

(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2020-530765

(P2020-530765A)

(43) 公表日 令和2年10月29日 (2020. 10. 29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/47 (2006. 01)	C 1 2 N 15/47 Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006. 01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/205 (2006. 01)	A 6 1 K 39/205	
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 31/14 (2006. 01)	A 6 1 P 31/14	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-502118 (P2020-502118)	(71) 出願人	305060279
(86) (22) 出願日	平成30年7月16日 (2018. 7. 16)		グラクソスミスクライン バイオロジカル
(85) 翻訳文提出日	令和2年3月12日 (2020. 3. 12)		ズ ソシエテ アノニム
(86) 国際出願番号	PCT/IB2018/055258		ベルギー ベー ー 1 3 3 0 リクセンサー
(87) 国際公開番号	W02019/016680		ル リュ ドランスティテュ 8 9
(87) 国際公開日	平成31年1月24日 (2019. 1. 24)	(74) 代理人	110002572
(31) 優先権主張番号	62/533, 312		特許業務法人平木国際特許事務所
(32) 優先日	平成29年7月17日 (2017. 7. 17)	(72) 発明者	ヘイシー, キャスリン
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		アメリカ合衆国 2 0 0 0 1 ワシントン
		(72) 発明者	ディーシー, ケー ストリート 1 0 5 0
			マルヤラ, パドマ
			アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー
			セッツ州, ケンブリッジ, テクノロジー
			スクエア 2 0 0
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 リサウイルス抗原構築物

(57) 【要約】

リサウイルス抗原をコードする核酸ベースのワクチン構築物は疾患の予防及び治療に有用である。リサウイルス抗原をコードする自己増幅RNA分子は効力が高く長期持続性の免疫をもたらす。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

全長リサウイルス糖タンパク質（G）、RNAポリメラーゼ（L）、マトリックスタンパク質（M）、核タンパク質（N）又はリンタンパク質（P）、その免疫原性誘導体若しくは免疫原性断片の1つ以上から選択される抗原を含むポリペプチドをコードする、核酸ベースの構築物。

【請求項 2】

前記核酸が、前記抗原のコード領域を含むRNAである、請求項1に記載の構築物。

【請求項 3】

リサウイルス糖タンパク質（G）配列を含む、請求項1又は2に記載の構築物。

10

【請求項 4】

リサウイルス核タンパク質（N）配列を含む、請求項1又は2に記載の構築物。

【請求項 5】

前記構築物が、

（a）配列番号3、配列番号5、配列番号7及び配列番号9のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列；

（b）配列番号2、配列番号4、配列番号6及び配列番号8のDNA配列を含む核酸配列；並びに

（c）（a）又は（b）の変異体又は断片

からなる群より選択される核酸配列を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の構築物。

20

【請求項 6】

前記構築物がコドンを最適化されている、請求項1～5のいずれか1項に記載の構築物。

【請求項 7】

前記構築物がコドン対最適化されている、請求項1～5のいずれか1項に記載の構築物。

【請求項 8】

請求項1～7のいずれかに記載の構築物を含むベクター。

【請求項 9】

請求項1～7のいずれかに記載の構築物を含む自己増幅RNA分子。

【請求項 10】

抗原をコードする自己増幅RNA分子であって、配列番号2、配列番号4、配列番号6及び配列番号8からなる群より選択される核酸配列を含む、自己増幅RNA分子。

30

【請求項 11】

請求項9又は10に記載の自己増幅RNA分子をコードするDNA分子。

【請求項 12】

請求項1～7のいずれか1項に記載の構築物、請求項8に記載のベクター又は請求項9若しくは10に記載の自己増幅RNA分子のうちの1つ以上の免疫学的に有効な量を含む組成物。

【請求項 13】

RNAベースのワクチンを含む、請求項12に記載の組成物。

【請求項 14】

自己増幅RNA分子を含む、請求項13に記載の組成物。

40

【請求項 15】

脂質ベースの非ウイルス送達材料を含む、請求項12～14のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記脂質ベースの非ウイルス送達材料が脂質ナノ粒子送達系を含む、請求項15に記載の組成物。

【請求項 17】

前記脂質ナノ粒子（LNP）送達系が、RV28、RV31、RV33、RV37、RV39、RV42、RV44、RV73、RV75、RV81、RV84、RV85、RV86、RV88、RV91、RV92、RV93、RV94、RV95、RV96、RV97、RV99、及びRV101からなる群より選択される、請求項16に記載の組成物。

【請求項 18】

50

前記脂質ベースの非ウイルス送達材料が、脂質カチオン性マイクロエマルジョン送達系を含む、請求項15に記載の組成物。

【請求項 19】

前記脂質カチオン性マイクロエマルジョン送達系がCNE56を含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項 20】

前記組成物が追加の抗原をコードする核酸配列をさらに含む、及び/又は前記組成物が追加の抗原をさらに含む、請求項12～19のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記組成物が、追加の抗原をコードする配列を含む核酸を含むさらなる組成物と組み合わせ対象に投与するために薬学的に許容されるものである、及び/又は前記組成物が、追加の抗原を含むさらなる組成物と組み合わせ対象に投与するために薬学的に許容されるものである、請求項12～20のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項 22】

1つ以上のアジュバントを含む、請求項12～21のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 23】

1.5ug、1.0ug、500ng、250ng、125ng、75ng、50ng又は25ngなどの2ug以下の核酸ベースの構築物を含む、請求項12～22のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 24】

抗原をコードする自己増幅RNA分子を含む組成物であって、該自己増幅RNA分子が、配列番号2、配列番号4、配列番号6及び配列番号8からなる群より選択される核酸配列を含み、かつ1.5ug、1.0ug、500ng、250ng、125ng、75ng、50ng又は25ngなどの2ug以下の核酸構築物を含む、組成物。

20

【請求項 25】

それを必要とする対象においてリサウイルスによって引き起こされる疾患に対する免疫応答を誘導する方法であって、請求項1～7のいずれか1項に記載の構築物、請求項8に記載のベクター、請求項9若しくは10に記載の自己増幅RNA分子、又は請求項12～22のいずれか1項に記載の組成物のうちの1つ以上を含む組成物の免疫学的に有効な量を対象に投与することを含む方法。

【請求項 26】

30

前記対象がヒトである、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

請求項8に記載のベクター又は請求項11に記載のDNAを転写して、前記抗原のコード領域を含むRNAを生成する工程を含む、RNAベースのワクチンを生成する方法。

【請求項 28】

前記転写がin vitroである、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記転写がin vivoである、請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

前記抗原のコード領域を含むRNAを送達系で製剤化する工程をさらに含む、請求項27～29のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 31】

前記送達系が脂質ナノ粒子送達系を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

前記送達系が、カチオン性ナノエマルジョン送達系を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項 33】

前記抗原のコード領域を含むRNAと、アジュバントを含む追加の組成物とを合わせる工程をさらに含む、請求項27～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 34】

対象におけるリサウイルス疾患に対する免疫応答を誘導するための、請求項1～7のい

50

れか1項に記載の構築物、請求項8に記載のベクター、請求項9若しくは10に記載の自己増幅RNA分子、又は請求項12～14のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項35】

対象におけるリサウイルス疾患に対する免疫応答を誘導するための医薬の製造における、請求項1～7のいずれか1項に記載の構築物、請求項8に記載のベクター、請求項9若しくは10に記載の自己増幅RNA分子、又は請求項12～14のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項36】

本明細書に実質的に記載される組成物、構築物、ベクター、DNA分子、自己増幅RNA分子、方法、プロセス又は使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

連邦政府による資金提供を受けた研究に関する声明

本発明は、DARPAにより授与された契約番号HR0011-12-3-0001に基づく米国政府の支援によりなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明は、ウイルス疾患を治療及び予防する分野におけるものである。特に、本発明は、リサウイルス抗原をコードする自己増幅RNA分子に関する。本発明は、狂犬病を治療及び予防するためのリサウイルス抗原の使用を含む。

20

【背景技術】

【0003】

発明の背景

リサウイルス (Lyssavirus) は、ラブドウイルス (Rhabdoviridae) 科のエンベロープを有する一本鎖RNAウイルスである。リサウイルス属のメンバーは狂犬病を引き起こし、全ての既知のヒトウイルス性病原体の中で最も高い致死率を有する。狂犬病は感染した哺乳動物の唾液を介して伝染する。向神経性ウイルスとして、それはその宿主の神経系に入り、ほぼ常に致死性である脳脊髄炎を引き起こす。現在、世界中で年間約6万人が狂犬病によって死亡しており、アジア及びアフリカの発展途上国ではイヌ咬傷によって、北米では野生生物及びコウモリによって主に引き起こされる。

30

【0004】

狂犬病は狂暴化又は麻痺の形態で現れる。潜伏期間は約5日から数年の間で変わるが、典型的には約20から90日の間である。臨床的症状は、ほとんどの場合、倦怠感、食欲不振、疲労、頭痛及び発熱の前駆症状の訴えから始まり、その後、曝露部位の痛み又異常感覚が続く。不安、興奮又は過敏性がこの期間中に顕著になり得、その後、多動、見当識障害、痙攣、恐水症、唾液分泌過多、並びに最終的には、麻痺、昏睡及び死亡に至る。

【0005】

実験的に、RNAワクチンはウイルス構造タンパク質を欠き、ウイルス構造タンパク質の代わりに異種抗原を発現するサブゲノムレプリコンに由来する。それらは、ワクチン抗原をコードするRNAを担持する感染性粒子の単一回の発現を可能にするパッケージング細胞株において産生され得る。次いで、細胞質におけるRNA増幅は抗原をコードするmRNAの複数のコピーを生成し、そして二本鎖RNA中間体を作製し、これは、先天性免疫の強力な刺激因子であることが知られている。従って、レプリコンRNAワクチンは、生ウイルスを使用することなく、一過性の高レベルの抗原産生を達成し得る (Brito et al. (2015) *Advances in Genetics* 89:179-233)。

40

【0006】

単に緩衝液を用いて製剤化されたRNA、すなわち裸のRNAを細胞に挿入することは遺伝子発現及び免疫応答の両方を誘導し得るが、裸のRNAの *in vivo* 不安定性はワクチンとしてのその効力を制限する。さらに、RNAの親水性及び強い負電荷は、その細胞への取り込みを妨げる。しかしながら、細胞質への移入 (transfer) は容易にすることができる。脂質ナ

50

ノ粒子及びカチオン性ナノエマルジョンなどの合成送達系は、自己増幅RNAなどの核酸を、コードされた抗原を増幅及び発現することができる細胞質に効果的に移入することが実証されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

非常に有効で、安全かつ簡便で、費用効果があり、長時間持続性であり、また広スペクトルの免疫応答を誘導する、リサウイルスにより引き起こされる疾患などの疾患に対する新規な免疫方法のニーズが残されている。したがって、ワクチン抗原、特にリサウイルス抗原を効果的に送達することができるベクターに対する需要がある。リサウイルス予防法は現在利用可能であるが、曝露の前と後の両方で多数回の投与が必要とされ、接種率は低く、医学的恩恵を減少させる。簡素化された投与スケジュール、向上した安全性、及び増強された製造プロファイルを有する改善されたリサウイルスワクチンが必要とされている。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概要

本発明は、対象においてリサウイルス病に対する免疫応答を誘導するための免疫原性組成物の成分として有用な構築物、治療におけるその使用のための方法、並びにその製造のための方法を提供する。

20

【0009】

本発明の第1の態様は、全長リサウイルスタンパク質又はその免疫原性断片を含む又はそれからなる1つ以上のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む又はそれからなる、核酸ベースのワクチン構築物を提供する。あるいは又はさらに、リサウイルスタンパク質は、糖タンパク質(G)、RNAポリメラーゼ(L)、マトリックスタンパク質(M)、核タンパク質(N)及びリンタンパク質(P)からなる群より選択される。

【0010】

あるいは又はさらに、ポリペプチドは、全長リサウイルス糖タンパク質又はその免疫原性断片を含む。あるいは又はさらに、リサウイルス糖タンパク質は、Flury high egg passage(「HEP」)狂犬病Gタンパク質(GenBankでAGN9427.1と称する)である。別の好ましい実施形態において、リサウイルス糖タンパク質は、Flury low egg passage(「LEP」)狂犬病Gタンパク質(GenBankでGU565703.1と称する)である。あるいは又はさらに、リサウイルス糖タンパク質はFlury LEP狂犬病Gタンパク質のコード最適化形態である。あるいは又はさらに、リサウイルス糖タンパク質はFlury LEP狂犬病Gタンパク質のコード最適化形態である。

30

【0011】

本発明の第2の態様は、核酸ベースのワクチン構築物を含む又はそれからなるベクターを提供する。

【0012】

本発明の第3の態様は、核酸ベースのワクチン構築物を含む又はそれからなる自己増幅RNA分子を提供する。本発明の自己増幅RNA分子はビリオンに含まれず、本発明の構築物はタンパク質カプシドを含まない。カプシドを作成する必要性を回避することにより、本発明はパッケージング細胞株を必要とせず、したがって商業生産のための容易なアップスケールを可能にし、危険な感染性ウイルスが不注意に生産されるリスクを最小限に抑える。

40

【0013】

本発明の第4の態様は、自己増幅RNA分子をコードするDNA分子を提供する。

【0014】

本発明の第5の態様は、本明細書に記載の構築物、ベクター又は自己増幅RNA分子のうちの1つ以上を含む又はそれからなる組成物を提供する。あるいは又はさらに、組成物は、

50

構築物、ベクター又は自己増幅RNA分子のうちの1つ以上の免疫学的に有効な量を含む又はそれからなる。

【0015】

あるいは又はさらに、組成物は、RNAベースのワクチンを含む又はそれからなる。

【0016】

本発明の第6の態様は、それを必要とする対象においてリサウイルス疾患に対する免疫応答を誘導するための方法であって、本明細書に記載の構築物、ベクター又は自己増幅RNA分子のうちの1つ以上を含む組成物の免疫学的に有効な量を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0017】

10

本発明の第7の実施形態は、本明細書に記載の自己増幅RNA分子をコードするベクター又はDNA分子を転写して、リサウイルス抗原のコード領域を含むRNAを生成する工程を含む、RNAベースのワクチンを生成する方法を提供する。

【0018】

本発明の第8の態様は、本明細書に記載の方法によって生成される組成物を提供する。

【0019】

本発明の第9の態様は、対象におけるリサウイルスにより引き起こされる疾患に対する免疫応答を誘導するための、本明細書に記載の構築物、ベクター、自己増幅RNA分子、又は組成物の使用を提供する。

【0020】

20

本発明の第10の態様は、医薬に使用するための、本明細書に記載の構築物、ベクター、自己増幅RNA分子、又は組成物を提供する。

【0021】

本発明の第11の態様は、（例えば防御的免疫応答を誘導することによる）対象におけるリサウイルスにより引き起こされる疾患の治療又は予防に使用するための、本明細書に記載の構築物、ベクター、自己増幅RNA分子、又は組成物を提供する。

【0022】

本発明の第12の態様は、対象におけるリサウイルス疾患に対する免疫応答を誘導するための医薬の製造における、本明細書に記載の構築物、ベクター、自己増幅RNA分子、又は組成物の使用を提供する。

30

【0023】

本発明の第13の態様は、ヒトにおいて免疫原性である2 μ g以下の量の、本明細書に記載の構築物、ベクター、自己増幅RNA分子、又は組成物のヒト用量を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1A】図1A：SAM狂犬病構築物の模式図。「NSP」は、非構造タンパク質をコードするウイルスRNAを指す。狂犬病G抗原はNSPの3'側にコードされている。構築物1：Flury HEP狂犬病G；構築物2：Flury LEP狂犬病G；構築物3：コドン最適化Flury LEP狂犬病G；構築物4：コドン対最適化Flury LEP狂犬病G。

【図1B - 1】図1B：構築物1～4のDNA配列のアラインメント。この図はもともとカラーであり、その後、白黒に改訂された。ここで、明細書はこの図に関連する色を指し、次の手がかりがこの図に適用される：黄 = 修飾なし；青 = イタリック体；緑 = 下線；白 = 太字。

40

【図1B - 2】図1Bの続き1。

【図1B - 3】図1Bの続き2。

【図1B - 4】図1Bの続き3。

【図2A】図2A：BHK細胞における構築物1～4による狂犬病糖タンパク質（G）抗原のウェスタンブロット発現。

【図2B】図2B：ペプチドN-グリコシダーゼA（PNGase A）処理前後の構築物1及び3による狂犬病糖タンパク質（G）抗原のウェスタンブロット発現。

50

【図3A】図3A：35日目のRABAVERTと比較した、14日目にCNE又はLNPで製剤化したSAM構築物1～4によりBalb/cマウスにおいて誘導された中和抗体（nAb）力価。迅速蛍光フォーカス抑制試験（Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test：RFFIT）により測定し、幾何平均力価（GMT）で表した。

【図3B】図3B：35日目のRABAVERTと比較した、35日目にCNE又はLNPで製剤化したSAM構築物1～4によりBalb/cマウスにおいて誘導された中和抗体（nAb）力価。迅速蛍光フォーカス抑制試験（RFFIT）により測定し、幾何平均力価（GMT）で表した。

【図4】図4：CNE又はLNPで製剤化した構築物4のBalb/cマウスにおける免疫後6ヶ月間のRFFITにより測定した中和抗体（nAb）力価。RABAVERT（丸）；CNE中1.5ugの構築物4（四角）；LNP中0.15ugの構築物4（三角）；LNP中1.5ugの構築物4（逆三角）。

10

【図5A】図5A：14日目。CNE又はLNPで製剤化した構築物4のBalb/cマウスにおけるRFFITにより測定した中和抗体（nAb）力価で、免疫原性との用量応答関係を示す。上の破線は100IU/mlのベンチマークを示し、これは高用量でRABAVERTによって誘発されることが観察されるピークnAb力価である。下の破線は免疫原性閾値0.5IU/mlを示す。

【図5B】図5B：35日目。CNE又はLNPで製剤化した構築物4のBalb/cマウスにおけるRFFITにより測定した中和抗体（nAb）力価で、免疫原性との用量応答関係を示す。上の破線は100IU/mlのベンチマークを示し、これは高用量でRABAVERTによって誘発されることが観察されるピークnAb力価である。下の破線は免疫原性閾値0.5IU/mlを示す。

【図6】図6：0、1及び3週での完全ヒト用量のRABAVERT免疫と比較した、0、8及び24週での構築物4の免疫の非ヒト霊長類におけるRFFITにより測定した中和抗体（nAb）力価。上図は、CNEに製剤化された4つの用量の構築物4の中和抗狂犬病抗体力価を示す。150ug（四角）；75ug（三角）；15ug（逆三角）；3ug（黒丸）；RABAVERT（白丸）。上側の破線は免疫原性の防御閾値を示し、log0.1の下側の点線は定量下限（LLOQ）を示す。下図はLNPに製剤化された4つの用量の構築物4の中和抗狂犬病抗体力価を示す。75ug（三角）；15ug（逆三角）；3ug（黒丸）；RABAVERT（白丸）。上側の破線は免疫原性の防御閾値を示し、log0.1の下側の点線は定量下限（LLOQ）を示す。

