

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4896021号
(P4896021)

(45) 発行日 平成24年3月14日(2012.3.14)

(24) 登録日 平成24年1月6日(2012.1.6)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 39/155	(2006.01) A 61 K 39/155 Z N A
A 61 K 48/00	(2006.01) A 61 K 48/00
A 61 K 35/76	(2006.01) A 61 K 35/76
A 61 P 31/16	(2006.01) A 61 P 31/16
A 61 K 39/215	(2006.01) A 61 K 39/215

請求項の数 32 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-527564 (P2007-527564)	(73) 特許権者 506361100 ノバルティス ヴァクシinz アンド ダ イアグノスティクス, インコーポレイテ ッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 08-2916, エミリービル, ホー トン ストリート 4560
(86) (22) 出願日	平成17年5月20日 (2005.5.20)	
(65) 公表番号	特表2008-500399 (P2008-500399A)	
(43) 公表日	平成20年1月10日 (2008.1.10)	
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/018225	
(87) 國際公開番号	W02006/078294	
(87) 國際公開日	平成18年7月27日 (2006.7.27)	
審査請求日	平成20年5月12日 (2008.5.12)	
(31) 優先権主張番号	60/573,433	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成16年5月21日 (2004.5.21)	(74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/643,737	
(32) 優先日	平成17年1月12日 (2005.1.12)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】呼吸器系病原体ワクチンのためのアルファウイルスベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫原性組成物であって、該組成物は、以下：

(a) アルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子であって、以下：

(i) 呼吸器系病原体に由来する少なくとも1つの免疫原性タンパク質をコードする第1の異種核酸、および

(ii) 呼吸器系病原体に由来する少なくとも1つの免疫原性タンパク質をコードする第2の異種核酸

を含み、該第1および第2の異種核酸が、同一の呼吸器系病原体の異なる株に由来する同一のタンパク質をコードする、アルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子；ならびに

(b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

【請求項 2】

前記呼吸器系病原体が、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、およびSARSウイルスからなる群から選択されるウイルスである、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

前記呼吸器系病原体が、Mycobacterium tuberculosis、Co

10

20

Corynebacterium diphtheriae、*Bordetella pertussis*、*Streptococcus pneumoniae*、型別不能 *Haemophilus influenzae*、*Moraxella catarrhalis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Bacillus anthracis*（炭疽菌）、および *Legionella pneumophila*（レジオネラ症）からなる群から選択される細菌である、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

前記呼吸器系病原体がインフルエンザウイルスであり、前記第 1 の異種核酸が、第 1 のインフルエンザウイルス株に由来する赤血球凝集素タンパク質をコードし、前記第 2 の異種核酸が、第 2 のインフルエンザウイルス株に由来する赤血球凝集素タンパク質をコードする、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。 10

【請求項 5】

1 つ以上の更なるインフルエンザウイルス株に由来する 1 つ以上の更なる免疫原性タンパク質をコードする 1 つ以上の更なる異種核酸をさらに含む、請求項 4 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

前記赤血球凝集素タンパク質が、1 つ以上のパンデミックなインフルエンザウイルス株またはパンデミックである可能性があるインフルエンザウイルス株に由来する、請求項 4 または請求項 5 に記載の免疫原性組成物。 20

【請求項 7】

前記赤血球凝集素タンパク質が、1 つ以上のインターパンデミックなインフルエンザウイルス株に由来する、請求項 4 または請求項 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

前記赤血球凝集素タンパク質が、1 つ以上のパンデミックなインフルエンザウイルス株またはパンデミックである可能性があるインフルエンザウイルス株と、1 つ以上のインターパンデミックなインフルエンザウイルス株との組み合わせに由来する、請求項 4 または請求項 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

免疫原性組成物であって、該組成物は、以下：

(a) アルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子であって、以下： 30

(i) 呼吸器系病原体に由来する少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質をコードする第 1 の異種核酸、および

(ii) 呼吸器系病原体に由来する少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質をコードする第 2 の異種核酸

を含み、該第 1 および第 2 の異種核酸が、異なる呼吸器系病原体に由来する同一のタンパク質をコードする、アルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子；ならびに

(b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。 40

【請求項 10】

前記呼吸器系病原体の 1 つが、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、*R S* ウィルス、ヒトメタニューモウィルス、および *S A R S* ウィルスからなる群から選択されるウイルスである、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

前記呼吸器系病原体の 1 つが、*Mycobacterium tuberculosis*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Bordetella pertussis*、*Streptococcus pneumoniae*、型別不能 *Haemophilus influenzae*、*Moraxella catarrhalis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Bacillus anthracis* 50

r a c i s (炭疽菌)、および *Legionella pneumophila* (レジオネラ症) からなる群から選択される細菌である、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

前記第 1 の異種核酸が、インフルエンザウイルスのタンパク質をコードし、前記第 2 の異種核酸が、SARS コロナウイルスのタンパク質をコードする、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

前記第 1 の異種核酸が、パラインフルエンザウイルスのタンパク質をコードし、前記第 2 の異種核酸が、RS ウィルスのタンパク質をコードする、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 14】

前記第 1 の異種核酸が、ヒトメタニューモウイルスのタンパク質をコードし、前記第 2 の異種核酸が、RS ウィルスのタンパク質をコードする、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

前記第 1 または第 2 の異種核酸が、赤血球凝集素タンパク質、ノイラミニダーゼタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質、およびマトリックスタンパク質からなる群から選択されるインフルエンザウイルスのタンパク質をコードする、請求項 1 または請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

前記第 1 または第 2 の異種核酸が、スパイクタンパク質、エンベロープタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質、およびマトリックスタンパク質から選択される SARS コロナウイルスのタンパク質をコードする、請求項 1 または請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 17】

前記第 1 または第 2 の異種核酸が、糖タンパク質 G、融合タンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質、およびマトリックスタンパク質から選択されるヒトメタニューモウイルスのタンパク質をコードする、請求項 1 または請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

前記第 1 または第 2 の異種核酸が、赤血球凝集素 - ノイラミニダーゼタンパク質、融合タンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質、およびマトリックスタンパク質から選択されるパラインフルエンザウイルスのタンパク質をコードする、請求項 1 または請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 19】

前記第 1 または第 2 の異種核酸が、糖タンパク質 G、融合タンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質、およびマトリックスタンパク質から選択される RS ウィルスのタンパク質をコードする、請求項 1 または請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

前記第 1 の異種核酸が、第 1 のアルファウイルスサブゲノム接合部プロモーターと作動可能に連結していて、前記第 2 の異種核酸が、第 2 のアルファウイルスサブゲノム接合部プロモーターと作動可能に連結している、請求項 1 ~ 請求項 19 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 21】

前記第 1 または第 2 の異種核酸が、配列内リボソーム進入部位 (IRES) に相当する核酸をさらに含む、請求項 1 ~ 請求項 19 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 22】

前記アルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子が、シンドビスウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、およびロス川ウイルスから選択される 1 つ以上のアルファウイルスに由来するものである、請求項 1 ~ 請求項 21 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

50

【請求項 2 3】

アジュバントをさらに含む、請求項 1 ~ 請求項 2 2 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4】

前記免疫原性組成物が凍結乾燥されている、請求項 1 ~ 請求項 2 3 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 請求項 2 4 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物を含むワクチン。

【請求項 2 6】

免疫反応を刺激するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 請求項 2 4 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物の使用。 10

【請求項 2 7】

前記医薬が、第 2 の免疫原性組成物と組合わせて使用するためのものであることを特徴とする、請求項 2 6 に記載の使用であって、

該第 2 の免疫原性組成物が

a) 前記異種核酸と実質的に同じ源に由来するタンパク質、ポリペプチド、または該タンパク質もしくは該ポリペプチドの一部、および

b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、使用。

【請求項 2 8】

前記第 2 の免疫原性組成物がアジュバントと組合わせて使用するためのものであることを特徴とする、請求項 2 7 に記載の使用。 20

【請求項 2 9】

前記第 2 の免疫原性組成物が、さらにアジュバントを含む、請求項 2 7 に記載の使用。

【請求項 3 0】

前記第 1 または第 2 の免疫原性組成物が、筋肉内、鼻腔内、皮下、皮内、気管内、および経口からなる群から選択される経路による投与に適していることを特徴とする、請求項 2 6 ~ 請求項 2 9 のいずれか 1 項に記載の使用。 30

【請求項 3 1】

前記医薬が、第 2 の免疫原性組成物と組合わせて使用するためのものであることを特徴とする、請求項 2 6 に記載の使用であって、

該第 2 の免疫原性組成物が

a) 前記異種核酸と実質的に同じ源に由来するタンパク質、ポリペプチド、または該タンパク質もしくは該ポリペプチドの一部をコードする、非アルファウイルス由来のウイルスベクター、および

b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、使用。

【請求項 3 2】

前記医薬が、第 2 の免疫原性組成物と組合わせて使用するためのものであることを特徴とする、請求項 2 6 に記載の使用であって、 40

該第 2 の免疫原性組成物が

a) 前記異種核酸と実質的に同じ源に由来するタンパク質、ポリペプチド、または該タンパク質もしくは該ポリペプチドの一部をコードする、弱毒化ウイルス、および

b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

(技術分野)

本発明は一般に、呼吸器系病原体に対する免疫反応を刺激するための組成物および方法 50

に関する。具体的には、本発明は、呼吸器系病原体に由来する1つ以上の抗原を発現するアルファウイルスレプリコン、アルファウイルスベクター構築物、アルファウイルスレプリコン粒子に関する。本明細書に記載された組成物は、1つ以上の呼吸器系病原体に対する（例えば、予防的および／または治療的な）免疫反応を生じさせるのに有用である。

【背景技術】

【0002】

（背景）

アルファウイルスは、トガウイルス科の一連の遺伝的、構造的、および血清学的に近縁の節足動物媒介性ウイルスを含む。シンドビスウイルス、セムリキ森林熱ウイルス（S F V）、ロス川ウイルス（R R）、およびベネズエラ馬脳炎（V E E）ウイルスなど、少なくとも26種の既知のウイルスおよびウイルス亜型がアルファウイルス属に分類されている。

10

【0003】

シンドビスウイルスは、トガウイルス科アルファウイルス属のプロトタイプメンバーである。その複製戦略は多様な培養細胞において十分に特徴付けられており、他のアルファウイルスのモデルとなっている。要するに、シンドビスのゲノムは（他のアルファウイルス同様）、キャップされ、ポリアデニル化され、また、ウイルスにコードされたカプシドタンパク質殻内に含まれる、約12kbの単鎖のプラスセンスRNA分子である。ヌクレオカプシドは宿主に由来する脂質エンベロープでさらに囲まれており、その中に2個のウイルス特異的糖タンパク質E1およびE2が挿入され、細胞質尾部によってヌクレオカプシドに固定されている。特定のアルファウイルス（例えばS F V）は、さらに、E2前駆タンパク質P E 2の切断産物である別のタンパク質E3を保持している。

20

【0004】

ウイルス粒子が標的細胞に吸着し、浸透し、そしてヌクレオカプシドを脱殻してウイルスのゲノムRNAを細胞質中に放出すると、ウイルスゲノムの5'末端の3分の2のところから翻訳される4種のアルファウイルスの非構造タンパク質（n s P）およびその前駆体によって複製過程が媒介される。次に、完全長マイナス鎖RNAが合成されて、さらに別のプラス鎖ゲノムRNA、およびサブゲノム接合部プロモーターから内部的に開始されて大量に発現される26SサブゲノムRNAを合成するための鋳型が提供される。アルファウイルス構造タンパク質は、ゲノムの3'末端側の3分の1に相当するサブゲノム26S RNAから翻訳され、n s P sのように、翻訳後に加工されて個々のタンパク質、カプシド、E1およびE2（p E 2）になる。

30

【0005】

呼吸器系ウイルス病原体において、アルファウイルスレプリコンベクターに基づくワクチンを、インフルエンザ（F L U）、呼吸器系合胞体ウイルス（R S V）およびパラインフルエンザウイルス（P I V）のような呼吸器系ウイルスに対する免疫反応を刺激する手段として利用するための、さまざまな方法が開示されてきた。より具体的には、F L Uに関するいくつかの研究では、各研究が、単一のH A 抗原または単一のN P 抗原を発現するレプリコンベクターの使用のみに取り組んできた（非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7参照）。

40

【0006】

免疫反応を刺激するために、H A またはN P 以外の代替的F L U抗原をコードする遺伝子を組み込む、アルファウイルスに基づく戦略を使うこと、または、1個より多いF L U抗原をコードする遺伝子を組み込む、アルファウイルスに基づく免疫原性組成物またはワクチンを使うことは記載されていない。したがって、これらの不十分な点に対処する改良型アルファウイルスベースのF L Uワクチンに対する需要が存在する。

【0007】

R S Vに対するワクチン戦略として、G抗原またはF抗原を発現するアルファウイルスベクターが検討されてきた（特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献5、非特許文献8、非特許文献9）。P I Vに関しても同様に、H N抗原またはF抗原

50

を発現するベクターが提案されてきた（特許文献6、特許文献7、特許文献8、特許文献9、特許文献10）。しかし、HN、G、またはF以外の代替的RSV抗原またはPIV抗原を組み込んで免疫反応を刺激する、アルファウイルスに基づく戦略を使うこと、または、複数のRSV抗原またはPIV抗原を組み合わせる、アルファウイルスベースの免疫原性組成物またはワクチンを使うことは記載されていない。

- 【特許文献1】米国特許第6060308A号明細書
- 【特許文献2】米国特許第6428324B1号明細書
- 【特許文献3】米国特許第6475780B1号明細書
- 【特許文献4】国際公開第9911808号パンフレット
- 【特許文献5】国際公開第9925858号パンフレット 10
- 【特許文献6】米国特許第6060308A号明細書
- 【特許文献7】米国特許第6428324B1号明細書
- 【特許文献8】米国特許第6475780B1号明細書
- 【特許文献9】国際公開第9911808号パンフレット
- 【特許文献10】国際公開第9925858号パンフレット
- 【非特許文献1】Huckriedeら, Vaccine, 2004年, 第22巻, p. 1104-113
- 【非特許文献2】Berglundら, Vaccine, 1999年, 第17巻, p. 497-507
- 【非特許文献3】Berglundら, Nat. Biotechnol., 1998年, 第16巻, p. 562-565 20
- 【非特許文献4】Pushkoら, Virology, 1997年, 第239巻, p. 389-401
- 【非特許文献5】Zhousら, PNAS, 1995年, 第92巻, p. 3009-3013
- 【非特許文献6】Vignuzziら, J. Gen. Virol., 2001年, 第82巻, p. 1737-1747
- 【非特許文献7】Schultz-Cherryら, Virology, 2000年, 第278巻, p. 55-59
- 【非特許文献8】Anderssonら, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2000年, 第29巻, p. 247-253 30
- 【非特許文献9】Fleetonら, J. Infect. Dis., 2001年, 第183巻, p. 1395-1398

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

ウイルス、細菌および真菌などの呼吸器系病原体に対する免疫反応をより効果的に刺激する手段として、アルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物およびレプリコン粒子を作製して使用する組成物および方法、ならびに、このようなアルファウイルスベースのベクターを含むワクチンに対する需要が依然として存在している。さらに、1つより多い呼吸器系病原体（例えば、混合免疫原またはワクチン）に対する免疫反応を刺激する手段として、アルファウイルスレプリコンベクターおよびレプリコン粒子を効果的に組み合わせるか、または共発現構築物として作製して使用する組成物および方法、ならびに、そのようなアルファウイルスベースのレプリコンを含むワクチンに対する需要が依然として存在している。 40

【課題を解決するための手段】

【0009】

（要旨）

呼吸器系ウイルス、細菌および真菌など、呼吸器系病原体は、アルファウイルスレプリコンベクターベースのワクチン法に適した標的である。呼吸器系ウイルス病原体は、例え 50

ば、インフルエンザウイルス（F L U）、呼吸器系合胞体ウイルス（R S V）、パライフルエンザウイルス（P I V）、S A R Sコロナウイルス（S A R S - C o V）、ヒトメタニьюモウイルス（H M P V）などを含むことができる。

【0010】

このようにレプリコンベースの方法の主要な商業的用途は人間用予防ワクチンであるが、本発明はまた、獣医学的用途のために同様の戦略を使うことをも意図しており、上記のウイルス群から多数の動物呼吸器系ウイルス病原体が、例えばウシ、ウマ、ブタ、家禽、イヌおよびネコなどにおいて同定されて、その特性が明らかにされている。獣医学分野における非限定的な呼吸器系ウイルス病原体の具体例としては、インフルエンザウイルス、パライフルエンザウイルス、鳥感染性気管支炎ウイルス、ウシR Sウイルス、ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス、馬ヘルペスウイルス、ウシ鼻気管炎ウイルス、イヌジスティンパーウイルス、およびネコカリシウイルスなどが挙げられる。

10

【0011】

本発明は、呼吸器系病原体に由来する1個以上の異種ポリペプチドをコードするアルファウイルスレプリコンベクター、アルファウイルスベクター構築物およびアルファウイルスレプリコン粒子を含む組成物、および、これらのレプリコンベクター、ベクター構築物およびレプリコン粒子を作製し、使用する方法を含む。特定の実施形態において、該アルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子は、1つ以上の呼吸器系病原体に由来するタンパク質の組み合わせをコードする2つ以上の異種配列を含んでいる。

20

【0012】

1つの態様において、アルファウイルスベクター構築物または粒子は、呼吸器系病原体に由来するタンパク質をコードする第1の異種核酸を含んでいる。特定の実施形態において、呼吸器系病原体は、例えばインフルエンザ（F L U）のようなウイルスを含んでおり、異種核酸は赤血球凝集素（H A）タンパク質またはノイラミダーゼ（N A）タンパク質をコードする。

【0013】

別の態様において、本明細書に記載されている免疫原性組成物は、病原体のさまざまな株に由来する同一のタンパク質（例えば、大流行を起こしているか、起こす可能性がある株など、さまざまな株に由来するF L UのH A型タンパク質）をコードする異種配列、同一の病原体の異なるタンパク質（例えば、F L UのH 1およびH 2タンパク質、またはR S VのGタンパク質およびFタンパク質）をコードする異種配列、異なる病原体の同じタンパク質（例えば、F L UノイラミニダーゼおよびP I Vノイラミニダーゼ）コードする異種配列、および/または、異なる病原体の異なるタンパク質をコードする異種配列などが含まれるが、これらに限定されない異種配列の組み合わせを含む。本明細書中に例示された組み合わせは例示に過ぎず、タンパク質の任意の組み合わせを利用できるものと理解されるべきである。

30

【0014】

さらに、任意の数のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、または粒子を用いて1つ以上の異種配列を担持することが可能である。特定の実施形態において、該異種配列は、同一のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、または粒子上に含まれている。例えば、1つ以上のインフルエンザ抗原（例えば、N Aタンパク質および/またはH Aタンパク質）は、本明細書に記載されているような1つのアルファウイルス構築物または粒子によってコードされうる。複数の抗原が含まれている場合、それらの抗原は複数のパンデミックな（またはパンデミックとなる可能性のあるウイルス）、および/またはインターパンデミック（i n t e r p a n d e m i c）な（「年間流行性（a n n u a l）」とも呼ばれる）インフルエンザ株に由来している可能性がある。組成物は、潜在的なパンデミックに対する予防的および/または治療的な免疫反応を被験体に生じさせる上で、および/または、複数の株に対して有効なワクチンを提供するために、有用である。本明細書に記載されている組成物は、従来の卵を用いるF L Uワクチン（典

40

50

型的には3種の抗原に限定され、また、卵の供給によっても制限される)よりも多様な抗原を含んでいるため、より優れた防御を提供することができる。さらに、本明細書に記載されている組成物は、より多様な抗原を含むことができるため、例えば抗原シフトに対して毎年f1uワクチンを組成変更する必要を減少させるか排除する。高齢、若年、または免疫低下している個体などにおいても、より高い効能が、本発明に係る組成物によってもたらされる可能性がある。

【0015】

他の実施形態において、別々のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、または粒子に1つ以上の異種配列が(例えば、第1のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、または粒子内に1つ以上の異種配列、ならびに第2のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物または粒子上に1つ以上の異種配列が)含まれている。

【0016】

このように、本明細書に記載されている組成物が、1つ以上の呼吸器系病原体に由来する複数の抗原タンパク質(例えば、複数のパンデミックおよび/またはインターパンデミックなFLU抗原)を含みうることによって、既述のものよりも多様な株および病原体に対する免疫反応を生じさせることが可能であることが明らかになろう。また、本明細書に記載されている組成物は、さらに1種以上の免疫原性組成物で追加免疫投与する前に初回刺激投与する場合などがあるが、そのような場合に限定されず、多様な組み合わせで使用可能であることも明らかになろう。

【0017】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている組成物は初回刺激投与として、および追加免疫として使用されるタンパク質として使われる。追加免疫投与のタンパク質は、異種配列によってコードされる1つ以上のタンパク質、および/または別のタンパク質を含むことができる。例えば、多数の(パンデミックおよび/またはインターパンデミックの)抗原性FLUタンパク質をコードする異種配列を含む本明細書記載の組成物を、1種以上のFLUタンパク質(例えば、従来型の3抗原FLUワクチン)を投与する前に1回以上投与してもよい。

【0018】

あるいは、本明細書に記載されている組成物を初回刺激および追加免疫に使用してもよい。例えば、パンデミック株に由来する多数の抗原FLUタンパク質をコードする異種配列を含む本明細書記載の組成物を、インターパンデミック株に由来する多数の抗原FLUタンパク質をコードする異種配列を含む本明細書記載の組成物よりも前に投与してもよい。

【0019】

本明細書に記載した任意の実施形態において、1回以上初回刺激した後、1回以上追加免疫することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

したがって、本発明は以下の番号付けされた実施形態を含むが、それらに限定されない。

1. (a) インフルエンザウイルスノイラミニダーゼタンパク質をコードする異種核酸を含むアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および(b)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

2. ノイラミニダーゼタンパク質をコードする上記の核酸が、N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、およびN9からなる群から選択されたインフルエンザウイルス亜型に由来するものである、実施形態1に記載された免疫原性組成物。

3. 上記アルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子が、インフルエンザウイルス赤血球凝集素タンパク質をコードする異種核酸をさらに含む

10

20

30

40

50

、実施形態 1 に記載された免疫原性組成物。

4 . 赤血球凝集素タンパク質をコードする上記核酸が H 1 、 H 2 、 H 3 、 H 4 、 H 5 、 H 6 、 H 7 、 H 8 、 H 9 、 H 10 、 H 11 、 H 12 、 H 13 、 H 14 、および H 15 からなる群から選択されたインフルエンザウイルス亜型に由来する、実施形態 3 に記載された免疫原性組成物。

5 . ノイラミニダーゼタンパク質をコードする上記核酸が第 1 のアルファウイルスサブゲノム接合部プロモーターと作動可能に連結し、また赤血球凝集素タンパク質をコードする上記核酸が第 2 のアルファウイルスサブゲノム接合部プロモーターと作動可能に連結している、実施形態 3 に記載された免疫原性組成物。

6 . 上記異種核酸が、配列内リボソーム進入部位 (I R E S) に相当する核酸をさらに含む、実施形態 3 に記載された免疫原性組成物。 10

7 . (a) パラインフルエンザウイルス赤血球凝集素 - ノイラミニダーゼタンパク質をコードする第 1 の異種核酸、およびパラインフルエンザウイルス融合タンパク質をコードする第 2 の異種核酸を含むアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および (b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む免疫原性組成物。

8 . 赤血球凝集素 - ノイラミニダーゼタンパク質をコードする上記核酸が第 1 のアルファウイルスサブゲノム接合部プロモーターと作動可能に連結し、融合タンパク質をコードする上記核酸が第 2 のアルファウイルスサブゲノム接合部プロモーターと作動可能に連結している、実施形態 7 に記載された免疫原性組成物。 20

9 . 上記核酸が配列内リボソーム進入部位 (I R E S) に相当する核酸をさらに含む、実施形態 7 に記載された免疫原性組成物。

10 . (a) 呼吸器系合胞体ウイルス糖タンパク質 G をコードする第 1 の異種核酸、および呼吸器系合胞体ウイルス融合タンパク質をコードする第 2 の異種核酸を含み、該第 1 および第 2 の異種核酸が配列内リボソーム進入部位 (I R E S) によって分離されている、アルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、ならびに (b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

11 . (a) ヒトメタニューモウイルス糖タンパク質をコードする異種核酸を含むアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および (b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。 30

12 . (a) インフルエンザウイルスタンパク質をコードする第 1 の異種核酸、および S A R S コロナウイルスのタンパク質、呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質、パラインフルエンザウイルスのタンパク質およびヒトメタニューモウイルスのタンパク質からなる群から選択された 1 つのタンパク質をコードする第 2 の異種核酸を含むアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および (b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

13 . 上記第 2 の異種核酸が S A R S コロナウイルスのタンパク質をコードする、実施形態 12 の免疫原性組成物。

14 . (a) パラインフルエンザウイルスのタンパク質をコードする第 1 の異種核酸、および、呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質、 S A R S コロナウイルスのタンパク質およびヒトメタニューモウイルスのタンパク質からなる群から選択された 1 つのタンパク質をコードする第 2 の異種核酸を含むアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および (b) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。 40

15 . 上記第 2 の異種核酸が呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質をコードする、実施形態 14 の免疫原性組成物。

16 . (a) 呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質をコードする第 1 の異種核酸、および、ヒトメタニューモウイルスのタンパク質、パラインフルエンザウイルスのタンパク質および S A R S コロナウイルスのタンパク質からなる群から選択された 1 つのタンパク質をコードする第 2 の異種核酸を含むアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物 50

、またはレプリコン粒子、および(b)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

17. 上記第2の異種核酸がヒトメタニューモウイルスのタンパク質をコードする、実施形態16の免疫原性組成物。

18. (a)インフルエンザウイルスのタンパク質をコードする異種核酸を含む第1のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、(b)SARSコロナウイルスのタンパク質、呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質、パラインフルエンザウイルスのタンパク質およびヒトメタニューモウイルスのタンパク質からなる群から選択された1つのタンパク質をコードする異種核酸を含む第2のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および(c)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。10

19. 上記第2のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子がSARSコロナウイルスのタンパク質をコードする、実施形態18の免疫原性組成物。

20. (a)パラインフルエンザウイルスのタンパク質をコードする異種核酸を含む第1のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、(b)呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質、SARSコロナウイルスのタンパク質およびヒトメタニューモウイルスのタンパク質からなる群から選択された1つのタンパク質をコードする異種核酸を含む第2のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および(c)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。20

21. 上記第2のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子が呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質をコードする、実施形態20の免疫原性組成物。

22. (a)呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質をコードする異種核酸を含む第1のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、(b)ヒトメタニューモウイルスのタンパク質、パラインフルエンザウイルスのタンパク質およびSARSコロナウイルスのタンパク質からなる群から選択された1つのタンパク質をコードする異種核酸を含む第2のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および(c)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。30

23. 上記第2のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子がヒトメタニューモウイルスのタンパク質をコードする、実施形態22の免疫原性組成物。

24. (a)インフルエンザウイルスのタンパク質をコードする第1の異種核酸を含む第1のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、(b)インフルエンザウイルスタンパク質をコードする第2の異種核酸であって、上記第1の異種核酸とは異なる第2の異種核酸を含む、第2のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および(c)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。40

25. (a)パラインフルエンザウイルスのタンパク質をコードする第1の異種核酸を含む第1のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、(b)パラインフルエンザウイルスタンパク質をコードする第2の異種核酸であって、上記第1の異種核酸とは異なる第2の異種核酸を含む、第2のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、および(c)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

26. (a)呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質をコードする第1の異種核酸を含む第1のアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物、またはレプリコン粒子、(b)呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質をコードする第2の異種核酸であって、上記第1の異種核酸とは異なる第2の異種核酸を含む、第2のアルファウイルスレプリコンベク50

ター、ベクター構築物、またはレブリコン粒子、および(c)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

27. (a) SARSコロナウイルスのタンパク質をコードする第1の異種核酸を含む第1のアルファウイルスレブリコンベクター、ベクター構築物、またはレブリコン粒子、(b) SARSコロナウイルスのタンパク質をコードする第2の異種核酸であって上記第1の異種核酸とは異なる第2の異種核酸を含む、第2のアルファウイルスレブリコンベクター、ベクター構築物、またはレブリコン粒子、および(c)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

28. (a)ヒトメタニューロウイルスのタンパク質をコードする第1の異種核酸を含む第1のアルファウイルスレブリコンベクター、ベクター構築物、またはレブリコン粒子、(b)ヒトメタニューロウイルスのタンパク質をコードする第2の異種核酸であって上記第1の異種核酸とは異なる第2の異種核酸を含む、第2のアルファウイルスレブリコンベクター、ベクター構築物、またはレブリコン粒子、および(c)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

29. (a)インフルエンザウイルスのタンパク質をコードする第1の異種核酸、および上記第1の異種核酸とは異なる、インフルエンザウイルスのタンパク質をコードする上記第2の異種核酸を含むアルファウイルスレブリコンベクター、ベクター構築物、またはレブリコン粒子、および(b)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む、免疫原性組成物。

30. さらにアジュバントを含む、実施形態1～29のいずれかに記載された免疫原性組成物。

31. インフルエンザウイルスのタンパク質をコードする上記核酸が、赤血球凝集素タンパク質をコードする配列、ノイラミニダーゼタンパク質をコードする配列、ヌクレオカプシドタンパク質をコードする配列、およびマトリックスタンパク質をコードする配列からなる群から選択される、実施形態12、18、24および29のいずれかに記載された免疫原性組成物。

32. SARSコロナウイルスのタンパク質をコードする上記核酸が、スパイクタンパク質をコードする核酸、エンベロープタンパク質をコードする核酸、ヌクレオカプシドタンパク質をコードする核酸、およびマトリックスタンパク質をコードする核酸からなる群から選択される、実施形態12、13、14、16、18、19、20、22、および27のいずれかに記載された免疫原性組成物。

33. ヒトメタニューロウイルスのタンパク質をコードする上記核酸が、糖タンパク質Gをコードする核酸、融合タンパク質をコードする核酸、ヌクレオカプシドタンパク質をコードする核酸、およびマトリックスタンパク質をコードする核酸からなる群から選択される、実施形態12、14、16、17、18、20、22、23、および28のいずれかに記載された免疫原性組成物。

34. パラインフルエンザウイルスのタンパク質をコードする上記核酸が、赤血球凝集素-ノイラミニダーゼタンパク質をコードする核酸、融合タンパク質をコードする核酸、ヌクレオカプシドタンパク質をコードする核酸、およびマトリックスタンパク質をコードする核酸からなる群から選択される、実施形態12、14、16、18、20、22、および25のいずれかに記載された免疫原性組成物。

35. 呼吸器系合胞体ウイルスのタンパク質をコードする上記核酸が、糖タンパク質Gをコードする核酸、融合タンパク質をコードする核酸、ヌクレオカプシドタンパク質をコードする核酸、およびマトリックスタンパク質をコードする核酸からなる群から選択される、実施形態12、14、15、16、18、20、21、22、および26のいずれかに記載された免疫原性組成物。

36. 上記のアルファウイルスレブリコンベクター、ベクター構築物、およびレブリコン粒子が、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、およびロス川ウイルスからなる群から選択された1つ以上のアルファウイルスに由来する、実施形態1～29のいずれかに記載された免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

37. 上記免疫原性組成物が凍結乾燥されている、実施形態1～29のいずれかに記載された免疫原性組成物。

38. 哺乳動物において免疫反応を刺激する方法であって、実施形態1～30に記載された免疫原性組成物を該哺乳動物に投与して免疫反応を生じさせることを含む方法。

39. (a) 上記異種核酸と実質的に同じ源に由来するタンパク質、ポリペプチド、またはその一部、および(b)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む第2の免疫原性組成物を投与する第2の工程をさらに含む、実施形態38に記載された免疫反応を活性化させる方法。

40. 第2の免疫原性組成物を投与する上記第2の工程がアジュバントを投与することをさらに含む、実施形態39に記載された方法。 10

41. 筋肉内、鼻腔内、皮下、皮内、気管内、および経口から選択された経路で上記免疫原性組成物が投与される、実施形態38に記載された方法。

42. (a) 異種核酸と実質的に同じ源に由来するタンパク質、ポリペプチド、またはその一部をコードする、非アルファウイルス由来のウイルス性ベクター、および(b)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む第2の免疫原性組成物を投与する第2の工程をさらに含む、実施形態38に記載された免疫反応を刺激する方法。

