

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6818748号
(P6818748)

(45) 発行日 令和3年1月20日 (2021.1.20)

(24) 登録日 令和3年1月5日 (2021.1.5)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/23 (2006.01)	A 6 1 K 39/23 Z N A
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00
C 1 2 N 15/866 (2006.01)	C 1 2 N 15/866 Z
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35

請求項の数 11 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-516415 (P2018-516415)	(73) 特許権者	519064665
(86) (22) 出願日	平成28年9月14日 (2016.9.14)		ベーリンガー インゲルハイム アニマル
(65) 公表番号	特表2018-529718 (P2018-529718A)		ヘルス ユーエスエイ インコーポレイ
(43) 公表日	平成30年10月11日 (2018.10.11)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/051736		アメリカ合衆国 ジョージア州 3009
(87) 国際公開番号	W02017/058521		6 ダルース サテライト ブールヴァー
(87) 国際公開日	平成29年4月6日 (2017.4.6)		ド 3239
審査請求日	令和1年6月10日 (2019.6.10)	(74) 代理人	100094569
(31) 優先権主張番号	62/234,196		弁理士 田中 伸一郎
(32) 優先日	平成27年9月29日 (2015.9.29)	(74) 代理人	100088694
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 弟子丸 健
		(74) 代理人	100103610
			弁理士 ▲吉▼田 和彦
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌパルボウイルス (CPV) ウイルス様粒子 (VLP) ワクチン及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウイルス様粒子 (VLP) 成分及び改変生ウイルス (MLV) 成分を含む組合せワクチンであって当該VLP及びMLVの両方が同じ病原体に向けられ、前記病原体がイヌパルボウイルス (CPV) であり、前記VLPはCPVのVP2から形成され、当該組合せワクチンが母獣由来抗体 (MDA) に打ち勝つ、前記組合せワクチン。

【請求項 2】

一回分用量で防御免疫を提供する、請求項1に記載の組合せワクチン。

【請求項 3】

組合せのVLP成分が全タンパク質含有量の関数として少なくとも10%のCPV VLP (w/w) を含む、請求項1に記載の組合せワクチン。

【請求項 4】

VLP成分が少なくとも20%のCPV VLP (w/w) を含む、請求項3に記載の組合せワクチン。

【請求項 5】

CPV VLPが昆虫細胞でバキュロウイルスベクターによって発現される、請求項1に記載の組合せワクチン。

【請求項 6】

CPV VLPが、配列番号:1、3、4、6、8、9又は10に示される配列を有するCPVポリペプチドを含むか、又はCPV VLPが、配列番号:1、3、4、6、8、9又は10に示される配列と少なくとも90%同一性を有するCPVポリペプチドを含む、請求項1に記載の組合せワクチン。

10

20

【請求項7】

CPV VLPが、配列番号:2、5又は7に示される配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるCPVポリペプチドを含むか、又はCPV VLPが、配列番号:2、5又は7に示される配列と少なくとも90%同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるCPVポリペプチドを含む、請求項1に記載の組成物又は組み合わせワクチン。

【請求項8】

組成物又はワクチンがアジュバント添加されず、かつ、医薬的又は獣医的に許容できる担体、賦形剤又はビヒクルを含んでいてもよい、請求項1に記載の組み合わせワクチン。

【請求項9】

非ヒト動物においてCPVに対する免疫応答を惹起する方法であって、請求項1-5のいずれか1項に記載の組成物を非ヒト動物に投与する工程を含む、前記方法。

10

【請求項10】

免疫応答が防御性であり、当該防御免疫応答が、後に続く病毒性CPVへの暴露に対してワクチン接種非ヒト動物を防御する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

ワクチン接種非ヒト動物において、前記非ヒト動物におけるCPVに対する高レベルの母獣由来抗体（MDA）の存在に関係なく防御免疫応答が惹起される、請求項10に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

（関連出願の相互引用）本出願は、参照によりその全体が本明細書に含まれるUSSN 62/234,196（2015年9月29日出願）に対し優先権を主張する。本明細書に引用する他の全ての参考文献も同様に参照によりその全体が本明細書に含まれる。

（配列表に関する記載）本出願に随伴する配列表はハードコピーに代わってテキスト形式で提供され、これによって本明細書に参照により含まれる。

（技術分野）

本発明は、ワクチン学分野、より具体的には母獣由来抗体（MDA）に打ち勝つという課題に関する。より具体的には、本発明は、ウイルス様粒子及び改変生ウイルス（MLV）の組合せを、同時組合せ、連続投与、又はプライム-ブースト投与レジメンにより動物（イヌを含む）に投与することによってMDAを圧倒することに関する。さらに具体的には、本発明は、イヌ及び仔犬にCPV MDAが存在するか否かに関係なく、イヌ及び仔犬においてパルボウイルスに対する防御免疫を惹起する組成物に関する。

30

【背景技術】

【0002】

イヌパルボウイルス（CPV）は主としてイヌ（特に若いイヌ）に感染する腸病原体である。パルボウイルス感染は、イヌ及び4から5週齢を過ぎた仔犬の急性下痢、発熱及び白血球減少症、さらに稀な事例ではより若い仔犬の心筋疾患を特徴とする。ワクチン非接種のイヌの当該疾患の死亡率は非常に高い。さらにまたいくつかのCPVワクチンが存在するが、母獣由来抗体（MDA）の存在は、本来であれば有効な防御免疫を提供するワクチンの能力を妨げる傾向がある。

40

生まれたばかりの仔犬は、疾患（例えばCPV感染）に対する受動免疫を、特に誕生後最初の2日間にその母親の授乳によって獲得する。乳を飲む仔犬は最初に生成される乳汁中の初乳を取り込み、当該初乳中の（MDA）が仔犬に渡される。イヌ（及び他の多くの哺乳動物）にとって、初乳によって提供される受動免疫のレベルは、MDAが代謝分解されるので徐々に低下する。したがって、仔犬がもはやMDAによって防御されなくなる年齢は、仔犬の初乳の摂取、初乳に含まれる抗体の量、及び他のいくつかの要因にしたがって大きく変動する。

仔犬へのワクチン接種時の具体的な課題は、母獣抗体によって提供される防御と重複し、母獣抗体が弱まるにつれて開始する防御を提供する時間枠にしたがってワクチンを投与

50

することである。これまでのところ、仔犬用ワクチンレジメンは典型的には約6週齢で開始し、その後ブースターが約3週間毎に、例えば9、12及び時に15週に提供される。しかしながら、このレジメンが完全な防御を提供するためには、最初のワクチン用量が直ちに防御免疫応答を引き出さねばならない。部分的には、仔犬の免疫系が未成熟であること及び免疫応答を立ち上げるために期間が必要であるため、この期待は完全に非現実的である。さらにまた、この状況は、残留MDA（約6週齢まで持続する）がMLVワクチンを中和するのでさらに複雑である。これまでのところ、市場で利用可能な全てのCPVワクチンがMLVワクチンである。

【0003】

重要なことに、CPV MDAを有する仔犬はいずれのMLV CPVワクチンにも応答しないことがあるが、それらの仔犬はなおCPVの病毒性野外株に感染しイヌパルボウイルス症を発症することがある。MDAの干渉があるので、ワクチン免疫の全過程が提供されるまで完全な防御は通常達成されない。結果として、CPV感染による年齢別死亡率はワクチン接種プロトコルの完了前にピークを迎える。したがって、最初の注射後に（かつMDAの存在下で）仔犬を能動的に免疫するワクチンを開発することは、イヌ医学ではこれまでにない最も重要な要請の1つである。

獣医医学におけるもう1つの課題は癌（例えばイヌの癌）の治療である。癌療法、特に老犬のための既存のツールには多くの制限が存在する。癌細胞を殺滅する腫瘍溶解性パルボウイルスの投与は、効果的な癌治療として極めて有望であることが示されている（Rommelaere et al, Cytokine & Growth Factor Reviews 21:185-195, 2010；及び；and U.S. Patent No. 7,179,456 (Rommelaere et al)（前記文献の完全な内容は参照により本明細書に含まれる））。しかしながら、パルボウイルスは既存の抗体によって中和されるであろうから、パルボウイルスに対する既存の抗体が存在することは（例えばワクチン接種の結果として）この方法を無効にするであろう。加えてイヌの遺伝子療法は現時点ではほとんど実施されていないが、ただし適切な核酸ベクターが認定されればいくつかの疾患の治療に有望な方法となろう。したがって、既存抗体に打ち勝つ方法はワクチンを超えた適用に有用であろう。

上記の観点から、安全性が改善されかつ良好な有効性（MDAに打ち勝つ能力を含む）を有するワクチン（異種CPV株に対して防御を提供するワクチンを含む）が希求される。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、CPVウイルス様粒子（VLP）抗原を含む医薬組成物、CPV改変生ウイルス（MLV）ワクチン、CPVに対してワクチン免疫する方法、及びそのような方法及び組成物とともに用いられるキットを提供する。

抗原性CPVポリペプチド並びにそのフラグメント及び変種を含む組成物又はワクチンが提供される。当該CPV抗原並びにそのフラグメント及び変種は免疫原性及び防御性特性を保有する。CPV抗原は昆虫細胞でバキュロウイルス発現ベクターによって生成され、CPV空キャプシド又はCPV VLP（ウイルス様粒子）に組み立てられ得る。

抗原性ポリペプチド並びにそのフラグメント及び変種は、CPV改変生ウイルス含有又は非含有ワクチン及び/又は医薬組成物に処方され得る。そのようなワクチン又は組成物を用いて、動物をワクチン免疫して同種及び異種CPV株に対する防御を提供することができる。

重要なことには、本発明者らは、驚くべきことにかつ予期に反して、MLV及びVLPの両方（各々は同じ病原体に対応する抗原であるが、必ずしも遺伝子又はそのサブユニットの同じ部分をコード又は提供する必要は無い）を含む組成物の投与は、MDAを圧倒してその後の前記病原体による病毒性チャレンジに対する防御免疫を誘発し得ることを見出した。したがって、具体的な実施態様では、本発明はMLV CPV及びCPV VLPの両方を含む組合せワクチンを提供し、前記ワクチンは、CPVに対する循環MDAを有するか否かに関係なく仔犬で防御免疫を引き出す。

別の実施態様では、本発明は、MDA干渉の懸念が存在する場合において、他の病原体に

対応するMLV及びVLPの両方を含む組合せワクチンを提供する。例えば、若いウシ類、ブタ類、ネコ類、ヤギ類、ヒツジ類、ウマ類及びその他の動物は多様な病原体に対する循環MDAを有する。それぞれの事例で、これらMDAの存在はワクチンの有効性に干渉することがある。本開示が明らかにされたところで、本発明者らは、MLV+VLPの両方の組合せを投与すれば病原体に無関係にMDAを圧倒するであろうと考える。病原体には、口蹄疫ウイルス（FMDV）、ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）、イヌジステンパーウイルス（CDV）、ネコ汎白血球減少症（FPL）、及びウマインフルエンザウイルス（EIV）が含まれ得るが、ただしこれらに限定されない。このアプローチ（MLV+VLPの提供）はMDAによる干渉が問題となるいずれの事例にも適用できることは当業者には理解されよう。

少なくとも1つの抗原性ポリペプチド又はそのフラグメント若しくは変種及び使用のための指示を含むキットもまた提供される。

10

【0005】

以下の詳細な説明は、本添付図面と一緒にすればもっとも容易に理解することができる（前記詳細な説明は、例示として提供されるが記載した個々の実施態様にのみ本発明を限定する意図はない）。当該図面は下記の通りである。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】DNA及びタンパク質配列を概略する表を示す。

【図2】pMEB072のプラスミドマップを示す。

【図3】pMEB073のプラスミドマップを示す。

20

【図4】パルボウイルス様ビリオンの正確な形状及び形態学を示すCPV VLPの電子顕微鏡写真である。

【図5】CPV VLPのレベルを示すウェスタンブロット及び添付データである。

【図6】CPV VLPのレベルを示すウェスタンブロット及び添付データである。

【図7】ELISAによって決定したワクチン接種後のCPV力価を示すグラフである。

【図8】Souriou及びBari株（低用量、アジュバント無し）又はpMEB072-生成CPV VLPによるワクチン接種後のELISA決定CPV力価を示すグラフである。開始はVLP投与グループでより迅速である。

【図9】Souriou及びBari株（中等度用量、アジュバント有り）又はpMEB073-生成CPV VLP（Al(OH)₃+サポニン添加）によるワクチン接種後のELISA決定CPV力価を示すグラフである。開始はやはりVLP投与グループでより迅速である。

30

【図10】Souriou及びBari株（高用量）又はpMEB073-生成CPV VLP（Al(OH)₃+サポニン添加）によるワクチン接種後のELISA決定CPV力価を示すグラフである。開始は3つのグループ全てで迅速である。

【図11】配列番号:1、3、4及び6のClustalWアラインメントである。

【図12】処置（D0でMLV又はMLV+VLP）及び日にしたがって個々の抗CPV抗体力価（IHA）を示すグラフである。各線は1匹の個体に対応し、点のサイズは表示した日及び力価を組合せた数値に対応する。D0のIHA力価が40以上のイヌのデータのみが示されている。

【図13】処置（D0でMLV又はMLV+VLP）及び日にしたがって抗CPV抗体力価の算術平均を示すグラフである。箱は中央値、25番目及び75番目パーセンタイルを示し、ヒゲの末端は四分位間範囲の1.5倍内の値を表す。各記号は1つの値を表す。

40

【図14】ワクチン接種後の日及びグループ（Gr A：VLP SC 500 µL、Gr D：VLP経口、Gr E：Ad5 CPV 8.64 log₁₀、Gr G：Ad5 CDV）にしたがって抗CPV抗体力価（ELISA log₁₀ OD 50によって決定）の算術平均を示すグラフである。イヌはD0及びD28にワクチン接種された。算術平均は、当該算術平均の±1標準誤差と表される。各点は1つの値を表す。

【図15】実施例7で開示した試験についてパーセント応答動物を示すグラフである。

【図16】HAI力価を示すグラフである。

【図17】CPV中和抗体の幾何平均力価を示すグラフである。

【図18】グループ及び日によるパーセンテージ応答動物を示すグラフである。

【図19】グループ及び日による幾何平均CPV抗体力価を示すグラフである。

50

【発明を実施するための形態】

【0007】

詳細な説明

動物で免疫原性応答を引き出すCPVポリペプチド、抗原、そのフラグメント及び変種を含む組成物が提供される。当該抗原性ポリペプチド又はそのフラグメント若しくは変種は、昆虫細胞でバキュロウイルス発現ベクターによって生成される。抗原性ポリペプチド又はそのフラグメント若しくは変種は、CPV改変生ウイルス含有若しくは非含有ワクチン又は医薬組成物に処方され、動物で防御応答を引き出し又は刺激するために用いられる。ある実施態様では、ポリペプチド抗原はCPVキャプシドポリペプチド又はその活性なフラグメント若しくは変種である。CPV抗原は、CPV空キャプシド又はCPV VLP（ウイルス様粒子）に組み立てることができる。

10

本発明の抗原性ポリペプチドは完全長ポリペプチドでも又はその活性なフラグメント若しくは変種でもよいことは理解される。“活性なフラグメント”又は“活性な変種”とは、当該フラグメント又は変種が当該ポリペプチドの抗原性の性質を保持することが意図される。したがって、本発明は、動物で免疫原性応答を引き出すいずれのCPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原も包含する。当該CPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原は、任意のCPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原、例えば、動物（例えばヒツジ、ウシ、ヤギ又はブタ）で応答を引き出し、誘導し又は刺激するタンパク質、ペプチド又はそのフラグメント若しくは変種である（ただしこれらに限定されない）。

本発明は、有効量の組換えCPV抗原を含むことができるイヌワクチン又は組成物に関する。いくつかの実施態様では、ワクチン又は組成物はアジュバント非添加であり、医薬的又は獣医的に許容できる担体、賦形剤又はビヒクルを含むことができる。

20

いくつかの実施態様では、動物の応答は防御免疫応答である。

【0008】

“動物”とは哺乳動物、鳥類などを意図する。動物又は宿主には哺乳動物及び人間が含まれる。動物は、ウマ類（例えばウマ）、イヌ類（例えばイヌ、オオカミ、キツネ、コヨーテ、ジャッカル）、ネコ類（例えばライオン、トラ、イエネコ、野生ネコ、他の大型のネコ、及び他のネコ類（チーター及びオオヤマネコを含む））、ヒツジ類（例えばヒツジ）、ウシ類（例えば畜牛）、ブタ類（例えばブタ）、ヤギ類（例えばヤギ）、トリ類（例えばニワトリ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、ウズラ、キジ、オウム、フィンチ、タカ、カラス、ダチョウ、エミュ及びヒクイドリ）、霊長類動物（例えば原猿、メガネザル、サル、テナガザル、類人猿）、及び魚類から成る群から選択され得る。“動物”という用語はまた、全ての発育段階（胚期及び胎児期を含む）の個々の動物を含む。

30

特段の説明がなければ、本明細書で用いられる全ての技術用語及び学術用語は、本開示が属する業界の業者の一人が通常理解する意味と同じ意味を有する。単数用語“a”、“an”及び“the”は、文脈が明瞭にそうでないことを示さないかぎり複数の対応語を含む。同様に、“or”という語は、文脈が明らかにそうでないことを示さないかぎり“and”を含むことが意図される。

本開示で、特に特許請求の範囲及び/又は項目で、例えば“comprises（含む）”、“comprised”、“comprising”などの用語は、米国特許法で当該用語に割り当てられた意味を有することができ、例えばそれらは、“includes（含む）”、“included”、“including”などを意味することができ、さらに例えば“consisting essentially of（本質的に～から成る）”及び“consists essentially of”という用語は、米国特許法で当該用語に割り当てられた意味を有することができ、例えばそれらは、明確に記載されていない構成成分を許容するが、従来技術で見出されるか、又は当該発明の基本的或いは新規な特徴に影響する構成成分を排除する。

40

【0009】

本発明の抗原性ポリペプチドはCPVに対して防御する能力を有する。すなわち、それらは動物で免疫応答を刺激することができる。“抗原”又は“免疫原”とは、宿主動物で特異的な免疫応答を誘導する物質を意味する。抗原は、生物体全体（死滅、弱毒化又は生）

50

；生物体のサブユニット又は部分；免疫原性特性を有する挿入物を含む組換えベクター；宿主動物に提示されたとき免疫応答を誘導できるDNA断片又はフラグメント；ポリペプチド、エピトープ、ハプテン、又は前記の任意の組合せを含むことができる。

