

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-528271

(P2019-528271A)

(43) 公表日 令和1年10月10日(2019.10.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/275 (2006.01)	A 6 1 K 39/275	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
C 1 2 N 15/39 (2006.01)	C 1 2 N 15/39	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-508842 (P2019-508842)	(71) 出願人	515260184
(86) (22) 出願日	平成29年8月18日 (2017. 8. 18)		セメンティス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成31年4月12日 (2019. 4. 12)		オーストラリア国、ビクトリア州 380
(86) 国際出願番号	PCT/AU2017/050879		6、パーウィック、シング クレセント
(87) 国際公開番号	W02018/032057		9
(87) 国際公開日	平成30年2月22日 (2018. 2. 22)	(74) 代理人	100080791
(31) 優先権主張番号	2016903295		弁理士 高島 一
(32) 優先日	平成28年8月19日 (2016. 8. 19)	(74) 代理人	100136629
(33) 優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア (AU)		弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100174296
			弁理士 當麻 博文
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルスワクチン

(57) 【要約】

本発明は、チクングンヤ熱と天然痘の感染、ジカウイルスと天然痘の感染、及び/又はチクングンヤ熱とジカウイルスと天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物に関する。該組成物は、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムは、チクングンヤ熱ウイルスの26Sサブゲノムポリプロテイン及び/又はジカウイルスのPrMEをコードする核酸配列を含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

チクングンヤ熱とジカウイルスと天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、チクングンヤ熱ウイルスの 26S サブゲノムポリプロテインをコードする核酸配列、及びジカウイルスの P r M E ポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組成物。

【請求項 2】

チクングンヤ熱と天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、チクングンヤ熱ウイルスの 26S サブゲノムポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組成物。

10

【請求項 3】

ジカウイルスの感染と天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、ジカウイルスの P r M E ポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組成物。

【請求項 4】

前記弱毒化したボックスウイルスが、改変ワクシニアアンカラ (M V A)、N Y V A C、アビボックス、カナリアボックス及び鶏痘からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 5】

前記弱毒化したボックスウイルスが改変オルトボックスウイルスであり、前記改変が、内在的な必須の集合、成熟タンパク質をコードする遺伝子の欠失を含み、及び / 又は組成物の免疫原性を増大させる、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記改変が D 1 3 L 遺伝子の欠失を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記改変が K 1 L 遺伝子の欠失を含む、請求項 5 又は請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記改変が A 3 9 R 遺伝子の欠失を含む、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 9】

前記改変が B 7 R - B 8 R 遺伝子の欠失を含む、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記改変が D 1 3 L 遺伝子、A 3 9 R 遺伝子及び B 7 R - B 8 R 遺伝子の欠失を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記医薬的に許容される担体がアジュバントを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 12】

前記アジュバントが水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム、水酸化リン酸カルシウム、フロイント完全アジュバント、モンタナイド (登録商標)、フロイント不完全アジュバント、i s c o m s、i s c o m マトリクス、I S C O M A T R I X^{T M} アジュバント、M a t r i x^{M T M} アジュバント、M a t r i x^{C T M} アジュバント、M a t r i x^{Q T M} アジュバント、A b I S C O (登録商標) - 1 0 0 アジュバント、A b I S C O (登録商標) - 3 0 0 アジュバント、I S C O P R E P^{T M}、I S C O P R E P^{T M} 誘導体、I S C O P R E P^{T M} 又は I S C O P R E P^{T M} 誘導体を含むアジュバント、Q S - 2 1、Q S - 2 1 誘導体、及び Q S - 2 1 又は Q S 2 1 誘

50

導体を含むアジュバントからなる群から選択される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

チクングンヤ熱と天然痘、天然痘とジカウイルスの感染及び / 又はチクングンヤ熱と天然痘とジカウイルスの感染に対する、被検体における防御免疫応答を誘導する方法であって、前記方法が、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物を、被検体に投与することを含む、方法。

【請求項 14】

チクングンヤ熱と天然痘、天然痘とジカウイルスの感染及び / 又はチクングンヤ熱と天然痘とジカウイルスの感染に対する、被検体における防御免疫応答の誘導において使用するための医薬の調製における、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、チクングンヤ熱と天然痘、ジカウイルス (virus) と天然痘及び / 又はチクングンヤ熱とジカウイルスと天然痘に対する防御のための弱毒化したボックスウイルスベクターをベースとするワクチンに関する。

【背景技術】

【0002】

背景

20

本明細書における参考文献の書誌詳細は、本明細書の最後に列記されている。

【0003】

任意の既刊行物 (若しくはそれに由来する情報) に対する、又は公知である任意の事項に対する、本明細書における参照は、既刊行物 (若しくはそれに由来する情報) 又は公知な事項が、本明細書が関連する努力傾注分野における共通の一般的な知見の一部を形成するという、同意又は承認又は何らかの形の示唆としては解釈されず、またそう解釈すべきでない。

【0004】

本明細書において言及された全ての刊行物は、参照することにより、その全体が本明細書に取り込まれる。

30

【0005】

ボックスウイルス科は、コルドボックスウイルス亜科及びエントモボックスウイルス亜科の2つの亜科を含む。コルドボックスウイルス亜科は、ヒトに感染する種 (例えば、天然痘の病原体である天然痘ウイルス、牛痘ウイルス (1796年にジェンナーによって報告されたオリジナルの天然痘ワクチンを形成した)、ワクシニアウイルス (第二世代の天然痘ワクチンとして使用された) 及びサルボックスウイルス) を含むオルトボックスウイルス科、並びに例えば鶏痘及びカナリアボックスウイルス等の鳥類に感染する種を含むアピボックスウイルス科を含む、8つの属を含む。天然痘ワクチンにおける抗原としてのそれらの使用に加えて、「骨格」ベクターとして、組換えワクシニアをベースとしたウイルス及びアピボックスウイルスの使用における、多くの興味が存在する。オルトボックスウイルス科は、細胞質内ベクターとして、とりわけ、宿主の細胞質、及び細胞表面上に提示するために抗原をペプチドにプロセッシングする抗原プロセッシング経路に外来抗原を送達することが可能である。外来抗原を発現するようなベクターは、他のワクチン接種戦略による治療が難しいことが証明されている、例えばAIDS、結核、マラリア及びがん等の疾患のワクチンの開発において使用されている。

40

【0006】

コルドボックスウイルス亜科は、パラボックスウイルスにおける130kbから、アピボックスウイルスにおける300kb超までのサイズに亘る直鎖の二本鎖DNAゲノムを有し、宿主中のそれらの生活環は、宿主細胞の細胞質においてその全体を過ごす。ボックスウイルスは、特に、早期のmRNA合成に関与するプロセスに関しては、宿主細胞及び宿主細胞分子が

50

ら実質的に独立して活動する。しかしながら、宿主分子は、中期及び後期のウイルスによる転写の開始又は終結に使用されるようである。ボックスウイルスは、宿主のシグナル伝達経路を特異的に狙い、操作し、細胞内の条件をウイルスが複製できるようにさせる、構造的に多様な「宿主域の因子」を産生する。殆どのボックスウイルスは哺乳動物細胞に結合及び感染し得るが、その後の感染が許容される（感染性ウイルス粒子を産生することができる）か、許容されない（実質的に感染性ウイルス粒子を産生できない）かどうかは、関与する特定のボックスウイルスと特定の細胞の種類に依存する。現在のところ、ボックスウイルス-宿主の相互作用、特に宿主領域の遺伝子、及びどの因子がウイルスと細胞の増殖の両方を促進するための関係を調節するために必要であるかについての、分子レベルでの理解が比較的乏しい。宿主域の遺伝子の概説のために、その全体が本明細書に取り込まれるWerdenら、2008が参照され得る。

10

【0007】

天然痘ワクチンとしての使用及びその次にウイルスベクターとしての使用に関連するワクシニア株についての観察が、1960年代前半から今日に至るまで公表されている。天然痘ワクチンとして利用される株を含む、ワクシニアのある株は、ヒト細胞中で増殖することができ、それゆえ、例えばウイルス性脳炎の発症等の健康リスクを示す。より安全なワクチンを開発するための視点で、アンカラ由来ワクシニア株（「CVA」として言及される）が、非ヒト細胞中で500回超継代された。この過程の間に、ワクシニアゲノムは、オリジナルのCVAゲノムと比較して、少なくとも6か所の大きな欠失の発生を含み、実質的に変化した。改変ウイルスはヒトにおいてはより低い病原性であったが、なお防御免疫応答を起こすことが出来た。この弱毒化したワクシニアウイルスはMVA（改変ワクシニアアンカラ）として言及され、異なる継代数のウイルスが、遺伝子型及び表現型において異なることが見られたことから、継代数によっても分類される。しかしながら、515回の継代数によって、MVA515は遺伝子的に安定であることが理解された。1990年代初期に、例えばMVA572及びその誘導体MVA F6等のMVA株が、許容されない（ウイルスが増殖しないであろう）細胞において、高いレベルでワクシニアタンパク質及び異種の（組換え）タンパク質を発現できたことが観察され、それにより、例えばワクチン用又は治療の送達用の抗原をコードするもの等、目的の異種の分子用のベクターとしてのMVAを開発できるようになった。

20

【0008】

より最近では、MVAで公知の6か所の大きい欠失を、CVAに導入することによって、MVAの性質を有する改変ワクシニアウイルスを生成する試みがなされている。興味深いことに、これによってMVAの弱毒化した性質を有するウイルスは生じなかった。観察された低減は、宿主域の遺伝子が存在しないことで起きたのかもしれないと提唱されたが、このことは立証されていない（例えば、Meyerら、Journal of General Virology (1991) 72:1031-1038を参照）。

30

【0009】

ボックスウイルスは、大きい直鎖のdsDNAゲノム、増殖の細胞質での部位及び複雑なウイルス粒子形態によって特徴付けられる、ウイルスの一大ファミリーを構成する。ワクシニアウイルスは、このグループのウイルスの代表的なウイルスであり、ウイルスの形態形成に関して最も良く研究されている。ワクシニアウイルスのウイルス粒子は、「側体」が隣接する、壁に囲まれた、両凹形のコアを特徴とする、複雑な内部構造を有する「レンガ形」又は「卵形」の膜結合粒子として出現する。ウイルス粒子の集合経路には、未成熟なウイルス粒子(IV)に発達し、次いで成熟ウイルス粒子(MV)に発展する、クレセント(crescents)を含む膜の作製が関与する。70個超の特異的な遺伝子産物がワクシニアウイルスのウイルス粒子内に含まれており、50個超の特異的な遺伝子における変異のワクシニアウイルスの集合における影響がここで記載されている。

40

【0010】

ワクシニアウイルスは、その表面の膜と、宿主細胞の細胞膜との融合によって、細胞に侵入し、細胞質中にコア（及び側体）を放出し、ウイルスの転写プログラムを活性化する。ウイルス粒子コアは、早期のmRNAの合成及び修飾に必要な、ウイルスにコードされてい

50

る酵素を完全に補完するものを含む。早期遺伝子は、DNAの増殖に必要な酵素をコードしており、従って、早期遺伝子の発現がピークに達すると、「工場」と呼ばれる細胞質の部位におけるウイルスDNAの増殖が続いて起こる。早期遺伝子はまた、前提のウイルスDNAの増殖が開始した後、連続して中期及び後期の遺伝子が発現するよう、中期の転写因子をコードしており、及び中期の遺伝子は、今度は、後期の転写因子をコードしている。従って、ウイルス遺伝子を完全に補完するものは、クラス特異的な転写プロモーター及びウイルスにコードされる転写因子によって識別される早期、中期及び後期のクラスがある、時間的なカスケードで転写される。更に、増殖したゲノムのみが、中期及び後期の転写が可能な鋳型である。遺伝子のこれらの2つのクラスは、共にウイルス粒子構造タンパク質、ウイルス粒子酵素及び集合因子をコードしており、新しい子孫のウイルス粒子の集合に必要なものである。

10

【0011】

ウイルスが取り込まれた直後、密度が均一であり、時々、時間と共にサイズが増大する小胞体（ER）に由来する嚢によって囲まれている、早期発現の感染特異的細胞質領域が細胞内に形成される。これらの領域は、ウイルスDNAの増殖の部位を示し、しばしば「ウイルス工場」と呼ばれる。

【0012】

ウイルス工場内で、強固なクレセント形構造（三次元の杯状）を形成し、ウイルスの集合が開始する。高分解能の電子顕微鏡では、これらのクレセント形構造の外層は、「スピキュール（spicules）」と呼ばれる規則的間隔の突起からなる。クレセントは、長さが増大するようである一方で、それらが未成熟ウイルス粒子（IV）と呼ばれる、閉じた球状（三次元の球状）となるまで同じ曲率を維持する。IVは、密度が均一であるが周囲の工場よりも目に見えて電子密度が高い「ウイロプラズム（viroplasm）」物質で満たされている。IVが形成するにつれ、カプシド化したDNAの取り込みもまた起こる：これらは電子顕微鏡像において、「核様体」と呼ばれる、IV内における、電子密度が高い、円形又は卵型のサブドメインとして観察される。凝集したDNAの核様体を含むIVは、しばしば、「IVN」として言及される。タンパク質の切断による幾つかのウイルス粒子タンパク質前駆体の成熟が、IVNから成熟ウイルス粒子（MV）への形態形成に必要である。成熟ウイルス粒子の大部分は、工場の外側で見られ、工場の周辺の塊か又は最も近い工場から相当な距離によって隔てられているようである塊のいずれかの中で存在し得る。

20

30

【0013】

ボックスウイルスのウイルス粒子は、3つの感染性の形態：成熟ウイルス粒子（MV）、包装された（wrapped）ウイルス粒子（WV）及び細胞外ウイルス粒子（EV）で存在する。ウイルスの最も単純な形態であるMVは、コアの凹部を満たす側体が隣接する、両凹形のDNA含有コアを含む、膜でコートされた粒子である。通常、MVは、専ら細胞内で見られ、細胞溶解によってのみ解放される。WVは、トランス・ゴルジ嚢に由来する2つの追加的な脂質二重層によって囲まれている、MVからなる。外膜が特徴的なウイルスタンパク質を含むWVは、EVの前駆体であり、細胞内においても見られる。EVは、一番外側のWV膜と細胞膜との融合によってエキソサイトーシスされたWVからなり、それにより1つの追加的な膜の中に包装されたMVが放出される。一部のEVが細胞表面に付着しているのが見られる一方、幾つかのEVは細胞外の媒質中に遊離しているのが見られる。EVは、生物内でウイルスが拡散するために重要であると考えられている。

40

【0014】

チクングンヤ熱は、チクングンヤ熱ウイルスによって引き起こされる感染症である。それは、通常2～7日間続く突然の発熱、及び、典型的には数週間又は数か月、しかし時には数年続く関節痛を特徴とする。死亡率は1000人に1人くらいであり、高齢者が最も死亡する可能性が高い。

【0015】

ウイルスは、蚊によってヒトに感染する。ウイルスの動物における保有宿主としては、サル、トリ、ウシ、及びげっ歯類が挙げられる。これに対して、デング熱は霊長類のみが

50

宿主である。

【 0 0 1 6 】

予防の最善の方法は、疾患が一般的である国における蚊の全体的な防除と蚊に刺されるのを回避することである。しかしながら、この疾患からの防御を提供するワクチンが非常に望ましい。

【 0 0 1 7 】

ジカウイルス (ZIKV) は、フラビウイルス科のフラビウイルス (Flavivirus) 属のメンバーであり、デング熱及びチクングンヤ熱ウイルスも保有するネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) によって主に伝染する、+鎖のみの一本鎖 (single strand) RNAウイルスである。程度はより低い、ジカはまた、その分布が温帯域の奥にまで及ぶヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) によっても拡散され得る。

