

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7655849号

(P7655849)

(45)発行日 令和7年4月2日(2025.4.2)

(24)登録日 令和7年3月25日(2025.3.25)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/44 (2006.01)

C 1 2 N 15/44

Z N A

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01

A 6 1 K 39/145 (2006.01)

A 6 1 K 39/145

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 P 31/16 (2006.01)

A 6 1 P 31/16

請求項の数 12 (全70頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-509824(P2021-509824)

(86)(22)出願日 令和1年8月20日(2019.8.20)

(65)公表番号 特表2021-536228(P2021-536228
A)

(43)公表日 令和3年12月27日(2021.12.27)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/047263

(87)国際公開番号 WO2020/041311

(87)国際公開日 令和2年2月27日(2020.2.27)

審査請求日 令和4年8月18日(2022.8.18)

(31)優先権主張番号 62/719,952

(32)優先日 平成30年8月20日(2018.8.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 506097988

ウィスコンシン アルムニ リサーチ フ
ァンデーションアメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3
7 2 6, マディソン, ウォルナット ス
トリート 6 1 4, サーティーンズ フロア

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘマグルチニン (H A) タンパク質内の非ドミナントエпитープに対する免疫応答を誘起
するためのベクター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

1つ以上の免疫ドミナントエпитープ内に1個以上の変化した残基を有するH3またはH5
ヘマグルチニン (H A) をコードする複数のインフルエンザウイルス核酸分子を作製する方
法であって、

少なくとも2つの免疫ドミナントエпитープを有するインフルエンザウイルスH3または
H5ヘマグルチニンをコードする単離された親インフルエンザウイルスの核酸分子の1つ以
上の免疫ドミナントエпитープの複数のコドンにランダムな変異を導入することにより、
変異インフルエンザウイルスヘマグルチニンをコードするインフルエンザウイルス核酸分
子のライブラリを提供すること；

このライブラリを細胞に導入して、該変異インフルエンザウイルスヘマグルチニンを発
現する細胞のライブラリを提供すること；および

該1つ以上の免疫ドミナントエпитープを形成する残基に1つ以上の置換および／または
欠失がある結果として該親インフルエンザウイルスのヘマグルチニンと比べて免疫ドミナ
ントエпитープの数が減少したライブラリによってコードされる変異ヘマグルチニンを同
定すること、ここで、H3の該変異ヘマグルチニンが置換を有する場合、該変異ヘマグルチ
ニンは該親インフルエンザウイルスのH3ヘマグルチニンと比べて5個より多い置換を有す
る、

を含む、方法。

【請求項2】

H3 HA内の、121位の残基が、Q、R、I、L、V、T、S、F、Y、もしくはAであるか、131位の残基が、R、A、M、K、V、S、Q、C、V、Y、D、E、もしくはLであるか、135位の残基が、Y、G、R、M、K、N、V、W、S、V、もしくはPであるか、138位の残基が、S、W、K、I、R、もしくはLであるか、140位の残基が、L、M、T、S、R、K、M、もしくはPであるか、142位の残基が、N、D、G、Y、Q、E、H、N、L、もしくはPであるか、144位の残基が、T、K、V、G、D、H、L、もしくはQであるか、145位の残基が、P、R、W、もしくはKであるか、155位の残基が、C、F、H、I、R、A、V、S、もしくはNであるか、156位の残基が、P、G、S、M、R、T、A、もしくはCであるか、157位の残基が、D、P、S、G、I、R、もしくはTであるか、158位の残基が、R、V、S、A、K、C、もしくはQであるか、171位の残基が、T、F、L、E、H、C、もしくはRであるか、189位の残基が、A、P、T、L、A、S、Y、もしくはRであるか、193位の残基が、Q、R、N、T、E、V、もしくはPであるか、212位の残基が、V、R、G、S、M、D、もしくはEであるか、または225位の残基が、L、P、C、S、Q、G、Y、もしくはFであるか、または、H5 HA内の、119位の残基が、L、K、R、S、G、T、E、A、V、F、もしくはNであるか；123位の残基が、L、Y、I、M、N、S、V、K、G、T、もしくはRであるか；125位の残基が、L、D、N、G、W、M、I、R、K、F、A、もしくはSであるか；126位の残基が、S、R、I、G、N、Q、A、N、もしくはRであるか；127位の残基が、V、A、S、M、L、K、F、もしくはYであるか；129位の残基が、D、S、G、K、W、R、E、V、Q、A、I、もしくはFであるか；138位の残基が、G、D、E、L、A、M、V、F、R、もしくはSであるか；140位の残基が、T、G、S、R、D、K、Q、E、C、もしくはVであるか；141位の残基が、R、P、W、K、E、A、M、D、L、もしくはQであるか；151位の残基が、T、S、L、Y、K、N、もしくはQであるか；152位の残基が、A、P、T、Y、H、E、S、I、F、もしくはDであるか；153位の残基が、R、Q、T、N、S、F、P、V、もしくはKであるか；154位の残基が、L、T、D、R、P、S、もしくはHであるか；155位の残基が、N、G、K、H、T、L、S、I、P、もしくはQであるか；156位の残基が、T、F、R、S、D、P、H、G、A、もしくはNであるか；185位の残基が、L、D、N、G、E、F、S、L、Q、P、V、M、R、A、もしくはSであるか；または189位の残基が、Y、S、L、R、K、G、E、F、D、V、E、I、もしくはHである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記変異HAが、10個以上の置換を有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

親インフルエンザウイルスと比べて変化した免疫ドミナントエピトープを持つ変異ヘマグルチニンをコードする核酸を含む複数のインフルエンザウイルスを作製する方法であって、

親H3 HA核酸分子において、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、または225位の残基についての2つ以上のコドンに、この親H3 HA内の免疫ドミナントエピトープの残基ではない残基をコードする変異を導入すること、または、親H5 HA核酸分子において、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、または189位の残基についての2つ以上のコドンに、この親H5 HA内の免疫ドミナントエピトープの残基ではない残基をコードする変異を導入すること、ここで、免疫ドミナントエピトープ残基ではない残基をコードするコドンの変異は、免疫認識のための多様な抗原性が異なる免疫ドミナントエピトープを提供する；および

この変異したH3またはH5 HAを持つ1種類以上のインフルエンザウイルスを単離または作製すること、ここで、該変異したH3核酸は、アミノ酸置換をコードするよう変異した5個より多いコドンを有する、を含む方法。

