

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-505033

(P2007-505033A)

(43) 公表日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 39/155 (2006.01)	A 61 K 39/155	4 B 02 4
A61K 9/127 (2006.01)	A 61 K 9/127	4 C 07 6
A61K 39/39 (2006.01)	A 61 K 39/39	4 C 08 5
A61K 39/295 (2006.01)	A 61 K 39/295	4 H 04 5
A61P 31/14 (2006.01)	A 61 P 31/14	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

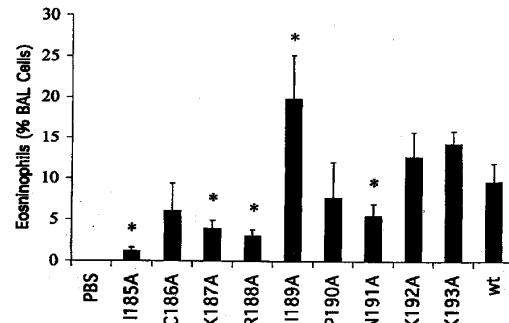
(21) 出願番号	特願2006-519734 (P2006-519734)	(71) 出願人	506013829
(86) (22) 出願日	平成16年7月14日 (2004.7.14)		アイディー バイオメディカル コーポレーション オブ ケベック
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月22日 (2006.2.22)		カナダ国 エイチ7ブイ 3エス8 ケベック, ラバル, カルティエ ブールバード ウエスト 525
(86) 國際出願番号	PCT/CA2004/001007	(74) 代理人	100078282
(87) 國際公開番号	W02005/007189	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(87) 國際公開日	平成17年1月27日 (2005.1.27)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/487,804	(74) 代理人	弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成15年7月15日 (2003.7.15)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/567,586		
(32) 優先日	平成16年5月3日 (2004.5.3)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	10/888,805		
(32) 優先日	平成16年7月9日 (2004.7.9)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】呼吸器合胞体得ウイルス感染に対するサブユニットワクチン

(57) 【要約】

本発明は、一般に、RSV感染を治療または予防する方法、特に、免疫病理学的応答を誘発せずに、または減少した免疫病理学的応答を誘発して、防御免疫を誘発することができる1つまたはそれ以上のRSV Gタンパク質免疫原またはそのフラグメントを含む組成物およびその使用に関する。1つの局面において、本発明は、RSV感染を治療または予防する方法を提供し、該方法は、配列番号2と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原またはそのフラグメント、および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含む組成物を、1つまたはそれ以上のGタンパク質免疫原またはそのフラグメントおよび変異体に特異的な免疫反応を誘発するのに充分な用量で、それを必要とする被験体に投与する工程を包含する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

呼吸器合胞体ウイルス感染を治療または予防する方法であって、配列番号 2 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つの呼吸器合胞体ウイルス G タンパク質免疫原またはそのフラグメント（該 G タンパク質免疫原は、免疫病理学的応答を誘発せずに、または減少した免疫病理学的応答を誘発して、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する）、および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含む組成物を、1 つまたはそれ以上の G タンパク質免疫原またはそのフラグメントに特異的な免疫反応を誘発するのに充分な用量で、それを必要とする被験体に投与することを包含する、方法。

10

【請求項 2】

該 G タンパク質免疫原が、配列番号 2 から成るアミノ酸配列である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該 G タンパク質免疫原が、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 56、配列番号 58、配列番号 60、配列番号 62、配列番号 64、配列番号 66、配列番号 68 または配列番号 70 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

該 G タンパク質免疫原が、配列番号 6、配列番号 56 または配列番号 58 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

該 G タンパク質免疫原が、疎水性成分をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

該疎水性成分がアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

該疎水性部分が脂質である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

該疎水性成分が、融合タンパク質のアミノ末端に存在する、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 9】

該疎水性成分が、融合タンパク質のカルボキシ末端に存在する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤がリポソームである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

該組成物がアジュvantをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

該アジュvantが、ミョウバン、プロトリンまたはプロテオソームである、請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

該組成物が、少なくとも 1 つの呼吸器合胞体ウイルス F タンパク質免疫原または M タンパク質免疫原をさらに含み、該 F タンパク質免疫原および該 M タンパク質免疫原がそれぞれ、免疫病理学的応答を誘発せずに、または減少した免疫病理学的応答を誘発して、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

該組成物が、少なくとも 2 つの G タンパク質免疫原を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

該 G タンパク質免疫原またはそのフラグメントが、融合タンパク質を形成するための第二アミノ酸配列をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 16】

該第二アミノ酸配列が、標識または酵素である、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

該第二アミノ酸配列が、チオレドキシン、ポリヒスチジンまたはそれらの組合せである、請求項15に記載の方法。

【請求項 18】

該融合タンパク質が疎水性成分をさらに含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 19】

該疎水性成分が、融合タンパク質のアミノ末端に存在する、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

該疎水性成分が、融合タンパク質のカルボキシ末端に存在する、請求項18に記載の方法。
。

【請求項 21】

該融合タンパク質が、疎水性成分をさらに含む、請求項17に記載の方法。

【請求項 22】

該免疫病理学的応答が、好酸球増加症または喘息である、請求項1に記載の方法。

【請求項 23】

該好酸球増加症が肺好酸球増加症である、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

感染がサブグループA呼吸器合胞体ウイルスによるものである、請求項1に記載の方法。 20

【請求項 25】

感染がサブグループB呼吸器合胞体ウイルスによるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項 26】

感染がサブグループAおよびサブグループBの呼吸器合胞体ウイルスの両方によるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項 27】

該組成物を、経腸、非経口、経皮、経粘膜、経鼻および吸入からなる群より選択される経路によって投与する、請求項1～4、11および12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 28】

該組成物を経鼻投与する、請求項1～4、11および12のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項 29】

請求項1～4、11および12のいずれか1項に記載の方法によって製造される、複数の抗体。

【請求項 30】

呼吸器合胞体ウイルス感染を治療または予防する方法であって、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤、および請求項29に記載の複数の抗体を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 31】

プロテオソームまたはプロトリンと配合された呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原を含む組成物であって、該Gタンパク質免疫原が、配列番号2に示す配列に少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、該Gタンパク質免疫原またはそのフラグメントが、免疫病理学的応答を誘発せずに、または減少した免疫病理学的応答を伴って、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する、組成物。 40

【請求項 32】

該Gタンパク質免疫原が、配列番号2から成るアミノ酸配列である、請求項31に記載の組成物。

【請求項 33】

該Gタンパク質免疫原が、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号6 50

8 または配列番号 7 0 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

該 G タンパク質免疫原が、配列番号 6 、配列番号 5 6 または配列番号 5 8 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

該 G タンパク質免疫原が、疎水性成分をさらに含む、請求項 3 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 6】

該 疎水性成分がアミノ酸配列を含む、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

該 疎水性部分が脂質である、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

該 疎水性成分が、融合タンパク質のアミノ末端に存在する、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

該 疎水性成分が、融合タンパク質のカルボキシ末端に存在する、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

該 G タンパク質免疫原またはそのフラグメントが、融合タンパク質を形成するための第二アミノ酸配列をさらに含む、請求項 3 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 1】

該 第二アミノ酸配列が、標識または酵素である、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 2】

該 第二アミノ酸配列が、チオレドキシン、ポリヒスチジンまたはそれらの組合せである、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

該 融合タンパク質が疎水性成分をさらに含む、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

該 疎水性成分が、融合タンパク質のアミノ末端に存在する、請求項 4 3 に記載の組成物。

【請求項 4 5】

該 疎水性成分が、融合タンパク質のカルボキシ末端に存在する、請求項 4 3 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本出願は、米国仮特許出願第 6 0 / 5 , 6 7 5 , 8 7 号 (2 0 0 4 年 5 月 3 日出願) 、および米国仮特許出願第 6 0 / 4 8 7 , 8 0 4 号 (2 0 0 3 年 7 月 1 5 日出願) の優先権を主張し、これらの仮出願は全体として、本明細書に参照として組み入れられる。

【0 0 0 2】

(技術分野)

本発明は、一般に感染の予防、より詳しくは、免疫病理学的応答を誘発せずに、または免疫病理学的応答を減少させて (例えは、関連した肺疾患を減少させる) 、防御免疫を誘発することができる 1 つまたはそれ以上の呼吸器合胞体ウイルス G タンパク質免疫抗原およびそのフラグメントまたは変異体を含む組成物およびその使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

(背景)

呼吸器合胞体ウイルス (R S V) は、早期新生児期における下気道感染症 (急性細気管支炎および肺炎) の主要な原因である (非特許文献 1 ~ 3) 。実際に、全ての子供は、2 歳までに R S V に感染し、全感染小児の 1 ~ 2 % は入院を必要とする (非特許文献 1 、 4

10

20

30

40

50

）。乳児および年少小児における RSV 感染の大発生および下気道感染死は、強い相関関係を示し（非特許文献 5）、入院した小児の死亡率は、米国およびカナダにおいて 0.1 ~ 1 % である（非特許文献 2、4、6 ~ 8）。乳児期における RSV 感染の結果は、細気管支炎または肺炎から小児喘息リスクの増加に及ぶ。

【0004】

過去 40 年にわたる熱心な努力にもかかわらず、RSV に対する安全かつ有効なワクチンは得られていない。ホルマリン不活性化および弱毒化生ウイルスを包含する初期の RSV ワクチン（非特許文献 9 に概説されている）は、残念なことに、非防御的であることが明らかになり、実際には、その後に自然 RSV 感染を受けたワクチン接種小児においてより重篤な肺疾患を生じた。炎症性細胞浸潤を特に包含する免疫病理学的応答は、肺組織への RSV 媒介損傷の基礎になり得ると考えられる。ホルマリン不活性 RSV ワクチンを接種された小児は、高レベルのウイルス特異性抗体を生じたが、抗体は低レベルの中和活性を有し（非特許文献 10）、RSV による感染に対して防御することができなかつた（非特許文献 11 ~ 13）。

【0005】

RSV ワクチン開発に関する最近の努力は、サブユニットおよび組換え法に焦点を当てている。RSV は 2 つの主要な表面糖タンパク質（F および G と称される）を有し、それらは潜在的ワクチンにおける使用が調査されている。F タンパク質は、ウイルスと標的細胞との膜融合に関与し（非特許文献 15）、G タンパク質は、細胞受容体へのウイルスの結合を媒介していると考えられる（非特許文献 16）。RSV F および G タンパク質の両方は、強い血清および粘膜免疫を誘発し、これらは RSV 感染に対する防御に重要である（非特許文献 1、2、17 ~ 19）。マウスを用いた研究は、ホルマリン不活性 RSV およびいくつかの G タンパク質コード化ワクシニア組換え体が有害な肺炎症反応（その反応において、好酸球が顕著な関与物質である）を生じることを示している（非特許文献 20 ~ 25）。

【0006】

好酸球および好酸球誘引サイトカイン IL-5 は、いわゆる 2 型免疫反応の特徴であると考えられ、これは、RSV 抗原での免疫化が、特定のウイルス免疫原の種類およびそれらの提示経路（route of presentation）のような要素に依存して 2 型反応を誘発する可能性を有するという考えを助長している（非特許文献 25 ~ 27）。最近の研究は、RSV G タンパク質の保存領域の一部が、RSV に対する防御免疫、および好酸球増加の誘発を含む炎症反応の発生に関与していることを示している（非特許文献 28 ~ 32）。

【非特許文献 1】 Glezen ら, Amer. J. Dis. Child., 1986, 140: 543

【非特許文献 2】 Holberg ら, Am. J. Epidemiol., 1991, 133: 1135

【非特許文献 3】 Fields, B. N. ら, 「Fields Virology」, Raven Press, N. Y., 1996, 特に、第 44 章, p. 1313 - 1351, Collins, P., McIntosh, K. および Chanock, R. M., 「Respiratory Syncytial Virus」

【非特許文献 4】 Parrott ら, Am. J. Epidemiol., 1973, 98: 289

【非特許文献 5】 Anderson ら, J. Infect. Dis., 1990, 161: 640

【非特許文献 6】 Navas ら, J. Pediatr., 1992, 121: 348

【非特許文献 7】 Law ら, Pediatr. Infect. Dis. J., 1993, 12: 659

【非特許文献 8】 Ruuskanen よび Ogra, Curr. Prob. Pediatr., 1993, 23: 50

- 【非特許文献 9】 Murphyら, Virus Res., 1994, 32: 13
- 【非特許文献 10】 Murphyら, J. Clin. Microbiol., 1986, 24: 197
- 【非特許文献 11】 Kimら, Am. J. Epidemiol., 1969, 89: 422
- 【非特許文献 12】 Kapikianら, Am. J. Epidemiol., 1969, 89: 405
- 【非特許文献 13】 Fulginitiら, Am. J. Epidemiol., 1969, 89: 435
- 【非特許文献 14】 Chinら, Virol., 1969, 1: 1 10
- 【非特許文献 15】 WalshおよびHruska, J. Virol., 1983, 47: 171
- 【非特許文献 16】 Levineら, J. Gen. Virol., 1987, 68: 2521
- 【非特許文献 17】 Glezenら, J. Pediatr., 1981, 98: 708
- 【非特許文献 18】 Lamprechtら, J. Infect. Dis., 1976, 134: 211
- 【非特許文献 19】 Hemmingら, Clin. Microbiol. Rev., 1995, 8: 22
- 【非特許文献 20】 Connorsら, J. Virol., 1994, 68: 5321 20
- 【非特許文献 21】 Doherty, Trends Microbiol., 1994, 2: 148
- 【非特許文献 22】 Warisら, J. Virol., 1996, 70: 2852
- 【非特許文献 23】 Grahamら, J. Immunol., 1993, 151: 2032
- 【非特許文献 24】 Beasleyら, Thorax, 1988, 43: 679
- 【非特許文献 25】 Openshawら, Int. Immunol., 1992, 4: 493
- 【非特許文献 26】 Kakukら, J. Infect. Dis., 1993, 167: 530
- 【非特許文献 27】 OpenshawおよびO'Donnell, Thorax, 1994, 49: 101
- 【非特許文献 28】 Sparerら, J. Expt'l. Med., 1998, 187: 1921
- 【非特許文献 29】 Tebbeyら, J. Expt'l. Med., 1998, 188: 1967
- 【非特許文献 30】 Srikiatchachornら, J. Virol., 1999, 73: 6590
- 【非特許文献 31】 Vargaら, J. Immunol., 2000, 165: 6487
- 【非特許文献 32】 HuangおよびAnderson, Vaccine, 2003, 21: 2500 40
- 【発明の開示】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0007】
- 従って、RSV感染に対して治療的に有効な組成物、特に、関連した有害な肺炎症を伴わずに、またはそれを減少させて、防御免疫を誘発することによってワクチンとして作用し得る組成物を、同定し開発することが必要とされている。さらに、種々のRSV免疫原性サブタイプおよびサブグループ(subgroup)によって感染に対して防御するかまたは治療するために変化させることができるワクチン配合物も必要とされている。本発明は、そのような要求を満たし、関連した他の利益も与える。 50

【課題を解決するための手段】

【0008】

(開示の要旨)

本発明は、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するのに有用な、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）免疫原、特にGタンパク質免疫原の治療配合物の発見を開示する。

【0009】

1つの局面において、本発明は、RSV感染を治療または予防する方法を提供し、該方法は、配列番号2と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原またはそのフラグメント（該Gタンパク質免疫原は、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する）、および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含む組成物を、1つまたはそれ以上のGタンパク質免疫原またはそのフラグメントおよび変異体に特異的な免疫反応を誘発するのに充分な用量で、それを必要とする被験体に投与することを含む方法である。関連した態様において、Gタンパク質免疫原は、配列番号2を含むかまたはそれから成るアミノ酸配列である。他の態様において、本発明は、Gタンパク質免疫原が配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70から選択されるアミノ酸配列を有する、呼吸器合胞体ウイルス感染の治療または予防法を提供する。さらに他の態様において、本発明は、該組成物が、少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルスFタンパク質免疫原またはMタンパク質免疫原（該Fタンパク質およびMタンパク質免疫原は、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する）をさらに含むかまたは少なくとも2つのGタンパク質免疫原を含有する方法を提供する。

【0010】

他の態様において、任意の前記Gタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体が、特にプロテオソームアジュバント送達賦形剤（delivery vehicle）を使用して配合する場合に、疎水性部分または成分（例えば、膜またはプロテオソームまたはリポソームのような脂質環境においてアンカー（anchor）またはフット（foot）として機能する）をさらに含む。さらに他の態様において、疎水性成分が、アミノ酸配列または脂質を含む。ある態様において、キャリアはリポソームであり、他の態様において、リポソームはDeinococcus radiodurans脂質または-ガラクトシルホスホチジルグリセロールアルキルアミンを含有する。他の態様において、任意の前記組成物は、アジュバント、例えば、ミヨウバン、フロイントアジュバント、またはプロテオソームに基づく配合物（例えば、プロテオソームアジュバント送達システム）をさらに含む。アジュバントは、ヒトにおける使用に適しているのが好ましい。他の態様において、Gタンパク質免疫原またはそのフラグメントおよび変異体は、融合タンパク質を形成するための第二アミノ酸配列をさらに含み、該第二アミノ酸配列は、標識（tag）、酵素またはそれらの組合せ、例えば、ポリヒスチジン、チオレドキシンまたはそれらの両方であってよい。ある態様において、そのような融合タンパク質は、疎水性成分をさらに含んでよい。さらに他の態様において、任意の前記方法を、RSV感染から生じたまたはそれに関連した免疫病理学的応答が好酸球増加症（例えば、肺好酸球増加症）または喘息である場合に使用する。さらに他の態様において、本発明は、感染がサブグループA、サブグループB、またはサブグループAとサブグループBの両方のRSVによる場合に、任意の前記方法を使用する。関連した態様において、任意の開示組成物を、経腸、非経口、経皮、経粘膜、経鼻または吸入から選択される経路によって、任意の前記方法で投与し得る。

