

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-514774
(P2025-514774A)

(43)公表日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 7 6
A 0 1 K	67/68 (2025.01)	A 0 1 K	67/68		4 C 0 8 4
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全53頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-561891(P2024-561891)				(71)出願人 523031024
(86)(22)出願日	令和5年4月18日(2023.4.18)				リプリケイト バイオサイエンス、イン
(85)翻訳文提出日	令和6年12月18日(2024.12.18)				コーポレイティド
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065898				アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 2
(87)国際公開番号	WO2023/205644				1 2 1, サンディエゴ, ソレント バレー
(87)国際公開日	令和5年10月26日(2023.10.26)				ロード 1 1 5 5 8, スイート 6
(31)優先権主張番号	63/332,606				(74)代理人 100099759
(32)優先日	令和4年4月19日(2022.4.19)				弁理士 青木 篤
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				(74)代理人 100123582
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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				弁理士 三橋 真二
				最終頁に続く	(74)代理人 100117019
					弁理士 渡辺 陽一
					(74)代理人 100141977
					弁理士 中島 勝
					(74)代理人 100138210
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改変西部ウマ脳炎ウイルス及びその使用

(57)【要約】

本開示は、改変ウイルスゲノム又は自己複製RNAを含む核酸分子、それを含む医薬組成物、並びに細胞培養内の又は生体内の所望の生成物の産生のためのそのような核酸分子及び組成物の使用を含む、分子ウイルス学の分野に関する。また、それを必要とする被験体において薬力学的効果を誘発する方法、並びにさまざまな健康状態を予防及び／又は治療する方法も提供される。

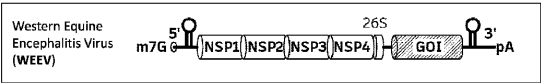


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変された西部ウマ脳炎ウイルス（WEEV）ゲノム又は自己複製RNA（srRNA）が、1つ又はそれ以上のウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部を欠いている、前記改変されたWEEVゲノム又はsrRNA核酸構築物をコードする核酸を含む、核酸構築物。

【請求項 2】

前記改変ウイルスゲノム又はsrRNAが、1つ又はそれ以上のウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の実質的な部分を欠いている、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 3】

前記改変ウイルスゲノム又はsrRNAが、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列を含まない、請求項 1～2 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 4】

さらに1つ又はそれ以上の発現カセットを含み、前記発現カセットのそれぞれが異種核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 5】

前記発現カセットの少なくとも1つが、異種核酸配列に作動可能に連結されたサブゲノム（sg）プロモーターを含む、請求項 4 に記載の核酸構築物。

【請求項 6】

前記sgプロモーターが26Sサブゲノムプロモーターである、請求項 5 に記載の核酸構築物。

【請求項 7】

前記改変WEEVゲノム又はsrRNAの少なくとも1つの非構造タンパク質（nsP）又はその一部が、前記改変WEEVゲノム又はsrRNAの残りの部分に対して異種である、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8】

異種nsP又はその一部をコードする核酸配列をさらに含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9】

1つ又はそれ以上の非翻訳領域（UTR）をさらに含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 10】

前記UTRの少なくとも1つが異種UTRである、請求項 9 に記載の核酸構築物。

【請求項 11】

前記発現カセットの少なくとも1つが目的遺伝子（GOI）のコード配列を含む、請求項 4～10 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 12】

前記GOIが、治療用ポリペプチド、予防用ポリペプチド、診断用ポリペプチド、栄養補助食品用ポリペプチド、工業用酵素、及びレポーターポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドをコードする、請求項 11 に記載の核酸構築物。

【請求項 13】

前記GOIが、抗体、抗原、免疫調節剤、酵素、シグナル伝達タンパク質、及びサイトカインからなる群から選択されるポリペプチドをコードする、請求項 11～12 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 14】

前記GOIのコード配列が、参照コード配列の発現レベルよりも高いレベルで発現するように最適化されている、請求項 11～13 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 15】

前記GOIのコード配列が、RNAの安定性を高めるように最適化されている、請求項

10

20

30

40

50

11～14のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項16】

前記核酸配列が、配列番号1又は配列番号2の核酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、請求項1～15のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項17】

請求項1～16のいずれか1項に記載の核酸構築物を含む組換え細胞。

【請求項18】

前記組換え細胞が真核細胞である、請求項17に記載の組換え細胞。

10

【請求項19】

前記組換え細胞が動物細胞である、請求項18に記載の組換え細胞。

【請求項20】

前記動物細胞が脊椎動物細胞又は無脊椎動物細胞である、請求項19に記載の組換え細胞。

【請求項21】

前記組換え細胞が昆虫細胞である、請求項20に記載の組換え細胞。

【請求項22】

前記組換え細胞が蚊細胞である、請求項21に記載の組換え細胞。

【請求項23】

前記組換え細胞が哺乳動物細胞である、請求項20に記載の組換え細胞。

20

【請求項24】

請求項20に記載の組換え細胞であって、前記組換え細胞が、SV40によって形質転換されたサル腎CV1細胞(COS-7)、ヒト胎児腎細胞(例えば、HEK293又はHEK293細胞)、ベビーハムスター腎細胞(BHK)、マウスセルトリ細胞(例えば、TM4細胞)、サル腎細胞(CV1)、ヒト子宮頸癌細胞(HeLa)、イヌ腎細胞(MDCK)、バッファローラット肝細胞(BRL3A)、ヒト肺細胞(W138)、ヒト肝細胞(HepG2)、マウス乳腺腫瘍(MMT060562)、TRI細胞、FS4細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、アフリカミドリザル腎細胞(Vero細胞)、ヒトA549細胞、ヒト子宮頸細胞、ヒトCHME5細胞、ヒトPER.C6細胞、NS0マウス骨髓腫細胞、ヒト上皮様喉頭細胞、ヒト線維芽細胞、ヒトHUH-7細胞、ヒトMRC-5細胞、ヒト筋細胞、ヒト内皮細胞、ヒト星状細胞、ヒトマクロファージ細胞、ヒトRAW264.7細胞、マウス3T3細胞、マウスL929細胞、マウス結合組織細胞、マウス筋細胞、及びウサギ腎細胞からなる群から選択される、組換え細胞。

30

【請求項25】

請求項17～24のいずれか1項に記載の少なくとも1つの組換え細胞と培養培地とを含む、細胞培養物。

【請求項26】

請求項1～16のいずれか1項に記載の核酸構築物を含むトランスジェニック動物。

40

【請求項27】

前記動物が脊椎動物又は無脊椎動物である、請求項26に記載のトランスジェニック動物。

【請求項28】

前記動物が昆虫である、請求項26に記載のトランスジェニック動物。

【請求項29】

前記動物が哺乳動物である、請求項27に記載のトランスジェニック動物。

【請求項30】

前記哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、請求項29に記載のトランスジェニック動物。

【請求項31】

50

目的のポリペプチドを産生する方法であって、(i) 請求項 26～30 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック動物を飼育すること、又は(ii) 請求項 12～16 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物を含む組み換え細胞を、前記トランスジェニック動物又は組み換え細胞が G O I によってコードされるポリペプチドを産生する条件下で培養することを含む、方法。

【請求項 32】

請求項 12～16 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物を被験体に投与することを含む、前記被験体において目的のポリペプチドを産生する方法。

【請求項 33】

前記被験体が脊椎動物又は無脊椎動物である、請求項 29～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 34】

前記被験体が昆虫である、請求項 29～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

前記被験体が哺乳動物被験体である、請求項 29～33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

前記哺乳動物被験体がヒト被験体である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

請求項 29～36 のいずれか 1 項に記載の方法によって産生された組換えポリペプチド。

20

【請求項 38】

医薬的に許容し得る賦形剤と以下とを含む、医薬組成物：

a) 請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物、

b) 請求項 17～24 のいずれか 1 項に記載の組換え細胞、及び／又は

c) 請求項 37 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 39】

請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物と医薬的に許容し得る賦形剤とを含む、請求項 38 に記載の医薬組成物。

【請求項 40】

請求項 17～24 のいずれか 1 項に記載の組換え細胞と医薬的に許容し得る賦形剤とを含む、請求項 38 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 41】

請求項 37 に記載の組換えポリペプチドと医薬的に許容し得る賦形剤とを含む、請求項 38 に記載の医薬組成物。

【請求項 42】

前記組成物が、リポソーム、脂質ベースのナノ粒子 (LNP)、ポリマーナノ粒子、ポリプレックス、ウイルスレプリコン粒子 (VRP)、ミクロスフェア、免疫刺激複合体 (ISCOM)、生物活性リガンド結合体、又はこれらの任意の組み合わせ中に配合されている、請求項 38～41 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 43】

前記組成物が免疫原性組成物である、請求項 38～42 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 44】

前記免疫原性組成物がワクチンとして配合される、請求項 43 に記載の医薬組成物。

【請求項 45】

前記組成物が被験体に対して実質的に非免疫原性である、請求項 38～42 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 46】

前記医薬組成物がアジュバントとして配合される、請求項 38～45 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

50

【請求項 47】

前記医薬組成物が、鼻腔内投与、髄腔内投与、経皮投与、腹腔内投与、筋肉内投与、気管内投与、節内投与、腫瘍内投与、関節内投与、静脈内投与、皮下投与、腔内投与、眼内投与、直腸投与、及び経口投与のうち1つ又はそれ以上のために配合される、請求項38～46のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 48】

それを必要とする被験体において薬力学的効果を誘発する方法であって、前記被験体に以下を含む組成物を投与することを含む方法：

- a) 請求項1～16のいずれか1項に記載の核酸構築物；
- b) 請求項17～24のいずれか1項に記載の組換え細胞；
- c) 請求項37に記載の組換えポリペプチド；及び／又は
- d) 請求項38～47のいずれか1項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 49】

前記薬力学的効果が、免疫原性効果、バイオマーカー応答、治療効果、予防効果、所望の効果、望ましくない効果、有害効果、及び疾患モデルにおける効果の1つ又はそれ以上を含む、請求項48に記載の方法。

【請求項 50】

前記薬力学的効果が前記被験体において免疫応答を誘発することを含む、請求項49に記載の方法。

【請求項 51】

それを必要とする被験体の健康状態を予防及び／又は治療する方法であって、前記被験体に以下を含む組成物を予防的又は治療的に投与することを含む方法：

- a) 請求項1～16のいずれか1項に記載の核酸構築物；
- b) 請求項17～24のいずれか1項に記載の組換え細胞；
- c) 請求項37に記載の組換えポリペプチド；及び／又は
- d) 請求項38～47のいずれか1項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 52】

前記投与された組成物が被験体において免疫応答を誘発する、請求項51に記載の方法。

【請求項 53】

前記状態が増殖性障害又は微生物感染症である、請求項51～52のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 54】

前記被験体が増殖性障害又は微生物感染症に関連する状態を有するか、又は有することが疑われる、請求項51～53のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 55】

前記投与された組成物により、前記被験体におけるインターフェロン産生の増加をもたらす、請求項51～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 56】

前記組成物が、前記被験体に単一の治療法（単剤療法）として、又は少なくとも1つの追加の治療法と組み合わせた第1の治療法として、個別に投与される、請求項51～55のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 57】

前記少なくとも1つの追加の治療法が、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、標的化療法、及び手術からなる群から選択される、請求項56に記載の方法。

【請求項 58】

薬力学的効果を誘発するための、免疫応答を誘発するための、及び／又は健康状態又は微生物感染症の予防及び／又は治療のための、以下を含むキット：

- a) 請求項1～16のいずれか1項に記載の核酸構築物；

50

- b) 請求項 17～24 のいずれか 1 項に記載の組換え細胞；
- c) 請求項 37 に記載の組換えポリペプチド；及び／又は
- d) 請求項 38～47 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物、
及び請求項 48～57 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するための説明書。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2022年4月19日に出願された米国仮特許出願第63／332,606号の優先権を主張する。上記参照出願の開示は、参照により、図面を含めてその全体が明示的に本明細書に取り込まれる。

10

配列表の取り込み

【0002】

添付の配列表の資料は、参照により本出願に取り込まれる。添付の配列表XMLファイル(2023-04-13 Sequence_Listing_ST26_058462-511001WO.xml)は、2023年4月13日に作成され、サイズは26,362バイトである。

分野

【0003】

本開示は、分子ウイルス学及び免疫学の分野に関し、特に、改変ウイルスゲノム及びレプリコン、例えば自己複製RNA(srRNA)分子をコードする核酸分子、それを含む医薬組成物、及び細胞培養物又は生体内で所望の生成物を生産するためのそのような核酸分子及び組成物の使用に関する。また、それを必要とする被験体において薬力学的効果を誘発する方法、並びにさまざまな健康状態を予防及び／又は治療する方法も提供される。

20

【背景技術】

【0004】

背景

近年、いくつかの異なる群の動物ウイルスが、それらのゲノムの相同組換え又は直接的な工学作成による遺伝子操作を受けている。DNAウイルスとRNAウイルスの両方に対する逆遺伝学システムの利用可能性により、例えばワクチン、発現ベクター、抗腫瘍剤、遺伝子治療ベクター、及び薬物送達ビヒクルとしての、組換えウイルスの使用に対する新しい展望が生まれている。

30

【0005】

例えば、多くのウイルスベースの発現ベクターが、培養された組換え細胞中の異種タンパク質の発現に使用されている。例えば、宿主細胞中の遺伝子発現のための改変ウイルスベクターの適用は拡大し続けている。この点に関する最近の進歩には、マルチサブユニットタンパク質複合体の生産のための技術及びシステムのさらなる開発、及び異種タンパク質の生産を改善するためのタンパク質修飾酵素の共発現が含まれる。ウイルス発現ベクター技術に関するその他の最近の進歩には、遺伝子発現の制御、ウイルスベクターの調製、インビボ遺伝子治療法の適用、及びワクチン送達ベクターの作成のための、多くの高度なゲノム工学操作の適用が含まれる。

40

【0006】

しかし、宿主細胞は病原体の侵入を検知しそれに対抗するための複雑で強力なメカニズムを開発できることが報告されている。さらに、ウイルス、特に病原性ウイルスは、感染及び複製に対する宿主細胞の細胞防御に対抗するために宿主細胞とともに進化してきたことが報告されている。感染の結果、多くの宿主細胞は、他の細胞に広がる可能性のある子孫のウイルス複製及びウイルス生成を制御するために、細胞タンパク質翻訳機構を停止させる。この現象は一般に「自然免疫応答」と呼ばれている。感染した細胞はまた、危険信号を他の細胞に局所的及び全身的に送信して、抗ウイルス状態を確立し感染を制御する。これらの細胞抗ウイルスシステムは宿主細胞に利益をもたらすが、これらはまた、有益な

50

ワクチン抗原又は治療用物質を発現するように設計された自己複製RNA (srRNA) に悪影響を与える可能性もある。例えば、細胞が有益なタンパク質を発現するsrRNAを検出し、その生来の免疫防御機構を活性化すると、そのような細胞における有益なタンパク質の発現が影響を受け、srRNAの有効性が損なわれる可能性がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、srRNAベースの発現プラットフォームで目的の産物を発現するためのより効率的な方法及びシステムが依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

概要

本開示は、増殖性疾患や微生物感染などのさまざまな健康状態の予防及び管理に使用するための、組み換え核酸構築物やそれを含む医薬組成物などの免疫治療薬の開発に関する。特に、以下でより詳細に説明されるように、本開示のいくつかの実施態様は、改変されたゲノム又はレプリコン、例えば、ウイルスの1つ又はそれ以上の構造タンパク質をコードするウイルス核酸配列の少なくとも一部を欠いているアルファウイルス (Alpha virus) 西部ウマ脳炎ウイルス (WEEV) の自己複製RNA (srRNA) をコードする配列を含む核酸構築物を提供する。また、本明細書で開示される核酸構築物の1つ又はそれ以上を含むように工学操作された組み換え細胞及びトランスジェニック動物、目的の分子 (例えば、目的のポリペプチド) を生成する方法、以下の1つ又はそれ以上を含む医薬組成物も開示される：(a) 本開示の核酸構築物、(b) 本開示のポリペプチド、(c) 本開示の組み換え細胞。さらに、本開示の特定の態様において、それを必要とする被験体において薬力学的効果を誘発するための、及び／又は増殖性疾患 (例えば、癌) 及び感染症を含む様々な健康状態の予防及び／又は治療のための組成物及び方法が提供される。

【0009】

本開示の1つの態様において、改変された西部ウマ脳炎ウイルス (WEEV) ゲノム又はレプリコン、例えば自己複製RNA (srRNA) をコードする核酸配列を含む核酸構築物が本明細書に提供され、ここで、改変されたWEEVゲノム又はレプリコン、例えばsrRNAは、1つ又はそれ以上のウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部を欠いている。

【0010】

本開示の核酸構築物の非限定的な例示的实施態様は、1つ又はそれ以上の以下の特徴を含むことができる。いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はレプリコン、例えばsrRNAは、1つ又はそれ以上のウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の実質的な部分を欠いている。いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はレプリコン、例えばsrRNAは、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列を含まない。いくつかの実施態様において、本開示の核酸分子はさらに、1つ又はそれ以上の発現カセットを含み、ここで、各発現カセットは、異種核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの発現カセットは、異種核酸配列に作動可能に連結されたサブゲノム (sg) プロモーターを含む。いくつかの実施態様において、sgプロモーターは26Sサブゲノムプロモーターである。

【0011】

いくつかの実施態様において、改変WEEVゲノム又はレプリコン、例えばsrRNAの少なくとも1つの非構造タンパク質 (nsP) 又はその一部は、改変WEEVゲノム又はレプリコン、例えばsrRNAの残りの部分に対して異種である。いくつかの実施態様において、改変WEEVゲノム又はレプリコン、例えばsrRNAはさらに、異種nsP又はその一部をコードする核酸配列を含む。

【0012】

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物はさらに、1つ又はそれ以上の非翻訳領域（UTR）を含む。いくつかの実施態様において、UTRの少なくとも1つは異種UTRである。

【0013】

いくつかの実施態様において、少なくとも1つの発現カセットは、目的遺伝子（GOI）のコード配列を含む。いくつかの実施態様において、GOIは、治療用ポリペプチド、予防用ポリペプチド、診断用ポリペプチド、栄養補助食品用ポリペプチド、工業用酵素、及びレポーターポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドをコードする。いくつかの実施態様において、GOIは、抗体、抗原、免疫調節剤、酵素、シグナル伝達タンパク質、及びサイトカインからなる群から選択されるポリペプチドをコードする。いくつかの実施態様において、GOIのコード配列は、参照コード配列の発現レベルよりも高いレベルで発現するように最適化されている。いくつかの実施態様において、GOIのコード配列はRNAの安定性を高めるように最適化されている。

10

【0014】

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物は、配列番号1又は配列番号2の核酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0015】

1つの態様において、本明細書に開示される核酸構築物を含む組換え細胞が本明細書に提供される。いくつかの実施態様において、組換え細胞は真核細胞である。いくつかの実施態様において、組換え細胞は動物細胞である。いくつかの実施態様において、動物細胞は脊椎動物細胞又は無脊椎動物細胞である。いくつかの実施態様において、組換え細胞は昆虫細胞である。いくつかの実施態様において、組換え細胞は蚊細胞である。いくつかの実施態様において、組換え細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施態様において、組換え細胞は、SV40によって形質転換されたサル腎CV1細胞（COS-7）、ヒト胎児腎細胞（例えば、HEK293又はHEK293細胞）、ベビーハムスター腎細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（例えば、TM4細胞）、サル腎細胞（CV1）、ヒト子宮頸癌細胞（HeLa）、イヌ腎細胞（MDCK）、バッファローラット肝細胞（BRL3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝細胞（HepG2）、マウス乳腺腫瘍（MMT060562）、TRI細胞、FS4細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、アフリカミドリザル腎細胞（Verob細胞）、ヒトA549細胞、ヒト子宮頸細胞、ヒトCHME5細胞、ヒトPER.C6細胞、NS0マウス骨髄腫細胞、ヒト上皮様喉頭細胞、ヒト線維芽細胞、ヒトHUH-7細胞、ヒトMRC-5細胞、ヒト筋細胞、ヒト内皮細胞、ヒト星状細胞、ヒトマクロファージ細胞、ヒトRAW264.7細胞、マウス3T3細胞、マウスL929細胞、マウス結合組織細胞、マウス筋細胞、及びウサギ腎細胞からなる群から選択される。また、関連する態様において、本明細書に開示される少なくとも1つの組換え細胞及び培養培地を含む細胞培養物も提供される。

20

30

【0016】

別の態様において、本明細書に記載される核酸構築物を含むトランスジェニック動物が提供される。いくつかの実施態様において、トランスジェニック動物は脊椎動物又は無脊椎動物である。いくつかの実施態様において、トランスジェニック動物は哺乳動物である。いくつかの実施態様において、トランスジェニック哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施態様において、トランスジェニック動物は昆虫である。いくつかの実施態様において、トランスジェニック昆虫はトランスジェニック蚊である。別の態様において、本明細書には目的のポリペプチドを産生する方法が提供され、ここで、この方法は、（i）本明細書に開示されるトランスジェニック動物を飼育すること、又は（ii）本明細書に開示される核酸構築物を含む組換え細胞を、トランスジェニック動物又は組換え細胞がGOIによってコードされるポリペプチドを産生する条件下で培養することを含む。

