

(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2019-509750

(P2019-509750A)

(43) 公表日 平成31年4月11日 (2019.4.11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 7/04 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/04	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15 Z N A	4 C 0 8 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-551252 (P2018-551252)	(71) 出願人	514313764 タケダ ワクチン, インコーポレイテッド TAKEDA VACCINES, INC . アメリカ合衆国 02139 マサチュー セッツ州 ケンブリッジ シドニー スト リート 75
(86) (22) 出願日	平成29年3月28日 (2017.3.28)		
(85) 翻訳文提出日	平成30年11月28日 (2018.11.28)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/024450		
(87) 国際公開番号	W02017/172698		
(87) 国際公開日	平成29年10月5日 (2017.10.5)		
(31) 優先権主張番号	62/316,264	(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠
(32) 優先日	平成28年3月31日 (2016.3.31)	(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100142907 弁理士 本田 淳
		(74) 代理人	100152489 弁理士 中村 美樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 生弱毒化アルファウイルス構築物及び方法、ならびにそれらの使用

## (57) 【要約】

本明細書の実施形態は、蚊細胞及び蚊ベクターによる伝達の複製が不可能な生弱毒化アルファウイルスに関する。他の実施形態は、生弱毒化アルファウイルス、その構築物の生成方法、及び免疫原性組成物におけるこれらの生弱毒化アルファウイルスの使用に関する。他の実施形態は、生弱毒化アルファウイルスを含む医薬組成物、及びこれら生弱毒化ウイルスを製造するための方法に関する。さらに別の実施形態は、アルファウイルス感染に対するワクチンなどの携帯用の適用のためのキットにおけるこれらの組成物の使用、及びその方法に関する。

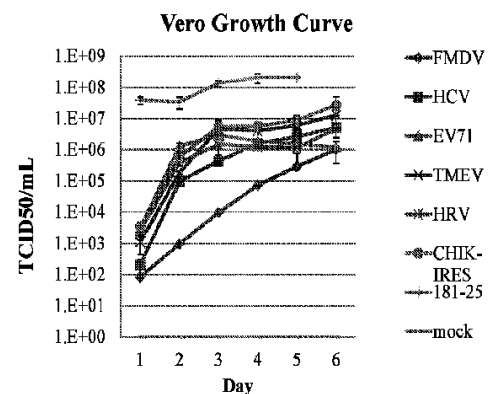


FIG. 3

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生弱毒化組換えアルファウイルスであって、  
( i ) 不活性化されたサブゲノムプロモーター、及び  
( i i ) 非構造タンパク質 4 ( n s P 4 ) コード配列の末端の 1 つと前記アルファウイルスのサブゲノム RNA コード配列の開始 A U G との間に、内部リボソーム侵入部位 ( I R E S ) の挿入を有するアルファウイルス核酸を含み、  
少なくとも 1 つのウイルス I R E S は、生存可能な弱毒化アルファウイルスを産生することができる I 型または I I 型ピコルナウイルス I R E S または他の I R E S 配列を含む前記生弱毒化組換えアルファウイルス。

10

**【請求項 2】**

前記 I R E S 配列は、エンテロウイルス I R E S、エンテロウイルス 7 1 I R E S ( E V 7 1 I R E S )、ライノウイルス I R E S、ヒトラノウイルス I R E S ( H R V I R E S )、アフトウイルス I R E S、アフトウイルス：サブタイプ：口蹄疫ウイルス ( F M D V I R E S )、テロウイルス I R E S ( T M E V I R E S )、及びフラビウイルス I R E S、フラビウイルスサブタイプ：ヘパシウイルス ( H C V I R E S ) からなる群から選択され、

前記アルファウイルスは弱毒化される、請求項 1 に記載の弱毒化アルファウイルス。

**【請求項 3】**

前記サブゲノムプロモーターは、前記非構造タンパク質 4 ( n s P 4 ) コード配列の末端とサブゲノム RNA コード配列の開始 A U G との間の前記サブゲノム RNA の 5 ' U T R の欠失により不活性化される、請求項 1 または 2 に記載の弱毒化アルファウイルス。

20

**【請求項 4】**

前記サブゲノムプロモーターは、前記アルファウイルスの非構造タンパク質 4 の前記カルボキシ末端に位置するクラスター化点突然変異によって不活性化される、請求項 1 または 2 に記載の弱毒化アルファウイルス。

**【請求項 5】**

前記生アルファウイルスは、チクングニヤウイルス ( C H I K )、オニオンニオンウイルス、ロスリバーウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、またはコロナウイルス科及びトガウイルス科の他のアルファウイルス、ベパールウイルス、マヤロウイルス、サブタイプ：ウナウイルス、オニオンニオンウイルス：サブタイプ：イボ - オラウイルス ( I g b o - O r a v i r u s )、ロスリバーウイルス：サブタイプ：ベパールウイルス、サブタイプ：ゲッタウイルス；サブタイプ：サギヤマウイルス、セムリキ森林ウイルス：サブタイプ：M e T r i ウイルスを含むセムリキ森林ウイルス複合体、及びそれらの組み合わせの 1 つ以上を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

30

**【請求項 6】**

前記クラスター化点突然変異は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5 からなる群から選択される少なくとも 1 つのポリヌクレオチド配列の 7 4 7 4、7 4 7 7、7 4 8 0、7 4 8 1、7 4 8 3、7 4 8 6、7 4 8 9、7 4 9 2、7 4 9 5、7 4 9 8、7 5 0 1、7 5 0 2、及び 7 5 0 3 の位置に 2 つ以上の点突然変異を含む同義の点突然変異である請求項 4 に記載の弱毒化アルファウイルス。

40

**【請求項 7】**

前記サブゲノムプロモーターの前記突然変異は、非構造タンパク質 4 の前記カルボキシ末端の前記アミノ酸配列を改変しない、請求項 3、4 または 6 に記載の弱毒化アルファウイルス。

**【請求項 8】**

前記アルファウイルスの前記非構造タンパク質のいずれか 1 つに適応変異をさらに含み、  
前記適応変異は、ウイルス複製、放出、及びウイルス力価の増加のために選択され得る請

50

求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項 9】

前記 I R E S は、エンテロウイルス 7 1 I R E S ( E V 7 1 I R E S ) を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項 10】

前記 I R E S は、ヒトライノウイルス I R E S ( H R V I R E S ) を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項 11】

前記 I R E S は、口蹄疫ウイルス I R E S ( F M D V I R E S ) を含む請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

10

【請求項 12】

前記 I R E S は、テロウイルス I R E S ( T M E V I R E S ) を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項 13】

前記 I R E S は、ヘパシウイルス I R E S ( H C V I R E S ) を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項 14】

前記アルファウイルスは、チクングニヤウイルスである請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項 15】

前記アルファウイルスは、東部ウマ脳炎ウイルスである請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

20

【請求項 16】

前記アルファウイルスは、ベネズエラウマ脳炎ウイルスである請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項 17】

前記アルファウイルスは、西洋ウマ脳炎ウイルスである請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項 18】

前記アルファウイルスは、蚊及び蚊細胞において複製することができない請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

30

【請求項 19】

請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の生弱毒化アルファウイルスをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の前記ベクターを含み、発現する宿主細胞。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の弱毒化組換えアルファウイルス、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 22】

前記アルファウイルスへの曝露から前記アルファウイルスへの感染の発症を減少させるために、対象において免疫応答を誘導するための、請求項 21 に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項 23】

前記対象は、ヒト、家畜、または他の飼育動物またはペットである請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】

蚊に感染することができない、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の生弱毒化組換えアルファウイルスを製造する方法であって、非構造タンパク質 4 ( n s P 4 ) コード配列の一端と前記アルファウイルスのサブゲノム

50

R N Aコード配列の開始 A U Gとの間に、  
エンテロウイルス I R E S、ライノウイルス I R E S、アフトウイルス I R E S、アフト  
ウイルス： I R E S、及びフラビウイルス I R E S からなる群から選択される内部リボソ  
ーム進入部位 ( I R E S ) をクローニングすることを含む方法。

【請求項 2 5】

前記アルファウイルスは、前記サブゲノムプロモーターを不活性化することによりさら  
に弱毒化される請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 I R E S は、 E V 7 1 I R E S を含む請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 I R E S は、 H R V I R E S を含む請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 I R E S は、 F M D V I R E S を含む請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 I R E S は、 T M E V I R E S を含む請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 I R E S は、 H C V I R E S を含む請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記生弱毒化組換えアルファウイルスは、チクングニヤウイルス ( C H I K )、オニョ  
ンニョンウイルス、ロスリバーウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウ  
イルス、西部ウマ脳炎ウイルス、またはコロナウイルス科及びトガウイルス科の他のアル  
ファウイルス、ベバールウイルス、マヤロウイルス、サブタイプ：ウナウイルス、オニョ  
ンニョンウイルス：サブタイプ：イボ - オラウイルス、ロスリバーウイルス：サブタイプ  
：ベバールウイルス、サブタイプ：ゲッタウイルス；サブタイプ：サギヤマウイルス、セ  
ムリキ森林ウイルス：サブタイプ：M e T r i ウイルスを含むセムリキ森林ウイルス複  
合体、及びそれらの組み合わせの 1 つ以上を含む請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 2】

対象においてアルファウイルスに対する免疫応答を誘導するための方法であって、

請求項 2 1 に記載の弱毒化組換えアルファウイルス組成物を前記対象に投与すること  
を含む方法。

【請求項 3 3】

前記対象は、ヒト、家畜、ペットまたは他の動物である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記生弱毒化組換えアルファウイルスは、チクングニヤウイルス ( C H I K )、オニョ  
ンニョンウイルス、ロスリバーウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウ  
イルス、西部ウマ脳炎ウイルス、またはコロナウイルス科及びトガウイルス科の他のアル  
ファウイルス、ベバールウイルス、マヤロウイルス、サブタイプ：ウナウイルス、オニョ  
ンニョンウイルス：サブタイプ：イボ - オラウイルス、ロスリバーウイルス：サブタイプ  
：ベバールウイルス、サブタイプ：ゲッタウイルス；サブタイプ：サギヤマウイルス、セ  
ムリキ森林ウイルス：サブタイプ：M e T r i ウイルスを含むセムリキ森林ウイルス複  
合体、及びそれらの組み合わせの 1 つ以上を含む、請求項 3 2 または 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

キットであって、

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの生弱毒化組換えアルファウイ  
ルス、及び  
少なくとも 1 つの容器を含む前記キット。

【請求項 3 6】

1 つ以上の安定剤を含む組成物をさらに含み、

前記組成物は、生弱毒化組換えアルファウイルスの不活性化を減少させる、請求項 3 5  
に記載のキット。

10

20

30

40

50

## 【請求項 37】

生弱毒化組換えアルファウイルスであって、

- a) エンベロープ糖タンパク質遺伝子の下流にあり、前記アルファウイルスの前記 3' UTR の上流に配置されたキャプシド遺伝子、
- b) 前記エンベロープ糖タンパク質遺伝子の 3' 末端と前記配置されたキャプシド遺伝子との間に導入された、少なくとも 1 つの IRES で、前記遺伝子は、エンベロープ糖タンパク質遺伝子、挿入 IRES、配置されたキャプシド遺伝子、及び 3' UTR として、5' から 3' に位置し、また、
- c) 前記 IRES の上流に位置する前記エンベロープ糖タンパク質遺伝子は、IRES 非依存的な様式で翻訳され、一方、前記配置されたキャプシドは IRES 依存的に翻訳され、

10

前記少なくとも 1 つのウイルス IRES は、生存可能な生弱毒化アルファウイルスを産生することができる I 型または II 型ピコルナウイルス IRES または他の IRES 配列である、生弱毒化組換えアルファウイルス。