【0011】

他の局面において、本発明は、前記の方法のいずれか1つの方法によって製造される複

10

20

30

40

50

数の抗体、T h 細胞またはそれらの両方を提供する。1つの態様において、RSV 感染を治療または予防する方法を提供し、該方法は、それを必要とする被験体に、薬学的に受容可能なキャリアまたはプロテオソームアジュバント送達賦形剤および前記の複数の抗体を含む組成物を投与することを含む。

【0012】

さらに他の局面において、プロテオソームアジュバント送達賦形剤と共に配合した呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原またはそのフラグメントを含む組成物であって、該Gタンパク質免疫原が、配列番号2と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有し、該Gタンパク質免疫原またはそのフラグメントが、免疫病理学的応答を誘発せずに、または免疫病理学的応答を減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する組成物を提供する。他の態様において、組成物は、任意の前記Gタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体、融合タンパク質、多価融合体(multivalent fusions)、カクテル組成物またはそれらの任意の組合せ、および他の添加剤、たとえばアジュバントを含有する。いくつかの態様において、アジュバントは、ミョウバン、プロテオソームまたはプロトリンである。

【0013】

本発明のこれらおよび他の局面は、下記の詳細な説明および添付の図面を参照すれば明らかである。

【0014】

(詳細な説明)

前記のように、本発明は、呼吸器合胞体ウイルス感染を治療または予防するために、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)Gタンパク質免疫原を使用し製造する組成物および方法を提供する。RSV再感染(即ち、攻撃)に対する防御は、RSV Gタンパク質の種々の形態および免疫化法から成る以前のワクチンによって得られたが、これは、顕著な好酸球増加を特徴とする好ましくない有害な肺炎症を伴う場合が多かった。それに加えて、重篤なRSV疾患にかかりやすい被験者(例えば、月齢2~7ヶ月のヒト被験者)の免疫化は、母系由来血清RSV-中和抗体の推定される免疫抑制作用によるか、または被験者の免疫学的未熟により、困難である。従って、本発明は一般に、特定のRSV Gタンパク質フラグメントを修飾して、RSVに対する防御免疫を誘発または惹起することができ、後のRSVでの感染時に例えば肺炎症および重篤疾患を生じる不隨免疫病理学的事象を誘発しないかまたはそれを減少させることができるという意外な発見に関する。特に、これらのGタンパク質免疫原は、RSVに関わる感染を治療または予防するのに有用である。本発明の使用に好適なGタンパク質免疫原またはそのフラグメントおよび変異体、ならびに代表的組成物および治療的使用について、以下に詳しく記載する。

【0015】

本発明の開示において、あらゆる濃度範囲、パーセント範囲、比率範囲または整数範囲は、特に指定しなければ、記載されている範囲内の任意の整数値、および適切な場合にその分数(例えば、整数の1/10および1/100)を包含するものと理解される。本明細書に使用される「約」または「から基本的に成る」という語句は、±15%を意味する。選択肢(例えば「または」)の使用は、選択肢の1つ、両方またはそれらの任意組合せを意味するものと理解すべきである。さらに、本明細書に記載されている配列、構造および置換基の種々の組合せから誘導される個々の化合物または化合物群は、各化合物または化合物群が個々に開示されているのと同じ程度に、本出願によって開示されているものと理解すべきである。従って、特定の配列、構造または置換基の選択は、本発明の範囲に含まれる。

【0016】

(RSV Gタンパク質免疫原)

本発明は一般に、他のポリペプチド(例えば、標識、他のタンパク質、疎水性アミノ酸配列、またはそれらの任意組合せ)への融合または他の修飾(例えば、脂質の付加、またはグリコシル化)を含む、Gタンパク質またはそのフラグメントおよび変異体の免疫原性

10

20

30

40

50

R S V ポリペプチド免疫原に関する。免疫原性 G ポリペプチドは、免疫病理学的応答を誘発せずに、または免疫病理学的応答を減少させて、R S V 感染に対する防御免疫応答を誘発することができるエピトープを有する G タンパク質の、任意の部分またはフラグメントを含んでよい。本発明の免疫原性ポリペプチドは、線形に配列または結合してよく、各免疫原は反復してもしなくてよく、該反復は 1 回または複数回存在してよい。さらに、複数の種々の R S V 免疫原性ポリペプチド（例えば、種々の G タンパク質、F タンパク質または M タンパク質変異体およびそのフラグメントまたはその変異体）を選択し、混合するかまたは組み合わせてカクテル組成物にするか、または融合、接合（conjugated）または連結させて、有害な不隨免疫反応を生じずに防御免疫応答を誘発するのに使用される多価ワクチンを提供することができる。

10

【0017】

本明細書に使用される「G タンパク質免疫原」または「R S V 免疫原」は、本明細書に記載されるように、免疫病理学的応答を誘発せずに、または免疫病理学的応答を減少させて、R S V 感染に対する防御免疫応答を誘発することができる、全ての全長ポリペプチド、全長変異体、フラグメントおよびその変異体、多価融合体、カクテル組成物、融合タンパク質、またはそれらの任意組合せを意味する。

【0018】

本発明はさらに、融合タンパク質を包含する合成または組換え多価 R S V ポリペプチド免疫原を製造する方法も提供する。例えば、G タンパク質免疫原コード化核酸発現構造物を含有する宿主細胞を培養して、組換え G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体を製造し得る。さらに、G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体、またはポリペプチドの組合せ（融合タンパク質を包含する）を使用して、R S V 感染を治療または予防するか、または免疫反応を誘発する方法も意図する。

20

【0019】

本明細書に使用される「免疫病理学的応答」という語句は、検出可能な臨床症候を有するかまたは有さない、免疫反応から生じる症状または疾患を意味する。例示的免疫病理学的応答は、過敏症または喘息を包含する。他の例示的免疫病理学的応答は、アレルギー状態または微生物感染（例えば、寄生虫感染または呼吸器合胞体ウイルス感染）の特徴である、血液好酸球増加または肺浸潤性好酸球増加に見られるような、2型サイトカインに応答した顆粒球の非定型誘発である。

30

【0020】

理論に縛られるものではないが、背景として、R S V は、少なくとも 10 のウイルスタンパク質（G、F、S H、M、M 2、N、P、L、N S 1 および N S 2）をコードする、負の向きの（negative-sense）、非セグメント化、一本鎖 R N A ゲノムを有する。R S V は 2 つの主要な表面糖タンパク質（F および G と称される）有し、これらは潜在的ワクチンにおける使用に関して調査されている。F タンパク質は、ウイルスと標的細胞との膜融合に関与し（Walsh および Hruska, J. Virol. 47: 171, 1983）、G タンパク質は、細胞受容体へのウイルスの結合を媒介していると考えられる（Levineら, J. Gen. Virol. 68: 2521, 1987）。R S V F および G タンパク質の両方は、強い血清および粘膜免疫を誘発し、これらは R S V 感染に対する防御に重要である（Glezenら, 1986; Holbergら; Glezenら, J. Pediatr. 98: 708, 1981; Lamprechtら, J. Infect. Dis. 134: 211, 1976; Hemmingら, Clin. Microbiol. Rev. 8: 22, 1995）。マウスを用いた研究は、ホルマリン不活化 R S V およびいくつかの G タンパク質コード化ワクシニア組換え体が有害な肺炎症反応（その反応において、好酸球が顕著な関与物質である）を生じることを示している（Connorsら, J. Virol. 68: 5321, 1994; Doherty, Trends Microbiol. 2: 148, 1994; Warisら, J. Virol. 70: 2852, 1996; Grahamら, J. Immunol. 151: 2032, 1993; Beasleyら, Thorax 43: 679, 1988; Opensh

40

50

awら, Int. Immunol. 4: 493, 1992)。本発明の意外な結果は、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するGタンパク質免疫原(例えば、野生型Gタンパク質の変異体または突然変異体; 例示的野生型Gタンパク質は配列番号4に示され、それは、配列番号3に示すような核酸配列によってコードすることができる)の同定である。従って、本発明の特定の態様において、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原またはそのフラグメントを使用して、RSV感染を治療または予防するのに有用な組成物を製造する。

【0021】

特定の態様において、RSV Gタンパク質免疫原は、配列番号2(RSV A群、Long株; 配列番号1は、配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列である)に示す全長Gタンパク質突然変異体、または配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70に示すそのフラグメントの、アミノ酸配列に、少なくとも50%~100%のアミノ酸同一性、好ましくは60%~99%の同一性、より好ましくは70%~97%の同一性、最も好ましくは80%~95%の同一性を有し、Gタンパク質免疫原変異体は、免疫病理学的応答(例えば、好酸球増加)を誘発せずに、またはそれを減少させて、RSVに対する防御免疫応答を誘発する少なくとも1つのエピトープを保持している。本明細書に使用される「パーセント同一性」または「%同一性」は、一般にデフォルトパラメーターと共に(with default parameters)、コンピューター実行アルゴリズム(computer implemented algorithm)を使用して、対象ポリペプチド、ペプチドまたはその変異体の配列の全てを、試験配列と比較することによって求められるパーセント値である。

【0022】

好ましい態様において、Gタンパク質免疫原は、点突然変異を有する野生型Gタンパク質の変異体であり、それにおいて、例えば位置191(Asn)における、アミノ酸が、Alaに変化し(配列番号2および図3参照; Gタンパク質N191Aとも称される)、より好ましい態様において、Gタンパク質免疫原変異体は、全長Gタンパク質のフラグメントである。例えば、そのようなGタンパク質フラグメントは、アミノ酸約128~アミノ酸約229を含み、該フラグメントはN191A突然変異を有する(配列番号6)。他の態様において、Gタンパク質変異体はアミノ酸128~229にわたり、該変異体は、P190AおよびN191A(配列番号56)またはR188AおよびN191A(配列番号58)のような二点突然変異を有する。本発明に使用される他の点突然変異は、位置178(配列番号60)および179(配列番号62)におけるAsn、および位置196(配列番号64)、197(配列番号66)、204(配列番号68)または205(配列番号70)におけるLysの点突然変異を包含する。

【0023】

本明細書に記載する代表的なGタンパク質免疫原変異体はAla置換を有するが、本発明はそれに限定されず、当業者は、他のアミノ酸を置換に使用し得ることを理解する。さらに、本発明の変異体免疫原は、1つまたはそれ以上の種々の突然変異、例えば、点突然変異、フレームシフト突然変異、ミスセンス突然変異、付加、欠失などを有するように製造することができ、または変異体は、例えば、グリコシル化、アルキル化等を包含する特定の化学置換による、修飾の結果であってもよい。本発明の各変異体は、免疫病理学的応答を誘発せずに、または免疫病理学的応答(例えば、好酸球増加)を減少させて、RSVに対する防御免疫応答を誘発できることが好ましい。

【0024】

本明細書に記載するように、RSV A群またはB群に由来するGタンパク質の好ましいフラグメントは、RSVに対する防御免疫応答を誘発し、減少した免疫病理学的応答を誘発するか、または免疫病理学的応答を誘発できない少なくとも1つのエピトープを保持

10

20

30

40

50

している免疫原である。特定の態様において、免疫原フラグメントまたはその変異体（例えば、N 1 9 1 A 突然変異）は、配列番号 2 のアミノ酸約 1 2 0 ~ アミノ酸約 3 0 0 、好ましくはアミノ酸約 1 2 5 ~ アミノ酸約 2 5 0 、より好ましくはアミノ酸約 1 5 0 ~ アミノ酸約 2 2 5 、最も好ましくはアミノ酸約 1 6 5 ~ アミノ酸約 1 9 5 にわたるアミノ酸配列において、野生型 G タンパク質からの突然変異または変異を有する。1 つの態様において、G タンパク質免疫原フラグメントがアミノ酸 1 2 8 ~ 2 2 9 を有し、突然変異は、G タンパク質のアミノ酸約 1 7 8 ~ 約 2 0 5 の範囲に見出すことができる。

【 0 0 2 5 】

配列比較は、任意の標準ソフトウェアプログラム、例えば、BLAST、tBLAST、pBLAST 10 またはMalignを使用して行うことができる。その他には、DNA STAR（登録商標）（Madison, Wisconsin）によって製造されているLasergeneバイオインフォーマティックスコンピューティングスイートにおいて提供されるソフトウェアプログラムを包含する。ALIGNまたはBLASTのようなアルゴリズムについての記載は、例えば、Altschul, J. Mol. Biol. 2 19: 555 - 565, 1991; またはHenikoffおよびHenikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 - 10919, 1992 に見出される。BLASTはNCBIウェブサイト(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)で利用できる。至適配列を決定することによって多数のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較する他の方法は、当業者に既知である（参照：例えば、PeruskiおよびPeruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wuら編, 'Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins', Methods in Gene Biotechnology, p. 123 - 151 (CRC Press, Inc. 1997); および、Bishop編, Guide to Human Genome Computing, 第2版, Academic Press, Inc., 1998）。

【 0 0 2 6 】

本明細書に使用される2つのペプチドまたはポリペプチドの「類似度」は、1つのペプチドまたはポリペプチドのアミノ酸配列を、第二ペプチドまたはポリペプチドのアミノ酸配列およびその保存アミノ酸置換基と比較することによって、一般に決定される。本発明のGタンパク質免疫原またはその変異体のフラグメントまたは部分は、ペプチド合成によって対応する全長Gタンパク質免疫原を製造するのに使用でき；従って、フラグメントは、全長Gタンパク質免疫原を製造するための中間体として使用し得る。同様に、本発明の核酸のフラグメントまたは部分を使用して、本発明の全長核酸を合成し得る。

【 0 0 2 7 】

本明細書に記載されるように、本発明のGタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体は、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する。フラグメントおよび変異体は、当分野で既知の生体内および生体外アッセイ、例えば、動物免疫化試験（例えば、マウスまたはウサギモデルを使用）およびウエスタンイムノプロット分析およびそれらの組合せを使用して、同定し得る。他の例は、本発明のGタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体が、免疫反応、特に防御（中和）免疫反応を誘発し得るかを評価するブラーク減少アッセイ（plate reduction assay）である。簡単に言えば、皮下投与によって、1つまたはそれ以上のGタンパク質免疫原またはその組成物で動物を免疫化し、血清を免疫化動物から収集し、次に、細胞培養単層のRSV感染を阻害する能力について、血清を試験する（感染は、形成されたブラークの数として測定される；即ち、細胞を溶解させるRSVによって生じる単層における「穴」）（例えば、実施例8参照）。さらに、変化した（減少または強化した）免疫病理学的応答は、例えば、本発明のGタンパク質免疫原

10

20

20

30

40

50

で免疫化した後に RSV で攻撃した動物におけるサイトカイン発現パターンを調査することによって、直接的に同定できる。例えば、本発明の G タンパク質免疫原での免疫化およびその後の RSV での攻撃後に 1 型または 2 型反応が優勢であるかを推定するリボヌクレアーゼ防御アッセイ (RPA) を使用して、特定のサイトカインレベルを関心のある組織において測定できる (実施例 9 参照)。これらおよび当業者に既知の他のアッセイを使用して、本発明に記載するような、免疫病理学的応答を誘発せずにまたは免疫病理学的応答を減少させて防御免疫応答を誘発する少なくともエピトープを有する G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体を同定することができる。

【0028】

本発明の RSV G タンパク質ポリペプチド、そのフラグメント、およびその融合タンパク質、ならびに対応する核酸は、好ましくは分離形態で提供され、特定の好ましい態様においては、精製して均質にされる。本明細書に使用される「分離された」という用語は、物質をその原環境または自然環境から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物または細胞に存在する天然核酸分子またはポリペプチドは分離されていないが、自然系におけるいくつかのまたは全ての共存物質から分離されている場合に、同じ核酸分子またはポリペプチドは分離されている。核酸分子は、例えば、ベクターの一部であってよく、そして / または、そのような核酸またはポリペプチドは組成物の一部であってよく、そして、そのようなベクターまたは組成物がその自然環境の一部でないという点で、やはり分離されている。

