

(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2014-502143

(P2014-502143A)

(43) 公表日 平成26年1月30日(2014.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-532945 (P2013-532945)	(71) 出願人	512272959
(86) (22) 出願日	平成23年10月6日 (2011.10.6)		ザ ユニバーシティ オブ ワシントン
(85) 翻訳文提出日	平成25年4月26日 (2013.4.26)		スルー イッツ センター フォー コマ
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/055113		ーシャライゼーション
(87) 国際公開番号	W02012/048115		THE UNIVERSITY OF W
(87) 国際公開日	平成24年4月12日 (2012.4.12)		ASHINGTON THROUGH I
(31) 優先権主張番号	61/390,591		TS CENTER FOR COMME
(32) 優先日	平成22年10月6日 (2010.10.6)		RCIALIZATION
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 98105 ワシントン
			州 シアトル イレブンス アベニュー
			エヌイー スイート 500 4311
		(74) 代理人	100105957
			弁理士 恩田 誠
		(74) 代理人	100068755
			弁理士 恩田 博宣
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチド、ならびに呼吸器多核体ウイルス感染症の治療および制限における該ポリペプチドの使用

(57) 【要約】

本発明は、ポリペプチド、呼吸器多核体ウイルス感染症の治療または制限のための該ポリペプチドの組成物、およびそのようなポリペプチドを設計するためのコンピュータ計算方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号 4 ～ 9 からなる群から選択された配列を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

10

【請求項 5】

配列番号 4、配列番号 5、配列番号 7、および配列番号 9 からなる群から選択された配列を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号 4、配列番号 7、および配列番号 9 からなる群から選択された配列を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含むウイルス様粒子 (VLP)。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする単離核酸。

20

【請求項 9】

プロモータに作動可能に連結された請求項 8 に記載の単離核酸を含む組換え発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の組換え発現ベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求項 7 に記載の VLP と、薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 12】

呼吸器多核体ウイルス (RSV) 感染症を治療する方法であって、RSV に感染した対象個体に、前記感染症を治療するのに有効な量の、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 7 に記載の VLP、または請求項 11 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法。

30

【請求項 13】

RSV 感染症の発症を制限する方法であって、RSV 感染症のリスクを有する対象個体に、RSV 感染症の発症を制限するのに有効な量の、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 7 に記載の VLP、または請求項 11 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法。

【請求項 14】

対象個体において免疫応答を引き起こす方法であって、前記対象個体に、免疫応答を引き起こすのに有効な量の、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 7 に記載の VLP、または請求項 10 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法。

40

【請求項 15】

(a) 請求項 8 に記載の単離核酸、請求項 9 に記載の組換え発現ベクター、および請求項 10 に記載の組換え宿主細胞のうち少なくともいずれかと、

(b) 薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 16】

対象個体における RSV を原因とする疾患のモニタリング、および RSV ワクチンによる免疫に対する対象個体の応答のモニタリングのうち少なくともいずれか一方を行うため

50

の方法であって、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 7 に記載の V L P、または請求項 1 1 に記載の医薬組成物を、対象個体由来の体液と接触させるステップと、対象個体の体液中の R S V 結合抗体を検出するステップとを含む方法。

【請求項 1 7】

体液は血清または全血を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

R S V 結合抗体を検出する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 7 に記載の V L P、または請求項 1 1 に記載の組成物を、R S V 結合抗体の候補を含む組成物と、R S V 抗体が前記ポリペプチド、V L P、または組成物に結合するのに適した条件下で接触させるステップと、

10

(b) 前記ポリペプチド、V L P、または組成物との R S V 抗体複合体を検出するステップと

を含む方法。

【請求項 1 9】

R S V 抗体を単離するステップをさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

R S V 抗体を生産する方法であって、

(a) 対象個体に、抗体応答を引き起こすのに有効な量の、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 7 に記載の V L P、または請求項 1 1 に記載の組成物を投与するステップと、

20

(b) 対象個体によって産生された抗体を単離するステップと

を含む方法。

【請求項 2 1】

ポリペプチドスカフォールドを設計するためのコンピュータ計算方法であって、

(a) フォールディング核として使用されるべきポリペプチド構造モチーフを定義するステップと、

(b) (i) 前記ポリペプチド構造モチーフとの適合性を有するポリペプチドスカフォールド用の標的三次元トポロジー、および (b) 前記ポリペプチド構造モチーフに置き換えられるべき前記標的三次元トポロジーの領域を定義するステップと、

30

(c) 前記ポリペプチド構造モチーフの原子座標の終点から延長ポリペプチド鎖を成長させるステップと、

(d) 前記ポリペプチド構造モチーフの主鎖二面角を固定状態に維持しながら延長ポリペプチド鎖をフォールディングするステップと、

(e) 標的三次元トポロジーに対するポリペプチド主鎖の根平均二乗偏差 (r m s d) のユーザ定義の閾値を満たすフォールディングされたポリペプチド鎖を、対象とするポリペプチドスカフォールドとして同定するステップと

を含む方法。

【請求項 2 2】

延長ポリペプチド鎖を成長させる前に標的三次元トポロジー由来の 1 つ以上の制約を決定することをさらに含む、請求項 2 1 に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

構造モチーフ内の元の側鎖立体配座を回復させるステップと、フォールディングおよび全原子最適化の 1 回または複数回の反復の間、前記立体配座を固定状態に保持するステップとをさらに含む、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

コンピュータデバイスに請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のコンピュータ計算方法を実行させるための命令一式を含む、非一時的な機械可読記憶媒体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、ポリペプチド、ならびに呼吸器多核体ウイルス感染症の治療および制限における該ポリペプチドの使用に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

呼吸器多核体ウイルス (R S V) は、全世界的に幼児のウイルスを原因とする死亡の主要原因であり、かつ高齢者および免疫不全者においても疾患を引き起こす。 R S V 感染症を予防するための現行の方法は、 F D A に認可された R S V 表面上の F タンパク質に結合するヒト化モノクローナル抗体であるパリビズマブ (P a l i) を用いた受動免疫法である。 R S V 感染症の予防には有効であるが、 P a l i 治療は世界規模では経済的または論理的に実現不可能である。

10

【 発明の概要 】

【 0 0 0 3 】

第 1 の態様では、本発明は、配列番号 1 ~ 9 のうちいずれかのアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、例えば本発明の方法において使用することができるポリペプチドを提供する。

【 0 0 0 4 】

別の態様では、本発明は、本発明のポリペプチドを含むウイルス様粒子を提供する。

さらなる態様では、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸、プロモータに作動可能に連結された本発明の単離核酸を含む組換え発現ベクター、および、本発明の組換え発現ベクターを含む組換え宿主細胞を提供する。

20

【 0 0 0 5 】

さらに別の態様では、本発明は、本発明のポリペプチドおよびウイルス様粒子のうち少なくともいずれか一方と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を提供する。

別の態様では、本発明は、 R S V 感染症を治療する方法であって、 R S V に感染した対象個体に、該感染症を治療するのに有効な量の本発明のポリペプチド、ウイルス様粒子、または医薬組成物を投与するステップを含む方法を提供する。

【 0 0 0 6 】

さらなる態様では、本発明は、 R S V 感染症の発症を制限する方法であって、 R S V 感染症のリスクを有する対象個体に、 R S V 感染症の発症を制限するのに有効な量の本発明のポリペプチド、ウイルス様粒子、または医薬組成物を投与するステップを含む方法を提供する。

30

【 0 0 0 7 】

さらに別の態様では、本発明は、対象個体において免疫応答を引き起こす方法であって、該対象個体に、免疫応答を引き起こすのに有効な量の本発明のポリペプチド、ウイルス様粒子、または医薬組成物を投与するステップを含む方法を提供する。

【 0 0 0 8 】

別の態様では、本発明は、

(a) 本発明の単離核酸、組換え発現ベクター、および組換え宿主細胞のうち少なくともいずれかと；

40

(b) 薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 0 9 】

さらなる態様では、本発明は、対象個体における R S V を原因とする疾患のモニタリング、および R S V ワクチンによる免疫に対する対象個体の応答のモニタリングのうち少なくともいずれか一方を行うための方法であって、本発明のポリペプチド、 V L P、または医薬組成物を、対象個体由来の体液と接触させるステップと、対象個体の体液中の R S V 結合抗体を検出するステップとを含む方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

さらに別の態様では、本発明は、 R S V 結合抗体を検出する方法であって、

50

(a) 本発明のポリペプチド、VLP、または組成物を、RSV結合抗体の候補を含む組成物と、RSV抗体がポリペプチド、VLP、または組成物に結合するのに適した条件下で接触させるステップと、

(b) ポリペプチド、VLP、または組成物とのRSV抗体複合体を検出するステップと

を含む方法を提供する。

【0011】

別の態様では、本発明は、RSV抗体を生産する方法であって、

(a) 対象個体に、抗体応答を引き起こすのに有効な量の本発明のポリペプチド、VLP、および組成物のうち少なくともいずれかを投与するステップと、

(b) 対象個体によって産生された抗体を単離するステップと

を含む方法を提供する。

【0012】

別の態様では、本発明は、ポリペプチドスカフォールド(scaffold)を設計するためのコンピュータ計算方法であって、

(a) フォールディング核として使用されるべきポリペプチド構造モチーフを定義するステップと、

(b) (i) 該ポリペプチド構造モチーフとの適合性を有するポリペプチドスカフォールドについての標的三次元トポロジー、および(b) 該ポリペプチド構造モチーフに置き換えられるべき該標的三次元トポロジーの領域、を定義するステップと、

(c) 該ポリペプチド構造モチーフの原子座標の終点から延長ポリペプチド鎖を成長させるステップと、

(d) 該ポリペプチド構造モチーフの主鎖二面角を固定状態に維持しながら延長ポリペプチド鎖をフォールディングするステップと、

(e) 標的三次元トポロジーに対するポリペプチド主鎖の根平均二乗偏差(rmsd)のユーザ定義の閾値を満たすフォールディングされたポリペプチド鎖を、対象とするポリペプチドスカフォールドとして同定するステップと、

を含む方法を提供する。

【0013】

さらなる態様では、本発明は、コンピュータデバイスに本発明のコンピュータ計算方法を実行させるための命令一式を含む、非一時的な機械可読記憶媒体を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】コンピュータ計算手順フォールド・フロム・ループス(Fold From Loops)の概要を示す図。この手順は、フォールディング核として使用されて該手順全体にわたり固定された主鎖立体配座に維持されることになる機能部位(例えば図中のヘリックス状ヘアピンなど)を用いる。標的トポロジーが供給され、距離制約は(任意選択で)フォールディング軌道を誘導するための標的トポロジー構造から得られる。フォールディング核からポリペプチド鎖が延長され、次いで該ポリペプチド鎖がフォールディングされる。作られたモデルが根平均二乗偏差(rmsd)のカットオフ値(例えば5)よりも標的トポロジーから離れる場合、そのモデルは廃棄される。そうでない場合、該モデルは設計および全原子最適化のサイクルに入る。図は、合理的選択として3サイクルの反復的設計および最適化を示しているが、サイクル数はユーザの自由裁量で選択されることになっている。

【図2】モタビズマブ(Motab)を、RSVFタンパク質由来のモタビズマブのペプチドエピトープとの複合体として示す図。A)複合体の側面図。B)複合体の背面図。C)複合体の境界面上の側鎖が棒で表されている。

【図3】様々なスカフォールドおよび標的トポロジーとして使用されたタンパク質(T93)の配列の配列アラインメントを示す図。スカフォールドにおいて意図的に標的トポロジーと同じであるように維持された表面により、多数の部位における類似性が与えられた。

。

10

20

30

40

50

【図 4】サイズ排除クロマトグラフィーおよび静的光散乱法によるスカフォールドのオリゴマー状態の特性解析を示す図。すべての分子が単一の単分散化学種を示し、モノマー化学種について予想される分子量（およそ 15 kDa）に近い分子量を有していた。サイズ排除由来の UV シグナルは全グラフの上方のトレースであり、光散乱シグナルは下方のトレースである。

【図 5】FFL 設計物の二次構造および熱安定性の円偏光二色性分析を示す図。設計物の波長スキャン（左列）はヘリックス状タンパク質に典型的な 2 つの極小を示す。熱変性曲線（右列）は、ほとんどの設計物について協調的アンフォールディングを示し、また FFL__005 が 95 °C まで融解しないことを示している。FFL__005 の高い安定性は 95 °C での波長スキャンによって例証される（左列）。融解温度は表 1 に示されている。

【図 6】SPR により測定されたモタビズマブに対するスカフォールドの結合を示す図。スカフォールドは biacore（登録商標）チップにカップリングされ、モタビズマブはアナライトとして使用された。データおよび速度論的フィットの両方が示されている。速度論的フィットパラメータは表 1 に示されている。

【図 7】SPR により測定された FFL__001 の MotA 結合特異性を示す図。MotA-IgG はリガンドであり、センサチップ上の抗ヒト IgG によって捕捉され、FFL__001 および FFL__001 のエピトープ点突然変異体（FFL__001__K82E）は濃度 2.2 μM におけるアナライトであった。FFL__001 と MotA との間の相互作用は点突然変異によって排除された。

【図 8】野生型（左）およびリジン官能化型（右）の HepBcAg 粒子のネガティブ染色 TEM を示す図。スケールバーは 50 nm である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

発明の詳細な説明

引用された参考文献はすべて、参照によりその全体が本明細書に援用される。本願においては、別途記載のない限り、利用される技法はいくつかのよく知られた参考文献、例えば

サンプルック（Sambrook）ら、「分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版社（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、1989 年、D. ゲッデル（D. Goeddel）編、「メソ
ツズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology）」第 185 巻、「遺伝子発現
技術（Gene Expression Technology）」、米国カリフォルニア州サンディエゴ、アカデミ
ックプレス（Academic Press）、1991 年、M. P. ドイツァー（M.P. Deutscher）編
、「メソツズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology）」、「タンパク質精
製の手引き（Guide to Protein Purification）」、アカデミックプレス社（Academic Press, Inc.）、1990 年；イニス（Innis）ら、「PCR プロトコール：方法および応用
の手引き（PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications）」、米国カリフォル
ニア州サンディエゴ、アカデミックプレス（Academic Press）、1990 年、R. I. フ
レッシュニー（R.I. Freshney）、「動物細胞の培養：基本技術マニュアル（Culture of An
imal Cells: A Manual of Basic Technique）」、第 2 版、米国ニューヨーク州ニューヨ
ーク、リス社（Liss, Inc.）、1987 年、E. J. マレー（E.J. Murray）編、「遺伝
子の導入および発現プロトコール（Gene Transfer and Expression Protocols）」、米国
ニュージャージー州クリフトン、ヒューマナ出版社（The Humana Press Inc.）、第 10
9 ~ 128 ページ、ならびにアンピオン（Ambion）1998 年カタログ（米国テキサス州
オースティン、アンピオン）、のうちいずれかに見られるものである。

【0016】

本明細書中で使用されるように、アミノ酸残基は以下すなわち：アラニン（Ala；A）、アスパラギン（Asn；N）、アスパラギン酸（Asp；D）、アルギニン（Arg；R）、システイン（Cys；C）、グルタミン酸（Glu；E）、グルタミン（Gln；Q）、グリシン（Gly；G）、ヒスチジン（His；H）、イソロイシン（Ile；

I)、ロイシン(L e u ; L)、リジン(L y s ; K)、メチオニン(M e t ; M)、フェニルアラニン(P h e ; F)、プロリン(P r o ; P)、セリン(S e r ; S)、トレオニン(T h r ; T)、トリプトファン(T r p ; W)チロシン(T y r ; Y)、およびバリン(V a l ; V)、のように略される。

【0017】

本明細書中で使用されるように、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が明らかにそうでないことを述べていない限り、複数の指示物を含む。本明細書中で使用される「および、ならびに(and)」は、明示的にそうでないことが定められた場合を除き、「または、もしくは(or)」と互換的に使用される。

【0018】

本発明の任意の態様のすべての実施形態は、文脈が明らかにそうでないことを述べていない限り、組み合わせて使用されうる。

第1の態様において、本発明は、下記すなわち：

(- / G) (- / S) (M / L / R / F) S D (R / A / I / M / V / L) (R / M) K
D (L / A / V) E (E / R / K / D) R (L / F / I / A) D K (L / F / A) (L /
V / F / M) E A (A / V / F / I / L) K N K (E / M / L / F / W / V) D K (F /
M / E / I / V) K A A (M / L / F / I) R K (R / E / G / D / Q) (G / D / P /
W / E / Q) (Q / I / P / K / F) (R / Q / K / S / G / H) E E R (M / K / R /
A) K D (W / L / M / K) (A / M / K / F) K (I / F / L / E / K / D) (A / V
/ M / F / L) R (D / K / E / Y) E (F / V / A / R / M / L) E Q (F / L / A /
V / M) R (K / R) A (V / M / I) R N (F / R / V / I / A / Y) (L / E / A)
(S) (E) (A / L) (L) (S) K (I) (N) D (Y / M / L) (P) I (T) (N)
(D) (D / Q / K) (K) (K) (L) (T / I / M / V / A) (S) (N) (D
/ K) (A / T / L / V / I) (K / L / I) K (F / Y / K / E / R / L) (D / A /
V / M) (A) (E / I / R) (V / A / M / L) (A / E / K / F / M / W) K K (L
/ I / V) E (A / L) (F / M / L / E / I) (K / A / V / M / I / L) A D (A /
V / I) E (E / R / D / K / I / A) (A / M / K / L / W) (A / F / V / K) T Q
(- / G) (- / S) (- / W) (配列番号 1)

