

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7311872号

(P7311872)

(45)発行日 令和5年7月20日(2023.7.20)

(24)登録日 令和5年7月11日(2023.7.11)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/155 (2006.01)

A 6 1 K 39/155

Z N A

A 6 1 K 39/39 (2006.01)

A 6 1 K 39/39

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 31/14

A 6 1 K 9/107(2006.01)

A 6 1 K 9/107

請求項の数 17 (全45頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-522569(P2018-522569)

(86)(22)出願日 平成28年10月27日(2016.10.27)

(65)公表番号 特表2019-500320(P2019-500320  
A)

(43)公表日 平成31年1月10日(2019.1.10)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/058976

(87)国際公開番号 WO2017/075125

(87)国際公開日 平成29年5月4日(2017.5.4)

審査請求日 令和1年10月25日(2019.10.25)

(31)優先権主張番号 62/247,962

(32)優先日 平成27年10月29日(2015.10.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/334,547

(32)優先日 平成28年5月11日(2016.5.11)

最終頁に続く

(73)特許権者 504391260

エモリー ユニバーシティ

アメリカ合衆国 3 0 3 2 2 ジョージア州

アトランタ、クリフトン・ロード・ノー

スイースト 1 5 9 9、フォース・フロア

、オフィス・オブ・テクノロジー・トラ

ンスファー

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100196966

弁理士 植田 渉

(72)発明者 ムーア, マーティン エル.

アメリカ合衆国 ジョージア州 3 0 0 3

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キメラ R S V、免疫原性組成物、及び使用方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

位置 7 9 に M、位置 1 9 1 に R、位置 3 5 7 に K、及び位置 3 7 1 に Y を有する R S V F タンパク質をコードする変異遺伝子を有し、ただし前記 R S V F タンパク質が配列番号：4 に対して 9 8 % 未満の配列同一性を有し、かつ前記 R S V F タンパク質が配列番号：1 または配列番号：1 3 に対して 9 0 % を超える配列同一性を有する、弱毒化生キメラ呼吸器合胞体ウイルス (R S V) を含む免疫原性組成物であって、前記弱毒化生キメラ R S V が免疫原性である、免疫原性組成物。

## 【請求項 2】

前記 R S V F タンパク質は位置 5 5 7 に V を有する、または F タンパク質が、位置 5 5 7 が V となるように変異している、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 3】

R S V N S 1、N S 2、及び G タンパク質をコードする遺伝子は、N S 1、N S 2、及び G の発現速度が、野生型 A 2 ウイルスと比較してベロ細胞において半分を超えて遅くなるようにコドン非最適化されている、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 4】

哺乳類細胞における G の発現速度は、野生型 A 2 ウイルスと比較してベロ細胞において 1 0 分の 1 を超えて低下する、請求項 3 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 5】

N S 1 の発現速度は、野生型 A 2 ウイルスと比較してベロ細胞において 4 分の 1 を超え

10

20

て低下する、請求項 3 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

N S 2 の発現速度は、野生型 A 2 ウイルスと比較してペロ細胞において 4 分の 1 を超えて低下する、請求項 3 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

S H タンパク質をコードする遺伝子が欠失または切頭されている、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

F タンパク質をコードする遺伝子は、位置 5 5 7 が V ではないように、または I が位置 5 5 7 にあるように変異している、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 9】

アジュバント及び/または他の製薬上許容できる担体を更に含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

前記アジュバントはアルミニウムゲル、アルミニウム塩、またはモノホスホリルリピド A である、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

前記アジュバントは、- トコフェロール、スクアレン、及び/または界面活性剤を所望により含む水中油型エマルジョンである、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

20

対象に呼吸器合胞体ウイルスに対して免疫付与方法において使用するための医薬組成物であって、前記医薬組成物が、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の有効量の免疫原性組成物を含み、前記方法が、前記有効量の免疫原性組成物を前記対象に投与することを含む、医薬組成物。

【請求項 13】

前記 R S V F タンパク質が配列番号：1 に対して 90 % を超える配列同一性を有する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

前記 R S V F タンパク質が配列番号：1 に対して 95 % を超える配列同一性を有する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 15】

前記 R S V F タンパク質が配列番号：1 に対して 90 % を超える配列同一性を有する、請求項 12 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

前記 R S V F タンパク質が配列番号：1 を含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

前記 R S V F タンパク質が配列番号：1 3 を含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

(関連出願の相互参照)

本出願は、2015 年 10 月 29 日に提出された米国仮出願第 62 / 247, 962 号、及び 2016 年 5 月 11 日に提出された同第 62 / 334, 547 号に対する優先権を主張する。これらの出願それぞれは全体が、あらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる。

オフィス電子出願システム (E F S - W E B) による、テキストファイルとして提出される材料の参照による組み込み

【0002】

本出願に関連する配列表は、紙の写しの代わりにテキストフォーマットで提供され、ここで明細書に参照により組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は 1 5 1 9

50

8 P C T \_ S T 2 5 . t x t である。テキストファイルは 4 9 K B であり、2 0 1 6 年 1 0 月 2 6 日に作成され、E F S - W e b を通して電子的に提出されている。

【背景技術】

【0003】

ヒト呼吸器合胞体ウイルス(RSV)は、気道感染症の原因となる。ヒトRSVは、乳児及び小児期の間に病院に訪れる主な原因である。パリビズマブは、特定の高リスク乳児において、RSVに起因する深刻な下気道疾患の予防に関してFDAが認可した、RSV融合タンパク質(RSV F)に結合するヒト化モノクローナル抗体(IgG)である。毎月投与されるキメラ抗体としてのパリビズマブは有効性が限定されており、アレルギー反応を引き起こす場合がある。したがって、改善された治療、及びRSV用に対する予防方法を識別する必要性が存在する。

10

【0004】

ワクチンは典型的には、生きたウイルス性株の殺傷された(不活化された)、または弱められた(弱毒化された)バージョンである。Kim et al. は、ホルマリンにより不活化したRSVワクチンの投与は、十分効果的ではないことを報告している(Am J Epidemiol 89, 422-434(1969))。弱毒化されたRSVワクチン候補は著しい安全性面での困難に直面しており、十分に弱毒化され免疫原性の、小児RSV弱毒生ワクチン(LAV)株の開発は達成し難いままである。Collins et al. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. Virus Res 162, 80-99(2011)を参照のこと。

20

【0005】

Karron et al. は、RNA合成因子M2-2のオープンリーディングフレーム(ORF)の大部分が欠失していることによって、子どもにおいて改善された抗体応答を有する弱毒化RSVワクチンが得られるRSVについて報告している。Sci Transl Med 7, 312ra175(2015)。Meng, et al. は、病原性遺伝子の標的化コドン非最適化による、呼吸器合胞体ウイルスの弱毒化及び免疫原性について報告している(MBio 5, e01704-01714(2014))。米国特許公開第2016/0030549号もまた参照のこと。Hotard et al. は、融合活性及び病因を制御する、ヒトRSV融合タンパク質中の残基について報告している(2015, J Virol 89:512-522)。Rostad et al. は、低融合Fタンパク質により弱毒化された組み換え呼吸器合胞体ウイルスワクチン候補は、コトントンラットでの抗原投与に対して免疫原性及び防御的であることについて報告している(J Virol, 2016, 90(16):7508-7518)。

30

【0006】

本明細書で引用する参考文献は、先行技術を承認するものではない。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、キメラ呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、弱毒生ワクチン及び免疫原性組成物、ならびに使用方法に関する。特定の実施形態において、キメラRSVは、位置79にM、位置191にR、位置357にK、及び/または位置371にYを有するRSV Fタンパク質をコードする、変異遺伝子パターンを有する。特定の実施形態において、RSV Fタンパク質は位置557にVを有する、またはFタンパク質は、位置557がVとなるように変異している。

40

【0008】

特定の実施形態において、位置79のM、位置191のR、位置357のK、及び位置371のYはRSV Fタンパク質中に存在せず、ここで、天然のRSV Fタンパク質はその特定のアミノ酸パターンを有する。すなわち、変異RSV Fタンパク質は、位置79にM、位置191にR、位置357にK、及び位置371にYを有するアミノ酸のRS

50

V Fタンパク質パターンをもたらす天然配列と比較した場合に、変異RSVFタンパク質が、位置79、191、357、または371に少なくとも1つの改変を有するように少なくとも1つのアミノ酸を含む。

【0009】

特定の実施形態において、変異したRSVFタンパク質は、RSV系統19（例えば亜型BのRSV株、例えば「Buenos Aires」（BAF）株などに見出されるFタンパク質以外のRSVFタンパク質に由来する。特定の実施形態において、RSVFタンパク質は配列番号：3もしくは4を含有しない、または、配列番号：3もしくは4に対して実質的同一性を有しない。特定の実施形態において、変異RSVFは、配列番号：1に対して85%または90%を超える同一性、しかし配列番号：4に対して95%、96%、97%、98%、または99%未満の同一性を有する。特定の実施形態において、変異RSVFは、配列番号：1に対して85%を超える同一性、しかし配列番号：4に対して99%未満の同一性を有する。

10

【0010】

特定の実施形態において、変異したRSVFタンパク質は（配列番号：1）MELL IHRSSAIFLT LAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDTKVKL MKQELDKYKNAVTE LQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKR RFLGFL LGVGS AIA SGIAVSKVLHLEGEVNKIKNAL LSTNKAVVSL SNGVSVLT SRVLDLKNYINNQLLP IVNQQSC RISSNIETVIEFQQKNSRLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS ELLSLINDMPIITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPIYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNIKEG SNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFFPQADKCKVQSNRVFCDTMYS LTL PSEVS L CNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCY GKT KCTAS NKNRGIIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKLE GK NLYVKGEPIINYYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQS LAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITAIIIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPTVTL SKDQLSGINNIAFS、またはその変異体を有する。

20

30

【0011】

特定の実施形態において、本開示は、膜貫通ドメインを欠く、またはアミノ酸1~524、例えば（配列番号：13）MELL IHRSSAIFLT LAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDTKVKL MKQELDKYKNAVTE LQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKR RFLGFL LGVGS AIA SGIAVSKVLHLEGEVNKIKNAL LSTNKAVVSL SNGVSVLT SRVLDLKNYINNQLLP IVNQQSC RISSNIETVIEFQQKNSRLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS ELLSLINDMPIITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPIYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNIKEG SNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFFPQADKCKVQSNRVFCDTMYS LTL PSEVS L CNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCY GKT KCTAS NKNRGIIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKLE GK NLYVKGEPIINYYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQS LAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNを有するキメラRSVFタンパク質を想到する。

40

【0012】

特定の実施形態において、変異は配列番号：1に対して95%、98%、または99%を超える配列同一性または類似性を有する。特定の実施形態において、位置79にM、位置191にR、位置357にK、または位置371にYの置換のいずれも存在しない場合

50

に、変異は1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のアミノ酸置換、欠失、または挿入である。特定の実施形態において、置換は保存的置換である。

【0013】

特定の実施形態において、RSV F変異体は位置11にV、位置20にF、位置23にA、位置45にF、位置102にTもしくはV、位置103にV、位置119にV、位置121にA、位置123にR、位置104にS、位置129にT、位置173にA、位置242にR、位置276にN、位置518にA、位置529にV、位置554にT、またはこれらの組み合わせを有する。

【0014】

特定の実施形態において、本明細書にて開示したRSV Fタンパク質配列の変異体は、位置79にM、位置191にR、位置357にK、または位置371にYの置換のいずれも存在しない場合に、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する。特定の実施形態において、置換は保存的置換である。

10

【0015】

特定の実施形態において、置換が位置79のM、位置191のR、位置357のK、位置371のY、及び位置557のVのいずれかの置換でない場合に、変異は1つまたは2つ、またはそれ以上のアミノ酸置換、欠失、または挿入である。特定の実施形態において、置換は保存的置換である。

【0016】

特定の実施形態において、置換が位置79のM、位置191のR、位置357のK、または位置371のYのいずれかの置換でない場合に、変異は1、2、または3つのアミノ酸置換、欠失、または挿入である。特定の実施形態において、置換は保存的置換である。

20

【0017】

特定の実施形態において、置換が位置79のM、位置191のR、位置357のK、位置371のY、及び位置557のVのいずれかの置換でない場合に、変異は1、2、または3つのアミノ酸置換、欠失、または挿入である。特定の実施形態において、置換は保存的置換である。

【0018】

特定の実施形態において、置換が位置79のM、位置191のR、位置357のK、及び位置371のYのいずれかの置換でない場合に、変異は4、5、6、7、8、9、10、または20個を超えるアミノ酸置換、欠失、または挿入を含有しない。特定の実施形態において、置換は保存的置換である。

30

【0019】

特定の実施形態において、置換が位置79のM、位置191のR、位置357のK、位置371のY、及び位置557のVのいずれかの置換でない場合に、変異は4、5、6、7、8、9、10、または20個を超えるアミノ酸置換、欠失、または挿入を含有しない。特定の実施形態において、置換は保存的置換である。

【0020】

特定の実施形態において、キメラRSVはRSV NS1、NS2をコードする遺伝子を有し、Gタンパク質は、NS1、NS2、及びGの発現速度が、野生型A2ウイルスと比較してベロ細胞において半分を超えて遅くなるようにコドン非最適化されている。

40

【0021】

特定の実施形態において、哺乳類細胞におけるGの発現速度は、野生型A2ウイルスと比較してベロ細胞において、3分の1を超えて、4分の1を超えて、5分の1を超えて、または10分の1を超えて遅くなる。

【0022】

特定の実施形態において、NS1の発現速度は、野生型系統A2ウイルスと比較してベロ細胞において、3分の1を超えて、4分の1を超えて、5分の1を超えて、または10分の1を超えて遅くなる。

【0023】

50

特定の実施形態において、NS2の発現速度は、野生型系統A2ウイルスと比較してペ口細胞において、3分の1を超えて、4分の1を超えて、5分の1を超えて、または10分の1を超えて遅くなる。

【0024】

特定の実施形態において、SHタンパク質をコードする遺伝子は、切頭タンパク質が発現する、またはタンパク質が発現しないように欠失または変異される。特定の実施形態において、M2-2をコードする遺伝子は、切頭タンパク質が発現する、またはタンパク質が発現しないように欠失または変異される。

【0025】

特定の実施形態において、Fタンパク質をコードする遺伝子は、位置557がVとならない、またはIが位置557となるように変異する。

【0026】

特定の実施形態において、本開示は、本明細書にて開示したRSV Fタンパク質、例えば配列番号：1、13、及び変異体を含む融合タンパク質を想到する。

【0027】

特定の実施形態において、本開示は、本明細書にて開示したキメラRSVを含むワクチン及び免疫原性組成物に関する。特定の実施形態において、組成物はアジュバント及び/または他の製薬上許容できる担体を更に含む。特定の実施形態において、アジュバントはアルミニウムゲル、アルミニウム塩、またはモノホスホリルリピドAである。

【0028】

特定の実施形態において、アジュバントは水中油型エマルジョンである。特定の実施形態において、水中油型エマルジョンは - トコフェロール、スクアレン、及び/または界面活性剤を更に含む。

【0029】

特定の実施形態において、本開示は、呼吸器合胞体ウイルスに対して対象をワクチン接種または免疫付与するための方法に関し、本方法は、本明細書にて開示した有効量のキメラRSV、またはそれを含む免疫原性組成物を対象に投与することを含む。特定の実施形態において、有効量は対象における防御免疫応答を生み出す。

【0030】

特定の実施形態において、対象は妊婦、2、3、または4歳以下の子どもである。特定の実施形態において、対象は低下した免疫系を有する、60歳もしくは65歳を超える、または、化学療法もしくは免疫抑制薬品を定期的に投与されている。

【0031】

特定の実施形態において、本開示は、本明細書にて開示したRSV Fタンパク質をコードする核酸に関する。特定の実施形態において、核酸は配列番号：14

```
ATGGAGTTTGCTGATCCATAGATCAAGTGCAATCTTCTCTAA
CTCTTGCTATTAAATGCATTGTACCTCACCTCAAGTCAAGAA
CATAACTGAGGAGTTTTTACCAATCGACATGTAGTGCAGTT
AGCAGAGGTTACTTGAGTGTCTTTAAGAACAGGTTGGTATA
CCAGTGTCATAACAATAGAAATTAAGTAATAATAAAGAAAC
CAAATGCAATGGAACTGACACTAAAGTAATAAATTTATAAAA
CAAGAAATTAGATAAGTATAAGAAATGCAGTAACAGAAATTAC
AGTTACTTTATGCAAAACACACCAGCTGCCAACCAACCGGGC
CAGAAAGAGAAAGCACCCACAGTATATGAACCTACACAATCAAT
ACCACTATAAAACCTAAATGTATCAATAAGCAAGAAAGAGGA
AACGAAGATTCTCTGGGCTTCTTGTAGGTGTAGGATCTGC
AATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTT
GAAGGAGAAAGTGAACAAGATCAAAAATGCTTTTGCTGTCTA
CAAAACAAGCTGTAGTCAAGTCTATCAAAATGGGGTCAAGTGT
```

10

20

30

40

50

TTTAACCAAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAAC  
AACCAATTATTACCTATAGTA AATCAACAGAGTTGTCGCA  
TTTCCAACATTGAACAGTTATAGAATTCCAGCAGAAAGAA  
CAGCAGATTGTTGGAAATCACCCAGAGAATTTAGTGTC AAT  
GCAGGTGTAAACGACACCTTTAAGCACTTACATGTTAAACAA  
ACAGTGAGTTACTATCATTTAATCAATGATATGCCTATAAC  
AAATGATCAGAAAAAATTAATGTCAAGCAATGTTTCAGATA  
GTAAGGCAACAAAGTTATTCTATCATGTCTATAATAAAGG  
AAGAAGTCCCTTGCAATATGTTGTACAGCTACCTATCTATGG  
TGTAATTGATACACCTTGCTGGAAATTACACACATCACCT  
CTGTGCACCAACCAACATCAAAGAAGGATCAAATATTTGTT  
TAACAAGGACTGATAGAGGATGGTACTGTGATAATGCAGG  
ATCAGTATCCTTCTTTCCACAGGCTGACACTTGTAAAGTA  
CAGTCCAATCGAGTATTTTGTGACACTATGAACAGTTTGA  
CATTACCAAGTGAAAGTCAGCCTTTGTAAACACTGACATATT  
CAATTCCAAGTATGACTGC AAAATTAATGACATCAAAAACA  
GACATAAGCAGCTCAGTAATTACTTCTCTAGGAGCTATAG  
TGTCATGCTATGGTAAAACTAAATGCACCTGCATCCAACAA  
AAATCGTGGAAATTATAAAGACATTTTCTAATGGTTGTGAT  
TATGTGTCAAACAAAGGAGTAGATACTGTATCAGTGGGCA  
ACACTTTATACTATGTCAACAAGCTGGAAGGCAAAAACCT  
TTATGTAAAAAGGGGAACCTATAATAAATTAATGACCTT  
CTAGTGTTTCTCTTGATGAGTTTGATGCATCAATATCTC  
AAGTCAATGAAAAAATTAATCAAAGTTTATAGCTTTTATTCG  
TAGATCCGATGAATTATTACATAATGTAAATACTGGAAAA  
TCTACTACAAATATTATGATAACTGCAATTATTATAGTAA  
TCATTGTAGTATTGTTATCATTTAATAGCTATTGGTTTACT  
GTTGTATTGCAAAGCCAAAAACACACCAGTTACACTAAGC  
AAAGACCAACTAAGTGGAATCAATAATATTGCATTCAGCA  
AATAG、

10

20

30

または50、60、70、80、90、95、98、または99%を超える配列同一性を有する変異を含む。

【0032】

特定の実施形態において、本開示は、本明細書にて開示したRSV Fタンパク質をコードする核酸を含むベクターに関する。特定の実施形態において、ベクターはプラスミドまたは細菌人工染色体から選択される。

【0033】

特定の実施形態において、キメラRSVは配列番号：15

ACGCGAAAAAATGCGTACAAACAAACCTTGCAATAAACCAAAAA  
AAATGGGGGCAATAAGAATTTGATAAGTACCCTTA AATT  
TAACTCCCTTGCTTAGCGATGGTGAGCGAGCTGATTAAGG  
AGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGGCACCGTGAA  
CAACCAACCACTTCAAGTGACACATCCGAGGGGCGAAGGCAAG  
CCCTACGAGGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGCGGGTCG  
AGGGGCGGCCCTCTCCCTTTCGCCTTCGACATCCTGGCTAC  
CAGCTTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTTCATCAACCAACACC  
CAGGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCCTTCCCCGAGG  
GCTTTCACATGGGAGAGAGTCAACCAACATACGAAGACGGGGG  
CGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCCAGCCTCCAGGACGGC  
TGCCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGGTGAACCTTCC

40

50

CATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAAGAAAACACTCGGCTG  
GGAGGCCCTCCACCGAGACCCCTGTACCCCGCTGACGGCGGC  
CTGGAAGGCGAGAGCCGACATGGCCCTGAAGCTCGTGGGCG  
GGGGCCACCTGATCTGCAACTTTGAAGACCACATACAGATC  
CAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTAC  
TATGTGGACAGAAAGACTGGGAAAGAATCAAGGAGGGCCGACA  
AAGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCTGTGGCCAG  
ATACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGGCACAGATGAGTA  
TTCAATTATAGTTATTA AAAA ACTTAACAGAAAGACAAAAAT  
GGGGCAAATAAGAAATTTGATAAGTACC ACTTA AATTTAAC  
TCCCTTGCTTAGCGATGGGGTTCGAATTCGCTATCGATGAT  
AAAAGTACGTCTACAAAAATCTATTTGATAATGATGAAGTA  
GCGCTACTAAAAATAACGTGTTATACGGATAAACTAATAC  
ATCTAACGAATGCGCTAGCGAAAGCGGTAATACATACGAT  
AAA ACTA AATGGTATAGTATTTGTACATGTAATAACGTCTG  
TCGGATATATGTCCGAATAATAATATAGTAGTAAAAATCGA  
ATTTTACGACGATGCCGGTACTACAAAAATGGTGGTTATAT  
ATGGGGA AATGATGGA ACTAACGCA TTGTT CGCA ACCGAAT  
GGTCTACTAGATGATAATTGTGAAATAAAATTTTTCGAAAA  
AACTATTCGGATTTCGACGATGACGAATTATATGAATCAACT  
ATCGGA ACTACTAGGTTTTTGATCTAAATCCGTAAATTATA  
ATTAATATCAACTAGCA AATCAATGTC ACTAACACCATT  
GTTAATATAAAA ACTTAACAGAAAGACAAAAAATGGGGCAAAT  
AAATCAATTCAGCCAAACCCAAACCATGGATACGACGCATAA  
TGATAATAACGCCGCAACGTCTAATGATAACGGATATGCGT  
CCGCTATCGCTAGAAACGATAATAACGTCTGCTAACGCGTG  
ATATAATAACGCATAAATTTATATATCTAATAAATCATGA  
ATGTATAGTACGTAAACTAGATGAACGTCAAGCGACGTTT  
ACGTTTTCTAGTAAATTTATGAAATGAAACTACTACATAAAG  
TAGGTTTCGACGAAATATAAAAAAATATACGGAAATATAATAC  
GAAATATGGTACGTTTTCCGATGCCGATATTTATAAATCAT  
GATGGTTTTTCTAGAATGTATAGGTATAAAACCGACGAAAC  
ATACGCCGATAATATATAAATATGATCTAAATCCGTAAAT  
TTCAACACAAATATTCACACAATCTAA AACAACTCTAT  
GCATAACTATACTCCATAGTCCAGATGGAGCCTGAAAATT  
ATAGTAATTTAAAAATTAAAGGAGAGATATAAGATAGAAGAT  
GGGGCAAATACAAAGATGGCTCTTAGCA AAGTCAAGTTGA  
ATGATACACTCAACAAAGATCAACTTCTGTCTCCAGCAA  
ATACACCATCCAACGGAGCACAGGAGATAGTATTGATACT  
CCTAATTATGATGTGCAGAAACACATCAATAAGTTATGTG  
GCATGTTATTAATCACAGAAAGATGCTAATCATAAATTAC  
TGGGTTAATAGGTATGTTATATGCGATGTCTAGGTTAGGA  
AGAGAAAGACACCATAAAAAATACTCAGAGATGCGGGGATATC  
ATGTAAAAAGCAAATGGAGTAGATGTAACAACACATCGTCA  
AGACATTAAATGGAA AAGAAATGAAATTTGAAGTGTTAA  
TTGGCAAGCTTAACA AACTGAAATTCAAATCAACATTGAGA  
TAGAATCTAGAAAAATCCTACAAAAA AATGCTAAAAAGAAAT  
GGGAGAGGTAGCTCCAGAAATACAGGCATGACTCTCCTGAT  
TGTGGGATGATAATATTATGTATAGCAGCATTAGTAATAA  
CTAAATTAGCAGCAGGGGACAGATCTGGTCTTACAGCCGT

10

20

30

40

50

GATTAGGAGAGCTAATAATGTCCTAAAAAATGAAATGAAA  
CGTTACAAAGGCTTACTACCCAAGGACATAGCCAACAGCT  
TCTATGAAGTGTTTGAAAAACATCCCCACTTTATAGATGT  
TTTTGTTCATTTTGGTATAGCACAAATCTTCTACCAGAGGT  
GGCAGTAGAGTTGAAGGGGATTTTGTGAGGATTGTTTATGA  
ATGCCTATGGTGCAAGGGCAAGTGATGTTACGGTGGGGAGT  
CTTAGCAAAATCAGTTAAAAAATATTATGTTAGGACATGCT  
AGTGTGCAAGCAGAAATGGAAACAAGTTGTTGAGGGTTTATG  
AATATGCCCAAAAAATTGGGGTGGTGAAAGCAGGATTCTACCA  
TATATTGAACAACCCAAAAAGCATCATTTATTTATCTTTGACT  
CAATTTCTCTCACTTCTCCAGTGTTAGTATTAGGCAATGCTG  
CTGGCCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGAGGTACACCGAG  
GAATCAAGATCTATATGATGCAGCAAAGGCATATGCTGAA  
CAACTCAAAGAAAAATGGTGTTGATTAACCTACAGTGTA  
ACTTGACAGCAGAAAGAACTAGAGGGCTATCAAACATCAGCT  
TAATCCAAAAAGATAATGATGTAGAGCTTTGAGTTAATAAA  
AAATGGGGCAAATAAATCATCATGGAAAAAGTTTGTCTCCTG  
AATTCATGGAGAAAGATGCAAACAACAGGGCTACTAAATT  
CCTAGAATCAATAAAGGGCAAATTCACATCACCCAAAGAT  
CCCAAGAAAAAAGATAGTATCATATCTGTCAACTCAATAG  
ATATAGAAGTAACCAAAAGAAAGCCCTATAACATCAAATTC  
AACTATTATCAACCCAAACAATGAGACAGATGATACTGCA  
GGGAACAAGCCCAATTATCAAAGAAAAACCTCTAGTAAGTT  
TCAAAGAAAGACCCCTACACCAAGTGATAATCCCTTTTCTAA  
ACTATACAAAGAAACCATAGAAACATTTGATAACAATGAA  
GAAGAATCCAGCTATTTCATACGAAGAAATAAATGATCAGA  
CAAACGATAAATAAACAGCAAGATTAGATAGGATTGATGA  
AAAAATTAAAGTGAAATACTAGGAATGCTTCACACATTAGTA  
GTGGCAAGTGCAAGGACCTACATCTGCTCGGGATGGTATAA  
GAGATGCCATGATTGGTTTAAAGAGAAAGAAATGATAGAAAA  
AATCAGAACTGAAGCATTTAATGACCAATGACAGATTAGAA  
GCTATGGCAAGACTCAGGAATGAGGAAAGTGAAAAAGATGG  
CAAAAGACACATCAGATGAAGTGCTCTCAATCCAACATC  
AGAGAAATTGAACAACCTATTGGAAGGGGAATGATAGTGAC  
AATGATCTATCACTTGAAAGATTTCTGATTAGTTACCACTC  
TTCACATCAACAACACAATAACCAACAGAAAGACCAACAACCT  
AACCACCCCAATCATCCAACCAAAACATCCATCCGCCAATC  
AGCCAAACAGCCAAACAACCAACAGCCAAATCCAAAACTA  
ACCACCCGGAAAAAATCTATAATATAGTTACAAAAAAAGG  
AAAGGGTGGGGCAAATATGGAAACATACGTGAACAAGCTT  
CACGAAGGCTCCACATACACAGCTGCTGTTCAATACAATG  
TCTTAGAAAAAGACGATGACCCCTGCATCACTTACAATATG  
GGTGCCCATGTTCCAATCATCTATGCCAGCAGATTTACTT  
ATAAAAGAACTAGCTAATGTCAAACATACTAGTGAAACAAA  
TATCCACACCCAAAGGGACCTTCACTAAGAGTTCATGATAAA  
CTCAAGAAAGTGCAAGTGCTAGCACAAATGCCCAGCAAAATT  
ACCATATGCGCTAATGTGTCTTGGATGAAAGAAAGCAAAAC  
TAGCATATGATGTAACCAACACCCCTGTGAAATCAAGGCATG  
TAGTCTAACATGCCTAAAAATCAAAAAAATATGTTGACTACA  
GTTAAAGATCTCACTATGAAGACACTCAACCCCTACACATG

10

20

30

40

50

ATATTATTGCTTTATGTGAATTTGAAAACATAGTAACATC  
AAAAAAGTTCATAATACCAACATACCTAAGATCCATCAGT  
GTCAGAAATAAAGATCTGAACACACTTGAAAATATAACAA  
CCACTGAATTCAAATAATGCTATCACAAATGCAAAATCAT  
CCCTTACTCAGGATTACTATTAGTTCATCACAGTGACTGAC  
AACAAAGGAGCATTCAAATACATAAAGCCACAAAGTCAAT  
TCATAGTAGATCTTGAGGCTTACCTAGAAAAAGAAAGTAT  
ATATTATGTTACCACAAATTGGAAGCACACAGCTACACGA  
TTTGCAATCAAACCCCATGGAAGATTAAACCTTTTCTCTCTA  
CATCAGTGTGTTAATTTCATACAAACTTTCTACCTACATTC  
TTCACCTTCACCATCACAAATCACAAACACTCTGTGGTTCAA  
CCAATCAAACAAAACTTATCTGAAGTCCCAGATCATCCCA  
AGTCATTGTTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGTTAATA  
AAAAATATACACATGGACGTCCATGGGGCAAATGCAAACA  
TGTCCAAAAACAAGGACCAACGCACCGCTAAGACATTAGA  
AAGGACCTGGGACACTCTCAATCATTTATTATTTCATATCA T

10

CGTGCTTATATAAGTTAAATCTTAAATCTGTAGCACAAAT  
CACATTATCCATTCTGGCAATGATAATCTCAACTTCACTT  
ATAATTGCAGCCATCATATTTCATAGCCTCGGGCAAACCACA  
AAGTCACACCAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAAG  
CCAGATCAAGAACACAACCCCAACATACCTCACCCAGAAAT  
CCTCAGCTTGGAATCAGTCCCTCTAATCCGTCTGAAATTA  
CATCACAAATCACCACTACTAGCTTCAACAACACCAGG  
AGTCAAGTCAACCCTGCAATCCACAACAGTCAAGACCAAA  
AACACAACAACAACCTCAAACACAAACCCAGCAAGCCCAACA  
CAAAACAACGCCAAACAACAACCAAGCAAAACCCCAATAA  
TGATTTTCACTTTGAAGTGTTCAACTTTGTACCCTGTCAGC  
ATATGCAGCAACAATCCAACCTGCTGGGCTATCTGCAAAA  
GAATACCAAAACAACAAACAGGAAGAAACCACTACCAA  
GCCCACAAAAAACAACCCCTCAAGACAACCAAAAAAGAT  
CCCAAAACCTCAAACCACTAAATCAAAGGAAGTACCCACCA  
CCAAGCCACAGAAAGAGCCAAACCATCAACACCACCAAAAC  
AAACATCATAACTACACTACTCACCTCCAACACCACAGGA  
AATCCAGAACTCACAAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAA  
CTTCCTCCGAAGGCAATCCAAGCCCTTCTCAAGTCTCTAC  
AACATCCGAGTACCCATCACAAACCTTCATCTCCACCCAAC  
ACACCACGCCAGTAGTTACTTAAAAACATATTATCACAAA  
AGGCCTTGACCAACCGCGGAGAAATCAAATAAACTCTGGG  
GCAAATAACAATGGAGTTGCTGATCCATAGATCAAGTGCA  
ATCTTCTTAACCTCTTGCTATTAAATGCATTGTACCTCACCT  
CAAGTCAGAAACATAACTGAGGAGTTTTACCAATCGACATG  
TAGTGAGTTAGCAGAGGTACTTGAGTGCTTTAAGAACAA  
GGTTGGTATACCAGTGTCATAACAATAGAATTAAAGTAATA  
TAAAAGAAACCAAAATGCAATGGAACTGACACTAAAGTAAA  
ACTTATAAAACAAGAAATTAGATAAGTATAAGAAATGCAGTA  
ACAGAAATTACAGTTACTTATGCAAAACACACCAGCTGCCA  
ACAACCGGGCCAGAAAGAGAAGCACCCACAGTATATGAAC TA  
CACAAATCAATACCACTAAAAAACCTAAATGTATCAATAAGC

20

30

40

50

A A G A A G A G G A A A C G A A G A T T T C T G G G C T T C T T G T T A G G T G  
T A G G A T C T G C A A T A G C A A G T G G T A T A G C T G T A T C C A A A G T  
T C T A C A C C T T G A A G G A G A A G T G A A C A A G A T C A A A A A T G C T  
T T G C T G T C T A C A A A C A A A G C T G T A G T C A G T C T A T C A A A T G  
G G G T C A G T G T T T T A A C C A G C A A A G T G T T A G A T C T C A A G A A  
T T A T A T A A A C A A C C A A T T A T T A C C T A T A G T A A A T C A A C A G  
A G T T G T C G C A T T T C C A A C A T T G A A A C A G T T A T A G A A T T C C  
A G C A G A A G A A C A G C A G A T T G T T G G A A A T C A C C A G A G A A T T  
T A G T G T C A A T G C A G G T G T A A C G A C A C C T T T A A G C A C T T A C  
A T G T T A A C A A A C A G T G A G T T A C T A T C A T T A A T C A A T G A T A  
T G C C T A T A A C A A A T G A T C A G A A A A A A T T A A T G T C A A G C A A  
T G T T C A G A T A G T A A G G C A A C A A A G T T A T T C T A T C A T G T C T  
A T A A T A A A G G A A G A A G T C C T T G C A T A T G T T G T A C A G C T A C  
C T A T C T A T G G T G T A A T T G A T A C A C C T T G C T G G A A A T T A C A  
C A C A T C A C C T C T G T G C A C C A C C A A C A T C A A A G A A G G A T C A  
A A T A T T T G T T T A A C A A G G A C T G A T A G A G G A T G G T A C T G T G  
A T A A T G C A G G A T C A G T A T C C T T C T T T C C A C A G G C T G A C A C  
T T G T A A A G T A C A G T C C A A T C G A G T A T T T T G T G A C A C T A T G  
A A C A G T T T G A C A T T A C C A A G T G A A G T C A G C C T T T G T A A C A  
C T G A C A T A T T C A A T T C C A A G T A T G A C T G C A A A A T T A T G A C  
A T C A A A A A C A G A C A T A A G C A G C T C A G T A A T T A C T T C T C T A  
G G A G C T A T A G T G T C A T G C T A T G G T A A A A C T A A A T G C A C T G  
C A T C C A A C A A A A A T C G T G G A A T T A T A A A G A C A T T T T C T A A  
T G G T T G T G A T T A T G T G T C A A A C A A A G G A G T A G A T A C T G T A  
T C A G T G G G C A A C A C T T T A T A C T A T G T C A A C A A G C T G G A A G  
G C A A A A A C C T T T A T G T A A A A G G G G A A C C T A T A A T A A A T T A  
C T A T G A C C C T C T A G T G T T T C C T T C T G A T G A G T T T G A T G C A  
T C A A T A T C T C A A G T C A A T G A A A A A A T T A A T C A A A G T T T A G  
C T T T T A T T C G T A G A T C C G A T G A A T T A T T A C A T A A T G T A A A  
T A C T G G A A A A T C T A C T A C A A A T A T T A T G A T A A C T G C A A T T  
A T T A T A G T A A T C A T T G T A G T A T T G T T A T C A T T A A T A G C T A  
T T G G T T T A C T G T T G T A T T G C A A A G C C A A A A A C A C A C C A G T  
T A C A C T A A G C A A A G A C C A A C T A A G T G G A A T C A A T A A T A T T  
G C A T T C A G C A A A T A G A T A A A A A T A G C A C C T A A T C A T G T T C  
T T A C A A T G G T T T A C T A T C T G C T C A T A G A C A A C C C A T C T A T  
C A T T G G A T T T T C T T A A A A T C T G A A C T T C A T C G A A A C T C T T  
A T C T A T A A A C C A T C T C A C T T A C A C T A T T T A A G T A G A T T C C  
T A G T T T A T A G T T A T A T A A A A C A C A A T T G A A T G C C A G T C G A  
C C T T A C C A T C T G T A A A A A T G A A A A C T G G G G C A A A T A T G T C  
A C G A A G G A A T C C T T G C A A A T T T G A A A T T C G A G G T C A T T G C  
T T A A A T G G T A A G A G G T G T C A T T T T A G T C A T A A T T A T T T T G  
A A T G G C C A C C C C A T G C A C T G C T T G T A A G A C A A A A C T T T A T  
G T T A A A C A G A A T A C T T A A G T C T A T G G A T A A A A G T A T A G A T  
A C C T T A T C A G A A A T A A G T G G A G C T G C A G A G T T G G A C A G A A  
C A G A A G A G T A T G C T C T T G G T G T A G T T G G A G T G C T A G A G A G  
T T A T A T A G G A T C A A T A A A C A A T A T A A C T A A A C A A T C A G C A  
T G T G T T G C C A T G A G C A A A C T C C T C A C T G A A C T C A A T A G T G  
A T G A T A T C A A A A A G C T G A G G G A C A A T G A A G A G C T A A A T T C  
A C C C A A G A T A A G A G T G T A C A A T A C T G T C A T A T C A T A T A T T  
G A A A G C A A C A G G A A A A C A A T A A A C A A A C T A T C C A T C T G T

10

20

30

40

50

T A A A A A G A T T G C C A G C A G A C G T A T T G A A G A A A A C C A T C A A  
A A A C A C A T T G G A T A T C C A T A A G A G C A T A A C C A T C A A C A A C  
C C A A A A G A A T C A A C T G T T A G T G A T A C A A A T G A C C A T G C C A  
A A A A T A A T G A T A C T A C C T G A C A A A T A T C C T T G T A G T A T A A  
C T T C C A T A C T A A T A A C A A G T A G A T G T A G A G T T A C T A T G T A  
T A A T C A A A A G A A C A C A C T A T A T T T C A A T C A A A A C A A C C C A  
A A T A A C C A T A T G T A C T C A C C G A A T C A A A C A T T C A A T G A A A  
T C C A T T G G A C C T C T C A A G A A T T G A T T G A C A C A A T T C A A A A  
T T T T C T A C A A C A T C T A G G T A T T A T T G A G G A T A T A T A T A C A  
A T A T A T A T A T T A G T G T C A T A A C A C T C A A T T C T A A C A C T C A  
C C A C A T C G T T A C A T T A T T A A T T C A A A C A A T T C A A G T T G T G  
G G A C A A A A T G G A T C C C A T T A T T A A T G G A A A T T C T G C T A A T  
G T T T A T C T A A C C G A T A G T T A T T T A A A A G G T G T T A T C T C T T  
T C T C A G A G T G T A A T G C T T T A G G A A G T T A C A T A T T C A A T G G  
T C C T T A T C T C A A A A A T G A T T A T A C C A A C T T A A T T A G T A G A  
C A A A A T C C A T T A A T A G A A C A C A T G A A T C T A A A G A A A C T A A  
A T A T A A C A C A G T C C T T A A T A T C T A A G T A T C A T A A A G G T G A  
A A T A A A A T T A G A A G A A C C T A C T T A T T T T C A G T C A T T A C T T  
A T G A C A T A C A A G A G T A T G A C C T C G T C A G A A C A G A T T G C T A  
C C A C T A A T T T A C T T A A A A A G A T A A T A A G A A G A G C T A T A G A  
A A T A A G T G A T G T C A A A G T C T A T G C T A T A T T G A A T A A A C T A  
G G G C T T A A A G A A A A G G A C A A G A T T A A A T C C A A C A A T G G A C  
A A G A T G A A G A C A A C T C A G T T A T T A C G A C C A T A A T C A A A G A  
T G A T A T A C T T T C A G C T G T T A A A G A T A A T C A A T C T C A T C T T  
A A A G C A G A C A A A A A T C A C T C T A C A A A A C A A A A A G A C A C A A  
T C A A A A C A A C A C T C T T G A A G A A A T T G A T G T G T T C A A T G C A  
A C A T C C T C C A T C A T G G T T A A T A C A T T G G T T T A A C T T A T A C  
A C A A A A T T A A A C A A C A T A T T A A C A C A G T A T C G A T C A A A T G  
A G G T A A A A A A C C A T G G G T T T A C A T T G A T A G A T A A T C A A A C  
T C T T A G T G G A T T T C A A T T T A T T T T G A A C C A A T A T G G T T G T  
A T A G T T T A T C A T A A G G A A C T C A A A A G A A T T A C T G T G A C A A  
C C T A T A A T C A A T T C T T G A C A T G G A A A G A T A T T A G C C T T A G  
T A G A T T A A A T G T T T G T T T A A T T A C A T G G A T T A G T A A C T G C  
T T G A A C A C A T T A A A T A A A A G C T T A G G C T T A A G A T G C G G A T  
T C A A T A A T G T T A T C T T G A C A C A A C T A T T C C T T T A T G G A G A  
T T G T A T A C T A A A G C T A T T T C A C A A T G A G G G G T T C T A C A T A  
A T A A A A G A G G T A G A G G G A T T T A T T A T G T C T C T A A T T T T A A  
A T A T A A C A G A A G A A G A T C A A T T C A G A A A A C G A T T T T A T A A  
T A G T A T G C T C A A C A A C A T C A C A G A T G C T G C T A A T A A A G C T  
C A G A A A A A T C T G C T A T C A A G A G T A T G T C A T A C A T T A T T A G  
A T A A G A C A G T G T C C G A T A A T A T A A T A A A T G G C A G A T G G A T  
A A T T C T A T T A A G T A A G T T C C T T A A A T T A A T T A A G C T T G C A  
G G T G A C A A T A A C C T T A A C A A T C T G A G T G A A C T A T A T T T T T  
T G T T C A G A A T A T T T G G A C A C C C A A T G G T A G A T G A A A G A C A  
A G C C A T G G A T G C T G T T A A A A T T A A T T G C A A T G A G A C C A A A  
T T T T A C T T G T T A A G C A G T C T G A G T A T G T T A A G A G G T G C C T T

10

20

30

40

T A T A T A T A G A A T T A T A A A A G G G T T T G T A A A T A A T T A C A A C  
A G A T G G C C T A C T T T A A G A A A T G C T A T T G T T T T A C C C T T A A

