

(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2021-519596

(P2021-519596A)

(43) 公表日 令和3年8月12日 (2021.8.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/295 (2006.01)	A 6 1 K 39/295	Z N A 4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 39/245	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 241 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-554442 (P2020-554442)
 (86) (22) 出願日 平成31年4月2日 (2019.4.2)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年11月20日 (2020.11.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/025422
 (87) 国際公開番号 W02019/195316
 (87) 国際公開日 令和1年10月10日 (2019.10.10)
 (31) 優先権主張番号 62/652, 199
 (32) 優先日 平成30年4月3日 (2018.4.3)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/652, 201
 (32) 優先日 平成30年4月3日 (2018.4.3)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 504456798
 サノファイ
 S A N O F I
 フランス国、エフ - 7 5 0 0 8 ・ パリ、リ
 ュ・ラ・ボエティ・54
 54 rue La Boe▼tie,
 F - 7 5 0 0 8 Paris, Franc
 e
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フェリチンタンパク質

(57) 【要約】

表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異、システインを含むNもしくはC末端リンカー、および／または表面に露出したアミノ酸を介してフェリチンタンパク質に連結された1つまたはそれ以上の免疫刺激性部分を含むフェリチンタンパク質を開示する。フェリチンタンパク質は、例えば非フェリチンポリペプチドに対する抗体の誘発に使用するために、非フェリチンポリペプチドをさらに含み、抗原性であり得る。

【選択図】 図 1 D

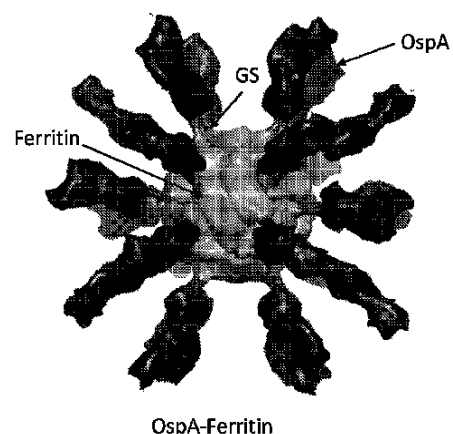


Fig. 1D

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異を含むフェリチンタンパク質。

【請求項 2】

システインを含む N または C 末端リンカーを含むフェリチンタンパク質。

【請求項 3】

表面に露出したアミノ酸を介してフェリチンタンパク質に連結した 1 つまたはそれ以上の免疫刺激性部分を含むフェリチンタンパク質。

【請求項 4】

非フェリチンポリペプチドをさらに含む抗原性フェリチンタンパク質である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 5】

抗原性フェリチンタンパク質であって、(i) 表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異およびシステインに連結した免疫刺激性部分；ならびに (i i) 非フェリチンポリペプチドを含む前記抗原性フェリチンタンパク質。

【請求項 6】

抗原性フェリチンタンパク質であって、(i) 表面に露出したシステイン、(i i) 該フェリチンタンパク質の N 末端側のペプチドリナー、および (i i i) 該ペプチドリナーの N 末端側の非フェリチンポリペプチドを含む前記抗原性フェリチンタンパク質。

【請求項 7】

表面に露出したアスパラギンを非アスパラギンアミノ酸に置き換える変異をさらに含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 8】

内部システインを非システインアミノ酸に置き換える変異をさらに含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 9】

内部システインは、H. ピロリフェリチンの 31 位、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、H. ピロリフェリチンの 31 位に対応する位置にある、請求項 8 に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 10】

抗原性フェリチンタンパク質であって：

- a. 表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異およびシステインに連結した免疫刺激性部分；
 - b. H. ピロリフェリチンの 31 位の内部システイン、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非 H. ピロリフェリチンの 31 位と類似の位置の内部システインを、非システインアミノ酸に置き換える変異
 - c. 表面に露出したアスパラギンを非アスパラギンアミノ酸に置き換える変異；ならびに
 - d. 非フェリチンポリペプチド
- を含む前記抗原性フェリチンタンパク質。

【請求項 11】

非システインアミノ酸はセリンである、請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 12】

アスパラギンは H. ピロリフェリチンの 19 位、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非 H. ピロリフェリチンの類似の位置にある、請求項 7 ～ 11 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 13】

フェリチンは、H. ピロリフェリチンの E12C、S26C、S72C、A75C、K79C、S100C、および S111C 変異の 1 つもしくはそれ以上、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非 H. ピロリフェリチンにおける 1 つま

10

20

30

40

50

たはそれ以上の対応する変異を含む、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 14】

非フェリチンポリペプチドは、インフルエンザ、エプスタインバーウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、またはボレリア由来のポリペプチドである、請求項 4～13 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 15】

非フェリチンポリペプチドは R S V G ポリペプチドを含み、場合により該 R S V G ポリペプチドは、G ポリペプチド中央保存領域を含む、請求項 14 に記載のフェリチンタンパク質。

10

【請求項 16】

フェリチンと非フェリチンポリペプチドとの間にペプチドリinker をさらに含む、請求項 4～5 または 7～15 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 17】

システインに連結され、水素結合またはイオン結合することが可能な部分を含む免疫刺激性部分を含む、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 18】

T L R 2、T L R 7／8、T L R 9、または S T I N G のアゴニストである免疫刺激性部分を含む、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

【請求項 19】

配列番号 201～207 または 211～215 のいずれか 1 つと 80%、85%、90%、95%、98%、または 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質。

20

【請求項 20】

請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質を含むフェリチン粒子。

【請求項 21】

請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質またはフェリチン粒子、および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 22】

第 1 のフェリチンタンパク質および第 2 のフェリチンタンパク質を含む組成物であって、該第 1 のフェリチンタンパク質はフェリチン重鎖および第 1 の非フェリチンポリペプチドを含み、該第 2 のフェリチンタンパク質はフェリチン軽鎖および第 2 の非フェリチンポリペプチドを含み、該第 1 および第 2 の非フェリチンポリペプチドは異なり、場合によりフェリチン粒子が該第 1 のフェリチンタンパク質および該第 2 のフェリチンタンパク質を含む、前記組成物。

30

【請求項 23】

アジュバントをさらに含む、請求項 21 または 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

対象のワクチン接種に使用するための、請求項 4～23 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質、フェリチン粒子、または組成物。

40

【請求項 25】

対象にワクチン接種する方法であって、請求項 4～23 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質、フェリチン粒子、または組成物を対象に投与する工程を含む前記方法。

【請求項 26】

対象はヒトである、請求項 24 に記載のフェリチンタンパク質、フェリチン粒子、もしくは組成物、または請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

場合により、核酸は m R N A である、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載のフェリチンタンパク質をコードする核酸。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本出願は、その各々の全内容が参照によって本明細書に組み入れられる、2018年4月3日に提出された米国仮特許出願第62/652,217号、2018年4月3日に提出された米国仮特許出願第62/652,199号、2018年4月3日に提出された米国仮特許出願第62/652,201号、2018年4月3日に提出された米国仮特許出願第62/652,210号、および2018年4月3日に提出された米国仮特許出願第62/652,204号の利益を主張する。

【0002】

本出願は、配列表を含有し、それらはASCIIフォーマットで電子提出されており、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。前記ASCIIコピーは、2019年3月27日に作成され、名称は2019-03-27_01121-0035-00PCT_SL_ST25.txtであり、サイズは1,115,992バイトである。

【背景技術】

【0003】

ワクチン学の分野での多くの成功にも関わらず、生命を脅かす多くの感染疾患からヒトを保護するために、新規打開策が必要である。現在認可されている多くのワクチンは、何十年も前の技術に依存して生弱毒化または不活化死菌ワクチンを産生しているが、これらは固有の安全性の懸念を有し、多くの場合、ごく短命な弱い免疫応答を刺激するに過ぎず、複数回用量の投与を必要とする。遺伝子工学および生化学工学の進歩により、難題である疾患標的に対する治療薬を開発することが可能となっているが、ワクチン学の分野へのこれらの応用は、まだ十分に実現されていない。

【0004】

組換えタンパク質技術により、現在では改善された抗原性ポリペプチドの設計が可能となっている。加えて、ナノ粒子は、有効な抗原提示および標的化薬物送達に関する潜在性をますます証明している。フェリチン粒子は、その分子積み荷を多価で呈示することによって与えられる結合アビディティの増加、およびその微視的サイズにより生物学的障壁をより効率的に通過する能力を有することが示されている。インフルエンザウイルス血球凝集素(HA)タンパク質に融合したヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori(H. pylori))フェリチン粒子は、マウスインフルエンザモデルにおいて抗原安定性の改善および免疫原性の増加を可能にした(非特許文献1を参照されたい)。この融合タンパク質は、8面体の対称性ナノ粒子へと自己集合して8個の3量体HAスパイク構造を提示し、アジュバントと共に使用する場合、様々な前臨床モデルにおいて強力な免疫応答を与える。しかし、これらの粒子は、自己アジュバント性ではなく、HAより免疫原性が低いHAインフルエンザ以外のポリペプチドにとって適したプラットフォームとして使用することができるか否かは不明であった。

【0005】

本明細書において、フェリチンを伴う1組の新規ポリペプチド、ナノ粒子、組成物、方法、および使用を提示する。本明細書において、アジュバントのような免疫刺激性部分が、表面に露出したアミノ酸を介して、またはフェリチンと非フェリチンポリペプチドとの間のリンカーを介してフェリチンにコンジュゲートされた自己アジュバント性プラットフォームを記載する。抗原性フェリチンポリペプチドは、非フェリチンポリペプチドをフェリチンと組み合わせることによって生成された。免疫刺激性部分を、非フェリチンポリペプチドと組み合わせたフェリチンとコンジュゲートすると、免疫刺激性部分と非フェリチンポリペプチドとを単一の高分子実体として標的化同時送達することが可能となり、これによって抗原およびアジュバントのような免疫刺激性部分を個別の分子として含む従来のワクチンに関して懸念される全身毒性の可能性を大きく減少させることができる。免疫刺激性部分を非フェリチンポリペプチドと共に高分子実体として同時送達すること、およびフェリチン粒子上でそれが多価で提示されることもまた、必要なワクチンの全体的な用量を低減させ、製造負荷およびコストを低減させることができる。同様に、本明細書におい

て呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、インフルエンザによる感染、およびライム病に対して免疫するために使用するための抗原性フェリチンポリペプチド、ナノ粒子、および組成物も開示される。

【0006】

さらに、本明細書に開示されるポリペプチド、ナノ粒子、組成物、および使用は、特定の病原体に対する所望の免疫学的転帰に調和するように、病原体由来の非フェリチンポリペプチドと、特定のタイプの免疫応答を誘発することができる目的に合わせた免疫シグナルの同時送達を可能にする。一例は、血球凝集素（HA）に融合したフェリチンにコンジュゲートされたTLR7/8アゴニストによるTh1型応答の誘導であり、これによってFcγRと会合してADCC機構によりウイルス感染細胞を除去するうえでより有効であることが公知であるIgG2aクラススイッチ抗体の産生がもたらされる（非特許文献2を参照されたい）。さらに、フェリチンにコンジュゲートされた免疫刺激性部分と非フェリチンポリペプチドとを単一の分子実体として同時送達することにより、免疫細胞の刺激が、非フェリチンポリペプチドの存在下で確実に起こることを保証することができる。これに対し、コンジュゲーションを伴わない同じ免疫刺激性分子の混合物は、全身分布をもたらし、一般的により高用量を必要とし、同様に、抗原が接触していない細胞における無差別の免疫刺激による望ましくない作用のリスクを有する。

10

【0007】

本明細書において、例えば、第1および第2の非フェリチンポリペプチドを含むフェリチン重鎖および軽鎖を提供することによって、複数のポリペプチドをフェリチン粒子に組み入れるプラットフォームも記載する。このプラットフォームは、二価であり、例えば本明細書に記載する免疫刺激性部分のコンジュゲーションのようなフェリチン治療薬に関連する他の利点を有する単一の高分子実体を提供することができる。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Kanekiyoら、Nature 499:102~106頁（2013）

【非特許文献2】DiLilloら、Nature Medicine 20:143~151頁（2014）

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本開示の目的は、上記の利点の1つまたはそれ以上を提供することができる、または有用な選択を公共に少なくとも提供する組成物、キット、方法、および使用を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

実施形態1は、表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異を含むフェリチンタンパク質である。

40

【0011】

実施形態2は、システインを含むNまたはC末端リンカーを含むフェリチンタンパク質である。

【0012】

実施形態3は、表面に露出したアミノ酸を介してフェリチンタンパク質に連結された1つまたはそれ以上の免疫刺激性部分を含むフェリチンタンパク質である。

【0013】

実施形態4は、非フェリチンポリペプチドをさらに含む抗原性フェリチンタンパク質である、実施形態1~3のいずれか1つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0014】

50

実施形態 5 は、抗原性フェリチンタンパク質であって、(i) 表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異およびシステインに連結した免疫刺激性部分；ならびに (i i) 非フェリチンポリペプチドを含む抗原性フェリチンタンパク質である。

【0015】

実施形態 6 は、抗原性フェリチンタンパク質であって、(i) 表面に露出したシステイン、(i i) フェリチンタンパク質の N 末端側のペプチドリンカー、および (i i i) ペプチドリンカーの N 末端側の非フェリチンポリペプチドを含む抗原性フェリチンタンパク質である。

【0016】

実施形態 7 は、表面に露出したアスパラギンを非アスパラギンアミノ酸に置き換える変異をさらに含む、実施形態 1～6 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

10

【0017】

実施形態 8 は、内部システインを非システインアミノ酸に置き換える変異をさらに含む、実施形態 1～7 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0018】

実施形態 9 は、内部システインが、H. ピロリフェリチンの 31 位、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、H. ピロリフェリチンの 31 位に対応する位置にある、実施形態 8 に記載のフェリチンタンパク質である。

【0019】

実施形態 10 は、抗原性フェリチンタンパク質であって：

20

a. 表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異およびシステインに連結した免疫刺激性部分；

b. H. ピロリフェリチンの 31 位の内部システインを非システインアミノ酸に置き換える変異、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非 H. ピロリフェリチンの 31 位と類似の位置の内部システインを非システインアミノ酸に置き換える変異；

c. 表面に露出したアスパラギンを非アスパラギンアミノ酸に置き換える変異；ならびに

d. 非フェリチンポリペプチド

を含む抗原性フェリチンタンパク質である。

【0020】

30

実施形態 11 は、非システインアミノ酸がセリンである、実施形態 8～10 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0021】

実施形態 12 は、アスパラギンが、H. ピロリフェリチンの 19 位、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非 H. ピロリフェリチンの類似の位置にある、実施形態 7～11 のいずれか 1 つに記載フェリチンタンパク質である。

【0022】

実施形態 13 は、フェリチンが、H. ピロリフェリチンの E12C、S26C、S72C、A75C、K79C、S100C、および S111C 変異の 1 つもしくはそれ以上、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非 H. ピロリフェリチンにおける 1 つまたはそれ以上の対応する変異を含む、実施形態 1～12 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

40

【0023】

実施形態 13 a は、フェリチンが、H. ピロリフェリチンの E12C 変異、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非 H. ピロリフェリチンにおける対応する変異を含む、実施形態 13 に記載のフェリチンタンパク質である。

【0024】

実施形態 13 b は、フェリチンが、H. ピロリフェリチンの S26C 変異、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非 H. ピロリフェリチンにおける対応する変異を含む、実施形態 13 に記載のフェリチンタンパク質である。

50

【0025】

実施形態13cは、フェリチンが、H. ピロリフェリチンのS72C変異、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非H. ピロリフェリチンにおける対応する変異を含む、実施形態13に記載のフェリチンタンパク質である。

【0026】

実施形態13dは、フェリチンが、H. ピロリフェリチンのA75C変異、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非H. ピロリフェリチンにおける対応する変異を含む、実施形態13に記載のフェリチンタンパク質である。

【0027】

実施形態13eは、フェリチンが、H. ピロリフェリチンのK79C変異、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非H. ピロリフェリチンにおける対応する変異を含む、実施形態13に記載のフェリチンタンパク質である。

10

【0028】

実施形態13fは、フェリチンが、H. ピロリフェリチンのS100C変異、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非H. ピロリフェリチンにおける対応する変異を含む、実施形態13に記載のフェリチンタンパク質である。

【0029】

実施形態13gは、フェリチンが、H. ピロリフェリチンのS111C変異、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非H. ピロリフェリチンにおける対応する変異を含む、実施形態13に記載のフェリチンタンパク質である。

20

【0030】

実施形態14は、非フェリチンポリペプチドが、インフルエンザ、エプスタインバーウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、またはボレリア(Borrelia)由来のポリペプチドである、実施形態4～13gのいずれか1つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0031】

実施形態14aは、非フェリチンポリペプチドがインフルエンザ由来のポリペプチドを含み、場合によりポリペプチドが血球凝集素ポリペプチドを含む、実施形態4～13gのいずれか1つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0032】

実施形態14bは、非フェリチンポリペプチドがエプスタインバーウイルス由来のポリペプチドを含み、場合によりポリペプチドが、gL、gH、gL/gH、gp220、またはgp42ポリペプチドの1つまたはそれ以上を含む、実施形態4～13gのいずれか1つに記載のフェリチンタンパク質である。

30

【0033】

実施形態14cは、非フェリチンポリペプチドが呼吸器合胞体ウイルス由来のポリペプチドを含み、場合によりポリペプチドがRSV FまたはRSV Gポリペプチドを含む、実施形態4～13gのいずれか1つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0034】

実施形態14dは、非フェリチンポリペプチドがボレリア由来のポリペプチドを含み、場合によりポリペプチドがOspAポリペプチドを含む、実施形態4～13gのいずれか1つに記載のフェリチンタンパク質である。

40

【0035】

実施形態15は、非フェリチンポリペプチドがRSV Gポリペプチドを含み、場合によりRSV GポリペプチドがGポリペプチド中央保存領域を含む、実施形態14または14cに記載のフェリチンタンパク質である。

【0036】

実施形態15aは、RSV Gポリペプチドがグリコシル化されていない、実施形態15に記載のフェリチンタンパク質である。

【0037】

50

実施形態 15b は、R S V G ポリペプチドがフェリチンタンパク質に化学的にコンジュゲートされている、実施形態 15 または 15a に記載のフェリチンタンパク質である。

【0038】

実施形態 16 は、フェリチンと非フェリチンポリペプチドとの間にペプチドリナーをさらに含む、実施形態 4～5 または 7～15b のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0039】

実施形態 17 は、システインに連結され、水素結合またはイオン結合することが可能な部分を含む免疫刺激性部分を含む、実施形態 1～16 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

10

【0040】

実施形態 18 は、T L R 2、T L R 7 / 8、T L R 9、または S T I N G のアゴニストである免疫刺激性部分を含む、実施形態 1～17 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0041】

実施形態 18a は、T L R 2 のアゴニストである免疫刺激性部分を含み、場合によりアゴニストが、P A M 2 C S K 4、F S L - 1、または P A M 3 C S K 4 である、実施形態 1～17 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0042】

実施形態 18b は、T L R 7 / 8 のアゴニストである免疫刺激性部分を含み、場合によりアゴニストが一本鎖 RNA、イミダゾキノリン、ヌクレオシドアナログ、3 M - 0 1 2、または S M 7 / 8 a である、実施形態 1～18a のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

20

【0043】

実施形態 18c は、T L R 9 のアゴニストである免疫刺激性部分を含み、場合によりアゴニストが、C p H オリゴデオキシヌクレオチド (O D N)、5' プリン (P u) - ピリミジン (P y) - C - G - P y - P u 3' を含む 1 つまたはそれ以上の 6 量体 C p G モチーフを含む O D N、配列番号 210 の配列を含む O D N、または I S S - 1 0 1 8 である、実施形態 1～18b のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0044】

実施形態 18d は、T L R 9 のアゴニストが、ホスホロチオエート結合を含む骨格を含む、実施形態 18c に記載のフェリチンタンパク質である。

30

【0045】

実施形態 18e は、S T I N G のアゴニストである免疫刺激性部分を含み、場合によりアゴニストが、環状ジヌクレオチド (C D N)、c d A、c d G、c A M P - c G M P、および 2' - 5'、3' - 5' c G A M P、または D M X A A である、実施形態 1～18d のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0046】

実施形態 19 は、配列番号 201～207 または 211～215 のいずれか 1 つと 80%、85%、90%、95%、98%、または 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1～18e のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

40

【0047】

実施形態 19a は、配列番号 201 と 80%、85%、90%、95%、98%、または 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1～19 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0048】

実施形態 19b は、配列番号 202 と 80%、85%、90%、95%、98%、または 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 19a のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0049】

50

実施形態 19 c は、配列番号 203 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 b のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0050】

実施形態 19 d は、配列番号 201 ～ 207 または 211 ～ 215 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 c のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0051】

実施形態 19 e は、配列番号 204 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 d のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

10

【0052】

実施形態 19 f は、配列番号 205 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 e のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0053】

実施形態 19 g は、配列番号 206 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 f のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0054】

実施形態 19 h は、配列番号 207 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 g のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

20

【0055】

実施形態 19 i は、配列番号 211 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 h のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0056】

実施形態 19 j は、配列番号 212 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 i のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

30

【0057】

実施形態 19 k は、配列番号 213 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 j のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0058】

実施形態 19 l は、配列番号 214 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 k のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

【0059】

実施形態 19 m は、配列番号 215 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 19 l のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質である。

40

【0060】

実施形態 20 は、実施形態 1 ～ 19 m のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質を含むフェリチン粒子である。

【0061】

実施形態 21 は、実施形態 1 ～ 20 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質またはフェリチン粒子、および薬学的に許容される担体を含む組成物である。

【0062】

50

実施形態 22 は、第 1 のフェリチンタンパク質および第 2 のフェリチンタンパク質を含む組成物であって、第 1 のフェリチンタンパク質が、フェリチン重鎖および第 1 の非フェリチンポリペプチドを含み、第 2 のフェリチンタンパク質が、フェリチン軽鎖および第 2 の非フェリチンポリペプチドを含み、ならびに第 1 および第 2 の非フェリチンポリペプチドが異なり、場合によりフェリチン粒子が、第 1 のフェリチンタンパク質および第 2 のフェリチンタンパク質を含む、組成物である。

【0063】

実施形態 23 は、アジュバントをさらに含む、実施形態 21 または 22 に記載の組成物である。

【0064】

実施形態 24 は、対象のワクチン接種に使用するための、実施形態 4～23 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質、フェリチン粒子、または組成物である。

【0065】

実施形態 25 は、実施形態 4～23 のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質、フェリチン粒子、または組成物を対象に投与することを含む、対象にワクチン接種する方法である。

【0066】

実施形態 26 は、対象がヒトである、実施形態 24 に記載のフェリチンタンパク質、フェリチン粒子、もしくは組成物、または実施形態 25 に記載の方法である。

【0067】

実施形態 26a は、対象が哺乳動物であり、場合により哺乳動物が霊長類もしくは家畜哺乳動物であり、さらに場合により霊長類が、非ヒト霊長類、サル、マカク、アカゲザル、もしくはカニクイザルもしくは類人猿であるか、または家畜哺乳動物が、イヌ、ウサギ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ラクダ、またはロバである、実施形態 24 に記載のフェリチンタンパク質、フェリチン粒子、もしくは組成物、または実施形態 25 に記載の方法である。

【0068】

実施形態 27 は、場合により核酸が mRNA である、実施形態 1～26a のいずれか 1 つに記載のフェリチンタンパク質をコードする核酸である。

【0069】

実施形態 F1 は、抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドであって、(i) 表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異を含むフェリチンタンパク質、および (ii) インフルエンザポリペプチドを含む抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0070】

実施形態 F2 は、抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドであって、(i) 表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異、およびシステインにコンジュゲートした免疫刺激性部分を含むフェリチンタンパク質；ならびに (ii) インフルエンザポリペプチドを含む抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0071】

実施形態 F3 は、システインを介してフェリチンタンパク質にコンジュゲートされた免疫刺激性部分をさらに含む、実施形態 F1 に記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0072】

実施形態 F4 は、インフルエンザポリペプチドが、血球凝集素 (HA) またはノイラミニダーゼ (NA) ポリペプチドを含む、実施形態 F1～F3 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0073】

実施形態 F5 は、HA ポリペプチドが保存領域を含む、実施形態 F4 に記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

10

20

30

40

50

【0074】

実施形態 F 6 は、保存領域が H A のステム領域の全てまたは一部を含む、実施形態 F 5 に記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0075】

実施形態 F 7 は、インフルエンザ抗原が Y 9 8 F 変異を含む H A 抗原を含む、実施形態 F 1 ～ F 6 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0076】

実施形態 F 8 は、内部システインを非システインアミノ酸に置き換える変異をさらに含む、実施形態 F 1 ～ F 7 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

10

【0077】

実施形態 F 9 は、内部システインが、H. ピロリフェリチンの 3 1 位、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、H. ピロリフェリチンの 3 1 位に対応する位置にあり、場合により内部システインがセリンに変異している、実施形態 F 8 に記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0078】

実施形態 F 1 0 は、表面に露出したアスパラギンを非アスパラギンアミノ酸に置き換える変異をさらに含み、場合により非アスパラギンアミノ酸がグルタミンである、実施形態 F 1 ～ F 9 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

20

【0079】

実施形態 F 1 1 は、表面に露出したアミノ酸が、H. ピロリフェリチンの E 1 2、S 2 6、S 7 2、A 7 5、K 7 9、S 1 0 0、もしくは S 1 1 1 の変異、または非 H. ピロリフェリチンにおける類似のアミノ酸である、実施形態 F 1 ～ F 1 0 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0080】

実施形態 F 1 2 は、表面に露出したアミノ酸の変異が、H. ピロリフェリチンの E 1 2 C、S 2 6 C、S 7 2 C、A 7 5 C、K 7 9 C、S 1 0 0 C、もしくは S 1 1 1 C、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって決定される、非 H. ピロリフェリチンにおける類似のアミノ酸である、実施形態 F 1 1 に記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

30

【0081】

実施形態 F 1 3 は、免疫刺激性部分が、T L R 7 または T L R 8 のアゴニストである、実施形態 F 1 ～ F 1 2 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0082】

実施形態 F 1 4 は、免疫刺激性部分が T L R 9 のアゴニストである、実施形態 F 1 ～ F 1 3 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0083】

実施形態 F 1 5 は、免疫刺激性部分とフェリチンタンパク質との間にリンカーをさらに含む、実施形態 F 1 または F 3 ～ F 1 4 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

40

【0084】

実施形態 F 1 6 は、リンカーが、マレイミド部分、ポリエチレングリコール (P E G) 部分、およびジベンゾシクロオクチン (D B C O) 部分の 1 つ、2 つ、または 3 つを含む、実施形態 F 1 5 に記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0085】

実施形態 F 1 7 は、フェリチンタンパク質とインフルエンザポリペプチドとの間にペプチドリンカーをさらに含む、実施形態 F 1 ～ F 1 6 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフ

50

ルエンザーフェリチンポリペプチドである。

【0086】

実施形態 F 1 8 は、実施形態 F 1 ～ F 1 7 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドを含むフェリチン粒子である。

【0087】

実施形態 F 1 9 は、実施形態 F 1 ～ F 1 8 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドまたはフェリチン粒子、および薬学的に許容される担体を含む組成物である。

【0088】

実施形態 F 2 0 は、フェリチンタンパク質および異なるインフルエンザポリペプチドを含む第 2 の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドをさらに含む、実施形態 F 1 9 の組成物である。

【0089】

実施形態 F 2 1 は、インフルエンザポリペプチドが、インフルエンザ A 型に由来し、第 2 の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドのインフルエンザポリペプチドが、インフルエンザ B 型に由来するか、またはインフルエンザポリペプチドおよび第 2 のインフルエンザフェリチンポリペプチドのインフルエンザポリペプチドが、サブタイプ H 1、H 2、H 3、H 4、H 5、H 6、H 7、H 8、H 9、H 1 0、H 1 1、H 1 2、H 1 3、H 1 4、H 1 5、H 1 6、H 1 7、もしくは H 1 8 に由来するか、またはインフルエンザポリペプチドの 1 つもしくは両方がサブタイプ H 1、H 3、H 7、もしくは H 1 0 に由来する操作された安定化ステム抗原を含む、実施形態 F 2 0 に記載の組成物である。

【0090】

実施形態 F 2 2 は、インフルエンザに対する免疫応答を誘発する方法において、またはインフルエンザに感染した対象の保護において使用するための、実施形態 F 1 ～ F 2 1 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチド、フェリチン粒子、または組成物である。

【0091】

実施形態 F 2 3 は、インフルエンザに対する免疫応答を誘発する、またはインフルエンザ感染に対して対象を保護する方法であって、実施形態 F 1 ～ F 2 2 のいずれか 1 つに記載の 1 つまたはそれ以上の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチド、フェリチン粒子、または組成物を対象に投与する工程を含む方法である。

【0092】

実施形態 F 2 4 は、対象がヒトである、実施形態 F 1 ～ F 2 3 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチド、フェリチン粒子、組成物、または方法である。

【0093】

実施形態 F 2 5 は、場合により核酸が mRNA である、実施形態 F 1 ～ F 1 7 のいずれか 1 つに記載の抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドをコードする核酸である。

【0094】

追加の目的および利点は、以下の説明に部分的に記載され、部分的に説明から明白であり、または実践により学ぶことができるであろう。目的および利点は、添付の特許請求の範囲に特に指摘された要素および組合せによって実現および達成される。

【0095】

前述の一般的説明および以下の詳細な説明は、単なる例示および説明であり、特許請求の範囲を制限するものではない。

【0096】

本明細書に組み入れられ、本明細書の一部を構成する以下の図面は、いくつかの実施形態を例証し、説明と共に本明細書に記載する原理を説明するために役立つ。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0097】

【図1A】OspA-フェリチンナノ粒子の例示的な設計を示す図である。図1A、フェリチンに遺伝的に融合したOspAは、融合タンパク質を形成する。OspAおよびフェリチン配列は、グリシン-セリンリンカー（-GS-）によって分離される。

【図1B】OspA-フェリチンナノ粒子の例示的な設計を示す図である。図1B、OspAのエクトドメインの構造を示す。OspAがフェリチンに結合しているC末端をアスタリスクで示す。

【図1C】OspA-フェリチンナノ粒子の例示的な設計を示す図である。図1C、H₂ピロリフェリチンの24モノマーで構成される例示的なフェリチンナノ粒子。

【図1D】OspA-フェリチンナノ粒子の例示的な設計を示す図である。図1D、例示的なOspA-フェリチン融合タンパク質ナノ粒子。フェリチン（薄灰色）、グリシン-セリンリンカー（GS）の位置、OspA（濃灰色および黒色）を示す（n：サブユニット数）。

10

【図2-1】図2A-2Dは、例示的なOspA-フェリチンの発現および精製を示す図である。図2A、Superose 6カラム上で精製された例示的なOspA-フェリチンナノ粒子のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）プロファイル。図2B、Exp i 293細胞由来の精製された例示的なOspA-フェリチンのSDS-PAGEゲル。図2C、例示的なOspA-フェリチンナノ粒子の動的光散乱（DLS）プロファイル。半径は13nmであり、Pd%（標準化された多分散性の尺度）は7.4であり、質量は100%である。図2D、67,000倍で318個の粒子の透過電子顕微鏡写真のクラス平均から構成された例示的なOspA-フェリチンの複合画像。フェリチンナノ粒子は、中空中心を有する強い円形密度として透過型電子顕微鏡上に現れる。各ナノ粒子は、環状またはわずかに長円形に見えるOspAに対応する多数の短い形状に囲まれている。

20

【図2-2】図2-1の続き。

【図2-3】図2-2の続き。

【図3A】大腸菌における代替血清型OspAナノ粒子の生成を示す図である。図3A、サイズ排除クロマトグラフィーにより精製したOspA-フェリチン血清型1~5および7のSDS-PAGEによる生化学分析。

【図3B】大腸菌における代替血清型OspAナノ粒子の生成を示す図である。図3B、OspA-フェリチン血清型1~5および7（98,000倍）の透過型電子顕微鏡検査。

30

【図4】例示的な血清型1のOspA-フェリチンナノ粒子のRECOMBITEK（登録商標）ライム（ボレリア・ブルグドルフェリ（*Borrelia burgdorferi*）の精製された外表面タンパク質A（OspA）の液体懸濁液）との免疫原性および期間の比較を示す図である。C3Hマウス（n=5）に1μgのOspA-フェリチン+Rib i アジュバント（Sigmaアジュバントシステム、カタログ番号S6322-1v1）またはRECOMBITEK（登録商標）ライムを第0週および第4週に筋肉内に免疫した。抗体応答は、各組成物を用いて2回目の免疫（6週目）の2週間後および2回目の免疫（25週目）の21週間後に、ELISAを介してエンドポイント力価を測定することにより評価された。

40

【図5-1】図5A-5Cは、例示的なOspA-フェリチンに関する情報を提供する図である。OspAポリペプチドは、ヒト白血球機能関連抗原-1（hLFA-1）の配列の断片と同一性を有するOspA血清型1のエピトープで修飾される。図5A、OspAエクトドメイン内のLFA-1相同部位（配列番号83のアミノ酸165~173）の位置を示す構造。図5B、配列番号83（B₁ブルドルフェリ血清型1のOspA）のOspAアミノ酸165~173と、hLFA-1および他のボレリア属（*Borrelia*）種および血清型の対応する配列との関係を示す樹状図。図5C、配列番号83のアミノ酸165~173における9アミノ酸セグメント（ノナペプチド）（「OspA」と標識）を、血清型2および血清型3のOspA由来の対応するノナペプチド（それぞれ「S2」（配列番号79）および「S3」（配列番号80））、合理的に設計された置換ノナペプチド（

50

「RD2」、配列番号81)、およびhLFA-1由来の対応するノナペプチド(配列番号78)と比較する。図5Cは、配列番号77、79~81、および78を、それぞれ、外観順に開示する。図5Dは、C3Hマウス(n=5)に、1μg用量のOspA血清型1-フェリチンナノ粒子をAddaVax(商標)アジュバント(スクアレンベース水中油ナノエマルジョン、InvivoGen、カタログ番号vac-adx-10から入手可能)で0週および4週に筋肉内(IM)に免疫した図である。OspA配列は、野生型hLFA-1相同部位(すなわち、配列番号83のアミノ酸165~173、「Sero1」)または配列番号81(「RD」)、配列番号80(「Sero3置き換え」)、配列番号79(「Sero2置き換え」)のような置換配列を含んでいた。抗体応答は、示された構築物の2回目の免疫の2週間後にELISAにより測定したエンドポイント力価を介して評価された。

10

【図5-2】図5-1の続き。

【図5-3】図5-2の続き。

【図6A】例示的な免疫刺激性部分:TLR7/8アゴニスト(3M-012)にコンジュゲートされた例示的なOspA-フェリチンナノ粒子に関する情報を提示する図である。図6A.3M-012をフェリチンに結合させるために、2ステップクリックケミストリー戦略を使用した。DBCO-PEG4-マレイミドリンカーをフェリチン上の表面露出システインに最初に付着させた。過剰のリンカーを除去した後、アジド-3M-012を添加した。

【図6B】例示的な免疫刺激性部分:TLR7/8アゴニスト(3M-012)にコンジュゲートされた例示的なOspA-フェリチンナノ粒子に関する情報を提示する図である。図6B.C3Hマウス(n=5)に、0および4週目に示された組成物1μgを筋肉内に免疫し、2週間後に分析した。「コンジュゲート」は、OspA-フェリチン-3M-012コンジュゲートナノ粒子を示す。「混合」は、29ngまたは20μgの3M-012またはミョウバンとともに投与された同じOspA-フェリチンの非コンジュゲート混合物を示す。OspA-フェリチンと3M-012の29ng「混合」混合物は、コンジュゲートナノ粒子上の3M-012のモル当量を表す。

20

【図7-1】図7A-7Cは、例示的な免疫刺激性部分:ISS-1018 CpG(配列番号210)にコンジュゲートされた例示的なOspA-フェリチンナノ粒子に関する情報を提供する図である。図7A.2ステップクリックケミストリー戦略を用いて、CPGをフェリチンに結合させた。DBCO-PEG4-マレイミドリンカーを、フェリチン上の表面露出システインに最初に付着させた。過剰のリンカーを除去した後、アジド-CPGを添加した。図7Aは、配列番号534を開示する。図7B.SDS-PAGEゲルによるCpGコンジュゲーションの生化学的分析は、CpGにコンジュゲートされたOspA-フェリチンの92%とのCpGへのコンジュゲーション後の分子量のシフトを明らかにする。図7C.C3Hマウス(n=5)は、指示された組成物の1μgで0週目と4週目に筋肉内に免疫され、2週間後に分析された。「コンジュゲート」は、OspA-フェリチン-CPGコンジュゲートナノ粒子を示す。「混合」は、339ngもしくは50μgのCpGまたはミョウバンとともに投与された同じOspA-フェリチンの非コンジュゲート混合物を示す。OspA-フェリチンとCPGの339ng「混合」混合物は、コンジュゲートナノ粒子上のCpGのモル当量を表す。

30

40

【図7-2】図7-1の続き。

【図8-1】図8A-8Fは、ミョウバンアジュバントを含む一価血清型適合OspA-フェリチン(1μg/用量)(「一価」)、または血清型1のOspA-フェリチン、血清型2のOspA-フェリチン、血清型3のOspA-フェリチン、血清型4のOspA-フェリチン、血清型5のOspA-フェリチン、および血清型7のOspA-フェリチンの各々(各1μg/用量)をミョウバンアジュバントとともに含む六価組成物(「六価」)を投与した後、血清型1(図8A)、血清型2(図8B)、血清型3(図8C)、血清型4(図8D)、血清型5(図8E)、および血清型7(図8F)に対する抗体応答を比較する図である。抗体応答は、C3Hマウス(n=5)を第0週および第4週に筋肉内

50

に免疫し、2週間後にELISAにより測定したエンドポイント力価を介して評価された。ELISAプレートをOspAの特定の血清型で被覆した。

【図8-2】図8-1の続き。

【図8-3】図8-2の続き。

【図9-1】図9A-9Gは、コンジュゲートされたおよびコンジュゲートされていない六価OspA-フェリチンナノ粒子組成物の投与後にマウスで観察された血清型1（図9A）、血清型2（図9B）、血清型3（図9C）、血清型4（図9D）、血清型5（図9E）、血清型6（図9F）、および血清型7（図9G）に対するマウスにおける抗体応答を示す図である。「六価-CpG」および「六価-3M-012」が、ナノ粒子がCpGおよび3M-012に化学的にコンジュゲートされていることを示す以外は、六価組成物は、図8A-Fに記載されるように、血清型1のOspA-フェリチン、血清型2のOspA-フェリチン、血清型3のOspA-フェリチン、血清型4のOspA-フェリチン、血清型5のOspA-フェリチン、および血清型7のOspA-フェリチンの各々を含む（図7Aおよび6A、ならびに添付の記載を参照されたい）。抗体応答は、2週間後にELISAにより測定されたエンドポイント力価を介して評価された。ELISAプレートをOspAの特定の血清型で被覆した。

【図9-2】図9-1の続き。

【図9-3】図9-2の続き。

【図9-4】図9-3の続き。

【図10-1】図10A-10Gは、六価OspA-フェリチンナノ粒子組成物に対する、アカゲサル（n=3匹/群）における血清型1~7に対する抗体応答をそれぞれ示す図である。これは、用量が総60μg（各血清型10μg）であり、コンジュゲートされていないAF03アジュバントを含有すること以外は、図9A~Gについて記載したものであった。サルは、第0週および第6週に筋肉内に免疫された。抗体応答は、免疫後2週間で、ELISAにより測定したエンドポイント力価を介して分析された。RECOMBITEK（登録商標）ライムを比較対照として10μg用量で使用した。全ての実験について、ELISAプレートを各パネルに示されたOspA血清型で被覆した。図10H-10Nは、六価OspA-フェリチンナノ粒子組成物に対する、アカゲサル（n=3匹/群）における血清型1~7に対する抗体応答をそれぞれ示す図である。これは、AF03アジュバントを使用せず、代わりにナノ粒子を3M-012またはCpGにコンジュゲートさせたこと以外は、図10A~10Gについて記載したものであった（図6Aおよび7A、ならびに添付の記載を参照されたい）。用量は、総60μg（各血清型10μg）であった。サルは、第0週および第6週に筋肉内に免疫された。抗体応答は、免疫後2週間で、ELISAにより測定したエンドポイント力価を介して分析された。全ての実験について、ELISAプレートを各パネルに示されたOspA血清型で被覆した。

【図10-2】図10-1の続き。

【図10-3】図10-2の続き。

【図10-4】図10-3の続き。

【図10-5】図10-4の続き。

【図11】3M-012結合OspA-フェリチン組成物のダニ負荷試験の結果を示す図である。マウスは、第0週および第4週に、示された組成物の1μg用量で免疫された。一価組成物は、3M-012にコンジュゲートされたOspA-フェリチン血清型1の1μgを含有した。「六価-3M-012」組成物は、図9A~Gについて記載された通りであった。対照粒子は、OspAポリペプチドを欠いていた。マウスは、ボレリア・ブルグドルフェリN40株（血清型1）に感染した5~6匹のダニを、2回目の免疫後、2週間で5日間負荷させ、2週間後に屠殺した。心臓、足首および耳からの組織試料を、B.ブルグドルフェリに対する抗生物質を添加したBSK培地中で6週間培養した。陰性試料は、PCR法によりB.ブルグドルフェリの存在について試験された。陽性試料は、培養またはPCR法のいずれかで陽性であった。

【図12】質量分析によるOspA-フェリチンナノ粒子のTLR7/8アゴニスト3M

ー 0 1 2 へのコンジュゲーションの確認を示す図である。上のパネルは、コンジュゲートされていない構築物を示し、下のパネルはコンジュゲートされた構築物を示す。データは、3 M-0 1 2 の添加と一致して、5 8 6 . 6 9 ダルトンの質量シフトを示した。

【図 1 3】示される希釈系列にわたって E L I S A により測定されたグリコシル化対応物 (R D) と比較した、非グリコシル化変異体 O s p A-フェリチン (N G-R D) に対するマウスにおける抗体応答を示す図である。R D=配列番号 5 2。N G-R D=配列番号 5 3。マウスに第 0 週および第 4 週に 1 μ g 用量をワクチン接種した。

【図 1 4】O s p A-フェリチン (配列番号 5 2) に対するマウスにおける抗体応答を示す図である。O s p A-フェリチングリコシル化変異体 N>Q (配列番号 5 3)、およびグリコシル化変異体 S/T>A (配列番号 6 3) は、示される希釈系列にわたって E L I S A により測定された、R E C O M B I T E K (登録商標) ライム対照および陰性 (P r e 免疫) 対照と比較された。

【図 1 5-1】図 1 5 A-1 5 E は、異なるリンカー (G S、G l y-S e r リンカー、G S 1、G l y-G l y-G l y-S e r リンカー (配列番号 4 4 3)、G S 2、配列番号 9 1 リンカー、G S 5、配列番号 9 2 リンカー、構築物配列は、それぞれ、配列番号 5 3 および 6 0~6 2) を含む O s p A 構築物の精製および特徴付けを示す。図 1 5 A. 示されるリンカーを含む精製 O s p A 構築物のクーマシー染色。図 1 5 A は、外観順に、配列番号 4 4 3~4 4 5 をそれぞれ開示する。図 1 5 B. G S 1 (配列番号 6 0) を含む O s p A-フェリチンナノ粒子の動的光散乱 (D L S)。図 1 5 C. G S 2 (配列番号 6 1) を含む O s p A-フェリチンナノ粒子の D L S。図 1 5 D. G S 5 (配列番号 6 2) を含む O s p A-フェリチンナノ粒子の電子顕微鏡写真 (E M)。図 1 5 E. G S 5 (配列番号 6 2) を含む O s p A-フェリチンナノ粒子の D L S。

【図 1 5-2】図 1 5-1 の続き。

【図 1 5-3】図 1 5-2 の続き。

【図 1 6】示される希釈系列にわたる E L I S A により測定した R E C O M B I T E K (登録商標) ライムおよび陰性 (P r e 免疫) 対照と比較した、異なるリンカーを (リンカー 1×G G G S 構築物、配列番号 6 0 (配列番号 4 4 3 として開示された「1×G G G S」)、リンカー 2×G G G S 構築物、配列番号 6 1 (配列番号 4 4 4 として開示された「2×G G G S」)、リンカー 5×G G G S 構築物、配列番号 6 2 (配列番号 4 4 5 として開示された「5×G G G S」)) 含む O s p A-フェリチン構築物に対するマウスの抗体応答を示す図である。

【図 1 7-1】図 1 7 A-1 7 C は、ルマジンシンターゼ O s p A 血清型 4 構築物 (配列番号 1 8) の特徴付けを示す図である。図 1 7 A. D L S データ。図 1 7 B. サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) トレースの示された画分 2 2~6 4 のクーマシーゲル。図 1 7 C. E M データ。

【図 1 7-2】図 1 7-1 の続き。

【図 1 8】ミョウバンを伴うまたは伴わない、O s p A 血清型 4-フェリチン構築物 (配列番号 4) および O s p A 血清型 4-ルマジンシンターゼ構築物 (配列番号 1 8) に対するマウスにおける抗体応答を示す図である。

【図 1 9-1】図 1 9 A-1 9 C は、O s p A 血清型 1-ルマジンシンターゼ構築物 (配列番号 1 2) の特徴付けを示す図である。図 1 9 A. E M データ。図 1 9 B. S E C トレースの示された画分 2 0~4 0 のクーマシーゲル。図 1 9 C. D L S データ。

【図 1 9-2】図 1 9-1 の続き。

【図 2 0-1】図 2 0 A-2 0 C は、O s p A 血清型 2-ルマジンシンターゼ構築物 (配列番号 1 6) の特徴付けを示す図である。図 2 0 A. E M データ。図 2 0 B. S E C トレースの示された画分 2 7~5 6 のクーマシーゲル。図 2 0 C. D L S データ。

【図 2 0-2】図 2 0-1 の続き。

【図 2 1 A】O s p A 血清型 3-ルマジンシンターゼ構築物 (配列番号 1 7) の特徴付けを示す図である。図 2 1 A. S E C トレースの示された画分 2 3~3 9 のクーマシーゲル。

。

10

20

30

40

50

【図 2 1 B】O s p A 血清型 3 ールマジンシンターゼ構築物（配列番号 1 7）の特徴付けを示す図である。図 2 1 B. D L S データ。

【図 2 2 A】O s p A 血清型 5 ールマジンシンターゼ構築物（配列番号 1 9）の特徴付けを示す図である。図 2 2 A. E M データ。

【図 2 2 B】O s p A 血清型 5 ールマジンシンターゼ構築物（配列番号 1 9）の特徴付けを示す図である。。図 2 2 B. S E C トレースの示された画分 2 2 ～ 3 8 のクーマシーゲル。

【図 2 2 C】O s p A 血清型 5 ールマジンシンターゼ構築物（配列番号 1 9）の特徴付けを示す図である。図 2 2 C. D L S データ。

【図 2 3 A】O s p A 血清型 7 ールマジンシンターゼ構築物（配列番号 2 1）の特徴付けを示す。図 2 3 A. E M データ。

【図 2 3 B】O s p A 血清型 7 ールマジンシンターゼ構築物（配列番号 2 1）の特徴付けを示す。図 2 3 B. S E C トレースの示された画分 2 0 ～ 3 8 のクーマシーゲル。

【図 2 3 C】O s p A 血清型 7 ールマジンシンターゼ構築物（配列番号 2 1）の特徴付けを示す。図 2 3 C. D L S データ。

【図 2 4 - 1】図 2 4 A - 2 4 G は、C 3 H マウス（n = 5 匹／群）において、ミョウバンまたは A F 0 3 のいずれかでアジュバント化した O s p A 血清型 1 ～ 7 （全部で 7 μ g）に対応する各 1 μ g の O s p A - フェリチンナノ粒子の七価 O s p A - フェリチンナノ粒子組成物、または R E C O M B I T E K （登録商標）ライムに対する血清型 1 ～ 7 に対する抗体応答をそれぞれ示す図である。全ての実験において、E L I S A プレートは、各パネルに「S X」（X は血清型番号である）として示される O s p A 血清型で被覆された。

【図 2 4 - 2】図 2 4 - 1 の続き。

【図 2 4 - 3】図 2 4 - 2 の続き。

【図 2 4 - 4】図 2 4 - 3 の続き。

【図 2 5】アカゲザルにおけるエンドポイント抗体価の時間経過を示す図である。0 週目および 6 週目に、六価 O s p A - フェリチンワクチン（別々のナノ粒子中に血清型 1、2、3、4、5、および 7 の O s p A を含む）を A F 0 3 アジュバントまたは R E C O M B I T E K （登録商標）でサルに筋肉内接種した。E L I S A プレートを O s p A 血清型 1 でコーティングした。

【図 2 6 - 1】図 2 6 A - 2 6 B は、代表的な H 1 N 1 インフルエンザウイルス株の配列比較および相同性を示す図である。（図 2 6 A）ベクター N T I A l i g n X ソフトウェアを用いた、候補抗原性 H A ポリペプチドの配列アライメント。白地に黒：所定の位置で完全に保存された残基に由来するコンセンサス残基。黒地に白：所定の位置で 1 個の残基が 5 0 % を超えて出現することに由来するコンセンサス残基。白地に黒の下線および太字：所定の位置でコンセンサス残基に弱く類似した残基。二重下線およびイタリックの白地に黒：所定の位置で類似した残基のブロックに由来するコンセンサス残基。白地に黒の太字：類似しない残基。示された配列は、以下の配列の H A 部分 + C 末端でのリンカーのセリンである：C A 0 9 H A - N p = 配列番号 3 1 5 の残基 1 ～ 5 1 9。C O B R A P 1 H A - N p = 配列番号 3 2 7 の残基 1 ～ 5 1 9。C O B R A X 6 H A - N p = 配列番号 3 2 9 の残基 1 ～ 5 1 8。N C 9 9 H A - N p = 配列番号 3 0 1 の残基 1 ～ 5 1 8。H K 7 7 H A - N p = 配列番号 3 1 8 の残基 1 ～ 5 1 9。F M 4 7 H A - N p = 配列番号 3 1 7 の残基 1 ～ 5 1 9。D V 5 7 H A - N p = 配列番号 3 2 1 の残基 1 ～ 5 1 8。M A L 5 4 H A - N p = 配列番号 3 1 6 の残基 1 ～ 5 1 9。（図 2 6 B）列挙されたインフルエンザ株由来の H A タンパク質配列について、近隣結合法（V e c t o r N T I）を用いて作製された樹状図。矢印は、これらの配列から H A - フェリチンナノ粒子を生成し、マウスにおけるそれらの免疫原性を試験することによって評価のための候補として選択された株を示す。

【図 2 6 - 2】図 2 6 - 1 の続き。

【図 2 6 - 3】図 2 6 - 2 の続き。

【図 2 7】フェリチン上の操作された表面露出システイン (C y s) を示す図である。表面露出アミノ酸を置き換える変異から生じるシステインの位置は、フェリチンナノ粒子との関連で示される。

【図 2 8 A】T o l l 様受容体 (T L R) アゴニストのフェリチンへのコンジュゲーションを示す図である。(図 2 8 A) マレイミド反応性基を有する P E G 4 リンカーを介してフェリチンの表面露出アミノ酸を置き換える変異から生じるシステインへの S M 7 / 8 a 小分子のコンジュゲーションの結果は、フェリチンナノ粒子との関連において示される。

【図 2 8 B】T o l l 様受容体 (T L R) アゴニストのフェリチンへのコンジュゲーションを示す図である。(図 2 8 B) フェリチンの表面露出アミノ酸を置き換える変異から生じるシステインへの C p G (配列番号 5 3 5) のコンジュゲーションの結果は、2 ステップクリックケミストリーを用いたフェリチンナノ粒子との関連において、マレイミド-D B C O 二官能性リンカーおよびアジド官能化 C p G 試薬で示される。

【図 2 9 A】フェリチンに対する T o l l 様受容体 (T L R) アゴニストのコンジュゲーションを示す図である。(図 2 9 A) マレイミド-D B C O 二官能性リンカーおよびアジド官能化 3 M-0 1 2 試薬を介した 2 ステップクリックケミストリー反応を用いて、フェリチンの表面露出システインにコンジュゲートした H A ポリペプチドおよび 3 M-0 1 2 を含むフェリチンナノ粒子のモデル。

【図 2 9 B】フェリチンに対する T o l l 様受容体 (T L R) アゴニストのコンジュゲーションを示す図である。(図 2 9 B) マレイミド-D B C O 二官能性リンカーおよびアジド官能化 C p G 試薬を用いた 2 ステップクリックケミストリー反応を用いて、フェリチンの表面露出システインにコンジュゲートした H A ポリペプチドおよび C p G を含むフェリチンナノ粒子のモデル。図 2 9 B は、配列番号 5 3 4 を開示する。

【図 3 0】特定のフェリチンナノ粒子構築物のフェリチン部分内のトリプシン切断部位を示す図である。いくつかのフェリチンナノ粒子は、アジュバントのコンジュゲーションのための不對表面露出システインに加えてトリプシン切断部位を含む。図 3 0 に示されるアミノ酸配列は、複数の構築物に共通の配列を示す「一般化された」配列である。例えば、配列番号 3 1 4 の残基 5 1 9 ~ 6 9 4 は、図 3 0 に示される「一般化された」配列を含む。「X X X」配列は、インフルエンザポリペプチドを表す。この配列に存在するフェリチン S 1 1 1 C 変異の位置もまた示される。

【図 3 1】図 3 1 A-3 1 B は、コンジュゲーション有りまたは無しでのゲルシフトおよび質量分析 (M S) の結果を示す図である。(図 3 1 A) マレイミド-P E G 4-S M 7 / 8 a へのコンジュゲーションの存在 (+) または不存在 (-) における H 1 / S t e m-N p (配列番号 3 4 3) のゲルシフトおよび質量分析の結果。(図 3 1 B) マレイミド-P E G 4-S M 7 / 8 a へのコンジュゲーションの存在 (+) または不存在 (-) における H 5 / h C o b r a 2-N p (配列番号 3 3 2) のゲルシフトおよび質量分析の結果。

【図 3 2 A】コンジュゲーション有りまたは無しでの、さらなるゲルシフトの結果を示す図である。(図 3 2 A) マレイミド-P E G 4-S M 7 / 8 a へのコンジュゲーションを伴うまたは伴わないペプチド N-グリコシダーゼ (P N G a s e) 処理後の H 1 / S t e m-N p のゲルシフトの結果、またはマレイミド-P E G 4-D B C O およびアジド-C p G を用いる 2 ステップクリックケミストリーによる結果。

【図 3 2 B】コンジュゲーション有りまたは無しでの、さらなるゲルシフトの結果を示す図である。(図 3 2 B) 2 ステップクリックケミストリーによる、マレイミド-P E G 4-S M 7 / 8 a またはマレイミド-P E G 4-D B C O およびアジド-C p G のいずれかへのコンジュゲーション有りまたは無しでの、トリプシン処理後の H 1 / S t e m-N p についてのゲルシフト結果。

【図 3 3 A】マレイミド-P E G 4-S M 7 / 8 a の H 1 / S t e m-N p へのコンジュゲーション有りまたは無しでの質量スペクトルを示す図である。(図 3 3 A) P N G a s e 処理後の M S データは、マレイミド-P E G 4-S M 7 / 8 a へのコンジュゲーションの前後における H 1 / S t e m-N p の質量を示す。

10

20

30

40

50

【図 3 3 B】マレイミド-PEG 4-SM 7/8 a の H 1 / S t e m-N p へのコンジュゲーション有りまたは無しでの質量スペクトルを示す図である。(図 3 3 B) H 1 / S t e m-N p をトリプシンで処理した後の MS データは、マレイミド-PEG 4-SM 7/8 a へのコンジュゲーションの前後における切断されたフェリチンの質量を示す。

【図 3 4】マレイミド-PEG 4-DBCO リンカーの H 1 / S t e m-N p へのコンジュゲーション有りまたは無しでの質量スペクトルを示す図である。H 1 / S t e m-N p へのマレイミド-PEG 4-DBCO リンカー付加をリンカー添加後の MS により測定した質量変化により確認した。

【図 3 5】2 ステップクリックケミストリーによる CpG のコンジュゲーションの前およびその種々の段階での H 1 / S t e m-N p の SDS-PAGE を示す図である。「アジド-CpG コンジュゲーション後」とは、2 ステップクリック反応の最終生成物を指す。

【図 3 6】3 M-0 1 2 を含むリンカーの NC 9 9 H A-T E V-N p 構築物へのコンジュゲーションの特徴付けを示す図である。WT レーンおよび +T E V レーンにおける構築物は、配列番号 3 1 3 の配列を有し、S 2 6 C は、配列番号 3 1 0 を指し、S 7 2 C は、配列番号 3 1 1 を指し、A 7 5 C は、配列番号 3 1 2 を指し、S 1 1 1 C は、配列番号 3 0 9 を指す。WT を除く全ての試料をタバコエッチ秒ウイルスプロテアーゼ (T E V) で処理した。

【図 3 7-1】図 3 7 A-3 7 E は、還元またはコンジュゲーション有りまたは無しでの、種々の構築物の質量スペクトルを示す図である。(図 3 7 A) 還元前の S 1 1 1 C を含む H 1 / S t e m-N p。(図 3 7 B) 還元後の S 1 1 1 C を含む H 1 / S t e m-N p。還元後に観察された質量 (1 1 5 D a) の減少は、システインの反応性を阻害する翻訳後修飾の除去と一致する。(図 3 7 C) 3 M 0 1 2 とのコンジュゲーション有りまたは無しでの、NC 9 9 H A-T E V-N p-S 2 6 C ナノ粒子 (配列番号 3 1 0) の質量スペクトル。(図 3 7 D) 3 M 0 1 2 へのコンジュゲーション有りまたは無しでの、NC 9 9 H A-T E V-N p-A 7 5 C ナノ粒子 (配列番号 3 1 2) の質量スペクトル。(図 3 7 E) 3 M 0 1 2 へのコンジュゲーション有りまたは無しでの、NC 9 9 H A-T E V-N p-S 1 1 1 C ナノ粒子 (配列番号 3 0 9) の質量スペクトル。

【図 3 7-2】図 3 7-1 の続き。

【図 3 7-3】図 3 7-2 の続き。

【図 3 7-4】図 3 7-3 の続き。

【図 3 8-1】図 3 8 A-3 8 F は、SM 7/8 a、3 M 0 1 2、または CpG へのコンジュゲーション有りまたは無しでの、H 1 / S t e m-N p または NC 9 9 H A-N p のナノ粒子のネガティブ染色電子顕微鏡 (E M) 画像を示す図である。(図 3 8 A) コンジュゲートしていない H 1 / S t e m-N p。(図 3 8 B) H 1 / S t e m-N p-S M 7/8 a コンジュゲート。(図 3 8 C) H 1 / S t e m-N p-C p G コンジュゲート。(図 3 8 D) NC 9 9 H A-N p (配列番号 3 0 9)。(図 3 8 E) NC 9 9 H A-N p-3 M 0 1 2 コンジュゲート。(図 3 8 F) NC 9 9 H A-N p-C p G コンジュゲート。

【図 3 8-2】図 3 8-1 の続き。

【図 3 9-1】図 3 9 A-3 9 C は、H 1 / S t e m-N p-S M 7/8 a コンジュゲート (図 3 9 A)、H 1 / S t e m-N p-C p G コンジュゲート (図 3 9 B)、またはコンジュゲートしていない H 1 / S t e m-N p (図 3 9 C) の動的光散乱 (D L S) 分析を示す図である。

【図 3 9-2】図 3 9-1 の続き。

【図 3 9-3】図 3 9-2 の続き。

【図 4 0 A】示される混合アジュバントを用いて製剤化された、または図 2 8 A-B に示されるように、PEG 4 リンカーを介して SM 7/8 a もしくは CpG などの TLR アゴニストにコンジュゲートされた H 1 / S t e m-N p に対する抗体応答を示す図である。血清を免疫後 5 週間 (第 0 週および第 3 週) でマウス (n=5) から回収し、抗体力価を酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) によって測定した。このデータは、H 1 / S t

10

20

30

40

50

e m-N p-T L R-アゴニストコンジュゲートの自己アジュバント特性を実証する。図 4 0 A は、H 1 / ニューカレドニア / 2 0 / 1 9 9 9 H A 三量体に対する E L I S A を示す。P A A = ポリアクリル酸、混合された等モル = 8 3 . 3 n g の S M 7 / 8 a (S M 7 / 8 をコンジュゲートしたフェリチンナノ粒子を用いて投与される用量に同等である)、高用量 = 2 1 . 8 4 μ g (S M 7 / 8 をコンジュゲートしたフェリチンナノ粒子を用いて投与される用量よりも高い)。

【図 4 0 B】示される混合アジュバントを用いて製剤化された、または図 2 8 A - B に示されるように、P E G 4 リンカーを介して S M 7 / 8 a もしくは C p G などの T L R アゴニストにコンジュゲートされた H 1 / S t e m-N p に対する抗体応答を示す図である。血清を免疫後 5 週間 (第 0 週および第 3 週) でマウス (n = 5) から回収し、抗体力価を酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) によって測定した。このデータは、H 1 / S t e m-N p-T L R-アゴニストコンジュゲートの自己アジュバント特性を実証する。図 4 0 B は、H 1 / ステム三量体に対する E L I S A を示す。混合等モル = 8 5 0 n g の C p G (C p G をコンジュゲートしたフェリチンナノ粒子を用いて投与される用量に同等である)、高用量 = 2 0 μ g の C p G。

【図 4 1 - 1】図 4 1 A - 4 1 C は、コンジュゲートされたまたは分離した 3 M - 0 1 2 (配列番号 3 0 9) 有りまたは無しでの、N C 9 9 H A - N p を用いて得られた力価の比較を示す図である。N C 9 9 H A - N p - 3 M 0 1 2 をコンジュゲートしたナノ粒子 (0 . 2 2 μ g / 用量) に対する抗体応答をマウスにおいて試験した。混合対照には、H A - N p (0 . 2 2 μ g / 用量) と 1 0 μ g の 3 M 0 1 2 (典型的な文献用量) の混合物、および H A - N p (0 . 2 2 μ g / 用量) と 1 . 7 n g の 3 M 0 1 2 (コンジュゲートと等モルマッチ) の混合物が含まれた。追加の対照には、一致した H A 含量 (0 . 1 7 μ g の H A / 用量) で投薬される、コンジュゲートされていない H A - N p および I I V が含まれた。E L I S A エンドポイント力価 (図 4 1 A)、偽ウイルス (P s V) 中和 I C 5 0 力価、および (図 4 1 B) 血球凝集阻害 (H A I) 力価 (図 4 1 C) に基づいて、H A - N p - 3 M 0 1 2 コンジュゲートは、等モル混合対照よりも有意に強い抗体応答を誘導した。コンジュゲートされたナノ粒子はまた、コンジュゲートされていないナノ粒子および I I V 標準治療よりも強い応答 (E L I S A) および強い中和抗体応答 (P s V) を誘導したが、この結果は、H A I アッセイでは統計学的に有意ではなかった。アッセイは、ブーストの 2 週間後からの血清のものである。全試料を 3 重にして実験した。中央値 ± S E M をグラフにする。* * * * p < 0 . 0 0 0 1、* * * p < 0 . 0 0 1、* * p < 0 . 0 1、* p < 0 . 0 5。

【図 4 1 - 2】図 4 1 - 1 の続き。

【図 4 2 - 1】図 4 2 A - 4 2 C は、コンジュゲートされたまたは分離した C p G (配列番号 3 0 9) 有りまたは無しでの、N C 9 9 H A - N p を用いて得られた力価の比較を示す図である。H A - N p - C p G をコンジュゲートしたナノ粒子 (0 . 2 2 μ g / 用量) に対する抗体応答をマウスにおいて試験した。混合対照には、H A - N p (0 . 2 2 μ g / 用量) と 2 0 μ g の C p G (典型的な治療用量) の混合物、および H A - N p (0 . 2 2 μ g / 用量) と 2 1 n g の C p G (コンジュゲートと等モルマッチ) の混合物が含まれた。追加の対照には、一致した H A 含量 (0 . 1 7 μ g の H A / 用量) で投薬される、コンジュゲートされていない H A - N p および I I V が含まれた。E L I S A エンドポイント力価 (図 4 2 A) および偽ウイルス中和 I C 5 0 力価 (図 4 2 B) に基づいて、コンジュゲートは、マッチさせた混合物、コンジュゲートされていない粒子、または I I V よりも強い結合および中和抗体応答を誘導した。また、H A - N p - C p G コンジュゲートは、等モル混合対照よりも有意に強い H A I 力価 (図 4 2 C) を誘導した。さらに、H A I 力価は、コンジュゲートされていない H A - F e r r および I I V よりも 2 . 6 倍および 3 . 0 倍高かったが、これらの結果は有意ではなかった。E L I S A および P s V アッセイは、ブーストの 2 週間後の血清のものであり、H A I アッセイは、ブーストの 5 週間後の血清のものであった。全試料を 3 重にして実験し、中央値 ± S E M をグラフにした。

* * * * p < 0 . 0 0 0 1、* * * p < 0 . 0 0 1、* * p < 0 . 0 1、* p < 0 . 0 5

。

【図 4 2 - 2】図 4 2 - 1 の続き。

【図 4 3 - 1】図 4 3 A - 4 3 C は、6 つの進化的に分岐した H 1 血球凝集素 (H A) 抗原および 2 つの計算的に生成した (C O B R A) 抗原に由来する自己集合 H A - フェリチンナノ粒子の特徴付けを示す図である。(図 4 3 A) ナノ粒子サイズおよび多分散性(「分散性」)は、動的光散乱 (D L S) によって測定された。(図 4 3 B) H A - ナノ粒子の純度は、S D S - P A G E クーマシー染色により評価された。(図 4 3 C) ナノ粒子の完全性は、8 0, 0 0 0 倍のネガティブ染色電子顕微鏡により可視化された。F M 4 7 = A / フォートモンマス / 1 - J Y 2 / 1 9 4 7、M A L 5 4 = A / マレーシア / 3 0 2 / 1 9 5 4、D V 5 7 = A / デンバー / 1 9 5 7 (D V 5 7)、H K 7 7 = A / 香港 / 1 1 7 / 1 9 7 7、N C 9 9 = A / ニューカレドニア / 2 0 / 9 9、C A 0 9 = A / カリフォルニア / 4 / 2 0 0 9。C O B R A P 1 および C O B R A X 6 は、C a r t e r D M ら、J V i r o l 9 0 : 4 7 2 0 ~ 4 7 3 4 頁 (2 0 1 6) によって最近記載された複数の配列から計算により生成されたコンセンサスである。配列番号については、図 2 6 A ~ 図 2 6 B の凡例を参照されたい。

10

【図 4 3 - 2】図 4 3 - 1 の続き。

【図 4 4 - 1】図 4 4 A - 4 4 H は、種々の H A - フェリチンナノ粒子によって誘発される免疫応答の効力および幅を示す図である(配列番号については図 2 6 A ~ 図 2 6 B の凡例を参照されたい)。示された H A - N p ワクチンを用いた免疫から 6 週間後のマウス由来血清の血球凝集阻害 (H A I) 力価 (l o g₂) を多様な H 1 N 1 インフルエンザウイルスのパネルに対してアッセイした。マウス (n = 5) を第 0 週および第 3 週に血球凝集素ナノ粒子 (H A - N p s) を用いて免疫した。破線は、アッセイの検出限界を示す。(図 4 4 A ~ 4 4 E) R i b i アジュバントを用いたデータ。(図 4 4 F ~ 4 4 H) A F 0 3 アジュバントを用いたデータ。x 軸は、基準年 (1 9 3 4 ~ 2 0 1 3 年) の H 1 N 1 インフルエンザ株のパネルを示す。表 2 は、各年に対応する株の完全な名称を示す。アスタリスクは、適合株を示す。

20

【図 4 4 - 2】図 4 4 - 1 の続き。

【図 4 4 - 3】図 4 4 - 2 の続き。

【図 4 4 - 4】図 4 4 - 3 の続き。

【図 4 5 - 1】図 4 5 A - 4 5 F は、H A - フェリチンナノ粒子によって誘導される H A 抗体応答を示す図である。(図 4 5 A) マウス [n = 5] を、S i g m a アジュバントシステム (カタログ番号 S 6 3 2 2) を使用して、特定のナノ粒子またはナノ粒子の組合せを用いて免疫した。I I V とは、インフルエンザ不活化ワクチンを指す。(図 4 5 B - F) 抗体応答は、A / フォートモンマス / 1 / 1 9 4 7 (図 4 5 B)、A / マレーシア / 3 0 2 / 1 9 5 4 (図 4 5 C)、A / 香港 / 1 1 7 / 1 9 7 7 (図 4 5 D)、A / ニューカレドニア / 2 0 / 9 9 (図 4 5 E)、または A / カリフォルニア / 4 / 2 0 0 9 (図 4 5 F) から H A 三量体に対する E L I S A 力価を決定することによって測定された。E L I S A 力価は、最初の免疫の 5 週間後に測定された。試験した血清希釈の最低値は、点線で示されるように検出のアッセイ限界を設定する。白丸は、マウスに投与されたナノ粒子の起源の株と E L I S A によりアッセイされた株との間の一致を示す。

30

40

【図 4 5 - 2】図 4 5 - 1 の続き。

【図 4 5 - 3】図 4 5 - 2 の続き。

【図 4 6 - 1】図 4 6 A - 4 6 H は、H A I 力価のアッセイで測定した、マウスに投与された複数のフェリチンナノ粒子の H A 混合物に対する抗体応答を示す図である。(図 4 6 A ~ 4 6 B) 二価の組合せ。(図 4 6 C ~ 4 6 E) 三価の組合せ。(図 4 6 F ~ 4 6 H) 四価の組合せ。一連の分岐型 H 1 N 1 インフルエンザウイルスの H A I 力価 (l o g₂) をアッセイした。マウス (n = 5) を第 0 週および第 3 週にアジュバントを用いて、示された H A - ナノ粒子の組合せで免疫した。二価組合せ C O B R A X 6 + C O B R A P 1 H A - N p s は、一価 C O B R A H A - N p の評価と一致させるために、A F 0 3 アジュバントを用いて試験された。同様に、個々の株 H A - フェリチンナノ粒子の組合せ

50

は、一価の個々の株H A - N p sの評価と一致させるためにR i b i アジュバントを使用された。アスタリスクは、マウスに投与されたナノ粒子の起源の株とE L I S Aによりアッセイされた株との間の一致を示す。x軸は、基準年（1934～2013年）のH1N1インフルエンザ株のパネルを示す。表2は、各年の株の完全な名称を示す。破線は、アッセイの検出限界を示す。

【図46-2】図46-1の続き。

【図46-3】図46-2の続き。

【図46-4】図46-3の続き。

【図47-1】図47A-47Fは、H A I力価のアッセイにより測定した、R i b i またはA F 0 3アジュバントを含む組成物に対する抗体応答を示す図である。A F 0 3アジュバントを用いて得られた結果（図47B、47D、および47F）と比較して、R i b i アジュバントを用いて得られた結果（図47A、47C、および47E）は、N C 9 9 とC A 0 9 H A - N p sの二価組合せ（図47A～47B）、N C 9 9、C A 0 9とH K 7 7 H A - N p sの三価組合せ（図47C～47D）、ならびにN C 9 9、C A 0 9とF M 4 7 H A - N p sの三価組合せ（図47E～47F）について類似する。H A I力価は、プライム投薬から6週間後にマウス血清で測定し、3週間後にブーストした。マウス[n=5]は、示されるように、R i b iまたはA F 0 3アジュバントのいずれかを用いて、H A - N p sの組合せを用いて免疫された。アスタリスクは、マウスに投与されたナノ粒子の起源の株とE L I S Aによりアッセイされた株との間の一致を示す。x軸は、基準年（1934～2013年）のH1N1インフルエンザ株のパネルを示す。表2は、各年の株の完全な名称を示す。破線は、アッセイの検出限界を示す。

【図47-2】図47-1の続き。

【図47-3】図47-2の続き。

【図48-1】図48A-48Cは、H A I力価のアッセイによって測定された、卵で産生されたN C 9 9およびC A 0 9不活化インフルエンザワクチン（I I V）によって誘発された比較抗体応答を示す図である。（図48A）N C 9 9 I I V。（図48B）C A 0 9 I I V。（図48C）N C 9 9 + C A 0 9 I I V。多様なH1N1インフルエンザウイルスのパネルに対して、単一成分または同時投与として、示されたI I Vワクチンによる免疫から6週間後のマウス由来血清の血球凝集阻害（H A I）力価（ $\log_2$ ）。マウス（n=5）は、R i b iアジュバントを用いて、第0週および第3週に各ワクチンの170ng（H A含有量）で免疫した。x軸は、1934年から2013年までの基準年で試験したH1N1インフルエンザ株のパネルを示す（表2も参照されたい）。x軸は、基準年（1934～2013年）に試験されたH1N1インフルエンザ株のパネルを示す。表2は、各年の株の完全な名称を示す。破線は、アッセイの検出限界を示す。

【図48-2】図48-1の続き。

【図49-1】図49A-49Dは、H A I力価のアッセイにより測定した、H A - フェリチンナノ粒子組成物またはI I Vを用いたフェレットの免疫後の種々のインフルエンザウイルスに対する抗体応答を示す図である。A F 0 3アジュバントと以下のものと混合した2回の免疫後のフェレット（n=12匹/群）由来の血清のH A I力価（ $\log_2$ ）：図49A：P B S単独、図49B：A / カリフォルニア / 2009 I I V、図49C：N C 9 9 + C A 0 9 + H K 7 7 H A - N p s、および図49D：C O B R A - X 6 + P 1 + H K 7 7 H A - N p s。図49Eは、H A - フェリチンナノ粒子組成物、I I V、またはP B Sで免疫したフェレットの異種負荷。フェレットを図49A-Dに記載されるように免疫し、50%組織培養感染量（T C I D 5 0）の $10^{4.65}$ 倍で1mLのA / フォートモンマス / 1 / 1947ウイルスを鼻腔内接種することにより、最終免疫から4週間後に1947年フォートモンマスウイルスで負荷した。ウイルス力価は、負荷後の7日間にわたって鼻腔洗浄液で定量化された。破線は、アッセイの検出限界を示す。ウイルス力価は、H A - N p s組合せで免疫したフェレットでは、ワンテール非対t検定およびワンウェイA N O V A [F (3, 44) = 5.18、p = 0.00375]によって、ビヒクル（P B S）対照と比較して、負荷から5日後に有意に低下したが、C A 0 9 I V

では低下しなかった。*** = $P \leq 0.001$ 、スチューデント t 検定による。

【図 49-2】図 49-1 の続き。

【図 49-3】図 49-2 の続き。

【図 50-1】図 50A-C は、混合した AF03 アジュバントとともに製剤化された 50 μg の H1 / Stem-NP、または 200 μg の H1 / Stem-NP（アジュバント対照なし）、または 200 μg の H1 / Stem-NP-SM7/8a コンジュゲート（図 28A に示される）、または 200 μg の H1 / Stem-NP-CpG コンジュゲート（図 28B に示される）で免疫した後のカニクイザル（*Macaca fascicularis*）の抗体応答を示す図である。図 50A は、0、4 および 10 週目に免疫された、指示された時点での H1 / ニューカレドニア / 20 / 1999 HA 三量体で被覆されたプレート上の酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によって測定された HA 抗体力価を示す。図 50B は、H1 / ニューカレドニア / 20 / 1999 HA および NA を用いてシュードタイプ化されたレンチウイルスの中和 IC50 を示す。図 50C は、H5 / ベトナム / 1203 / 2004 HA および NA を用いてシュードタイプ化されたレンチウイルスの中和 IC50 を示す。このデータは、霊長類モデルにおける H1 / Stem-NP-TLR アゴニストコンジュゲートの自己アジュバント特性を実証する。

10

【図 50-2】図 50-1 の続き。

【図 51-1】図 51A-51B は、コンジュゲートまたは分離された 3M-012（配列番号 309）有りまたは無しでの、NC99 HA-NP で得られた力価の比較を示す図である。NC99 HA-NP-3M012 をコンジュゲートしたナノ粒子に対する抗体応答は、0.1 μg 、0.5 μg 、2.5 μg 、および 12.5 μg の 4 用量であった。比較のために、混合対照およびコンジュゲートされていないナノ粒子を含めた。「等モル」混合対照および「高用量」混合対照に使用した TLR アゴニストの量は、最初のコンジュゲーション試験で使用したアジュバントに対する抗原の比を維持するために計算された（「等モル」については 1.7 ng の 3M012 または「高用量」については 10 μg のいずれかを伴う 0.22 μg の HA-NP）。血清中和は、NC99 レンチウイルスレポーターアッセイ（左、図 51A）および NC99 HA I アッセイ（右、図 51B）において測定された。矢印は、2.5 μg 用量を強調し、HA-NP-3M012 コンジュゲートは、5000 倍より少ない 3M012 アジュバントを含むにも関わらず、HA-NP+3M012 に対して同様の抗体力価を誘導した。平均値 ± 標準誤差をグラフにする。

20

30

【図 51-2】図 51-1 の続き。

【図 52-1】図 52A-52B は、クーマシーおよびウエスタンブロット分析による His タグの除去の有無に関わらず、一本鎖 gL および gH 単量体（図 52A）（配列番号 406）および三量体（図 52B）（配列番号 411）を示す図である。図 52B はまた、サイズ排除カラム（Superose（登録商標）6）精製からの画分の UV 吸光度トレースを示す。

【図 52-2】図 52-1 の続き。

【図 53-1】図 53A-53E は、一本鎖 gL / gH-フェリチンナノ粒子（配列番号 414）の精製および特徴付けを示す図である。Superose（登録商標）6 精製画分の UV 吸光度トレース（図 53A）、ならびに精製から選択された画分のクーマシー（図 53B）およびウエスタンブロット（図 53C）分析（L は、分子量ラダーを示し、150 および 250 kDa のバンドは 150 および 250 kDa のバンドの位置で標識され、図 53B 右に示される）。また、一本鎖ナノ粒子の動的光散乱（図 53D）および電子顕微鏡（図 53E）分析を提示する。

40

【図 53-2】図 53-1 の続き。

【図 53-3】図 53-2 の続き。

【図 53-4】図 53-3 の続き。

【図 54】異なる代表的な一本鎖 gL / gH-フェリチン構築物を示す図である。

【図 55】スクアレンエマルジョンベースのアジュバントである、AF03 アジュバントと混合した一本鎖 gL / gH 三量体またはナノ粒子（NP）でマウスを免疫した後の抗体

50

力価を示す図である。* N P構築物をその対応する三量体構築物と比較した場合のp値＝ <0.05 。左から右に、構築物は、配列番号416、410、411、413、412、および414であった。

【図56】図56A－56Bは、一本鎖g L／g Hナノ粒子および陰性対照の裸のフェリチン（すなわち、いずれの非フェリチンポリペプチドまたは免疫刺激性部分にも結合していないフェリチン）と比較した、g p 2 2 0ナノ粒子（配列番号401）と一本鎖g L／g Hナノ粒子（「g L—g H—C 5 N P」、配列番号419）の両方を含む二価組成物に対するマウスの抗g L／g H抗体応答を示す図である。結果は、二価組成物を使用しても、陰性対照の裸のフェリチンによる一本鎖g L／g Hの結果と比較して、抗g L／g H抗体応答との干渉をもたらさないことを示す。両組成物は、A F 0 3アジュバントを含んだ。個々の希釈液（図56A）および結合力価（図56B）におけるE L I S Aの結果を示す。

10

【図57】図57A－57Bは、図57A～図57Bについて記載されるように、g p 2 2 0ナノ粒子と一本鎖g L／g Hナノ粒子の両方を含む二価組成物に対する抗g p 2 2 0抗体応答を示す図である。結果は、二価組成物を使用しても、陰性対照の裸のフェリチンを用いたg p 2 2 0ナノ粒子の結果と比較して、抗g p 2 2 0抗体応答との干渉をもたらさないことを示す。両組成物は、A F 0 3アジュバントを含んだ。個々の希釈液（図56A）および結合力価（図56B）におけるE L I S Aの結果を示す。

【図58】図58Aは、T o l l様受容体（T L R）アゴニストなどの免疫刺激性部分へコンジュゲーションのために、表面露出アミノ酸をシステインで置き換える変異を含む、E B Vポリペプチドおよびフェリチンを含むナノ粒子の設計を示す図である。この設計に対応する例示的な配列については、配列番号414を参照されたい。ここで、一本鎖g L／g H抗原は、可撓性46アミノ酸リンカーによってフェリチンに結合される。図58Bは、図58Aによる構築物へのコンジュゲーションに適した代表的なツール様受容体アゴニスト（P E G 4－マレイミドリンカーを有するS M 7／8 a）を示す。図58Cは、フェリチン表面上のシステインおよびP E G 4－マレイミドリンカーを介してコンジュゲートされたS M 7／8 aを有するg L／g Hナノ粒子の電子顕微鏡写真（E M）画像を示す。

20

【図59A】図59Aは、表面露出アミノ酸をシステインで置き換える変異を含むフェリチンの一部の構造を示す図であり、システインの位置が示される。

30

【図59B】図59Bは、フェリチン、リンカー、およびC p Gアジュバントを隣接させることによる、フェリチンへのC p Gアジュバント（配列番号535）のコンジュゲーションを示し、これらは、互いに近接して結合するようになる各部分の一部を示すように配向される。

【図60A】g L／g H－フェリチンをコンジュゲートしていない形態（図60A）およびS M 7／8 aをコンジュゲートした形態（図60B）の質量分析（M S）スペクトルを示す図である。主ピークの質量の差は711Daであり、これはS M 7／8 aとリンカーとのコンジュゲートから予測された差にほぼ対応する。

【図60B】g L／g H－フェリチンをコンジュゲートしていない形態（図60A）およびS M 7／8 aをコンジュゲートした形態（図60B）の質量分析（M S）スペクトルを示す図である。主ピークの質量の差は711Daであり、これはS M 7／8 aとリンカーとのコンジュゲートから予測された差にほぼ対応する。

40

【図61A】g p 2 2 0－フェリチンのコンジュゲートしていない形態（図61A）およびS M 7／8 aをコンジュゲートした形態（図61B）の質量分析（M S）スペクトルを示す図である。主ピークの質量の差は714.7Daであり、これはS M 7／8 aとリンカーとのコンジュゲーションから予測された差にほぼ対応する。

【図61B】g p 2 2 0－フェリチンのコンジュゲートしていない形態（図61A）およびS M 7／8 aをコンジュゲートした形態（図61B）の質量分析（M S）スペクトルを示す図である。主ピークの質量の差は714.7Daであり、これはS M 7／8 aとリンカーとのコンジュゲーションから予測された差にほぼ対応する。

50

【図 6 2】図 6 2 A－6 2 D は、コンジュゲートしていない（図 6 2 A、C）およびコンジュゲートした（図 6 2 B、D）一本鎖 g L / g H（図 6 2 A、B）および g p 2 2 0（図 6 2 C、D）フェリチンナノ粒子の電子顕微鏡（EM）画像を示し、これらのナノ粒子への S M 7 / 8 a のコンジュゲーションは、ナノ粒子構造を破壊しなかったことを示す。

【図 6 3】図 6 3 A－6 3 B は、コンジュゲートした S M 7 / 8 a または他のアジュバントを含まない一本鎖 g L / g H、別個の分子としての A F 0 3 アジュバント、またはコンジュゲート S M 7 / 8 a を含むフェリチンナノ粒子で処置した後のマウスにおける抗体応答を示す図である。E L I S A の結果は、個々の希釈（図 6 3 A）および結合力価（図 6 3 B）として示される。

【図 6 4】図 6 4 A－6 4 B は、単独、別個の分子としての A F 0 3 アジュバント、またはコンジュゲートした S M 7 / 8 a のいずれかを含むナノ粒子での処置後のマウスにおける抗体応答を示す図である。E L I S A の結果は、個々の希釈（図 6 4 A）および結合力価（図 6 4 B）として示される。

【図 6 5】図 6 5 A－6 5 B は、E L I S A により測定した、S M 7 / 8 a にコンジュゲートした一本鎖 g L / g H フェリチンナノ粒子および裸のフェリチンでの処置と比較した、S M 7 / 8 a にコンジュゲートした g p 2 2 0 ナノ粒子および S M 7 / 8 a にコンジュゲートした一本鎖 g L / g H フェリチンナノ粒子での処置後のマウスにおける抗 g L / g H 抗体応答を示す図である。結果は、混合した A F 0 3 を用いない（図 6 5 A）または混合した A F 0 3 を用いた（図 6 5 B）実験について示される。

【図 6 6】図 6 6 A－6 6 B は、E L I S A により測定した、S M 7 / 8 a にコンジュゲートした g p 2 2 0 ナノ粒子および裸のフェリチンでの処置と比較した、S M 7 / 8 a にコンジュゲートした g p 2 2 0 ナノ粒子および S M 7 / 8 a にコンジュゲートした一本鎖 g L / g H ナノ粒子での処置後のマウスにおける抗 g p 2 2 0 抗体応答を示す図である。結果は、混合した A F 0 3 を用いない（図 6 6 A）または混合した A F 0 3 を用いた（図 6 6 B）実験について示される。

【図 6 7】E L I S A エンドポイント力価によって測定した、E L I S A により測定した、一本鎖 g L / g H ナノ粒子にコンジュゲートした混合した A F 0 3 アジュバントおよび／または S M 7 / 8 a のいずれかまたは両方を伴うまたは伴わない、一本鎖 g L / g H ナノ粒子（g L / g H __ C 5、配列番号 4 1 9）および裸のフェリチンでの処置後のマウスにおける抗 g L / g H 抗体応答を示す図である。

【図 6 8】g p 2 2 0 ナノ粒子にコンジュゲートした混合 A F 0 3 アジュバントおよび／または S M 7 / 8 a のいずれかまたは両方を伴うまたは伴わない、g p 2 2 0 ナノ粒子および裸のフェリチンでの処置後のマウスにおける抗 g p 2 2 0 抗体応答を示す図である。

【図 6 9】g p 2 2 0 ナノ粒子および一本鎖 g L / g H ナノ粒子を含む二価組成物での処置後のマウスにおける抗 g L / g H 抗体応答を示す図である。凡例に示されるように、いくつかのナノ粒子は S M 7 / 8 a にコンジュゲートされ、いくつかのナノ粒子は A F 0 3 と混合された。鍵となる上から下へのシンボルの順序は、グラフの左から右へのシンボルの順序と一致する。

【図 7 0】一本鎖 g L / g H ナノ粒子および g p 2 2 0 ナノ粒子および／または裸のフェリチンを含む二価組成物での処置後のマウスにおける抗 g p 2 2 0 抗体応答を示す。凡例に示されるように、いくつかのナノ粒子は S M 7 / 8 a にコンジュゲートされ、いくつかのナノ粒子は A F 0 3 と混合された。キーの上から下へのシンボルの順序は、グラフの左から右へのシンボルの順序と一致する。

【図 7 1－1】図 7 1 A－7 1 D は、混合 A F 0 3 および／または S M 7 / 8 a（図 7 1 A、7 1 C、または 7 1 D）もしくは C p G オリゴデオキシヌクレオチド（図 7 1 B）へのコンジュゲーションを伴うまたは伴わない、g L __ g H __ C 7 ナノ粒子（配列番号 4 2 0）での処置後のマウスにおける抗体応答を示す図である。示されているのは、E L I S A（図 7 1 A）によって測定されたプライム採血からのエンドポイント力価、ブースター採血（図 7 1 B）からの個々の希釈での E L I S A 結果、ならびにブースター採血（図 7 1 C）および最終採血（図 7 1 D）からの E L I S A によって測定されたエンドポイント

10

20

30

40

50

力価である。

【図 7 1 - 2】図 7 1 - 1 の続き。

【図 7 2】プライム、ブースト、および最終採血からの E L I S A により測定されたエンドポイント力価として、混合 A F 0 3 アジュバントおよび／または S M 7 / 8 a へのコンジュゲーションを伴うまたは伴わない、g L _ g H _ C 5 ナノ粒子（配列番号 4 1 9）での処置後のマウスにおける抗体応答を示す図である。

【図 7 3】プライム、ブースト、および最終採血からの E L I S A により測定されたエンドポイント力価として、混合 A F 0 3 アジュバントおよび／または S M 7 / 8 a へのコンジュゲーションを伴うまたは伴わない、g p 2 2 0 ナノ粒子での処置後のマウスにおける抗体応答を示す図である。

【図 7 4 A】図 7 4 A は、クーマシー染色により可視化された、g p 2 2 0 または g L / g H のいずれかとの融合有りまたは無しでの、T . n i フェリチンの軽鎖および重鎖を示す図である。図 7 4 A の最も右側のレーンにおける 2 0 、 2 5 、 7 5 、 1 0 0 、および 1 5 0 k D a のマーカーは標識される。

【図 7 4 B】図 7 4 B は、g p 2 2 0 または g L / g H のいずれかとの融合有りまたは無しでの、T . n i フェリチンの軽鎖および重鎖を含む構築物の例を提供する。

【図 7 5 - 1】図 7 5 A - 7 5 D は、g p 2 2 0 - T . n i フェリチンのイオン交換（Q カラム）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（S E C）精製を実証する図である。p H 7 での Q カラム（図 7 5 A）および S E C S u p e r o s e（登録商標）6 , 1 6 / 6 0 0（図 7 5 B）からの吸光度トレース、p H 7 での Q カラムからの画分のクーマシー染色（図 7 5 C）（左からのレーンは入力（「I n」）、フロースルー（「F T」）、分子量ラダー（左に k D で表示されたサイズ）、および選択された画分）、および S E C S u p e r o s e（登録商標）6 , 1 6 / 6 0 0 からの画分のクーマシー染色（図 7 5 D）（左からのレーンは分子量ラダーであり（左に k D で表示されたサイズ）および選択された画分）が示される。図 7 5 E は、構築物の例を示す。

【図 7 5 - 2】図 7 5 - 1 の続き。

【図 7 5 - 3】図 7 5 - 2 の続き。

【図 7 6 - 1】図 7 6 A - 7 6 D は、g L / g H（軽）/ g p 2 2 0（重）- T . n i フェリチンのイオン交換（Q カラム）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（S E C）精製を実証する図である。p H 7 での Q カラム（図 7 6 A）および S E C S u p e r o s e（登録商標）6 , 1 6 / 6 0 0（図 7 6 B）からの吸光度トレース、p H 7 での Q カラムからの画分のクーマシー染色（図 7 6 C）（左からのレーンは入力（「I n」）、フロースルー（「F T」）、分子量ラダー（左に k D で表示されたサイズ）、および選択された画分）、および S E C S u p e r o s e（登録商標）6 , 1 6 / 6 0 0 からの画分のクーマシー染色（図 7 6 D）（左からのレーンは分子量ラダーであり（左に k D で表示されたサイズ）および選択された画分）が示される。図 7 6 E は、構築物の例を示す。

【図 7 6 - 2】図 7 6 - 1 の続き。

【図 7 6 - 3】図 7 6 - 2 の続き。

【図 7 7 - 1】図 7 7 A - 7 7 H は、クーマシー染色によって視覚化され（図 7 7 A および 7 7 E）、図式的に例示され（図 7 7 B および 図 7 7 F）、動的な光散乱（D L S）によって特徴付けられ（図 7 7 D および 7 7 H）、および電子顕微鏡写真で可視化された（図 7 7 C および 7 7 G）、g p 2 2 0 - T . n i フェリチンまたは g L / g H（軽鎖）/ g p 2 2 0（重鎖）- T . n i フェリチン構築物を示す図である。図 7 7 A ~ 7 7 D は、軽鎖と重鎖の両方に融合された g p 2 2 0 を用いたデータを示す（図 7 7 B の図）。図 7 7 E ~ 7 7 H は、重鎖に融合された g p 2 2 0 および軽鎖に融合された g L / g H を用いたデータを示す（図 7 7 F の図）。

【図 7 7 - 2】図 7 7 - 1 の続き。

【図 7 7 - 3】図 7 7 - 2 の続き。

【図 7 7 - 4】図 7 7 - 3 の続き。

【図 78-1】図 78A-78C は、クーマシー染色によって可視化され（図 78A）、電子顕微鏡写真で可視化され（図 78B）、および DLS によって特徴付けられた（図 78C）、裸の T. ni フェリチン粒子（すなわち、非フェリチンポリペプチドに融合されていない）を示す図である。

【図 78-2】図 78-1 の続き。

【図 79A】図 79A は、293 の expi 細胞で発現された精製 gH/gL/gp42 NP 構築物（配列番号 227）を用いた SDS 変性クーマシー染色ゲル（左）、および（右）gH/gL/gp42 NP のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）ピークを示す図である。SEC クロマトグラムの水平軸の単位は mL である。

【図 79B】図 79B は、約 26.2 nm の動的光散乱半径を有するように CHO プールから精製された gH/gL/gp42 NP を示す。

【図 80】図 80A-B は、裸のフェリチンナノ粒子と組み合わせた一価の gH/gL/gp42 ナノ粒子組成物、または二価組成物（gp220 と組み合わせた gH/gL/gp42 ナノ粒子）によって誘発された免疫応答の評価を示す図である。図 80A は、B 細胞中和を示す。図 80B は、上皮細胞中和を示す。

【図 81-1】図 81A-E は、示された抗原に対するエンドポイント結合力価を示す図である。図 81F-G は、示されるようにワクチン接種されたフェレット由来の血清の EBV ウイルス中和アッセイを示す図である。プライム = Inj. 1、ブースト = Inj. 2。

【図 81-2】図 81-1 の続き。

【図 81-3】図 81-2 の続き。

【図 81-4】図 81-3 の続き。

【図 82A】図 82A は、Superose 6 サイズ排除クロマトグラフィーを用いた gH/gL/gp42__NP__C12（配列番号 228）の精製を示す図である。矢印は、変性クーマシーゲル分析および抗フェリチン抗体を用いたウエスタンブロット分析によりピークから回収した画分を示す。

【図 82B】図 82B は、20.6 nm の粒子径半径を示す、図 31A における試料の動的光散乱分析である。

【図 83A】図 83A は、Superose 6 サイズ排除クロマトグラフィーを用いた gH/gL/gp42__NP__C13（配列番号 229）の精製を示す図である。矢印は、変性クーマシーゲル分析および抗フェリチン抗体を用いたウエスタンブロット分析によりピークから回収した画分を示す。

【図 83B】図 83B は、17.1 nm の粒径半径を示す、図 32A における試料の動的光散乱分析である。

【図 84A】図 84A は、Superose 6 サイズ排除クロマトグラフィーを用いた gH/gL/gp42__NP__C14（配列番号 230）の精製を示す図である。矢印は、変性クーマシーゲル分析および抗フェリチン抗体を用いたウエスタンブロット分析によりピークから回収した画分を示す。

【図 84B】図 84B は、16.9 nm の粒径半径を示す、図 84A における試料の動的光散乱分析である。

【図 85】左側の SDS 還元クーマシーゲルは、精製された一本鎖 gH/gL/gp42-His 産物（配列番号 226）を示す図である。タンパク質をニッケルアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。右側は、一本鎖 gH/gL/gp42-His 産物（配列番号 226）の 2.9 オングストローム結晶構造である。Gp42（濃い灰色であって、矢印で示す）は gH/gL ヘテロ二量体と相互作用する。

【図 86】図 86A-E は、（配列番号 227~231 の各々におけるように）フェリチンに融合された gH/gL/gp42 の一本鎖構築物の描画を図 86A に示す図である。各タンパク質間の融合は、可撓性アミノ酸リンカーまたは上記に明記された堅いアミノ酸リンカーを介する。一本鎖 gH/gL/gp42 分子は、ナノ粒子上のヘテロ三量体形成の 1:1:1 の比を確証する。このヘテロ三量体の結晶構造は、一本鎖 gH/gL/gp

10

20

30

40

50

42が、天然に見られる野生型gH、gL、およびgp42タンパク質と同様のヘテロ三量体形成を採用し得ることを示すために解明されている(図86B、図85も参照されたい)。図86Cは、この一本鎖gH/gL/gp42ヘテロ三量体がフェリチンとの融合を介してナノ粒子上にどのように提示されるかのモデルである。単一のナノ粒子上に提示される一本鎖gH/gL/gp42のコピーが24個ある。図86Dは、293Expi細胞における配列番号227の発現後の精製を示す。変性SDSクマシーゲルは、フェリチンに融合したgH/gL/gp42がグリコシル化により150kDを超えることを示す。図35Eは、精製産物のネガティブ染色電子顕微鏡分析を示し、フェリチンに融合した一本鎖gH/gL/gp42が、表面上にgH/gL/gp42抗原を提示するナノ粒子を首尾よく形成できることを示す。