本明細書で用いられる“免疫原性タンパク質、ポリペプチド、又はペプチド”という用語には、宿主に投与されると、当該タンパク質に対抗する液性及び/又は細胞性タイプの免疫応答を誘発することができるという意味で免疫学的に活性なポリペプチドが含まれる。好ましくは、タンパク質フラグメントは、全タンパク質と実質的に同じ免疫学的活性を有するものである。したがって、本発明のタンパク質フラグメントは、少なくとも1つのエピトープ又は抗原性決定基を含むか、又は本質的に前記から成るか、又は前記から成る。本明細書で用いられる“免疫原性”タンパク質又はポリペプチドには、当該タンパク質の完全長配列、そのアナログ、又はその免疫原性フラグメントが含まれる。“免疫原性フラグメント”とは、1つ以上のエピトープを含み、したがって上記に記載する免疫学的応答を引き出すタンパク質フラグメントを意味する。そのようなフラグメントは、当業界で周知の多数のエピトープマッピング技術を用いて認定され得る。例えば以下を参照されたい：Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol.66, Glenn E.Morris, Ed., 1996。例えば、線形エピトープは、例えば多数のエピトープ（当該エピトープは当該タンパク質分子の複数の部分に対応するペプチドである）を固相上で同時合成し、さらに当該ペプチドが支持相になお固着している間に当該ペプチドを抗体と反応させることによって決定できる。そのような技術は当業界で公知であり、例えば以下に記載されている：U.S.Pat.No.4,708,871；Geysen et al., 1984；Geysen et al., 1986。同様に、立体構造エピトープは、アミノ酸の空間的配置を例えばx-線結晶学及び二次元核磁気共鳴によって決定することにより容易に認定される。例えば上掲書（Epitope Mapping Protocols）を参照されたい。特にT. パルバ（T.parva）のタンパク質に応用できる方法はPCT/US2004/022605に完全に記載されている（参照によりその全体が本明細書に含まれる）。

【0010】

考察したように、本発明は抗原性ポリペプチドの活性なフラグメント及び変種を包含する。したがって、“免疫原性タンパク質、ポリペプチド、又はペプチド”という用語はさらに当該配列に対する欠失、付加及び置換を意図するが、ただし当該ポリペプチドが本明細書に定義する免疫学的応答を生じることを条件とする。“保存的変更”は、あるアミノ酸残基の生物学的に類似する別のアミノ酸残基による入替え、又は、コードされるアミノ酸残基は変化しないか又は生物学的に類似する別の残基であるような核酸配列中の入替えを指す。これに関して、特に好ましい置換は一般に保存的であり、すなわち1つのアミノ酸ファミリー内で生じる置換であろう。例えば、アミノ酸は一般的に以下の4つのファミリーに分割される：（1）酸性－アスパラギン酸及びグルタミン酸；（2）塩基性－リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性－アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び（4）非荷電極性－グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンは時には芳香族アミノ酸として分類される。保存的変更の例には以下が含まれる：1つの疎水性残基（例えばイソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニン）による別の疎水性残基の置換、又は1つの極性残基による別の極性残基の置換（例えばアルギニンによるリジンの置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸の置換、又はグルタミンによるアスパラギンの置換など）、又はあるアミノ酸の構造的に関連するアミノ酸による（生物学的活性に大きな影響を与えないであろう）保存的入替え。参照配列と実質的に同じアミノ酸配列を有するタンパク質であって、当該タンパク質の免疫原性に実質的に影響しない小さなアミノ酸置換を保有するタンパク質は、したがって当該参照ポリペプチドの定義に入る。これらの改変によって生じるポリペプチドは全て前記の中に含まれる。“保存的変更”という用語はまた、非置換親アミノ酸の代わりに置換アミノ酸の使用を含むが、ただし置換ポリペプチドに対して生じた抗体が非置換ポリペプチドと免疫反応することを条件とする。

【0011】

“エピトープ”という用語は、特異的B細胞及び/又はT細胞が応答する抗原又はハプテン上の部位を指す。この用語はまた、“抗原性決定基”又は“抗原性決定部位”と互換的に用いられる。同じエピトープを認識する抗体は、1つの抗体の別の抗体と標的抗原との結合を阻止する能力を示す簡単な免疫アッセイで認定できる。

ある組成物又はワクチンに対する“免疫学的応答”は、当該宿主における問題の組成物又はワクチンに対する細胞性及び/又は抗体媒介性免疫応答の発生である。通常、“免疫学的応答”には以下の効果の1つ以上が含まれる（ただしこれらに限定されない）：問題の組成物又はワクチンに含まれる1つの抗原又は複数の抗原に特異的に向かう抗体、B細胞、ヘルパーT細胞及び/又は細胞傷害性T細胞の産生。好ましくは、宿主は治療性又は防御性免疫学的応答のどちらかを示し、したがって新規な感染に対する抵抗性が強化されるか、及び/又は当該疾患の臨床的重篤性が軽減されるであろう。そのような防御は、感染宿主によって通常示される徴候の軽減又は欠如、より迅速な回復時間、及び/又は感染宿主におけるウイルス力価の低下によって示されるであろう。

合成抗原、例えばポリエピトープ、フランキングエピトープ、及び他の組換え体又は合成により誘導される抗原もまた本定義に含まれる。例えば以下を参照されたい：Bergmann et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Suhrbier, 1997; Gardner et al., 1998。本発明の目的のためには、免疫原性フラグメントは、通常、当該分子の少なくとも約3アミノ酸、少なくとも約5アミノ酸、少なくとも約10-15アミノ酸、又は約15-25アミノ酸又はそれより大きいアミノ酸（ほぼ完全長のタンパク質配列又は当該タンパク質の少なくとも1つのエピトープを含む融合タンパク質さえも含むことがある）を含むであろう。

したがって、エピトープを発現するポリヌクレオチドの最小限の構造は、それが、CPVポリペプチドの1つのエピトープ又は抗原性決定基をコードするヌクレオチドを含むか、本質的に前記ヌクレオチドから成るか又は前記ヌクレオチドから成るといものである。CPVポリペプチドのフラグメントをコードするポリヌクレオチドは、当該ポリペプチドをコードする配列の連続する又は隣接する、最小限15ヌクレオチド、約30-45ヌクレオチド、約45-75、又は少なくとも57、87、又は150ヌクレオチドを含むか、本質的に前記ヌクレオチドから成るか又は前記ヌクレオチドから成り得る。エピトープ決定手順、例えばオーバーラップペプチドライブラリーの作製（Hemmer et al., 1998）、ペップスキャン（Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1985; Van der Zee R. et al., 1989; Geysen, 1990; Multipin.RTM. Peptide Synthesis Kits de Chiron）及びアルゴリズム（De Groot et al., 1999; PCT/US2004/022605）を本発明の実施で用いることができる。

【0012】

“核酸”及び“ポリヌクレオチド”という用語は、線状若しくは分枝鎖、一本若しくは二本鎖、又は前記のハイブリッドであるRNA又はDNAを指す。この用語はまたRNA/DNAハイブリッドを包含する。以下はポリヌクレオチドの非限定例である：遺伝子又は遺伝子フラグメント、エクソン、イントロン、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ及びプライマー。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド（例えばメチル化ヌクレオチド及びヌクレオチドアナログ）、ウラシル、他の糖類及び連結基（例えばフルオロリボース及びチオレート）、及びヌクレオチド分枝を含むことができる。ヌクレオチドの配列は重合化後に例えば標識成分による連結によってさらに改変できる。本定義に含まれる他のタイプの改変は、キャップ、天然に存在する1つ以上のヌクレオチドのアナログによる置換、及びタンパク質、金属イオン、標識成分、他のポリヌクレオチド又は固体支持体にヌクレオチドを付着させるための手段の導入である。ポリヌクレオチドは化学合成によって入手するか、又は微生物から誘導することができる。

“遺伝子”という用語は、生物学的機能と密接に結びついたポリヌクレオチドの任意のセグメントを指すために広く用いられる。したがって、遺伝子は、ゲノム配列中にイントロン及びエクソンを含むか、又はcDNAのように単にコード配列を含むか、それら遺伝子の発現に必要な調節配列を含む。例えば、遺伝子はまた、mRNA若しくは機能性RNAを発現するか、又は具体的なタンパク質をコードする核酸フラグメント（調節配列を含む）を指す

。

本発明はさらに、CPV抗原、エピトープ又は免疫原をコードするポリヌクレオチドの相補鎖を含む。相補鎖は、任意の長さのポリマーであり、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及びアナログを任意の組合せで含むことができる。

【0013】

“タンパク質”、“ペプチド”、“ポリペプチド”及び“ポリペプチドフラグメント”という用語は本明細書では互換的に用いられ、任意の長さのアミノ酸残基ポリマーを指す。当該ポリマーは直鎖状でも分枝していてもよく、改変アミノ酸又はアミノ酸アナログを含むことができ、さらにアミノ酸以外の化学的部分によって中断されていてもよい。当該用語はまた、天然に又は介入によって改変されてあるアミノ酸ポリマーを包含する。前記改変は、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、又は任意の他の操作若しくは改変（例えば標識又は生物活性成分との連結）である。

“単離された”生物学的構成要素（例えば核酸又はタンパク質又は細胞小器官）は、当該成分が天然に存在する生物の細胞内の他の生物学的構成要素（例えば他の染色体及び染色体外DNA及びRNA、タンパク質及び細胞小器官）から実質的に分離されているか又は精製されている構成要素を指す。“単離された”核酸及びタンパク質には標準的精製方法によって精製された核酸及びタンパク質が含まれる。この用語はまた、組換え技術とともに化学合成によって調製された核酸及びタンパク質を包含する。

本明細書で用いられる“精製された”という用語は完全な精製を要求せず、相対的用語として意図される。したがって、例えば、精製されたポリペプチド調製物は、当該ポリペプチドがその天然の環境にある場合よりも濃縮されているものである。それは、当該ポリペプチドが細胞成分から分離されているということである。“実質的に精製された”とは、当該ポリペプチドが、細胞成分又は物質の少なくとも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98%以上が取り除かれたいくつかの様相を表すことを意図する。同様に、当該ポリペプチドは部分的に精製されることがある。“部分的に精製される”とは、細胞成分又は物質の60%未満が除去されることを意図する。同じことがポリヌクレオチドに適用される。本明細書に開示するポリペプチドは当業界で公知の手段のいずれかによって精製できる。

【0014】

上記に特筆したように、抗原性ポリペプチド又はそのフラグメント若しくは変種は、昆虫細胞でバキュロウイルス発現ベクターによって生成されるCPV抗原性ポリペプチドである。開示のポリヌクレオチドのフラグメント及び変種並びにそれによってコードされるポリペプチドもまた本発明に包含される。“フラグメント”とは、ポリヌクレオチドの一部又はポリヌクレオチドによってコードされる抗原性アミノ酸配列の一部を意図する。ポリヌクレオチドのフラグメントは、ネイティヴなタンパク質の生物学的活性を保持し、したがって本明細書の別の箇所で特筆した免疫原性活性を有するタンパク質フラグメントをコードすることができる。当該ポリペプチド配列のフラグメントは動物において防御免疫応答を誘導する能力を保持する。

“変種”は実質的に類似する配列を意味することが意図される。ポリヌクレオチドについては、変種は、ネイティヴなポリヌクレオチド内の1つ以上の部位の1つ以上のヌクレオチドの欠失及び/又は付加、及び/又はネイティヴなポリヌクレオチドの1つ以上の部位の1つ以上のヌクレオチドの置換を含む。本明細書で用いられるように、“ネイティヴな”ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、天然に存在するヌクレオチド配列又はアミノ酸配列をそれぞれ含む。本発明の個々のポリヌクレオチド（すなわち参照ポリヌクレオチド）の変種はまた、変種ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドとの間のパーセント配列同一性の比較によって評価され得る。“変種”タンパク質は、ネイティヴなタンパク質の1つ以上の部位の1つ以上のアミノ酸の欠失及び/又は付加、及び/又はネイティヴなタンパク質の1つ以上の部位の1つ以上のヌクレオチドの置換によってネイティヴなタンパク質から誘導されるタンパク質を意味することが意図される。本発明に包含される変種タンパク質は生物学的に活性

であり、それは、それら変種タンパク質が免疫応答を引き出す能力を有するということである。

【0015】

ある特徴では、本発明はCPV単離株由来のCPVポリペプチドを提供する。別の特徴では、本発明は、配列番号:1、3、4、6、8-10に示される配列を有するポリペプチド及びその変種又はフラグメントを提供する。

別の特徴では、本発明は、CPV空キャプシド又はCPV VLP（ウイルス様粒子）に関する。当該キャプシドはCPV VP2ポリペプチド又は変種（その末端切断短縮型変型を含む）を含むか、本質的にそれらから成るか又はそれらから成り得る。

さらにまた、CPVポリペプチドのホモログは本発明の範囲内であることが意図される。本明細書で用いられるように、“ホモログ”という用語はオーソログ、アナログ及びパラログを含む。“アナログ”という用語は、同じ又は類似機能を有するが無関係の生物で別々に進化した2つのポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。“オーソログ”という用語は、異なる種に由来するが種分化によって共通の祖先遺伝子から進化した2つのポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。オーソログは通常同じ又は類似機能を有するポリペプチドをコードする。“パラログ”という用語は、ゲノム内重複によって関係する2つのポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。パラログは通常異なる機能を有するが、これらの機能は関連することがある。野生型CPVポリペプチドのアナログ、オーソログ、及びパラログは、翻訳後修飾によって、アミノ酸配列相違によって又はその両方によって野生型CPVポリペプチドと異なり得る。特に、本発明のホモログは一般的に、野生型CPVポリヌクレオチド配列の全部又は部分に関して少なくとも80-85%、85-90%、90-95%、又は95%、96%、97%、98%、99%配列同一性を示し、さらに類似の機能を示すであろう。変種には対立遺伝子変種が含まれる。“対立遺伝子変種”という用語は、タンパク質のアミノ酸配列の変化をもたらす、天然の集団（例えばウイルスの種又は系統）内に存在する多型を含むポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。そのような天然の対立遺伝子変動は、典型的にはポリヌクレオチド又はポリペプチドで1-5%の多様性をもたらす。対立遺伝子変種は、多数の異なる種で問題の核酸配列の配列決定によって認定することができ、それらの種で同じ遺伝子の遺伝子座を認定するハイブリダイゼーションプローブを用いることによって容易に実行できる。天然の対立遺伝子変動の結果でありかつ問題の遺伝子の機能的活性を変化させない、いずれかの及び全てのそのような核酸変動並びにその結果のアミノ酸多形又は変動は、本発明の範囲内であることが意図される。

【0016】

本明細書において、“誘導体”又は“変種”という用語はポリペプチド又はポリペプチドをコードする核酸を指し、以下のように1つ以上の保存的なアミノ酸変動又は他の小さな改変を有する：（1）対応するポリペプチドは、野生型ポリペプチドと比較したとき実質的に同等な機能を有するか、又は（2）当該ポリペプチドに対して生じる抗体は野生型ポリペプチドと免疫反応性である。これらの変種又は誘導体には、CPVポリペプチドの一次アミノ酸配列に小さな改変を有するポリペプチドが含まれ、前記改変は、対応する未改変ポリペプチドと比較したとき実質的に同等な活性を有するポリペプチドを生じ得る。そのような改変は、部位特異的変異導入のように意図的であることも又は偶発的であることもある。“変種”という用語はさらに当該配列に対する欠失、付加及び置換を意図するが、ただし当該ポリペプチドが本明細書に定義する免疫学的応答を生じる場合に限られる。

“保存的変動”という用語は、あるアミノ酸残基の別の生物学的に類似する残基による入替え、又はある核酸配列におけるヌクレオチドの入替え（コードされるアミノ酸残基は変化しないか又は別の生物学的に類似する残基である）を指す。これに関して、特に好ましい置換は、上記に記載したように概して本質的に保存的である。

開示のポリヌクレオチドは、特定の宿主のための遺伝暗号、例えば最適化コドン使用頻度の結果として縮重配列を含む。本明細書で用いられるように、“最適化”は、与えられた種でその発現を高めるために遺伝的に操作されたポリヌクレオチドを指す。CPVポリペ

10

20

30

40

50

プチドをコードする最適化ポリヌクレオチドを提供するために、CPVタンパク質の遺伝子のDNA配列は、1) 個々の種で高度に発現される遺伝子が好むコドンを含むように、2) 前記の種で実質的に見いだされるA+T又はG+C含量をヌクレオチド塩基組成に含むように、3) 前記の種の開始配列を形成するように、4) 不安定化、不適切なポリアデニル化、RNAの分解及び終了を引き起こす配列、又は二次構造ヘアピン又はRNAスプライス部位を形成する配列を排除するように改変できる。前記の種におけるCPVタンパク質の発現増加は、真核細胞及び原核細胞又は個々の種におけるコドン使用の分布頻度を利用することによって達成できる。“好ましいコドン使用頻度”という用語は、あるアミノ酸を指定するためにヌクレオチドコドンの使用で特定の宿主細胞によって示される優先性を指す。20の天然のアミノ酸が存在し、その大半が2つ以上のコドンによって指定される。したがって、当該ヌクレオチド配列によってコードされるCPVポリペプチドのアミノ酸配列が機能的変化を生じないかぎり、全ての縮重ヌクレオチド配列が本開示に含まれる。

10

【0017】

2つのアミノ酸配列間の配列同一性は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) ペアワイズblast及びblosum62で標準的パラメータを用いて確立することができる(例えばNCBI ("National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, Md., USA)) のサーバーで利用できるBLAST又はBLASTXアルゴリズムとともにAltschulらの論文(したがって、この文献はBLAST又はBLASTXのアルゴリズム及びBLOSUM62マトリックスを“blast”の関係によって用いることについて述べている)を参照されたい)。

配列に関して“同一性”は、2つの配列の短い方の配列のヌクレオチド数又はアミノ酸数で割った同一ヌクレオチド又はアミノ酸を有する位置の数ということができ、この場合、2つの配列のアラインメントは、WilburとLipmanのアルゴリズム (Wilbur and Lipman) にしたがって20ヌクレオチドのウィンドウサイズ、4ヌクレオチドのワード長、及び4のギャップペナルティを用いて決定できる。さらにコンピュータを利用するアラインメントを含む分析及び配列データ解釈は、市販プログラム(例えばIntelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc.CA)を用いて都合よく実施することができる。RNA配列がDNA配列と類似する、又はある程度の配列同一性若しくは相同性を有するときは、DNA配列中のチミジン (T) はRNA配列中のウラシル (U) と等しいとみなされる。したがって、RNA配列は本発明の範囲内であり、RNA配列は、DNA配列のチミジン (T) をRNA配列のウラシル (U) と等しいとみなすことによってDNA配列から誘導することができる。

20

30

2つのアミノ酸配列の配列同一性又は配列類似性、或いは2つのヌクレオチド配列間の配列同一性は、ベクターNTIソフトウェアパッケージ (Vector NTI software package (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA)) を用いて決定できる。

下記文献は配列の相対的同一性又は相同性の比較のためのアルゴリズムを提供し、さらに、上記記載に加えて或いは上記記載とは別に、それら参考文献の教示を用いてパーセント相同性又は同一性を決定することができる: Needleman SB and Wunsch CD; Smith TF and Waterman MS; Smith TF, Waterman MS and Sadler JR; Feng DF and Dolittle RF; Higgins DG and Sharp PM; Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ; 及びDevereux J, Haeblerli P and Smithies O. さらに、必要以上の試験を行うことなく、当業者は、パーセント相同性の決定のために多くの他のプログラム又は参考文献から助言を得ることができる。

