

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7354106号
(P7354106)

(45)発行日 令和5年10月2日(2023.10.2)

(24)登録日 令和5年9月22日(2023.9.22)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/193 (2006.01)

A 6 1 K 39/193

A 6 1 K 39/39 (2006.01)

A 6 1 K 39/39

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 31/14

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01

Z N A

C 1 2 N 15/86 (2006.01)

C 1 2 N 15/86

Z

請求項の数 15 (全35頁)

(21)出願番号 特願2020-530342(P2020-530342)

(86)(22)出願日 平成30年12月3日(2018.12.3)

(65)公表番号 特表2021-505558(P2021-505558
A)

(43)公表日 令和3年2月18日(2021.2.18)

(86)国際出願番号 PCT/EP2018/083297

(87)国際公開番号 WO2019/110481

(87)国際公開日 令和1年6月13日(2019.6.13)

審査請求日 令和2年12月1日(2020.12.1)

(31)優先権主張番号 62/607,101

(32)優先日 平成29年12月18日(2017.12.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/594,342

(32)優先日 平成29年12月4日(2017.12.4)

最終頁に続く

(73)特許権者 510000976

インターベット インターナショナル ベ
ー、 フェー、オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボ
ツクスメール、ウイム・ドウ・コルベル
ストラート・3 5

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レプリコン粒子および油性アジュバントによるワクチン接種

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子を含むワクチンであって、ここで、前記ワクチンは、油性アジュバントをも含み、ここで、油性アジュバントが、流動パラフィン油である鉱油、及び、ビタミンE-アセテートである非鉱油を含む、ワクチン。

【請求項 2】

前記油性アジュバント中の鉱油の量が、油性アジュバントの1～70% v/vである、請求項1に記載のワクチン。

【請求項 3】

前記油性アジュバント中の非鉱油の総量が、油性アジュバントの0.1～30% w/vである、請求項1または2に記載のワクチン。

【請求項 4】

前記油性アジュバントが、水中油型エマルジョンとして処方される、請求項1～3のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 5】

前記油性アジュバントのエマルジョンが、乳化剤を含む、請求項4に記載のワクチン。

【請求項 6】

前記乳化剤が、ポリソルベートを含む、請求項5に記載のワクチン。

【請求項 7】

前記ポリソルベートが、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレートである、請求項 6 に記載のワクチン。

【請求項 8】

前記アルファウイルス RNA レプリコン粒子が、ベネズエラ馬脳炎（VEE）アルファウイルス RNA レプリコン粒子である、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 9】

動物病原体が、魚、鳥および哺乳動物から成る群から選択される動物の病原体である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 10】

前記哺乳動物がブタである、請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 11】

前記鳥が、ニワトリまたはシチメンチョウである、請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 12】

前記魚が、シクリッド科の一員である、請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 13】

少なくとも 2 つの容器を含むキットであって、ここで少なくとも一方の容器が、動物病原体を由来とする抗原をコードしているベネズエラ馬脳炎（VEE）アルファウイルス RNA レプリコン粒子を含み、そして、少なくとも一方の容器が、流動パラフィン油である鉱油及びビタミン E - アセテートである非鉱油を含む油性アジュバントを含む、キット。

【請求項 14】

非ヒト動物を免疫化する方法であって、免疫学的有効量の請求項 1 ～ 12 のいずれかのワクチンを前記非ヒト動物へ投与することを含む方法。

【請求項 15】

非ヒト動物病原体を由来とする抗原をコードしているベネズエラ馬脳炎（VEE）アルファウイルス RNA レプリコン粒子を含むワクチンの免疫学的有効量を、非ヒト動物に投与することを含む、非ヒト動物を免疫化する方法であって、ここで、前記アルファウイルス RNA レプリコン粒子は、流動パラフィン油である鉱油及びビタミン E - アセテートである非鉱油を含む油性アジュバントとの同時使用または並行使用により非ヒト動物の身体内または身体上に投与される、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルファウイルスレプリコン RNA 粒子および油性アジュバントを使用した動物病原体に対するワクチン接種に関する。ワクチン、ならびに、レプリコン粒子および油性アジュバントを含むキットおよびパーツに関する。また、ワクチンとそのキットの構成要素を作製および使用する方法および使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

動物病原体から防御する目的で、ベクターに基づく多くの戦略がワクチンのために長年にわたり採用されてきた。こうしたベクター戦略の 1 つには、アルファウイルス由来のレプリコン RNA 粒子（RP）の使用 [Vander Veen, et al. Anim Health Res Rev. 13 (1) : 1-9 (2012) doi: 10.1017/S1466252312000011, Kamrud et al., J Gen Virol. 91 (Pt 7) : 1723-1727 (2010)] を含む。これは、ベネズエラ馬脳炎ウイルス（VEE）[Pushko et al., Virology 239 : 389-401 (1997)]、シンドビスウイルス [Bredenbeek et al., Journal of Virology 67 : 6439-6446 (1993)] およびセムリキフォレストウイルス [Liljestrom and Garoff, Biotechnology (NY) 9 : 1356-361 (1991)] を含む、いくつかの異なるアルファウイルスから開発されたものである。標的のヒトまたは動物細胞が感染

10

20

30

40

50

した後、レプリコン粒子によりコードされた病原性抗原が発現される。結果は、発現した抗原に対する防御抗体が誘導される。RPは、いくつかの伝統的なワクチン製剤と比較すると、魅力的な安全性および有効な特性を有する[Vander Veen, et al., Anim Health Res Rev. 13 (1) : 1-9 (2012)]。RPプラットフォームは、いくつかのUSDAにより認可されたワクチンを基にしており、これにはブタ流行性下痢ワクチン、RNA粒子（製品コード19U5P1）、ブタインフルエンザワクチン、RNA（製品コード19A5D0）、鳥インフルエンザワクチン、RNA（製品コード19O5D0）および医療用薬品、RNA粒子（製品コード9PP000）を含む。

【0003】

アルファウイルス由来のレプリコンRNA粒子は、アルファウイルス構造タンパク質遺伝子を欠損しているが、細胞質RNAの自己増幅に必要な複製要素および高度活性26Sアルファウイルスのサブゲノムプロモータにより駆動される、挿入された異種核酸の発現を維持する。したがって、RPは単一サイクルの感染性粒子であり、構造タンパク質遺伝子が欠如しているため複製に欠陥がある[Lundstrom, Vaccines 6 : 2392-2415 (2014)]。このため、レプリコン粒子のパッケージングおよび産生に必要な構造タンパク質は、RPを産生するために適切な宿主細胞中にて異なる分子間に提供されなければならない[Vajdy et al., Immunol. and Cell Biol. 82 : 617-627 (2004)を参照されたい]。構造タンパク質は、一般的に、レプリコンRNAおよび構造タンパク質をコードした1種以上の「ヘルパー」RNAを、一過性で同時トランスフェクションすることにより提供される。代替的には、RPは、1種以上のDNA発現カセットより構成的または一過性にウイルス性構造タンパク質を発現する、パッケージング細胞株から産生され得る。このようにして、レプリコン粒子の産生物は、得られるRPゲノム内に構造タンパク質を含まないため、ベクターの複製欠陥性質を維持する[Pollo et al., Dev. Biol., 104 : 181-185 (2000)]。こうした複製欠陥があるアルファウイルスRNAレプリコン粒子は、標的となるヒトまたは動物の免疫化に使用する際に、インビボで防御免疫応答を誘導する。例えば、VEEを基とするアルファウイルスベクターは、マウスおよびそれよりも大きな動物の全身免疫化の後、強力な粘膜および全身免疫応答を誘発する[Davis et al., IUBMB Life 53 : 209-211 (2002)]。

【0004】

アジュバントは、標的のヒトまたは動物の免疫系に対し、非特異的な刺激を提供することが可能な既知の化合物である。標準的なアジュバントの使用は、不活化またはサブユニット抗原を基とするワクチン中においてである。様々なアジュバントの種類および組成物が存在し：例えば、水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムのようなアルミニウム塩、リポソーム、グルカン、アルギネート、細胞壁成分のような細菌性成分、鉱油または非鉱油、非イオン性ブロックポリマーのような合成アジュバント、硫酸デキストランのようなポリアミン、Carbopol（商標）、ピランおよびQuil A（商標）、Q-vac（商標）のようなサポニンである。ISCOM（商標）においては、サポニンおよびワクチン成分が組み合わされていてよい。

【0005】

更には、ムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、タフトシンのようなペプチドが、多くの場合アジュバントとして使用されている。同様に、ISA（商標）組成物（Seppic, France）のような組合せ製品が使用されている。

【0006】

アジュバントおよびその使用と効果に関するハンドブックは、“Vaccine adjuvants” (Methods in molecular medicine, vol. 42, D. O’Hagan ed., 2000, Humana press, NJ, ISBN : 0896037355) である。

【0007】

本明細書における任意の参照の引用は、そのような参照が本出願の「先行技術」として利用可能であることの承認として解釈されるべきではない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】Vander Veen, et al. Anim Health Res Rev . 13 (1) : 1-9 (2012) doi:10.1017/S1466252312000011

Kamrud et al., J Gen Virol. 91 (Pt 7) : 1723-1727 (2010)

Pushko et al., Virology 239:389-401 (1997)

Bredenbeek et al., Journal of Virology 67: 6439-6446 (1993)

Liljestrom and Garoff, Biotechnology (NY) 9: 1356-361 (1991)

Vander Veen, et al., Anim Health Res Rev. 13 (1) : 1-9 (2012)

Lundstrom, Vaccines 6:2392-2415 (2014)

Vajdy et al., Immunol. and Cell Biol. 82:617-627 (2004)

Polo et al. Dev. Biol., 104:181-185 (2000)

Davis et al., IUBMB Life 53:209-211 (2002)

“Vaccine adjuvants” (Methods in molecular medicine, vol. 42, D. O’Hagan ed., 2000, Humana press, NJ, ISBN:0896037355)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、動物病原体を由来とする抗原をコードしている、アルファウイルスRNAレプリコン粒子を含むワクチンを提供し、ここで、該ワクチンは、油性アジュバントをも含む。

【0010】

本発明のワクチンの一実施形態では、油性アジュバントは、鉱油および非鉱油から選択される少なくとも1種の油を含む。

【0011】

本発明のワクチンの一実施形態では、油性アジュバントは鉱油を含み、好ましくは、鉱油は流動パラフィン油である。

【0012】

本発明のワクチンの一実施形態では、油性アジュバントは非鉱油を含み、好ましくは、非鉱油は、合成油、半合成油、動物油および植物油から選択される。より好ましくは、非鉱油は、スクアラン、スクアレノ、トコフェロールおよび植物油から選択される。一実施形態では、トコフェロールは、アルファートコフェロールであり、より好ましくは、アルファートコフェロールは、ビタミンEおよびビタミンE-アセテートから選択される。一実施形態では、植物油はオレアートであり、より好ましくはエチルーオレアートである。

【0013】

より好ましくは、非鉱油はスクアランである。

【0014】

本発明のワクチンの好ましい実施形態では、油性アジュバントは、2種以上の油を含む。

【0015】

2種以上の油を含む油性アジュバントの一実施形態では、アジュバントは鉱油および1

10

20

30

40

50

種以上の非鉱油を含む。より好ましくは、油性アジュバントは、鉱油として流動パラフィン油と、スクアラン、スクアレン、ビタミンE、ビタミンE-アセテート、オレアートおよびエチル-オレアートから選択される1種以上の非鉱油と、を含む。一層より好ましくは、油性アジュバントは、流動パラフィン油およびビタミンE-アセテートを含む。最も好ましくは、油性アジュバントは、X S o l v e（商標）である。

【0016】

2種以上の油を含む油性アジュバントの代替的实施形態では、アジュバントは、2種以上の非鉱油を含む。好ましくは、油性アジュバントは、スクアラン、スクアレン、ビタミンE、ビタミンE-アセテート、オレアートおよびエチル-オレアートから選択される2種以上の非鉱油を含む。一層より好ましくは、油性アジュバントは、スクアランおよびビタミンE-アセテートを含む。最も好ましくは、油性アジュバントはS V E A（商標）である。

10

【0017】

本発明のワクチンの一実施形態では、油性アジュバント中の鉱油量は、油性アジュバントの1~70% v/vである。好ましくは、油性アジュバントは、油性アジュバントの5~60% v/vの量の鉱油を含む。

【0018】

本発明のワクチンの一実施形態では、非鉱油の総量は、油性アジュバントの0.1~30% w/vである。好ましくは、油性アジュバントは、油性アジュバントの0.5~25% v/vの非鉱油の総量を含む。

20

【0019】

一実施形態では、非鉱油がスクアランを含むとき、油性アジュバントは、油性アジュバントの0.5~30% w/vでスクアランを含み；より好ましくは、油性アジュバントは、1~25% w/v、2~15% w/vでスクアランを含むか、または油性アジュバントの3~10% w/vでもスクアランを含む。