40

【0017】

50

別の態様において、本明細書では、被験体において目的のポリペプチドを産生する方法が提供され、ここで、この方法は、被験体に本明細書に開示される核酸構築物を投与することを含む。いくつかの実施態様において、被験体は脊椎動物又は無脊椎動物である。いくつかの実施態様において、被験体は昆虫である。いくつかの実施態様において、昆虫は蚊である。いくつかの実施態様において、被験体は哺乳動物被験体である。いくつかの実施態様において、哺乳動物被験体はヒト被験体である。さらに別の態様において、本明細書では、本開示の方法によって産生される組換えポリペプチドが提供される。

【0018】

さらに別の態様において、本明細書では、医薬的に許容し得る賦形剤と、a) 本開示の核酸構築物、b) 本開示の組換え細胞、及び／又はc) 本開示の組換えポリペプチドとを含む、医薬組成物が提供される。

10

【0019】

本開示の医薬組成物の非限定的な例示の実施態様は、1つ又はそれ以上の以下の特徴を含み得る。いくつかの実施態様において、本明細書に開示される核酸構築物と医薬的に許容し得る賦形剤とを含む組成物が本明細書に提供される。いくつかの実施態様において、本明細書に開示される組換え細胞と医薬的に許容し得る賦形剤とを含む組成物が本明細書に提供される。いくつかの実施態様において、組成物は、本明細書に開示される組換えポリペプチドと医薬的に許容し得る賦形剤とを含む。いくつかの実施態様において、リポソーム、脂質ベースのナノ粒子(LNP)、ポリマーナノ粒子、ポリプレックス、ウイルスレプリコン粒子(VRP)、ミクロスフェア、免疫刺激複合体(ISCOM)、生物活性リガンドの結合体、又はこれらの任意の組み合わせに配合される組成物が、本明細書に提供される。いくつかの実施態様において、組成物は免疫原性組成物である。いくつかの実施態様において、免疫原性組成物はワクチンとして配合される。いくつかの実施態様において、免疫原性組成物は被験体に対して実質的に非免疫原性である。いくつかの実施態様において、医薬組成物はアジュバントとして配合される。いくつかの実施態様において、医薬組成物は、鼻腔内投与、髄腔内投与、経皮投与、腹腔内投与、筋肉内投与、気管内投与、節内投与、腫瘍内投与、関節内投与、静脈内投与、皮下投与、腔内投与、眼内投与、直腸投与、及び経口投与の1つ又はそれ以上用に配合される。

20

【0020】

別の態様において、本明細書では、それを必要とする被験体において薬力学的効果を誘発する方法が提供され、この方法は、被験体に、a) 本発明の核酸構築物、b) 本開示の組換え細胞、c) 本開示の組換えポリペプチド、及び／又はd) 本開示の医薬組成物、を含む組成物を投与することを含む。いくつかの実施態様において、薬力学的効果は以下の1つ又はそれ以上を含む：免疫原性効果、バイオマーカー応答、治療効果、予防効果、所望の効果、望ましくない効果、有害効果、及び疾患モデルにおける効果。いくつかの実施態様において、薬力学的効果は、被験体における免疫応答の誘発を含む。

30

【0021】

さらに別の態様において、本明細書では、それを必要とする被験体の健康状態を予防及び／又は治療する方法が提供され、この方法は、被験体に、a) 本開示の核酸構築物、b) 本開示の組み換え細胞、c) 本開示の組み換えポリペプチド、及び／又はd) 本開示のいずれか1つの医薬組成物を含む組成物を、予防的又は治療的に投与することを含む。いくつかの実施態様において、投与された組成物は薬力学的効果を誘発する。いくつかの実施態様において、薬力学的効果は、被験体における免疫応答の誘発を含む。

40

【0022】

開示の方法の非限定的な例示の実施態様は、1つ又はそれ以上の以下の特徴を含み得る。いくつかの実施態様において、状態は増殖性障害又は微生物感染症である。いくつかの実施態様において、被験体は、増殖性障害又は微生物感染症に関連する状態を有するか、又は有することが疑われる。いくつかの実施態様において、投与された組成物は、被験体におけるインターフェロン産生の増加をもたらす。いくつかの実施態様において、組成物は、被験体に単一の治療法(単独療法)として、又は少なくとも1つの追加の治療法と組

50

み合わせた第1の治療法として個別に投与される。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの追加の治療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、標的化療法、及び手術からなる群から選択される。

【0023】

さらに別の態様において、本明細書では、薬力学的応答を誘発するための、免疫反応を誘発するための、及び／又は健康状態又は微生物感染症の予防及び／又は治療のためのキットが提供され、キットは、a) 本開示の核酸構築物、b) 本開示の組み換え細胞、c) 本開示の組み換えポリペプチド、及び／又はd) 本開示の医薬組成物を含む。

【0024】

本明細書に記載の各態様及び実施態様は、実施態様又は態様の文脈から明示的に又は明確に除外されない限り、一緒に使用することができる。

10

【0025】

前述の概要は例示のみを目的としており、いかなる形でも限定するものではない。本明細書に記載の例示の実施態様及び特徴に加えて、本開示のさらなる態様、実施態様、目的、及び特徴は、図面、詳細な説明、及び請求項から完全に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、本開示のいくつかの実施態様に従う改変WEEVゲノム設計の非限定例のグラフ表示であり、ここで、元のウイルスのウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列は完全に削除されている。この図に記載されている改変されたWEEV設計は、WEEV株Imperialに由来する未変性の5'UTR及び3'UTRを含み、さらに26Sサブゲノムプロモーターの制御下で配置された目的の異種遺伝子(GOI)を含む。非構造タンパク質nsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4のコード配列が示されている。

20

【0027】

【図2A-2B】図2A-2Bは、本開示のいくつかの実施態様に従うた非限定的な例示的WEEV srRNA設計のグラフ表示であり、ここで、Imperial株由来の改変WEEVゲノムをコードする配列がプラスミドDNAベクターに取り込まれており(図2A)、これには、例示的な目的の遺伝子(GOI)、例えばインフルエンザAウイルスH5N1のヘマグルチニン前駆体(HA)のコード配列も含まれている(図2B)。

30

【発明を実施するための形態】

【0028】

本開示の詳細な説明

本明細書では、とりわけ、組換え細胞において、例えばワクチンや治療用ポリペプチドなどの異種分子を発現するのに適した、優れた発現能力を有するウイルス発現システムが提供される。例えば、本開示のいくつかの実施態様は、核酸構築物、例えば、改変ゲノム又はレプリコン、例えば、構造タンパク質をコードする元のウイルス配列の少なくとも一部が欠失された西部ウマ脳炎ウイルス(WEEV)のsrRNAを含む発現構築物及びベクターに関する。また、本開示のいくつかの実施態様において、異種ポリペプチドをコードする1つ又はそれ以上の発現カセットを含むウイルスベースの発現ベクターも提供される。さらに、本明細書に開示された1つ又はそれ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された組換え細胞も提供される。このような組換え細胞から得られる生体材料及び組換え生成物も、本出願の範囲内である。また、それを必要とする被験体において薬力学的効果を誘発するのに有用な組成物及び方法、並びにさまざまな健康状態を予防及び／又は治療する方法も提供される。

40

【0029】

RNAウイルス(例えば、アルファウイルス)に基づく自己複製RNA(srRNA)は、堅牢な発現システムとして使用することができる。例えば、WEEVなどのアルファウイルスをウイルス発現ベクターとして使用する利点は、これらが組換え宿主細胞中で大量の異種タンパク質の合成を誘導できることであると報告されている。他の利点の中でも

50

、治療用単鎖抗体などのポリペプチドは、インビボで高レベルで発現した場合に最も効果的である可能性がある。さらに、培養細胞（エクスピボ）から精製された組換え抗体を産生する場合、srRNAからの高タンパク質発現は、抗体生成物の全体的な収量を増加させることができる。さらに、発現されるタンパク質がワクチン抗原である場合、高レベルの発現は、インビボで最も堅牢な薬力学的効果を誘導することができる。

【0030】

アルファウイルス（Alphavirus）は、UTR、構造領域、及び非構造領域に含まれるモチーフを利用して、宿主細胞内での複製に影響を与える。これらの領域には、宿主細胞の自然免疫を回避するメカニズムも含まれている。しかし、アルファウイルスの種間では大きな違いが報告されている。例えば、新世界（New World）アルファウイルスと旧世界（Old World）アルファウイルスは、細胞内のストレス顆粒、JAK-STATシグナル伝達、FXR、及びG3BPタンパク質を利用して、ウイルス複製複合体を組み立てるためのさまざまな構成要素を進化させている。ゲノムのどの部分がこれらの構成要素を含むかはアルファウイルス間で異なる。例えば、PKRの活性化とそれに続くEIF2アルファのリン酸化を回避することは、シンドビス（Sindbis）などの一部の旧世界アルファウイルスでは下流ループを介して行われるが、この経路を回避することは、認識可能なDLPを欠くチングニア（Chikungunya）ではnsP4を介して行われると考えられている。さらに、個々のアルファウイルス間の変動を超えて、アルファウイルスの株内でも、毒性などの特性の変化の原因となる違いがよくある。一例として、新世界東部ウマ脳炎ウイルス（New World Eastern Equine Encephalitis virus: EEEV）の北米株と南米株の間の配列の変動は、STAT1経路を調節する能力を変え、タイプIインターフェロンの誘導の違いと、その結果としての毒性の変化につながる。さらなる例として、ゲノム配列の相違が2.7%未満の北米WEEV分離株のセットを用いたマウスの研究では、結果はゼロから完全致死までの範囲であった。

【0031】

アルファウイルスの非構造領域と構造領域における宿主細胞減衰因子の異なる存在を考慮すると、合成ベクターでの異種遺伝子発現を可能にするために構造遺伝子を削除すると、個々のベクターにさまざまな影響が及ぶ。非構造領域に異なる宿主減衰因子を有する合成レプリコンは、発現される異種遺伝子に対する免疫応答の誘導において異なる優位性を有する。例えば、旧世界ウイルスでは宿主細胞機能の停止がnsP2に関連付けられているのに対し、新世界ウイルス（例えば、EEEV、VEEV、及びWEEV）では、この活性は主にカプシドタンパク質（C）に関連付けられており、これは合成ベクターでは一部又は完全に欠失している。nsP3タンパク質の超可変ドメイン（HVD）は、各アルファウイルスに特異的な宿主相互作用を有する。特に、EEEV nsP3は、細胞FXR及びG3BPタンパク質ファミリー、DDX3、S100A4、IKK β 、PGAM5、及び細胞骨格再構成タンパク質、及び小胞輸送タンパク質と相互作用することが示されている。WEEVの非構造タンパク質を具体的に詳述した研究はほとんどないが、WEEVのゲノム配列決定は、EEEVとSINVの祖先間の組み換えの結果であることを明らかにしている。WEEV nsPのアミノ酸同一性はEEEV nsPと80%以上の同一性があると報告されているが、EEEV nsPをWEEV nsPに置き換えると、弱毒化されたキメラが生成され、ヌクレオチド及びコード配列の変化によってウイルスのライフサイクルに不可欠いくつかの活性が保持されるものの、生物学的活性には大きな違いがあることが実証されている。EEEV nsPとWEEV nsPが広範囲の病原性に寄与する既知及び未記載のメカニズムは、WEEVベースのsrRNAベクターが、ワクチン又はバイオ治療用途の異種タンパク質の発現のための独特で有利なベクターになる可能性があることを示唆している。これらのこれまで未記載のsrRNAベクターがもたらす利点は、まったく研究も予測もされていない。

【0032】

定義

10

20

30

40

50

特に他に定義しない限り、本明細書で使用されるすべての専門用語、表記法、及びその他の科学用語又は専門用語は、本出願が関係する技術分野の当業者が一般的に理解している意味を有することを意図している。場合によっては、一般的に理解されている意味を有する用語が、明確さのため、及び／又は参照しやすいように本明細書で定義されており、そして本明細書にそのような定義が含まれていることは、必ずしも当該技術分野で一般的に理解されているものとの実質的な違いを表すものと解釈されるべきではない。本明細書に記載又は参照されている技術及び操作の多くは、当業者によって十分に理解されており、従来の方法論を使用して一般的に使用されている。

【0033】

単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈上明らかに別の意味を示さない限り、複数形も含む。例えば、「a cell」という用語には、これらの混合物を含む1つ又はそれ以上の細胞が含まれる。「A及び／又はB」は、本明細書では、以下の選択肢のすべてを含むために使用される：「A」、「B」、「A又はB」、及び「A及びB」。

【0034】

本明細書で使用される「投与」及び「投与する」という用語は、限定されるものではないが、鼻腔内、経皮、静脈内、動脈内、筋肉内、節内、腹腔内、皮下、筋肉内、経口、膈内、及び局所投与、又はこれらの組み合わせを含む投与経路による生物活性組成物又は製剤の送達を指す。この用語には、限定されるものではないが、医療専門家による投与及び自己投与が含まれる。

【0035】

「細胞」、「細胞培養物」、及び「細胞株」という用語は、特定の対象細胞、細胞培養物、又は細胞株だけでなく、培養における移植又は継代数に関係なく、そのような細胞、細胞培養物、又は細胞株の子孫若しくは潜在的な子孫も指す。すべての子孫が親細胞と完全に同一であるとは限らないことを理解すべきである。これは、突然変異（例えば、意図的な又は意図しない突然変異）又は環境の影響（例えば、メチル化又は他のエピジェネティックな改変）のいずれかにより、後続の世代で特定の改変が発生する可能性があるためであり、従って、子孫は実際には親細胞と同一ではない可能性があるが、子孫が元の細胞、細胞培養物、又は細胞株と同じ機能を保持している限り、本明細書で使用される用語の範囲内に含まれる。

【0036】

本開示の組成物、例えば核酸構築物（例えばレプリコン構築物、例えばsrRNA構築物）、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物の「有効量」、「治療有効量」、又は「医薬的有效量」という用語は、一般に組成物が、組成物の存在しない場合と比較して規定の目的を達成するのに十分な量（例えば、投与の目的の効果を達成する、免疫応答を刺激する、疾患を予防又は治療する、又は疾患、障害、感染、若しくは健康状態の1つ又はそれ以上の症状を軽減する）を指す。「有効量」の例は、疾患の症状の治療、予防、又は軽減に寄与するのに十分な量であり、「治療有効量」とも呼ばれる。症状の「軽減」とは、症状の重症度又は頻度の減少、又は症状の除去を意味する。「治療有効量」を含む組成物の正確な量は、治療の目的によって異なり、当業者であれば既知の技術を使用して確認することができる（例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); 及び Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkinsを参照）。

【0037】

「構築物」という用語は、異種起源の1つ又はそれ以上の単離された核酸配列又はアミノ酸配列を含む、組換え分子、例えば組換え核酸又はポリペプチドを指す。例えば、ポリ

10

20

30

40

50

ペプチド構築物は、異なる起源の2つ又はそれ以上のアミノ酸配列が、単一のポリペプチド構築物内で互いに機能的に連結されているキメラポリペプチド分子であり得る。同様に、核酸構築物は、異なる起源の2つ又はそれ以上の核酸配列が単一の核酸分子に組み立てられたキメラ核酸分子であり得る。従って、代表的な核酸構築物には、(1)自然界では互いに隣接して存在しない調節配列及びコード配列を含む核酸配列(例えば、少なくとも1つのヌクレオチド配列が、少なくとも1つの他のヌクレオチド配列に関して異種である)、又は(2)自然界では隣接していない機能的RNA分子又はタンパク質の部分をコードする配列、又は(3)自然界では隣接していないプロモーターの部分を含む任意の構築物が含まれる。代表的な核酸構築物は、1つ又はそれ以上の核酸配列が機能的に連結された核酸分子を含む、ゲノム組み込み又は自律複製が可能な、プラスミド、コスミド、ウイルス、自律複製ポリヌクレオチド分子、ファージなどの任意の供給源に由来する、任意の組換え核酸分子、線状又は環状、一本鎖又は二本鎖のDNA又はRNA核酸分子を含む。本開示の核酸構築物は、構築物にも含まれる目的の核酸配列の発現を誘導するために必要な要素を含むことができる。このような要素は、目的の核酸配列に(転写を誘導するように)作動可能に連結されたプロモーターなどの制御要素を含むことができ、任意選択的にポリアデニル化配列を含むことができる。

10

【0038】

本開示のいくつかの実施態様において、1つ又はそれ以上の核酸構築物が、単一のベクターなどの単一の核酸分子内に取り込まれる(例えば、挿入される)か、又は2つ又はそれ以上の別々のベクターなどの2つ又はそれ以上の別々の核酸分子内に取り込まれる(例えば、挿入される)ことができる。本明細書では、「ベクター」という用語は、別の核酸分子を移送又は輸送することができる核酸分子又は配列を指すために使用される。従って、「ベクター」という用語は、DNAベースのベクターとRNAベースのベクターの両方を包含する。「ベクター」という用語には、クローニングベクター及び発現ベクター、並びにウイルスベクター及び組み込みベクターが含まれる。「発現ベクター」とは、調節領域を含むベクターであり、これにより、インビトロ、エクスピボ、及び／又はインビボでDNA配列及び断片を発現することができる。いくつかの実施態様において、ベクターは、例えばプラスミド(DNAベースのベクター)又は自己複製RNAベクターなどの、細胞内で自律複製を指示する配列を含む。いくつかの実施態様において、ベクターは、宿主細胞DNAへの組み込みを可能にするのに十分な配列を含む。有用なベクターには、例えば、プラスミド(例えば、DNAプラスミド又はRNAプラスミド)、トランスポゾン、コスミド、細菌人工染色体、及びウイルスベクターが含まれる。いくつかの実施態様において、本開示のベクターは、一本鎖ベクター(例えば、ssDNA又はssRNA)であり得る。いくつかの実施態様において、本開示のベクターは、二本鎖ベクター(例えば、dsDNA又はdsRNA)であり得る。いくつかの実施態様において、ベクターは、遺伝子送達ベクターである。いくつかの実施態様において、ベクターは、遺伝子を細胞に移送するための遺伝子送達ビヒクルとして使用される。いくつかの実施態様において、本開示のベクターは自己複製RNA(srRNA)ベクターである。

20

30

【0039】

構築物の成分に加えて、ベクターには、例えば、1つ又はそれ以上の選択マーカー、原核生物及び真核生物起源の1つ又はそれ以上の複製開始点、少なくとも1つの多重クローニング部位、及び／又は細胞のゲノムへの構築物の安定した組み込みを促進する要素が含まれ得る。2つ又はそれ以上の構築物は、単一のベクターなどの単一の核酸分子内に取り込むことができ、又は2つ又はそれ以上の別々のベクターなどの2つ又はそれ以上の別々の核酸分子内に取り込むことができる。「発現構築物」は、一般に、目的のヌクレオチド配列に作動可能に連結された少なくとも1つの制御配列を含む。このようにして、例えば、発現されるヌクレオチド配列と操作可能に接続されたプロモーターが、細胞内での発現のために発現構築物に提供される。本開示の実施のために、構築物及び細胞を調製及び使用するための組成物及び方法は、当業者に公知である。

40

【0040】

50

本明細書で使用される用語「作動可能に連結された」は、2つ又はそれ以上の要素、例えばポリペプチド配列又はポリヌクレオチド配列間の物理的又は機能的な連結を示し、これにより、これらの要素が意図された様式で作動することを可能にする。例えば、本明細書に記載される核酸分子又は核酸分子内のコード配列及びプロモーター配列の文脈で使用される用語「作動可能に連結された」は、コード配列及びプロモーター配列がインフレームであり、適切な空間的及び距離的に離れており、転写因子又はRNAポリメラーゼによるそれぞれの結合が転写に及ぼす影響を可能にすることを意味する。作動可能に連結された要素は、連続的又は非連続的（例えば、リンカーを介して互いに連結されている）であってもよいことが理解されるべきである。ポリペプチド構築物の文脈では、「作動可能に連結された」は、アミノ酸配列（例えば、異なるセグメント、部分、領域、又はドメイン）間の物理的連結（例えば、直接的又は間接的に連結されている）を指し、これが構築物の記載された活性を提供する。本明細書に開示されるポリペプチド又は核酸分子の作動可能に連結されたセグメント、部分、領域、及びドメインは、連続していても非連続であってもよい（例えば、リンカーを介して互いに連結されている）。