のアミノ酸配列を含むかまたは該アミノ酸配列で構成されている単離ポリペプチドを提供する。

【0019】

本発明者らは、パリビズマブまたはモタビズマブと同様の特異性を備えた中和抗体を誘発するために本発明のポリペプチドを設計した。パリビズマブは、呼吸器多核体ウイルス(R S V)の表面糖タンパク質Fの抗原部位A(「部位II」とも呼ばれる)に結合することによりR S Vを強力に中和する、F D Aに認可された治療抗体である。モタビズマブはパリビズマブの親和性成熟型バリエーションである。したがって、パリビズマブ(P a l i)またはモタビズマブ(M o t a)に類似したR S V中和抗体を誘発するワクチンは、R S ウイルス感染に対する防御をなすために望ましい。P a l iおよびM o t aはR S VのFタンパク質上の立体配座依存的エピトープに結合する。本明細書中に開示されるように、本発明者らは、エピトープの立体配座の安定化および免疫系への提示のためのタンパク質スカフォールドをデノボ(de novo)設計するためのコンピュータ計算方法を開発した。この方法は、本発明のポリペプチドを設計するためにM o t aエピトープに適用され、該ポリペプチドは、モノマーであり、熱安定性が高く、かつM o t aへの結合親和性が極めて高いことが示され、このことは、該ポリペプチドが、結晶構造解析によって確認されるように、所望のエピトープ立体配座を安定化することに成功したことを示している。本発明者らは、この属(genus)の範囲内にあるポリペプチドがR S Vに対する中和抗体を誘発することができることも実証した。

【0020】

カッコはポリペプチド中の可変部位を表し、その部位における代替として挙げられたアミノ酸残基と共に示されている。

10

20

30

40

50

1つの好ましい実施形態では、ポリペプチドは下記すなわち：

(- / G) (- / S) (M / L / R / F) S D (R / A / I / M / V) R K D (L / A / V) E (E / R / K / D) R (L / F / I / A) D K (L / F / A) (L / V / F) E A (A / V / F / L) K N K (M / L / F / V) D K (F / M / E / I) K A A (M / L / F / I) R K (R / E / G / D) (G / D / P / W / Q) (Q / I / P / F) (R / Q / K / S / H) E E R (M / K / R / A) K D (W / L / M / K) (A / M / K / F) K (I / F / L / E / K / D) (A / V / M / F / L) R (D / K / Y / E) E (F / V / A / R / M) E Q (F / L / A / V / M) R (K / R) A (V / M / I) R N (F / R / V / I / Y) (L / E / A) S E (A / L) L S K I N D (Y / M / L) P I T N D (D / Q / K) K K L (T / I / M / V / A) S N D (T / L / V / I) (K / L / I) K (F / Y / K / E / L) (D / A / V / M) A (E / I / R) (V / A / M / L) (E / K / F / W) K K (L / I / V) E (A / L) (F / M / L / E / I) (K / A / V / M / L) A D (A / V / I) E (E / R / D / K / I / A) (A / M / K / L / W) (A / F / V) T Q (- / G) (- / S) (- / W) (配列番号 2)

のアミノ酸配列を含むかまたは該アミノ酸配列で構成されている。

【 0 0 2 1 】

後述の実施例において実証されるように、この属のポリペプチドは最良の範囲の活性を実証するポリペプチド中に存在するポリペプチドである。

さらなる好ましい実施形態では、ポリペプチドは下記すなわち：

(- / G) (- / S) (M / L / R / F) S D (I / M) R K D (L / A) E (E / R / D) R (F / A) D K (L / F / A) (V / F) E A (A / V / L) K N K (L / F / W) D K (F / M / I) K A A (L / F / I) R K (E / G / D) (G / D / W / Q) (Q / I / P / F) (Q / K / S / H) E E R (M / R / A) K D (W / L / M) (M / K / F) K (F / L / K / D) (A / M / L) R (Y / K) E (V / A / M) E Q (L / A / M) R (K / R) A (V / M / I) R N (F / R / I / Y) (L / E / A) S E (A / L) L S K I N D (M / L) P I T N D (D / Q) K K L (I / M / A) S N D (L / V / I) (K / L / I) K (F / Y / E / L) (D / A / V / M) A (E / I / R) (V / A / L) (E / F / W) K K (L / I) E A (M / L / I) (K / A / M / L) A D (A / V / I) E (R / D / I / A) (M / K / L / W) (A / F / V) T Q (- / G) (- / S) (- / W) (配列番号 3)

のアミノ酸配列を含むかまたは該アミノ酸配列で構成されている。

【 0 0 2 2 】

この属のポリペプチドは、R S Vに対する中和抗体を誘発するとして本発明者らにより例証されたポリペプチドである。

さらなる好ましい実施形態では、ポリペプチドは、

> F F L _ 0 0 1

G S R S D M R K D A E R R F D K F V E A A K N K F D K F K A A L R K G D I K E E R R K D M K K L A R K E A E Q A R R A V R N R L S E L L S K I N D M P I T N D Q K K L M S N D V L K F A A E A E K K I E A L A A D A E D K F T Q G S W (配列番号 4) ;

> F F L _ 0 0 2

G S L S D V R K D V E K R I D K A L E A F K N K M D K E K A A F R K D P P S E E R R K D K K K E F R E E R E Q V R K A I R N V L S E A L S K I N D L P I T N D K K K L V S N D V I K K V A E M K K K V E L E V A D V E K K V T Q G S W (配列番号 5) ;

> F F L _ 0 0 4

G S M S D A R K D L E E R L D K L L E A A K N K M D K F K A A M R K R G Q R E E R K K D W A K I V R D E F E Q F R K A V R N F L S E A L S K I N D Y P I T N D D K K L T S N D T K K F A A E V E K K L E A F K A D V E E A A T Q (配列番号 6) ;

> F F L _ 0 0 5

10

20

30

40

50

G S M S D I R K D L E E R F D K L V E A L K N K V D K M K A A F R K D Q F H E E
R M K D W F K D L R K E V E Q M R R A V R N Y A S E A L S K I N D L P I T N D D
K K L A S N D V L K L V A E V W K K L E A I L A D V E A W F T Q (配列番号 7) ;
> F F L _ _ 0 0 6

G S F S D I R K D A E D R A D K A F E A A K N K F D K I K A A I R K D W P S E E
R A K D L M K K A R Y E M E Q A R R A I R N I E S E A L S K I N D L P I T N D Q
K K L A S N D I I K E M A R L F K K L E A L M A D I E I L V T Q (配列番号 8) ;
および > F F L _ _ 0 0 7

G S L S D I R K D A E R R F D K L V E A V K N K L D K M K A A L R K E G Q Q E E
R M K D L M K F M R K E V E Q L R K A M R N F L S E A L S K I N D M P I T N D D
K K L I S N D L K K Y D A I A E K K L E A M K A D V E R M A T Q G S W (配列番号
9)

10

からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むかまたは該アミノ酸配列で構成されている。

【 0 0 2 3 】

これらのポリペプチドの各々は、後述の実施例において、モノマーであり、熱安定性が高く、かつ M o t a への極めて高い結合親和性を有することが実証され、このことは該ポリペプチドが所望のエピトープ立体配座の安定化に成功したことを示している。また、これらのポリペプチドの多くは R S V に対する中和抗体を誘発することが示された。

【 0 0 2 4 】

20

さらなる好ましい実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 4 (F F L _ _ 0 0 1)、配列番号 5 (F F L _ _ 0 0 2)、配列番号 7 (F F L _ _ 0 0 5)、配列番号 8 (F F L _ _ 0 0 6)、および配列番号 9 (F F L _ _ 0 0 7) からなる群から選択された配列を含むかまたは該配列で構成される。より好ましい実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 4 (F F L _ _ 0 0 1)、配列番号 5 (F F L _ _ 0 0 2)、配列番号 7 (F F L _ _ 0 0 5)、および配列番号 9 (F F L _ _ 0 0 7) からなる群から選択された配列を含むかまたは該配列で構成される。より好ましい実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 4 (F F L _ _ 0 0 1)、配列番号 7 (F F L _ _ 0 0 5)、および配列番号 9 (F F L _ _ 0 0 7) からなる群から選択された配列を含むかまたは該配列で構成される。

【 0 0 2 5 】

30

さらなる実施形態では、ポリペプチドは、リストに記載された配列の任意の再表面形成 (resurfaced) 型を含み、コレイア (Correia) ら、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol Biol)、2 0 1 1 年または再表面形成 (resurfacing) の概念のあらゆる関連出願に記載されている再表面形成を指している。

【 0 0 2 6 】

さらなる実施形態では、ポリペプチドは、1 つ以上のジスルフィド結合を加えることにより得られた、リストに記載された配列の任意のバリエーションを含む。

本明細書中に開示されるように、本発明者らは、エピトープの立体配座の安定化および免疫系への提示のためのタンパク質スカフォールドを設計するためのコンピュータ計算方法を開発した。この方法は M o t a エピトープに適用されて本発明のポリペプチドが設計され、該ポリペプチドは、モノマーであり、熱安定性が高く、かつ M o t a への結合親和性が極めて高いことが示される。

40

【 0 0 2 7 】

本願全体にわたって使用されるように、用語「ポリペプチド」は、サブユニットのアミノ酸の配列を指す該用語の最も広い意味で使用される。本発明のポリペプチドは、L - アミノ酸、D - アミノ酸 (生体内 (in vivo) の L - アミノ酸特異的プロテアーゼに対して抵抗性である)、または D - アミノ酸と L - アミノ酸との組み合わせを含むことができる。本明細書中に記載されるポリペプチドは、化学合成されてもよいし、組換え発現されてもよい。ポリペプチドは、ポリペプチド精製を容易にするペプチドタグや所望の免疫応答を増強するための T ヘルプエピトープのような、任意の所望の用途で使用するための任意

50

の適切なリンカーなどを含有することができる。例えば、下記に議論される例示のポリペプチドのうち2つは、これらのポリペプチドが他に「W」残基を含まないことからタンパク質濃度の決定を容易にするC末端「GSW」を備えている。

【0028】

ポリペプチドは、例えばPEG化(PEGylation)、HESylation(登録商標)、PASylation(登録商標)、グリコシル化などによってin vivoでの半減期延長を促進する他の化合物に連結されてもよいし、Fc融合体として生産されても、脱免疫(deimmunized)バリエーションとして生産されてもよい。当業者には理解されるように、そのような連結は共有結合であっても非共有結合であってもよい。

【0029】

10

さらなる実施形態では、本発明の任意の実施形態のポリペプチドは、検出可能な構成部分または治療薬のようなタグをさらに含むことができる。タグは、例えば、ジスルフィド結合、水素結合、静電気結合、組換え融合および立体配座的結合を含むがこれらに限定されない共有結合により、ポリペプチドに連結されうる。別例として、タグは、1つ以上の連結化合物によりポリペプチドに連結されてもよい。ポリペプチドにタグをコンジュゲートするための技術は当業者には周知である。検出可能なタグを含むポリペプチドは、例えば、該ポリペプチド中に存在するエピトープに特異的なB細胞を単離するためのプローブとして使用されうる。しかしながら、タグは、その他の検出および分析目的のうち少なくともいずれか一方のためにも使用されうる。任意の適切な検出タグ、例えば、限定するものではないが、酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、陽電子放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが使用されうる。使用されるタグは、使用される特定の検出/分析の技術および/または方法、例えばフローサイトメトリー検出、レーザー走査型サイトメトリー検出、蛍光免疫測定法、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、バイオアッセイ(例えば中和アッセイ)、ウエスタンブロッティングの適用などに応じて変わることになる。本発明のポリペプチドが、フローサイトメトリー検出、レーザー走査型サイトメトリー検出、または蛍光免疫測定法に使用される場合、タグは例えばフルオロフォアを含むことができる。本発明のポリペプチドを蛍光標識するために有用な種々のフルオロフォアが当業者に良く知られている。ポリペプチドがin vivoでの診断用途に使用される場合、タグは、例えば、ガドリニウムジエチレントリアミン五酢酸のような磁気共鳴撮像(MRI)造影剤を含むこともできるし、超音波造影剤に、もしくはX線造影剤に、または放射性同位体標識によってもよい。

20

30

【0030】

本発明のポリペプチドは、ウイルス様粒子のような粒子に結合するためのリンカー(例えばシステインまたはリジンのようなアミノ酸リンカーを含むがこれらに限定はされない)のようなタグをさらに含むこともできる。別の例として、本発明のポリペプチドは、ELISAのためにマイクロタイタープレートの表面に有用なように取り付け可能である。本発明のポリペプチドは、以降の実施例に記載されているように、精製を容易にするためにマーカー配列に融合されてもよい。実施例としては、限定するものではないが、ヘキサヒスチジンタグ、mycタグまたはフラグタグが挙げられる。

40

【0031】

別の実施形態では、複数のポリペプチドが複合されて dendrimer とされてもよい。Dendrimer は、三次元の高次オリゴマーおよび/またはポリマー化合物であって、典型的にはコア分子もしくは指定の開始剤上で該オリゴマーおよび/またはポリマーを付加して外側表面を提供する反復した連続反応によって形成される化合物である。適切な dendrimer には、限定するものではないが「スターバースト」 dendrimer および様々な dendrimer ポリカチオンが挙げられる。Dendrimer の調製および使用のための方法は当業者によく知られている。

【0032】

別の実施形態では、ポリペプチドは、該ポリペプチドのN末端、C末端、またはN末端

50

およびC末端の両方を介してオリゴマー化ドメインに（組換えによる手段もしくは化学的手段により）融合されてもよい。任意の適切なオリゴマー化ドメインが使用可能である。

1つの非限定的な実施形態では、ポリペプチドは、三量体を形成するGCN4バリエーションに融合される（従って、融合ポリペプチドの三量体または六量体が提示されることが考えられる）。別の非限定的な実施形態では、ポリペプチドは、三量体を形成するフィブリチン（fibrin）のフォルドン（foldon）ドメインに融合される。他の非限定的な実施形態では、オリゴマー化ドメインは、集合して、例えば（非ウイルスの）ルマジンシンターゼタンパク質から作られる粒子や（非ウイルスの）フェリチンまたはフェリチン様タンパク質から作られる粒子を含むがこれらに限定されない粒子を形成する任意のタンパク質であってもよい。

10

【0033】

別の実施形態では、ポリペプチドは、リボソームに化学的にコンジュゲートされてもよい。1つの非限定的な実施形態では、リボソームは、反応性基を担持するようにPEG基が官能化されたPEG化脂質を一部含有しており、ポリペプチドはPEG上の該反応性基に化学的に連結される。別の非限定的な実施形態では、さらなる免疫刺激性の化合物がリボソーム内の脂質層中またはその内側に含まれる。別の非限定的な実施形態では、特定の細胞を標的とする分子、例えば、限定するものではないが樹状細胞の表面上のタンパク質に結合する分子が、リボソームの表面に含まれている。

【0034】

別の実施形態では、免疫系へのポリペプチドの提示をさらに増強するために、複数（すなわち2以上、好ましくは少なくとも5、10、15、20、25、50、75、90個またはそれ以上のコピー数）のポリペプチドがウイルス様粒子（VLP）の中に存在していてもよい。本明細書中で使用されるように、「ウイルス様粒子」とは、少なくとも1つの属性の点ではウイルスに類似しているが感染性であることは実証されていない構造物を指す。本発明で用いるウイルス様粒子は、該ウイルス様粒子のタンパク質をコードしている遺伝子情報を担持していない。一般に、ウイルス様粒子はウイルスゲノムを欠き、したがって非感染性である。加えて、ウイルス様粒子は異種発現によって多量に生産可能である場合が多く、かつ容易に精製されうる。好ましい実施形態では、VLPは、自然発生的な自己集合を生じうるウイルスタンパク質を含み、そのようなウイルスタンパク質には、例えば、限定するものではないが、アデノ随伴ウイルスの組換えタンパク質、ロタウイルス、ノーウォークウイルスの組換えタンパク質、アルファウイルスの組換えタンパク質、口蹄疫ウイルスの組換えタンパク質、レトロウイルスの組換えタンパク質、B型肝炎ウイルスの組換えタンパク質、タバコモザイクウイルスの組換えタンパク質、フロックハウスウイルスの組換えタンパク質、およびヒトパピローマウイルスの組換えタンパク質、ならびにQ β バクテリオファージ粒子が含まれる。1つの好ましい実施形態では、ウイルスタンパク質はB型肝炎コア抗原粒子を含む。別の実施形態では、VLPは脂質エンベロープウイルスに由来し、脂質および任意の適切なウイルスタンパク質、例えば、限定するものではないが、チクングンヤウイルス由来のタンパク質、またはB型肝炎表面抗原タンパク質を含む。組換え生産型VLPを生産して特性解析する方法は、米国特許出願公開第20110236408号明細書に概説されるように、いくつかのウイルス由来のVLPについて記載されている；米国特許第7,229,624号明細書も参照のこと。以降の実施例に記載されるように、B型肝炎（HepB）コア抗原粒子上にコンジュゲートされたおよそ75コピーのFFL__001ポリペプチド（配列番号4）を用いたVLPに関連する免疫は、該ポリペプチドへの免疫応答の増大をもたらす。