10

【 0 0 1 8 】

ジカウイルスは、1947年、ウガンダのジカの森のサルにおいて最初に発見され、このウイルスは最近まで科学的に興味を持たれているに過ぎなかった。感染した人の80%前後が症状を示さず、残りの人でも数日以内に消散する軽度の病気に過ぎなかった。元々、アフリカ及びアジアにおいて小規模な流行に留まっていたが、ウイルスは2007年に太平洋、ミクロネシアのヤップ島に広がっていった。2013年に、フランス領ポリネシアでの大流行によって28,000人が感染した。アメリカ大陸での最近の大流行は、ポリネシアから到達したと考えられている。ウイルスは、2014年のFIFAワールドカップ、又はポリネシア人の競技者が出場したカヌーレースの期間に、ブラジルに持ち込まれた可能性がある。それ以来、ウイルスはコロンビア、メキシコ、パラグアイ及びベネズエラを含む、ラテンアメリカの数か国に拡散した。

20

【 0 0 1 9 】

アフリカ及びアジアの2つのZIKV遺伝子系統がこれまでに記載されている。2015~2016年の間のブラジルの試料から単離された株は、アジア株、特にフランス領ポリネシア株の物 (those of) と似ていた (Barontiら、2014、Complete coding sequence of Zika virus from a French Polynesia outbreak in 2013. *Genome Announc* 2:e00500-e00514; Brasilら、2016、Zika virus outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical characterization, epidemiological and virological aspects. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004636; Fariaら、2016、Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* 352:345-349; Giovanettiら、2016、Zika virus complete genome from Salvador, Bahia, Brazil. *Infect Genet Evol.*)。

30

【 0 0 2 0 】

アフリカ系統MR766のZIKV標準株は、外膜タンパク質のASN 153/154の保存的なグリコシル化部位が欠失しており (Sirohiら、2016、The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, 352 (6284): 467-70の図3を参照)、MR766株において非グリコシル化Eタンパク質が生じるという点でアジア系統とは異なる。このグリコシル化の欠如は、ジカウイルスの感染性に影響しないようであるが、毒性において役割を担っている可能性があり、アジア株がMR766よりも毒性が強いようである理由を提供するかも知れないが、これまでにこのことは証明されていない。

40

【 0 0 2 1 】

SCVベースのワクチンの設計のために、これらのワクチンの抗原性配列はアジア系統を基にした。PrME (pr膜 + 外膜) ポリプロテイン配列を、ワクチンのワクチン抗原として使用した。

【 発明の概要 】

【 0 0 2 2 】

要旨

本発明者等は、そのゲノムがチクングンヤ熱ウイルスの26Sサブゲノムポリプロテイン及び/又はジカウイルスのPrMEをコードする核酸配列を含むように改変した弱毒化したポックスウイルスの使用により、チクングンヤ熱と天然痘の感染、ジカウイルスと天然痘の

50

感染、及び／又は（an/or）チクングンヤ熱とジカウイルスと天然痘の感染のリスクを低減する組成物が得られ得ることを見出した。

【0023】

従って、第一の態様においては、本発明は、チクングンヤ熱と天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、チクングンヤ熱ウイルスの26Sサブゲノムポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組成物を提供する。

【0024】

第二の態様においては、本発明は、ジカウイルスの感染及び天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、ジカウイルスのPrMEポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組成物を提供する。

10

【0025】

第三の態様においては、本発明は、チクングンヤ熱とジカウイルスと天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、チクングンヤ熱ウイルスの26Sサブゲノムポリプロテインをコードする核酸配列、及びジカウイルスのPrMEポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組成物を提供する。

20

【0026】

第四の態様においては、本発明は、チクングンヤ熱と天然痘、天然痘とジカウイルスの感染及び／又はチクングンヤ熱と天然痘とジカウイルスの感染に対する（against against）、被検体における防御免疫応答を誘導する方法であって、該方法が本発明の第一、第二又は第三の態様の組成物を、被検体に投与することを含む、方法を提供する。

【0027】

第五の態様においては、本発明は、チクングンヤ熱と天然痘、天然痘とジカウイルスの感染及び／又はチクングンヤ熱と天然痘とジカウイルスの感染に対する、被検体における防御免疫応答を誘導するための医薬の調製における、本発明の第一、第二又は第三の態様の組成物の使用を提供する。

30

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】SCV301A相同組換えカセット。

【図2】VACV-COPゲノムにおける相同組換えのためのF1及びF2標的。

【図3】SCV301AのCHIKV-26S挿入部位。

【図4】相同組換えによる、Ecogpt及びEGFPの欠失。

【図5】pTC29のプラスミドマップ。

【図6】欠失HRカセット。

【図7】B7R-B8R欠失HRカセット。

40

【図8】トランスドミナント選択を用いた相同組換えの作用方式（Method）。

【図9】ZIKR HRカセット。

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の詳細な説明

本発明は、特定の手順又は試薬、試薬の特定の製剤及び様々な医学的方法論に限定されず、それゆえ変形し得る。本明細書において用いられる専門用語は、特定の実施形態を記載する目的のためのものに過ぎず、限定されることを意図していない。特に定義しない限り、本明細書において用いられる全ての技術及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。

50

【 0 0 3 0 】

本明細書に記載されたのと類似するか又は同等である、任意の材料及び方法が、本発明を実施又はテストするために使用され得る。実施者は特に以下：Sambrookら（1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版）Cold Spring Harbor Press、Plainsview、N.Y.；Ausubelら（1999）Current Protocols in Molecular Biology（Supplement 47）John Wiley & Sons、New York；Murphyら（1995）Virus Taxonomy Springer Verlag:79-87、Mahy Brian WJ and Kangro O Hillar（編）：Virology Methods Manual 1996、Academic Press；及びDavison AJ and Elliott RM（編）：Molecular Virology、A practical Approach 1993、IRL Press at Oxford University Press；Perkusら、Virology（1990）179(1):276-86、又は当該技術分野の定義及び用語、並びに当業者に公知である他の方法を対象とする。

10

【 0 0 3 1 】

本明細書に記載されたのと類似するか又は同等である、任意の材料及び方法が、本発明の実施又はテストにおいて使用され得るが、好ましい方法及び材料について記載する。本発明の目的のために、以下の用語を以下において定義する。

【 0 0 3 2 】

本明細書を通して、文脈上別段の必要がない限り、文言「含む（comprise）」、「含む（comprises）」及び「含む（comprising）」は、記載した工程若しくは要素、又は工程若しくは要素のグループを包含するが、任意の他の工程若しくは要素、又は工程若しくは要素のグループを排除しないことを暗示することが理解される。従って、用語「含む（comprising）」等の使用は、列記された要素が必要又は必須であることを示すが、他の要素は任意選択であり、存在するか又はしない場合があることを示す。弱毒化したオルトボックスベクターの文脈においては、本発明のベクターは、必須な成熟又は集合遺伝子の欠失を含むことによって、弱毒化するように改変されるが、例えばベクター、抗原又はその他のタンパク質等に対する更なる改変が包含される。

20

【 0 0 3 3 】

「からなる（consisting of）」は、含むが、該「からなる（consisting of）」という表現に続くものには何でも限定されることを意味する。従って、表現「からなる（consisting of）」は、列記された要素が必要又は必須であることを示し、その他の要素が存在してはいけないことを示す。「から本質的になる（consisting essentially of）」は、該表現の後に列記した任意の要素を含み、列記した要素についての開示において特定された活性若しくは作用と干渉しないか、又はそれに貢献しない、他の要素に限定されることを意味する。従って、表現「から本質的になる（consisting essentially of）」は、列記された要素が必要又は必須であるが、他の要素は任意選択であり、それが列記した要素の活性又は作用に影響するかどうか依存して、存在するか、又は存在しない場合があることを示す。

30

【 0 0 3 4 】

本明細書において用いられる場合、単数形の「a」、「an」及び「the」には、文脈上明らかに別段の指示がない限り、複数の態様が含まれる。従って、例えば、「細胞（a cell）」に対する言及は、単一の細胞、及び2以上の細胞を含み；「生物（an organism）」に対する言及は、1の生物、及び2以上の生物を含む；等である。幾つかの実施形態においては、「an」は「1以上」を意味する。

40

【 0 0 3 5 】

本明細書において用いられる場合、「及び／又は」は、1以上の列記した関連する項目の任意及び全ての可能な組合せを指し、包含し、並びに、代替的なもの（or）と解釈される場合には組合せが無いことを指し、包含する。

【 0 0 3 6 】

本明細書において用いられる場合、「弱毒化」又は「弱毒化された」は、ウイルスベクターの毒性の低下を意味する。毒性は、特定の宿主において疾患を引き起こすウイルスの能力として定義される。感染性ウイルスを生成できないボックスウイルスベクターは、最

50

初は細胞に感染し得るが、実質的に、宿主内で自身を完全に複製できないか若しくは増殖できないか、又は病気を引き起こせない。このことは、該ベクターが宿主細胞の細胞質に、そのタンパク質又は核酸を送達するが、被検体に有害ではないので、望ましい。

【0037】

「調節エレメント」又は「制御配列」は、特定のボックスウイルスベクター、プラスミド又は細胞において、作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な核酸配列（例、DNA）を意味する。真核細胞に好適である制御配列としては、例えばプロモーター等の転写制御配列、ポリアデニル化シグナル、転写エンハンサー、例えば翻訳エンハンサー及び内部リボソーム進入部位（IRES）等の翻訳制御配列、mRNAの安定性を調節する核酸配列、並びに転写されたポリヌクレオチドにコードされる産物を、細胞内の細胞内区画若しくは細胞外の環境に向かわせるターゲティング配列が挙げられる。

10

【0038】

配列が提供される場合、対応する配列が包含される。「対応する（corresponds to）」、「対応する（corresponding）」又は「対応する（corresponding to）」は、参照核酸配列に実質的な配列同一性（例、参照核酸配列の全体又は一部に対して、少なくとも約50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、97、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%又は100%までもの配列同一性）を示す核酸配列、又は参照アミノ酸配列に実質的な配列類似性若しくは同一性（例、参照アミノ酸配列の全体又は一部に対して、少なくとも約50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、97、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%又は100%までもの配列類似性又は同一性）を示すアミノ酸配列を意味する。

20

【0039】

「有効量」は、病気を治療若しくは予防する文脈、又は標的抗原若しくは生物に対する免疫応答を調節することに関しては、一定量の薬剤（例、本明細書に記載された弱毒化したオルトボックスベクター）又はそれを含む組成物を、そのような治療又は予防の必要がある個人に対して、症状が生じるのを予防するため、そのような症状を抑制するため及び／又は存在するその病気の症状を治療するため、標的抗原若しくは生物に対する免疫応答を調節するために有効である、単回投与か又は連続投与の一部としてかのいずれかで投与することを意味する。有効量は、治療される個体の健康状態及び体調、治療される個体の分類群、組成物の製剤、病状の評価及びその他の関連する因子に依存して変動する。その量は、通常の試験によって決定し得る、相対的に広い範囲に収まることが期待される。

30

【0040】

本明細書において用いられる場合、用語「コードする（encode）」、「コードする（encoding）」等は、別の核酸又はポリペプチドを提供するための核酸の能力を指す。例えば、ポリペプチドを生成するために転写及び／若しくは翻訳され得る場合、又はポリペプチドを生成するために転写及び／若しくは翻訳され得る形態にプロセッシングされ得る場合、核酸配列は、ポリペプチドを「コードする（encode）」という。そのような核酸配列は、コード配列、又はコード配列及び非コード配列の両方を含み得る。従って、用語「コードする（encode）」、「コードする（encoding）」等としては、DNA分子の転写から生じたRNA産物、RNA分子の翻訳から生じたタンパク質、RNA産物を形成するためのDNA分子の転写及びその後のRNA産物の翻訳から生じたタンパク質、又はRNA産物を提供するためのDNA分子の転写、プロセッシングされたRNA産物（例、mRNA）を提供するためのRNA産物プロセッシングとその後のプロセッシングされたRNA産物の翻訳から生じたタンパク質が挙げられる。

40

【0041】

用語「内在的」は、通常、宿主生物内で見られる遺伝子又は核酸配列又は部分を指す。

【0042】

用語「発現可能」、「発現された」及びそれらの変形は、ヌクレオチド配列をRNAに転

50

写する、及び、任意選択で、生物学的又は生化学的機能をもたらすペプチド又はポリペプチドを合成するようにmRNAを翻訳する、細胞の能力を指す。

【0043】

本明細書において用いられる場合、用語「遺伝子」としては、任意選択で、mRNAを生成するために使用することができる核酸分子（このプロセスを補助するためのエレメントの追加を伴う）が挙げられる。遺伝子は、機能的なタンパク質を生成するために使用できるものであっても、できないものであっても良い。遺伝子は、コード領域及び非コード領域の両方（例、イントロン、調節エレメント、プロモーター、エンハンサー、終結配列、並びに5'及び3'非翻訳領域）を含み得る。

【0044】

用語「異種の核酸配列」、「異種のヌクレオチド配列」、「異種のポリヌクレオチド」、「異物のポリヌクレオチド」、「外来のポリヌクレオチド」等は、実験操作によって生物のゲノムに導入される任意の核酸（例、IRESを含むヌクレオチド配列）を指すように交換可能に使用され、導入された遺伝子が、改変前のウイルスゲノム配列に対して幾つかの改変（例、少なくとも1個のヌクレオチドの点突然変異、欠失、置換又は挿入、エンドヌクレアーゼ切断部位の存在、loxP部位の存在等）を含有する限り、その生物において見出される遺伝子配列が挙げられ得る。

【0045】

用語「異種のポリペプチド」、「異物のポリペプチド」及び「外来のポリヌクレオチド」は、上記の「異種の核酸配列」、「異種のヌクレオチド配列」、「異種のポリヌクレオチド」、「異物のポリヌクレオチド」及び「外来のポリヌクレオチド」によってコードされる、任意のペプチド又はポリペプチドを指すように交換可能に使用される。

【0046】

用語「防御免疫応答」は、チクングンヤ熱及びノ又は天然痘の感染のリスク又は重篤度を予防又は低減する免疫応答を意味する。

【0047】

好ましくは、本発明のボックスウイルスベクターは、哺乳動物細胞中で増殖する。本発明において使用され得る哺乳動物細胞の詳細は、相互参照により本明細書に取り込まれる、国際特許出願第PCT/AU2014/050330号の開示において提供される。

【0048】

幾つかの実施形態においては、哺乳動物細胞はヒト細胞、霊長類細胞、ハムスター細胞又はウサギ細胞である。

【0049】

細胞は単細胞であっても良く、液体培養、単層等として組織培養中で増殖させ得る。宿主細胞はまた、組織から直接的若しくは間接的に由来するものであっても良く、又は動物を含む生物内に存在しても良い。

【0050】

本明細書で考慮される場合、免疫応答を「誘導する」としては、免疫応答を誘発若しくは刺激すること、及びノ又は既に存在している免疫応答を増大することが挙げられることが理解されるであろう。

【0051】

本明細書において用いられる場合、用語「作動可能に結合された（operably connected）」又は「作動可能に連結された（operably linked）」は、並置であって、そう記述された構成要素が意図された様式で機能することを可能にする関係にある並置を指す。例えば、コード配列に「作動可能に連結された」転写制御配列は、転写制御配列に適合する条件下でコード配列の発現を可能にするための、コード配列に対する転写制御配列の配置及びノ又は方向付けを指す。別の例においては、オルトボックスウイルスのコード配列に作動可能に結合されたIRESは、オルトボックスウイルスのコード配列のキャップ非依存的な翻訳を可能にするための、オルトボックスウイルスのコード配列に対するIRESの配置及びノ又は方向を指す。