40

【0018】

ハイブリダイゼーション反応は、種々の“ストリンジェンシー”の条件下で実施できる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーを増加させる条件は周知である(例えば以下を参照されたい: “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition, Sambrook et al., 1989)。

本発明はさらに、ベクター分子又は発現ベクターに含まれ、かつプロモータエレメント、場合によってエンハンサーに連結されたCPVポリヌクレオチドを包含する。

“ベクター”は、標的細胞にin vitro又はin vivoでデリバリーされるべき異種ポリヌクレオチドを含む組換えDNA若しくはRNAプラスミド又はウイルスを指す。異種ポリヌクレ

50

オチドは予防又は治療のために関心のある配列を含むことができ、場合によって発現カセットの形態で存在し得る。本明細書で用いられるように、ベクターは最終標的細胞又は対象で複製能力を有することを必要としない。前記用語にはクローニングベクター及びウイルスベクターが含まれる。

“組換え体”という用語は、天然に存在しないか、又は天然には見出されない編成で別のポリヌクレオチドに連結されている半合成又は合成起源のポリヌクレオチドを意味する。

“異種の”は、比較されている実体の残りの部分と遺伝学的に別個の実体に由来することを意味する。例えば、あるポリヌクレオチドは遺伝子操作技術によって異なる供給源に由来するプラスミド又はベクター中に配置でき、当該ポリヌクレオチドは異種ポリヌクレオチドである。そのネイティヴなコード配列から取り出され、当該ネイティヴな配列以外のコード配列に連結されたプロモータは異種プロモータである。

【0019】

本発明は、ヒツジ類、ウシ類、ヤギ類及びブタ類のワクチン又は医薬若しくは免疫学的組成物に関し、前記ワクチン又は医薬若しくは免疫学的組成物は有効量の組換えCPV抗原及び医薬的又は獣医的に許容できる担体、アジュバント、賦形剤又はビヒクルを含むことができる。

本明細書に記載する内容は、部分的には、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系で調製されるCPV抗原に関連する組成物及び方法に向けられる。前記抗原は高度に免疫原性であり、同種及び異種CPV株によるチャレンジに対して動物を防御した。

本発明はCPVワクチン又は組成物に関し、前記CPVワクチン又は組成物は有効量の組換えCPV抗原及び医薬的又は獣医的に許容できる担体、賦形剤又はビヒクルを含むことができる。ある実施態様では、CPV抗原はバキュロウイルス発現ベクターによって昆虫細胞で発現される。

本発明のある実施態様は、CPV空キャプシド又はCPV VLP（ウイルス様粒子）を含むワクチン又は組成物に関する。CPV空キャプシド又はCPV VLP（ウイルス様粒子）は、CPVキャプシドタンパク質の発現によって入手される。

本発明はまた、これらワクチンを調製するプロセス、これらワクチンを生成するための抗原の使用、及びそれらを使用してワクチン免疫する方法に関する。

本発明はまたヌクレオチド配列、特にcDNA及びアミノ酸配列に関し、前記配列は天然のウイルスの配列と比較して改変されている。本発明はまた、当該改変されたヌクレオチド配列の発現生成物、並びにこれら改変を取り込んでいるCPV抗原及びウイルスに関する。

本発明は、動物（例えばヒツジ類、ウシ類、ヤギ類又はブタ類）で免疫学的応答を引き出す任意のCPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原を包含する。CPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原は、任意のCPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原、例えば、動物（例えばイヌ類）で応答を引き出し、誘導し又は刺激するタンパク質、ペプチド又はそのフラグメント（ただしこれらに限定されない）であり得る。

【0020】

CPV免疫学的組成物又はワクチンが組換え免疫学的組成物又はワクチンである実施態様では、組換えベクターを含む当該組成物又はワクチンはアジュバント非添加であり、場合によって医薬的又は獣医的に許容できる賦形剤、担体又はビヒクルを含むことができ、当該組換えベクターは、バキュロウイルス発現ベクターであり、これらのベクターは、CPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。CPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原はキャプシドタンパク質又はその任意のフラグメントであり得る。

ある実施態様では、1つ以上のCPV抗原をコードする核酸分子はCPVキャプシドタンパク質をコードするcDNAである。別の実施態様では、1つ以上のCPV抗原をコードする核酸分子はCPVキャプシドタンパク質のフラグメントをコードするcDNAである。

別の実施態様では、CPV抗原はCPV 100869-1株から誘導され得る。

本発明は、有効量の組換えCPV抗原を含むことができるCPV組成物又はワクチンに関する

。当該CPV組成物又はワクチンはアジュバントを含まない。当該CPV組成物又はワクチンは、場合によって医薬的又は獣医的に許容できる担体、賦形剤又はビヒクルを含むことができる。

本発明はさらに、ベクター分子又は発現ベクターに含有され、場合によってプロモータエレメント及び場合によってエンハンサーに作動できるように連結されたCPVポリヌクレオチドを包含する。

ある特徴では、本発明は、配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列を有するCPVポリペプチド及びその変種又はフラグメントを提供する。

別の特徴では、本発明は、本発明の抗原性ポリペプチド、特に配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列を有するポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%配列同一性を有するポリペプチドを提供する。

10

【0021】

さらに別の特徴では、本発明は、上記で認定したCPVポリペプチド（配列番号:1、3、4、6又は8-10）のフラグメント及び変種を提供し、当業者は、周知の分子生物学技術を用いて前記を容易に調製できる。

変種は、配列番号:1、3、4、6又は8-10に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%同一性のアミノ酸配列を有する相同なポリペプチドである。

CPVポリペプチドの免疫原性フラグメントは、配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列を有するCPVポリペプチド、又はその変種の連続する少なくとも8、10、15、又は20アミノ酸、少なくとも21アミノ酸、少なくとも23アミノ酸、少なくとも25アミノ酸、又は少なくとも30アミノ酸を含む。別の実施態様では、CPVポリペプチドのフラグメントは、完全長CPVポリペプチドで見出される特異的な抗原性エピトープを含む。しかしながら、CPV VLPの形成を可能にするためにはCPVポリペプチドの十分な部分が存在せねばならないことは当業者には理解されるであろう。

20

別の特徴では、本発明は、CPVポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。さらに別の特徴では、本発明は、配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列を有するポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%配列同一性を有するポリペプチド、或いは保存的変種、対立遺伝子変種、ホモログ、又はこれらポリペプチドの1つの連続する少なくとも8アミノ酸若しくは10アミノ酸を含む免疫原性フラグメント、又はこれらポリペプチドの組合せをコードするポリヌクレオチドを提供する。

30

別の特徴では、本発明は、配列番号:2、5、7、11又は12に示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド又はその変種を提供する。さらに別の特徴では、本発明は、配列番号:2、5、7、11又は12に示される配列を有するポリヌクレオチドの1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%配列同一性を有するポリヌクレオチド、又はその変種を提供する。

【0022】

40

本発明のポリヌクレオチドは追加の配列を含むことができ、前記追加の配列は、例えば、同じ転写ユニット内の追加のコード配列、制御エレメント、例えばプロモータ、リボソーム結合部位、5' UTR、3' UTR、転写ターミネータ、ポリアデニル化部位、同じ又は異なるプロモータ制御下にある追加の転写ユニット、クローニング、発現、相同組換え及び宿主細胞の形質転換を可能にする配列、並びに本発明の実施態様を提供するために所望され得る任意の構築物である。

CPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原の発現のためのエレメントが有利には本発明のベクターに存在する。最小限の態様では、このエレメントは、開始コドン（ATG）、終止コドン及びプロモータ、並びに場合によってはまたある種のベクター（例えばプラスミド）及びある種のウイルスベクター（例えばボックスウイルス以外のウイルスベク

50

ター)のためのポリアデニル化配列を含むか、本質的にこれらから成るか又はこれらから成る。ポリヌクレオチドがポリタンパク質フラグメント(例えばCPVペプチド)をコードするときは、有利にはベクターにATGがリーディングフレームの5'に配置され、終止コドンが3'に配置される。制御発現のための他のエレメント、例えばエンハンサー配列、安定化配列(例えばイントロン)及びタンパク質の分泌を許容するシグナル配列が存在し得る。

【0023】

本発明はまたベクター(例えば発現ベクター)を含む調製物、例えば治療組成物に関する。当該調製物は、1つ以上のベクター(例えばin vivo発現ベクター)を含むことができ、前記ベクターは1つ以上のCPVポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原を含み、前記を発現する。ある実施態様では、ベクターはポリヌクレオチドを含有し、医薬的に又は獣医的に許容できる担体、賦形剤又はビヒクル内で前記を発現する。前記ポリヌクレオチドは、CPV抗原、エピトープ又は免疫原をコードする(及び有利にはこれが発現する)ポリヌクレオチドを含むか、本質的にそのようなポリヌクレオチドから成るか又はそのようなポリヌクレオチドから成る。したがって、本発明のある実施態様にしたがえば、調製物中の当該他の1つのベクター又は複数のベクターは、CPVポリペプチド、抗原、エピトープ若しくは免疫原又は前記のフラグメントの1つ以上の他のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むか、本質的にそのようなポリヌクレオチドから成るか又はそのようなポリヌクレオチドから成り、適切な環境下で当該ベクターはそれらを発現する。

別の実施態様にしたがえば、調製物中の当該1つのベクター又は複数のベクターは、CPVポリペプチド、抗原、エピトープ若しくは免疫原の1つ以上のタンパク質又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むか、本質的に前記ポリヌクレオチドから成るか又は前記ポリヌクレオチドから成り、当該1つのベクター又は複数のベクターは前記ポリヌクレオチドを発現する。別の実施態様では、調製物は、CPVポリペプチド、抗原、融合タンパク質又は前記のエピトープをコードしこれを(有利にはin vivoで)発現するポリヌクレオチドを含む1つ、2つ又は3つ以上のベクターを含む。

【0024】

本発明のさらにまた別の実施態様にしたがえば、発現ベクターは、プラスミドベクター又はDNAプラスミドベクター、特にin vivo発現ベクターである。具体的で非限定的な例では、pVR1020又は1012プラスミド(VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996、例えば米国特許5,846,946号及び6,451,769号を参照されたい)を、ポリヌクレオチド配列の挿入のためのベクターとして利用することができる。pVR1020プラスミドはpVR1012から誘導され、ヒトtPAシグナル配列を含む。ある実施態様では、ヒトtPAシグナルはアミノ酸M(1)からアミノ酸S(23)(Genbankアクセッション番号HUMTPA14)を含む。別の具体的で非限定的な例では、ポリヌクレオチド配列の挿入のためのベクターとして用いられるプラスミドは、ウマIGF1アミノ酸M(24)からアミノ酸A(48)(Genbankアクセッション番号U28070)のシグナルペプチド配列を含むことができる。情報を得るか実施に際して利用することができるDNAプラスミドに関する更なる知見は例えば以下で見いだされる：米国特許6,852,705号、6,818,628号、6,586,412号、6,576,243号、6,558,674号、6,464,984号、6,451,770号、6,376,473号及び6,221,362号。

プラスミドという用語は、任意のDNA転写ユニットをカバーし、本発明のポリヌクレオチド及び所望の宿主若しくは標的の1つの細胞又は複数の細胞での前記のin vivo発現に必要なエレメントを含む。これに関しては、スーパーコイル又は非スーパーコイルの環状プラスミドが直鎖型とともに本発明の範囲内に入ることが意図される。

【0025】

各プラスミドは、CPV抗原をコードするポリヌクレオチドに加えて、エピトープ又は免疫原(場合によって異種ペプチド配列と融合されている)、変種、アナログ又はフラグメントを含むか含有するか又は本質的にこれらから成り、それらは場合によってプロモータに連結しているか又はプロモータの制御下にあるか又はプロモータに依存する。一般的には、真核細胞で機能する強力なプロモータを利用することが有利である。強力なプロモ-

タは、ヒト又はげっ歯類起原の最初期サイトメガロウイルスプロモータ (CMV-IE) (又は場合によって別の起原 (例えばラット又はモルモット) を有するもの、スーパープロモータ (Ni, M. et al., Plant J.7, 661-676, 1995)) であり得るが、ただしこれらに限定されない。CMV-IEプロモータは事実上のプロモータ部分を含み、エンハンサー部分と結合している場合もそうでない場合もある。EP-A-260 148、EP-A-323 597、米国特許5,168,062号、5,385,839号及び4,968,615号とともにPCT出願W087/03905を参照されたい。CMV-IEプロモータは有利にはヒトCMV-IE (Boshart et al., 1985) 又はげっ歯類CMV-IEである。

より一般的な用語として、プロモータはウイルス、植物又は細胞起源である。本発明の実施で有用に利用できるCMV-IE以外の強力なウイルスプロモータは、SV40ウイルスの初期/後期プロモータ又はラウス肉腫ウイルスのLTRプロモータである。本発明の実施で有用に利用できる強力な細胞性プロモータは、細胞骨格遺伝子のプロモータ、例えばデスミンプロモータ (Kwissa et al., 2000) 又はアクチンプロモータ (Miyazaki et al., 1989) である。

プラスミドは他の発現制御エレメントを含むことができる。安定化配列、例えばイントロン配列、例えばトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼイントロン (Callis et al. Genes & Dev.1(10):1183-1200, Dec.1987)、hCMV-IEの最初のイントロン (PCT出願W019 89/01036)、ウサギ β -グロビン遺伝子のイントロンII (van Ooyen et al., 1979) を取り込むことは特に有益である。別の実施態様では、プラスミドは3' UTRを含むことができる。3' UTRはアグロバクテリウムノパリンシンターゼ (Nos) 3' UTRであり得るが、ただしこれらに限定されない (Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. D epicker, A. et al. J. Mol. Appl. Genet., 1982; Bevan, NAR, 1984, 12(22): 8711-8721)。

プラスミド及びボックスウイルス以外のウイルスベクターのためのポリアデニル化シグナル (polyA) に関しては、ウシ成長ホルモン (bGH) 遺伝子のポリ(A)シグナル (U.S.5,122,458参照)、又はウサギ β -グロビン遺伝子のポリ(A)シグナル、又はSV40ウイルスのポリ(A)シグナルがより有用であり得る。

“宿主細胞”は、外因性ポリヌクレオチド (例えば組換えプラスミド又はベクター) によって遺伝的に変化しているか、又は遺伝的に変化させることができる原核細胞又は真核細胞を指す。遺伝的に変化している細胞というとき、当該用語は、最初に変化させた細胞及びその子孫の両方を指す。

ある実施態様では、組換えCPV抗原は昆虫細胞で発現される。

ある具体的な実施態様では、CPV抗原はSF9細胞で発現される。

【0026】

使用方法

ある実施態様では、本明細書に開示される内容は、ヒツジ類、ウシ類、ヤギ類又はブタ類をワクチン免疫する方法に向けられ、前記方法は、当該ヒツジ類、ウシ類、ヤギ類又はブタ類に有効量のワクチンを投与する工程を含み、当該ワクチンは、有効量の組換えCPV抗原及び医薬的又は獣医的に許容できる担体、賦形剤又はビヒクルを含み得る。

本発明のある実施態様では、当該方法は、本発明の乳剤で処方されたワクチン組成物の単回投与を含む。例えば、ある実施態様では、免疫学的又はワクチン組成物は、バキュロウイルス発現CPV抗原 (ポリペプチド及びVLP (ウイルス様粒子) 又は空キャプシドを含む) を含む。電子顕微鏡検査により、バキュロウイルス発現ベクターで形質転換された昆虫細胞はCPV VLP又はCPV空キャプシドを生成することが示される。したがって、本発明の免疫学的又はワクチン組成物はCPV VLP又はCPV空キャプシドを含むものを包含する。

ある実施態様では、本明細書に開示される内容は、ヒツジ類、ウシ類、ヤギ類又はブタ類をワクチン免疫する方法に向けられ、前記方法は、当該ヒツジ類、ウシ類、ヤギ類又はブタ類にバキュロウイルスベクターによって昆虫細胞で生成されたCPV抗原を投与する工程を含む。

ある実施態様では、本明細書に開示される内容は免疫応答を引き出す方法に向けられ、前記方法は、バキュロウイルスベクターによって昆虫細胞で生成されたCPV抗原を含むワ

10

20

30

40

50

クチンをヒツジ類、ウシ類、ヤギ類又はブタ類に投与する工程を含む。

ある実施態様では、本明細書に開示される内容はワクチン又は組成物を調製する方法に向けられ、前記方法は、バキュロウイルスベクターによって昆虫細胞で生成されたCPV抗原を単離する工程、及び場合によって医薬的又は獣医的に許容できる担体、賦形剤又はビヒクルを混合する工程を含む。

同種及び異種CPV株の両方をチャレンジに用いてワクチンの有効性を試験する。投与は皮下でも又は筋肉内でもよい。投与は注射針不使用であり得る（例えばバイオジェクト（Bioject））。

【0027】

本発明のある実施態様では、プライム-ブーストレジメンを用いることができる。プライム-ブーストレジメンは、少なくとも1回のプライム投与、及び、少なくとも1つの共通のポリペプチド、抗原、エピトープ又は免疫原を用いて少なくとも1回のブースター投与で構成される。典型的には、プライム投与で用いられる免疫学的組成物又はワクチンは、ブースターとして用いられるものとは本質的に異なる。しかしながら、同じ組成物を一次投与及びブーストとして用いてもよいことは特筆される。本投与プロトコルは“プライム-ブースト”と呼ばれる。

本発明のプライム-ブーストは組換えウイルスベクターを含むことができ、ベクターはCPVコード配列、又はそのフラグメント（抗原性ポリペプチド又はフラグメントをコードする）、又はその変種の発現のために用いられる。具体的には、ウイルスベクターは、CPV遺伝子又は抗原性ポリペプチドをコードするそのフラグメントを発現することができる。本明細書で意図されるウイルスベクターには以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：ポックスウイルス（例えばワクシニアウイルス又は弱毒ワクシニアウイルス、トリポックス又は弱毒トリポックス（例えばカナリアポックス、鶏痘、ハトポックス、ピジョンポックス、ウズラポックス、ALVAC、TROVAC（例えばUS 5,505,941、US 5,494,807を参照されたい））、アライグマポックスウイルス、ブタポックスウイルスなど）、アデノウイルス（例えば、ヒトアデノウイルス、イヌアデノウイルス）、ヘルペスウイルス（例えば、イヌヘルペスウイルス、シチメンチョウヘルペスウイルス、マレック病ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス、ネコヘルペスウイルス、喉頭気管炎ウイルス（ILTV）、ウシヘルペスウイルス、ブタヘルペスウイルス）、バキュロウイルス、レトロウイルスなど。別の実施態様では、トリポックス発現ベクターはカナリアポックスベクター（例えばALVAC）であり得る。さらにまた別の実施態様では、トリポックス発現ベクターは鶏痘ベクター（例えばTROVAC）であり得る。発現されるべき本発明のCPV抗原は、特定のポックスウイルスプロモータの制御下に挿入される。前記プロモータは、とりわけ、例えばエントモポックスウイルスアムサクタ・モオレイ（*Amsacta moorei*）42Kプロモータ（Barcena, Lorenzo et al., 2000）、ワクシニアプロモータ7.5kDa（Cochran et al., 1985）、ワクシニアプロモータI3L（Riviere et al., 1992）、ワクシニアプロモータHA（Shida, 1986）、牛痘プロモータATI（Funahashi et al., 1988）、ワクシニアプロモータH6（Taylor et al., 1988b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989）である。

