

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-533332

(P2016-533332A)

(43) 公表日 平成28年10月27日(2016.10.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 9/51 (2006.01)	A61K 9/51	4B065
A61K 39/12 (2006.01)	A61K 39/12	4C076
A61K 47/48 (2006.01)	A61K 47/48	4C085
A61K 47/42 (2006.01)	A61K 47/42	4H045
A61K 47/36 (2006.01)	A61K 47/36	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-516958 (P2016-516958)	(71) 出願人	596060697 マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 39ケンブリッジ、マサチューセッツ・ア ヴェニュー・77
(86) (22) 出願日	平成26年9月24日 (2014.9.24)	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(85) 翻訳文提出日	平成28年5月20日 (2016.5.20)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葵
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/057240	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(87) 國際公開番号	W02015/048149	(74) 代理人	100138911 弁理士 櫻井 陽子
(87) 國際公開日	平成27年4月2日 (2015.4.2)		
(31) 優先権主張番号	61/881,848		
(32) 優先日	平成25年9月24日 (2013.9.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】自己集合型ナノ粒子ワクチン

(57) 【要約】

本発明は、準安定ウイルスタンパク質（例えばRSV Fタンパク質）と自己集合性分子（例えばフェリチン、HSP）とを、これらキーウィルスタンパク質の融合前コンフォメーション状態が、自己集合して多面体形状を構築するタンパク質と共に保全され（かつ固定され）るように併せ持ち、よって有効なワクチン剤であるナノ粒子をもたらす、さまざまなコンストラクトのナノ粒子および組成物を提供する。本発明は、ウイルス融合タンパク質またはそのフラグメントもしくは変異体と自己集合性分子とを含むナノ粒子、ならびにそれを含む免疫原性組成物およびワクチン組成物も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

呼吸器合胞体ウイルス (RSV) Fタンパク質またはそのフラグメントと自己集合性分子とを含むナノ粒子であって、前記自己集合性分子が準安定融合前コンフォメーションにある前記Fタンパク質またはそのフラグメントを捕捉する多量体アセンブリを形成し、よってナノ粒子を形成する、ナノ粒子。

【請求項 2】

前記Fタンパク質がF1およびF2ヘテロ二量体を含む、請求項1に記載のナノ粒子。

【請求項 3】

前記Fタンパク質フラグメントがエクトドメインを含む、請求項1に記載のナノ粒子。 10

【請求項 4】

前記Fタンパク質フラグメントが7アミノ酸リピートAドメイン (HRA) および7アミノ酸リピートCドメイン (HRC) を含む、請求項1に記載のナノ粒子。

【請求項 5】

前記Fタンパク質フラグメントが、HRAドメイン、HRCドメイン、ならびにF1ドメインIおよびIIを含む、請求項1に記載のナノ粒子。

【請求項 6】

前記Fタンパク質フラグメントが、HRAドメイン、HRCドメイン、F1ドメインIおよびII、ならびに7アミノ酸リピートBドメイン (HRB) を含む、請求項1に記載のナノ粒子。

【請求項 7】

1つ以上のF1およびF2のホモ三量体を含む、請求項1に記載のナノ粒子。

【請求項 8】

前記Fタンパク質が配列番号1～12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のナノ粒子。 20

【請求項 9】

前記Fタンパク質が前記自己集合性分子に共有結合で取り付けられている、請求項1から8のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 10】

前記Fタンパク質が前記自己集合性分子に遺伝子レベルで融合されている、請求項1から9のいずれか一項に記載のナノ粒子。 30

【請求項 11】

前記自己集合性分子が、タンパク質、ペプチド、核酸、ウイルス様粒子、ウイルスキヤプシド、脂質、および糖質からなる群より選択される、請求項1から10のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 12】

前記自己集合性分子が集合して多面体対称性を有するシェルを構築する、請求項11に記載のナノ粒子。

【請求項 13】

前記シェルが八面体対称性を有する、請求項12に記載のナノ粒子。

【請求項 14】

前記シェルが前記自己集合性分子の単量体を24個含む、請求項13に記載のナノ粒子。 40

【請求項 15】

前記自己集合性分子が、フェリチン、熱ショックタンパク質、およびDspからなる群より選択されるタンパク質である、請求項11に記載のナノ粒子。

【請求項 16】

前記自己集合性分子がフェリチンである、請求項15に記載のナノ粒子。

【請求項 17】

前記フェリチンタンパク質が配列番号13～17からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項16に記載のナノ粒子。

【請求項 18】

50

前記自己集合性分子が熱ショックタンパク質、例えばsHSP(小分子熱ショックタンパク質)、HSP100、HSP90、HSP70、およびHSP60である、請求項15に記載のナノ粒子。

【請求項19】

前記熱ショックタンパク質が配列番号36～42からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項18に記載のナノ粒子。

【請求項20】

前記Fタンパク質と自己集合性分子とがリンカーを使って取り付けられている、請求項1から19のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項21】

前記リンカーが、前記自己集合性分子とFタンパク質との間の立体障害を防止するのに十分な長さを有する、請求項20に記載のナノ粒子。

【請求項22】

前記リンカーがgly-serリンカーである、請求項20に記載のナノ粒子。

【請求項23】

前記リンカーが約4～7アミノ酸長である、請求項22に記載のナノ粒子。

【請求項24】

前記Fタンパク質のアミノ酸配列が細胞からの分泌を容易にするためのN末端リーダーをさらに含む、請求項1から23のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項25】

前記N末端リーダーが、配列番号51～53からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項24に記載のナノ粒子。

【請求項26】

請求項1から25のいずれか一項に記載のナノ粒子と医薬上許容される担体とを含む免疫原性組成物。

【請求項27】

さらにアジュバントを含む、請求項26に記載の免疫原性組成物。

【請求項28】

請求項1から25のいずれか一項に記載のナノ粒子を含むワクチン組成物であって、融合前コンフォメーションにあるFタンパク質ホモ三量体が、前記自己集合分子の多量体アセンブリによって形成されるシェルの表面にディスプレイされている、ワクチン組成物。

【請求項29】

さらにアジュバントを含む、請求項28に記載のワクチン組成物。

【請求項30】

配列番号18～21、24～27、および30～33からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質-フェリチン融合タンパク質。

【請求項31】

配列番号22、23、28、29、34、および35からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質-熱ショックタンパク質融合タンパク質。

【請求項32】

請求項1から25、30および31のいずれか一項に記載のナノ粒子または融合タンパク質と使用説明書とを含むキット。

【請求項33】

RSV感染を阻害および/または防止する抗体を生産する方法であって、請求項1から31のいずれか一項に記載のナノ粒子、免疫原性組成物、ワクチン組成物、または融合タンパク質を対象に投与することを含む方法。

【請求項34】

前記対象から抗体を単離することをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

RSVに対するワクチンを生産する方法であって、a) 单量体型自己集合分子とRSV Fタンパク質とを含む複合体を、融合前コンフォメーションにあるFタンパク質三量体が前記自

10

20

30

40

50

自己集合分子の多量体化によって形成されるシェルの表面にディスプレイされるような条件下で、発現させること、およびb) Fタンパク質をディスプレイしているシェルを回収することを含む方法。

【請求項 3 6】

RSVに対するワクチン接種を対象に行う方法であって、請求項 3 3 に記載のワクチンを前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 3 7】

前記リンカーを取り付けるFタンパク質上の箇所が、配列番号1の位置513にあるロイシンであり、前記リンカーを取り付けるフェリチン上の箇所が配列番号13の位置5にあるアスパラギン酸である、請求項 3 6 に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

請求項 1 から 2 5 、 3 0 および 3 1 のいずれか一項に記載のナノ粒子または融合タンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項 3 9】

請求項 3 8 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載の核酸を含む単離された細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

20

関連出願

本願は、2013年9月24日に出願された米国仮特許出願第61 / 881,848号に基づく優先権と同仮特許出願の利益とを主張し、その内容は全て引用により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

ヒト呼吸器合胞体ウイルス (RSV) は、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のネガティブセンス一本鎖RNAウイルスであり、パラミクソウイルスのニューモウイルス亜科 (Pneumovirinae) の一メンバーである。RSVは幼児における下気道感染症の主原因であり、小児が人生の最初の数年間に何度も病院を受診する結果を招くことが多い。事実、RSVの自然感染後に生じる防御免疫は時間の経過と共に衰弱するので、RSVによる感染は複数回起こる可能性があり、乳児によっては、1シーズンに2回以上、RSVに感染する場合もある。幼児におけるRSVの予防的処置も利用できるが、RSVに対するワクチンを生産しようとするこれまでの努力は不成功に終わっている。RSVタンパク質は複雑であるため、均一な免疫原性タンパク質調製物を得ることは困難である。したがって、改良されたRSVタンパク質組成物およびワクチン、ならびにそれを生産するための改良された方法が必要とされている。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 3】

40

いくつかのウイルス（例えばRSV、フラビウイルス（例えばデングウイルス、ウエストナイルウイルス）、およびHIV）に対するワクチン開発にとって大きな課題の一つは、「融合前」状態にあるキーウィルスタンパク質を「捕捉」することである。「融合前」状態にあるキーウィルスタンパク質は、宿主細胞とのウイルスの融合にとって不可欠なウイルスタンパク質上の重要残基を「提示する」ので、極めて重要である。この状態にあるこれらのウイルスタンパク質は迅速に融合してコンフォメーション変化を起こすので、通常、それらを捕捉することは困難である。したがって、これらの「準安定(meta-stable)」ウイルスタンパク質の「融合前」状態を保全し、かつ「固定」する機構を創製することにより、これらのウイルス性因子に対して、より有効なワクチンの開発が可能になるであろう。したがって、準安定ウイルスタンパク質をその融合前状態で固定することを可能にする

50

方法は、大いに望ましい。

【0004】

自己集合性ナノ粒子の概念を応用して新しいワクチン技術が創製された。フェリチンや熱ショックタンパク質(HSP)などの分子は、自然に集合して多面体形状を構築することが知られている。自己集合性タンパク質に準安定ウイルスタンパク質を遺伝子レベルで取り付けることにより、さまざまな多面体ナノ粒子が創製される。それぞれの融合前状態にある準安定ウイルスタンパク質を組み込んだタンパク質に基づくナノ粒子は、これらのウイルス性因子に対する有効なワクチンとして使用することができる。しかし、有効なワクチンの設計に際して、そのようなタンパク質をそのN末端またはC末端を介してフェリチンや熱ショックタンパク質などの自己集合分子に連結するだけで適正な配向が保全されまたは準安定ウイルスタンパク質のコンフォメーションが固定されることになるかどうかは自明ではないので、準安定ウイルスタンパク質に自己集合系を使用することには、大きな制約または課題がある。したがって、準安定ウイルスタンパク質に基づくナノ粒子の創製に際して考慮すべき重要な事項は、自己集合性分子に準安定タンパク質を取り付ける方法であって、分子の自己集合を妨害せず、しかも準安定タンパク質をその融合前コンフォメーションに固定するような方法である。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明では、例示的準安定ウイルスタンパク質(例えばRSV Fタンパク質)と自己集合性分子(例えばフェリチン、HSP)とを、それらキーウイルスタンパク質の融合前コンフォメーション状態が、自己集合して多面体形状を構築するタンパク質と共に保全され(かつ固定され)るように併せ持ち、よって有効なワクチン剤であるナノ粒子をもたらす、さまざまなコンストラクトのナノ粒子および組成物の概略を記す。

20

【0006】

本発明は、概して、ウイルス融合タンパク質またはそのフラグメントもしくは変異体と自己集合性分子とを含むナノ粒子、ならびにそれを含む免疫原性組成物およびワクチン組成物に関する。

【0007】

したがって一態様において、本発明は、ウイルス融合タンパク質、例えば呼吸器合胞体ウイルス(RSV)Fタンパク質またはそのフラグメント(例えば切断体)と、自己集合性分子とを含むナノ粒子であって、自己集合性分子が、準安定融合前コンフォメーションにあるウイルス融合タンパク質(例えばFタンパク質)またはそのフラグメントを捕捉する多量体アセンブリを形成し、よってナノ粒子を形成するものに関する。

30

【0008】

いくつかの態様において、本発明は、本発明のナノ粒子と医薬上許容される担体とを含む免疫原性組成物に関する。いくつかの実施形態では、前記免疫原性組成物がアジュvantを含む。

【0009】

いくつかの態様において、本発明は、本発明のナノ粒子を含むワクチン組成物であって、融合前コンフォメーションにあるウイルス融合タンパク質ホモ三量体、例えばFタンパク質ホモ三量体が、前記自己集合分子の多量体アセンブリによって形成されるシェルの表面にディスプレイされているものに関する。いくつかの実施形態では、前記ワクチンがアジュvantを含む。

40

【0010】

いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質が、クラスI、IIまたはIII融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質が、二量体型または三量体型の四次構造をとる。

【0011】

いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質が、パラミクソウイルス科、フラビウイルス科、またはレトロウイルス科のウイルス融合タンパク質である。いくつかの

50

実施形態では、前記フラビウイルス科ウイルス融合タンパク質がフラビウイルスである。いくつかの実施形態では、前記フラビウイルスが、ウエストナイルウイルス、デングウイルスまたは黄熱ウイルスである。別の実施形態では、前記ウイルスがデングウイルスであり、前記融合タンパク質がEタンパク質である。いくつかの実施形態では、前記パラミクソウイルス科ウイルス融合タンパク質が、パラミクソウイルス亜科またはニューモウイルス亜科のウイルス、例えばアブラウイルス(Avularvirus)、レスピロウイルス、およびニューモウイルスである。いくつかの実施形態では、前記ウイルスが、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、および呼吸器合胞体ウイルス(RSV)である。別の実施形態では、前記ウイルスがRSVであり、前記融合タンパク質がFタンパク質である。

【0012】

10

いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質またはそのフラグメントが、膜貫通ドメインおよび細胞質テール(cytotail)ドメインを欠く(アミノ酸1~524;配列番号2)。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質またはそのフラグメントが、膜貫通ドメインおよび細胞質テールドメインならびにHRBドメインの一部を欠く(アミノ酸1~513;配列番号3)。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質が、F1およびF2ヘテロ二量体を含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質またはそのフラグメントが、F1ドメイン(例えばアミノ酸137付近からアミノ酸524付近まで(配列番号5)、またはアミノ酸137付近からアミノ酸513付近まで(配列番号6))を含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質またはそのフラグメントが、N末端配列MELLILKANAITTILTAVTFCFASG(配列番号54)を持たないFタンパク質またはそのフラグメントを含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質フラグメントが、エクトドメインを含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質フラグメントが、7アミノ酸リピートAドメイン(HRA)および7アミノ酸リピートCドメイン(HRC)を含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質フラグメントが、HRAドメイン、HRCドメイン、ならびにF1ドメインIおよびIIを含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質フラグメントが、HRAドメイン、HRCドメイン、F1ドメインIおよびII、ならびに7アミノ酸リピートBドメイン(HRB)を含む。いくつかの実施形態では、前記ナノ粒子が、F1およびF2のホモ三量体を1つ以上含む。

20

【0013】

いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質が、配列番号1~12に示すアミノ酸配列を含む。

30

【0014】

いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質、例えばFタンパク質が、前記自己集合性分子に共有結合で取り付けられている。

【0015】

いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質、例えばFタンパク質(例えば配列番号1~12のFタンパク質)が、前記自己集合性分子に遺伝子レベルで融合されている。

【0016】

いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子が、タンパク質性または非タンパク質性である。いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子が、タンパク質、ペプチド、核酸、ウイルス様粒子、ウイルスキヤプシド、脂質、または糖質である。いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子が集合して八面体対称性などの多面体対称性を有するシェルを構築する。いくつかの実施形態では、前記シェルが、前記自己集合性分子の単量体を24個含む。

40

【0017】

いくつかの実施形態では、自己集合性分子が、フェリチン、熱ショックタンパク質、Ds_p、ルマジンシンターゼまたはMrgAである。いくつかの実施形態では、前記フェリチンタンパク質が、配列番号13~17に示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子が、sHSP(小分子熱ショックタンパク質)、HSP100、HSP90、HSP70、およびHSP60などの熱ショックタンパク質である。いくつかの実施形態では、前記熱ショック

50

タンパク質が、配列番号36～42に示すアミノ酸配列を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質（例えばFタンパク質）と自己集合性分子とが、アミノ酸リンカー（例えばgly-serリンカー）などのリンカーを使って取り付けられている。いくつかの実施形態では、前記リンカーが(GlySer)_nリンカーである。いくつかの実施形態では、前記リンカーが、前記自己集合性分子とウイルス融合タンパク質（例えばFタンパク質）との間の立体障害を防止するのに十分な長さを有する。例えば、いくつかの実施形態では、前記リンカーが約5～7アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、前記リンカーを取り付けるFタンパク質上の箇所が、配列番号1の位置513にあるロイシンであり、リンカーを取り付けるフェリチン上の箇所が配列番号13の位置5にあるアスパラギン酸である。

10

【0019】

いくつかの実施形態では、トランスフェクト細胞（例えば293細胞）から培養培地への組換えタンパク質の効果的な分泌が容易になるように、前記ウイルス融合タンパク質（例えばFタンパク質）がさらにN末端リーダーを含む。N末端リーダー配列としては、配列番号51～53に示すものが挙げられるが、これらに限るわけではない。

【0020】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号18～21、24～27、または30～33に示すアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質・フェリチン融合タンパク質に関する。

20

【0021】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号22、23、28、29、34、または35に示すアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質・熱ショックタンパク質融合タンパク質に関する。

【0022】

もう一つの態様において、本発明は、RSV感染を阻害および／または防止する抗体を生産する方法であって、本発明のナノ粒子、免疫原性組成物、ワクチン組成物、または融合タンパク質を対象に投与することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、前記抗体が前記対象から単離される。

【0023】

もう一つの態様において、本発明は、RSVに対するワクチンを生産する方法であって、a) 単量体型自己集合分子とRSV Fタンパク質とを含む複合体を、融合前コンフォメーションにあるFタンパク質三量体が前記自己集合分子の多量体化によって形成されるシェルの表面にディスプレイされるような条件下で、発現させること、およびb) Fタンパク質をディスプレイしているシェルを回収することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、前記対象が、本発明のワクチンを使って、RSVに対するワクチン接種を受ける。

30

【0024】

さらにもう一つの態様において、本発明は、本発明のナノ粒子または融合タンパク質をコードする単離された核酸、前記核酸を含むベクター、および前記核酸を含む単離された細胞に関する。

【0025】

さらにもう一つの態様において、本発明は、本発明のナノ粒子または融合タンパク質と使用説明書とを含むキットに関する。

40

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】RSV Fタンパク質の概略図である。タンパク質ドメインはこの図に指定されている。

【図2】八面体対称性の24個の対称ドメインのそれぞれを占める24個のフェリチン単量体から構成されたフェリチンシェル（フェリチンケージ）の構造を示している。

【図3】自己集合して八面体対称性を有するシェルを構築する24個の単量体から構成された熱ショックタンパク質シェル（HSPケージ）の構造を示す。

【図4】フェリチン単量体上の3つの「等価な」箇所を示す。これらの箇所をつなぐと、

50

三回対称軸上に重心を持つ三角形が得られる。

【図5】RSV Fタンパク質三量体とフェリチン三量体とが同じ三回軸に沿って配向するプロセスを示す。各RSV Fタンパク質単量体は、Leu513で、フェリチン単量体のAsp5残基に連結される。これらの残基セットのそれぞれをつなぐと、辺長がRSV Fタンパク質三量体の場合は12.1オングストローム、フェリチン三量体の場合は28.7オングストロームである2つの正三角形が形成される。

【図6】図6Aは、リンカーを介してフェリチン単量体に連結されたRSV Fタンパク質単量体の構造を示す。図6Bは、図6Aに示したリンカーの拡大図である。

【図7】全部で24個のFタンパク質が三回軸の周りに配向している八面体フェリチン-Fタンパク質ナノ粒子を示す。

【図8】例示的RSVFタンパク質-リンカー-ヘリコバクター・ピロリ・フェリチン(HypF)（「RSVF-HypF」）融合タンパク質のアミノ酸配列を示す（配列番号30）。リーダー配列（ヒトCD5リーダー配列）を通常フォントで示し、RSV Fドメインをボールド体で示し、リンカーをイタリック体で示し、HypFドメインを下線付きボールド体で示す。

【図9】2つの異なる細胞密度でプレーティングした293F細胞におけるRSVF-HypF融合タンパク質の経時的発現をウェスタンプロットで示す。3日目、4日目、5日目、および6日目に上清を収集した。検出には融合前状態のRSV Fタンパク質を特異的に検出するD25抗体を使用した。分子量から、このバンドは三量体に相当すること、およびタンパク質が融合前状態で発現していることが示唆される。

【図10】図9のRSVF-HypF融合タンパク質の精製を示す。NaCl勾配を使ってタンパク質をカラムから溶出させた。モノクローナルD25抗体を使って全ての溶出画分を検出した。

【発明を実施するための形態】

【0027】

詳細な説明

定義

特許請求の範囲および明細書において使用する用語は、別段の明示がある場合を除き、以下に示すように定義される。親仮特許出願において使用した用語とあからさまな矛盾が生じた場合は、本明細書において使用される用語が優先されるものとする。

【0028】

「アミノ酸」とは、天然アミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同じように機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を意味する。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされているもの、ならびに後から修飾されたアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体とは、天然アミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合した炭素を有する化合物、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムなどを意味する。そのような類似体は修飾されたR基を有するか（例えばノルロイシン）、修飾されたペプチド主鎖を有するが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持している。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同じように機能する化学化合物を意味する。

【0029】

本明細書では、アミノ酸を、IUPAC-IUB生化学命名委員会の勧告に従い、それぞれのよく知られた三文字記号で言及する場合も、一文字記号で言及する場合もある。同様に、又クレオチドも、広く受け入れられている一文字コードで言及する場合がある。

【0030】

「アミノ酸置換」とは、予め決定されたアミノ酸配列（出発ポリペプチドのアミノ酸配列）中の少なくとも1つの既存アミノ酸残基をもう一つの異なる「交換」アミノ酸残基と交換することを意味する。「アミノ酸挿入」とは、予め決定されたアミノ酸配列中に、少なくとも1つの追加アミノ酸を組み入れることを意味する。通常、挿入は1つまたは2つのアミノ酸残基の挿入からなるであろうが、より大きな「ペプチド挿入」、例えば約3～約5

10

20

30

40

50

アミノ酸残基、さらには約10、15、または20アミノ酸残基までの挿入を行うこともできる。挿入される残基は上に開示した天然残基であっても非天然残基であってもよい。「アミノ酸欠失」とは、予め決定されたアミノ酸配列から少なくとも1つのアミノ酸残基を除去することを意味する。

【0031】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを意味するために、本明細書では可換的に使用される。これらの用語は、天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸多量体だけでなく、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の人工的化学模倣体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