【0029】

本発明は、合成的にまたは組換え的に、好ましくは組換え的に製造された RSV G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体にも関する。免疫原の免疫原性ポリペプチド成分は、自動化手順による合成を包含する標準合成法によって合成し得る。一般に、免疫原性ペプチドは、HATU をカップリング剤として使用して、固相 Fmoc 保護法に基づいて合成される。免疫原性ペプチドは、側鎖官能基も脱保護する適切なスカベンジャーを含有するトリフルオロ酢酸を使用して、固相樹脂から開裂される。分取逆相クロマトグラフィーによって、粗免疫原ペプチドをさらに精製する。他の精製法、例えば、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過、ゲル電気泳動法、またはイオン交換クロマトグラフィーを使用し得る。tBoc 保護法、種々のカップリング試薬の使用等のような、当分野で既知の他の合成法を使用して、同様の免疫原性ペプチドを製造し得る。さらに、D- または L- アミノ酸およびそれらの組合せを包含する任意の天然アミノ酸またはその誘導体も使用し得る。特に好ましい態様において、本発明の合成 G タンパク質免疫原は、配列番号 2、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 56、配列番号 58、配列番号 60、配列番号 62、配列番号 64、配列番号 66、配列番号 68 または配列番号 70 と少なくとも 80 % 同一のアミノ酸配列を有する。

【0030】

本明細書に記載するように、特定の態様の G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体を組換えてもよく、それにおいて、核酸発現構造物中の発現制御配列 (例えば、プロモータ) に操作可能に連結されたボリヌクレオチドから、所望の G タンパク質免疫原を発現させる。特に好ましい態様において、組換え G タンパク質免疫原は、配列番号 2 と少なくとも 80 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの好ましい組換え G タンパク質免疫原は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むか、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列だけから成る。より好ましくは、組換え G タンパク質免疫原およびその変異体は、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 56、配列番号 58、配列番号 60、配列番号 62、配列番号 64、配列番号 66、配列番号 68 または配列番号 70 に示すアミノ酸配列を含み、より好ましくは、配列番号 6、配列番号 56 または配列番号 58 に示すアミノ酸配列を含む。好ましい態様において、組換え G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体は、免疫生理学的反応を誘発せずに、またはそれを減少させて

10

20

30

40

50

、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する。

【0031】

「核酸」または「核酸分子」は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生じるフラグメント、およびライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用およびエキソヌクレアーゼ作用のいずれかによって生じるフラグメントのいずれかを意味する。核酸は、天然ヌクレオチド（例えば、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチド）、天然ヌクレオチドの類似体（例えば、天然ヌクレオチドの-鏡像異性形）、またはそれら両方の組合せであるモノマーから成ってよい。修飾ヌクレオチドは、糖成分および/またはピリミジンまたはプリン塩基成分において、修飾を有することができる。糖修飾は、例えば、1つまたはそれ以上のヒドロキシル基の、ハロゲン、アルキル基、アミンおよびアジド基での置換を包含し、または糖をエーテルまたはエステルとして官能化することができる。さらに、糖成分全体を、立体的および電子的に類似した構造物、例えばアザ糖および炭素環式糖類似体で置換してよい。塩基成分における修飾の例は、アルキル化プリンおよびピリミジン、アシル化プリンおよびピリミジン、および他のよく知られた複素環式置換基を包含する。核酸モノマーを、ホスホジエステル結合またはそのような結合の類似物によって連鎖させることができる。ホスホジエステル結合の類似物は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニリデート、ホスホラミデート等を包含する。「核酸」という用語は、いわゆる「ペプチド核酸」も包含し、それは、ポリアミド主鎖に結合した天然または修飾核酸塩基を有する。核酸は一重基準あるいは二重基準になることができる。

【0032】

さらに、「分離核酸分子」は、その起源細胞（それが通常存在する染色体を包含する）から、少なくとも一度、実質的に純粋な形態で分離された、分離フラグメントの形態の、またはより大きい核酸構造物の成分としての、ポリヌクレオチド分子を意味する。例えば、RSV粒子から、またはRSVで感染されたかまたはそれを含んでいる宿主細胞から分離された、RSVポリペプチド、ペプチドまたはその変異体をコードするDNA分子は、分離DNA分子である。分離核酸分子の他の例は、化学的に合成された核酸分子である。核酸分子は、DNA、cDNA、RNA、ヌクレオチド類似体またはそれらのある組合せを包含する種々のヌクレオチドから成ってよい。1つの態様において、分離核酸分子は、配列番号2と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有するGタンパク質免疫原またはそのフラグメントをコードする配列を含み；該Gタンパク質免疫原は、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する。他の態様において、分離核酸分子は、配列番号2を含むかまたはそれから成るアミノ酸配列を有するGタンパク質免疫原をコードする配列を含む。他の態様において、分離核酸分子は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70に示すアミノ酸配列、より好ましくは、配列番号6、配列番号56または配列番号58に示すアミノ酸配列を含むGタンパク質免疫原フラグメントをコードする配列を含む。

【0033】

特定の局面において、本発明は、本発明の核酸配列を含有する核酸ベクターおよび構造物、特に、前記のRSVポリペプチドおよびそのフラグメントまたは変異体をコードする任意ポリヌクレオチドを含有する「核酸発現構造物」に関する。他の局面において、本発明は、本発明のベクターまたは構造物で遺伝子操作した宿主細胞、およびその製造、およびRSV感染を治療または予防するかまたは免疫反応を誘発する方法におけるその使用に関する。RSVペプチドおよびそのフラグメントまたは変異体は、適切な発現制御配列の制御下に、哺乳動物細胞、酵母、細菌または他の細胞において発現し得る。無細胞トランスレーションシステムによって、本発明の核酸発現構造物から誘導されたRNAを使用して、そのようなタンパク質を製造してもよい。原核生物および真核生物宿主と共に使用さ

10

20

30

40

50

れる適切なクローニングおよび発現ベクターは、例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, NY, (1989) に記載されており、プラスミド、コスミド、シャトルベクター、ウイルスベクター、および本明細書に開示される複製の染色体源を含むベクターを包含する。

【0034】

1つの態様において、核酸発現構造物は、配列番号2と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有するGタンパク質免疫原またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結した発現制御配列を有し；該Gタンパク質免疫原は、免疫病理学的応答を誘発せずに、または免疫病理学的応答を減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する。特定の態様において、核酸発現構造物は、配列番号2を含むかまたはそれから成るアミノ酸配列を有するGタンパク質免疫原をコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結した発現制御配列を有する。他の態様において、核酸発現構造物は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70に示すアミノ酸配列、より好ましくは、配列番号6、配列番号56または配列番号58に示すアミノ酸配列を含むGタンパク質免疫原またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結した発現制御配列を有する。

【0035】

他の態様において、本明細書に記載する核酸発現構造物は、誘発性プロモータを有し、それは、lac、tac、trc、ara、trp、ファージ、T7ファージおよびT5ファージプロモータであってよく、より好ましくは、米国特許出願公開第2003/0143685号に開示されているT5ファージプロモータ/lacオペレータ発現制御配列(プラスミドpT5)である。「発現制御配列」は、宿主細胞において、関心のあるタンパク質の発現を可能にするのに充分なあらゆる配列を意味し、1つまたはそれ以上のプロモータ配列、エンハンサー配列、オペレータ配列(例えば、lacO)等を含有する。特定の態様において、RSVポリペプチドをコードする核酸が、プラスミド、好ましくはプラスミドpT5中にあり、宿主細胞は細菌、好ましくはEscherichia coliである。

【0036】

種々の病原体の抗原をコードする遺伝子輸送媒介物(gene delivery vehicles)(例えば裸DNA)のヒトへの注入は、防御免疫応答を生じることが示されている(Ulmerら, Science 259:1745-9, 1993; Bourneら, J. Infect. Dis. 173:800-7, 1996; Hoffmanら, Vaccine 12:1529-33, 1994)。筋肉組織に注射された裸DNAからの異種タンパク質の生体内発現が最初に記載されてから(Wolffら, Science 247:1465-8, 1990)、ワクチン接種のためのDNAの設計および輸送においていかか進歩が見られる。

【0037】

抗体が最終的に防御免疫を確立するので、本明細書に記載するRSVワクチンは、裸DNAによる輸送に適しているのが理想的である。例えば、1つの態様において、Gタンパク質免疫原またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を、哺乳動物細胞発現用に特に操作されたプラスミドに連結させる(参照:例えば、Hortikkala, Hum Gene Ther 7:1205-17, 1996; これは、サイトメガロイロス初期遺伝子からのプロモータ/エンハンサー成分、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子からのシグナルペプチド、およびウシ成長ホルモン遺伝子からのテミネーター成分を含有する)。RSVポリペプチドをプラスミドにクローン化し、これを使用してヒト細胞系をトランスフェクションして、組換えタンパク質発現を確実にする。プラスミドをE. coliのような細菌中で増殖させ、免疫化試験に充分な量で塩化セシウム勾配遠心分離に

10

20

30

40

50

よって精製し得る。マウスのような動物を、例えば、生理食塩水 50 μL 中の分離組換えプラスミド 50 μg で、筋肉内 (i. m.) 免疫化することができる。初期注射から 3 週間および 6 週間の間隔で、同じ用量のブースター注射をさらに行ってよい。

【0038】

他の種々の遺伝子輸送媒介物も本発明に使用することができ、それは、ウイルス、レトロトランスポソンおよびコスミドを包含する。代表的な例は、下記のものを包含する：アデノウイルスベクター（例えば、WO 94/2914、WO 93/9191；Yeilら, Gene Therapy 1:192-200, 1994；Kollsら, PNAS 90(24):11498-502, 1993；Guzmanら, Circulation 88(6):2838-48, 1993；Guzmanら, Circ. Res. 73(6):1202-1207, 1993；Zabnerら, Cell 75(2):207-216, 1993；Liら, Hum Gene Ther. 4(4):403-409, 1993；Cailliaudら, Eur. J. Neurosci. 5(10):1287-1291, 1993）、アデノ関連 1 型（「AAV-1」）またはアデノ関連 2 型（「AAV-2」）ベクター（WO 95/13365；Flotteら, PNAS 90(22):10613-10617, 1993 参照）、デルタ肝炎ベクター、生、弱毒化デルタウイルスワクシニアベクターおよびヘルペスウイルスベクター（例えば、米国特許第 5,288,641 号）ならびに米国特許第 5,166,320 号に開示されているベクター。他の代表的なベクターは、レトロウイルスベクター（例えば、EP 0415731；WO 90/07936；WO 91/02805；WO 94/03622；WO 93/25698；WO 93/25234；米国特許第 5,219,740 号；WO 93/11230；WO 93/10218）を包含する。遺伝子治療におけるそのようなベクターの使用法は、当分野でよく知られている（参照：例えば、Larrick, J. W. および Burck, K. L., Gene Therapy: Application of Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, New York, 1991；および Kreigler, M., Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York, 1990）。

【0039】

遺伝子輸送媒介物は、媒介物を使用するか、または種々の物理的方法によって、宿主細胞に導入し得る。そのような方法の代表的な例は、下記の方法である：磷酸カルシウム沈降を使用するトランスフォーメーション（Dubenskyら, PNAS 81:7529-7533, 1984）、そのような核酸分子の無処置標的細胞への直接マイクロインジェクション（Assadiら, Nature 352:815-818, 1991）、およびエレクトロポレーション（それにより、導電溶液に懸濁した細胞を、強電場に暴露して膜を過渡的に分極して、核酸分子の侵入を可能にする）。他の方法は、下記のものを使用する方法を包含する：不活性アデノウイルスに結合した核酸分子（Cottonら, PNAS 89:6094, 1990）、リポフェクション（Felgnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989）、微粒子銃（Williamsら, PNAS 88:2726-2730, 1991）、ポリカチオン化合物（例えばポリリシン）、受容体特異性リガンド、核酸分子を包括しているリポソーム、スフェロプラスト融合（それにより、核酸分子を含有する *E. coli* から外細胞壁を剥離し、ポリエチレングリコールを使用して動物細胞に融合させる）、ウイルストランスタクション（Clineら, Pharmac. Ther. 29:69, 1985；および Friedmannら, Science 244:1275, 1989）、および DNA リガンド（Wuら, J. of Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989）、ならびにセンダイまたはアデノウイルスのようなソラレン不活性化ウイルス。

10

20

30

40

50

【0040】

R S V ポリペプチド免疫原およびそのフラグメントまたは変異体、およびその融合体を含有する遺伝子輸送媒介物で免疫化した被験体からの血清を、天然 P S V ポリペプチドを抗原として使用する E L I S A によって、全抗体滴定量について分析することができる。血清防御抗原は、本明細書に記載のように、または当分野で既知であるように、分析し得る。D N A R S V ポリペプチドワクチンの防御効力は、例えば、医薬組成物またはワクチンにおいて示される R S V 血清型を使用する（即ち、攻撃感染試験）直接的動物防御アッセイ（即ち、攻撃感染試験）によって、測定することができる。

【0041】

当業者によって理解されるように、R S V ポリペプチドをコードする核酸は、例えば遺伝暗号の縮重による、自然配列の変異体であってよい（相同形または株（strain）変異体または他の変異体を包含する）。簡単に言えば、「変異体」は、自然多型性から生じ得るか、または組換え法（例えば、特定宿主における発現のために、コドン至適化を得るため）または化学合成によって合成でき、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換、挿入、欠失等により、野生型ポリペプチドと異なってよい。保存的アミノ酸置換を含む変異体は、例えば、1つの脂肪族アミノ酸の別の脂肪族アミノ酸への置換（例えば、I le、V al、L e u または A la）または1つの極性残基の別の極性残基への置換（例えば、L ys と A rg、G lu と A sp、または G ln と A sn）を包含する。そのような置換は、類似した物理的性質、構造的特性および機能的活性、例えば、類似抗体（例えば、野生型 G タンパク質に特異的に結合する抗体）を誘発しそれと交差反応を有する能力、を有する変異体を生じることは当分野でよく知られている。他の変異体は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70に対して少なくとも50%～100%のアミノ酸同一性を有するGタンパク質免疫原フラグメントをコードする核酸配列を有する。好ましい態様は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70のアミノ酸配列との90%または95%より以上の同一性を有する変異体である。

【0042】

特定の態様において、本発明は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70に示すアミノ酸配列を有するGタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体をコードし、機能的活性を保持している（例えば、免疫病理学的応答を誘発せずに、または免疫病理学的応答を減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する）、任意の前記縮重核酸分子を含む。他の局面において、R S V ポリペプチド変異体が1つまたはそれ以上のR S V 株に特異的な抗体を誘発し得る少なくとも1つのエピトープを保持する（野生型から）かまたは有するような、保存的アミノ酸置換または欠失または置換を有するGタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体をコードする核酸分子を意図する。

【0043】

特定の局面において、核酸配列を修飾して、核酸配列の特定コドンが特定宿主に好ましいコドンに変化され、高レベルの発現を生じることができるR S V 免疫原またはその機能変異体をコードし得る（例えば、H a a s ら, C u r r . B i o l . 6 : 3 1 5 , 1 9 9 6 ; Y a n g ら, N u c l e i c A c i d s R e s . 2 4 : 4 5 9 2 , 1 9 9 6 参照）。例えば、E s c h e r i c h i a c o l i における発現増加のために、ペプチドの一次配列を変化せずに、免疫原性ペプチドの特定コドンを至適化することができる。例示するものであって、限定するものはないが、A G G / A G A のアルギニン（A rg）コ

10

20

30

40

50

ドンを、 C G T / C G C の A r g コドンに変化させることができる。同様に、 A G G / A G A A r g コドンを、 C G T / C G C コドンに至適化することができる。当分野で知られているように、 G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体が発現される宿主（細菌、真菌、昆虫細胞、植物細胞および哺乳動物細胞を包含する）のために、コドンを至適化し得る。さらに、種々のアミノ酸をコードするコドンを変化させてもよく、その場合、特定宿主に最も適合するように、種々のアミノ酸をコードする 1 つまたはそれ以上のコドンを同時に変化させてよい（例えば、アルギニン、グリシン、ロイシンおよびセリンのコドンを全て至適化するか、またはそれらの任意組合せを至適化してよい）。細菌における発現のために至適化したコドンを有する例示的核酸配列は、配列番号 23 、配列番号 25 、配列番号 27 、配列番号 29 、配列番号 31 および配列番号 33 に示す配列を有する。これらの核酸配列は、配列番号 24 、配列番号 26 、配列番号 28 、配列番号 30 、配列番号 32 および配列番号 34 にそれぞれ示す、 G タンパク質免疫原フラグメント融合タンパク質（即ち、チオレドキシンまたはヘキサヒスチジン標識に融合している）をコードする。または、コドン至適化は、一次アミノ酸配列における 1 つまたはそれ以上の変化、例えば、保存的アミノ酸置換、付加、欠失およびそれらの組合せを生じ得る。