43. (a) 異種核酸と実質的に同じ源に由来するタンパク質、ポリペプチド、またはその一部をコードする、弱毒化ウイルス、および(b)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤を含む第2の免疫原性組成物を投与する第2の工程をさらに含む、実施形態38に記載された免疫反応を刺激する方法。 20

44. 実施形態1～37のいずれかにおけるような免疫原性組成物を含むワクチン。

45. (a) 実質的に精製され不活性化されたパラインフルエンザウイルスの調製物、(b)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤、および(c)アジュバントを含む免疫原性組成物。

46. 上記アジュバントがMF59、LTK63、およびミョウバンからなる群から選択される、実施形態45に記載された免疫原性組成物。

47. (a) 実質的に精製され不活性化されたパラインフルエンザウイルスの調製物、(b)薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤、および(c)アジュバントを含むパラインフルエンザウイルスワクチン。

48. 上記アジュバントがMF59、LTK63、およびミョウバンからなる群から選択される、実施形態45に記載されたワクチン。 30

49. 哺乳動物中において免疫反応を刺激する方法であって、実施形態45に記載された免疫原性組成物、または実施形態47に記載されたワクチンを上記哺乳動物に投与して、免疫反応を生じさせることを含む方法。

50. 上記の免疫原性組成物またはワクチンが、筋肉内、鼻腔内、皮下、皮内、気管内、および経口からなる群から選択された経路で投与される、実施形態49に記載された方法。

。

【0021】

本発明の上記およびその他の態様および実施形態は、以下の詳細な説明、添付の図面、および、特定の手順または組成物（例えば、プラスミド、配列など）をより詳細に説明する本明細書に記載されたさまざまな参考文献を参照すれば明らかになろう。 40

【0022】

（詳細な説明）

本発明は、呼吸器系病原体をコードする少なくとも1つの異種核酸を含むアルファウイルスレプリコンベクター、アルファウイルスベクター構築物、またはアルファウイルスレプリコン粒子を含む免疫原性組成物に関する。免疫原性組成物（例えばワクチン）は、被験体に投与して免疫反応を生じさせるのに有用である。

【0023】

本発明の実施には、別段の記載がない限り、当分野における技術に含まれる、化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学の従来の方法が利用される。このような技術は文 50

献において十分に説明されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods in Enzymology (S. Colowick および N. Kaplan, 編, Academic Press, Inc.)、ならびにHandbook of Experimental Immunology, 第I巻~第IV巻(D. M. Weir および C. C. Blackwell, 編, 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第2版, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry(Birdi, K. S. 編, CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 第4版(Ausubelら編, 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course. (Reamら編, 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 第2版(Newton および Graham編, 1997, Springer Verlag); Petersら, Fields Virology(第2版), Fieldsら(編), B. N. Raven Press, New York, NY 参照。

【0024】

10

本明細書に引用されたすべての出版物、特許および特許出願は、前掲のものも後掲のものも、その全体が参照されて本明細書に組み込まれる。

【0025】

20

本明細書において、単数形の「a」、「an」および「the」は、その内容から別段であることが明確に示されない限り複数形も意味する。したがって、例えば、「1個の粒子」に言及することは2個以上のその粒子の混合物を含む。

【0026】

本発明を説明する前に、本明細書中以下で使用されるいくつかの用語の定義を示す。

【0027】

30

1個の「核酸」分子は、原核生物の配列、真核生物のmRNAまたはその他のRNA、真核生物のmRNAまたはその他のRNAに由来するcDNA、真核生物(例えば、哺乳動物)のDNAに由来するゲノムDNA配列、さらには合成DNA配列も含むことができるが、これらに限定されない。この用語は、DNAおよびRNAの既知の塩基アナログのいずれかを含む配列をも含み、本来の配列に対する欠失、付加および置換などの改変(性質において一般に保存的である)を含む。これらの改変は、部位特異的突然変異によるなど、計画的なものであってもよく、または偶発的なものであってよい。ポリヌクレオチドの改変は、例えば、宿主細胞中でのポリペプチド産物の発現が促進されるなど、いくつもの効果を生じうる。

【0028】

30

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基の多量体を意味し、その生成物の最短のものに限定されない。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体などがこの定義に含まれる。完全長タンパク質もそれらのフラグメントもこの定義に含まれる。また、これらの用語は、ポリペプチドの発現後の修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化なども含む。さらに、本発明の目的にとって、「ポリペプチド」とは、タンパク質が所望の活性を維持する限り、本来の配列に対する欠失、付加および置換などの(性質において一般に保存的である)改変を含むタンパク質を意味する。これらの改変は、部位特異的突然変異によるなど、計画的なものであってもよく、または、そのタンパク質を産生する宿主の突然変異、またはPCR增幅によるエラーによるものなど、偶発的なものであってよい。さらに、次の効果の1つ以上をもつ改変が行われてもよい。すなわち、毒性の減少、細胞のプロセシングの促進(例えば、分泌、抗原提示

40

50

など)、ならびにB細胞および/またはT細胞に対する提示の促進。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書においては同義的に使われ、アミノ酸残基の任意の多量体を意味する。これらの用語は、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体などを包含する。このようなポリペプチドは天然源に由来し得、合成され得、または組換え技術によって作出することが可能である。また、これらの用語は、ポリペプチドが発現後に修飾されること、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化なども含む。

【0029】

本明細書中で定義されるポリペプチドは一般に20個の天然アミノ酸

【0030】

【化1】

10

Ala (A), Arg (R), Asn (N), Asp (D), Cys (C), Gln (Q), Glu (E), Gly (G), His (H), Ile (I), Leu (L), Lys (K), Met (M), Phe (F), Pro (P), Ser (S), Thr (T), Trp (W), Tyr (Y) および Val (V)

からなり、いくつかの既知のアミノ酸アナログであって、天然および合成のアナログの任意のもの、例えば、ホモイソロイシン、アサロイシン (a s a l e u c i n e)、2-(メチレンシクロプロピル)グリシン、S-メチルシステイン、S-(プロピ-1-エニル)システイン、ホモセリン、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ホモアルギニン、3-(3-カルボキシフェニル)アラニン、シクロヘキシリララニン、ミモシン、ピペコリン酸、4-メチルグルタミン酸、カナバニン、2,3ジアミノプロピオン酸などを含むことでもできるが、これらに限定されない。本発明において利用されるポリペプチド剤のさらなる例を後述する。

20

【0031】

「野生型」のポリペプチド、ポリペプチド剤またはポリペプチド薬とは、天然のポリペプチド配列(および、場合によっては、それに対応する2次構造)を意味する。「単離された」または「精製された」タンパク質またはポリペプチドとは、天然では、通常そのタンパク質が関与している生体そのものから切り離して分離したことである。この用語がさまざまなレベルの純度のタンパク質を示すのは明らかである。典型的には、精製タンパク質を含む組成物は、組成物中の全タンパク質の少なくとも約35%、好ましくは少なくとも約40~50%、より好ましくは少なくとも約75~85%、そして最も好ましくは少なくとも約90%以上が問題のタンパク質となっている組成物である。

30

【0032】

「作動可能に連結した」とは、記載された成分が、それらの通常の機能を行うことができるよう配置されている要素の並び方を意味する。したがって、コード配列に作動可能に連結した所定のプロモーターは、適当な酵素が存在すると、コード配列の発現をもたらすことができる。このプロモーターは、コード配列の発現を指令する機能をもつかぎり、コード配列と接触している必要はない。したがって、例えば、未翻訳であるが転写済みの介在配列がプロモーター配列とコード配列の間に存在しても、コード配列およびプロモーター配列は、依然コード配列と「動作可能に連結」しているものとみなされ得る。

40

【0033】

アミノ酸配列の「類似性」を測定する技術は、当技術分野で周知である。通常、「類似性」は、アミノ酸が同一であるか、電荷または疎水性など、類似した化学的および/または物理的な特性をもつ場合に、適当な位置にある2つ以上のポリペプチドのアミノ酸同士の正確な比較を意味する。そして、比較されたポリペプチド配列間で、いわゆる「パーセント類似性」が決定され得る。

【0034】

核酸配列およびアミノ酸配列の同一性を測定する技術も、当技術分野で周知であり、その遺伝子に対するmRNAのヌクレオチド配列を(通常はcDNA中間体を介して)決定し、それによってコードされるアミノ酸配列を決定すること、および、これを第2のアミ

50

ノ酸配列と比較することを含む。通常、「同一性」は、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列のそれ各自クレオチド同士またはアミノ酸同士が、正確に対応することを意味する。

【0035】

2つ以上のポリヌクレオチド配列は、その「同一率(%)」を決定して比較することができる。2つ以上のアミノ酸配列も同様に、その「同一率(%)」を決定して比較することができる。核酸配列であってもペプチド配列であっても、2つの配列の同一率(%)は、通常、2つの整列された配列の間で正確に一致する数を、短い方の配列の長さで除してから100を乗じた数であると説明されている。核酸配列の近似的なアラインメントは、SmithおよびWaterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981) の局所的相同性アルゴリズムによって得られる。このアルゴリズムを拡張し、Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhoff編, 5補遺3:353-358、National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USAによって開発され、Gibskov, Nucl. Acids Res. 14(6): 6745-6763 (1986) によって標準化されたスコアマトリクス法(score matrix)を用いてペプチド配列にも使うことができる。核酸およびペプチド配列に関するこのアルゴリズムの実行法は、Genetics Computer Group (Madison, WI) のBest Fitユーティリティーアプリケーションによって提供されている。この方法のデフォルトパラメーターは、Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (Genetics Computer Group Madison, WIから入手可能) に記載されている。配列間の同一率(%)または類似率(%)を計算するための、他の同等に適切なプログラムも一般的に当業者に知られている。

【0036】

例えば、参照配列に対する特定のヌクレオチド配列の同一率(%)は、デフォルトのスコア表および6ヌクレオチド位置のギャップペナルティーを用い、SmithおよびWatermanの相同性アルゴリズムを利用して決定することができる。本発明に関連して同一率(%)を確認する別の方法は、University of Edinburghが版権を所有し、John F. CollinsおよびShane S. Sturrookによって開発され、IntelliGenetics, Inc (Mountain View, CA) から頒布されているMPSEARCHプログラムパッケージを用いることである。この一式のパッケージから、デフォルトパラメーターをスコア表に使用して(例えば、ギャップオープンペナルティーを12、ギャップエクステンションペナルティーを1、ギャップを6にして)、Smith-Watermanアルゴリズムを利用することができる。生成されたデータから、「マッチ」値が「配列の同一性」を反映している。デフォルトパラメーターを用いて使われ得るBLASTアラインメントプログラムなど、配列間の同一率(%)または類似率(%)を計算するための別の適当なプログラムも、当技術分野において一般的に公知である。例えば、BLASTNおよびBLASTPは以下のデフォルトパラメーターで用いられ得る。遺伝子コード=標準；フィルタ=無；鎖=両方；カットオフ=60；期待値=10；マトリクス=BLOSUM62；記述=50配列、ソート=HIGH SCOREによる、データベース=非重複, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻訳物+Swiss protein+Supodate+PIR。これらのプログラムの詳細は、インターネットアドレス: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>に見つけることができる。

【0037】

当業者は、適切な検索パラメーターを容易に決定して、上記のプログラムにおいて所定の配列に使うことができる。例えば、検索パラメーターは問題の配列のサイズによって変

10

20

30

40

50

わる可能性がある。したがって、例えば、本明細書の代表的な実施形態は、以下のようなX個の連続したヌクレオチドを有する単離ポリヌクレオチドを含むであろう。すなわち、(i) X個の連続したヌクレオチドが、本明細書に記載された配列のいずれかに由来するY個の連続したヌクレオチドと少なくとも約50%の同一性をもち、(ii) XはYと等しく、かつ、(iii) Xは6ヌクレオチド以上5000ヌクレオチド以下、好ましくは8ヌクレオチド以上5000ヌクレオチド以下、より好ましくは10~12ヌクレオチドから5000ヌクレオチド以下、およびさらに好ましくは15~20ヌクレオチドから本明細書に記載された完全長配列に存在するヌクレオチド数以下であり、上記の範囲内のすべての整数値を含む。

【0038】

10

2個の核酸フラグメントは、本明細書に記載されているように「選択的にハイブリダイズ」と考えられている。2個の核酸分子間の配列同一性の程度が、このような分子間のハイブリダイゼーション現象の効率および強さに影響する。部分的に同一性がある核酸配列は、完全に同一な配列が標的分子にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害しようとする。完全に同一である配列によるハイブリダイゼーションの阻害は、当該分野で周知のハイブリダイゼーションアッセイを利用して評価することができる（例えば、サザーンプロット法、ノーザンプロット法、溶液ハイブリダイゼーションなど。Sambr o o k r a , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , 第2版(1989)Cold Spring Harbor, N.Y.参照）。このようなアッセイは選択性の程度を変えながら、例えば、条件を低ストリンジエンシーから高ストリンジエンシーへと変えながら行うことができる。低ストリンジエンシー条件を使用する場合には、部分的な配列同一性すらない（非特異的結合事象がなければ、2次プローブが標的とハイブリダイズしないような）2次プローブ（例えば、標的分子との配列同一性が約30%未満のプローブ）を利用して、非特異的結合が存在しないことを測定することができる。

【0039】

20

ハイブリダイゼーションに基づく検出システムを利用する場合、標的の核酸配列に相補的な核酸プローブを選択して、次に、適切な条件を選んで、プローブと標的配列とが互いに「選択的にハイブリダイズ」、すなわち結合して、ハイブリッド分子を形成する。「中度のストリンジエントな」条件で標的配列に選択的にハイブリダイズできる核酸分子は、一般的に、少なくとも約10~14ヌクレオチドの長さがあり、選択された核酸プローブの配列との配列同一率が少なくとも約70%である標的核酸配列を検出することが可能な条件下で選択的にハイブリダイズすることが可能である。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件では、通常、少なくとも約10~14ヌクレオチドの長さがあり、選択された核酸プローブの配列と配列同一率が約90~95%より高い標的核酸配列の検出が可能である。プローブおよび標的が特定の配列の同一性をもっている場合、プローブノ標的のハイブリダイゼーションにとって有用なハイブリダイゼーション条件は、当技術分野公知の方法で決定することができる（例えば、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, B.D. HamesおよびS.J. Higgins編, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press参照）。

30

【0040】

40

ハイブリダイゼーションのストリンジエンシー条件について、数多くの同等の条件を用いて、例えば、下記の要素を変えて、具体的なストリンジエンシーを確立することができる事が当技術分野で周知である。すなわち、プローブ配列および標的配列の長さと性質、さまざまな配列の塩基組成、塩およびその他のハイブリダイゼーション溶液組成物の濃度、ハイブリダイゼーション溶液中のブロッキング剤（例えば、ホルムアミド、硫酸デキストラン、およびポリエチレングリコール）の有無、ハイブリダイゼーション反応の温度および時間のパラメーター、ならびに、種々の洗浄条件などの要素。特定のハイブリダイゼーション条件の組の選択は、当技術分野で標準的な以下の方法に従って行われる（例え

50

ば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y. 参照)。

【0041】

「由来する」という用語は、ある分子(例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど)のウイルス源を確認するために使われる。第1のポリヌクレオチドが、第2のポリヌクレオチド、そのcDNA、その相補配列の一領域と同一または実質的に同一な塩基対配列を有する場合、または上記のような配列同一性を示す場合には、第1のポリヌクレオチドは第2のポリヌクレオチド「に由来する」ものである。したがって、ウイルスの配列またはポリヌクレオチドが、(i)ある特定のウイルス配列と同一または実質的に同一の配列をもつか、または(ii)上記のように、そのウイルスのポリペプチドに対して配列同一性を示せば、そのウイルスの配列またはポリヌクレオチドは、特定のウイルス(例えば、種)に「由来している」。

【0042】

(i) 第1のポリペプチドが、第2のポリヌクレオチドに由来する第1のポリヌクレオチドによってコードされているか、または、(ii)上記のように、その第2のポリペプチドに配列同一性を示す場合には、第1のポリペプチドは第2のポリペプチドに由来するものである。したがって、ウイルスのポリペプチド(タンパク質)が、(i)特定のウイルスのポリヌクレオチドのオープンリーディングフレーム(ウイルスポリヌクレオチド)によってコードされているか、または(ii)上記のように、そのウイルスのポリペプチドに対して配列同一性を示せば、そのウイルスのポリペプチド(タンパク質)は、特定のウイルスに「由来している」。

【0043】

ポリヌクレオチド分子もポリペプチド分子も、物理的にウイルスに由来することが可能であり、あるいは、例えば、既知の配列に基づいて組換え技術によって、もしくは合成法によって作出することが可能である。

【0044】

「異種」という用語は相対的な用語で、核酸に関して使われると、該核酸が、天然では互いに同じ関係の中には存在しない2個以上の部分配列を含むことを示す。したがって、本件では、呼吸器系ウイルスのタンパク質をコードする核酸は、それが含まれているアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物またはレプリコン粒子の配列に対して異種である。

【0045】

「サブゲノムRNA」は、それが由來したゲノムRNAより小さな長さまたはサイズのRNA分子を意味する。サブゲノムRNAは、ゲノムRNAまたはその相補配列の内側に配列が存在する内部プロモーターから転写される。好ましい実施形態において、サブゲノムRNAはアルファウイルスベクター構築物、RNAベクターレプリコン、または欠損ヘルパー構築物から產生され、1つ以上のアルファウイルスの構造タンパク質、または目的とするその他の異種配列をコードする。通常、サブゲノムRNAは、5'または3'末端の非翻訳領域と、タンパク質をコードするオープンリーディングフレームとをもつ典型的なmRNAに類似している。

【0046】

本明細書において使用される、「ベクター構築物」という語句は、一般的に、目的とする核酸配列または遺伝子の発現を指令することができる任意の集合体を意味する。ベクター構築物は、一般的に、転写プロモーター/エンハンサー、すなわち遺伝子座を画定する要素、または選択的スプライシング、核RNAのエクスポート、メッセンジャーの翻訳後修飾、またはタンパク質の転写後修飾など別の手段によって遺伝子発現を調節する他の要素を含む。さらに、ベクター構築物は、通常、転写されると、目的とする配列または遺伝子と動作可能に連結して、翻訳開始配列の働きをする配列を含む。また、ベクター構築物は、場合によっては、ポリアデニル化を指令するシグナル、選択マーカー、ならびに1個

10

20

30

40

50

以上の制限部位、および翻訳終結配列を含むことも可能である。ベクター構築物の例としては、R N Aベクター構築物のc D N A相補配列を含むE L V I Sベクター、R N Aベクター構築物自体、アルファウイルスベクター構築物、C M Vベクター構築物などがある。

【0047】

「アルファウイルスベクター構築物」は、目的とする配列または遺伝子の発現を指令する能力がある集合体を意味する。このようなベクター構築物は、アルファウイルスR N Aの転写を開始させる能力がある5'配列(5'保存ヌクレオチド配列要素(C S E)、または、5'シス複製配列とも呼ばれる)、ならびに、発現すると生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質(例えば、n s P 1、n s P 2、n s P 3、n s P 4)をコードする配列、アルファウイルスR N Aポリメラーゼ認識配列(3' C S E、または、3'シス複製配列とも呼ばれる)、および、場合によってはポリアデニル化部位から成る。さらに、ベクター構築物はウイルスサブゲノム「接合部(junction region)」プロモーター、1つ以上の構造タンパク質遺伝子またはその一部に由来する配列、ウイルス様粒子(例えば、レプリコン粒子)を產生するのに十分な大きさの外来の核酸分子、インビトロまたはインビボ(例えば、真核細胞の内部)においてc D N AからウイルスR N Aの合成を開始させることができる5'側プロモーター、発現される異種配列、および異種配列を挿入するための1個以上の制限部位を含むこともできる。

【0048】

「アルファウイルスR N Aレプリコンベクター」、「R N Aレプリコンベクター」、「レプリコンベクター」または「レプリコン」は、標的細胞内部にある、インビボで自己増幅または自己複製を指令することができるR N A分子を意味する。自己増幅を指令するには、R N A分子はR N A増幅を触媒するのに必要な酵素(例えば、アルファウイルス非構造タンパク質n s P 1、n s P 2、n s P 3、n s P 4)をコードしなければならず、また、コードされた酵素によって認識されて利用される、複製に必要とされるシスR N A配列も含まなければならない。アルファウイルスR N Aベクターレプリコンは、以下の順序の要素を含まなければならない。すなわち、非構造タンパク質に仲介される増幅に必要とされる5'側ウイルス配列または5'側細胞配列(5' C S E、すなわち5'シス複製配列、または、複製のためにシスで必要とされる5'側ウイルス配列、またはアルファウイルスの転写を開始させる能力のある5'配列とも呼ばれる)、発現すると生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質(例えば、n s P 1、n s P 2、n s P 3、n s P 4)をコードする配列、および非構造タンパク質に仲介される増幅に必要とされる3'側ウイルス配列または3'側細胞配列(3' C S E、すなわち複製のためにシスで必要とされる3'側ウイルス配列、またはアルファウイルスR N Aポリメラーゼ認識配列とも呼ばれる)。アルファウイルスR N Aベクターレプリコンは、例えば、いくつかの実施形態において、サブゲノムフラグメントのウイルス転写を増加もしくは減少させるため、または、欠損ヘルパーまたは構造タンパク質発現力セットとの相容性を低下させるために改変することが可能なI R E Sもしくはウイルス(例えば、アルファウイルス)サブゲノムプロモーター(例えば、接合部プロモーター)など、1つ以上の異種配列を発現させる手段、および発現されるべき1つ以上の異種配列を含むことができる。また、レプリコンは、例えば、1つ以上のポリペプチド(例えば、タンパク質をコードする遺伝子または3'側の隣接遺伝子)および/またはポリアデニル化部位をコードする1つ以上の異種配列など、さらに別の配列を含むこともできる。このレプリコンは、アルファウイルスの構造タンパク質(カブシド、E 2、E 1)の全部をコードする配列を含んではならない。レプリコンベクターによって発現され得る異種配列の非限定的な例は、例えば、米国特許第6,015,686号に記載されおり、その全体が参照されて本明細書に組み込まれているが、例えば、抗原、リンフォカイン、サイトカインなどを含む。

【0049】

「パッケージングシグナル」または「パッケージング配列」は、ウイルス粒子(ビリオン)の中にヌクレオチド(例えば、ゲノムD N AまたはゲノムR N A)を組み込むことに関与する、シスとして機能する配列を意味する。多数のウイルス由来型パッケージングシ

10

20

30

40

50

グナルが説明されてきた。例えば、Youill. R.ら、(2003) Human gene therapy 14(10):1017-1034; Beasley B Eら(2002) J. of Virology 76(10):4950-4960; Watanabe Tら(2003) J. of Virology 77(19):10575-10583参照。

【0050】

「組換えアルファウイルス粒子」または「レプリコン粒子」は、アルファウイルスRNAベクターレプリコンを含むビリオン様の構造単位を意味する。一般に、組換えアルファウイルス粒子またはレプリコン粒子は、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質、脂質エンベロープおよびRNAベクターレプリコンを含む。好ましくは、組換えアルファウイルス粒子は、アルファウイルスによってコードされるエンベロープ糖タンパク質が埋め込まれた、宿主細胞に由来する原形質膜などの脂質二重層の内部に含まれるヌクレオカブシド構築物を含む。また、この粒子は、アルファウイルスが由来した粒子の向性を指令する他の成分(例えば、標的要素、その他のウイルス構造タンパク質、またはその他のレセプター結合リガンド)も含むことができる。

【0051】

「アルファウイルス構造タンパク質発現力セット」は、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質を発現することができるベクター構築物を意味する。アルファウイルス構造タンパク質発現力セットは、トランスで供給される生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質に反応して、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質のRNAを増幅もしくは複製、および発現することができる「欠損ヘルパー構築物」であってもよい。欠損したヘルパー構築物は、一般的に、以下の順序に並んだ要素を含む。すなわち、5'側の増幅またはシス複製配列、ウイルスサブゲノム接合部プロモーター、発現すると1つ以上の生物学的に活性なアルファウイルス構造タンパク質(例えば、C、E3、E2、6K、E1)をコードする配列、3'側の増幅またはシス複製配列、およびポリアデニル化部位。また、欠損ヘルパー構築物は、インビトロまたはインビボ(例えば、真核細胞内)においてcDNAからウイルスRNA合成を開始させる能力がある5'プロモーター、転写の終結を調節する3'側配列、スプライス認識配列、触媒リボザイムプロセッシング配列、選択マーカーをコードする配列、および/または核外移行シグナルを含むこともできる。欠損ヘルパー構築物は、4つの機能的アルファウイルス非構造タンパク質のすべてをコードしてはならない。

【0052】

「非構造タンパク質に仲介される増幅に必要とされる5'側ウイルス配列または細胞配列」および「非構造タンパク質に仲介される増幅に必要とされる5'側配列」および「増幅配列」および「5'側増幅配列」および「5'CSSE」および「複製のためにシスで必要とされる5'側ウイルス配列」および「アルファウイルスの転写を開始させる能力のある5'側配列」という用語は同義的に使われ、ウイルスまたはウイルス由来のベクターがプラス鎖RNAを合成する認識部位を提供する機能的要素を意味する。したがって、それは、ウイルスまたはベクター内部に含まれる実際の配列の相補配列であって、マイナス鎖RNAコピーの3'末端に相当する配列であり得、この3'末端には非構造タンパク質であるレプリカーゼ複合体、および、場合によっては付加的な宿主細胞因子が結合し、そこからプラス鎖RNAの転写が開始される。多様な配列が、例えば、アルファウイルス5'末端非翻訳領域(NTR)および、例えばヌクレオチド210、250、300、350、400、または450までの配列などのその他の隣接配列を含む、増幅配列として利用されている。あるいは、例えばシンドビス(SIN)ベクターの場合には、tRNAアスパラギン(tRNAasp)(Schlesingerら,米国特許第5,091,309号)に対する非アルファウイルスのヌクレオチド10~75が使われている。

【0053】

本明細書において使用される、「5'側改変増幅配列」は、上記で定義された増幅配列を含むヌクレオチド(RNAまたはDNA)分子であって、この増幅配列の一次構造(配

10

20

30

40

50

列)が、既知の増幅シグナルと比較して改変(例えば、置換、付加、欠失)されているため、改変された配列がパッケージングシグナルとしては不完全であるが、それらの増幅(複製)機能を維持している分子を意味する。例えば、改変された増幅配列は、一次配列レベルでパッケージングシグナルとの相同性が減少しているが、二次構造は本来の増幅配列の相同性のままのものを含むことが可能である。改変された増幅配列は、二次構造および/またはシスに機能する増幅能力が維持されるかぎり、付加的配列をさらに含むことができる。

【0054】

「3'側隣接遺伝子(3' Proximal Gene)」という用語は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列であって、レプリコンベクター、真核レイヤードベクター開始システム(Eukaryotic Layered Vector Initiation System)、欠損ヘルパーRNA、または構造タンパク質発現力セットの内部に含まれ、別の要素に対して特定の位置内に存在するヌクレオチド配列を意味する。この3'側隣接遺伝子の位置は、非構造タンパク質に仲介される増幅(上記)に必要な3'側配列について決定されるはずであるが、ここで、3'側隣接遺伝子は、この要素の5'側(上流)で直前にあるタンパク質コード配列である。

【0055】

「ウイルスサブゲノムプロモーター」という用語は、必要とされるウイルスまたは細胞のポリメラーゼならびに他の因子とともに、ゲノム長未満のRNA分子の転写を可能にするウイルス起源の配列を意味する。アルファウイルス(アルファウイルスの)サブゲノムプロモーターまたはアルファウイルス(アルファウイルスの)サブゲノム接合部プロモーターに関して、この配列は、一般的に、非構造タンパク質のオープンリーディングフレーム(ORF)と構造タンパク質のオープンリーディングフレーム(ORF)との間の領域に由来しており、通常、サブゲノムmRNAの転写を調節する。典型的には、アルファウイルスサブゲノムプロモーターは、プロモーターに関連した活性のほとんどを提供するコア配列、およびプロモーターに関連した活性をさらに促進する近傍部位(例えば、拡張型プロモーターまたは天然プロモーター)から成る。サブゲノムプロモーターは、ウイルスまたはベクターの内部に含まれる実際の配列の相補配列であって、マイナス鎖RNAのコピー内の領域に対応していて、プラス鎖サブゲノムmRNAの転写開始を促す、相補配列であってもよい。例えば、アルファウイルスのプロトタイプであるシンドビスウイルスの場合、通常のサブゲノム接合部プロモーターは、典型的にほぼヌクレオチド番号7579から始まり、少なくともヌクレオチド番号7612まで続く(おそらくそれ以降も)。最低でも、ヌクレオチド7579~7602が、サブゲノムフラグメントの転写に必要なコア配列の機能を果たすと考えられている。

【0056】

「非構造タンパク質の仲介による増幅に必要とされる3'側ウイルス配列または細胞配列」または「非構造タンパク質に仲介される増幅に必要とされる3'側配列」という用語は、3' CSE、または3'側シス複製配列、または複製のためにシスで必要とされる3'ウイルス配列、またはアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列と同義的に使われる。この配列は、マイナス鎖RNAの合成によってウイルスまたはウイルス由来のベクターが複製(増幅)を開始する認識部位を提供する機能的要素である。多様な配列がこの機能のために利用される。例えば、この配列は、例えば、SINなどをもち、ヌクレオチド11,647から11,703までを含む、完全なアルファウイルスの3'末端非翻訳領域(NTR)、または、認識配列としての機能は依然として維持する切断型3'NTR領域(例えば、ヌクレオチド11,684から11,703)を含み得る。これに関連して利用することができる配列の別例は、マイナス鎖RNAの合成を開始させる能力と同様の機能を維持している非アルファウイルスの配列またはその他の配列などである(例えば、Georgeら、(2000)J.Viro1.74:9776-9785に記載される配列)が、これらに限定されるものではない。

【0057】

10

20

30

40

50

「安定的形質転換」は、核酸分子が生細胞に導入されて、その核酸分子が連續的な細胞分裂周期を介して長期または永久に子孫細胞中に維持されることを意味する。この核酸分子は、いずれかの細胞区画（核、ミトコンドリア、または細胞質などが挙げられるが、これらに限定されない）中で維持され得る。好ましい実施形態において、核酸分子は核の中に維持される。維持は、染色体内部（組み込み）でも、エピソーム事象として染色体外でも可能である。

【0058】

「アルファウイルスパッケージング細胞株」は、アルファウイルス構造タンパク質発現力セットを含み、アルファウイルスベクター構築物、RNAベクターレプリコン、真核細胞レイヤードベクター開始システム（例えば、米国特許第5,814,482号）、または組換えアルファウイルス粒子が導入されると、組換えアルファウイルス粒子を產生する細胞をいう。親細胞は哺乳動物起源または非哺乳動物起源であってよい。好ましい実施形態の範囲内において、パッケージング細胞株は、構造タンパク質発現力セットによって安定的に形質転換される。

【0059】

「真核レイヤードベクター開始システム」は、目的とする配列または遺伝子の発現を指令することができる集合体を意味する。真核レイヤードベクター開始システムは、インビボ（すなわち真核細胞内）でcDNAからRNAの合成を開始させることができる5'側プロモーター、および、真核細胞において自己複製を指令し、異種配列を発現させることができる核酸ベクター配列（例えば、ウイルスベクター）を含まなければならない。好ましくは、この核酸ベクター配列は、アルファウイルス由来の配列であり、非構造タンパク質に仲介される増幅に必要とされる5'側のウイルス配列または細胞配列（5'CS-E、または5'シス複製配列、または複製のためにシスで必要とされる5'側のウイルス配列、またはアルファウイルスの転写を開始させることができる5'配列とも呼ばれる）、ならびに、発現すると生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質（例えば、nsp1、nsp2、nsp3、nsp4）をコードする配列、および非構造タンパク質に仲介される増幅に必要とされる3'側のウイルス配列または細胞配列（3'CS-E、または複製のためにシスにおいて必要とされる3'側のウイルス配列または細胞配列、またはアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列とも呼ばれる）から成る。さらに、このベクター配列は、例えば、いくつかの実施形態において、ウイルスによるサブゲノムフラグメントの転写を妨げたり、増加させたり、または減少させたりするため、または欠損ヘルパーもしくは構造タンパク質発現力セットとの相同意を低下させるために改変することができるウイルス（例えば、アルファウイルス）のサブゲノムプロモーター（例えば、接合部プロモーター）などの異種配列を発現させる手段、および発現させようとする1つ以上の異種配列を含むことができる。好ましくは、異種配列はタンパク質をコードする遺伝子を含み、この遺伝子はベクター配列内部にある3'側隣接遺伝子である。また、真核レイヤードベクター開始システムは、ポリアデニル化配列、スプライス認識配列、触媒リボザイムプロセッシング配列、核外移行シグナル、および転写終結配列も含むことができる。いくつかの実施形態において、cDNAからのベクター核酸配列のインビボ合成は、誘導型プロモーターを用いて調節することができる。または、サブゲノムの発現は、翻訳調節因子または修飾された非構造タンパク質を利用して誘導可能である。