20

【図7】図7：0、1及び3週での完全ヒト用量のRABAVERT免疫と比較した、0、8及び24週での構築物4の免疫の非ヒト霊長類におけるELISAにより測定したIgG力価。上図は、CNEに製剤化された4つの用量の構築物4の抗狂犬病IgG力価を示す。150ug（四角）；75ug（三角）；15ug（逆三角）；3ug（黒丸）；RABAVERT（白丸）。上側の破線は免疫原性の防御閾値を示し、log0.1の下側の点線は定量下限（LLOQ）を示す。下図は、RV39 LNPに製剤化された構築物4の4つの用量の抗狂犬病IgG力価を示す。75ug（三角）；15ug（逆三角）；3ug（黒丸）；RABAVERT（白丸）。上側の破線は免疫原性の防御閾値を示し、log0.1の下側の点線は定量下限（LLOQ）を示す。

30

【図8】図8：15pg～1.5ugの用量範囲のLNP又はCNE 15ug中の構築物4のマウスにおけるRFFITにより測定した中和抗体力価の用量応答性。上図は、1日目の単回用量後6ヶ月間の中和抗体力価を示している。下図は、1日目と22日目の2回用量後6ヶ月間の中和抗体力価を示している。RABAVERT（白丸）；LNP 1.5ug（白四角）；LNP 0.15ug（白三角）；LNP 0.015ug（白逆三角）；LNP 0.0015ug（黒四角）；LNP 0.00015ug（黒三角）；LNP 0.000015ug（黒逆三角）；CNE 15ug（黒丸）。上側の破線は免疫原性の防御閾値を示し、log0.1未満の下側の点線は定量下限（LLOQ）を示す。以下の所見が認められた。以前の狂犬病SAM研究と同様の抗体レベルが、より低いRNA用量で用量応答で誘導された。15ピコグラムという低用量での単回免疫は、マウスで試験した6ヶ月間の期間にわたって維持された、かなりの安定したレベルの狂犬病中和抗体を誘導した。このレベルは2回目の免疫によってブーストされ、3回のRABAVERT免疫よりも有意に高いままであった。

40

【図9】図9：CNE中に製剤化された構築物4の単回15ug用量によるマウスにおける特異的多機能性CD8+T細胞応答。Th1サイトカインであるIL-2、TNF、インターフェロン及びCD107aは、狂犬病抗原ペプチドによって刺激された。CD4+及びCD8+T細胞におけるそれらの発現は、それぞれ上と下のパネルに示されている。ワクチン接種群（8匹）を生理食塩水対照群（5匹）と比較した。各群の細胞を狂犬病抗原ペプチド又は培地対照のいずれかに

50

曝露した。

【図 1 0】図10：2回用量（1日及び22日）後6ヶ月間における15pg～0.15ugの用量範囲の構築物4のマウスにおけるRFFITにより測定した中和抗体力価の用量応答性。構築物4は、LNP RV39又はLNP RV94のいずれかで製剤化された。RABAVERT（白丸）；0.15ug RV39（白四角）；0.15ug RV94（破線四角）；0.0015ug RV39（白三角）；0.0015ug RV94（破線三角）；0.000015ug RV39（白逆三角）；0.000015ug RV94（破線逆三角）。RV39及びRV94 LNP製剤はいずれも同様の狂犬病nAb力価をもたらすが、RV39では寿命が長いことが観察された。

【図 1 1】図11：2回用量（1日及び22日）後6ヶ月間における15pg～0.15ugの用量範囲の構築物4のマウスにおけるELISAにより測定したIgGの用量応答性。構築物4は、LNP RV39又はLNP RV94のいずれかで製剤化された。RABAVERT（白丸）；0.15ug RV39（白四角）；0.15ug RV94（破線四角）；0.0015ug RV39（白三角）；0.0015ug RV94（破線三角）；0.000015ug RV39（白逆三角）；0.000015ug RV94（破線逆三角）。

10

【発明を実施するための形態】

【0025】

配列の説明

配列番号1：ベクター骨格 - VEE TC83（空ベクター）

配列番号2：構築物1 コード配列

配列番号3：構築物1 アミノ酸配列

配列番号4：構築物2 コード配列

配列番号5：構築物2 アミノ酸配列

配列番号6：構築物3 コード配列

配列番号7：構築物3 アミノ酸配列

配列番号8：構築物4 コード配列

配列番号9：構築物4 アミノ酸配列

20

【0026】

発明の詳細な説明

リサウイルスワクチン

ラブドウイルス（Rhabdoviridae）科の属であるリサウイルスは、一本鎖アンチセンスRNAゲノムを有するエンベロープウイルスである。これは中枢神経系を介して広がる神経毒性ウイルスであり、脳と脊髄の重度の炎症を引き起こす。このRNAは、糖タンパク質（G）、ウイルスRNAポリメラーゼ（L）、マトリックスタンパク質（M）、核タンパク質（N）、及びリンタンパク質（P）の5つの遺伝子をコードする。Gタンパク質は防御中和抗体の主要な標的である。

30

【0027】

リサウイルス属は7つの遺伝子型を含み、そのうち次の6つはヒト狂犬病の症例と関連付けられている：狂犬病ウイルス（RABV、遺伝子型1）、モコラ（Mokola）ウイルス（遺伝子型3）、ドゥベンハイグ（Duvenhage）ウイルス（遺伝子型4）、ヨーロッパコウモリリサウイルス（遺伝子型5）、ヨーロッパコウモリリサウイルス2（遺伝子型6）、及びオーストラリアコウモリリサウイルス（遺伝子型7）。症状が発症すると、狂犬病はほぼ100パーセント致死的である。

40

【0028】

ワクチン接種は、感染性疾患を予防するための最も有効な方法の1つである。しかし、抗原の単回投与は、完全な免疫及び/又は長期持続性の応答を付与するのに十分でないことが多い。現在、狂犬病には複数用量ワクチン接種が必要である。特定の病原体に対する強力かつ持続的な免疫を確立するためのアプローチには、ワクチンへのアジュバントの添加及び/又は反復ワクチン接種、すなわち、抗原の1回以上のさらなる用量の投与による免疫応答のブーストが含まれる。そのようなさらなる投与は、同じワクチンで（同種の追加免疫）又は異なるワクチンで（異種の追加免疫）実行され得る。同種の追加免疫の最も一般的なアプローチは、同じワクチンを投与するだけでなく、以前の投与と同じ用量で投与

50

することでもある。

【 0 0 2 9 】

狂犬病ワクチンは現在主に曝露後予防に使用されており、狂犬病ワクチン用量の低いパーセンテージのみが曝露前予防に使用されている。介入スケジュールは、ウイルスが侵入する創傷の重症度及び種類に基づいて世界保健機関によって規定されており、抗狂犬病免疫グロブリンによる追加の治療を含み得る。曝露前予防は、典型的には、曝露リスクに応じてタイミングを調整した追加免疫を用いた2～3回の筋肉内用量のための2～3回の訪問を含む。曝露後予防は、典型的には、4～5回の筋肉内用量のための3～5回の訪問、又は4回の皮内用量のための4回の訪問を含む。一部の発展途上国では、感染した動物の脳内で狂犬病ウイルスを増殖させ、ウイルスを不活化し、腹壁内に皮下で14～21回、毎日注射することによって未だ免疫が行われている。

10

【 0 0 3 0 】

現在、いくつかの狂犬病ワクチンが曝露前及び曝露後予防の両方でヒトでの使用に利用可能であり、特定の投与レジメンで投与される場合には規制当局によって承認されている。IMOVAX (Sanofi Pasteur) は、Wistar Instituteから得られた株PM-1503-3Mから調製された凍結乾燥狂犬病ウイルスとして提供されている。それは感染したヒト二倍体細胞から採取され、次いで不活化される。曝露前及び曝露後予防は両方とも、0、7及び21又は28日目に筋肉内投与される3回用量からなる。VERORAB (Sanofi Pasteur) は、Wistar Instituteから得られた株PM/WI 38 1503-3Mから調製される凍結乾燥狂犬病ウイルスとして提供される。それはVero細胞から回収され、次いで不活化される。曝露前予防は、0、7及び21又は28日目に筋肉内投与される3回用量からなる。曝露後予防は、0、3、7、14及び28日目に筋肉内投与される5回用量からなる。VAXIRAB/LYSSAVAC (Zydus Cadila/Novavax) は、狂犬病ウイルスのPitman Moore株から調製された凍結乾燥狂犬病ウイルスとして提供される。それはアヒル胚細胞において産生され、次いで不活化される。曝露前予防は、0、7及び21又は28日目に筋肉内投与される3回用量からなる。曝露後予防は、0、3、7、14及び28日目に筋肉内投与される5回用量からなる。曝露後予防も皮内投与することができ、0、3、7及び28日目に2つの部位の各々に注射することができる。RABAVERT (GSK) は、Flury LEP (low egg passage : 低卵継代) 株から調製される凍結乾燥狂犬病ウイルスとして提供される。それはニワトリ線維芽細胞の初代培養物中で増殖され、次いで不活化される。曝露前予防は、0、7及び21又は28日目に筋肉内投与される3回用量からなる。曝露後予防は、0、3、7、14及び28日目に筋肉内投与される5回用量からなる。

20

30

【 0 0 3 1 】

RABAVERT中に存在する狂犬病ウイルス株Flury LEPは、59代目の卵継代としてアメリカンタイプカルチャーコレクションから入手した。ウイルスの増殖のための増殖培地は、ヒトアルブミン、加工ウシゼラチン (ポリゼリン) 及び抗生物質を添加した合成細胞培養培地である。ウイルスを -プロピオラクトンで不活化し、ショ糖密度勾配でのゾーン遠心分離によってさらに処理する。このワクチンを、緩衝化ポリゲリン及びグルタミン酸カリウムの安定剤溶液の添加後に凍結乾燥する。1用量 (1.0ml) のRABAVERTの効力は、約2.5IU狂犬病抗原である。

【 0 0 3 2 】

核酸ベースの狂犬病ワクチンは過去に試みられてきたが、RABAVERTよりも劣っていることが証明されている。糖タンパク質遺伝子をコードする狂犬病DNAワクチン及び糖タンパク質遺伝子をコードする狂犬病自己増幅RNAワクチンを、RABAVERTと直接比較した。RABAVERTをワクチン接種したマウスは、狂犬病Gタンパク質を発現するシンDBIS (Sindbis) ウイルスRNAレプリコン又は狂犬病Gタンパク質を発現するDNAワクチンのいずれかをワクチン接種したマウスよりも、より強力なT細胞増殖反応、サイトカイン産生の増加、及びより高い抗体力価を示した。シンDBISウイルスレプリコンワクチンはまた、狂犬病チャレンジに対する防御においてRABAVERTよりも劣っていた (Saxena et al. (2009) Veterinary Microbiol. 136:36)。

40

【 0 0 3 3 】

50

抗原、変異体、断片及び構築物

本発明は、対象におけるリサウウイルスによって引き起こされる疾患に対する免疫応答の誘導のための免疫原性組成物の成分として有用な構築物を提供する。これらの構築物は、抗原の発現、処置におけるそれらの使用のための方法、及びそれらの製造のための方法に有用である。「構築物」は遺伝子操作された分子である。「核酸構築物」は遺伝子操作された核酸を指し、DNA、RNA、又は非天然核酸モノマーを含み得る。

【0034】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される構築物は、リサウウイルスの野生型ポリペプチド配列、その変異体又は断片をコードする。構築物は、リサウウイルスのポリペプチド配列に対して異種のポリペプチド配列をさらにコードし得る。いくつかの実施形態において、構築物は、CVS11、CVS-N2C、Evelyn Rokitniki Abelset (ERA)、Flury、Pitman Moore又はWistar株のリサウウイルスタンパク質のポリペプチド配列の野生型、変異体及び/又は断片をコードする。このような抗原は、狂犬病ウイルス糖タンパク質(G)、RNAポリメラーゼ(L)、マトリックスタンパク質(M)、核タンパク質(N)及びリンタンパク質(P)に由来し得る。

【0035】

ポリペプチド配列の「変異体(バリエーション)」は、基準配列と比較した場合、1つ以上のアミノ酸の付加、置換及び/又は欠失を有するアミノ酸配列を含む。変異体は、全長野生型ポリペプチド、例えば、配列番号3、配列番号5、配列番号7又は配列番号9によるポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含み得る。あるいは又はそれに加えて、ポリペプチドの断片は、全長ポリペプチドの連続アミノ酸配列と同一である少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも20、又はそれ以上のアミノ酸の連続アミノ酸配列を含み得るか又はそれからなり得る、全長ポリペプチドの免疫原性断片(すなわち、エピトープ含有断片)を含み得る。

【0036】

リサウウイルスG抗原が野生型リサウウイルス糖タンパク質の変異体である場合、変異体は、全長野生型ポリペプチド、例えば、配列番号3、配列番号5、配列番号7又は配列番号9によるポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むか又はそれからなってもよい。あるいは又はさらに、ポリペプチドの断片は、全長ポリペプチドの連続アミノ酸配列と同一である少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも20、又はそれ以上のアミノ酸の連続アミノ酸配列を含み得るか又はそれからなり得る、全長ポリペプチドの免疫原性断片(すなわち、エピトープ含有断片)を含み得る。

【0037】

本明細書中で使用される場合、用語「抗原」は、宿主の免疫系を刺激して、体液性及び/又は細胞性抗原特異的免疫応答(すなわち、天然ポリペプチドを特異的に認識する免疫応答)を生じる1つ以上のエピトープ(例えば、直鎖状、コンホメーション状、又はその両方)を含む分子をいう。「エピトープ」は、その免疫特異性を決定する抗原の部分である。

【0038】

T細胞及びB細胞エピトープは経験的に(例えば、PEPSCAN又は類似の方法を使用して)同定し得る。それらはまた、公知の方法(例えば、Jameson-Wolf抗原性インデックス、マトリックスペースのアプローチ、TEPITOPE、ニューラルネットワーク、OptiMer&EpiMer、ADEPT、Tsites、親水性又は抗原性インデックスを使用する)によって予測し得る。

【0039】

10

20

30

40

50

あるいは又はさらに、本明細書中の構築物は、リサウイルスG抗原をコードする。「リサウイルスG抗原」とは、野生型リサウイルス糖タンパク質、その変異体、又は断片のアミノ酸配列、又はアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を意図する。図1は、いくつかの全長リサウイルスGタンパク質変異体の核酸コード配列を同定する。

【0040】

あるいは又はさらに、ワクチン構築物の交差防御範囲は、抗原のメドイド (medoid) 配列を含めることによって増大させることができる。「メドイド (medoid)」とは、他の配列に対して最小限の非類似性を有する配列を意味する。あるいは又はさらに、本発明のベクターは、狂犬病G糖タンパク質又はその免疫原性断片のメドイド配列を含む。あるいは又はさらに、本発明の自己増幅RNA構築物は、狂犬病G糖タンパク質のメドイド配列を含む。あるいは又はさらに、メドイド配列は、NCBIデータベースにおいて注釈された全ての狂犬病Gタンパク質配列の中でアミノ酸同一性の平均のパーセントが最も高い天然ウイルス株に由来する。あるいは又はさらに、狂犬病G糖タンパク質のメドイド配列はNCBI株AGN94271である。

10

【0041】

遺伝暗号の縮重性の結果として、ポリペプチドは、種々の異なる核酸配列によってコードされ得る。コード化は、いくつかの同義コドン、すなわち同じアミノ酸をコードするコドンを、他のものよりも使用するように偏っている。「コドン最適化」とは、組換え核酸のコドン構成における修飾がアミノ酸配列を変化させることなく行われることを意図する。コドン最適化は、生物特異的コドン使用頻度を使用することによって、異なる生物におけるmRNA発現を改善するために使用されてきた。

20

【0042】

コドン偏りに加えて及びそれとは独立して、いくつかの同義コドン対が、他のものよりも高頻度で使用される。このコドン対の偏りは、いくつかのコドン対が過剰提示され、他のコドン対が過小提示されることを意味する。コドン対脱最適化は、ウイルス毒性を減少させるために使用されてきた。例えば、過小提示されるコドン対を含むように改変されたポリオウイルスは野生型ポリオウイルスと比較して、減少した翻訳効率を実証し、そして弱毒化されたことが報告されている (WO 2008/121992; Coleman et al. (2008) Science 320:1784)。Coleman et al. は、コドン対の脱最適化によって合成弱毒化ウイルスを操作することによって、野生型と同じアミノ酸配列をコードしながらも、同義コドンの異なるペアワイズ配置を使用するウイルスを作り出すことができることを示した。コドン対脱最適化によって弱毒化されたウイルスは野生型と比較して1000倍まで少ないブランクを生成し、より少ないウイルス粒子を生成し、そしてブランクを形成するために約100倍多くのウイルス粒子を必要とした。

30

【0043】

対照的に、ヒトゲノムにおいて過剰提示されるコドン対を含むように改変されたポリオウイルスは野生型RNAと同様の様式で作用し、そして野生型RNAとサイズが同一のブランクを生成した (Coleman et al. (2008) Science 320:1784)。これは、過剰提示されたコドン対を有するウイルスが過少提示されたコドン対を有するウイルスと同様の数の突然変異を含み、野生型と比較して翻訳の増強を示したという事実にもかかわらず起こった。この観察は、コドン対最適化構築物がそれらの非コドン対最適化対応物と同様の様式で作用することが予想され、そして機能的利点を提供することが予想されないことを示唆する。

40

【0044】

あるいは又はさらに、本発明の構築物はコドン最適化核酸配列を含む。あるいは又はさらに、本発明の自己増幅RNA構築物は、狂犬病糖タンパク質又はその免疫原性誘導体若しくは断片のコドン最適化配列を含む。あるいは又はさらに、本発明の自己増幅RNA構築物は、Flury LEP野生型狂犬病糖タンパク質又はその免疫原性誘導体若しくは断片のコドン最適化配列を含む。

【0045】

あるいは又はさらに、本発明の構築物は、コドン対最適化核酸配列を含む。あるいは又

50

はさらに、本発明の自己増幅RNA構築物は、狂犬病糖タンパク質又はその免疫原性誘導体若しくは断片のコード最適化配列を含む又はそれからなる。あるいは又はさらに、本発明の自己増幅RNA構築物は、Flury LEP野生型狂犬病糖タンパク質又はその免疫原性誘導体若しくは断片のコード最適化配列を含む又はそれからなる。

【0046】

あるいは又はさらに、本明細書中の構築物は、リサウイルスL抗原をコードする。「リサウイルスL抗原」とは、既知の野生型リサウイルスRNAポリメラーゼ、その変異体又は断片のアミノ酸配列、又はアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を意図する。したがって、リサウイルスL抗原が野生型リサウイルスRNAポリメラーゼの変異体である場合、変異体は、全長野生型ポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、
10
少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含み得る。あるいは又はさらに、ポリペプチドの断片は、全長ポリペプチドの連続アミノ酸配列と同一である少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも20、又はそれ以上のアミノ酸の連続アミノ酸配列を含み得る全長ポリペプチドの免疫原性断片（すなわち、エピトープ含有断片）を含み得る。

【0047】

あるいは又はさらに、本明細書中の構築物は、リサウイルスM抗原をコードする。「リサウイルスM抗原」とは、既知の野生型リサウイルスマトリックスタンパク質、その変異体又は断片のアミノ酸配列、又はアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を意図する。
20
したがって、リサウイルスM抗原が野生型リサウイルスマトリックスタンパク質の変異体である場合、変異体は、全長野生型ポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含み得る。あるいは又はさらに、ポリペプチドの断片は、全長ポリペプチドの連続アミノ酸配列と同一である少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも20、又はそれ以上のアミノ酸の連続アミノ酸配列を含み得る全長ポリペプチドの免疫原性断片（すなわち、エピトープ含有断片）を含み得る。
30

