PFUで鼻腔内に用いて形質導入した。形質導入の5日後に、マウスを単回の100 μ gまたは500 μ g用量の対照hIgG、SAB-300またはSAB-301を用いて腹腔内注射によって処置した。12時間後、マウスに総体積50 μ lのMERS-CoV（ 1×10^5 PFU）を鼻腔内感染させた。感染の5日の経過にわたって追加的な抗体注射は行わなかった。感染の1日後、3日後および5日後にマウスを安楽死させ、それらの肺を切開した。ウイルス力価を得るために、手動ホモジナイザーを使用して肺をPBS中でホモジナイズし、遠心分離することによって清澄化し、ペロ細胞で力価測定を行った（図13）。無処置群、および陰性対照ヒトIgGを受けた群の肺において感染の1日後および3日後に肺組織1mg当たり約 1×10^6 PFUの力価が見いだされ、注射5日後には力価が 1×10^5 に低下した。SAB-300を100 μ gまたは500 μ g注射したマウスでは、hIgG対照注射群と比較して、それぞれ約50分の1または500分の1のウイルス力価の低下が感染の1日後に見いだされた（図13A）。感染の3日後までに、100 μ g群についてのウイルス力価の低下は約5000分の1であり、500 μ gを受けたマウスにおける力価は検出レベル未満であった。感染の5日後には、どちらの処置群においてもウイルス力価は検出レベル未満であった（図13A）。SAB-301抗体についても、感染の1日後の肺力価がSAB-300で処置したマウスと比較してわずかに高かった以外は同様のウイルス力価の低下が見いだされた（図13B）。感染の5日前までに、SAB-301で処置したマウス全てでウイルス力価が検出レベル未満であった（図13B）。これらのデータにより、SAB-300とSAB-301がどちらも単回の予防注射でマウスをMERS-CoV感染から保護できることが実証される。

20

30

40

【0124】

実施例4

MERS-CoVスパイクタンパク質（S）ナノ粒子を用いて免疫した動物における抗体のBIACORE解析

[00136] 図10Aおよび実施例3に示されている一連の免疫に従ってMERS-CoV Sナノ粒子ワクチンを用いて免疫したTcウシ2頭（#2178および2183）由来の2種の抗体の結合活性を抗S親和性（Biacore（商標））解析によって試験した。これらの動物の、ワクチン接種3（v3）、ワクチン接種4（v4）、およびワクチン接種5（v5）後の血清中の抗体の結合活性を試験した。簡単に述べると、CM5チップとアミンカップリングしたプロテインA/Gを使用して、ウシTc血清IgGをフローセルに捕捉した

50

。MERSスパイクタンパク質抗原を0 nM、20 nM、および40 nMでフローセルに180秒にわたって注射し、その後600秒にわたって解離させた。1:1フィットモデルを適用した。会合速度および解離速度を時間に応じて測定し、センサーグラムにプロットし、会合速度および解離速度から解離定数を算出した。図14および表1に結果が示されている。

【0125】

【表1】

表1

MERS-CoV S 抗原のウシ由来 Tc ヒト IgG に対する 結合カイネティクス			
血清試料	k_{on} (Ms)	k_{off} (/s)	K_D (M)
2178 v3	6019	5.69×10^{-4}	9.45×10^{-8}
2178 v4	1.44×10^5	1.79×10^{-7}	1.24×10^{-12}
2178 v5	9.80×10^4	1.23×10^{-7}	1.25×10^{-12}
2183 v3	7.97×10^4	3.90×10^{-7}	4.89×10^{-12}
2183 v4	1.07×10^5	1.04×10^{-8}	9.78×10^{-14}
2183 v5	1.10×10^5	1.71×10^{-8}	1.57×10^{-13}

10

20

【0126】

[00137] 表2には、Yingら、J. Virol. (2014)に開示されているファージディスプレイによって産生される抗S1 mAbの親和性が示されている。これらの2つの表中のデータを比較することにより、ファージディスプレイによって産生されたMERS-CoV mAbの報告された K_D および抗体 k_{off} 速度がTcウシにおいて誘導されるポリクローナル抗S応答よりも数桁低いことが実証される。

【0127】

【表2】

表2

mAb の MERS-CoV RBD に対する結合カイネティクス(Yingら(2014))			
mAb	k_{on} (Ms)	k_{off} (/s)	K_D (M)
m336	1.66×10^6	1.65×10^{-4}	9.94×10^{-11}
m337	1.87×10^5	1.54×10^{-4}	8.24×10^{-10}
m338	3.55×10^5	1.98×10^{-4}	5.58×10^{-10}

30

40

【0128】

他の実施形態

[00138] 当業者は、日常的な実験だけを使用して、本明細書に記載の特定の実施形態に対する多くの均等物を理解または確認することができる。そのような均等物は、本明細書において提供される特許請求の範囲に包含されるものとする。