【0028】

本発明のプライム-ブーストプロトコルの別の特徴では、本発明のCPV抗原を含む組成物が投与され、その後、組換えウイルスベクターを含むワクチン又は組成物（CPV抗原を含みin vivoでこれを発現する）、又はCPV抗原を含む不活化ウイルスワクチン又は組成物、又はDNAプラスミドワクチン又は組成物（CPV抗原を含むか又は発現する）が投与される。同様に、プライム-ブーストプロトコルは、組換えウイルスベクターを含むワクチン又は組成物（CPV抗原を含みin vivoでこれを発現する）、又はCPV抗原を含む不活化ウイルスワクチン又は組成物、又はDNAプラスミドワクチン又は組成物（CPV抗原を含むか又は発現する）の投与を含み、その後、本発明のCPV抗原を含む組成物が投与される。さらに、一次投与及び二次投与の両方が本発明のCPV抗原を含む組成物を含み得ることが特筆される。

プライム-ブーストプロトコルは少なくとも1回のプライム投与、及び、少なくとも1つ

の共通のポリペプチド及び/又はその変種若しくはフラグメントを用いた少なくとも1回のブースト投与を含む。プライム投与に用いられるワクチンは後のブースターワクチンとして用いられるものと異なり得る。プライム投与は1回以上の投与を含むことができる。同様に、ブースト投与は1回以上の投与を含むことができる。

哺乳動物標的種のウイルスベクター系組成物（例えば非ポックスウイルスベクター系組成物）の一用量体積は、概ね約0.1から約5.0mL、約0.1から約3.0mL、約0.5mLから約2.5mLである。

ワクチンの有効性は、最後の免疫後約2から4週で、動物（例えばネコ又はイヌ）をCPVの病毒株でチャレンジすることによって試験することができる。

【0029】

これらCPV株の更なる詳細は、European Bioinformatics Information (EMBL-EBI) のウェブページで見出すことができ、関連するヌクレオチド配列の全てが参照により本明細書に含まれる。本発明者らは、全てのCPV株（本明細書に記載されたもの及び未だ同定されていないものの両方）が本開示の教示にしたがって発現され、例えば有効なワクチン組成物を生成し得ると考える。同種及び異種株の両方をチャレンジに用いてワクチンの有効性が試験される。動物は皮内、皮下、噴霧、鼻内、眼内、気管内に及び/又は経口的にチャレンジされ得る。

プライム-ブースト投与は、有利には1から6週間離して、例えば約4週間離して実施できる。ある実施態様にしたがえば、半年に1回のブースター又は1年に1回のブースター（有利にはウイルスベクター系ワクチンを用いる）もまた想定される。動物は有利には最初の投与時に少なくとも6から8週齢である。

プライム-ブーストプロトコルで用いられる、本発明の組換え抗原性ポリペプチドを含む組成物はアジュバントを添加されず、場合によって医薬的又は獣医的に許容できるビヒクル、希釈剤又は賦形剤に含有され得る。本発明のプロトコルは動物をCPVから防御し、及び/又は感染動物における疾患の進行を予防する。

【0030】

本明細書の開示は例示として提供され、本発明はそれらに限定されないことは当業者には理解されるべきである。本明細書の開示及び当業界の知見から、当業者は、必要以上の試験を実施することなく投与回数、投与ルート及び各注射プロトコルに用いられるべき用量を決定することができる。

本発明は、本発明にしたがって生成された治療組成物の有効量を少なくとも1回動物へ投与することを意図する。動物は、雄、雌、妊娠雌及び新生仔であり得る。この投与は多様なルートによることが可能で、前記ルートには筋肉内（IM）、皮内（ID）若しくは皮下（SC）注射又は鼻内若しくは経口投与が含まれるが、ただしこれらに限定されない。本発明の治療組成物はまた例えば以下を用いる無注射針装置によって投与できる：ピグジェット（Pigjet）、デルモジェット（Dermojet）、バイオジェクター（Biojector）、アビジェット（Avijet (Merial, GA, USA)）、ベトジェット（Vetjet）又はビタジェット（Vitajet）装置（Bioject, Oregon, USA）。プラスミド組成物を投与する別のアプローチはエレクトロポレーションの使用である（例えば以下を参照されたい：Tollefsen et al., 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al., 2002; PCT出願WO99/01158）。別の実施態様では、治療組成物は遺伝子銃又は金粒子ボンバードメントによって動物にデリバリーされる。

ある実施態様では、本発明は、CPV抗原又はエピトープの標的細胞デリバリー及び発現のために治療的に有効な量の処方物の投与を提供する。治療的有效量の決定は当業者には日常的な作業である。ある実施態様では、処方物は、CPV抗原又はエピトープを発現するポリヌクレオチド及び医薬的又は獣医的に許容できる担体、ビヒクル又は賦形剤を含む発現ベクターを含む。別の実施態様では、医薬的又は獣医的に許容できる担体、ビヒクル又は賦形剤は、トランスフェクション又はポリヌクレオチドを宿主動物へ移転する他の手段を促進するか、及び/又は宿主での当該ベクター又はタンパク質の保存を改善する。

ある実施態様では、本明細書に開示される内容は、感染動物とワクチン接種動物との識

10

20

30

40

50

別（DIVA）のための検出方法を提供する。

本発明のワクチン又は組成物の使用は動物のCPV感染の検出を可能にすることが本明細書で開示される。本発明のワクチン又は組成物の使用は、感染動物とワクチン接種動物とを識別（DIVA）することによって動物における感染の検出を可能にすることが本明細書で開示される。

【0031】

製品

ある実施態様では、本明細書に開示される内容は、免疫応答を引き出すか又は誘導する方法を実施するためのキットに向けられ、前記キットは、組換えCPV免疫学的組成物若しくはワクチン、又は不活化CPV免疫学的組成物若しくはワクチン、組換えCPVウイルス組成物若しくはワクチンのいずれか1つ、及び当該方法を実施するための指示を含むことができる。

10

本発明の別の実施態様は、動物においてCPVに対する免疫学的応答又は防御応答を誘導する方法を実施するためのキットであり、前記キットは、本発明のCPV抗原及び組換えCPVウイルス免疫学的組成物若しくはワクチンを含む組成物又はワクチン、並びに免疫応答を動物において引き出すために有効量でデリバリーする方法を実施するための指示を含む。

本発明の別の実施態様は、動物においてCPVに対する免疫学的応答又は防御応答を誘導する方法を実施するためのキットであり、前記キットは、本発明のCPV抗原及び不活化CPV免疫学的組成物若しくはワクチンを含む組成物又はワクチン、並びに免疫応答を動物において引き出すために有効量でデリバリーする方法を実施するための指示を含む。

20

本発明のさらにまた別の特徴は、上記に記載した本発明のプライム-ブーストワクチン免疫のためのキットに関する。当該キットは少なくとも2つのバイアルを含み、第一のバイアルは本発明のプライム-ワクチン免疫のためのワクチン若しくは組成物を含み、第二のバイアルは本発明のブースト-ワクチン免疫のためのワクチン若しくは組成物を含む。キットは有利には、追加の第一又は第二のバイアルを含み、前記バイアルは追加のプライム-ワクチン免疫又は追加のブースト-ワクチン免疫のためである。

以下の実施態様が本発明に包含される。ある実施態様では、CPV抗原又はそのフラグメント若しくは変種及び医薬的又は獣医的に許容できる担体、賦形剤又はビヒクルを含む組成物が開示される。別の実施態様では、当該CPV抗原又はそのフラグメント若しくは変種がCPV抗原の少なくとも15アミノ酸を含む免疫原性フラグメントを含む、上記に記載の組成物が開示される。ある実施態様では、当該CPV抗原又はそのフラグメント若しくは変種が部分的に精製される上記の組成物が開示される。ある実施態様では、当該CPV抗原又はそのフラグメント若しくは変種が実質的に精製される上記の組成物が開示される。

30

【0032】

ある実施態様では、当該CPV抗原又はそのフラグメント若しくは変種がCPVポリペプチドである上記の組成物が開示される。ある実施態様では、当該CPVポリペプチドがキャプシドタンパク質又はそのフラグメントである上記の組成物が開示される。ある実施態様では、当該CPV抗原又はそのフラグメント若しくは変種が配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列と少なくとも80%配列同一性を有する上記の組成物が開示される。ある実施態様では、当該CPV抗原が、配列番号:2、5、7、11又は12に示される配列と少なくとも70%配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされる上記の組成物が開示される。別の実施態様では、上記組成物を投与する工程を含む、CPV感受性動物をワクチン免疫する方法が開示される。ある実施態様では、プライム-ブーストレジメンを含む、CPV感受性動物をワクチン免疫する方法が開示される。ある実施態様では、昆虫細胞で発現され、実質的に精製された抗原性ポリペプチドが開示され、この場合、当該ポリペプチドは配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列を有するポリペプチドと少なくとも80%配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。任意の実施態様で、動物は好ましくはネコ類又はイヌ類である。ある実施態様では、動物のCPV感染を診断する方法が開示される。さらに別の実施態様では、少なくとも2つのバイアルを含むプライム-ブーストワクチン免疫用キットが開示され、この場合、第一のバイアルは本発明の組成物を含み、第二のバイアルは、組換

40

50

えウイルスベクターを含む組成物、又は不活化ウイルス組成物を含む組成物、又はCPV抗原を含むか若しくは発現するDNAプラスミド組成物を含むブースト-ワクチン免疫用組成物を含む。

【0033】

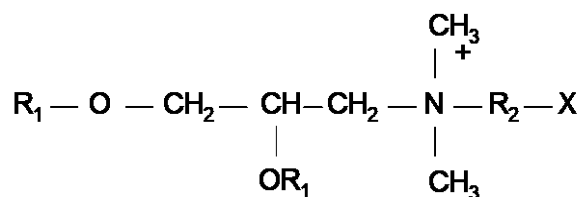
医薬的又は獣医的に許容できる担体又はビヒクル又は賦形剤は当業者には周知である。例えば、医薬的又は獣医的に許容できる担体又はビヒクル又は賦形剤は、0.9% NaCl溶液（例えば生理食塩水）又はリン酸緩衝液であり得る。本発明の方法に用いることができる他の医薬的又は獣医的に許容できる担体又はビヒクル又は賦形剤には、ポリ-(L-グルタメート)又はポリビニルピロリドンが含まれるが、ただしこれらに限定されない。医薬的又は獣医的に許容できる担体又はビヒクル又は賦形剤は、ベクター（又はin vitroで本発明のベクターから発現されるタンパク質）の投与を促進する任意の化合物又は化合物の組合せであり得る。有利には、当該担体又はビヒクル又は賦形剤はトランスフェクションを促進し及び/又はベクター（又はタンパク質）の保存を改善する。用量及び一用量体積は本明細書で一般的な記述として考察されており、その上、本開示を読み解きかつ当業界の知識と併せれば必要以上の試験を行うことなく当業者によって決定され得る。

10

第四級アンモニウム塩を含む陽イオン性脂質（プラスミドにとって適切であるがただし絶対にというわけではない）は、有利には下記の式を有するものである：

【0034】

【化1】



20

【0035】

式中、R₁は12から18の炭素原子を有する飽和又は不飽和直鎖脂肪族基であり、R₂は2から3の炭素原子を含む別の脂肪族基であり、Xはアミン又はヒドロキシル基（例えばDMRIE）である。別の実施態様では、陽イオン性脂質は中性脂質（例えばDOPE）と結合することができる。

30

これらの陽イオン性脂質の中で、DMRIE（N-(2-ヒドロキシエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)-1-プロパンアンモニウム（W096/34109）が好ましく、有利にはDMRIEは中性脂質（有利にはDOPE（ジオレオイル-ホスファチジル-エタノールアミン）（Behr, 1994））と結合してDMRIE-DOPEを形成する。

有利にはプラスミドとアジュバントとの混合物は下準備なく生成され、さらに有利には調製物の投与と同時に又は調製物の投与の少し前に（例えば投与の少し前又は投与に先立って）生成される。プラスミド-アジュバント混合物は、有利には混合物が複合体を形成するために十分な時間を投与前に提供するために、例えば投与の約10分から約60分前、例えば投与のほぼ30分前に生成される。

DOPEが存在するとき、DMRIE：DOPEモル比は、有利には約95：約5から約5：約95、より有利には約1：約1、例えば1：1であり得る。

40

DMRIE又はDMRIE-DOPEアジュバント：プラスミド重量比は、約50：約1から約1：約10、例えば約10：約1から約1：約5、及び約1：約1から約1：約2、例えば1：1から1：2である。

【0036】

別の実施態様では、医薬的又は獣医的に許容できる担体、賦形剤、アジュバント、又はビヒクルは油中水乳剤であり得る。適切な油中水乳剤の例には油を基剤とする安定かつ4℃で液体である油中水ワクチン乳剤が含まれる。それらには以下が含まれる：6から50v/v %の抗原含有水相、好ましくは12から25 v/v %、50から94 v/v %の油相（全体で又は部分的に非代謝性油（例えば鉱物油、例えばパラフィン油）及び/又は代謝性油（例えば植物

50

油又は脂肪酸、ポリオール又はアルコールエステルを含む)、0.2から20 p/v %の界面活性剤(好ましくは3から8 p/v %)。後者は、全体で又は部分的に或いは混合物中でポリグリセロールエステル(前記ポリグリセロールエステルは好ましくはポリグリセロール(ポリ)リシンオレエートである)又はポリオキシエチレンリシン油若しくは他の水素添加ポリオキシエチレンリシン油である。油中水乳剤で用いることができる界面活性剤の例には、エトキシ化ソルビタンエステル(例えばポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート(TWEEN 80(商標)、アプリケム社(AppliChem, Inc., Cheshire, CT)から入手できる)及びソルビタンエステル(例えばソルビタンモノオレエート(SPAN 80(商標)、シグマアルドリッチ社(Sigma Aldrich, St.Louis, MO)から入手できる)が含まれる。加えて、油中水乳剤に関しては、参照により本明細書に含まれる米国特許6,919,084号(その実施例8)もまた参照されたい。いくつかの実施態様では、抗原含有水相は、1つ以上の緩衝剤を含む生理食塩水溶液を含む。適切な緩衝溶液の例はリン酸緩衝生理食塩水である。ある有利な実施態様では、油中水乳剤は水/油/水(W/O/W)三重乳剤であり得る(米国特許6,358,500号)。他の適切な乳剤の例は米国特許7,371,395号に記載されている。

【0037】

本発明の免疫学的組成物及びワクチンは、1つ以上のアジュバントを含むか又は本質的に前記から成り得る。本発明の実施に用いられる適切なアジュバントは、(1)アクリル酸又はメタクリル酸ポリマー、無水マレイン酸及びアルケニル誘導体ポリマー、(2)免疫刺激性配列(ISS)、例えば1つ以上の非メチル化CpGユニットを有するオリゴデオキシリボヌクレオチド配列(Klinman et al., 1996; W098/16247)、(3)水中油乳剤、例えばSPT乳剤(以下の147ページに記載されている: "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", M.Powell, M.Newman, Plenum Press刊(1995))及び乳剤MF59(同書、183ページに記載)、(4)四級アンモニウム塩を含む陽イオン脂質、例えばDDA、(5)サイトカイン、(6)水酸化アルミニウム又はリン酸アルミニウム、(7)サポニン、又は(8)本出願に引用され参照により含まれる任意の資料で考察されている他のアジュバント、又は(9)前記の任意の組合せ又は混合物である。

(3)の水中油乳剤(ウイルスベクターに対して特に適切である)は、以下を基剤とすることができる:軽質流動パラフィン油(欧州局方型)、イソプレノイド油(例えばスクアラン、スクアレン)、アルケンのオリゴマー化から得られる油(例えばイソブテン又はデセン)、直鎖アルキル基を有する酸又はアルコールのエステル(例えば植物油、オレイン酸エチル、プロピレングリコール、ジ(カプリレート/カプレート)、グリセロールトリ(カプリレート/カプレート)、及びジオレイン酸プロピレングリコール、又は分枝脂肪アルコール又は酸のエステル(特にイソステアリン酸エステル)。

乳剤を形成するために、油を乳化剤と組み合わせて用いる。乳化剤は非イオン性界面活性剤であり得る。非イオン性界面活性剤は例えば以下のものである:一方でソルビタン、マンニド(例えば無水オレイン酸マンニトール)、グリセロール、ポリグリセロール又はプロピレングリコールのエステルのエステル、及び他方でオレイン酸、イソステアリン酸、リシノール酸又はヒドロキシステアリン酸のエステル(これらのエステルは場合によってエトキシ化される)、又はポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンコポリマーブロック(例えばプルロニック(Pluronic)、例えばL121。

【0038】

(1)のタイプのアジュバントポリマーの中では、架橋アクリル酸又はメタクリル酸ポリマー、特に糖又は多価アルコールのポリアルケニルエーテルによって架橋されたものが好ましい。これらの化合物はカルボマーの名称で知られる(Pharmeuropa, vol.8, no.2, June 1996)。当業者はまた米国特許2,909,462号を参照でき、前記特許は、ポリヒドロキシ化合物によって架橋されたアクリル酸ポリマーを提供する。前記ヒドロキシ化合物は、少なくとも3つのヒドロキシ基(好ましくはそのような基は8つを超えない)を有し、少なくとも3つのヒドロキシ基の水素原子は、少なくとも2つの炭素原子を有する不飽和脂肪族基によって入れ替えられる。好ましい置換基は、2から4の炭素原子を含むもの、例えばビニル、アリル、及び他のエチレン性不飽和基である。不飽和基はまた、他の置換

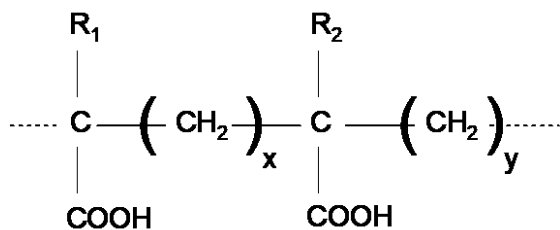
基（例えばメチル）を含むことができる。カルボポル（Carbopol）（BF Goodrich, Ohio, USA）という名で販売される製品が特に適切である。それらはアシルサッカロース又はアシルペンタエリトリールによって架橋される。それらの中では、カルボポル974P、934P及び971Pが挙げられる。