10

【0041】

本明細書で用いられる「部分」という用語は、割合を指す。ポリヌクレオチド配列、アミノ酸配列、又はタンパク質などの特定の構造に関して、その「部分」という用語は、前記構造の連続した部分又は不連続な割合を指す場合がある。例えば、アミノ酸配列の一部は、そのアミノ酸配列のアミノ酸の少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、及び少なくとも90%を含む。さらに又は代わりに、部分が不連続な部分である場合、その不連続な部分は、構造（例えば、タンパク質のドメイン）の2、3、4、5、6、7、8、又はそれ以上の部分から構成され、各部分は構造の連続した要素である。例えば、アミノ酸配列の不連続割合は、前記アミノ酸配列の2、3、4、5、6、7、8、又はそれ以上、例えば4つ以下の部分から構成され得、各部分は、アミノ酸配列の少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5つの連続したアミノ酸、少なくとも10の連続したアミノ酸、少なくとも20の連続したアミノ酸、又は少なくとも30の連続したアミノ酸を含む。

20

【0042】

細胞、核酸、タンパク質、又はベクターに関して使用される「組換え体」という用語は、細胞、核酸、タンパク質、又はベクターが、例えば実験室の方法によって改変されたか、又は実験室の方法の結果であるなどのように、人間の介入によって改変又は生成されたことを示す。従って、例えば、組換えタンパク質及び核酸には、実験室の方法によって生成されたタンパク質及び核酸が含まれる。組み換えタンパク質には、タンパク質の未変性（非組み換え又は野生型）の形態には存在しないアミノ酸残基が含まれる場合があり、又は修飾（例えば、標識）されたアミノ酸残基が含まれる場合もある。この用語には、ペプチド、タンパク質、又は核酸配列へのあらゆる修飾が含まれる。このような修飾には、以下が含まれる：1つ又はそれ以上のアミノ酸、デオキシリボヌクレオチド、又はリボヌクレオチドを含むペプチド、タンパク質、又は核酸配列のあらゆる化学修飾；ペプチド又はタンパク質内の1つ又はそれ以上のアミノ酸の付加、欠失、及び／又は置換；融合タンパク質の作成（例えば、抗体断片を含む融合タンパク質）；及び核酸配列内の1つ又はそれ以上の核酸の追加、欠失、及び／又は置換。細胞に関して使用される「組み換え体」という用語は、天然に存在する細胞を含むことを意図しているのではなく、組み換え／修飾されなければ細胞内に存在しないポリペプチド又は核酸を含むか発現するように工学操作／修飾された細胞を包含することを意図している。

30

40

【0043】

本明細書において2つ又はそれ以上の核酸又はタンパク質の文脈で使用される用語「同一性パーセント」は、以下に記載するデフォルトパラメータを用いたBLAST又はBLAST2.0配列比較アルゴリズムを使用して、又は用手的整列及び目視検査によって測定された、同じであるか、又は同じヌクレオチド又はアミノ酸の特定のパーセント（例え

50

ば、比較ウィンドウ又は指定領域にわたって、最大一致のために比較及び整列された場合、特定の領域にわたって約60%の配列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の同一性)を有する2つ又はそれ以上の配列又はサブ配列を指す。例えば、NCBIウェブサイト `ncbi.nlm.nih.gov/BLAST` を参照されたい。従ってこのような配列は「実質的に同一」とであると言われる。この定義は、クエリ配列の相補体にも言及されるか又は適用される。この定義は、BLASTアルゴリズムによって実行される配列比較を含み、ここで、このアルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列間の最大の一一致が得られるように選択される。この定義はまた、欠失及び／又は付加を含む配列、並びに置換を含む配列も含む。配列同一性は、少なくとも約20個のアミノ酸又はヌクレオチドの長さの領域、又は10～100個のアミノ酸若しくはヌクレオチドの長さの領域、又は特定の配列の全長にわたって計算することができる。配列同一性は、公開された技術及び広く入手可能なコンピュータプログラム、例えば、GCSプログラムパッケージ (Devereux et al., *Nucleic Acids Res* (1984) 12:387)、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul et al., *J Mol Biol* (1990) 215:403) を使用して計算することができる。配列同一性は、Wisconsin Biotechnology Center (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) の the Genetics Computer Group の配列分析ソフトウェアパッケージなどの配列分析ソフトウェアを、そのデフォルトパラメータを使用して使用して測定することができる。アミノ酸配列の類似性又は同一性を決定するために適切に利用できる追加の方法論には、Rosetta からの構造予測スコアを取り込んだ位置特異的構造スコアリングマトリックス (P3SM) に依存する方法論、並びに、例えば Setcliff et al., *Cell Host & Microbe* 23(6), May 2018 で既に説明されているように、長さ正規化編集距離に基づく方法論が含まれる。【0044】

10

20

本明細書で使用される用語「医薬的に許容し得る賦形剤」は、被験体に目的の化合物を投与するための医薬的に許容し得る担体、添加剤、又は希釈剤を提供する任意の適切な物質を指す。従って、「医薬的に許容し得る賦形剤」は、医薬的に許容し得る希釈剤、医薬的に許容し得る添加剤、及び医薬的に許容し得る担体と呼ばれる物質を含み得る。本明細書で使用される用語「医薬的に許容し得る担体」は、限定されるものではないが、生理食塩水、溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などの医薬的投与に適合するものを含む。補助的な活性化合物(例えば、抗生物質及び追加の治療剤)も組成物に取り込むことができる。【0045】

30

本明細書で使用される「被験体」又は「個体」は、ヒト(例えば、ヒト個体)及び非ヒト動物などの動物を含む。いくつかの実施態様において、「被験体」又は「個体」は、医師の治療下にある患者である。従って、被験体は、関係する健康状態(例えば、癌又は感染症)及び／又は健康状態の1つ又はそれ以上の症状に罹患しているか、罹患している疑いがあるか、又は罹患するリスクがあるヒト患者又は個人であり得る。被験体はまた、診断時又はそれ以降に関係する健康状態のリスクがあると診断された個人であり得る。用語「非ヒト動物」には、すべての脊椎動物、例えば哺乳動物、例えばげっ歯類、例えばマウス、家畜、家畜化された動物及びペット、非ヒト霊長類、及び例えば他の哺乳動物、例えば、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウシ、ニワトリ、及び非哺乳動物、例えば両生類、爬虫類などが含まれる。【0046】

40

本明細書に記載の開示の態様及び実施態様は、態様及び実施態様を「含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むことが理解される。本明細書で使用される「含む (comprising)」は、「含む (including)」、「含有する (con

50

taining)」、又は「特徴とする」と同義であり、包括的又は制限がなく、追加の記載されていない要素又は方法の工程を除外するものではない。本明細書で使用されている「からなる」は、請求された組成物又は方法に指定されていない要素、工程、又は成分を除外する。本明細書で使用されている「本質的にからなる」は、請求された組成物又は方法の基本的かつ新規な特性に実質的に影響しない材料又は工程を除外するものではない。本明細書で特に組成物の成分の説明又は方法の工程の説明で「含む (comprising)」という用語が言及されている場合、それは、記載された成分又は工程から本質的になり、及びそれらからなる組成物及び方法を包含するものと理解される。

【0047】

明確にするために、別々の実施態様の文脈で説明されている本開示の特定の特徴は組み合わせ、単一の実施態様で提供できることが理解される。逆に、簡潔にするために単一の実施態様の文脈で説明されている本開示のさまざまな特徴は、別々に、又は任意の適切な部分組み合わせで提供されてもよい。本開示に関連する実施態様のすべての組み合わせは、本開示によって具体的に包含され、すべての組み合わせが個別に明示的に開示されているかのように本明細書に開示される。さらに、さまざまな実施態様及びその要素のすべての部分組み合わせも、本開示によって具体的に包含され、すべてのそのような部分組み合わせが個別に明示的に本明細書に開示されているかのように本明細書に開示される。

【0048】

値の範囲が提供される場合、文脈が明確に他を指示しない限り、その範囲の上限と下限、及びその指定された範囲内のその他の指定された値又は介在値との間の各介在値は、下限の単位の10分の1まで本開示内に含まれると理解される。これらのより小さい範囲の上限と下限は、より小さい範囲に独立して含まれることができ、指定された範囲内で明示的に除外されている制限を条件として、本開示内に含まれる。記載された範囲に限界値の1つ又は両方が含まれる場合、含まれる限界値の1つ又は両方を除外する範囲も本開示に含まれる。

【0049】

本明細書では、数値の前に「約」という用語が付けられて特定の範囲が提示されており、この用語は、本明細書で使用されているように、概算という通常の意味を持っている。「約」という用語は、その後付された正確な数値、及びその用語の後に付された数値に近い又は近似する数値を文字通り裏付けるために使用されている。数値が具体的に記載された数値に近い又は近似しているかを判断する際に、近い又は近似する記載されていない数値は、それが提示されている文脈において、具体的に記載された数値と実質的に同等である数値である可能性がある。近似の程度が文脈から明らかでない場合は、「約」は、提供された値のプラス又はマイナス10%以内、又は提供された値を含むすべての場合で最も近い有効数字に丸められた数値を意味する。一部の実施態様において、「約」という用語は、指定された値±10%まで、最大±5%まで、又は最大±1%までを示す。

【0050】

値の範囲が提示されている場合、当業者であれば、本明細書に開示されているすべての範囲が、ありとあらゆる部分範囲及びその部分範囲の組み合わせを包含することを理解できる。記載されている範囲はいずれも、同じ範囲を少なくとも半分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1などに分割することを十分に記載し、可能にするものと容易に認識できる。非限定例として、本明細書で説明されている各範囲は、下3分の1、中3分の1、上3分の1などに容易に分割できる。当業者であれば、「最大」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」などのすべての言葉は、列挙された数字を含み、上記のように後で部分範囲に分割できる範囲を指すことも理解できる。最後に、当業者であれば理解できるように、範囲には個々のメンバーが含まれる。従って、例えば、1～3個の項目を含むグループは、1個、2個、又は3個の項目を含むグループを指す。同様に、1～5個の項目を有するグループは、1、2、3、4、又は5個の項目を有するグループを指し、以下同様である。

【0051】

例えば (a)、(b)、(i) などの見出しは、明細書及び請求項を読みやすくするためにのみ提示されている。明細書又は請求項における見出しの使用は、工程又は要素をアルファベット順又は数字順、又は提示されている順序で実行することを要求するものではない。

【0052】

西部ウマ脳炎ウイルス (WEEV)

西部ウマ脳炎ウイルス (WEEV) は、アルファウイルス属に属する蚊媒介性ウイルスであり、遺伝的、構造的、及び血清学的に関連するトガウイルス科 (Togaviridae) のウイルスのグループを含み、グループIVプラスセンス一本鎖RNAウイルスとして分類される。現在、アルファウイルス属には、シンドビスウイルス (SINV)、セムリキ森林ウイルス (SFV)、ロスリバーウイルス (RRV)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV)、東部ウマ脳炎ウイルス (EEEV) などがあり、これらはすべて近縁であり、哺乳動物、げっ歯類、魚類、鳥類、ヒトや馬などの大型哺乳動物などのさまざまな脊椎動物、昆虫などの無脊椎動物に感染する可能性がある。WEEVの珍しい特徴の1つは、シンドビスウイルス (SINV) 様祖先と東部ウマ脳炎ウイルス (EEEV) 様祖先間の古代の組み換えイベントの子孫であることである。

【0053】

WEEV及びEEEVを含むアルファウイルス属は広く研究されており、これらのウイルスのライフサイクル、複製形式などは十分に特性解析されている。この点に関する詳しい情報は、例えば、Corrin T. et al., Vector-Borne and Zoonotic Diseases, Vol. 21, No. 5, 2021に記載されている。さらに、アルファウイルスは動物細胞内で非常に効率的に複製されることが示されており、そのため、これらは細胞内でタンパク質や核酸を産生するためのベクターとして有用になっている。種と個体間の伝染は主に蚊を介して起きるため、アルファウイルスはアルボウイルス (Arbovirus) (節足動物媒介ウイルス) の収集に寄与している。

【0054】

これらのアルファウイルスはそれぞれ、ウイルススパイクタンパク質を含むエンベロープに囲まれたヌクレオカプシドに包まれた正極性の一本鎖RNAゲノムを有する。アルファウイルス粒子はエンベロープで覆われ、球形になる傾向があり (わずかに多形性があるが)、等尺性のヌクレオカプシドを有する。アルファウイルスゲノムは、長さ約11~12 kbの正極性の一本鎖RNAであり、5' キャップ、3' ポリAテール、及び2つのオープンリーディングフレームを含み、最初のフレームは酵素機能を有する非構造タンパク質をコードし、2番目のフレームはウイルス構造タンパク質 (例えば、カプシドタンパク質CP、E1糖タンパク質、E2糖タンパク質、E3タンパク質、及び6Kタンパク質) をコードする。例えば、WEEVは、5' 及び3' 非翻訳領域 (UTR) に挟まれた2つのオープンリーディングフレーム (ORF) を含む約11.5 kbの一本鎖プラスセンスRNAゲノムを有し、これは5' 末端がキャップされ、3' 末端がポリアデニル化されている。WEEVは、主な媒介蚊であるイエカ (Culex tarsalis) によって主に農業生息地で伝染する。哺乳動物は二次サイクルに参加できる。ヒトとウマはどちらも終末宿主であると考えられているが、ロバやポニーなどの一部のウマ科動物は低~中程度のウイルス血症 (104 PFU/mlをわずかに下回る) を発症し、これらの宿主が動物間流行の増幅に寄与する可能性がある。WEEVによるヒトの感染は、目立った症状がないもの (大多数) から、インフルエンザ様症候群、そして生命を脅かす脳炎や髄膜炎まで多岐にわたる。症状のある感染では、典型的には、突然の発熱、頭痛、吐き気、嘔吐、食欲不振、倦怠感の発現がみられ、次に、認知症状、衰弱、髄膜障害が起きる。

【0055】

アルファウイルスゲノムの5' 末端の3分の2は、ウイルスRNAの転写及び複製に必要な多数の非構造タンパク質をコードしている。これらのタンパク質はRNAから直接翻訳され、細胞タンパク質とともに、ウイルスゲノムの複製及びサブゲノムRNAの転写に

不可欠なRNA依存性RNAポリメラーゼを形成する。4つの非構造タンパク質（nsP1～4）が単一のポリタンパク質として生成され、ウイルスの複製機構を構成する。ポリタンパク質の処理は高度に制御された方法で行われ、P2／3ジャンクションでの切断がゲノム複製中のRNAテンプレートの使用に影響する。この部位は狭い溝の底部に位置しており、容易にアクセスできない。切断されると、nsP3はnsP2を取り囲むリング構造を形成する。これら2つのタンパク質は広範なインターフェイスを有する。非細胞変性ウイルス又は温度感受性表現型を生成するnsP2の変異は、P2／P3インターフェイス領域に集中している。nsP2非細胞変性変異の位置の反対側にあるP3変異は、P2／3の効率的な切断を妨ぐ。次にこれは、RNAの感染性に影響を及ぼし、ウイルスRNAの産生レベルを変化させる可能性がある。

10

【0056】

ゲノムの3'の1／3は、ウイルス粒子の形成に必要なすべての構造タンパク質（コアヌクレオカプシドタンパク質C、及びヘテロ二量体として会合するエンベロープタンパク質P62及びE1）の翻訳のテンプレートとして機能するサブゲノムRNAを含む。ウイルスの膜に固定された表面糖タンパク質は、受容体の認識と膜融合による標的細胞への侵入を担っている。サブゲノムRNAは、nsP4タンパク質をコードするRNA配列の3'末端にあるp26Sサブゲノムプロモーターから転写される。P62がE2とE3にタンパク質分解的成熟をすると、ウイルス表面が変化する。E1、E2、場合によってはE3の糖タンパク質「スパイク」が一緒になって、E1／E2二量体又はE1／E2／E3三量体を形成する。ここで、E2は中心から頂点まで伸び、E1は頂点間の空間を埋め、E3は、存在する場合はスパイクの遠位端にある。ウイルスがエンドソームの酸性に曝されると、E1はE2から解離してE1ホモ三量体を形成し、これは、細胞膜とウイルス膜と一緒に動かす融合工程に必要である。アルファウイルスの糖タンパク質E1はクラスIEウイルス融合タンパク質であり、これは、インフルエンザウイルスやHIVに見られるクラスI融合タンパク質とは構造が異なる。E2糖タンパク質は細胞質ドメインを介してヌクレオカプシドと相互作用する機能を有し、一方、その細胞外ドメインは細胞受容体に結合する役割を担っている。WEEVを含むほとんどのアルファウイルスは末梢タンパク質E3を失うが、セムリキウイルスではE3はウイルス表面に結合したままである。

20

【0057】

ほとんどのアルファウイルスと同様に、WEEVの複製は宿主細胞内の膜状表面で起きる。感染サイクルの第一段階では、ゲノムRNAの5'末端がRNAポリメラーゼ活性を有するポリタンパク質（nsP1～4）に翻訳され、ゲノムRNAと相補的なマイナス鎖が生成される。第二段階では、マイナス鎖がテンプレートとして使用されて、それぞれ2つのRNAが生成される：（1）翻訳によって他のnsPタンパク質を生成し、ウイルスのゲノムとして作用する二次ウイルスのゲノムに対応するプラスゲノムRNA；及び（2）感染粒子を形成するウイルスの構造タンパク質をコードするサブゲノムRNA。プラスゲノムRNA／サブゲノムRNA比は、ポリタンパク質がタンパク質分解によりnsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4に自己切断されることによって調節される。実際には、ウイルス遺伝子の発現は2つのフェーズで起きる。第1フェーズでは、プラスのゲノム鎖とマイナスのゲノム鎖の主な合成が行われる。第2フェーズでは、サブゲノムRNAの合成は事実上排他的であり、その結果、大量の構造タンパク質が生成される。

30

40

【0058】

自己複製RNA

当業者には理解されるように、「自己複製RNA」という用語は、許容細胞内で自己増幅又は自己複製を誘導するために必要なすべての遺伝情報を含むRNA分子を指す。従って、srRNAは「自己増幅RNA」（saRNA）と呼ばれることもある。一部の実施態様において、srRNAは「レプリコン」であり、これは単位として連続的に複製されるDNA又はRNAの線形又は円形のセクションである。レプリコンの非限定例としては、「レプリコンRNA」又は「RNAレプリコン」がある。srRNAは、自身の複製を誘導するために、一般的に（1）ポリメラーゼ、レプリカーゼ、又はウイルス若しくは宿

50

主細胞由来のタンパク質、核酸、若しくはリボ核タンパク質と相互作用してRNA増幅プロセスを触媒する可能性のある他のタンパク質をコードし、そして(2)サブゲノムRNAの複製及び転写に必要なシス作用性RNA配列を含む。これらの配列は、複製プロセス中に、自己コード化タンパク質、又は非自己コード化細胞由来のタンパク質、核酸、若しくはリボ核タンパク質、又はこれらのいずれかの構成要素間の複合体に結合する場合がある。本開示のいくつかの実施態様において、レプリコン(例えば、srRNA)はアルファウイルス(例えば、WEEV)に由来する。本開示のいくつかの実施態様において、アルファウイルスsrRNA構築物(例えば、srRNA、saRNA、又はレプリコン分子)は、一般に以下の要素を含む:複製のためにシスで必要な5'ウイルス又は欠陥干渉RNA配列、生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質(例えば、nsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4)をコードする配列、サブゲノムRNA(sgRNA)のためのサブゲノムプロモーター(sg)、複製のためにシスで必要な3'ウイルス配列、及び任意選択的にポリアデニル化域(ポリ(A))。場合によっては、異種配列の発現を指示するサブゲノムプロモーター(sg)を本開示のsrRNA構築物に含めることができる。

10

【0059】

さらに、srRNA分子(例えば、srRNA、saRNA、又はレプリコン分子)という用語は、一般に、正極性又は「メッセージ」センスの分子を指し、srRNAは既知の天然アルファウイルスの長さとは異なる長さであってもよい。本開示のいくつかの実施態様において、srRNAは、1つ又はそれ以上のアルファウイルス構造タンパク質のコード配列の少なくとも一部を含まず、及び/又は構造遺伝子をコードする配列は、異種配列で置換することができる。これらの場合、srRNAが組み換えアルファウイルス粒子にパッケージ化される場合、これは、粒子形成につながるアルファウイルス構造タンパク質との相互作用を開始するのに有用な、いわゆるパッケージングシグナルと呼ばれる1つ又はそれ以上の配列を含むことができる。