10

20

30

40

50

【0052】

本明細書において用いられる場合、用語「オープンリーディングフレーム」及び「ORF」は本明細書において交換可能に使用され、コード配列の翻訳開始コドンと終止コドンとの間にコードされたアミノ酸配列を指す。用語「開始コドン」（例、ATG）及び「終止コドン」（例、TGA、TAA、TAG）は、タンパク質合成（mRNA翻訳）の開始と鎖の終結をそれぞれ特定する、コード配列中の3つの隣りあったヌクレオチドの単位（「コドン」）を指す。

【0053】

本明細書において用いられる場合、用語「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」又は「核酸配列」（“nucleic acid sequence”）は、mRNA、RNA、cRNA、cDNA又はDNAを指す。典型的には、用語は、リボヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチドのいずれか又はいずれかの種類のヌクレオチドの改変型の、少なくとも10塩基長のヌクレオチドのポリマー形態を指す。用語には、RNA又はDNAの一本鎖及び二本鎖の形態が含まれる。

10

【0054】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」及び「タンパク質性分子」は本明細書において交換可能に使用され、アミノ酸残基のポリマー及びそれらの変異体及び合成類似体を含む又はそれからなる分子を指す。従って、これらの用語は、1以上のアミノ酸残基が、例えば対応する天然で生じるアミノ酸の化学類似体等の、合成により非天然で生じるアミノ酸である、アミノ酸のポリマーにも、天然で生じるアミノ酸のポリマーにも適用される。

20

【0055】

本明細書において用いられる場合、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」等に適用される、用語「組換え」は、本明細書に記載された宿主細胞又は無細胞系において転写及び/又は翻訳され得る、人工的な核酸構造体（即ち、複製しないcDNA若しくはRNA；又はレブリコン、自己複製するcDNA若しくはRNA）を意味することが理解される。組換え核酸分子又はポリヌクレオチドは、ベクター中に挿入しても良い。例えばプラスミド発現ベクター等の非ウイルスベクター、又はウイルスベクターが使用され得る。本発明による、ベクターの種類及び核酸コンストラクトの挿入技術は、当業者に公知である。本発明による、核酸分子又はポリヌクレオチドは、本発明によって記載された配置では、天然で生じない。換言すれば、異種のヌクレオチド配列は、親ウイルスゲノムのエレメント（例、プロモーター、ORF、ポリアデニル化シグナル、リボザイム）と自然に結合しない。

30

【0056】

本明細書において用いられる場合、用語「組換えウイルス」は、少なくとも1つの異種の核酸配列を含む「親ウイルス」への言及であると理解されるであろう。

【0057】

本明細書において用いられる場合、用語「配列同一性」は、比較のウィンドウ（window）上において、ヌクレオチドとヌクレオチドとに基づくか、又はアミノ酸とアミノ酸とに基づいて、配列が同一である、程度を指す。従って、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較のウィンドウ上において2つの最適に整列させた配列を比較することによって計算され、一致した位置の数を生成するために、同一な核酸の塩基（例、A、T、C、G、I）又は同一なアミノ酸残基（例、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys及びMet）が両方の配列中で見られる位置の数を決定し、比較のウィンドウ中の位置の合計数（即ち、ウィンドウのサイズ）によって、一致した位置数を除算し、配列同一性のパーセンテージを生成するために、その結果に100を乗算する。本発明の目的のために、「配列同一性」は、ソフトウェアに付属する参照マニュアルにおいて使用される通り、標準的な初期設定を用いて、DNASISコンピュータプログラム（ウィンドウズ用バージョン2.5；日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社、南サンフランシスコ、カリフォルニア州、USAから入手できる）により計算された「一致のパーセンテージ」を意味することが理解されるであろう。

40

50

【 0 0 5 8 】

用語「シグナル配列」又は「シグナルペプチド」(“signal peptide”)は、サイトゾルから、例、例えば核、ミトコンドリアのマトリクス及び小胞体等のある細胞小器官へ、翻訳と同時又は翻訳後にタンパク質の輸送を指示する短い(約3～約60アミノ酸長)ペプチドを指す。ERターゲティングシグナルペプチドを有するタンパク質については、典型的には、シグナルペプチドは、タンパク質がERに輸送された後に、シグナルペプチダーゼによって前駆体形態から切断され、生じたタンパク質は細胞内(例、ゴルジ体、細胞膜若しくは細胞壁)又は細胞外の部位へ、分泌経路に沿って移動する。本明細書において用いられる場合、「ERターゲティングシグナルペプチド」としては、ER膜を通してERのルーメンに、タンパク質の一部又は全部が挿入された後に、通常、酵素的に除去されるアミノ末端の疎水性配列が挙げられる。従って、配列のシグナル前駆体形態は、タンパク質の前駆体形態の一部として存在し得るが、一般的にはタンパク質の成熟形態には存在しないことが、当該技術分野において公知である。

10

【 0 0 5 9 】

「類似性」は、以下の表Aに記載された通りの、同一であるか又は保存的置換を構成する、アミノ酸数のパーセンテージを指す。類似性は、例えばGAP (Deverauxら、1984、Nucleic Acids Research 12:387-395)等の配列比較プログラムを使用して決定し得る。このように、本明細書で引用した配列に対して類似するか又は実質的に異なる長さの配列は、整列に挿入されたギャップにより比較され得、そのようなギャップは、例えばGAPによって使用される比較アルゴリズムによって決定される。

20

【 0 0 6 0 】

【表1】

表A：例示的な保存的アミノ酸置換

オリジナルの残基	例示的な置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln、His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn、Gln
Ile	Leu、Val
Leu	Ile、Val
Lys	Arg、Gln、Glu
Met	Leu、Ile、
Phe	Met、Leu、Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp、Phe
Val	Ile、Leu

30

40

50

【0061】

比較されるウィンドウを整列させるための配列の最適な整列は、コンピュータによるアルゴリズム (Wisconsin Geneticsソフトウェア・パッケージ・リリース7.0 (Genetics Computer グループ、575 Science Drive Madison, WI, USA) におけるGAP、BESTFIT、FASTA 及びTFASTA) の実行によってか、又は選択した様々な方法のいずれかにより生成された、検査 (inspection) と最適な (即ち、比較したウィンドウ上で最高の相同性のパーセンテージとなる) 整列によって、実行しても良い。例えば、Altschulら、1997、Nucl. Acids Res. 25:3389により開示されたように、BLAST系のプログラムをまた参照しても良い。配列分析についての詳細な検討は、Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons社、1994-1998、15章のユニット19.3において見出し得る。

10

【0062】

本明細書において交換可能に使用される用語「被検体」、「患者」、「宿主」又は「個体」は、治療又は予防が望まれる任意の被検体、特に、脊椎動物の被検体、よりいっそう具体的には哺乳動物の被検体を指す。本発明の範囲内に含まれる好適な脊椎動物としては、霊長類 (例、ヒト、サル及び類人猿、並びにマカク (*Macaca*) 属 (例、例えばカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 等のカニクイザル、並びに / 又はアカゲザル (*Macaca mulatta*) に由来するサルの種を含む)、及びヒヒ (チャクマヒヒ (*Papio ursinus*))、並びにマーモセット (マーモセット (*Callithrix*) 属の種)、リスザル (リスザル (*Saimiri*) 属の種) 及びタマリン (タマリン (*Saguinus*) 属の種)、並びに例えばチンパンジー (*Pan troglodytes*) 等の類人猿の種)、げっ歯類 (例、マウス、ラット、モルモット)、ウサギ目 (例、ウサギ、野ウサギ)、ウシ (bovines) (例、ウシ (*cattle*))、ヒツジ (ovines) (例、ヒツジ (*sheep*))、ヤギ (caprines) (例、ヤギ (*goats*))、ブタ (porcines) (例、ブタ (*pigs*))、ウマ (equines) (例、ウマ (*horses*))、イヌ (canines) (例、イヌ (*dogs*))、ネコ (felines) (例、ネコ (*cats*))、鳥類 (例、ニワトリ、七面鳥、アヒル、ガチョウ、例えばカナリア、セキセイインコ等のコンパニオンバード)、海洋哺乳動物 (例、イルカ、クジラ)、爬虫類 (ヘビ、カエル、トカゲ等)、並びに魚類を含む、脊索動物亜門 (subphylum Chordata) の任意のメンバーが挙げられるが、それらに限定されない。好ましい被検体は、病気の治療又は予防の必要があるヒトである。しかしながら、上記の用語が、症状が存在していることを意味するものでないことが理解されるであろう。

20

【0063】

用語「導入遺伝子」は、宿主生物のゲノムに人為的に導入されたか、又は導入されようとする、及びその宿主の子孫に伝達される、遺伝物質を記載するために本明細書において用いられる。幾つかの実施形態においては、それが導入される哺乳動物細胞若しくはオルトボックスベクターに所望の特性を与えるか、又は別の方法で、それが所望の治療若しくは診断の転帰を導く。

30

【0064】

本明細書において用いられる場合、用語「治療 (treatment)」、「治療する (treating)」等は、所望の薬理学的及び / 又は生理学的な効果が得られることを指す。該効果は、それらの疾患若しくは症状が完全に若しくは部分的に予防されるという観点で予防的であっても良く、及び / 又は疾患及び / 若しくは疾患に起因する悪影響が部分的若しくは完全に治癒されるという観点で治療的であっても良い。本明細書において用いられる場合、「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を網羅し、及び、以下：(a) 疾患に罹患しやすいかも知れないが、それを有しているとは未だ診断されていない被検体において、疾患が生じることを予防すること；(b) 疾患を阻害すること、即ち、その発症を阻止すること；及び(c) 疾患を緩和すること、即ち、疾患の退行を引き起こすことが挙げられる。

40

【0065】

生物、ポリペプチド又は核酸配列に関しての用語「野生型」、「天然型」、「ネイティブ」等は、その生物、ポリペプチド又は核酸配列が、天然で生じるか、又はヒトによって変化、変異若しくは他の方法で操作されていない、少なくとも1個の天然で生じる生物中

50

で入手できることである (that)。

【0066】

変異体としては、選択的なハイブリダイゼーションが、中程度若しくは高度なストリンジェンシーの条件下で達成され得るように、その全体若しくは部分で参照分子若しくはそれらの相補的な形態に十分に類似する核酸分子、又は少なくとも約15個のヌクレオチドを含む比較ウィンドウに亘って、参照のボックスウイルス宿主域の因子を定義するヌクレオチド配列に対して約60%~90%若しくは90~98%の配列同一性を有する核酸分子が挙げられる。好ましくは、ハイブリダイゼーション領域は、長さで約12~約18ヌクレオチド塩基以上である。好ましくは、特定のヌクレオチド配列と参照配列との間の同一性のパーセントは、少なくとも約80%、若しくは85%、又はより好ましくは、約90%以上、例えば約95%、96%、97%、98%、99%以上の類似である。80%と100%との間の同一性のパーセントが包含される。ヌクレオチド配列長は、その提唱された機能に依存する。ホモログが包含される。用語「ホモログ (homolog)」、「相同な遺伝子」又は「ホモログ (homologs)」は、他の種に由来するものを含む、機能的及び構造的に関連する分子を広く指す。ホモログ及びオルソログは、変異体の例である。

10

【0067】

核酸配列の同一性は、以下の様式で決定され得る。被検体の核酸配列は、プログラムBLASTMバージョン2.1 (Altschulら (1997) *Nucleic Acids Research*25:3389-3402に基づく) を使用して、例えばGenBankデータベース (ウェブサイト、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>、でアクセス可能)等の核酸配列データベースを検索するために使用される。プログラムは、ギャップ無しのモードで使用する。複雑度が低い領域に起因する、配列の相同性を除去するために初期フィルタリングを使用する。BLASTMの初期パラメーターが使用される。

20

【0068】

アミノ酸配列の同一性は、以下の様式で決定され得る。被検体のポリペプチド配列は、BLASTPプログラムを使用して、例えばGenBankデータベース (ウェブサイト、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>、でアクセス可能)等のポリペプチド配列データベースを検索するために使用される。プログラムは、ギャップ無しのモードで使用する。複雑度が低い領域に起因する、配列の相同性を除去するために初期フィルタリングを使用する。BLASTPの初期パラメーターが使用される。複雑度が低い配列に対するフィルタリングに、SEGプログラムを使用し得る。

30

【0069】

好ましい配列は、参照配列又はその相補的な配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするであろう。用語「ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」及びそれと文法的に等価なものは、定義された温度及び塩濃度の条件下で、標的の核酸分子 (例えばサザンブロット又はノザンブロット等の、例えばDNA又はRNAブロットにおいて固定された標的核酸分子等) にハイブリダイズする、核酸分子の能力を指す。約100塩基より長い核酸分子に関しては、典型的なストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、ネイティブの二重鎖の融点 (T_m) より低い、25 ~ 30 以下 (例えば、10) である (一般的には、Sambrookら (上記) ; Ausubelら (1999) を参照)。約100塩基より長い核酸分子の T_m は、式 $T_m = 81.5 + 0.41\% (G + C - \log (Na^+))$ によって計算し得る。100塩基より短い長さを有する核酸分子に関しては、例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、 T_m より 5 ~ 10 低い。

40

【0070】

本文脈における用語「欠失」は、標的遺伝子のコード領域の全部又は一部がないことである。該用語はまた、標的遺伝子の遺伝子発現をなくするか、又はコードされたタンパク質のレベル若しくは活性をなくするか若しくは実質的に下方制御する、変異又は形質転換の任意の形態を包含する。

【0071】

「遺伝子」に対する言及は、遺伝子のエキソン又はオープンリーディングフレームに対

50

応するDNAを含む。本明細書における「遺伝子」に対する言及はまた、以下：転写及び／又は翻訳調節配列及び／又はコード領域及び／又は非翻訳配列（即ち、イントロン、5'-及び3'-非翻訳配列）からなる、古典的なゲノム遺伝子；又は、コード領域（即ち、エキソン）並びに遺伝子の5'-及び3'-非翻訳配列に対応するmRNA若しくはcDNAを含むと解釈される。

【0072】

「制御エレメント」又は「制御配列」は、特定の宿主細胞において、作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な核酸配列（例、DNA）を意味する。原核細胞に好適である制御配列としては、例えば、プロモーター、並びに任意選択で、オペレーター配列及びリボソーム結合部位等のシス作用配列が挙げられる。真核細胞に好適である調節配列としては、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、転写エンハンサー、翻訳エンハンサー、mRNAの安定性を調節するリーダー又はトレイリング（trailing）、及び転写されたポリヌクレオチドにコードされる産物を細胞内の細胞内区画又は細胞外環境に向かわせるターゲティング配列が挙げられる。

10

【0073】

本改変哺乳動物細胞をもたらすために好適なキメラのコンストラクトは、制御配列に作動可能に連結した、オルトボックスの宿主域の因子をコードする核酸配列を含む。制御配列は、好適には、細胞内における発現に適合するであろう、転写及び／又は翻訳制御配列を含む。典型的には、転写及び翻訳を制御する制御配列としては、プロモーター配列、5'非コード領域、例えば転写制御タンパク質若しくは翻訳制御タンパク質の機能的な結合部位等のシス-制御領域、上流のオープンリーディングフレーム、リボソーム結合配列、転写開始部位、翻訳開始部位、及び／又はリーダー配列をコードするヌクレオチド配列、終止コドン、翻訳終結部位並びに3'非翻訳領域が挙げられるが、それらに限定されない。当該技術分野において公知である、構成的又は誘導性プロモーターが考えられる。プロモーターは、天然で生じるプロモーター、又は1超のプロモーターのエレメントを組合せるハイブリッドプロモーターのいずれであっても良い。

20

【0074】

考慮されるプロモーター配列は、哺乳動物細胞に対してネイティブであっても良く、又は代替的なソース（該領域が選択した生物内において機能的である）に由来しても良い。プロモーターの選択は、意図される宿主細胞によって異なるであろう。例えば、哺乳動物細胞における発現に使用され得るプロモーターとしては、とりわけ、例えばカドミウム等の重金属に応答して誘導し得るメタロチオネインプロモーター、 α -アクチンプロモーター、並びに例えばSV40ラージT抗原プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）即時早期（IE）プロモーター、ラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（Ad MLP）、単純ヘルペスウイルスプロモーター、及びHPVプロモーター、特にHPV上流調節領域（URR）等のウイルスプロモーターが挙げられる。これらのプロモーターは全て、当該技術分野において、良く記載されており、容易に入手可能である。