## 【請求項 38】

前記 IRES 配列は、エンテロウイルス IRES、ライノウイルス IRES、アフトウイルス IRES、タイロウイルス IRES、及びフラビウイルス IRES からなる群より選択され、前記アルファウイルスは、弱毒化されている、請求項 1 に記載の弱毒化アルファウイルス。

20

## 【請求項 39】

前記 IRES は、エンテロウイルス 71 IRES (EV71 IRES) を含む請求項 37 または 38 に記載の弱毒化アルファウイルス。

## 【請求項 40】

前記 IRES は、ヒトライノウイルス IRES (HRV IRES) を含む、請求項 37 または 38 に記載の弱毒化アルファウイルス。

## 【請求項 41】

前記 IRES は、口蹄疫ウイルス IRES (FMDV IRES) を含む、請求項 37 または 38 に記載の弱毒化アルファウイルス。

## 【請求項 42】

請求項 37 または 38 に記載の弱毒化アルファウイルスであって、

30

前記 IRES は、タイロウイルス IRES (TMENV IRES) を含む弱毒化アルファウイルス。

## 【請求項 43】

前記 IRES は、ヘパシウイルス IRES (HCV IRES) を含む、請求項 37 または 38 に記載の弱毒化アルファウイルス。

## 【請求項 44】

前記生弱毒化組換えアルファウイルスは、チクングニヤウイルス (CHIK)、オニオンニオンウイルス、ロスリバーウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、またはコロナウイルス科及びトガウイルス科の他のアルファウイルス、ベパールウイルス、マヤロウイルス、サブタイプ：ウナウイルス、オニオンニオンウイルス：サブタイプ：イボ - オラウイルス、ロスリバーウイルス：サブタイプ：ベパールウイルス、サブタイプ：ゲッタウイルス；サブタイプ：サギヤマウイルス、セムリキ森林ウイルス：サブタイプ：Me Tr i ウイルスを含むセムリキ森林ウイルス複合体、及びそれらの組み合わせの 1 つ以上を含む、請求項 37 ~ 43 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

40

## 【請求項 45】

前記生弱毒化アルファウイルスは、チクングニヤウイルス (CHIKV) である請求項 37 ~ 43 のいずれか一項に記載の弱毒化アルファウイルス。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

50

## 【 0 0 0 1 】

## 優先権

本 P C T 出願は、2 0 1 6 年 3 月 3 1 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 3 1 6 , 2 6 4 号の利益を米国特許法第 1 1 9 条 ( e ) 下に請求するものであり、その全体は参照することによって本明細書に援用される。

## 【 0 0 0 2 】

## 発明の分野

本明細書の実施形態は、蚊細胞において複製することができず、蚊ベクターにより伝達することができない生弱毒化アルファウイルスに関する。他の実施形態は、生弱毒化アルファウイルス及びその構築物を作製する方法に関する。さらに他の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化アルファウイルスは、前記アルファウイルスによる感染に対して、免疫原性組成物を作製するために使用され得る。他の実施形態は、生弱毒化アルファウイルスを含む医薬組成物、及びこれら生弱毒化ウイルスの製造方法に関する。いくつかの実施形態は、アルファウイルス感染に対する免疫原性組成物などの携帯用の適用のためのキットにおけるこれらの組成物の使用、及びその方法に関する。本明細書に開示される特定の実施形態は、組換えアルファウイルス構築物に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 3 】

## 背景

病原性ウイルス感染から防御するためのワクチンは、ヒトの疾患の発生を減少させるために効果的に使用されてきた。ウイルスワクチンに使用される最も成功した技術の 1 つは、弱体化または弱毒化されたウイルス株 ( 「 生弱毒化ウイルス 」 ) を動物またはヒトに免疫することである。免疫後の制限された複製のために、前記弱毒化株は、それが改変されているため、宿主または他の対象において疾患を引き起こさない。しかしながら、この限定されたウイルス複製は、ウイルス抗原の完全なレパートリーを発現するのに十分であり、このようなワクチンを受ける対象において、前記ウイルスに対して強力かつ長続きする免疫応答を生成し得る。従って、前記ウイルスの病原性株へのその後の曝露時に、前記免疫された個体は、前記ウイルスによって引き起こされる疾患から保護され得る。これらの生きた弱毒化ウイルスワクチンは、公衆衛生において使用される最も成功したワクチンの一つである。

## 【 0 0 0 4 】

T o g a v i r i d a e 科の A l p h a v i r u s 属は、多数の重要なヒト及び動物の病原体を含む。これらのウイルスは、南極地域を除くすべての大陸に広く分布しており、重大な公衆衛生上の脅威になっている。アルファウイルスの大部分は、蚊によって伝達され、それらが前記宿主において生涯にわたる感染を引き起こす可能性がある。それらの血液の食事の間に蚊に感染した脊椎動物において、アルファウイルスは、新しい蚊の感染の前提条件であるウイルス血症、及び自然においてその継続的な循環に特徴付けられる、急性感染を引き起こす可能性がある。これらのウイルスに対するワクチンは限られている。

## 【 0 0 0 5 】

ワクチンにおける遺伝子組換えウイルスの使用は、蚊ベクターによって媒介される自然循環に導入され得て、蚊または脊椎動物宿主におけるウイルス血症発生の間のいずれかにおいて、長期間の複製の間にさらなる進化を示し得るという健康上の懸念がある。従って、ワクチンにおいて使用の生存するウイルス株の新世代を設計するには、蚊などのベクターによって広がることができない弱毒化ウイルスを作製することが重要である。

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 6 】

本明細書の実施形態は、蚊細胞において複製することができず、蚊ベクターによって伝達することができない生弱毒化アルファウイルスに関する。他の実施形態は、生弱毒化アルファウイルスの作製方法、その構築物、及び免疫原性組成物におけるこれらの生弱毒化アルファウイルスの使用に関する。他の実施形態は、本明細書に開示される前記生弱毒化

アルファウイルスを含み得る医薬組成物、及びこれらの医薬組成物の製造方法に関する。さらに他の実施形態は、携帯用の適用のためのキットにおけるアルファウイルスに対するこれらの免疫原性組成物の使用、及び方法に関する。

【0007】

いくつかの実施形態では、生弱毒化組換えアルファウイルスは、非構造タンパク質4 (nsP4) コード配列の一端と前記アルファウイルスのサブゲノムRNAコード配列の開始AUGとの間に、少なくとも1つのウイルスの内部リボソーム侵入部位の挿入を有するアルファウイルス核酸を含み得る。これらの実施形態によれば、内部リボソーム侵入部位 (IRES) 配列は、哺乳動物細胞における遺伝子の転写/発現を可能にする、前記アルファウイルスのゲノムに挿入される異なる IRES 配列を含み得る。これらの IRES 配列は、対照的に、本質的に昆虫細胞における発現が不可能である。特定の実施形態において、異なる IRES 配列は、I 型 (例えば、エンテロウイルス: サブタイプ、エンテロウイルス71 (EV71)、及びサブタイプ、ヒトライノウイルス (HRV)) というピコルナウイルス由来の1以上の IRES 配列、及び/またはII型 IRES 配列 (例えば、カルジオウイルス: サブタイプ、EMCV IRES 以外のタイロウイルス (TMENV)、及びアフロウイルス: サブタイプ、口蹄疫ウイルス (FMDV)) というピコルナウイルス由来の1以上の IRES 配列が挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態において、IRES 配列は、フラビウイルス (例えば、サブタイプ、ヘパシウイルス (HCV)) に由来するかまたは見出される1つ以上の IRES 配列を含み得る。

10

【0008】

別の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスは、上記に開示したような IRES 配列の挿入に加えて、不活性化されたサブゲノムプロモーターを含み得る。これらの実施形態によれば、不活性化されたサブゲノムプロモーターは、突然変異誘発、点突然変異、欠失、及び挿入 (例えば、フレームシフトをもたらさないか、または翻訳領域が保存される) などの当技術分野で公知の任意の方法によって不活性化され得る。他の実施形態において、アルファウイルスサブゲノムプロモーターは、非構造タンパク質4 (nsP4) コード配列の末端とサブゲノムRNAコード配列の開始AUGとの間のサブゲノムRNAの5' UTRの欠失により、不活性化され得る。他の実施形態において、生弱毒化組換えアルファウイルスのアルファウイルスサブゲノムプロモーターは、前記サブゲノムRNAの5' UTRに位置する前記アルファウイルス核酸におけるクラスター化された点突然変異により、不活性化され得る。他の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスは、前記変異が非構造タンパク質4のカルボキシ末端のアミノ酸配列を改変しない、前記サブゲノムプロモーターにおいて、1つ以上の変異を含み得る。さらに他の実施形態において、前記生弱毒化組換えアルファウイルスは、前記アルファウイルスの非構造タンパク質のいずれか1つに適応突然変異を含み、前記適応突然変異は、ウイルス複製、放出、及びウイルス力価を増加させる。他の実施形態において、前記生弱毒化ウイルスは、前記生弱毒化ウイルスの翻訳を最適化するために、コドンの最適化についての操作を含み得る。

20

30

【0009】

特定の実施形態において、本発明の生弱毒化組換えアルファウイルスは、蚊及び蚊細胞において複製することができない生弱毒化組換えアルファウイルスを含み得る。これらの実施形態によれば、前記生弱毒化組換えアルファウイルスは、哺乳動物及び哺乳動物細胞において発現し得る。

40

【0010】

他の実施形態において、生弱毒化アルファウイルス及びアルファウイルス構築物は、チクングニヤウイルス、オニオンニオンウイルス、ロスリバーウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルスなどのアルファウイルスまたはコロナウイルス科及びトガウイルス科の他のアルファウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。他のセムリキ森林ウイルス複合体は、ベバールウイルス、マヤロウイルス、サブタイプ: ウナウイルス、オニオンニオンウイルス: サブタイプ: イボ - オラウイ

50

ルス (Igbo - Ora virus)、ロスリバーウイルス：サブタイプ：ベバールウイルス、サブタイプ：ゲッタウイルス；サブタイプ：サギヤマウイルス、セムリキ森林ウイルス：サブタイプ：Me Tri ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、前記生弱毒化アルファウイルス及び／またはアルファウイルス構築物は、生弱毒化チクングニヤウイルスであり得る。

#### 【0011】

特定の実施形態において、ベクターは、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスをコードするヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態は、前記生弱毒化組換えアルファウイルスをコードするヌクレオチド配列を有するベクターを発現し得る宿主細胞を含み得る。

10

#### 【0012】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されている生弱毒化組換えアルファウイルスまたはアルファウイルス構築物は、医薬組成物の一部であってもよく、製薬上許容される担体を含んでいてもよい。これらの実施形態において、前記生弱毒化組換えアルファウイルスまたはアルファウイルス構築物に対する免疫応答を誘導するために、医薬組成物の一部として、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスまたは構築物は、対象に投与され得る。特定の実施形態において、本明細書に開示される医薬組成物は、1つ以上の用量で対象に投与するための使用のワクチン組成物の一部であり得る。これらの実施形態によれば、対象は、ヒト対象（例えば、成人または子供または乳児）またはウマ、ウシ、ラクダ、アルパカなどの家畜、または飼育動物またはペットであり得る。

20

#### 【0013】

特定の実施形態において、本明細書に開示される免疫原性のアルファウイルス組成物は、アルファウイルスのポリペプチド及びポリヌクレオチドの混合物であり得る。これらの実施形態によれば、免疫原性のアルファウイルス組成物は、ポリヌクレオチドによってコードされる種々のポリペプチドを含むかまたは含まない、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含み得る。他の実施形態において、本明細書に開示される方法は、例えば、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、経皮的、経口的、吸入、腔内、局所、鼻腔内または直腸内または他の公知の適用を含む任意の許容可能な方法で、1つ以上の用量の薬学的に許容される免疫原性組成物の生弱毒化アルファウイルスを対象に投与することを含み得る。これらの実施形態によれば、免疫原性製剤は、対象に単回用量または2回以上の用量で投与され得る。いくつかの実施形態において、免疫原性製剤は、相互に約365日（1年）以内に、相互に約120日以内に、相互に約90日以内に、相互に約60日以内に、相互に約30日以内に、互いに約30日以内に投与され得る。他の実施形態において、2つ以上の用量が、同一または異なる解剖学的位置で、同じ日に対象に提供され得る。さらに他の実施形態において、生弱毒化アルファウイルス構築物は、単回または複数回の投与量で、対象に投与するのに適合する他のワクチンと混合され得て、例えば、病原性ウイルスを運ぶことができる蚊が蔓延している風土病領域に入る旅行者に投与される。