【請求項5】

前記変異したH3 HA内の、121位の残基が、Q、R、I、L、V、S、F、Y、もしくはAで

あるか、131位の残基が、R、V、S、Q、C、V、Y、D、E、もしくはLであるか、135位の残基が、Y、K、N、V、W、G、S、V、もしくはPであるか、138位の残基が、W、K、I、F、R、もしくはLであるか、140位の残基が、L、M、T、S、R、K、M、Y、もしくはPであるか、142位の残基が、N、G、Y、Q、E、H、N、もしくはQであるか、144位の残基が、T、V、G、D、P、H、L、K、もしくはQであるか、145位の残基が、P、D、R、W、もしくはNであるか、155位の残基が、C、I、R、A、V、S、もしくはQであるか、156位の残基が、P、G、S、T、A、もしくはCであるか、157位の残基が、D、P、S、G、I、Q、R、もしくはTであるか、158位の残基が、R、V、S、A、K、C、Q、もしくはGであるか、171位の残基が、T、F、L、E、H、V、もしくはRであるか、189位の残基が、A、P、T、L、S、Y、もしくはRであるか、193位の残基が、Q、R、N、T、E、V、もしくはPであるか、212位の残基が、V、R、G、S、M、D、もしくはEであるか、または225位の残基が、L、P、C、S、Q、G、Y、もしくはFであるか、または、H5_HA内の、119位の残基が、L、K、R、S、G、T、E、A、V、F、もしくはNであるか；123位の残基が、L、Y、I、M、N、S、V、K、G、T、もしくはRであるか；125位の残基が、L、D、N、G、W、M、I、R、K、F、A、もしくはSであるか；126位の残基が、S、R、I、G、N、Q、A、N、もしくはRであるか；127位の残基が、V、A、S、M、L、K、F、もしくはYであるか；129位の残基が、D、S、G、K、W、R、E、V、Q、A、I、もしくはFであるか；138位の残基が、G、D、E、L、A、M、V、F、R、もしくはSであるか；140位の残基が、T、G、S、R、D、K、Q、E、C、もしくはVであるか；141位の残基が、R、P、W、K、E、A、M、D、L、もしくはQであるか；151位の残基が、T、S、L、Y、K、N、もしくはQであるか；152位の残基が、A、P、T、Y、H、E、S、I、F、もしくはDであるか；153位の残基が、R、Q、T、N、S、F、P、V、もしくはKであるか；154位の残基が、L、T、D、R、P、S、もしくはHであるか；155位の残基が、N、G、K、H、T、L、S、I、P、もしくはQであるか；156位の残基が、T、F、R、S、D、P、H、G、A、もしくはNであるか；185位の残基が、L、D、N、G、E、F、S、L、Q、P、V、M、R、A、もしくはSであるか；または189位の残基が、Y、S、L、R、K、G、E、F、D、V、E、I、もしくはHである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

H3_HA内の、121位の残基がNであるか、131位の残基がTであるか、135位の残基がTであるか、138位の残基がAであるか、140位の残基がIであるか、142位の残基がRであるか、144位の残基がSであるか、145位の残基がSであるか、155位の残基がTであるか、156位の残基がHであるか、157位の残基がLであるか、158位の残基がNであるか、171位の残基がNであるか、189位の残基がKであるか、193位の残基がFであるか、212位の残基がAであるか、または225位の残基がDである、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記変異HAが、少なくとも6個または少なくとも10個の置換を有する、請求項4、5または6に記載の方法。

【請求項8】

抗原性が異なる複数の残基を含む変異体H3またはH5ヘマグルチニン（HA）をそれぞれがコードする核酸分子を含む複数の異なる組み換えインフルエンザウイルスを含む組成物であって、

H3の該複数の異なる組み換えインフルエンザウイルスのそれぞれが、H3_HA内に、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、もしくは225位の残基のうちの2つ以上に置換を含むか、または121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、もしくは225位の残基のうちの1つ以上に欠失を含むか、またはこれらの任意の組み合わせを含むか、ここで、該置換は、親H3_HAの免疫ドミナントエピトープ残基ではない残基をコードする、または、H5の該複数の異なる組み換えインフルエンザウイルスのそれぞれが、H5_HA内に、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、15

10

20

30

40

50

1位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、もしくは189位の残基のうちの2つ以上に置換を含むか、または119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、もしくは189位の残基のうちの1つ以上に欠失を含むか、またはこれらの任意の組み合わせを含む、ここで、該置換は、親H5 HAの免疫ドミナントエピトープ残基ではない残基をコードする、およびここで、少なくとも1つのH3の該複数の異なる組み換えインフルエンザウイルスは、該親H3 HAと比べて5個より多い置換を有するH3ヘマグルチニンを有する、およびここで、コドンの置換または欠失は、免疫認識のための多様な抗原性が異なる免疫ドミナントエピトープを提供する、

組成物。

10

【請求項9】

前記置換を持つ少なくとも5種類または少なくとも10種類の異なる組み換えインフルエンザウイルスを有する、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

下記表1Bまたは表6中の変異体H3 HAを含む1種類以上のウイルスを有する、請求項8に記載の組成物であって、表1Bおよび表6中の変異は、インフルエンザA Tokyo 2 (TK/2)親ウイルスと比べたものである、組成物。