【0129】

参照による組み込み

[00139] 本出願は、本明細書に開示されている全ての刊行物または参考文献の全体をあ

50

らゆる目的に関して参照により組み入れる。

【 0 1 3 0 】

[00140] 本出願は、あらゆる目的に関して以下の全体を参照により組み入れる：2007年6月27日出願の米国特許出願第12/306,965号、2007年12月20日出願の米国特許出願第61/015,440号、2006年10月18日出願の米国特許出願第11/582,540号、2006年10月18日出願の米国特許出願第12/633,995号、2005年10月18日出願の米国特許出願第60/727,513号；2006年3月10日出願の60/780,847；2006年5月15日出願の60/800,006；2006年7月17日出願の60/831,196；2006年7月21日出願の60/832,116、および、2006年9月19日出願の60/845,495、および2003年7月11日出願の10/617,569。

10

参考文献

1. Berglund, P., Fleeton, M. N., Smerdou, C., and Liljestrom, P. (1999). Immunization with recombinant Semliki Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine* 17, 497-507.
2. Cox, J. C., and Coulter, A. R. (1997). Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248-256.
3. Crawford, J., Wilkinson, B., Vosnesensky, A., Smith, G., Garcia, M., Stone, H., and Perdue, M. L. (1999). Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 17, 2265-2274.
4. Crowther R A, Kiselev N A, Bottcher B, Berriman J A, Borisova G P, Ose V, Pumps P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 17, 943-50.
5. Gomez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E., and Portela, A. (1999). Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J. Gen. Virol.* 80, 1635-1645.
6. Johansson, B. E. (1999). Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine. *Vaccine* 17, 2073-2080.
7. Lakey, D. L., Treanor, J. J., Betts, B. F., Smith, G. E., Thompson, J., Sanne Ila, E., Reed, G., Wilkinson, B. E., and Wright, P. E. (1996) Recombinant baculovirus influenza A hemagglutinin vaccines are well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 174, 838-841.
8. Latham, T., and Galarza, J. M. (2001). Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* 75, 6154-6165.
9. Mena, I., Vivo, A., Perez, E., and Portela, A (1996). Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza-like particles obtained from recombinant plasmids. *J. Virol.* 70, 5016-5024.
10. Murphy, B. R., and Webster, R. G. (1996). Orthomyxoviruses. In "Virology" (D. M. K. B. N. Fields, P. M. Howley, Eds.) Vol. 1, pp. 1397-1445. Lippincott-Raven, Philadelphia.
11. Neumann, G., Watanabe, T., and Kawaoka, Y. (2000). Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *J. Virol.* 74, 547-551.
12. Olsen, C. W., McGregor, M. W., Dybdahl-Sissoko, N., Schram, B. R., Nelson, K. M., Lunn, D. P., Macklin, M. D., and Swain, W. F. (1997). Immunogenicity and efficacy of baculovirus-expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice. *Vaccine* 15, 1149-1156.
13. Peiris, J. S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R. G., and Shortt

20

30

40

50

idge, K. F. (2001). Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 in influenza A viruses in pigs in southwestern China: potential for genetic reassortment? *J. Virol.* 75, 9679-9686.

14. Pumpens, P., and Grens, E. (2003). Artificial genes for chimeric virus-like particles. In: "Artificial DNA" (Khudyakov, Y. E, and Fields, H. A., Eds.) pp. 249-327. CRC Press, New York.

15. Pushko, P., Parker, M., Ludwig, G. V., Davis, N. L., Johnston, R. E., and Smith, J. F. (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* 239, 389-401. 10

16. Slepishkin, V. A., Katz, J. M., Black, R. A., Gamble, W. C., Rota, P. A., and Cox, N. J. (1995). Protection of mice against influenza A virus challenged by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine* 13, 1399-1402.

17. Treanor, J. J., Betts, R. F., Smith, G. E., Anderson, E. L., Hackett, C. S., Wilkinson, B. E., Belshe, R. B., and Powers, D. C. (1996). Evaluation of a recombinant hemagglutinin expressed in insect cells as an influenza vaccine in young and elderly adults. *J. Infect. Dis.* 173, 1467-1470.

18. Tsuji, M., et al. (1998). Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. *J. Virol.* 72, 6907-6910. 20

19. Ulmer, J. B., et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749.

20. Ulmer, J. B., et al. (1998). Protective CD4+ and CD8+T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J. Virol.* 72, 5648-5653.

21. Watanabe, T., Watanabe, S., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2002) Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J. Virol.* 76, 767-773.