20

【0060】

本開示の核酸分子は、任意の長さの核酸分子でもよく、一般に長さが約2kb~50kb、例えば約5kb~約40kb、約5kb~約30kb、約5kb~約20kb、又は約10kb~約50kb、例えば約15kb~30kb、約20kb~約50kb、約20kb~約40kb、約5kb~約25kb、又は約30kb~約50kbの核酸分子を含む。いくつかの実施態様において、核酸分子は少なくとも6kbの長さである。いくつかの実施態様において、核酸分子は約6kb~約20kbである。本開示のレプリコン構築物(例えば、srRNA構築物)は、一般に、少なくとも約2kbの長さを有する。例えば、srRNAは、少なくとも約2kb、少なくとも約3kb、少なくとも約4kb、少なくとも約5kb、少なくとも約6kb、少なくとも約7kb、少なくとも約8kb、少なくとも約9kb、少なくとも約10kb、少なくとも約11kb、少なくとも約12kb、又は12kb以上の長さを有し得る。いくつかの実施態様において、srRNAは、約4kb~約20kb、約4kb~約18kb、約5kb~約16kb、約6kb~約14kb、約7kb~約12kb、約8kb~約16kb、約9kb~約14kb、約10kb~約18kb、約11kb~約16kb、約5kb~約18kb、約6kb~約20kb、約5kb~約10kb、約5kb~約8kb、約5kb~約7kb、約5kb~約6kb、約6kb~約12kb、約6kb~約11kb、約6kb~約10kb、約6kb~約9kb、約6kb~約8kb、約6kb~約7kb、約7kb~約11kb、約7kb~約10kb、約7kb~約9kb、約7kb~約8kb、約8kb~約11kb、約8kb~約10kb、約8kb~約9kb、約9kb~約11kb、約9kb~約10kb、又は約10kb~約11kbの長さを有し得る。いくつかの実施態様において、srRNAは約6kb~約14kbの長さを有し得る。いくつかの実施態様において、srRNAは約6kb~約16kbの長さを有し得る。

30

40

【0061】

本開示の組成物

50

以下でより詳細に説明するように、本開示の1つの態様は、改変ウイルスゲノム又はsrRNAをコードする核酸配列を有する核酸構築物に関し、ここで、改変されたゲノム又はsrRNAは、対応する非改変ウイルスゲノム又はsrRNAの1つ又はそれ以上の構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部を欠いている（例えば、含まない）。本開示のいくつかの実施態様は、非構造タンパク質nsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4のコード配列が存在するが、1つ又はそれ以上の構造タンパク質をコードする全配列の少なくとも一部又は存在しない改変されたアルファウイルスゲノム又はsrRNAを提供する。また、本明細書に開示される核酸構築物を含むように工学作成された組換え細胞及び細胞培養物も提供される。

【0062】

A. 核酸構築物

以下でより詳細に説明するように、本開示の1つの態様は、西部ウマ脳炎ウイルス（WEEV）などのアルファウイルスの改変ゲノム又はsrRNAをコードする核酸配列を含む新規核酸構築物に関する。例えば、いくつかの実施態様において、改変アルファウイルスゲノムは、親アルファウイルスゲノムのゲノム領域の1つ又はそれ以上に欠失、置換、及び／又は挿入を含むことができる。

【0063】

本開示の核酸構築物（例えば、レプリコン構築物、例えばsrRNA構築物）の非限定的な例示的实施態様は、以下の特徴の1つ又はそれ以上を含むことができる。いくつかの実施態様において、核酸構築物は、改変WEEVゲノム又はsrRNAをコードする核酸配列を含むことができ、ここで、改変WEEVゲノム又はsrRNAは、非改変WEEVゲノム又はsrRNAの1つ又はそれ以上の構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部が欠けており、例えば、改変WEEVゲノム又はsrRNAは、WEEV構造タンパク質CP、E1、E2、E3、及び6Kの1つ又はそれ以上のコード配列の少なくとも一部を含まない。毒性及び非毒性WEEV株の両方が適している。本開示の組成物及び方法に適したWEEV株の非限定例としては、WEEV California、McMillan、IMP181、Imperial、Imperial181、IMPR441、71V-1658、AG80-646、BFS932、COA592、EP-6、E1416、BFS1703、BFS2005、BSF3060、BSF09997、CHLV53、KERN5547、85452NM、Montana-64、S8-122、及びTBT-235が含まれる。本開示の組成物及び方法に適したWEEV株のさらなる例には、5614、93A27、93A30、93A38、93A79、B628（CL15）、CBA87、CNTR34、CO921356、Fleming、Lake43、PV012357A、PV02808A、PV72102、R02PV001807A、R02PV002957B、R02PV003422B、R05PV003422B、R0PV003814A、及びR0PV00384Aが含まれる。さらなる適切なWEEV株には、限定されるものではないが、Bergren NA et al., J. Virol. 88 (16): 9260-9267, Aug 2014, に記載されている株、及びVirus Pathogen Resource ウェブサイト（VIPR; www.viprbrc.org/brc/vipr/genome/search.sp?method=SubmitForm&blockId=868&decorator=togaで公開されている）に掲載されている。いくつかの実施態様において、改変WEEVゲノム又はsrRNAはWEEV Imperial株に由来する。

【0064】

本開示の核酸構築物（例えば、レプリコン構築物、例えばsrRNA構築物）の非限定的な例示的实施態様は、以下の特徴の1つ又はそれ以上を含み得る。いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はsrRNAは、非改変ウイルスゲノム又はsrRNAのウイルス構造タンパク質CP、E1、E2、E3、及び6Kのうちの1つ又はそれ以上をコードする核酸配列の少なくとも一部を欠いている。いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はsrRNAは、CPをコードする配列の一部又は全部を欠いてい

10

20

30

40

50

る。いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はs r R N Aは、E 1をコードする配列の一部又は全部を欠いている。いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はs r R N Aは、E 2をコードする配列の一部又は全部を欠いている。いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はs r R N Aは、E 3をコードする配列の一部又は全部を欠いている。いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はs r R N Aは、6 Kをコードする配列の一部又は全部を欠いている。いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はs r R N Aは、C P、E 1、E 2、E 3、及び6 Kの組み合わせをコードする配列の一部又は全部を欠いている。本開示のいくつかの実施態様は、非改変W E E Vゲノム又はs r R N Aの非構造タンパク質n s P 1、n s P 2、n s P 3、及びn s P 4のコード配列が存在するが、W E E Vゲノム又はs r R N Aの1つ又はそれ以上の構造タンパク質（例えば、C P、E 1、E 2、E 3、及び6 K）をコードする配列の少なくとも一部又は全部が存在しない改変W E E Vゲノム又はs r R N Aを提供する。本開示のいくつかの実施態様は、非改変W E E Vゲノム又はs r R N Aの非構造タンパク質n s P 1、n s P 2、n s P 3、及びn s P 4のコード配列が存在するが、W E E Vゲノム又はs r R N Aの1つ又はそれ以上の構造タンパク質（例えば、C P、E 1、E 2、E 3、及び6 K）をコードする配列の少なくとも一部又は全部が存在しない改変W E E Vゲノム又はs r R N Aを提供する。

10

【0065】

いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はs r R N Aは、1つ又はそれ以上のウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の大部分を欠いている。当業者であれば、ウイルス構造ポリペプチドをコードする核酸配列の大部分は、当業者による配列の用手的評価によって、又はB L A S T（例えば、“B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l”； A l t s c h u l S F e t a l. , J . M o l . B i o l . 215:403-410, 1993を参照）などのアルゴリズムを使用するコンピュータ自動化された配列比較及び識別によって、そのポリペプチドの推定識別を可能にするのに十分な、ウイルス構造ポリペプチドをコードする核酸配列が含まれ得ることを理解するであろう。従って、ヌクレオチド配列の大部分は、配列を含む核酸断片の特異的な識別及び／又は単離を可能にするのに十分な配列を含む。例えば、核酸配列の大部分は、全長核酸配列の少なくとも約20%、例えば約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%を含み得る。上述のように、本開示は、1つ又はそれ以上のウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の一部又は全部を欠く核酸分子及び構築物を提供する。本明細書に開示された配列の恩恵を受ける熟練技術者は、開示された配列の全部又は大部分を本開示の組成物及び方法のために容易に使用することができる。従って、本出願は、本明細書に開示された完全な配列、例えば、添付の配列表に記載されたもの、並びに上記で定義した配列の大部分を含む。

20

30

【0066】

いくつかの実施態様において、改変ウイルスゲノム又はs r R N Aは、ウイルス構造タンパク質をコードする配列全体を欠いており、例えば、改変ウイルスゲノム又はs r R N Aは、ウイルスの未改変ゲノム又はs r R N Aの構造タンパク質をコードする核酸配列を含まない。

40

【0067】

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物は、さらに1つ又はそれ以上の発現カセットを含む。原則として、本明細書に開示される核酸構築物は、一般に、任意の数の発現カセットを含む。いくつかの実施態様において、本明細書に開示される核酸構築物は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は少なくとも6つの発現カセットを含む。当業者であれば、「発現カセット」という用語が、コード配列と、細胞内、インビボ、及び／又はエクスピボでコード配列の適切な転写及び／又は翻訳を指示するのに十分な調節情報とを含む遺伝物質の構築物を指すことを理解するであろう。発現カセットは、所望の宿主細胞を標的とするためのベクターに、及び／又は被験体若しくは個体に挿入されてもよい。従って、いくつかの実施態様において、発現カセット

50

という用語は、「発現構築物」という用語と互換的に使用され得る。いくつかの実施態様において、「発現カセット」という用語は、例えばプロモーター及び／又は終結シグナルなどの調節要素に作動可能に連結されたタンパク質又は機能的RNAをコードする遺伝子と、任意選択的に、遺伝子の転写又は翻訳に影響を及ぼす他の核酸配列のいずれか又は組み合わせを含む核酸構築物とを指す。

【0068】

いくつかの実施態様において、少なくとも1つの発現カセットは異種核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む。従って、本明細書で提供される核酸構築物は、例えば、異種核酸配列に作動可能に連結された調節要素（例えばプロモーター）を含む場合、異種核酸配列の発現に影響を及ぼすことができる発現ベクターとして使用することができる。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの発現カセットは、異種核酸配列に作動可能に連結されたサブゲノム（sg）プロモーターを含む。いくつかの実施態様において、sgプロモーターは26Sサブゲノムプロモーターである。いくつかの実施態様において、改変WEEVゲノム又はsrRNAの少なくとも1つの非構造タンパク質（nsP）又はその一部は、改変WEEVゲノム又はsrRNAの残りの部分に対して異種である。いくつかの実施態様において、改変WEEVゲノム又はsrRNAは、異種nsP又はその一部をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施態様において、本開示の核酸分子は、1つ又はそれ以上の非翻訳領域（UTR）をさらに含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つのUTRは異種UTRである。

【0069】

いくつかの実施態様において、少なくとも1つの発現カセットは目的の遺伝子（GOI）のコード配列を含む。いくつかの実施態様において、GOIのコード配列は、単一のポリペプチド（例えば、一遺伝子PCI）を含む目的のポリペプチド構築物（PCI）のコード配列を含む。いくつかの実施態様において、PCIのコード配列は、複数のポリペプチド、例えば多遺伝子PCI（例えば、二遺伝子、三遺伝子、又は四遺伝子など）のコード配列を含む。いくつかの実施態様において、複数のポリペプチドのコード配列のそれぞれは、別個のプロモーター配列に作動可能に連結されている。いくつかの実施態様において、複数のポリペプチドのコード配列は、単一のオープンリーディングフレーム内（例えば、ポリシストロニックORF内）で互いに作動可能に連結されている。いくつかの実施態様において、ポリシストロニックORFのコード配列は、プロモーター配列に作動可能に連結されている。いくつかの実施態様において、プロモーター配列の少なくとも1つはサブゲノム（sg）プロモーターである。いくつかの実施態様において、sgプロモーターは26Sゲノムプロモーターである。

【0070】

いくつかの実施態様において、複数のポリペプチドは、互いに直接又は間接的に（例えば、1つ又はそれ以上のコネクター配列を介して）連結することができる。例えば、いくつかの実施態様において、複数のポリペプチドは、例えば、互いに隣接して、互いに直接連結することができる。いくつかの実施態様において、複数のポリペプチドのうちの少なくとも2つ（例えば、2、3、4、又は5つ）は、1つ又はそれ以上のコネクター配列によって互いに作動可能に連結される。いくつかの実施態様において、コネクター配列の長さ及びアミノ酸組成は、PCIの所望の活性又は特性を達成するために、ポリペプチドの互いに対する配向、柔軟性、及び／又は近接性を変化させるように最適化することができる。いくつかの実施態様において、複数のコネクター配列の1つのコネクター配列は、1つ又はそれ以上の自己タンパク質分解ペプチド配列を含む。本開示の方法及び組成物に適した自己タンパク質分解ペプチド配列の非限定例には、カルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼ（フーリン）、豚テスコウイルス-1 2A（P2A）、口蹄疫ウイルス（FMDV）2A（F2A）、馬鼻炎Aウイルス（ERAV）2A（E2A）、トーセアアシグナウイルス（Thosea signavirus）2A（T2A）、細胞質多角体病ウイルス2A（BmCPV2A）、及びフラシェリーウイルス（Flacherievirus）2A（BmIFV2A）に由来する自己タンパク質分解切断配列が含まれる

。いくつかの実施態様において、複数のポリペプチドのうち少なくとも2つは、P2A自己タンパク質分解切断配列を介して互いに作動可能に連結されている。

【0071】

いくつかの実施態様において、複数のポリペプチドのコード配列は、1つ又はそれ以上の内部リボソーム進入部位(IRES)によって互いに作動可能に連結されている。本開示の方法及び組成物に適したIRESの非限定例には、ウイルスIRES配列、細胞IRES配列、及び人工IRES配列が含まれる。適切なIRES配列の例には、限定されるものではないが、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV) IRES、肝炎ウイルスIRES、ペステイウイルス(Pestivirus) IRES、クリパウイルス(Cripavirus) IRES、ロパロシフムパディウイルス(Rhopalosiphum padi virus) IRES、線維芽細胞増殖因子IRES、血小板由来増殖因子IRES、血管内皮増殖因子IRES、インスリン様増殖因子IRES、ピコルナウイルスIRES、脳心筋炎ウイルス(EMCV) IRES、Pim-1 IRES、p53 IRES、Apaf-1 IRES、TDP2 IRES、L-myc IRES、及びc-myc IRESが含まれる。

10

【0072】

原則として、本開示のレプリコン構築物(例えば、srRNA構築物)によって発現され得る適切なポリペプチド及びPCIに関して、特別な制限はない。本開示の組成物及び方法に適したポリペプチドの例示的なタイプには、微生物タンパク質、ウイルスタンパク質、細菌タンパク質、真菌タンパク質、哺乳動物タンパク質、及びこれらの任意の組み合わせが含まれる。例えば、PCIは、1つ又はそれ以上の抗原分子及び／又はバイオ治療分子、例えば、サイトカイン、細胞毒素、ケモカイン、免疫調節剤、プロアポトーシス因子、抗アポトーシス因子、ホルモン、分化因子、脱分化因子、免疫細胞受容体若しくはレポーター、又はこれらの任意の組み合わせを含み得る。

20

【0073】

いくつかの実施態様において、GOIのコード配列は、所望の特性、例えば、安定性、効力、及び発現(例えば、翻訳効率)の向上のために、再設計、リファクタリング、及び／又は最適化され、その結果、バイオ治療薬の製造、送達、及び投与の影響を最大化することができる。例えば、いくつかの実施態様において、GOIのコード配列は、参照コード配列の発現レベルよりも高いレベルでの発現に最適化されており、例えば、参照コード配列よりも20%高い、30%高い、40%高い、50%高い、60%高い、70%高い、80%高い、90%高い、又は95%高い。いくつかの実施態様において、参照コード配列は、野生型の最適化されていない配列である。ヌクレオチド配列の配列最適化に関して、遺伝コードの縮重により、遺伝子から生成されるポリペプチドのアミノ酸配列を変更することなく、遺伝子のタンパク質コード配列の少なくとも1つの塩基を異なる塩基に置換することが可能になる。従って、本開示の核酸構築物は、遺伝コードの縮重に従って置換することにより、本明細書に開示される任意のポリヌクレオチド配列から変更された任意の塩基配列を有してもよい。コドン使用法を記載した参考文献は、公に容易に入手可能である。いくつかの実施態様において、ポリヌクレオチド配列変種は、例えば、特定の宿主に対する発現を最適化するなどのさまざまな理由(例えば、アルファウイルスmRNAのコドン使用を、ヒト、非ヒト霊長類、ハムスター、マウス、又はサルなどの他の生物が好むものに変更する)で生成され得る。従って、いくつかの実施態様において、GOIのコード配列は、発現のために最適化されたコドンを使用することにより、標的宿主細胞における発現のために最適化される。宿主細胞発現に最適な好ましいコドンを使用してGOIをコードする合成核酸配列を構築する技術は、当該技術分野で公知の技術によって、宿主細胞ゲノムの天然タンパク質をコードするためのコドン使用の共通性及びこれらの相対的存在量を分析する計算方法によって決定することができる。コドン使用データベース(例えば、<http://www.kazusa.or.jp/codon>)は、哺乳動物細胞環境でのコドン最適化配列の生成に使用することができる。さらに、ある生物の配列を別の宿主生物の最適なコドン使用法に変換するためのさまざまなソフトウェアツールが

30

40

50

利用可能であり、例えば、J C a t コドン最適化ツール (J C a t C o d o n O p t i m i z a t i o n T o o l) (www.jcat.de)、Integrated DNA Technologies (IDT) コドン最適化ツール (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>)、又はOptimizerオンラインコドン最適化ツール (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>) がある。このような合成配列は、合成核酸分子の構築に関する当技術分野で公知の技術によって構築することができ、さまざまな販売業者から入手できる。従って、いくつかの実施態様において、GOIのコード配列は、例えばコドン最適化されていないコード配列などの参照コード配列の発現レベルよりも高いレベルで発現するように最適化されている。いくつかの実施態様において、GOIのコドン最適化された配列は、コドン最適化されていない参照コード配列と比較して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも100%の発現レベルの増加をもたらす。いくつかの実施態様において、GOIのコドン最適化された配列は、コドン最適化されていない参照コード配列と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、又は少なくとも5倍の発現レベルの増加をもたらす。

10

【0074】

いくつかの実施態様において、GOIのコード配列は、RNAの安定性及び／又は発現の増強のために最適化される。RNAの安定性は、一般にRNAの「半減期」に関連する。「半減期」は、分子の活性、量、又は数の半分を除去するのに必要な期間に関連する。本開示の文脈において、RNAの半減期は、前記RNAの安定性を示す。RNAの半減期は、RNAの「発現期間」に影響を及ぼす可能性がある。RNAの安定性の増強に使用する原理、戦略、及び方法に関する追加情報は、例えば、Leppek K. et al., Combinatorial optimization of mRNA structure, stability, and translation for RNA-based therapeutics (Nature Communications. Vol 13, Article No. 1536, March 2022)に記載されている。

20

【0075】

GOIによってコードされるポリペプチドは、一般的には任意のポリペプチドであり、例えば、治療用ポリペプチド、予防用ポリペプチド、診断用ポリペプチド、栄養補助食品用ポリペプチド、工業用酵素、及びレポーターポリペプチドであり得る。いくつかの実施態様において、GOIは、抗体、抗原、免疫調節剤、酵素、シグナル伝達タンパク質、及びサイトカインからなる群から選択されるポリペプチドをコードする。いくつかの実施態様において、GOIは、微生物タンパク質、ウイルスタンパク質、細菌タンパク質、真菌タンパク質、哺乳動物タンパク質、及びこれらの任意の組み合わせをコードすることができる。いくつかの実施態様において、GOIは、インフルエンザAウイルスH5N1のヘマグルチニン前駆体(HA)をコードする。GOIの非限定例には、インターロイキン及び相互作用タンパク質(G-CSF、GM-CSF、IL-1、IL-10、IL-10様、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-18BP、IL-1様、IL-1RA、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-20、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6様、IL-7、IL-9、IL-21、IL-22、IL-33、IL-37、IL-38、LIF、及びOSMを含む)が含まれる。その他の適切なGOIには、限定されるものではないが、インターフェロン(例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)、TNF(例えば、CD154、LT- β 、TNF- α 、TNF- β 、4-1BBL、APRIL、CD70、CD153、CD178、GITRL、LIGHT、OX40L、TALL-1、TRAIL、TWEAK、及びTRANCE)、TGF- β (例えば、TGF- β 1、TGF- β 2、及びTGF- β 3)、ヘマトポエチン(例えば、Epo、Tpo、Flt-3L、SCF、M-CSF、MSP)、ケモカイン及びその受容体(XCL1、X

30

40

50

CCL2、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、及びCX3CL1)、免疫抑制遺伝子産物及び関連転写因子(例えば、PECAM1、FCGR3A、FOS、NFKB1、JUN、HIF1A、PD-L1、mTOR、STAT5B、及びSTAT4)が含まれる。本開示の組成物及び方法に適した追加のGOIには、限定されるものではないが、免疫刺激遺伝子産物(例えば、CD27/CD70、CD40、CD40L、B7.1、BTLA、MAVS、OX40、OX40L、RIG-I、及びSTING)、遺伝子の薬剤耐性変異体/変種、例えばABCB1、ABCC1、ABCG2、AKT1、ALK、BAFF、BCR-ABL、BRAF、CCND1、cMET、EGFR、ERBB2、ERBB3、ERK2、ESR1、GRB2、KRAS、MDR1、MRP1、NTRK1、PDC4、P-gp、PI3K、PTEN、RET、ROS1、RSK1、RSK2、SHIP、及びSTK11が含まれる。また、本開示の組成物及び方法に適したものには、ウイルスタンパク質、特にスパイクタンパク質、繊維タンパク質、構造タンパク質、及び付着タンパク質をコードする配列が含まれる。