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表1B：TK/2 17アミノ酸（H3）変異体の配列

略号	位置（H3での番号付け）																	注	FFU/ 50 μ l
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2			
	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	7	8	9	1	2		
	1	1	5	8	0	2	4	5	5	6	7	8	1	9	3	2	5		
TK2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D		
TK2-17AA -mut-1	Y	V	V	K	W	S	G	P	V	G	V	R	D	N	A	Q	K		8.05E +04
TK2-17AA -mut-2	M	V	G	D	F	T	D	R	C	A	N	G	R	E	G	N	K		1.08E +05
TK2-17AA -mut-4	K	R	G	.	P	D	A	G	M	T	S	P	K	D	G	L	E		7.91E +04
TK2-17AA -mut-5	Q	R	Y	K	L	N	T	P	C	P	D	R	T	A	Q	V	L		2.92E +06
TK2-17AA -mut-6	V	R	R	F	M	N	T	W	V	A	.	H	T	I	S	R	P		4.46E +04
TK2-17AA -mut-7	F	G	V	.	K	A	M	L	I	L	S	G	.	-	-	S	.	+追加のアミ ノ酸の欠失	1.85E +05
TK2-17AA -mut-9	V	K	V	T	H	E	R	R	A	S	P	V	R	R	T	I	S		1.12E +05
TK2-17AA -mut-10	R	V	K	W	M	G	V	P	I	G	P	V	F	T	R	R	P		6.16E +05
TK2-17AA -mut-11	T	G	L	R	C	S	G	R	Y	P	.	Q	T	F	A	R	T		4.37E +04
TK2-17AA -mut-12	I	.	N	K	T	Y	D	.	R	S	S	S	F	A	Q	G	C		2.37E +05
TK2-17AA -mut-14	V	M	L	K	T	G	A	W	Q	S	R	L	Q	L	R	R	E		3.03E +04
TK2-17AA -mut-15	A	K	S	R	N	D	G	V	R	S	R	F	T	E	A	Y	G		1.17E +05
TK2-17AA -mut-16	V	C	N	I	K	.	P	D	A	A	G	A	L	A	P	S	S		2.34E +05
TK2-17AA -mut-17	V	C	L	L	R	F	K	T	I	P	S	P	Q	N	S	T	S		1.91E +04
TK2-17AA -mut-21	V	R	V	V	V	D	P	R	G	S	C	I	I	-	-	-	-	+追加のアミ ノ酸の欠失	5.51E +04
TK2-17AA -mut-22	S	S	.	K	S	Q	G	.	R	P	I	K	E	P	N	V	Q		3.59E +05
TK2-17AA -mut-23	V	Q	V	R	R	E	H	.	V	T	.	R	H	L	T	M	G		1.16E +06
TK2-17AA -mut-24	L	R	N	T	K	T	N	.	Q	K	R	F	S	.	T	V	S		1.65E +05
TK2-17AA -mut-25	R	R	I	V	N	G	T	R	W	P	S	P	R	S	S	V	R		1.11E +05

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

略号	位置 (H3での番号付け)																		注	FFU/ 50 μ l
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2				
	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	7	8	9	1	2			
	1	1	5	8	0	2	4	5	5	6	7	8	1	9	3	2	5			
TK2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D			
TK2-17AA -mut-26	V	R	Y	K	T	A	E	Q	.	L	W	G	R	Y	Q	M	N		1.13E +05	
TK2-17AA -mut-28	F	D	S	K	G	N	V	K	P	T	R	R	L	S	-	P	S		3.79E +04	
TK2-17AA -mut-29	S	R	K	T	N	.	A	P	Q	.	M	K	F	T	N	F	C		8.16E +04	
TK2-17AA -mut-30	F	V	W	S	M	H	Q	P	Q	G	R	C	T	S	E	.	Y		3.35E +05	
TK2-17AA -mut-31	R	V	V	.	T	A	E	G	S	I	P	M	C	S	G	L	C		1.02E +05	
TK2-17AA -mut-32	F	D	G	F	.	N	.	W	R	A	S	Q	V	Y	R	V	L		6.94E +05	
TK2-17AA -mut-34	I	Y	S	R	Y	.	L	.	S	C	S	.	L	R	V	S	S		3.13E +05	
TK2-17AA -mut-35	I	M	Q	W	A	V	E	K	E	C	G	Q	G	T	S	P	S		1.29E +05	
TK2-17AA -mut-36	H	G	S	R	K	M	G	E	K	R	K	Q	K	A	K	C	S		5.46E +03	
TK2-17AA -mut-37	R	A	V	R	N	N	K	Q	V	R	I	S	S	G	S	T	A		4.05E +04	
TK2-17AA -mut-38	I	E	R	G	D	P	P	N	V	G	E	H	R	R	.	S	C		1.01E +05	
TK2-17AA -mut-39	V	E	A	E	L	A	I	N	S	E	E	C	L	N	S	C	H		1.47E +05	
TK2-17AA -mut-40	T	I	A	R	C	S	K	P	R	N	R	T	R	V	K	T	V		5.09E +04	
TK2-17AA -mut-41	V	D	C	S	L	G	Q	F	P	L	R	R	L	N	S	W	C		4.81E +04	
TK2-17AA -mut-43	V	K	A	Q	M	.	.	K	S	S	A	I	R	A	M	S	.		1.57E +05	
TK2-17AA -mut-44	I	G	G	R	.	D	.	P	I	P	P	G	L	E	V	L	.		8.63E +04	
TK2-17AA -mut-45	M	N	S	T	R	H	K	.	C	D	T	Q	V	S	P	I	P		2.33E +05	
TK2-17AA -mut-46	Y	L	Q	T	F	.	G	A	A	C	A	H	T	N	L	F	C		4.31E +04	
TK2-17AA -mut-47	V	N	L	L	A	T	T	.	K	R	A	R	R	V	P	P	P		1.03E +05	
TK2-17AA -mut-48	F	R	S	V	V	Q	R	P	D	G	N	T	M	T	G	R	M		2.04E +05	

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

略号	位置 (H3での番号付け)																		注	FFU/ 50 μ l
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2			
	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	7	8	9	1	2			
	1	1	5	8	0	2	4	5	5	6	7	8	1	9	3	2	5			
TK2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D			
TK2-17AA -mut-50	V	C	P	L	W	H	Q	P	G	S	T	H	T	R	K	R	C		3.43E +04	
TK2-17AA -mut-51	M	K	Y	Q	Y	I	N	H	S	P	F	R	F	I	D	F	C		1.05E +05	
TK2-17AA -mut-53	T	N	C	R	W	N	K	C	I	.	P	L	K	H	N	V	Q		1.45E +05	
TK2-17AA -mut-54	V	R	N	C	F	N	T	P	L	I	P	K	R	H	A	R	L		4.86E +04	
TK2-17AA -mut-55	Y	R	P	.	N	K	T	R	N	.	P	A	T	H	N	E	L	C139 Δ	1.98E +05	
TK2-17AA -mut-56	R	.	Q	S	C	Q	T	T	A	P	.	S	R	G	N	V	S		4.18E +04	
TK2-17AA -mut-57	T	S	D	.	G	N	Y	A	P	F	S	G	L	I	D	V	C		3.35E +04	
TK2-17AA -mut-58	F	H	M	R	L	N	N	T	R	R	C	G	H	T	K	G	A		2.87E +04	
TK2-17AA -mut-59	H	R	R	R	M	G	N	D	Y	S	R	P	I	L	T	V	A		6.80E +04	
TK2-17AA -mut-60	T	Q	S	Q	E	Q	I	R	.	S	K	G	I	T	R	L	W		7.46E +04	
TK2-17AA -mut-61	V	S	K	D	H	K	A	G	R	D	R	K	T	V	K	W	S	G209D	6.47E +04	
TK2-17AA -mut-64	L	G	A	Q	R	Q	E	A	S	D	R	R	E	R	G	V	M		2.31E +05	
TK2-17AA -mut-65	F	R	V	.	Q	.	E	P	M	T	T	H	T	Q	T	R	F		1.95E +05	
TK2-17AA -mut-66	Y	E	P	L	L	Q	.	N	.	S	T	G	R	S	P	D	P		3.34E +05	
TK2-17AA -mut-67	L	E	S	V	R	Y	N	D	R	G	P	P	T	A	R	E	I		1.33E +05	
TK2-17AA -mut-68	I	S	G	L	R	P	G	V	S	W	D	P	.	N	R	E	T		2.79E +05	
TK2-17AA -mut-70	W	E	S	W	K	H	R	P	L	T	T	K	V	I	R	L	P		6.00E +04	
TK2-17AA -mut-71	E	Q	E	L	Q	D	M	A	V	P	Q	G	F	P	M	.	E		3.88E +05	
TK2-17AA -mut-72	T	R	M	R	Q	N	Y	P	W	I	S	K	W	E	R	S	P		1.25E +04	
TK2-17AA -mut-73	S	L	S	R	L	E	W	P	G	Q	R	T	L	T	S	R	A		2.10E +05	