無水マレイン酸-アルケニル誘導体コポリマーに関しては、EMA（Monsanto）が好ましい。EMAは直鎖又は架橋されたエチレン-無水マレイン酸コポリマーであり、それらは、例えばジビニルエーテルによって架橋される。以下の文献もまた参照されたい：J.Fields et al., 1960。

構造に関しては、アクリル酸又はメタクリル酸ポリマー及びEMAは、好ましくは下記式を有する基本ユニットによって形成される：

【0039】

【化2】



【0040】

式中、 R_1 及び R_2 は、H又は CH_3 を表し、同じでも異なってもよく、 $x=0$ 又は1で、好ましくは $x=1$ であり、 $y=1$ 又は2で、 $x+y=2$ である。

EMAについては、 $x=0$ で $y=2$ であり、カルボマーについては $x=y=1$ である。

これらのポリマーは水又は生理学的塩類溶液（20g/LのNaCl）中で可溶性であり、pHは7.3から7.4に例えばソーダ（NaOH）によって調整して、発現ベクターを取り込むことができる。最終的な免疫学的又はワクチン組成物中のポリマー濃度は、約0.01から約1.5% w/v、約0.05から約1% w/v、及び約0.1から約0.4% w/vの範囲であり得る。

【0041】

1つ若しくは複数の（5）のサイトカインは免疫学的又はワクチン組成物中でタンパク質型として存在するか、又は、1つ若しくは複数の免疫原又はそのエピトープとともに宿主で共発現させることができる。1つ若しくは複数の免疫原又はそのエピトープを発現する同じベクターによって又は別々のベクターによって、1つ若しくは複数のサイトカインを共発現させることが好ましい。

本発明は、例えば複数の活性成分を、有利には一緒にかつ担体、サイトカイン及び/又は希釈剤とともに混合することによりそのような組合せ組成物を調製することを包含する。

本発明で用いることができるサイトカインには、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン α （IFN α ）、インターフェロン β （IFN β ）、インターフェロン γ （IFN γ ）、インターロイキン-1 α （IL-1 α ）、インターロイキン-1 β （IL-1 β ）、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-3（IL-3）、インターロイキン-4（IL-4）、インターロイキン-5（IL-5）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-7（IL-7）、インターロイキン-8（IL-8）、インターロイキン-9（IL-9）、インターロイキン-10（IL-10）、インターロイキン-11（IL-11）、インターロイキン-12（IL-12）、腫瘍壊死因子 α （TNF α ）、腫瘍壊死因子 β （TNF β ）、ポリイノシン及びポリシチジン酸、シチジン-リン酸-グアノシンオリゴデオキシヌクレオチド（CpG ODN）、並びに形質転換増殖因子 β （TGF β ）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。サイトカインは、本発明の免疫学的又はワクチン組成物と同時投与されるか、及び/又は連続的に投与され得ることは理解されるであろう。したがって、例えば

10

20

30

40

50

、本発明のワクチンはまた、in vivoで適切なサイトカイン（例えばワクチンを接種される又は免疫学的応答が誘引される宿主に適合するサイトカイン（例えばウシに投与される調製物にはウシサイトカイン））を発現する外因性核酸分子を含むことができる。

バキュロウイルス/昆虫細胞発現ポリペプチド系の免疫学的組成物及び/又はワクチンの事例では、一用量は、約1 µgから約2000 µg、約50 µgから約1000 µg、及び約100 µgから約500 µgのCPV抗原、エピトープ又は免疫原を含むことができる。当該用量は、約 10^2 から約 10^{20} のVLP、約 10^3 から約 10^{20} 、約 10^4 から約 10^{20} のVLPを含むことができる。一用量体積は約0.1から約10mL、約0.2から約5mLであり得る。一般的に、当業者は多くの用量決定手法を承知しており、非日常的作業を実施することなく用量を最適化することができるであろう。

10

【0042】

ある特徴では、本発明は、ウイルス様粒子（VLP）成分及び改変生ウイルス（MLV）成分を含む組合せワクチンを提供し、この場合、VLP及びMLVの双方が同じ病原体又は疾患に向けられ、当該組合せワクチンは母獣由来抗体（MDA）を圧倒する。

いくつかの実施態様では、組合せワクチンは一回分用量で防御免疫を提供する。

いくつかの実施態様では、当該病原体又は疾患はイヌパルボウイルス（CPV）である。

いくつかの実施態様では、当該病原体又は疾患は口蹄疫ウイルス（FMDV）である。

いくつかの実施態様では、当該組合せのVLP成分は全タンパク質含有量の関数として少なくとも10%のCPV VLP（w/w）を含む。

いくつかの実施態様では、当該VLP成分は少なくとも20%のCPV VLP（w/w）を含む。

20

いくつかの実施態様では、当該CPV VLPは昆虫細胞でバキュロウイルスベクターによって発現される。

いくつかの実施態様では、当該CPV VLPは少なくとも1つのCPVキャプシドタンパク質を含む。

いくつかの実施態様では、当該CPV VLPは、配列番号:1、3、4、6、8、9又は10に示される配列を有するCPVポリペプチドを含むか、又は当該CPV VLPは、配列番号:1、3、4、6、8、9又は10に示される配列と少なくとも90%同一性を有するCPVポリペプチドを含む。

いくつかの実施態様では、当該CPV VLPは、配列番号:2、5又は7に示される配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるCPVポリペプチドを含むか、又は当該CPV VLPは、配列番号:2、5又は7に示される配列と少なくとも90%同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるCPVポリペプチドを含む。

30

いくつかの実施態様では、当該組合せワクチンはアジュバント添加されず、かつ場合によって医薬的又は獣医的に許容できる担体、賦形剤又はビヒクルを含む。

別の特徴では、本発明は、CPV VLPの生成に有用なプラスミドを提供し、前記プラスミドは、配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列を有するCPV抗原をコードするポリヌクレオチド、又は配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列と少なくとも90%同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。

いくつかの実施態様では、当該ポリヌクレオチドは、配列番号:2、5、7、11又は12に示される配列を含むか又は前記配列から成る。

いくつかの実施態様では、当該プラスミドは配列番号:11又は12に示される配列から成る。

40

いくつかの実施態様では、当該プラスミドは安定的に昆虫細胞を形質転換し、前記細胞はCPV VLPを発現する。

別の特徴では、本発明は、実質的に精製された昆虫細胞発現CPV空キャプシド又はCPV VLP提供し、当該CPV空キャプシド又はVLPは、配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列を有するポリペプチドを含むか、或いは当該CPV空キャプシド又はVLPは、配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列と少なくとも90%同一性を有するポリペプチドを含む。

いくつかの実施態様では、当該CPV空キャプシド又はVLPは、配列番号:1、3、4、6又は8-10に示される配列を有するポリペプチドから成る。

別の特徴では、本発明は動物においてCPVに対する免疫応答を引き出す方法を提供し、

50

前記方法は、本明細書に開示する組成物、ワクチン、組合せワクチン及びVLPを当該動物に投与する工程を含む。

いくつかの実施態様では、当該免疫応答は、後に続く病毒性CPVへの暴露に対してワクチン接種動物を防御する。当該暴露は自然的でも又は実験的でもよい。

いくつかの実施態様では、当該免疫応答は、ワクチン接種動物で前記動物におけるCPVに対する高レベルの母獣由来抗体（MDA）の存在に関係なく惹起される。“高レベル”は通常的な意味を有し、一般的には、従来技術のワクチンがMDA陽性動物において強力な防御応答を引き出す能力を妨げるMDAレベルを指す。

本発明は、これから以下の非限定的実施例の手段によってさらに説明されるであろう。

実施例

特段の記載がなければ、DNA挿入物、プラスミド、及び組換えウイルス又はバキュロウイルスベクターの構築は、以下の文献に記載されている標準的な分子生物学技術を用いて実施された：J.Sambrook et al.(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989。

【実施例1】

【0043】

バキュロウイルス/昆虫細胞系におけるCPVキャプシド抗原の構築及び発現

目的：昆虫細胞に対して最適化されたCPV（イヌパルボウイルス、Souriou株血清型2c）のCPVキャプシドタンパク質をコードするpVL1393系トランスファープラスミドを作製し、さらにウイルス様粒子（VLP）を発現させるために組換えバキュロウイルスBacMEB072を生成すること。参照配列はSouriou 2c株（Meriel）であり、呼称Genbank BAD34656/Swissprot P61826（配列番号:1）を有する。

CPVキャプシド遺伝子（1755bp）は584アミノ酸のポリペプチド（シグナルペプチドを含まない）をコードする。CPV VP2タンパク質をコードする配列（配列番号:1）をクローニングし、対応するDNA配列を昆虫細胞に対してコドン最適化させた（配列番号:5）。潜在的機能性ドメインを下記の表1に示す。

【0044】

表1：潜在的機能性ドメインは下記の通りである

（P61826についてのSwiss-prot注釈による）

推定的ドメイン	開始位置—終止位置 （又は位置）	長さ
シグナル配列	無し	
VP2成熟鎖	1-584	584
N-グリコシル化	25-47-64-180-443-505-517	
N-グリコシル化部位	490-494	

【0045】

プラスミドpMEB072の作製：昆虫発現のために最適化したCPVキャプシド（配列番号:1）をベクター及び挿入物の双方のXbaI及びBamHI部位を利用して市販のプラスミドpVL1393（Pharmlngen）中にクローン化し、発現プラスミドpMEB072を作製した。

【0046】

組換えバキュロウイルスBacMEB072の作製：用いたバキュロウイルスベクターは、相同組換えによってのみレスキューされる致死性欠失により改変されたAcNPVである（BaculoGold DNA, Pharmlngen）。プラスミドpMEB072を用いて相同組換えによって、ポリヘドリンプロモータの制御下でSouriou株血清型2cのCPVキャプシド遺伝子をコードする組換えバキュロウイルスを生成した。ツマジロクサヨトウ（Spodoptera frugiperda）(Sf)9昆虫細胞に、製造業者のプロトコル（BaculoGold, Pharmlngen）にしたがってプラスミドpMEB072及びBsu36I三重切断直線化AcNPV DNAをコトランスフェクトした。コトランスフェクション上清の組換えバキュロウイルスを2回ブランク精製した。5クローンを25cm²の単層培養フラスコスケールで28℃にて増幅した（継代1）。CPVキャプシド発現について感染細胞及

び上清をドットプロットによって分析した（CPVキャプシド抗原特異的モノクローナル抗体（CPV103B10A）を用いた）。クローン1は正確なドットプロットプロフィールを示した。このクローンをエーレンマイヤー（Erlenmeyer）50mLスケールで28℃、105rpm（懸濁）でさらに増幅した（継代2）。200mLスケールの3回目の継代（継代3）を実施して、タンパク質発現に用いるウイルスストックを得た。続いて、このウイルスストックの力価をブランクアッセイによって決定した。ウイルスストックは、2%のFCSを補充したSF900II培地を用いて得られた。力価決定後、組換えバキュロウイルスストック（継代3）を無血清培地でのタンパク質生成に用いた。

【0047】

バキュロウイルスBacMEB072の発現分析：

表2：

プラスミド	サイズ (AA)	PM (kDa)	シグナル ペプチド	タグ	N-グリコ シル化	ジスルフィド 架橋	存在 場所
pMEB062	545	59.2	無し	無し	10箇所の 潜在部位	無し	分泌

【0048】

昆虫細胞（Sf9）にBacMEB072を1 pfu/mLの感染多重度（MOI）で感染させた。昆虫細胞をFCS非含有Sf900II培地で28℃、105rpmで4日間増殖させた。タンパク質生成は、全Sf9溶解物及び培養上清をSDS-PAGE（4-20%、Invitrogen）、続いてモノクローナル抗体（CPV103B10A）によるドットプロットに付すことによって分析した。発現タンパク質の溶解性は、細胞ペレットを溶解緩衝液（50 mM Tris-HCl（pH8）、500 mM NaCl+抗プロテアーゼ）で溶解し、3回の音波破碎（20%パワーで15秒、30秒待機、20%パワーで15秒、氷上で5分間溶解）によって調べた。可溶性タンパク質を不溶性材料から遠心分離（11,000rcf、4℃、30分）によって分離させた。

予想サイズのバンドが、クマシー染色で認められるように、溶解して清澄化させた感染細胞ペレットで発現された。タンパク質は細胞中に蓄積されたが、溶解後の可溶性分画でも検出された。VP2タンパク質の実体は、CPVキャプシドに対する特異的モノクローナル抗体（CPV103B10A）を用いてドットプロットで確認した。

電子顕微鏡（EM）分析でキャプシドタンパク質のVLPへの正確な自己組み立てが確認された。前記VLPは25-30nmの直径及びパルボウイルス様ビリオンの正確な形態を有していた（図4）。VLP生成の最適な条件は、MOI=0.1の使用及び感染後5日での採集であった。他の条件も想定されるが、これらの特定の条件では1mL当たり約 10^{11} のVLP濃度が得られた。

【実施例2】

【0049】

末端切断短縮CPV VP2を含むBacMEB073の作製

目的は、哺乳動物に対して最適化されたCPV（イヌパルボウイルス、Souriou株血清型2c）の短縮VP2キャプシドタンパク質をコードするpVL1393系トランスファープラスミドを作製し、続いてVLPを発現する対応する組換えバキュロウイルスBacMEB073を作製することであった。VLP形成を妨げることなくVP2発現を強化しようと、9個のN-末端アミノ酸を欠失させた（-9AA）（Hurtado et al. Journal of Virology, August 1996）。さらにまた、キャプシド構造及び形成を改善しようと、3つのアミノ酸（M、L及びK）を付加した（Gilbert et al., Journal of Nanobiotechnology, 2006）。本開示の前には、この欠失及び挿入が、CPV VP2発現及びその後のキャプシド形成に対してどんな影響があるかは知られてなかった。

末端切断し哺乳動物のために最適化した（Geneart）VP2遺伝子（N-末端の9アミノ酸の欠失は追加のMLKによって入れ替えられた）を、さらにベクター及び挿入物の双方のBamHI及びXbaI部位を利用してプラスミドpVL1393中にクローン化した。

バキュロウイルスベクター作製及びタンパク質の発現。 バキュロウイルスベクター： 相

10

20

30

40

50

同組換えによってのみレスキューされる（BaculoGold DNA, Pharmingen）、致死性欠失により改変されたAcNPV。

組換えバキュロウイルスBacMEB073の作製：プラスミドpMEB073を用いて相同組換えによって、ポリヘドリンプロモータの制御下でSouriou株血清型2cの短縮CPVキャプシド遺伝子をコードする組換えバキュロウイルスを生成した。ツマジロクサヨトウSf9昆虫細胞に、製造業者のプロトコル（Baculogold, Pharmingen）にしたがってプラスミドpMEB073及びBsu36I三重切断直線化AcNPV DNAをコトランスフェクトした。コトランスフェクション上清の組換えバキュロウイルスを2回プラーク精製した。5クローンを25cm²の単層培養フラスコスケールで28℃にて増幅した（継代1）。CPVキャプシド発現について感染細胞及び上清をドットプロットによって分析した（CPVキャプシド抗原特異的モノクローナル抗体（CPV 103B10A）を用いた）。クローン1は正しいドットプロットプロファイルを示した。このクローンをエーレンマイヤー（Erlenmeyer）50mLスケールで28℃、105rpm（懸濁）でさらに増幅した（継代2）。200mLスケールの3回目の継代（継代3）を実施して、タンパク質発現に用いるウイルスストックを得た。続いて、このウイルスストックの力価をプラークアッセイによって決定した。ウイルスストックは、2%のFCSを補充したSF900II培地を用いて得られた。

力価決定後、組換えバキュロウイルスストック（継代3）を無血清培地でのタンパク質生成に用いた。

発現分析：

表3：予想される組換え体

プラスミド	サイズ (AA)	PM (kDa)	シグナル ペプチド	N-グリコシル化 部位	ジスルフィド 架橋	細胞内 分布
pMEB073	578	64.1	無し	11,19,40,50,58, 66,72,79,80,511	無し	分泌

昆虫細胞（Sf9）にBacMEB073をMOI=1 pfu/mLで感染させた。昆虫細胞をFCS非含有Sf900II培地で28℃、105rpmで4日間増殖させた。タンパク質生成は、全Sf9溶解物及び培養上清をSDS-PAGE（4–20%、Invitrogen）、続いてモノクローナル抗体（CPV103B10A）によるドットプロットに付すことによって分析した。

発現タンパク質の溶解性は、細胞ペレットを溶解緩衝液（50 mM Tris-HCl（pH8）、500 mM NaCl＋抗プロテアーゼ）で溶解し、3回の音波破碎（能力の20%で15秒、30秒待機、能力の20%で15秒、氷上で5分間待機）によって調べた。可溶性タンパク質を不溶性材料から遠心分離（11,000rcf、4℃、30分）によって分離した。

結果及び結論：64kDaの予想サイズのバンドが、クマシー染色で認められるように、溶解して清澄化させた感染細胞の細胞ペレットで発現された。細胞に蓄積されたタンパク質はまた溶解後の可溶性分画で検出された。VP2タンパク質の実体は、CPVキャプシドに対する特異的モノクローナル抗体（CPV103B10A）を用いてドットプロットで確認した。

EM分析でキャプシドタンパク質のVLPへの正確な自己組み立てが確認された。前記VLPは25–30nmの直径とともに10¹²VLP/mLの濃度のパルボウイルス様ビリオンの正確な形態を有していた（図4）。VLP生成はMOI=0.1及び感染後5日での採集で最適であったが、他の条件でもまた高度レベルのVLPを得ることができる。

【実施例 3】

【0050】

バキュロウイルス発現CPVキャプシドタンパク質によるイヌのワクチン免疫

本研究の主要な目的は、CPV2c Souriou株の2つのウイルス様粒子（VLP）（すなわち、実施例1及び2に記載のBacMEB072及びBacMEB073）の安全性及び免疫原性を仔犬で査定及び比較することであった。二次的な目的は、BacMEB072及びBacMEB073によって生成されたVLPの免疫原性に対する水酸化アルミニウム/サポニン又はイスコマトリックスのアジュバント効果を評価することであった。8週齢の仔犬にワクチン接種し、表4に示すように調査した。

表4：末端切断短縮CPV VP2 VLP対完全長CPV VP2 MLV試験の実験設計

グループ	抗原： VLP CPV2	アジュバント	ワクチン 接種	臨床 モニタ リング	血清	全血 (ヘパ リンナ トリ ウム)
A (n=6)	BacME073 (短縮)	無し	D0及び D28： SCで 25 μ gの 活性成分 を含む 1mL	D0、 D0+4-6h、 D1、D2 D28、 D28+4-6h、 D29、D30	D-7、 D0*、 D7、 D28、 D35、 D42、 D70	D35、 D42
B (n=6)	BacME073 (短縮)	ゲルAl(OH) ₃ (1.7mg) + サポニン(12溶血単位)				
C (n=6)	BacME072 (非短縮)	無し				
D (n=6)	BacME072 (非短縮)	ゲルAl(OH) ₃ (1.7mg) + サポニン(12溶血単位)				
E (n=6)	BacME072 (非短縮)	イスコマトリックス (75 μ g)				
F (n=5)	コントロール		コントロ ール			