【0032】

「核酸」とは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、および一本鎖の形態または二本鎖の形態にあるそれらのポリマーに関する場合を除き、この用語は、参照核酸と類似する結合特性を有し、天然ヌクレオチドと同じように代謝される、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含有する核酸を包含する。別段の表示がある場合を除き、ある特定核酸配列は、明示した配列だけでなく、保存的に改変されたその変異体（例えば縮重コドン置換）および相補的配列も暗黙のうちに包含する。具体的に述べると、縮重コドン置換は、選択した1つ以上の（または全ての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することによって達成することができる（Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605 - 2608, 1985；およびCassol et al., 1992；Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91 - 98, 1994）。アルギニンとロイシンについては、2番目の塩基における改変も保存的でありうる。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、および遺伝子がコードするmRNAと可換的に使用される。本発明のポリヌクレオチドは、無改変RNAもしくはDNAまたは改変RNAまたはDNAであることができる任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドで構成されうる。例えばポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、および一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖であってもよいし、より典型的には二本鎖であるか、または一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であることもできるDNAとRNAとを含むハイブリッド分子で構成されうる。加えて、ポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域でも構成されうる。ポリヌクレオチドは、1つ以上の改変塩基、または安定性その他の理由で改変されたDNAもしくはRNA主鎖を含有することもできる。「改変」塩基としては、例えばトリチル化塩基やイノシンなどの特殊な(unusual)塩基が挙げられる。DNAおよびRNAにはさまざまな改変を加えることができるので、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的に改変された形態を包含する。

【0033】

本明細書において使用する用語「連結された」、「融合された」または「融合」は、化学的コンジュゲーションや組換え手段（例えば遺伝子融合）を含むいかなる手段によるものであれ、2つ以上の要素もしくは構成要素またはドメインの接合に関連する場合は、可換的に使用される。化学的コンジュゲーションの方法（例えばヘテロ二官能性架橋剤を使用するもの）は当技術分野において知られている。より具体的に述べると、本明細書にいう「ウイルス融合タンパク質 - 自己集合性分子複合体または融合物」は、自己集合性分子（これはタンパク質性であってもタンパク質性でなくてもよい）への準安定ウイルス融合タンパク質（例えばRSV Fタンパク質）の遺伝子レベルでのコンジュゲーションまたは化学的コンジュゲーションを意味する。本明細書にいう「ウイルス融合タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質」は、タンパク質性自己集合性分子（例えばフェリチン、HSP）への準安定ウイルス融合タンパク質（例えばRSV Fタンパク質）の遺伝子レベルでのコンジュゲーションまたは化学的コンジュゲーションを意味する。好ましい一実施形態では、ウイルス融合タンパク質をフェリチンまたはHSPなどのタンパク質性自己集合性分子に、グリシン - セリン（gly - ser）リンカーなどのリンカーを介して融合する。

10

20

30

40

50

【0034】

本明細書において使用する用語「gly-serリンカー」は、グリシン残基とセリン残基とからなるペプチドを意味する。

【0035】

本明細書において使用する用語「プロリン-アラニン(pro-alanine)」リンカーは、プロリン残基とアラニン残基とからなるペプチドを意味する。

【0036】

指定されたポリペプチドまたはタンパク質に「由来する」ポリペプチドまたはアミノ酸配列とは、そのポリペプチドの起源を意味する。好ましくは、ある特定配列に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は、当該配列またはその一部分（ここで前記一部分は、少なくとも10～20アミノ酸、好ましくは少なくとも20～30アミノ酸、より好ましくは少なくとも30～50アミノ酸からなる）と基本的に同一であるアミノ酸配列、または他の形でその起源が前記配列にあると当業者が同定しうるアミノ酸配列を有する。

10

【0037】

別のペプチドに由来するポリペプチドは、出発ポリペプチドと比較して、1つ以上の突然変異、例えば別のアミノ酸残基で置換された1つ以上のアミノ酸残基、または1つ以上のアミノ酸残基の挿入または欠失を有する1つ以上のアミノ酸残基を有しうる。

【0038】

ポリペプチドは、天然には存在しないアミノ酸配列を含みうる。そのような「変異体」は、出発分子に対して必然的に100%未満の配列同一性または配列類似性を有する。好ましい一実施形態において、変異体は、出発ポリペプチドのアミノ酸配列に対して約75%から100%未満まで、より好ましくは、例えば変異体分子の全長にわたって、約80%から100%未満まで、より好ましくは約85%から100%未満まで、さらに好ましくは約90%から100%未満まで（例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）、最も好ましくは約95%から100%未満までのアミノ酸配列同一性またはアミノ酸配列類似性を有するであろう。

20

【0039】

一実施形態では、出発ポリペプチド配列とそれに由来する配列との間に1つのアミノ酸相違が存在する。この配列に関する同一性または類似性は、本明細書では、最大のパーセント配列同一性が得られるように配列を整列し、必要であればギャップを導入した後に、出発アミノ酸残基と同一（すなわち同じ残基）である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。

30

【0040】

一実施形態では、本発明のペプチドがスクレオチド配列によってコードされる。本発明のスクレオチド配列は、次に挙げるものを含むいくつかの応用に役立ちうる：クローニング、遺伝子治療、タンパク質の発現および精製、突然変異導入、DNAワクチン接種を必要とする宿主のDNAワクチン接種、例えば受動免疫処置のための抗体生成、PCR、プライマーおよびプローブの生成など。

40

【0041】

ウイルス融合タンパク質または自己集合性タンパク質（および結果として生じるタンパク質融合物）を、ネイティブ配列の望ましい活性（例えばフォールディングまたは自己集合）を保ったまま、それらが由来する天然配列またはネイティブ配列とは配列が異なる（すなわち「変異体」という）ように変化させることは、当業者には理解されるであろう。例えば、保存的置換または「非必須」アミノ酸残基の変化をもたらすスクレオチド置換またはアミノ酸置換を行うことができる。突然変異は、部位特異的変異誘発法またはPCR媒介変異誘発法などといった標準的技法によって導入することができる。

【0042】

「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似する側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。当技術分野では、例えば塩基性側鎖（例えはリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えはアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性

50

側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ-分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などといった、類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが規定されている。したがって、結合ポリペプチド中の非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーに属するもう一つのアミノ酸残基で、好ましく置き換えられる。もう一つの実施形態では、一続きのアミノ酸を、側鎖ファミリーメンバーの順序および／または組成が異なる構造的に類似する一続きで置き換えることができる。

【0043】

10

本明細書において使用する用語「感染性因子」は、脊椎動物において感染を引き起こす微生物を意味する。通常、それらの生物はウイルス、細菌、寄生虫、原虫および／または真菌である。

【0044】

本明細書において使用する用語「抗原製剤」または「抗原組成物」または「免疫原性組成物」は、脊椎動物、とりわけ鳥または哺乳動物に投与した場合に、免疫応答を誘導するであろう調製物を意味する。

【0045】

20

エンベロープウイルスは、ウイルス膜と細胞膜とが融合するプロセスによって宿主細胞に侵入する。このプロセスはウイルス表面糖タンパク質の融合誘発活性によって触媒される。多くの膜エンベロープウイルスで、融合糖タンパク質は不活性前駆体として合成され、それが数回の翻訳後修飾を受けることで、準安定型としてビリオン上にディスプレイされることを特徴とする。

【0046】

本明細書において使用する用語「準安定」は、タンパク質（例えばRSV Fタンパク質などのウイルス融合タンパク質）との関連で使用する場合は、条件が変化すると、より安定なコンフォメーション状態へと迅速に転化する、不安定なコンフォメーション状態を意味する。例えば、融合前RSV Fタンパク質は不安定な準安定コンフォメーションにあり、例えば宿主細胞に融合すると、より安定な融合後コンフォメーションに転化する。

【0047】

30

本明細書において使用する用語「自己集合性分子」は、自発的集合または誘導的集合を起こして、分子間力によって一つにまとめられた、所定の、安定な、非共有結合的に結合したアセンブリを構築する分子を意味する。自己集合性分子としては、タンパク質、ペプチド、核酸、ウイルス様粒子、脂質および糖質が挙げられる。自己集合性分子の限定でない例として、フェリチン、熱ショックタンパク質、DSP、ルマジンシンターゼ、およびDNAが挙げられる。

【0048】

40

本明細書において使用する用語「タンパク質ケージ」または「タンパク質シェル」は、自己集合することでタンパク質ケージ（元々溶媒がアクセスできる内部空洞を持つか、溶媒濃度、pH、平衡定数などを変化させることによって、溶媒がアクセスできるようにすることができる内部空洞を持つ構造）を形成するタンパク質性シェルの組成物を意味する。

【0049】

本明細書において使用する用語「ナノ粒子」はタンパク質ケージを包含するが、タンパク質性でないケージも含む。これは、シェル（例えばタンパク質ケージ）とナノ粒子コアの両方を含み、カーゴ（例えばアジュvant、治療剤、イメージング剤）は装填されていても、装填されていなくてもよい。

【0050】

本明細書において使用する用語「RSV Fタンパク質」および「Fタンパク質」および「融合タンパク質」および「Fタンパク質ポリペプチド」および「融合タンパク質ポリペプチド」は可換的に使用され、RSV融合タンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部または

50

一部を有するポリペプチドまたはタンパク質を意味する。数多くのRSV融合タンパク質および変異体（例えば天然変異体）が記載され、当業者に知られている（例えばUS20100203071に対応するWO2008 / 114149参照、その内容は引用により本明細書に組み込まれる）。US20100203071の図4は、本発明において使用することができるいくつかのRSV Fタンパク質変異体のアラインメントを示している。

【0051】

感染性因子との関連において使用する「融合前」という用語は、宿主細胞に融合する前の感染性因子のタンパク質のコンフォメーションを意味する。この文脈において「融合後」という用語は、宿主細胞に融合した後の感染性因子のタンパク質のコンフォメーションを意味する。

10

【0052】

RSV Fタンパク質の「融合後コンフォメーション」は、3つのHRB領域と3つのHRA領域とを含む6ヘリックス束の存在を特徴とする三量体である。RSV Fタンパク質の融合後コンフォメーションは、典型的には、「クラッチ」コンフォメーションまたは「ゴルフティー」コンフォメーションを有すると特徴づけられる。

【0053】

RSV Fタンパク質の「融合前コンフォメーション」は、3つのHRB領域を含む3ヘリックスを含有する三量体を特徴とするコンフォメーションである。RSV Fタンパク質の融合前コンフォメーションは、典型的には、「ロリポップ」コンフォメーションまたは「柄付き球(ball and stem)」コンフォメーションを有すると特徴づけられる。

20

【0054】

本明細書にいう「RSV Fエクトドメインポリペプチド」とは、成熟RSV Fタンパク質の実質的に細胞外部分を含有するRSV Fタンパク質ポリペプチドであって、シグナルペプチドはあってもなくてもよいが（例えばアミノ酸1付近からアミノ酸524付近まで（配列番号2）またはアミノ酸22付近からアミノ酸524付近まで）、天然RSV Fタンパク質の膜貫通ドメインと細胞質テールを欠くものを意味する。いくつかの実施形態では、前記RSV Fタンパク質ポリペプチドが成熟RSV Fタンパク質の実質的に細胞外部分を含有し、シグナルペプチドはあってもなくてもよく、膜貫通ドメイン、細胞質テール、およびHRBドメインの一部を欠く（例えばアミノ酸1付近からアミノ酸513付近まで（配列番号3）、またはアミノ酸22付近からアミノ酸513付近まで、例えば26～513（配列番号4））。

30

【0055】

本発明にいう「切断型RSV Fエクトドメインポリペプチド」とは、101 / 102付近から160 / 161付近までの1つ以上の位置で切断されて2つのサブユニットを生じ、一方のサブユニットはF₁を含み、他方のサブユニットがF₂を含んでいる、RSV Fエクトドメインポリペプチドを意味する。

【0056】

本明細書にいう「C末端非切断型RSV Fエクトドメインポリペプチド」とは、101 / 102付近から131 / 132付近までの1つ以上の位置で切断され、132 / 133付近から160 / 161付近までの1つ以上の位置では切断されずに2つのサブユニットを生じ、一方のサブユニットがF₁を含み、他方のサブユニットがF₂を含んでいる、RSV Fエクトドメインポリペプチドを意味する。

40

【0057】

本明細書にいう「非切断型RSV Fエクトドメインポリペプチド」とは、101 / 102付近から160 / 161付近までの1つ以上の位置で切断されていないRSV Fエクトドメインポリペプチドを意味する。非切断型RSV Fエクトドメイン ポリペプチドは、例えば単量体または三量体であることができる。

【0058】

本明細書において使用する用語「免疫原」または「抗原」は、免疫応答を誘発する能力を有するタンパク質、ペプチド、ペプチド、核酸などの物質を意味する。どちらの用語もエピトープを包含し、可換的に使用される。

50

【0059】

本明細書において使用する用語「ワクチン」は、脊椎動物に投与することができる形態にあって、免疫を誘導して感染を防止しかつ／または改善し、かつ／または感染の少なくとも1つの症状を低減し、かつ／または別途投与された融合タンパク質もしくはナノ粒子の効力を強化するのに十分な防御免疫応答を誘導する、本発明の融合タンパク質またはナノ粒子を含有する製剤を意味する。典型的には、ワクチンは、従来の食塩水または緩衝水溶液媒質を含み、そこに、本発明の組成物が懸濁または溶解している。この形態にある本発明の組成物は、感染を防止し、改善し、または他の形で処置するために、便利に使用することができる。宿主に導入されると、ワクチンは、例えば限定するわけではないが、抗体および／またはサイトカインの産生、および／または細胞傷害性T細胞、抗原提示細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞および／または他の細胞応答の活性化などといった免疫応答を惹起することができる。ワクチンはアジュバントと一緒に投与することができる。

10

【0060】

本明細書において使用する用語「アジュバント」は、特異的免疫原と組み合わせて製剤中に使用した場合に、結果として得られる免疫応答を増強しまたは他の形で改変しもしくは修飾することになる化合物を意味する。免疫応答の修飾には、抗体免疫応答および細胞免疫応答の一方または両方の特異性の増大または拡大が含まれる。免疫応答の修飾は、一定の抗原特異的免疫応答を減少させまたは抑制することも意味しうる。

20

【0061】

本明細書において使用する用語「医薬上許容されるワクチン」は、脊椎動物に投与することができる形態にあって、免疫を誘導して感染または疾患を防止しかつ／または改善し、かつ／または感染または疾患の少なくとも1つの症状を低減し、かつ／または別途投与された融合タンパク質もしくはナノ粒子の効力を強化するのに十分な防御免疫応答を誘導する、本発明の融合タンパク質またはナノ粒子を含有する製剤を意味する。一実施形態では、本発明の融合タンパク質またはナノ粒子を含有する製剤に関する。典型的には、ワクチンは、従来の食塩水または緩衝水溶液媒質を含み、そこに、本発明の組成物が懸濁または溶解している。この形態にある本発明の組成物は、感染を防止し、改善し、または他の形で処置するために、便利に使用することができる。宿主に導入されると、ワクチンは、例えば限定するわけではないが、抗体および／またはサイトカインの産生、および／または細胞傷害性T細胞、抗原提示細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞および／または他の細胞応答の活性化などといった免疫応答を惹起することができる。

30

【0062】

本明細書において使用する用語「改善する」は、疾患状態、例えばウイルス感染の処置における、その予防、重症度もしくは進行の軽減、寛解、または治癒などといった、治療上有益な任意の結果を意味する。

【0063】

本明細書において使用する用語「インビオ」は、生きている生物内で起こるプロセスを意味する。

【0064】

本明細書において使用する「哺乳動物」または「対象」または「患者」という用語は、ヒトとヒト以外の両方を包含し、例えば限定するわけではないが、ヒト、非ヒト靈長類（例えばチンパンジー、サル、ヒヒ）、イヌ、ネコ、マウス、ラット（例えばコットンラット）、ウシ（例えば子牛）、ウマ、ブタ、モルモット、フェレットおよびハムスターなどが挙げられる。

40

【0065】

パーセント「同一性」という用語を、2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列に関連して、本明細書において使用する場合、これは、後述の配列比較アルゴリズムの一つ（例えばBLASTPおよびBLASTNまたは当業者が利用できる他のアルゴリズム）を用いる測定でまたは目視検査による測定で最大限の一一致が得られるように比較し整列した時に同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基が指定した百分率である、2つ以上の配列または部分

50

配列を意味する。用途に依存して、パーセント「同一性」は、比較する配列のある領域にわたって、例えば機能ドメインにわたって存在するか、あるいは比較しようとする2つの配列の全長にわたって存在しうる。

【0066】

配列を比較するには、典型的には一つの配列を参照配列とし、試験配列をそれと比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合は、試験配列と参照配列をコンピュータに入力し、必要であれば部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。そうすると、指定されたプログラムパラメータに基づいて、配列比較アルゴリズムが参照配列に対する試験配列のパーセント配列同一性を計算する。

【0067】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えばSmith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981) のローカルホモロジーアルゴリズム、Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) のホモロジーアラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988) の類似性検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実施 (Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group ; ウィスコンシン州マディソン、サイエンスドライブ575) のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、または目視検査などによって実行することができる（概論については後述のAusubel et al. を参照されたい）。

【0068】

パーセント配列同一性およびパーセント配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの一例は、Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 - 410 (1990) に記載されているBLASTアルゴリズムである。BLAST解析を実行するソフトウェアは、国立バイオテクノロジ情報センターウェブサイトにより、公に利用することができる。

【0069】

「治療抗体」は、抗体、抗体のフラグメント、または抗体から誘導されたコンストラクトであり、ターゲット細胞上の細胞表面抗原に結合することで、治療効果を生じさせることができる。そのような抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、または完全ヒト抗体であることができる。そのような抗体を生産するための方法は、当技術分野では知られている。そのような抗体には、抗体の一本鎖Fcフラグメント、ミニボディ、およびダイアボディが含まれる。治療抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体でありうる。好ましい実施形態では、治療抗体が、融合前コンフォメーションにあるウイルス融合タンパク質（例えばRSV Fタンパク質）を標的とする。

【0070】

本明細書において使用する用語「十分量」または「～するのに十分な量」とは、所望の効果を生じさせるのに足りる量、例えば細胞へのウイルスの融合を阻害するのに足りる量を意味する。

【0071】

本明細書において使用する用語「治療有効量」は、疾患の症状を改善するのに有効な量である。予防は治療とみなすことができるので、治療有効量は「予防有効量」であることができる。

【0072】

本明細書にいう「約」は、当業者には理解されるであろう。また、この用語は、それが使用される文脈に依存して、ある程度変動するであろう。この用語が使用される文脈を考慮しても、当業者にとって明確でないこの用語の使用があった場合、「約」は、当該特定値の±10%までを意味するであろう。

【0073】

本明細書および本願の特許請求の範囲において使用される単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上そうでないことが明確である場合を除き、複数の指示対象を包含することに留意しなければならない。

【0074】

10

20

30

40

50

I. 概観

自己集合性ナノ粒子の概念を応用して新しいワクチン技術が創製された。フェリチンや熱ショックタンパク質(HSP)などの分子は、自然に集合して多面体形状を構築することが知られている。タンパク質またはポリペプチドなどの自己集合性分子に準安定ウイルスタンパク質を遺伝子レベルで取り付けることにより、さまざまな多面体ナノ粒子が創製される。それぞれの融合前状態にある準安定ウイルスタンパク質を組み込んだタンパク質ベースのナノ粒子は、これらのウイルス性因子に対する有効なワクチンとして使用することができる。しかし、有効なワクチンの設計に際して、そのようなタンパク質をそのN末端またはC末端を介してフェリチンや熱ショックタンパク質などの自己集合分子に連結するだけで適正な配向が保全されまたは準安定ウイルスタンパク質のコンフォメーションが固定されることになるかどうかは自明ではないので、準安定ウイルスタンパク質に自己集合系を使用することには、大きな制約または課題が存在する。本発明は、準安定ウイルスタンパク質に基づくナノ粒子の創製に際して考慮すべき重要な事項、具体的には(1)いかにして、準安定タンパク質を自己集合性タンパク質に、前記タンパク質が自己集合によって多面体形状を構築するのを妨害しないような形で取り付け、それと同時に(2)準安定タンパク質をその融合前コンフォメーションで固定するか、というものに対処するものである。

10

【0075】

本発明は、概して、ウイルス融合タンパク質またはそのフラグメント(例えば切断体)もしくは変異体と自己集合性分子とを含むナノ粒子、ならびにそれを含む免疫原性組成物およびワクチン組成物に関する。

20

【0076】

したがって一態様において、本発明は、ウイルス融合タンパク質またはそのフラグメントと自己集合性分子とを含むナノ粒子であって、前記自己集合性分子が、準安定融合前コンフォメーションにあるウイルス融合タンパク質を捕捉する多量体アセンブリを形成し、よってナノ粒子を形成するものに関する。いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質が、クラスI、II、またはIII融合タンパク質である。

【0077】

いくつかの態様において、本発明は、本発明のナノ粒子と医薬上許容される担体とを含む免疫原性組成物に関する。

30

【0078】

いくつかの態様において、本発明は、本明細書に記載するナノ粒子を含むワクチン組成物であって、融合前コンフォメーションにあるウイルス融合タンパク質ホモ三量体、例えばRSV Fタンパク質ホモ三量体(例えば配列番号1~12のエクトドメインまたはそのフラグメントのホモ三量体)が、前記自己集合分子の多量体アセンブリによって形成されるシェルの表面にディスプレイされているものに関する。いくつかの実施形態では、前記ワクチン組成物がアジュvantを含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質が、二量体型または三量体型の四次構造をとる。

40

【0080】

いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質がパラミクソウイルス科融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、前記パラミクソウイルス科ウイルス融合タンパク質が、アブラウイルス、レスピロウイルスまたはニューモウイルスのパラミクソウイルス科またはニューモウイルス科(Pneumonviridae)融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質が、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、および呼吸器合胞体ウイルス(RSV)からなる群より選択されるウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、前記ウイルスがRSVであり、前記融合タンパク質がFタンパク質である。

【0081】

50

いくつかの実施形態では、前記フラビウイルス科ウイルス融合タンパク質が、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、または黄熱ウイルスなどのフラビウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、前記ウイルスがデングウイルスであり、前記融合タンパク質がEタンパク質である。

【0082】

もう一つの態様において、本発明は、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)Fタンパク質またはそのフラグメントと自己集合性分子とを含むナノ粒子であって、前記自己集合性分子が、準安定融合前コンフォメーションにある前記Fタンパク質またはそのフラグメントを捕捉する多量体アセンブリを形成し、よって前記ナノ粒子を形成するものに関する。

【0083】

いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質またはそのフラグメントが、膜貫通ドメインおよび細胞質テールドメインを欠く(アミノ酸1~524;配列番号2)。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質またはそのフラグメントが、膜貫通ドメイン、細胞質テールドメイン、およびHRBドメインの一部分を欠く(アミノ酸1~513;配列番号3)。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質またはそのフラグメントが、F1ドメイン(例えばアミノ酸137付近からアミノ酸524付近まで(配列番号5)、またはアミノ酸137付近からアミノ酸513付近まで(配列番号6))を含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質またはそのフラグメントが、N末端配列MELLILKANAITILTAVTFCFASG(配列番号54)を持たないFタンパク質またはそのフラグメントを含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質がF1およびF2ヘテロ二量体を含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質フラグメントがエクトドメインを含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質フラグメントが、7アミノ酸リピートAドメイン(HRA)および7アミノ酸リピートCドメイン(HRC)を含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質フラグメントが、HRAドメインおよびHRCドメイン、ならびにF1ドメインIおよびIIを含む。いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質フラグメントが、HRAドメイン、HRCドメイン、F1ドメインIおよびII、ならびに7アミノ酸リピートBドメイン(HRB)を含む。いくつかの実施形態では、前記ナノ粒子が、1つ以上の、F1およびF2のホモ三量体を含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、前記Fタンパク質が配列番号1~12に示すアミノ酸配列を含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質またはRSV Fタンパク質が、(GlySer)_nリンカーなどのアミノ酸リンカーを介して、前記自己集合性分子に共有結合で取り付けられる。いくつかの実施形態では、前記リンカーが約4~7アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、前記リンカーが、前記自己集合性分子とウイルス融合タンパク質との間の立体障害を防止するのに十分な長さを有する。いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質またはRSV Fタンパク質(例えば配列番号1~12のFタンパク質)が、前記自己集合性分子に遺伝子レベルで融合される。一実施形態では、Fタンパク質上のリンカーの取り付け箇所が配列番号1の位置513にあるロイシンであり、フェリチン上のリンカー取り付け箇所が配列番号13の位置5にあるアスパラギン酸である。

