



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0093811
 (43) 공개일자 2012년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/155 (2006.01) **C07K 14/115** (2006.01)
C07K 14/135 (2006.01)
 (21) 출원번호 **10-2012-7001752**
 (22) 출원일자(국제) **2010년06월24일**
 심사청구일자 **없음**
 (85) 번역문제출일자 **2012년01월20일**
 (86) 국제출원번호 **PCT/EP2010/059006**
 (87) 국제공개번호 **WO 2010/149743**
 국제공개일자 **2010년12월29일**
 (30) 우선권주장
 61/219,958 2009년06월24일 미국(US)

(71) 출원인
아이디 바이오메디컬 코퍼레이션 오브 퀘벡
 캐나다 퀘벡 레이벌 카르티에 불러바드 웨스트
 525 (우편번호: 에이치7브이 3에스8)
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
 벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜
 트 89
 (72) 발명자
블라이스, 노르만드
 캐나다 에이치7브이 3에스8 퀘벡주 라발 카르티에
 불러바드 웨스트 525 글락소스미스클라인 바이올
 로지칼즈 라발
레이올트, 패트릭
 캐나다 에이치7브이 3에스8 퀘벡주 라발 카르티에
 불러바드 웨스트 525 글락소스미스클라인 바이올
 로지칼즈 라발
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 63 항

(54) 발명의 명칭 **백신**

(57) 요약

본 개시내용은 인간 메타뉴모바이러스 (hMPV), 파라인플루엔자 바이러스 (PIV) 및 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)로부터 선택된 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 개시된 조성물의 항원은 삼량체 융합전 입체형태를 안정시키기 위해 변형된 재조합 F 단백질 폴리펩티드이다. 항원을 코딩하는 핵산 뿐만 아니라 이들의 생성 및 사용 방법이 또한 제공된다.

(72) 발명자

반-쉐르펜질-팀, 비르기니

벨기에 비-1330 리센사르트 워 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이올로지칼스 에스.에이.

바실레브, 벤치슬라브

벨기에 비-1330 리센사르트 워 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이올로지칼스 에스.에이.

특허청구의 범위

청구항 1

인간 메타뉴모바이러스 (hMPV), 파라인플루엔자 바이러스 3 (PIV-3) 및 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)의 균으로부터 선택된 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원이 각각 파라믹소바이러스 F 단백질 폴리펩티드의 F₂ 도메인 및 F₁ 도메인을 포함하는 F 단백질 폴리펩티드를 포함하고, F 단백질 폴리펩티드는 막횡단 도메인이 결여되어 있고, 이중 삼량체화 도메인을 포함하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원이 재조합 F 단백질 폴리펩티드인 면역원성 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 이중 삼량체화 도메인이 F₁ 도메인에 대해 C-말단에 위치하는 면역원성 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 푸린 절단 부위의 개입 없이 F₂ 도메인 및 F₁ 도메인을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 F₂ 도메인과 F₁ 도메인 사이에 무손상 융합 펩티드를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이

- (a) 하나 이상의 효소적 절단 부위의 결실;
- (b) F 단백질 세포외 도메인의 소수성 도메인에서 친수성 아미노산의 하나 이상의 치환 또는 부가; 및
- (c) 글리코실화를 변경시키는 아미노산 치환

으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드가 삼량체로 어셈블링되는 면역원성 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원이 인간 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV) F 단백질 항원 및 인간 메타뉴모바이러스 (hMPV) F 단백질 항원 및 파라인플루엔자 바이러스 3 (PIV-3) F 단백질 항원 중 하나 이상을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원이 인간 메타뉴모바이러스 (hMPV) F 단백질 항원 및 파라인플루엔자 바이러스 3 (PIV-3) F 단백질 항원을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV) F 단백질 항원을 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 (HA) 단백질 항원을 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 신호 펩티드를 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 코일드-코일(coiled-coil) 도메인을 포함하는 이중 삼량체화 도메인을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 이소류신 지퍼(zipper)를 포함하는 삼량체화 도메인을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 서열 15의 아미노산 서열을 포함하는 이소류신 지퍼 도메인을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 F 단백질 세포외 도메인의 소수성 도메인에서 친수성 아미노산의 하나 이상의 치환 또는 부가를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 소수성 도메인이 F 단백질 세포외 도메인의 HRB 코일드-코일 도메인인 면역원성 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 소수성 도메인이 F 단백질 세포외 도메인의 HRA 도메인인 면역원성 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 자연 발생 F 단백질 전구체 (F₀)에 존재하는 푸린 절단 부위를 제거하는 하나 이상의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 글리코실화를 변경시키는 하나 이상의 변형을 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원 중 하나 이상이

a) 서열 10을 포함하거나 이로 이루어진 RSV F 단백질 폴리펩티드, 서열 12를 포함하거나 이로 이루어진 hMPV F 단백질 폴리펩티드, 및 서열 14를 포함하거나 이로 이루어진 PIV-3 F 단백질 폴리펩티드;

b) 서열 9에 의해 코딩되는 RSV F 단백질 폴리펩티드, 서열 11에 의해 코딩되는 hMPV F 단백질 폴리펩티드, 서열 13에 의해 코딩되는 PIV-3 F 단백질 폴리펩티드, 및 서열 9, 11 및 13 중 하나 이상에 대해 실질적으로 그의 전체 길이 상에서 엄격한 조건하에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 PreF 단백질

폴리펩티드; 및

c) 서열 10에 대해 89% 이상의 서열 동일성을 갖는 PreF 폴리펩티드; 서열 12에 대해 94% 이상의 서열 동일성을 갖는 PreF 폴리펩티드; 및 서열 14에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 PreF 폴리펩티드

의 균으로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 파라믹소바이러스 G 단백질 폴리펩티드 또는 그의 단편을 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, G 단백질 폴리펩티드가 서열 4의 참조 G 단백질 서열의 아미노산 위치 149 내지 229에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, G 단백질 폴리펩티드가 자연 발생 G 단백질 폴리펩티드와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 아미노산 치환은 백신 증강된 바이러스 질환의 감소 또는 예방과 상호관련되는 것인 면역원성 조성물.

청구항 26

제23항에 있어서, G 단백질 폴리펩티드가 전장 G 단백질 폴리펩티드 또는 G 단백질 폴리펩티드의 적어도 일부를 포함하는 융합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 27

제23항에 있어서, G 단백질 폴리펩티드가 F 단백질 항원을 포함하는 융합 단백질에 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 링커를 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 링커가 아미노산 서열 GG를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 30

제28항에 있어서, 링커가 아미노산 서열 GSGGSGGS를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 폴리히스티딘 태그를 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 폴리펩티드의 다량체를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, F 단백질 폴리펩티드 중 하나 이상이 폴리펩티드의 삼량체를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 또는 부형제를 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 담체 또는 부형제가 완충제를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 아주반트(adjuvant)를 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 아주반트가 Th1 편향된 면역 반응을 도출하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 아주반트가 3D-MPL, QS21, 수중유 에멀전 및 명반 중 하나 이상을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 아주반트가 수중유 에멀전을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 수중유 에멀전이 토폴을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 3D-MPL을 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 42

제38항에 있어서, 아주반트가 3D-MPL을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 명반을 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 44

제42항에 있어서, QS21을 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 3D-MPL 및 QS21이 리포솜 제제에 있는 면역원성 조성물.

청구항 46

제36항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 아주반트가 신생아에 대한 투여에 적합한 것인 면역원성 조성물.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, hMPV, PIV-3 및 RSV 중 2개 이상으로의 감염을 감소시키거나 예방하는 면역원성 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, hMPV, PIV-3 및/또는 RSV로의 감염에 따른 병적 증상 또는 질환을 감소시키거나 예방하는 면역원성 조성물.

청구항 49

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 제조합 파라믹소바이러스 F 단백질 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제조합 핵산.

청구항 50

제49항에 있어서, RSV 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 선택된 숙주 세포에서 발현을 위해 최적화된 코돈인 재조합 핵산.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서,

- a) 서열 9, 서열 11 및 서열 13을 포함하거나 이들로 이루어진 폴리뉴클레오티드 서열;
- b) a)의 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 실질적으로 그의 전체 길이 상에서 엄격한 조건하에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및
- c) a)의 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 핵산.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항의 재조합 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 53

제52항에 있어서, 원핵생물 또는 진핵생물 발현 벡터를 포함하는 벡터.

청구항 54

제49항 또는 제50항의 핵산 또는 제52항 또는 제53항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 55

제54항에 있어서, 박테리아 세포, 곤충 세포, 식물 세포 및 포유동물 세포의 군으로부터 선택되는 숙주 세포.

청구항 56

RSV 감염을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 F 단백질 항원 또는 제49항 또는 제50항의 핵산의 용도.

청구항 57

제56항에 있어서, 의약이 hMPV, PIV-3 및 RSV 중 하나 이상에 의해 유발되는 감염을 예방적으로 치료하는 목적을 위해 투여되는 것인, F 단백질 항원 또는 핵산의 용도.

청구항 58

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, hMPV, PIV-3 및 RSV 중 하나 이상에 대한 면역 반응을 도출하는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 면역 반응이 Th1 편향된 면역 반응을 포함하는 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 면역 반응이 hMPV, PIV-3 및 RSV 중 하나 이상으로의 감염을 감소시키거나 예방하는 보호성 면역 반응을 포함하는 방법.

청구항 61

제58항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간 대상체인 방법.

청구항 62

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 의약에 사용하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 63

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, RSV-관련 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 면역원성 조성물.

명세서

기술분야

- [0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>
- [0002] 본 출원은 2009년 6월 24일에 출원된 미국 가출원 제61/219,958호의 출원일의 이점을 주장하고, 그의 개시내용은 본원에 참고로 도입된다.
- [0003] <37 C.F.R. § 1.71(E)에 따른 저작권 통지>
- [0004] 본 특허 문헌의 개시내용의 일부는 저작권의 보호를 받는 자료를 함유한다. 저작권자는, 특허 문헌 또는 특허 명세서가 특허청의 특허 파일 또는 기록에 나와 있는 바와 같이, 누군가가 특허 문헌 또는 특허 명세서를 원본 그대로 복사하는 것을 반대하지 않지만, 그렇지 않은 경우에는 어떠한 것이든 모든 저작권을 보유한다.

배경기술

- [0005] 본 개시내용은 면역학의 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본 개시내용은 하기도 감염의 주요 원인에 의한 감염 및/또는 감염의 증상을 감소시키는 면역 반응을 도출하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.
- [0006] 인간 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV), 인간 메타뉴모바이러스 (hMPV) 및 파라인플루엔자 바이러스 (PIV1-4)는 1세 미만의 유아에서 가장 흔한 하기도 감염 (LRI)의 원인이다. 이들 바이러스에 의해 유발되는 질환의 스펙트럼은 비염 및 이염에서부터 폐렴 및 세기관지염까지의 광범위한 호흡기 증상을 포함하고, 후자의 2가지 질환은 상당한 이환율 및 사망률과 관련된다.
- [0007] 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)는 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae) 부류, 뉴모비리나에(Pneumovirinae) 하위부류, 뉴모바이러스(Pneumovirus) 속의 병원성 바이러스이다. RSV의 게놈은 11개 단백질을 코딩하는 음성-센스 RNA 분자이다. RNA 게놈과 바이러스 N 단백질의 단단한 회합은 바이러스 외피 내부에 감싸진 뉴클레오펙시드를 형성한다. G 당단백질의 항원성에서의 차이를 기초로 인간 RSV 균주의 A 군 및 B 군의 2개 군이 기술되어 있다.
- [0008] 인간 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)와 같이, 인간 메타뉴모바이러스 (hMPV)는 파라믹소비리다에 부류의 뉴모비리나에 하위부류로 분류된다. 그러나, hMPV는 조류 메타뉴모바이러스 (이전에 칠면조 비기관염 바이러스로 불림)와 가장 밀접하게 유전적으로 관련된다. 이들 2개의 바이러스는 메타뉴모바이러스 속으로 분류되고, hMPV는 첫째로 인간에서 질환을 유발하는 것으로 상기 속으로 분류되었다. hMPV는 첫째로 네덜란드의 연구원에 의해 2001년에 기재되었고, 그 이후로 남극을 제외한 모든 대륙의 국가에서 확인되었다. hMPV는 단일 음성-가닥 RNA-외피 바이러스이다. 현재까지 hMPV의 2개의 주요 군 (A 및 B) 및 4개의 하위군이 확인되었다.
- [0009] 인간 파라인플루엔자 바이러스는 오직 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)에 대해서 어린 소아에서의 하기도 질환의 두번째 원인으로 평가받은 파라믹소바이러스의 군이다. 인간 파라인플루엔자 바이러스는 파라믹소비리나에 하위부류, 레스피로바이러스(Respirovirus) 속으로 분류된다. RSV와 같이, 인간 파라인플루엔자 바이러스 (HPIV)는 일생 동안 반복된 감염을 유발할 수 있다. 이들 감염은 통상적으로 상기도 질병 (예컨대 감기 또는 인후통)에 의해 명백해진다. HPIV는 또한 특히 중장년층 중에서, 및 면역계가 손상된 환자 중에서, (폐렴, 기관지염 및 세기관지염을 포함하여) 반복 감염을 갖는 심각한 하기도 질환을 유발할 수 있다. 각각의 4개의 HPIV (혈청형 1-4)는 상이한 임상적 및 역학적 양상을 갖는다. HPIV-1 및 HPIV-2의 가장 독특한 임상적 특징은 크룹(croup) (후두기관지염)이다. HPIV-3이 세기관지염 및 폐렴을 비롯한 중증의 하부 호흡기 질환과 가장 흔히 관련된다. HPIV-4는 드물게 중증의 질환과 관련된다.
- [0010] 다양한 접근법이 건강한 집단 및 위험 집단에서 오래 지속되고 보호성인 면역 반응을 생성하는, 이들 호흡기 바이러스에 대해 안전하고 유효한 백신을 생성하기 위한 노력으로 시도되었다. 그러나, 현재까지 이들 바이러스에 의해 유발되는, 하부 호흡기 감염 (LRI)을 비롯한 감염의 예방 및/또는 질환의 감소 또는 예방의 목적을 위

한 백신으로 안전하고 유효한 것으로 입증된 평가 후보는 없다.

발명의 내용

[0011] <간단한 개요>

[0012] 본 개시내용은 인간에서 하기도 감염의 주요 바이러스 원인 중에서 선택된 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원을 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 본원에 개시된 면역원성 조성물은 메타뉴모바이러스 (hMPV), 파라인플루엔자 바이러스 (PIV) 및 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)로부터 선택된 2개 이상의 F 단백질 항원을 포함한다. 조합된 항원은 삼량체 융합전 입체형태를 안정시키기 위해 변형된 재조합 F 단백질이다. 또한, 예를 들어 이들 작용제로 감염 및/또는 감염에 의해 유발되는 질환에 대해 보호하기 위한, 이들 바이러스 중 2개 이상에 대해 특이적인 면역 반응을 도출하는 재조합 항원을 코딩하는 핵산 및 이러한 항원의 생성 및 사용 방법이 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1a는 RSV F 단백질의 구조적 특징을 강조하여 도식적으로 설명한 것이다. 도 1b는 예시적 RSV 융합전 F (PreF) 항원을 도식적으로 설명한 것이다.

도 2는 RSV, hMPV 및 PIV의 예시적 F 단백질 폴리펩티드 사이의 서열 정렬이다.

도 3a는 hMPV의 예시적 균주의 관련성을 설명하는 계통 발생학의 가계도이다. 도 3b는 동일성%의 페어 방식 비교를 제공하는 요약표이다.

도 4a는 PIV-3의 예시적 균주의 관련성을 설명하는 계통 발생학의 가계도이다. 도 4b는 동일성%의 페어 방식 비교를 제공하는 요약표이다.

도 5a는 RSV의 예시적 균주의 관련성을 설명하는 계통 발생학의 가계도이다. 도 5b는 동일성%의 페어 방식 비교를 제공하는 요약표이다.

도 6a 및 6b는 IgG 및 PreF 항원에 의해 도출되는 RSV에 특이적인 중화 항체의 역할을 설명하는 막대 그래프이다.

도 7은 마우스에서 RSV PreF 항원에 의해 제공된 시험접종(challenge)에 대한 보호를 나타내는 그래프이다.

도 8a 및 8b는 IgG 및 파라믹소바이러스 F 단백질 항원의 조합을 포함하는 면역원성 조성물의 성분에 특이적인 중화 항체의 역할을 설명하는 막대 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] <상세한 설명>

[0015] 도입

[0016] 유아 및 어린 소아에서, 세기관지염 및 폐렴과 같은 중증의 징후를 비롯하여, 하기도 감염의 3가지 주요 원인은, 내림 차순으로 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV), 인간 메타뉴모바이러스 (hMPV) 및 파라인플루엔자 바이러스 (PIV) 부류의 구성원이다. 본 개시내용은 파라믹소바이러스 부류의 바이러스 병원체에 대해 보호하는 조합 백신을 기재하고, 일상적인 면역화와 호환가능한 예방접종 스케줄에 따라서 매우 어린 유아의 보호를 용이하게 하기 위한 면역화 스케줄의 최적화를 제공한다.

[0017] PCT/CA2008/002277은 삼량체 융합전 입체형태를 안정시키기 위해 변형된 재조합 RSV F 단백질을 포함하는 신규 항원의 설계, 생성 및 활용을 개시한다. 개시된 재조합 항원은 우수한 면역원성을 나타내고, 특히 바람직하게는 RSV 감염 및/또는 질환에 대한 보호를 위한 면역원성 조성물 (예를 들어, 백신)의 성분으로 사용된다. 재조합 항원을 코딩하는 핵산, 항원을 함유하는 면역원성 조성물, 및 항원의 생성 및 사용 방법이 또한 개시된다. 본 개시내용은 이러한 교시를 인간 호흡 감염 및 질환을 담당하는 다른 파라믹소바이러스로 확장한다. 보다 구체적으로, 본 개시내용은 삼량체 융합전 입체형태에서 유사하게 안정화된 재조합 hMPV 및 PIV (예를 들어, PIV-3) 단백질을 제공한다. 이들 항원은 특히 2개 이상의 파라믹소바이러스에 의한 감염의 충격에 대해 보호하거나 이를 감소시키는 면역 반응을 도출하기 위한 항원의 조합을 함유하는 조성물에 유용하다.

[0018] 본 개시내용의 한 측면은 하기도 균으로부터 선택된 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원을 포함하는 면역

원성 조성물에 관한 것이다: 인간 메타뉴모바이러스 (hMPV), 파라인플루엔자 바이러스 (PIV) 및 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV). 파라믹소바이러스 F 단백질 항원은 파라믹소바이러스 F 단백질 폴리펩티드의 F2 도메인 및 F1 도메인을 포함하고, 막횡단 도메인 (예를 들어, 가용성임)이 결핍되고, 이중 삼량체화 도메인에 의해 삼량체 융합전 입체형태에서 안정화된 재조합 F 단백질 폴리펩티드이다. 예를 들어, 이중 삼량체화 도메인은 서열 15의 아미노산 서열에 의해 예시된 바와 같이 코일드-코일(coiled-coil) 도메인, 예컨대 이소슈신 지퍼(zipper)를 포함할 수 있다. 발현시, F 단백질 폴리펩티드는 다량체, 바람직하게는 삼량체로 어셈블링된다.

- [0019] F 단백질 폴리펩티드는 전형적으로 푸린 절단 부위가 개입되지 않은 F2 도메인 및 F1 도메인을 포함한다. F2 및 F1 도메인이 프로세싱 동안 절단되지 않고, 성숙한 형태이도록, F 단백질 폴리펩티드는 F2 및 F1 도메인 사이에 무손상 융합 펩티드를 유지한다. 전형적으로, 이중 삼량체화 도메인은 F1 도메인에 대해 C-말단에 위치한다 (예를 들어, 막횡단 도메인이 자연 발생 파라믹소바이러스 F 단백질에서 발생하는 위치에 대해 N-말단인 약 20개 아미노산 대신에 또는 그 내에 위치함).
- [0020] 전형적으로, F 단백질 폴리펩티드는 신호 펩티드 (성숙한 항원으로부터 절단될 수 있음)를 포함한다. 신호 펩티드는 동일한 파라믹소바이러스 F 단백질, 상이한 파라믹소바이러스 F 단백질, 또는 함께 상이한 단백질로부터의 것일 수 있다. 예를 들어, 신호 펩티드는 선택된 숙주 세포에서 생성을 용이하게 하기 위해 진료의의 재량에 따라 선택될 수 있다.
- [0021] F 단백질 폴리펩티드는 융합전 입체형태를 유지하도록 조작된 삼량체로 안정하게 어셈블링된다. 임의로, F 단백질 폴리펩티드는 또한 융합전 입체형태의 안정성을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함한다. 예를 들어, 바람직한 변형은 하기를 포함한다: F 단백질 세포의 도메인 (예를 들어, HRA 및/또는 HRB)의 소수성 도메인에서 친수성 아미노산의 치환 또는 부가; 및 글리코실화를 변경시키는 아미노산의 치환. 임의로, F 단백질 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하기 위해 폴리히스티딘 서열 또는 다른 태그를 포함한다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 또한 하나 이상의 파라믹소바이러스 G 단백질 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 단편을 포함한다. G 단백질 폴리펩티드는 전장 재조합 G 단백질 또는 단리된 면역원성 단편 또는 키메라 (또는 "융합") 단백질 (F 단백질 폴리펩티드 또는 또 다른 융합 파트너에 대함)일 수 있다. 단편이 선택되는 경우, 단편은 전형적으로 하나 이상의 면역우성 에피토프, 예를 들어 RSV G 단백질의 아미노산 184-198을 유지한다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 2개의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원을 포함한다. 예를 들어, 한 구체적인 실시양태에서, 면역원성 조성물은 hMPV F 단백질에 상응하는 F 단백질 폴리펩티드 및 PIV (예를 들어, PIV-3) F 단백질에 상응하는 F 단백질 폴리펩티드를 포함한다. 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 hMPV F 단백질 폴리펩티드 또는 PIV 단백질 폴리펩티드 또는 hMPV 및 PIV 단백질 폴리펩티드 둘 모두와 함께 RSV F 단백질 폴리펩티드를 포함한다. 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은, 2개 이상의 파라믹소바이러스 F 단백질 항원 이외에도, 하나 이상의 추가의 항원을 포함한다. 예를 들어, RSV, hMPV 및/또는 PIV에 상응하는 F 단백질 폴리펩티드 이외에도, 면역원성 조성물은 또한 추가의 파라믹소바이러스 항원, 예컨대 상이한 RSV 균주에 상응하는 F 단백질 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 다르게는, 면역원성 조성물은, 예를 들어 조성물이 PIV-3 및 PIV-1의 항원을 포함하도록 하는, 제2 (이상의) PIV F 단백질 항원, 예컨대 PIV의 상이한 혈청형에 상응하는 F 단백질 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 바이러스, 예컨대 인플루엔자 (오르토믹소바이러스), 아데노바이러스, 또는 또한 기도 감염을 담당하는 SARS로부터의 제3 또는 후속 항원을 포함한다. 예를 들어, 면역원성 조성물은, hMPV F 단백질 폴리펩티드 및 PIV 단백질 폴리펩티드 및/또는 RSV F 단백질 폴리펩티드 뿐만 아니라, 인플루엔자 HA 항원을 포함할 수 있다.
- [0024] 특정 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 또한 하나 이상의 담체 또는 부형제 (예를 들어, 완충제)를 포함한다. 면역원성 조성물은 바람직하게는 아주반트로 제제화되고, 바람직하게는 Th1 편향된 면역 반응을 도출하는 아주반트로 제제화된다. 아주반트는 전형적으로 표적 집단, 예를 들어 신생아 및 유아에서 과도한 면역원성을 유발하지 않고 보호성 면역 반응을 증가시키기 위해 선택된다.
- [0025] 대상체 또는 대상체의 집단에 투여될 때, 본원에 개시된 면역원성 조성물은 2개 이상의 hMPV, PIV 및 RSV, 및 임의로 하나 이상의 추가의 호흡기 병원체로의 감염 및/또는 이들에 의해 유발되는 병적 반응을 감소시키거나 예방한다. 따라서, 본 개시내용은 본원에 개시된 면역원성 조성물을 대상체 (예를 들어, 인간 대상체)에게 투여함으로써 하나 이상의 hMPV, PIV 및 RSV에 대한 면역 반응을 도출하는 방법을 제공한다. 개시된 면역원성 조성물의 투여는 바람직하게는 2개 이상의 hMPV, PIV 및 RSV에 의한 감염을 감소시키거나 예방하는 Th1 편향된 면역 반응을 도출한다. 따라서, 본 개시내용은 2개 이상의 hMPV, PIV 및 RSV에 의해 유발된 감염의 치료 (예를

들어, 예방)을 위한 의약의 제조에 있어 파라믹소바이러스 F 단백질 항원의 용도에 관한 것이다. 예를 들어, F 단백질 항원 (또는 핵산)은 하나 이상의 hMPV, PIV 및 RSV에 의해 유발되는 감염을 예방적으로 치료하기 위한 의약의 제조에 사용된다.

[0026] 본 개시내용의 또 다른 측면은 본원에 개시된 재조합 파라믹소바이러스 F 단백질 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 핵산에 관한 것이다. 이러한 핵산은 빈번하게 선택된 숙주 세포에서 발현에 대해 최적화된 코돈이다. 핵산은 벡터, 예컨대 원핵생물 또는 진핵생물 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 핵산은 숙주 세포에 도입된다. 숙주 세포는 바람직하게는 박테리아 세포, 곤충 세포, 식물 세포 및 포유동물 세포 중에서 선택된다.

[0027] 용어

[0028] 달리 설명되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 분자 생물학에서의 통상적인 용어의 정의를 문헌 [Benjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9)]; [Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)]; 및 [Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]에서 찾아볼 수 있다.

[0029] 단수형 관사 ("a", "an", 및 "the")는 명확하게 문맥적으로 다르게 지시되지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 유사하게, "또는"이라는 단어는 명확하게 문맥적으로 다르게 지시되지 않는 한 "및"을 포함한다. 용어 "복수"는 2개 이상을 나타낸다. 핵산 또는 폴리펩티드에 대해 제공된 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기, 및 모든 분자량 또는 분자 질량 값은 대략적이고, 설명을 위해 제공된다는 것을 추가로 이해하여야 한다. 추가로, 물질, 예컨대 항원의 농도 또는 수준과 관련하여 제공된 수치 한정은 대략적일도록 의도된다. 따라서, 농도가 (예를 들어) 200 pg 이상인 것으로 지시되는 경우, 농도는 대략 (또는 "약" 또는 "~") 200 pg 이상인 것으로 이해된다.

[0030] 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 개시내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 하기에 기재된다. 용어 "포함하다(comprise)"는 "포함된다(include)"를 의미한다. 따라서, 문맥적으로 달리 요구되지 않는 한, "포함하다(comprise)"라는 단어, 및 변형물 예컨대 "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"은 언급된 화합물 또는 조성물 (예를 들어, 핵산, 폴리펩티드, 항원) 또는 단계, 또는 화합물들 또는 단계들의 군의 포함을 의미하지만, 임의의 다른 화합물, 조성물, 단계 또는 이들의 군의 배제를 의미하지는 않는 것으로 이해될 것이다. 약어 "예를 들어(e.g.)"는 라틴어 <exempli grati a>로부터 유래되고, 비-제한적인 예를 지시하도록 본원에 사용된다. 따라서, 약어 "예를 들어(e.g.)"는 용어 "예를 들어(for example)"와 동의어이다.

[0031] 본 개시내용의 다양한 실시양태의 검토를 용이하게 하기 위해, 하기의 용어 설명이 제공된다. 추가의 용어 및 설명이 본 개시내용과 관련하여 제공될 수 있다.