【0020】

代替的にはまたは追加的には、非鉱油がビタミンE-アセテートを含む場合の一実施形態では、油性アジュバントは、油性アジュバントの0.1~30% w/vでビタミンE-アセテートを含み、より好ましくは、油性アジュバントは0.5~20% w/v、1~16% w/vでビタミンE-アセテートを含み、または油性アジュバントの2~10% w/vでもビタミンE-アセテートを含む。

30

【0021】

本発明のワクチンの一実施形態では、油性アジュバントは、油相と水相のエマルジョンとして処方されている。好ましくは、油性アジュバントは、水中油型（O/W）エマルジョンとして処方されている。

【0022】

一実施形態では、水相は、薬学的に許容される品質の水を含む。

【0023】

一実施形態では、油性アジュバントのエマルジョンは、マイクロエマルジョンとして処方されており、ここで、内部相の液滴は1マイクロメートル未満である。好ましくは、マイクロエマルジョンは、O/Wエマルジョンであり、より好ましくは、O/Wマイクロエマルジョンは、高エネルギー均質化を使用して調製され、更により好ましくは、マイクロフルイダイゼーションの方法によって調製される。

40

【0024】

本発明のワクチンの一実施形態では、油性アジュバントのエマルジョンは乳化剤を含み、好ましくは、乳化剤はポリソルベートを含み、より好ましくは、乳化剤はポリソルベート80を含む。

【0025】

一実施形態では、本発明のワクチンは油性アジュバントのエマルジョンを含み、好ましくは、ワクチンは、O/Wエマルジョンとして処方された油性アジュバントを含む。

50

【0026】

本発明のワクチンの一実施形態では、ワクチンは水中油型（O/W）エマルジョンとして処方されている。

【0027】

本発明のワクチンの一実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子は、ベネズエラ馬脳炎（VEE）アルファウイルスRNAレプリコン粒子である。更に特定の実施形態では、VEEアルファウイルスRNAレプリコン粒子は、TC-83VEEアルファウイルスRNAレプリコン粒子である。他の実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子は、シンドビス（Sindbis）アルファウイルスRNAレプリコン粒子である。更に他の実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子は、セムリキフォレスト（Semliki Forest）ウイルスアルファウイルスRNAレプリコン粒子である。

10

【0028】

本発明のワクチンの一実施形態では、動物病原体を由来とするコードされた抗原向けには、動物病原体は、ウイルス、細菌、寄生虫、原虫、真菌、リケッチアおよびプリオンから選択される。より好ましくは、コードされた動物病原体を由来とする抗原は、ウイルスまたは細菌由来である抗原である。最も好ましくは、抗原はウイルスに由来する。

【0029】

本発明のワクチンの一実施形態では、RPは、動物病原体を由来とする抗原をコードし、これにより、動物は、獣医科学に関連する動物である。好ましくは、動物は、魚、鳥および哺乳動物から選択される。より好ましくは、動物は、野生動物、家畜動物またはペット用動物である。家畜動物は、魚、鳥、ブタまたは反芻動物であり；好ましくは、ブタ（porcine）はブタ（pig）であり；好ましくは、鳥は、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラまたはダチョウであり；好ましくは、反芻動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、バッファロー、ラクダまたはシカであり；好ましくは、魚は、硬骨魚類でヒレを有するものであり、より好ましくは、サケ科の魚またはシクリッドの魚（すなわち、シクリッド科の一員）である。サケ科の魚は、タイセイヨウサケ、スチールヘッドサケ、マスノスケ、ギンザケ、カラフトマス、シロサケおよびベニザケ、ニジマス、カワマス、レイクトラウトおよびブラントラウトならびにイワナから好ましくは選択される。シクリッドの魚は、好ましくはティラピアである。ペット用動物は好ましくは、ネコ、イヌおよびウマから選択される。より好ましくは、動物はティラピア、ニワトリまたはブタである。

20

30

【0030】

本発明のワクチンの一実施形態では、本発明の動物病原体を由来とする抗原をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列は、ワクチン用に標的動物種の細胞内で発現する目的で最適化されている。一実施形態では、ヌクレオチド配列最適化はコドン最適化である。一実施形態では、ヌクレオチド配列最適化は、RNA転写の二次構造を最適化するものである。

【0031】

好ましい実施形態では、本発明の動物病原体を由来とする抗原をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列最適化は、コドン使用法およびRNA転写の二次構造の両方に関連する。好ましくは、ヌクレオチド配列最適化は、米国特許第7,561,972号、米国特許第7,561,973号、米国特許第7,805,252号および米国特許第8,126,653号のうち1つ以上に記載された手順に従って行われる。

40

【0032】

本発明のワクチンの詳細な好ましい実施形態では、油性アジュバントは鉱油および非鉱油を含み、ワクチンはO/Wエマルジョンとして処方され、アルファウイルスRNAレプリコン粒子はVEEアルファウイルスRNAレプリコン粒子であり、動物病原体の抗原はウイルス抗原であり、そして、ウイルスはブタ病原体である。

【0033】

50

本発明のワクチンの好ましい実施形態では、動物病原体を由来とするコードされた抗原は、インフルエンザウイルスの赤血球凝集素（HA）タンパク質またはノイラミニダーゼ（NA）タンパク質、またはそのようなHAタンパク質もしくはNAタンパク質の抗原断片である。HAおよび／またはNAタンパク質は、好ましくはインフルエンザウイルスA型を由来とし、より好ましくはブタインフルエンザA型ウイルスまたはPEDVを由来とする。

【0034】

本発明は、本発明のアルファウイルスRNAレプリコン粒子を含む多価ワクチンを更に提供し、ここで、ワクチンは、抗原をコードしている2つ以上のRPを含むか、または1つまたは2つ以上の本発明での抗原をそれぞれコードしている1つ以上のRPを含む。

10

【0035】

本発明のワクチンは、免疫学的有効量の本発明用のアルファウイルスRNAレプリコン粒子を含む。一実施形態では、ワクチンは、約 1×10^3 ～約 1×10^{11} のRPを含む。より具体的な実施形態では、ワクチンは、約 1×10^4 ～約 1×10^{10} のRPを含む。更により具体的な実施形態では、ワクチンは、約 1×10^5 ～約 1×10^9 のRPを含む。

【0036】

本発明のワクチンは、免疫学的有効量の本発明用の油性アジュバントを含む。一実施形態では、ワクチンは、ワクチンの約10%～90% v/vの量の油性アジュバントを含む。より好ましくは、ワクチンは、ワクチンの約20%～80% v/v、30～70% v/vまたは40～60% v/vでさえある量の、油性アジュバントを含む。最も好ましくは、ワクチンは、ワクチンの約50% v/vの量の油性アジュバントを含む。

20

【0037】

具体的な実施形態では、本発明のワクチンは、動物用量あたり0.05mL～5mLの体積で投与される。より具体的な実施形態では、動物あたり投与される用量は、0.1mL～2mLである。一層より具体的な実施形態では、投与される用量は、0.2mL～1.5mLである。更により具体的な実施形態では、投与される用量は、0.3～1.0mLである。一層より具体的な実施形態では、動物あたり投与される用量は、0.4mL～0.8mLである。

【0038】

本発明のワクチンの一実施形態では、ワクチンは更なるアジュバントを含む。好ましくは、更なるアジュバントは、細菌細胞壁成分、サイトカインおよび非メチル化CpGを含む免疫刺激性核酸の群から選択される。一実施形態では、免疫刺激性核酸は、国際公開第2012/089800号（X4ファミリー）、国際公開第2012/160183号（X43ファミリー）および国際公開第2012/160184号（X23ファミリー）から1種以上選択される。

30

【0039】

本発明のワクチンの一実施形態では、ワクチンは、動物病原体の更なる抗原を含む。好ましい実施形態では、更なる抗原は、弱毒化生微生物、不活化微生物および微生物のサブユニットの群から選択される。

40

【0040】

更なる態様では、本発明はキットオブパーツを提供し、該キットは少なくとも2つの容器を備え、これにより、少なくとも一方の容器は、動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子を含み、少なくとも一方の容器は、油性アジュバントを含む。少なくとも2つの容器は、免疫学的有効量で、アルファウイルスRNAレプリコン粒子または油性アジュバントをそれぞれ含む。

【0041】

本発明のキットオブパーツの好ましい実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、コードされた抗原、動物病原体および油性アジュバントの1つ以上またはその全ては、本明細書に記載されたいずれか1つまたは複数の実施形態にて定義された通りであ

50

る。

【0042】

好ましい実施形態では、RPを含む少なくとも一方の容器は、凍結乾燥物としてRPを含む。

【0043】

代替的な実施形態では、RPを含む少なくとも一方の容器は、水溶液中にRPを含み、該水溶液は好ましくは緩衝液を含み、該水溶液は好ましくは冷却状態または凍結状態を保っている。一実施形態では、水溶液は再構成したRP溶液であり、これは、RP凍結乾燥物と適切な水性希釈液とを混合することにより生成される。

【0044】

少なくとも一方の容器が凍結乾燥物としてRPを含む一実施形態では、本発明でのキットオブパーツは、凍結乾燥されたRPを再構成するための適切な希釈液を含有する更なる容器を含むことができる。好ましい実施形態では、希釈液は水溶液であり、好ましくは緩衝液および／または安定剤および薬学的に許容される品質の水を含む。

【0045】

好ましい実施形態では、油性アジュバントを含む容器は、油相および水相のエマルジョンとして処方された油性アジュバントを含む。好ましくは、エマルジョンは水中油型エマルジョンである。

【0046】

キットオブパーツの一実施形態では、キットは、キットおよび／またはその構成部分の使用に関する指示書を含む。好ましい実施形態では、使用に関する指示書は、1つ以上のキット構成部分上にもしくはそれに付属して提供され；または、例えば閲覧可能である情報またはキットの製造元もしくはキット販売元によるインターネットウェブサイトからダウンロード可能な情報のような電子形態での指示を参照することにより提供される。

【0047】

一実施形態では、キットオブパーツは少なくとも2つの容器を含む箱と、箱とともにまたは箱内に含まれている情報媒体（例えば、カードまたはリーフレット）に表示された使用に関する指示書である。

【0048】

キットオブパーツの一実施形態では、キットはまた、本発明の免疫化の方法に使用するため、例えばインターネットのウェブサイト上の、構成部分（商用に関連する）の提供であってよい。

【0049】

キットオブパーツの一実施形態では、1つ以上の容器は、本明細書に記載されるような更なるアジュバントを含んでよく、更にはまたは代替的には、1つ以上の容器は、本明細書に記載されるような動物病原体の更なる抗原を含んでよい。

【0050】

動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコンおよび油性アジュバントは、両方とも本明細書に定義されているように、標的動物に投与することができる。こうした投与により、動物病原体により引き起こされる感染症または疾患に対し、当該動物中での効果的な免疫防御が誘導されることになる。免疫学的な動物用医薬品を関連使用するため、例えば欧州医薬品庁動物用医薬品委員会（EMA-CVMP）のガイドラインに沿って投与を実施することができる。

【0051】

したがって、更なる態様では、本発明は、免疫学的有効量の、動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントを、動物へと投与することを含む、動物を免疫化する方法を提供する。

【0052】

本発明の動物を免疫化する方法の好ましい実施形態では、該方法は動物に本発明のワクチンを投与することを含む。

10

20

30

40

50

【0053】

本発明の動物を免疫化する方法の好ましい実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、コードされた抗原、動物病原体および油性アジュバントのうちの1つ以上または全ては、本明細書に記載されたいずれか1つ以上の実施形態にて定義された通りである。

【0054】

本発明の動物を免疫化する方法の好ましい実施形態では、動物病原体を由来とするコードされた抗原は、魚、シクリッド科の一員、ティラピア、哺乳動物、鳥およびニワトリからの病原体を由来とする抗原である。

【0055】

本発明の動物を免疫化する方法の一実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントは、同時使用または並行使用により、標的動物の身体内または身体上に投与される。

【0056】

本発明の動物を免疫化する方法の好ましい実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントは、同時使用（すなわち、単一組成物として）により、標的動物の身体内または身体上に投与される。

【0057】

好ましい実施形態では、単一組成物は本発明のワクチンである。

【0058】

好ましい実施形態では、単一組成物は、両方とも本発明用に記載されているように、RPを含む組成物と油性アジュバントを含む組成物とを混合することにより、より好ましくは、本発明のキットオブパーツの容器の内容物を混合することにより、更により好ましくは、RPを含む水溶液と、油性アジュバントのO/Wエマルジョンを含む組成物とを混合することにより、標的動物へと投与する直前に調製される。代替的な更により好ましい実施形態では、両方とも本発明向けに本明細書に記載されているように、油性アジュバントのO/Wエマルジョンを用いてRP凍結乾燥物を再構成することにより、単一組成物が調製される。効果的には、単一組成物の調製により本発明のワクチンが生成される。

【0059】

好ましくは、「標的動物へと投与する直前」とは、望ましい順に、標的動物へと投与する24時間以内前、より好ましくは16時間以内前、12時間以内前、8時間以内前、4時間以内前であり、または標的動物へと投与する2時間以内前でさえある。