10

【0076】

いくつかの実施態様において、GOIは抗体又は抗体変種(例えば、単鎖Fv、二重特異性、ラクダ科動物抗体、Fab、及びHCAb)をコードすることができる。いくつかの実施態様において、抗体は、癌に関連するかアップレギュレートされた表面分子、又は感染症に関連する表面分子を標的とする。いくつかの実施態様において、抗体は、免疫刺激機能を有するか又は免疫抑制機能を有する表面分子を標的とする。

20

【0077】

いくつかの実施態様において、GOIは、例えば、アガルシダーゼベータ、アガルシダーゼアルファ、イミグルセラゼ、タリグルセラゼアルファ、ベラグルセラゼアルファ、アルグルセラゼ、セベリパーゼアルファ、ラロニダーゼ、イデュルスルファゼ、エロスルファゼアルファ、ガルスルファゼ、アルグルコシダーゼアルファ、及びCTFRなどの、その欠損又は変異が疾患又は健康状態に関連する酵素をコードすることができる。

30

【0078】

いくつかの実施態様において、GOIは、抗原分子、バイオ治療分子、又はこれらの任意の組み合わせから選択されるポリペプチドをコードすることができる。いくつかの実施態様において、GOIは、腫瘍関連抗原、腫瘍特異的抗原、新抗原、及びこれらの任意の組み合わせから選択されるポリペプチドをコードすることができる。当業者には理解されるように、TAAは、腫瘍細胞及び正常細胞上、又は多くの正常細胞上に存在するが、腫瘍細胞上よりもはるかに低い濃度である分子、例えばタンパク質を含む。対照的に、TSAは、一般に、腫瘍細胞上に存在するが正常細胞には存在しない分子、例えばタンパク質を含む。腫瘍関連抗原は、癌細胞、例えば乳癌細胞、B細胞リンパ腫、脾臓癌、ホジキンリンパ腫細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、中皮腫、肺癌細胞、非ホジキンB細胞リンパ腫(B-NHL)細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、中皮腫細胞、黒色腫細胞、慢性リンパ性白血病細胞、急性リンパ性白血病細胞、神経芽細胞腫細胞、神経膠腫、神経膠芽腫、結腸直腸癌細胞などに関連する抗原であり得る。また、場合によっては、腫瘍関連抗原が非癌細胞によって発現されることもあることが理解されるであろう。いくつかの実施態様において、GOIは、エストロゲン受容体、細胞内シグナル伝達酵素、及びヒト表皮成長受容体から選択されるポリペプチドをコードすることができる。いくつかの実施態様において、GOIは、免疫調節剤、血管新生調節剤、細胞外マトリックス調節剤、代謝調節剤、神経調節剤、及びこれらの任意の組み合わせから選択されるバイオ治療用ポリペプチドをコードすることができる。いくつかの実施態様において、GOIは、ケモカイン、イン

40

50

ターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、及び腫瘍壊死因子から選択されるサイトカインをコードすることができる。いくつかの実施態様において、GOIは、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-15、IL-17、IL-23、IL-27、IL-35、IFN γ 、及びこれらの任意のサブユニットから選択されるインターロイキンをコードすることができる。いくつかの実施態様において、GOIは、IL-12A、IL-12B、IL-1RA、及びこれらの任意の組み合わせから選択されるバイオ治療用ポリペプチドをコードすることができる。

【0079】

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物は、配列番号1の核酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する改変WEEVをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物は、配列番号2の核酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する改変WEEVをコードする核酸配列を含む。

【0080】

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物は、配列番号1の核酸配列と100%の配列同一性を有する改変WEEVをコードする核酸配列を含み、ここで、核酸配列の1、2、3、4、5個、又はそれ以上のヌクレオチドは、異なるヌクレオチドで置換されていてもよい。いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物は、配列番号2の核酸配列と100%の配列同一性を有する改変WEEVをコードする核酸配列を含み、ここで、核酸配列の1、2、3、4、5個、又はそれ以上のヌクレオチドは、異なるヌクレオチドで置換されていてもよい。

【0081】

目的の改変WEEVの配列と高い配列同一性（例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%）を有する核酸配列は、本明細書で特定された配列（例えば、配列番号1又は配列番号2）又は当技術分野で公知の他の任意の配列を使用して、それぞれのWEEVゲノムで同定された配列からの縮重プライマー又は遺伝子特異的プライマーを用いるゲノム配列分析、ハイブリダイゼーション、及び／又はPCRによって特定及び／又は単離することができる。

【0082】

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物は1つ又はそれ以上のアダプター配列、例えばクローニングアダプター配列を含む。いくつかの実施態様において、1つ又はそれ以上のアダプター配列は以下の配列を含む：5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAAACCTTGGAACCT-3'（配列番号3）。いくつかの実施態様において、1つ又はそれ以上のアダプター配列は以下の配列を含む：5'-GACCGCTACGCCCCAATGACCCGACCAAGC-3'（配列番号4）。

【0083】

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物に突然変異（例えば、サイレント突然変異）を取り込んで、制限酵素切断部位、例えばSapI及びSpeI制限酵素切断部位を排除することができる（例えば、実施例1～3を参照）。例えば、固有の制限酵素切断部位（SpeI、5'-A'CTAG, T-3'）を、未変性のWEEV構造遺伝子のコード配列の代わりに取り込むことができる（ここで、5'Aは構造ポリタンパク質ATG開始コドンの位置と一致し、3'Tは構造ポリタンパク質終止コドンTAAの位置と一致する）。いくつかの実施態様において、5'アダプター配列（例えば、配列番号3）をSpeI部位の上流に挿入し、3'アダプター配列（配列番号4）をSpeI部位の下流に挿入して、次のGibson Assembly（登録商標）操作に使用することができ

る (Gibson et al., Nat. Methods 6, 343-345, 2009)。いくつかの実施態様において、プロモーター配列 (例えば、バクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼプロモーター) が WEEV ゲノム配列の上流に含まれ、下流にはポリ (A) 配列とそれに続く制限酵素切断部位 (例えば、SapI) が含まれ、これが認識部位の上流を切断する。この制限酵素切断部位 (SapI) のすぐ下流には、ターミネーター配列 (例えば、T7 ターミネーター配列) とそれに続く固有の制限酵素切断部位 (例えば、NotI') が含まれ得る。

【0084】

いくつかの実験では、1つ又はそれ以上の nsP をコードする配列が異種 nsP で置き換えられる。他のいくつかの実験では、1つ又はそれ以上の UTR をコードする配列が異種 UTR で置き換えられる。

10

【0085】

これらの新しい核酸構築物を組み立て、特性解析する分子技術及び方法は、本出願の実施例でより詳細に説明される。いくつかの実施態様において、核酸分子は組換え核酸分子である。本明細書で使用される「組換え」という用語は、間接的であるにせよ、人間の操作によって生じた分子 (例えば、DNA、RNA、ポリペプチド)、すなわち結果を意味する。非限定例として、cDNA は、インビトロのポリメラーゼ反応によって生成されたか、又はリンカーが結合されたか、又はクローニングベクターや発現ベクターなどのベクターに組み込まれた核酸分子のように、組換え DNA 分子である。非限定例として、組換え核酸分子は、1) 例えば、核酸分子の化学的又は酵素的技術 (例えば、化学的核酸合成の使用、又複製、重合、エキソヌクレアーゼ消化、エンドヌクレアーゼ消化、連結、逆転写、転写、塩基修飾 (例えば、メチル化を含む)、又は組換え (相同組換え及び部位特異的組換えを含む) のための酵素の使用) を使用してインビトロで合成又は改変されている；2) 自然界では結合していない結合ヌクレオチド配列を含む；3) 天然に存在するヌクレオチド配列について1つ又はそれ以上のヌクレオチドが欠如するように、分子クローニング技術を使用して工学操作されている；及び／又は4) 天然に存在するヌクレオチド配列について1つ又はそれ以上の配列変更又は再配置が行われるように、分子クローニング技術を使用して操作されている。

20

【0086】

いくつかの実施態様において、本明細書に開示される核酸分子は、組換え DNA 技術 (例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅、クローニングなど) 又は化学合成を使用して製造される。本明細書に開示される核酸分子は、天然の核酸分子及びその相同体 (限定されるものではないが、1つ又はそれ以上のヌクレオチド残基が挿入、欠失、及び／又は置換された天然の対立遺伝子変種及び改変核酸分子を含む) が含まれ、そのような修飾により、本明細書に記載されるような生物学的活性をもたらす際に所望の特性が提供される。

30

【0087】

天然に存在する核酸配列の変種を含む核酸分子は、当業者に知られているいくつかの方法を使用して製造することができる (例えば、Sambrook et al., In: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) を参照)。核酸分子の配列は、その由来となった天然配列に対して、さまざまな技術を使用して改変することができ、これらの技術には、限定されるものではないが、古典的な突然変異誘発技術及び組み換え DNA 技術、例えば、限定されるものではないが、部位特異的突然変異誘発、突然変異を誘発するための核酸分子の化学処理、核酸断片の制限酵素切断、核酸断片の連結、核酸配列の選択された領域の PCR 増幅及び／又は突然変異誘発、組み換えクローニング、及び化学合成 (核酸分子の混合物を「構築」するための、オリゴヌクレオチド混合物の化学合成、混合物群の連結)、及びこれらの組み合わせを含む。核酸分子相同体は、改変された核酸分子の混合物から、核酸分子によってコードされるタンパク質又は srRNA

40

50

の機能をスクリーニングすることによって、及び／又は野生型遺伝子又はその断片とのハイブリダイゼーションによって、又は標的若しくは野生型核酸分子若しくは配列と相同性を有するプライマーを使用するPCRによって、選択することができる。

【0088】

B. 組み換え細胞

本開示の核酸構築物は、宿主細胞に導入して、核酸分子を含む組み換え細胞を生成することができる。従って、本明細書に記載の改変WEEVゲノムをコードする核酸構築物を含む原核細胞又は真核細胞も、本開示の特徴である。関連する態様では、本明細書に開示されるいくつかの実施態様は、動物細胞などの宿主細胞に本明細書に提供される核酸構築物を導入し、次に、形質転換された細胞を選択又はスクリーニングすることを含む、細胞を形質転換する方法に関する。本発明の核酸構築物の細胞への導入は、当業者に知られている方法、例えば、ウイルス感染、トランスフェクション、結合、プロトプラスト融合、リポフェクション、電気穿孔法、ヌクレオフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンジオキサイド（PEI）媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクション、粒子銃技術、直接微量注入法、ナノ粒子媒介核酸送達などによって達成することができる。

10

【0089】

1つの態様において、本開示のいくつかの実施態様は、組換え細胞、例えば、本明細書に記載の核酸構築物を含む組換え動物細胞に関する。核酸構築物は、宿主ゲノムに安定的に組み込まれてもよいし、エピソーム複製してもよいし、又は安定的な若しくは一過性の発現のためのミニサークル発現ベクターとして組換え宿主細胞に存在してもよい。従って、本開示のいくつかの実施態様において、核酸構築物は、エピソーム単位として組換え宿主細胞内で維持され、複製される。いくつかの実施態様において、核酸構築物は、組換え細胞のゲノムに安定的に組み込まれる。安定した組み込みは、古典的なランダムゲノム組換え技術を使用して、又はガイドRNA誘導クリスパー／Cas9若しくはTALENゲノム編集などのより正確なゲノム編集技術を使用して完了することができる。いくつかの実施態様において、核酸構築物は、組換え宿主細胞内で、安定した発現又は一過性の発現のためのミニサークル発現ベクターとして存在する。

20

【0090】

宿主細胞は、形質転換されていない細胞、又はすでに少なくとも1つの核酸分子でトランスフェクトされている細胞のいずれかであり得る。従って、いくつかの実施態様において、宿主細胞は、少なくとも1つの核酸分子で遺伝子操作（例えば、形質導入、又は形質転換、又はトランスフェクション）され得る。

30

【0091】

本明細書に記載の目的のポリペプチドのクローニング又は発現に適した宿主細胞には、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞が含まれる。従って、いくつかの実施態様において、組換え細胞は、細菌である大腸菌などの原核細胞、又は昆虫細胞（例えば、蚊細胞又はSf21細胞）、又は哺乳動物細胞（例えば、COS細胞、NIH3T3細胞、又はHeLa細胞）などの真核細胞である。いくつかの実施態様において、細胞はインビボ、例えば生体内の組換え細胞、例えばトランスジェニック被験体の細胞である。いくつかの実施態様において、被験体は脊椎動物又は無脊椎動物である。いくつかの実施態様において、被験体は昆虫である。いくつかの実施態様において、被験体は哺乳動物である。いくつかの実施態様において、細胞はエクスピボ、例えば治療又は処置のために生体又は生物から、個々の細胞として又は臓器若しくは組織の一部として抽出されており、次に生体又は生物に戻される。いくつかの実施態様において、細胞はインビトロであり、例えば貯蔵場所から得られる。

40

【0092】

いくつかの実施態様において、組換え細胞は真核細胞である。いくつかの実施態様において、組換え細胞は動物細胞である。いくつかの実施態様において、動物細胞は脊椎動物細胞又は無脊椎動物細胞である。いくつかの実施態様において、組換え細胞は哺乳動物細胞

50

胞である。いくつかの実施態様において、組換え細胞は、SV40によって形質転換されたサル腎CV1細胞（例えば、COS-7）、ヒト胎児腎細胞（例えば、HEK293又はHEK293細胞）、ベビーハムスター腎細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（例えば、TM4細胞）、サル腎細胞（例えば、CV1）、ヒト子宮頸癌細胞（例えば、HeLa）、イヌ腎細胞（例えば、MDCK）、バッファローラット肝細胞（例えば、BRL3A）、ヒト肺細胞（例えば、W138）、ヒト肝細胞（例えば、HepG2）、マウス乳腺腫瘍（例えば、MMT060562）、TRI細胞、FS4細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、アフリカミドリザル腎細胞（例えば、Vero細胞）、ヒトA549細胞、ヒト子宮頸部細胞、ヒトCHME5細胞、ヒトPER.C6細胞、NS0マウス骨髄腫細胞、ヒト類表皮喉頭細胞、ヒト線維芽細胞、ヒトHUH-7細胞、ヒトMRC-5細胞、ヒト筋細胞、ヒト内皮細胞、ヒト星状細胞、ヒトマクロファージ細胞、ヒトRAW264.7細胞、マウス3T3細胞、マウスL929細胞、マウス結合組織細胞、マウス筋細胞、及びウサギ腎細胞からなる群から選択される。

10

【0093】

いくつかの実施態様において、組換え細胞は、アフリカミドリザル腎細胞（Vero細胞）、ベビーハムスター腎（BHK）細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、ヒトA549細胞、ヒト子宮頸部細胞、ヒトCHME5細胞、ヒト上皮様喉頭細胞、ヒト線維芽細胞、ヒトHEK-293細胞、ヒトHeLa細胞、ヒトHepG2細胞、ヒトHUH-7細胞、ヒトMRC-5細胞、ヒト筋細胞、マウス3T3細胞、マウス結合組織細胞、マウス筋細胞、及びウサギ腎細胞からなる群から選択される。いくつかの実施態様において、組換え細胞は、上記の細胞に由来する細胞（すなわち、本明細書に記載の元の細胞の派生細胞）であり、例えば、元の細胞のクローンから増殖した細胞、元の細胞を工学操作されたバージョン、又は元の細胞が広範囲に継代された後の、又は別の宿主を介して継代された後に再分類された細胞である。

20

【0094】

いくつかの実施態様において、組換え細胞は昆虫細胞、例えば昆虫細胞株の細胞である。いくつかの実施態様において、組換え細胞はSf21細胞である。追加の適切な昆虫細胞株には、限定されるものではないが、双翅目（Diptera）、鱗翅目（Lepidoptera）、及び半翅目（Hemiptera）の昆虫から樹立された細胞株が含まれ、異なる組織源から誘導することができる。いくつかの実施態様において、組換え細胞は鱗翅目昆虫細胞株の細胞である。過去数十年間、鱗翅目昆虫細胞株の入手可能性は10年あたり約50株増加している。入手可能な鱗翅目昆虫細胞株に関するさらなる情報は、例えば、Lynn D. E., Available lepidopteran insect cell lines. Methods Mol Biol. 2007; 388: 117-38に記載されており、これは参照により本明細書に取り込まれる。いくつかの実施態様において、組換え細胞は蚊細胞、例えば、ハマダラカ（Anopheles）（An.）属、イエカ（Culex）（Cx.）属、及びヤブカ（Aedes）（Stegomyia）（Ae.）属の蚊種の細胞である。本明細書に記載の組成物及び方法に適した例示的な蚊細胞株には、以下の蚊種の細胞株が含まれる：Aedes aegypti、Aedes albopictus、Aedes pseudoscutellaris、Aedes triseriatus、Aedes vexans、Anopheles gambiae、Anopheles stephensi、Anopheles albimanus、Culex quinquefasciatus、Culex theileri、Culex tritaeniorhynchus、Culex bitaeniorhynchus、及び Toxorhynchites amboinensis。適切な蚊細胞株には、限定されるものではないが、CCL-125、Aag-2、RML-12、C6/26、C6/36、C7-10、AP-61、A.t. GRIP-1、A.t. GRIP-2、UM-AVE1、Mos.55、Sua1B、4a-3B、Mos.43、MSQ43、及びLSB-AA695BBが含まれる。いくつかの実施態様において、蚊細胞はC6/26細胞株の細胞である。

30

40

50

【0095】

別の態様において、本明細書に開示される少なくとも1つの組換え細胞と培養培地を含む細胞培養物が提供される。一般に、培養培地は、本明細書に記載される細胞を培養するための任意の適切な培養培地であり得る。上記宿主細胞及び種の広範な種類を形質転換するための技術は当技術分野で知られており、技術文献及び科学文献に記載されている。従って、本明細書に開示される少なくとも1つの組換え細胞を含む細胞培養物も、本出願の範囲内である。細胞培養物を生成及び維持するのに適した方法及びシステムは、当技術分野で知られている。

【0096】

C. トランスジェニック動物

また、別の態様において、本明細書に記載される核酸構築物（例えば、ベクター、レプリコン、又はsrRNA分子）を含むトランスジェニック動物が提供される。いくつかの実施態様において、トランスジェニック動物は脊椎動物又は無脊椎動物である。いくつかの実施態様において、トランスジェニック動物は昆虫である。いくつかの実施態様において、昆虫は蚊である。いくつかの実施態様において、トランスジェニック動物は哺乳動物である。いくつかの実施態様において、トランスジェニック哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。一般に、本開示のトランスジェニック動物は、当該技術分野で公知の任意の非ヒト動物であり得る。いくつかの実施態様において、本開示の非ヒト動物は非ヒト霊長類である。本開示の組成物及び方法に適した他の動物種には、(i) 遺伝子導入 (transgenesis) に適しており、及び(ii) 免疫グロブリン遺伝子セグメントを再配置して抗体応答を生成できる動物が含まれる。このような種の例には、限定されるものではないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、及びウシが含まれる。本開示の組成物及び方法に適した非ヒト動物のさらなる例には、限定されるものではないが、実験動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ、モルモットなど）、家畜（例えば、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、アヒル、ガチョウ、ニワトリなど）、飼いならされた動物及びペット（例えば、ネコ、イヌ犬など）、非ヒト霊長類（例えば、類人猿、チンパンジー、オランウータン、サルなど）、魚類、両生類（例えば、カエル、サンショウウオなど）、爬虫類（例えば、ヘビ、トカゲなど）、及びその他の動物（例えば、キツネ、イタチ、ウサギ、ミンク、ビーバー、オコジョ、カワウソ、クロテン、アザラシ、コヨーテ、チンチラ、シカ、マスカラット、フクロネズミなど）が含まれる。

【0097】

いくつかの実施態様において、トランスジェニック動物は昆虫である。いくつかの実施態様において、昆虫は蚊である。いくつかの実施態様において、本開示のトランスジェニック動物はキメラトランスジェニック動物である。いくつかの実施態様において、本開示のトランスジェニック動物は、1つ又はそれ以上（例えば、1つ又はそれ以上、2つ又はそれ以上、3つ以上、4つ又はそれ以上など）の核酸構築物を含む生殖細胞及び体細胞を有する本開示のトランスジェニック動物である。いくつかの実施態様において、1つ又はそれ以上の核酸構築物は、トランスジェニック動物のゲノムに安定的に組み込まれている。いくつかの実施態様において、本開示のトランスジェニック動物のゲノムは、本開示の1つ又はそれ以上の核酸構築物の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又はそれ以上のコピーのいずれかを含むことができる。

【0098】

トランスジェニック非ヒト動物を調製するためのアプローチ及び方法は、当該技術分野で公知である。例示的な方法には、前核微量注入法、DNA微量注入法、レンチウイルスベクターに介在される初期胚へのDNA移入、及び精子介在遺伝子組み換え、動物精子へのアデノウイルス介在DNA導入（例えば、ブタ）、レトロウイルスベクター（例えば、鳥類の種）、体細胞核移入（例えば、ヤギ）が含まれる。トランスジェニック家畜の調製における最新技術は、Niemann, H. et al. (2005) Rev. Sci. Tech. 24:285-298の総説がある。いくつかの実施態様におい