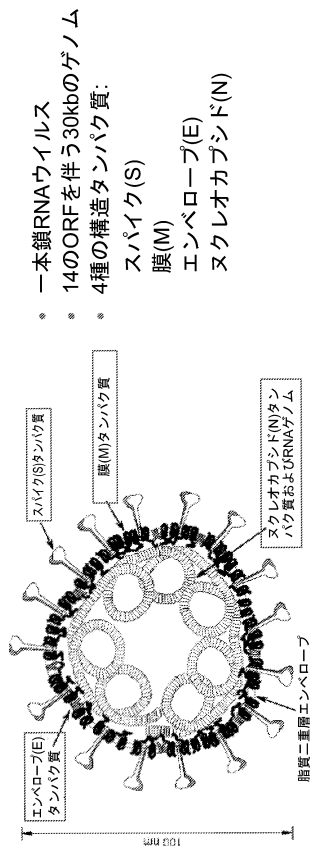
22. Zhou, X., et al. (1995). Generation of cytotoxic and humoral immune responses by non-replicative recombinant Semliki Forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3009-3013. 30

23. Zabel et al. (2014). Viral Particles Drive Rapid Differentiation of Memory B Cells into Secondary Plasma Cells Producing Increased Levels of Antibodies. *J. Immunol.* 192:5499-5508.

24. Zhang et al. (2000). HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine.* 18:1051-8.

【 図 1 】

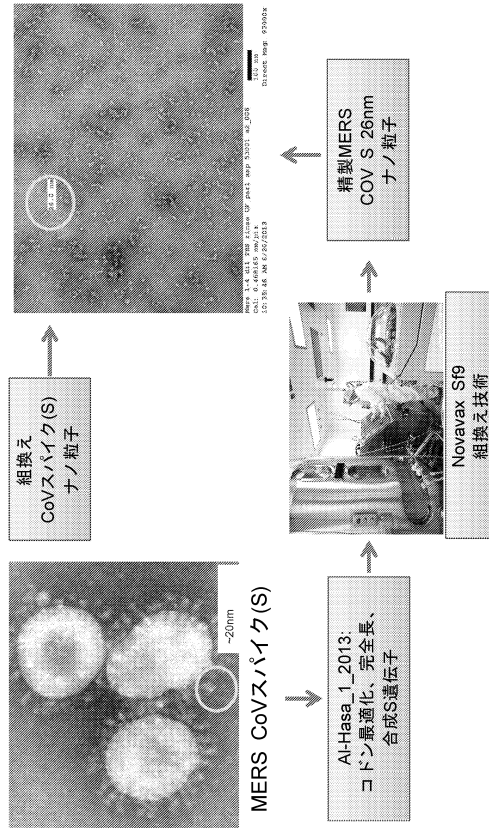
コロナウイルス構造



Masters, Adv. Virus Res 2006

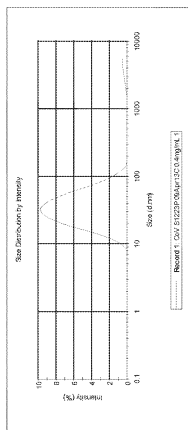
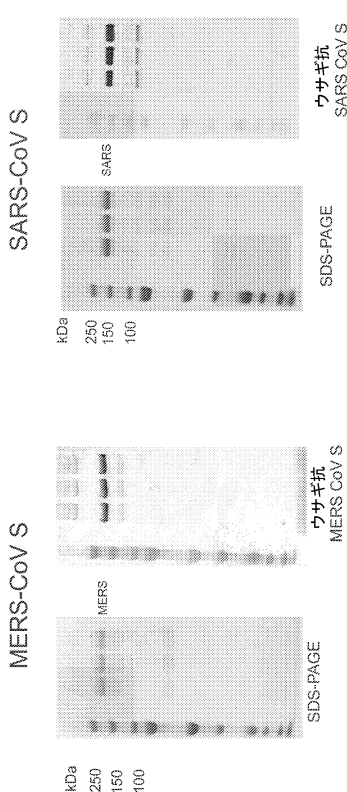
【 図 2 】