【0086】

いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子がタンパク質性または非タンパク質性である。いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子が、タンパク質、ペプチド、核酸、ウイルス様粒子、ウイルスキヤプシド、脂質、または糖質である。いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子が集合して、八面体対称性などの多面体対称性を有するシェルを構築する。いくつかの実施形態では、前記シェルが、前記自己集合性分子の単量体を24個含む。

【0087】

いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子が、フェリチン、熱ショックタンパク質、Dsp、ルマジンシンターゼ、DNA、または後述するものである。いくつかの実施形態では

10

20

30

40

50

、前記フェリチンタンパク質が配列番号13～17に示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記熱ショックタンパク質が配列番号36～42に示すアミノ酸配列を含む。

【0088】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号18～21、24～27、および30～33に示すアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質・フェリチン融合タンパク質に関する。

【0089】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号22、23、28、29、34、および35に示すアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質・熱ショックタンパク質融合タンパク質に関する。

【0090】

いくつかの実施形態では、トランスフェクト細胞（例えば293細胞）から培養培地への組換えタンパク質の効果的な分泌を容易にするために、前記RSV Fタンパク質配列の前に、N末端リーダー、例えばヒトCD5リーダー（配列番号51）が配置される。例示的リーダー配列として配列番号51～53に示すものが挙げられ、これらは本明細書に開示するRSV Fタンパク質・自己集合性分子融合タンパク質のどれとでも一緒に使用することができる。N末端リーダーを含む例示的RSV F・フェリチン融合タンパク質を配列番号30～33に示す。前記N末端リーダーが、細胞からのタンパク質の分泌を容易にすることが当技術分野において知られる任意の配列でありうることは、当業者には理解されるであろう。

10

【0091】

もう一つの態様において、本発明は、RSV感染を阻害および／または防止する抗体を生産する方法であって、本発明のナノ粒子、免疫原性組成物、ワクチン組成物、または融合タンパク質を対象に投与することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、前記抗体が対象から単離される。

20

【0092】

もう一つの態様において、本発明は、RSVに対するワクチンを生産する方法であって、a) 单量体型自己集合分子とRSV Fタンパク質とを含む複合体を、融合前コンフォメーションにあるFタンパク質三量体が前記自己集合分子の多量体化によって形成されるシェルの表面にディスプレイされるような条件下で、発現させること、およびb) Fタンパク質をディスプレイしているシェルを回収することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、前記対象が、本発明のワクチンによるワクチン接種を受ける。

30

【0093】

もう一つの態様において、本発明は、本発明のナノ粒子または融合タンパク質と使用説明書とを含むキットに関する。

【0094】

さらにもう一つの態様において、本発明は、本発明のナノ粒子または融合タンパク質をコードする単離された核酸、前記核酸を含むベクター、および前記核酸を含む単離された細胞に関する。

【0095】

II. 準安定タンパク質・自己集合性分子融合物

本発明のナノ粒子は、タンパク質性または非タンパク質性の自己集合性分子に融合された準安定タンパク質を含む。本発明は、準安定タンパク質を、エネルギーが高く安定性の低いコンフォメーションに保つこと、すなわちエネルギーの低い安定なコンフォメーションを準安定タンパク質にとらせないことが有益であるような任意の準安定タンパク質（例えば準安定ウイルス融合タンパク質）に応用することができる。例示的準安定ウイルスタンパク質の一つ、RSV Fタンパク質の場合、Fタンパク質三量体と、それを融合した自己集合性分子の多量体アセンブリとの形成により、Fタンパク質は、エネルギーが高い融合前状態に固定される。したがってナノ粒子表面は、例えば実施例2で述べるように融合前状態を特異的に認識する抗体（例えばmAb D25）で評価すると、融合前状態にある三量体型Fタンパク質をディスプレイしている。

40

【0096】

RSVのF糖タンパク質は、ビリオンエンベロープと宿主細胞形質膜との間の融合によるウ

50

イルス侵入を指示する。これは、4つの一般ドメイン、すなわちN末端ER移行シグナル配列（SS）、エクトドメイン（ED）、膜貫通ドメイン（TM）、および細胞質テール（CT）を有するI型1回貫通型内在性膜タンパク質である。前記細胞質テールは、パルミトイル化システイン残基を1つ含んでいる。Fタンパク質の配列はRSV単離株間で高度に保存されているが、これは絶え間なく進化している。RSVのFタンパク質は、それが他のウイルスタンパク質に依存することなく、進入およびシンシチウム形成を媒介しうる点で、他のパラミクソウイルスのFタンパク質とは異なっている（他のパラミクソウイルスでは、通常、Fに加えてHNも必要である）。

【0097】

RSV F mRNAは、F₀と呼ばれる574アミノ酸の前駆体タンパク質に翻訳され、これはN末端にシグナルペプチド配列を含んでいるが、このシグナルペプチド配列は小胞体においてシグナルペプチダーゼによって除去される。F₀は、トランスゴルジにおいて細胞性プロテアーゼ（例えばフューリン）によって2つの部位（aa 109 / 110および136 / 137）で切断されて、短いグリコシル化された介在配列を取り除き、F₁（約50kDa；C末端側；残基137～574）およびF₂（約20kDa；N末端側；残基1～109）と呼ばれる2つのサブユニットを生成する。F₁はそのN末端に疎水性融合ペプチドを含有し、2つの疎水性7アミノ酸リピート領域（HRAおよびHRB）も含有する。HRAは融合ペプチドに近く、HRBは膜貫通ドメインに近い。F₁-F₂ヘテロ二量体はビリオンではホモ三量体として集合している。

【0098】

RSVは、単一の血清型として存在するが、これには抗原サブグループAおよびBがある。これら2つのグループのF糖タンパク質は約90%同一である。本発明ではAサブグループ、Bサブグループ、または両者の組み合わせもしくはハイブリッドを使用することができる。配列の一例として、Aサブグループについては配列番号1（A2株；GenBank GI:138251；Swiss Prot P03420）が、またBサブグループについては配列番号7（18537株；GI:138250；Swiss Prot P13843）が挙げられる。配列番号1および配列番号7はどちらも574アミノ酸の配列である。シグナルペプチドはA2株ではaa1～21であるが、18537株では1～22である。どちらの配列でも、TMドメインはおよそaa530～550であるが、525～548との報告もある。Aおよび/またはBサブグループはどちらも本発明のナノ粒子における使用に適している。本明細書に記載するナノ粒子における使用には、A2株および18537株由来のFタンパク質のフラグメントも適している（例えばそれぞれ配列番号1および7）。

【0099】

RSV Fタンパク質は、融合前、融合後、および融合中コンフォメーションという、3つのコンフォメーションで存在することが知られている。RSV Fタンパク質の「融合後コンフォメーション」は、ネイティブRSV Fの低エネルギーコンフォメーションであると考えられ、3つのHRB領域と3つのHRA領域とを含む6ヘリックス束の存在を特徴とする三量体である。融合後コンフォメーションは、電子顕微鏡像では、特徴的な「クラッチ」状または「ゴルフティー」状の形状を有する。RSV Fタンパク質の「融合前コンフォメーション」は、3つのHRB領域を含むコイルドコイルを含有する三量体を特徴とする準安定コンフォメーションである。融合前コンフォメーションでは融合ペプチドが露出していないので、融合前コンフォメーションは一般にロゼットを形成せず、電子顕微鏡像では、「ロリポップ」または「柄付き球」のような形状を有する。

【0100】

上述のように、本発明は、自己集合性分子の多量体アセンブリ内で三量体型Fタンパク質が融合前コンフォメーションに固定されるように自己集合性分子に融合することによって、RSV Fタンパク質またはそのフラグメントを、エネルギーの高い「融合前」コンフォメーション、すなわち「準安定」コンフォメーションに固定することに関する（実施例1参照）。例えばRSVのF糖タンパク質は、その融合前コンフォメーションでは三量体型の四次構造をとる。融合前コンフォメーションのエピトープは、天然ビリオンを認識してそれを中和することができる抗体を誘発する能力が高いであろう。いかなる特定理論にも束縛されることはないが、融合前コンフォメーションは、天然のRSVビリオン上に発現し

10

20

30

40

50

ているものと類似するエピトープまたは同一のエピトープを含有し、それゆえに中和抗体を誘発するのに有利であろうと考えられる。融合前コンフォメーションFタンパク質に特異的なエピトープとは、融合中コンフォメーションまたは融合後コンフォメーションでは提示されないエピトープである。融合前コンフォメーションFタンパク質の少なくとも1つのエピトープが安定に提示されること、例えば前記エピトープが、溶液状態で、少なくとも12時間、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも4日、少なくとも6日、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも4週間、または少なくとも6週間は、安定に提示されることが好ましい。

【0101】

本発明のナノ粒子の基本単位は、自己集合性分子単量体にリンカーを介して融合された準安定タンパク質単量体（例えば単量体型RSV Fタンパク質 - リンカー - フェリチン単量体ポリペプチド）である。話を簡単にするために、RSV Fタンパク質 - リンカー - フェリチン融合タンパク質を、例示的準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質とする。準安定ウイルス融合タンパク質（例えばRSV Fタンパク質）と自己集合性分子（例えばフェリチン）へのリンカーの正確な取り付け箇所（ならびにリンカーの最適な長さ）は、実施例1で述べるように、計算によって決定することができ、これにより、三量体型に集合したときにウイルス融合タンパク質が、自己集合性分子の多量体アセンブリを妨害することなく、そのネイティブ融合前コンフォメーションをとりうることが保証される。RSV Fタンパク質とフェリチンの場合、次の構造レベルは、RSV Fタンパク質の三量体型アセンブリとフェリチンの三量体型アセンブリである。この実施形態では、RSV Fタンパク質のその融合前コンフォメーションでのアセンブリも、フェリチンの多量体アセンブリも、どちらも障害されることがないように、融合タンパク質が設計される。次に、三量体型フェリチンが集合して八面体対称性を有するシェルを構築することによってナノ粒子が形成されるが、このナノ粒子では、8つのフェリチン三量体とRSV Fタンパク質三量体とが整列していて、表面にはRSV Fタンパク質三量体が融合前コンフォメーションで安定にディスプレイされる。

【0102】

当業者には理解されるであろうが、本発明は、RSV Fタンパク質と類似する特徴を有する他のウイルスタンパク質、すなわち融合前コンフォメーションと融合後コンフォメーションの両方を有するものにも応用することができる。いくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質が、クラスI融合タンパク質（例えばパラミクソウイルスFタンパク質、インフルエンザHA）である。別の実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質がクラスII融合タンパク質（例えばTBEV Eタンパク質、SFV E1 / E2）である。さらに別の実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質がクラスIII融合タンパク質（例えばVSV G）である。クラスI~IIIウイルス融合タンパク質は、引用により本明細書に組み込まれる文献（例えばColman and Lawrence. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2003;4:309 - 19 ; White et al., Crit Rev Biochem Mol Biol 2008;43:189 - 219）に広く詳述されている。別の実施形態では、前記融合タンパク質が、インフルエンザHAタンパク質を除くクラスIウイルス融合タンパク質である。この特徴を呈するウイルスタンパク質のさらなる具体例として、ニューモウイルス科（pneumoviridae）、パラミクソウイルス科、フラビウイルス科、およびレトロウイルス科のウイルス融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。したがっていくつかの実施形態では、前記ウイルス融合タンパク質が、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、フラビウイルス（例えばウエストナイルウイルス、デングウイルス、黄熱ウイルスなど）、およびヒト免疫不全ウイルス（HIV）のものである。一実施形態では、ウイルスがデングウイルスであり、融合タンパク質がEタンパク質である。

【0103】

本発明で使用される準安定タンパク質は、当技術分野において知られている自己集合性分子に融合することができる。下記のさらなる詳細で述べるように、自己集合性分子はタンパク質性であっても非タンパク質性であってもよい。好ましい一実施形態では、自己集

10

20

30

40

50

合性分子がタンパク質性である。いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子が集合して多面体対称性を有するシェルを構築する。一実施形態では、シェルが八面体対称性を有する。さらにもう一つの実施形態では、シェルが自己集合性分子の単量体を24個含む。いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子がフェリチン（これは八面体対称性を有し24個の単量体によるシェルを形成する）である。別の実施形態では、前記自己集合性分子が熱ショックタンパク質（HSP）、例えば小分子HSP20（sHSP20；配列番号36または37）、HS P100（配列番号42）、HSP90（配列番号40または41）、HSP70（配列番号39）、およびHSP6 0（配列番号38）、またはそれらのフラグメントである。

【0104】

いくつかの実施形態では、前記準安定タンパク質を前記自己集合性分子に化学的に融合する。好ましい実施形態では、準安定タンパク質が自己集合性分子に、ポリペプチドリンカーナどのリンカーを使って、またはリンカーを使わずに、遺伝子レベルで融合される。リンカー配列は、RSVに対する免疫応答を誘発する能力が維持されるような形でRSV Fタンパク質が配置されるように、挿入することができる。一実施形態では、適正な配向が保全され、または準安定ウイルスタンパク質がその融合前コンフォメーションで固定されるような方法で、準安定RSV Fタンパク質がフェリチンに連結される。例えば準安定ウイルスタンパク質は自己集合性タンパク質（例えばフェリチン）に、タンパク質が多面体形状へと自己集合するのを障害しないように、取り付けることができる。例えば、RSV Fタンパク質三量体とフェリチン三量体とを同じ三回軸の周りに配向させるには、RSV Fタンパク質のLeu - 513残基をフェリチンのAsp - 5残基に連結することができる。一実施形態では、4~7アミノ酸リンカーを使って、RSV Fタンパク質のLeu - 513残基をフェリチンのAsp - 5残基に連結する。このリンカーは、グリシン残基とセリン残基の混合物（ser-glyリンカー）を含みうる。

10

20

30

40

【0105】

本発明のリンカー配列はアミノ酸を含む。使用することが好ましいアミノ酸は、小さな側鎖を有するものおよび／または荷電していないものである。そのようなアミノ酸は、融合タンパク質の適正なフォールディングおよび活性を妨げる可能性が低い。したがって、リンカー配列に単独でまたは組み合わせて使用することが好ましいアミノ酸は、セリン、グリシンおよびアラニンである。リンカーの組成は、セリン残基とグリシン残基が交互しているものであってもよい。セリン残基とグリシン残基とを交互することにより、コンフォメーションに柔軟性をもたせることができる。リンカーの例としては、SGG、GSG、SGS、GG、SGSG（配列番号43）、NGTGGSG（配列番号44）、SGGSG（配列番号45）、GGSGSG（配列番号46）、SGSGSG（配列番号47）、SGGSGSG（配列番号48）、SGSGSGSGS（配列番号49）およびSGSGSGSGSG（配列番号50）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。アミノ酸は必要に応じて付加し、または取り除くことができる。例えばリンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15もしくは20アミノ酸長、またはそれ以上であることができる。例えばリンカーは、4~7、5~8、5~9、5~10、6~10、7~10、8~10、または9~10アミノ酸長であることができる。当業者であれば、本発明の融合タンパク質にとって適当なリンカー配列を適当なリンカー長と共に決定することができる。例えば実施例1で述べるアプローチを使って、準安定タンパク質を自己集合性分子から離すのに適切なリンカーを設計することができる。

30

40

【0106】

いくつかの実施形態では、本発明のナノ粒子が、準安定タンパク質変異体および／または自己集合性分子変異体および／または準安定タンパク質・自己集合性分子融合物変異体を含む。例えば準安定タンパク質変異体および／または自己集合性分子変異体および／または準安定タンパク質・自己集合性分子融合物変異体は、対応する野生型準安定タンパク質および／または野生型自己集合性分子および／または野生型準安定タンパク質・自己集合性分子融合物と、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または100%同一でありうる。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、野生型RSV Fタンパク質および／または野生型自己集合性分子および／または野生型RSV Fタンパク質・自

50

己集合性分子融合タンパク質と少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一であるRSV Fタンパク質変異体および/または自己集合性分子変異体および/またはRSV Fタンパク質 - 己集合性分子融合タンパク質変異体を含むナノ粒子に関する。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号1~42のいずれか一つと少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一であるポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、準安定タンパク質変異体および/または自己集合性分子変異体および/または準安定タンパク質 - 己集合性分子融合物変異体が、少なくとも1つの突然変異（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個、またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、付加、または置換）を有しうる。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、野生型RSV Fタンパク質および/または野生型自己集合性分子および/または野生型RSV Fタンパク質 - 己集合性分子融合タンパク質と比較して、少なくとも1つの突然変異（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個、またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、付加、または置換）を有するRSV Fタンパク質変異体および/または自己集合性分子変異体および/またはRSV Fタンパク質 - 己集合性分子融合タンパク質変異体を含むナノ粒子に関する。前記突然変異は、三量体型RSV Fタンパク質の融合前コンフォメーションを変化させず、自己集合性分子の自己集合能力も変化させないことが好ましい。変異体を含むナノ粒子が、融合前コンフォメーションにあるFタンパク質を標的とするRSV中和抗体の生産を誘発する能力を保っているかどうかを評価するには、後述のように、さまざまなアッセイを利用することができます。

10

20

30

40

50

【0107】

アミノ酸置換を有する上述の変異体において、置換アミノ酸残基は（必須ではないが）保存的置換であることができ、これには通例、次の群内での置換が含まれる：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

【0108】

いくつかの実施形態では、準安定タンパク質コンフォメーションを特異的に認識する抗体の生産を誘発する準安定タンパク質のエピトープが利用可能であり、それがディスプレイされるのであれば、準安定タンパク質配列全体の代わりに準安定タンパク質のフラグメントを使用してもよい。RSV Fタンパク質の場合は、一実施形態において、ナノ粒子の形態で、融合前Fタンパク質のコンフォメーションナルエピトープがディスプレイされ、そのエピトープに対する抗体の生産を誘発することができるのであれば、RSV Fタンパク質のフラグメントを自己集合分子に例えばリンカーを介して融合することができる。したがって、いくつかの実施形態において、RSV Fタンパク質フラグメントは、RSV Fタンパク質に由来する少なくとも25アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも75アミノ酸、少なくとも100アミノ酸、少なくとも150アミノ酸、少なくとも200アミノ酸、少なくとも300アミノ酸、少なくとも400アミノ酸、または少なくとも500アミノ酸を含むことができ、前記RSV Fタンパク質フラグメントは、融合前コンフォメーションにあるRSV Fタンパク質に対する中和抗体の生産を誘発する。

【0109】

いくつかの実施形態では、前記RSV Fフラグメントが、エクトドメイン、7アミノ酸リピートAドメイン（HRA）および7アミノ酸リピートCドメイン（HRC）；HRAドメイン、HRCドメイン、ならびにF1ドメインIおよびII；またはHRAドメイン、HRCドメイン、F1ドメインIおよびII、ならびに7アミノ酸リピートBドメイン（HRB）など、RSV Fタンパク質のドメインを1つ以上含む。後述のように、RSV Fタンパク質フラグメント - 己集合性分子融合物を含む候補ナノ粒子がRSV Fタンパク質の融合前コンフォメーションを特異的に認識する

中和抗体を誘発するかどうかを決定するために、当業者はさまざまなアッセイを利用することができる。

【0110】

例えば、RSV Fフラグメントは、エクトドメイン（例えば引用によりその内容が本明細書に組み込まれるUS 2011 / 0305727）、7アミノ酸リピートAドメイン（HRA）および7アミノ酸リピートCドメイン（HRC）（配列番号1のアミノ酸22～214）；HRAドメイン、HRCドメイン、ならびにF1ドメイン（H1）（配列番号1のアミノ酸22～476）；またはHRAドメイン、HRCドメイン、F1ドメイン（H1）およびH2（配列番号1のアミノ酸22～524）など、RSV Fタンパク質のドメイン（図1）を1つ以上含みうる。当業者は他のRSV Fタンパク質または抗原サブグループのドメインを容易に決定することができる。10

【0111】

一般に、本発明の実施に使用される融合タンパク質は、合成物であるか、組換え核酸分子の発現によって生産されるであろう。ポリペプチドがRSV Fタンパク質 - フェリチン融合物またはRSV Fタンパク質 - HSP融合物である場合は、RSV Fタンパク質をコードする一配列とフェリチンまたはHSPの全部または一部をコードするもう一つの配列とを含有するハイブリッド核酸分子によって、それをコードすることができる。好ましい実施形態では、第1配列と第2配列とがリンカーによって隔てられるであろう。

【0112】

準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合物またはその変異体を作製するために必要な技法は当技術分野では常法であり、はなはだしい実験に頼ることなく実行することができる。例えば、準安定タンパク質（例えばRSV Fタンパク質）中のアミノ酸残基の1つ以上の置換からなる突然変異は、PCRによる変異導入技術を使って（当技術分野において知られているように）作出することができる。準安定タンパク質ポリペプチドおよび／または自己集合性分子ポリペプチドおよび／または準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合ポリペプチドからのアミノ酸残基の欠失またはそれらへのアミノ酸残基の付加からなる突然変異も、標準的組換え技法で作製することができる。欠失または付加の場合は、準安定タンパク質をコードする核酸分子を、単に、適当な制限エンドヌクレアーゼで消化する。その結果生じたフラグメントはそのまま発現させるか、または例えばそれを第2のフラグメントにライゲートすることなどによって、さらに操作することができる。ライゲーションは、核酸分子の2つの末端が互いにオーバーラップする相補的ヌクレオチドを含有していれば容易になるが、平滑末端フラグメントをライゲートすることもできる。PCRによって生成する核酸は、さまざまな突然変異型配列を生成させるためにも使用することができる。20

【0113】

組換え分子生物学的技法によって改変された核酸分子の発現によって準安定タンパク質変異体 - 自己集合性分子融合物を生成させることに加えて、それら融合物を化学合成することもできる。当業者は化学合成ポリペプチドを日常的に生成している。30

【0114】

上述のように、準安定タンパク質（例えばRSV Fタンパク質）は、準安定タンパク質と自己集合性分子とを含む融合ポリペプチドまたはキメラポリペプチドとして調製することができる。いくつかの実施形態では、前記キメラポリペプチドが、準安定タンパク質、自己集合性分子、および抗原タグとして機能するポリペプチド、例えばFLAG配列を含みうる。FLAG配列は、本明細書において述べるように、ビオチン化された高度に特異的な抗FLAG抗体によって認識される（Blanar et al., Science 256:1014, 1992; LeClair et al., PNAS 89:8145, 1992も参照されたい）。抗原タグを付加するための方法およびキメラポリペプチドを構築するための方法はよく知られており、当業者の能力があれば十分に可能な従来の分子生物学的技法で、実行することができる。40

【0115】

III. 自己集合性分子

本発明の融合物および融合タンパク質は、準安定ウイルスタンパク質（例えばRSV Fタ

10

20

30

40

50

ンパク質)および自己集合性分子を含む。いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子がタンパク質またはペプチドに基づく分子(例えばフェリチン、熱ショックタンパク質、DNA結合タンパク質、およびウイルスキャプシドタンパク質、またはそれらの変異体)である。別の実施形態では、前記自己集合性分子が、タンパク質またはペプチドに基づく分子ではない(例えば核酸、脂質、リポソーム、デキストラン、多糖、金属など)。当技術分野において認識されている分子は、その分子が自己集合することで、そこに融合された準安定タンパク質を安定化し、その融合前コンフォメーションに固定することを可能にする多面体対称性を構築するのであれば、タンパク質性であってもそうでなくても、いずれも本発明における使用に適している。さらにまた、タンパク質配列の多少の変異は、そのタンパク質の活性に影響を及ぼすことなく、許容されうることが当技術分野では知られている。