【0060】

「病原体」は、疾患と関連しているか、それを引き起こす任意の生体を意味する。したがって、「呼吸器系病原体」という用語は、呼吸によって伝染するか、気道における疾患に関連するか、その原因となる病原体生物を意味する。呼吸器系病原体は当技術分野で公知であり、本明細書記載のウイルス、細菌、寄生生物および真菌を含むが、これらに限定されるものではない。

【0061】

「抗原」は、宿主の免疫系を刺激して、体液性および/または細胞性の抗原特異的反応を起こさせる、1つ以上の（線状型、立体構造型または両型の）エピトープを含む分子を

10

20

30

40

50

意味する。この用語は、用語「免疫原」と同義的に使われる。通常、1つのエピトープは約3～15個、一般には約5～15個のアミノ酸を含む。1個のB細胞エピトープは、通常約5個のアミノ酸であるが、3～4個のアミノ酸ほど小さくてもよい。CTLエピトープなど、T細胞エピトープは、少なくとも約7～9個のアミノ酸を含み、ヘルパーT細胞エピトープは少なくとも約12～20個のアミノ酸を含むものである。通常、エピトープは、約7個～15個のアミノ酸、例えば9個、10個、12個または15個のアミノ酸を含むものである。「抗原」という用語は、サブユニット抗原（すなわち、天然において抗原が会合しているそのままの生体から分離され、切り離された抗原）、ならびに、死滅したか、弱毒化されたか、または不活性化された細菌、ウイルス、真菌、寄生生物またはその他の微生物、ならびに、細胞表面レセプターの細胞外ドメイン、およびT細胞エピトープを含む可能性のある細胞内部位などの腫瘍抗原を意味する。抗イディオタイプ抗体などの抗体、またはそれらのフラグメント、および、抗原または抗原決定基を模倣することができる合成ペプチドミモトープも、本明細書における抗原の定義にも含まれうる。同様に、遺伝子治療およびDNA免疫応用法など、インビボで抗原または抗原決定基を発現するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドも本明細書の抗原の定義に含まれる。10

【0062】

所定のタンパク質のエピトープは、当技術分野で周知である、任意の数のエピトープマッピング技術を利用して同定することができる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, 編, 1996) Human Press, Totowa, New Jersey 参照。例えば、線状エピトープは、例えば、固定支持体上で、タンパク質分子の一部に相当する多数のペプチドを合成しながら、それらのペプチドが支持体に付着している間に、ペプチドを抗体と反応させることによって決定することができる。このような技術は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号; Geyseyら(1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geyserenら(1986) Mol. Immunol. 23:709-715に記載されており、これらはすべて、その全体が参照されて本明細書に組み込まれる。20

【0063】

同様に、立体構造型エピトープは、例えば、X線結晶解析および核磁気共鳴によるなど、アミノ酸の空間的立体配置を測定して容易に同定される。例えば、前出のEpitope Mapping Protocolsを参照。30

【0064】

以下さらに詳細に説明するように、本発明の目的にとって、抗原は数種の既知のウイルス、細菌、寄生生物および真菌のいずれにも由来することができる。また、この用語は、免疫反応が望まれる任意の他の抗原も意図している。さらに、本発明の目的にとって、「抗原」は、本明細書で定義されているように、タンパク質が免疫学的反応を誘導する能力を維持するかぎり、天然の配列に対する（通常、性質において保存的な）欠失、付加および置換などの改変を含むタンパク質を意味する。これらの改変は、部位特異的突然変異によるような意図的なものであっても、抗原を産生する宿主の突然変異によるなど、偶発的なものであってもよい。40

【0065】

抗原または組成物に対する「免疫学的反応」は、被験体において、目的とする組成物に存在する抗原に対して体液性および/または細胞性の免疫反応が発生することである。本発明の目的にとって、「体液性免疫反応」は、分泌性(IgA)分子またはIgG分子など、抗体分子によって仲介される免疫反応を意味するが、「細胞性免疫反応」は、Tリンパ球および/またはその他白血球によって仲介される免疫反応である。細胞性免疫反応の1つの重要な態様は、細胞傷害性T細胞（「CTL」）による抗原特異的反応を含む。CTLは、主要組織適合性複合体(MHC)によってコードされるタンパク質と一緒に提示され、細胞表面上で発現するペプチド抗原に対して特異性を有する。CTLは、細胞内の50

微生物の破壊、またはそれら微生物に感染した細胞の溶解を誘導・促進するのを助ける。細胞性免疫の別の態様は、ヘルパーT細胞による抗原特異的反応を含む。ヘルパーT細胞は、この機能を刺激するのを助けるよう作用し、また、非特異的エフェクター細胞の活性を、MHC分子と一緒にペプチド抗原をその表面上に提示する細胞に対して集中させる。「細胞性免疫反応」は、CD4+およびCD8+のT細胞に由来する白血球細胞など、活性化T細胞および/またはその他の白血球細胞によって產生されるサイトカイン、ケモカインおよび他の同類の分子の產生も意味する。さらに、ケモカイン反応は、投与された抗原に反応して、さまざまな白血球細胞または内皮細胞によって誘導されうる。

【0066】

細胞性免疫反応を誘導する組成物またはワクチンは、MHC分子とともに抗原を細胞表面に提示して、脊椎動物である被験体を感作する働きをすることができる。細胞媒介性免疫反応は、表面に抗原を提示する細胞またはその周辺に向けられている。さらに、抗原特異的Tリンパ球を產生させて、免疫された宿主を将来防御することが可能となる。

10

【0067】

特定の抗原が細胞媒介性免疫反応を刺激する能力は、リンパ球増殖（リンパ球活性化）アッセイ、CTL細胞傷害性細胞アッセイによるか、または、感作された被験体内の抗原に対して特異的なTリンパ球をアッセイするなど、多数のアッセイによって測定することが可能である。このようなアッセイは当技術分野で周知である。例えば、Ericksonら、J. Immunol. (1993) 151: 4189-4199; Doeら、Eur. J. Immunol. (1994) 24: 2369-2376 参照。細胞媒介性免疫反応を測定する最近の方法は、T細胞集団による細胞内サイトカインもしくはサイトカイン分泌の測定（例えば、ELISPOT技術による）、またはエピトープ特異的T細胞の測定（例えば、四量体技術による）によるものが含まれる（McMichael, A. J. および O'Callaghan, C. A., J. Exp. Med. 187(9): 1367-1371, 1998; McHeyzer-Williams, M. G. など、Immunol. Rev. 150: 5-21, 1996; Lalvani, A. など、J. Exp. Med. 186: 859-865, 1997 による概説）。

20

【0068】

したがって、本明細書において、免疫学的反応はCTLを刺激し、および/またはヘルパーT細胞の產生または活性化を刺激するものであってよい。ケモカインおよび/またはサイトカインの產生も刺激されうる。また、目的とする抗原は、抗体媒介性免疫反応を誘導する。よって、免疫学的反応は以下の効果の1つ以上を含みうる。すなわち、B細胞による抗体（例えば、IgAまたはIgG）の產生；および/または、目的とする組成物またはワクチンの中に存在する1つまたは複数の抗原を特異的に指向するサブレッサーT細胞、細胞傷害性T細胞、またはヘルパーT細胞および/またはT細胞の活性化。これらの反応は、感染性を中和し、および/または抗体・補体、または抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を媒介して、免疫された宿主に防御をもたらすように機能する。このような反応は、当技術分野で周知の標準的な免疫アッセイ法および中和アッセイ法を利用して測定することができる。

30

【0069】

「免疫原性組成物」は、組成物が被験体に投与されると、被験体の中で、目的とする抗原性分子に対する体液性および/または細胞性および/または粘膜性の免疫反応が生じる抗原性分子（または抗原性分子をコードするヌクレオチド配列）を含む組成物である。免疫原性組成物は、注射、吸入、経口、経鼻またはその他のいずれかの非経口または粘膜（例えば、直腸内または膣内）の投与経路などによって、レシピエントである被験体に直接導入することができる。

40

【0070】

「サブユニットワクチン」は、ウイルス、細菌、寄生生物または真菌など、目的とする病原体由来の抗原に由来するか、または相同である、1つ以上の選択された抗原を含むが、すべての抗原は含まないワクチン組成物を意味する。このような組成物は、実質的には

50

、無処理の病原細胞または病原性粒子、あるいは、このような細胞または粒子の溶解物を含まない。したがって、「サブユニットワクチン」は、病原体に由来する、少なくとも部分的に精製された（好ましくは実質的に精製された）免疫原性ポリペプチド、またはそのアナログから調製することができる。サブユニットワクチンに含まれる抗原を得る方法は、したがって、標準的な精製技術、組換え產生法、または合成製造法を含むことができる。

【0071】

（アルファウイルスの構築物および粒子）

本明細書記載の免疫原性組成物は、1つ以上のアルファウイルス構築物、レブリコンベクター、またはレブリコン粒子を含み、各構築物または粒子は、呼吸器系病原体に由来するタンパク質をコードする1つ以上の配列を含む。

【0072】

アルファウイルス属の数種のメンバーが、ワクチンおよび治療的用途に使うために、「レブリコン」発現ベクターとして開発されている。レブリコンベクターは、DNAベクター構築物、RNAレブリコンベクター、および組換えレブリコン粒子など、いくつかの方式のいずれかで利用することができる。このようなレブリコンベクターは、例えば、SIN (Xiongら (1989) Science 243: 1188-1191; Dubenskyら (1996) J. Virol. 70: 508-519; Hariharanら (1998) J. Virol. 72: 950-958; Poloら (1999) PNAS 96: 4598-4603)、セムリキ森林熱ウイルス (Liljestrom (1991) Bio/Technology 9: 1356-1361; Berglundら (1998) Nat. Biotech. 16: 562-565)、VEE (Pushkoら (1997) Virology 239: 389-401)、および複数のアルファウイルスに由来するキメラ (米国特許第6376236B1号、WO2002099035、Perriら (2003) J. Virol. 77: 10394-10403)などのアルファウイルスに由来している。

【0073】

一般に言えば、アルファウイルスレブリコン粒子は、自己複製アルファウイルスベクターまたは「レブリコン」核酸を含むウイルス様の粒子を意味する。レブリコン粒子自体は、一般に複製不能または「不完全」であると考えられており、すなわち、パッケージングのために必要な1つ以上の構造タンパク質をコードする遺伝子が欠失しているために、宿主細胞がレブリコン粒子に感染しても、子孫レブリコン粒子は生じない。長年の間、組換えウイルス粒子、組換えアルファウイルス粒子、アルファウイルスレブリコン粒子およびレブリコン粒子など、レブリコン粒子を説明するためにいくつかの同義語が現ってきた。しかし、本明細書において、これらの用語はすべて、アルファウイルス由来のRNAベクター-レブリコンを含むビリオン様のユニットを意味する。さらに、これらの用語は総称的にベクター、ベクター構築物または遺伝子運搬ベクターと呼ばれる。

【0074】

広範な文献によって、現在では、予防的または治療的な用途など、免疫反応を刺激するためのアルファウイルス由来のレブリコンベクター（例えば、DNA、RNA、粒子）の有用性が実証されている（例えば、Dubenskyら、同書；Berglundら、同書；Hariharanら、同書；Pushkoら、同書；Poloら、同書d；Davisら (2000) J. Virol. 74: 371-378；SchlesingerおよびDubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10: 434-439；Berglundら (1999) Vaccine 17: 497-507；Kirmannら (2003) Infect. Immun. 71: 575-579；Pasettiら (2003) J. Virol. 77: 5209-5217；Vajdyら (2001) J. Inf. Dis. 184: 1613-1616；Perriら (2003) J. Virol. 77: 10394-10403参照）。本発明は、抗原特異的免疫反応を刺激し、防御ワクチンのモダリティーを提供するための手段として、ヒトまたは動物

10

20

30

40

50

物の呼吸器系病原体（例えば、ウイルス、細菌、真菌）に由来する1つ以上の抗原を発現させるアルファウイルスレプリコンベクターを誘導および利用することを意図するものである。

【0075】

アルファウイルスベクター構築物の典型的な「レプリコン」の構成（図1）は、上記ならびに米国特許第5789245号、第5843723号、第5814482号、および第6015694号、WO00/61772、WO02/99035で詳細に説明されているように、アルファウイルスRNAの転写を開始させる5'側配列、アルファウイルスの非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、隣接する異種核酸配列の発現を指令するウイルスサブゲノム接合部プロモーター、RNAポリメラーゼ認識配列および、好ましくはポリアデニル化部位を含む。同じ要素を定義する他の用語も、当技術分野で公知である。

10

【0076】

本発明のもののように、アルファウイルスベクターは、RNAとしてインビボにおいて直接投与するために使用され得るか、または、しばしば、インビボでのワクチンおよび治療用に、プラスミドベースのcDNA（例えば、真核レイヤードベクター開始システム）として送達されるが、アルファウイルスのRNAレプリコンベクターまたはレプリコンRNAは、まず、アルファウイルス構造タンパク質（例えば、カプシドタンパク質およびエンベロープ糖タンパク質）を含むウイルス様粒子の中にまずパッケージされる。その構造のため、ベクターレプリコンは、組換えアルファウイルスレプリコン粒子の中にパッケージするのに必要なこれらのアルファウイルス構造タンパク質を発現しない。したがって、レプリコン粒子を産生させるには、構造タンパク質をトランスで提供しなければならない（図1）。

20

【0077】

パッケージングは、インビトロ転写されたレプリコンと欠損ヘルパーRNAの同時形質転換（Liljestrom, Bio/Technology 9:1356-1361, 1991; Bredenbeekら, J. Virol. 67:6439-6446, 1993; Frolovら, J. Virol. 71:2819-2829, 1997; Pushkoら, Virology 239:389-401, 1997; 米国特許第5,789,245号および第5,842,723号）、またはプラスミドDNAベースのレプリコンと欠損ヘルパー構築物の同時形質転換（Dubenskyら, J. Virol. 70:508-519, 1996）などの一時的な方法、および安定したパッケージング細胞株（PCL）へのアルファウイルスレプリコンの導入（Polrola, PNAS 96:4598-4603, 1999; 米国特許第5,789,245号、第5,842,723号、第6,015,694号；WO9738087、WO9918226）など、さまざまな方法で行うことができる。

30

【0078】

トランスパッケージング法によって、1つ以上の構造タンパク質遺伝子を（例えば、弱毒化変異体などのアルファウイルス変体の配列を組み込むために（米国特許第5,789,245号、第5,842,723号、第6,015,694号））変更した後、最終的なレプリコン粒子中に変更された構造タンパク質を組み込むことが可能になる。さらに、このようなパッケージングによって、ベクターハウスのものとは異なる第2のアルファウイルスに由来する構造タンパク質を用いて、第1のアルファウイルスに由来するベクター構築物またはRNAレプリコンをパッケージすることによって、アルファウイルスレプリコン粒子全部を変更することが可能になる（WO95/07994; Polrola, 1999, 同書; Gardnerら, J. Virol. 74:11849-11857, 2000; Perrisら(2003)J. Virol. 77:10394-10403）。

40

【0079】

（A. アルファウイルスのレプリコンおよび粒子）

上記のように、本明細書に記載されたレプリコン粒子は、一般的には、1つ以上のポリ

50

ヌクレオチド配列（例えば、RNAレプリコン）を含む。レプリコン粒子中に存在するときは、これらのポリヌクレオチドは、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質によって囲まれて（相互作用して）いる。本発明を実施する際に使用することができるポリヌクレオチド配列および構造タンパク質の非限定な例が本明細書に記載されている。

【0080】

（A.1. ヌクレオチド成分）

本明細書記載の粒子、ベクターおよびレプリコンは、一般的には、コード配列および非コード配列である、さまざまな核酸配列を含む。本明細書記載の組成物が、通常、完全なアルファウイルスゲノムに満たないものを含む（例えば、アルファウイルスのゲノムに含まれるコード配列および／または非コード配列の全部に満たないものを含む）ことは明らかであろう。

10

【0081】

（A.2. 非コードポリヌクレオチド成分）

本明細書記載の粒子およびレプリコンは、一般的には、（例えば、構造または非構造の）ポリペプチドをコードする配列、および、制御因子などの非コード配列を含む。非コード配列の非限定な例は、非構造タンパク質に仲介される増幅に必要な5'側配列、異種ヌクレオチド配列を発現させるための手段、および非構造タンパク質に仲介される増幅に必要な3'側配列（米国特許第5,843,723号、第6,015,694号、第5,814,482号；PCT特許公開WO97/38087、WO00/61772）を含む。本明細書の教示内容から、本明細書に記載された1つ、2つ以上、または全部の配列が、本明細書記載の粒子、ベクター、および／またはレプリコンに含まれることが可能であり、さらに、本明細書の教示内容に従って使用するために、これらの配列の1つ以上を改変するか、そうでなければ操作することが可能であることが明らかであろう。

20

【0082】

このように、本明細書記載のポリヌクレオチドは、代表的に、非構造タンパク質に仲介される増幅に必要な5'側配列を含む。適当な5'側配列の非限定な例には、天然型アルファウイルスの5'側末端、非天然型DIアルファウイルスの5'末端、および細胞RNA由来の配列（例えば、tRNA要素）などの制御要素を含む（例えば、Monroeら、PNAS 80:3279-3283, 1983）。

【0083】

30

また、ポリヌクレオチド配列は、通常、異種ヌクレオチド配列（例えば、ポリペプチドをコードする配列）を発現させるための手段も含む。このような手段の非限定例は、プロモーターなどの制御因子など、例えば、相同ウイルス由来の天然型アルファウイルスサブゲノムプロモーター、異種ウイルス由来の天然型アルファウイルスサブゲノムプロモーター、（相同または異種の）コアアルファウイルスサブゲノムプロモーター、コアサブゲノムプロモーターから上流または下流の最小配列、コアまたは天然型のサブゲノムプロモーターの突然変異／欠失／付加、非アルファウイルス由来の親和的サブゲノムプロモーター（例えば、植物ウイルス）、内部リボソーム進入部位（IRES）、および／またはリボソームリードスルーフォン（例えば、BIP）などを含む。

【0084】

40

非構造タンパク質に仲介される増幅に必要とされる、適当な3'側配列の非限定例は、天然型アルファウイルスの3'末端、非天然DIアルファウイルスの3'末端、および上記の配列の突然変異、欠失、または付加を含む配列などの制御要素を含む。

【0085】

（A.3. コード配列）

また、本明細書記載の組成物は、さまざまなアルファウイルスポリペプチド、例えば、アルファウイルスの1つ以上の非構造ポリペプチド（nsp1、nsp2、nsp3、nsp4）または構造ポリペプチド（例えば、カプシド、エンベロープ糖タンパク質）をコードする1つ以上の配列を含むことも可能である。

【0086】

50

Straussら(1984)，前出，に記載されているように、野生型SINゲノムは、5'キャップおよび3'末端ポリ(A)部位を除いて、長さが11,703ヌクレオチドある。5'末端キャップの後ろには、59個のヌクレオチドの5'側非翻訳核酸があり、その後、非構造ポリペプチドをコードし、単一のオパール終止コドン以外に開放されている7539ヌクレオチドのリーディングフレームが続いている。非構造タンパク質をコードする配列と構造タンパク質をコードする配列を分ける接合部にある48個の非翻訳塩基の後ろに、構造タンパク質をコードする、長さ3735ヌクレオチドのオープンリーディングフレームがある。最後に、3'側非翻訳領域は、長さ322ヌクレオチドである。非構造タンパク質は、ゲノムRNAから2つのポリプロテイン前駆体として翻訳される。第1のものはnsp1、nsp2およびnsp3を含み、長さが1896アミノ酸であり、1897位のオパールコドンで終結する。オパールコドンのリードスルーより長さ2513アミノ酸の第2のポリプロテイン前駆体が產生されると、第4の非構造タンパク質であるnsp4が產生され、その後、翻訳後に切断される。

【0087】

野生型アルファウイルスゲノムも、構造タンパク質をコードする配列を含む。SINにおいて、構造タンパク質は、7598位のヌクレオチドから始まり、長さが4106ヌクレオチドであり(ポリ(A)部位を除く)、ゲノムRNAの3'末端と同じところで終結するサブゲノムメッセージから翻訳される。非構造タンパク質と同様に、構造タンパク質も、切断されるとヌクレオカプシドタンパク質、および2つの内在性膜糖タンパク質、ならびに、成熟型ビリオンには存在しない2つの低分子ペプチドを產生するポリプロテイン前駆体として翻訳される。このように、本発明のレプリコン、粒子およびベクターは、1つ以上のアルファウイルスに由来する1つ以上のコード配列を含むことが可能である。

【0088】

(B. アルファウイルス構造タンパク質)

アルファウイルスレプリコンまたはベクターのポリヌクレオチド成分を取り囲む(場合によっては相互作用する)構造タンパク質は、カプシドタンパク質とエンベロープタンパク質の両方を含むことができる。ほとんどの場合、ポリヌクレオチド成分は、ヌクレオカプシドを形成するカプシドタンパク質の複数のコピーに囲まれている。次に、ヌクレオカプシドは、好ましくは、エンベロープ糖タンパク質を含む脂質エンベロープによって囲まれている。アルファウイルスのカプシドタンパク質およびエンベロープ糖タンパク質は、Straussら(1994)Microbiol. Rev., 58:491-562に一般的に説明されている。カプシドタンパク質は、アルファウイルスの構造ポリプロテインのN末端タンパク質であり、ポリプロテインからのプロセッシングの後、アルファウイルスRNAおよび別のカプシドタンパク質単量体と相互作用して、ヌクレオカプシド構築物を形成する。アルファウイルスのエンベロープ糖タンパク質(例えば、E2、E1)は、レセプター結合、および標的細胞への進入に機能的に関与する表面「スパイク」としてエンベロープをもつ粒子から突き出ている。

【0089】

(C. アルファウイルスレプリコン粒子の作製法)

本発明に係るアルファウイルスレプリコン粒子は、公開された多様な方法を利用して產生することができる。そのような方法は、例えば、インビトロ転写されたレプリコンと1つ以上の欠損ヘルパーRNAとの同時形質転換(Liljestrom, Bio/Technology 9:1356-1361, 1991; Bredenbeekら, J. Virol. 67:6439-6446, 1993; Frolovら, J. Virol. 71:2819-2829, 1997; Pushkoら, Virology 239:389-401, 1997; 米国特許第5,789,245号および第5,842,723号)、またはプラスミドDNAベースのレプリコンと欠損ヘルパー構築物との同時形質転換(Dubenskyら, J. Virol. 70:508-519, 1996)などの一時的なパッケージング法、および安定したパッケージング細胞株(PCL)へのアルファウイルスレプリコンの導入(Polozら, PNAS 96:4598-4603, 1999)などである。

10

20

30

40

50

; 米国特許第5,789,245号、第5,842,723号、第6,015,694号；WO97/38087、WO99/18226、WO00/61772、WO00/39318、およびWO01/92552などを含む。その他の产生方法は、非欠損型ヘルパーベースのRNA、またはDNA構造タンパク質発現力セットであって、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質を作動可能にコードするものの使用を含む（米国特許第5、789、245号、第5、842、723号、第6、015、694号；WO97/38087、WO99/18226、WO00/61772、WO00/39318、WO01/92552、WO2004085660A2、WO2003023026A1）。

【0090】

10

好ましい実施形態において、レプリコン粒子産生のために、安定したアルファウイルスパッケージング細胞株が利用される。PCLを、インビトロで転写されたレプリコンRNAで形質転換するか、プラスミドDNAベースのレプリコン（例えば、ELVISベクター）で形質転換するか、またはレプリコン粒子のシードストックに感染させてから、培養上清中で高力価のパッケージされたレプリコン粒子を産生するのに十分な条件下で、それに十分な時間インキュベートすることができる。特に好ましい実施形態において、PCLを2段階のプロセスで利用するが、第1の段階として、PCLをプラスミドDNAベースのレプリコンで形質転換してレプリコン粒子のシードストックを産生させる。次に、第2段階では、PCLの新鮮な培養物にシードストックを感染させて、ずっと大きなレプリコン粒子のストックを作製する。このような感染は、MOI = 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、3、5、または10など、さまざまな感染多度（MOI）を用いて行うことができる。好ましくは、感染は低いMOI（例えば、1未満）で実施される。シードストックに感染したPCLからレプリコン粒子を 10^8 感染単位（IU）/mlを超える力価で、時間をかけて採取することができる。さらに、低多重感染を繰り返すことによって、レプリコン粒子を、さらに大量の無処理PCL培養物の中で引き継ぎ継代する、同一の高力価をもつ商業規模の調製物が得られる。重要なことには、「分断」された構造遺伝子構成のPCLを用いて、検出可能な汚染性RCVを含まないレプリコン粒子ストックを生産することができる。

20

【0091】

30

アルファウイルスレプリコン粒子の大規模な産生は、バイオリアクターを利用して行われる。好ましくは、バイオリアクターは外部コンポーネントバイオリアクターであり、基質に付着した細胞の大量培養、増殖および工程を調節するための集積モジュール式バイオリアクターシステムである。細胞（例えば、アルファウイルスパッケージング細胞）の付着および増殖は、組織培養処理された表面をもつ容器またはチャンバー内で行われ、これらの細胞は、細胞産生能を向上させるために新鮮な培地に入れられる。気体、温度、pH、グルコースなどのパラメーターについて観察および調整が行われて、灌流ポンプを利用して粗ベクターを採取する。典型的には、外部バイオリアクターの個々のコンポーネントは、（すなわち、チューブを介して）連結している外部モジュールを分離する。外部コンポーネントは、ポンプ、容器、酸素供給装置、培養モジュール、およびその他の非標準的な部品であってよい。外部コンポーネントバイオリアクターの代表例は、CellCube（登録商標）system（Corning, Inc.）である。

40

【0092】

本明細書記載の外部コンポーネントバイオリアクターを使うことに加え、いくつかの場合には、アルファウイルスレプリコン粒子の産生のために、従来からの搅拌槽バイオリアクターを使うことができる。搅拌槽バイオリアクター内では、アルファウイルスパッケージング細胞は基質に付着していない（例えば、懸濁液中で浮動していても）、基質（例えば、ポリディスク、マイクロキャリアまたはマクロキャリア、ビーズ）に付着していてもよい。あるいは、中空糸培養系（Hollow Fiber Culture System）を用いることも可能である。懸濁液適合型細胞を利用するも可能である。

【0093】

50

集菌後、キメラアルファウイルスレプリコン粒子を含む粗培養上清を、採取物を（例えば、孔径0.2μM、0.45μM、0.65μM、0.8μMの）フィルタに通して、清澄化することができる。場合によっては、濾過して大きな細胞片を除去する前に、粗上清を低速遠心分離にかけてもよい。1つの実施形態の範囲内で、クロマトグラフィーによる精製工程の前か後に、エンドヌクレアーゼ（例えば、ベンゾナーゼ（Benzonase），Sigma # E8263）をアルファウイルスレプリコン粒子の調製物に添加して外来性核酸を分解する。さらに、この調製物は、周知の方法の1つ（例えば、接線流濾過法）を用いて精製の前に濃縮され得る。

【0094】

粗製または清澄化されたアルファウイルスレプリコン粒子を、クロマトグラフィー技術（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー）によって濃縮および精製することができる。2つ以上のこのような精製法を連続して行うことも可能である。好ましい実施形態において、テンタクルイオン交換樹脂などのイオン交換樹脂を用いるイオン交換クロマトグラフィーの少なくとも1工程が行われ、そして、サイズ排除クロマトグラフィーの少なくとも1工程が行われる。要するに、清澄化アルファウイルスレプリコン粒子の濾液を、荷電したイオン交換基質または樹脂（例えば、陽イオンまたは陰イオンの交換）を含むカラムに充填することができる。この基質または樹脂は、架橋されたアガロース、架橋されたポリスチレン、架橋されたスチレン、親水性ポリエーテル樹脂、アクリル樹脂、およびメタクリル酸ベースの樹脂など（しかしこれらに限定されない）、多様な物質で構成されうる。イオン交換体の成分は、スルフォプロピル陽イオン交換体、カルボキシメチル陽イオン交換体、スルホン酸交換体、スルホン酸メチル陽イオン交換体、およびSO3-交換体から成るリストから選択された1つの陽イオン交換体を含むことができるが、これらに限定されるものではない。別の実施態では、イオン交換体の成分は、DEAE, TMAEおよびDMAEから成るリストから選択された1つの陰イオン交換体を含むことができるが、これらに限定されるものではない。最も好ましくは、イオン交換クロマトグラフィーは、テンタクル陽イオン交換体を用いて行われるが、ここでイオン交換樹脂は、SO3-陽イオン交換体（例えば、Fractogel（登録商標）EDMSO3-）をもつメタクリル酸ベースの樹脂である。

【0095】

レプリコン粒子はイオン交換樹脂に結合してから、塩（例えば、250mM以下のNaCl）を含む緩衝液で1回以上洗浄することができる。そして、レプリコン粒子を、塩濃度を上げた緩衝液を用いて、精製された形でカラムから溶離することができる。好ましい実施形態において、塩濃度は少なくとも300mM、350mM、400mM、450mMまたは500mMである。溶離は、好ましくは280nmにて分光光度計でモニターされ得るが、レプリコン滴定アッセイ、発現転移（transfer of expression: TOE）アッセイ、クーマシーブルー染色またはウエスタンプロッティングによるタンパク質ゲル解析も可能である。

【0096】

次に、より高い塩濃度の溶離緩衝液を、例えば、適当な水性溶液で希釈したり、粒子を含む溶離液を分子排除カラムに通したりして、より望ましい緩衝液と交換することができる。さらに、分子サイズ排除カラムを使うことで、場合によっては、さらに精製することができる。例えば、1つの実施形態において、Sephacryl S-500またはS-400（Pharmacia）クロマトグラフィーを、緩衝液交換として、また、イオン交換カラムから溶離されたレプリコン粒子を含む画分をさらに精製するために使用することが可能である。この特定の樹脂を用いると、通常、レプリコン粒子は、後期の空隙容量に溶離されるが、混入物質のいくつかは分子量が小さいためカラムにより長く保持されるために、純度のレベルの改善を示す。しかし、異なった組成の代替的樹脂を、サイズ排除同様に利用して、ほぼ同じか、よりよい結果が得られるかもしれない。これらの方法では、レプリコン粒子が基質に入り込むことができるため、より長く保持される、Seph-

10

20

30

40

50

acr y 1 S - 1000 など大きなサイズの樹脂が組み込まれて、分画を可能にするであろう。

【0097】

当業者は、レプリコン RNA の許容性細胞への導入を、例えば、RNA (例えば、インビトロで転写された RNA) のトランスフェクションまたはエレクトロポレーション、細胞内における DNA からの RNA 転写 (例えば、真核レイヤードベクター開始システム) 、またはウイルスもしくはウイルス様の粒子 (例えば、レプリコン粒子) による輸送のような種々の手段によって行うことができ、また、1 つ以上のアルファウイルス構造タンパク質をコードする欠損ヘルパー RNA または m RNA を許容性細胞内に導入することも、例えば、RNA (例えば、インビトロで転写された RNA) のトランスフェクションまたはエレクトロポレーション、または細胞内における DNA からの RNA 転写 (例えば、構造タンパク質発現カセット) など、多様な手段で行うことができることを、容易に理解できよう。

【0098】

(D . 不活性ウイルス)

本発明は、不活性 (または死滅させた) ウイルス (例えば PIV) を含む組成物、およびそれらを作製する方法を含む。不活性ウイルス組成物は予防用ワクチンとして使用することができる。好ましくは、不活性ウイルスワクチン組成物は、対数で約 4 ~ 8 のブラーク形成単位 (PFU) 、またはミリリットルあたり対数で約 4 ~ 8 の組織培養感染価 50 (TCID50) のウイルス力価に等しい量の不活性ウイルスを含む。さらにより好ましくは、この不活性ウイルスワクチン組成物は、対数で約 5 ~ 9 のブラーク形成単位 (PFU) 、またはミリリットルあたり対数で約 5 ~ 9 の組織培養感染価 50 (TCID50) のウイルス力価に等しい量の不活性ウイルスを含む。このワクチン組成物は、靈長類において免疫学的反応を起こすのに十分な量ウイルス抗原を含む。