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

略号	位置（H3での番号付け）																		注	FFU/ 50 μ l
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2			
	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	7	8	9	1	2			
	1	1	5	8	0	2	4	5	5	6	7	8	1	9	3	2	5			
TK2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D			
TK2-17AA -mut-75	F	R	N	E	R	N	P	T	I	P	V	S	L	S	A	S	C		2.02E +05	
TK2-17AA -mut-76	E	R	K	L	L	N	N	G	.	Q	.	S	A	S	D	.	A		9.73E +04	
TK2-17AA -mut-77	A	L	V	I	P	.	K	.	S	T	Q	Q	L	R	P	E	F		6.92E +05	
TK2-17AA -mut-79	L	G	L	D	D	A	.	P	D	K	P	C	R	S	N	R	A		1.52E +05	

「.」 野生型と同じアミノ酸；「-」 欠失

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表6：TK/2（H3）変異体

名称	アミノ酸位置																		遺伝子型
	1 2 1	1 3 1	1 3 5	1 3 8	1 4 0	1 4 2	1 4 4	1 4 5	1 5 5	1 5 6	1 5 7	1 5 8	1 7 1	1 8 9	1 9 3	2 1 2	2 2 5		
Tokyo 2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D	1	
TK/2-177 hCK-4 1_14	.	.	M	S	F	H	.	P	.	M	S	G	D	R	S	R	.		
TK/2-177 hCK-4 1_69	.	.	M	S	F	H	.	P	.	M	S	G	D	R	S	R	.		
TK/2-177 hCK-4 1_9	.	.	M	S	F	H	.	P	.	M	S	G	D	R	S	R	.	2	
TK/2-177 hCK-3 7_87	A	R	G	S	R	L	D	P	.	N	D	A	Y	N	R	N	E		
TK/2-177 hCK-3 7_73	E	K	.	T	P	D	R	M	Y	K	S	A	T	L	E	S	G	3	
TK/2-177 hCK-3 7_84	E	K	.	T	P	D	R	M	Y	K	S	A	T	L	E	S	G		
TK/2-177 hCK-3 7_68	E	L	N	S	K	K	A	P	F	S	T	S	Q	A	R	L	T	4	
TK/2-177 hCK-3 7_101	E	S	S	.	T	F	G	A	F	A	R	G	R	M	H	Q	.	5	
TK/2-177 hCK-4 1_3	F	M	G	S	.	E	M	P	F	S	Q	M	R	T	D	L	G	6	
TK/2-177 hCK-4 1_34	F	M	G	S	.	E	M	P	F	S	Q	M	R	T	D	L	G		
TK/2-177 hCK-3 7_70-3	F	M	G	S	.	E	M	P	F	S	Q	M	R	T	D	L	G		
TK/2-177 hCK-3 7_11	F	R	N	.	T	N	I	N	Y	I	R	E	K	D	G	S	E	7	
TK/2-177 hCK-3 7_19	F	R	S	S	P	M	G	N	.	L	P	D	K	D	A	.	A	8	
TK/2-177 hCK-3 7_10	F	S	G	S	L	H	R	A	W	S	R	T	F	F	S	S	L	9	
TK/2-177 hCK-3 7_1	F	S	H	S	S	T	N	P	F	A	S	R	M	A	Q	S	C	10	
TK/2-177 hCK-3 7_98	F	V	G	S	K	T	G	Q	I	R	S	T	L	N	S	I	R	11	
TK/2-177 hCK-3 7_71	F	Y	H	S	W	N	K	L	.	A	.	P	S	E	R	T	R	12	
TK/2-177 hCK-3 7_90	H	A	V	.	R	I	Q	P	Y	Q	S	R	V	S	R	S	.	13	
TK/2-177 hCK-4 1_H50	H	E	V	.	V	N	V	P	H	R	H	E	M	N	W	T	S	14	
TK/2-177 hCK-3 7_70-2	H	K	S	S	K	.	G	P	S	Q	G	R	M	A	.	L	G	15	
TK/2-177 hCK-4 1_H96	H	K	V	S	P	L	R	T	S	A	W	D	R	S	A	H	A	16	

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

名称	アミノ酸位置																		遺伝子型
	1 2 1	1 3 1	1 3 5	1 3 8	1 4 0	1 4 2	1 4 4	1 4 5	1 5 5	1 5 6	1 5 7	1 5 8	1 7 1	1 8 9	1 9 3	2 1 2	2 2 5		
Tokyo 2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D	17	
TK/2-177 hCK-3 7_12	H	R	V	.	R	S	M	T	V	S	S	S	R	N	N	S	G		
TK/2-177 hCK-3 7_16	I	E	H	S	D	.	K	P	V	T	R	K	S	R	S	W	G		18
TK/2-177 hCK-3 7_74 2 と 3	I	E	K	S	Y	T	G	N	V	R	R	G	F	R	D	F	S	19	
TK/2-177 hCK-4 1_58	I	L	S	S	D	Y	K	K	R	A	R	.	P	N	A	T	R		20
TK/2-177 hCK-3 7_81	I	R	M	S	L	A	N	.	.	N	R	V	V	S	R	G	.	21	
TK/2-177 hCK-3 7_102	I	R	Q	S	N	A	M	P	.	K	H	L	L	H	S	T	K		22
TK/2-177 hCK-3 7_49	K	N	.	.	H	N	M	P	F	R	S	.	T	T	L	S	H	23	
TK/2-177 hCK-3 7_22-1	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R		24
TK/2-177 hCK-3 7_31	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R		
TK/2-177 hCK-3 7_56	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R		
TK/2-177 hCK-4 1_75	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R		
TK/2-177 hCK-3 7_95	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R		
TK/2-177 hCK-4 1_H48	L	A	.	S	P	D	F	P	H	S	R	L	A	S	T	Q	Q	25	
TK/2-177 hCK-4 1_H51	L	A	.	S	P	D	F	P	H	S	R	L	A	S	T	Q	Q		
TK/2-177 hCK-4 1_H58	L	A	.	S	P	D	F	P	H	S	R	L	A	S	T	Q	Q		
TK/2-177 hCK-3 7_64	L	A	A	S	L	K	N	Y	.	S	M	D	C	F	A	T	S	26	
TK/2-177 hCK-3 7_74-1	L	A	A	S	L	K	N	Y	.	S	M	D	C	F	A	T	S		
TK/2-177 hCK-4 1_79	L	A	F	.	S	H	R	.	Y	A	V	G	T	M	M	T	S	27	
TK/2-177 hCK-3 7_59	L	I	.	S	L	I	G	N	.	.	S	G	V	H	Q	T	L	28	
TK/2-177 hCK-4 1_89	L	L	D	S	S	.	G	P	H	A	Q	A	A	R	S	V	H	29	
TK/2-177 hCK-3 7_33	L	L	R	S	L	.	R	E	H	S	P	M	.	M	A	N	H	30	
TK/2-177 hCK-3 7_35	L	S	Q	.	N	F	A	P	F	S	E	S	.	N	G	.	S	31	
TK/2-177 hCK-3	M	.	N	S	P	T	N	Q	F	S	R	R	H	V	N	S	T	32	