30

#### 【0014】

他の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルス、構築物及び組成物は、本明細書に開示される少なくとも1つの生弱毒化組換えアルファウイルスまたは構築物、及び少なくとも1つの容器を含むキットの一部であり得るが、これらに限定されない。さらに他の実施形態において、キットは、1つまたは複数の安定化剤、生理食塩水もしくは緩衝液、及び／または送達デバイスをさらに含み得るが、これらに限定されない。上記の参照された実施形態のいずれかは、本出願人による目標を達成するために組み合わせることができることに留意されたい。

40

#### 【0015】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本明細書の特定の実施形態の特定の態様をさらに示すために含まれる。前記実施形態は、本明細書に提示される詳細な説明と組み合わせて、これらの図面の1つ以上を参照することにより、よりよく理解され得る。

#### 【図面の簡単な説明】

50



## 【 0 0 1 6 】

【図 1】図 1 は、本発明のいくつかの実施形態の生弱毒化組換えアルファウイルスを生成する概略的方法を示す。

【図 2】図 2 は、本発明のいくつかの実施形態の生弱毒化組換えアルファウイルスを生成する代替の概略的方法を示す。

【図 3】図 3 は、ポジティブコントロール及びネガティブコントロールと比較した、哺乳動物細胞で増殖させた本発明のいくつかの実施形態の特定の生弱毒化アルファウイルスのグラフ図を表す。

【図 4】図 4 は、昆虫細胞で増殖させた本発明のいくつかの実施形態の特定の生弱毒化アルファウイルスのグラフ図を表す。

10

【図 5】図 5 は、ポジティブコントロールと比較した場合の、本発明のいくつかの実施形態の特定の生弱毒化アルファウイルスのブランク形態を示す。

【図 6】図 6 は、治験ワクチン及びポジティブコントロールの生弱毒化アルファウイルスと比較した、本発明のいくつかの実施形態の特定の生弱毒化アルファウイルスについての中和力価を示す棒グラフである。

【図 7】図 7 は、ポジティブコントロールの生弱毒化アルファウイルス及び治験ワクチンと比較した、本発明のいくつかの実施形態の特定の生弱毒化アルファウイルスの中和力価の範囲を示す表である。

【図 8】図 8 は、ポジティブコントロールのアルファウイルス構築物と比較した、本発明のいくつかの実施形態の様々な生弱毒化アルファウイルス構築物の医薬組成物の投与後、野生型のアルファウイルスを用いたチャレンジ後の期待中和力価の範囲を示す表である。

20

【図 9】図 9 は、IRES 挿入を有するいくつかのアルファウイルスの典型的なアラインメントを示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 1 7 】

## 配列の簡単な説明

配列番号 1 は、CHIKV - EV71 IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 2 は、CHIKV - HRV2 IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 3 は、CHIKV - FMDV IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 4 は、CHIKV - TMEM IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 5 は、CHIKV - HCV IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 6 は、EV71 IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 7 は、HRV2 IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 8 は、FMDV IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 9 は、TMEM IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 10 は、HCV IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 11 は、CHIKV - HAV IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 12 は、CHIKV - FGF1 IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 13 は、HAV IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 14 は、FGF1 IRES のポリヌクレオチド配列の例であり、配列番号 15 は、本明細書に開示される特定の実施形態において使用されるプライマーの DNA 配列の例であり、配列番号 16 は、本明細書に開示される特定の実施形態において使用されるプライマーの DNA 配列の例であり、配列番号 17 は、本明細書に開示される特定の実施形態において使用されるプローブの DNA 配列の一例であり、配列番号 18 は、CHIK - IRES のいくつかの構造ポリペプチドを表し、配列番号 19 は、CHIK - IRES 非構造ポリペプチドの非構造ポリペプチドを表し、また、配列番号 20 は、EMCV - IRES のポリヌクレオチド配列の例である。

30

40

## 【 0 0 1 8 】

## 例示的な実施形態の説明

## 定義

本明細書で使用される場合、「1つ」は、1つまたは複数のアイテムを意味し得る。

50

## 【0019】

本明細書で使用される場合、「約」は、プラスまたはマイナス5パーセントまでを意味し、例えば、約100は、95及び105までを意味し得る。

本明細書で使用される場合、「弱毒化ウイルス」は、動物に投与された場合、疾患の臨床的徴候の減少を示すか、または全く示さないウイルスを意味し得る。

## 【0020】

詳細な説明

以下のセクションでは、様々な実施形態を詳述するために、様々な例示的な組成物及び方法を説明する。様々な実施形態を実施することは、本明細書に概説された特定の詳細のすべてまたは一部を使用する必要はなく、むしろ濃度、時間、及び他の特定の詳細を日常的な実験によって変更することができることは当業者には明らかである。場合によっては、よく知られている方法または構成要素は、前記説明に含まれていないことがある。

10

## 【0021】

本明細書に開示される実施形態によれば、当業者の範囲内の従来の分子生物学、タンパク質化学、微生物学、及び組換えDNA技術が使用され得る。このような技術は、前記文献に十分に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., Animal Cell Culture, R.I. Freshney, ed., 1986)を参照のこと。

20

## 【0022】

本明細書に開示される特定の実施形態は、生弱毒化アルファウイルスの新規構築物に関する。これらの実施形態によれば、これらの生弱毒化アルファウイルスは、脊椎動物細胞において効率的に複製することができるが、昆虫細胞では発現が無くなるまで減少している。いくつかの実施形態において、生弱毒化組換えアルファウイルスは、非構造タンパク質4 (nsP4) コード配列の一端と前記アルファウイルスのサブゲノムRNAコード配列の開始AUGとの間に、少なくとも1つのウイルスの内部リボソーム進入部位 (IRES) の挿入を有するアルファウイルス核酸を含み得る。これらの実施形態によれば、IRES配列は、哺乳動物細胞における遺伝子の発現を駆動する構築物を作製し得る異なるIRES配列を含み得る。特定の実施形態において、異なるIRES配列には、I型 (例えば、エンテロウイルス：サブタイプ、エンテロウイルス71 (EV71) 及びサブタイプ、ヒトライノウイルス (HRV)) というピコーマウイルス由来の1以上のIRES配列、及び/またはEMCV IRES以外のII型IRES配列 (例えば、カルジオウイルス：サブタイプ、タイロウイルス (TMENV) 及びアフマトキシン：サブタイプ、口蹄疫ウイルス (FMDV)) というピコルナウイルス由来の1以上のIRES配列が挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態において、IRES配列は、フラビウイルス (例えば、サブタイプ、ヘパシウイルス (HCV)) に由来するかまたは見出される1つ以上のIRES配列を含み得る。本明細書に開示される構築物は、EMCV IRES挿入を有さないことに留意されたい。

30

40

## 【0023】

他の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスは、不活性化サブゲノムプロモーターを含み得る。これらの実施形態によれば、生弱毒化組換えアルファウイルスは、本明細書に詳述されるようなIRES挿入を含み、対象のアルファウイルス (例えば、CHIK) の変異または他の不活性化形態により、不活性化サブゲノムプロモーターをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスは、生存可能であり得て、また、高度に弱毒化された表現型として特徴付けられ得るが、例えば、対象におけるアルファウイルス感染を低減または予防するために投与される場合、前記対象におけるアルファウイルスに対する免疫応答を複製及び誘発し得る。これらの実施形態によれば、不活性化されたサブゲノムプロモ-

50

ターは、突然変異誘発、点突然変異、欠失、挿入（例えば、フレームシフトをもたらさないか、またはある翻訳領域が保存される）などの当該分野で公知の任意の方法によって不活性化され得る。他の実施形態において、前記生弱毒化組換えアルファウイルスの前記サブゲノムプロモーターは、前記サブゲノムRNAの5'UTRに位置するアルファウイルス核酸におけるクラスター化点突然変異によって不活性化され得る。他の実施形態において、本明細書中に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスは、非構造タンパク質4のカルボキシ末端のアミノ酸配列を改変しないサブゲノムプロモーターに、1つ以上の変異を含み得る。さらに他の実施形態において、前記生弱毒化組換えアルファウイルスは、前記アルファウイルスの前記非構造タンパク質のいずれか1つに適応する突然変異をさらに含み得て、前記適応する突然変異は、例えば、製造目的のために、ウイルス複製、ウイルス放出、及び/またはウイルス力価を増加させ得る。

10

#### 【0024】

特定の実施形態において、組織培養または胚における継代によるアルファウイルスの減弱は、前記アルファウイルスの構造遺伝子及び非構造遺伝子、ならびにウイルスゲノムのcis作用エレメントにおける点突然変異をもたらし得る。さらに、突然変異は、化学的な突然変異誘発によって増加させ得る。いくつかの実施形態において、RNA+ウイルスの感染性cDNAクローンの配列を改変することによる遺伝子操作は、ウイルスゲノム（例えば、欠失、挿入、逆位、突然変異）の安定した有意な改変を作製するために使用され得て、野生型または他の昆虫感染性ゲノム配列、または前記変異体の免疫原性を増強する可能性のあるさらなる遺伝物質に戻ることを、非常に困難または不可能にするであろう。特定の実施形態において、本発明の生弱毒化組換えアルファウイルスは、蚊及び蚊細胞において複製することができない生弱毒化組換えアルファウイルスを含み得る。これらの実施形態によれば、前記生弱毒化組換えアルファウイルスは、哺乳動物及び哺乳動物細胞において発現することができる。

20

#### 【0025】

いくつかの実施形態において、生弱毒化アルファウイルス及びアルファウイルス構築物は、チクングニヤウイルス、オニオンニオンウイルス、ロスリバーウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルスなどのアルファウイルスウイルス、またはコロナウイルス科及びトガウイルス科の他のアルファウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。他のセムリキ森林ウイルス複合体は、ベバールウイルス、マヤロウイルス、サブタイプ：ウナウイルス、オニオンニオンウイルス：サブタイプ：イボ-オラウイルス、ロスリバーウイルス：サブタイプ：ベバールウイルス、サブタイプ：ゲッタウイルス。サブタイプ：サギヤマウイルス、セムリキ森林ウイルス：サブタイプ：Me Tr iウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、前記生弱毒化アルファウイルス及び/またはアルファウイルス構築物は、チクングニヤウイルスである。他の実施形態において、病原性アルファウイルスに対する医薬組成物は、対象への投与について、適合性の組合せ医薬組成物において、複数の生弱毒化アルファウイルスまたは他の生弱毒化もしくは死滅ウイルスを含み得る。

30

#### 【0026】

アルファウイルスは、家畜の病気を含むかなりの数のヒト及び動物の病気に関与する、小さく球状のエンベロープを持つポジティブセンスRNAウイルスである。例えば、チクングニヤウイルス(CHIKV; Togaviridae Alphavirus)は、アルボウイルス病原体であり、最近、アフリカやアジアなど、世界中の何百万人もの人々を巻き込む爆発的な都市での大発生を引き起こしている。これらのウイルスに対する生アルボウイルスワクチン株は、節足動物宿主間の循環が病原性の増大、及び少なくとも他の宿主への感染の可能性を含む予期せぬ変化につながる可能性があるため、節足動物ベクターによって伝染してはならない。前者のリスクは、1971年にルイジアナ州で収集された蚊のベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV) TC-83 ワクチン株の検出によって明らかにされ、これはテキサス州に限られた流行病/流行の外の領域である。このワクチン株 VEEV TC-83 は、ワクチン接種後に蚊細胞及び感染する蚊に複製することがで