[0032] 용어 "F 단백질" 또는 "융합 단백질" 또는 "F 단백질 폴리펩티드" 또는 "융합 단백질 폴리펩티드"는 파라믹소바이러스 융합 단백질 폴리펩티드의 아미노산 서열 전부 또는 일부를 갖는 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다. 유사하게, 용어 "G 단백질" 또는 "G 단백질 폴리펩티드"는 파라믹소바이러스 부착 단백질 폴리펩티드의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다. 수많은 파라믹소바이러스 융합 및 부착 단백질이 기재되어 있고, 당업자에게 공지되어 있다. W02008114149는 본 개시문의 출원일자로 공개적으로 입수 가능한 예시적 RSV F 및 G 단백질 변이체 (예를 들어, 자연 발생 변이체)를 나타낸다. hMPV F 단백질의 예시적 균주는 문헌 [Boivin et al. Emerg. Infect. Dis.10:1154-1157 (2004)] (hMPV 서열의 개시내용에 대한 참고로 본원에 도입됨)에서 분류되어 있고, 여기에 부록 1로 첨부된다. 예시적 PIV (예를 들어, PIV-3) F 단백질의 서열은 문헌 [Prinoski et al. Virus Research 22:55-69 (1991)] (PIV 서열의 개시내용에 대한 참고로 본원에 도입됨)에서 분류되어 있고, 여기에 부록 2로 첨부된다. 이들 참조문헌은 각각 예시적 F 단백질 서열을 개시하는 목적을 위해 본원에 참고로 도입된다. 추가로, 다수의 이들 서열은 진뱅크 데이터베이스 (2009년 6월 24일자)에서 공개적으로 입수가능하다.

[0033] 핵산 또는 폴리펩티드 (예를 들어, 파라믹소바이러스 F 또는 G 단백질 핵산 또는 폴리펩티드 또는 유사체)를 나타내는 경우의 "변이체"는 참조 핵산 또는 폴리펩티드와 상이한 핵산 또는 폴리펩티드이다. 통상적으로, 변이체 핵산 또는 폴리펩티드와 참조 핵산 또는 폴리펩티드 간의 차이(들)은 지시 대상물과 비교하여 비례적으로 소

수의 차이를 차지하고 있다.

- [0034] 폴리펩티드 또는 단백질의 "도메인"은 폴리펩티드 또는 단백질 내의 구조적으로 한정되는 요소이다. 예를 들어, "삼량체화 도메인"은 폴리펩티드를 삼량체로 어셈블링하는 것을 증진시켜 주는 폴리펩티드 내의 아미노산 서열이다. 예를 들어, 삼량체화 도메인은 다른 삼량체화 도메인 (동일하거나 상이한 아미노산 서열을 수반한 추가의 폴리펩티드의 삼량체화 도메인)과의 연합을 통하여 삼량체로 어셈블링되는 것을 증진시킬 수 있다. 상기 용어는 또한, 이러한 펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0035] 용어 "천연" 및 "자연 발생"은 자연계에서와 동일한 상태로 존재하는 요소, 예를 들어 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산을 나타낸다. 즉, 이러한 요소가 인공적으로 변형되지 않았다. 본 개시내용과 관련하여, RSV의 여러 자연 발생 균주 또는 단리물로부터 예를 들어 수득된 RSV 단백질 또는 폴리펩티드의 수많은 천연/자연 발생 변이체가 있음이 이해될 것이다.
- [0036] 용어 "폴리펩티드"는 단량체들이 아미드 결합을 통해 함께 연결되는 아미노산 잔기인 중합체를 나타낸다. 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 임의의 아미노산 서열을 포함하도록 의도되고, 당단백질과 같은 변형 서열을 포함한다. 용어 "폴리펩티드"는 자연 발생 단백질, 뿐만 아니라 재조합적으로 또는 합성적으로 생성된 것들을 포함하도록 명확하게 의도된다. 폴리펩티드와 관련하여, 용어 "단편"은 폴리펩티드의 일부분 (즉, 하위서열)을 나타낸다. 용어 "면역원성 단편"은 전장 참조 단백질 또는 폴리펩티드의 하나 이상의 우성 면역원성 에피토프를 보유하는 모든 폴리펩티드 단편을 나타낸다. 일반적으로 폴리펩티드 내의 배향은 개별 아미노산들의 아미노 및 카르복시 잔기의 배향에 의해 정의되는 N-말단 → C-말단 방향으로 열거된다. 폴리펩티드는 N 또는 아미노-말단으로부터 C 또는 카르복시-말단을 향해 번역된다.
- [0037] "신호 펩티드"는 새롭게 합성된 분비 또는 막 단백질을 막 (예를 들어, 세포질 세망의 막)으로 또는 막을 통과하도록 지시하는 짧은 아미노산 서열 (예를 들어, 아미노산 대략 18-25개 길이)이다. 신호 펩티드는 보편적이지는 않지만 자주 폴리펩티드의 N-말단에 위치하고, 단백질이 막을 가로지른 후 신호 펩티다제에 의해 자주 절단된다. 신호 서열은 전형적으로 3개의 공통적인 구조 특성을 함유한다: N-말단 극성 염기성 영역 (n-영역), 소수성 코어(core), 및 친수성 c-영역.
- [0038] 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산 서열"은 염기 10개 이상 길이의 중합체 형태의 뉴클레오티드를 나타낸다. 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 어느 한쪽 뉴클레오티드의 변형된 형태일 수 있다. 이러한 용어는 단일 및 이중 형태의 DNA를 포함한다. "단리된 폴리뉴클레오티드"는 자신이 유래된 생물의 자연 발생 계통 내에서 자신과 바로 인접한 코딩 서열 둘 모두 (5' 말단 상의 하나 및 3' 말단 상의 하나)에 바로 인접하지 않는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 코딩한다. 핵산의 5' 및 3' 방향은 개별 뉴클레오티드 단위의 연결성을 기준으로 하여 규정되고, 데옥시리보스 (또는 리보스) 당 고리의 탄소 위치에 따라서 지정된다. 폴리뉴클레오티드 서열의 정보성 (코딩) 내용은 5' → 3' 방향으로 판독된다.
- [0039] "재조합" 핵산은 자연 발생이 아닌 서열을 지니거나 또는 인공적인 조합이 아니면 분리되어 있는 2개의 서열 절편의 인공적인 조합에 의해 제조된 서열을 갖는 핵산이다. 이러한 인공적인 조합은 화학적 합성에 의해, 또는, 보다 통상적으로, 단리된 핵산 절편의 인공적인 조작 (예를 들어, 유전자 조작 기술에 의한 조작)에 의해 달성될 수 있다. "재조합" 단백질은 숙주 세포, 예컨대 박테리아 또는 진핵생물 세포 내로 도입된 이중 (예를 들어, 재조합) 핵산에 의해 코딩되는 단백질이다. 핵산은 도입된 핵산에 의해 코딩되는 단백질을 발현할 수 있는 신호가 있는 발현 벡터 상에서 도입될 수 있거나, 또는 핵산이 숙주 세포 염색체 내로 통합될 수 있다.
- [0040] 핵산, 폴리펩티드 또는 또 다른 세포성 성분과 관련된 용어 "이중"은 이러한 성분이 자연계에서는 정상적으로 발견되지 않는 경우에 발생되고/되거나 이것이 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된다는 것을 표시한다.
- [0041] 용어 "정제" (예를 들어, 병원체 또는 병원체를 함유하는 조성물과 관련된 정제)는 존재가 바람직하지 않은 성분을 조성물로부터 제거하는 과정을 나타낸다. 정제는 상대적인 용어이고, 바람직하지 않은 성분의 모든 흔적이 조성물로부터 제거되는 것을 요구하지 않는다. 백신 생성과 관련하여, 정제는 원심분리, 투석, 이온-교환 크로마토그래피, 및 크기 배제 크로마토그래피, 친화도-정제 또는 침전과 같은 과정을 포함한다. 따라서, 용어 "정제된"은 절대 순도를 요구하지 않고, 오히려, 이는 상대적인 용어로서 의도된다. 따라서, 예를 들어, 정제된 핵산 제제는 특정 단백질이 이러한 핵산이 그의 생성 환경, 예를 들어 세포 또는 생화학적 반응 챔버에 있는 것보다 더 증강된 제제이다. 실질적으로 순수한 핵산 또는 단백질 제제는 원하는 핵산이 제제의 전체 핵산 함량의 50% 이상을 나타내도록 정제될 수 있다. 특정 실시양태에서, 실질적으로 순수한 핵산은 제제의 전체 핵

산 또는 단백질 함량의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상 또는 이를 초과하는 값을 나타낼 것이다.

- [0042] "단리된" 생물학적 성분 (예컨대 핵산 분자, 단백질 또는 소기관)은 이러한 성분이 자연 발생하는 생물의 세포 내의 다른 생물학적 성분, 예컨대 다른 염색체 및 염색체의 DNA 및 RNA, 단백질 및 소기관으로부터 실질적으로 분리 또는 정제하였다. "단리된" 핵산 및 단백질에는 표준 정제 방법에 의해 정제된 핵산 및 단백질이 포함된다. 이러한 용어는 숙주 세포에서의 재조합 발현에 의해 제조된 핵산 및 단백질, 뿐만 아니라 화학적으로 합성된 핵산 및 단백질을 또한 포함한다.
- [0043] "항원"은 동물 내로 주사되거나, 흡수되거나 또는 다른 방식으로 도입되는 조성물을 포함하는, 동물에서 항체 생성 및/또는 T 세포 반응을 자극할 수 있는 화합물, 조성물 또는 물질이다. 용어 "항원"은 모든 관련된 항원성 에피토프를 포함한다. 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정기"는 B 및/또는 T 세포가 반응하는 항원 상의 부위를 나타낸다. "우성 항원성 에피토프" 또는 "우성 에피토프"는 기능적으로 중요한 숙주 면역 반응, 예를 들어 항체 반응 또는 T-세포 반응이 만들어지는 에피토프이다. 따라서, 병원체에 대한 보호성 면역 반응과 관련하여, 우성 항원성 에피토프는 숙주 면역계에 의해 인식된 경우에 병원체에 의해 유발되는 질환으로부터의 보호를 가져다 주는 항원성 잔기이다. 용어 "T-세포 에피토프"는 적절한 MHC 분자에 결합되는 경우 T 세포에 의해 특이적으로 (T 세포 수용체를 통해) 결합되는 에피토프를 나타낸다. "B-세포 에피토프"는 항체 (또는 B 세포 수용체 분자)에 의해 특이적으로 결합되는 에피토프이다.
- [0044] "아주반트"는 비-특이적 방식으로 면역 반응의 생성을 증강시키는 작용제이다. 통상의 아주반트에는 그 위로 항원이 흡착되는 무기질 (명반, 수산화알루미늄, 인산알루미늄) 현탁액; 에멀전, 예를 들어 유중수, 및 수중유 (및 그의 변이체, 예를 들어 이중 에멀전 및 가역성 에멀전), 리포사카라이드, 리포폴리사카라이드, 면역자극성 핵산 (예를 들어, CpG 올리고뉴클레오티드), 리포솜, 톨 (Toll)-유사 수용체 효능제 (특히, TLR2, TLR4, TLR7/8 및 TLR9 효능제), 및 상기 성분의 각종 조합이 포함된다.
- [0045] "면역원성 조성물"은, 예를 들어 병원체, 예컨대 hMPV, PIV (예를 들어, PIV-3, PIV-1 포함), 및/또는 RSV에 대한 특이적 면역 반응을 도출할 수 있는, 인간 또는 동물 대상체 (예를 들어, 실험적 상황 하의 상기 대상체)에게 투여하기에 적합한 조성물이다. 따라서, 면역원성 조성물은 하나 이상의 항원 (예를 들어, 폴리펩티드 항원) 또는 항원성 에피토프를 포함한다. 면역원성 조성물은 면역 반응을 도출 또는 증강시킬 수 있는 하나 이상의 추가의 성분, 예컨대 부형제, 담체, 및/또는 아주반트를 또한 포함할 수 있다. 특정 예에서, 면역원성 조성물은 병원체에 의해 유도되는 증상 또는 상태에 대해 대상체를 보호하는 면역 반응을 도출하도록 투여된다. 일부 경우에, 대상이 병원체 (예를 들어, hMPV, PIV 및/또는 RSV)에 노출된 후 병원체의 복제를 억제하는 것에 의해 병원체에 의해 야기되는 증상 또는 질환이 예방 (또는 감소 또는 완화)된다. 본 개시내용과 관련하여, 용어 면역원성 조성물은 병원체에 대한 보호성 또는 경감성 면역 반응을 도출하는 목적으로 대상 또는 대상들의 집단에게 투여되도록 의도되는 조성물 (즉, 백신 조성물 또는 백신)을 포함하는 것으로 이해될 것이다.
- [0046] "면역 반응"은 자극에 대한 면역계 세포, 예컨대 B 세포, T 세포, 또는 단핵구의 반응이다. 면역 반응은 특이적 항체, 예컨대 항원 특이적 중화 항체의 생성을 초래하는 B 세포 반응일 수 있다. 또한 면역 반응은 T 세포 반응, 예컨대 CD4+ 반응 또는 CD8+ 반응일 수 있다. 일부 경우에, 반응은 특정 항원에 대해 특이적이다 (즉, "항원-특이적 반응"). 항원이 병원체로부터 유래되는 경우, 항원-특이적 반응은 "병원체-특이적 반응"이다. "보호성 면역 반응"은 병원체의 해로운 기능 또는 활성을 억제하거나, 병원체에 의한 감염을 감소시키거나, 또는 병원체에 의한 감염으로부터 초래되는 증상 (사망 포함)을 감소시키는 면역 반응이다. 예를 들어, 플라크 감소 검정 또는 ELISA-중화 검정에서의 바이러스 복제 또는 플라크 형성의 억제에 의해, 또는 생체 내에서의 병원체 시험접종에 대한 내성을 측정함으로써, 보호성 면역 반응을 측정할 수 있다.
- [0047] "Th1" 편향된 면역 반응은 IL-2 및 IFN- γ 를 생성하는 CD4+ T 헬퍼 세포의 존재를 특징으로 하므로, IL-2 및 IFN- γ 의 분비 또는 존재를 특징으로 한다. 이와는 달리, "Th2" 편향된 면역 반응은 IL-4, IL-5 및 IL-13을 생성하는 CD4+ 헬퍼 세포의 수적 우세를 특징으로 한다.
- [0048] "면역학적 유효량"은 조성물 (전형적으로, 면역원성 조성물)에 대한 또는 조성물 중 항원에 대한 면역 반응을 대상체에서 도출하기 위해 사용되는 상기 조성물의 양이다. 통상적으로, 원하는 결과는 병원체에 대해 대상을 보호할 수 있거나 보호하는데 기여하는 항원 (예를 들어, 병원체)-특이적 면역 반응의 생성이다. 그러나, 병원체에 대한 보호성 면역 반응을 수득하는 것은 면역원성 조성물의 다중 투여를 요구할 수 있다. 따라서, 본 개시내용과 관련하여, 용어 면역학적 유효량은 기존의 투여 또는 추후의 투여와 조합되어 보호성 면역 반응을 달성하는 것에 기여하는 분할 용량을 포함한다.

- [0049] 형용사 "제약상 허용되는"은 지시 대상물이 대상체 (예를 들어, 인간 또는 동물 대상체)에게 투여하는 데 적합하다는 것을 표시한다. 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)]에 면역원성 조성물이 포함되는 치료 및/또는 예방 조성물의 제약 전달에 적절한 조성물 및 제제 (회석제 포함)이 기재되어 있다.
- [0050] 반응, 예컨대 면역 반응과 관련하여 용어 "조정하다"는 반응의 개시, 규모, 기간 또는 특성을 변경 또는 변화시키는 것을 의미한다. 면역 반응을 조정하는 작용제는 그의 투여 후의 면역 반응의 개시, 규모, 기간 또는 특성 중 하나 이상을 변경시키거나, 또는 참조 작용제와 비교하여 개시, 규모, 기간 또는 특성 중 하나 이상을 변경시킨다.
- [0051] 작용제의 투여 후 반응 또는 상태가 정량적으로 줄어드는 경우 또는 참조 작용제와 비교하여 작용제의 투여 후 반응 또는 상태가 줄어드는 경우 작용제가 반응 또는 상태를 감소시키는 것이도록, 용어 "감소시킨다"는 상대적인 용어이다. 유사하게, 용어 "예방한다"는 반응 또는 상태의 하나 이상의 특성이 제거되는 한, 작용제가 반응 또는 상태를 완전히 제거하는 것을 반드시 의미하지는 않는다. 따라서, 감염 또는 반응, 예컨대 병적 반응, 예를 들어, 백신에 의해 증강되는 바이러스 질환을 감소시키거나 예방하는 면역원성 조성물은, 감염 또는 반응이 측정가능하게, 예를 들어, 작용제의 부재하의 또는 참조 작용제와 비교했을 때의 감염 또는 반응의 약 50% 이상, 예컨대 약 70%, 또는 약 80%, 또는 심지어 약 90% 이상만큼 (즉, 10% 이하로) 줄어드는 한, 이러한 감염 또는 반응을 제거할 수 있지만, 반드시 완전히 제거하지는 않는다.
- [0052] "대상체"는 살아 있는 다세포 척추동물 유기체이다. 본 개시내용과 관련하여, 대상체는 실험용 대상체, 예컨대 비-인간 동물, 예를 들어 마우스, 코튼 래트, 또는 비-인간 영장류일 수 있다. 다르게는, 대상체는 인간 대상체일 수 있다.
- [0053] PreF 항원
- [0054] 자연계에서, 파라믹소바이러스 F 단백질은 F0으로 명명된 단일 폴리펩티드 전구체로 발현된다. 생체내에서, F0은 소포체에서 올리고머화되고, 푸린 프로테아제에 의해 단백질가수분해 처리되어 2개의 디설피드-연결된 단편으로 이루어진 올리고머를 생성한다. RSV F F0 전구체는 2개의 푸린 인식 부위에서 절단되어 pep27로 명명된 개입 펩티드를 방출시키는 한편, 다른 파라믹소바이러스의 F 단백질 (PIV 및 hMPV F 단백질 포함)은 단일 부위에서 절단된다. 푸린 절단에 의해 생성된 2개의 단편 중 보다 작은 것은 F2로 지칭하고, 이는 F0 전구체의 N-말단 부분으로부터 기원한다. 보다 큰 C-말단 F1 단편은 24개 아미노산 세포질성 미부에 인접해 있는 소수성 아미노산 서열을 통하여 막 내에 F 단백질을 정착시킨다. 약어 F0, F1 및 F2는 과학 문헌에서의 F₀, F₁ 및 F₂를 통상적으로 명명하는 것으로 당업자에게 인식될 것이다.
- [0055] 3개의 F2-F1 이량체가 연합하여 성숙한 F 단백질을 형성하는데, 이는 표적 세포 막과의 접촉시 입체형태적 변화를 진행하기 위해 촉발되는 준안정 진용해성 ("융합전") 입체형태를 채택하고 있다. 이러한 입체형태적 변화는 융합 펩티드로서 공지된 소수성 서열을 노출시켜, 이를 숙주 세포 막과 연합시키고 바이러스 또는 감염된 세포의 막과 표적 세포 막과의 융합을 증진시켜 제공하였다.
- [0056] F1 단편은 HRA 및 HRB로 명명되고 융합 단백질과 막횡단 정착 도메인 각각과 인접하여 위치해 있는, 2개 이상의 헵타드 (heptad) 반복 도메인을 함유한다. 융합전 입체형태에서, F2-F1 이량체가 구상 두부와 줄기 구조를 형성하는데, 여기서는 HRA 도메인이 구상 두부 내에 절편화 (연장된) 입체형태로 존재한다. 이와는 달리, HRB 도메인은 두부 영역으로부터 연장되는 3-가닥 코일드 코일 줄기를 형성한다. 융합전 입체형태에서부터 융합후 입체형태로 전이되는 동안, HRA 도메인은 붕괴되고, HRB 도메인과 인접하게 되어 항-평행 6 나선 다발을 형성한다. 융합후 상태에서, 융합 펩티드와 막횡단 도메인이 병렬되어 막 융합을 용이하게 한다.
- [0057] 상기 제공된 입체형태적 설명이 결정학적 데이터의 분자성 모델링에 기초하긴 하지만, 융합전 입체형태와 융합후 입체형태 간의 구조적 차이는 결정학에 의지하지 않고서도 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 전자 현미경사진을 이용하여 융합전 입체형태와 융합후 입체형태 (다르게는, 진용해성 입체형태와 용해성 입체형태로 명명됨) 사이를 구별할 수 있는데, 이는 그의 기술적 교시 목적으로 본원에 참고로 도입되는 다음 문헌에 의해 입증된 바와 같다 [Calder et al., Virology, 271:122-131 (2000)] 및 [Morton et al., Virology, 311:275-288]. 융합전 입체형태는 또한, 그의 기술적 교시 목적으로 본원에 참고로 도입되는 문헌 [Connolly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:17903-17908 (2006)]에 의해 기재된 바와 같은 리포솜 연합 검정에 의해 용해성 (융합후) 입체형태와 구별될 수 있다. 부가적으로, 융합전 및 용해성 입체형태는 융합전 또는 용해성 형태의 파라믹소바이러스 F 단백질 중 하나 또는 다른 하나 상에 존재하지만, 다른 형태 상에는 존재하지 않는 입체형

태 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체)를 이용하여 구별할 수 있다. 이러한 입체형태 에피토프는 항원 결정기가 해당 분자의 표면 상에 우선적으로 노출되는 것에 기인할 수 있다. 다르게는, 입체형태적 에피토프는 선형 폴리펩티드에서 인접하지 않는 아미노산의 병렬로부터 비롯될 수 있다.

[0058] 본원에 개시된 PreF 항원은 파라믹소바이러스 F 단백질의 융합전 입체형태를 안정화 및 유지시켜, 발현된 단백질 집단 내에서, 이러한 발현된 단백질 집단의 상당 부분이 전용해성(융합전) 입체형태가 되도록 (예를 들어, 구조적 및/또는 열역학적 모델링에 의해 예측되는 바와 같거나, 또는 상기 개시된 방법들 중 하나 이상에 의해 평가된 바와 같음) 설계한다. 안정화 변형은 천연 (또는 합성) F 단백질, 예컨대 서열 2의 예시적 RSV F 단백질, 서열 6의 예시적 hMPV 단백질 및/또는 서열 8의 예시적 PIV 단백질에 도입된다. 개시된 안정화 변형의 도입은 세포 또는 세포외 환경으로의 PreF 항원의 도입 후 (예를 들어, 생체내, 예를 들어 대상체에게 투여한 후), 융합전 입체형태의 주요 면역원성 에피토프를 유지시킨다.

[0059] 첫째, 이중 안정화 도메인을 구조물의 C-말단 끝에 놓아두어 F0 폴리펩티드의 막 정착 도메인을 대체시킬 수 있다. 이러한 안정화 도메인은 HRB 불안정성을 상쇄시켜 주어 융합전 이형태체 (conformer)를 안정화시키는 데 도움을 주는 것으로 예측된다. 예시적 실시양태에서, 이중 안정화 도메인은 단백질 다량체화 도메인이다. 이러한 단백질 다량체화 도메인의 한 특별히 바람직한 예는 삼량체화 도메인이다. 예시적 삼량체화 도메인은 코일드-코일 도메인을 갖는 다중 폴리펩티드의 삼량체로의 어셈블링을 증진시켜 주는 상기 코일드-코일 내로 폴딩된다. 삼량체화 도메인의 한 바람직한 예는 이소류신 지퍼이다. 예시적 이소류신 지퍼 도메인은 문헌 [Harbury et al. Science 262:1401-1407 (1993)]에 기재된 조작된 효모 GCN4 이소류신 변이체이다. 한 적합한 이소류신 지퍼 도메인의 서열이 서열 15로서 제시되긴 하지만, 코일드-코일 안정화 도메인을 형성할 수 있는 능력을 보유하고 있는 상기 서열의 변이체가 동등하게 적합하다. 대안적 안정화 코일드-코일 삼량체화 도메인에는 TRAF2 (진뱅크[®] 승인 번호 Q12933 [gi:23503103]; 아미노산 299-348); 트롬보스폰딘 (Thrombospondin) 1 (승인 번호 P07996 [gi:135717]; 아미노산 291-314); 마트릴린 (Matrilin)-4 (승인 번호 095460 [gi:14548117]; 아미노산 594-618); CMP (마트릴린-1) (승인 번호 NP_002370 [gi:4505111]; 아미노산 463-496); HSF1 (승인 번호 AAX42211 [gi:61362386]; 아미노산 165-191); 및 쿠빌린 (Cubilin) (승인 번호 NP_001072 [gi:4557503]; 아미노산 104-138)이 포함된다. 적합한 삼량체화 도메인은 발현된 단백질의 실질적 부분을 삼량체로 어셈블링시켜 주는 것으로 예상된다. 예를 들어, 삼량체화 도메인을 갖는 재조합 PreF 폴리펩티드의 50% 이상이 삼량체로 어셈블링될 것이다 (예를 들어, AFF-MALS에 의해 평가한 바와 같음). 전형적으로, 발현된 폴리펩티드의 60% 이상, 보다 바람직하게 70% 이상, 가장 바람직하게 약 75% 이상 또는 그 초과가 삼량체로서 존재한다.

[0060] 추가로 안정성을 증강시키기 위해, HRB 내의 중성 잔기 (예컨대, 류신, 이소류신 또는 발린)는 극성 잔기 (예컨대, 리신, 아르기닌 또는 글루타민)에 의해 치환될 수 있다. 예를 들어, RSV PreF 항원과 관련하여, PreF의 위치 512 (천연 F0 단백질을 기준으로 함)에 위치한 류신 잔기를 리신으로 치환시킬 수 있다 (서열 10의 예시적 PreF 항원 폴리펩티드의 L482K). 이러한 치환으로 인해, 코일드 코일 소수성 잔기 주기성이 개선된다. 유사하게, 리신을 위치 105에 있는 아미노산 뒤에 부가할 수 있다. 상응하거나 대등한 잔기는 당업자에 의해 hMPV 및 PIV-3 F 단백질에서 선택될 수 있다.

[0061] 또한, 푸린 절단 모티프(들) (hMPV 및 PIV의 경우에 하나, 및 RSV의 경우에 하나 또는 둘 모두)의 결실은 융합전 이형태체를 추가로 안정화시킨다. 이러한 설계를 이용하므로, 융합 단백질은 F2로부터 절단되지 않아 융합전 이형태체의 구상 두부로부터 방출되지 못하게 되고 근처 막에 대한 접근 가능성도 방지된다. 융합 단백질과 막 계면 간의 상호 작용은 융합전 상태 불안정성에 있어서 중요한 논쟁이 되는 것으로 예측된다. 융합 과정 동안, 융합 펩티드와 표적 막 간의 상호 작용으로 인해, 구상 두부 구조 내로부터 융합 펩티드가 노출되어, 융합전 상태의 불안정성과 융합후 이형태체로의 폴딩이 증가된다. 이러한 입체형태 상의 변화로 인해 막 융합 과정이 가능해진다. 푸린 절단 부위(들) 중 하나 (또는 임의로 둘 모두, RSV의 경우)를 제거하면, 막이 융합 펩티드의 N-말단 부로 접근되는 것이 방지되므로, 융합전 상태를 안정화시키는 것으로 예측된다. RSV F 단백질의 경우에, pep27로 명명된 2개의 푸린 절단 부위 사이의 서열은 또한 제거될 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 예시적 실시양태에서, 푸린 절단 모티프(들)의 제거는 프로세싱 및 어셈블리 동안 또는 그 후에 푸린에 의해 절단되지 않는 무손상 융합 펩티드를 포함하는 PreF 항원을 생성한다.