【0099】

ウイルスを不活性または死滅させて、ウイルスが哺乳動物の細胞に感染する能力を破壊する方法は当技術分野で公知である。このような方法は化学的または物理的手段を含む。ウイルス (例えば、PIV) を不活性させる化学的手段は、有効量の以下の因子の 1 つ以上のものでウイルスを処理することを含む。すなわち、界面活性剤、ホルムアルデヒド、ホルマリン、 - プロピオラクトン、または UV 光。不活性のためのさらに別の化学的手段は、メチレンブルー、ソラレン、カルボキシフラーレン (C60) 、またはこれらのいずれかを組み合わせたもので処理することを含む。その他にウイルスを不活性させる方法、例えば、バイナリーエチルアミン、アセチルエチレンイミン、またはガンマ線照射などが当技術分野で公知である。

【0100】

例えば、 - プロピオラクトンを、 0.01 ~ 0.5 % 、好ましくは 0.5 % ~ 0.2 % 、さらに好ましくは 0.025 ~ 0.1 % などの濃度で使用することが可能である。ウイルス増殖に使用した容器から前記培養上清を回収する前か後に、回収前に細胞に結合したウイルスを放出させるための細胞破壊工程とともに、またはその工程なしで、ウイルスを含む培養上清 (ウイルス材料) に不活性化剤を添加する。さらに、前記培養上清を凍結貯蔵し、解凍した後、または細胞混入物質を除去するための 1 回以上の精製工程の後に、不活性剤を添加してもよい。 pH の酸性方向への有害な遷移を水酸化ナトリウム (例えば、 1 N の NaOH) または重炭酸ナトリウムの溶液で調節しつつ、ウイルス材料に プロピオラクトンを添加する。不活性剤とウイルス材料の混合物を、 4 ~ 37 の温度で、好ましくは 12 ~ 72 時間のインキュベーション時間でインキュベートする。

【0101】

使用可能な別の不活性剤は、バイナリーエチルアミンである。等容積の 0.2 モルの臭化水素酸プロモエチルアミン溶液、および 0.4 モルの水酸化ナトリウム溶液を混合して、 60 分間約 37 でインキュベートする。生じた環化不活性剤がバイナリーエチルアミンであって、容積対容積で、 0.5 ~ 4 パーセント、好ましくは 1 ~ 3 パーセントでウイ

10

20

30

40

50

ルス材料に添加される。不活化ウイルス材料を約4～37で24～72時間、周期的に攪拌しながら保持した。このインキュベーションの最後に、1モルの無菌チオ硫酸ナトリウム溶液20mlを添加して確実にB E Iを中和する。

【0102】

1つの実施形態において、本発明は、ウイルスの不活化剤への曝露を最大にし、かつ、温度感受性ウイルス粒子が高温に長期間曝露されることを最小限に抑えるように設計されている不活性化法を含む。本発明は、ウイルスを(BPLなどの)不活化剤に冷蔵温度で12～24時間曝露してから、3時間だけ温度を上昇させて、残留する不活化剤を加水分解する不活性化法を含む。好ましくは、冷蔵温度は0から8の間であり、より好ましくは約4である。好ましくは、上昇温度は33から41の間であり、より好ましくは約37である。

10

【0103】

不活化ウイルス材料の希釈サンプルまたは未希釈サンプルを、感受性細胞(組織)培養物(例えば、LLC-MK2、VERO)に添加して、不活化されていないウイルスを検出する。培養細胞を複数回継代して、例えば、細胞変性効果(CPE)および抗原検出(例えば、ウイルスに特異的な蛍光抗体結合体を介する)など、多様な方法のいずれかに基づいてウイルスの存在を検査する。このような検査によって、ウイルスが完全に不活性化したことを見定すことが可能になる。

【0104】

不活性化用のウイルスまたはアルファウイルスベクターは、一般的に哺乳動物細胞培養物中で培養するか増殖させる。細胞培養物は、付着して増殖する細胞であっても、または懸濁液中で増殖する細胞であってもよい。好ましくは、細胞は哺乳動物起源であるが、鳥類(例えば、メンドリ胚細胞(CEF細胞)などのメンドリの細胞、EB45細胞)、両生類、爬虫類、昆虫、または魚類に由来するものであってもよい。哺乳動物細胞源は、ヒトまたは非ヒト霊長類(例えば、MRC-5(ATCC CCL-171)、WI-38(ATCC CCL-75)、ヒト胚性腎臓細胞(293細胞、典型的には剪断されたアデノウイルス5型DNAによって形質転換されている)、PER.C6、LLC-MK2細胞、サル腎臓由来のVERO細胞)、ウマ、ウシ(例えば、MDBK細胞)、ヒツジ、イヌ(例えば、イヌ腎臓由来のMDCK細胞、ATCC CCL34 MDCK(NBL2)またはMDCK33016、WO97/37001に記載されているように寄託番号DSM ACC2219)、ネコ、および齧歯動物(例えば、BHK21-Fなどのハムスター細胞、HCKC細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞))などであるが、これらに限定されず、例えば、成体期、新生児期、胎児期、胚芽期など、多様な発育段階から得ることが可能である。好ましくは、本発明のウイルスはLLC-MK2、VERO細胞または胎児アカゲサル腎臓細胞において増殖させる。

20

【0105】

上記細胞型の培養条件がさまざまな出版物において十分に説明されており、あるいは、例えばCambrex Bioproducts(East Rutherford, NJ)のカタログおよび付加的文献に記載されているように、培養培地、補助剤、および条件を商業的に購入することができる。いくつかの実施形態において、本明細書記載の方法で使用される宿主細胞は、血清および/またはタンパク質を含まない培地で培養される。本発明に関しては、培地は、ヒトまたは動物起源の血清に由来する添加物が存在せず、無血清培地と呼ばれる。タンパク質非含有とは、タンパク質、増殖因子、その他のタンパク質添加物、および非血清タンパク質を排除した、細胞増殖が起こる培養を意味するものとする。このような培養物中で増殖する細胞は、当然ながらタンパク質そのものを含む。既知の無血清培地は、イスコブの培地、ウルトラCHO培地(Bio Whittaker)またはEX-CELL(JRH Bioscience)が挙げられる。通常の血清含有培地は、イーグル基本培地(BME)または最小必須培地(MEM)(Eagle, Science, 130, 432(1959))またはダルベッコ改変イーグル培地(DM EMまたはEDM)などであり、これらは、通常、最大10%のウシ胎児血清または同様

30

40

50

の添加物とともに使用される。場合によっては、最小必須培地 (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) またはダルベッコ改変イーグル培地 (DMEMまたはEDM) を、血清含有補助剤なしで使用してもよい。PF-CHO (JHR Bioscience) のようなタンパク質非含有培地、ProCHO 4 CDM (Biowhittaker) またはSMIF 7 (Gibco/BRL Life Technologies) などの化学的に定義された培地、およびプリマクトン (Primatec tone)、ペプチケース (Peptidase)、またはHy Pep (登録商標) (すべてQuest Internationalより) などのマイトジエン性ペプチド、またはラクトアルブミンの加水分解物 (Gibco および他の製造業者) も従来技術において十分に公知である。植物の加水分解物に基づいた培地添加物には、ウイルス、マイコプラズマまたは未知の感染因子の混入を排除できるという特別な利点がある。 10

【0106】

所望の用途に用いられる細胞培養条件 (温度、細胞密度、pH値など) は、本発明に従って使用される細胞株の適合性によって広い範囲にわたって多様であり、ウイルスまたはベクターの増殖に必要なものにも合わせることが可能である。

【0107】

不活化ウイルスの精製法は当技術分野で公知であり、例えば、勾配遠心分離、超遠心分離、連続流超遠心分離、および、例えばイオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、および液体アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーの1個以上を含むことができる。JP Gregersen "Herstellung von Virussimpfstoffen aus Zellkulturen" Chapter 4.2 in Pharmazeutische Biotechnologie (O. Kayser および R.H. Mueller 編) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2000 参照。また、O'Neilら, "Virus Harvesting and Affinity Based Liquid Chromatography. A Method for Virus Concentration and Purification", Biotechnology (1993) 11: 173-177; Priorら, "Process Development for Manufacture of Inactivated HIV-1", Pharmaceutical Technology (1995) 30-52; および Majhdiら, "Isolation and Characterization of a Coronavirus from Elk Calves with diarrhea" Journal of Clinical Microbiology (1995) 35(11): 2937-2942 も参照。 20 30

【0108】

本発明で使うのに適した精製法の他の例は、ポリエチレングリコール沈殿法または硫酸アンモニウム沈殿法 (Trepanierら, "Concentration of human respiratory syncytial virus using ammonium sulfate, polyethylene glycol or hollow fiber ultrafiltration" Journal of Virological Methods (1981) 3(4): 201-211; Hagenら, "Optimization of Poly(ethylene glycol) Precipitation of Hepatitis Virus Used to prepare VAQTA, a Highly Purified Inactivated Vaccine" Biotechnology Progress (1996) 12: 406-412; および Carlssonら, "Purification of Infectious Pancreatic Necrosis Virus by Anion Exchange Chromatography Increases the Specific Infectivity" Journal of 40 50

Virological Methods (1994) 47: 27 - 36 参照)、ならびに超遠心分離法および精密濾過法 (Payら, Developments in Biological Standardization (1985) 60: 171 - 174; Tsurumiら, "Structure and filtration performances of improved cuprammonium regenerated cellulose hollow fiber (improved BM M hollow fiber) for virus removal" Polymer Journal (1990) 22 (12): 1085 - 1100; および Makinoら, "Concentration of live retrovirus with a regenerated cellulose hollow fiber, BM M" ; Archives of Virology (1994) 139 (1 - 2): 87 - 96 参照) を含む。

【0109】

好ましくは、ウイルスは、イオン交換クロマトグラフィーなど、クロマトグラフィーを利用して精製される。クロマト精製によって、ウイルスを含む懸濁液を大量に作製することが可能になる。目的とするウイルス産物を、単純な吸着 / 脱離のメカニズムによってクロマト培地と相互作用させることができるので、1回の充填で大量のサンプルを処理することができる。吸着剤に親和性をもたない混入物質はカラムを通過しない。よって、ウイルス材料は、濃縮された形で溶離される。

【0110】

本発明で使用される好ましい陰イオン交換樹脂は DEAE、EMD-TMAE などである。好ましい陽イオン交換樹脂は、スルホン酸によって修飾された表面を含むことができる。1つの実施形態において、第1の工程では強力な陰イオン交換樹脂 (すなわち、EMD-TMAE)、そして第2の工程では EMD-SO₃ (陽イオン交換樹脂) を含むイオン交換クロマトグラフィーを用いて、ウイルスを精製する。さらなる精製を行うために、金属結合アフィニティークロマトグラフィー工程を任意で含んでもよい (例えば、WO 97/06243 参照)。

【0111】

本発明において使用される好ましい樹脂は、Fractogel (登録商標) EMD である。このメタクリル酸ベースの合成樹脂は、共有結合で結合した、長い線状多量体の鎖 (いわゆる「テンタクル」) をもっている。この「テンタクルの化学作用」によって、立体的に接触可能な大量のリガンドが立体的障害なしに生体分子と結合することができる。この樹脂は圧力安定性も向上している。

【0112】

カラムベースの液体アフィニティークロマトグラフィーは、本発明で使用される別の好ましい精製法である。この精製法において利用される樹脂の一例は、Matrex (登録商標) Cellufine (登録商標) 硫酸 (MCS) である。MCS は、セルロースの6位に低濃度の硫酸エステル官能基をもつ、排除限界 3,000 ダルトンの剛球体 (直径約 45 ~ 105 μm) セルロース基質 (その孔構造により巨大分子が排除される) から成る。官能性リガンド (硫酸エステル) は、比較的高度に分散するため、ほとんどの可溶性タンパク質をビーズ表面に吸着させるには不十分な陽イオン電荷密度を示す。したがって、典型的なウイルス貯留に存在するタンパク質のバルク (細胞培養上清、すなわち発熱物質およびほとんどの混入タンパク質、ならびに核酸および内毒素) をカラムから洗浄して、結合ウイルスのある程度の精製が達成される。

【0113】

不活化ウイルスを精製するために利用される、さらに別の精製法は、核酸分解剤、好ましくは、DNase 活性および RNase 活性をもつヌクレアーゼなどの核酸分解酵素、または、例えば、靈菌に由来する、Benzonase (登録商標) として市販されているエンドヌクレアーゼ、陰イオン官能基をもつ膜吸着剤 (例えば、Sartobind (登録商標))、または、陰イオン官能基 (例えば、DEAE または TMAE) を用いる追

10

20

30

40

50

加的なクロマトグラフィー工程を含む。超濾過 / 透析濾過および最終的な除菌工程を、精製法に加えることも可能である。好ましくは、精製は、1つ以上の核酸分解酵素によってウイルス調製物を処理することを含む。これらの酵素は、ウイルス精製工程における宿主細胞核酸レベルを低下させるために利用され得る。細胞培養において利用される核酸分解酵素は当技術分野で公知であり、例えば、Benzonase (登録商標) を含む。

【0114】

本発明の精製ウイルス調製物は、細胞または細胞培養物に由来する混入タンパク質を実質的に含まず、好ましくはウイルス抗原 $1 \mu\text{g}$ あたり細胞核酸約 50 pg 未満を含む。さらに好ましくは、精製ウイルス調製物は約 20 pg 未満、さらに好ましくは約 10 pg 未満を含む。ウイルスサンプル中の宿主細胞核酸レベルの測定法は、当技術分野で公知である。WHOまたはFDAのような監督機関によって承認または推奨されている標準化法が好ましい。

10

【0115】

本発明は、予防に効果的な量のウイルス抗原、好ましくはエンベロープ糖タンパク質またはその免疫原性フラグメントを含む不活化ワクチン組成物を含む。ウイルス抗原は、好ましくは、投与量あたり抗原 $0.1 \sim 50 \mu\text{g}$ 、さらに好ましくは $0.3 \sim 30 \mu\text{g}$ の濃度で存在する。さらに好ましくは、抗原は投与量あたり約 $15 \mu\text{g}$ である。

【0116】

1つの実施形態において、より低濃度のウイルス抗原が本発明の不活化ワクチン組成物において使用される。このような低濃度ワクチンは、必要に応じて、抗原に対する宿主の免疫反応を高めるアジュvantを含むこともできる。このような「低投与量」ワクチンにおいては、ウイルス抗原は、好ましくは投与量あたり抗原 $15 \mu\text{g}$ 未満（すなわち、投与量あたり抗原 $1.0, 7.5, 5$ または $3 \mu\text{g}$ 未満）の濃度で存在する。

20

【0117】

本発明の不活化ワクチン調製物は、不活化ウイルス調製物の中で免疫原性タンパク質の完全性を保存するための安定剤をさらに含むことができる。ワクチンで使用するのに適した安定剤は当技術分野で公知であり、例えば、緩衝液、糖、糖アルコール、およびアミノ酸を含むことができる。安定化緩衝液は、好ましくは生理学的pH領域に調整され、リン酸塩緩衝液、トリス緩衝液、TE (トリス/EDTA)、TEN (トリス/NaCl/EDTA) およびアール (Earle's) 食塩水を含むことができる。安定化糖は、例えば、スクロース、グルコース、フルクトース、デキストラン、デキストラン硫酸、およびトレハロースの1つ以上を含むことができる。安定化糖アルコールは、例えば、キシリット/キシリトール、マンニット/マンニトール、ソルビット/ソルビトール、およびグリセロールを含むことができる。本発明で使用するのに適したアミノ酸は、例えば、Lグルタミン、アルギニン、システイン、およびリジンを含む。本発明において使用できる別の安定剤は、酒石酸、プルロニックF68、およびTween80を含む。

30

【0118】

本発明の不活化ウイルス調製物に使用され得るウイルス単離株は、例えば、精製された（例えば、ブラーク精製された）臨床サンプル由来、または既知の保存株（例えば、ATCC）由来など、多様な源から得ることができる。ウイルスを単離する方法は当技術分野で公知である。

40

【0119】

(呼吸器系病原体)

本明細書記載の組成物および方法は、このように、ウイルス、真菌および/または細菌などの1つ以上の呼吸器系病原体由来のタンパク質をコードする核酸配列を含むアルファウイルスレプリコンベクター、ベクター構築物またはレプリコン粒子を含む。本発明の目的では、事実上いかなるポリペプチドまたはポリヌクレオチドも利用することができる。

【0120】

抗原は、数種の既知の呼吸器系病原体（例えば、細菌、ウイルス、真菌）のいずれかに由来することができ、これらに対する免疫応答が望まれる。さらに、本発明の目的にとっ

50

て、「抗原」は、タンパク質が免疫応答を誘導する能力を維持するかぎり、天然配列に対する（天然においては一般に保存的な）欠失、付加および置換などの改変を含むタンパク質を意味する。これらの改変は、部位特異的突然変異によるなど、計画的なものであってもよく、または、抗原を産生する宿主の突然変異によるなど偶発的なものであってよい。

【0121】

抗原は単独または任意の組み合わせで利用することができる。組み合わせは、同一病原体に由来する複数の抗原、異なる病原体に由来する複数の抗原、または同一の病原体および異なる病原体に由来する複数の抗原を含みうる。したがって、さまざまな呼吸器系ウイルス性病原体由来のウイルス抗原を、同一組成物に含むこともできるか、または同一被験体に別々に投与することも可能である。

10

【0122】

抗原を併用して免疫応答を起こすことは一般的に好ましい。核酸は、同一の呼吸器系病原体に由来する免疫原性タンパク質をコードするか、または、代替的に異なる呼吸器系病原体に由来する免疫原性タンパク質をコードすることができる。免疫原性タンパク質をコードする核酸が同一の呼吸器系病原体に由来していれば、その核酸が、さまざまなアルファウイルスベクターまたは粒子に含まれていることが好ましいが、必ずしも必要ではない。さらに、核酸が同一の呼吸器系病原体に由来する免疫原性タンパク質をコードする場合、該核酸は同一株または異なる株に由来することが可能である。

【0123】

このように、本明細書記載の免疫原性組成物およびワクチンは、呼吸器系病原体に対して、より最適または完全な防御を提供すること、および防御的免疫応答の幅を広げることを意図するものである。

20

【0124】

本発明のウイルス性呼吸器系病原体の非限定的な例は、オルソミキソウイルス科（例えば、*Vaccines*, 1998, Plotkin & Mortimer編 (ISBN 0-7216-1946-0) の19章に記載されているように、A型、B型およびC型インフルエンザウイルスなど）、パラミクソウイルス科（例えば、*Vaccines*, 1998, Plotkin & Mortimer編 (ISBN 0-7216-1946-0) の9～11章に記載されているようにパラインフルエンザウイルス、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルスなど）、コロナウイルス科（例えば、*SARS*コロナウイルス、*Rotar*, 2003, *Science* 300: 1394-1399）、ピコルナウイルス科（例えば、ライノウイルス）インフルエンザウイルス（*Kawaokar*, *Virology* (1990), 179: 759-767; *Webster*ら, “Antigenic variation among type A influenza viruses” p. 127-168. In: *P. Palese*ら *D.W. Kingsbury* (編), *Genetics of influenza viruses*. Springer-Verlag, New York) などである。

30

【0125】

本発明の細菌性呼吸器系病原体の非限定的な例は、*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌)、*Corynebacterium diphtheriae* (ジフテリア菌)、*Bordatella pertussis* (百日咳菌)、*Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌)（例えば、糖類またはタンパク質抗原、特に肺炎球菌由来の糖類）、型別不能 *Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌)、*Moraxella catarrhalis*、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)、*Bacillus anthracis* (炭疽菌)、および *Legionella pneumophila* (レジオネラ・ニューモフィラ菌) (レジオネラ症) などである。

40

【0126】

真菌性呼吸器系病原体の非限定的な例は、*Coccidioides immitis* (バレー熱の病原因子)、クリプトコッカス菌（例えば、*Cryptococcus n*

50

eoformans (クリプトコッカス・ネオフォルマンス))、およびカンジダ菌 (例えば、*Candida albicans* (カンジダ・アルビカンス)) およびアスペルギルス菌などである。

【0127】

(A. RSウイルス)

RSウイルスは、1歳未満の乳児および小児の気管支炎および肺炎の最も一般的な原因である。ほとんどの場合、発熱、鼻水、咳、時として喘鳴を伴って病気が始まる。最初のRSV感染で、乳児および幼児の25%~40%が気管支炎または肺炎の兆候または症状を示し、0.5%~2%が入院を要する。ほとんどの小児が8~15日で治癒する。RSV感染のために入院した小児の大部分は、生後6ヶ月未満である。RSVは、通常は中程度ないし重度の風邪様の症状を伴いながら、一生感染を繰り返しもするが、重度の下部気道疾患があらゆる年齢、特に高齢においてか、または心臓、肺もしくは免疫系に欠陥のある人々に発生し得る。

【0128】

RSVは、パラミクソウイルス科に属するマイナス鎖の単鎖RNAウイルスであり、表面に存在する付着糖タンパク質 (G) および融合糖タンパク質 (F) の「スパイク」など、ワクチン用途のために、十分に特徴付けられた標的抗原を複数持っている (Johnsonら (1987) J. Virol., 61: 3163-3166)。G抗原およびF抗原に加えて、本発明において有用なポリペプチドをコードする他のRSV遺伝子は、マトリックスタンパク質 (M)、SHタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質 (N)、P、L、M2-1およびM2-2を含む (例えば、GenBank登録番号M74568およびNC001781; Wertz, ら1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4075-4079; Johnsonら (1988) J. Gen. Virol. 69: 2623-2628; Johnsonら, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5625-5629; Collinsら, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7683-7687; Collinsら, (1990) J. Gen. Virol. 71: 3015-3020 参照)。

【0129】

(B. パラインフルエンザ)

ヒトパラインフルエンザウイルス (HPIV) は、幼児の下部気道疾患の一般的な原因としてはRSVに劣る。RSV同様、HPIVは一生感染を繰り返すことができ、通常は上部気道疾患 (風邪および/または咽喉炎) によって顕在化する。HPIVはまた、繰り返し感染することにより、特に老人および免疫系不全患者に、深刻な下部気道疾患 (例えば、肺炎、気管支炎、および気管支梢炎) を引き起こし得る。

【0130】

4種類のHPIVのそれぞれは、異なる臨床的特徴および疫学的特徴を持っている。HPIV-1およびHPIV-2の最も明確な臨床的特徴はクルップ (すなわち、喉頭気管気管支炎) であり、HPIV-1は小児のクルップの主な原因であるが、HPIV-2は頻繁には検出されない。HPIV-1およびHPIV-2はともに、他の上部および下部気道の疾患を引き起こすことがある。HPIV-3は、喉頭気管梢炎および肺炎と関連していることがよくある。HPIV-4は、おそらく重度の疾病を引き起こすことがないので、まれにしか検出されない。

【0131】

PIVは、パラミクソウイルス科に属するマイナス鎖の単鎖RNAウイルスであり、それらの表面に融合糖タンパク質 (F) 、および赤血球凝集素 - ノイラミニダーゼ (HN) 糖タンパク質の「スパイク」を有する。4種の血清型HPIV (1~4) と2種の特殊型 (4aおよび4b) がある。F抗原およびHN抗原に加えて、本発明において有用なポリペプチドをコードするその他のPIV遺伝子は、マトリックスタンパク質 (M) 、ヌクレオカプシド (NP) 、殻タンパク質 (P) 、L、修飾タンパク質 V、C、D、W、X、お

10

20

30

40

50

およびIを含む（例えば、GenBank登録番号#Z11575、NC001796、AF533012、およびU51116、ならびにStokesら、1992 Virus Res. 25: 91-103参照）。

【0132】

（C.ヒトメタニьюモウイルス）

ヒトメタニьюモウイルスは、RSウイルスと同じパラミクソウイルス科の亜科の肺炎ウイルス属に属する、最近発見された呼吸器系病原体である。HMPVは、20年間にわたって小児から採取された鼻咽頭吸引液サンプル中に2001年にオランダで最初に認められた。以来、世界各国で同定されている。最近のHMPV調査報告によれば、呼吸器系疾患で入院するHMPV感染小児は、RSV感染小児と同様、気管支梢炎および肺炎との臨床診断をしばしば受ける。HMPV感染小児の臨床症状は、乾性咳嗽、鼻づまり、および喘鳴を含んでいた。最も一般的に報告された、胸部エックス線の異常は、肺炎の指標である両側浸潤影であった。最近の研究では、小児のヒトメタニьюモウイルス（HMPV）感染を、RSウイルス（RSV）感染と同じような重症度の呼吸器系疾病に関連付けている。

【0133】

RSVおよびPIVと同様に、HMPVは、エンベロープG糖タンパク質（G）および融合タンパク質（F）、マトリックスタンパク質（M）、ヌクレオカプシドタンパク質（N）、SHタンパク質、P、L、およびM2など、本明細書記載の免疫原性組成物において有用な複数の抗原標的をもつ（例えば、Van Den Hoogenら、2001, Nature Med. 7: 719-724: およびGenBank登録番号AF371337; Crowe (2004) Pediatr. Infect. Dis. J., 23: S215-221参照）。

【0134】

（D. SARS）

重症急性呼吸器症候群（SARS）は、SARS関連コロナウイルス（SARS-CoV）と呼ばれるコロナウイルスによって引き起こされるウイルス性呼吸器系疾患である。SARSは、2003年2月にアジアで初めて報告された。その後数ヶ月間にわたって、2003年のSARSの世界的集団発生が抑え込まれるまで、この病気は北アメリカ、南アメリカ、ヨーロッパ、およびアジアの24より多い国々に拡大した。世界保健機関（WHO）によれば、2003年の集団発生期間中に、全世界で総計8,098人がSARSにより病気になった。そのうち774人が死亡した。一般的に、SARSは、高熱（100.4°F (> 38.0) よりも高い体温)とともに始まる。この他の症状は、頭痛、全身の不快感および身体の痛みを含み得る。また、発症時には軽度の呼吸器症状を示す人もいる。患者の約10パーセント～20パーセントが下痢を有する。2～7日後、SARS患者は乾いた咳をするようになる。ほとんどの患者は肺炎に罹る。

【0135】

他のコロナウイルスのように、SARS-CoVはスパイク糖タンパク質（S）など、複数の抗原標的をもつ大型のプラス鎖RNAウイルスである（Songら、(2004) J. Virol. 78: 10328-10335）。本発明にとって有用なポリペプチドをコードするSARS-CoV遺伝子は、例えばスパイク糖タンパク質（S）、E、M、N、ORF1a、ORF1b、および機能があまり分かっていない比較的小型の多様なタンパク質を含む（Rotaら、2003, Science 300: 1394-1399; Marraら、2003, Science 300: 1399-1404; Ruanら、2003, Lancet 361: 1779-1785; Eickmannら、2003, Science 302: 1504-1505）。SARSポリペプチドも、WO04/092360に記載されている。

【0136】

（E.インフルエンザ）

インフルエンザウイルスは3つの異なる型、A型、B型、およびC型を含む。A型イン

10

20

30

40

50

フルエンザウイルスは、ウイルスの表面上の2個のタンパク質、赤血球凝集素（H A）およびノイラミニダーゼ（N A）に基づいて亜型に分けられる。15の異なるH A亜型および9の異なるN A亜型がある。これらのウイルスは、その表面タンパク質に従って分類される。例えば、「H 7 N 2 ウイルス」は、血球凝集素7タンパク質およびノイラミニダーゼ2タンパク質をもつA型インフルエンザの亜型を表す。野生のトリは、A型インフルエンザウイルスのすべての亜型の天然宿主である。B型インフルエンザおよびA型インフルエンザの特定の亜型（H 1 N 1、H 1 N 2 およびH 3 N 2）は、通常はヒトの間を循環していて、毎年病気の流行を引き起こす。C型インフルエンザウイルスは穏やかなので、流行を引き起こさない。A型ウイルスが、歴史的にインフルエンザの大流行の原因であった。

10

【0137】

インフルエンザウイルスは、大流行しているヒト株、新たに大流行するヒト株、および今後大流行するヒト株を含む。大流行の発生を引き起こす可能性のあるインフルエンザ株の特徴は以下である：（a）現在循環しているヒト株における赤血球凝集素と比較して新しい赤血球凝集素を含む。すなわち、10年以上にわたりヒト集団において明らかにならなかったもの（例えば、H 2）、またはヒト集団においてはまれにしか見られず（例えば、一般的に、トリ集団のみに見出されるH 5、H 7またはH 9）、その結果、ヒト集団が、その株の赤血球凝集素に対して免疫学的にナイーブになっている；（b）ヒト集団において水平に伝染し得る；および（c）ヒトに対して病原性である。

【0138】

単純なインフルエンザ疾患は、全身および呼吸器の兆候および症状（例えば、発熱、筋肉痛、頭痛、重度の倦怠感、乾性咳嗽、喉頭炎、および鼻炎）の突然の発症という特徴がある。中耳炎、吐き気、および嘔吐も、小児のインフルエンザ疾患について一般的に報告されている。インフルエンザが原因となる呼吸器系疾患は、症状だけで、他の呼吸器系病原体が原因となった疾患と区別するのは難しい。大多数の人々にとって、インフルエンザ疾患は、一般的に、数日後には消散するが、咳および倦怠感が2週間よりも長く持続し得る。ある特定の人々の間では、インフルエンザは、基礎的な医学的状態（例えば、肺または心臓疾患）を悪化し得、2次的な細菌性肺炎または1次的なインフルエンザウイルス性肺炎を発症させ得るか、他のウイルス性または細菌性病原体との同時感染の一部として生じ得る。インフルエンザに感染した幼児は、高熱を伴う細菌性敗血症に似た初期症状を有し得、インフルエンザで入院した小児の20%以下が熱性発作を起こすことがある。インフルエンザ感染は、脳障害、横断性脊髄炎、ライ症候群、筋炎、心筋炎、心膜炎とも関連している。

20

【0139】

インフルエンザによる合併症、入院、および死亡のリスクは、65歳以上の人々、幼児、および任意の年齢の特定の基礎的健康状態を有する人々（Persons at Increased Risk for Complications参照）では、健康な年長児および若年成人よりも高い。インフルエンザに関連した死亡は、肺炎ならびに心肺状態およびその他慢性疾患の悪化に起因し得る。高齢者が、肺炎およびインフルエンザが原因となる死亡の90%以上を占めている。

30

【0140】

通常は人に感染するインフルエンザウイルスに加えて、通常人々に感染するインフルエンザウイルスとは一般的に遺伝子的に区別可能であり、家禽にさまざまな程度の病気を引き起こすトリインフルエンザウイルスも本発明において意図されている。トリインフルエンザに感染しているトリは、唾液、鼻腔分泌物および糞便でウイルスを撒き散らす。感受性のトリが汚染された排泄物に接触すると疾患が広がる。A型トリインフルエンザは、通常はヒトに感染しないが、ヒトに感染した数件の例、およびトリインフルエンザの大発生が1997年以来報告されている。トリインフルエンザのヒト感染のほとんどの事例は、感染した家禽または汚染表面との接触が原因と考えられている。ヒトに感染したと報告されているトリインフルエンザの一例はH 7インフルエンザウイルスであるが、このウイル

40

50

スはトリの間では世界的に循環していて、特に、ニワトリその他の家禽など、飼われているトリに対して致死性となり得る。しかしながら、2003年に、A(H7N7)型インフルエンザが数箇所の飼育場の家禽において発生したことを、オランダが報告した。後に、ブタおよびヒトの間での感染が報告された。全部で83人が、この家禽での発生に関連したH7N7インフルエンザウイルスに感染したことが確認された。これらの症例はほとんど家禽の作業員の間で発生した。デラウェア州も、家禽にA(H7N2)型トリインフルエンザが発生したことを報告した。感染した家禽は処分されているところであり、防疫対策が策定されている。このH7N2型ウイルスはH7N7型ウイルスと著しく異なっている。アジア諸国ではトリ集団の間で、タイおよびベトナムではヒトで、A(H5N1)型インフルエンザの発生が現在起こりつつある。これまでに、H5N1型トリインフルエンザウイルスは、1997年に香港で(18例)、また2003年に中国に旅をした香港の2人にヒトの病気を引き起こした。本発明の好ましいFLU抗原は、表面糖タンパク質赤血液凝集素(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)を含む。