40

50

き、従って、蚊によるその伝達は可能性のみである。

【 0 0 2 7 】

特定の実施形態において、本明細書に開示されるヌクレオチド配列を発現するベクターは、本明細書に開示される生弱毒化アルファウイルスまたは構築物を生成するための使用が意図される。他の実施形態において、ベクターは、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスまたはアルファウイルス構築物をコードするヌクレオチド配列を発現させるために使用され得る。いくつかの実施形態は、生弱毒化組換えアルファウイルスをコードするヌクレオチド配列を有するベクターを発現することができる宿主細胞を含み得る。これらの構築物を発現することができる任意のベクターは、本明細書に開示される方法に使用され得ることが企図される。

10

【 0 0 2 8 】

他の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスまたは1つ以上のアルファウイルス構築物は、医薬組成物の一部であり得、薬学的に許容される担体を含み得る。これらの実施形態によれば、生弱毒化組換えアルファウイルスまたは本明細書に開示された医薬組成物の一部を構成する構築物は、生弱毒化組換えアルファウイルスまたはアルファウイルス構築物に対する免疫応答を誘導するために、対象に投与され得る。特定の実施形態において、本明細書に開示される医薬組成物は、1つ以上の用量で、対象に投与するための使用のワクチン組成物の一部であり得る。これらの実施形態によれば、対象は、ヒト対象（例えば、成人または子供または乳児）、家畜、またはウマ、ウシ、ラクダ、アルパカ、動物園、または野生動物または飼育動物またはペットなどの他の動物であり得る。

20

【 0 0 2 9 】

特定の実施形態において、本明細書に開示される免疫原性アルファウイルス組成物は、ポリペプチド及びポリヌクレオチドの混合物であり得る。これらの実施形態によれば、免疫原性アルファウイルス組成物は、ポリヌクレオチドによってコードされる種々のポリペプチドを含むかまたは含まない本明細書に記載のポリヌクレオチドを含み得る。他の実施形態において、方法は、1つ以上の用量の本明細書に開示される薬学的に許容される免疫原性組成物を任意の既知の様式によって対象に投与することを含み得る。これらの実施形態によれば、投与様式は、対象に前記組成物を皮下、筋肉内、静脈内、皮内、経皮、経口、吸入、腔内、局所、鼻腔内、または直腸投与することが挙げられるが、これらに限定されない。これらの実施形態によれば、免疫原性製剤は、対象に単回用量または2回以上の用量で投与され得る。いくつかの実施形態において、免疫原性製剤は、ブースターとして、相互に約365日（1年）以内に、相互に約120日以内に、相互に約90日以内に、相互に約60日以内に、相互に約30日以内に、互いに約30日以内に投与され得る。特定の実施形態において、対象は、成人、子供または乳児または動物であり得る。他の実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、対象に1日で皮下または皮内または鼻腔内に投与され、続いて、第1の用量の30日以内または6ヶ月～1年までに、別の日に第2の用量を追加投与した。

30

【 0 0 3 0 】

現在、チングニヤに対するワクチンや治療薬がほとんどないため、これらのウイルスの流行は、人々を蚊の媒介にさらすことを防ぎ、病気の症状を治療することによってのみ制御され得る。1980年代、ウォルターリードアーミー研究所の科学者は、181/クロン25（以下、181-25という。）という試験用ワクチンを製造した。この生弱毒化株は、野生型CHIKV株の連続的なブラークからブラークへの継代によって生成された。前記ウイルスは、げっ歯類及び非ヒト霊長類の両方において弱毒化され、ヒトにおいて高度な免疫原性である。しかしながら、この181-25株は、軽度で一過性の関節痛を引き起こし、第2相試験の間、天然の蚊ベクターAe. Aegyptusにより、実験的に伝達されることが判明した。さらに、ホルマリン不活性化ワクチンは、高価で非効率である。これらのワクチンは、複数の反復ワクチン接種を必要とすることもある。従って、CHIKVに対する改善された免疫原性薬剤の必要性が存在する。

40

50

## 【 0 0 3 1 】

アルファウイルスに特有の資源が限られている国に効果的で、流行と戦うために、理想的なアルファウイルスワクチンは、単回投与後に迅速かつ長命な免疫を誘導し、反応原性及び病原性への復帰のリスクが低く、安価である。アルボウイルスの疾患に対する免疫原性組成物は、ウイルス血症が起こった場合、特に、非風土病領域で使用される場合、蚊を介して免疫化された人からの伝染のリスクが低くなければならぬ。安全性を重視する複製が欠損している免疫原性候補が記載されているが、単回投与後に、迅速または長期生存免疫を誘導することは示されておらず、産生するのに費用がかかるものもあり得る。

## 【 0 0 3 2 】

本明細書の特定の実施形態は、蚊及び蚊細胞において複製することができないが、哺乳動物細胞において複製することができる、生弱毒化組換えアルファウイルスを含む。これらの実施形態によれば、これらの構築物は、E M C V I R E S 配列以外の内部リボソーム進入部位 ( I R E S ) 配列を使用して生成され得る。いくつかの配列が所望の表現型を達成することができなかったため、すべての I R E S 配列が E M C V I R E S の代わりになるわけではないことに留意されたい。本開示の生弱毒化アルファウイルスは、様々な外来種の特定の I R E S 配列の制御下で、特定の I R E S 配列を慎重に選択し、アルファウイルス複製の翻訳制御を置くことにより達成された。これらの実施形態によれば、外因性 I R E S 配列は、E M C V I R E S を排除するが、限定されないがフラビウイルス、ピコノウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、フィロウイルス、パラミクソウイルス、オルトミクソウイルス、ブニヤウイルス、アレナウイルス、レトロウイルス、ヘパドナウイルス、ペスチウイルス、カリシウイルス、レオウイルス、バルボウイルス、パポバウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、及び/またはボックスウイルスの I R E S 配列が挙げられる。米国特許第 8, 4 2 6, 1 8 8 号を参照されたく、これらの開示は、本明細書の明白な教示と矛盾しない範囲で、その全体が参照により組み込まれる。

## 【 0 0 3 3 】

ピコルナウイルス (ピコルナウイルス科) は、多くの既知のヒト及び/または動物の疾患を引き起こす、正十二面体キャプシドを有する非エンベロープのプラス鎖 R N A ウイルスである。ピココマウイルスは、他のウイルスよりも頻繁にヒトに感染するライノウイルス、長年にかけて何百万人もの人々が麻痺したり死亡したりしたポリオウイルス)、及び口蹄疫ウイルスを含むいくつかの注目すべきメンバーを含み、それらは、世界中の専門機関の生産につながった。

## 【 0 0 3 4 】

ピコルナウイルスは、キャップ依存性の翻訳が損なわれた場合、m R N A におけるキャップ非依存性の翻訳開始を制御する能力と組み合わせた、c i s 作用の R N A 調節配列である内部リボソーム侵入部位 ( I R E S ) エlementを含む。前記ピココマウイルスの I R E S 配列は、その一次構造及び二次構造に基づいて、3つのタイプに分類される。I 型 I R E S 配列を有するピコウイルスは、エンテロウイルス：サブタイプ、エンテロウイルス 7 1 ( E V 7 1 )、ヒトライノウイルス ( H R V )、ヒトエンテロウイルス A ( H E V )、コクサッキーウイルス B ( C V B ) (ヒトエンテロウイルス B)、ポリオウイルス ( P V ) (ヒトエンテロウイルス C)、ウシエンテロウイルス ( B E V ) が挙げられるが、これらに限定されない。II 型 I R E S 配列を有するピココマウイルスは、アフロウイルス：サブタイプ、口蹄疫ウイルス ( F M D V )、ウマ鼻炎 A ウイルス ( E R A V )、及びウシ鼻炎 B ウイルス ( B R B V ) ; が挙げられるが、これらに限定されない。カーディオウイルス：サブタイプ、タイロウイルス ( T M E V )、及び脳心筋炎ウイルス ( E M C V ) ; エルボウイルス：サブタイプ、ウマ鼻炎 B ウイルス ( E R B V ) ; パレコウイルス：サブタイプ、ヒトパレコウイルス ( H P e V ) ; コウウイルス：サブタイプ、アイチウイルス ( A i V ) ; アビシウイルス、コサウイルス、及びハンニウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。これらの I R E S の型は、宿主タンパク質の要件、及び前記エントリー部位に関する前記開始コドンの位置が異なる。A 型肝炎ウイルス ( H A V ) の I R

10

20

30

40

50

ES は、他のピコルナウイルスとは異なり、グループ (III 型) を単独で構成する。

【0035】

いくつかの実施形態において、I 型または II 型ピコルナウイルスの IRES 配列は、生弱毒化組換えアルファウイルスに挿入され得る。他の実施形態において、生弱毒化組換えアルファウイルスは、非ピコルナウイルス由来の IRES 配列を含み得る。これらの非ピコルナウイルスの IRES 配列は、フラビウイルス：サブタイプ、ハパシウイルス (HCV)、ベスチウイルス、ジシストロウイルス、及びレトロウイルス由来の IRES 配列が挙げられるが、これらに限定されない。これらの IRES 配列のいくつかは、本明細書に開示される免疫原性組成物に使用するアルファウイルス構築物を作製するために、首尾よく使用された。

10

【0036】

特定の実施形態において、生弱毒化アルファウイルス及びアルファウイルス構築物は、チクングニヤウイルス、オニオンニオンウイルス、ロスリバーウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルスなどのアルファウイルス、またはコロナウイルス科及びトガウイルス科の他のアルファウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。他のセムリキ森林ウイルス複合体は、ベパールウイルス、マヤロウイルス、サブタイプ：ウナウイルス、オニオンニオンウイルス：サブタイプ：イボ - オラウイルス、ロスリバーウイルス：サブタイプ：ベパールウイルス、サブタイプ：ゲッタウイルス；サブタイプ：サギヤマウイルス、セムリキ森林ウイルス：サブタイプ：Me T r i ウイルス、もしくはそれらの組み合わせ、または他の生弱毒化ウイルス製剤との組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0037】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、蚊または他の昆虫細胞において複製することができない生弱毒化組換えアルファウイルスを含み得る。特定の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスのサブゲノムプロモーターは、非構造タンパク質 4 (nsP4) コード配列の末端とサブゲノム RNA コード配列の開始 AUG と間のサブゲノム RNA の 5' UTR の欠失により不活性化され得る。別の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスのサブゲノムプロモーターは、前記サブゲノムプロモーター内のクラスター化点突然変異により不活性化され得る。これらの実施形態によれば、前記アルファウイルスサブゲノムプロモーターは、前記サブゲノム RNA の 5' UTR に位置する核酸のクラスター化点突然変異を含み得る。他の実施形態において、アルファウイルスサブゲノムプロモーターは、前記非構造タンパク質の野生型アミノ酸を保存しながら、同義変異を用いて不活性化され得る。一例において、前記アルファウイルス、チクングニヤウイルス、サブゲノムプロモーターは、クラスター化点突然変異により不活性化され得る。同様のクラスター化点突然変異は、他のアルファウイルスのサブゲノムプロモーターを不活性化するために使用され得る。これらの実施形態によれば、クラスター化点突然変異は、ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド配列の 7474, 7477, 7480, 7481, 7483, 7486, 7489, 7492, 7495, 7498 及び / または 7501 - 7503 の位置に、2 つ以上の突然変異の同義の点突然変異を含み得て、前記ポリペプチドは、1 つ以上の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5 を含み得る。前記サブゲノムプロモーターを不活性化するためのクラスター化点突然変異の使用は、上記の突然変異の 2 つ以上、4 つ以上、6 つ以上、または前記アルファウイルスのターゲットの前記サブゲノムプロモーターにおいて 12 までの突然変異のような、逆転を低減または防止するのに十分な数である。本明細書に開示される特定の実施形態におけるアルファウイルスは、遺伝的に類似している (例えば、図 9、いくつかのアルファウイルスのアラインメントを参照のこと)。