[0062] 임의로, 하나 이상의 비-푸린 절단 부위는, 예를 들어 하나 이상의 아미노산을 치환시킴으로서 제거할 수도 있다. 예를 들어, 실험을 이용한 명백한 증거는 특정 메탈로프로테이나제에 의한 절단에 도움이 되는 조건 하에, RSV PreF 항원을 아미노산 110-118 부근에서 절단시킬 수 있다고 제안하고 있다 (예를 들어, 절단은 PreF 항원

의 아미노산 112와 113 사이; 서열 2의 참조 F 단백질 폴리펩티드의 위치 142에서의 류신과 위치 143에서의 글리신 사이에서 일어남). 따라서, 이러한 영역 내의 하나 이상의 아미노산의 변형은 PreF 항원의 절단을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 위치 112에서의 류신을 상이한 아미노산, 예를 들어 이소류신, 글루타민 또는 트립토판으로 치환시킬 수 있다. 다르게는 또는 부가적으로, 위치 113에서의 글리신을 세린 또는 알라닌으로 치환시킬 수 있다. 비-푸린 프로테아제에 의한 절단이 hMPV 및 PIV PreF 항원의 생성 동안 관찰되는 사건에서 유사한 변형을 만들 수 있다.

[0063] 임의로, PreF 항원은 글리코실화 패턴 또는 상태를 변경시키는 (예를 들어, 천연 F 단백질 폴리펩티드에 존재하는 글리코실화 부위 중 하나 이상에서 글리코실화된 분자의 비율을 증가시키거나 감소시킴으로써) 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열 2의 천연 RSV F 단백질 폴리펩티드는 아미노산 위치 27, 70 및 500 (서열 10의 예시적 PreF 항원의 위치 27, 70 및 470에 상응함)에서 글리코실화될 것으로 예측된다. 한 실시양태에서, 변형은 아미노산 위치 500 (N470으로 명명됨)에서 글리코실화 부위의 부근에서 도입된다. 예를 들어, 글리코실화 부위는 아미노산 치환, 예컨대 (예시적 PreF 항원의 위치 470에 대한 정렬에 의해 상응하는 참조 서열의) 위치 500에서 아스파라긴 대신 글루타민 (Q)의 치환에 의해 제거될 수 있다. 유리하게는, 이 글리코실화 부위에서 글리코실화 효율을 증가시키는 변형이 도입된다. 적합한 변형의 예는 위치 500-502에서 하기 아미노산 서열: NGS; NKS; NGT; NKT를 포함한다. 흥미롭게도, 글리코실화를 증가시키는 이 글리코실화 부위의 변형은 또한 실질적으로 PreF 생성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 특정 실시양태에서, PreF 항원은 참조 PreF 서열 (서열 2)의 아미노산 500에 상응하는 위치, 예를 들어 서열 10에 의해 예시된 PreF 항원의 위치 470에서 변형된 글리코실화 부위를 갖는다. 적합하게는, 변형은 참조 F 단백질 폴리펩티드 서열의 위치 500-502에 상응하는 아미노산에서 서열: NGS; NKS; NGT; NKT를 포함한다. 유사하게, 글리코실화 부위는 hMPV 및 PIV PreF 항원에서, 예를 들어 서열 6의 참조 hMPV F 단백질 폴리펩티드 서열의 위치 57, 172 및/또는 353 중 하나 이상에 상응하는 아미노산 및/또는 예를 들어 서열 8의 참조 PIV3 F 단백질 폴리펩티드의 위치 238, 359 및/또는 446 중 하나 이상에 상응하는 아미노산에서 변형될 수 있다.

[0064] 본원에 개시된 안정화 변형 중 어느 하나, 예를 들어 이중 안정화 도메인, 예컨대 코일드-코일 (예를 들어, 이소류신 지퍼 도메인)의 부가 (바람직하게는 PreF 항원의 C-말단 끝에 위치함); 소수성 HRB 도메인에서 잔기의 변형, 예컨대 류신의 리신으로의 변형; 푸린 절단 모티프의 제거; 비-푸린 절단 부위의 제거; 및/또는 글리코실화 부위의 변형이 임의의 하나 이상의 (또는 임의의 바람직한 조합에서 모두까지) 다른 안정화 변형과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, RSV PreF 항원에서, 이중 코일드-코일 (또는 다른 이중 안정화 도메인)이 단독으로 또는 임의의 소수성 영역의 변형, 및/또는 pep27의 제거, 및/또는 하나 또는 둘 모두의 푸린 절단 부위의 제거, 및/또는 비-푸린 절단 부위의 제거, 및/또는 글리코실화 부위의 변형과 함께 사용될 수 있다. 특정 구체적 실시양태에서, RSV PreF 항원은 C-말단 코일드-코일 (이소류신 지퍼) 도메인, HRB 소수성 도메인에서의 안정화 치환, 및 둘 모두의 푸린 절단 부위의 제거를 포함한다. 이러한 실시양태는 pep27이 결여되어 있고, 푸린 절단에 의해 제거되지 않는 무손상 융합 펩티드를 포함한다. 한 구체적 실시양태에서, PreF 항원은 또한 아미노산 위치 500에서 변형된 글리코실화 부위를 포함한다. hMPV 및/또는 PIV PreF 항원에서, 이중 코일드-코일 (또는 다른 이중 안정화 도메인)은 단독으로 또는 임의의 소수성 영역의 변형, 및/또는 푸린 절단 부위의 제거, 및/또는 비-푸린 절단 부위의 제거, 및/또는 글리코실화 부위의 변형과 함께 사용될 수 있다. 특정 구체적 실시양태에서, hMPV 또는 PIV PreF 항원은 C-말단 코일드-코일 (이소류신 지퍼) 도메인, HRB 소수성 도메인에서 안정화 치환, 및 푸린 절단 부위의 제거를 포함한다. 이러한 실시양태는 푸린 절단에 의해 제거되지 않는 무손상 융합 펩티드를 포함한다. 임의로, hMPV 또는 PIV PreF 항원은 또한 변형된 글리코실화 부위를 포함한다.

[0065] 천연 F 단백질 폴리펩티드는 PreF 항원이 바람직한 파라믹소바이러스의 임의의 F 단백질로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, RSV의 경우에, RSV A 또는 RSV B 균주, 또는 그의 변이체 (상기 정의된 바와 같음)로부터 선택될 수 있다. 특정 예시적 실시양태에서, F 단백질 폴리펩티드는 서열 2로 나타낸 F 단백질이다. 상이한 RSV 균주로부터의 F 단백질 폴리펩티드의 다수의 추가의 예가 WO2008114149에 개시되어 있다 (이는 RSV F 및 G 단백질 서열의 추가의 예를 제공할 목적으로 본원에 참고로 도입됨).

[0066] hMPV의 경우, 임의의 A 또는 B (예를 들어, A1, A2, B1, B2) 균주, 또는 그의 변이체 (상기 정의된 바와 같음)로부터 선택될 수 있다. 특정 예시적 실시양태에서, hMPV F 단백질 폴리펩티드는 서열 6으로 나타낸 F 단백질이다. 상이한 hMPV 균주로부터의 F 단백질 폴리펩티드의 다수의 추가의 예는 문헌 [Boivin et al. *Emerg. Infect. Dis.*10:1154-1157 (2004)] (예시적 hMPV F 단백질 서열을 개시하는 목적을 위해 본원에 도입됨)에 개시되어 있다. 예시적 핵산 서열은 진뱅크 데이터베이스를 참조하여 용이하게 확인할 수 있다.

[0067] PIV의 경우, 혈청형 1-4, 또는 그의 변이체 (상기 정의된 바와 같음)로부터 선택된 임의의 균주가 선택될 수 있

다. 예를 들어, 하기도 질환을 예방하기 위해 설계된 조성물에서, PIV는 가장 일반적으로 PIV-3의 균주이다. 특정 예시적 실시양태에서, PIV F 단백질 폴리펩티드는 서열 8로 나타낸 F 단백질이다. 추가의 PIV (예를 들어, PIV-3) 융합 단백질의 서열은 문헌 [Prinoski et al. Virus Research 22:55-69 (1991)] (예시적 PIV F 단백질 서열을 개시하는 목적을 위해 본원에 도입됨)에 제공되어 있다. 예시적 핵산 서열은 진뱅크 데이터베이스를 참조하여 용이하게 확인할 수 있다.

[0068] 이러한 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 균주에 상관없이 모든 아미노산 잔기 위치가 예시적 F 단백질 중 하나의 아미노산 위치를 기준으로 하여 제시된다 (즉, 아미노산 잔기 위치는 예시적 F 단백질의 아미노산 위치에 상응함). 다른 임의의 파라믹소바이러스의 대등한 아미노산 위치는, 용이하게 입수가 가능하고 널리 공지된 정렬 알고리즘 (예컨대, 예를 들어 디폴트 파라미터를 이용하는 BLAST)을 사용하여, 선택된 바이러스 F 단백질의 아미노산 서열을 예시적 서열과 정렬시킴으로써 당업자에 의해 용이하게 결정할 수 있다. 이들 또는 임의의 다른 파라믹소바이러스 F 단백질의 추가의 변이체는 유전적 부동을 통하여 생성될 수 있거나, 또는 부위 지시된 또는 무작위 돌연변이 유발을 이용하거나 또는 기존의 2개 이상의 변이체를 재조합함으로써 인공적으로 생성될 수 있다. 이러한 추가의 변이체는 또한, 본원에 개시된 PreF (및 PreF-G) 항원과 관련하여 적합하다.

[0069] F 단백질의 F2 및 F1 도메인을 선택하는데 있어서, 당업자는 전체 F2 및/또는 F1 도메인을 포함하는 것이 엄격하게 필요하지 않다는 것을 인지할 것이다. 전형적으로, F2 도메인의 하위서열 (또는 단편)을 선택할 때 입체형상적인 고려가 중요하다. 따라서, F2 도메인은 전형적으로, 폴리펩티드의 어셈블리와 안정성을 촉진시키는 F2 도메인의 일부를 포함한다. PCT/CA2008/002277에 개시된 바와 같이, RSV F 단백질이 관련되는 특정 실시양태에서, F2 도메인은 아미노산 26-105를 포함한다. hMPV F 단백질이 관련되는 특정 예시적 실시양태에서, F2 도메인은 아미노산 19-98을 포함한다. PIV F 단백질이 관련되는 특정 예시적 실시양태에서, F2 도메인은 아미노산 19-105를 포함한다. 그러나, 길이에 있어 약간의 변형을 수반한 변이체 (이는 하나 이상의 아미노산을 부가하거나 결실시킴으로써 이루어짐)가 또한 가능하다.

[0070] 전형적으로, 적어도 F1 도메인의 하위서열 (또는 단편)은 F 단백질의 면역우성 에피토프를 포함하는 안정한 입체형상을 유지하도록 선택되고 디자인된다. RSV F 단백질이 관련되는 예시적 실시양태에서, F1 도메인 폴리펩티드는 적어도 RSV F 단백질 폴리펩티드의 약 아미노산 262-436을 포함한다. 본원에 제공된 한 비-제한성 예에서, F1 도메인은 천연 F 단백질 폴리펩티드의 아미노산 137 내지 516을 포함한다. 당업자는 추가적인 더 짧은 하위서열들이 실행자의 재량에 따라 사용될 수 있음을 인지할 것이다. hMPV F 단백질이 관련되는 예시적 실시양태에서, F1 도메인은 아미노산 103-480 (예를 들어, 103-481)을 포함하고, PIV F 단백질이 관련되는 예시적 실시양태에서, F1 도메인은 아미노산 110-481 (예를 들어, 110-484)을 포함한다.

[0071] F2 또는 F1 도메인의 하위서열을 선택하는 경우에는 (또는 특정 PreF-G 항원의 G 단백질 성분과 관련하여 하기 논의되는 바와 같이), 입체형태적 고려 이외에도, 추가의 면역원성 에피토프의 봉입을 기준으로 하여 서열 (예를 들어, 변이체, 하위서열 등)을 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 정착 모티프, 또는 당업계에 공지된 다른 방법, 예를 들어 중성 네트 또는 다명 결정을 이용하여 추가의 T 세포 에피토프를 확인할 수 있다 [예를 들어, RANKPEP (www.mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html에서 입수가 가능함); ProPredI (www.imtech.res.in/raghava/propredI/index.html에서 입수가 가능함); Bimas (www.bimas.dcrn.nih.gov/molbi/hla_bind/index.html에서 입수가 가능함); 및 SYFPEITH (www.syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm에서 입수가 가능함) 참조]. 예를 들어, 알고리즘을 사용하여, 펩티드의 "결합 역치"를 결정하고, 특정 친화도의 MHC 또는 항체 결합의 높은 가능성을 제공하는 점수의 펩티드를 선택한다. 이러한 알고리즘은 특정 위치에서의 특정 아미노산의 MHC 결합에 대한 효과, 특정 위치에서의 특정 아미노산의 항체 결합에 대한 효과, 또는 모티프-함유 펩티드에서의 특정 치환의 결합에 대한 효과를 기초로 한다. 면역원성 펩티드와 관련하여, "보존 잔기"는 펩티드 내의 특정 위치에서 무작위 분포에 의해 예상되는 것보다 유의하게 더 높은 빈도로 나타나는 것이다. 정착 잔기는 MHC 분자와의 접촉점을 제공하는 보존 잔기이다. 이러한 예측 방법에 의해 확인된 T 세포 에피토프는 특이적 MHC 단백질에 대한 그의 결합을 측정함으로써, 및 MHC 단백질과 관련하여 제시되는 경우에 T 세포를 자극하는 그의 능력에 의해 입증될 수 있다.

[0072] 바람직하게는, PreF 항원 (하기 논의되는 바와 같은 PreF-G 항원 포함)은 발현 시스템에 상응하는 신호 펩티드, 예를 들어 포유동물 또는 바이러스 신호 펩티드, 예컨대 RSV FO 천연 신호 서열 (예를 들어, 서열 2의 아미노산 1-25 또는 서열 10의 아미노산 1-25) 또는 hMPV 또는 PIV 천연 신호 서열 (예를 들어, 서열 6 또는 8의 아미노산 1-18)을 포함한다. 전형적으로, 신호 펩티드는 재조합 발현을 위해 선택된 세포와 화합성이 되도록 선택한다. 예를 들어, 신호 펩티드 [예컨대, 배큘로바이러스 (baculovirus) 신호 펩티드, 또는 멜리틴 (melittin) 신호 펩티드]를 곤충 세포에서의 발현을 위해 대체시킬 수 있다. 식물 발현 시스템이 바람직한 경우, 적합한 식

물 신호 펩티드가 당업계에 공지되어 있다. 다수의 예시적 신호 펩티드가 당업계에 공지되어 있고 (예를 들어, 문헌 [Zhang & Henzel, Protein Sci., 13:2819-2824 (2004)] 참조; 이에 는 다수의 인간 신호 펩티드가 기재되어 있음), 예를 들어 SPdb 신호 펩티드 데이터베이스에 목록으로 만들어져 있는데, 이에 는 고박테리아, 원핵생물 및 진핵생물의 신호 서열이 포함된다 (<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>). 임의로, 임의의 상기 언급된 항원이 정제를 용이하게 하기 위한 추가의 서열 또는 태그, 예를 들어 His-태그를 포함할 수 있다.

[0073] 임의로, PreF 항원이 추가의 면역원성 성분을 포함할 수 있다. 특정 특히 바람직한 실시양태에서, PreF 항원은 파라믹소바이러스 G 단백질 항원성 성분을 포함한다. RSV로부터의 PreF 및 G 성분을 갖는 예시적 키메라 단백질은 PCT/CA2008/002277 (예시적 키메라 PreF-G 단백질의 상세한 설명과 관련하여 그 전문이 본원에 도입됨)에 상세하게 기재되어 있다. 임의의 파라믹소바이러스 (특히 hMPV 및 PIV (예를 들어, PIV-3) 포함)에 대해 대등한 PreF-G 단백질이 설계되고 생성될 수 있다.

[0074] 예를 들어, 자연 발생 균주에 상응하는 서열 선택과 관련하여, 하나 이상의 도메인은 서열 면에서 RSV A 또는 B 균주, 예컨대 A2 또는 Long으로 명명된 통상의 실험실 단리물, 또는 임의의 다른 자연 발생 균주 또는 단리물 (상기 언급된 WO2008114149에 기재된 바와 같음)에 상응할 수 있다. 유사하게, 다른 자연 발생 파라믹소바이러스 (예를 들어, hMPV 및 PIV 포함) (각각 상기 언급된 문헌 [Boivin et al. Emerg. Infect. Dis.10:1154-1157 (2004)] 및 [Prinoski et al. Virus Research 22:55-69 (1991)]에 개시된 바와 같음)에 상응하는 서열이 선택될 수 있다. 예시적 PreF 단백질 폴리펩티드는 서열 10, 12 및 14 (각각 RSV, hMPV 및 PIV-3)에 제공된다.

[0075] 이러한 자연 발생 및 단리된 변이체 이외에도, 상기 언급된 서열과 서열 유사성을 공유하고 있는 조작된 변이체를 PreF (PreF-G 포함) 항원과 관련하여 이용할 수도 있다. 당업자는 폴리펩티드 (및 일반적으로 뉴클레오티드 서열)에 관한 한은, PreF 항원 폴리펩티드 (및 하기 기재되는 바와 같은 폴리뉴클레오티드 서열) 간의 유사성을 서열들 간의 유사성 측면에서 표현할 수 있는데, 달리 서열 동일성으로 지칭되기도 한다. 서열 동일성은 동일성 (또는 유사성) 백분율의 관점에서 종종 측정되고; 백분율이 높을수록, 2개의 서열 간의 1차 구조가 보다 유사하다. 일반적으로, 2개의 아미노산 (또는 폴리뉴클레오티드) 서열의 1차 구조가 보다 유사할수록, 폴딩 및 어셈블리로부터 초래되는 더 높은 차원의 구조가 보다 유사하다. PreF 폴리펩티드 (및 폴리뉴클레오티드) 서열의 변이체는 전형적으로, 1개 또는 소수의 아미노산 결실, 부가 또는 치환을 가질 것이지만, 그럼에도 불구하고 극히 높은 비율의 그의 아미노산, 및 일반적으로 그의 폴리뉴클레오티드 서열을 공유할 것이다. 보다 중요하게는, 상기 변이체가 본원에 개시된 참조 서열의 구조적 특징과, 이에 따른 입체형태적 특징을 보유하고 있다. 따라서, 서열 10, 12 및 14의 예시적 PreF 서열 중 하나에 대해 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 10개 이하의 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환을 갖는 PreF 단백질 폴리펩티드가 또한 본원에 개시된 PreF 단백질 폴리펩티드의 실시양태이다. 예를 들어, 적합한 실시양태는 글리코실화 부위를 변형시키는 (상기 논의된 바와 같음) 아미노산 치환을 갖는 RSV, hMPV 및/또는 PIV-3 PreF 단백질 (예를 들어, 서열 10, 12 및/또는 14의 단백질)을 포함한다. 유사하게, 적합한 실시양태는 서열 10, 12 및/또는 14에 대해 내부 펩티다제 절단 부위를 변경시키는 (상기 논의된 바와 같음) 아미노산의 치환을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, PreF 폴리펩티드는 서열 10, 12 및 14에 대해 이러한 변형 둘 모두를 포함한다.

[0076] 서열 동일성을 결정하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고, PreF 항원 폴리펩티드 뿐만 아니라 이를 코딩하는 핵산에도 적용 가능하다 (예를 들어, 하기 기재된 바와 같음). 다양한 프로그램 및 정렬 알고리즘이 문헌 [Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981]; [Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970]; [Higgins and Sharp, Gene 73:237, 1988]; [Higgins and Sharp, CABIOS 5:151, 1989]; [Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881, 1988]; 및 [Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988]에 기재되어 있다. 문헌 [Altschul et al., Nature Genet. 6:119, 1994]에 서열 정렬 방법 및 상동성 계산의 상세한 고려사항이 제시된다. 서열 분석 프로그램 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 함께 사용하기 위해, <National Center for Biotechnology Information> (NCBI, Bethesda, MD)이 포함되는 여러 공급원으로부터, 및 인터넷 상에서 <NCBI Basic Local Alignment Search Tool> (BLAST) (문헌 [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990])이 입수가능하다. 이러한 프로그램을 사용하여 서열 동일성을 결정하는 방법에 관한 설명이 인터넷 상의 NCBI 웹사이트에서 입수가능하다.

[0077] 일부 경우에, PreF 항원은 이것이 유래되는 자연 발생 균주의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변형 (예를 들어, 상기 언급된 안정화 변형 이외의 변형)을 갖고 있다. 이러한 차이는 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환일 수 있다. 변이체는 전형적으로, 아미노산 잔기의 약 1%, 또는 2%, 또는 3%, 또는 4%, 또는 5%, 또는 6%, 또는 10%, 또는 15%, 또는 20% 이하가 상이하다. 예를 들어, 변이체 PreF 항원 (PreF-G 포함) 폴리펩티드 서열은 서열 10의 예시적 PreF 항원 폴리펩티드 서열, 또는 hMPV 및/또는 PIV 서열을

기반으로 유사한 PreF 항원 (예컨대, 서열 12 및 14의 예시적 서열)과 비교하여 1개, 또는 2개, 또는 5개 이하, 또는 약 10개 이하, 또는 약 15개 이하, 또는 약 50개 이하, 또는 약 100개 이하의 아미노산 차이를 포함할 수 있다. 따라서, F 또는 G 단백질, 또는 PreF 항원 (PreF-G 항원 포함)과 관련하여 변이체는 전형적으로 참조 단백질, 또는 본원에 개시된 임의의 예시적 PreF 항원에 대해 80%, 또는 85% 이상, 보다 통상적으로 약 90% 이상 또는 그 초과, 예컨대 94%, 또는 95%, 또는 96%, 또는 97%, 또는 심지어 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 공유한다. 본 개시내용의 특징으로 포함된 추가의 변이체는 W02008114149 (RSV), 문헌 [Boivin et al. *Emerg. Infect. Dis.*10:1154-1157 (2004)] (hMPV) 및 [Prinoski et al. *Virus Research* 22:55-69 (1991)] (PIV)에 개시된 자연 발생 변이체로부터 선택된 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 PreF 항원 (PreF-G 항원 포함)이다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, RSV PreF 폴리펩티드는 서열 10에 대해 89% 이상의 서열 동일성을 갖고; hMPV PreF 폴리펩티드는 서열 12에 대해 94% 이상의 서열 동일성을 갖고; PIV PreF 폴리펩티드는 서열 14에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 추가의 변이체는 유전적 부동을 통하여 생성될 수 있거나, 또는 부위 지시된 또는 무작위 돌연변이 유발을 이용하거나 또는 기존의 2개 이상의 변이체를 재조합함으로써 인공적으로 생성될 수 있다. 이러한 추가의 변이체는 또한, 본원에 개시된 PreF (및 PreF-G) 항원과 관련하여 적합하다. 예를 들어, 변형은 생성되는 PreF 항원의 입체형태 또는 면역원성 에피토프를 변경시키지 않는 하나 이상 아미노산 (예를 들어, 2개 아미노산, 3개 아미노산, 4개 아미노산, 5개 아미노산, 약 10개 이하 아미노산 또는 그 초과)의 치환일 수 있다.

[0078] 다르게는 또는 부가적으로, 변형에는 하나 이상의 아미노산의 결실 및/또는 하나 이상의 아미노산의 부가가 포함될 수 있다. 실제로, 경우에 따라 하나 이상의 폴리펩티드 도메인은 어떠한 단일 균주에서 상응하지 않지만, 다중 균주로부터의 성분 하위서열, 또는 심지어 파라믹소바이러스 바이러스 폴리펩티드의 다중 균주를 정렬시킴으로서 추론된 컨센서스 서열로부터의 성분 하위서열을 포함하는 합성 폴리펩티드일 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 폴리펩티드 도메인은 태그를 구성하고 있고, 후속 프로세싱 또는 정제를 용이하게 하는 아미노산 서열을 부가함으로써 변형시킨다. 이러한 태그는 항원성 또는 에피토프 태그, 효소적 태그 또는 폴리히스티딘 태그일 수 있다. 전형적으로, 태그는 단백질의 한 말단 또는 다른 말단, 예컨대 항원 또는 융합 단백질의 C-말단 또는 N-말단에 위치시킨다.

[0079] PreF 항원을 코딩하는 핵산

[0080] 본 개시내용의 또 다른 측면은 상기 기재된 바와 같은 PreF 항원을 코딩하는 재조합 핵산에 관한 것이다. 보다 명확하게, 이러한 핵산은 (i) 이중 삼량체화 도메인을 포함하는 아미노산 서열의 부가; (ii) 하나 이상의 푸린 절단 부위의 결실; (iii) 하나 이상의 비-푸린 절단 부위의 결실; 및 (iv) F 단백질 세포외 도메인의 소수성 도메인에서 친수성 아미노산의 하나 이상의 치환 또는 부가로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는, 파라믹소바이러스 F 단백질 폴리펩티드의 F2 도메인 및 F1 도메인을 포함하는 F 단백질 폴리펩티드 항원을 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 임의로, 이러한 폴리뉴클레오티드는 글리코실화 부위에서 변형을 갖는 PreF 항원을 코딩한다. 추가로, RSV PreF 항원의 경우에, 변형은 또한 pep27 도메인의 하나 이상의 아미노산의 결실을 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드의 특성 및 구조적 세부사항은 상기 상세하게 개시되어 있다. 당업자는 서열 목록에 제공된 예시적 서열 및 이 개시문에 (예를 들어, 참고로 도입에 의해) 포함된 다른 것을 비롯하여, 본원의 교시내용에 기초한 기재된 폴리펩티드 서열 중 일부 및 모두를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 용이하게 결정할 수 있을 것이다.

[0081] 특정 실시양태에서, 이러한 재조합 핵산은 선택된 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서 발현시키기 위해 코돈 최적화시킨다. PreF 항원을 코딩하고, 포유동물 세포, 예를 들어 CHO 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된, 코돈 최적화된 핵산의 상세내용이 PCT/CA2008/002277 (본원에 참고로 도입됨)에 제공되어 있다. 복제 및 발현을 용이하게 하기 위해, 핵산이 벡터, 예컨대 원핵생물 또는 진핵생물 벡터 내로 도입될 수 있다. 재조합 파라믹소바이러스 PreF 항원-코딩 핵산을 포함하는 숙주 세포가 또한, 본 발명의 특징이다. 바람직한 숙주 세포에는 원핵생물 (즉, 박테리아) 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*) 뿐만 아니라 다수의 진핵생물 숙주 세포, 예를 들어 진균 (예를 들어, 효모) 세포, 곤충 세포, 및 포유동물 세포 (예를 들어, CHO, VERO 및 HEK293 세포)가 포함된다.

[0082] 복제 및 발현을 용이하게 하기 위해, 핵산이 벡터, 예컨대 원핵생물 또는 진핵생물 벡터 내로 도입될 수 있다. 본원에 개시된 핵산이 다양한 벡터들 (예를 들어, 박테리아성 플라스미드; 파지 DNA; 배콜로바이러스; 효모 플라스미드; 백시니아, 아데노바이러스, 계두 바이러스, 거저광견병, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스 및 다른 다수와 같은 바이러스 DNA, 파지 DNA와 플라스미드의 조합으로부터 유래된 벡터가 포함됨) 중 임의의 벡터 내에 포함될 수 있지만, 가장 통상적으로, 벡터는 폴리펩티드 발현 생성물을 생성시키

는데 적절한 발현 벡터일 것이다. 발현 벡터에서, PreF 항원을 코딩하는 핵산을 전형적으로, mRNA 합성을 지시하기에 적절한 전사 제어 서열 (프로모터 및 임의로, 하나 이상의 인핸서)에 근접하고 이러한 서열을 향한 배향으로 배열한다. 즉, 관심 폴리뉴클레오티드 서열이 적합한 전사 제어 서열에 작동가능하게 연결된다. 이러한 프로모터의 예에는 CMV의 즉발형 프로모터, LTR 또는 SV40 프로모터, 배콜로바이러스의 폴리헤드린 프로모터, 이. 콜라이 lac 또는 trp 프로모터, 파지 T7 및 람다 P_L 프로모터, 및 원핵 또는 진핵 세포 또는 그의 바이러스에서의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 공지된 다른 프로모터가 포함된다. 발현 벡터는 번역 개시를 위한 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결자를 또한 전형적으로 함유한다. 벡터는 발현을 증폭시키기 위한 적합한 서열을 임의적으로 포함한다. 또한, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 위한 표현형 소질, 예컨대 진핵생물 세포 배양에 대한 디히드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 저항성, 또는 예컨대 이. 콜라이에서의 카나마이신, 테트라시클린 또는 엠포실린 저항성을 제공하는 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자를 임의적으로 포함한다.