【0048】

あるいは又はさらに、本明細書中の構築物は、リサウイルスN抗原をコードする。「リサウイルスN抗原」とは、野生型リサウイルス核タンパク質、その変異体又は断片のアミノ酸配列、又はアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を意図する。したがって、リサウイルスN抗原が野生型リサウイルス核タンパク質の変異体である場合、変異体は、全長野生型ポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含み得る。あるいは又はさらに、ポリペプチドの断片は、全長ポリペプチドの連続アミノ酸配列と同一である少なくとも8、
40
少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも20、又はそれ以上のアミノ酸の連続アミノ酸配列を含み得る全長ポリペプチドの免疫原性断片（すなわち、エピトープ含有断片）を含み得る。

【0049】

あるいは又はさらに、本明細書中の構築物は、リサウイルスP抗原をコードする。「リサウイルスP抗原」とは、既知の野生型リサウイルスリンタンパク質、その変異体又は断片のアミノ酸配列、又はアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を意図する。したがって、リサウイルスP抗原が野生型リサウイルスリンタンパク質の変異体である場合、変異体は、全長野生型ポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、
50
少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、

少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含み得る。あるいは又はさらに、ポリペプチドの断片は、全長ポリペプチドの連続アミノ酸配列と同一である少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも20、又はそれ以上のアミノ酸の連続アミノ酸配列を含み得る全長ポリペプチドの免疫原性断片（すなわち、エピトープ含有断片）を含み得る。

【0050】

あるいは又はさらに、構築物はポリペプチドの複数の要素をコードする。要素は隣接する要素のすぐ隣に、すなわちいかなる介在アミノ酸もなしに並置される。あるいは又はさらに、1、2、3、4又は5アミノ酸のリンカー基が、1つ以上のポリペプチド要素の間に存在する。

10

【0051】

あるいは又はさらに、構築物は、1つ以上の抗原を含むRNA核酸配列を含む。複数の抗原を、本発明の構築物によって同時送達することができる。本発明の構築物は、第1のリサウウイルス抗原をコードする第1の配列、及び任意に、リサウウイルス抗原であってもなくてもよい第2の抗原を含有する組換えポリシストロン性核酸分子を含む又はそれからなる。所望であれば、追加の抗原（例えば、第3の抗原、第4の抗原、第5の抗原など）をコードする1つ以上の追加の配列が、組換えRNA中に存在し得る。あるいは又はさらに、本発明の構築物は、ポリシストロン性であり得る。

20

【0052】

ポリペプチド

「ポリペプチド」とは、配列を規定し、アミド結合によって連結された複数の共有結合したアミノ酸残基を意味する。この用語は、ペプチドと交換可能に使用される。ペプチドという用語は、当技術分野で知られているように、化学反応又は酵素触媒反応によって導入される翻訳後修飾も包含する。この用語は、ポリペプチドの変異体又は断片を指すこともある。

【0053】

あるいは又はさらに、本明細書中のポリペプチドは非天然形態（例えば、組換え形態又は修飾形態）である。本発明のポリペプチドは、C末端及び/又はN末端に共有結合修飾を有し得る。それらはまた、種々の形態（例えば、天然、融合、グリコシル化、非グリコシル化、脂質化、非脂質化、リン酸化、非リン酸化、ミリスティル化、非ミリスティル化、単量体、多量体、粒状、変性など）をとり得る。ポリペプチドは天然又は非天然にグリコシル化され得る（すなわち、ポリペプチドは、対応する天然ポリペプチドにおいて見出されるグリコシル化パターンとは異なるグリコシル化パターンを有し得る）。

30

【0054】

本明細書中のポリペプチドの非天然形態は、リサウウイルス抗原配列に加えて、1つ以上の異種アミノ酸配列（例えば、別の抗原配列、別のシグナル配列、検出可能なタグなど）を含み得る。例えば、本明細書中のポリペプチドは、融合タンパク質であり得る。あるいは又はさらに、ポリペプチドのアミノ酸配列又は化学構造は、天然ポリペプチド配列と比較して、（例えば、1つ以上の非天然アミノ酸を用いて、共有結合修飾によって、及び/又は例えば、1つ以上のグリコシル基の除去若しくは付加によって異なるグリコシル化パターンを有することによって）修飾されてもよい。

40

【0055】

あるいは又はさらに、構築物は、配列番号3、配列番号5、配列番号7及び配列番号9からなる群より選択される配列を有するポリペプチドをコードする。あるいは又はさらに、構築物は、配列番号3、配列番号5、配列番号7及び配列番号9からなる群から選択される配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるポリペプチドをコードする。あるいは又はさらに、構築物は、配列番号3、配列番号5、配列番号7及び配列番号9からなる群より選択される全長配列の断片を含む

50

ポリペプチドをコードし、ここで、断片は、全長配列よりも最大1、10、25、50、100、200、300、400、450又は475アミノ酸短い、全長配列のアミノ酸配列の連続したストレッチを含む。

【0056】

核酸

用語「核酸」は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、及び/又はそれらの類似体を含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を意味する。これには、DNA、RNA及びDNA/RNAハイブリッドが含まれる。それにはまた、修飾された骨格（例えば、ペプチド核酸（PNA）若しくはホスホロチオエート）又は修飾された塩基を含むものなどのDNA又はRNA類似体が含まれる。したがって、本開示の核酸は、mRNA、DNA、cDNA、組換え核酸、分岐核酸、プラスミド、ベクターなどを含む。核酸がRNAの形態をとる場合、核酸は5'キャップを有していても有していなくてもよい。

10

【0057】

本発明者は、本明細書において、リサウイルス抗原をコードする1つ以上の核酸配列を含む核酸を開示する。本明細書中に開示される核酸は種々の形態（例えば、一本鎖、二本鎖、ベクターなど）をとり得る。核酸は環状であっても分枝状であってもよいが、典型的には直鎖状である。

【0058】

本明細書中で使用される核酸は、好ましくは精製された形態又は実質的に精製された形態、すなわち、他の核酸を実質的に含まない（例えば、天然に存在する核酸を含まない）、特に他のリサウイルス又は宿主細胞核酸（典型的には、少なくとも約50%の純度（重量による）、及び通常は少なくとも約90%の純度である）を実質的に含まない形態で提供される。

20

【0059】

核酸は、多くの方法で、例えば、全部又は一部の化学合成（例えば、DNAのホスホルアミダイト合成）によって、ヌクレアーゼ（例えば、制限酵素）を使用してより長い核酸を消化することによって、より短い核酸又はヌクレオチドを連結することによって（例えば、リガーゼ又はポリメラーゼを使用して）、ゲノム又はcDNAライブラリーから、調製され得る。

【0060】

本明細書中の核酸は、少なくとも1つのリサウイルス抗原をコードする配列を含む。典型的には、本発明の核酸は、組換え形態、すなわち、天然に存在しない形態である。例えば、核酸は、リサウイルス抗原をコードする配列に加えて、1つ以上の異種核酸配列（例えば、別の抗原をコードする配列、及び/又はプロモーター若しくは内部リボソーム侵入部位のような制御配列）を含み得る。核酸は、ベクターの一部、すなわち、1つ以上の細胞型の形質導入/トランスフェクションのために設計された核酸構築物の一部であり得る。ベクターは、例えば、宿主細胞においてヌクレオチド配列を発現するように設計された発現ベクター、又は組換えウイルス若しくはウイルス様粒子の産生をもたらすように設計されたウイルスベクターであり得る。

30

【0061】

あるいは又はさらに、核酸の配列又は化学構造は、リサウイルス抗原をコードする天然配列と比較して修飾し得る。核酸分子の配列は、例えば、核酸の発現若しくは複製の効率を増加させるために、又は分解に対するさらなる安定性若しくは耐性を提供するために、修飾し得る。あるいは又はさらに、本発明のワクチン構築物は、in vitroアッセイにおいてRNase消化に対して耐性である。

40

【0062】

上記のポリペプチドをコードする核酸は、翻訳効率及び/又は半減期を増加させるために修飾し得る。例えば、核酸は、コドン最適化又はコドン対最適化し得る。ポリAテール（例えば、約30、約40又は約50以上のアデノシン残基）を、その半減期を増加させるためにRNAの3'末端に結合し得る。RNAの5'末端は構造m7G (5')ppp(5')N（キャップ0構造）又

50

はその誘導体を有する修飾リボヌクレオチドでキャップされてもよく、これはRNA合成の間に組み込まれてもよく、又はRNA転写後に酵素的に操作されてもよい（例えば、N7-モノメチル化キャップ0構造の構築を触媒する、mRNAトリホスファターゼ、グアニリルトランスフェラーゼ及びグアニン-7-メチルトランスフェラーゼからなるワクシニアウイルスキャップ酵素（VCE）を使用することによって）。キャップ0構造は、RNA分子の安定性及び翻訳効率を維持する際に重要な役割を果たす。RNA分子の5'キャップは2'-O-メチルトランスフェラーゼによってさらに修飾されてもよく、これはキャップ1構造（m7Gppp [m2'-N] N）の生成をもたらし、これは翻訳効率をさらに増大させ得る。

【0063】

核酸は、1つ以上のヌクレオチド類似体又は修飾ヌクレオチドを含み得る。本明細書中で使用される場合、「ヌクレオチド類似体」又は「修飾ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの窒素塩基（例えば、シトシン（C）、チミン（T）、ウラシル（U）、アデニン（A）又はグアニン（G））中又は上に1つ以上の化学修飾（例えば、置換）を含むヌクレオチドをいう。ヌクレオチド類似体は、ヌクレオシドの糖部分（例えば、リボース、デオキシリボース、修飾リボース、修飾デオキシリボース、6員糖類似体、又は開鎖糖類似体）の中又は上、あるいはリン酸部分の中又は上にさらなる化学修飾を含むことができる。多くの修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドが市販されている。

【0064】

修飾ヌクレオシド及びヌクレオチドに組み込むことができ、mRNA分子中に存在する修飾核酸塩基としては、以下が挙げられる：m5C(5-メチルシチジン)；m5U(5-メチルウリジン)；m6A(N6-メチルアデノシン)；s2U(2-チオウリジン)；Um(2'-O-メチルウリジン)；m1A(1-メチルアデノシン)；m2A(2-メチルアデノシン)；Am(2'-1-O-メチルアデノシン)；ms2m6A(2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン)；i6A(N6-イソペンテニルアデノシン)；ms2i6A(2-メチルチオ-N6イソペンテニルアデノシン)；io6A(N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン)；ms2io6A(2-メチルチオ-N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン)；g6A(N6-グリニルカルバモイルアデノシン)；t6A(N6-トレオニルカルバモイルアデノシン)；ms2t6A(2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン)；m6t6A(N6-メチル-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン)；hn6A(N6-30ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)；ms2hn6A(2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)；Ar(p)(2'-O-リボシルアデノシン(リン酸))；l(イノシン)；mil(1-メチルイノシン)；m'lm(1, 2'-O-ジメチルイノシン)；m3C(3-メチルシチジン)；Cm(2T-O-メチルシチジン)；s2C(2-チオシチジン)；ac4C(N4-アセチルシチジン)；f5C(5-ホルミルシチジン)；m5Cm(5,2-O-ジメチルシチジン)；ac4Cm(N4アセチル2T0メチルシチジン)；k2C(リシジン)；m1G(1-メチルグアノシン)；m2G(N2-メチルグアノシン)；m7G(7-メチルグアノシン)；Gm(2'-O-メチルグアノシン)；m22G(N2, N2-ジメチルグアノシン)；m2Gm(N2,2'-O-ジメチルグアノシン)；m22Gm(N2,N2,2'-O-トリメチルグアノシン)；Gr(p)(2'-O-リボシルグアノシン(リン酸))；yW(ワイプトシン)；o2yW(ペルオキシワイプトシン)；OHyW(ヒドロキシワイプトシン)；OHyW⁺(過少修飾ヒドロキシワイプトシン)；imG(ワイオシン)；mimG(メチルグアノシン)；Q(キューオシン)；oQ(エポキシキューオシン)；galQ(ガルタクトシルキューオシン)；manQ(マンノシル-キューオシン)；preQo(7-シアノ-7-デアザグアノシン)；preQi(7-アミノメチル-7-デアザグアノシン)；G*(アルカエオシン)；D(ジヒドロウリジン)；m5Um(5,2'-O-ジメチルウリジン)；s4U(4-チオウリジン)；m5s2U(5-メチル-2-チオウリジン)；s2Um(2-チオ-2'-O-メチルウリジン)；acp3U(3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン)；ho5U(5-ヒドロキシウリジン)；mo5U(5-メトキシウリジン)；cmo5U(ウリジン5-オキシ酢酸)；mcmo5U(ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル)；chm5U(5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン)；mchm5U(5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル)；mcm5U(5-メトキシカルボニルメチルウリジン)；mcm5Um(S-メトキシカルボニルメチル-2-O-メチルウリジン)；mcm5s2U(5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン)；nm5s2U(5-アミノメチル-2-チオウリジン)；mnm5U(5-メチルアミノメチルウリジン)；mnm5s2U(5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン)；mnm5se2U(5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン)；ncm5U

10

20

30

40

50

(5-カルバモイルメチルウリジン) ; ncm5Um(5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン) ; cmnm5U(5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン) ; cnmm5Um(5-カルボキシメチル1アミノメチル-2-L-Oメチルウリジン) ; cmnm5s2U(5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン) ; m62A(N6,N6-ジメチルアデノシン) ; Tm(2'-O-メチルイノシン) ; m4C(N4-メチルシチジン) ; m4Cm(N4, 2-O-ジメチルシチジン) ; hm5C(5-ヒドロキシメチルシチジン) ; m3U(3-メチルウリジン) ; cm5U(5-カルボキシメチルウリジン) ; m6Am(N6,T-O-ジメチルアデノシン) ; rn62Am(N6,N6,O-2-トリメチルアデノシン) ; m2'7G(N2,7-ジメチルグアノシン) ; m2'2'7G(N2,N2,7-トリメチルグアノシン) ; m3Um(3,2T-O-ジメチルウリジン) ; m5D(5-メチルジヒドロウリジン) ; £5Cm(5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン) ; m1Gm(1,2'-O-ジメチルグアノシン) ; m'Am(1,2-O-ジメチルアデノシン)イリノメチルウリジン) ; tm5s2U(S-タウリノメチル-2-チオウリジン) ; iniG-14(4-デメチルグアノシン) ; imG2(イソグアノシン) ; ac6A(N6-アセチルアデノシン) ; ヒポキサンチン ; イノシン ; 8-オキソ-アデニン、その7-置換誘導体 ; ジヒドロウラシル ; シュードウラシル ; 2-チオウラシル ; 4-チオウラシル ; 5-アミノウラシル ; 5-(C1~C6)-アルキルウラシル ; 5-メチルウラシル ; 5-(C2~C6)-アルケニルウラシル ; 5-(C2~C6)-アルキニルウラシル ; 5-(ヒドロキシメチル)ウラシル ; 5-クロロウラシル ; 5-フルオロウラシル ; 5-プロモウラシル ; 5-ヒドロキシシトシン ; 5-(C1~C6)-アルキルシトシン ; 5-メチルシトシン ; 5-(C2~C6)-アルケニルシトシン ; 5-(C2~C6)-アルキニルシトシン ; 5-クロロシトシン ; 5-フルオロシトシン ; 5-プロモシトシン ; N2-ジメチルグアニン ; 7-デアザグアニン ; 8-アザグアニン ; 7-デアザ-7-置換グアニン ; 7-デアザ-7(C2~C6)アルキニルグアニン ; 7-デアザ-8-置換グアニン ; 8-ヒドロキシグアニン ; 6-チオグアニン ; 8-オキソグアニン ; 2-アミノプリン ; 2-アミノ-6-クロロプリン ; 2,4-ジアミノプリン ; 2,6-ジアミノプリン ; 8-アザプリン ; 置換7-デアザプリン ; 7-デアザ-7-置換プリン ; 7-デアザ-8-置換プリン ; 水素 (脱塩基残基(abasic residue)) ; m5C ; m5U ; m6A ; s2U ; W ; 又は2'-O-メチル-U。これらの修飾核酸塩基及びそれらの対応するリボヌクレオシドの多くは商業的供給源から入手可能である。

10

20

30

40

50

【0065】

あるいは又はさらに、構築物は、配列番号2、配列番号4、配列番号6及び配列番号8からなる群より選択されるDNA核酸配列を含む。あるいは又はさらに、構築物は、配列番号2、配列番号4、配列番号6及び配列番号8からなる群から選択される配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一である核酸配列を含む。あるいは又はさらに、構築物は、配列番号2、配列番号4、配列番号6及び配列番号8からなる群より選択される全長配列の断片を含む核酸配列を含み、ここで、断片は、全長配列よりも最大1、10、25、50、100、200、300、400、450又は475核酸短い、全長配列の核酸配列の連続したストレッチを含む。

【0066】

核酸ベースのワクチン

本発明は、リサウイルス抗原、その変異体又は断片を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む組成物を開示する。このような組成物は、核酸ベースのワクチンであり得る。1つ以上の追加のリサウイルス抗原をコードする核酸配列を含むさらなる組成物はまた、核酸ベースのワクチンとして提供され得る。あるいは又はさらに、組成物は、第1のリサウイルス株由来のリサウイルス抗原をコードする核酸配列と、リサウイルスの1つ以上の他の株由来の追加のリサウイルス抗原をコードする追加の核酸配列とを含む。あるいは又はさらに、組成物は、リサウイルス抗原及び追加のリサウイルス抗原をコードする核酸配列を含む。あるいは、追加の非リサウイルス抗原がコードされてもよい。

【0067】

核酸は、例えばRNA(すなわち、RNAベースのワクチン)又はDNA(すなわち、プラスミドDNAワクチンなどのDNAベースのワクチン)であり得る。あるいは又はさらに、核酸ベースのワクチンは、RNAベースのワクチンである。あるいは又はさらに、RNAベースのワクチンは、自己増幅RNA分子を含む。自己増幅RNA分子は、アルファウイルス由来RNAレプリコ

ンであってもよい。

【0068】

本明細書中で使用される場合、用語「アルファウイルス」は、当該技術分野で慣用的な意味を有し、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEE、例えば、トリニダードドンキー、TC83C Rなど）、セムリキ森林ウイルス（SFV）、シンドビスウイルス、ロスリバーウイルス（Ross river virus）、西部ウマ脳炎ウイルス（Western equine encephalitis virus）、東部ウマ脳炎ウイルス（Eastern equine encephalitis virus）、チクングンヤウイルス（Chikungunya）、S.A. AR86ウイルス、エバグレーズウイルス（Everglades virus）、ムカンボウイルス（Mucambo）、パルマーフォレストウイルス（Barmah forest virus）、ミデルブルグウイルス（Middelburg virus）、ピクスナウイルス（Pixuna virus）、オニョンニョンウイルス（O'nyong-nyong virus）、ゲタウイルス（Getah virus）、サギヤマウイルス（Sagiyama virus）、ベバルウイルス（Bebaru virus）、マヤロウイルス（Mayaro virus）、ウナウイルス（Una virus）、アウラウイルス（Aura virus）、ワタロアウイルス（Whataroa virus）、バンバンキウイルス（Banbanki virus）、キジラガッチウイルス（Kyzylagach virus）、ハイランズジェイウイルス（Highlands J virus）、フォートモルガンウイルス（Fort Morgan virus）、ヌドゥムウイルス（Ndumu virus）、及びバギークリークウイルス（Buggy creek virus）などの種々の種がある。アルファウイルスという用語はまた、2つ以上のアルファウイルス由来のゲノム配列を含むキメラアルファウイルスを含み得る。