30

40

【0038】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、蚊及び蚊細胞において複製することができず、一方、哺乳動物細胞で発現することができる生弱毒化組換えアルファウイルスの製

50

造方法を含む。これらの実施形態によれば、これらの生弱毒化組換えアルファウイルスは、前記アルファウイルスゲノムに突然変異を導入し、前記アルファウイルスの構造タンパク質 (structural protein) (または構造タンパク質 (structural proteins)) のキャップ依存性の翻訳を不活性化し、前記構造遺伝子の上流のアルファウイルスゲノムへの脊椎動物由来細胞の翻訳を選択的に開始するIRESをクローニングすることにより作製され得る。

#### 【0039】

他の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスは、a) エンベロープ糖タンパク質遺伝子の下流に位置し、前記アルファウイルスの3' UTRの上流に位置するキャプシド遺伝子、b) 前記エンベロープ糖タンパク質遺伝子の3' 末端と前記配置されたキャプシド遺伝子との間に導入され、前記遺伝子は、エンベロープ糖タンパク質遺伝子として5' から3' に位置する少なくとも1つのIRES、挿入されたIRES、配置されたキャプシド遺伝子、及び3' UTR、ならびにc) 前記IRESの上流に位置する前記エンベロープ糖タンパク質遺伝子は、IRES非依存的な様式で翻訳され、一方、前記配置されたキャプシドは、IRES依存的な様式で翻訳されることを含み得る。

10

#### 【0040】

図1を参照すると、アルファウイルスのゲノムが示され、前記模式図で表されるアルファウイルスは、4つの非構造タンパク質 (nsP1-4)、及び3つの主要構造タンパク質 (Capsid、E1及びE2エンベロープ糖タンパク質) をコードする。複製中に、2つの異なるRNA、すなわちゲノムRNA及びサブゲノムRNAが生成される。前記サブゲノムRNAは、感染の間に、前記nsP4遺伝子の3' 末端に見出され得るサブゲノムプロモーター (SGプロモーター) から遅れて転写される。いくつかの実施形態は、外因性ウイルスまたはヒト/哺乳動物IRES (例えば、ピコマウイルス及び/またはフラビウイルス) のIRES配列を、アルファウイルスcDNAクローンのSGプロモーターの下流に直接挿入することにより、蚊細胞において複製することができない生弱毒化組換えアルファウイルスを生成する方法を含む (図1; 中央図)。本明細書に開示される他の実施形態はまた、不活性化されたSGプロモーターを有する生弱毒化組換えアルファウイルスを含み得る。例えば、前記サブゲノムプロモーターは、不活性化され得る (例えば、1つ以上の点突然変異、図1の下)。不活性SGプロモーターを有するこれらの生弱毒化組換えアルファウイルスは、蚊の要素依存性の翻訳に戻ることができないという点で安定である。このような逆転は、前記IRESの欠失だけでなく、機能しているサブゲノムプロモーターの修復も、これを非常に起こりそうにない出来事としている。

20

30

#### 【0041】

ここで図2を参照すると、本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、前記3' UTRのすぐ上流の前記サブゲノム領域の前記3' 末端に前記キャプシド遺伝子を有する、前記エンベロープ糖タンパク質遺伝子の下流にIRES配列を配置することにより、生弱毒化組換えアルファウイルスを生成する方法を含み得る (図2; バージョン2)。この戦略によって生成されたこれらの生弱毒化組換えアルファウイルスは、活性サブゲノムプロモーターを保持し得る。これらの実施例において、キャップ依存的に翻訳されたエンベロープタンパク質遺伝子、及びIRES依存的な要式で翻訳されたキャプシドタンパク質を用いて、サブゲノムメッセージが作製され得る。本明細書に開示される他の実施形態は、不活性SGプロモーターを有する生弱毒化組換えアルファウイルスを含み得る。本明細書に記載の1つの弱毒化戦略に基づいて、遺伝子発現を変化させ、前記アルファウイルスを弱毒化させるために、前記脳心筋炎ウイルス (EMCV) IRESを使用する、生弱毒化チクングンヤウイルスが以前に設計された。1つの生弱毒化アルファウイルス、IRES挿入を有するチクングンヤにおいて、クラスター化点突然変異は、前記サブゲノムプロモーターを不活性化するために使用され、また、前記IRESは、前記構造タンパク質のオープンリーディングフレーム (ORF) の上流の遺伝子間領域に挿入された。第2のバージョンのCHIKV/IRES v2は、野生型サブゲノムプロモーターを保持したが、前記キ

40

50

ャプシドタンパク質遺伝子を前記エンベロープタンパク質遺伝子の下流、及び前記 I R E S の後ろに配置した。いくつかの実施形態において、本明細書に示される生弱毒化組換えアルファウイルスは、記載されるような弱毒化戦略を用いて、生弱毒化ウイルスのこれらのバージョンを用いて生成され得る。例えば、米国特許第 8, 426, 188 号を参照されたく、これらの開示は、本明細書の明白な教示と矛盾しない範囲で、その全体が参照により組み込まれる。E M C V I R E S 配列を用いたこれらの従来の構築物を考慮すると、驚くべきことに、すべての I R E S 配列が以前に設計された構築物に使用され得るとは限らないことが判明した。さらに、E M C V I R E S がメンバーであるピコルナウイルス由来の I R E S 配列のすべてが、本明細書に開示された生弱毒化組換えアルファウイルスの適切な代替物であるとは限らない。生存率を維持しながら前記アルファウイルスを弱毒化するために、特異的な I R E S 配列のみが生弱毒化アルファウイルスにおいて機能することが発見された。驚くべきことに、試験した I 型及び I I 型ピコルナウイルスの I R E S 配列の一部のみが機能的な構築物を生成し、I I I 型ピコルナウイルスの I R E S ( H A V、A 型肝炎 ) 配列は機能しなかった。さらに、細胞性 F G F ( 例えば、哺乳動物 ) の I R E S 配列はまた、本明細書に開示された構築物に挿入された場合、生存可能なアルファウイルスを産生しなかった。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 4 2 】

I R E S 配列は、前記 R N A において生成される二次構造の広範なステム - ループ / ヘアピン配列を含む。これらの構造は、すべての I R E S タイプで共有されているわけではなく、実際には、3つのタイプ ( I 型、I I 型、及び I I I 型 ) の間でかなり異なる。しかしながら、I I I 型は、I 型及び I I 型への二次構造においてより劇的に異なる。これは、どの翻訳因子が前記 I R E S 構造に結合し、これらのプロモーターからポリペプチド産生を開始することができるかに影響を及ぼす可能性がある ( 例えば、Martinez - Salas E . et al . , Picomavims I R E S elements : RNA structure and host protein interactions , Vims Research , vol . 206 , pp . 62 - 73 , 2015 に記載されており、これらの開示は、本明細書の明白な教示と矛盾しない範囲で、その全体が参照により本明細書に援用される ) 。さらに、3種のピコマウイルスの I R E S 配列内の他の構造的相違が、本明細書に開示される免疫原性組成物における使用のアルファウイルス構成成分を生成する際に異なる効果に寄与し得ることが明らかである。

#### 【 0 0 4 3 】

##### 医薬組成物

本明細書の実施形態は、生物学的に適合する形態で、必要とする対象に投与するための生弱毒化アルファウイルス構築物を作製及び使用するための方法を提供する。インビボでの投与について、生物学的適合性のある適切な形態は、前記活性剤の治療上の利点により、有害な影響を上回って投与される活性剤の形態 ( 例えば、特定の実施形態の生弱毒化アルファウイルスの組成物 ) であり得る。治療的に有効な量の治療用組成物の投与は、所望の結果を達成するのに必要な投与量及び時間で、効果的な量とみなされ得る、例えば、治療的に活性な化合物の量は、前記個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重、ならびに前記個体において所望の応答を誘発するための製剤の能力のような要因に従って変化し得る。投薬計画は、最適な治療応答を提供するように調整され得る。

#### 【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される組成物 ( 例えば、いくつかの実施形態の医薬免疫原性組成物 ) は、そのような組成物で作用することが知られている任意の様式で投与され得て、皮下、静脈内、経口投与、吸入、経皮適用、皮内適用、腔内適用、局所適用、鼻腔内または直腸投与が挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態において、本明細書に開示される組成物は、皮下投与で投与され得る。さらに別の実施形態において、本明細書に開示される組成物は、皮下もしくは筋肉内、または皮内もしくは鼻腔内投与により、または初回用量及び追加投与レジメンとしての組み合わせにより、投与され得る。



## 【 0 0 4 5 】

免疫原性組成物は、前記組成物と同時投与される適切な担体または希釈剤において、対象に投与され得る。本明細書で使用される用語「薬学的に許容される担体」は、生理食塩水及び水性緩衝液などの希釈剤を含むことを意味する。本明細書に開示される生弱毒化アルファウイルス構築物はまた、非経口的にまたは腹腔内に投与され得る。分散液は、H E P E S 緩衝液及び他の適切な薬剤などの適切な緩衝液において調製され得る。保存及び使用の通常の条件下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するための保存剤を含有し得る。

## 【 0 0 4 6 】

投与に適した医薬組成物は、当該分野で公知の任意の手段によって投与され得る。例えば、滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のために、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液及び滅菌粉末または凍結乾燥／凍結乾燥ケーキが使用され得る。すべての場合において、前記組成物は、無菌であり得て、容易な注射可能性が存在する程度に流動性であり得る。それは、細菌及び真菌のような微生物の汚染作用に対して、さらに保存され得る。前記薬学的に許容される担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの適切な混合物を含有する溶媒、安定化組成物、または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合には必要とされる粒子サイズの維持、及び界面活性剤の使用により維持され得る。

## 【 0 0 4 7 】

滅菌注射溶液は、活性化化合物を、必要に応じて、適切な溶媒または上記に列挙した成分の1つまたは組合せと共に組み入れ、その後、滅菌することにより調製され得る。

処方されると、溶液は、投薬製剤と適合する様式で、治療的に有効な量で投与され得る。治療有効量は、患者の健康または幸せに、単一または累積的に有益な効果を有する生物活性化化合物の量である。前記製剤は、上記の注射可能な溶液のタイプのような、様々な剤形で容易に投与される。徐放性カプセル、徐放性微粒子なども、本明細書の組成物を投与するために使用され得ると考えられる。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、及び腹腔内投与に特に適している。

## 【 0 0 4 8 】

生弱毒化ウイルスワクチンが効果的であるためには、それらは免疫後に複製可能でなければならない。前記ウイルスを不活性化する要因は、前記生弱毒化アルファウイルスを傷つける可能性がある。一般に使用されるワクチンの中には、極端な温度に敏感なものもある。過度の熱または偶発的な凍結は、前記ワクチンを不活性化する可能性がある。流通を通じてこの「コールドチェーン」を維持することは、アルファウイルスがよく発生する資源が限られている国では、特に困難である。特定の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスは、これらのアルファウイルスの劣化または不活性化を低減または防止するために、液体もしくは水性製剤、または凍結もしくは凍結乾燥形態で保存され得る。他の実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルスは、室温（例えば、約20 ～ 約25 、さらには40 もの高温）または冷蔵温度（例えば、約0 ～ 約10 ）で、長期間安定性を維持するために、様々な添加剤を用いて配合され得る。生弱毒化組換えアルファウイルスの劣化または不活性化を減少させる添加剤は、炭水化物及び／またはアミノ酸、またはP B S 緩衝液、または他の適切な緩衝液を用いたH E P E S （例えば、約10 . 0 ～ 約200 m M H E P E S ）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、限定されるものではないが、タンパク質剤は、ゼラチン、または本質的に不活性な低減させたアレルギー反応または免疫原性応答を有する他の薬剤を含み得る製剤に添加され得る。本明細書中のさらに別の実施形態は、低温（例えば、冷蔵保存または凍結保存）の必要性を減少させること、ならびに水性及び／または再構成された生弱毒化組換えアルファウイルスの貯蔵寿命を延長させることに指向されており、前記生弱毒化アルファウイルスを保存するための前記処方物の使用は、H E P E S バッファーまたは他の適切なバッファーを含み得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 9 】