10

20

30

40

50

て、本開示のトランスジェニック非ヒト宿主動物は、非ヒト動物のゲノムに外因性核酸を導入するための当該技術分野で公知の標準的な方法を使用して調製される。いくつかの実施態様において、本開示のトランスジェニック動物は、古典的なランダムゲノム組換え技術を使用して、又はガイドRNA誘導クリスパー／Casゲノム編集、又はNgAgo (Natronobacterium gregoryi Argonaute)を用いるDNA誘導エンドヌクレアーゼゲノム編集、又はTALENゲノム編集(転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ)などのより正確な技術を使用して生成することができる。いくつかの実施態様において、本開示のトランスジェニック動物は、トランスジェニック微量注入技術を使用して作製することができ、相同組換え技術の使用を必要とせず、従って相同組換えを使用するアプローチよりも調製及び選択が容易であると考えられる。いくつかの実施態様において、トランスジェニック動物は、本明細書に記載されるような目的のタンパク質を産生する。

10

【0099】

本開示のトランスジェニック非ヒト宿主動物は、非ヒト動物のゲノムに外因性核酸を導入するための当該技術分野で公知の標準的な方法を使用して調製される。いくつかの実施態様において、本開示の非ヒト動物は非ヒト霊長類である。本開示の組成物及び方法に適した他の動物種には、(i)遺伝子導入(transgenesis)に適しており、及び(ii)免疫グロブリン遺伝子セグメントを再配置して抗体応答を生成できる動物が含まれる。このような種の例には、限定されるものではないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、及びウシが含まれる。トランスジェニック非ヒト動物を調製するためのアプローチ及び方法は、当該技術分野で公知である。例示的な方法には、前核微量注入法、DNA微量注入法、レンチウイルスベクターに介在される初期胚へのDNA移入、及び精子介在遺伝子組み換え、動物精子へのアデノウイルスによるDNA移入(例えば、ブタ)、レトロウイルスベクター(例えば、鳥類の種)、体細胞核移入(例えば、ヤギ)が含まれる。トランスジェニック家畜の調製における最新技術は、Niemann, H. et al. (2005) Rev. Sci. Tech. 24:285-298の総説がある。

20

【0100】

いくつかの実施態様において、動物は脊椎動物又は無脊椎動物である。いくつかの実施態様において、動物は昆虫である。いくつかの実施態様において、昆虫は蚊である。いくつかの実施態様において、動物は哺乳動物被験体である。いくつかの実施態様において、哺乳動物は非ヒト動物である。いくつかの実施態様において、哺乳動物は非ヒト霊長類である。いくつかの実施態様において、本開示のトランスジェニック動物は、古典的なランダムゲノム組換え技術を使用して、又はガイドRNA誘導クリスパー／Casゲノム編集、又はNgAgo (Natronobacterium gregoryi Argonaute)によるDNA誘導エンドヌクレアーゼゲノム編集、又はTALENゲノム編集(転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ)などのより正確な技術を使用して作製することができる。いくつかの実施態様において、本開示のトランスジェニック動物は、トランスジェニック微量注入技術を使用して作製することができ、相同組換え技術の使用を必要とせず、従って相同組換えを使用するアプローチよりも調製及び選択が容易であると考えられる。別の態様において、本明細書では、目的のポリペプチドを産生するための方法が提供され、その方法は、(i)本明細書に開示されるトランスジェニック動物を飼育すること、又は(ii)本明細書に開示される核酸構築物を含む組換え細胞を、トランスジェニック動物又は組換え細胞がGOIによってコードされるポリペプチドを産生する条件下で培養することを含む。別の態様において、被験体において目的のポリペプチドを産生する方法が本明細書に提供され、ここで、その方法は、本明細書に開示される核酸構築物を被験体に投与することを含む。いくつかの実施態様において、被験体は脊椎動物又は無脊椎動物である。いくつかの実施態様において、被験体は昆虫である。いくつかの実施態様において、昆虫は蚊である。いくつかの実施態様において、被験体は哺乳動物被験体である。いくつかの実施態様において、哺乳動物被験体はヒト被験体である。従って、本明

30

40

50

細書に開示される方法によって産生される組換えポリペプチドも、本開示の範囲内である。

【0101】

組換えポリペプチドを製造するための開示された方法の非限定的な例示的实施態様は、以下の特徴の1つ又はそれ以上を含み得る。いくつかの実施態様において、本開示の組換えポリペプチドを製造するための方法は、製造されたポリペプチドを単離及び／又は精製することをさらに含む。いくつかの実施態様において、本開示のポリペプチドを製造するための方法は、製造されたポリペプチドの構造を改変して半減期を延長することをさらに含む。

【0102】

D. 医薬組成物

本開示の核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチドは、医薬組成物を含む組成物に取り込むことができる。このような組成物は、一般に、本明細書に記載及び提供される核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチドの1つ又はそれ以上、及び医薬的に許容し得る賦形剤、例えば担体を含む。いくつかの実施態様において、本開示の組成物は、免疫疾患又は微生物感染（例えば、ウイルス感染、微小真菌感染、又は細菌感染）などの健康状態の予防、治療、又は管理のために処方される。例えば、本開示の組成物は、予防組成物、治療組成物、又は医薬的に許容し得る賦形剤を含む医薬組成物、又はこれらの混合物として処方することができる。いくつかの実施態様において、本開示の組成物は、ワクチンとして使用するために処方される。いくつかの実施態様において、本出願の組成物は、ア

10

20

【0103】

従って、1つの態様において、本明細書では、医薬的に許容し得る賦形剤と、a) 本開示の核酸構築物、b) 本開示の組み換え細胞、及び／又はc) 本開示の組み換えポリペプチドとを含む医薬組成物が提供される。

【0104】

本開示の医薬組成物の非限定的な例示的实施態様は、以下の特徴の1つ又はそれ以上を含み得る。いくつかの実施態様において、本明細書では、本明細書で開示される核酸構築物と医薬的に許容し得る賦形剤とを含む組成物が提供される。いくつかの実施態様において、本明細書では、本明細書で開示される組み換え細胞と医薬的に許容し得る賦形剤とを含む組成物が提供される。いくつかの実施態様において、組成物は、本明細書で開示される組み換えポリペプチドと医薬的に許容し得る賦形剤とを含む。

30

【0105】

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物（例えば、ベクター又はsrRNA分子）は、裸の形態で使用することも、送達ビヒクルとともに配合することもできる。本開示の組成物及び方法に適した例示的な送達ビヒクルには、限定されるものではないが、リポソーム（例えば、中性又はアニオン性リポソーム）、ミクロスフェア、免疫刺激複合体（ISCOMS）、脂質ベースのナノ粒子（LNPs）、固体脂質ナノ粒子（SLNs）、ポリプレックス、ポリマーナノ粒子、ウイルスレプリコン粒子（VRPs）、又は送達を容易にし、及び／又は免疫応答を増強することができる生物活性リガンドとの結合体が含まれる。これらの化合物は、当業者には容易に入手可能である；例えば、Liposomes: A Practical Approach, RCP New Ed, IRL Press (1990)を参照。リポソーム以外の他のアジュバントなども使用され、当該分野で公知である。アジュバントは、抗原（例えば、核酸構築物、ベクター、srRNA分子）を局所的な沈着物に隔離することにより、抗原が急速に分散するのを防ぐことができ、又は、アジュバントは、マクロファージ及び免疫系の他の成分に対して走化性である因子を分泌するように宿主を刺激する物質を含むことができる。

40

【0106】

本開示の組成物は、意図された投与経路と適合性のある形式、例えばリポソーム、脂質ベースのナノ粒子（LNPs）、ポリマーナノ粒子、ポリプレックス、ウイルスレプリコン

50

粒子（VRP）、ミクロスフェア、免疫刺激複合体（ISCOM）、生物活性リガンドの結合体、又はこれらの任意の組み合わせで配合することができる。従って、いくつかの実施態様において、本開示の組成物はリボソームに配合される。

【0107】

いくつかの実施態様において、本開示の組成物は脂質ベースのナノ粒子（LNP）に配合される。本明細書に記載の送達システムに適した脂質の例示的なタイプには、カチオン性脂質、イオン化可能なカチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、及びこれらの組み合わせが含まれる。

【0108】

いくつかの実施態様において、本開示のLNPは、1つ又はそれ以上のイオン化可能な脂質を含むことができる。本開示の組成物及び方法に適した例示的なイオン化可能な脂質には、PCT公開WO2020252589A1及びWO2021000041A1、並びにLove K. T. et al., Proc Natl Acad Sci USA, Feb. 2, 2010 107 (5) 1864-1869に記載されているものがあり、これらは参照によりその全体が本明細書に取り込まれる。

【0109】

従って、いくつかの実施態様において、本開示のLNPは、Love K. T. et al., 2010（前述）に記載されている1つ又はそれ以上の脂質化合物、例えばC16-96、C14-110、及びC12-200を含む。いくつかの実施態様において、LNPは、ALC-0315、C12-200、LN16、MC3、MD1、SM-102、及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるイオン化可能なカチオン性脂質を含む。いくつかの実施態様において、本開示のLNPはC12-200を含む。

【0110】

いくつかの実施態様において、本開示のLNPは、1つ又はそれ以上のカチオン性脂質を含む。適切なカチオン性脂質は、限定されるものではないが、98N12-5、C12-200、C14-PEG2000、DLin-KC2-DMA（KC2）、DLin-MC3-DMA（MC3）、XTC、MD1、及び7C1を含む。

【0111】

いくつかの実施態様において、本開示のLNPは、1つ又はそれ以上の中性脂質を含む。前述のように、いくつかの実施態様において、「構造脂質」又は「ヘルパー脂質」としても知られる神経脂質も脂質配合物及び脂質粒子に取り込むことができる。脂質配合物及び脂質粒子は、組成物の約10～40モル%で1つ又はそれ以上の構造脂質を含むことができる。適切な構造脂質は、製造中の粒子の形成をサポートする。構造脂質とは、生理学的pHでアニオン性、非荷電性、又は中性両性イオン性のいずれかの形態で存在する多数の脂質種のいずれかを指す。代表的な構造脂質は、ジアシルホスファチジルコリン類、ジアシルホスファチジリエタノールアミン類、ジアシルホスファチジルグリセロール類、セラミド類、スフィンゴミエリン類、ジヒドロスフィンゴミエリン類、セファリン類、セレブロシド類を含む。

【0112】

例示的な構造脂質は、両性イオン脂質、例えば、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジリエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジリエタノールアミン（POPE）及びジオレオイルホスファチジリエタノールアミン4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（DOPE-mal）、ジパルミトイルホスファチジリエタノールアミン（DPPE）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイルホスファチジリエタノールアミン（DSPE）、16-O-モノメチルPE、16-O-ジメチルPE、18-1-トランスPE、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジリエタノールアミン（SOPE）、及び1,2-ジェライドイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノール

アミン（トランスDOPE）を含む。

【0113】

別の実施態様において、構造脂質は、生理学的pHで負に帯電している任意の脂質であり得る。これらの脂質には、ホスファチジルグリセロール類、例えばジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、パルミトイルオレイルホスファチジルグリセロール（POPG）、カルジオリピン、ホスファチジリノシトール、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、及び中性脂質に結合した他のアニオン性修飾基が含まれる。他の適切な構造脂質には、糖脂質（例えば、モノシアロガングリオシドGM1）が含まれる。

【0114】

本開示の組成物及び方法に適した非限定的な中性脂質には、DPSC、DPPC、POPC、DOPE、及びSMが含まれる。いくつかの実施態様において、本開示のLNPには、PCT公開WO2020252589A1及びWO2021000041A1に記載された1つ又はそれ以上のイオン化可能な脂質化合物が含まれ、これらは参照によりその全体が本明細書に取り込まれる。

【0115】

いくつかの実施態様において、本開示のLNPには、C12-200、C14-PEG2000、DOPE、DMG-PEG2000、DSPC、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-コレステロール、DOTAP-コレステロール、GAP-DMORIE-DPyPE、及びGL67A-DOPE-DMPE-ポリエチレングリコール（PEG）からなる群から選択される少なくとも1つの脂質が含まれる。

【0116】

本明細書に記載の送達システムがLNPを含むいくつかの実施態様において、LNP送達システム中の脂質と核酸の質量比は、約100:1～約3:1、約70:1～10:1、又は16:1～4:1である。いくつかの実施態様において、LNP送達システム中の脂質と核酸の質量比は、約16:1～4:1である。いくつかの実施態様において、LNP送達システム中の脂質と核酸の質量比は、約20:1である。いくつかの実施態様において、LNP送達システム中の脂質と核酸の質量比は、約8:1である。いくつかの実施態様において、脂質ベースのナノ粒子（LNP）の平均直径は、約1000nm、約500nm、約250nm、約200nm、約150nm、約100nm、約75nm、約50nm、又は約25nm未満である。いくつかの実施態様において、LNPの平均直径は約70nm～100nmの範囲である。いくつかの実施態様において、LNPの平均直径は約88nm～約92nm、82nm～約86nm、又は約80nm～約95nmの範囲である。

【0117】

脂質製剤の実施態様には、混合物の完全性を確保するために安定剤を含めることができる。安定剤は、分子間の疎水性-親水性相互作用を破壊したり形成を助けたりする分子のクラスである。適切な安定剤には、限定されるものではないが、ポリソルベート80（別名ツイーン80、IUPAC名2-[2-[3,4-ビス(2-ヒドロキシエトキシ)オキソラン-2-イル]-2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]エチルオクタデカ-9-エノエート）、Myrj52（ポリオキシエチレン(40)ステアレート）、及びBrij（商標）S10（ポリオキシエチレン(10)ステアリルエーテル）が含まれる。ポリエチレングリコール結合脂質も使用することができる。安定剤は、単独で使用することも、互いに組み合わせて使用することもできる。

【0118】

いくつかの実施態様において、安定剤は、脂質混合物全体の約0.1～3モル%を構成する。いくつかの実施態様において、安定剤は、脂質混合物全体の約0.5～2.5モル%を構成する。いくつかの実施態様において、安定剤は2.5モル%を超えて存在する。いくつかの実施態様において、安定剤は5モル%で存在する。いくつかの実施態様において、安定剤は10モル%で存在する。いくつかの実施態様において、安定剤は、約0.5

10

20

30

40

50

、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5などである。他の実施態様において、安定剤は脂質混合物の2.6～10モル%である。他の実施態様において、安定剤は脂質混合物の10モル%を超えて存在する。

【0119】

特定の用途において、ステロイドも脂質組成物に含めることもでき、それから作られた脂質粒子には、ステロール類、例えばコレステロールや植物ステロールが含まれる。

【0120】

いくつかの実施態様において、本開示の組成物はポリマーナノ粒子に配合される。本開示の組成物及び方法に適したポリマーの例は、Jiang X et al. (Polymeric nanoparticles for RNA delivery. Encyclopedia of Nanomaterials, 2021) に記載されており、これは参照により本明細書に取り込まれる。本開示の組成物及び方法に適した例示的なポリマーには、カチオン性ポリマー、非カチオン性ポリマー、及びこれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施態様において、本開示のポリマーナノ粒子は天然由来のカチオン性ポリマーを含み得る。いくつかの実施態様において、天然由来のカチオン性ポリマーは、キトサン、ゼラチン、デキストラン、セルロース、シクロデキストリン、又はこれらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施態様において、カチオン性ポリマーは、合成カチオン性ポリマーであり得る。いくつかの実施態様において、合成カチオン性ポリマーは、ポリエチレンイミン (PEI)、ポリ-L-リジン (PLL)、ポリ(アミノ酸) (PAA)、ポリ(アミドアミン) (PAMAM)、ポリ(アミノ-コーエステル) (PAE)、ポリ(2-N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、ポリ(ベータアミノエステル) (PBAE)、イミダゾール含有ポリマー、第三級アミン含有ポリマー、ポリ(2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート)、ポリ-N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリアミドアミンデンドリマー、カチオン性グリコポリマー、又はこれらの誘導体を含み得る。

【0121】

いくつかの実施態様において、非カチオン性ポリマーは、負に帯電している（すなわち、アニオン性）か又は電子的に中性である。いくつかの実施態様において、非カチオン性ポリマーは、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリエステル（例えば、ポリ乳酸 (PLA)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸) (PLGA)、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリカプロラクトン (PCL)）、及びポリサルコシン (pSar)、又はこれらの誘導体を含む。

【0122】

いくつかの実施態様において、ポリマーは水溶性及び／又は生分解性であってもよい。いくつかの実施態様において、ポリマーナノ粒子は、以下の1つ又はそれ以上を含む：ポリ(？-L-グルタミルグルタミン) (PGGA)、ポリ(？-L-アスパルチルグルタミン) (PGAA)、ポリ-L-乳酸 (PLLA)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸) (PLGA)、ポリアルキルシアノアクリレート (PACA)、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルマレート、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ(オルトエステル)、ポリシアノアクリレート、[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド] (HPMA) コポリマー、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリ尿素、ポリアミンポリイブシロン-カプロラクトン (PCL)、及びこれらの共重合体。

【0123】

いくつかの実施態様において、組成物は免疫原性組成物、例えば、被験体における免疫応答を刺激することができる組成物である。いくつかの実施態様において、免疫原性組成物はワクチンとして配合される。いくつかの実施態様において、医薬組成物はアジュバントとして配合される。

【0124】

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様において、免疫原性組成物は、バイオ治療薬、例えば、生物活性を有する異なる分子の遺伝子送達のためのビヒクルとして配合される。バイオ治療薬の非限定例には、サイトカイン、ケモカイン、及びその他の可溶性免疫調節剤、酵素、ペプチド及びタンパク質アゴニスト、ペプチド及びタンパク質アンタゴニスト、ホルモン、受容体、抗体及び抗体誘導体、成長因子、転写因子、及び遺伝子サイレンシング／編集分子が含まれる。いくつかの実施態様において、医薬組成物はアジュバントとして配合される。

【0125】

いくつかの実施態様において、免疫原性組成物は、実質的に非免疫原性であるか、又は最小限に免疫原性である（例えば、被験体における免疫応答を最小限に刺激する組成物）。いくつかの実施態様において、非免疫原性又は最小限に免疫原性の組成物は、バイオ治療薬として配合される。いくつかの実施態様において、医薬組成物は、鼻腔内投与、経皮投与、髄腔内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、気管内投与、節内投与、腫瘍内投与、関節内投与、静脈内投与、皮下投与、腔内投与、眼内投与、直腸投与、及び経口投与のうちの1つ又はそれ以上用に配合される。

10

【0126】

注射用途に適した医薬組成物には、無菌水溶液又は分散液、及び無菌注射用溶液又は分散液を即時に調製するための無菌粉末が含まれる。静脈内投与の場合、適切な担体には、生理食塩水、殺菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, N. J.）、又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれる。これらの場合、組成物は無菌であって、容易に注射できる程度に流動性がなければならない。これは、製造及び保存条件下で安定であり、細菌や真菌などの微生物の汚染作用から防御することができる。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）、及びこれらの適切な混合物を含む溶媒又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によって、分散の場合に必要な粒子サイズの維持によって、及びドデシル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの様々な抗菌剤及び抗真菌剤によって達成することができる。多くの場合、組成物には等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、及び／又は塩化ナトリウムが含まれるのが一般的である。注射用組成物の吸収を延長するには、組成物に吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンが含まれることによって達成される。

20

30

【0127】

無菌注射用溶液は、必要に応じて、上記に列挙した成分の1つ又は組み合わせを含む適切な溶媒に必要な量の活性化化合物を取り込み、次に濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本分散媒体及び上記に列挙した成分から必要な他の成分を含む無菌ビヒクルに、活性化化合物を取り込むことによって調製される。

【0128】

いくつかの実施態様において、本開示の医薬組成物は、吸入用に配合される、例えば、エアロゾル、スプレー、ミスト、液体、又は粉末である。吸入による投与は、乾燥粉末又はエアロゾル製剤のいずれかの形態でもよく、これらは、被験体（例えば、患者）によって、吸入装置、例えばマイクロスプレー、加圧式定量吸入器、又はネブライザーを使用して吸入される。

40

【0129】

いくつかの実施態様において、組成物は、鼻腔内投与、髄腔内投与、経皮投与、筋肉内投与、リンパ節内投与、静脈内投与、腹腔内投与、経口投与、腔内、又は頭蓋内投与のうちの1つ又はそれ以上のために配合される。いくつかの実施態様において、投与された組成物は、被験体におけるインターフェロンの産生の増加をもたらす。いくつかの実施態様において、投与された組成物は、被験体において1つ又はそれ以上の炎症誘発性分子の産生を誘導する。いくつかの実施態様において、1つ又はそれ以上の炎症誘発性分子には、

50

インターフェロンガンマ（ $IFN\gamma$ ）、サイトカイン、 $TNF-\alpha$ 、 $GM-CSF$ 、及び $MIP1\alpha$ 、グランザイム B、グランザイム A、パーフォリン、又はこれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0130】