MERS CoVナノ粒子ワクチン



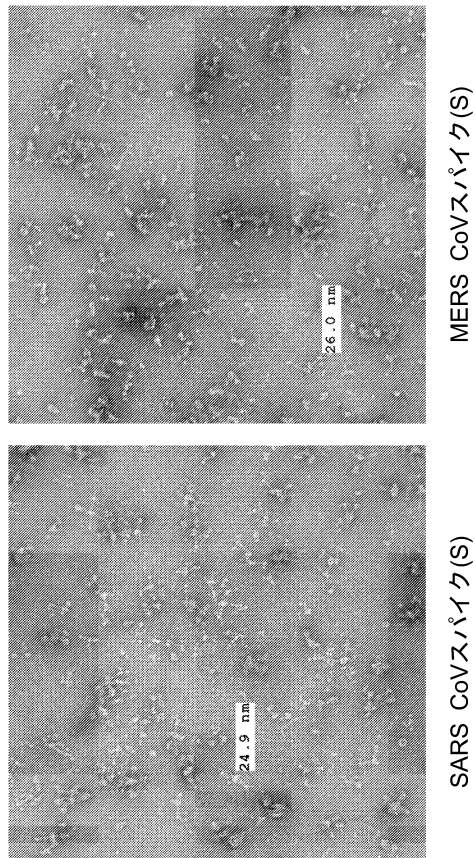
【 図 3 】

精製MERS-CoVナノ粒子ワクチンおよび精製SARS-CoVナノ粒子ワクチン



【 図 4 】

電子顕微鏡:MERS CoV Sナノ粒子およびSARS CoV Sナノ粒子



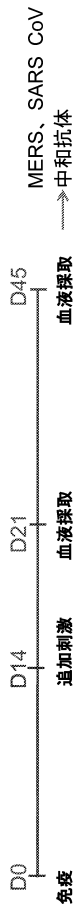
MERS-CoVマウス免疫原性

【図5】

試験デザイン

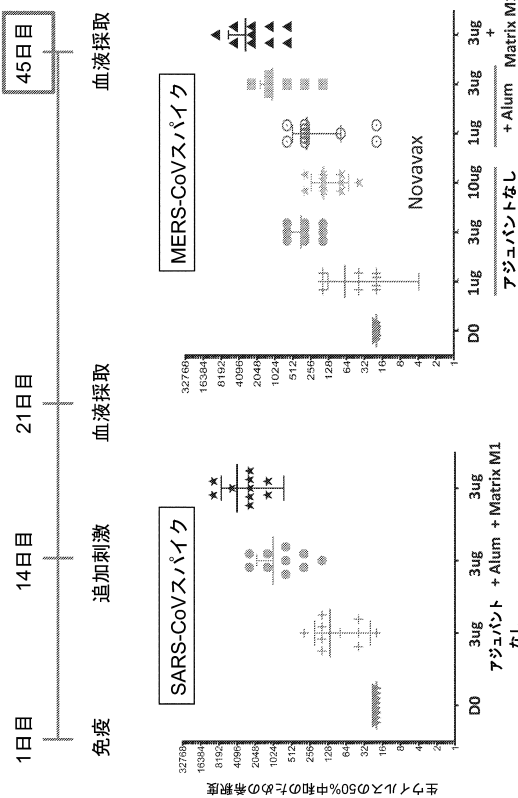
群	精製S抗原	用量 (µg)	アラム アジュバント (120µg)	Matrix M1 アジュバント (5µg)	群当たりの数	免疫 (日数)	血液採取 (日数)
1		10.0	-	-	10	0, 14, 45	0, 21, 45
2		3.0	-	-	10	0, 14, 45	0, 21, 45
3		1.0	-	-	10	0, 14, 45	0, 21, 45
4	MERS-CoV	3.0	*	-	10	0, 14, 45	0, 21, 45
5		1.0	+	-	10	0, 14, 45	0, 21, 45
6		3.0	-	+	10	0, 14, 45	0, 21, 45
7		1.0	-	+	10	0, 14, 45	0, 21, 45
8	SARS-CoV	3.0	-	-	10	0, 14, 45	0, 21, 45
9		3.0	+	-	10	0, 14, 45	0, 21, 45
10		3.0	-	+	10	0, 14, 45	0, 21, 45

タイムライン



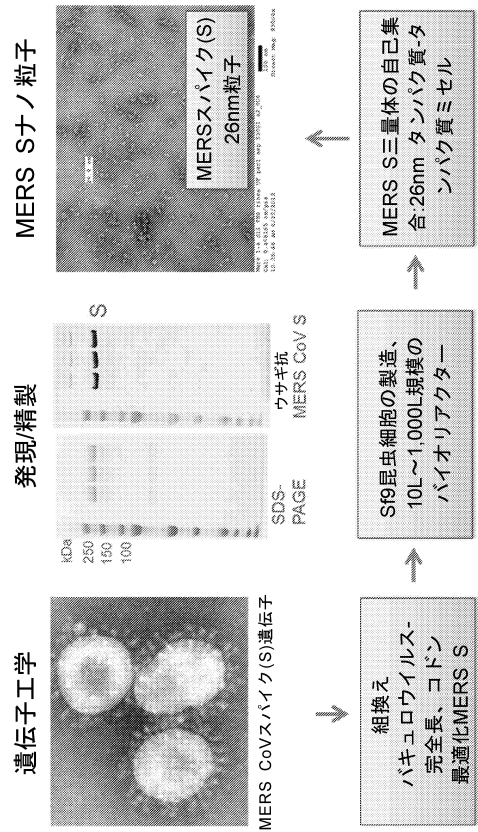
【図7】

ワクチンとして使用するためのMERS-CoVスパイクナノ粒子
マウスへのワクチン接種およびマウス血清に対する生ウイルスマイクロ中和アッセイ



【図6】

MERS-CoV AI-Hasa_1_2013ナノ粒子ワクチン候補



【図8A】

図8A: MERS AI Hasa 1スパイクタンパク質のコード最適化配列 (ヌクレオチド配列)