10

【図87A】例示的なRSV Pre-F-NPポリペプチド構造を示す図である。(図87A)各セグメントのN末端に対応する残基番号を列挙する線形図。番号付けは配列番号526による。ドメイン1~3は、それぞれDI、DIIおよびDIIIで示され、7残基(heptad)反復領域A(HRA)および7残基反復領域B(HRB)もまた標識される。C末端フェリチンは標識される(フェリチンナノ粒子)。RSV F部分のF1およびF2断片を描画の下に表示する。ペプチド27断片(p27)融合ペプチド(FP)とフリン切断部位(フリン部位)を欠失させ、可撓性リンカーで置き換えて一本鎖F構築物を形成したF1とF2断片の間の領域をラインとして示し、描画の上に表示した。図の上の星印は、操作されたグリコシル化部位E328N、S348NおよびR507Nのおおよその位置を示す。

20

【図87B】例示的なRSV Pre-F-NPポリペプチド構造を示す図である。(図87B)D25、AM14、101F、およびパリビズマブ抗体についての鍵となる中和(Nab)エピトープを示す、融合前RSV F部分の構造モデル。共有される融合前および融合後の構造エピトープの近似領域は、白い三角形で示される。例示的な操作されたグリコシル化部位E328N、S348NおよびR507Nの位置は標識される。操作されたグリコシル化部位は、融合前と融合後のコンフォメーション間で構造的に共有され、D25、AM14、101Fおよびパリビズマブなどの抗体によって認識される鍵となる中和エピトープから離れた領域にマップされる。このように、これらの操作されたグリカン部位を含有する構築物は、依然として上記の中和抗体に結合する(データは示されていない)。

30

【図87C】例示的なRSV Pre-F-NPポリペプチド構造を示す図である。(図87C)HRAおよびHRB領域を有するRSV融合前Fタンパク質ナノ粒子(Pre-F-NP)の構造モデルはより濃い影の者である。得られた折り畳まれたPre-F-NP構築物は、図87Bにリストされた鍵となるエピトープを提示する24-量体を形成することができる。

【図87D】例示的なRSV Pre-F-NPポリペプチド構造を示す図である。(図87D)RSV Pre-F-NP構築物RF8085(配列番号501)の電子顕微鏡写真の2Dクラス平均は、24マーのフェリチンナノ粒子上のRSV F三量体部分の対称性を示す。

【図88】D25抗体ウェスタンブロットにより測定された、293細胞馴化培地中で発現された、いくつかのPre-F-NP構築物の小規模発現を示す図である。RF8090は、配列番号502であり、これは、RF8085と同じ配列、すなわち配列番号501を有するCHO発現において使用されるクローニング変異体である。RF8085およびRF8090は、図87Aに記載の欠失および一本鎖リンカーを有するDS-CAVのジスルフィドおよび空洞充填変異を有するPre-F-NP構築物であり、N末端をフェリチンに融合させたものである。RF8100-RF8105およびRF8108-RF8112は、それぞれ配列番号503~508および511~514の配列を有する。scFpFerr=RSV Fポリペプチドとフェリチンの融合タンパク質。RF8090ベンチマークに対する構築物の発現を改善すると思われる変異は、ウェスタンブロット下に示される。注目すべき変異には、E328N、S348NおよびR507N変異を介

40

50

したグリカン部位の付加、ならびにウエスタンブロットで測定した馴化培地中へのRSVFナノ粒子の発現および分泌を増加させた中央ヘリックスキャッピング変異I327Pがある。

【図89】293発現からの馴化培地のウエスタンブロット分析により測定した、RF8085（配列番号501、対照構築物）およびRF8106（配列番号509、RF8108におけるI217P変異およびDS-CAV1のジスルフィド（DS）変異を欠除するI217P変異を含む）の発現を示す図である。DSを中心ヘリックスキャッピング変異I217Pで置き換えると、発現が有意に増加した。DSを中心ヘリックスキャッピング変異で置き換えても、融合前特異的抗体D25およびAM14への構築物の結合に影響を及ぼさない。

【図90】RF8106構築物（配列番号509）のサイズ排除クロマトグラフィー精製の結果を示す。Superose 6調製SECカラム上の約65mlのRF8106ナノ粒子の保持体積は、折り畳まれた24マーのナノ粒子と一致しており、これは、RF8106における変異はナノ粒子形成を妨げなかったことを示唆する。

【図91】図91A-91Bは、非還元（79A）および還元（79B）RF8106の動的光散乱（DLS）分析を示す図である。SEC分析と同様に、DLSは、RSVF-Pre-F-NPが予想される折り畳みナノ粒子を形成することを実証した。さらに、還元データは、粒子が還元によって破壊されなかったことを示しており、これは、変異によってフェリチン上に導入された表面露出システインへのアジュバントコンジュゲーション前に行われた（図92を参照されたい）。

【図92】TLR9アゴニストCpGへのコンジュゲーションの有無に関わらず、RF8106のクーマシー染色SDS-PAGEゲル分析を示す図である。CpG処理ナノ粒子のゲルシフトの増加は、CpGアジュバントをRSVFナノ粒子に約40～50%完了まで添加し得ることを実証した。CpG、またはTLR7/8アゴニストSM7/8などの他の免疫刺激性部分のコンジュゲーションは、融合前特異的抗体D25およびAM14に結合する粒子の能力を阻害しなかった。

【図93】（RF8117、配列番号517）を有するRSVF、および追加のグリカン（RF8085、配列番号501、およびRF8113、配列番号516）を有しないRSVFを含むナノ粒子のウエスタンブロットを示す図である。RF8113は、RF8106と同様であるが、RF8106からのS111C表面露出システイン（フェリチン残基番号付けを使用して、すなわち、配列番号208のフェリチン配列中の位置に対応する）を、K79C表面露出システイン（またフェリチン残基番号付けを使用する）に置き換えて、コンジュゲーション部位をPre-F部分からさらに離すようにした。RF8106と同様に、RF8113は、ベンチマーク分子RF8085に対して改善された発現を保持する。RF8117は、RF8113と同様であるが、図88で同定された3つのグリコシル化変異、すなわち、E328N、S348NおよびR507Nをさらに含み、発現をさらに改善し、図87Bに記載されるように、融合前Fおよび融合後Fコンフォメーション間で共有される非中和エピトープをブロックする。

【図94】潜在的トリプシン様プロテアーゼ切断部位における異なる置換を有するRSVF構築物の発現を示す図である。RF8090（CHO発現ベクターに適合した異なるDNA配列を有するRF8085と同じタンパク質配列）のCHO細胞株発現において、ポリペプチドがFとフェリチン部分の間で切り取られ、発現の低下をもたらすことが観察された。F部分の得られた質量により、タンパク質分解は、Pre-F-NP構築物のHRB、ブルーフログリンカー領域の近くで起こる可能性があるとは推定された。この領域内のリジンおよびアルギニン残基（残基約450～550）の変異を、構築物の潜在的トリプシン様タンパク質分解を排除するために探索した。RF8117（K498LおよびK508Q）に対するRF8122（配列番号518）の変異は、293細胞における改善された発現をもたらし、CHO細胞におけるタンパク質分解を減少または排除し得る。選択的変異は、発現を制限した。

【図95-1】図95A-Bは、安定にトランスフェクトされたCHO細胞におけるRF

10

20

30

40

50

8090、RF8117およびRF8140の発現を示す図である。RF8090（配列番号501）の発現収率は、低レベルで観察された。DS-CAV1のジスルフィドを置き換える変異、および潜在的なチプシン切断部位を除去するためのF部分とフェリチン部分の間のリンカーへの変異を上記のように導入して、RF8117（配列番号517）およびRF8140（配列番号523）を構築し、これを安定発現CHO細胞にクローニングした。（図95A）CHO馴化培地中のCHO細胞の3つおよび4つのプールからのRF8117およびRF8140のそれぞれの発現を、D25-ウエスタンブロット分析によりCHO馴化培地中のRF8090の収率と比較した。RF8117の3つ全てのCHOプール、およびRF8140の4つ全てのCHOプールは、RF8090よりも高い収率で発現する。（図95B）OctetによるD25融合前F特異抗体により測定したCHO馴化培地へのRF8117の発現。左のパネルは、標準曲線を提供するプロテインAチップ上のD25への結合の応答に対してプロットされた既知濃度の293培地から精製されたRF8140の応答を示す。個々のドットは、RF8117 CHO馴化培地からのD25結合に対する応答を表す。右のパネルは、D25結合応答に基づくCHOプール馴化培地中のRF8117またはRF8140の計算された収率を示す。RF8117とRF8140の両方は、D25およびAM14の結合によって測定すると培地中で発現され、293細胞と同様に、CHO細胞は、融合前F三量体構造を保持する折り畳まれた様式でPre-F-NPを発現することができることを実証した。

10

【図95-2】図95-1の続き。

【図96】図96A-Bは、Pre-F-NP RF8117に対する中和抗体応答。（図96A）DS-CAV1（Pre-F三量体、配列番号525）、融合後F三量体（Post-F三量体、配列番号524）または操作されたグリコシル化を有するPre-F-NP（Pre-F-NP、RF8117、配列番号517）の高用量（1μg）および低用量（0.1μg）免疫によって誘発されたRSV中和力価の比較をVERO細胞アッセイによって測定した。全てのRSVポリペプチドを、本明細書に記載されるように、アジュバントAF03とともに投与した。全体を通じて、別段の記載がない限り、AF03は、RSVポリペプチドまたはナノ粒子とともに投与されたが、それにコンジュゲートされなかった。RSVポリペプチドおよび用量は、x軸の下に表示される。Pre-F-NP免疫と比較した高用量反応の統計学的解析が示される。（図96B）DS-CAV1（Pre-F三量体）、操作されたグリコシル化を伴わないPre-F-NP（RF8113、配列番号516）、または操作されたグリコシル化を伴うPre-F-NPを用いた高用量（1μg）および低用量（0.1μg）免疫によって誘発されたRSV中和力価の比較をVERO細胞アッセイによって測定した。全てのRSVポリペプチドは、本明細書に記載されるように、アジュバントAF03（いずれのポリペプチドまたはナノ粒子にもコンジュゲートしていない）とともに投与された。RSVポリペプチドおよび用量は、x軸の下に表示される。

20

30

【図97-1】図97A-Dは、マウスまたは非ヒト霊長類モデルにおいて、融合後F三量体（配列番号524）またはPre-F-NP（RF8140、配列番号523）を用いた免疫によって誘発されたRSV融合前F三量体（DS-CAV1）結合抗体およびRSV中和抗体の比較を示す図である。（図97A）融合後FとPre-F-NP（RF8140、配列番号523）との間の免疫からマウスにおいて誘発された融合前F三量体結合抗体応答を比較する。（図97B）融合後FおよびPre-F-NP（RF8140、配列番号523）による免疫からマウスにおいて誘発された中和抗体応答を示す。（図97C）アジュバントの有無に関わらず、Pre-F-NPによって非ヒト霊長類において誘発された融合前F三量体結合抗体応答（AF03、下記括弧内に示される）を比較する。（図97D）AF03アジュバントの有無に関わらず、Pre-F-NP（RF8140、配列番号523）による免疫によって誘発されたRSV中和力価を比較する。マウスにおいては、Pre-F-NPは、融合後三量体と比較して、高い融合前のF結合応答およびRSV中和反応を誘発する。非ヒト霊長類においては、Pre-F-NPは、強力な中和反応を誘発する。

40

50

【図 97-2】図 97-1 の続き。

【図 98】図 98A-98B は、操作されたグリコシル化部位が融合後エピトープをブロックすることを示す図である。(図 98A) Octet により測定した、高用量 (1 μ g) および低用量 (0.1 μ g) での操作されたグリコシル化を伴わない Pre-F-NP (RF8113)、または操作されたグリコシル化を伴う Pre-F-NP (操作された Gly 粒子) による免疫によって誘発された融合前 F (DS-CAV1) に対する抗体応答を示す。(図 98B) Octet により測定した、高用量 (1 μ g) および低用量 (0.1 μ g) での操作されたグリコシル化を伴わない Pre-F-NP (RF8113)、または操作されたグリコシル化を伴う Pre-F-NP (RF8117) による免疫によって誘発された融合後三量体に対する抗体応答を示す。上記のように、全ての RSV ポリペプチドを免疫中に AF03 と混合した。RF8113 と RF8117 はいずれも、融合前 F に対する強固な抗体応答を誘発するが、RF8117 によって誘発される融合後 F 抗体応答は、大幅に低下する。これは、共有される融合前エピトープおよび融合後エピトープへの操作されたグリカンマッピングによる (図 88B)。

【図 99-1】図 99A-C は、操作されたグリコシル化部位による非中和エピトープのブロッキングを示す図である。(FIG99A) VERO 細胞アッセイにより測定したマウス試験における 0.1 μ g 用量での野生型グリコシル化部位 (「Wt グリカン粒子」、RF8113、配列番号 516) を有する Pre-F NP 対追加的な操作されたグリコシル化部位 (「+グリカン粒子」、RF8117、配列番号 517) を有する Pre-F NP による免疫によって誘発された RSV 中和力価の比較。(図 99B) マウス研究における 0.1 μ g 用量での Wt グリカン粒子 (RF8113、配列番号 516) 対 +グリカン粒子 (RF8117、配列番号 517) による免疫によって誘発された RSV 融合後 F 三量体結合抗体応答の比較。(図 99C) パネル A および B からの結合力価に対する測定された中和力価の比は、操作されたグリカンが、機能的な中和抗体応答を低下させなかったが、共有された融合前後エピトープに誘発された非中和抗体を低下させ (図 87B)、それによって中和/結合抗体比を改善したことを実証する。

【図 99-2】図 99-1 の続き。

【図 100-1】図 100A-D は、フェリチンナノ粒子にコンジュゲートした RSV G 中央ドメインペプチド (Gcc) の特徴付けを示す図である。(図 100A) Gcc-NP 抗原を形成する、RSV G 中央ドメイン (配列番号 529) のフェリチンナノ粒子へのクリックコンジュゲーションを示すクーマシー染色 SDS-PAGE ゲル。(図 100B) Gcc-NP の構造モデル。(図 100C) マウス研究における、Gcc ペプチド単独 (Gcc ペプチド、配列番号 529) 対ナノ粒子にコンジュゲートした Gcc ペプチド (Gcc-NP) による免疫によって誘発された Gcc 結合抗体応答の比較。未処理血清からの代表的な反応を白枠で示し、2 回目の免疫後からの反応を薄灰色枠で示し、3 回目の免疫後からの反応を濃灰色枠で示す。(図 100D) HAE 細胞アッセイによって測定された、3 回目の注射後のマウス研究における Gcc ペプチド (配列番号 529) 対 Gcc-NP による免疫によって誘発された RSV 中和力価の比較。未処置動物からの血清および Gcc ペプチドで免疫した動物からの血清をプールし、力価をバーとして示した。

【図 100-2】図 100-1 の続き。

【図 101-1】図 101A-C は、RSV Pre-F-NP (RF8140) および Gcc-NP の同時投与は、中和反応を誘発する。マウスを、抗原あたり 1 μ g 用量で、Pre-F-NP (RF8140) 単独、Gcc-NP 単独、または Pre-F-NP および Gcc-NP を組み合わせて免疫した。上記のように、全ての免疫を AF03 でアジュバント化した。(図 101A) RF8140 単独 (Pre-F-NP) または RF8140 および Gcc-NP (Pre-F-NP + Gcc-NP) によるマウスの免疫は、融合前 F 三量体に結合する抗体を誘発した。(図 101B) Gcc-NP 単独 (Gcc-NP) または RF8140 および Gcc-NP (Pre-F-NP + Gcc-NP) によるマウスの免疫は、Gcc ペプチドに結合する抗体を誘発した。(図 101C) Pre-F-NP 単独、Gcc-NP 単独、または Pre-F-NP と Gcc-NP の同時投与のい

いずれかで免疫した動物は、H A E 中和アッセイで測定した場合、第 2 および第 3 の免疫後に中和反応を誘発する。P r e - F - N P + G c c - N P の同時投与は、P r e - F - N P 単独による免疫によって誘発されるものよりも優れた中和反応を誘発した。

【図 1 0 1 - 2】図 1 0 1 - 1 の続き。

【図 1 0 2】図 1 0 2 A - B は、P r e - F - N P および G c c - N P の同時投与は、P r e - 融合 F 三量体または G c c - ナノ粒子に結合する抗体の誘発と干渉しない。F 感受性 V E R O 細胞アッセイによって測定された中和力価は、図 1 0 2 A の左側にあり、F および G 感受性 H A E アッセイによって測定された中和力価は、図 1 0 2 B の右側に示される。動物の免疫は、図 1 0 1 と同様であった。免疫に使用される R S V ポリペプチドは、水平軸下にある。黒いバーは、図 1 0 1 に記載される免疫群からプールされた血清を表し、同様に標識される。未処置動物の血清もまた黒いバーで示され、比較のために表示される。融合前 F 三量体で枯渇された血清は白色で示され、対応する黒いバーの右側にある。G エクトドメインで枯渇された血清は、対応する黒いバーのちょうど右側に、斜めにストライプされた棒で示される。融合前 F 三量体で枯渇され、続いて G エクトドメインで枯渇された血清は、垂直にストライプされたバーで示される。(図 1 0 2 A) 中和力価は、R F 8 1 4 0 免疫および R F 8 1 4 0 + G c c - N P 同時投与由来の血清について、V E R O 細胞アッセイにおいて観察されたが、未処理血清または G c c - N P 免疫単独由来の血清では観察されなかった。R F 8 1 4 0 または R F 8 1 4 0 + G c c - N P 群の血清を融合前 F 三量体で枯渇させると、測定可能な中和力価が低下した。(図 1 0 2 B) 中和力価は、R F 8 1 4 0、G c c - N P、または G c c - N P と同時投与した R F 8 1 4 0 で免疫した動物由来の血清について、H A E 細胞アッセイにおいて観察された。未処置動物からの血清は中和反応を示さなかった。融合前 F 三量体で枯渇させた R F 8 1 4 0 で免疫した動物由来の血清は、測定可能な中和力価の低下を示す。G エクトドメインで枯渇させた G c c - N P で免疫した動物由来の血清は、測定可能な中和力価の低下を示す。R F 8 1 4 0 と G c c - N P の同時投与で免疫した動物由来の血清は、融合前 F 三量体単独で枯渇させた場合、測定可能な中和力価の低下を示さないが、融合前 F 三量体と G エクトドメインの両方で枯渇させた場合、測定可能な中和力価の低下を示す。まとめると、これらのデータは、P r e - F - N P と G c c - N P の同時投与は、融合前 F または G に対する中和抗体を誘発する抗原のそれぞれの能力と干渉しないことを示唆する。

【図 1 0 3】図 1 0 3 A - B は、A F 0 3、S P A 0 9 もしくはミョウバンによる R F 8 1 1 7 または R F 8 1 4 0 のアジュバント化は、非アジュバント化 R F 8 1 1 7 と比較して、マウスにおいて優れた中和反応を誘発する。(図 1 0 3 A) 非アジュバント化 (N o A d j)、ミョウバンでアジュバント化または A F 0 3 でアジュバント化のいずれかの R F 8 1 1 7 で免疫したマウス由来の血清の中和力価は、V E R O 細胞アッセイによって測定した場合に示される。(図 1 0 3 B) 非アジュバント化 (A d j なし) の R F 8 1 1 7、S P A 0 9 でアジュバント化された R F 8 1 1 7、または A F 0 3 でアジュバント化された R F 8 1 4 0 のいずれかで免疫したマウス由来の血清の中和力価は、V E R O 細胞アッセイによって測定した場合に示される。R F 8 1 1 7 または R F 8 1 4 0 のいずれについての全ての場合において、未処置マウスのアジュバント化群では、非アジュバント化非群よりも高い中和力価が誘発された。

【図 1 0 4 - 1】図 1 0 4 A - B は、A F 0 3 または S P A 0 9 を用いた R F 8 1 4 0 のアジュバント化は、非ヒト霊長類 (N H P) において、非アジュバント化 F 8 1 4 0 免疫と比較して優れた中和反応を誘発する。(図 1 0 4 A) E L I S A で測定された、非アジュバント化 (A d j なし)、A F 0 3 でアジュバント化または S P A 0 9 でアジュバント化 (以下に示されように、S P A 0 9 の 2 用量を使用した) のいずれかの R F 8 1 4 0 による免疫後の N H P 血清で測定された融合前 F 三量体結合応答。全ての時点で、A F 0 3 または S P A 0 9 によるアジュバント化は、優れた中和反応を誘発する。(図 1 0 4 B) 非アジュバント化 (N o A d j)、A F 0 3 でアジュバント化された、または S P A 0 9 でアジュバント化された (下記に示すように、S P A 0 9 の 2 用量を使用した) のいずれかの、R F 8 1 4 0 で免疫した N H P からの血清の中和力価を、V E R O 細胞アッセイ

10

20

30

40

50

により測定した。全ての場合において、アジュバントによるRF8140による免疫は、全ての時点において、アジュバント非アジュバント投与群よりも高い中和力価を誘導する。

【図104-2】図104-1の続き。

【図105】図105A-Bは、RF8140のTLR7/8アゴニストSM7/8またはTLR9アゴニストCpGへのコンジュゲーションは、非アジュバント化RF8140単独と比較して優れた融合前F結合能力価を誘導する。(図105A)未処置マウス、非アジュバント化RF8140で免疫したマウス、SM7/8アジュバントとコンジュゲートされたRF8140で免疫したマウス、130ngのSM7/8でアジュバント化されたRF8140、または20μgのSM7/8でアジュバント化されたRF8140のいずれかからの血清において測定された融合前F三量体結合応答が示されている。SM7/8にコンジュゲートされたRF8140は、非アジュバント化群またはSM7/8アジュバント化群よりも高い融合前F三量体結合能力価を誘発する。(図105B)未処置マウス、非アジュバント化RF8140で免疫したマウス、CpGアジュバントとコンジュゲートされたRF8140、680ngのCpGでアジュバント化されたRF8140、または20μgのSM7/8でアジュバント化されたRF8140のいずれかで免疫したマウスからの血清において測定された融合前F三量体結合応答を示す。SM7/8にコンジュゲートされたRF8140は、非アジュバント化群またはSM7/8アジュバント化群よりも高い融合前Fトリマー結合能力価を誘発する。

【図106-1】図106A-Gは、Fサブユニットワクチン候補は、MIMICシステムにおいて、Pre-F指向性中和抗体およびTh1 CD4⁺T細胞反応を誘発する。(図106A)MIMICシステムにおける抗pre-F力価は、10ng/mlのPre-F NPで各Agをモル等量濃度のFでプライミングした後、AFにより測定された(n=48~49ドナー/群)。(図106B)微小中和力価を測定し、国際単位/ml(IU/ml)で表す。(図106C)抗pre-Fとpost-Fとの比>1は、F結合後抗体と比較して、F結合前抗体のより高いレベルを表し、一方、比值<1は、ポストFに対するより大きな抗体応答を表す。(図106D)Fタンパク質負荷された標的細胞で再刺激された活性化CD154⁺/CD4⁺T細胞におけるTNFαの産生は、フローサイトメトリーを用いて測定された(n=48)。統計的有意性は、Tukey-Kramer-HSD多重比較によって決定された。(図106E)ヒト対象における既存の抗体力価(血清状態)は、MIMICシステムにおけるRSV免疫応答の大きさと強く相関する。各ドナーからの血清中の抗Pre-F IgGを示す線形回帰プロット対総抗Pre-F IgG応答をソフトウェアまたはアルゴリズムにより生成し、共通の勾配に関するp値を統計学的方法により分析した(n=50)。Y軸は、RSVによるプライミング後に得られた抗Pre-F IgGレベルを表す。(図106F)図106Eと同様に、Fサブユニットワクチン候補でプライミングした後の各ドナーからの血清中の抗Pre-F IgG対総抗Pre-F IgGを示す線形回帰プロット(ポストFは四角形、Pre-F-NPは円形、およびDC-Cav1は菱形)。抗Pre-F IgGの既存循環力価は、199, 800~3, 037, 600, 000の範囲であった。各ドナーは、各々、各ドナーのIgG値を表す。(図106G)ヒトB細胞において、Gccペプチド単独(Gccペプチド)対ナノ粒子にコンジュゲートされたGccペプチド(Gcc-NP)による処置によって誘発されたGcc結合抗体応答の比較。上述のように、比較のために処置なし群を示す。

【図106-2】図106-1の続き。

【図106-3】図106-2の続き。

【図106-4】図106-3の続き。

【図107】図107A-Cは、低用量(0.5μg)のRSV Gcc-フェリチンナノ粒子(「Gcc-NP」)によって誘発される中和抗体力価を示す図である。陰性対照および陽性対照として未処理および高度免疫血清を用いて、2回目の免疫の2週間後(2wp2)に採取された血清(図107A)、または3回目の免疫の2週間後(2wp3)

に採取された血清（図107B）から、RSV A2 Gcc配列（AF03で製剤化される）を含有するRSV Gcc-NPによる免疫から誘発されたRSV A株HAE中和力価が示される。また、3回目の免疫の2週間後（2wp3）に採取された血清（図107C）から、RSV A2 Gcc配列（AF03で製剤化される）を含有するRSV Gcc-NPによる免疫から誘発されたRSV B株HAE中和力価もまた示される。

【図108】図108A-Bは、RSV Gcc-NPによって誘発されたRSV A2株抗原結合抗体応答を示す図である。（図108A）高用量（5μg）のRSV Gcc-NPによって誘発された、2回目の注射から2週間後（薄灰色棒）および3回目の注射から2週間後（濃灰色棒）に測定されたGcc A2株に対して誘発されたGcc結合抗体応答。未処置マウスの血清反応は陰性対照として示される。（図108B）低用量（0.5μg）のRSV Gcc-NPによって誘発された、2回目の注射から2週間後（薄灰色棒）および3回目の注射から2週間後（濃灰色棒）に測定されたGcc A2株に対して誘発されたGcc結合抗体応答。

【図109】図109A-Bは、RSV Gcc-NPによって誘発されたRSV B1株抗原結合抗体応答を示す図である。（図109A）高用量（5μg）のRSV Gcc-NPによって誘発された、2回目の注射から2週間後（薄灰色棒）および3回目の注射から2週間後（濃灰色棒）に測定されたGcc B1株に対して誘発されたGcc結合抗体応答。未処置マウスの血清反応は、陰性対照として示される。（図109B）低用量（0.5μg）のRSV Gcc-NPによって誘発された、2回目の注射から2週間後（薄灰色棒）および3回目の注射から2週間後（濃灰色棒）に測定されたGcc B1株に対して誘発された、Gcc結合抗体応答。

【発明を実施するための形態】

【0098】

本明細書において、免疫に使用するための新規フェリチンプラットフォームポリペプチドおよびナノ粒子を提供する。このフェリチンは、免疫刺激性部分を、操作された表面に露出したシステインに直接コンジュゲートすることができるように、表面に露出したアミノ酸において非システインアミノ酸をシステインに変化させる変異を含み得る。本明細書に提供されるフェリチンポリペプチドは、非フェリチンポリペプチド構成要素をさらに含み得、個別の分子としてのアジュバントと共に単独で、および／またはナノ粒子の一部として投与した場合に抗原性であり得、自己アジュバント性であり得る。フェリチンプラットフォームタンパク質およびナノ粒子の設計は、免疫原性を増加させ、および／またはアジュバントを個別に投与する必要性をなくすまたは低減させ、同様にフェリチンに会合した（例えば、融合した）非フェリチンポリペプチドに対する免疫応答を誘発するために必要なアジュバント／免疫刺激性部分の量をおそらく低減させ得る。本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸も同様に提供される。

【0099】

I. 定義

「フェリチン」または「フェリチンタンパク質」は、本明細書で使用される場合、H. ピロリフェリチン（配列番号208または209）、またはP. フリオス（P. furiosus）フェリチン、イラクサギンウワバ（Trichoplusia ni）フェリチン、もしくはヒトフェリチンのような本明細書で考察される別のフェリチンと検出可能な配列同一性を有し、鉄を例えば細胞内もしくは組織内で貯蔵する、または鉄を血流に運ぶ役目を果たすタンパク質を指す。重鎖および軽鎖（例えば、イラクサギンウワバおよびヒトフェリチン）として知られる2つのポリペプチド鎖として存在するフェリチンを含むそのような例示的なフェリチンを、以下で詳細に考察する。一部の実施形態では、フェリチンは、本明細書に、例えば表1（配列表）に開示されるフェリチン配列と少なくとも15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または99.5%の同一性を有する配列を含む。フェリチンは、完全長の天然に存在する配列の断片であり得る。「野生型フェリチン」は、本明細書で使用される場合、その配列が天然に存在する配列からなるフェリチンを

指す。フェリチンはまた、完全長のフェリチン、または野生型フェリチンとはそのアミノ酸配列において1つまたはそれ以上の差を有するフェリチンの断片も含む。

【0100】

本明細書で使用される場合、「フェリチン単量体」は、他のフェリチン分子と集合していない単一のフェリチン分子（例えば、該当する場合、単一のフェリチン重鎖または軽鎖）を指す。「フェリチン多量体」は、複数の会合したフェリチン単量体を含む。「フェリチンタンパク質」は、単量体フェリチンおよび多量体フェリチンを含む。

【0101】

本明細書で使用される場合、「フェリチン粒子」は、球状形態に自己集合したフェリチンを指す。フェリチン粒子は時に、「フェリチンナノ粒子」または単に「ナノ粒子」と呼ばれる。一部の実施形態では、フェリチン粒子は、24個のフェリチン単量体（または該当する場合、全体で24個の重鎖および軽鎖）を含む。

【0102】

「ハイブリッドフェリチン」は、本明細書で使用される場合、ウシガエルフェリチンのアミノ末端伸長部を有するH₂ピロリフェリチンを含むフェリチンを指す。ウシガエルフェリチンのアミノ末端伸長部として使用される例示的な配列を、配列番号217として示す。ハイブリッドフェリチンでは、免疫刺激性部分の結合部位がフェリチン粒子表面上に均一に分布するように、ウシガエルフェリチンのアミノ末端伸長部をH₂ピロリフェリチンに融合することができる。「ウシガエルリンカー」は、本明細書で使用される場合、配列番号217の配列を含むリンカーである。ハイブリッドフェリチンはまた、時に「bfpFerr」または「bfpフェリチン」と呼ばれる。ウシガエル配列を含むいずれの構築物も、ウシガエル配列がなくとも、例えばリンカーまたは代替リンカーがなくとも提供することができる。例示的なウシガエルリンカー配列を、表1に提供する。表1はウシガエルリンカーを示すが、リンカーまたは代替リンカーを有しない同じ構築物を作製してもよい。

【0103】

「N-グリカン」は、本明細書で使用される場合、タンパク質のN（アスパラギン）残基のアミド窒素でタンパク質に結合した糖質鎖を指す。そのため、N-グリカンは、Nグリコシル化のプロセスによって形成される。このグリカンは多糖類であり得る。

【0104】

「グリコシル化」は、本明細書で使用される場合、タンパク質への糖質単位の付加を指す。

【0105】

「免疫応答」は、本明細書で使用される場合、抗原またはワクチンのような刺激に対する、B細胞、T細胞、樹状細胞、マクロファージ、または多形核細胞のような免疫系の細胞の応答を指す。免疫応答は、例えばインターフェロンまたはサイトカインを分泌する上皮細胞を含む、宿主防御応答に関係する体の任意の細胞を含み得る。免疫応答は、生得のおよび／または適応免疫応答を含むがこれらに限定されない。本明細書で使用される場合、「保護的免疫応答」は、対象を感染から保護する（例えば、感染を防止する、または感染に関連する疾患の発生を防止する）免疫応答を指す。免疫応答を測定する方法は、当技術分野で周知であり、例えばリンパ球（例えば、BまたはT細胞）の増殖および／または活性、サイトカインまたはケモカインの分泌、炎症、抗体産生等を測定することを含む。

「抗体応答」は、抗体が産生される免疫応答である。

【0106】

本明細書で使用される場合、「抗原」は、生物に曝露または投与した場合に、免疫応答を誘発する作用物質、および／またはT細胞受容体（例えば、MHC分子によって提示される場合）が結合する、もしくは抗体（例えば、B細胞によって産生される場合）に結合する作用物質を指す。一部の実施形態では、抗原は、生物において液性応答（例えば、抗原特異的抗体の産生を含む）を誘発する。あるいはまたは加えて、一部の実施形態では、抗原は、生物において細胞性応答（例えば、その受容体が抗原と特異的に相互作用するT

10

20

30

40

50

細胞を含む)を誘発する。特定の抗原は、標的生物(例えば、マウス、ウサギ、霊長類、ヒト)の1つまたはいくつかのメンバーにおいて免疫応答を誘発し得るが、標的生物種の全てのメンバーにおいて誘発するわけではない。一部の実施形態では、抗原は、標的生物種のメンバーの少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%において免疫応答を誘発する。一部の実施形態では、抗原は、抗体および/またはT細胞受容体に結合するが、生物において特定の生理的応答を誘導しても誘導しなくてもよい。一部の実施形態では、例えば、抗原は、*in vivo*でそのような相互作用が起こるか否かによらず、*in vitro*で抗体および/またはT細胞受容体に結合し得る。一部の実施形態では、抗原は、異種免疫原によって誘導される産物を含む、特異的液性免疫または細胞性免疫の産物と反応する。抗原は、本明細書に記載されるフェリチン(例えば、1つまたはそれ以上の変異を含む)および非フェリチンポリペプチドを含む抗原性フェリチンタンパク質を含む。

10

【0107】

「免疫刺激性部分」は、本明細書で使用される場合、フェリチンまたは抗原性フェリチンポリペプチドに共有結合し、免疫系の構成要素を活性化することができる(単独で、またはフェリチンまたは抗原性フェリチンポリペプチドに結合した場合)部分を指す。例示的な免疫刺激性部分は、*tol l-l i k e*受容体(TLR)、例えば、TLR4、7、8、または9のアゴニストを含む。一部の実施形態では、免疫刺激性部分はアジュバントである。

20

【0108】

「アジュバント」は、本明細書で使用される場合、抗原に対する免疫応答を非特異的に増強する物質またはビヒクルを指す。アジュバントには、抗原を吸着させた無機質(例えば、ミョウバン、水酸化アルミニウム、またはリン酸塩)の懸濁液、抗原溶液を鉱油または水中で乳化させた油中水型または水中油型乳剤(例えば、フロイント不完全アジュバント)を挙げることができるがこれらに限定されない。時に、抗原性をさらに増強するために死菌マイコバクテリア(例えば、フロイント完全アジュバント)を含める。免疫刺激性オリゴヌクレオチド(例えば、CpGモチーフ)もまた、アジュバントとして使用することができる(例えば、米国特許第6,194,388号;第6,207,646号;第6,214,806号;第6,218,371号;第6,239,116号;第6,339,068号;第6,406,705号;および第6,429,199号を参照されたい)。アジュバントはまた、*T o l l-L i k e*受容体(TLR)アゴニストおよび共刺激分子のような生物学的分子も含み得る。アジュバントは、組成物中の個別の分子として、またはフェリチンもしくは抗原性フェリチンポリペプチドに共有結合(コンジュゲート)して投与してもよい。

30

【0109】

「抗原性フェリチンポリペプチド」および「抗原性フェリチンタンパク質」は、本明細書において互換的に使用され、フェリチン、および分子が非フェリチンポリペプチドに関して抗原性であるのに十分な長さの非フェリチンポリペプチドを含むポリペプチドを指す。抗原性フェリチンポリペプチドはさらに、免疫刺激性部分を含み得る。抗原性は、より大きい構築物の一部としての非フェリチン配列の特色であり得る。すなわち、構築物は、フェリチンを有しない非フェリチンポリペプチド(および該当する場合、免疫刺激性部分)がそうすることができるか否かによらず、非フェリチンポリペプチドに対する抗原としての役目を果たすことができれば十分である。非フェリチンポリペプチドは、抗原性フェリチンポリペプチドの文脈において、その宿主において病原体に対する保護的免疫応答を生じることができる、病原体のポリペプチドから得た、それに由来する、またはそれと類似の分子、例えば病原体に由来する分子全体または分子の断片であり得る。非フェリチンポリペプチドは、天然に存在する配列を含んでもよく、またはその構造が天然に存在する分子と非同一であるように人工的に設計もしくは改変することができる。例えば、ポリペプチドは、それがより大きい免疫原性を有するように、または対象において不適切な応答

40

50

(例えば、自己免疫応答)を媒介するリスクが減少するように、その天然に存在する型とは異なり得る。一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、RSV、インフルエンザ、EBV、またはOspAポリペプチドであり、この場合抗原性フェリチンポリペプチドはまた、「抗原性Xポリペプチド」であり、XはRSV、インフルエンザ、EBV、またはOspAである。しかし、明白にするために、抗原性RSV、インフルエンザ、EBV、またはOspAポリペプチドは、フェリチンを含む必要はない。「抗原性ポリペプチド」は、本明細書において使用される場合、抗原性フェリチンポリペプチド、および抗原性RSV、EBV、またはOspAポリペプチドのいずれかまたは両方であるポリペプチドを指す。

【0110】

「抗原性EBVポリペプチド」は、本明細書において使用される場合、分子がEBVに関して抗原性であるのに十分な長さのEBVアミノ酸配列の全てまたは一部を含むポリペプチドを指す。抗原性は、フェリチンまたはルマジンシンターゼタンパク質のような異種配列、および／または免疫刺激性部分をさらに含む構築物の一部としてのEBV配列の特色であり得る。すなわち、EBV配列が異種配列をさらに含む構築物の一部である場合、構築物は、異種配列を有しないEBV配列がそうすることができるか否かによらず、抗EBV抗体を生成する抗原としての役目を果たすことができれば十分である。

【0111】

「抗原性RSVポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、分子がRSVに関して抗原性であるのに十分な長さのRSVアミノ酸配列の全てまたは一部を含むポリペプチドを指す。抗原性は、フェリチンのような異種配列、および／または免疫刺激性部分をさらに含む構築物の一部としてのRSV配列の特色であり得る。すなわち、RSV配列が異種配列をさらに含む構築物の一部である場合、構築物は、異種配列を有しないRSV配列がそうすることができるか否かによらず、抗RSV抗体を生成する抗原としての役目を果たすことができれば十分である。

【0112】

「抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、分子がインフルエンザポリペプチドに関して抗原性であるフェリチンおよびインフルエンザポリペプチドを含む分子を指す。抗原性は、より大きい構築物の一部としてのインフルエンザポリペプチドの特色であり得る。すなわち、構築物は、フェリチンを有しないインフルエンザポリペプチドがそうすることができるか否かによらず、インフルエンザポリペプチドに対する抗体を生成する抗原としての役目を果たすことができれば十分である。一部の実施形態では、インフルエンザポリペプチドおよびフェリチンは、融合タンパク質として遺伝子融合されている。一部の実施形態では、インフルエンザポリペプチドおよびフェリチンは、例えば化学コンジュゲーションによって非遺伝的に連結されている。

【0113】

「抗原性OspAポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、ポリペプチドがOspAに関して抗原性であるのに十分な長さのOspAの全てまたは一部を含むポリペプチドを指す。完全長のOspAは、以下に定義するように、膜貫通ドメインおよびエクストドメインを含む。抗原性は、フェリチンまたはルマジンシンターゼタンパク質のような異種配列をさらに含む構築物の一部としてのOspA配列の特色であり得る。すなわち、OspAが異種配列をさらに含む構築物の一部である場合、構築物は、異種配列を有しないOspA配列がそうすることができるか否かによらず、抗OspA抗体を生成する抗原としての役目を果たすことができれば十分である。

【0114】

「自己アジュバント性」は、本明細書で使用される場合、フェリチンおよび免疫刺激性部分が同じ分子実体中にあるように、フェリチンおよびフェリチンに直接コンジュゲートされた免疫刺激性部分を含む組成物またはポリペプチドを指す。非フェリチンポリペプチドを含む抗原性フェリチンポリペプチドを、免疫刺激性部分にコンジュゲートして、自己アジュバント性ポリペプチドを生成してもよい。

10

20

30

40

50

【0115】

「表面に露出した」アミノ酸は、本明細書で使用される場合、該当する場合に、多量体形成後、タンパク質がその本来の三次元コンフォメーションにある場合に溶媒分子が接触することができる側鎖を有するタンパク質（例えば、フェリチン）中のアミノ酸残基を指す。このように、例えば24量体を形成するフェリチンの場合、表面に露出したアミノ酸残基は、フェリチンが24量体として、例えばフェリチン多量体またはフェリチン粒子として集合する場合に、その側鎖に溶媒が接触することができる残基である。

【0116】

本明細書で使用される場合、「対象」は、動物界の任意のメンバーを指す。一部の実施形態では、「対象」はヒトを指す。一部の実施形態では、「対象」は非ヒト動物を指す。一部の実施形態では、対象は、哺乳動物、鳥類、は虫類、両生類、魚類、昆虫、および／または虫を含むがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、非ヒト対象は、哺乳動物（例えば、齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、および／またはブタ）である。一部の実施形態では、対象は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、および／またはクローンであり得る。本発明のある特定の実施形態では、対象は成体、青年期、または幼体である。一部の実施形態では、用語「個体」または「患者」は、「対象」と互換的に使用され、互換的であると意図される。

【0117】

本明細書で使用される場合、用語「ワクチン接種」または「ワクチン接種する」は、例えば病原体に対して免疫応答を生成することが意図される組成物の投与を指す。ワクチン接種は、病原体に対する曝露および／または1つもしくはそれ以上の症状の発生の前、間、および／または後に投与することができ、一部の実施形態では、病原体に対する曝露の前、間、および／または直後に投与することができる。一部の実施形態では、ワクチン接種は、ワクチン接種組成物の適切な間隔を空けた複数回の投与を含む。

【0118】

本明細書で使用される場合、「EBVポリペプチド」は、EBVによってコードされるアミノ酸配列の全てまたは一部を含むポリペプチドを指す。同様に、gL、gH、gp42、およびgp220ポリペプチドはそれぞれ、EBVによってコードされるgL、gH、gp42、またはgp220アミノ酸配列の全てまたは一部を含むポリペプチドを指す。例えば、EBVコードポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドは、必然的にEBVコードポリペプチドの一部を含む。用語「gLポリペプチド」、「gHポリペプチド」、「gp42ポリペプチド」、および「gp220ポリペプチド」はそれぞれ、「EBV gLポリペプチド」、「EBV gHポリペプチド」、「EBV gp42ポリペプチド」、および「EBV gp220ポリペプチド」と互換的に使用される。抗原性ポリペプチドの一部または全てとしてのEBVポリペプチドによる免疫は、EBVによる感染症に対する保護を付与し得る。本文がそれ以外であると述べていない限り、EBVポリペプチドを含む本明細書に開示される任意のポリペプチドは、EBV（例えば、EBVのgLおよびgHの全てもしくは一部、またはEBVのgL、gH、およびgp42の全てもしくは一部）によってコードされる複数の配列の全てまたは一部を含み得る。

【0119】

本明細書で使用される場合、EBVポリペプチドの文脈における「単量体」または「単量体構築物」は、一本鎖タンパク質として発現される構築物を指す。単量体は、一本鎖で発現されるEBVのgLおよびgH、または一本鎖で発現されるEBVのgL、gH、およびgp42を含み得る。

【0120】

本明細書で使用される場合、EBVポリペプチドの文脈における「三量体」または「三量体構築物」は、T4ファージフィブリチンに由来するフォルドン三量体形成ドメインのような三量体形成ドメインと共にEBVのgLおよび／またはgHを含む構築物を指す。ヒトコラーゲンXVII三量体形成ドメイン（例えば、Alvarez-Cienfuegos

10

20

30

40

50

egosら、Scientific Reports 2016; 6: 28643を参照されたい) およびL1ORF1p三量体形成ドメイン(例えば、Khazinaら、Proc Natl Acad Sci U S A 2009 Jan 12; 106(3): 731-36を参照されたい)のような他の三量体形成ドメインもまた当技術分野で公知であり、三量体構築物において使用することができる。

【0121】

「抗原性部位0」または「部位0エピトープ」は、本明細書で使用される場合、野生型RSV(配列番号526)のアミノ酸残基62~69および196~209を含む、融合前RSV F三量体の頂点に位置する部位を指す。部位0エピトープは、D25およびAM14のような、融合前RSV Fに対して特異性を有する抗体の結合部位であり、部位0エピトープに対する抗体の結合は、RSVの細胞表面結合をブロックする(McLellanら、Science 340(6136): 1113-1117(2013))を参照されたい)。

10

【0122】

本明細書で使用される場合、「抗原安定性」は、経時的なまたは溶液中での抗原の安定性を指す。

【0123】

「空洞充填置換」は、本明細書で使用される場合、融合前のRSV F三量体に存在する空洞を充填するための操作された疎水性置換を指す。

【0124】

「Fタンパク質」または「RSV Fタンパク質」は、ウイルス侵入時のウイルスエンベロープと宿主細胞膜との融合の促進に関与するRSVのタンパク質を指す。

20

【0125】

「RSV Fポリペプチド」または「Fポリペプチド」は、Fタンパク質の少なくとも1つのエピトープを含むポリペプチドを指す。

【0126】

「グリカン付加」は、本明細書で使用される場合、構築物の発現を増加させる、構築物の安定性を増加させる、または融合前および融合後のコンフォメーションの間で共有されるエピトープをブロックするように操作することができる、野生型配列(例えば、野生型RSV F)には存在しないグリコシル化部位を導入する変異の付加を指す。グリカン付加を含む改変タンパク質は、より多くのグリコシル化を有し、したがってより高い分子量を有するであろう。グリカン付加は、RSV FポリペプチドがRSV Fの融合後コンフォメーションに対する抗体を誘発する程度を低減させることができる。

30

【0127】

「Gタンパク質」または「RSV Gタンパク質」は、本明細書で使用される場合、RSVとヒト気道上皮細胞との会合に関与する結合タンパク質を指す。例示的な野生型RSV Gアミノ酸配列を配列番号527として提供する。RSV Gタンパク質は、細胞外に存在するエクトドメイン(RSV G(配列番号527)のアミノ酸およそ66~297)を含む。RSV Gのエクトドメイン内に中央保存領域(GccまたはCCR、配列番号527のアミノ酸およそ151~193)がある。RSV GのCCRは、CX3Cモチーフを含む。CX3Cモチーフは、CX3CR1受容体に対するGタンパク質の結合を媒介する。

40

【0128】

「ヘリックスPROキャッピング」または「ヘリックスプロリンキャッピング」は、本明細書で使用される場合、ヘリックスキャップがプロリンを含む場合、ヘリックス形成を安定化できることを指す。

【0129】

「プロモーター内安定化置換」は、本明細書で使用される場合、RSV F三量体のプロモーター内の相互作用を安定化することによって融合前のコンフォメーションを安定化させる、RSV Fにおけるアミノ酸置換を記載する。

50

【0130】

「プロモーター間安定化置換」は、本明細書で使用される場合、R S V F三量体のプロモーターと互いの相互作用を安定化させることによって融合前コンフォメーションを安定化させる、R S V Fにおけるアミノ酸置換を記載する。

【0131】

「プロテアーゼ切断」は、本明細書で使用される場合、ポリペプチド配列における感受性がある残基（例えば、リシンまたはアルギニン）のタンパク質分解（時に、当技術分野で「クリッピング」とも呼ばれる）を指す。

【0132】

「融合後」は、R S V Fに関連して本明細書で使用される場合、ウイルスと細胞膜の融合後に起こるR S V Fの安定なコンフォメーションを指す。

10

【0133】

「融合前」は、R S V Fに関連して本明細書で使用される場合、ウイルスー細胞相互作用の前に取り入れられるR S V Fのコンフォメーションを指す。

【0134】

「プロトマー」は、本明細書で使用される場合、オリゴマータンパク質の構造単位を指す。R S V Fの場合、R S V F三量体の個々の単位はプロトマーである。

【0135】

「血球凝集素」または「HA」は、本明細書で使用される場合、宿主細胞膜上のシアル酸に対する結合に関与する任意のインフルエンザウイルスの糖タンパク質を指す（例示的な血球凝集素は、UniProt受託番号：P03451である）。HAは、以下に記載されるCOBRA P1、COBRA X6、およびCOBRA X3のような抗HA抗体によって認識されるまたは抗HA抗体を誘発することができる合成ポリペプチドを包含する。

20

【0136】

「HAステム」は、本明細書で使用される場合、HAエクトドメイン内のHAの保存領域から設計された操作されたインフルエンザポリペプチドを指す。保存されたとは、領域が全体としてのHAの配列同一性より、異なるHAサブタイプを有するインフルエンザの異なる株由来のHAの間で有意により高い配列同一性を維持することを意味する。HAステム抗原は、例えばImpagliazzaら、Science 2015 Sep 18, 349 (6254) : 1301~6頁; Valkenburgら、Sci Rep. 2016 Mar 7, 6 : 22666頁; Mallajosyulaら、Front Immunol. 2015, 6 : 329頁において詳細に考察されている。

30

【0137】

「ノイラミニダーゼ」または「NA」は、本明細書で使用される場合、ウイルスおよび細胞グリココンジュゲート由来の末端のシアル酸残基の除去を触媒することに関与する任意のインフルエンザウイルスの糖タンパク質を指す（例示的なノイラミニダーゼは、UniProt受託番号：P03472である）。

【0138】

「Y98F変異」は、本明細書で使用される場合、シアル酸と直接接触する野生型HA配列中のチロシンのフェニルアラニンによる置き換えを指す。この変異に起因するフェニルアラニンの位置を図26Aに示す。正確な位置は一部のHAサブタイプにおいて異なり得るが、配列アライメントまたは構造分析によって同定することができる。HA配列にY98F変異が存在すれば、対応する野生型HAが、シアル酸と直接接触するチロシンを含むサブタイプであることを暗示している。

40

【0139】

「免疫刺激性部分」は、本明細書で使用される場合、免疫系の構成要素を活性化することができる（単独で、またはフェリチンもしくは抗原性フェリチンポリペプチドに結合した場合）フェリチンまたは抗原性フェリチンポリペプチドに共有結合した部分を指す。例示的な免疫刺激性部分は、tolllike受容体（TLR）のアゴニスト、例えば、

50

T L R 4、7、8、または9を含む。一部の実施形態では、免疫刺激性部分はアジュバントである。

【0140】

本明細書で使用される場合、用語「キット」は、1つまたはそれ以上の化合物または組成物のような関連する構成要素、および溶媒、溶液、緩衝液、説明書、または乾燥剤のような1つまたはそれ以上の関連する材料の包装された組を指す。

【0141】

「N-グリカン」は、本明細書で使用される場合、タンパク質のN（アスパラギン）残基のアミド窒素でタンパク質に結合する糖質鎖を指す。そのため、N-グリカンは、N-グリコシル化プロセスによって形成される。このグリカンは多糖類であり得る。

10

【0142】

「O s p A エクトドメイン」は、本明細書で使用される場合、B. ブルグドルフェリ (B. burgdorferi) O s p A (UniProt 受託番号 P0CL66) のアミノ酸残基約27~273、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって同定される、そのホモログの対応する位置を指す。O s p A エクトドメインのさらなる例は、配列番号83~89のいずれかの27~X位を含み、ここでXは関連する配列のC末端位置であり、場合によりC末端L y s は含まれていない。一部の実施形態では、エクトドメインは、そのN末端に、対応する完全長の野生型配列の26番目の残基または25番目および26番目の残基をさらに含み；配列番号83~89では、25番目および26番目の残基はA s p およびG l u である。O s p A エクトドメインのなおさらなる例は、配列番号94~102のいずれかを含み、場合によりN末端の1、2、または3つの残基 (M e t - A s p - G l u) が含まれておらず、さらに場合によりC末端L y s が含まれていない。

20

【0143】

「O s p A 膜貫通ドメイン」は、本明細書で使用される場合、B. ブルグドルフェリ O s p A (UniProt 受託番号 P0CL66) のアミノ酸残基約2~24、またはペアワイズもしくは構造アライメントによって同定される、そのホモログの対応する位置を指す。

【0144】

本開示は、所定の核酸配列またはアミノ酸配列（参照配列）に対してそれぞれ、ある特定の程度の同一性を有する核酸配列およびアミノ酸配列を記載する。

30

【0145】

2つの核酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同定されたヌクレオチドのパーセンテージを示す。2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。

【0146】

用語「同一%」、「同一性%」、または類似の用語は、特に比較される配列間の最適なアライメントにおいて同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸のパーセンテージを指すと意図される。前記パーセンテージは、純粹に統計学的であり、2つの配列間の差は、比較される配列の全長にわたって分布していてもよいが、必ずしもランダムに分布している必要はない。2つの配列の比較は通常、対応する配列の局所領域を同定するために、最適なアライメント後に前記配列を、セグメントまたは「比較ウィンドウ」に関して比較することによって実行される。比較のための最適なアライメントは、手動で、またはS m i t h and W a t e r m a n, 1981, A d s App. M a t h. 2, 482頁によるローカルホモロジーアルゴリズムの助けを借りて、N e e d l e m a n and W u n s c h, 1970, J. M o l. B i o l. 48, 443頁のローカルホモロジーアルゴリズムの助けを借りて、P e a r s o n and L i p m a n, 1988, P r o c . N a t l A c a d. S c i. U S A 88, 2444頁の類似性検索アルゴリズムの助けを借りて、または前記アルゴリズムを使用するコンピュータプログラムの助けを借りて (G A P、B E S T F I T、F A S T A、B L A S T P、B L A S T N、およびT F A S T A、in W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a

40

50

ckage, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.) 実行してもよい。

【0147】

パーセンテージ同一性は、比較される配列が対応する同一の位置の数を決定する工程、この数を比較される位置の数（例えば、参照配列における位置の数）で除算する工程、およびこの結果に100を乗算する工程によって得られる。

【0148】

一部の実施形態では、同一性の程度は、参照配列の全長の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または約100%である領域に関して与えられる。例えば、参照核酸配列が200ヌクレオチドからなる場合、同一性の程度は、少なくとも約100、少なくとも約120、少なくとも約140、少なくとも約160、少なくとも約180、または約200ヌクレオチド、一部の実施形態では、連続ヌクレオチドに関して与えられる。一部の実施形態では、同一性の程度は、参照配列の全長にわたって与えられる。

【0149】

所定の核酸配列またはアミノ酸配列に対してそれぞれ、特定の同一性の程度を有する核酸配列またはアミノ酸配列は、前記所定の配列の少なくとも1つの機能的特性を有することができ、例えば、一部の例では前記所定の配列と機能的に等価である。1つの重要な特性は、特に、対象に投与した場合にサイトカインとして作用する能力を含む。一部の実施形態では、所定の核酸配列またはアミノ酸配列に対して特定の同一性の程度を有する核酸配列またはアミノ酸配列は、前記所定の配列と機能的に等価である。

【0150】

本明細書で使用される場合、用語「キット」は、1つまたはそれ以上の化合物または組成物のような関連する構成要素、および溶媒、溶液、緩衝液、説明書、または乾燥剤のような1つまたはそれ以上の関連する材料の包装された組を指す。

【0151】

II. 例示的なフェリチン、抗原性フェリチンポリペプチド、コンジュゲート、組成物、方法、および使用

フェリチンタンパク質は、複数の個々の単量体を含む球状のタンパク質複合体へと自己集合する。自己集合したフェリチン複合体は、フェリチン粒子またはナノ粒子と呼ぶことができる。

【0152】

フェリチン遺伝子は、多くの種において見出され、配列の変動はあるものの一般的に保存された高度のアルファヘリックス構造を示す。そのため、任意の特に記載されたフェリチンとのその配列同一性にも関わらず、細菌、昆虫、およびヒトフェリチンを含む任意のフェリチンを本発明において使用することができる。

【0153】

一部の実施形態では、フェリチンは、細菌、昆虫、真菌、鳥類、または哺乳動物である。一部の実施形態では、フェリチンはヒトである。一部の実施形態では、フェリチンは細菌である。一部の実施形態では、フェリチンは、H. ピロリフェリチンである。

【0154】

一部の実施形態では、フェリチンは、軽鎖および／または重鎖フェリチンである。一部の実施形態では、フェリチンは、場合により本明細書に記載される1つまたはそれ以上の改変を有する、ヒト重鎖フェリチン（FTH1、GENE ID番号：2495）、またはヒト軽鎖フェリチン（FTL、GENE ID番号：2512）である。一部の実施形態では、フェリチンは、場合により本明細書に記載される1つまたはそれ以上の変異を有する、イラクサギンウワバ重鎖フェリチン（GenBank：AY970291.1）またはイラクサギンウワバ軽鎖フェリチン（AY970292.1）である。一部の実施形態では、フェリチンナノ粒子は、重鎖フェリチンおよび軽鎖フェリチンの全体で24個のサブユニット、例えば12個の重鎖サブユニットおよび12個の軽鎖サブユニットを含む

。一部の実施形態では、フェリチンは、表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異を含む。

【0155】

一部の実施形態では、フェリチン、および分子が非フェリチンポリペプチドに関して抗原性であるのに十分な長さの非フェリチンポリペプチドを含む抗原性フェリチンポリペプチドが提供される。

【0156】

一部の実施形態では、抗原性フェリチンポリペプチドは、重鎖フェリチンまたは非フェリチンポリペプチド、ならびに軽鎖フェリチンおよび非フェリチンポリペプチドを含む。そのようなポリペプチドを組み合わせて、単一のフェリチン多量体または粒子上で同じまたは異なる2つの非フェリチンポリペプチドを発現させることができる。一部の実施形態では、2つの異なる非フェリチンポリペプチドは、単一の感染作用物質によってコードされる。一部の実施形態では、2つの異なる非フェリチンポリペプチドは、2つの異なる感染作用物質によってコードされる。一部の実施形態では、感染作用物質はウイルスまたは細菌である。一部の実施形態では、2つの異なる非フェリチンポリペプチドは、2つの異なる感染作用物質、例えばインフルエンザ、ボレリア、RSV、もしくはEBVのような異なる病原体、またはインフルエンザ、ボレリア、RSV、もしくはEBVのような病原体の異なる株もしくはタイプによってコードされ、重鎖および軽鎖フェリチンに結合してナノ粒子へと集合する。

【0157】

一部の実施形態では、抗原性フェリチンポリペプチドは、軽鎖フェリチンおよび非フェリチンポリペプチドと共に集合して二価組成物を産生する、重鎖フェリチンおよび非フェリチンポリペプチドを含む。一部の実施形態では、フェリチンは、本明細書に記載される1つまたはそれ以上の変異を有するH. ピロリフェリチン（例示的なH. ピロリフェリチン配列に関しては、配列番号208または209を参照されたい）である。一部の実施形態では、H. ピロリフェリチン（または他の細菌フェリチン）とヒトフェリチンとの間の配列相同性がより低いことにより、ワクチンプラットフォームとして使用した場合に自己免疫の可能性を減少させ得る（Kanekiyoら、Cell 162, 1090~1100頁（2015）を参照されたい）。

【0158】

一部の実施形態では、フェリチンは、本明細書に記載される1つまたはそれ以上の変異を有するピュロコックス・フリオス（*Pyrococcus furiosus*）フェリチン（NCBI seq WP_011011871.1）である。

【0159】

一部の実施形態では、フェリチンは、野生型フェリチンと70%より高い、75%より高い、80%より高い、85%より高い、90%より高い、95%より高い、97%より高い、98%より高い、または99%より高い同一性を有する配列を含む。

【0160】

一部の実施形態では、ナノ粒子を形成することが可能な異なるタンパク質を、フェリチンの代わりに使用する。一部の実施形態では、このタンパク質は、ルマジンシンターゼ（Raら、Clin Exp Vaccine Res 3:227~234頁（2014）を参照されたい）である。一部の実施形態では、このタンパク質は、ルマジンシンターゼ血清型1、2、3、4、5、6、または7である。例示的なルマジンシンターゼ配列を、配列番号216および219に提供する。一部の実施形態では、ルマジンシンターゼは、配列番号216または219と、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の同一性を有する配列を含む。

【0161】

A. フェリチン変異

1つまたはそれ以上の変異を含むフェリチンを本明細書に開示する。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の変異は、例えば野生型フェリチンのアミノ酸配列の変化、およ

び／またはNもしくはC末端での挿入を含む。一部の実施形態では、1、2、3、4、5、またはそれより多くの異なるアミノ酸が、野生型フェリチンと比較してフェリチンにおいて変異している（一部の実施形態では、任意のN末端挿入に加えて）。1つまたはそれ以上の変異は、例えば以下で詳細に考察するように、フェリチンの機能的特性を変化させることができる。一般的に、変異は単に、対応する野生型フェリチンと比較した配列の差（置換された、付加された、または欠失されたアミノ酸残基または複数の残基のような）を指す。

【0162】

1. コンジュゲーションのためのシステイン

一部の実施形態では、フェリチンを、免疫刺激性部分および／または非フェリチンポリペプチドのコンジュゲーションのための化学ハンドルを提供するように変異させる。これは、表面に露出した非システインアミノ酸をシステインに置き換える変異によって達成することができる。誤解を避けるため、「表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える」のような表現は、野生型または変異前配列における表面に露出したアミノ酸がシステインではないことを必然的に暗示している。免疫刺激性部分または非フェリチンポリペプチドのコンジュゲーションのための化学ハンドルを提供する別のアプローチは、リンカーのようなアミノ酸のセグメントをフェリチンのNまたはC末端に含めることであり、アミノ酸のセグメントはシステインを含む。一部の実施形態では、このシステイン（表面に露出したアミノ酸を置き換えるか、またはNもしくはC末端リンカーにある）は不対であり、このことは、これがジスルフィド結合を形成するために適切なパートナーシステインを有していないことを意味する。一部の実施形態では、このシステインは、フェリチンの二次構造を変化させない。一部の実施形態では、このシステインは、フェリチンの三次構造を変化させない。

【0163】

一部の実施形態では、このシステインを使用して、免疫刺激性部分のような作用物質をフェリチンにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、このシステインは、反応性である遊離のチオール基を提供する。一部の実施形態では、フェリチン上のこのシステインにコンジュゲートされた作用物質は、集合したフェリチン粒子の表面上で露出する。一部の実施形態では、このシステインは、投与後にフェリチン粒子が集合する間、対象の分子および細胞と相互作用することができる。

【0164】

一部の実施形態では、このシステインの存在により、1つまたはそれ以上の免疫刺激性部分、例えばアジュバントのコンジュゲーションが可能となる。一部の実施形態では、免疫刺激性部分のコンジュゲーションは、このシステインの非存在下では起こらない。

【0165】

一部の実施形態では、システインに置き換えられる非システインアミノ酸は、H. ピロリフェリチンのE12、S72、A75、K79、S100、およびS111から選択される。このように、一部の実施形態では、システインのために置き換えられる表面に露出したアミノ酸は、H. ピロリフェリチンのE12、S26、S72、A75、K79、S100、またはS111に対応するアミノ酸残基である。類似のアミノ酸を、ペアワイズまたは構造アライメントによって、非H. ピロリフェリチンにおいて見出すことができる。一部の実施形態では、システインに置き換えられる非システインアミノ酸は、ヒト軽鎖フェリチンのS3、S19、S33、I82、A86、A102、およびA120に対応するアミノ酸から選択することができる。一部の実施形態では、システインに置き換えられる表面に露出したアミノ酸は、本来のアミノ酸がシステインに置き換えられた場合、これは集合したフェリチン多量体もしくは粒子において反応性である、および／またはこのシステインはフェリチン多量体もしくは粒子の安定性を妨害しない、および／またはこのシステインがフェリチンの発現レベルの低減をもたらさないという理解に基づいて選択される。

【0166】

一部の実施形態では、フェリチンは E 1 2 C 変異を含む。一部の実施形態では、E 1 2 C 残基を使用して、作用物質（例えば、免疫刺激性部分および／または非フェリチンポリペプチド）をフェリチンにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、E 1 2 C 残基は、反応性である遊離のチオール基を提供する。一部の実施形態では、フェリチン単量体上の E 1 2 C 残基にコンジュゲートされた作用物質は、集合したフェリチン多量体または粒子の表面上で発現される。一部の実施形態では、24 個の E 1 2 C 残基（各単量体から 1 つ）が、フェリチン多量体または粒子の表面上に存在する。

【0167】

一部の実施形態では、フェリチンは、S 2 6 C 変異を含む。一部の実施形態では、S 2 6 C 残基を使用して、作用物質（例えば、免疫刺激性部分および／または非フェリチンポリペプチド）をフェリチンにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、S 2 6 C 残基は、反応性である遊離のチオール基を提供する。一部の実施形態では、フェリチン単量体上の S 2 6 C 残基にコンジュゲートされた作用物質は、集合したフェリチン多量体または粒子の表面上で発現される。一部の実施形態では、24 個の S 2 6 C 残基（各単量体から 1 つ）が、フェリチン多量体または粒子の表面上に存在する。

10

【0168】

一部の実施形態では、フェリチンは、S 7 2 C 変異を含む。一部の実施形態では、S 7 2 C 残基を使用して、作用物質（例えば、免疫刺激性部分および／または非フェリチンポリペプチド）をフェリチンにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、S 7 2 C 残基は、反応性である遊離のチオール基を提供する。一部の実施形態では、フェリチン単量体上の S 7 2 C 残基にコンジュゲートされた作用物質は、集合したフェリチン多量体または粒子の表面上で発現される。一部の実施形態では、24 個の S 7 2 C 残基（各単量体から 1 つ）が、フェリチン多量体または粒子の表面上に存在する。

20

【0169】

一部の実施形態では、フェリチンは、A 7 5 C 変異を含む。一部の実施形態では、A 7 5 C 残基を使用して、作用物質（例えば、免疫刺激性部分および／または非フェリチンポリペプチド）をフェリチンにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、A 7 5 C 残基は、反応性である遊離のチオール基を提供する。一部の実施形態では、フェリチン単量体上の A 7 5 C 残基にコンジュゲートされた作用物質は、集合したフェリチン多量体または粒子の表面上で発現される。一部の実施形態では、24 個の A 7 5 C 残基（各単量体から 1 つ）が、フェリチン多量体または粒子の表面上に存在する。

30

【0170】

一部の実施形態では、フェリチンは、K 7 9 C 変異を含む。一部の実施形態では、K 7 9 C 残基を使用して、作用物質（例えば、免疫刺激性部分および／または非フェリチンポリペプチド）をフェリチンにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、K 7 9 C 残基は、反応性である遊離のチオール基を提供する。一部の実施形態では、フェリチン単量体上の K 7 9 C 残基にコンジュゲートされた作用物質は、集合したフェリチン多量体または粒子の表面上で発現される。一部の実施形態では、24 個の K 7 9 C 残基（各単量体から 1 つ）が、フェリチン多量体または粒子の表面上に存在する。

【0171】

一部の実施形態では、フェリチンは、S 1 0 0 C 変異を含む。一部の実施形態では、S 1 0 0 C 残基を使用して、作用物質（例えば、免疫刺激性部分および／または非フェリチンポリペプチド）をフェリチンにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、S 1 0 0 C 残基は、反応性である遊離のチオール基を提供する。一部の実施形態では、フェリチン単量体上の S 1 0 0 C 残基にコンジュゲートされた作用物質は、集合したフェリチン多量体または粒子の表面上で発現される。一部の実施形態では、24 個の S 1 0 0 C 残基（各単量体から 1 つ）が、フェリチン多量体または粒子の表面上に存在する。

40

【0172】

一部の実施形態では、フェリチンは、S 1 1 1 C 変異を含む。一部の実施形態では、S 1 1 1 C 残基を使用して、作用物質（例えば、免疫刺激性部分および／または非フェリチン

50

ンポリペプチド)をフェリチンにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、S 1 1 1 C 残基は、反応性である遊離のチオール基を提供する。一部の実施形態では、フェリチン単量体上の S 1 1 1 C 残基にコンジュゲートされた作用物質は、集合したフェリチン多量体または粒子の表面上で発現される。一部の実施形態では、24 個の S 1 1 1 C 残基(各単量体から 1 つ)が、フェリチン多量体または粒子の表面上に存在する。

【0173】

2. 内部システインの除去

一部の実施形態では、フェリチンは、内部システインを非システインアミノ酸に置き換える変異を含む。本来の内部システイン残基を除去することによって、フェリチン単量体あたり 1 つのみの不對システインが存在することを確実にし、ジスルフィド形成のような望ましくない反応を回避することができ、より安定かつ効率的な結果(例えば、アジュバントの提示)をもたらすことができる。一部の実施形態では、H. ピロリフェリチンの C 3 1 が非システインアミノ酸に置き換えられる。一部の実施形態では、H. ピロリフェリチンの C 3 1 がセリンに置き換えられる(C 3 1 S)が、任意の非システイン残基、例えばアラニン、グリシン、トレオニン、またはアスパラギンを使用してもよい。類似のアミノ酸を、ペアワイズまたは構造アライメントによって、非 H. ピロリフェリチンにおいて見出すことができる。このように、一部の実施形態では、非システインのために置き換えられる内部システインは、H. ピロリフェリチンの C 3 1 と整列するアミノ酸残基である。C 3 1 S 変異を示す例示的なフェリチン配列を、配列番号 201 ~ 207 に示す。一部の実施形態では、1 つより多くの内部システインがフェリチンに存在する場合、2 つまたはそれより多く(例えば、各々の)内部システインは、セリン、またはセリン、アラニン、グリシン、トレオニン、もしくはアスパラギンから選択されるアミノ酸のような非システインアミノ酸に置き換えられる。

【0174】

3. グリコシル化

ヒト適合性のグリコシル化は、組換え薬物製品における安全性および効能に関与し得る。規制当局の承認は、極めて重要な品質属性として適切なグリコシル化を証明することを条件とし得る(Zhang ら、Drug Discovery Today 21 (5) : 740 ~ 765 頁(2016)を参照されたい)。N-グリカンは、アスパラギン側鎖のグリコシル化に起因することができ、ヒトと、細菌および酵母のような他の生物との間で構造が異なり得る。このように、本開示に従うフェリチンにおいて、非ヒトグリコシル化および/または N グリカン形成を低減または除去することが望ましいであろう。一部の実施形態では、フェリチンのグリコシル化を制御することにより、特にヒトワクチン接種に使用する場合、組成物の効能および/または安全性が改善される。

【0175】

一部の実施形態では、フェリチンを、N-グリカンの形成を阻害するように変異させる。一部の実施形態では、変異したフェリチンは、その対応する野生型フェリチンと比較して低減されたグリコシル化を有する。

【0176】

一部の実施形態では、フェリチンは、表面に露出したアスパラギンを非アスパラギンアミノ酸に置き換える変異を含む。一部の実施形態では、表面に露出したアスパラギンは、H. ピロリフェリチンの N 1 9、またはペアワイズまたは構造アライメントによって決定される、H. ピロリフェリチンの 3 1 位に対応する位置である。一部の実施形態では、そのようなアスパラギン、例えば H. ピロリフェリチンの N 1 9 を変異させることは、フェリチンのグリコシル化を減少させる。一部の実施形態では、変異は、アスパラギンをグルタミンに置き換える。一部の実施形態では、フェリチンは、N 1 9 Q 変異を含む H. ピロリフェリチンである。配列番号 201 ~ 207 は、N 1 9 Q 変異を含む例示的なフェリチン配列である。

【0177】

細菌または酵母において産生されたグリコシル化タンパク質に曝露された哺乳動物は、

細菌または酵母における所定のタンパク質のグリコシル化パターンが、哺乳動物における同じタンパク質のグリコシル化パターンとは異なり得ることから、グリコシル化タンパク質に対する免疫応答を生じ得る。このように、いくつかのグリコシル化治療タンパク質は、細菌または酵母における産生にとって適切ではないことがあり得る。

【0178】

一部の実施形態では、アミノ酸変異によるフェリチンのグリコシル化の減少は、細菌または酵母におけるタンパク質の産生を促進する。一部の実施形態では、フェリチンのグリコシル化の減少は、細菌または酵母において発現された変異フェリチンの投与時の哺乳動物における副作用の可能性を低減させる。一部の実施形態では、細菌または酵母において産生された変異フェリチンのヒト対象における反応原性は、グリコシル化が減少していること

10

【0179】

一部の実施形態では、低減されたグリコシル化を有する変異フェリチンを含む組成物の対象における分解は、野生型フェリチンを含む組成物、または野生型グリコシル化を有する対応するフェリチンを含む組成物と比較して遅い。一部の実施形態では、低減されたグリコシル化を有する変異フェリチンを含む組成物は、野生型フェリチン、または野生型グリコシル化を有する対応するフェリチンを含む組成物と比較して、対象において低減されたクリアランスを有する。一部の実施形態では、低減されたグリコシル化を有する変異フェリチンを含む組成物は、野生型フェリチン、または野生型グリコシル化を有する対応するフェリチンを含む組成物と比較してより長い血清中半減期を有する。

20

【0180】

4. 変異の組合せ

一部の実施形態では、フェリチンは、本明細書に記載される変異の1つより多くのタイプを含む。一部の実施形態では、フェリチンは、グリコシル化を減少させる変異、内部システインを除去する変異、および表面に露出したシステインを生成する変異から独立して選択される1つまたはそれ以上の変異を含む。一部の実施形態では、フェリチンは、グリコシル化を減少させる変異、内部システインを除去する変異、および表面に露出したシステインを生成する変異を含む。

30

【0181】

一部の実施形態では、フェリチンは、N19Q変異、C31S変異、および表面に露出したシステインを生成する変異を含む。一部の実施形態では、フェリチンは、N19Q変異、C31S変異、およびE12C変異を含む。一部の実施形態では、フェリチンは、N19Q変異、C31S変異、およびS72C変異を含む。一部の実施形態では、フェリチンは、N19Q変異、C31S変異、およびA75C変異を含む。一部の実施形態では、フェリチンは、N19Q変異、C31S変異、およびK79C変異を含む。一部の実施形態では、フェリチンは、N19Q変異、C31S変異、およびS100C変異を含む。一部の実施形態では、フェリチンは、N19Q変異、C31S変異、およびS111C変異を含む。一部の実施形態では、フェリチンは、前述の変異の組のいずれかに対応する変異を含み、対応する変異は、フェリチンアミノ酸配列とH. ピロリフェリチンアミノ酸配列（配列番号208または209）とのペアワイズアライメントによって決定した位置で、NをQに、CをSに、および非システインの表面に露出したアミノ酸をシステインに変化させる。

40

【0182】

1つより多くのタイプの変異を含む例示的なフェリチンを、配列番号201～207に提供する。

【0183】

5. 構造アライメント

上記で考察したように、H. ピロリフェリチンに関して記載した変異に対応する変異の

50

位置は、ペアワイズまたは構造アライメントによって同定することができる。構造アライメントは、タンパク質がかなりの配列変動にも関わらず類似の構造を共有し、ファミリーの多くのメンバーが構造的に特徴付けされている、フェリチンのような大きいタンパク質ファミリーにとって適切であり、これもまた、インフルエンザ（例えば、血球凝集素）、ボレリア（例えば、OspA）、RSV（例えば、RSV FまたはG）、およびEBV（例えば、gL、gH、gp220、またはgp42）のような、本明細書に記載される他のポリペプチドの異なる形態における対応する位置を同定するために使用することができる。タンパク質データバンク（PDB）は、その受託番号と共に以下に列挙するフェリチンを含む、多くのフェリチンに関する3D構造を含む。

【0184】

2jd6, 2jd7-PfFR-ピロコックス・フリオスス。2jd8-PfFR+Zn。3a68-遺伝子SferH4由来のsoFR-ダイズ。3a9q-遺伝子SferH4（変異体）由来のsoFR。3egm, 3bv f, 3bv i, 3bv k, 3bv l-HpFR-ヘリコバクター・ピロリ。5c6f-HpFR（変異体）+Fe。1z4a, 1vlg-FR-テルモトガ・マリティマ（Thermotoga maritima）。1s3q, 1sq3, 3kx9-FR-アルカエオグロブス・フルギダス（Archaeoglobus fulgidus）。1krq-FR-カンピロバクター・ジェジュニ（Campylobacter jejuni）。1eum-EcFR-大腸菌（Escherichia coli）。4reu-EcFR+Fe。4xgs-EcFR（変異体）+Fe₂O₂。4ztt-EcFR（変異体）+Fe₂O+Fe₂+Fe+O₂。1qgh-LiFR-リスティア・イノキュア（Listeria innocua）。3qz3-VcFR-ビブリオ・コレラ（Vibrio cholerae）。3vn x-FR-アナアオサ（Ulva pertusa）。4ism, 4isp, 4itt, 4itw, 4iwj, 4iwk, 4ixk, 3e6s-PnmFR-プセウドニッチア（Pseudo-nitzschia multiseries）。4zkh, 4zkw, 4z kx, 4z l5, 4z l6, 4z lw, 4z mc-PnmFR（変異体）+Fe。1z6o-FR-イラクサギンウワバ。4cm y-FR+Fe-緑色硫黄細菌（Chlorobaculum tepidum）。フェリチン軽鎖（FTL）。1lb3, 1h96-mFTL-マウス。1rcc, 1rcd, 1rci-bFTL+タルトレート+Mg。1rce, 1rcg-bFTL+タルトレート+Mn。3noz, 3np0, 3np2, 3o7r-hoFTL（変異体）-ウマ。3o7s, 3u90-hoFTL。4v1w-hoFTL-cryo EM。3rav, 3rd0-hoFTL+バルビツレート。フェリチン軽鎖+重鎖：5gn8-hFTH+Ca。

【0185】

構造アライメントは、（i）第2の配列の公知の構造を使用して第1の配列の構造をモデリングする工程、または（ii）両方が公知である第1および第2の配列の構造を比較する工程、ならびに第2の配列における目的の残基に最も類似に位置する第1の配列中の残基を同定する工程によって、2つ（またはそれより多く）のポリペプチド配列を超えて対応する残基を同定する工程を伴う。対応する残基は、重ねた構造におけるアルファ炭素の距離の最小化（例えば、どの組のアルファ炭素対がアライメントに関する最小平均二乗偏差を提供するか）に基づいて一部のアルゴリズムにおいて同定される。H. ピロリフェリチンに関して記載された位置に対応する非H. ピロリフェリチンにおける位置を同定する場合、H. ピロリフェリチンは、「第2の」配列であり得る。目的の非H. ピロリフェリチンが利用可能な公知の構造を有しないが、公知の構造を有する別の非H. ピロリフェリチンに、H. ピロリフェリチンより密接に関連する場合、密接に関連する非H. ピロリフェリチンの公知の構造を使用して目的の非H. ピロリフェリチンをモデリングし、次にそのモデルをH. ピロリフェリチン構造と比較して、目的のフェリチンにおける所望の対応する残基を同定することが最も有効であり得る。構造モデリングおよびアライメントに関して広範囲の文献が存在し、代表的な開示には、米国特許第6859736号；米国特許第8738343号；およびAslamら、Electronic Journal

10

20

30

40

50

of Biotechnology 20 (2016) 9~13 頁において引用される開示が挙げられる。公知の関連する構造または複数の構造に基づく構造のモデリングの考察に関して、例えば、Bordoliら、Nature Protocols 4 (2009) 1~13 頁、およびその中で引用されている参考文献を参照されたい。

【0186】

B. 免疫刺激性部分；アジュバント；コンジュゲートされた非フェリチンポリペプチド

一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドおよび／またはアジュバントのような免疫刺激性部分は、表面に露出したアミノ酸に結合する。一部の実施形態では、表面に露出したアミノ酸は、例えば上記で考察した変異に起因するシステインである。一部の実施形態では、表面に露出したアミノ酸は、リシン、アスパルテート、またはグルタメートである。グルタルアルデヒド（リシンをアミノ担持リンカーまたは部分にコンジュゲートするため）またはカルボジイミド（例えば、アスパルテートもしくはグルタメートをアミノ担持リンカーもしくは部分にコンジュゲートするための、またはリシンをカルボキシル担持リンカーもしくは部分にコンジュゲートするための、1-シクロヘキシル-3-（2-モルフォリン-4-イル-エチル）カルボジイミド、または1-エチル-3-（3-ジメチル-アミノプロピル）カルボジイミド（EDC；EDAC））を使用するコンジュゲーション手順は、例えばwww.springer.com から入手可能な、Chapter 4 of Holtzhauser, M., Basic Methods for the Biochemical Lab, Springer 2006, ISBN 978-3-540-32785-1に記載されている。

【0187】

一部の実施形態では、アジュバントのような免疫刺激性部分は、フェリチンの表面に露出したアミノ酸に結合する。一部の実施形態では、アジュバントのような1つより多くの免疫刺激性部分が、フェリチンの表面に露出したアミノ酸に結合する。一部の実施形態では、24個の免疫刺激性部分が、フェリチン多量体または粒子（例えば、H. ピロリフェリチン粒子における各々の単量体の1つの部分）に結合する。複数の免疫刺激性部分がフェリチンナノ粒子に結合した一部の実施形態では、免疫刺激性部分は全て同一である。複数の免疫刺激性部分がフェリチンナノ粒子に結合した一部の実施形態では、免疫刺激性部分は全て同一ではない。

【0188】

1. 免疫刺激性部分のタイプ；アジュバント

表面に露出したアミノ酸（例えば、システイン）に結合することができる免疫刺激性部分を、本開示に従ってフェリチンにおいて使用することができる。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、B細胞アゴニストである。

【0189】

一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、疎水性ではない。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は親水性である。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、極性である。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、水素結合またはイオン結合することが可能であり、例えば水素結合ドナー、水素結合アクセプター、カチオン性部分またはアニオン性部分を含む。部分が、pH 6、7、7.4、または8のような生理的に関連するpHで、水溶液中でイオン化される場合、部分はカチオン性またはアニオン性であると考えられる。

【0190】

一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、アジュバントである。一部の実施形態では、アジュバントは、病原体関連分子パターン（PAMP）を含む。一部の実施形態では、アジュバントは、toll-like受容体（TLR）アゴニストまたはインターフェロン遺伝子（STING）アゴニストの刺激剤である。一部の実施形態では、アジュバントはBおよび／またはT細胞におけるTLRシグナル伝達を活性化する。一部の実施形態では、アジュバントは、適応免疫応答を調節する。

【0191】

a) TLR2アゴニスト

一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、T L R 2 アゴニストである。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、T L R 2 シグナル伝達を刺激する。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、T L R 2 の合成低分子リガンドである。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、T L R 2 シグナル伝達の合成低分子アゴニストである。

【0192】

一部の実施形態では、T L R 2 アゴニストは、P A M 2 C S K 4、F S L - 1、または P A M 3 C S K 4 である。

【0193】

b) T L R 7 / 8 アゴニスト

一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、T L R 7 および / または T L R 8 アゴニスト（すなわち、T L R 7 および T L R 8 の少なくとも 1 つのアゴニスト）である。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、T L R 7 および / または T L R 8 シグナル伝達を刺激する。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、T L R 7 および / または T L R 8 の合成低分子リガンドである。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、T L R 7 および / または T L R 8 シグナル伝達の合成低分子アゴニストである。

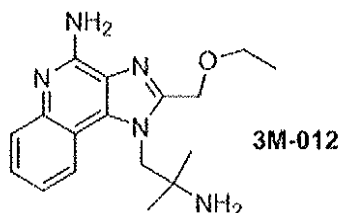
【0194】

一部の実施形態では、T L R 7 および / または T L R 8 アゴニストは、一本鎖（s s R N A）である。一部の実施形態では、T L R 7 および / または T L R 8 アゴニストは、イミダゾキノリンである。一部の実施形態では、T L R 7 および / または T L R 8 アゴニストは、ヌクレオシドアナログである。

【0195】

一部の実施形態では、T L R 7 および / または T L R 8 アゴニストは、3 M - 0 1 2 （3 M P h a r m a c e u t i c a l s）のようなイミダゾキノリンアミン T o l l - 1 i k e 受容体（T L R）アゴニストである。遊離の 3 M - 0 1 2 の構造は：

【化1】

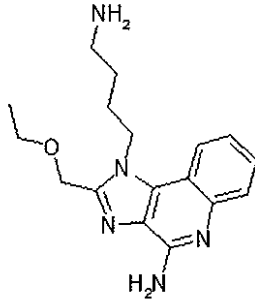


である。3 M - 0 1 2 または本明細書で考察する任意の部分のような免疫刺激性部分は、この部分の適切な末端原子（例えば、水素）を、例えば表面に露出したシステインの硫黄での本明細書に記載されるフェリチンとの結合に置換することによって、またはそのような硫黄に結合するリンカーによってフェリチンにコンジュゲートすることができると理解される。このように、フェリチンにコンジュゲートする場合、免疫刺激性部分の構造は、遊離の分子の構造とはわずかに異なる。

【0196】

一部の実施形態では、T L R 7 および / または T L R 8 アゴニストは、S M 7 / 8 a である。遊離の S M 7 / 8 a の構造は：

【化 2】



10

である。

【0197】

例えば、Nat Biotechnol. 2015 Nov; 33(11):1201~10頁. doi:10.1038/nbt.3371を参照されたい。

【0198】

c) TLR9アゴニスト

一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、TLR9アゴニストである。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、TLR9シグナル伝達を刺激する。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、TLR9の合成低分子リガンドである。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、TLR9シグナル伝達の合成低分子アゴニストである。

20

【0199】

一部の実施形態では、TLR9アゴニストは、CpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)である。一部の実施形態では、TLR9アゴニストは、非メチル化CpG ODNである。一部の実施形態では、CpG ODNは、通常のDNAにおいて見出される天然のホスホジエステル(PO)骨格の代わりに、部分的または完全なホスホロチオエート(PS)骨格を含む。

【0200】

一部の実施形態では、CpG ODNは、クラスB ODNであり、これは5'プリン(Pu)ーピリミジン(Py)ーCーGーPyーPu3'を含む1つまたはそれ以上の6量体CpGモチーフを含み；十分にホスホロチオエート化された(すなわち、PS改変された)骨格を有し；18~28ヌクレオチド長を有する。一部の実施形態では、CpG ODNは、配列番号210の配列を含み、場合により、骨格にホスホロチオエート結合を含む。

30

【0201】

一部の実施形態では、TLR9アゴニストは、免疫刺激性配列(ISS)を含む。一部の実施形態では、TLR9アゴニストは、ISS-1018(Dynavax)(配列番号210)である。

【0202】

d) STINGアゴニスト

一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、STING(インターフェロン遺伝子タンパク質刺激因子、小胞体IFN刺激因子とも呼ばれる)アゴニストである。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、STINGシグナル伝達を刺激する。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、STINGの合成低分子リガンドである。一部の実施形態では、免疫刺激性部分は、STINGシグナル伝達の合成低分子アゴニストである。

40

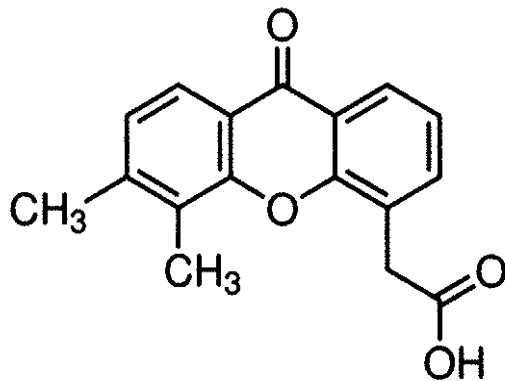
【0203】

一部の実施形態では、STINGアゴニストは、環状ジヌクレオチド(CDN)である。例えば、Danilchankaら、Cell 154:962~970頁(2013)を参照されたい。例示的なCDNは、cdA、cdG、cAMPーcGMP、および2'ー5', 3'ー5' cGAMPを含む(構造に関しては、Danilchankaら、を参照されたい)。STINGアゴニストはまた、DMXAAのような合成アゴニストも

50

含む。

【化 3】



10

【0204】

2. コンジュゲートされた非フェリチンポリペプチド

一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、フェリチンの表面に露出したアミノ酸にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、病原体由来のポリペプチドであり、フェリチンタンパク質を抗原性にする。一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、単独で抗原性であるが、一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、フェリチンとのその会合のために抗原性である。一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、本明細書に記載される非フェリチンポリペプチドのいずれか1つである。

20

【0205】

3. コンジュゲーション

一部の実施形態では、表面に露出したシステイン（例えば、本明細書に記載される変異に起因する）、またはフェリチン（例えば、フェリチンのN末端）に結合したペプチドリinker中のシステインを使用して、アジュバントのような免疫刺激性部分または非フェリチンポリペプチドを、フェリチンにコンジュゲートする。一部の実施形態では、リンカーは、そのようなシステインにコンジュゲートされ、リンカーを次に、アジュバントのような免疫刺激性部分、または非フェリチンポリペプチドにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、そのようなシステインは、アジュバント、リンカー、または非フェリチンポリペプチドを結合させるコンジュゲーション反応のための化学ハンドルを作製する。一部の実施形態では、バイオコンジュゲートが産生され、アジュバントのような免疫刺激性部分または非フェリチンポリペプチドは、そのようなシステインの還元後にフェリチンに連結される。一部の実施形態では、システインは、表面に露出した不対システイン、すなわちジスルフィド結合を形成するための適切な位置にパートナーシステインを欠如するシステインである。一部の実施形態では、システインは、遊離のチオール側鎖を含む不対システインである。

30

【0206】

a) コンジュゲーションケミストリーのタイプ

任意のタイプのケミストリーを使用して、例えばシステインまたはLys、Glu、もしくはAspのような別のアミノ酸のような表面に露出したアミノ酸の反応を介して、アジュバントのような免疫刺激性部分または非フェリチンポリペプチドをフェリチンにコンジュゲートすることができる。

【0207】

一部の実施形態では、コンジュゲーションは、クリックケミストリーを使用して実施される。本明細書で使用される場合、「クリックケミストリー」は、互いに急速かつ選択的に反応する（すなわち、「クリックする」）1対の官能基間での反応を指す。一部の実施形態では、クリックケミストリーは、緩和な水性条件下で実施することができる。一部の

40

50

実施形態では、クリックケミストリー反応は、表面に露出したアミノ酸の変異に起因するシステインのようなフェリチンの表面上のシステインを利用し、システインと反応することができる官能基を使用してクリックケミストリーを実施する。

【0208】

クリックケミストリーの基準を満たす多様な反応が、当技術分野で公知であり、当業者は、複数の公表された方法論のいずれかを使用することができる（例えば、Heinら、Pharm Res 25(10):2216~2230頁(2008)を参照されたい）。クリックケミストリーに関してSigma Aldrich、Jena Bioscience、またはLumiprobeの試薬のような広範囲の市販の試薬を使用することができる。一部の実施形態では、コンジュゲーションは、以下の実施例に記載されるようにクリックケミストリーを使用して実施される。

10

【0209】

一部の実施形態では、クリックケミストリーは、フェリチンの還元後に起こる。

【0210】

一部の実施形態では、クリックケミストリーは、1ステップクリック反応であり得る。一部の実施形態では、クリックケミストリーは、2ステップクリック反応であり得る。

【0211】

一部の実施形態では、反応は、金属フリーのクリックケミストリーを含む。一部の実施形態では、反応は、チオールマレイミドおよび／またはジスルフィド交換を含む。

【0212】

金属フリークリックケミストリー

金属フリークリックケミストリーは、タンパク質の起こり得る酸化を回避するためにコンジュゲーション反応に関して使用することができる。金属フリークリックケミストリーは、抗体コンジュゲートを形成するために使用されている(van Geelら、Bioconjugate Chem. 2015, 26, 2233~2242頁を参照されたい)。

20

【0213】

一部の実施形態では、金属フリークリックケミストリーは、アジュバントをフェリチンに結合させる反応において使用される。一部の実施形態では、アジュバントをフェリチンに結合させる反応において銅フリーコンジュゲーションを使用する。一部の実施形態では、金属フリークリックケミストリーは、ビスクロ[6.1.0]ノニン(BCN)を使用する。一部の実施形態では、金属フリークリックケミストリーは、ジベンゾアザシクロオクチン(DBCO)を使用する。一部の実施形態では、BCNまたはDBCOは、アジド基と反応する。

30

【0214】

DBCOは、触媒の非存在下での歪み促進型クリック反応を介してアジド基に対して高い特異性を有し、高収率の安定なトリアゾールをもたらす。一部の実施形態では、DBCOは、銅触媒の非存在下でアジドと反応する。

【0215】

一部の実施形態では、金属フリークリックケミストリーは、1ステップクリック反応において使用される。一部の実施形態では、金属フリークリックケミストリーは、2ステップクリック反応において使用される。

40

【0216】

チオールマレイミドおよびジスルフィド交換

本明細書で使用されるフェリチンは、スルフヒドリルとしても知られるチオールを含むシステインを含むことができ、これはスルフヒドリル反応性化学基との反応に関して利用可能である(または還元を通して利用可能となり得る)。このように、システインは、アジュバントのような免疫刺激性部分をフェリチンに付加するための化学選択的改変を可能にする。塩基性条件下では、システインは、脱プロトン化されて、チオレート求核試薬を生成し、これはマレイミドおよびヨードアセトアミドのような弱い求電子試薬と反応する

50

ことができる。システインとマレイミドまたはヨードアセトアミドとの反応は、炭素－硫黄結合をもたらす。

【0217】

一部の実施形態では、スルフヒドリル反応性化学基は、表面に露出したシステインまたはフェリチンのリンカー中のシステインと反応する。一部の実施形態では、スルフヒドリル反応性化学基は、ハロアセチル、マレイミド、アジリジン、アクリロイル、アリール化剤、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、またはTNB－チオールである。

【0218】

一部の実施形態では、スルフヒドリル反応性化学基は、アルキル化によってシステインのスルフヒドリルにコンジュゲートする（すなわち、チオエーテル結合の形成）。一部の

10

【0219】

一部の実施形態では、アジュバントのような免疫刺激性部分をフェリチンにコンジュゲートする反応は、チオール－マレイミド反応である。

【0220】

一部の実施形態では、スルフヒドリル反応性化学基は、マレイミドである。一部の実施形態では、マレイミドとシステインとの反応は、例えば可逆的ではない安定なチオエステル結合の形成をもたらす。一部の実施形態では、マレイミドは、フェリチン中のチロシン、ヒスチジン、またはメチオニンとは反応しない。一部の実施形態では、非反応マレイミドは、遊離のチオールを例えば過剰に添加することによって、反応終了時にクエンチされる。

20

【0221】

一部の実施形態では、アジュバントのような免疫刺激性部分をフェリチンにコンジュゲートする反応は、ジスルフィド相互交換としても知られるチオール－ジスルフィド交換である。一部の実施形態では、反応は、当初のジスルフィドの一部を含む混合ジスルフィドの形成を伴う。一部の実施形態では、当初のジスルフィドは、表面に露出したアミノ酸の変異またはN末端リンカーの付加によってフェリチンに導入されたシステインである。

【0222】

一部の実施形態では、スルフヒドリル反応性化学基は、ピリジルジチオールである。一部の実施形態では、スルフヒドリル反応性化学基は、TNB－チオール基である。

30

【0223】

b) コンジュゲーションのためのリンカー

一部の実施形態では、アジュバントのような免疫刺激性部分、または非フェリチンポリペプチドは、システインのような表面に露出したアミノ酸に共有結合したリンカーを介してフェリチンに結合する。一部の実施形態では、リンカーは、ポリエチレングリコール、例えば、PEGリンカーを含む。一部の実施形態では、ポリエチレングリコール（例えば、PEG）リンカーは、アジュバントのような免疫刺激性部分に連結したフェリチンの水溶性およびライゲーショ効率を増加させる。PEGリンカーは、2～18PEG長の間、例えば、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10、PEG11、PEG12、PEG13、PEG14、PEG15、PEG16、PEG17、およびPEG18である。

40

【0224】

一部の実施形態では、リンカーは、マレイミドを含む。一部の実施形態では、リンカーは、免疫刺激性部分（ISM）－リンカー－マレイミドの構成要素を含む。一部の実施形態では、ISM－リンカー－マレイミドは、マレイミドとフェリチンのシステインとの反応によって1ステップクリックケミストリーにおいてフェリチンにコンジュゲートされる。一部の実施形態では、アジュバント－リンカー－マレイミドのISMは、SM7／8aである。一部の実施形態では、ISM－リンカー－マレイミドのリンカーはPEG4である。一部の実施形態では、ISM－リンカー－マレイミドは、SM7／8a－PEG4－

50

マレイミドである。

【0225】

一部の実施形態では、2ステップクリックケミストリープロトコルを、1つの末端でスルフィドリル反応性化学基および他方の末端でアミン反応基を含むリンカーと共に使用する。そのような2ステップクリックケミストリープロトコルでは、スルフィドリル反応性化学基は、フェリチンのシステインと反応するが、アミン反応基はISMに結合した試薬と反応する。このようにして、ISMは、1組の2クリックケミストリー試薬の組を介してフェリチンにコンジュゲートされる。

【0226】

2ステップクリックケミストリープロトコルの一部の実施形態では、スルフィドリル反応性化学基はマレイミドである。2ステップクリックケミストリープロトコルの一部の実施形態では、マレイミドは、表面に露出したアミノ酸の変異またはN末端リンカーの付加によってフェリチンに導入されたシステインと反応する。

【0227】

2ステップクリックケミストリープロトコルの一部の実施形態では、アミン反応基はDBCOである。2ステップクリックケミストリープロトコルの一部の実施形態では、DBCOは、ISMに結合したアジド基と反応する。

【0228】

一部の実施形態では、マレイミドリンカーDBCOを使用する。一部の実施形態では、マレイミドリンカーDBCOは、フェリチンの還元後、フェリチンにコンジュゲートされる。一部の実施形態では、マレイミドリンカー試薬は、第1のステップでマレイミドとフェリチンのシステインとの反応によってフェリチンにコンジュゲートされる。一部の実施形態では、DBCOを使用してアジドに結合したISMに連結する。一部の実施形態では、アジドに連結したISMは、ISS-1018である。一部の実施形態では、アジドにカップリングしたアジュバントは、3M-012またはCpGである。