[0083] 발현 벡터는, 예를 들어, 번역 효율을 개선하기 위해, 추가의 발현 요소를 또한 포함할 수 있다. 이러한 신호에는, 예를 들어, ATG 개시 코돈 및 인접 서열이 포함될 수 있다. 일부 경우에, 예를 들어, 번역 개시 코돈 및 관련 서열 요소가 관심 폴리뉴클레오티드 서열과 동시에 적합한 발현 벡터 내로 삽입된다 (예를 들어, 천연 출발 코돈). 이러한 경우에, 추가의 번역 제어 신호가 요구되지 않는다. 그러나, 단지 폴리펩티드-코딩 서열 또는 그의 일부만이 삽입된 경우에는, PreF 항원을 코딩하는 핵산의 번역을 위해, ATG 개시 코돈을 포함한 외인성 번역 제어 신호를 제공한다. 개시 코돈은 관심 폴리뉴클레오티드 서열의 번역을 확실하게 하도록 정확한 판독 프레임 내에 놓인다. 외인성 전사 요소 및 개시 코돈은 천연 및 합성 둘 모두의 다양한 기원으로부터의 것일 수 있다. 경우에 따라, 사용 중인 세포 세상에 적절한 인핸서를 포함함으로써 발현 효율이 추가로 증가될 수 있다 (문헌 [Scharf et al. Results Probl Cell Differ 20:125-62 (1994)]; [Bitter et al. Methods in Enzymol 153:516-544 (1987)]).

[0084] 일부 경우에, PreF 항원을 코딩하는 핵산 (예컨대, 벡터)은 숙주 세포 내로 도입되는 경우에 PreF 코딩 핵산의 발현을 증가시키고/시키거나 최적화시키기 위해 선택된 하나 이상의 부가 서열 요소를 포함한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서 PreF 항원을 코딩하는 핵산은 인트론 서열, 예를 들어 인간 헤르페스바이러스 (Herpesvirus) 5 인트론 서열을 포함한다. 인트론은 재조합 구조물에 적당하게 위치시킨 경우에 동종 및 이종 핵산의 발현을 증강시키는 것으로 반복해서 입증되었다. 또 다른 부류의 발현 증강성 서열에는 후성적 요소, 예를 들어 매트릭스 부착 영역 (또는 MAR), 또는 유사한 후성적 요소, 예를 들어 STAR 요소 (예를 들어, 문헌 [Otte et al., Biotechnol. Prog. 23:801-807, 2007]에 개시된 STAR 요소)가 포함된다. 이론에 제한되지 않으면서, MAR은 표적 DNA 서열이 핵 기질에 고정되는 것을 매개하여, 이질염색질(heterochromatin) 코어로부터 바깥쪽으로 확장되는 염색질 루프 도메인을 생성시키는 것으로 여겨진다. MAR은 어떠한 명백한 컨센서스 서열 또는 인식가능한 서열도 함유하지 않지만, 그의 가장 일관된 특색은 전체적으로 높은 A/T 함량, 및 한쪽 가닥에서 우세한 C 염기인 것으로 보인다. 이러한 영역은 가닥이 분리되기 쉬울 수 있는 구부러진 2차 구조를 형성하는 것으로 보이고, 가닥 분리를 위한 핵형성 지점으로 작용할 수 있는 코어-풀기(unwinding) 요소 (CUE)를 포함할 수 있다. 몇 개의 간단한 AT-풍부 서열 모티프가 MAR 서열과 연관이 있어 왔는데, 예를 들어 A-박스, T-박스, DNA 폴립 모티프, SATB1 결합 부위 (H-박스, A/T/C25) 및 척추동물 또는 드로소필라 (Drosophila)에 대한 컨센서스 토포이소머라제 II 부위이다. 예시적인 MAR 서열들이 공개된 미국 특허 출원 제20070178469호, 및 국제 특허 출원 제W002/074969호 (본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있다. PreF 항원을 코딩하는 핵산의 발현을 증강시키는 데 사용될 수 있는 추가의 MAR 서열에는 문헌 [Girod et al., Nature Methods, 4:747-753, 2007]에 기재된 닭 리소자임 MAR, MARp1-42, MARp1-6, MARp1-68, 및 MARpx-29 (각각 진뱅크 승인 번호 EA423306, DI107030, DI106196, DI107561, 및 DI106512에 개시됨)가 포함된다. 당업자는 MAR 1-9에 대해 보고된 바와 같이, 중간 수준의 증강을 일으키는 MAR을 선택함으로써 발현이 추가로 조정될 수 있음을 이해할 것이다. 경우에 따라, PreF 항원의 발현을 증가시키기 위한 대안적 MAR 서열은, 예를 들어 MAR-파인더 (Finder) (futuresoft.org/MarFinder 웹 상에서 입수가 가능함), SMARTest (genomatix.de 웹 상에서 입수가 가능함), 또는 SMARScan I (문헌 [Levitsky et al., Bioinformatics 15:582-592, 1999])와 같은 소프트웨어를 이용하여 서열 데이터베이스를 조사함으로써 확인할 수 있다. 특정 실시양태에서, MAR을 PreF 항원-코딩 서열로서 동일한 핵산 (예를 들어, 벡터) 상의 숙주 세포 내로 도입한다 (예를 들어, 형질감염시킴). 대안적 실시양태에서, MAR을 별개의 핵산 상으로 도입하고 (예를 들어, 트랜스로), 이는 임의로, PreF 항원-코딩 폴리뉴클레오티드 서열과 공동-통합시킬 수 있다.

[0085] 재조합 PreF 항원 핵산의 생성 전반에 걸쳐 당업자를 안내하는데 충분한 예시적인 절차들을 문헌 [Sambrook et

al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989]; [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001]; [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1992] (및 2003년까지의 증보); 및 [Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4th ed., Wiley & Sons, 1999]에서 찾아볼 수 있다.

[0086] PreF 항원 폴리펩티드를 코딩하는 예시적 핵산은 서열 9로 나타내고, PCT/CA2008/002277에서 나타낸다. 글리코실화 부위에, 예를 들어 서열 2의 위치 500에 상응하는 아미노산에서 변형을 포함하는 변이체는 (예를 들어 서열 1의 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여) 위치 1408-1414의 부근에 있는 뉴클레오티드를 변경 (예를 들어, 돌연변이화)시킴으로서 생성될 수 있다. 글리코실화 변이체 (예를 들어, 글리코실화 효율 증가)를 코딩하는 뉴클레오티드의 적합한 서열은 aacgggt, aacaagt, aacggga 및 aacaaga를 포함한다. 글리코실화 부위를 제거하는 대안적 서열, 예컨대 cagcagt가 또한 가능하다. 추가의 변이체는, 예를 들어 W02008114149에 개시된 바와 같이, 기존에 밝혀진 (또는 후속 밝혀진) 임의의 파라믹소바이러스로부터 선택된, 또는 문헌 [Boivin et al. Emerg. Infect. Dis.10:1154-1157 (2004)] (hMPV) 및 [Prinoski et al. Virus Research 22:55-69 (1991)] (PIV)에 개시된 변이체를 코딩하는 유사한 F 및 G 단백질 폴리펩티드 서열을 어셈블링함으로써 생성시킬 수 있다. hMPV 및 PIV PreF 단백질을 코딩하는 예시적 폴리뉴클레오티드 서열이 각각 서열 11 및 13에 제공된다. 예시적인 변이체들과 서열 동일성을 공유하는 추가의 서열 변이체들이 당업자에 의해 생성될 수 있다. 전형적으로, 핵산 변이체는 아미노산 잔기의 1%, 또는 2%, 또는 5%, 또는 10%, 또는 15%, 또는 20% 이하가 상이한 폴리펩티드를 코딩할 것이다. 즉, 코딩된 폴리펩티드는 서열 9, 11 및 13 중 하나에 대해 80%, 또는 85% 이상, 보다 통상적으로는 약 90% 이상 또는 그 초과, 예컨대 95%, 또는 심지어 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 공유한다. 당업자는 PreF 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 유전자 코드의 중복성으로 인해 덜한 서열 동일성을 공유할 수 있다는 것을 즉시 이해할 것이다. 일부 경우에, PreF 항원은 이것이 유래되는 자연 발생 균주의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변형 (예를 들어, 상기 언급된 안정화 변형 이외의 변형)을 갖고 있다. 이러한 차이는 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 각각의 부가, 결실 또는 치환일 수 있다. 변이체는 전형적으로, 뉴클레오티드 잔기의 약 1%, 또는 2%, 또는 5%, 또는 10%, 또는 15%, 또는 20% 이하가 상이하다. 예를 들어, 변이체 PreF 항원 (PreF-G 포함) 핵산은 서열 9의 예시적 PreF 항원 핵산 또는 서열 11 및 13의 예시적 hMPV 또는 PIV PreF 서열의 유사한 핵산과 비교하여 1개, 또는 2개, 또는 5개 이하, 또는 약 10개 이하, 또는 약 15개 이하, 또는 약 50개 이하, 또는 약 100개 이하의 뉴클레오티드 차이를 포함할 수 있다. 따라서, RSV F 또는 G 단백질, 또는 PreF 항원 (PreF-G 항원 포함) 핵산과 관련하여 변이체는 전형적으로 서열 9, 11 또는 13에 예시된 PreF 단백질 폴리펩티드에 대해 80% 또는 85% 이상, 보다 통상적으로 약 90% 이상 또는 그 초과, 예컨대 95%, 또는 심지어 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 공유한다. 추가의 변이체는 유전적 부동을 통하여 생성될 수 있거나, 또는 부위 지시된 또는 무작위 돌연변이 유발을 이용하거나 또는 기존의 2개 이상의 변이체를 재조합함으로써 인공적으로 생성될 수 있다. 이러한 추가의 변이체는 또한, 본원에 개시된 PreF (및 PreF-G) 항원과 관련하여 적합하다.

[0087] 이전에 기재된 변이체 핵산 이외에도, 서열 9, 11 또는 13 (및/또는 서열 1, 3 및 5)로 나타낸 예시적 핵산 중 하나 이상과 혼성화되는 핵산을 또한 PreF 항원을 코딩하는 핵산과 관련하여 사용할 수 있다. 당업자는 상기 논의된 서열 동일성(%) 측정치 이외에도, 두 핵산 간의 서열 유사성의 또 다른 지표가 혼성화할 수 있는 능력이라는 것을 인지할 것이다. 2개의 핵산의 서열이 유사할수록, 이들이 혼성화할 조건이 더 엄격하다. 혼성화 조건의 엄격도는 서열-의존적이고, 상이한 환경 파라미터하에 상이하다. 따라서, 특정 정도의 엄격도를 초래할 혼성화 조건은 선택된 혼성화 방법의 성질 및 혼성화될 핵산 서열의 조성 및 길이에 따라 변할 것이다. 일반적으로, 혼성화 온도 및 혼성화 완충제의 이온 강도 (특히, Na⁺ 및/또는 Mg⁺⁺ 농도)가 혼성화의 엄격도를 결정할 것이지만, 세척 시간 또한 엄격도에 영향을 미친다. 일반적으로, 엄격한 조건은 규정된 이온 강도 및 pH에서 특정 서열에 대한 열 용점 (T_m)보다 약 5°C 내지 20°C 더 낮도록 선택된다. T_m은 (규정된 이온 농도 및 pH 하에) 표적 서열의 50%가 완벽하게 매칭되는 프로브에 혼성화하는 온도이다. 핵산 혼성화 조건 및 엄격도의 계산을, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001]; [Tijssen, Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993] 및 [Ausubel et al. Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999]에서 찾아볼 수 있다.

[0088] 본 개시내용의 목적을 위해, "엄격한 조건"은 혼성화 분자와 표적 서열 간에 25% 미만의 미스매치가 있는 경우

에만 혼성화가 발생할 조건을 포함한다. "엄격한 조건"은 보다 정확한 정의를 위해 특정 수준의 엄격도로 분류될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 "적당한 엄격도" 조건은 25%를 초과하는 서열 미스매치가 있는 분자들이 혼성화하지 않을 조건이고, "중등도의 엄격도" 조건은 15%를 초과하는 미스매치가 있는 분자들이 혼성화하지 않을 조건이며, "고도의 엄격도" 조건은 10%를 초과하는 미스매치가 있는 서열들이 혼성화하지 않을 조건이다. "매우 고도의 엄격도" 조건은 6%를 초과하는 미스매치가 있는 서열들이 혼성화하지 않을 조건이다. 이와는 달리, "낮은 엄격도" 조건하에 혼성화되는 핵산에는 훨씬 덜한 서열 동일성을 나타내는 핵산, 또는 핵산의 짧은 하위서열에 걸쳐서만 서열 동일성을 나타내는 핵산이 포함된다. 따라서, 본 개시내용에 포괄되는 핵산의 각종 변이체가 적어도 F 단백질의 F2 도메인 및 F1 도메인을 코딩하는 부분 상에서 서열 1, 3 및 5 중 하나 이상에 혼성화할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들어, 이러한 핵산은 서열 9, 11 및/또는 13 중 하나 이상의 실질적으로 전체 길이 상에서 혼성화할 수 있다.

[0089] 특정 예에서, 원핵생물 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포에서의 도입 및 발현에 적합한 벡터를 통하여 핵산을 세포 내로 도입한다. 예를 들어, PreF 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 각종 시판용 또는 독점적 벡터, 예를 들어 pET 시리즈의 발현 벡터 (예를 들어, pET9b 및 pET2d) 내로 도입할 수 있다. IPTG에 의해 코딩 서열의 발현이 유도될 수 있어, 높은 수준의 단백질 발현이 초래된다. PreF 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 파지 T7 프로모터하에 전사시킨다. 대안적 벡터, 예컨대 열-유도성 람다 pL 프로모터를 포함하는 pURV22가 또한 적합하다.

[0090] 이어서, 적합한 박테리아 숙주 내로 (예를 들어, 전기천공에 의해) 발현 벡터가 도입된다. 이. 콜라이의 다수의 적합한 균주가 입수가능하고, 이는 당업자에 의해 선택될 수 있다 [예를 들어, 로제타 (Rosetta) 및 BL21 (DE3) 균주가 PreF 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 재조합 벡터의 발현에 바람직한 것으로 입증되었다].

[0091] 보다 전형적으로는, PreF 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 진핵성 세포 (예를 들어, 곤충 또는 포유동물 세포)로의 도입 및 이러한 세포에서의 발현에 적합한 발현 벡터 내로 혼입시킨다. 바람직하게는, 이러한 핵산은 선택된 벡터/숙주 세포에서 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 한 예시적 실시양태에서는, PreF 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 pEE14 벡터 (론자 바이올로지칼스(Lonza Biologicals) 사에 의해 개발됨)와 같은 벡터 내로 도입한다. 폴리펩티드는 구성적 프로모터, 예를 들어 즉발형 CMV (시토메갈로바이러스) 프로모터하에 발현시킨다. 이러한 폴리펩티드를 발현하는 안정적으로 형질감염된 세포의 선택은 글루타민 공급원의 부재하에서 성장할 수 있는 형질감염된 세포의 능력에 기초하여 이루어진다. pEE14 벡터가 GS (글루타민 신테타제) 효소를 발현하기 때문에, pEE14가 성공적으로 통합된 세포는 외인성 글루타민의 부재하에 성장할 수 있다. 선택된 세포를 클론적으로 확장시키고, 목적하는 PreF 폴리펩티드의 발현에 관하여 특성화할 수 있다.

[0092] 또 다른 예에서, PreF 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 배큘로바이러스 발현 시스템 (BEVS)을 이용하여 곤충 세포 내로 도입한다. 시판되는 벡터, 키트 및/또는 시스템, 예컨대 BD 바이오사이언스(BD Bioscience)로부터의 BD 배큘로골드(BD BaculoGold) 시스템을 사용하여, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 배큘로바이러스를 생성시킬 수 있다. 간략하게, 상기 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 pAcSG2 전이 벡터 내로 삽입한다. 이어서, 숙주 세포 SF9 [스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*)]를, 배큘로바이러스 아우토그라파 칼리포르니카 핵 다각체병 바이러스 [*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV)]의 선형화 게놈 DNA를 함유하는 BD 배큘로골드 및 pAcSG2-키메라 플라스미드에 의해 공동-형질감염시킨다. 형질감염 후, pAcSG2 플라스미드와 배큘로바이러스 게놈 사이에 상동 재조합이 발생하여 재조합 바이러스가 생성된다. 한 예에서, PreF 항원을 폴리헤드린 프로모터 (pH)의 조절성 제어하에 발현시킨다. 염기성 (Ba) 및 p10 프로모터와 같은 다른 프로모터를 사용하여 유사한 전달 벡터를 생성할 수 있다. 유사하게는, 대안적 곤충 세포를 이용할 수 있는데, 예컨대 Sf9와 밀접한 관계가 있는 SF21, 및 캐비지 루퍼 (cabbage looper), 트리코플루시아 니 (*Trichoplusia ni*)로부터 유래된 하이 파이프 (High Five) 세포주가 있다.

[0093] (선택된 프로모터 및/또는 증강인자 또는 기타 조절성 요소에 따라서) 형질감염 및 발현 유도시킨 후, 이와 같이 발현된 폴리펩티드를 회수하고 (예를 들어, 정제 또는 증강시킴), 재생시켜 항원성 활성 융합전 입체형태로 폴딩되도록 한다.

[0094] RSV 항원 폴리펩티드의 생성 방법

[0095] 본원에 개시된 PreF 항원 (PreF-G 항원, 및 또한 적용 가능한 경우, G 항원 포함)은 재조합 단백질의 발현 및 정제를 위해 널리 확립된 절차를 이용하여 생성시킨다. 당업자를 안내하기에 충분한 절차는 다음 문헌에서 찾아볼 수 있다 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, NY, 200]; 및 [Ausubel et al. Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 999]. 추가적이고 구체적인 상세사항들이 하기에서 제공된다.

- [0096] PreF 항원을 코딩하는 재조합 핵산 (상기 기재된 바와 같음)은 벡터 및 숙주 세포의 선택에 따라서 널리 공지된 각종 절차, 예컨대 전기전공, 리포솜 매개된 형질감염 (예를 들어, 시판용 리포솜 형질감염 시약, 예컨대 LIPOFECTAMINE™2000 또는 TRANSFECTIN™을 이용한다), 인산칼슘 침전, 감염, 형질감염 등에 의해 숙주 세포 내로 도입한다.
- [0097] 따라서, 재조합 PreF 항원-코딩 핵산을 포함하는 숙주 세포가 또한, 본 발명의 특징이다. 유리한 숙주 세포에는 원핵생물 (즉, 박테리아) 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이, 뿐만 아니라 진균 (예를 들어, 효모, 예컨대 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피치아 파스토리스(*Picchia pastoris*)) 세포, 곤충 세포, 식물 세포 및 포유동물 세포 (예컨대 CHO 및 HEK293 세포)가 포함되는 다수의 진핵생물 숙주 세포가 포함된다. 재조합 PreF 항원 핵산은, 예를 들어 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)를 통하여 숙주 세포 내로 도입한다 (예를 들어, 형질도입, 형질전환 또는 형질감염시킴). 상기 기재된 바와 같이, 벡터는 가장 전형적으로는 플라스미드이지만, 이러한 벡터는 예를 들어 바이러스 입자, 파지 등일 수도 있다. 적절한 발현 숙주의 예로는 박테리아 세포, 예컨대 이. 콜라이, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 및 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*); 진균 세포, 예컨대 사카로마이세스 세레비지아에, 피치아 파스토리스, 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 곤충 세포, 예컨대 드로소필라 및 스포도프테라 프루기페르다; 포유동물 세포, 예컨대 3T3, COS, CHO, BHK, HEK293 또는 보웬스(Bowes) 흑색종; 조류 세포가 포함되는 식물 세포 등이 포함된다.
- [0098] 프로모터 활성화, 형질전환체 선택 또는 삽입된 폴리뉴클레오티드 서열의 증폭을 위해 적합하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 숙주 세포를 배양할 수 있다. 전형적으로 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현용으로 선택된 숙주 세포와 함께 기존에 사용된 조건이고, 당업자에게, 및 문헌 [Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York] 및 이에 인용된 참조문헌이 예를 들어 포함되는 본원에 인용된 참조문헌에서 명백할 것이다. 본 발명의 핵산에 상응하는 발현 생성물이 비-동물 세포 예컨대 식물, 효모, 진균, 박테리아 등에서 또한 생성될 수 있다. 삼브룩 (Sambrook), 베르거 (Berger) 및 오수벨 (Ausubel) 이외에도, 세포 배양에 관한 상세 내역을 다음 문헌에서 찾아볼 수 있다 [Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY]; [Gamborg and Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York)] 및 [Atlas and Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL].
- [0099] 박테리아 시스템에서, 발현 생성물에 대해 의도되는 용도에 따라 다수의 발현 벡터가 선택될 수 있다. 예를 들어, 다량의 폴리펩티드 또는 그의 단편이 항체의 생성에 필요한 경우, 쉽게 정제되는 용합 단백질의 높은 수준의 발현을 지시하는 벡터가 유리하게 사용된다. 이러한 벡터에는 다기능성 이. 콜라이 클로닝 및 발현 벡터, 예컨대 관심 코딩 서열, 예를 들어, 상기 기재된 바와 같은 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 베타-갈락토시다제의 아미노-말단 번역 개시 메티오닌 및 이어지는 7개의 잔기에 대한 서열과 인-프레임으로 벡터 내로 라이게이션되어, 촉매적으로 활성인 베타 갈락토시다제 용합 단백질이 생성될 수 있는 BLUESCRIPT (스트라타진: Stratagene); pIN 벡터 (문헌 [Van Heeke & Schuster (1989) J Biol Chem 264:5503-5509]); 아미노-말단 메티오닌이 히스티딘 태그와 인-프레임으로 라이게이션된 pET 벡터 (노바젠: Novagen, 매디슨(Madison) WI) 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0100] 유사하게, 효모, 예컨대 사카로마이세스 세레비지아에에서, 알파 인자, 알콜 산화효소 및 PGH와 같은 구성적 또는 유도성 프로모터를 함유하는 다수의 벡터가 원하는 발현 생성물의 생성에 사용될 수 있다. 검토를 위해, [Berger, 상기 문헌], [Ausubel, 상기 문헌], 및, 예를 들어 문헌 [Grant et al. (1987; Methods in Enzymology 153:516-544)]을 참조한다. 포유동물 숙주 세포에서, 플라스미드-기반 시스템과 바이러스-기반 시스템 둘 모두를 포함한 다수의 발현 시스템을 활용할 수 있다.
- [0101] 삽입된 서열의 발현을 조정하거나 발현된 단백질을 원하는 방식으로 프로세싱하는 능력에 대해 숙주 세포가 임의적으로 선택된다. 단백질의 이러한 변형에는 글리코실화 (뿐만 아니라, 예를 들어, 아세틸화, 카르복실화, 인산화, 지질화 및 아실화)가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 번역후 프로세싱, 예를 들어, 전구체 형태를 성숙된 형태의 단백질로 (예를 들어, 푸린 프로테아제에 의해) 절단하는 프로세싱이 숙주 세포와 관련하여 임의적으로 수행된다. 3T3, COS, CHO, HeLa, BHK, MDCK, 293, WI38 등과 같은 여러 숙주 세포들이 이러한 번역후 활성화에 대한 특이적인 세포 기구 및 특징적인 메커니즘을 지니고, 도입된 외래 단백질의 정확한 변형 및

프로세싱을 확실히 하도록 선택될 수 있다.

- [0102] 본원에 기재된 재조합 PreF 항원을 장기간 고 수율로 생성하기 위해, 안정한 발현 시스템을 전형적으로 사용한다. 예를 들어, PreF 항원 폴리펩티드를 안정적으로 발현하는 세포주를, 바이러스 복제 기점 또는 내인성 발현 요소 및 선택가능한 마커 유전자를 함유하는 발현 벡터를 이용하여 숙주 세포 내로 도입한다. 벡터의 도입 후, 세포를 강화 배지에서 1-2일 동안 성장시킨 후, 선택 배지로 전환시킨다. 선택가능한 마커의 목적은 선택에 대한 저항성을 부여하는 것이고, 그의 존재는 도입된 서열을 성공적으로 발현하는 세포의 성장 및 회수를 허용한다. 예를 들어, 안정적으로 형질전환된 세포의 저항성 균 또는 콜로니가 세포 유형에 적합한 조직 배양 기술을 사용하여 증식될 수 있다. PreF 항원을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 숙주 세포는 임의로, 세포 배양물로부터 발현된 단백질을 발현 및 회수하는 데 적합한 조건하에 배양한다.
- [0103] 적절한 숙주 세포주의 형질도입 및 적합한 세포 밀도로의 숙주 세포의 성장 후, 선택된 프로모터를 적합한 수단 (예를 들어, 온도 이동 또는 화학적 유도)로 유도하고, 세포를 추가의 기간 동안 배양한다. 임의로, 배지가 프로테이나제에 의한 발현된 단백질의 분해를 감소시켜 주는 성분 및/또는 첨가제를 포함한다. 예를 들어, PreF 항원을 생성하기 위해 세포를 배양하는 데 사용된 배지는 세포내 또는 세포외 (예를 들어, 매트릭스) 프로테이나제에 의한 바람직하지 못한 절단을 감소 또는 없애주는 프로테아제 억제제, 예를 들어 킬레이트제 또는 소분자 억제제 (예를 들어, AZ11557272, AS111793 등)를 포함할 수 있다. 임의로, 세포는 혈청 비함유 (및/또는 동물 생성물-비함유) 배지에서 배양된다. 세포는 예를 들어 진탕기 플라스크 또는 생물반응기에서, 목적을 위해 편리한 규모로 성장시킬 수 있다.
- [0104] 그 후, 분비된 폴리펩티드 생성물을 배양 배지로부터 회수한다. 다르게는, 세포를 원심분리에 의해 수확하고, 물리적 또는 화학적 수단에 의해 파괴하고, 생성된 미정제 추출물을 추가의 정제를 위해 유지시킬 수 있다. 단백질의 발현에 사용된 진핵생물 또는 미생물 세포를 동결-해동 사이클링, 초음파처리, 기계적 파괴, 또는 세포 용해제의 사용이 포함되는 임의의 편리한 방법, 또는 당업자에게 주지되어 있는 다른 방법에 의해 파괴시킬 수 있다.
- [0105] 발현된 PreF 항원은 당업계에 널리 공지된 다수의 방법, 예를 들어 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 여과, 환외여과, 원심분리, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 (예를 들어, 본원에 언급된 태그화 시스템을 이용함), 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 및 렉틴 크로마토그래피에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제할 수 있다. 성숙된 단백질의 입체형상을 완성시키는 것에서, 경우에 따라, 단백질 리폴딩(refolding) 단계를 사용할 수 있다. 최종적으로, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 최종 정제 단계에 사용할 수 있다. 상기 언급된 참고 문헌 이외에도, 각종 정제 방법이 당업계에 널리 공지되어 있는데, 이에에는 예를 들어 문헌 [Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.]; 및 [Bollag et al. (1996) Protein Methods, 2nd Edition Wiley-Liss, NY]; [Walker (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris and Angal (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, U.K.]; [Scopes (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3rd Edition Springer Verlag, NY]; [Janson and Ryden (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, NY]; 및 [Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ]에 제시된 방법이 포함된다.
- [0106] 한 예시적 실시양태에서, PreF 단백질은 하기 정제 반응식에 따라 세포로부터 회수된다. PreF 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 핵산을 숙주 CHO 세포로 도입한 후에, 일시적으로 형질감염된 숙주 세포 또는 도입된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 확장된 안정한 집단은 원하는 목적을 위해 허용되는 규모의 성장에 적합한 배지에서 이러한 조건하에 성장한다 (예를 들어, 일반적으로 문헌 [Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York] 및 여기에 인용된 참조문헌에 기재된 바와 같음). 전형적으로, 세포는 37°C에서 혈청-비함유 배지에서 성장하고, 진탕 플라스크 또는 생물반응기에서 2-3일 간격으로 계대배양된다. 이들 조건에서 확장된 세포로부터 확립된 새로운 배양물은 전형적으로 생물반응기에서 혈청-비함유 배지 중에서 수행하고, PreF 항원을 생성하기 위해 5 내지 7일 동안 20%에서 유지된 pO₂로 27°C에서 인큐베이션한다.
- [0107] 재조합 PreF 항원을 회수하기 위해, 세포 배양물을 원심분리하고, 세포 배양물 상청액을 추가의 사용시까지 -70°C에서 보관한다. 배양물 상청액을 해동한 후에, 상청액을 밀리큐(MilliQ) 물로 2배 희석하고, HCl로 pH 6.0으로 조정한다. 희석된 상청액을 20 mM 인산염 pH 6.0에서 평형화된, BPG 140/500 칼럼에 패키징된 3L CM 세라믹

HyperD FF 수지에 75 cm/h에서 로딩한다. 샘플의 로딩 후에, 평형 완충제를 칼럼을 통해 처리하여 다시 UV 기준선에 되도록 한다. 25 mM 인산염 pH 7.0 완충제의 5 칼럼 부피 (CV)로 세척한 후에, 0.1 M NaCl을 함유하는 50 mM 인산염 pH 7.0 완충제를 사용하여 용리를 수행하였다.