50

GATGGTTAACTTACTATAAACTAAACACTTATCCTTCTTT  
GTTGGAACCTTACAGAAAGAGATTGTGTTATCAGGA  
CTACGTTTCTATCGTGAGTTTTCGGTTGCCTAAAAAAGTGG  
ATCTTGAAATGATTATAAATGATAAAGCTATATCACCTCC  
TAAAAAATTTGATATGGACTAGTTTCCCTAGAAATTACATG  
CCATCACACATACAAAACCTATATAGAACATGAAAAATTAA  
AATTTTCCGAGAGTGATAAATCAAGAAGAGTATTAGAGTA  
TTATTTAAGAGATAACAAATTCAATGAATGTGATTTATAC  
AACTGTGTAGTTAATCAAAGTTATCTCAACAACCCCTAATC  
ATGTGGTATCATTTGACAGGCCAAAGAAAGAGAACTCAGTGT  
AGGTAGAATGTTTGC AATGCAACC GGGAATGTTTCAGACAG  
GTTCAAATATTGGCAGAGAA AATGATAGCTGAAAACATTT  
TACAATTCTTTCTGAAAGTCTTACAAGATATGGTGATCT  
AGAACTACAAAAAATATTAGAATTGAAAGCAGGAATAAGT  
AACAAATCAAATCGCTAC AATGATAATTACAACAATTACA  
TTAGTAAGTGCTCTATCATCACAGATCTCAGCAAATTCAA  
TCAAGCATTTTCGATATGAAACGTCATGTATTTGTAGTGAT  
GTGCTGGATGAACTGCATGGTGTACAATCTCTATTTTCT  
GGTTACATTTAACTATTTCTCATGTCAACAATAATATGCAC  
ATATAGGCATGCACCCCCCTATATAGGAGATCATATTGTA  
GATCTTAACAATGTAGATGAACAAAGTGGATTATATAGAT  
ATCACATGGGTGGCATCGAAGGGTGGTGTCAAAAACTGTG  
GACCATAGAAGCTATATCACTATTGGATCTAATATCTCTC  
AAAGGGGA AATTCTCAATTACTGCTTTAATTAAATGGTGACA  
ATCAATCAATAGATATAAGCAAACCAATCAGACTCATGGA  
AGGTCAAACCTCATGCTCAAGCAGATTATTTGCTAGCATTA  
AATAGCCTTAAATTA CTGTATAAAGAGTATGCAGGCATAG  
GCCACAAATTA AAGGAACCTGAGACTTATATATCACGAGA  
TATGCAATTTATGAGTAAAACAATTCAACATAACGGTGTA  
TATTACCCAGCTAGTATAAAGAAAGTCTAAGAGTGGGAC  
CGTG GATAAACACTATACTTGATGATTTCAAAGTGAGTCT  
AGAATCTATAGGTAGTTTGCACAAAGAATTAGAATATAGA  
GGTGAAAGTCTATTATGCAGTTTAAATATTTAGAAATGTAT  
GGTTATATAATCAGATTGCTCTACAATTAAAAAATCATGC  
ATTATGTAAACAATAAACTATATTTGGACATATTAAAGGTT  
CTGAAACACTTAAAAACCTTTT TTAATCTTGATAATATTG  
ATACAGCATTAACATTGTATATGAATTTACCCATGTTATT  
TGGTGGTGGTGATCCCAACTTGTTATATCGAAGTTTCTAT  
AGAAGA AACTCCTGACTTCTCTCACAGAGGCTATAGTTCACT  
CTGTGTTTCATACTTAGTTATTATACAAACCATGACTTAAA  
AGATAAACTTCAAGATCTGTCAGATGATAGATTGAATAAG  
TTCTTAACATGCATAATCACGTTTGC AAAAAACCCCTAATG  
CTGAATTCGTAAACATTGATGAGAGATCCTCAAGCTTTAGG  
GTCTGAGAGACAAGCTAAAAATTACTAGCGAAATCAATAGA  
CTGGGCAGTTACAGAGGTTT TGAGTACAGCTCCAAACAAAA  
TATTCTCCAAAAGTGCACAACATTATACTACTACAGAGAT  
AGATCTAAATGATATTATGCAAAATATAGAACCCTACATAT  
CCTCATGGGCTAAGAGTTGTTTATGAAAGTTTACCCCTTTT  
ATAAAGCAGAGAAAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAA  
ATCTATAACTAACATACTGGAAAAAACTTCTGCCATAGAC

10

20

30

40

50

TTAACAGATATTGATAGAGGCCACTGAGATGATGAGGAAAA  
ACATAACTTTTGCTTATAAGGATACTTCCATTGGATTGTAA  
CAGAGATAAAAAGAGAGATATTGAGTATGGAAAACCTAAGT  
ATTACTGAATTAAAGCAAATATGTTAGGGAAAGATCTTGGT  
CTTTATCCAATATAGTTGGTGTACATCACCCAGTATCAT  
GTATACAATGGACATCAAATATACTACAAGCACTATATCT  
AGTGGCATAAATTATAGAGAAATATAATGTTAACAGTTTAA  
CACGTGGTGAGAGAGAGGCCCACTAAACCATGGGGTTGGTTC  
ATCTACACAAGAGAAAAAAACAATGCCAGTTTATAATAGA  
CAAGTCTTAACCAAAAAACAGAGAGATCAAATAGATCTAT  
TAGCAAAAATTGGATTGGGTGTATGCATCTATAGATAACAA  
GGATGAATTCATGGAAGAACTCAGCATAGGAACCCCTTGGG  
TTAACATATGAAAAGGCCAAGAAATTATTTCCACAATATT  
TAAGTGTCAAATTATTTGCATCGCCTTACAGTTCAGTAGTAG  
ACCATGTGAATTCCCTGCATCAATACCAGCTTATAGAACAA  
ACAAATTATCACTTTGACACTAGCCCTATTAAATCGCATAT  
TAACAGAAAAAGTATGGTGATGAAGATATTGACATAGTATT  
CCAAAACCTGTATAAGCTTTGGCCCTTAGTTTAAATGTCAGTA  
GTAGAACAAATTTACTAATGTATGTCCTAACAGAAATTATTC  
TCATACCTAAGCTTAATGAGATACATTTGATGAAACCTCC  
CATATTCACAGGTGATGTTGATATTCACAAGTTAAACAA  
GTGATACAAAAACAGCATATGTTTTTACCAGACAAAAATAA  
GTTTGACTCAATATGTGGAATTATTTCTTAAGTAATAAAC  
ACTCAAATCTGGATCTCATGTTAATTCTAATTTAATATTG  
GCACATAAAATATCTGACTATTTTTCATAATACTTTACATTT  
TAAGTACTAATTTAGCTGGACATTGGATTCTGATTATACA  
ACTTATGAAAGATTCTAAAGGTATTTTTTGAAAAAGATTGG  
GGAGAGGGGATATATAACTGATCATATGTTTATTAATTTGA  
AAGTTTTTCTTCAATGCTTATAAGACCTATCTCTTGTGTTT  
TCATAAAGGTTATGGCAAAGCAAAGCTGGAGTGTGATATG  
AACACTTTCAGATCTTCTATGTGTATTGGAATTAAATAGACA  
GTAGTTATTGGAAGTCTATGTCTAAGGTATTTTTTAGAACAA  
AAAAGTTATCAAATACATTTCTTAGCCAAGATGCAAGTTTA  
CATAGAGTAAAAAGGATGTCATAGCTTCAAATTTATGGTTTT  
TTAAACGTCTTAATGTAGCAGAAATTCACAGTTTGGCCCTTG  
GGTTGTTAACATAGATTATCATCCAACACATATGAAAGCA  
ATATTAACTTATATAGATCTTGTTAGAATGGGATTGATAA  
ATATAGATAGAAATACACATTAATAAACACAAATTTCAA  
TGATGAATTTTATACTTCTAATCTCTTCTACATTAATTTAT  
AACTTCTCAGATAATACTCATCTATTAACTAAACATATAA  
GGATTGCTAATTCTGAATTAGAAAAATAATTACAACAAATT  
ATATCATCCTACACCAGAAACCCCTAGAGAAATATACTAGCC  
AATCCGATTAAAAAGTAATGACAAAAAAGACACTGAATGACT  
ATTGTATAGGTAAAAAATGTTGACTCAATAATGTTACCATTT  
GTTATCTAATAAGAAGCTTATTAAATCGTCTGCAATGATT  
AGAACCAATTACAGCAAAACAAGATTTGTATAATTTATTCC  
CTATGGTTGTGATTGATAGAAATTATAGATCATTCAGGCAA  
TACAGCCAAATCCAACCAACTTTACACTACTACTTCCCAC  
CAAATATCTTTAGTGCACAATAGCACATCACTTTACTGCA  
TGCTTCTCTTGGCATCATATTAAATAGATTCAATTTTGTATT

10

20

30

40

50

T A G T T C T A C A G G T T G T A A A A T T A G T A T A G A G T A T A T T T T A  
A A A G A T C T T A A A A T T A A A G A T C C C A A T T G T A T A G C A T T C A  
T A G G T G A A G G A G C A G G G A A T T T A T T A T T G C G T A C A G T A G T  
G G A A C T T C A T C C T G A C A T A A G A T A T A T T T A C A G A A G T C T G  
A A A G A T T G C A A T G A T C A T A G T T T A C C T A T T G A G T T T T T A A  
G G C T G T A C A A T G G A C A T A T C A A C A T T G A T T A T G G T G A A A A  
T T T G A C C A T T C C T G C T A C A G A T G C A A C C A A C A A C A T T C A T  
T G G T C T T A T T T A C A T A T A A A G T T T G C T G A A C C T A T C A G T C  
T T T T T G T C T G T G A T G C C G A A T T G T C T G T A A C A G T C A A C T G  
G A G T A A A A T T A T A A T A G A A T G G A G C A A G C A T G T A A G A A A G  
T G C A A G T A C T G T T C C T C A G T T A A T A A A T G T A T G T T A A T A G  
T A A A A T A T C A T G C T C A A G A T G A T A T T G A T T T C A A A T T A G A  
C A A T A T A A C T A T A T T A A A A A C T T A T G T A T G C T T A G G C A G T  
A A G T T A A A G G G A T C G G A G G T T T A C T T A G T C C T T A C A A T A G  
G T C C T G C G A A T A T A T T C C C A G T A T T T A A T G T A G T A C A A A A  
T G C T A A A T T G A T A C T A T C A A G A A C C A A A A A T T T C A T C A T G  
C C T A A G A A A G C T G A T A A A G A G T C T A T T G A T G C A A A T A T T A  
A A A G T T T G A T A C C C T T T C T T T G T T A C C C T A T A A C A A A A A A  
A G G A A T T A A T A C T G C A T T G T C A A A A C T A A A G A G T G T T G T T  
A G T G G A G A T A T A C T A T C A T A T T C T A T A G C T G G A C G T A A T G  
A A G T T T T C A G C A A T A A A C T T A T A A A T C A T A A G C A T A T G A A  
C A T C T T A A A A T G G T T C A A T C A T G T T T T A A A T T T C A G A T C A  
A C A G A A C T A A A C T A T A A C C A T T T A T A T A T G G T A G A A T C T A  
C A T A T C C T T A C C T A A G T G A A T T G T T A A A C A G C T T G A C A A C  
C A A T G A A C T T A A A A A A C T G A T T A A A A T C A C A G G T A G T C T G  
T T A T A C A A C T T T C A T A A T G A A T A A T G A A T A A A G A T C T T A T A

10

20

A T A A A A A T T C C C A T A G C T A T A C A C T A A C A C T G T A T T C A A T  
T A T A G T T A T T A A A A A T T A A A A A T C G T A C G A T T T T T T A A A T  
A A C T T T T A G T G A A C T A A T C C T A A A G T T A T C A T T T T A A T C T  
T G G A G G A A T A A A T T T A A A C C C T A A T C T A A T T G G T T T A T A T  
G T G T A T T A A C T A A A T T A C G A G A T A T T A G T T T T T G A C A C T T  
T T T T T C T C G T

30

または、50、60、70、80、90、95、98、または99%を超える配列同一性を有する変異を含む。

【0034】

特定の実施形態において、キメラRSVはヒト対象に感染性であるもの、及びヒト対象に感染性でないものを含む。

【0035】

40

特定の実施形態において、本開示は、本明細書にて開示した変異RSV Fタンパク質を含む粒子、RSV粒子、またはウイルス様粒子に関する。特定の実施形態において、粒子は弱毒生及び弱感染化RSVゲノムまたはアンチゲノムを含む。特定の実施形態において、粒子は例えば、RSVタンパク質のいずれかの1つ、2つ、3つ、またはそれ以上を発現不可能な核酸を有する、または有しない不活化RSVゲノムまたはアンチゲノムを含む。特定の実施形態において、粒子は熱またはホルムアルデヒドなどの方法を使用して殺傷される。特定の実施形態において、粒子は本明細書にて開示したウイルス性構造タンパク質及び変異RSV Fタンパク質の発現により再構築される。

【図面の簡単な説明】

【0036】

50

【図1】I557V変異(クエリー)を有するFタンパク質(配列番号:3)と、典型的な野生型RSV株系列19配列(対象)(配列番号:4)とのRSV配列比較を示す。

【図2】RSVワクチン候補OE4を示す。コドン非最適化NS1及びNS2(dNS1/dNS2)を有するRSVは通常安定であり、野生型ウイルスA2などの免疫原性を維持しながら、RSVを弱毒化する。OE4はまた、Gタンパク質のコドン非最適化、SHタンパク質の欠失も有し、RSV系列19 Fタンパク質を発現する。

【図3】RSVがペロ細胞に感染した際の、コドン非最適化RSV G、NS1、NS2遺伝子に対するタンパク質発現の低下を示すペロ細胞可溶化物のウエスタンブロットを示す。

【図4】系列19F(A2系列19F)を発現するキメラRSVは、株A2のRSV Fと比較して融合前Fバイアスを示すことを示すデータを示す。

10

【図5A】Buenos Airesクレード(BAF)の低融合RSV亜型B株のコンセンサス配列(対象)(配列番号:2)と比較した際の、DB1 QUAD(クエリー)として示される、位置79にM、位置191にR、位置357にKの置換を有するFタンパク質の配列を示す。

【図5B】DB1 QUAD Fタンパク質(クエリー)(配列番号:1)と、典型的な野生型RSV株系列19配列(対象)(配列番号:4)とのアミノ酸配列の比較を示す。519/573の同一性(91%)及び548/573の類似性(95%)が存在する。

【図6-1】Aは、配列番号:2のコンセンサスFタンパク質を含有するDB1を含む、7日後における特定のRSV構築物の熱安定性についてのデータを示す。Bは、系列19のFタンパク質に見られる特定の位置に対応する、Fタンパク質アミノ酸を含有するDB1構築物を含む、7日後における特定のRSV構築物の熱安定性についてのデータを示す。DB1 QUADとは、位置79にM、位置191にR、位置357にK、及び位置371にY、及び位置557にVのアミノ酸パターンを含む、配列番号:1を有するFタンパク質を意味する。

20

【図6-2】特定のワクチン候補の全F(融合前及び融合後F)に対する融合前Fの割合を示すデータを示す。

【図7A】A2系列19Fと比較した際に、DB1 QUADがより弱毒化されたことを示す、BALB/cマウスにおけるワクチン構築物の弱毒化についてのデータを示す。

【図7B】DB1 QUADはRSV Bに対する免疫原性を増加させたことを示す、異なるRSV株に対する、BALB/cマウスにおけるワクチン構築物の免疫原性についてのデータを示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0037】

本開示を更に詳細に説明する前に、本開示は説明される特定の実施形態に限定されるものではなく、それ故にももちろん変化し得るものと理解されなければならない。また、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲のみにより限定されるため、本明細書で使用する用語は特定の実施形態を説明するためだけのものであり、限定を意図するものではないことも理解されなければならない。

【0038】

40

別段定めがない限り、本明細書で使用する全ての技術及び科学用語は、本開示が属する当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で記載されるものに類似する、または等価なあらゆる方法及び材料は、本開示の実践または試験においてもまた使用することができるものの、好ましい方法及び材料がここで記載される。

【0039】

本明細書で引用される全ての広報及び特許は、あたかも、各個別の広報または特許が参照により組み込まれていることを具体的に、かつ個別に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれ、広報が引用されるものと関連する方法及び/または材料を開示及び記載するために、参照により本明細書に組み込まれている。あらゆる広報の引用は、開示に対して出願日より以前のものであり、先立った開示を理由として、本開示がその

50

ような広報に先立つ資格を有しないということを認めるものとして解釈されるべきではない。更に、示される広報の日付は、独立して認められる必要があり得る実際の広報の日付と異なっているもよい。

【 0 0 4 0 】

本開示を読む際に当業者には明らかとなるように、本明細書で記載及び説明される個別の実施形態はそれぞれ、個々の構成成分及び形質を有し、それらは、本開示の範囲及び精神を逸脱することなく、他のいくつかの実施形態のいずれかの形質から速やかに分離してよい、またはそれらと組み合わせられてよい。引用される全ての方法は、引用する事象の順番で、または論理的に可能な任意の他の順番で実施することができる。

【 0 0 4 1 】

本開示の実施形態は、特に断りのない限り、当該技術の範囲内にある免疫学、薬学、有機化学、生化学、分子生物学、薬理学、生理学などの技術を用いる。そのような技術は、文献内で完全に説明されている。

【 0 0 4 2 】

本明細書中及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈で明確に別様に規定されない限り、複数への言及を含むことを記しておかなければならない。本明細書において、そして後に続く特許請求の範囲において、逆の意図が明らかである場合を除き、以下の意味を有するように定義されるべき多数の用語について参照を行う。

【 0 0 4 3 】

様々な実施形態を説明する前に以下の定義を示し、特に断りのない限り使用しなければならない。

【 0 0 4 4 】

用語「タンパク質」及び「ポリペプチド」とは、ペプチド結合を介して結合したアミノ酸を含む化合物を意味し、これらは互換的に用いられる。

【 0 0 4 5 】

タンパク質に言及して使用される（「所与のタンパク質の一部」など）場合の用語「タンパク質」とは、そのタンパク質の断片を意味する。断片は、4つのアミノ酸残基から、アミノ配列全体マイナス1つのアミノ酸まで、サイズが変化してよい。

【 0 0 4 6 】

用語「キメラ呼吸器合胞体ウイルス」または「キメラRSV」とは、宿主細胞（例えばベロ細胞）においてゲノムまたはアンチゲノムの複製を可能にする、十分なRSV遺伝子を含む核酸を意味し、配列核酸を変異させて、構造的に同一の（すなわち、RSV株がRSVゲノム全体にわたり発生する）天然RSV株ではないように、少なくとも1つの核酸セグメントを含める。キメラ呼吸器合胞体ウイルスはRSV遺伝子を含み、ここで、コドンを変異させて、たとえ、RSVが天然に発現するものと同じのアミノ酸配列を有するポリペプチドを生成する場合でも、天然のコドンとは異なるようにする。RSVの異なる株は異なるヌクレオチド配列を有し、類似の機能を有する異なるアミノ酸配列を有するタンパク質を発現する。したがって、キメラRSVはRSV遺伝子を含み、ここで、RSVゲノム全体の核酸配列が、天然に見出されるRSVと同一ではないように、1つの株からの1つ以上の遺伝子が、代替のまたは第2の株の遺伝子から置き換えられる。特定の実施形態において、キメラRSVはこれらの株を含み、ここで核酸は、タンパク質発現を打ち切るために、そのようなゲノムの打ち切りパターンが天然のRSVで見出されない場合、翻訳を開始するためのコドンの後で欠失される。特定の実施形態において、キメラRSVは感染性のRSVを含み、ヒト対象内で複製することができる。

【 0 0 4 7 】

ポリペプチドに言及して使用される場合の用語「融合」とは、自然環境には合わせて存在せず、共にクローニングされ、翻訳後、1つのポリペプチド配列として機能するような、異なる源から入手した2つ以上のコード配列の発現生成物を意味する。融合ポリペプチドは「ハイブリッド」ポリペプチドと呼ばれることもある。コード配列は、生命体の同じ

10

20

30

40

50

、または異なる種から入手した配列を含む。

【 0 0 4 8 】

しかし、この種類の融合タンパク質は、開示したワクチンの R S V 融合タンパク質と同一ではない。R S V 融合タンパク質 ( F ) は、ヴィリオン膜を標的細胞膜に融合させる主表面糖タンパク質である。融合タンパク質は、ヴィリオン及び標的細胞膜に接近して融合を可能にし、後で主なりフォールディングを受けて安定した融合後形態になる、準安定の融合前構造の中に存在する。F タンパク質は R S V 株の中で非常に保存されており、潜在的な R S V 免疫原である。ヒトにおける自然感染の後、抗 R S V 中和抗体の大部分は F タンパク質、特に F の融合前構造に対して指令を受ける。

【 0 0 4 9 】

ポリペプチドに言及して使用する場合の用語「ホモログ」または「相同の」とは、2つのポリペプチド間の高度な配列同一性、三次元構造体間での高度な類似性、または活性部位と作用機序との高度な類似性を意味する。好ましい実施形態では、ホモログは、参照配列と 60 % を超える配列同一性、及びより好ましくは 75 % を超える配列同一性、及び更により好ましくは 90 % を超える配列同一性を有する。

【 0 0 5 0 】

ポリペプチドに適用される場合、用語「実質的同一性」とは、2つのペプチド配列が、例えばデフォルトギャップ重量を使用してプログラム G A P または B E S T F I T により最適にアラインされる場合に、少なくとも 80 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 90 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、またはそれ以上（例えば 99 % の配列同一性）を共有することを意味する。同一でない残基の位置は保存的アミノ酸置換により異なっているのが好ましい。