*ワクチン接種前

安全性に関しては、Al(OH)₃/サポニンは、全身反応も他のいずれの徴候（局部発熱及び浮腫を除く）も誘導しなかった。軽度の浮腫が大半のイヌで各ワクチン接種後3から4日間観察された。免疫原性に関しては、VLP CPV2による仔犬のワクチン接種は液性及び細胞性免疫応答の双方を誘導でき、VLPと一緒にした短縮型VP2又は完全長VP2間で大きな違いはなかった。留意すべきことに、液性免疫応答の持続が、Al(OH)₃/サポニン又はイスコマトリックスでVLPにアジュバント添加したときに延長され、調べた2つのアジュバント間で顕著な違いはなかった。さらにまた、イスコマトリックスアジュバントは、無アジュバントグループだけでなくAl(OH)₃及びサポニングループと比較しても、IFNガンマ応答の規模を高めた。

【実施例4】

【0051】

バキュロウイルス発現CPV VLP又はMLV CPV (Souriou又はBari株) によるイヌのワクチン免疫

この試験の目的は、CPV VLP、Souriou CPV MLV又はBari CPV MLVをワクチン接種した仔犬の免疫応答を比較することであった。第一の実験は、1.52log₁₀ TCID₅₀/mL (IFI) Souriou; 1.0log₁₀ TCID₅₀/mL (HA) Bari; 及びpMEB072 VLPを比較した（結果は図8）。第二の実験は、2.21log₁₀ TCID₅₀/mL (IFI) Souriou; 2.0log₁₀ TCID₅₀/mL (HA) Bari; 及びAl(OH)₃+サポニンアジュバント入りpMEB073-生成VLPを比較した（結果は図9）。最後に第三の実験は、3.81log₁₀ TCID₅₀/mL (IFI) Souriou; 3.0log₁₀ TCID₅₀/mL (HA) Bari; 及びAl(OH)₃+サポニンアジュバント入りpMEB072-生成VLPを比較した（結果は図10）。総合すれば、これらの結果は、本発明にしたがって作製されたCPV VLPは、例示的なCPV MLVと比較したとき匹敵し得る免疫応答を提供することを示した。重要なことに、当該VLPは、いずれのMLV株の低及び中間用量の双方と比較したときよりも迅速な免疫応答を誘導できた。

【実施例5】

【0052】

CPV MLV又はバキュロウイルス発現CPVキャプシドタンパク質+MLV CPVによるイヌのワクチン免疫

この試験の目的は、母獣抗体を有する仔犬に種々の用量で皮下に投与される種々のワク

10

20

30

40

50

チン候補物の免疫原性を評価することであった。この実験以前には、CPV VLPが仔犬において母獣抗体に打ち勝って防御免疫を誘導するか否かは不明であった。

表5：CPV VLP対CPV MLV試験の実験設計

グループ		D0にワクチン皮下投与	血液サンプル (6mL/仔犬)	分析
A	CPV MLV (n=9)	CPV2 MLV 5.5log10 (1mL)	D0*, D7、D14、 D21、D28、D34、 D42、D56	抗CPV抗体測定(血球凝集阻害及び/又はELISA)
B	CPV VLP+ CPV MLV (n=10)	CPV VLP 標的用量：500 μ g(mL) + CPV2 MLV 5.5log10 (1mL)		

10

図11、図12及び表6に示すように、CPV抗体力価はMLV+VLPグループで有意に高かった。これらのデータは、ワクチン処方物へのCPV VLPの添加は母獣抗体に打ち勝つために十分であるという、驚くべきかつ予想に反する結果を示している。本発明者らは、VLPは循環CPV MDAの顕著な部分を捕捉し、このことは次にVLP及びCPV MLVが仔犬を能動的に免疫することを可能にすると考えられる。

表6：ワクチン接種後日数に対応する抗CPV抗体力価（IHA）

グループ	ID	0	7	14	21
MLV	2252826	10	< 5	2560	320
MLV	2253001	10	< 5	1280	< 5
MLV	2284928	80	< 5	< 5	< 5
MLV	2284973	80	20	< 5	20
MLV	2284975	80	20	< 5	10
MLV	2285160	< 5	< 5	< 5	5
MLV	2285360	160	40	< 5	20
MLV	2285367	40	< 5	< 5	20
MLV	2285387	10	5	< 5	< 5
MLV+VLP	2252827	80	640	1280	320
MLV+VLP	2252828	5	160	5120	2560
MLV+VLP	2284818	10	640	2560	2560
MLV+VLP	2284843	10	640	2560	1280
MLV+VLP	2284861	20	1280	1280	1280
MLV+VLP	2284935	40	640	1280	320
MLV+VLP	2284941	80	640	1280	640
MLV+VLP	2284943	20	320	1280	1280
MLV+VLP	2284978	40	1280	1280	1280
MLV+VLP	2285000	80	320	640	640

20

30

MLV：改変生ワクチン（PRIMODOG(商標)5.5log10/mL)

VLP：ウイルス様粒子、500 μ g

40

【実施例6】

【0053】

バキュロウイルス発現CPVキャプシドタンパク質、MLV CPV又はアデノウイルスベクターCDVによるイヌのワクチン免疫

この試験の目的は、種々のルートで投与されたいくつかの用量の種々のワクチン候補物の免疫原性を評価することであった。当該種々の候補物は、CPV VLP、及びCPV又はCDP（イヌジステンパー）遺伝子を発現する組換えアデノウイルスとした。

表7：CPV VLP対アデノCPV対アデノCDV試験の実験設計

グループ		D0及びD28**に投与されたワクチン、用量及びルート	サンプル採取	分析	
A	VLP+_1 (n=6)	VLP CPV 高用量（500μLストック溶液/用量）、SC（1mL）	血液 バイアル： D0、D7、 D14、D21、 D28、D35、 D42、D56 及び D63 ヘパリン 血 バイアル： D7、D31、 D35、D56	抗CDV抗体 の測定 （ELISA 及び/又は 血球凝集阻害）	細胞性 及び/又は Bメモリー 細胞免疫 応答
B	VLP+_2 (n=6)				
C	VLP-** (n=6)	VLP CPV 低用量（50μLストック溶液/用量）、SC（1mL）			
D	VLP_経口 (n=6)	VLP CPV、2mLの未希釈 ストック溶液、経口			
E	Ad5_CPV+ (n=6)	アデノ CPV vAD3032 高用量（標的用量8.64log10 CID50/mL*）、SC（1mL）		抗CDV抗体 の測定 （血清中和）	
F	Ad5_CPV (n=6)	アデノ CPV vAD3032 低用量（標的用量7.64log10 TCID50/mL*）、SC（1mL）			
G	Ad5_CDV- (n=6)	アデノ CDVvAD3031 低用量（標的用量7.34log10 TCID50/mL*）、SC（1mL）			
H	Ad5_CDV+ (n=6)	アデノ CDVvAD3031 高用量（標的用量8.34log10 TCID50/mL*）、SC（1mL）			

10

20

図13に示すように、グループA及びEは防御レベルのCPV抗体力価を仔犬で誘導した。

【実施例7】

【0054】

バキュロウイルス発現CPVキャプシドタンパク質 (VLP)、VLP+RECOMBITEK(商標)C4、RECOMBITEK(商標)C4単独又はNOBIVAC(商標)3によるイヌのワクチン免疫

この試験の目的は、CPV MDAを有するイヌで多様な実験的多価ワクチン処方物の投与後の抗体応答を査定することであった。前記処方物には、通常のCPV-2 MLV又はバキュロウイルス発現CPV-2c組換えウイルス様粒子ワクチン (VLP) 及び競合ワクチン/市販ワクチンが含まれていた。

30

以前にCPVについて妊娠中に免疫した雌犬に由来する、40匹の6-7週齢の母獣由来抗体 (MDA) 陽性ビーグル犬を、同腹仔及び抗体力価を用いて4つのグループ (n=10匹) にランダムに割り当てた。-27日目に収集した血液サンプルの力価を任意抽出に利用した。全てのイヌに下記表にしたがって割り当てたワクチンを21日離して2回接種した。仔犬はD0にCPV母獣由来Ab (MDA) を有する。

表8：CPV VLP対RECOMBITEK(商標)C4及びNOBIVAC(商標)試験の実験設計

グループ	D0及びD21にワクチン接種	力価	犬数
1	CPV VLP 試験ワクチン#4 (1mL) *VLPs CPV-2c	273.5 μ g 総タンパク質 7.1Log HA力価	10
2	CPV VLP #4(0.5mL) *VLP CPV-2c + RECOMBITEK(商標)C4 #1(CDV-CAV-CPi, CPV2)*** (1mL)	273.5 μ g 総タンパク質 7.1Log HA力価 CPV : 6.9TCID ₅₀ /mL CDV : 7.1TCID ₅₀ /mL CPi : 5.8TCID ₅₀ /mL CAV2 : 6.0TCID ₅₀ /mL	10
3	RECOMBITEK(商標)C4 #1(CDV-CAV-CPi, CPV2)*** (1mL)	CPV : 6.9TCID ₅₀ /mL CDV : 7.1TCID ₅₀ /mL CPi : 5.8TCID ₅₀ /mL CAV2 : 6.0TCID ₅₀ /mL	10
4	NOBIVAC(商標)3 (CDV-CAV2-CPV2) (1mL)	不明	10

10

* イヌパルボウイルスVP2のウイルス様粒子：VLP CPV-2c

20

** 同時使用ワクチンと同じ側にほぼ3cm離して投与

***CDV-CAV-CPi-CPV2ワクチンをC4と称する

HA : 0.5mLで血球凝集

血液を0、7、15、21、28、35及び42日目に全てのイヌから収集し、HAI及び血清中和抗体 (SNA) アッセイによってCPV抗体について血清を試験した。

CPV HAI力価は血球凝集を妨げる最高希釈の逆数として示され、<20の値を陰性とみなした。

グループ3 (C4) の2匹のイヌを除いて、各グループの全てのイヌが0日目のワクチン接種前にHAIでCPV陽性であった。ワクチン接種後の血清転換は0日目から4倍以上の力価の増加と定義した。最初のワクチン接種後、VLP-CPV2c (グループ1) をワクチン接種した10匹のうち6匹、及びVLP-CPV2c- C4 (グループ2) をワクチン接種した10匹のイヌのうち6匹が7日目までに血清転換を示した。グループ3及び4 (すなわちVLP非含有) では7日目に応答はなかった。21日目までに、グループ2 (VLP-CPV2c- C4) の10匹のイヌのうち5匹、グループ1 (VLP-CPV2c) の10匹のうち2匹、グループ4 (NOBIVAC3(商標)) の10匹のうち3匹、及びグループ3 (C4) の10匹のうち2匹が血清転換を示した (図15)。

30

二回目のワクチン接種後、35日目 (ワクチン接種後2週間) までに、血清転換が、グループ2 (VLP-CPV2c- C4) 及びグループ4 (NOBIVAC3(商標)) の全てのイヌで、続いてグループ3 (C4) の9匹及びグループ1 (VLP-CPV2c) の8匹で観察された。VLP+C4 (グループ2) 処置は、この試験を通じて最高の幾何平均抗体力価を誘導した。図17を参照されたい。V2から7日後 (28日目)、このグループのGMTは、VLT単独 (GMT=520) より-7.5倍高く、C4単独 (GMT=422) より-9倍高く、NOBIVAC3(商標)グループ (GMT=139) より-28倍高かった。

40

【0 0 5 5】

表9：IDによるIHA力価及びCPV VLP対RECOMBITEK(商標)C4及びNOBIVAC(商標)試験の日

			日にち						
			0	7	15	21	28	35	42
グループ	ワクチン	イヌ ID							
1	VLP CPV-2c	LCR-5	80	40	<20	<20	40	40	40
		LGR-5	40	40	<20	<20	640	1280	1280
		LRR-5	20	160	160	160	10240	1280	1280
		LVQ-5	20	80	80	80	2560	640	640
		QQR-5	20	320	40	20	160	160	160
		RCR-5	40	320	80	20	640	640	640
		RDR-5	20	160	320	640	2560	1280	640
		RGQ-5	20	320	320	320	1280	640	320
		RLQ-5	80	80	40	<20	80	160	320
		RRR-5	80	40	20	<20	80	320	160
2	VLP CPV-2c + rDAPPI	LDR-5	20	160	160	40	5120	1280	640
		LHR-5	40	40	<20	<20	1280	640	640
		LSQ-5	20	1280	1280	640	20480	5120	2560
		LWQ-5	40	160	5120	2560	20480	5120	5120
		PKR-5	40	20	<20	<20	1280	1280	1280
		PLQ-5	40	80	1280	640	20480	5120	5120
		QRR-5	20	160	1280	1280	5120	2560	2560
		RHQ-5	20	320	640	1280	5120	2560	1280
		ROQ-5	40	40	20	<20	320	640	640
		RSQ-5	40	160	40	40	1280	640	320
3	rDAPPI	LPR-5	20	<20	160	160	1280	640	640
		LQR-5	20	<20	160	160	640	640	320
		LTQ-5	20	<20	<20	<20	640	320	640
		PIR-5	20	<20	<20	<20	160	320	640
		POQ-5	<20	<20	<20	<20	1280	640	1280
		QSR-5	40	20	20	<20	160	320	160
		RER-5	<20	<20	<20	<20	640	320	640
		RIQ-5	20	<20	<20	<20	1280	320	640
		RPQ-5	80	40	20	20	<20	<20	<20
		RTQ-5	20	20	<20	<20	640	320	320
4	Nobivac	LER-5	40	20	<20	<20	<20	640	640
		LFR-5	20	<20	<20	<20	640	1280	1280
		LUQ-5	40	20	<20	<20	40	1280	1280
		PJR-5	20	<20	<20	<20	<20	640	640
		QTR-5	40	20	<20	<20	160	2560	1280
		RFR-5	20	<20	1280	640	1280	1280	1280
		RJQ-5	20	<20	80	640	1280	2560	1280
		RKR-5	40	20	20	<20	40	1280	1280
		RQR-5	40	20	<20	<20	160	320	320
		RUQ-5	40	20	20	640	160	320	640

【 0 0 5 6 】

表10：CPV VLP対RECOMBITEK(商標)C4及びNOBIVAC(商標)試験の要約統計量

日	グループ	ワクチン	N	幾何平均	算術平均	中央値	Min	Max
0	1	VLP CPV-2c	10	34.82	42.00	30	20.0	80.0
	2	VLP CPV-2c + rDAPPI	10	30.31	32.00	40	20.0	40.0
	3	rDAPPI	10	24.62	28.00	20	20.0	80.0
	4	Nobivac	10	30.31	32.00	40	20.0	40.0
7	1	VLP CPV-2c	10	113.14	156.00	120	40.0	320.0
	2	VLP CPV-2c + rDAPPI	10	121.26	242.00	160	20.0	1280.0
	3	rDAPPI	10	21.44	22.00	20	20.0	40.0
	4	Nobivac	10	20.00	20.00	20	20.0	20.0
15	1	VLP CPV-2c	10	64.98	110.00	60	20.0	320.0
	2	VLP CPV-2c + rDAPPI	10	226.27	986.00	400	20.0	5120.0
	3	rDAPPI	10	30.31	48.00	20	20.0	160.0
	4	Nobivac	10	34.82	152.00	20	20.0	1280.0
21	1	VLP CPV-2c	10	52.78	132.00	20	20.0	640.0
	2	VLP CPV-2c + rDAPPI	10	171.48	654.00	340	20.0	2560.0
	3	rDAPPI	10	30.31	48.00	20	20.0	160.0
	4	Nobivac	10	56.57	206.00	20	20.0	640.0
28	1	VLP CPV-2c	10	519.84	1828.00	640	40.0	10240.0
	2	VLP CPV-2c + rDAPPI	10	3880.23	8096.00	5120	320.0	20480.0
	3	rDAPPI	10	422.24	674.00	640	20.0	1280.0
	4	Nobivac	10	139.29	380.00	160	20.0	1280.0
35	1	VLP CPV-2c	10	422.24	644.00	640	40.0	1280.0
	2	VLP CPV-2c + rDAPPI	10	1810.19	2496.00	1920	640.0	5120.0
	3	rDAPPI	10	298.57	386.00	320	20.0	640.0
	4	Nobivac	10	970.06	1216.00	1280	320.0	2560.0
42	1	VLP CPV-2c	10	367.58	548.00	480	40.0	1280.0
	2	VLP CPV-2c + rDAPPI	10	1371.87	2016.00	1280	320.0	5120.0
	3	rDAPPI	10	367.58	530.00	640	20.0	1280.0
	4	Nobivac	10	905.10	992.00	1280	320.0	1280.0

*'＜'の記号は要約統計量の計算のために除去した。

【実施例 8】

【0057】

バキュロウイルス発現CPVキャプシドタンパク質（VLP）、VLP+RECOMBITEK(商標)C4、RECOMBITEK(商標)C4単独又はNOBIVAC(商標)3によるイヌのワクチン免疫

この試験の目的は、イヌパルボウイルス2c型のVP2キャプシドタンパク質から形成した実験的ウイルス様粒子を種々の力価で、CPV-2 MLV多価ワクチン処方物及び1つの市販ワクチンと組み合わせてCPV MDAを有するイヌに投与した後でCPV抗体応答を評価することであった。

以前にCPVについて妊娠中に免疫した雌犬に由来する、40匹の6-7週齢の母獣由来抗体（MDA）陽性ビーグル犬を、同腹仔及び抗体力価を用いて5つの処置グループ（n=10匹/グループ）にランダムに割り当てた。-15日目に収集した血液サンプルの力価を任意抽出に利用した。

ワクチンは希釈成分を用いて凍結乾燥成分を再水和することによって調製した。試験ワクチンとして用いた凍結乾燥シリーズ#1、#2、#3及び#5は同じ実験的4-ウエイ（C4）ワクチンであった。各成分の力価は以下の通りであった：CPV：6.1Log TCID50/mL（1X培養の約0.2mL）、CDV：7.3Log TCID50/mL、CPi：5.5Log TCID50/mL、及びCAV2：6.0Log TCID50/mL。全てのイヌに下記表11にしたがって割り当てたワクチンを21日離して2回接種した。

表11：CPV VLP対RECOMBITEK(商標)C4及びNOBIVAC(商標)試験の実験設計

グループ (n=10)	ワクチン凍結乾燥成分	ワクチン希釈成分
1 C4+ 高用量VLP-CPV2c	CDV-CAV2-CPi-CPV	VLP CPV-2c ; lot# : 14Dec15 未希釈 7.0 Log aHA/mL 1X培養の約10mL
2 C4+ 中用量VLP-CPV2c	CDV-CAV2-CPi-CPV	VLP CPV-2c ; lot # : 14Dec15 水で1:5に希釈 6.3 Log aHA/mL 1X培養の約2mL
3 C4+ 低用量VLP- CPV2c	CDV-CAV2-CPi-CPV	VLP CPV-2c ; lot # : 14Dec15 水で1:25に希釈 5.7 Log aHA/mL 1X培養の約0.4mL
4 Nobivac3 DAPv	Nobivac(商標)Canine 3 (CDV- CAV2-CPV2) (1 ml)	不明
5 C4 VLP- CPV2c無し	CDV-CAV2-CPi-CPV	水