前記活性治療剤は、用量当たり標的アルファウイルスに対して免疫応答を誘導する（例えば、中和抗体を産生する）ブランク形成単位（PFU）により、測定された生弱毒化アルファウイルスを含み得る混合物中に処方され得る。単回投与または複数回投与も、所定の状況のための適切なスケジュールで投与され得る。いくつかの実施形態において、用量は、本明細書で企図されるウイルスへの曝露の前、曝露中及び／または曝露の後に投与され得る。他の実施形態において、対数PFUは、前記組成物を投与された対象に依存して変化し得る。1用量あたりのPFUの範囲は、 $2 \text{ Log}_{10} \sim 8 \text{ Log}_{10}$ の間であり得る。特定の実施形態において、用量範囲は、対象に前記アルファウイルスに対する免疫応答を誘発するために前記対象に投与される場合、 $3 \text{ Log}_{10} \sim 6 \text{ Log}_{10}$ であり得るか、または医療従事者によって適切であると判明した他の用量であり得る。

10

## 【 0 0 5 0 】

特定の実施形態において、本明細書で使用する生弱毒化アルファウイルス免疫原性組成物は、医薬組成物の一部であってよく、ポリヌクレオチドにより代表される生弱毒化アルファウイルス、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドとポリペプチドの両方の混合物を含み得る。これらの実施形態によれば、本明細書に開示される組成物は、そのような治療を必要とする対象を治療するため、またはアルファウイルスへの曝露に起因する障害または感染の発症の予防のために使用され得る。

## 【 0 0 5 1 】

## キット

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される生弱毒化組換えアルファウイルス、構築物及び組成物は、本明細書に開示される少なくとも1つの生弱毒化組換えアルファウイルス、または構築物、及び少なくとも1つの容器を含むキットの一部であり得るが、これらに限定されない。さらに他の実施形態において、キットは、1つまたは複数の安定化剤、緩衝液、及び／または送達デバイスをさらに含み得るが、これらに限定されない。キットはまた、本明細書に開示される前記組成物と共に送達されるのに適した1つ以上の追加の薬剤を含み得る。

20

## 【 0 0 5 2 】

前記キットは、それを必要とする対象において、適切に分取された組成物の使用をさらに含み得る。さらに、本明細書の組成物は、部分的にまたは完全に脱水されていても、または水性であってもよい。本明細書で企図されるキットは、特定の製剤に依存して、本明細書に開示される室温または冷蔵温度で保存され得る。

30

## 【 0 0 5 3 】

前記キットの容器手段は、組成物がその中に置かれ、好ましくは適切に分取される、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジまたは他の容器手段を一般に含む。追加の成分が提供される場合、前記キットは、一般に、この薬剤または成分が配置され得る1つまたは複数の追加の容器も含む。本明細書のキットはまた、典型的には、前記薬剤、組成物、及び他の試薬容器を商業的販売のために密閉して収容するための手段を含む。そのような容器は、所望のバイアルが保持される注入またはブロー成形されたプラスチック容器を含み得る。

40

## 【 実施例 】

## 【 0 0 5 4 】

以下の実施例は、本明細書に提示される特定の実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本明細書に開示される実施において良好に機能することが判明した技術を表し、従って、その実施のための好ましい態様を構成すると考えられ得ることは、当業者には理解されるはずである。しかしながら、当業者であれば、本開示に照らして、本明細書の精神及び範囲から逸脱することなく、開示された特定の実施形態において多くの変更を行うことができ、同様のまたは類似の結果を得ることを認識すべきである。

## 【 0 0 5 5 】

50

## 実施例 1

## プラスミドの生産及び配列決定

1つの例示的な方法では、不活性化突然変異 (CHIKV / IRES = EMCV IRES) を含有するポジティブコントロールのウイルス) を用いて、サブゲノムプロモーターをアブレーションした EMCV IRES を含む CHIKV cDNA クローンを、標準組換え DNA 技術を用いて作製し、そこにおいて、先に記載した La Reunion 株 (LR) の感染クローンを鋳型、及び以下に開示する他の構築物に対するポジティブコントロールとして使用した。前記サブゲノムプロモーターの不活性化は、部位特異的突然変異誘発を用いて行った。前記サブゲノムプロモーターを介して、nsP4 遺伝子の 3' 末端をコードする中間構築物を、Finnzymes (Espoo, Finland) の高忠実度 Phusion DNA ポリメラーゼを用いた PCR を使用して作製した。得られたアンプリコンをシャトルベクター prS2 にクローニングし、BigDye キット (例えば、Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて配列決定した。前記 LR 株由来のキャプシド遺伝子の 5' 末端を、前記 IRES 配列に相補的なオーバーハングを有する PCR を用いて増幅した。次いで、IRES 含有及びキャプシドフラグメントを融合 PCR を用いて結合させ、このフラグメントを前記シャトルベクターにクローン化して再配列させた。前記 IRES / キャプシドフラグメント、及び前記突然変異したサブゲノムフラグメントを、両方のフラグメントに導入された SpeI 部位を介して最終的に連結した。次いで、完成した挿入物を LR 骨格にクローニングし、この最終構築物を完全に配列決定した。

10

20

## 【0056】

さらに、不活性化突然変異 (例えば、EV71 及び HRV) を用いて不活性化されたサブゲノムプロモーターを有する I 型ピコルナウイルスの IRES 配列を含有する CHIKV cDNA クローン、不活性化突然変異 (例えば FMDV 及び TMEV) を用いて不活性化されたサブゲノムプロモーターを有する II 型ピコルナウイルスの IRES 配列を含有する CHIKV cDNA クローン、不活性化突然変異 (例えば、HAV) を用いて不活性化されたサブゲノムプロモーターを有する III 型ピコルナウイルスの IRES 配列を含有する CHIKV cDNA クローン、不活性化突然変異 (例えば、HCV) を用いてアブレーションされたサブゲノムプロモーターを有する非ピコルナウイルスの IRES 配列を含有する CHIKV cDNA クローン、及び不活性化突然変異 (例えば、FGF1) を用いて不活性化されたサブゲノムプロモーターを有する非ウイルス性の哺乳動物の IRES を含有する CHIKV cDNA クローンを、上記の標準組換え DNA 技術を用いて作製した。

30

## 【0057】

## 実施例 2

## RNA 転写、トランスフェクション、及びウイルス産生

陰イオン交換カラムを用いて、大規模プラスミド精製を行った。次いで、精製した前記 DNA を NotI 制限エンドヌクレアーゼ (例えば、New England Biolabs, Ipswich, MA) を用いて線状化し、1.2% アガロースゲルで小さなサンプルを解析して線状化を確認した。Ambion SP6 インビトロ転写キットを用いて、残りの前記 DNA を転写した。前記 RNA を定量し、BTX ECM 830 エレクトロポレーターを用いて、ベロ細胞をエレクトロポレーションした。簡潔には、90% コンフルエントのベロ細胞を含有する 2つの T-150 フラスコをトリプシン処理し、RNA 分解酵素がない DPBS で 3 回洗浄した。前記細胞を 700 µL の DPBS に再懸濁し、10 µg の RNA を添加した。前記溶液を 4 mm のキュベットに入れ、250 v で 10 秒間、1 秒間隔で 2 回パルスした。次いで、前記細胞を室温で 10 分間放置した後、T-75 フラスコに播種した。前記ウイルスは、エレクトロポレーションの 48 時間後に、または明らかな CPE が観察され、771 × g で遠心分離するまで採取された。上清を回収し、ベロ細胞上の TCID<sub>50</sub> アッセイにより、力価測定した。

40

## 【0058】

50

## 細胞培養

一例では、ベロアフリカミドリザルの腎臓細胞が得られた（例えば、American Type Cell Culture (Bethesda, MD) 由来）。前記細胞を、10%ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン、及びストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) において、37 で維持した。C6/36 Aelbopictus細胞も28 で10%FBSを含むDMEMにおいて維持した。

### 【0059】

#### 細胞培養増殖曲線

試験された各ウイルスについて、二連でT-25フラスコ中で複製の動態を測定した。前記フラスコをベロ細胞またはC6/36細胞を用いて、95%のコンフルエントに播種した。培地を除去し、MOI 0.001で1時間感染させた。次いで、5%FBSを含有するDMEM 5mLを添加した。0時点を直ちに除去した(300 µL)。1~6日目の残りの各時点で、300 µLを除去した。前記サンプルをTCID<sub>50</sub>アッセイにより、力価測定した。

10

### 【0060】

#### 実施例3

##### ウイルス及び抗体力価

他の典型的な実験において、封じ込めの要件及び感度の必要性に応じて、アルファウイルスのストック及び実験サンプルをブランクアッセイまたはTCID<sub>50</sub>により力価測定し、ウイルスの希釈を用いた定量的リアルタイムPCRを使用して推定し、(ブランク形成単位)PFU力価を外挿することができる標準曲線を作成した。この特定のアッセイにおいて、プライマーは、例えば、(5' - GAYCCCGACTCAACCATCCT - 3' - 配列番号15)、及び(5' - CATMGGGCARACGCACCTGGTA - 3' - 配列番号16)、ならびに典型的な色素FAMを含有する前記プローブ(5' - AGYGCGCCAGCAAGGAGGAKGATGT - 3' - 配列番号17)を用いた。Ab力価は、50%低減した終点を有するブランク減少中和試験を用いて測定した。

20

### 【0061】

#### 実施例4

##### ウイルスレスキュー

特定の例示的な方法において、サブゲノムプロモーターに複数の突然変異を有する組換えアルファウイルス構築物を、上記のIRESに基づく弱毒化戦略を用いた標準組換えDNA技術を使用して、cDNA中に作製した。インビトロで転写されたRNAのベロ細胞へのエレクトロポレーションによりレスキューされた、すべての得られたウイルス(例えば、FMDV、HCV、EV71、TMENV、及びHRV由来のIRES)は、非機能性のサブゲノムプロモーターを含んでいた。FGF1及びHAV IRES構築物は、いずれのCPEも示さなかった。さらに、FGF1及びHAVのIRES配列を有する構築物は、ベロ細胞に回収されたが、ウイルス活性は示さなかった。

30

### 【0062】

#### 実施例5

##### ベロ細胞の増殖速度

ベロ細胞における生存率を評価するために、前記エレクトロポレーションに由来するウイルスを、CHIKV(チクングニヤウイルス)感染後に比較した。ここで、図3を参照すると、CHIK-IRES及び他の生弱毒化アルファウイルスを、試験ワクチンであるチクングニヤ181-25株と比較して、ベロ細胞における生存能力、及び増殖における弱毒化について試験した。同様に、FMDV、EV71、HCV、TMENV、及びHRVのIRES配列を含有する組換えアルファウイルス構築物は、ベロ細胞で生存可能であることが見出され、古典的に弱毒化(細胞培養の継代後)された181-25株と比較して、増殖においてCHIK-IRESと類似の弱毒化レベルを示した。HCV及びFMDVは、CHIK-IRESと比較して、増殖において弱毒化を示した。しかしながら、FGF1及びHAV IRES構築物は、生存可能なウイルスを生成しなかった。