30

【0075】

エンハンサーエレメントはまた、哺乳動物のコンストラクトの発現レベルを増大するために本明細書において用いられ得る。例としては、例えばDijkemaら（1985）EMBO J. 4:761に記載されたSV40早期遺伝子エンハンサー、例えばGormanら（1982）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777に記載されたラウス肉腫ウイルスの長鎖末端反復（LTR）に由来するエンハンサー／プロモーター、及び例えばCMVイントロンA配列に含まれるエレメント等の、例えばBoshartら（1985）Cell 41:521に記載されたヒトCMVに由来するエレメントが挙げられる。

40

【0076】

キメラコンストラクトはまた、3'非翻訳配列を含み得る。3'非翻訳配列は、ポリアデニル化シグナル、及びmRNAプロセッシング又は遺伝子発現をもたらすことができる任意の他の制御シグナルを含む、DNA断片を含む、遺伝子の部分を指す。ポリアデニル化シグナ

50

ルは、mRNA前駆体の3'末端にポリアデニル酸トラクト(tracts)の付加をもたらすことを特徴とする。通常、ポリアデニル化シグナルは、標準的な形態である5' AATAAA-3'に対する相同性を有することによって認識されるが、変形型は珍しいものではない。好ましくは、3'非翻訳制御DNA配列は、約50~1,000 ntを含み、ポリアデニル化シグナルに加えて、転写及び翻訳終結配列、並びにmRNAプロセッシング又は遺伝子発現をもたらすことができる任意の他の制御シグナルを含み得る。

【0077】

幾つかの実施形態においては、キメラコンストラクトは、該コンストラクトを含む細胞の選択を可能にする選択的なマーカー遺伝子を更に含む。選択遺伝子は、当該技術分野において周知であり、目的の細胞内における発現に適合するであろう。

10

【0078】

一実施形態においては、オルトボックスの構造又は集合遺伝子の発現は、プロモーターの調節下にある。非限定的な一実施形態においては、プロモーターは、宿主細胞における重大な毒性が無く、ウイルスの増殖を維持するためのCP77の十分なレベルの発現に向かわせる、例えばヒトEF1アルファ(ヒト伸長因子1アルファ遺伝子プロモーター)、DHFR(ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子プロモーター)、又はPGK(ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子プロモーター)等の細胞内で構成的なプロモーターである。プロモーターはまた、例えば細胞内で誘導性のプロモーター等の誘導性であり得、MTH(メタロチオネイン遺伝子に由来)ウイルスプロモーターがまた、例えばCMV、RSV、SV-40及びMoU3等の哺乳動物細胞中で利用される。

20

【0079】

本発明は、チクングンヤ熱と天然痘ウイルスの感染に対する防御を誘導するためのワクチンとして使用し得る、弱毒化したボックスウイルスを含む組成物を提供する。本明細書において用いられる場合、用語「弱毒化」、「弱毒化した」等は、ウイルスベクターの毒性の低下を意味する。典型的には、毒性は、特定の宿主内で疾患を引き起こすウイルスの能力として定義される。例えば、感染性ウイルスを産生できないボックスウイルスは、最初は細胞に感染し得るが、宿主又は宿主細胞内で、実質的に、自身を完全に複製若しくは伝播できないか、又は疾患若しくは病気を起こすことができない。このことは、ボックスウイルスベクターが宿主又は宿主細胞に核酸を送達し得るが、典型的には、宿主又は宿主細胞に有害ではないので、望ましい。

30

【0080】

ボックスウイルス科には、コルドボックスウイルス亜科及びエントモボックスウイルス亜科の2つの亜科が含まれる。エントモボックスウイルス亜科が昆虫に感染する一方で、コルドボックスウイルス亜科は、ヒトに感染する種を含む、オルトボックスウイルス科を含む8属を含む。オルトボックスウイルス科としては、例えば、天然痘の病原体である天然痘ウイルス、1796年にジェンナーによって報告されたオリジナルの天然痘ワクチンを形成した牛痘ウイルス、及び第二世代の天然痘ワクチンとして使用されているワクシニアウイルスが挙げられる。アピボックスウイルス科のウイルスは、例えば鶏痘及びカナリアボックスウイルス等の、鳥類に感染する種を含む。天然痘ワクチンにおける抗原としてのそれらの用途に加えて、目的の異種遺伝子を送達及び/又は発現するためのベクターとしての、組換えの、ワクシニアをベースとしたウイルス及びアピボックスウイルスの用途における大きな関心がある。オルトボックスウイルス科は、細胞質内のベクターとして、宿主細胞質、及び細胞表面上に提示するために抗原をペプチドにプロセッシングする抗原プロセッシング経路に、異物の抗原を送達することができる。異物の抗原を発現している、そのようなベクターは、遺伝子治療における用途、並びに幅広い病気及び疾患のためのワクチンの開発に好適である。

40

【0081】

ボックスウイルスは、大きい直鎖のdsDNAゲノム、増殖する細胞質の部位及び複雑なウイルス粒子の形態によって、特徴付けられるウイルスの一大ファミリーを構成する。ワクシニアウイルスは、このグループのウイルスの代表的なウイルスであり、ウイルスの形態

50

形成に関して最も良く研究されている。ワクシニアウイルスのウイルス粒子は、「側体」が隣接する、壁に囲まれた、両凹形のコアを特徴とする、複雑な内部構造を有する、「レンガ形」又は「卵形」の膜結合粒子として出現する。ウイルス粒子の集合経路には、未成熟ウイルス粒子 (IV) に発達し、次いで成熟ウイルス粒子 (MV) に発展する、クレセントを含む膜の作製が関与する。70個超の特異的な遺伝子産物がワクシニアウイルスのウイルス粒子内に含まれており、50個超の特異的な遺伝子における変異のワクシニアウイルスの集合における影響が、ここで記述されている。

【 0 0 8 2 】

好適な弱毒化したボックスウイルスは、当業者に公知である。実例としては、弱毒化した改変ワクシニアアンカラ (MVA)、NYVAC、アビボックス、カナリアボックス及び鶏痘が挙げられる。従って、本明細書において開示された実施形態においては、弱毒化したボックスウイルスは、改変ワクシニアアンカラ (MVA)、NYVAC、アビボックス、カナリアボックス及び鶏痘からなる群から選択される。一実施形態においては、弱毒化したボックスウイルスは弱毒化したワクシニアウイルスである。ワクシニア株の実例は、コペンハーゲン (COP)、ウェスタンリザーブ (WR)、ワイス、ACAM2000、LC16m8及びコンノートラボラトリーズ (CL) である。

【 0 0 8 3 】

当業者によって、他のオルトボックスウイルス株が、弱毒化したボックスウイルスを産生するよう改変されても良いことが理解されるであろう。実例においては、弱毒化したボックスウイルスは、内在的な必須の集合 (endogenous essential assembly) 又は成熟タンパク質をコードする、ボックスウイルスのゲノム由来の遺伝子を改変する (例、欠失する、置換する、又は別の方法でその機能を破壊する) ことによって生成し得る。従って、本明細書に開示された実施形態においては、弱毒化したボックスウイルスは改変オルトボックスウイルスであって、該改変は、内在的な必須の集合又は成熟タンパク質をコードする遺伝子の欠失を含む、ウイルスである。

【 0 0 8 4 】

一実施形態においては、弱毒化したボックスウイルスは改変ワクシニアウイルスであり、該改変は、内在的な集合又は成熟タンパク質をコードする、ワクシニアウイルスゲノムの遺伝子の欠失 (又は別の方法でのその機能の破壊) を含み、該改変により、宿主細胞 (例、ヒト細胞) 中で増殖する (又は増殖し得る) ワクシニアベクターが、宿主細胞中で実質的に複製できない、弱毒化したワクシニアベクターに変換される。一実施形態においては、必須の内在的な集合又は成熟遺伝子は、COP-A2.5L、COP-A3L、COP-A4L、COP-A7L、COP-A8R、COP-A9L、COP-A10L、COP-A11R、COP-A12L、COP-A13L、COP-A14L、COP-A14.5L、COP-A15L、COP-A16L、COP-A17L、COP-A21L、COP-A22R、COP-A26L、COP-A27L、COP-A28L、COP-A30L、COP-A32L、COP-D2L、COP-D3R、COP-D6R、COP-D8L、COP-D13L、COP-E8R、COP-E10R、COP-E11L、COP-F10L、COP-F17R、COP-G1L、COP-G3L、COP-G4L、COP-G5R、COP-G7L、COP-G7L、COP-H1L、COP-H2R、COP-H3L、COP-H4L、COP-H5R、COP-H6R、COP-I1L、COP-I2L、COP-I6L、COP-I7L、COP-I8R、COP-J1R、COP-J4R、COP-J6R、COP-L1R、COP-L3L、COP-L4R及びCOP-L5Rからなる群から選択される。

【 0 0 8 5 】

好ましい実施形態においては、改変は、D13L遺伝子及び / 又はK1L遺伝子及び / 又はA39R遺伝子及び / 又はB7R-B8R遺伝子の欠失を含む。

【 0 0 8 6 】

更に好ましい実施形態においては、改変は、D13L遺伝子、A39R遺伝子及びB7R-B8R遺伝子の欠失を含む。

【 0 0 8 7 】

第一の態様においては、本発明は、チクングンヤ熱と天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、チクングンヤ熱ウイルスの26Sサブゲノムポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組

10

20

30

40

50

成物を提供する。

【0088】

第二の態様においては、本発明は、ジカウイルス感染及び天然痘感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、ジカウイルスのPrMEポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組成物を提供する。

【0089】

第三の態様においては、本発明は、チクングンヤ熱とジカウイルスと天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、チクングンヤ熱ウイルスの26Sサブゲノムポリプロテインをコードする核酸配列、及びジカウイルスのPrMEポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組成物を提供する。

10

【0090】

第四の態様においては、本発明は、チクングンヤ熱と天然痘、天然痘とジカウイルスの感染及び/又はチクングンヤ熱と天然痘とジカウイルスの感染に対する (against against)、被検体における防御免疫応答を誘導する方法であって、該方法が本発明の第一、第二又は第三の態様の組成物を、被検体に投与することを含む、方法を提供する。

【0091】

第五の態様においては、本発明は、チクングンヤ熱と天然痘、天然痘とジカウイルスの感染及び/又はチクングンヤ熱と天然痘とジカウイルスの感染に対する、被検体における防御免疫応答を誘導するための医薬の調製における本発明の第一、第二又は第三の態様の組成物の使用を提供する。

20

【0092】

本発明の好ましい形態においては、弱毒化したボックスウイルスは、ワクシニア、牛痘、改変ワクシニアアンカラ (MVA)、NYVAC、アビボックス、カナリアボックス及び鶏痘からなる群から選択される。弱毒化したボックスウイルスが、改変オルトボックスウイルスであって、該改変が内在的な必須の集合又は成熟タンパク質をコードする遺伝子の欠失を含むことが好ましい。該改変がD13L遺伝子の欠失を含み、好ましくは、K1L遺伝子の欠失を更に含むことが更に好ましい。

30

【0093】

ある実施形態においては、医薬的に許容される担体はアジュバントを含む。該アジュバントは、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム、水酸化リン酸カルシウム、フロイント完全アジュバント、モンタナイド (登録商標)、フロイント不完全アジュバント、iscoms、iscmマトリクス、ISCOMATRIXTMアジュバント、Matrix MTMアジュバント、Matrix CTMアジュバント、Matrix QTMアジュバント、AbISCO (登録商標) -100アジュバント、AbISCO (登録商標) -300アジュバント、ISCOPREPTM、ISCOPREPTM誘導体、ISCOPREPTM又はISCOPREPTM誘導体を含むアジュバント、QS-21、QS-21誘導体、及びQS-21又はQS21誘導体を含むアジュバントからなる群から選択されることが好ましい。

40

【0094】

本明細書において使用できる様々な実施形態について、以下の限定されない実施例によって更に説明する。

【実施例】

【0095】

実施例1

構築戦略の概要

SCV1002、単一ベクター化CHIK/ZIKAワクチンの構築に先立って、3つのSCVウイルスを構築した。EGFP及びEcogpt発現カセットと共に、CHIKV-26S発現カセットで、ワクシニアウイルス・コペンハーゲン株のA39R ORFを置換することによって、SCV301Cを構築した。SCV301Cから、EGFP及びEcogptカセットを欠失させることによって、SCV302を作製した。次

50

いで、SCV302からB7R-B8R ORF及びD13L ORFを欠失させることによって、SCV305 (SCV-CHIKワクチン) を作製した。最後に、ZIKV-prME発現カセットで、SCV302のB7R-B8R ORFを置換し、D13L ORFを欠失させることによって、SCV1002 (SCV-CHIK / ZIKAワクチン) を作製した。

【 0 0 9 6 】

SCV301C (VACV-CHIK) の構築

説明

SCV301C (CHIKV-26S) における、チクングンヤ熱ワクチンの抗原発現カセットは、直線配列の以下のエレメントからなる：

- ・ ワクシニア早期 / 後期プロモーター、
- ・ ポックスウイルス、毒性レユニオン株06_21の26SサブゲノムポリプロテインのCHIKVタンパク質コード配列、及び
- ・ ポックスウイルス早期転写停止配列。

【 0 0 9 7 】

発現した場合、CHIKVの26Sサブゲノムポリプロテインは、ウイルス粒子の形成に必要な個々の構造遺伝子にプロセッシングされるであろう。CHIKV全ゲノムが存在しておらず、サブゲノムRNAは5' UTR及び3' UTRを含まないので、転写されたウイルスRNAは、新たに形成されたウイルス粒子中にパッケージングされないであろう。本質的には、26Sサブゲノムポリプロテインの発現だけで、ウイルスゲノムRNAを欠く、ウイルス様粒子 (VLP) を生じさせるであろう。ワクチン接種により、VLP形成に繋がるサブゲノムポリプロテインのin vivoでの発現は、中和抗体を刺激する (CHIKVに対する (again) 予防的なワクチン接種のための免疫と重要な関係を有する) ために好都合であろう。

【 0 0 9 8 】

CHIKV-26S発現カセット中の26Sサブゲノムポリプロテインのアミノ酸配列は、新たな蚊ベクター用にその宿主域が広がるように遺伝的に変化させた、毒性レユニオン株に由来した (Genbankアクセッション番号：AM258992)。2005～2006年のレユニオンのエビデミックの間に、ウイルスは、そのベクター - 宿主の範囲がアジアトラカ (ヒトスジシマカ) に広がるように変異した。アジアトラカは、世界で最も速く拡散した蚊である。ヒトの周囲で生息することに極端に良く順応し、古タイヤ中で移動することが知られている。それは世界中の地方及び都市の緑化域において見られ、ヒト、家畜動物及び野生動物、並びに鳥類を、日中積極的に刺す。この蚊は、世界中にチクングンヤ熱を拡散させる潜在性を有している。CHIKV-26Sタンパク質コード配列の最終的なヌクレオチド配列の設計を、ポックスウイルス早期転写モチーフ「TTTTTNT」についてスクリーニングしたが、何も見出されなかった。ポックスウイルス早期転写停止配列TTTTTATを、終止コドンの直後に付加した。上記のCHIKV-26S発現カセットの配列は、配列番号1中に示されている。

【 0 0 9 9 】

SCV301Cを作製するために、以下の図1及び2に示す通り、相同組換えのために、VACV-COP A39R ORFの上流及び下流配列を標的とする、いずれも左及び右の相同組換えアームが隣接しているCHIKV-26S発現カセット、強化緑色蛍光タンパク質発現カセット、Ecogpt発現カセットからなる相同組換えカセットを、GeneArt GmbHにより合成した。表1は、SCV301A相同組換えカセットの特徴を列記しており、詳細な配列は配列番号2において提供される。