10

20

30

【 0044 】

R S V 免疫原をコードする分離核酸の特定の態様を配列番号 1 、配列番号 3 、配列番号 5 、配列番号 7 、配列番号 9 、配列番号 11 、配列番号 13 、配列番号 15 、配列番号 17 、配列番号 19 、配列番号 21 、配列番号 55 、配列番号 57 、配列番号 59 、配列番号 61 、配列番号 63 、配列番号 65 、配列番号 67 または配列番号 69 に示すが、本発明の開示において、 1 つまたはそれ以上の分離核酸についての記載は、これらの配列の変異体を包含し、該変異体は、配列番号 2 、配列番号 6 、配列番号 8 、配列番号 10 、配列番号 12 、配列番号 14 、配列番号 16 、配列番号 18 、配列番号 20 、配列番号 22 、配列番号 56 、配列番号 58 、配列番号 60 、配列番号 62 、配列番号 64 、配列番号 66 、配列番号 68 または配列番号 70 の R S V ポリペプチドに含有される少なくとも 1 つの G タンパク質エピトープに類似した構造を有し、それに対する特異的抗体を誘発する類似した機能的能力を有する天然または非天然 R S V ポリペプチドをコードするという点で実質的に類似している。本明細書に使用されるヌクレオチド配列は、下記の場合に「実質的に類似している」と考えられる：（ a ）ヌクレオチド配列が、 R S V G タンパク質遺伝子（例えば、本明細書に記載する配列の部分または配列の相同異形を包含する）のコード領域から誘導され、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発する実質的に同じ能力を有する G タンパク質エピトープを含有する場合；（ b ）ヌクレオチド配列が、中度または高度厳密条件下に、本発明のヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションすることができる場合；（ c ）遺伝暗号の結果として、ヌクレオチド配列が縮重して（即ち、異なるコドン配列を使用して同じアミノ酸をコードする配列）、（ a ）または（ b ）に定義されるヌクレオチド配列に生じる場合；または（ d ）（ a ）、（ b ）または（ c ）に定義されるいずれかの配列に相補的である場合。

30

40

【 0045 】

本明細書に使用されるように、実質的に相補的な核酸配列間に安定なハイブリッドが形成される場合、 2 つのヌクレオチド配列は、特定厳密条件下に「ハイブリダイズしている」と考えられる。ハイブリダイゼーションの厳密性は、ハイブリッドをアニールし洗浄する際の環境（即ち、アニールしたハイブリッドが、ハイブリダイズした状態またはアニールした状態を維持する条件）を説明するものであり、変化するイオン強度および温度を一般に包含する。ハイブリダイゼーションに作用し得る他の要因は、ハイブリッドを形成させるプローブの大きさおよび時間を包含する。例えば、「高度」、「中度」、「低度」厳密性は、下記の条件またはそれと同等の条件を包含する：高度厳密性は $0.1 \times S S P E$ または S S C 、 $0.1 \% SDS$ 、 65 であり；中度厳密性は $0.2 \times S S P E$ または S S C 、 $0.1 \% SDS$ 、 50 であり；低度厳密性は $1.0 \times S S P E$ または S S C 、 $0.1 \% SDS$ 、 50 である。本明細書に使用される「高度厳密条件」は、配列間に少なくとも 95 % 、好ましくは少なくとも 97 % の同一性が存在する場合にのみ、 1 つまた

50

はそれ以上の配列がハイブリダイズされた状態を維持することを意味する。好ましい態様において、Gタンパク質免疫原をコードする核酸分子にハイブリダイズした状態を維持する核酸配列は、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70のいずれか1つのGタンパク質免疫原の少なくとも1つのエピトープを保持し、免疫病理学的応答を示さずに、または免疫病理学的応答を減少させて、防御免疫応答を誘発する実質的に同じ能力を有するエピトープを有する。

【0046】

本発明のRSVポリペプチドを製造する方法も提供し、該方法において、本明細書に記載する任意の核酸分子および宿主細胞を使用し得る。好ましい態様において、Gタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体（免疫病理学的応答を示さずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発する少なくとも1つのエピトープを有する）を製造する方法は、RSVポリペプチド、例えば、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70のいずれか1つに示すRSV Gタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体をコードする核酸分子に操作可能に連結された少なくとも1つの発現制御配列を含む核酸発現ベクターを含有する宿主細胞を、ポリペプチドの発現に充分な条件および時間において、培養することを含む。1つの態様において、RSV Gタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体をこの方法で製造し、より好ましくは、製造されたRSVポリペプチドが、配列番号2、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70に示すアミノ酸配列を含み、さらに好ましくは、製造されたRSVポリペプチドが、配列番号6、配列番号56または配列番号58に示すアミノ酸配列を含む。

【0047】

特定の態様において、多価ワクチンが考えられる。例えば、そのような多価組成物は、2つまたはそれ以上の種々のGタンパク質免疫原の組合せ、または1つまたはそれ以上のGタンパク質免疫原と1つまたはそれ以上の他のRSV免疫原（例えば、Fタンパク質またはMタンパク質免疫原）との組合せを含んでよい。抗原の組合せは、カクテル（即ち、複数の異なる免疫原の混合物）として配合するか、またはその組合せは、接合、連結または融合させた（化学的または組換的）複数の異なる免疫原であってもよい。さらに、融合免疫原は、多価融合タンパク質内で少なくとも1回反復している1つまたはそれ以上の免疫原を有してよく、該反復は、選択された多価免疫原ポリペプチドのアミノ末端、カルボキシ末端、内部位置、多位置、またはそれらの任意組合せに存在してよい。例えば、そのような多価ハイブリッドRSV免疫原は、Gタンパク質の1つまたはそれ以上のペプチドフラグメント、およびRSVのFタンパク質またはMタンパク質の1つまたはそれ以上のペプチドフラグメント、およびそれらの任意組合せを含んでよい。特定の態様において、そのような多価ハイブリッドRSV免疫原ワクチン組成物は、種々のRSV抗原群からの免疫原性エピトープ、例えば、サブグループAウイルス（例えば、LongおよびA2）またはサブグループBウイルス（例えば、CH-18537および8/60）からの免疫原、またはサブグループAおよびBウイルスの両方からの免疫原（または、例えばヒトに感染すること見出されている他のあらゆるRSVサブグループ）を組み合わせてよい。

【0048】

いくつかの態様において、RSV免疫原を、例えば、制限酵素認識部位である核酸配列によってコードされる少なくとも2つのアミノ酸によって連結してよく、該制限部位は、BamHI、ClaI、EcoRI、HindIII、KpnI、NcoI、NheI、

10

20

30

40

50

P m l I 、 P s t I 、 S a l I 、 X h o I 等のいずれか 1 つまたはそれ以上であってよい。当分野において既知であり、本明細書に記載するように、付加的アミノ酸リンカーも合成的に付加してよい。好ましくは、付加的アミノ酸は、ヒトタンパク質の 5 アミノ酸ストレッチ (s t r e t c h) を含む配列においていかなる同一性も形成せず、それによって、ヒト組織交差反応抗体を誘発する可能性を最小限にする。さらに、本発明のハイブリッドポリペプチドは、少なくとも 1 つの付加的カルボキシ末端アミノ酸をさらに含んでよく、該付加的アミノ酸は D - または L - アミノ酸である。20 の天然アミノ酸またはその誘導体のいずれか、例えば、システイン、ヒスチジン、ロイシンおよびグルタミン酸を添加し得る。例えば、システインの添加は、脂質、キャリアタンパク質、標識、酵素等のような他の成分を結合させる（例えば、酵素的に、または化学架橋による）のに有用な場合がある。

10

【 0 0 4 9 】

本明細書に記載するように、本発明は、 R S V 免疫原融合タンパク質も提供し、該融合タンパク質は、例えば、ハイブリッドポリペプチド融合タンパク質の検出、分離および精製を可能にする、付加的な機能性または非機能性ポリペプチド配列に融合した、 G タンパク質免疫原またはそのフラグメントを含む。例えば、付加的な機能性ポリペプチド配列は標識配列であってよく、それは、特定の態様において、タンパク質 - タンパク質親和（例えば、受容体 - リガンド）、金属親和または電荷（ c h a r g e ）親和法によって検出、分離または精製される融合タンパク質を包含する。他の特定の態様において、ハイブリッドポリペプチド融合タンパク質を、プロテアーゼ認識配列を含む配列を有する融合タンパク質の特異的プロテアーゼ開裂によって検出でき、それによって、ハイブリッドポリペプチドを付加的ポリペプチド配列から分離し得る。さらに、融合タンパク質のアミノ末端、カルボキシ末端または内部位置（非末端）に存在し得る付加的アミノ酸、キャリアタンパク質、疎水性部分または成分（例えば脂質）または標的配列を含むハイブリッドポリペプチドを、合成的に製造し得る。特に好ましい態様において、例えば、組換え R S V 免疫原を標識にインフレーム融合させ、該タグは、アルカリホスファテーゼ、チオレドキシン（ T r x ）、 - ガラクトシダーゼ、ヘキサヒスチジン（ 6 x - H i s ）、 F L A G (登録商標) エピトープ標識（ D Y K D D D D K 、配列番号 7 1 ）、 G S T 等のいずれか 1 つ、およびそれらの任意組合せであってよい。

20

【 0 0 5 0 】

好ましい態様は、ハイブリッドポリペプチドの親和検出および分離を促進し、例えば、ポリ - H i s または米国特許第 5 , 0 1 1 , 9 1 2 号および H o p p ら（ 1 9 8 8 , B i o / T e c h n o l o g y 6 : 1 2 0 4 ）に記載されている規定（ d e f i n e d ）抗原ペプチドエピトープ、または X P R E S S TM エピトープ標識（ D L Y D D D D K 、配列番号 7 2 ; I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ）またはチオレドキシンを含んでよい、ハイブリッドポリペプチド融合タンパク質を包含する。親和配列は、ベクターによって供給されるヘキサ - ヒスチジン標識であってよい。例えば、 p B A D / H i s (I n v i t r o g e n) 、 p E T ベクター (I n v i t r o g e n) または p Q E ベクター (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) は、ニッケル親和カラムを使用して、細菌のような特定の宿主から成熟タンパク質融合体の精製するためのポリヒスチジン標識を提供することができる。または、 R S V の免疫原ペプチドをコードする核酸配列を組換えて生成する（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を使用）のに使用されるプライマーに、親和配列を合成的にまたは遺伝子工学的に付加し得る。任意の前記 G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体、およびその融合タンパク質は、アミノ末端またはカルボキシ末端に接合、連結または融合された（化学的または組換的）疎水性部分（アンカーまたはフット）も任意に有してよい。代表的な疎水性成分は、少なくとも 5 個のアミノ酸のアミノ酸配列、例えば、 M F L L A V F Y G G (配列番号 3 5) または G G Y F V A L L F (配列番号 3 6) 、または脂質を包含する。

40

【 0 0 5 1 】

特定の態様において、 R S V 免疫原をチオレドキシンまたはポリヒスチジン標識に融合

50

させ、それは、そのような融合タンパク質をコードする組換え核酸配列によってコードされる。好ましい態様において、R S V G タンパク質免疫原フラグメントをチオレドキシンおよびポリヒスチジンに融合させ、それは、配列番号 2 3 または 2 5 に示す核酸配列によってコードされる。チオレドキシンおよびポリヒスチジン標識に融合させた R S V G タンパク質免疫原フラグメントの例示的アミノ酸配列は、配列番号 2 4 および 2 6 に示されている。関連した態様において、配列番号 2 7 、 2 9 、 3 1 または 3 3 に示す配列に見られるような、 G 免疫原融合タンパク質に連結または融合した疎水性成分またはフットをコードする核酸配列をさらに含む R S V G タンパク質免疫原融合タンパク質をコードする核酸配列を提供する。チオレドキシンおよびポリヒスチジン標識に融合し、疎水性部分またはフットをさらに含む、 R S V G タンパク質免疫原グラグメントの例示的アミノ酸配列を、配列番号 2 8 、配列番号 3 0 、配列番号 3 2 および配列番号 3 4 に示す。好ましい態様において、疎水性成分は、融合タンパク質のアミノ末端に融合した M F L L A V F Y G G (配列番号 3 5) 、または融合タンパク質のカルボキシ末端に融合した G G Y F V A L L F (配列番号 3 6) のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 2 】

融合タンパク質は、 G タンパク質免疫原またはそのフラグメントのアミノ末端またはカルボキシ末端に融合した疎水性成分を含んでよい。または、融合タンパク質は、リンカー (例えば、 1 個またはそれ以上、好ましくは 2 個または 4 個のアミノ酸) に融合した疎水性部分を含んでもよく、次に、これが、 G タンパク質免疫原またはそのフラグメントのアミノ末端またはカルボキシ末端に融合される。さらに他の態様において、融合タンパク質は、 1 つまたはそれ以上のアミノ酸配列 (例えば、チオレドキシンまたはポリヒスチジンのような標識) に融合した疎水性成分を含んでもよく、次に、これが、 G タンパク質免疫原またはそのフラグメントのアミノ末端に融合されるか ; または、融合タンパク質は、 G タンパク質免疫原またはそのフラグメントのアミノ末端に融合した 1 つまたはそれ以上のアミノ酸配列 (例えば、チオレドキシンまたはポリヒスチジンのような標識) を含んでもよく、次に、これが、疎水性部分に融合される。当業者に理解されるように、本発明の融合タンパク質は、 1 つまたはそれ以上の G タンパク質免疫原またはそのフラグメントおよび変異体、 1 つまたはそれ以上のリンカー、 1 つまたはそれ以上の付加的アミノ酸標識配列、 1 つまたはそれ以上の疎水性部分、またはそれらの任意組合せを含有するように構成し得る。

【 0 0 5 3 】

(治療配合物および使用法)

本発明は、 1 つまたはそれ以上の R S V 免疫原を含有する医薬組成物にも関し、該組成物を使用して、免疫病理学的応答を伴わずに、または免疫病理学的応答を少なくとも減少させて、免疫反応を誘発し得る。本発明は、 R S V 感染を治療および予防する方法にも関し、該方法は、本明細書に記載する R S V に特異的な抗体を誘発するのに充分な用量で、 G タンパク質免疫原またはそのフラグメントおよび変異体、融合タンパク質、多価免疫原、またはそのような免疫原の混合物を、被験体に投与することによって行われる。 G タンパク質免疫原またはそのフラグメントおよび変異体、またはそのような免疫原のカクテルは、本発明の方法に使用される場合に、薬学的に受容可能な組成物の一部であるのが好ましい。

【 0 0 5 4 】

背景として、動物またはヒト被験体の自然または実験感染は、 G タンパク質を認識する C D 8⁺ C T L 免疫反応を誘発しないと考えられ、これに対して、 F タンパク質は C D 8⁺ C T L 免疫反応を誘発する。従って、本明細書に記載する G および F 複合 R S V 抗原ワクチンは、有害なまたは好ましくない病理学的増殖性リンパ球反応を誘発せずに、またはそれを減少させて、 C D 4⁺ および C D 8⁺ 防御免疫応答の両方を誘発すると考えられる。さらに、 R S V 抗原と組み合わしたプロテオソーム技術に基づく成分の使用は、 R S V 抗原に対して生じる免疫反応における、主要 2 型反応から選択的 1 型反応へのシフト (当業者に既知のサイトカインプロフィールによって決定) に影響を与え、それによって

10

20

30

40

50

、本発明のワクチンまたは医薬組成物での免疫化後に、望ましくない好酸球性反応、望ましくないIgE反応またはそれらの両方を統計的有意に除去または減少させる。例えば、RSV Fタンパク質の1つまたはそれ以上のMHCクラスI CD8⁺免疫原性エピトープと、RSV Gタンパク質に含有される1つまたはそれ以上のCD4⁺MHCクラスI免疫原性エピトープとを組み合わせる。

【0055】

当分野で知られているように、RSV免疫原への最初の暴露時におけるサイトカイン発現およびCD4⁺リンパ球活性化のパターンは、後の暴露に対する免疫反応のパターンに影響を与える。従って、本発明の免疫原性組成物は、呼吸器疾患および好酸球増加症に対する防御と共に、RSV感染に関連した小児喘息に対する防御に有効であると考えられる。1つの好ましい態様において、例えば、本発明のワクチンは、RSV感染の病理学的結果に対して防御するかまたはそれを緩和する免疫反応を誘発することができ、それと同時に、共通のアレルゲンに対する後のIgE抗体反応を除去するかまたは減少させる。

【0056】

特定の態様において、本発明は、プロテオソームまたはリポソームと共に配合した呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原を含む組成物を提供し、該Gタンパク質免疫原は、配列番号2に少なくとも80%同一のアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、該Gタンパク質免疫原またはそのグラグメントは、病理学的反応を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する。1つの態様は、配列番号2に示すアミノ酸配列を含むか、または配列番号2から成る、Gタンパク質免疫原である。他の好ましい態様は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70、より好ましくは、配列番号6、配列番号56または配列番号58から選択されるアミノ酸配列を含むGタンパク質免疫原である。好ましくは、1つまたはそれ以上のRSV免疫原を含有するように配合したリポソームが、Deinococcus radiodurans脂質または-L-ガラクトシルホスホジルグリセロアルキルアミンをさらに含む。リポソームにおけるそのような脂質の付加は、防御免疫性を増加させ有害な好酸球増加を抑制することによって、RSVワクチン組成物の有効性を増強させることができる（例えば、HuangおよびAnderson, Vaccine 20:1586, 2002参照）。