【0060】

本発明の動物を免疫化する方法の代替的に好ましい実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントは、並行使用（すなわち、位置および／または時間を分けて投与されるような、別個の組成物内に含まれるものとして）により、標的動物の身体内または身体上に投与される。

【0061】

好ましい実施形態では、並行使用は、本発明のキットオブパーツ内に含まれるようなアルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントを、位置および／時間を分けて、標的動物の身体内または身体上へと投与することを含む。

【0062】

本発明の並行使用の好ましい実施形態では、別個の組成物は、同一のまたは異なる投与経路により、標的動物の身体内または身体上の別個の部位へと、互いに限られた時間内で投与され；好ましくは、「限られた時間」は、望ましい順に、互いに2週間以内、より好ましくは互いに1週間以内、更により好ましくは1日以内、16時間以内、12時間以内、8時間以内、4時間以内、2時間以内、1時間以内、30分以内であり、または互いに10分以内でさえある。最も好ましくは、並行使用による投与は、実質的には同時での使用である。

【0063】

本発明の並行使用の好ましい実施形態では、別個の組成物は、別個の部位にて、同一のまたは異なる投与経路により標的動物の身体内または身体上へと、互いに限られた時間内で投与される。本発明では、別個の投与部位は、望ましい順に、互いに少なくとも1 cm分、好ましくは少なくとも2 cm分、少なくとも5 cm分、少なくとも10 cm分または互いに少なくとも25 cm分でさえも、動物の身体上または身体内で分けられている。

【0064】

本発明の並行使用の好ましい実施形態では、別個の組成物は、互いに限られた時間内に、同一のまたは異なる投与経路により、標的動物の身体内または身体上の実質的に同一の部位で標的動物の身体内または身体上で、ただし、投与部位で組成物同士が混合するのを防止するため、時間は互いに十分に離れて投与される。本発明では、混合を防止するために時間を十分離すということは、望ましい順に、互いに2時間以内であってはならず、好ましくは6時間以内であってはならず、12時間以内であってはならず、1日以内であってはならず、2日以内であってはならず、または互いに1週間以内でさえあってはならない。

10

【0065】

本発明の動物を免疫化する方法の一実施形態では、標的動物の身体内または身体上への投与は、非経口投与によって実施される。代替的な実施形態では、投与は、粘膜投与の方法による。一層代替的な実施形態では、ワクチンは局所投与の方法により投与される。

【0066】

投与の好ましい方法は、皮内、筋肉内、腹腔内、皮下、浸漬およびスプレーから選択される。皮内投与方法は、好ましくは針を用いない投与によるものであり、より好ましくはIDAL（登録商標）デバイス（液体の皮内適用（Intra-Dermal Application of Liquids））を使用する。

20

【0067】

本発明のワクチン投与の一実施形態では、ワクチンはプライマーワクチンおよび／またはブースターワクチンとして投与される。特定の実施形態では、本発明のワクチンは、その後のブースター投与を必要としない1回（ワンショット）のワクチン接種として投与される。特定の実施形態では、プライマーワクチンおよびブースターワクチンの両方を投与する場合、プライマーワクチンおよびブースターワクチンは同一経路により投与される。代替的な実施形態では、プライマーワクチンおよびブースターワクチンの両方を投与する場合、プライマーワクチンの投与がある1つの経路によって実施され、ブースターワクチンはそれとは別の経路により実施される。

30

【0068】

本発明のワクチン投与の一実施形態では、ワクチンはブタへと投与され、プライマーワクチンおよびブースターワクチンは、両方とも皮内注射により投与される。代替的な実施形態では、プライマーワクチンは皮内注射により投与され、ブースターワクチンは別の経路により投与される。

【0069】

更なる態様では、本発明は、本発明のワクチンを製造するための方法を提供し、該方法は、動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子と、油性アジュバントとを混合する工程を含む。アルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントの両方は、免疫学的有効量で混合されている。

40

【0070】

本発明のワクチンを製造するための方法の好ましい実施形態では、ワクチン、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、コードされた抗原、動物病原体および油性アジュバントのうち1つ以上または全ては、本明細書に記載されたいずれか1以上の実施形態にて定義された通りである。

【0071】

本発明のワクチンを製造するための方法の一実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子は、水溶液中に含まれる。

50

【0072】

本発明のワクチンを製造するための方法の好ましい実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、それぞれアルファウイルスRNAレプリコン粒子を含む水溶液、および油性アジュバントは、望ましい順に、1:10~10:1の体積比、より好ましくは1:5~5:1の体積比、1:4~4:1、1:3~3:1または1:2~2:1でさえあってもその体積比で混合されるように混合が実施される。最も好ましくは、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、それぞれアルファウイルスRNAレプリコン粒子を含む水溶液、および油性アジュバントは、約1:1の体積比で混合される。

【0073】

一実施形態では、本発明のワクチンを製造するための方法は、本発明のキットオブパーツの容器の内容物を混合することを含む。

10

【0074】

本発明のワクチンを製造するための方法の一実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、それぞれアルファウイルスRNAレプリコン粒子を含む水溶液は、本発明のために定義された病原体の抗原を含む別のO/Wエマルジョン内に含まれた油性アジュバントと混合される。好ましくは、他のO/Wエマルジョンは、不活化されたウイルスおよび/または細菌病原体を含むワクチンである。より好ましい実施形態では、SIVまたはPEDV由来の抗原をコードしているRPは、ブタサーコウイルス(PCV)および/またはCircumvent(登録商標)PCVMのようなマイコプラズマ・ハイオニューモニエを含むO/Wエマルジョンワクチンを用いて混合される。

20

【0075】

更なる態様では、本発明は、動物病原体により引き起こされる感染症または疾患に対する動物の防御に使用するための、動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子を提供し、ここで、アルファウイルスRNAレプリコン粒子は、油性アジュバントとともに、同時使用または並行使用において標的動物の身体内または身体上に投与される。アルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントの両方は、動物の防御に使用する際、免疫学的有効量で含まれる。

【0076】

本発明の防御に使用するためのアルファウイルスRNAレプリコンの好ましい実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、コードされた抗原、動物病原体および油性アジュバントのうちの1つ以上または全ては、本明細書に記載されたいずれか1以上の実施形態にて定義された通りである。

30

【0077】

本発明の防御に使用するためのアルファウイルスRNAレプリコンの好ましい実施形態では、使用は、本発明のワクチンの使用を含む。

【0078】

本発明の防御に使用するためのアルファウイルスRNAレプリコンの一実施形態では、防御は、異なる年齢および種類の標的動物に有効である。

【0079】

一実施形態では、使用は若年動物の防御に対してのものである。好ましくは、若年動物は、週齢3週間までのブタ、または週齢1週間までのニワトリ、または月齢14ヶ月までのサケ科の魚である。

40

【0080】

更なる実施形態では、使用は青年期の動物の防御のためのものである。好ましくは、青年期の動物は、週齢3週間~月齢8ヶ月のブタ、または週齢1~22週間のニワトリ、または月齢14~24ヶ月のサケ科の魚である。

【0081】

更なる実施形態では、使用は成体動物の防御のためのものである。好ましくは、成体動物は月齢8ヶ月以上のブタ、または週齢22週間以上のニワトリ、または月齢24ヶ月以上のサケ科の魚である。

50

【0082】

ティラピアについて本発明の防御のために使用する好ましい期間は、通常は年齢ではなく、体重全体の範囲を表示することによって表され；薬浴処理によるワクチン接種は、好ましくはティラピアの重量が0.5g～5gの場合に行われる。非経口注射によるワクチン接種は、好ましくはティラピアの重量が10g～100gの場合に行われ、より好ましくはティラピアの重量が20g～25gの場合に行われる。

【0083】

本発明の防御において使用するためのアルファウイルスRNAレプリコンの一実施形態では、標的動物は、動物病原体にとっての抗体に対してまたは動物病原体に対して、動物病原体を由来とする抗原それぞれのいずれかに対して、血清反応が陽性または陰性であり得る。

10

【0084】

本発明の防御において使用するためのアルファウイルスRNAレプリコンの一実施形態では、標的動物は、MDA (maternally derived antibodies：母体由来抗体) に対して陽性の動物であり、これにより、MDAは、防御が意図されている対象の動物病原体と反応する。より好ましくは、MDAに対して陽性の動物は、鳥、反芻動物またはブタである。一層より好ましくは、MDAに対して陽性の動物はブタである。

【0085】

本発明の防御において使用するためのアルファウイルスRNAレプリコンの一実施形態では、標的動物は妊娠中の動物である。より好ましくは妊娠中の動物は、反芻動物またはブタである。一層より好ましくは妊娠中の動物は、ブタである。

20

【0086】

本発明の防御において使用するためのアルファウイルスRNAレプリコンの一実施形態では、防御は畜産用動物のためである。好ましくは、畜産用動物は、肥育用に飼育されたブタであるか、またはブロイラーもしくは卵用ニワトリ、または乳もしくは肉の生産用に飼育された反芻動物、またはサケ、またはティラピアである。

【0087】

更なる実施形態では、防御は個体群を繁殖させるための動物のためである。好ましくは、個体群を繁殖させるための動物は、畜産用動物の父母系統または祖父母系統である。

30

【0088】

更なる態様では、本発明は、動物病原体により引き起こされる感染症または疾患に対する動物の防御用のワクチンの製造のための、動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子の使用を提供し、前記アルファウイルスRNAレプリコン粒子の油性アジュバントとの同時使用または並行使用を含む。アルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントの両方は、免疫学的有効量で使用されている。

【0089】

本発明のワクチンを製造するための使用の好ましい実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、コードされた抗原、動物病原体および油性アジュバントのうちの1以上または全てが、本明細書に記載されたいずれか1以上の実施形態にて定義された通りである。

40

【0090】

更なる態様では、本発明は、本発明のための本明細書で定義されるキットオブパーツの構成要素の製造のための動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子の使用を提供し、それによりキットは、前記キットの構成要素を同時使用または並行使用することによって、動物病原体により引き起こされる感染症または疾患に対して動物を防御するためのものである。アルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントの両方は、免疫学的有効量で使用されている。

【0091】

50

本発明のキットオブパーツの構成要素の製造のための使用の好ましい実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、コードされた抗原、動物病原体、油性アジュバントおよびキットオブパーツのうちの1つ以上またはその全ては、本明細書に記載されたいずれか1つまたは複数の実施形態にて定義された通りである。

【0092】

更なる態様では、本発明は、動物病原体により引き起こされる感染症または疾患に対する動物の防御のための動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子の使用を提供し、ここで、該使用は、当該アルファウイルスRNAレプリコン粒子の油性アジュバントとの同時使用または並行使用を含む。アルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントの両方は、免疫学的有効量で使用されている。

10

【0093】

本発明の動物の防御のための使用の好ましい実施形態では、アルファウイルスRNAレプリコン粒子、コードされた抗原、動物病原体および油性アジュバントのうちの1つ以上またはその全てが、本明細書に記載されたいずれか1以上の実施形態にて定義された通りである。

【0094】

本発明のこうした態様および他の態様は、以下の図および詳細な説明を参照することにより、更に良く理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

20

【0095】

【図1A】実施例2の結果であり、肺病変を示す。

【図1B】実施例2の結果であり、肺病変を示す。

【図1C】実施例2の結果であり、鼻排出を示す。

【図1D】実施例2の結果であり、鼻排出を示す。

【図1E】実施例2の結果であり、NI力価を示す。

【図1F】実施例2の結果であり、NI力価を示す。

【図2A】実施例2の結果であり、HI力価の結果を示す（図は左から右の順に番号を割り振っており、上の列の後、下の列となる）。

【図2B】実施例2の結果であり、HI力価の結果を示す（図は左から右の順に番号を割り振っており、上の列の後、下の列となる）。

30

【図2C】実施例2の結果であり、HI力価の結果を示す（図は左から右の順に番号を割り振っており、上の列の後、下の列となる）。

【図2D】実施例2の結果であり、HI力価の結果を示す（図は左から右の順に番号を割り振っており、上の列の後、下の列となる）。

【図2E】実施例2の結果であり、HI力価の結果を示す（図は左から右の順に番号を割り振っており、上の列の後、下の列となる）。

【図2F】実施例2の結果であり、HI力価の結果を示す（図は左から右の順に番号を割り振っており、上の列の後、下の列となる）。

【図3】実施例3の多価NA-RPでワクチン接種されたブタにおけるN1-古典的抗原に対する血清抗体応答である。実施例3に記載されたようなワクチン組成物のN1-古典的株に対して特異的である血清ノイラミニダーゼ抑制（NI）抗体応答が表されている。初回ワクチン接種（週齢3週）前、2回目のワクチン接種（週齢7週）前およびチャレンジ（週齢10週）前に血清サンプルを収集した。

40

【図4】H1N1ウイルスによる感染後5日目の肉眼で確認できる肺病変スコアに関し、実施例3で試験したようなチャレンジ感染に対する4種混合NA-RPワクチンの効果である。これは、実施例3にて記載されるワクチン接種組成物の投与およびH1-ガンマーN1-古典的ウイルスによるチャレンジ感染後のブタの肺病変スコアを示す。