20

30

40

【0035】

本明細書中に議論されるように、本発明のVLPはRSV感染の治療または制限のためのワクチン剤または抗原調合物として使用可能である。いくつかの実施形態では、VLPは、RSVFタンパク質またはRSVGタンパク質由来の他のエピトープを提示する他のスカフォールドをさらに含むこともできる。他の実施形態では、VLPは、さらなるRSVタンパク質、例えばM、N、GおよびSHのうち少なくともいずれかに由来するエピト

50

ープを提示するスカフォールドをさらに含むこともできる。

【0036】

別の実施形態では、ポリペプチドは、合成ポリマー、脂質ミセルまたは金属のような非天然のコア粒子上に存在していてもよい。そのようなコア粒子は、対象個体に送達して免疫応答の増強をもたらすための本発明の複数のポリペプチドの組織化に使用することができる。例を挙げると、合成ポリマーまたは金属のコア粒子は、複数のペプチドループが取り付けられたカリックスアレーン有機スカフォールドの、「抗体模倣体 (antibody mimic)」の作出における使用を開示する米国特許第5,770,380号明細書に記載されており、また米国特許第5,334,394号明細書は、金属またはセラミックスを含む種々様々の無機質材料からなる、ウイルスのおとりとして使用されるナノ結晶粒子について述べている。本実施形態において好ましい金属には、クロム、ルビジウム、鉄、亜鉛、セレン、ニッケル、金、銀、白金が挙げられる。本実施形態において好ましいセラミックス材料には、二酸化ケイ素、二酸化チタン、酸化アルミニウム、酸化ルテニウムおよび酸化スズが挙げられる。本実施形態のコア粒子は炭素 (ダイヤモンド) を含む有機材料から作られてもよい。好ましいポリマーには、ポリスチレン、ナイロンおよびニトロセルロースが挙げられる。この種のナノ結晶粒子については、酸化スズ、二酸化チタンまたは炭素 (ダイヤモンド) から作られた粒子が特に好ましい。脂質ミセルは、当分野で周知の任意の手段によって調製可能である。米国特許第7,229,624号明細書および本明細書中に開示された参考文献を参照されたい。

10

【0037】

第2の態様では、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。該単離核酸配列はRNAまたはDNAを含むことができる。本明細書中で使用されるように、「単離核酸」とは、ゲノム配列中またはcDNA配列中において通常その周囲にある核酸配列から取り出された核酸である。そのような単離核酸配列は、コードされたタンパク質の発現および精製のうち少なくともいずれか一方を容易にするのに有用な追加の配列を含むことができ、そのような追加の配列には、例えば、限定するものではないが、poly A配列、修飾コザック配列、ならびに、エピトープタグ、移出シグナル、および分泌シグナル、核局在シグナル、および原形質膜局在シグナルをコードする配列が含まれる。本明細書中の教示に基づけば、どの核酸配列が本発明のポリペプチドをコードすることになるかは当業者には明白であろう。

20

30

【0038】

第3の態様では、本発明は、適切な制御配列に作動可能に連結された本発明の任意の態様の単離核酸を含む組換え発現ベクターを提供する。「組換え発現ベクター」には、核酸コード領域または遺伝子を該遺伝子産物の発現を達成することができる任意の制御配列に作動可能に連結するベクターが含まれる。本発明の核酸配列に作動可能に連結される「制御配列」は、該核酸分子の発現を達成することができる核酸配列である。制御配列は、該制御配列が核酸配列の発現を導くように機能する限り、該核酸配列に隣接している必要はない。したがって、例えば、翻訳されないが転写される介在配列がプロモータ配列と核酸配列との間に存在することが可能であり、その場合も該プロモータ配列はコード配列に「作動可能に連結された」とみなすことができる。他のそのような制御配列には、限定するものではないが、ポリアデニル化シグナル、終結シグナル、およびリボソーム結合部位が挙げられる。そのような発現ベクターは当分野において既知の任意の種類のものであってよく、例えば、限定するものではないが、プラスミドおよびウイルス系の発現ベクターが挙げられる。開示された核酸配列の発現を哺乳類の系において駆動するために使用される制御配列は、構成的 (様々なプロモータのうち任意のもの、例えば、限定するものではないが、CMV、SV40、RSV、アクチン、EFプロモータによって駆動される) であってもよいし、誘導型 (例えばいくつかの誘導プロモータのうち任意のもの、例えば、限定するものではないが、テトラサイクリン、エクジソン、ステロイド応答性のプロモータによって駆動される) であってもよい。原核細胞のトランスフェクションに使用される発現ベクターの構築は当分野においてよく知られており、よって標準的技法により達成可能

40

50

である。(例えば、サムブルック(Sambrook)、フリッチェ(Fritsch)およびマニアティス(Maniatis)、「分子クローニング、実験マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年; E. J. マレー(E.J. Murray)編、「遺伝子の導入および発現プロトコール(Gene Transfer and Expression Protocols)」、米国ニュージャージー州クリフトン、ヒューマナ出版社(The Humana Press Inc.)、第109~128ページ、ならびにアンピオン(Ambion)1998年カタログ(米国テキサス州オースティン、アンピオン)を参照)。発現ベクターは、エピソードとして、または宿主染色体DNAへの組込みにより、宿主生物体内において複製可能でなければならない。好ましい実施形態では、発現ベクターはプラスミドを含む。しかしながら、本発明は、ウイルスベクターのような同等の機能を果たす他の発現ベクターを含むことも意図されている。

10

【0039】

第4の態様では、本発明は、本明細書中に開示された組換え発現ベクターでトランスフェクションされた宿主細胞を提供し、該宿主細胞は原核細胞であってもよいし真核細胞であってもよい。細胞は、一過性にトランスフェクションされることも、安定的にトランスフェクションされることも可能である。原核細胞および真核細胞への発現ベクターのそのようなトランスフェクションは、当分野で既知の任意の技術、例えば、限定するものではないが、標準的な細菌形質転換、リン酸カルシウム共沈法、エレクトロポレーション、またはリポソーム介在型、DEAEデキストラン介在型、ポリカチオン介在型、もしくはウイルス介在型のトランスフェクションによって行うことができる。(例えば、サムブルック(Sambrook)ら、「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年; R. I. フレッシュニー(R.I. Freshney)、「動物細胞の培養：基本技術マニュアル(Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique)」、第2版、米国ニューヨーク州ニューヨーク、リス社(Liss, Inc.)、1987年を参照のこと)。本発明のポリペプチドを生産する方法は本発明の補足部分である。該方法は、(a)本発明のこの態様の宿主を、該ポリペプチドの発現を助長する条件下で培養するステップと、(b)任意選択で、発現されたポリペプチドを回収するステップとを含む。発現されたポリペプチドは、無細胞抽出物から回収可能であるが、培地から回収されることが好ましい。無細胞抽出物または培地からポリペプチドを回収する方法は、当業者によく知られている。

20

30

【0040】

第5の態様では、本発明は、本発明の1つ以上のポリペプチド、VLP、核酸、組換え発現ベクター、または宿主細胞と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物(ワクチンなど)を提供する。本発明の医薬組成物は、例えば、下記に記載された本発明の方法において使用されうる。該医薬組成物は、本発明のポリペプチドに加えて、(a)リオプロテクタント; (b)界面活性剤; (c)増量剤; (d)等張化剤; (e)安定化剤; (f)防腐剤および(g)バッファーのうち少なくともいずれかを含むことができる。

【0041】

いくつかの実施形態では、医薬組成物中のバッファーは、トリスバッファー、ヒスチジンバッファー、リン酸バッファー、クエン酸バッファーまたは酢酸バッファーである。医薬組成物は、リオプロテクタント、例えばショ糖、ソルビトールまたはトレハロースを含むこともできる。ある実施形態では、該医薬組成物は、防腐剤、例えば塩化ベンザルコニウム、ベンゼトニウム、クロルヘキシジン、フェノール、m-クレゾール、ベンジルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロロブタノール、o-クレゾール、p-クレゾール、クロロクレゾール、硝酸フェニル水銀、チメロサル、安息香酸、およびこれらの種々の混合物を含む。他の実施形態では、該医薬組成物は、グリシンのような増量剤を含む。さらに他の実施形態では、該医薬組成物は、界面活性剤、例えばポリソルベート-20、ポリソルベート-40、ポリソルベート-60、ポリソルベート-65、ポリソルベート-80、ポリソルベート-85、ポロキサマー-188、ソルビタンモノラウ

40

50

レート、ソルビタンモノパルミタート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタントリラウレート、ソルビタントリステアレート、ソルビタントリオレエート、またはこれらの組み合わせを含む。医薬組成物はさらに、等張化剤、例えば調合物をヒト血液とほぼ等張または等浸透圧にする化合物も含むことができる。典型的な等張化剤には、ショ糖、ソルビトール、グリシン、メチオニン、マンニトール、デキストロース、イノシトール、塩化ナトリウム、アルギニンおよび塩酸アルギニンが挙げられる。他の実施形態では、医薬組成物はさらに、安定化剤、例えば、対象とするタンパク質と組み合わせられたときに、凍結乾燥形態または液体形態における該対象タンパク質の化学的および/または物理的不安定性を実質的に防止または低減する分子を含む。典型的な安定化剤には、ショ糖、ソルビトール、グリシン、イノシトール、塩化ナトリウム、メチオニン、アルギニンおよび塩酸アルギニンが挙げられる。

10

【0042】

ポリペプチドは医薬組成物中の唯一の活性物質であってもよいし、該組成物が、意図される用途に適した1つ以上の他の物質、例えば、限定するものではないが、免疫系を広く刺激しかつ免疫応答を全体的に高めるアジュバントを、さらに含むこともできる。任意の適切なアジュバントが使用可能である。用語「アジュバント」は、抗原への免疫応答を増強する化合物または混合物を指す。典型的なアジュバントには、限定するものではないが、Adj u - P h o s (登録商標)、Adj u m e r (商標)、アルブミン-ヘパリン微粒子、藻類グルカン (Algal Glucan)、アルガミュリン (Algammulin)、アラム (Alum)、抗原調合物 (Antigen Formulation)、A S - 2 アジュバント、自己由来樹状細胞、自己由来P B M C、A v r i d i n e (商標)、B 7 - 2、B A K、B A Y R 1 0 0 5、ブピバカイン、ブピバカイン - H C l、B W Z L、カルシトリオール、リン酸カルシウムゲル (Calcium Phosphate Gel)、C C R 5 ペプチド、C F A、コレラホロトキシン (C T) およびコレラトキシンBサブユニット (C T B)、コレラトキシンA1サブユニット-プロテインA Dフラグメント融合タンパク質、C p G、C R L 1 0 0 5、サイトカイン含有リボソーム、D - M u r a p a l m i t i n e、D D A、D H E A、ジフテリアトキソイド、D L - P G L、D M P C、D M P G、D O C / アラム複合体 (DOC/Alum Complex)、鶏痘、フロイント完全アジュバント、γイヌリン、G e r b u A d j u v a n t (登録商標)、G M - C S F、G M D P、h G M - C S F、h I L - 1 2 (N 2 2 2 L)、h T N F - α、I F A、p c D N A 3 中の I F N γ、I L - 1 2 D N A、I L - 1 2 プラスミド、I L - 1 2 / G M C S F プラスミド (サイクス (Sykes))、p c D N A 3 中の I L - 2、I L - 2 / I g プラスミド、I L - 2 / I g タンパク質、I L - 4、p c D N A 3 中の I L - 4、イミキモド、I m m T h e r (商標)、共刺激分子に対する抗体を含有しているイムノリボソーム、インターフェロンγ、インターロイキン1β、インターロイキン12、インターロイキン2、インターロイキン7、I S C O M (s) (商標)、I s c o p r e p 7 . 0 . 3 (商標)、キーホールリンペットヘモシアニン、脂質系アジュバント、リボソーム、ロキシリビン (Loxoribine)、L T (R 1 9 2 G)、L T - O A すなわち L T 経口アジュバント、L T - R 1 9 2 G、L T K 6 3、L T K 7 2、M F 5 9、M O N T A N I D E I S A 5 1、M O N T A N I D E I S A 7 2 0、M P L (商標)、M P L - S E、M T P - P E、M T P - P E リボソーム、ムラメチド、M u r a p a l m i t i n e、N A G O、n C T 天然コレラトキシン、非イオン性界面活性剤ベシクル、コレラトキシンの非毒性突然変異体 E 1 1 2 K である m C T - E 1 1 2 K、p - ヒドロキシ安息香酸メチルエステル、p C I L - 1 0、p C I L 1 2、p C M V m C A T 1、p C M V N、ペプトマーNP (Peptomer-NP)、ブルーラン (Pleuran)、P L G、P L G A、P G A、および P L A、P l u r o n i c (登録商標) L 1 2 1、P M M A、P O D D S (商標)、ポリr A : ポリr U、ポリソルベート80、プロテインコクレエート (Protein Cochleates)、Q S - 2 1、クアドリ (Quadri) A サポニン、Q u i l - A (登録商標)、R e h y d r a g e l (登録商標) H P A、R e h y d r a g e l (登録商標) L V、R I B I (登録商標)、R i b i l i k e アジュバントシステム (M P L、T M D、C W S)、S - 2 8 4 6 3、S A F - 1、スクラボ・ペプチド (Sclavo peptide)、セ

20

30

40

50

ンダイプロテオリポソーム (Sendai Proteoliposome)、センダイ含有脂質マトリックス (Sendai-containing Lipid Matrix)、Span (登録商標) 85、Specol (登録商標)、スクアラン1、スクワレン2、ステアリルチロシン、破傷風トキソイド (TT)、Theramide (商標)、トレオニルムラミルジペプチド (TMDP)、Ty 粒子、およびウォルター・リード・リポソーム、が挙げられる。アジュバントの選択は、ワクチン接種を受ける対象個体に応じて変化する。好ましくは、薬学的に許容可能なアジュバントが使用される。

【0043】

該ポリペプチドを含む組成物は、任意の標準的な形態、例えば水溶液または凍結乾燥された固形物として保管可能である。そのような組成物は、細胞または対象個体へ投与される場合は一般に滅菌状態である。水溶液の滅菌は、濾過滅菌メンブレンによる濾過によって容易に行われる。組成物が凍結乾燥形態で保管される場合、組成物は凍結乾燥および再構成の前に濾過されてもよいし後で濾過されてもよい。

10

【0044】

第6の態様では、本発明は、RSV感染症の治療および制限のうち少なくともいずれか一方を行う方法であって、RSV感染症の治療および制限のうち少なくともいずれか一方を行うために、投与を必要とする対象個体に、治療上有効な量の本発明の1つ以上のポリペプチド、該ポリペプチドの塩、該ポリペプチドのコンジュゲート物、該ポリペプチドのVLP、または該ポリペプチドの医薬組成物を投与するステップを含む方法を提供する。別の実施形態では、該方法は、RSV感染しているかまたはRSV感染症のリスクを有する個体において免疫応答を誘発することを含み、免疫応答を引き起こすために、投与を必要とする対象個体に、治療上有効な量の本発明の1つ以上のポリペプチド、該ポリペプチドの塩、該ポリペプチドのコンジュゲート物、該ポリペプチドのVLP、または該ポリペプチドの医薬組成物を投与するステップを含む。

20

【0045】

「呼吸器多核体ウイルス」および「RSV」は、特に小児において呼吸器疾患を引き起こすパラミクソウイルス科の一本鎖マイナスセンスRNAウイルスを指す。

該方法がRSV感染を治療することからなる場合、1つ以上のポリペプチド、VLP、または組成物は、RSVに既に感染している対象個体、またはRSVに感染しているであろうことを示す症状（例えば、限定するものではないが、下気道感染、上気道感染、細気管支炎、肺炎、発熱、気力低下、食欲減退、反復性喘鳴、および喘息）を患っている対象個体に投与される。本明細書中で使用されるように、「治療する」または「治療」とは、下記すなわち：(a) 対象個体におけるRSV力価の低減；(b) 対象個体におけるRSV力価の何らかの増大の制限；(c) RSV症状の重症度の低減；(d) 感染後のRSV症状の発症の制限または予防；(e) RSV症状の悪化の抑制；(f) 以前にRSV感染の症状を示した対象個体におけるRSV症状の再発の制限または予防、のうち1つ以上を達成することを意味する。一実施形態の方法では、ポリペプチド、VLP、または組成物は、既に存在している感染症の改善および新たなRSVウイルスによる感染症の予防の提供のうち少なくともいずれか一方を行うために、「治療ワクチン」として使用される。