血液を0、7、15、21、28、35及び42日目に全てのイヌから収集し、HAIアッセイによってCPV抗体について血清を試験した。

CPV HAI力価は血球凝集を妨げる最高希釈の逆数として示され、<20の値を陰性とみなした。試験した各グループの全てのイヌが0日目のワクチン接種前にHAIでCPV陽性であった（全てのグループのGMT平均力価は42.87から80の間であった）。ワクチン接種後の血清転換は0日目から4倍以上の力価の増加と定義した。血清転換を示したイヌを応答動物として分類した（図18）。最初のワクチン接種から7日後に、高用量のVLP-CPV2c-C4（グループ1）をワクチン接種した10匹のうち5匹、及び中用量のVLP-CPV2c-C4（グループ2）をワクチン接種した10匹のイヌのうち1匹が血清転換を示した。グループ3、4及び5（すなわち低VLP又は無VLPグループ）では7日目に応答はなかった。最初のワクチン接種から21日後に、グループ1（高用量VLP-CPV2c-C4）の全てのイヌ、グループ2（中用量VLP-CPV2c- C4）の10匹のイヌのうち3匹、グループ3（低用量VLP-CPV2c- C4）の10匹のうち1匹が血清転換した。グループ4及び5（すなわちVLPを含まないグループ）では応答はなかった（図18）。

34日目に（二回目のワクチン接種から13日後）、血清転換が、グループ1（高用量VLP-CPV2c-C4）及びグループ4（NOBIVAC3(商標)）の全てのイヌで、続いてグループ2（中用量VLP-CPV2c- C4）の9匹、グループ3（低用量VLP-CPV2c- C4）の6匹、及びグループ5（VLPの無いC4）の1匹が血清転換した。

図19に示すように、高用量VLP+C4（グループ1）処置は、この試験を通して最高の幾何平均抗体力価を誘導した。V2後13日で（34日目）、このグループのGMTは4457.22で、その後中用量VLP-CPV2c-C4及びNOBIVAC3(商標)グループ（GMT=1470.33）、低用量VLP-CPV2c-C4（GMT=298.57）、C4単独（GMT=45.95）が続いた。

【0058】

表12：二回目CPV VLP対RECOMBITEK(商標)C4及びNOBIVAC(商標)試験のグループ、ID及び日にちにおけるHIの結果

10

20

30

40

			日にち						
			0	7	15	21	28	34	42
グループ	*ワクチン	ID							
1	試験ワクチン#1 (rDAPP; C4)+ VLP CPV-2c 7.1Log HA	PFE6	40	320	640	1280	5120	5120	2560
		PRD6	40	5120	5120	2560	5120	5120	2560
		QFC6	40	5120	5120	5120	10240	10240	5120
		QOE6	20	160	2560	2560	10240	5120	5120
		RIE6	80	80	40	20	1280	2560	2560
		RKD6	80	320	1280	640	10240	5120	2560
		SPF6	160	80	2560	1280	10240	10240	5120
		TAF6	80	160	1280	640	10240	5120	5120
		VAF6	80	160	80	80	640	1280	1280
		VCE6	40	80	80	40	5120	2560	2560
		GMT	56.57	298.57	735.17	519.84	5120.00	4457.22	3151.73
2	試験ワクチン#2 (rDAPP; C4)+ VLP CPV-2c 6.4Log HA	PWF6	40	160	320	160	2560	2560	1280
		QBF6	160	160	80	40	640	640	320
		QLE6	40	80	1280	2560	10240	10240	5120
		RJD6	80	80	320	160	2560	1280	1280
		RWE6	80	80	20	<20	80	2560	1280
		RXE6	40	80	20	20	320	640	640
		STE6	80	40	20	20	40	640	320
		SUF6	40	40	40	20	160	5120	2560
		TBF6	80	40	40	40	320	2560	1280
		VDE6	80	40	40	20	40	160	160
		GMT	64.98	69.64	74.64	56.57	393.97	1470.33	905.10

10

20

30

3	試験ワクチン#3 (rDAPP; C4)+ VLP CPV-2c 5.7Log HA	QDE6	80	40	20	20	40	80	80
		QED6	40	40	320	320	2560	2560	1280
		QKE6	40	20	<20	<20	40	160	160
		RGF6	40	80	40	20	40	1280	640
		RPD6	40	40	20	20	40	1280	640
		RTF6	40	40	20	<20	80	1280	1280
		SCE6	20	20	<20	<20	1280	1280	1280
		SQF6	80	40	40	20	40	160	160
		UOE6	40	20	20	<20	40	20	<20
		UXF6	40	40	20	20	20	<20	<20
		GMT	42.87	34.82	30.31	26.39	85.74	298.57	242.51
4	Nobivacイヌ3-DAPv	PCE6	20	<20	<20	<20	40	640	640
		QCF6	80	40	20	<20	<20	2560	640
		RFF6	160	40	20	20	20	1280	640
		RLD6	160	160	20	<20	<20	2560	1280
		ROD6	160	40	20	<20	<20	1280	1280
		SDE6	40	40	20	<20	40	1280	1280
		SWE6	40	20	<20	<20	<20	640	320
		SXE6	40	20	20	<20	<20	1280	1280
		TCE6	160	40	<20	20	<20	2560	1280
		UYF6	160	160	40	40	<20	2560	1280
		GMT	80.00	42.87	21.44	21.44	22.97	1470.33	905.10
5	試験ワクチン#5 (rDAPP; C4)	PBE6	20	<20	<20	<20	80	1280	640
		REF6	80	40	20	<20	<20	<20	<20
		RHE6	160	20	<20	<20	<20	<20	<20
		RUE6	80	80	40	20	<20	<20	<20
		SVF6	160	<20	<20	<20	<20	<20	<20
		TDE6	160	160	40	<20	<20	<20	<20
		ULF6	20	20	<20	<20	<20	320	320
		UPE6	80	20	<20	<20	<20	80	320
		UZF6	160	160	40	20	20	<20	<20
		VPF6	80	20	20	20	<20	<20	<20
		GMT	80.00	37.32	24.62	20.00	22.97	45.95	49.25

*実施例8の目的のために、下記の表及び図表で以下の名称が用いられる。

* C4+高用量VLP-CPV2c=試験ワクチン#1

* C4+中用量VLP-CPV2c=試験ワクチン#2

* C4+低用量VLP-CPV2c=試験ワクチン#3

* C4+無VLP-CPV2c=試験ワクチン#5

【0059】

表13：二回目CPV VLP対RECOMBITEK(商標)C4及びNOBIVAC(商標)試験の要約統計量

10

20

30

40

日	グループ	ワクチン	N	幾何平均	算術平均	中央値	Min	Max
0	1	C4＋高用量VLP-CPV2c	10	56.57	66.00	60	20.0	160.0
	2	C4＋中用量VLP-CPV2c	10	64.98	72.00	80	40.0	160.0
	3	C4＋低用量VLP-CPV2c	10	42.87	46.00	40	20.0	80.0
	4	Nobivacイヌ3-DAPv	10	80.00	102.00	120	20.0	160.0
	5	C4＋無VLP-CPV2c	10	80.00	100.00	80	20.0	160.0
7	1	C4＋高用量VLP-CPV2c	10	298.57	1160.00	160	80.0	5120.0
	2	C4＋中用量VLP-CPV2c	10	69.64	80.00	80	40.0	160.0
	3	C4＋低用量VLP-CPV2c	10	34.82	38.00	40	20.0	80.0
	4	Nobivacイヌ3-DAPv	10	42.87	58.00	40	20.0	160.0
	5	C4＋無VLP-CPV2c	10	37.32	56.00	20	20.0	160.0
15	1	C4＋高用量VLP-CPV2c	10	735.17	1876.00	1280	40.0	5120.0
	2	C4＋中用量VLP-CPV2c	10	74.64	218.00	40	20.0	1280.0
	3	C4＋低用量VLP-CPV2c	10	30.31	54.00	20	20.0	320.0
	4	Nobivacイヌ3-DAPv	10	21.44	22.00	20	20.0	40.0
	5	C4＋無VLP-CPV2c	10	24.62	26.00	20	20.0	40.0
21	1	C4＋高用量VLP-CPV2c	10	519.84	1422.00	960	20.0	5120.0
	2	C4＋中用量VLP-CPV2c	10	56.57	306.00	30	20.0	2560.0
	3	C4＋低用量VLP-CPV2c	10	26.39	50.00	20	20.0	320.0
	4	Nobivacイヌ3-DAPv	10	21.44	22.00	20	20.0	40.0
	5	C4＋無VLP-CPV2c	10	20.00	20.00	20	20.0	20.0
28	1	C4＋高用量VLP-CPV2c	10	5120.00	6848.00	7680	640.0	10240.0
	2	C4＋中用量VLP-CPV2c	10	393.97	1696.00	320	40.0	10240.0
	3	C4＋低用量VLP-CPV2c	10	85.74	418.00	40	20.0	2560.0
	4	Nobivacイヌ3-DAPv	10	22.97	24.00	20	20.0	40.0
	5	C4＋無VLP-CPV2c	10	22.97	26.00	20	20.0	80.0
34	1	C4＋高用量VLP-CPV2c	10	4457.22	5248.00	5120	1280.0	10240.0
	2	C4＋中用量VLP-CPV2c	10	1470.33	2640.00	1920	160.0	10240.0
	3	C4＋低用量VLP-CPV2c	10	298.57	812.00	720	20.0	2560.0
	4	Nobivacイヌ3-DAPv	10	1470.33	1664.00	1280	640.0	2560.0
	5	C4＋無VLP-CPV2c	10	45.95	182.00	20	20.0	1280.0
42	1	C4＋高用量VLP-CPV2c	10	3151.73	3456.00	2560	1280.0	5120.0
	2	C4＋中用量VLP-CPV2c	10	905.10	1424.00	1280	160.0	5120.0
	3	C4＋低用量VLP-CPV2c	10	242.51	556.00	400	20.0	1280.0
	4	Nobivacイヌ3-DAPv	10	905.10	992.00	1280	320.0	1280.0
	5	C4＋無VLP-CPV2c	10	49.25	142.00	20	20.0	640.0

【 0 0 6 0 】

表14：グループ及び日数による応答動物（血清転換）数（1=Yes、0=No；血清転換は基準線から4倍以上の力価の増加と定義する）

10

20

30

40

			日にち						
			0	7	15	21	28	34	42
グループ	ワクチン	ID							
1	C4＋高用量VLP-CPV2c	PFE6	0	1	1	1	1	1	1
		PRD6	0	1	1	1	1	1	1
		QFC6	0	1	1	1	1	1	1
		QOE6	0	1	1	1	1	1	1
		RIE6	0	0	0	0	1	1	1
		RKD6	0	1	1	1	1	1	1
		SPF6	0	0	1	1	1	1	1
		TAF6	0	0	1	1	1	1	1
		VAF6	0	0	0	0	1	1	1
		VCE6	0	0	0	0	1	1	1
		合計	0	5	7	7	10	10	10
2	C4＋中用量VLP-CPV2c	ID							
		PWF6	0	1	1	1	1	1	1
		QBF6	0	0	0	0	1	1	1
		QLE6	0	0	1	1	1	1	1
		RJD6	0	0	1	1	1	1	1
		RWE6	0	0	0	0	0	1	1
		RXE6	0	0	0	0	1	1	1
		STE6	0	0	0	0	0	1	1
		SUF6	0	0	0	0	1	1	1
		TBF6	0	0	0	0	1	1	1
		VDE6	0	0	0	0	0	0	0
		合計	0	1	3	3	7	9	9
3	C4＋低用量VLP-CPV2c	ID							
		QDE6	0	0	0	0	0	0	0
		QED6	0	0	1	1	1	1	1
		QKE6	0	0	0	0	0	1	1
		RGF6	0	0	0	0	0	1	1
		RPD6	0	0	0	0	0	1	1
		RTF6	0	0	0	0	0	1	1
		SCE6	0	0	0	0	1	1	1
		SQF6	0	0	0	0	0	0	0
		UOE6	0	0	0	0	0	0	0
		UXF6	0	0	0	0	0	0	0
		合計	0	0	1	1	2	6	6

10

20

30

40

4	Nobivac(商標)イヌ3-DAPv	ID							
		PCE6	0	0	0	0	0	1	1
		QCF6	0	0	0	0	0	1	1
		RFF6	0	0	0	0	0	1	1
		RLD6	0	0	0	0	0	1	1
		ROD6	0	0	0	0	0	1	1
		SDE6	0	0	0	0	0	1	1
		SWE6	0	0	0	0	0	1	1
		SXE6	0	0	0	0	0	1	1
		TCE6	0	0	0	0	0	1	1
		UYF6	0	0	0	0	0	1	1
		合計	0	0	0	0	0	10	10
5	C4+ 無VLP-CPV2c	ID							
		PBE6	0	0	0	0	1	1	1
		REF6	0	0	0	0	0	0	0
		RHE6	0	0	0	0	0	0	0
		RUE6	0	0	0	0	0	0	0
		SVF6	0	0	0	0	0	0	0
		TDE6	0	0	0	0	0	0	0
		ULF6	0	0	0	0	0	1	1
		UPE6	0	0	0	0	0	0	1
		UZF6	0	0	0	0	0	0	0
		VBF6	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	1	2	3

したがって、CPV VLPは、MDA+の仔犬でMLV単独よりも早期の免疫開始（00I）を促し、さらにCPV VLPはMDA+の仔犬でMLV C4と相乗的に働く。出願人らは、これらの結果は予想に反しかつ極めて有利であると提起する。母犬由来抗体に勝ることはワクチン研究者にとって長らく困難な課題であった。これらのデータは、本明細書に開示したVLP+MLVのアプローチは、MDA+の仔孫に防御免疫を提供するという課題に広範囲に適用可能であることを示している。

10

20

30

【図 1】

配列番号	タイプ	遺伝子の説明
1	タンパク質	CPV VP2 - GenBank BAD34656.1
2	DNA	pVL1393-9632bpバキュロウイルストランスファベクター
3	タンパク質	CPV VP2 Sauriou (血清型2c)
4	タンパク質	pMEB072中の非切端CPV VP2
5	DNA	CPV VP2をコードするpMEB072コドン最適化核酸 (配列番号:4)
6	タンパク質	pMEB073中の切端CPV VP2
7	DNA	CPV VP2をコードするpMEB073コドン最適化核酸 (配列番号:6)
8	タンパク質	GenBank: AHW47988.1 (a CPV VP2)
9	タンパク質	GenBank: AHW47989.1 (a CPV VP2)
10	タンパク質	GenBank: ADA61118.1 (a CPV VP2)
11	DNA	pMEB072
12	DNA	pMEB073

FIG. 1

【図 2】

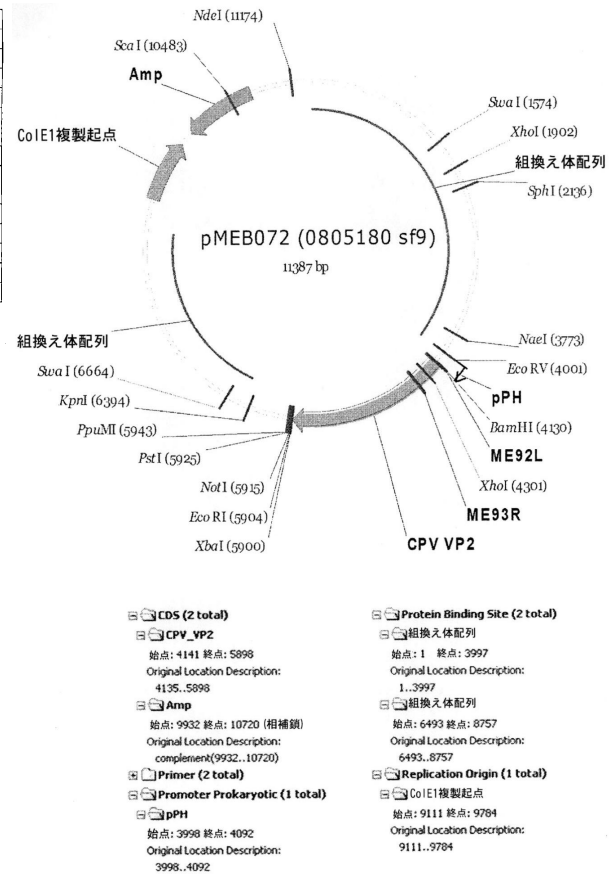


FIG. 2

【図 3】

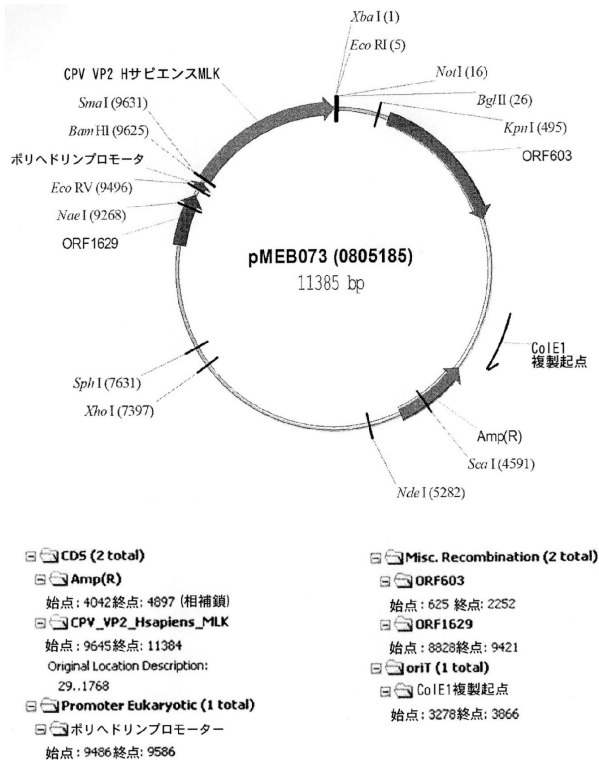


FIG. 3

【図 4】

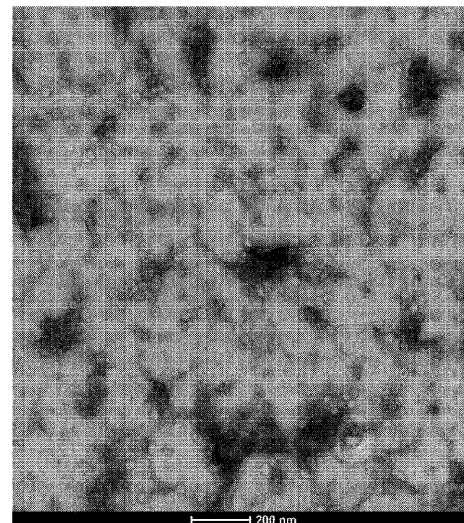
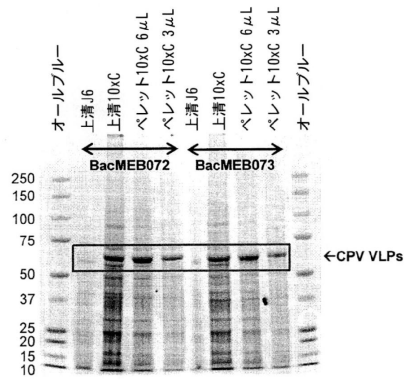