【 0 1 0 0 】

【表 2】

表 1: SCV301C 相同組換えカセットの特徴の表

エレメント	説明	サイズ	
A39R-F1アーム	A39R ORFの上流をターゲティングする相同組換えアーム1	501bp	
prPs	早期/後期ワクシニアウイルスプロモーター	44bp	
EGFP	強化緑色蛍光タンパク質のタンパク質コード配列	720bp	
T5NT	ワクシニアウイルス早期転写停止配列	7bp	
prPs	早期/後期ワクシニアウイルスプロモーター	44bp	10
Ecogpt	大腸菌のグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼタンパク質コード配列	459bp	
T5NT	ワクシニアウイルス早期転写停止配列	7bp	
prPs	早期/後期ワクシニアウイルスプロモーター	44bp	
CHIKV 26S	キャプシド、E3、E2、gp6K 及び E1 からなる CHIKV 26S ポリプロテインのタンパク質コード配列。Genbank アクセッション番号: AM258992 に由来する配列。	3747bp	
T5NT	ワクシニアウイルス早期転写停止配列	7bp	
A39R-F2アーム	A39R ORFの下流をターゲティングする相同組換えアーム2	501bp	20

【0101】

上記の図2に示した通り、F1とF2との間での相同組換えにより、A39R ORFをVACV-COPゲノムと相同な配列と置換することによって、ワクシニアウイルス・コペンハーゲン株 (VACV-COP) に、CHIKV-26S相同組換えカセットを挿入することで、SCV301Aを構築し、図3に示した挿入の構成を生じる。

【0102】

方法論

相同組換えによってSCV301C (VACV-CHIKV)を構築し、大腸菌グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) の発現用のボックスウイルス発現カセットと共に、VACVプロモーター (Chakrabartiら、1997)の調節下、CHIKV 26S構造ポリプロテイン (Genbankアクセッション番号: AM258992)を発現するボックスウイルス発現カセットからなる、GeneArt GmbHにより合成したCHIKV-26S相同組換えカセットで、VACVのA39R ORFを置換した。Smith (1993)のプロトコール6に記載され、Falknerら (1988) 及びBoyleら (1988) において公表された通りに、CHIKV-26S及びEcogpt発現カセットに隣接する相同組換えアームを、A39R ORFに隣接する配列と相同であるように設計して、相同組換え、及びEcogpt発現カセットの共挿入を有する組換えウイルスの正の選択を行った。簡易には、相同組換えは、VACV-COPを用いて、1時間1細胞当たり0.01 pfuの感染強度 (moi) で感染させ、続けてCHIKV-26S相同組換えカセットを用いたトランスフェクションを行った、BHK21細胞中で行った。次いで、感染/トランスフェクトした細胞を、全体的な細胞変性効果が見られるまで2~3日間インキュベートし、続けてウイルス抽出物を作製するために回収し、細胞溶解を行った。微量な親VACV-COPを除去するために、48WP中で限界希釈によって20ラウンド、ブラック精製を行い、A39R特異的なPCR分析によって評価したことを除き、Smith (1993)のプロトコール6に記載された通りに、BHK21細胞のMXHAT処理を使用して、Ecogpt薬剤選択によって、SCV301Cを正で選択した。次いで、ワクチン接種試験のためのSCV301Cのバッチが由来する、ウイルスシードのストックを作製するために、MXHAT処理なしでBHK21細胞中で候補クローンを増幅した。SCV301Cゲノムの配列は、配列番号3中に示す。

【0103】

参考文献:

Chakrabarti, S, Sisler, JR, and Moss, B (1997). Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. Biotechniques 23: 1094-1097 50

Smith, GL (1993) In: Davison, AJ and Elliotand, RM (編). Expression of genes by vaccinia virus vectors in "Molecular Virology a Practical Approach". IRL Press at Oxford University Press.

Falkner, FG, and Moss, B (1988). Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. J Virol 62: 1849-1854.

Boyle, DB, and Coupar, BE (1988). A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses. Gene 65: 123-128.

【 0 1 0 4 】

10

SCV305 (SCV-CHIK) の構築

SCV302を作製するためのEGFP / Ecogptレポーターカセットの欠失

説明

SCV305を構築するために、SCV301CからEGFP及びEcogpt発現カセットを欠失させ、A39R ORFに挿入されたチクングンヤ熱26Sポリプロテイン発現カセットのみを含む、組換えワクシニアウイルス・コペンハーゲン株、SCV302を作製する必要がある。以下の図4に示した通り、pTC29を用いた相同組換えにより、SCV301CからEcogpt / EGFPレポーター発現カセットを欠失させること、及び機能的なEcogpt発現を伴うウイルスをカウンターセクションすることにより、本ウイルスを構築した。

【 0 1 0 5 】

20

pTC29の説明

pTC29は、図4に示された通り、相同組換えによりSCV301CからEGFP及びEcogpt発現カセットを欠失させるために必要な相同組換えアーム、A39R-F1及びSCV301C-F2を含む、プラスミドクローンである。pTC29の詳細な配列は、配列番号4中に示し、プラスミドマップを図5に示す。

【 0 1 0 6 】

方法論

Smith (1993)のプロトコール7に記載され、Isaacsら(1990)において公表された通りに、相同組換えアームを、組換えVACV-CHIKゲノム内のEcogpt及びEGFP発現カセットに隣接する配列に相同であるように設計し、Ecogpt及びEGFP発現カセットを相同組換えにより、SCV301Cから除去し、Ecogpt発現に対するセクションに対応した(counter)。相同組換え後、コンタミネーションしているEcogptを発現するウイルス、即ち、オリジナルのSCV301Cに対して、カウンターセクションするために、6-チオグアニン (6-TG)存在下で、hrpt⁻細胞株中においてSCV302を更にブランク精製した。

【 0 1 0 7 】

参考文献：

Smith, G.L. (1993). Expression of genes by vaccinia virus vectors. In Molecular Virology a Practical Approach, A.J. Davison and R.M. Elliotand編(IRL Press at Oxford University Press), pp. 257-283.

Isaacs, S.N., Kotwal, G.J., and Moss, B. (1990). Reverse guanine phosphoribosyltransferase selection of recombinant vaccinia viruses. Virology 178, 626-630.

【 0 1 0 8 】

SCV305を作製するためのB7R-B8R及びD13Lの欠失

説明

SCV305は、D13L欠失相同組換え(HR)カセット(トランスドミナントCP77 / DsRed選択を用いたD13Lの欠失)及びB7R-B8R欠失相同組換え(HR)カセット(シアン / ゼオシントランスドミナント選択を用いたB7R-B8Rの欠失)を用いた、1回の相同組換え反応で、SCV302からD13L及びB7R-B8R ORFを同時に除去することによって、構築した。各カセットの詳細な構成は図6及び7に示し、詳細な配列は配列番号5及び配列番号6に示す。

50

【 0 1 0 9 】

【 表 3 】

表 2 : D13L 欠失 HR カセットの特徴の表

エレメント	説明	サイズ
D13L-F1	D13L-F1 欠失相同組換えアーム	1000bp
prCP77	CPXV-BR A25L プロモーター (早期プロモーター)	136bp
CP77	牛痘の CHO 宿主域のタンパク質 (BR-A25L ORF)	2007bp
T5NT	ワクシニアウイルス早期転写停止配列	7bp
prPs	ワクシニアウイルス早期/後期プロモーター	44bp
DsRed	DsRed-Express2 タンパク質コード配列	678bp
T5NT	ワクシニアウイルス早期転写停止配列	7bp
F1-Rpt	D13L-F1 アームの 3' 繰り返し配列	251bp
D13L-F2	D13L-F2 欠失相同組換えアーム	1000bp

10

【 0 1 1 0 】

【 表 4 】

表 3 : B7R-B8R 欠失 HR カセットの特徴の表

エレメント	説明	サイズ
B7R-F1	D7R-F1 欠失相同組換えアーム	1000bp
prPs	ワクシニアウイルス早期/後期プロモーター	40bp
AmCyanZeo	ゼオシン耐性タンパク質コード配列との、AmCyan 蛍光タンパク質融合	1059bp
T5NT	ワクシニアウイルス早期転写停止配列	7bp
F1-Rpt	B7R-F1 アームの 3' 繰り返し配列	305bp
B8R-F2	B8R-F2 欠失相同組換えアーム	1000bp

20

【 0 1 1 1 】

D13L 欠失を有するウイルスを選択するために、D13 タンパク質を発現している細胞株 : CHO + D13 (D13 タンパク質を発現している CHO 細胞株) 及び CHO + D13 + CP77 (D13 タンパク質及び CP77 タンパク質を発現している CHO 細胞株) を使用した。2つのそのような細胞株を利用する理由は、ウイルスによる CP77 の発現が CHO 細胞中における増殖を可能にし、それゆえ正の選択ツールとして使用されたからである。CP77 / DsRed 発現カセットでの D13L ORF の置換によって、CHO-D13 細胞中における D13L 欠失ウイルスの増幅が可能となり、感染させた細胞の赤色蛍光により確認し得る。D13L 欠失が確認された後、ウイルスによる CP77 の発現がもはや必要でなくなった際に、CP77 / DsRed レポーターカセットを欠失させるために、本カセットを欠失させるように分子内組換えを設計した。これは、D13 タンパク質だけでなく、ウイルスが発現する CP77 をリダグダントにする CP77 タンパク質も発現する、CHO + D13 + CP77 中の D13L 欠失ウイルスを増幅させること、及び図 4 に例示した分子内組換えによってその除去を可能にすることにより行った。

30

【 0 1 1 2 】

B7R-B8R 欠失を有するウイルスを選択するために、ゼオシン耐性 / シアン蛍光レポーターカセットを使用して、相同組換えによりこれらの ORF を置換した。ゼオシン / シアンカセットの挿入は、感染の間、ゼオシン中で細胞を培養すること、及びシアン蛍光細胞について選択することによって、正で選択した。一旦、B7R-B8R の欠失を確認したら、図 8 に例示したように、分子内組換えによる本レポーターの除去を、感染の間、ゼオシン非存在下で開始した。

40

【 0 1 1 3 】

D13L 及び B7R-B8R を同時に欠失させるための実験ストラテジーは、(i) CHO + D13 細胞中で、D13L 欠失 HR カセット及び B7R-B8R HR カセットを用いた、SCV302 の相同組換え、(iii) ゼオシンを用いて処理した CHO + D13 細胞中で、SCV305 を増幅させること、(iii) 純粋なダブルノックアウトクローンが単離されるまで、シアン及び赤色の蛍光を共に発する、個別

50

に感染させた細胞を単離すること、次いで(iv) ゼオシン処理せずにCHO + D13 + CP77細胞を感染させること、及び(シアン及び赤色に関して)無蛍光の感染させた細胞を単離することによって、両方のレポーターカセットの除去を開始することにより行った。

【0114】

ウイルス中間体の混入がないと同定された、標的ORFが欠失したクローンを、PCR及びシーケンシング分析により確認した。A39R ORF内のCHIKV-26S発現カセットの存在を、PCR及びシーケンシング分析により更に確認し、CHIKVタンパク質の発現を、ウェスタンブロット分析により確認した。SCV305の全体的な弱毒化は、ワクシニアウイルスを許容する細胞株における感染性試験によって確認した。

【0115】

方法論

D13欠失HR及びB7R-B8R欠失HRカセットは両方とも、GeneArt GmbHによって合成した。SCV305 (SCV-CHIK)を生成するために、相同組換えにより、SCV302からD13L ORF及びB7R-B8R ORFを欠失させ、ゼオシン存在下で、D13タンパク質のみを発現しているCHO細胞(CHO-D13)の感染によって、成功した欠失の正の選択を行った。CHOは、VACV感染を許容しないので、牛痘ウイルスのCHO宿主域タンパク質CP77をコードする発現カセットで、D13L ORFを置換することによって、D13L欠失ウイルスについて正の選択を成し遂げた。SCV302内のD13L ORFに隣接する配列に相同な、左及び右の組換えアームが隣接する、CP77発現カセット及びdsRed蛍光タンパク質の発現カセットからなる相同組換えプラスミドを構築した。CP77を発現しているVACVはCHO中で溶解性のブラークを形成しないので、dsRed発現カセットを付加した；それゆえ、感染は赤色蛍光の存在によってモニタリングした。D13L ORFを置換したCP77及びdsRed発現カセット、並びにB7R-B8R ORFを置換したAmCyanZeo発現カセットの除去を補助するために、左の相同組換えアームの繰り返し配列を、両方の相同組換えカセット内部の、CP77及びdsRed発現カセットの下流、並びにAmCyanZeo発現カセットの下流であるが、右の相同組換えアームの上流においた。相同組換えは、予め1細胞当たり0.01 PFUのMOIでVACV-CHIKを感染させたCHO-D13に、D13L及びB7R-B8Rを欠失させる相同組換えカセットを、トランスフェクトすることによって行った。ゼオシンを用いて処理したCHO-D13中においてウイルスを増幅させることによって、相同組換えの感染からSCV305を濃縮し、増幅したウイルスを用いて、ゼオシン処理した新鮮なCHO-D13細胞のセットを感染させた。これらの感染させた細胞を回収し、FACS Aria Fusionフローサイトメーター (BD Biosciences)を使用して、ゼオシンで処理し培養したCHO-D13細胞を含む、96ウェルプレートのうちの1ウェルに、1細胞の赤色及びシアン蛍光細胞が播種されるように、TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific)の消化により単一細胞の懸濁液とし、次いで単一細胞を選別した。次いで、赤色及びシアン蛍光の感染の焦点(foci)が、96ウェルプレートのウェルのいずれにおいても観察できるようになるまで、赤色/シアン蛍光細胞を播種した96ウェルプレートを、37 °C / 5% CO₂でインキュベートした。感染の単一の焦点を含むウェルを回収し、単細胞選別及び、ゼオシンを用いて処理した新鮮なCHO-D13細胞の96ウェルプレート中への播種の前に単一細胞の懸濁液として再懸濁した。オリジナルのSCV302を含む微量なコンタミネーションを除去し、クローンのSCV305を生成するために、この単細胞選別過程を5回繰り返した。クローン化で精製したSCV305の多くの候補を、ゼオシン処理したCHO-D13細胞中で増幅し、SCV302のコンタミネーションの存在について、並びにCP77及びdsRed発現カセットによるD13Lの置換、及びAmCyanZeo発現カセットでのB7R-B8Rの置換を確認するために、次いでPCR分析によってテストした。次いで、CP77のウイルス発現に依存する必要はもはやなく、ゼオシン非存在下における、ゼオシン耐性タンパク質の発現の必要をもはや要しないので、左の相同組換え配列とその繰り返し配列との間の分子内組換えを促すために、最適なクローンをCHO + D13 + CP77株 (CP77及びD13タンパク質の両方を発現している)中で増幅し、SCV305からCP77及びdsRed発現カセット、並びにAmCyanZeo発現カセットを欠失させた。TrypLE Selectを用いた消化により、感染させたCHO + D13 + CP77細胞を単一細胞懸濁液とし、FACS Aria Fusionフローサイトメーターを使用して細胞を選別し、そこでは非蛍光細胞をバルクで選別し、保持した。CHO+D13+CP77細胞の進行性

10

20

30

40

50

のスケールアップ感染により、シードストックを作製するために、SCV305ウイルスを更に増幅した。SCV305の全ゲノム配列は配列番号7中に示す。

【 0 1 1 6 】

SCV1002 (SCV-CHIK / ZIKA) の構築

説明

SCV1002は、以下の特徴：

- ・ SCV-CHIKV-26S-サブゲノム発現カセット (CHIKV-26S) でのA39R ORFの置換
- ・ SCV-ZIKV-prME発現カセットでのB7R-B8R ORFの置換
- ・ D13 ORFの欠失