【 0 0 5 1 】

ポリペプチドに言及して使用する場合の用語「多様体 ( v a r i a n t ) 」及び「変異体 ( m u t a n t ) 」は、1つ以上のアミノ酸が別の、通常は関連するポリペプチドと異なるアミノ酸配列を意味する。多様体は「保存的」変更を有してよく、ここで、置換されたアミノ酸は類似の構造的または化学的性質を有する。保存的アミノ酸置換の1つの種類は、類似の側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンであり、脂肪族 - ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群はセリン及びスレオニンであり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群はアスパラギン及びグルタミンであり、芳香族側鎖を有するアミノ酸の群はフェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンであり、塩基性側鎖を有するアミノ酸の群はリシン、アルギニン、及びヒスチジンであり、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群はシステイン及びメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換の群は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リシン - アルギニン、アラニン - バリン、及びアスパラギン - グルタミンである。より珍しくは、多様体は「非保存的」変更（例えば、グリシンのトリプトファンによる置換）を有してよい。同様の小数のバリエーションとしては、アミノ酸欠失もしくは挿入（すなわち付加）、または両方もまた挙げてよい。生物活性を損なわずに、どのアミノ酸残基が、そしてどれだけ多くのアミノ酸残基が置換、挿入、または欠失され得るかを測定する手引きは、当該技術分野において周知のコンピュータプログラム、例えば D N A S t a r ソフトウェアを使用して見出され得る。多様体を、機能アッセイで試験することができる。好ましい多様体は、（置換、欠失などに関係なく）10 % 未満、及び好ましくは 5 % 未満、及び更により好ましくは 2 % 未満の変化を有する。

【 0 0 5 2 】

用語「遺伝子」とは、R N A、またはポリペプチド、またはその前駆体（例えばプロインスリン）の産生に必要なコード配列を含む、核酸（例えば D N A または R N A ）配列を意味する。機能的ポリペプチドは、ポリペプチドの所望の活性または機能的性質（例えば酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達など）が維持される限り、完全長コード配列により、またはコード配列の任意の部分によりコードされることができる。遺伝子に言及して

10

20

30

40

50

使用する場合、用語「一部」とは、その遺伝子の断片を意味する。断片は、数個のヌクレオチドから、遺伝子配列全体マイナス1つのヌクレオチドまで、サイズが変化してよい。したがって、「遺伝子の少なくとも一部を含むヌクレオチド」は、遺伝子の断片、または遺伝子全体を含んでよい。

【0053】

用語「遺伝子」は、構造的遺伝子のコード領域もまた包含し、遺伝子が完全長 mRNA の長さに対応するように、いずれかの末端に約 1 kb の距離で、5' 及び 3' 末端の両方のコード領域に隣接して位置する配列を含む。コード領域の 5' に位置し、mRNA 上に存在する配列は、5' 非翻訳配列と呼ばれる。コード領域の 3' すなわち下流に位置し、mRNA 上に存在する配列は、3' 非翻訳配列と呼ばれる。用語「遺伝子」は、遺伝子の cDNA 形態及びゲノム形態の両方を包含する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と呼ばれる、非コード配列によって中断されたコード領域を含有する。イントロンは、核 RNA (mRNA) に転写される遺伝子のセグメントであり、イントロンはエンハンサーなどの制御因子を含有してよい。イントロンは核転写物または一次転写産物から取り除かれる、または「スプライシング」されており、それ故イントロンはメッセンジャー RNA (mRNA) 転写産物中には存在しない。mRNA は翻訳中に、初期のポリペプチドにおけるアミノ酸の配列、すなわち順序を特定する機能を果たす。

【0054】

イントロンを含有することに加えて、遺伝子のゲノム形態は、RNA 転写産物に存在する配列の 5' 及び 3' 末端の両方に位置する配列もまた含んでよい。これらの配列は「フランキング」配列または領域と呼ばれる（これらのフランキング配列は、mRNA 転写産物上に存在する非翻訳配列に対して 5' または 3' に位置する）。5' フランキング領域は、遺伝子の転写を制御する、または転写に影響を及ぼすプロモーター及びエンハンサーなどの調節配列を含有してよい。3' フランキング領域は、転写の終結、翻訳後切断、及びポリアダニル化を指令する配列を含有する。

【0055】

用語「異種遺伝子」とは、自然環境に存在しない（すなわち、人の手により変更された）因子をコードする遺伝子を意味する。例えば、異種遺伝子は、別の種に導入される 1 つの種からの遺伝子を含む。異種遺伝子は、いくつかの方法（例えば変異、複数のコピーへの付加、非内在性プロモーター配列またはエンハンサー配列への結合など）で変更されている生命体に対して内在性の遺伝子もまた含む。異種遺伝子は、異種遺伝子によりコードされるタンパク質に対する遺伝子、もしくは染色体中の植物遺伝子配列と自然に関係していることが見出されていない、または、自然では見出されない染色体の部分（例えば、遺伝子が通常発現しない遺伝子座で発現する遺伝子）と関係するプロモーターなどの制御因子を含むヌクレオチド配列に典型的に結合する異種遺伝子配列という点で内因性の植物遺伝子と区別される。

【0056】

用語「ポリヌクレオチド」とは、2 つ以上、好ましくは 4 つ以上、そして通常は 11 個以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含む分子を意味する。厳密なサイズは多くの因子に依存し、それにより、オリゴヌクレオチドの最終的な機能または使用に依存する。ポリヌクレオチドは、化学合成、DNA 複製、逆転写、またはこれらの組み合わせを含む任意の方法で生成することができる。用語「オリゴヌクレオチド」とは一般に、通常は 30 ヌクレオチド長未満の、長さが短い一本鎖ポリヌクレオチド鎖を意味するが、用語「ポリヌクレオチド」と同じ意味で用いられてもよい。

【0057】

用語「核酸」とは、上述のとおり、ヌクレオチドのポリマー、すなわちポリヌクレオチドを意味する。この用語は、1 個の分子、または分子の集合を示すために使用される。核酸は一本鎖または二本鎖であってよく、後述のように、コード領域、及び様々な調節因子の領域を含んでよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 8 】

用語「遺伝子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド」、または「遺伝子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド」、または、特定のポリペプチド」をコードする核酸配列」とは、遺伝子のコード領域を含む核酸配列、または言い換えると、遺伝子産物をコードする核酸配列を意味する。コード領域はcDNA形態、ゲノムDNA形態、またはRNA形態のいずれかで存在してよい。DNA形態で存在する場合、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、または核酸は一本鎖（すなわちセンス鎖）、または二本鎖であってよい。エンハンサー／プロモーター、スプライスジャンクション、ポリアデニル化シグナルなどの好適な調節要素は、一次RNA転写産物の好適な転写開始及び／または正しいプロセッシングを行わせる必要がある場合、遺伝子のコード領域に近接して配置されてよい。あるいは、本開示の発現ベクター内で使用されるコード領域は、内因性エンハンサー／プロモーター、スプライスジャンクション、介在配列、ポリアデニル化シグナルなど、または、内因性調節要素及び外因性調節要素の両方の組み合わせを含

10

## 【 0 0 5 9 】

核酸分子に言及する際の実語「組み換え」とは、分子生物学技術により結合した核酸セグメントを含む核酸分子を意味する。タンパク質またはポリペプチドに言及する際の実語「組み換え」とは、組み換え核酸分子を使用して発現するタンパク質分子を意味する。

## 【 0 0 6 0 】

用語「相補的な」及び「相補性」とは、塩基対形成の規則により関係しているポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）を意味する。例えば、配列「A - G - T」は、配列「T - C - A」に相補的である。相補性は「部分的」であってよく、この場合、核酸塩基のいくつかのみが、塩基対形成の規則に従って一致する。または、核酸の間で「完全な」または「全ての」相補性が存在してよい。核酸鎖間での相補性の程度は、核酸鎖間でのハイブリダイゼーションの効率及び強度に著しい影響力を持っている。相補性は、核酸間の結合に依存する増幅反応及び検出法において特に重要である。

20

## 【 0 0 6 1 】

核酸に関して用いられる場合の実語「相同性」とは、相補性の程度を意味する。部分的相同性または完全な相同性（即ち同一性）が存在することができる。「配列同一性」とは、2つ以上の核酸またはタンパク質間の関係性の尺度を意味し、比較した全ての長さに対する割合で与えられる。同一性の計算には、同一であり、それぞれのより大きな配列中の同じ相対位置に存在するヌクレオチドまたはアミノ酸残基を想到に入れる。同一性の計算は、「GAP」（Genetics Computer Group, Madison, Wis.）及び「ALIGN」（DNASTar, Madison, Wis.）などのコンピュータプログラム内に含まれるアルゴリズムにより実施することができる。部分的な相補配列とは、完全な相補配列が標的核酸にハイブリダイズすることを少なくとも部分的に阻害する（または、ハイブリダイズすることと競合する）配列であり、機能的な用語「実質的に相同な」を使用することを意味する。標的配列に対する完全な相補配列のハイブリダイゼーションの阻害は、低ストリンジェンシー条件下にてハイブリダイゼーションアッセイ（サザンブロットまたはノーザンブロット、溶液ハイブリダイゼーションなど）を使用して調査することができる。実質的に相同な配列またはプローブが、低ストリンジェンシーな条件下にて、標的に完全に相同な配列の結合（すなわちハイブリダイゼーション）と競合し、これを阻害する。これは、低ストリンジェンシー条件は非特異的結合を可能にするようなものであることを意味するものではない。低ストリンジェンシー条件には、2つの配列の互いの結合が特異的（すなわち選択的）な相互作用であることを必要とする。非特異的結合が存在しないことは、部分的な相補性（例えば、30%未満の同一性）の程度すらも欠いている第2標的を使用することにより試験することができる。非特異的結合が存在しない場合、プローブは第2の非相補性標的にハイブリダイズしない。

30

40

## 【 0 0 6 2 】

以下の用語は、2つ以上のポリヌクレオチド間の配列関係を説明するために使用される

50

：「参照配列」、「配列同一性」、「配列同一性の割合」、及び「実質的同一性」。「参照配列」とは、配列比較のための基準として使用される、規定された配列である。参照配列は、例えば、配列表に示される完全長cDNA配列のセグメントとしての、より大型の配列のサブセットであってよい、または、完全な遺伝子配列を含んでよい。一般に、参照配列は少なくとも20ヌクレオチド長、頻繁には少なくとも25ヌクレオチド長、そして多くの場合、少なくとも50ヌクレオチド長である。2つのポリヌクレオチドはそれぞれ、(1)2つのポリヌクレオチド間で類似する配列(すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部)を含み得る、及び(2)2つのポリヌクレオチド間で異なる配列を更に含み得るため、2つ(以上)のポリヌクレオチド間での配列比較は通常、「比較窓」にまたがる2つのポリヌクレオチドの配列を比較して、局所領域の配列類似性を識別及び比較することにより実施される。本明細書で使用する場合、「比較窓」とは、少なくとも20個の連続したヌクレオチド位置の概念的セグメントを意味し、ここで、ポリヌクレオチド配列を少なくとも20個の連続したヌクレオチドの参照配列と比較してよく、比較窓のポリヌクレオチド配列の一部は、2つの配列の最適アラインメントに関する(付加または欠失を含まない)参照配列と比較した際に、20%以下の付加または欠失(すなわちギャップ)を含んでよい。比較窓をアラインするための配列の最適アラインメントは、Smith及びWatermanの局所相同性アルゴリズム(Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981))により、Needleman及びWunschの相同性アラインメントアルゴリズム(Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970))により、Pearson及びLipmanの、類似性方法に関する調査(Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 85:2444(1988))により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)により、または検査により実施することができ、様々な方法により生み出された最適のアラインメント(すなわち、比較窓にまたがって最大割合の相同性が得られるもの)を選択する。用語「配列同一性」とは、2つのポリヌクレオチド配列が比較窓にまたがり(すなわち、ヌクレオチド塩基同士で)同一であることを意味する。

#### 【0063】

特定の実施形態において、用語「配列同一性の割合」は、比較窓にまたがる、2つの最適にアラインされた配列を比較し、両方の配列にて同一の核酸塩基(例えばA、T、C、G、U、またはI)が生じる位置の数を測定して、一致する位置の数を入手し、一致した位置の数を比較窓の位置の総数(すなわち窓サイズ)で除し、結果に100を掛け、配列同一性の割合を得ることにより計算される。

#### 【0064】

特定の実施形態において、配列「同一性」とは、最も短い配列の大きい方により除した同一位置の数、または、オーバハングを除外した等価な位置の数(ここでは、内部ギャップを等価な位置として数える)を使用して計算した2つの配列のアラインメント間における配列アラインメントにおいて、(割合として表現した)厳密に一致しているアミノ酸の数を意味する。例えば、ポリペプチドGGGGGG及びGGGGTは5つのうち4つ、すなわち80%の配列同一性を有する。例えば、ポリペプチドGGGPPP及びGGGAPPは7つのうち6つ、すなわち85%の配列同一性を有する。特定の実施形態において、本明細書で表現される配列同一性の任意の詳細説明を、配列類似性で置き換えてよい。パーセント「類似性」を使用して、アラインメントの2つの配列間の類似性を定量化する。特定のアミノ酸が一致を有するように同一である必要がないことを除いて、本方法は同一性を測定するものと同じである。アミノ酸は、以下のアミノ酸群に従った、類似の性質を有する群に属する場合、一致として分類される：芳香族 - F Y W；疎水性 - A V I L；正に荷電：R K H；負に荷電 - D E；極性 - S T N Q。

## 【 0 0 6 5 】

本明細書で使用する場合、用語「実質的同一性」とはポリヌクレオチド配列の性質を示し、ここで、ポリヌクレオチドは、少なくとも20ヌクレオチドの位置の比較窓にまたがる、頻繁には少なくとも25～50ヌクレオチドの窓にまたがる参照配列と比較して、少なくとも85%の配列同一性を有する配列、好ましくは少なくとも90～95%の配列同一性、より一般的には少なくとも99%の配列同一性を含み、配列同一性の割合は、比較窓にまたがり参照配列が合計で20%以下である、欠失または付加を含み得るポリヌクレオチド配列に対する参照配列を比較することにより計算される。参照配列は、例えば、本開示にて特許請求されている組成物の完全長配列のセグメントとしての、より大型の配列のサブセットであってよい。

10

## 【 0 0 6 6 】

cDNAまたはゲノムクローンなどの二本鎖核酸配列に言及して使用される場合、用語「実質的に相同な」とは、上述した低～高ストリンジエンシー条件下にて、二本鎖核酸配列の鎖のいずれかまたは両方にハイブリダイズ可能な任意のプローブを意味する。

## 【 0 0 6 7 】

一本鎖核酸配列に言及して使用する場合、用語「実質的に相同な」とは、上述した低～高ストリンジエンシー条件下にて、一本鎖核酸配列にハイブリダイズ可能（すなわち、一本鎖核酸配列の相補鎖である）ことができる任意のプローブを意味する。

## 【 0 0 6 8 】

用語「作用可能な組み合わせで」、「作用可能な順番で」、及び「作用可能に結合した」とは、所与の遺伝子の転写、及び/または所望のタンパク質分子の合成を指令することが可能な核酸分子が生成されるような方法での核酸配列の結合を意味する。この用語は、機能性タンパク質が生成される方法でのアミノ酸配列の結合もまた意味する。

20

## 【 0 0 6 9 】

用語「制御因子」とは、核酸配列の発現のいくつかの側面を制御する遺伝因子を意味する。例えば、プロモーターとは、作用可能に結合したコード領域の転写開始を促進する制御因子である。他の制御因子はスプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、終結シグナルなどである。

## 【 0 0 7 0 】

真核生物における転写制御シグナルは「プロモーター」因子と「エンハンサー」因子とを含む。プロモーター及びエンハンサーは、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用するDNA配列のショートアレイからなる（Maniatis, et al., Science 236:1237, 1987）。プロモーター因子及びエンハンサー因子は、酵母菌細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞及び植物細胞中の遺伝子を含む様々な真核細胞源から単離されている。プロモーター因子及びエンハンサー因子はウイルスからも単離されており、原核生物で発見されている。特定のプロモーター及びエンハンサーの選択は、対象のタンパク質を発現させるために使用される細胞型に依存する。いくつかの真核細胞プロモーター及びエンハンサーは広範な宿主範囲を有するが、他のものは限定的な細胞型のサブセットにおいて機能的である（確認には、Voss, et al., Trends Biochem. Sci., 11:287, 1986; 及びManiatis, et al., supra 1987を参照のこと）。

30

40

## 【 0 0 7 1 】

本明細書で使用する場合、用語「プロモーター因子」、「プロモーター」、または「プロモーター配列」とは、DNAポリマーのタンパク質コード領域の5'末端に位置する（すなわち先方に位置する）DNA配列を意味する。自然に知られている大部分のプロモーターの場所は、転写された領域に先行する。プロモーターはスイッチとして機能し、遺伝子の発現を活性化する。遺伝子が活性化されると、それは転写された、あるいは転写に関与していると言われる。転写には、遺伝子からのmRNAの合成が伴う。それ故、プロモーターは転写制御因子として機能し、遺伝子のmRNA中への転写を開始するための部位もまたもたらす。

50

## 【 0 0 7 2 】

プロモーターは組織特異的、または細胞特異的であってよい。プロモーターに適用される用語「組織特異的」とは、異なる種類の組織（例えば葉）において、対象の同一のヌクレオチド配列の発現が相対的に存在していない場合に、対象のヌクレオチド配列の選択的発現を、特定の種類の組織（例えば種子）に指令することが可能なプロモーターを意味する。プロモーターの組織特異性は例えば、レポーター遺伝子をプロモーター配列に作用可能に結合させてレポーター構築物を生成すること、レポーター構築物が得られるトランスジェニック植物の各組織内に組み込まれるように、植物のゲノム内にレポーター構築物を導入すること、及び、トランスジェニック植物の異なる組織中でのレポーター遺伝子の発現を検出すること（例えば、mRNA、タンパク質を検出すること、またはレポーター遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を検出すること）により評価することができる。別の組織内でのレポーター遺伝子の発現度合いと比較して、1つ以上の組織内でのレポーター遺伝子の発現度合いが大きいことが検出されることにより、より大きな発現度合いが検出される組織に対してプロモーターが特異的であることが示される。プロモーターに適用される用語「細胞型特異的」とは、同じ組織において、異なる種類の細胞における対象の同じヌクレオチド配列の発現が相対的に存在しない場合に、特定の種類の細胞において、対象のヌクレオチド配列の選択的発現の指令が可能なプロモーターを意味する。プロモーターに適用される場合の用語「細胞型特異的」とは、1つの組織内の領域における、対象のヌクレオチド配列の選択的発現を促進可能なプロモーターもまた意味する。プロモーターの細胞型特異性は、当該技術分野において周知の方法、例えば免疫組織化学染色を使用して評価することができる。手短かに言えば、組織部分をパラフィンに埋め込み、パラフィン部分を、発現がプロモーターにより制御される対象のヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド生成物に特異的な一次抗体と反応させる。一次抗体に対して特異的な標識済み（例えばペルオキシダーゼ結合）二次抗体を、部分化した組織に結合させ、顕微鏡により特異的結合を検出する（例えばアビジン/ビオチンにより）。

10

20

## 【 0 0 7 3 】

プロモーターは構成的、または制御性であってよい。プロモーターに言及する場合の用語「構成的」とは、刺激（例えば熱ショック、化学物質、光など）の不存在下にて作用可能に結合した核酸配列の転写を指令可能なプロモーターを意味する。典型的には、構成的プロモーターは実質的にあらゆる細胞及びあらゆる組織において、導入遺伝子の発現を指令することが可能である。

30

## 【 0 0 7 4 】

対照的に、「制御性」または「誘導性」プロモーターとは、刺激の不存在下で作用可能に結合した核酸配列の転写の度合いとは異なる刺激（例えば熱ショック、化学物質、光など）の存在下において作用可能に結合した核酸配列の、一定水準の転写を指令可能なプロモーターである。

## 【 0 0 7 5 】

エンハンサー及び/またはプロモーターは「内因性」または「外因性」または「異種」であることができる。「内因性」エンハンサーまたはプロモーターとは、ゲノム内の所与の遺伝子と自然に結合したものである。「外因性」または「異種」エンハンサーまたはプロモーターとは、遺伝子の転写が結合したエンハンサーまたはプロモーターにより指令されるように、遺伝子操作（すなわち分子生物学技術）により遺伝子に並置されるものである。例えば、第1の遺伝子と作用可能に組み合わせた内因性プロモーターを単離して除去し、第2の遺伝子と作用可能に組み合わせ配置することにより、第1の遺伝子を第2の遺伝子と作用可能に組み合わせた「異種プロモーター」とすることができる。そのような様々な組み合わせを想到する（例えば、第1及び第2の遺伝子は同じ種、または異なる種に由来することができる）。

40

## 【 0 0 7 6 】

真核細胞中での組み換えDNA配列の効率的な発現には典型的には、得られる転写産物の効率的な終結及びポリアデニル化を指令するシグナルの発現が必要である。転写終結シ

50

グナルは通常、ポリアデニル化シグナルの下流に見出され、数百ヌクレオチド長である。本明細書で使用する場合、用語「ポリ(A)部位」または「ポリ(A)配列」とは、初期のRNA転写産物の終結及びポリアデニル化の両方を指令するDNA配列を意味する。ポリ(A)尾部を欠く転写産物は不安定であり急速に分解するため、組み換え転写産物の効率的なポリアデニル化が望まれる。発現ベクターで利用されるポリ(A)シグナルは「異種」または「内因性」であってよい。内因性ポリ(A)シグナルは自然には、ゲノム内の所与の遺伝子のコード領域の3'末端において見出される。異種ポリ(A)シグナルは、ある遺伝子から単離され、別の遺伝子の3'に配置されているものである。一般に使用される異種ポリ(A)シグナルはSV40ポリ(A)シグナルである。SV40ポリ(A)シグナルは237bp BamHI/BclI制限断片に含有され、終結及びポリアデニル化の両方を指令する。

10

#### 【0077】

用語「ベクター」とは、ある細胞から別の細胞にDNAセグメント(複数可)を移す核酸分子を意味する。用語「ビヒクル」は、「ベクター」と同じ意味で用いられるときがある。