10

[0 1 1 6]

したがって一実施形態では、自己集合性分子のフラグメントも、それらが多量体集合を起こす能力を保っており、高エネルギー・コンフォメーションにある準安定タンパク質、例えばRSV Fタンパク質の融合前コンフォメーションを提示することができるのであれば、考えられる。例えばフェリチンタンパク質の場合であれば、単量体型フェリチンサブユニットタンパク質の一部分または一領域も、その部分が単量体型フェリチンサブユニットの自己集合による球状タンパク質の構築を指示するアミノ酸配列を含んでいる限り、利用することができる。そのような領域の一例が、ヘリコバクター・ピロリ・フェリチンタンパク質のアミノ酸5とアミノ酸167の間にある。さらに具体的な領域は、引用によりそのまま本明細書に組み込まれるZhang, Y. 「Self - Assembly in the Ferritin Nano - Cage Protein Super Family」2011, Int. J. Mol. Sci., 12, 5406 - 5421に記載されている。さらによくまた、実施例1で述べるような本発明の適切なナノ粒子の設計に盛り込まれる構造上の考慮事項を考えると、フェリチンフラグメントの使用は好ましいであろう。例えば実施例1に記載するRSV Fタンパク質 - フェリチン融合タンパク質（すなわち配列番号18～21、24～27、および30～33）は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) フェリチンのアミノ酸5～167にまたがるフェリチンフラグメントにリンカーを介して融合されたRSV Fタンパク質を含む。すなわちリンカーはヘリコバクター・ピロリ・フェリチンのAsp-5残基に連結される。同様に、実施例2に記載するRSV Fタンパク質 - sHSP20融合タンパク質（すなわち配列番号22、23、28、29、34、および35）の場合、RSV Fタンパク質は、リンカーを介して、sHSP20のアミノ酸24～147にまたがるsHSP20フラグメントに連結される。すなわちリンカーは、sHSP20のThr-24残基に連結される。

20

30

[0 1 1 7]

いくつかの実施形態では、前記自己集合性分子が、さまざまな治療薬、アジュvant、イメージング剤、または分子の送達媒体として役立つ。例えば前記さまざまな治療薬、アジュvant、イメージング剤、または分子を、自己集合型分子の内部空間に装填するか、または自己集合型分子に取り付けることができる。

40

フェリチン

フェリチンは、全ての動物、細菌、および植物に見出される球状タンパク質であり、これは、水和した鉄イオンとプロトンをミネラル化されたコアに出し入れすることにより、主として多核Fe₍₁₁₁₎O₃形成の速度と場所を制御するように作用している。球状のフェリチンは、約17~20kDaの分子量を有するポリペプチドである単量体型サブユニットタンパク質（単量体型フェリチンサブユニットともいう）から構成されている。そのような単量体型フェリチンサブユニットの配列の一例を配列番号13に示す。各単量体型フェリチンサブユニットは、4つの逆平行ヘリックスモチーフを含むヘリックス束とその4ヘリックス束の長軸にほぼ垂直に配された短い5番目のヘリックス（c末端ヘリックス）というトポロジーを有する。慣例に従って、これらのヘリックスをN末端から順にそれぞれ「A、B、C、およびDならびにE」と呼ぶ。N末端配列はキャプシド3回軸に隣接して、表面に向かって伸びてあり、一方、Eヘリックスは4回軸に詰め込まれていて、C末端が粒子コアに向かって

50

伸びている。このパッケージングの結果として、キャップシド表面に2つの細孔が作り出される。これらの細孔の一方または両方が、水和された鉄が拡散によってキャップシドに入りする箇所に相当すると予想される。生産に続いて、これらの単量体型フェリチンサブユニットタンパク質は自己集合して、球状のフェリチンタンパク質（すなわち多面体対称性を有するシェル）を構築する。したがって球状型のフェリチン（すなわちフェリチンシェル）は、24個の単量体型フェリチンサブユニットタンパク質を含み、432対称性（すなわち八面体対称性）を有するキャップシド様構造を持つ。これら24個のフェリチン単量体は、24個の対称ドメインのそれぞれを占める。

【0119】

本発明の単量体型フェリチンサブユニットは、フェリチンタンパク質の完全長單一ポリペプチドであるか、または単量体型フェリチンサブユニットの自己集合による球状タンパク質の構築を指示する能力を有するその任意の一部分である。自己集合してナノ粒子を形成し、RSV Fをその表面に融合前コンフォメーションで提示する能力を単量体型フェリチンサブユニットが有する限り、任意の既知フェリチンタンパク質の単量体型フェリチンサブユニットに由来するアミノ酸配列を使って、本発明の融合タンパク質を作ることができる。Fタンパク質が融合前コンフォメーションで発現しているかどうかは、例えば実施例2で述べるように、例えば融合前コンフォメーションを特異的に認識する抗体（例えばD25 mAb）を使って決定することができる。一実施形態では、単量体型サブユニットが、細菌フェリチンタンパク質、植物フェリチンタンパク質、藻類フェリチンタンパク質、昆虫フェリチンタンパク質、真菌フェリチンタンパク質および哺乳動物フェリチンタンパク質からなる群より選択されるフェリチンタンパク質に由来する。一実施形態では、フェリチンタンパク質がヘリコバクター・ピロリに由来する。もう一つの実施形態では、フェリチンタンパク質がヒト（*Homo sapiens*）に由来する。

10

20

30

40

【0120】

熱ショックタンパク質

熱ショックタンパク質（HSP）は自己集合して多面体対称性を生じることが知られている。本発明における使用に適した熱ショックタンパク質としては、HspG41C（例えばKaiser et al., *Int J Nanomedicine* 2007;2:715 - 33参照）や、24個の単量体の均一な多量体であって八面体対称性を有するものを形成するメタノコッカス・ヤンナスキイ（*Methanococcus jannaschii*）のsHSPホモログ（Kim et al., *PNAS* 1998;95:9129 - 33 ; Kim et al., *Nature* 1998;394:595 - 9;US2007 / 0258889 ; Flenniken et al., *Nano Lett* 2003;3:1573 - 6）が挙げられる。本発明における使用に適した他の熱ショックタンパク質として、HSP60、HSP70、HSP90、およびHSP100、または自己集合する能力を保っているそのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

30

40

【0121】

好ましい一実施形態では、本発明の準安定タンパク質（例えばRSV Fタンパク質）をsHSP（配列番号36または37）に融合する。一実施形態では、RSV Fタンパク質-sHSP融合物が、配列番号22、23、28、29、34、または35に示す配列を有する。自己集合性分子としての使用に適した他のHSPとして、HSP60（配列番号38）、HSP70（配列番号39）、HSP90（配列番号40～41）、およびHSP100（配列番号42）が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

50

【0122】

ウイルス

ウイルスの高度に組織化された繰り返しモチーフと対称性とを考慮すると、ウイルスも本発明における使用に適したケージになる。限定するわけではないが、適切なウイルスとして、ササゲクロロティックモトルウイルス（CCMV）（Speir et al., *Structure* 1995;3 :63 - 78 ; Gillitzer et al., *Chem Common (Camb)* 2002;21:2390 - 1, Gillitzer et al., *Small* 2006;2:962 - 6 ; Brumfield et al., *J Gen Virol* 2004;85:1049 - 53 ; US2007 / 02 58889）、ササゲモザイクウイルス（CPMV）（Brennan et al., *Mol Biotechnol* 2001;17: 15 - 26 ; Chatterji et al., *Intervirology* 2002;45:362 - 70 ; Raja et al., *Biomacromo*

50

olecules 2003;4:472 - 6 ; Blum et al., Nano Letters 2004;4:867 - 70 ; Rae et al., Virology 2005;343:224 - 35 ; Lewis et al., Nat Med 2006;12:354 - 60)、ジャガイモウイルス (PVX ; Marusic et al., J Virol 2001;75:8434 - 9)、MS2ウイルス (US2007 / 02588 89)、およびタバコモザイクウイルス (Koo et al. PNAS 1999;96:7774 - 9 ; Smith et al. Virology 2006;348:475 - 88)が挙げられる。

【 0 1 2 3 】

DpsおよびDps様タンパク質

DpsおよびDps様タンパク質、例えば大腸菌 (*E. coli*) 由来のもの (Almiron et al. Genes Dev 1992;6:2646 - 54 ; Ilari et al. JBC 2002;277:27619 - 623)、ヘリコバクター・ピロリ由来のもの (Tonello et al. Mol Microbiol 1999;34:238 - 46)、ハロバクテリウム・サリナルム (*Halobacterium salinarum*) 由来のもの (Zeth et al. PNAS 2004;101:13780 - 5)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) 由来のもの (Papinutto et al. PNAS 2002;277:15093 - 8)、スルホロブス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*)、パイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) およびリストリア・イノキュア (*Listeria innocua*) 由来のもの (Ilari et al. Acta crystallogr 1999;D55:552 - 3 ; Stefanini et al. Biochem J 1999;338:71 - 75 ; Bozzi et al. JBC 1997;272:3259 - 265 ; Su et al. Biochemistry 2005;44:5572 - 8) も、本発明におけるタンパク質ケージとしての使用に適している。
10

【 0 1 2 4 】

その他

当技術分野において認識されている他の自己集合性分子には、ルマジンシンターゼ (Shenton et al. Angewandte Chemie - International Edition 2001;40:442 - 5)、リポソーム (Lee and Low Biochim biophys Acta 1995;1233:134 - 44 ; Muller et al. Cancer Gene Ther 2001;8:107 - 17 ; Barratt et al. Cell Mol Life Sci 2003;60:21 - 37)、ミセル (Roy et al. J Am Chem Soc 2003;125:7860 - 5)、ポリアミドアミンデンドリマークラスター (Choi et al. Chem Biol 2005;12:35 - 43 ; Gurdag et al. Bioconjug Chem 2006;17:375 - 83)；ポリ (D,L - 乳酸 - コ - グリコール酸) ナノ粒子 (Yoo et al. Pharm Res 1999;16:1114 - 8 ; Yoo et al. J Control Release 2000;68:419 - 31)；ヒドロゲルデキストランナノ粒子 (Jana et al. FEBS Lett 2002;515:184 - 8 ; Na and Bae. Pharm Res 2002;19:681 - 8)；多糖ナノ粒子 (Janes et al. Adv Drug Deliv Rev 2001;47:83 - 97)；ポリアルキルシアノアクリレートナノカプセル (Damge et al. Diabetes 1998;87:246 - 51)；脂質ナノ粒子 (Fundaro et al. Pharmacol Res 2000;42:337 - 43)；金属ナノシェル (Loo et al. Opt Lett 2005;30:1012 - 4 ; Loo et al. Technol Cancer Res Treat 2004;3:33 - 40)；両親媒性コアシェルナノ粒子 (Sun et al. Biomacromolecules 2005;6:2541 - 54)；他のタンパク質ケージに基づくナノ構造 (Hooker et al. J Am Chem Soc 2004;126:3718 - 9)；シリカナノ粒子、およびアルブミンなどがある。
20
30

【 0 1 2 5 】

IV. 準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質をコードする核酸分子

本発明は、本発明の準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質をコードする核酸にも関係する。準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質、例えば上述したものは、核酸分子の発現によって得ることができる。したがって、準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合物を含有するポリペプチドをコードする核酸分子は、本発明の範囲内であるとみなされる。準安定タンパク質変異体 - 自己集合性分子融合タンパク質を野生型準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質 (すなわち準安定タンパク質および / または自己集合性分子が野生型である)との同一性という観点から説明することができるのと全く同様に、それらをコードする核酸分子も、必然的に、野生型準安定タンパク質 (例えばRSV Fタンパク質) および / または自己集合性分子 (例えばフェリチン、HSP) をコードするものと、一定の同一性を有することになる。例えば準安定タンパク質変異体および / または自己集合性分子変異体および / または準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合物変異体をコードする核酸分子は、野生型準安定タンパク質および / または野生型自己集合性
40
50

分子および／または野生型準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合物をコードする核酸と、少なくとも50%、少なくとも65%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、そして最も好ましくは少なくとも95%（例えは99%）同一であり得る。

【0126】

本発明の核酸分子は、天然の配列を含有するか、または自然に存在するものとは異なるが、遺伝暗号の縮重ゆえに、同じポリペプチドをコードする配列を含有しうる。これらの核酸分子は、RNAもしくはDNA（例えはゲノムDNA、cDNA、または合成DNA、例えはホスホルアミダイトに基づく合成法によって生産されるもの）またはこれらの核酸タイプ内でのヌクレオチドの組み合わせもしくは修飾物からなりうる。加えて、核酸分子は二本鎖または一本鎖（すなわちセンス鎖またはアンチセンス鎖のいずれか）でありうる。

10

【0127】

核酸分子は、ポリペプチドをコードする配列に限定されず、コーディング配列の上流または下流にある非コーディング配列の一部または全部を含めることもできる。分子生物学の当業者は、核酸分子を単離するための日常的手法に精通している。核酸分子は、例えはゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼで処理するか、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことによっても、生成させることができる。核酸分子がリボ核酸（RNA）である場合は、例えはインビトロ転写によって分子を生産することができる。

【0128】

本発明の単離された核酸分子には、自然の状態において、それ自体は見出されないフラグメントを含めることができる。したがって本発明は、組換え分子、例えは核酸配列がベクター（例えはプラスミドまたはウイルスベクター）に組み込まれているもの、または異種細胞のゲノムに（または相同細胞のゲノムの自然の染色体上の位置とは異なる位置に）組み込まれているものを包含する。

20

【0129】

V. 発現方法および／または作製方法

上述の核酸分子は、例えは当該ベクターで形質導入された細胞におけるその発現を指示する能力を有するベクター内に含めることができる。したがって、準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質（例えはRSV Fタンパク質 - フェリチン融合物、RSV Fタンパク質 - HSP融合物）をコードする核酸分子を含有する発現ベクター、およびそれらのベクターをトランスフェクトした細胞は、好ましい実施形態に含まれる。

30

【0130】

本発明における使用に適したベクターには、細菌用のT7系ベクター（例えはRosenberg et al., Gene 56:125, 1987参照）、哺乳動物細胞用のpMSXND発現ベクター（Lee and Nathans, J. Biol. Chem. 263:3521, 1988）、および昆虫細胞用のバキュロウイルス由来ベクター（例えはClontech（カリリフォルニア州パロアルト）の発現ベクターpBacPAK9）などがある。そのようなベクターにおいて、目的のポリペプチドをコードする核酸インサートは、例えそれを発現させようとする細胞タイプなどに基づいて選択されるプロモーターに、作動的に連結することができる。例えは細菌ではT7プロモーターを使用することができ、昆虫細胞ではポリヘドリンプロモーターを使用することができ、哺乳動物細胞ではサイトメガロウイルスプロモーターまたはメタロチオネインプロモーターを使用することができる。また、高等真核生物の場合、組織特異的プロモーターおよび細胞タイプ特異的プロモーターを広く入手することができる。これらのプロモーターは、体内の所与の組織または細胞タイプにおいて核酸分子の発現を指示することができるので、そのように名付けられている。核酸の発現を指示するために使用することができる数多くのプロモーターその他の調節要素が、当業者にはよく知られている。

40

【0131】

ベクターは、挿入された核酸分子の転写を容易にする配列に加えて、複製起点、および選択可能マーカーをコードする他の遺伝子を含有することができる。例えはネオマイシン耐性（neo^r）遺伝子は、それが発現する細胞にG418耐性を付与し、よってトランスフェクト細胞の表現型選択を可能にする。当業者は、所与の調節要素または選択可能マーカーが

50

特定の実験状況における使用に適しているかどうかを、容易に決定することができる。

【0132】

本発明において使用することができるウイルスベクターには、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ隨伴ベクター、ヘルペスウイルス、シミアンウイルス40(SV40)、およびウシパピローマウイルスベクター(例えばGluzman編「Eukaryotic Viral Vectors」CSH Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー参照)などがある。

【0133】

準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質(例えばRSV Fタンパク質 - フェリチン融合物、RSV Fタンパク質 - HSP融合物)またはその変異体をコードする核酸分子を含有し発現させる原核細胞または真核細胞も、本発明の特徴である。本発明の細胞はトランスフェクト細胞、すなわち核酸分子、例えば準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質(例えばRSV Fタンパク質 - フェリチン融合物、RSV Fタンパク質 - HSP融合物)またはその変異体をコードする核酸分子が組換えDNA技法を使って導入された細胞である。そのような細胞の子孫も本発明の範囲内であると見なされる。

10

【0134】

発現系の正確な構成要素は決定的な問題ではない。例えば準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質(例えばRSV Fタンパク質 - フェリチン融合物、RSV Fタンパク質 - HSP融合物)またはその変異体は、原核宿主、例えば細菌である大腸菌中で生産するか、真核宿主、例えば昆虫細胞(例えばSf21細胞)または哺乳動物細胞(例えばCOS細胞、NIH 3T3細胞、またはHeLa細胞)中で生産することができる。これらの細胞は、American Type Culture Collection(バージニア州マナッサス)を含む多くの供給源から入手することができる。発現系の選択において重要なのは、構成要素が互いに適合することだけである。当業者であればそのような決定を行うことができる。さらにまた、発現系の選択において指針が必要であれば、当業者は、Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, ニューヨーク州ニューヨーク, 1993) およびPouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985 Suppl. 1987) を参照することができる。

20

【0135】

発現したポリペプチドは、日常的な生化学的手法を使って発現系から精製することができ、例えば本明細書で述べるように、治療剤 / 予防剤(例えばワクチン)として使用することができる。

30

【0136】

いくつかの態様では、準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合タンパク質を、合成法によって作製することができる。例えば固相合成技法を使用することができる。適切な技法は当技術分野ではよく知られており、Merrifield(1973), Chem. Polypeptides, pp. 33 5 - 61 (Katsoyannis and Panayotish編); Merrifield(1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis et al. (1985), Biochem. Intl. 10: 394 - 414; Stewart and Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; 米国特許第3,941,763号; Finn et al. (1976), The Proteins(第3版)2: 105 - 253; およびErickson et al. (1976), The Proteins(第3版)2:257 - 527に記載されているものなどがある。

40

【0137】

当技術分野では分子発現 / 合成の方法が他にも当業者に広く知られている。

【0138】

VI. インビオアッセイ / モデル

本発明は、本明細書に記載するRSV F - フェリチン融合物に基づくワクチンを含む候補ナノ粒子の、対象における免疫原性をアッセイするための方法を提供する。一実施形態において、対象は靈長類(例えばヒト、チンパンジー、サル、ヒビ)、ラット(例えばコットンラット)、マウス、子牛、モルモット、フェレットおよびハムスターでありうる。いくつかの実施形態では、対象が免疫無防備状態でありうる。

50

【0139】

対象には、さまざまな用量の融合タンパク質で、筋肉内にワクチン接種することができる。対象には、融合タンパク質で、1回、2回、3回、4回またはそれ以上ワクチン接種することができる。例えば対象には0日目と21日目にワクチン接種することができる。あるいは、0日目、14日目および28日目に対象にワクチン接種するか、または0日目、21日目および35日目に対象にワクチン接種するか、0日目、14日目、28日目および42日目に対象にワクチン接種することができる。対象には、後日、ブースター注射によるワクチン接種を行ってもよい。

【0140】

各ワクチン接種後に血清抗RSV F抗体価を測定することができ、免疫処置に先だって対照血清価も測定することができる。いくつかの実施形態では、血清抗RSV F抗体価を最初のワクチン接種の2週間後または3週間後と2回目のワクチン接種の2週間後または3週間後に測定する。別の実施形態では、血清抗RSV F抗体価を2回目、3回目および／または4回目のワクチン接種の2週間後または3週間後に測定する。抗体価は、当技術分野で知られている方法によって決定することができる。例えば抗体価は、ELISA、イムノプロットアッセイまたは間接免疫蛍光法によってアッセイすることができる。これらのアッセイで使用される抗原は、RSV - Fタンパク質、例えば融合前コンフォメーションにある三量体型RSV Fタンパク質であることができる。生成した抗体がRSV F融合後コンフォメーションとの比較でRSV Fタンパク質融合前コンフォメーションに対して示す特異性は、例えば融合前コンフォメーションまたは融合後コンフォメーションにある三量体型RSV Fタンパク質を抗原として使用するELISAアッセイによって決定することができる。ワクチン接種した対象から単離された抗体が、融合後コンフォメーションにある三量体型RSV Fタンパク質と比較して、融合前コンフォメーションにある三量体型RSV Fタンパク質に、少なくとも1.5倍、例えば少なくとも2倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、少なくとも4.5倍、少なくとも5倍またはそれ以上高いアフィニティーで結合するのであれば、候補ナノ粒子ワクチンは、融合前三量体型Fタンパク質を標的とする抗体を誘導するワクチンであるとみなすことができる。

10

20

30

40

【0141】

いくつかの実施形態では、ワクチン接種された対象において中和抗体が生成したかどうかを決定するために、ワクチン接種された対象には、最後の免疫処置後に、RSVを鼻腔内にチャレンジすることができる。例えば、最後の免疫処置の3週間後、4週間後または5週間に、対象にRSVをチャレンジすることができる。いくつかの実施形態では、対照未ワクチン接種対象も、ワクチン接種対象と同時にRSVをチャレンジする。

【0142】

ワクチン接種した対象からの血清試料は、マイクロ中和アッセイによって、中和抗体の存在について試験することができる。マイクロ中和アッセイは、当技術分野において知られている方法で行うことができる。感染性ウイルス粒子の数は、免疫染色法でシンシチウム形成を検出することによって決定することができる。中和力価は、対照（血清なし）と比較して1ウェルあたりのシンシチウムの数を少なくとも60%低減させる血清希釈度の逆数と定義することができる。

【0143】

対象の肺におけるウイルス量はプラークアッセイによって決定することができる。対象の肺をRSV感染後に収集し、プラークアッセイを使って感染性ウイルスについて試験することができる。プラーク数を数えることでウイルス量を決定することができる。

【0144】

ウイルス量を決定するための代替方法は、定量リアルタイムPCR (qRT - PCR) である。ウイルス量は、既述のRSV - F遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使ったqRT - PCRによって決定することができる (I. Borg et al, Eur Respir J 2003 ; 21:944 - 51)、オリゴヌクレオチドプライマーはいくつかの変更を含んでもよい。qRT - PCRを実行するための方法は当技術分野では知られている。

50

【0145】

VII. 免疫原性組成物 / ワクチンおよび投与様式

本発明の準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合物（例えばRSV F - フェリチン融合タンパク質）およびナノ粒子は、準安定タンパク質または準安定タンパク質を発現する感染性因子に対する免疫応答を誘発する能力を有する。一実施形態では、準安定タンパク質が融合前コンフォメーションにあるRSV Fタンパク質であり、自己集合性分子がフェリチンである。したがってこれらの融合タンパク質は、個体を例えばRSV感染から防御するためのワクチンとして使用することができる。あくまで一例として、以下の説明ではRSV F - フェリチン融合タンパク質について述べるが、これらの免疫原性組成物、ワクチン、および投与様式が、本発明の任意の準安定タンパク質 - 自己集合性分子融合物に当てはまるることは、当業者には理解されるであろう。