からなる、チクングンヤ熱及びジカウイルスの単一ベクター化された多価ワクチンである。

【 0 1 1 7 】

SCV1002は、ジカウイルスprMEポリプロテイン発現カセット (casstte) で、SCV302のB7R-B8R ORFを置換すること、及びD13L ORFを欠失させることにより、構築した。ジカウイルスprME発現カセットの詳細な配列は配列番号8中に示し、prME配列はブラジル株のZikaSPH2015 (Genbank : KU321639) に由来する。図10に示すように、GeneArtにより、ZIKV-prME相同組換え (HR) カセットを合成し、その詳細な配列は配列番号9中に示す。

【 0 1 1 8 】

【 表 5 】

表 4 : ZIKV prME HR カセットの特徴の表

エレメント	説明	サイズ
B7-F1 アーム	B7R ORF に隣接する相同組換えアーム	1000bp
T5NT	BFPzeo 発現カセットのボックスウイルス早期転写停止配列	7bp
BFPzeo	青色蛍光タンパク質及びゼオシン不活性化酵素の融合タンパク質のタンパク質コード配列	1071bp
prPs	BFPzeo 発現カセットのワクシニアウイルス早期/後期プロモーター	40bp
F1-Rpt アーム	F1 アームの繰り返し配列	301bp
prPs	ワクシニアウイルス早期/後期プロモーター	40bp
prME ポリプロテイン	prME ポリプロテイン配列のタンパク質コード配列。該配列は Genbank : KU321639 (ブラジル株 ZikaSPH2015) に由来した。	2076bp
T5NT	ZIKV-PrME 発現カセットのボックスウイルス早期転写停止配列	7bp
B8-F2 アーム	B8R ORF に隣接する相同組換えアーム	1000bp

【 0 1 1 9 】

方法論

SCV1002 (SCV-CHIK / ZIKA) は、ZIKV prME (ブラジル分離株ZikaSPH2015、Genbank : KU321639) についてのボックスウイルス発現カセットでB7R-B8R ORFを置換すること、及び相同組換えによりD13L ORFを欠失させることにより構築した。B7R-B8R ORFを置換することにより、ZIKV prME発現カセットを挿入するために、以下：(i) B7R遺伝子の下流のF1相同組換えターゲティング配列、(ii) ゼオシン耐性タンパク質 (BFPzeo) と融合させた青色蛍光タンパク質のタンパク質コード配列に作動可能に連結された、ワクシニアウイルス早期/後期プロモーターからなり、ボックスウイルス早期転写停止配列で終わっている発現カセット、(iii) F1相同組換えアームの繰り返し、(iv) ZIKV prMEのタンパク質コード配列に作動可能に連結したワクシニアウイルス早期/後期プロモーターとそれに続くボックスウイルス早期転写停止配列からなる発現カセット、及び最後に(v) B8R遺伝子の下流のF2相同組換えターゲティング配列、のエレメントからなる相同組換えカセットをGeneArt GmbHにより合成した。SCV305 (SCV-CHIK) の構築において記載した通り、D13L ORFを除去した。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 0 】

予め1細胞当たり0.01 PFUのMOIで、SCV302を用いて感染させたCHO + D13細胞に、ZIKV prME HRカセット及びD13L欠失HRの両方をトランスフェクトすることにより、相同組換えを行った。結果として得られたSCV1002は、ゼオシン(ThermoFisher Scientific)存在下でCHO + D13細胞中でウイルスを増幅させることにより、相同組換え感染から濃縮し、続けてゼオシン存在下で増幅させたウイルスを用いて、新鮮なCHO+D13細胞のセットの2回目の感染を行った。FACSAria Fusion フローサイトメーター (BD Biosciences)を使用して、CHO+D13細胞を含む、96ウェルプレート1ウェルに、単一の青色及び赤色蛍光細胞が播種されるよう、これらの感染させた細胞を回収し、TrypLE Select消化により、単一細胞の懸濁液とし、次いで単一細胞を選別した。ゼオシン存在下でのインキュベーション後、単一細胞を選別し、96ウェルプレート中への新鮮なCHO+D13細胞の播種の前に、単一の青色及び赤色蛍光の感染の焦点 (focus) を含むウェルは、回収し、単一細胞の懸濁液として再懸濁した。オリジナルのSCV302の微量なコンタミネーションを除去し、クローン化したSCV1002を生成するために、ゼオシン存在下でのこの単一細胞の選別及び培養を5回繰り返した。クローン化で精製した幾つかのSCV1002を、ゼオシン非存在下でCHO+D13+CP77細胞中で増幅し、B7R-B8R遺伝子座へのZIKV prMEの挿入、A39R遺伝子座におけるCHIK 発現カセットの保持、及びSCV302のコンタミネーションが存在しないことを確認するために、次いでPCR分析に供した。F1 相同組換え配列とF1繰り返し配列との間での分子内組換えを促すために、ゼオシン非存在下のCHO+D13+CP77細胞中でクローンを増幅し、BFPzeo及びDsRed/CP77発現カセットの両方を欠失させた。これらの培養の単一細胞の懸濁液をバルクで選別し (FACSAria)、非蛍光細胞を保持した。挿入の保持、及びBFPzeo、DsRed/CP77の喪失、並びにD13L ORFの欠失を確認するために、PCRを繰り返した。SCV1002ワクチンストックを、CHO-D13+CP77細胞中で調製し、力価を測定した (titred)。SCV1002ゲノム全体の配列は配列番号10中に示す。

10

20

【 0 1 2 1 】

実施例2

SCV305を用いたワクチン接種は、ECTVから防御する

数群の6~8週齢の雌性のC57BL/6マウスに、SCV305を用いて腹腔内にワクチン接種するか (10^5 、 10^6 、 10^7 PFU)、又はPBSを用いて疑似のワクチン接種をした (1群当たりn=5マウス)。特異的な抗ワクシニアウイルスIgGレベルを、エンドポイントのELISAによって決定した。SC305を用いたワクチン接種では、類似の用量のワクシニアウイルス (VACV) のワクチン接種で得られたものと、類似の、相当量の特異的な抗ワクシニアウイルス抗体の力価が提供されることが観察された。

30

【 0 1 2 2 】

4週間後、マウスに致死用量 (50 LD_{50}) のマウスボックスウイルス、エクトロメリア (ECTV) を投与した。ECTVは、マウスに対して非常に感染性があり、天然痘がヒトにおいて引き起こすのと同じ症状をマウスにおいて引き起こす。

【 0 1 2 3 】

10^7 、 10^6 及び 10^5 PFUのSCV305又は 10^5 PFUのVACVを用いてワクチン接種したマウスは、体重減少、臨床症状及び致死率に対して、類似のレベルの防御を示した。複数の器官にECTVが行き渡ることまた、ワクチン接種した全てのマウスにおいて予防された。これらの結果は、SCV305を用いた単回のワクチン接種によって、致死的なボックスウイルスの投与からの完全な防御が提供されることを示しており、このことは、SCVが天然痘ワクチンとしての有用性を保持していることを示唆している。

40

【 0 1 2 4 】

SCV305を用いた単回のワクチン接種は、堅固で持続的な抗チクングンヤ熱ウイルス抗体応答を生成する

チクングンヤ (chikungunya) 熱ウイルス (CHIKV) に対する防御には、CHIKVのE2表面糖タンパク質に対するヒト及びマウス抗体が、防御を媒介することが示されたことで、抗体が重要であると考えられる。マウスに、単回用量のワクチン (10^5 、 10^6 及び 10^7 PFUのS

50

CV-CHIK)を投与し、ELISAによりCHIKV E2特異的なIgG応答を試験した。10⁷ PFUを投与したマウスで、CHIKV-E2特異的なIgGレベルの用量及び時間依存的な増加を観察し、複製能のあるVACV-CHIKワクチン接種したマウスにより誘導された抗体応答と類似するキネティックス及び強度を示した。このことにより、増殖欠損SCV305ワクチンが、増殖できるVACV-CHIKワクチンに匹敵する、組換え抗原に対する抗体応答を生成できることが示された。

【0125】

10⁵ PFUのSCV305ワクチンが投与されたマウス6匹中、4匹で中和抗体応答が検出された一方で、10⁶ PFU及び10⁷ PFUのSCV305ワクチンが投与されたマウス6匹の全てで中和抗体応答が生成された。

【0126】

抗体応答の「Th1 / Th2バランス」の指標を提示するために、CHIKV特異的なIgG1及びIgG2cのレベルを、ワクチン接種30日後のマウス血清において試験した。10⁷ PFUでは、SCV305は、IgG2cの、VACV-CHIKにより誘導された応答に匹敵する応答を刺激した。しかしながら、SCV305は、VACV-CHIKよりも高いIgG1応答を誘導した。このことは、VACV-CHIKがよりTh1に偏っており、SCV-CHIKによって、よりバランスのとれたTh1 (IgG2c) / Th2 (IgG1) 応答が生成されることを示唆する。

【0127】

SCV-CHIKワクチンにより誘導された抗体応答の期間を分析するために、ワクチン接種の4週間後、6カ月後及び1年後に、抗CHIKV抗体応答を試験した。期間中のSCV305ワクチン及びVACV-CHIKワクチンを接種したマウスの間で、匹敵する抗体レベルが維持されており、この期間に亘る抗CHIKV抗体レベルの低下は限定的であることが観察された。更に、SCV305及びVACV-CHIKでワクチン接種したマウスにおいて、ワクチン接種の1年後、CHIKV E2特異的な抗体を分泌する細胞 (ASC)、並びにCHIKV E2 / E1及びカプシド特異的なIFN- 産生細胞が検出された。

【0128】

VACV-CHIK (10⁷ PFU)を用いてワクチン接種したマウス、及びCHIKV (レユニオン島分離株 ; LR2006-OPY1、10⁴ CCID₅₀)を投与したマウスが、ウイルス血症と関節痛から完全に防御されることを実証したことによって、ワクチン接種 CHIKV攻撃モデルが導かれた。SCV-CHIKワクチンによって、同じ10⁷ PFUの用量で、VACV-CHIKに匹敵する中和抗体応答が誘導されたので、より低い用量(10⁵及び10⁶ PFU)でのSCV305ワクチンの防御効能を評価した。10⁶ PFUのSCV305を用いてワクチン接種し、40日後に (レユニオン島分離株 ; LR2006-OPY1、10⁴ CCID₅₀で) 攻撃したマウスでは、ウイルス血症又は足の腫脹が検出できなかった。10倍低い用量(10⁵ PFU)でワクチン接種したマウスは、対照のVACV-感染マウスと比較して、ウイルス血症においては約4ログの低下、及び足の腫脹の相当の低減により、部分的に防御された。期間の研究によって、SCV305でワクチン接種したマウスが、ワクチン接種の1年後のCHIKV攻撃から防御されることが確認された。

【0129】

特に関節の組織におけるCHIKVゲノムRNAの持続は、ヒト及びマウスのモデルにおける、CHIKV感染に続く慢性関節炎と関連している。攻撃の30日後に、10⁶ PFUのSCV305ワクチンを用いてワクチン接種したマウスは、持続性ウイルスRNAのレベルにおいて、バックグラウンドレベルにまで相当な低下を示した。このことは、SCV305ワクチン接種により、関節の組織における持続性CHIKV RNAの確立を予防し得ることを示している。

【0130】

まとめると、これらの発見は、強く、バランスが取れ、持続的なCHIKV特異的な抗体応答を誘発し、CHIKV攻撃後のウイルス血症、急性関節炎及びウイルスRNAの持続性に対する防御を提供する、SCV305ワクチンの能力を実証する。

【0131】

実施例3

SCV1002ワクチン接種

生きている弱毒化した様々なウイルスワクチンを組み合わせる場合、ウイルス間での競

10

20

30

40

50

合が最も頻繁に観察される問題である。それは、組合せワクチンの用量を増やすこと、又は各ワクチン成分の投与量を調整することによって回避し得、ドミナントなワクチン（複数可）の成分の競合が克服される。

【0132】

「免疫学的干渉」による抗原の競合は、ジフテリア - 百日咳 - 破傷風の3価ワクチンの成分間、イヌジステンパーバクテリアと生イヌジステンパーウイルスの間、並びにジステンパーウイルス、2型アデノウイルス、パルボウイルス及びパラインフルエンザウイルスの生の組合せワクチンの希釈剤としてボルデテラを使用する場合に、報告されている（Huntら、2001）。これらの例においては、複数の成分ワクチンを用いた接種によって、成分を単独で投与する場合よりも、少ない抗体が誘発される。幾つかのケースにおいては、1つの抗原に対する応答が優越する一方で、他に対する応答が抑制される。他のケースにおいては、相互の競合が生じ、全ての成分に対する応答が低下する。

10

【0133】

抗原性の競合の程度は、競合する抗原を接種する相対的な部位、抗原投与の間の時間間隔、及び抑制される抗原に対するドミナント抗原の用量を含む、ワクチン接種の多くのパラメーターに依存することが示されている。

【0134】

たとえ、幾つかの病原体に由来する免疫抗原を同じベクターから発現させ、それによって免疫系に対する各免疫抗原の対等な提示が確保されることにより、また、抗原送達のための単一ベクター（単に該ベクターのための最適なワクチン接種経路のみが考慮されることを要する）により、上記のことを解決し得るとしても、例えばB細胞及び樹状細胞等の抗原提示細胞による選択的抗原捕捉とMHC提示により、抗原干渉が起こり得るリスクが存在する。ドミナントなB細胞及び/又は（and or）T細胞エピトープを含む抗原は、次善的な（sub-optimal）B細胞及び/又はT細胞エピトープを有する抗原よりも強い免疫応答を生成するであろう。それゆえ、このことによって、複数の病原体の複数の抗原を発現する単一のベクターを用いて、ワクチン接種した場合に、最もドミナントな抗原に対する偏った免疫応答が導かれる。他の疾患の他の抗原も発現するベクターから発現させた抗原、例、ジカウイルス抗原と共に発現させたチクングンヤ熱抗原が、チクングンヤ熱抗原を発現させるだけの免疫ベクターよりも強い免疫応答を生成しない場合があることが予想される。

20

30

【0135】

複数の病原ウイルスに由来する複数のドミナントな抗原の発現が、お互いの免疫応答に干渉するかどうかを決定するために、研究を行った。例えば、チクングンヤ熱E2タンパク質は、チクングンヤ熱の感染を中和し得る、非常に良好な中和抗体応答を刺激する強い能力がある。同様に、ジカウイルスEタンパク質もまた、ジカウイルスの感染を中和する強力な中和抗体応答を刺激する。しかしながら、同じベクターからのこれらの2つのドミナントな抗原を発現させることによって、それぞれのウイルスに対する強力な免疫応答を刺激する、互いの能力が干渉され得る、即ち、1つのドミナントな抗原が、他を上回ってより優位であり得る。

【0136】

同じベクターに由来する複数のドミナントな抗原を発現させることが、単一のベクターに由来する各ドミナントな抗原を発現させることと比較して、最適な免疫応答を刺激することにおいて有害でないかどうかを決定するために、チクングンヤ熱特異的な中和抗体の刺激に関して、SCV1002（CHIK/ZIKAワクチン）と、SCV305（CHIKワクチン）とを比較する、マウスにおけるワクチン接種試験を実施した。

40

【0137】

ワクチン接種戦略：

雌性の野生型C57BL/6マウス及びインターフェロン受容体欠損(IFNAR)マウスを、各処理群当たり6匹のマウスの群で、単一ベクター化CHIKV/ZIKVワクチン（SCV1002）、CHIKVのみ（SCV305）又は対照の空ベクター（SCV105）のいずれかを用いて、一回、ワクチン接種し