ATGATCCACTCCGGTCTCTGTTGATGTTCCCTGTTGACTCCTACCGAAAGCTACGTTGAT
 GTTGGTCCAGATTCCGTTGAAGAGCGCCCTGCATCGAGGTGGATATCCAGCAAACTTCTTC
 GACAAGACCTGGCCGAGGCCATCGATGTTCTCCAAAGGCTGACGGTATATCTTACCTCCAG
 GGCAGAACTTACTTAACTCACTATCACAATACCAAGGCTGTTCCATCCAGGGTGGAC
 CACGGCGATATGTAAGTCTACAGCGCTGGACACAGCTACCGGAACCACTTCTCAGAAGCTC
 TTGTTGCCAACTACTACAGGACCTGAAGCAATTCGCTAACGGATTTCGGTCCGTATC
 GGTGCTGCCCTACAGCACCGGTAATGATGATCATCTCCCAAGCACTTCAAGCAAACTC
 CGCAAGATCACTCCCTGCTTTCATGCTGGTTCCTCTGTGGGCAACTTCTCCGATGGAAAG
 ATGGGACGGTCTTCAACCACACTCTCGTCTGCTCCCTGACGGCTGGCAAACTTCTGCT
 AGGGCTTCTACTGATCTTGGAGCTTAGATCTGGCAACCACTGCGCCAGTGGAAACAGC
 TACCTTCATTCGGCCACTTACCACACTCCAGCTACAGACTGAGCGTGTAACTACAAC
 CGTAACGCTTCGTTGAATCCTTCAAGGAATACTTCAACTCGCCAACTGCATTTGATG
 TACCTTACAACATCACTGAGGACGAAATCCTGGAGTGGTTCCGAAATCACACAGACCGCC
 CAAGGTTCACCTCTTCAAGTCACTGCTGAGTGGATTTGACGTTGGCAACATGTTCCAG
 TTGCTACTTCCCGAGTACAGACAAATCAAGTACTACTCCATTCGCGCACTTATC
 CGTAGCTCCAATCAGACCGAAGGCTTGGCCCGCTTCTACTGCTACAGACTCGAGCT
 CTACCTTCTCTTGGATTTCCTCGTTGACGGCTACATCGCTCGCGTTCGATTCGCGGA
 TTCAACGACTTGTCTCAGCTGCATGTTCTGTAAGAACTCTTCAAGCTCGAGTCCGGAGTT
 TACTCGTTCGCTCTTCAGGCGCAAGCCCTCGGTTCCGTTTGTGGAGCAAGCTGAGGTT
 GTGGATGCGCACTTCTCTCTGCTCAGCGTACTTCCCTCCGCTTCAACCTTCAAG
 GCTCTGGTTTTCACCAACTGCAACTTCAACTCACTACTAGTTGCTCTCTTTGTTCCAGCGT
 ACGACTTCCGCTGCAAGATCTCCGCGCCGCTTATCGTACGACTGTACTCTTACG
 CTGATCTCGATTACTTCTCATACCCTGCTCAATGAAGTCTGACTCAGGCTCTCATCG
 GCCGCGCGATCTCCCAATTCACACTACAAGCAGCTTTTCAGCAACCTTCACTTGTGATC
 CTGGCTACTGTGCCACCACTTGCACCACTTCAACCAAGCAGCTTTTCAGCAACCTTCACTT
 AACAGTGTCTCAAGGCTCTTGTGGAGGATGAAACCGAAGTCCCAACTTGGTGAACGCT
 AACCAGTACTCCCTTGGCTCTTATCGTTTCAAGCAGCGCTTGGGAGACGGCGATATC
 TACCGCAAGCAGCTTCTCCCTTGGAGGGAGTGGCTGGTGGTGGCTCAGGATCGACA
 GTCCGATGACCGGAGCAGTGCAAATGGGTTTCGGCATCACTGTGCACTACGTTACTGAT
 ACAAACTCCGTTTCGCCCTAAGCTGGAATTCGCCAAGCACAAAGATCGCTTCTCAGCT
 GGTAACTCGCTGGAGTACTCCCTTCAAGGCGTGTTCGGACGGGTGTCTTCCAAACTGT
 ACTGCGCTCGGTGTTCTCAGCAACGCTTCTGCTTACGAGCTTACCAAGCTTGGTTGGT
 TACTACTCCAGCATGGCACTACTTCTGCTGAGGGCTTGTGTCCGTCGCGGTGCTCC
 GTGATTCAGCAAGGAAACCAAGACTCAAGCCACCTGTTTCGGTAGCGTGGCTTTCGGAG
 CACTTCTCTACTACTTGCACAACTCCAGGCTTACAAGATCGATGCTTCAAGAGGAGA
 CTACTCCACATACGGGACCAATTCAGACACCCAGTGGGATGGCTTCTCGTTTGGTGAACG
 TCACTGTTCTGTTGAAGATGCAAGCTGCCCTCGGCCAGTCCCTGTGTGCTTCTCCGAGC
 ACCCTTCTACTATGACCCCGGCTTCAAGTTCGCTCGGTGCGCGGAGATGAGACTGAGCT
 TCCATGCTTTCAACCCCAATCCAGGTTGAGCAATGAACTCGCTTCTACTTCAAGCTG
 AGCATCCCGCAAACTTCTCATTTGCTGTCACCCAGGACTACATCAAACTCAATCCAG
 ARGTTACCGTTGACTGCAAGCAGTACTGTTGTAAGGCTTCCAAAGTGGCAAGCTGCT
 CTCAGGGAGTACGGCAAAATTCGTTCTTAAGTCAACCAAGGCTTTCAGCGGTGCTCAG
 CGTCAAGCAGATTCGTTGCGCAACTGTTCCGCAAGGCTCAAGTTCAGCAAGCTTCAAGCT
 ATCATCCAGGATTCGTTGGTGTACTTCAACTCACTTCTGTTGCGAAGCTTTCAGCATCTCA
 ACTGGTTCAGGTCGCGAGTCTGCTATCAGGAGTCTCTGTTGCAAGAGTGAACCTCAG
 GCTGACCCCGCTACTGCAAGGATACGAGATTCATGCAAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCT
 AGAGATCTGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 GTGACATGGAAAGCGCTTACCTTCTCCCTGCTGGTTCATCGCTGGCGTGGATGG