#### 【0078】

用語「発現ベクター」または「発現カセット」とは、所望のコード配列、及び、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列の発現のために使用される適切な核酸配列を含有する組み換え核酸を意味する。原核生物での発現に用いられる核酸配列としては通常、多くの場合他の配列と合わせて、プロモーター、オペレーター(任意)、及びリボソーム結合部位が挙げられる。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、ならびに終結及びポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。

20

#### 【0079】

用語「宿主細胞」とは、異種遺伝子を複製及び/または転写及び/または翻訳可能な任意の細胞を意味する。したがって、「宿主細胞」とは、*in vitro*に位置するか、または*in vivo*に位置するかにかかわらず、任意の真核細胞及び原核細胞(例えば *E. coli*などの細菌細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、トリ細胞、両生類細胞、植物細胞、魚細胞、及び昆虫細胞)を意味する。例えば、宿主細胞はトランスジェニック動物に位置してよい。

#### 【0080】

「選択マーカー」とは、人工的な選択または識別(レポート遺伝子)に好適な形質を付与する(例えば、 $\beta$ -ラクタマーゼは抗生物質耐性を付与する)ポリペプチドをコードする組み換えベクター内に導入される核酸であり、 $\beta$ -ラクタマーゼを発現する生命体が、増殖培地中にて抗生物質が存在する中で生残することを可能にする。別の例はチミジンキナーゼであり、宿主をガンシクロビル選択に対して感受性とする。スクリーニング可能なマーカーによって、想定される色の有無に基づいて所望の細胞と望ましくない細胞を区別することが可能となり得る。例えば、*lac-z* 遺伝子は、*X-gal* (5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド)の存在下にて青色を付与する $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素を生み出す。組み換え挿入が*lac-z* 遺伝子を不活化する場合、得られるコロニーは無色である。1つ以上の選択マーカー、例えば、発現生命体の不能性を補完して、その増殖(栄養素要求性)に必要な特定の化合物を合成し、増殖のために化合物を別の毒性化合物に転換可能な酵素が存在してよい。URA3、オロチジン-5'ホスフェートデカルボキシラーゼはウラシルの生合成に必要であり、ウラシルに栄養素要求性であるura3変異体を補完することができる。URA3はまた、5-フルオロオロチン酸を毒性の化合物5-フルオロウラシルに転換する。想到される更なる選択マーカーとしては、抗菌耐性を付与する、または蛍光タンパク質を発現する任意の遺伝子が挙げられる。例としては以下の遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない：*amp<sup>r</sup>*、*cam<sup>r</sup>*、*tetr<sup>r</sup>*、プラストサイジン<sup>r</sup>、*neo<sup>r</sup>*、*hygr<sup>r</sup>*、*abx<sup>r</sup>*、ネオマイシンリン酸転移酵素II型遺伝子(*np<sup>t</sup>II*)、*p*-グルクロニダーゼ(*gus*)、緑色蛍光タンパク質(*gfp*)、*egfp*、*yfp*、*mCherry*、*p*-ガラクトシダーゼ(*lacZ*)

30

40

50

)、lacZa、lacZAM15、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(cac)、アルカリホスファターゼ(phoA)、細菌性ルシフェラーゼ(luxAB)、ピアラホス耐性遺伝子(bar)、ホスホマンノースイソメラーゼ(pmi)、キシロースイソメラーゼ(xylA)、アラビトールデヒドロゲナーゼ(atlD)、UDP-グルコース：ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼI(galT)、アントラニル酸シンターゼのフィードバック感受性 サブユニット(OASAD)、2-デオキシグルコース(2-DGR)、ベンジルアデニン-N-3-グルクロニド、E.coliスレオニンデアミナーゼ、グルタメート1-セミアルデヒドアミノトランスフェラーゼ(GSA-AT)、D-アミノ酸オキシダーゼ(DAAO)、対塩性遺伝子(rstB)、フェレドキシン様タンパク質(pflp)、トレハロース-6-Pシンターゼ遺伝子(AtTPS1)、リシンラセマーゼ(lyr)、ジヒドロジピコリネートシンターゼ(dapA)、トリプトファンシンターゼ 1(AtTSB1)、デハロゲナーゼ(dhlA)、マンノース-6-ホスフェートレダクターゼ遺伝子(M6PR)、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(HPT)、及びD-セリンアンモニアリアーゼ(dsda)。

#### 【0081】

「標識」とは、別の分子(例えば抗体またはタンパク質)に直接または間接的に結合し、その分子の検出を容易にする、検出可能な化合物または組成物を意味する。標識の具体的な非限定例としては、蛍光タグ、酵素結合、及び放射性同位元素が挙げられる。一例では、「標識レセプター」とは、レセプターへの異種ポリペプチドの組み込みを意味する。標識は、放射性標識したアミノ酸の組み込み、または標識したアビジン(例えば、光学的方法または比色分析法により検出可能な蛍光マーカーマたは酵素活性を含有するストレプトアビジン)により検出可能なポリペプチドへの、ビオチニル部位の共有結合を含む。ポリペプチド及び糖タンパク質を標識する様々な方法が当技術分野において既知であり、使用することができる。ポリペプチド用の標識の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：放射性同位体または放射性ヌクレオチド( $^{35}\text{S}$ または $^{131}\text{I}$ など)、蛍光標識(フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、ランタニド蛍光体など)、酵素標識(ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光マーカーマ、ビオチニル基、第2のレポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープ(ロイシンジッパー対配列、第2の抗体用結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグなど)、または磁気性作用物質(ガドリニウムキレートなど)。いくつかの実施形態において、標識は様々な長さのスペーサーアームにより結合され、潜在的な立体障害が低下する。

#### 【0082】

特定の実施形態において、本開示は、本明細書にて開示した配列、またはその多様体もしくは融合体を含む組み換えポリペプチドに関し、ここで、アミノ酸配列のアミノ末端または炭素末端は所望により異種アミノ酸配列、標識、またはレポーター分子に結合している。

#### 【0083】

特定の実施形態において、本開示は、本明細書にて開示したポリペプチドまたはその融合タンパク質をコードする核酸を含む組み換えベクターに関する。

#### 【0084】

特定の実施形態において、組み換えベクターは所望により、哺乳類、ヒト、昆虫、ウイルス、細菌、細菌プラスミド、酵母に関連する複製起点、または遺伝子(遺伝子もしくはレトロウイルス遺伝子もしくはレンチウイルスLTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、及びINSヌクレオチドセグメントなど)、またはtat、rev、nef、vif、vpr、vpu、及びvpvから選択される遺伝子、またはgag、pol、及びenvから選択される構造遺伝子を含む。

#### 【0085】

特定の実施形態において、組み換えベクターは所望により、遺伝子ベクター因子(核酸

)、例えば選択マーカー領域、*lac*オペロン、*CMV*プロモーター、ハイブリッドニワトリB-アクチン/*CMV*エンハンサー(*CAG*)プロモーター、*tac*プロモーター、*T7* RNAポリメラーゼプロモーター、*SP6* RNAポリメラーゼプロモーター、*SV40*プロモーター、内部リボソーム侵入部位(*IRES*)配列、*cis*-作用ウッドストック後制御因子(*WPRES*)、スキヤフォールド付着領域(*SAR*)、逆向き末端反復配列(*ITR*)、*FLAG*タグコード領域、*c-myc*タグコード領域、金属親和性タグコード領域、ストレプトアビジン結合ペプチドタグコード領域、ポリHisタグコード領域、*HA*タグコード領域、*MBP*タグコード領域、*GST*タグコード領域、ポリアデニル化コード領域、*SV40*ポリアデニル化シグナル、*SV40*複製起点、*ColE1*複製起点、*f1*起点、*pBR322*起点、または*pUC*起点、*TEV*プロテアーゼ認識部位、*loxP*部位、*Cre*リコンビナーゼコード領域、または、50ヌクレオチド未満もしくは60ヌクレオチド未満の連続セグメント内に5、6、もしくは7個もしくはそれ以上の制限部位を有するもの、もしくは、20ヌクレオチド未満もしくは30ヌクレオチド未満の連続セグメントを有する3もしくは4個もしくはそれ以上の制限部位を有するものなどの複数のクローニング部位を含む。

#### 【0086】

用語「レポーター遺伝子」とは、アッセイされ得るタンパク質をコードする遺伝子を意味する。レポーター遺伝子の例としては、変性*katushka*、*mkate*及び*mkate2*(例えば*Merzlyak et al.*, *Nat. Methods*, 2007, 4, 555-557 及び *Shcherbo et al.*, *Biochem. J.*, 2008, 418, 567-574を参照)、ルシフェラーゼ(例えば*deWet et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 7:725(1987)ならびに米国特許第6,074,859号;同5,976,796号;同5,674,713号;及び同5,618,682号(これらすべてが参照により本明細書に組み込まれる)を参照)、緑色蛍光タンパク質(例えば*Genbank*受け入れ番号U43284;多数のGFP多様体が*Clontech Laboratories*, *Palo Alto, Calif.*から市販されている)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ならびに西洋ワサビペルオキシダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0087】

遺伝子に言及する際の用語「野生型」とは、天然源から単離した遺伝子の特性を有する遺伝子を意味する。遺伝子産物に言及する際の用語「野生型」とは、天然源から単離した遺伝子産物の特性を有する遺伝子産物を意味する。対象物に適用されて本明細書で 사용되는用語「天然」とは、対象物が自然において発見可能である事実を意味する。例えば、自然に源から単離することが可能であり、実験室にて人により意図的に改変されていない生命体(ウイルスを含む)に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然である。野生型遺伝子は集団にて最も頻繁に観察されるものであり、それ故遺伝子の「通常」形態または「野生型」形態と、任意に示される。対照的に、遺伝子、または遺伝子産物に言及する際の用語「改変された」または「変異体」とはそれぞれ、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した際に、配列及び/または機能的性質の改変(即ち、変化した特性)を示す遺伝子または遺伝子産物を意味する。天然の変異体を単離することができることに注意する;これらは、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した際に、変化した特性を有するという事実によって識別される。

#### 【0088】

用語「アンチセンス」または「アンチゲノム」とは、センス鎖のヌクレオチド残基の配列に対して、ヌクレオチド残基の配列が逆の5'→3'方向となっているヌクレオチド配列を意味する。DNA二本鎖の「センス鎖」とは、細胞により自然状態から「センスmRNA」に転写される、DNA二本鎖中の鎖を意味する。したがって、「アンチセンス」配列は、DNA二本鎖内の非コード鎖と同じ配列を有する配列である。

#### 【0089】

用語「単離された」とは、天然環境では通常付随する、または相互作用する構成成分を実質的に含まない生体物質（例えばウイルス、核酸またはタンパク質）を意味する。単離された材料は所望により、自然環境（例えば細胞）では、その材料と共には見出されない材料を含む。例えば、材料が細胞などの自然環境に存在する場合、材料は、その環境では見出されない材料に対してネイティブでない細胞内の位置（例えばゲノムまたは遺伝因子）に配置されている。例えば、天然核酸（例えばコード配列、プロモーター、エンハンサーなど）は、非天然の手段により、その核酸にネイティブでないゲノム（例えばプラスミドもしくはウイルスベクターなどのベクター、または単位複製配列）の遺伝子座に導入される場合に、単離される。そのような核酸は「異種」核酸と呼ばれることもある。単離されたウイルスは例えば、野生型ウイルスのネイティブ環境（例えば感染した個体の鼻咽頭）以外の環境（例えば細胞培養系、または細胞培養からの精製）に存在する。

10

## 【0090】

「免疫学的有効量」のRSVとは、RSVへの後の曝露に対して、個体（例えばヒト）自身の免疫応答を高めるのに十分な量である。誘導された免疫の度合いを、中和分泌及び/または血清抗体の量を測定することにより、例えばブランク中和、補体固定、酵素結合免疫吸着、またはマイクロ中和アッセイにより、監視することができる。

## 【0091】

RSVに対する「防御免疫応答」とは、個体が後で野生型RSVに曝される、及び/または野生型RSVに感染する際に、深刻な下気道疾患（例えば肺炎及び/または細気管支炎）に対して防御的である個体（例えばヒト）により示される免疫応答を意味する。

20

キメラ呼吸器合胞体ウイルス（RSV）

## 【0092】

天然のRSV粒子は典型的には、マトリックスタンパク質により囲まれているヘリックスヌクレオカプシド内のウイルスゲノム、及び糖タンパク質を含有するエンベロープを含有する。ヒト野生型RSVのゲノムは、タンパク質、NS1、NS2、N、P、M、SH、G、F、M2-1、M2-2、及びLをコードする。G、F、及びSHは糖タンパク質である。RSVポリメラーゼ活性は、大型タンパク質（L）及びリントタンパク質（P）からなる。ウイルスM2-1タンパク質は転写中に使用され、転写酵素複合体の構成成分である可能性がある。ウイルスNタンパク質は、複製中に初期RNAをカプシド形成するのに使用される。

30

## 【0093】

ゲノムは転写され、宿主細胞の細胞質中に複製される。宿主細胞転写は典型的には、10個のメチル化mRNA及びポリアデニル化mRNAの合成をもたらす。アンチゲノムは複製中に作製されるゲノムのセンス方向RNA相補鎖であり、ゲノム合成の鋳型として機能する。ウイルス遺伝子は保存された遺伝子開始（GS）及び遺伝子終了（GE）配列に隣接する。ゲノムの3'及び5'末端にはリーダーヌクレオチド及びトレイラーヌクレオチドが存在する。野生型リーダー配列は3'末端にプロモーターを含有する。ウイルスポリメラーゼがGESIGNALに到達すると、ポリメラーゼはmRNAをポリアデニル化して放出し、次のGSIGNALにおいてRNA合成を再び開始する。L-P複合体は、プロモーターの認識、RNA合成、mRNAの5'末端のキャッピング及びメチル化、ならびにmRNAの3'末端のポリアデニル化を担うと考えられている。ポリメラーゼは接合部において遺伝子から乖離する場合があると考えられている。ポリメラーゼはゲノムの3'末端において転写を開始するため、ゲノムの3'末端の遺伝子は5'末端の遺伝子よりも頻繁に転写されて、発現の勾配がもたらされる。

40

## 【0094】

ゲノムを複製するために、ポリメラーゼはcis-作用GE及びGSIGNALにตอบสนองせず、ゲノムのセンス方向RNA相補鎖、つまりアンチゲノムを生成する。アンチゲノムの3'末端にはトレイラーの相補鎖が存在し、これはプロモーターを含有する。ポリメラーゼはこのプロモーターを使用して、ゲノムセンスRNAを生成する。裸のRNAとして放出されるmRNAとは異なり、アンチゲノム及びゲノムRNAは合成されると、ウイルス核

50

タンパク質 ( N ) でカプシド形成される。

【 0 0 9 5 】

ウイルス m R N A の翻訳後、完全長 ( + ) アンチゲノム R N A は、 ( - ) R N A ゲノムを複製するための鋳型として生成される。感染性組み換え R S V ( r R S V ) 粒子は、トランスフェクションしたプラスミドから回収されてよい。R S V N、P、L、及び M 2 - 1 タンパク質と完全長アンチゲノム R N A の同時発現は、R S V 複製のためには十分である。Collins et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 1995, 92 ( 25 ) : 11563 - 11567、及び米国特許第 6, 790, 449 号を参照のこと。

【 0 0 9 6 】

特定の実施形態において、本開示は、R S V F ポリペプチドの特定の望ましい配列、及びこれをコードする組み換え核酸に関する。特定の実施形態において、本開示は、これらのポリペプチドをコードする核酸を含む組み換えベクター、及び前記ベクターを含む細胞を想到する。特定の実施形態において、ベクターは選択マーカーまたはレポーター遺伝子を含む。

【 0 0 9 7 】

R S V を保管する一般的なベクターとしては、プラスミド及び細菌人工染色体 ( B A C ) が挙げられる。典型的には、細菌人工染色体は、選択マーカーと作用可能に組み合わせさせた、因子 F の ori S、rep E、par A、及び par B 遺伝子からなる群から選択される 1 つ以上の遺伝子、例えば、抗生物質への耐性を付与する遺伝子を含む。核酸配列は、所望により変異したウイルス、例えば所望により変異した R S V 株のゲノムまたはアンチゲノム配列であってよい。

【 0 0 9 8 】

E . coli 細菌中で R S V を培養することは、細菌人工染色体 ( B A C ) を利用することにより達成可能である。R S V を保存して遺伝子組み換えするための B A C ベクターは、Stobart et al., Methods Mol Biol., 2016, 1442 : 141 - 53 及び米国特許公開第 2012 / 0264217 号に報告されている。開示した B A C は、F 遺伝子を除いて呼吸器合胞体ウイルス ( R S V ) 株 A 2 の完全なアンチゲノム配列を含有し、これは R S V 株系列 19 のアンチゲノム配列である。ヘルパープラスミドと共に、感染性ウイルスを回収するためのリバースジェネティクスシステムにおいてこれを使用することができる。プラスミド上のアンチゲノム配列をウイルス回収の前に変異させて、所望の変異を有するウイルスを生成することができる。

【 0 0 9 9 】

特定の実施形態において、本開示は、B A C 遺伝子及び R S V アンチゲノムを含むベクターを単離した真核細胞に挿入することと、R S V ヴィリオンが形成される条件下にて、R S V の N タンパク質をコードするベクター、R S V の P タンパク質をコードするベクター、R S V の L タンパク質をコードするベクター、R S V の M 2 - 1 タンパク質をコードするベクターからなる群から選択される 1 つ以上のベクターを細胞に挿入することと、を含む、呼吸器合胞体ウイルス ( R S V ) 粒子の作製方法に関する。ベクターを細胞に挿入することは、ベクターが細胞に入る条件下にて、物理的に注入することにより、エレクトロポレーションにより、または細胞とベクターを混合することにより行うことができる。

【 0 1 0 0 】

キメラ R S V は、特定の変異、欠失、または多様体の組み合わせ、例えば r A 2 c p 248 / 404 / 1030 S H などの、R S V の冷却継代 ( c p ) 非温度感受性 ( t s ) 誘導体である c p R S V を含むことが想到される。r A 2 c p 248 / 404 S H は、4 つの独立した弱毒化遺伝因子：共に c p R S V の非 t s 弱毒化表現型をもたらす N 及び L タンパク質、ならびに F 糖タンパク質中の 5 個のミスセンス変異に基づく c p ; t s 248 ( L タンパク質中のミスセンス変異 ) ; t s 404 ( M 2 遺伝子の遺伝子開始転写シグナルにおけるヌクレオチド置換 ) ; 及び S H ( S H 遺伝子の完全な欠失 ) を含有する。r A 2 c p 248 / 404 / 1030 S H は 5 個の独立した弱毒化遺伝因子を含有し

10

20

30

40

50

、これらは r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 S H 及び t s 1 0 3 0 ( L タンパク質中の別のミスセンス変異) に存在する。K a r r o n e t a l . , J I n f e c t D i s . , 2 0 0 5 , 1 9 1 ( 7 ) : 1 0 9 3 - 1 1 0 4 ( 参照により本明細書に組み込まれる) を参照のこと。特定の実施形態の中では、R S V アンチゲノムは、可欠遺伝子 ( 例えば S H 、 N S 1 、 N S 2 、 及び M 2 - 2 遺伝子) における欠失もしくは変異、またはこれらの組み合わせを含有することができると想到される。

#### 【0101】

遺伝子コードの縮退により、個々のアミノ酸は複数のコドン配列 ( 同義コドンと呼ばれる場合がある) によりコードされる。異なる種において、同義コドンは多かれ少なかれ頻繁に用いられ、場合によってはコドンバイアスと呼ばれる。以下で示される同義コドンを遺伝子組換えして遺伝子のコード配列にすることにより、タンパク質のアミノ酸配列を変更することなく、タンパク質翻訳の速度低下がもたらされることが示されている。M u e l l e r e t a l . は、コドンバイアス中の変化によるウイルスの弱毒化について報告している。S c i e n c e , 2 0 0 8 , 3 2 0 : 1 7 8 4 を参照のこと。W O 2 0 0 8 1 2 1 9 9 2 号、及び W O 2 0 0 6 0 4 2 1 5 6 号、B u r n s e t a l . , J V i r o l o g y , 2 0 0 6 , 8 0 ( 7 ) : 3 2 5 9 、及び M u e l l e r e t a l . , J V i r o l o g y , 2 0 0 6 , 8 0 ( 1 9 ) : 9 6 8 7 もまた参照のこと。

#### 【0102】

R S V におけるコドン非最適化の使用については、M e n g , e t a l . , M B i o 5 , e 0 1 7 0 4 - 0 1 7 1 4 ( 2 0 1 4 ) 及び米国特許公開第 2 0 1 6 / 0 0 3 0 5 4 9 号で報告されている。特定の実施形態において、本開示は、単離された核酸、コドン非最適化による組み換え呼吸器合胞体ウイルス ( R S V ) 、それから作製されるワクチン、及びこれらに係るワクチン接種方法に関する。特定の実施形態において、コドン非最適化は非構造化遺伝子 N S 1 及び N S 2 、所望により遺伝子 G 、及び所望により遺伝子 L に存在する。更なる実施形態では、遺伝子 S H が欠失される。更なる実施形態では、遺伝子 F が変異される ( 例えば、位置 7 9 に M 、位置 1 9 1 に R 、位置 3 5 7 に K 、及び位置 3 7 1 に Y 、及び位置 5 5 7 に V のアミノ酸パターンを有する R S V F タンパク質) 。