【0141】

例えば、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、またはH15の各赤血球凝集素、ならびにN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、およびN9の各ノイラミニダーゼをもつ亜型(例えば、H7N7、H7N2、H5N1、H5N2、H3N2、H1N1、H2N2、H3N8の各株)をもつ亜型など、さまざまなインフルエンザ亜型が、本発明によって意図された標的抗原の供給源である。本発明の抗原をコードするFLU遺伝子は、赤血球凝集素(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)、ヌクレオカプシド(NP)、マトリックスタンパク質(M₁)、イオンチャンネルタンパク質(M₂)、NS₁、NS₂、PB₁、PB₂、およびPAを含む(Lambら, 2001, Fields Virology, KnipeらHowley, 編, pp. 1487-1532, Lippincott, Williamslar Wilkins; Wrightら, 2001, Fields Virology, KnipeらHowley, 編, pp. 1533-1579, Lippincott, WilliamsらWilkinsを参照)。

【0142】

上記のように、1つ以上のインフルエンザタンパク質(抗原)が、本明細書に記載されている1つ以上のアルファウイルスの構築物または粒子によってコードされうる。特定の実施形態において、本明細書に記載されているのは、1つのFLU抗原(HAおよび/またはNA)を含む第1のアルファウイルスの構築物または粒子を含む組成物である。または、他の実施形態において、免疫原性組成物は、抗原が、パンデミックな、またはパンデミックである可能性のある複数のインフルエンザ株に由来する場合、複数のインフルエンザ抗原(例えば、HAおよび/またはNA)を(同一の粒子または異なった構築物または粒子の中に)含む。この組成物は、パンデミックな、またはパンデミックである可能性のあるインフルエンザ株、およびインターパンデミックなインフルエンザ株による感染に対する防御的および治療的な免疫応答を被験体に生じさせるため、または、「汎用」fluワクチンを提供するために使用される。

【0143】

抗原が、パンデミックな、またはパンデミックである可能性のある複数のインフルエンザ株に由来する場合、複数のインフルエンザタンパク質(抗原)を、複数のインフルエンザ抗原(例えば、HAおよび/またはNA)を(同一の粒子または異なった構築物もしくは粒子の中で)コードしている1つ以上のアルファウイルスの構築物または粒子によってコードすることができる。この組成物は、パンデミックな、またはパンデミックである可能性のあるインフルエンザ株による感染に対する防御的および/または治療的な免疫応答を被験体に生じさせるため、または、「汎用」パンデミックなfluワクチンを提供するために使用される。

【0144】

同様に、インターパンデミックなインフルエンザ株に由来する複数のFLUタンパク質

10

20

30

40

50

(例えば、N A および / または H A タンパク質) をコードする配列を (同一の粒子または異なる構築物または粒子の中に) 含む 1 つ以上の構築物または粒子を、(卵の供給によって制限される) 従来型卵ベースの F L U ワクチンよりも広範囲の抗原をもつ免疫原性組成物 (例えば、ワクチン) を提供するため、または毎年再処方される必要がなく、および / もしくは、抗原不連続変異を抑制するのに役立つ汎用ワクチンを提供するために作製することができる。

【0145】

(F. 細菌性呼吸器系病原体)

免疫原性タンパク質をコードする核酸を得ることができる呼吸器系細菌性病原体は、以下のものを含むが、これらに限定されない：結核菌 (例えば、リポタンパク質、L P S、B C G 抗原、抗原 85 B (A g 85 B) の融合タンパク質、および / または、必要に応じて陽イオン性脂質小胞に処方される E S A T - 6 (Infect Immun. 2004 October; 72 (10) : 6148)、結核菌 (M t b) イソクエン酸脱水素酵素に関連した抗原 (Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Aug 24; 101 (34) 12652)、および / または M P T 51 抗原 (Infect Immun. 2004 July; 72 (7) : 3829)；ジフテリア菌、百日咳菌、肺炎連鎖球菌 (例えば、糖またはタンパク質の抗原、特に肺炎連鎖球菌由来の糖)、型別不能ヘモフィルスインフルエンザ菌、M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s (例えば、外膜タンパク質抗原 (H M W - O M P)、C 抗原、および / または L P S)；緑膿菌 (例えば、内毒素 A、W z z タンパク質、緑膿菌 L P S、より具体的には P A O 1 (O 5 血清型) から単離された L P S、および / または、外膜タンパク質 F (O p r F) などの外膜タンパク質 (Infect Immun. 2001 May; 69 (5) : 3510 - 3515))；炭疽菌 (例えば、A 成分 (致死因子 (L F) および浮腫因子 (E F)) 由来の炭疽菌抗原 (任意には解毒されている) で、両者とも防御的抗原 (P A) として知られる共通 B 成分を共有し得る)；および / またはレジオネラ・ニューモフィラ菌 (レジオネラ症) : L . ニューモフィラ抗原 - 必要に応じて、破壊された a s d 遺伝子をもつ細胞株に由来する (Infect Immun. 1998 May; 66 (5) : 1898)。

【0146】

特に参照されていない場合、本発明のさらなる細菌性抗原は、上記のいずれかの莢膜抗原、多糖類抗原、またはタンパク質抗原である。また、さらなる細菌性抗原は、外膜小胞 (O M V) 調製物も含むことができる。さらに、抗原は、上記の細菌のいずれかの生の型、弱毒化された型、分割された型、および / または精製された型を含む。本発明の細菌または微生物に由来する抗原は、グラム陰性またはグラム陽性、および好気性または嫌気性であり得る。

【0147】

さらに、上記の細菌由来の糖類 (多糖類、L P S、L O S またはオリゴ糖類) のいずれも、キャリアタンパク質 (例えば C R M ₁₉₇) などの別の因子または抗原と結合体化することができる。このような結合体化は、米国特許第 5,360,897 号および C a n J Biochem Cell Biol. 1984 May; 62 (5) : 270-5 に記載されているように、糖類のカルボニル部分の還元性アミノ化によってもたらされる、タンパク質上のアミノ基への直接的な結合体化であってもよい。または、この糖類は、例えば、スクシニアミドまたは、B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s 1996 および C R C , C h e m i s t r y o f P r o t e i n C o n j u g a t i o n a n d C r o s s - L i n k i n g , 1993 に記載されている他の連結によって、リンカーを介して結合体化することができる。

【0148】

(G. 真菌性呼吸器系病原体)

免疫原性タンパク質をコードする核酸が由来し得る真菌性呼吸器系病原体は、以下のものが含まれるが、これらに限定されない：バレー熱の病原因子 (抗原 - 2 またはプロリン

10

20

30

40

50

富化抗原 (A g 2 / P R A) (S i l v a , ら , (2 0 0 5) F E M S I mm u n o l M e d M i c r o b i o l . 2 0 0 5 4 3 (3) : 3 9 3 - 8) である C o c c i d i o i d e s i m m i t i を含むコクシジオイデス種、クリプトコッカス・ネオフォルマンス (例えば、クリプトコッカス抗原 (L i a w , ら , (1 9 9 8) J C l i n M i c r o b i o l . 3 3 (6) : 1 5 8 8 - 9 1)) などのクリプトコッカス菌、カシジダ菌 (例えば、カシジダ・アルビカンス) 、およびアスペルギルス菌。

【0149】

免疫原性タンパク質をコードする核酸が由来することのできる呼吸器系真菌抗原は、吸入または感作の後に呼吸器系疾患を引き起こす真菌抗原を含む。

【0150】

(H. 併用)

上記したように、免疫原性組成物は、好ましくは、少なくとも 1 つの呼吸器系病原体に由来する 2 つ以上の免疫原性タンパク質をコードする核酸を含む。この免疫原性組成物は、本明細書記載のタンパク質の任意の組み合わせを含むことができる。さらに、免疫原性タンパク質をコードする核酸は、例えば、免疫原性タンパク質が P I V 、 R S V または S A R S に由来している場合、さまざまなアルファウイルスベクター構築物またはレプリコン粒子に含まれる。例えば、該組成物が、同一または異なった P I V タンパク質をコードする 2 つの核酸を含む場合、この 2 つの核酸は別のアルファウイルス構築物または粒子に含まれているのが好ましくあり得る。同様に、組成物が、同一または異なった S A R S タンパク質、あるいは同一または異なった R S V タンパク質をコードする 2 つの核酸を含んでいる場合、この 2 つの核酸が、別のアルファウイルス構築物または粒子に含まれているのが好ましくあり得る。

【0151】

また、本発明は、同一のアルファウイルスベクター構築物またはレプリコン粒子に含まれる複数の免疫原性タンパク質をコードする核酸も包含する。

【0152】

(H. 細胞株)

呼吸器系病原体に由来する抗原は、例えば、哺乳動物細胞、鳥類細胞、バキュロウイルス、細菌、および酵母で用いられる系など、当該分野において知られたさまざまな発現系において产生することができる。このような発現系では、一般的には、免疫原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドが使用される。このような配列は、本明細書記載のアミノ酸配列を翻訳するなど、分子生物学の標準的技術を利用して得られる。したがって、本発明は、本発明のウイルス性抗原をコードするポリヌクレオチドを含む。さらに、本発明のウイルス性抗原は合成化学法によって (少なくとも部分的に、好ましくは全部を) 製造することができる。

【0153】

バキュロウイルス系など、昆虫細胞の発現系は当業者に知られており、例えば、S u m m e r s ら S m i t h , T e x a s A g r i c u l t u r a l E x p e r i m e n t S t a t i o n B u l l e t i n N o . 1 5 5 5 (1 9 8 7) に記載されている。バキュロウイルス / 昆虫細胞発現系用の材料および方法は、キットの形で購入可能であり、とりわけ I n v i t r o g e n , S a n D i e g o C A から購入可能である。鳥類細胞の発現系も当業者に知られており、例えば、米国特許第 5 , 3 4 0 , 7 4 0 号、第 5 , 6 5 6 , 4 7 9 号、第 5 , 8 3 0 , 5 1 0 号、第 6 , 1 1 4 , 1 6 8 号、および第 6 , 5 0 0 , 6 6 8 号、欧州特許第 E P 0 7 8 7 1 8 0 B 号、欧州特許出願第 E P 0 3 2 9 1 8 1 3 . 8 号、W O 0 3 / 0 4 3 4 1 5 , および W O 0 3 / 0 7 6 6 0 1 に記載されている。同様に、細菌および哺乳動物細胞の発現系も当該分野において知られており、例えば、Y e a s t G e n e t i c E n g i n e e r i n g (B a r r , ら , 編 , 1 9 8 9) B u t t e r w o r t h s , L o n d o n に記載されている。

【0154】

上記の系で使用される多数の適当な宿主細胞も知られている。例えば、哺乳動物の細胞

10

20

30

40

50

株は当該分野において既知であり、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な不死化細胞株（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、仔ハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（例えば、HepG2）、Madin-Darbyウシ腎臓（「MDBK」）細胞、などがあるが、これらに限定されない）が挙げられる。細胞の哺乳動物の供給源としては、ヒトまたは非ヒト霊長類（例えば、その全体が参照として本明細書に援用される、WO 01/38362およびWO 02/40665に記載されており、また、ECACC寄託番号96022940号としても保管されているPERC.6細胞、MRC-5 (ATCC CCL-171)、WI-38 (ATCC CCL-75)、アカゲザル胎児の肺細胞 (ATCC CL-160)、ヒト胚腎細胞 (293細胞、一般的には、剪断されたアデノウイルス5型のDNAによって形質転換されている)、サルの腎臓に由来するVERO細胞）、ウマ、ウシ（例えば、MDBK細胞）、ヒツジ、イヌ（例えば、イヌの腎臓に由来するMDCK細胞、WO 97/37001に記載されているように、寄託番号DSM ACC 2219の、ATCC CCL 34 MDCK (NBL 2) またはMDCK 33 016）、ネコ、および齧歯類（例えば、BHK 21-F、HKCC細胞などのハムスター細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞））が挙げられるが、これらに限定されず、例えば、成体、新生児、胎児、および胚など、多様な発生段階から得ることも可能である。
10

【0155】

細胞の鳥類の供給源としては、ニワトリ細胞（例えば、ニワトリ胚性幹細胞（例えば、EBX（登録商標）細胞）、ニワトリ胚性線維芽細胞、ニワトリ胚性生殖細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。同様に、大腸菌、枯草菌、および連鎖球菌などの細菌宿主は、本発明構築物に用途を見いだすであろう。本発明において有用な酵母宿主としては、とりわけ、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、*Candida maltosa*、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces fragilis*、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia guillerimondii*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe*および*Yarrowia lipolytica*が挙げられる。バキュロウイルス発現ベクターとともに使われる昆虫細胞としては、とりわけ、*Aedes aegypti*、*Autographa californica*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda*および*Trichoplusia ni*が挙げられる。
20
30

【0156】

（薬学的組成物）

また、本発明は、本明細書に記載されているアルファウイルスのレプリコン粒子、ベクターおよび／またはレプリコンならびに不活化ウイルスのいずれかを、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤とともに含む薬学的組成物も提供する。本発明は、不活化ウイルスに関する上記の手順が、アルファウイルスベクター（例えば、レプリコン粒子）にも適用可能であり得ると考えている。特定の好ましい実施形態の範囲内で、十分な量の処方用緩衝液を、精製されたレプリコン粒子に添加して水性懸濁液を作成する。好ましい実施形態において、処方用緩衝液は、水の中に糖類および緩衝化成分を含み、1つ以上のアミノ酸または高分子量の構造添加物も含むことができる。処方用緩衝液は、十分な量を添加して、構成物質の望ましい最終濃度に達して、レプリコン粒子を最小限に希釈する。そして、この水性懸濁液を、好ましくは-70で貯蔵するか、直ちに乾燥させる。
40

【0157】

水性懸濁液は、周囲温度で凍結乾燥または蒸発によって乾燥することができる。要するに、凍結乾燥法は、水性懸濁液を気体転移温度より下、または水性懸濁液の共晶融点より下に冷却し、冷却された懸濁液から昇華によって水分を取り除いて、凍結乾燥したレプリコン粒子を形成する工程を含む。1つの実施形態に範囲内において、処方された組み換え
50

10 ウィルスのアリコートを、凍結乾燥器 (Supermodulyo 12 K) に取り付けられた Edwards Refrigerated Chamber (3段棚式RC3Sユニット) に容れる。 Phillipsら, (Cryobiology 18: 414, 1981) によって説明されている多段階凍結乾燥法を用いて、処方されたレプリコン粒子を、好ましくは -40 ~ -45 の温度で凍結乾燥する。得られた組成物は、凍結乾燥されたレプリコン粒子の重量の 10 % 未満の水分を含む。いったん凍結乾燥されると、以下により詳細に論じるように、レプリコン粒子は安定し、 -20 ~ 25 で保存することができる。蒸発法では、水を周囲温度で蒸発させて水性懸濁液から取り除く。1つの実施形態の範囲内では、水分は、水性懸濁液が予熱気体流に送出される噴霧乾燥法によって取り除かれるが、水性懸濁液は予熱気体流に送出されると、通常、水分が懸濁液の小滴から急速に蒸発する。いったん水分を取り除かれると、組み換えウイルスは安定し、 -20 ~ 25 で保存することができる。

【0158】

20 処方に用いられる水溶液は、好ましくは、糖類、緩衝成分、および水を含む。また、この溶液は、1つ以上のアミノ酸および高分子量の構造添加剤も含み得る。この成分の組み合わせを、凍結、およびまた凍結乾燥、または蒸発によって乾燥すると、レプリコン粒子の活性を保存するように作用する。好ましい糖類はラクトースであるが、スクロース、マンニトール、グルコース、トレハロース、イノシトール、フルクトース、マルトースまたはガラクトースなど、他の糖類も使用可能である。特に好ましいラクトース濃度は、3 ~ 4 重量 % の濃度である。

【0159】

高分子量の構造添加剤は、粒子が凍結中に凝集するのを防止するのに役立ち、凍結乾燥状態または乾燥状態において構造的な支持をもたらす。本発明の文脈内で、構造添加剤は、5000 M.W. よりも大きければ、「高分子量」であると見なされる。好ましい高分子量構造添加剤はヒト血清アルブミンである。しかし、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、デキストラン、セルロース、ゼラチン、またはポビドンなど、他の物質も使用可能である。ヒト血清アルブミンの特に好ましい濃度は 0.1 重量 % である。

【0160】

30 緩衝成分は、比較的一定の pH を維持して、溶液を緩衝化するよう作用する。好ましくは 7.0 と 7.8 の間である、所望の pH 範囲に応じて、多様な緩衝剤が用いることができる。適当な緩衝剤は、リン酸塩緩衝剤およびクエン酸塩緩衝剤などである。さらに、水溶液は、最終的な処方レプリコン粒子を適当な等浸透圧塩濃度に調整するために使われる中性塩を含むことが好ましい。適当な中性塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウムまたは塩化マグネシウムなどである。好ましい塩は塩化ナトリウムである。凍結乾燥または脱水された本発明のレプリコン粒子は、多様な物質を利用して再構成され得るか、好ましくは、水を利用して再構成される。特定の場合において、最終処方物を等浸透圧にする希釈食塩水も利用され得る。

【0161】

(A. アジュバント)

40 本発明の免疫原性組成物（例えば、ワクチン）は、他の免疫調節因子と組み合わせて投与され得る。具体的には、組成物は、通常、アジュバントを含む。本発明で利用されるアジュバントは、下記に示されたものの 1 つ以上を含むが、これらに限定されない。

【0162】

(A. 無機物含有組成物)

本発明において、アジュバントとして使用するのに適した無機物含有組成物は、アルミニウム塩およびカルシウム塩などの無機物塩などである。本発明は、水酸化物（例えば、オキシ水酸化物）、リン酸塩（例えば、ヒドロキシホスフェート、オルトリリン酸塩）、硫酸塩などの無機塩（例えば、Vaccine Design... (1995) Powe 11 & Newman. 編 ISBN: 030644867X. Plenum の 8 章お

10

20

30

40

50

より9章参照)、または、さまざまな無機化合物の混合物(例えば、必要に応じて、リン酸塩を過度に含む、リン酸塩アジュバントと水酸化物アジュバントとの混合物)を含み、これらの化合物は任意の適当な形状(例えば、ゲル、結晶、非結晶など)を取り、かつ、塩に吸着していることが好ましい。無機物含有組成物は、金属塩の粒子としても処方することができる(WO00/23105)。

【0163】

アルミニウム塩は、Al³⁺の投与量が投与1回あたり0.2mgから1.0mgになるよう、本発明のワクチンに含まれ得る。

【0164】

1つの実施形態において、アルミニウムベースのアジュバントは、ミョウバン(硫酸カリウムアルミニウム(AlK(SO₄)₂))、または、リン酸緩衝液中で抗原をミョウバンと混合してから、水酸化アンモニウムまたは水酸化ナトリウムなどの塩基で滴定および沈殿することにより、インサイチュで形成される誘導体などのミョウバン誘導体である。

【0165】

本明細書記載の免疫原性組成物とともに使用される、別のアルミニウムベースのアジュバントは、水酸化アルミニウムアジュバント(Al(OH)₃)または結晶オキシ水酸化アルミニウム(AlOOH)であり、これは約500m²/gの表面積をもつ、優れた吸着剤である。あるいは、水酸化アルミニウムアジュバントの水酸基の数個または全部の代わりにリン酸基を含む、リン酸アルミニウムアジュバント(AlPO₄)またはアルミニウムヒドロキシホスフェートが提供される。本明細書において提供される、好ましいリン酸アルミニウムアジュバントは、酸性、塩基性および中性の媒体中で非晶性かつ可溶性である。

【0166】

別の実施形態において、アジュバントは、リン酸アルミニウムおよび水酸化アルミニウムをともに含む。これらのより具体的な実施形態において、アジュバントは、リン酸アルミニウムを水酸化アルミニウムより多く含む(例えば、水酸化アルミニウムに対するリン酸アルミニウムの重量比は、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1または9:1より大きい)。さらに具体的には、ワクチン中のアルミニウム塩が、ワクチン投与1回分あたり0.4~1.0mg、またはワクチン投与1回分あたり0.4~0.8mg、またはワクチン投与1回分あたり0.5~0.7mg、またはワクチン投与1回分あたり約0.6mgで存在する。

【0167】

通常、好ましいアルミニウムベースのアジュバント、または複数のアルミニウムベースのアジュバントの比率(例えば、水酸化アルミニウムに対するリン酸アルミニウムの比率)は、抗原がアジュバントとして望ましいpHで反対の電荷を帯びるように、分子間の静電気引力を最適化することによって選択する。例えば、リン酸アルミニウムアジュバント(iep=4)は、pH7.4でリゾチームを吸着するが、アルブミンは吸着しない。アルブミンが標的ならば、水酸化アルミニウムアジュバントが選択される(iep=11.4)。あるいは、リン酸で水酸化アルミニウムを前処理すると、その等電点が低下して、より塩基性の抗原にとって好ましいアジュバントとなる。

【0168】

(A. 油エマルジョン)

アジュバントとして利用するのに適した油エマルジョン組成物としては、MF59(マイクロフルイダイザー(microfluidizer)を用いてサブミクロン粒子に処方された5%スクアレン、0.5%Tween80、および0.5%Span85)など、スクアレン-水エマルジョンが挙げられる。WO90/14837参照。また、Podda, "The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine", Vaccine (2001) 19: 50

2673-2680, Frey, ら, "Comparison of the safety, tolerability, and immunogenicity of a MF59-adjuvanted influenza vaccine and a non-adjuvanted influenza vaccine in non-elderly adults", Vaccine (2003) 21: 4234-4237も参照。MF59は、FLUADTMインフルエンザウイルスの3価性サブユニットワクチンにおけるアジュバントとして使用されている。

【0169】

本明細書記載の免疫原性組成物とともに使用するのに特に好ましいアジュバントは、サブミクロン油中水型エマルジョンである。本明細書で使用するのに好ましいサブミクロン油中水型エマルジョンは、さまざまな量のMTP-PEを任意に含むスクアレン/水エマルジョンである(例えば、4~5%w/vのスクアレン、0.25~1.0%w/vのTween 80TM(モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン)、および/または0.25~1.0%のSpan 85TM(トリオレイン酸ソルビタン)、ならびに、必要に応じて、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラミン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホホリオキシ)-エチルアミン(MTP-PE)を含むサブミクロン油中水型エマルジョン(例えば、「MF59」(国際出願番号WO90/14837、米国特許第6,299,884号および第6,451,325号、ならびにOtt, ら, "MF59--Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M. F. and Newman, M. J. 編) Plenum Press, New York, 1995, pp. 277-296)として知られるサブミクロン油中水型エマルジョン)。MF59は、4~5%w/vのスクアレン(例えば、4.3%)、0.25~0.5%w/vのTween 80TM、および0.5%w/vのSpan 85TMを含み、モデル110Yマイクロフルイダイザー(Microfluidics, Newton, MA)のようなマイクロフルイダイザーを用いて処方されてサブミクロン粒子に処方した、さまざまな量のMTP-PEを任意に含む。例えば、MTP-PEは、投与1回あたり約0~500μg、より好ましくは投与1回あたり0~250μg、最も好ましくは投与1回あたり0~100μgの量で存在させることができる。本明細書中において、「MF59-0」という用語は、MTP-PEを欠く、上記のサブミクロン油中水型エマルジョンを意味するが、MF59-MTPという用語は、MTP-PEを含む処方物を意味する。例えば、「MF59-100」は、投与1回量あたり100μgのMTP-PEを含む、等々である。本明細書で使用するための別のサブミクロン油中水型エマルジョンであるMF69は、4.3%w/vのスクアレン、0.25%w/vのTween 80TM、および0.75%w/vのSpan 85TM、ならびに任意にMTP-PEを含む。さらに別のサブミクロン油中水型エマルジョンは、SAFとしても知られるMF75であり、10%w/vのスクアレン、0.4%w/vのTween 80TM、5%w/vのブルロニックでプロックされた多量体L121、およびthr-MDPを含み、マイクロ流動化(microfluidize)されてサブミクロンのエマルジョンになる。MF75-MTPは、投与1回量あたり100~400μgのMTP-PEなどのMTPを含むMF75処方物をいう。

【0170】

サブミクロン油中水型エマルジョン、その製造方法、および、組成物中で使用するためのムラミルペプチドなどの免疫刺激因子が、国際公開番号WO90/14837ならびに米国特許第6,299,884号および第6,451,325号に詳細に記載されている。

【0171】

完全フロイトアジュバント(CFA)および不完全フロントアジュバント(IFN)

10

20

30

40

50

も、本発明におけるアジュバントとして使用され得る。

【0172】

(B. サポニン処方物)

サポニン処方物も、アジュバントとして使用され得る。サポニンは、広範な植物種の樹皮、葉、茎、根および花にも存在するステロール配糖体およびトリテルペノイド配糖体の不均質なグループである。Quillaia saponaria Molinaの木の樹皮から単離されたサポニンは、アジュバントとして広く研究されてきた。また、サポニンは、Smilax ornata(サルサバリラ(Sarsaparilla))、Gyrophilla paniculata(ブライズベール(brides veil))、およびSaponaria officinalis(ソープルート(soap root))からも商業的に得られ得る。サポニンのアジュバント処方物は、QS21などの精製された処方物、およびISCOMなどの脂質処方物などである。

【0173】

サポニン組成物は、高速薄層クロマトグラフィー(HP-TLC)および逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を用いて精製されてきた。これらの技術を利用して、QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-BおよびQH-Cなど、特定の精製画分が同定されている。好ましくは、サポニンはQS21である。QS21を製造する方法は、米国特許第5,057,540号に開示されている。サポニン処方物は、コレステロールなどのステロールを含むこともできる(WO96/33739参照)。

【0174】

サポニンおよびコレステロールの組み合わせを用いて、免疫刺激複合体(ISCOM)と呼ばれる固有の粒子を形成することができる。また、ISCOMは、一般的には、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンなどのリン脂質も含む。既知のいずれのサポニンもISCOMに使用することができる。好ましくは、ISCOMは、Qui1A、QHA、およびQHCの1つ以上を含む。ISCOMは、さらに、EP0109942、WO96/11711およびWO96/33739にも記載されている。任意には、ISCOMは追加的な界面活性剤を含まなくてもよい。WO00/07621参照。

【0175】

サポニンベースのアジュバントの開発に関する概説が、Barr,ら, "ISCOMs and other saponin based adjuvants", Advanced Drug Delivery Reviews (1998) 32:247-271に見出され得る。Sjolander,ら, "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", Advanced Drug Delivery Reviews (1998) 32:321-338も参照。

【0176】

(C. ビロソームおよびウイルス様粒子(VLP))

ビロソームおよびウイルス様粒子(VLP)も、本発明においてアジュバントとして利用され得る。これらの構造体は一般に、必要に応じてリン脂質と混合または処方されている、ウイルスに由来する1つ以上のタンパク質を含む。これらは一般に、非病原性、非複製性であり、通常、天然のウイルスゲノムを全く含まない。ウイルスタンパク質は組み換え生成され得るか、完全なウイルスから単離され得る。ビロソームまたはVLPにおいて使用するのに適した、これらウイルスタンパク質は、インフルエンザウイルス(例えば、HAまたはNA)、B型肝炎ウイルス(例えば、コアまたはキャプシドタンパク質)、E型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、シンドビスウイルス、ロタウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、ノーウォークウイルス、ヒトパピローマウイルス、HIV、RNAファージ、Qファージ(例えば、コートタンパク質)、GAファージ、f_rファージ、AP205ファージ、およびTy(例えば、レトロトランスポソンTyタンパク質p1)に由来するタンパク質などである。VLPは、さらにWO03/024480、WO03/0

10

20

30

40

50

24481、およびNiikuraら、"Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes", *Virology* (2002) 293: 273-280; Lenzら、"Papillomavirus-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells", *Journal of Immunology* (2001) 5246-5355; Pinto, ら、"Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16L1 Virus-Like Particles", *Journal of Infectious Diseases* (2003) 188: 327-338; およびGerberら、"Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Co-administered with Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG", *Journal of Virology* (2001) 75(10): 4752-4760で検討されている。ビロソームは、さらに、例えば、Gluckら、"New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future", *Vaccine* (2002) 20: B10-B16で検討されている。免疫増強性再構成インフルエンザビロソーム (IRIV) は、鼻腔内に投与される3価のINFLEXALTM生成物 {Mischler & Metcalf (2002) *Vaccine* 20 Suppl 5: B17-23} およびINFLUVAC PLUSTM生成物においてサブユニット抗原送達系として利用されている。

【0177】

(D. 細菌性または微生物性の誘導体)

本発明において利用されるのに適したアジュバントには、以下のような細菌性または微生物性の誘導体がある。

【0178】

(1) 腸内細菌性リポ多糖体 (LPS) の非毒性誘導体

このような誘導体は、モノホスホリルリピドA (MPL) および3-O-脱アシル化MPL (3dMPL) などである。3dMPLは、4、5または6個のアシル化鎖をもつ3脱-O-アシル化モノホスホリルリピドAの混合物である。好ましい「小粒子」型の3脱-O-アシル化モノホスホリルリピドAがEP0689454に開示されている。このような「小粒子」の3dMPLは、0.22ミクロン膜で濾過して滅菌できるほど小さい (EP0689454参照)。他の非毒性LPS誘導体は、モノホスホリルリピドAの模倣体、例えばRC-529など、リン酸アミノアルキルグルコサミニド誘導体などである。Johnsonら (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273-2278 参照。

【0179】

(2) リピドA誘導体

リピドA誘導体は、例えば、OM-174など、大腸菌に由来するリピドAの誘導体などである。OM-174は、例えばMeraldiら、"OM-174, a New Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of Plasmodium berghei", *Vaccine* (2003) 21: 2485-2491; およびPajak, ら、"The Adjuv

10

20

30

40

40

50

ant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo", Vaccine (2003) 21: 836-842に記載されている。

【0180】

(3) 免疫刺激オリゴヌクレオチド

本発明においてアジュバントとしての利用に適する免疫刺激オリゴヌクレオチドは、CpGモチーフ（非メチル化シトシンとそれに続くグアノシンを含み、リン酸エステル結合によって連結された配列）を含むヌクレオチド配列などである。パリンドローム配列またはポリ(dG)配列を含む、細菌の2本鎖RNAまたはオリゴヌクレオチドも、免疫刺激性であることが示されている。

10

【0181】

CpGは、ホスホロチオエート修飾などのヌクレオチド修飾／アナログを含むことができ、2本鎖でも1本鎖でもよい。必要に応じて、グアノシンは、2'-デオキシ-7'-デアザグアノシンなどのアナログと置換されていてもよい。可能なアナログ置換の例に関しては、Kandimalla, ら, "Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles", Nucleic Acids Research (2003) 31(9): 2393-2400; WO02/26757およびWO99/62923参照。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は、さらに、Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?", Nature Medicine (2003) 9(7): 831-835; McCluskie, ら, "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", FEMS Immunology and Medical Microbiology (2002) 32: 179-185; WO98/40100, 米国特許第6,207,646号, 第6,239,116号および米国特許第6,429,199号で検討されている。

20

【0182】

CpG配列は、GTCGTTモチーフ、またはTTCGTTモチーフなど、TLR9に対し指向することが可能である。Kandimalla, ら, "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", Biochemical Society Transactions (2003) 31(part 3): 654-658参照。CpG配列は、CpG-AODNなど、Th1免疫応答を誘導するのに特異的であり得るか、または、CpG-BODNなど、B細胞反応を誘導するのにより特異的であり得る。CpG-AおよびCpG-BODNは、Blackwell, ら, "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Driven IFN-alpha", J. Immunol. (2003) 170(8): 4061-4068; Krieg, "From A to Z on CpG", Trends in Immunology (2002) 23(2): 64-65およびWO01/95935で論じられている。好ましくは、CpGはCpG-AODNである。

40

【0183】

好ましくは、CpGオリゴヌクレオチドは、5'末端がレセプターを認識しやすいよう

50

に構築されている。任意には、2つのCpGオリゴヌクレオチド配列が、3'末端で結合して、「イムノマー(immunomer)」を形成することができる。例えば、Kandimalla, ら, "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", BBRC(2003)306:948-953; Kandimalla, ら, "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", Biochemical Society Transactions(2003)31(part 3):664-658; Bhagat, ら, "CpG penta- and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents" BBRC(2003)300:853-861およびWO03/035836 参照。