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

名称	アミノ酸位置																		遺伝子型
	1 2 1	1 3 1	1 3 5	1 3 8	1 4 0	1 4 2	1 4 4	1 4 5	1 5 5	1 5 6	1 5 7	1 5 8	1 7 1	1 8 9	1 9 3	2 1 2	2 2 5		
Tokyo 2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D		
7_39																			
TK/2-177 hCK-3 7_45	M	.	V	S	M	G	V	P	H	V	M	S	L	Y	K	S	S	33	
TK/2-177 hCK-4 1_76	M	N	.	S	G	E	E	E	Y	A	R	E	R	M	T	H	G		
TK/2-177 hCK-4 1_21	M	Q	A	S	T	N	.	R	F	V	S	R	.	D	S	L	T	35	
TK/2-177 hCK-3 7_17-1	R	G	S	S	L	S	I	P	K	A	A	A	S	I	H	F	R		
TK/2-177 hCK-4 1_93	R	L	V	S	A	G	R	A	S	S	Q	S	Y	D	.	S	R	37	
TK/2-177 hCK-4 1_53	R	L	V	S	A	K	M	P	.	A	S	L	E	T	L	S	M		
TK/2-177 hCK-3 7_36	R	N	H	S	R	G	M	M	.	A	S	L	F	S	T	V	C	39	
TK/2-177 hCK-3 7_60	R	N	H	S	R	G	M	M	.	A	S	L	F	S	T	V	C		
TK/2-177 hCK-3 7_H5	R	N	S	.	M	Q	Q	V	.	K	F	R	M	E	S	W	?	40	
TK/2-177 hCK-3 7_96	S	A	V	S	N	K	H	A	F	S	D	S	Q	E	A	Q	.		
TK/2-177 hCK-4 1_48	S	G	R	S	R	N	.	N	W	S	G	K	L	T	S	I	G	42	
TK/2-177 hCK-3 7_67	S	H	V	S	.	Q	Q	W	.	L	H	D	T	G	A	S	.		
TK/2-177 hCK-4 1_7	S	K	S	S	Y	L	E	.	H	A	D	Q	G	.	A	R	S	44	
TK/2-177 hCK-3 7_37	T	E	G	C	M	H	T	M	F	K	P	R	E	R	S	V	G		
TK/2-177 hCK-3 7_28	T	G	V	S	.	T	R	.	V	A	N	V	K	S	D	H	T	46	
TK/2-177 hCK-4 1_54	T	K	Q	S	N	G	K	Q	S	S	D	E	L	T	W	I	S		
TK/2-177 hCK-3 7_40	T	N	W	S	S	N	A	G	.	S	A	L	L	N	H	S	S	48	
TK/2-177 hCK-3 7_86	T	R	G	T	V	.	E	R	V	Q	R	G	S	A	G	M	S		
TK/2-177 hCK-3 7_85	T	V	A	S	K	I	G	V	.	R	S	L	L	V	K	V	G	50	
TK/2-177 hCK-3 7_97	T	V	A	S	K	I	G	V	.	R	S	L	L	V	K	V	G		
TK/2-177 hCK-3 7_94	V	?	V	S	S	S	G	M	.	A	S	E	I	T	S	L	L	51	
TK/2-177 hCK-3 7_17-2 と 3	V	A	.	.	L	C	E	A	V	S	T	R	S	G	S	S	G		
																		52	

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

名称	アミノ酸位置																	遺伝子型
	1 2 1	1 3 1	1 3 5	1 3 8	1 4 0	1 4 2	1 4 4	1 4 5	1 5 5	1 5 6	1 5 7	1 5 8	1 7 1	1 8 9	1 9 3	2 1 2	2 2 5	
Tokyo 2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D	53
TK/2-177 hCK-4 1_4	V	K	.	S	P	G	.	D	F	T	P	I	Y	N	Y	V	E	
TK/2-177 hCK-3 7_5	V	K	.	S	P	G	.	D	F	T	P	I	Y	N	Y	V	E	
TK/2-177 hCK-3 7_42	V	K	V	.	P	G	D	Y	.	S	W	K	R	Q	.	G	Q	54
TK/2-177 hCK-4 1_55	V	K	V	S	Q	.	R	H	.	S	T	S	R	L	N	.	L	55
TK/2-177 hCK-3 7_57	V	L	V	S	L	S	.	H	V	V	S	K	E	S	H	T	R	56
TK/2-177 hCK-4 1_78	V	L	V	S	L	S	.	H	V	V	S	K	E	S	H	T	R	
TK/2-177 hCK-3 7_2	V	N	C	S	A	A	M	N	.	Q	S	Q	T	R	N	V	R	57
TK/2-177 hCK-3 7_65	V	N	C	S	A	A	M	N	.	Q	S	Q	T	R	N	V	R	
TK/2-177 hCK-4 1_51	V	Q	.	S	K	T	K	R	W	K	G	H	R	E	Q	S	T	58
TK/2-177 hCK-3 7_100	V	R	.	.	S	G	I	R	.	W	V	G	M	V	A	W	A	59
TK/2-177 hCK-3 7_20	V	R	G	S	C	V	K	F	.	A	K	S	L	E	I	L	E	60
TK/2-177 hCK-4 1_41	V	R	K	S	P	E	.	K	V	M	E	Q	H	R	S	Q	H	61
TK/2-177 hCK-4 1_26	W	K	.	S	H	Y	T	P	S	A	Q	E	A	R	A	?	Q	62
TK/2-177 hCK-4 1_38	W	K	.	S	H	Y	T	P	S	A	Q	E	A	R	A	T	Q	
TK/2-177 hCK-4 1_66	W	K	.	S	H	Y	T	P	S	A	Q	E	A	R	A	T	Q	
TK/2-177 hCK-3 7_22-3	Y	K	S	S	K	M	N	P	.	M	?	L	W	T	L	L	R	63
TK/2-177 hCK-3 7_32	Y	L	R	S	L	H	E	R	S	R	.	R	M	A	E	H	.	64
TK/2-177 hCK-4 1_50	Y	L	R	S	L	H	E	R	S	R	.	R	M	A	E	H	.	
TK/2-177 hCK-4 1_8	Y	L	R	S	L	H	E	R	S	R	.	R	M	A	E	H	.	
TK/2-177 hCK-4 1_52	Y	L	R	S	M	A	H	Q	Y	A	W	R	E	Q	R	V	W	65
TK/2-177 hCK-3 7_62	Y	M	S	.	.	E	R	M	V	K	.	G	S	S	D	F	A	66