10

20

【0069】

「アルファウイルスレプリコン粒子」（VRP）又は「レプリコン粒子」は、アルファウイルス構造タンパク質でパッケージングされたアルファウイルスレプリコンである。

【0070】

「アルファウイルスレプリコン」（又は「レプリコン」）は、標的細胞においてin vivoでそれ自体の増幅を指令することができるRNA分子である。レプリコンはRNA増幅を触媒するポリメラーゼをコードし、コードされたポリメラーゼによって認識され利用される、複製に必要なシスRNA配列を含む。アルファウイルスレプリコンは、典型的には以下の順序付けられた要素：複製のためにシスで必要とされる5'ウイルス配列、生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質（nsP1、nsP2、nsP3、nsP4）をコードする配列、複製のためにシス必要とされる3'ウイルス配列、及びポリアデニレートトラクトを含む。アルファウイルスレプリコンはまた、異種ヌクレオチド配列の発現を指示する1つ以上のウイルスサブゲノム「接合領域」プロモーターを含み得、これは、発現対象のサブゲノム断片及び異種配列のウイルス転写を増加又は減少させるために改変され得る。

30

40

【0071】

「自己増幅RNA」及び「RNAレプリコン」は、それ自体を複製する能力を有するRNAを意味するために互換的に使用される。本発明の自己増幅RNA分子は、1つ以上の抗原をコードするmRNAを含む。このmRNAは、感染性ウイルスの産生に必要な構造タンパク質をコードする核酸配列と置き換えることができる。RNAは、酵素転写によってin vitroで産生され得、それによって、ワクチンの細胞培養製造に関連する製造上の問題を回避する。本発明の自己増幅RNA分子で免疫した後、RNA分子の複製及び増幅はトランスフェクトされた細胞の細胞質において起こり、核酸はゲノムに組み込まれない。RNAはゲノムに組み込まれず、標的細胞を形質転換しないので、自己増幅RNAワクチンは、組換えDNAワクチンが直面する安全性の障害をもたらさない。

【0072】

自己増幅RNA分子は当該分野で公知であり、そして例えば、アルファウイルスに由来する複製エレメントを使用し、そして構造ウイルスタンパク質を、目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列で置換することによって作製され得る。自己増幅RNA分子は、典型的には細胞への送達後に直接翻訳され得るプラス鎖分子である。この翻訳はRNA依存性RNAポリメラーゼを提供し、次いで、これは、送達されたRNAからアンチセンス転写物及びセンス転写物の両方を産生する。従って、送達されたRNAは、複数の娘RNAの産生を導く。

50

これらの娘RNA、並びに同一線上 (collinear) のサブゲノム転写物は、コードされる抗原 (例えば、リサウイルス抗原) のin situ発現を提供するためにそれ自体翻訳され得るか、あるいは送達されたRNAと同じ意味 (センス) を有するさらなる転写物を提供するために転写され得、次いで、これは、抗原のin situ発現を提供するために翻訳される。転写のこの配列の全体的な結果は導入されたレプリコンRNAの数の膨大な増幅であり、従って、コードされる抗原は、細胞の主要なポリペプチド産物になる。

【0073】

このように自己増幅を達成するための1つの適切な系は、アルファウイルスに基づくレプリコンを使用することである。これらのレプリコンは、細胞に送達後にレプリカーゼ (又はレプリカーゼ転写酵素) の翻訳を導くプラス鎖RNAである。レプリカーゼは、ポリタンパク質として翻訳され、これは自己切断して複製複合体を提供し、これがプラス鎖の送達されたRNAのゲノム鎖コピーを生成する。これらのマイナス鎖転写産物は、それ自体が転写されてプラス鎖の親RNAのさらなるコピーを与え、また抗原をコードするサブゲノム転写産物を与えることができる。サブゲノム転写産物の翻訳は、感染した細胞による抗原のin situ発現へと導く。適切なアルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスなどからのレプリカーゼを使用することができる。突然変異又は野生型のウイルス配列を使用することができ、例えば、VEEVの弱毒化TC83変異体がレプリコンで使用されている。

【0074】

自己増幅RNAは、mRNAの基本要素、すなわちキャップ、5'UTR、3'UTR、及びポリ (A) テールを含む。それらはさらに、非構造ウイルス遺伝子及び1つ以上のサブゲノムプロモーターをコードする大きなオープンリーディングフレーム (ORF) を含む。ポリメラーゼを含む非構造遺伝子は、細胞内RNA複製工場を形成し、サブゲノムRNAを高レベルで転写する。ワクチン抗原をコードするこのmRNAは細胞内で増幅され、高レベルのmRNAと抗原発現をもたらす。

【0075】

あるいは又はさらに、本明細書に記載の自己増幅RNA分子は、(i) 自己増幅RNA分子からRNAを転写することができるRNA依存性RNAポリメラーゼ、及び(ii) リサウイルス抗原をコードする。このポリメラーゼは、アルファウイルスレプリカーゼであり得、例えば、アルファウイルスタンパク質nsP1、nsP2、nsP3及びnsP4の1つ以上を含む。

【0076】

天然アルファウイルスゲノムは、非構造レプリカーゼポリタンパク質に加えて構造ビリオンタンパク質をコードするが、あるいは又はさらに、自己増幅RNA分子はアルファウイルス構造タンパク質をコードしない。したがって、自己増幅RNAは、細胞内でそれ自体のゲノムRNAコピーの生成へと導くことができるが、RNAを含むビリオンの生成には導くことができない。これらのビリオンを生成することができないことは、野生型アルファウイルスとは異なり、自己増幅RNA分子がそれ自体、感染性形態で永続化することができないことを意味する。野生型ウイルスの永続化に必要とされるアルファウイルス構造タンパク質は、本開示の自己増幅RNAには存在せず、それらの場所は、目的の免疫原をコードする遺伝子 (複数可) によって占有され、そのため、サブゲノム転写産物は、構造アルファウイルスビリオンタンパク質ではなく免疫原をコードする。

【0077】

したがって、本発明で有用な自己増幅RNA分子は、2つのオープンリーディングフレームを有し得る。第1のオープンリーディングフレームはレプリカーゼをコードする。第2のオープンリーディングフレームは抗原をコードする。あるいは又はさらに、RNAは、例えば、追加の抗原をコードするため、又はアクセサリーポリペプチドをコードするために、1つ以上の追加の (例えば、下流の) オープンリーディングフレームを有することができる。

【0078】

あるいは又はさらに、本明細書に開示の自己増幅RNA分子は、5'キャップ (例えば、7-

10

20

30

40

50

メチルグアノシン)を有する。このキャップは、RNAのin vivo翻訳を増強することができる。あるいは又はさらに、自己増幅RNA分子の5'配列は、コードされるレプリカーゼとの適合性を保証するように選択すべきである。

【0079】

自己増幅RNA分子は、3'ポリAテールを有することができる。これはまた、その3'末端近辺にポリAポリメラーゼ認識配列(例えば、AAUAAA)を含むことができる。

【0080】

自己増幅RNA分子は、様々な長さを持つことができるが、それらは、典型的には、5000~25000ヌクレオチドの長さである。自己増幅RNA分子は、典型的には一本鎖である。一本鎖RNAは、一般的に、TLR7、TLR8、RNAヘリカーゼ及び/又はPKRに結合することにより、アジュバント効果を開始することができる。二本鎖形態で送達されるRNA(dsRNA)は、TLR3に結合することができ、この受容体はまた、一本鎖RNAの複製の間、又は一本鎖RNAの二次構造内、のいずれかに形成されたdsRNAにより誘発することができる。

10

【0081】

自己増幅RNAは、好都合には、in vitro転写(IVT)により調製することができる。IVTは、細菌中でプラスミドの形で作製及び増幅されるか、又は合成的に(例えば、遺伝子合成及び/又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)工学的的方法により)作製されるcDNA鋳型を使用することができる。例えば、DNA鋳型から自己増幅RNAを転写するために、DNA依存性RNAポリメラーゼ(例えば、バクテリオファージT7、T3、又はSP6 RNAポリメラーゼ)を使用することができる。適切なキャッピング及びポリA付加反応を、必要に応じて使用することができる(通常、レプリコンのポリAはDNA鋳型内にコードされているが)。これらのRNAポリメラーゼは、転写された5'ヌクレオチド(複数可)についてのストリンジェントな要件を有することがあり、一部の実施形態では、これらの要件を、コードされるレプリカーゼの要件と一致させて、IVT転写されたRNAが、自己によりコードされるそのレプリカーゼのための基質として効率的に機能できることを確実にする必要がある。

20

【0082】

自己増幅RNAは、任意の5'キャップ構造に加えて、修飾核酸塩基を有する1つ以上のヌクレオチドを含むことができる。本発明で使用されるRNAは、理想的にはヌクレオシド間のホスホジエステル結合のみを含むが、いくつかの実施形態では、ホスホルアミデート、ホスホリチオエート、及び/又はメチルホスホネート結合を含むことができる。

30

【0083】

自己増幅RNA分子は、単一の異種ポリペプチド抗原(すなわち、リサウイルス抗原)をコードしてもよいし、又は任意で、アミノ酸配列として発現される場合に、各配列がその同一性を保持するように一緒に連結された(例えば、直列に連結された)2つ以上の異種ポリペプチド抗原をコードしてもよい。次いで、自己増幅RNAから生成された異種ポリペプチドは、融合ポリペプチドとして産生されるか、又は別個のポリペプチド若しくはペプチド配列をもたらしように操作され得る。

【0084】

本明細書に記載の自己増幅RNA分子は、2つ以上のオープンリーディングフレームから複数のヌクレオチド配列を発現するように操作され、それによりサイトカイン又は他の免疫調節物質(免疫応答の生成を増強することができる)と一緒に1つ、2つ又はそれ以上のリサウイルス抗原(例えば、1つ、2つ又はリサウイルス抗原)などのタンパク質の共発現が可能になる。そのような自己増幅RNA分子は、例えば、二価又は多価ワクチンとして、例えば、同時に様々な遺伝子産物(例えば、タンパク質)の生産において、特に有用かもしれない。

40

【0085】

必要に応じて、自己増幅RNA分子をスクリーニング又は分析して、当業者に公知のさまざまなin vitro又はin vivo試験方法を使用して、それらの治療及び予防特性を確認することができる。たとえば、迅速蛍光フォーカス抑制試験(RFFIT)は、狂犬病ウイルス中和活性のレベルを測定できる。自己増幅RNA分子を含むワクチンは、増殖の誘導に対する

50

効果、又は特定の目的のリンパ球タイプ、例えばB細胞、T細胞、T細胞株若しくはT細胞クローンのエフェクター機能に対する効果について試験することができる。例えば、免疫したマウスの脾臓細胞を単離し、細胞傷害性Tリンパ球がリサウイルス抗原をコードする自己増幅RNA分子を含む自己標的細胞を溶解する能力を得ることができる。さらに、TH1 (IL-2及びIFN-) 及び/又はTH2 (IL-4及びIL-5) サイトカインの増殖又は産生をELISAで測定することにより、あるいは細胞質サイトカイン染色及びフローサイトメトリによりCD4+ T細胞で直接測定することにより、Tヘルパー細胞の分化を分析し得る。

【0086】

リサウイルス抗原をコードする自己増幅RNA分子はまた、例えば対象のリサウイルス抗原に特異的な抗体のB細胞産生の誘導により実証されるように、液性免疫応答を誘導する能力について試験することができる。これらのアッセイは、例えば、免疫された個体の末梢Bリンパ球を使用して実施することができる。そのようなアッセイ方法は、当業者に公知である。自己増幅RNA分子を特性決定するために使用し得る他のアッセイは、標的細胞によるコードされたりリサウイルス抗原の発現の検出を含み得る。例えば、蛍光活性化細胞選別 (FACS) を使用して、細胞表面又は細胞内での抗原発現を検出できる。FACS選択のもう1つの利点は、発現のレベルが異なる場合にソートできることであり、これは、より低い発現が望まれる場合があるためである。特定の抗原を発現する細胞を同定する他の適切な方法は、プレート上のモノクローナル抗体を使用したパニング、又はモノクローナル抗体でコーティングされた磁気ビーズを使用した捕獲を含む。

【0087】

あるいは又はさらに、自己増幅RNA分子をコードするDNA配列が提供され、配列番号2、配列番号4、配列番号6及び配列番号8からなる群より選択され得る。あるいは又はさらに、自己増幅RNA分子をコードするDNA配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6及び配列番号8からなる群から選択される配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一である配列を含む。あるいは又はさらに、自己増幅RNA分子をコードするDNA配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6及び配列番号8からなる群より選択される全長配列の断片を含む又はそれからなり、ここで、断片は、全長配列よりも最大1、10、25、50、100、200、300、400、450又は475核酸短い、全長配列の核酸配列の連続したストレッチを含む又はそれからなる。

【0088】

脂質ベースの送達系

本発明の核酸ベースのワクチンは、非ウイルス送達系、例えば、脂質ベースの送達系を含み得る。これらの系は自己増幅RNAワクチンを細胞の内部に効率的に送達することができ、次いで、そこでコードされる抗原 (複数可) を複製し、発現することができる。

【0089】

送達系は、コードされるリサウイルス抗原の免疫原性を増強するアジュバント効果を有し得る。例えば、核酸分子は、リボソーム又は非毒性の生分解性ポリマー微粒子中に封入され得る。あるいは又はさらに、核酸ベースのワクチンは、脂質ナノ粒子 (LNP) 送達系を含む。あるいは又はさらに、核酸分子は、カチオン性ナノエマルジョン (CNE) として送達され得る。あるいは又はさらに、核酸ベースのワクチンは、裸のRNA (例えば、mRNA) のような裸の核酸を含み得るが、脂質ベースの送達系が好ましい。

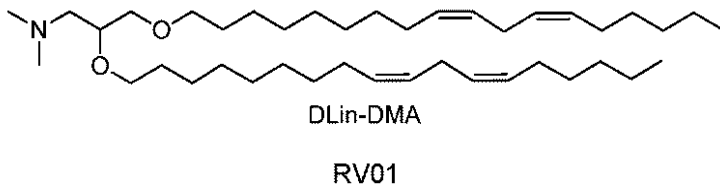
【0090】

「脂質ナノ粒子 (LNP)」は、核酸分子 (例えば、RNA) を封入することができる非ビリオンリボソーム粒子である。LNP送達系及び非毒性生分解性ポリマー微粒子、並びにそれらの調製方法は、当技術分野で公知である。粒子はいくらかの外部RNA (例えば、粒子の表面上に) を含み得るが、RNAの少なくとも半分 (好ましくはその全て) が封入される。リボソーム粒子は例えば、飽和又は不飽和であり得る双性イオン性、カチオン性及びアニオン性脂質、例えば、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) (双性イオン性、飽和)、1,2-ジリノレイルオキシ (dilinoleoxy)-3-ジメチルアミノプロパン

(DlinDMA) (カチオン性、不飽和)、及び/又は1,2-ジミリストイル-rac-グリセロール (DMG) (アニオン性、飽和) の混合物から形成され得る。本発明で使用するのに好ましいLNPは、リポソームを形成することができる双性イオン性脂質を含み、任意選択で、少なくとも1つのカチオン性脂質 (N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチル-硫酸 (DOTAPビス(2-メタクリロイル)オキシエチルジスルフィド (DSDMA)、2,3-ジオレイルオキシ-1-(ジメチルアミノ)プロパン (DODMA)、1,2-ジリノレイオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DlinDMA)、N,N-ジメチル-3-アミノプロパン (DlenDMA) など) と組み合わせることができる。DSPC、DlinDMA、PEG-DMG及びコレステロールの混合物は特に有効である。あるいは又はさらに、LNPはRV01リポソームである。

【化1】

10



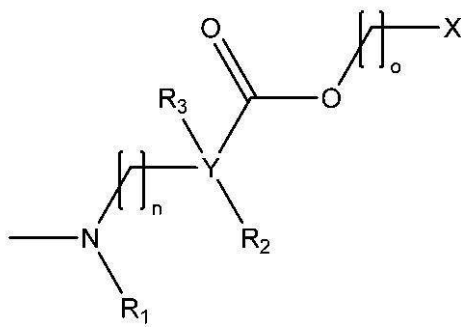
【0091】

あるいは又はさらに、LNPは、中性脂質、カチオン性脂質、コレステロール及びポリエチレングリコール (PEG) を含み、自己増幅RNAを含むナノ粒子を形成する。一部の実施形態では、本明細書におけるカチオン性脂質は、式I:

20

【0092】

【化2】



30

【0093】

の構造を含み、式中、

nは、1から3の整数であり、

(i) R₁はCH₃であり、R₂とR₃はともにHであり、及びYはCであり；又は

(ii) R₁及びR₂は集合的にCH₂-CH₂であり、窒素と一緒にあって、5員、6員、又は7員のヘテロシクロアルキルを形成し、R₃はCH₃であり、及びYはCであり；又は

(iii) R₁はCH₃であり、R₂とR₃はともに存在せず、及びYはOであり；

oは、0又は1であり；

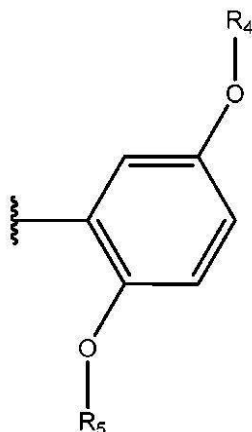
Xは、

(i)

40

【0094】

【化 3】



10

【 0 0 9 5 】

{ 式中、

R₄ 及び R₅ は、独立して、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有するC₁₀ ~ 20炭化水素鎖である}；又は

(ii) -CH(-R₆)-R₇

{ 式中、

(1) R₆ は、-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈ 若しくは -C_p-R₈ であり；

20

(2) R₇ は、-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈' 若しくは -C_p'-R₈' であり；

(3) p 及び p' は、独立して、0、1、2、3 若しくは 4 であり；及び

(4) R₈ 及び R₈' は、独立して、

(A) オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有するC₈ ~ 20炭化水素鎖；

(B) -C₁ ~ 3-C(-O-C₆ ~ 12)-O-C₆ ~ 12 飽和又は不飽和炭化水素鎖；(C) -C₆ ~ 16 飽和炭化水素鎖；(D) -C(-C₆ ~ 16)-C₆ ~ 16 飽和又は不飽和炭化水素鎖；(E) -C[-C-O-C(O)-C₄ ~ 12]-C-O-C(O)-C₄ ~ 12 飽和又は不飽和炭化水素鎖；及び(F) -C₆ ~ 16 飽和又は不飽和炭化水素鎖

30

である}

である。

【 0 0 9 6 】

一実施形態では、R₁ はCH₃であり、R₂ と R₃ はともにHであり、YはCである。一部の実施形態では、R₁ 及び R₂ は集合的にCH₂-CH₂であり、窒素と一緒にあって、5員、6員、又は7員のヘテロシクロアルキルを形成し、R₃ はCH₃であり、及びYはCである。一部の実施形態では、R₁ はCH₃であり、R₂ と R₃ はともに存在せず、YはOである。