10

【0146】

本発明によれば、RSV F - フェリチン融合タンパク質またはナノ粒子を免疫原性組成物に使用することで、ワクチンを生成することができる。したがって本発明の一実施形態は、RSV F - フェリチン融合タンパク質を含むナノ粒子を含むワクチンである。本発明のワクチンは、他の構成要素、例えばアジュバント、バッファーなども含有することができる。アジュバントについては後で詳述する。

20

【0147】

一実施形態において、本発明は、RSVに対するワクチンを生産する方法であって、a) 単量体型自己集合分子とRSV Fタンパク質とを含む複合体を、融合前コンフォメーションにあるFタンパク質三量体が前記自己集合分子の多量体化によって形成されるシェルの表面にディスプレイされるような条件下で、発現させること、およびb) Fタンパク質をディスプレイしているシェルを回収することを含む方法に関する。

30

【0148】

一態様において、本発明は、RSVに対するワクチン接種を対象に行う方法であって、特に、宿主細胞への融合が起こる前のウイルスを標的とすることによる方法に関する。そのような方法では本発明のワクチンを使用する。したがって、一実施形態において、本方法は、RSVウイルスに対する免疫応答が対象において生じるように、本発明のナノ粒子を対象に投与することを含み、ここで前記ナノ粒子は、RSV Fタンパク質またはそのフラグメントとフェリチンとを含み、前記フェリチンは準安定融合前コンフォメーションにあるRSV Fタンパク質またはそのフラグメントを捕捉する多量体アセンブリを形成し、融合前コンフォメーションにあるRSV Fタンパク質ホモ三量体は、フェリチンの多量体アセンブリが形成するシェルの表面にディスプレイされる。

30

【0149】

一実施形態では、集合することで（例えばフェリチンやHSPの場合のように）八面体対称性などの多面体対称性を有するシェルを構築する自己集合性分子で、ナノ粒子が構成される。いくつかの実施形態では、シェルが自己集合性分子の単量体を24個含む。

【0150】

一実施形態では、融合前コンフォメーションにあるRSV Fタンパク質を標的とすることにより、宿主細胞に融合する前のRSVに対する中和抗体を誘発する能力を、RSV Fタンパク質が有する。

40

【0151】

本発明のワクチンは、プライム / ブーストプロトコールを使って個体にワクチン接種を行うために使用することができる。そのようなプロトコールは米国特許出願公開第2011/0177122号に記述されており、その全ては引用により本明細書に組み込まれる。そのようなプロトコールでは、第1ワクチン組成物を個体に投与し（プライム）、次に一定期間の後に、第2ワクチン組成物を前記個体に投与する（ブースト）。ブースティング組成物の投与は一般的にはプライミング組成物の投与の数週間または数ヶ月後、好ましくは約2~3週間後もしくは4週間後、または8週間後、または16週間後、または20週間後、または24週間後、または28週間後、または32週間後である。一実施形態では、ブースティング組成物

50

が、プライミング組成物の投与の約1週間後、または2週間後、または3週間後、または4週間後、または5週間後、または6週間後、または7週間後、または8週間後、または9週間後、または16週間後、または20週間後、または24週間後、または28週間後、または32週間後に投与するために処方される。

【0152】

第1および第2ワクチン組成物は同じ組成物であってもよいが、その必要はない。したがって本発明の一実施形態では、ワクチンを投与するステップが、第1ワクチン組成物を投与し、次に時間をおいてから、第2ワクチン組成物を投与することを含む。一実施形態では、第1ワクチン組成物が本発明のRSV F - フェリチン融合タンパク質を含むナノ粒子を含む。一実施形態では、第1ワクチン組成物のRSV - Fが、配列番号18 ~ 21、24 ~ 27、および30 ~ 33からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも約80%同一、例えば少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するRSV F - フェリチン融合タンパク質を含むナノ粒子を含み、前記ナノ粒子がRSVに対する免疫応答を誘発する。一実施形態では、第2ワクチン組成物が、第1ワクチンのものと同一のRSV F - フェリチン融合タンパク質を含むナノ粒子を含む。

【0153】

一実施形態では、個体に、RSVによる感染のリスクがある。一実施形態では、個体がRSVにばく露された後である。例えば、個体は高齢者、小児、乳児、または免疫無防備状態の個体でありうる。本明細書において使用する「ばく露された」、「ばく露」などの用語は、RSVに感染していることがわかっている人または動物と接触した対象を示す。本発明のワクチンは、当業者に周知の技法を使って投与することができる。処方および投与の技法は、例えば「Remington's Pharmaceutical Sciences」第18版、1990、Mack Publishing Co.（ペンシルバニア州イーストン）に見出すことができる。ワクチンは、限定するわけではないが、伝統的なシリンジ、無針注射デバイス、またはマイクロプロジェクトイルポンバードメント遺伝子銃などといった手段によって投与することができる。適切な投与経路として、非経口送達、例えば筋肉内、皮内、皮下、髄内注射、ならびに髄腔内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注射、その他が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。注射の場合は、本発明の一実施形態の化合物を水溶液に、好ましくは生理的に適合するバッファー、例えばハンクス液、リングル液、または生理食塩緩衝液に処方することができる。

【0154】

一実施形態では、RSVによる感染から対象を防御するために、本発明のワクチンまたはナノ粒子を使用することができる。すなわち、あるRSV株に由来するRSV - Fタンパク質を使って作製されたワクチンは、RSVの異なる株、例えば突然変異株による感染から個体を防御する能力を有する。

【0155】

一実施形態では、抗原的に多様なRSVによる感染から個体を防御するために、本発明のワクチンまたはナノ粒子を使用することができる。抗原的に多様とは、RSVの株が経時に突然変異を起こし、それゆえに免疫系に提示されるアミノ酸を変化させがちであることを意味する。

【0156】

VIII. アジュバント

本発明の免疫原性組成物およびワクチン組成物は、1つ以上のアジュバントと一緒に投与することができる。アジュバントの使用はワクチン生物学では常法であり、どのアジュバントまたはアジュバントの組み合わせが所与のワクチンにとって適當であるかは、当業者であれば容易に理解できるであろう。

【0157】

適切なアジュバントとしては、例えばUS2011 / 0305727（これは引用によりそのまま本明細書に組み込まれる）が挙げられるが、それらに限るわけではない。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 8 】

いくつかの実施形態では、アジュバントがミネラル含有組成物である。本発明においてアジュバントとして使用するのに適したミネラル含有組成物として、カルシウム塩やアルミニウム塩（またはその混合物）などのミネラル塩が挙げられる。本発明は、水酸化物（例えばオキシ水酸化物）、リン酸塩（例えばリン酸水素塩、オルトリン酸塩）、硫酸塩などのミネラル塩または異なるミネラル化合物の混合物を包含し、これらの化合物は、任意の適切な形態（例えばゲル、結晶、無定形など）をとり、吸着は好ましい。カルシウム塩にはリン酸カルシウム（例えばUS6,355,271に開示されている「CAP」粒子）が含まれる。アルミニウム塩には、水酸化物、リン酸塩、硫酸塩などが含まれる。ミネラル含有組成物は、ミネラル塩の粒子として処方することもできる（WO00 / 23105）。アルミニウム塩アジュバントは、US2011 / 0305727に詳述されている。

10

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態では、アジュバントが油エマルション組成物（US2011 / 0305727に詳述されている）である。本発明におけるアジュバントとしての使用に適した油エマルション組成物としては、スクアレン・水エマルション、例えばMF59（5%スクアレン、0.5%Tween 80および0.5%Span、マイクロフルイダイザーを使ってサブミクロン粒子に製剤化されたもの）が挙げられる。

【 0 1 6 0 】

いくつかの実施形態では、アジュバントがサイトカイン誘導剤（US2011 / 0305727に詳述されている）である。本明細書における使用に適したサイトカイン誘導剤として、Toll様受容体7（TLR7）アゴニスト（例えばWO 2009 / 111337に開示されているベンゾナフチリジン化合物）が挙げられる。

20

【 0 1 6 1 】

いくつかの実施形態では、前記アジュバントがサポニン（「Vaccine Design: the Subunit and Adjuvant Approach」（Powell & Newman編）Plenum Press 1995（ISBN 0 - 306 - 44867 - X）のChapter 22）であり、これは、多種多様な植物種の樹皮、葉、幹、根、さらには花にも見出されるステロール配糖体とトリテルペノイド配糖体の不均一な一群である。キラヤ・サポナリア・モリナ（Quillaia saponaria Molina）の木の樹皮から得られるサポニンはアジュバントとして広く使用してきた。スミラックス・オルナタ（Smilax ornata）（サルサパリラ（sarsaparilla））、シュッコンカスミソウ（Gypsophilla paniculata）（ブライダルベール（bridal veil））、およびサポンソウ（Saponaria officinalis）（ソープルート（soap root））由来のサポニンも購入することができる。サポニンアジュバント製剤としては、QS21などの精製製剤の他、ISCOMなどの脂質製剤も挙げられる。QS21はSTIMULON（商標）として販売されている。サポニン組成物はHPLCおよびRP - HP LCを使って精製されている。これらの技法を使って、QS7、QS17、QS18、QS21、QH - A、QH - BおよびQH - Cなどといった特殊な精製画分が同定されている。サポニンはQS21であることが好ましい。QS21の生産方法はUS5,057,540に開示されている。サポニン製剤はコレステロールなどのステロールも含みうる（WO96 / 33739）。サポニン類とコレステロール類との組み合わせを使って、免疫刺激複合体（ISCOM）と呼ばれるユニークな粒子を形成させることができる。ISCOMは典型的にはホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルコリンなどのリン脂質も含む。既知のサポニンはいずれもISCOMに使用することができる。ISCOMは、QuillA、QHAおよびQHCのうちの1つ以上を含むことが好ましい。ISCOMはWO96 / 33739、EP - A - 0109942、およびWO96 / 11711にさらに詳しく記述されている。場合により、ISCOMは追加の洗浄剤を欠いてもよい（WO00 / 07621）。サポニンに基づくアジュバントの開発に関する総説は、Barr et al. (Advanced Drug Delivery Reviews 1998;32:247 - 71) およびSjolanderet et al. (Advanced Drug Delivery Reviews 1998;32:321 - 38) に見出すことができる。

30

【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態では、前記アジュバントが、水中油型エマルション、腸内細菌リポ多糖に由来する修飾天然リピドA、リン脂質化合物（例えば合成リン脂質二量体E6020）な

40

50

どといった、脂質に基づくアジュバント（US2011 / 0305727に詳述されている）である。

【0163】

いくつかの実施形態では、アジュバントが細菌ADPリボシリ化毒素（例えば大腸菌易熱性エンテロトキシン「LT」、コレラ毒素「CT」、または百日咳毒素「PT」）およびそれらの無毒化誘導体、例えばLT-K63およびLT-R72として知られている突然変異型毒素である（Pizza et al., Int J Med Microbiol 2000;290:455 - 61）。無毒化ADPリボシリ化毒素の粘膜アジュバントとしての使用はWO95 / 17211に記載され、非経口アジュバントとしての使用はWO98 / 43275に記載されている。

【0164】

いくつかの実施形態では、アジュバントが、エステル化ヒアルロン酸マイクロスフェア（Singh et al., J Cont Release 2001;70:267 - 76）またはキトサンおよびその誘導体（WO99 / 27960）などといった生体付着剤または粘膜付着剤である。

【0165】

いくつかの実施形態では、アジュバントがマイクロ粒子（すなわち、直径約100nm～約150 μm、より好ましくは直径約200nm～約30 μm、または直径約500nm～約10 μmの粒子）であり、このマイクロ粒子は、生分解性かつ非毒性の材料（例えばポリ（-ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトンなど）（ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）が好ましい）から形成され、場合によっては負に帯電した表面を有するように（例えばSDSで）または正に帯電した表面を有するように（例えばCTABなどのカチオン洗浄剤で）処理されたものである。

【0166】

いくつかの実施形態では、アジュバントがリポソームである（「Vaccine Design: the Subunit and Adjuvant Approach」（PowellおよびNewman編）Plenum Press 1995（ISBN 0-306-44867-X）のChapter 13およびChapter 14）。アジュバントとしての使用に適したリポソーム製剤の例は、US6,090,406、US5,916,588、およびEP-A-0626169に記載されている。

【0167】

いくつかの実施形態では、アジュバントがポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステルである（WO99 / 52549）。そのような製剤には、さらに、オクトキシノールと組み合わされたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（WO01 / 21207）や、オクトキシノールなどの少なくとも1つの追加ノニオン界面活性剤と組み合わされたポリオキシエチレンエーテルまたはエステル界面活性剤（WO01 / 21152）も含まれる。好ましいポリオキシエチレンエーテルは次の群から選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル（ラウレス9）、ポリオキシエチレン-9-ステアリルエーテル（polyoxyethylene-9-stearyl ether）、ポリオキシエチレン-8-ステアリルエーテル（polyoxyethylene-8-stearyl ether）、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。

【0168】

いくつかの実施形態では、アジュバントがムラミルペプチド、例えばN-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン（「thr-MDP」）、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（nor-MDP）、N-アセチルグルコサミニル-N-アセチルムラミル-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-ジパルミトキシプロビルアミド（「DTP-DPP」または「Theramide（商標）」）、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1',2'-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン（「MTP-PE」）である。

【0169】

いくつかの実施形態では、アジュバントが、第1グラム陰性菌に由来する外膜タンパク質プロテアソーム調製物と第2グラム陰性菌に由来するリポ糖調製物とを組み合わせたものであり、前記外膜タンパク質プロテアソーム調製物とリポ糖調製物は、安定な非共有結

10

20

30

40

50

合的アジュバント複合体を形成する。そのような複合体として、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 外膜トリポ多糖とから構成される複合体「IVX - 908」が挙げられる。

【0170】

いくつかの実施形態では、アジュバントがポリオキシドニウムポリマー (Dyakonova et al., *Int Immunopharmacol* 2004;4:1615 - 23 ; FR - 2859633) または他のN酸化型ポリエチレン - ピペラジン誘導体である。

【0171】

いくつかの実施形態では、アジュバントがメチルイノシン5' - リン酸（「MIMP」）である (Signorelli & Hadden. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1177 - 86)。

【0172】

いくつかの実施形態では、アジュバントがWO2004 / 064715に記載のポリヒドロキシル化ピロリジン化合物である。

【0173】

いくつかの実施形態では、アジュバントがCD1dリガンド、例えば - グリコシルセラミド (De Libero et al. (*Nature Reviews Immunology* 2005;5:485 - 96 ; US 5,936,076 ; Oki et al. (*J Clin Invest* 2004;113:1631 - 40) ; US2005 / 0192248 ; Yang et al. (*Angew Chem Int Ed* 2004;43:3818 - 22 ; WO2005 / 102049 ; Goffet et al. (*Am Chem Soc* 2004; 126:13602 - 3 ; WO03 / 105769) (例えば - ガラクトシルセラミド) 、 フィ0 [(2S,3S,4R) - 1 - O - - グリコシルセラミド、 OCH、 KRN7000 [(2S,3S,4R) - 1 - O - (- D - ガラクトピラノシル) - 2 - (N - ヘキサコサノイルアミノ) - 1,3,4 - オクタデカントリオール] 、 CRONY - 101、 3" - O - スルホ - ガラクトシルセラミドなどである。 20

【0174】

いくつかの実施形態では、アジュバントが、ガンマイヌリン (Cooper et al. *Pharm Biotechnol* 1995;6:559 - 80) またはその誘導体、例えばアルガムリン (algammulin) である。

【0175】

いくつかの実施形態では、前記アジュバントがビロゾームまたはウイルス様粒子 (VLP) である。これらの構造物は一般に、ウイルスに由来する1つ以上のタンパク質を含有し、場合によってはそれがリン脂質と組み合わされまたはリン脂質と共に処方される。これらは一般に非病原性、非複製性であり、一般に天然ウイルスゲノムを一切含有しない。ウイルスタンパク質は組換え生産するか、ウイルス全体から単離することができる。ビロゾームまたはVLPでの使用に適したこれらのウイルスタンパク質には、例えば次に挙げるものに由来するタンパク質がある：インフルエンザウイルス (HAまたはNAなど) 、B型肝炎ウイルス (コアタンパク質またはキャプシドタンパク質など) 、E型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、シンドビスウイルス、ロタウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、ノーウォークウイルス、ヒトパピローマウイルス、HIV、RNAファージ、Q ファージ (コートタンパク質など) 、GAファージ、frファージ、AP205ファージ、およびTy (レトロトランスポゾンTyタンパク質p1など) 。したがって、いくつかの実施形態では、タンパク質ケージそのものも、アジュバントとして機能しうる。 30

【0176】

これらのアジュバント - 活性物質および他のアジュバント - 活性物質は、例えば「*Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*」 (Powell & Newman編) Plenum Press 1995 (ISBN 0 - 306 - 44867 - X) や「*Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*」 (Methods in Molecular Medicineシリーズの第42巻) (ISBN:1 - 59259 - 083 - 7, O'Hagan編) で、さらに詳しく論じられている。

【0177】

本発明の免疫原性組成物は、2つ、3つ、4つまたはそれ以上のアジュバントを含みうる。例えば、水中油型エマルションとサイトカイン誘導剤との両方、またはミネラル含有組成物とサイトカイン誘導剤との両方、または2つの水中油型エマルションアジュバント、または2つのベンゾナフチリジン化合物などを含む本発明の組成物は有利でありうる。 50

【0178】

水酸化アルミニウムおよび／またはリン酸アルミニウムアジュバントは特に小児において有用であり、抗原は一般にこれらの塩に吸着させる。水中スクアレンエマルションも特に高齢者において好ましい。有用なアジュバントの組み合わせとして、Th1アジュバントとTh2アジュバントの組み合わせ、例えばCpGとアラム、またはレシキモドヒアラムが挙げられる。リン酸アルミニウムと3dMPLの組み合わせも使用することができる。使用することができる他の組み合わせには、アラムとベンゾナフチリジン (benzonaphthidine) 化合物またはSMIP、水中スクアレンエマルション (MF59など) とベンゾナフチリジン化合物またはSMIP、およびE6020と水中スクアレンエマルション (MF59など) またはアラムなどがある。

10

【0179】

適切なアジュバントとして、さらに、次に挙げるものもある：遺伝子アジュバント、例えばIL-2遺伝子またはそのフラグメント、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 遺伝子またはそのフラグメント、IL-18遺伝子またはそのフラグメント、ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド21 (CCL21) 遺伝子またはそのフラグメント、IL-6遺伝子またはそのフラグメント、および他の免疫刺激遺伝子；タンパク質アジュバント、例えばIL-2またはそのフラグメント、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) またはそのフラグメント、IL-18またはそのフラグメント、ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド21 (CCL21) またはそのフラグメント、IL-6またはそのフラグメント、脂質アジュバント、例えばカチオン性リポソーム、N3 (カチオン性脂質)、モノホスホリルリピドA (MPL1)；他のアジュバント、例えばFms様チロシンキナーゼ-3リガンド (Flt-3L)、ブピバカイン、マーカイン、およびレバミソール。

20

【0180】

本発明の組成物は細胞性免疫応答と体液性免疫応答をどちらも誘発しうる。TH1免疫応答はTH1アジュバントを使って誘発することができる。TH1アジュバントは一般に、アジュバントなしの抗原の免疫処置と比較して、IgG2a産生レベルの増加を誘発するであろう。本発明における使用に適したTH1アジュバントとしては、例えばサポニン製剤、ビロゾームおよびウイルス様粒子、腸内細菌リポ多糖 (LPS) の非毒性誘導体、免疫刺激オリゴヌクレオチドを挙げることができる。免疫刺激オリゴヌクレオチド、例えばCpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチドは、本発明における使用に関して好ましいTH1アジュバントである。TH2免疫応答はTH2アジュバントを使って誘発することができる。TH2アジュバントは一般に、アジュバントなしの抗原の免疫処置と比較して、IgG1産生レベルの増加を誘発するであろう。本発明における使用に適したTH2アジュバントとしては、例えばミネラル含有組成物、油エマルション、およびADPリボシリ化毒素およびその無毒化誘導体が挙げられる。ミネラル含有組成物、例えばアルミニウム塩は、本発明における使用に関して好ましいTH2アジュバントである。

30

【0181】

組成物はTH1アジュバントとTH2アジュバントの組み合わせを含みうる。好ましいことに、そのような組成物は、強化されたTH1応答と強化されたTH2応答を誘発する。すなわち、アジュバントなしの免疫処置と比較して、IgG1産生とIgG2a産生の両方を増加させる。さらに好ましいことに、TH1アジュバントとTH2アジュバントの組み合わせを含む組成物は、単一のアジュバントによる免疫処置と比較して（すなわちTH1アジュバントのみまたはTH2アジュバントのみによる免疫処置と比較して）、増加したTH1免疫応答および／または増加したTH2免疫応答を誘発する。

40

【0182】

IX. 予防および処置の方法

免疫原性組成物を調製し、それを必要とする対象に投与する方法は、当技術分野ではよく知られているか、または当業者であれば容易に決定することができる。投薬量と投与頻度はその処置が予防的処置であるか治療的処置であるかに依存しうる。

【0183】

50

本発明の免疫原性組成物およびナノ粒子は、哺乳動物（例えば靈長類（例えばヒト、チンパンジー、サル、ヒヒ）、ラット（例えばコットンラット）、マウス、ウシ（例えば子牛）、モルモット、フェレットおよびハムスター）への投与に適している。一実施形態において、本発明は、哺乳動物において免疫応答を誘導する方法であって、本発明の組成物（例えば免疫原性組成物）を前記哺乳動物に投与するステップを含む方法を提供する。組成物（例えば免疫原性組成物）は、哺乳動物を免疫処置するためのワクチン製剤を生産するために使用することができる。前記哺乳動物は典型的にはヒトであり、前記免疫原性組成物は典型的にはRSV F - フェリチン融合タンパク質またはRSV F - HSP融合タンパク質を含む。しかし前記哺乳動物は、RSVによる感染を起こしうる他の任意の哺乳動物、例えばウシRSVに感染しうるウシであることができる。

10

【0184】

本発明は、医薬として使用するための、例えばRSV感染に対して患者を免疫処置する際に使用するための、本発明の組成物も提供する。

【0185】

本発明は、患者において免疫応答を生じさせるための医薬の製造における上述のポリペプチドの使用も提供する。

【0186】

これらの方法および使用によって生じる免疫応答には、一般に抗体応答、好ましくは防御抗体応答が含まれるであろう。RSVワクチン接種後の抗体応答を評価するための方法は当技術分野ではよく知られている。

20

【0187】

本発明の組成物は、筋肉内注射（例えば腕または脚への注射）、皮下注射、鼻腔内投与、経口投与、皮内投与、経皮（transcutaneous）投与、経皮（transdermal）投与など、いくつかの適切な方法で投与することができる。適当な投与経路は、当該哺乳動物の年齢、健康状態および他の特徴に依存するであろう。臨床家は、これらの因子および他の因子に基づいて適当な投与経路を決定することができるであろう。

【0188】

免疫原性組成物、およびワクチン製剤は、小児を処置するためにも、妊婦を含む成人を処置するためにも、使用することができる。したがって対象は、1歳未満、1～5歳、5～15歳、15～55歳、または少なくとも55歳である。ワクチン投与の好ましい対象は、高齢者（例えば>50歳、>60歳、>65歳、好ましくは>75歳）、若年（例えば<6歳、例えば4～6歳、<5歳）、および妊婦である。ただしワクチンはこれらのグループに限定されるわけではなく、集団内で、より広く使用することができる。