【請求項 1 1】

前記複数の異なる組み換えインフルエンザウイルスそれぞれがH5 HAを含み、このH5 HA内の、119位の残基が、L、K、R、S、G、T、E、A、V、F、もしくはNであるか；123位の残基が、L、Y、I、M、N、S、V、K、G、T、もしくはRであるか；125位の残基が、L、D、N、G、W、M、I、R、K、F、A、もしくはSであるか；126位の残基が、S、R、I、G、N、Q、A、N、もしくはRであるか；127位の残基が、V、A、S、M、L、K、F、もしくはYであるか；129位の残基が、D、S、G、K、W、R、E、V、Q、A、I、もしくはFであるか；138位の残基が、G、D、E、L、A、M、V、F、R、もしくはSであるか；140位の残基が、T、G、S、R、D、K、Q、E、C、もしくはVであるか；141位の残基が、R、

P、W、K、E、A、M、D、L、もしくはQであるか；151位の残基が、T、S、L、Y、K、N、もしくはQであるか；152位の残基が、A、P、T、Y、H、E、S、I、F、もしくはDであるか；153位の残基が、R、Q、T、N、S、F、P、V、もしくはKであるか；154位の残基が、L、T、D、R、P、S、もしくはHであるか；155位の残基が、N、G、K、H、T、L、S、I、P、もしくはQであるか；156位の残基が、T、F、R、S、D、P、H、G、A、もしくはNであるか；185位の残基が、L、D、N、G、E、F、S、L、Q、P、V、M、R、A、もしくはSであるか；189位の残基が、Y、S、L、R、K、G、E、F、D、V、E、I、もしくはHであるか、またはこれらの位置の残基が、これらの残基の任意の組み合わせであるか、または前記複数の異なる組み合わせインフルエンザウイルスそれぞれがH3 HAを含み、このH3 HA内の、121位の残基が、Q、R、I、L、V、S、F、Y、もしくはAであるか、131位の残基が、R、V、S、Q、C、V、Y、D、E、もしくはLであるか、135位の残基が、Y、K、N、V、W、G、S、V、もしくはPであるか、138位の残基が、W、K、I、F、R、もしくはLであるか、140位の残基が、L、M、T、S、R、K、M、Y、もしくはPであるか、142位の残基が、N、G、Y、Q、E、H、N、もしくはQであるか、144位の残基が、T、V、G、D、P、H、L、K、もしくはQであるか、145位の残基が、P、D、R、W、もしくはNであるか、155位の残基が、C、I、R、A、V、S、もしくはQであるか、156位の残基が、P、G、S、T、A、もしくはCであるか、157位の残基が、D、P、S、G、I、Q、R、もしくはTであるか、158位の残基が、R、V、S、A、K、C、Q、もしくはGであるか、171位の残基が、T、F、L、E、H、V、もしくはRであるか、189位の残基が、A、P、T、L、S、Y、もしくはRであるか、193位の残基が、Q、R、N、T、E、V、もしくはPであるか、212位の残基が、V、R、G、S、M、D、もしくはEであるか、または225位の残基が、L、P、C、S、Q、G、Y、もしくはFであるか、またはこれらの位置の残基が、これらの残基の任意の組み合わせである、請求項8、9または10に記載の組成物。

【請求項12】

親ウイルスにおいて免疫ドミナントエピトープを形成する残基と比べて抗原性が異なる複数の残基を含むヘマグルチニンをそれぞれがコードする少なくとも6種の異なる組み合わせインフルエンザH3またはH5ウイルスを組み合わせることを含む、免疫原性組成物を作製するための方法であって、

該少なくとも6種の異なる組み合わせインフルエンザH3ウイルスのそれぞれが、H3内に、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、もしくは225位のうちの6つ以上に置換を含むか、または121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、もしくは225位のうちの1つ以上に欠失を含むか、またはこれらの任意の組み合わせを含むか、ここで、該置換は、該親ウイルスのH3 HAの免疫ドミナントエピトープ残基ではない残基をコードする、または、該少なくとも6種の異なる組み合わせインフルエンザH5ウイルスのそれぞれが、H5内に、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、もしくは189位のうちの2つ以上に置換を含むか、または119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、もしくは189位のうちの1つ以上に欠失を含むか、またはこれらの任意の組み合わせを含む、ここで、該置換は、該親ウイルスのH5 HAの免疫ドミナントエピトープ残基ではない残基をコードする、およびここで、コドンの置換または欠失は、免疫認識のための多様な抗原性が異なる免疫ドミナントエピトープを提供する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する出願の相互参照

本出願は、2018年8月20日に出願されたアメリカ合衆国出願第62/719,952号の出願

10

20

30

40

50

日の恩恵を主張するものであり、その開示内容が参照によって本明細書に組み込まれている。

【0002】

政府の権利の宣言

本発明は、政府の援助を得て国立衛生研究所から資金提供されたHHSN272201400008Cのもとでなされた。政府は本発明において所定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