#### 【0103】

特定の実施形態において、本開示は、野生型ヒト R S V または多様体の非最適化遺伝子 N S 1 及び / または N S 2 、ならびに所望により遺伝子 G 及び所望により遺伝子 L をコードする単離された核酸に関し、ヌクレオチドは、G l y を生成するコドンが G G T 、A s p を生成するコドンが G A T 、G l u を生成するコドンが G A A 、H i s を生成するコドンが C A T 、I l e を生成するコドンが A T A 、L y s を生成するコドンが A A A 、L e u を生成するコドンが C T A 、A s n を生成するコドンが A A T 、G l n を生成するコドンが C A A 、V a l を生成するコドンが G T A 、または T y r を生成するコドンが T A T 、またはこれらの組み合わせとなるように置換されている。特定の実施形態において、単離された核酸の遺伝子は、少なくとも 2 、3 、4 、5 、6 、7 、8 、9 、1 0 子、または全ての個々のコドンの組み合わせを更に含む。特定の実施形態において、単離された核酸中の遺伝子は、少なくとも 2 0 、3 0 、4 0 、または 5 0 個、またはそれ以上のコドンを含む。

#### 【0104】

特定の実施形態において、本開示は本明細書にて開示する単離された核酸に関し、ヌクレオチドは、A l a を生成するコドンが G C G 、C y s を生成するコドンが T G T 、P h e を生成するコドンが T T T 、P r o を生成するコドンが C C G 、A r g を生成するコドンが C G T 、S e r を生成するコドンが T C G 、または T h r を生成するコドンが A C G 、またはこれらの組み合わせとなるように置換されている。特定の実施形態において、核酸を含有する遺伝子は、少なくとも 2 、3 、4 、5 、6 、7 、8 、9 、1 0 、1 1 、1 2 、1 3 、1 4 、1 5 、1 6 個、または全ての個別のコドンの組み合わせを含む。特定の実施形態において、単離された核酸の遺伝子は、少なくとも 2 0 、3 0 、4 0 、または 5 0 個、またはそれ以上のコドンを含む。

## 【 0 1 0 5 】

Glenn et al. は、妊娠可能年齢の健康な女性における、呼吸器合胞体ウイルス組み換え融合 (F) ナノ粒子ワクチンの、無作為化盲検対照の用量範囲研究について報告している (J Infect Dis. 2016, 213 (3): 411 - 22)。特定の実施形態において、本開示は、本明細書で報告される変異 F タンパク質を含有するウイルス粒子及びウイルス様粒子 (VLP) に関する。ウイルス粒子は一般に、不活化ワクチン (または死菌ワクチン) として使用される。RSV は培養液中で増殖し、その後熱またはホルムアルデヒドなどの方法を使用して死菌することができる。弱毒生ワクチンは典型的には、複製速度及び / または感染速度が遅くなるように、弱められる。

## 【 0 1 0 6 】

特定の実施形態において、本開示は、全体のウイルスワクチンとしてのキメラ RSV 粒子、例えば、RSV のゲノムが非複製性である、または非感染性となるように、熱、化学物質、または放射線に曝される全体のウイルス粒子を想到する。特定の実施形態において、本開示は、界面活性剤を使用してウイルスを破壊し、本明細書にて開示した変異 F タンパク質を抗原として精製し、免疫系を刺激してウイルスに対する応答をマウントすることにより作製される、スプリットウイルスワクチン中のキメラ RSV 粒子を想到する。

## 【 0 1 0 7 】

VLP は成熟ヴィリオンに近似しているが、ウイルスゲノム材料 (すなわちウイルスゲノム RNA) を含有しない。したがって、VLP は自然では非複製性である。更に、VLP はその表面上にタンパク質を発現することができる。更に、VLP はインタクトなヴィリオンに似て、多価の粒子状構築物であるため、VLP は表面タンパク質への抗体の中和を誘発するのに効果的であることができる。VLP は反復投与することができる。

## 【 0 1 0 8 】

特定の実施形態において、本開示は、表面上に本明細書にて開示した変異 F タンパク質、及びインフルエンザウイルスマトリックス (M1) タンパク質核を含む VLP を想到する。Quan et al. は、インフルエンザウイルスマトリックス (M1) タンパク質核及び表面上の RSV - F で作製されたウイルス様粒子の作製方法について報告している (J Infect Dis. 2011, 204 (7): 987 - 995)。RSV F 及びインフルエンザ M1 を発現する組み換えバキュロウイルス (rBV) を生成し、作製のためにこれを昆虫細胞にトランスフェクションすることができる。

使用方法

## 【 0 1 0 9 】

特定の実施形態において、本開示は、免疫学的有効量のキメラ呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、RSV ポリペプチド、RSV 粒子、RSV ウイルス様粒子、及び / または本明細書にて開示した核酸を含む免疫原性組成物に関する。特定の実施形態において、本開示は、個体の免疫系を刺激して、RSV に対する防御免疫応答を生み出す方法に関する。特定の実施形態において、免疫学的有効量のキメラ RSV、ポリペプチド、及び / または本明細書にて開示した核酸を、生理学上許容できる担体中から個体に投与する。

## 【 0 1 1 0 】

特定の実施形態において、本開示は、本明細書にて開示した使用のための、本明細書にて開示した核酸を含む薬剤及びワクチン製品に関する。

## 【 0 1 1 1 】

特定の実施形態において、本開示は、本明細書にて開示した使用のための薬剤を製造するための、本明細書にて開示した核酸またはベクターの使用に関する。

## 【 0 1 1 2 】

本開示は、他の種類の弱毒化変異体を分析し、それらをワクチンまたは他の使用のためにキメラ RSV に組み込む技能もまた提供する。例えば、マウスの肺炎ウイルスの、組織培養適合性の非病原性株 (RSV のマウス等価物) は、G タンパク質の細胞質尾部を欠いている (Randhawa et al., Virology 207: 240 - 245 (1995))。類推により、RSV 糖タンパク質、F、G、及び SH のそれぞれの細胞質

10

20

30

40

50

及び膜貫通ドメインを欠失または改変して、弱毒化を達成することができる。

【0113】

本開示の感染性RSVで使用するための他の変異としては、RSVミニゲノムの変異分析中に識別されるcis-作用シグナルでの変異が挙げられる。例えば、リーダー及びトレイラー及びフランキング配列の挿入分析及び欠失分析はウイルスプロモーター及び転写シグナルを識別し、RNA複製または転写の様々な減少度合いに関連する、一連の変異をもたらす。これらのcis-作用シグナルの飽和突然変異誘発（これにより、各位置がヌクレオチド代替物のそれぞれに改変される）はまた、RNA複製または転写を減少させた（またはある場合によっては増加させた）多くの変異を識別している。これらの変異のいずれかを、本明細書に記載した完全アンチゲノムまたはゲノムに挿入することができる。他の変異は、ゲノムの3'末端をアンチゲノムからの等価物で置換することを伴い、これはRNA複製及び転写における変化に関係している。更に、遺伝子間領域（Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4594-4598 (1986)、参照により本明細書に組み込まれている）を短くする、または配列含量を伸ばすまたは変更することができ、また、天然遺伝子のオーバーラップ（Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5134-5138 (1987)、参照により本明細書に組み込まれている）を、本明細書記載の方法により除去する、または異なる遺伝子間領域に変更することができる。

10

【0114】

ワクチン使用のために、本開示に従って作製したウイルスをワクチン配合物中で直接使用することができる、または、所望により当業者に周知の凍結乾燥法を使用して凍結乾燥することができる。凍結乾燥したウイルスは典型的には、約4にて維持される。使用準備が整ったときに、凍結乾燥したウイルスを安定化溶液（例えばSPG、Mg、及びHEPESを含む生理食塩水）中で、更に後述するアジュバントと共に、またはアジュバントなしで再構築する。

20

【0115】

典型的には、本開示のRSVワクチンは活性成分として、本明細書に記載のとおりで作製した、免疫学的有効量のRSVを含有する。改変したウイルスを、生理学上許容できる担体及び/またはアジュバントを用いて対象に導入してよい。有用な担体は当該技術分野において周知であり、例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などが挙げられる。得られる水溶液をそのまま使用するためにパッケージ化する、または凍結乾燥してよく、凍結乾燥した配合物は、上述したとおりに投与前に滅菌溶液と混合する。組成物は、例えばpH調整及び緩衝剤、張度調整剤、湿潤剤などの、生理学的条件に近づけるために必要な製薬上許容できる補助物質、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリル酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミンなどを含有してよい。許容されるアジュバントとしては、不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、またはミョウバンが挙げられ、これらは当該技術分野において周知の材料である。

30

【0116】

本明細書に記載したRSV組成物を用いて、エアゾール、液滴、経口、局所、または他の経路により免疫付与すると、対象の免疫系は、RSVウイルスタンパク質（例えばF糖タンパク質）に特異的な抗体を産生することにより、ワクチンに応答する。ワクチン接種の結果、対象はRSV感染症に対して少なくとも部分的にまたは完全に免疫性となる、あるいは、中程度または深刻な（特に下気道の）RSV感染症の進行に対して耐性がつく。

40

【0117】

ワクチンが投与される対象は、RSVまたは密接に関係したウイルスによる感染症を受けやすい任意の哺乳類であることができ、この対象は、ワクチン接種株の抗原に対する防御免疫応答を生み出すことができる。したがって、好適な対象としては、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、齧歯類などが挙げられる。したがって、本開示は、様々なヒト及び獣医学使用のためのワクチンの作製方法を提供する。

50

## 【 0 1 1 8 】

本開示の R S V を含有するワクチン組成物を、R S V 感染症に感染しやすい、さもなくば R S V 感染症のリスクにある対象に投与し、対象自身の免疫応答能力を向上させる。このような量は「免疫原性的有効量」と定義される。この使用において、正確な量もまた、対象の健康状態及び体重、投与方法、製剤の性質に依存する。ワクチン製剤は、深刻な、または生命を脅かす R S V 感染症から対象患者を効果的に防御するのに十分な量の、本開示の改変 R S V を提供しなければならない。

## 【 0 1 1 9 】

本開示に従い作製する R S V を他の亜型または株のウイルスと組み合わせて、複数の R S V 亜型または株からの防御を達成することができ、または、これらの株の防御エピトープを、本明細書に記載したとおりにあるウイルスに組み換えることができる。典型的には、異なるウイルスは混合物であり同時に投与されるが、個別に投与されてもよい。例えば、2つの R S V 亜型の F 糖タンパク質はアミノ酸配列が約 11% しか異ならないため、この類似性は、R S V または F 抗原で免疫付与され、異種株を抗原投与された動物で観察される交差防御免疫応答の基準となる。したがって、ある株による免疫付与は、同一または異なる亜型の異なる株を防御することができる。

10

## 【 0 1 2 0 】

場合によっては、本開示の R S V ワクチンを、他の作用物質（特に他の小児ウイルス）との防御応答を誘導するワクチンと組み合わせるのが望ましいことがある。例えば、本開示の R S V ワクチンを、Clements et al., J. Clin. Microbiol. 29: 1175 - 1182 (1991)（参照により本明細書に組み込まれている）に記載されているように、パラインフルエンザウイルスワクチンと同時に投与することができる。本開示の別の態様では、本明細書に記載した感染性 R S V を生み出すために使用される R S V ゲノムまたはアンチゲノムに、防御抗原をコードする配列を組み込むことにより、R S V を、パラインフルエンザなどの他の気道病原体のこれらの防御抗原に対するベクターとして使用することができる。

20

## 【 0 1 2 1 】

本開示のワクチン組成物の単回投与または複数回投与を行うことができる。新生児及び乳児において、十分な程度の免疫を誘発するために、複数回の連続投与が必要となる場合がある。投与は、ネイティブ（野生型）R S V 感染症に対する十分な程度の防御を維持する必要に応じて、生後 1 ヶ月以内、または約 2 ヶ月となる前、典型的には 6 ヶ月以内に、及び、小児期を通しての間隔、例えば 2 ヶ月、6 ヶ月、1 年及び 2 年で開始してよい。同様に、繰り返し、または深刻な R S V 感染症に特に罹りやすい成人、例えばヘルスケアワーカー、デイケアワーカー、幼児の家族、高齢者（55 歳、60 歳、もしくは 65 歳より上）、または心肺機能が損なわれた個人などは、複数の免疫付与により防御免疫応答を確立する、及び/または維持する必要がある場合がある。誘発される免疫の程度は、中和分泌及び血清抗体の量を測定すること、ならびに、所望の程度の防御を維持することに応じた、調節される投与量または反復される免疫付与により監視することができる。更に、異なるレシピエント群に対しては異なるワクチンウイルスが有利となる場合がある。例えば、T 細胞エピトープ内で追加のタンパク質を豊富に発現する組み換え R S V 株は、乳児ではなく成人に対して特に有利であり得る。

30

40

## 【 0 1 2 2 】

本開示の更に別の態様では、R S V は気道の一過性遺伝子治療のためのベクターとして使用される。本実施形態に従うと、組み換え R S V ゲノムまたはアンチゲノムは、対象の遺伝子産物をコード可能な配列を組み込む。対象の遺伝子産物は、R S V 発現を制御する、それ同じ、またはそれとは異なるプロモーターの制御下にある。組み換え R S V ゲノムまたはアンチゲノムと、N、P、L、及び M2 - 1 タンパク質とを同時発現することにより作製され、対象の遺伝子産物をコードする配列を含有する感染性 R S V を患者に投与する。投与は典型的には、治療される患者の気道への、エアゾール、ネブライザ、または他の局所適用によるものである。組み換え R S V を、治療または予防水準の所望の遺伝子産

50

物の発現をもたらすのに十分な量で投与する。本方法で投与される代表的な遺伝子産物の例としては、例えば、一時的発現に特に好適なものをコードするもの、例えば、インターロイキン - 2、インターロイキン - 4、 - インターフェロン、GM - CSF、G - CSF、エリスロポエチン、及び他のサイトカイン、グルコセレブロシダーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、嚢胞性線維症膜貫通型コンダクタンス制御因子 (CFTR)、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、細胞毒素、癌抑制因子遺伝子、アンチセンスRNA、及びワクチン抗原が挙げられる。

#### 【0123】

特定の実施形態において、本開示は、本発明の免疫学的有効量の組み換えRSV（例えば弱毒生組み換えRSVもしくは不活化非複製RSV）、本明細書にて開示した免疫学的有効量のポリペプチド、及び/または本明細書にて開示した免疫学的有効量の核酸を含む免疫原性組成物（例えばワクチン）に関する。

10

#### 【0124】

特定の実施形態において、本開示は、個体の免疫系を刺激して、RSVに対する防御免疫応答を生み出す方法に関する。本方法において、本明細書にて開示した免疫学的有効量の組み換えRSV、本明細書にて開示した免疫学的有効量のポリペプチド、及び/または本明細書にて開示した免疫学的有効量の核酸を、生理学上許容できる担体中から個体に投与する。

#### 【0125】

典型的には、担体または賦形剤は、製薬上許容できる担体または賦形剤、例えば滅菌水、食塩水溶液、緩衝生理食塩水、デキストロース水溶液、グリセロール水溶液、エタノール、またはこれらの組み合わせである。無菌性、pH、等張性、及び安定性を確保すること、のような溶液の調製を、当該技術分野において確立された手順に従いもたらす。一般的には、担体または賦形剤は、アレルギー効果及び他の望ましくない効果を最小限に抑え、特定の投与経路、例えば皮下、筋肉内、経鼻、経口、局所などに適するように選択する。得られる水溶液を、例えばそのまま使用するためにパッケージ化する、または凍結乾燥することができ、凍結乾燥した配合物を、投与前に滅菌溶液と混合する。

20

#### 【0126】

特定の実施形態において、RSVの1種以上の株に特異的な免疫応答を刺激するのに十分な量でRSV（またはRSV構成成分）を投与する（例えば、免疫学的有効量のRSVまたはRSV構成成分を投与する）。RSVの投与は防御免疫応答を誘発するのが好ましい。RSVへの防御免疫応答を生み出すのに適合した、抗ウイルス性の防御免疫応答を誘発するための投与量及び方法が当業者に既知である。例えば、米国特許第5,922,326号、Wright et al. (1982) Infect. Immun. 37:397-400; Kim et al. (1973) Pediatrics 52:56-63; 及びWright et al. (1976) J. Pediatr. 88:931-936を参照のこと。例えば、ウイルスは、投与される用量1回あたり、約 $10^3 \sim 10^6$  pfu（プラーク形成単位）（例えば、投与される用量1回あたり $10^4 \sim 10^5$  pfu）の範囲でもたらすことができる。典型的には、用量は、例えば年齢、健康状態、体重、性別、食事、投与形態及び投与時間、ならびに他の臨床的因子に基づいて調節される。ワクチン製剤は、例えば針及びシリンジ、または無針注射装置を使用した皮下または筋肉注射により、全身投与することができる。ワクチン製剤は、例えばドロップ、エアゾール（例えば大粒子エアゾール（約 $10 \mu\text{m}$ より大きい））、または上気道へのスプレーにより、経鼻投与されるのが好ましい。上記送達経路のいずれでも全身防御免疫応答はもたらされるが、経鼻投与は、ウイルス侵入部位における粘膜免疫を誘発させるという、更なる利点をもたらす。経鼻投与に関して、弱毒生ウイルスワクチン、例えば、弱毒化冷却適合性及び/または温度感受性組み換えRSV、例えばキメラ組み換えRSVが、多くの場合好ましい。弱毒生ウイルスワクチンの代替物として、またはこれに加えて、Walsh et al. (1987) J. Infect. Dis. 155:1198-1204及びMurphy et al. (1990) Vaccine 8:497-502により提案されて

30

40

50

いるように、例えば死菌ウイルスワクチン、核酸ワクチン、及び／またはポリペプチドサブユニットワクチンを使用することができる。

【0127】

特定の実施形態において、弱毒化組み換えRSVはワクチンで使用されるとおりであり、ウイルス構成成分（例えば本明細書における核酸またはポリペプチド）がワクチンまたは免疫原性構成成分として使用される実施形態において、感染症の症状、または深刻な感染症の少なくとも症状が、弱毒化RSVを免疫付与された（別様においてはこれに感染した）大部分の個体で発生しないように、十分に弱毒化されている。しかし、毒性は、中程度または深刻な下気道感染症が、ワクチン接種した、または随伴性の対象では典型的には生じないように典型的には十分に無効となっている。

10

【0128】

単回投与による防御免疫応答の刺激が好ましいが、同一または異なる経路により更なる用量を投与して、所望の予防効果を達成することができる。例えば、新生児及び乳児において、十分な程度の免疫を誘発するために、複数回投与が必要となる場合がある。野生型RSV感染症に対する、十分な程度の防御を維持する必要に応じて、投与は小児期全体の間隔にて継続することができる。同様に、繰り返し、または深刻なRSV感染症に特に罹りやすい成人、例えばヘルスケアワーカー、デイケアワーカー、幼児の家族、高齢者、または心肺機能が損なわれた個人などは、複数の免疫付与により防御免疫応答を確立する、及び／または維持する必要がある場合がある。例えばウイルス中和分泌及び血清抗体の量、ならびに、所望の防御水準を誘発及び維持する必要に応じて、調節される用量または反復ワクチン接種を測定することにより、誘発される免疫の度合いを監視することができる。

20

【0129】

あるいは、免疫応答を、ウイルスによる、樹状細胞の*ex vivo*または*in vivo*標的化により刺激することができる。例えば、増殖樹状細胞をウイルスに、樹状細胞によるRSV抗原の捕捉を可能にするのに十分な量、かつ十分な時間曝す。次に、標準的な静脈内移植法によりワクチン接種される対象に細胞を移す。

【0130】

所望により、RSVを投与するための製剤は、RSV抗原に対する免疫応答を向上させるための1つ以上のアジュバントもまた含有する。想到されるアジュバントとしては、Alhydrogel（登録商標）及びAdjuvphos（登録商標）が挙げられる。想到されるアジュバントとしては水中油型エマルションが挙げられ、これは、油が水相中で溶質として機能し、乳化剤により安定化された、分離した液滴を形成する。特定の実施形態において、エマルションは、界面活性剤としてのトリオレイン酸ソルビタン及びポリソルベート-80（PS80）などの追加の乳化剤を含む、スクアレンまたは-トコフェロール（ビタミンE）を含有する。特定の実施形態において、エマルションは、グルコピラノシルリピドA（GLA）を含有する。GLAを単独で、またはスクアレンベースの水中油型安定エマルション（SE）中のいずれかで、キメラRSV、粒子、またはRSVタンパク質と共に製剤化することができる。Iyer et alは、呼吸器合胞体ウイルス融合タンパク質（RSV-F）を使用した、異なる粒径の水中油型アジュバントについて報告している（Hum Vaccin Immunother, 2015, 11(7): 1853-1864）。

30

40

【0131】

好適なアジュバントとしては、例えば、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、サポニン、ミネラルゲル（水酸化アルミニウムなど）、界面活性基剤（リゾレシチンなど）、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油または炭化水素エマルション、カルメット・格蘭ウシ型結核菌（BCG）、コリネバクテリウムパルブム、及び合成アジュバントQS-21が挙げられる。

【0132】

所望する場合、RSVの予防ワクチン投与を、1つ以上の免疫活性化分子の投与と共に実施することができる。免疫活性化分子としては、免疫活性、免疫強化及び炎症活性を有

50

する様々なサイトカイン、リンホカイン及びケモカイン、例えばインターロイキン（例えばIL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 12、IL - 13）；増殖因子（例えば顆粒球 - マクロファージ（GM） - コロニー刺激因子（CSF））；及び他の免疫活性化分子、例えばマクロファージ炎症性因子、Flt3リガンド、B7.1；B7.2などが挙げられる。免疫活性化分子はRSVと同じ製剤で投与することができる、または個別に投与することができる。タンパク質、またはタンパク質をコードする発現ベクターのいずれかを投与して、免疫活性効果を生み出すことができる。

#### 【0133】

個体に特定の亜型の特定の株の弱毒化RSVをワクチン接種させることは、異なる株及び/または亜型のRSVに対する交差防御を誘導することができるものの、所望する場合、少なくとも2種の株（例えばそれらのそれぞれが異なる亜型を示す）からの弱毒化RSVを個体にワクチン接種させることにより交差防御を高めることができる。同様に、弱毒化RSVワクチンを所望により、他の病原菌に対して防御免疫応答を誘発するワクチンと組み合わせることができる。