30

【0046】

該方法がRSV感染症を制限することからなる場合、1つ以上のポリペプチド、VLP、または組成物は、感染しているか否か不明であるがRSVに曝露したリスクを有しうる対象個体に予防的に投与される。本明細書中で使用されるように、「制限」とは、RSV感染症のリスクを有する対象個体のRSV感染を制限することを意味する。特に高いリスクを有するグループには、18歳未満の小児（特に3歳以下の幼児）、65歳を超える成人、および任意の種類の免疫不全に罹患している人が含まれる。この方法では、ポリペプチド、VLP、または組成物はワクチンとして使用される。

40

【0047】

本明細書中で使用されるように、「治療上有効な量」とはRSV感染症の治療および制限のうち少なくともいずれか一方を行うために有効なポリペプチドの量を指す。ポリペプ

50

チドは、一般的には上記に開示されたもののような医薬組成物として製剤化され、任意の適切な経路を介して、例えば経口的に、parentally、吸入スプレーにより、経直腸的に、または局所的に、従来の薬学的に許容可能な担体、アジュバント、およびビヒクルを含有する投与単位製剤として投与されうる。本明細書中で使用される非経口という用語には、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、胸骨内、腱内、脊髄内、頭蓋内、胸内、点滴技法または腹腔内が含まれる。ポリペプチド組成物は、ミクロスフェア、リボソーム、免疫刺激複合体 (ISCOM)、または適切な組織 (例えば血液) 中に導入されるその他の微小粒子送達システムもしくは徐放性製剤を介して投与されてもよい。投与レジメンは望ましい最適な応答 (例えば治療的応答または予防的応答) を提供するために調節されうる。適切な用量域は、例えば、体重 1 kg 当たり 0.1 µg ~ 100 mg であってよく；別例として、適切な用量域は体重 1 kg 当たり 0.5 µg ~ 50 mg；1 µg ~ 25 mg、または 5 µg ~ 10 mg であってよい。ポリペプチドは単回のボーラス投与で送達されてもよいし、主治医の決定により 2 回以上 (例えば 2、3、4、5 回またはそれ以上) 投与されてもよい。

10

20

30

40

50

【0048】

ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、以降の実施例で実証されるように、RSV の感染力を中和する。様々な実施形態において、本発明のポリペプチドは、該ポリペプチドの非存在下での RSV による宿主細胞の感染と比較して、RSV が宿主細胞に感染するのを少なくとも 99%、少なくとも 95%、少なくとも 90%、少なくとも 85%、少なくとも 80%、少なくとも 75%、少なくとも 70%、少なくとも 60%、少なくとも 50%、少なくとも 45%、少なくとも 40%、少なくとも 35%、少なくとも 30%、少なくとも 25%、少なくとも 20%、または少なくとも 10% 予防する。中和は当分野において標準的な技法を使用して測定可能である。

【0049】

別の態様では、本発明は、

(a) 本発明の単離核酸、組換え発現ベクター、および組換え宿主細胞のうち少なくともいずれかと；

(b) 薬学的に許容可能な担体と

を含む医薬組成物を提供する。この態様では、本発明の核酸、発現ベクター、および宿主細胞は、対象個体において、コードされたポリペプチドを *in vivo* で発現することによりコードされたポリペプチドに対する免疫応答を誘発するための、ポリヌクレオチド系免疫原性組成物として使用することができる。ポリヌクレオチドを動物に投与するための様々な方法が利用可能である。動物に特定のポリヌクレオチドを導入するのに適した方法の選択は、当分野の技術の範囲内にある。本発明のポリヌクレオチドは、当分野で既知の他の方法、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム沈澱法、リポフェクション (リソソーム融合)、または DNA ベクタートランスポーターによっても対象個体に導入可能である (例えば、ウー (Wu) ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、1992 年、第 267 巻、p. 963 ~ 967 を参照のこと)。

【0050】

本発明のポリペプチド、VLP、または組成物に対する免疫応答は、対象個体に本発明の免疫原性組成物を 1 回以上接種することによって引き起こされうる。初回接種は「一次接種」と呼ばれ、その後の免疫処置は「ブースター接種」と呼ばれる。ブースター接種は一般に免疫応答を増強し、少なくとも 1 回のブースター接種を含む免疫処置レジメンが好ましい。本発明の任意のポリペプチド、VLP、または組成物が初回免疫またはブースター免疫に使用されうる。選択されたワクチン接種パラメータ、例えば製剤、用量、レジメンなどの妥当性は、対象個体から血清のアリコートを採取して免疫処置プログラムの経過中に抗体力価をアッセイすることにより判定可能である。別例として、T 細胞集団が従来の方法によってモニタリングされてもよい。加えて、対象個体の臨床症状が、期待される

効果、例えば R S V 感染症の制限、病状の改善（例えばウイルス負荷の低減）などについてモニタリングされてもよい。そのようなモニタリングによりワクチン接種が不十分であることが示された場合、対象個体に追加用量の組成物がブースター接種されてもよく、またワクチン接種パラメータが、免疫応答を強化すると予想される様式に修正されてもよい。従って、例えば、ポリペプチド、V L P、もしくは組成物、およびアジュバントのうち少なくともいずれかの用量が増加されてもよいし、投与経路が変更されてもよい。

【0051】

さらなる態様では、本発明は、対象個体において R S V により引き起こされた疾患をモニタリングするか、または R S V ワクチンによる免疫に対する対象個体の応答をモニタリングするための方法であって、本発明のポリペプチド、V L P、または医薬組成物を対象個体由来の体液と接触させるステップと、対象個体の体液中の R S V 結合抗体を検出するステップとを含む方法を提供する。「R S V により引き起こされた疾患」とは、R S V によって直接または間接的に引き起こされた任意の疾患を意図している。該方法は、本発明のポリペプチド、V L P、または組成物を、ある量の対象個体由来の体液（血清、全血など）と接触させるステップと；対象個体の体液中の R S V 結合抗体を検出するステップとを含む。R S V 結合抗体の検出は、対象個体における R S V 疾患のモニタリングを可能にする。加えて、R S V 結合抗体の検出は、R S V ワクチンによる免疫に対する対象個体の応答のモニタリングも可能にする。さらに別の方法では、R S V 結合抗体の力価が決定される。任意の適切な検出アッセイ、例えば、限定するものではないが、均一系および不均一系の免疫学的測定法であって、ラジオイムノアッセイ（R I A）、E L I S A、免疫蛍光検査法、免疫組織化学的検査、F A C S、B I A C O R E およびウエスタンブロット解析などが使用可能である。該方法は溶液中で行われてもよいし、本発明のポリペプチドを、担体または基材、例えば微量定量プレート（例えば E L I S A 用）、メンブレンおよびビーズなどに結合または付着させてもよい。担体または基材は、ガラス、プラスチック（例えばポリスチレン）、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース、またはテフロン（登録商標）などで作製されうる。そのような支持体の表面は、一面に均質であっても、多孔性であってもよく、かつ任意の好都合な形状のものであってよい。この態様で使用される本発明のポリペプチドは、所与のアッセイに適した任意の検出技法に有用なタグを提供するために、上記に開示されるようなコンジュゲートを含むこともできる。

【0052】

さらに別の態様では、本発明は、R S V 結合抗体を検出する方法であって、

（a）本発明のポリペプチド、V L P、または組成物を、R S V 結合抗体の候補を含む組成物と、R S V 抗体がポリペプチド、V L P、または組成物に結合するのに適した条件下で接触させるステップと；

（b）ポリペプチド、V L P、または組成物との R S V 抗体複合体を検出するステップと、を含む方法を提供する。この態様では、該方法は、R S V 結合抗体の候補が本発明のポリペプチド中に存在する R S V F エピトープを認識するか否かを決定するために実施される。任意の適切な組成物、例えば、限定するものではないが、適切な対象個体（R S V に感染した人など）由来の体液試料（血清、全血など）、ナイーブラライブラリ、修飾ライブラリ、および、R S V 特異的免疫応答を示すヒト提供者から直接作製されたライブラリが使用されうる。アッセイは、ポリペプチドに対する抗体の結合を促進するのに適した条件下で実施され、そのような条件は本明細書中の教示に基づいて当業者により決定されうる。任意の適切な検出アッセイ、例えば、限定するものではないが、均一系および不均一系の免疫学的測定法であって、ラジオイムノアッセイ（R I A）、E L I S A、免疫蛍光検査法、免疫組織化学的検査、F A C S、B I A C O R E およびウエスタンブロット解析などが使用可能である。該方法は溶液中で行われてもよいし、本発明のポリペプチドを、担体または基材、例えば微量定量プレート（例えば E L I S A 用）、メンブレンおよびビーズなどに結合または付着させてもよい。担体または基材は、ガラス、プラスチック（例えばポリスチレン）、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース、またはテフロン（登録商標）などで作製されうる。そのような支持体の表面は、一面に均質であっても、多孔性で

あってもよく、かつ任意の好都合な形状のものであってよい。この態様で使用される本発明のポリペプチドは、所与のアッセイに適した任意の検出技法に有用なタグを提供するために、上記に開示されるようなコンジュゲートを含むこともできる。さらなる実施形態では、R S V F 結合抗体は標準的な手順を用いて単離される。1つの実施形態では、該方法は、当分野における標準的な技法を使用した蛍光活性化細胞選別法 (FACS) によるポリペプチド特異的な記憶 B 細胞の単離を含むこともできる (例えば、サイエンス (Science) のDOI:10.1126/science.1187659を参照のこと)。

【0053】

別の態様では、本発明は、R S V 抗体を生産する方法であって、

(a) 抗体応答を引き起こすのに有効な量の本発明のポリペプチド、VLP、および組成物のうち少なくともいずれかを対象個体に投与するステップと； 10

(b) 対象個体によって産生された抗体を単離するステップと
を含む方法を提供する。本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドを認識する抗体を生成するためにも使用されうる。該方法は、本発明のポリペプチド、VLP、または組成物を対象個体に投与するステップを含む。そのような抗体は、例えば、R S V 研究に使用することができる。この実施形態に使用される対象個体は、抗体生産のために一般に使用される対象個体、例えば、限定するものではないが、哺乳動物、例えばげっ歯動物、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどである。生成される抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかであってよい。ポリクローナル抗体は、適切な動物 (例えばマウスまたはウサギ) に抗原ポリペプチドを注射 (例えば皮下注射または筋肉内注射) することにより産生される。その後、抗体は該動物から採取された血液試料から得られる。ポリクローナル抗体を生産するために使用される技術は、広く文献に記載されている。対象個体によって産生されたポリクローナル抗体は、例えば、該抗体を産生させたポリペプチドを基材に結合させ、その基材に該抗体を結合させ、さらにその基材から溶出させることにより、さらに精製可能である。当業者であれば、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の精製および濃縮のうち少なくともいずれか一方のための様々な標準的技法について精通しているであろう。モノクローナル抗体は当分野で既知の技法を使用して生成されてもよい。 20

【0054】

第7の態様では、本発明は、ポリペプチドスカフォールドを設計するためのコンピュータ計算方法を提供する。その方法は： 30

(a) フォールディング核として使用されるべきポリペプチド構造モチーフを定義するステップと、

(b) (i) 該ポリペプチド構造モチーフとの適合性を有するポリペプチドスカフォールド用の標的三次元トポロジー、および (ii) 該ポリペプチド構造モチーフに置き換えられるべき該標的三次元トポロジーの領域、を定義するステップと、

(c) 該ポリペプチド構造モチーフの原子座標の終点から延長ポリペプチド鎖を成長させるステップと、

(d) 該ポリペプチド構造モチーフの主鎖二面角を固定状態に維持しながら延長ポリペプチド鎖をフォールディングするステップと、 40

(e) 標的三次元トポロジーに対するポリペプチド主鎖の根平均二乗偏差 (rmsd) のユーザ定義の閾値を満たすフォールディングされたポリペプチド鎖を、対象とするポリペプチドスカフォールドとして同定するステップと
を含みうる。

【0055】

開示されたコンピュータ計算方法は、任意の適切なコンピュータデバイス、例えば、限定するものではないが、サーバコンピュータ、パーソナルコンピュータ、およびモバイルコンピュータのうち少なくともいずれかによって実行されうる。

【0056】

開示されたコンピュータ計算方法によって設計されたポリペプチドスカフォールドは、 50

例えば、エピトープの立体配座の安定化および免疫系への提示を促進するために使用される。この方法論（本明細書中ではフォールド・フロム・ループス（Fold From Loops（FFL））と呼ばれる）の出発点は、タンパク質への機能性付与を担う構造モチーフおよび該機能性モチーフ周辺でフォールディングされるべき標的トポロジである（図1）。FFL手法の実際的な取り組みは2点すなわち：（1）in silicoのフォールディング段階により、機能性モチーフの正確な立体配座を安定させるためのスカフォールド全体の構造および配列の最適化が可能となること；ならびに（2）標的トポロジについて、該戦略が天然に存在するフォールディング構造または自然界で未だ確認されていないフォールディング構造のいずれをも利用することができること、である。該方法は、以下により詳細に議論されるように、RSV広域中和エピトープ周辺の3ヘリックス束トポロジをフォールディングかつ設計するために適用されてもよい。

10

【0057】

ポリペプチド構造モチーフは、任意の機能性ポリペプチドセグメントまたはドメイン、例えば、タンパク質結合部位、酵素活性部位、小分子結合部位、DNAもしくはRNA結合部位などであってよいが、これらに限定されない。同様に、該構造モチーフは、フォールディング核として使用される連続的構造モチーフ（単一のアミノ酸セグメント）であってもよいし、特定の三次元形状で提示される複数（すなわち2つ以上）の不連続セグメントを含むこともできる。

【0058】

フォールディング核として使用されるべきポリペプチド構造モチーフを定義するステップの特徴は、様々な形態をとりうる。一例において、コンピュータデバイスは、ユーザにより入力されたデータ、ローカルデータ保存記憶装置および遠隔データ保存記憶装置のうち少なくともいずれかから取得されたデータ、および、別のコンピュータデバイスから受信されたデータのうち少なくともいずれかに基づいて、ポリペプチド構造モチーフを定義することができる。その他の例も同様に可能である。

20

【0059】

ポリペプチド構造モチーフとの適合性を有するポリペプチドスカフォールド用の標的三次元トポロジ、およびポリペプチド構造モチーフに置き換えられるべき標的三次元トポロジの領域を定義するステップの特徴も、様々な形態をとりうる。一例において、コンピュータデバイスは、ユーザにより入力されたデータ、ローカルデータ保存記憶装置および遠隔データ保存記憶装置のうち少なくともいずれかから取得されたデータ、および、別のコンピュータデバイスから受信されたデータのうち少なくともいずれかに基づいて、標的三次元トポロジおよび置き換えられるべき領域を定義することができる。同じく、標的三次元トポロジの基になるデータは様々な形態をとりうる。例えば、このデータは、意図される用途について任意の適切な特徴、例えば、限定するものではないが、（i）原子座標に関する構造モチーフとの既存の三次元的類似性、（ii）二次構造に関する構造モチーフとの既存の類似性、および/または（iii）同様の距離だけ隔てられるように意図された、モチーフの終点間の距離およびトポロジ中の残基間の距離の比較、を示すことができる。その他の例も同様に可能である。

30

【0060】

コンピュータデバイスはさらに、標的三次元トポロジを定義する際に様々な制約を考慮に入れることができる。例えば、コンピュータデバイスは、既知構造のタンパク質またはモデル由来の構造フラグメントを考慮することができ、その構造フラグメントは主鎖二面角情報を含み、かつ配列および二次構造のうち少なくともいずれかの類似性に基づき標的トポロジと一致するものとして選択される。特に、コンピュータデバイスは、これらのフラグメントに含まれた一組の二面角をポリペプチド鎖に無作為に適用することができる。別の例として、コンピュータデバイスは、低解像度または高解像度の三次元構造から収集された距離の制約を使用して、特定の残基対の間の距離が対応する標的トポロジの距離±ユーザ定義の標準偏差以内でないポリペプチド立体配座にエネルギー的なペナルティを課すことにより、FFLフォールディング段階を誘導することができる。その他の例

40

50

も同様に可能である。

【0061】

ポリペプチド構造モチーフによって置き換えられるべき標的三次元トポロジーの定義された領域は、様々な形態をとることができる。1つの実施形態では、該領域は連続的な構造モチーフ（単一のアミノ酸セグメント）である。別の実施形態では、領域は複数（すなわち2つ以上）の不連続なセグメントを含む。