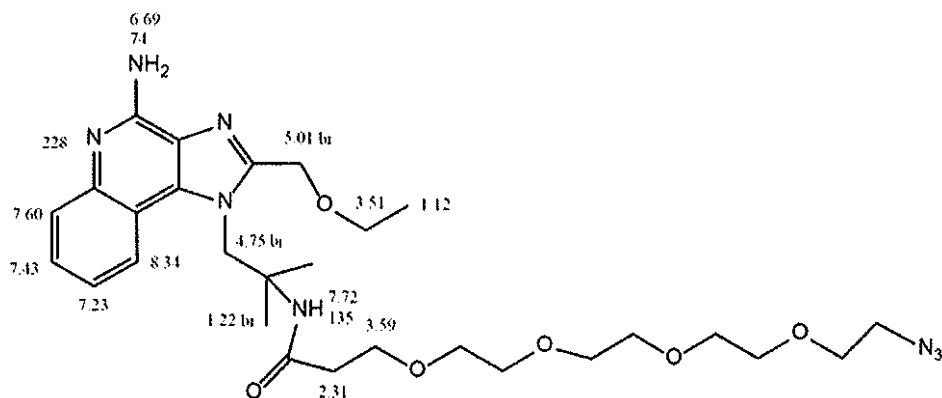
【0229】

一部の実施形態では、反応基を有するリンカーをISMに付加する。一部の実施形態では、リンカーは、PEG4-アジドリンカー、またはPEG4-マレイミドリンカーである。

【0230】

一部の実施形態では、PEG4-アジドリンカーは、3M-012にコンジュゲートされる。PEG4-アジドリンカーにコンジュゲートされた3M-012の例示的な構造は：

【化4】



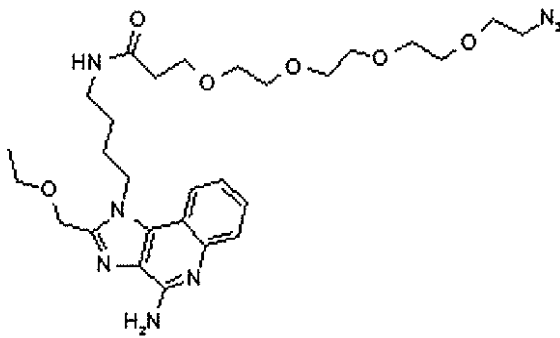
である。

【0231】

一部の実施形態では、PEG4-アジドリンカーは、SM7/8aにコンジュゲートされる。PEG4-アジドリンカーにコンジュゲートされたSM7/8aの例示的な構造は

:

【化 5】



SM7/8a-PEG4-アジド

10

である。

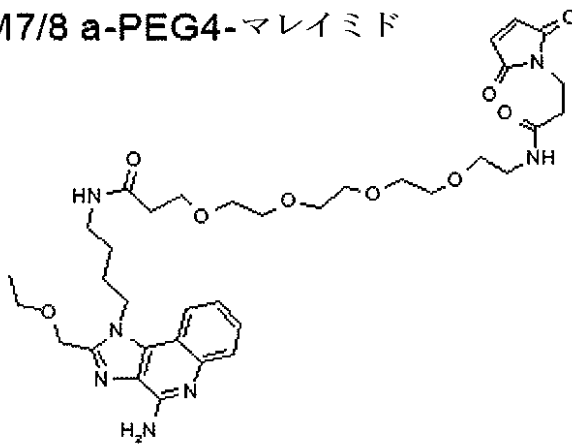
【 0 2 3 2】

一部の実施形態では、PEG4-マレイミドリンカーは、SM7/8aにコンジュゲートされる。PEG4-マレイミドリンカーにコンジュゲートされたSM7/8aの例示的な構造は：

【化 6】

20

SM7/8 a-PEG4-マレイミド



30

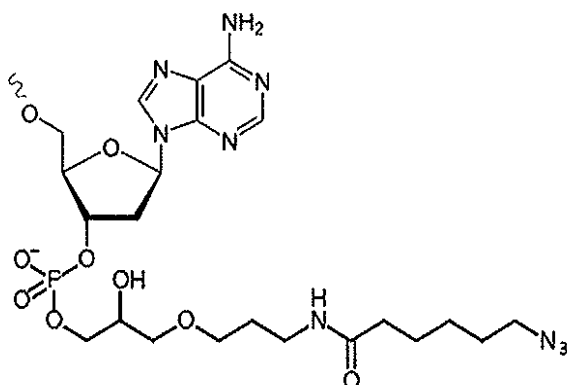
である。

【 0 2 3 3】

一部の実施形態では、アジド基は、ISS-1018にコンジュゲートされる。NHSエステル-アジドリンカーにコンジュゲートされたISS-1018の例示的な構造は：

【化 7】

40



である。

50

【0234】

C. 抗原性フェリチンポリペプチド

一部の実施形態では、本明細書に記載されるフェリチンは、非フェリチンポリペプチドをさらに含む抗原性フェリチンポリペプチドの一部である。一部の実施形態では、抗原性フェリチンポリペプチドは、非フェリチンポリペプチドにカップリングしたフェリチンを含む融合タンパク質である。一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、フェリチンのN末端に融合される。一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、フェリチンのC末端に融合される。非フェリチンポリペプチドはまた、例えば表面に露出したアミノ酸の変異に起因するシステインまたはNもしくはC末端リンカーに導入されたシステインを介して上記で考察したフェリチンにコンジュゲートすることもできる。

10

【0235】

1. リンカー

一部の実施形態では、リンカーは、非フェリチンポリペプチドのアミノ酸配列をフェリチンのアミノ酸配列から分離する。任意のリンカーを使用してもよい。一部の実施形態では、リンカーは、融合タンパク質としての抗原性フェリチンポリペプチドの発現を容易にすることができるペプチドリリンカーである（例えば、単一のオープンリーディングフレーム由来）。一部の実施形態では、リンカーは、グリシン-セリンリンカーである。一部の実施形態では、グリシン-セリンリンカーは、G S、G G G S（配列番号443）、2 X G G G S（すなわち、G G G S G G G S）（配列番号444）、または5 X G G G S（配列番号445）である。リンカーは、フェリチンに対してNまたはC末端である。

20

【0236】

一部の実施形態では、リンカーは、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、約2~4、2~6、2~8、2~10、2~12、または2~14アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも15アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも25アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも30アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも35アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも40アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、60アミノ酸長未満またはそれに等しい。一部の実施形態では、リンカーは、50アミノ酸長未満またはそれに等しい。一部の実施形態では、リンカーは、約16、28、40、46、または47アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、フレキシブルである。一部の実施形態では、リンカーは、例えば免疫刺激性部分（例えば、アジュバント）のコンジュゲーション部位として使用するためのシステインを含む；システインを含む例示的なリンカーを、配列番号225として提供する。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号225と少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する配列を含み、配列番号225中のシステインに対応するシステインをさらに含む。一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも25アミノ酸（例えば、25~60アミノ酸）を含み、システインは、N末端から8番目のアミノ酸からC末端から8番目のアミノ酸までの範囲の位置、または中央残基の10アミノ酸以内の位置、またはリンカーの結合位置に位置する。

30

40

【0237】

一部の実施形態では、リンカーは、グリシン（G）および／またはセリン（S）アミノ酸を含む。一部の実施形態では、リンカーは、グリシン（G）、セリン（S）、アスパラギン（N）、および／またはアラニン（A）アミノ酸、ならびに場合により上記で考察されているようなシステインを含むか、またはそれからなる。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号222と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、G G G S G G G G S G G G G S G（配列番号220）、G G S G S G S N S S A S S G A S S G G A S G G S G G S G（配列番号221）、G G S G S A S S G A S A S G S S N G S G S G S G S N S S A S S G A S S G G A S G G S G G S G（配列番号2

50

22)、またはGSを含む。一部の実施形態では、リンカーは、FR1(配列番号223)またはFR2(配列番号224)を含む。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号233~238を含む。

【0238】

一部の実施形態では、フェリチンは、ウシガエルフェリチンのアミノ末端伸長部を有するH.ピロリフェリチン(ハイブリッドフェリチンと呼ばれる)を含む。一部の実施形態では、このハイブリッドフェリチンは、表面上に均一に分布した非フェリチンポリペプチド結合部位を有する多量体を形成する(Kanekiyo 2015を参照されたい)。一部の実施形態では、ハイブリッドフェリチンとのN末端融合タンパク質は、フェリチンナノ粒子表面上の非フェリチンポリペプチドの提示を可能にする。一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、ウイルスまたは細菌ポリペプチドである。一部の実施形態では、フェリチンは、配列番号208(このグルタメートを含むハイブリッドフェリチン)の13位、または配列番号209(6位がイソロイシンである野生型H.ピロリフェリチン)の6位に対応する位置でグルタメートを含む。ウシガエルリンカーと組み合わせると、このグルタメートは、ヒトおよびウシガエルフェリチンにおいて見出される保存された塩架橋を維持すると考えられる(ヒト軽鎖およびウシガエル下部サブユニットフェリチンの両方における6Rおよび14E)。Kanekiyoら、Cell 162, 1090~1100頁(2015)を参照されたい。

【0239】

一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドは、システイン-トロンビン-ヒスチジンリンカーを介してフェリチンに連結される。一部の実施形態では、このリンカーを使用して、クリックケミストリーを介してある部分(例えば、免疫刺激性部分または非フェリチンポリペプチド)をフェリチンに直接コンジュゲートする。システイン-トロンビン-ヒスチジンリンカーを含む例示的な配列は、配列番号218である。システイン-トロンビン-ヒスチジンリンカーを伴うコンジュゲーション反応にとって適したクリックケミストリーは上記で考察されている。

【0240】

一部の実施形態では、アジュバントのような免疫刺激性部分のためのコンジュゲーション部位としてシステインを含むリンカーは、表面に露出した不對システインを欠如するフェリチン分子を含む構築物において、または表面に露出した不對システインを含むフェリチン分子を含む構築物において使用される。

【0241】

一部の実施形態では、構築物はリンカーを含まない。一部の実施形態では、構築物は、1つのリンカーを含む。一部の実施形態では、構築物は、2つまたは2つより多くのリンカーを含む。

【0242】

抗原性フェリチンポリペプチドに組み入れるために非フェリチンポリペプチドの起源として使用することができる代表的な病原体(ウイルスおよび細菌)には、エプスタイン-バーウイルス(EBV)、インフルエンザ、ボレリア(例えば、B.ブルグドルフェリのような、ライム病を引き起こすボレリア種)、および呼吸器合胞体ウイルス(RSV)を含む。一部の実施形態では、病原体由来の非フェリチンポリペプチドは、病原体によって発現またはコードされるタンパク質由来のペプチド配列を含む。一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドのアミノ酸は、ハイブリッドフェリチンのアミノ酸配列に連結され、非フェリチンポリペプチド配列は、ウシガエルフェリチンのN末端伸長部の前にある。

【0243】

一部の実施形態では、非フェリチンポリペプチドのアミノ酸が、ハイブリッドフェリチンのアミノ酸配列に結合すると、融合タンパク質を生成する。一部の実施形態では、この融合タンパク質は、非フェリチンポリペプチドが、フェリチンの各々の単量体に存在するように、非フェリチンポリペプチドと共にハイブリッドフェリチンを含む。一部の実施形

態では、これらの単量体は、フェリチンナノ粒子へと自己集合する。一部の実施形態では、ハイブリッドフェリチン単量体を含むフェリチンナノ粒子は、ナノ粒子表面上に非フェリチンポリペプチドの複数のコピーを含む。一部の実施形態では、24個のハイブリッドフェリチン単量体の集合体は、ナノ粒子の表面上で24個の非フェリチンポリペプチドと共にフェリチンナノ粒子を形成する。

【0244】

一部の実施形態では、抗原性フェリチンポリペプチドは、配列番号1～76、301～343、401～403、410、413～414、417～427、または501～523のいずれか1つの配列を含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、前述の配列のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%の同一性有する配列を含み、フェリチン配列は、表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異を含む。そのようなフェリチン配列は、遊離のH. ピロリフェリチン（配列番号208）の19位に対応する位置でAsnからGluへの変異、および／または遊離のH. ピロリフェリチン（配列番号208）の31位に対応する位置でCysからSerへの変異をさらに含み得る。一部の実施形態では、表面に露出したアミノ酸の変異に起因するシステインは、本明細書に開示される任意のシステイン位置、例えば、H. ピロリフェリチンの12、26、72、75、79、100、または111位に対応する。

10

【0245】

2. 非フェリチンポリペプチドとしてのEBVポリペプチド

一部の実施形態では、本明細書に記載されるフェリチンポリペプチドは、EBVポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドの非フェリチンポリペプチドは、EBVポリペプチドである。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドもまた、抗原性EBVポリペプチドである。

20

【0246】

a) gLおよびgHポリペプチドを含むEBVポリペプチド

EBVは、コア膜融合機構を形成し、ウイルスを細胞内に貫通させる3つの糖タンパク質、すなわち糖タンパク質B（gB）、gH、およびgLを有する。gLおよびgHは、例えば以前に、Matsuuraら、Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Dec 28; 107(52): 22641～6頁に記載されている。ワクチンとして使用するためのgLおよびgHの単量体および三量体は、例えばCuiら、Vaccine. 2016 Jul 25; 34(34): 4050～5頁に記載されている。gHおよびgLタンパク質は会合して、ウイルス侵入にとって必要な効率的な膜融合および上皮細胞受容体との結合にとって必要であると考えられるヘテロ二量体複合体を形成する。

30

【0247】

一部の実施形態では、EBVポリペプチドは、EBV gLおよびEBV gHを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、一本鎖として存在する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、例えば、フェリチンの多量体形成またはルマジンシンターゼを通して、ナノ粒子（例えば、フェリチンまたはルマジンシンターゼ粒子）を形成する。一部の実施形態では、本開示に従う抗原性EBVポリペプチドは、EBV gLポリペプチドおよびEBV gHポリペプチド、ならびにEBV gLポリペプチドとEBV gHポリペプチドとを隔てる少なくとも15アミノ酸長を有するリンカーを含む。比較的長いリンカーは、発現および／または免疫原性の改善のような利益を提供することができるが見出されている。

40

【0248】

一部の実施形態では、EBV gHおよび／またはgLポリペプチドは、完全長のgHおよび／またはgL（例示的な完全長の配列に関してはそれぞれ、GenBank受託番号CEQ35765.1およびYP_001129472.1を参照されたい）を含む。一部の実施形態では、EBV gHおよび／またはgLポリペプチドは、gHおよび／ま

50

たは g L の断片である。一部の実施形態では、g L ポリペプチドは、g L C 末端の端部で 7 アミノ酸の欠失を有する g L (D 7) 構築物である。一部の実施形態では、g H ポリペプチドは、C 1 3 7 A 変異のような変異を C 1 3 7 で含む。一部の実施形態では、C 1 3 7 変異は、非特異的コンジュゲーションを回避するために、本来の不对システインを除去する。一部の実施形態では、g H ポリペプチドは、C 1 3 7 A 変異のような、配列番号 4 3 7 のシステイン 1 3 7 に対応する位置を除去する変異を含む。一部の実施形態では、C 1 3 7 変異は、非特異的コンジュゲーションを回避するために本来の不对システインを除去する。

【0249】

一部の実施形態では、E B V g L ポリペプチドは、配列番号 4 3 6 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、E B V g H ポリペプチドは、配列番号 4 3 7 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0250】

一部の実施形態では、哺乳動物リーダー配列（シグナル配列としても知られる）は、g H または g L ポリペプチドのような E B V ポリペプチドの N 末端に、例えばポリペプチドの N 末端に付加される。一部の実施形態では、哺乳動物リーダー配列は、哺乳動物細胞において発現される場合、タンパク質の分泌をもたらす。

【0251】

本来の E B V g H および／または g L 配列を、G e n B a n k 受託番号 N C _ 0 0 9 3 3 4 . 1 （ヒトヘルペスウイルス 4、完全なゲノム、日付 2 6 - M a r - 2 0 1 0）に示す。完全長または断片化した本来の E B V g H および／または g L を、非フェリチンポリペプチドとして利用してもよい。本明細書に開示される構築物の一部では、N C _ 0 0 9 3 3 4 . 1 における g L アミノ酸配列のアミノ酸 2 3 ~ 1 3 7 を g L ポリペプチドとして使用し、本来のシグナルペプチド（N C B I 配列のアミノ酸 1 ~ 2 2）を I g G κ リーダー配列に置き換えた。構築物の一部では、N C _ 0 0 9 3 3 4 . 1 における g H アミノ酸配列のアミノ酸 1 9 ~ 6 7 8 を、g H ポリペプチドとして使用した。一部の実施形態では、g L および g H を本明細書に記載される配列表に示すようにリンカーを介して連結した。

【0252】

一部の実施形態では、g L および g H ポリペプチドは、一本鎖単量体として発現される。一部の実施形態では、単量体組成物は、配列表に示され、「単量体」として説明に記載されている配列を含むまたはそれからなる。g L および g H ポリペプチドを含む一本鎖は、「g L / g H」と呼ぶことができ、これらは、「g H _ g L」、「g L _ g H」、または「g L / g H」と互換的に使用することができる。

【0253】

g L / g H ポリペプチドを、本明細書で考察されるフェリチンまたはルマジンシンターゼのいずれかと組み合わせることができる。例えば、一部の実施形態では、抗原性 E B V ポリペプチドは、単量体または三量体 g L / g H ポリペプチド（+ / - g p 4 2 および／または g p 2 2 0）、および i i）重鎖もしくは軽鎖フェリチン（例えば、イラクサギンウワバ重鎖または軽鎖フェリチン）；または i i）場合により表面に露出したシステインを含む、フェリチンを含む。

【0254】

加えて、一部の実施形態では、E B V g L / g H ポリペプチドおよびフェリチンを含むいずれの抗原性 E B V ポリペプチドも、フェリチン、ならびに g L / g H 以外の E B V ポリペプチド、例えば g p 2 2 0 および／または g p 4 2 を含む別の抗原性 E B V ポリペプチドのような、本明細書に開示される別のポリペプチドを含む組成物中に存在することができる。

【0255】

10

20

30

40

50

b) gp220ポリペプチドを含むEBVポリペプチド

一部の実施形態では、EBVポリペプチドは、gp220ポリペプチドを含む。gp220-ハイブリッドウシガエル/H.ピロリフェリチンナノ粒子は、Kaneakiyo Cell. 2015 Aug 27; 162(5): 1090~1000頁において既に記載されている。このナノ粒子は、本明細書に記載されるある特定のフェリチンからの他の差の中でも、表面に露出したシステインを提供する変異またはシステインを含むリンカーを含まない。

【0256】

一部の実施形態では、gp220ポリペプチドは、配列番号438と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0257】

一部の実施形態では、哺乳動物リーダー配列（シグナル配列としても知られる）は、gp220ポリペプチドのN末端に付加される。一部の実施形態では、哺乳動物リーダー配列は、哺乳動物細胞において発現された場合にタンパク質の分泌をもたらす。

【0258】

gp220ポリペプチドを、本明細書で考察される任意のフェリチンまたはルマジシンターゼと組み合わせることができる。例えば、一部の実施形態では、抗原性EBVポリペプチドは、gp220ポリペプチド（+/-gL/gHおよび/またはgp42）、およびi）重鎖もしくは軽鎖フェリチン（例えば、イラクサギンウワバ重鎖または軽鎖フェリチン）；またはii）場合により本明細書に記載される表面に露出したシステインを含む、フェリチンを含む。

20

【0259】

加えて、一部の実施形態では、gp220ポリペプチドおよびフェリチンを含むいずれの抗原性EBVポリペプチドも、フェリチン、ならびにgp220以外のEBVポリペプチド、例えばgL/gHおよび/またはgp42を含む別の抗原性EBVポリペプチドのような、本明細書に開示される別のポリペプチドを含む組成物中に存在することができる。

【0260】

c) gp42ポリペプチドを含むEBVポリペプチド

30

一部の実施形態では、EBVポリペプチドは、gp42ポリペプチドを含む。例示的なgp42配列を、配列番号434として提供する。例えばgLおよびgHポリペプチドとの融合体に含めるために適したさらに例示的なgp42配列を、配列番号239として提供する。gLおよびgHポリペプチドとの融合体に含めるために適したさらに例示的なgp42配列を配列番号240として提供する。

【0261】

一部の実施形態では、gp42ポリペプチドは、配列番号434と、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、gp42ポリペプチドは、配列番号239と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、gp42ポリペプチドは、配列番号240と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0262】

一部の実施形態では、哺乳動物リーダー配列（シグナル配列としても知られる）は、gp42ポリペプチドのN末端に付加される。一部の実施形態では、哺乳動物リーダー配列は、哺乳動物細胞において発現された場合にタンパク質の分泌をもたらす。例示的なリーダー配列は、配列番号226のアミノ酸1~22である。

【0263】

一部の実施形態では、gHおよび/またはgLポリペプチドを含む抗原性EBVポリペ

50

プチドは、g p 4 2 ポリペプチドをさらに含む。上記の g H および／または g L ポリペプチドを含む任意の E B V ポリペプチドが、g p 4 2 ポリペプチドをさらに含み得る。一部の実施形態では、g p 4 2 ポリペプチドは、配列番号 4 2 1 および 2 2 6 ～ 2 3 1 に例証されるように g H および／または g L ポリペプチドの C 末端に位置する。一部の実施形態では、g p 4 2 ポリペプチドは、配列番号 4 2 1 および 2 2 7 ～ 2 3 1 に例証されるようにフェリチンの N 末端に位置する。このように、例えば抗原性 E B V ポリペプチドは、N から C 末端方向に、g L ポリペプチド、g H ポリペプチド、g p 4 2 ポリペプチド、および場合によりフェリチンを含む。本明細書で記載されるリンカーのようなリンカーは、E B V ポリペプチド由来の g p 4 2 ポリペプチド、ならびに／またはその N 末端および／もしくは C 末端に位置するフェリチンを分離する。一部の実施形態では、リンカーは、抗原性フェリチンポリペプチド中の各々の E B V ポリペプチド（例えば、g L ポリペプチド、g H ポリペプチド、および g p 4 2 ポリペプチド）を分離し、存在する場合にはフェリチンと、それに対して近位の E B V ポリペプチド（例えば、g p 4 2 ポリペプチド）との間にさらなるリンカーが存在してもよい。

10

【0264】

一部の実施形態では、少なくとも 15 アミノ酸長を有するリンカーは、E B V g H ポリペプチドおよび E B V g p 4 2 ポリペプチドを分離する。そのようなリンカーは、15 ～ 60 アミノ酸長、20 ～ 60 アミノ酸長、30 ～ 60 アミノ酸長、40 ～ 60 アミノ酸長、30 ～ 50 アミノ酸長、または 40 ～ 50 アミノ酸長を有し得る。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号 2 3 4 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0265】

一部の実施形態では、g p 4 2 およびフェリチンがポリペプチド中に存在する場合、リンカーは、E B V g p 4 2 ポリペプチドおよびフェリチンを分離する。そのようなリンカーは、少なくとも 15 アミノ酸長を有してもよく、または 15 ～ 60 アミノ酸長、20 ～ 60 アミノ酸長、30 ～ 60 アミノ酸長、40 ～ 60 アミノ酸長、30 ～ 50 アミノ酸長、または 40 ～ 50 アミノ酸長を有する。一部の実施形態では、そのようなリンカーは、配列番号 2 3 3、2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、または 2 3 8 のいずれか 1 つと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0266】

g p 4 2 ポリペプチドを、本明細書で考察するフェリチンまたはルマジンシンターゼのいずれかと組み合わせることができる。例えば、一部の実施形態では、ポリペプチドは、g p 4 2 ポリペプチド（+／－ g L／g H および／または g p 2 2 0）および重鎖もしくは軽鎖フェリチン（例えば、イラクサギンウワバ重鎖または軽鎖フェリチン）；または i i）場合により本明細書に記載される表面に露出したシステインを含む、フェリチンを含む。

【0267】

一部の実施形態では、抗原性 E B V ポリペプチドは、配列番号 2 2 6 のアミノ酸 2 3 ～ 1 0 7 8 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、抗原性 E B V ポリペプチドは、配列番号 2 2 6 のアミノ酸 1 ～ 1 0 7 8 と 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、抗原性 E B V ポリペプチドは、配列番号 2 2 6、2 2 7、2 2 8、2 2 9、2 3 0、または 2 3 1 のいずれか 1 つと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の同一性を有する配列を含み、場合によりリーダー配列を欠如する（例えば、これらの配列のアミノ酸 1 ～ 2 2 のいずれかまたは全てを欠如する）。

40

【0268】

加えて、一部の実施形態では、g p 4 2 ポリペプチドおよびフェリチンを含むいずれの抗原性 E B V ポリペプチドも、フェリチン、ならびに g p 4 4 2 以外の E B V ポリペプチ

50

ド、例えば g L / g H および / または g p 2 2 0 を含む別の抗原性 E B V ポリペプチドのような、本明細書で開示される別のポリペプチドを含む組成物中に存在することができる。

【0269】

d) 起こり得る酸化、脱アミド、またはイソアスパルテート形成部位を除去するための g L、g H、g p 4 2、リンカー、および / またはフェリチン配列における変異

一部の実施形態では、抗原性 E B V ポリペプチドは、以下の表 1 に記載の例示的な変異のような、起こり得る酸化、脱アミド、またはイソアスパルテート形成部位を除去するための 1 つまたはそれ以上の変異を含む。

【0270】

10

例えば、一部の実施形態では、g L 配列は、起こり得るスクシンイミド / イソアスパルテートまたは脱アミド部位を除去するための 1 つまたはそれ以上の変異を含む。例えば、g L 配列は、配列番号 2 2 7 の 3 6 位に対応する位置で G から A への変異；配列番号 2 2 7 の 4 7 位に対応する位置で N から Q への変異；または配列番号 2 2 7 の 1 0 5 位に対応する位置で N から Q への変異を含み得る。S m i t h - W a t e r m a n アルゴリズムのような標準的な配列アライメントアルゴリズムに従って、デフォルトパラメータを使用してその位置を整列させる場合、アミノ酸配列におけるある位置は、配列番号 2 2 7 における所定の位置に「対応する」。

【0271】

20

一部の実施形態では、リンカーは、起こり得る脱アミド部位を除去するために 1 つまたはそれ以上の変異を含む。例えば、リンカー配列は、配列番号 2 2 7 の 1 3 2 または 1 4 1 位に対応する位置で N から G への変異を含み得る。

【0272】

一部の実施形態では、g H 配列は、起こり得るスクシンイミド / イソアスパルテートまたは酸化部位を除去するために 1 つまたはそれ以上の変異を含む。例えば、g H 配列は、配列番号 2 2 7 の 1 8 9、4 0 1、もしくは 7 2 9 位に対応する位置で M から L への変異；配列番号 2 2 7 の 3 6 8 位に対応する位置で D から E への変異；配列番号 2 2 7 の 4 9 9 もしくは 6 3 9 位に対応する位置で M から I への変異；または配列番号 2 2 7 の 6 5 3 位に対応する位置で N から Q への変異を含み得る。

【0273】

30

一部の実施形態では、g p 4 2 配列は、起こり得る脱アミド部位を除去するために 1 つまたはそれ以上の変異を含む。例えば、g p 4 2 配列は、配列番号 2 2 7 の 9 5 9 もしくは 9 9 0 位に対応する位置で N から Q への変異；または配列番号 2 2 7 の 9 8 8 位に対応する位置で N から S への変異を含み得る。

【0274】

一部の実施形態では、フェリチン配列は、起こり得る脱アミド、酸化、またはイソアスパルテート形成部位を除去するために 1 つまたはそれ以上の変異を含む。例えば、フェリチン配列は、配列番号 2 2 7 の 1 1 5 0 位に対応する位置で Q から S への変異；配列番号 2 2 7 の 1 1 6 8 位に対応する位置で M から I への変異；配列番号 2 2 7 の 1 1 7 7 位に対応する位置で M から L への変異；配列番号 2 2 7 の 1 1 8 8 位に対応する位置で G から A への変異；または配列番号 2 2 7 の 1 2 5 3 もしくは 1 2 9 6 位に対応する位置で N から Q への変異を含み得る。

40

【0275】

例示的な変異を以下の表 6 に示す。位置の番号付けは配列番号 2 2 7 に対応する。

【0276】

【表 1】

表6. 例示的な変異

位置	改変	開始	終了	モチーフ	溶媒の曝露	変異
gL	スクシンイミド/イソアスパルテート	35	36	DG	曝露	G36A
gL	脱アミド	47	47	N	曝露の可能性	N47Q
gL	脱アミド	105	105	N	曝露	N105Q
リンカー	脱アミド	132	132	N	曝露	N132G
リンカー	脱アミド	141	141	N	曝露	N141G
gH	酸化	189	189	M	曝露	M189L
gH	スクシンイミド/イソアスパルテート	368	369	DY	曝露	D368E
gH	酸化	401	401	M	埋もれている	M401L
gH	スクシンイミド/イソアスパルテート	429	430	DT	曝露	D429E
gH	酸化	499	499	M	曝露	M499I
gH	酸化	639	639	M	曝露	M639I
gH	酸化	653	653	N	曝露	N653Q
gH	酸化	729	729	M	曝露	M729L
gp42	脱アミド	959	959	N	曝露	N959Q
gp42	脱アミド	988	988	N	曝露	N988S
gp42	脱アミド	990	990	N	曝露	N990Q
フェリチン	脱アミド	1150	1150	Q	曝露	Q1150S
フェリチン	酸化	1168	1168	M	埋もれている	M1168I
フェリチン	脱アミド	1177	1177	M	埋もれている	M1177L
フェリチン	イソアスパルテート	1187	1188	DG	埋もれている	G1188A
フェリチン	脱アミド	1253	1253	N	曝露	N1253Q
フェリチン	脱アミド	1296	1296	N	曝露	N1296Q

【0277】

3. 非フェリチンポリペプチドとしてのインフルエンザポリペプチド

一部の実施形態では、本明細書に記載されるフェリチンポリペプチドは、インフルエンザポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原性フェリ

10

20

30

40

50

チンポリペプチドの非フェリチンポリペプチドは、インフルエンザポリペプチドである。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドは、抗原性インフルエンザフェリチンポリペプチドである。

【0278】

a) HAおよびNAポリペプチド

一部の実施形態では、インフルエンザポリペプチドは、完全長または部分長のHAまたはNAを含むHAまたはNAポリペプチドである。任意のHAまたはNAポリペプチドを使用してもよい。HAまたはNAポリペプチドは、天然に存在してもよく、または天然から変化してもよい。一部の実施形態では、HAは、H1～H18のいずれか1つに由来する。一部の実施形態では、NAは、N1～N11のいずれか1つに由来する。

10

【0279】

一部の実施形態では、HAポリペプチドは、HAエクトドメインを含む。HAエクトドメインは、H1～H18を含むインフルエンザの任意のサブタイプに由来し得る。

【0280】

一部の実施形態では、HAポリペプチドは、HAのステム領域を含む。HAのステム領域は、H1～H18を含むインフルエンザの任意のサブタイプに由来し得る。

【0281】

一部の実施形態では、HAポリペプチドは、インフルエンザA型ウイルスに由来する。インフルエンザA型ウイルスは、A/プエルトリコ/1934、A/ワイス/1/1943、A/フォートモンマス/1/1947 (FM47)、A/マレーシア/302/54 (MAL54)、A/デンバー/1/1957 (DV57)、A/ニュージャージー/8/1976、A/USSR/90/1977、A/香港/117/1977 (HK77)、A/ブラジル/11/1978、A/チリ/1/1983、A/台湾/1/1986、A/テキサス/36/1991、A/北京/262/1995、A/ニューカレドニア/20/1999 (NC99)、A/ソロモン諸島/6/2006、A/ブリスベン/59/2007、A/カリフォルニア/07/2009 (CA09)、A/バングラデシュ/2021/2012、またはA/ベトナム/3050/2013であり得る。

20

【0282】

一部の実施形態では、HAポリペプチドは、H1インフルエンザウイルスに由来する。一部の実施形態では、H1ウイルスは、A/サウスカロライナ/1/18である。

30

【0283】

一部の実施形態では、HAポリペプチドは、H2インフルエンザウイルスに由来する。一部の実施形態では、H2ウイルスは、1957年に流行したH2N2インフルエンザA型ウイルスである。

【0284】

一部の実施形態では、HAポリペプチドは、H3インフルエンザウイルスに由来する。一部の実施形態では、H3インフルエンザウイルスは、H3N8ウイルスである。一部の実施形態では、H3N8ウイルスは、ウマーオハイオ2003である。一部の実施形態では、H3N8ウイルスは、ウマーバリ2005である。一部の実施形態では、H3N8ウイルスは、ウマーアポイン2003である。一部の実施形態では、H3インフルエンザウイルスは、H3N2ウイルスである。一部の実施形態では、H3N2ウイルスは、パース2009である。一部の実施形態では、H3N2ウイルスは、ビクトリア2011である。

40

【0285】

一部の実施形態では、HAポリペプチドは、H5インフルエンザウイルスに由来する。一部の実施形態では、H5インフルエンザウイルスは、H5/N1ウイルスである。一部の実施形態では、H5/N1ウイルスは、インドネシア2005である。一部の実施形態では、H5/N1ウイルスは、インドガン2005である。一部の実施形態では、H5/N1ウイルスは、オオハクチョウ2005である。一部の実施形態では、H5/N1ウイルスは、マガモ/ホワドン2003である。

50

【0286】

一部の実施形態では、HAポリペプチドは、インフルエンザB型ウイルスに由来する。一部の実施形態では、B型ウイルスは、ウィスコンシン2010である。一部の実施形態では、B型ウイルスは、マサチューセッツ2012である。一部の実施形態では、B型ウイルスは、プーケット2013である。一部の実施形態では、B型ウイルスは、ブリスベン2008である。一部の実施形態では、ブリスベン2008配列は、D197N変異を含む。この変異は、このナノ粒子の発現を改善することが見出され、これは、B／ブリスベン／2009およびB／プーケット／2013のような他の株における天然に存在する変異である。このアミノ酸は、シアル酸受容体の接触に関係し得る。

【0287】

一部の実施形態では、HAポリペプチドは、Giles BM and Ross T M, Vaccine 29(16):3043~54頁(2011)またはCarter DMら、J Virol 90:4720~4734頁(2016)の実施例に従って生成された計算上最適化された広範反応性抗原(Computationally Optimized Broadly Reactive Antigen(COBRA))を含む。

【0288】

一部の実施形態では、COBRA配列は、ヒトH1N1インフルエンザ配列から生成される。一部の実施形態では、COBRA配列は、1999~2012年の期間のヒトH1N1インフルエンザ配列から生成される。1999~2012年の期間のヒトH1N1インフルエンザ配列から生成された例示的なCOBRA配列は、配列番号329に含まれるCOBRA X6である。一部の実施形態では、COBRA配列は、1933~1957年および2009~2011年の期間のヒトH1N1株に加えて、1931~1998年の期間のブタH1N1インフルエンザ株から生成される。1933~1957年および2009~2011年の期間のヒトH1N1株に加えて1931~1998年の期間のブタH1N1インフルエンザ株から生成される例示的なCOBRA配列は、配列番号327に含まれるCOBRA P1である。

【0289】

一部の実施形態では、COBRA配列はX3である。一部の実施形態では、COBRA配列はH5N1から生成されるhCOBRA-2である。

【0290】

HA受容体結合部位を除去する変異(Y98F)は、Whittleら、Journal of Virology 11(8):4047~4057頁(2014)に記載された。一部の実施形態では、HAポリペプチドは、Y98F変異を含む。上記のHAのいずれも、Y98F変異を含むように改変することができる。一部の実施形態では、HAは、H1／ニューカレドニア／1999(NC99)ウイルスに由来し、Y98F変異を含む。

【0291】

4. 非フェリチンポリペプチドとしてのボレリアおよびOspAポリペプチド

一部の実施形態では、本明細書に記載されるフェリチンポリペプチドは、ボレリアポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、抗原性フェリチンポリペプチドの非フェリチンポリペプチドは、ボレリアポリペプチドである。一部の実施形態では、ボレリアポリペプチドは、B. ブルグドルフェリに由来する。一部の実施形態では、ボレリアポリペプチドは、血清型1、2、3、4、5、6、または7に対応するボレリア種に由来する。一部の実施形態では、ボレリアは、マダニ(Ixodes)属のダニが運ぶことができる。

【0292】

一部の実施形態では、ボレリアポリペプチドは、OspAポリペプチドである。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドもまた、抗原性OspAポリペプチドである。

【0293】

一部の実施形態では、OspAポリペプチドは、ボレリアの改変外部表面タンパク質A (OspA)を含む。OspAは、OspAの異なる種に対するモノクローナル抗体との反応性によって定義されるように複数の血清型で存在する(Wilksら、J Clin Microbiol 31(2):340~350頁(1993)を参照されたい)。これらの血清型は、ボレリア細菌の異なる遺伝子種と相関する。一部の実施形態では、OspAは、血清型1~7のいずれか1つである。一部の実施形態では、OspAは、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・マヨニイ(Borrelia mayonii)、ボレリア・アフゼリ(Borrelia afzelii)、ボレリア・ガリニ(Borrelia garinii)、またはボレリア・ババリエンシス(Borrelia bavarientis)に由来する。一部の実施形態では、OspAは、ボレリア・ブルグドルフェリOspAである。一部の実施形態では、ボレリアは、マダニ属のダニが運ぶことができる。一部の実施形態では、ボレリアは、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・マヨニイ、ボレリア・アフゼリ、ボレリア・ガリニ、またはボレリア・ババリエンシスである。

【0294】

一部の実施形態では、OspAポリペプチドは、OspA血清型1エクドメインのようなOspA血清型1ポリペプチドである。文献により、配列番号83のアミノ酸165~173でのOspA血清型1のエピトープは、ヒト白血球機能関連抗原-1(hLFA-1)、すなわち配列番号78の配列の断片と同一性を有することが報告されている(Gross, D. M.ら、Science 281(5377):703~6頁(1998)を参照されたい)。配列番号83のアミノ酸165~173は、配列番号77における単離されたノナペプチドとして示され、hLFA-1同一性部位と呼ばれる。配列番号83は、本明細書においてOspAにおけるアミノ酸位置の考察のための基準配列として使用される例示的な野生型血清型1のOspA配列である。この同一性部位は、抗生物質耐性ライム関節炎を含むライム関節炎の発症において役割を果たし得る。一部の実施形態では、OspAポリペプチドは、ボレリアの改変OspA血清型1ポリペプチドを含み、改変OspAは、配列番号77の配列を含まない。そのようなポリペプチドは、抗体を誘発するために使用する場合、安全性の改善、例えば自己免疫応答を誘発するリスクの低減を有し得る。一部の実施形態では、OspA血清型1ポリペプチドは、hLFA-1との同一性を低減させる1つまたはそれ以上の改変を有する。配列番号78との同一性を低減させる、配列番号78との同一性を低減させる、または配列番号78と比較して1つもしくはそれ以上の非保存的置換を導入する任意の改変が包含される。

【0295】

一部の実施形態では、OspAポリペプチドは、ボレリアのOspA血清型1ポリペプチドを含み、OspAポリペプチドは、配列番号77の配列を含まない。一部の実施形態では、OspAポリペプチドは、OspA血清型1のエクドメインを含み、エクドメインは、配列番号77の配列を含まない。一部の実施形態では、OspA血清型1ポリペプチドは、配列番号94~102のいずれか1つの配列と少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%、または100%の同一性を有する配列を含む。

【0296】

「同一性を低減させる」は、配列同一性を低減させることおよび／または配列類似性を低減させることを包含し、以下の表4において保存的置換として記載された1組のアミノ酸の各メンバーは、記載された当初の残基およびその組の他のメンバーに対して類似であると考えられ；例えば表の1列目は、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンが互いに類似であることを示し、8列目は、アラニンおよびグリシンが互いに類似であることを示している。類似性は、推移的ではなく、そのため例えばイソロイシンおよびグリシンは類似ではないと考えられる。一部の実施形態では、OspAポリペプチドは、野生型OspA血清型と比較してhLFA-1に対して低減された同一性を有するOspA血清型1タンパク質を包含する。一部の実施形態では、改変されたOspAは、配列番号7

7のアミノ酸の任意の1つまたはそれ以上に対する改変を含むO s p A血清型1を含む。一部の実施形態では、配列番号77に対する改変は、非保存的アミノ酸置換である。非保存的置換は、以下の表に示す保存的置換とは異なる置換である。

【0297】

【表2】

表4:保存的アミノ酸置換

当初の残基	保存的置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン

10

20

30

40

【0298】

一部の実施形態では、O s p Aポリペプチドは、配列番号77の1つまたはそれ以上のアミノ酸が、血清型2、3、4、5、6、または7のO s p Aのような非血清型1 O s p Aの対応するアミノ酸に置き換えられているO s p A血清型1タンパク質を含む。一部の実施形態では、配列番号77のアミノ酸の各々は、血清型2、3、4、5、6、または7のO s p Aの対応するアミノ酸に置き換えられている。一部の実施形態では、配列番号77のアミノ酸は、血清型2（S2、配列番号79）または血清型3（S3、配列番号80）の対応するアミノ酸に置き換えられている。

【0299】

一部の実施形態では、O s p Aポリペプチドは、配列番号81を含む。一部の実施形態

50

では、O s p A ポリペプチドは、配列番号 8 2 を含む。配列番号 8 1 および 8 2 は、配列番号 7 7 を置き換えると意図され、それによって配列番号 7 8 に対する相同性を低減させる。

【0300】

一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、完全長の O s p A（例えば、本明細書に記載される h L F A - 1 に対する相同性を低減させる改変を含んでもよくまたは含まなくてもよい膜貫通ドメインおよびエクトドメインを含む）である。

【0301】

一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、膜貫通ドメインを欠如する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、膜貫通ドメインの一部、例えば野生型 O s p A 配列の N 末端の 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または 24 アミノ酸を欠如する。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、O s p A 血清型 1 のアミノ酸 17、またはペアワイズまたは構造アライメントによって同定される、そのホモログの対応する位置を含むセグメントを欠如する。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、O s p A 血清型 1 のような、O s p A のアミノ酸少なくとも 1 ~ 17、またはペアワイズまたは構造アライメントによって同定される、そのホモログにおける対応するアミノ酸を欠如する。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、O s p A 血清型 1 のような O s p A の少なくとも N 末端の 18、19、20、21、22、23、もしくは 24 アミノ酸、またはペアワイズまたは構造アライメントによって同定される、そのホモログにおける対応するアミノ酸を欠如する。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、O s p A 血清型 1 のような O s p A のアミノ酸 1 ~ 25、またはペアワイズまたは構造アライメントによって同定される、そのホモログにおける対応するアミノ酸を欠如する。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、O s p A 血清型 1 のアミノ酸 1 ~ 26、またはペアワイズまたは構造アライメントによって同定される、そのホモログにおける対応するアミノ酸を欠如する。誤解を避けるために、膜貫通ドメインを欠如することは、ポリペプチドが N 末端メチオニンを欠如することを必要としない；例えば第 1 の残基がメチオニンで第 2 の残基が野生型 O s p A の残基 26 に対応し、その後 27 番目、28 番目等の野生型 O s p A 残基に対応する残基が続くポリペプチドは、膜貫通ドメインを欠如すると考えられる。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドを含むポリペプチドは、野生型 O s p A 血清型 1 の膜貫通ドメイン内に含有される脂質付加部位のような脂質付加部位を欠如する。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、O s p A 血清型 1 のシステイン 17 を欠如する。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、野生型 O s p A、例えば配列番号 83 ~ 89 のいずれかの 1 ~ 25 位のいずれかに対応するシステインを含まない。一部の実施形態では、ポリペプチドは、O s p A 血清型 1 のシステイン 17 を欠如するか、またはシステイン 17 で置換を有する。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、脂質付加部位を欠如するように、野生型 O s p A 膜貫通ドメインの少なくとも一部を欠如する。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、O s p A 血清型 1 のアミノ酸 1 ~ 17 と整列するアミノ酸を欠如する。

【0302】

一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、パルミトイル基を含まない。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、ジアシルグリセロール基を含まない。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、脂質付加されていない。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、脂質付加部位を欠如する。一部の実施形態では、この脂質付加部位は、膜貫通ドメイン内に含有される。一部の実施形態では、除去される脂質付加部位は、O s p A 血清型 1 のシステイン 17 である。一部の実施形態では、O s p A ポリペプチドは、O s p A 血清型 1 のシステイン 17 を欠如するかまたはシステイン 17 で置換を有する。

【0303】

一部の実施形態では、O s p A 脂質付加部位および／もしくは膜貫通ドメインもしくは

その一部の除去、ならびに／またはパルミトイルおよび／もしくはジアシルグリセロール基の欠如は、例えばタンパク質の溶解度を改善することによって、および／またはタンパク質を、イオン交換および他の形態のクロマトグラフィーのような技術による精製をより受けやすくすることによって、より容易なタンパク質精製を可能にする。

【0304】

一部の実施形態では、O s p Aポリペプチドは、哺乳動物リーダー配列（シグナル配列としても知られる）を含む。一部の実施形態では、哺乳動物リーダー配列は、哺乳動物細胞において発現された場合に、ポリペプチドの分泌をもたらす。

【0305】

一部の実施形態では、O s p Aポリペプチドは、グリコシル化部位を欠如する。グリコシル化部位を除去する改変を、本明細書において詳細に記載する。本開示に従うO s p Aポリペプチドは、h L F A－1 相同性部位に対する改変、および／または膜貫通ドメインの一部もしくは全ての欠失を含む、本明細書に記載される任意の他の改変と組み合わせることができる任意のそのような改変を含み得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号77（例えば、h L F A－1 aに対して低減された相同性を有する）を含まず、およびグリコシル化を低減させる変異を有し、および／または膜貫通ドメインを欠如する。

10

【0306】

a) グリコシル化の改変

N結合グリコシル化は、タンパク質のアスパラギン（A s n；N）残基のアミド窒素に対するグリカンの結合である。結合プロセスは、グリコシル化タンパク質をもたらす。グリコシル化は、タンパク質の翻訳後にグリコシル化酵素により接近可能であり、認識されるタンパク質中の任意のアスパラギン残基で起こり得、N X S／T X部位の一部である接近可能なアスパラギンで最も一般的であり、アスパラギンの後に続く第2のアミノ酸残基は、セリンまたはトレオニンである。非ヒトグリコシル化パターン（例えば、ある特定の非ヒト細胞タイプにおけるグリコシル化部位を含むポリペプチドの発現に起因する）は、抗体を誘発するために使用する場合、ポリペプチドを望ましくないほど反応原性に行き得ることがある。加えて、通常グリコシル化されないポリペプチドのグリコシル化は、その免疫原性を変化させることができる。例えば、グリコシル化は、タンパク質内の重要な免疫原性エピトープを隠すことができる。このように、グリコシル化を低減または除去するために、アスパラギン残基またはセリン／トレオニン残基のいずれかを、例えば別のアミノ酸への置換によって改変することができる。

20

30

【0307】

一部の実施形態では、O s p Aポリペプチドを含むポリペプチドは、グリコシル化を低減または除去するように改変される。一部の実施形態では、O s p Aにおける1つまたはそれ以上のNグリコシル化部位が除去される。一部の実施形態では、Nグリコシル化部位の除去は、O s p Aのグリコシル化を減少させる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、野生型血清型1 O s p Aのような野生型O s p Aと比較して減少したグリコシル化を有する。一部の実施形態では、Nグリコシル化部位の除去は、O s p Aのグリコシル化を除去する。

40

【0308】

一部の実施形態では、O s p Aにおける1つまたはそれ以上のアスパラギンは、非アスパラギンアミノ酸に置き換えられる。一部の実施形態では、O s p Aにおける各アスパラギンは、非アスパラギンアミノ酸に置き換えられる。タンパク質において見出される任意の天然または非天然アミノ酸、例えばグルタミンを使用して、アスパラギンを置き換えてもよい。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去するための改変は、N X S／T Xグリコシル化部位を改変する（Nの後の第2の残基はSまたはTである）。一部の実施形態では、N X S／T X部位における第1のXおよび／またはN X S／T X部位における第2のXは、プロリンではない。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、NからQへの置換である。一部の実施形態では、グリコシル化を低減また

50

は除去する改変は、S / T の A への置換である。

【0309】

グリコシル化を低減または除去するように改変することができる位置の詳細な考察を以下に述べる。位置の番号は、配列番号83～89として提供される完全長のO s p A配列における位置を指す。位置の番号は、部分的小および改変O s p A配列に関して適切に調節すべきであると理解される（例えば、N末端欠失によって25アミノ酸残基の真の短縮がもたらされる場合、位置の番号を25減少すべきである）。

【0310】

一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型1（配列番号83）のN20、N71、N190、N202、およびN251の任意の1つまたはそれ以上の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型1のN71、N190、N202、およびN251の各々で改変を含む。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型1のN20Q、N71Q、N190Q、N202Q、またはN251Qの1つまたはそれ以上を含む。対応するアミノ酸は、ペアワイズアライメントによって異なる血清型のO s p Aにおいて見出すことができる。このように、一部の実施形態では、血清型2～7のO s p Aにおいて置き換えられたアスパラギン残基は、O s p A血清型1のN20、N71、N190、N202、およびN251と整列するアミノ酸残基である。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型1の22、73、192、204、および253位でS e rまたはT h rの任意の1つまたはそれ以上の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型1の22、73、192、204、および253位で1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基のアラニンとの置換を含む。

【0311】

一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型2（配列番号84）のN20、N71、N141、N164、N202、およびN205の任意の1つまたはそれ以上の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型2のN20、N71、N141、N164、N202、およびN205の各々で改変を含む。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型2のN20Q、N71Q、N141Q、N164Q、N202Q、またはN205Qの1つまたはそれ以上を含む。類似のアミノ酸を、ペアワイズアライメントによって異なる血清型のO s p Aにおいて見出すことができる。このように、一部の実施形態では、血清型1または3～7のO s p Aにおいて置き換えられたアスパラギン残基は、O s p A血清型2のN20、N71、N141、N164、N202、およびN205と整列するアミノ酸残基である。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型2の22、73、143、166、204、および207位で任意の1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型2の22、73、143、166、204、および207位で1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基のアラニンとの置換を含む。

【0312】

一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型3（配列番号85）のN20、N71、N95、N141、N191、およびN203の任意の1つまたはそれ以上の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型3のN20、N20、N71、N95、N141、N191、およびN203の各々で改変を含む。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型3のN20Q、N71Q、N95Q、N141Q、N191Q、またはN203Qの1つまたはそれ以上を含む。類似のアミノ酸を、ペアワイズアライメントによって異なる血清型のO s p Aにおいて見出すことができる。このように、一部の実施形態では、血清型1～2、または4～7のO s p Aにおいて置き換えられたアスパラギン残基は、O s p A血清型3のN20、N20、N71、N95、N141、N191、およびN203と整列するアミノ酸残基である。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変

は、O s p A血清型3の22、73、97、143、193、および205位で任意の1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型3の22、73、97、143、193、および205位で1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基のアラニンとの置換を含む。

【0313】

一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型4（配列番号86）のN20、N71、N141、N202、N205、およびN219の任意の1つまたはそれ以上の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型4のN20、N71、N141、N202、N205、およびN219の各々で改変を含む。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型4のN20Q、N71Q、N141Q、N202Q、N205Q、またはN219Qの1つまたはそれ以上を含む。類似のアミノ酸を、ペアワイズアライメントによって異なる血清型のO s p Aにおいて見出すことができる。このように、一部の実施形態では、血清型1～3、または5～7のO s p Aにおいて置き換えられたアスパラギン残基は、O s p A血清型4のN20、N71、N141、N202、N205、およびN219と整列するアミノ酸残基である。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型4の22、73、143、204、207、および221位で任意の1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型4の22、73、143、204、207、および221位で1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基のアラニンとの置換を含む。

【0314】

一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型5のN20、N71、およびN141の任意の1つまたはそれ以上の置換を含む（血清型5～7を含むある特定の血清型は、血清型1のようなある特定の他のO s p A配列より少ないグリコシル化部位を含有する）。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型5（配列番号87）のN20、N71、およびN141の各々で改変を含む。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型5のN20Q、N71Q、またはN141Qの1つまたはそれ以上を含む。類似のアミノ酸を、ペアワイズアライメントによって、異なる血清型のO s p Aにおいて見出すことができる。このように、一部の実施形態では、血清型1～4、または6～7のO s p Aにおいて置き換えられたアスパラギン残基は、O s p A血清型5のN20、N71、およびN141と整列するアミノ酸残基である。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型5の22、73、および143位で任意の1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型5の22、73、および143位で1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基のアラニンとの置換を含む。

【0315】

一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型6（配列番号88）のN20、N71、およびN141の任意の1つまたはそれ以上の置換を含み得る。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型6のN20、N71、およびN141の各々で改変を含む。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型6のN20Q、N71Q、またはN141Qの1つまたはそれ以上を含む。類似のアミノ酸を、ペアワイズアライメントによって異なる血清型のO s p Aにおいて見出すことができる。このように、一部の実施形態では、血清型1～5、または7のO s p Aにおいて置き換えられたアスパラギン残基は、O s p A血清型6のN20、N71、およびN141と整列するアミノ酸残基である。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型6の22、73、および143位で任意の1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型6の22、73、および143位で1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基のアラニンとの置換を含む。

【0316】

一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型7（配列番号89）のN20、N71、N141、およびN191の任意の1つまたはそれ以上の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型7のN20、N71、N141、およびN191の各々で改変を含む。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型7のN20Q、N71Q、N141Q、またはN191Qの1つまたはそれ以上を含む。類似のアミノ酸を、ペアワイズアライメントによって異なる血清型のO s p Aにおいて見出すことができる。このように、一部の実施形態では、血清型1～6のO s p Aにおいて置き換えられたアスパラギン残基は、O s p A血清型7のN20、N71、N141、およびN191と整列するアミノ酸残基である。一部の実施形態では、グリコシル化を低減または除去する改変は、O s p A血清型7の22、73、143、および193位で任意の1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基の置換を含む。一部の実施形態では、改変は、O s p A血清型7の22、73、143、および193位で1つまたはそれ以上のS e rまたはT h r残基のアラニンとの置換を含む。

10

【0317】

5. 非フェリチンポリペプチドとしてのR S Vポリペプチド

一部の実施形態では、本明細書に記載されるフェリチンポリペプチドは、R S Vポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドの非フェリチンポリペプチドは、R S Vポリペプチドである。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドは、抗原性R S Vポリペプチドである。R S Vポリペプチドは、本明細書に記載される任意のR S V FポリペプチドのようなR S V Fポリペプチドであり得る。R S V Fポリペプチドは、R S V Fの配列全体またはR S V Fの一部を含み得る。R S V Fポリペプチドは、野生型配列と比較して1つまたはそれ以上の改変（例えば、アミノ酸置換）を含み得る。R S Vポリペプチドは、本明細書に記載される任意のR S V GポリペプチドのようなR S V Gポリペプチドであり得る。

20

【0318】

a) R S V Fポリペプチド

一部の実施形態では、R S V Fポリペプチドは、完全長または断片の野生型R S V Fポリペプチドである。一部の実施形態では、融合前R S V Fと融合後R S V Fの間で共有されるR S Vポリペプチドのエピトープをブロックする。エピトープのブロッキングにより、抗原性R S Vポリペプチドを対象に投与した場合に、エピトープに対する抗体の生成が低減または除去される。これは、融合前コンフォメーションのようなFの特定のコンフォメーションに対して特異的なエピトープを標的とする抗体の割合を増加させることができる。Fは、まだ細胞に侵入していないウイルスの融合前コンフォメーションを有することから、融合前Fを標的とする抗体の割合の増加は、より大きい程度の中和を提供することができる（例えば、本明細書に記載されるように中和対結合比として表記される）。ブロッキングは、共有されたエピトープの近位にあるNグリカンのようなかさ高い部分を操作することによって達成することができる。例えば、野生型Fに存在しないNグリコシル化部位を、例えば適切な残基をアスパラギンに変異させることによって付加することができる。一部の実施形態では、ブロックされたエピトープは、R S V Fの抗原性部位1のエピトープである。一部の実施形態では、融合前R S V Fと融合後R S V Fの間で共有される2つまたはそれより多くのエピトープがブロックされている。一部の実施形態では、R S V Fの抗原性部位1の2つまたはそれより多くのエピトープがブロックされている。一部の実施形態では、ブロックされたエピトープと地形学的に重複する1つもしくはそれ以上、または全てのエピトープが、同様にブロックされ、場合によりブロックされたエピトープはR S V Fの抗原性部位1のエピトープである。

30

40

【0319】

一部の実施形態では、R S V Fポリペプチドは、配列番号526の328、348、

50

または507位に対応するアスパラギンを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号526の328、348、または507位の少なくとも2つに対応するアスパラギンを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号526の328、348、または507位に対応するアスパラギンを含む。実施例に記載するように、そのようなアスパラギンは、グリコシル化部位として機能することができるが見出されている。さらに、いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、これらの部位でのグリカンは、ポリペプチドを対象に投与する場合、融合前および融合後RSV Fタンパク質に共通するエピトープを含む近くのエピトープに対する抗体の発生を阻害し得る。一部の実施形態では、配列番号26の328、348、または507位に対応するアスパラギンのグリコシル化は、抗原性部位1のエピトープのような、融合前RSV Fと融合後RSV Fの間で共有される少なくとも1つのエピトープをブロックする。融合前および融合後RSVタンパク質に共通するエピトープに対する抗体の発生を阻害することは、それが、他のRSV Fエピトープに対する抗体より有効な中和活性を有し得る部位0エピトープのような、融合前RSV Fタンパク質に対して特異的なエピトープに対する抗体発生を方向付けることができることから有益であり得る。部位0エピトープは、配列番号526のアミノ酸残基62～69および196～209を伴う。したがって、一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは、配列番号526のアミノ酸残基62～69および196～209を含む。

【0320】

本明細書に記載される構築物は、野生型RSV Fと比較して異なる長さの欠失または置換を有し得ることに注意すべきである。例えば、配列番号523および他の構築物において、野生型配列（配列番号526）の98～144位を、GSGNVGL（配列番号523の98～104位；同様に配列番号531）に置き換えると、40アミノ酸の真の除去をもたらし、それによって配列番号526の328、348、または507位は、配列番号523の288、308、および467位に対応する。一般的に、本明細書に記載される構築物における位置は、ペアワイズアライメントによって、例えば標準的なパラメータ（EBL O S U M 6 2 行列、ギャップペナルティ10、ギャップ伸長ペナルティ0.5）によるNeedleman-Wunschのアルゴリズムを使用することによって、配列番号526の野生型配列上にマッピングすることができる。同様に、対応する位置を同定するための代替アプローチとして、本明細書に提供される構造アライメントの考察も参照されたい。

【0321】

一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは、融合前RSV Fの表面上のエピトープと構造的に類似である融合前抗原上のエピトープをブロックするためにグリカンを付加する変異を含む。一部の実施形態では、グリカンは、RSV Fの融合前コンフォメーションに存在し得るエピトープを特異的にブロックするように付加される。一部の実施形態では、RSV Fの融合前コンフォメーションに存在し得るエピトープをブロックするが、部位0エピトープのようなRSV Fの融合前コンフォメーションに存在する1つまたはそれ以上のエピトープに影響を及ぼさないグリカンが付加される。

【0322】

一部の実施形態では、上記の1つまたはそれ以上のグリコシル化部位で付加されるグリカンは、他の構築物と比較して、哺乳動物細胞のような発現系において分泌を増加させる。

【0323】

一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは、配列番号517のアミノ酸1～478と少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、99%、または99.5%の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは、配列番号517の配列と少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、99%、または99.5%の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは、配列番号517のアミノ酸1～478を含む。一部の実施形態では、RSV Fポリペ

プチドは、配列番号 5 1 7 の配列を含む。

【0 3 2 4】

一部の実施形態では、R S V F ポリペプチドは、配列番号 5 2 3 のアミノ酸 1 ~ 4 7 8 と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 9 9 . 5 % の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、R S V F ポリペプチドは、配列番号 5 2 3 の配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 9 9 . 5 % の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、R S V F ポリペプチドは、配列番号 5 2 3 のアミノ酸 1 ~ 4 7 8 を含む。一部の実施形態では、R S V F ポリペプチドは、配列番号 5 2 3 の配列を含む。

【0 3 2 5】

一部の実施形態では、R S V F ポリペプチドは、上記のアスパラギンの少なくとも 1 つ、2 つ、または 3 つを含むさらなる改変が作製される D S - C A V 1 配列（例えば、M c L e l l a n, J. S. ら、S c i e n c e 3 4 2 (6 1 5 8) : 5 9 2 ~ 5 9 8 頁 (2 0 1 3) に記載される）（配列番号 5 2 5）を含む。

【0 3 2 6】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、フェリチンタンパク質をさらに含む。フェリチンタンパク質は、フェリチンに関する章において以下に記載した特色のいずれかまたはその組合せをさらに含み得る。

【0 3 2 7】

R S V F ポリペプチドは、あるいはまたは加えて、以下の考察に記載される任意の追加の特色、またはそのような特色の任意の実現可能な組合せを含み得る。

【0 3 2 8】

一本鎖構築物

一部の実施形態では、R S V F ポリペプチドは、一本鎖構築物、例えばフリン切断部位を欠如する R S V F ポリペプチドである。一部の実施形態では、R S V F は、1 つまたはそれ以上のフリン切断部位を含む。フリン切断部位を欠如する構築物は、本来の F タンパク質の生物学的 F 1 / F 2 断片に切断されない単一のポリペプチドとして発現される。

【0 3 2 9】

アミノ酸置換

一部の実施形態では、R S V F は、野生型配列と比較して単一のアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、R S V F は、野生型配列と比較して 1 つより多くの単一のアミノ酸置換、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 個の置換を含む。例示的な野生型配列は、配列番号 5 2 6 である。

【0 3 3 0】

一部の実施形態では、アミノ酸置換またはアミノ酸置換の対は、プロトマー間の安定化置換である。プロトマー間安定化であり得る例示的な置換は、配列番号 5 2 6 の位置番号付けを使用して V 2 0 7 L ; N 2 2 8 F ; I 2 1 7 V および E 2 1 8 F ; I 2 2 1 L および E 2 2 2 M ; または Q 2 2 4 A および Q 2 2 5 L である。

【0 3 3 1】

一部の実施形態では、アミノ酸置換またはアミノ酸置換の対は、プロトマー間安定化である。プロトマー間安定化であり得る例示的な置換は、配列番号 5 2 6 の位置番号付けを使用して V 2 2 0 I ; ならびに A 7 4 L および Q 8 1 L である。

【0 3 3 2】

一部の実施形態では、アミノ酸置換は、ヘリックス安定化、すなわち R S V F のヘリックスドメインを安定化すると予想される。ヘリックスドメインの安定化は、部位 0 エピトープの安定性および R S V F の融合前コンフォメーションの安定性に関与し得る。ヘリックス安定化であり得る例示的な置換は、配列番号 5 2 6 の位置番号付けを使用して N 2 1 6 P または I 2 1 7 P である。

【0 3 3 3】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、アミノ酸置換は、ヘリックスキャッピングである。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、ヘリックスPROキャッピングである。ヘリックスキャッピングは、アルファヘリックスにおけるプロリン残基変異部位が、ヘリックス形成を妨害し得るが、ヘリックス領域のN末端でのプロリンは、PHI/PSI結合角を安定化することによってヘリックス形成の誘導に役立ち得る、という生物物理学的観察に基づく。ヘリックスキャッピングであり得る例示的な置換は、配列番号526の位置番号付けを使用してN216PまたはI217Pである。

【0334】

一部の実施形態では、アミノ酸置換は、DS-CAV1のジスルフィド変異を置き換える。一部の実施形態では、DS-CAV1の操作されたジスルフィドを、野生型に復帰させる（DS-CAV1のC69Sおよび/またはC212S変異、配列番号526の位置番号付けを使用して）。一部の実施形態では、DS-CAV1の1つまたはそれ以上のC残基をS残基に置き換えて、ジスルフィド結合を除去する。一部の実施形態では、配列番号526の位置番号付けを使用するC69SまたはC212S置換は、ジスルフィド結合を除去する。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは、配列番号526の位置番号付けを使用してC69SおよびC212Sの両方を含む。一部の実施形態では、そのようなシステインの置き換えおよびそれによるジスルフィド結合の除去は、RSV Fポリペプチドの還元（すなわち、還元剤からの電子の受容）をブロックする。一部の実施形態では、配列番号526の位置番号付けを使用するI217P置換は、C69および/またはC212での置換の代わりに抗原に含まれる。配列番号526における位置217は、配列番号523における位置177に対応する。

【0335】

一部の実施形態では、アミノ酸置換は、トリプシンまたはトリプシン様プロテアーゼによるタンパク質分解を防止する。一部の実施形態では、そのようなタンパク質分解を防止するアミノ酸置換は、RSV Fの7残基反復領域B（HRB）にある。野生型HRB領域を含むRSV F-フェリチン構築物のタンパク質分解と一貫する断片の出現は、この領域におけるリシンまたはアルギニンがタンパク質分解の標的であることを示唆した。KまたはR残基を除去するアミノ酸置換は、ノックアウト（KO）と呼ぶことができる。一部の実施形態では、KまたはRを、LまたはQの代わりに使用する。一部の実施形態では、Kは、LまたはQの代わりに使用される。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは、配列番号526の位置番号付けを使用してK498Lおよび/またはK508Qを含む。配列番号523における対応する位置はそれぞれ、458および468である。一部の実施形態では、RSV Fポリペプチドは、K498LおよびK508Qの両方を含む。

【0336】

一部の実施形態では、アミノ酸置換はグリカンが付加する。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、グリカンにRSV Fポリペプチドに付加することによってグリコシル化を増加させる。グリカンが付加する置換はまた、本来のグリコシル化（追加のグリカンを有しない）と比較して操作されたグリコシル化と呼ぶことができる。

【0337】

一部の実施形態では、グリカンが付加するアミノ酸置換は、Nへの置換であった。一部の実施形態では、Nへのアミノ酸置換は、N結合グリコシル化を可能にする。一部の実施形態では、Nへの置換は、Nに対してC末端側の第2のアミノ酸位置でTまたはSへの置換を伴い、これはNxT/Sグリコシル化モチーフを形成する。一部の実施形態では、Nは、表面に露出している。以下の例に示すように、グリコシル化を増加させる変異は、RSV Fポリペプチドを含むポリペプチドの発現の増加を提供することができる。

【0338】

改変に基づくRSV Fポリペプチドの特性に対する変化

RSV Fのアミノ酸配列に対する改変は、RSV Fポリペプチドの特性を変化させることができる。RSV Fポリペプチドの特性は、RSV Fポリペプチドの任意の構

10

20

30

40

50

造的または機能的特徴を含み得る。

【0339】

一部の実施形態では、アミノ酸配列に対する単一の改変は、R S V Fポリペプチドの複数の特性を変化させる。一部の実施形態では、R S V Fポリペプチドは、R S V Fポリペプチドの異なる特性を変化させる複数の改変を含み得る。一部の実施形態では、複数の改変は、R S V Fポリペプチドの特性のより大きい変化を生じる。

【0340】

一部の実施形態では、複数の改変は、特定の特性に対して相加効果を有し得る。例えば、グリカンが付加する2つのアミノ酸置換は、単一のアミノ酸置換と比較してR S V Fポリペプチドのグリコシル化のより大きい増加を生じることができる。

10

【0341】

一部の実施形態では、複数の改変は、R S V Fポリペプチドの異なる特性に影響を及ぼす。例えば、グリコシル化を増加させる1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を、低減をブロックするために1つまたはそれ以上のアミノ酸置換と共に作製することができる。

【0342】

一部の実施形態では、R S V Fポリペプチドに対する改変は、融合前コンフォメーションを安定化させる。

【0343】

一部の実施形態では、改変は、例えばMcLellanら、Science 340 (6136): 1113~1117頁(2013)に記載されるように融合前R S V Fの部位0エピトープ(抗原性部位0としても知られる)を安定化させる。一部の実施形態では、部位0エピトープを安定化させる改変は、プロトマー間安定化である。一部の実施形態では、部位0エピトープを安定化させる改変は、抗体D25またはAM14に対する結合によってそれぞれ測定する部位0および部位V結合によって測定した場合に融合前Fを安定化させる。

20

【0344】

一部の実施形態では、改変は、発現系においてR S V Fの発現を増加させる。一部の実施形態では、改変は発現系においてR S V Fの分泌を増加させる。一部の実施形態では、改変は、発現後に組換えR S V Fの安定性を増加させる。この変化は、細菌、真菌、昆虫、または哺乳動物のような任意のタイプの発現系に存在し得る。

30

【0345】

一部の実施形態では、プロリンを導入するアミノ酸置換は、他の構築物と比較して発現を増加させる。一部の実施形態では、グリカンが付加するアミノ酸置換は、他の構築物と比較して発現を増加させる。一部の実施形態では、KまたはRを他のアミノ酸に置換するアミノ酸置換は、他の構築物と比較して発現を増加させる。発現の観察可能な増加は、宿主細胞または細胞外環境におけるプロテアーゼ切断もしくは分解の相対的阻害および/または安定性の増加を含む、発酵の実施または他の産生プロセスの収量を増加させる任意の機構に起因し得る。一部の実施形態では、R S V FのHRB領域における1つまたはそれ以上のK残基を他のアミノ酸に置換するアミノ酸置換は、他の構築物と比較して発現を増加させる。

40

【0346】

一部の実施形態では、Kを他のアミノ酸に置換するアミノ酸置換は、R S V Fポリペプチドの安定性を増加させる。一部の実施形態では、R S V FのHRB領域における1つまたはそれ以上のK残基を他のアミノ酸に置換するアミノ酸置換は、R S V Fポリペプチドの安定性を増加させる。一部の実施形態では、この安定性の増加は、プロテアーゼ切断の低減による。

【0347】

一部の実施形態では、R S V Fは、例えば還元後のコンジュゲーションを防止するために、ジスルフィドを除去する変異を含む。一部の実施形態では、I217P置換は、R S V Fポリペプチドの低減をブロックする。一部の実施形態では、Kを他のアミノ酸に

50

置換するアミノ酸置換は、還元剤の存在下で R S V F ポリペプチドの低減をブロックする。

【0348】

一部の実施形態では、一本鎖構築物は、他の構築物と比較して発現を増加させる。

【0349】

一部の実施形態では、R S V F ポリペプチドは、D S - C A V 1 配列（配列番号 5 2 5）（例えば、Mc L e l l a n, J. S. ら、S c i e n c e 3 4 2 (6 1 5 8) : 5 9 2 ~ 5 9 8 頁 (2 0 1 3) に記載されている）を含む。一部の実施形態では、R S V F ポリペプチドは、上記のアスパラギンの少なくとも 1 つ、2 つ、または 3 つを含むさらなる改変が作製される D S - C A V 1 の配列を含む。

10

【0350】

b) R S V G ポリペプチド

本明細書で使用される場合、R S V G ポリペプチドは、R S V G の配列全体または R S V G の一部を含み得る。R S V G ポリペプチドは、野生型配列と比較して改変を含み得る。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、野生型 R S V G（配列番号 5 2 7）と比較して改変された R S V G である。一部の実施形態では、これらの改変は、野生型 R S V G と比較して R S V G ポリペプチドのアミノ酸に対する変化である。

【0351】

一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、R S V G のエクストドメイン（配列番号 5 2 8 またはそれに対応する位置）の全てまたは一部を含む。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、G c c 領域（R S V G（配列番号 5 2 7）のアミノ酸 1 5 1 ~ 1 9 3）の全てまたは一部を含む。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、C X 3 C モチーフを含む。一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、C X 3 C R 1 受容体に結合する。G c c 領域は、保存され、かつ免疫原性であり、このように R S V 株に対して広い活性を有する抗体を誘発するために使用することができる。一部の実施形態では、配列番号 5 3 6 に示す R S V G c c 株 A を提供する。一部の実施形態では、配列番号 5 3 7 に示す R S V G c c 株 B を提供する。

20

【0352】

一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、グリコシル化されない。例えば、R S V G ポリペプチドは、N または S / T 残基の切断または変異（例えばそれぞれ、Q または A への）またはその組合せのいずれかにより、N X S / T X グリコシル化部位を欠如し得る。

30

【0353】

一部の実施形態では、R S V G ポリペプチドは、例えばフェリチン上の表面に露出したシステインを介して、本明細書に記載されるフェリチンにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、このフェリチンナノ粒子は、R S V F ポリペプチドを含むいずれかのポリペプチドのような R S V F ポリペプチドおよび上記のフェリチンタンパク質も含む融合タンパク質である。

【0354】

D. 例示的な組成物、キット、核酸、使用、および方法

一部の実施形態では、本発明は、病原体による感染に対して対象を免疫する方法を提供する。本発明は、対象における病原体に対する免疫応答を誘発する方法をさらに提供する。一部の実施形態では、本発明の方法は、本明細書に記載される医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む。一部の実施形態では、本発明の方法は、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドまたはナノ粒子の有効量を対象に投与する工程を含む。

40

【0355】

一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、病原体による感染に対して対象を免疫するために、ヒトを含む対象に投与される。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、ヒトのような対象の免疫に使用するためである。一部の実施形態では、

50

投与される組成物は、配列番号 1～76、301～343、401～403、410、413～414、417～427、または501～523のいずれか1つの配列を含むポリペプチドを含む。一部の実施形態では、投与は、インフルエンザ、EBV、RSV、またはボレリアに対して免疫する。

【0356】

同様に、組成物を将来の感染に対する保護的免疫応答を生じるために投与してもよい。一部の実施形態では、将来の感染は、インフルエンザ、EBV、RSV、またはボレリア感染である。

【0357】

一部の実施形態では、保護的免疫応答は、入院の発生率を減少させる。一部の実施形態では、組成物がインフルエンザポリペプチドを含む場合、保護的免疫応答は、検査により確認されたインフルエンザ感染症の発生率を減少させる。一部の実施形態では、組成物がEBVポリペプチドを含む場合、保護的免疫応答は、EBV感染症、単核球症、単核球症によって引き起こされる合併症（例えば、肝炎、脳炎、重度の溶血性貧血、または脾腫）、鼻咽頭がん、胃がん、またはBリンパ腫（バーキットまたはホジキンリンパ腫を含む）の発生率を減少させる。一部の実施形態では、組成物がRSVポリペプチドを含む場合、保護的免疫応答は、RSVによる感染症、肺炎、気管支炎、または喘息の発生率を減少させる。一部の実施形態では、組成物がボレリアポリペプチドを含む場合、保護的免疫応答は、関節の炎症、神経学的症状、認知障害、または心リズム不規則を含む急性または慢性ライム病の発生率を減少させる。

【0358】

1. 対象

一部の実施形態では、対象は哺乳動物である。一部の実施形態では、対象はヒトである。

【0359】

一部の実施形態では、対象は成人（年齢18歳より上または18歳に等しい）である。一部の実施形態では、対象は小児または青年（年齢18歳未満）である。一部の実施形態では、対象は高齢者（年齢60歳より上）である。一部の実施形態では、対象は、非高齢成人（年齢18歳より上またはそれに等しく、年齢60歳未満またはそれに等しい）である。

【0360】

一部の実施形態では、組成物の1回より多くの投与を対象に投与する。一部の実施形態では、ブースター投与は免疫応答を改善する。

【0361】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原性ポリペプチドまたは組成物の1つまたはそれ以上は、霊長類（例えば、サル（例えば、アカゲザルまたはカニクイザルのようなマカク）または類人猿のような非ヒト霊長類）、齧歯類（例えば、マウスまたはラット）、または家畜哺乳動物（例えば、イヌ、ウサギ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ラクダ、またはロバ）のような哺乳動物において使用するためである。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原性ポリペプチドまたは組成物の1つまたはそれ以上は、家禽（例えば、ニワトリ、七面鳥、アヒル、ガチョウ、ホロホロ鳥、または白鳥）のような鳥類において使用するためである。

【0362】

2. アジュバント

本明細書で使用される場合、アジュバントは、表面に露出したアミノ酸、例えば、システインを介してフェリチンにコンジュゲートしてもよい。非コンジュゲートアジュバントもまた、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドと共に対象に投与してもよい。一部の実施形態では、抗原性フェリチンポリペプチドと共にアジュバントを投与すると、アジュバントを投与しない非フェリチンポリペプチド単独、または抗原性フェリチンポリペプチド単独の投与と比較して、対象において非フェリチンポリペプチドに対するよ

り高力価の抗体を生じる。アジュバントは、抗原性ポリペプチドに対するより早期の、より強力な、またはより持続性の免疫応答を促進し得る。

【0363】

一部の実施形態では、組成物は、1つのアジュバントを含む。一部の実施形態では、組成物は1つより多くのアジュバントを含む。一部の実施形態では、組成物は、アジュバントを含まない。

【0364】

一部の実施形態では、アジュバントはアルミニウムを含む。一部の実施形態では、アジュバントは、リン酸アルミニウムである。一部の実施形態では、アジュバントはミョウバン (Allyhydrogel '85 2%; Brenntag-カタログ番号21645-51-2) である。

10

【0365】

一部の実施形態では、アジュバントは有機アジュバントである。一部の実施形態では、アジュバントは油基剤のアジュバントである。一部の実施形態では、アジュバントは水中油型ナノ乳剤を含む。

【0366】

一部の実施形態では、アジュバントはスクアレンを含む。一部の実施形態では、スクアレンを含むアジュバントは、Ribit (Sigma adjuvant systemカタログ番号S6322-1v1)、Addavax (商標) MF59、AS03、またはAF03 (米国特許第9703095号を参照されたい) である。一部の実施形態では、スクアレンを含むアジュバントは、ナノ乳剤である。

20

【0367】

一部の実施形態では、アジュバントは、ポリアクリル酸ポリマー (PAA) を含む。一部の実施形態では、PAAを含むアジュバントはSPA09である (WO2017218819を参照されたい)。

【0368】

一部の実施形態では、アジュバントは非代謝性油を含む。一部の実施形態では、アジュバントは、フロイント不完全アジュバント (IFA) を含む。

【0369】

一部の実施形態では、アジュバントは、非代謝性油および結核死菌 (Mycobacterium tuberculosis) を含む。一部の実施形態では、アジュバントはフロイント完全アジュバント (CFA) である。

30

【0370】

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

【0371】

3. 医薬組成物

様々な実施形態では、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドおよび／または関連する実体を含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、医薬組成物は、病原体に対して保護的免疫応答のような免疫応答を誘発することが可能な免疫原性組成物 (例えば、ワクチン) である。

40

【0372】

例えば、一部の実施形態では、医薬組成物は、以下の1つまたはそれ以上を含み得る：

(1) (i) 表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異、および(ii) 非フェリチンポリペプチドを含む抗原性フェリチンタンパク質；(2) (i) 表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異、およびシステインに連結した免疫刺激性部分；ならびに(ii) 非フェリチンポリペプチドを含む抗原性フェリチンタンパク質；(3) (i) 表面に露出したシステイン、(ii) フェリチンタンパク質に対してN末端側のペプチドリンカー；および(iii) ペプチドリンカーに対してN末端側の非フェリチンポリペプチドを含む抗原性フェリチンタンパク質；(4) (i) 表面に露出したアミノ酸

50

をシステインに置き換える変異、およびシステインに連結した免疫刺激性部分、(i i) H. ピロリフェリチンの31位の内部システイン、またはペアワイズまたは構造アライメントによって同定される、非H. ピロリフェリチンの31位と類似の位置の内部システインを非システインアミノ酸に置き換える変異；(i i i) 表面に露出したアスパラギンを非アスパラギンアミノ酸に置き換える変異、ならびに(i v) 非フェリチンポリペプチドを含む抗原性フェリチンタンパク質；または(5) 前述のフェリチンタンパク質を含むフェリチン粒子。

【0373】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される抗原性ポリペプチドに関連する抗体または他の作用物質を含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載される抗原性ポリペプチドに結合するおよび／またはそれと競合する抗体を含む。あるいは、抗体は、本明細書に記載される抗原性ポリペプチドの非フェリチンポリペプチド構成要素を含むウイルス粒子または細菌を認識し得る。

【0374】

一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物は、単独で、または免疫応答を増強するための1つもしくはそれ以上の作用物質、例えば本明細書に記載されるアジュバントと組み合わせて投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、上記のアジュバントをさらに含む。

【0375】

一部の実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体または賦形剤をさらに含む。本明細書で使用される場合、用語「担体」は、それと共に医薬組成物が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。例示的な実施形態では、担体は、滅菌液体、例えば水、および石油、動物、植物、または合成起源の油を含む油、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等を含み得る。一部の実施形態では、担体は、1つまたはそれ以上の固体構成要素であるか、またはそれらを含む。薬学的に許容される担体はまた、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、およびその組合せを含み得るがこれらに限定されない。本明細書で使用される場合、賦形剤は、例えば所望のコンシステンシーまたは安定化効果を提供するまたはそれに関与するように医薬組成物に含めることができる任意の非治療剤である。適した薬学的賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等を含むがこれらに限定されない。様々な実施形態では、医薬組成物は無菌的である。

【0376】

一部の実施形態では、医薬組成物は、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有する。一部の実施形態では、医薬組成物は、安定化剤、緩衝剤、または保存剤のような任意の多様な添加剤を含み得る。加えて、補助剤、安定化剤、濃化剤、潤滑剤、および着色剤を含めることができる。

【0377】

様々な実施形態では、医薬組成物は、任意の所望の投与様式に適合するように製剤化することができる。例えば、医薬組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、滴剤、錠剤、丸剤、ペレット、カプセル剤、液体を含有するカプセル、ゼラチンカプセル、散剤、徐放性製剤、坐剤、乳剤、エアロゾル、噴霧剤、懸濁剤、凍結乾燥粉末、凍結懸濁液、乾燥粉末の形態、または使用するために適した他の任意の形態をとることができる。薬剤の製剤化および製造における一般的検討は、例えば参照によって本明細書に組み入れられる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に見出すことができる。

【0378】

医薬組成物は、任意の投与経路を介して投与することができる。投与経路は、例えば経

10

20

30

40

50

口、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、粘膜、硬膜外、舌下、鼻腔内、脳内、膈内、経皮、直腸内、気管内点滴、気管支点滴、吸入、または局所投与経路を含む。投与は局所または全身であり得る。一部の実施形態では、投与は経口で実施される。別の実施形態では、投与は非経口注射による。一部の例では、投与は、本明細書に記載される抗原性フェリチンポリペプチドの血流への放出をもたらす。投与様式は、医師の裁量に委ねることができる。

【0379】

一部の実施形態では、医薬組成物は、非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、および皮下）にとって適している。そのような組成物は、例えば、液剤、懸濁剤、分散剤、乳剤等として製剤化することができる。それらは、使用直前に滅菌注射可能媒体に溶解または懸濁することができる滅菌固体組成物（例えば、凍結乾燥組成物）の形態で製造してもよい。例えば、非経口投与は注射によって達成することができる。そのような実施形態では、注射剤は、通常の形態、すなわち液体溶液または懸濁液、注射前に液体中の溶液または懸濁液にとって適した固体形態、または乳剤として調製される。一部の実施形態では、注射溶液および懸濁液は、滅菌粉末、凍結乾燥粉末、または顆粒から調製される。

【0380】

さらなる実施形態では、医薬組成物は、吸入（例えば、肺および呼吸器への直接送達）による送達のために製剤化される。例えば、組成物は、点鼻用噴霧剤または他の任意の公知のエアロゾル製剤の形態をとり得る。一部の実施形態では、吸入用またはエアロゾル送達のための調製物は、複数の粒子を含む。一部の実施形態では、そのような調製物は、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、または約13ミクロンの平均粒子サイズを有し得る。一部の実施形態では、吸入またはエアロゾル送達のための調製物は、乾燥粉末として製剤化される。一部の実施形態では、吸入またはエアロゾル送達のための調製物は、例えば湿潤剤を含めることを通して湿潤粉末として製剤化される。一部の実施形態では、湿潤剤は、水、食塩水、または生理的pHの他の液体からなる群から選択される。

【0381】

一部の実施形態では、本発明に従う医薬組成物は、鼻または口腔への滴剤として投与される。一部の実施形態では、用量は、複数の液滴（例えば、1～100、1～50、1～20、1～10、1～5滴等）を含み得る。

【0382】

本発明の医薬組成物は、所望の転帰を達成するために適切な任意の用量で投与することができる。一部の実施形態では、所望の転帰は、組成物に存在する抗原性フェリチンポリペプチドに存在する非フェリチンポリペプチドの起源のような病原体に対する長期間持続する適応免疫応答の誘導である。一部の実施形態では、所望の転帰は、感染症の1つまたはそれ以上の症状の強度、重症度、頻度の低減、および／または発生の遅延である。一部の実施形態では、所望の転帰は、感染症の阻害または予防である。必要な用量は、対象の種、年齢、体重、および全身状態、予防または処置される感染の重症度、使用される特定の組成物、およびその投与様式に応じて対象毎に変化する。

【0383】

一部の実施形態では、本発明に従う医薬組成物は、単回または複数回用量で投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、異なる日に投与される複数回用量で投与される（例えば、プライムブーストワクチン接種戦略）一部の実施形態では、医薬組成物は、ブースターレジメンの一部として投与される。

【0384】

様々な実施形態では、医薬組成物は、1つまたはそれ以上の追加の治療剤と同時投与される。同時投与は、それらの投与時期が、追加の治療剤および医薬組成物中の活性成分の薬理活性が時間的に重複し、それによって組み合わせた治療効果を発揮する場合には、治療剤を同時に投与する必要はない。一般的に、各々の作用物質は、その作用物質に関して決定された用量および時間スケジュールで投与される。

【0385】

4. 核酸／mRNA

同様に、本明細書に記載される抗原性ポリペプチドをコードする核酸も提供される。一部の実施形態では、核酸はmRNAである。ポリペプチドをもたらす翻訳を受けることが可能な任意の核酸は、本開示の目的に関してmRNAであると考えられる。

【0386】

5. キット

同様に本明細書において、本明細書に記載される1つまたはそれ以上の抗原性ポリペプチド、核酸、抗原性フェリチン粒子、抗原性ルマジンシンターゼ粒子、組成物、または医薬組成物を含むキットも提供される。一部の実施形態では、キットは、溶媒、溶液、緩衝剤、説明書、または乾燥剤の1つまたはそれ以上をさらに含む。

10

【0387】

本説明および例示的な実施形態は、制限すると解釈すべきではない。本明細書および添付の特許請求の目的に関して、特に示していない限り、量、パーセンテージ、または割合を表記する全ての数値、ならびに本明細書および特許請求の範囲で使用される他の数値は、全ての例において、既にそのように修飾されていない程度に、用語「約」によって修飾されると理解される。「約」は、記載される主題の特性に実質的に影響を及ぼさない変動の程度、例えば10%、5%、2%、または1%以内の変動を示す。したがって、逆を示していない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲で記載される数値パラメータは、得ることが求められる所望の特性に応じて変化し得る近似値である。少なくとも、および特許請求の範囲と均等論の適用を制限する試みとしてではなく、各々の数値パラメータは、報告された有効数字を検討する、および通常の四捨五入技術を適用することによると少なくとも解釈すべきである。

20

【0388】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その」、ならびに他の用語の任意の単数形での使用は、1つの指示対象に明白かつ明確に限定されていない限り、複数の指示対象を含むことに注意されたい。本明細書に使用される場合、用語「含む」およびその文法的変形形態は、非制限的であると意図され、リストにおける項目の引用は、列挙される項目に置換または追加することができる他の類似の項目の除外ではない。用語「または」は、包括的な意味で使用され、すなわち本文がそれ以外であることを示していない限り、「および／または」と等価である。

30

【0389】

【表 3】

表1 (配列表): 配列の説明

説明	配列	配列番号
(「フェリチン」は、特に示していない限り、場合により1つまたはそれ以上の変異を有するH.ピロリフェリチンを指す)	配列1~102に関する略語一覧: • リーダー配列を、時に下線で示す • <u>改変 LFA-1 部位を、イタリック体および下線で示す (存在する場合)</u> • <u>改変 LFA-1 部位以外の変異を、太字および波線下線で示す</u> • <u>リンカーを、二重下線で示す</u> • <u>ウシガエル配列を、イタリック体および波線下線で示す (存在する場合)</u> • <u>ヒト重鎖フェリチン配列を、太字で示す (存在する場合)</u> • <u>膜貫通ドメインを、イタリック体で示す (存在する場合)</u> • <u>脂質付加部位を、太字、イタリック体、および下線で示す (存在する場合)</u>	
血清型1 RD2 Os PA-フェリチン	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADSKVKLTISDDLGQTTLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYTLEGQLSDEKTTLVVKEGTVTLISKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNNGSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS AVEITKLD EIKNALKGS <u>ESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSW\$YTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVVPVQLT\$ISAPEH</u> KFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKDKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIA KSRKS	1
血清型1 RD1 Os PA-フェリチン	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADSKVKLTISDDLGQTTLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYDLKGEL\$SEKTTLVVKEGTVTLISKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNNGSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS AVEITKLD EIKNALKGS <u>ESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSW\$YTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVVPVQLT\$ISAPEH</u> KFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKDKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIA KSRKS	2
血清型1 Ospa-フェリチン;LFA-1置き換え 血清	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADSKVKLTISDDLGQTTLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYTLEGQVANEKTTLVVKEGTVTLISKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNNGSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS AVEITKLD EIKNALKGS	3

【表4】

型2	<u>ESQVRQQFSK</u> <u>DI</u> <u>KL</u> <u>NE</u> <u>QV</u> <u>NK</u> <u>EM</u> <u>Q</u> <u>SS</u> <u>NL</u> <u>Y</u> <u>MS</u> <u>SS</u> <u>SW</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>TH</u> <u>SL</u> <u>DG</u> <u>AG</u> <u>FL</u> <u>FD</u> <u>HA</u> <u>EE</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>AK</u> <u>KL</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>FL</u> <u>NN</u> <u>VP</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>H</u> KFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIA KSRKS	
血清型1 OspA- フェリチン;LFA- 1置き換え 血清 型3	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKGKYSLKATVDKLELKGTSKDNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLGQTTLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSTEKEFNEKEGVSEKIIIRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGFALGTLTDEKTTLVVKEGTVILSKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSAVEITKLDEIKNALKGS <u>ESQVRQQFSK</u> <u>DI</u> <u>KL</u> <u>NE</u> <u>QV</u> <u>NK</u> <u>EM</u> <u>Q</u> <u>SS</u> <u>NL</u> <u>Y</u> <u>MS</u> <u>SS</u> <u>SW</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>TH</u> <u>SL</u> <u>DG</u> <u>AG</u> <u>FL</u> <u>FD</u> <u>HA</u> <u>EE</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>AK</u> <u>KL</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>FL</u> <u>NN</u> <u>VP</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>H</u> KFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIA KSRKS	4
血清型2 OspA- フェリチン	MDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKGKYSLKATVDKLELKGTSKDNNGSGVLEGTCKDDKSKAKLTIADDLKTTFFELFKEDGK TLVSRKVSSKDKTSTDEMFEKNGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKKNFTLEGKVANDKVTVLEVKEGTVILSKEI AKSGEVTVALNDTNTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDLKNALKGS <u>ESQVRQQFSK</u> <u>DI</u> <u>KL</u> <u>NE</u> <u>QV</u> <u>NK</u> <u>EM</u> <u>Q</u> <u>SS</u> <u>NL</u> <u>Y</u> <u>MS</u> <u>SS</u> <u>SW</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>TH</u> <u>SL</u> <u>DG</u> <u>AG</u> <u>FL</u> <u>FD</u> <u>HA</u> <u>EE</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>AK</u> <u>KL</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>FL</u> <u>NN</u> <u>VP</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>H</u> KFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIA KSRKS	5
血清型3 OspA- フェリチン	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKGKYSLMATVEKLELKGTSKDNNGSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFEIFKEDGK TLVSRKVNSKDKSSTEKEFNKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTEGTVTLSKN ISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQYNNRAGNALEGSPAIEDLAELKAALKG <u>SESQVRQQFSK</u> <u>DI</u> <u>KL</u> <u>NE</u> <u>QV</u> <u>NK</u> <u>EM</u> <u>Q</u> <u>SS</u> <u>NL</u> <u>Y</u> <u>MS</u> <u>SS</u> <u>SW</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>TH</u> <u>SL</u> <u>DG</u> <u>AG</u> <u>FL</u> <u>FD</u> <u>HA</u> <u>EE</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>AK</u> <u>KL</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>FL</u> <u>NN</u> <u>VP</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>H</u> HKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGI AKSRKS	6
血清型4 OspA- フェリチン	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKGKYSLMATVDKLELKGTSKDNNGSGTLEGEKSDKSKAKLTISEDLSKTTFEIFKEDGK TLVSKKVNSKDKSSIEEKFNAKGEKSEKTIIRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLVKTEGTVVLSKHI PNSGEITVELNDSNSTQATKKTCKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDLKNALKGS <u>ESQVRQQFSK</u> <u>DI</u> <u>KL</u> <u>NE</u> <u>QV</u> <u>NK</u> <u>EM</u> <u>Q</u> <u>SS</u> <u>NL</u> <u>Y</u> <u>MS</u> <u>SS</u> <u>SW</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>TH</u> <u>SL</u> <u>DG</u> <u>AG</u> <u>FL</u> <u>FD</u> <u>HA</u> <u>EE</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>AK</u> <u>KL</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>FL</u> <u>NN</u> <u>VP</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>H</u> KFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIA KSRKS	7
血清型5 OspA-	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKGKYSLMATVEKLELKGTSKDNNGSGTLEGEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGK	8

10

20

30

40

【表 5】

フェリチン	TLVSKKVTLKDKSSTEEKFNEKGEISEKTIIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGLTAAADGKTTILKVTEGTVVLSKN ILKSGEITVALDDSDTTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSQTKNLVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGKAVEITTTLEKLDALKG SESQVRQQFSKDIEKLLNEQVKNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPE HKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKG AKSRKS	
血清型6 OspA- フェリチン	MDEKNSVSVDLPGGTMVLSKEKDKGYSLEATVDKLELKGTSKNNNGSGTLEGEKTDKSKVKSTIADDLSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTLKDKSSTEEKFNGKGETSEKTIIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGLTAAADGKTTILKVTEGTVVLSKN ILKSGEITAAALDDSDTTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSQTKNLVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGKAVEITTTLEKLDALKG SESQVRQQFSKDIEKLLNEQVKNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPE HKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKG AKSRKS	9
血清型7 OspA- フェリチン	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKGYSLEATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKAAKSKAKLTIADDLSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTLKDKSSTEEKFNNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIQNDGSGKAKEVLKSLTLEGTLTADGETKLTVEAGTVVLSKN ISESGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSTSTLTISKNSQTKQLVFTKENTITVQKYNTAGTKLEGSAPAEIKDLEALKAAALKG SESQVRQQFSKDIEKLLNEQVKNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPE HKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKG AKSRKS	10
血清型4 OspA- スデイン-トロ ンピン-His	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKGYSLEATVDKLELKGTSKNNNGSGTLEGEKSDKSKAKLTISEDLSKTTTFFKEDGK TLVSKKVNKDKSSIEEKFNAKGELSEKTIIVRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTLKVTEGTVVLSKHI PNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDLKNALKQL VPRGSLEHHHHHH	11
血清型1 OspA- ルマジンシナン ーゼ;LFA-1置き 換え RD2	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKGYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISSDDLQQTTFEVFKEDGK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKGYTLEGQLSDEKTTLVVKEGTVVLSKNI SKSGEVSVELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQKYDSNGTKLEGSAPAEIKDLEIKNALKGG GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRIVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI RGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIERAGTKHGKNGWEAALSIAEMANLFKSLR	12

10

20

30

40

【表 6】

血清型1 OSpA- ルマジンシンタ ーゼ; LFA-1置き 換え RD1	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKDNNGSGVLEGVKADSKSVKLTISDDLQQTTLVEFKEDGK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKEGVSEKIIIRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYDLKGELSSEKTTLVVKEGTVTLISKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALKGG GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI RGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIERAGTKKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	13
血清型1 OSpA- ルマジンシンタ ーゼ; LFA-1置き 換え Sero2	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKDNNGSGVLEGVKADSKSVKLTISDDLQQTTLVEFKEDGK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKEGVSEKIIIRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYDLKGVANCKTTLVVKEGTVTLISKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALKGG GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI RGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIERAGTKKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	14
血清型1 OSpA- ルマジンシンタ ーゼ; LFA-1置き 換え Sero3	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKDNNGSGVLEGVKADSKSVKLTISDDLQQTTLVEFKEDGK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKEGVSEKIIIRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYDLKGFTLEGVANEKTTLVVKEGTVTLISKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALKGG GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI RGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIERAGTKKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	15
血清型2 OSpA- ルマジンシンタ ーゼ	MDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLKATVDKIELKGTSKDNNGSGVLEGTDKDDSKAKLTIIADDSKTTTFFELFKEDGK TLVSRKVSSKDKTSTDEMFNEKEGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGVANDKVTLVEGTVTLISKEI AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSTSTLTISVNSKKTTLQVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDLKNALKGG GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI RGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIERAGTKKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	16
血清型3 OSpA- ルマジンシンタ ーゼ	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLSMATVEKLELKGTSKDNNGSGVLEGEKADSKAKLTISQDLNQTTTFFELFKEDGK TLVSRKVNSKDKSSTEEKFNKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGYDLKGFTLEGVANDKVTLVEGTVTLISKNI ISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALKG GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI RGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIERAGTKKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	17
血清型4 OSpA- ルマジンシンタ ーゼ	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLSMATVDKLELKGTSKDNNGSGVLEGEKADSKAKLTISEDLSKTTTFFELFKEDGK TLVSKKVNSKDKSSIEEFNAKGESEKTIIRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTTLKVTEGTVVLSKHI PNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDLKNALKGG	18