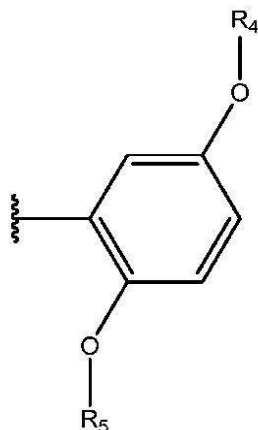
【 0 0 9 7 】

一実施形態では、Xは、

【 0 0 9 8 】

40

【化 4】



10

【0099】

であり、式中、R₄及びR₅は、独立して、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有するC₁₀～₂₀炭化水素鎖である。

【0100】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈～₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈～₂₀炭化水素鎖である。

20

【0101】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈～₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁～₃-C(-O-C₆～₁₂)-O-C₆～₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0102】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈～₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆～₁₆飽和炭化水素鎖である。

30

【0103】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈～₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆～₁₆)-C₆～₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0104】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈～₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄～₁₂]-C-O-C(O)-C₄～₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

40

【0105】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈～₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆～₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0106】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁～₃-C(-O-C₆～₁₂)-O-C₆～₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

50

$_{12})-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、 R_8' は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖である。

【0107】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0108】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖である。

10

【0109】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C(-C_6 \sim 16)-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0110】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C[-C-O-C(O)-C_4 \sim 12]-C-O-C(O)-C_4 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

20

【0111】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0112】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖である。

30

【0113】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0114】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖である。

40

【0115】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C(-C_6 \sim 16)-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0116】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C[-C-O-C(O)-C_4 \sim 12]-C-O-C(O)-C_4 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

一実施形態では、Xは $-\text{CH}(-\text{R}_6)-\text{R}_7$ であり、 R_6 は $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_8$ であり、 R_7 は $-(\text{CH}_2)_q$

$-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C[-C-O-C(O)-C_4 \sim 12]-C-O-C(O)-C_4 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C(-C_6 \sim 16)-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0128】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C[-C-O-C(O)-C_4 \sim 12]-C-O-C(O)-C_4 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C[-C-O-C(O)-C_4 \sim 12]-C-O-C(O)-C_4 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0129】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C[-C-O-C(O)-C_4 \sim 12]-C-O-C(O)-C_4 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

10

【0130】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖である。

【0131】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

20

【0132】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖である。

【0133】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C(-C_6 \sim 16)-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

30

【0134】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C[-C-O-C(O)-C_4 \sim 12]-C-O-C(O)-C_4 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0135】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

40

【0136】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖であり、 R_8' は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖である。

【0137】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれ

50

か又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0138】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖である。

【0139】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C(-C_6 \sim 16)-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

10

【0140】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C[-C-O-C(O)-C_4 \sim 12]-C-O-C(O)-C_4 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0141】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

20

【0142】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_8 \sim 20$ 炭化水素鎖である。

【0143】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

30

【0144】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和炭化水素鎖である。

【0145】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C(-C_6 \sim 16)-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

40

【0146】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C[-C-O-C(O)-C_4 \sim 12]-C-O-C(O)-C_4 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0147】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_1 \sim 3-C(-O-C_6 \sim 12)-O-C_6 \sim 12$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_6 \sim 16$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

50

。

【 0 1 4 8 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖である。

【 0 1 4 9 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁₋₃-C(-O-C₆₋₁₂)-O-C₆₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

10

【 0 1 5 0 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 5 1 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 5 2 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

20

【 0 1 5 3 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 5 4 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、R₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖である。

30

【 0 1 5 5 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁₋₃-C(-O-C₆₋₁₂)-O-C₆₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 5 6 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

40

【 0 1 5 7 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 5 8 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

50

【 0 1 5 9 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 6 0 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖である。

【 0 1 6 1 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁₋₃-C(-O-C₆₋₁₂)-O-C₆₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 6 2 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、及びR₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 6 3 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 6 4 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 6 5 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 6 6 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖である。

【 0 1 6 7 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇はC_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁₋₃-C(-O-C₆₋₁₂)-O-C₆₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 6 8 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

【 0 1 6 9 】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈

10

20

30

40

50

'であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_{6-16}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C(-C_{6-16})-C_{6-16}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0170】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_{6-16}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C[-C-O-C(O)-C_{4-12}]-C-O-C(O)-C_{4-12}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0171】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8$ であり、 R_7 は $-C_p-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_{6-16}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_{6-16}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

10

【0172】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-C_p-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_{8-20}$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_{8-20}$ 炭化水素鎖である。

【0173】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-C_p-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_{8-20}$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_{1-3}-C(-O-C_{6-12})-O-C_{6-12}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

20

【0174】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-C_p-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_{8-20}$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_{6-16}$ 飽和炭化水素鎖である。

【0175】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-C_p-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_{8-20}$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C(-C_{6-16})-C_{6-16}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

30

【0176】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-C_p-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_{8-20}$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C[-C-O-C(O)-C_{4-12}]-C-O-C(O)-C_{4-12}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0177】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-C_p-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_{8-20}$ 炭化水素鎖であり、及び R_8' は $-C_{6-16}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

40

【0178】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-C_p-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_{1-3}-C(-O-C_{6-12})-O-C_{6-12}$ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及び R_8' は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する $-C_{8-20}$ 炭化水素鎖である。

【0179】

一実施形態では、 X は $-CH(-R_6)-R_7$ であり、 R_6 は $-C_p-R_8$ であり、 R_7 は $-(CH_2)_p-O-C(O)-R_8'$ であり、 p 及び p' は独立して0、1、2、3又は4であり、 R_8 は $-C_{1-3}-C(-O-C_{6-12})-O-C_{6-12}$

50

₂ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0180】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆ 飽和炭化水素鎖である。

【0181】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

10

【0182】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0183】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

20

【0184】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆-₁₆ 飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈-₂₀ 炭化水素鎖である。

【0185】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆-₁₆ 飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

30

【0186】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆-₁₆ 飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆ 飽和炭化水素鎖である。

【0187】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆-₁₆ 飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0188】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆-₁₆ 飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

40

【0189】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆-₁₆ 飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆ 飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0190】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆ 飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2

50

つのシスアルケン基を有する-C₈-₂₀炭化水素鎖である。

【0191】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0192】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆飽和炭化水素鎖である。

10

【0193】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、R₈'は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0194】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0195】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

20

【0196】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈-₂₀炭化水素鎖である。

【0197】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

30

【0198】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆飽和炭化水素鎖である。

【0199】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

40

【0200】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0201】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

50

0)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0202】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖である。

【0203】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁₋₃-C(-O-C₆₋₁₂)-O-C₆₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

10

【0204】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

【0205】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

20

【0206】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0207】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-(CH₂)_p-O-C(O)-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0208】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖である。

30

【0209】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁₋₃-C(-O-C₆₋₁₂)-O-C₆₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

40

【0210】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

【0211】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

50

【0212】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈-₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0213】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈-₂₀炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

10

【0214】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈-₂₀炭化水素鎖である。

【0215】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

20

【0216】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆飽和炭化水素鎖である。

【0217】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆-₁₆)-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0218】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄-₁₂]-C-O-C(O)-C₄-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

30

【0219】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆-₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0220】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆-₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈-₂₀炭化水素鎖である。

40

【0221】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆-₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁-₃-C(-O-C₆-₁₂)-O-C₆-₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0222】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆-₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'

50

は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

【0223】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0224】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0225】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0226】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖である。

【0227】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁₋₃-C(-O-C₆₋₁₂)-O-C₆₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0228】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

【0229】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0230】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0231】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0232】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖である。

【0233】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁₋₃-C(-O-C₆₋₁₂)-O-C₆₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

10

20

30

40

50

【0234】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

【0235】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0236】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0237】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0238】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は、オメガ6と9の位置のいずれか又は両方に1つ又は2つのシスアルケン基を有する-C₈₋₂₀炭化水素鎖である。

【0239】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₁₋₃-C(-O-C₆₋₁₂)-O-C₆₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0240】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和炭化水素鎖である。

【0241】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C(-C₆₋₁₆)-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0242】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈''であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C[-C-O-C(O)-C₄₋₁₂]-C-O-C(O)-C₄₋₁₂飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0243】

一実施形態では、Xは-CH(-R₆)-R₇であり、R₆は-C_p-R₈であり、R₇は-C_p'-R₈'であり、p及びp'は独立して0、1、2、3又は4であり、R₈は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖であり、及びR₈'は-C₆₋₁₆飽和又は不飽和炭化水素鎖である。

【0244】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV28である。

【0245】

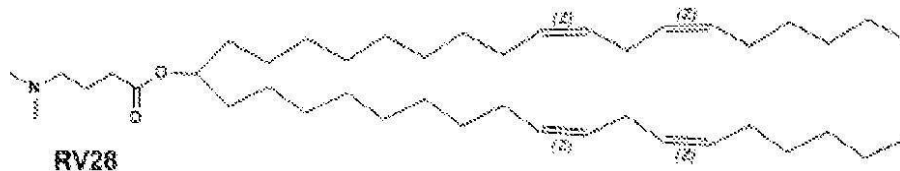
10

20

30

40

【化 5】



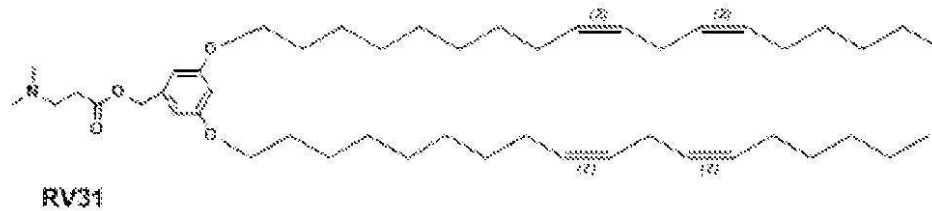
【 0 2 4 6 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV31である。

【 0 2 4 7 】

【化 6】

10



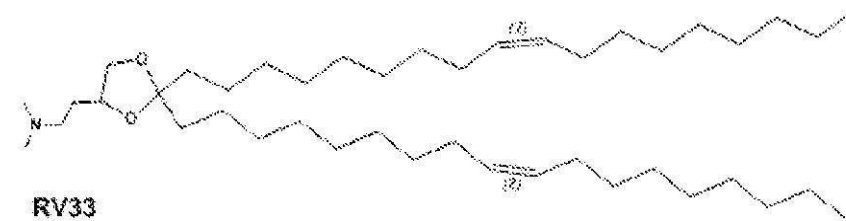
【 0 2 4 8 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV33である。

【 0 2 4 9 】

【化 7】

20



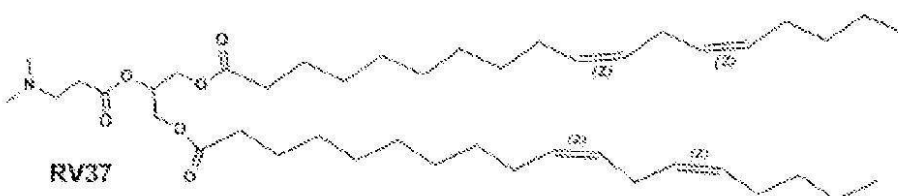
【 0 2 5 0 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV37である。

【 0 2 5 1 】

30

【化 8】



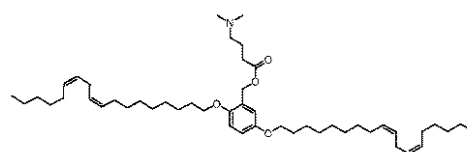
【 0 2 5 2 】

一実施形態では、LNPIは、カチオン性脂質RV39、すなわち2,5-ビス((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ)ベンジル4-(ジメチルアミノ)ブタノエートを含む。

40

【 0 2 5 3 】

【化 9】



RV39

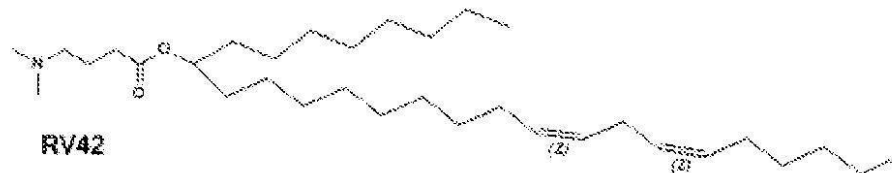
【 0 2 5 4 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV42である。

50

【 0 2 5 5 】

【 化 1 0 】



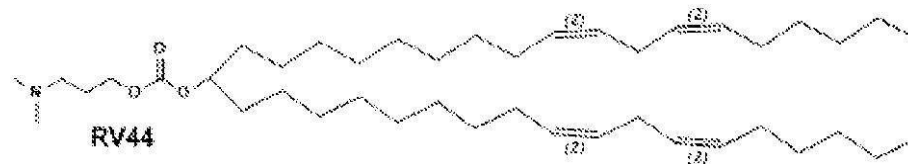
【 0 2 5 6 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV44である。

10

【 0 2 5 7 】

【 化 1 1 】



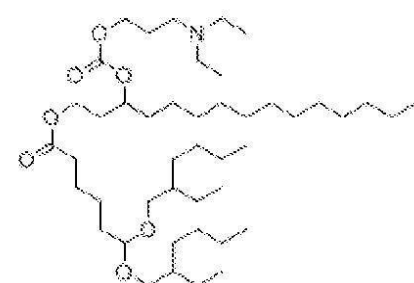
【 0 2 5 8 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV73である。

20

【 0 2 5 9 】

【 化 1 2 】



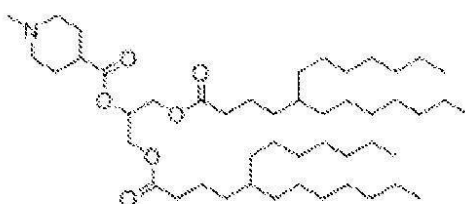
30

【 0 2 6 0 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV75である。

【 0 2 6 1 】

【 化 1 3 】



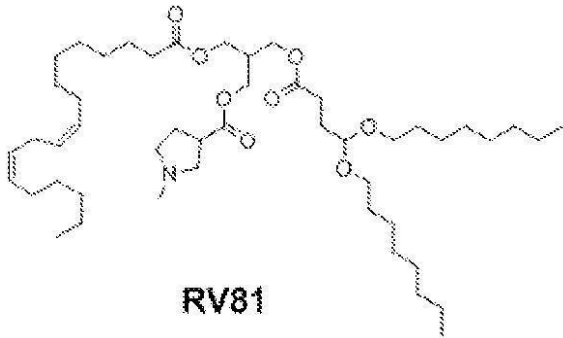
40

【 0 2 6 2 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV81である。

【 0 2 6 3 】

【化 1 4】



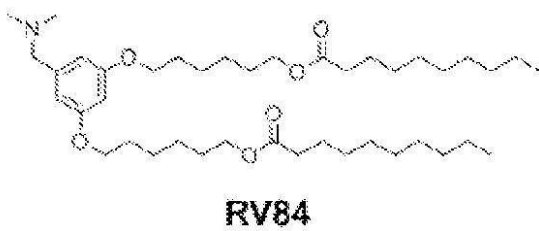
10

【 0 2 6 4】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV84である。

【 0 2 6 5】

【化 1 5】



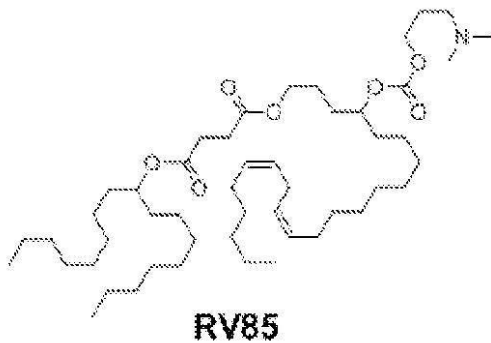
20

【 0 2 6 6】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV85である。

【 0 2 6 7】

【化 1 6】



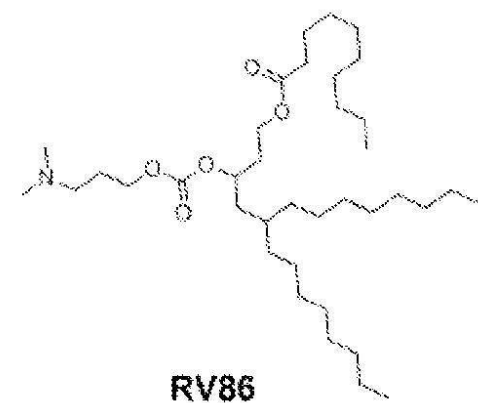
30

【 0 2 6 8】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV86である。

【 0 2 6 9】

【化 1 7】



40

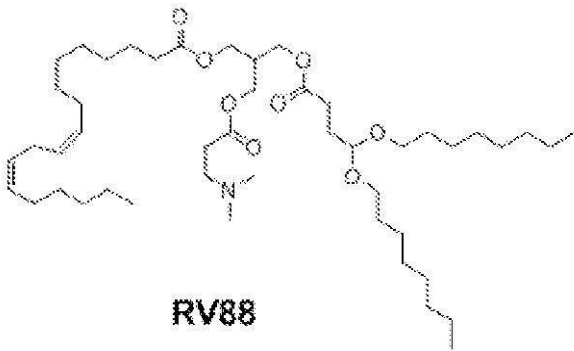
50

【 0 2 7 0 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV88である。

【 0 2 7 1 】

【 化 1 8 】



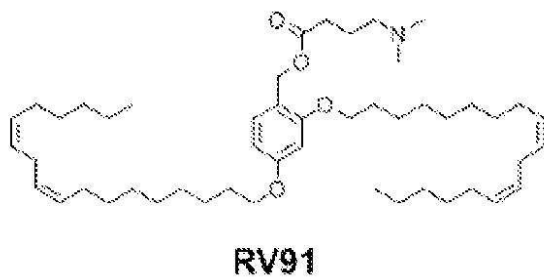
10

【 0 2 7 2 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV91である。

【 0 2 7 3 】

【 化 1 9 】



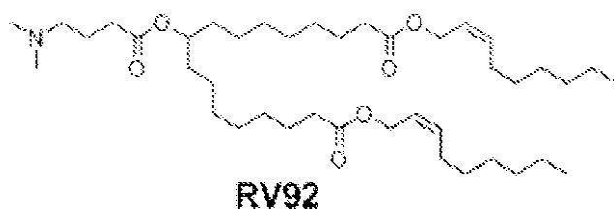
20

【 0 2 7 4 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV92である。

【 0 2 7 5 】

【 化 2 0 】



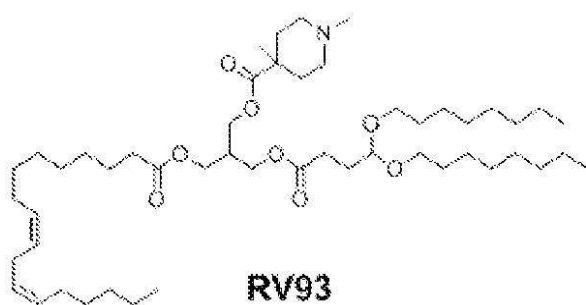
30

【 0 2 7 6 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV93である。

【 0 2 7 7 】

【 化 2 1 】



40

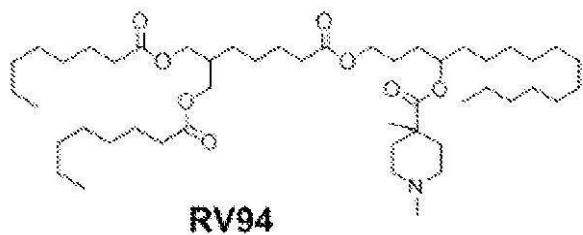
【 0 2 7 8 】

50

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有する2-(5-((4-((1,4-ジメチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ)ヘキサデシル)オキシ)-5-オキソペンチル)プロパン-1,3-ジイルジオクタノエート (RV94) である。