キメラRSVウイルスの組み立てと救助

#### 【0134】

以下の組み換えウイルス：A2、A2 - 系列19F、A2 - 系列19F（M79I）、A2 - 系列19F（R191K）、A2 - 系列19F（K357T）、A2 - 系列19F（Y371N）、A2 - 系列19F（I557V）、A2 - 系列19F（K357T/Y371N）、及びA2 - mKate2 - 2 - 20F/Gを、以下に記載の通りに準備した：Hotard et al. Identification of residues in the human respiratory syncytial virus fusion protein that modulate fusion activity and pathogenesis. J Virol 89, 512 - 522 (2015) Meng et al. Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein Contribution to Infection Depends on the Specific Fusion Protein. Journal of virology 90, 245 - 253 (2015) Hotard et al. A stabilized respiratory syncytial virus reverse genetics system amenable to recombination-mediated mutagenesis. Virology 434, 129 - 136 (2012)。

#### 【0135】

OE4用の細菌人工染色体（BAC）構築物を、A2 - mKate2 - 系列19F（I557V）を含有する公開されているBACを改変することにより生成した。モノマーのKatushka 2（mKate2、K）（赤外蛍光性レポーター）用遺伝子は、RSV抗原cDNAの第1の遺伝子の位置に存在する。mKate2をこの位置に含めることにより、in vitroで、またはマウス中でRSVは弱毒化しなかった。SHの欠失（SH）を、組み換えが介在する突然変異誘発（リコンビニアリング）により行った。以下のオリゴヌクレオチド（Integrated DNA Technologies / IDT）を使用して、単位複製配列末端が標的部位に相同であり、SHをgalKで置き換えるようにgalKカセットをPCR増幅した：dSH50f（配列番号：5）5' - AGATCTAGTACTCAAATAAGTTAATAAATAATATACACATGGACGTCCATCCTGTTGACAATTAATCATCGGCA - 3'）（ここで、下線部分はBAC中のSH遺伝子開始のすぐ50nt上流を示す）、及びdSH50r（配列番号：6）5' - GTCTTAGCGGTGCGTTGGTCCCTTGTTTTTGACATGTTTTGCATTTGCCCTCAGCACTGTCCCTGCTCCTT - 3'）（ここで、下線部分はBAC中のG遺伝子開始から始まる50ntの相補鎖を表す）。プライマーの下線を引いていない部分は、記載したとおりにgalKカセットに特異的である。E. coliでの組み換えは、遺伝子開始の開始部からSH - G遺伝子間領域

10

20

30

40

50

の末端にかけて、SHのgalKカセットでの置き換えをもたらした。以下の相補オリゴヌクレオチドをアニールし、リコンビニアリングの第2ステップにおけるgalKカセットの取り除きに使用した：dSH100f（配列番号：7）5'-AGATCTAGTAC TCAAATAAGTTAATAAAAAATATACACATGGACGTC CATGGGCAAAATGCAAAACATGTCCAAACAAAGGACCAACGCAC CGCTAAGAC-3'）、及びdSH100r（配列番号：8）5'-GTCCTTAG CGGTGCGTTGGTCCCTTGT TTTTGGACATGTTTGCATTTG CCCCATGGACGTC CATGTGTATATTTT TTTAATAACTTTATTT GAGTACTAGATCT-3'）。SHの正確な欠失を、配列決定してA2-K-SH-系列19F（I557V）BACを入手することにより確認した。

10

#### 【0136】

ヒトコドン非最適化NS1及びNS2コード領域（dNSh）を、A2-dNShの回収に用いたBACから分解し、A2-K-SH-系列19F（I557V）BACにライゲーションし、A2-K-dNSh-SH-系列19F（I557V）を得た。この構築物を、OE4+野生型A2-G（OE4+wtGと呼ばれる）の回収のために使用した。ヒトコドン使用バイアスに基づく、最も頻繁に使用しなかったあらゆるコドンの、A2のRSV-G配列へのコンピュータによる置換により、Gのコドン非最適化を実施した。点突然変異（M48I）を導入して、Gの分泌形態を取り除いた。コドン非最適化G（dG）のコード領域をGenScriptにより合成し、制限分解、及びA2-K-dNSh-SH-系列19F（I557V）BACへのライゲーションによりクローニングし、A2-K-dNSh-SH-dG-系列19F（I557V）を得、OE4用のBACを回収した。

20

#### 【0137】

上述の方法によりBuenos AiresコンセンサスF（BAF）遺伝子配列をOE4+wtG-BACにクローニングすることにより、BAFを救出するためのBACを生成した。系列19F残基K357及びY371をBAFコード配列に導入することにより、BAF-357/371を生成した。A2-M2-2を救出するためのBACをリコンビニアリングにより生成した。既に行ったように、M2-2のM2-238234nt（7番目のコドンから終止コドン）を欠失した。以下のオリゴヌクレオチドを使用して、リコンビニアリングの第1ステップ用にgalKカセットをPCR増幅した：delM2-1-f（配列番号：9）5'-TTAGTGATACAAATGACCATG CCA AAAATAATGATACTACCTGACAAATACCTGTTGACAAATTA ATCATCGGCA-3'）、及びdelM2-2-r（配列番号：10）5'-ATT GTTTGAATTAATAATGTAACGATGTGGTGAGTGTTAGAAAT TGAGTGTTTCAGCACTGTCCTGCTCCTT-3'）。以下の相補オリゴヌクレオチドをアニールして、第2のリコンビニアリングステップのために使用した：M22\_\_100f（配列番号：11）5'-TTAGTGATACAAATGACCATG CCA AAAATAATGATACTACCTGACAAATAACACTCAATTCTA ACACCTCACCCACATCGTTACATTTAATAATTC AAACAAT-3'）、及びM22\_\_100r（配列番号：12）5'-ATTGTTTGAATTAATAAT GTAACGATGTGGTGAGTGTTAGAAATTGAGTGTTATTTGTC AGGTAGTATCATTTATTTTGGCATGGTCAATTTGTATCACT AA-3'）。標化した234ntの正確な欠失を配列決定により確認した。

30

40

#### 【0138】

組み換えウイルスをBSR-T7/5細胞内で救助し、ウイルスストックをベロ細胞内で増殖させた。

#### 【0139】

コottonラット抗血清におけるRSV-nAb力価の定量化に使用されるRSV株のパネルをまず、以下のA及びB株のF及びG遺伝子のcDNA（GeneArt, Invitrogen）を合成することにより生成した：RSVA/1998/12-21（JX

50

069802)、Riyadh A/91/2009 (JF714706/JF714710); ならびにRSV B株NH1276 (JQ680988/JQ736678)、9320 (AY353550)、及びTX11-56 (JQ680989/JQ736679)。制限分解及びライゲーションにより、G及びF遺伝子断片をA2-K BACにクローニングし、レポーターウイルスをBSR-T7/5細胞にトランスフェクションして回収し、その後HEp-2細胞にストックを増殖させた。

#### 【0140】

RSV N、P、M2-1、またはLタンパク質を発現した、4つのヒトコドン最適化ヘルパープラスミドを有するRSV抗原BACをBSR-T7/5細胞にコトランスフェクションすることにより組み換えウイルスを回収した。ワクチン株のマスター及び機能ウイルスストックを、後で増殖させてベロ細胞内で回収した。

10

プレ-F抗原ELISA

#### 【0141】

ウイルスアリコートを解凍してMEMに希釈し、高力価の懸濁原液を得た。100 µLの各ウイルス懸濁原液をCostar Assay Plate, High Binding (Corning)の3個1組のウェルに添加した。プレートを覆い、室温で一晩インキュベートした。翌日、ウイルス懸濁液をプレートから取り出し、プレートを、ウェル1個あたり150 µLのPBS-Tween (PBST、PBS中に0.05%のTween 20)で一度洗浄した後、ブロッキングのためにウェル1個あたり150 µLの5% BSA (PBS中)を添加した。プレートを室温で2時間インキュベートした。ヒトコドン最適化VH及びVL配列を使用したHEK293-X2 Free Style細胞中でのUタンパク質発現により、プレ-F特異的mAb MPE839を生成した。プレ-F及びポスト-Fを結合するモタビズマブmAbを、Nancy Ulbrandt (MedImmune/AZ)から得た。抗体をPBS中で1 µg/mLまで希釈することにより、MPE8及びモタビズマブ抗体を調製し、その後1% BSA中で連続希釈することにより、1:10, 000 ~ 1:320, 000まで更に希釈した。ブロッキングの後、プレートをもう一度、ウェル1個あたり150 µLのPBSTで洗浄し、その後、100 µLの希釈した一次抗体をウェルに適用した。プレートを2時間室温でインキュベーションした後、空にして、ウェル1個あたり150 µLのPBSTで3回洗浄した。洗浄後、1% BSA中の、100 µLの抗ヒトHRP抗体の1:10, 000希釈を適用し、プレートを室温で1時間インキュベートした。次にプレートを空にし、150 µLのPBSTで3回洗浄し、その後、100 µLの予混合した反応性基質試薬混合物(R&D Systems)を適用して、比色分析反応を触媒した。プレートを覆って約10分インキュベートし、その後、100 µLの0.2 N硫酸を添加して反応をクエンチした。ELISAプレートリーダーにて、プレートを450 nmにて読み取った。収集した吸光度の読み取り値をバックグラウンドから引き、曲線にプロットした。モタビズマブ(プレ-F及びポスト-F、全F)の曲線の下面積に対する、MPE8(プレ-F)の曲線の下面積の比率を使用して全Fに対して正規化したプレ-Fレベルを測定した。

20

30

ベロ細胞での増殖

#### 【0142】

BEAS-2B、NHBE、及びHAE細胞。6ウェルプレート中の、70%コンフルエントベロ細胞またはBEAS-2B細胞からの培地を吸引し、MOIが0.01のウイルス(0.5 mL)を添加して、各ウイルス株が得られる時点それぞれに関して、ウェルを複製した。プレートを室温で1時間振盪した。感染後、ウイルスを注意深く吸引し、単層を1 mLのPBSで2回洗浄し、その後2 mLの予熱した完全E-MEM(ベロ)またはRPMI(BEAS-2B)を添加した。プレートを37 °C及び5% CO<sub>2</sub>にて、時間推移の間インキュベーションした。感染後1、12、24、36、48、72、及び96時間の時点で得た。各時点において、単層を細かくして上清に入れ、簡便にボルテックスし、液体窒素中で瞬間冷凍し、その後-80 °Cで保管した。2つのドナーからのNHBE細胞をALIにて分化させ、単層をPBSで洗浄した後、MOI 2.6にて100 µ

40

50

Lのウイルスを先端で感染させた。ウイルスを残して2時間37℃にてインキュベーションし、その後取り除いて、PBSで3回、後で洗浄した。指定した時点において、誘導因子を含まない150μLの分化培地を、先端面で10分間37℃でインキュベーションし、その後回収して微細遠心分離管に移した。本プロセスを繰り返して、合計で300μLのプールした先端洗浄を得、これを液体窒素中で冷却し、後の滴定のために-80℃で保管した。NHBE感染同様に、2つのドナーからのHAE細胞をALIにて分化させ、先端面をPBSで洗浄し、初期MOI 6.7で感染させた。2時間37℃でのインキュベーションの後、ウイルス種菌を吸引し、先端層をPBSで3回洗浄し、培養液を37℃でインキュベートした。指定した各時点において、先端層を425μLの培地で30分間37℃で洗浄し、上清を-80℃で保管した。HEp-2またはベロ細胞のいずれかにおいて、上述のとおり全ての分析に関してFFU滴定を実施した。

10

マウスにおけるウイルス量、中和力価、及び防御

#### 【0143】

ウイルス量の測定のために、7週齢のメスBALB/cマウス(Charles River)を、無血清MEM中の100μLのウイルスにより鎮静させながら鼻孔内感染させた。2、4、6、及び8日目にマウスを安楽死させて、残った肺をウイルスFFU力価アッセイのために回収した。検出限界以下の力価を、検出限界の半分に等しい値として割り当てた。血清nAb力価の測定及び抗原投与調査のために、7週齢のメスBALB/cマウス(Jackson)を、無血清MEM中の100μLのウイルスで鼻孔内感染させた。35、70、及び100日目に、マウスを鎮静させて、血清サンプルを頸下静脈播種により得た。FFUマイクロ中和アッセイによる定量化まで、血清を-80℃で保管した。中和力価を、同時インキュベーション加熱不活性化(56℃、30分)血清により測定し、これを1時間37℃にて、50~100FFUのウイルスで2倍に連続希釈した。血清ウイルス混合物を次に、96ウェルプレート中のHEp-2単層上に、30分間4℃にて2900×gでスピノキュレーションし、その後完全MEM中で0.75%メチルセルロースを重ねた。ウェル1個あたりのFFUを2日後に数え、非線形回帰分析によりEC50力価を測定した。ワクチン接種後にマウスに抗原投与するために、マウスを播種後102日目に鎮静させ、105PFUのA2-系列19Fで鼻孔内感染させた。4日後、HEp-2細胞でのブランクアッセイにより、左肺でのウイルス量を測定した。

20

熱安定性及び免疫原性が高まった弱毒生RSVワクチン

30

#### 【0144】

他のパラミクソウイルス融合タンパク質同様に、RSV融合糖タンパク質(RSV F)は、ウイルスエンベロープ及び標的細胞の融合を媒介するI型内在性膜タンパク質である。RSV Fはまず、ヴィリオン膜内でメタ安定的な、融合前コンホメーションで3量体として集合する。トリガリングにより、Fの融合後形態への主要なリフォールディングがもたらされ、これはウイルス及び標的膜に近似し、融合を媒介する。プレ-F及びポスト-Fの両方が調製したウイルスストック中のRSVヴィリオンに存在する場合、RSVストック中のプレ-F抗原の相対量を、ELISAベースのアプローチを用いて評価した。株A2-系列19Fは、プロトタイプのA2株のバックグラウンドにおいて株系列19のFタンパク質を発現し、株A2よりも著しく高い、プレ-F特異的mAbへの結合を示した。BALB/cマウスへのA2-系列19Fの鼻孔内播種により、A2より高いnAb力価がもたらされた。

40

#### 【0145】

系列19Fに独自の5種類のアミノ酸残基：M79、R191、K357、Y371、及びI557が存在する。これらの位置のそれぞれにおいてA2残基を含有するA2-系列19F変異体でのプレ-F抗原ELISAは、残基K357及びY371は株19Fプレ-Fレベルに重要であることを示した。

#### 【0146】

RSVは熱不安定性ウイルスであることが知られており、高温によりRSVポスト-Fコンホメーションへの転移を引き起こすことができる。プレ-Fレベルが高まったRSV

50

は、温度失活への耐性がより大きくなってはならない。4 及び 37 において、RSV A2 - 系列 19 F の感染性は経時的に、系列 19 F の K357 及び Y371 残基により部分的に媒介された表現型である A2 よりも熱安定性であった。K357 及び Y371 を、遺伝的に多様なワクチン株 DB1 の F に導入し、抗原亜型 B「Buenos Aires」(BAF) クレードのコンセンサス F 遺伝子を発現した。我々は以前に DB1 の生成について記載しており、これもまた、遺伝子型 RSV - A2 - dNS1 - dNS2 - SH - BA と共に、コドン非最適化非構造タンパク質遺伝子及び欠失 SH 遺伝子を含む。DB1 は低量のプレ F 抗原を発現し、熱不安定性であった。しかし、K357 及び Y371 残基を導入して DB1 - 357 / 371 を生成することにより MPE8 結合が強化され、部分的に熱安定性が回復した。これらのデータは、残基 357 及び 371 は、MPE8 結合、プレ F 抗原量の相関だけでなく、ウイルスストックにおける熱不活化へウイルス耐性をも支配したことを示した。

10

#### 【0147】

OE4 と呼ばれる RSV LAV は、系列 19 F を複数構成成分ワクチンに導入することにより生成された。インターフェロン経路の標的化及びアポトーシスの抑制により、宿主の先天性免疫を抑制する RSV の 2 つの非構造タンパク質をコードする NS1 及び NS2 遺伝子をコドン非最適化した。NS1 及び NS2 遺伝子のコドン非最適化は遺伝的に安定であり、NS1 及び NS2 タンパク質発現を低下させ、マウスにおいて、わずかに免疫原性が強化されたウイルス弱毒化がもたらされた。小型疎水性 (SH) タンパク質遺伝子を、F を含む下流ウイルス遺伝子の転写を増加させる目的で、ウイルスリーダーへの近似性を変更することにより欠失した。SH の欠失はまた、マウス及びチンパンジーで適度な弱毒化を行ったが、先行研究では、子どもでのワクチン候補では明らかな弱毒化はもたらしなかった。RSV 付着 (G) 糖タンパク質遺伝子をコドン非最適化し、G の分泌形態を点突然変異により取り除いた。RSV は G の膜結合形態 (G<sub>m</sub>) 及び分泌形態 (G<sub>s</sub>) を発現し、これらは不死化細胞系におけるウイルス複製には必要ない。RSV G は防御中和抗体の誘発を行うことができる。しかし、G は F ほど保存されず、ケモカイン模倣物による先天性免疫応答を抑制する。G<sub>s</sub> は抗原デコイとして機能し、C 型レクチンとの相互作用により、樹状細胞シグナル伝達及び活性化を変更することができる。OE4 ワクチン候補の得られる遺伝子型は、RSV - A2 - dNS1 - dNS2 - SH - dG<sub>m</sub> - G<sub>s</sub> null - 系列 19 であった。ウェスタンブロッティングを使用して、親 A2 と比較して、OE4 は NS1、NS2、及び G の発現量が低下したことを測定した。OE4 は A2 - 系列 19 F よりも F 発現量が高く、SH の欠失に寄与している可能性が高い。

20

30

#### 【0148】

OE の MPE8 及び D25 結合を分析し、4 及び 37 におけるワクチンの熱安定性を測定した。A2 - 系列 19 F 同様に、OE4 は、系列 19 F タンパク質の発現に一致する抗体結合及び熱安定性により比較的高いプレ F 抗原量を示した。測定したプレ - F の安定性を OE4 の MPE8 結合により定量化し、ウイルスストックからの A2 を一定時間にわたり 4 でインキュベートした。プレ F 抗原の相対量は 8 日の期間の後、両方のウイルスで減少した。それ故、A2 及び OE4 感染性の熱安定性に関する反応速度論は、プレ F 抗原量の減少と相関しない。しかし、OE4 は A2 と比較して、各時点においてプレ F 抗原量の 2 倍の量より多くを維持し、プレ - F の最小閾値は感染性を維持するのに十分であり得る。

40

#### 【0149】

RSV A2 及び OE4 への、ヴィリオン及び糖タンパク質の構造全体の組み込みを評価するために、BEAS - 2B 細胞から発生したウイルスの薄切片透過電子顕微鏡 (TEM)、ネイティブイムノ TEM、及びクライオ電子線トモグラフィー (クライオ - ET) を実施した。BEAS - 2B は不死化ヒト気管支上皮細胞株である。ウイルス感染した細胞と放出されたヴィリオンを分析し、続いて、サンプル処理を最小限にしながらヴィリオンのネイティブ構造の保存を最大化した。まず、薄切片 TEM と組み合わせた、内因性イムノゴールドラベリングを、プレ - F (MPE8)、ポスト - F (131 - 2A)、全 F

50

(モタビズマブ)、またはG(131-2G)に優先的に結合するmAbを使用して実施した。膜長さあたりの金粒子の密度を、各ウイルス及び免疫標識に関して定量化した。潜在的にはSHの欠失により、OE4ウイルス粒子はA2よりも、組み込まれたプレ-F及び全Fの密度を高く示した。A2及びOE4粒子の表面上で検出されるポスト-Fの量に、著しい差は存在しなかった。G遺伝子のコドン非最適化の設定で予想されたとおり、OE4粒子でのGタンパク質密度は著しく低下した。

#### 【0150】

不死化細胞と一次ヒト気道上皮細胞における弱毒化の程度を測定することにより、OE4ワクチン候補を特性決定した。ウイルスストックの生成に用いられたベロ細胞では、OE4は非弱毒化親A2-系列19Fを僅かに下回る力価となった。BEAS-2B細胞では、野生型と比較してOE4がより弱毒化された。我々は次に、一次ヒト気道上皮細胞においてOE4増殖を評価し、血清反応陰性の子どもにおけるRSV LAV弱毒化を近似させるためのシステムを確立した。我々はNHBE-ALI及びHAE-ALIの2つのモデルを実装し、OE4は両方のモデルで著しく弱毒化され、培養液の中で拡散するという欠点を示したことを見出した。OE4におけるGのコドン非最適化は、NHBE-ALIにおいて野生型G(OE4+wtG)を発現するOE4と比較して、弱毒化の度合いに著しく寄与し、これは前述した、一次細胞におけるGの付着役割による可能性がある。BALB/cマウスにおいて、OE4は適度に弱毒化され、A2-系列19Fと等しく、A2より高いnAb力価を誘発した。鼻孔内接種の後、102日目にマウスにA2-系列19Fを抗原投与し、OE4をワクチン接種したマウスは抗原投与から完全に防御された。

#### 【0151】

OE4は臨床試験の前にコットンラットで評価された。コットンラットでは、OE4は上気道及び下気道で大きく弱毒化され、OE4は、RSVの多様性を示すRSV株に対し比較的少量の血清nAbを誘発した。OE4をワクチン接種したコットンラットは、肺だけでなく上気道においても、RSV抗原投与から完全に防御された。非常に弱毒化されているにも関わらず、OE4は効果的な粘膜免疫を確立した。