10

20

30

40

【表 7】

	GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI RGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIAERAGTKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	
血清型5 OspA- ルマジンシンタ ーゼ	MDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLELKGTSKNNNGSGTLEGEKTDKSKVKSLTIADDSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTCLKDKSSTEEFKNGKEISEKTIIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTLKVTEGTVVLSKN ILKSGEITVALDDSDTTQATKKTGWDSKTSTLTISVNSQTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKDALKG GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI IRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIAERAGTKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	19
血清型6 OspA- ルマジンシンタ ーゼ	MDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLELKGTSKNNNGSGTLEGEKTDKSKVKSLTIADDSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTCLKDKSSTEEFKNGKEISEKTIIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTLKVTEGTVVLSKN ILKSGEITVALDDSDTTQATKKTGWDSKTSTLTISVNSQTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKDALKG GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI IRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIAERAGTKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	20
血清型7 OspA- ルマジンシンタ ーゼ	MDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKAASKAKLTIADDSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTCLKDKSSTEEFKNGKEISEKTIIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKSLTLEGTLTADGETKLTVEAGTVVLSKN ISESGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSTSTLTISKNSQTKQLVFTKENTITVQRYNTAGTKLEGSFAEIKDLKALKAALKG GSMQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLI IRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIAERAGTKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	21
血清型1 OspA:L FA-1置き換え RD2-ヒト重鎖フ ェリチン	MDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYDIAITVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKSLTISDDLGQTTLEVFKEGDK TLVSKKVTCLKDKSSTEEFKNGKEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYTLEGQLSDEKTLVVKEGTVVLSKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQRYDSNGTKLEGSFAEITKLDEIKNALKGS MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEEREHAELMKLQNRGGRIFLQ DIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAE YLFDKHKTLDSDNES	22
OspA血清型1;LF A-1置き換え R D1-ヒト重鎖フ ェリチン	MDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYDIAITVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKSLTISDDLGQTTLEVFKEGDK TLVSKKVTCLKDKSSTEEFKNGKEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYLKGELSSSEKTLVVKEGTVVLSKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQRYDSNGTKLEGSFAEITKLDEIKNALKGS MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEEREHAELMKLQNRGGRIFLQ DIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAE YLFDKHKTLDSDNES	23

10

20

30

40

【表 8】

OspA血清型1;LF A-1置き換え 血 清型2-ヒ ト重鎖 フェリチン	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQGTTFEIVFKEDGK TLVSKKVTSKDKSSTEEFNEKEGEVSEKIIITRADGTRLEYGTSKSDSGKAKEVLKGFTEGKVAANEKTTLVVKEGTVTLISKNI SKSGEVSELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGSAVEITKLDKIKNALKGS MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEEREHAEKIMKLQNRGGRIFLQ DIKKPCDDWE SGLNAME CALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKA I KELGDHVTNLRKMGAPESGLAE YLFDKHTLGDSDNES	24
OspA血清型1;LF A-1置き換え 血 清型3-ヒ ト重鎖 フェリチン	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQGTTFEIVFKEDGK TLVSKKVTSKDKSSTEEFNEKEGEVSEKIIITRADGTRLEYGTSKSDSGKAKEVLKGFALGTLTDEKTTLVVKEGTVTLISKNI SKSGEVSELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGSAVEITKLDKIKNALKGS MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEEREHAEKIMKLQNRGGRIFLQ DIKKPCDDWE SGLNAME CALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKA I KELGDHVTNLRKMGAPESGLAE YLFDKHTLGDSDNES	25
OspA血清型2-ヒ ト重鎖フェリチ ン	MDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSKATVDKIELKGTSKDNNGSGVLEGTCKDDKSKAKLTIAADDLSKTTFEIVFKEDGK TLVSRKVSSSKDKTSTDEMFNEKEGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLISKEI AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTTLQVFTKQDTITVQYDSAGTNLEGTAVEIKTLDKIKNALKGS MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEEREHAEKIMKLQNRGGRIFLQ DIKKPCDDWE SGLNAME CALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKA I KELGDHVTNLRKMGAPESGLAE YLFDKHTLGDSDNES	26
OspA血清型3-ヒ ト重鎖フェリチ ン	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSKATVVEKLELKGTSKDNNGSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFEIVFKEDGK TLVSRKVNKSKDKSSTEEFNDFNDKGLSEKVVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDEGGETKLTVTGEGTVTLISKNI ISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTITVQYDSAGTNLEGTAVEIKTLDKIKNALKGS SMTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEEREHAEKIMKLQNRGGRIFLQ QDIKKPCDDWE SGLNAME CALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKA I KELGDHVTNLRKMGAPESGLAE EYLFDKHTLGDSDNES	27
OspA血清型4-ヒ ト重鎖フェリチ ン	MDEKNSVVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSKATVVDKLELKGTSKDNNGSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFEIVFKEDGK TLVSKKVNKSKDKSSIEEFNAKGEVSEKIIIRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKGFALGTLTADKTTILKVTEGTVTLISKNI	28

10

20

30

40

【表 9】

ノ	PNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDLKNALKGS MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLMSYDFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERHAELMKLQNGRGRIFLQ DIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAE YLFDKHTLGDSDNES	
OspA血清型5-ヒ ト重鎖フェリチ ン	MDEKNSVSVLPGGMKVLVSKEKDKGKYSIMATVEKLELKGTSKNNNGSGTLEGEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGK TLVSKKVTCLKDKSSTEKEKFNKEGEISEKTIIVRANGTRLEXYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGLTAAADGKTTLVKTEGTVVLSKN ILKSGEITVALDDSDTTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSQTKNLVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGKAVEITTTLEKLKDALKG SMTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLMSYDFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERHAELMKLQNGRGRIFL QDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLA EYLFDKHTLGDSDNES	29
OspA血清型6-ヒ ト重鎖フェリチ ン	MDEKNSVSVLPGGMKVLVSKEKDKGKYSLEATVDKLELKGTSKNNNGSGTLEGEKTDKSKVKSTIADDLSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTCLKDKSSTEKEKFNKEGEISEKTIIVRANGTRLEXYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGLTAAADGKTTLVKTEGTVVLSKN ILKSGEITVALDDSDTTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSQTKNLVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGKAVEITTTLEKLKDALKG SMTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLMSYDFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERHAELMKLQNGRGRIFL QDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLA EYLFDKHTLGDSDNES	30
OspA血清型7-ヒ ト重鎖フェリチ ン	MDEKNSVSVLPGGMKVLVSKEKDKGKYSLEATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKAAKSKAKLTIAADDLSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTCLKDKSSTEKEKFNKEGEISEKTIIVRANGTRLEXYTDIKSDGSGKAKEVLKSLTLEGLTADGETKLTVEAGTVTTLKSN ISESGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSTSTLTISKNSQTKQLVFTKENTITVQKYNTAGTKLEGSPAETIKDLEALKAAALKG SMTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLMSYDFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERHAELMKLQNGRGRIFL QDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLINEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLA EYLFDKHTLGDSDNES	31
OspA血清型1;LF A-1置き換え R D2-ピュロコック ス・フリオススフ ェリチン	MDEKNSVSVLPGGMKVLVSKEKDKGKYDLDIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQTTLEVFKEGDK TLVSKKVTCLKDKSSTEKEKFNKEGEVSEKIITRADGTRLEXYTGIKSDGSGKAKEVLKGYTLEGQLSDEKTTLVVKEGTVTTLKSN SKSGEVSVELNDTDDSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQKYDSNGTKLEGSAVEITKLDEIKNALKGS MLSERMLKALNDQLNRELAYSALYFAMAAYFEDLGEFANWMAQAEIEIGHALRFYNYIYDRNGRVELDEIPKPPKEWESPL KAFEAAAYEHKEFISKSIYELAALAEKEEDYSTRAFLWFINEQVEEASVKKILDKLFAKDSQILFMLDKELSARAPKLPGL LMQGGGE	32

10

20

30

40

【表 10】

OspA 血清型1;LF A-1置き換え R D1-ピュロコック ス・フリオススフ ェリチン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQQTTFLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSSTEEKFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKG ~~YDLKGELSSEK~~ TLVVKEGTVTLTKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGS ~~AVEITKLD~~ EIKNALKGS MLSEMLKALNDQLNRELAYSAYLYFAMAA ~~YFED~~ LGLEGFANWMAQAE ~~EEEEIGHALRFYNYI~~ YDRNGRVELDEIPKPPKEWESPL KAFEAA ~~YEHEK~~ FISKSIYELAALAE ~~EKDY~~ STRAFEWFINEQVEE ~~EASVK~~ ILDKLKFAKDS ~~PQILF~~ MLDKELSARAPKLPGL LMQGGE	33
OspA 血清型1;LF A-1置き換え 血 清型2-ピュロコ ックス・フリオス スフェリチン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQQTTFLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSSTEEKFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKG ~~FTEGKVANEK~~ TLVVKEGTVTLTKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGS ~~AVEITKLD~~ EIKNALKGS MLSEMLKALNDQLNRELAYSAYLYFAMAA ~~YFED~~ LGLEGFANWMAQAE ~~EEEEIGHALRFYNYI~~ YDRNGRVELDEIPKPPKEWESPL KAFEAA ~~YEHEK~~ FISKSIYELAALAE ~~EKDY~~ STRAFEWFINEQVEE ~~EASVK~~ ILDKLKFAKDS ~~PQILF~~ MLDKELSARAPKLPGL LMQGGE	34
OspA 血清型1;LF A-1置き換え 血 清型3-ピュロコ ックス・フリオス スフェリチン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQQTTFLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSSTEEKFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKG ~~FALEGT~~ LTDEKTLVVKEGTVTLTKNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGS ~~AVEITKLD~~ EIKNALKGS MLSEMLKALNDQLNRELAYSAYLYFAMAA ~~YFED~~ LGLEGFANWMAQAE ~~EEEEIGHALRFYNYI~~ YDRNGRVELDEIPKPPKEWESPL KAFEAA ~~YEHEK~~ FISKSIYELAALAE ~~EKDY~~ STRAFEWFINEQVEE ~~EASVK~~ ILDKLKFAKDS ~~PQILF~~ MLDKELSARAPKLPGL LMQGGE	35
OspA 血清型2-ピ ュロコックス・フ リオススフェリ チン	MDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSILKATVDKIELKGTSKDNNGSGVLEGTCKDDSKAKLTIA ~~DDL~~ SKTTFELFKEDGK TLVSRKVSSKDKTSTDEMFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTL ~~SK~~ EI AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGA ~~WDSKTSTLTISVNSKTTQ~~ LFTKQDITVQKYDSAGNLEGTA ~~VEIKTLD~~ EIKNALKGS MLSEMLKALNDQLNRELAYSAYLYFAMAA ~~YFED~~ LGLEGFANWMAQAE ~~EEEEIGHALRFYNYI~~ YDRNGRVELDEIPKPPKEWESPL KAFEAA ~~YEHEK~~ FISKSIYELAALAE ~~EKDY~~ STRAFEWFINEQVEE ~~EASVK~~ ILDKLKFAKDS ~~PQILF~~ MLDKELSARAPKLPGL LMQGGE	36
OspA 血清型3-ピ ュロコックス・フ リオススフェリ	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSILMATVEKLELKGTSKDNNGSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFE ~~IF~~ FKEDGK TLVSRKVNSKDKSSSTEEKFN ~~DKGLSEKVV~~ TRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKG ~~FALEGT~~ ITDGGETKLTIVTEGTVTL ~~SK~~ N ISKSGEITVALNDTETTPADKKTGE ~~WKS~~ DTSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGS ~~PAEIKDL~~ AELKAAL ~~KG~~	37

10

20

30

40

【表 1 1】

チン	SMLSERMLKALNDQNLRELAYSAYLYFAMAAYFEDLGLGEGFANWMAQAEIEIGHALRFYNYIYDRNGRVELDEIPKPPKEWESP LKAFEAAAYEHEKFISKSIIYELAAALAEKDYSTRAFLEWFINEQVEEASVKKILDKLFAKDSPQILFMLDKELSARAPKLPGL LLMQGGE	
OspA 血清型4-ピ ュロコックス・フ リオススフェリ チン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLSMATVVKLELKGTSKNSGSGTLEGEKSDKSKAKLTIISEDLSKTTFEIFKEDGK TLVSKKVNKDKSSIEEKNFNAKSELSEKTIIRANGTRLEYTEIKSDGSGKAKEVLKDFTEGLTAAADKTTILKVTEGTVVLSKHI PNSGEITVELNDSNSTQATKTKGWDSNTSTLTIISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDLKNALKGS MLSERMLKALNDQNLRELAYSAYLYFAMAAYFEDLGLGEGFANWMAQAEIEIGHALRFYNYIYDRNGRVELDEIPKPPKEWESP LKAFEAAAYEHEKFISKSIIYELAAALAEKDYSTRAFLEWFINEQVEEASVKKILDKLFAKDSPQILFMLDKELSARAPKLPGL LLMQGGE	38
OspA 血清型5-ピ ュロコックス・フ リオススフェリ チン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLSMATVVKLELKGTSKNSGSGTLEGEKSDKSKAKLTIISEDLSKTTFEIFKEDGK TLVSKKVTILKDKSSTEKEFNKGEI SEKTIIRANGTRLEYTEIKSDGSGKAKEVLKDFTEGLTAAADKTTILKVTEGTVVLSKN ILKSGEITVALDDSDTTQATKTKGWDSKTSTLTIISVNSQTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEITTLKLDALKG SMLSERMLKALNDQNLRELAYSAYLYFAMAAYFEDLGLGEGFANWMAQAEIEIGHALRFYNYIYDRNGRVELDEIPKPPKEWESP LKAFEAAAYEHEKFISKSIIYELAAALAEKDYSTRAFLEWFINEQVEEASVKKILDKLFAKDSPQILFMLDKELSARAPKLPGL LLMQGGE	39
OspA 血清型6-ピ ュロコックス・フ リオススフェリ チン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLSMATVVKLELKGTSKNSGSGTLEGEKSDKSKAKLTIADDLSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTILKDKSSTEKEFNKGEI SEKTIIRANGTRLEYTEIKSDGSGKAKEVLKDFTEGLTAAADKTTILKVTEGTVVLSKN ILKSGEITVALDDSDTTQATKTKGWDSKTSTLTIISVNSQTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEITTLKLDALKG SMLSERMLKALNDQNLRELAYSAYLYFAMAAYFEDLGLGEGFANWMAQAEIEIGHALRFYNYIYDRNGRVELDEIPKPPKEWESP LKAFEAAAYEHEKFISKSIIYELAAALAEKDYSTRAFLEWFINEQVEEASVKKILDKLFAKDSPQILFMLDKELSARAPKLPGL LLMQGGE	40
OspA 血清型7-ピ ュロコックス・フ リオススフェリ チン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLSMATVVKLELKGTSKNSGSGTLEGEKSDKSKAKLTIADDLSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTILKDKSSTEKEFNKGEI SEKTIIRANGTRLEYTEIKSDGSGKAKEVLKDFTEGLTAAADKTTILKVTEGTVVLSKN ISESGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSKTSTLTIISVNSQTKNIVFTKEDTITVQKYNTAGTKLEGSPAIEKDLEALKAALKG SMLSERMLKALNDQNLRELAYSAYLYFAMAAYFEDLGLGEGFANWMAQAEIEIGHALRFYNYIYDRNGRVELDEIPKPPKEWESP LKAFEAAAYEHEKFISKSIIYELAAALAEKDYSTRAFLEWFINEQVEEASVKKILDKLFAKDSPQILFMLDKELSARAPKLPGL LLMQGGE	41
OspA 血清型1;LF A-1置き換え R D2-イラクサギン ウクバフェリチ ン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLSMATVVKLELKGTSKNSGSGTLEGEKSDKSKAKLTIADDLSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTILKDKSSTEKEFNKGEI SEKTIIRANGTRLEYTEIKSDGSGKAKEVLKDFTEGLTAAADKTTILKVTEGTVVLSKN SKSGEVSVELNDTSSAATKTKTAWNSTSTLTIISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEITTLKLDLKNALKGS TQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNSMRQIQMEVGASLQYLANGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLIYLLMRGEL TNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDDSEFNHYHLVDYLTGDFLEEQYKQORDLAGKASTLK	42

10

20

30

40

【表 1 2】

	KLMRHEALGEFIFDKKLLGIDV	
OspA 血清型1;LF A-1置き換え R DI-イラクサギン ウワバフエリチ ン	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISSDDLQQTTFLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKEGEVSEKIIIRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKG ~~F~~ LEGVANEKTLVVKEGTVTILSKNI SKSGEVSVELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS ~~AVEIT~~ KLDEIKNALKGS TQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNSMRQIQMEVGASLQYLAMGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLI ~~EYLLMRGEL~~ TNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDSEFN ~~DYHLVDYLTGDFLEE~~ QYKGQORDLAGKASTLK KLMRHEALGEFIFDKKLLGIDV	43
OspA 血清型1;LF A-1置き換え 血 清型2-イラクサ ギンウワバフエ リチン	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISSDDLQQTTFLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKEGEVSEKIIIRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKG ~~F~~ LEGVANEKTLVVKEGTVTILSKNI SKSGEVSVELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS ~~AVEIT~~ KLDEIKNALKGS TQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNSMRQIQMEVGASLQYLAMGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLI ~~EYLLMRGEL~~ TNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDSEFN ~~DYHLVDYLTGDFLEE~~ QYKGQORDLAGKASTLK KLMRHEALGEFIFDKKLLGIDV	44
OspA 血清型1;LF A-1置き換え 血 清型3-イラクサ ギンウワバフエ リチン	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISSDDLQQTTFLEVFKEGDK TLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKEGEVSEKIIIRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKG ~~F~~ LEGVANEKTLVVKEGTVTILSKNI SKSGEVSVELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS ~~AVEIT~~ KLDEIKNALKGS TQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNSMRQIQMEVGASLQYLAMGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLI ~~EYLLMRGEL~~ TNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDSEFN ~~DYHLVDYLTGDFLEE~~ QYKGQORDLAGKASTLK KLMRHEALGEFIFDKKLLGIDV	45
OspA 血清型2-イ ラクサギンウワ バフエリチン	MDEKNSASVDLPGEKVLVSKEKDKDGKYSLKATVDKIELKGTSKNNNGSGVLEGTCKDDKSKAKLTIADDDLSKTTFFELFKEDGK TLVSRKVS ~~SKDKT~~ STDEMFNEKEGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTILSKEI AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLITSVNSKTKDLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLD ~~ELKNALKGS~~ TQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNSMRQIQMEVGASLQYLAMGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLI ~~EYLLMRGEL~~ TNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDSEFN ~~DYHLVDYLTGDFLEE~~ QYKGQORDLAGKASTLK KLMRHEALGEFIFDKKLLGIDV	46
OspA 血清型3-イ ラクサギンウワ バフエリチン	MDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLSMATVEKLELKGTSKNNNGSGVLEGEKADKSKAKLTISSDDLQQTTFE ~~IF~~ FKEDGK TLVSRKVN ~~SKDKS~~ STEEKFN ~~DKGL~~ SEKVVT ~~TRANG~~ TRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALEGTLDGGETKLT ~~VT~~ EGTVTILSKN ISKSGEITVALNDTETT ~~PADKKT~~ GTGEWKS ~~DTSTLT~~ ISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGS ~~PAEIKDLAELKAALKG~~	47

【表 1 3】

	STQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNMRQIQMEVGASQYLAMGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLI EYLLMRGE LTNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDDSEFNDYHLVDYLTGDFLEEYKQGORDLAGKASTL KKLMDRHEALGEFIFDKKLLGIDV	
OspA 血清型4-イ ラクサギンウワ バフエリチン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKGKYSLMATVDKLELKGTSKNSNGSGTLEGEKSDSKAKLTISEDLSKTTFEIFKEDGK TLVSKKVNKDKSSIEEKNAGKELSEKTIIRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVKTEGTVVLSKHI PNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTIDELKNALKGS TQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNMRQIQMEVGASQYLAMGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLI EYLLMRGEL TNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDDSEFNDYHLVDYLTGDFLEEYKQGORDLAGKASTLK KKLMDRHEALGEFIFDKKLLGIDV	48
OspA 血清型5-イ ラクサギンウワ バフエリチン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKGKYSLMATVEKLELKGTSKNSNGSGTLEGEKTDKSKVLTIAEDLSKTTFEIFKEDGK TLVSKKVTLLKDKSSTEEFNEKGEISEKTIIRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLLKVTEGTVVLSKN ILKSGEITVALDDSDTTQATKKTGKWSKTSTLTISVNSQTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGKAVEITTLLEKLDALKG STQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNMRQIQMEVGASQYLAMGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLI EYLLMRGE LTNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDDSEFNDYHLVDYLTGDFLEEYKQGORDLAGKASTL KKLMDRHEALGEFIFDKKLLGIDV	49
OspA 血清型6-イ ラクサギンウワ バフエリチン	MDEKNSVSDLPGEMTIVLSKEKDKGKYSLEATVDKLELKGTSKNSNGSGTLEGEKTDKSKVSTIADDSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTLLKDKSSTEEFNKGKGETSEKTIIRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLLKVTEGTVVLSKN ILKSGEITAAALDDSDTTQATKKTGKWSKTSTLTISVNSQTKNIVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALKG STQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNMRQIQMEVGASQYLAMGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLI EYLLMRGE LTNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDDSEFNDYHLVDYLTGDFLEEYKQGORDLAGKASTL KKLMDRHEALGEFIFDKKLLGIDV	50
OspA 血清型7-イ ラクサギンウワ バフエリチン	MDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKGKYSLEATVDKLELKGTSKNSNGSGVLEGVKAAKSKAKLTIAADDSQTKFEIFKEDGK TLVSKKVTLLKDKSSTEEFNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIQNDGSGKAKEVLKSLTLEGTLDAGETKLTVEAGTVTLSKN ISESGEITVELKDTETTPADKKSGTWSKTSTLTISKNQTKQLVFTKENTITVQKYNTAGTKLEGSPAIEIKDLEALKAAALKG STQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNMRQIQMEVGASQYLAMGAHFSKDVVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLI EYLLMRGE LTNDVSSLLQVRPPTRSSWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDDSEFNDYHLVDYLTGDFLEEYKQGORDLAGKASTL KKLMDRHEALGEFIFDKKLLGIDV	51
血清型1 LFA-1 置き換え RD2 OspA -フエリチ	MDSKGSSQKGRLLLLLVVSNLLLPQGVLAMDEKNVSVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLLATVVDKLELKGTSKNSNGSGVLE GVKADKSKVKLTISDDLQGTTLVEVFKEDGKTLVSKKVTSKDKSSTEKEFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGYTLEGQLSDEKTTLVVKEGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTSSAAATKKTAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITV	52

10

20

30

40

【表 1 4】

ン	QQYDSNGTKLEGS ~~AVEIT~~ KLDEIKNALKGS ~~ESQVRQ~~ FSKDIEKLLNEQVNKEM ~~Q~~ SSNLYMSMSS ~~SW~~ YTHSLDGAGLFLFDHAA EYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISI ~~SAPEHKFEGLTQIFQ~~ KAYEHEQHISESINNIVDHAIK ~~CKDHATFN~~ FLOWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVVKGIASRKS	53
血清型1 非グリ コシル化 LFA- 1置き換え RD2 OspA-フエリチ ン	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLV~~ SNLLLPQGVLAMDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGGVLE GVKADKSKVKLTISDDLQOTTLEVFKE ~~DKTLVSKKVT~~ SKDKSSTE ~~EKFNEKGEVSEKI~~ ITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGYTLEGQLSDEK ~~TTLVVKEGTVT~~ LSKQISKSCEVSVELQ ~~DDTSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKT~~ KDLVFTKENTITV QQYDSQGT ~~KL~~ EGSAVEITKLDEIKNALKGS ~~ESQVRQ~~ FSKDIEKLLNEQVNKEM ~~Q~~ SSNLYMSMSS ~~SW~~ YTHSLDGAGLFLFDHAA EYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISI ~~SAPEHKFEGLTQIFQ~~ KAYEHEQHISESINNIVDHAIK ~~CKDHATFN~~ FLOWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVVKGIASRKS	54
LFA-1部位が血 清型2に置き換え られたOspA-フ エリチン血清型1	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLV~~ SNLLLPQGVLAMDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGGVLE GVKADKSKVKLTISDDLQOTTLEVFKE ~~DKTLVSKKVT~~ SKDKSSTE ~~EKFNEKGEVSEKI~~ ITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGF ~~TLEG~~ KVANEK ~~TTLVVKEGTVT~~ LSKNI ~~SKSCEVSVELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKT~~ KDLVFTKENTITV QQYDSNGTKLEGS ~~AVEIT~~ KLDEIKNALKGS ~~ESQVRQ~~ FSKDIEKLLNEQVNKEM ~~Q~~ SSNLYMSMSS ~~SW~~ YTHSLDGAGLFLFDHAA EYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISI ~~SAPEHKFEGLTQIFQ~~ KAYEHEQHISESINNIVDHAIK ~~CKDHATFN~~ FLOWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVVKGIASRKS	55
LFA-1部位が血 清型2に置き換え られた非グリコ シル化OspA-フ エリチン血清型1	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLV~~ SNLLLPQGVLAMDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGGVLE GVKADKSKVKLTISDDLQOTTLEVFKE ~~DKTLVSKKVT~~ SKDKSSTE ~~EKFNEKGEVSEKI~~ ITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGF ~~TLEG~~ KVANEK ~~TTLVVKEGTVT~~ LSKQISKSCEVSVELQ ~~DDTSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKT~~ KDLVFTKENTITV QQYDSQGT ~~KL~~ EGSAVEITKLDEIKNALKGS ~~ESQVRQ~~ FSKDIEKLLNEQVNKEM ~~Q~~ SSNLYMSMSS ~~SW~~ YTHSLDGAGLFLFDHAA EYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISI ~~SAPEHKFEGLTQIFQ~~ KAYEHEQHISESINNIVDHAIK ~~CKDHATFN~~ FLOWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVVKGIASRKS	56
LFA-1部位が血 清型3に置き換え られたOspA-フ エリチン血清型1	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLV~~ SNLLLPQGVLAMDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGGVLE GVKADKSKVKLTISDDLQOTTLEVFKE ~~DKTLVSKKVT~~ SKDKSSTE ~~EKFNEKGEVSEKI~~ ITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGF ~~ALEGTLTDEK~~ TTLVVKEGTVTLSKNI ~~SKSCEVSVELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKT~~ KDLVFTKENTITV QQYDSNGTKLEGS ~~AVEIT~~ KLDEIKNALKGS ~~ESQVRQ~~ FSKDIEKLLNEQVNKEM ~~Q~~ SSNLYMSMSS ~~SW~~ YTHSLDGAGLFLFDHAA EYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISI ~~SAPEHKFEGLTQIFQ~~ KAYEHEQHISESINNIVDHAIK ~~CKDHATFN~~ FLOWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVVKGIASRKS	57
LFA-1部位が血 清型3に置き換え られた非グリコ	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLV~~ SNLLLPQGVLAMDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGGVLE GVKADKSKVKLTISDDLQOTTLEVFKE ~~DKTLVSKKVT~~ SKDKSSTE ~~EKFNEKGEVSEKI~~ ITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGF ~~ALEGTLTDEK~~ TTLVVKEGTVTLSKQISKSCEVSVELQ ~~DDTSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKT~~ KDLVFTKENTITV	

10

20

30

40

【表 15】

シル化OspA-フ ェリチン血清型1	QQYDSQGTKEGSAVEITKLD ~~EIKNALKGSESOVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSW~~ SYTHSLDGAGLFLFDHAA EEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	58
LFA-1部位がRD 1に置き換えられ たOspA-フェリ チン血清型1	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLVVSNLLLPQGVLAMDEKNSVSV~~ DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGSVLE GVKADKSKVKLTISDDLQGT ~~TLEVFKE~~ DGKTLVSKKVTSKDKSS ~~TEEFNEKGEVSEKI~~ IITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGYDLKGEL ~~SEKTTLVVKEGTVTL~~ SKNISKSCEVSVELQ ~~DT~~ SSAATKTA ~~WN~~ SGTSTLITITVNSKTKDLVFTKENTITV QQYDSNGTKLEGSAVEITKLD ~~EIKNALKGSESOVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSW~~ SYTHSLDGAGLFLFDHAA EEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	59
LFA-1部位がRD 1に置き換えられ た非グリコシル 化OspA-フェリ チン血清型1	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLVVSNLLLPQGVLAMDEKNSVSV~~ DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGSVLE GVKADKSKVKLTISDDLQGT ~~TLEVFKE~~ DGKTLVSKKVTSKDKSS ~~TEEFNEKGEVSEKI~~ IITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGYDLKGEL ~~SEKTTLVVKEGTVTL~~ SKNISKSCEVSVELQ ~~DT~~ SSAATKTA ~~WN~~ SGTSTLITITVNSKTKDLVFTKENTITV QQYDSQGTKEGSAVEITKLD ~~EIKNALKGSESOVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSW~~ SYTHSLDGAGLFLFDHAA EEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	60
非グリコシル化、 OspA-フェリチ ン血清型1、LFA- 1置き換え RD2 、1×GGGS(配列 番号443)リンカ ー	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLVVSNLLLPQGVLAMDEKNSVSV~~ DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGSVLE GVKADKSKVKLTISDDLQGT ~~TLEVFKE~~ DGKTLVSKKVTSKDKSS ~~TEEFNEKGEVSEKI~~ IITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGYTLEGQL ~~SDEKTTLVVKEGTVTL~~ SKNISKSCEVSVELQ ~~DT~~ SSAATKTA ~~WN~~ SGTSTLITITVNSKTKDLVFTKENTITV QQYDSQGTKEGSAVEITKLD ~~EIKNALKGGSESOVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSW~~ SYTHSLDGAGLFLFDH AAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAEQHEE EVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	61
非グリコシル化、 OspA-フェリチ ン血清型1、LFA- 1置き換え RD2 、2×GGGS(配列 番号444)リンカ ー	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLVVSNLLLPQGVLAMDEKNSVSV~~ DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGSVLE GVKADKSKVKLTISDDLQGT ~~TLEVFKE~~ DGKTLVSKKVTSKDKSS ~~TEEFNEKGEVSEKI~~ IITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGYTLEGQL ~~SDEKTTLVVKEGTVTL~~ SKNISKSCEVSVELQ ~~DT~~ SSAATKTA ~~WN~~ SGTSTLITITVNSKTKDLVFTKENTITV QQYDSQGTKEGSAVEITKLD ~~EIKNALKGGSGGSESOVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSW~~ SYTHSLDGAGLFL LFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAE QHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	62
非グリコシル化、 OspA-フェリチ ン血清型1、LFA- 1置き換え RD2 、2×GGGS(配列 番号444)リンカ ー	MDSKGSSQKGSRL ~~LLLLLVVSNLLLPQGVLAMDEKNSVSV~~ DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS ~~DKN~~ QSGSVLE GVKADKSKVKLTISDDLQGT ~~TLEVFKE~~ DGKTLVSKKVTSKDKSS ~~TEEFNEKGEVSEKI~~ IITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV LKGYTLEGQL ~~SDEKTTLVVKEGTVTL~~ SKNISKSCEVSVELQ ~~DT~~ SSAATKTA ~~WN~~ SGTSTLITITVNSKTKDLVFTKENTITV QQYDSQGTKEGSAVEITKLD ~~EIKNALKGGSGGSESOVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSW~~ SYTHSLDGAGLFL LFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAE QHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	62

10

20

30

40

[illegible]

【表 1 7】

	VQYNRAGNALEGSPAEIKDLAELKAALKGSESOVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHA AEEYEHAKKLIIFLNENNVVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKQKHATFNFLQWYVAEQHEEE VLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRSKS	68
非グリコシル化 OspA-フエリチ ン血清型3	MSKGSQKGSRLLLLVVSNLLLPQGLAMDEKNSVSVDLPGMKVLSKEKDKGKYSIMATVEKLELKGTSKSDKSGGVLE GEKADKSKAKLTISQDIQOTTFFEIFKEDGKTLVSRKVNKSKDSSTEKFNKGLSEKVVTRAQOTRLEYTEIKNDGSGKAKEV LKGFALGTLTDGGETTLVTEGTVLTSKQISKSGETTVALQDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKPKQLVFTKEDTIT VQYNRAGNALEGSPAEIKDLAELKAALKGSESOVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHA AEEYEHAKKLIIFLNENNVVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKQKHATFNFLQWYVAEQHEEE VLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRSKS	69
血清型4 OspA- フエリチン	MSKGSQKGSRLLLLVVSNLLLPQGLAMDEKNSVSVDLPGMKVLSKEKDKGKYSIMATVDKLELKGTSKSDKSGSGTLE GEKSDKSKAKLTISEDLSKTTFFEIFKEDGKTLVSKKVNKSKDKSSIEEFNAKGELSEKTIIRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEV LKDFALGTLAADKTTLVTEGTVLTSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWDSNTSTLTISVNSKTKKNIVFTKEDTITV QKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALKGSESOVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAA EYEHAKKLIIFLNENNVVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKQKHATFNFLQWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRSKS	70
非グリコシル化 OspA-フエリチ ン血清型4	MSKGSQKGSRLLLLVVSNLLLPQGLAMDEKNSVSVDLPGMKVLSKEKDKGKYSIMATVDKLELKGTSKSDKSGSGTLE GEKSDKSKAKLTISEDLSKTTFFEIFKEDGKTLVSKKVNKSKDKSSIEEFNAKGELSEKTIIRAQOTRLEYTEIKSDGTGKAKEV LKDFALGTLAADKTTLVTEGTVLTSKHIPNSGEITVELQDSQSTQATKKTGWDSQOTSTLTISVNSKTKKNIVFTKEDTITV QKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALKGSESOVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAA EYEHAKKLIIFLNENNVVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKQKHATFNFLQWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRSKS	71
OspA-フエリチ ン血清型5	MSKGSQKGSRLLLLVVSNLLLPQGLAMDEKNSVSVDLPGMKVLSKEKDKGKYSIMATVEKLELKGTSKDNNGSGTLE GEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFFEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSSTEEFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEV LKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVLTSKNILKSGETTVALDDSDTTQATKKTGWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTIT VQKYDSAGTNLEGNAVEITTEKLDALKGSESOVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHA AEEYEHAKKLIIFLNENNVVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKQKHATFNFLQWYVAEQHEEE VLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRSKS	72
血清型5 非グリ コシル化OspA- フエリチン	MSKGSQKGSRLLLLVVSNLLLPQGLAMDEKNSVSVDLPGMKVLSKEKDKGKYSIMATVEKLELKGTSKDNNGSGTLE GEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFFEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSSTEEFNEKGEISEKTIIVRAQOTRLEYTDIKSDGSGKAKEV LKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVLTSKNILKSGETTVALDDSDTTQATKKTGWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTIT	

【表 1 8】

	VQYDSAGTNLEGKAVEITTTLEKLDALKGSESVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGLFLFDHA AEYEHAHAKLIIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEE VLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	73
血清型6 非グリ コシル化OspA- フェリチン	MDSKGSSQKGRLLLLLVVSNLLLLPQGVLAMDEKNSVSVLPGGMTVLVSKEKDKGKYSLEATVDKLELKGTSKKNNGSGTLE GEKTDKSKVKSTIADDLSTQKFEIFKEDGKTLVSKKVTLLKDKSSTEKEKNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEV LKDFTEGTLAAGKTTIKVTEGTIVLSKNILKSGETAALDDSDTTTRATKKTGWDSKTSTLTISVNSQTKNLVFTKEDTIT VQYDSAGTNLEGKAVEITTTLEKLDALKGSESVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGLFLFDHA AEYEHAHAKLIIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEE VLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	74
血清型6 OspA- フェリチン	MDSKGSSQKGRLLLLLVVSNLLLLPQGVLAMDEKNSVSVLPGGMTVLVSKEKDKGKYSLEATVDKLELKGTSKKNNGSGTLE GEKTDKSKVKSTIADDLSTQKFEIFKEDGKTLVSKKVTLLKDKSSTEKEKNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEV LKDFTEGTLAAGKTTIKVTEGTIVLSKNILKSGETAALDDSDTTTRATKKTGWDSKTSTLTISVNSQTKNLVFTKEDTIT VQYDSAGTNLEGKAVEITTTLEKLDALKGSESVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGLFLFDHA AEYEHAHAKLIIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEE VLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	75
OspA-フェリチ ン血清型7	MDSKGSSQKGRLLLLLVVSNLLLLPQGVLAMDEKNSVSVLPGGMTVLVSKEKDKGKYSLEATVDKLELKGTSKKNNGSGVLE GVKAASKAKLTIIADDLSTQKFEIFKEDGKTLVSKKVTLLKDKSSTEKEKNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTEIQNDGSGKAKEV LKSLTEGTLTADGETKLTVEAGTVTLISKNISESGETIVELKDTETTPADKKSGTWDSTSTLTISKNSQTKQLVFTKENTIT VQYNTAGTKLEGSPAIEIKDLEALKALKGSESVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGLFLFDHA AEYEHAHAKLIIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEE VLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	76
血清型7 非グリ コシル化OspA- フェリチン	MDSKGSSQKGRLLLLLVVSNLLLLPQGVLAMDEKNSVSVLPGGMTVLVSKEKDKGKYSLEATVDKLELKGTSKKNNGSGVLE GVKAASKAKLTIIADDLSTQKFEIFKEDGKTLVSKKVTLLKDKSSTEKEKNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTEIQNDGSGKAKEV LKSLTEGTLTADGETKLTVEAGTVTLISKNISESGETIVELKDTETTPADKKSGTWDSTSTLTISKNSQTKQLVFTKENTIT VQYNTAGTKLEGSPAIEIKDLEALKALKGSESVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGLFLFDHA AEYEHAHAKLIIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEE VLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	77
OspA血清型Iの	YVLEGTLLTA	

10

20

30

40

【表 19】

アミノ酸165~173					
OspA血清型1の アミノ酸165~173と 相同性を有するhLFA-1の 配列	YVIEGTSKQ			78	
OspA血清型2由来のS2配列	FTLEGKVAN			79	
OspA血清型3由来のS3配列	FALEGTLTD			80	
RD2	YTLEGQLSD			81	
RD1	YDLKGELSS			82	
例示的なOspA血清型1(株WP_010890378.1)	MKKYLLGIGL ILALIAACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGEMKV LVSKEKNKDG KYDLIATVDK LELKGTSDKN NGSGVLEG VK ADKSKVKLTI SDDLQQTTFE VFKEGDKTLV SKVTSKDKS STEEFNEKG EVSEKIITRA DGRLEYTGI KSDGS GKAKE VLKGYVLEGT LTAEKTTLV KEGTVTLNKN ISKSGEVSVE LNDTDSSAAT KKTAAWNNGT STLTITVNSK KT KDLVFTKE NTITVQQYDS NGTKLEGSV EITKLDEIKN ALK			83	
例示的なOspA血清型2(株WP_011703777.1)	MKKYLLGIGL ILALIAACKQN VSSLDEKNSA SVDLPGEMKV LVSKEKDKDG KYSLKATVDK IELKGTSDKD NGSGVLEG TK DDKSKAKLTI ADDLSKTTFE LFKEDGKTLV SRKVSSKDKT STDEMENEKG ELSAKTMTRE NGTKLEYTEM KSDGT GKAKE VLKNFTLEGK VANDKVTLEV KEGTVTLNKE IAKSGEVTVA LNDTNTQAT KKTGAWDST STLTISVNSK KT TQLVFTKQ DTITVQKYDS AGTNLEGTAV EIKTLDELKN ALK			84	
例示的なOspA血清型3(株CAA56549.1)	MKKYLLGIGL ILALIAACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGEMKV LVSKEKDKDG KYSLMATVEK LELKGTSDKS NGSGVLEG EK ADKSKAKLTI SDDLQQTTFE IFKEDGKTLV SRKVNSKDKS STEEFNDKG KLSEKVVTRA NGRLEYTEI KNDGS GKAKE VLKGFALERT LTDGGETKLT VTGTVTLNKN NISKSGETV ALNDTETTPA DKKTGEWKS TSTLTISKNS QK PKQLVFTK ENTITVQNYN RAGNALEGSP AEIKDLAELK AALK			85	
例示的なOspA血清型4(株WP_011187157.1)	MKKYLLGIGL ILALIAACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGEMKV LVSKEKDKDG KYSLMATVDK LELKGTSDKS NGSGTLEG EK SDKSKAKLTI SEDLSKTTFE IFKEDGKTLV SKKVNSKDKS SIEEFNAKG ELSEKTLRA NGRLEYTEI KSDGT GKAKE VLKDFALERT LAADKTTLV TEGTVVLSKH IPNSGEITVE LNDNSTQAT KKTGKWDST STLTISVNSK KT KNIVFTKE			86	

10

20

30

40

【表 2 0】

(101)

JP 2021-519596 A 2021.8.12

	DTITVQKYDS AGTNLEGNV EIKTLDELKN ALK	
例示的なOspA血清型5(株CAA597 27.1)	MKKYLLGIGL ILALIA ~~C~~ KQN VSSLDEKNSV SVDLP ~~G~~ G ~~M~~ KV LVSKEKDKDG KYSIMATVEK LELKGTSDKN NGSGTLEG EK TDKSKVKLTI AEDLSQTKFE IFKEDGKTLV SKKVTLKDKS STEEFNEKG EISEKTIVRA NGRLEYTDI KSDGS GKAKE VLKDFTL ~~E~~ GT LAADGKTKL VTEGTVVLSK NILKSGEITV ALDDSDTTQA TKKTGKWDSK TSTLTISVNS QK TKNLVFTK EDTITVQKYD SAGTNLEGKA VEITTL ~~E~~ KLK DALK	87
例示的なOspA血清型6(株CAA450 10.1)	MKKYLLGIGL ILALIA ~~C~~ KQN VSSLDEKNSV SVDLP ~~G~~ G ~~M~~ TV LVSKEKDKDG KYSLEATVDK LELKGTSDKN NGSGTLEG EK TDKSKVKSTI ADDLSQTKFE IFKEDGKTLV SKKVTLKDKS STEEFNGKG ETSEKTIVRA NGRLEYTDI KSDGS GKAKE VLKDFTL ~~E~~ GT LAADGKTKL VTEGTVVLSK NILKSGEITA ALDDSDTTTRA TKKTGKWDSK TSTLTISVNS QK TKNLVFTK EDTITVQRYD SAGTNLEGKA VEITTL ~~E~~ KLK NALK	88
例示的なOspA血清型7(株CAA565 47.1)	MKKYLLGIGL ILALIA ~~C~~ KQN VSSLDEKNSV SVDLP ~~G~~ G ~~M~~ KV LVSKEKDKDG KYSLEATVDK LELKGTSDKN NGSGVLEG VK AAKSKAKLTI ADDLSQTKFE IFKEDGKTLV SKKVTLKDKS STEEFNDKG KLSEKVVTRA NGRLEYTEI QNDGS GKAKE VLKSLTLEGT LTADGETKLT ENTITVQKYN TAGTKLEGSP AEIKDLEALK AALK	89
N末端で8アミノ酸のウシガエル配列を有するH.ピロリフェリン	ESQVROQ ~~F~~ SKDIEKLLNEQV ~~N~~ KEMQ ~~S~~ NLYMSMSW ~~S~~ YTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLT ~~S~~ ISAPEH KFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIA KSRKS	90
GS2リンカー	GGSGGGGS	91
GS5リンカー	GGSGGGSGGGSGGGGS	92
例示的なルマジンシシターゼ	MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRIVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRG ATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALS ~~A~~ IEMANLFKSLR	93
血清型1 RD2 Os pA	MDEKNSVSVDLP ~~G~~ EMKVLVSKEKNKGKDYDLIATVDKLELKGTS ~~D~~ KNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLGQTTLEVFKE ~~D~~ GK TLVSKKVTSKDKSS ~~T~~ EEKFNEKEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYTLEGQLSDEKTTLVVKEGTVTL ~~S~~ KNI SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKT ~~K~~ DLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSAVEITKLDEIKNALK	94
血清型1 RDI Os	MDEKNSVSVDLP ~~G~~ EMKVLVSKEKNKGKDYDLIATVDKLELKGTS ~~D~~ KNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLGQTTLEVFKE ~~D~~ GK	95

10

20

30

40

【表 2 1】

pA	TLVSKKVTSKDKSS ~~TEEFNEKEGVSEKII~~ TRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYDLKGE ~~LSSEKTT~~ LVVKEGTVTL ~~SKNI~~ SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTA ~~AWNSGTSTLTITVNSKKT~~ DLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS ~~AVEITKLDEIK~~ NALK	
血清型1 OspA;L FA-1置き換え 血清型2	MDEKNSVSV ~~DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYD~~ LIATVDKLELKGTS ~~DKNNGSGVLEGVKADKSKVKLT~~ ISSDDL ~~GQTTLEVFKE~~ DGK TLVSKKVT ~~SKDKSS~~ TEEFNEKEGVSEKII ~~TRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGF~~ LEGK ~~VA~~ NEKTTLVVKEGTVTL ~~SKNI~~ SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTA ~~AWNSGTSTLTITVNSKKT~~ DLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS ~~AVEITKLDEIK~~ NALK	96
血清型1 OspA;L FA-1置き換え 血清型3	MDEKNSVSV ~~DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYD~~ LIATVDKLELKGTS ~~DKNNGSGVLEGVKADKSKVKLT~~ ISSDDL ~~GQTTLEVFKE~~ DGK TLVSKKVT ~~SKDKSS~~ TEEFNEKEGVSEKII ~~TRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGF~~ ALEG ~~LTDEKTT~~ LVVKEGTVTL ~~SKNI~~ SKSGEVSVELNDTDSSAATKKTA ~~AWNSGTSTLTITVNSKKT~~ DLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS ~~AVEITKLDEIK~~ NALK	97
血清型1 非グリ コシル化 LFA- 1置き換え RD2 OspA	MDEKNSVSV ~~DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYD~~ LIATVDKLELKGTS ~~DKNNGSGVLEGVKADKSKVKLT~~ ISSDDL ~~GQTTLEVFKE~~ DGK TLVSKKVT ~~SKDKSS~~ TEEFNEKEGVSEKII ~~TRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGY~~ TLEG ~~Q~~ LS ~~DEKTT~~ LVVKEGTVTL ~~SKQI~~ SKSGEVSVEL ~~Q~~ DDTDSSAATKKTA ~~AWNSGTSTLTITVNSKKT~~ DLVFTKENTITVQQYDS ~~Q~~ GTKLEGS ~~AVEITKLDEIK~~ NALK	98
LFA 部位が血清 型2に置き換えら れた非グリコシ ル化OspA血清型 1	MDEKNSVSV ~~DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYD~~ LIATVDKLELKGTS ~~DKNNGSGVLEGVKADKSKVKLT~~ ISSDDL ~~GQTTLEVFKE~~ DGK TLVSKKVT ~~SKDKSS~~ TEEFNEKEGVSEKII ~~TRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGF~~ LEGK ~~VA~~ NEKTTLVVKEGTVTL ~~SKQI~~ SKSGEVSVEL ~~Q~~ DDTDSSAATKKTA ~~AWNSGTSTLTITVNSKKT~~ DLVFTKENTITVQQYDS ~~Q~~ GTKLEGS ~~AVEITKLDEIK~~ NALK	99
LFA 部位が血清 型3に置き換えら れた非グリコシ ル化OspA血清型 1	MDEKNSVSV ~~DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYD~~ LIATVDKLELKGTS ~~DKNNGSGVLEGVKADKSKVKLT~~ ISSDDL ~~GQTTLEVFKE~~ DGK TLVSKKVT ~~SKDKSS~~ TEEFNEKEGVSEKII ~~TRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGF~~ ALEG ~~LTDEKTT~~ LVVKEGTVTL ~~SKQI~~ SKSGEVSVEL ~~Q~~ DDTDSSAATKKTA ~~AWNSGTSTLTITVNSKKT~~ DLVFTKENTITVQQYDS ~~Q~~ GTKLEGS ~~AVEITKLDEIK~~ NALK	100
LFA 部位が RD1 に置き換えられ た非グリコシル 化OspA血清型1 改変血清型1 Os pA(Xは、任意の アミノ酸であり;	MDEKNSVSV ~~DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYD~~ LIATVDKLELKGTS ~~DKNNGSGVLEGVKADKSKVKLT~~ ISSDDL ~~GQTTLEVFKE~~ DGK TLVSKKVT ~~SKDKSS~~ TEEFNEKEGVSEKII ~~TRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYDLKGE~~ LSSEKTTLVVKEGTVTL ~~SKQI~~ SKSGEVSVEL ~~Q~~ DDTDSSAATKKTA ~~AWNSGTSTLTITVNSKKT~~ DLVFTKENTITVQQYDS ~~Q~~ GTKLEGS ~~AVEITKLDEIK~~ NALK	101
	MDEKNSVSV ~~DLPGEMKVLVSKEKNKDGKYD~~ LIATVDKLELKGTS ~~DKNNGSGVLEGVKADKSKVKLT~~ ISSDDL ~~GQTTLEVFKE~~ DGK TLVSKKVT ~~SKDKSS~~ TEEFNEKEGVSEKII ~~TRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGF~~ ALEG ~~LTDEKTT~~ LVVKEGTVTL ~~SKZI~~ SKSGEVSVELZ ~~DDTDSSAATKKTA~~ AWNSGTSTLTITVNSKKT ~~DLVFTKENTITVQQYDSZ~~ GTKLEGS ~~AVEITKLDEIK~~ NALK	102

10

20

30

40

【表 2 3】

H.ピロリフェリ チン(Genbank受 託番号AAD06160 .1)(ウシガエルリ ンカーまたはN 末端Metを有しな い)		
CpG (ISS-1018)	TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA	210
イラクサギンウ ワバ重鎖フェリ チン	TQCNVNPVQIPKDWITMHRSCRNSMRQQIQMEVGASLQYLAMGAHFSKDVVNRPFGAQLF FDAASEEREHAMKLI EYLLMRGELTNDVSSLLQVRPPTRSSWKGVEALEHALSMESDVT KSIRNVIKACEDDDSEFNDYHIVDYLTCDFLEEQYKGQORDLAGKASTLKKLMDRHEALGEF IFDKKLLGIDV	211
イラクサギンウ ワバ軽鎖フェリ チン	ADTCYNDVALDCGITSNSLALPRCNNAVYGEYSGHGNVATELOAYAKHLERSYDYLLSAAYFNNTQNRAGFSKLFKKLSDEAW SKTIDI IKHVTKRQDKMNFQDQSTMTKTERKNYTAENHELEALAKALDTQKELAERAFYI HREATRNSQHLHDPEIAQYLEEEFI EDHAEKIRTLAGHTSDLKKFITANNHDL SLALYVFDEYLQTV	212
ピュロコックス・ フリオススフェ リチン	MLSERMLKALNDQNLRELYSAYLYFAMAAYFEDLGLGCFANWKAQAEIEIGHALRFYNY IYDRNGRVELDEIPKPPKEWESPLKAFEAAYEHEKFISKSIYELAAALAEKDYSTRAFL EWFINEQVEEEASVKKILDKLFAKDSQILFMLDKELSARAPKIPGLIMQGG	213
ヒト重鎖フェリ チン	MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEEREHAEKLMKLQNRGGRIFLQ DIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVQSSLELHLKLATDKNDPHLCDFIETHYLNQVKATKELGDHVTNLRKMGAPESGLAE YLFDKHTLGDSDQES	214
ヒト軽鎖フェリ チン(シグナルペ プチドを下線で 示す)	MDSKGSSQKGSRLLLLVVSNLLLPQGLASSQIRQNYSTDEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFREL AEKREGYERLLKMQNRGGRALFQDIKKPAEDEWGT PDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEV KLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTCLKHD	215
アクイフェックス・ アエオリックス由 来のルマジンシ ンターゼ	MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRG ATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPTTFGVITADTLEQAIERAGTKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	216
ウシガエルリン カー	<u>ESQVRQQF</u>	217
システイン-トロ ロ	<u>CLVPRGSLEHHHHH</u>	218

10

20

30

40

【表 2 4】

ンビン-Hisリン カー			
大腸菌6,7-ジメチ ル-8-リビチル マジンシンター ゼ	MNIIEANVATPDARVAITIAFNNFINDSLLEGAIDALKRIGQVKDENITVWVPGAYELPLAAGALAKTGKYDAVIALGTVIR GGTAHFEYVAGGASGLAHVAQDSEIPVAFGVLTTESTIEQAIERAGTKACGNKGAEAAALTALEMINVLKAICA	219	
16アミノ酸リン カー	GGGGSGGGSGGGSGG	220	
28アミノ酸リン カー	GGSGSGSNSSASSGSGSGGASGGSGGGSG	221	
46アミノ酸リン カー	GGSGSASSGASASGSSNGSGSGSGSNSSASSGSGSGGASGGSGGGSG	222	
FR1	GGSGSASAEAAAKEAAKAGGGSGG	223	
FR2	GGSGSASAEAAAKEAAKEAAKASGGSGGGSG	224	
コンジュゲーシ ョンのためのCを 含む47アミノ酸 リンカー	SGGGSGSASSGASASGSSCSGSGSGSSSSASSGSGSGGASGGSGGGSGG	225	
配列番号226～242の略語一覧：			
• リーダー配列-下線 • gL - イタリック体 • リンカー - <u>二重下線</u> • gH - 太字 • bfpFerr (フェリチン) - <u>波状下線</u> • FR - 影を付けた灰色 • gp220 - イタリック体および太字			

10

20

30

40

【表 2 5】

	- gp42 - <u>イタリック体および下線</u> - イラクサギンウワバフエリチン重鎖 - <u>二重の波状下線</u> - フォルドン配列: <u>イタリック体および波状下線</u> - トロンピン切断部位: <u>イタリック体および破線の下線^e</u> 6X (配列番号 442) タグ: 太字、<u>イタリック体、および波線下線</u>	226
SIB 15007 gH/gH/gp42-His	MRVGVFLAICLVITIFVLPWTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLELLTTLTLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGSGSASSGASGSSNGSGSGSSNSASS GASSGGASGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWTELMKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSCTGLGIA LAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVI SGLNSPACMLSAPLEKQLFYI GTMLPNTRPHSYVYQLRAHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFLMGTYKRVTEKGDEHVL SLVFGTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLIVITTFVHYANFNHYFVNPKDMFSRA VTMTAASYARYVLQKLVILLEMKGGCREPELDTETLTTFMEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFEFTVLKDIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLMATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETL FIGSHVVLRELRLNVTTCGNLALYQLLSTALCSALEICEVLRGLALGTE SGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMA PQEATLDQAA VSNVADGFLGRLSLEREDRD AWHLPAYKCVDRDLKVLMI IPLINVTFI ISSDREVRGSALYEASTYLSLSPVIMNKCQS GAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTITYITSQEVQNSILSSNYFDNHLHVHYLLLTNGTVMIEIAGL YEERASGGSGSASSGASGSSGSGSGSSASSGLAYFLPPRVGGGRVAAAATWVPKPNVEVWPVDP PPPPVNFNKTAEQ EYGDKEVKLPHTWPTLHTTFQVPQNYTKANCYCNTRYETFSYKGCCEYFTKKKHTWNGCFQACAEELYPCITYFYGPTDILPVVT RNLNAIESLWVGVRVGEGNWTSLDGGTFKVYQIFGSHCTYVSKFSTVPVSHHECSFLKPCLCVSQRNSGSHHHHH	
SIB 15008 gH/gL/gp42 NP	MRVGVFLAICLVITIFVLPWTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLELLTTLTLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGSGSASSGASGSSNGSGSGSSNSASS GASSGGASGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWTELMKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSCTGLGIA LAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVI SGLNSPACMLSAPLEKQLFYI GTMLPNTRPHSYVYQLRAHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFLMGTYKRVTEKGDEHVL SLVFGTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLIVITTFVHYANFNHYFVNPKDMFSRA VTMTAASYARYVLQKLVILLEMKGGCREPELDTETLTTFMEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFEFTVLKDIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLMATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETL FIGSHVVLRELRLNVTTCGNLALYQLLSTALCSALEICEVLRGLALGTE SGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMA PQEATLDQAA VSNVADGFLGRLSLEREDRD AWHLPAYKCVDRDLKVLMI IPLINVTFI ISSDREVRGSALYEASTYLSLSPVIMNKCQS GAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTITYITSQEVQNSILSSNYFDNHLHVHYLLLTNGTVMIEIAGL YEERASGGSGSASSGASGSSGSGSGSSASSGLAYFLPPRVGGGRVAAAATWVPKPNVEVWPVDP PPPPVNFNKTAEQ	227

10

20

30

40

【表 27】

gH/gL/gp42_NP_ C14	GASSGGASGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWTELMKAVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGLIA LAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVI SGLNSPACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTPRPHSYVYFQLRRAHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFLMGTYKRVTEKGDHVL SLVFGKTKDLPDLRPGFSPYSLTSAQSGDYSLVITVTFVHYANFNHNYFVFNPKDMFSRA VTMTAASARYVLQKLVILLEMKGGCREPELDTETLTMTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGCATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETL FIGSHVVLRLNVTQGNALYQLLSTALCSALE IGEVLRLGALGTE SGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAA VSNVAVDGLRLSLEREDRDAWHLPAYKCVDRDLKVLMI IPIINVTFI ISSDREVRGSAIYEASTYLSLSSFLSPVIMNKCSQ GAVAGEPRQIPKIQTFRTRQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTYITTSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMIEIAGL YEERASGGSGSASSGASGSGSGSGSSASSGLAYFLPPRVGGGRVAAAATWVPKPNVEVPVDPVPPVFNFNKTAEQ EYGDKEVKLPHWTPTLHTFQVPQNYTKANCYTCNTREYTFYKGCCTYFKKKHTWNGCFQACAEALYPCYFYGYPTDILPVVT RNLNAIESLWVGYRVGEGNWTSLDGGTFKVIYQIFGSHCTYVSKFSTVPVSHHCECSFLKPCLCVSQRSNNGSGSGESQVRQFQSK DIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVVQVLTISISAPEHKFEGLTQIFQ KAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVLKDLKDILKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	231
SIB 15012	MDSKGSQKGSRLLLLVVSNLLLPQGVLANWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDAFSLASLNSPKQGSNQLVI SRCANGLNVVFFSILKRSALTGHLRELLTLETLYGSFVEDLFGAQLNRYAWHRGGGSGSASSGASASGSGSGSGSGS GSGSSASSGSGSGSGSGGSAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWTELMKAVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYK TSGTLGIALAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVI SGLNSPACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTPRPHSYVYFQLRCHLSYVALS INGDKFQYTGAMTSKFLMGTYKRVTEKGDHVL SLVFGKTKDLPDLRPGFSPYSLTSAQSGEYSILVITVTFVHYANFNHNYFVFN LKDMFSRAVTMTAASARYVLQKLVILLEMKGGCREPELDTETLTMTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLK DIIIGICYGATVKGMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGCATSVLLSAYNRHPLFQPL HTVMRETLFIGSHVVLRLNVTQGNALYQLLSTALCSALE IGEVLRLGALGTE SGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSIAPO EATLDQAAVSQAVDGLRLSLEREDRDAWHLPAYKCVDRDLKVLMI IPIINVTFI ISSDREVRGSAIYEASTYLSLSSFLSP VIINKCSQGAVAGEPRQIPKIQTFRTRQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTYITTSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNG TVMEIAGLYEERASGGSGSASSGASGSGSGSGSSASSGAI TWVPKPNVEVPVDPVPPVFNFNKTAEQEYGDKEVKLP HWTPTLHTFQVPQNYTKANCYTCNTREYTFYKGCCTYFKKKHTWQCFQACAEALYPCYFYGYPTDILPVVTRSLQAIESLW VGIVRVGEGNWTSLDGGTFKVIYQIFGSHCTYVSKFSTVPVSHHCECSFLKPCLCVSQRSNNGSGSGSASSGASGSGSGSGSGS SSASSGSGSGSGSGSGSGSGSASSGSGSGSGSSASSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS NKEMQSSNLYMSMSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVVQVLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHIS ESINQIVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVLKDLKDILKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	232
SIB 15013 gH/gL リジッ トNP C16	MRAVGFLAICLVITFVLPTGNWYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVSRCANGLN VVSFFISILKRSALTGHLRELLTLETLYGSFVEDLFGANLRYAWHRGGGSGSASSGASASGSGSGSGSGSGSSASS GASSGGASGGSGGSAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWTELMKAVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGLIA LAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVI SGLNSPACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTPRPHSYVYFQLRRAHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFLMGTYKRVTEKGDHVL SLVFGKTKDLPDLRPGFSPYSLTSAQSGDYSLVITVTFVHYANFNHNYFVFNPKDMFSRA VTMTAASARYVLQKLVILLEMKGGCREPELDTETLTMTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGCATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETL FIGSHVVLRLNVTQGNALYQLLSTALCSALE IGEVLRLGALGTE SGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAA VSNVAVDGLRLSLEREDRDAWHLPAYKCVDRDLKVLMI IPIINVTFI ISSDREVRGSAIYEASTYLSLSSFLSPVIMNKCSQ	232

10

20

30

40

10

20

30

40

10
20
30
40

[illegible]

【表 3 0】

(111)

JP 2021-519596 A 2021.8.12

	YSEESKLNREKIDSGGDI IKLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNNNVPVQLTS ISAPEHKFEGLTOIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIAKQKHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDLIDKIELIGNENHGLYLADQ YVKGIAKSRKSGS	
SIB 6243: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S /S111C	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCILKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPEC ELLISKEWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEELREQLSSVSFFERFEIFPKESWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNKEKEVLVLGWVHPPNIGNQALYHTENAYSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGA INSSLPFQNVHPVTIGEC PKYVRS AKLRMTGLRN IPQRETRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTOFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERETLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNAKE IGNCCFEFYHKCNNECME SVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDGSESQVROQFSKDI EKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTSISAPEHKFEGLTOIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIAKQKHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDLIDKIELIGNE NHGLYLADQYVKGIAKSRKS	302
SIB 6244: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCILKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPEC ELLISKEWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEELREQLSSVSFFERFEIFPKESWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNKEKEVLVLGWVHPPNIGNQALYHTENAYSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGA INSSLPFQNVHPVTIGEC PKYVRS AKLRMTGLRN IPQRETRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTOFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERETLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNAKE IGNCCFEFYHKCNNECME SVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDGSESQVROQFSKDI EKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTSISAPEHKFEGLTOIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIAKQKHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDLIDKIELIGNE NHGLYLADQYVKGIAKSRKS	303
SIB 6245: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S /E12C	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCILKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPEC ELLISKEWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEELREQLSSVSFFERFEIFPKESWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNKEKEVLVLGWVHPPNIGNQALYHTENAYSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGA INSSLPFQNVHPVTIGEC PKYVRS AKLRMTGLRN IPQRETRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTOFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERETLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNAKE IGNCCFEFYHKCNNECME SVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDGSESQVROQFSKDI EKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTSISAPEHKFEGLTOIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIAKQKHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDLIDKIELIGNE NHGLYLADQYVKGIAKSRKS	304
SIB 6246: HA (	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCILKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPEC	305

10

20

30

40

【表 3 1】

(112)

JP 2021-519596 A 2021.8.12

NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S /S26C	ELLISKEWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEELEQLSSVSSFERFEIFPKESWPNHHTVTVGSASCSHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYIYWTLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGAINSLSLPPQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRN IPQRETRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNAKEIGNGCFFEYHKCNNECMESVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDGSESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTISISAPCHKFEGLTOIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNE NHGLYLADQYVKGIAKSRKS	306
SIB 6247: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S /S72C	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCVAGWILGNPEC ELLISKEWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEELEQLSSVSSFERFEIFPKESWPNHHTVTVGSASCSHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYIYWTLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGAINSLSLPPQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRN IPQRETRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNAKEIGNGCFFEYHKCNNECMESVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDGSESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTISISAPCHKFEGLTOIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNE NHGLYLADQYVKGIAKSRKS	307
SIB 6248: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S /A75C	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCVAGWILGNPEC ELLISKEWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEELEQLSSVSSFERFEIFPKESWPNHHTVTVGSASCSHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYIYWTLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGAINSLSLPPQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRN IPQRETRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNAKEIGNGCFFEYHKCNNECMESVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDGSESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTISISAPCHKFEGLTOIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNE NHGLYLADQYVKGIAKSRKS	308
SIB 6249: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S /S100C	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCVAGWILGNPEC ELLISKEWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEELEQLSSVSSFERFEIFPKESWPNHHTVTVGSASCSHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYIYWTLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGAINSLSLPPQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRN IPQRETRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNAKEIGNGCFFEYHKCNNECMESVKNGTYDYPK	

10

20

30

40

【表 3 2】

	<u>YSEESKLNREKIDGSESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE</u> <u>NNVPVOLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISEG</u><u>INNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDI</u><u>LDKIELIGNE</u> <u>NHGLYLADQYVKGIAKSRKS</u>	
SIB 6250: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S TEV-S111C	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHTSVNLLLED SHNGKLCILKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPEC ELLISKE SWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEEELREQLSSVSSEFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNKEKEVLVWG VHHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYTWLTLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGA INSSLPFQNVHPVTICECPKYVRS AKLRMVTGLRN IPQRETRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTOFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFEYHKKNECME SVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDENLYFOGSESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKL IIFLNENNVVOLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDI LDKIELIGNEHGLYLADQYVKGIAKSRKS	309
SIB 6252: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S TEV-S26C	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHTSVNLLLED SHNGKLCILKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPEC ELLISKE SWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEEELREQLSSVSSEFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNKEKEVLVWG VHHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYTWLTLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGA INSSLPFQNVHPVTICECPKYVRS AKLRMVTGLRN IPQRETRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTOFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFEYHKKNECME SVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDENLYFOGSESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKL IIFLNENNVVOLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDI LDKIELIGNEHGLYLADQYVKGIAKSRKS	310
SIB 6253: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S TEV-S72C	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHTSVNLLLED SHNGKLCILKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPEC ELLISKE SWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEEELREQLSSVSSEFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLT GKNGLYPNLSKSYVNKEKEVLVWG VHHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYTWLTLEP GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGA INSSLPFQNVHPVTICECPKYVRS AKLRMVTGLRN IPQRETRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTOFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFEYHKKNECME SVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDENLYFOGSESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKL IIFLNENNVVOLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDI LDKIELIGNEHGLYLADQYVKGIAKSRKS	311

【表 3 3】

SIB 6254: HA (NC99 Y98F) bfp Ferr N19Q/C31S TEV-A75C	312	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCILKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPEC ELLISKESWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEEELREQLSSVSFFERFEIFPKTSSWPNHVTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWL GKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVWGVHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLPE GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGAINSILPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMTGLRN IPQRETRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLNNAKEIGNGCFFEYHKCNNECME SVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDENLYEQGSESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKL IIFLNENNVPVQLTSSISAPHEHKEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKI ELIGNENHGLYIADQYVKGIAKSRKS
SIB 6255: HA (NC99 Y98F) TE V bfpFerr-N19Q/C31S/S100C	313	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCILKGIAPLQLGNC SVAGWILGNPEC ELLISKESWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEEELREQLSSVSFFERFEIFPKTSSWPNHVTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWL GKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVWGVHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLPE GDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGAINSILPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMTGLRN IPQRETRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNKLERRM ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLNNAKEIGNGCFFEYHKCNNECME SVKNGTYDYPK YSEESKLNREKIDENLYEQGSESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKL IIFLNENNVPVQLTSSISAPHEHKEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKI ELIGNENHGLYIADQYVKGIAKSRKS
SIB9063: HA(サウスカロライナ1918,Y98F)bfpFerr N19Q/C31S/S111C	314	MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCILKGIAPLQLGKNIAAGWILGNPEC DILLTASSWSYIVETSPNENGTCFPGDFIDYEEELREQLSSVSFFERFEIFPKTSSWPNHETTKGVTAACSYAGASSFYRNLLWL TTKGSSYPKLSKSYVNNKGEVLVWGVHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAARPVKVRDQAGRMNYWTLLPE PGDTITFEATGNLIAPWYAFALNRGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGAINSILPFQNVHPVTIGECPKYVRSATKLRMATGLR NIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNKLERR IENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLNNAKEIGNGCFFEYHKCNNECME SVRNGTYDYP KYSEESKLNREEIDSGGESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIFL NENNVPVQLTSSISAPHEHKEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKIELIG NENHGLYIADQYVKGIAKSRKS
SIB9065: HA(カリフォルニア2009,Y98F)bfpFerr N19Q/C31S/S111C	315	MKAILVLLIYTFATANADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLIEDSHNGKLCILKGIAPLHLGKCNIAAGWILGNPEC ESLSTASSWSYIVETSPSDNGTCFPGDFIDYEEELREQLSSVSFFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFKYKNLIWL VKKGNYPKLSKSYINDKGEVLVWGVHPPNIGNQALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAARPVKVRDQAGRMNYWTLLPE PGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGAINTSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSATKLRLATGLR NIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNHLEKR

10

20

30

40

【表 3 4】

SIB9066:HA(マ レーシヤ 1954,Y9 8F)bfpFerr N19 Q/C31S/S111C	IENTNKKVDDGFILD IWTYNAAELLVLENERETIDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKE I GNGCFE FYHKCDNT CME SVKNGTYDYP KYSEEA KLNREE IDSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLD GAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL NENNV PVOLTSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCQKD HATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDI LDKIELIG NENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	316
SIB9067:HA(フ ォートモンモス1 947,Y98F)bfpFer r N19Q/C31S/S1 11C	IENTNKKVDDGFILD IWTYNAAELLVLENERETIDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKE I GNGCFE FYHKCDNT CME SVKNGTYDYP KYSEEA KLNREE IDSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLD GAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL NENNV PVOLTSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCQKD HATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDI LDKIELIG NENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	317
SIB9068:HA(香 港1977,Y98F)bfp Ferr N19Q/C31S /S111C	IENTNKKVDDGFILD IWTYNAAELLVLENERETIDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKE I GNGCFE FYHKCDNT CME SVKNGTYDYP KYSEEA KLNREE IDSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLD GAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL NENNV PVOLTSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCQKD HATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDI LDKIELIG NENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	318

【表 3 5】

SIB9070: HA (H 2, 1957, Y98F) bfpFerr N19Q/C 31S/S111C	319	MAIIYLILLLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITILERNVTVTTHAKDILEKTHNGKCLKINGIPPLELGDSCSIAGWLLGNPECDR LLSVPEWSYIMEKENPRDGLCPGSEFNDYEEELKHLSSVKHFEKVILPKDRWTQHTTTGSRACAVSCNPSPFFRNVMVWLTKE SNYPVAKGSYNNSTSGEOMLIWGVHHPNDETEQRTLYQNVGYVSVTSTLNKRSTPDIAIRPKVNGLSRMEFSTWLLDMWDT INFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENCETKQTPLAGAINTTLPFHNHPLTIGECPPYKSEKLVLATGLRNVPO IESRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQSGYAADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMTQFEAVGKEFSNLERLENL NKKMEDGFLDVWYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDPKYEE ESKLNREIKSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAFEYEHAKKLIIFLNENN VPVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKIELIGNENH GLYLADQYVVKGIASRKS
SIB9072: HA(H5 N1, インドネシア 2005, Y98F、一塩 基)bfpFerr N19 Q/C31S/S111C	320	MEKIVILLALIVSLVKSDDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKCLDLDGVKPLIILRDCSVAGWLLGNPMCD EFINVPEWSYIVEKANPTNDLCPGSEFNDYEEELKHLSSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVMVWLIK KNSTYPTIKKSYNNNTQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYNQNPITYISIGTSTLNQRLVPKIAIRSKVNGQSGRMEFFWTILKPN DAINFESNGNFIAPYAYKIVKGDISAIMKSELEYGNCNTKQTPMGAINSSMPFHNHPLTIGECPPYKSNRLVLATGLRNS PQRETRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKADGVNTKNVSIIDKMTQFEAVGREFNNLERIE NLNKKMEDGFLDVWYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQRLDNAKELNGCGFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQY SEEARLKREEISSGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAFEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKIELIGNENH NHGLYLADQYVVKGIASRKS
SIB9097: HA(デ ンバー-1957, Y98F)bfpFerr N19Q/ C31S/S111C	321	MKAKLILLCALSATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLDSSHNGKLCRLKGKAPLQLGNCNIAGWVLGNPEC ESLLSNRSWSYIAETPNSENGTCFPGDFADYEEELREQLSSVSSEFERFEIPKERSWPNHTTRGVTAACPHARKSSFYKNLVWLT EANGSYPNLSRSYVNNQEKVVLWGVHHPNDETEQRTLYQNVGYVSVTSTLNKRSTPDIAIRPKVNGLSRMEFSTWLLDMWDT GDTIIFEATGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENCETKQTPLAGAINTTLPFHNHPLTIGECPPYKSEKLVLATGLRNVPO IPSVQSRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKADGVNTKNVSIIDKMTQFEAVGREFNNLERIE ENLNKKVDDGFMDIWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQRLDNAKELNGCGFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQY YSEESKLNREKIDSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAFEYEHAKKLIIFLN ENNVVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKIELIGNENH ENHGLYLADQYVVKGIASRKS
SIB9109: HA(H3 N8, ウマ オハイ オ2003, Y98F)bfp Ferr N19Q/C31S /S111C	322	MKTTIILILLTHWAYSQNPISGNNATLCLGHAVANGTLVKTISDDQIEVTNATELVQISIMGKICNNSYRILDCRNCCLIDA MLGDPHCDAFQYENWDLEFIERSAFNSCFPYDIPDYASLRISIVASSGTLEFTEAGFTWTVTQNGRSGACKRGSDSFFSRINW LTKSGSSYPTLNVTMPNNKFNFDKLYIWGIHHPNDETEQRTLYQNVGYVSVTSTLNKRSTPDIAIRPKVNGLSRMEFSTWLLDMWDT KPGDILMINSNGNLVAPRGYFKLTKGSSVMRSVDPIDICVSECITPNGSISNDKPPQNVNKTGKCPKYIRQNTLKLATGMR NVPEKQIRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKADGVNTKNVSIIDKMTQFEAVGREFNNLERIE

10

20

30

40

【表 3 6】

	IQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTAEMNKLFTEKTRRQOLRENAEDMGGGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHY IYRDEALNNRFXKIDSGGESQVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL NENNVPVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDLIDKIELIG NENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	323
SIB9110:HA(H3N8, ヲマ バリ 2005, Y98F)bfpFerr N19Q/C31S/S111C	MKTTFIFIFILLTHWAYSQNPISDNNTATLCIGHAVANGTLVKTISDDQIEVTNATELVQISIMGKICNNSYRILDCRNCCTLI DAMLGDPHCDVQYENWDLFIERSSAFSNCFFPYDIPDYASLRSIVASSGTLEFTAEGFTWGTQNGRSGACKRGSAADSSFFSRL NWLTKSGNSYPTLNVTPNNKNEFKLYIWGIHHPSSNQEQTKLYIOESGRVTSTKRQQOTMIPNIGSRPWVRGQSGRISIIYWT IVKPGDILMINSNGNLVAPRGYFKLKTGKSSVMRSDVPIDICVSECITPNGSISNDKPPQNVNKVITYGKCPKYIRQNTLKLATG MRNVPEKQIRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFYQNSEGTQAAADLKSTQAAIDQINGKLNRVIERTNEKFHQIEKEFESEVE GRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTAEMNKLFTEKTRRQOLRENAEDMGGGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYD HYIYRDEALNNRFXKIDSGGESQVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL FLNENNVPVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDLIDKIELIG IGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	324
SIB9111:HA(H3N8, ヲマ アボイ 2003, Y98F)bfpFerr N19Q/C31S/S111C	METTIIILLTHWVYSQNPISGNNTATLCIGHAVANGTLVKTITDDQIEVTNATELVEISIMGKICNNSYRVLDCRNCCTLIIDA MLGDPHCDDFQYESWDLFIERSASSSNCFFPYDIPDYASLRSIVASSGTLEFTAEGFTWGTQNGRSGACKRGSAADSSFFSRLNW LTKSGNSYPTLNVTPNNKNEFKLYIWGIHHPSSNQEQTKLYIOESGRVTSTKRQQOTMIPNIGSRPWVRGQSGRISIIYWTIV KPGDVLMINSGNLVAPRGYFKLRTGKSSVMRSDALIDTCVSECITPNGSIPNDKPPQNVNKVITYGKCPKYIRQNTLKLATGMR NVPEKQIRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFYQNSEGTQAAADLKSTQAAIDQINGKLNRVIERTNEKFHQIEKEFESEVEGR IQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTAEMNKLFTEKTRRQOLRENAEDMGGGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHY IYRDEALNNRFXKIDSGGESQVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL NENNVPVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDLIDKIELIG NENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	325
SIB9132:HA(B, マサチユーセツ 2012, Y98F)bfpFerr N19Q/C31S/S111C	MKAIIIVLLMVVTSNADRICTGITSNSPHVVKTTATQGEVNVTVGVIPLTTPTKSYFANLKGTKTRGKLCPCDCLNCTDLIDVALGR PMCVGTTSPSAKASILHEVRPVTSGCFPMHMDRTKIRQLANLLRGYENIRLSTQNVIDA EKAPGGPYRLGTSGSCP NATSKSGFF ATMAWAVPKDNKNKATNPLTVEVPYICAEGEDQITVWGFHSDNKTQMKNLGDSNPQKFTSSANGVTTHVVSQIGGFPDQTEDG GLPQSGRIVDYMMQPKGTGTIVYQRCVLLPQKWCASGRSKVIGKSLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYTGHEHAKAIGNCP TWKTPKLKANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAWHGYTSHGAGHVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELE VKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDLDRADTISQIETLAVLSNEGINSEDEHLLALERKLMGSAVDIGNGCFTKHK CNQTCLDRIAAGCTFNAGEFSLPTFDSLNTASGGESQVRQOFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLF DHAAEEYEHAKKLIIFLNNVPVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNFLOWYVAEQH EEEVLFKDLIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	10 20 30 40

【表 3 7】

SIB9147: HA (B, ブーケ ッ ト 2013) bfpFerr N19Q/C 31S/S11C	326	<u> MKAIIIVLLMVVTSNADRICTGITSNSPHVVKATQGEVNTGVIPLTTPTKSYFANLKGTRGKLCPCDCLNCTDLDVALGR PMCVGTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPMHRTKIRQLPNLLRGYEKIRLSTQNVDIAEKAPGPGYRLGTSGSCPNATSKIGFF ATMAWVPKDNKYKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMSLYGDSNPQKFTSSANGVTTHVVSQIGDFPDQTEDG GLPQSGRIVVDYMMQPKGTGTIVYQGVLLPQKWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEEYGGLNKSKPYITGKHAKAIGNCP IWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHVAAADLKSTQEAINKITKNLSLSELE VKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVVDDLRADTISQIEIAVLVLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHK CNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNTAASSGSESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLF LFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISAPHEKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNELQWYVAE QHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS </u>
SIB9158: HA (H IN1 COBRA-P1, Y98F) bfpFerr N19Q/C31S/S11 C	327	<u> MKARLLVLLCALAATDADTICIGYHANNSTDVTDVLEKNVTVTHSVNLLLEDSHNGKLCCKLKGIAPLQLGKCNIAAGWLLGNPEC ESLLSARSWSYIVETPNSENGTCFPGDFIDYEEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTTKGVTAACSHACKSSFYRNLLWL TKKGGSYPKLSKSYVNNKKEVLVLWGVHHPSTSTDQQLYQENAYVSVSSYNRRFTPEIAERPQVRGQAGRMNYIWTLLLE PGDTIIFEATGNLIAPWYAFALSRGSGGIIITSNASMHECNTKQTPQGAINSSLPFQNIHPVTICECPKYVRSTKLRMTGLR NIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNLEKR MENLNKKVDDGGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLRNNAKEIENGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYDYP KYSEESKLNREKIDSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLEFDHAAEEYEHAKKLIIFL NENNVPVQLTISAPHEKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNELQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIG NENHGLYLADQYVKGIAKSRKS </u>
SIB9160: HA (H IN1 COBRA-X3, Y98F) bfpFerr N19Q/C31S/S11 C	328	<u> MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDVTDVLEKNVTVTHSVNLLLEDSHNGKLCRLKGIAPLQLGNCVAGWILGNPEC ESLFSKESWSYIAETPNPENGTCFPGYFADYEEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTTKGVTAACSHNGKSSFYRNLLWL TEKNGLYPNLSKSYVNNKKEVLVLWGVHHPSNIGDQRAIYHTENAYVSVSSHYSRRTPEIAKRPKVRDQEGRINYIWTLLLE PGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMDECDKQTPQGAINSSLPFQNVHPVTICECPKYVRSTKLRMTGLR NIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERR MENLNKKVDDGGFLDIWTYNAELLVLENERITLDFHDSNVKNLYEKVKSQLRNNAKEIENGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYP KYSEESKLNREKIDSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLEFDHAAEEYEHAKKLIIFL NENNVPVQLTISAPHEKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNELQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIG NENHGLYLADQYVKGIAKSRKS </u>
SIB9162: HA (H IN1 COBRA-X6, Y98F) bfpFerr N19Q/C31S/S11	329	<u> MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDVTDVLEKNVTVTHSVNLLLEDSHNGKLCILKGIAPLQLGNCVAGWILGNPEC ELLISKESWSYIVETPNPENGTCFPGYFADYEEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTTKGVTAACSHNGKSSFYRNLLWL GKNGLYPNLSKSYANNKKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHTENAYVSVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYIWTLLLEP GDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKQTPQGAINSSLPFQNVHPVTICECPKYVRSKLRMTGLRN IPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRM </u>

10

20

30

40

【表 3 8】

C	ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVRKNGTYDPK YSEESKLNREKIDSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLN ENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKIELIGN ENHGLYLADQYVVKGIASRKS	330
SIB9164:HA(H3 N2,ハー×2009)b fpFerr N19Q/C3 IS/S111C	MKTIIALSUILCLVFAQKLPNDNSTATLCLGHAVPNGTIVKTIENDQIEVTNATELVQSSSTGEICDSPHQILDGKNCITLID ALLGDPQCDGQFNKKWDLFVERSKAYSNCPYDVPDYASLSLVAASGTFLEFNNESFNWGTGTQNGTSSACIRRSKNSFFSRLN WLTHLNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKQDIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVSPNIGSRPRVRNIPSRISIYWTI VKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIIPNDKPFQNVNRIITYGACPRYVKQNTLKLATGM RNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWGMVDGWYGFHRQNSEGRQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFESEVEG RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTSEMKNLFEKTKKQOLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDH DVYRDEALNNRFQIKSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIF LNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKIELI GNENHGLYLADQYVVKGIASRKS	331
SIB9167:HA(H3 N2 ビクトリア 2011)bfFerr N1 9Q/C31S/S111C	MKTIIALSUILCLVFAQKLPNDNSTATLCLGHAVPNGTIVKTIENDQIEVTNATELVQSSSTGEICDSPHQILDGKNCITLID ALLGDPQCDGQFNKKWDLFVERSKAYSNCPYDVPDYASLSLVAASGTFLEFNNESFNWGTGTQNGTSSACIRRSKNSFFSRLN WLTHLNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKQDIFLYAQSSGRIITVSTKRSQQAVIPNIGYRPRIRNIPSRISIYWTI VKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIIPNDKPFQNVNRIITYGACPRYVKQNTLKLATGM RNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWGMVDGWYGFHRQNSEGRQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFESEVEG RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTSEMKNLFEKTKKQOLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDH DVYRDEALNNRFQIKSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIF LNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKIELI GNENHGLYLADQYVVKGIASRKS	332
SIB9320:HA(H5 N1,hCOBRA-2,Y 98F,一塩基)bfFe rr N19Q/C31S/S 111C	MEKIVLLIAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKICDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMD EFINVPWSYIVEKANPANDLCPFGNFNDYEEKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGSPPFFRNVVWLK KNNTYPTIKRSYNTNQEDLLVLWGTHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIAIRSKVNGSQSGRMEFFWTILKPN DAINFE SNGNFIAPYAYKIVKKGDSALMKSELEYGNCNTKQCTPIGAINSMFPFHNHPLTIGECPPKYVKSNNRLVLTGLRNS PQRETRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQKADIGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGFEFNLERIE NLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLENERLTDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAMELGNGCFEFYHKCDNECMESVRKNGTYDPQY SEEARLKREEISSGGESQVROQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLEFKDILDKIELIGNE NHGLYLADQYVVKGIASRKS	332

【表 3 9】

SIB9321:HA(H5 N1,インドガン20 05,Y98F,一塩基)b fpFerr N19Q/C3 1S/S11C	MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCILDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCD EFLNVPWSYIVEKINPANDLCFPGNFNDYEEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRSSFFRNVVWLK KNAYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLVYQNPITYISVGTSTLNQRLVPKIAATRSKVNQSGRMEFFWTILKPN DAINFESNGNFIAPENAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPIGAINSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSRLVLATGLRNS PQIETRGLEFAGIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKADGVTKNVNSIIDKMTQFEAVGREFNNLERRIE NLNKKMEDGFLDVWTYNALVLVLMENERTLD FHD SNVKNLYDKVRLQRLDNAKELGNGCFEFYHRCDCNECME SVRNGTYDYPQY SEEARLKREEISSGGESQVRQOFSKDIKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKQKDHATFNLOWYVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNE NHGLYLADOQVVKGIASRKS	333
SIB9329:HA(H5 N1、ハクチヨウ 2005,Y98F,一塩 基)bfpFerr N19 Q/C31S/S11C	MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCILDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCD EFLNVPWSYIVEKINPANDLCFPGNFNDYEEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRSSFFRNVVWLK KDNAYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLVYQNPITYISVGTSTLNQRLVPKIAATRSKVNQSGRMEFFWTILKPN DAINFESNGNFIAPENAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPIGAINSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSRLVLATGLRNS PQIETRGLEFAGIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKADGVTKNVNSIIDKMTQFEAVGREFNNLERRIE NLNKKMEDGFLDVWTYNALVLVLMENERTLD FHD SNVKNLYDKVRLQRLDNAKELGNGCFEFYHRCDCNECME SVRNGTYDYPQY SEEARLKREEISSGGESQVRQOFSKDIKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKQKDHATFNLOWYVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNE NHGLYLADOQVVKGIASRKS	334
SIB9330:HA(H5 N1,マガモ/ホワ ドン2003,Y98F, 一塩基)bfpFerr N19Q/C31S/S11 C	MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCILDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCD EFLNVPWSYIVEKINPANDLCFPGNFNDYEEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRSSFFRNVVWLK KNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLVYQNPITYISVGTSTLNQRLAPKIAATRSKVNQSGRMEFFWTILKPN DAINFESNGNFIAPENAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSRLVLATGLRNS PQIETRGLEFAGIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKADGVTKNVNSIIDKMTQFEAVGREFNNLERRIE NLNKKMEDGFLDVWTYNALVLVLMENERTLD FHD SNVKNLYDKVRLQRLDNAKELGNGCFEFYHRCDCNECME SVRNGTYDYPQY SEEARLKREEISSGGESQVRQOFSKDIKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTSSISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKQKDHATFNLOWYVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNE NHGLYLADOQVVKGIASRKS	335
SIB9332:HA(B, プリズベン2008, D197N)pFerr N1 9Q/C31S/S11C	MDTLILLVLLWVPGSTGDRICITSSSPHVVKTAQGEVNVTVGVIPLTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLDVA LGRPKCTGKIPSAVSVILHEVRPVTSGCFPIHMDRTKIRQLPNLIRGYEHIRLSTHNVINAENAPGPGYKIGTSGSCPNTNGN GFEATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFPNQ TEDGGILPQSGRIVVDYVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIGKSLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYTGEGHAKAI GNCPIWVKTPKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGLEGGEWEGMIAWHGYTSHGAHGVAAADLKSTQEAINKITKNLSL	336

10

20

30

40

【表 4 0】

SIB9334:HA(B, フーケ ッ ト 2013) pFerr N19Q/C31 S/S111C	SELEVKNLQRLSGAMDELHNE ILELDEKVDDLRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMKLGPSSAVEIGNGCFFE TKHKCNQTCILDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSLNTAASSGRSSGGDI IKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGAGLFLF DHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKKQKDHATFNFLQWYVAEQH EEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKSGS	337
SIB9337:HA(B, ブリスベ ン 2008, D197N)pFerr N1 9Q/C31S/S111C	MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSNSSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPCDCLNCTDLDVALGR PMCVGTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIHMDRTKIRQLPNLLRGYERKIRLSTQNVDAEKAPGGPYRLGTSGSCPNATSKIGFF ATMAWVPKDNKYKATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKSLYGDSPNQFTSSANGVTTHYVSQIGDFPDQTEDG GLPQSGRIVVDYMMQPKGTGTIVYQGVLLPQKVCASGRSKVTKGSLPLICEADCLHEEYGGNLKSKPYTGEHAKAIGNCP IWKVTPKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMTAGWHGYTSHGAGHVAADLKTQEAINKITKNLNSLSELE VKNLQRLSGAMDELHNE ILELDEKVDDLRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMKLGPSSAVDIGNGCFETKHK CNQTCILDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNTAASSGGDI IKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGAGLFLFDHAAEEYE HAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKD ILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKSGS	338
SIB9347:HA(B, ウイスコンシン 2 010,Y98F)pFerr N19Q/C31S/S111 C	MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSNSSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPCDCLNCTDLDVALGR PMCVGTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIHMDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVDAEKAPGGPYRLGTSGSCPNATSKIGFF ATMAWVPKDNKYKATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKSLYGDSPNQFTSSANGVTTHYVSQIGDFPDQTEDG GLPQSGRIVVDYMMQPKGTGTIVYQGVLLPQKVCASGRSKVTKGSLPLICEADCLHEEYGGNLKSKPYTGEHAKAIGNCP IWKVTPKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMTAGWHGYTSHGAGHVAADLKTQEAINKITKNLNSLSELE VKNLQRLSGAMDELHNE ILELDEKVDDLRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMKLGPSSAVDIGNGCFETKHK CNQTCILDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNTAASSGGDI IKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGAGLFLFDHAAEEYEHA KKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDIL DKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKSGS	339

10

20

30

40

【表 4 1】

SIB9379:(H3-ス テ△)bfpFerr N1 9Q/C31S/S111C	MKTIIALSIIILCLVFAQKLPNGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTIITNDQIEVTNATELVFPCCGVKLKATGMNVPEKQTRGIF GAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRRHONSEGIGQAADLKSTQAAINQINGMVNRVIELMEQGGPDCYLAELLVALLNQHVIDLTDSE MRKLFERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKSGGESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVN KEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIIFLNENNVVOLTISIAPCHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISE SINNIVDHAIAIKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	340
SIB9380:(H7-ス テ△)bfpFerr N1 9Q/C31S/S111C	MNTQILVFALIAIIPTNADKICLGHAVSNGTKVNTLTERGEVVVNATELVFPCCGVKLKATGMNVPEIPKGRGLFGAIAAGFI ENGWGLIDGWYGFRRHQAQEGTAADYKSTQSAIDQITGMVNRVIELMEQGGPDCYLAELLVALLNQHVIDLADSEMDKLYER VKRQLRENAEEDGTGCFEIFHKCDDDCMASIRNNTYDHSKYREEAMQNRIOIDSGGESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSN LYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIIFLNENNVVOLTISIAPCHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVD HAIAIKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	341
SIB9408:(H10-ス テ△)bfpFerr N1 9Q/C31S/S111C	MYKIVVIAIALLGAVKGLDKICLGHAVANGTIVKTLTNEQEEVTNATELVFPCCGVLMATGMNVPELIQGRGLFGAIAAGFLE NGWEGMVDGWYGFRRHQAQGTQAADYKSTQAAIDQITGMVNRVIELMEQGGPDCYLAELLVALLNQHVIDLADSEMDKLYER RKQLRONAEEDGKGCFEIYHACDDSCMESIRNNTYDHSQYREALLNRLNINSGGESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSN LYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIIFLNENNVVOLTISIAPCHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVD AIAIKQKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	342
SIB9148:(H1-ス テ△)bfpFerr N1 9Q/C31S/S111C	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDFVLEKNVTVTHSVNLGSLRMVTGLRNIPQRETRGLFGAIAAGFIEGGWTG MVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNMVNSVIEKMGSGSGTDLAEILLVLLINERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLK NNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMEVKNGTYPKYSEESKLNREKIDSGGESQVRQOQFSKDIEKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMS SWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIIFLNENNVVOLTISIAPCHKFEGLTQIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIAIKQK DHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	343
TEV切断部位	ENLYFQG	344
CpG(ホスホロチ オエー ト 改変を* で示す)	T*G*A*C*T*G*T*G*A*A*C*G*T*T*G*A*A*G*A*T*G*A	345
	使用していない	346-400
	配列番号401～445の略語一覧: • リーダー配列-下線 • g^L - イタリック体 • リンカー - 二重下線	

10

20

30

40

【表 4 2】

	● gH - 太字 ● bfpFerr (フェリチン) - 波状下線 ● FR - 影を付けた灰色 ● gp220 - イタリック体および太字 ● gp42 - イタリック体および下線 ● イラクサギンウワバフェリチン重鎖-二重の波状下線 ● フォルドン配列: <u>イタリック体および波状下線</u> ● トロンビン切断部位: <u>イタリック体および破線の下線</u> ● 6×His(配列番号 442)タグ:太字、イタリック体、および波線下線	MDSKSSQKGSRLLLLVSNLLLPQGVLAEEAALLVCQYTIQSLIHLTGEDPGFFNFVEIPEFFPFTCNVCTADVNTINFVVG GKKHQDLDFGQLTPHTKAVYQPRGAFGGSSENATNLFLELLGAGELALTMRSKKLPINVTGEEQQVSLSESDVYFQDVFGTM WCHHAEMQNPVYLIPETVPYIKWDNCNSTNITAVVRAQGLDVTPLSLPTSAQDSNFSVKTEMLGNEIDIECIMEDGEISQVLP GDNKENITCSGYESHVPSGGILTSSTPVATP IPGTGYAYSRLRTPRPVSRFLGNNSILYVFYSGNGPKASGGDYCIQSNIVFSD EIPASQDMPNTNTDIITYVGDNATYSVPMVTSEDANSPNVTVTAFAWPNNTETDFKCKWTLTSGTPSGCENISGAFAASNRFTDI TVSGLGTA PKTLIIITRTATNATTTTHKVIFFSKAPEGSESOVRQOFSKDIKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDGAGL FLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTOIFOKAYEHEQHISEINNIVDHAICKDHATFNFLQWYVA EQHEEEVLEFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	401
SIB 7187 リー ダー配列gp220 b fpFerrナノ粒子N 19Q/C31S/S111C		MRAVGVFLAICLVITIFVLPTWGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFGSLASLNPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLTYGSFVEDLFGANLNRRGGSGSASSGASASGSSNGSGSGSNSSASSGSSGGA SGSGSGSGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWTEIMAKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSCTGLIALAEFVDI PAVSEGSMDQVASKVHPGVISGLNSPACMLSAPEKQLFYIIGTMLPNTRPHSYVYQLRCHLSYVALSINGDKFYTGAMTSK FLMGTYKRVTEKGDHVLISLVEGKTKDLPDLRGPFSYPSLTSQAQSGDYSLVITTFVHYANFHNYPVFNLDKMFSTRAVTMTAAS YARYVLQKLVILEMKGCCREPELDTETLTTFMEFVSVAFFKVGHAVGETGNCVCDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYGATVKGMQ SYGLERLAAMMATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETLFIGSHVV LRELRLNVTQTQPNLALYQLLSTALCSALEICEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPQEAITLDQAAVSNVAVDG FLGRLSLEREDRDRAWHLPAYKCVDRDLKVLMIIPLINVTFIISDREVRSALYEASTTLYSSSLFSPVIMNKCSQGAAGEP RQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTTYITSQEVQNSILSSNYDFDNLHVHYLLLTNGTVMELAGLYEERASG	402
SIB 7340 リー ダー配列gL(D7)- リンカー-gH bf pFerrナノ粒子N 19Q/C31S/S111C			

10

20

30

40

10
20
30
40

[illegible]

【表 4 4】

(125)