【 図 8 B 】

図8B: MERS Al Hasa 1スパイクタンパク質のコードン最適化配列

```

ACTGCTGGTCTCAGCTCATTCGCGCGTATCCCTTCGCCCAAAGCATCTTCTACCGTTT
AACGGTGGCGCATCACTCAGGCAAGTTTTGTCAGAGAACCAGAAGCTGATCGTAAACAAG
TTCACCCRAAGCCTGGGCGCTTCAGAGCCGGATTCACCACTACAACAGAAAGCCTTCGGT
AAGTCCRAAGACCGTGTCAACAACAAGCCGAGGCTCTCTCAAGTTGGCGTCCGAGCGT
TCTAACACCTTCGGCGCCATCTCTGTAGATCGAGATATCATCCAGCGCTCTGAGCGTG
CTCGAGCAGGATGCTCAAAATCGACAGGCTGATCAACGGCAGATGACACACTCTGAAGCGC
TTGCTCGCTCAGCAACTCGTTAGATCAGAAATCGGCTGCTCTCTCGCTCAGCTCGCTAAG
GACAAAGGTGACGAGTGGTGGTGAAGGCCAAGCAAGCGGTTGAGTTTCTGTGGACAGGGC
ACCCACATCGTGTCTTCTGCTGTAACGCTCCCAACGGCTGACTTCTATGACAGCTCGGC
TACTACCTTCAAACACATCGAGGTGGTCTCGGCTACGGCTCTGCGATGCGCTAAC
CGACTAACTGATCGTCCCGTGAACGGCTACTTCAATCAAGAACCAACACACTCGCATC
GTGGAGAAATGGTCTACACCGGCTCGTCTTCTACGCCCTGAGCCAACTCACTCACTG
AACACAAAGTACGCTCGTCCCGACTTACTTACCAGAATCTCGACAAACTTGCCTCCCT
CCATTGCTGGGTAACTCAACCGGATCGACTTCCAGATGAAGTGGACGAGTTCTTCAAG
AACGTGTCACACTCTATCCCTAATCTCGGCTCCCTGACCCAGATCAACACAAACCTCTTG
GATCTCACTTACGAAATGTTTCCCTGACGAAAGTTGAAAGGCCCTGAACGAATCTTAC
ATCGATCTCAAGAGTTGGGAAACTACACTACTACAACAAGTGGCCATGGTACATCTGG
CTCGGATTCATCGCTGGTTTGGTGGCCCTCGCTTTGTGCGCTCTTCTTCACTCTGTGCTGT
ACCGGCTCGGAACTAACTGATGGCAAGCTGAAGTGAACCGCTGCTGTGATCGCTAC
GAGGAAATAGCACTTGGAGCCCAACAAGGTGACAGTCCACTAA