ヒトにおけるインフルエンザのアウトブレイクは公衆衛生の大きな懸念材料である。毎年のエピデミック（ヒトの間で流行するインフルエンザウイルスのアウトブレイク）と散発的なパンデミック（ヒトに防御免疫がない新たなインフルエンザウイルスのアウトブレイク）がヒト集団の罹患率と死亡率を増大させ、多大な経済的損失を生じさせている。インフルエンザウイルスに感染したり、現行のワクチンを接種すると、ウイルス表面の糖タンパク質であるヘマグルチニン（HA）のヘッド領域にある非常に変化しやすい免疫ドミナントエピトープに対して抗体が誘起される。大きな変異率と免疫圧によってこれら免疫ドミナントエピトープに変異が蓄積し、その結果としてウイルスは、個人の体内を循環している抗体から「逃避する」。したがってこの個人は再感染することになる。感染またはワクチン接種の際に誘起される免疫応答からウイルスが「逃避する」結果として、ワクチン株を頻繁に交換する必要がある。最近、アメリカ国立アレルギー・感染性疾患研究所（NIAID）は、多様な抗原性の多数の株から保護する「万能な」インフルエンザワクチンを開発するための戦略的計画を発表した。

【0004】

免疫ドミナント性（免疫優性）は、強い免疫応答が抗原エピトープのサブセット（すなわち免疫ドミナント抗原エピトープ）に向かう一方で、それよりもはるかに弱い免疫応答は、残っている免疫サブドミナントエピトープに向かうという現象を記述している。インフルエンザウイルスの免疫ドミナントエピトープは、HAヘッドの非常に変化しやすい領域に位置する（すなわち感染またはワクチン接種の後に誘起される大半の抗体が、これらの主要な抗原エピトープに向かう）。免疫サブドミナントエピトープは、HAヘッドの保存された領域と、保存されたHAステムに位置する。これら免疫サブドミナントエピトープの保存された領域に対して誘起される抗体は、典型的には広い範囲のインフルエンザウイルスに反応するが、エピトープは免疫サブドミナントであるため、広く反応するこれらの抗体のレベルは低い。

【0005】

いくつかの研究から、抗原として新奇なインフルエンザウイルスに最初に曝露されると、HAヘッドの非常に変化しやすい領域にある主要な免疫ドミナントエピトープに対する抗体が高レベルで生成することに加え、HAステム内の免疫サブドミナントエピトープに対する抗体が比較的高レベルで生成することがわかっている。Paleseとその共同研究者は、同じシステム領域を持つがヘッド領域は異なるHA亜型に由来する複数のキメラHAを用いた反復免疫化により、ステム反応性抗体のレベルが、同じヘッドを持つHAを用いた反復ワクチン接種と比べて上昇することを実証した（Chen他、2016年；Krammer他、2013年；Margine他、2013年；Nachbagauer他、2017年と2015年；Krammer他、2012年と2014年；Goff他、2013年）。

【0006】

キメラHAで得られたこの有望なデータがあるにもかかわらず、このアプローチには欠点がある。すなわち（i）ヘッド領域の交換に使用できるHA亜型の数が限られていること（および、ステムとヘッドのあらゆる組み合わせが安定なわけではないこと）と；（ii）HAヘッドを交換する現在のアプローチは、ヘッド内の亜型特異的な保存された免疫サブドミナントエピトープを活用していないことである。

【0007】

ヒトインフルエンザウイルス感染は、個人の健康と、公衆衛生分野と、世界経済に多大

な負担を与える。ヒトの間で流行するインフルエンザウイルス（すなわち「季節性」インフルエンザウイルス）は、典型的には毎年エピデミックを引き起こし、その結果として2010年以降はアメリカ合衆国だけで年に9200万～3億5600万人が罹患し、14万～71万人が入院し、1万2千～5万6千人が死亡している（<https://www.cdc.gov/flu/about/disease/burden.htm>）。エピデミックはA型とB型のインフルエンザウイルスによって起こる。A型インフルエンザウイルスは、ウイルス表面の糖タンパク質であるHAとノイラミニダーゼ（NA）の抗原性に基づいてさらに亜型に分けられる。現在までに18種類のHA（H1～H18）と11種類のNA（N1～N11）を持つ亜型が同定されており、HAは、系統発生関係に基づき、2つのスーパーグループ（グループ1、H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11～H13、H16～18；グループ2、H3、H4、H7、H10、H14、H15）に分類されている。しかしH1N1、H2N2、H3N2という亜型のウイルスだけがヒトの間で流行する。世界的なアウトブレイク（パンデミック）は、ヒトで以前に流行していたウイルスとは抗原性が異なるHAを持つウイルスによって起こるため、免疫学的にナイーブな集団に遭遇すると世界中に急速に広がる。過去100年の間にパンデミックは4回起こった。1918年のパンデミックはH1N1ウイルスによって起こり、それが1957年にはH2N2ウイルスに置き換わって「アジア」パンデミックを引き起こした。1968年にはH3N2ウイルスがH2N2ウイルスに置き換わり、「香港」パンデミックを引き起こした。1950年代に流行していたのと似たH1N1ウイルスが1977年に再び出現し、H3N2ウイルスとともに2009年まで流行した。その年、そのH1N1ウイルスは、抗原的に異なるHAを持つH1N1ウイルスに置き換わった（2009年のパンデミック）。

【0008】

野生の水鳥はA型インフルエンザウイルスの天然のリザーバであり、たいいていの亜型のインフルエンザウイルスを保持している。トリインフルエンザウイルスがヒトに散発的に伝播すると深刻な呼吸器疾患を引き起こし、大きな死亡率になる可能性がある。H5亜型の高病原性トリインフルエンザは840人に感染し、454人が死亡した。（2013年に出現した）H7N9ウイルスがヒトに感染することで、報告されている1,625人のうちで死亡率が38%になった（2018年5月24日の時点）。これらのトリインフルエンザウイルスはヒトの間を効率的に伝播することはないため（まだ）パンデミックを引き起こしていないが、H7N9ウイルスは、呼吸器飛沫を通じてフェレット（インフルエンザウイルスの伝播を研究するのに一般に用いられている動物モデル）の間を伝播するし（1～4）、少数の変異を持つH5ウイルスは、呼吸器飛沫を通じてフェレットの間を伝播する可能性がある（5、6）。何らかの万能なワクチン戦略があれば、理想的にはこれらの型のウイルスに適用／適応できるはずである。