JP 2021-519596 A 2021.8.12

ダー配列 $g_L(D7)$ _ リンカー_gH三 量体	SFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRGGSGGGSGGGSGGAAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIP WTELMKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGLIALAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNSPACMLS APLEKQLFYYIGITMLPNTRPHSYVFFYQLRCHLSYVALSINGDKFQYTGAMTSKFLMGTYKRVTEKGEHVLISLVEGKTKDLPDL RGPFSYPSLTSAQSGDYSLVIVTTFVHYANFHNYPVNLKDMFSRAVTMTAAASYARYVLQKLVLLEMKGGCREPELDTETLTTM FEVSAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYGATVKGMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTTEKQEYA LRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETLFIGSHVVLRELRLNVTTQGNLALYQLLSTALCSALEI GEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPEATLDQAAVSNVADGFLGRLSLERDRDAWHLPAYKCVDRDKVLM IIPLINVTFIISDREVRGSALYEASTYLSLSPVIMNKCSQGAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEG LETTYITSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNTNGTVMEIAGLYEERASGGYIPEAPRDGOAYVRKDGGEWVLLSTFLGSG SCSGLVPRGSGAGGGHHHHH	406
SIB 7381 リー ダー配列 $g_L(D7)$ _ リンカー_gH単 量体	MRAVGVELAICLVITFVLPTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFGLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRGGSGGASASGSSNGSGGSSSSASSGSGGA SGGSGSGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPWTELMKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGLIALAE PVDI PAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNSPACMLSAPLEKQLFYYIGITMLPNTRPHSYVFFYQLRCHLSYVALSINGDKFQYTGAMTSK FLMGTYKRVTEKGEHVLISLVEGKTKDLPDLRGPFSYPSLTSAQSGDYSLVIVTTFVHYANFHNYPVNLKDMFSRAVTMTAAAS YARYVLQKLVLLEMKGGCREPELDTETLTMFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYGATVKGMQ SYGLERLAAMLATVKMEELGHLTTEKQEYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETLFIGSHV LRELRLNVTTQGNLALYQLLSTALCSALEICEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPEATLDQAAVSNVADG FLGRLSLERDRDAWHLPAYKCVDRDKVLMITPLINVTFIISDREVRGSALYEASTYLSLSPVIMNKCSQGAVAGEP RQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTYITSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNTNGTVMEIAGLYEERASG SCSGGLVPRGSGAGGGHHHHH	407
SIB 7382 リー ダー配列 $g_L(D7)$ _ リンカー_gH単 量体	METDILLWVLLWVPGSTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFGLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLNVV SFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRGGSGGGSGGGSGGAAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIP WTELMKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGLIALAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNSPACMLS APLEKQLFYYIGITMLPNTRPHSYVFFYQLRCHLSYVALSINGDKFQYTGAMTSKFLMGTYKRVTEKGEHVLISLVEGKTKDLPDL RGPFSYPSLTSAQSGDYSLVIVTTFVHYANFHNYPVNLKDMFSRAVTMTAAASYARYVLQKLVLLEMKGGCREPELDTETLTTM FEVSAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYGATVKGMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTTEKQEYA LRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETLFIGSHVVLRELRLNVTTQGNLALYQLLSTALCSALEI GEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPEATLDQAAVSNVADGFLGRLSLERDRDAWHLPAYKCVDRDKVLM IIPLINVTFIISDREVRGSALYEASTYLSLSPVIMNKCSQGAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEG	40

10

20

30

40

【表 4 5】

SIB 7392 リー ダー配列 gL₂ リ ンカー - gH 単量 体	LETTTITSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMEIAGLYEERASGSGSGLVPRGSGAGGGHHHHHH MRAVGVFALACLVTIFVLPTGWNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGSGSASSASGSSNGSGSGSSNSASS GASSGGASGSGSGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWELMAKVPGLSPEALWREANVTEDIASMLNRYKLIYKTSGLTIGIA LAEPVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNSPACMLSAPELQKLFYYIGTMLPNTPRHSYVYQLRCHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFLMGTYKRVTEKGEHVLSLVFGKTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVITTFVHYANFNHNYFVFNKDMFSRA VTMTAASARYVVLQKLVLEMKGGCREPELDTETLTMTFEVSAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYG ATVKMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLITTEKQYALRLATVGYPKAGVSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETL FIGSHVVLRELRLNVTQCPNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRLGALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAA VSNADVGLGRLSLERDRDAWHLPAYKCDRLDKVLMIPLINVTFIISDREVRGSALYEASTTYLSSSLFLSPVIMNKCQ GAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTTYITSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMEIAGL YEERASGSGSGLVPRGSGAGGGHHHHHH	408
SIB 7397 リー ダー配列 gL₂ リ ンカー - gH 単量 体	MRAVGVFALACLVTIFVLPTGWNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGSGSASSASGSGSGGSGGAAS LSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWELMAKVPGLSPEALWREANVTEDIASMLNRYKLIYKTSGLTIGIALAE PVDIPAVSEGSMQVD ASKVHPGVISGLNSPACMLSAPELQKLFYYIGTMLPNTPRHSYVYQLRCHLSYVALSINGDKFQYTGAMTSKFLMGTYKRVTE KGEHVLSLVFGKTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVITTFVHYANFNHNYFVFNKDMFSRAVMTAAARYVVLQKLV LEMKGCCREPELDTETLTMTFEVSAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYGATVKMQSYGLERLAAML MATVKMEELGHLITTEKQYALRLATVGYPKAGVSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETLFIGSHVVLRELRLNVTQ CPNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRLGALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAAVSNADVGLGRLSLERD RDAWHLPAYKCDRLDKVLMIPLINVTFIISDREVRGSALYEASTTYLSSSLFLSPVIMNKCQGAVAGEPRQIPKIQNFTR TQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTTYITSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMEIAGLYEERASGSGSGLVPRG SGAGGGHHHHHH	409
SIB 7400 リー ダー配列 gL₂ リ ンカー - gH bfp errナノ粒子N19 Q/C31S/SH11C	METDTLLWVLLWVPGSTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLNVV SFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGSGGSGGSGGAASLSEVKLHLDIEGHA SHYTIPTWELMAKVPGLSPEALWREANVTEDIASMLNRYKLIYKTSGLTIGIALAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNS PACMLSAPELQKLFYYIGTMLPNTPRHSYVYQLRCHLSYVALSINGDKFQYTGAMTSKFLMGTYKRVTEKGEHVLSLVFGKT KDLPLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVITTFVHYANFNHNYFVFNKDMFSRAVMTAAARYVVLQKLVLEMKGGCREPELDT ETLTMTFEVSAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYGATVKMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTT EKQYALRLATVGYPKAGVSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETLFIGSHVVLRELRLNVTQCPNLALYQLLSTAL CSALEIGEVLRLGALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAAVSNADVGLGRLSLERDRDAWHLPAYKCDVR LDKVLMIPLINVTFIISDREVRGSALYEASTTYLSSSLFLSPVIMNKCQGAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLS	410

10

20

30

40

10
20
30
40

SIB 7402	リー ダ一配列g _L _リ ンカ一_gH_三量 体	YDEKEGLETTTYITTSQEVQNSILSSNYDFDNLHVHYLLLTNGTVMIEIAGLYEERASGGSGGGGGGGGGGGGGSESVQRQ QFSKDIKLLNEOVNKEMOSSNLYMSMSSWSTHSIDGAGLEFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVVOLTSISAPHEKFEGLT QIFOKAYEHEQHISESINNIVDHAIKCKDHATFNLOWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIASRKS	411
SIB 7403	リー ダ一配列g _L _リ ンカ一_gH_三量 体	MRAUGVFELACLVTIFVLPTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVFFISILKRSSALTGHIRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGGSGSGSNSSASSGASSGSGSGSGGAAS LSEVKHLHDIEGHASHYTIPWTLMMAKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGTLGIALAE PVD IPAVSEGSMQVD ASKVHPGVISGLNSPACMLSAPLEKQLFYYIGTMLPNTRPHSYVYQLRCHLSYVALSINGDKFYQTGAMTSKFILMGTYKRVTE KGDEHVL SLVFGTKDL PDLRGPFPSPSLTSAQSGDYSLVITTFVHYANFHNFYVPNLKDMESRAVMTAASYARYVLQKLVL LEMKGCCREPELDTE TLTMFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYCATVKGMQSYGLERLAAML MATVKMEELGHLTTEKOEYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSULLSAYNRHPLFQPLHTVMRETIFIGHVVLRELRLNVTTQ GENLALYQLLSTALCSALEICEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKILLSMAPQEATLDQAASNAVDGFLGRLSLERED RDWAHLPAYKCVDRLDKVLMIIPLINVTFIISDREVRSALYEASTYLSSSLFSPVIMNKSQGAVAGEPRQIPKIQNFTFR TQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTYITTSQEVQNSILSSNYDFDNLHVHYLLLTNGTVMIEIAGLYEERASGGGYIPEAPRDG QAYVRKDGGEWVLLSTFLGSGSGGLVPRGSGAGGGHHHHHH	412
SIB 7404	リー ダ一配列g _L _リ ンカ一_gH_bfpf errナノ粒子N19 Q/C31S/S11IC	MRAUGVFELACLVTIFVLPTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVFFISILKRSSALTGHIRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGGSGSGSNSSASSGASSGSGSGSGGAAS LSEVKHLHDIEGHASHYTIPWTLMMAKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGTLGIALAE PVD IPAVSEGSMQVD ASKVHPGVISGLNSPACMLSAPLEKQLFYYIGTMLPNTRPHSYVYQLRCHLSYVALSINGDKFYQTGAMTSKFILMGTYKRVTE KGDEHVL SLVFGTKDL PDLRGPFPSPSLTSAQSGDYSLVITTFVHYANFHNFYVPNLKDMESRAVMTAASYARYVLQKLVL LEMKGCCREPELDTE TLTMFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYCATVKGMQSYGLERLAAML MATVKMEELGHLTTEKOEYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSULLSAYNRHPLFQPLHTVMRETIFIGHVVLRELRLNVTTQ YTERASGGGYIPEAPRDGOAYVRKDGGEWVLLSTFLGSGSGGLVPRGSGAGGGHHHHHH	413

【表 4 7】

	GPNLALYQLLSTALCSALEICEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATIDQAAVSNVAVDGLRLSLERED RDAWHLPAYKCVDRDLKVLMIIPLINVTFIISDREVRGSALYEASTTLYSSSLFLSPVIMNKCSQCAVAGEPRQIPKIQNFTTR TOKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTTYITTSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMEIAGLYEERASCGGSGGGSGGGS GGGSGGSESQVRQFSKDIKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVVPVQL TSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKDHAENFLQWYVAEQHEEEVLFKDLIDKIELIGNENHGLYLA DQYVKGIAKSRKS	414
SIB 7406 リー ダー配列 gL ₂ リ ンカー ₂ gH bfpF errナノ粒子 N19 Q/C31S/S111C	MRAVGVFIAICLVITIFVLPTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGSGGSASSGASAGSSNGSGSGSNSSASS GASSGGASGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWTELMKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGIA LAEPVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNSPACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTRPHSYVYQLRCHLSYVALSINGDKFOY TGAMTSKFLMGTYKRVTEKGEHVLSLVFGTKDLPDLRGPPSPSLTSAQSGDYSLVITVTFVHYANFNHYFVFNKDMFSRA VTMTAASYARYVLQKLVLEMKGGCREPELDTETLTMTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLMATVKMEELGHLTTEKQEYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETL FIGSHVVLRELRLNVTTQGNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRLGALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAA VSNVAVDGLRLSLEREDRDWHLPAYKCVDRDLKVLMIIPLINVTFIISDREVRGSALYEASTTLYSSSLFLSPVIMNKCSQ GAVAGEPRQIPKIQNFTTRQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTTYITTSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMEIAGL YEERASGGSGGGSGGGSGGSGGSESVQRQFSKDIKLLNEQVNKEMOSSNLYMSMSSWSYTHSLDAGLFLFDHAAEEYE HAKKLIIFLNENNVVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKDHAENFLQWYVAEQHEEEVLFKD ILDKIELIGNENHGLYLAQYVKGIAKSRKS	415
SIB 7414 リー ダー配列 gL ₂ リ ンカー ₂ gH 重量 体	METDTLLWVLLWVPGSTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLNVV SFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGSGGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHA SHYTIPTWTELMKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGIALAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNS PACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTRPHSYVYQLRCHLSYVALSINGDKFOYTGAMTSKFLMGTYKRVTEKGEHVLSLVFGKT KDLPDLRGPPSPSLTSAQSGDYSLVITVTFVHYANFNHYFVFNKDMFSRAVTMTAASYARYVLQKLVLEMKGGCREPELDT ETLTMTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYGATVKGMQSYGLERLAAMLMATVKMEELGHLTT EKQEYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETLFIGSHVVLRELRLNVTTQGNLALYQLLSTAL CSALEICEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAAVSNVAVDGLRLSLEREDRDWHLPAYKCVDR LDKVLMIIPLINVTFIISDREVRGSALYEASTTLYSSSLFLSPVIMNKCSQCAVAGEPRQIPKIQNFTTRQKSCIFCGFALLS YDEKEGLETTTYITTSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMEIAGLYEERASGGSGGSLVPRGSGAGGGHHHHHH	416
SIB 7429 リー ダー配列 gL ₂ リ ンカー ₂ gH 三量	METDTLLWVLLWVPGSTGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLNVV SFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGSGGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHA SHYTIPTWTELMKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGIALAE PVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNS	

10

20

30

40

【表 4 8】

体	PACMLSAPELEKQLFYIIGTMLPNTNRPHSYVYQRLCHLSYVALSINGDKFYTGAMTSKFLMGTYKRVTEKGDHVLSLVFGKT KDLPLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVIVTTFVHYANFNHNYFVPNLKDMFSRAVMTAAASYRVVLQKLVLEMKGGCREPELDT ETLTTMFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYGATVKGMSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTT EKQYALRLATVGPYKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETLFISGVVLRRLNVTQGPNLALYQLLSTAL CSALEIGEVLRLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAAVSNVADGFLGRLSLEREDRDAWHLPAYKCVDR LDKVLMIPLINVTFFIISDREVRGSALYEAATYLSLSSFLSPVIMNKCSQGA VAGEPRQIPKIQTQKSCIFCGGFALLS YDEKEGLETTYITTSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMEIAGLYEERASGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLS <u>TFLGSGSGSLVPRGSGAGGHHHHHH</u>	417
SIB 15000 ジ一配列 _{g_L} FR1 _gH bfpFerrナ ノ粒子N19Q/C31 S/S111C	MRAVGVFALACLVTIFVLPTWGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYIVSNQTCDFSLASINSPKNGSNQLVISRCANGLN VV/SFFISILKRSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYYAHRGGGSGSASAEAAAKEAAAKAGSGSGGAASLS EVKLHLDIEGHASHYTIPTWELMAKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGLIALAE PVDIPAVSEGSMDVDAS KVHPGVISGLNSPACMLSAPELEKQLFYIIGTMLPNTNRPHSYVYQRLCHLSYVALSINGDKFYTGAMTSKFLMGTYKRVTEK DEHVLSLVFGKTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVIVTTFVHYANFNHNYFVPNLKDMFSRAVMTAAASYRVVLQKLVLE MKGGCREPELDTETLTMFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYGATVKGMSYGLERLAAMLMA TVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGPYKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETLFISGVVLRRLNVTQGP NLALYQLLSTALCSALEIGEVLRLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAAVSNVADGFLGRLSLEREDRD AWHLPAYKCVDRDKVLMIIPLINVTFFIISDREVRGSALYEAATYLSLSSFLSPVIMNKCSQGA VAGEPRQIPKIQTQKSCIFCGGFALLS KSCIFCGGFALLSYDEKEGLETTYITTSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMEIAGLYEERASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG GSGSGSESQVRQQFSKDIEKLNEQVNKEMOSSNLMSMSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVVQVLTIS ISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKDHAATENFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQ <u>YVKGIAKSRKS</u>	418
SIB 15001 ジ一配列 _{g_L} FR2 _gH bfpFerrナ ノ粒子N19Q/C31 S/S111C	MRAVGVFALACLVTIFVLPTWGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYIVSNQTCDFSLASINSPKNGSNQLVISRCANGLN VV/SFFISILKRSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYYAHRGGGSGSASAEAAAKEAAAKAGSGSGGS GAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWELMAKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGLIALAE PVDIPAVSEGS MQVDASKVHPGVISGLNSPACMLSAPELEKQLFYIIGTMLPNTNRPHSYVYQRLCHLSYVALSINGDKFYTGAMTSKFLMGTYK RVTEKGDHVLSLVFGKTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVIVTTFVHYANFNHNYFVPNLKDMFSRAVMTAAASYRVVLQ KLVLEMKGGCREPELDTETLTMFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYGATVKGMSYGLERL AAMIMATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGPYKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETLFISGVVLRRLN VTQGPNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAAVSNVADGFLGRLSL EREDRDAWHLPAYKCVDRDKVLMIIPLINVTFFIISDREVRGSALYEAATYLSLSSFLSPVIMNKCSQGA VAGEPRQIPKIQT NFTRTQKSCIFCGGFALLSYDEKEGLETTYITTSQEVQNSILSSNYFDFDNLHVHYLLLTNGTVMEIAGLYEERASGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG GGSGSGSGSGSESQVRQQFSKDIEKLNEQVNKEMOSSNLMSMSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNV <u>PVQLTISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKDHAATENFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENH</u>	419

10

20

30

40

【表 4 9】

(130)

JP 2021-519596 A 2021.8.12

	<u>LYLADQYVKGIAKSRKS</u>	
SIB 15002 ダー配列 物5 gL_リンカー _gH_リンカー _bfpFerrナノ粒 子N19Q/C31S/S1 11C	MRAVGFLAICLVTFIVLPTWGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASINSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVSDEDLFGANLNRYAWHRRGGGSGSASSGASAGSSNGSGSGSGSNSSASS GASSGGASGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWELMAKVPGLSPEALWREANVTEDIASMLNRYKLIYKTSGLTIGIA LAEPVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNSPACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTNRPHSYFYQLRCHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFLMGTYKRVTEKGEHVL SLVFGKTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVITVTFVHYANFHNHYFVFNPKDMFSRA VTMTAASARYVVLQKLVLLEMKGGCREPELDTETLTMTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLMA TVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETL FIGSHVLRRLNVTQTGPNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRLGALGTE SGLFSPCYLSIRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAA VSNVADGFLGRLSLEREDRDAWHLPAYKCVDRDKVLMIPLINVTFIISSDREVRSALYEASTYLSLSPVIMNKCQ GAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTTYITTSQEVQNSILSSNYFDNHLHVHYLLLTNGTVMETIAGL YEERASGGSGSASSGASAGSSGGSGSGSSASSGASGGSGSGSGESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNMKEMQSSNLNYS MSSWSYTHSLDGAGLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVVOLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIK CKDHATFNLOWYVAEQHEEEVLKDIIDKIELIGNENHGLYIADQYVKGIAKSRKS	419
SIB 15003 ダー配列 物7 gL_リンカー _gH_リンカー _bfpFerrナノ粒 子N19Q/C31S	MRAVGFLAICLVTFIVLPTWGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASINSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVSDEDLFGANLNRYAWHRRGGGSGSASSGASAGSSNGSGSGSGSNSSASS GASSGGASGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWELMAKVPGLSPEALWREANVTEDIASMLNRYKLIYKTSGLTIGIA LAEPVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNSPACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTNRPHSYFYQLRCHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFLMGTYKRVTEKGEHVL SLVFGKTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVITVTFVHYANFHNHYFVFNPKDMFSRA VTMTAASARYVVLQKLVLLEMKGGCREPELDTETLTMTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLMA TVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHVTMRETL FIGSHVLRRLNVTQTGPNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRLGALGTE SGLFSPCYLSIRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAA VSNVADGFLGRLSLEREDRDAWHLPAYKCVDRDKVLMIPLINVTFIISSDREVRSALYEASTYLSLSPVIMNKCQ GAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTTYITTSQEVQNSILSSNYFDNHLHVHYLLLTNGTVMETIAGL YEERASGGSGSASSGASAGSSCGSGSGSSASSGASGGSGSGSGESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNMKEMQSSNLNYS MSSWSYTHSLDGAGLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVVOLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIK SKDHATFNLOWYVAEQHEEEVLKDIIDKIELIGNENHGLYIADQYVKGIAKSRKS	420
SIB 15004 ダー配列 物8 gL_gH_gp42 _bfpFerrナノ粒 子N19Q/C31S/S1	MRAVGFLAICLVTFIVLPTWGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASINSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTTLETLYGSFVSDEDLFGANLNRYAWHRRGGGSGSASSGASAGSSNGSGSGSGSNSSASS GASSGGASGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWELMAKVPGLSPEALWREANVTEDIASMLNRYKLIYKTSGLTIGIA LAEPVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGVISGLNSPACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTNRPHSYFYQLRCHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFLMGTYKRVTEKGEHVL SLVFGKTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVITVTFVHYANFHNHYFVFNPKDMFSRA	421

10

20

30

40

【表 5 0】

11C	VTMTAASYARYVLQKLVILEMKGCCREPELDTETLTTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETL FIGSHVVLRELRLNVTQGPNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAA VSNVAVDGLRLSLEREDRDRAWHLPAYKCVDRDKVLMIIPLINVTFISSDREVRGSALYEASTTYLSSSLFLSPVIMNKCSQ GAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTITYITSQEVQNSILSSNYFDDNHLHVHYLLLTNGTVMETIAGL YEERASGGSGSGSASSGASGSSGSGSSASSGDSKSSQKSRLLLLLVSNLLPQCVLAYFLPPRVRGCGGRVAAAI TWVPKPNVEVWPVDPVPPVNFNKTAEQYGDKEVKLPHWTPTLHTFOVPONYTKANCYCNTRYETFSYKCCCFYFTKKKHTWN GCFQACAELYPCTYFYGPTPDILPVVTRNLNAIESLWVGVRVGEWNWTSLDGGTFKYYQIFGSHCTYVSKFSTVPVSHHECSF LKPCLCVSQRSNSGGSGSASSGASGSSGSGSSASSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSSA SSGASSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSSA NENNVFVQLTSSISAPEHKEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICKKDHAFTNFLOWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIG NENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	422
SIB 15005 リー ダ一配列 構築 物5 gL_gH_C137 A_bfpFerrナノ粒 子N19Q/C31S/S1 11C	MRAVGFLAICLVTFIVLPTWGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFGSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTLETLYGSFVEDLFGANLNRAYAWHRGGGSGSASSGASGSSNGSGSGSGSNSSASS GASSGGASGGSGSGGAAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPWTELMKAVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGIA LAEPVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGIVSGLNSPACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTRPHSYVVFYQJLRAHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFIMGTYKRVTEKGDHVLVSLVFGTKDLPDLRGPFSYPSLTSAQSGDYSLVITVTFVHYANFHNYPVFNKDMFSRA VTMTAASYARYVLQKLVILEMKGCCREPELDTETLTTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETL FIGSHVVLRELRLNVTQGPNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAA VSNVAVDGLRLSLEREDRDRAWHLPAYKCVDRDKVLMIIPLINVTFISSDREVRGSALYEASTTYLSSSLFLSPVIMNKCSQ GAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTITYITSQEVQNSILSSNYFDDNHLHVHYLLLTNGTVMETIAGL YEERASGGSGSGSASSGASGSSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSSA MSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVFVQLTSSISAPEHKEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAICK CKDHATFNLOWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	423
SIB 15006 リー ダ一配列 構築 物7 gL_gH_C137 A_bfpFerrナノ粒 子N19Q/C31S	MRAVGFLAICLVTFIVLPTWGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFGSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSSALTGHLRELLTLETLYGSFVEDLFGANLNRAYAWHRGGGSGSASSGASGSSNGSGSGSGSNSSASS GASSGGASGGSGSGGAAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPWTELMKAVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLTGIA LAEPVDIPAVSEGSMQVDASKVHPGIVSGLNSPACMLSAPLEKQLFYIIGTMLPNTRPHSYVVFYQJLRAHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFIMGTYKRVTEKGDHVLVSLVFGTKDLPDLRGPFSYPSLTSAQSGDYSLVITVTFVHYANFHNYPVFNKDMFSRA VTMTAASYARYVLQKLVILEMKGCCREPELDTETLTTFEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETL FIGSHVVLRELRLNVTQGPNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRGLALGTESGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPOEATLDQAA	424

10

20

30

40

【表 5 2】

	HLERSYDYLLSAAFYNNYQTNRAGFSKLFKKLSDEAWSKTIDI IKHVTKRGDKMNFDOHSTMKTERKNTYAENHELEALAKALD TQKELAEARAFYIHREATRNSOHLHDPEIAOYLEEEFIEDHAEKIRTLAGHTSDLKKFITANNNGHDLALALYVFEYLOKTV	427
SIB 17398 リー ダー配列 gL ₁ リ ンカー ₁ gH-イラ クサギンウロバ フェリチン軽鎖	MRAVGVELAICLVTFIVLPTWGNWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGLN VVSFFISILKRSSALTGHLRELLTLETLVGSFVEDLFGANLNRYAWHRGGGSGSASSGASGSSNGSGSGSGSSASS GASSGGASGGSGGGAASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPTWELMAKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSCTLGIA LAEPVDIPAVSEGSMQVDAASKVHPGVISGLNSPACMLSAPEKQLFYIGTMLPNTRPHSYVVFYQLRCHLSYVALSINGDKFQY TGAMTSKFMGTYKRVTEKGEHVLIVFGKTKDPLRGPFSYPSLTSAQSDYSLIVTTFVHYANFHNHYFVFNKDMFSRA VTMTAASARYVYVLOKLVLLEMGKGCPELDTETLTTFEVSAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIIGICYG ATVKGMQSYGLERLAAMLMAATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSGLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETL FIGSHVLRRLNVTTQGPNIALYQLLSTALCSALEICEVLRGLALGTE SGLFSPCYLSLRFDLTRDKLLSMAPQEAATLDQAA VSNVADGFLGRLSLEREDRDAWHLPAYKCVDRDKVIMIIPLINVTFIISDREVRGSALYEASTTYLSSSLFSPVIMNKCSQ GAVAGEPRQIPKIQNFTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTTYITTSQEVQNSILSSNYFDDNHLHVHYLLLTNGTVMEIAGL YEERASGSADTCYNDVALDCGITSNLALPRCNAVYGEYGSCHGNVATELOAYAKLHLERSYDYLLSAAFYNNYQTNRAGFSKLF KKLSDEAWSKTIDI IKHVTKRGDKMNFDOHSTMKTERKNTYAENHELEALAKALDTQKELAEARAFYIHREATRNSOHLHDPEIA QYLEEEFIEDHAEKIRTLAGHTSDLKKFITANNNGHDLALALYVFEYLOKTV	428
16アミノ酸リン カー	GGGGSGGGGGGGSG	429
28アミノ酸リン カー	GGSGGSNNSSASSGASGGGSGGSG	430
46アミノ酸リン カー	GGSGSASSGASAGSSNGSGSGSNSSASSGASGGGSGGSG	431
FRI	GGSGSASAEAAAKEAAAKAGGGSGG	432
FR2	GGSGSASAEAAAKEAAAKEAAKASGGSGGSG	433
コンジュゲーションの ための C を含む 47 アミノ 酸リンカー	SGGGSGSASSGASAGSSCSGSGSGSSASSGASGGGSGGSG	434
Gp42	DSKGSSQKGSRLLLLLLVVSNLLLPQGVLAFLPPRVRRGGRRVAAAATWPKPNVEVWPVDPPPPVPVFNKTAEEQYGDKEVKLP HWTPTLHTFQVPQNYTKANCTYCNTRYTFYSYKGCCTFYTKKKHTWNGCFQACAELYPCITYFYGPTPDILPVVTRNLNAIESLW	

10

20

30

40

【表 5 3】

CpG(ホスホロチ オエー ト 改 変、* で 示 す)	VGYYRVGEGNWTSLDGGTFKVIYQIFGSHCTYVSKFSTVPVSHHECSFLKPCLCVSRSNS	435
	T*G*A*C*T*G*T*G*A*A*C*G*T*T*G*A*A*G*A*T*G*A	
例示的なgLポリ ペプチド	NWAYPCCHVTQLRAQHLLALENISDIYLVSNQTCDFSLASLNSPKNGSNQLVISRCANGNLNVVSFFISILKRSSSALTGHLRE LLTTLETLYGSFVEDLFGANLNRYAWHRGG	436
例示的なgHポリ ペプチド	AASLSEVKLHLDIEGHASHYTIPWTELMKVPGLSPEALWREANVTEDLASMLNRYKLIYKTSGLGIALAEPVDIPAVSEGSM QVDASKVHPGVISGLNSPACMLSAPIEKQLFYIYIGTMLPNTRPHSYVYQLRCHLSYVALSINGDKFQYTGAMTSKFLMGTYKR VTEKGEHVLVLVFGKTKDLPDLRGPFSPSLTSAQSGDYSLVITTFVHYANFHNHYFVFNLDKMFSAVMTAASYARYVLQK LVLLEMKGGCREPELDTETLTTFMEVSVAFFKVGHAVGETGNGCVDLRWLAKSFFELTVLKDIIGICYGATVKGMSYGLERLA AMLMATVKMEELGHLTTEKQYALRLATVGYPKAGVYSLIGGATSVLLSAYNRHPLFQPLHTVMRETLFIGSHVVLRELRLNV TTQGNLALYQLLSTALCSALEIGEVLRLGALGTEGLFSPCYLSLREDLTRDKLLSMAPQEATLDQAAVSNVAVDGFGLRLSLE REDRDAMHLPAYKCVDRDLKVLMIIPLINVTFIISDRVRSALYEASTTLYSSSLFSPVIMNKCSQGA VAGEPRQIPKIQN FTRTQKSCIFCGFALLSYDEKEGLETTTYITSQEVQNSILSSNYEFDNLHVHYLLLTNTNGTVMEIAGLYEERA	437
例示的なgp220ポ リペプチド	EAALLVCQYTIQSLIHLTGEDPGFFNVEIPEPPFYPTCNVCTADVNTINFDVGGKKHQLDLDFGQLTPHTKAVYQPRGAFGGS ENATNLFLELLGAGELALTMRSKKLPINVTGEEQQVSLESDVYFQDFGTMWCHHAEMQNVPVYLIPETVPYIKWDCNCSN ITAVVRAQGLDVTLPPLSLPTSQADSNSFVKTEMLGNEIDIECIMEDGEISQVLPDGNKFNITCSGYESHVPSGGILITSTSPVAT PIPGTGAYSRLRTPRPVSRFLGNNISILYVYSGNGPKASGGDYCIQSNIVFSDEIPASQDMPTNTTDTIVVGDNATYSVPMVT SEDANSPNVTVTAFWAWPNNTETDFKCKWTLTSGTSPGCENISGAFAFNRTFDITVSGLGTAPKTLIIITRTATNATTTTHKVIF SKAPE	438
システイン-トロ ンビン-Hisリン カー(システイン を二重下線で示 す)	CLVPRGSLEHHHHH	439
アクイフェクス・ アエオリクス(株 VF5)のルマジン シンターゼ	MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRG ATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPIITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR	440
大腸菌6,7-ジメチ ル-8-リビチルル マジンシンター ゼ	MNIIEANVATPDARVAITIAEFNNFINDSLLEGAIDALKRIGQVKDENITVVWVPGAYELPLAAGALAKTKGYDAVIALGTVIR GCTAHFEYVAGGASGLAHVAQDSEIPVAFGLVTTESIEQAIERAGTKAGNKGAEAAALTALEMINVLKAIKA	441
ヘキサHisタグ	HHHHHH	442

10

20

30

40

【表 5 4】

グリシン-セリン リンカー	GGGS	443
グリシン-セリン リンカー	GGSGGGS	444
グリシン-セリン リンカー	GGSGGGGGGGGGGGGS	445
	使用していない	446-500
RF8085: ウシガエル(bf)hpフェリチンN19Q_C31S_S111C(対照)上に一本鎖リンカー-S GSGS(配列番号533)を有するNIH DS-CAV1(一過性のトランスフェクティングフローティングベクターによって発現される、502と同じタンパク質配列)	MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVLIKQELD KYKNAVTELOLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVKNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNIETVIEFQKNNRLLIETREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKLMNNVQIVRQSSYSIMCII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSGNICLRTDRGWYCDNAGSVSFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYGTCTASNNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELLSGSGSESQVRQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	501
RF8090: ウシガエル(bf)hpフェリチンN19Q_C31S_S111C(対照)上に一本鎖リンカー-S GSGS(配列番号533)を有するNIH DS-CAV1(CHO細胞株生成のために使用されるクローニングベクターによって発	MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVLIKQELD KYKNAVTELOLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVKNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNIETVIEFQKNNRLLIETREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKLMNNVQIVRQSSYSIMCII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSGNICLRTDRGWYCDNAGSVSFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYGTCTASNNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELLSGSGSESQVRQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	502

10

20

30

40

【表 5 5】

現される、501と同じタンパク質配列)		
RF8100:RSV scF _SGSGS(配列番号533)-bf-pFerr- N19Q_C31S_S111 C]に対する単一のT324Nグリカ ン部位の付加	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGAVACKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSI SNIEVTIEFOQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGNI CLTRDRGWYCDNAGSVSFPFQAE TCKVQSNRVFCDTMNSRTL P SEVNL CNVDI FNP KYDCKIMT SKTDVSSSVITSLGAI VSCYGTCTASNKNRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAHKKLIIFLNENNVPVQLTISI SAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLDQYVKGIAKSRKS	503
RF8101:RSV scF _SGSGS(配列番号533)-bf-pFerr- N19Q_C31S_S111 C]に対する単一のグリカン部位E32 8Nの付加	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGAVACKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSI SNIEVTIEFOQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGNI CLTRDRGWYCDNAGSVSFPFQAE TCKVQSNRVFCDTMNSRTL P SEVNL CNVDI FNP KYDCKIMT SKTDVSSSVITSLGAI VSCYGTCTASNKNRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAHKKLIIFLNENNVPVQLTISI SAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLDQYVKGIAKSRKS	504
RF8102:RSVscF _SGSGS(配列番号533)-bf-pFerr_N1 9Q_C31S_S111C に対する単一の グリカン部位_K 390T_の付加	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGAVACKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSI SNIEVTIEFOQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGNI CLTRDRGWYCDNAGSVSFPFQAE TCKVQSNRVFCDTMNSRTL P SEVNL CNVDI FNP TYDCKIMT SKTDVSSSVITSLGAI VSCYGTCTASNKNRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAHKKLIIFLNENNVPVQLTISI SAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLDQYVKGIAKSRKS	505
RF8103:RSVscF _SGSGS(配列番号533)-bf-pFerr_N1 9Q_C31S_S111C に対する単一の グリカン部位S34 8N_の付加	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGAVACKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSI SNIEVTIEFOQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGNI CLTRDRGWYCDNAGSVSFPFQAE TCKVQSNRVFCDTMNSRTL P SEVNL CNVDI FNP KYDCKIMT SKTDVSSSVITSLGAI VSCYGTCTASNKNRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAHKKLIIFLNENNVPVQLTISI SAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLDQYVKGIAKSRKS	506
RF8104:RSVscF _SGSGS(配列番号533)-bf-pFerr_N1 9Q_C31S_S111C	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGAVACKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSI SNIEVTIEFOQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGNI CLTRDRGWYCDNAGSVSFPFQAE TCKVQSNRVFCDTMNSRTL P	507

10

20

30

40

【表 5 6】

に対する単一の グリカン部位_Y 478S_の付加	SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGTCTKCTASKNRGI IKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFSDDLVPFSDDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLSGSGESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	508
RF8105:RSVscF_ SGSGS(配列番号 533)-bf-pFerr_N1 9Q_C3IS_S11C に対する単一の グリカン部位R50 7N_の付加	MELLILKANAITTILTAFTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVSLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNPETVIEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAYVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTLTP SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGTCTKCTASKNRGI IKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFSDDLVPFSDDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLSGSGESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	509
RF8106:発現を増 加させるI217Pを 有し、DS-CAV1の ジスルフィド結 合(DS)を除去し、 RF8085(またはR F8090)と比較し てさらに高い発 現をもたらしRF 8108	MELLILKANAITTILTAFTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVSLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNPETVIEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAYVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTLTP SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGTCTKCTASKNRGI IKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFSDDLVPFSDDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLSGSGESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	510
RF8107:DS-CAV1 のジスルフィド 結合の除去と共 に、RF8108のブ ロリン置換(I217 P)およびRF8111 の疎水性空洞充 填置換(N228L)	MELLILKANAITTILTAFTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVSLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNPETVIEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAYVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTLTP SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGTCTKCTASKNRGI IKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFSDDLVPFSDDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLSGSGESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	511
RF8108:融合前の 中央ヘリックス を安定化させ(DS -CAV1のDSは存 在する)、発現を 増加させる、プロ	MELLILKANAITTILTAFTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVSLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNPETVIEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAYVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTLTP SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGTCTKCTASKNRGI IKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFSDDLVPFSDDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLSGSGESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI	

10

20

30

40

【表 5 7】

リン置換I217P	VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	512
RF8109:RSVscF [™] SGSGS(配列番号 533)-bf-pFerr _{N1} 9Q_C31S_S111C 上での疎水性空 洞充填_Q224L ₋	MELLILKANAITTILTAVTCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCVKVHLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVSLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNIETVIEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAHVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSDICLRTDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFDYDPLVPFSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDSELLSGSGSESQVRQQFSKDIKLLNEQVKNEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	513
RF8110:RSV scF [™] _SGSGS(配列番 号533)-bf-pFerr _{N1} 9Q_C31S_S111 C上での疎水性空 洞充填置換_Q22 4LおよびQ225V ₋	MELLILKANAITTILTAVTCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCVKVHLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVSLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNIETVIEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAHVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSDICLRTDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFDYDPLVPFSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDSELLSGSGSESQVRQQFSKDIKLLNEQVKNEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	514
RF8111:RSVscF [™] SGSGS(配列番号 533)-bf-pFerr _{N1} 9Q_C31S_S111C 上での疎水性空 洞充填置換N228 L ₋	MELLILKANAITTILTAVTCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCVKVHLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVSLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNIETVIEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAHVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSDICLRTDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFDYDPLVPFSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDSELLSGSGSESQVRQQFSKDIKLLNEQVKNEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	515
RF8112:疎水性空 洞充填置換N228 F_RSVscF_SGSG S(配列番号533)-b f-pFerr _{N1} 9Q_C3 1S_S111C	MELLILKANAITTILTAVTCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCVKVHLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVSLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNIETVIEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAHVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSDICLRTDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFDYDPLVPFSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDSELLSGSGSESQVRQQFSKDIKLLNEQVKNEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVVQVLTISIAPCHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	516
RF8113(DS-CAV1 のDSを除去する RF8106PのI217P 変異、およびフェ リチンWt ser111	MELLILKANAITTILTAVTCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVCVKVHLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVSLTFKVLDLKNYIDKQLLPILN KQSCSISNIETVIEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII KEEVLAHVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSDICLRTDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFDYDPLVPFSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDSELLSGSGSESQVRQQFSKDIKLLNEQVKNEMQS	

10

20

30

40

【表 5 8】

およびコンジェーションのためのK79Cの操作されたCYS)	SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPHCFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	517
RF8117(上記の成功した改善された発現/分泌変異の組合せ(図76):DSなし、I217P、E328N、S348N、R507N、フェリチンK79C)	MELLILKANAIITTLTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTFKVLDLKNIYIDKQLLPILN KQSCISNPETVIEFQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKLLMSNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVSPFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYKTKCTASKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPINIFYDPLVPFSPDEFDASISQVNEKINQSLAFINKSDELLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPHCFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	518
RF8122(プロテアーゼ(LYS)に基づく)切断を除去し、安定性/発現を増加させるための追加のK498LおよびK508Qを有する上記のRF8117)	MELLILKANAIITTLTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTFKVLDLKNIYIDKQLLPILN KQSCISNPETVIEFQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKLLMSNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVSPFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYKTKCTASKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPINIFYDPLVPFSPDEFDASISQVNEKINQSLAFINKSDELLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPHCFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	519
RF8123(フェリチンCYSに対する特異的コンジェーションのために69位および212位のCがノックアウトされたRF8117:C69V、C212V)	MELLILKANAIITTLTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTFKVLDLKNIYIDKQLLPILN KQSCISNPETVIEFQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKLLMSNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVSPFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYKTKCTASKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPINIFYDPLVPFSPDEFDASISQVNEKINQSLAFINKSDELLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPHCFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	520
RF8134:タンパク質分解不安定性を制限するためK528NおよびK	MELLILKANAIITTLTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTFKVLDLKNIYIDKQLLPILN KQSCISNPETVIEFQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKLLMSNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVSPFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYKTKCTASKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN	520

10

20

30

40

【表 5 9】

532N変異を有するRF8122類似体	KQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNELINQSLAFINQSDLLSGSGSESQVRQQFSNDIENLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHCFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKSKDHATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	521
RF8135:タンパク質分解不安定性を制限するためK465NおよびK470N変異を有するRF8122類似体	MELLILKANAIITTLTAVTFCFASQGNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTFKVLDLKNIYIDKQLLPILN KQSCSISNPETVIEFQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSLINDMPIITNDQKLMNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNRGIIKTFNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVN KQEGNSLYVNGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNELINQSLAFINQSDLLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHCFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKSKDHATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	522
RF8136:タンパク質分解不安定性を制限するためK465N、K470N、K528N、およびK532N変異を有するRF8122類似体	MELLILKANAIITTLTAVTFCFASQGNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTFKVLDLKNIYIDKQLLPILN KQSCSISNPETVIEFQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSLINDMPIITNDQKLMNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNRGIIKTFNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVN KQEGNSLYVNGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNELINQSLAFINQSDLLSGSGSESQVRQQFSNDIENLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHCFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKSKDHATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	523
RF8140:CHO細胞における起こり得るタンパク質分解を防止するために変異させたウシガエルリンカーにおけるR523Qを有するRF8122融合後、ベンザマック対照分子	MELLILKANAIITTLTAVTFCFASQGNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTFKVLDLKNIYIDKQLLPILN KQSCSISNPETVIEFQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSLINDMPIITNDQKLMNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNRGIIKTFNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVN KQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNELINQSLAFINQSDLLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHCFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKSKDHATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	524
DS-CAV1、陽性対照分子	MELLILKANAIITTLTAVTFCFASQGNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTFKVLDLKNIYIDKQLLPILN KQSCSISNPETVIEFQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSLINDMPIITNDQKLMNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSRTL SEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNRGIIKTFNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVN KQEGNSLYVNGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNELINQSLAFINQSDLLSGSGSESQVRQQFSKDIEKLLNEQVNKEMQS SNLYMSMSSWSYTHSLDGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVQVLTISIAPCHCFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKSKDHATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	525

10

20

30

40

【表 6 0】

	SALLSTNKAVVSLNGSVLTFRKVLDLKKNYIDKQLLPILNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQSSYSIMCIIKEEVLAYVQPLVLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSGNICLTR TDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYKGT KCTASNKNRGIKFTFSGNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYVYVQKQEGKSLYVKGEPINIFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLA FIRKSDLLSGSGSSGGSDIIKLLNEQVKNEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDAGLFLFDHAAEEYEHAHAKKLIIFLNENNVFV QLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDLIDKIELIGNENHGLY LADQYVKGIAKSRKSGS	526
野生型、本来の R SV F(A2株)	MELLILKANAITTILTAFTCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNCNGTDAKVKLKQELD KYKNAVTELQLLMQSTPPTNNRARELPRFMNYTLNNAKNTVTLSSKKRRRFLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVKNKIK SALLSTNKAVVSLNGSVLTFRKVLDLKKNYIDKQLLPILNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQSSYSIMCIIKEEVLAYVQPLVLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSGNICLTR TDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYKGT KCTASNKNRGIKFTFSGNGCDYVSNKGMDTVSGNTLYVYVQKQEGKSLYVKGEPINIFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLA FIRKSDLLHNVNAGKSTTNIMITIIIVILLSLIAGVLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN	527
本来の RSV G A 株、UniProtKB/S wiss-Prot:P27022. 1	MSKNKDQRTAKTLERTWDTLNHLFISSCLYKLNKSVQITLSILAMIIISTSLIIVAIIFIASANHKITSTTTIIQDATNQIK NTTPTYLTONPQLGISPNPSDITSLITILDSTPGVKSTLQSTTVGKNTTTTQAQPNKPTTKQRQNKPPSKPNNDHFHFEVF NEVPCSI CSNNPTCWAICKRI PNKKPGKRTTKPTKKPKPQTTKSKAPTTPKEPTINTTKNTIITLLTSNT TRNPELTSQMETFHSTSEGNPSPSVITSEYPSQPPPTPR	528
RSV G エクトド メイン残基66~2 97	NHKVTLTTAIIQDATSQIKNTTPTYLTDQDPQLGISFNSLSEITSTTILASTTPGVKSNLQPTTVKTKNTTTTQTQPSKPTTK QRQNKPPNPNNDHFHFEVFVPCSI CSNNPTCWAICKRI PNKKPGKRTTKPTKKPKPQTTKSKAPTTPKEPTINTTKNTIITLLTSNT PTINTTKNTIITLLTNNTTGNPKLTSQMETFHSTSEGNLSPSVITSEYPSQPPPTTRQ	529
N末端アジドリ ンカーおよび隣 接するグルタメ ートとのコンジ ュゲーションの ための RSV G ペ プチドA2(アミノ 酸151~193)	アジド-PEG4-SGGSSGSSEEGGSRQNKPNNDHFHFEVFVPCSI CSNNPTCWAICKRI PNKKKEEE	530
CpGオリゴデオ キシヌクレオチ ド(星印はホスホ ロチオエート結 合を示す)	T*G*A*C*T*G*T*G*A*A*C*G*T*T*C*G*A*G*A*T*G*A	531
配列番号526(野 生型RSV F)の98	GSGNVGL	

10

20

30

40

【表 6 1】

～144位に置換されるRF8117における置き換え配列		
一塩基変異配列	PQRET	532
リンカー	SGSGS	533
CpGオリゴヌクレオチド	tgactgtgaacggttcgagatg	534
CpGオリゴヌクレオチド	tccatgacggttcctgacggt	535
RSV Gcc(中央保存領域)A2株res 151～193	RQNKPPNKPENNDHFHFVFNFPVPCSI CSNNPTCWAICKRIPNKK	536
RSV Gcc(中央保存領域)B1株	RKNPPKKPKDDYHFHFVFNFPVPCSI CGNNQLCKSICKTIPNKK	537

実施例

以下の実施例は開示した特定の実施形態を説明するために提供され、本開示の範囲を限定するものとは決して解釈すべきでない。

【実施例1】

【0391】

OspA-フェリチン抗原性ポリペプチドの調製

OspAおよびフェリチンを含む抗原性ポリペプチドを産生した。

【0392】

OspAは、以下の配列：ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) 株B31 (血清型1) NCBI配列ID WP_010890378.1、ボレリア・アフゼリ (*Borrelia afzelii*) 株PKO (血清型2) NCBI配列：WP_011703777.1、ボレリア・ガリニ (*Borrelia garinii*) 株PBr (血清型3) GenBank: CAA56549.1、ボレリア・ババリエンス (*Borrelia bavarientis*) (血清型4) NCBI配列WP_011187157.1、ボレリア・ガリニ (*Borrelia garinii*) (血清型5) GenBank CAA59727.1、ボレリア・ガリニ (*Borrelia garinii*) (血清型6) GenBank: CAA45010.1、およびボレリア・ガリニ (*Borrelia garinii*) (血清型7) GenBank CAA56547.1からGenescriptによって合成した。N末端ウシガエルフェリチン配列を挿入したH. ピロリ (*H. pylori*) フェリチンはGenescriptによって合成した。その中でウシガエルフェリチン配列は以前の研究のものと同様である (Kanekiyo, M. ら、Cell 162 (5): 1090~100頁 (2015) を参照)。大腸菌 (*E. coli*) 中でHisタグ付けOspAおよびOspA-フェリチンのナノ粒子を発現させるために、pet21aベクターを用いた。Exp i 293細胞中で発現させるために、以前用いたものと同様の哺乳動物発現ベクターを用いた (Xu, L. ら、Science 358 (6359): 85~90頁 (2017) を参照)。

【0393】

OspA-フェリチンナノ粒子は、OspAのエクトドメインをフェリチンのアミノ末端に遺伝子的に融合させて抗原性ポリペプチドを産生させることによって創成した (図1A)。OspAは、ただ1つのカルボキシ末端 α ヘリックスを有する21個の連続したアンチパラレル β ストランドから作られた、延長された β シート構造を有する31kDaのリポタンパク質である (図1B) (Kitahara, R. ら、Biophys J 102 (4): 916~26頁 (2012) を参照)。OspAのカルボキシ末端はまた、著しく大きな空洞 (約200 Å) を有し、これがグリシン-セリン配列を用いるフェリチンへの連結に適合する部位に相当する (図1B)。フェリチンの24個のサブユニットは自発的に集合して、中空の球状ナノ粒子を形成する (図1C)。本研究で用いたフェリチンはヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) のフェリチンに融合したウシガエルフェリチンのアミノ末端配列を含み、ヒトフェリチンとの関連が最小のキメラを創成している (Kanekiyo, 2015を参照)。アミノ末端ウシガエルフェリチン配列はナノ粒子のコアから半径方向に突出しており (Trikhia, J. ら、J Mol Biol 248 (5): 949~67頁 (1995) を参照)、ナノ粒子の表面上におけるOspAの均一な提示を容易にしている。

【0394】

フェリチンの機能性を改善するために、フェリチンの構造に3つの追加的な変更、すなわちN19Q、C31S、およびS111Cを行った。N19Qの置換によってアミノ末端のグリコシル化の可能性のある部位を除去した。S111Cの置換によって、フェリチンの表面に露出したシステインが導入され、これは例えばクリックケミストリーによってアジュバントをコンジュゲートするために用いることができる。最後に、コンジュゲーションによってただ1つのシステインが修飾されるように、システイン31をセリンに改変

した。ナノ粒子の表面上のOspAの呈示は、24量体の抗原性ナノ粒子を提供する（図1D）。

【0395】

大腸菌からの精製のため、BL21 Star (DE3) (Invitrogen社、Cat # C601003)を用いた。100 μ MのIPTGと終夜、16℃でタンパク質を誘起した。Tris緩衝液、pH8、50mM NaCl中での超音波処理を用いて、細胞ペレットを溶解した。濾過滅菌した上清をアニオン交換カラム(HiTrap Q HP、GE社)でフロースルーからOspA-フェリチンを採取することによって精製した。次いで1% Triton X114抽出を6回繰り返すことによって、エンドトキシンを除去した。次いでAmicon 100MWカットオフフィルター(Millipore社、Cat # UFC910096)を用いて水相を濃縮し、次いでSuperose 6調製用SECカラム 120mlにて4℃でナノ粒子をさらに精製した。哺乳動物細胞の培養からの精製については、FectoPROトランスフェクション試薬(Polyplus社、Cat # 116-100)を用い、メーカーの指示書に従ってExp293細胞にプラスミドDNAをトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を5日目に培養し、上清を採取して濾過した。エンドトキシンフリーの試薬およびガラス器具を用い、エンドトキシンフリーのプロトコルに従った。50mMのTris、pH7、50mMのNaClを用いてQセファロースファストフロービーズ(GE社、Cat # 17-0510-01)を調製し、濾過滅菌した上清に重力流で添加した。フロースルーを採取し、Amicon 100MWカットオフフィルターを用いて4mlに濃縮した。次いでSuperose 6調製用SECカラム 120mlにて室温でナノ粒子をさらに精製した。

【0396】

His₆タグ付けした(配列番号442)OspAの精製のため、血清型1、4、5、および7のOspAを大腸菌BL21 (DE3) (Invitrogen社、Cat # C600003)から精製し、血清型2および3をExp293細胞から精製した。これらの構築物は膜貫通ドメインを欠除し、C末端His₆タグ(配列番号442)を含み、それ以外は野生型であった。大腸菌の精製については、500 μ MのIPTGで5時間、タンパク質を誘起し、細胞をペレット化して-20℃で凍結した。Complete Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich社、Cat # 11697498001)を含むTBS緩衝液中1% Tritonにペレットを再懸濁し、超音波処理によって細胞を溶解した。上清を濾過滅菌した。哺乳動物細胞の培養については、トランスフェクションの5日後に上清を採取し、濾過滅菌した。上清を、AKTA Pure FPLCに取り付けたGE社のHiTrap HP 5mlカラム(Cat # 17-5248-02)に流した。TBS中20mMのイミダゾールでカラムを洗浄し、負荷し、再び洗浄した。TBS中250mMのイミダゾールで最終のタンパク質を溶出させた。

【0397】

OspA血清型1は、トランスフォームされたヒト腎上皮細胞株Exp293中のフェリチンに融合したB. ブルグドルフェリ株B31から発現した(図2A~図2D、配列番号52)。ナノ粒子の形成およびタンパク質の純度は、サイズ排除カラムクロマトグラフィー(SEC)およびSDS-PAGE(それぞれ図2Aおよび図2B)によって確認した。SEC解析により、予想された保持時間における単一で対称的なピークが明らかになった(図2A)。

【0398】

動的光散乱(DLS)解析も実施した。精製したナノ粒子を、透明な底を有する黒色の384ウェルのプレート(Corning社、Cat # 3540)に濃度約0.4 μ g/mlで負荷した。サンプルを制御温度25℃で、DynaProプレートリーダーII(Wyatt社)で読み取った。DLSにより、純粋で凝集物のない、低い多分散性(7.4%)の粒径13nmが記録された(図2C)。脂質化部位を含むOspAの膜貫通ドメイン(アミノ酸1~25)を除去することにより、精製の容易さが改善された。OspA

の配列はアミノ連結グリコシル化の可能性のある4つの部位を含んでおり、哺乳動物細胞から精製されたOspA-フェリチンはグリカンの付加に符合する高い分子量で泳動した(図2B)。

【0399】

OspA-フェリチンナノ粒子について透過型電子顕微鏡陰性染色イメージングおよび2Dクラス平均解析を実施した(図2D)。OspA-フェリチンナノ粒子のサンプルを1×TBSで300倍に希釈し、400メッシュの銅グリッド上のニトロセルロースによって支持された連続炭素層の上でイメージングした。グリッドは、清浄したグリッドの上にサンプル懸濁液3μlを塗布し、濾紙で吸い取り、直ちにギ酸ウラニルで染色することによって調製した。電子顕微鏡観察は、FEI Eagle 4k×4K CCDカメラを取り付けたFEI Tecnai T12電子顕微鏡を用いて実施した。高拡大画像は67,000倍(0.16mm/ピクセル)で取得した。画像は-1.9μm~-0.8μmの公称アンダーフォーカスおよび約30e⁻/Å²の電子量で取得した。自動摘取プロトコル(Lander, G. C. ら、J Struct Biol, 166(1):95~102頁(2009)を参照)を用いて、67,000倍高拡大画像中の個別の粒子を選択した。XMIPP処理パッケージに基づく参照なし整列戦略を用いた(Sorzano, C. O. ら、J Struct Biol 148(2):194~204頁(2004)を参照)。このパッケージにおけるアルゴリズムは選択した粒子を整列させ、これらを自己相似群またはクラスに分類する。

【0400】

フェリチンナノ粒子は、中央部に中空の中心を有する円形の高密度として現れた(図2D)。それぞれのナノ粒子は、やや楕円形状に見えるOspAの多くの短く均一なスパイクに取り囲まれていた。粒子は約194~220Åの範囲の全体の直径を有し、フェリチンコアの直径は125Åであった。スパイクは粒子の表面から長さ45Åまでで、均一な大きさ、形状、および配向をもって延在していた。OspAスパイクの幅は約30Åで、フェリチンのグリシン-セリンリンカーにおいて最小の密度に細くなっていた。

【0401】

LYMERIX(商標)ワクチンが2002年に中止された際に、このワクチンがヒト白血球機能関連抗原-1(hLFA-1、Gross, D. M. ら、Science 281(5377):703~6頁(1998)参照)のノナペプチドセグメント(配列番号78)にホモロジーを有するエピトープ(配列番号83のアミノ酸165~173)を含んでいるという懸念が生じていた(図5A)。配列番号83のアミノ酸165~173をhLFA-1ホモロジー部位と称する。OspA血清型1は、この配列ホモロジーを含む唯一の血清型である(図5B)。この配列に関する潜在的な懸念があればこれを避けるため、hLFA-1ホモロジー部位を、対応するOspA血清型2(配列番号79)または血清型3(配列番号80)のノナペプチド配列に置き換え、あるいはhLFA-1に対する類似性を低減させる点置換を導入し、hLFA-1に結合する抗体の産生を防止することを意図した(RD2、配列番号81)(図5C)。点置換については、βシート構造の不安定化を避けまたは最小化しつつ、hLFA-1への類似性を低減させるために表面に露出したアミノ酸を置換した。

【0402】

hLFA-1へのホモロジー部位を改変したhLFA-1ナノ粒子の免疫原性をマウスで試験し、そのような改変を行っていないOspA-フェリチンナノ粒子に対して免疫応答を比較した(図5D)。hLFA-1ホモロジー部位を改変したナノ粒子によって誘発された抗体力価は強力であり、改変していないhLFA-1ホモロジー部位を有するナノ粒子との間に有意な差はなかった。

【実施例2】

【0403】

OspA-フェリチンナノ粒子の免疫原性の特徴解析

OspA-フェリチンナノ粒子の免疫原性を評価するため、Rib i アジュバントの存

在下の血清型 1 O s p A－フェリチンナノ粒子、または血清型 1 で脂質化された完全長の組換え O s p A を含むイヌワクチンである R E C O M B I T E K（登録商標）L y m e（B．ブルグドルフェリの精製された外表面プロテイン A（O s p A）の脂質懸濁液）で 2 回、C 3 H マウスを免疫した（図 4）。C 3 H／H e N マウスは、0 週および 4 週で筋肉内ワクチン接種した。2 回目の投与の 2 週間後から血清について E L I S A を行った。R i b b i（S i g m a 社アジュバントシステム C a t # S 6 3 2 2－1 v l）を P B S 1 m l 中に再懸濁して 1 分ボルテックスし、免疫に先立って等体積で抗原に添加した。

【0404】

抗体応答は、組換え O s p A に対する酵素連結免疫吸着アッセイ（E L I S A）を用いて決定した。簡単には、P B S で希釈した $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の O s p A－H i s で 96 ウェルプレートにコートし、4℃で終夜インキュベートした。O s p A－H i s を除去し、P B S T に溶解した 5% のスキムミルクでプレートをブロックした。ブロッキング試薬を除去した後、一次血清サンプルを P B S T で連続的に希釈して加えた。最終的に 50% のブロッキング溶液濃度になるよう、一次サンプルをブロッキング溶液に等体積で加えた。1 時間インキュベートした後、P B S T でプレートを洗浄し、H R P 連結ヤギ抗マウス I g G 二次抗体（ブロッキング溶液中 5,000 倍希釈）と室温で 1 時間インキュベートした。二次抗体を吸引除去し、洗浄して、プレートを S u r e B l u e T M B ペルオキシダーゼ基質（K P L 社、G a i t h e r s b u r g, M D）とインキュベートし、続いて等体積の停止溶液（0.5 N 硫酸）を加えた。450 nm で吸光度を測定した。

【0405】

O s p A－フェリチンによる免疫は 6 週で R E C O M B I T E K（登録商標）L y m e より 4.4 倍高いエンドポイント力価を誘起した（ $p < 0.001$ ）。25 週における抗体力価も、R E C O M B I T E K（登録商標）L y m e より有意に高かった（ $p < 0.005$ ）（図 4）。

【実施例 3】

【0406】

グリコシル化変異体；有効性の評価

この O s p A－フェリチンの保護有効性を評価するため、B．ブルグドルフェリを持つダニを免疫マウスまたは対照マウスに感染させるチャレンジモデルを用いた（R o s a, P. A. ら、N a t R e v M i c r o b i o l 3（2）：129～43 頁（2005）参照）。

【0407】

C 3 H／H e N マウスに筋肉内で、A d d a V a x（商標）と 1：1 で混合した O s p A－フェリチンナノ粒子 $1 \mu\text{g}$ 、またはフェリチンナノ粒子 $1 \mu\text{g}$ をワクチン接種した。マウスは 0 週および 4 週でワクチン接種した。マウスを免疫するために、h L F A－1 ホモロジー部位に対する合理的に設計した改変および全ての潜在的な N－グリコシル部位を除去する改変を加えた血清型 1 O s p A－フェリチンナノ粒子（配列番号 53）を用いた。それは、天然に細菌で発現された O s p A はこれらの部位でグリコシル化されないからである。グリコシル化を防止するため、配列は下記：N 71 Q、N 190 Q、N 202 Q、および N 251 Q の N>Q 置換を含んでいた。その免疫原性はグリコシル化ナノ粒子と同様であった（図 13）。

【0408】

グリコシル化部位セリン／トレオニンがアラニンに変異した場合（配列番号 63）、O s p A－フェリチンのグリコシル化変異体も試験した。この構築物および上で論じた N>Q 構築物のいずれも、野生型のグリコシル化部位を有する O s p A－フェリチン（配列番号 52）と比較して強い免疫応答を生じ、R E C O M B I T E K（登録商標）L y m e 対照より優れていた（図 14）。

【0409】

ダニチャレンジモデルにおいて O s p A－フェリチンナノ粒子の保護有効性を評価するさらなる実験では、N a t i o n a l T i c k R e s e a r c h a n d E d u c

10

20

30

40

50

ation Center, Oklahoma State University (Stillwater, OK) からイクソデス・スカブラリス (*Ixodes scapularis*) ダニ幼虫 (larvae) を入手した。B. ブルグドルフェリに感染した幼虫 (ニμφ、nymphs) は、未感染の幼虫にB. ブルグドルフェリ株N40に感染させたSCIDマウスを飽食するまで吸血させることによって産生した。充血した幼虫を採取し、室温および高相対湿度で4～6週、脱皮させてニμφとした。吸血した幼虫におけるB. ブルグドルフェリ感染率は、各バッチから回収したダニの一部を培養することによって決定した。

【0410】

OspA-フェリチン (配列番号53) およびAddaVax (商標) アジュバント、または対照のフェリチンの1 μ g用量で0週と4週の2回、マウスを免疫し、並行して比較群をRECOMBITEK (登録商標) Lymeで免疫した。6週目 (すなわち2回目のワクチン投与の2週後) に5～6匹のB. ブルグドルフェリ感染ダニニμφを飽食するまで吸血させることによってマウスをチャレンジした。吸血したニμφを採取し、BSK培地中で培養することによってB. ブルグドルフェリ感染をアッセイした。チャレンジの2週後にマウスを屠殺し、耳、足首、および心臓の培養によってB. ブルグドルフェリ感染をアッセイした。B. ブルグドルフェリの存在は、暗視野顕微鏡によって培養液を観察することによって決定した。暗視野顕微鏡によって1つまたはそれ以上の臓器培養が陽性となった場合に、マウスはB. ブルグドルフェリに感染していると定義した。陰性培養もB. ブルグドルフェリに特異的なPCRによって試験した。

【0411】

2週後にマウスを屠殺した。心臓、足首、および耳からの組織サンプルをBSK培地中、B. ブルグドルフェリに対する抗生剤の存在下に6週培養した。陰性サンプルはPCRによってB. ブルグドルフェリの存在について試験した。また、陰性培養液は全てPCR陰性であった。保護は感染しなかったマウスの百分率として計算した。

【0412】

OspA-フェリチンおよびAddaVax (商標) アジュバントを含む組成物は感染を示さず (0/4)、5匹中4匹の動物が感染した陰性対照フェリチンと対照的であった (表5、 $p < 0.01$)。

【0413】

【表62】

表 5:OspA-フェリチンナノ粒子の保護有効性

抗原	マウス数/群	感染マウス数	感染率%
対照粒子	5	4	80
OspA-フェリチン+ AddaVax(商標)	4	0	0
RECOMBITEK(登録商標) Lyme	4	0	0

【実施例4】

【0414】

免疫刺激性部分にコンジュゲートしたOspA-フェリチンの有効性の評価

クリックケミストリーによってTLRアゴニスト (図6A) またはCpG (配列番号210; ISS-1018、図7A) 等の免疫刺激性部分の直接コンジュゲーションを可能にする、フェリチンナノ粒子の表面上のシステインの操作 (S111C) によって、自己アジュバント性構築物を産生した。直接コンジュゲーションの手順は下記の通りであった

。哺乳動物から生成された材料を50 mMのTris、pH 8.5中の10 mMのTCEP (Amresco社、K831-10G)で1時間還元してシステイン化を解除した。次いでタンパク質を100 mMのTris、pH 8、50 mMのNaCl中に透析してTCEPを除去した。大腸菌から生成した材料は還元する必要はない。DBCO-PEG4-マレイミドリンカー (Sigma-Aldrich社 cat # 760676、5 mg)をDMSO中で5 mg/mlに再懸濁した。リンカー2.5 mgを体積10 mlでタンパク質3 mgに加えた(最終DMSO濃度は5%であった)。リンカーを還元タンパク質と室温で30分インキュベートした。Ambicon社の100 MWカットオフフィルター濃縮器を用いて緩衝液交換により過剰なリンカーを除去した(Millipore社 Cat # UFC910096)。アジド-PEG4-3M-012(社内で合成)およびアジド-CPG (ISS-1018、IDT社によりカスタム合成)を最終のクリックケミストリーステップに用いた。最終のコンジュゲーションステップとしてアジュバント0.5 mgをタンパク質0.5 mgに加え、37℃で6時間、次いで4℃で終夜インキュベートした。Ambicon社の100 MWカットオフフィルター濃縮器を用いて緩衝液交換により過剰なアジュバントを除去した。コンジュゲーションの効率は、3M-012についてはマスマススペクトロメトリーで、CPGについてはSDS-PAGE解析で確認した。

10

【0415】

HIVのGagタンパク質に直接コンジュゲートした場合に抗体応答を増大させることが以前に示されたTLR7/8アゴニスト3M-012 (Wille-Reece, U.ら、Proc Natl Acad Sci USA 102(42); 15190~4頁(2005)参照)を用いた。2ステップクリックケミストリーアプローチを用いて3M-012を配列番号53のナノ粒子に結合させた。最初にDBCO-PEG4-マレイミドリンカーをシステインに連結し、次いで修飾した3M-012をPEG4-アジドリンカーとともに銅を含まないアジド-アルキン環化付加によって付加した(図6A)。マスマススペクトロメトリーによって99%超のコンジュゲーション効率を確認され、マシフトは587ダルトンであった(図12)。アジド-3M-012に加えて、アジド-CPGの付加にも成功した(図7A)。これについては、ゲルシフトによってコンジュゲーションが確認できた(図7B)。

20

【0416】

フェリチンのほぼ完全なコンジュゲーションが観察され、大部分のナノ粒子が24分子のアゴニストを持っていることが示唆された。次いでコンジュゲートしたOspA-フェリチンナノ粒子の免疫原性をマウスで評価した。C3H/HeNマウスを0週と4週に筋肉内でワクチン接種した。2回目の投与の2週間後から血清についてELISAを行った。免疫に先立ってアラム (Allyhydrogel '85 2%、Brenntag社、Cat # 21645-51-2)を等体積で抗原に添加した。Rib i (Sigma社アジュバントシステム Cat # S6322-1 v1)をPBS 1 ml中に再懸濁して1分ボルトックスし、免疫に先立って等体積で抗原に添加した。

30

【0417】

3M-012をコンジュゲートした粒子で免疫したマウスは、コンジュゲートしていない材料より4.5倍高いOspA抗体応答を生成した(図6B、 $p < 0.05$)。3M-012をコンジュゲートした粒子によって誘発された抗体応答は、等モル量の3M-012 (29 ng)と混合した粒子よりも大きく、1000倍高い用量 (20 μ g)の3M-012または標準のアラム (Allyhydrogel '85、2%、Brenntag社-Cat # 21645-51-2)アジュバントと混合した粒子と同程度であった。

40

【0418】

同様の抗体生成の増強がCPGをコンジュゲートしたOspA-フェリチンナノ粒子(配列番号53)で観察され、コンジュゲートしていない粒子と比較して免疫応答が6.3倍増大し、ナノ粒子と混合した等量のコンジュゲートしていないCPGに対して4.7倍増大した(図7C)。

【0419】

50

したがって、O s p A－フェリチンナノ粒子にコンジュゲートしたアジュバントの標的送達により、効果的かつ特異的な抗体応答を刺激しつつ、アジュバントの量を実質的に低減させることが可能になる。

【実施例 5】

【0420】

様々な血清型を含む O s p A－フェリチンナノ粒子の免疫原性の評価

血清型 1 O s p A 株 B. ブルグドルフェリは米国で疾患を引き起こす一方、B. アフゼリ（血清型 2）、B. ガリニ（血清型 3、5、6、7）、および B. ババリエンシス（血清型 4）は欧州、アジア、およびその他の地域で疾患を引き起こす。幅広く交差保護する組成物を産生するため、血清型 1、2、3、4、5、および 7（配列番号 1、5、6、7、8、および 10）について O s p A－フェリチンナノ粒子を設計した。これらの粒子を発現させ、大腸菌からアニオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した（図 3 A）。全ての O s p A－フェリチン抗原性ポリペプチドは予想された分子量である 47 k D a を有し、D L S 解析および透過型電子顕微鏡によっても 6 種の O s p A ナノ粒子全ての形成が確認された（図 3 B）。

【0421】

血清型 1～5 および 7 の O s p A－フェリチンのそれぞれを等モルの割合で組み合わせることによって、6 成分の組成物を産生した。

【0422】

アラムを添加したこの 6 成分の組成物（すなわち六価）の免疫原性を、同じアジュバントを添加した単一血清型の粒子（すなわち一価）とマウスで比較した（図 8 A～図 8 F）。各血清型について一価の組成物は 1 μ g 用量で、六価の組成物は 1 μ g で投与した（総量 6 μ g 用量）。免疫に先立ってアラム（A l y h y d r o g e l ' 8 5、2 %、B r e n n t a g 社－C a t # 2 1 6 4 5－5 1－2）を等体積で抗原に添加した。6 成分の組成物は O s p A 血清型 1～5 および 7 の 6 種全てに対して強力な抗体応答を誘起した。さらに、単一血清型の対照に対する応答は混合物と同様であり、6 種の血清型の組合せの中で干渉がないことが示された。血清型 4 に対し、六価の組成物において単一成分の組成物と比較して改善された免疫応答が見られた（図 8 D、血清型 4 を参照）。

【0423】

六価の組成物が免疫原性であること、およびいくつかの例では一価の組成物より優れていることが確立されたので、6 種の O s p A－フェリチンナノ粒子のそれぞれと 3 M－0 1 2 および C p G とのコンジュゲートを調製した。3 M－0 1 2 にコンジュゲートした 6 種の O s p A－フェリチンナノ粒子を組み合わせ、別に C p G にコンジュゲートした 6 種の O s p A－フェリチンナノ粒子を組み合わせることによって、2 種の 6 成分をコンジュゲートした組成物を創成した。C p G コンジュゲートした六価の組成物および 3 M－0 1 2 コンジュゲートした六価の組成物は、世界的に見出される O s p A の 7 種の血清型全てについて、コンジュゲートしていない六価の組成物と比較して抗体応答の顕著な増大をマウスで示し（図 9 A～図 9 G）、O s p A 血清型 6 ポリペプチドが組成物中に存在していないにも関わらず、六価の処方も血清型 6 に対する保護を付与していることが示された。

【0424】

非ヒト霊長類（N H P、アカゲザル）で試験すると、A F 0 3 アジュバントを添加した六価のナノ粒子組成物（非コンジュゲート）は、R E C O M B I T E K（登録商標）L y m e 対照より性能が優れており、循環するボレリア血清型 7 種全てに対して 1 1 倍～2 0 0 倍高い A b 力価を示した（図 1 0 A～図 1 0 G）。マウスと同様に、六価の組成物はアジュバントの存在下で高い力価の抗体応答を誘発した。3 M－0 1 2 および C p G とコンジュゲートした組成物は N H P において R E C O M B I T E K（登録商標）L y m e 対照と同様の応答を誘起した（図 1 0 A～図 1 0 G をそれぞれ図 1 0 H～図 1 0 N と比較）。N H P における六価のワクチンの抗体力価はブースト投与の 1 9 週後も強力であり、R E C O M B I T E K（登録商標）L y m e 対照に対する優位性を保持していた（図 2 5）。

【0425】

コンジュゲートした組成物をダニチャレンジモデルでも試験した。マウスを0週および4週に1 μ gの用量の抗原でワクチン接種した。一価の組成物は3M-012にコンジュゲートしたOspA-フェリチン血清型1 1 μ gを含んでいた。六価の組成物はそれぞれ3M-012にコンジュゲートした血清型1、2、3、4、5、および7のOspA 1 μ gを含んでいた。2回目の免疫の2週後にボレリア・ブルグドルフェリN40株（血清型1）に感染させた5～6匹のダニを5日間、マウスにチャレンジし、2週後に屠殺した。心臓、足首、および耳からの組織サンプルを、B.ブルグドルフェリに対する抗生剤を添加したBSK培地中で6週培養した。陰性サンプルをPCRによりB.ブルグドルフェリの存在について試験した。陽性サンプルは培養またはPCRのいずれかについて陽性であった（図11）。

10

【0426】

さらに、7種の血清型全てを含む七価のワクチンをマウスで試験した。アラムもしくはAF03をアジュバントとして添加したOspA血清型1～7に対応するOspA-フェリチンナノ粒子それぞれ1 μ g（総量7 μ g）の七価OspA-フェリチンナノ粒子組成物、またはRECOMBITEK（登録商標）Lyme（1 μ g用量）で、マウスを0週および4週に筋肉内で免疫した。免疫の2週後にELISAによって測定したエンドポイント力価で抗体応答を解析した。RECOMBITEK（登録商標）と比較して強力な免疫応答が実証された（図24A～図24G）。

【0427】

このように、OspA-フェリチンナノ粒子は、7種の主要な血清型に対して高い力価の抗体応答を誘発した。さらに、7成分のライムワクチン候補は、ライム病の世界的な蔓延を制御する可能性を提示している。

20

【実施例6】

【0428】

様々な可撓性のリンカーを有するOspA-フェリチン構築物の特徴解析

OspAとフェリチンとの間に可撓性を提供するためにいくつかの異なったリンカーを試験した。構築物は1個から5個の-GGG-S-（配列番号443）配列の範囲であった。種々のリンカー構築物を精製し、均一な大きさのナノ粒子を形成した。

【0429】

GS1（GGG-S）（配列番号443）、GS2（配列番号91）、またはGS5（配列番号92）のリンカーを含むOspA-リンカー-フェリチン構築物は全て発現することができ（図15A）、矛盾のないDL5（図15B、図15C、および図15E）およびEM（図15D）のプロファイルを示した。

30

【0430】

さらに、様々な-GGG-S-リンカー構築物（配列番号443として開示される「GGG-S」）（リンカー1×GGG-S（配列番号443として開示される「1×GGG-S」）〔配列番号60〕、リンカー2×GGG-S（配列番号444として開示される「2×GGG-S」）〔配列番号61〕、およびリンカー5×GGG-S（配列番号445として開示される「5×GGG-S」）〔配列番号62〕）は全てC3Hマウスにおいて強い免疫応答を示した（図16）。

40

【実施例7】

【0431】

ルマジシンターゼOspAナノ粒子の特徴解析

もう1つのナノ粒子であるアクイフェックス・エオリクス（Aquifex aeolicus）由来のルマジシンターゼについて、OspAの抗原呈示を検討した。様々な血清型を含むOspA-ルマジシンターゼ粒子は、大腸菌細胞からアニオン交換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によって容易に精製された。OspA血清型1（配列番号12、図19A～図19C）、OspA血清型2（配列番号16、図20A～図20C）、OspA血清型3（配列番号17、図21A～図21B）、OspA血清型4（配列番号18、図17A～図17C）、OspA血清型5（配列番号19、

50

図 2 2 A～図 2 2 C)、および O s p A 血清型 7 (配列番号 2 1、図 2 3 A～図 2 3 C) からなる構築物を産生し特徴解析した。O s p A ルマジンシンターゼ粒子は E M で 1 5 . 8 n m の粒子を形成しており、D L S で大きさは均一であった。

【0 4 3 2】

O s p A 血清型 4 ルマジンシンターゼ粒子 (配列番号 1 8) をマウスで免疫原性について試験した (図 1 8)。アラムを添加しまたは添加していない O s p A ルマジンシンターゼ粒子は、同様の O s p A 血清型 4 フェリチンナノ粒子 (配列番号 7) の免疫応答と少なくとも同じく強力と思われる強い免疫応答を生じた。

【0 4 3 3】

したがって、ルマジンシンターゼおよび O s p A ポリペプチドを含む抗原性ポリペプチドも、抗 O s p A 抗体応答を誘発させるために用いることができる。

【実施例 8】

【0 4 3 4】

H A - フェリチンナノ粒子の設計、精製、および特徴解析

H A のエクストドメイン配列 (4 8 個の C 末端膜貫通残基を欠除する) をフェリチンの N 末端に融合して哺乳動物細胞中で自己集合するナノ粒子を生成させることによって、H A ナノ粒子 (H A - N p) を産生した。フェリチンは表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異 (配列番号 2 0 8 のフェリチン配列に対する S 2 6 C、A 7 5 C、または S 1 1 1 C の変異に起因する) を含み、H A - N p へのアジュバントのコンジュゲーションが可能になる。そのようなシステインの表現を図 2 7 に提示する。

【0 4 3 5】

上記の変異に起因するシステインは免疫刺激性部分をコンジュゲートするために用いることができる。図 2 8 A に、マレイミド - P E G 4 - S M 7 / 8 a クリック試薬を用いて T L R アゴニストをフェリチンにコンジュゲートする例示的な 1 ステップクリックケミストリー反応の結果を図示する。この反応では、マレイミドは対になっていないシステインと反応し、表面に露出したシステインにおいて介在するリンカーを介して T L R 7 / 8 アゴニスト分子を共有結合でフェリチンにコンジュゲートさせ、共有結合による T L R 7 / 8 アゴニスト - フェリチンコンジュゲートを生じる。本例では 1 つの単量体の表面上の 1 つのシステインを示している。フェリチンナノ粒子は多量体であり、例えば 2 4 個の単量体からなっている。したがって、フェリチンナノ粒子は単量体の数と等しい数の表面露出システインを含むことができ、表面露出システインのそれぞれがコンジュゲートすることができる。

【0 4 3 6】

図 2 8 B および図 2 9 A～図 2 9 B に、アジュバントをフェリチンナノ粒子にコンジュゲートするために用いることができる例示的な 2 ステップクリックケミストリー、ならびに C p G および 3 M - 0 1 2 (3 M 0 1 2 と称することもある) が中間二官能性リンカーを介する 2 ステップクリックケミストリー反応によってどのようにしてフェリチンにコンジュゲートさせることができるかを示す。例示的なリンカーは、マレイミドおよび D B C O 反応基を含む S i g m a 社の P E G リンカー (カタログ # 7 6 0 6 7 6) である。本例では、T L R アゴニストは反応性アジド基によって官能化される。

【0 4 3 7】

以下に記載した実験においてマスマスペクトロメトリー (M S) を用いて、コンジュゲートした免疫刺激性部分を含みおよび含まないインフルエンザーフェリチンの特徴解析する。M S に供した分析物質は、いくつかの場合にはインフルエンザーフェリチンのトリプシン消化物であった。トリプシンは一般に、プロリンが後に続く場合を除いて、リシンおよびアルギニン残基の後で切断する。しかし、構成したナノ粒子 (指示したトリプシン部位の C 末端) は、タンパク質分解に耐性がある。天然の条件下で配列番号 3 1 4 等のウシガエル - H . ピロリフェリチン構築物においてトリプシンによって切断される最遠位 (C 末端) のトリプシン部位を図 3 0 に示す。このように、トリプシン消化は M S 解析に好適なタンパク質分解耐性のフェリチン粒子を放出する。

10

20

30

40

50

【0438】

したがって、リンカー配列がトリプシンにより接近可能であるという前提で、切断されていないポリペプチドの中のN末端抗原の存在とは関係なしに、トリプシン消化およびそれに続く単純化されたMS解析を用いてナノ粒子へのコンジュゲーションを評価することができる。本方法は、糖タンパク質抗原がMS解析に提起する複雑さを克服するために考案された。例えば、H1/Stem-NpがMSによって解析できるのは、そうでなければPNGase処理の後のみである（図33A）。

【0439】

以下のインフルエンザ株からのHA配列をヘリコバクター・ピロリーウシガエルハイブリッドフェリチンのN末端に遺伝子的に融合してHANANO粒子を構築した。A/フォートマンモス/1-JY2/1947 (GenBank CY147342、アミノ酸1~518、Y108F)；A/マレーシア/302/1954 (GenBank CY009340.1、アミノ酸1~518、Y108F)；A/デンバー/1957 (GenBank CY008988、アミノ酸1~517、Y108F)；A/香港/117/1977 (GenBank CY009292、アミノ酸1~518、Y108F)；A/ニューカレドニア/20/99 (GenBank AHJ09883.1、アミノ酸1~518)；A/カリフォルニア/4/2009 (GenBank AHJ09884.1、アミノ酸1~518)；COBRA P1 (米国特許出願公開第20150017196A1の配列番号302、アミノ酸1~518、Y108F)、およびCOBRA X6 (米国特許出願公開第20140127248A1、アミノ酸1~517、Y108F)。COBRA P1およびCOBRA X6は、階層的配列平均化 (Carter DMら、J Virol 90:4720~4734頁 (2016)) のコンピュータ法によって産生した。COBRA X6は1999年~2012年にわたるヒトH1N1インフルエンザ配列から、またCOBRA P1は1933年~1957年および2009年~2011年にわたるヒトH1N1株ならびに1931年~1998年にわたるブタH1N1インフルエンザ株から産生した (Carter、2016)。HA-フェリチン遺伝子は哺乳動物での発現のために、ATG開始コドンの前のgccacc kozak配列とともにSIB002ベクターのXbaI/BamHI部位にクローニングした。全ての配列はヒト細胞株での発現のためにコドン最適化した。

【0440】

HA-NpプラスミドをPowerprepキット (Origene社カタログ#NP100009) で精製して、Exp293細胞 (ThermoFisher社カタログ#A14635) にトランスフェクトするために用いた。FectoPRO DNAトランスフェクション試薬 (Polypplus社#116-100) を標準的条件 (DNA 0.5 µg/mL、FectoPRO試薬0.75 µl/mL、エンハンサー0.45 µl/mL) で用いた。トランスフェクションの4~6日後に4℃で15分、3,488gで遠心分離することによって、Exp293の上清からナノ粒子を回収し、0.45 µmの真空駆動フィルターユニット (Thermo Scientific社カタログ#167-0045) を通して濾過した。HA-Npを重力流でQ-Sepharose Fastフローカラム (GE社カタログ#17051001) に通過させ、フロースルーを採取し、水で3倍に希釈し、Tris緩衝液pH8.5を加えて最終濃度50mMになるようpHを調節した。あるいは、最初のQ-Sepharoseカラムを用いる代わりに、上清を緩衝液A (50mM Tris、pH8.5、5mM NaCl) で5倍に希釈した。次いでサンプルをQ-Sepharoseカラム (HiTrap Q HP、GE社カタログ#17115401) に負荷し、カラム体積の30倍の緩衝液A (50mM Tris、pH8.5、5mM NaCl) と緩衝液B (50mM Tris、pH8.5、1M NaCl) の0~60%の混合物のNaCl勾配でタンパク質を溶出させた。HANANO粒子タンパク質分画を採取し、Amicon Ultra-15遠心フィルターユニット (Millipore社カタログ#UFC910024) で濃縮し、リン酸緩衝食塩液中のSuperose6カラムPG XK 16/70、60~65cm (カタロ

10

20

30

40

50

グ###90100042)を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。最終分画を濃縮し、0.22 μmのフィルター(Millipore社SLGV004SL)を通して濾過滅菌した。エンドトキシンフリーの溶液を用い、検出限界0.05 EU/mlのLALカートリッジを備えたCharles Rivers Endosafe PTS装置を用いて最終タンパク質を試験した。

【0441】

H1/Stem-Np(配列番号343、図31A)およびH5/COBRA-Np(配列番号332、図31B)のトリプシン消化を示す。両方の例では、トリプシン消化による分子量のシフト(「+」で示す)は、SM7/8aの分子量(711ダルトン)に相当する。したがって、これらのデータは、表面に露出したシステインを含むフェリチンナノ粒子へのSM7/8aのコンジュゲーションが成功したことを示している。

10

【0442】

マレイミド-PEG4-SM7/8aのような低分子量の分子へのコンジュゲーションの後のフェリチンナノ粒子の質量変化の決定は、トリプシン処理なしにPNGaseを用いてH1/Stem-Npのグリコシル化を除去するゲルシフト実験(図32A)では明確でない。図32Bに示すように、トリプシン処理によって、SM7/8aのような小分子のH1/Stem-Npへのコンジュゲーションをゲルシフトアッセイで確認することが可能になる。CpGのような分子量がより高い分子のコンジュゲーションは、脱グリコシル化されたH1/Stem-Npのゲルシフトアッセイによって(図32A)、および天然の条件下でのトリプシン消化によってH1/Stem-Npから放出されたフェリチンナノ粒子のゲルシフトアッセイによって、観察することができる。したがって、天然の条件下でのフェリチンナノ粒子のトリプシン消化を用いることによって、これらの分析アッセイに干渉する可能性がある特性を有する所与の抗原について、さもなければゲルシフトまたはマスマスペクトロメトリー(MS)実験で解析することが困難なプラットフォーム技術としての、TLRアゴニストがコンジュゲートするコア断片の特徴解析の方法が提供される。

20

【0443】

SM7/8a-PEG4-マレイミドをH1/Stem-Npにコンジュゲートし、分析目的のためのみにPNGase処理を行った後、MS上のコンジュゲーション生成物は42930Daの質量を有することが分かった。これはコンジュゲートしていないH1/Stem-Npよりほぼ715kDa重かった(図33A)。トリプシン消化の後、還元したフェリチンナノ粒子は19510Daの質量を有していた(ナノ粒子のH1/Stem部分の切断に基づく)(図33B)。コンジュゲーションの後、トリプシン消化したコンジュゲートしたナノ粒子の質量もほぼ715kDa重かった。したがって、図33Aおよび図33Bはいずれも、アジュバントを含むリンカーのフェリチンナノ粒子へのコンジュゲーションにおけるコンジュゲーション効率は約100%であることを支持している。

30

【0444】

マレイミド-PEG4-DBCOリンカーを2ステップのクリックケミストリー反応でH1-stem-Npにコンジュゲートした。このとき、マレイミドはフェリチンナノ粒子の表面上に露出したシステインと反応し、トリプシン消化後のMS解析によって、リンカー付加の分子量であるほぼ675Daと符合する質量増加が見られた(図34)。

40

【0445】

次に、アジド-CpGをH1/Stem-Np-PEG4-DBCO中間体(図35において「Mal-PEG4-DBCO後」とラベル)に添加した。これは、ゲルシフトアッセイによって確認した。アジド-CpGはIDT社に発注した(配列番号345)。SDS-PAGEの前に、コンジュゲートおよび対照をPNGaseで処理した。CpGのコンジュゲーションは、付加された質量(約7.5kDa)のために、リンカーのコンジュゲーションと比較して上方へのゲルシフトを生じた。「Stem-Np-CpG」および「Stem-Np」とラベルした2つのバンドのデンストメトリーによって定量したコンジュゲーション効率50%の例を図36に示す。Stem-NpはH1/Stem-N

50

p（配列番号343）である。未処理は還元前のH1／Stem-Npを意味する。TCEP-還元は3mMのTCEPと室温で1時間処理し、PBSに対して4℃で終夜透析したH1／Stem-Npを意味する。

【0446】

コンジュゲーションを評価するためにタバコエッチウイルス（TEV）プロテアーゼ切断部位（配列番号344）も用いた。2ステップクリックケミストリープロセスを用いて3M-012を種々のNC99 HA-TEV-Np構築物（配列番号309～312）にコンジュゲートした。2mMまたは10mMのTCEPを用いてHA-TEV-Np構築物を還元した。TCEPはTRIS緩衝液（100mM TRIS、pH8.0、50mM NaCl）への透析（MWCO 10kDaの3mLの透析カセット、Thermo社#87730）によって除去した。DBCO-PEG4-マレイミドリンカー（Sigma社#760676）を加えた。緩衝液をPBS7.4に変更しつつ過剰なリンカーを超濾過（MWCO 100kDa、Millipore社Amicon#UFC810024または#UFC910096）によって除去した。最後に、アジド官能化TLRアゴニスト（CpGまたは3M-012）を分子にクリックした。超濾過（MWCO 100kDa、Millipore社Amicon#UFC810024または#UFC910096）またはゲル濾過によって過剰な薬物を除去した。HA-TEV-Npの中のTEV切断部位により、コンジュゲーションの解析のためのTEVによる選択的切断が可能になる。

【0447】

3M-012（リンカー約500Da＋約600Da）のHA-TEV-Np構築物へのコンジュゲーションの後、構築物をTEVで処理した。TEV切断の後、ゲルシフトSDS-PAGE上の得られたHAバンドは約57kDaとグリカンおよびFerrの約20kDaである（図36、「+TEV」とラベルしたレーン）。約20kDaおよび21kDaの二重のバンド（「S26C」、「S72C」、「A75C」、および「S111C」（それぞれ配列番号310、311、312、および309）は、コンジュゲーションの成功を示している。コンジュゲーションの有効性はバンドの強度に対応し、ここで低いバンドはコンジュゲートされていないフェリチン、高いバンドはコンジュゲートされたフェリチンである。

【0448】

S111Cを含むH1／Stem-Npは293Exp1細胞中に発現されると109ダルトン（システイン化に符合する）の翻訳後改変を有することが見出された（図37A）。これは、反応性チオールを遊離させるための3mM濃度のTCEP（トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン）との室温、1時間の還元によって除去した（図37B）。したがって、改変部位を還元して表面に露出したシステインを遊離のチオールとして露出することができ、これは市販のリンカーまたはカスタム化された小分子の上のマレイミド基との反応性が極めて高い。

【0449】

MSデータによっても、3M-012のHA-Npへのコンジュゲーションが成功したことが確認された。HA-TEV-Np-S26C（配列番号310、図37C）、A75C（配列番号312、図37D）、またはS111C（配列番号309、図37E）。A75CおよびS111Cのフェリチン改変を含むナノ粒子（それぞれ配列番号312および309）は、3M-012への95%を超えるコンジュゲーションを示した。したがって、MSデータは、アジュバントをフェリチンの変異に起因する種々の表面露出システインに連結して、アジュバントに連結された抗原性フェリチンポリペプチドを成功裏に産生できることを示している。

【0450】

陰性染色電子顕微鏡（EM）から、コンジュゲーションがナノ粒子の一体性に影響しないことが確認された。H1／Stem-Np（配列番号343）単独（図38A）、マレイミド-PEG4-SM7/8aにコンジュゲートされたH1／Stem-Np（図38

B)、C p GにコンジュゲートされたH 1 / S t e m - N p (図 3 8 C)、N C 9 9 H A - N p (配列番号 3 0 9) 単独 (図 3 8 D)、D B C O - マレイミドリンカーを介して 3 M - 0 1 2 にコンジュゲートされたN C 9 9 H A - N p (図 3 8 E)、およびD B C O - マレイミドリンカーを介してC p GにコンジュゲートされたN C 9 9 H A - N p (図 3 8 F) を示す。さらに、マレイミド - P E G 4 - D B C O リンカーを介するT L R 7 / 8 アゴニスト (マレイミド - P E G 4 - S M 7 / 8 a、図 3 8 A) またはT L R 9 アゴニスト (C p G、図 3 8 B) のH 1 / S t e m - N p へのコンジュゲーションは、動的光散乱 (D L S) による測定で、コンジュゲートしていないH 1 / S t e m - N p と比較して、ナノ粒子の一体性に影響しない (図 3 9 C)。

【0451】

これらのデータは、フェリチンおよびH A ポリペプチドを含む抗原性ポリペプチドの調製が成功したことを実証している。さらに、アジュバントを含むリンカーをこれらのフェリチンナノ粒子に成功裏にコンジュゲートすることができる。

【実施例9】

【0452】

H A - フェリチンナノ粒子組成物の免疫原性の特徴解析

種々のアジュバントおよびH 1 / S t e m - N p へのT L R アゴニストのコンジュゲーションのH 1 / S t e m - N p 組成物の免疫原性に対する影響を評価した。図 4 0 A に、H 1 / S t e m - N p T L R 7 / 8 アゴニストコンジュゲートによる免疫で誘起されたH 1 / ニューカレドニア / 1 9 9 9 (N C 9 9) H A 三量体に対するI g G 抗体力価を示す。H 1 / S t e m - N p 1 0 μ g を、アジュバントなしに、等モル量の遊離S M 7 / 8 a アジュバント (8 3 . 3 n g) と混合して、高用量の遊離S M 7 / 8 a アジュバント (2 1 . 8 4 μ g) と混合して、または体積比 1 : 1 のP A A もしくはA F 0 3 アジュバントと、0 週および3 週で投与した。H 1 / S t e m - N p - S M 7 / 8 a コンジュゲートは、他のアジュバントなしに投与した。2 回目の投与の2 週後に血清をアッセイした。図 4 0 B に、H 1 / S t e m - N p T L R 9 アゴニストコンジュゲートによる免疫で誘起されたH 1 / S t e m 三量体に対するI g G 抗体力価を示す。H 1 / S t e m - N p 1 0 μ g を、アジュバントなしに、等モル量の遊離C p G アジュバント (8 5 0 n g) と混合して、高用量の遊離C p G アジュバント (2 0 μ g) と混合して、または体積比 1 : 1 のA F 0 3 アジュバントと、0 週および3 週で投与した。H 1 / S t e m - N p - C p G コンジュゲートは、他のアジュバントなしに投与した。2 回目の投与の2 週後に血清をアッセイした。

【0453】

図 4 0 A のデータは、S M 7 / 8 a とコンジュゲートしたH 1 / S t e m - N p が、ポリアクリル酸 (P A A) またはA F 0 3 アジュバントと混合したコンジュゲートしていないナノ粒子と同程度の免疫原性を示すことを示している。フェリチンナノ粒子に直接コンジュゲートしたS M 7 / 8 a は、フェリチンナノ粒子とは別の化合物として投与した等モル用量のS M 7 / 8 a (「等モル混合」) よりも効果的であった。さらに、フェリチンナノ粒子に直接コンジュゲートしたS M 7 / 8 a は、フェリチンナノ粒子とは別の化合物として投与した高用量のS M 7 / 8 a (「高用量混合」) よりも効果的であった。したがって、H A ポリペプチドおよびフェリチンを含む抗原ポリペプチドにS M 7 / 8 a をコンジュゲートすることによって、この化合物は免疫原性かつ自己アジュバント性になった。自己アジュバント性組成物を投与することによって、別個のアジュバントを低減または排除することができた。同様に図 4 0 B は、T L R 9 アゴニストC p G をH 1 / S t e m - N p にコンジュゲートすることによって、コンジュゲートしていない等モル混合物の対照と比較して、混合したC p G 分子を 2 3 倍高い用量で投与した場合に匹敵するレベルまで、その免疫原性が改善されることを示している。

【0454】

血清は、H 1 / ニューカレドニア / 1 9 9 9 (N C 9 9) H A / N A シュードタイプ化レンチウイルスを *i n v i t r o* で中和する能力についても評価した。シュードタイプ

10

20

30

40

50

化中和アッセイは以前記載されたように実施した (Kanekiyoら、Nature 499:102~106頁 (2013))。簡単には、Protection Mammalian Transfectionキット (Promega社カタログ#E1200)を用い、5種のプラスミド、すなわちHA 400 ng、NA 100 ng、TMPRSS2 50 ng、CMVΔR8.2 7 μg、およびpHR'CMV-Luc 7 μgのトランスフェクションによってレンチウイルスをHEK293T細胞にパッケージした。トランスフェクションの48時間後および72時間後にウイルス粒子を採取し、0.45 μmのフィルターを通して濾過した。

【0455】

マウス (n=5/群) を、3週の投与間隔で2回免疫した。3M-012にコンジュゲートしたNC99 HA-Np (配列番号309) (HA-Ferr-3M-012、0.22 μg/用量) を、混合した対照と並行して投与した。対照は、NC99 HA-Np (0.22 μg/用量) と3M-012 10 μgの混合物 (典型的な治療用量)、および別にNC99 HA-Np (0.22 μg/用量) と3M-012 1.7 ngの混合物 (コンジュゲートと等モルで一致) とした。HA含量 (HA 0.17 μg/用量) を一致させて投与したコンジュゲートしていないNC99 HA-Npおよび不活化インフルエンザワクチン (IIV) を追加の対照とした。5週目に、これらのマウスからの血清を段階希釈して、指示された株からのHAおよびニューラミニダーゼ (NA) 遺伝子でシュードタイプ化したレンチウイルスに対する中和活性についてアッセイした。希釈の範囲の抗血清を固定された量のレンチウイルスと前インキュベートし、標的の293A細胞に感染させるために用いた。感染はPromega Luciferase Assay System (カタログ#E1500) を用いて72時間後に定量した。これらの中和曲線からGraphpad Prismソフトウェアを用いてIC₅₀値を計算し、PsVの50%中和を達成する血清希釈係数を決定した。エンドポイント力価 (ELISA) および血球凝集阻害 (HAI) 力価も、それぞれ5週目と8週目に決定した。例示的なELISAおよびHAIの手順については以下の実施例を参照されたい。全てのサンプルは3重測定した。