- [0108] CM HyperD 용리액은 20 mM PO₄ (Na) 완충제 pH 7.0으로 50 mL/분에서 평형화된, 270 ml 히드록시아파타이트 유형 II 칼럼 (XK 50에 패키징됨)으로 처리될 20 mM 인산염, pH 7.0으로 3.3배 희석한다. 칼럼을 평형 완충제 (약 3 CV)로 세척한 후에, 0.5 M NaCl을 함유하는 20 mM PO₄ (Na) pH 7.0 완충제를 사용하여 용리를 수행하였다.
- [0109] HA 용리액은 20 mM 인산염 pH 7.0에서 평형화된, 150 mL Capto 부착 칼럼 (XK 26에 패키징됨)으로 (수지와 10 분 접촉 시간을 반영하기 위해) 15 mL/분에서 처리한다. 0.1 M 아르기닌 완충제를 함유하는 10 mM 인산염 pH 7.0의 5 CV로 세척한 후에, 0.6 M 아르기닌을 함유하는 10 mM 인산염 pH 7.0 완충제를 사용하여 용리를 수행한다.
- [0110] 이어서, Capto 부착 용리액은 정제용 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 칼럼으로의 처리를 위해 대략 10x 농축시킨다. 50 kD 펠리콘(Pellicon) 폴리에테르술폰 멤브레인을 사용하여 농축을 수행한다. SEC 칼럼으로 처리되기 전에, 물질을 바이러스 제거 단계로 사용되는, PLANOVA 20N 100 cm² 필터를 통해 여과한다. 이 나노여과 단계는 펠리콘 멤브레인 상에서의 농축 후에 또는 전에 위치할 수 있다.
- [0111] 이어서, 500 mL 슈퍼덱스(Superdex) S200 칼럼 및 10 mM 인산염 (Na/K₂), 160 mM NaCl, pH 6.5 완충제 (최종 완충제에 상응함)를 이동상으로 사용하여 정제용 SEC를 수행한다. 5%의 SEC 칼럼 부피에 상응하는 농축된 PreF의 부피를 약 2.6 mL/분에서 수지 상에 로딩한다. 전형적으로, 10 mL의 분획을 수집한다. 분획의 분석용 풀은 HCP (숙주 세포 단백질) 수준을 최소화하면서 수율을 최적화시키기 위해 경우에 따라 은 염색 및 웨스턴 블롯 항 HCP에 의해 SDS 겔 상에서 분석할 수 있다.
- [0112] 0.22 μm 밀렉스(Millex) 필터 (다르게는, 스테리벡스(Sterivex) 필터를 사용할 수 있음) 상에서의 여과 후에 정제된 벌크를 수득한다. 경우에 따라, 정제된 PreF 항원 제제는 사용 전에 -70°C에 보관할 수 있다.
- [0113] 다르게는, PreF 단백질은 정제를 용이하게 하기 위해 사용될 수 있는 폴리히스티딘 (예를 들어, 6개 히스티딘) 태그를 포함할 수 있다. 이러한 히스티딘 태그 부착된 PreF 폴리펩티드의 경우, 하기 정제 프로토콜을 사용할 수 있다. 고정된 금속 이온 친화도 크로마토그래피 (IMAC)를 사용하는 정제 전에, 세포 배양물 상청액을 완충제 A (20 mM 비신(Bicine), pH 8.5)에서 2배 희석하고, pH를 8.5로 조정한다. 생성된 용액을 완충제 A로 이전에 평형화된, 예를 들어 23 ml의 칼럼 부피의 Q 세파로스 FF 칼럼 (GE 헬스케어(GE Healthcare)) 상에 로딩한다. PreF 단백질이 일부 숙주 세포 오염물질과 함께 칼럼 상에 포획된다. IMAC 정제 단계를 방해할 배양 배지 오염물질이 남아있지 않고, 이를 통한 흐름에서 제거된다. 단백질을 분리하고, 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM 및 1 M NaCl의 단계적 용리에 의해 용리한다. 관심있는 PreF 단백질은 200 mM NaCl에서 제1 단계 동안 용리한다. 임의로, 희수는 태그 부착된 PreF 단백질을 검출하기 위해 항 His-태그 항체를 사용하는 SDS PAGE 및 웨스턴 블롯팅을 이용하여 모니터링할 수 있다. 분획은 정제를 계속하기 전에 모을 수 있다.
- [0114] 용리액을 함유하는 (모은) PreF 단백질을 완충제 B (20 mM 비신, 500 mM NaCl, pH 8.3)에서 3배 희석하고, pH를 8.3으로 조정한다. 생성된 용액을 완충제 B로 이전에 평형화시킨 니켈 클로라이드(Nickel chloride) (GE 헬스케어) (예를 들어, 5 ml의 칼럼 부피)로 로딩된 IMAC 세파로스 FF 수지 상에 로딩한다. PreF를 수지에 결합시키고, 대부분의 숙주 세포 오염물질을 이를 통하는 흐름에서 용리한다. 약하게 결합된 오염물질을 제거하기 위해 칼럼을 20 mM 이미다졸로 세척한다. PreF 단백질을 250 mM 이미다졸의 단계 용리에 의해 용리한다. SDS PAGE를 쿠마시 블루(coomassie blue)로 염색하고, 양성 분획을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 항 His-태그를 수행할 수 있다.
- [0115] 이어서, IMAC로부터의 풀은 센트리콘 농축 장치 (밀리포어: Millipore)를 사용하여 150 μg/ml 이상의 농도로 농축시키고, 단백질은 500 mM L-아르기닌이 보충된 PBS 완충제에서 투석될 수 있다. 생성된 단백질은 RCDC 단백질 검정 (바이오라드(BioRad))을 이용하여 정량하고, 사용할 때까지 -70 또는 -80°C에서 보관한다.
- [0116] 면역원성 조성물 및 방법
- [0117] 본원에 개시된 PreF 항원은 면역원성 조성물, 특히 유아에서 호흡기 질환, 예컨대 중증의 하부 호흡기 질환의 중요한 원인인 2개 이상의 상이한 파라믹소바이러스로부터의 항원의 조합을 포함하는 것의 제제화에 유용하다. 전형적으로, 이러한 면역원성 조성물은 2개 이상의 파라믹소바이러스 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를

포함한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 hMPV 항원 및 PIV 항원, 예컨대 PIV-3 항원 또는 PIV-1 항원을 포함한다. 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 RSV 항원 및 hMPV 항원 또는 PIV 항원 (예를 들어, PIV-3 항원 또는 PIV-1 항원)을 포함한다. 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 3개의 항원을 포함한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 hMPV 항원, PIV 항원 및 RSV 항원 (예를 들어, hMPV 항원, PIV-3 항원 및 RSV 항원)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 hMPV 항원 및 2개의 상이한 PIV 항원 (예컨대, PIV-3 항원 및 PIV-1 항원)을 포함한다. 이러한 조성물은 임의로 또한 RSV 항원을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본원에 개시된 바와 같이 항원은 파라믹소바이러스 PreF 항원이다.

[0118] 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 hMPV, PIV (예를 들어, PIV-3) 및 RSV 중 2개 이상으로의 감염을 감소시키거나 예방하는 백신이다. 일부 실시양태에서, 면역원성 조성물은 hMPV, PIV (예를 들어, PIV-3) 및 RSV 중 2개 이상으로의 감염에 따른 병적 반응을 감소시키거나 예방하는 백신이다. 임의로, 상이한 파라믹소바이러스로부터 선택된 (예를 들어, hMPV, PIV 및 RSV로부터 선택된) 2개 이상의 PreF 항원을 함유하는 면역원성 조성물은 상이한 병원성 바이러스의 하나 이상의 추가의 항원과 제제화된다. 예를 들어, 병원성 유기체는 파라믹소바이러스의 또 다른 균주 (예를 들어, PIV-1, PIV의 첫째 균주가 PIV-3인 경우)일 수 있고, 또는 이는 파라믹소바이러스 이외의 기도의 바이러스 병원체, 예컨대 인플루엔자 바이러스일 수 있다. 다른 실시양태에서, 추가의 항원은 투여를 용이하게 하거나 다수의 감염 유기체에 대해 대상체를 보호하기 위해 필요한 접종의 회수를 감소시키도록 선택된다. 예를 들어, 항원은 다른 것들 중에서 인플루엔자, B형 간염, 디프테리아, 과상풍, 페르투시스, 헤모필루스 인플루엔자, 폴리오바이러스, 스트렙토코쿠스 또는 뉴모코쿠스 중 임의의 하나 이상으로부터 유래될 수 있다.

[0119] 특정 실시양태에서, 전형적으로 PreF 항원이 G 단백질 성분을 포함하지 않는 실시양태에서, 면역원성 조성물이 하나 이상의 단리된, 재조합 및/또는 정제된 파라믹소바이러스 G 단백질과 제제화될 수 있다. 다수의 적합한 G 단백질이 당업계에 기재되었고, 이에겐 전장 재조합 G 단백질 및 G 단백질의 일부 (예를 들어, 아미노산 128-229 또는 130-230)와 융합 파트너 (예를 들어, 티오레독신), 또는 발현 및/또는 정제를 용이하게 하는 신호 및/또는 리더 서열로 구성된 키메라 단백질이 포함된다. PreF 항원과 혼합하여 사용하는 것에 대한 예시적 RSV G 단백질은 다음 문헌에서 찾아볼 수 있다 [PCT/CA2008/002277, WO2008114149, 미국 특허 제5,149,650호, 미국 특허 제6,113,911호, 미국 특허 공개공보 제20080300382호, 및 미국 특허 제7,368,537호; 각각이 본원에 참고로 도입됨].

[0120] 제약상 허용되는 담체 및 부형제는 잘 알려져 있고, 당업자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 담체 또는 부형제는 바람직하게는 완충제를 포함할 수 있다. 임의로, 담체 또는 부형제는 또한 용해도 및/또는 안정성을 안정화시키는 하나 이상의 성분을 함유한다. 가용화제/안정화제의 예에는 세제, 예를 들어 라우렐 사르코신 및/또는 트윈이 포함된다. 대안적 가용화제/안정화제는 아르기닌, 및 유리 형성 폴리올 (예컨대, 수크로스, 트레할로스 등)을 포함한다. 다수의 제약상 허용되는 담체 및/또는 제약상 허용되는 부형제는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5th Edition (975)]에 기재되어 있다.

[0121] 따라서, 선택된 투여 경로에 의해 대상체에게 전달하기에 적합한 제제가 생성되도록 당업자가 적합한 부형제 및 담체를 선택할 수 있다.

[0122] 적합한 부형제는 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 소르비톨, 트레할로스, N-라우로일사르코신 나트륨 염, L-프롤린, 비 세제 술포베타인, 구아니딘 히드로클로라이드, 우레아, 트리메틸아민 옥시드, KCl, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ 및 다른 2가 양이온 관련 염, 디티오프레이톨, 디티오에리트롤 및 β-메르캅토에탄올을 비제한적으로 포함한다. 다른 부형제는 세제 [트윈(Tween)80, 트윈20, 트리톤 (Triton) X-00, NP-40, 엠펜겐 (Empigen) BB, 옥틸글루코시드, 라우로일 말토시드, 쯔비터젠트(Zwittergent) 3-08, 쯔비터젠트 3-0, 쯔비터젠트 3-2, 쯔비터젠트 3-4, 쯔비터젠트 3-6, CHAPS, 나트륨 테옥시콜레이트, 나트륨 도데실 술페이트, 세틸트리메틸암모늄 브로마이드 포함]일 수 있다.

[0123] 임의로, 면역원성 조성물이 아주반트를 포함하기도 한다. RSV에 대한 보호성 면역 반응을 도출하기 위한 목적으로 대상체에게 투여하기에 적합한 면역원성 조성물과 관련하여, 아주반트는 Th1 편향된 면역 반응을 도출하도록 선택된다.

[0124] 전형적으로, 아주반트는 조성물이 투여되는 대상체 또는 대상체 집단에서 Th1 편향된 면역 반응을 증강시키도록 선택된다. 예를 들어, 면역원성 조성물을 RSV 감염에 걸리기 쉬운 (또는 감염 위험이 증가된) 특별한 연령 군

의 대상체에게 투여해야 하는 경우에는, 이러한 대상체 또는 대상체 집단에게 안전하면서도 유효한 아주반트를 선택한다. 따라서, 노인 대상체 (예를 들어, 65세 초과 대상체)에게 투여하기 위한 RSV PreF 항원을 함유하는 면역원성 조성물을 제제화하는 경우에는, 노인 대상체에게 안전하면서도 유효한 아주반트를 선택한다. 유사하게, PreF 항원을 함유하는 면역원성 조성물을 신생아 또는 유아 대상체 (예컨대, 출생부터 2세까지의 대상체)에게 투여하고자 하는 경우에는, 신생아 및 유아에게 안전하면서도 유효한 아주반트를 선택한다.

[0125] 부가적으로, 면역원성 조성물을 투여시키는 투여 경로를 통하여 투여하는 경우에, Th1 면역 반응을 증강시켜 주는 아주반트를 전형적으로 선택한다. 예를 들어, PreF 항원을 함유하는 면역원성 조성물을 비내 투여용으로 제제화하는 경우에는, 프로테오솜 및 프로톨린이 바람직한 Th1-편향성 아주반트이다. 이와는 달리, 면역원성 조성물을 근육내 투여용으로 제제화하는 경우에는, 3D-MPL, 스쿠알렌 (예를 들어, QS21), 리포솜 및/또는 오일 및 수 에멀전 중 하나 이상을 포함한 아주반트를 선택하는 것이 바람직하다.

[0126] PreF 항원과 함께 사용하기에 적합한 한 아주반트는 비독성 박테리아 리포폴리사카라이드 유도체이다. 지질 A의 적합한 비독성 유도체의 예는 모노포스포릴 지질 A, 보다 특히 3-탈아실화 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)이다. 3D-MPL은 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 엔.에이.(GlaxoSmithKline Biologicals N.A.)에서 MPL이라는 명칭으로 시판되고, 본 문서 전반에 걸쳐 MPL 또는 3D-MPL로 지칭된다. 예를 들어, 미국 특허 제4,436,727호; 제4,877,611호; 제4,866,034호 및 제4,912,094호를 참조한다. 3D-MPL은 주로 IFN- γ (Th1) 표현형으로 CD4+ T 세포 반응을 촉진시킨다. GB2220211 A에 개시된 방법에 따라 3D-MPL을 생성할 수 있다. 화학적으로 이는 3, 4, 5 또는 6 아실화된 쇠와 3-탈아실화된 모노포스포릴 지질 A의 혼합물이다. 본 발명의 조성물에서, 소형 입자 3D-MPL이 사용될 수 있다. 소형 입자 3D-MPL은 0.22 μm 필터를 통해 멸균-여과될 수 있도록 하는 입자 크기를 갖는다. 이러한 제제가 W094/21292에 기재되어 있다.

[0127] 리포폴리사카라이드, 예컨대 3D-MPL은 면역원성 조성물의 인간 용량 당 1 내지 50 μg 의 양으로 사용될 수 있다. 이러한 3D-MPL은 약 25 μg 의 수준, 예를 들어 20-30 μg , 적합하게는 21-29 μg 또는 22 내지 28 μg 또는 23 내지 27 μg 또는 24 내지 26 μg , 또는 25 μg 으로 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 인간 용량의 면역원성 조성물은 약 10 μg 의 수준, 예를 들어 5 내지 15 μg , 적절하게는 6 내지 14 μg , 예를 들어 7 내지 13 μg 또는 8 내지 12 μg 또는 9 내지 11 μg , 또는 10 μg 으로 3D-MPL을 포함할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 면역원성 조성물의 인간 용량은 약 5 μg 의 수준, 예를 들어 1 내지 9 μg , 또는 2 내지 8 μg 또는 적합하게는 3 내지 7 μg 또는 4 내지 μg , 또는 5 μg 으로 3D-MPL을 포함한다.

[0128] 다른 실시양태에서, 리포폴리사카라이드는 미국 특허 제6,005,099호 및 EP 특허 제0 729 473 B1호에 기재된 바와 같은 β (1-6) 글루코사민 이당류일 수 있다. 당업자는 이러한 참조문헌의 교시에 기초하여 다양한 리포폴리사카라이드, 예컨대 3D-MPL을 쉽게 생성할 수 있을 것이다. 그럼에도 불구하고, 각각의 이러한 참조문헌은 본원에 참고로 도입된다. 상기 언급된 면역자극제 (구조 면에서 LPS 또는 MPL 또는 3D-MPL과 유사함)에 더하여, 상기 MPL 구조에 대해 하위-일부분(sub-portion)인 아실화 단당류 및 이당류 유도체가 또한 적합한 아주반트이다. 다른 실시양태에서, 아주반트는 지질 A의 합성 유도체이고, 그의 일부는 TLR-4 효능제로 기재되고, 하기의 것들을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: OM174 (2-데옥시-6- α -[2-데옥시-2-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4- α -포스포노- β -D-글루코피라노실]-2-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]- α -D-글루코피라노실디히드로겐포스페이트), (WO 95/14026); OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9(R)-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]테칸-1,10-디올,1,10-비스(디히드로게노포스페이트) (WO 99/64301 및 WO 00/0462); 및 OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]테칸-1,10-디올,1-디히드로게노포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트) (WO 01/46127).

[0129] 사용될 수 있는 다른 TLR4 리간드는 알킬 글루코사미나이드 포스페이트 (AGP), 예컨대 WO 98/50399 또는 미국 특허 제6,303,347호에 개시된 것 (AGP의 제조를 위한 과정이 또한 개시되어 있음), 적합하게는 RC527 또는 RC529 또는 미국 특허 제6,764,840호에 개시된 AGP의 제약상 허용되는 염이다. 일부 AGP는 TLR4 효능제이고, 일부는 TLR4 길항제이다. 둘 모두 아주반트로서 유용할 것으로 생각된다.

[0130] TLR-4 (문헌 [Sabroe et al., JI 2003 p1630-5])를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 다른 적합한 TLR-4 리간드는, 예를 들어 감마-음성 박테리아로부터의 리포폴리사카라이드 및 그의 유도체, 또는 이들의 단편, 특히 LPS (예컨대 3D-MPL)의 비독성 유도체이다. 다른 적합한 TLR 효능제는 열 충격(heat shock) 단백질 (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 또는 90; 계면활성제 단백질 A, 히알루로난 올리고사카라이드, 헤파란 술페이트 단편, 피브로넥틴 단편, 피브리노겐 펩티드 및 b-테넨신-2, 및 뮤라일 디펩티드 (MDP)이다. 한 실시양태에서, TLR 효능제는

HSP 60, 70 또는 90이다. 다른 적합한 TLR-4 리간드는 WO 2003/011223 및 WO 2003/099195에 기재된 바와 같고, 예컨대 WO2003/011223의 4-5면 또는 WO2003/099195의 3-4면에 개시된 화합물 I, 화합물 II 및 화합물 III, 특히 WO2003/011223에 ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 및 ER804764로 개시된 화합물이다. 예를 들어, 한 적합한 TLR-4 리간드는 ER804057이다.

[0131] 추가의 TLR 효능제들이 아주반트로서 또한 유용하다. 용어 "TLR 효능제"는 직접적인 리간드로서 또는 간접적으로 내인성 또는 외인성 리간드의 생성을 통해 TLR 신호전달 경로를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 작용제를 나타낸다. 이러한 천연 또는 합성 TLR 효능제들이 대안적 또는 추가의 아주반트로서 사용될 수 있다. 아주반트 수용체로서의 TLR의 역할의 간략한 검토가 문헌 [Kaisho & Akira, *Biochimica et Biophysica Acta* 1589:1-13, 2002]에서 제공된다. 이러한 잠재적인 아주반트들에는 TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 및 TLR9에 대한 효능제가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 한 실시양태에서, 아주반트 및 면역원성 조성물은 TLR-1 효능제, TLR-2 효능제, TLR-3 효능제, TLR-4 효능제, TLR-5 효능제, TLR-6 효능제, TLR-7 효능제, TLR-8 효능제, TLR-9 효능제, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아주반트를 더 포함한다.

[0132] 본 발명의 한 실시양태에서, TLR-1을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 사용된다. 적합하게는, TLR-1을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 트리-아실화 리포펩티드 (LP); 페놀-가용성 모듈린(modulin); 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) LP; 박테리아 지단백질의 아세틸화 아미노 말단을 모방하는 S-(2,3-비스(팔미토일옥시)-(2-RS)-프로필)-N-팔미토일-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, 트리히드로클로라이드 (Pam3Cys) LP 및 보렐리아 부르도르페리(*Borrelia burgdorferi*)로부터의 OspA LP로부터 선택된다.

[0133] 대안적 실시양태에서, TLR-2를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 사용된다. 적합하게는, TLR-2를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 미코박테리움 투베르쿨로시스, 보렐리아 부르도르페이 또는 트레포네마 팔리둠(*T pallidum*)으로부터의 지단백질, 펩티도글리칸, 박테리아 리포펩티드; 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)가 포함되는 종으로부터의 펩티도글리칸; 리포테이코산, 만누론산, 네이세리아(*Neisseria*) 포린, 박테리아 펴브리아에(fimbriae), 예르시나(*Yersina*) 독력 인자, CMV 비리온, 홍역 혈구응집소, 및 효모로부터의 자이모산 중 하나 이상이다.

[0134] 대안적 실시양태에서, TLR-3을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 사용된다. 적합하게는, TLR-3을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 이중 가닥 RNA (dsRNA), 또는 바이러스 감염과 관련된 분자 핵산 패턴인 폴리이노신산-폴리사이티딜산 (폴리 IC(Poly IC))이다.

[0135] 대안적 실시양태에서, TLR-5를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 사용된다. 적합하게는, TLR-5를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 박테리아 플라젤린(flagellin)이다.

[0136] 대안적 실시양태에서, TLR-6을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 사용된다. 적합하게는, TLR-6을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 마이코박테리아 지단백질, 디-아실화 LP, 및 페놀-가용성 모듈린이다. 추가의 TLR6 효능제가 WO 2003/043572에 기재되어 있다.

[0137] 대안적 실시양태에서, TLR-7을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 사용된다. 적합하게는, TLR-7을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 단일 가닥 RNA (ssRNA), 록소리빈, 위치 N7 및 C8에서의 구아노신 유사체, 또는 이미다조퀴놀린 화합물, 또는 이들의 유도체이다. 한 실시양태에서, TLR 효능제는 이미퀴모드이다. 추가의 TLR7 효능제가 WO 2002/085905에 기재되어 있다.

[0138] 대안적 실시양태에서, TLR-8을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 사용된다. 적합하게는, TLR-8을 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 단일 가닥 RNA (ssRNA), 항-바이러스 활성이 있는 이미다조퀴놀린 분자, 예를 들어 레시퀴모드 (R848)이고, 레시퀴모드는 TLR-7에 의한 인식이 또한 가능하다. 사용될 수 있는 다른 TLR-8 효능제에는 WO 2004/071459에 기재된 것들이 포함된다.

[0139] 대안적 실시양태에서, TLR-9를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 사용된다. 한 실시양태에서, TLR-9를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 HSP90이다. 다르게는, TLR-9를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 박테리아 또는 바이러스 DNA, 메틸화되지 않은 CpG 뉴클레오티드, 특히 CpG 모티프로 공지된 서열 환경을 함유하는 DNA이다. CpG-함유 올리고뉴클레오티드는 우세하게 Th1 반응을 유도한다. 이러한 올리고뉴클레오티드들이 널리 공지되어 있고, 예를 들어 WO 96/02555, WO 99/33488 및 미국 특허 제6,008,200호 및 제5,856,462호에 기재되어 있다. 적합하게는, CpG 뉴클레오티드는 CpG 올리고뉴클레오티드이다. 본 발명의 면역원성 조성물에 사용하기 위한 적절한 올리고뉴클레오티드는 3개 이상, 적합

하계는 6개 이상 또는 그 초과 뉴클레오티드에 의해 분리된 2개 이상의 디뉴클레오티드 CpG 모티프를 임의적으로 함유하는, CpG 함유 올리고뉴클레오티드이다. CpG 모티프는 시토신 뉴클레오티드에 이어진 구아닌 뉴클레오티드이다. 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 테옥시뉴클레오티드이다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 내의 뉴클레오티드간 부분은 포스포로디티오에이트, 또는 적합하게는 포스포로티오에이트 결합이지만, 포스포디에스테르 및 다른 뉴클레오티드간 결합이 본 발명의 범주 내에 속한다. 혼합된 뉴클레오티드간 결합이 있는 올리고뉴클레오티드가 본 발명의 범주 내에 또한 포함된다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드 또는 포스포로디티오에이트의 제조 방법이 미국 특허 제5,666,153호, 제5,278,302호 및 WO 95/26204에 기재되어 있다.

[0140] PreF 항원과 함께 면역원성 조성물에 예를 들어 그 자체로서 사용되거나 또는 3D-MPL과 함께 사용될 수 있는 다른 아주반트, 또는 본원에 기재된 또 다른 아주반트는 사포닌, 예를 들어 QS21이다.

[0141] 사포닌은 문헌 [Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386)]에 교시되어 있다. 사포닌은 식물 및 해양 동물계에 광범위하게 분포되어 있는 스테로이드 또는 트리테르펜 글리코시드이다. 진탕 시 발포되는 수중 콜로이드 용액을 형성하고, 콜레스테롤을 침전시키는 것에 대해 사포닌이 주목된다. 사포닌이 세포막 주변에 있을 때, 이는 막이 과열되도록 하는 기공-유사 구조를 막 내에 생성시킨다. 적혈구 용혈이 이러한 현상의 예이고, 이는 전체는 아니지만 특정 사포닌의 성질이다.

[0142] 사포닌은 전신 투여용 백신에서 아주반트로 공지되어 있다. 개별 사포닌의 아주반트 및 용혈 활성이 당업계에서 광범위하게 연구되었다 ([Lacaille-Dubois and Wagner, 상기 문헌]). 예를 들어, Quil A (남아메리카산 나무인 퀴라자 사포나리아 몰리나(Quillaja Saponaria Molina)의 나무껍질로부터 유래됨), 및 그의 분획이 US 5,057,540 및 문헌 ["Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55]; 및 EP 0 362 279 B1에 기재되어 있다. 면역 자극 복합체 (ISCOMS)로 명명된, Quil A의 분획을 포함하는 미립자 구조물이 용혈성이고, 백신 제작에 사용되었다 (Morein, B., EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). 용혈성 사포닌 QS21 및 QS17 (Quil A의 HPLC 정제 분획)이 강력한 전신 아주반트로서 기재되었고, 이들의 제조 방법이 본원에 참고로 도입된 미국 특허 제5,057,540호 및 EP 0 362 279 B1에 개시되어 있다. 전신 백신접종 연구에 사용된 다른 사포닌은 깽소필라(Gypsophila) 및 사포나리아(Saponaria)와 같은 다른 식물 종으로부터 유래된 것들을 포함한다 (문헌 [Bomford et al., *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992]).