【図5】実施例8のNI力価の結果である。図5は、標準偏差を含む経時的に測定された3つの時点におけるN1古典的NA抗原に対するNI力価を表す。これは、他の3つのN

50

A種に対して測定されたNI力価プロファイルを表している。

【図6】実施例8のNI力価の結果である。図6は、2回目のワクチン接種後7日目時点における混合された4つのNA種のグループ平均NI力価を表す。

【発明を実施するための形態】

【0096】

本発明は、動物病原体の1種以上の抗原をコードし、免疫学的有効量の、1種以上のアルファウイルスRNAレプリコン粒子および油性アジュバントを含む、ワクチンを提供する。アルファウイルスRNAレプリコン粒子は、標的であるヒトまたは動物の宿主細胞を感染させることができ、それらを含む遺伝子を発現させることができるという点で、生ウイルスと実質的に同様である。これはまた、RPが細胞上で感染-滴定することにより一般的に定量化されるという事実によって証明される。したがって、こうしたRPは、薬学的に許容される担体中で一般的には有効なワクチンの単独の成分であり、生（弱毒化）ウイルスワクチンと同様のものである。非アジュバントRPを基とするいくつかのワクチンが開発されており、商品化されている。

【0097】

アジュバントは、主に死菌またはサブユニットワクチン抗原とのみ組み合わせて使用される。更には、油性アジュバントは他のワクチン成分に対して極めて活動的であり得るため、これにより油性アジュバントは一般的には生ワクチンと結合されることはない。更に、アルファウイルスRNA RPのワクチンであって、特にVEEアルファウイルスを基としたものは、後天的免疫応答と比較して、標的の先天的な免疫系からの、それら単独で既存の強力な抗ウイルス応答を誘導することが知られている。したがって、追加の免疫刺激といった任意の必要性を効果的に防ぐ。

【0098】

それにも関わらず、驚くべきことに、油性アジュバントは、動物病原体を由来とする抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子の免疫原性効果を著しく増強し得ることを見いだした。これは、水酸化アルミニウムのようなアルミニウムを基とするアジュバントとは対照的である。RPおよび油性アジュバントを適用した場合、単一組成物中に組み合わされた際（すなわち同時使用）に、または、別個の組成物として投与した際（すなわち並行使用）の両方で、増強効果を得ることが可能であった。（油性）アジュバントなしの場合と比較した際、RPおよび油性アジュバントを用いたワクチン接種では、RPの最小有効用量を桁違いに減少させることが可能であるため、油性アジュバントによる効果増強の程度もまた予測できなかった。更に油性アジュバントを使用することにより、RPワクチンを接種することによる免疫応答の期間を増加させることが可能であった。更には、油性アジュバントとRPを組み合わせることで、RP構成要素単独では全く免疫を誘導しない場合でも、優れた免疫応答を提供することが可能であった。

【0099】

本発明をより完全に理解するために、以下の定義を提供する。

【0100】

「ワクチン」とは、医学的效果を有する周知の組成物であり、免疫学的に活性な構成要素と、薬学的に許容される担体と、を含む。水溶液および／または油性アジュバントは、該ワクチンに対して「担体」として機能させることができる。本発明のワクチンにとって、「免疫学的に活性な構成要素」とは、動物病原体を由来とするコードされた抗原のことであり、これはRPを用いて送達かつ発現される。ワクチンは、ワクチン接種された標的動物の免疫系を刺激し、防御的な免疫学的応答を誘導する。応答は、動物の先天的な免疫系および／または後天的免疫系に由来してよく、細胞性型および／または体液性型であってよい。

【0101】

ワクチンは、例えば病原体の数を減少させ、または動物中もしくは動物上で病原体が複製する期間を短縮させ、感染もしくは侵入により引き起こされる病変の数、強度もしくは重症度を減少させることにより、ワクチン接種された動物内にて、その後に起こる感染ま

たは侵入による重症度を減少させることによる「感染症または疾患に対する」「防御」を提供する。更にはまたは結果的には、このような感染、侵入もしくは複製によって、またはその感染、侵入または複製に対する標的応答によって引き起こされ得る疾患による（臨床的な）症候を減少または改善させるという点でワクチンは効果的である。このような疾患および臨床的徴候に対する参照は、「The Merck veterinary manual」（10th ed., 2010, C. M. Kahn ed., ISBN: 091191093X）である。こうしたワクチンは、口語的には、特定の病原体に「対する」ワクチンと呼ばれる。

【0102】

本明細書にて使用される場合、用語「含む（comprising）」（ならびに「含む（comprise）」、「含む（comprises）」および「含んだ（comprised）」のような変形）は、こうした要素または組み合わせが明示的に列挙されていない場合であっても、この用語が使用されるテキストの一部、段落、請求項などの範囲内であるかまたはその中に含まれる、全ての要素、および、本発明のために想定される任意の可能性のある組合せに言及し、そしてこうした任意の要素（類）または組合せの除外については言及しない。それゆえ、こうした任意のテキストの一部、段落、請求項などは、用語「含む（comprises）」（またはその変形）が、「から成る（consist of）」、「から成る（consisting of）」または「から本質的に成る（consist essentially of）」のような用語に置換されるような1つ以上の実施形態にもまた関連している。

【0103】

本明細書にて使用される場合、用語「レプリコン」は、細胞培養物または動物宿主の中で親ウイルスを正常に増殖することが可能であるような1つ以上の要素（例えば、構造タンパク質に対するコード配列）が存在する場合、それらを欠損している修飾されたRNAウイルスゲノムを指す。適切な細胞状況では、レプリコンは自身を増幅させ、1つ以上のサブゲノムのRNA種を産生することができる。

【0104】

本明細書にて使用される場合、「RP」と略された、用語「アルファウイルスRNAレプリコン粒子」は、ウイルス性構造タンパク質中にパッケージングされた、例えばカプシドおよび糖タンパク質のアルファウイルス由来のRNAレプリコンであり、例えばPuschko et al. [Virology 239 (2): 389-401 (1997)]により記載されているようなアルファウイルスから誘導されたものでもある。RPは、適切な標的細胞を感染させ、その後挿入された異種遺伝子（類）を発現させるが、細胞培養物または動物宿主内では、（ヘルパープラスミドまたは類似成分なしでは）増殖させることができず、その理由は、レプリコンはアルファウイルスの構造成分（例えば、カプシドおよびウイルス糖タンパク質）をコードしないからである。

【0105】

説明に好都合であるために単数形の用語を使用することは、そのように制限することを意図するものでは決してない。そのため、例えば「アルファウイルスRNAレプリコン粒子」への参照は、特に指示しない限り、こうした複数のアルファウイルスRNAレプリコン粒子への参照を含む。

【0106】

抗原を「コードしている」RPは、RP中に含まれているそのタンパク質抗原に対する核酸の転写および／または核酸の翻訳を指し、発現しているタンパク質抗原を生じさせる。通常、タンパク質をコードしているこうした核酸は、オープンリーディングフレーム（ORF）であり、あまりにも早くタンパク質の翻訳を終結させ得るような、所望されない停止コドンが全く存在しないことを意味している。核酸は、完全なタンパク質をコードしている完全な遺伝子であってよく、または遺伝子断片であってよく、これらは、例えばタンパク質の成熟形態または分泌された形態のみをコードする、すなわち、「リーダー」、「アンカー」または「シグナル配列」を有さないタンパク質の一部をコードする。ヌクレ

オチド配列は、天然源のものまたは合成源のものであってよい。

【0107】

本発明のための抗原を発現する異種核酸配列の構築および操作は、クローニング、トランスフェクション、組換え、選択および増幅を含む周知の分子生物学的技術によって行うことができる。このような技術および他の技術は、Sambrook & Russellによる「Molecular cloning: a laboratory manual」(2001, Cold Spring Harbour Laboratory Press; ISBN: 0879695773)、Ausubel et al.による「Current Protocols in Molecular Biology」(J. Wiley and Sons Inc., NY, 2003, ISBN: 047150338X)、C. Dieffenbach & G. Dvekslerによる「PCR primers: a laboratory manual」(CSHL Press, ISBN 0879696540)およびJ. Bartlett and D. Stirling (Humana press, ISBN: 0896036421)による「PCR protocols」のような標準的なテキストにてより詳細に説明されている。

10

【0108】

本発明では、「タンパク質」はアミノ酸の分子鎖である。タンパク質は、天然または成熟タンパク質、プレまたはプロタンパク質、またはタンパク質の一部であり得る。とりわけ、ペプチド、オリゴペプチドおよびポリペプチドが、タンパク質の定義内に含まれている。

20

【0109】

本発明での「抗原」は、標的動物内での防御的な免疫学的応答を適正な環境内で誘導することができるタンパク質を指す。

【0110】

用語「を由来とする (originate from)」、「を由来とする (originates from)」および「を由来としている (originating from)」は、所与のタンパク質抗原および天然にそれをコードする病原体または病原体の株に対し互換的に使用される。本明細書にて使用される場合、これらの用語は、修飾されていないおよび／または修飾された所与のタンパク質抗原のアミノ酸配列が、その病原体またはその病原体の株によってコードされていることを表す。病原体を由来とするタンパク質抗原に対する本発明の核酸構築物内のコード配列は、由来とする病原体または病原体の株（自然弱毒株も含む）内のそのタンパク質抗原の対応するコード配列に関連する発現されたタンパク質抗原のアミノ酸配列を修飾、短縮化および／または伸長させるように、遺伝子的に処理されていてよい。

30

【0111】

「動物病原体」は、例えば、野生動物、家畜動物またはペット用動物のような獣医学に関連する動物で、感染症および／または疾患を引き起こすことが可能である任意の生物学的実体を指す。

【0112】

本発明では、動物病原体は、本発明のワクチンを受けている標的動物の天然病原体であってもなくてもよい。

40

【0113】

「油」は、ここでは一般的な意味で使用され、典型的には比較的粘性のある液体であり、水よりも軽い密度を有し、疎水性かつ親油性の比較的高い炭化水素含有量を有する非極性の化学物質を指す。油は、合成、半合成、動物または植物由来のような、鉱物由来または「非鉱物」由来のものであり得る。油の一部は代謝可能である。

【0114】

用語「鉱物」は、それぞれの油が鉱物源を由来とし、典型的には石油由来であることを示す。

【0115】

50

「半合成油」は、動物油または植物油のような、由来が非鉱物である油であるが、これらは化学プロセスまたは物理プロセスにより構造および／または組成にて変性される。

【0116】

用語「アジュバント」は、ここでは、非特異的な方法にて標的動物内で免疫応答を刺激可能な一般的な意味の組成物で使用されている。

【0117】

「流動パラフィン油」は、白色（鉱物）油とも命名されている鉱油の一種であるか、または軽流動パラフィン油であり、これはCAS番号8042-47-5を有する。それは一般的に入手可能であり、薬学的な等級品質でもある。例としては、Drakeol（登録商標）6VR（Penreco）、Marcol（登録商標）52（Exxon Mobile）およびKlearol（登録商標）（Sonneborn）である。

10

【0118】

「ビタミンE-アセテート」は、CAS番号58-95-7を有する化学化合物を指す。いくつかの別名は、トコフェリルアセテートまたはアルファートコフェロールアセテートである。ビタミンE-アセテートは、ビタミンE（トコフェロール）の酢酸エステルであり、種子、ナッツ、果物もしくは葉のような植物性材料、または脂身から誘導されることができるが、合成的に製造されてもよい。そのため、ビタミンE-アセテートの定義には、天然、合成もしくは半合形成態、またはそれらの混合物が含まれる。ビタミンE-アセテートは、異なる程度の純度で市販されている。

【0119】

「スクアラン」は、CAS番号111-01-3を有する化学化合物を指す。いくつかの別名は、水素添加サメ肝油、ヘキサメチルトトラコサンまたはペルヒドロスクアレンである。これは、ポリ不飽和C30油であり、コレステロール経路の化合物として代謝可能なスクアレン（CAS番号111-02-4）と混同されてはならない。

20

【0120】

元来、スクアランの前駆体はサメ肝から得られていたが、環境への懸念から、これはオリーブ油のような他の天然源または化学合成へと移行してきている。したがって、スクアランの定義には、天然、合成もしくは半合形成態、またはそれらの混合物が含まれる。スクアランは、例えば植物源由来、Worlee（Squalane、植物）またはCroda（Pripure Squalane）由来、または例えばKuraray（Squalane-PE）による合成物由来の様々な純度で市販されている。本発明では、高純度のスクアランが好ましく、望ましい順では、好ましくは75%超の純度、より好ましくは80、90または一層より好ましくは95%超の純度である。

30

【0121】

「エマルジョン」は、少なくとも2つの不混和性液体の混合物であり、それにより、一方が別のものの中に分散される。典型的には、分散相の液滴は、マイクロメートル未満の範囲であり、非常に小さい。本発明では、エマルジョンは油相および水相を含む。

【0122】

任意の規模にてエマルジョンを調製するための手順および機器は、当該技術分野にて周知であり、例えば、「Remington: the science and practice of pharmacy」（2000, Lippincott, USA, ISBN: 683306472）および「Veterinary vaccinology」（P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681）のようなハンドブック内に記載されている。