【0456】

ELISAのエンドポイント力価 (図41A) またはシュードウイルス中和IC₅₀力価 (図41B) に基づいて、3M-012にコンジュゲートしたNC99 HA-Npは、一致させた混合物、コンジュゲートしていない粒子、またはIIVよりも強い結合および中和抗体応答を誘起した。HA-Np-3M-012コンジュゲートは、等モル混合の対照より有意に強いHAI力価 (図41C) をも誘起した。さらに、HAI力価はコンジュゲートしていないHA-FerrおよびIIVよりも3.7倍および1.6倍高かったが、これらの結果は有意ではなかった。

【0457】

H1/Stem-Np-TLRアゴニストコンジュゲートの免疫原性も、非ヒト霊長類モデルで評価した。USDAの規制およびAnimal Welfare Actを含む全ての連邦規制を順守して、Bioqual Inc. 社によって12匹のカニクイザル (Macaca fascicularis) を収容し、世話した。動物は事前スクリーニングし、ELISAによって2016~2017年のFluzone Quadrivalent抗原 (A/カリフォルニア/07/2009; A/香港/4801/2014 X-263B; B/プーケット/3073/2013; B/ブリスベン/60/2008) への反応性がないことで選択した。NHP対象 (雌10匹、雄2匹) (5~13年齢、体重3.5 kg~7.8 kg) を各免疫群 (n=3匹/群) にランダムに割り付けた。各群に、H1-SS-npとAF03 50 μg、またはH1-SS-np (アジュバント対照なし) 200 μg、またはH1-SS-np-SM7/8コンジュゲート 200 μg、またはH1-SS-np-CpG 200 μgのいずれかを0週、4週、および10週に3用量投与した。血清を単離するため、0週、2週、4週、6週、8週、10週、および12週に血液サンプル10 mLを採取した。PBMCを単離するため、0週、2

週、5週、6週、および12週に血液サンプル10～16 mLを採取した。血清およびPBM Cを単離し、標準的な操作手順に従って凍結保存した。カニクイザルを、AF03アジュバントを混合して処方したH1/Stem-Np 50 μ g、またはH1/Stem-Np (アジュバント対照なし) 200 μ g、またはH1/Stem-Np-SM7/8aコンジュゲート (図28Aに示す) 200 μ g、またはH1/Stem-Np-CpGコンジュゲート (図28Bに示す) 200 μ gのいずれかで0週、4週、および10週に免疫するように割り付けた。種々の時点で単離した血清を、ELISAによる抗HA抗体力価について (図50A)、ならびにH1サブタイプHAおよびNA (図50B) またはH5サブタイプHAおよびNA (図25C) でシュードタイプ化したレンチウイルスの中和について、アッセイした。これらを合わせて、図50A～図50Cに示す結果は、TLR-アゴニストのコンジュゲーションが非ヒト霊長類モデルにおけるH1/Stem-Npの免疫原性を改善することを実証している。このモデルでは、TLR7/8アゴニストコンジュゲートはCpGコンジュゲートよりも高い力価を生じるようであり、AF03混合アジュバントは試験した条件において最高の力価を誘発した。

【0458】

CpGにコンジュゲートしたNC99 HA-Np (配列番号309) (HA-Ferr-CpG、0.22 μ g/用量) の免疫原性も、混合した対照 (HA-Np (0.22 μ g/用量) とCpG 20 μ gの混合物 (典型的な治療用量) およびHA-ferr (0.22 μ g/用量) とCpG 21 ngの混合物 (コンジュゲートと等モルで一致)) と比較して評価した。HA含量 (0.17 μ g HA/用量) を一致させて投与したコンジュゲートしていないHA-NpおよびIIVを追加の対照とした。上記のように0週と3週に投与した。ELISAおよびPsVアッセイはブーストの2週間後から血清について実施し、ブーストの5週間後の血清についてHAIを実施した。全てのサンプルは3重測定した。

【0459】

ELISAのエンドポイント力価 (図42A) またはシュードウイルス中和IC₅₀力価 (図42B) に基づいて、コンジュゲートは、一致させた混合物、コンジュゲートしていない粒子、またはIIVよりも強い結合および中和抗体応答を誘起する。HA-Np-CpGコンジュゲートは、等モル混合の対照より有意に強いHAI力価 (図42C) を誘起する。さらに、HAI力価はコンジュゲートしていないHA-FerrおよびIIVよりも2.6倍および3.0倍高かったが、これらの結果は有意ではなかった。

【0460】

次に、より高い用量で与えた場合に3M012コンジュゲートの免疫原性が改善されるか否かを決定した。これを行うため、コンジュゲート、等モル混合物、高用量混合物、コンジュゲートしていないナノ粒子を、HA-NPの用量を0.1 μ g、0.5 μ g、2.5 μ g、および12.5 μ gとして試験した (図51A～図51B)。HA-NPの用量0.1 μ gおよび0.5 μ gでは、高い混合用量の場合を除いて中和およびHAIアッセイにおいて最小の応答が見られた。2.5 μ gの用量では、コンジュゲートしていないHA-NPおよびHA-NPと3M012の等モル混合物はいずれも最小限の抗体応答を誘起した。高用量の混合物群と比較すると、3M012をコンジュゲートしたHA-NPは3M012の含量が5000分の1以上少ないにも関わらず、同様の抗体応答を誘起し、直接のコンジュゲーションおよびTLRアゴニストの標的送達の有効性が立証された。

【実施例10】

【0461】

候補ポリペプチドを含むナノ粒子のEMおよびDLSによる特徴解析

上に概要を示したプロセスを用いて、図26Aに提示するインフルエンザポリペプチドを含むHA-Npを発現し、培地中に放出した (HA部分の配列アライメントを図26Aに示し、デンドグラムを図26Bに示す)。図26B中の矢印は候補ポリペプチドを示す。図43Aに列挙するHA-Npはアニオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィーによって293Exp i細胞培養上清から精製した。ナノ粒子の生成に成功したことを確認

するクーマシー染色の結果を図43Bに示す。

【0462】

電子顕微鏡（EM）および動的光散乱（DLS）解析は、下記のように実施した。

【0463】

動的光散乱はWyatt社のDynaPro Plate Reader IIを用いて25℃で測定した。精製したHA-Npは動的光散乱で予想された16～18nmの大きさを呈した（図43A、「サイズ」尺度で示す）。ナノ粒子の形成は陰性染色透過型電子顕微鏡（TEM）でも確認された（図43C）。EMのために、グロー放電に30秒曝露することによって親水化した炭素コートグリッドにHA-フェリチンナノ粒子サンプルを1分間吸着させた。過剰な液体を濾紙（Whatman社#1）で除去し、サンプルを0.75%のギ酸ウラニルで30秒染色した。過剰なギ酸ウラニルを濾紙で除去した後、グリッドをTecnaig² Spirit BioTWINで検査し、AMT 2k CCDカメラで画像を記録した。

10

【実施例11】

【0464】

分岐したH1N1インフルエンザウイルスの代表的なパネルに対する単一株HA-フェリチンナノ粒子の免疫原性

特定のウイルス株からのHA-Npの免疫原性を検討するため、目的の株からのナノ粒子でマウスを2回免疫し、第2の免疫の3週後に血球凝集素阻害アッセイ（HAI）を用いて血清をアッセイした。全ての免疫は動物の取り扱いのための確立されたガイドラインに従った。Balb/cマウス（5匹/群）を0週および3週にHA-フェリチンナノ粒子220ng（HA含量170ng）で、および適用可能な場合には筋肉内注射（後ろ足あたり50μL）の直前に1:1でアジュバントと混合して、免疫した。Ribi（Sigma社アジュバントシステムカタログ#S6322-1v1）またはAF03（Sanofi Pasteur社）を図の凡例に指示するように用いた。二価、三価、および四価の組合せについては、注射の前に各ナノ粒子220ngを事前混合した。ブースト注射の2週および3週後に血清を採取した。

20

【0465】

インフルエンザシードストックを用いるHA阻害アッセイ（HAI）は、Centers for Disease Control and Prevention（Atlanta, Georgia, USA）から入手した。免疫血清は血清1部を酵素3部で希釈することによる受容体破壊酵素（RDE）で前処理し、37℃の水浴中で終夜インキュベートした。酵素は56℃、30分のインキュベーションおよびそれに続いてPBS6部を添加して最終希釈10倍にすることによって不活化した。HAIアッセイは、V底96ウェルのマイクロ力価プレート中、0.5%のシチメンチョウ赤血球中の4HA単位（HAU）のウイルスを用いて実施した。HAI力価は、血球凝集の完全な阻害をもたらす血清の最大希釈度として決定した。

30

【0466】

全てのデータについて、エラーバーは所与の処置群（マウスについてn=5、フェレットについてn=12）における各動物からのサンプルをアッセイして得られた平均値の標準誤差を表す。StudentのT検定は、Microsoft社のExcelを用いて計算した。ANOVAはVassarStats（ウェブからvassarstats.net/anova.htmlで入手可能）を用いて計算した。

40

【0467】

ウイルスの進化の78年にわたる代表的な16種のインフルエンザ株のパネルを用いた。パネル中のウイルスを表2に列挙する。

【0468】

【表 6 3】

表2:HAIに用いたH1N1インフルエンザ株のパネル

H1N1 HAI インフルエンザパネル
A/プエルトリコ/1934
A/ワイス/1/1943
A/FM/1/1947
A/デンバー/1/1957
A/ニュージャージー/8/1976
A/ソ連/90/1977
A/ブラジル/11/1978
A/チリ/1/1983
A/台湾/1/1986
A/テキサス/36/1991
A/北京/262/1995
A/ニューカレドニア/20/1999
A/ソロモン諸島/6/2006
A/ブリスベン/59/2007
A/カリフォルニア/07/2009
A/バングラデシュ/2021/2012
A/ベトナム/3050/2013

10

20

【0469】

全ての例において、一致した株の強力な中和が観察された（CA09、NC99、FM47、およびHK77、図44A～図44D）。

【0470】

血清学的応答も、一致した抗原に対するELISAによって確認した（図45A～図45F）。各群に投与した免疫原を図45Aに列挙する。図45B～図45Fに示すように、ELISAには三量体を用いた。

30

【0471】

ELISAアッセイのため、Nunc社のMaxiSorp 96ウェルプレート（カタログ#44-2404-21）を100ng/ウェルの三量体HAまたは安定化されたステムタンパク質で、4℃で終夜コートし、PBST中5%のスキムミルクでブロックした。指示した通りに抗血清を希釈し、室温で1時間インキュベートし、結合した抗体を、抗マウス-HRP抗体（カタログ#NA931、5,000倍）または抗サル-HRP抗体（Southern Biotech社、カタログ#4700-05、ロット#A3814-P907、5,000倍）と5%ミルク-PBST中でこれも室温で、1時間インキュベートすることによって検出した。PBSTで5回洗浄した後、SureBlue TMB基質（カタログ#52-00-02）でHRPを発色させ、0.5Nの硫酸で停止した。吸光度は450nm（Spectramax M5）で読み取った。エンドポイント価は、閾値を0.2、典型的バックグラウンドレベルを0.05として、Graphpadプリズムで計算した。

40

【0472】

HA/NAシュードタイプ化レンチウイルスの中和も上記のようにして評価した。結果を表3に示す。試験した全ての例において、一致した株については強い中和活性が観察され、これらの値を閾値として用いた。HA-Npと相補的中和活性との組合せにより、交差反応性への加成的な拡張が導かれた。

50

【0473】

【表64】

表3:単一成分または組合せとして投与したHA-フェリチンナノ粒子による2種の免疫後のマウスにおけるHA/NAシュードタイプ化レンチウイルス(PsV)に対する中和IC50

群 #	免疫原	FM	マレーシア	香港	ニューカレ ドニア
		1947	1954	1977	1999
1	NC99 Np	<200	<200	1.8×10^3	5.8×10^4
2	CA09 Np	<200	<200	8.8×10^2	5.3×10^2
3	FM47 Np	4.2×10^5	2.1×10^4	2.8×10^4	4.8×10^2
4	HK77 Np	1.2×10^5	1.7×10^4	4.6×10^5	9.9×10^2
5	Mal54 Np	4.3×10^3	5.7×10^5	6.8×10^3	2.8×10^3
6	NC99+CA09 Np	<200	<200	2.1×10^3	6.2×10^4
7	NC99+CA09+FM47 Np	4.4×10^5	1.6×10^3	2.3×10^4	2.9×10^5
8	NC99+CA09+HK77 Np	2.8×10^5	8.9×10^3	2.1×10^5	1.5×10^5
9	NC99+CA09+Mal54 Np	1.7×10^3	1.6×10^5	2.2×10^3	1.7×10^5
10	NC99+CA09+HK77+FM47 Np	4.1×10^5	2.6×10^3	2.1×10^5	1.4×10^5
11	NC99+CA09+HK77+MAL54 Np	7.4×10^4	1.5×10^5	1.6×10^5	2.7×10^5
12	NC99+CA09+FM47+MAL54 Np	3.7×10^5	1.1×10^5	3.1×10^4	9.8×10^4
13	NC99 IIV	1.0×10^3	<200	1.6×10^3	4.8×10^4
14	CA09 IIV	<200	<200	1.6×10^3	1.0×10^3
15	NC99+CA09 IIV	1.0×10^3	<200	1.7×10^3	3.0×10^4

< 10,000

>10,000

>100,000

通常
フォント太字
フォント

イタリックフォント

【0474】

CA09 HA-Npは強い免疫応答を誘発したが、これらは、これもブタ起源でCA09と近いホモロジーを有する現代(2009年以降)の株および1976年の単離株に限られていた(図44A)(Gaydosら、2006. Emerg Infect Dis 12:23~28頁(1976)を参照)。NC99 HA-Npは1990年代後半および2000年代初期のインフルエンザウイルスに対して強力な中和を誘発した(図44B)。FM47 HA-Npに対する免疫応答は一次的には一致した株に拡張していたが、これも1977年の株への中等度の交差反応性を示した(図44C)。この交差反応性のレベルは、主として26歳以下の人が罹患した1977年の流行との臨床的関連性を有しており、1940年~1950年の流行によるインフルエンザウイルスへの曝露によって1977年の株に対する保護が付与されたことを示唆している(Kilbourne、2006)。興味深いことに、HA配列の中でHK77 HA-Npは、その交差反応性が1947年、1978年、および1983年の株に拡張しており、目を引く(図44D)。一方、MAL54 HA-NpおよびDV57 HA-Npへの免疫応答は一致した株に制限されている(図44E、図44F、および表3)。

【0475】

COBRA P1およびCOBRA X6のナノ粒子で観察された交差反応性は、それらのウイルス様粒子(VLP)の同等物と符合した(Carter DMら、J Virol 90:4720~4734頁(2016)参照)。COBRA P1 HA-Npによって誘発された免疫応答はCA09 HA-Npと同様であり(図44Aおよび図4

4 G)、COBRA X6 HA-NpはNC99 HA-Npと同様の免疫プロファイルを示した(図44Bおよび図44H)。

【実施例12】

【0476】

HA-フェリチンナノ粒子の一価、二価、三価、および四価の処方

選定したHA-Npの組合せによって誘発されたHA I 交差反応性を評価した。個別のナノ粒子を組み合わせることで作成した二価、三価、または四価の処方で、上述のようにマウスを免疫し、試験した。NC99およびCA09のHA-Npの二価の組合せは、いずれかの一価の組成物と比較して拡張した交差反応性を示した(図46A)。しかし、この二価の組合せは1934年~1957年および1977年~1991年の古い分岐した株に対しては検出可能な抗体価を誘発しなかった。COBRA X6およびCOBRA P1の二価の組合せの免疫原性は同じ傾向に従った(図46B)。この組合せはNC99/CA09の二価組成物と比較して増大した幅を示したが、いくつかの株に対するHA I 力価は中程度であった。三価の組合せについては、NC99およびCA09のHA-Npへの第3成分の含有によって、第3成分がFM47 HA-Np(図46C)またはHK77 HA-Np(図46E)の場合には交差反応性が増大したが、MAL54

HA-Np(図46D)は幅を増強しなかった。四価処方における第4成分の添加は、NC99、CA09、およびHK77のHA-Npの三価の組合せと比較して観察可能な交差反応性の付加を生じなかった(図46F~図46H)。

【0477】

様々なアジュバントを用いた場合に、類似の結果が観察された(すなわち、Rib i 対AF03、図47A~図47F)。重要なことに、様々なHA-Npの共投与による抗原の競合の証拠はなかった。これらのデータは、個別のHA I プロファイルに高度の相補性がある場合には、交差反応性プロファイルに加成性があることを示唆している。正規化したHAの用量を用いて卵から製造した不活化インフルエンザワクチン(II V)として送達したNC99およびCA09の免疫原によって得られたHA I プロファイルも測定した(図48A~図48C)。

【実施例13】

【0478】

フェレットにおけるナノ粒子組成物によるチャレンジに対する保護

ある種のHA-Np組合せの有効性を、ヒト疾患に関連する動物モデルであるフェレットで試験した。フェレット(n=12匹/群)を、リン酸緩衝食塩液(図49A)、CA09不活化インフルエンザワクチン(II V、図49B)、野生型HA-Npの三価の組合せ(NC99+CA09+HK77、図49C)、またはCOBRA P1+COBRA X6+HK77 HA-Npの組合せ(図49D)のいずれかで免疫した。筋肉内注射の前に、これらの組成物をAF03アジュバントと1:1で混合して最終注射量を1mlとした。

【0479】

2回の免疫の後、一致した株に対する顕著なHA I 力価が観察された(図49B~図49D)。ナノ粒子の組合せで免疫した両方の群のフェレットは、FM47、HK77、およびNC99に対して顕著なHA I 力価を示した。CA09 II Vはマウスで観察されたFM47およびHK77株に対する交差中和力価をフェレットでは誘発しなかった(図49B)。

【0480】

免疫の後、一致しない分岐株であるH1/フォートマンモス/1947ウイルスをフェレットにチャレンジした。インフルエンザチャレンジは2回目の免疫の4週後に50%組織培養感染用量(TCID50)の $10^{4.65}$ 倍のA/フォートマンモス/1/1947ウイルス1mlの鼻内接種で実施した。臨床兆候を2週間、毎日追跡し、チャレンジ後7日の間、鼻の洗浄液を毎日採取し、標準的なTCID₅₀アッセイによってウイルス負荷を試験した。チャレンジに続いて鼻の洗浄液からウイルス力価を定量した。三価のNC

99+CA09+HK77またはCOBRA-P1+X6+HK77のナノ粒子の組合せのいずれかを受けたフェレットのコホートでは対照群より早くウイルスが消滅し、感染後5日目のウイルス力価が顕著に低減したことを示した(図49E、 $p \leq 0.001$)。対照的に、CA09+IIVで免疫した群はPBSで免疫した対照群より顕著に早くウイルスが消滅しなかった。全ての群では、FM47株の複製に成功し、感染後1週以内に消滅した。したがって、ヒト疾患に関連する感染の動物モデルにおいて、三価の組合せは効果的なHAI応答を刺激し、これは分岐したウイルスチャレンジに対しても保護する。

【実施例14】

【0481】

EBVに対する抗体を誘発するための抗原性EBVポリペプチド

10

EBVに対する抗体を誘発する抗原性ポリペプチドを開発した。EBVのgLおよびgHのポリペプチドを一本鎖として呈示する自己集合性フェリチンナノ粒子を開発し、これらのナノ粒子のマウスにおける免疫原性を評価した。

【0482】

単量体および三量体のgL/gH構築物を発現させ、精製した。図52Aは、クーマシーおよびウエスタンブロット(抗His)解析による、Hisタグ切断を伴いまたは伴わない一本鎖のgLおよびgHの単量体(配列番号406)を示す。図52BにSuperose(登録商標)SECカラム上の吸光度のトレースとして、およびクーマシーによるgLおよびgHの三量体(配列番号411)の分画を、トロンビンプロテアーゼによるHisタグの切断を確認するためのウエスタンブロットとともに示す。配列番号406の構築物について、サンプルの最終濃度は1mg/mL、全体積は15mL、エンドトキシンレベルは1.48EU/mLであった。

20

【0483】

一本鎖gL/gHフェリチンナノ粒子(配列番号414)を発現させ、精製した。図53A~図53Eは、Superose(登録商標)6SEC分画(53A)、SEC分画のクーマシー(53B)、SEC分画の抗フェリチン一次抗体によるウエスタンブロット(53C)、動的光散乱(DLS、53D)、および電子顕微鏡(53E)による精製および特徴解析を示す。

【0484】

フェリチンに融合した一本鎖EBVのgLおよびgHの例示的な構築物を図54に示す。ツール様受容体7/8アゴニスト(TLR7/8a)等の免疫刺激性部分のためのコンジュゲート部位は、フェリチン上またはリンカー上に存在することができる(例示的な配列として例えば配列番号414、419、422、420、423、および433を参照)。

30

【0485】

様々なリンカーを含むgL/gH三量体またはナノ粒子をマウスに注射して、免疫血清を評価した(図55)。マウスには3週の投与間隔で、2μgの注射を2回、スクアレンエマルジョン系のアジュバントであるアジュバントAF03とともに投与した。6週目にELISAによって抗gL/gH抗体エンドポイント力価を測定した。gH-16-gLについては、ナノ粒子(配列番号410)が三量体構築物(配列番号416)より優れていた。gL-28-gHナノ粒子(配列番号413)は、三量体構築物(配列番号411)と顕著に異なる性能はなかった。gL-46-gHナノ粒子(配列番号414)は、gL-46-gH三量体(配列番号412)より優れていた。

40

【0486】

これらのデータは、一本鎖gL/gHナノ粒子がEBVに対して強力な免疫応答を誘発し得ることを示している。

【実施例15】

【0487】

gL/gHおよびgp220に対する二価の免疫

一本鎖のgL/gHナノ粒子およびgp220ナノ粒子を含む組成物を用いて、二価の

50

免疫を実施した。g p 2 2 0 ナノ粒子（配列番号 4 0 1）を含ませることは、上述のようにワクチン接種したマウスの血清を用いる E L I S A 結合アッセイによって測定して、一本鎖 g L / g H ナノ粒子（g L - g H - C 5 N P [配列番号 4 1 9]）によって誘発された免疫応答に対して顕著な干渉効果を有しなかった（図 5 6 A ~ 図 5 6 B、それぞれ個別の希釈および結合力価における測定を示す）。同様に、一本鎖 g L / g H ナノ粒子と組み合わせて投与した場合、E L I S A によって測定して、g p 2 2 0 ナノ粒子への免疫応答に対する応答において干渉は観察されなかった（図 5 7 A ~ 図 5 7 B、それぞれ個別の希釈および結合力価における測定を示す）。

【0488】

したがって、一本鎖 g L / g H ナノ粒子および g p 2 2 0 ナノ粒子の両方による免疫は、いずれのポリペプチドに対する免疫応答も低減しなかった。

【実施例 16】

【0489】

フェリチンナノ粒子へのアジュバントのコンジュゲーション

次に、フェリチンナノ粒子へのアジュバントのコンジュゲーションを評価した。図 5 8 A に、その中のフェリチンが表面に露出したアミノ酸をコンジュゲーションのために利用可能なシステインに置き換える変異を含む構築物を図示する。図 5 8 B は、P E G 4 リンカーおよびマレイミドに連結された例示的な免疫刺激性部分（S M 7 / 8 a、T L R - 7 / 8 アゴニスト）を示す。このマレイミドはフェリチンの表面に露出したシステインにリンカー（それ自体 S M 7 / 8 a に結合している）を共有結合でコンジュゲートするために用いることができる。S M 7 / 8 a にコンジュゲートされたフェリチンに融合した一本鎖 g L / g H ポリペプチドを含むポリペプチドを、図 5 8 C の電子顕微鏡写真に示す。

【0490】

表面に露出したアミノ酸の変異に起因するシステインを、図 5 9 A のフェリチン分子の構造に図示する。C p G アジュバント（配列番号 5 3 5）のフェリチンへのコンジュゲーションを、フェリチン、リンカー、および C p G アジュバントを並置し、互いに近接して結合する各部分のパーツを示すように配向させて、図 5 9 B に図示する。

【0491】

g L / g H ナノ粒子（配列番号 4 1 9）を 2 mM の T C E P を用いて還元し、次いで 1 X P B S の添加および 1 0 0 k D のミクロスピナラムを用いて T C E P を除去することによって酸化した。次いでコンジュゲーションのために S M 7 / 8 a を g L / g H ナノ粒子とインキュベートした。過剰な S M 7 / 8 a を 1 0 0 k D のミクロスピナラムによって反応から除去した。マスペクトロメトリー（M S）データより、コンジュゲートしていないポリペプチドのスペクトル（図 6 0 A）に対する主要な M S ピークのシフトに基づいて、一本鎖 g L / g H およびフェリチン（配列番号 4 1 9）を含むポリペプチドの約 1 0 0 % が S M 7 / 8 a にコンジュゲートされた（図 6 0 B）ことが示された。コンジュゲートされたポリペプチドとコンジュゲートされていないポリペプチドの質量の差は S M 7 / 8 a - リンカー - マレイミドアダクトの分子量（7 1 1 D a）に相当する。

【0492】

g p 2 2 0 ナノ粒子（配列番号 4 0 1）を 2 mM の T C E P を用いて還元し、次いで 1 X P B S の添加および 1 0 0 k D のミクロスピナラムを用いて T C E P を除去することによって酸化した。次いでコンジュゲーションのために S M 7 / 8 a を g L / g H ナノ粒子とインキュベートした。過剰な S M 7 / 8 a を 1 0 0 k D のミクロスピナラムによって反応から除去した。M S データより、コンジュゲートしていないポリペプチドのスペクトル（図 6 1 A）に対する主要な M S ピークのシフトに基づいて、g p 2 2 0 およびフェリチン（配列番号 4 0 1）を含むコンジュゲートされたポリペプチドの約 1 0 0 % が S M 7 / 8 a にコンジュゲートされている（図 6 1 B）ことが示された。

【0493】

電子顕微鏡（E M）データからも、一本鎖 g L / g H およびフェリチンを含むポリペプチド（図 6 2 A におけるコンジュゲートしていないサンプルと比較した図 6 2 B）または

10

20

30

40

50

g p 2 2 0 およびフェリチンを含むポリペプチド（図 6 2 C におけるコンジュゲートしていないサンプルと比較した図 6 2 D）への S M 7 / 8 a のコンジュゲーションがナノ粒子の集合を破壊しなかったことが確認された。

【0494】

一本鎖 g L / g H を含むナノ粒子（g L _ g H _ C 5 NP、図 6 3 A および図 6 3 B）または g p 2 2 0 を含むナノ粒子（図 6 4 A および図 6 4 B）1 μ g で免疫した後の E L I S A によって抗体応答をアッセイした。ナノ粒子は裸のフェリチン 1 μ g と組み合わせ、S M 7 / 8 a にコンジュゲートしたものとししないものであった。コンジュゲートしていないナノ粒子は混合した A F 0 3 アジュバントとともに、またはそれなしに投与した。それぞれのマウスは上述のナノ粒子組成物 1 0 0 μ L の投与を受けた。A F 0 3 アジュバントの投与を受けるマウスについては、体積比 1 : 1 で A F 0 3 とナノ粒子を混合した。B A L B / c マウス（n = 5 / 群）を 3 週の投与間隔で 2 回免疫した。5 週目に E L I S A 解析のために血液を採取した。最も強力な E L I S A 応答は A F 0 3 アジュバント中で投与したナノ粒子で見られた。S M 7 / 8 a へのコンジュゲーションは、アジュバントなしのコンジュゲートしていないナノ粒子と比較してより強力な E L I S A 応答を生じた。

10

【0495】

S M 7 / 8 a にコンジュゲートした g L _ g H _ C 5 ナノ粒子および S M 7 / 8 a にコンジュゲートした g p 2 2 0 ナノ粒子それぞれ 1 μ g の共投与の効果も、裸のフェリチンナノ粒子を伴ういずれかのナノ粒子の単独の投与と比較して、図 6 5 A ~ 図 6 5 B および図 6 6 A ~ 図 6 6 B で評価した。一本鎖 g L / g H（図 6 5 A ~ 図 6 5 B、それぞれ A F 0 3 なしおよびあり）または g p 2 2 0（図 6 6 A ~ 図 6 6 B、それぞれ A F 0 3 なしおよびあり）のいずれに対する免疫応答に対しても干渉は観察されなかった。

20

【実施例 17】

【0496】

長期免疫原性の検討

一本鎖 g L / g H（g L / g H _ C 5、配列番号 4 1 9）を含むナノ粒子を投与した 3 カ月後の免疫原性を評価する検討を実施した。B A L B / c マウス（n = 5 / 群）を 3 週の投与間隔で 2 回免疫した。裸のフェリチン（すなわち、いずれのポリペプチドまたはアジュバントにもコンジュゲートしていないフェリチン）1 μ g を一本鎖 g L / g H を含むナノ粒子 1 μ g と投与し、ナノ粒子は混合した A F 0 3 アジュバントの存在下または非存在下に処方した。1 3 週目に E L I S A 解析のために血液を採取した。A F 0 3 アジュバントの投与を受けるマウスについては、体積比 1 : 1 で A F 0 3 とナノ粒子組成物を混合した。それぞれのマウスは上述のナノ粒子組成物 1 0 0 μ L の投与を受けた。数匹のマウスはその中のフェリチンが S M 7 / 8 a にコンジュゲートされた一本鎖の g L / g H を含むナノ粒子の投与を受けた（図 6 7 ~ 図 6 8 における「7 / 8 a」）。

30

【0497】

図 6 7 に示すように、S M 7 / 8 a にコンジュゲートした一本鎖 g L / g H を含むナノ粒子は、A F 0 3 中で処方すると最大の免疫応答を生じた。これらのナノ粒子についても、A F 0 3 がいない場合でも強力な免疫応答が見られた。

【0498】

一本鎖 g L / g H を含むナノ粒子の代わりに g p 2 2 0 ナノ粒子（配列番号 4 0 1）（S M 7 / 8 a へのコンジュゲーションありまたはなし）を用いて並行実験を実施した。これらのナノ粒子についても同様の結果が見られ、混合した A F 0 3 を含む処方是最も強力な応答を生じ、これらのナノ粒子についても、A F 0 3 がいない場合でも強力な免疫応答が見られた（図 6 8）。

40

【0499】

一本鎖 g L / g H を含むナノ粒子（g L / g H _ C 5、配列番号 4 1 9）および g p 2 2 0 を含むナノ粒子（配列番号 4 0 1）を含む二価の組成物によって誘発される免疫応答を評価した。B A L B / c マウス（n = 5 / 群）を 3 週の投与間隔で免疫した。各ナノ粒子 1 μ g を含むナノ粒子組成物 1 0 0 μ L を投与した。A F 0 3 アジュバントの投与を受

50

けるマウスについては、体積比 1 : 1 で A F 0 3 とワクチンを混合した。最終の 1 3 週目に E L I S A 解析のために血液を採取した。一本鎖 g L / g H (図 6 9) および g p 2 2 0 (図 7 0) に対する免疫応答については、いずれかのナノ粒子を裸のフェリチンと組み合わせて投与した場合と比較して、組み合わせたナノ粒子の投与による干渉は見られなかった。

【0500】

g L / g H _ C 5 ナノ粒子 (配列番号 4 1 9) を用いたさらなる実験により、ナノ粒子を S M 7 / 8 a にコンジュゲートした場合 (7 / 8 a)、またはナノ粒子を A F 0 3 中で処方した場合 (図 7 2) に長期の免疫応答が見られることが確認された。B A L B / c マウス (n = 5 / 群) を 3 週の投与間隔で免疫した。ナノ粒子 1 μ g を含むナノ粒子組成物 1 0 0 μ L を投与した。A F 0 3 アジュバントの投与を受けるマウスについては、体積比 1 : 1 で A F 0 3 とワクチンを混合した。2 週 (プライム)、5 週 (ブースト)、および 1 3 週 (最終) で E L I S A 解析のために血液を採取した。g p 2 2 0 ナノ粒子 (配列番号 4 0 1) を用いて並行実験を実施し、g p 2 2 0 ナノ粒子についても同様の長期応答が見られた (図 7 3)。

【0501】

一本鎖 g L / g H を含む様々なナノ粒子 (g L _ g H _ C 7、配列番号 4 2 0) も評価した。g L _ g H _ C 7 構築物は、g H ポリペプチドと、免疫刺激性部分のためのコンジュゲーション部位としてのシステインを含むフェリチンとの間の可撓性のリンカーを含む。リンカーは表面に露出したシステインを含まないフェリチンとともに用いてもよい (配列番号 4 2 0 に示すように)。S M 7 / 8 a は 2 m M の T C E P を用いてこのタンパク質を還元し、次いで 1 X P B S の添加および 1 0 0 k D のミクロスピナラムを用いて T C E P を除去することによって酸化して、g L _ g H _ C 7 にコンジュゲートした。次いで S M 7 / 8 a を g L / g H ナノ粒子とともにインキュベートした。コンジュゲートの後、過剰な S M 7 / 8 a を 1 0 0 k D のミクロスピナラムによって反応から除去した。

【0502】

7 / 8 a にコンジュゲートしまたはコンジュゲートしていないこれらの g L / g H ナノ粒子 1 μ g および裸のフェリチン 1 μ g をマウスに投与した。ナノ粒子 1 μ g を含むナノ粒子組成物 1 0 0 μ L を投与した。B A L B / c マウス (n = 5 / 群) を 3 週の投与間隔で免疫した。A F 0 3 アジュバントの投与を受けるマウスについては、体積比 1 : 1 で A F 0 3 とナノ粒子組成物を混合した。2 週 (プライム)、5 週 (ブースター)、および 1 3 週 (最終) で E L I S A 解析のために血液を採取した。これらのナノ粒子は、プライム採血における E L I S A エンドポイント力価によって測定して、A F 0 3 中で処方した場合または S M 7 / 8 a にコンジュゲートした場合に、免疫応答を誘発した (図 7 1 A)。ブースター採血 (図 6 7 C) または最終採血 (図 7 1 D) のサンプルで同様の結果が見られた。これらのナノ粒子を C p G オリゴデオキシヌクレオチドにもコンジュゲートし、同様にして投与した。C p G コンジュゲートについての結果は 5 週においてコンジュゲートしていないナノ粒子と同様であった (図 7 1 B)。

【実施例 18】

【0503】

トリコプルシア・ニイ (T r i c h o p l u s i a n i) フェリチンを含むナノ粒子の特徴解析

トリコプルシア・ニイフェリチンならびに g p 2 2 0 および / または g L / g H ポリペプチドを含むナノ粒子も開発した。トリコプルシア・ニイフェリチンナノ粒子は 1 : 1 の比で自己集合した重鎖および軽鎖を含む。軽鎖を有する 1 つの非フェリチンポリペプチドと重鎖上の別の非フェリチンポリペプチドとを組み合わせることにより、個別のナノ粒子の表面上に 2 つの異なったポリペプチドを提示することができるが見出された。したがって、例えば自己集合したトリコプルシア・ニイフェリチンナノ粒子は、g p 2 2 0 と g L / g H の両方を提示することができた。

【0504】

トリコプルシア・ニイフェリチンナノ粒子は、g p 2 2 0（配列番号4 2 4）または一本鎖 g L / g H（配列番号4 2 5）に融合した重鎖および g p 2 2 0（配列番号4 2 6）または一本鎖 g L / g H（配列番号4 2 7）に融合した軽鎖を用いて生成し精製した（構築物を図7 4 Bに図示し、クーマシーゲル染色によって図7 4 Aに可視化している。軽鎖および重鎖の単独と比較して予想される分子量の増大を示す）。それぞれ g L / g H および g p 2 2 0 に融合した軽鎖および重鎖またはその逆の組合せによって、2つの異なる E B V ポリペプチドを提示することができる個別の多価ナノ粒子が産生された。

【0 5 0 5】

重鎖と軽鎖の両方に g p 2 2 0 のみを含むもの（図7 5 Eに示す）または重鎖に g p 2 2 0、軽鎖に g H — g L を含むもの（図7 6 Eに示す）の2つの T．ニイフェリチンナノ粒子も生成した。精製は2つの工程に従った。最初の精製工程はイオン交換クロマトグラフィー工程であった（Qカラム、図7 5 Aおよびクーマシー結果の図7 5 C、ならびに図7 6 Aおよびクーマシー結果の図7 6 Cを参照）。この工程に続いてサイズ排除クロマトグラフィーを行った（図7 5 Bおよびクーマシー結果の図7 5 D、ならびに図7 6 Bおよびクーマシー結果の図7 6 Dを参照）。

【0 5 0 6】

g p 2 2 0 に融合したトリコプルシア・ニイ軽鎖および重鎖を含むナノ粒子（配列番号4 2 4および4 2 6、図7 7 Bに図示）は、クーマシー染色（図7 7 A）、裸の T．ニイフェリチン（図7 8 C）と比較した D L S 半径の増大（図7 7 D）、および裸のナノ粒子と比較してナノ粒子のコアの周囲にさらに末梢の密度が現れた E M 解析（図7 7 C）に基づいて、異種の g p 2 2 0 ポリペプチドを含むナノ粒子の形成と符合するプロファイルを示した（図7 7 B）。配列番号4 2 4および4 2 7についても、ナノ粒子中の異種の g L / g H および g p 2 2 0 ポリペプチドの存在を示す同様の結果が見られた（トリコプルシア・ニイの g L / g H ポリペプチドを含む軽鎖および g p 2 2 0 ポリペプチドを含む重鎖、それぞれクーマシー染色による可視化、構築物の図示、電子顕微鏡写真、および D L S による特徴解析について図7 7 E～図7 7 Hを参照）。比較のため、図7 8 A～図7 8 Cに裸の（すなわち、いずれのポリペプチドにもコンジュゲートしていない） T．ニイフェリチンについてのクーマシー染色（図7 8 A）、D L S 半径（図7 8 B）、および E M 解析（図7 8 C）を示す。

【0 5 0 7】

したがって、T．ニイフェリチンを用いることにより、個別のナノ粒子の上に2つのポリペプチドを提示することが可能になる。

【実施例19】

【0 5 0 8】

g H / g L / g p 4 2 構築物

フェリチンに融合した g H / g L / g p 4 2 の一本鎖構築物の概略図を（配列番号2 2 7～2 3 1および2 4 1～2 4 2のそれぞれにおいて）図8 6 Aに示す。各タンパク質の間の融合は、可撓性のアミノ酸リンカーまたは硬いアミノ酸リンカーを介している。一本鎖 g H / g L / g p 4 2 分子は、ナノ粒子上で1：1：1の比のヘテロ三量体を形成する。

【0 5 0 9】

g H / g L / g p 4 2 H i s タグ付け融合（配列番号2 2 6）の結晶構造が解明され、一本鎖 g H / g L / g p 4 2 は、天然に見出される野生型の g H、g L、および g p 4 2 タンパク質と同様のヘテロ三量体コンフォメーションをとり得ることが示された（図8 5および図8 6 B）。図8 5および図8 6 Bにおいて、G p 4 2（図8 5では暗灰色矢印を示す）は g H / g L ヘテロ二量体と相互作用する。図8 6 Cは、フェリチンに融合したこの一本鎖 g H / g L / g p 4 2 ヘテロ三量体がナノ粒子上にどのように呈示されるかのモデルである。単一のナノ粒子の上に呈示される一本鎖 g H / g L / g p 4 2 の2 4 個のコピーが存在する。

【0 5 1 0】

g H / g L / g p 4 2 N P 構築物（配列番号 2 2 7）を 2 9 3 e x p i 細胞に発現させて精製した（図 7 9 A）。C H O プールから精製した g H / g L / g p 4 2 N P は、約 2 6 . 2 n m の動的光散乱半径を有していた（図 7 9 B）。

【0 5 1 1】

一価（g H / g L / g p 4 2 N P + 裸のフェリチンナノ粒子）または二価（g H / g L / g p 4 2 N P + g p 2 2 0 N P）の組成物によって誘発された免疫応答を評価した。g H / g L / g p 4 2 N P は配列番号 2 2 7 の配列を有し、g p 2 2 0 N P は配列番号 1 の配列を有していた。B A L B / c マウス（n = 5 / 群）を 3 週の投与間隔で免疫した。各ナノ粒子 1 μ g を含むナノ粒子組成物 1 0 0 μ L を A F 0 3 アジュバント（1 : 1 の体積比で A F 0 3 をワクチンと混合）とともに投与した。ブーストは 2 回目の免疫の 5 週後に血清を採取したことを示す。5 週でマウスから採取した血清を用いて、B 細胞中（図 8 0 A）および上皮細胞中（図 8 0 B）における E B V ウイルス中和アッセイ解析を行った。一価形（裸のフェリチンと g H / g L / g p 4 2）の投与と比較して、二価処方のナノ粒子の投与による干渉は見られなかった。

【0 5 1 2】

アジュバント A F 0 3 の存在下の一本鎖 g L / g H / ナノ粒子（g L _ g H _ C 1 3 7 A _ b f p F e r r ナノ粒子 N 1 9 Q / C 3 1 S / S 1 1 1 C [配列番号 2 2]）および g p 2 2 0 ナノ粒子（配列番号 1）（図 8 1 A ~ 図 8 1 B）またはアジュバント A F 0 3 の存在下の g L / g H / g p 4 2 N P（配列番号 2 2 7）および g p 2 2 0 ナノ粒子（配列番号 1）（図 8 1 C ~ 図 8 1 E）を含む組成物を用いてフェレットの二価免疫を実施した。I n j . 1 = 注射 1（I n j . 1 の 2 週後に 6 匹のフェレットから血清を採取）。I n j . 2 = 注射 2（I n j . 2 の 2 週後に 6 匹のフェレットから血清を採取）。図 8 1 A ~ 図 8 1 E、図 8 1 F ~ 図 8 1 G に示す抗原に対する E L I S A 結合アッセイで測定したエンドポイント結合力価は、アジュバント A F 0 3 の存在下の g L / g H / g p 4 2 N P（配列番号 2 2 7）および g p 2 2 0 ナノ粒子（配列番号 1）の二価ワクチン接種を受けたフェレットの血清の（それぞれ B 細胞および上皮細胞における）E B V ウイルス中和アッセイを示す。プライム = I n j . 1、ブースト = I n j . 2。

【0 5 1 3】

g H / g L / g p 4 2 N P _ C 1 2（配列番号 2 2 8）を発現して、S u p e r o s e 6 サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した（図 8 2 A）。図 8 2 A のサンプルの動的光散乱解析により、2 0 . 6 n m の粒子半径が示された（図 8 2 B）。

【0 5 1 4】

g H / g L / g p 4 2 N P _ C 1 3（配列番号 2 2 9）を発現して、S u p e r o s e 6 サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した（図 8 3 A）。図 8 3 A のサンプルの動的光散乱解析により、1 7 . 1 n m の粒子半径が示された（図 8 3 B）。

【0 5 1 5】

g H / g L / g p 4 2 N P _ C 1 4（配列番号 2 3 0）を発現して、S u p e r o s e 6 サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した（図 8 4 A）。図 8 4 A のサンプルの動的光散乱解析により、1 6 . 9 n m の粒子半径が示された（図 8 4 B）。

【0 5 1 6】

図 8 6 D に、2 9 3 E x p i 細胞中で発現した後の配列番号 2 2 7 の精製を示す。変性 S D S クーミングゲルにより、フェリチンに融合した g H / g L / g p 4 2 がグリコシル化により 1 5 0 k D を超えることが示される。精製した生成物の陰性染色電子顕微鏡解析により、フェリチンに融合した一本鎖 g H / g L / g p 4 2 がナノ粒子を形成することに成功し、表面上に g H / g L / g p 4 2 抗原を呈示することが示される（図 8 6 E）。0 日、3 日、7 日、または 1 4 日における温度、酸化、および／または脱アミド化のストレス試験により、配列番号 2 2 7 の一本鎖 g H / g L / g p 4 2 ナノ粒子の配列解析またはマスマスプロトメトリーから潜在的な不安定配列が同定された。ワクチンの安定性を改善するため、様々な組合せ、特に表 1 に列挙した部位において、このワクチン構築物の発現および／または免疫原性、保存的なアミノ酸置換変異を配列番号 2 2 7 に加えることにな

10

20

30

40

50

る。特定の遺伝子のそれぞれの場所における保存的なアミノ酸置換は、g p 4 2 の C 末端をフェリチン配列の N 末端と融合するリンカー配列のみが配列番号 2 2 7 と異なる配列番号 2 2 8 ~ 2 3 0 においても試験することになる。

【実施例 20】

【0517】

R S V F ポリペプチドに対する改変の設計および特徴解析

他のパラミキソウイルス F タンパク質と同じく、R S V F は N 末端シグナルペプチドおよびタンパク質をウイルス表面に固定する C 末端膜貫通領域を有する前駆体タンパク質として発現される。R S V F はプロテアーゼフリンによって細胞内切断を受けて疎水性の融合ペプチド (図 8 7 A の「F P」) を放出する。融合ペプチドの役割は、感染の際に標的細胞に結合することである。融合ペプチドに隣接してヘプタッドリピート領域 A (H R A) があり、一方ヘプタッドリピート領域 B (H R B) は膜貫通ドメインに隣接している。

10

【0518】

融合前および融合後のコンフォメーションにおける R S V F エクトドメイン三量体の結晶構造によって、H R A および H R B 領域がどのように顕著な再配置を受けて細胞融合事象を促進するかが実証される (図 8 7 B) (Swanson, K. A. ら、Proc Natl Acad Sci USA 108 (23): 9619 ~ 24 頁 (2011); McLellan, J. S. ら、Science 342 (6158): 592 ~ 598 頁 (2013); McLellan, J. S. ら、J Virol 85 (15): 7788 ~ 96 頁 (2011); および McLellan, J. S. ら、Science 342 (6158): 592 ~ 8 頁 (2013) 参照)。融合前のコンフォメーションにおいて、ヘプタッドリピート A (H R A) 領域は球状のヘッドに関連しており、融合ペプチドの先端は大部分、タンパク質の中央に埋め込まれている。融合前のコンフォメーションはいくつかのヘリックスを含み、プロトマーの間のある種の接触が関与して融合前三量体を形成している。

20

【0519】

プロトマー間の安定化であるように一連のアミノ酸置換を設計した。例示的な置換には V 2 0 7 L; N 2 2 8 F; I 2 1 7 V および E 2 1 8 F; I 2 2 1 L および E 2 2 2 M; または Q 2 2 4 A および Q 2 2 5 L が含まれる。実施例における R S V F アミノ酸配列の全ての番号付けは、配列番号 5 2 6 の番号付けを用いる。

30

【0520】

ヘリックスの安定化であるようにアミノ酸置換を設計した。したがって、これらの置換は R S V F のヘリカルドメインを安定化することが予測される。例示的な置換には N 2 1 6 P または I 2 1 7 P が含まれる。

【0521】

プロトマー内の安定化であるようにアミノ酸置換を設計した。例示的な置換には V 2 2 0 I; または A 7 4 L および Q 8 1 L が含まれる。

【0522】

ヘリックスのキャッピングであるようにアミノ酸置換を設計した。例示的な置換には N 2 1 6 P または I 2 1 7 P が含まれる。

40

【0523】

凝集を減少させるようにアミノ酸置換を設計した。例示的な置換には V 1 9 2 E および L 6 1 Q が含まれる。

【0524】

N 2 2 8 F 等の疎水性アミノ酸を導入することによって空洞を満たすように他のアミノ酸置換を設計した。

【0525】

非アスパラギン残基をアスパラギンに置き換えることによってグリコシル化部位を追加するために、アミノ酸置換 E 3 2 8 N、S 3 4 8 N、および R 5 0 7 N を設計した。融合

50

前のFタンパク質の表面上の融合後のRSV Fに露出したエピトープをブロックするために非天然グリカンの付加を用いることができると仮定された(図87B)。

【0526】

目的のRSV F構築物は、N末端ウシガエルフェリチンリンカーとH.ピロリフェリチン(pFerr)を含むハイブリッドフェリチンとの一本鎖(scF)融合タンパク質として産生した(図87A)。フェリチンはK79CまたはS111Cの変異に起因する表面露出システインを含んでいた(フェリチン配列の番号付けは配列番号208に対応する)。

【0527】

当分野で公知の標準的なクローニング慣習を用いて種々のRSV Pre-F-NPおよびフェリチンコーディング配列の産生を実施した。一般的に言えば、記載した置換を有するRSV F構築物のためのDNAを合成して、Genscriptによって哺乳動物の発現ベクターにクローニングした。以前に刊行されたプロトコルと同様にRSV F DS-CAV1および融合後F三量体を産生した(McLellan, J. S. ら、Science 342(6158):592~598頁(2013)参照)。DS-CAV1構築物はRSV FのC末端三量体化ドメインを保持しており、これを空洞充填疎水性置換と組み合わせた。RSV F DS-CAV1はS155C~S290Cジスルフィドマルチネーション(DS)およびS190F~V207L(CAV1)を含んでいる。

【0528】

RSV F-フェリチンナノ粒子をコードするベクター、裸のフェリチン(RSV Fに結合していない)、およびRSV F三量体を293EXPI細胞にトランスフェクトし、4日後に馴化培地から発現生成物を回収した。RSV Fナノ粒子は従来のクロマトグラフィー法を用い、pH7.0および8.5の一連のアニオン性Qカラム精製(GE Healthcare社、Cat#17-1154-01)およびそれに続くPBS中Superose6 SEC精製(GE Healthcare社、Cat#90-1000-42)によって精製した。DS-CAV1融合前三量体および融合後三量体は-80℃で保存し、RSV Fナノ粒子は4℃で保存した。

【0529】

RSV Fナノ粒子のコンフォメーションを決定するため、電子顕微鏡を実施した。RSV Fナノ粒子調製物(25mM Tris、50mM NaCl中、30μg/mL)を400メッシュの炭素コートグリッド(Electron Microscopy Sciences社)に吸収させ、0.75%のギ酸ウラニルで染色した。80kVで操作するJEOL社の1200EX顕微鏡を用いてサンプルを解析した。顕微鏡写真は65,000倍の拡大で取得し、EM会社Nanoimaging Services, Inc.社(San Diego, CA)による当分野の従来法を用いて2Dクラス平均を調製した(図87D)。

【0530】

過渡的にトランスフェクトした293EXPI細胞(Invitrogen社)によるこれらのRSV Fポリペプチドおよびフェリチンを含むポリペプチド(配列番号501~508および511~515)の発現および分泌を、抗RSV Fウエスタンブロットによって評価した。全ての抗RSV Fウエスタンブロットは、McLellanら、Science 340(6136):1113~1117頁(2013)および米国特許第8,562,996号に記載された部位0特異的D25抗体を用いた。図88に示すように、多くの構築物の発現および分泌に成功した。

【0531】

RF8085ポリペプチド(配列番号501)は、N末端でフェリチンナノ粒子に融合した発表済みのDS-CAV1 RSV Fの一本鎖変異体を表す(McLellan, J. S. ら、Science 342(6158):592~598頁(2013)参照)。この構築物は抗原部位0を保持したRSV FのS155C~S290C二重変異体(DS)を含んでいる。

10

20

30

40

50

【0532】

R F 8 1 0 6 ポリペプチド（配列番号509）は、D S - C A V 1 に置換される2つのシステインの代わりにI 2 1 7 P置換を有している。図89に示すように、R F 8 1 0 6 構築物は4日後に抗R S V F ウエスタンブロットによる馴化培地からの評価で、過渡的にトランスフェクトした293 E X P I 細胞において顕著に良好な発現を有していた。

【0533】

R F 8 1 0 6 のサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）は、融合タンパク質ナノ粒子と符合するR S V 抗原に融合した集合したフェリチン粒子と符合する保持時間において主ピークの溶出を示した（P r e - F - N P、図90）。R F 8 1 0 6 の動的光散乱（D L S）解析を、還元状態（図91B）および非還元状態（図91A）で行った。還元は2 m M T C E P による処理で行った。R F 8 1 0 6 はほぼ15 nmの半径を有しており、これは還元状態および非還元状態のナノ粒子（24量体）への組み込みと符合している。以下に述べるように、融合タンパク質の還元剤への安定性は、アジュバントが融合タンパク質にコンジュゲートして自己アジュバント性ナノ粒子を形成することを容易にしている。

【0534】

次に、R S V F ポリペプチドとフェリチンとの融合タンパク質へのアジュバントのコンジュゲーション（P r e - F - N P）を評価した。フェリチンの上の遊離の表面システインを用いてs c F - p F e r r 融合タンパク質に追加の部分を結合させることができることが見出された。図92に、配列T * G * A * C * T * G * T * G * A * A * C * G * T * T * C * G * A * G * A * T * G * A（配列番号530、*はホスホロチオエートリンケージを示す）を有するC p G オリゴデオキシヌクレオチド（O D N）のR F 8 1 0 6 へのコンジュゲーションの成功を示す。これは、クーマシー染色S D S - P A G E ゲルで評価した分子量の増大によって証明された。

【0535】

E 3 2 8 N、S 3 4 8 N、およびR 5 0 7 Nの置換（R F 8 1 1 7、配列番号517）を用いてグリコシル化部位を追加することの効果、フェリチンとの融合タンパク質としてのこの構築物（すなわちP r e - F - N P 構築物として）を過渡的にトランスフェクトした293 E X P I 細胞で評価した。R F 8 1 1 7 はまた、R F 8 1 1 3 と同様にI 2 1 7 P置換を含んでいる。図93に示すように、R F 8 0 8 5 対照構築物およびR F 8 1 1 3 構築物（配列番号516、これはI 2 1 7 Pのプロリン置換を含むが、E 3 2 8 N、S 3 4 8 N、およびR 5 0 7 Nの置換を含まない）と比較して、R F 8 1 1 7 の発現の増大が見られた。R F 8 1 1 3 は、操作されたフェリチンのシステインがフェリチン残基のS 1 1 1 CでなくK 7 9 Cの上にあることを除いて、既に述べたR F 8 1 0 6 と同様である。R F 8 1 1 7 構築物はまた、R F 8 1 1 3 およびR F 8 1 1 7 の分子量の増大を示し、グリカンの付加に成功したことを示した。

【0536】

図94に、P r e - F - N P のタンパク質分解安定性を増大したR S V F ナノ粒子の改変をまとめる。出発構築物はR F 8 1 1 7（上記）であった。その前の構築物R F 8 0 8 5 をR F 8 0 9 0 としてC H O ベクターにクローニングしてC H O 細胞にトランスフェクトした際、いくつかの物質がFとフェリチン部分との間で切り取られたことが観察された。H R B 領域またはFとフェリチン部分との間のリンカーにおけるアルギニンまたはリシンの残基がトリプシン様のプロテアーゼで切断されていたことが疑われた。この領域内のリシンおよびアルギニン残基の変異を、293細胞中での発現に関して試験した。図94より、K 4 9 8 L およびR 5 0 8 Q の変異（R F 8 1 2 2、配列番号518における）が、R F 8 1 1 7 と比較して発現に影響しまたは発現を増大させないことが確認された。これらの変異をR 5 2 3 Q とともに本明細書で述べたR F 8 1 1 7 の変異と組み合わせて、構築物R F 8 1 4 0（配列番号523）を形成した。

【0537】

293細胞での発現において、一本鎖とプロリン（I 2 1 7 P）改変の組合せにより、発現のより大きな改善（ほぼ5倍）（これらの置換を有する例示的な構築物にはR F 8 1

10

20

30

40

50

06（配列番号509）およびRF8113（配列番号516）が含まれる）、およびRSV Fのグリコシル化部位改変の追加に起因する発現および溶解性のさらなる改善（例示的な構築物RF8117（配列番号517）およびRF8140（配列番号23））が見られた。これらの構築物は全て、配列GSGNVGL（配列番号531）に置き換えられた融合ペプチドおよびp27ペプチド領域（配列番号526のアミノ酸98～144）を有していた。しかし、RF8090を製造用CHO細胞株で発現した場合には、ウェスタンブロットでさらなるRSV Fバンドが観察され、この構築物はおそらくアルギニンまたはリシン残基におけるトリプシン様切断によるタンパク質分解を受けやすいことを示唆している。

【0538】

プロテアーゼに対する感受性の潜在的役割も検討した。HRB領域およびF部分とフェリチン部分との間のリンカーにおけるK残基の置換（ノックアウトまたはKO）を行った。それは、これらの部分が製造用CHO細胞株において初期に観察されたK介在切断の可能性のある部位であると予想されたからである。図95Aおよび図95Bに示すように、D25ウェスタンブロットまたはD25およびAM14 Octet解析で測定して、RF8117およびRF8140はいずれも、製造用CHO細胞株においてRF8090と比較して高いレベルを発現した。

【0539】

これらのデータより、一本鎖の構築物およびヘリックスキャッピングのためのアミノ酸の改変、グリコシル化の増大、ならびにプロテアーゼによる切断を受けやすいリシンまたはアルギニンの除去によって、RSV Pre-F-NP抗原を含むRSV Fポリペプチドの発現を改善できることが示される。

【実施例21】

【0540】

RSV Fおよびフェリチンナノ粒子の融合タンパク質の特徴解析

動物研究に先立って、DS-CAV1およびRSV Fナノ粒子の濃度を、Octetを用いる結合によって解析した。融合前抗原の融合前特異的抗体D25およびAM14への結合も、ForteBio Octet装置を用いて測定した。全てのアッセイはPBS中、30℃で実施した。抗体をプロテインA（ProA）センサーチップ（forteBio #18-5013）に400秒、負荷して、ほぼ飽和に達するまで捕捉させた。次いでバイオセンサーチップをPBS中で90秒、平衡にし、次いで公知の濃度の抗原とPBS中で300秒会合させ、次いでPBS中で抗原を解離させた。1:1の相互作用を仮定したデータ解析および曲線フィッティングを、公知の濃度の精製したPre-F-NPの結合の外部標準曲線を用いるOctet Data Analysis HT10.0ソフトウェアで行った。CHO馴化培地中のPre-F-NP濃度を決定する例示的なアッセイ結果を図95Bに示す。

【実施例22】

【0541】

RSV Fポリペプチドへの免疫応答のin vivo特徴解析

マウスにおけるRSV抗原に対するin vivo応答を評価するため、雌BALBcマウスを0週、3週、および6週で指定した用量のRSV抗原で筋肉内免疫した。他に注記しなければ、RSV抗原を（例えばとりわけ図96A～図96B、および図12A～図12Bの実験において）ベッドサイド混合戦略によりAF03でアジュバント化した。すなわち、それぞれの後ろ足に50μlを注射する直前に、関連するタンパク質の溶液50μlをSanofi社のアジュバントAF03（スクアレン系エマルジョン、Kluckera, J Pharm Sci. 2012 Dec; 101(12): 4490～5000頁参照）50μlと混合した。非アジュバント化群については、抗原を上記のように混合したが、AF03を等体積のPBSに置き換えた。SPA09またはアラムと混合した抗原については、AF03をそれぞれ等体積のSPA09またはアラムに置き換えて上記の手順を実施した。いずれの処方についても免疫による有害な影響は観察されなかった。

10

20

30

40

50

最初の免疫の1日前、およびそれぞれの注射の少なくとも2週間後（すなわち、2週、5週、および8週）に血液を採取した。他に特定しなければ、示したデータは3回目の注射の2週間後（8週、2 w p 3とも注記する）のものであった。典型的には、血清は免疫前の動物（ナイーブと注記）、2回目の注射の2週間後（ポスト2または2 w p 2）、または3回目の注射の2週間後（ポスト3^{r d}または2 w p 3）から分析した。

【0542】

V e r o細胞中和アッセイのため、血清を56℃で30分、熱不活化した。不活化血清の4倍連続希釈系列を、2%のウシ胎児血清（FBS）、1%のG l u t a M A X、および1%の抗生-抗有糸分裂剤を補ったD u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e M e d i u m（DMEM）中で作成した。RSVウイルスストックを希釈血清と100μL添加し、37℃、5%CO₂で1.5時間インキュベートした。次いでウイルス-血清混合物を、コンフルエントなV e r o細胞単層を含む24ウェルのプレートに1ウェルあたり100μL添加し、37℃、5%CO₂で1.5時間インキュベートした。次いで接種材料を1ウェルあたり1mLの、2%のFBS、2%のG l u t a M A X、および2%の抗生-抗有糸分裂剤を補ったDMEM中、0.75%のメチルセルロースで覆った。5%CO₂中、37℃で5日インキュベートした後、上層を除去し、単層を氷冷メタノールで20分固定した。

10

【0543】

次いでプレートを水で1回洗浄し、室温で30分、穏やかに振盪しながらリン酸緩衝食塩液（PBS）中5%の脂肪を含まないドライミルクでブロックした。次いでブロッキング溶液を、1ウェルあたり200μLのセイヨウワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートした抗RSV抗体（A b c a m社AB20686）の2000倍希釈物を含むPBS中、2%ドライミルクに置き換えた。室温で3時間インキュベートした後、プレートを水で2回洗浄し、T r u e B l u e H R P基質で発色させ、水でさらに2回洗浄して風乾した。

20

【0544】

染色したプラークを解剖用顕微鏡を用いて計数した。中和抗体力価は、式： $60\% \text{ プラーク低減力価} = (C/V \times 0.4 - \text{Low}) / (\text{High} - \text{Low}) \times (\text{HSD} - \text{LSD}) + \text{LSD}$ を用いてモック中和ウイルス対照の60%低減エンドポイントで決定した。ここでC/V=モック中和ウイルス対照ウェルにおけるRSVプラークの平均、LowおよびHighは血清サンプルのC/V×0.4値を挟む2つの希釈におけるRSVプラークの平均数、HSDおよびLSDは高い方および低い方の血清希釈倍率である。

30

【0545】

H A E中和アッセイのため、血清を56℃で30分、熱不活化した。不活化血清の4倍連続希釈系列を、P n e u m a C u l t（商標）-A L I 10X S u p p l e m e n t（S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s社、05003）および1%の抗生-抗有糸分裂剤を補ったP n e u m a C u l t（商標）-A L I B a s a l M e d i u m（S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s社、05002）（以下、培地）中で作成した。RSVウイルスストックを希釈血清と1:1で合わせ、37℃で1.5時間インキュベートした。次いでウイルス-血清混合物を、完全に分化したH A E細胞を含む24ウェルのプレートに1ウェルあたり50μL加え、37℃、5%CO₂で1.5時間インキュベートした。インキュベーションの後、接種材料を除去し、ウェルを培地で2回洗浄して未結合のウイルスを除去し、37℃、5%CO₂でさらに20時間インキュベートした。m K a t e（T a g F P 6 3 5）レポーターを発現するRSVに感染した培養における感染事象を、蛍光顕微鏡で計数した。

40

【0546】

m K a t eレポーターを発現しないRSVによる感染を検出するため、偽重層上皮を培地で十分に洗浄して粘液を除去し、次いで4%パラホルムアルデヒドで室温、30分固定し、0.25%のT r i t o n X-100で30分透過性にし、2%のFBSを補ったDMEMで37℃で、1時間ブロックした。ブロッキング液を1ウェルあたり100μL

50

の2%のFBSを補ったDMEMで200倍に希釈したマウス抗RSVモノクローナル抗体混合物(Millipore社、MAB 858-4)に置き換え、プレートを37℃で2時間インキュベートした。次いでプレートを0.05%のTween 20を補ったPBSで3回洗浄した。2%のFBSを補ったDMEM中、200倍に希釈したヤギ抗マウスIgG(H+L)(Invitrogen社、A11001)100μLを1ウェルあたりに加え、プレートを4℃で終夜インキュベートした。翌朝、プレートを0.05%のTween 20を補ったPBSで3回洗浄し、蛍光シグナルをProLong Gold AntiFadeおよびDAPI(Thermo Fisher Scientific社、P36935)で安定化させ、蛍光顕微鏡で計数した。中和抗体力価は上記のように60%低減エンドポイントで決定した。

10

【0547】

抗F結合のため、融合前F(DS-CAV1)または融合後FのいずれかをOctet上の抗HIS抗体チップに結合した。特定しない限り、全ての抗F結合は抗融合前F三量体(DS-CAV1)結合を意味する。His₆-タグ付け(配列番号442)RSV F三量体(DS-CAV1)または融合後Fを抗ペンターHIS(HIS1K)センサーチップ(ForteBio社#18-5122)に400秒、前負荷して、ほぼ飽和に達するまで捕捉させた。次いでバイオセンサーチップをOctet Wash Buffer中で90秒、平衡にし、希釈した血清と300秒会合させた。会合曲線の最終応答は、Octet Data Analysis HT10.0ソフトウェアを用いて測定し、応答に希釈係数(100または300)を乗じて最終報告応答を得た。

20

【0548】

抗Gcc結合のため、C末端HISタグを有するGccペプチドの三量体化二量体を上と同様にOctetチップ上で用いた。His₆-タグ付け(配列番号442)Gcc(A2株)六量体を抗ペンターHIS(HIS1K)センサーチップ(ForteBio社#18-5122)に400秒、前負荷して、ほぼ飽和に達するまで捕捉させた。次いでバイオセンサーチップをOctet Wash Buffer中で90秒、平衡にし、希釈した血清と300秒会合させた。会合曲線の最終応答は、Octet Data Analysis HT10.0ソフトウェアを用いて測定し、応答に希釈係数(100または300)を乗じて最終報告応答を得た。

【0549】

30

非ヒト霊長類(NHP)の研究のため、NHPをRSV応答について事前スクリーニングした(ベースラインは全てのアッセイについて検出限界未満であることが見出された)。NHPは上記のマウスプロトコルと同様に表示されたアジュバントとともにRF8140 50μgで免疫したが、アジュバントの体積は多かった(図97C~図97Dおよび図104)。

【0550】

非ヒト霊長類の研究のため、VERO中和アッセイを上記のように実施した。Pre-F結合は下記のELISAアッセイによって評価した。

【0551】

NHP血清サンプルを2倍段階希釈し(初期希釈100倍)、ブロックされたRSV可溶性F(Sinobiological社#11049-V08B)でコートしたプレート(1μg/mL、100μL/ウェル)上、37℃で1時間インキュベートした。セイヨウワサビエルオキシダーゼコンジュゲート抗サルIgG(BioRad社AAI42P、10,000倍希釈)を用いて37℃、90分でRSV F特異的IgGを検出した。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB Tebu-Bio社)を用いてプレートを発色させ、1N塩酸(ProLabo社#30024290)で停止した。マイクロプレートリーダー(SpectraMax社)を用いて450nm~650nmの光学密度(OD)を測定した。RSV sF特異的IgG力価はSoftmax Proソフトウェアを用いて滴定曲線からOD値範囲0.2~3.0について計算した(各プレートに標準のマウス超免疫血清を加えた)。

40

50

【0552】

随意のELISA単位（EU）で表したこの参照のIgG力価はOD1.0を与える希釈倍数の逆数のlog10に対応した。抗体検出の閾値は20（1.3log10）EUであった。グラフ化のため、全ての最終力価をlog10で表した。1.3log10未満のそれぞれの力価に、随意の力価1.0log10を割り付けた。

【0553】

NHP研究における細胞介在免疫を評価するため、IFN γ /IL-2 FluoroSpotキット（FS-2122-10、Mabtech社）をメーカーの説明書に従って用いた。簡単には、IPFLプレートの膜を35%エタノールで前湿潤化し、捕捉抗体（抗IFN γ および抗IL-2）を4℃で終夜コートした。

10

【0554】

次いでプレートを、10%ウシ胎児血清（FCS）を含む200 μ L/ウェルの細胞インキュベーション培地で、37℃で2時間ブロックした。培地を除去し、刺激剤：完全長のF抗原（抗原特異的刺激）、抗CD3（陽性対照）、または細胞培養培地（非刺激対照）をウェルに加えた。マカク末梢血単核球（PBMC）を解凍して計数した。1ウェルあたり400,000個の細胞を加え、5%CO₂を含む加湿したインキュベーター中、37℃で24時間インキュベートした。

【0555】

検出のため細胞を取り出し、検出抗体（コンジュゲートした抗IFN γ および抗IL-2）を加え、室温で2時間インキュベートした。次いでフルオロフォアをコンジュゲートした試薬を加え、室温で1時間インキュベートした。プレートを空にし、乾燥させ、分析まで暗所に室温で保存した。陽性対照として抗CD3mAbを用い、PBMC百万個あたり500超のスポット形成カウント（SFC）の応答が全サンプルで見られ、サンプルの品質が許容できることを確認した。非刺激ウェル（細胞培養培地）で検出されたスポットをF抗原刺激細胞から差し引いた。

20

【0556】

ヒト細胞（またはB細胞）の解析のため、Daunerら、Vaccine 2017 Oct 4; 35(41): 5487~5494頁の参照した実験と同様の実験を実施した（図106）。細胞は未処理（PBSで処理）、または100ng用量と注記したようにRSV FまたはRSV Gポリペプチドで処理した。F結合およびG結合の応答は、それぞれプレF三量体（DS-CAV1）またはGエクトドメインでコートしたビーズを用いて文献に記載されたルミネックスアッセイを用いて実施した。

30

【0557】

RF8117（配列番号517）はE328N、S348N、およびR507Nで操作されたグリコシル化部位を含み、これらは上述のようにD25またはAM14の結合を阻止しない。これらの融合前ナノ粒子が他の融合前抗原（DS-C A1）と同様の免疫応答を誘発することを実証するため、5匹の群のマウスを1 μ gまたは0.1 μ gの用量で、全てAF03アジュバントとともに、pre-F三量体（DS-C A1）、融合後F、またはRF8117で、注射の間3週あけて3回免疫した。3回目の免疫の2週後に血清の中和力価をVERO細胞アッセイによって試験した。高用量のRF8117は融合前対照と同様で融合後対照よりも優れた中和力価を誘発した。低用量ではRF8117は融合前対照および融合後対照のいずれよりも高い中和力価を誘発した（図96A）。

40

【0558】

RSV Pre-F-NPは、融合前および融合後のコンフォメーションの間に共有されたエピトープをブロックするように操作されたグリコシル化部位を有している。これらのグリカンが中和性応答を阻害していたかどうかを評価した。操作されたグリカンを持つRF8117（配列番号517）を、RF8113（RF8117と同様であるが操作されたグリカンを欠除する。配列番号516）および融合前三量体対照（DS-C A V1）と比較した。5匹の群のマウスを1 μ gまたは0.1 μ gの用量で、全てAF03アジュバントとともに、注射の間3週あけて3回免疫した。3回目の免疫の2週後に血清の中

50

和力価をVERO細胞アッセイを用いて試験した。中和力価によって判断して、RF8113およびRF8117の構築物の間でいずれの用量でも有意な相違はなかった。

【0559】

本明細書で述べたRF8140（配列番号523）のリシンおよびアルギニンのノックアウトが抗原の中和性応答を誘発する能力に影響しないことを実証するため、RF8140（配列番号525）の免疫原性を、融合後F三量体（配列番号524）の免疫原性とマウスで比較した（図97Aおよび図97B）。低用量（0.1 μ g）ではRF8140（配列番号525）は融合後三量体（配列番号524）より優れた中和力価を誘発する。RF8140（配列番号523）がNHPで免疫応答を誘発することを実証するため、アジュバント（AF03）の存在下または非存在下で、NHPをRF8140（配列番号525）で免疫した。図97CにRSV F結合応答（ELISA力価）を示す一方、図97DでPre-F-NP（RF8140、配列番号523）による免疫で誘発されたRSV中和力価を比較する。アジュバントの非存在下および存在下のRF8140（配列番号525）はいずれもNHPで免疫応答を誘発する。

【0560】

RF8117（配列番号517）およびRF8140（配列番号523）の操作されたグリコシル化部位はこれらの抗原が中和性応答を誘発することを阻止しないことが示されたので、これらが融合前および融合後のコンフォメーションの間で共有された非中和性または低中和性のエピトープをブロックすることを実証することが望まれた（図98）。Octetで測定して、高用量（1 μ g）および低用量（0.1 μ g）で、操作されたグリコシル化なしのPre-F-NP（RF8113、配列番号516）または操作されたグリコシル化ありのPre-F-NP（操作されたGly粒子、RF8117、配列番号517）による免疫で誘発された融合前F（DS-CAV1、配列番号525）に対する抗体応答（図98A）。いずれかのPre-F-NPによって誘発された応答は同様であった。Octetで測定して、高用量（1 μ g）および低用量（0.1 μ g）で、操作されたグリコシル化なしのPre-F-NP（RF8113、配列番号516）または操作されたグリコシル化ありのPre-F-NP（RF8117、配列番号517）による免疫で誘発された融合後三量体に対する抗体応答（図98B）。RF8117（配列番号517）によって誘発された融合後F結合応答は、RF8113（配列番号516）によって誘発された応答より有意に低かった。したがって、RF8113とRF8117はいずれも融合前Fに強力な抗体応答を誘発する一方、RF8117によって誘発される融合後F抗体応答は大きく抑制される。これは、共有された融合前および融合後のエピトープに対する操作されたグリカンのマッピングによる（図88B）。

【0561】

操作されたグリコシル化部位は非中和性エピトープをブロックするが、中和性抗体力価を非中和性抗体力価に迂回することをさらに実証するため、上記のデータを異なる方法で解析した（図99A～図99C）。マウス研究における野生型グリコシル化部位を有するPre-F-NP（Wt グリカン粒子、RF8113、配列番号516）による免疫で誘発され、VERO細胞アッセイによって測定したRSV中和力価と、操作されたグリコシル化部位を追加したPre-F-NP（+グリカン粒子、RF8117、配列番号517）の比較を測定し、有意な相違がなかった（図99A）。マウス研究におけるWtグリカン粒子（RF8113、配列番号516）による免疫と、+グリカン粒子（RF8117、配列番号517）による免疫で誘発されたRSV融合後F三量体結合抗体応答の比較は、操作されたグリカンを有するPre-F-NPについて抑制された融合後F結合応答を示した（図99B）。操作されたグリカンが機能的な中和性抗体応答を低減しないが、共有された融合前／融合後エピトープに対して誘発される非中和性抗体を減少させ、それにより操作されたグリカン構築物によって誘発される中和性抗体の全抗体に対する比を改善することを実証するため、F結合応答に対する中和力価の比をプロットした（図99C）。したがって、操作されたグリカンを有するPre-F-NPはマウスの研究において結合抗体プロファイルに優れた中和性を誘発する。

【0562】

フェリチンナノ粒子がRSV Gの中央ドメイン抗原の免疫原性を改善するために用いることができることを実証するため、Gccペプチド（配列番号529）をフェリチンナノ粒子に化学的にコンジュゲートする方法を開発した。本明細書に記載したS111C変異を有するフェリチンは、NH₂基を介してN末端に結合したPEG4リンカーの上のマレイミド基を用いて合成されたGccペプチド（配列番号529）でコンジュゲートすることができる。N末端マレイミドを有するGccペプチドを合成し、Peptide International社（Louisville, KY, USA）がHPLCで精製した。マレイミド-Gcc抗原をフェリチンS111C粒子に添加すれば、マレイミドが遊離のシステインにコンジュゲートしてGcc-NPを形成し、これはクーマシー染色SDS-PAGEゲルで観察することができる（図100A）。コンジュゲーションの効率は典型的には50%~90%であるが、Gccペプチドフェリチンナノ粒子（100%コンジュゲーション）のモデルを図100Bに示す。

10

【0563】

Gcc-NPがGccペプチド（配列番号529）より優れた免疫応答を誘発するかどうかを決定するため、1群あたり5匹のマウスをGccペプチドまたはGcc-NPで免疫した（それぞれの免疫のため1.3μgの用量をRIBIと1:1で混合）。2回目の免疫の2週間後、および3回目の免疫の2週間後のGcc結合応答（O₄）を、ナイーブなマウス血清の代表的な群と比較した（図100C）。マウスの研究における3回目の注射後のGccペプチド（配列番号529）とGcc-NPによる免疫で誘発された中和性応答も、HAE中和アッセイで比較した（図100D）。Gcc結合応答と中和性応答の両方で判断して、Gcc-NPはGccペプチド単独より優れた免疫応答を誘発する。

20

【0564】

RSV Pre-F-NP（RF8140）とGcc-NPの共投与がいずれの抗原の免疫応答を誘発する能力に干渉しないことを実証するため、マウスをPre-F-NP単独（RF8140、配列番号523）、Gcc-NP（Gccペプチド配列番号529とコンジュゲートしたフェリチン）、またはPre-F-NP（RF8140、配列番号523）とGcc-NPとの組合せで免疫した（図101A~図101C）。全ての免疫はAF03でアジュバント化した。RF8140単独（Pre-F-NP）またはRF8140とGcc-NP（Pre-F-NP+Gcc-NP）で免疫したマウスは融合前F三量体（DS-CAV1、配列番号525）に結合する抗体を生じたが、Gcc-NPで免疫したマウスはこれを生じなかった。Gcc-NP単独（Gcc-NP）またはRF8140とGcc-NPで免疫したマウスはGccペプチドに結合する抗体を生じたが、RF8140だけで免疫したマウスはこれを生じなかった。Pre-F-NP単独、Gcc-NP単独、またはPre-F-NPとGcc-NPの共投与で免疫した動物は全て、HAE中和アッセイで測定して2回目の免疫および3回目の免疫の後で中和性応答を生じた。

30

【0565】

RSV Pre-F-NPとGcc-NPの共投与がいずれの抗原の中和性抗体を誘発する能力に干渉するかどうかを決定するため、FおよびGに対する中和性抗体を枯渇アッセイで検討した（図102A~図102B）。Gcc-NPの添加がPre-F-NPの中和性応答を誘発する能力に干渉しないことを実証するため、上記の群についてF感受性VERO細胞アッセイによって中和力価を測定した（図102A）。抗原枯渇の品質を判断するため、ナイーブな動物からの血清も試験した。VEROアッセイにおいて、RF8140（配列番号523）単独またはGcc-NPと混合したRF8140で免疫したマウスの血清は同様の中和性応答を誘発した一方、Gcc-NPはF抗体感受性VEROアッセイにおいて中和性応答を誘発しないようであった。融合前三量体（DS-CAV1、配列番号525）に結合する抗体がRF8140（配列番号523）単独で免疫された動物またはRF8140（配列番号523）とGcc-NPで免疫された動物からのプール血清から枯渇している場合には、VEROアッセイにおいて測定可能な中和力価の低減が観察された。上記の群をHAE細胞アッセイにおける中和力価について測定すると、全て

40

50

の免疫群はFおよびG感受性アッセイにおいて中和性応答を生じることが観察された（図102B）。RF8140（配列番号523）単独で免疫された動物からのプール血清はHAEアッセイにおいて融合前F三量体（DS-CAV1、配列番号525）で枯渇された可能性がある中和性応答を誘発した。Gcc-NP単独で免疫された動物からのプール血清はHAEアッセイにおいてGエクトドメイン（配列番号528）で枯渇された可能性がある中和性応答を誘発した。Pre-F-NP（RF8140、配列番号523）とGcc-NPの両方で免疫された動物からのプール血清はHAEアッセイにおいて、DS-CAV1（配列番号525）によって完全には枯渇しないが、DS-CAV1、次いでGエクトドメイン（配列番号528）による引き続く枯渇によって完全に枯渇する中和性応答を誘発した。併せて、これらのデータは、Pre-F-NPおよびGcc-NPの共投与が、いずれの抗原のそれぞれ融合前のFまたはGに対する中和性抗体を誘発する能力にも干渉しないことを示唆している。

10

【0566】

RF8117（配列番号517）またはRF8140（配列番号523）のアジュバント化の効果を実証するため、AF03、SPA09、またはアラムと混合したこれらの構築物をマウスに投与した。図103Aではアジュバントと混合した抗原10 μ gでマウスを免疫し、図103Bではアジュバントと混合した抗原1 μ gでマウスを免疫した。図103Aでは3回目の免疫時点の2週後にVERO細胞アッセイによって中和力価を測定した。非アジュバント化（No Adj）、アラムでアジュバント化、またはAF03でアジュバント化したRF8117（配列番号517）で免疫したマウスからの血清を示す。図103Bでは、AF03でアジュバント化したRF8117（配列番号517）、SPA09でアジュバント化したRF8117（配列番号517）、またはAF03でアジュバント化したRF8140によって免疫したマウスからの血清についてのVERO細胞アッセイによって中和力価を測定した。RF8117（配列番号517）またはRF8140（配列番号523）のいずれについても全ての場合に、ナイーブマウスのアジュバント群は非アジュバント群より高い中和力価を誘発した。AF03と混合したRF8117（配列番号517）またはRF8140（配列番号523）で免疫したマウスは同様の中和性応答を誘発し、RF8140（配列番号523）に付加されたリシンおよびアルギニンの変異はPre-F-NPの中和性応答を誘発する能力に干渉しないことが示唆された。

20

【0567】

AF03およびSPA09のアジュバント効果をさらに検討するため、非アジュバント化、AF03でアジュバント化、または2種の用量のSPA09でアジュバント化したRF8140で非ヒト霊長類（NHP）を免疫した（図104A）。NHPは0日および29日に指示されたアジュバントと混合した抗原50 μ gで免疫し、指示された時点でELISAまたはVERO中和性応答によって免疫応答を測定した。融合前F三量体ELISA応答は、非アジュバント化（No Adj）、AF03でアジュバント化、またはSPA09でアジュバント化したRF8140で免疫した後のNHP血清で測定した（SPA09の500 μ gおよび2000 μ gの用量を用いた）。全ての時点で、AF03またはSPA09によるアジュバント化により、優れた中和性応答が誘発された。上記のNHP群の血清の中和力価も、VERO細胞アッセイによって測定した（図104B）。全ての例では、アジュバントを伴うRF8140による免疫は、全ての時点において非アジュバント化群より高い中和力価を誘発した。

30

40

【0568】

RF8140（配列番号523）のTLR7/8アゴニストSM7/8またはTLR9アゴニストCpGへの直接コンジュゲーションの効果を試験した。抗原を小分子のSM7/8またはCpGでコンジュゲートし、マウスに10 μ g投与した。RF8140はそのフェリチン配列中に、表面に露出したアミノ酸をシステインに置き換える変異（K79C）を含んでおり、これをクリックケミストリーによってコンジュゲーションに用いることができる。比較のため、図105に示すように、高用量または低用量（コンジュゲートしない）で小分子と混合することによって、非アジュバント化（No-adj）またはアジ

50

ュバント化したRF8140をマウスに投与した。2回目および3回目の免疫の後の動物からの血清を融合前F三量体結合について試験した。

【0569】

図105Aでは、融合前F三量体結合応答を、ナイーブなマウス、非アジュバント化RF8140（配列番号523）で免疫したマウス、SM7/8アジュバントとコンジュゲートしたRF8140（配列番号523）、130ngのSM7/8でアジュバント化したRF8140（配列番号523）、または20μgのSM7/8でアジュバント化したRF8140（配列番号523）で免疫したマウスのいずれかの血清中で測定した。SM7/8にコンジュゲートしたRF8140（配列番号523）は、非アジュバント群またはSM7/8アジュバント群より高い融合前F三量体結合能力価を誘発した。

10

【0570】

図105Bでは、融合前F三量体結合応答を、ナイーブなマウス、非アジュバント化RF8140（配列番号523）で免疫したマウス、CpGアジュバントとコンジュゲートしたRF8140（配列番号523）、680ngのCpGでアジュバント化したRF8140（配列番号523）、または20μgのCpGでアジュバント化したRF8140（配列番号523）で免疫したマウスのいずれかの血清中で測定した。SM7/8にコンジュゲートしたRF8140（配列番号523）は、非アジュバント群またはSM7/8アジュバント群より高い融合前F三量体結合能力価を誘発した。

【0571】

Pre-F-NP抗原およびGcc-NP抗原のヒト細胞における応答を誘発する能力を実証するため、MIMICプラットフォームでの実験を実施した（図106A～図106D）。MIMICプラットフォームはチャレンジに際して先天的なまたは後天的な抗原特異的応答を迅速かつ再現性よく産生することができる自己ヒト免疫細胞のみからなっている。以前の研究により、HBV、破傷風トキソイド、モノクローナル抗体、YF-VAX、およびインフルエンザB細胞応答等の多様な標的に対して*in vivo*の免疫プロファイルを反復するMIMICシステムの能力が実証されている。Pre-F-NP RF8140（配列番号523）、対、融合後F三量体（配列番号524）による処置によって誘発されるRSV融合前F三量体結合抗体応答をヒトB細胞で比較した。代表的なベースライン応答を比較のために示す（処置なし）（図106A）。ヒトB細胞において、Pre-F-NP（RF8140、配列番号523）、対、融合後F（配列番号524）による処置によって誘発された融合前F三量体（DS-CAV1、配列番号525）、対、融合後F三量体（配列番号524）に対する測定された結合応答の比を図106Cに示す。異なるF抗原による処置によって誘発されたMIMICからの抗体をVERO細胞アッセイを用いて測定した（図106C）。ヒトB細胞において、Pre-F-NP（RF8140、配列番号523）、対、融合後F三量体（配列番号524）による処理によって誘発された中和力価を非処理群と比較し、RF8140（配列番号523）がヒト細胞において優れた中和性応答を誘発することを示した。

20

30

【0572】

RSV感染またはFサブユニットワクチンの候補に対する抗体応答の大きさを、MIMIC研究で検討したヒト対象の血清状態に基づいて決定した。これは線形回帰解析によって評価した。以前から存在する抗pre-F IgGの高い循環力価を有するドナーは、RSV処置の後（図106E、 $p=0.0041$ ）およびpost-Fプライミングの後（図106F、 $p=0.0019$ ）に、有意により高い抗pre-F IgGを生成した。相関は統計的有意性に達しなかったが、pre-Fはまた、誘起された抗体のレベルと以前から存在する抗体のレベルとの間に関連性を示した。他の処置と異なり、pre-F-NPは以前から存在する抗pre-F IgGが高いドナーからと同様に、以前から存在する抗体が低いドナーから比較的高いレベルの抗pre-F IgGを誘起したことは注目に値する（図106F）。これは、pre-F-NPが以前から存在するIgGのレベルが低いドナーからでも効果的に抗体応答を取り戻す（または強化する）ことができることを示している。

40

50

【0573】

Gcc-NPがGccペプチド（配列番号529）単独より優れたG抗体応答を誘発することを実証するため、ヒト細胞をGccペプチド単独（配列番号529）またはヒトB細胞中でナノ粒子にコンジュゲートしたGccペプチド（Gcc-NP）で処理した。Gcc-NPは優れたG結合抗体応答を誘発した（図106G）。組み合わせ、これらのデータは、Pre-F-NPおよびGcc-NPがヒトの免疫において免疫応答を誘発することを示唆している。

【実施例23】

【0574】

RSV Gcc-フェリチンナノ粒子に対する免疫応答の *in vivo* 特徴解析

RSV Gcc-NPを上述のように調製した。マウスにおけるRSV Gcc-NPに対する *in vivo* 応答を評価するため、雌BALBcマウスを0週、3週、および6週で、高用量（5 μ g）または低用量（0.5 μ g）の抗原を用い、指定された用量のRSV抗原で筋肉内免疫した。他に注記しなければ、RSV Gcc-NPをベッドサイド混合戦略によりAF03でアジュバント化した。すなわち、それぞれの後ろ足に50 μ lを注射する直前に、タンパク質溶液50 μ lをSanofi社のアジュバントAF03（スクアレン系エマルジョン、Klucknerら、J Pharm Sci. 2012 Dec; 101(12): 4490~5000頁参照）50 μ lと混合した。免疫による有害な影響は観察されなかった。最初の免疫の1日前、およびそれぞれの注射の少なくとも2週後（すなわち、2週、5週、および8週）に血液を採取した。他に特定しなければ、示したデータは3回目の注射の2週後（8週、2wp3とも注記する）のものである。典型的には、血清は免疫前の動物（ナイーブと注記）、2回目の注射の2週後（ポスト2または2wp2）、または3回目の注射の2週後（ポスト3rdまたは2wp3）から分析した。

【0575】

HA E中和アッセイのため、血清を56℃で30分、熱不活化した。不活化血清の4倍連続希釈系列を、PneumaCult（商標）-ALI 10X Supplement（Stem Cell Technologies社、05003）および1%の抗生-抗有糸分裂剤を補ったPneumaCult（商標）-ALI Basal Medium（Stem Cell Technologies社、05002）（以下、培地）中で作成した。RSVウイルスストックを希釈血清と1:1で合わせ、37℃で1.5時間インキュベートした。次いでウイルス-血清混合物を、完全に分化したHA E細胞を含む24ウェルのプレートに1ウェルあたり50 μ L加え、37℃、5%CO₂で1時間インキュベートした。インキュベーションの後、接種材料を除去し、ウェルを培地で2回洗浄して未結合のウイルスを除去し、37℃、5%CO₂でさらに20時間インキュベートした。mKate（TagFP635）レポーターを発現するRSVに感染した培養における感染事象を、蛍光顕微鏡で計数した。

【0576】

mKateレポーターを発現しないRSVによる感染を検出するため（RSV B株中和）、偽重層上皮を培地で十分に洗浄して粘液を除去し、次いで4%パラホルムアルデヒドで室温、30分固定し、0.25%のTriton X-100で30分透過性にし、2%のFBSを補ったDMEMで37℃、1時間ブロックした。ブロッキング液を1ウェルあたり100 μ Lの2%のFBSを補ったDMEMで200倍に希釈したマウス抗RSVモノクローナル抗体混合物（Millipore社、MAB 858-4）に置き換え、プレートを37℃で2時間インキュベートした。次いでプレートを0.05%のTween 20を補ったPBSで3回洗浄した。2%のFBSを補ったDMEM中、200倍に希釈したヤギ抗マウスIgG（H+L）（Invitrogen社、A11001）100 μ Lを1ウェルあたりに加え、プレートを4℃で終夜インキュベートした。翌朝、プレートを0.05%のTween 20を補ったPBSで3回洗浄し、蛍光シグナルをProLong Gold AntiFadeおよびDAPI（Thermo Fisher

r Scientific社、P36935)で安定化させ、蛍光顕微鏡で計数した。中和抗体力価は60%低減エンドポイントで決定した。

【0577】

RSV G抗原による中和性応答の誘発が高い多価性によって改善されることを実証するため、RSV F抗原によってマウスを免疫した。全ての免疫はAF03によってアジュバント化した。AF03とともに処方したRSV Gcc-NPでマウスを免疫し、2回目の注射の2週間および3回目の注射の2週後に中和力価を測定した(図107A~図107C)。RSV Gcc-NPは、ナイーブなマウス血清に関連する中和性応答を誘発した。2回目の免疫の2週間(図107A)および3回目の免疫の2週間(図107B)に、A2株からのGccを含むGcc-NPで免疫したマウスはRSV A株に対する中和性応答を示した。3回目の注射の2週後に、Gcc-NPはRSV B1株に対する中和性応答をも誘発した(図107C)。

10

【0578】

抗Gcc結合のため、C末端HISタグを有するGccペプチドの三量体化された二量体をOctetチップ上で用いた。His₆タグ付けしたGcc(A2株)六量体またはHis₆タグ付けしたGcc(B1株)六量体を抗ペンタ-HIS(HIS1K)センサーチップ(ForteBio社#18-5122)に400秒、前負荷して、ほぼ飽和に達するまで捕捉させた。次いでバイオセンサーチップをOctet Wash Buffer中で90秒、平衡にし、希釈した血清と300秒会合させた。会合曲線の最終応答は、Octet Data Analysis HT10.0ソフトウェアを用いて測定し、応答に希釈係数(100または300)を乗じて最終報告応答を得た。

20

【0579】

RSV Gcc-NPがGcc結合免疫応答を誘発するかどうかを決定するため、上記の免疫による血清のGcc A2六量体またはGcc B1六量体に結合する能力について試験した。高用量(図108Aおよび図109A)および低用量(図108Bおよび図109B)におけるGcc結合応答を2回目の免疫の2週間および3回目の免疫の2週後に試験した。A2株(図108A~図108B)およびB1株(図109A~図109B)のいずれについても、RSV Gcc-NPはナイーブなマウス血清に関連する結合応答を誘発した。

【実施例24】

30

【0580】

ヒト細胞におけるPre-F-NPおよびGcc-NPへの応答

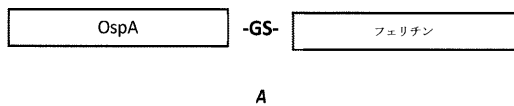
Pre-F-NPおよびGcc-NPのヒト細胞における応答を誘発する能力を実証するため、MIMICプラットフォームでの実験を実施した。MIMICプラットフォームはチャレンジに際して先天のおよび後天的な抗原特異的応答を迅速かつ再現性よく產生することができる自己ヒト免疫細胞のみからなっている。以前の研究により、HBV、破傷風トキソイド、モノクローナル抗体、YF-VAX、およびインフルエンザB細胞応答等の多様な標的に対してin vivoの免疫プロファイルを反復するMIMICシステムの能力が実証されている。Pre-F-NP RF8140(配列番号23)、対、融合後F三量体(配列番号24)による処置によって誘発されるRSV融合前F三量体結合抗体応答をヒトB細胞で比較し、代表的なベースライン応答と比較した。ヒトB細胞において、Pre-F-NP(RF8140、配列番号23)、対、融合後F(配列番号24)による処置によって誘発された融合前F三量体(DS-CAV1、配列番号25)、対、融合後F三量体(配列番号24)に対する測定された結合応答の比を決定した。異なるF抗原による処置によって誘発されたMIMICからの抗体をVERO細胞アッセイを用いて測定した。ヒトB細胞において、Pre-F-NP(RF8140、配列番号23)、対、融合後F三量体(配列番号24)による処理によって誘発された中和力価を非処理群と比較し、RF8140(配列番号23)がヒト細胞において優れた中和性応答を誘発することを示す。Gcc-NPがGccペプチド(配列番号29)単独より優れたG抗体応答を誘発することを実証するため、ヒト細胞をGccペプチド単独(配列番号29)ま

40

50

たはヒト B 細胞中でナノ粒子にコンジュゲートした G c c ペプチド (G c c - N P) で処置した。 G c c - N P は優れた G 結合抗体応答を誘発した。したがって、 P r e - F - N P および G c c - N P はヒトの免疫において免疫応答を誘発した。