【0062】

1つの実施形態では、該方法は、延長ポリペプチド鎖を成長させるステップの前に標的三次元トポロジー由来の1つ以上の制約を決定するステップをさらに含む。上記の制約は様々な形態をとることが可能であり、例えば、限定するものではないが、 C_{α} 距離の制約、 C_{α} もしくは他の座標に関する角度もしくは二面角についての制約、トポロジーを安定化するのに重要であると思われるジスルフィド結合もしくは金属結合部位に基づいた幾何学的制約、特定の二次構造要素間の相互作用についての制約（例えば、トポロジーがいくつかのヘリックスを有する場合の、どのヘリックスが他のどのヘリックスと対になるべきかについての制約、および、トポロジーに β シートが存在する場合の、どの β ストランドが β シート中の他のどの β ストランドと対になるべきかについての制約）、および、どの残基を埋没させるべきで、かつどれを露出させるべきかについての（例えば、フォールディング中の近接 C_{β} の数を概算することによるか、またはより正確には溶媒露出面積（accessible surface area）による）制約のうち少なくともいずれかである。1つの実施形態では、制約は標的三次元トポロジーからの C_{α} 距離の制約を決定することを含むことができる。1つの非限定的な例では、配列上の離隔が6より大きな残基の C_{α} 原子の間の距離は、結合部位が挿入されることになる範囲の外側で収集される。

【0063】

ポリペプチド構造モチーフの原子座標の終点から延長ポリペプチド鎖を成長させるステップの特徴は、さらに様々な形態をとりうる。例えば、コンピュータデバイスは、ポリペプチド構造モチーフの主鎖の座標を「フォールディング核」としての役割を果たすように使用して、延長される鎖を最初に該モチーフの終点から成長させ、その後フォールディングさせてもよい。この点で、該モチーフの正確な主鎖原子座標は、該方法全体を通じて保存されることが好ましい。コンピュータデバイスはさらに、 C_{α} 距離を抽出するためのテンプレートとして標的三次元トポロジーを使用し、その後フォールディング段階を誘導するための制約として該 C_{α} 距離を使用することもできる。1つの非限定的な実施形態では、コンピュータデバイスは、結合部位原子座標の終点から延長ポリペプチド鎖を成長させ、その結果として、ポリペプチド構造モチーフが該モチーフの元の主鎖二面角を含有するが残りのすべての残基が延長された立体配座にある、セントロイド構造がもたらされてもよい。その他の例も同様に可能である。

【0064】

ポリペプチド構造モチーフの主鎖二面角を固定状態に維持しながら延長ポリペプチド鎖をフォールディングするステップの特徴も、様々な形態をとりうる。特に、コンピュータデバイスは、この特徴を実行するために、任意の適切なフォールディングプロトコール、例えば、限定するものではないが、ROSETTA（商標）ソフトウェア・パッケージにおいて利用可能なプロトコールを使用することができる（ブラッドリー P (Bradley P)、ベイカー D (Baker D)、プロテイン (Proteins.)、2006年12月1日、第65巻、第4号、p. 922 - 9；シモンズ KT (Simons KT)、クーバーバーグ C (Kooperberg C)、ホアン E (Huang E)、ベイカー D (Baker D)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J Mol Biol.)、1997年4月25日、第268巻、第1号、p. 209 - 25；ロール CA (Rohl CA)、シュトラウス CE (Strauss CE)、ミスラ KM (Misura KM)、ベイカー D (Baker D)、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods Enzymol.)、2004年、第383巻、p. 66 - 93)。例えば、コンピュータデバイスは、低解像度エネルギー関数によって評価された低エネルギー立体配座を探索するために、フラグメント挿入に依存するROSETTA（商標）のabi

10

20

30

40

50

n i t i o プロトコルを使用することができる。任意選択で、コンピュータデバイスは、距離の制約に基づいたフォールディングプロトコルを使用することもできる。F F L プロトコルについては、既存のタンパク質由来の構造フラグメントが、配列相同性および二次構造予測によって選択された。F F L の低解像度モデルに割り当てられる配列は、標的トポロジーおよび入力された構造モチーフから得られた。

【 0 0 6 5 】

延長ポリペプチド鎖をフォールディングする間、コンピュータデバイスは、構造モチーフの主鎖二面角を「フォールディング核」として作用させるために固定状態に保持する。標的トポロジーから収集された C_{α} 距離は、立体配座サンプリングに制約を与えるために使用することができるが、 C_{α} 距離に基づいた制約は、例えば、ガウスのペナルティ関数 (Gaussian penalty function) においてより大きな標準偏差を可能にすることにより、緩めることができる。

10

【 0 0 6 6 】

該方法は2つ以上の不連続なセグメントを備えた不連続の構造モチーフと共に使用可能であるので、ポリペプチド構造モチーフ内の主鎖二面角を固定することに加えて、該方法は、構造モチーフ内のセグメントの空間的配置を固定することをさらに含むこともできる。

【 0 0 6 7 】

標的三次元トポロジーに対するポリペプチド主鎖の根平均二乗偏差 (r m s d) のユーザ定義の閾値を満たす延長ポリペプチド鎖を、対象とするポリペプチドスカフォールドとして同定するステップの特徴も、様々な形態をとりうる。例えば、コンピュータデバイスは、標的トポロジーに対するユーザ定義の閾値未満の主鎖 r m s d を備えた構造を同定することが可能であり、その後の全原子の設計段階のために選択されうる。この点で、ユーザ定義の閾値は例えば5 オングストロームであってよい。その他の例も同様に可能である。

20

【 0 0 6 8 】

好ましい実施形態では、該方法は、構造モチーフ内の元の側鎖立体配座を回復させるステップと、反復的なフォールディング設計を数サイクル (少なくとも 1、3、4、5、6、7、8、9、10 サイクルまたはそれ以上) 実施するステップとをさらに含む。この実施形態では、構造モチーフの元の側鎖立体配座のうち一部または全部が回復され、数回の反復的設計および全原子最適化の全体にわたって固定状態に保持される。構造モチーフ上のいくつかの部位は残基を他のアミノ酸に変更することが許容されうる。例えば、1つの実施形態では、構造モチーフ上の部位は、元の側鎖が機能に直接寄与しない (例えば、抗体または小分子またはDNAもしくはRNAなどの結合パートナーと直接接触せず、かつ化学反応を触媒しない) 場合、また、その部位の他の側鎖がフォールディングされたスカフォールドの他の部分と直接接触可能であり、その意味で構造モチーフの立体配座安定化およびスカフォールドの熱安定性に寄与しうる場合に、残基を20種のアミノ酸のうちの任意のものに変更することが許容されるであろう。フォールディング段階で生成されたモデルは、典型的には、構造全体にわたる局所的な主鎖最適化と対をなす数回の配列設計に供される。一般的でありかつタンパク質設計分野の当業者に良く知られているように、構造モチーフの外側の残基は20種のアミノ酸のうちいずれにも変更が許容されるが、ユーザはある部位について許容されるアミノ酸を制限することもできる。例えば、設計されるタンパク質について細胞外環境のような酸化環境での使用が意図される場合、ユーザはシステイン残基の包含を不可とすることに決めてもよい。1つの実施形態では、F F L 設計法のユーザは、全原子設計がいくつ作出されるべきかを決定することができる。例えば、合理的な数は10000であるが、より少数または多数の設計が適切な場合もある。該方法は、1つ以上のスコアフィルタ (例えば、全原子スコア、パッキング、埋没した不飽和の極性原子または他のフィルタなど) を使用するステップと、手動の検証のための望ましい (例えば、指定された基準に基づいた) 設計を選択するステップとをさらに含む。検証のための設計の数はユーザが決定することができる。例えば、ユーザは50個の設計

30

40

50

を検証することができるが、当業者であれば、ユーザによって検証される設計の数は50個より少なくても多くてもよいことを認識するであろう。

【0069】

別の実施形態では、該方法はさらに、1つ以上の構造上の特徴、例えば、必ずしも限定するものではないが、ROSETTA(商標)エネルギー、ラマチャンドラン・スコア、埋没した不飽和の主鎖原子の数、およびコアパッキングによる設計をフィルタリングするステップも含むことができる。この実施形態では、設計されたモデル(典型的には10000)の最終的なプールは上記の構造上の基準によってフィルタリングおよびランク付けされる。

【0070】

さらに別の実施形態では、該方法は、最初のトポロジーの表面残基(標的結合部位ではない)を、例えば、疎水性残基のクラスターが存在する場合に該クラスターを除去するために再設計するステップをさらに含むことができる。該方法はさらに、タンパク質コアの選択部位の構造を、例えば、過剰に存在する残基の変異、パッキングの改善、および、埋没した極性アミノ酸の除去のうち少なくともいずれかを行うために再設計するステップをさらに含むこともできる。1つの実施形態では、再設計ステップの後に全原子の最適化ステップが行われうる。いくつかの実施形態では、該方法は、エネルギー、パッキングおよび目視による検証に基づいて追加のフィルタリングステップを含むことができる。該方法は、異なるポリペプチド設計の間にアミノ酸部位の類似性を与えることができる、構造モチーフの外側のスカフォールド表面上のアミノ酸のうち一部または全部を標的トポロジーと同じように維持するステップを、さらに含むことができる。

【0071】

さらに別の実施形態では、該方法は、定義されたポリペプチド構造モチーフ、定義された標的三次元トポロジー、定義された標的三次元トポロジーの領域、同定された延長ポリペプチド鎖、1つ以上の制約、および本明細書中で議論された他の特徴のいずれかのうち少なくともいずれかを表すデータを格納するステップをさらに含むことができる。さらに、該方法は、定義されたポリペプチド構造モチーフ、定義された標的三次元トポロジー、定義された標的三次元トポロジーの領域、および同定がなされたフォールディングされたポリペプチド鎖のうち少なくともいずれかを表すデータを表示するステップを含むことができる。さらになお、該方法は、別のコンピュータデバイスに、定義されたポリペプチド構造モチーフ、定義された標的三次元トポロジー、定義された標的三次元トポロジーの領域、および同定がなされたフォールディングされたポリペプチド鎖のうち少なくともいずれかを表すデータを送信するステップを含むことができる。

【0072】

開示された方法を実行するコンピュータデバイスは様々な形態をとることができる。典型的なコンピュータデバイスには、ユーザインタフェース、通信インタフェース、プロセッサ、およびデータ保存記憶装置であっていずれもシステムバス、ネットワーク、または他の接続機構を介して相互に連結されたものが含まれうる。コンピュータデバイスは同様に他の構成要素も含みうる。

【0073】

ユーザインタフェースは、ユーザのコンピュータデバイスとの対話を容易にするように構成されうる。そのため、ユーザインタフェースは、ユーザとの対話を容易にする様々な構成要素への接続性を備えるかまたは提供することができる。例えば、ユーザインタフェースは、例えばキーボード、マウス、タッチスクリーン、およびマイクロホンのうち少なくともいずれかのような入力構成要素への接続性を備えるかまたは提供することができる。別の例として、ユーザインタフェースは、例えば表示スクリーンおよびスピーカーのうち少なくともいずれか一方のような出力構成要素への接続性を備えるかまたは提供することもできる。さらに別の例として、ユーザインタフェースは、アナログ・デジタル(A-D)またはデジタル・アナログ(D-A)回路構成のような信号処理構成要素を備えてもよい。他の構成も同様に可能である。

【0074】

通信インタフェースは別のコンピュータデバイスとの通信を容易にするように構成される。この通信を容易にするために、通信インタフェースは様々な形態をとりうる。例えば、通信インタフェースは、イーサネット（登録商標）・インターフェース、シリアルバス・インタフェース（例えばFirewire、USB 2.0など）、所望のプロトコールを与える無線通信を容易にするようになされたチップセットおよびアンテナ、および、別のコンピュータデバイスとの有線通信および無線通信のうち少なくともいずれか一方を提供する任意の他のインタフェースのうち少なくともいずれかの形態をとることができる。通信インタフェースはさらに、異なる種類のインタフェースの組み合わせを含むこともできる。他の構成も同様に可能である。

10

【0075】

プロセッサは、1つ以上のプロセッサ構成要素、例えば汎用プロセッサ（例えばマイクロプロセッサ）、特定用途向きプロセッサ（例えばASICまたはDSP）、プログラマブルロジックデバイス（例えばFPGA）、または現在既知もしくは将来開発される他のプロセッサ構成要素などを含むことができる。次に、データ保存記憶装置は、1つ以上の非一時的なコンピュータ可読記憶媒体、例えば揮発性データ記憶媒体（例えば、RAM）レジスタ、およびキャッシュのうち少なくともいずれか）、または不揮発性データ記憶媒体（例えば、ROM、ハードディスクドライブ、ソリッドステートドライブ、フラッシュメモリ、光記憶装置デバイス、およびフロッピーディスクのうち少なくともいずれか）を含むことができる。いくつかの記憶媒体は、全体または一部がプロセッサと一体化していてもよい。さらに、いくつかの記憶媒体は、コンピュータデバイスへの外付け式および着脱式のうち少なくともいずれか一方であってよく、その場合、そのような記憶媒体は、様々な様式で（例えば周辺装置インタフェースおよび通信インタフェースのうち少なくともいずれか一方を介して）コンピュータデバイスと連動することができる。データ保存記憶装置は（i）プログラム論理および（ii）プログラムデータを含み、これらはデータ保存記憶装置内に別々に維持されてもよいし、一緒に維持されてもよい。

20

【0076】

プログラム論理は、好ましくは、開示されたポリペプチドスカフォールド設計方法に従って機能を実行するための、プロセッサのような処理装置により実行可能であり、かつ／または説明可能である機械語命令を含む。次に、プログラムデータは、開示されたポリペプチドスカフォールド設計方法に関連してプロセッサにより使用されうるデータ、例えば、定義されたポリペプチド構造モチーフ、定義された標的三次元トポロジー、定義された標的三次元トポロジーの領域、同定がなされたフォールディングされたポリペプチド鎖、1つ以上の制約、およびユーザ定義の閾値のうち少なくともいずれかを表すデータを含むことができる。

30

【0077】

該方法は、最初のトポロジーの表面残基（標的結合部位ではない）を、例えば、疎水性残基のクラスターが存在する場合に該クラスターを除去するために再設計するステップをさらに含むことができる。該方法はさらに、タンパク質コア中の選択部位の構造を、例えば、過剰に存在する残基の変異、パッキングの改善、および、埋没した極性アミノ酸の除去のうち少なくともいずれかを行うために再設計するステップをさらに含むこともできる。1つの実施形態では、再設計ステップの後に全原子の最適化ステップが行われうる。いくつかの実施形態では、該方法は、エネルギー、パッキングおよび目視による検証に基づいて追加のフィルタリングステップを含むことができる。

40

【0078】

別の態様では、本発明は、コンピュータデバイスに本発明のコンピュータ計算方法を実行させるための命令一式を含む、非一時的な機械可読記憶媒体を提供する。この態様では、本発明は、ポリペプチドスカフォールドを設計するための自動化されたコンピュータ計算方法のステップをプロセッサに実行させるための命令を含む、機械可読記憶媒体を提供する。本明細書中で使用されるように、用語「コンピュータ可読記憶媒体」には、磁気デ

50

ィスク、光ディスク、有機メモリ、およびCPUにより読取可能な任意の他の揮発性（例えばランダムアクセスメモリ（「RAM」））または不揮発性（例えば読み出し専用メモリ（「ROM」））の大容量記憶システムが含まれる。コンピュータ可読媒体には、協調型（cooperating）または相互接続型（interconnected）のコンピュータ可読媒体が含まれ、該媒体は該処理システムにのみ存在してもよいし、該処理システムに対してローカル接続な場合も遠隔接続な場合もある多数の相互接続型処理システムの中に分布してもよい。

【0079】

本明細書中で引用された参考文献はすべて、参照により組込まれる。本開示の態様は、必要な場合には、本開示のさらに別の実施形態を提供するために、上記参考文献および出願のシステム、機能および概念を使用するための修正がなされることも可能である。上記およびその他の変更は、詳細な説明を考慮して本開示に対して行うことができる。

10

【0080】

本開示の実施形態についての説明は、網羅的であることも、本開示内容を開示された正確な形態に限定するようにも意図されない。本開示の特定の実施形態、および本開示の実施例は、例示目的で本明細書中に記載されているが、当業者であれば認識するように、様々な等価な修正が本開示の範囲内で可能である。

【0081】

先述の実施形態のうちいずれの特定の要素も、組み合わせられてもよいし、または他の実施形態の要素の代替とされてもよい。更に、本開示のある実施形態に伴う利点はこれらの実施形態に関連して記載されているが、他の実施形態がそのような利点を示すことも可能であり、また本開示の範囲内にあるためにすべての実施形態が必ずそのような利点を示す必要があるとも限らない。