40

【0123】

本発明での油性アジュバントがエマルジョンである場合、該エマルジョンは油中水型（W/O）エマルジョンであり得、ここで、油は連続した外側の相である。代替的には、エマルジョンは、「水中油型」（O/W）エマルジョンであり得、ここで、該油は分散された内部相である。

【0124】

50

適切な種類および濃度の乳化剤（類）を選択することにより、こうしたエマルジョンを形成することができ、安定的に維持することができる。

【0125】

乳化剤は、水と油間の界面相である位置に存在し、内部の分散相の液滴を安定化させる。多くの異なる乳化剤が知られており、これはワクチンのような薬学的な使用に適している。本発明の油性アジュバントにとって好ましい乳化剤は、ポリソルベート80であり、これはポリオキシエチレンソルビタンモノオレートとしても知られており、Tween（登録商標）80として市販されている。Tween80は、油性アジュバントの0.1～10%w/vの量で、本発明向けの油性アジュバント中で使用されている。

【0126】

本発明では、O/Wエマルジョンの形態である場合、油性アジュバントはそれゆえに外側の水相と分散された内部の油相から成る。これにより、本発明での動物病原体を由来とする抗原をコードしているRPと、O/Wエマルジョンとしての油性アジュバントとの混合が促進される。例えば、RPを含む水性組成物を、油性アジュバントO/Wエマルジョンと混合することによる。次いで、約1分間にわたる簡単な手での攪拌で、適切に2つの水性組成物を十分混合させる。

【0127】

代替的におよび高度に有利なことには、O/Wエマルジョンとしての油性アジュバントは、凍結乾燥形態からRPを再構成するのに直接使用されることができる。このことは、RPが凍結乾燥物として高度に安定した形態で提供されることができ、本発明のワクチンが、標的動物に投与する前に、都合のよい時間に現場にて混合することにより調製することができることを意味する。

【0128】

本明細書にて使用される場合、用語「約（about）」は、用語「約（approximately）」と互換的に使用され、値は、表示した値の50パーセント以内であることを示し、すなわち、1ミリリットルあたり「約（approximately）」 1×10^8 アルファウイルスRNAレプリコン粒子を含有する組成物は、1ミリリットルあたり $5 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^8$ のアルファウイルスRNAレプリコン粒子を含有する。

【0129】

本発明のワクチン用であるO/Wエマルジョン油性アジュバントの一例は、XSolve（商標）である。XSolveは、ビタミンEアセテートを基とする（欧州特許第382,271号を参照されたい）Diluvac Forte（商標）、および、流動パラフィン油を基とする（国際公開第2009/144,088号を参照されたい）Microsol（商標）の、2つのO/Wエマルジョンアジュバント成分の組合せである。

【0130】

こうしたエマルジョンにおいて、鉱油および非鉱油の油滴の体積平均サイズは異なっていてよい。好ましくは、鉱油の液滴はサブミクロンサイズである。

【0131】

好都合なことには、油性アジュバントエマルジョンは、本発明のRPとは分けて調製される。それゆえ、RPが油性アジュバント内に存在する場合に、その性質維持に適合することがない油性アジュバントを乳化するための方法および機器が使用され得る。一例には、マイクロフルイダイザープロセッサ（Microfluidics, MA, USA）のような高圧均質化によってサブミクロンのエマルジョンを得るために使用される高せん断性の乳化法がある。

【0132】

本発明のワクチン用であるO/Wエマルジョン油性アジュバントの更なる例は、SVEA（商標）であり、これは、スクアランおよびビタミンE-アセテートを含んでおり、国際公開第2018/115,435号にて記載されている。

【0133】

本発明では、例えばベネズエラ馬脳炎ウイルス（V E E）および鳥インフルエンザウイルスなどのような微生物または病原体の名称は、現在適用可能である前述微生物の各分類区分を指す。ただしそのような名称は、新しい見識により新規または異なる分類群へと再度区分化され得ることから、時間とともに変化する可能性がある。しかしながら、このことによって微生物そのものおよび抗原レパートリーが変化するわけではなく、単に科学的名称または区分が変化するのみであり、再度区分化された微生物は、本発明の範囲内であり続ける。

【0134】

分類学的ファミリーに対する参照は、そのファミリー内の種、サブタイプ、変異型、生物型、血清型または遺伝子型である任意の微生物を含む。

【0135】

本発明では、「ブタ」はイノシシ科のファミリーである動物を指し、好ましくは、例えば、野生または家畜用ブタ、イノシシ、バビルサまたはイボイノシシのイノシシ属の動物を指す。これはまた、それらの性別、年齢またはサイズを参照した任意の名称（例えば雌のブタ、雄のブタ、家畜用ブタ、若い雌のブタ、離乳したブタまたは子ブタ）によって示されるブタを含む。

【0136】

本明細書にて使用される場合、用語「鳥」は、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ヤマウズラ、クジャク、ウズラ、ハト、キジ、ホロホロチョウまたはダチョウのような農業的に関連のある鳥を指す。好ましくは、鳥はニワトリ、シチメンチョウ、アヒルまたはガチョウである。より好ましくは、鳥はニワトリまたはシチメンチョウである。最も好ましくは、鳥はニワトリである。

【0137】

鳥は例えば、卵用ニワトリ、種ニワトリ、ブロイラー、雑種または任意のこうした品種の父母系統のような任意の種類のものであり得る。好ましい鳥の種類はブロイラーである。

【0138】

本明細書にて使用される場合、用語「ティラピア」には、シクリッド科であり、ほぼ百種類の硬骨魚類でヒレを有するものを含み得る。ティラピアは、主に浅い小川、池、川および湖に生息しているおよび淡海水中に生息していることが稀に見られる淡水魚である。

【0139】

本発明用の「キットオブパーツ」は、典型的には所定量の特異的組成物を有する容器を梱包して組み合わせたものであり、このキットは、本発明の調製およびワクチン接種を実施するための指示書を含むか、これを指すものであってよい。

【0140】

ワクチン、免疫化方法ならびに動物を防御するための本発明の化合物および使用の標的は、コードされた抗原が由来とする特定の病原体により引き起こされる感染症または疾患に対しワクチン接種の必要がある動物である。健康であり、非感染状態である標的にワクチン接種し、かつできる限り早くワクチン接種することは明確に好ましいものの、年齢、重量、性別、免疫学的状態およびワクチン接種される／防御される／免疫化される標的の他のパラメータは重要ではない。

【0141】

本明細書にて使用される場合、「系統発生クラスター」は、系統樹または同じ（同種）祖先へと遡る進化樹にて（同じ枝上に）共に分類されてきている、一連のインフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼである。米国にて発見されたIAV-Sノイラミニダーゼ（NA）に関しては、N1の2つの優性系統発生クラスターであるN1-古典的およびN1-パンデミック、ならびにN2の2つの優性である系統発生クラスターであるN2-1998およびN2-2002が存在している。N1古典的系統発生クラスターは、H1N1古典的ブタインフルエンザウイルス由来であるNAとともに分類されたNAを含有する。N1パンデミック系統発生クラスターは、H1N1パンデミックインフルエンザウイルスが起源であるNAとともに分類されたNAを含有する。N2-1998系統発生クラスター

10

20

30

40

50

ーは、1998年にブタへと感染したヒトH3N2インフルエンザウイルス由来であるNAとともに分類されたNAを含有し、一方、N2-2002系統発生クラスターは、2002年にブタへと感染したヒトH3N2インフルエンザウイルス由来であるNAとともに分類されたNAを含有する。[Anderson et al., Influenza and other Respiratory Viruses 7 (Suppl. 4): 42-51 (2013) を参照されたい。]

【0142】

用語「非IAV-S」は、各病原体および／または抗原（もしくは免疫源）は、IAV-S病原体でもIAV-S抗原（免疫源）でもなく、非IAV-Sタンパク質抗原（または免疫源）が、IAV-Sを由来としていないことを表す病原体および／または抗原（もしくは免疫源）といった用語を修飾するために使用されている。

10

【0143】

本明細書にて使用される場合、多価ワクチンは、2つ以上の異なる抗原を含むワクチンであり、それにより、その違いは、属、種、血清型などのような多くの生物学的レベルのものうちのどれかにおいて存在し得る。この種類の具体的な実施形態では、多価ワクチンは、2種以上の異なる動物病原体または同じ病原体のうち、免疫反応的に異質である変異型に対し標的動物の免疫系を刺激する。

【0144】

本明細書にて使用される場合、用語「薬学的に許容される」は、修飾された名詞が薬学製品にて使用するのに適切であることを意味するよう、形容詞的に使用されている。例えば、薬学的なワクチン中の賦形剤を記載するためにその用語が使用されている場合、賦形剤は、組成物の他の成分と適合性があり、意図したレシピエント動物（例えばブタ）に対して不利益であるような有害性を持つものではないと特徴づけられる。

20

【0145】

動物標的に対して本発明のキットの各自構成要素であるワクチンの「投与」は、任意の実行可能な方法および経路を使用して実施されることができる。典型的には、投与の最適な方法は、適用されるワクチン／化合物の種類、および標的の特性、および防御を意図する対象である疾患によって決定されることになる。どのようにワクチン／化合物を処方するかによっては、異なる投与技術が適用され得る。例えば、本発明のO/Wエマルジョンワクチン／化合物の場合には、経腸経路または粘膜経路、すなわち点眼剤、点鼻剤、経口剤、腸溶剤、口腔鼻液滴剤、スプレー剤によって投与され得る。他の選択肢としては、水を飲むこと、広範囲スプレー、霧化、食事をとることなどを介するような大量投与方法を介することである。

30

【0146】

「非経口投与」には、皮下注射、粘膜下注射、静脈内注射、筋肉内注射、皮内注射および点滴を含む。

【0147】

「粘膜投与」には、眼、鼻、経口、眼-鼻、気管内、腸管内、肛門および膣内投与経路を含む。

【0148】

「局所投与」には、皮膚および経皮投与経を含む。

40

【0149】

ワクチン、本発明のキットの各自構成要素を投与する方法、タイミングおよび体積は、好ましくは、標的のストレスを低減させ、かつ人件費を削減する目的のために、標的とする動物が必要とする可能性がある現存する他のワクチン接種のワクチン接種予定と一本化される。こうした他の免疫化自体は、登録済の用途と適合性のある方法で、関連する使用方法によって投与されることができる。

【0150】

本明細書にて使用される場合、特定のタンパク質（例えばタンパク質抗原）に関する用語「抗原断片」は、抗原性、すなわち、例えば免疫グロブリン（抗体）またはT細胞抗原

50

受容体のような免疫系の抗原認識分子と特異的に相互作用可能なタンパク質の断片である。例えば、IAV-Sノイラミニダーゼ（NA）抗原断片は、抗原性のNAタンパク質の断片である。好ましくは、本発明の抗原断片は、抗体および／またはT細胞受容体の認識に対して免疫優勢である。具体的な実施形態では、所与のタンパク質抗原に関する抗原断片は、完全長タンパク質の少なくとも25%の抗原性を保持する。好ましい実施形態では、抗原断片は完全長タンパク質の少なくとも50%の抗原性を保持する。より好ましい実施形態では、抗原断片は完全長タンパク質の少なくとも75%の抗原性を保持する。抗原断片は12個のアミノ酸と同じ程度で小さいものであり得るか、またはその一方で、完全長タンパク質から単一のアミノ酸と同じ程度欠損している大きな断片であり得る。具体的な実施形態では、抗原断片は25～150個のアミノ酸残基を含む。他の実施形態では、抗原断片は50～250個のアミノ酸残基を含む。

10

【0151】

本明細書にて使用される場合、あるアミノ酸配列は、両方の配列のアミノ酸残基が同一である場合、第2のアミノ酸配列に対して100%「同一」であるか、または100%の「同一性」を有する。したがって、2つのアミノ酸配列の50%のアミノ酸残基が同一である場合、あるアミノ酸配列は、第2のアミノ酸配列に対して50%「同一」である。配列比較は、例えばタンパク質といった所与のタンパク質または比較されているポリペプチドの一部により含まれているアミノ酸残基の隣接ブロックにわたって実施される。具体的な実施形態では、他の場合では2つのアミノ酸配列間の対応関係を変化させ得る、選択された欠失または挿入が考慮されている。

20

【0152】

本明細書にて使用される場合、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列のパーセント同一性は、C, MacVector (MacVector, Inc. Cary, NC 27519)、Vector NTI (Informax, Inc. MD)、Oxford Molecular Group PLC (1996)、ならびにアラインメントデフォルトパラメータおよび同一性用のデフォルトパラメータを用いたClustal Wアルゴリズムを用いて決定されることができる。こうした市販のプログラムもまた、同じまたは類似のデフォルトパラメータを使用して配列類似性を決定するために使用され得る。代替的には、例えば、デフォルトパラメータを使用したGCG Package v. 7 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) Pileupプログラムを使用して、デフォルトフィルタ条件下にてAdvanced Blast searchを使用することができる。