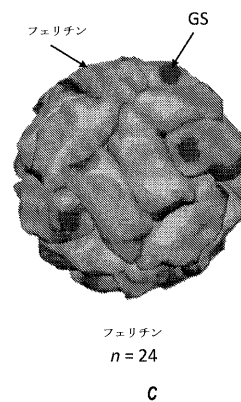
【図 1 A】



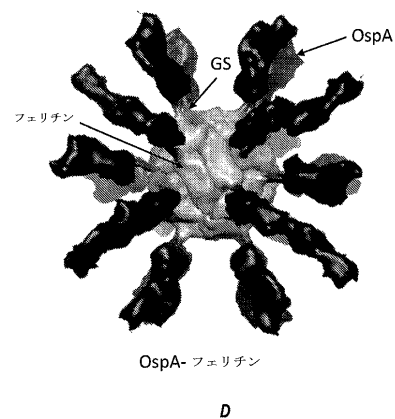
【図 1 B】



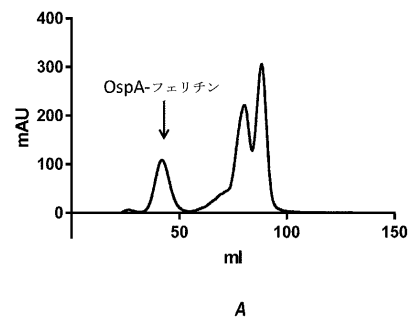
【図 1 C】



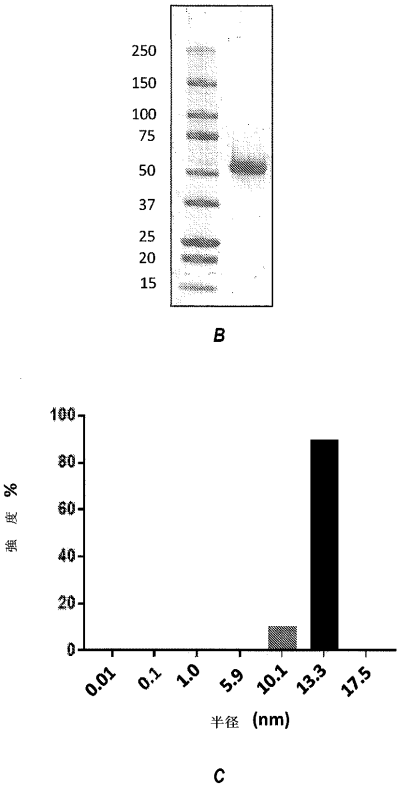
【図 1 D】



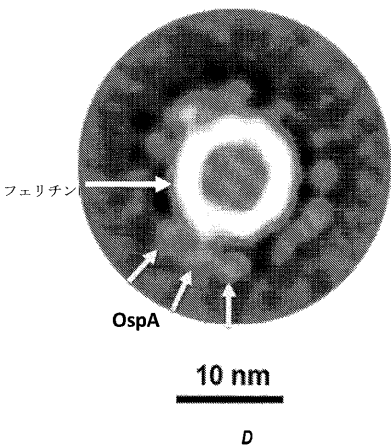
【図 2 - 1】



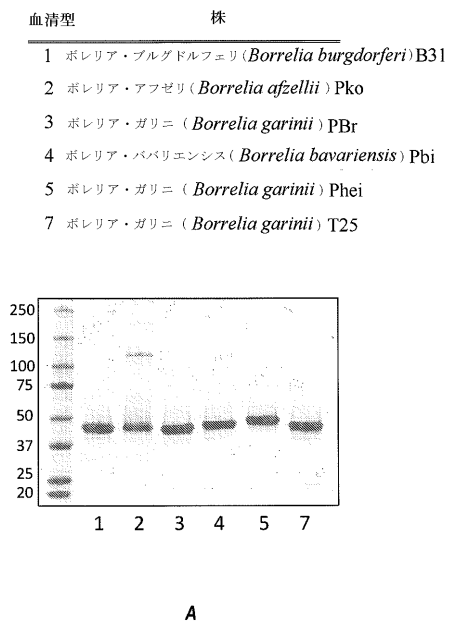
【図 2 - 2】



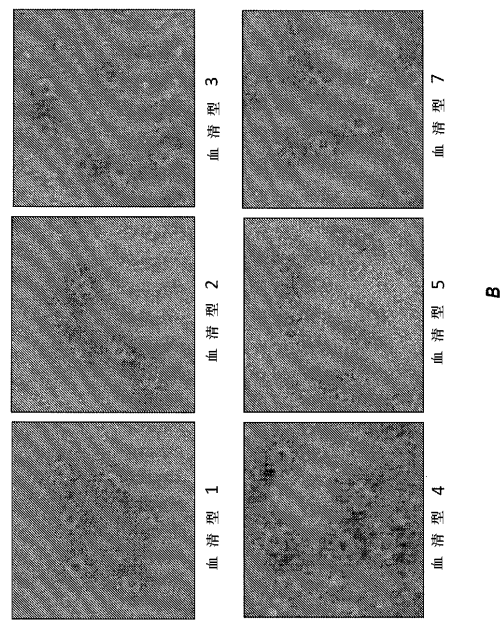
【図 2 - 3】



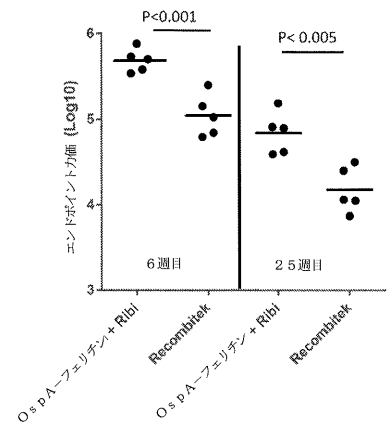
【図 3 A】



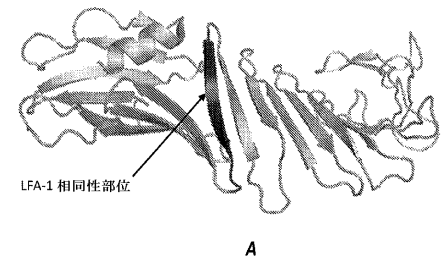
【図 3 B】



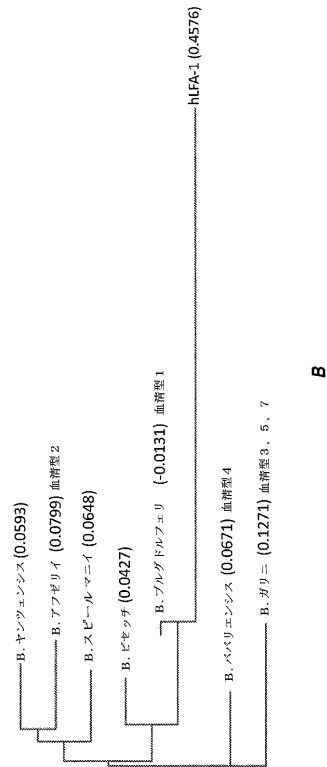
【図 4】



【図 5 - 1】

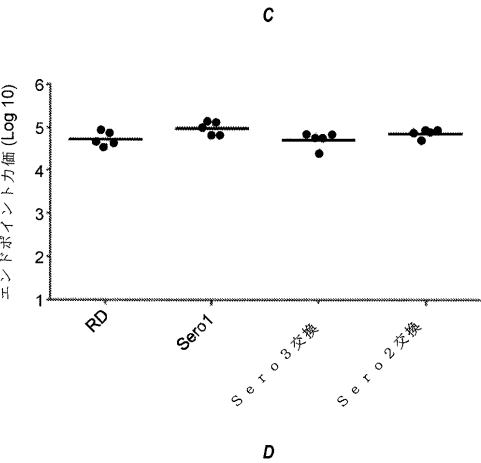


【図 5 - 2】

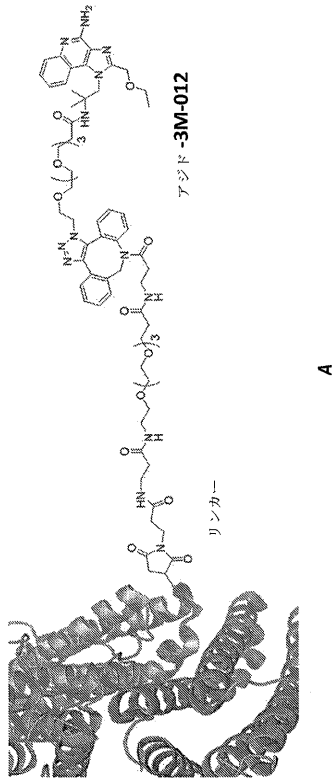


【図 5 - 3】

OspA: YVLEGLTLA
S2 : FTLEGGKVAN
S3 : FALEGLTLD
RD2 : YTLEGGQLSD
Lfa1: YVIEGTSKQ

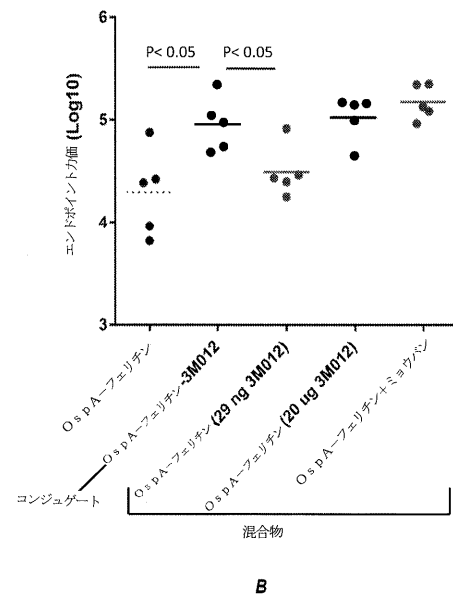


【図 6 A】



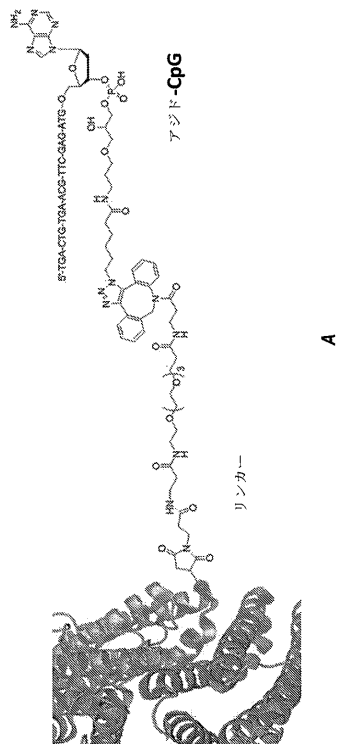
A

【図 6 B】



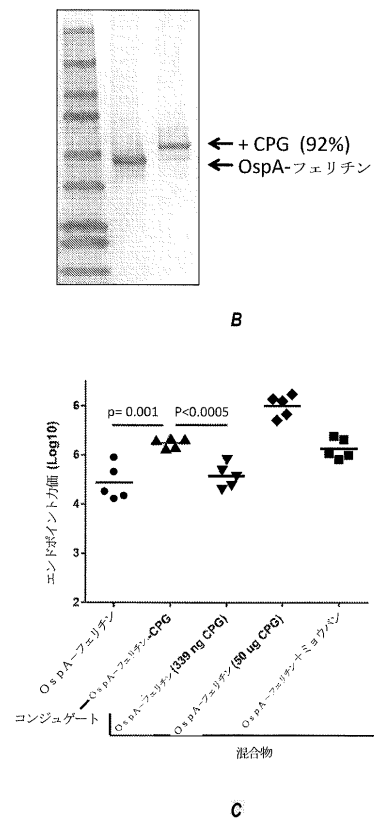
B

【図 7 - 1】



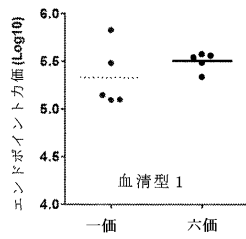
A

【図 7 - 2】

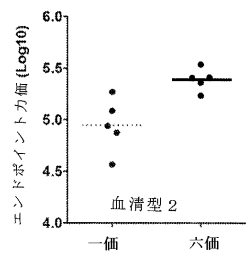


C

【図 8 - 1】

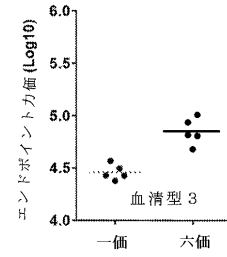


A

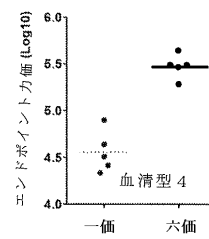


B

【図 8 - 2】

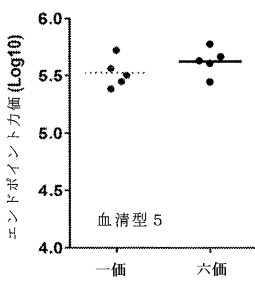


C

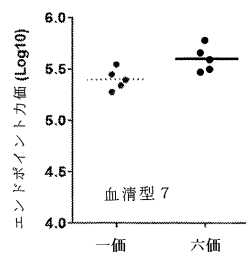


D

【図 8 - 3】

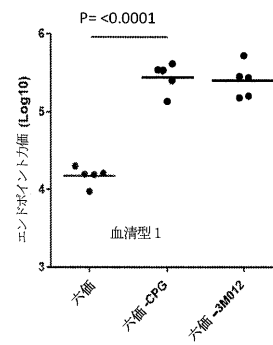


E

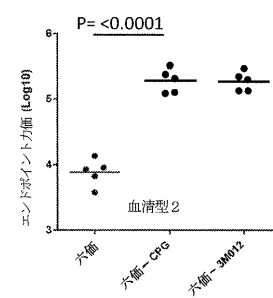


F

【図 9 - 1】

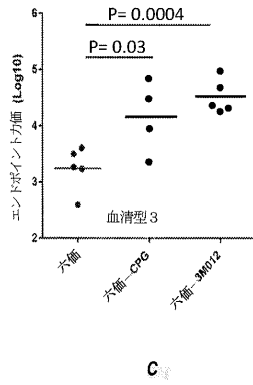


A

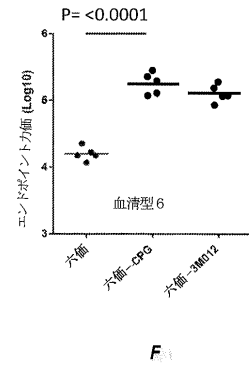
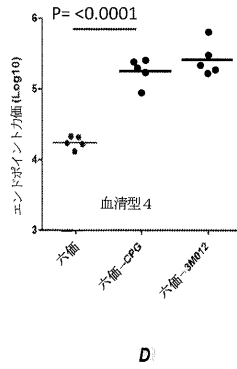
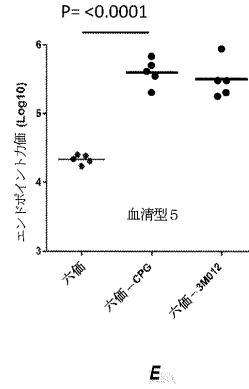


B

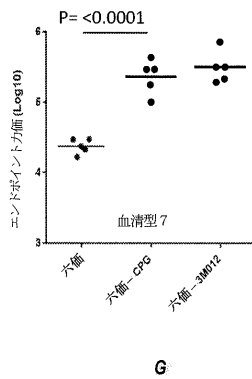
【図 9 - 2】



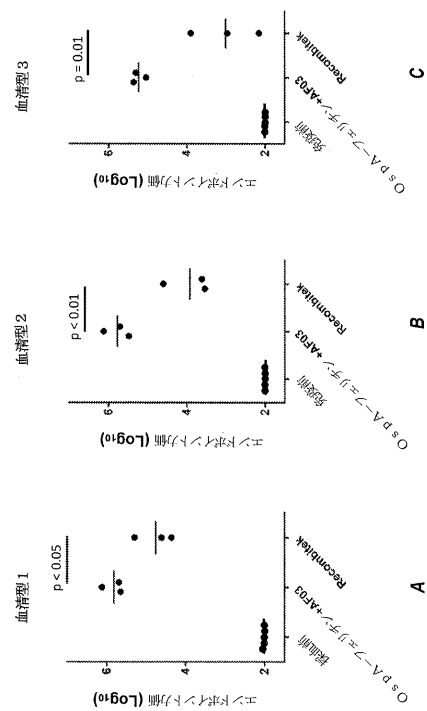
【図 9 - 3】



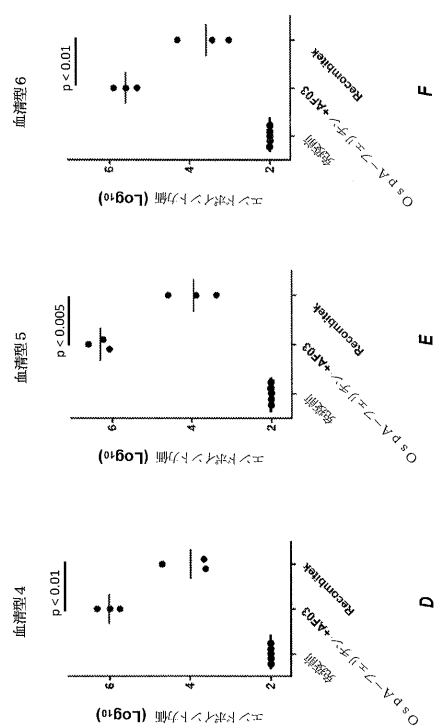
【図 9 - 4】



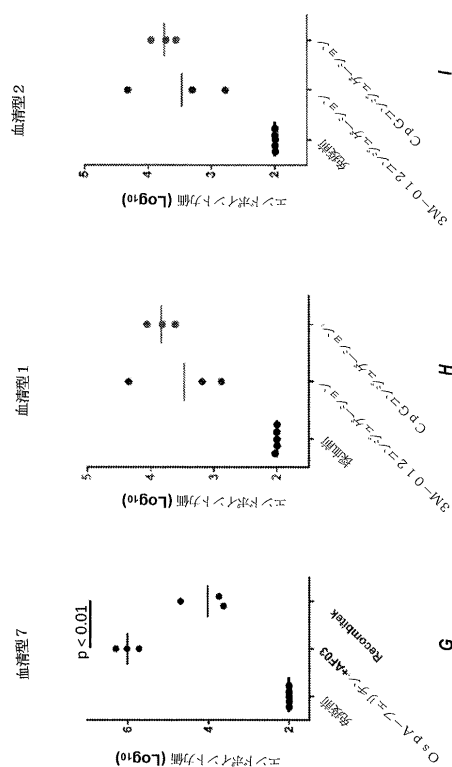
【図 10 - 1】



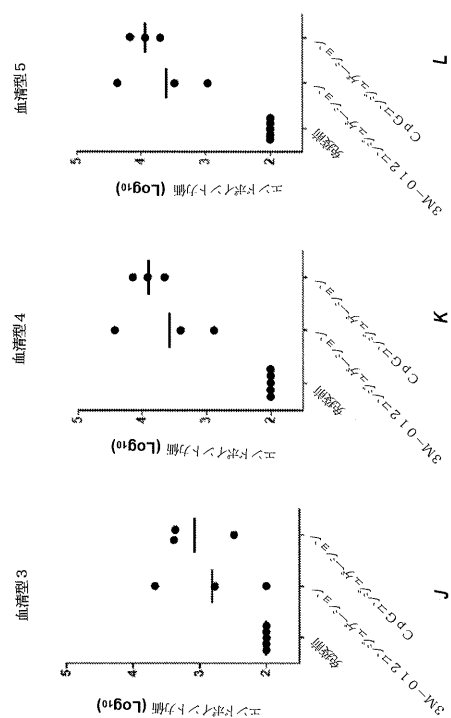
【图 10-2】



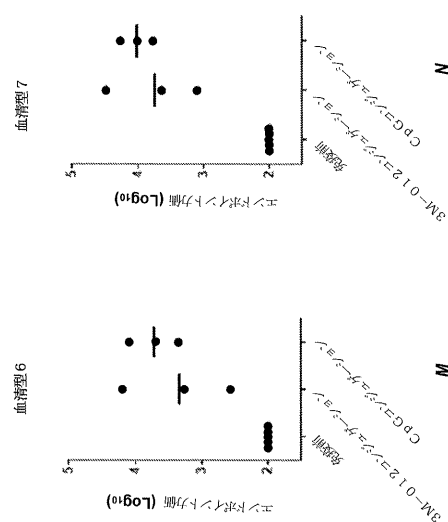
【図 10-3】



【 図 1 0 - 4 】



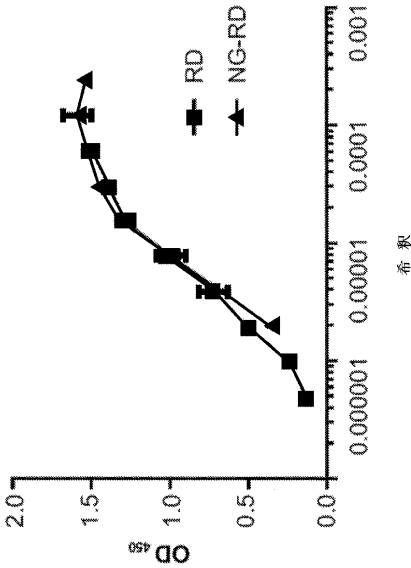
【図 10-5】



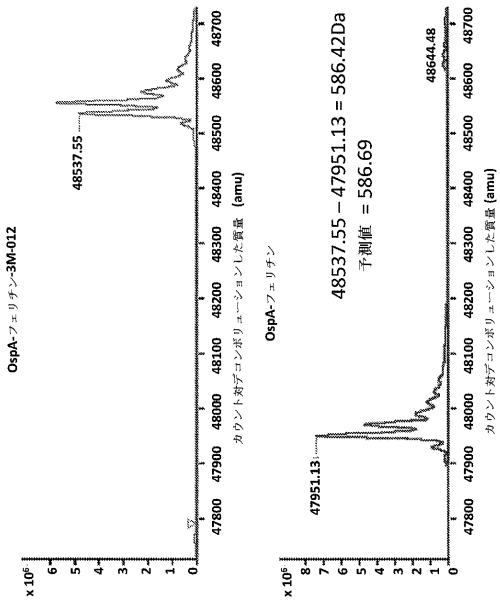
【図 1 1】

抗原	マウス/群	# 培養陽性マウスの数	# 感染マウス数 (培養および PCR)	感染%	P 値
一 価 -3M-012	8	0	0	0	P<0.0005
六 価 -3M-012	8	0	1	12.5	P<0.005
対照粒子	9	6	7	77.8	

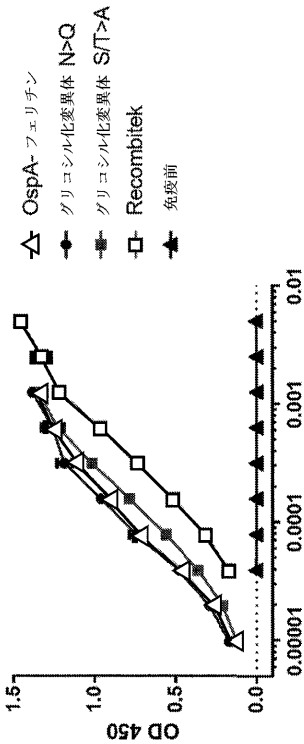
【図 1 3】



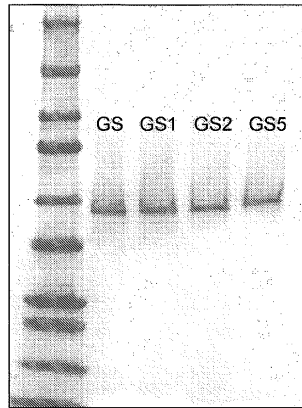
【図 1 2】



【図 1 4】



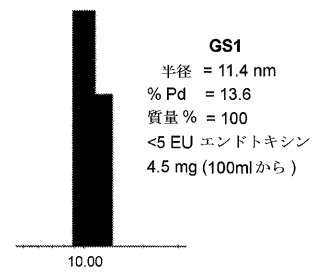
【図 15-1】



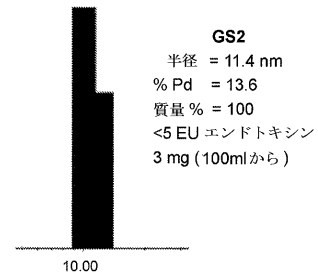
GS OspA-GS- フェリチン
 GS1 OspA- GGGS- フェリチン
 GS2 OspA- GGGS GGGS- フェリチン
 GS5 OspA- GGGS GGGS GGGS GGGS GGGS- フェリチン

A

【図 15-2】

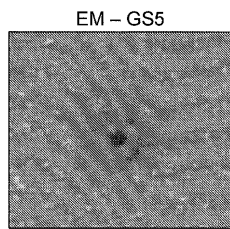


B

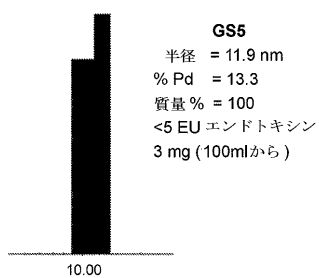


C

【図 15-3】

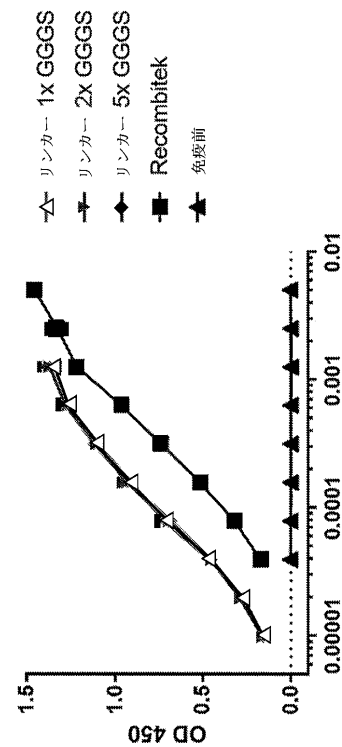


D

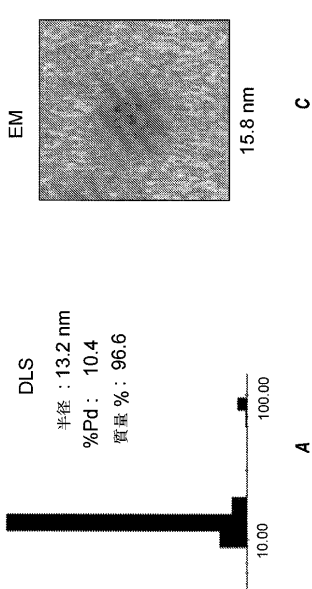


E

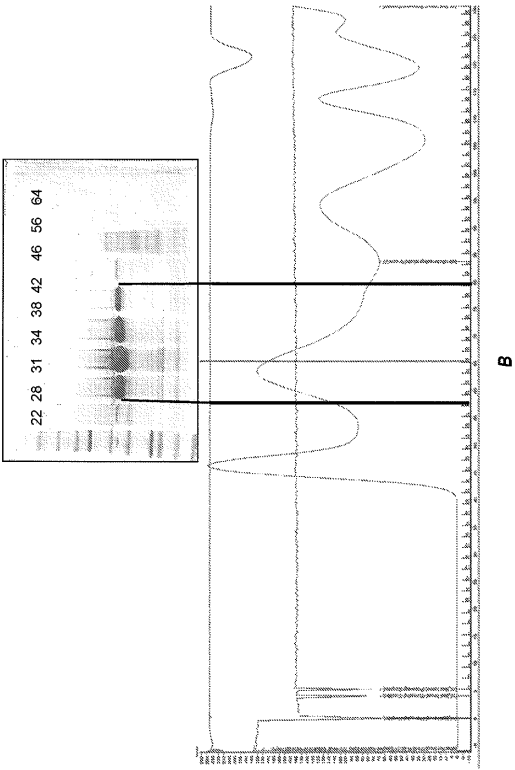
【図 16】



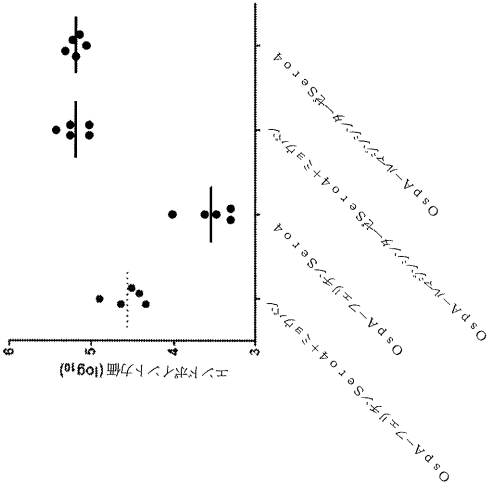
【図 17-1】



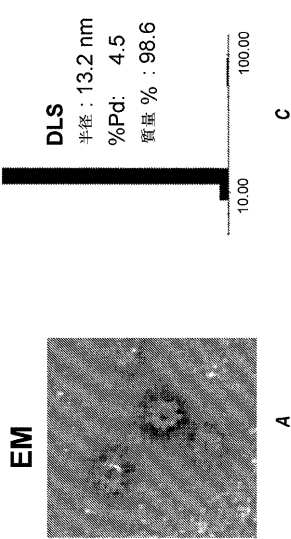
【図 17-2】



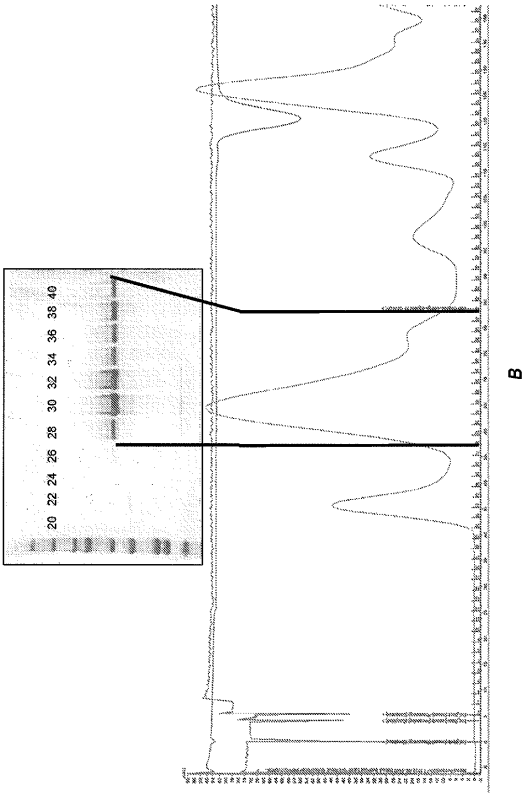
【図 18】



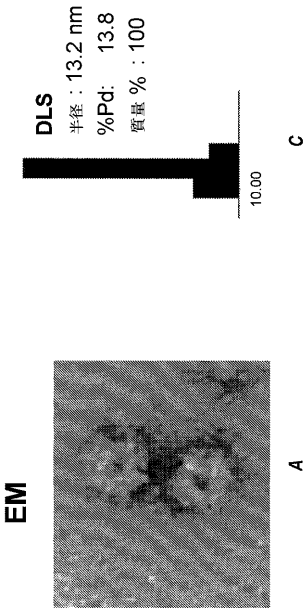
【図 19-1】



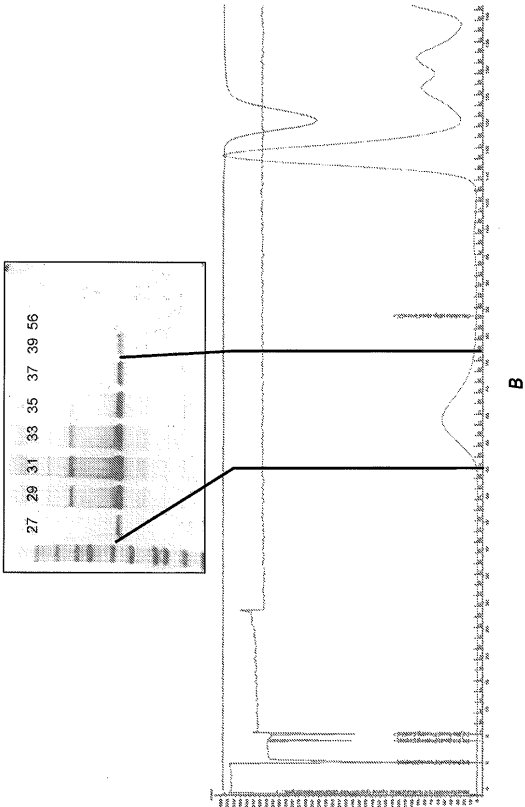
【図 19-2】



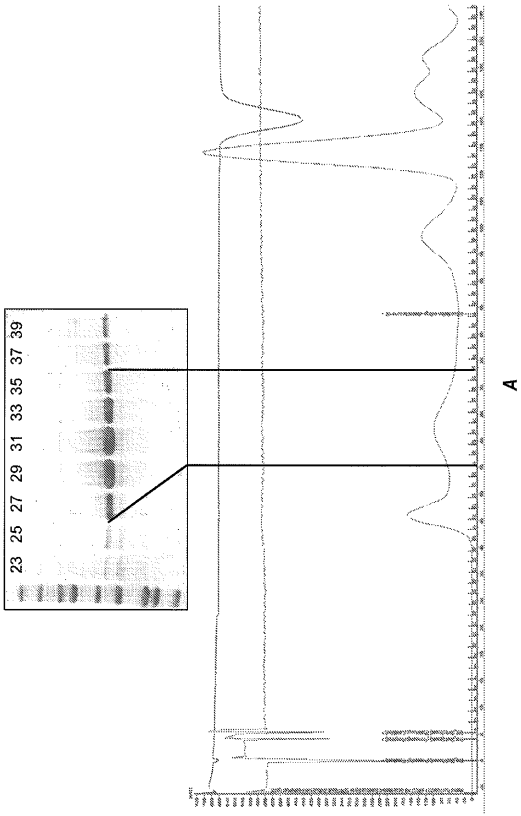
【図 20-1】



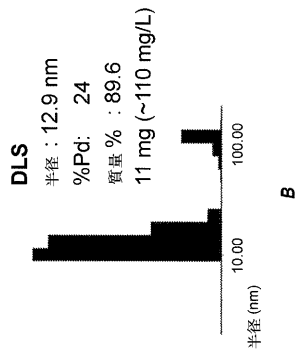
【図 20-2】



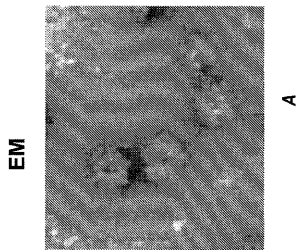
【図 21 A】



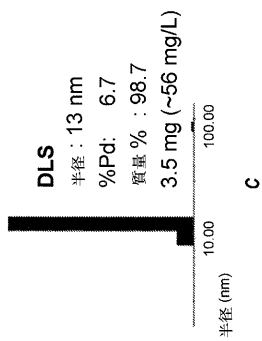
【図 2 1 B】



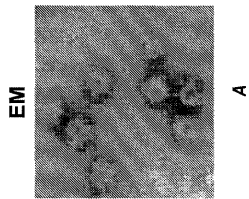
【図 2 2 A】



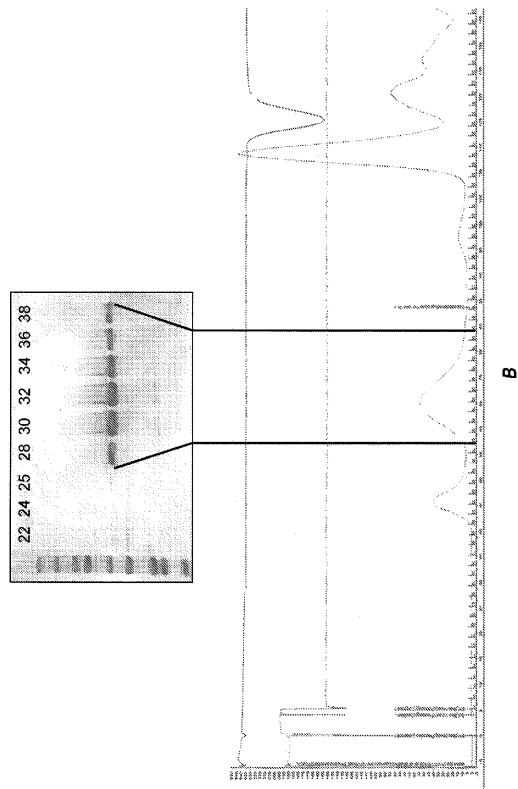
【図 2 2 C】



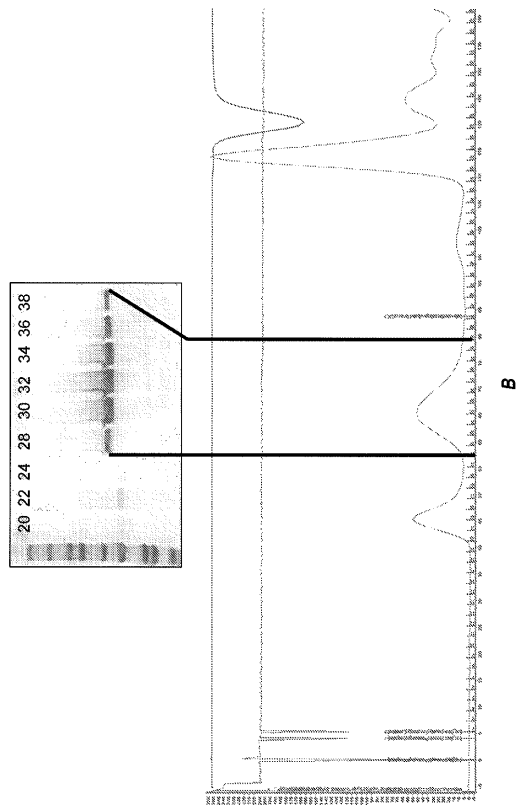
【図 2 3 A】



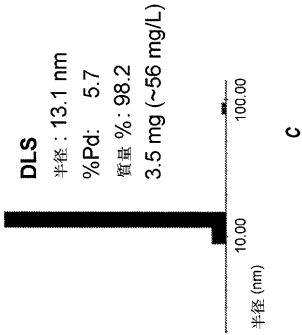
【図 2 2 B】



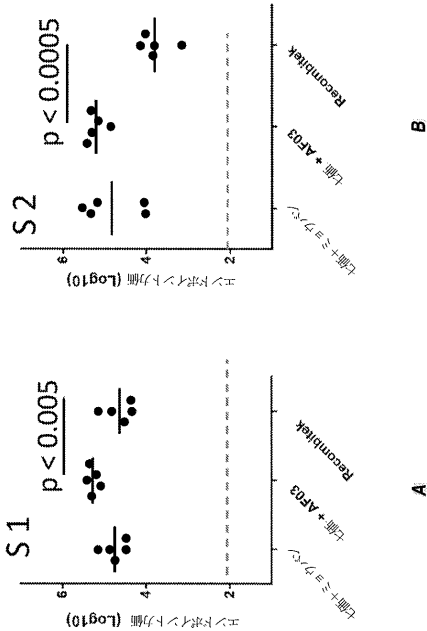
【図 2 3 B】



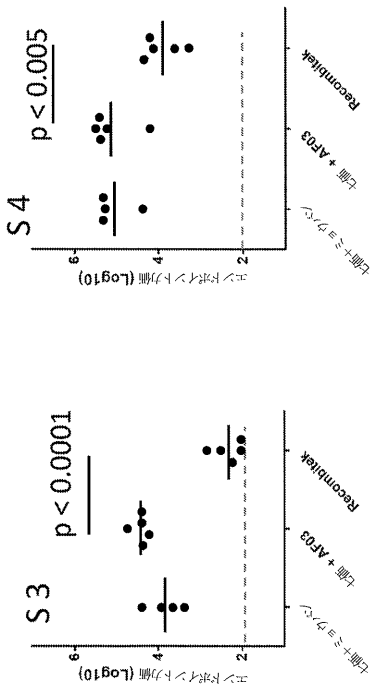
【 図 2 3 C 】



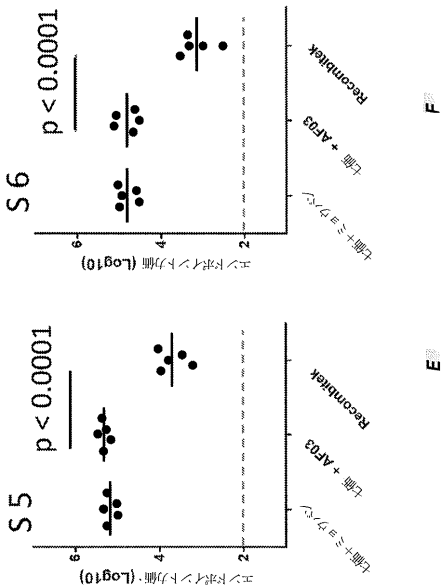
【 図 2 4 - 1 】



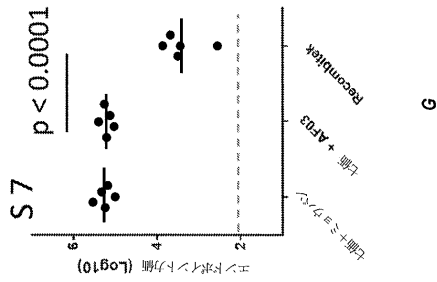
【 図 2 4 - 2 】



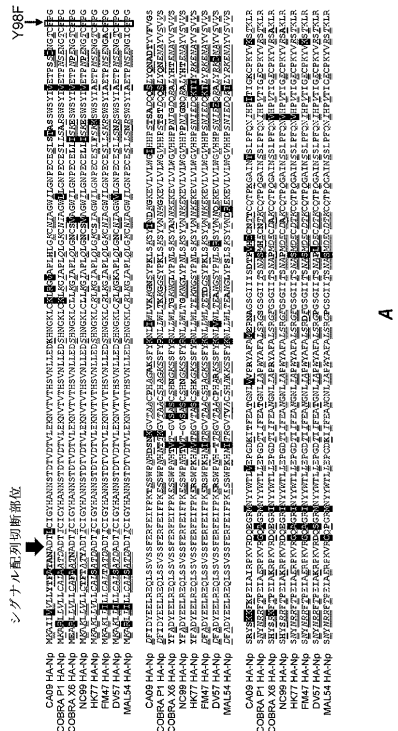
【 図 2 4 - 3 】



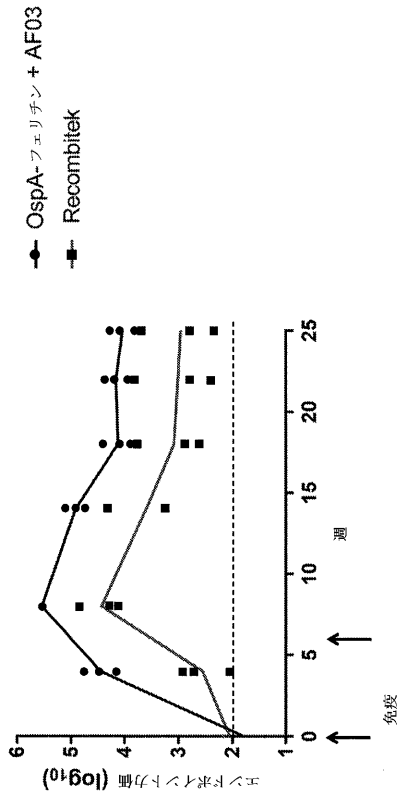
【図 2 4 - 4】



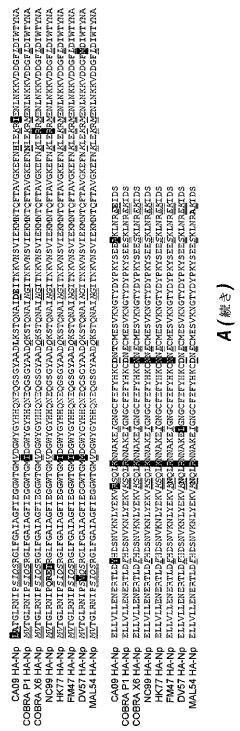
【図 2 6 - 1】



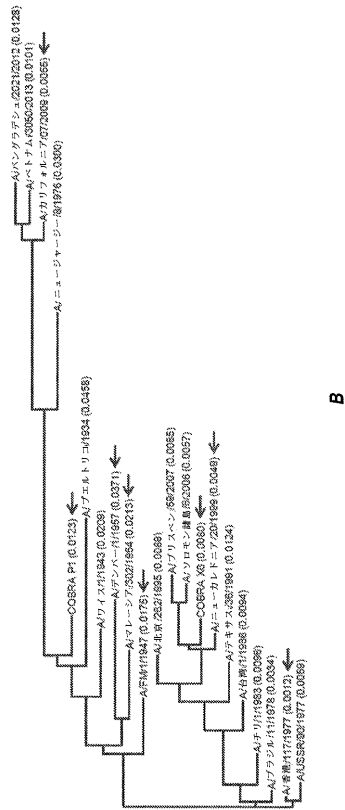
【図 2 5】



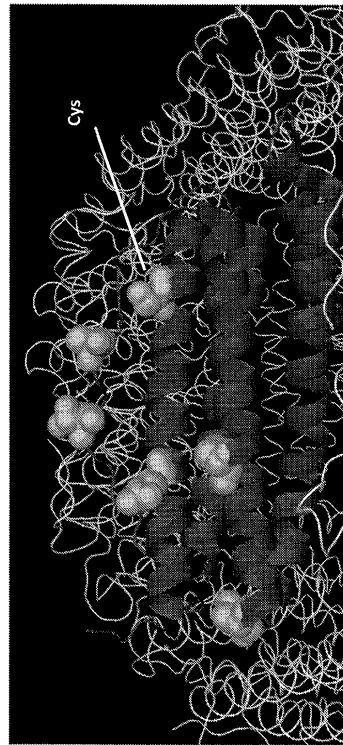
【図 2 6 - 2】



【图 2 6 - 3】

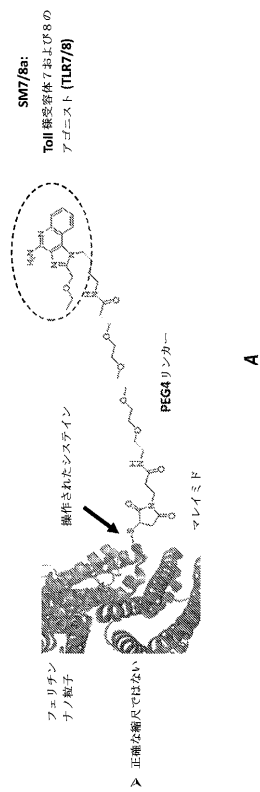


【图 2 7】

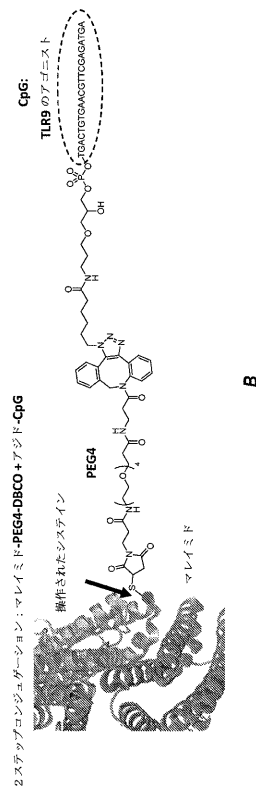


【図 28 A】

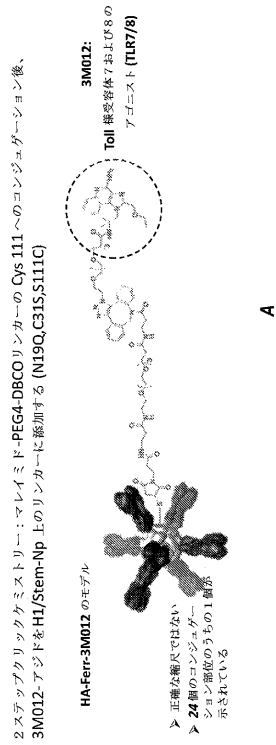
1 ステップクリックケミストリー: SM7/8a-PEG4-マレイミドは、H1/Stem-Np (N19Q, C31S, S111C) の還元後、部位特異的に不対システイン (Cys 111) にコンジュゲートされる。



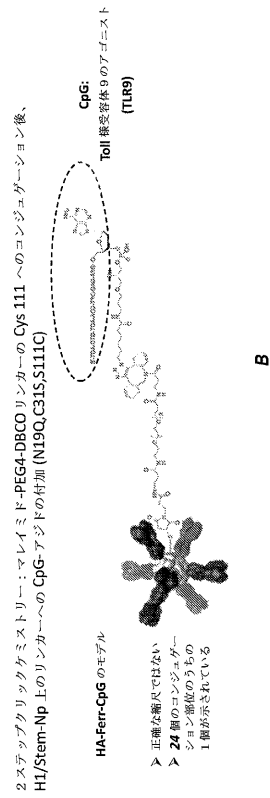
【図 28 B】



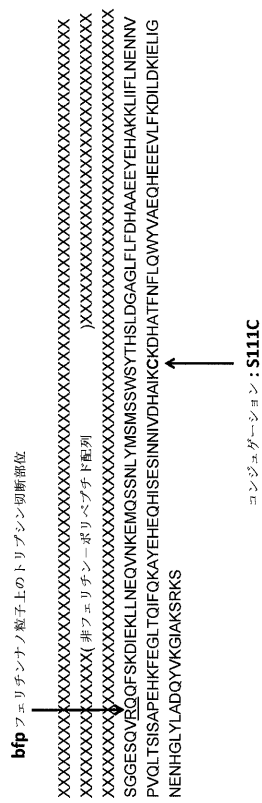
【図 29 A】



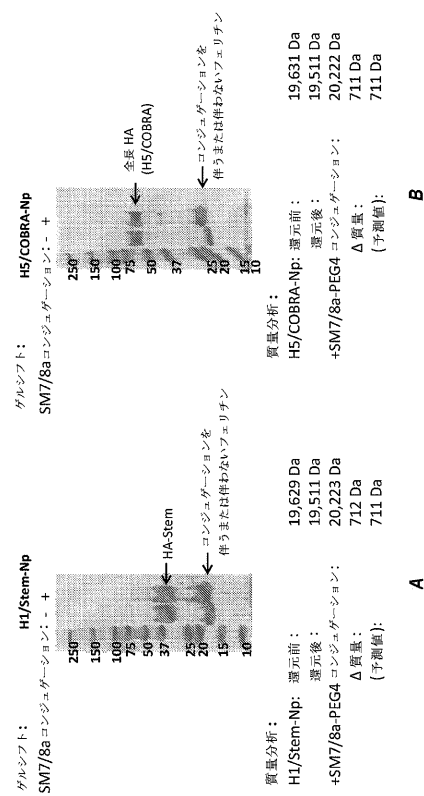
【图 2 9 B】



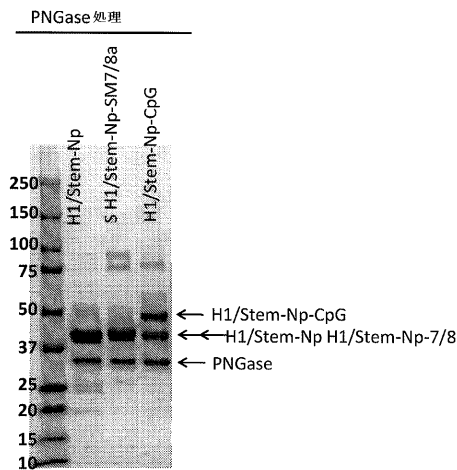
【 図 3 0 】



【 図 3 1 】

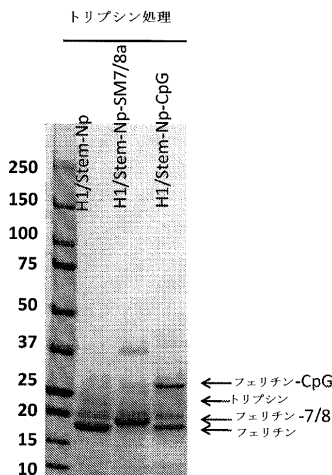


【図 3 2 A】



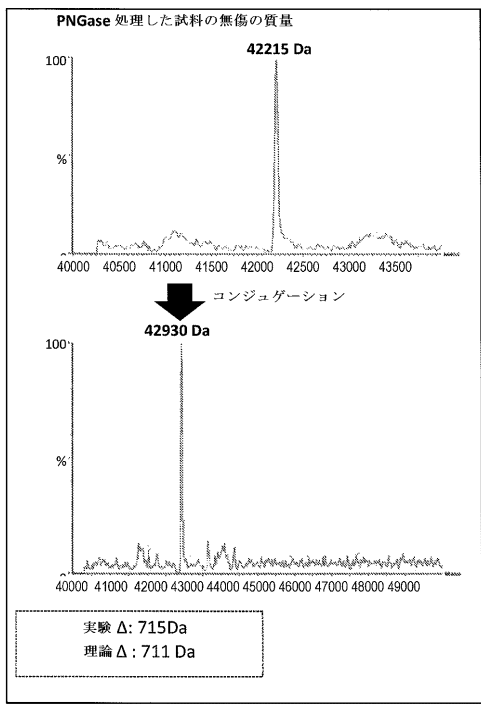
A

【図 3 2 B】



B

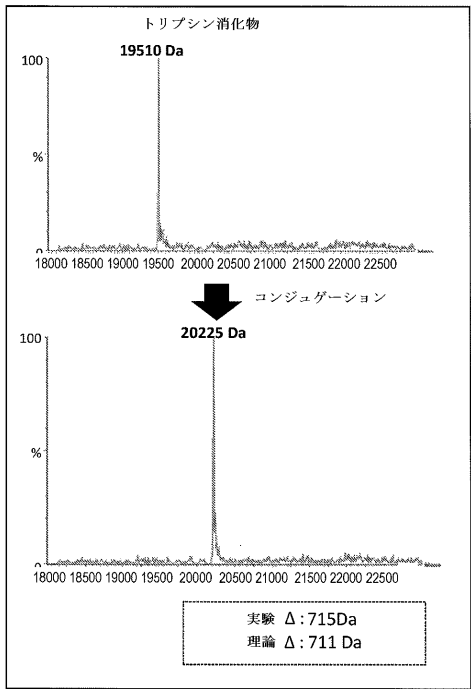
【図 3 3 A】



コンジュゲーション効率 = 100%

A

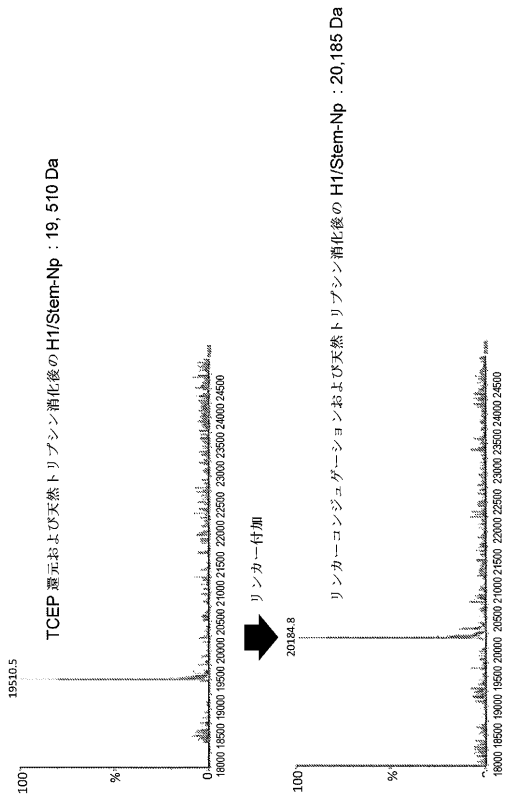
【図 3 3 B】



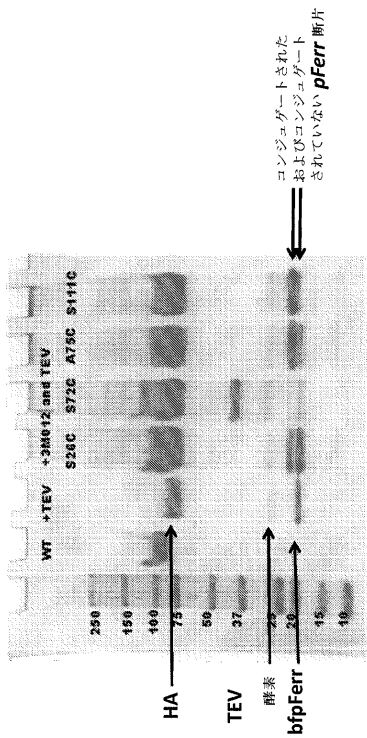
コンジュゲーション効率 = 100%

B

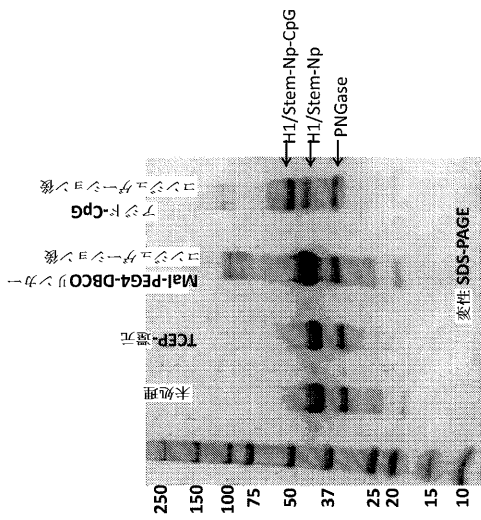
【図 3 4】



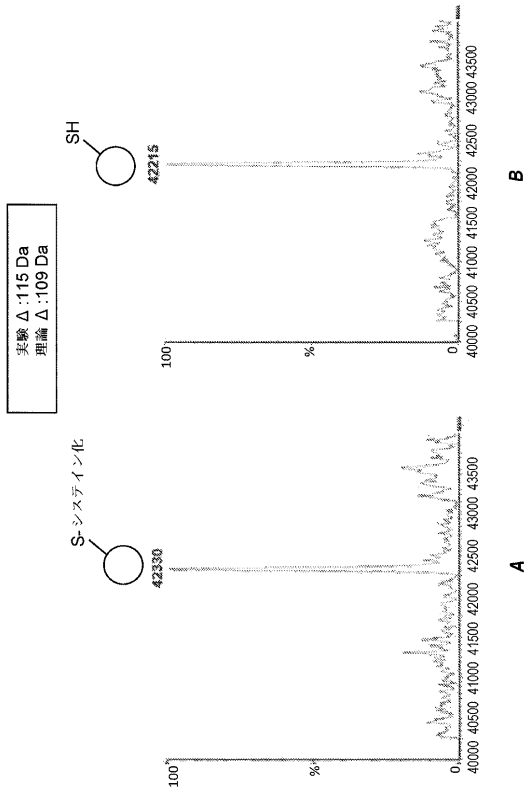
【図 3 6】



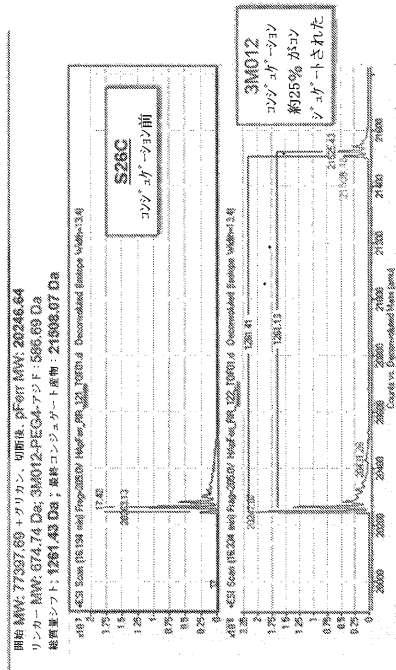
【図 3 5】



【図 3 7 - 1】

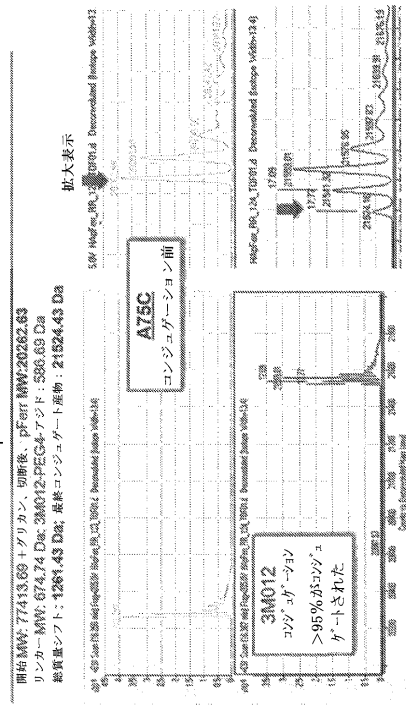


【図 3 7 - 2】



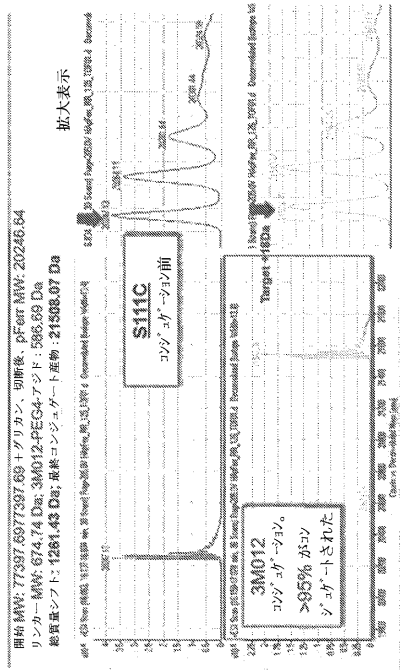
6

【図 3 7 - 3】



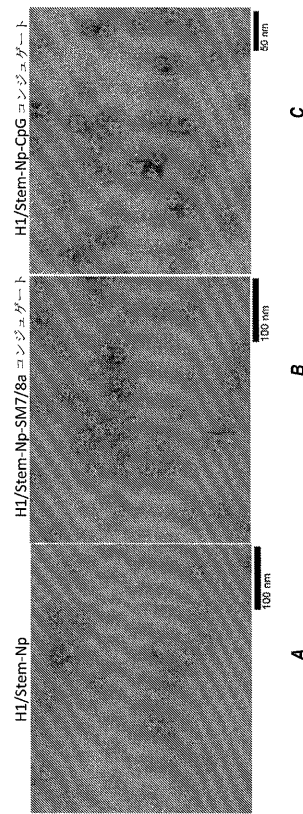
Q

【図 3 7 - 4】



3

【図 3 8 - 1】

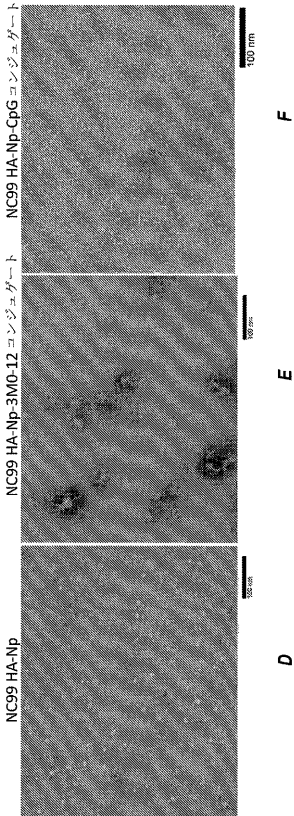


A

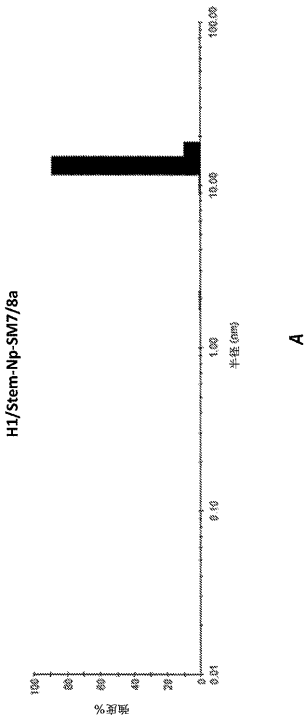
8

6

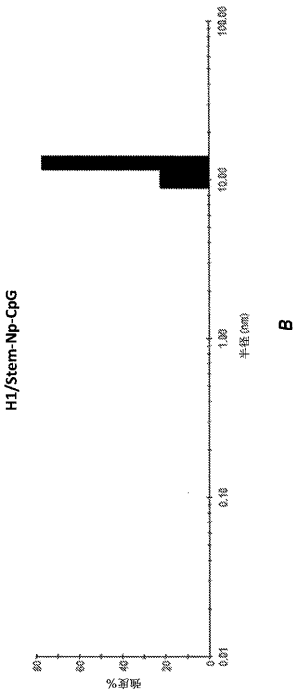
【図 3 8 - 2】



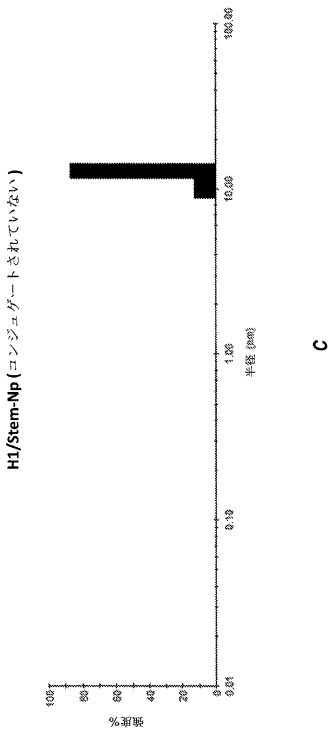
【図 3 9 - 1】



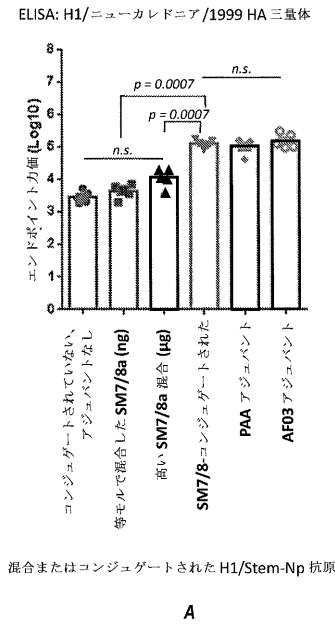
【図 3 9 - 2】



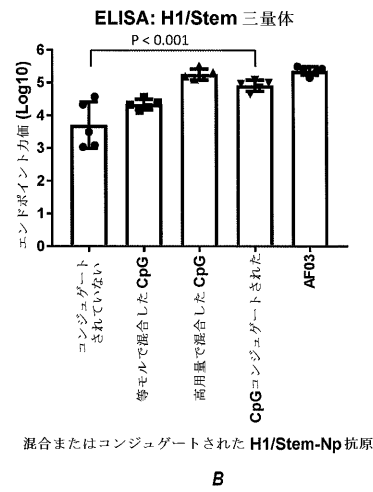
【図 3 9 - 3】



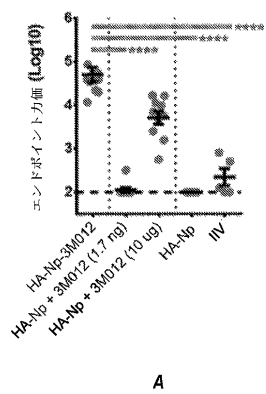
【 図 4 0 A 】



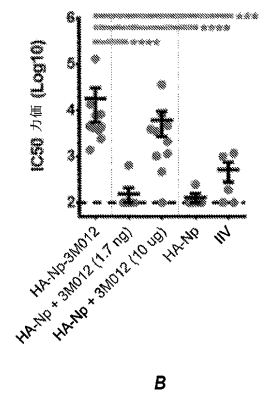
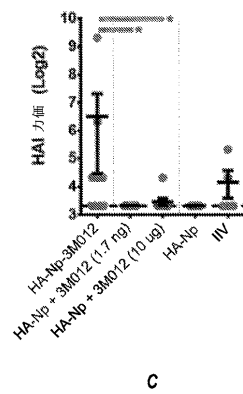
【 図 4 0 B 】



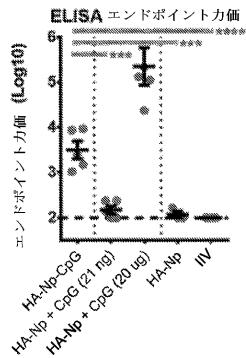
【 図 4 1 - 1 】



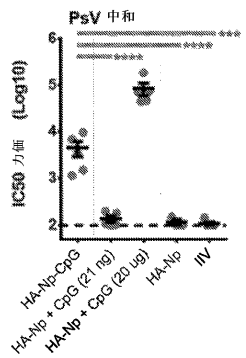
【 図 4 1 - 2 】



【 図 4 2 - 1 】

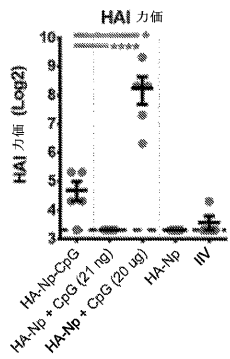


A



B

【 図 4 2 - 2 】



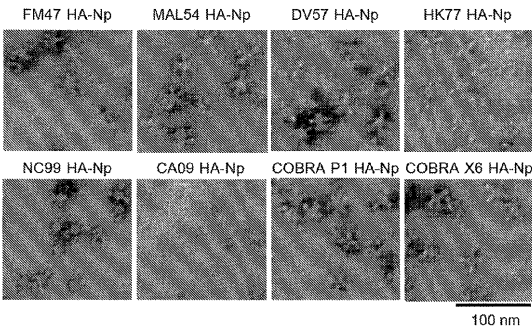
C

【 図 4 3 - 1 】

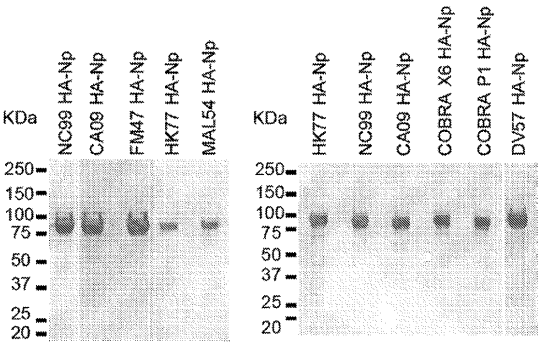
年	ナノ粒子	サイズ (nm)	分散性 (%)
1947	FM47 HA-Np	16.8	8.9
1954	MAL54 HA-Np	17.9	8.9
1957	DV57 HA-Np	17.7	6.2
1977	HK77 HA-Np	17.6	10.9
1999	NC99 HA-Np	17.3	8.6
2009	CA09 HA-Np	16.8	9.3
1999-2012	COBRA X6 HA-Np	17.5	5.1
1933-1957 + 2009-2011 および 1931-1998	COBRA P1 HA-Np	17.1	7

A

【 図 4 3 - 2 】

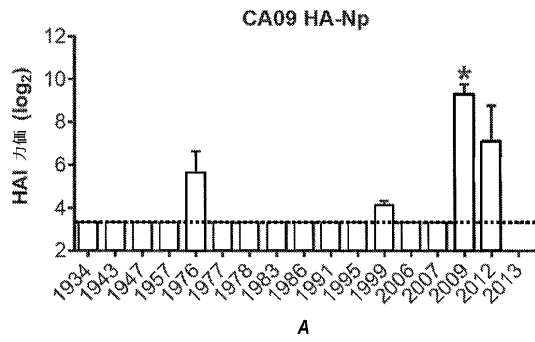


C

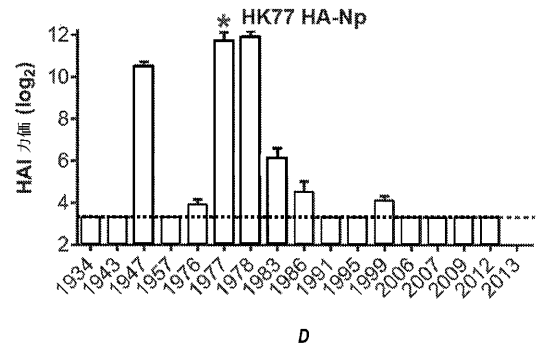
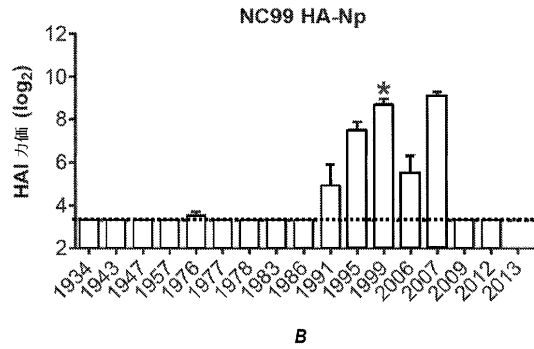
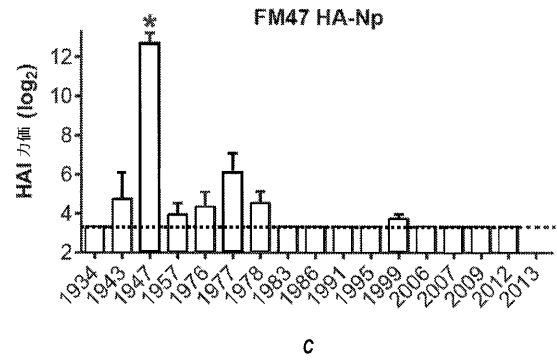


B

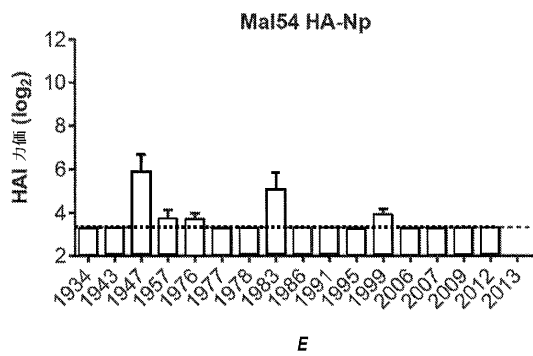
【図 4 4 - 1】



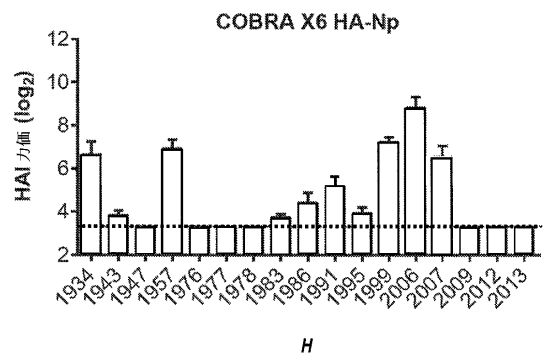
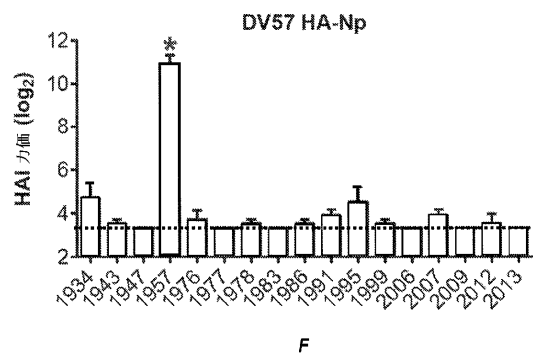
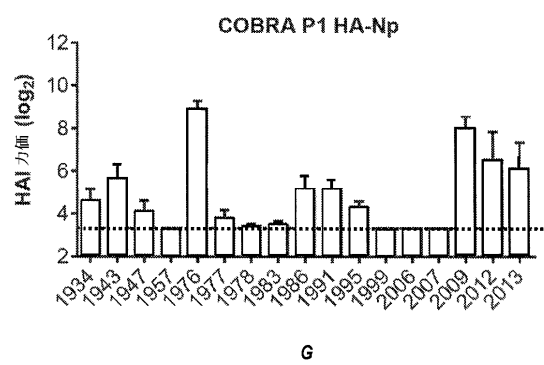
【図 4 4 - 2】



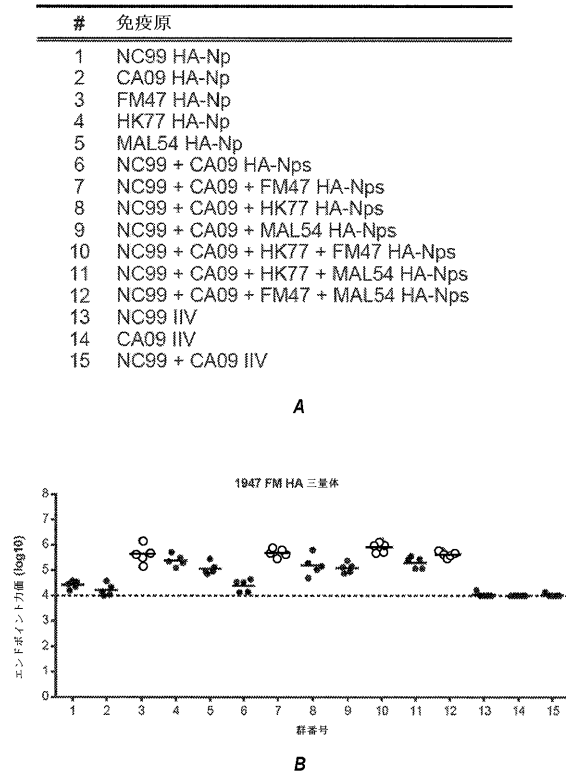
【図 4 4 - 3】



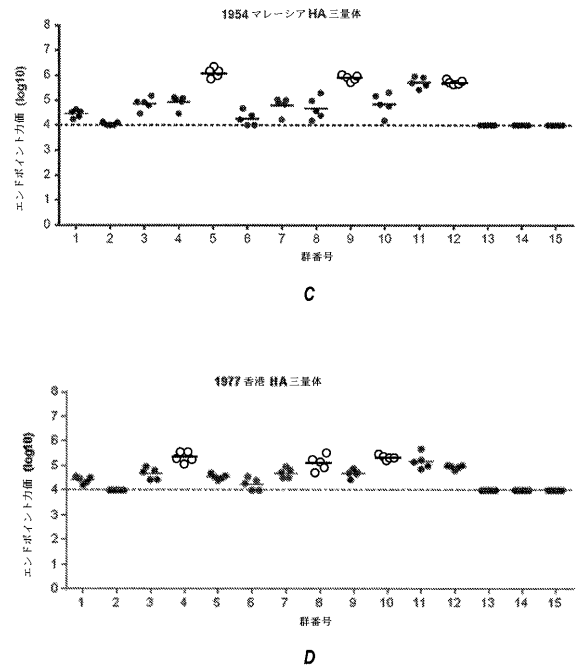
【図 4 4 - 4】



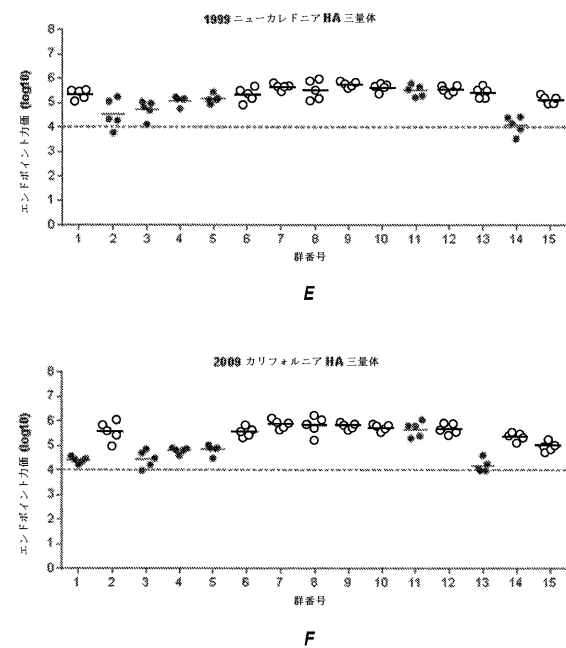
【図 4 5 - 1】



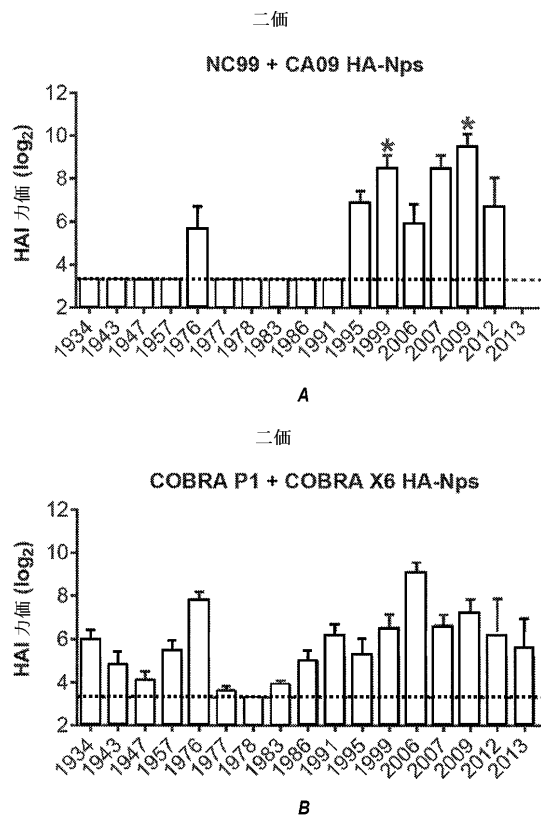
【図 4 5 - 2】



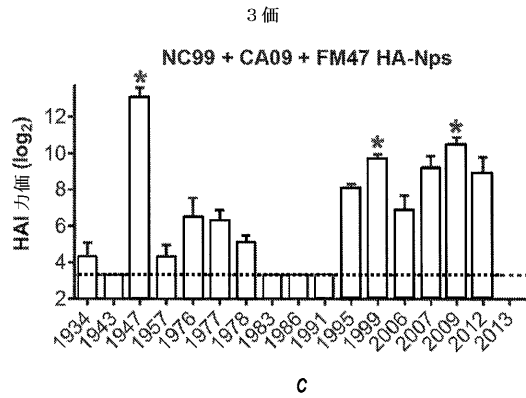
【図 4 5 - 3】



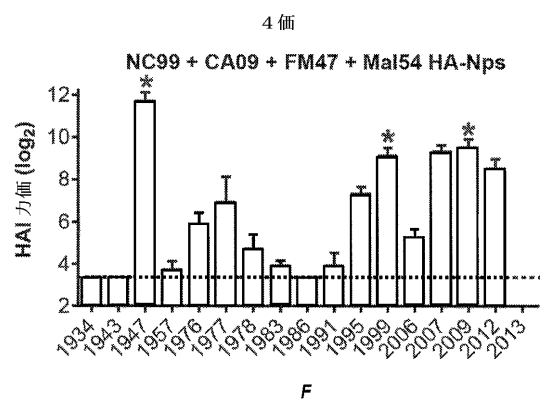
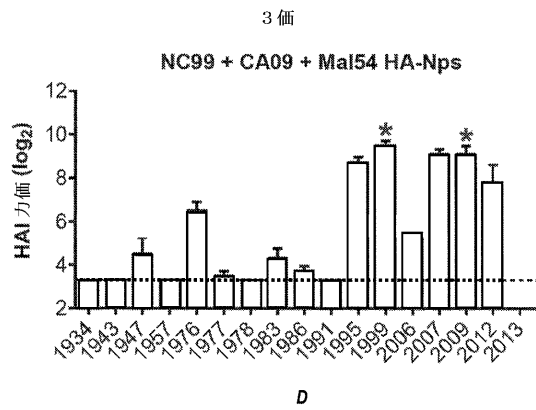
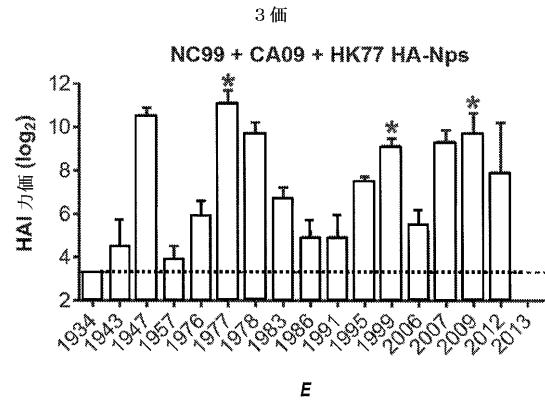
【図 4 6 - 1】



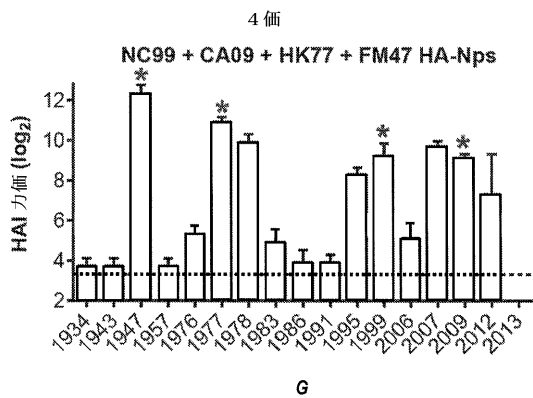
【図 4 6 - 2】



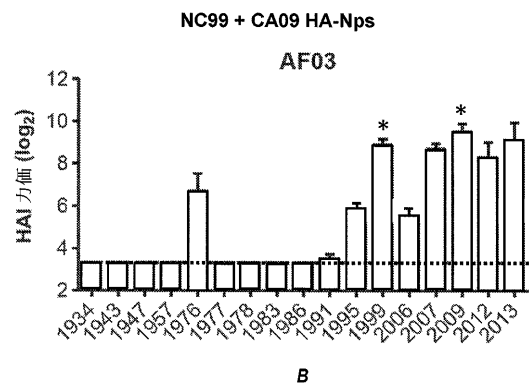
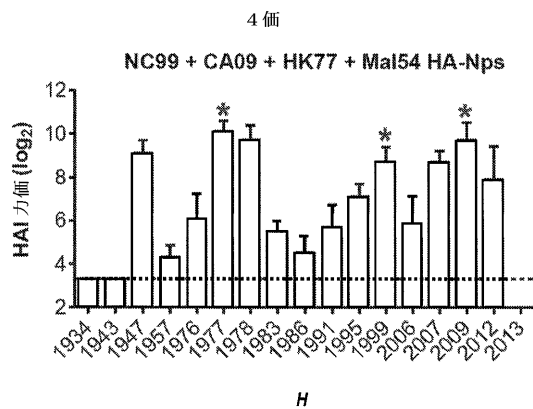
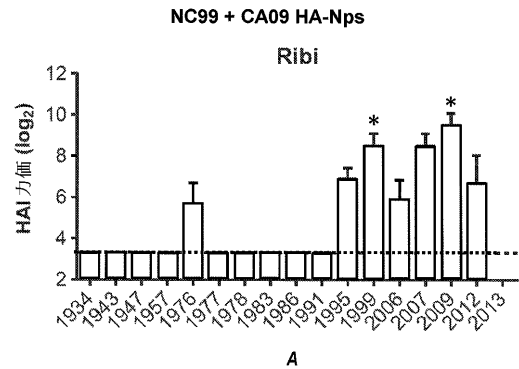
【図 4 6 - 3】



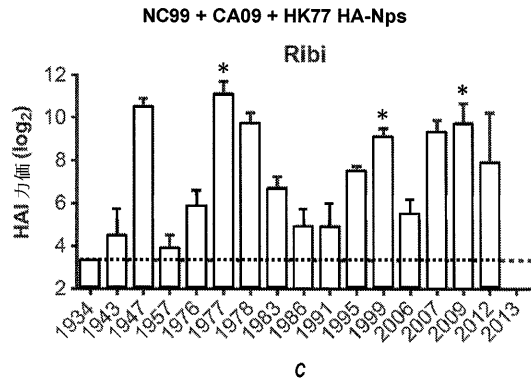
【図 4 6 - 4】



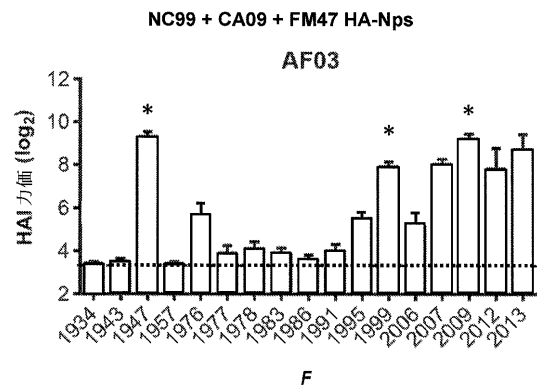
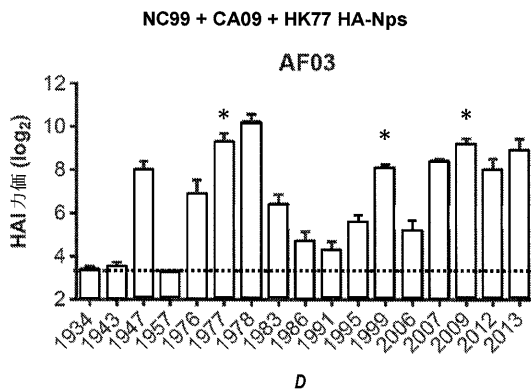
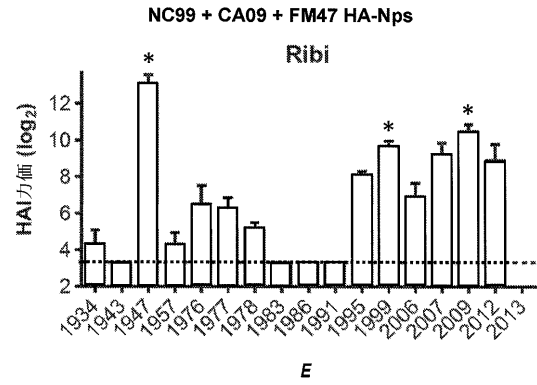
【図 4 7 - 1】



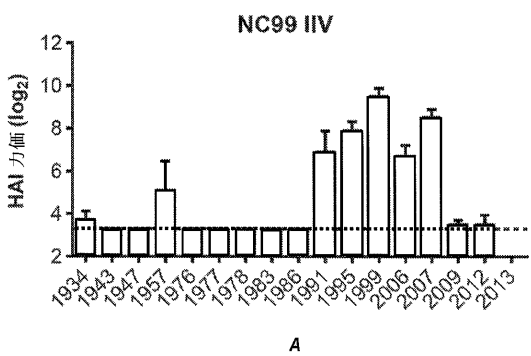
【図 4 7 - 2】



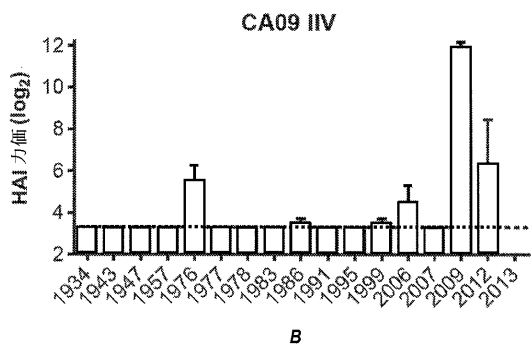
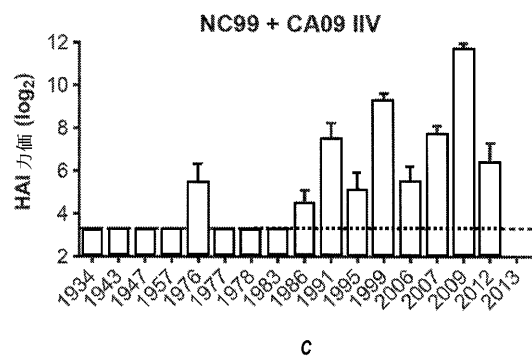
【図 4 7 - 3】



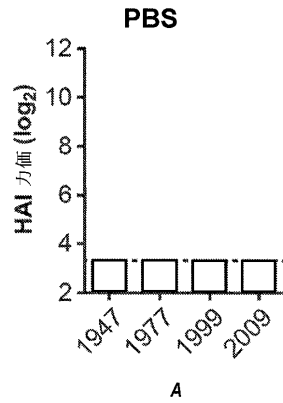
【図 4 8 - 1】



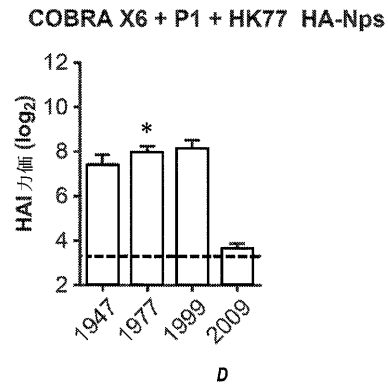
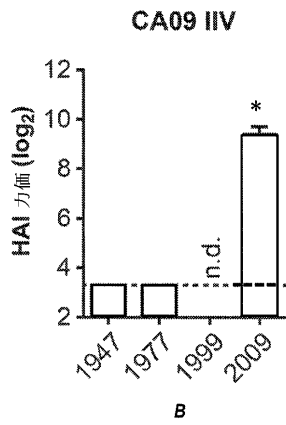
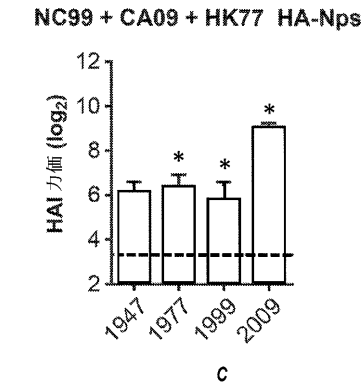
【図 4 8 - 2】