```

【 図 9 】

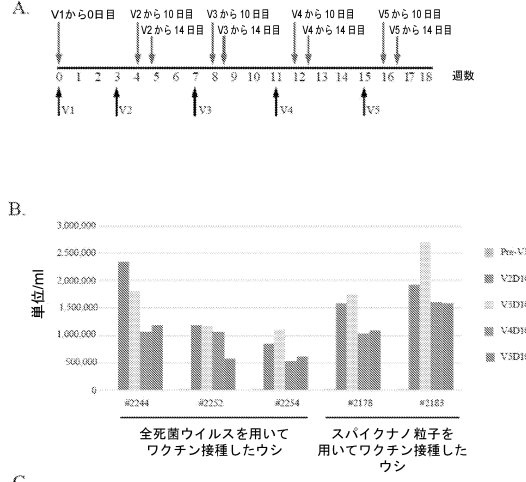
図9: MERS Al Hasa 1スパイクタンパク質のコードン最適化配列(アミノ酸配列)

```

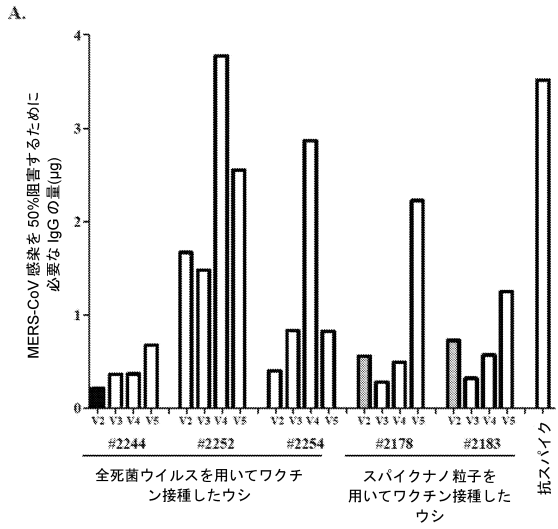
>MERS_AlHasa1
1 mhsvfillmf lltptesyv d vgpdsvk sac ievdiqstff dktwprpidv skadgilypq
61 qety snitit ygplfpypp hgdmyvysag hatgttpekl fvanysgdvk qfangfvri
121 qaanstgtv iispsasat rkiyafmlg asvgnfisdgk mgrffnhtlv lpdgctll
181 rafycilepr sgnhcapgns ytsfatyhtp atdcsgdgnyn rnaslnsfke yfnlrnctfm
241 ytnyitidel lewfgitqta qgvhlfssy vdylygnmfq fatlpvyvdti kyysiiphal
301 rsiqsdtrakw afyvyklqp ltfllfdesvd gyirradog fndlsqhlcs yesfdvesgy
361 ysvsfeakp sgsyvqaeg vecdfsplls gtpgqvynfk rlvftncyn ltkllslfv
421 ndftcsqisp aaiascyss lildfyfpl smksdlsvss agpisdqfnyk qsfanptcli
481 latvpnhltt itkplkyysi nkcsllsdd rtevpglvna nqyspcvsiv pstvwedgyd
541 yrkqispleg ggwlvagst vanteqimq fgitvqygd tnsvcpkief andtkiasql
601 gnceveyslyg vsgrgvfanc tavgrvqrfr vydayqlvg yysddgnnyc lracvsrvps
661 viydketkth atligavaca hiestmsqys rstmslkrz dstyglqtp vgcwlglvns
721 slfvedcklp lggelcalpd tpslttrsv rsvgsmlra siafnhpiev dqlnsyfk
781 siptnfsfgy tgeyigtig kvrvdckqyv cmgfkceql lreyqfcek ingalhgml
841 vqdsvtnlf asvksqssp liipfgdfn ltllepvis tgsraarsai edllfdkvti
901 adpgymgyd demgqppasa rdliacqyva gykvlppimd vnmeaayts lligsiagvw
961 taglesfaai pfagsifyrl ngvfgitqvl senqkliank fnqalgamqt gttitneair
1021 kvqdvannna qaleklaseel sntfgaisas igdiqrdlv legdaqldrl ingrltlna
1081 fvaqqlvrse saalsaqlak dknecvkaq skragfcggy thivsfvna pnglyfmhvg
1141 yypsnhievv sayglcdaan ptnciapvng yfikntnri vdewsytses fyapepitol
1201 atkyvaphvt yqnhistalpp pllgnstgid fgdeldeffk nvstsiptng siltgintll
1261 dtyemlsiq qvkkainesy idikelgnyt yynkwpwyiw lgfiagival aicvffilcc
1321 tggotncmgk lkncrccdry eeydlephkv hvh