FIG. 4

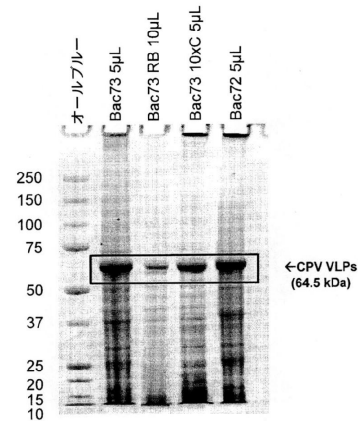
【図 5】



バッチ	工程	VLPバンド	合計	% VLPs
BacMEB072	D6上清	3	28	11
	10X 濃縮上清	20	90	22
	ペレット6μL	41	79	52
	ペレット3μL	22	52	42
BacMEB073	D6上清	2	11	18
	10X 濃縮上清	31	121	26
	ペレット6μL	35	64	55
	ペレット3μL	17	34	50

FIG. 5

【図 6】



サンプル名称	SDSによる 概算純度	総タンパク質 μg/mL	[CPV VLPs] μg/ml	ELISA力価 (Log10) D050/mL
CPV VLP BacMEB073 P4 10X 濃縮	53%	2122	1134	5.48
CPV VLP BacMEB073 P5	54%	503	273	4.99
CPV VLP BacMEB073 P5 10X 濃縮	55%	1986	1096	5.60
CPV VLP BacMEB072 P4 10X 濃縮	43%	2410	1041	5.67

FIG. 6

【図 7】

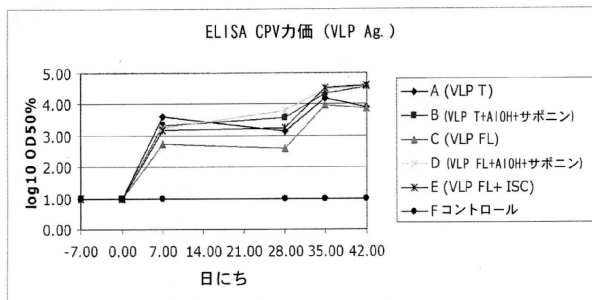


FIG. 7

【図 9】

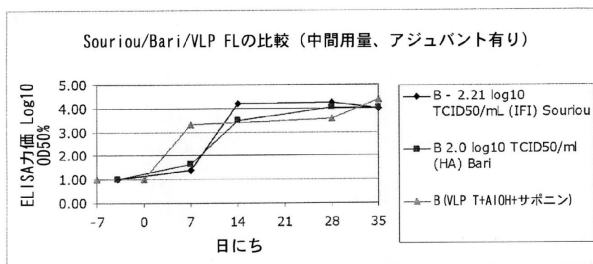


FIG. 9

【図 8】

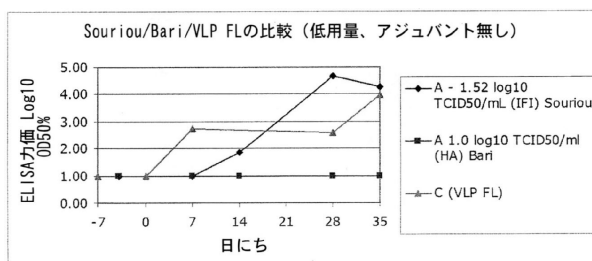


FIG. 8

【図 10】

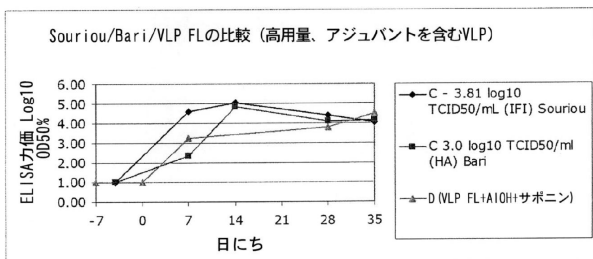


FIG. 10

【図 1 1】

配列番号 1 MSDGAVQPDGGQFAVRNERATGSGNGSGGGGGGGGGGGVIGTGTENNQTEFKFLENGWVE 60
 配列番号 3 MSDGAVQPDGGQFAVRNERATGSGNGSGGGGGGGGGGGVIGTGTENNQTEFKFLENGWVE 60
 配列番号 4 MSDGAVQPDGGQFAVRNERATGSGNGSGGGGGGGGGGGVIGTGTENNQTEFKFLENGWVE 60
 配列番号 5 -----MLKGGQFAVRNERATGSGNGSGGGGGGGGGGGVIGTGTENNQTEFKFLENGWVE 54

 配列番号 1 ITANSSRLVHLNMPESSENYRRVVNNLDKTAVNGMALDDTHACIVTPWPSLVDAWAGVW 120
 配列番号 3 ITANSSRLVHLNMPESSENYRRVVNNLDKTAVNGMALDDTHACIVTPWPSLVDAWAGVW 120
 配列番号 4 ITANSSRLVHLNMPESSENYRRVVNNLDKTAVNGMALDDTHACIVTPWPSLVDAWAGVW 120
 配列番号 5 ITANSSRLVHLNMPESSENYRRVVNNLDKTAVNGMALDDTHACIVTPWPSLVDAWAGVW 114

 配列番号 1 FNGDWQLIVNTMSELHLVSFEQSEIFNVVLKTVSSATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSN 180
 配列番号 3 FNGDWQLIVNTMSELHLVSFEQSEIFNVVLKTVSSATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSN 180
 配列番号 4 FNGDWQLIVNTMSELHLVSFEQSEIFNVVLKTVSSATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSN 180
 配列番号 5 FNGDWQLIVNTMSELHLVSFEQSEIFNVVLKTVSSATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSN 174

 配列番号 1 NIMFTTAAARSETLGFYFWKPTIPTPWRYFQWDRLLIPSHHTSGTPTNIYHGTDPDD 240
 配列番号 3 NIMFTTAAARSETLGFYFWKPTIPTPWRYFQWDRLLIPSHHTSGTPTNIYHGTDPDD 240
 配列番号 4 NIMFTTAAARSETLGFYFWKPTIPTPWRYFQWDRLLIPSHHTSGTPTNIYHGTDPDD 240
 配列番号 5 NIMFTTAAARSETLGFYFWKPTIPTPWRYFQWDRLLIPSHHTSGTPTNIYHGTDPDD 234

 配列番号 1 VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFEFDCKPCRLTHWTQNRALGLPFFINSLPOAEGG 300
 配列番号 3 VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFEFDCKPCRLTHWTQNRALGLPFFINSLPOAEGG 300
 配列番号 4 VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFEFDCKPCRLTHWTQNRALGLPFFINSLPOAEGG 300
 配列番号 5 VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFEFDCKPCRLTHWTQNRALGLPFFINSLPOAEGG 294

 配列番号 1 TNFGYIGVQDKRRGVTQMGNTNVIYIATIMRPAEVGYSAPYYSFEASTQGPFTPIAAG 360
 配列番号 3 TNFGYIGVQDKRRGVTQMGNTNVIYIATIMRPAEVGYSAPYYSFEASTQGPFTPIAAG 360
 配列番号 4 TNFGYIGVQDKRRGVTQMGNTNVIYIATIMRPAEVGYSAPYYSFEASTQGPFTPIAAG 360
 配列番号 5 TNFGYIGVQDKRRGVTQMGNTNVIYIATIMRPAEVGYSAPYYSFEASTQGPFTPIAAG 354

 配列番号 1 RGAQTQDENQAADGDPYAFGRHQGKTTTGTETPERFTYIAHQDTGRYPEGDWQININ 420
 配列番号 3 RGAQTQDENQAADGDPYAFGRHQGKTTTGTETPERFTYIAHQDTGRYPEGDWQININ 420
 配列番号 4 RGAQTQDENQAADGDPYAFGRHQGKTTTGTETPERFTYIAHQDTGRYPEGDWQININ 420
 配列番号 5 RGAQTQDENQAADGDPYAFGRHQGKTTTGTETPERFTYIAHQDTGRYPEGDWQININ 414

 配列番号 1 NLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGLTALNNVPPVYVNGQIWDKEFDTDLKP 480
 配列番号 3 NLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGLTALNNVPPVYVNGQIWDKEFDTDLKP 480
 配列番号 4 NLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGLTALNNVPPVYVNGQIWDKEFDTDLKP 480
 配列番号 5 NLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGLTALNNVPPVYVNGQIWDKEFDTDLKP 474

 配列番号 1 RLHVNAFVQCQNNCPGQLEVKVAPNLTNEYDPPDASANMSRIVTYSDFWKKGLVFKAKLR 540
 配列番号 3 RLHVNAFVQCQNNCPGQLEVKVAPNLTNEYDPPDASANMSRIVTYSDFWKKGLVFKAKLR 540
 配列番号 4 RLHVNAFVQCQNNCPGQLEVKVAPNLTNEYDPPDASANMSRIVTYSDFWKKGLVFKAKLR 540
 配列番号 5 RLHVNAFVQCQNNCPGQLEVKVAPNLTNEYDPPDASANMSRIVTYSDFWKKGLVFKAKLR 534

 配列番号 1 ASHTWNPIQOMSINVNDQFNYPVPSNIGGMKIVVEKSQLAPRKLY 584
 配列番号 3 ASHTWNPIQOMSINVNDQFNYPVPSNIGGMKIVVEKSQLAPRKLY 584
 配列番号 4 ASHTWNPIQOMSINVNDQFNYPVPSNIGGMKIVVEKSQLAPRKLY 584
 配列番号 5 ASHTWNPIQOMSINVNDQFNYPVPSNIGGMKIVVEKSQLAPRKLY 578

FIG. 11

【図 1 2】

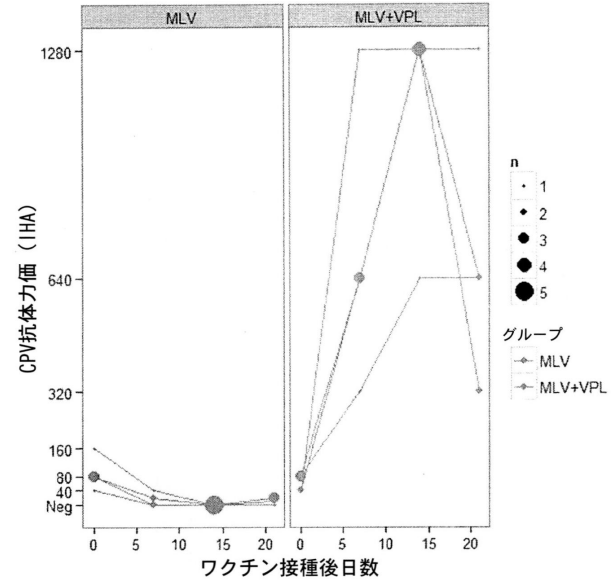


FIG. 12

【図 1 3】

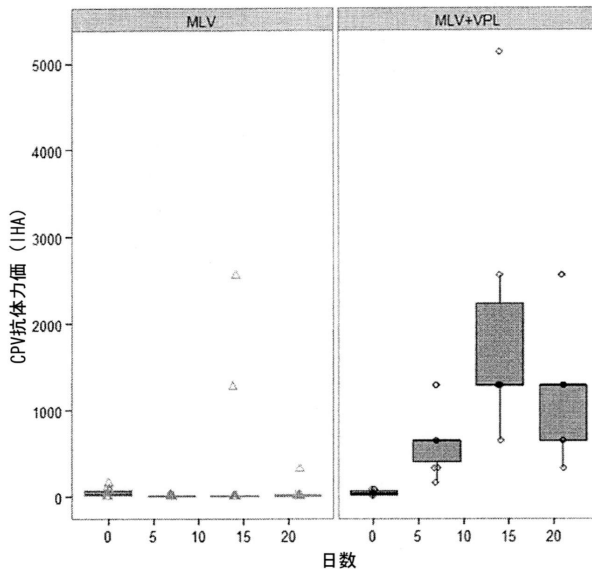


FIG. 13

【図 1 4】

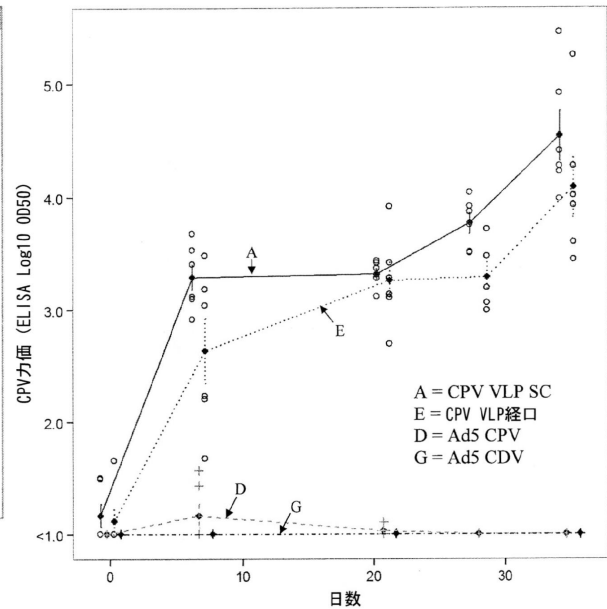
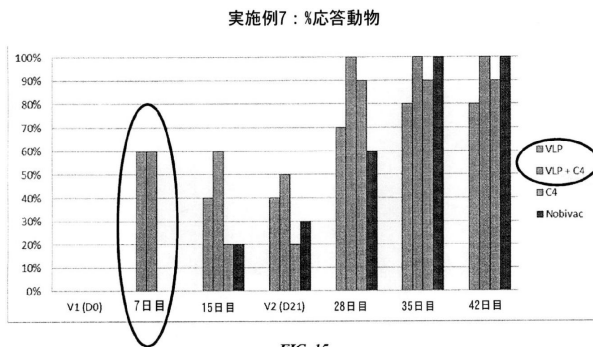
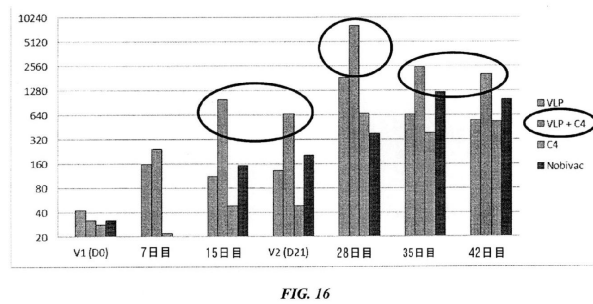


FIG. 14

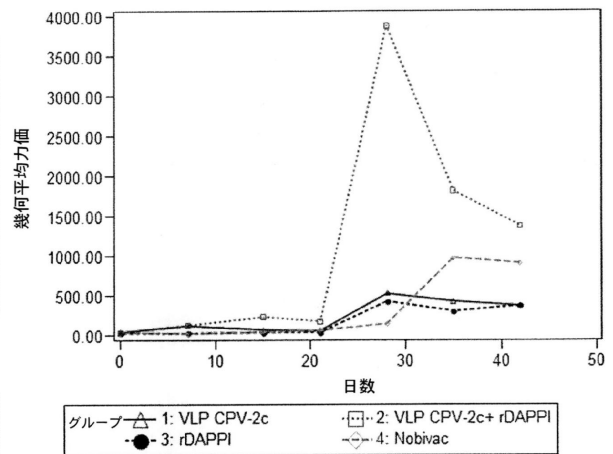
【図 15】



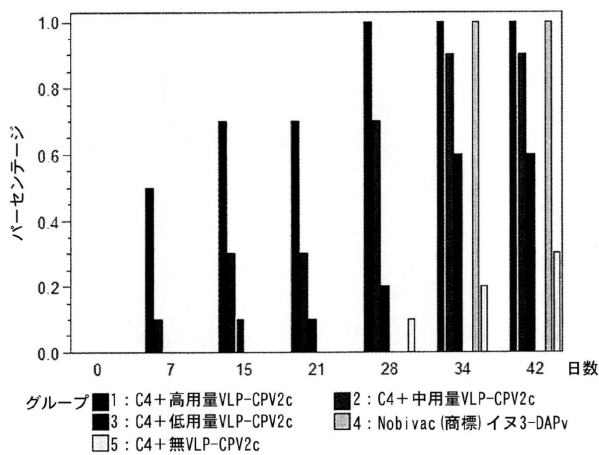
【図 16】



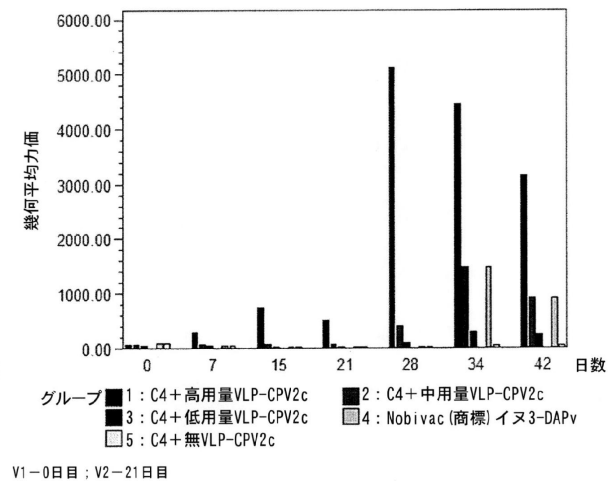
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【配列表】

0006818748000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C
- (74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
- (74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄
- (72)発明者 デイヴィッド フレデリック
アメリカ合衆国 ジョージア州 3 0 6 7 7 ワトキンスヴィル クリスティアン テラス 1 1
3 0
- (72)発明者 アンナスージェバーラ ザヒア
フランス 6 9 3 4 0 フランシェヴィル リュー デ ショー 4 レ バスティデ デュ ヴ
ァロン
- (72)発明者 プレ エルヴェ
フランス 6 9 1 1 0 サント フォワ レ リヨン プラース デ キャトル ヴィエルジュ
2
- (72)発明者 ミンケ ジュール マールテン
フランス 0 6 2 0 0 ニース アヴニユ ド ラ カリフォルニ 1 2

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0052082 (US, A1)
国際公開第2014/016362 (WO, A1)
Appl. Microbiol. Biotechnol. (2014) vol.98, issue 8, p.3529-3538
PLoS One (2014) vol.9 issue 1, e79575
Antiviral Res. (2012) vol.96, issue 3, p.288-295

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 3 9 /
C 1 2 N 1 5 / 3 5
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
D W P I (D e r w e n t I n n o v a t i o n)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q