30

【0153】

アルファウイルスRNAレプリコン粒子が個別に保存されているが、投与前に他のワクチン成分との混合が意図されている場合、アルファウイルスRNAレプリコン粒子は、他の成分の溶液、例えば緩衝液または高スクロース溶液と同じ水性安定化溶液中に保存され得る。

【0154】

本発明のワクチンは、任意の標準的な「動物を免疫化する方法」によって容易に投与されることができる。当業者は、投与される標的動物およびワクチンの特性を考慮した上で投与経路が選択されることを理解するであろう。好ましくは、ワクチン組成物は、各種の標的動物および投与経路に適切に処方される。

40

【0155】

本発明では、「微生物のサブユニット」は、タンパク質、炭水化物、リポ多糖、脂質または核酸分子のような生物学的または合成分子であり得る。

【0156】

ワクチン、キット、方法または本発明の使用を更に最適化することは、当業者にとって十分達成可能な範囲にある。一般的にこれは、提供された免疫防御を更に向上する目的でワクチン接種／免疫化の効果を微調整することを含む。これは、用量、体積、アジュバントまたは投与される物質の抗原含量を適用させることによって、または、異なる経路、方

50

法またはレジメによる投与によって実施され得る。これらは全て本発明の範囲内である。

【0157】

こうした構成、工程段階および物質はある程度変化させることができるため、本発明は、特定の構成、工程段階、本明細書に開示されている物質に対して制限するものではないこともまた理解されるべきである。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲およびその同等物によってのみ制限されるものであるため、特定の実施形態のみを記載するという目的のために本明細書で用いられる専門用語が使用され、また制限することを目的としたものではないこともまた理解されるべきである。

【表1】

配列表

配列番号:	記述(5' ->3')	種類
1	ggcgcgcgcacc	核酸
2	ttaattaa	核酸

【0158】

以下の非限定的な実施例は、本発明の更なる理解を提供するのに役立つものであるが、本発明の効果的な範囲を制限するいかなる方法も意味するものではない。

【0159】

【実施例】

【実施例1】

油性アジュバントは、ブタインフルエンザウイルス赤血球凝集素をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子に対し、ブタ中の抗体応答の規模および期間を向上する物質および方法

配列最適化へとHA遺伝子挿入を施す(ATUM, CA, USA)変更により、赤血球凝集素(HA)遺伝子を発現するよう設計されたVEEレプリコンベクターを、前に記載されたように構成した[参照として本明細書にここで組み込まれた内容としては、米国特許第9,441,247B2号を参照されたい]。TC-83-誘導レプリコンベクター「pVEK」[米国特許第9,441,247B2号内で開示され記載されている]は、制限酵素であるAscIおよびPacIによって消化された。5'フランキング配列(5'-GGCGCGCCGCACC-3') [配列番号:1] および3'フランキング配列(5'-TTAATTAA-3') [配列番号:2] を有する、N1またはN2遺伝子をコドン最適化したオープンリーディングフレーム配列を含有するDNAプラスミドは、制限酵素であるAscIおよびPacIによって同様に消化された。次いで、合成遺伝子カセットを消化されたpVEKベクターへと結合し、得られたクローンを「pVHV-N1-パンデミック」、「pVHV-N1-古典的」、「pVHV-N2-2002」および「pVHV-N2-1998」と再度命名した。「pVHV」ベクター命名は、pVEKの複数のクローニング部位におけるAscIおよびPacI部位を介して、クローン化された導入遺伝子カセットを含有するpVEK-誘導レプリコンベクターを指すように選択された。

【0160】

前に記載された方法[参照として本明細書にここで組み込まれた内容としては、米国特許第9,441,247B2号および米国特許第8,460,913B2号]に従って、TC-83 RNAレプリコン粒子の産生が実行された。簡潔には、MegaScript (商標) T7 RNAポリメラーゼおよびキャップアナログ(Promega, Madison, WI)を使用した生体外の転写の前に、pVHVレプリコンベクターDNAおよびヘルパーDNAプラスミドは、NotI制限酵素で直線化された。重要な点としては、産生に使用されるヘルパーRNAは、前に記載されているようにVEEサブゲノムプロモータ配列を欠損している[Kamrud et al., J Gen Virol. 91 (Pt 7): 1723-1727 (2010)]。レプリコンおよびヘルパー成分用の

精製RNAを、ベロ細胞の懸濁液と結合および混合し、4mmキュベット内で電気穿孔し、OptiPro（商標）SFM細胞培地（Thermo Fisher, Waltham, MA）へと戻した。一晚インキュベーションした後、アルファウイルスRNAレプリコン粒子を精製し、5%w/vスクロースおよび1%v/vブタ血清を有するリン酸緩衝生理食塩水中で処方し、0.22ミクロンのメンブレンフィルタを通すことにより滅菌し、保存のためにアリコート中へと分散させた。ベロ細胞単層上での感染免疫蛍光法アッセイによって、機能的RPの力価を決定した。パッケージングされたレプリコンによってコードされた抗原により、RPのバッチを識別した。

【0161】

ブタインフルエンザウイルスに対する抗体に陰性である10頭の子ブタを、5頭のブタのグループへと無作為化した。H3N2ブタインフルエンザ株の赤血球凝集素抗原を発現しているRPワクチンを、 5×10^5 RP/用量の力価で調製した。ワクチン接種の直前に、RPのみのグループのワクチンは、滅菌PBS希釈液で1:1（v/v）に希釈され、一方で、RP+アジュバントグループのワクチンは、Xsolveアジュバントで1:1（v/v）に希釈された。その後、ブタは、2.0mLの適切な物質を筋肉内へとワクチン接種された。ワクチン接種プロセスは0～21日間の試験日程で実施され、その時ごとにワクチンを新鮮に調製した。試験中収集された血清を、H3N2ブタインフルエンザウイルス抗原を使用した赤血球凝集抑制（HI）活性用にアッセイした。阻害活性を有した最大希釈として結果を報告し、1:10未満の力価は1:9として報告し、640超の力価は1:641として報告した。幾何平均力価を表1に示す。

【表2】

表 1:幾何平均赤血球凝集抑制(HI)力価

試験日程	0	21	28	35	56	70	84
RP	9.0	9.0	25.8	22.5	12.9	9.4	9.4
RP+アジュバント	9.0	9.2	242.7	211.1	91.9	52.8	52.8

【0162】

比較的低用量の 5×10^5 RPでは、非アジュバントワクチンは、低規模、短期間で一過性のHI力価を誘導した。比較すると、アジュバントワクチンは、ブースターワクチンの接種後に高いHI力価を誘導し、それらのHI力価は、84日間の試験終了まで上昇した状態を保っていた。

【0163】

この発見により、Xsolveは、非常に低い用量（ 5×10^5 RP）でのブタRP免疫化において非常に大幅な効果を有し得ることがまずはっきりと示された。アジュバントを含まないRPワクチンを使用する先行研究では、用量あたり非常に高い量のRP成分を使用しなければならず、これは例えば、FMD RPでは 1×10^9 であり、SIV RPでは 5×10^7 であった。

【0164】

【実施例2】

油性アジュバントは、ブタインフルエンザウイルス抗原をコードしている多価アルファウイルスRNAレプリコン粒子に対し、ブタ中の抗体応答の規模および期間を向上する

ブタインフルエンザに陰性である群れから、乳離れした子ブタのグループを表2に表示されるような処置グループへと無作為化した。ブタインフルエンザ向けの多価アルファウイルスRNAレプリコン粒子ワクチンは、ブタインフルエンザの様々な株由来であるHAまたはNAのいずれかを発現している、8個の個別のRNA粒子抗原を使用して、それぞれ約 1×10^7 RP/用量に配合された。2つのH3、4つのH1、1つのN1および

1つのN2抗原が含まれており、一对の血清学的アッセイ（HIまたはNI）が、各抗原に対する抗体応答を評価するために使用された。試験は重複させた設計として実行され、動物の半数はH1N1ウイルスでチャレンジされており、残りの半数はH1N2ウイルスでチャレンジした。

【表3】

表2:実施例2の試験用プロトコル

グループ	ブタの数	ワクチン	チャレンジ株
1	16	多価 RP のみ	H1N1
2	16	多価 RP+油性アジュバント	
3	16	プラセボ	
4	16	多価 RP のみ	H1N2
5	16	多価 RP+油性アジュバント	
6	16	プラセボ	

【0165】

X Solve 油性アジュバントの使用により、8個全てのワクチン分画に対する血清応答の規模を著しく増加させることが見いだされた。両方のワクチン製剤により、肺病変を防御したが（図1A～図1B）、X Solveを添加したものは、H1N1およびH1N2インフルエンザウイルスの鼻排出による測定の場合（図1C～図1D）、ワクチン効果を向上させた。図1～図1Fは、対応するNI力価スコアを表す。HI力価上でのアジュバントの効果は、図2A～図2Fに表示されている。

【0166】

この試験により、非アジュバント多価SIV RPは、全分画に対して抗体を誘導したが、油性アジュバントを添加することにより、全分画の免疫応答を著しく増強させたことが証明された。鼻排出および肺スコアのより密なクラスター化の減少は、例えば、群れまたは個体群内における感染症の水平拡散を制限することに関する、重要な臨床的利点を表す。

【0167】

【実施例3】

初回ワクチン接種時にN1抗体を有する乳離れしたブタにおけるH1N1感染に対する、アジュバント4種混合NA-RPワクチンの効果

アジュバント4種混合NA-RPワクチンの2つの用量レベルでの効果および免疫原性を決定するため、ワクチン接種チャレンジ試験を行った。アジュバントワクチンは、4つのRPコンストラクトを含み、これはそれぞれ、現代U.S. IAV-S分離株の単独で異なるNA遺伝子を、個別にコードしたものである。こうしたNA遺伝子と一緒に、2つのN1系統発生クラスター（N1-古典的およびN1-パンデミック）ならびに2つのN2クラスター（N2-1998およびN2-2002）を表す（表3を参照されたい）。初回ワクチン接種時にN1-古典的抗原に対して抗体陽性である乳離れしたブタに、1mL/用量にて2つの筋肉内（IM）ワクチン接種することによりアジュバントワクチンを投与した。アジュバント4種混合NA-RPワクチン効果を、異種N1（H1N1ウイルス）チャレンジ感染に対して試験した。

【0168】

物質および方法

NA-RP抗原の構築：

複製に欠陥があるアルファウイルスRNAレプリコン粒子（RP）はノイラミニダーゼ（NA）遺伝子をコードしており、本質的に本明細書の実施例1に記載された通りにこれを調製した。

【表 4】

表 3: 実施例 3 の NA-RP コンストラクトにおいてコードされた N1 および N2 遺伝子

NA 系統発生クラスター	遺伝子ドナー株	GenBank 登録番号
N1-古典的	A/ブタ/アイオワ/A01410307/2014(H1N1)	KJ605083
N1-パンデミック	A/ブタ/ミネソタ/A01483170/2014(H1N1)	KP036969
N2-1998	A/ブタ/ミシガン/A02077465/2015(H1N2)	KR982634
N2-2002	A/ブタ/イリノイ/A01475495/2014(H1N2)	KJ941362

n=1 グループあたり 10 頭のブタ

【0169】

ウイルス

チャレンジウイルスは、USDAの国立獣医学研究所（National Veterinary Services Laboratories）から得た。A／ブタ／イリノイ／A01554351／2015（H1N1）は、H1－ガンマクラスターのHA遺伝子と、N1－古典的クラスターのNA遺伝子を保持する。ウイルスをMDCK細胞培養にて増殖した。集密的な細胞を約48時間の間、細胞単層の70％超で細胞変性効果が明らかになるまで感染させた。収集時、その上澄みを容器から取り除き、ウイルスを凍結保存する前に遠心分離することで清澄化した。

【0170】

動物

乳離れした子ブタを高度に健康な群れから血清スクリーニングを基に選択して、ワクチンおよびチャレンジ株に対する既存のHIまたはNI（ノイラミニダーゼ抑制）抗体の欠損を確認した。動物は雄と雌を混合させており、初回ワクチン接種時には週齢約3週間であった。

【0171】

ワクチン接種およびチャレンジ

処置グループを表4にて概説した。4種混合NA－RPワクチンは、各RP／用量につき 10^6 個のコピーにて処方されており、これは機能的RPを定量化する免疫蛍光法に基づく効力アッセイに基づくものであった。NA－RP抗原は、1％のブタ血清と5％のスクロースから成る安定剤中で処方された。プラセボワクチンは、同様の安定剤から成っていたが、抗原を含まなかった。ワクチンは、週齢3週および週齢7週のブタへとIM経路によって投与される直前に、XSolve油性アジュバント（1：1v／v、1mL用量）と混合された。用量レベルは、ワクチン接種後に保存されていたワクチン物質上でIFA試験を行うことにより逆滴定された。血清サンプルを初回ワクチン接種の日、2回目のワクチン接種の日、および、チャレンジ感染の日に収集した。