【0279】

【化22】



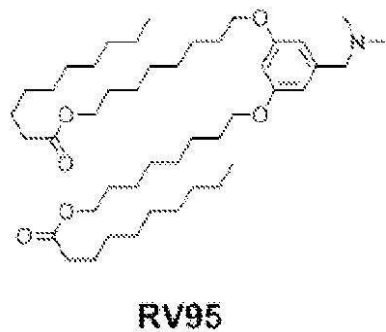
10

【0280】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV95である。

【0281】

【化23】



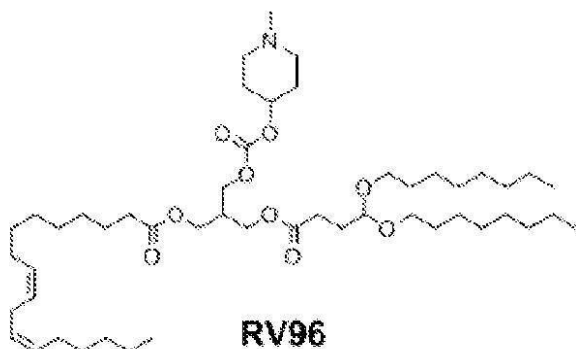
20

【0282】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV96である。

【0283】

【化24】



30

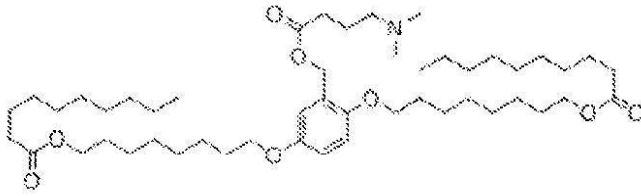
【0284】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV97である。

【0285】

40

【化 2 5】

**RV97**

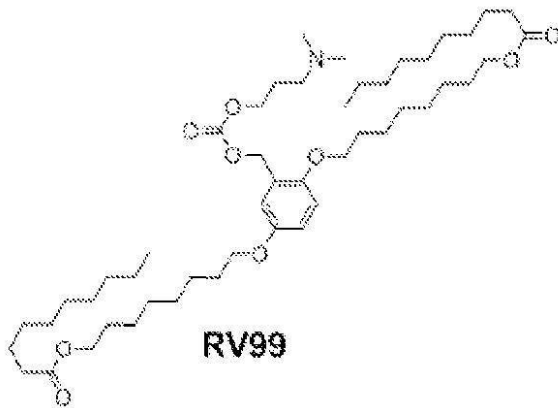
【 0 2 8 6 】

10

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV99である。

【 0 2 8 7 】

【化 2 6】

**RV99**

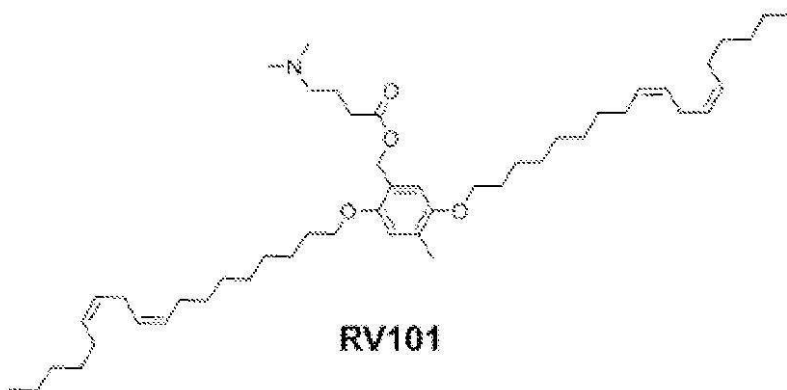
20

【 0 2 8 8 】

一実施形態では、例示的なカチオン性脂質は、以下の構造を有するRV101である。

【 0 2 8 9 】

【化 2 7】

**RV101**

30

【 0 2 9 0 】

40

一実施形態では、カチオン性脂質は、RV39、RV88、及びRV94からなる群から選択される。

【 0 2 9 1 】

式Iを有する化合物、並びにRV28、RV31、RV33、RV37、RV39、RV42、RV44、RV73、RV75、RV81、RV84、RV85、RV86、RV88、RV91、RV92、RV93、RV94、RV95、RV96、RV97、RV99、及びRV101を合成するための組成物及び方法は、2014年12月17日に出願されたPCT/US2014/070882(国際公開番号第2015/095340号)及びPCT/US2014/070891(国際公開番号第2015/095346号)において、並びに2015年9月4日に出願されたPCT/US2015/048535(国際公開番号第2016/037053号)に見出すことができる。

【 0 2 9 2 】

50

RNAと脂質の比率は様々であり得る。ヌクレオチド(N)のリン脂質(P)に対する比率は、例えば、1N:1P、2N:1P、3N:1P、4N:1P、5N:1P、6N:1P、7N:1P、8N:1P、9N:1P、又は10N:1Pの範囲であり得る。ヌクレオチド(N)のリン脂質(P)に対する比率は、例えば、1N:1Pから10N:1P、2N:1Pから8N:1P、2N:1Pから6N:1P、又は3N:1Pから5N:1Pの範囲であり得る。あるいは又はさらに、ヌクレオチド(N)とリン脂質(P)の比率は4N:1Pである。

【0293】

あるいは又はさらに、核酸ベースのワクチンは、カチオン性ナノエマルジョン(CNE)送達系を含む。カチオン性水中油型エマルジョンを使用して、RNA分子などの負に帯電した分子を細胞内部に送達し得る。エマルジョン粒子は、疎水性オイルコアとカチオン性脂質を含み、後者はRNAと相互作用することができ、それによりそれをエマルジョン粒子に固定する。CNE送達系では、抗原をコードする核酸分子(例えば、RNA)は、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合化される。

10

【0294】

したがって、本発明の核酸ベースのワクチンにおいて、リサウイルス抗原をコードするRNA分子は、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合化され得る。粒子は通常、25

で液相にあるオイルコア(例えば植物油又はスクアレン)、カチオン性脂質(例えばリン脂質)、及び必要に応じて界面活性剤(例えばトリオレイン酸ソルビタン、ポリソルベート80)を含み、ポリエチレングリコールも含めることができる。あるいは又はさらに、CNEは、スクアレン、及び1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)などのカチオン性脂質を含む。一実施形態では、CNEは、ポリソルベートで安定化されたDOTAP及びスクアレンの水中油型エマルジョンである。

20

【0295】

本発明のLNP及びCNE送達系は、液性及び細胞性免疫応答の両方を誘発するのに特に有効であり得る。これらの送達系の利点には、制限的な抗ベクター免疫応答がないことも含まれる。

【0296】

医薬組成物、免疫原性組成物

本開示は、リサウイルスポリペプチド、例えばリサウイルス抗原をコードする配列を含む核酸を含む組成物を提供する。組成物は、医薬組成物、例えば免疫原性組成物又はワクチン組成物であり得る。したがって、組成物は、薬学的に許容される担体も含み得る。一部の実施形態において、リサウイルスは狂犬病ウイルスである。

30

【0297】

「薬学的に許容される担体」には、組成物を受容する個体に有害な抗体の産生をそれ自体誘導しない任意の担体が含まれる。本発明の組成物は、水、発熱物質を含まない滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、グリセロールなどの薬学的に許容される希釈剤も含み得る。さらに、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝物質などの補助物質などが存在してもよい。

【0298】

医薬組成物は、淡水(例えば、注射用水「w.f.i.」)又は緩衝液、例えば、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、ホウ酸緩衝液、コハク酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、若しくはクエン酸緩衝液中に、本明細書のいずれかに記載の構築物、核酸配列、及び/又はポリペプチド配列を含み得る。緩衝液塩は、通常は5~20mMの範囲で含まれる。医薬組成物は、5.0~9.5、例えば、6.0~8.0のpHを有し得る。組成物は、張度を与えるためにナトリウム塩(例えば、塩化ナトリウム)を含み得る。10±2mg/ml NaClの濃度が典型的であり、例えば、約9mg/mLである。組成物は、金属イオンキレート剤を含み得る。これらは、ホスホジエステルの加水分解を加速し得るイオンを除去することにより、RNAの安定性を延長させることができる。したがって、組成物は、EDTA、EGTA、BAPTA、ペンテト酸などのうちの1つ以上を含み得る。このようなキレート剤は、典型的には、10~500µM、例えば0.1mMで存在する。クエン酸塩、例えばクエン酸ナトリウムはまた、キレート剤として作用することがで

40

50

き、一方で、緩衝活性も有利に提供する。

【0299】

医薬組成物は、200mOsm/kg～400mOsm/kg、例えば、240～360mOsm/kg、又は290～310mOsm/kgの浸透圧を有し得る。医薬組成物は、1つ以上の防腐剤、例えば、チオメルサール又は2-フェノキシエタノールを含み得る。水銀を含まない組成物が好ましく、防腐剤を含まないワクチンを調製することができる。医薬組成物は、無菌又は滅菌であり得る。医薬組成物は、非発熱性であり、例えば、1用量あたり<1ED（内毒素単位、標準尺度）、好ましくは1用量あたり<0.1EUを含み得る。医薬組成物は、グルテンを含まない。医薬組成物は、単位用量剤形で調製することができる。あるいは又はさらに、単位用量は、0.1～2.0ml、例えば、約1.0又は0.5mlの体積を有し得る。

10

【0300】

本発明の組成物は、アジュバントと共に又はアジュバントなしで投与され得る。あるいは又はさらに、組成物は、特に組成物が免疫学的に有効な量のリサウイルス抗原をコードする核酸を含む場合、1つ以上のアジュバント（例えば、ワクチンアジュバント）を含むか、又は一緒に投与することができる。

【0301】

「アジュバント」とは、組成物の有効成分に対する免疫応答を増大、刺激、活性化、増強又は調節する剤を意味する。アジュバント効果は、細胞レベル若しくは液性レベル又はその両方で生じ得る。アジュバントは、実際の抗原に対する免疫系の反応を刺激するが、それ自体免疫学的作用はない。あるいは又はさらに、本発明のアジュバント添加組成物は、1つ以上の免疫刺激剤を含んでもよい。「免疫刺激剤」とは、抗原とともに投与するか別個に投与するかにかかわらず、対象の免疫応答の一般的な一時的増加を誘発する剤を意味する。

20

【0302】

使用方法/使用

本明細書に開示される構築物又は組成物の免疫学的に有効な量を投与するステップを含む、それを必要とする対象においてリサウイルスによって引き起こされる疾患に対する免疫応答を誘導する方法が提供される。いくつかの実施形態では、それを必要とする対象においてリサウイルス抗原に対する免疫応答を誘導するための、本明細書に開示される構築物又は組成物の使用が提供される。いくつかの実施形態では、対象においてリサウイルスに対する免疫応答を誘導する医薬の製造における、本明細書に開示される構築物又は組成物の使用が提供される。

30

【0303】

「対象」とは、脊椎動物、例えば哺乳動物など、例としてヒト又は獣医哺乳動物を意図している。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【0304】

投与経路

本明細書に開示される組成物は一般に、対象に直接投与される。直接送達は、非経口注射、例えば皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮内、又は組織の間質腔への注射により達成され得る。リサウイルス抗原をコードする自己増幅RNAは、あらゆる年齢の個体に予防的又は治療的に投与することができる。予防的に、例えば狂犬病に固有の地域の居住者又は旅行者に予防的に投与する場合、投与スケジュールは3回用量、2回用量又は単回用量で構成され得る。あるいは又はさらに、単回用量を予防的に投与する。治療的に、例えば狂犬病曝露後に治療的に投与する場合、投与スケジュールは5回用量、4回用量、3回用量、2回用量又は単回用量で構成され得る。好ましい実施形態では、単回又は2回用量が治療的に投与される。

40

【0305】

本明細書で使用する場合、組成物の投与「後の」組成物の投与は、第1及び第2の組成物が同じか異なるかに関係なく、第1の組成物の投与と第2の組成物の投与との間に時間間隔が経過したことを示す。

50

【0306】

製造方法及び製剤

あるいは又はさらに、自己増幅RNAの製造方法は、in vitro転写 (IVT) のステップを含む。いくつかの実施形態では、自己増幅RNAを製造する方法は、IVTでRNAを生成するステップを含み、その後にキャッピング5' ジヌクレオチドm7G(5')ppp(5')G反応が続き、さらにRNAと非ウイルス送達系を合わせるステップを含む。あるいは又はさらに、自己増幅RNAを製造する方法は、RNAを生成するIVTのステップを含み、さらにRNAを脂質ベースの送達系と合わせるステップを含む。

【0307】

配列同一性

配列に関する同一性は、最大パーセント配列同一性を達成するように配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮しないで、参照アミノ酸配列と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして、本明細書において定義される。

【0308】

配列同一性は、2つのポリペプチドのアミノ酸の位置の類似性を比較するために一般的に使用されている標準的な方法によって決定することができる。BLAST又はFASTAのようなコンピュータプログラムを使用して、2つのポリペプチドをそれらの各々のアミノ酸の一致が最適化するように（一方又は両方の配列の全長にわたって、或いは一方又は両方の配列の所定部分にわたって）整列させる。これらのプログラムは、初期設定のオープニングペナルティ及び初期設定のギャップペナルティを提供し、PAM250又はswgapdnantなどのスコアリングマトリックスをそのコンピュータプログラムと組み合わせて使用することができる。一実施形態では、ギャップオープニングペナルティ15、ギャップ伸長ペナルティ6.66、ギャップ分離ペナルティ範囲8、アライメントディレイのためのパーセント同一性40である。例えば、一致の合計数を100倍し、次いで一致した領域内のより長い配列の長さ、2つの配列を整列させるためにより短い配列に導入されたギャップの数との合計で除算したものと、パーセント同一性を計算することができる。

【0309】

本開示がUniProt又はGenbankアクセッションコードへの参照によって配列を参照する場合、参照される配列は本出願の出願日現在のバージョンである。

【0310】

単一のアミノ酸又は低いパーセンテージのアミノ酸を改変、付加又は欠失させるタンパク質への個々の置換、欠失又は付加は、当該改変がアミノ酸の機能的に類似したアミノ酸との置換、又は免疫原性機能に実質的に影響を及ぼさない残基の置換/欠失/付加である場合に「免疫原性誘導体」であることを当業者は認識するものである。

【0311】

機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換の表は当技術分野において周知である。一般に、そのような保存的置換は、以下に特定されるアミノ酸グループの1つとなるが、ある状況では、抗原の免疫原性に実質的に影響を及ぼすことなく他の置換が可能であり得る。以下の8つのグループは、各々、通常互いが保存的置換となるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リジン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、スレオニン (T)；及び
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)。

【0312】

適切には、そのような置換はエピトープの領域の中で起こらず、したがって、抗原の免

10

20

30

40

50

疫原性特性に著しい影響を与えない。

【0313】

免疫原性誘導体は、参照配列と比較して追加のアミノ酸が挿入されているものも含み得る。適切には、そのような挿入はエピトープの領域の中では起こらず、それ故抗原の免疫原性特性に著しい影響を与えない。挿入の一例は、対象の抗原の発現及び/又は精製を補助するためのヒスチジン残基の短い領域（例えば2～6残基）を含む。

【0314】

免疫原性誘導体は、参照配列と比較してアミノ酸が欠失しているものを含む。適切には、そのような欠失はエピトープの領域に起こらず、したがって抗原の免疫原性特性に著しい影響を与えない。

10

【0315】

特定の免疫原性誘導体は、置換、欠失及び付加（又はその任意の組合せ）を含み得ることを、当業者は認識する。

【0316】

他に説明されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。単数形の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」には、文脈からそうでないことが明確に示されていない限り、複数の指示対象が含まれる。同様に、「又は(or)」という言葉は、文脈から明確に他に示されない限り、「及び」を含むことが意図される。「複数」という用語は、2つ以上を指す。さらに、物質の濃度又はレベルに関して与えられる数値限定、例えば、溶液成分濃度又はその比率、及び反応条件、例えば、温度、圧力及びサイクル時間は、近似値であることが意図される。本明細書で使用される「約」という用語は、量 $\pm 10\%$ を意味することが意図される。

20

【0317】

以下の非限定的な実施例により本発明をさらに説明する。以下の実施例に示される結果は、リサウイルス抗原をコードする自己増幅RNAが、様々な脂質組成物中に製剤化された場合、強力で長期持続性の免疫を伝達することを実証する。それらの製造の容易性、低用量での有効性、及び既存のワクチンに対する優位性は、狂犬病の予防及び曝露後の処置に著しいブレイクスルーを提供する。

【0318】

30

[実施例]

実施例1：リサウイルス抗原を用いたSAMの構築物設計

本発明者は、アルファウイルスレプリコンに由来する合成自己増幅mRNA（「SAM」）を用いて、リサウイルスワクチンの研究を開始した。VEE TC-83（配列番号1）由来のSAMベクターを、クローニングのためのバックボーンとして選択した。対象のリサウイルス抗原をこのベクターで発現させ、堅牢な抗原産生、免疫原性、in vitro及びin vivoモデルを用いた有効性について評価した。

【0319】

【表 1】

表 1: SAM 狂犬病 G タンパク質構築物

	狂犬病 G タンパク質	配列番号
構築物 1	Medoid Flury HEP	配列番号 2 配列番号 3
構築物 2	Flury LEP RABAVERT	配列番号 4 配列番号 5
構築物 3	コドン最適化	配列番号 6 配列番号 7
構築物 4	コドン対最適化	配列番号 8 配列番号 9

10

【 0 3 2 0 】

本発明のSAM狂犬病構築物は、表1及び図1Aに記載される構築物によって例示される。これらの構築物は全て狂犬病全長糖タンパク質（「G」）を発現する。構築物1は、メドイド（medoid）Gタンパク質配列をコードするものであり、狂犬病ウイルスのFlury-HEP及びERA株と密接に関連している。構築物2は、認可されたRABAVERTワクチンの株であるFlury-LEP株の野生型配列（GenBank GU565703.1）をコードしている。構築物3及び4は、Flury-LEP株の野生型配列に由来する。構築物3は、GENEWIZが提供する独自のバイオインフォマティクスプラットフォームを用いてコドン最適化した。構築物4は、Coleman et al. (2008) Science 320:1784により記載されたコドン対脱最適化に使用される表に基づいて、コドン対最適化した。Colemanらにより同定された高スコアを用いて、バイオインフォマティクスツール又は計算アルゴリズムを使用せずに、手動でコドン対最適化を実施した。構築物1～4のDNA配列のアラインメント比較を図1Bに示す。

20

【 0 3 2 1 】

実施例2：SAMリサウイルス抗原のin vitro発現

ウェスタンブロット分析を行い、導入遺伝子がSAM狂犬病構築物から発現されるかどうかを決定した。BHK細胞（ 1×10^6 ）に構築物1～4由来の2.5ug RNAをトランスフェクトした。20時間後、細胞抽出物を回収し、SDSゲル電気泳動により狂犬病Gタンパク質の産生を分析した後、マウス抗狂犬病糖タンパク質抗体MAB8727（Millipore Sigma, Billerica Massachusetts, US）によるウェスタンブロット分析を行った。一次抗体とインキュベートした後、膜を洗浄し、次にペルオキシダーゼ結合抗マウス抗体115-035-003（Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove Pennsylvania, US）とインキュベートした。最後に、標準的な手法（GE Healthcare RPN2106, Little Chalfont, UK）を用いて、電気化学発光法（ECL）によりアッセイを開発した。