40

50

## 【 0 0 6 3 】

## C 6 / 3 6 蚊細胞の増殖速度

蚊細胞の生存率を評価するために、C 6 / 3 6 蚊細胞の感染後に、エレクトロポレーションに由来するウイルスを比較した。ここで、図 4 を参照すると、1 8 1 - 2 5 株は、C 6 / 3 6 蚊細胞で生存可能な唯一の株であった。本明細書で試験したすべての組換えアルファウイルス構築物は、生存可能ではなく、C 6 / 3 6 蚊細胞で増殖を示さなかった。

## 【 0 0 6 4 】

## 実施例 6

## ブランクアッセイ

チクングニヤ 1 8 1 - 2 5 株、及び C H I K - I R E S ( E M C V I R E S、ポジティブコントロール) は、ベロ細胞上にブランクを生成した。ここで図 5 を参照すると、いくつかの組換えアルファウイルス構築物 (例えば、E V 7 1、H C V、T M E V、及び H R V 由来の I R E S) は、ベロ細胞上にブランクを生成したが、異なるサイズのブランクを示した。例えば、E V 7 1 I R E S 配列の挿入物を有する構築物は、コントロールの C H I K - I R E S より一貫してより大きなブランクを生成したが、一方で、H C V、H R V、及び T M E V 由来の I R E S 配列を有する構築物のような、他の組換えアルファウイルス構築物は、E V 7 1 I R E S 配列を挿入した構築物 C H I K - I R E S ( E M C V、ポジティブコントロールの構築物)、及び 1 8 1 - 2 5 株よりも小さい疫病を生じた。F M D V は、ブランクの生成に失敗した。ブランクのサイズは、ウイルスの適応性の指標であり、各構築物は、独特のブランクの表現型を有しており、- さらに、I R E S 挿入のすべてが、この弱毒化生成方法において、同等に機能するとは限らないことを支持する。

10

20

## 【 0 0 6 5 】

## 実施例 7

## 中和力価

チクングニヤウイルスである 1 8 1 - 2 5 に対して産生された中和ウサギポリクローナル抗体は、公に入手可能である。この抗体を、これらの I R E S 構築物の各々がこの試薬に対して中和される能力について、T C I D<sub>50</sub> 中和アッセイで試験した。各生弱毒化アルファウイルス株を、中和ポリクローナル抗体 ( n P a b ) を中和するその能力について試験した。この抗体は、インビボで免疫原性及び中和抗体応答を誘導する能力を有するウイルス上のエピトープに結合することが理解される。一定量のウイルス (  $1 \times 10^4$  T C I D<sub>50</sub> ) を 2 倍希釈系列の抗体に添加した。投入ウイルスの 5 0 % が中和された希釈液を、各々の生弱毒化アルファウイルス株間で比較する。

30

## 【 0 0 6 6 】

ここで、図 6 を参照すると、このヒストグラムのプロットに示すように、コントロールの抗チクングニヤウサギ血清プールを 1 : 4 から 1 : 8 1 9 2 まで連続的に希釈した。5 つの組換えアルファウイルス構築物、チクングニヤ - E M C V I R E S ( I R E S C O N T R O L , C H I K / I R E S )、及び 1 8 1 - 2 5 の集団チクングニヤワクチン株を T C I D<sub>50</sub> / m L 2 0 0 0 の同等のウイルス力価に希釈した。等量の各抗体希釈液及び各ウイルスサンプルを合わせ、3 7 °C で 1 . 5 時間インキュベートした。9 6 ウェルのベロ細胞プレートの 1 ウェルあたり、各ウイルス抗体試料 1 0 0 μ L を蒔いた。5 日後、前記細胞層中に C P E が存在しないことによって示されるように、前記ウイルスが完全に中和された抗体の最も高い希釈物が記録された。前記図の値は、2 つの異なる機会に、3 回の反復の幾何平均である。前記グラフの縦線に示されるように、E M C V I R E S のコントロールは、3 2 - 1 6 1 の G M T 値をもたらした。

40

## 【 0 0 6 7 】

ここで、図 7 を参照すると、コントロールの抗チクングニヤウサギ血清プールを 1 : 4 から 1 : 8 1 9 2 まで連続的に希釈した。試験した前記 I R E S アルファウイルス構築物、前記チクングニヤ E M C V - I R E S ( I R E S のコントロール)、及び古典的に弱毒化した生 1 8 1 / 2 5 の集団チクングニヤワクチン株を、T C I D<sub>50</sub> / m L 2 0 0 0

50

の同等のウイルス力価に希釈した。等量の各抗体希釈液、及び各ウイルスサンプルを合わせ、37 で1.5時間インキュベートした。96ウェルのペロ細胞プレートの1ウェルあたり、各ウイルス抗体試料100  $\mu$ Lを蒔いた。5日後、前記細胞層中にCPEが存在しないことによって示されるように、前記ウイルスが完全に中和された抗体の最も高い希釈物が記録された。前記図の値は、2つの異なる実験における3回の反復の幾何平均である。生存可能なアルファウイルス構築物の各々は、前記中和抗体によって中和され得る。前記GMTは、ワクチンの遺伝子型に渡って同等ではなかったが、前記力価範囲は、1または2希釈以内であり、強固な中和を示した。

#### 【0068】

##### 実施例8

##### 動物試験

予備動物試験でマウスを使用し得る。例えば、A129マウスを入手して、コントロールの構築物であるEMCV-IRESアルファウイルス構築物の以前の試験と同様のマウス試験に使用し得る。3~10週齢の動物は、約 $1 \times 10^4$  PFUの選択された構築物、または他の適切な投与量を、左後足の足跡に皮内感染させ得る。足跡の測定は、予防接種の48時間後に、前記ボールで後足の垂直高さとして、キャリパーを用いて行い得る。前記動物を15~45日（または、約38日）維持し、21日目と35日目に出血させ得る。次いで、これらの動物に、約100 PFU、またはアルファウイルス（例えば、天然に存在し、感染症の症状、罹患率、及び死亡についてモニタリングされたCHIKV）の他の適切なチャレンジでチャレンジし得る。これらのチャレンジに対する反応は、CHIKVまたは他の標的アルファウイルスによる感染の減少及び感染に対する防御について観察し得る。

#### 【0069】

予備的データに基づいて、5つの構築物のいずれかで免疫したマウス（図7または8参照）は、ウイルス感染及びウイルス感染後の条件に対する防御を有するCHIK野生型チャレンジに応答するであろう。これらの組み合わせられたデータに基づいて、マウスは、GMTで測定した、図8に見られる表に示される中和力価傾向を生じる。EV71 IRESアルファウイルス構築物は、EMCV CHIK-IRESを含む、試験された他の構築物よりも一貫して大きなプラークを生成する能力に部分的に基づいて、コントロールのEMCV CHIK-IRESよりも優れていないとしても、同様に機能するであろう。図8に示されるすべての試験構築物は、標的アルファウイルスに曝露された場合、前記対象における標的アルファウイルスの感染を減少させるのに適したそのような構築物を受けている対象において、中和力価を生成する可能性が高い。

#### 【0070】

##### 第1相試験のデザイン

別の例では、遺伝的に改変された生弱毒化チクングニヤワクチンの候補を用いたフェーズI、非盲検、プラセボ対照用量漸増初回ヒト単回中心試験が記載されており、18~49歳の44人の健常な男性及び女性の成人がこの試験で評価される。インフォームドコンセント手続、試験参加についての適格性評価、及びワクチン接種前の血液採取（ベースラインのルーチン検査パラメーターについて、HIV/慢性肝炎を排除するため、及びベースラインのチクングニヤ抗体力価について）は、1日目のCHIKVワクチン候補の単回投与と共に、ワクチン接種の28日前までと0日目に行われる。ワクチン接種の7、14、28、182及び364日後に、安全性、忍容性及び免疫原性を評価する。図8及び図9に示された各試験構築物について、上記で議論された予備試験のために、前記構築物の投与後の対象において、すべての構築物がCHIKに対する中和抗体を産生する可能性が高い。

#### 【0071】

10

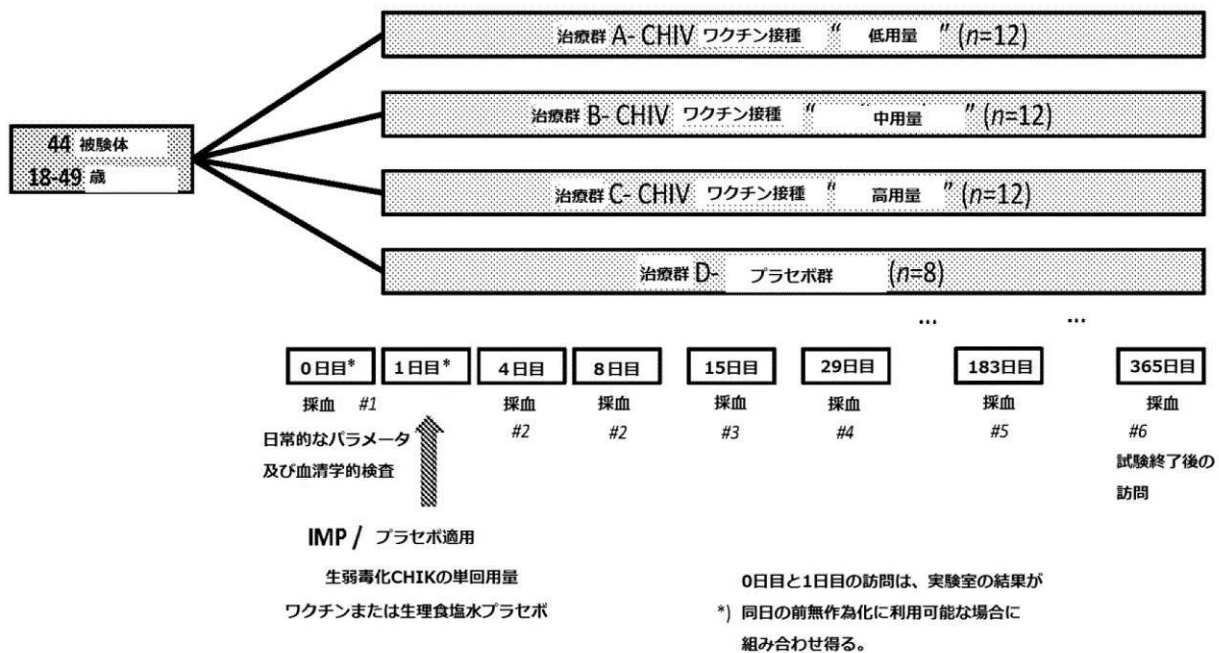
20

30

40

【表 1】

スキーム1：試験のデザイン



10

20

## 【0072】

## 実施例 9

## 蚊の感染

蚊由来の *Ae. albopictus* のコロニーを回収し、これらの実験に使用し得る。これらの昆虫は、前記 LR CHIKV 株（及び他のアルファウイルス）に対して非常に感受性が高いため、この種が選択され得る。羽化3～4日後に採取した成虫の蚊を、冷蔵テーブル（Bioquip、Rancho Dominguez, CA）を用いて麻酔し得て、胸腔内に約  $10^4$  のベロPFU/mL ウイルスのストック  $1.0 \mu\text{L}$  を注射し得る。前記蚊を、自由摂取で提供された10%ショ糖と共に、27℃で7日間インキュベートし得る。前記蚊を、例えば、2% FBS 及び殺菌剤を含む MEM のような培地において、凍結及び磨砕し得る。10,000 × G で10分間遠心分離した後、96ウェルプレートを用いて、ベロ細胞上に前記上清をプレーティングし得る。前記細胞を37℃で1時間感染させ、次いで、2% FBS を含む MEM で覆い、CPE を測定するために48時間インキュベートする。次いで、前記構築物による昆虫細胞の感染性を評価するために、標的構築物の存在について、前記細胞を評価する。上記の予備的な証拠に基づいて、図8及び図9に示された試験構築物のいずれも、前記昆虫細胞において有意なレベルの生弱毒化アルファウイルスを産生するが、実証されるように、前記構築物は哺乳動物細胞で増殖し得る。