20

【0082】

実施例 1

フォールド・フロム・ループス（Fold From Loops）

FFLプロトコールはROSETTA（商標）ソフトウェア・パッケージに実装された。FFLプロトコールは、始動時の入力として構造モチーフおよびフォールディングされるべき標的トポロジーのpdbファイルを必要とする（図1）。ここでは、入力された構造モチーフは、モタビズマブのFab部分との複合体で結晶化されたRSVペプチド-エピトープであった（PDBid 3IXT）。3ヘリックス束の標的トポロジーは、次の基準すなわち：ヘリックス束にヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフが存在すること；テンプレートの標的トポロジーとして使用されるタンパク質の熱安定性が高いこと、に基づいて選択された。FFLプロトコールは2つの主要な段階すなわち：I）大規模な立体配座サンプリングを用いる低解像度段階と、II）配列設計および限定された立体配座サンプリングの反復を用いる全原子の段階とに分けられる。

30

【0083】

低解像度の立体配座サンプリング

延長ポリペプチド鎖を入力モチーフの終点に付加し、残基の総数をテンプレートトポロジーの残基総数と一致させた。入力モチーフが挿入されるトポロジーの残基はループ・ファイルを通じて定義され、入力モチーフの位置から、付加するポリペプチド鎖の長さが決定された。この低解像度段階では、ポリペプチド鎖の表現は粗雑であり、主鎖の原子のみが明示的に表現され、側鎖は球体として表現された。

40

【0084】

この段階で行われた立体配座サンプリングは、Rosetta（商標）abinitio型プロトコールで実施された。abinitioプロトコールは、一連の大量の既知タンパク質構造から抽出されたフラグメントの挿入を利用する。使用されたフラグメントは、提供された配列およびその二次構造予測によってフラグメント・ライブラリーを構築するプログラムNNMAKE（商標）を用いて収集された。ここで記載される設計作業については、フラグメントはテンプレートの配列に由来するものであった。

50

【0085】

任意選択で、フォールディング軌道を標的トポロジーの軌道に類似した構造物となるようにバイアスするために、標的トポロジーからC α 制約が抽出され[ロール(Rohl)ら、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、2004年、第383巻]、スコアリング項(scoring term)として全体的なスコアリング関数(scoring function)に組み込まれた。距離制約を組み込むRosetta(商標)フォールディングプロトコールは、ロール(Rohl)らによって既に説明されている。残基間の距離は、配列上の離隔が6より大きい場合、ならびにいずれの残基も5残基上流および下流を含む機能部位の範囲の外側にある場合に、収集された。ここで記載された設計については、テンプレートのタンパク質から抽出された各C α -C α 距離について3の標準偏差が許容された。

10

【0086】

一般に、サンプリング段階全体を通じて入力モチーフの主鎖二面角には手を付けなかったが、それにもかかわらず、アルゴリズム実装は該モチーフの終点を移動可能なものとして設定することを許容する。入力モチーフ内の上記自由度を許容すべき論理的根拠は、入力モチーフと残りのタンパク質との間の円滑な構造変換に有利に働くということである。

【0087】

全原子の配列設計および構造最適化

大きな立体配座空間が調査される低解像度段階の後、生成されたモデルは、天然のトポロジーの座標に対する該モデルのRMSDに従ってフィルタリングされた。ここでは、5のRMSD閾値が使用されて、標的トポロジーと構造的に近いモデルが配列設計段階に移され、モデルが規定の閾値を上回る場合、該モデルは自動的に廃棄された。入力モチーフ由来の元の側鎖立体配座が回復され、全原子段階の全体にわたって固定された。

20

【0088】

初期設定により、配列設計段階では、入力された機能モチーフを除いたモデルのすべての残基において19個のアミノ酸(システインは除外)が許容された。システインの除外は必須ではない。一般に、ジスルフィド結合が設計されている場合を除いてシステインは免疫原の設計には使用されないが、これは、免疫原が酸化性の細胞外環境を対象としており、従って細胞外環境において対をなしていないシステインは他のシステインと対をなすことによりジスルフィドを形成しやすいからである。細胞内での適用に関するタンパク質設計については、対をなしていないシステインは完全に許容可能である。この段階でも、特定の残基部位において許容されるアミノ酸が何であるかをより詳細に管理するために追加のオプションが行われた。ここで説明されたFFL設計では、入力モチーフのいくつかの部位は抗体接触面の一部ではなく、したがってタンパク質コアの一部を構成したが、いくつかのシミュレーションでは、この接触をなさない側鎖については変更が許容された。

30

【0089】

配列設計の各ステップの後、局所の立体配座空間の調査を確実にしながら全原子の精密化(緩和(relax))のステップが実施された。この緩和プロトコールは、小さな主鎖の摂動と、側鎖の再パッキングと、エネルギーの最小化とを1ラウンドとした数ラウンドで構成されている。

40

【0090】

反復的な配列設計および構造の最小化のサイクルは、3回繰り返された。サイクル数はユーザにより調整可能である。

設計の選択

品質フィルタ

典型的には10,000個の設計物が各FFLの実行によって生成され、適用される最初のフィルタはRosetta(商標)全原子エネルギーに基づき、Rosetta Energy(商標)による最良の50個の設計についてさらに検討がなされた。次に、最良の構造的特徴を備えた設計物を選択するために複合フィルタが適用された。検討された構

50

造的特徴は、R o s e t t a (商 標) において実装されるようなラムチャンドラン・スコア；水素結合に関与しない埋没した極性原子の数；および、R o s e t t a H o l e s (商 標) アルゴリズムによるコアパッキング判定であった。この3つの特徴による上位25個以内の設計モデルが次の段階に移行された。

【0091】

いくつかの設計は、モデルの幾何学的特性、特にヘリックスの屈曲角度に基づいて選択された。ヘリックス束を構成する各ヘリックスの屈曲角度の統計量は、ソフトウェアH e l l a n a l (商 標) を用いて収集された。最も小さい平均屈曲角度を備えた束が次の段階のために選択された。

【0092】

10

F F L 後の設計

R o s e t t a (商 標) エネルギー関数の長期にわたり認識されてきた問題点は、周知のとおり溶媒に曝露される残基を正確に設計する能力がないことであり、考えられる原因の1つは適切な静電学的パラメータ化の不在に関係している。この既知の問題点を回避するために、F F L 後の設計の第1のステップでは、溶媒に曝露される部位にテンプレートトポロジーとして使用されるタンパク質の残基と同一の残基を定めた。

【0093】

次に、手動設計および全原子精密化のステップが、コアパッキングの瑕疵を修正してコアから極性アミノ酸を取り除くために使用された。手動設計は、設計物のコア内における極性残基（特にヒスチジン）の存在；ならびに、テンプレートトポロジーと比較してアラニンが過剰でありかつバリンが不足している自動段階直後の設計を修正するために実施される。アラニンの高頻出は、所定の主鎖二面角におけるあるアミノ酸を見出す確率を表すエネルギー項（ラムチャンドラン項（Ramachandran term））に関係している可能性がある。多くがヘリックス状であるF F L タンパク質を前提とすると、ラムチャンドラン項はアラニンの存在を好み、バリンまたはβ分岐側鎖を備えたアミノ酸の存在を嫌うことになる。別の潜在的な有力要因は、部位によってはアラニンより大きなアミノ酸に適合することを許容できない可能性のあるヘリックスの基端側の配置構成である。

20

【0094】

反復的な設計手順の性質を考慮すると、生成されるモデルはコア内の突然変異に対して極めて許容度が低かった。従って、手動の設計段階では、突然変異により立体化学的衝突が導入され、全原子のエネルギーの正確な評価には精密化ステップが必要であった。精密化は実施された手動の突然変異に対するフィルタリングステップとしての役割も果たした。その理由は、所与の1つまたは一連の突然変異が、局所のヘリックス構造に大きな歪みを引き起こすことなく全原子のエネルギーが著しく回復する場合にのみ許容されたためである。実験的特性解析のために選択された設計物のうち1つ（F F L _ 0 0 1）は、コア内で実施される手動の変更を伴わない純粋なF F L 設計物であった。このポリペプチドは熱力学的に安定であり、対象とする抗体に高い親和性で結合した。

30

【0095】

実験的特性解析のために選択された設計物は、相互に比較すると6～48個の突然変異がある点で異なっていた。元のテンプレートの配列と比較すると、設計物は51～59個の突然変異を示した。F F L 設計物および元のテンプレートの配列の配列アラインメントを図3に示す。

40

【0096】

設計されたモデル内の主鎖 r m s d は 0 . 5 3 ~ 3 . 0 6 であり、設計物を当初のテンプレートの座標と比較した場合は 1 . 8 3 ~ 2 . 9 1 であった。

設計の最小化

F F L 設計物の大きさをさらに縮小するために、m o t a エピトープと接触しないタンパク質セグメントが除去された。

【0097】

実験方法

50

発現および精製

非標識タンパク質

スカフォールド構築物をコードするDNAセグメントは、コドン使用を最適化してRNA構築物(コドン・デバイス(Codon Devices)、ジェンスクリプト社(Genscript Corp.))を用いて合成され、pET29(イー・エム・ディー・バイオサイエンシズ(EMD Biosciences))にサブクロニングされ、ArcticExpress(商標)大腸菌(インビトロジェン(Invitrogen))の形質転換に用いられた。単一コロニーは、10 mLのルリア・ブロス(LB)+カナマイシン(100 mg/mL)中にて37 で一晩増殖させた。このスタータカルチャーが1 LのLB+カナマイシンへと拡大され、37 でインキュベートされた。細胞が対数増殖期に達した時、250 μ MのIPTGを培養物に添加してタンパク質発現を誘導し、次いで細胞を12 で一晩インキュベートした。その後、培養物をペレット化してスタートバッファー(160 mMイミダゾール、4 M塩化ナトリウム、160 mMリン酸ナトリウム)中に再懸濁し、プロテアーゼ阻害剤タブレット(ノバジェン(Novagen))を添加して該細胞懸濁液を-20 で冷凍した。

【0098】

細胞懸濁液を解凍し、細胞を溶解するために10 mLの10×Bugbuster(商標)(ノバジェン(Novagen))、50 μ LのBenzonase(登録商標)ヌクレアーゼおよび1.7 μ LのrLyszyme(ノバジェン(Novagen))を添加した。次いで該細胞懸濁液をオービタルシェーカーで20分間穏やかに転倒混和した。溶解された細胞をペレット化し、上清を0.22 μ mのフィルタ(ミリポア(Millipore))を通して過した。上清を、5 mLのNi++Sepharose(登録商標)6 Fast Flow(ジー・イー・ヘルスケア(GE Healthcare))とともに4 で1時間転倒混和した。樹脂を30 mLの洗浄バッファー(50 mMイミダゾール、500 mM塩化ナトリウムおよび160 mMリン酸ナトリウム)で3回洗浄し、20 mLの溶出バッファー(250 mMイミダゾール、500 mM塩化ナトリウムおよび20 mMリン酸ナトリウム)で溶出させた。対象とする構築物を含有するフラクションを合わせ、Superdex(登録商標)75 16/60(ジー・イー・ヘルスケア(GE Healthcare))における分離用サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によりHBS中で室温にてさらに精製した。収集されたフラクションを4~12%SDS変性ゲル(インビトロジェン(Invitrogen))で分析し、陽性のフラクションを合わせて限外濾過(Vivaspin(登録商標)、バイオエクスプレス(Bioexpress))により濃縮した。280 nmにおけるUV吸収シグナルを測定(Nanodrop(商標))し、理論上の吸光係数から計算することによりタンパク質濃度が決定された。迅速かつ正確なタンパク質量を容易にするために、一次配列中にトリプトファンを含まないすべての設計物にGSW配列が付加された。

【0099】

低エンドトキシンタンパク質

免疫研究用の低エンドトキシンのタンパク質を調製するために、細菌のペレットを界面活性剤バッファー(50 mM NaH₂PO₄、500 mM NaCl、10 mMイミダゾール、0.5 mg/mLリゾチーム、0.01 mg/mL DNアーゼ、0.1% Triton(登録商標)X114)中に別途再懸濁し、また別途Ni++樹脂を、10 mMイミダゾール、50 mM NaH₂PO₄、500 mM NaCl、0.1% Triton(登録商標)X114で最初に洗浄した。

【0100】

N15 標識タンパク質

FFL__001、FFL__005、FFL__006およびFFL__007のアイソトープ標識試料を、1 g/Lの¹⁵N塩化アンモニウムを補足したMOPS最小培地で増殖させた。このスタータカルチャーは1 LのMOPSに拡大され、37 で一晩インキュベートされた。増殖を継続するために3 mLの40% ¹⁵Nグルコースを添加し、OD_λ=600に到達した時、タンパク質発現を誘導するために250 μ MのIPTGを培養物に添加し、次いで細胞を16 で一晩インキュベートした。

【 0 1 0 1 】

光散乱法

精製されたタンパク質の単分散度および分子量を、静的光散乱デバイス (miniDAWN TREOS (登録商標)、ワイアット (Wyatt)) にインライン接続された HPLC (アジレント (Agilent)、1200 系) によってさらに測定した。100 μl の 1 ~ 2 mg/mL タンパク質試料が使用され、収集データは ASTRA (商標) ソフトウェア (ワイアット (Wyatt)) で解析した。

【 0 1 0 2 】

円偏光二色性

溶液の熱安定性 (T_m) は、アビブ (Aviv) 62A DS 分光計における円偏光二色性 (CD) によって測定された。15 ~ 25 μM のタンパク質の遠紫外線波長スキャン (190 ~ 260 nm) が、1 mm 路程のキュベットで収集された。温度により誘発されたタンパク質変性が、210 nm における楕円率の変化により追跡測定された。実験は 1 ~ 99 度の温度範囲にわたって 3 分おきに 2 刻みで実施され、得られたデータは平均残基楕円率に変換されて二状態モデルにフィッティングされた。

10

【 0 1 0 3 】

NMR

NMR 試料は、25 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 7.0、および 90% H_2O / 10% D_2O 中に 500 μM の濃度で調製された。FFL_001、FFL_005、FFL_006 および FFL_007 の HSQC スペクトルは、アクティブシールドされた z - グラジエント三重共鳴 cryo - probe が装備された Bruker Avance (商標) 600 MHz NMR 分光器で記録された。スペクトルはすべて 25 °C で記録された。スペクトルは、NMR Pipe (商標) および NMR View (商標) を使用して処理された (1、2)。

20

【 0 1 0 4 】

表面プラズモン共鳴

実験はすべて、送液バッファーとして HBSEP (0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA および 0.005% (v/v) サーフアクトン P20 (Surfactant P20)) (ジー・イー・ヘルスケア (GE Healthcare)) を用いて 25 °C で Biacore 2000 (ジー・イー・ヘルスケア (GE Healthcare)) において実行された。結合解析については、200 ~ 500 レスポンスユニット (response unit: RU) のモタビズマブ IgG が、アミンで連結された 8000 ~ 9000 RU のマウス抗ヒト IgG (ヒト抗体捕捉キット (Human Antibody Capture kit)、ジー・イー・ヘルスケア (GE Healthcare)) を含有する CM5 センサチップ上に捕捉された。この表面上に、様々なタンパク質濃度の試料が流速 50 ~ 100 μl / 分にて二連で注入された。必要に応じ、流速 10 μl / 分での 3 M $MgCl_2$ の 2 回の 60 秒間注入により、表面の再生が実施された。1つのフローセルは抗ヒト IgG のみを含み、そのアナライトとの相互作用がリファレンスとして使用された。別法として、エピトープがセンサチップにアミンでカップリングされ、Motta Fab が上述と同じ流速で注入される別の様式が使用された。

30

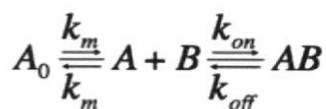
40

【 0 1 0 5 】

データの準備および解析は、Scrubber 2.0 (バイオロジック・ソフトウェア (BioLogic Software)) を使用して実施された。動態解析については、バイオセンサ・データは、マストランスポートリミテーション影響下の単純な二分子結合モデル:

【 0 1 0 6 】

【 数 1 】



50

(上記式中、 A_0 は注入されたアナライトを表す) に対してグローバルフィッティングされた。

【0107】

実施例1の結果

モタビズマブに結合したRSV Fの部位Aペプチドの構造を、スカフォールディング (scaffolding) のための標的結合部位として使用した。(図2) このペプチド構造 (PDBID: 3IXTのP鎖) はヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフであり、このことは、本発明者らが3ヘリックス束を上記スカフォールドの標的トポロジーとして選択するように導いた。PDBID: 3LHP (S鎖) の構造が特定の3ヘリックス束として選択された。FFL設計の手順の詳細は表1に示されている。FFLシミュレーションに使用される種々のパラメータおよびフィルタリング基準が概説されている。手動での介入段階も、実施されるコア突然変異の数、設計物の初期のRosettaエネルギーならびに突然変異および全原子精密化ステップ後のRosettaエネルギーに関連して概説されている。