[0143] QS21은 퀴라자 사포나리아 몰리나의 나무껍질로부터 유래된, Hplc로 정제된 비독성 분획이다. QS21의 생성 방법이 미국 특허 제5,057,540호에 개시되어 있다. QS21을 함유하는 비-반응발생성 아주반트 제제가 WO 96/33739에 기재되어 있다. 상기 언급된 참고문헌들은 본원에 참고로 도입된다. 상기의 면역학적으로 활성인 사포닌, 예컨대 QS21은 면역원성 조성물의 인간 용량 당 1 내지 50 μg 의 양으로 사용될 수 있다. 유리하게는, QS21은 약 25 μg 의 수준, 예를 들어 20-30 μg , 적합하게는 21-29 μg 또는 22-28 μg 또는 23-27 μg 또는 24-26 μg , 또는 25 μg 으로 사용된다. 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물의 인간 용량은 QS21을 약 10 μg 의 수준, 예를 들어 5 내지 15 μg , 적합하게는 6-14 μg , 예를 들어 7-13 μg 또는 8-12 μg 또는 9-11 μg , 또는 10 μg 으로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 면역원성 조성물의 인간 용량은 QS21을 약 5 μg 의 수준, 예를 들어 1-9 μg , 또는 2-8 μg 또는 적합하게는 3-7 μg 또는 4-6 μg , 또는 5 μg 으로 포함한다. QS21 및 콜레스테롤을 포함하는 이러한 제제는 항원과 함께 제제되는 경우 성공적인 Th1 자극 아주반트인 것으로 나타났다. 따라서, 예를 들어, PreF 폴리펩티드는 바람직하게, QS21과 콜레스테롤의 조합을 포함하는 아주반트와 함께 면역원성 조성물에 이용할 수 있다.

[0144] 임의적으로, 아주반트는 무기 염 예컨대 알루미늄 또는 칼슘 염, 특히 수산화알루미늄, 인산알루미늄 및 인산칼슘을 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 3D-MPL을 알루미늄 염 (예를 들어, 수산화알루미늄 또는 "명반")과 조합하여 함유하는 아주반트가 인간 대상체에게 투여하기 위한, PreF 항원을 함유하는 면역원성 조성물에서 제제화하는 데에 적합하다.

[0145] PreF 항원과 제제화하는 데에 사용하기 적합한 Th1 편향성 아주반트의 또 다른 부류에는 OMP-기반 면역자극성 조성물이 포함된다. OMP-기반 면역자극성 조성물은, 예를 들어, 비내 투여를 위해, 점막 아주반트로서 특히 적합하다. OMP-기반 면역자극성 조성물은 그람-음성 박테리아, 비제한적으로 예를 들어 네이세리아 종 (예를 들어, 문헌 [Lowell et al., *J. Exp. Med.* 167:658, 1988]; [Lowell et al., *Science* 240:800, 1988]; [Lynch et al., *Biophys. J.* 45:104, 1984]; [Lowell, in "New Generation Vaccines" 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, page 193, 1997]; 미국 특허 제5,726,292호; 미국 특허 제4,707,543호 참조)으로

부터의 외부 막 단백질 (OMP; 일부 포린 포함) 제제 속인데, 이는 박테리아 또는 바이러스 항원과 같은 면역원에 대한 담체로서 또는 이러한 면역원에 대한 조성물 중에 유용하다. 일부 OMP-기반 면역자극 조성물은 "프로테오솜"으로 지칭될 수 있고, 이는 소수성이고 인간에서의 사용에 대해 안전하다. 프로테오솜은 약 20 nm 내지 약 800 nm의 소포 또는 소포-유사 OMP 클러스터로 자가-어셈블링되는, 및 단백질 항원 (Ag), 특히 소수성 잔기가 있는 항원을 비공유결합적으로 혼입하거나, 이와 배위 결합되거나, 회합 (예를 들어, 정전기적으로 또는 소수성으로)되거나, 다른 방식으로 조합되는 능력을 지닌다. 하나 이상의 OMP의 다중-분자 막 구조 또는 용융 구체-유사 OMP 조성물이 포함되는 소포 형태 또는 소포-유사 형태 내의 외막 단백질 성분을 초래하는 임의의 제조 방법이 프로테오솜의 정의에 포함된다. 프로테오솜은, 예를 들어, 당업계에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제5,726,292호 또는 미국 특허 제5,985,284호 참조). 프로테오솜은 OMP 포린을 생성시키기 위해 사용되어 온 박테리아 (예를 들어, 네이세리아 종)으로부터 유래되는 내인성 리포폴리사카라이드 또는 리포올리고사카라이드 (각각 LPS 또는 LOS)를 함유할 수도 있는데, 이는 일반적으로 전체 OMP 제제의 2% 미만일 것이다.

[0146] 프로테오솜은 주로, 세제에 의해 용액 중에 유지된, 네이세리아 메닝기티디스 (*Neisseria meningitidis*)로부터 화학적으로 추출된 외부 막 단백질 (OMP) (주로 포린 A 및 B 뿐만 아니라 부류 4 OMP)로 구성된다 (문헌 [Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206]). 프로테오솜은, 예를 들어 투석여과 또는 전통적 투석 과정에 의해, 바이러스 공급원으로부터 유래된 정제된 단백질 또는 재조합 단백질과 같은 각종 항원 (본원에 기재된 PreF 폴리펩티드를 포함함)과 함께 제제화할 수 있다. 세제를 점진적으로 제거하면 직경이 대략 100-200 nm인 소수성 미립자 복합체가 형성되게 된다 (문헌 [Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206]).

[0147] 본원에 사용된 "프로테오솜:LPS 또는 프로톨린(Protollin)"은, 예를 들어, 외인성 첨가에 의해, OMP-LPS 조성물 (이는 면역자극 조성물로 기능할 수 있음)을 제공하도록 하나 이상의 종류의 리포폴리사카라이드와 함께 혼합된 프로테오솜의 제제를 나타낸다. 따라서, OMP-LPS 조성물은 (1) 그람-음성 박테리아, 예컨대 네이세리아 메닝기티디스로부터 제조된 프로테오솜의 외막 단백질 제제 (예를 들어, 프로주반트(Projuvant)), 및 (2) 하나 이상의 리포사카라이드의 제제를 포함하는 프로톨린의 기본 성분들 중 2개로 구성될 수 있다. 리포올리고사카라이드는 내인성일 수 있거나 (예를 들어, OMP 프로테오솜 제제와 함께 천연적으로 함유됨), 외인성으로 제조된 리포올리고사카라이드 (예를 들어, OMP 제제 이외의 상이한 미생물 또는 배양물로부터 제조됨)로부터 OMP 제제와 혼합 또는 조합될 수 있거나, 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 외인성으로 첨가된 LPS는 OMP 제제가 제조된 것과 동일한 그람-음성 박테리아로부터의 것이거나 또는 상이한 그람-음성 박테리아로부터의 것일 수 있다. 프로톨린은 지질, 당지질, 당단백질, 소형 분자 등, 및 이들의 조합을 임의적으로 포함하는 것으로 또한 이해되어야 한다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2003/0044425호에 기재된 바와 같이, 프로톨린을 제조할 수 있다.

[0148] 상기 언급된 바와 같은, 상이한 아주반트의 조합을 PreF 항원과 함께 조성물에 사용할 수도 있다. 예를 들어, 이전에 언급된 바와 같이, QS21이 3D-MPL과 함께 제제화될 수 있다. 전형적으로 QS21:3D-MPL의 비율은 대략 1:10 내지 10:1, 예컨대 1:5 내지 5:1, 종종 실질적으로 1:1일 것이다. 전형적으로, 비율은 2.5:1 내지 1:1 3D-MPL:QS21의 범위이다. 또 다른 조합 아주반트 제제는 3D-MPL 및 알루미늄 염, 예컨대 수산화알루미늄을 포함한다. 조합되어 제제화되는 경우, 이러한 조합은 항원-특이적 Th1 면역 반응을 증강시킬 수 있다.

[0149] 일부 경우에, 아주반트 제제는 수중유 에멀전, 또는 무기질 염, 예를 들어 칼슘 또는 알루미늄 염, 예를 들어 인산칼슘, 인산알루미늄 또는 수산화알루미늄을 포함한다.

[0150] 일부 실시양태에서, 아주반트는 오일 및 수 에멀전, 예를 들어 수중유 에멀전을 포함한다. 수중유 에멀전의 한 예는 대사가가능한 오일, 예컨대 스쿠알렌, 토클, 예컨대 토클페롤, 예를 들어 알파-토클페롤, 및 계면활성제, 예컨대 소르비탄 트리올레에이트 (스팬 85(Span 85)TM) 또는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트 (트윈 80^T)를 수성 담체 중에 포함한다. 특정 실시양태에서, 수중유 에멀전은 임의의 추가의 면역자극제(들)를 함유하지 않는다 (특히, 이는 비독성 지질 A 유도체, 예컨대 3D-MPL, 또는 사포닌, 예컨대 QS21을 함유하지 않음). 수성 담체는, 예를 들어 인산염 완충 염수일 수 있다. 부가적으로, 수중유 에멀전은 스펜 85 및/또는 레시틴 및/또는 트리카프릴린을 함유할 수 있다.

[0151] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 항원 또는 항원 조성물과, 수중유 에멀전 및 임의로 하나 이상의 추가의 면역자극제를 포함하는 아주반트 조성물을 포함하는 백신 조성물이 제공되는데, 상기 수중유 에멀전은 0.5-10 mg 대

사가능한 오일 (적합하게는, 스쿠알렌), 0.5-11 mg 토폴 (적합하게는, 토크페롤, 예컨대 알파-토크페롤) 및 0.4-4 mg 유화제를 포함한다.

[0152] 한 구체적인 실시양태에서, 아주반트 제제는 에멀전, 예컨대 수중유 에멀전의 형태로 제조된 3D-MPL을 포함한다. 일부 경우에, 에멀전은 WO 94/21292에 개시된 바와 같이 직경 0.2 μm 미만의 작은 입자 크기를 갖는다. 예를 들어, 3D-MPL의 입자는 0.22 μm 막을 통해 평균 여과되기에 충분히 작을 수 있다 (유럽 특허 제0 689 454호에 기재된 바와 같음). 다르게는, 3D-MPL은 리포솜 제제로 제조될 수 있다. 임의로, 3D-MPL (또는 그의 유도체)을 함유하는 아주반트는 추가의 면역자극 성분을 또한 포함한다.

[0153] 아주반트는 면역원성 조성물이 투여된 인구에서 안전하고 유효하도록 선택된다. 성인 및 노인 집단에 대해, 제제는 전형적으로 유아 제제에서 전형적으로 발견되는 것보다 많은 아주반트 성분을 포함한다. 수중유 에멀전을 사용하는 특정 제제에서, 이러한 에멀전은 추가의 성분, 예를 들어, 콜레스테롤, 스쿠알렌, 알파 토크페롤, 및/또는 세제, 예컨대 트윈 80 또는 스펠 85를 포함할 수 있다. 예시적인 제제에서, 이러한 성분은 하기의 양으로 존재할 수 있다: 약 1-50 mg 콜레스테롤, 2 내지 10% 스쿠알렌, 2 내지 10% 알파 토크페롤 및 0.3 내지 3% 트윈 80. 전형적으로, 스쿠알렌:알파 토크페롤의 비율은 1 이하인데, 이것이 보다 안정한 에멀전을 제공하기 때문이다. 일부 경우에, 제제는 또한 안정화제를 함유할 수 있다.

[0154] 예를 들어, PreF 폴리펩티드 항원을 포함하는 면역원성 조성물이 유아에게 투여하기 위해 제제화된 경우, 아주반트의 투여량은 유아 대상체에서 유효하고 상대적으로 비-반응유발성인 것으로 결정된다. 일반적으로, 유아 제제에서 아주반트의 투여량은 성인 (예를 들어, 65세 이상의 성인)에게 투여하기 위해 고안된 제제에서 사용되는 것보다 더 낮다. 일반적으로, 유아 제제에서 아주반트의 투여량은 성인 (예를 들어, 65세 이상의 성인)에게 투여하도록 설계된 제제에 사용되는 것보다 더 낮다 (예를 들어, 용량은 성인에게 투여될 제제에 제공되는 용량의 부분일 수 있음). 예를 들어, 3D-MPL의 양은 전형적으로 용량 당 1 μg -200 μg , 예컨대 10-100 μg , 또는 10 μg -50 μg 범위이다. 유아 용량은 전형적으로 이 범위의 하한, 예를 들어 약 1 μg 내지 약 50 μg , 예컨대 약 2 μg , 또는 약 5 μg , 또는 약 10 μg , 내지 약 25 μg , 또는 약 50 μg 이다. 전형적으로, QS21이 제제에 사용되는 경우, 범위는 대등하다 (그리고 상기 나타낸 비율에 따름). 오일 및 수 에멀전 (예를 들어, 수중유 에멀전)의 경우에, 소아 또는 유아에게 제공되는 아주반트의 용량은 성인 대상체에게 투여되는 용량의 부분일 수 있다. 명반이 존재하는 경우 (예를 들어, 3D-MPL과 조합됨), 양은 전형적으로 용량 당 약 100 μg 내지 1 mg, 예컨대 약 100 μg , 또는 약 200 μg 내지 약 750 μg , 예컨대 약 500 μg 이다.

[0155] 면역원성 조성물은 전형적으로 면역보호성인 양 (또는 그의 분할 용량)의 항원을 함유하고, 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다. 면역원성 조성물 (인간 대상체에게 투여하기 위한 것 포함)의 제조가 문헌 [Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995], [New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978]에 일반적으로 기재되어 있다. 리포솜 내의 캡슐화가, 예를 들어 풀러톤(Fullerton)의 미국 특허 제4,235,877호에 기재되어 있다. 거대분자에 대한 단백질의 접합은, 예를 들어 릭히트(Likhite)의 미국 특허 제4,372,945호 및 아모르(Armor) 등의 미국 특허 제 4,474,757호에 개시되어 있다.

[0156] 전형적으로, 면역원성 조성물의 각각의 용량 내의 단백질의 양은 전형적인 대상에서 유의한 불리한 부작용 없이 면역보호성 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 이와 관련하여 면역보호성은 반드시 감염에 대해 완전하게 보호성인 것을 의미하는 것은 아니며; 이는 증상 또는 질환, 특히 바이러스와 관련된 중증 질환에 대한 보호를 의미한다. 항원의 양은 어떠한 특이적 면역원이 사용되는지에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 각각의 인간 용량은 1-1000 μg 의 단백질, 예컨대 약 1 μg 내지 약 100 μg , 예를 들어 약 1 μg 내지 약 50 μg , 예컨대 약 1 μg , 약 2 μg , 약 5 μg , 약 10 μg , 약 15 μg , 약 20 μg , 약 25 μg , 약 30 μg , 약 40 μg , 또는 약 50 μg 을 포함할 것으로 예상된다. 면역원성 조성물에 사용되는 양은 대상 집단 (예를 들어, 유아 또는 노인)을 기초로 선택된다. 대상체에서의 항체 역가 및 다른 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의해 특정 조성물에 대한 최적의 양을 확인할 수 있다. 최초의 예방 접종 후, 약 4주 내에 대상에게 추가접종을 제공할 수 있다.

[0157] 선택된 아주반트에 상관없이, 최종 제제 중 농도는 표적 집단에게 안전하고 유효하도록 계산한다는 것을 인지해야 한다. 예를 들어, 인간에서 파라믹소바이러스, 예를 들어 RSV, hMPV 및 PIV에 대한 면역 반응을 도출하기 위한 면역원성 조성물은 유아 (예를 들어, 초기 투여 연령이 출생부터 1세까지, 예컨대 0 내지 6개월인 유아)에게 투여하는 것이 바람직하다. 파라믹소바이러스, 예를 들어 RSV, hMPV 및 PIV에 대한 면역 반응을 도출하기 위한 면역원성 조성물은 또한, 노인에게 투여하는 것이 바람직하다 (예를 들어, 단독으로 투여하거나 또는 인플

루엔자 항원 및/또는 COPD와 연관된 다른 병원체의 항원과 함께 투여함). 아주반트의 선택은 이러한 상이한 적용에 있어서 상이할 수 있고, 각 상황에 대한 최적의 아주반트 및 농도는 당업자에 의해 실험적으로 결정할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0158] 따라서, PreF 항원 또는 이를 코딩하는 핵산을 hMPV, PIV 및 RSV 중 2개 이상에 대한 노출 또는 이에 의한 감염을 치료 (이러한 노출이나 감염 후에 치료적으로 처치하거나 노출이나 감염 이전에 예방적으로 처치함)하기 위한 약물을 제조하는 데 사용하는 것이 또한, 본 발명의 특징이다. 마찬가지로, 대상체에서 hMPV, PIV 및/또는 RSV에 대한 면역 반응을 도출하는 방법이 본 발명의 특징이다. 이러한 방법은 PreF 항원을 포함하는 조성물의 면역학적 유효량을 대상체, 예를 들어 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 통상적으로, 상기 조성물은 Th1 편향된 면역 반응을 도출하는 아주반트를 포함한다. 이 조성물은 이들 병원체 중 어느 하나와의 접촉에 따른 바이러스 질환의 증강없이 hMPV, PIV 및/또는 RSV에 대해 특이적인 면역 반응을 도출하도록 제제화한다. 즉, hMPV, PIV 및/또는 RSV로의 감염을 감소시키거나 또는 예방하고/거나 이들 파라믹소바이러스로의 감염에 따른 병적 반응을 감소시키거나 예방하는 Th1 편향된 면역 반응을 야기시키도록 조성물을 제제화한다. 상기 조성물을 각종 상이한 경로에 의해 투여할 수 있으나, 가장 통상적으로는 면역원성 조성물을 근육내 또는 비내 투여 경로에 의해 전달한다.

[0159] 면역원성 조성물은 전형적으로 면역보호성인 양 (또는 그의 분할 용량)의 항원을 함유하고, 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다. 면역원성 조성물 (인간 대상체에게 투여하기 위한 것 포함)의 제조가 문헌 [Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995], [New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978]에 일반적으로 기재되어 있다. 리포솜 내의 캡슐화가, 예를 들어 폴러톤의 미국 특허 제4,235,877호에 기재되어 있다. 거대분자에 대한 단백질의 접합은, 예를 들어 릭히트의 미국 특허 제4,372,945호 및 아모르 등의 미국 특허 제4,474,757호에 개시되어 있다.

[0160] 전형적으로, 면역원성 조성물의 각각의 용량 내의 단백질의 양은 전형적인 대상에서 유의한 불리한 부작용 없이 면역보호성 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 이와 관련하여 면역보호성은 반드시 감염에 대해 완전하게 보호성인 것을 의미하는 것은 아니며; 이는 증상 또는 질환, 특히 바이러스와 관련된 중증 질환에 대한 보호를 의미한다. 항원의 양은 어떠한 특이적 면역원이 사용되는지에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 각각의 인간 용량은 1-1000 μg 의 단백질, 예컨대 약 1 μg 내지 약 100 μg , 예를 들어 약 1 μg 내지 약 50 μg , 예컨대 약 1 μg , 약 2 μg , 약 5 μg , 약 10 μg , 약 15 μg , 약 20 μg , 약 25 μg , 약 30 μg , 약 40 μg , 또는 약 50 μg 을 포함할 것으로 예상된다. 면역원성 조성물에 사용되는 양은 대상 집단 (예를 들어, 유아 또는 노인)을 기초로 선택된다. 대상체에서의 항체 역가 및 다른 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의해 특정 조성물에 대한 최적의 양을 확인할 수 있다. 초기 백신접종 후, 약 4-12주 내에 대상체를 추가접종할 수 있다. 예를 들어, PreF 항원을 함유하는 면역원성 조성물을 유아 대상체에게 투여하는 경우, 초기 및 후속 접종은 이러한 기간 동안에 투여된 다른 백신과 동시에 투여할 수 있다.

[0161] 하기 실시예는 특정 특별한 특징 및/또는 실시양태를 설명하기 위해 제공된다. 이들 실시예는 본 발명을 본원에 기재된 특별한 특징이나 실시양태로 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0162] 실시예

[0163] 실시예 1: 예시적 PreF 항원

[0164] 호흡기 세포융합 바이러스

[0165] 예시적 파라믹소바이러스 PreF 항원을 PCT/CA2008/002277 (모든 목적을 위해 본원에 도입됨)에 개시된 RSV F 단백질을 기반으로 생성하였다. F의 융합전 입체형태에 대해 생성된 면역 반응이 결합, 입체형태 이동 및/또는 막 융합에 관여하는 다른 사건을 예방하여 보호성 반응의 효율을 증가시키는 항체를 우선적으로 포함한다는 예측을 기반으로, RSV F 단백질을 그의 융합전 입체형태에서 단백질을 안정화시키기 위해 변형시켰다.

[0166] 도 1a 및 1b는 RSV F0 및 예시적 PreF 재조합 항원의 특징으로 도식적으로 설명한 것이다. 도 1a는 RSV F0 단백질을 나타낸 것이다. F0은 574개 아미노산으로 이루어진 전-단백질이다. F0 전-단백질은 번역 후 단백질 분해적으로 프로세싱되고 글리코실화된다. 신호 펩티다제에 의해 나중에 제거되는 신호 펩티드는 F0 전-단백질의 번역이 내형질 세망 (RE)을 표적으로 한다. 이어서, RE 내의 신생 펩티드를 다중 부위에서 N-글리코실화시킨다 (삼각형으로 표시됨). F0의 푸린 절단으로 F2 펩티드 도메인과 F1 펩티드 도메인이 생성되는데, 이를 함께, F2-F1 이중이량체의 삼량체 (즉, 3 x F2-F1)로서 폴딩 및 어셈블링한다. 그의 천연 상태에서는 F 단백질이 C-

말단 영역 내의 막횡단 나선에 의해 막에 정착된다. F0 폴리펩티드의 또 다른 특징에는 15개의 시스테인 잔기, 4개의 특징적인 중화 에피토프, 2개의 코일드-코일 영역, 및 1개의 지질화 모티프가 포함된다. 도 1b는 예시적 PreF 항원의 특징을 설명한 것이다. PreF 항원을 구축하기 위해, F 단백질의 융합전 입체형태를 안정화시킴으로써, 숙주 세포와 결합하여 융합되기에 앞서 RSV 바이러스로 나타낸 바와 같은 F 단백질의 우세한 면역원성 에피토프를 보유하도록 F0 폴리펩티드를 변형시켰다. F0 폴리펩티드와 비교하여 하기 안정화 돌연변이를 PreF 항원 내로 도입하였다. 첫째, 안정화 코일드-코일 도메인을 F0 폴리펩티드의 세포외 도메인의 C-말단 끝에 놓아 두어, F0의 막 정착 도메인을 대체시켰다. 둘째, pep27 펩티드 (천연 단백질 중에서 F2 도메인과 F1 도메인 사이에 위치함)를 제거하였다. 셋째, 두 푸린 모티프를 제거하였다. 대안적 실시양태 (PreF_V1 및 PreF_V2로 명명됨)에서는 RSV G 단백질의 면역학적 활성 부분 (예를 들어, 아미노산 149-229)을 C-말단 도메인에 추가하였다. 예시적 RSV PreF 항원의 서열은 서열 10에 의해 나타낸다.

[0167] PCT/CA2008/0022777에 상세하게 개시된 바와 같이, 예시적 PreF 항원은 RSV에 대해 특이적인 강력한 면역 반응을 도출하는 것으로 나타났다. 도 6a 및 6b는 특징적인 IgG 및 중화 항체 반응을 설명한다. 도 7은 예시적 PreF 항원의 투여에 의해 부여되는 RSV 감염에 대한 보호를 설명한다.

[0168] 인간 메타뉴모바이러스 (hMPV) 및 파라인플루엔자 바이러스 3 (PIV-3)

[0169] hMPV 및 PIV-3 융합 단백질에 상응하는 추가의 PreF 항원을 생성하였다. 이들 PreF 폴리펩티드의 서열은 각각 서열 12 및 14에 의해 나타낸다. RSV PreF 항원에 대해 나타낸 바와 같이, hMPV 및 PIV-3 PreF 폴리펩티드는 그 자체로 용액에서 삼량체로 어셈블링된다.

[0170] hMPV 및 PIV-3 PreF 폴리펩티드의 면역원성을 확인하고, 파라믹소바이러스에 의한 감염을 예방하기 위한 조합 백신에 사용하기 위한 항원으로서의 그의 적합성을 증명하기 위해, 표 1에 나타낸 바와 같이, 마우스를 하나 이상의 PreF 폴리펩티드를 포함하는 면역원성 조성물 단독으로 및 이중 및 삼중 조합으로 면역화시켰다.

표 1

면역화 프로토콜: RSV, hMPV, PIV-3 조합 조성물

군	면역원	용량 preF (μ g)	용량 (μ g/mL)	아주반트	부피 (μ L)
1	RSV, hMPV 및 PIV-3으로부터의 PreF	3 x 2	120	AS03B	50
2	RSV 및 hMPV로부터의 PreF	2 x 2	80	AS03B	50
3	RSV 및 PIV-3으로부터의 PreF	2 x 2	80	AS03B	50
4	RSV로부터의 PreF	2	40	AS03B	50
5	hMPV로부터의 PreF	2	40	AS03B	50
6	PIV-3으로부터의 PreF	2	40	AS03B	50
7	없음	-	-	AS03B	50

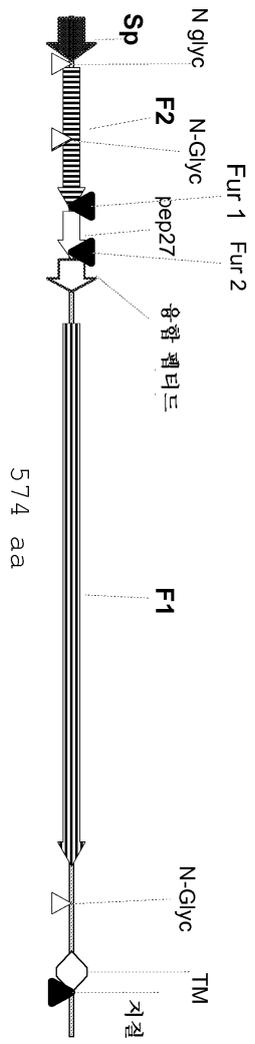
[0171]

[0172] 항원-특이적 IgG 항체 역가는 ELISA에 의해 개별 혈청 샘플에 대해 결정하였다. 간략하게, 3개 시리즈의 96-웰 플레이트를 각각 RSV, hMPV 또는 PIV (0.5 μ g) 단백질로부터의 하나의 PreF로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 혈청 샘플을 1:200에서 시작하여 차단 완충제에 연속적으로 희석하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 결합된 항체를 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 항-마우스 IgG (시그마: Sigma, ON)로 검출하였다. 3,3A,5,5A-테트라메틸벤지딘 (TMB, BD Opt EIATM, BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences), ON)을 HRP에 대한 기질로 사용하였다. 50 μ l의 1 M H₂SO₄를 각각의 웰에 첨가하여 반응을 중지시켰다. 각각의 웰에 대한 흡광도 값을 몰레큘라 디바이시즈(Molecular Devices) 마이크로플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시즈, 미국)로 450 nm에 검출하였다. 결과를 기하 평균 역가 (GMT +/- 95% CL)로 표현하였다. 예시적 결과를 도 8a에 나타내었다.