開示の方法

本明細書に記載の治療組成物、例えば核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のいずれか1つの投与は、関連する健康状態、例えば、増殖性疾患（例えば癌）、感染症（例えば、急性感染症、慢性感染症、又はウイルス感染症）、希少疾患、及び／又は自己免疫疾患、及び／又は炎症性疾患の治療に使用することができる。いくつかの実施態様において、本明細書に記載の核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、それを必要とする被験体における薬力学的効果の調節、例えば誘発又は抑制に有用であり得る。いくつかの実施態様において、薬力学的効果には、被験体における免疫応答の誘発が含まれる。薬力学的効果の非限定例には、免疫原性効果、バイオマーカー応答、治療効果、予防効果、所望の効果、望ましくない作用、有害作用、及び疾患モデルにおける効果が含まれる。従って、本開示の1つの態様は、それを必要とする被験体における薬力学的効果を調節するための方法に関し、その方法は、被験体に以下のうちの1つ又はそれ以上を含む組成物を投与することを含む：（a）本明細書に記載の核酸構築物；（c）本明細書に記載の組み換え細胞；（c）本明細書に記載の組み換えポリペプチド；及び（d）本明細書に記載の医薬組成物。いくつかの実施態様において、薬力学的効果は以下のうちの1つ又はそれ以上を含む：免疫原性効果、バイオマーカー応答、治療効果、予防効果、所望の効果、望ましくない作用、有害作用、及び疾患モデルにおける効果。

10

20

【0131】

いくつかの実施態様において、本明細書に記載の核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、1つ又はそれ以上の関連する健康状態又は疾患に罹患しているか、罹患している疑いがあるか、又は罹患するリスクが高い可能性がある被験体を治療する方法で使用するための治療薬に取り込むことができる。従って、別の態様において、被験体の健康状態を予防又は治療する方法が本明細書に提供され、その方法は、被験体に、以下の1つ又はそれ以上を含む組成物を予防的又は治療的に投与することを含む：（a）本明細書に記載の自己複製RNA構築物；（b）本明細書に記載の核酸；（c）本明細書に記載の組み換え細胞；及び（d）本明細書に記載の医薬組成物。いくつかの実施態様において、投与された組成物は、被験体において免疫応答を誘発する。いくつかの実施態様において、投与された組成物は、被験体において1つ又はそれ以上の炎症誘発性分子の産生を誘導する。いくつかの実施態様において、1つ又はそれ以上の炎症誘発性分子は、インターフェロンガンマ（ $IFN\gamma$ ）、サイトカイン、 $TNF-\alpha$ 、 $GM-CSF$ 、及び $MIP1\alpha$ 、グランザイム B、グランザイム A、パーフォリン、又はこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施態様において、被験体は以前に1つ又はそれ以上の治療法で治療されており、前記1つ又はそれ以上の治療法に対して少なくとも部分的な耐性を発現している。

30

【0132】

例示的な健康状態又は疾患には、限定されるものではないが、癌、免疫疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、遺伝子治療、遺伝子置換、心血管疾患、加齢性病状、希少疾患、急性感染症、及び慢性感染症が含まれる。いくつかの実施態様において、被験体は医師の治療を受けている患者である。

40

【0133】

本開示の方法に適した自己免疫疾患の例には、限定されるものではないが、関節リウマチ、変形性関節症、スチル病、家族性地中海熱、全身性強皮症、多発性硬化症、強直性脊椎炎、橋本甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、糖尿病性網膜症、糖尿病性血管症、糖尿病性神経障害、膵島炎、乾癬、大脱毛症、温冷自己免疫性溶血性貧血（AIHA）、悪性貧血、急性炎症性疾患、自己免疫性副腎炎、慢性炎症性脱髄性多発

50

神経炎（C I D P）、ランバート・イートン症候群、苔癬性硬化症、ライム病、バセドウ病、ベーチェット病、メニエール病、反応性関節炎（ライター症候群）、チャグ・ストラウス症候群、コーガン症候群、C R E S T 症候群、尋常性天疱瘡及び落葉状天疱瘡、水疱性類天疱瘡、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、膵炎、腹膜炎、乾癬性関節炎、リウマチ熱、サルコイドーシス、シェーグレンセン症候群、強皮症、セリアック病、スティフマン症候群、高安動脈炎、一過性グルテン不耐症、自己免疫性ぶどう膜炎、白斑、多発性軟骨炎、疱疹状皮膚炎（D H）又はデューリング病、線維筋痛症、グッドパスチャー症候群、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、自己免疫性肝炎、炎症性腸疾患（I B D）、クローン病、潰瘍性大腸炎、重症筋無力症、免疫複合体疾患、糸球体腎炎、結節性多発動脈炎、抗リン脂質症候群、多腺性自己免疫症候群、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、蕁麻疹、自己免疫性不妊症、若年性関節リウマチ、サルコイドーシス、及び自己免疫性心筋症が含まれる。

10

【0134】

本発明の方法に適した感染症の非限定例には、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、B型肝炎ウイルス（H B V）、B型肝炎ウイルス（H C V）、サイトメガロウイルス（C M V）、呼吸器合胞体ウイルス（R S V）、ヒトパピローマウイルス（H P V）、エプスタイン・バーウイルス（E B V）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（S A R S - C o V 2）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（S A R S - C o V）、中東呼吸器症候群（M E R S）、インフルエンザウイルス、エボラウイルスなどのウイルスによる感染症が含まれる。本開示の方法に適した追加の感染症には、リーシュマニア、リケッチア、クラミジア、コクシエラ、マラリア原虫、ブルセラ、マイコバクテリア、リステリア、トキソプラズマ、トリパノソーマなどの細胞内寄生虫による感染症が含まれる。いくつかの実施態様において、レプリコン構築物、s r R N A 構築物、核酸構築物、組み換え細胞、及び／又は医薬組成物は、自己免疫疾患又は炎症性疾患、例えば、糸球体腎炎、炎症性腸疾患、腎炎、腹膜炎、乾癬性関節炎、変形性関節症、スチル病、家族性地中海熱、全身性強皮症及び硬化症、炎症性腸疾患（I B D）、クローン病、潰瘍性大腸炎、急性肺損傷、髄膜炎、脳炎、ぶどう膜炎、多発性骨髄腫、糸球体腎炎、腎炎、喘息、アテローム性動脈硬化症、白血球接着不全症、多発性硬化症、レイノー症候群、シェーグレン症候群、若年発症糖尿病、ライター病、ベーチェット病、免疫複合体腎炎、I g A 腎症、I g M 多発性神経障害、免疫介在性血小板減少症、溶血性貧血、重症筋無力症、ループス腎炎、ループスエリテマトーデス、関節リウマチ（R A）、強直性脊椎炎、天疱瘡、バセドウ病、橋本甲状腺炎、小血管血管炎、オーメズ症候群、慢性腎不全、自己免疫甲状腺疾患、急性伝染性単核球症、H I V、ヘルペスウイルス関連疾患、ヒトウイルス感染症、コロナウイルス、その他のエンテロウイルス、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、R S ウイルス又はアデノウイルス感染症、細菌性肺炎、創傷、敗血症、脳卒中／脳浮腫、虚血再灌流障害、C型肝炎の治療及び／又は予防に有用であり得る。

20

30

【0135】

本開示の方法に適した炎症性疾患の非限定例には、喘息、炎症性腸疾患（I B D）、慢性大腸炎、脾腫、関節リウマチなどの炎症性疾患が含まれる。

【0136】

いくつかの実施態様において、健康状態は増殖性障害又は微生物感染症（例えば、細菌感染症、微小真菌感染症、又はウイルス感染症）である。いくつかの実施態様において、被験体は、増殖性疾患又は微生物感染症（例えば、細菌感染症、微小真菌感染症、又はウイルス感染症）に関連する状態を有するか又は有することが疑われる。

40

【0137】

いくつかの実施態様において、健康状態は希少疾患、例えばオーファンドラッグ法（T h e O r p h a n D r u g A c t）（www.fda.gov/patients/rare-diseases-fda）で定義されている、米国で20万人未満が罹患している疾患又は状態、及び／又は炎症性疾患、及び／又は自己免疫疾患である。いくつかの実施態様において、被験体は、炎症性疾患及び／又は自己免疫疾患及び／又は希少疾

50

患（例えば、限定されるものではないが、家族性地中海熱又は成人発症スチル病を含む）に関連する状態を有するか又は有することが疑われる。

【0138】

いくつかの実施態様において、開示された組成物は、意図された投与経路に適合するように配合される。例えば、本開示の核酸構築物（例えば、レプリコン構築物、例えば、srRNA構築物）、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、経口又は吸入により投与されてもよいが、非経口経路により投与される可能性が高い。非経口投与経路の例には、例えば、筋肉内、腫瘍内、眼内、静脈内、節内、皮内、皮下、経皮（局所）、経粘膜、腔内、及び直腸投与が含まれる。いくつかの実施態様において、組成物は筋肉内に投与される。いくつかの実施態様において、組成物は腫瘍内に投与される。非経口投与に使用される溶液又は懸濁液は以下の成分を含み得る：無菌希釈剤、例えば、注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又はその他の合成溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）；緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、トリス、スクロース；及び張性調整剤、例えば、塩化ナトリウムやデキストロース。pHは、酸又は塩基、例えば、一塩基性及び／又は二塩基性リン酸ナトリウム、塩酸、又は水酸化ナトリウムで調整することができる（例えば、pHを約7.2～7.8、例えば7.5に調整）。非経口製剤は、ガラス又はプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器、又は複数回投与用バイアルに封入することができる。

10

20

【0139】

本開示のこのような主題の核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物の投与量、毒性、及び治療有効性は、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学的操作によって、例えば、LD50（人口の50%に致死的な投与量）及びED50（人口の50%に治療効果のある投与量）を測定することによって決定することができる。毒性効果と治療効果の投与量比は治療指数であり、LD50/ED50比として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が一般に適切である。毒性副作用を示す化合物が使用される場合もあるが、感染していない細胞への潜在的な損傷を最小限に抑え、それによって副作用を軽減するために、そのような化合物が影響を受けた組織の部位を標的とする送達システムを設計するように注意する必要がある。

30

【0140】

例えば、細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータは、ヒトで使用する投与量の範囲を決定する際に使用することができる。このような化合物の投与量は、一般に、毒性がほとんど又は全くないED50を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、使用される剤形及び使用される投与経路に応じて、この範囲内で変化し得る。開示の方法で使用する任意の化合物について、治療有効投与量は、最初に細胞培養アッセイから推定することができる。投与量は、細胞培養で測定されたIC50（例えば、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルで配合することができる。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

40

【0141】

本明細書に記載の治療組成物、例えば核酸構築物、例えばsrRNA構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、1日1回又はそれ以上から1週間に1回又はそれ以上（1日おきに1回を含む）投与することができる。当業者であれば、特定の要因が被験体を効果的に治療するために必要な投与量及びタイミングに影響を及ぼし得ることを理解するであろう。このような要因には、限定されるものではないが、疾患の重症度、以前の治療、被験体の全般的な健康状態及び／又は年齢、及び存在する他の疾患を含む。さらに、本開示の対象の多価ポリペプチド及び多価抗体の治療有効量による被験体の治療は、1回の治療を含むことも、一連の治療を含むこともできる。いくつかの

50

実施態様において、組成物は8時間ごとに5日間投与され、次に2～14日間、例えば9日間の休止期間が続き、次にさらに8時間ごとに5日間投与される。核酸構築物（例えば、レプリコン構築物、例えば、srRNA構築物）及び組み換えポリペプチドに関して、本開示の核酸構築物又は組み換えポリペプチドの治療有効量（例えば、有効投与量）は、選択された核酸構築物又は組み換えポリペプチドに依存する。例えば、患者の体重1kgあたり約0.001～0.1mgの範囲の単回投与量を投与することができる。いくつかの実施態様において、約0.005、0.01、0.05mg/kgを投与することができる。いくつかの実施態様において、患者の体重1kgあたり約0.03μg～300μgの範囲の単回投与量を投与することができる。いくつかの実施態様において、患者の体重1kgあたり約0.3mg～3mgの範囲の単回投与量を投与することができる。

10

【0142】

上で述べたように、治療有効量には、被験体、例えば、例えば疾患又は感染などの健康状態に罹患しているか、罹患している疑いがあるか、又は罹患するリスクがある被験体に投与された場合に、特定の効果を促進するのに十分な治療組成物の量が含まれる。いくつかの実施態様において、有効量は、疾患又は感染症状の発現を予防又は遅延するか、疾患又は感染症状の経過を変える（例えば、限定されるものではないが、疾患又は感染症状の進行を遅らせる）か、又は疾患又は感染症状を逆転させるのに十分な量を含む。任意の特定の症例について、適切な有効量は、当業者が日常的な実験を使用して決定できることが理解される。

【0143】

疾患又は感染の治療のための開示された治療組成物を含む治療の有効性は、熟練した臨床医が決定することができる。しかし、疾患又は感染の兆候又は症状の少なくともいずれか1つ又はすべてが改善又は緩和される場合、治療は有効な治療とみなされる。有効性はまた、入院又は医療介入の必要性によって評価して、個体の症状が悪化しないこと（例えば、疾患又は感染の進行が停止するか、又は少なくとも遅くなる）によっても測定することができる。これらの指標を測定する方法は、当業者に公知であるか及び／又は本明細書に記載されている。治療には、被験体又は動物（一部の非限定例はヒト又は哺乳動物を含む）における疾患又は感染のあらゆる治療が含まれ、及び（1）疾患又は感染を阻害すること、例えば、症状の進行を止めるか又は遅くすること、又は（2）疾患又は感染を緩和すること、例えば、症状の退行を引き起こすこと、及び（3）症状の発現の可能性を防止又は軽減すること、が含まれる。

20

30

【0144】

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物（例えば、レプリコン構築物、例えば、srRNA構築物）、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、被験体に、医薬的に許容し得る担体を有する組成物で、免疫応答を刺激するのに有効な量で投与することができる。一般に、被験体は、最初の一連の注射（又は以下に記載する他の経路の1つによる投与）によって免疫され、次に、追加免疫剤を投与して最初の一連の投与によってもたらされる防御を強化することができる。最初の一連の注射及び次の追加免疫剤は、被験体の免疫応答を刺激するのに必要な用量で必要な期間にわたって投与される。いくつかの実施態様において、投与された組成物により、被験体におけるインターフェロンの産生が増加する。開示された方法のいくつかの実施態様において、被験体は哺乳動物である。いくつかの実施態様において、哺乳動物はヒト被験体である。

40

【0145】

上述したように、注射用途に適した医薬的に許容し得る担体には、無菌水溶液（水溶性の場合）又は分散液、及び無菌注射用溶液又は分散液を即座に調製するための無菌粉末が含まれる。これらの場合、組成物は無菌であり、容易に注射できる程度に流動性でなければならない。組成物はさらに、製造及び保存条件下で安定でなければならない、及び細菌や真菌などの微生物による汚染作用から防御されなければならない。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）、これらの適切な混合物、及び植物油を含む溶媒又は分散媒体

50

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によって、分散物の場合は必要な粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。

【0146】

無菌注射液は、必要な量の核酸構築物、組換え細胞、及び／又は組換えポリペプチドを、上記に列挙した成分の1つ又は組み合わせを含む適切な溶媒に取り込み、必要に応じて、次に濾過無菌することによって調製することができる。

【0147】

核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物が上記のように適切に防御されている場合、これらは、例えば不活性希釈剤又は吸収可能な食用担体とともに経口投与することができる。核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物及び他の成分はまた、ハードシェル若しくはソフトシェルゼラチンカプセルに封入することも、錠剤に圧縮することも、又は個体の食事に直接取り込むこともできる。経口治療投与の場合、活性化合物は賦形剤とともに取り込まれ、摂取可能な錠剤、口腔内錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハーなどの形態で使用され得る。

【0148】

いくつかの実施態様において、本開示の核酸構築物及び組換えポリペプチドは、脂質ベースのナノ粒子（LNP）によって細胞又は被験体に送達され得る。LNPは一般に、ウイルス粒子よりも免疫原性が低い。多くのヒトはウイルス粒子に対する既存の免疫を有するが、LNPに対する既存の免疫はない。さらに、LNPに対する適応免疫応答は起きそうにないため、LNPの繰り返し投与が可能になる。

【0149】

LNPで使用するために、いくつかの異なるイオン化可能なカチオン性脂質が開発されている。これらには、特にC12-200、MC3、LN16、及びMD1が含まれる。例えば、あるタイプのLNPでは、GalNAc部分がLNPの外側に付着しており、アシアロ糖タンパク質受容体を介して肝臓に取り込まれるリガンドとして作用する。これらのカチオン性脂質のいずれかを使用して、本開示の核酸構築物及び組換えポリペプチドを肝臓に送達するためのLNPを配合することができる。

【0150】

いくつかの実施態様において、LNPは、直径が1000nm、500nm、250nm、200nm、150nm、100nm、75nm、50nm、又は25nm未満の任意の粒子を指す。あるいは、ナノ粒子のサイズは、1～1000nm、1～500nm、1～250nm、25～200nm、25～100nm、35～75nm、又は25～60nmの範囲であり得る。

【0151】

LNPは、カチオン性脂質、アニオン性脂質、又は中性脂質から作成することができる。融合性リン脂質DOPEや膜成分コレステロールなどの中性脂質は、LNP中に「ヘルパー脂質」として含めて、トランスフェクション活性及びナノ粒子の安定性を高めることができる。カチオン性脂質の限界には、安定性の低さと迅速なクリアランスによる効力の低さ、並びに炎症性又は抗炎症性応答の発生が含まれる。LNPはまた、疎水性脂質、親水性脂質、又は疎水性脂質と親水性脂質の両方を有することもできる。

【0152】

当該技術分野で公知の多数の脂質又は脂質の組み合わせを使用してLNPを生成することができる。LNPの生成に使用するのに適した脂質の非限定例には、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-コレステロール、DOTAP-コレステロール、GAP-DMORIE-DPyPE、及びGL67A-DOPE-DMPE-ポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。カチオン性脂質の非限定例には、98N12-5

10

20

30

40

50

、C12-200、DLin-KC2-DMA (KC2)、DLin-MC3-DMA (MC3)、XTC、MD1、及び7C1が含まれる。中性脂質の非限定例としては、DPPC、DPPC、POPC、DOPE、及びSMが含まれる。PEG修飾脂質の非限定例には、PEG-DMG、PEG-CerC14、及びPEG-CerC20が含まれる。

【0153】

いくつかの実施態様において、脂質を任意の数のモル比で組み合わせてLNPを生成することができる。さらに、ポリヌクレオチドを脂質と広範囲のモル比で組み合わせてLNPを生成することができる。

【0154】

いくつかの実施態様において、本明細書に記載の治療組成物、例えば核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、癌、自己免疫疾患、及び／又は感染症に罹患しているか、罹患している疑いがあるか、又は罹患するリスクが高い可能性がある被験体を予防又は治療する方法で使用するための治療組成物に取り込まれる。

10

【0155】

いくつかの実施態様において、本明細書に記載の治療組成物、例えば核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、微生物感染症に罹患しているか、罹患している疑いがあるか、又は罹患するリスクが高い可能性がある被験体を予防又は治療する方法で使用するための治療組成物に取り込まれる。いくつかの実施態様において、微生物感染症は細菌感染症である。いくつかの実施態様において、微生物感染症は真菌感染症である。いくつかの実施態様において、微生物感染症はウイルス感染症である。

20

【0156】

追加の治療法

いくつかの実施態様において、本開示の組成物は、被験体に個別に、単一の治療法（単独療法）として、又は少なくとも1つの追加の治療法（例えば、第2の治療法）と組み合わせた第1の治療法として投与される。いくつかの実施態様において、第2の治療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、標的化療法、及び手術からなる群から選択される。いくつかの実施態様において、第2の治療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、又は手術からなる群から選択される。いくつかの実施態様において、第1の治療法と第2の治療法は同時に施される。いくつかの実施態様において、第1の治療法は第2の治療法と同時に施される。いくつかの実施態様において、第1の治療法と第2の治療法は順次施される。いくつかの実施態様において、第1の治療法は第2の治療法の前に施される。いくつかの実施態様において、第1の治療法は第2の治療法の後に施される。いくつかの実施態様において、第1の治療法は第2の治療法の前及び／又は後に施される。いくつかの実施態様において、第1の治療法と第2の治療法は交互に施される。いくつかの実施態様において、第1の治療法と第2の治療法は単一の製剤と一緒に投与される。

30

【0157】

キット

また、本明細書に記載された方法を実施するための様々なキット、並びにその製造及び使用に関する説明書も本明細書に提供される。特に、本開示のいくつかの実施態様は、薬力学的効果を調節するためのキットを提供する。本開示のいくつかの実施態様は、被験体において免疫応答を誘発するためのキットを提供する。他のいくつかの実施態様は、それを必要とする被験体における健康状態の予防のためのキットに関する。他のいくつかの実施態様は、それを必要とする被験体における健康状態の治療方法のためのキットに関する。例えば、本明細書では、いくつかの実施態様において、本明細書で提供及び説明される核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のうちの1つ又はそれ以上、並びにそれらを製造及び使用するための説明書を含むキットが提供される。