【0172】

初回ワクチン接種の1日前に全てのブタを計量し、N1－古典的抗体陽性グループのブタには、2mL／kg用量のN1－古典的過免疫血清（N1－古典的抗原に対し、1：2560の抗NI抗体力価）を皮下注射した。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4:実施例 3 のような H1N1 チャレンジ株を有する処置グループ

グループ	N1-古典的 抗体の状態	ワクチン (+XSolve)	RP 1mL 用量あたり
1	陽性	4 種混合 NA-RP	10^6
2	陰性	4 種混合 NA-RP	10^6
3	陽性	プラセボ	---
4	陰性	プラセボ	---

(n=1 グループあたり 10 頭のブタ)

【0173】

チャレンジ感染は、2 回目のワクチン接種の 3 週間後にブタへと投与された。H1N1 のチャレンジ物質（H1-ガンマ-N1-古典的）を、 $10^6.5$ TCID₅₀/ブタ（6 mL の体積）である目標用量に処方した。チャレンジ物質を気管内経路により投与した。保存されていたチャレンジ物質を逆滴定することにより、チャレンジウイルス用量を確認した。全てのブタから、チャレンジ前日、チャレンジ後 1 日目、3 日目および 5 日目時点で鼻スワブを収集した。

【0174】

剖検をチャレンジ後 5 日目時点で実施した。資格のある獣医師の監修の下で、5 DPC でバルビツールを過量投与することにより、ブタを安楽死させた。肉眼で確認できる病変に侵された各葉の表面積を記録するため、肺を収集して観察し、総合的なパーセントの肺病変スコアを得た。全てのブタから気管支肺泡洗浄液および鼻スワブを収集し、ウイルス力価を測定した。肺切片は、顕微鏡レベルの病変を病理組織学的分析のために収集された。

【0175】

免疫応答分析：

ブタ血清サンプル中の IAV-S 特異的抗体は、NI 試験により決定された。血清は、 56°C で 30～60 分間熱不活化された。NI 試験は、Sandbulte & Eichlerberger (Methods Mol Biol 1161: 337-45, 2014) の方法を少し変更して実施された。簡潔には、血清の 2 倍段階希釈物を、発現されたタンパク質抗原と等量にてフェチュインコーティングされた 96 ウェルプレート上で混合し、 37°C で一晩インキュベートした。ピーナツアグルチニン・ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を、室温にて 2 時間添加し、シアル酸を取り除いたフェチュイン分子と結合させた。TMB 着色基質によりシグナルを得て、結果は 650 nm で読み取られた。NA 抗原を欠損したネガティブコントロールの平均光学密度 (OD) を、全てのウェルから差し引いた。その後、試験サンプルの OD 値は、0～100% のスケール上で標準化され、ここで、ポジティブコントロールウェルの平均 OD (NA 抗原を含有していたが、血清は含有していない) を 100% と定義した。NI 抗体力価は、ノイラミニダーゼ活性の 50% 以上を阻害したサンプルの最大希釈として定義された。

【0176】

肺の病理検査

全ての肺葉の外側にて観察された肉眼で確認できる病変（紫～桃色で明確に区分された浸潤影）を、肺前部および後部のグリッド図上に記録した。各ブタに対する総合スコア（パーセント肺病変）は、病変を侵しているグリッドの数に従って計算した。

【0177】

ウイルス排出

鼻スワブおよび BAL 流体を、感染した媒体 [0.3% のウシ血清アルブミン (画分 V)、2 mM の L-グルタミン、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゲンタマイシン、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トリプシン IX を追加したダルベッコ最小必須培地 (DMEM)] で 10 倍段階希釈し、100 μ

Lの各希釈液を、96ウェルプレート中の集密的なMDCK細胞の4つ組のウェルへと添加した。プレートを5%のCO₂、37℃でインキュベートし、各ウェルからの上澄みを赤血球凝集反応試験することにより、感染性ウイルスの存在を72時間後に観察した。IAV-S力価は、Spearman-Kärber法を用いて計算され、mLあたりLog₁₀ TCID₅₀として表した。

【0178】

結果

多価NA-RPによりワクチン接種されたブタの免疫応答を図3に表す。以下の点は注目すべき点である。

【0179】

－初回ワクチン接種を受ける前日にN1－古典的過免疫血清を用いて受動的に導入されたブタは、ワクチン接種時に40～80のN1－古典的抗体力価を有した。

【0180】

－X Solveアジュバントで4種混合NA-RPワクチンを2回ワクチン接種した後、血清陰性およびN1－抗体血清陽性であるブタの両方は、そのN1－古典的抗体力価の著しい増加を示した。これは、RPコードされた抗原に対する抗体に対して陽性である標的動物であっても、油性アジュバントを含むRPワクチン接種は効果的であることを示した。

【0181】

－N1－古典的陰性／プラセボワクチン接種されたグループにおけるブタのNI力価は、血清陰性のままであった。

【0182】

肺病変に関して、チャレンジ感染に対する4種混合NA-RPワクチン効果を図4に表す。注目すべきは、4種混合NA-RPワクチン接種は、それらの初回ワクチン接種時にN1－古典的抗体を有するブタまたは有さないブタにワクチン接種した場合、両方の場合で肺病変を減少させる点で高い効果があったことである。両方のグループにおいて、肺病変のパーセントは、プラセボワクチン接種されたグループと比べて著しく減少した。

【0183】

〔実施例4〕

油性アジュバントは、アルミニウムアジュバントまたは水に対して、ブタ流行性下痢ウイルス抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子に対するブタ中の抗体応答の規模および期間を向上する

9頭の子ブタであって週齢が約3週である子ブタを、それぞれ3頭ずつの動物のグループへと無作為化した。ブタ流行性下痢ウイルス（PEDV）のスパイク糖タンパク質を発現しているアルファウイルスRNAレプリコン粒子ワクチンを調製し、20用量のバイアル内に凍結乾燥させた。試験0日目に、ブタは、水、水酸化アルミニウムアジュバントまたはX Solveアジュバントのいずれかで再水和された1.0mLのアルファウイルスRNAレプリコン粒子ワクチンを用いて、筋肉内にワクチン接種された。試験21日目、ワクチンの新しいバイアルにより該プロセスを繰り返した。再水和後の用量あたりのアルファウイルスRNAレプリコン粒子の最終力価は、免疫蛍光アッセイによって決定され、全グループに対して約 7×10^6 RP/用量であった。試験中収集された血清を、PEDV中和抗体用にアッセイした。表5を参照されたい。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 5:中和抗体開発における異なるアジュバントの効果

アジュバント	ブタ #	PEDV 中和抗体の力価				
		プレブリー ード	20 DPV	6 DPV2	13 DPV2	20 DPV2
アジュバントなし	154	<20	<20	20	40	20
	157	20	<20	<20	20	<20
	158	<20	<20	<20	<20	<20
XSolve	151	<20	<20	160	320	160
	155	<20	<20	40	80	20
	159	<20	<20	160	160	160
アルヒドロゲル	152	<20	<20	<20	<20	20
	153	20	<20	<20	<20	40
	156	<20	20	<20	<20	40

10

【0184】

非アジュバントワクチンで処理されたブタは、2つの用量のワクチン後、中和抗体が低量かまたは検出不可能であった。水酸化アルミニウムによるアジュバントワクチンで処理されたブタは全て中和抗体を発現させ、検出限界のすぐ上であった。対照的に、XSolveによるアジュバントワクチンは、2つの用量のワクチン後、より高い中和抗体を誘導しており、3頭のブタ全てが他の試験グループで観察されたピーク力価よりも高い最小抗体力価に達していた。したがって、アジュバントとしての水酸化アルミニウムの使用は有効ではなく、実質的には油性アジュバントの方がより効果的であった。

20

【0185】

【実施例 5】

油性アジュバントは、ニワトリにおいてインフルエンザ抗原をコードしているアルファウイルスRNAレプリコン粒子のワクチン接種効果を向上させる

30

初生雛を、10羽の鳥のグループへと無作為化した。H3N2ブタインフルエンザ株の赤血球凝集素抗原を発現しているアルファウイルスRNAレプリコン粒子ワクチンを、 1×10^8 RP/用量の力価で調製した。ワクチン接種の直前に、RPのみを受けるグループ向けのワクチンを、滅菌PBS希釈液を用いて1:1 (v/v)で希釈し、一方、アジュバントを加えたアルファウイルスRNAレプリコン粒子のグループのワクチンを、XSolveアジュバントを用いて1:1 (v/v)で希釈した。雛からの血清を、ワクチン接種後試験0日目、7日目および14日目における赤血球凝集抑制(HI)力価用にあてた。

【表 7】

表 6:HI 力価における油性アジュバントの効果

40

ワクチン	鳥の数	幾何平均 HI 力価		
		0 日目	7 日目	14 日目
RP のみ	10	25	25	18
RP+油性アジュバント	10	25	35	55
プラセボ	10	25	27	14

【0186】

50

非アジュバントワクチンおよびプラセボワクチンと対照的に、X S o l v e アジュバントをアルファウイルスRNAレプリコン粒子ワクチンに添加することで、単回のワクチン接種後、鳥のHI力価に対する明確な増加を誘導した。

【0187】

〔実施例6〕

油性アジュバントは、ニワトリにおいてIBDV抗原を発現しているアルファウイルスRNAレプリコン粒子ワクチンの効果を向上させる

このワクチン接種チャレンジ検査は、ファラガー株52／70である、伝染性ファブリキウス嚢病（IBDV）由来のVP2-4-3ポリタンパク質抗原を発現しているRPのワクチン接種効果において、油性アジュバントの効果を試験した。試験動物は、IBDVに対して抗体に陰性であるSPF（特異的な病原体を含まない）ニワトリであった。グループのサイズは5羽または10羽の鳥であった。皮下経路により、日齢（孵化日）にてワクチン接種を実施し、一方のグループ（n=5）は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で偽ワクチン接種された。ワクチン接種された一方のグループは、水性緩衝液中のRPワクチンを受け、他のワクチングループは、X S o l v e アジュバントを1：1で混合したRPワクチンを受けた。ワクチン接種後28日目には、全てのグループは、点眼経路により毒性の強いIBDV株CS89によってチャレンジ感染を施された。チャレンジ後10日目に実施した剖検にて全体の病変に対する嚢状組織をスコアリングし、IBDV感染向けの周知の基準に従い、組織病理学により、ワクチン接種効果を監視した。

【表8】

表 7:重篤な IBDV チャレンジに対する、RP ワクチン接種効果における油性アジュバントの効果

グループ	ワクチン	鳥の数	防御%	
			総嚢状病変に基づく	顕微鏡レベルの病変に基づく
1	RP-IBDV ポリタンパク質	10	0%	0%
2	RP-IBDV ポリタンパク質 +XSolve	10	100%	100%
3	プラセボ	5	0%	0%

【0188】

油性アジュバントをRPワクチンに添加することにより、明らかに、ゼロから完全防御へとニワトリの免疫応答を向上させる、重篤なチャレンジ感染に対するワクチン接種効果において著しい効能が生じた。

【0189】

〔実施例7〕

油性アジュバントはまた、魚におけるアルファウイルスRNAレプリコン粒子ワクチンの効果を向上させる

マダイイリドウイルス（RSIV）の主要なカプシドタンパク質を発現しているアルファウイルスRNAレプリコン粒子ワクチンを、本明細書に記載されるような標準方法によって調製した。ティラピアに、0.05mLのワクチンを用いて筋肉内へとワクチン接種し、次いで、ワクチン接種後異なる時点にてチャレンジさせた。本試験では、処置ごとおよびチャレンジ時間ごとに30匹の魚を使用した。ワクチン接種直前に、アルファウイルスRNAレプリコン粒子ワクチンを、PBSまたは2つの物質を含む非鉱油アジュバントであるSVEAと、1：1（v／v）で混合させた。処置ごとのRPの力価は、 1×10^7 RP／用量であった。コントロールである魚を、プラセボワクチンでワクチン接種し

た。

【表 9】

表 8A: ティラピアの生存パーセントにおける油性アジュバントの効果

ワクチン処置グループ	チャレンジ後 14 日目の生存率			
	3 週間の 低用量チ ャレンジ	3 週間の高 用量チャ レンジ	6 週間の 低用量チ ャレンジ	6 週間の高 用量チャ レンジ
アジュバントを含まない RP-イ リド	77%	47%	83%	47%
油性アジュバントを含む RP-イ リド	90%	43%	83%	70%
非ワクチン接種コントロール	43%	27%	67%	37%

10

【表 10】

表 8B: ティラピアの相対生存パーセントにおける油性アジュバントの効果

ワクチン処置グループ	コントロールに対する相対生存パーセント			
	3 週間の 低用量チ ャレンジ	3 週間の高 用量チャ レンジ	6 週間の 低用量チ ャレンジ	6 週間の高 用量チャ レンジ
アジュバントを含まない RP-イ リド	58.8	27.3	50.0	15.8
油性アジュバントを含む RP-イ リド	82.4	22.7	50.0	52.6
非ワクチン接種コントロール	なし	なし	なし	なし