【0057】

本発明の呼吸器合胞体ウイルス免疫原は、共有結合疎水性成分をさらに含有し得る。疎水性成分は、例えば、米国特許第5,726,292号に開示されているように、アミノ酸配列または脂質であってよい。特定の態様において、疎水性成分は、免疫原のアミノ末端に融合したMFLLAVFYGG（配列番号35）、または免疫原のカルボキシ末端に融合したGGYFVALLF（配列番号36）のアミノ酸配列である。天然RSV Gタンパク質は、疎水性膜内外アミノ酸配列を含有し、該配列は、本発明の疎水性成分として機能し得る。1つの態様において、本発明のRSV組成物（例えば、ワクチン組成物）は、プロテオソームまたはプロトリンと共に配合された、本明細書に記載するようなRSV

Gタンパク質免疫原またはそのフラグメントを含む。プロテオソームまたはプロトリンと共に配合する場合、Gタンパク質免疫原は疎水性成分をさらに含むのが好ましく、該疎水性成分は、疎水性アミノ酸配列または脂質（本明細書に使用される脂質は、溶解特性を意味し、従って、アルキル、アリールアルキル、アリール、脂肪酸、グリセリドおよびグリセリルエーテル、ホスホリピド、スフィンゴリピド、長鎖アルコール、ステロイド、ビタミン等を包含する）から成ってよい。特定の態様において、疎水性成分を含有するかまたは含有しないGタンパク質免疫原は、第二アミノ酸配列をさらに含有して融合体を形成してもよく、該第二アミノ酸配列は、本明細書に記載するように、標識、キャリア、酵素またはそれらの組合せである。本発明の1つの好ましいRSVワクチンは、高免疫原性でありウイルス増殖を免疫中和することができる非感染性RSVポリペプチドまたはそのフ

10

20

30

40

50

ラグメントを含むことができる。本発明の好ましい態様において、そのようなRSVサブユニットワクチンは、ワクチン接種した被験体、例えばヒトまたは動物における好ましくない免疫病理学的副作用（例えば、好酸球増加症または喘息）を減少させるか有さない。

【0058】

医薬組成物は、1つまたはそれ以上のRSV免疫原またはその融合タンパク質および任意に他の成分に加えて、薬学的に受容可能な賦形剤、キャリア、希釈剤または添加剤の少なくとも1つを含有するのが好ましい。例えば、Gタンパク質免疫原またはその融合タンパク質、または2つまたはそれ以上のGタンパク質のカクテルまたはその融合タンパク質、またはG、FおよびM免疫原のカクテルまたはその融合タンパク質の組成物に使用するのに好適な薬学的に受容可能なキャリアは、例えば、粘稠化剤、緩衝剤、溶剤、保湿剤、防腐剤、キレート剤、アジュバント等およびそれらの混合物を包含する。

【0059】

例示的アジュバントは、ミョウバン（水酸化アルミニウム、REHYDRAGEL（登録商標）、磷酸アルミニウム、LPS（プロトリン）を含有するかまたはLPSを含有しないプロテオソームアジュバント（例えば、米国特許第5,726,292号および第5,985,284号、および米国特許出願公開第2001/0053368号および第2003/0044425号参照）、ビロゾーム、Lipid A含有および非含有リポソーム、Detox（Ribix/Corixa）、MF59、または他の油性および水性エマルジョン型アジュバント、例えばナノエマルジョン（例えば、米国特許第5,716,637号参照）およびサブミクロンエマルジョン（例えば、米国特許第5,961,970号参照）、およびフロインド完全および不完全アジュバントを包含する。治療用途の薬学的に受容可能なキャリアは、製薬分野でよく知られており、本明細書、および、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaroら, 第18版, 1990) およびCRC Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients, CRC Press LLC (S.C. Smolinski編, 1992) に記載されている。

【0060】

特定の態様において、Gタンパク質免疫原およびそのフラグメントおよび変異体（融合タンパク質および多価組成物を包含する）を、プロテオソームを使用して配合する。本明細書に使用される「プロテオソーム」または「プロジュバント」は、ナイセリア種のようなグラム陰性細菌からの外膜タンパク質（OMP、ポーリンとしても既知）の調製物を意味し（参照：例えば、Lowellら, J. Exp. Med. 167:658, 1988; Lowell, Science 240:800, 1988; Lynchら, Biophys. J. 45:104, 1984; Lowell, 「New Generation Vaccines」第2版, Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, p. 193, 1997; 米国特許第5,726,292号；米国特許第4,707,543号）、これらは、細菌またはウイルス抗原のような免疫原用のキャリアまたはアジュバントとして有用である。プロテオソームは、疎水性であり、ヒトへの使用に安全であり、ある種のウイルスに比較し得る大きさである。プロテオソームは、20~80nmの小胞または小胞状OMPクラスターに自己集合し、タンパク質抗原（Ag's）、特に疎水性成分を有する抗原に、非共有結合的に、組み込まれるか、配位結合するか、会合するか（例えば、静電気的または疎水的）または共同する興味深い能力を有する。小胞形態または小胞状形態の外膜タンパク質成分（多分子膜状構造物、または1つまたはそれ以上のOMPの溶融球状OMP組成物を包含する）を生じるあらゆる製造法が、プロテオソームの定義に含まれる。プロテオソームは、例えば、文献に記載されているように製造し得る（米国特許第5,726,929号または第5,985,284号参照）。

【0061】

特定の態様において、Gタンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体（融合

10

20

30

40

50

タンパク質および多価組成物を包含する)を、プロトリンを使用して配合する。本明細書に使用される「プロテオソーム：LPS」または「プロトリン」(「IVX-908」としても既知)は、OMP-LPS組成物(免疫刺激組成物として機能し得る)を得るために、少なくとも1種類のリポサッカリドと本明細書に記載のように混合したプロジェクトの調製物を意味する。従って、OMP-LPSアジュバントは、プロトリンの2つの基本成分から構成することができ、それは(1)Neisseria meningitidisのようなグラム陰性細菌から調製されるプロテオソーム(即ち、プロジェクト)の外膜タンパク質調製物、および(2)1つまたはそれ以上のリポサッカリドの調製物、を包含する。プロトリンの成分は、脂質、糖脂質、糖タンパク質、小分子等であってよいか、またはそれらを含有してよいとも考えられる。プロトリンは、例えば、米国特許出願公開第2003/0044425号に記載のように製造し得る。

10

【0062】

プロジェクトは一般に、天然、修飾または補足的疎水性成分または部分(「フット」または「アンカー」とも称される)を有する抗原(天然または修飾)と共に使用される。プロトリン(外因的に付加されたLPS含有)を、疎水性フットドメインを含有せず、性質上ほぼ親水性の抗原と共に使用することもできる。プロトリンは、疎水性フットを含有する抗原、疎水フットを含有しない抗原、または疎水性部分またはフットを含有する抗原と含有しない抗原との組合せと、混合するかまたは組み合わせることができる。

【0063】

本明細書に使用される「リポサッカリド」(例えば、プロトリンの製造に使用されリポサッカリド)は、下記の細菌に由来する天然(分離、または天然構造物を使用して合成的に製造)または修飾リポポリサッカリドまたはリポオリゴ糖(集合名詞的に、「LPS」とも称される)を意味する:グラム陰性細菌、例えばShigella FlexneriまたはPlesiomonas shigelloides、または他のグラム陰性細菌、例えば、Alcaligenes、Bacteroides、Bordetella、Borrellia、Brucella、Campylobacter、Chlamydia、Citrobacter、Edwardsiella、Ehrlichia、Enterobacter、Escherichia、Francisella、Fusobacterium、Gardnerella、Hemophilus、Helicobacter、Klebsiella、Legionella、Leptospira(Leptospira interrogansを包含)、Moraxella、Morganella、Neisseria、Pasteurella、Proteus、Providencia、他のPlesiomonas、Porphyromonas(Porphyromonas gingivalisを包含)、Prevotella、Pseudomonas、Rickettsia、Salmonella、Serratia、他のShigella、Spirillum、Veillonella、VibrioまたはYersinia種。リポサッカリドは無毒化形態(即ち、脂質A核が除去されている)であってもよく、または無毒化していない形態であってもよい。本発明において、リポサッカリドは無毒化する必要はなく、無毒化しないのが好ましい。

20

30

30

【0064】

OMP-LPSアジュバントの2つの成分を特定の初期比率で配合して、成分間の相互作用を至適化し、それによって、本発明の免疫原性組成物の製造に使用される成分の安定な会合および配合を生じ得る。該方法は、透析、好ましくはダイアフィルトレーション/限外濾過法によって界面活性剤の量を所定の好ましい濃度に減少させながら、選択した界面活性剤溶液(例えば、Empigen(登録商標)BB、Triton(登録商標)X-100、またはMega-10)中で成分を混合し、次に、OMPおよびLPS成分の錯化を行うことを一般に含む。2つの成分の混合、共沈または凍結乾燥を使用して、適切かつ安定な会合または配合を得ることもできる。好ましい態様において、免疫原性組成物は、1つまたはそれ以上のGタンパク質免疫原、およびアジュバントを含んでよく、該アジュバントは、プロジェクト(即ち、プロテオソーム)およびリポサッカリドを含む。

40

50

【0065】

特定の態様において、全プロテオソームタンパク質の重量%として示すリポサッカリド最終含有量は、約1%～約500%、より好ましくは約10%～約200%、または約30%～約150%である。他の態様は、プロテオソームを*Neisseria meningitidis*から製造し、リポサッカリドを*Shigella flexneri*または*Plesiomonas shigelloides*から製造し、最終リポサッカリド含有量が全プロテオソームタンパク質の50wt%～150wt%であるアジュバントを含有する。他の態様において、全OMPの約0.5%～約5%の内因性リポオリゴ糖(LOS)含有量を有するプロテオソームを製造する。本発明の他の態様は、全OMPの約12%～約25%、好ましい態様においては約15%～約20%の内因性リポサッカリドを含有するプロテオソームを提供する。本発明は、プロテオソームの由来と同じグラム陰性細菌種であるかまたは異なる細菌種である任意のグラム陰性細菌種に由来するリポサッカリドを含有する組成物も提供する。10

【0066】

特定の態様において、免疫原性組成物における、(プロテオソームまたはプロトリン)/(Gタンパク質免疫原)の比率は、1:1より大、2:1より大、3:1より大、または4:1より大である。この比率は、8:1またはそれ以上であってもよい。他の態様において、免疫原性組成物の(プロテオソームまたはプロトリン)/(コロナウイルス抗原)の比率は、約1:1～約1:500、好ましくは、その比率は少なくとも1:5、少なくとも1:10、少なくとも1:20、少なくとも1:50、または少なくとも1:100である。(プロトリン)/(Gタンパク質免疫原)比率1:2～1:200の利点は、免疫反応を誘発するGタンパク質免疫原の能力に有意な影響を与えずに、プロテオソームに基づくアジュバントの量を顕著に減少し得ることである。20

【0067】

本明細書に記載される「薬学的に受容可能な塩」は、本発明化合物と、有機または無機酸(酸付加塩)または有機または無機塩基(塩基付加塩)との組合せから誘導される本発明化合物の塩を意味する。本発明化合物は、遊離塩基または塩の形態で使用してよく、両形態は、本発明の範囲に含まれるものとする。

【0068】

さらに、本発明の医薬組成物は、希釈剤または賦形剤、例えば水または磷酸緩衝生理食塩水(PBS)をさらに含有し得る。好ましくは、希釈剤または賦形剤は、最終磷酸濃度約0.1mM～約1M、より好ましくは約0.5mM～約500mM、さらに好ましくは約1mM～約50mM、最も好ましくは約2.5mM～約10mMを有するPBSであり；最終塩濃度は、約100mM～約200mM、最も好ましくは約125mM～約175mMである。好ましくは、最終PBS濃度は、約5mM磷酸および約150mM塩(例えばNaCl)である。特定の態様において、本明細書に記載するいずれかのRSV免疫原またはRSV免疫原カクテルを含む本発明の医薬組成物は、滅菌されている。30

【0069】

組成物は、それらを無菌環境下で製造することによって滅菌することができ、または当分野で使用される方法によってそれらを定期に滅菌することができる。多くの医薬は滅菌状態に製造され、この基準はU.S.P. XXII<1211>によって規定されている。この態様における滅菌は、工業において承認されU.S.P. XXII<1211>に示されている多くの方法(ガス滅菌、電離放射または濾過を包含する)によって行われる。滅菌は、これもU.S.P. XXII<1211>に規定されている無菌処理と称される方法によって維持し得る。ガス滅菌に使用するのに許容されるガスは、エチレンオキシドを包含する。電離放射に使用するのに許容される放射線種は、例えばコバルト60源からの線、および電子線を包含する。線の一般的な線量は、2.5MRadである。適切であれば、好適な孔径、例えば0.22μm、および好適な材料、例えばTeflon(登録商標)のフィルターを使用して濾過を行ってよい。「U.S.P.」という用語は、米国薬局方を意味する(www.usp.org; Rockville, MD参照)。40

【0070】

本発明は、RSV感染を治療または予防する方法にも関し、該方法は、配列番号2と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原またはそのフラグメント（該Gタンパク質免疫原は、免疫病理学的応答を誘発せずに、または免疫病理学的応答を減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する）、および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含む組成物を、1つまたはそれ以上のGタンパク質免疫原またはそのフラグメントに特異的な免疫反応を誘発するのに充分な用量で、それを必要とする被験体に投与することを含む方法である。特定の態様において、感染が、RSVのサブグループA、サブグループB、またはサブグループAおよびBの両方による。特定の好ましい態様において、本明細書に記載する任意の組成物および方法に使用されるGタンパク質免疫原は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70、より好ましくは配列番号6、配列番号56または配列番号58に示すアミノ酸配列を有する。

10

【0071】

本発明は、RSV感染に関連した免疫病理学的応答のリスクを減少させる方法にも関し、該方法は、配列番号2と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原またはそのフラグメント（該Gタンパク質免疫原は、免疫病理学的応答を誘発せずに、または免疫病理学的応答を減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する）、および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含む組成物を、1つまたはそれ以上のGタンパク質免疫原またはそのフラグメントに特異的な免疫反応を誘発するのに充分な用量で、それを必要とする被験体に投与することを含む方法である。特定の態様において、感染が、RSVのサブグループA、サブグループB、またはサブグループAおよびBの両方による。特定の好ましい態様において、本明細書に記載する任意の組成物および方法に使用されるGタンパク質免疫原は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70、より好ましくは配列番号6、配列番号56または配列番号58に示すアミノ酸配列を有する。

20

【0072】

RSV免疫原配合物での治療に適した被験体は、疾患を発症するリスクの充分に確立した指標によるか、または存在する疾患の充分に確立した特徴によって同定し得る。例えば、感染の指標は、発熱、膿、微生物陽性培養物（microorganism positive cultures）、炎症等を包含する。本発明のRSV免疫原ワクチンで治療または予防し得る感染は、その感染が一次、二次、日和見などにかかわらず、RSVによって生じたまたはそれに起因する感染を包含する。RSVの例は、これらのウイルスのあらゆるサブタイプ、株、抗原変異体などを包含する。予防目的のために、例えば、RSVに感染するいくつかの既知の危険因子は、早産、慢性肺疾患を有する小児、デイケアに通っている小児、家庭における学童期兄弟姉妹の存在、家庭における受動煙への暴露、および免疫無防備状態の被験体（成人および小児）を包含する。

30

【0073】

本発明の1つまたはそれ以上のRSV免疫原を含有する医薬組成物は、組成物を被験体、例えばヒトまたは動物に、投与することを可能にするどのような形態であってもよい。例えば、本発明のGタンパク質免疫原、融合タンパク質および多価組成物を、液体溶液として製造し投与してもよく、または固体形態（例えば、凍結乾燥）として製造し、これを固体形態で投与するか、または投与に関して液体に再懸濁してもよい。ハイブリッドポリペプチド組成物を、それに含有される活性成分が被験体または患者への組成物の投与時に生物学的に利用可能であるように、または徐放出によって生物学的に利用可能であるよう

40

50

に、配合し得る。被験体または患者に投与される組成物は1つまたはそれ以上の投与単位の形態を取り、その場合、例えば、錠剤が单一投与単位であってよく、エーロゾル形態の1つまたはそれ以上の本発明化合物の容器が複数の投与単位を含有してよい。特定の好ましい態様において、本発明のRSV免疫原または免疫原カクテルを含む本発明の任意医薬組成物を、容器、好ましくは滅菌容器に入れる。

【0074】

1つの態様において、治療組成物を経鼻投与し、その場合、細胞、例えば、鼻に関連したリンパ組織に存在する細胞が、本発明のRSV免疫原またはカクテル組成物を受け取ることができる。他の一般的な投与経路は、経腸、非経口、経皮／経粘膜、経鼻および吸入を包含するがそれらに限定されない。本明細書に使用される「経腸」という用語は、免疫原性組成物が胃腸管または口腔粘膜から吸収される投与経路であり、経口、直腸および舌下投与を包含する。本明細書に使用される「非経口」という用語は、胃腸管を通らない投与経路を意味し、動脈内、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、静脈内、皮下、粘膜下および臍内注射または注入法を包含する。本明細書に使用される「経皮／経粘膜」という用語は、免疫原性組成物が皮膚を介してまたは通って投与される投与経路であり、局所投与を包含する。「経鼻」および「吸入」という用語は、免疫原性組成物が呼吸樹に導入される投与法を意味し、肺内または経肺投与を包含する。好ましくは、本発明の組成物は経鼻投与される。