40

【0158】

50

いくつかの実施態様において、本開示のキットは、提供される核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のいずれか1つを被験体に投与するのに有用な1つ又はそれ以上の手段をさらに含む。例えば、いくつかの実施態様において、本開示のキットは、提供される核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のいずれか1つを被験体に投与するために使用される、1つ又はそれ以上の注射器（充填済み注射器を含む）及び／又はカテーテル（充填済み注射器を含む）をさらに含む。いくつかの実施態様において、キットは、所望の目的、例えば、それを必要とする被験体の状態を診断、予防、又は治療するために、他のキット構成要素と同時に又は順番に投与することができる1つ又はそれ以上の追加の治療剤を有し得る。

【0159】

上記キットはいずれも、さらに1つ又はそれ以上の追加の試薬を含むことができ、ここで、そのような追加の試薬は、希釈緩衝液、復元溶液、洗浄緩衝液、対照試薬、対照発現ベクター、陰性対照、陽性対照、本開示の提供される核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のインビトロ産生に適した試薬から選択することができる。

【0160】

いくつかの実施態様において、キットの構成要素は別々の容器に入っているもよい。他のいくつかの実施態様において、キットの構成要素は単一の容器で組み合わせることができる。従って、本開示のいくつかの実施態様において、キットには、本明細書で提供及び説明される核酸構築物、組み換え細胞、組み換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物の1つ又はそれ以上が1つの容器（例えば、無菌ガラス又はプラスチックバイアル）に含まれ、及び別の治療薬が別の容器（例えば、無菌ガラス又はプラスチックバイアル）に含まれる。

【0161】

別の実施態様において、キットには、本明細書に記載の組成物の組み合わせが含まれ、この組み合わせは、本開示の1つ又はそれ以上の核酸構築物、組換え細胞、及び／又は組換えポリペプチドを、任意選択的に医薬組成物中に一緒に配合された1つ又はそれ以上のさらなる治療剤と合わせて、単一の共通容器内に含まれる。

【0162】

キットが被験体への非経口投与用の医薬組成物を含む場合、キットは、そのような投与を行うためのデバイス（例えば、注射器具又はカテーテル）を含み得る。例えば、キットは、本開示の1つ又はそれ以上の核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物を含む、上記で説明した1つ又はそれ以上の皮下注射針又はその他の注射器具を含み得る。

【0163】

いくつかの実施態様において、キットの構成要素は、別々の容器内に入っているもよい。他のいくつかの実施態様において、キットの構成要素は、単一の容器内で組み合わせることができる。

【0164】

いくつかの実施態様において、キットは、本明細書に開示された方法を実施するために、キットの構成要素を使用するための説明書をさらに含み得る。例えば、キットは、キット内の医薬組成物及び剤形に関する情報を含む添付文書を含むことができる。一般に、このような情報は、患者及び医師が同梱の医薬組成物及び剤形を効果的かつ安全に使用するのに役立つ。例えば、開示内容の組み合わせに関する以下の情報が添付文書に提供されてもよい：薬物動態、薬力学、臨床研究、有効性パラメータ、適応症及び使用法、禁忌、警告、注意事項、副作用、過剰投与、適切な投与量及び投与方法、供給方法、適切な保存条件、参考文献、製造業者／販売元情報、及び知的財産権情報。

【0165】

方法を実施するための説明書は、一般に適切な記録媒体に記録される。例えば、説明書は紙やプラスチックなどの基材に印刷することができる。説明書は、キットの添付文書と

10

20

30

40

50

して、キットの容器又はその構成要素のラベルなどに記載することができる（例えば、パッケージ又はサブパッケージに付随している）。説明書は、CD-ROM、ディスク、フラッシュドライブなどの適切なコンピュータ可読記憶媒体に存在する電子記憶データファイルとして存在することができる。場合によっては、実際の説明書はキットに含まれておらず、リモートソース（例えば、インターネット経由）から説明書を取得する手段が提供される。この実施態様の一例は、説明書を表示したり及び／又は説明書をダウンロードしたりできるウェブアドレスを含むキットである。説明書と同様に、説明書を取得するこの手段は、適切な基材に記録することができる。

【0166】

本開示で言及されているすべての刊行物及び特許出願は、個々の刊行物又は特許出願が参照により取り込まれていることが具体的にかつ個別に示されている場合と同程度に、参照により本明細書に取り込まれている。

【0167】

本明細書で引用されている参考文献が先行技術を構成することを決して認めるものではない。参考文献の議論は、その著者の主張を述べるものであり、本出願人は、引用された文書の正確性及び妥当性に異議を唱える権利を留保する。科学雑誌の記事、特許文書、教科書など、多数の情報源が本明細書で参照されているが、この参照は、これらの文書のいずれかが当該技術分野における一般的な知識の一部を構成するという承認を構成するものではないことは明瞭に理解されるであろう。

【0168】

本明細書で示されている一般的な方法の議論は、例示のみを目的としている。本開示を検討すれば、他の代替方法及び代替物が当業者には明らかであり、それらは本出願の精神及び範囲内に含まれるものとする。

【0169】

さらなる実施態様は、以下の実施例でさらに詳細に開示されるが、これらの実施例は例として提供されており、本開示又は請求項の範囲を制限することを意図するものではない。

【実施例】

【0170】

本発明の実施では、特に断りのない限り、当業者によく知られている分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、及び免疫学の従来技術が使用される。そのような技術は、文献に、例えば、Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory and Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (jointly referred to herein as "Sambrook"); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (including supplements through 2014); Bollag, D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. et al. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. et al. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997).

The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. et al. (1998). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferree, F. & Gibbs, R. (1994). PCR: The Polymerase Chain Reaction. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). Antibodies: A Laboratory Manual (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. et al. (2000). Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. New York, NY: Wiley (2014年までの増刊を含む); 及び Makrides, S. C. (2003). Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V. で詳細に説明されており、これらの開示内容は参照により本明細書に取り込まれる。

【0171】

追加の実施態様が以下の実施例でさらに詳細に開示されるが、これらは例として提供されており、決して本開示又は請求項の範囲を制限することを意図したものではない。

【0172】

実施例 1

WEEVベクターの構築

本実施例は、基本WEEVベクター（例えば、異種遺伝子を含まない）を構築するために実施した実験について説明する。このベクターは、次に、目的の遺伝子（例えば、インフルエンザAウイルスH5N1のヘマグルチニン前駆体HA）の発現用のWEEVベクターの構築に使用される。

【0173】

基本WEEVベクター（すなわち、目的の異種遺伝子を含まない）を、次のように構築する：基本WEEVベクター（例えば、図2Aを参照）は、参照配列（Genbank GQ287641）にいくつかの変更を加えて、4つの約4kb部分で新規合成する。参照配列内のあいまいなヌクレオチド割り当ては、コード化された残基の同義コドンに一致するヌクレオチドに割り当てる。サイレント変異を取り込んで、SapI及びSpeI制限酵素切断部位を除去する。固有の制限酵素切断部位（SpeI、5'-A'CTAG, T-3'）は、未変性のWEEV構造遺伝子のコード配列（ここで、5'Aは、構造ポリタンパク質ATG開始コドンの位置と一致し、3'Tは構造ポリタンパク質停止コドンTAAの位置と一致する）の代わりに取り込むことができる。5'アダプター配列（5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCCTGGACCT-3'；配列番号3）をSpeI部位の上流に挿入し、3'アダプター配列（5'-GACCGCTACGCCCCCAATGACCCGACCAAGC-3'；配列番号4）を、後続のGibson Assembly（登録商標）操作（Gibson et al., Nat. Methods 6, 343-345, 2009）のためにSpeI部位の下流に挿入する。バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼプロモーター（5'-TAATACGACTCACTATAG-3'；配列番号5）を、WEEVゲノム配列の上流に含めて、下流にはポリ（A）配列とそれに続くSapI部位が含まれてもよく、これは認識部位の上流を切断する。SapI部位のすぐ下流は、T7ターミネーター配列（5'-AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTT-3'；配列番号6）であり、次に固有の制限酵素切断部位（NotI、5'-GC'GGCC, GC-3'）が続く。これらの部分は、5ピースのGibson Assembly（登録商標）反応で結合させる：線状化された

p Y L 主鎖と 4 つの合成断片が、W E E V 基本ベクターを与える。

【0174】

いくつかの実験で、1 つ又はそれ以上の n s P をコードする配列を異種 n s P に置き換える。他のいくつかの実験で、1 つ又はそれ以上の U T R をコードする配列を異種 U T R に置き換える。

【0175】

異種遺伝子を含む W E E V ベクターの構築は、以下のように実行する：図 2 B に記載されている W E E V ベクターは、図 2 A の空の W E E V ベクターを S p e I 消化によって線状化して構築する。インフルエンザ由来のヘマグルチニン（H A）遺伝子（G e n b a n k A Y 6 5 1 3 3 4）は、ヒト発現用にコンピューターでコドン最適化／リファクタリングし、新規合成（I D T）する。合成産物は、H A 遺伝子の末端に 5' 及び 3' アダプター配列を追加したプライマーを使用して増幅する。消化産物と P C R 産物を、G i b s o n A s s e m b l y（登録商標）操作によって結合させて最終的なベクターを生成する。

10

【0176】

実施例 2

改変 W E E V ベクターのインビトロ評価

本実施例は、上記実施例 1 で説明した合成 W E E V s r R N A 構築物の発現レベルを評価して、これらの示差的挙動（例えば、複製及びタンパク質発現）を調べるために実行されるインビトロ実験について説明する。

【0177】

これらの実験では、W E E V 株 I m p e r i a l 由来の合成 s r R N A 構築物を設計し、次に評価する。

20

【0178】

インビトロ転写：R N A を、5' A R C A キャップ付きのバクテリオファージ T 7 ポリメラーゼ（H i S c r i b e（商標）T 7 A R C A m R N A キット、N E B）を用いて、S a p I 線状化したプラスミドテンプレートからのインビトロ転写によって、又はキャップなし転写（H i S c r i b e（商標）T 7 高収率 R N A 合成キット、N E B）とそれに続く 5' キャップ 1（V a c c i n i a C a p p i n g S y s t e m、m R N A キャップ 2'-O-メチルトランスフェラーゼ、N E B）の付加によって調製する。次に、R N A をフェノール／クロロホルム抽出又はカラム精製（M o n a r c h（登録商標）R N A クリーンアップキット、N E B）を使用して精製する。260 nm の吸光度によって R N A 濃度を測定する（N a n o d r o p, T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）。

30

【0179】

複製：R N A を、B H K-21 細胞又は電気穿孔法によって V e r o 細胞（例えば、4 D-N u c l e o f e c t o r（商標）、L o n z a）に形質転換する。形質転換後 15～20 時間で、細胞を固定し、透過処理して（e B i o s c i e n c e（商標）F o x p 3／転写因子染色緩衝液セット、I n v i t r o g e n）、次に、P E 結合抗 d s R N A マウスモノクローナル抗体（J 2、S c i c o n s）を使用して染色し、d s R N A＋細胞の頻度と個々の細胞内の d s R N A の平均蛍光強度（M F I）を蛍光フローサイトメトリーによって定量する。

40

【0180】

タンパク質発現：R N A を、電気穿孔法によって B H K-21 細胞又は V e r o 細胞（例えば、4 D-N u c l e o f e c t o r（商標）、L o n z a）に形質転換する。形質転換の 15～20 時間後、細胞を固定し、透過処理して（e B i o s c i e n c e（商標）F o x p 3／転写因子染色緩衝液セット、I n v i t r o g e n）、A P C 結合抗 H A マウスモノクローナル抗体（2 B 7、A b c a m）を使用して染色して、個々の細胞内の H A タンパク質を発現する細胞の頻度と H A タンパク質の平均蛍光強度（M F I）を蛍光フローサイトメトリーによって定量する。

【0181】

50

追加実験：BHK-21細胞又はVero細胞を、組換えインターフェロン（IFN）の力価測定曲線で前処理した後、RNAの電気穿孔を行い、ベクターの複製及びタンパク質発現への影響を、上記のアッセイを使用して測定する。

【0182】

いくつかの実験では、BHK-21細胞をWEEV srRNA構築物で形質転換する。標的GOIのないWEEV srRNAを電気穿孔法で形質転換し、形質転換の20時間後に、形質転換細胞を固定し、透過処理し、そしてPE結合抗dsRNAマウスモノクローナル抗体（J2、Scicons）を使用して染色して、dsRNA+細胞の頻度を蛍光フローサイトメトリーによって定量する。さらに、標的GOIのコード配列を含むWEEV srRNAを同様にBHK-21細胞に形質転換し、dsRNA検出に加えて、APC結合抗GOIモノクローナル抗体を使用してトランス遺伝子の発現が検出する。抗dsRNA抗体と抗GOI抗体の両方で個々の細胞を陽性染色すると、本明細書に記載の改変WEEV設計が有効な合成srRNAであり、RNA複製を行ってトランス遺伝子を発現できることが証明される。

10

【0183】

実施例3

改変WEEVベクターのインビボ評価

本実施例は、上記実施例1及び2に記載した合成WEEV srRNA構築物（例えば、未配合ベクターとLNP配合ベクターの両方）によるワクチン接種後の免疫応答を評価するために実行されたインビボ実験を記載する。

20

【0184】

これらの実験では、WEEV株Imperial由来の合成srRNA構築物を設計し、次に評価する。

【0185】

マウスと注射。雌のC57BL/6又はBALB/cマウスをEnvigo, Charles River Labs 又は Jackson Laboratoriesから購入する。投与当日、0.1~10 µgの材料を両方の大腿四頭筋に分けて筋肉内注射する。ベクターは、生理食塩水中で配合しないか、又はLNP配合するか、又はポリマー配合するのいずれかで投与する。動物を、試験期間中、体重及びその他の全身観察項目について監視する。免疫原性試験では、動物への投与は0日目と21日目に行う。35日目に脾臓を収集し、14日目と35日目に血清を単離する。タンパク質発現試験では、動物に0日目に投与し、タンパク質発現又は生物発光を1日目、3日目、及び／又は7日目に評価する。WEEV srRNA構築物がルシフェラーゼなどのレポータータンパク質をコードする一部の試験では、指定された時点でIVIシステムを使用して、ルシフェラーゼ活性のインビボイメージングを行う。WEEV srRNA構築物が分泌タンパク質をコードする一部の試験では、全身レベルを血清ELISAでアッセイする。

30

【0186】

LNP配合物。いくつかの実験では、srRNAをマイクロ流体ミキサーを使用して脂質ナノ粒子に配合し、粒子サイズ、動的光散乱を使用する多分散性、及びカプセル化効率について分析する。これらの実験では、LNP粒子を配合する際に、広範囲のモル比の脂質が使用される。これらの実験で使用される脂質の例示的なモル比は、35% C12-200、46.5% コレステロール、2.5% PEG-2K、及び16% DOPCである。

40

【0187】

ELISpot。HA特異的T細胞応答の大きさを測定するために、製造業者の説明書に従って、マウスIFNγ ELISpot PLUSキット（HRP）（MabTech）を使用してIFNγ ELISpot分析を実施する。これらの実験では、脾臓細胞を単離し、WEEV srRNA構築物によってコードされた目的のタンパク質のT細胞エピトープを表すペプチドを含む培地で、例えば5×10⁶細胞/mLなどの適切な濃度に再懸濁する。これらの実験にはまた、例えばPMA/イオノマイシンなどの1つ又はそれ以上の陽性対照、及び模擬刺激として使用されるDMSOも含まれる。

50

【 0 1 8 8 】

抗体。総HA特異的IgGを測定するための抗体応答を、Alpha Diagnostic InternationalのELISAキットを使用して製造業者の説明書に従って測定する。本開示の特定の代替法が開示されているが、さまざまな改変及び組み合わせが可能であり、添付の請求項の真の精神及び範囲内であると考えられることを理解されたい。従って、本明細書で提示された正確な要約及び開示に限定する意図はない。

【 図 面 】

【 図 1 】

【 図 2 A - 2 B 】

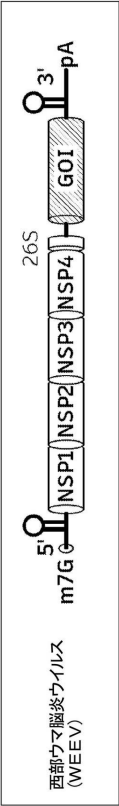


FIG. 1

Imperial株由来の改変WEEV基本ベクター及びG0Iコード化ベクター

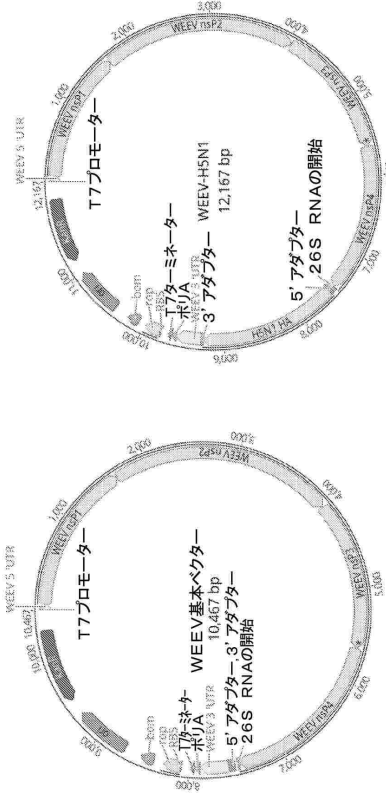


FIG. 2B

FIG. 2A

【 配 列 表 】

2025514774000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 15/86, A61K 39/00, A61P 37/04 (2023.01)

ADD. C12N 15/40, A61K 35/76, A61K 39/12 (2023.01)

CPC - INV. C12N 15/86, A61K 39/12, A61K 39/0011, A61P 37/04

ADD. C12N 2770/36111, A61K 2039/53, A61K 2039/572, A61K 2039/575, C12N 2710/10343

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)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022/009049 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 13 January 2022 (13.01.2022) abstract, para [0027], [0072], [0074], [0427], [0429], Claim 17	1-3
A	US 2021/0290756 A1 (ARCTURUS THERAPEUTICS, INC.) 23 September 2021 (23.09.2021) para [0010], [0044], [0156], [0192], Claim 1, Claim 38	1
A	US 2004/0049025 A1 (DONSON ET AL.) 11 March 2004 (11.03.2004) para [0002], [0311]-[0315]	1

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

"I" 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

15 July 2023

Date of mailing of the international search report

JUL 31 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Karl Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65898

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65898

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.: 4-58
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:

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 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.:

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.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 K 14/00 (2006.01)
 A 0 1 K 67/0275(2024.01)
 A 6 1 K 47/46 (2006.01)
 A 6 1 P 37/04 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/39 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 K 39/145 (2006.01)
 A 6 1 P 31/16 (2006.01)
 A 6 1 K 9/51 (2006.01)
 A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 C 0 7 K 14/52 (2006.01)
 C 1 2 N 15/19 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 0 7 K 16/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/44 (2006.01)
 C 0 7 K 14/11 (2006.01)

C 0 7 K 14/00
 A 0 1 K 67/0275
 A 6 1 K 47/46
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 39/39
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 39/145
 A 6 1 P 31/16
 A 6 1 K 9/51
 A 6 1 K 39/00 H
 C 0 7 K 14/52
 C 1 2 N 15/19
 C 1 2 N 15/13
 C 0 7 K 16/00
 C 1 2 N 15/44
 C 0 7 K 14/11

4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

,MC,ME,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,C
 O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
 R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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
 ,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 池田 達則

(74)代理人 100227592

弁理士 孔 詩麒

(72)発明者 ナサニエル スティーブン ワン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ソレント バレー ロード 1 1 5
 5 8, スイート 6, シー／オー リプリケイト バイオサイエンス, インコーポレイティド

(72)発明者 シゲキ ジョーセフ ミヤケーストナー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ソレント バレー ロード 1 1 5
 5 8, スイート 6, シー／オー リプリケイト バイオサイエンス, インコーポレイティド

F ターム (参考)

4B064 AG01 AG02 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA27 CA44
 4C076 AA19 AA61 AA65 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB25 BB27
 BB29 BB30 BB31 CC07 CC26 CC27 CC31 CC35 DD60 DD63 DD70
 EE23 EE57
 4C084 AA13 AA19 MA02 MA24 MA38 MA43 MA52 MA56 MA59 MA60
 MA63 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB031 ZB091 ZB092 ZB211 ZB261 ZB262
 ZB311 ZB331 ZC751
 4C085 AA03 AA38 BA55 CC05 CC31 DD62 EE01 EE03 EE06 FF21
 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08 GG10
 4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 CA20 MA02 MA38 MA43 MA52
 MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB03 ZB09 ZB21
 ZB26 ZB31 ZB33 ZC75
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 DA01 DA76 DA86 DA89 EA20

F ターム (参考)

EA20 EA50 FA74