30

【 0 3 2 2 】

図2Aは、構築物1～4をトランスフェクトしたBHK細胞が全て狂犬病Gタンパク質を発現したことを示す。39kDa、51kDa及び64kDaのタンパク質の位置を示す分子量標準をプロットの左側に示す。下側の39kDaのバンドはアクチンタンパク質であり、各レーン中のタンパク質の総量の標準として用いた。4つの構築物のそれぞれは、最初の4レーンに示されているように、狂犬病Gタンパク質を発現した。構築物1によって発現されるタンパク質の分子量は、構築物2～4によって発現されるタンパク質の分子量よりも低い。この差は潜在的に異なるグリコシル化パターンに起因した。バイオインフォマティクス解析から、構築物1は2つのN-グリコシル化部位と2つのO-グリコシル化部位を含み、構築物2、3及び4は3又は4つのN-グリコシル化部位と5つのO-グリコシル化部位を含むことが予測される。

40

【 0 3 2 3 】

図2Bは、これらのサンプルをペプチドN-グリコシダーゼA（PNGase A）で処理してN-結合型糖鎖を除去すると、分子量の差が顕著に減少したことを示しており、N-グリコシル化の差が観察された分子量の差の少なくとも一部を説明していることを示している。

50

【0324】

実施例3：in vivo免疫原性

SAM狂犬病構築物の免疫原性を、BALB/cマウスにおいてRABAVERTと並行して評価した（図3A及び図3B）。図1A及び表1に示した4つの構築物の各々を、カチオン性ナノエマルジョン（CNE）又は脂質ナノ粒子（LNP）のいずれかで製剤化した。認可されたRABAVERT投与スケジュールに従って、SAMワクチン構築物で0日目及び21日目に、RABAVERTで0日目、7日目及び21日目に動物を免疫した。各群は10匹のマウスから構成された。14日目及び35日目に血清を採取し、狂犬病に対する動物の免疫原性を評価した。血清学的検査は、狂犬病に対するマイクロ迅速蛍光フォーカス抑制試験（RFFIT）により行い、抗狂犬病中和抗体（nAb）の力価を決定した（Smith et al. Bull. World Health Organ. 48:535 (1973)）。世界保健機関（WHO）のガイドラインでは、nAb力価を決定するためにRFFITを用いることが推奨されており、Ab力価が0.5IU/mlであれば狂犬病ワクチンに対する十分な反応と考える（WHO Position Paper (2010) Vaccine 28:7140）。 10

【0325】

図3Aは、14日目、すなわちSAM狂犬病ワクチンの単回用量から2週間後、又は0、7及び21日目に投与したRABAVERTの3回用量から35日後に、中和抗狂犬病抗体を検出するための血清学的検査の結果を示す。免疫の14日後、構築物2、3及び4を含みLNPで製剤化したSAM狂犬病ワクチンの単回用量は、中和抗体を誘発するのに3回用量のRABAVERTと同等に有効であり、すなわち約100IU/mlのnAb力価を生じた。免疫後14日で、検査したすべての構築物のnAb力価は、自然発生狂犬病感染に対する防御の有効性の閾値の代用マーカーである0.5IU/mlの力価を上回って上昇した。この免疫原性閾値は、ヒト及び新生豚における防御効果と相関することが実証されており、マウスモデルを用いた最近の刊行物でも引用されている（Schnee et al. (2016) PLoS Negl. Trop. Dis. 10:e0004746、例えば15頁）。星付きの線（グラフの上）は、LNPにおける0.15ug用量の構築物4が14日目のLNPにおける0.15ug用量の構築物2よりも統計的に有意に強力であったことを示す。 20

【0326】

図3Bは、35日目、すなわち、0及び21日目に投与されたSAM狂犬病ワクチンの2回用量又は0、7及び21日目に投与されたRABAVERTの3回用量後2週間での、中和抗体を検出するための血清学的検査の結果を示す。点線は、RABAVERTに反応するnAb力価（約100IU/ml）を示す。（図3Aと図3BのRFFIT力価のスケールの違いに留意のこと）。構築物1、2、3及び4の0.15ug用量は、いずれも35日目においてRABAVERTよりも統計学的に有意に強力であった。 30

【0327】

免疫から35日後、1.5ugのCNEで製剤化した構築物2、3及び4を含むSAM狂犬病ワクチンの2用量は、3用量のRABAVERTと同様に中和抗体の誘発に有効であった。0.15又は1.5ugのLNP RV39のいずれかで製剤化したSAM狂犬病構築物2、3及び4の2用量は、RABAVERTを著しく上回り、約10倍高い力価の中和抗体を産生した。

【0328】

実施例4：SAM狂犬病ワクチンは長期の免疫原性をもたらす

SAM狂犬病ワクチンの長期免疫原性付与能を検討し、その結果を図4に示す。構築物4は、CNEで1.5ug（四角）、LNPで0.15ug（三角）、又はLNPで1.5ug（逆三角）の量で製剤化した。RABAVERT（丸）は、ヒト臨床用量の1/25の希釈係数で0、7及び21日目に3回用量で投与した。これらの各製剤で免疫したマウスの中和抗体力価を、免疫後56、90及び180日目にRFFITにより測定した。点線は、0.5IU/mlの狂犬病ワクチンの免疫原性の閾値を示す。 40

【0329】

14日目に、CNEで製剤化した1.5ug構築物4 RNA、LNPで製剤化した0.15ug構築物4 RNA、又はLNPで製剤化した1.5ug構築物4 RNAは、有効性の免疫原性閾値をはるかに上回るレベルで狂犬病に対する中和抗体を誘発した。35日目まで及びその後の時点で、LNP製剤化SAMベクターはRABAVERTと同等又はそれ以上の力価を誘発した。35日目以降の時点で、SAM構築物4ベクターの各々は、RABAVERTと同等又は優れた免疫原性を示した。LNPで製剤化した 50

ベクターは用量依存的効果を示し、RV39で製剤化された1.5ug用量は0.15ug用量よりも強力であった。56日目までに、RABAVERT力価は低下し始めた。対照的に、SAM狂犬病構築物の力価は一定であった。

【0330】

免疫原性については、さらに用量範囲試験で検討し、その結果を図5に示す。本試験では、構築物4の低下させた用量をLNP又はCNEのいずれかで製剤化した。構築物4は、4.5ug、1.5ug、0.5ug、0.167ug、0.055ug、0.0185ug、0.006ug、0.002ug若しくは0.0007ugのRNAの低下する量でLNPで製剤化するか、又は15若しくは1.5ugのRNAの量でCNEで製剤化した。Balb/cマウスを、示された用量で構築物4で0日目及び21日目に、又はRABAVERTで0日目、7日目及び21日目にのいずれかで免疫した。各群は10匹のマウスから構成された。14日目及び35日目に血清を採取し、中和抗体についてRFFITにより分析した。両パネルにおいて有効性の免疫原性閾値は下の破線で示され、歴史的に観察されたRABAVERT力価のピークは上の破線で示されている。

10

【0331】

図5Aは、免疫後14日で、LNPで製剤化された0.055～4.5ugのRNAの量のSAM狂犬病の1回用量がRABAVERTと同程度に有効であったことを示している。2.0ng及び0.7ng RNAの非常に低用量であっても、LNPで製剤化されたSAM狂犬病で免疫化されたマウスは、有効性の免疫原性閾値をはるかに上回る中和抗体を産生し、CNEで製剤化された場合、15ug又は1.5ug RNAの量でSAM狂犬病で免疫化されたマウスも同様であった。対照的に、1000倍に希釈した場合、RABAVERTの有効性はほぼ無効レベルまで低下した（データは示さず）。

20

【0332】

図5Bは、35日目、すなわち0日目及び21日目に投与されたSAM狂犬病ワクチンの2回用量又は0、7及び21日目に投与されたRABAVERTの3回用量後に、中和抗体を検出するための血清学的検査の結果を示す。SAM狂犬病ワクチンの効力は、14日目に観察されたレベルと比較して、全ての用量及び両方の脂質製剤で増大した。35日目に、0.7ngから4.5ug RNAまでの非常に低い量からLNPで製剤化されたSAM狂犬病ワクチンの2回用量は、RABAVERTの3回用量レジメンを有意に上回った。15ug RNAの用量でCNEで製剤化されたSAM狂犬病ワクチンもRABAVERTを上回った。

【0333】

実施例6：非ヒト霊長類におけるin vivo免疫原性

30

SAM LNP製剤及びSAM CNE製剤はいずれも忍容性が良好であり、非ヒト霊長類において機能的免疫応答を誘導した。3歳～4歳半（体重4.3kg超）の雌アカゲザル35匹に、表2に示す用量で、RABAVERT、CNEで製剤化した構築物4又はLNPで製剤化した構築物4のいずれかを筋肉内免疫した。RABAVERT用量はヒトでの全用量であり、投与スケジュールはヒトで 사용되는ものと同じ、すなわち0週、1週及び3週であった。1、8、15、22、36、57、71、85、113、141、169、183及び197日目に血清を採取し、RFFIT中和試験及びELISAによる総IgGの測定を行った。末梢血単核細胞（PBMC）を、T細胞細胞内サイトカイン染色（ICS）アッセイのために、1、22、36、57、71、113、141、169、183及び197日目に全血から得た。

【0334】

【表 2】

表 2: 非ヒト霊長類における SAM 狂犬病 G タンパク質免疫原性

群	動物数	ワクチン	用量	製剤	投与 レジメン
1	4	RABAVERT	完全ヒト用量	N/A	1、8、15 日 (0、1、3 週)
2	4	構築物 4	150 ug RNA	CNE56	1、57、169 日 (0、8、24 週)
3	4	構築物 4	75 ug RNA	CNE56	
4	4	構築物 4	15 ug RNA	CNE56	
5	4	構築物 4	3 ug RNA	CNE56	
6	5	構築物 4	75 ug RNA	LNP RV39	
7	5	構築物 4	15 ug RNA	LNP RV39	
8	5	構築物 4	3 ug RNA	LNP RV39	

10

【 0 3 3 5 】

図6に示すように、CNEで製剤化されたSAM狂犬病とLNPで製剤化されたSAM狂犬病の両方は、RFFITで測定されたように、高レベル及び長期持続性の狂犬病中和抗体を誘導した。

【 0 3 3 6 】

図6の上図は、RABAVERTと比較した、CNEで製剤化された4つの用量の構築物4の中和抗狂犬病抗体力価を示す。4つの用量すべてが防御閾値（破線）をはるかに上回る抗体レベルを誘導した。抗体レベルは2回目と3回目のSAMワクチン接種によりブーストされ、ブーストされた力価はRABAVERTで達成された力価よりも優れていた。用量応答が観察された；150ug（白四角）及び75ug（白三角）用量は、15ug（逆白三角）及び3ug（黒丸）用量より高い抗体力価を生じた。3ug RNAの非常に低い用量でさえ、CNE中に製剤化された構築物4は、RABAVERT（白丸）よりも高いレベルで、高い及び持続した中和抗狂犬病抗体力価を誘発した。

20

【 0 3 3 7 】

図6の下図は、RABAVERTと比較した、LNPで製剤化された4つの用量の構築物4の中和抗狂犬病抗体力価を示す。SAM LNP力価はSAM CNE力価より高かった。3つの用量すべてが防御閾値（破線）をはるかに上回る抗体レベルを誘導した。抗体レベルは2回目と3回目のSAMワクチン接種によりブーストされ、ブーストされた力価はRABAVERTで達成された力価よりも優れていた。用量応答は、75ug（白三角）、15ug（逆白三角）及び3ug（黒丸）の用量で観察された。3ug RNAの非常に低い用量でさえ、LNP中に製剤化された構築物4は、RABAVERT（白丸）よりも高いレベルで、高い及び持続した中和抗狂犬病抗体力価を誘発した。

30

【 0 3 3 8 】

図7に示すように、SAM-RG-CNE及びSAM-RG-LNPの両方は、標準ELISA法により測定した抗狂犬病IgGの高レベル及び長期持続性レベルを誘導した。IgG反応は中和抗体反応と同様のパターンを示した。

【 0 3 3 9 】

図7の上図は、RABAVERTと比較した、CNEで製剤化された構築物4によって誘導された抗狂犬病IgG結合抗体レベルを示す。4つの用量全てが、防御閾値（破線）をはるかに上回るIgGレベルを誘導した。2回目及び3回目のSAMワクチン接種によりIgGレベルがブーストされ、ブーストされた力価はRABAVERTで達成された力価よりも優れていた。用量応答が観察された；150ug（白四角）及び75ug（白三角）用量は、15ug（逆白三角）及び3ug（黒丸）用量より高い抗体力価を生じた。非常に低用量の3ug RNAでも、CNE中に製剤化されたSAM-RG-co2は、RABAVERT（白丸）よりも高いレベルで高い持続的な抗狂犬病IgG力価を誘発した。

40

【 0 3 4 0 】

図7の下図は、RABAVERTと比較した、LNPで製剤化された4つの用量の構築物4の抗狂犬病IgG力価を示す。SAM LNP力価はSAM CNE力価より高かった。3つの用量すべてが防御閾値（

50

破線)をはるかに上回る抗体レベルを誘導した。2回目及び3回目のSAMワクチン接種により抗体レベルがブーストされ、ブーストされた力価はRABAVERTで達成された力価よりも優れていた。用量応答は、75ug(白三角)、15ug(逆白三角)及び3ug(黒丸)用量で観察された。非常に低用量の3ug RNAでも、LNP中に製剤化された構築物4は、RABAVERT(白丸)よりも高いレベルで、高い持続性の抗狂犬病IgG力価を誘発した。

【0341】

実施例7：RFFIT及びELISAによる構築物4の用量応答性

実験1

雌Balb/Cマウス(6~8週齢)に、1、8及び22日目に臨床用量の1/10のRABAVERT、1日目に構築物4、又は1及び22日目に構築物4のいずれかを、表3に示す用量で筋肉内注射によりワクチン接種した。15、36、57、91及び181日目に血清を採取し、RFFITウイルス中和アッセイを実施した。

【0342】

【表3】

表3:CNEと比較したLNPの用量応答

群	ワクチン	用量	製剤	注射(日)
1	RABAVERT	1/10 臨床	LNP	1, 8, 22
2	構築物4	1.5 ug	LNP	1
3	構築物4	0.15 ug	LNP	1
4	構築物4	0.015 ug	LNP	1
5	構築物4	0.0015 ug	LNP	1
6	構築物4	0.00015 ug	LNP	1
7	構築物4	0.000015 ug	LNP	1
8	構築物4	15 ug	CNE	1
9	構築物4	1.5 ug	LNP	1, 22
10	構築物4	0.15 ug	LNP	1, 22
11	構築物4	0.015 ug	LNP	1, 22
12	構築物4	0.0015 ug	LNP	1, 22
13	構築物4	0.00015 ug	LNP	1, 22
14	構築物4	0.000015 ug	LNP	1, 22
15	構築物4	15 ug	CNE	1, 22

【0343】

RFFITアッセイの結果を図8に示す。上の点線は0.5IU/mlの中和抗体の防御閾値を示し、下の点線はアッセイの定量下限(LLoQ)を示す(log0.1以下)。用量応答関係は、単回及び2回用量レジメンの両方で観察された。少なくとも15ピコグラム程度の非常に低用量のSAM RNAを用いた単回免疫では、中和抗体が非常に高く安定したレベルで誘導された(上図)。レベルは2回目の免疫によりブーストされ、3回用量のRABAVERTにより誘導された中和抗体レベルよりも有意に高いままであった(下図)。

【0344】

ELISAアッセイの結果を図8に示し、これはRFFITで観察された結果と類似している。上の点線は0.5IU/mlの中和抗体の防御閾値を示し、下の点線はアッセイの定量下限(LLoQ)を示す(log0.1以下)。用量応答関係は、単回及び2回用量レジメンの両方で観察された。少なくとも15ピコグラム程度の非常に低用量のSAM RNAによる単回免疫は、狂犬病IgGの非常に高い安定したレベルを誘導した(上図)。レベルは2回目の免疫によりブーストされ、3回用量のRABAVERTにより誘導された中和抗体レベルよりも有意に高いままであった(下図)。

【0345】

10

20

30

40

50

CNE中で製剤化された構築物4の単回15ug用量を免疫した5匹のマウスから脾臓を摘出した。脾臓T細胞をプレフェルジンAで刺激し、細胞内サイトカインをフローサイトメトリーで検出した。細胞性免疫応答を図9に示す。SAM狂犬病CNEワクチンの1回用量は、主にCD8+T細胞（上図）及びまたCD4+T細胞（下図）から、Th1サイトカインであるIL2、TNF、インターフェロン及びCD107aの高レベルを誘導したことから、T細胞応答は多機能性であった。Th2応答（IL-4、IL-13）及びTh17（IL-17A、IL-17F）応答は無視できる程度であった。

【0346】

実験2

雌Balb/Cマウス（6～8週齢）に、1、8及び22日目に臨床用量の1/10のRABAVERT、1日目に構築物4、又は1及び22日目に構築物4のいずれかを、表4に示す用量で、LNP RV29又はLNP RV94のいずれかで製剤化して、筋肉内注射によりワクチン接種した。15、36、57、91及び181日目に血清を採取し、RFFITウイルス中和アッセイ及び総IgGに対するELISAアッセイの両方を実施した。

【0347】

【表4】

表4: LNP RV29 及び LNP RV94 の用量応答

群	ワクチン	用量	製剤	注射 (日)
1	RABAVERT	1/10 臨床		1, 8, 22
2	構築物4	0.15 ug	LNP RV29	1, 22
3	構築物4	0.0015 ug	LNP RV29	1, 22
4	構築物4	0.000015 ug	LNP RV29	1, 22
5	構築物4	0.15 ug	LNP RV94	1, 22
6	構築物4	0.0015 ug	LNP RV94	1, 22
7	構築物4	0.000015 ug	LNP RV94	1, 22

【0348】

RFFITアッセイの結果を図10に示す。上の点線は0.5IU/mlの中和抗体の防御閾値を示し、下の点線はアッセイの定量下限（LLOQ）を示す（log0.1以下）。実験1の結果と同様に、少なくとも15ピコグラム程度の非常に低用量のSAM RNAは、非常に高く安定したレベルの中和抗体が誘導された。LNP RV39及びLNP RV94製剤は同様に高い中和抗体レベルを誘導した。

【0349】

ELISAアッセイの結果を図11に示し、これは実験1と同様に、RFFITで観察された結果と同様である。上の点線は0.5IU/mlの中和抗体の防御閾値を示し、下の点線はアッセイの定量下限（LLOQ）を示す（log0.1以下）。少なくとも15ピコグラム程度の非常に低用量のSAM RNAは、狂犬病IgGの非常に高い安定したレベルを誘導した。

【0350】

動物への筋肉内注射により投与される治療薬は、相対体重に応じてヒトにスケーリングされるべきである（FDA Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (2005) US Dept. Health and Human Services; Nair et al. J Basic Clin. Pharma. 7:27-31 (2016)）。SAM LNPプラットフォームを用いて投与された低用量（すなわち15ピコグラム）のmRNAを体重に基づいて成人ヒトに変換するために、平均成人体重50kg及び平均マウス体重20gを用いた。これらの平均体重を用いると、2500のスケーリング係数が得られる（50,000グラム/20グラム=2500）。このスケーリング係数を使用して、ワクチンのマウス用量を体重に基づいてヒトの等価用量に変換すると、マウスの15ピコグラムの低用量は38ナノグラム（ 3.8×10^{-8} グラム）のヒト用量に相当する。計算は15ピコグラム×2500