【0075】

他の態様において、少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原またはそのフラグメントを含む本発明組成物を、予防法に使用できる。例えば、本発明のRSV免疫原またはカクテル組成物を、妊娠中の母親に投与して、母親のRSV感染を防止し、胎児または新生児に受動免疫を与え得る。予防法は、第一被験体に、RSV免疫原および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含む組成物を投与し、次に、第二被験体に、少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルス免疫原を含む第二組成物を投与することを含んでよく；該第一組成物は、第二被験体に投与されるのと異なるRSV免疫原を含み、該第二組成物は、配列番号2と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する少なくとも1つの呼吸器合胞体ウイルスGタンパク質免疫原またはそのフラグメント、および薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含み；該Gタンパク質免疫原は、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する。特定の態様において、予防に使用されるGタンパク質免疫原は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68または配列番号70、より好ましくは配列番号6、配列番号56または配列番号58に示すアミノ酸配列を有することができる。

【0076】

代表的な第一被験体は、妊娠中の母親であり、代表的な第二被験体はその母親の新生児である。各組成物は、1つまたはそれ以上のRSV免疫原（例えば、本明細書に開示するGタンパク質免疫原）に特異的な免疫反応を誘発するのに充分な用量で投与される。理論に縛られるものではないが、例えば、RSVへの暴露により母親が既に有している抗体と同様のIgG抗体を誘発し得るGタンパク質免疫原およびその組成物を、母親に全身的に（例えば、静脈内）投与することができる。次に、粘膜を介して（例えば、鼻腔内）、新生児を免疫化することができ、これは分泌型IgA抗体を誘発し、従って、IgG抗体が粘膜境界面に存在しないので、粘膜を介して投与されたGタンパク質免疫原は、新生児が受け継いだ全身性母系（IgG）抗体によって検出されない。即ち、母系的に受け継がれた抗体は、新生児の鼻腔内免疫化によって誘発されるIgA反応に不利な影響を与えない。特定の態様において、投与された組成物は、RSVのサブグループA、サブグループB、またはサブグループAおよびBの両方による感染を予防し得る。RSV免疫原配合物での処置に適した被験体は、本明細書に記載し当分野で既知であるような、疾患を発症する

10

20

30

40

50

リスクの充分に確立した指標によるか、または存在する疾患の充分に確立した特徴によって同定し得る。本発明の RSV 免疫原で治療し得る感染は、RSV によって生じたまたはそれに起因する感染を包含する。RSV の例は、これらのウイルスのあらゆる株、サブタイプ、抗原変異体などを包含する。

【0077】

本発明は、RSV 感染の予防法によって生じる複数の抗体も提供し、該方法は、1つまたはそれ以上の RSV 免疫原に特異性の抗体を誘発するのに充分な用量で、本発明の組成物を被験体に投与することを含み、該 G タンパク質免疫原は、免疫病理学的応答を誘発せずに、またはそれを減少させて、防御免疫応答を誘発するエピトープを有する。1つの態様において、抗体は、サブグループ A RSV、またはサブグループ B RSV、またはサブグループ A および B RSV の両方に特異性の、少なくとも1つの抗体を含む。他の態様において、RSV 感染を治療または予防する方法が、アジュバンドを含有するかまたは含有しない薬学的に受容可能なキャリア、および複数の本発明の抗体を含む組成物を、被験体に投与することを含む。

【0078】

さらに、RSV 感染のリスクを有する被験体は、配列番号 2 と少なくとも 80% 同一のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの異なる呼吸器合胞体ウイルス G タンパク質免疫原またはそのフラグメント、および医薬的にされるキャリア、希釈剤または賦形剤を含む本発明組成物の投与前、投与と同時または投与後に投与された、複数の本発明の抗体を有し得る。特定の好ましい態様において、本明細書に記載する任意の組成物および方法に使用される G タンパク質免疫原は、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 5 6、配列番号 5 8、配列番号 6 0、配列番号 6 2、配列番号 6 4、配列番号 6 6、配列番号 6 8 または配列番号 7 0、より好ましくは配列番号 6、配列番号 5 6 または配列番号 5 8 に示すアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、1つまたはそれ以上の RSV 抗原に特異性の抗体を受動的に得ることができる一方で、被験体がワクチン接種を受けて、1つまたはそれ以上の異なる RSV 免疫原に対する抗体を能動的に誘発する。

【0079】

他の局面において、本発明の RSV G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体を使用して、本発明の G タンパク質免疫原およびそのフラグメントまたは変異体に存在する少なくとも1つのエピトープに特異性の抗体を誘発する。従って、本発明は、そのような抗体も提供する。好ましい態様において、抗体が、RSV G タンパク質に存在する特定の防御エピトープに結合する。本発明に関して、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、单一特異性抗体、モノクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、 $F(ab') および $F(ab)$ フラグメントのようなフラグメント、および組換え的または合成的に製造された抗体を包含する。そのような抗体は、モノクローナル抗体が特異的に結合し得るようにする可変領域を組み込んでおり、これは、抗体が、サブタイプ A または B の RSV G タンパク質からのペプチドまたはポリペプチドに選択的に結合できることを意味する。「～に特異性」とは、本発明のサブタイプ A または B からの RSV G タンパク質、またはサブタイプ A または B からの合成 RSV G タンパク質をコードする核酸配列によってコードされるポリペプチドまたはペプチドに選択的に結合する、タンパク質（例えば抗体）の能力を意味する。特定の抗原への抗体の会合または「結合」は、静電的相互作用、水素結合、ファンデルワース相互作用および疎水性相互作用を一般に包含する。これらのいずれか1つまたはそれらの任意組合せが、抗体とその抗原との結合において役割を果たすことができる。そのような抗体は、抗原、例えば、少なくとも 10^4 、好ましくは少なくとも 10^5 、より好ましくは少なくとも 10^6 、さらに好ましくは少なくとも 10^7 、最も好ましくは少なくとも 10^8 の親和力定数 (K_a) を有する G タンパク質免疫原と、一般に会合する。親和力定数は、よく知られている方法を使用して当業者によって求められる (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660-672, 1949 参照)。モノクローナル抗体または抗体の親和力は、当業者によって容易$

10

20

30

40

50

に求められる (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660-672, 1949 参照)。

【0080】

さらに、本明細書に使用される「抗体」という用語は、天然抗体ならびに非天然抗体を包含し、例えば、単鎖抗体、キメラ、二官能性およびヒト化抗体、完全ヒト抗体、ならびにそれらの抗原結合フラグメントである。そのような非天然抗体は、固相ペプチド合成を使用して構成するか、組換え的に製造するか、または、例えば、可変重鎖および可変軽鎖から成る組合せライブラリーをスクリーニングすることによって得られる (Huseら, Science 246: 1275-1281 (1989))。例えば、キメラ、ヒト化、CDRグラフト、単鎖、および二官能性抗体を製造するこれらおよび他の方法は、当分野でよく知られている (WinterおよびHarris, Immunol. Today 14: 243, 1993; Wardら, Nature 341: 544, 1989; HarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1992; Borrabekk, Antibody Engineering, 第2版, Oxford Univ. Press, 1995; Hilyardら, Protein Engineering: A Practical approach, IRL Press, 1992)。

10

20

30

40

50

【0081】

ポリクローナル抗体は、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ニワトリ、シチメンチョウ、ウサギ、マウスまたはラットを包含する種々の温血動物から、当業者によって容易に得ることができる。簡単に言えば、所望のGタンパク質免疫原またはそのフラグメント、またはRSV免疫原の混合物、またはそれらの変異体を、非経口、腹腔内、筋肉内、眼内または皮下注射によって動物に投与して免疫化する。関心のあるハイブリットポリペプチドの免疫原性を、アジュバント、例えば、ミヨウバンおよびフロント完全アジュバントまたは不完全アジュバントの使用によって増加し得る。数週間にわたる数回の追加免疫化後に、血清の少量試料を収集し、所望の免疫原への反応性について試験した。動物の滴定量が、本発明のGタンパク質免疫原への反応性においてプラトーに達したら、毎週の放血によるか、または動物の全採血によって、より多い量のポリクローナル免疫血清を容易に得ることができる。

【0082】

当分野で既知であり本明細書に記載する生体外および生体内アッセイを使用して、本発明のRSV免疫原を容易に同定することができる。代表的なアッセイを実施例に示す。同様に、本明細書に記載するように、いくつかのアッセイを使用して、本発明のRSV免疫原によって誘発される抗体の活性を調査することもできる。

【0083】

本明細書および出願データシートに記載されている全ての米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許刊行物は全体として、本明細書に参照として組み入れられる。記載した本発明および下記の実施例は、本発明を限定するものではなく例示するものである。

【実施例】

【0084】

(実施例1)

(プロテオソームの調製)

本発明の免疫原を、非共有結合的相互作用によってプロテオソームと共に配合して、免疫化したヒトまたは動物被験体において防御免疫応答を誘発させることができるワクチン組成物を形成し得る。本発明のプロテオソームは、例えばグループB2型Neisseria meningitidisから精製した外膜タンパク質を含む粘膜アジュバント輸送賦形剤である。ワクチン配合におけるプロテオソームの使用は、Lowell, G. H., 「New Generation Vaccines」第2版, Marcel Dekker, 1998

kkker, Inc., New York, Basil, Hong Kong (1977) p. 193-206に概説されている。本発明のプロテオソームは、下記のようにして製造し得る：1M塩化カルシウム中の6%Empigen BB (EBB) (AlbrightおよびWilson, Whithaven, UK)の溶液でのフェノール殺菌細菌ペーストの抽出、次に、エタノールでの沈殿、1%EBB-Triis/EDTA-生理食塩水中での可溶化、次に、硫酸アンモニウムでの沈殿。沈殿物を1%EBB緩衝液に再溶解し、透析し、0.1%EBB中において-70で保存する。代替法をプロテオソームの製造に使用してよく、例えば、工程を短縮するために硫酸アンモニウム沈殿を省いて製造してもよい。プロテオソームの製造は、米国特許出願公開第2001/0053368号および米国特許第6,476,201 B1号に開示されている。

10

【0085】

(実施例2)

(リポソームの調製)

免疫化したヒトまたは動物被験体において防御免疫応答を誘発させることができるワクチン組成物として、本発明の免疫原をリポソームに非共有結合的に結合させ得る。当業者に既知の方法によって、例えば、脱水と組み合わした再構成法(dehydration coupled reconstitution method) (KirbyおよびGregoriadis, Biotechnology 2:979, 1984)を使用して、免疫原を多層リポソームで封入し得る。簡単に言えば、リポソームを下記のようにして製造し得る：PBS中の最終脂質濃度30mg/mLのジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC/コレステロール、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 5:1, W/W)の音波処理；または、抗原の存在または不存在下に、HuangおよびAnderson, Vaccine 20:1586, 2002に記載されているDeinococcus radiodurans脂質または-ガラクトシルホスホジルグリセロアルキルアミンを使用するリポソームの生成。1つまたはそれ以上の免疫原を含有するかまたは含有しないリポソームを、凍結乾燥し、滅菌水に再懸濁させる。リポソームに組み込まれていない免疫原は、磷酸緩衝生理食塩水(PBS)中でリポソームを繰り返し洗浄し遠心分離(例えば、13,200rpmで1分間の微細遠心分離)にかけることによって除去し得る。免疫原含有および不含有の洗浄リポソームのタンパク質含有量を、例えば、血清アルブミンのような校正量既知タンパク質標準を使用して定量的銀染色SDS-PAGEによって測定する。リポソームのタンパク質含有量を測定し、所望のように調節し、例えば、タンパク質含有量を0.3mg/mg脂質(リポソームとして)/mLに調節し得る。

20

30

40

【0086】

ある場合には、タンパク質抗原がリポソームと相互作用する仕方を評価するために、Gタンパク質免疫原およびそのフラグメント(野生型または突然変異体)のアリコートを含有するリポソームを、PBS中37で1時間、プロティナーゼK(Gibco/BRL)を使用して1.0、0.1および0.01μg/mLで培養し得る。いくつかの培養は、リポソームを崩壊させる1% Triton X-100も含有し、それによって、プロティナーゼKの、タンパク質、融合タンパク質またはそれらのポリペプチドフラグメントへの完全な接近を可能にし得る。培養を終了し、試料をSDS-PAGEおよび銀染色によって分析する。そのような手順を使用して、免疫原(例えば、1つまたはそれ以上のウイルスタンパク質)調製物のリポソーム封入の程度を測定し得る。

【0087】

(実施例3)

(Gタンパク質免疫原およびそのフラグメントをコードする核酸および発現構造物の調製)

アミノ酸128-229、ならびに、例えば、突然変異128-229配列に対応するRSV(Long株)からのGタンパク質コード化核酸配列を、RT-PCRによってウイルスRNAから増殖し、得られたPCR生成物を、pET-32-LIC細菌発現プラ

50

スミド (Novagen , Madison , WI) の EcoRI および XhoI 部位にクローン化した。RSV G128-229 タンパク質配列の部位特異的突然変異を、Stratagene QuickChange (登録商標) 部位特異的突然変異プロトコルによって行った。簡単に言えば、PCRを、テンプレート pET-32-LIC-G128-229 DNA で行った (G128-229 配列を EcoRI および XhoI 部位にクローン化)。

【0088】

これらの実験において、プライマー対は、下記の通りであった：

【0089】

【化1】

10

CCTGCTGGGCTGCCTGCAAAAGAATACCAAACAAAAACCAGG (配列番号

37) および CCTGGTTTTGTTGGTATTCTTGCAGGCAGCCCAGCAG (配列番号 38)

(配列番号 38) (G128-229, I185A 突然変異体)；

CTGCTGGGCTATGCCAAAAGAATACCAAACAAAAACCAGG (配列番号 39)

および CCTGGTTTTGTTGGTATTCTTGCAGATAGCCCAGCAG (配列番号 40)

(G128-229, C186A 突然変異体)；

20

CTGCTGGGCTATCTGCGCAAGAATACCAAACAAAAACCAGG (配列番号 41)

および CCTGGTTTTGTTGGTATTCTTGCAGATAGCCCAGCAG (配列番号

42) (G128-229, K187A 突然変異体)；

30

CTGCTGGGCTATCTGCAAAGCAATACCAAACAAAAACCAGG (配列番号 43)

および CCTGGTTTTGTTGGTATTGCTTGCAGATAGCCCAGCAG (配列番号

44) (G128-229, R188A 突然変異体)；

30

CTGCTGGGCTATCTGCAAAGAGCACCAAACAAAAACCAGG (配列番号 45)

および CCTGGTTTTGTTGGTCTTGCAGATAGCCCAGCAG (配列番号 46)

(G128-229, I189A 突然変異体)；

40

CTGCTGGGCTATCTGCAAAGAATAGCAAACAAAAACCAGG (配列番号 47)

および CCTGGTTTTGTTGCTATTCTTGCAGATAGCCCAGCAG (配列番号 48)

(G128-229, P190A 突然変異体)；

【0090】

【化2】

CTGCAAAAGAATACCAAGCCAAAAACCAGGAAAGAAAAACCACC (配列番号
49)およびGGTGGTTTCTTCCTGGTTTTGGCTGGTATTCTTTGCAG (配列
番号 50) (G128-229, N191A突然変異体);

CTGGGCTATCTGCAAAAGAATACCAAACGCAAAACCAGGAAAG (配列番号
51)およびCTTCCTGGTTTGCAGTTGGTATTCTTTGCAGATAGCCCAG (配列
番号 52) (G128-229, K192A突然変異体);

10

GCAAAAGAATACCAAACAAAGCACCAAGGAAAGAAAAACCAC (配列番号
53)およびGTGGTGGTTTCTTCCTGGTGTGTTGGTATTCTTTGC (配列
番号 54) (G128-229, K193A突然変異体)

20

【0091】

野生型、および前記突然変異 RSV G タンパク質フラグメントを含有するチオレドキシン (Trx) - 融合タンパク質を、実施例 4 に記載するように製造した。

【0092】

(実施例 4)

(G タンパク質免疫原およびそのフラグメントの調製)

薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤と混合することによって、RSV G タンパク質免疫原を医薬組成物として製造することができる。例えば、本明細書に記載し、修飾 pET-32-LIC プラスミドに含有される核酸によってコードされる、RSV G タンパク質配列を、IPTG での誘発後に、形質転換 E. coli BL21 / DE3 細胞中にチオレドキシン (Trx) - 融合タンパク質として発現させた。8M 尿素での抽出、次に、TALON (登録商標) (Clontech, Palo Alto, CA) を使用する親和精製および PBS に対する透析によって、全ての Trx - 融合タンパク質を、形質転換細胞ペレットから回収した。ポリミキシン B ビーズ (BioRad, Mississauga, ON, Canada) での処理によって、精製 Trx - G128-229 ポリペプチドを、汚染エンドトキシンから遊離させた。この手順の詳細および改変は、当業者によく知られている。免疫化に使用する際に、免疫原を、アジュバント、例えば、ミョウバンまたはプロテオソームに基づくジュバントと、さらに組み合わせかまたは混合することができる。