【0184】

(4) ADPリボシリ化毒素およびそれらの無毒化誘導体

細菌性ADPリボシリ化毒素およびそれらの無毒化された誘導体は、本発明においてアジュバントとして使用することができる。好ましくは、このタンパク質は、大腸菌(すなわち、大腸菌熱不安定性エンテロトキシン「LT」)、コレラ(「CT」)、または百日咳(「PT」)に由来する。無毒化ADPリボシリ化毒素を粘膜アジュバントとして使用することが、WO95/17211に記載されており、非経口アジュバントとしてはWO98/42375に記載されている。好ましくは、このアジュバントは、例えば、LT-K63、LT-R72、およびLTR192Gなどの無毒化LT変異体である。ADPリボシリ化毒素およびそれらの無毒化された誘導体、特にLT-K63およびLT-R72をアジュバントとして使用することが、以下の参考文献に見出され得る。Beignon, ら, "The LTR72 Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of Escherichia coli Enhances the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin", Infection and Immunity(2002)70(6):3012-3019; Pizza, ら, "Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants", Vaccine(2001)19:2534-2541; Pizza, ら, "LT-K63 and LTR72, two mucosal adjuvants ready for clinical trials" Int. J. Med. Microbiol(2000)290(4-5):455-461; Scharton-Kerstens, ら, "Transcutaneous Immunization with Bacterial ADP-Ribosylating Exotoxins, Subunits and Unrelated Adjuvants", Infection and Immunity(2000)68(9):5306-5313; Ryan, ら, "Mutants of Escherichia coli Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular Pertussis Vaccine: Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells" Infection and Immunity(1999)67(12):6270-6280; Partidos, ら, "Heat-labile enterotoxin of Escherichia coli and its site-directed mutant LTK63 enhance the proliferative and cytotoxic T- 10 20 30 40 50

cell responses to intranasally co-immunized synthetic peptides", *Immunol. Lett.* (1999) 67 (3) : 209 - 216; Peppoloniら, "Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines", *Vaccines* (2003) 21 (2) : 285 - 293; および Pineら, (2002) "Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from *Escherichia coli* (LTK63)" *J. Control. Release* (2002) 85 (1 - 3) : 263 - 270。アミノ酸置換の数的な参照については、好ましくは、Domenighiniら, *Mol. Microbiol.* (1995) 15 (6) : 1165 - 1167に示されたADPリボシル化毒素のAおよびBサブユニットのアラインメントに基づく。

【0185】

(E. 生体接着剤および粘膜接着剤)

生体接着剤および粘膜接着剤も、アジュバントとして使用することができる。適当な生体接着剤は、エステル化されたヒアルロン酸ミクロスフィア (Singhら (2001) *J. Control. Release* 70 : 267 - 276)、またはポリアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖類、およびカルボキシメチルセルロースの架橋誘導体などの粘膜接着剤などである。キトサン、およびその誘導体も、アジュバントとして使用できる。例えば、WO 99/27960 参照。

【0186】

(F. 微粒子)

微粒子もアジュバントとして利用され得る。ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)を用いた、生物分解性で無毒性の物質(例えば、ポリ(-ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酸、ポリオルソエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトン)から形成される微粒子(すなわち、直径約100nm～約150μm、より好ましくは直径約200nm～約30μm、および最も好ましくは直径約500nm～約10μmの粒子)が好ましく、必要に応じて、(例えば、SDSによって)負に帯電した表面、または(例えば、CTABなどの陽イオン性界面活性剤によって)正に帯電した表面をもつように処理される。

【0187】

(G. リポソーム)

アジュバントとして利用するのに適したリポソーム処方物の例は、米国特許第6,090,406号、米国特許第5,916,588号およびEP 0626169に記載されている。

【0188】

(H. ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル処方物)

本明細書記載の免疫原性組成物とともに利用するのに適したアジュバントは、ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステルなどである。WO 99/52549。このような処方物はさらに、オクトキシノールと混合したポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(WO 01/21207)、および、例えば、オクトキシノールのような少なくとも1つの付加的非イオン性界面活性剤と混合したポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはエステル界面活性剤(WO 01/21152)を含む。

【0189】

好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群から選択される。すなわち、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル(laureth 9)、ポリオキシエチレン-9-ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン-8-ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。

10

20

30

40

50

【0190】

(I. ポリホスファゼン(PCPP))

PCPP処方物は、例えば、Andrianovら，“Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions”，Biomaterials(1998)19(1-3):109-115およびPayneら，“Protein Release from Polyphosphazene Matrices”，Adv. Drug. Delivery Review(1998)31(3):185-196に記載されている。

【0191】

(J. ムラミルペプチド)

本明細書において、アジュバントとして利用するのに適したムラミルペプチドの例は、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-d-イソグルタミン(nor-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-d-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2')-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ-エチルアミンMTP-PE)などである。

【0192】

(K. イミダゾキノリン化合物)

本明細書において、アジュバントとして利用するのに適したイミダゾキノリン化合物の例は、イミキモド、およびそのアナログなどであり、さらに、Stanley，“Imiquimod and the imidazoquinolines: mechanism of action and therapeutic potential” Clin Exp Dermatol(2002)27(7):571-577; Jones, “Resiquimod 3M”, Curr Opin Investig Drugs(2003)4(2):214-218; および米国特許第4,689,338号、第5,389,640号、第5,268,376号、第4,929,624号、第5,266,575号、第5,352,784号、第5,494,916号、第5,482,936号、第5,346,905号、第5,395,937号、第5,238,944号、および第5,525,612号に記載されている。

【0193】

(L. チオセミカルバゾン化合物)

すべて本発明においてアジュバントとして利用するのに適した、チオセミカルバゾン化合物の例、および、化合物を処方、製造、スクリーニングする方法は、WO04/60308に記載されたものなどである。チオセミカルバゾンは、TNF-などのサイトカインを産生させるためにヒト末梢血単核細胞を刺激するのに特に有効である。

【0194】

(M. トリプタントリン化合物)

すべて本発明においてアジュバントとして利用するのに適した、トリプタントリン化合物の例、および化合物を処方、製造、スクリーニングする方法は、WO04/64759に記載されたものなどである。トリプタントリン化合物は、TNF-などのサイトカインを産生させるためにヒト末梢血単核細胞を刺激するのに特に有効である。

【0195】

本発明は、上記に特定したアジュバントの1つ以上の態様を組み合わせたものを含むことができる。例えば、以下のアジュバント組成物を本発明において使用することができる。

【0196】

(1) サポニンおよび油中水型エマルジョン(WO99/11241)；

(2) サポニン(例えば、QS21) + 無毒性LPS誘導体(例えば、3dMPL)(WO94/00153参照)；

10

20

30

40

50

(3) サポニン(例えば、QS21) + 無毒性LPS誘導体(例えば、3dMPL) + コレステロール;

(4) サポニン(例えば、QS21) + 3dMPL + IL-12(必要に応じて+ステロール)(WO98/57659)

(5) 3dMPLと、例えば、QS21および/または油中水型エマルジョンとの組み合わせ(欧州特許出願0835318、0735898および0761231参照);

(6) 10%スクアレン、0.4%Tween80、5%フルロニックブロックポリマー-L121、およびthr-MDPを含むSAFであって、マイクロ流動化処理されてサブミクロンエマルジョンになっているか、ボルテックス処理されて粒子サイズのより大きいエマルジョンになったもの。

10

【0197】

(7) 2%スクアレン、0.2%Tween80を含むRibitTMアジュvantシステム(RAS)、(Ribit Immunochem)、ならびに、モノホスホリリビドA(MPL)、ジミコール酸トレハロース(TDM)からなる群由来の1つ以上の細菌細胞壁成分、および細胞壁骨格(CWS)、好ましくはMPL+CWS(DetoxTM) ; および

(8) 1つ以上の無機物塩(例えば、アルミニウム塩) + LPSの無毒性誘導体(例えば、3dPML)。

【0198】

(9) 1つ以上の無機物塩(例えば、アルミニウム塩) + 免疫刺激オリゴヌクレオチド(例えば、CpGモチーフを含むヌクレオチド配列)。

20

【0199】

(N.ヒト免疫調節因子)

本発明においてアジュvantとしての利用に適したヒト免疫調節因子には、インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12など)、インターフェロン(例えば、インターフェロン-)、マクロファージコロニー刺激因子、および腫瘍壊死因子などのサイトカインが含まれる。

【0200】

アルミニウム塩およびMF59は、注射可能なインフルエンザワクチンとともに使われる好ましいアジュvantである。細菌性毒素および生体接着剤は、粘膜投与ワクチン(例えば、経鼻投与ワクチン)とともに利用される好ましいアジュvantである。

30

【0201】

上記の特許、特許出願および刊行物の記事のすべての内容は、あたかもその全体が本明細書に示されるように、参考として本明細書に援用される。

【0202】

(応用)

アルファウイルスレプリコン、レプリコン粒子およびベクター構築物を用いて、例えば、免疫応答を活性化する、呼吸器系病原体由来の抗原をコードする異種配列を含む、多様なヌクレオチド配列を送達することができる。上記のヌクレオチド配列は、既述されたものなどであり、保存株から得ることができ、公開配列を利用してウイルスRNAまたは他のRNAから容易にクローニングされ得るか、または、例えば、Applied Biosystems Inc.のDNA合成装置(例えば、APB DNA合成装置モデル392(Foster City, CA))で合成され得る。

40

【0203】

また、本発明は、これらの選択された異種配列を、ワクチンまたは治療薬として使用するため温血哺乳動物(例えばヒトなどの哺乳動物、またはその他の温血動物、例えば、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラット、またはマウス)に送達する方法を提供し、この方法は、選択された異種配列を発現させることができる、本明細書に記載したようなレプリコン粒子、レプリコンベクター、ベクター構築物、または真核レイヤードベクター開始システムを哺乳動物に投与する工程を含む。送達は、さまざまな経路(例えば、

50

静脈内、筋肉内、皮内、皮下、経口、鼻腔内)によることが可能である。

【0204】

本発明のアルファウイルスレプリコン粒子を作製する好ましい方法は、混入する自己複製能をもつウイルス(RCV)が生成される可能性を最小にするための当該分野において既知の技術を利用しなければならないことに留意されるべきである。このような方法の1つが、「分断型」構造タンパク質発現カセットを含む欠損ヘルパーまたはPCLを利用することである(米国特許第5,789,245号、第6,242,259号、第6,329,201号参照)。これに関して、アルファウイルスの構造タンパク質遺伝子を、別々の発現構築物に分けて(例えば、カプシドを糖タンパク質から分けて)、発現された構造タンパク質の完全に相補的な配列を再生させる組み換えがほとんど起こらないようにする。

10

【0205】

以下の実施例は、本発明をさらに十分に説明するために記載されている。さらに、これらの実施例は本発明の好ましい実施形態を提供するが、その範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0206】

(実施例1)

インフルエンザウイルスのHA抗原、NA抗原、またはNP抗原をコードする遺伝子を含むアルファウイルスレプリコンベクターの構築

20

インフルエンザウイルス株であるA/パナマ/2007/99Resvир-17(H3N2)(2000年から2003年の生産のための推奨ワクチン株)およびWS/33(H1N1)をNational Institute of Biological Standards and Controls: NIBSC, Herdfordshire, UK)から入手した。ウイルスのシードストックから、またはこれらのウイルスに感染した卵の尿膜腔液のいずれかから、QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)を用いて全RNAを抽出した。そして、これらのインフルエンザウイルスRNAを逆転写用の鋳型として以下のとおり用いた。

【0207】

30

1μlのRNAを、全量12μlの中で20ngのプライミング用オリゴヌクレオチド(表1)にアニールさせた。モロニーマウス白血病ウイルスに由来し、RNase H活性を含まない200ユニットの逆転写酵素(Superscript II RNase H-, Gibco-BRL Eggenstein, Germany)、および製造業者が推奨する反応条件を用いて、20μl容量中で第1鎖DNAを合成した。反応混合液を42度60分間置いた後、95度30分間変性させた。インフルエンザウイルス株A/HK/213/03(H5N1)の相補的DNA配列は、NIBSCのRobert Newmann博士から提供された。

【0208】

40

50μlの反応混合液の中で、60ユニットの熱安定性PwoDNAポリメラーゼ(Roche Applied Science, Rotkreuz, Switzerland)によって1μlのcDNAからPCRにより、赤血球凝集素(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)、および核タンパク質(NP)をコードするDNA配列を別々に増幅した。5'側および3'側の各PCRプライマーは、クローニング目的のための人工的な制限酵素部位を含んでいる。さらに、5'側プライマーは、真核細胞の中で目的遺伝子を効率的に翻訳するため、遺伝子の開始コドンの直前に正規のコザック配列(GCCGCCACCC、配列番号:1)を含んでいる。PCR(95度45秒間の変性工程、60度45秒間のアニーリング工程、および72度90秒間の伸長工程)を30サイクル行った後、さらに生成物を72度7分間インキュベートした。その後、この反応液に、4μlの100mM MgCl₂、および2μlの大腸菌DNAポリメラーゼのクレノウフラグメン

50

ト(5ユニット/μl)を加えて37℃で15分間インキュベートした。

【0209】

このDNAをQIAquick PCR精製キット(QIAGEN)で精製して、塩類、および取り込まれなかつたモノヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを除去した。パンデミックウイルス株(H5)の赤血球凝集素遺伝子以外の増幅フラグメントを以下のようにクローニングした。Sal IおよびNot Iで制限酵素消化した後、予想されたサイズのDNAフラグメント(赤血球凝集素、ノイラミニダーゼ、および核タンパク質について、それぞれ1.7kb、1.4kb、および1.5kb)を分取用アガロースゲル電気泳動によって単離した。回収されたDNAフラグメントを、T4DNAリガーゼを用いてpBluecript KSベクター(Sal IおよびNot I消化のみ)に連結させ、XL-10大腸菌コンピテント細胞(Stratagene, La Jolla, CA)に形質転換した。H5のcDNAフラグメントをAsc IおよびNot Iで消化した後、分取用アガロースゲル電気泳動を行つた。精製されたH5フラグメントを、T4DNAリガーゼを用いて、Sal I部位をAsc I部位に変更しておいたpBluecript KSベクターに連結させ、XL-10大腸菌コンピテント細胞に形質転換した。単一大腸菌コロニーから数個のcDNAクローンを単離して、増幅されたDNAフラグメントに人為的変異が導入されていないことを確認した。

【0210】

次に、各インフルエンザ遺伝子を、以下の通りにアルファウイルスレプリコンベクターにサブクローニングした(図2)。Resvир-17(H3およびN2)の赤血球凝集素およびノイラミニダーゼの遺伝子フラグメント(Sal I - Not I)をpBluecriptから切り出して、シンドビスウイルスのレプリコンのバックボーンであるSINCR(Gardnerら, 2000, J. Virol. 74: 11849 - 11857)のXho I - Not I部位の中にサブクローニングした。VEE/SINレプリコンベクターのバックボーンであるpVCRchim2.1(Perrisら, 2003, J. Virol. 77: 10394 - 10403)にH3フラグメントをサブクローニングするために、まずこのpBluecriptクローンをSal Iで消化し、クレノウフラグメントで平滑末端化し、Not I制限によって切り出した。単離したH3フラグメントを、Asc I部位を平滑末端化しておいたpVCRchim2.1に移入した。WS/33の赤血球凝集素(H1)、ノイラミニダーゼ(N1)、および核タンパク質(WNP)の遺伝子をpVCRchim2.1ベクターにサブクローニングするため、挿入部位の一方にあるSal I認識配列をSal I制限によってAsc Iに変更し、突出末端をdNTPとクレノウフラグメントで充填して、Asc Iリンカーと連結させた。

【0211】

Asc Iで広範囲に消化してから、DNAフラグメントを分取用アガロースゲル電気泳動によって単離した。回収したDNAフラグメントを、T4DNAリガーゼを用いて自己連結させて、XL-10大腸菌細胞に導入した。形質転換された大腸菌クローン由来のプラスミドDNAをAsc I / Not Iによる二重制限に付した。Asc I / Not I二重消化によってH5フラグメントを直接精製した。分取用アガロースゲル電気泳動によって、ベクターDNAから挿入フラグメントを分離した。精製されたDNAフラグメントを、T4DNAリガーゼを用いて、(Asc IおよびNot Iで消化した)pVCRchim2.1ベクターに連結した。挿入配列と連結したすべてのpVCRchim2.1ベクターを、XL-1blue大腸菌電気的コンピテント(electrocompetent)細胞(Stratagene, La Jolla, CA)に形質転換した。

【0212】

その他のインフルエンザウイルス遺伝子を、本明細書に提示された教示内容を用いて、当業者によって同様にして作成することができる。さらに、当然のことながら、過度の実験を要せずに、他のアルファウイルスに由来する類似したアルファウイルスベクター構築物で容易に代替することが可能である。

【0213】

10

20

30

40

50

表 1 に、PCR および逆転写に用いられたさまざまなプライマーの配列を示す。

【0214】

【表 1】

表 1 逆転写およびPCRのプライマー配列

標的遺伝子	プライマーナンバー	配列	付加した配列
H3	HA3F1 (cDNAおよびPCRの5'側プライマー)	5'-GGGTCGACTG CAGCCGCCAC CATGAAGACT ATCATTGCT (配列番号:2)	Sal I, Pst I, コザック
H3	HA3R1 (PCR 3'プライマー)	5'-GCATGCGGCC GCATCGATT CAAATGCAAAT GTTGCACCT (配列番号:3)	Not I, Cla I
N2	NA2F1 (cDNAおよびPCRの5'側プライマー)	5'-GGGTCGACAG ATCTGCCGCC ACCATGAATC CAAATCAA (配列番号:4)	Sal I, Bgl II, コザック
N2	NA2R1 (PCR 3'プライマー)	5'-GCATGCGGCC GCATCGATT TATAGGCATG AGATTGATG (配列番号:5)	Not I, Cla I
H1	HA1F1 (cDNAおよびPCRの5'側プライマー)	5'-GGGTCGACTG CAGCCGCCAC CATGAAGGCA AAACTACT (配列番号:6)	Sal I, Pst I, コザック
H1	HA1R1 (PCR 3'プライマー)	5'-GCATGCGGCC GCATCGATT AGATGCATAT TCTRCA (配列番号:7)	Not I, Cla I
N1	NA1F1 (cDNAおよびPCRの5'側プライマー)	5'-GGGTCGACAG ATCTGCCGCC ACCATGAATC CAAACCARA (配列番号:8)	Sal I, Bgl II, コザック
N1	NA1R1 (PCR 3'プライマー)	5'-GCATGCGGCC GCATCGATCT ACTTGTCAAAT GSTGA (配列番号:9)	Not I, Cla I
WNP (WS/33 のNP)	NPF1 (cDNAおよびPCRの5'側プライマー)	5'-GGGTCGACTC TAGAGCCGCC ACCATGGCGT CYCAAGGCAC CA (配列番号:10)	Sal I, Xba I, コザック
WNP (WS/33 のNP)	NPR1 (PCR 3'プライマー)	5'-GCATGCGGCC GCATCGATT ATTGTGTY TCYTC (配列番号:11)	Not I, Cla I
H5	HA5F1 (cDNAおよびPCRの5'側プライマー)	5'-GCATGGCGCG CCGTCGACGC CACCATGGAR ARAAYAGTGC TTCT (配列番号:12)	Asc I, Sal I, コザック
H5	HA5R1 (PCR 3'プライマー)	5'-GCATGCGGCC GCATCGATT AATGCARATT CTGC (配列番号:13)	Not I, Cla I
IRES	EMIRF2 (PCR 5'プライマー)	5'-TTTGGCGCGC CATCGATGAT ATCTGATT CCACCATATT G (配列番号:14)	Asc I, Cla I
IRES	EMIRR2 (PCR 3'プライマー)	5'-GCATGCGGCC GCGTCGACTT ATCAGCGTGT TTTCAAAGG (配列番号:15)	Not I, Sal I

R = AまたはG, S = CまたはG, Y = CまたはT

(実施例 2)

インフルエンザウイルス抗原をコードする遺伝子を少なくとも 2 つ含むアルファウイルスレプリコンベクターの構築

例え、バイシストロン性 (b i c i s t r o n i c) 構築物 (図 2) のように、同一のレプリコンベクターの中に少なくとも 2 つの別々に抗原をコードする遺伝子を含むさらなるレプリコンベクターを作成した。特に、代表的な例では、脳心筋炎ウイルス (E M C V) の配列内リボソーム進入部位 (I R E S) 配列 (D u l e , ら , 1 9 9 2 , J . V i r o l . 8 6 : 6 1 2 6) を用いて、赤血球凝集素抗原およびノイラミニダーゼ抗原の両方を同時発現させた。

【0215】

この I R E S を、I R E S を含むプラスミド (p I R E S)、および表 1 に示したプライマーを用いて、PCR によって人工クローニング部位を付加した p B l u e s c r i p t にサブクローニングした。H A 1 をコードする A s c I - C l a I フラグメント、および N A 1 をコードする S a l I - N o t I フラグメントを、同じ制限部位を用いて、新し

10

20

30

40

50

く構築したIRESプラスミドにサブクローニングした。AscI/NotI二重制限によって3.6kbのフラグメントが得られたが、これは、H1、IRES、およびN1配列をこの順序で含んでいる。このフラグメントを分取用アガロースゲル電気泳動によって精製し、他のモノシストロン性(monocistromic)構築物と同じ方法で、(AscIおよびNotIで消化した)pVCRchim2.1ベクターにサブクローニングした。

【0216】

また、第2の(例えば、重複した)アルファウイルスサブゲノム接合部プロモーターを用いて、以下のように、またPIV遺伝子について後述するようにして、第2のインフルエンザウイルス遺伝子を発現させた。より具体的には、FLUNAのみを発現する上記ベクター構築物を、アルファウイルスサブゲノムプロモーターおよびNA遺伝子を含むフラグメントをPCR增幅するための鋳型として用いた。以下に示すオリゴヌクレオチドIN-FおよびIN-Rを、標準的な条件下でPCRプライマーとして用いた。

IN-F

【0217】

【化2】

5'-ATATATATATGCGGCCGCTGGAGGGTTATTTGTGTGAC

(配列番号: 16)

IN-R

【0218】

【化3】

5'-ATATATATATGTAGCGGCGGCCGCGATCGATT

(配列番号: 17)

このPCR生成物を精製し、NotIで消化し、これもNotIで消化された、HAのみを発現するアルファウイルスベクターに連結して、2つのFLU遺伝子の発現をもたらす重複サブゲノムプロモーターをもつバイシストロン性HA+NA構築物を作成した。

【0219】

FLUのHA遺伝子およびNA遺伝子の両方を発現するレプリコンベクターに加えて、本発明では、例えば、HA+NP、NA+NP、HA+M、NA+Mなど、FLU遺伝子の別の組合せで代替することも可能である。FLU遺伝子は、例えば、主に上記のトリ株(例えば、H5、H7、H9)に由来するものなど、任意のFLUウイルス供給源から得ることが可能である。また、当然ながら、過度の実験を要せずに、当業者により、同様の方法で、他のアルファウイルスに由来する類似した多シストロン性(例えば、バイシストロン性)アルファウイルスベクター構築物を容易に構築することも可能である。

【0220】

(実施例3)

1つ以上のインフルエンザウイルス抗原を発現するアルファウイルスレプリコン粒子の作製

上記および当分野において使用されている、いくつもの利用可能な方法(例えば、インビトロで転写された欠損ヘルパーRNAとのRNAの同時形質転換法、パッケージング細胞株への導入)を用いて、上記のレプリコン構築物を含むアルファウイルスレプリコン粒子を調製する。

【0221】

特に、上記のレプリコンベクターを含むインフルエンザウイルス遺伝子をインビトロで転写して、Perrilら(2003)J.Viro1.77:10394-10403)に記載されているようなレプリコン粒子を作製した。レプリコン粒子を細胞培養上清として回収し、濾過により清澄化し、イオン交換クロマトグラフィー(WO0192552)を行い、さらに濾過を行い、精製されたレプリコン粒子物質を薬学的に受容可能な希釈剤

10

20

30

40

50

に処方した。基本的に、米国特許第 6 0 1 5 6 9 4 号、第 5 7 8 9 2 4 5 号、第 5 8 4 3 7 2 3 号、第 6 4 5 1 5 9 2 号；Perril (2003) J. Virol. 77: 10 3 9 4 - 1 0 4 0 3 ; Pollo 上記；WO 01 9 2 5 5 2) に記載されているようにして、当該分野における標準的な技術を用いて、レブリコン粒子の力価の測定、およびレブリコンを受容可能なウイルスが存在しないことの判定を行った。

【0222】

培養細胞の感染後の抗原の発現を、適当な抗原特異的抗体を用いた免疫染色によって確認した。ここで、図 11 を見ると、1 つ以上のインフルエンザ抗原を発現するアルファウイルス粒子による細胞の感染後の抗原発現を測定するために行われた蛍光活性化細胞選別研究の結果が示されている。

10

【0223】

図 11 は、培養細胞に感染させると、上記した 2 つの異なるバイリストロン性アルファウイルスレブリコン（一方は配列内リボソーム進入部位である IRES をもち、もう一方は、重複したアルファウイルスサブゲノムプロモーターである sgp をもつ）構造物から FLU の HA 抗原および NA 抗原が発現することを実証している。本明細書で提示した教示内容に基づいて、免疫原組成物またはワクチン組成物として利用するために、FLU 抗原の別の組合せをバイリストロン性構造物で同じように発現させることができる。また、本発明は、免疫原組成物またはワクチン組成物において 2 つ以上の異なったレブリコン粒子を（例えば、さまざまな FLU 抗原を発現する）組み合わせること、およびそのような組合せを用いて免疫応答を刺激する方法も意図している。このような組み合わせの非限定的な例としては、例えば、FLU HA をコードする粒子 + FLU NA をコードする粒子、FLU HA をコードする粒子 + FLU NP をコードする粒子、FLU NA をコードする粒子 + FLU NP をコードする粒子、FLU NA をコードする粒子 + FLU M をコードする粒子、第 1 の株の FLU HA + NA の両方をコードする粒子 + 第 2 の株の FLU HA をコードする粒子など挙げられる。

20

【0224】

（実施例 4）

ヒトパラインフルエンザウイルスの HN 抗原または F 抗原をコードする遺伝子を含むアルファウイルスレブリコンベクターの作製

ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (hPIV3) の融合タンパク質 (F) を発現するアルファウイルスレブリコン粒子を作製するために、F のオーブンリーディングフレーム (GenBank 登録番号 Z11575 のゲノム配列の nt 4690 ~ nt 5589 ; および Stokes, et al., 1992, Virus Res. 25 (1-2), 91-103) を、標準的な市販の遺伝子合成技術によって 2 重鎖 DNA 分子として合成し、その配列を確認し、そして、合成された遺伝子を、GenScript Corporation によって pUC18 ベクターにクローニングした。

30

【0225】

合成の間、ATG 開始コドンのすぐ上流に AscI 制限部位およびコザックコンセンサス配列を付加し、NotI を終止コドンのすぐ下流に付加した。そして、F 遺伝子を含むプラスミドを AscI および NotI で消化して、F 遺伝子を VCR-Chim2.1 レブリコンバックボーンにサブクローニングして、VCR-Chim2.1-F_{PIV3} を作製した（図 3）。

40

【0226】

本発明のエンベロープ糖タンパク質の切断型（このタンパク質が分泌型となるように、膜貫通アンカー領域の全部または一部（および、場合によっては細胞質尾部）を欠失している）も作製される。例えば、PIV の F 遺伝子を、膜アンカー領域（アミノ酸残基 494 - 516 ）が除去されるよう改変する。より具体的には、VCR-Chim2.1-F_{PIV3} 中で、都合のよい制限部位である XbaI と NotI の間（最後の 73 アミノ酸残基をコードする領域）にある F 遺伝子のセグメントを、膜貫通アンカーに相当する 22 アミノ酸残基が欠失していて、かつ、クローンをスクリーニングするために都合のよい制

50

限部位 (ScaI) を付加するサイレント変異を有する、このフラグメントを再生させる重複オリゴヌクレオチドによって作製されたDNAフラグメントで置換する。以下のオリゴヌクレオチドを用いる：

TM-F1 (配列番号：18) :

【0227】

【化4】

ctagaagaatcaaaagaatggataagaaggtaaatcaaaaaactagattctattggaaatggcatcaatctagcacta

TM-R1 (配列番号：19) :

【0228】

10

【化5】

tagtacttaattgttagtgcttagattgatgccaatttccaatagaatctagttttgatttgacccctttatccattttgattctt

TM-F2 (配列番号：20) :

【0229】

【化6】

ctagaagaatcaaaagaatggataagaaggtaaatcaaaaaactagattctattggaaatggcatcaatctagcacta

TM-R2 (配列番号：21) :

【0230】

20

【化7】

Gccgcttatttggttagtacataggcttgtcatttgatccactcgattctctttgaattctg

供給業者の推奨するとおりに、各個のオリゴの100nM溶液を得るためにオリゴヌクレオチドを再構成する。フラグメントを組み立てるために、T4ポリヌクレオチドキナーゼバッファー (New England Biolabs, Beverly, MA)、1mMrATP、水、および10ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼ酵素 (New England Biolabs, Beverly, MA)を、最終反応容量500μlで含む1本の反応用チューブの中で各オリゴを100ピコモルずつ混合する。リン酸化反応を37℃で30分間進行させ、その時点で反応液にさらに10ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼを補充して、さらに30分間反応を続けさせる。

【0231】

30

反応の終わりに、大量の水を含むビーカーの中で混合液を含むチューブを95℃で5分間加熱して、酵素、およびすでにアニールし得たあらゆるDNA鎖を変性させる。そして、このビーカーを熱源から外し、相補的なオリゴヌクレオチドが完全な2重鎖DNAにアニールするよう周囲温度までゆっくり冷却させる。

【0232】

冷却したところで、0.2pmoleの反応済み物質を、予めXbaIとNotIで消化しておいた100pmoleのVCR-Chim2.1-F_{PIV3}DNAと連結し、アルカリホスファターゼ処理して、(12kbのバンドを)ゲル精製する。ライゲーションしたものを標準的な方法によってコンピテントな細菌に形質転換し、形質転換体を解析して、適当な末端酵素部位があるか、挿入配列のサイズ、挿入配列の重複の証拠、および方向性について調べる。次に、数個の陽性の形質転換体を無作為に選んで配列を確認する。どんな配列の誤りも、標準的な部位特異的変異誘発法によって正すことができる。また、標準的なPCR法、プライマーとして下記のオリゴヌクレオチド、および鑄型としてVCR-Chim2.1-F_{PIV3}を用いることによって、膜貫通ドメインおよび細胞質尾部の両方が欠失した構築物を作製する。

PIVf:

【0233】

40

【化8】

5'-ATATATATATACGGCGGCCACCATGCCAAC

(配列番号: 22)

P I V r :

【0234】

【化9】

5'-ATATATATATGCGGCCGCTTATGTAGTGCTAGATTGATGCCAATTTC

(配列番号: 23)

10

次に、切断型 F 遺伝子の P C R 産物を標準的な技術を用いて、全長 P I V F 遺伝子の代わりに V C R - C h i m 2 . 1 - F _{P I V 3} の中に置換する。

【0235】

F と同様に、h P I V 3 の H N 抗原を発現するアルファウイルスレプリコン粒子を作製するために、H N のオープンリーディングフレーム（ゲノム配列の n t 6 8 0 6 ~ n t 8 5 2 4 ）も、当該分野において公知の標準的な市販の技術を用いて合成し、G e n S c r i p t C o r p o r a t i o n によって p U C 1 8 にクローニングした。この場合、A s c I および N o t I 制限部位およびコザックコンセンサス配列も付加した。そして、このプラスミドを A s c I および N o t I で消化して V C R - C h i m 2 . 1 にクローニングして V C R - C h i m 2 . 1 - H N _{P I V 3} を作製した（図3）。標準的な方法を用いて V C R - C h i m 2 . 1 - H N _{P I V 3} の鋳型から合成したインビトロ転写 R N A による B H K 細胞のトランスフェクションによって H N の発現を確認した後、不活性化 P I V 3 ウィルスに対して生じた P I V 特異的ポリクローナル抗血清を用いてウエスタンプロット解析を行った。

20

【0236】

これも当然ながら、別の P I V 遺伝子を使用することも可能であり、また、別のアルファウイルスに由来する類似したモノシストロン性またはバイシストロン性のアルファウイルスベクター構築物も過度の実験を要せずに、同様の方法で当業者によって容易に構築することが可能である。また、下記で R S V 遺伝子について説明されているような標準的な R T - P C R 技術を用いて、アルファウイルスベクターのバックボーンにクローニングするため P I V 遺伝子を作製することもできる。