50

た。腹腔内注射によって、マウス1匹当たり 10^6 pfuのワクチンを全ての処理群に投与し、ワクチン接種後、2週間及び4週間で採血した。ワクチン接種の6週間後、全てのマウスに攻撃を行った。

【0138】

中和アッセイ：

中和抗体のレベルは、しばしば、防御と相関があるものとして使用される。それゆえ、ZIKV / CHIKV (SCV1002)、CHIKVのみ (SCV305)又は対照の空ベクター (SCV105)の全てのワクチン群において、ベロ細胞でのチクングンヤ熱のレユニオン株に対する標準的なマイクロ中和アッセイを使用して、攻撃に先立って、中和抗体のレベルを算出した。簡易には、各マウスに由来する血清を熱失活させ（56℃、30分間）、96ウェルプレート中、デュブリケートで段階希釈し、100 CCID₅₀ 単位のウイルスを用いてインキュベートし、37℃で1時間インキュベートした。この中和工程に続いて、小分けにした新鮮なベロ細胞を血清/ウイルス混合物上に重層し（1ウェル当たり 10^4 細胞）、顕微鏡下で細胞変性効果が可視化されるまで、5日間インキュベートした。クリスタルバイオレット染色を使用して、細胞変性効果に対する100%の防御をもたらす血清の希釈を決定した。

10

【0139】

結果

CHIKV抗原を発現しているワクチン候補は両方とも、ワクチンを単回投与した後に、チクングンヤ熱ウイルスに対する中和抗体を誘導した。

20

【0140】

しかしながら、ワクチン接種に同等な用量を使用したにも関わらず、単一ベクター化CHIK / ZIKAワクチンの単回投与は、遥かに高いレベルのCHIKV中和抗体を誘導する。

【0141】

結論

このワクチン接種試験は、同等な用量のSCV305 (CHIKのみワクチン)及びSCV1002 (単一ベクター化CHIK / ZIKAワクチン)の1回打ちによって、マウスにワクチン接種した場合に、単一ベクター化ワクチン (SCV1002)は、より良好なチクングンヤ熱に特異的な中和抗体応答をもたらしたことを示す。他のドミナントな抗原の発現、即ち、ジカウイルスEタンパク質が免疫応答について競合し、従って、チクングンヤ熱 (中和抗体の標的であるE2抗原)及びジカウイルス (中和抗体の標的であるE抗原)の両方のドミナントな抗原に対する免疫応答が低下するか、又は消失しさえすると認識されていたので、このことは予想外であった。これはそういうことではないと思われ、ジカウイルス抗原の発現が、ワクチン接種によりチクングンヤ熱VLPに対して予想される、チクングンヤ熱抗原に対する免疫応答が増大するのを補助するアジュバント効果を有していたと推測され得る。

30

【0142】

妊娠前にSCV1002を用いて予めワクチン接種していた母体のジカウイルス感染からのマウス胎児の防御

アメリカ及びアジアにおいて続いているジカウイルスの大流行の、主な合併症は、胎盤を通過して胎児脳に感染するウイルスの能力によって引き起こされる、先天性欠損症である。Setohら (2017、De Novo Generation and Characterization of New Zika Virus Iso late Using Sequence Data from a Microcephaly Case. mSphere 2:e00190-17. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00190-17>)は、母獣において、症状のある感染を引き起こすことなく、IFNAR^{-/-}マウスにおける胎児脳感染 (子宮内での成長抑制を含む)モデルを確立するために、ZIKV-ナタール株を使用し得る、マウスモデルについて記載している。

40

【0143】

本研究の目的は、妊娠に先立って、SCV1002 (単一ベクター化ZIKA / CHIK)を用いた、雌性マウスに予め行ったワクチン接種が、まだ生まれていない胎児のジカウイルス感染に対して防御を提供できることを示すことであった。

【0144】

50

本研究は、SCV1002 (単一ベクター化CHIK / ZIKAワクチン) 又はSCV105 (ベクターのみ) のいずれかを用いて、雌性のIFNAR -/-をワクチン接種し、その後に雄性のIFNARマウスとの交配を行うことにより、実行した。次いで、Setohら (2017) に記載の通り、ジカウイルス-ナタール株を用いて、妊娠中のマウスを感染させた。

【0145】

ワクチン接種のスケジュール：

- ・ 単一ベクター化ワクチンのZIKV / CHIKV (SCV1002) 又は空の対照ワクチン (SCV105) のいずれかを用いて、筋肉内経路により、マウス1匹当たり 10^6 で、0週目に1回、6~8週齢の雌性のインターフェロン受容体欠損マウス (IFNAR -/-) にワクチン接種した。

- ・ ワクチンに対する抗体陽転を確認するために、ワクチン接種後4週間目に、数群のマウスから採血した。

- ・ ワクチン接種の6週間後、ワクチン接種したマウスにおける妊娠を誘導するために、時限交配を開始した。毎日、雌性のマウスの妊娠成功の兆候 (膣栓) について確認した。

- ・ 6.5日胚の時、皮下感染によって、 10^4 CCID50単位で、ジカ・ナタール株を用いて妊娠中のマウスを感染させた。

- ・ 感染の後、妊娠中のマウスから採血し、1~5日目に毎日、ウイルス血症について確認した。

- ・ Setohら (2017) に記載の通り、17.5日胚の時に、感染性ZIKVについて評価するために、妊娠中のマウスを選び取り、母体胎盤及び胎児の頭部を回収した。

【0146】

結果

妊娠するのに先立って、SCV1002 (CHIK / ZIKAワクチン) を用いて、予め、ワクチン接種した妊娠中の雌性マウスは、攻撃後にウイルス血症が検出されなかったことで示されたように、ジカウイルス・ナタール株を用いた攻撃の間の、ジカウイルスの複製を妨げることができた。しかしながら、予想された通り、SCV105 (SCVベクターのみ) でワクチン接種したマウスでは、攻撃後の最初の5日において高レベルのウイルス血症が見られたことで示されたように、ジカウイルスによるウイルスの複製を妨げることができなかった。

【0147】

交配及び妊娠に先立って、SCV1002 (CHIK / ZIKAワクチン) を1回打ちすることで、予めワクチン接種した雌性のマウスは、攻撃後に、それらの胎盤及び胎児の脳において検出できるレベルのジカウイルスが見られなかった。ワクチン接種によって、胎盤に感染するウイルスの攻撃が予防され、そのようにすることで、攻撃を受けやすい胎児にジカウイルスの伝播が進行することをブロックした。

【0148】

しかしながら、SCVベクターのみを用いて予めワクチン接種した雌性マウスについてはそうではなく、妊娠の間の攻撃後に、幾つかの胎盤は感染し、ジカウイルスの感染は、胎児の脳の幾つかに伝播した。

【0149】

結論

CHIK / ZIKAの単一ベクター化ワクチンの1回打ちによって、予めワクチン接種していた雌性マウスは、妊娠中、ウイルス血症の結果によって示された通り、対照のワクチンと比較して、ZIKVの攻撃から防御された。

【0150】

妊娠に先立つ、母体のワクチン接種によって、ジカウイルスの攻撃が母体胎盤にウイルスを感染させるのを予防すること、胎児脳への伝播が進行することをブロックすることによって、まだ生まれていない胎児に防御が提供された。

【0151】

この前臨床モデルにおけるこれらの結果は、胎児への攻撃的ジカウイルスの伝播の進行は、妊娠前に予め母体に行ったワクチン接種によりブロックされ得ることを実証している

10

20

30

40

50

。

【0152】

SCV1002はロスリバーウイルスを用いた致死的な攻撃からマウスを防御できる

チクングンヤ熱 (CHIKV) は、アルファウイルスグループに属し、そのグループの別のメンバーはロスリバーウイルス (RRV) である。RRVは、オーストラリアの北部及び中央部、並びに太平洋地域において特有である。RRV及びCHIKVは、蚊によって伝染し、両方とも多発性関節炎を引き起こし得、ヒトに持続的な感染を起こし得る。しかしながら、チクングンヤ熱ウイルスの蚊ベクターは、ネッタイシマカ及びヒトスジシマカである一方で、ロスリバーウイルスの主な蚊ベクターは、塩湿地で生息する2種の蚊、アエデス・カンプトリンチャス (*Aedes camptorhynchus*) 及びアエデス・ビジラックス (*Aedes vigilax*)、並びに淡水で生息する蚊、クレクス・アニユリロストリス (*Culex annulirostris*) である

10

。

【0153】

SCV1002のチクングンヤ熱ワクチン抗原が、SCV1002 (CHIK/ZIKAワクチン)を用いたワクチン接種の6週間後の、RRVを用いた致死的な攻撃を完全に防御できるかどうかを決定するために、RRVに対して致死的な感染を受けやすいマウス系統 (IRF3/7ノックアウト) におけるワクチン接種研究を行った。

【0154】

実験設計

チクングンヤ熱及びロスリバーウイルスの感染の両方を受けやすいIRF3/7 ノックアウトマウスにおいて、このワクチン接種及び攻撃研究を行った。これらのウイルスを用いた感染はこのマウス系統においては致死的である。

20

【0155】

2群のIRF3/7^{-/-}マウスに、マウス当たり 10^6 pfuのSCV1002 (単一ベクター化CHIK/ZIKAワクチン)、又はSCV105 (SCVベクターのみ)のいずれかを、筋肉内経路で、1回打ちでワクチン接種した (where either vaccination)。

【0156】

ワクチン接種の6週間後、Ruddら (2012)に記載された通りに、足の先端に、皮下経路によって、 10^4 CCID₅₀のロスリバーウイルス (TT株)を用いて、全てのマウスを攻撃した。

【0157】

攻撃の後、30日間、攻撃からの生存をモニタリングした。臨床症状が倫理的に定義されたエンドポイント (Ruddら (2012) Interferon Response Factors 3 and 7 Protect against Chikungunya Virus Hemorrhagic Fever and Shock. J. Virol., 86 (18): 9888-9898に記載された通り) に達したときに、マウスを安楽死させた。

30

【0158】

結果

SCV105ではなくSCV1002を用いたIRF3/7^{-/-}のワクチン接種によって、致死的なRRV攻撃からの完全な防御が提供されることが見出された。このことは、SCV-CHIK/ZIKVワクチン (SCV1002) が、アルファウイルス属の他のウイルスに対して交差防御的であることを実証している。

40

【0159】

ZIKV、次いでCHIKVを用いて攻撃した、SCV1002でワクチン接種したIFNAR^{-/-}マウス

数群の>6週齢の6匹の成体の雌性マウスに、マウス1匹当たり 10^6 pfuのSCV1002、SCZ305又はSCV105 (SCV空ベクター)を、腹腔内注射により注射した。ワクチン接種後の任意の副作用についてマウスをモニタリングした。

【0160】

ワクチン接種の6週間後の数群のマウスを、マウス1匹当たり 10^3 CCID₅₀で、マウスに適合させたアフリカジカ株MR766を、尾の基部に皮下注射することで攻撃した。

【0161】

ジカウイルスによる攻撃の6週間後、マウス1匹当たり 10^4 CCID₅₀のチクングンヤ熱ウイ

50

ルスのラ・レユニオン株 (LR2006-OPY1) を足の先端に皮下注射することで、生存群のマウスを攻撃した。

【0162】

結果

SCV1002 (単一ベクター化CHIK+ZIKワクチン) でワクチン接種したマウスは、ジカウイルスによる攻撃から完全に防御されたが、SCV305 (CHIKのみのワクチン) 及びSCV105 (ベクターのみ) でワクチン接種したマウスは全て、感染の9日後までに、ジカウイルス感染で死亡した。

【0163】

SCV1002 (単一ベクター化CHIK+ZIKワクチン) でワクチン接種したIFNAR^{-/-}マウスを、まずZIKVで攻撃し、部分的に防御されて生存した。即ち、攻撃の3日後までに、ワクチン接種していない全てのマウスを殺すことができたCHIKVを用いた、極度に強い致死的な攻撃に対して、33%の有効性であった。

【0164】

結論

IFNAR^{-/-}マウスの、マウス1匹当たり 10^6 pfuの単一用量を用いたSCV1002ワクチン接種により、マウスに適合させたジカウイルス株を用いた致死的な攻撃に対する完全な防御が提供された。

【0165】

生き残っているマウスに対する、極度に強い致死的な用量のCHIKVを用いた、その後の攻撃は部分的に防御された。即ち、このマウスモデルにおいては、SCV1002ワクチンは、マウス1匹当たり 10^4 の感染単位でのCHIKV感染に対して、33%の有効性であった。 10^4 の感染性の攻撃用量は、インターフェロン受容体を欠く、免疫が無効化したこのマウスモデルにとっては強すぎた。そのために抗ウイルス状態におけるインターフェロンに応答できなかった。通常、抗ウイルスインターフェロンの産生は、初期感染を調節する一方で、適応免疫応答は、侵入してくるウイルス感染に反応するためには時間が掛かる。事後的には、このマウスモデルにおけるCHIKV攻撃に対するこの用量は、ワクチン接種していない全てのマウスを、3日以内に死亡させるので、強すぎた。それは、侵入してくるウイルス感染を調節し、一掃するために、既往の抗ウイルス抗体応答を起こさせるためには、短すぎる期間であった。自然な状況においては、抗ウイルスインターフェロンは、適応免疫応答によって、宿主が感染を克服し、中和し、一掃するために十分に長い時間、初期のウイルス感染を抑制する。ワクチン接種していないマウスが 10^4 感染単位の用量を用いた感染の3日後までに死亡する、IFNARマウスにおいては、CHIKVの毒性は、非天然状態の高いレベルであったにも関わらず、SCV1002を用いたワクチン接種によって、この極限状態下において、予想外にも、ある程度の防御をすることができた。従って、このワクチンの高い免疫原性の効力が強調される。

【0166】

SCV1002ワクチン接種の後のCHIKV感染

本研究の目的は、自然感染の文脈で、抗原干渉又は抗原性罪 (sin) を評価することであった。チクングンヤ熱ウイルスによる、予めの自然感染はジカウイルスに対する免疫応答の誘導に影響する一方で、SCV1002 (SCV-CHIK/ZIKAワクチン) を用いたワクチン接種後に、ワクチンが誘導したチクングンヤ熱に対する追加免疫応答が起こっている。

【0167】

野生型C57BL/6マウスを、チクングンヤ熱ウイルスに感染させ、ウイルスを一掃させ、次いで単一ベクター化CHIKV/ZIKVワクチンを用いて追加免疫した。ワクチン追加免疫の前、及びワクチン接種の4週間後、マウスから採血し、抗CHIKV及び抗ZIKVの抗体応答のレベルを評価した。

【0168】

数群の、>6週齢の成体の6匹の雌性マウスに、足の先端への皮下感染によって、マウス1匹当たり 10^4 CCID₅₀ のチクングンヤ熱ウイルスのラ・レユニオン株 (LR2006-OPY1) を注射

10

20

30

40

50

した。感染後の任意の副作用について、マウスをモニタリングし、ワクチン接種に先立って、感染の後、8週間目に採血した。

【0169】

感染の8週間後、マウス1匹当たり 10^6 pfuの、腹腔内送達される単一ベクター化CHIKV/ZIKVワクチン (SCV1002)を用いて、マウスに追加免疫を行った。ワクチン接種後の任意の副作用について、マウスをモニタリングし、ワクチン接種の前及び後の、抗CHIKV及び抗ZIKVの抗体レベルを比較するために、ワクチン接種の4週間後に、再度、マウスから採血した。

【0170】

予めCHIKV感染に暴露した野生型マウスのSCV1002ワクチン接種は、予めCHIKV感染がなかった際に見られたのと類似のレベルにまで抗ZIKV抗体を誘導したことが見出された。

10

【0171】

抗原性罪は、1つの抗原に対する暴露によって、2番目の抗原が防御免疫応答を誘導する能力を阻害し得る現象である。この概念の背後にある機構は、最初の抗原に対してのみ応答するようプログラムされている、最初の抗原によって感作されたB細胞が関与することが示唆されている。2番目の抗原が導入される場合、有効な免疫応答が生成され得る前に、これらのB細胞は本質的に、2番目の抗原を除去し、それにより、極端に低い又は乏しい免疫性となる。本研究においては、この概念をテストした。