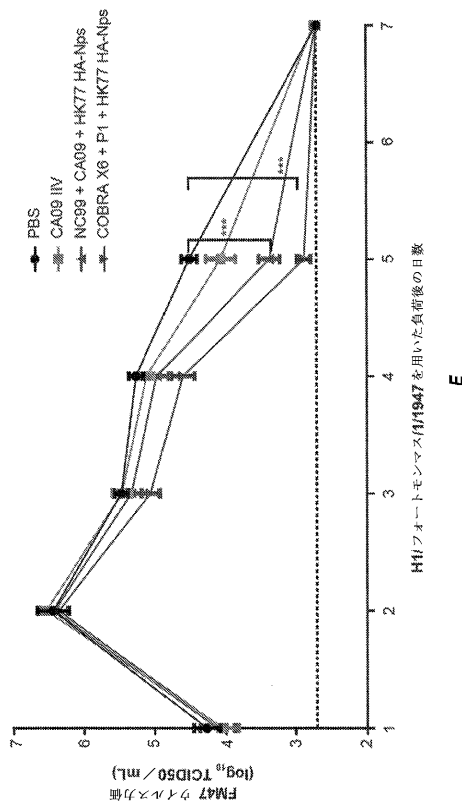
【図49-1】



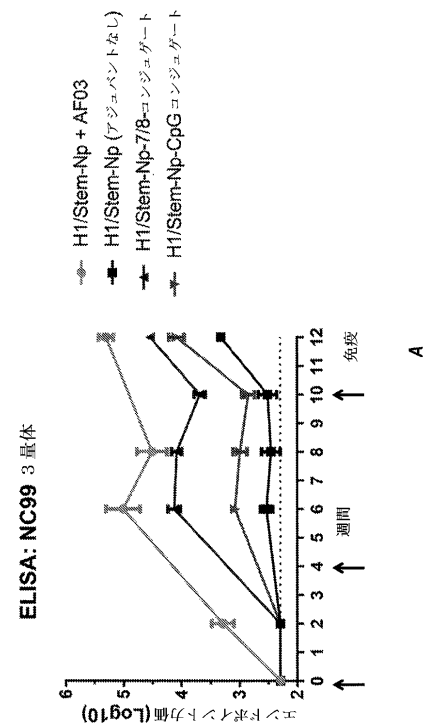
【図49-2】



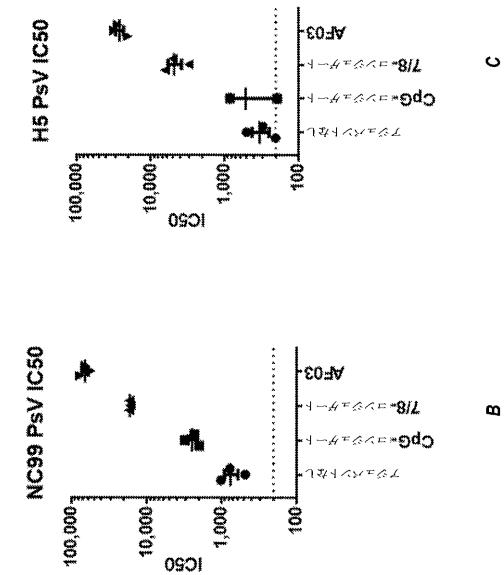
【図49-3】



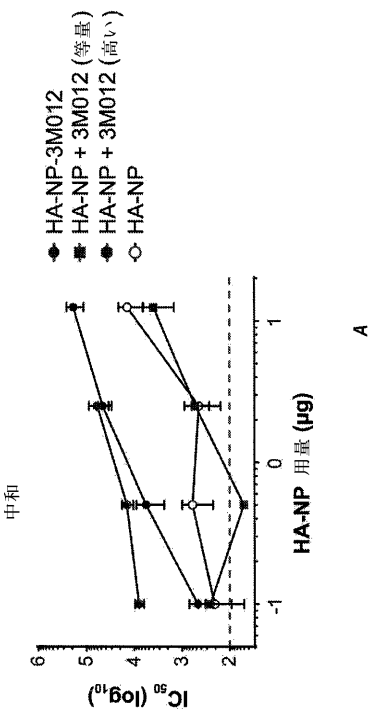
【図50-1】



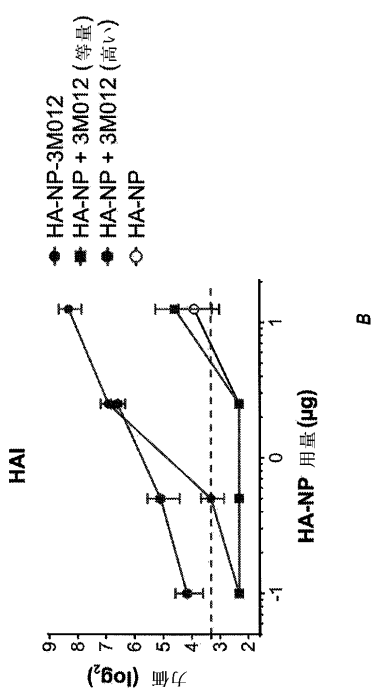
【図 5 0 - 2】



【図 5 1 - 1】



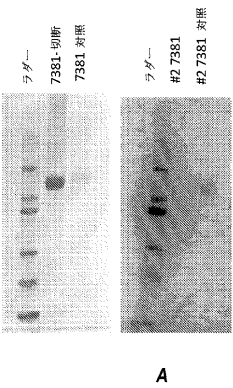
【図 5 1 - 2】



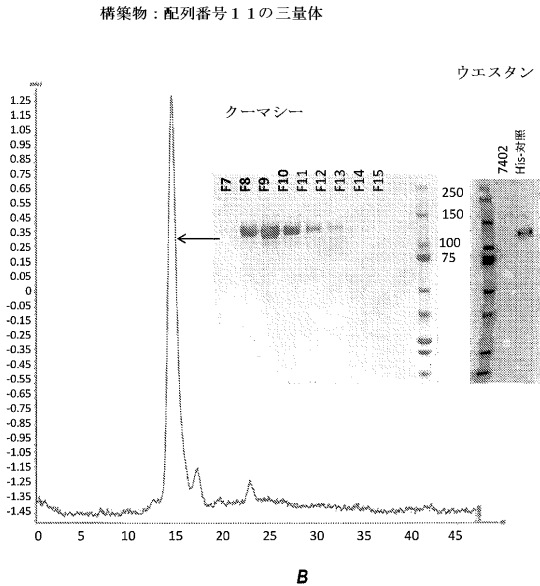
【図 5 2 - 1】

構築物：配列番号 406 の単量体

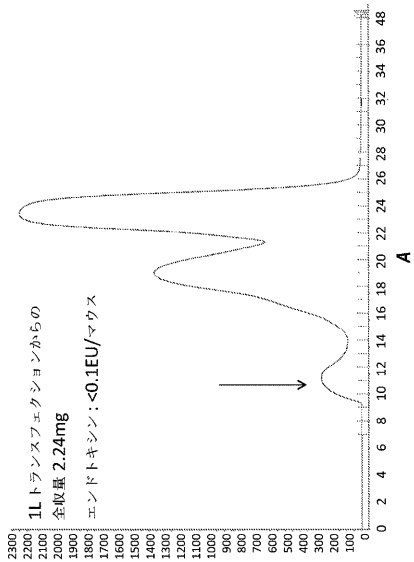
クーマシー ウェスタン 抗H i s



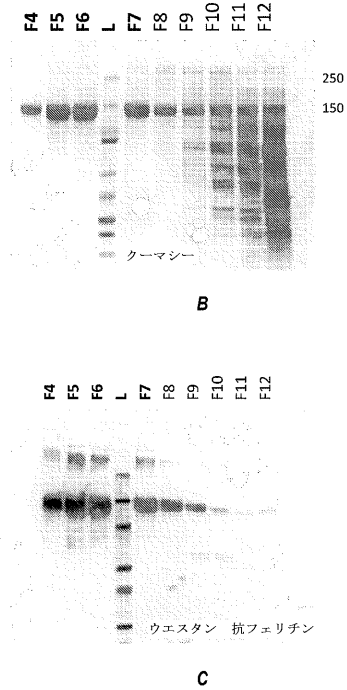
【図 5 2 - 2】



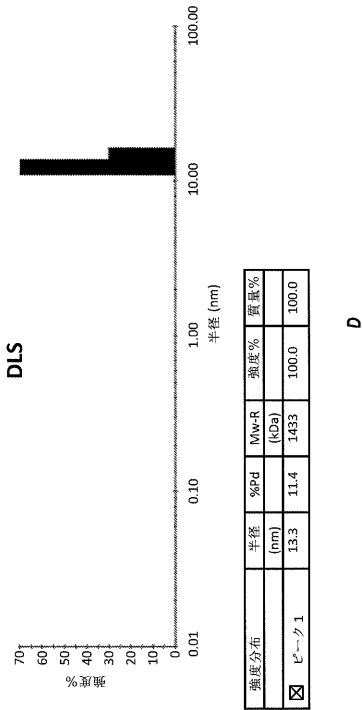
【図 5 3 - 1】



【図 5 3 - 2】

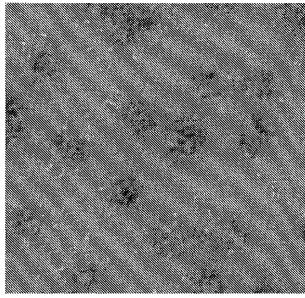


【図 5 3 - 3】



【図 5 3 - 4】

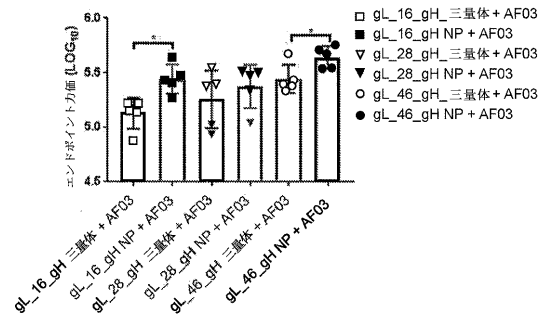
gLおよびgHナノ粒子の
陰性染色EM画像



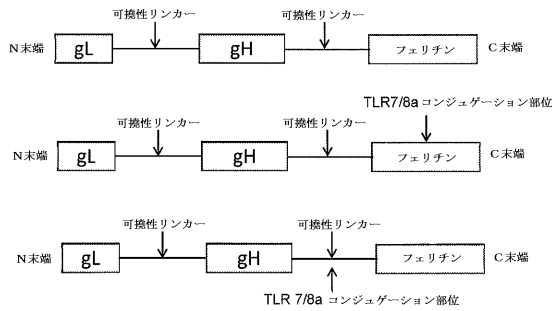
E

【図 5 5】

2回目の免疫後の三量体対ナノ粒子+AF03アジュバント

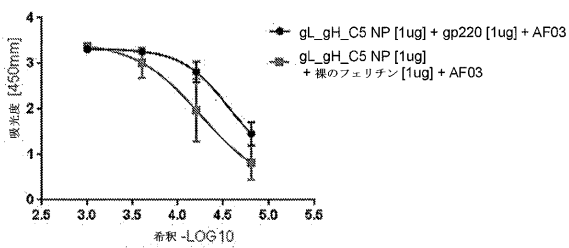


【図 5 4】



【図 5 6】

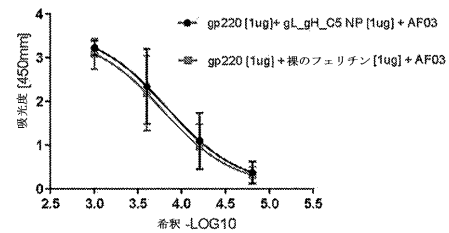
単量体一本鎖 gL/gH に対する
ELISA 結合アッセイ



A

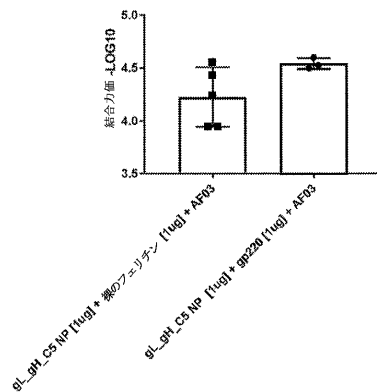
【図 5 7】

gp220 に対する ELISA 結合アッセイ



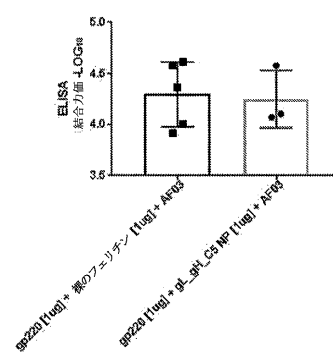
A

単量体一本鎖 gLgH に対する
ELISA 結合アッセイ



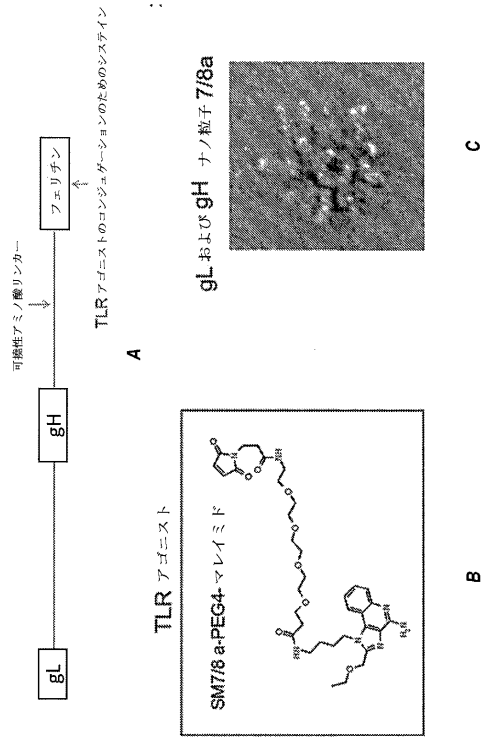
B

gp220 に対する ELISA 結合アッセイ

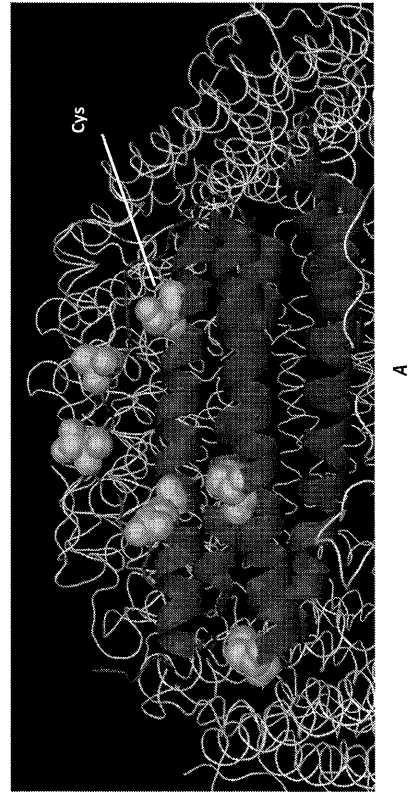


B

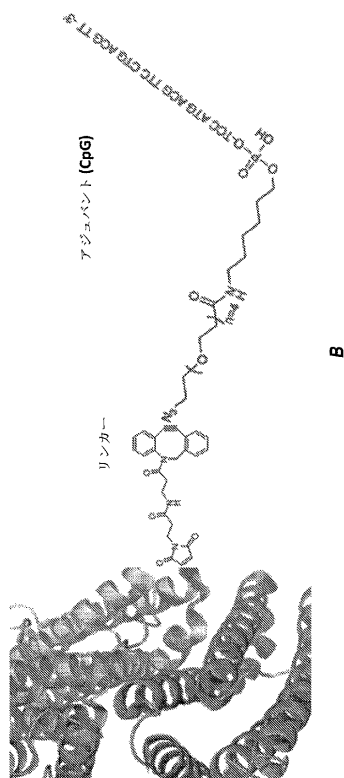
【図 5 8】



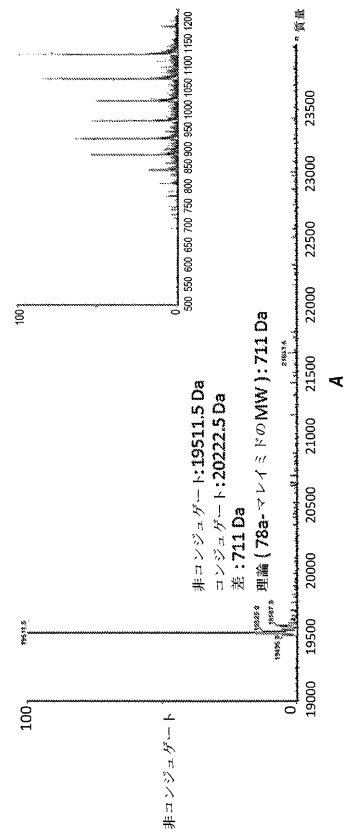
【図 5 9 A】



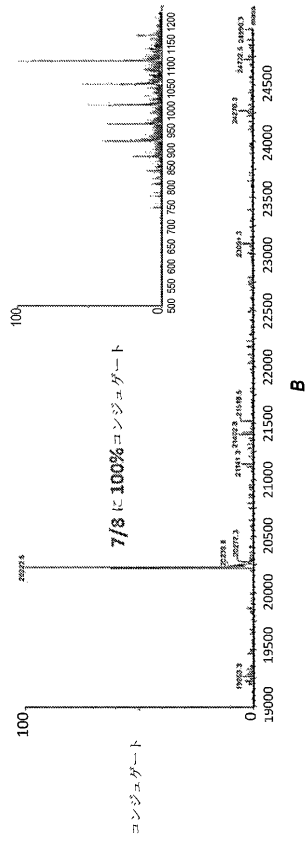
【図 5 9 B】



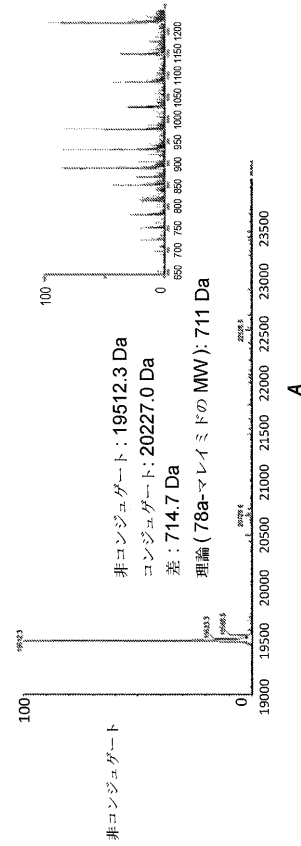
【図 6 0 A】



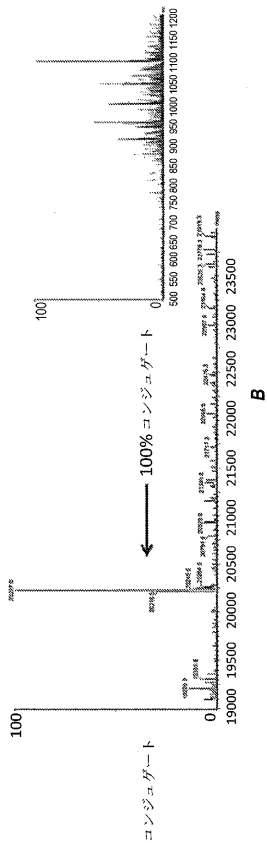
【 ㊦ 6 0 B 】



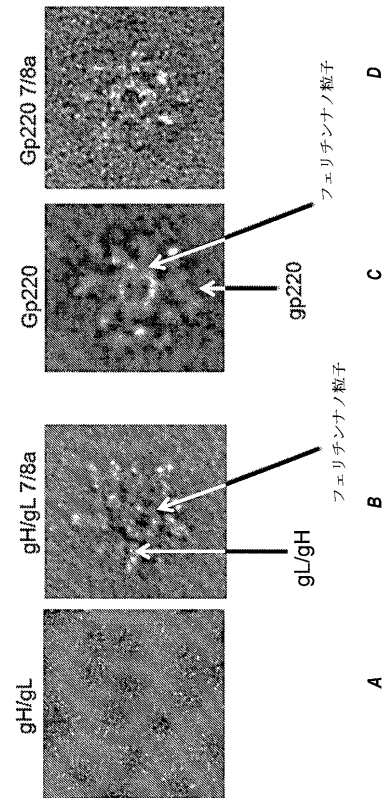
【图 6 1 A】



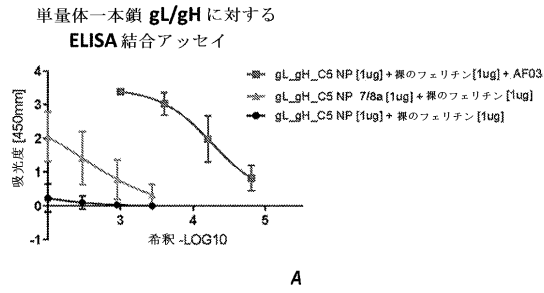
【図 6 1 B】



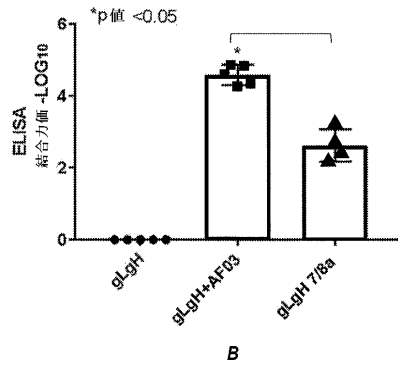
【图 6 2】



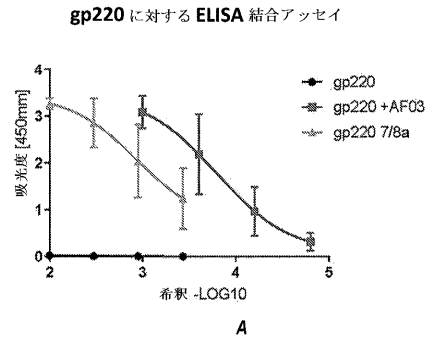
【図 6 3】



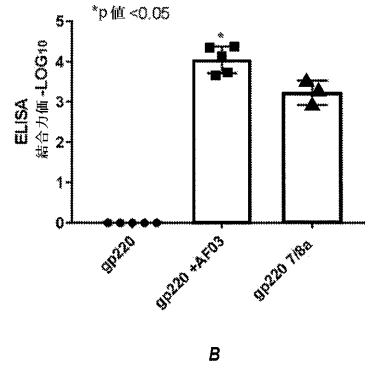
ELISA 結合アッセイ
単量体一本鎖 **gLgH**



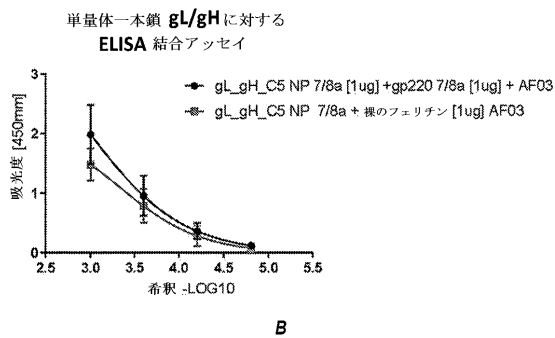
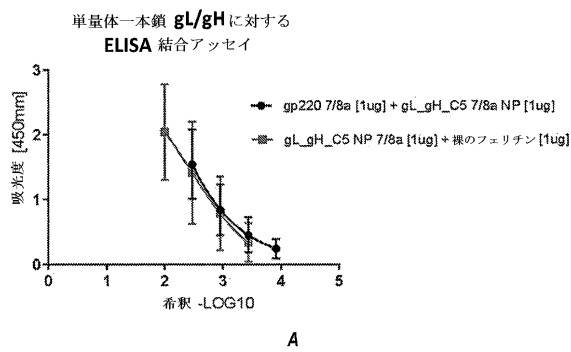
【図 6 4】



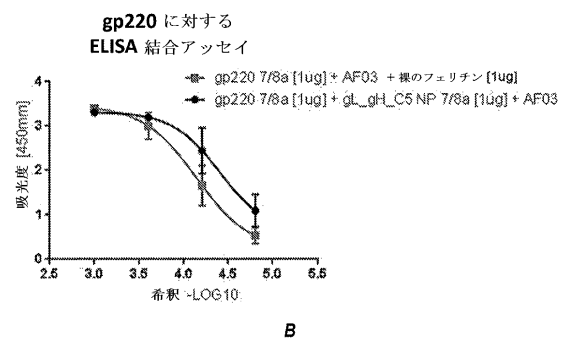
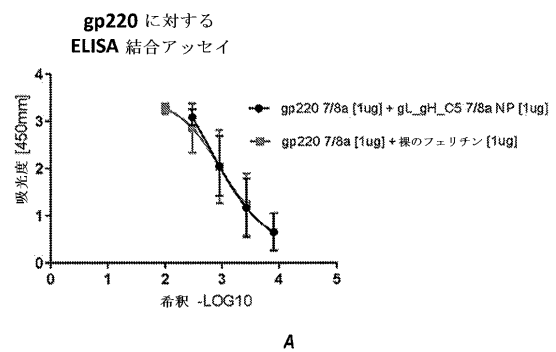
ELISA 結合アッセイ
単量体一本鎖 **gp220**



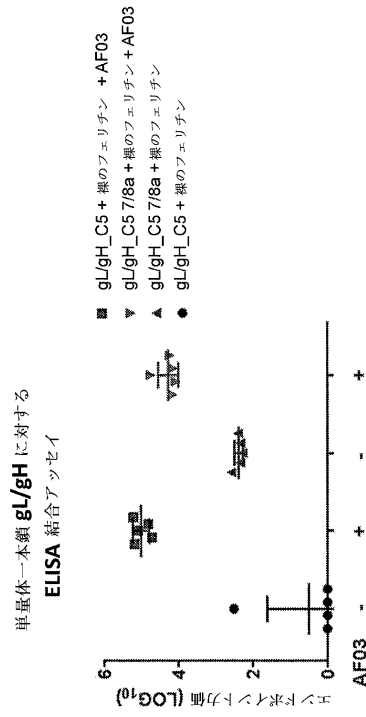
【図 6 5】



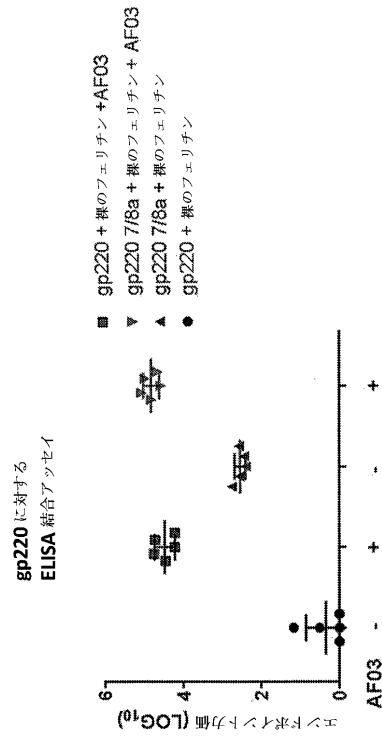
【図 6 6】



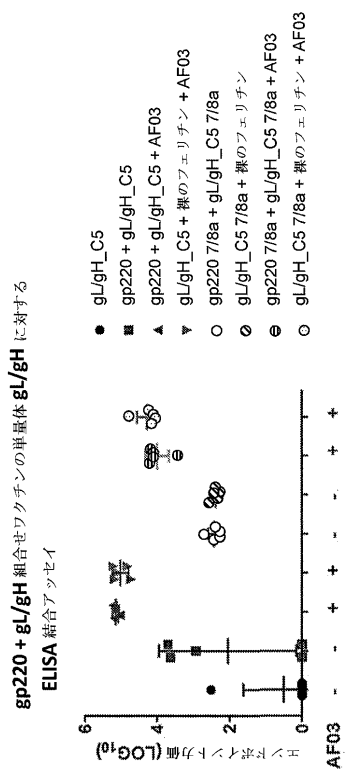
【图 6 7】



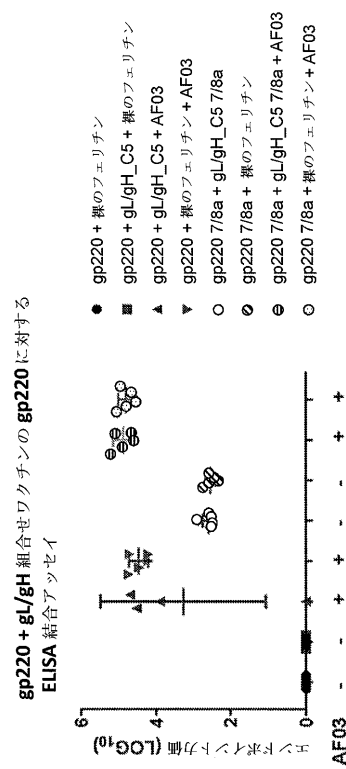
【图 6 8】



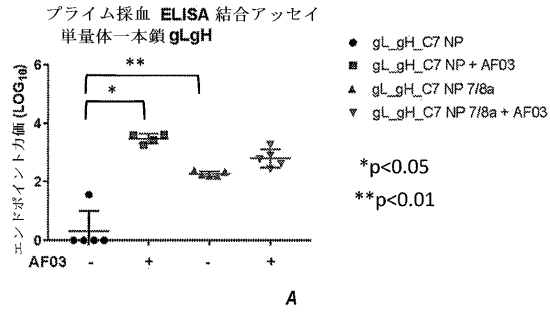
【图 6 9】



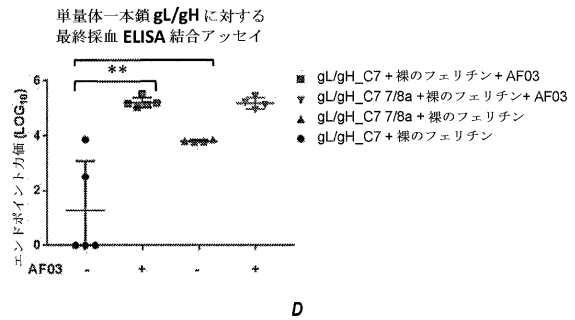
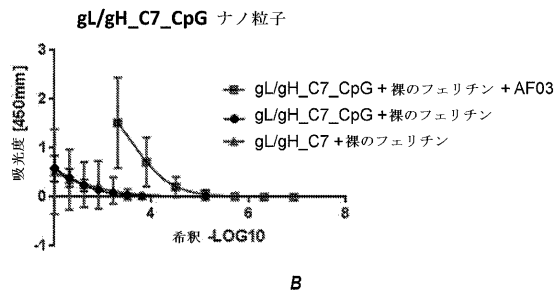
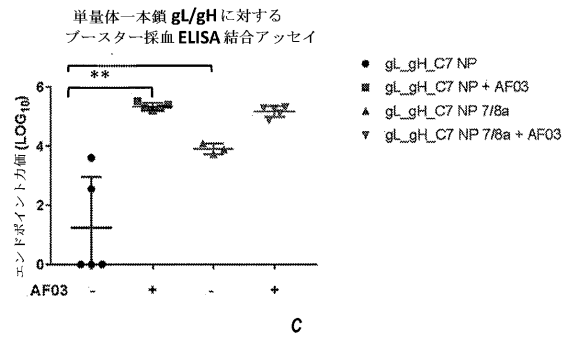
【 図 7 0 】



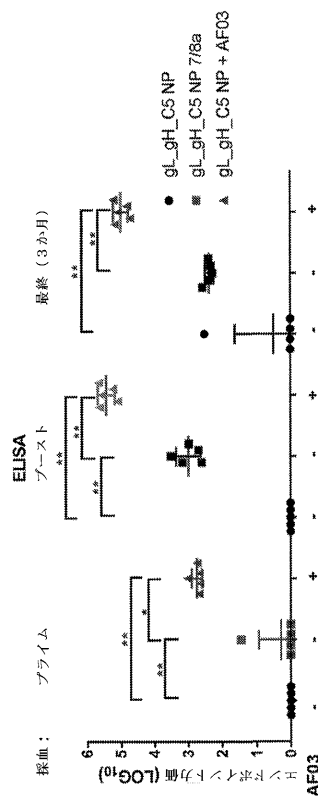
【図 7 1 - 1】



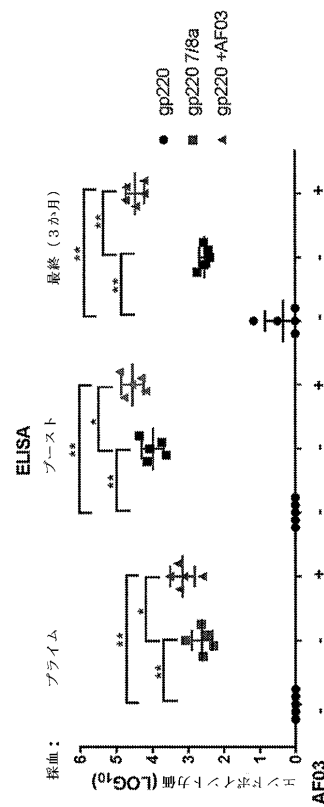
【図 7 1 - 2】



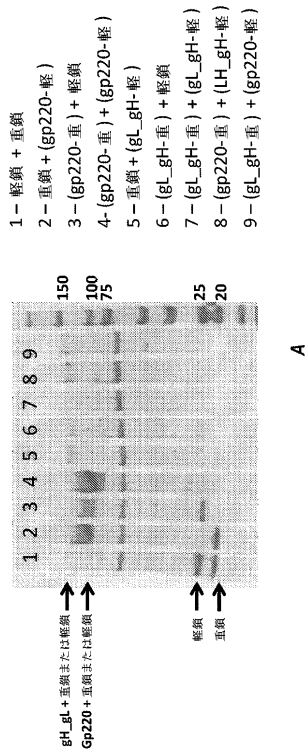
【図 7 2】



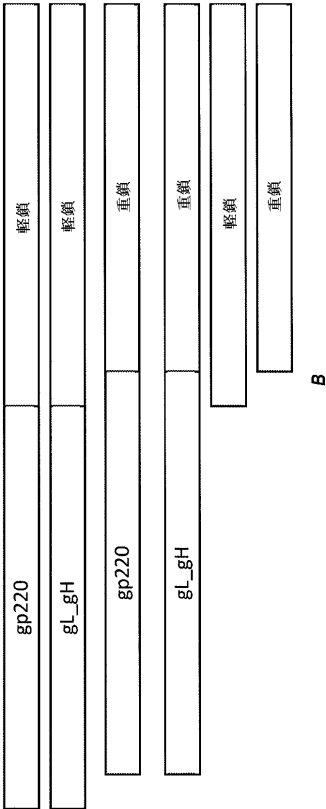
【図 7 3】



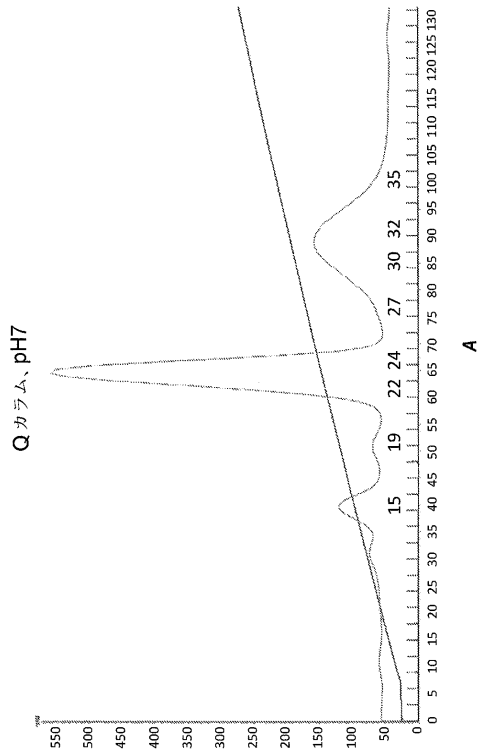
【図 7 4 A】



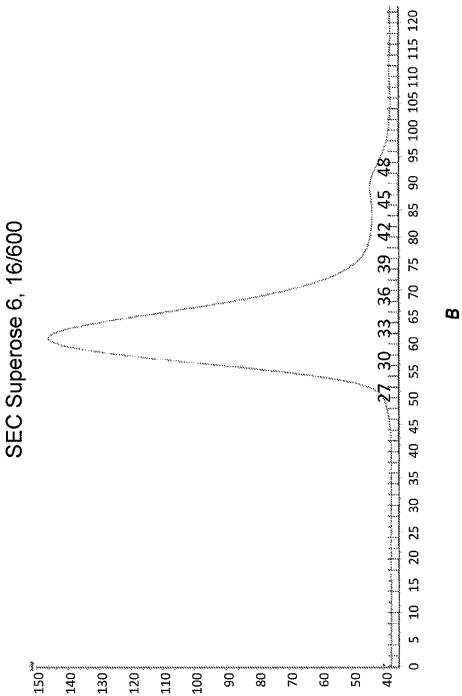
【図 7 4 B】



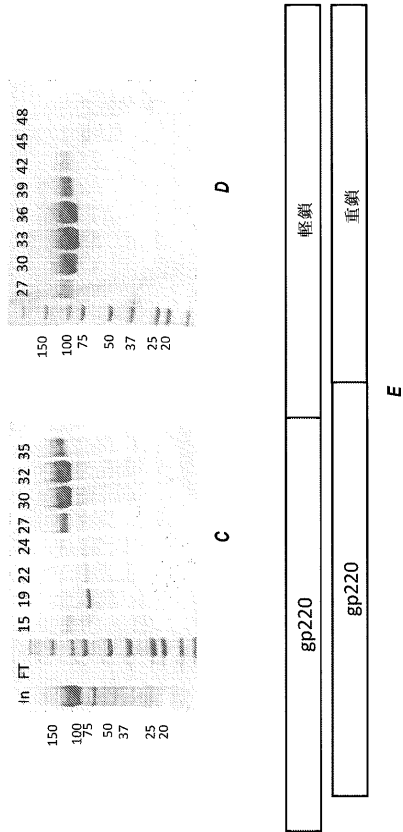
【図 7 5 - 1】



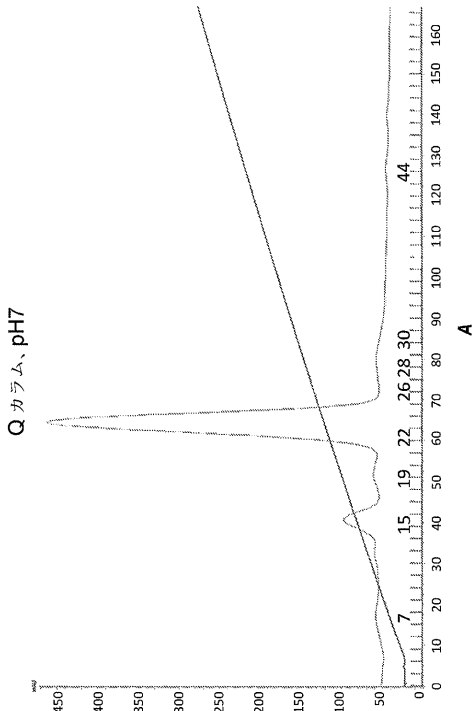
【図 7 5 - 2】



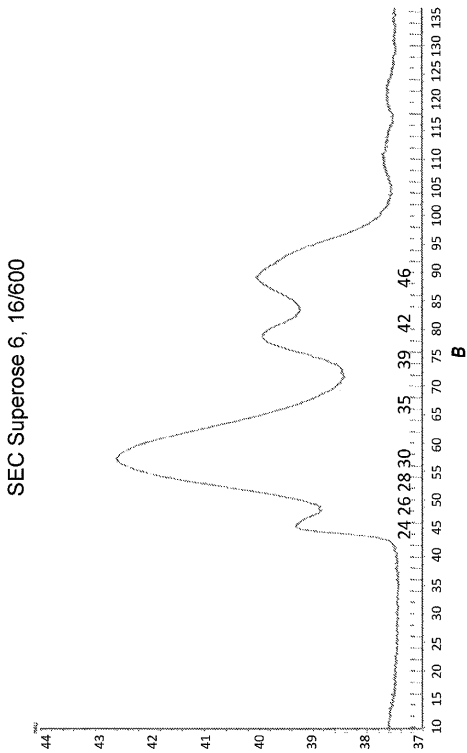
【図 7 5 - 3】



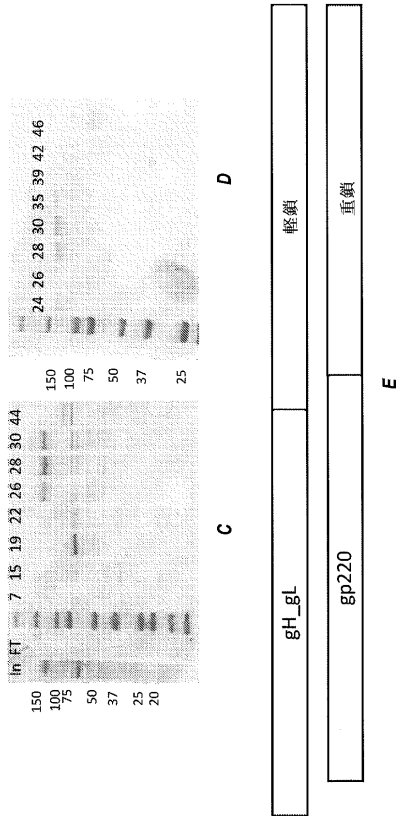
【図 7 6 - 1】



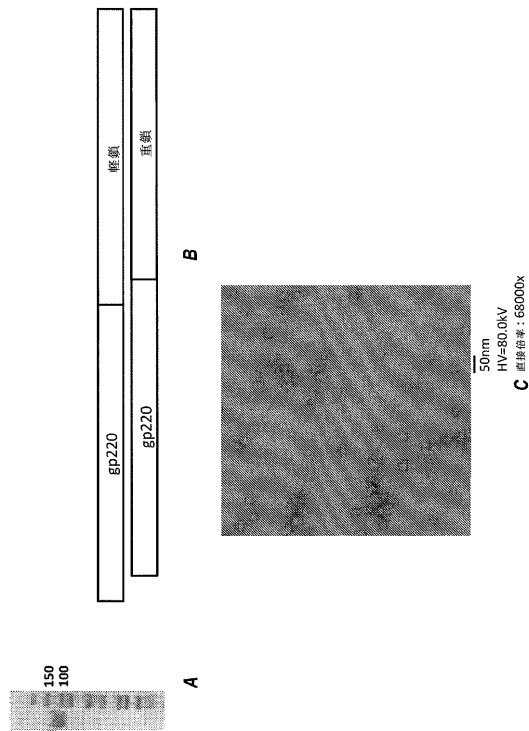
【図 7 6 - 2】



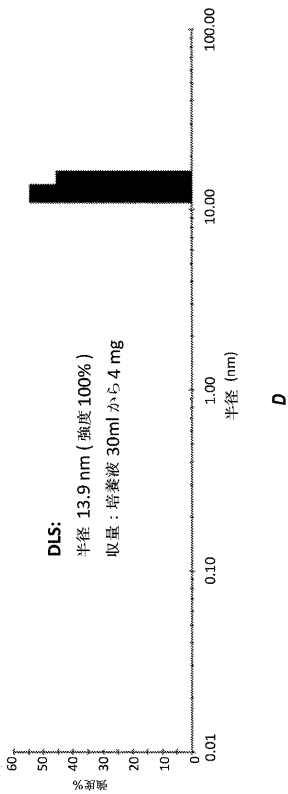
【図 7 6 - 3】



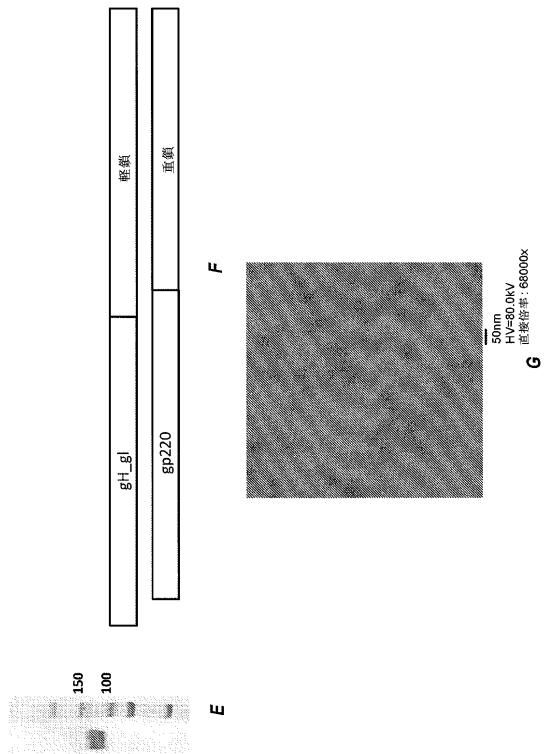
【図 77 - 1】



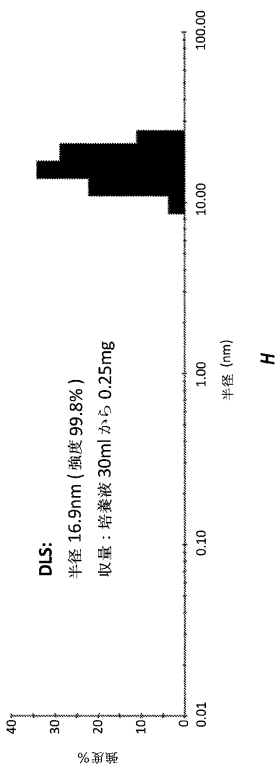
【図 77 - 2】



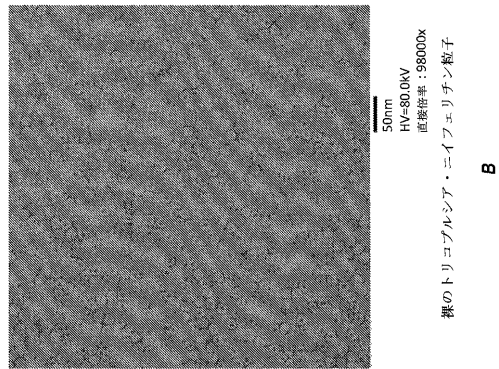
【図 77 - 3】



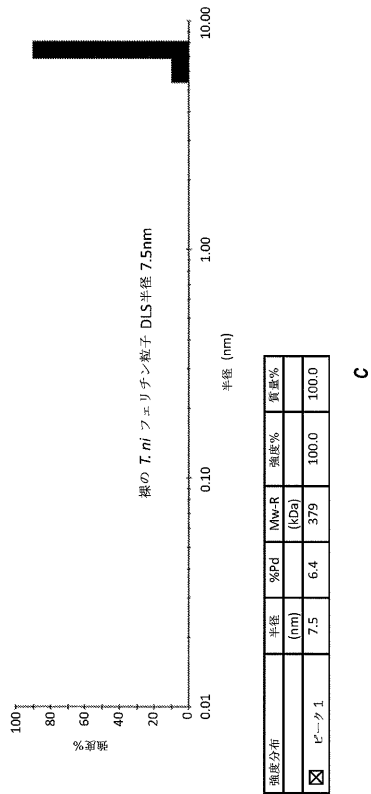
【図 77 - 4】



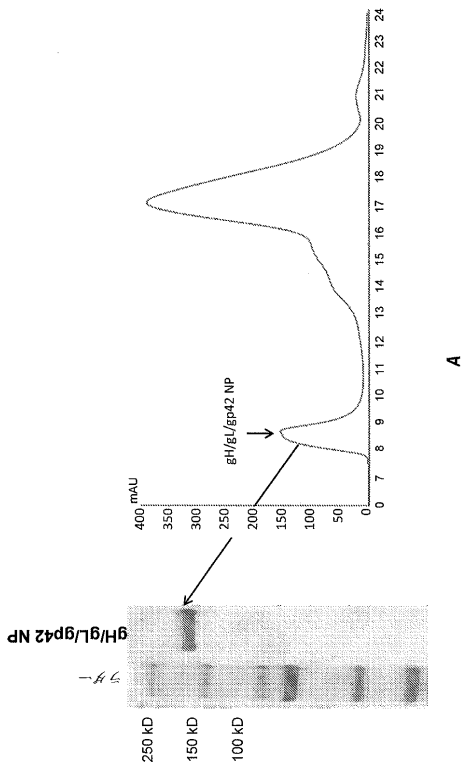
【図 7 8 - 1】



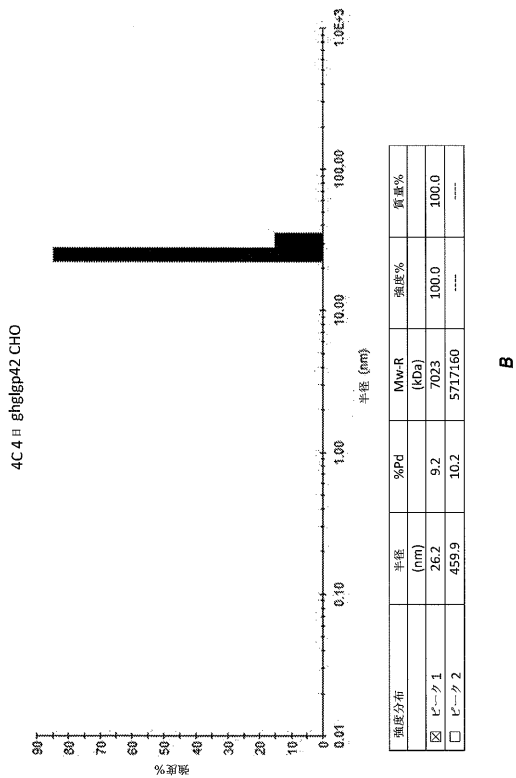
【図 7 8 - 2】



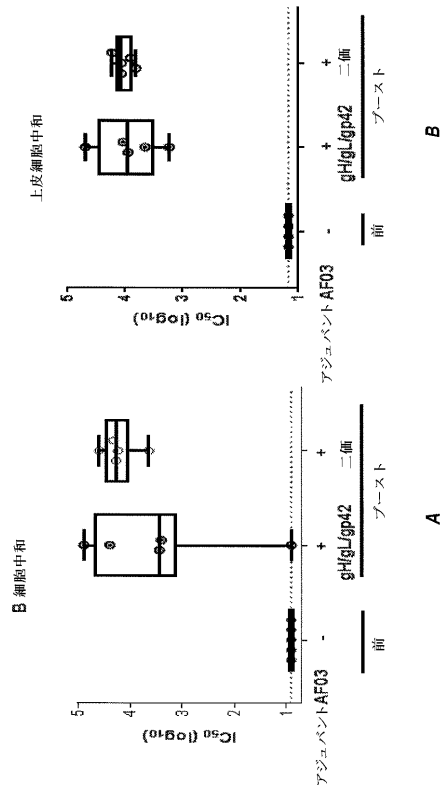
【図 7 9 A】



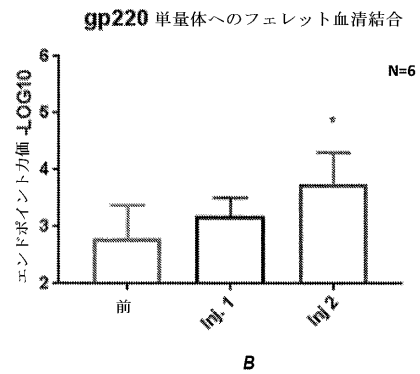
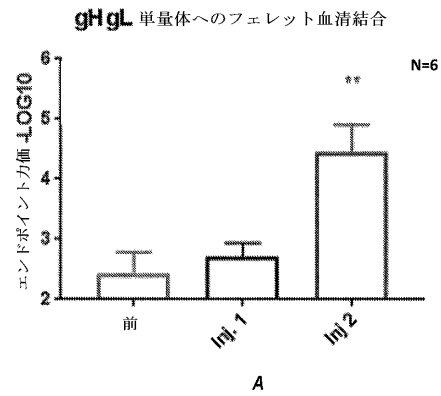
【図 7 9 B】



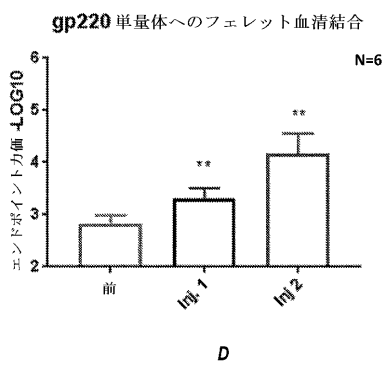
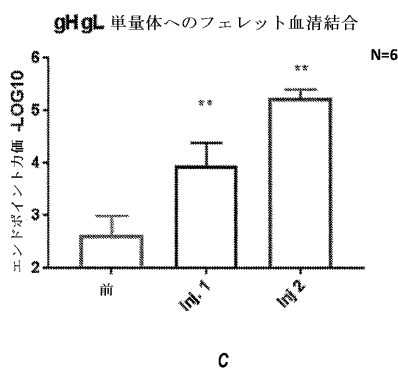
【図 80】



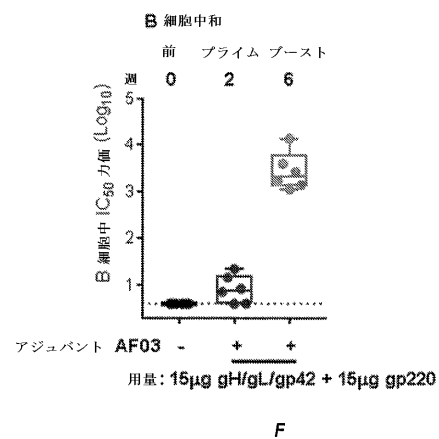
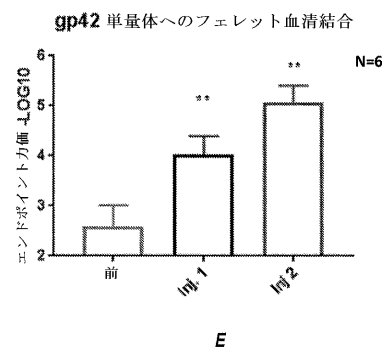
【図 81-1】



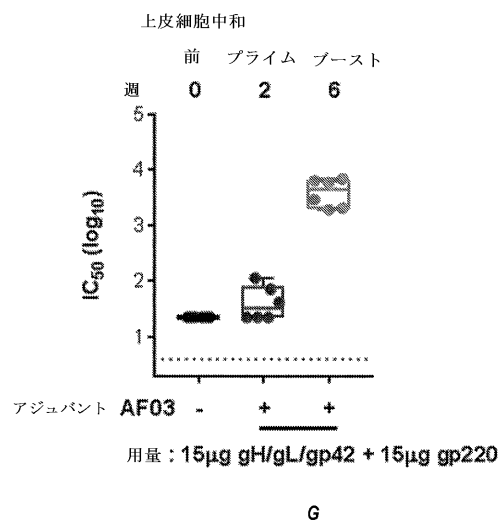
【図 81-2】



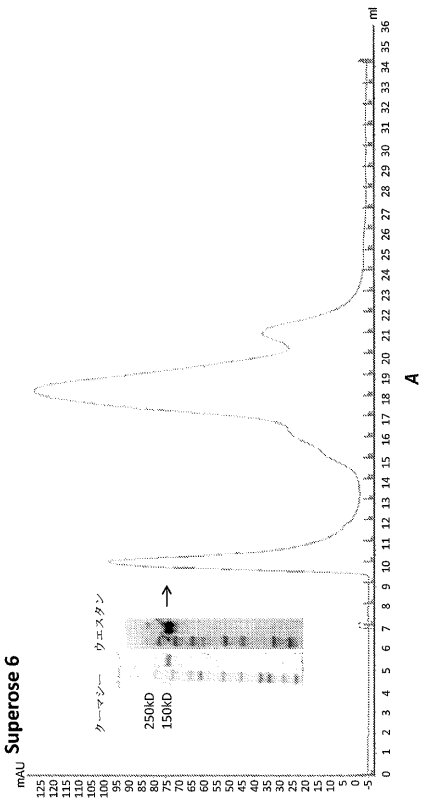
【図 81-3】



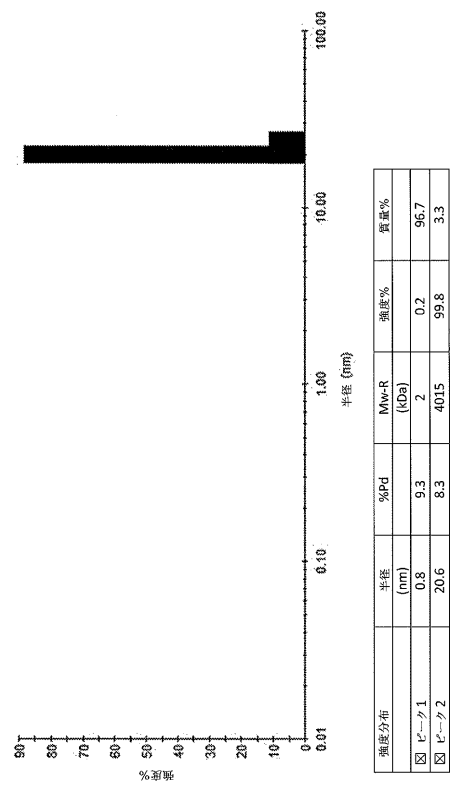
【図 8 1 - 4】



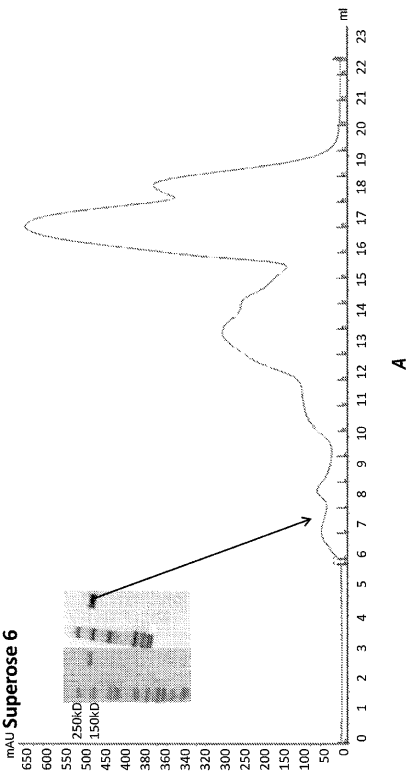
【図 8 2 A】



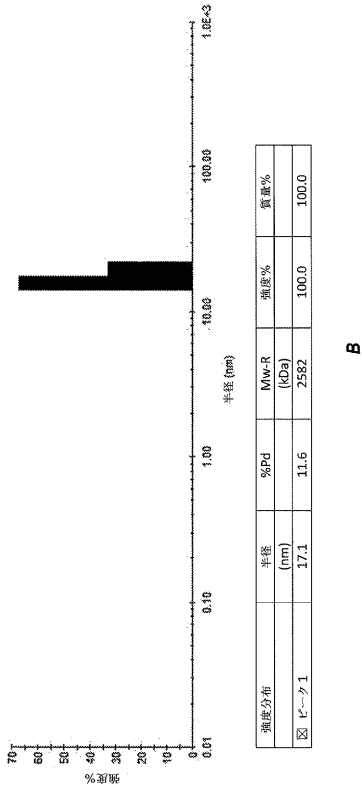
【図 8 2 B】



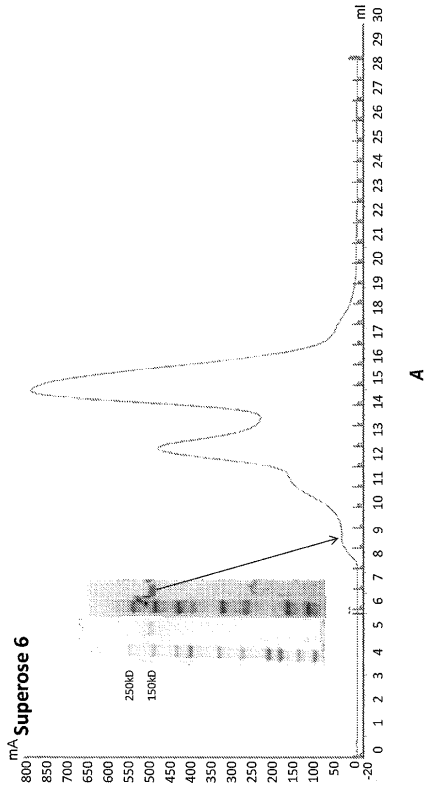
【図 8 3 A】



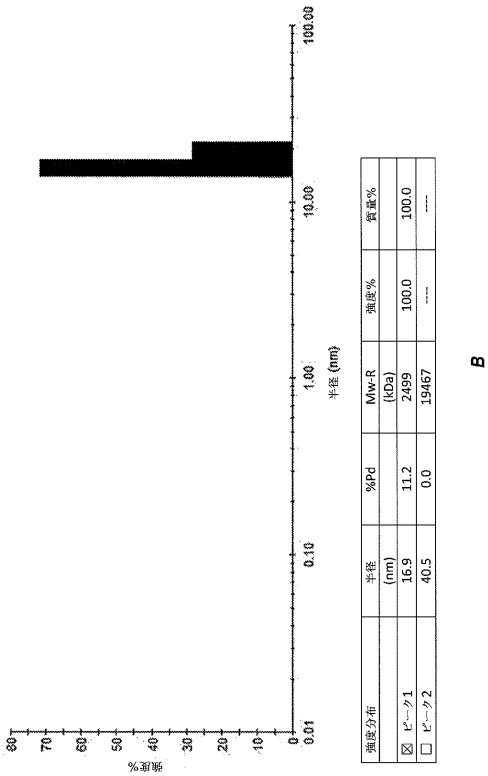
【図 8 3 B】



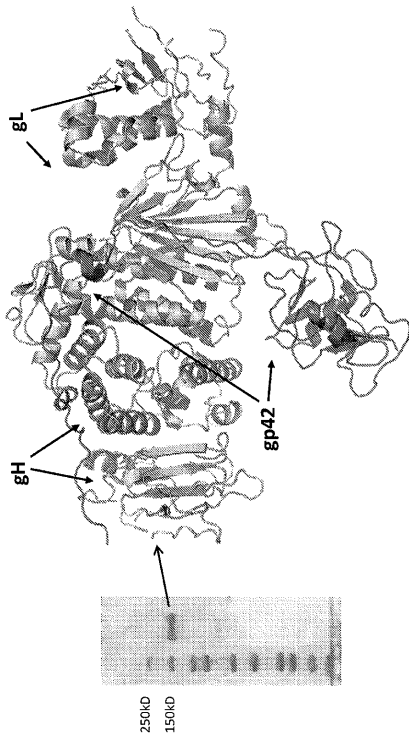
【図 8 4 A】



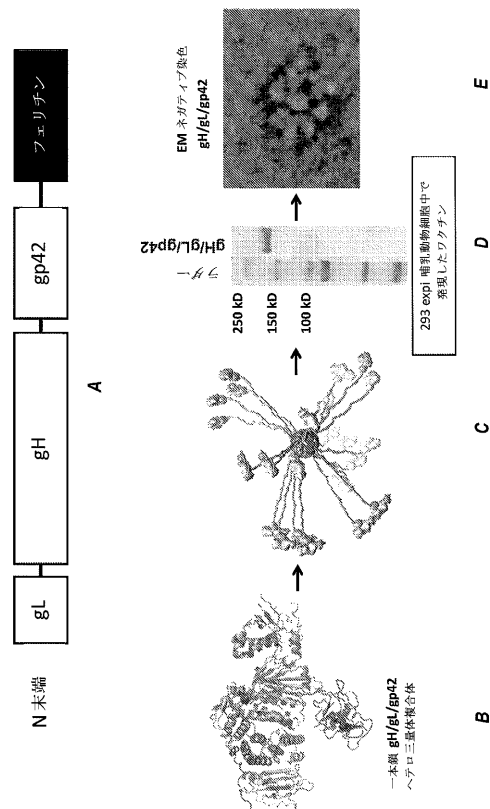
【図 8 4 B】



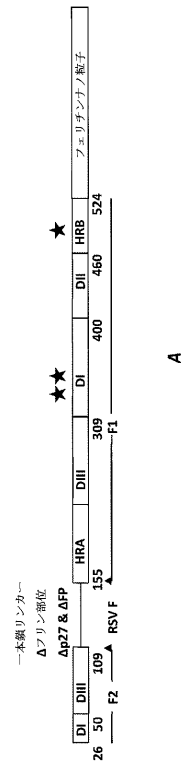
【図 8 5】



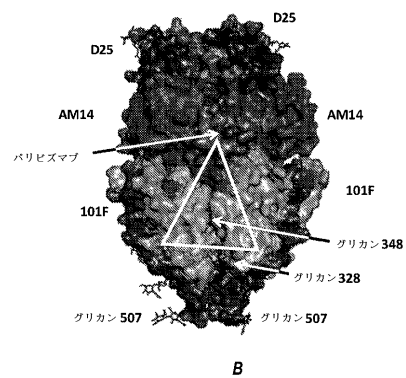
【図 8 6】



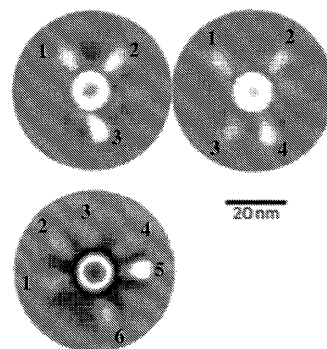
【図 8 7 A】



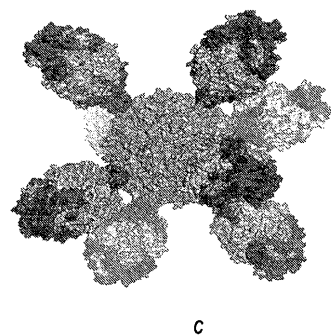
【図 8 7 B】



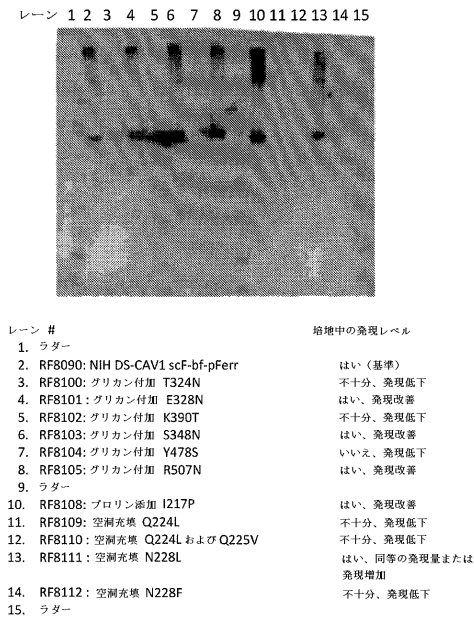
【図 8 7 D】



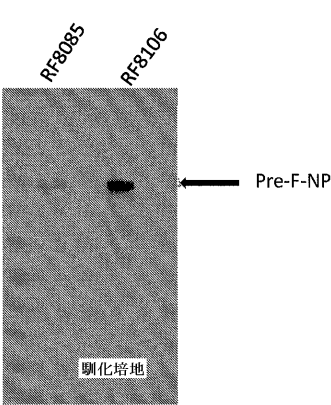
【図 8 7 C】



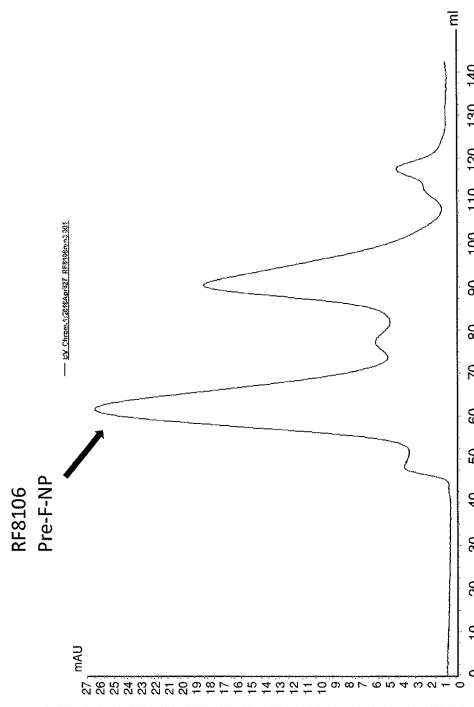
【図 8 8】



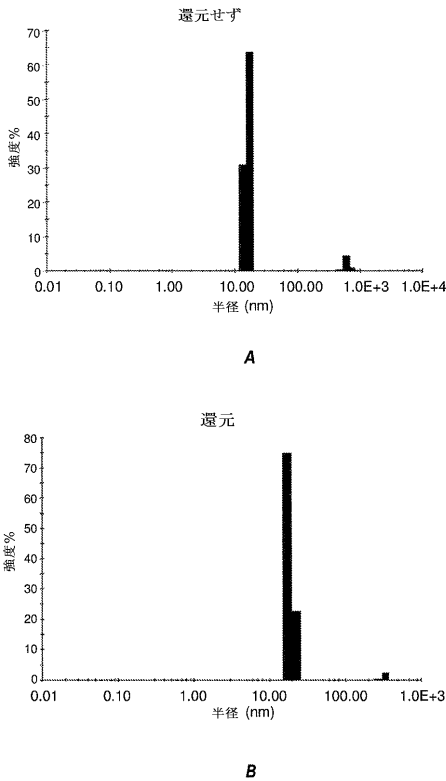
【図 8 9】



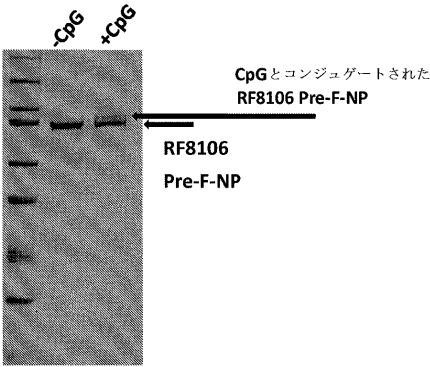
【図 9 0】



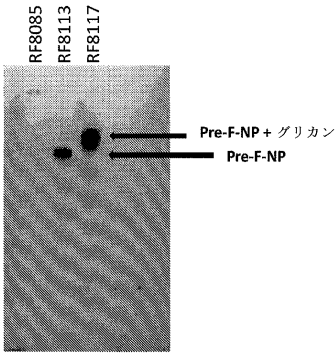
【図 9 1】



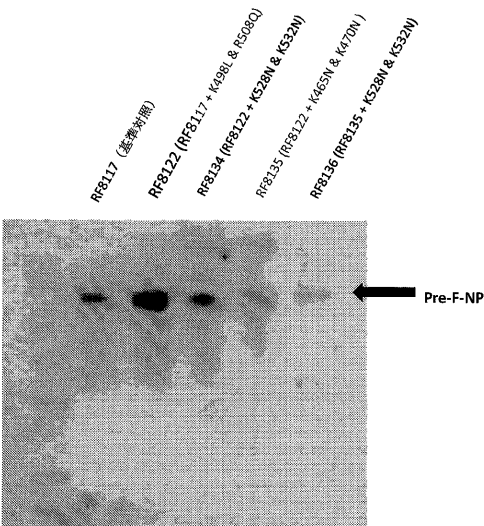
【図 9 2】



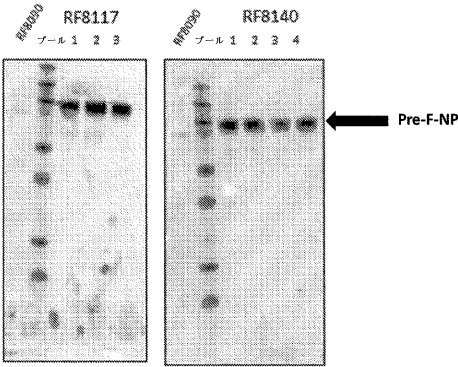
【図 9 3】



【図 9 4】



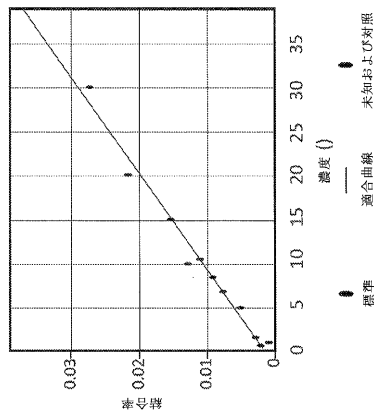
【図 9 5 - 1】



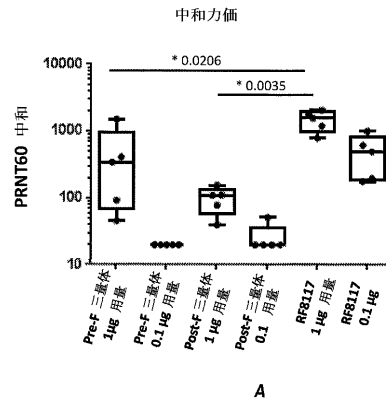
A

【図 9 5 - 2】

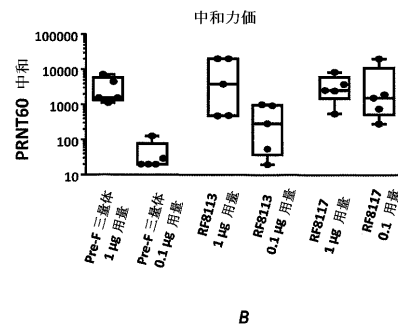
試料 ID	ウェル濃度	希釈倍率	計算された濃度 (mg/50μl)
1:3 RF8117 5日	0.7413	3	2.22
1:3 RF8117 7日	1.63	3	4.9
1:3 RF8117 11日	10.4	3	31.3
1:3 RF8140 5日	6.73	3	20.2
1:3 RF8140 7日	8.46	3	25.4
1:3 RF8140 11日	6.85	3	20.6



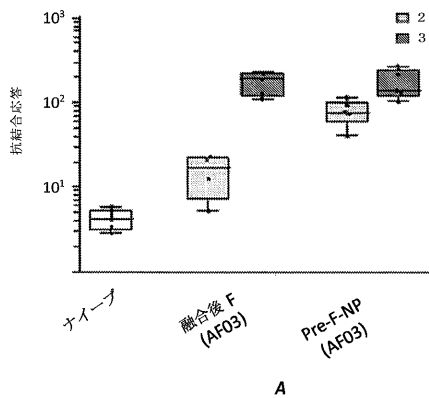
【図 9 6】



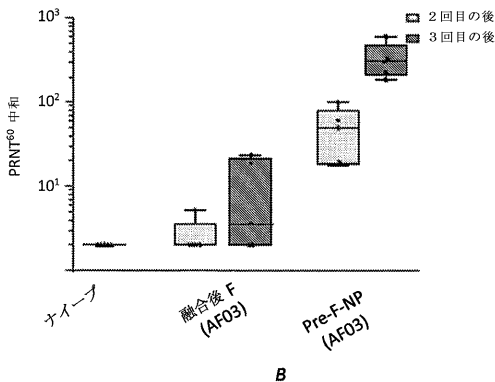
B



【図 9 7 - 1】

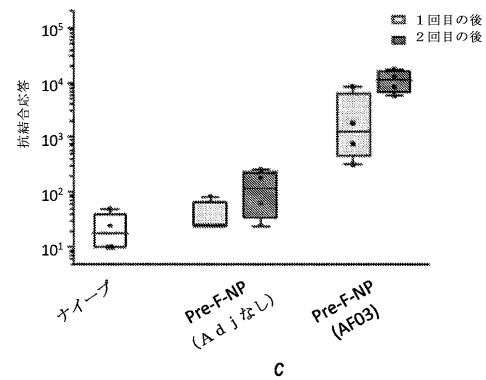


A

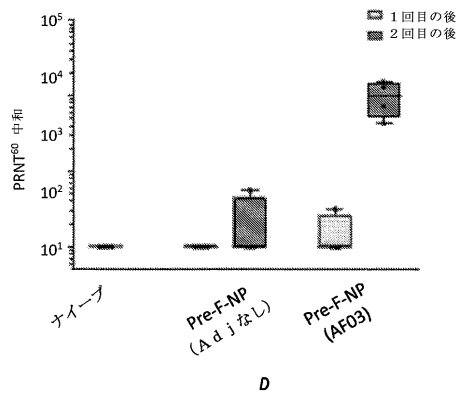


B

【図 9 7 - 2】

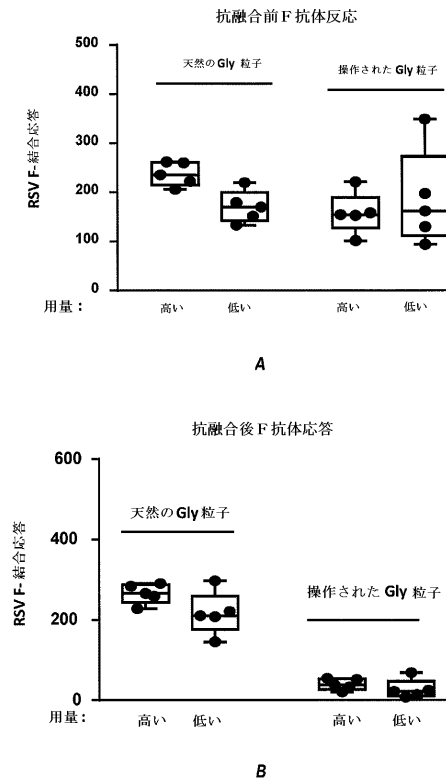


C

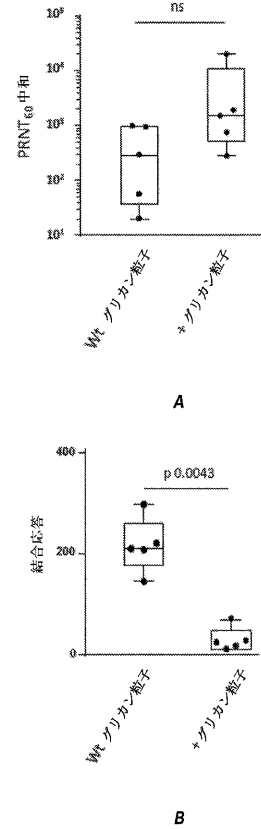


D

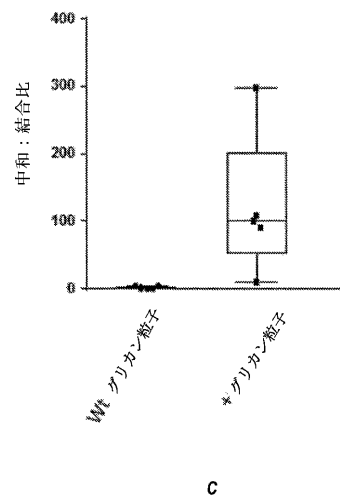
【図 9 8】



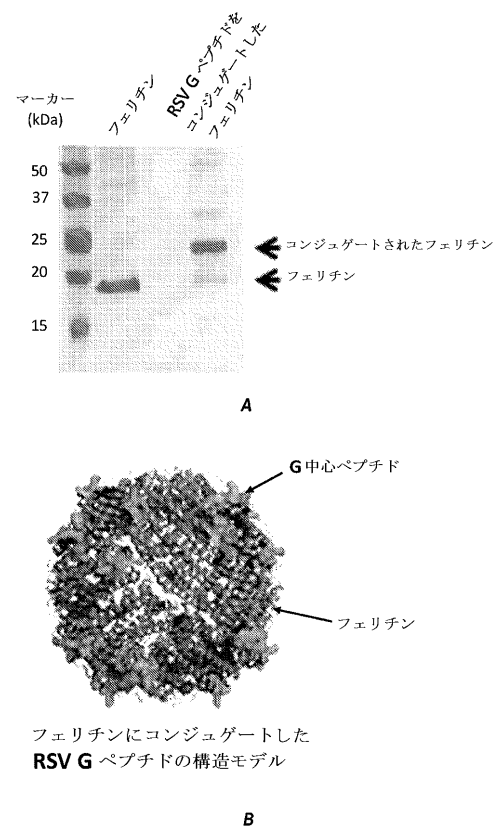
【図 9 9 - 1】



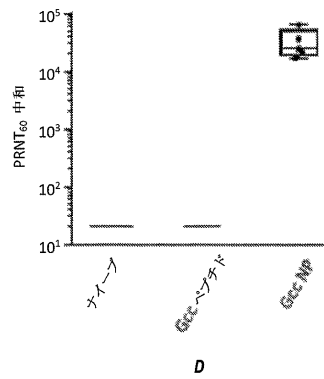
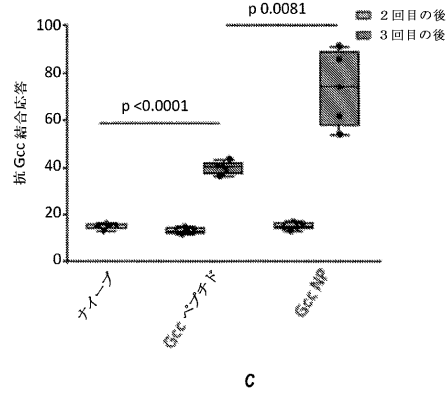
【図 9 9 - 2】



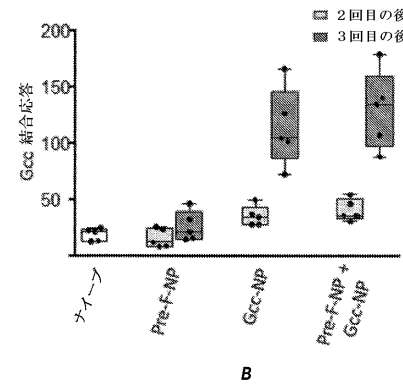
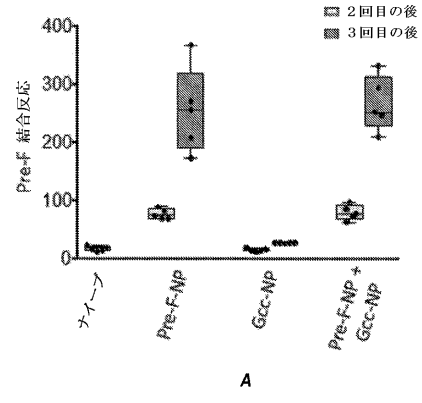
【図 1 0 0 - 1】



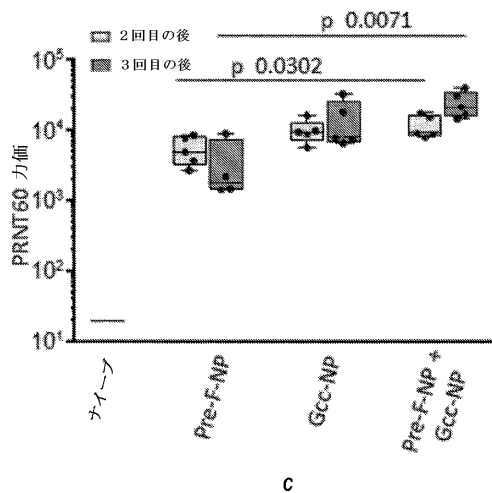
【図 100-2】



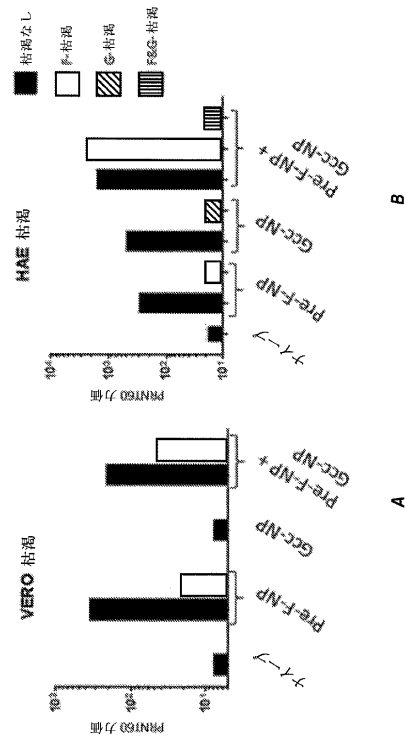
【図 101-1】



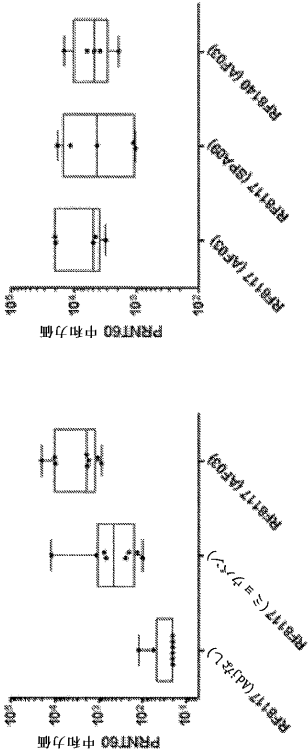
【図 101-2】



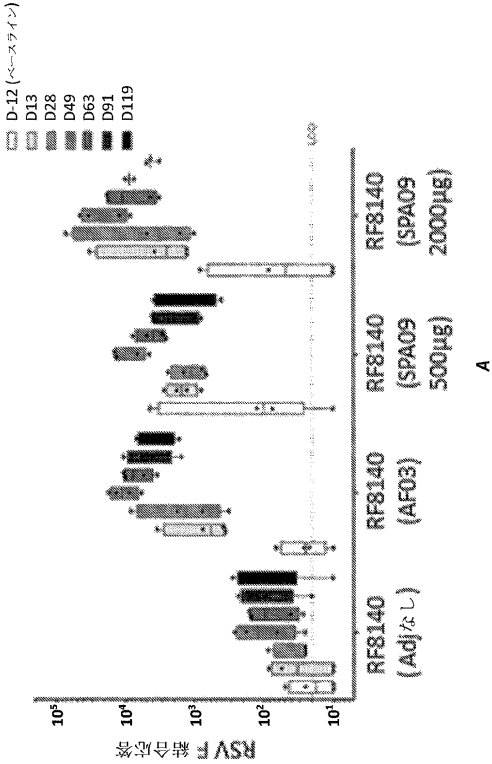
【図 102】



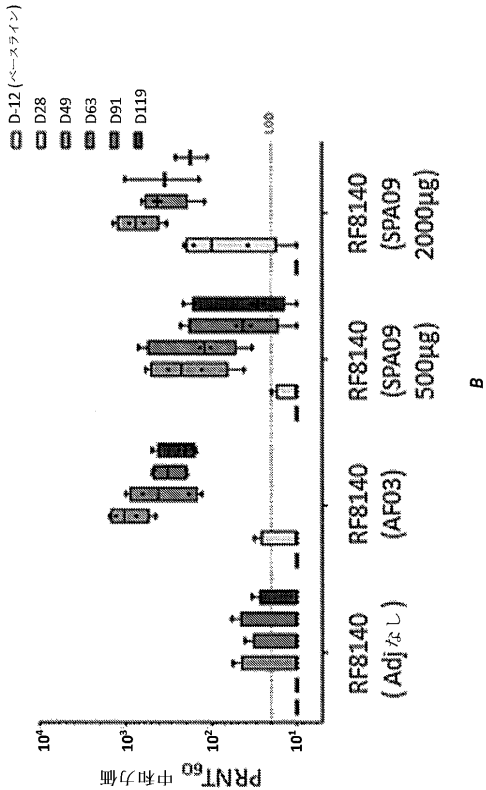
【図 1 0 3】



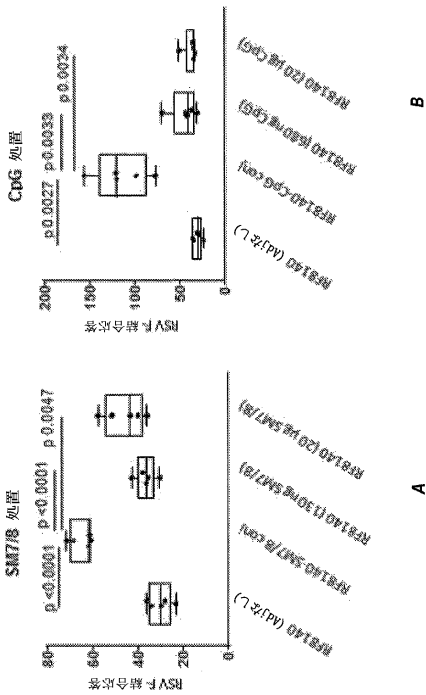
【図 1 0 4 - 1】



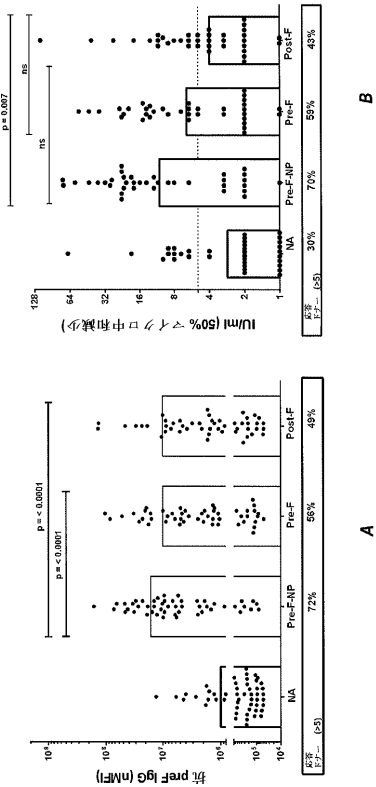
【図 1 0 4 - 2】



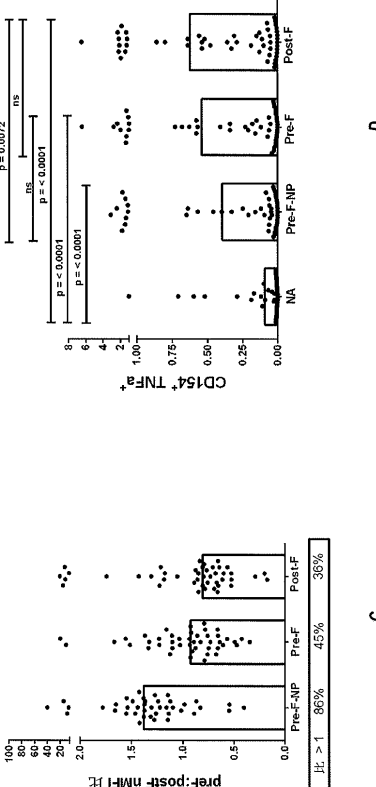
【図 1 0 5】



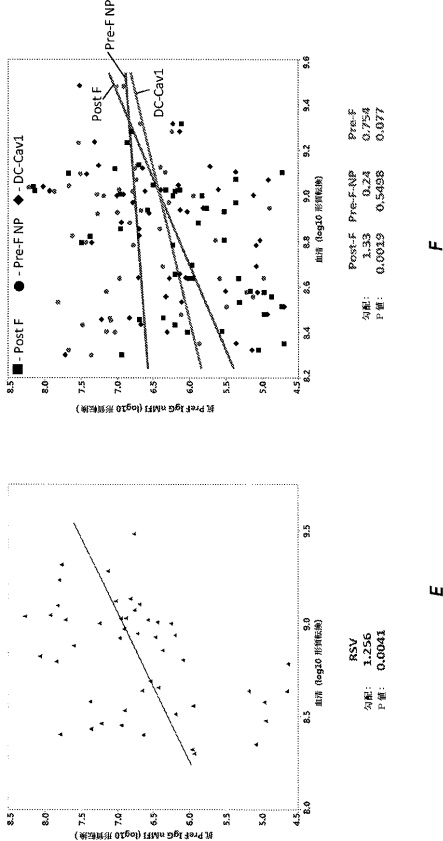
【図 1 0 6 - 1】



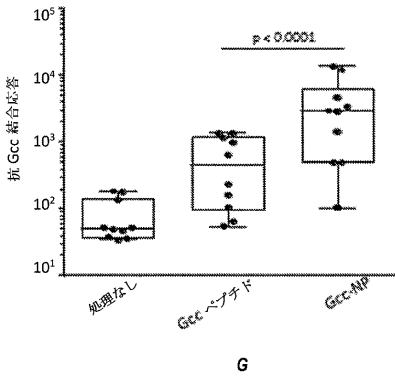
【図 1 0 6 - 2】



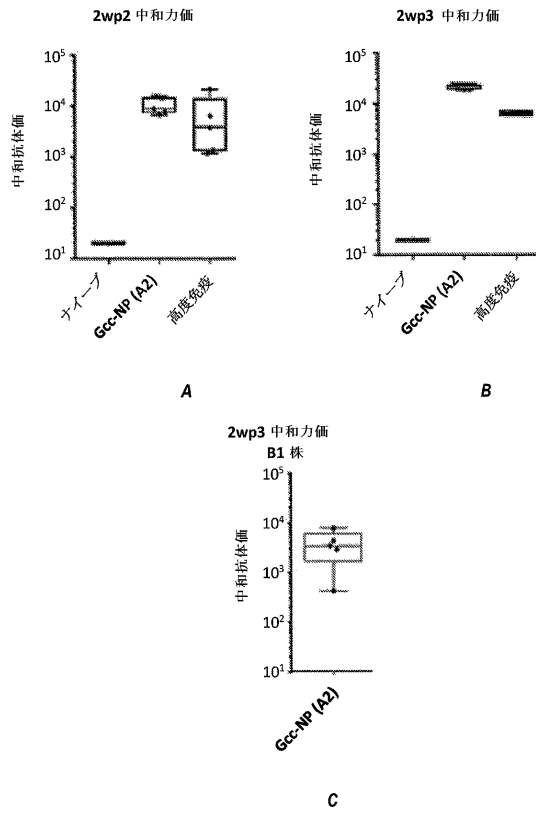
【図 1 0 6 - 3】



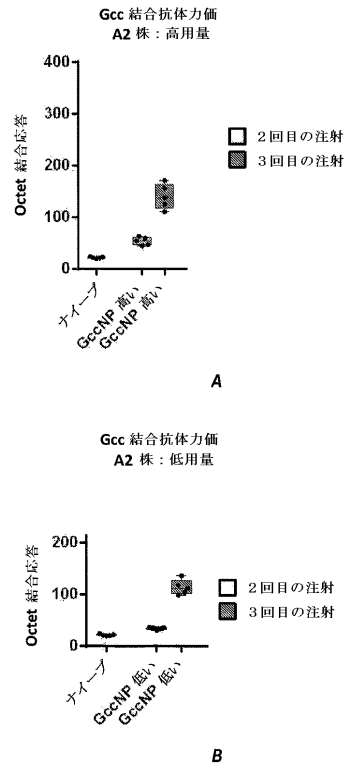
【図 1 0 6 - 4】



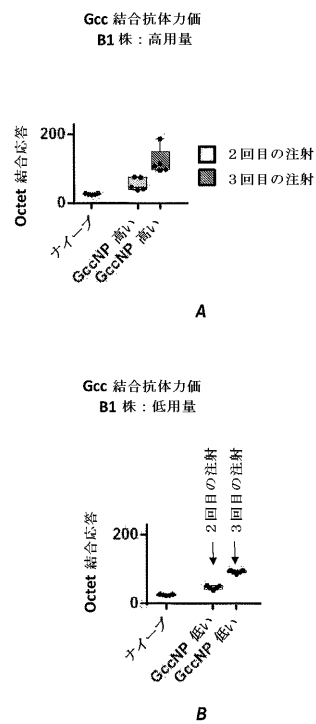
【図 107】



【図 108】



【図 109】



【配列表】

2021519596000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/025422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K39/02 A61K39/145 A61K39/12 A61P31/04 A61P31/20	
ADD.	A61P31/14 A61P31/16 C07K14/205	
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)		
A61K C12N A61P C12R 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 practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MASARU KANEKIYO ET AL: "Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies", NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD, LONDON, vol. 499, no. 7456, 4 July 2013 (2013-07-04), pages 102-106, XP002735539, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE12202 [retrieved on 2013-05-22] abstract, page 102, right-hand col.; page 105, last paragraph; fig. 1-4 ----- -/--	1,3-27
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 June 2019		04/09/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bernhardt, Wiebke

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/025422

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MASARU KANEKIYO ET AL: "Rational Design of an Epstein-Barr Virus Vaccine Targeting the Receptor-Binding Site", CELL, vol. 162, no. 5, 27 August 2015 (2015-08-27), pages 1090-1100, XP055594869, AMSTERDAM, NL ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.043 abstract, pages 1091, 1096-1096; figures 1, 4-7 -----	1,3-27
Y	KWINTEN SLIEPEN ET AL: "Presenting native-like HIV-1 envelope trimers on ferritin nanoparticles improves their immunogenicity", RETROVIROLOGY, vol. 11, no. 1, 26 September 2015 (2015-09-26), page e1004767, XP055284972, DOI: 10.1186/s12977-015-0210-4 abstract, figures 1, 2 -----	1,3-27
Y	WO 2013/044203 A2 (US HEALTH [US]) 28 March 2013 (2013-03-28) abstract, examples -----	1,3-27
Y	WO 2016/138160 A1 (US HEALTH [US]) 1 September 2016 (2016-09-01) pages 77-82 -----	1,3-27
X	MASAKI UCHIDA ET AL: "Targeting of Cancer Cells with Ferrimagnetic Ferritin Cage Nanoparticles", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 128, no. 51, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 16626-16633, XP055150188, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja0655690 pages 16627-16628, bridging paragraph -----	1,4
Y	HU QI-YING ET AL: "Towards the next generation of biomedicines by site-selective conjugation", CHEMICAL SOCIETY REVIEWS,, vol. 45, no. 6, 21 March 2016 (2016-03-21) , pages 1691-1719, XP002772944, DOI: 10.1039/C4CS00388H page 1695, left-hand col. ----- -/--	1,3-27

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/025422

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YOUNGGYU KIM ET AL: "Efficient Site-Specific Labeling of Proteins via Cysteines", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 19, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 786-791, XP055008636, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc7002499 abstract	1,3-27
Y	----- RALPH A. TRIPP ET AL: "Respiratory Syncytial Virus: Targeting the G Protein Provides a New Approach for an Old Problem", JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 92, no. 3, 8 November 2017 (2017-11-08), pages 1-8, XP055598913, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01302-17 abstract	15
Y	----- TOM Y.-H. WU: "Strategies for designing synthetic immune agonists", IMMUNOLOGY, vol. 148, no. 4, 11 July 2016 (2016-07-11), pages 315-325, XP055594767, GB ISSN: 0019-2805, DOI: 10.1111/imm.12622 page 316, left-hand col.	3-27
Y	----- WO 2018/005558 A1 (US HEALTH [US]) 4 January 2018 (2018-01-04) Seq ID NO. 1, 5	1,3-27
Y	----- WO 2017/211886 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]) 14 December 2017 (2017-12-14) sequence 56	1,3-27
A	----- ARIANE GOMES ET AL: "Harnessing Nanoparticles for Immunomodulation and Vaccines", VACCINES, vol. 5, no. 1, 14 February 2017 (2017-02-14), page 6, XP055580035, DOI: 10.3390/vaccines5010006 the whole document in particular abstract, table 1, figure 1, pages 4-5	1,3-27
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/025422

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI C Q ET AL: "Ferritin nanoparticle technology... A new platform for antigen presentation and vaccine development", INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, MARY ANN LIEBERT, US, vol. 2, no. 2, 17 July 2006 (2006-07-17), pages 143-147, XP002739855, ISSN: 1550-9087, DOI: 10.1089/IND.2006.2.143 pages 143-147 -----	1,3-27
A	WANG ZHANTONG ET AL: "Functional ferritin nanoparticles for biomedical applications", FRONTIERS OF CHEMICAL SCIENCE AND ENGINEERING, HIGHER EDUCATION PRESS, HEIDELBERG, vol. 11, no. 4, 15 February 2017 (2017-02-15), pages 633-646, XP036409437, ISSN: 2095-0179, DOI: 10.1007/S11705-017-1620-8 [retrieved on 2017-02-15] whole document, in particular abstract, figures 1, 2 pages 635-636 -----	1,3-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/025422

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

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

1, 3, 5, 6, 10(completely); 4, 7-9, 11-27(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2019/025422

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 3, 5, 6, 10(completely); 4, 7-9, 11-27(partially)

A ferritin protein comprising a mutation replacing a surface-exposed amino acid with a cysteine; an antigenic ferritin protein further comprising a non-ferritin polypeptide, a ferritin particle; a composition thereof; medical use thereof; nucleic acid encoding said ferritin protein

2. claims: 2(completely); 4, 7-9, 11-27(partially)

A ferritin protein comprising an N- or C-terminal linker comprising a cysteine; an antigenic ferritin protein further comprising a non-ferritin polypeptide, a ferritin particle; a composition thereof; medical use thereof; nucleic acid encoding said ferritin protein

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/025422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013044203 A2	28-03-2013	CA 2849822 A1	28-03-2013
		CN 103957891 A	30-07-2014
		EP 2758038 A2	30-07-2014
		US 2014072958 A1	13-03-2014
		US 2014302079 A1	09-10-2014
		US 2017189518 A1	06-07-2017
		WO 2013044203 A2	28-03-2013

WO 2016138160 A1	01-09-2016	EP 3261665 A1	03-01-2018
		KR 20170140180 A	20-12-2017
		US 2018244756 A1	30-08-2018
		US 2019256579 A1	22-08-2019
		WO 2016138160 A1	01-09-2016

WO 2018005558 A1	04-01-2018	EP 3474893 A1	01-05-2019
		WO 2018005558 A1	04-01-2018

WO 2017211886 A1	14-12-2017	AR 108781 A1	26-09-2018
		AU 2017276698 A1	20-12-2018
		BR 112018075420 A2	12-03-2019
		CA 3025855 A1	14-12-2017
		CN 109310749 A	05-02-2019
		EP 3463444 A1	10-04-2019
		US 2019125856 A1	02-05-2019
		WO 2017211886 A1	14-12-2017

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	39/155	(2006.01)	A 6 1 K	39/155
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39
A 6 1 K	39/106	(2006.01)	A 6 1 K	39/106
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	47/65
A 6 1 K	47/55	(2017.01)	A 6 1 K	47/55
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P	31/22
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	14/135	(2006.01)	C 0 7 K	14/135
C 0 7 K	14/11	(2006.01)	C 0 7 K	14/11
C 0 7 K	14/05	(2006.01)	C 0 7 K	14/05
C 1 2 N	15/38	(2006.01)	C 1 2 N	15/38
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	15/10	(2006.01)	C 1 2 N	15/10 2 0 0 Z
C 1 2 N	15/44	(2006.01)	C 1 2 N	15/44
C 1 2 N	15/45	(2006.01)	C 1 2 N	15/45
C 0 7 K	14/20	(2006.01)	C 0 7 K	14/20
C 1 2 N	15/117	(2010.01)	C 1 2 N	15/117 Z
C 0 7 K	14/205	(2006.01)	C 0 7 K	14/205

(31)優先権主張番号 62/652,204

(32)優先日 平成30年4月3日(2018.4.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/652,210

(32)優先日 平成30年4月3日(2018.4.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/652,217

(32)優先日 平成30年4月3日(2018.4.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

2. TWEEN

- (72)発明者 デイリー・ジェイ・ナーベル
アメリカ合衆国ニュージャージー州08807, ブリッジウォーター, メイル・コード55エー
505エー, コーポレートドライブ55
- (72)発明者 チージェン・ウェイ
アメリカ合衆国ニュージャージー州08807, ブリッジウォーター, メイル・コード55エー
505エー, コーポレートドライブ55
- (72)発明者 カート・スワンソン
アメリカ合衆国ニュージャージー州08807, ブリッジウォーター, メイル・コード55エー
505エー, コーポレートドライブ55

F ターム(参考) 4C076 CC06 CC29 CC41 EE41 EE59
4C085 AA03 AA04 BA07 BA15 BA20 BA55 BA57 BA80 CC07 CC08
CC21 DD86 EE01 EE06 GG01 GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 BA41 CA01 CA40 DA01 DA86 EA22
EA31 FA74