= 38ナノグラムである。

【0351】

そこで、上に示したマウスで作成されたin vivoデータ及びこのマウスからヒトへの変換に基づき、SAM LNPワクチンプラットフォームを用いたワクチンは、成人においてナノグラム範囲の用量で適切かつ有効な免疫応答を生成する。

【0352】

実施例8：SAM狂犬病ワクチンは致死的な狂犬病チャレンジから保護する

致死性狂犬病ウイルスチャレンジに対するSAMワクチンの防御能を試験し、生理食塩水対照と比較した。Ps P4コウモリ分離株生狂犬病ウイルスの致死量を滴定法により決定し、 1×10^4 組織培養感染用量50% (TCID₅₀/ml) の濃度のストックウイルスの1:2.5希釈であると決定し、筋肉内送達した。狂犬病の臨床徴候は7~12日目から観察され、12日目の剖検時に脳の直接蛍光抗体 (DFA) 検査によって確認した。

【0353】

約4~6週齢の雌ICRマウスを、8群に分けて表5に示す製剤及び投与量レジメンでSAM狂犬病ワクチンで免疫した。

【0354】

【表5】

表5:致死性狂犬病チャレンジ

群	ワクチン	用量	製剤	投与 レジメン (日)
1	RABAVERT	1/10 臨床 用量	N/A	1, 8, 22
2	生理食塩水	-	-	1, 22
3	構築物4	1.5 ug	LNP RV39	1, 22
4	構築物4	1.5 ug	LNP RV94	1, 22
5	構築物4	1.5 ug	CNE56	1, 22
6	構築物4	1.5 ug	LNP RV39	1
7	構築物4	1.5 ug	LNP RV94	1
8	構築物4	1.5 ug	CNE56	1

【0355】

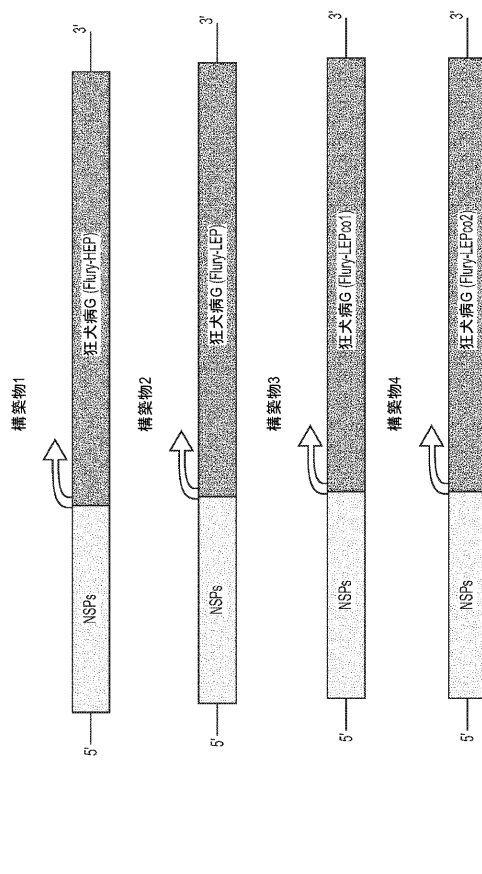
最初の免疫の60日後、マウスに致死量のPs P4コウモリ分離株生狂犬病、 1×10^4 組織培養感染用量50% (TCID₅₀/ml) 濃度のストックウイルスの1:2.5希釈で筋肉内送達してチャレンジした。生理食塩水群の全マウスは狂犬病の臨床徴候を示し、8日目までに100%の死亡率が観察された。ワクチン接種したマウスはいずれも狂犬病の臨床徴候を示さず、チャレンジ後31日目に屠殺した時点でDFA試験を行ったところ、脳に狂犬病ウイルスが存在しないことが確認された。

【0356】

SAM製剤はいずれも安全で忍容性は良好であった。体重をモニタリングし、有意な異常変化は認められなかった。注射部位反応を各用量の6、24及び48時間後にモニタリングし、Draize変法に従って段階的に評価した。いずれの製剤も忍容性は良好で、DraizeスコアはすべてのLNP製剤でゼロ (浮腫又は紅斑及び痂皮形成なし) であった。

【0357】

【 図 1 A 】



【 図 1 B - 1 】

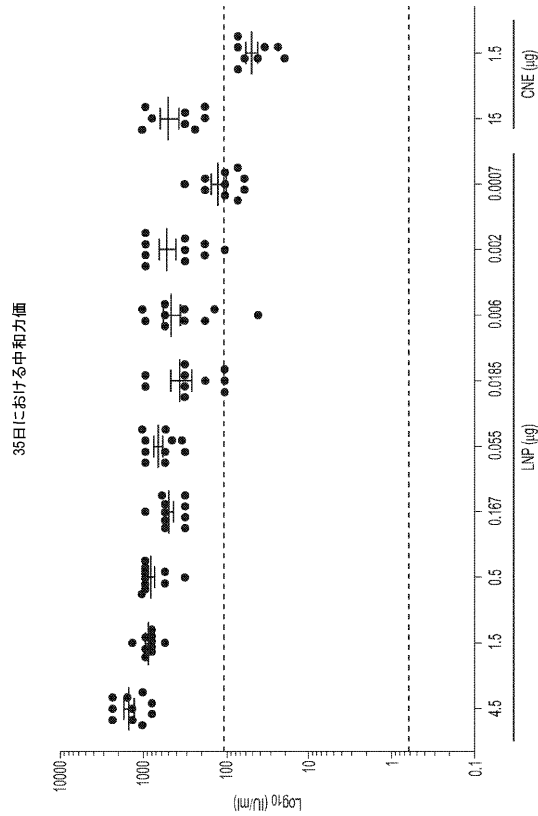
黄色:修飾なし
青色:イタリック体
緑色:下線
白色:太字

[illegible]

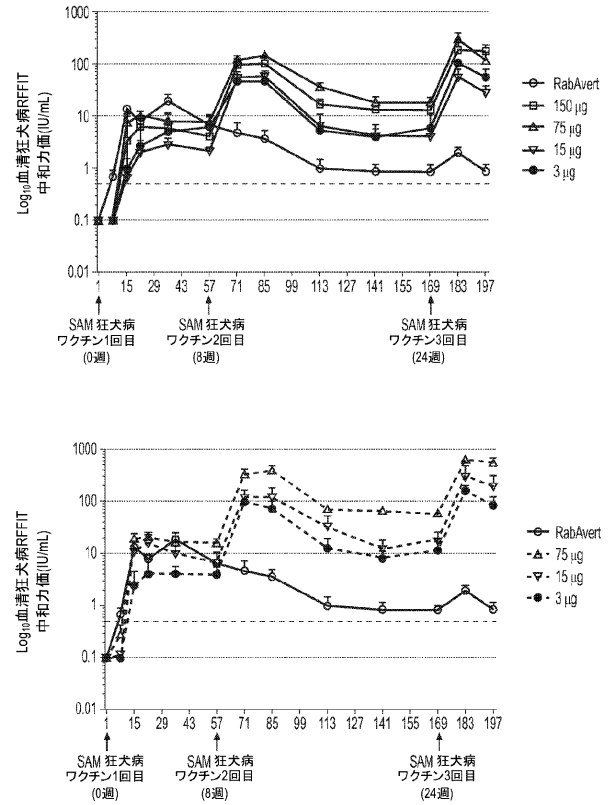
1B

図1B(続き1)<

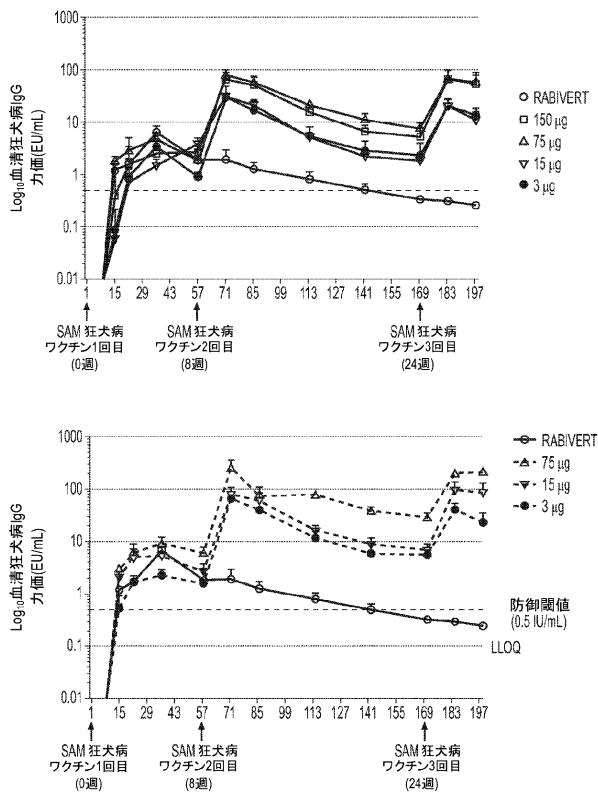
【図 5 B】



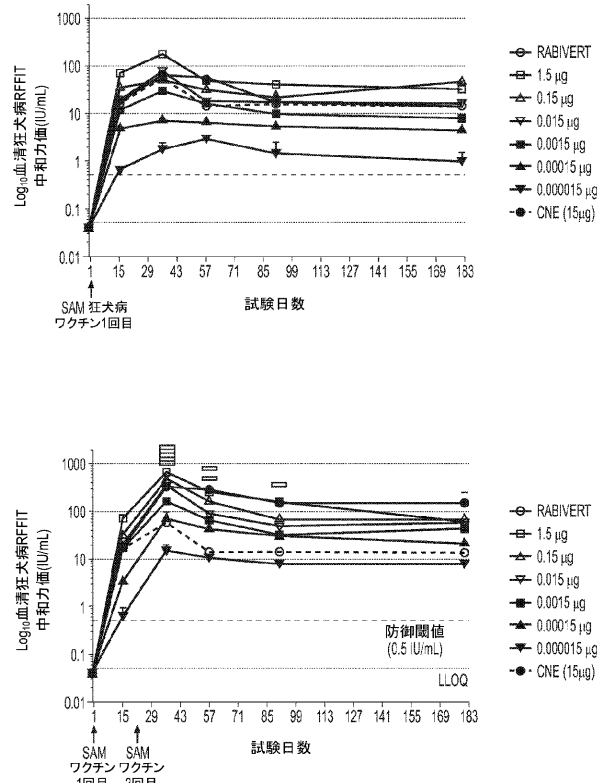
【図 6】



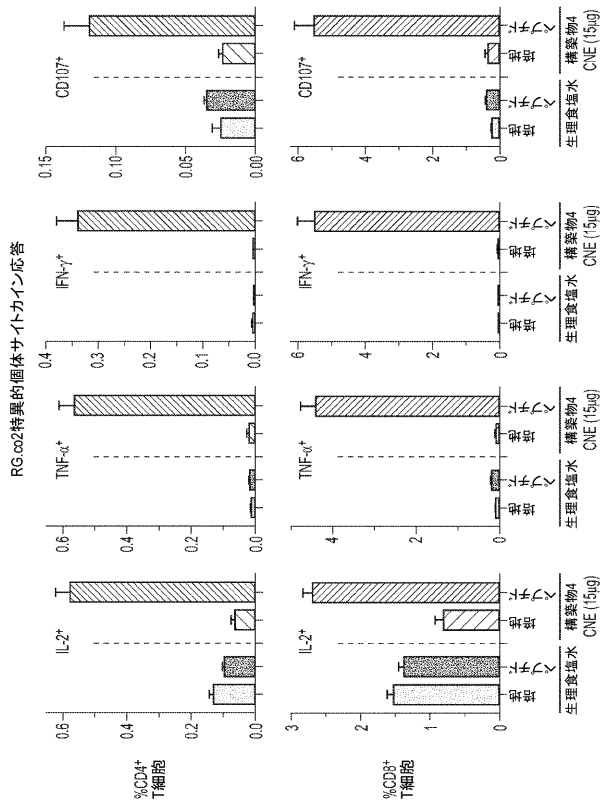
【図 7】



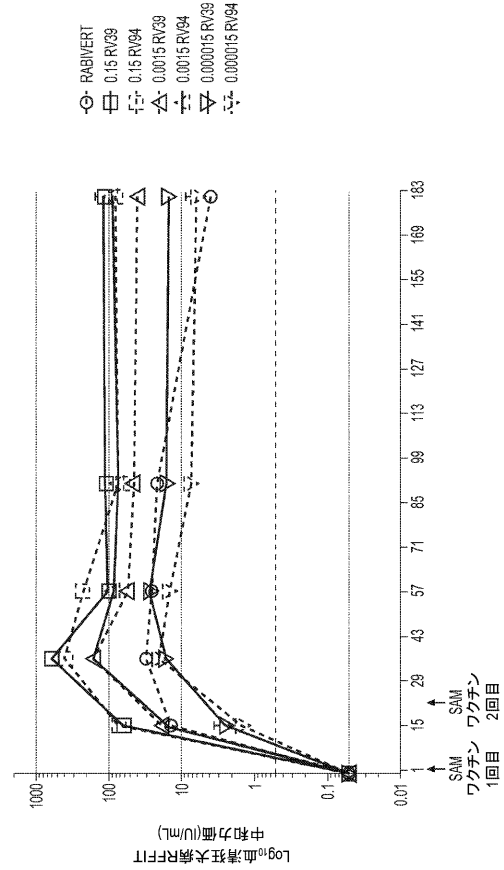
【図 8】



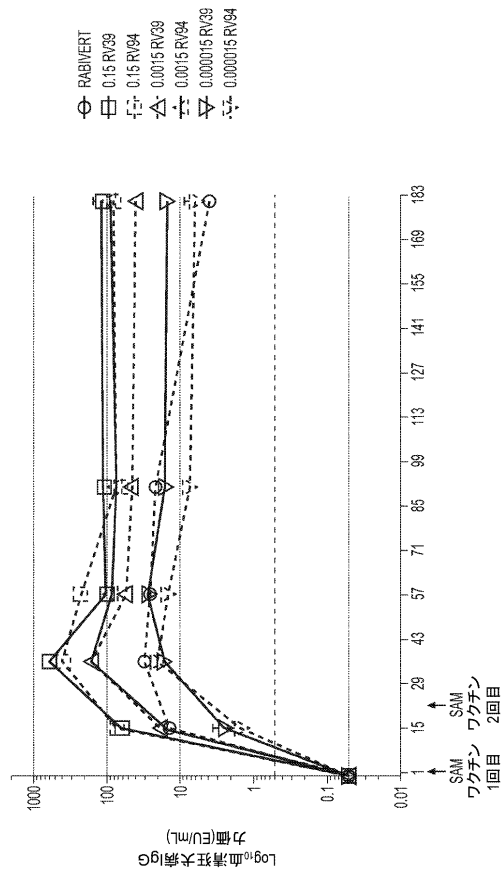
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

2020530765000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2018/055258

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/47 C07K14/145 C12N7/00 C12N15/86 A61K39/205
 ADD. A61K39/00

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)

C12N A61K

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)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Luis A. Brito ET AL: "Self-Amplifying mRNA Vaccines" In: "Advances in Genetics", 1 January 2015 (2015-01-01), Academic Press, US, XP055301432, ISSN: 0065-2660 vol. 89, pages 179-233, DOI: 10.1016/bs.adgen.2014.10.005, see the whole document, in particular section 5.2.4.1	1-3,5-36
Y	----- -/--	18,19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2018

Date of mailing of the international search report

08/10/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brenz Verca, Stefano

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2018/055258

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LUIS A BRITO ET AL: "A Cationic Nanoemulsion for the Delivery of Next-generation RNA Vaccines", MOLECULAR THERAPY, vol. 22, no. 12, 16 July 2014 (2014-07-16), pages 2118-2129, XP055180488, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2014.133 see the whole document, in particular Figure 6</p>	18,19
X	<p>-----</p> <p>SAXENA S ET AL: "A sindbis virus replicon-based DNA vaccine encoding the rabies virus glycoprotein elicits immune responses and complete protection in mice from lethal challenge", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 26, no. 51, 2 December 2008 (2008-12-02), pages 6592-6601, XP025685724, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2008.09.055 [retrieved on 2008-10-09] see the whole document, in particular the cited passages; figures 1,8,9</p>	1,3,5,8, 11,12, 21,25, 27,29, 34-36
X	<p>-----</p> <p>SAXENA S ET AL: "Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein", VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 136, no. 1-2, 14 April 2009 (2009-04-14), pages 36-44, XP026071306, ISSN: 0378-1135, DOI: 10.1016/J.VETMIC.2008.10.030 [retrieved on 2008-11-05] see the whole document, in particular the cited passages; figures 1,8,9</p>	1-3,5,8, 9,11-14, 21,25, 27,28, 34-36
X	<p>-----</p> <p>W0 2015/024665 A1 (CUREVAC GMBH [DE]) 26 February 2015 (2015-02-26)</p> <p>page 20, line 23 - page 32, line 15; figures 8A,9A,10B; examples 1-14; sequences 6,11 page 58, lines 8-31 page 63, line 10 - page 65, line 28</p> <p>----- -/--</p>	1-6,8, 12,13, 20,21, 25-28, 33-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2018/055258

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>W0 2018/104919 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE]) 14 June 2018 (2018-06-14)</p> <p>page 7, lines 9-13; claims 61,64-69; sequences 40, 42, 44, 46</p> <p>-----</p>	<p>1-3,5-8, 12,21, 22,25, 26,34-36</p>
X,P	<p>W0 2018/104911 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE]) 14 June 2018 (2018-06-14)</p> <p>construct "pChAd157delta1 E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RG#1559"; sequences 23,24</p> <p>-----</p>	<p>1,3,5,8, 12,21, 22,25, 26,34-36</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/B2018/055258

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2018/055258

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015024665	A1	26-02-2015	AU 2014310931 A1 21-01-2016
			CA 2915712 A1 26-02-2015
			CN 105517569 A 20-04-2016
			RU 2016109940 A 26-09-2017
			US 2016166711 A1 16-06-2016
			WO 2015024665 A1 26-02-2015

WO 2018104919	A1	14-06-2018	NONE

WO 2018104911	A1	14-06-2018	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/06		

(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

(72)発明者 サムサ, マルセロ
アメリカ合衆国 2 0 8 5 0 メリーランド州, ロックビル, シャディ グローブ ロード 1 4
2 0 0

(72)発明者 スラック, オルガ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 2
0 0

(72)発明者 ユー, ドン
アメリカ合衆国 2 0 8 5 0 メリーランド州, ロックビル, シャディ グローブ ロード 1 4
2 0 0

(72)発明者 ストークス, アラン
アメリカ合衆国 2 0 8 5 0 メリーランド州, ロックビル, シャディ グローブ ロード 1 4
2 0 0

(72)発明者 ジャラー, ラシュミ
アメリカ合衆国 2 0 8 5 0 メリーランド州, ロックビル, シャディ グローブ ロード 1 4
2 0 0

F ターム(参考) 4C084 AA13 AA19 NA05 NA14 ZB091 ZB211 ZB331
4C085 AA03 BA64 DD62 EE01 EE03 EE06