【0172】

しかしながら、予めチクングンヤ熱ウイルスを用いて感染させ、次いでCHIKV/ZIKVワクチンを用いてワクチン接種したマウスは、予めCHIKV感染がなかった場合に見られたのと類似する、有効なCHIKV及びZIKV免疫応答を誘導することができたので、抗原性罪はこの設定の下では働いていない。CHIKV及びZIKVは、2つの異なるウイルス科に由来する、非常に異なるウイルスであるので、この可能性が最も高い。このデータは、CHIKVが広まっていることが予め知られている国において、2価ワクチンを使用し得ることを示唆する。

20

【0173】

雄性的マウスにおけるジカウイルス感染に対する防御

ジカウイルスは、依然として、蚊が伝播し、性行為によっても伝染し得る、唯一のウイルスである。ジカウイルスは、雄性から雌性へ、又は雄性から雄性へと伝播し得、ウイルスは、症状の発症後に、数カ月までの間、精液中に留まることが示されている。

30

【0174】

本研究の目的は、SCV1002 (単一ベクター化ZIKA/CHIK)を用いたワクチン接種が、雄性的マウスにおけるジカウイルス感染に対する防御を提供し得ることを示すことであった。

【0175】

本研究は、Setohら (2017) (De Novo Generation and Characterization of New Zika Virus Isolate Using Sequence Data from a Microcephaly Case. mSphere 2:e00190-17. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00190-17>)に記載の通り、SCV1002 (単一ベクター化CHIK/ZIKAワクチン)又はSCV105 (ベクターのみ)のいずれかを用いて、雄性的IFNAR^{-/-}にワクチン接種し、続いてジカウイルス・ナタール株に感染させることによって行った。

40

【0176】

6~8週齢の雄性的インターフェロン受容体欠損マウス (IFNAR^{-/-})に、マウス1匹当たり 10^6 PFUで、0週目に、単一ベクター化ワクチンのZIKV/CHIKV (SCV1002)、又は空の対照ワクチン (SCV105)のいずれかを用いて、筋肉内経路でワクチン接種した。

【0177】

ワクチンに対する抗体陽転を確認するために、ワクチン接種後、4週目に、数群のマウスから採血した。ワクチン接種後6週間で、 10^4 CCID₅₀単位のジカ・ナタール株を用いて、皮下感染により雄性的マウスを感染させた。感染後、1~5日目までの間、毎日、マウスから採血し、ウイルス血症について確認した。

【0178】

50

感染後21日目にマウスを選び取り、prM遺伝子を標的とするプライマーを使用した定量的リアルタイムPCRにより、ZIKV RNAを評価するために、精巢を回収した。製造業者の指示に従って、Trizol (Life Technologies)を使用してRNAを抽出した。製造業者の指示に従って、Biorad iscript逆転写酵素スーパーミックスを使用してcDNAを合成した。Biorad iTaq Universal Sybr greenスーパーミックスキットを使用して、定量的リアルタイムを行った。リアルタイムPCRの結果は、ハウスキーピング遺伝子RPL13のレベルと比較して定量した。

【 0 1 7 9 】

攻撃後に検出されたウイルス血症が最小限であることによって示されたように、SCV1002 (CHIK / ZIKAワクチン)を用いてワクチン接種した雄性のマウスでは、ジカウイルス・ナタール株を用いた攻撃後に、ジカウイルスが複製できなかった。しかしながら、SCV105 (SCVベクターのみ)を用いてワクチン接種したマウスでは、予想通り、攻撃後の最初の3日間で、高レベルのウイルス血症がみられたことによって示されるように、ジカウイルスが複製できた。

10

【 0 1 8 0 】

対照ワクチンSCV105を用いてワクチン接種したマウスと比較して、SCV1002 (CHIK / ZIKA)を用いたワクチン接種はまた、21日目に精巢中に見られたウイルスのRNA量を減少させることができた。

【 0 1 8 1 】

参考文献一覧

20

Altschulら (1997) Nucleic Acids 25:3389-3402

Ausubelら (1999) Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47) John Wiley & Sons, New York

Boshartら (1985) Cell 41:521

Brooksら (1995) J. Virol. 69(12):7688-7698

Dijkemaら (1985) EMBO J. 4:761

Drillien Rら (1978) J Virol. 28(3):843-50

Gormanら (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA79:6777

Ham RG. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53 : 288-293

Hsiao JCら (2006) J. Virol. 80(15):7714-28

30

Kiblerら (2011) PLOS ONE 6(11)

Meisinger-Henschelら (2007) J. Gen. Virol. 88(12):3249-3259

Murphyら (1995) Virus Taxonomy Springer Verlag:79-87

Puck TTら (1958) J. Exp. Med. 108:945-956

Sambrookら (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual (第2版) Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.

Shislerら (2004) J. Virol.78(7):3553-3560

Spehner Dら (1988) J Virol.、62(4):1297-1304

Werden SJら (2008) 3章 : Poxvirus Host Range Genes. In : Advances in Virus Research, 71

40

【 図 1 】

図1: SCV301A相同組換えカセット



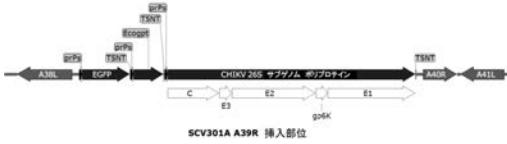
【 図 2 】

図2: VACV-COPゲノムにおける相同組換えのためのF1及びF2標的



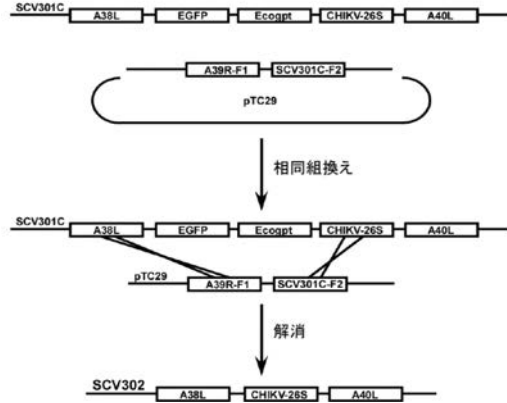
【 図 3 】

図3: SCV301AのCHIKV-26S挿入部位



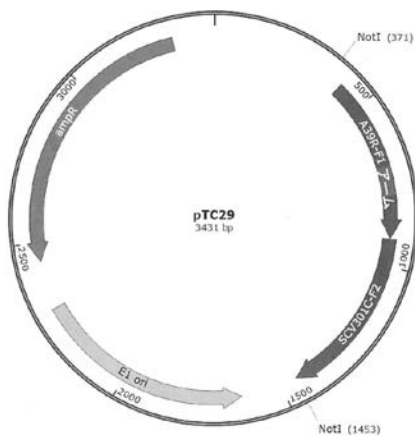
【 図 4 】

図4：相同組換えによるEcogpt及びEGFPの欠失



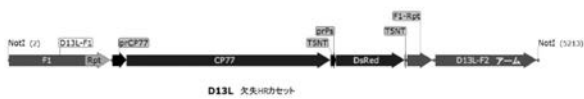
【 図 5 】

図5: pTC29のプラスミドマップ



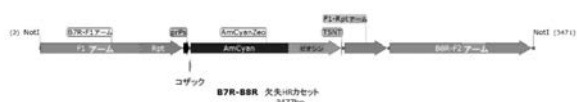
【 図 6 】

図6：D13L欠失HRカセット



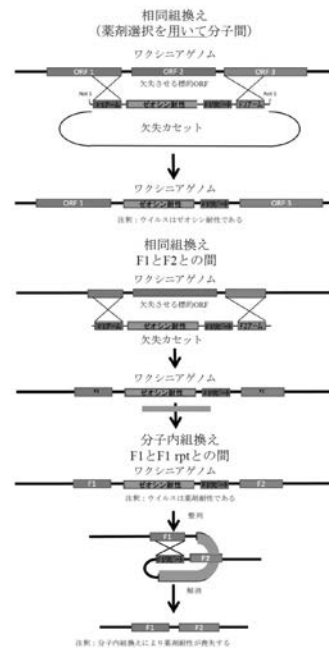
【圖 7】

図7：B7R・B8R欠失HRカセット



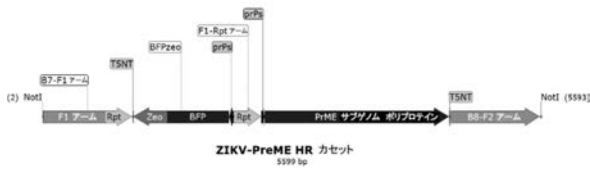
【 図 8 】

図8 トランスドミナント選択を用いた相同組換えの作用方式



【 図 9 】

図9：ZIKV-HRカセットの詳細



【 配 列 表 】

2019528271000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成30年4月3日 (2018.4.3)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

チクングンヤ熱とジカウイルスと天然痘の感染のリスクを低減する、免疫応答を、動物において惹起するための組成物であって、該組成物が、医薬的に許容される担体及び弱毒化したボックスウイルスを含み、該ボックスウイルスのゲノムが、チクングンヤ熱ウイルスの26Sサブゲノムポリプロテインをコードする核酸配列、及びジカウイルスのPrMEポリプロテインをコードする核酸配列を含む、組成物。

【 請 求 項 2 】

前記弱毒化したボックスウイルスが、改変ワクシニアアンカラ(MVA)、NYVAC、アビボックス、カナリアボックス及び鶏痘からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【 請 求 項 3 】

前記弱毒化したボックスウイルスが改変オルトボックスウイルスであり、前記改変が、内在的な必須の集合、成熟タンパク質をコードする遺伝子の欠失を含み、及び/又は組成物の免疫原性を増大させる、請求項1に記載の組成物。

【 請 求 項 4 】

前記改変が D 1 3 L 遺伝子の欠失を含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記改変が A 3 9 R 遺伝子の欠失を含む、請求項 3 又は請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記改変が B 7 R - B 8 R 遺伝子の欠失を含む、請求項 3 又は請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記改変が D 1 3 L 遺伝子、A 3 9 R 遺伝子及び B 7 R - B 8 R 遺伝子の欠失を含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記医薬的に許容される担体がアジュバントを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記アジュバントが水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム、水酸化リン酸カルシウム、フロイント完全アジュバント、モンタナイド（登録商標）、フロイント不完全アジュバント、i s c o m s、i s c o m マトリクス、I S C O M A T R I XTM アジュバント、M a t r i x MTM アジュバント、M a t r i x CTM アジュバント、M a t r i x QTM アジュバント、A b I S C O（登録商標）- 1 0 0 アジュバント、A b I S C O（登録商標）- 3 0 0 アジュバント、I S C O P R E PTM、I S C O P R E PTM 誘導体、I S C O P R E PTM 又は I S C O P R E PTM 誘導体を含むアジュバント、Q S - 2 1、Q S - 2 1 誘導体、及び Q S - 2 1 又は Q S 2 1 誘導体を含むアジュバントからなる群から選択される、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

チクングンヤ熱と天然痘、天然痘とジカウイルスの感染及び / 又はチクングンヤ熱と天然痘とジカウイルスの感染に対する、被検体における防御免疫応答を誘導する方法であって、前記方法が、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物を、被検体に投与することを含む、方法。

【請求項 11】

チクングンヤ熱と天然痘、天然痘とジカウイルスの感染及び / 又はチクングンヤ熱と天然痘とジカウイルスの感染に対する、被検体における防御免疫応答の誘導において使用するための医薬の調製における、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2017/050879
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 35/76 (2015.01) A61K 31/7088 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
DATABASES: MEDLINE, EPODOC, WPIAP, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE.		
KEYWORDS: Chikungunya, CHIKV, zika, smallpox, Attenuated, Poxvirus, modified vaccinia Ankara, MVA, NYVAC, avipox, canarypox, fowlpox, orthopoxvirus, vaccinia, Nucleic acid, DNA, RNA, encoding, 26S subgenomic, PrME, prMembrane plus envelope, vaccine, immune response, immunity, modification, deletion, D13L, K1L, A39R, B7R_B8R, adjuvant as well as synonyms and similar terms.		
Applicant and/or Inventor searches of the patent and non-patent literature was performed using Patentscope, PubMed, and in internal databases provided by IP Australia.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 13 October 2017	Date of mailing of the international search report 13 October 2017	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au	Authorised officer Monica Graham AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262833179	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2017/050879
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/086980 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 09 June 2016 (see abstract, page 4 paragraph 3 and Examples)	2, 4, 5, 7, 11-14
X	García-Arriaza, J. et al. "A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against chikungunya infection." J Virol. 2014 Mar;88(6):3527-47. doi: 10.1128/JVI.03418-13. Epub 2014 Jan 8. (Abstract and page 3528 left column paragraphs 2-3, page 3528 right column paragraph 2)	2, 4, 5, 7, 11-14
A	van den Doel, P. et al. "Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing glycoprotein E2 of Chikungunya virus protects AG129 mice against lethal challenge." PLoS Negl Trop Dis. 2014 Sep 4;8(9):e3101. doi: 10.1371/journal.pntd.0003101. eCollection 2014 Sep. (see whole document)	1-14
A	US 7767209 B2 (STAIB et al.) 03 August 2010 (see column 6 lines 37-46)	7
A	Gerhard, A. et al. "The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses." Virology. 1998 May 10;244(2):365-96. Review. Erratum in: Virology. 2006 Jul 5;350(2):501-2. (see whole document)	5-10
P,X	Eldi, P. et al. "Production of a Chikungunya Vaccine Using a CHO Cell and Attenuated Viral-Based Platform Technology." Mol Ther. 2017 Jul 15. pii: S1525-0016(17)30280-0. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.06.017. [Epub ahead of print 22 June 2017] (see whole document)	2, 4, 5-7, 13 and 14
P,X	Hayball, J. et al. "A dual Chikungunya and smallpox vaccine derived from a novel, replication-incompetent poxvirus vaccine system provides mice with complete protection from Chikungunya virus and mousepox infection." European Journal of Immunology, (AUG 2016) Vol. 46, No. Suppl. 1, Sp. Iss.SI, pp. 809. Meeting Info.: International Congress of Immunology (ICI). Melbourne, AUSTRALIA. August 21 - 26, 2016. (see Abstract)	2, 4, 5, 7, 13 and 14
P,X	WO 2017/136419 A1 (GEOVAX INC.) 10 August 2017 (see Abstract, page 26 last paragraph – page 27 first paragraph and Examples)	3-5, 7, 13 and 14
<p>Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2017/050879	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2016/086980 A1	09 June 2016	WO 2016086980 A1	09 Jun 2016
US 7767209 B2	03 August 2010	US 2007160627 A1	12 Jul 2007
		US 7767209 B2	03 Aug 2010
		AU 2004276486 A1	07 Apr 2005
		AU 2004276486 B2	21 Jan 2010
		BR PI0414874 A	12 Dec 2006
		CN 1842602 A	04 Oct 2006
		CN 1842602 B	29 Jun 2011
		EP 1518932 A1	30 Mar 2005
		EP 1668142 A1	14 Jun 2006
		WO 2005030971 A1	07 Apr 2005
WO 2017/136419 A1	10 August 2017	WO 2017136419 A1	10 Aug 2017
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/40 (2006.01) C 1 2 N 15/40

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

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 ハウリー、ポール

オーストラリア国、ヴィクトリア州 3 8 0 6、パーウィック、シング クレセント 9

F ターム(参考) 4C084 AA13 MA66 NA01 ZB33

4C085 AA04 BA85 CC08 DD62 EE06 FF01 FF02 FF03 FF11 FF20
 GG01

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 CA20 MA02 MA66 NA01 ZB33