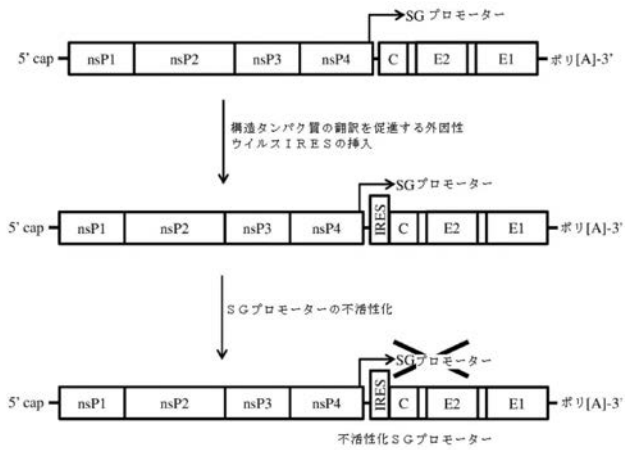
30

## 【0073】

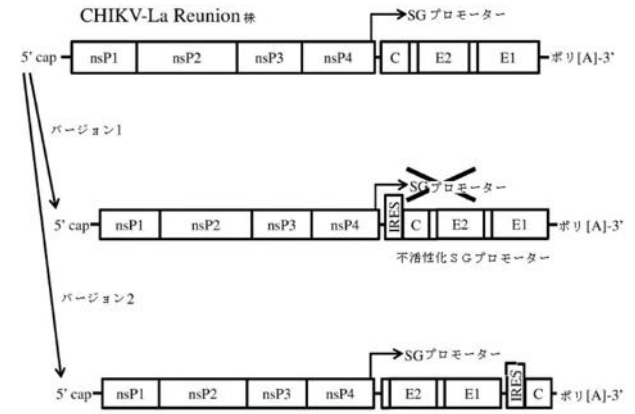
本明細書に開示され特許請求されている組成物及び方法のすべては、本開示に照らして過度の実験をすることなく、作製及び実行され得る。前記組成物及び方法は、好ましい実施形態に関して記載されているが、本明細書の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、前記組成物及び方法、ならびに本明細書に記載された方法のステップの順序で変形が適用され得ることは、当業者には明らかである。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連する特定の薬剤を、本明細書に記載の薬剤と置き換えて、同じまたは類似の結果を達成し得る。当業者に明らかなそのような類似の置換及び修飾はすべて、添付の特許請求の範囲により規定される精神、範囲、及び概念の範囲内であるとみなされる。

40

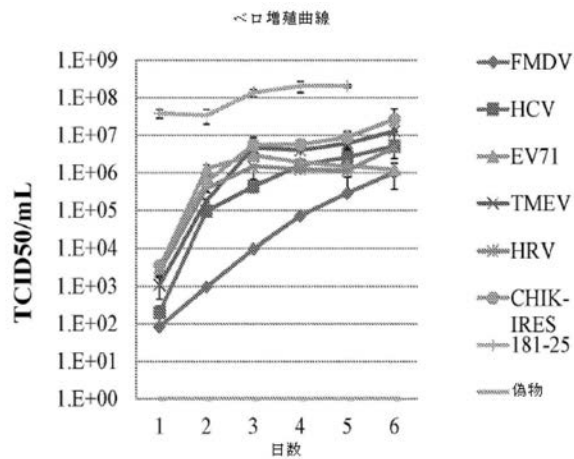
【 図 1 】



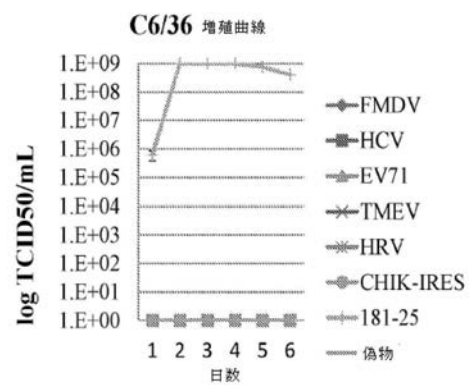
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

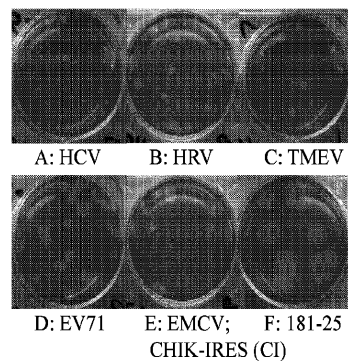
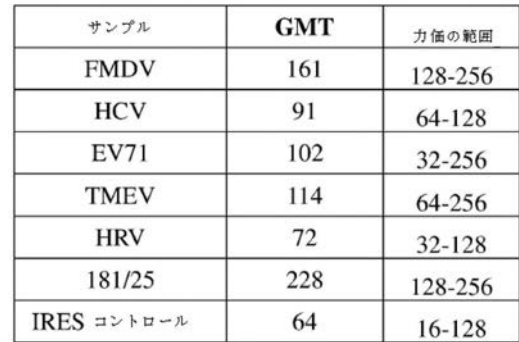


FIG. 5



【圖 7】



【圖 9】

[illegible]

【配列表】

2019509750000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/024450

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/12 C12N7/00 C12N15/86  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/131604 A2 (UNIV TEXAS [US]; WEAVER SCOTT C [US]; FROLOV ILYA V [US]; FROLOVA ELEN) 29 October 2009 (2009-10-29)	1,3-5,7, 8,14-25, 31-38, 43-45 6
Y	abstract page 3, lines 29-35 page 7, lines 12-23 page 8, lines 20-25 page 13 - page 14; example 10 page 15 - page 16; example 13 page 18 - page 19; example 15 claim 13 ----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier application or patent but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 2017

Date of mailing of the international search report

01/09/2017

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

Irion, Andrea

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/024450

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VOLKOVA E ET AL: "IRES-dependent replication of Venezuelan equine encephalitis virus makes it highly attenuated and incapable of replicating in mosquito cells", VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 377, no. 1, 20 July 2008 (2008-07-20), pages 160-169, XP022716137, ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1016/J.VIROL.2008.04.020 [retrieved on 2008-05-22] abstract page 161, left-hand column, paragraph 3 page 164, right-hand column, paragraph 3 - page 165, right-hand column, paragraph 2 -----	1,3-5,7, 8,16, 18-23, 32-36
X	KENNETH PLANTE ET AL: "Novel Chikungunya Vaccine Candidate with an IRES-Based Attenuation and Host Range Alteration Mechanism", PLOS PATHOGENS, vol. 7, no. 7, 28 July 2011 (2011-07-28), page e1002142, XP55012299, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002142 abstract page 2, left-hand column, paragraph 4 - page 3, left-hand column, paragraph 1 page 8, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 4 -----	1,3-5,7, 8,14, 18-23, 32-36
X	D. Y. KIM ET AL: "Design of Chimeric Alphaviruses with a Programmed, Attenuated, Cell Type-Restricted Phenotype", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 85, no. 9, 23 February 2011 (2011-02-23), pages 4363-4376, XP055012304, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00065-11	1-5,7,8, 13,14, 18-23, 30,32-36
Y	page 4367, right-hand column, paragraph 2 figure 6A page 4371, right-hand column, paragraph 3 -----	6
X	PANDYA JYOTSNA ET AL: "A vaccine candidate for eastern equine encephalitis virus based on IRES-mediated attenuation", VACCINE, vol. 30, no. 7, February 2012 (2012-02), pages 1276-1282, XP002773045, abstract page 1277, left-hand column, paragraph 3 - paragraph 4 ----- -/--	1,3-5,7, 8,15, 18-23, 32-36

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/024450

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATHILDE GUERBOIS ET AL: "IRES-driven Expression of the Capsid Protein of the Venezuelan Equine Encephalitis Virus TC-83 Vaccine Strain Increases Its Attenuation and Safety", PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, vol. 7, no. 5, 9 May 2013 (2013-05-09), page e2197, XP55295599, DOI: 10.1371/journal.pntd.0002197 abstract page 2, right-hand column, paragraph 2 page 6, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 -----	1,3-5,7, 8,16, 18-23, 32-36
X	CHU HAIYAN ET AL: "Deciphering the protective role of adaptive immunity to CHIKV/IRES a novel candidate vaccine against Chikungunya in the A129 mouse model", VACCINE, vol. 31, no. 33, 29 May 2013 (2013-05-29), pages 3353-3360, XP028595583, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2013.05.059 abstract page 354, left-hand column, paragraph 4 -----	1,3-5,7, 8,14, 18-23, 32-36
X	WILLIAM J. WEISE ET AL: "A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever", PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, vol. 8, no. 8, 1 August 2014 (2014-08-01), page e2969, XP055399653, US ISSN: 1935-2727, DOI: 10.1371/journal.pntd.0002969 abstract page 2, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 figure 1 page 7, right-hand column, paragraph 4 -----	1,3-5,7, 8,18-23, 32-36
X	C. J. ROY ET AL: "Chikungunya Vaccine Candidate Is Highly Attenuated and Protects Nonhuman Primates Against Telemetrically Monitored Disease Following a Single Dose", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. JID, vol. 209, no. 12, 7 January 2014 (2014-01-07), pages 1891-1899, XP055399656, CHICAGO, IL. ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1093/infdis/jiu014 abstract ----- -/--	1,3-5,7, 8,14, 18-23, 32-36

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/024450

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SVETLANA ATASHEVA ET AL: "Venezuelan equine encephalitis virus variants lacking transcription inhibitory functions demonstrate highly attenuated phenotype", JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 89, no. 1, 15 October 2014 (2014-10-15), pages 71-82, XP055399658, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.02252-14 page 73, right-hand column, paragraph 5 -----	1-45
A	MARTÍNEZ-SALAS ENCARNACIÓN ET AL: "Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions", VIRUS RESEARCH, vol. 206, 21 January 2015 (2015-01-21), pages 62-73, XP029178945, ISSN: 0168-1702, DOI: 10.1016/J.VIRUSRES.2015.01.012 the whole document -----	1-45

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/024450

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009131604 A2	29-10-2009	AU 2009238667 A1	29-10-2009
		CA 2713165 A1	29-10-2009
		CA 2910235 A1	29-10-2009
		CN 102083986 A	01-06-2011
		CO 6290702 A2	20-06-2011
		EP 2250269 A2	17-11-2010
		EP 3085787 A1	26-10-2016
		IL 207167 A	30-04-2014
		JP 5758632 B2	05-08-2015
		JP 2011523347 A	11-08-2011
		KR 20100106599 A	01-10-2010
		KR 20160124255 A	26-10-2016
		NZ 587502 A	21-12-2012
		NZ 603790 A	29-08-2014
		SG 187513 A1	28-02-2013
		SG 10201606111X A	29-09-2016
		US 2011052634 A1	03-03-2011
		US 2014010841 A1	09-01-2014
		WO 2009131604 A2	29-10-2009
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63	Z
<b>A 6 1 K 39/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/12	
<b>A 6 1 K 39/215 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/215	
<b>A 6 1 K 39/193 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/193	
<b>A 6 1 P 31/14 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/14	

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

(72) 発明者 ライブングッド、 ジル アン  
 アメリカ合衆国 8 0 5 2 6 コロラド州 フォート コリンズ ハンプシャー コート 2 3 4  
 8

(72) 発明者 パウエル、 ティモシー デュアン  
 アメリカ合衆国 0 1 7 5 4 マサチューセッツ州 メイナード ブルー ジェイ ウェイ 5  
 F ターム(参考) 4B065 AA87X AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 BA02 BA03 CA24  
 CA44 CA45  
 4C085 AA03 BA51 BA61 BA71 CC05 CC08 DD62 EE01 GG01 GG08