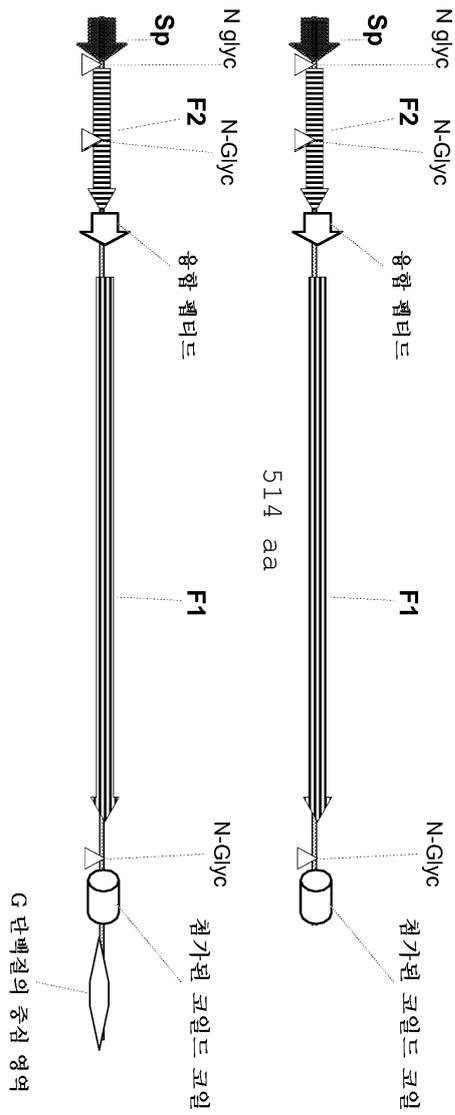
- [0173] 모든 3개의 PreF 항원은 단독으로 또는 이중 및 삼중 조합으로 ELISA에 의해 검출된 바와 같이 유의한 IgG 항체 역가를 도출하였다.
- [0174] 높은 역가의 중화 항체의 존재는 파라믹소바이러스 감염에 대한 보호와 상호관련이 있는 것으로 나타났다. PreF 폴리펩티드가 보호성 면역 반응을 도출할 수 있다는 것을 증명하기 위해, 3가, 2가 및 1가 - AS03 면역화된 마우스로부터의 혈청을 바이러스에 대한 중화 잠재력에 대해 평가하였다. 중화 항체를 검출하기 위한 검정은 TCID₅₀ 방법을 기반으로 하였다.
- [0175] 개별 면역화된 동물로부터의 혈청을 96-웰 플레이트에서 배지 (20 μ l/웰) 중 1:16의 희석에서 시작하여 연속적으로 희석하였다. 대조군 웰은 배지 단독 또는 바이러스 특이적인 항체를 함유하였다. 바이러스의 적정은 중화 검정 전에 수행하였다. 상이한 바이러스 사이의 표준화는 Vero 세포에 대한 감염성을 기반으로 하였다. 20 μ l/웰의 바이러스 원액 (하기 역가)을 플레이트에 첨가하였다.
- [0176] RSV \rightarrow 2.67x10⁷ TCID₅₀/ml
- [0177] hMPV \rightarrow 2.81x10⁷ TCID₅₀/ml
- [0178] PIV-3 \rightarrow 2.11x10⁹ TCID₅₀/ml
- [0179] 플레이트를 33°C에서 20분 동안 인큐베이션하고, 혼합물을 이전에 1x10⁵ 개 세포/mL Vero 세포를 시딩한 96-웰 편평-바닥 플레이트로 전달하였다. 33°C (5% CO₂)에서의 4일 후에, 상청액을 제거하고; 플레이트를 PBS로 세척하고, 부착 세포를 PBS 중 1% 파라포름알데히드로 1시간 동안 고정시켰다. 감염을 간접 면역형광 (RSV; hMPV) 또는 세포변성 효과 (PIV-3)에 의해 모니터링하였다.
- [0180] 50% 조직 배양물 감염 용량 (TCID₅₀) 계산을 스피어만-카버(Spearman-Kärber) (SK) 방법 및 하기와 같이 계산된 NI의 백분율을 사용하여 수행하였다:
- $$\frac{\text{중화 역가}(0\mu\text{g/ml 억제제}) - \text{중화 역가}(25\mu\text{g/ml 억제제})}{\text{중화 역가}(0\mu\text{g/ml 억제제})} \times 100$$
- [0181]
- [0182] 도 8b에 나타난 바와 같이, 모든 PreF 항원은 단독으로 또는 조합하여 바이러스 복제를 억제할 수 있는 특이적 중화 항체를 도출하였다.

도면

도면1a



도면1b



도면2

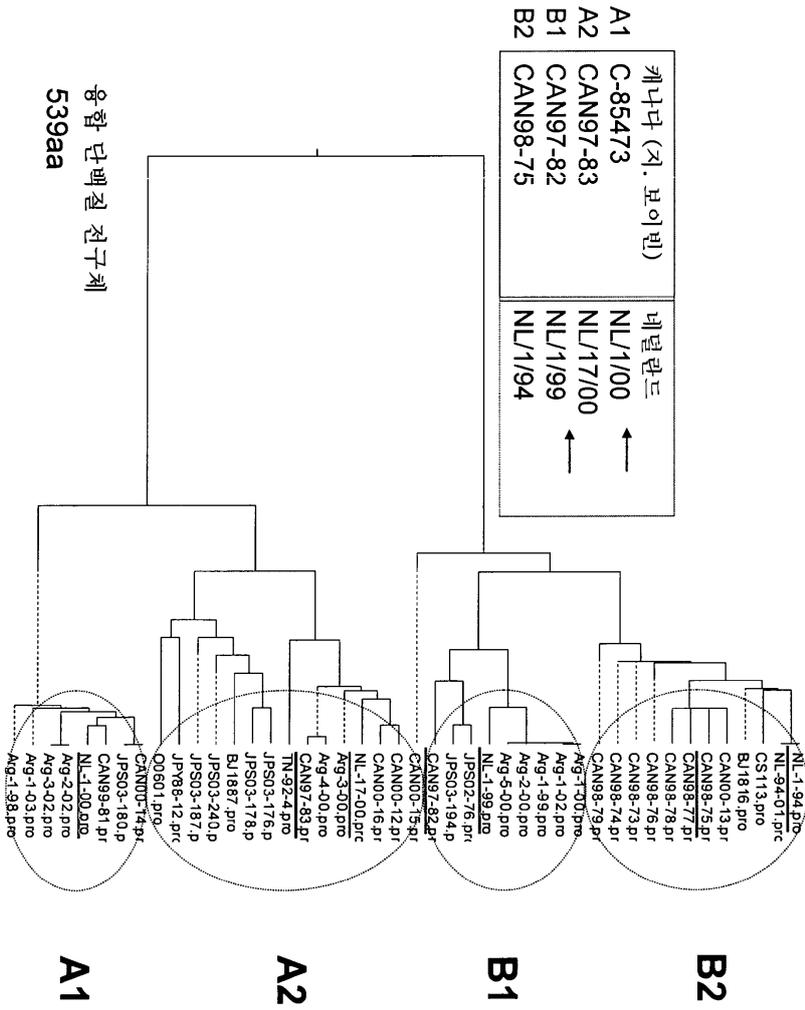
F 단백질 서열의 정렬

융합 단백질 진구체

진행크 참조: RSV (AAB06664), hPFV (AAN52910), hPIV3 (AAB21447)

		20	40	60	80	
RSV-A2.pro	:	MELLILKANAHTTLLTAVTFCFASGQNTPEFYQSTCGAVSRVGLGALRTGZATTSVITLLENKFKKNGTDAKVKLEK	:	80		
hMPV-CAN97-83.pro	:	-----MDEKVVIIYELLIYFQHLKESYLEESCSPITTEGYLSVLRITGZATVTVPLVEVDENLTCSS--DCPS-LIK	:	68		
hPIV3-C-243.pro	:	-----MPSIGILLIITMINASFQQIDITFLQHVGVVNSPKRKLISGNFETRYLLSLIPRIEDSNSCGDQIKQYK	:	72		
		100	120	140	160	
RSV-A2.pro	:	QELDFYKNAVELQLLMQSTPATNRR--ARRELPRFQVYTLANAKETNVTLSKRRRRLQFLLOVGGALASGVAVSKVLS	:	159		
hMPV-CAN97-83.pro	:	TELDLTKSALRELKTVGADQLARE---IQIENPQSRFVLG-----AIALGVATAAAVITAGVAIAKTIK	:	129		
hPIV3-C-243.pro	:	RLTIDYIYPLVTVSTSLQTRVTVSNQKSDPNTDPTPTREFFPQVTFG-----PTALGVATSAQITPAADATLTKAKD	:	130		
		180	200	220	240	
RSV-A2.pro	:	LEGEVNRKISALLSTNKAVVSLNMGVS/LTISKVLDLRFYIDKQLLEIVNRKQSCSISNIAIVIEPQQRNRLLEITREFSV	:	239		
hMPV-CAN97-83.pro	:	LESEVTAIKNALKTINEAVSTLGNVRLATAVARELQDFVSKNLTRALNENKCDIDDLKMAVFSQFNRRFLAVVRQFSD	:	209		
hPIV3-C-243.pro	:	ARSDIERLKEAIRDTNKAVQSVQSSIGNLIVAIKSVQDYVNRKIVPSIARLGEAAAGLQGLIALTQHYSS---ELTNIIFGD	:	216		
		260	280	300	320	
RSV-A2.pro	:	NAGVTPPVSTYQLTNSGLLS--LINDMPTINDOKKLMGNVQIVRQQSVYSIMSI--IKKEVLAIVVQLPLYG--VIDTFCNKL	:	316		
hMPV-CAN97-83.pro	:	NAGITPAISLDMTDAELAR--AVSNMPTISAGQIKMLGNRAMVRKGFGLIG--VYGSVIVMVLPIFG--VIDTFCNIV	:	286		
hPIV3-C-243.pro	:	NIGSLOEKIKLGGIASLVRTNITZIFPTSTVDKYDIYDLLFTSEIKVRVIDVLDLNDYSITIQVRLPLLRLNLTQIYK	:	296		
		340	360	380	400	
RSV-A2.pro	:	HTSLCTTNTKESNICLITRTRDREMYCDNAGSVSFFPQARTCKVQSNRVPCTDMMSLDPSFVMLCNVDIFNPKYDCKIM	:	396		
hMPV-CAN97-83.pro	:	KAAPCCGE--EKENYACLREDDQGYCQDMSVTVYRERKDCETRELDHVFCDFAAGIIVNARSKREKINISYIMYPCKE	:	364		
hPIV3-C-243.pro	:	DSISYNIQ--NREMYIPLPS----HMTKGAFLGGADVKECTEAFSSVICPSDPCFVLNHEMSC---LGGNHSQCPR	:	366		
		420	440	460	480	
RSV-A2.pro	:	TSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGRTECTASNENRGIIRTPSNGCDIVSNKGVDTVSVGNLYVNRQEGKSLAVRGEPIIN	:	476		
hMPV-CAN97-83.pro	:	TGRHPISMVALPLGALVACYKGVSCSIGSNKVGIIROLNKGCSYITNQDADVTIDNTVYCLGRVGECHVINGRPVSS	:	444		
hPIV3-C-243.pro	:	VVTSQVLPKRYAFVNGGVVANCITPTCTANGIGNRINQPPDQGVKIIITRKECHTIGINGMLFMTNKEGLAFYTPNDITLN	:	446		
		500	520	540	560	
RSV-A2.pro	:	FVDPLVFPSEDFDASISQVNERKINQSLAFIRKSDLELHNVNAGRSTINIMITTHIIVIVILLSLIAGVLLLYCFARSTP	:	556		
hMPV-CAN97-83.pro	:	SPDPIKFPEDJFVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAERG---WAGFIIVILLIAGVLLYVSIPIIIRKTKRP	:	520		
hPIV3-C-243.pro	:	--NSVALDPIDISIELKAKSDLEESKEMTRRSNQRKLDSCGNM--QSSPTLILVLMIIILFIINVTIIIAVRYVRI	:	521		
		580				
RSV-A2.pro	:	VPLKQDLGSHNNIAFGN---	:	574		
hMPV-CAN97-83.pro	:	TGAPP--ELSGVTNNGFIPHN-	:	539		
hPIV3-C-243.pro	:	QKRN--V-DNDRKPYVLENK	:	539		

도면3a



		동일성%							
	1	2	3	4	5	6	7		
1	97.8	98.1	93.9	94.1	94.4	94.6	94.6	NL-1-00.pro A1	
2	99.6	94.2	94.2	94.4	95.0	95.2	95.2	NL-17-00.pro A2	
3	94.2	94.4	94.4	95.0	95.2	95.2	95.2	CAN97-83.pro A2	
4	99.1	98.7	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	NL-1-99.pro B1	
5	98.9	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7	CAN97-82.pro B1	
6	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	NL-1-94.pro B2	
7	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9	CAN98-75.pro B2	

융합 단백질 친구체
539aa

캐나다 및 네덜란드로부터의 프로토타입 사이의 비교

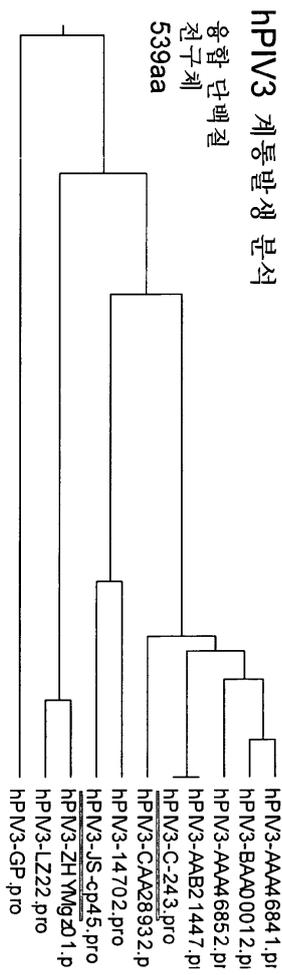
A2	NL/17/00 대 CAN97-83	99.6%
B1	NL/1/99 대 CAN97-82	99.1%
B2	NL/1/94 대 CAN98-75	99.4%

하위군 사이의 비교

A1 대 A2	>97.8%
B1 대 B2	>98.5%
A 대 B	>93.9%

도면3b

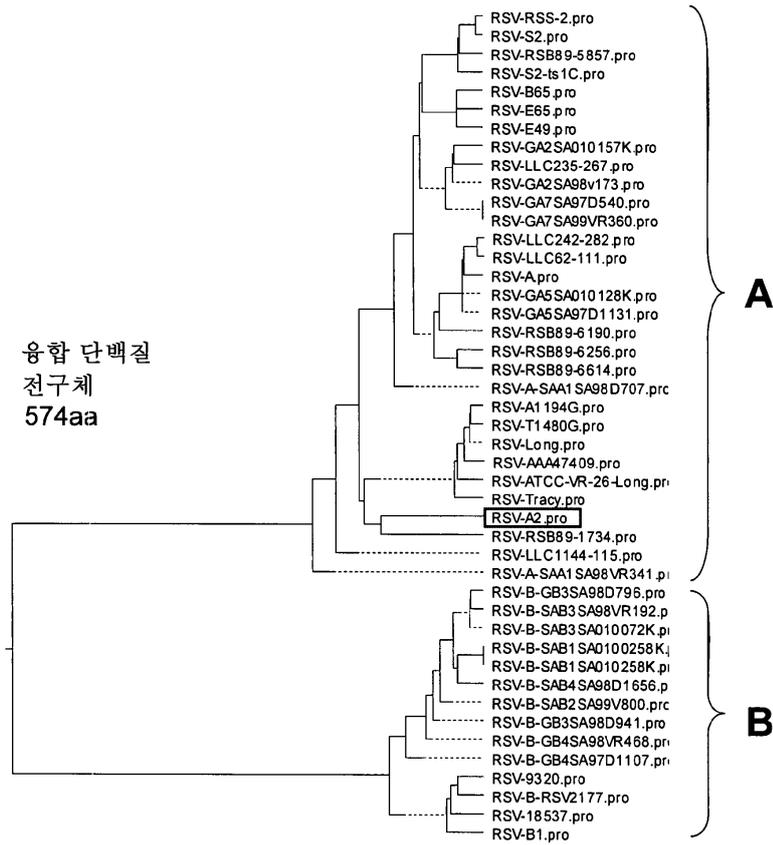
도면4a



도면4b

		동일성%											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	97.4	96.5	96.8	97.2	96.5	97.2	96.8	96.5	97.4	99.6	1	hPIV3-ZHYMg201.pro	
2	97.4	97.4	97.8	98.1	97.4	98.1	97.8	97.0	99.1	97.4	2	hPIV3-14702.pro	
3	99.4	99.1	99.8	99.1	99.8	99.1	98.7	95.9	97.2	96.5	3	hPIV3-AAA46841.pro	
4	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.3	96.3	97.6	96.8	4	hPIV3-AAA46852.pro	
5	99.3	100.0	99.6	96.7	98.0	97.2	96.7	96.7	98.0	97.2	5	hPIV3-AAB21447.pro	
6	99.3	98.9	95.9	97.2	96.5	96.7	95.9	97.2	96.5	97.2	6	hPIV3-BA40012.pro	
7	99.6	96.7	98.0	97.2	96.5	96.7	96.7	98.0	97.2	96.5	7	hPIV3-C-243.pro	
8	96.3	97.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.3	97.8	96.8	96.8	8	hPIV3-CA28932.pro	
9	97.2	96.5	96.5	96.5	96.5	96.5	96.3	97.2	96.5	96.5	9	hPIV3-GP.pro	
10	97.4	96.5	96.5	96.5	96.5	96.5	96.3	97.2	96.5	96.5	10	hPIV3-JS-cp45.pro	
11	97.4	96.5	96.5	96.5	96.5	96.5	96.3	97.2	96.5	96.5	11	hPIV3-LZZ22.pro	

도면5a



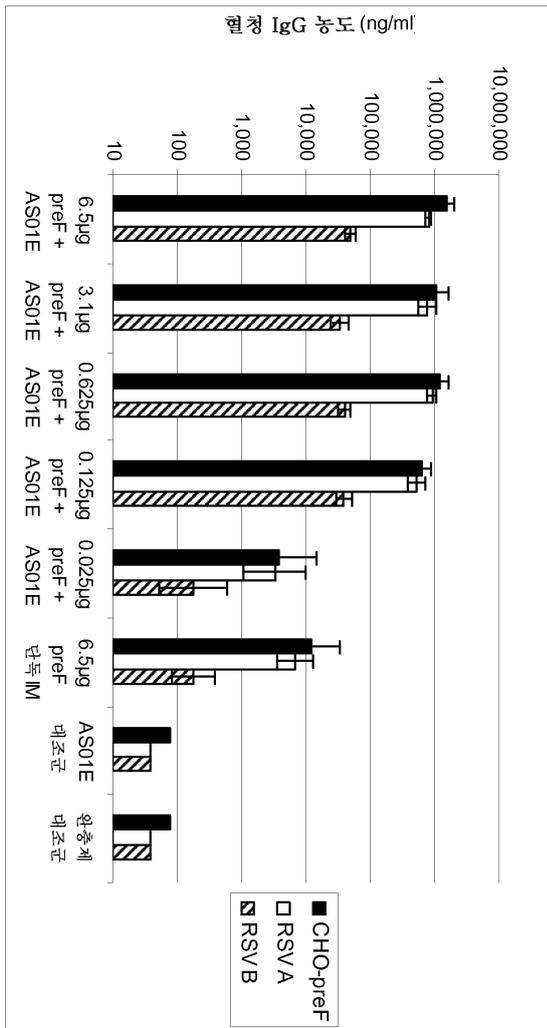
도면5b

- 하위유형 A 관주 사이의 동일성% : >96.7%
- 하위유형 B 관주 사이의 동일성% : >98.4%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	89.4	89.4	89.2	89.4	89.4	89.5	89.2	89.2	89.2	89.0	89.2	89.4	89.2	89.2	89.2	RSV/A2.pro
2	11.5	98.6	99.0	99.0	98.4	99.0	99.1	98.8	98.8	98.0	99.1	99.0	99.1	99.0	99.1	RSV/B1.pro
3	11.5	14	99.3	99.3	98.8	99.3	99.0	99.3	99.3	99.1	99.3	99.5	98.6	98.8	98.8	RSV/B-SAB4SA98D1656.pro
4	11.7	1.1	0.7	99.7	99.1	99.7	99.3	99.5	99.5	99.5	99.7	99.8	99.0	99.1	99.1	RSV/B-GB3SA98D796.pro
5	11.5	1.1	0.7	0.3	99.1	99.7	99.3	99.5	99.5	99.5	99.1	99.3	99.0	99.1	99.1	RSV/B-GB3SA98D941.pro
6	11.5	1.6	1.2	0.9	0.9	99.5	98.8	99.0	99.0	99.0	99.3	98.4	98.6	98.6	98.6	RSV/B-GB4SA97D1107.pro
7	11.3	1.1	0.7	0.3	0.3	0.5	99.3	99.5	99.5	99.5	99.7	99.8	99.0	99.1	99.1	RSV/B-GB4SA98V/R468.pro
8	11.7	0.9	1.1	0.7	0.7	1.2	0.7	99.1	99.1	99.1	99.3	99.5	99.1	99.3	99.3	RSV/B-RSV2177.pro
9	11.7	1.2	0.7	0.5	0.5	1.1	0.5	0.9	100.0	99.3	99.5	99.7	98.8	99.0	99.0	RSV/B-SAB1SA010258K.pro
10	11.7	1.2	0.7	0.5	0.5	1.1	0.5	0.9	0.0	99.3	99.5	99.7	98.8	99.0	99.0	RSV/B-SAB1SA0100258K.pro
11	11.9	1.2	0.9	0.5	0.5	1.1	0.5	0.9	0.7	99.5	99.7	98.8	99.0	99.1	99.1	RSV/B-SAB2SA99V/800.pro
12	11.7	1.1	0.7	0.3	0.3	0.9	0.3	0.7	0.5	0.5	99.8	99.0	99.1	99.1	99.1	RSV/B-SAB3SA98V/R192.pro
13	11.5	0.9	0.5	0.2	0.2	0.7	0.2	0.5	0.3	0.3	0.2	99.1	99.3	99.3	99.3	RSV/B-SAB3SA010072K.pro
14	11.7	1.1	1.4	1.1	1.1	1.6	1.1	0.9	1.2	1.2	1.2	1.1	0.9	99.1	99.1	RSV-18537.pro
15	11.7	0.9	1.2	0.9	0.9	1.4	0.9	0.7	1.1	1.1	1.1	0.9	0.7	0.9	99.1	RSV-9320.pro

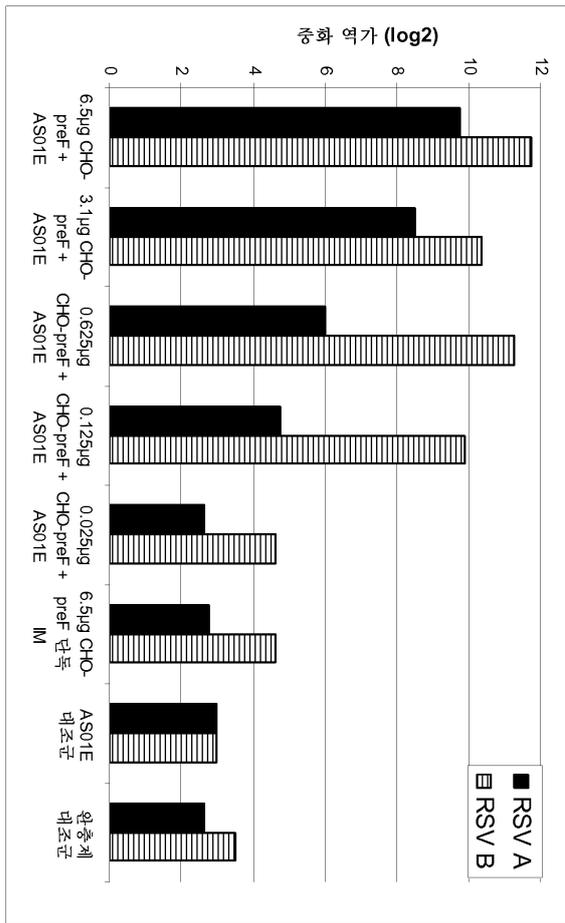
동일성%

도면6a



면역화된 마우스에서의 혈청학, CHO-pref

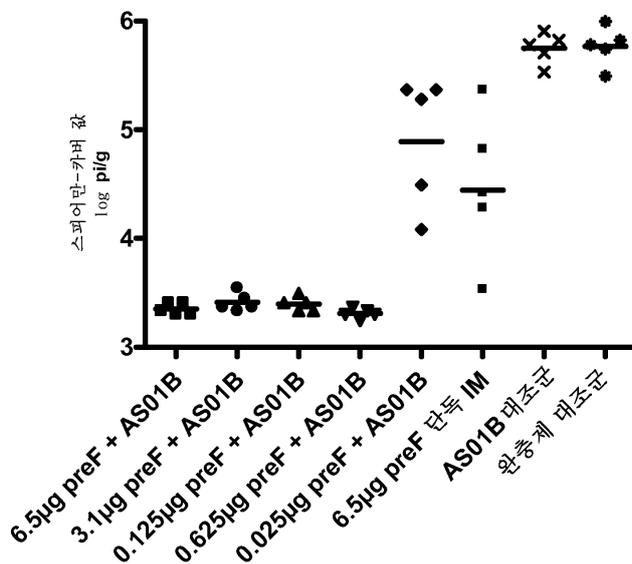
도면6b



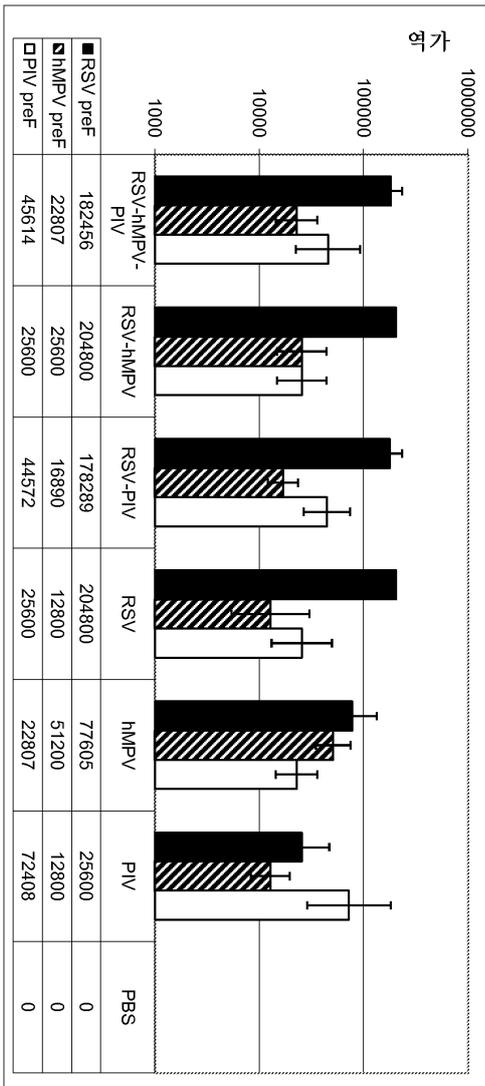
CHO-prefF 생체내 중화 역가의 평가

도면7

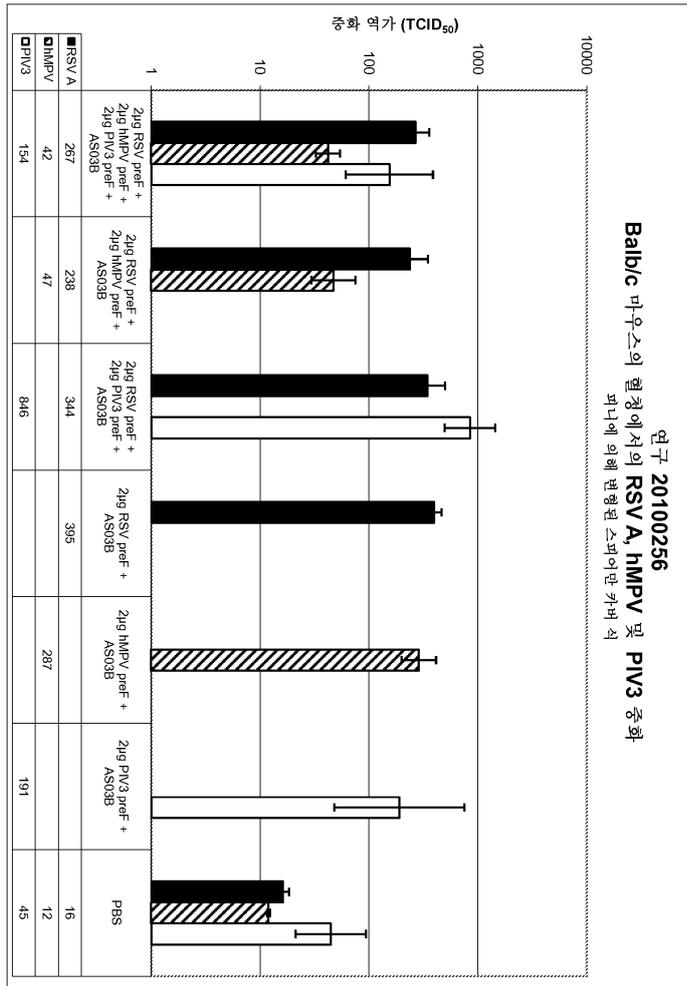
시험접종에 대한 CHO-prefF 보호



도면8a



도면8b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, SA
BLAIS, Normand
RHEAULT, Patrick
VAN-SCHERPENZEEL-THIM, Virginie
VASSILEV, Ventzislav