```

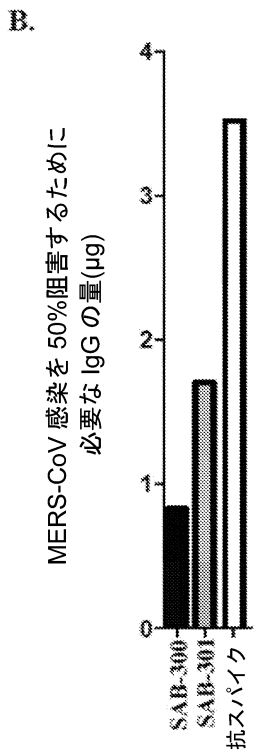
【 図 1 0 】



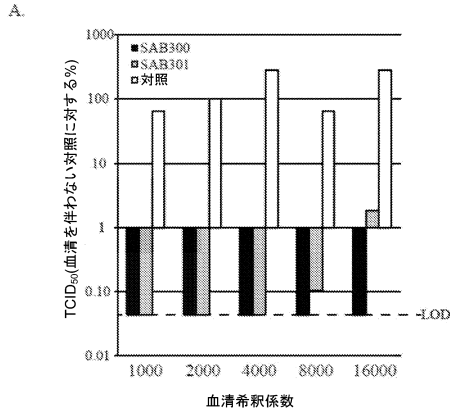
【 図 1 1 A 】



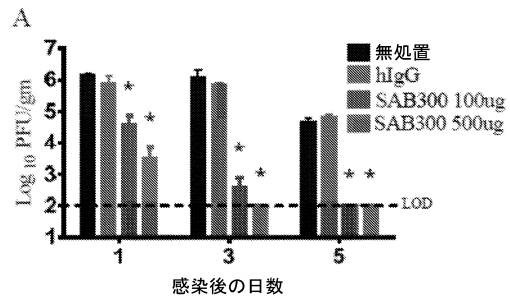
【 図 1 1 B 】



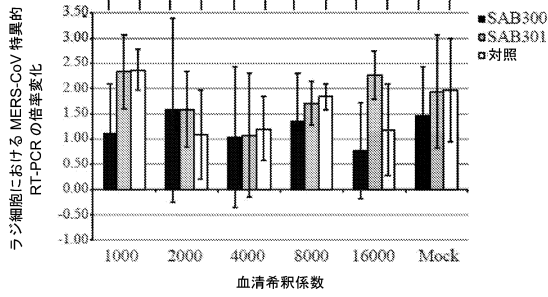
【 図 1 2 】



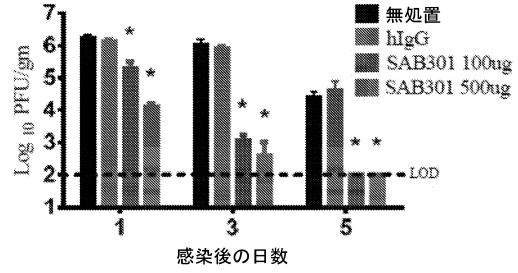
【 図 1 3 】



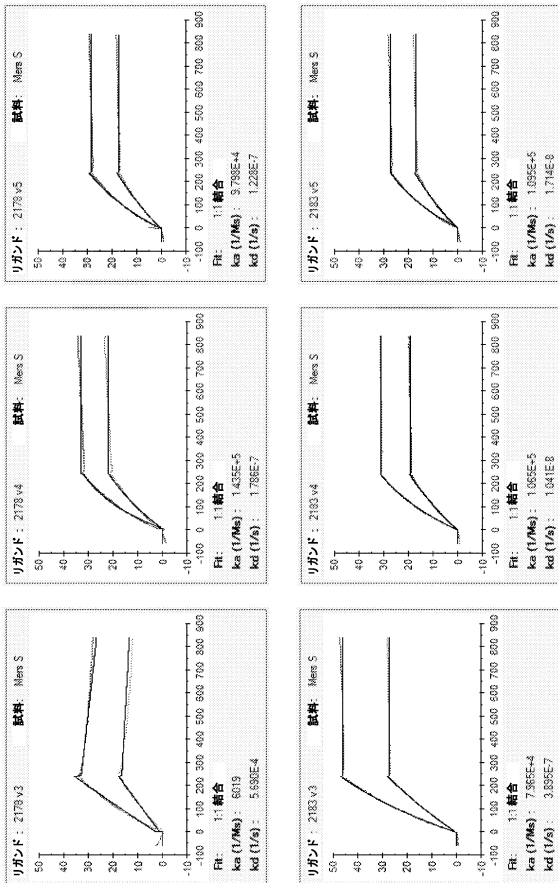
B.



B.



【 図 1 4 】



【配列表】

0006643239000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/50 (2006.01) C 0 7 K 16/08
 C 1 2 N 15/50

(72)発明者 スミス, ゲイル
 アメリカ合衆国, メリーランド州 2 0 8 7 8 , ゲイザースバーグ, ファーストフィールド ロード 2 0 , ノバボックス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 リウ, イエ
 アメリカ合衆国, メリーランド州 2 0 8 7 8 , ゲイザースバーグ, ファーストフィールド ロード 2 0 , ノバボックス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 マサレ, マイケル
 アメリカ合衆国, メリーランド州 2 0 8 7 8 , ゲイザースバーグ, ファーストフィールド ロード 2 0 , ノバボックス, インコーポレイテッド内

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 NOVAVAX, STIFEL 2013 HEALTHCARE CONFERENCE, [ONLINE], 2 0 1 3年 9月12日, URL, http://www.novavax.com/download/file/2013_09_12%20Novavax_Stifel_presentation.pdf
 Novavax creates MERS-CoV vaccine candidate, Vaccine News daily, 2 0 1 3年 6月 7日, URL, <https://vaccinenewsdaily.com/stories/510534663-novavax-creates-mers-cov-vaccine-candidate>
 DELMAS, B., et al., J. Virology, 1990, Vol.64, No.11, pp.5367-5375
 Vaccine, 2011, Vol.29, pp.6606-6613
 J. Virology, 2013.08, Vol.87, No.21, pp.11950-11954
 COTTEN, M. et al., 'S protein [Middle East respiratory syndrome coronavirus]' DATABASE NCBI Protein, [online], accession No.AGN70973, 10-Jun-2013, [retrieved on 2018.06.13], URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/511261317?sat=18&satkey=14547166>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q