30

【0237】

（実施例5）

ヒトパラインフルエンザウイルスの H N 抗原および F 抗原の両方を同時に発現するアルファウイルスレプリコンベクターの作製

h P I V 3 の H N および F 抗原を同時発現するアルファウイルスレプリコンベクターを、例えば、I R E S - バイシストロン性構築物（上記）として、または、二重のサブゲノムプロモーター構築物（これも上記）として、複数の方法で構築することができる（図3）。

40

【0238】

具体的には、H N 抗原を第1のアルファウイルスサブゲノムプロモーターから発現させ、F 抗原を第2のアルファウイルスサブゲノムプロモーターから発現させる。このような構築物は、構築物 V C R - C h i m 2 . 1 - F _{P I V 3} または V C R - C h i m 2 . 1 - F d 1 S P _{P I V 3}（上記）由来の F のオープンリーディングフレームとアルファウイルスのサブゲノムプロモーターを既に含むカセットとして、F 遺伝子をクローニングすることによって容易に作成される。

【0239】

これらの構築物を、M s c I（転写開始点から - 8 2 の所に位置する）または S w a I（転写開始点から - 5 6 6 の所に位置する）の単一の制限酵素によって消化し、N o t I リンカーを連結させ、N o t I で消化し、ゲル精製してから、予め N o t I およびアルカ

50

リホスファターゼで処理しておいた V C R - C h i m 2 . 1 - H N P I V 3 に連結させる。そして、A s c I など、1 . 7 k b (M s c I - N o t I カセット) または 2 . 2 k b (S w a I - N o t I カセット) を解離する適当な制限酵素消化によって、挿入配列が存在すること、および正しい方向性をもつことについて形質転換体をスクリーニングする。あるいは、上記したような標準的な P C R 法を用いて、同じ構築を行うことも可能である。

【 0 2 4 0 】

(実施例 6)

1つ以上のパラインフルエンザウイルス抗原を発現するアルファウイルスレプリコン粒子の製造

10

上記および当分野において使用されている、いくつもの利用可能な方法（例えば、1つ以上のインピトロで転写された欠損ヘルパー R N A とのレプリコン R N A の同時形質転換法、パッケージング細胞株へのレプリコン導入）を用いて、上記のレプリコン構築物を含むアルファウイルスレプリコン粒子を調製することが可能である。例えば、実施例 4 および 5 に記載されたパラインフルエンザウイルスの H N 遺伝子を含むレプリコンベクターを、インピトロで転写して、P e r r i ら (2003, J. V i r o l . 7 7 : 1 0 3 9 4 - 1 0 4 0 3) に記載されているようなレプリコン粒子を製造するために使用した。

【 0 2 4 1 】

細胞培養上清からレプリコン粒子を回収して、濾過によって清澄化し、イオン交換クロマトグラフィー (W O 0 1 9 2 5 5 2) を行い、さらに濾過工程を行い、精製されたレプリコン粒子物質を薬学的に受容可能な希釈剤に処方した。当該分野において標準的な技術（例えば、米国特許第 6 0 1 5 6 9 4 号、第 5 7 8 9 2 4 5 号、第 5 8 4 3 7 2 3 号、第 6 4 5 1 5 9 2 号；P e r r i ら (2003) J. V i r o l . 7 7 : 1 0 3 9 4 - 1 0 4 0 3；P o l o ら上記；W O 0 1 9 2 5 5 2 を参照）を用いて、レプリコン粒子の力価の測定、およびレプリコンを受容可能なウイルスが混入していないことの判定を行った。培養細胞に感染させた後、適当な抗体による免疫染色およびウエスタンプロットによって P I V 抗原の発現を確認した。

20

【 0 2 4 2 】

(実施例 7)

R S ウイルスの G 抗原および F 抗原をコードする遺伝子を含むアルファウイルスレプリコンベクターの作製

30

R S V の融合糖タンパク質 (F) を発現するアルファウイルスレプリコンベクターを構築するために、F のオープンリーディングフレームを、標準的な市販の遺伝子合成技術によって2重鎖 D N A 分子として、ヒト A 2 株 (G e n B a n k 登録番号 M 7 4 5 6 8 の n t 5 6 6 1 ~ n t 7 3 8 2 のゲノム配列；W e r t z , ら, 1 9 8 5 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 2 , 4 0 7 5 - 4 0 7 9) から作製し、その配列を確認し、そして、合成した遺伝子を、R e t r o g e n C o r p o r a t i o n による p U C 1 8 ベクターにクローニングした。

【 0 2 4 3 】

合成の間、A T G 開始コドンのすぐ上流に A s c I 制限部位およびコザックコンセンサス配列を付加し、N o t I を終止コドンのすぐ下流に付加した。そして、F 遺伝子を含むプラスミドを A s c I および N o t I で消化して、F 遺伝子を V C R - C h i m 2 . 1 レプリコンのバックボーンにサブクローニングして、V C R - C h i m 2 . 1 - F R S V を作製した（図 4）。

40

【 0 2 4 4 】

R S ウイルス (R S V) の G 付着タンパク質を発現するアルファウイルスレプリコンベクターを以下のように作製する。G タンパク質をコードする c D N A 配列を、例えば、A 2 株 (G e n B a n k 登録番号 M 7 4 5 6 8 ; W e r t z , ら, 1 9 8 5 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 2 , 4 0 7 5 - 4 0 7 9) などのヒト単離体から作製する。R S V に感染した細胞から抽出したポリ A m R N A (T r i a z o l 、 B R

50

Lで抽出し、その後Oligotex、Qiaagenで抽出した)を、Superscript 予備増幅キット(GIBCO-BRL)およびpolydTオリゴヌクレオチドを用いた逆転写によって、900ヌクレオチドの遺伝子(ゲノム配列のnt4690~nt5589)のcDNAを作製する。そして、このcDNAを、Ventポリメラーゼ(NEB)またはPfu(Stratagene)、および下記のオリゴヌクレオチドを用い、標準的な3段階PCR増幅法(94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で1分間を30サイクル)によって増幅させる:

RSV-Gf:

【0245】

【化10】

atatatatggcgccccaccatgtccaaaaacaaggaccaac

(配列番号: 24)

RSV-Gr:

【0246】

【化11】

atatatatgcggccgcctactggcggtgtgttggg

(配列番号: 25)

RSV-Gfオリゴヌクレオチドは、好都合な制限部位AscI、続いて開始ATGの上流にあるコザックコンセンサス配列を含む。RSV-Grオリゴヌクレオチドは、制限部位NotIを含む。増幅後、DNAフラグメントをQIAquick-spin(Qiaagen)によって精製し、AscIおよびNotIによって消化してゲル精製する。次に、このフラグメントを、予めAscIおよびNotIで消化し、エビ由来アルカリホスファターゼで処理し、0.7%アガロースゲルから精製しておいたVCR-Chim2.1レプリコンベクターDNAに連結して、構築物VCR-Chim2.1-G_{RSV}を作製する(図4)。同様に、Fタンパク質をコードするcDNA(ゲノム配列のnt5661~nt7382)を、前記実施例に記載したようにして、例えばA2株のような、ヒトまたは動物(家畜)の単離体から作製する。このcDNAを、Ventポリメラーゼ(NEB)またはPfu(Stratagene)、および下記のオリゴヌクレオチドを用い、標準的な3段階PCR増幅法(94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で1分間を30サイクル)によって増幅する:

RSV-Ff:

【0247】

【化12】

atatatatggcgccccaccatggagttgctaattctaaagc

(配列番号: 26)

RSV-Fr:

【0248】

【化13】

atatatatgcggccgcctagttactaaatgcaatatttataac

(配列番号: 27)。

【0249】

RSV-Ffオリゴヌクレオチドは、好都合な制限部位AscI、続いて開始ATGのすぐ上流にあるコザックコンセンサス配列を含む。RSV-Grオリゴヌクレオチドは、制限部位NotIを含む。そして、増幅されたフラグメントを、前記実施例に記載されたように処理し、VCR-Chim2.1にクローニングして、構築物VCR-Chim2.1-F_{RSV}を作製する(図4)。あるいは、PIV遺伝子について上記したように、

10

20

30

40

50

R S V の G 遺伝子を商業的に合成することも可能である。

【 0 2 5 0 】

本発明の呼吸器系ウイルス病原体のエンベロープ糖タンパク質（例えば、R S V F）の切断型（この糖タンパク質が分泌型となるように膜貫通アンカー領域の全部または一部（および、場合によっては細胞質尾部）を欠失している）も、標準的な分子生物学の技術を用いて当業者によって作製することも可能である。本発明のエンベロープ糖タンパク質遺伝子に対するその他の改変も考えられ、例えば、5'末端非翻訳領域の欠失または置換、異種リーダー配列の取り込みなど、容易に置換することができる。

【 0 2 5 1 】

同様にして、隣接するA s c I 部位およびN o t I 部位をもつR S V のM 2 - 1 配列を商業的に合成して、V R C - C h i m 2 . 1 のバックボーンにクローニングする。 10

【 0 2 5 2 】

このライゲーションによって生じる形質転換体を、まず、適当なクローニング部位の存在、挿入配列のサイズ、および挿入配列の重複の証拠について解析する。数個 s の陽性の形質転換体を無作為に選んで配列の確認を行なう。

【 0 2 5 3 】

（実施例 8 ）

R S ウィルスの G 抗原および F 抗原の両方を同時に発現するアルファウイルスレプリコンベクターの構築

R S V の G 抗原と F 抗原との両方、または F もしくは G のいずれかと別の抗原（例えば、M 2 - 1 ）とを同時発現するアルファウイルスレプリコンベクターを、例えば、I R E S - バイシストロン性構築物（上記）として、または、二重のサブゲノムプロモーター構築物（これも上記）として、複数の方法で構築する（図 4 ）。 20

【 0 2 5 4 】

1 つの代表的な例では、G 抗原を第 1 のアルファウイルスサブゲノムプロモーターから発現させ、F 抗原を、同じレプリコンベクターの中にある第 2 のアルファウイルスサブゲノムプロモーターから発現させる。この構築物は、F のオーブンリーディングフレーム、および上記のV C R - C h i m 2 . 1 - F _{R S V} のアルファウイルスサブゲノムプロモーターを含むカセットとして F 遺伝子配列をクローニングすることによって容易に作成される。 30

【 0 2 5 5 】

この構築物を、M s c I (転写開始点から - 8 2 の所に位置する) または S w a I (転写開始点から - 5 6 6 の所に位置する) の単一の制限酵素で消化し、N o t I リンカーに連結させ、N o t I で消化し、ゲル精製してから、予めN o t I およびアルカリホスファターゼで処理しておいたV C R - C h i m 2 . 1 - G _{R S V} に連結させる。そして、A s c I など、1 k b (M s c I - N o t I カセット) または 1 . 5 k b (S w a I - N o t I カセット) を解離する適当な制限酵素消化によって、挿入配列が存在すること、および正しい方向性をもつことについて形質転換体をスクリーニングする。

【 0 2 5 6 】

また、本発明は、別のアルファウイルスに由来する類似した単一またはバイシストロン性のアルファウイルスベクター構築物を、本明細書で提示した教示内容を用いて、同様の方法で当業者によって容易に構築することが可能であるとも考える。 40

【 0 2 5 7 】

（実施例 9 ）

1 つ以上のR S ウィルス抗原を発現するアルファウイルスレプリコン粒子の製造

上記および当分野において使用されている、いくつもの利用可能な方法（例えばインビトロで転写された欠損ヘルパー R N A との R N A の同時形質転換法、パッケージング細胞株への導入法）を用いて、上記のレプリコン構築物を含むアルファウイルスレプリコン粒子を調製することが可能である。例えば、R S ウィルスの G 遺伝子を含むレプリコンベクターは、インビトロで転写して、P e r r i l a (2 0 0 3) J . V i r o l . 7 7 : 1 0 50

3 9 4 - 1 0 4 0 3) に記載されているようなレプリコン粒子を製造するために使用する。トランスフェクトされた細胞培養上清を回収してレプリコン粒子を得、濾過によって清澄化し、イオン交換クロマトグラフィー (WO 0 1 9 2 5 5 2) を行い、さらなる濾過工程を行い、精製されたレプリコン粒子物質を薬学的に受容可能な希釈剤に処方した。当該分野において標準的な技術 (米国特許第 6 0 1 5 6 9 4 号、第 5 7 8 9 2 4 5 号、第 5 8 4 3 7 2 3 号、第 6 4 5 1 5 9 2 号 ; Perril (2 0 0 3) J . Virol . 7 7 : 1 0 3 9 4 - 1 0 4 0 3 ; Polio 上記 ; WO 0 1 9 2 5 5 2) を用いて、レプリコン粒子の力価の測定、およびレプリコンを受容可能なウイルスが混入していないことの判定を行う。抗原発現の確認は、レプリコン粒子による培養細胞の感染後、免疫染色、またはその他適当な技術により行う。

10

【 0 2 5 8 】

(実施例 1 0)

ヒトメタニューモウイルスの G 抗原をコードする遺伝子を含むアルファウイルスレプリコンベクターの構築

ヒトメタニューモウイルス (H M P V) の付着タンパク質 (G) を発現するアルファウイルスレプリコンベクターを構築するために、前記実施例に記載されているような感染培養物から抽出された R N A 上での R T - P C R によって、 G タンパク質をコードする c D N A 配列を、例えば、単離体 0 0 - 1 (Van Den Hoogenら 2 0 0 1 , N ature Med . 7 : 7 1 9 - 7 2 4 、 Gen Bank 登録番号 # A F 3 7 1 3 3 7) などのヒトウイルス単離体から作製する。以下のように、 P C R 増幅するための正方向オリゴヌクレオチドは、 A s c I 部位およびコザックコンセンサス配列を含み、逆方向オリゴは、 N o t I 部位を含む。

20

H M P V - G f :

【 0 2 5 9 】

【 化 1 4 】

atatatatggcgcgcgcgcaccatggaggtgaaagtggagaac

(配列番号 : 2 8)

H M P V - G r :

【 0 2 6 0 】

30

【 化 1 5 】

atatatatatgcggccgcctaactagttggtttatgttgttg

(配列番号 : 2 9) 。

【 0 2 6 1 】

そして前記実施例に記載したように、増幅したフラグメントを処理して、 V C R - C h i m 2 . 1 にクローニングし、レプリコン V C R C h i m 2 . 1 - G H M P V を作製する。このベクターを含むレプリコン粒子を上記したように作出する。

【 0 2 6 2 】

40

(実施例 1 1)

S A R S コロナウイルスのスパイク抗原をコードする遺伝子を含むアルファウイルスレプリコンベクターの構築

S A R S ウィルスのスパイク遺伝子は、その全体 (全長のスパイクタンパク質をコードする) または、例えば、コードされるスパイクタンパク質が全長よりも短くなる (例えば、膜貫通領域および細胞質尾部の欠失) よう、配列の欠失もしくは切断を含む改変型をアルファウイルスレプリコンベクターの中に取り込むことができる。例えば、スパイク遺伝子を全長遺伝子として、標準的な R T - P C R 条件によって V C R - c h i m 2 . 1 ベクター (WO 0 2 / 9 9 0 3 5) にクローニングすることが可能である。標準的な R T - P C R における逆転写工程には、 S u p e r s c r i p t 予備増幅キット (I n v i t r o g e n) および以下のプライマーを用いる :

50

S p - R T - R

【0263】

【化16】

Ctcataaacaatccataagttcg

(配列番号：30)

増幅工程には、cDNAポリメラーゼアドバンテージキット（CloneTech）および以下のプライマーを用いる：

S p - F - B b v C I

【0264】

【化17】

atatatatat cctcago ccacc atgtttatttcttattatttcttactc

10

(配列番号：31)

S p - R - N o t I

【0265】

【化18】

Atatatatgcggccgcgttatgtataatgtaaattgacaccc

(配列番号：32)。

20

【0266】

正方向プライマーは、スパイク遺伝子の翻訳効率を最適化するためにATGコドンの前にcccc配列（Kozak, 1991, JBC 19867-70）が含まれるよう設計する。また、PCR増幅遺伝子を後でクローニングするため、この正方向プライマーはBbvcI制限部位を含み、逆方向プライマーはNotI制限部位を含む。PCR産物をQIAquickヌクレオチド除去キット（QIAgen）を用いて精製し、BbvcIおよびNotIで消化し、QIAquickゲル抽出キット（QIAgen）でゲル精製して、同じ酵素で予め消化しておいたプラスミドVCR-Chim2.1に連結させる。

【0267】

30

配列決定してSARSスパイク配列を含むクローンを確認し、新たな構築物をVCRChim2.1-SARSspikeと呼ぶ。

【0268】

VEERep/SINenv-SARSspikeレプリコン粒子を作製するために、プラスミドVCR-Chim2.1-SARSspike、VCR-DH-Scap（WO02/99035）、およびVCR-DH-Sg1y d1160（WO02/99035）を制限酵素PmeIで直鎖化して、既述したようにインビトロ転写に用いた（Polola, 1999, PNAS 96:4598-603, WO02/99035）。転写産物を、既述したようにBHK細胞に同時トランスフェクトする（（Polola, 1999, ibid, WO02/99035）。トランスフェクトした細胞を34でインキュベートし、エレクトロポレーションから20時間後および30時間後に上清を回収し、遠心分離によって清澄化し、既述したようにクロマトグラフィーによって精製する（PCT WO01/92552）。

40

【0269】

精製したVEERep/SINenv-SARSspikeまたはVEERep/SINenv-GFP（WO02/99035）レプリコン粒子をBHK細胞に一晩感染させて、レプリコン粒子ベクターからのSARSスパイクタンパク質の発現を確認した。さらにもう、BHK細胞を、インビトロで転写されたVCR-Chim2.1-SARSspikeレプリコンRNAにより並行してトランスフェクションさせた。感染およびトランスフェクションから16時間後に、細胞を溶解し、溶解物のサンプルを、SARSウイル

50

スのスパイクタンパク質を認識する抗体を用いるウエスタンプロットによって解析して発現を確認した。

【0270】

(実施例12)

不活化PIVワクチンの製造

PIV3株JSを用いてLLC-MK2細胞に感染させ、感染から96時間後に回収した培地上清を0.2μmフィルタで清澄化および濾過した。約450mlの回収した培地を、陽イオン交換樹脂であるFractogel（登録商標）EMDSO₃⁻（M）（s-Fractogel（登録商標）、EM Industries）を含む10mlのカラムに適用した。このカラムを、0.5NのNaOH、その後10カラム容量のWFIで消毒し、10mMのリン酸ナトリウム、125mMの塩化ナトリウム、pH7.0で平衡化した。

【0271】

清澄化した上清を115cm/時の流速でカラムに通した。このカラムを約40カラム容量の平衡バッファーで洗浄した。10mMのリン酸ナトリウム、400mMの塩化ナトリウム、pH7.0を含む約20mlのバッファーを適用して1段階溶出を行った。280nmにおける吸光度に基づく溶出ピークを125mM塩化ナトリウム、および40mg/mlラクトースに希釈した。

【0272】

-プロピオラクトン（カタログ番号：P1424、Spectrum Chemical Mfg. Corp., Gardena, CA）を添加して、PIV3の不活化をもたらした。まず、-プロピオラクトンのストック溶液を高度精製水で1:200に希釈した後、ゆっくりと一滴ずつ、1:2000の濃度までウイルス保存液に直接希釈した。この溶液を慎重に混合して、4℃で一晩インキュベートした。37℃で4時間インキュベートして-プロピオラクトンの不活化を行った。

【0273】

不活化の効果を評価するために、不活化ウイルスのアリコートをLLC-MK2細胞に対して連続希釈して7日間インキュベートした。細胞障害効果（CPE）によって測定したところ、不活化サンプルにおいてウイルスは検出されなかった。-プロピオラクトンで不活化したウイルスの全タンパク質濃度をBCA（Pierce Chemical）によって0.5mg/mlであると推定した。筋肉内および鼻腔内の免疫化を用いて、マウスおよびハムスターの両方における不活化ウイルスの免疫原性を確認した。鼻腔内免疫化の1回用量は5μgの-プロピオラクトン不活化ウイルスおよび10μgのLTK63アジュバントからなり、全容量は、マウスについて0.03ml、またハムスターについては0.1mlであった。筋肉内免疫化の用量は、免疫化直前に0.05mlのラクトースバッファーに希釈してから、等量のMF59アジュバントと緩やかに転倒混合した5μgの-プロピオラクトン不活化ウイルスを含んだ。マウスおよびハムスターの両方に対する筋肉内免疫化の全容量は0.1mlであった。

【0274】

(実施例13)

アルファウイルスレプリコン粒子ワクチンを用いたインフルエンザウイルス特異的免疫応答の刺激

FLU抗原特異的免疫応答の刺激を示すために、HA抗原を発現するSINレプリコン粒子を用いて、市販のサブユニットFLUワクチン抗原と並行してBALB/cマウスを免疫した。レプリコン粒子およびタンパク質を筋肉内に2回投与し、各免疫後に標準的なELISAアッセイによってHA特異的な血清抗体応答を測定した。

【0275】

2.5μg/mlの1価サブユニットインフルエンザワクチン調製物（Chiron S.r.l., Italy）を含むPBS溶液によって、Nunc Maxisorp（登録商標）平底プレートを4℃で一晩コーティングした。そして、プレートを0.05ml

10

20

30

40

50

%のTween-20を補充したPBS(pH7.2)(PBS-T)で3回洗浄した。ウェルを洗浄した後、PBS-T中5%(w/v)のドライミルクを用いて、37で1時間、非特異的な結合をブロックした。サンプル血清を、PBS-Tで1:50から開始して3倍に連続希釈した。希釈した血清により37で90分間インキュベートした後、プレートをPBS-Tで3回洗浄した。

【0276】

さらに、プレートを、PBS-Tで希釈したアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウスのIg、IgG1、またはIgG2a(Southern Biotechnology Associates Inc., AL)により37で1時間インキュベートした。PBS-Tで入念に洗浄した後、色素-基質溶液である、ジエタノールアミン中1mg/mlのパラニトロフェニルホスフェートを各ウェルに100μl加えた。そして、20分後、SpectraMax(登録商標)(Molecular Devices, CA)を用いて、405nmでプレートを読み取った。力価を計算するために、カットオフ値を、PBSコントロールの光学密度(OD)の平均値にそれらの標準偏差の3倍を足したものと定義した。そして、抗体力価を、カットオフ値のODを生じさせるサンプルの希釈度として計算した。図6に示すように、SINレプリコン粒子は、テストした両方の用量で非常に有効であって、市販のタンパク質ベースのワクチンよりも強い免疫原性を持っていた。

【0277】

3つの異なったマウス系統で行われた別の実験でも同様の結果を確認した。増強されたELISA(結合)抗体力価に加えて、さらに重要なことに、SINレプリコン粒子は、赤血球凝集素阻害アッセイによって測定したところ、より大量の中和抗体を產生した(図7)。免疫されたマウスの血清に、PBS(pH7.0)で1:50または1:100に希釈した試験用ノイラミニダーゼ(Dade Behring, Liederbach, Germany)を4倍容量加えてノイラミニダーゼにより処理し、37で一晩インキュベートした。ノイラミニダーゼを不活化するために、3血清容量分の2.5%クエン酸ナトリウム溶液を加えて、温水槽中56で30分間インキュベートした。2血清容量分のPBSを更に加えて、アッセイを行う前に希釈度を1:10に調整した。25μlの連続2倍希釈した血清を、V字底の96ウェルプレートに分注した。4赤血球凝集素ユニットを含む、同じ容量のウイルス溶液(RESVIR-17)を加えて血清を希釈した。

【0278】

室温で60分インキュベートした後、50μlのニワトリ赤血球懸濁液(0.5%)を加えて、室温でさらに60分間インキュベートした。赤血球凝集を阻害する最も高い血清の希釈度を視覚的に判定した。このアッセイを二連で行い、平均希釈度をH1力価とした。

【0279】

HAを発現するSIN由来レプリコン粒子を、HAを発現するVEE/SINキメラレプリコン粒子と比較して、相対的な免疫原性を測定した(図8)。10⁶個、10⁵個、または10⁴個のレプリコン粒子の投与量でマウスを2回免疫した。1回目および2回目の免疫後に得られた血清サンプルを上記したようにELISAで解析した。SINレプリコン粒子は、市販のサブユニットワクチン抗原よりも免疫原性が高かったが、VEE/SINレプリコン粒子は、さらに高いレベルの免疫原性を示した。FLU HAを発現するVEE/SIN粒子についても、アカゲザルにおける免疫原性を評価したところ、H1力価に基づいて、顕著なレベルのFLU中和抗体を誘導することが示された(図10)。

【0280】

(実施例14)

インフルエンザウイルス抗原を発現するアルファウイルスレプリコン粒子によって免疫された動物におけるインフルエンザウイルス曝露に対する防御

6週齢のメスのBalb/cマウスをCharles River Laboratoriesから購入した。曝露に用いるインフルエンザウイルスWS/33をインビボで滴

10

20

30

40

50

定して、無処理のマウスに対する致死用量を決定した。免疫には、 10^6 個の投与量の F L U H A または F L U N A のいずれかを発現するレブリコン粒子、または 3 μ g の赤血球凝集素を含む F L U サブユニットワクチン調製物（1価、A / New Caledonia / 20 / 99 (H1N1) の再集合体）を容量 50 μ l の P B S に入れ、前脛骨筋に投与して各群のマウス（10匹/群）に受容させた。マウスを3週間おきに2回免疫した。2回目に免疫してから2週間後、マウスを生 W S / 33 インフルエンザウイルスに曝露した。20 μ l（各鼻孔に対して 10 μ l）の上記尿膜腔液を P B S で 1000 倍に希釈し（約 100 LD₅₀）、麻酔なしで鼻腔内に投与して、上気道にウイルスを感染させた。

【0281】

10

曝露した日から2週間動物の死亡率をモニタリングした。図9に示すように、F L U H A または F L U N A のいずれかを発現するアルファウイルスレブリコン粒子ベースのワクチンは、鼻腔内 F L U ウィルス曝露に対する完璧な防御をもたらした。また、H A または N A を発現する組成物は、例えば、 10^4 個以下などのレブリコン粒子の非常に低い免疫用量でも、鼻腔内からの F L U 曝露に対して高度の防御を示した（図21）。

【0282】

単一の F L U 抗原を発現するレブリコン粒子ベースの F L U ワクチンに加えて、1つより多い F L U 抗原（H A + N A、上記参照）を発現するレブリコン粒子調製物も、鼻腔内曝露モデルにおいて高度の防御を示した（図22）。

【0283】

20

本発明は、タンパク質ベースのワクチン処方物（例えば、市販のサブユニットまたは分割ワクチン）によって、アルファウイルスレブリコンで免疫された温血哺乳動物を「追加免疫」することによって、上記アルファウイルスレブリコン粒子ベースの F L U ワクチンの任意のものに対する免疫原性応答をさらに促進することができると考えていることに留意しなければならない。これは、（例えば、H3、H1を含む）一般的なインターパンデミックな F L U 感染またはワクチン接種に以前曝露されていて、それらから生じる既存の抗体レベルがほとんど効果がない可能性のある、（例えば、H5、H7、H9を含む）トリ F L U ウィルスによるヒト感染によって生じる F L U の流行に対して特に魅力的な方法となり得る。

【0284】

30

（実施例15）

H N 抗原を発現するアルファウイルスレブリコン粒子ワクチンを用いたパラインフルエンザウイルス特異的免疫応答の刺激

本明細書において既述したように、アルファウイルスレブリコン粒子は、温血哺乳動物に投与した後、さまざまな呼吸器系病原体（例えば、ウイルス、細菌、真菌など）に対する免疫応答を刺激するために利用することができる。

【0285】

P I V の H N 抗原を発現する S I N または V E E / S I N のキメラレブリコン粒子を、実施例4に記載したように、B A L B / c マウスで評価した。I M 経路、I N 経路、または I N 後 I M 経路によってマウスを2回免疫し、2回目の免疫後 E L I S A アッセイによって血清抗体を測定した（図12）。この免疫原性実験では、さらに別の群も、さまざまな経路で不活化 P I V ワクチンによって免疫した。E L I S A のため、パラインフルエンザウイルス3型の等級2抗原（A m e r i c a n R e s e a r c h P r o d u c t, I n c. カタログ番号 123065）で I m m u l o n I b E L I S A プレートを、25 ng / ウェルの濃度で一晩（4）コーティングした。P B S 中 0.5% カゼイン、5% ヤギ血清により、37 度で1時間ブロッキングして、非特異的結合を除去した。

【0286】

試験血清を 0.5% カゼインに連続希釈し、37 度で1時間インキュベートした後、プレートを P B S で洗浄してから、H R P 結合ヤギ抗マウス I g G 1 または I g G 2 a (C a 1 T a g) のいずれかにより 37 度で1時間インキュベートした。T M B によって免疫

40

50

複合体を検出し、450 nmで読み取った。

【0287】

結果は、いずれの経路、または経路の組み合わせ（IN（鼻腔内）の後IM（筋肉内））でも、レブリコン粒子の免疫原性を示しており、また、IMまたはIN/IM投与後の不活化PIVワクチンの免疫原性も示している。次に、PIV-HNを発現するVEE/SINレブリコン粒子の用量を、10⁷個、10⁶個、および10⁵個という範囲にわたる粒子について試験した（図13）。各用量とも、高度に免疫原性であることが示された。

【0288】

不活化PIVワクチンを、（実施例12に記載されたように）アジュバントが存在する場合と存在しない場合とで、さまざまな経路によってさらに特徴付けた。実施例14に示したように、アジュバント（MF59）を加えると、IM送達された不活化PIVワクチンの免疫原性は強化された。LTK63アジュバントとともにIN投与され、その後MF59とともにIM投与された不活化PIVも、強い抗体応答を誘導した。

【0289】

（実施例16）

PIVワクチンの有効性：鼻腔内曝露からの動物の防御

マウスの免疫原性実験に加えて、本発明のPIVワクチンをワクチンの効力について評価した。文献に記載されているように（例えば、Ottoliniら, 2002, J. Infect. Dis. 186: 1713-1717; Taoら, 1999, Vaccine 17: 1100-1108; Brideauら, 1993, J. Gen. Virol. 74: 471-477; Durbinalら, 2000, Vaccine 18: 2462-2469; Pennathurら, 2003, J. Gen. Virol. 84: 3253-3261参照）、ウイルス曝露の後、防御を測定した。ハムスターの曝露モデルでは、鼻腔内曝露後、ヒトPIV3ウイルスは増殖感染して、ハムスターの肺および鼻甲介の中で複製する。PIV曝露ウイルスが、免疫された動物のこれらの組織の中で顕著に複製できにくくなることから明らかなように、有効なワクチンは、鼻腔内曝露からの防御をもたらす。

【0290】

8匹のハムスターからなる群を、MF59中5 μgの用量のBPL不活化PIVで2回IM免疫するか、または、PIV-HNを発現する10⁷個のVEE/SINレブリコン粒子によってIMで2回免疫するか、または、1回はINで、その後IMで1回免疫した。コントロール群には、ワクチン抗原を含まない希釈剤のみを投与した。3週間の間を置いてワクチン接種を行い、各免疫から2週間後、PIV特異的抗体の誘導について血清を調べた。図15および16に示すように、レブリコン粒子もアジュバント化された不活化PIVワクチンも、高レベルのPIV抗体を誘導した。2回目に免疫してから3週間後、全ての動物をPIVウイルスに鼻腔内曝露した。曝露後4日目に動物を殺処理して、肺および鼻甲介におけるPIV曝露ウイルスの力値を測定した。

【0291】

図17に示すように、レブリコン粒子および不活化PIVワクチンは、上気道および下気道の両方をウイルス曝露から完全に防御した。PIV3感染からの上下両気道組織の防御（肺だけなど、単に1つの組織だけではない）は、これらのモデルにおける有効性の重要な決定要因および指標である。

【0292】

これらのハムスターにおける有効性実験を拡充するために、アルファウイルスレブリコン粒子ベースのPIVワクチン、非経口のIM経路、および粘膜のIN経路を比較した。6匹のハムスターからなる群を、IM注射またはIN液滴投与によって、3週間おきにVEE/SIN-HNレブリコン粒子（10⁷I.U.）で2回免疫した。図23に示すように、IN経路でもIM経路でも、免疫後2週間でPIV3特異的抗体応答を生じさせたことが明らかである。以前、レブリコン粒子によるIM免疫で確認されているように、IMま

10

20

40

50

たはINで免疫した群をその後曝露したところ、鼻腔内PIV3曝露後、上部気道（鼻）および下部気道（肺）の両組織がウイルス複製から完全に防御されることが実証された（図23）。