30

【0189】

処置は、単回投与スケジュールまたは複数回投与スケジュールによることができる。複数回投与は、一次免疫処置スケジュールおよび／またはブースター免疫処置スケジュールで使用することができる。複数回投与スケジュールでは、さまざまな用量を同じ経路で与えるか、例えば非経口プライムと粘膜ブーストまたは粘膜プライムと非経口ブーストなどのように、異なる経路で与えることができる。2回以上（典型的には2回）の投与が、免疫学的にナイーブな患者にはとりわけ有用である。複数回投与は典型的には少なくとも1週間（例えば約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間など）の間隔をあいて行われるであろう。

40

【0190】

本発明の組成物を使って生産されるワクチン製剤は（例えば医療専門家またはワクチン接種センターでの診療または診察時に）他のワクチンと実質上同時に、患者に投与することができる。

【0191】

X. キット

本発明の免疫原性組成物またはナノ粒子はキットに入れて提供することができる。一実施形態では、キットが(a)1単位用量以上の免疫原性組成物またはナノ粒子を含む組成物

50

が入っている容器、および場合によっては(b)情報資料を含む。単位用量の免疫原性組成物またはナノ粒子は、対象において免疫原応答(例えば抗体生産)を引き起こすのに十分なものである。情報資料は、説明資料、指示資料、販売資料、または本明細書に記載する方法および/もしくは治療的利益を得るための薬剤の使用に関する他の資料でありうる。キットは免疫原応答に関する試験(アッセイ)に有用な試薬および指示書も含みうる。免疫原応答に関するそのようなアッセイの方法として、例えば本明細書に記載する試験方法のいずれかが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。一実施形態では、キットがRSVを処置するための1つ以上の追加薬剤を含む。例えばキットは、免疫原性組成物を含む組成物が入っている第1容器と、1つ以上の追加薬剤を含む第2容器とを含む。

【0192】

10

キットの情報資料はその形態に制約がない。一実施形態では、情報資料は、免疫原性組成物の生産、組成物の分子量、濃度、有効期限、バッチまたは生産施設情報などに関する情報を含みうる。

【0193】

一実施形態では、情報資料が、RSVに感染している対象、またはRSVに感染するリスクがある対象を処置するために免疫原性組成物を、例えば適切な用量、剤形、または投与様式(例えば本明細書に記載する用量、剤形、または投与様式)で投与する方法に関する。情報は、印刷物、コンピュータ可読材料、ビデオ記録、または音声記録、または実体的資料へのリンクもしくはアドレスを提供する情報など、さまざまなフォーマットで提供することができる。

20

【0194】

前記薬剤(例えばRSV F-フェリチン融合タンパク質)に加えて、キット中の組成物は、他の成分、例えば溶媒もしくはバッファー、安定剤、または保存剤を含むことができる。薬剤は任意の形態で、例えば液体、乾燥型または凍結乾燥型で、好ましくは実質的に純粋かつ/または滅菌された形態で提供することができる。薬剤が溶液として提供される場合、その溶液は好ましくは水溶液である。薬剤が乾燥型として提供される場合、再構成は、一般に、適切な溶媒の添加によって行われる。溶媒、例えば滅菌水またはバッファーは、場合によってはキットに入れて提供することができる。

【0195】

30

キットは、前記薬剤を含有する1つまたは複数の組成物のための容器を1つ以上含みうる。いくつかの実施形態では、前記キットが、組成物および情報資料のために個別の容器、仕切りまたは区画を含みうる。例えば、組成物は瓶、バイアル、またはシリンジに入れておくことができ、情報資料はプラスチック製のスリーブまたは小袋に入れておくことができる。別の実施形態では、キットの前記別個の要素が、仕切られていない单一の容器に入っている。例えば組成物は瓶、バイアルまたはシリンジに入っていて、そこに情報資料がラベルの形態で貼付されている。いくつかの実施形態では、キットが、複数の(例えば一組の)個別容器を含み、そのそれぞれに前記薬剤の単位剤形(例えば本明細書に記載する剤形)が1つ以上入っている。容器は、複合単位投薬量、例えばRSV F-フェリチン融合タンパク質と第2の薬剤の両方を例えば所望の比で含む単位を含みうる。例えばキットは、例えばそれぞれに单一の複合単位用量が入っている複数のシリンジ、アンプル、ホイル小袋、ブリストー包装、または医用デバイスを含む。キットの容器は気密性、防水性(例えば湿度の変化または蒸発に対して不透過性)、および/または遮光性でありうる。

40

【0196】

キットは場合により、組成物の投与に適したデバイス、例えばシリンジまたは他の適切な送達デバイスを含む。デバイスは、薬剤の一方または両方が前もって充填された状態で提供することもできるし、空であるが充填に適したものであってもよい。

【0197】

本明細書で言及する刊行物、特許、および特許出願は、上述のものも後述のものも全て、引用によりそのまま本明細書に組み込まれる。

【実施例】

50

【0198】

実施例1：ナノ粒子の設計とモデルの創製

自然界において、フェリチンと熱ショックタンパク質の2つは、適当な条件下で自己集合して多面体対称性を有するシェルを構築することがよく知られているタンパク質の例である。フェリチンシェルは24個のフェリチン単量体から構成され、それらが八面体対称性の24個の対称ドメインのそれぞれを占めている（図2）。

【0199】

例示的準安定ウイルスタンパク質であるRSVのF糖タンパク質は、その融合前状態において、三量体型四次構造をとる。もう一つの例示的準安定ウイルスタンパク質であるデングウイルスのE糖タンパク質は、融合前中間状態において、三量体型四次構造をとる。これらの状態にある準安定ウイルスタンパク質のコンフォメーションは、効果的なナノ粒子ワクチンを実現するのに好都合である。天然に二量体および三量体を形成する分子は、多面体シェルのそれぞれ二回軸または三回軸上に配置することができる。それらを適切に取り付ければ、これらの二量体および三量体内での四次構造相互作用は、多面体シェルの集合を助けることができる。

10

【0200】

ナノ粒子の設計に際して考慮すべき重要な事項は、準安定ウイルスタンパク質上の厳密なアミノ酸残基と自己集合性タンパク質上の厳密なアミノ酸残基およびそれら2つの分子を、結果として生じる分子が自己集合して多面体対称性を有するナノ粒子を構築しかつ準安定ウイルスタンパク質が融合前コンフォメーションに固定されるような形で取り付けることになる正確なリンカーを同定することである。これを、それら2つのタンパク質系のコンピュータモデリングを使って達成した。加えて、これらの性質を有するナノ粒子を創製するために要求される特別な実験条件も、決定しなければならない。以下は、RSV F糖タンパク質およびフェリチンナノ粒子の組成物を生成させるためのコンピュータモデリングの詳細である。以下に述べるF糖タンパク質 - フェリチンの組合せが単なる例示に過ぎないこと、そしてこの方法を任意の準安定タンパク質 - 自己集合性分子の組み合わせに応用できることは、当業者には理解されるであろう。

20

【0201】

モデルの作成

RSV融合前F糖タンパク質とフェリチンの分子構造のコンピュータモデリングを行って、連結されることになるそれら2つのタンパク質の厳密な残基、ならびにフェリチンの自己集合が起こり、かつRSV F糖タンパク質がその融合前コンフォメーションを保って、そのコンフォメーションに固定されることになるような形でそれらを繋ぐ、リンカーの正確な組成および構造を決定した。

30

【0202】

融合前F糖タンパク質は三量体であるから、Fタンパク質に取り付けられたフェリチンから構成される24個の単量体は集合して、3つのFタンパク質は3回対称軸のそれぞれの周りに配向されるであろうという仮説を設けた。

【0203】

a. シェル

ナノ粒子のモデルを創製する際に考慮すべき重要な事項は、三量体化した融合前Fタンパク質とシェル内の3つのフェリチン分子の3回対称軸の配向である（図4）。

40

【0204】

b. リンカー

Fタンパク質三量体とフェリチン三量体とを同じ三回軸の周りに配向させるために、Fタンパク質のLeu - 513残基をフェリチンのAsp - 5残基に連結することができる。これらの残基セットのそれぞれを結ぶと、辺長がRSV Fタンパク質三量体の場合で12.1オングストローム、フェリチン三量体の場合で28.7オングストロームである2つの正三角形が形成された（図5）。もしこれらの三角形が同じ平面にあるとすれば、Fタンパク質のLeu - 513とフェリチンのASP - 5との間の距離は、9.6オングストロームになるであろう。しかし、立体

50

障害が存在せず、フェリチンの自己集合が起こりうることを保証するには、Fタンパク質三量体をフェリチン三量体の平面の上に持ち上げる必要がある。このことから、約4~7アミノ酸残基というリンカーの長さが示唆される。リンカーの組成は、セリン残基とグリシン残基とが交互しているものとすことができ、これにより、そのコンフォメーションに柔軟性をもたせることができる(図6Aおよび6B)。7アミノ酸リンカー(SGGSGSG;配列番号48)、6アミノ酸リンカー(SGSGSG;配列番号47)、5アミノ酸リンカー(SGGSG;配列番号45)、および4アミノ酸リンカー(SGSG;配列番号43)による例示的Fタンパク質-リンカー-フェリチン融合物を、それぞれ配列番号18~21、24~27、および30~33に示す。

【0205】

その結果生じた構造を検証し、不良接触も / 00)と二次ウサギ抗ヒ違背もないことを保証するために精密化した。最後に、整列させたこれらの三量体8つを、フェリチンの自己集合テンプレートに従って整列することで、Fタンパク質三量体が融合前コンフォメーションで提示され、固定されている、フェリチン/Fタンパク質単量体の八面体シェルを形成させた(図7)。

【0206】

実施例2 - RSVF - リンカー - ヘリコバクター・ピロリ・フェリチン(HypF)融合タンパク質の発現と精製

4アミノ酸リンカー(SGSG;配列番号43)とヒトCD5リーダー配列(MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLG;配列番号51)とを有するRSVF-リンカー-HypF融合コンストラクトを哺乳動物発現についてコドン最適化し、2つの異なる密度(1×10^6 および 2×10^6 細胞/mL)でプレーティングした293F細胞に、PEIで一過性にトランスフェクトした。トランスフェクション後の3日目、4日目、5日目、および6日目にタンパク質を培養上清から収集し、ウェスタンプロットで分析した。融合前状態にあるFタンパク質を特異的に認識するモノクローナルD25抗体(供給源;1:1000)と二次ウサギ抗ヒトFc抗体(供給源;1:10,000)とを使って、タンパク質を検出した。図9に示すように、RSVF-HypF融合タンパク質を検出することができ、Fタンパク質は融合前状態で発現していた。融合タンパク質の分子量から、これは三量体として発現していたことが示唆される。

【0207】

また、RSVF-HypF融合タンパク質を、アニオン交換カラム(HiTrap Q HPカラム;GE)を用いるFPLCで精製した。上述のようにトランスフェクトした293F細胞の培養上清を収集し、Freestyle 293培地(供給源)で1:4希釈し、アニオン交換カラムにローディングした。カラムを1×PBSで洗浄し、NaCl勾配(1×PBS + 1M NaCl)を使って溶出させた。溶出した画分の一部を、上述のようにモノクローナルD25抗体を用いるウェスタンプロットに付した。図10に示すように、素通り画分と洗浄画分にはタンパク質は検出されなかった。RSVF-HypFタンパク質を含有する溶出画分はいずれも、D25抗体で融合物が検出されたことから、Fタンパク質は融合前状態で発現することが示唆された。ここでも、融合タンパク質の分子量から、これは三量体として発現していたことが示唆される。

【0208】

これらの結果は全体として、実施例1の方法に従って設計されたRSVF-フェリチン融合タンパク質が、融合前状態のFタンパク質を伴って発現することを示唆している。

【0209】

実施例3 - RSV Fタンパク質 - HSPナノ粒子

同様の方法を使って、RSV F糖タンパク質および熱ショックタンパク質ナノ粒子の組成物も生成させた。熱ショックタンパク質は、適当な条件下で自己集合して多面体対称性を有するシェルを構築することがよく知られているタンパク質のもう一つの例である(図3)。そこで、フェリチン-Fタンパク質ナノ粒子について上述した方法と同様の方法を使って、融合前コンフォメーションにあるFタンパク質を安定化するであろうRSV Fタンパク質-小分子HSP20ナノ粒子を設計した。Fタンパク質三量体とsHSP20三量体とを同じ三回軸の周りに配向させるために、Fタンパク質のLeu-513残基をsHSP20のThr-24残基に連結しうることが、実施例1で述べたようなコンピュータモデリングによって示された。最適な

10

20

30

40

50

リンカー長さは8~10アミノ酸であることがわかった。10アミノ酸リンカー（SGSGSGSGSG；配列番号50）による例示的Fタンパク質-リンカー-sHSP20タンパク質融合物を配列番号22に示す。

【0210】

実施例4 - Fタンパク質 - 非タンパク質性自己集合性分子

実施例1で述べたものと同様の考慮事項をDNAなどの非タンパク質性自己集合性分子にも適用することができる。例えばHe et al., Nature 2008;452:198 - 201に記載されているように、DNAは集合して、多種多様な一次元、二次元、さらには三次元構造、例えば立方体、八面体、四面体、十二面体、またはバッキー・ボールを構築することができる。したがって、三量体型RSV Fタンパク質がDNAナノ構造上に固定された融合前状態で提示されるRSV Fタンパク質-DNA融合ナノ粒子の設計に適合するように、実施例1で述べたものと同様のコンピュータモデリング戦略を改造することができる。タンパク質を核酸に連結する方法は当技術分野ではよく知られている。そのようなRSV Fタンパク質-DNA融合ナノ粒子は、本明細書に記載する方法を使って、融合前Fタンパク質に対する抗体を誘発する能力について試験することができる。

10

【0211】

実施例5 - RSV Fタンパク質 / 自己集合性分子融合物による免疫処置

本明細書に記載するRSV F-自己集合性分子融合物（例えば実施例1~4で述べたもの）とアジュバントを、対象に、2週間または3週間の間隔を置いて2回、筋肉内投与する。各免疫処置の2週間後および最初の免疫処置の1週間前に対象から血清を収集する。

20

【0212】

免疫処置対象からの免疫前および免疫後血清を、RSV Fへの結合について、ELISAでアッセイする。血清を連続希釈し、RSV Fタンパク質および対照タンパク質との反応性についてアッセイする。

【0213】

実施例6 - 免疫処置およびチャレンジ

マウスの免疫処置とウイルスチャレンジはSingh et al., Vaccine 2007;25:6211 - 23に記載の方法を使って行う。簡単に述べると、4~6週齢のマウス（例えばヒトRSV A2株による感染を受けるBALB/cマウス）に、本明細書に記載のRSV F-自己集合性分子融合物または媒体とアジュバントで、鼻腔内に3回（2週間ごとに1回）免疫処置する。最後の免疫処置の2週間後に、マウスの鼻腔内に生RSVをチャレンジし、チャレンジの5日後に屠殺する。肺を収集し、ホモジナイズし、遠心分離することで、ウイルスを含有する上清を集め。力価決定のために上清をPBSで10倍連続希釈する。チャンバー付組織培養スライド中で単層に生育したHEp-2細胞に連続希釈した上清を加え、30分間吸着させた後、培養培地を加える。RSV感染を48時間行った後、細胞を10%TCAで固定し、引き続きアルコール洗浄を行う。次に細胞を抗RSV Fモノクローナル抗体とFITCコンジュゲートヤギ抗マウス二次抗体とを使った蛍光免疫細胞化学に付す。スライドを蛍光顕微鏡下で観察し、蛍光を放つ細胞の数をカウントすることで、PFUの数を得る。次に、RSVF-フェリチン融合物で免疫処置したマウスと、媒体で処置したマウスとの間でPFUを比較する。RSV F-自己集合性分子融合物で免疫処置したマウスのPFUは、媒体を投与したマウスより低いと予想される。

30

実施形態

【0214】

1. 呼吸器合胞体ウイルス（RSV）Fタンパク質またはそのフラグメントと自己集合性分子とを含むナノ粒子であって、前記自己集合性分子が準安定融合前コンフォメーションにある前記Fタンパク質またはそのフラグメントを捕捉する多量体アセンブリを形成し、よってナノ粒子を形成する、前記ナノ粒子。

40

【0215】

2. 前記Fタンパク質がF1およびF2ヘテロ二量体を含む、実施形態1のナノ粒子。

【0216】

3. 前記Fタンパク質フラグメントがエクトドメインを含む、実施形態1のナノ粒子。

50

【0217】

4. 前記Fタンパク質フラグメントが7アミノ酸リピートAドメイン（HRA）および7アミノ酸リピートCドメイン（HRC）を含む、実施形態1のナノ粒子。

【0218】

5. 前記Fタンパク質フラグメントが、HRAドメイン、HRCドメイン、ならびにF1ドメインおよびIIを含む、実施形態1のナノ粒子。

【0219】

6. 前記Fタンパク質フラグメントが、HRAドメイン、HRCドメイン、F1ドメインおよびI、ならびに7アミノ酸リピートBドメイン（HRB）を含む、実施形態1のナノ粒子。

【0220】

7. 1つ以上のF1およびF2のホモ三量体を含む、実施形態1のナノ粒子。

【0221】

8. 前記Fタンパク質が配列番号1～12に示すアミノ酸配列を含む、実施形態1のナノ粒子。

。

【0222】

9. 前記Fタンパク質が前記自己集合性分子に共有結合で取り付けられている、上記実施形態のいずれか一つのナノ粒子。

【0223】

10. 前記Fタンパク質が前記自己集合性分子に遺伝子レベルで融合されている、上記実施形態のいずれか一つのナノ粒子。

【0224】

11. 前記自己集合性分子が、タンパク質、ペプチド、核酸、ウイルス様粒子、ウイルスキャップシド、脂質、および糖質からなる群より選択される、上記実施形態のいずれか一つのナノ粒子。

【0225】

12. 前記自己集合性分子が集合して多面体対称性を有するシェルを構築する、実施形態11のナノ粒子。

【0226】

13. 前記シェルが八面体対称性を有する、実施形態12のナノ粒子。

【0227】

14. 前記シェルが前記自己集合性分子の単量体を24個含む、実施形態13のナノ粒子。

【0228】

15. 前記自己集合性分子が、フェリチン、熱ショックタンパク質、およびDspからなる群より選択されるタンパク質である、実施形態11のナノ粒子。

【0229】

16. 前記自己集合性分子がフェリチンである、実施形態15のナノ粒子。

【0230】

17. 前記フェリチンタンパク質が配列番号13～17に示すアミノ酸配列を含む、実施形態16のナノ粒子。

【0231】

18. 前記自己集合性分子が熱ショックタンパク質、例えばsHSP（小分子熱ショックタンパク質）、HSP100、HSP90、HSP70、およびHSP60である、実施形態15のナノ粒子。

【0232】

19. 前記熱ショックタンパク質が配列番号36～42に示すアミノ酸配列を含む、実施形態18のナノ粒子。

【0233】

20. 前記Fタンパク質と自己集合性分子とがリンカーを使って取り付けられている、上記実施形態のいずれか一つのナノ粒子。

【0234】

21. 前記リンカーが、前記自己集合性分子とFタンパク質との間の立体障害を防止する

10

20

30

40

50

のに十分な長さを有する、実施形態20のナノ粒子。

【0235】

22. 前記リンカーがgly-serリンカーである、実施形態20のナノ粒子。

【0236】

23. 前記リンカーが約4~7アミノ酸長である、実施形態22のナノ粒子。

【0237】

24. 前記Fタンパク質のアミノ酸配列が細胞からの分泌を容易にするためのN末端リーダーをさらに含む、上記実施形態のいずれか一つのナノ粒子。

【0238】

25. 前記N末端リーダーが、配列番号51~53からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態24のナノ粒子。 10

【0239】

26. 上記実施形態のいずれか一つのナノ粒子と医薬上許容される担体とを含む免疫原性組成物。

【0240】

27. さらにアジュバントを含む、実施形態26の免疫原性組成物。

【0241】

28. 実施形態1~25のいずれか一つのナノ粒子を含むワクチン組成物であって、融合前コンフォメーションにあるFタンパク質ホモ三量体が、前記自己集合分子の多量体アセンブリによって形成されるシェルの表面にディスプレイされている、前記ワクチン組成物。 20

【0242】

29. さらにアジュバントを含む、実施形態28のワクチン組成物。

【0243】

30. 配列番号18~21、24~27、および30~33からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質 - フェリチン融合タンパク質。

【0244】

31. 配列番号22、23、28、29、34、および35からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質 - 熱ショックタンパク質融合タンパク質。 30

【0245】

32. 実施形態1~25、30、および31のいずれか一つのナノ粒子または融合タンパク質と使用説明書とを含むキット。

【0246】

33. RSV感染を阻害および/または防止する抗体を生産する方法であって、実施形態1~31のいずれか一つのナノ粒子、免疫原性組成物、ワクチン組成物、または融合タンパク質を対象に投与することを含む、前記方法。

【0247】

34. 前記対象から前記抗体を単離することをさらに含む、実施形態33の方法。

【0248】

35. RSVに対するワクチンを生産する方法であって、a) 単量体型自己集合分子とRSV Fタンパク質とを含む複合体を、融合前コンフォメーションにあるFタンパク質三量体が前記自己集合分子の多量体化によって形成されるシェルの表面にディスプレイされるような条件下で、発現させること、およびb) 前記Fタンパク質をディスプレイしているシェルを回収することを含む、前記方法。 40

【0249】

36. RSVに対するワクチン接種を対象に行う方法であって、実施形態35のワクチンを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【0250】

39. 前記リンカーを取り付けるFタンパク質上の箇所が、配列番号1の位置513にあるロイシンであり、前記リンカーを取り付けるフェリチン上の箇所が配列番号13の位置5にあるアスパラギン酸である、実施形態38の方法。 50

【0251】

40. 実施形態1～25、30、および31のいずれか一つのナノ粒子または融合タンパク質をコードする単離された核酸。

【0252】

41. 実施形態40の核酸を含むベクター。

【0253】

42. 実施形態41の核酸を含む単離された細胞。

【0254】

43. ウィルス融合タンパク質またはそのフラグメントと自己集合性分子とを含むナノ粒子であって、前記自己集合性分子が準安定融合前コンフォメーションにある前記ウイルス融合タンパク質を捕捉する多量体アセンブリを形成し、よってナノ粒子を形成する、前記ナノ粒子。10

【0255】

44. 前記ウイルス融合タンパク質がクラスI、II、またはIII融合タンパク質である、実施形態43のナノ粒子。

【0256】

45. 前記ウイルス融合タンパク質が、二量体型または三量体型の四次構造をとる、実施形態44のナノ粒子。20

【0257】

46. 前記ウイルス融合タンパク質が三量体型の四次構造をとる、実施形態45のナノ粒子。20

【0258】

47. 前記ウイルス融合タンパク質が、パラミクソウイルス科、ラビウイルス科、またはレトロウイルス科ウイルス融合タンパク質である、実施形態43のナノ粒子。

【0259】

48. 前記パラミクソウイルス科ウイルス融合タンパク質が、アブラウイルス、レスピロウイルス、およびニューモウイルスからなる群より選択されるパラミクソウイルス亜科またはニューモウイルス亜科ウイルスである、実施形態47のナノ粒子。30

【0260】

49. 前記ウイルスが、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、および呼吸器合胞体ウイルス（RSV）からなる群より選択される、実施形態48のナノ粒子。30