10

【0108】

【表1】

設計物	コンピュータ計算 アルゴリズム		フィルタリング		手動介入		
	SD (Å) ^a	BS 設計 ^b	エネルギー + 複合フィルタ	ヘリックス の屈曲 ^c	Rosetta エネルギー	突然変異	Rosetta エネルギー (緩和 後) ^d
FFL_001	1.5	×	✓	×	-	-	-
FFL_002	3.0	✓	✓	×	-289	10	-276
FFL_003	3.0	✓	✓	×	-286	4	-293
FFL_004	3.0	✓	✓	×	-285	7	-291
FFL_005	1.5	✓	×	✓	-292	11	-287
FFL_006	3.0	✓	✓	×	-291	3	-290
FFL_007	1.5	✓	×	✓	-293	11	-285
FFL_008	1.5	✓	×	✓	-293	8	-286

20

30

表1

^a SD - 標的トポロジーに由来する制約に対して許容された標準偏差

40

^b BS - 抗体と直接接触しない部位の結合部位設計

^c Helical に実装されるようなヘリックス屈曲角度に基づいたフィルタリング基準

^d 突然変異が実施され、および全原子最適化のステップ後のRosettaエネルギー

7個のスカフォールドがフォールド・フロム・ループス (Fold From Loops) 法を使用して設計され (表2)、該スカフォールドの配列は、3LHP由来のテンプレートの3ヘリックス束「T93」の配列と共に図3に示されている。

【0109】

【表 2】

R S V Fタンパク質の部位Aエピトープについてのタンパク質スカフォールド

タンパク質スカフォールド	参照番号
RSVF_siteA_001	FFL 001 (配列番号 4)
RSVF_siteA_002	FFL 002 (配列番号 5)
RSVF_siteA_003	FFL 003 (配列番号 10)
RSVF_siteA_004	FFL 004 (配列番号 6)
RSVF_siteA_005	FFL 005 (配列番号 7)
RSVF_siteA_006	FFL 006 (配列番号 8)
RSVF_siteA_007	FFL 007 (配列番号 9)
RSVF_siteA_008	FFL 008 (配列番号 12)

10

20

設計された配列は互いに 8 ~ 42 個の突然変異で異なっている。コンピュータ計算モデルの構造多様性は互いに 0.53 ~ 3.06 の間で異なっている。

【0110】

発現および溶解度を評価するために、組換えタンパク質を大腸菌で発現させた。これら 7 個の設計バリエーションは可溶性であり、金属親和性クロマトグラフィー (Ni⁺⁺) およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) のステップを通じて精製可能であり、発現収量は 3 ~ 5 mg L⁻¹ の範囲であった。溶液中でのオリゴマー化状態を評価するために、7 個の可溶性設計物を SEC および静的光散乱法によって解析した (図 4)。6 個の設計物は単分散であり、モノマータンパク質に相当するみかけの分子量を示す (約 15 kDa)。設計された分子のフォールディングおよび熱安定性を評価するために、本発明者らは円偏光二色性分光法 (CD) を実施した (図 5)。6 個のモノマー設計物は、適切にフォールディングされたヘリックス状タンパク質の典型的な CD スペクトルを示した。温度誘発性の変性後の CD から、設計物の安定性が 48 から 100 超まで及ぶことが示された (表 3)。機能部位 (motA エピトープ) が忠実に再形成されたか否かを試験するために、表面プラズモン共鳴 (SPR) 実験によって結合親和性が評価された (図 6)。結合定数 (K_D) は 30 ~ 652 pM の範囲内であった。(表 3 を参照) スカフォールドは biacore チップにカップリングされ、モタビズマブがアナライトとして使用された。結合相互作用は、RSV に関して同じ効果を有することが以前に報告されているエピトープ領域 (K28E) の点突然変異によって容易に阻止され、したがって、結合特異性がエピトープを対象にしていることが示された (図 7)。

30

40

【0111】

最良の FFL 設計物により示された親和性は、ペプチドエピトープについて過去に公表された K_D (200 nM) をおよそ 7000 倍上回る向上に相当する。最近では、他の異種スカフォールドに RSV エピトープを移植するため側鎖グラフト戦略が利用された (マクレラン (McLellan) ら、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.)、2011 年、第 409 巻、p. 853 - 866)。その研究では、親和性の最も高い設計物は motA 抗体に対して 60 nM の K_D を示した。したがって、FFL 設計物は、マクレランらの結果をおよそ 2000 倍上回る K_D を有していた。

【0112】

設計された分子の溶液挙動および構造特性のオルトゴナル (orthogonal) な特性解析を

50

得るために、 ^1H - ^{15}N 異核種単一量子コヒーレンス (H S Q C) スペクトルが収集された。これらのスペクトルは、明確に画成された球状の折りたたみ構造 (図示せず) を備えたタンパク質に典型的な良好なピーク分散を示した。本発明者らのコンピュータ計算設計の精度をさらに評価するために、F F L _ 0 0 5 の X 線構造が解明された。コンピュータ計算モデルおよび F F L _ 0 0 5 の結晶構造 (図示せず) はほぼ一致しており (主鎖原子に関して $1.7 \text{ \AA}$ r m s d)、所望の構造モチーフおよび三次元構造を備えたポリペプチドを設計するためのコンピュータ計算方法の妥当性を実証していた。更に、F F L _ 0 0 5 の結晶構造内の M o t a エピトープの立体配座は、 $0.5 \text{ \AA}$ の r m s d を備えた P D B : 3 i x t 由来の M o t a 結合ペプチドの立体配座と一致し、F F L 法がフォールディング核として使用される構造モチーフの立体配座を安定化することができるという主張が支持された。

10

【0113】

これらの研究は、分子の機能部分と熱力学的安定性とを同時に最適化するために i n s i l i c o のフォールディングプロセスと配列設計とをカップリングすることによる、新規な機能タンパク質作出の成功を実証している。記載されたコンピュータ計算戦略は一般的であって融通性を有し、よって標的トポロジーが天然に存在するタンパク質であることは必要とされず、簡単に算出できるトポロジーを機能性タンパク質の設計に使用することも可能となっている。機能部位の構造の複雑さに関して、F F L アルゴリズムは、天然に存在するタンパク質の機能部位において通常必要とされる複数の主鎖セグメントによって構成された非連続的モチーフを処理するように適合されている。これらの結果は、機能タンパク質のコンピュータ設計および既存のタンパク質構造の潜在的テンプレートとしての使用について幅広い影響力を有する。

20

【0114】

【表3】

F F L 設計物の M o t a 結合親和性および熱安定性。結合親和性は S P R により、熱安定性は C D 分光法により評価された。

分子	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	SPR		
		k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{off}/k_{on} (pM)
FFL_001	75	3.99×10^6	1.19×10^{-4}	29.98
FFL_002	48	1.56×10^6	7.34×10^{-4}	469.9
FFL_004	>85	1.05×10^6	8.32×10^{-4}	795
FFL_005	>100	2.97×10^6	2.09×10^{-4}	70.3
FFL_006	>85	3.57×10^6	2.32×10^{-4}	651.9
FFL_007	>85	1.45×10^6	1.36×10^{-4}	94.1

30

実施例 2

エピトープに対する免疫応答を向上させるために、F F L _ 0 0 1 スカフォールドは H e p B c A g 粒子の表面にコンジュゲートされた。該スカフォールドは、スカフォールド中のエピトープに対向する端部に遺伝子工学的に導入されたシステインと、H e p B c A g の主要な免疫優性領域の先端上に遺伝子工学的に導入されたリジンの間のヘテロ二機能性の架橋剤を介してコンジュゲートされた。これにより、該スカフォールドは、エピトープがコンジュゲート粒子の径方向に外側の面に露出するように配向された。

40

【0115】

細菌における高発現をもたらし、かつ 2 4 0 個の H e p B c A g モノマーを備えた大きな $T = 4$ 粒子を優勢とする構築物である H B c A g 残基 1 ~ 1 4 9 由来の粒子 (ズロトニック (Zlotnick) ら、1 9 9 6 年; ウィン (Wynne) ら、1 9 9 9 年) が、大腸菌で発現されて標準的なショ糖勾配法によって精製された。モノマーの F F L 免疫原の化学的カップリングについては、純粋なリジンで官能化された H B c A g (1 - 1 4 9) 粒子が、標準的な技法を使用して発現および精製され、その技法ではリジン残基がサブユニットごと

50

の免疫優性スパイクの先端に遺伝子工学的に導入された。HBcAg (1-149) のWT粒子およびリジン官能化粒子はいずれも普通サイズ (30 nm) であった。(図8)

FFL__001スカフォールドおよびHepBcAgのコンジュゲーションは、10%ショ糖および1%CHAPSを使用して標準的な条件下で実行され、その結果、ショ糖勾配超遠心分離の精製フラクションについて行われたSDS-PAGEゲルの密度計測分析によれば、各HepB粒子におよそ75個のFFL__001スカフォールドが取り付けられた。該FFL__001コンジュゲート粒子へのMotaの結合については、Mota IgGをセンサチップ上に捕捉し、次いでMota IgGでコーティングされた表面にFFL__001粒子を結合させることによるSPRで評価され、続いてMota Fabをアナライトとして使用し、Mota-IgGに捕捉されたFFL__001粒子へのMota Fabの結合の動態を評価した。このようにして、FFL__001コンジュゲート粒子がFFL__001モノマーと同様の高い親和性でMotaに結合することが確認された(データは示さない)。

10

【0116】

表4は、FFLスカフォールドモノマーおよびFFL__001コンジュゲートHepBcAg粒子を用いたマカク免疫実験の結果を概括している。免疫原は、「001」、「005」および「007」とラベルされたスカフォールドモノマー、ならびに「001-粒子」とラベルされたFFL__001コンジュゲートHepBcAg粒子であった。アカゲザル(1つの免疫原当たり4頭)は、筋肉内経路で0、1および2か月の時点で免疫された。動物には、Adjuplex(商標)アジュバントと混合された全体積1mLの抗原を、両腕に0.5mLずつ注入した。初回の免疫処置は合計200ugのスカフォールドを含み、その後の免疫処置は合計100ugのスカフォールドを含んでいた。「ナীব」血清は、初回免疫前の第0日に各動物から採取された。「Imm3」血清は、3回目の免疫処置の2週間後に各動物から採取された。「ナীব」および「Imm3」のいずれの血清も、1:20に希釈されて標準的なブランク減少アッセイで中和について評価された。試料はそれぞれ二連で実施された(2回の個々の実施についての計数値は「ナীব1」、「ナীব2」、「Imm3__1」および「Imm3__2」として示されている)。平均ブランク計数値「ナীব__ave」および「Imm3__ave」は2回の実施から計算された。ブランク減少率(%)は、(ナীব__ave-Imm3__ave)/ナীব__aveとして算出された。血清は組換えRSVFタンパク質へのELISA反応性についても試験された。各動物についてのエンドポイント力価が示されている。ブランク減少率(%)の数値はELISA力価との緩やかな直線相関を示し、ピアソンの係数は0.58である。

20

30

【0117】

これらのデータは、FFLスカフォールドモノマーまたはHepBcAg粒子上に提示されたFFLスカフォールドを用いたマカクの免疫がRSVF結合抗体およびRSV中和抗体の産生をもたらしうることを実証している。中和率(%) (ブランク減少率(%)) は、粒子に提示されたスカフォールドについては88%、モノマースカフォールドについては72%であった。VLPに提示されたスカフォールドについての平均ブランク減少率(%)は $51 \pm 25\%$ であり、これはいずれのモノマー試料の平均よりも高かった(モノマー試料についての最も高いブランク減少率(%)はFFL__001モノマーの $33 \pm 11\%$ である)。粒子-001をモノマー-001と比較した平均ブランク減少率(%)の差は統計的に有意ではなかった。平均RSVF ELISA力価も、最も高い力価のモノマー試料(FFL__001について 79000 ± 66000)と比較して粒子-001試料(94000 ± 20000)は高かったが、これもその差は統計的に有意ではなかった。

40

【0118】

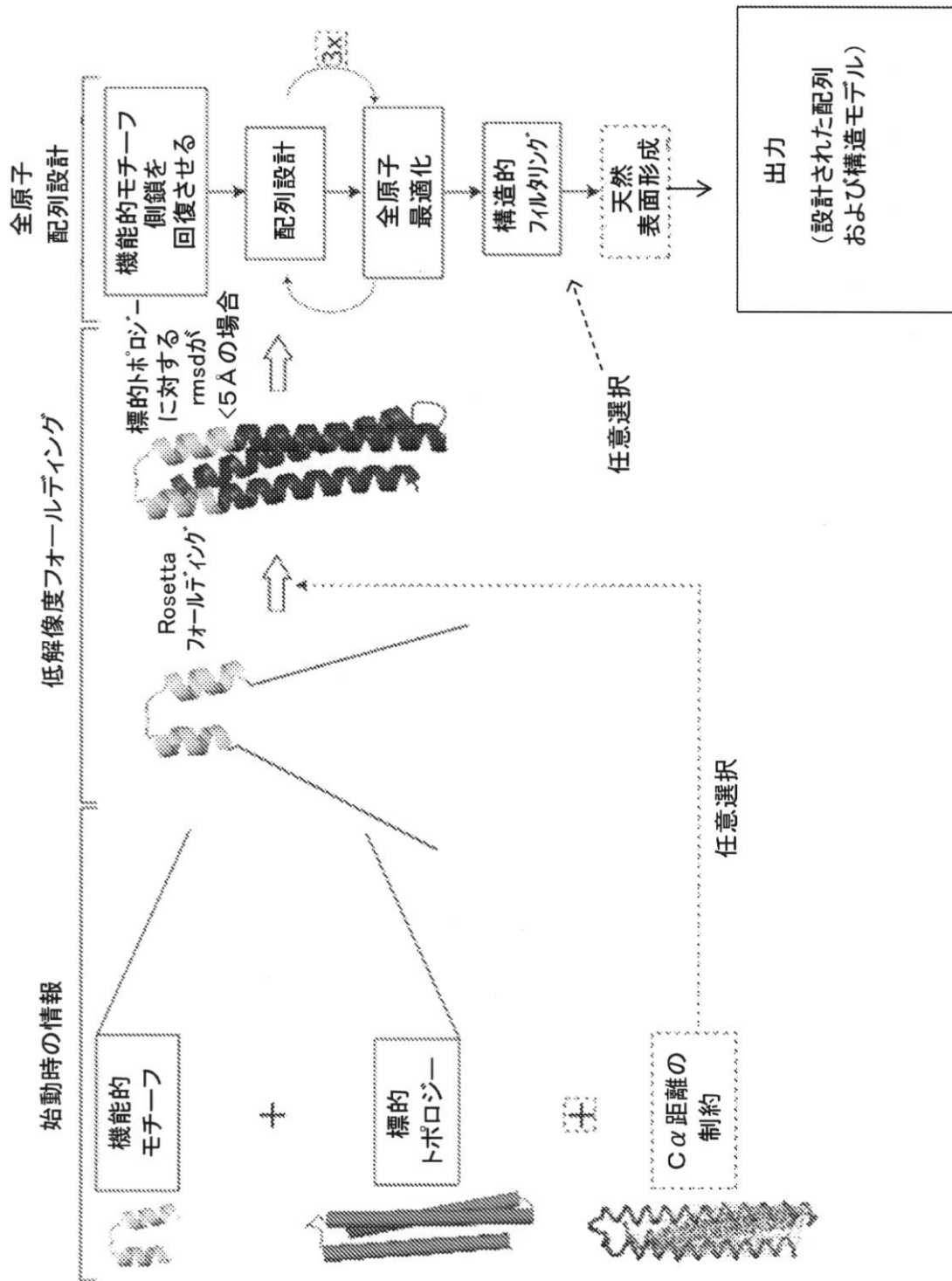
【表 4】

免疫原	NHP id	プラーク 減少率 (%)	RSVF ELISA 力価	ナイフ _ave	ナイフ 1	ナイフ 2	Imm3_ ave	Imm3_ 1	Imm3_ 2
001-粒子	D039	0.8757	120000	84.5	83	86	10.5	13	8
007	D030	0.717	110000	79.5	80	79	22.5	21	24
005	D180	0.5924	22000	78.5	72	85	32	35	29
001	C012	0.4536	170000	91.5	89	94	50	46	54
001-粒子	C004	0.4491	93000	83.5	74	93	46	50	42
001-粒子	D130	0.4207	91000	72.5	68	77	42	43	41
007	D227	0.3716	23000	91.5	84	99	57.5	57	58
007	C010	0.3709	36000	75.5	70	81	47.5	44	51
001	D027	0.3642	12000	75.5	81	70	48	46	50
001	D052	0.3243	65000	92.5	89	96	62.5	63	62
001-粒子	D184	0.3038	72000	79	72	86	55	52	58
005	D104	0.2	8500	67.5	64	71	54	54	54
001	D172	0.1954	69000	87	88	86	70	65	75
005	D190	0.1931	4800	72.5	68	77	58.5	50	67
005	D032	0.1243	9500	88.5	85	92	77.5	78	77
007	D087	0.047	15000	74.5	73	76	71	70	72