【0293】

このように、アルファウイルスレプリコン粒子を用い、非経口または粘膜のいずれかからの投与によって、呼吸器系病原体（例えば、ウイルス）に対する免疫応答を生じさせ得る。

【0294】

（実施例17）

H N抗原およびF抗原を同時発現するアルファウイルスレプリコン粒子ワクチンを用いたパラインフルエンザウイルス特異的免疫応答の刺激

本明細書において既述したように、複数の抗原を同時発現するレプリコン粒子は、温血哺乳動物に投与した後、パラインフルエンザウイルスに対する免疫応答を刺激するために利用することができる。

【0295】

実施例5および6に記載したように、PIVのH N抗原およびF抗原の両方を同時発現するレプリコン粒子を、ヒトにおける臨床評価に先立って、上記したような多数の動物モデルにおいて、免疫原性および有効性について評価する。

【0296】

例えば、IM、IN、SC、ID、IN後IMなど、さまざまな経路のいずれかによって処方物を投与する。レプリコン粒子を、少なくとも 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、または 10^8 感染ユニット（IU）の投与量で1回以上送達する。結合抗体（ELISA）および/または中和抗体（HIアッセイ法）の標準的測定法によって免疫原性を測定し、文献に記載されているようにして（例えば、Ottoliniら, 2002, J. Infect. Dis. 186: 1713-1717; Taoら, 1999, Vaccine 17: 1100-1108; Brideauら, 1993, J. Gen. Virol. 74: 471-477; Durbinら, 2000, Vaccine 18: 2462-2469; Pennathurら, 2003, J. Gen. Virol. 84: 3253-3261参照）、ウイルスに曝露した後、防御を判定することができる。

【0297】

（実施例18）

G抗原およびF抗原を同時発現するアルファウイルスレプリコン粒子ワクチンを用いたRSウイルス特異的免疫応答の刺激

レプリコン粒子は、温血哺乳動物に投与した後、RSウイルス（RSV）に対する免疫応答を刺激するために使用することができる。例えば、実施例8および9に記載したように、RSVのG抗原およびF抗原の両方を同時発現するレプリコン粒子を、ヒトにおける臨床評価に先立って、多数の動物モデル（例えば、マウス、コットンラット、サル）で評価する。例えば、IM、IN、SC、ID、IN後IMなど、さまざまな経路のいずれかによって処方物を投与する。レプリコン粒子を、少なくとも 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、または 10^8 感染ユニット（IU）の投与量で1回以上送達する。結合抗体（ELISA）および/または中和抗体の標準的測定法によって免疫原性を測定し、文献に記載されているようにして（例えば、Princeら, 2001, J. Gen. Virol. 82: 2881-2888; Liら, 2000, Virology 269: 54-65参照）、ウイルスに曝露した後、防御を判定することができる。

【0298】

（実施例19）

G抗原を発現するアルファウイルスレプリコン粒子ワクチンを用いたヒトメタニューモウイルス特異的免疫応答の刺激

レプリコン粒子は、温血哺乳動物に投与した後、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）に対する免疫応答を刺激するために使用される。例えば、実施例10に記載したように

10

20

30

40

50

、H M P VのG抗原を発現するレプリコン粒子を、ヒトにおける臨床評価に先立って、多数の動物モデル（例えば、マウス、コットンラット、フェレット、サル）で評価する。

【0299】

例えば、IM、IN、SC、ID、IN後IMなど、さまざまな経路のいずれかによつて処方物を投与する。レプリコン粒子を、少なくとも 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、または 10^8 感染ユニット（IU）の投与量で1回以上送達する。結合抗体（ELISA）および/または中和抗体の標準的測定法によって免疫原性を測定し、標準的なウイルス曝露を行つた後、防御を判定することができる。

【0300】

（実施例20） 10

2つの抗原を同時発現するアルファウイルスレプリコン粒子ワクチンを用いた複数の呼吸器系ウイルス病原体に対する免疫応答の刺激

アルファウイルス由来の構築物および上記教示内容、多数のさらなるバイリストロン性構築物を構築する（図5）。これらの構築物は、上記したウイルス、細菌、および/または真菌の病原体など、1つより多い呼吸器系病原体に由来するタンパク質をコードする遺伝子を含むことができる。このような構築物は、好ましくは、異種配列（抗原コード配列）の同時発現を行なう手段として、重複したサブゲノムプロモーターまたはIRES要素（既述）を使用することに基づく。

【0301】

本発明は、併用免疫原およびワクチンとして、さまざまな病原体由来の抗原をコードするこのような構築物を使用することを意図している。このような構築物の非限定的な例には、例えば、RSVのタンパク質をコードする遺伝子+PIVのタンパク質をコードする遺伝子（例えば、PIV HN+RSV F）、RSVのタンパク質をコードする遺伝子+ヒトメタニューモウイルスのタンパク質をコードする遺伝子（例えば、RSV G+HMPV G）、FLUのタンパク質をコードする遺伝子+SARSウイルスのタンパク質をコードする遺伝子（例えば、FLU HA+SARS スパイク）、SARSウイルスのタンパク質をコードする遺伝子+HMPVのタンパク質をコードする遺伝子（例えば、SARSスパイク+HMPV F）などを発現するアルファウイルスレプリコン構築物が挙げられる。このような物質の構築、製造、および試験は、上記した開示内容に基づき、当業者によって容易に行うことができる。 20 30

【0302】

アルファウイルスレプリコンベクターがPIV抗原（例えば、HN糖タンパク質）およびRSV抗原（例えば、F糖タンパク質）の両方を発現するよう構築されているPIV/RSV併用ワクチンを作製した。より具体的には、上記既述したレプリコンベクター構築物VCR-Chim2.1-HN_{PIV3}を、RSVのF糖タンパク質を同時発現するよう、さらに改変した。F糖タンパク質を、鑄型であるVCR-Chim2.1-F_{RSV}（これも上記した）と以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用い、標準的な条件下でPCRによって、アルファウイルスサブゲノムプロモーターとともに増幅した。

SGP-正方向

【0303】

【化19】

5'-ATATATATATGCGGCCGCTGGAGGGTTATTTGTGTGAC

（配列番号：33）

RSV F-逆方向

【0304】

【化20】

5'-ATATATATATCCGCGGCCGCTTAGTTACTAAATGCAATATTATTTATAC

（配列番号：34）

10

20

30

40

50

R S V の F 遺伝子に作動可能に結合したアルファウイルスサブゲノム接合部プロモーターを含む P C R フラグメントを N o t I で消化して、 V C R - C h i m 2 . 1 - H N _{P I} v ₃ (これも N o t I で消化し、アルカリホスファターゼで処理した) に連結して、バイシストロン性構築物の V C R - C h i m 2 . 1 - H N _{P I} v ₃ - S g p - F _{R S V} を作出した。

【 0 3 0 5 】

このバイシストロン性アルファウイルスレプリコンベクターを用いて、レプリコン粒子ベースの P I V / R S V 併用ワクチン調製物 (V E E / S I N - H N _{P I} v ₃ - S g p - F _{R S V} と命名) を作製し、適当な抗原特異的抗体を用いた免疫染色によって R S V F および P I V H N の両抗原の発現を確認した。

10

【 0 3 0 6 】

ここで、図 2 4 を見ると、レプリコンベクターによって 2 つの異種抗原が細胞内で発現することを示す、蛍光活性化細胞選別研究の結果が示されている。細胞を回収し、 C y t o f i x / C y t o p e r m (P h a r M i g e n # 5 5 4 7 2 2) で固定および透過処理して、二連のサンプルを、 R S V 特異的抗体 (ヤギ抗 R S V - F I T C 結合体、 C h e m i c o n I n t . より) または P I V 特異的抗体 (ハムスター抗 P I V 3 一次抗体、その後、ヤギ抗ハムスター - A l e x a 4 8 8 結合体、 M o l e c u l a r P r o b e s , I n c より) のいずれかとインキュベートした。図 2 4 は、バイシストロン性アルファウイルスレプリコンベクターからの P I V 3 H N および R S V F の発現を示している。

20

【 0 3 0 7 】

これらのレプリコン粒子ワクチン調製物は、上記したように、免疫原性および有効性について適当な動物モデルで評価することができる。

【 0 3 0 8 】

免疫原性組成物またはワクチン組成物として使用するために、本明細書に提示された教示内容に基づいて、呼吸器系病原体由来の他の抗原の組み合わせを、バイシストロン性構造物で同じように発現させることができる。

【 0 3 0 9 】

(実施例 2 1)

さまざまな抗原を発現するアルファウイルスレプリコン粒子の少なくとも 2 つの集団を含むワクチンを用いた複数の呼吸器系病原体に対する免疫応答の刺激

30

上記したような第 1 の呼吸器系病原体に由来する 1 つ以上のポリペプチド抗原をコードするレプリコンベクター粒子を、 1 つより多い疾患を予防するのに有用な免疫原性組成物として、上記したような第 2 の呼吸器系病原体に由来する 1 つ以上のポリペプチド抗原をコードするレプリコン粒子と組み合わせができる。このような併用ワクチンは、少なくとも 2 つのこのようなレプリコン粒子の集団、 3 つ以上のレプリコン粒子の集団、および 4 つ以上のレプリコン粒子の組み合わせなど、多岐にわたる異なった組み合わせを含むことが可能である。

【 0 3 1 0 】

さらに、本発明では、別々の呼吸器系ウイルス病原体の抗原をコードする少なくとも 2 つのレプリコン粒子を含む本発明の免疫原性組成物は、単一の抗原または複数の抗原 (例えれば、バイシストロン性、図 2 ~ 5 参照) を発現するレプリコン粒子を含むことも可能であると考える。非限定的な例には、例えれば、 R S V のタンパク質をコードする遺伝子 + P I V のタンパク質をコードする遺伝子 (例えれば、 P I V H N + R S V F) 、 R S V のタンパク質をコードする遺伝子 + ヒトメタニューモウイルスのタンパク質をコードする遺伝子 (例えれば、 R S V G + H M P V G) 、 F L U のタンパク質をコードする遺伝子 + S A R S ウィルスのタンパク質をコードする遺伝子 (例えれば、 F L U H A + S A R S スパイク) 、 S A R S ウィルスのタンパク質をコードする遺伝子 + H M P V のタンパク質をコードする遺伝子 (例えれば、 S A R S スパイク + H M P V F) などが挙げられる。

40

【 0 3 1 1 】

50

他の非制限的な例には、PIV-HNを発現するアルファウイルスレプリコン粒子+RSV-Fを発現するレプリコン粒子、PIV-HNを発現するレプリコン粒子+HMPV-Gを発現するレプリコン粒子、FLU-HAを発現するレプリコン粒子+SARS-Sを発現するレプリコン粒子、FLU-HAを発現するレプリコン粒子+HMPV-Gを発現するレプリコン粒子、SARS-Sを発現するレプリコン粒子+HMPV-Gを発現するレプリコン粒子、PIVのHNおよびFを同時発現するレプリコン粒子+RSVのGおよびFを同時発現するレプリコン粒子などを含む免疫原性組成物が挙げられる。このような免疫原性組成物は、適当な動物モデルにおいて、上記に詳述したように免疫原性および有効性について評価を行うことができる。

【0312】

10

特に、異なった呼吸器系病原体の抗原を発現するレプリコン粒子の少なくとも2つの集団の混合物を含む免疫原性組成物が、コードされた複数の抗原のそれぞれに対する強力な免疫応答を、干渉することなく誘導することを実証するため、本発明者らは、上記の2つのウイルス病原体由来のタンパク質を評価した。PIV/FLU混合ワクチン調製物を作製するため、FLU-HAを発現するVEE/SINレプリコン粒子を、PIV-HNを発現するVEE/SINレプリコン粒子と混合した(図18、19、および25)。

【0313】

この混合ワクチンによる抗体誘導を、FLU-HAのみ、またはPIV-HNのみを発現するレプリコン粒子によるヘッド・ツー・ヘッド(head-to-head)の動物実験で比較した。図18および25に示されているように、レプリコン粒子ベースのPIV/FLU混合ワクチンは、PIV-HNのみを発現するレプリコン粒子に匹敵するレベルでPIV特異的抗体を誘導した。同じPIV/FLU混合ワクチンも、FLU-HAのみを発現するレプリコン粒子に匹敵するレベルでFLU-HA抗体を誘導した(図19)。

20

【0314】

RSV-F糖タンパク質をコードするアルファウイルスレプリコン粒子(VEE/SIN-F_{RSV})、およびPIV3-HN糖タンパク質をコードするアルファウイルスレプリコン粒子(VEE/SIN-HN_{PIV3})の組み合わせを含む免疫原性ワクチン組成物を、上記したPIVおよびRSVの各ワクチン成分を用いて作製した。適当な抗原特異的抗体を用いて、RSV-FおよびPIV-HNの両抗原の発現を免疫染色により確認した。

30

【0315】

図24は、蛍光活性化細胞選別研究の結果を示しており、混合したレプリコンベクターによる細胞内での2つの抗原の発現を実証している。細胞を回収し、Cytofix/Cytoperm(PharMigen#554722)で固定および透過処理して、二連のサンプルを、RSV特異的抗体(ヤギ抗RSV-FITC結合体、Chemicon Int.より)またはPIV特異的抗体(ハムスター抗PIV3一次抗体、その後、ヤギ抗ハムスター-Alexa488結合体、Molecular Probes, Inc.より)のいずれかとインキュベートした。図24に示されたとおり、PIV3-HNもRSV-Fも、アルファウイルスレプリコンベースのPIV/RSV混合ベクターから発現した。

40

【0316】

これらのレプリコン粒子ワクチン調製物を、上記したように、免疫原性および有効性について適当な動物モデルで評価する。

【0317】

これらの結果は、ウイルスなどの呼吸器系病原体に対する混合ワクチンの土台として、アルファウイルスレプリコン粒子が有用であることを示している。呼吸器系病原体のその他の抗原も、本明細書に提示された教示内容に基づいて、免疫原性組成物またはワクチン組成物として利用するために、レプリコン粒子をこのように組み合わせて、同じように発現させることができる。

50

【0318】

さらに、図20に示されているとおり、このような混合ワクチンは、必ずしも、レプリコン粒子の混合物として同時送達する必要はない。むしろ、第1の抗原（本実施例ではSARSスパイク）を発現するレプリコン粒子を投与し、第2の抗原（本実施例ではFLU HA）を発現するレプリコン粒子で免疫することができ、FLU HAをコードするレプリコン粒子で無処理のマウスにワクチン接種したときと比較しても、第2のコードされた抗原に対する応答を阻害することはない。

【0319】

本明細書における数値範囲の記載は、単に、該範囲に含まれる各個の数値を個別に記載する簡略な方法として用いるものであり、別段の記載がない限り、各個の数値は、それぞれ個別に記載されているものとして本明細書に組み込まれる。本明細書に記載された方法はすべて、本明細書に別段の記載がないか、または、明らかに文脈上矛盾しない限り、任意の適当な方法で実施し得る。本明細書に記載されたいかなる例示、または例示的言語（例えば、「など」）の使用は、単に本発明をより分かりやすくするためのものであり、別途記載された発明の範囲に制限を付すものではない。

10

【0320】

本明細書に開示した発明の代替的要素または実施形態をグループ化したことを制限と解してはならない。各グループの構成要素を、個別に、または本明細書に記載されたグループの他の構成要素または他の要素とともに参照および記載することも可能である。便宜上および／または特許性の観点から、あるグループの1つ以上の構成要素を、あるグループに組み入れ得るか、または除き得ることも想定される。このような組み入れや削除が行われると、本明細書は、その改変されたグループを含むと見なされるため、本明細書において用いられるすべてのマーカッシュ（Markush）グループの記載を満たす。

20

【0321】

本発明の好適な実施形態が、発明者が認識する本発明を実施するための最良の形態を含め本明細書に記載されている。当然ながら、それらの好適な実施形態を変更することも、上記記載を読めば、当業者には明らかとなろう。本発明者らは、当業者が、適当な変更を採用することを予想し、また、本発明が、本明細書に具体的に記載された以外の方法で実施されることも意図している。したがって、本発明は、適用法令で認められているとおり、本明細書に記載された内容を改変したもの、およびそれと同等のものを含む。さらに、上記要素の任意の組み合わせで、それに対しあらゆる可能な変更が加えられたものも、本明細書に別段の記載がないか、または、明らかに文脈上矛盾しない限り、本発明に含まれる。

30

【図面の簡単な説明】

【0322】

【図1】アルファウイルスレプリコン粒子を作製するために用いられた代表的なアルファウイルスレプリコンベクターおよびパッケージング要素の一般的な配置を示す略図である。

【図2】1種以上のインフルエンザウイルス抗原をコードする代表的なアルファウイルスレプリコンベクターの略図である。

40

【図3】1種以上のパラインフルエンザウイルス抗原をコードする代表的なアルファウイルスレプリコンベクターの略図である。

【図4】1種以上の呼吸器系合胞体ウイルス抗原をコードする代表的なアルファウイルスレプリコンベクターの略図である

【図5】少なくとも2つの異なる呼吸器系ウイルス病原体から選択された抗原をコードする代表的なアルファウイルスレプリコンベクターの略図である。

【図6】アルファウイルスレプリコン粒子で免疫されたマウスにおけるFLU HA特異的抗体の力値を、従来型HAサブユニットワクチン抗原と比較して示すグラフである。

【図7】アルファウイルスレプリコン粒子で免疫されたマウスにおける（HI力値として測定された）FLU特異的中和抗体を、HAサブユニットワクチン抗原と比較して示すグ

50

ラフである。

【図8】F L U HA抗原を発現するS I Nレプリコン粒子およびV E E / S I Nレプリコン粒子のさまざまな投与量の免疫原性を比較するグラフである。

【図9】F L UのH AまたはN Aを発現するアルファウイルスレプリコン粒子で免疫した後の鼻腔内F L Uウイルス曝露からのマウスの防御を示すグラフである。

【図10】F L U HA抗原を発現するV E E / S I Nレプリコン粒子で免疫されたアカゲザルにおけるF L U中和抗体の誘導を示すグラフである。

【図11】重複サブゲノムプロモーターまたはI R E S要素を利用して、バイシストロン性のV E E / S I Nレプリコン粒子からのF L UのH AおよびN Aの二重発現を示すグラフである。

【図12】P I VのH N抗原を発現するレプリコン粒子で、I M、I N、またはI N後I Mによって免疫されたマウスにおけるP I V特異的抗体反応の誘導を示すグラフである。

【図13】H Nを発現するアルファウイルスレプリコン粒子の投与量を減らしながら免疫したマウスにおけるP I V抗体反応の誘導を示すグラフである。

【図14】アジュバント(M F 5 9またはL T K 6 3)とともに、またはアジュバントなしで、およびI Mによって、またはI N後I Mによって投与した場合、不活化P I Vワクチンで免疫されたマウスにおけるP I V特異的抗体反応の誘導を示すグラフである。

【図15】H Nを発現するV E E / S I Nレプリコン粒子、または、不活化P I Vワクチンによって、M F 5 9アジュバントとともに1回免疫したハムスターにおけるP I V抗体反応の誘導を実証するグラフである。

【図16】H Nを発現するV E E / S I Nレプリコン粒子、または、不活化P I Vワクチンによって、M F 5 9アジュバントとともに2回免疫したハムスターにおけるP I V抗体反応の誘導を実証するグラフである。

【図17】H N抗原を発現するV E E / S I Nレプリコン粒子、または、不活化P I Vワクチンによって、M F 5 9アジュバントとともに免疫した後の鼻腔内P I V曝露からハムスターが防御されたことを実証する表である。

【図18】アルファウイルスレプリコン粒子ベースのP I V / F L U混合ワクチンによる免疫後のP I V特異的抗体反応の誘導を示すグラフである。

【図19】アルファウイルスレプリコン粒子ベースのP I V / F L U混合ワクチンによる免疫後のF L U特異的抗体反応の誘導を示すグラフである。

【図20】S A R S - Sタンパク質を発現するアルファウイルスレプリコン粒子、およびF L UのH Aタンパク質を発現するアルファウイルスレプリコン粒子で順次免疫されたマウスにおける、S A R SおよびF L Uの特異的抗体反応の誘導を示すグラフである。

【図21】パネルAおよびBは、F L UのH AまたはN Aを発現するアルファウイルスレプリコン粒子を低投与量にして免疫した後の鼻腔内F L Uウイルス曝露からのマウスの防御を示すグラフである。

【図22】H A抗原およびN A抗原の両方を発現するアルファウイルスレプリコン粒子ワクチン調製物で免疫した後の鼻腔内F L Uウイルス曝露からのマウスの防御を表わすグラフである。

【図23】図23Aは、ハムスターにおける、P I V 3のH N抗原を発現するアルファウイルスレプリコン粒子ワクチンをI MまたはI Nによって投与した場合の免疫原性と、その結果得られた、これらワクチン投与された動物の、P I V 3ウイルスによる鼻腔内曝露からの完全な防御を示すグラフである。図23Bは、図23Aのグラフに示された結果を示す表である。

【図24】バイシストロン性アルファウイルスレプリコン粒子からのP I V 3 H NおよびR S V Fの二重発現、およびそれぞれ別個にP I V H NとR S V Fとを発現するレプリコン粒子を混合したものからのP I V 3 H NおよびR S V Fの二重発現を示すグラフである。

【図25】アルファウイルスレプリコン粒子ベースのP I V / F L U混合ワクチンによる免疫後のP I V特異的抗体反応の誘導を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図1】

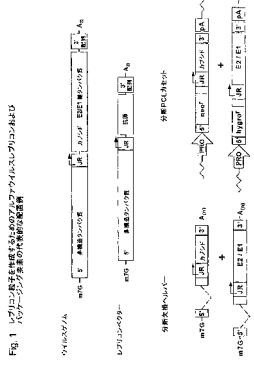


Fig. 1 レトロコンピュータを用いたアリゲーターPCRコンボキット

【図2】

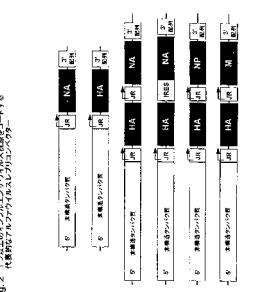


Fig. 2 レトロコンピュータを用いたアリゲーターPCRコンボキット

【図5】

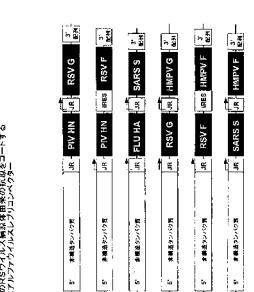


Fig. 5 レトロコンピュータを用いたアリゲーターPCRコンボキット

【図6】

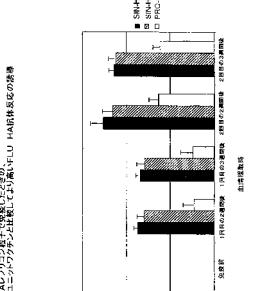


Fig. 6 SARS-CoV-2 spike protein geneの検出率を示す。陰性、陽性、不明の各検査結果の検出率を示す。

【図7】

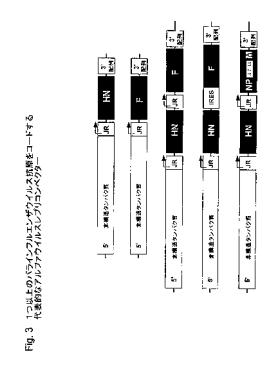


Fig. 3 レトロコンピュータを用いたアリゲーターPCRコンボキット

【図4】

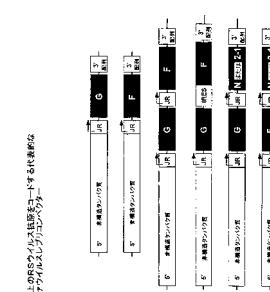


Fig. 4 レトロコンピュータを用いたアリゲーターPCRコンボキット

【図7】

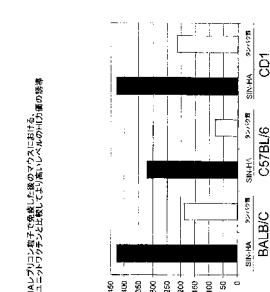


Fig. 7 SARS-CoV-2 spike protein geneの検出率を示す。

【図8】

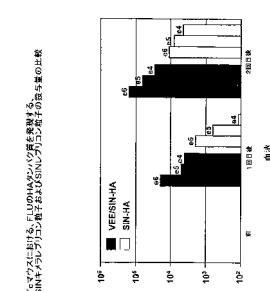


Fig. 8 SARS-CoV-2 spike protein geneの検出率を示す。陰性、陽性、不明の各検査結果の検出率を示す。

【図 9】

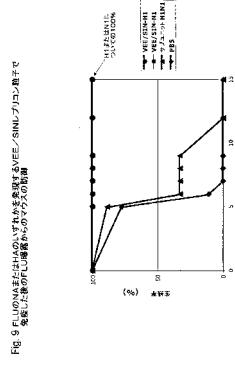


Fig. 9 VEE/SIN-PRV3-1NBSの量とVEE/SIN-PRV3-1NBSの量の関係

【図 10】

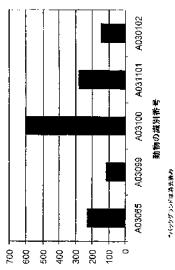


Fig. 10 VEE/SIN-PRV3-1NBSの量とVEE/SIN-PRV3-1NBSの量の関係

【図 13】

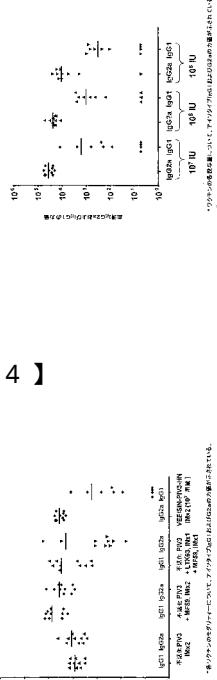


Fig. 13 VEE/SIN-PRV3-1NBSの量とVEE/SIN-PRV3-1NBSの量の関係

【図 14】

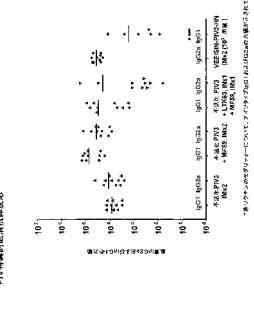


Fig. 14 VEE/SIN-PRV3-1NBSの量とVEE/SIN-PRV3-1NBSの量の関係

【図 11】

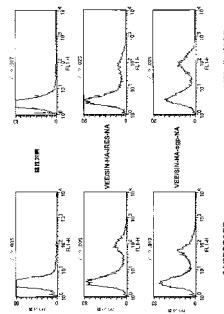


Fig. 11 VEE/SIN-PRV3-1NBSの量とVEE/SIN-PRV3-1NBSの量の関係

【図 12】

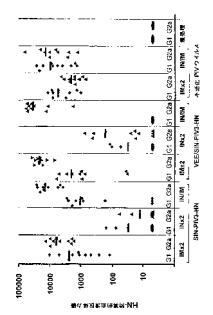


Fig. 12 VEE/SIN-PRV3-1NBSの量とVEE/SIN-PRV3-1NBSの量の関係

【図 15】

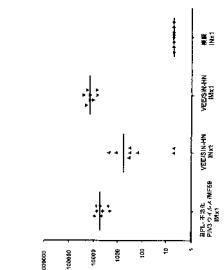


Fig. 15 VEE/SIN-PRV3-1NBSの量とVEE/SIN-PRV3-1NBSの量の関係

【図 16】

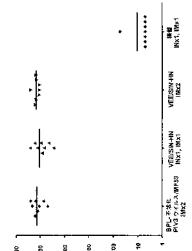
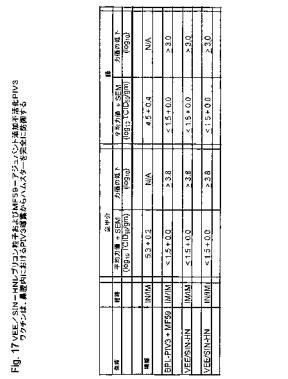
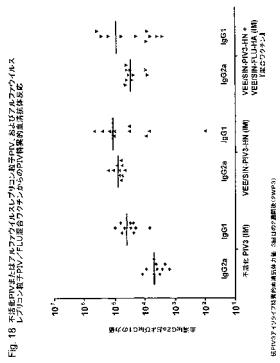


Fig. 16 VEE/SIN-PRV3-1NBSの量とVEE/SIN-PRV3-1NBSの量の関係

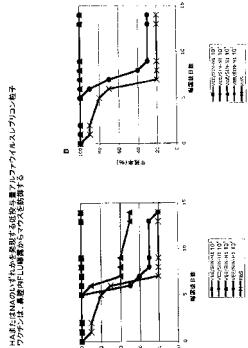
【 図 17 】



【図18】



【図21】



【 図 2 2 】

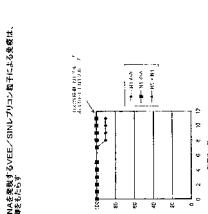
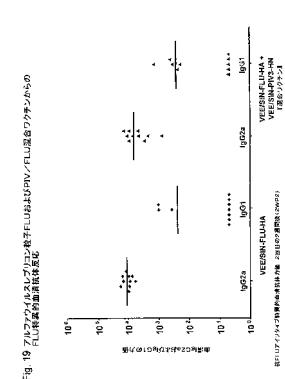
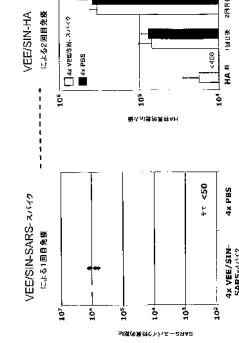


図 3-22 FLUORHAMMEL/ゼネラルエレクトリック社による検査は、
■ 超音波FLUOR検査からの断面をもたらす

【図19】



【図20】



【 図 2 3 】

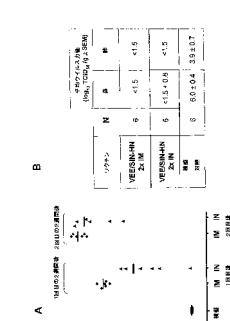
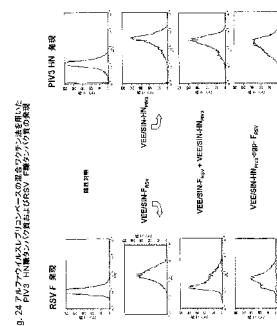
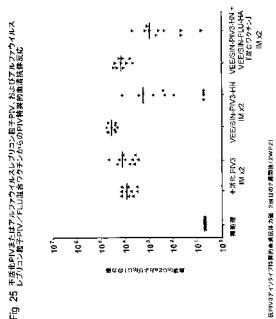


図 23 VEE/SIN-HuV-ブロッカウスによるVEEVとHNVとの完全な複合化を示す
ハムスターの免疫学的検定。複数のHNV導入群の完全な複合化を示す。

【図24】



【図25】



【配列表】

0004896021000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	39/21	(2006.01) A 6 1 K 39/21
A 6 1 K	39/04	(2006.01) A 6 1 K 39/04
A 6 1 K	39/05	(2006.01) A 6 1 K 39/05
A 6 1 K	39/09	(2006.01) A 6 1 K 39/09
A 6 1 K	39/102	(2006.01) A 6 1 K 39/102
A 6 1 K	39/10	(2006.01) A 6 1 K 39/10
A 6 1 K	39/104	(2006.01) A 6 1 K 39/104
A 6 1 K	39/07	(2006.01) A 6 1 K 39/07
A 6 1 K	39/39	(2006.01) A 6 1 K 39/39
A 6 1 P	11/00	(2006.01) A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	31/12	(2006.01) A 6 1 P 31/12
A 6 1 P	31/14	(2006.01) A 6 1 P 31/14
A 6 1 P	31/04	(2006.01) A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	31/06	(2006.01) A 6 1 P 31/06

(72)発明者 ペリ, シルビア

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608-2916, エミリービル, ホートン ストリート 4560

(72)発明者 ポロ, ジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608-2916, エミリービル, ホートン ストリート 4560

(72)発明者 ウエマツ, ヤスシ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エミリービル, ホートン ストリート 4560

(72)発明者 グリーア, キャサリン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エミリービル, ホートン ストリート 4560

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 國際公開第2002/099035 (WO, A1)

國際公開第2002/053757 (WO, A1)

米国特許第06008035 (US, A)

PUSHKO, P. et al., VIROLOGY, 1997年12月22日, Vol.239 No.2, pp.389-401

PUSHIKO, P. et al., JOURNAL OF VIROLOGY, 2001年, Vol.75 No.23, pp.11677-11685

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00-44

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)