#### 【0152】

別のRSVワクチン候補であるホルマリン不活性化RSVの欠損により強調される主な懸念は、自然感染時の、ワクチンにより強化された病気に対するプライミングに対する潜在性である。RSV LAV候補は深刻な病気を引き起こすことがまだ示されていないものの、OE4により用いられた新規のワクチン接種法が、抗原投与時に深刻な病気に対してプライミングをもたらすか否かをコットンラットで評価した。RSV抗原投与はmockと比較して、OE4での感染後に深刻な病気をもたらさなかった。対照的に、ホルマリン不活性化RSVは、OE4及びmockと比較して、細気管支周囲の湿潤及び肺炎の増加と関連する深刻な病気をもたらした。

低融合Fタンパク質により弱毒化されたキメラ呼吸器合胞体ウイルスワクチン候補は、コットンラットにおいて免疫原性かつ抗原投与に対して防御的であった

#### 【0153】

Buenos Aires Fタンパク質(BAF)は単独で発現した場合、A2F及び系列19Fタンパク質と比較して不十分な膜融合性であった。リバースジェネティクスを実施して、非構造タンパク質NS1及びNS2(dNS)に対する遺伝子のコドン非最適化；小型疎水性タンパク質(SH)遺伝子の欠失；及び、野生型融合(F)タンパク質遺伝子の、Buenos Airesクレード(BAF)の低融合RSV亜型BFコンセンサス配列による置換を組み合わせたLAVを設計した。「DB1」という名前のこのワクチン候補RSV-A2-dNS-SH-BAFは、コットンラットの一次ヒト気道上皮細胞、ならびに上気道及び下気道の2つのモデルで弱毒化された。DB1はコットンラットにおいて非常に免疫原性であり、組み換えRSV株の様々なパネルに対して、幅広く中和抗体を誘発した。ワクチン接種したコットンラットに野生型RSV Aを抗原投与した際、DB1はワクチン接種していない動物と比較してそれぞれ、上気道及び下気道のウイルス力価を $3.8 \log_{10}$  全PFU、及び $2.7 \log_{10}$  PFU/g組織、低下

させた ( $P < 0.0001$ )。それ故、DB1は弱毒化され、非常に免疫原性であり、コトンラットでのRSV抗原投与に防御的であった。ウイルス複製を弱毒化し免疫原性を保存する戦略としての、DB1は低融合Fタンパク質を組み込む最初のRSV LAVである。

#### 【0154】

DB1はコトンラットの上気道及び下気道で10倍を超えて弱毒化されたが、依然としてRSV A及びB組み換え株の様々なパネルに対して、広範なnAbの高い力価を誘発した。DB1はまた、コトンラットの鼻洗浄試料においてRSV特異的IgA抗体の形態で、粘膜免疫を生み出した。ワクチン接種した動物にRSVを抗原投与した際、DB1は、鼻洗浄試料及び肺洗浄試料の両方において、99%を超えて抗原投与株の力価を低下させた。したがって、DB1は弱毒化され、非常に免疫原性であり、コトンラットにおけるRSV抗原投与を防御するのに有効であった。

10

本発明は以下を提供する。

[1]位置79にM、位置191にR、位置357にK、及び位置371にYを有するRSV Fタンパク質をコードする変異遺伝子を、前記RSV Fタンパク質が配列番号：3または配列番号：4を有しない場合に有する弱毒生ワクチンキメラ呼吸器合胞体ウイルス(RSV)を含む免疫原性組成物。

[2]前記RSV Fタンパク質は位置557にVを有する、またはFタンパク質が、位置557がVとなるように変異している、上記[1]に記載の免疫原性組成物。

[3]前記RSV Fタンパク質は配列番号：1または13を有する、上記[1]に記載の免疫原性組成物。

20

[4]RSV NS1、NS2、及びGタンパク質をコードする遺伝子は、NS1、NS2、及びGの発現速度が、野生型A2ウイルスと比較してベロ細胞において半分を超えて遅くなるようにコドン最適化されている、上記[1]に記載の免疫原性組成物。

[5]哺乳類細胞におけるGの発現速度は、野生型A2ウイルスと比較してベロ細胞において10分の1を超えて低下する、上記[4]に記載の免疫原性組成物。

[6]NS1の発現速度は、野生型A2ウイルスと比較してベロ細胞において4分の1を超えて低下する、上記[4]に記載の免疫原性組成物。

[7]NS2の発現速度は、野生型A2ウイルスと比較してベロ細胞において4分の1を超えて低下する、上記[4]に記載の免疫原性組成物。

30

[8]SHタンパク質をコードする遺伝子が欠失または切頭されている、上記[1]に記載の免疫原性組成物。

[9]Fタンパク質をコードする遺伝子は、位置557がVではないように、またはIが位置557にあるように変異している、上記[1]に記載の免疫原性組成物。

[10]アジュバント及び/または他の製薬上許容できる担体を更に含む、上記[1]~[19]に記載の免疫原性組成物。

[11]前記アジュバントはアルミニウムゲル、アルミニウム塩、またはモノホスホリルリピドAである、上記[10]に記載の免疫原性組成物。

[12]前記アジュバントは、-トコフェロール、スクアレン、及び/または界面活性剤を所望により含む水中油型エマルジョンである、上記[10]に記載の免疫原性組成物。

40

[14]対象に呼吸器合胞体ウイルスに対して免疫付与方法であって、前記方法は、上記[1]~[14]に記載の有効量の免疫原性組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

[15]位置79がI、位置191がK、位置357がT、及び位置371がNとなるようにRSV Fタンパク質をコードする核酸。

[16]配列番号：14または多様体を含む、上記[15]に記載の核酸。

[17]上記[16]に記載の核酸を含むベクター。

[18]プラスミドまたは細菌人工染色体から選択される上記[17]に記載のベクター。

[19]位置79がM、位置191がR、位置357がK、及び位置371がYとなるようなRSV Fタンパク質を含む、単離された組み換え粒子。

50

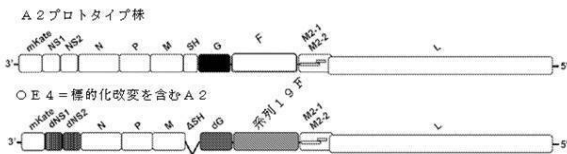
[ 2 0 ]弱毒化 R S V ゲノムまたはアンチゲノムを含む、上記[ 1 9 ]に記載の単離された組  
み換え粒子。

【 図 面 】

【 図 1 】

クエリー 1 MELPILKANAITITLAAVTFCAFSSQNIIEEFQSTCSAVSGYLSALRTQWITSVITIE 60  
対象 1 MELPILKANAITITLAAVTFCAFSSQNIIEEFQSTCSAVSGYLSALRTQWITSVITIE 60  
クエリー 61 LSMIKKNCNCHTDARVKIMQELDKYKNAVTEIQLIMQSTPAANRRARRLFRPMYTLN 120  
対象 61 LSMIKKNCNCHTDARVKIMQELDKYKNAVTEIQLIMQSTPAANRRARRLFRPMYTLN 120  
クエリー 121 NTKKTNVTLSEKKRRPLGFLGVSAIASGIAVSKVHLEGEVKNISALLSTNRVAVS 180  
対象 121 NTKKTNVTLSEKKRRPLGFLGVSAIASGIAVSKVHLEGEVKNISALLSTNRVAVS 180  
クエリー 181 LSMGVSVLTSRVLDLQNYIDKQLLPIVNRQSCRSNIETVIEFQKQNRLLIETREFSVN 240  
対象 181 LSMGVSVLTSRVLDLQNYIDKQLLPIVNRQSCRSNIETVIEFQKQNRLLIETREFSVN 240  
クエリー 241 AGVTFPVSTMLTNSLLSLINDMPINDQKIMSNVQIVRQQSYMSIIKEEVLAIV 300  
対象 241 AGVTFPVSTMLTNSLLSLINDMPINDQKIMSNVQIVRQQSYMSIIKEEVLAIV 300  
クエリー 301 VQLPLYGVIDTFCNKLHTSPLCTNTKESGNICLTRDRGWICDHAGSVFFPQAECKV 360  
対象 301 VQLPLYGVIDTFCNKLHTSPLCTNTKESGNICLTRDRGWICDHAGSVFFPQAECKV 360  
クエリー 361 QSMRVCDTMSLTLPSEVNLCHVDIFNPKYDCKIMTKTQVSSVITSLGAIIVSCYGT 420  
対象 361 QSMRVCDTMSLTLPSEVNLCHVDIFNPKYDCKIMTKTQVSSVITSLGAIIVSCYGT 420  
クエリー 421 KCTASNNRGIKTFFNGCDVSNKGVDTVSVGNTLYVNRQKSLIVKGEPIINFYDP 480  
対象 421 KCTASNNRGIKTFFNGCDVSNKGVDTVSVGNTLYVNRQKSLIVKGEPIINFYDP 480  
クエリー 481 LVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKDELLNVAAGSTTNIMITIIIVIVILLS 540  
対象 481 LVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKDELLNVAAGSTTNIMITIIIVIVILLS 540  
クエリー 541 LIAVGLLYCHARSTPTLSKQSLGGINNAFNN ( 配列番号 : 3 )  
対象 541 LIAVGLLYCHARSTPTLSKQSLGGINNAFNN ( 配列番号 : 4 )

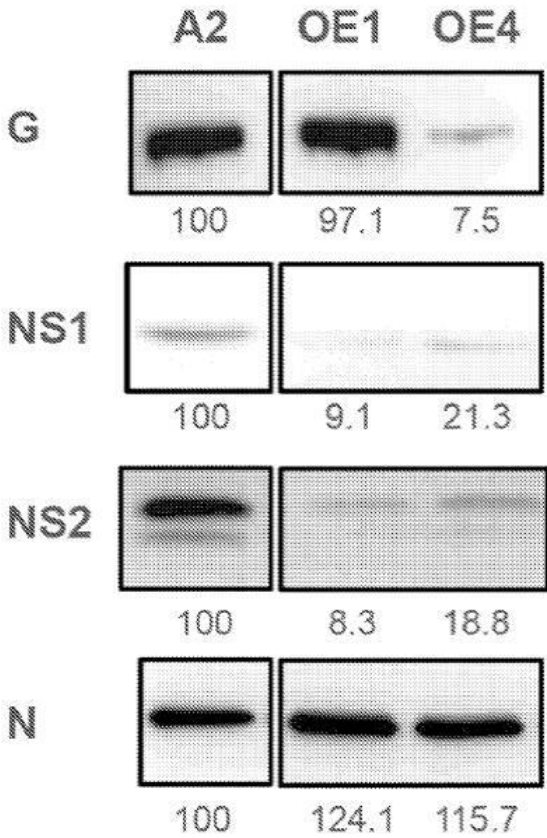
【 図 2 】



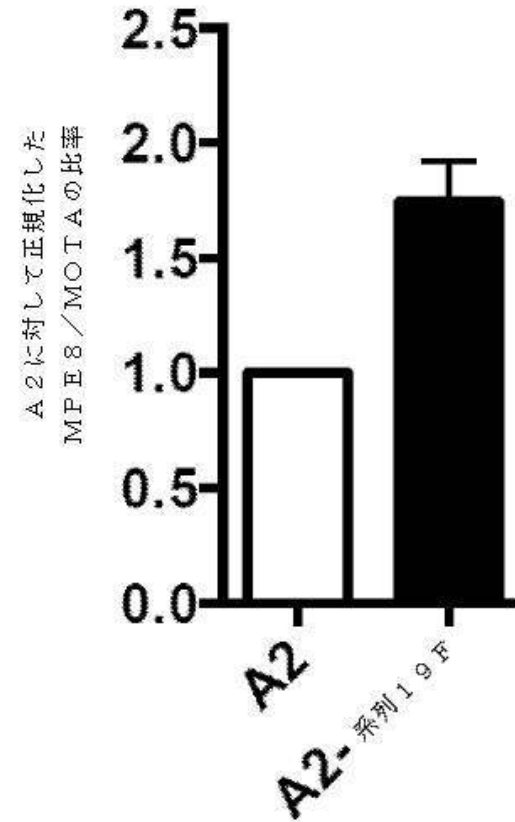
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】



30

40

50

【図 5 A】

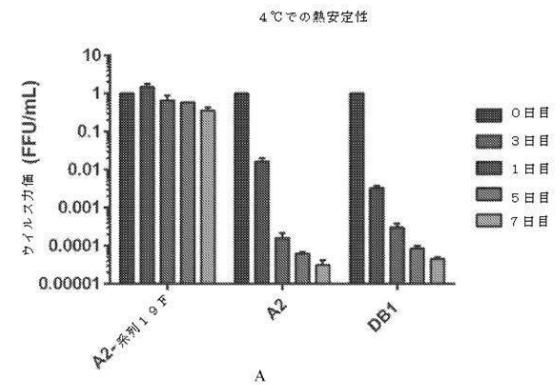
クエリー	1	MELLHRSSAIFLTALINALYLTSSQNIITEFVQSTCSAVSRGYLSALRTOMYTSVITIE	60
対象	1	MELLHRSSAIFLTALINALYLTSSQNIITEFVQSTCSAVSRGYLSALRTOMYTSVITIE	60
クエリー	61	LSNIKETKNGTDTKVLMQQLDKYKMAVTELQLLMNTFAANNRAREAPQTHMTIN	120
対象	61	LSNIKETKNGTDTKVLMQQLDKYKMAVTELQLLMNTFAANNRAREAPQTHMTIN	120
クエリー	121	TTKHLNVSISKKRRRFLGVLGVSAIASGIASVHLHLEGEVNIKNALLSTNRVVS	180
対象	121	TTKHLNVSISKKRRRFLGVLGVSAIASGIASVHLHLEGEVNIKNALLSTNRVVS	180
クエリー	181	LSNGSVLTSRVLDKNYINQQLLPIVQQSCRSNIETVIEFQQNSRLLEITREFSVN	240
対象	181	LSNGSVLTSRVLDKNYINQQLLPIVQQSCRSNIETVIEFQQNSRLLEITREFSVN	240
クエリー	241	AGVTFPLSTMNLSELLSLINDMPTNDQKLMSSNVQIVRQGSYSIMSIIKEVLAV	300
対象	241	AGVTFPLSTMNLSELLSLINDMPTNDQKLMSSNVQIVRQGSYSIMSIIKEVLAV	300
クエリー	301	VQLPIYGVITPCNKLHSPCLCTNIKESSNICLTRDRGWYCDNAGSVSPFPQADCKV	360
対象	301	VQLPIYGVITPCNKLHSPCLCTNIKESSNICLTRDRGWYCDNAGSVSPFPQADCKV	360
クエリー	361	QSNRVCDTMSLTLPSVSLCNDTIFNSKYDCKIMTSKTDISSVITSLGAIVSCYGT	420
対象	361	QSNRVCDTMSLTLPSVSLCNDTIFNSKYDCKIMTSKTDISSVITSLGAIVSCYGT	420
クエリー	421	KCTASNNKRGIIKFTSNQCDYVNNKGVDTVSQNTLYVVKLEGEMLYKGEPIINYDP	480
対象	421	KCTASNNKRGIIKFTSNQCDYVNNKGVDTVSQNTLYVVKLEGEMLYKGEPIINYDP	480
クエリー	481	LVPFDEFDASISQWNEKINQSLAFIRSDDELLNVTQKSTTNIMITAIIVIVLLS	540
対象	481	LVPFDEFDASISQWNEKINQSLAFIRSDDELLNVTQKSTTNIMITAIIVIVLLS	540
クエリー	541	LIAIGLLLYCAKNTFVTLSDQGLSGINNIAS (配列番号: 1)	
対象	541	LIAIGLLLYCAKNTFVTLSDQGLSGINNIAS (配列番号: 2)	

【図 5 B】

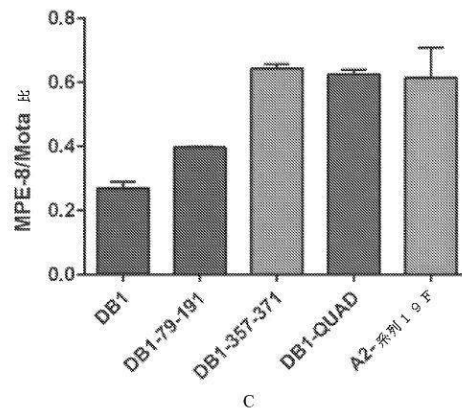
クエリー	1	MELLHRSSAIFLTALINALYLTSSQNIITEFVQSTCSAVSRGYLSALRTOMYTSVITIE	60
対象	1	MELLHRSSAIFLTALINALYLTSSQNIITEFVQSTCSAVSRGYLSALRTOMYTSVITIE	60
クエリー	61	LSNIKETKNGTDTKVLMQQLDKYKMAVTELQLLMNTFAANNRAREAPQTHMTIN	120
対象	61	LSNIKETKNGTDTKVLMQQLDKYKMAVTELQLLMNTFAANNRAREAPQTHMTIN	120
クエリー	121	TTKHLNVSISKKRRRFLGVLGVSAIASGIASVHLHLEGEVNIKNALLSTNRVVS	180
対象	121	TTKHLNVSISKKRRRFLGVLGVSAIASGIASVHLHLEGEVNIKNALLSTNRVVS	180
クエリー	181	LSNGSVLTSRVLDKNYINQQLLPIVQQSCRSNIETVIEFQQNSRLLEITREFSVN	240
対象	181	LSNGSVLTSRVLDKNYINQQLLPIVQQSCRSNIETVIEFQQNSRLLEITREFSVN	240
クエリー	241	AGVTFPLSTMNLSELLSLINDMPTNDQKLMSSNVQIVRQGSYSIMSIIKEVLAV	300
対象	241	AGVTFPLSTMNLSELLSLINDMPTNDQKLMSSNVQIVRQGSYSIMSIIKEVLAV	300
クエリー	301	VQLPIYGVITPCNKLHSPCLCTNIKESSNICLTRDRGWYCDNAGSVSPFPQADCKV	360
対象	301	VQLPIYGVITPCNKLHSPCLCTNIKESSNICLTRDRGWYCDNAGSVSPFPQADCKV	360
クエリー	361	QSNRVCDTMSLTLPSVSLCNDTIFNSKYDCKIMTSKTDISSVITSLGAIVSCYGT	420
対象	361	QSNRVCDTMSLTLPSVSLCNDTIFNSKYDCKIMTSKTDISSVITSLGAIVSCYGT	420
クエリー	421	KCTASNNKRGIIKFTSNQCDYVNNKGVDTVSQNTLYVVKLEGEMLYKGEPIINYDP	480
対象	421	KCTASNNKRGIIKFTSNQCDYVNNKGVDTVSQNTLYVVKLEGEMLYKGEPIINYDP	480
クエリー	481	LVPFDEFDASISQWNEKINQSLAFIRSDDELLNVTQKSTTNIMITAIIVIVLLS	540
対象	481	LVPFDEFDASISQWNEKINQSLAFIRSDDELLNVTQKSTTNIMITAIIVIVLLS	540
クエリー	541	LIAIGLLLYCAKNTFVTLSDQGLSGINNIAS (配列番号: 1)	
対象	541	LIAIGLLLYCAKNTFVTLSDQGLSGINNIAS (配列番号: 4)	

10

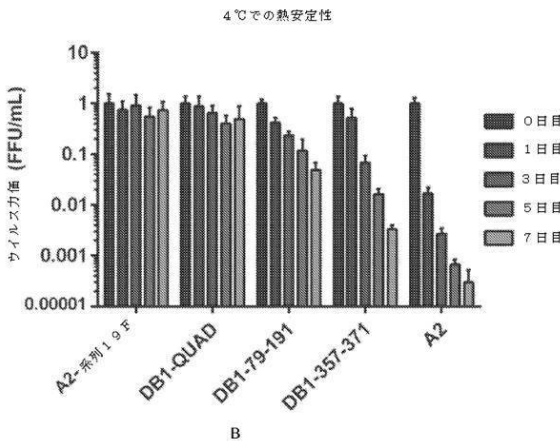
【図 6 - 1】



【図 6 - 2】



20

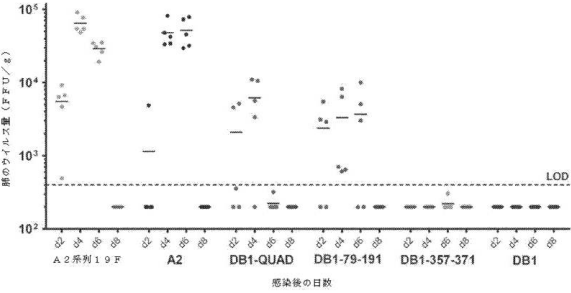


30

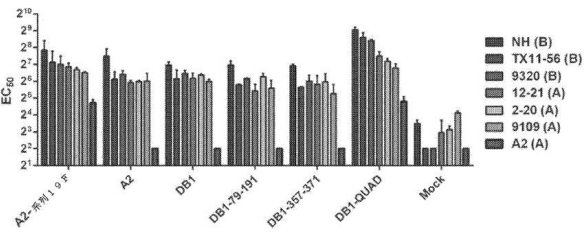
40

50

【図 7 A】



【図 7 B】



10

【配列表】

[0007311872000001.app](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
C 0 7 K 14/115 (2006.01)	C 0 7 K 14/115	
C 1 2 N 15/45 (2006.01)	C 1 2 N 15/45	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04	

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

前置審査  
0 , ディケーター , モッキンバード レーン 1 4 4

(72)発明者 ロスタッド , クリスティナ  
アメリカ合衆国 ジョージア州 3 0 3 0 6 , アトランタ , ハイランド スクエア ドライブ 9 1 1

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 5 2 5 3 4 ( WO , A 1 )  
国際公開第 2 0 1 4 / 1 6 0 4 6 3 ( WO , A 1 )  
J.Virol. , 2015年01月 , 89(1) , pp.512-522  
J.Virol. , 2009年 , 83(9) , pp.4185-4194  
Virology , 2012年 , 434 , pp.129-136

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)  
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4  
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )  
U n i P r o t / G e n e S e q