<120> VACCINE

<130> VU63732_PCT

<150> 61/219,958

<151> 2009-06-24

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1697

<212> DNA

<213> respiratory syncytial virus

<400> 1

```

atggagttgc taatcctcaa agcaaatgca attaccacaa tcctcactgc agtcacattt      60

gttttgcttc tggtaaaaac atcactgaag aattttatca atcaacatgc agtgcagtag      120
caaaggctat cttagtgtc tggaaactgg ttggtatacc agtgttataa ctatagatta      180
agtaatatca aggaaaaataa gtgtaatgga acagatgcta aggtaaaatt gataaacaag      240
aattagataa atataaaaat gctgtaacag aattgcagtt gctcatgcaa agcaccaccg      300
aacaacaat cgagccagaa gagaactacc aaggtttatg aattatacac tcaaaatgcc      360
aaaaaaacca atgtaacatt aagcaagaaa aggaaaagaa gatttcttgg tttttgttag      420
gtgttggatc tgcaatgcc agtggcgttg ctgtatctaa ggtcctgcac ctgaagggga      480

agtgaacaag atcaaaagtg ctctactatc cacaacaag gctgtagtca gttatcaaat      540
ggagttagtg tcttaaccag caaagtgtta gacctcaaaa actatataga aaacaattgt      600
tacctattgt gaacaagcaa agctgcagca tatcaaatat agcaactgta tagagtcca      660
acaaaagaac aacagactac tagagattac caggaattt agtgtaagc aggtgtaact      720
acacctgtaa gcacttacat gttactaat agtgaattat tgtcattatc aatgatatgc      780
ctatacaaaa tgatcagaaa aagttaatgt ccaacaatgt tcaaatgta gacagcaaag      840
ttactctatc atgtccataa taaaagagga agtcttagca tatgtgtaca attaccacta      900

tatggtgta tagatacacc ctgttggaaa ctacacacat cccctatgt acaaccaaca      960
caaaagaagg gtccaacatc tgtttaacaa gaactgacag aggtggtact gtgacaatgc      1020
aggatcagta tctttcttcc cacaagctga aacatgtaaa gtcaatcaaa tcgagtattt      1080
tgtgacacaa tgaacagttt aacattacca agtgaagtaa actctgcaat gttgacatat      1140
tcaaccccaa atatgattgt aaaattatga cttcaaaaac gatgtaagca gctccgttat      1200
cacatctcta ggagccattg tgteatgcta tggcaaaaaca aatgtacagc atccaataaa      1260
aatcgtggaa tcataaagac attttctaac ggtgctgata tgtatcaaat aaaggggtgg      1320

acactgtgtc tgtaggtaac acattatatt atgtaaaaag caagaaggta aaagtctcta      1380
tgtaaaagggt gaaccaataa taaatttcta tgacccttag tattcccctc tgatgaattt      1440
gatgcatcaa tatctcaagt caacgagaag attaacagag cctagcattt attcgtaaat      1500

```

ccgatgaatt attacataat gtaaagtctg gtaatccacc ataatatca tgataactac 1560
 tataattata gtgattatag taatattggt atcttaattg ctgttgact gctcttatac 1620
 tgtaaggcca gaagcacacc agtcacacta agaaagatca actgagtggg ataaataata 1680
 ttgcatttag taactaa 1697

<210> 2

<211> 574

<212> PRT

<213> respiratory syncytial virus

<400> 2

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30
 Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45
 Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60
 Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110
 Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Ala Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile

420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp

435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly

450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu

500 505 510
 Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Ile Asn Ile Met Ile Thr

515 520 525
 Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val

530 535 540
 Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn

565 570

<210> 3

<211> 897

<212> DNA

<213> respiratory syncytial virus

<400> 3

atgtcaaaa acaaggacca acgcaccgct aagacactag aaaagacctg ggacactctc 60

aatcatttat taitcatatc atcgggctta tataagttaa atcttaaate tatagcacia 120

atcacattat ccattctggc aatgataate tcaacttcac ttataattac agccatcata 180

ttcatagcct cggcaaacca caaagtcaca ctaacaactg caatcataca agatgaaca 240

agccagatca agaacacaac cccaacatac ctactcagg atcctcagct tggaatcagc 300

ttctccaate tgtctgaaat tacatcacia accaccacca tactagcttc aacaacacca 360

ggagtcaagt caaacctgca acccacaaca gtcaagacta aaaacacaac aacaacccaa 420

acacaacca gcaagccac taaaaaaca cgccaaaaca aaccaccaa caaaccaat 480
aatgatattt acttgaagt gtttaacttt gtaccctgca gcatatgcag caacaatcca 540
acctgctggg ctatctgcaa aagaatacca aacaaaaaac caggaaagaa aaccaccacc 600
aagcctacaa aaaaaccaac cttcaagaca accaaaaaag atctcaaacc tcaaaccact 660
aaaccaaagg aagtaccac caccaagccc acagaagagc caaccatcaa caccaccaa 720

acaaacatca caactacact gctcaccaac aacaccacag gaaatccaaa actcacaagt 780
caaatggaaa ccttccactc aacctctcc gaaggcaatc taagcccttc tcaagtctcc 840
acaacatccg agcaccatc acaacctca tctccacca acacaacacg ccagtag 897

<210> 4

<211> 298

<212> PRT

<213> respiratory syncytial virus

<400> 4

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Lys Thr
1 5 10 15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Gly Leu Tyr Lys
20 25 30

Leu Asn Leu Lys Ser Ile Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
35 40 45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Thr Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
50 55 60

Ala Asn His Lys Val Thr Leu Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
65 70 75 80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asp Pro Gln
85 90 95

Leu Gly Ile Ser Phe Ser Asn Leu Ser Glu Ile Thr Ser Gln Thr Thr
100 105 110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Asn Leu Gln Pro
115 120 125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn

145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys

165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys

180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe

195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Leu Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu

210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys

225 230 235 240

Thr Asn Ile Thr Thr Thr Leu Leu Thr Asn Asn Thr Thr Gly Asn Pro

245 250 255

Lys Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly

260 265 270

Asn Leu Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu His Pro Ser Gln

275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Thr Arg Gln

290 295

<210> 5

<211> 1620

<212> DNA

<213> human metapneumovirus

<400> 5

atgtcttggg aagtggatg cttttttca ttgctaataa cacctcaaca cggctttaa 60

gagagctacc tagaagaatc atgtagcact ataactgagg gatatttag tgttctgagg 120

acaggttggg ataccaactg ttttacatta gaggtgggtg atgtagaaaa cttacatgt 180

tctgatggac cttagcctaataaaaacagaa ttgatctga ccaaaagtgc actaagagag 240

ctcaaaaacag tctctgctga ccaattggca agagaggaac aaattgagaa tccagacaa 300

tctaggtttg ttctaggagc aatagcactc ggtgttgcaa cagcagctgc agtcacagca 360

ggtgttgcaa ttgccaaaac catccggcct gagagtgaag tcacagcaat taagaatgcc 420
 ctcaaaacga ccaatgaagc agtatctaca ttggggaatg gagttcgagt gttggcaact 480
 gcagtgagag agctgaaaga ctttgtgagc aagaatttaa ctctgtcaat caacaaaaac 540
 aagtgcgaca ttgatgacct aaaaatggcc gtttagcttca gtcaattcaa cagaaggttt 600
 ctaaatgttg tgcggcaatt ttcagacaat gctggaataa caccagcaat atctttggac 660

ttaatgacag atgctgaact agccagggcc gtttctaaca tgccgacatc tgcaggacaa 720
 ataaaatga tgttggagaa ccgtgcatg gtgcgaagaa aggggttcgg aatcctgata 780
 ggggtctacg ggagctccgt aatttcatg gtgcagctgc caatctttgg cgttatagac 840
 acgccttgct ggatagtaaa agcagcccct tcttgttccg aaaaaaggg aaactatgct 900
 tgcctcttaa gagaagacca aggggtggtat tgcagaatg cagggtcaac tgtttactac 960
 ccaaagaga aagactgtga aacaagagga gaccatgtct tttgcgacac agcagcggga 1020
 attaagtgtg ctgagcaatc aaaggagtgc aacatcaaca tatccactac aaattacca 1080

tgcaaagtca gcacaggaag acatcctatc agtatggttg cactgtctcc tcttggggct 1140
 ctggttgctt gctacaaagg agtaagctgt tccattggca gcaacagagt agggatcatc 1200
 aagcagctga acaagggttg ctctatata accaaccaag atgcagacac agtgacaata 1260
 gacaacactg tatatcagct aagcaaagt gaggggtgaac agcatgttat aaaagcaga 1320
 ccagtgtaaa gcagctttga tccaatcaag tttcctgaag atcaattcaa tgttgcaact 1380
 gaccaagttt ttgagaacat tgaaaacagc caggccttgg tagatcaatc aacagaatc 1440
 ctaagcagtg cagagaaagg gaatactggc ttcacattg taataattct aattgctgtc 1500

cttggtctta gcatgatcct agtgagcatc ttattataa tcaagaaaac aaagaaacca 1560
 acgggagcac ctccagagct gagggtgtc acaacaatg gcttcatacc acataattag 1620

<210> 6

<211> 539

<212> PRT

<213> human metapneumovirus

<400> 6

Met Ser Trp Lys Val Val Ile Ile Phe Ser Leu Leu Ile Thr Pro Gln
 1 5 10 15
 His Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Cys Ser Thr Ile Thr
 20 25 30
 Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Asn Val Phe

Ala Pro Ser Cys Ser Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Ala Cys Leu Leu Arg
 290 295 300
 Glu Asp Gln Gly Trp Tyr Cys Gln Asn Ala Gly Ser Thr Val Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Pro Asn Glu Lys Asp Cys Glu Thr Arg Gly Asp His Val Phe Cys Asp
 325 330 335
 Thr Ala Ala Gly Ile Asn Val Ala Glu Gln Ser Lys Glu Cys Asn Ile
 340 345 350
 Asn Ile Ser Thr Thr Asn Tyr Pro Cys Lys Val Ser Thr Gly Arg His
 355 360 365
 Pro Ile Ser Met Val Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ala Leu Val Ala Cys
 370 375 380
 Tyr Lys Gly Val Ser Cys Ser Ile Gly Ser Asn Arg Val Gly Ile Ile
 385 390 395 400
 Lys Gln Leu Asn Lys Gly Cys Ser Tyr Ile Thr Asn Gln Asp Ala Asp
 405 410 415
 Thr Val Thr Ile Asp Asn Thr Val Tyr Gln Leu Ser Lys Val Glu Gly
 420 425 430
 Glu Gln His Val Ile Lys Gly Arg Pro Val Ser Ser Ser Phe Asp Pro
 435 440 445
 Ile Lys Phe Pro Glu Asp Gln Phe Asn Val Ala Leu Asp Gln Val Phe
 450 455 460
 Glu Asn Ile Glu Asn Ser Gln Ala Leu Val Asp Gln Ser Asn Arg Ile
 465 470 475 480
 Leu Ser Ser Ala Glu Lys Gly Asn Thr Gly Phe Ile Ile Val Ile Ile
 485 490 495
 Leu Ile Ala Val Leu Gly Ser Ser Met Ile Leu Val Ser Ile Phe Ile
 500 505 510
 Ile Ile Lys Lys Thr Lys Lys Pro Thr Gly Ala Pro Pro Glu Leu Ser
 515 520 525
 Gly Val Thr Asn Asn Gly Phe Ile Pro His Asn

ataattatat tgtttataat taatgtaacg ataattataa ttgcagttaa gtattacaga 1560
attcaaaaga gaaatcgagt ggatcaaaat gataaacat atgtattaac aaacaaatga 1620

<210> 8
<211> 539
<212> PRT
<213> parainfluenza virus 3
<400> 8

Met Pro Thr Ser Ile Leu Leu Ile Ile Thr Thr Met Ile Met Ala Ser

1 5 10 15
Phe Cys Gln Ile Asp Ile Thr Lys Leu Gln His Val Gly Val Leu Val
 20 25 30
Asn Ser Pro Lys Gly Met Lys Ile Ser Gln Asn Phe Glu Thr Arg Tyr
 35 40 45
Leu Ile Leu Ser Leu Ile Pro Lys Ile Glu Asp Ser Asn Ser Cys Gly
 50 55 60
Asp Gln Gln Ile Lys Gln Tyr Lys Arg Leu Leu Asp Arg Leu Ile Ile

65 70 75 80
Pro Leu Tyr Asp Gly Leu Arg Leu Gln Lys Asp Val Ile Val Ser Asn
 85 90 95
Gln Glu Ser Asn Glu Asn Thr Asp Pro Arg Thr Lys Arg Phe Phe Gly
 100 105 110
Gly Val Ile Gly Thr Ile Ala Leu Gly Val Ala Thr Ser Ala Gln Ile
 115 120 125
Thr Ala Ala Val Ala Leu Val Glu Ala Lys Gln Ala Arg Ser Asp Ile

130 135 140
Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser
145 150 155 160
Val Gln Ser Ser Ile Gly Asn Leu Ile Val Ala Ile Lys Ser Val Gln
 165 170 175
Asp Tyr Val Asn Lys Glu Ile Val Pro Ser Ile Ala Arg Leu Gly Cys
 180 185 190

Glu Ala Ala Gly Leu Gln Leu Gly Ile Ala Leu Thr Gln His Tyr Ser
 195 200 205
 Glu Leu Thr Asn Ile Phe Gly Asp Asn Ile Gly Ser Leu Gln Glu Lys
 210 215 220
 Gly Ile Lys Leu Gln Gly Ile Ala Ser Leu Tyr Arg Thr Asn Ile Thr
 225 230 235 240
 Glu Ile Phe Thr Thr Ser Thr Val Asp Lys Tyr Asp Ile Tyr Asp Leu
 245 250 255
 Leu Phe Thr Glu Ser Ile Lys Val Arg Val Ile Asp Val Asp Leu Asn
 260 265 270
 Asp Tyr Ser Ile Thr Leu Gln Val Arg Leu Pro Leu Leu Thr Arg Leu
 275 280 285
 Leu Asn Thr Gln Ile Tyr Lys Val Asp Ser Ile Ser Tyr Asn Ile Gln
 290 295 300
 Asn Arg Glu Trp Tyr Ile Pro Leu Pro Ser His Ile Met Thr Lys Gly
 305 310 315 320
 Ala Phe Leu Gly Gly Ala Asp Val Lys Glu Cys Ile Glu Ala Phe Ser
 325 330 335
 Ser Tyr Ile Cys Pro Ser Asp Pro Gly Phe Val Leu Asn His Glu Met
 340 345 350
 Glu Ser Cys Leu Ser Gly Asn Ile Ser Gln Cys Pro Arg Thr Val Val
 355 360 365
 Thr Ser Asp Ile Val Pro Arg Tyr Ala Phe Val Asn Gly Gly Val Val
 370 375 380
 Ala Asn Cys Ile Thr Thr Thr Cys Thr Cys Asn Gly Ile Gly Asn Arg
 385 390 395 400
 Ile Asn Gln Pro Pro Asp Gln Gly Val Lys Ile Ile Thr His Lys Glu
 405 410 415
 Cys Asn Thr Ile Gly Ile Asn Gly Met Leu Phe Asn Thr Asn Lys Glu
 420 425 430
 Gly Thr Leu Ala Phe Tyr Thr Pro Asn Asp Ile Thr Leu Asn Asn Ser

aaaaaactga tgcacaaca cgtgcagatc gtgcggcagc agtcctacag catcatgagc 780
 atcatcaagg aagagggtct ggcctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac 840
 accccttget ggaagctgca cacctcccc ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggtcc 900
 aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc tggtaactgcg acaacgccgg ctccgtgtcc 960
 ttcttcctc tggccgagac ctgcaaggtg cagtccaacc ggggtttctg cgacaccatg 1020

aactccctga cctgccttc cgaggtgaac ctgtgcaaca tegacatctt caaccecaag 1080
 tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtgat cacctcctg 1140
 ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga 1200
 atcatcaaga ccttctcaa cggctgcgac tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg 1260
 tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag 1320
 ggcgagccta tcatcaactt ctacgacct ctggtgttcc cttccgacga gttcgacgcc 1380
 tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac cagtccctgg ccttcatcgg gaagtccgac 1440

gagaagctgc ataactgga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc 1500
 gagaacgaga tgccccgat caagaagctg atcggcgagg cctgataatc taga 1554

<210> 10

<211> 514

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic RSV PreF analog

<400> 10

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Thr Asn Ala Ile Thr Ala Ile Leu Ala

1 5 10 15

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe

20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu

35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile

50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys

65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu

	85	90	95
Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu			
	100	105	110
Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu			
	115	120	125
His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr			
	130	135	140
Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser			
145	150	155	160
Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile			
	165	170	175
Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu			
	180	185	190
Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser			
	195	200	205
Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn			
	210	215	220
Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln			
225	230	235	240
Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr			
	245	250	255
Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln			
	260	265	270
Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr			
	275	280	285
Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu			
	290	295	300
Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser			
305	310	315	320
Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe			
	325	330	335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
 340 345 350

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
 355 360 365

Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
 370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
 385 390 395 400

Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
 405 410 415

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
 420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
 435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
 450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
 465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
 485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
 500 505 510

Glu Ala

<210> 11

<211> 1536

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hMPV PreF analog

<400> 11

atgagctgga aggtggatcat catcttctcc ctgctgatca cccccagca cggcctgaaa

60

gagtcctacc tggaagagtc ctgctccacc atcaccgagg gctacctgtc cgtgctgcgg 120

accggctggt acaccaatgt gttcaccttg gaagtgggcg acgtggaaaa cctgacctgc 180

tccgacggcc ccagcctgat caagaccgag ctggacctga ccaagtccgc cctgcgcgag 240

ctgaaaaccg tgtccgccga ccagctggcc agagaggaac agatcgagaa cccaagcag 300

tccaagttag tctggtggcg tctcggcctg ggcgtggcaa ccgctgctgc tgtgaccgt 360

ggcgtggcca ttgccaagac catecggctg gaatccgaag tgaccgcat caagaacgcc 420

ctgaaaacca ccaacgaggc cgtgtccacc ctgggcaatg gcgtgcggt gctggctacc 480

ggcgtgctgg aactgaagga cttcgtgtcc aagaacctga ccagggccat caacaagaac 540

aagtgcgaca tcgacgacct gaagatggcc gtcagcttca gccagttcaa cggcggttc 600

ctgaactgg tccgacagtt ctccgacaac gccggcatca cccccccat ctccctggac 660

ctgatgaccg atgccgagct gcccagggcc gtgtctaaca tgeccacctc tgcccggccag 720

atcaagctga tcttgaaaa cgggctatg gtccgacgga agggcttcgg catcctgatc 780

ggcgtgtacg gtcctccgt gatctacatg gtgcagctcc ccatcttcgg cgtgatcgac 840

acccctgct ggatcgtgaa ggccgctccc agctgctccg agaagaaggg caactacgcc 900

tgctctgta gagaggacca gggctggtac tgccagaacg ccggctccac cgtgtactac 960

cccaacgaga aggactgcga gacacggggc gaccacgtgt tctgcgacac cgccctggc 1020

atcaactgg ccgagcagtc caaagagtgc aacatcaaca tctccaccac caactacccc 1080

tgcaaggtgt ccaccggcag acaccccatc agcatggtgg ccctgagccc tctgggcgct 1140

ctggtggctt gctacaaggg cgtgtcctgc tctatcggct ccaacagagt gggcatcacc 1200

aagcagctga acaagggtg ctctacatc accaaccagg acgccgacac cgtgaccatc 1260

gacaacaccg tgtaccagct gtccaagtg gaaggcgagc agcacgtgat caaggcgaga 1320

cccgtgtcct ccagcttga ccccatcaag tccccgagg accagttcaa tgtggccctg 1380

gaccaggtgt tcgagccat cgagaactcc caggccctgg tggaccagtc caacagaatc 1440

ctgtcctctg ccgaggataa gatcgaggaa atcctgtcca aaatctacca catcgagaac 1500

gagatcgccc ggatcaagaa gctgatcggc gaggcc 1536

<210> 12

<211> 512

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic hMPV Pref analog

<400> 12

Met Ser Trp Lys Val Val Ile Ile Phe Ser Leu Leu Ile Thr Pro Gln
 1 5 10 15
 His Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Cys Ser Thr Ile Thr
 20 25 30
 Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Asn Val Phe
 35 40 45
 Thr Leu Glu Val Gly Asp Val Glu Asn Leu Thr Cys Ser Asp Gly Pro
 50 55 60
 Ser Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Leu Thr Lys Ser Ala Leu Arg Glu
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Val Ser Ala Asp Gln Leu Ala Arg Glu Glu Gln Ile Glu
 85 90 95
 Asn Pro Lys Gln Ser Lys Phe Val Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Val
 100 105 110
 Ala Thr Ala Ala Ala Val Thr Ala Gly Val Ala Ile Ala Lys Thr Ile
 115 120 125
 Arg Leu Glu Ser Glu Val Thr Ala Ile Lys Asn Ala Leu Lys Thr Thr
 130 135 140
 Asn Glu Ala Val Ser Thr Leu Gly Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Thr
 145 150 155 160
 Ala Val Arg Glu Leu Lys Asp Phe Val Ser Lys Asn Leu Thr Arg Ala
 165 170 175
 Ile Asn Lys Asn Lys Cys Asp Ile Asp Asp Leu Lys Met Ala Val Ser
 180 185 190
 Phe Ser Gln Phe Asn Arg Arg Phe Leu Asn Val Val Arg Gln Phe Ser
 195 200 205
 Asp Asn Ala Gly Ile Thr Pro Ala Ile Ser Leu Asp Leu Met Thr Asp
 210 215 220
 Ala Glu Leu Ala Arg Ala Val Ser Asn Met Pro Thr Ser Ala Gly Gln
 225 230 235 240
 Ile Lys Leu Met Leu Glu Asn Arg Ala Met Val Arg Arg Lys Gly Phe

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ala

500 505 510

<210> 13

<211> 1536

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding PIV-3 PreF analog

<400> 13

atgcccacct ccacctctgct gatcatcaca accatgatca tggccagctt ttgccagatc 60

gacatcacca agctccagca cgtgggcgtg ctggtcaact cccccaaggg catgaagatc 120

agccagaact tcgagacagc ctacctgatc ctgtccctga tcccgaagat cgaggactcc 180

aactcctgcg gcgaccagca gatcaagcag tacaagcggc tgcctggaccg gctgatcatc 240

cccctgtacg acggcctgcg gctccagaaa gacgtgatcg tgtccaacca ggaatccaac 300

gagaacaccg accccaagac caagaaattc ttcggcggcg tgatcggcac aatcgccctg 360

ggcgtggcca cctctgcca gatcaccgct gccgtggccc tgggtggaagc caagcaggcc 420

agaagcgaca tcgagaagct gaaagaggcc atccgggaca ccaacaaggc cgtgcagagc 480

gtgcagtcct ccacggcaa cctgatcgtg gccatcaagt ccgtgcagga ctacgtgaac 540

aaagaaatcg tgcctctat cgcccggctg ggctgtgaag ctgccggcct ccagctggga 600

atcgccctga ccagcaacta ctccgagctg accaacaatc tggcgacaa catcggcagc 660

ctccaggaaa agggcatcaa gctccaggga atcgctccc tgtaccggac caacatcacc 720

gagattttca ccacctcac cgtggataag tacgacatc acgacctgct gttcaccgag 780

tccatcaaag tgcgcgtgat cgacgtggac ctgaacgact acagcatcac cctccaggtc 840

cgactgcccc tgctgaccgg gctgctgaac acccaaatc acaaggtgga ctccatctcc 900

tacaacatcc agaacagaga gtggtacatc cccctgcct cccacattat gaccaagggc 960

gccttctctg gcgagccga cgtgaaagag tgcacgagg ctttctccag ctacatctgc 1020

ccctccgacc cggccttctg gctgaaccac gagatggaat cctgcctgtc cggcaacatc 1080

tcccagtgcc cccggaccgt ggtcaatcc gacatcgtgc ccagatacgc cttcgtgaac 1140

ggcggcgtgg tggccaactg catcaccacc acctgtacct gcaacggcat cggcaacaga 1200

atcaaccagc cccccacca gggcgtgaag attatcacc acaaagagt caacaccatc 1260

ggcatcaacg ggatgctgtt caacaccaac aaagagggca cctggcctt ctacaccccc 1320

aacgacatca cctgaacaa ctctgtggcc ctggaccca tcgacatctc catcgagctg 1380

aacaaggcca agtccgacct ggaagagtcc aaagagtgga tcagacggtc caaccagaag 1440
 ctggacagca tcgaggacaa gatcgaagag atcctgtcca aaatctacca catcgagaac 1500
 gagatgccc ggatcaagaa gctgatcggc gaggcc 1536

<210> 14

<211> 512

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic PIV-3 PreF analog

<400> 14

Met Pro Thr Ser Ile Leu Leu Ile Ile Thr Thr Met Ile Met Ala Ser
 1 5 10 15

Phe Cys Gln Ile Asp Ile Thr Lys Leu Gln His Val Gly Val Leu Val
 20 25 30

Asn Ser Pro Lys Gly Met Lys Ile Ser Gln Asn Phe Glu Thr Arg Tyr
 35 40 45

Leu Ile Leu Ser Leu Ile Pro Lys Ile Glu Asp Ser Asn Ser Cys Gly
 50 55 60

Asp Gln Gln Ile Lys Gln Tyr Lys Arg Leu Leu Asp Arg Leu Ile Ile
 65 70 75 80

Pro Leu Tyr Asp Gly Leu Arg Leu Gln Lys Asp Val Ile Val Ser Asn
 85 90 95

Gln Glu Ser Asn Glu Asn Thr Asp Pro Lys Thr Lys Lys Phe Phe Gly
 100 105 110

Gly Val Ile Gly Thr Ile Ala Leu Gly Val Ala Thr Ser Ala Gln Ile
 115 120 125

Thr Ala Ala Val Ala Leu Val Glu Ala Lys Gln Ala Arg Ser Asp Ile
 130 135 140

Glu Lys Leu Lys Glu Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser
 145 150 155 160

Val Gln Ser Ser Ile Gly Asn Leu Ile Val Ala Ile Lys Ser Val Gln
 165 170 175

Asp Tyr Val Asn Lys Glu Ile Val Pro Ser Ile Ala Arg Leu Gly Cys

Gly Thr Leu Ala Phe Tyr Thr Pro Asn Asp Ile Thr Leu Asn Asn Ser
 435 440 445

Val Ala Leu Asp Pro Ile Asp Ile Ser Ile Glu Leu Asn Lys Ala Lys
 450 455 460

Ser Asp Leu Glu Glu Ser Lys Glu Trp Ile Arg Arg Ser Asn Gln Lys
 465 470 475 480

Leu Asp Ser Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
 485 490 495

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ala
 500 505 510

<210> 15

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic isoleucine zipper

<400> 15

Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn
 1 5 10 15

Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ala
 20 25