30

【0093】

(実施例 5)

(RSV の調製)

40

RSV (Long 株) を、American Type Culture Collection から入手し、ペリシン G (100U/mL) および硫酸ストレプトマイシン (100ug/mL) を含有し、1% 血清 (ウシ胎児血清 / ウシ血清、1:3) を補足したイーグル最少必須培地 (MEM) で培養した HEp-2 細胞において増殖させた。細胞およびウイルスは、PCR アッセイによってマイコプラズマ汚染が陰性であることが確認された (American Type Culture Collection)。この実施例に記載する HEp-2 細胞の集密的単層培養物に、RSV (Long 株) を感染多密度 (MOI) 1 で接種し、4 で 90 分間吸着させ、洗浄し、1% ウシ胎児血清 (Sigma, St. Louis, MO) を補足した RPMI-1640 培地 (Sigma, St. Louis, MO) において 37 で培養した。培養細胞を 24 ~ 30 時間後に収集し

50

、その際、細胞単層はほぼ完全に融合しており；ウイルスを、手持ち型テフロン（登録商標）スクレーパ（Gibco-BRL）での崩壊によって細胞から剥離し、細胞片を、13,000×gで5分間の微細遠心分離によって除去した。上澄みを、マウス攻撃試験用のウイルス源として使用した（実施例6参照）。

【0094】

（実施例6）

（マウス免疫化）

全ての免疫化を、BALB/cマウス（Charles River, Ste. Constance, QC, Canada）を使用して行い、該マウスにケタミン（2.3mg/マウス；Bimeda-MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada）およびキシラジン（0.5mg/マウス；Bayer, Toronto, ON, Canada）で麻酔をかけた。ワクチン/攻撃試験において、7~9匹のBALB/cマウス（6~8週齢）のグループを、14日間隔で2回、PBS/ミョウバン、PBS/ミョウバン中のTrx-G128-229または突然変異Trx-G128-229タンパク質（50μL容量中10μgタンパク質）で皮下的に免疫化した。第二投与から14日後に、マウスをRSV（50μL中2×10⁶pfu）で鼻腔内攻撃した。4日後、ペントバルビタールナトリウムを使用してマウスを犠牲にし、当業者によく知られている方法によって、肺ウイルス滴定量および気管支肺胞液における白血球浸潤を分析した。

【0095】

免疫プロット分析は、RSV Gタンパク質のアミノ酸128-229に対して生じた血清抗体が、野生型または突然変異Trx-G128-229タンパク質で免疫化したマウスにおけるRSV Gタンパク質を特異的に認識できることを示した（図1参照）。RSV感染HEp-2細胞の抽出物を、SDS-PAGEによって分離し、膜（例えば、ポリアクリルアミド（PAGE）膜）に移した。移したタンパク質を含有する膜を、室温で一晩の培養によって、TBST（0.8%NaCl、0.1%Tween-20、20 mM Tris、pH 7.6）中の4%脱脂乳および0.5%カゼイン（Hammerstein銘柄）を使用して、ブロックした（非特異性相互作用を防止するため）。次に、ブロックした膜を血清試料と共に培養し、TBSTで洗浄し、次に、ヒツジ抗マウス抗体共役ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）と共に1時間培養し、次に、当分野で既知の手順によって、ジアミノベンジジン（DAB；1mg/mL、0.03%NiCl₂および0.1%H₂O₂）を使用して、シグナルを検出した。強いGタンパク質特異性抗体（IgG）反応が、野生型およびN191A突然変異タンパク質で観測された。極めて少ないRSV Gタンパク質抗体特異性シグナルが、I185AまたはK187A突然変異RSV Gポリペプチド融合タンパク質から得た血清において観測された。残るTrx-G128-229突然変異タンパク質は、中間レベルのRSV G特異性抗体を誘発した（図1）。

【0096】

（実施例7）

（免疫化マウスのRSV攻撃）

これらの実験において、野生型Trx-G128-229または9つの突然変異体の1つでマウスを免疫化し（実施例6に記載のように免疫化）、次に、RSVで攻撃した。好酸球増加症の誘発を、Maderら、Vaccine 18:1110, 2000に記載の手順によって測定した。図2Aに示すように、野生型Trx-G128-229および種々の单一突然変異体は、RSV攻撃からマウスを種々の程度に防御した。比較すると、N191A突然変異Trx-G128-229は、突然変異P190A、R188AおよびI189Aより優れた防御を与えた。残るTrx-G128-229突然変異タンパク質は、中間レベルの防御を与えた。さらに比較すると、R188AおよびN191A突然変異体は、最も高いレベルの防御を示した。この意外な結果は、Gタンパク質における単一突然変異が、かなり減少した免疫病理学的応答（例えば、肺好酸球増加症）を伴って

20

30

40

50

、防御免疫応答を誘発できるポリペプチドを生じ得ることを示す。

【0097】

(実施例8)

(RSV中和アッセイ)

これらの実験において、滴定前RSVのアリコートを、各マウス血清の連続希釈試料と混合し、室温で1時間培養した。各マウスからの血清を、実施例6に記載したミョウバン中の免疫原の2回の皮下投与の第二投与から14日後に、収集した。プラーク減少アッセイによって、RSV中和抗体について血清を分析した。混合物を、HEp-2細胞の60~80%集密的単層を含有する24穴平板に二重に適用し、4で90分間吸着させ、次に、洗浄し、1%ウシ胎児血清を補足したRPMI培地1mL中で37で40時間にわたってその平板を培養した。培養後、単層を15%ホルムアルデヒドで固定し、ウイルスプラークの可視化のために0.01%クリスタルバイオレットで染色した。プラーク減少を、プラーク減少中和滴定量₅₀(PRNT₅₀)として計算し、これは、HEp-2細胞の半集密的(sub confluent)単層においてRSVプラークの50%を中和するのに必要とされる血清のレシプロカル(reciprocal)希釈である。

10

20

【0098】

RSVプラーク減少アッセイの結果を表1に示す。免疫化マウスからの血清におけるRSV中和滴定量は、免疫化に使用したTrx-G128-229タンパク質の185-193領域内のアミノ酸配列への、中和抗体反応の強い依存性を示した(実施例6の免疫化の結果と同様)。

【0099】

【表1】

表 1. Trx-G変異タンパク質で免疫化したマウスからの血清の中和滴定

免疫原	PRNT ₅₀ [*]
PBS	7 ± 3
Trx-G128-229	144 ± 37
Trx-G128-229 (I185A)	18 ± 5
Trx-G128-229 (C186A)	81 ± 12
Trx-G128-229 (K187A)	34 ± 11
Trx-G128-229 (R188A)	39 ± 13
Trx-G128-229 (I189A)	115 ± 38
Trx-G128-229 (P190A)	98 ± 26
Trx-G128-229 (N191A)	95 ± 21
Trx-G128-229 (K192A)	27 ± 7
Trx-G128-229 (K193A)	31 ± 12

* PRNT₅₀ (プラーク減少中和滴定量₅₀) は、
HEp-2細胞におけるRSVプラーカーの50%を中和するのに
必要とされる血清のレシプロカル希釈を求めるこによって計
算される。結果を平均±標準偏差で示す。

10

20

30

40

【0100】

(実施例9)

(RSV Gタンパク質変異体へのサイトカインmRNAの反応)

種々のRSV Gタンパク質変異体で免疫化したマウスの肺におけるサイトカインmRNAレベルを、リボヌクレアーゼ保護アッセイによって測定した(該アッセイは、有害な好酸球性反応が生じるかどうかの指標になり得る)。各マウス肺からの1つの葉(lob)を、RNAlaterTM溶液(Qiagen, Mississauga, ON, Canada)中において-20で保存し、次に、RNeasy(登録商標)ミニキット(Qiagen, Mississauga, ON, Canada)を使用してRNA抽出のために処理した。RNAを定量化し、サイトカイン(MCK-1)テンプレート(BD-Pharmingen, Mississauga, ON, Canada)からプローブを合成する転写キット(BD-Pharmingen, Mississauga, ON, Canada)を使用してリボヌクレアーゼ保護アッセイ(RPA)に付し、-³²P[UTP]を使用して放射性標識し、次に、ハイブリダイゼーションし、RPAAIIキット(Ambion, Austin, TX)を使用してRNase消化に付した。反応混合物を、製造会社の指示に従って5%ポリアクリルアミド8M尿素ゲル上で分解し、次に、乾燥し、増感紙を使用して-70でオートラジオグラフィーに付した。

【0101】

RPA結果は、野生型または突然変異Trx-Gタンパク質で免疫化し、次に、RSV 50

で攻撃したマウス間に顕著な差異があることを示した(図4)。図4に示すように、アップレギュレーションを最も受けやすいTh2型サイトカインは、IL-4、IL-10、IL-13であり、より低い程度に受けるのはIL-5であった。Gタンパク質変異体K193A、P190AおよびI189Aは、顕著なIL-4、IL-10およびIL-13反応を誘発することが見出された。弱いIL-4、IL-10およびIL-13反応が、他のGタンパク質変異体、例えば、N192A、N191A、R188A、K187AおよびC186Aで観測された。この試験の結果は、IL-13の明白な重要性を示し、IL-13は、最近、喘息(Grunigら, Science 282:2261, 1998)ならびにRSVワクチン誘発疾患(JohnsonおよびGraham, J. Virol. 73:8485, 1999)と関連づけられている。高レベルのIL-13およびIL-10は、野生型または突然変異体I189A、P190A、K192AおよびK193Aで免疫化したRSV攻撃マウスにおいて観測された高レベルの好酸球増加とよく相関していた。これに対して、N191A、K187AおよびR188Aのような突然変異体は、IL-4の中程度の誘発物質であったが、IL-13、IL-10および好酸球増加の低誘発物質であった。

10

【0102】

比較すると、原型Th1サイトカイン、IFN- γ は、全ての実験マウス群において増加した。理論に縛られるものではないが、例として、これは、NK細胞ならびにTh1細胞からのIFN- γ の発現(Trinchieri, Adv. Immunol. 47:187, 1989)、RSV感染時のIFN- γ の急速誘発(HussellおよびOppenshaw, J. Gen. Virol. 79:2593, 1998)および/またはTh2反応が優勢であると考えられる免疫過程におけるIFN- γ 発現の支配的性質(Warissら, J. Virol. 70:2852, 1996; Spenderら, J. Gen. Virol. 79:1751, 1998; SrikiatkhachornおよびBracciale, J. Virol. 71:678, 1997)を反映していると考えられる。

20

【0103】

(実施例10)

(RSV Gタンパク質免疫原を含有するプロテオソームの調製)

保存RSV Gタンパク質生成物免疫原(例えば、野生型または突然変異ペプチド)の一部を、例えば、ダイアフィルトレーション/限外濾過法を使用するかまたは透析を使用することによって、プロテオソームと配合し得る。いずれの方法においても、RSV Gタンパク質生成物を、例えば、所望の界面活性剤(例えば、1%のEmpigen BB(EBB)、または0.1%~2%のEBB、または使用される界面活性剤の種類に依存する他の好適な界面活性剤)を含有する生理食塩水緩衝溶液に溶解させ、次に、生理食塩水緩衝1%Empigen溶液(または、適切な濃度の他の適切な界面活性剤)中のプロテオソームと、1:4~8:1(1:4、1:1、2:1、4:1および8:1を含む)の種々のプロテオソーム:RSV G(wt/wt)比率で混合する。Empigenを除去するために、その混合物を、次に、限外濾過/ダイアフィルトレーション法に付すか、または、例えば10,000分子量カットオフ(MWCO)を有する透析膜、またはMWCO範囲1,000~30,000を有する機能的に類似した膜を使用して、緩衝生理食塩水に対して、4で1~2週間、毎日少なくとも500部緩衝液を交換して、完全に透析する。種々の段階で、ELISAおよび一元放射状免疫拡散法(SRID)のような免疫学的アッセイを使用して、有効性を測定し得る。ハロ免疫拡散法を使用して、種々の比率におけるRSV G抗原とプロテオソームとの配合物の含有量を測定する(プロテオソームの調製についての詳細は、例えば、米国特許出願公開第2001/0053368号参照)。

30

40

【0104】

多価ワクチンは、個々の一価プロテオソームワクチンを製造し、次に、最終配合および充填の前に、必要とされる比率でそれらを合わせることによって製造し得る。多価調製物は、個々のRSV G抗原を所望の比率で合わし、その混合物をプロテオソームと配合する

50

ことによって製造し得る。多価ワクチン調製物は、1つまたはそれ以上のRSV-Fタンパク質免疫原および/または1つまたはそれ以上のMタンパク質免疫原を、1つまたはそれ以上のRSV-Gタンパク質免疫原と組み合わせて含有し得る。次に、ワクチン組成物を、0.8μm孔径の薄膜フィルターに通し、免疫化前および免疫化中に4で保存する。

【0105】

RSV-Gタンパク質免疫原（例えば、野生型または前記のいずれかの形態の突然変異ペプチド）を、例えば米国特許第6476201B1、および本明細書に開示されているようなプロテオソーム-LPSアジュバントの種々の量と配合してもよい。

【0106】

（実施例11）

（プロトリン配合RSV-Gタンパク質免疫原での免疫化）

プロトリンと配合したRSV-G野生型（アミノ酸128-229）または突然変異（N191A）タンパク質で、マウスを鼻腔内免疫化して、RSV-特異性の全身および粘膜滴定量を誘発されるかを判定した。BALB/cマウスを、用量6μgまたは2μgのTrx-(polyHis)-G(128-229)融合タンパク質だけか、またはプロトリンまたはミョウバンで増強したので、3回免疫化した。プロトリンだけかまたはプロトリンと配合した融合タンパク質を鼻腔内投与し、ミョウバンだけまたはミョウバンと配合した融合タンパク質を皮下投与した。第二投与後（第35日）に、伏在静脈から採血し、第三投与から2週間後（第62日）に、全採血によって血清を得た。気管支肺胞洗浄（BAL）試料も第62日に収集した。

【0107】

RSV-G特異性血清IgGおよびBAL-IgA滴定量を、ELISAによって測定した。6および2μgの両用量でTrx-(polyHis)-G(128-229)だけで免疫化したマウスと比較して、プロトリンと配合したTrx-(polyHis)-G(128-229)で鼻腔内免疫化したマウスにおいて、血清IgG滴定量の10倍の増加が観測された（図5）。プロトリン配合物で鼻腔内に、またはミョウバン配合物で皮下的に免疫化したグループの間に、血清IgG滴定量における有意な差異はなかった。いずれかのアジュバントを使用して与えたG(128-229)野生型およびG(128-229)突然変異N191Aの両方に関して、比較し得る滴定量が得られた。RSV-G(128-229)-特異性BAL-IgA滴定量は、プロトリンと配合したG(128-229)免疫原（野生型または突然変異体）を与えたグループにおいて、免疫原だけで免疫化したグループと比較して顕著に高かった（図6）。この場合も、比較し得る滴定量が、野生型および突然変異G(128-229)免疫原の両方に関して得られた。予想されるように、ミョウバンと配合したG(128-229)免疫原で皮下的に免疫化したグループにおいて、IgAが検出されなかった。これらの結果は、プロトリン配合G(128-229)免疫原（野生型または突然変異体）ワクチンが、鼻腔内投与された場合に、充分に許容されるものであり、免疫原性であることを示す。

【0108】

本発明の特定の態様を例示目的で本明細書に記載したが、本発明の意図および範囲を逸脱せずに種々の変更を加え得ることは、前記の記載から明らかである。従って、本発明は、請求の範囲による以外は限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1】図1は、ミョウバン中の野生型または突然変異Trx-(polyHis)-G(128-229)タンパク質で免疫化したマウスにおける血清抗体の誘発、野生型RSV-Gタンパク質を認識するそれらの能力、およびそのような誘発におけるGタンパク質突然変異の作用を示す。RSV感染HEp-2-細胞の抽出物を、SDS-PAGEによって分解し、膜に移し、各グループのマウスからのプール血清で探査した（マウスを、14日間隔で2回、PBS/ミョウバン、またはミョウバン-アジュバント野生型または突

10

20

30

40

50

然変異 Trx - (polyHis) - G (128 - 229) タンパク質で免疫化した)。RSV G タンパク質へのマウス血清 (1 : 100 希釀) の特異性を示す SDS - PAGE ゲルの免疫プロットを示す。

【図 2 A】図 2 A および図 2 B は、G タンパク質変異体が、RSV で攻撃された免疫化マウスにおける防除免疫 (A) および気管支肺胞液における好酸球浸潤 (B) において、どのように作用するかを示す。マウスを、14 日間隔で 2 回、PBS / ミョウバン、またはミョウバン中の野生型または突然変異 Trx - G 128 - 229 タンパク質で皮下的に免疫化し、次に、RSV で攻撃した。RSV 攻撃から 4 日後に、肺ホモジネートにおける RSV 滴定量、ならびに気管支肺胞液洗浄好酸球 (全細胞の % として) を測定した。結果を平均 \pm SD として示す。