【0261】

50. 前記ウイルスがRSVであり、前記融合タンパク質がFタンパク質である、実施形態49のナノ粒子。

【0262】

51. 前記ラビウイルス科ウイルス融合タンパク質がラビウイルスである、実施形態47のナノ粒子。

【0263】

52. 前記ラビウイルスがウェストナイルウイルス、デングウイルス、または黄熱ウイルスである、実施形態51のナノ粒子。40

【0264】

53. 前記ウイルスがデングウイルスであり、前記融合タンパク質がEタンパク質である、実施形態52のナノ粒子。

【0265】

54. 前記ウイルス融合タンパク質が前記自己集合性分子に共有結合で取り付けられている、実施形態43～53のいずれか一つのナノ粒子。

【0266】

55. 前記ウイルス融合タンパク質が前記自己集合性分子に遺伝子レベルで融合されている、実施形態43～54のいずれか一つのナノ粒子。

【0267】

56. 前記自己集合性分子が、タンパク質、ペプチド、核酸、ウイルス様粒子、ウイルスキャップシド、脂質、および糖質からなる群より選択される、実施形態43～55のいずれか一項のナノ粒子。

【0268】

57. 前記自己集合性分子が集合して多面体対称性を有するシェルを構築する、実施形態56のナノ粒子。

【0269】

58. 前記シェルが八面体対称性を有する、実施形態57のナノ粒子。

【0270】

59. 前記シェルが前記自己集合性分子の単量体を24個含む、実施形態58のナノ粒子。 10

【0271】

60. 前記自己集合性分子が、フェリチン、熱ショックタンパク質、Dsp、ルマジンシンターゼ、およびMrgAからなる群より選択されるタンパク質である、実施形態59のナノ粒子。
。

【0272】

61. 前記自己集合性分子がフェリチンである、実施形態60のナノ粒子。

【0273】

62. 前記フェリチントンパク質が配列番号13～17に示すアミノ酸配列を含む、実施形態51のナノ粒子。

【0274】

63. 前記自己集合性分子が、sHSP、HSP100、HSP90、HSP70、およびHSP60からなる群より選択される熱ショックタンパク質である、実施形態62のナノ粒子。 20

【0275】

64. 前記熱ショックタンパク質が配列番号36～42に示すアミノ酸配列を含む、実施形態63のナノ粒子。

【0276】

65. 前記ウイルス融合タンパク質と自己集合性分子とがリンカーを使って取り付けられている、実施形態43～64のいずれか一項のナノ粒子。

【0277】

66. 前記リンカーが前記自己集合性分子とウイルス融合タンパク質との間の立体障害を防止するのに十分な長さを有する、実施形態65のナノ粒子。 30

【0278】

67. 前記リンカーが(GlySer)_nリンカーである、実施形態66のナノ粒子。

【0279】

68. 前記リンカーが約4～7アミノ酸長である、実施形態67のナノ粒子。

【0280】

69. 実施形態43～68のいずれか一つのナノ粒子と医薬上許容される担体とを含む免疫原性組成物。

【0281】

70. さらにアジュバントを含む、実施形態69の免疫原性組成物。 40

【0282】

71. 実施形態43～68のいずれか一つのナノ粒子を含むワクチン組成物であって、融合前コンフォメーションにあるウイルス融合タンパク質ホモ三量体が、前記自己集合分子の多量体アセンブリによって形成されるシェルの表面にディスプレイされている、前記ワクチン組成物。

【0283】

72. さらにアジュバントを含む、実施形態71のワクチン組成物。

【0284】

配列のまとめ

【表1-1】

配列番号	説明	配列
1	A2株のRSV Fタンパク質 (GenBank GI: 138251 ; Swiss Prot P03420) (完全長)	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALR TGWYTSVITIELSNIKENCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQ STPPPTNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKRKRRFLGFLLGVGSA IASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLK NYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLITREFSVNAGVTT PVSTYMLTNSELLSLLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKE EVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCNTNTKEGSNICLRTDRGWYC DNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEINLCNVDIFNPKYD CKIMTSKTDVSSSVITSLSGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY VSNKGMDTVSVGNTLYYVNVQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIIVILL SLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN
2	RSV Fタンパク質(C末端切断体 aa 1-524, A2株由来)	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALR TGWYTSVITIELSNIKENCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQ STPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKRKRRFLGFLLGVGSA IASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLK NYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLITREFSVNAGVTT PVSTYMLTNSELLSLLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKE EVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCNTNTKEGSNICLRTDRGWYC DNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYD CKIMTSKTDVSSSVITSLSGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY VSNKGMDTVSVGNTLYYVNVQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN
3	RSV Fタンパク質(C末端切断体 aa 1-513, A2株由来)	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALR TGWYTSVITIELSNIKENCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQ STPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKRKRRFLGFLLGVGSA IASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLK NYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLITREFSVNAGVTT PVSTYMLTNSELLSLLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKE EVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCNTNTKEGSNICLRTDRGWYC DNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYD CKIMTSKTDVSSSVITSLSGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY VSNKGMDTVSVGNTLYYVNVQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN
4	融合用に切断されたRSV Fタン パク質(A2株由来)	QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWTSTVITIELSNIKENCNGTDA KVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK KTNVTLSKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALL STNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVI EFQQKNNRLLITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLLINDMPITNDQ KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTS PLCNTNTKEGSNICLRTDRGWYCNDAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC TMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLSGAIVSCY GKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDYVSNKGMDTVSVGNTLYYVNVQEGKS LYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA SISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
5	RSV F1タンパク質(A2株由来) (aa. 137-524)	FLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGV SVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLIT REFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQ QSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCNTNTKEGSNI CLRTDRGWYCNDAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLC NVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLSGAIVSCYGKTCTASNKNRG

10

20

30

40

【表1-2】

		IIKTFNSNGCDYVSNKGVDTSVGNTLYVNQEGKSLYVKGEPI INFYD PLVFPSPDEFDAISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN
6	RSV F1タンパク質(A2株由来)(aa. 137-513)	FLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNVKIKSALLSTNKAVVSLNSGV SVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEIT REFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQ QSYSIMSIIKEEVLAYVVLQPLYGVIDTPCWLHTSPLCTNTKEGSNI CLTRTDRGWYCDNAGSVFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNL CNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASKNRNG IIKTFNSNGCDYVSNKGVDTSVGNTLYVNQEGKSLYVKGEPI INFYD PLVFPSPDEFDAISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
7	18537株のRSV Fタンパク質(Swiss Prot P13843)	MELLIHRSSAIFLTAVNALYTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALR TGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQ NTPAANNRARREAPQYMNTINTTKNLNVSIASKRKRRFLGFLGVGSA IASGIAVSKVLHLEGEVNVKIKNALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSVLDLK NYINNRLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEITREFSVNAGVTT PLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKE EVLAYVVLQPIYGVIDTPCWLHTSPLCTTNIKEGSNICLRTDRGWYC DNAGSVFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVSLCNDIFNSKYD CKIMTSKTDISSLVITSLGAIVSCYGKTCTASKNRGI IKTFSNGCDY VSNKGVDTSVGNTLYVNKLEGKNLYVKGEPI INYYDPLVFPSPDEFDA SISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNNTGKSTTNIMITTIIIVVLL SLIAIGLLYCAKNTPTVLSKDQLSGINNIAFSK
8	18537株のRSV Fタンパク質(Swiss Prot P13843)(C末端切断体, a.a. 1-524)	MELLIHRSSAIFLTAVNALYTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALR TGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQ NTPAANNRARREAPQYMNTINTTKNLNVSIASKRKRRFLGFLGVGSA IASGIAVSKVLHLEGEVNVKIKNALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSVLDLK NYINNRLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEITREFSVNAGVTT PLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKE EVLAYVVLQPIYGVIDTPCWLHTSPLCTTNIKEGSNICLRTDRGWYC DNAGSVFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVSLCNDIFNSKYD CKIMTSKTDISSLVITSLGAIVSCYGKTCTASKNRGI IKTFSNGCDY VSNKGVDTSVGNTLYVNKLEGKNLYVKGEPI INYYDPLVFPSPDEFDA SISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNNTGKSTTN
9	18537株のRSV Fタンパク質(Swiss Prot P13843)(C末端切断体, a.a. 1-513)	MELLIHRSSAIFLTAVNALYTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALR TGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQ NTPAANNRARREAPQYMNTINTTKNLNVSIASKRKRRFLGFLGVGSA IASGIAVSKVLHLEGEVNVKIKNALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSVLDLK NYINNRLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEITREFSVNAGVTT PLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKE EVLAYVVLQPIYGVIDTPCWLHTSPLCTTNIKEGSNICLRTDRGWYC DNAGSVFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVSLCNDIFNSKYD CKIMTSKTDISSLVITSLGAIVSCYGKTCTASKNRGI IKTFSNGCDY VSNKGVDTSVGNTLYVNKLEGKNLYVKGEPI INYYDPLVFPSPDEFDA SISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNNTGKSTTN
10	融合用に切断されたRSV Fタンパク質(18537株由来)	QNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDT KVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMNTINTTK NLNVSIASKRKRRFLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNVKIKNALL STNKAVVSLNSNGVSVLTSVLDLKNYINNRLLPIVNQQSCRISNIETVI EFQQMNSRLLEITREFSVNAGVTTPPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQ KKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVLQPIYGVIDTPCWLHTS PLCTTNIKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVFFPQAETCKVQSNRVFC TMNSLTLPEVSLCNDIFNSKYDCKIMTSKTDISSLVITSLGAIVSCY GKTCTASKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTSVGNTLYVNKLEGKN LYVKGEPI INYYDPLVFPSPDEFDAISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
11	RSV F1タンパク質(18537株由来)(aa. 137-524)	FLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNVKIKNALLSTNKAVVSLNSGV SVLTSKVLDLKNYINNRLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEIT

10

20

30

40

【表1-3】

		REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQ QSYSIMSIKEEVLAYVVLPIYGVIDTPCWLHTSPLCTTNIKEGSNI CLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCVKQSNRVFCDTMNSLTLPEVSL CNTDIFNSKYDKIMTSKTDISSLGAIVSCYGKTCTASNKNRG IIKTFNSNGCDYVSNKGVDTSVGNTLYVNLEGKNLVKGEPINYD PLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVTNGKSTTN
12	RSV F1タンパク質 (18537株由来; C末端切断体) (aa. 137-513)	FLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVLSNGV SVLTSKVLDLKNYIINRLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEIT REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQ QSYSIMSIKEEVLAYVVLPIYGVIDTPCWLHTSPLCTTNIKEGSNI CLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCVKQSNRVFCDTMNSLTLPEVSL CNTDIFNSKYDKIMTSKTDISSLGAIVSCYGKTCTASNKNRG IIKTFNSNGCDYVSNKGVDTSVGNTLYVNLEGKNLVKGEPINYD PLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
13	フェリチン(H. ピロリJ99) (ア ミノ酸1~167)	MLSKDIKLLNEQVNKEEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAE EYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHIS ESINNIVDHAIKSKDHTATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNE NHGLYLAQYVVKGIAKSRKS
14	フェリチン(H. ピロリJ99) フラ グメント(C末端セリン残基を 欠く) (アミノ酸1~166)	MLSKDIKLLNEQVNKEEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAE EYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHIS ESINNIVDHAIKSKDHTATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNE NHGLYLAQYVVKGIAKSRKS
15	フェリチン重鎖(ヒト)183アミ ノ酸	MTTASTSQVRQNYHQDSEAAIRQINLEYASYVYLSMSYYFDRDDVAL KNFAKYFLHQSHEREHAEKLMKLQNQRGGRIFLQDIKPDCDDWESGL NAMECALHLEKVNQSLLEHLKLATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIC ELGDHVNTLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGSDNES
16	融合用に切断されたフェリチ ン(H. ピロリ) (完全長H. ピロリ ・フェリチンのアミノ酸5~ 167)	DIKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEE YEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQH ISESINNIVDHAIKSKDHTATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIE LIGNENHGLYLAQYVVKGIAKSRKS
17	融合用に切断されたフェリチ ン(H. ピロリ) (完全長H. ピロリ ・フェリチンのアミノ酸5~ 166)	DIKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEE YEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQH ISESINNIVDHAIKSKDHTATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIE LIGNENHGLYLAQYVVKGIAKSRKS
18	フェリチンに連結された切断 型F糖タンパク質(1); SGSGSG リンカー	QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENCNGTDA KVKLKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK KTNVTLSSKKRKKRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALL STNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVI EFQQKNNRLLIEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQ KKLMSNNVQIVRQSYSIMSIKEEVLAYVVLPIYGVIDTPCWLHTS PLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCVKQSNRVFC TMNSLTLPESEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDYVSNKGVDTSVGNTLYVN LEGKNLVKGEPINYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD ELSGGSGDIIKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFD HAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAY EHEQHISESINNIVDHAIKSKDHTATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKD ILDKIELIGNEHGLYLAQYVVKGIAKSRKS
19	フェリチンに連結された切断 型F糖タンパク質(2); SGSGSG リンカー	QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENCNGTDA KVKLKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK KTNVTLSSKKRKKRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALL STNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVI EFQQKNNRLLIEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQ KKLMSNNVQIVRQSYSIMSIKEEVLAYVVLPIYGVIDTPCWLHTS PLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCVKQSNRVFC TMNSLTLPESEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCY

10

20

30

40

【表1-4】

		GKTKCTASNKRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVNQEGKS LYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQNEKINQSLAFIRKSDELLSG SGSGDIIKLLNEQVNKEQMSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDH AAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYE HEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDIL DKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRSKS
20	フェリチンに連結された切 断型 F 糖タンパク質(3); SGSG リンカー	QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENCNGTDA KVKLICKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK KTNVTLSKKRKRRFLGFLGVGSIAISGVAVSKVLHLEGEVNQIKSALL STNKAVVSLNSNGSVLTSKVLIDLKNYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVI EFQQKNNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQ KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVQQLPLYGVIDTPCWKLHTS PLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCD TMNSLTLPSSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCY GKTCTASNKRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVNQEGKS LYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQNEKINQSLAFIRKSDELLSG SGSGDIKLLNEQVNKEQMSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHA AEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEH EQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILD KIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRSKS
21	フェリチンに連結された切 断型 F 糖タンパク質(4); SGSG リンカー	QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENCNGTDA KVKLICKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK KTNVTLSKKRKRRFLGFLGVGSIAISGVAVSKVLHLEGEVNQIKSALL STNKAVVSLNSNGSVLTSKVLIDLKNYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVI EFQQKNNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQ KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVQQLPLYGVIDTPCWKLHTS PLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCD TMNSLTLPSSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCY GKTCTASNKRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVNQEGKS LYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQNEKINQSLAFIRKSDELLSG SGSGDIKLLNEQVNKEQMSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHA AEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEH EQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILD KIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRSKS
22	sHSP20 に連結された切 断型 F 糖タンパク質(1); SGSGSGSGSG リンカー	QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENCNGTDA KVKLICKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK KTNVTLSKKRKRRFLGFLGVGSIAISGVAVSKVLHLEGEVNQIKSALL STNKAVVSLNSNGSVLTSKVLIDLKNYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVI EFQQKNNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQ KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVQQLPLYGVIDTPCWKLHTS PLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCD TMNSLTLPSSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCY GKTCTASNKRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVNQEGKS LYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQNEKINQSLAFIRKSDELLSG SGSGSGSGTGTTMIQSSTGIQISGKGFMPISIIEGDQHIKVI GVNKEDIILNAVGDTLEIRAKRSPLMITESERIIYSEIPEEEEIYR TIKLPATVKEENASA FENGVL S V I L P K A E S S I K K G I N I E
23	HSP に連結された切 断型 F 糖タンパク質(2); SGSGSGSGS リンカー	QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENCNGTDA KVKLICKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK KTNVTLSKKRKRRFLGFLGVGSIAISGVAVSKVLHLEGEVNQIKSALL STNKAVVSLNSNGSVLTSKVLIDLKNYIDKQLLPIVNQSCSISNIETVI EFQQKNNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQ KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVQQLPLYGVIDTPCWKLHTS PLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCD TMNSLTLPSSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCY

10

20

30

40

【表1-5】

		GKT KCT ASN KNRG I IKT F SNG CDY V SNK G V D T V S V G N T L Y Y V N K Q E G K S L Y V K G E P I I N F Y D P L V F P S D E F D A S I S Q V N E K I N Q S L A F I R K S D E L L S G S G S G S G S T G T M I Q S S T G I Q I S G K G F M P I S I I E G D Q H I K V I A W L P G V N K E D I I L N A V G D T L E I R A K R S P L M I T E S E R I Y S E I P E E E I Y R T I K L P A T V K E E N A S A K F E N G V L S V I L P K A E S S I K K G I N I E
24	フェリチンに連結されたF糖タンパク質(N末端配列あり)(1) ; SGSGSG リンカー	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGNITEEFYQSTCSAVSKGYLSAL RTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLM QSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNNAKTKNTVLSKKRKRRFLGFLLGVGGS AIAASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDL KNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIK EEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWW CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKY DCKIMTSKTDVSSSVITSLSGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCD YVSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFD ASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSGDIKLLNEQVNKEMQSS NLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVP VQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDH HATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLAQYVK GIAKSRSK
25	フェリチンに連結されたF糖タンパク質(N末端配列あり)(2) ; SGSGSG リンカー	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGNITEEFYQSTCSAVSKGYLSAL RTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLM QSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNNAKTKNTVLSKKRKRRFLGFLLGVGGS AIAASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDL KNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIK EEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWW CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKY DCKIMTSKTDVSSSVITSLSGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCD YVSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFD ASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSGDIKLLNEQVNKEMQSSN LYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVP QLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDH ATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLAQYVK GIAKSRSK
26	フェリチンに連結されたF糖タンパク質(N末端配列あり)(3) ; SGSGSG リンカー	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGNITEEFYQSTCSAVSKGYLSAL RTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLM QSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNNAKTKNTVLSKKRKRRFLGFLLGVGGS AIAASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDL KNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIK EEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWW CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKY DCKIMTSKTDVSSSVITSLSGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCD YVSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFD ASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSGDIKLLNEQVNKEMQSSN YMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVP LTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDH ATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLAQYVK GIAKSRSK
27	フェリチンに連結されたF糖タンパク質(N末端配列あり)(4) ; SGSGSG リンカー	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGNITEEFYQSTCSAVSKGYLSAL RTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLM QSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNNAKTKNTVLSKKRKRRFLGFLLGVGGS AIAASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDL KNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT

10

20

30

40

【表1-6】

		TPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNQIVRQQSYSIMSI IK EEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWY CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPKY DCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASKNRGI IKTFNSNGCD YVSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEP I INFYDPLVFPSEFD ASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGDI IKLLNEQVNKEMQSSNLY MSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLI IFLNENNVPVQL TSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHA FNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLAQYVKGIA KSRKS
28	sHSP20に連結されたF糖タンパク質(N末端配列あり)(1) ; SGSGSGSGSリンクマー	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSAL RTGWTYSVITIELSNIKENKCNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLM QSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNNAKTKNTVTLSSKKRKRRFLGFLLGVG AIAASGVAVSKVHLGEVNVNIKSALLSTNAVSVLSNGVSVLTSKVLDL KNYIDKQLLPIVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLIEITREFSVNAGVT TPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNQIVRQQSYSIMSI IK EEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWY CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPKY DCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASKNRGI IKTFNSNGCD YVSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEP I INFYDPLVFPSEFD ASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSGSGSGSTGTTMIQSSTGIQI SGKGFMPI SIIEGDQHIKVI AWLPGVNKEDII NAVGDTLEIRAKR SPLMITESERIIYSEIPEEEEYRTIKLPATVKEENASAKFENGVL SVILPKAESSSIKKGINIE
29	HSPに連結されたF糖タンパク質(N末端配列あり)(2) ; SGSGSGSGSリンクマー	MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSAL RTGWTYSVITIELSNIKENKCNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLM QSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNNAKTKNTVTLSSKKRKRRFLGFLLGVG AIAASGVAVSKVHLGEVNVNIKSALLSTNAVSVLSNGVSVLTSKVLDL KNYIDKQLLPIVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLIEITREFSVNAGVT TPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNQIVRQQSYSIMSI IK EEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWY CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPKY DCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASKNRGI IKTFNSNGCD YVSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEP I INFYDPLVFPSEFD ASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSGSGSGSTGTTMIQSSTGIQI SGKGFMPI SIIEGDQHIKVI AWLPGVNKEDII NAVGDTLEIRAKR SPLMITESERIIYSEIPEEEEYRTIKLPATVKEENASAKFENGVL SVILPKAESSSIKKGINIE
30	リーダー-RSVF-リンクマー HypF(1) ; SGSGSGリンクマー	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGMELLILKANAITTILTAVTFCF ASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWTYSVITIELSNIKENK CNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLM QSTPATNNRARRELPRF MNYTLNNNAKTKNTVTLSSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVHL EGEVNVNIKSALLSTNAVSVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPI VNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLIEITREFSVNAGVTTPVSTYML TNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNQIVRQQSYSIMSI IKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCD NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPK YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASKNRGI IKTFNS NGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEP I INFYDPLV FPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSGSGDI IKLLNE QVNKEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLI IFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINN IVDHAIKSKDHAFTNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENH GLYLAQYVKGIAKSRA
31	リーダー-RSVF-リンクマー	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGMELLILKANAITTILTAVTFCF

10

20

30

40

【表1-7】

	HypF(2) ; SGSGSGリンク	ASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENK CNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRF MNYTLNNAKKTNVTLSKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHL EGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPI VNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNQIVRQOQSISMSIIKEEVLA YVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCD NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLNCVDIFNPK YDCKIMTSKTDVSSVITS LGAI VSCY GKT CT ASN KNRG II KTF NGCDYVSNKGVDTVSGNTLYVNQEGKSLYVKGEP I INF YDPLV FPSDEF DAS IS QVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSDI KLLNEQ VNKE MQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLI FLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIV DHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGL YLADQYVKGIAKSRK
32	リーダー- RSVP- リンカーハイブリッド HypF(3) ; SGSGリンク	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGMELLILKANAITTILTAVTFCF ASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENK CNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRF MNYTLNNAKKTNVTLSKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHL EGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPI VNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNQIVRQOQSISMSIIKEEVLA YVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCD NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLNCVDIFNPK YDCKIMTSKTDVSSVITS LGAI VSCY GKT CT ASN KNRG II KTF NGCDYVSNKGVDTVSGNTLYVNQEGKSLYVKGEP I INF YDPLV FPSDEF DAS IS QVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSDI KLLNEQ VNKE MQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLI FLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIV DHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGL YLADQYVKGIAKSRK
33	リーダー- 完全長RSVP- リンカーハイブリッド HypF(4) ; SGSGリンク	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGMELLILKANAITTILTAVTFCF ASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENK CNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRF MNYTLNNAKKTNVTLSKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHL EGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPI VNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNQIVRQOQSISMSIIKEEVLA YVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCD NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLNCVDIFNPK YDCKIMTSKTDVSSVITS LGAI VSCY GKT CT ASN KNRG II KTF NGCDYVSNKGVDTVSGNTLYVNQEGKSLYVKGEP I INF YDPLV FPSDEF DAS IS QVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSDI KLLNEQ VNKE MQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLI FLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIV DHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGL YLADQYVKGIAKSRK
34	リーダー- RSVP- リンカーハイブリッド shSP20(1) ; SGSGSGSGリンク	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGMELLILKANAITTILTAVTFCF ASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENK CNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRF MNYTLNNAKKTNVTLSKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHL EGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPI VNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNQIVRQOQSISMSIIKEEVLA

10

20

30

40

【表1-8】

		YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCD NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVCDFCDTMSNLTLPSEVNLCNVDIFNPK YDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFS NGCDYVSNKGVDVTSGVNTLYYVNQKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSGSGSTGTTM IQSSTGIQISGKGFMPIIIEGDQHICKVIAWLPGVNKEDIILNAVGD TLEIRAKRSPLMITESERIYSEIPEEEEYRTIKLPATVKEENA SAKFENGVLVSILPKAESIJKGINIE	
35	リーダー- RSVF- リンカー- sHSP20(2) ; SGSGSGSGS リンカ ー	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGMELLILKANAITTILTAVTF ASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENK CNGTDAKVKLKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRF MNYTLNNNAKKTNTVTLSSKKRKRRLFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHL EGEVNKIKSALLSTNKAUVVSLNSNGVSVLTSKVLSDLKNYIDKQLLPT VNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCD NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVCDFCDTMSNLTLPSEVNLCNVDIFNPK YDCKIMTSKTDVSSVITSLGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFS NGCDYVSNKGVDVTSGVNTLYYVNQKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSGSGSGSGSTGTTM QSSTGIQISGKGFMPIIIEGDQHICKVIAWLPGVNKEDIILNAVGD TLEIRAKRSPLMITESERIYSEIPEEEEYRTIKLPATVKEENAS AKFENGVLVSILPKAESIJKGINIE	10
36	sHSP20完全長 (NP_247258.1)	MFGRDPDFDSLFERMFKEFFATPMGTTMIQSSTGIQISGKGFMPI IIEGDQHICKVIAWLPGVNKEDIILNAVGDTEIRAKRSPLMITESE RIIYSEIPEEEEYRTIKLPATVKEENASAKFENGVLVSILPKAES SIJKGINIE	20
37	融合用に切断されたsHSP20(完 全長sHSP20アミノ酸24~147)	TGTTMIQSSTGIQISGKGFMPIIIIEGDQHICKVIAWLPGVNKEDII LNAVGDTEIRAKRSPLMITESERIYSEIPEEEEYRTIKLPATV KEENASAKFENGVLVSILPKAESIJKGINIE	
38	HSP60(ヒト) (NP_002147.2)	MLRLPTVFRQMRPVSRVLAPHLTRAYAKDVFKGADARALMLQGVDL LADAVAVTMGPKGKRTVIIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKN IGAKLVQDVANNNTNEEAGDGTATVLA RSIAKEGFEKISKGANPV EIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTPEEIAQVATISANGDKEIGN IISDAMKKVGRKGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKFDRGYIISPYFIN TSKGQKCEFQDAYVLLSEKKISSIQSIVPALEIANAHRKPLVIIAE DVDGEALSTLVNLKVGLOVVA VAPGFGDNRKNQLKDMAIATGG AVFGEGLTLMLEDVQPHDLGVGEV ITVKDDAMLLKGKGDKAQIE KRIQEIIEQLDVTTSEYEKEKLNERLAKLSDGVAVLKVG GGTS NEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLGGGCALLRCIPALDSLTPANED QKIGIEIIKRTLKIPAMTI AKNAGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYDAM AGDFVN MVEKGII DPTKVV RTALLDA AGVASL TTAEVV TEIPKE EKDPMGAMGGMGGGGGG GM	30
39	HSP70(ヒト) (NP_002145.3)	MSVVGIDLGFQSCYVAVARAGGIETIANEYSDRCTPACISFGPKNRSIG AAAKSQVISNAKNTVQGFKRFHGRAFSDPFVEAEKSNL AYDIVQLPTGL TGIVKTYMEEERNFTTEQV TAMLLSKLKETAESVLKKPV VDCV VPCF YTDAERRSVM DATQIAGLN CLRLMNETTA VALAYGIYK QDLP AEEKP R NVVF DMGH SAYQ VS CAF NRG KL V L A T A F DT TL G GR K F D E V L V N H F C EEFG KKY KLD I KS K I R A L L R L S Q E C E K L K L M S A N A S D L P L S I E C F M N D V D V S G T M N R G K F L E M C N D L L A R V E P P L R S V L E Q T K L K K E D I Y A V E I V G G A T R I P A V K E K I S K F F G K E L S T T L N A D E A V T R G C A L Q C A I L S P A F K V R E P F T L E A Y S S P Q D L P Y P D P A I A Q F S V Q K V T P Q S D G S S K V K V R V N H G I F S V S S A S L V E V H K S E E N E E P M E T D Q N A K E E K M Q V D Q E E P H V E E Q Q Q Q T P	40

【表1-9】

		AENKAESSEEMETSQAGSKDKKMDQPPQAKKAKVKTSTVDLPIENQLLWQ IDREMLNLYIENEGKMINMQDKLEKERNDAKNAVVEYVYEMRDKLSGEYE KFVSEDDRNSFTLKLEDTENWLYEDGEQPKQVYVDKLAELKNLGQPIK IRFQESEERPKLFEELGKQIQQYMKIISSFKNKEDQYDHLDADMTKVE KSTNEAMEWMNNKLNQNQSLTMDEPVVKSKIEAKIKELTSTCSPII SKPKPKVEPPKEEQKNAEQNGPVDQGDNPQAAEQTDTAVPSD SDKKLPEMDID
40	HSP90アルファアイソフォーム 1(ヒト) (NP_001017963.2)	MPPCSGGDGSTPPGPSLRDRDCPAQSAEYPRDRLDPRPGSPSEASS PPFLRSRAPVNWYQEKAQVFLWHLMSGSTLLCLWKQPFHVSAPP VTASLAFRQSQGAGQHLYKDLQPFIILLRLLMPEETQTQDQPMEEEEE VETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYE SLTDPSKLDGSKELHINLIPNKQDRTLTIVDTGIGMTKADLINNLG TIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKH NDDEQYAWESSAGGSFTVRTDTGEPMGRGTKVILHLKEDQTEYLEE RRIKEIVKKHSQFIGYPITLFVEKERDKEVSDDEAEEKEDKEEEKE KEEKESEDKPEIEDVGSDEEEKKDGDKKKKKIKEKYIDQEEELNK TKPIWTRNPDDITNEEYGEFYKSILTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFR ALLFVPRRAPFDLFENRKKNNIKLYVRRVFIMDNCEELIPEYLN IRGVVDSEDPLNISREMLQQSKILKVKIRKNLVKKCLELFTELAED KENYKKFYEQFSKNIKLGIHEDSQNRKKSELLRYTSASGDEMVS LKDYCTRMKENQKHIYYITGETKDQVANSFVERLRKHGLEVIYMI EPIDEYCVQQLKEFEGKTLVSVTKEGLELPEDEEKKQEEKKTF ENLCKIMKDILEKKVEKVVVSNRLVTSPCCIVTSTYGTANMERIM KAQALRDNSTMGYMAAKKHLIEINPDHSIIETLRQKAEADKNDKSVK DLVILLYETALLSSGSLEDPQTHANRIYRMIKLGIGIDEDDPTAD DTSAAVTEEMPLEGDDDSRMEEV
41	HSP90アルファアイソフォーム 2(ヒト) (NP_005339.3)	MPEETQTQDQPMEEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFL RELISNSSDALDKIRYESLTDPSKLDGSKELHINLIPNKQDRTLTIV DTGIGMTKADLINNLGTTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGF YSAYLVAEKVTVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVRTDTGEPMGRGT KVILHLKEDQTEYLEERRIKEIVKKHSQFIGYPITLFVEKERDKEV SDDEAEEKEDKEEEKEKEESEDKPEIEDVGSDEEEKKDGDKKK KKKIKEKYIDQEEELNKTTPKPIWTRNPDDITNEEYGEFYKSILTNDWED HLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLFENRKKNNIKLYVRRV FIMDNCEELIPEYLNFIRGVVDSEDPLNISREMLQQSKILKVKIRK NLVKKCLELFTELAEDKENYKKFYEQFSKNIKLGIHEDSQNRKKLS ELLRYYTSASGDEMVSFKDYCTRMKENQKHIYYITGETKDQVANSA FVERLRKHGLEVIYMIPEIDEYCVQQLKEFEGKTLVSVTKEGLELP EDEEEKKQEEKKTFENLCKIMKDILEKKVEKVVVSNRLVTSPCC IVTSTYGTANMERIMKAQALRDNSTMGYMAAKKHLIEINPDHSII TLRQKAEADKNDKSVKDLVILLYETALLSSGSLEDPQTHANRIYR MIKLGIGIDEDDPTADDTSAAVTEEMPLEGDDDSRMEEV
42	HSP100(ヒト) (NP_006651.2)	MPSCGACTCGAAAVRLITSSLASAQRGISGGRIHMSVLGRLGTFET QILQRAPLRSFTETPAYFASKDGISKDGSGDGNNKKSASEGSSKKSG SGNSGKGGNQLRCPKCGDLCTHVETFVSSSTRFKCEKCHFFVVLS EADSKKSIIKEPESAAEAVKLAQQKPPPPPQKIIYNYLDKYVVGQS FAKKVLSAVYNHYKRIYNNIPANLRQQAEVEKQTSLTPRELEIRR REDEYRFTKLLQIAGISPHGNALGASMQQQVNQQIPQEKRKGGEVLD SSHDDIKLEKSNILLGPTGSGKTLAQTAKCLDVPFAICDCTTL TQAGYVGEDIESVIAKLILQDANYNVEKAQQGIVFLDEVDKIGSVP IHQLRDVGEGVQQGLLKLLEGTIVNVPEKNSRKLGETVQVDTTN ILFVASGAFNGLDRIISRRKNEKYLGFGTSPNLGKGRAAAADLA NRSGESNTHQDIEEKDRLLRHVEARDLIEFGMIPFVGRLPVVPL HSLDEKTLVQILTEPRNAVIPQYQALFSMDKCELNVTEDALKAIAR

10

20

30

40

【表 1 - 10】

		LALERKTGARGLRSIMEKLLLEPMFEVPNSDIVCVEVDKEVVEGKK EPGYIRAPTKESSEEEYDSGVVEEGWPRQADAANS
43	リンカー	SGSG
44	リンカー	NGTGGSG
45	リンカー	SGGS
46	リンカー	GGSGSG
47	リンカー	SGSGSG
48	リンカー	SGGS
49	リンカー	SGSGSGSGS
50	リンカー	SGSGSGSGSG
51	N末端リーダー(ヒトCD5由来)	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLG
52	N末端リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTG
53	N末端リーダー	MDSYIIMWGILTEIMVPGCQA
54	N末端Fタンパク質配列	MELLILKANAITTILTAVTFCFASG

10

【図 2】

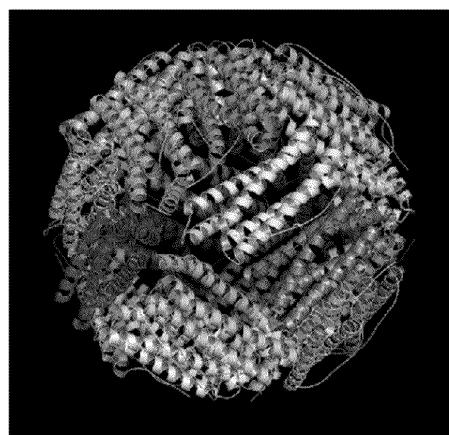
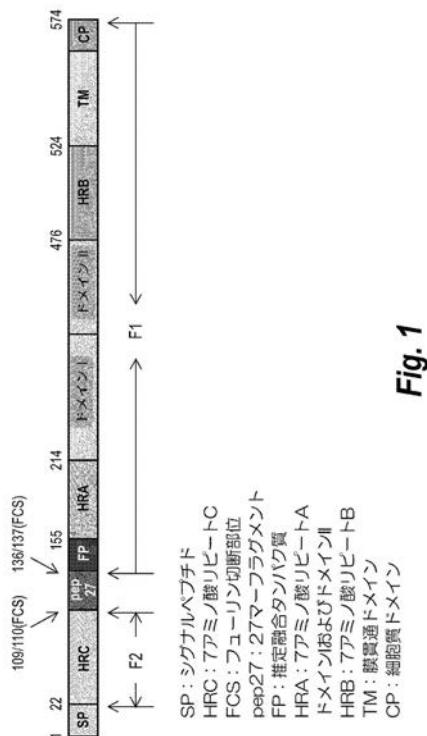


Fig. 2

【図 1】



【図3】

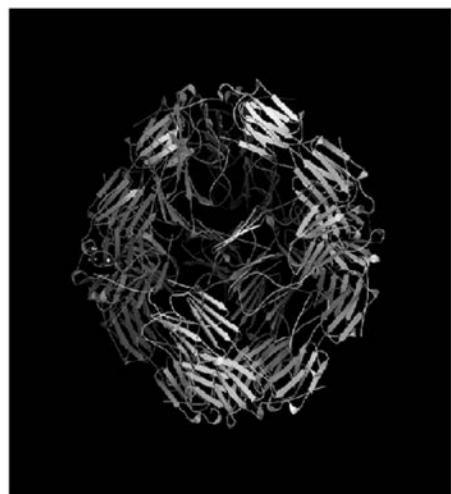


Fig. 3

【図4】

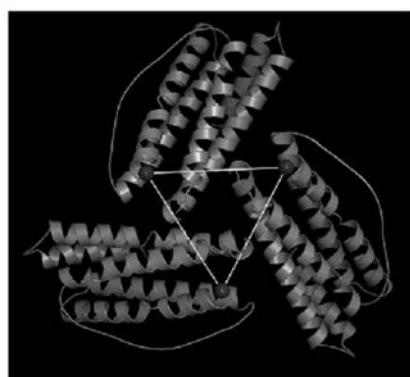


Fig. 4

【図5】

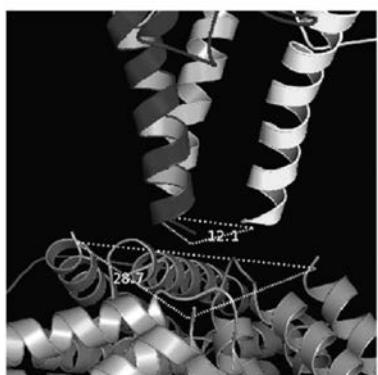


Fig. 5

【図6】



Fig. 6A

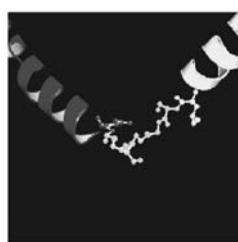


Fig. 6B

【図7】

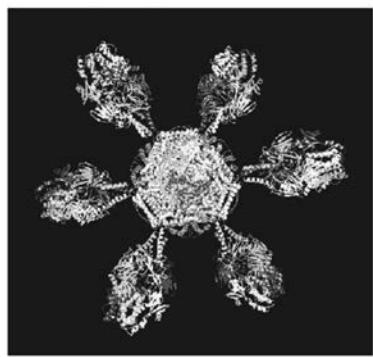


Fig. 7

【図8】

リーダー-RSVFタンパク質-リンク-ヘリコバクター-ヒロリ・フェリチン (HypF)
 MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGMELLILKANAITTILTAVTFCFAASQNITEEFYQST
 CSAVSKGYLSALRTGWTWITIENNIKENCNGTDAKVKLICKRFLGFLLGVGSIAASGV
 AVSKVLHLEGVNKKISALLSTNKAVVLSNSNGVSVLTSKVLDDLNKYIDKQLLPVNQKS
 CSISNIETVIEFQQKNNRLLTREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLLNDMPITNDQK
 KLMSNNQIVRQCSYSIMSIIKEEVAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCNTNTKEGS
 NICLRTDRGWYCDNAGSVSFPPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPSEVNLCNVDF
 NPKYDCKIMTSKTDVSSVITSGLAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNCGDVSNKG
 VDTVSGVNTLYVNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFI
 RKSDELLSGGGSSGDIKKLNEQVNKEEMOSSNLMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDH
 AAEELYEHAKKLIFLNENNVPVQLTISIAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDH
 AIKSKDHAFTNFLQWVVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLAQQYVKGIAKSRK
 (配列番号30)

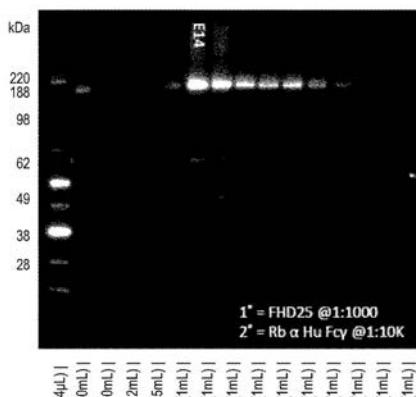
Fig. 8

【図9】



Fig. 9

【図10】



SeeBlue Plus 2 \times -カ \times -(5 μ L) + MagicMark XP (4 μ L)
 3日目収集, 1e6細胞/mL
 3日目収集, 2e6細胞/mL
 4日目収集, 1e6細胞/mL
 4日目収集, 2e6細胞/mL
 5日目収集, 1e6細胞/mL
 5日目収集, 2e6細胞/mL
 6日目収集, 1e6細胞/mL
 6日目収集, 2e6細胞/mL
 4日目収集, 1e6細胞/mL
 5日目収集, 1e6細胞/mL
 6日目収集, 1e6細胞/mL
 4日目収集, 2e6細胞/mL
 5日目収集, 2e6細胞/mL
 6日目収集, 2e6細胞/mL

SeeBlue Plus 2 (5 μ L) + MagicMark XP (4 μ L)
 FH△3 (過剰上清 (過濾前) (60mL))
 FH△3 FS (過濾後 (1:4上清) (60mL))
 精製F78(8つ中) (32mL)
 薄荷洗浄液 (15mL)
 E1 (1mL)
 E14 (1mL)
 E15 (1mL)
 E16 (1mL)
 E17 (1mL)
 E18 (1mL)
 E20 (1mL)
 E22 (1mL)
 E4 (1mL)
 E11 (1mL)

1* = FHD25 @ 1:1000
 2* = Rb α Hu Fcγ @ 1:10K

【配列表】

2016533332000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2014/057240
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/155 C07K14/135 C07K14/47 A61K39/02 A61K39/12 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category* <input checked="" type="checkbox"/> X	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages WO 2013/049342 A1 (NOVAVAX INC [US]; SMITH GALE [US]; WU YINGYUN [US]; MASSARE MICHAEL [U] 4 April 2013 (2013-04-04) page 1, paragraphs [0118], [0237] - page 7, line 7; figures 1-5, 7, 16, 18, 27, 30, 34, 40, 41, 43-47; examples 9-17 ----- -/--	Relevant to claim No. 1-7, 10-14, 24, 26-29, 32-36, 38-40
<input checked="" type="checkbox"/> X Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> X See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 9 January 2015		Date of mailing of the international search report 02/02/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentstaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schulz, Regine

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/057240

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GALE SMITH ET AL: "Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein Expressed in Insect Cells Form Protein Nanoparticles That Induce Protective Immunity in Cotton Rats", PLOS ONE, vol. 7, no. 11, 1 January 2012 (2012-01-01), page e50852, XP055060314, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0050852 page 4, left-hand column - page 11; figures 1-3, 5, 6,; table 1 -----	1-7, 10-14, 24, 26-29, 32-36, 38-40
Y	ALAN RIGTER ET AL: "A Protective and Safe Intranasal RSV Vaccine Based on a Recombinant Prefusion-Like Form of the F Protein Bound to Bacterium-Like Particles", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 8, no. 8 1 August 2013 (2013-08-01), pages e41072.1-e41072.14, XP002718926, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0071072 Retrieved from the Internet: URL: http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0071072&representation=PDF [retrieved on 2013-08-12]	15,16, 20-23
X	----- page 5, right-hand column, paragraph 2nd full - page 12; figures 1-8	1-7,9, 11-14, 26,28, 32-36, 38-40
Y	----- GREGORY M. GLENN ET AL: "Safety and immunogenicity of a Sf9 insect cell-derived respiratory syncytial virus fusion protein nanoparticle vaccine", VACCINE, vol. 31, no. 3, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 524-532, XP055160107, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.009 the whole document	15,16, 20-23
T	----- J. S. MCLELLAN ET AL: "Structure of RSV Fusion Glycoprotein Trimer Bound to a Prefusion-Specific Neutralizing Antibody", SCIENCE, vol. 340, no. 6136, 25 April 2013 (2013-04-25), pages 1113-1117, XP055132644, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1234914	-----
1	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/057240

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	<p>WO 2014/160463 A1 (US OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY DEPT OF HEALTH & HUMAN S) 2 October 2014 (2014-10-02)</p> <p>page 13, line 19; figures 56-58; example 10; sequences 127, 350, 380, 405, 601, 602, 605, 606, 608, page 23, line 9 - line 12; sequences 623-627, 630-632, 648, 649</p> <p>-----</p> <p>J. S. MCLELLAN ET AL: "Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus", SCIENCE, vol. 342, no. 6158, 31 October 2013 (2013-10-31), pages 592-598, XP055132637, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1243283</p> <p>-----</p> <p>WO 2010/075491 A2 (UNIV ROCHESTER [US]; MURATA YOSHIHIKO [US]; WALSH EDWARD E [US]) 1 July 2010 (2010-07-01) paragraph [[0008]] - paragraph [[0015]]</p> <p>-----</p> <p>WO 2013/044203 A2 (US OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY DEPARTMENT OF HEALTH &) 28 March 2013 (2013-03-28) page 1 - page 7, line 7; figures 1-10, 15-24; examples 1-10</p> <p>-----</p>	1-8, 10-18, 20-24, 26-29, 32,33, 35,36, 38-40
A		1,26-29, 32
Y		15,16, 20-23
A		1-14, 17-19, 24-40
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/057240

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2013049342	A1	04-04-2013	AU	2013201495 A1	18-04-2013
			CA	2849471 A1	04-04-2013
			CN	104080476 A	01-10-2014
			EP	2760469 A1	06-08-2014
			JP	2014530010 A	17-11-2014
			KR	20140077169 A	23-06-2014
			US	2013122032 A1	16-05-2013
			WO	2013049342 A1	04-04-2013
<hr/>					
WO 2014160463	A1	02-10-2014	NONE		
<hr/>					
WO 2010075491	A2	01-07-2010	US	2011318376 A1	29-12-2011
			WO	2010075491 A2	01-07-2010
<hr/>					
WO 2013044203	A2	28-03-2013	CA	2849822 A1	28-03-2013
			CN	103957891 A	30-07-2014
			EP	2758038 A2	30-07-2014
			US	2014072958 A1	13-03-2014
			US	2014302079 A1	09-10-2014
			WO	2013044203 A2	28-03-2013
<hr/>					

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A
C 0 7 K 14/115 (2006.01)	C 0 7 K 14/115	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,Th,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72) 発明者 ラム・サシセカラン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アヴェニュー 7
7 番、ビルディング 7 6、ルーム 4 6 1 シー

(72) 発明者 アディトヤ・ラグラム

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州ケンブリッジ、オックスフォード・ストリート 1 番
・ナンバー 2 1 8 7

(72) 発明者 ビドヤ・スプラマニアン

アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 マサチューセッツ州ウォルサム、スターンズ・ヒル・ロード 2 9 0 2 番
F ターム(参考) 4B065 AA95Y AB01 BA02 CA24 CA44

4C076 AA65 AA95 CC06 CC35 CC41 EE30 EE41 EE51 EE59 EE60

4C085 AA03 BA57 CC08 DD86 EE06

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA01 CA40 DA86 EA31 FA74