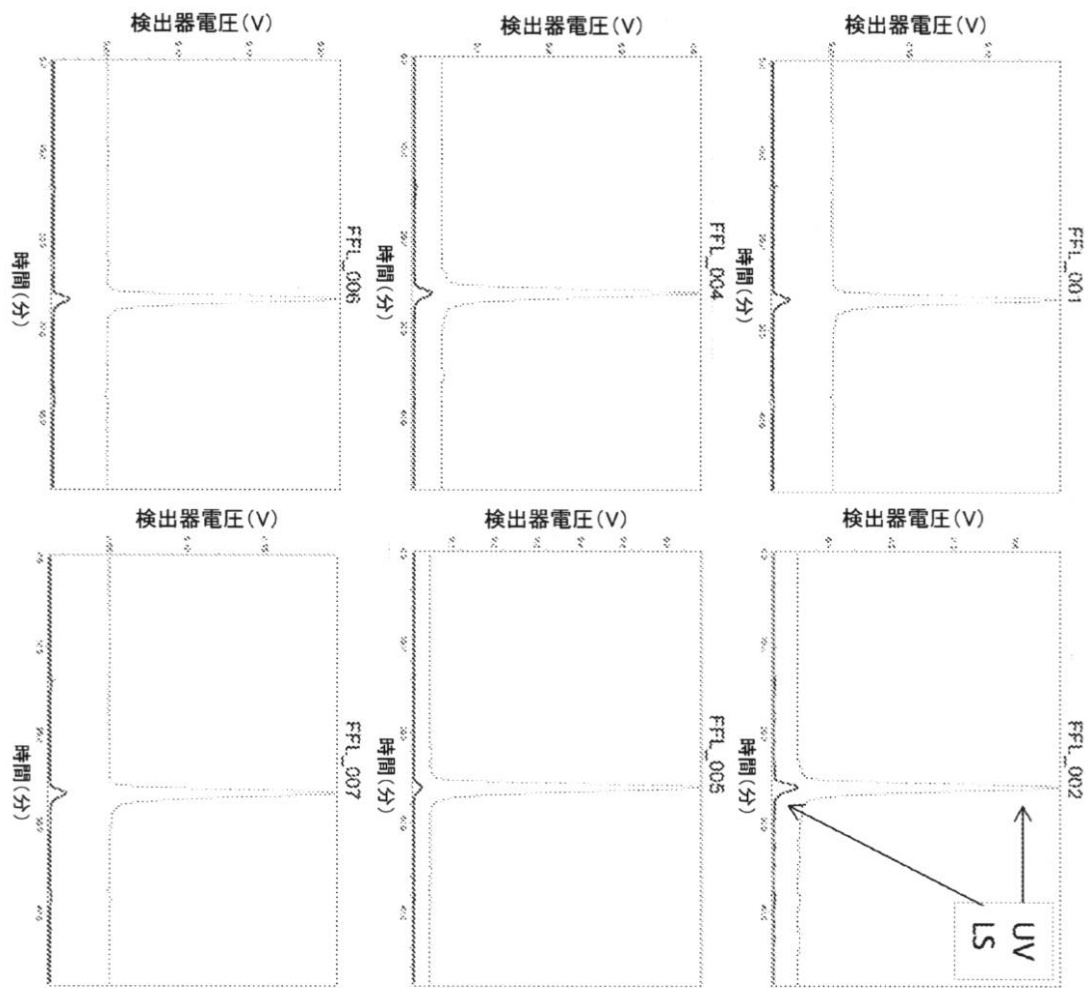
10

20

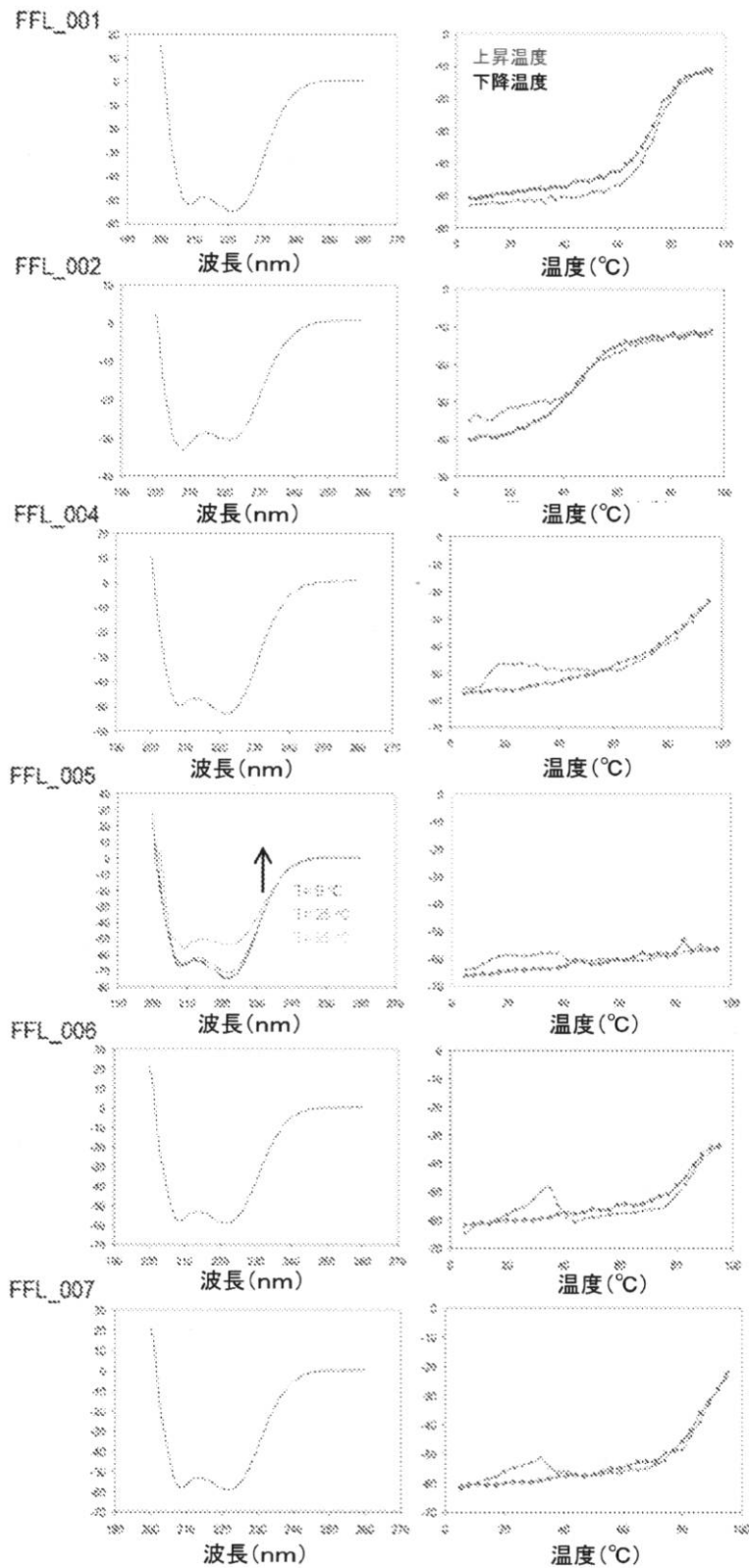
【図 1】



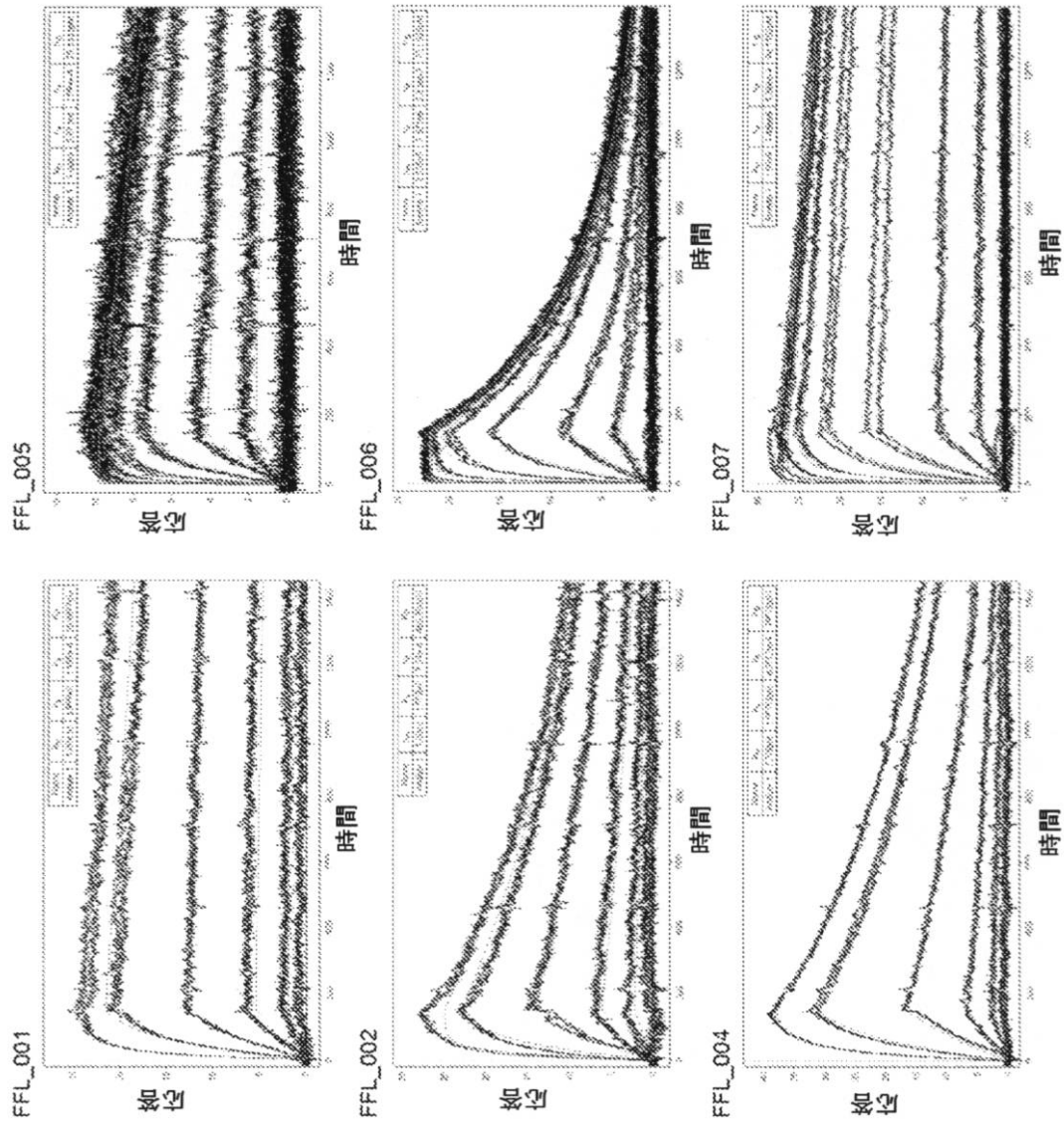
【図 4】



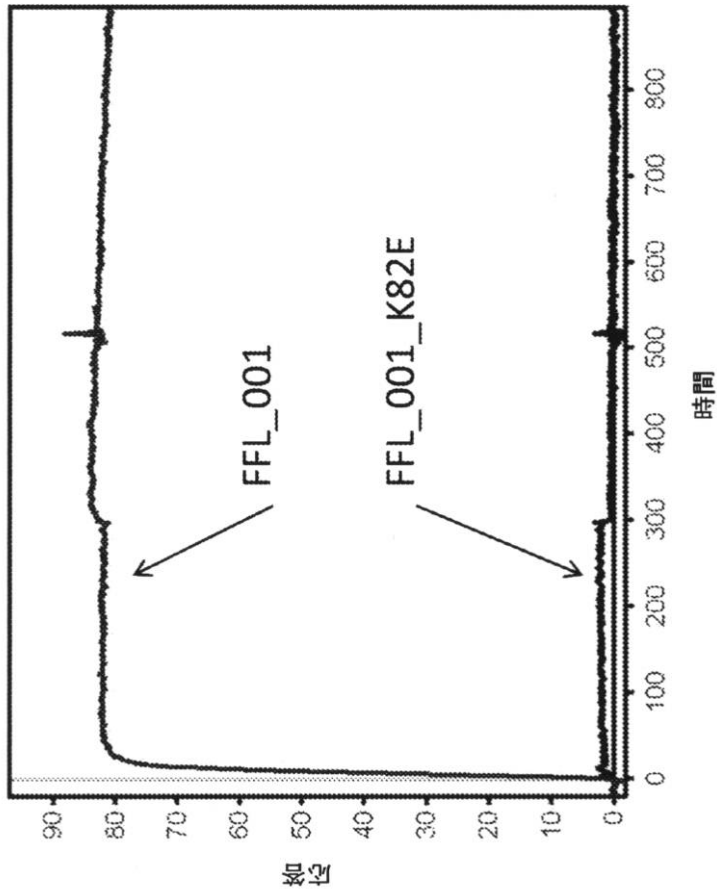
【図 5】



【図 6】



【 図 7 】



【 配列表 】

2014502143000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/055113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/435 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) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/079796 A1 (ID BIOMEDICAL CORP QUEBEC [CA]; GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BAUDOU) 2 July 2009 (2009-07-02) Examples and claims -----	1-20
A,P	JASON S. MCLELLAN ET AL: "Design and Characterization of Epitope Scaffold Immunogens That Present the Motavizumab Epitope from Respiratory Syncytial Virus", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 409, no. 5, 1 April 2011 (2011-04-01) , pages 853-66, XP055000825, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/j.jmb.2011.04.044 ----- - / -	1-20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 February 2012		Date of mailing of the international search report 27/04/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gómez Ortiz, Mariola

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/055113

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU ET AL: "Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 368, no. 3, 6 April 2007 (2007-04-06), pages 652-665, XP022020027, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2007.02.024 the whole document -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/055113

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-20

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2011/ 055113

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-20

Polypeptides comprising SEQ ID NO: 1,2,3,4-9, VLP, corresponding nucleic acid, VLP, vector, host cell, pharmaceutical compositions, methods for treating a respiratory syncytial virus RSV), detecting or producing RSV antibodies.

2. claims: 21-24

Computational method for designing a polypeptide scaffold and machine readable storage medium

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/055113

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009079796 A1	02-07-2009	AU 2008340949 A1	02-07-2009
		CA 2710600 A1	02-07-2009
		CN 101952321 A	19-01-2011
		EA 201070794 A1	28-02-2011
		EP 2222710 A1	01-09-2010
		JP 2011507533 A	10-03-2011
		KR 20100109933 A	11-10-2010
		US 2010291147 A1	18-11-2010
		WO 2009079796 A1	02-07-2009

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/08 (2006.01)	C 0 7 K 14/08	
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . F I R E W I R E

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(72)発明者 シーフ、ウィリアム アール .

アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州 エンシニータス アルリック アベニュー 1
3 5 9

(72)発明者 コレイア、ブルーノ イー .

アメリカ合衆国 9 2 1 0 9 カリフォルニア州 サン ディエゴ アゲート ストリート 9 4
7 1 / 2

(72)発明者 ベイカー、デビッド

アメリカ合衆国 9 8 1 1 2 ワシントン州 シアトル トゥエンティセカンド アベニュー イ
ースト 2 5 5 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 CA09 CA12 CA20 DA01 DA02 DA05 DA06
DA11 EA04 GA11 HA01 HA09 HA11
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90X AB01 AC14 BA02 BA14 CA24
CA44 CA45
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA21 BA23 CA53 NA14 ZB331
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA14 ZB33
4H045 AA11 AA20 AA30 CA01 EA20 FA74 GA22 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2014502143A5	公开(公告)日	2014-10-30
申请号	JP2013532945	申请日	2011-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	华盛顿通过其一分钱COMMLIZATION THE UNIV		
申请(专利权)人(译)	华盛顿通过它的中心联合金属玛西娅大学		
[标]发明人	シーフウィリアムアール コレイアブルーノイー ベイカーデビッド		
发明人	シーフ、ウィリアム アール. コレイア、ブルーノ イー. ベイカー、デビッド		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/08 C07K16/10 A61K38/00 A61P31/12 A61K48/00 A61K31/7088 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/001 A61K39/00 A61K39/12 A61K2039/552 A61K2039/55566 A61K2039/6075 C07K14/005 C12N2760/18522 C12N2760/18534 G16B15/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K14/08 C07K16/10 A61K37/02 A61P31/12 A61K48/00 A61K31/7088 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/ DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA09 4B024/HA11 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA14 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/ AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZB331 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ ZB33 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA01 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA26		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	61/390591 2010-10-06 US		
其他公开文献	JP2014502143A JP6023061B2		

摘要(译)

本发明提供了用于治疗或限制呼吸道合胞病毒感染的多肽，所述多肽的组合物，以及用于设计这种多肽的计算机计算方法。