【図 2 B】図 2 A および図 2 B は、G タンパク質変異体が、RSV で攻撃された免疫化マウスにおける防除免疫 (A) および気管支肺胞液における好酸球浸潤 (B) において、どのように作用するかを示す。マウスを、14 日間隔で 2 回、PBS / ミョウバン、またはミョウバン中の野生型または突然変異 Trx - G 128 - 229 タンパク質で皮下的に免疫化し、次に、RSV で攻撃した。RSV 攻撃から 4 日後に、肺ホモジネートにおける RSV 滴定量、ならびに気管支肺胞液洗浄好酸球 (全細胞の % として) を測定した。結果を平均 \pm SD として示す。

【図 3】図 3 A および図 3 B は、RSV A 群、Long 株 G タンパク質の、核酸配列 (配列番号 1) およびアミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。太字で示されているのは、本発明の G タンパク質免疫原を生じるアミノ酸の例示的突然変異 (N 191 A、コドン A A C から G C C へ) であり、そのフラグメントおよび変異体を本明細書に記載のように使用できる。

【図 4 A】図 4 A および図 4 B は、肺組織におけるサイトカイン mRNA のリボヌクレアーゼ保護アッセイ (RPA) のポリアクリルアミドゲルオートラジオグラムを示す。結果は、14 日間隔で 2 回、PBS / ミョウバンだけ、ミョウバンをアジュバントとする野生型 Trx - G 128 - 229 タンパク質または変異体 Trx - G 128 - 229 タンパク質で皮下的に事前に免疫化したマウスの肺における、RSV 攻撃から 4 日後に分析したサイトカイン mRNA の相対レベルを示す。パネル A および B は、3 日間 (A) または 1 時間 (B) 、放射線用フィルムを露光したポリアクリルアミドゲルの種々の領域を示す。

【図 4 B】図 4 A および図 4 B は、肺組織におけるサイトカイン mRNA のリボヌクレアーゼ保護アッセイ (RPA) のポリアクリルアミドゲルオートラジオグラムを示す。結果は、14 日間隔で 2 回、PBS / ミョウバンだけ、ミョウバンをアジュバントとする野生型 Trx - G 128 - 229 タンパク質または変異体 Trx - G 128 - 229 タンパク質で皮下的に事前に免疫化したマウスの肺における、RSV 攻撃から 4 日後に分析したサイトカイン mRNA の相対レベルを示す。パネル A および B は、3 日間 (A) または 1 時間 (B) 、放射線用フィルムを露光したポリアクリルアミドゲルの種々の領域を示す。

【図 5】図 5 は、野生型または変異体 Trx - (polyHis) - G (128 - 229) 融合タンパク質だけか、またはプロトリンまたはミョウバンをアジュバントとするもので免疫化した BALB / c マウスからの、特異性血清 IgG 抗体の E L I S A による検出を示す。マウスを、6 μ g または 2 μ g 用量の Trx - (polyHis) - G (128 - 229) 融合タンパク質で 3 回免疫化した。プロトリンだけか、またはプロトリンと共に配合した融合タンパク質を鼻腔内投与し、ミョウバンだけか、またはミョウバンと共に配合した融合タンパク質を皮下投与した。第二免疫化後 (第 35 日) 、および第三免疫化から 2 週間後 (第 62 日) に、血清試料を得た。

【図 6】図 6 は、野生型または変異体 Trx - (polyHis) - G (128 - 229) 融合タンパク質だけか、またはプロトリンまたはミョウバンをアジュバントとするもので免疫化した BALB / c マウスからの、特異性気管支肺胞洗浄 (BAL) IgA 抗体の E L I S A による検出を示す。マウスを、6 μ g または 2 μ g 用量の Trx - (polyHis) - G (128 - 229) 融合タンパク質で 3 回免疫化した。プロトリンだけか、またはプロトリンと共に配合した融合タンパク質を鼻腔内投与し、ミョウバンだけか、ま

たはミョウバンと共に配合した融合タンパク質を皮下投与した。BAL試料を、第62日（第三免疫化から2週間後）に収集した。

【図1】

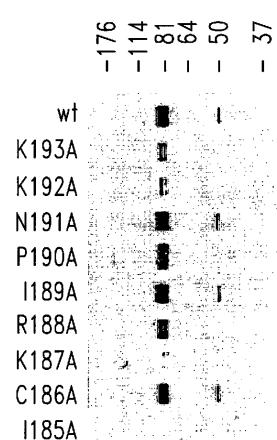


FIG. 1

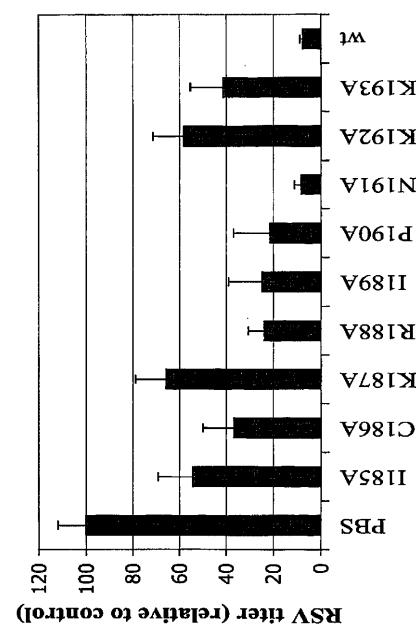


FIG. 2A

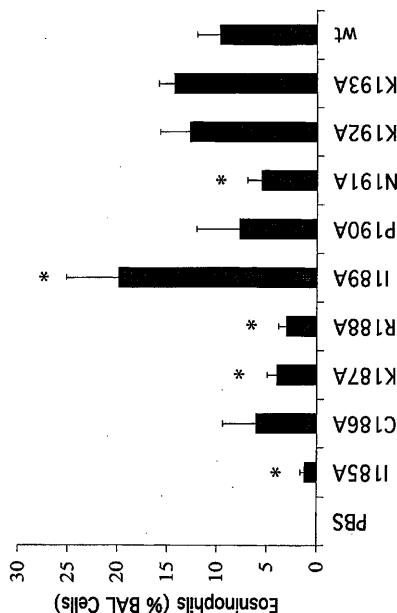


FIG. 2B

ggggcaang caaac atg tcc aaa aac aag gac caa cgc acc gct aag aca 51
 Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr
 1 5 10

cta gaa aag acc tgg gac act ctc aat cat tta tta ttc ata tca tcc 99
 Leu Glu Lys Thr Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser
 15 20 25

ggc tta tat aag tta aat ctt aaa tct ata gca caa atc aca tta tcc 147
 Gly Leu Tyr Lys Leu Asn Leu Lys Ser Ile Ala Gln Ile Thr Leu Ser
 30 35 40

att ctg gca atg ata atc tca act tca ctt ata att aca gcc atc ata 195
 Ile Leu Ala Met Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Thr Ala Ile Ile
 45 50 55 60

ttc ata gcc tcc gca aac cac aaa gtc aca cta aca act gca atc ata 243
 Phe Ile Ala Ser Ala Asn His Lys Val Thr Leu Thr Thr Ala Ile Ile
 65 70 75

caa gat gca aca agc cag atc aag aac aca acc cca aca tac ctc act 291
 Gln Asp Ala Thr Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr
 80 85 90

cag gat cct cag ctt gga atc agc ttc tcc aat ctg tct gaa att aca 339
 Gln Asp Pro Gln Leu Gly Ile Ser Phe Ser Asn Leu Ser Glu Ile Thr
 95 100 105

cta caa acc acc acc ata cta gct tca aca aca cca gga gtc aag tca 387
 Ser Gln Thr Thr Ile Leu Ala Ser Thr Pro Gly Val Lys Ser
 110 115 120

acc ctg caa ccc aca aca gtc aag act aaa aac aca aca acc cca 435
 Asn Leu Gln Pro Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Gln
 125 130 135 140

aca ccd ccc agc aag ccc act aca aaa cca cgc caa aad aaa cca cca 483
 Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro
 145 150 155

aac aaa ccc aat aat gat ttt cac ttc gaa gtg ttt aac ttt gta ccc 531
 Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro
 160 165 170

FIG. 3A

tgc agc ata tgc agc aac aat cca acc tgc tgg gct atc tgc aaa aga 579
 Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg
 175 180 185

ata cca gcc aaa aaa cca gga aag aaa acc acc acc aag cct aca aaa 627
 Ile Pro Ala Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Lys Pro Thr Lys
 190 195 200

aaa cca acc ttc aag aca acc aaa aaa gat cac aaa cct caa acc act 675
 Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gin Thr Ile
 205 210 215 220

aaa cca aag gaa gta ccc acc aac aag ccc aca gaa gag cca acc atc 723
 Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile
 225 230 235

aac acc acc aaa aca aac atc ata act aca cta ctc acc aac aac acc 771
 Asn Thr Thr Lys Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Asn Asn Thr
 240 245 250

aca gga aat cca aaa ctc aca agt caa atg gaa acc ttc cac tca acc 819
 Thr Gly Asn Pro Lys Leu Thr Ser Gin Met Glu Thr Phe His Ser Thr
 255 260 265

tcc tcc gaa ggc aat cta aca agc ctc tct cca gtc aca aca tcc gag 867
 Ser Ser Glu Gly Asn Leu Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu
 270 275 280

cac cca tca caa ccc tca tct cca ccc aac aca aca cgc cag tag 912
 His Pro Ser Gln Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Thr Arg Gln *
 285 290 295

ttatt 917

FIG. 3B

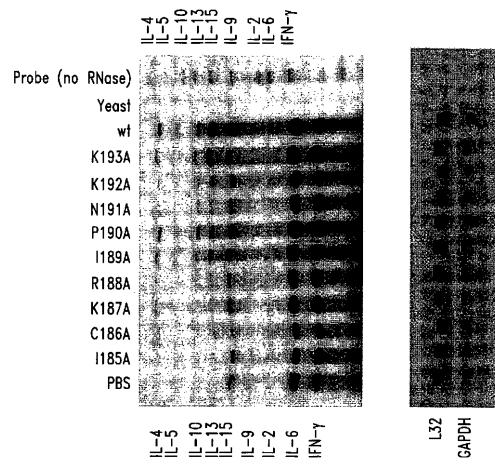


FIG. 4A

FIG. 4B

【図5】

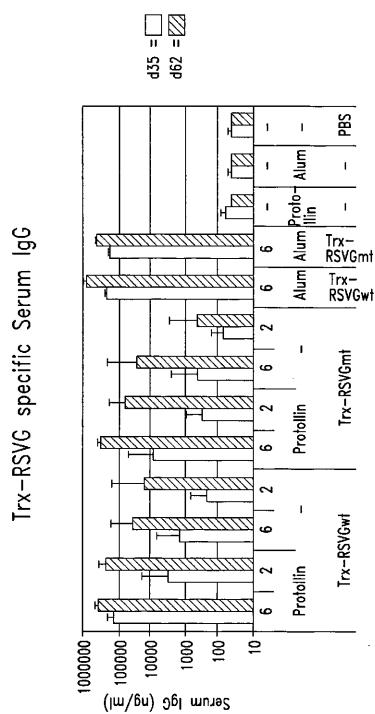


FIG. 5

【図6】

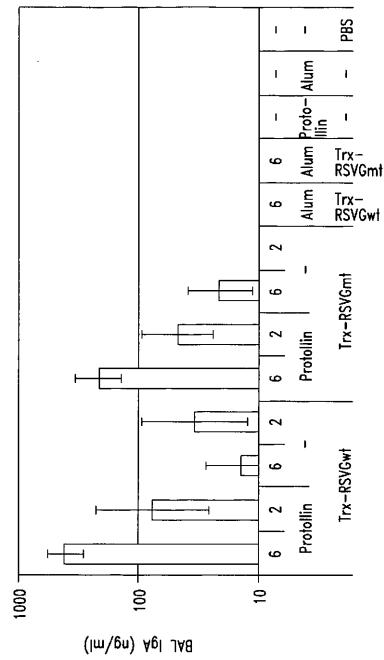


FIG. 6

【配列表】

2007505033000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年3月23日(2006.3.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2007505033000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA2004/001007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/155 C07K14/135 C07K16/10 C12N15/62 A61K39/295
A61K39/39 C12N15/45

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/14334 A (TEBBEY PAUL W ; AMERICAN CYANAMID CO (US); HANCOCK GERALD E (US)) 25 March 1999 (1999-03-25) the whole document	1-45
X	HUANG Y ET AL: "A single amino acid substitution in a recombinant G protein vaccine drastically curtails protective immunity against respiratory syncytial virus (RSV)" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 21, no. 19-20, 2 June 2003 (2003-06-02), pages 2500-2505, XP004424161 ISSN: 0264-410X the whole document	1-45

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the International search report
19 November 2004	08/12/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sommerfeld, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA2004/001007

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HUANG Y ET AL: "Enhanced immune protection by a liposome-encapsulated recombinant respiratory syncytial virus (RSV) vaccine using immunogenic lipids from <i>Deinococcus radiodurans</i>" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 11-12, 22 February 2002 (2002-02-22), pages 1586-1592, XP004340380 ISSN: 0264-410X the whole document</p> <p>-----</p>	1-45
Y	<p>SPARER T E ET AL: "Eliminating a region of respiratory syncytial virus attachment protein allows induction of protective immunity without vaccine-enhanced lung eosinophilia" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 187, no. 11, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 1921-1926, XP002091345 ISSN: 0022-1007 the whole document</p> <p>-----</p>	1-45
Y	<p>VARGA S M ET AL: "The attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus contains a single immunodominant epitope that elicits both Th1 and Th2 CD4+ T cell responses." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 DEC 2000, vol. 165, no. 11, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 6487-6495, XP002306390 ISSN: 0022-1767 the whole document</p> <p>-----</p>	1-45
Y	<p>SRIKIATKHACHORN ANON ET AL: "Induction of Th-1 and Th-2 responses by respiratory syncytial virus attachment glycoprotein is epitope and major histocompatibility complex independent" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 6590-6597, XP002306391 ISSN: 0022-538X the whole document</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA2004/001007

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TEBBEY PW ET AL: "Atypical pulmonary eosinophilia is mediated by a specific amino acid sequence of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 188, no. 10, 16 November 1998 (1998-11-16), pages 1967-1972, XP002091346 ISSN: 0022-1007 the whole document	1-45
Y	WO 02/058725 A (PF MEDICAMENT ; POWER ULTAN (FR); N GUYEN THIEN NGOC (FR)) 1 August 2002 (2002-08-01) the whole document	1-45
A	RYAN E J ET AL: "Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM,, GB, vol. 19, no. 8, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 293-304, XP004254296 ISSN: 0167-7799 the whole document	
A	WO 01/60402 A (INTELLIVAX INTERNAT INC ; WHITE GREGORY LEE (CA); PLANTE MARTIN (CA);) 23 August 2001 (2001-08-23) the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2004/001007**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-28 and 30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members				International Application No	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 9914334	A 25-03-1999	AU	751022 B2	08-08-2002	
		AU	9572598 A	05-04-1999	
		BR	9812240 A	18-07-2000	
		CA	2302833 A1	25-03-1999	
		CN	1322250 T	14-11-2001	
		EP	1015595 A1	05-07-2000	
		JP	2001516583 T	02-10-2001	
		WO	9914334 A1	25-03-1999	
		US	6699478 B1	02-03-2004	
		US	2004197348 A1	07-10-2004	
WO 02058725	A 01-08-2002	FR	2819810 A1	26-07-2002	
		EP	1353690 A2	22-10-2003	
		WO	02058725 A2	01-08-2002	
WO 0160402	A 23-08-2001	AU	3847801 A	27-08-2001	
		CA	2400468 A1	23-08-2001	
		EP	1255561 A2	13-11-2002	
		EP	1419784 A2	19-05-2004	
		JP	2003522802 T	29-07-2003	
		NO	20023829 A	13-08-2002	
		WO	0160402 A2	23-08-2001	
		US	2004156867 A1	12-08-2004	
		US	2001053368 A1	20-12-2001	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	Z N A
C 0 7 K 14/115 (2006.01)	C 0 7 K 14/115	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,M,A,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アンダーソン, ロバート

カナダ国 ピー・3エル 1シード・ノバ・スコーシア, ハリファックス, キンプール・ロード
7109

(72)発明者 フアン, ヤン

カナダ国 ティー・4シー 1エード・アルバータ, コクラン, ボックス 563

(72)発明者 パート, デーヴィッド・エス.

カナダ国 エイチ・9エー 3ケード・ケベック, ダラード・デ・オルモー, ニュートン・ロード 330

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA01 CA09 DA06 EA04

4C076 AA19 AA93 BB05 BB11 BB21 BB25 BB31 CC15 CC35 CC47

DD15H DD63H FF68

4C085 AA03 AA04 AA38 BA57 BB11 CC08 CC21 CC32 DD62 EE03

EE06 FF02 FF21 GG10

4H045 AA11 BA10 BA41 BA55 CA01 DA75 DA86 EA29 EA31 FA71

FA74