20

【0190】

「3 週間の低用量」および「6 週間の高用量」チャレンジの両方にて、アジュバントにより RP ワクチン接種された魚の相対的な生存が強力に向上した。2 つの他のチャレンジ処置により同等の結果を得た。したがって、アジュバントを含まない RP ワクチンと比べて、アジュバントを含むアルファウイルス RNA RP ワクチンはかなりより効果的であり、単回用量によるワクチン接種のみを用いるだけで有効なワクチン接種を提供した。

30

【0191】

【実施例 8】

RP および油性アジュバントの同時使用および並行使用の有効性

試験は、実施例 3 に記載されたように、アルファウイルス RNA レプリコン粒子の 4 種混合ブタインフルエンザウイルス NA ワクチンを用いてブタで実施された。これは、ワクチン成分である RP と油性アジュバントを、異なる種類で使用するることによる効果を示すのに役立った。

【0192】

物質および方法

ブタは、週齢約 4 週および約 7 週でワクチン接種された。4 種混合 NA ワクチンは、実施例 3 に記載されたように、二重遺伝子である N1 と、二重遺伝子である N2 RP コンストラクトとの混合物であり、それぞれ約 2×10^6 RP/用量で投与された。全グループは、4 頭のブタを含有していた。試験プロトコルの構成を表 9 に表す。グループ 2 は、X Solve アジュバントと混合された NA RP を同時使用にて受けていた。

40

【0193】

グループ 3 および 4 は、RP および油性アジュバントの並行使用の効果を試験し；投与は、首の同じ側（5 cm 超離れた）か、または首の反対側のいずれかにて、互いに約 10 分間以内に施された。

【0194】

50

ブタインフルエンザ H A H 1 抗原をコードしている R P を使用している、1 つのコントロールグループであるグループ 5 が含まれていた。これは、約 1×10^7 R P / 用量で投与された。

【0195】

血清は、初回ワクチン接種の日、2 回目のワクチン接種の日および 2 回目のワクチン接種後 7 日目に収集された。これらの血清は、それぞれ 4 種類の N A 種用に個別の同種 N I アッセイ上で試験された。

【0196】

測定された得られた N I 力価は、図 5 および図 6 中に表されており、これにより、図 5 は経時的に測定された標準偏差を含む 3 つの時点での N 1 古典的 N A 抗原に対する N I 力価を表す。図 6 は、2 回目のワクチン接種後 7 日目時点における、結合された 4 種類の N A 種のグループ平均 N I 力価を表す。

【表 11】

表 9: 実施例 8 の試験プロトコル

グループ	RP	アジュバント	投与
1	SIV 4 種混合 NA	なし	1ml 用量で IM 注射
2		Xsolve	1ml 用量で混合および IM 注射
3			個別に RP および油性アジュバントをそれぞれ 0.5ml 注射、IM、首の同じ側
4			個別に RP およびアジュバントをそれぞれ 0.5ml 注射、IM、首の反対側
5	SIV HA H1	なし	1ml 用量で混合および IM 注射

【0197】

結果および結論

実施例 8 にて測定された結果から、以下のいくつかの効果を観察できた：

ー測定された 3 つの時点での 4 種類の N A 種に対する N I 力価のパターンはほぼ同一であり、したがって、図 5 で表された N A N 1 古典的の結果は、他の 3 種類の N A 種に対する力価パターンを表す。

【0198】

ー更には、7 d p v 2 での 4 種類の N A 種向けの N I 力価応答パターンは、図 6 に表されているように大部分が同じものである。

【0199】

ー予想されたように、H A H 1 R P コントロール（グループ 5）の N I 力価結果は N I 力価を誘導しなかった；これにより、特異的な応答に対する力価閾値を設定している。

【0200】

ーいくつかの試験用変化を除いて、グループ 2～4 における大半の N I 力価は、R P および油性アジュバントを受けた際には、R P のみを受けたグループ（グループ 1）の力価よりも著しく高かった。これは油性アジュバントが、R P による免疫化を強力に高めることを示す。

【0201】

ー同時使用における R P および油性アジュバントを受けるグループ（グループ 2）は、前述の実施例中で既に観察された油性アジュバントの強力な効果を確認した。

【0202】

ー R P および油性アジュバント（グループ 3～4）を並行使用することの免疫化効果は、同時使用のそれと非常に近い状態となっており、R P 免疫応答による強力な刺激であった。投与の部位の違いによる明確な影響は存在しなかった。

【0203】

本発明は、本明細書に記載されるような特異的な実施形態によって範囲内に限定されるべきではない。実際には、本明細書に記載されるような変更に加え、前述の説明から様々な本発明の変更が当業者には明らかとなるだろう。こうした変更は、添付の特許請求の範囲の範囲内にあることが意図されている。

【0204】

核酸またはポリペプチドに対して与えられた全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、全ての分子量または分子質量値は近似のものであり、説明のために提供されていることが更に理解されるであろう。

10

20

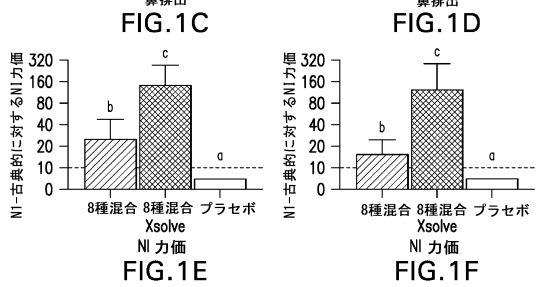
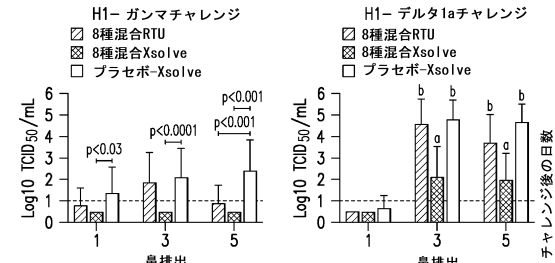
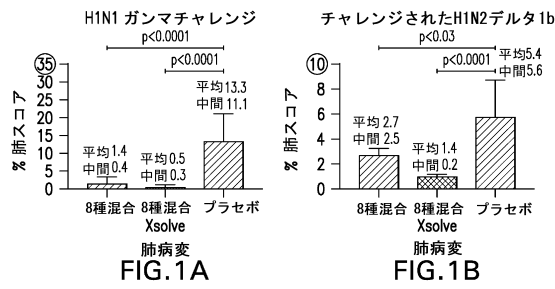
30

40

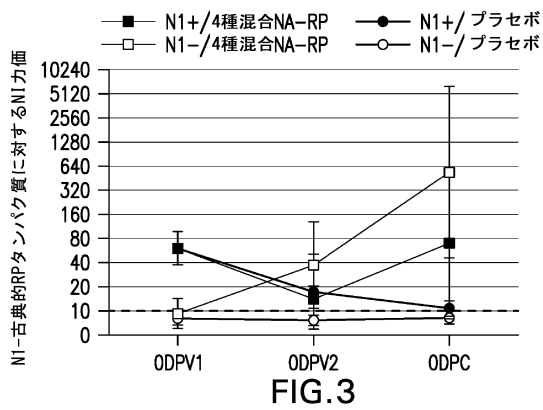
50

【図面】

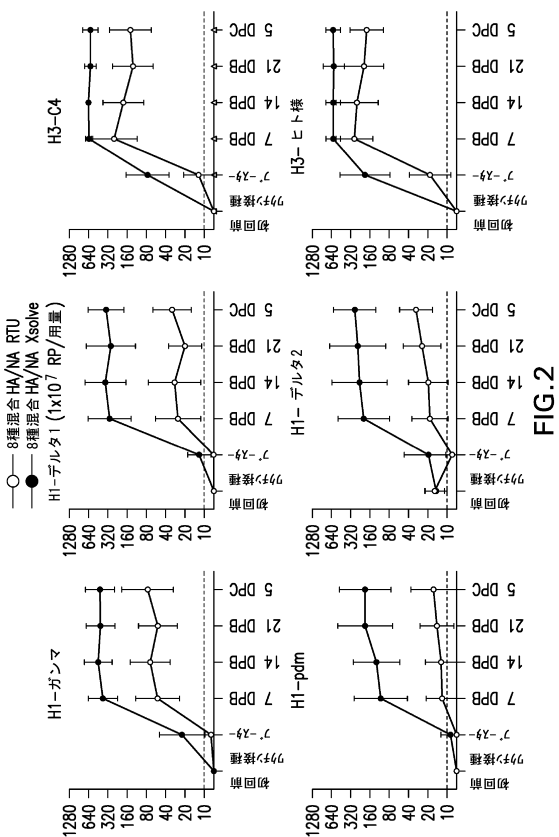
【図 1】



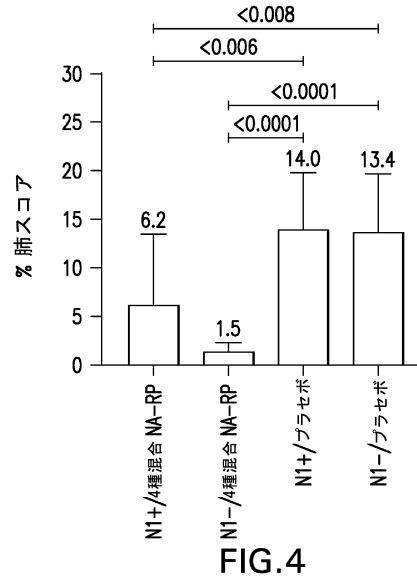
【図 3】



【図 2】



【図 4】



10

20

30

40

50

【図 5】

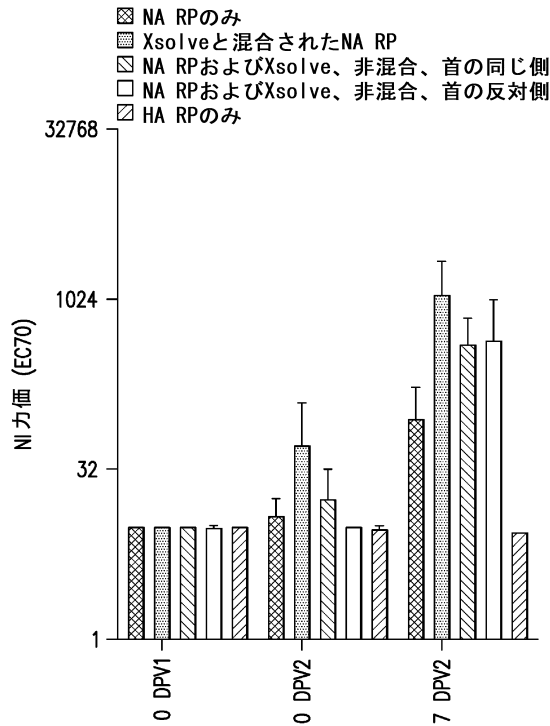


FIG.5

【図 6】

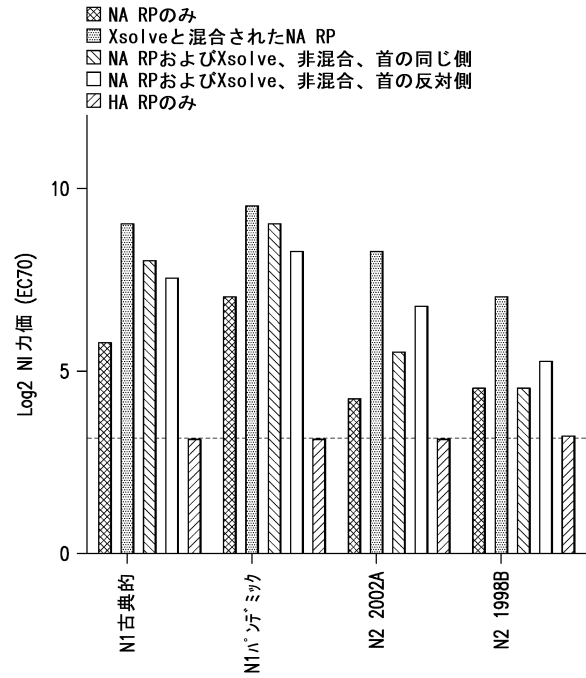


FIG.6

【配列表】

0007354106000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 モグラ, マーク・エー

アメリカ合衆国、アイオワ・50010、エイムズ、サザン・ヒルズ・ドライブ・アイオワ・ステイト・ユニバーシティ・パーク・1102

(72)発明者 ストレート, エリン

アメリカ合衆国、カンザス・66018、デソート、ウエスト・ナインティファースト・ストリート・35500

(72)発明者 セヘルス, ルード・フィリップ・アントン・マリア

オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメル、ウィム・ドゥ・コルベルストラート・35

審査官 平井 裕彰

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0300205 (US, A1)

国際公開第2017/162741 (WO, A1)

特表2014-522840 (JP, A)

特表2013-531680 (JP, A)

特表2004-516333 (JP, A)

特開平11-269093 (JP, A)

国際公開第2013/131565 (WO, A1)

国際公開第2005/007689 (WO, A1)

Poultry Science, 1995, Vol.74, No.4, pp.666-671

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K39/00~39/44

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)