【発明の概要】

【0009】

本明細書に開示されているのは、トリまたは哺乳動物における免疫応答を、（頻繁に変異する）免疫ドミナントエピトープから、より保存された非ドミナント（サブドミナント）エピトープへとリダイレクトさせる方法である。この方法によって作製された1種類以上のウイルスを用いた免疫化により、保存された免疫サブドミナントエピトープを標的とする抗体がより多く産生され、そのことによって今度は広域保護免疫が増大する。この方法は、免疫ドミナントエピトープに対する免疫応答を大きく減弱させ（outdilute）、その結果として保存された非ドミナントエピトープに向かう抗体のレベルをより高くする。改変されたHAを持つ1種類以上のインフルエンザウイルスを有するインフルエンザワクチンは、非ドミナントエピトープ（すなわちインフルエンザウイルス（例えばヒトインフルエンザウイルス）のヘマグルチニン（HA）ヘッ드의表面にあるドミナント抗原エピトープよりも保存されているエピトープ）に対する免疫応答を誘起するため、連続抗原変異を起こしたウイルスに対する保護を提供する可能性がある。したがってワクチン接種が必要になるのは、1～3年よりも長くなる可能性がある。ワクチンは異なる複数のHAタンパク質の混合物を含むことができ、それぞれのHAタンパク質は、免疫ドミナント抗原エピトープに対する免疫応答を減弱させるため変異した（例えば自然には生じない）免疫ドミナント

エピトープを持つことで、免疫サブドミナントエピトープに向かう抗体のレベルを上昇させる。

【0010】

本明細書に記載されているようにして、例えば任意のHA亜型に由来するHAヘッド内の非常に変化しやすい免疫ドミナント抗原エピトープの選択された位置にランダムな変異を持つインフルエンザウイルス「ライブラリ」（例えば数百万個のバリエーションの混合物）を生成させる。例えばH3 HAでは、HAの免疫ドミナント抗原エピトープ内に17個までの変異を持つインフルエンザウイルスを作製し、これらインフルエンザウイルスが生存可能であることを見いだした。このウイルスライブラリを異なる血清（例えばフェレットおよび／またはヒトの血清）とともにインキュベートし、抗原性が野生型と似ているバリエーションを除外した。改変された個々のHA配列（個別のID-EpiMut HA）をクローニングし、配列決定し、HAの免疫ドミナントエピトープまたはサブドミナントエピトープに向かうモノクローナル抗体との反応性を調べることができる。その後、保存された免疫サブドミナントエピトープに向かう抗体に対する反応性が大きいID-EpiMut HAと、免疫ドミナントエピトープに向かう抗体に対する反応性が小さいID-EpiMut HAを単離し、場合によってはワクチン製剤の中にプールする。

【0011】

一実施態様では、マウスにおける免疫化を研究するため、これらのID-EpiMut HAを、エボラウイルスVP40マトリックスタンパク質からなるウイルス様粒子（VLP）の中に組み込む。そのためインフルエンザウイルスの別のタンパク質が免疫に寄与する可能性が排除される。マウス血清で、免疫ドミナントエピトープと免疫サブドミナントエピトープに向かう抗体のレベルを調べた。フェレットにおけるワクチン接種とチャレンジの研究を、ID-EpiMut HAを有する不活化インフルエンザワクチンを用いて実施する。ナイーブな動物、またはあらかじめ曝露された動物にワクチンを接種し、免疫サブドミナントエピトープに対する抗体のレベルを評価し、動物に同種インフルエンザウイルスと異種インフルエンザウイルスでチャレンジする。ID-EpiMut HAに基づくワクチンは、野生型HAに基づくワクチンよりも大きな交差防御能を持つ可能性が大きい。

【0012】

したがって本開示により、任意の亜型のHA内の免疫サブドミナントエピトープに対する広域保護抗体を誘起する方法が提供される。インフルエンザウイルスの混合物、または他のベクターの混合物（例えば変化したHAをコードするmRNAとDNAを含む単離された核酸の混合物であり、他のベクターには、他のウイルスベクター（例えばフィロウイルス、アデノウイルスなど）またはウイルス様粒子（エボラVLPとインフルエンザVLPが含まれる）が含まれる）、または変化したインフルエンザヘマグルチニン（HA）（免疫ドミナントエピトープを形成する残基の置換および／または欠失と、保存された免疫サブドミナントエピトープの結果として、非天然の免疫ドミナント抗原ヘッドを持つように変化している）を有するポリペプチドの混合物（図2）が、ヘッド内とステム内の保存された免疫サブドミナントエピトープに対する大量のAbを誘起することのできるワクチンを提供し、その結果として現在のワクチンによって誘起される保護より保護が広域になる。1個以上の変化した残基を持つHA、または1個以上の変化した残基を持つHAをコードする単離された核酸、または1個以上の変化した残基を持つ単離されたHAを含む個別の1種類の組み換えウイルス（例えばインフルエンザウイルス、フィロウイルス、アデノウイルス）またはそのVLPを有する組成物が考えられる。

【0013】

一実施態様では、この方法によって作製される組み換えインフルエンザウイルスは、HAの1つ以上の免疫ドミナントエピトープ内に1個以上の変化した残基（エピトープ内の複数の残基が一次アミノ酸配列の中で連続していること、または互いに近傍にあることは必要とされない）を持つHAを有する結果としてエピトープが変化し、例えば上記の1つ以上の免疫ドミナントエピトープに対して特異的な抗体に、親HA内の（変化していない）免疫ドミナントエピトープほど効率的には結合しなくなる、および／または投与されると、免疫

ドミナントエピトープ内に1個以上の変化した残基を持つHAは、HAのヘッド内および／またはステム内の保存された免疫サブドミナントエピトープに対する抗体を誘起する。一実施態様では、この方法によって作製される組み換えインフルエンザウイルスは、1つ以上の免疫ドミナントエピトープの一部である20個以下の変化していない残基を持ち、例えば15個、10個、5個、4個、3個、2個、1個、0個いずれかの残基が、例えば特定の親インフルエンザウイルスの中の1つ以上の天然の免疫ドミナントエピトープの中で変化していない。一実施態様では、この方法によって作製される組み換えインフルエンザウイルスは、2つ以上の免疫ドミナントエピトープ内に1～10個、または10～20個の変化した免疫ドミナント残基を持つ。一実施態様では、この方法によって作製される組み換えインフルエンザウイルスは、1つまたは2つの免疫ドミナントエピトープ内に10個以下、例えば5個または3個の変化していない免疫ドミナント残基を持つ。例えばこの方法によって作製される組み換えインフルエンザH3ウイルスは、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、225位のいずれかの位置に5個以下の免疫ドミナント残基を持つ。例えばこの方法によって作製される組み換えインフルエンザH5ウイルスは、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、189位のいずれかの位置に5個以下の免疫ドミナント残基を持つ。

10

【0014】

一実施態様では、この方法によって作製される組み換えインフルエンザウイルスは、免疫ドミナントエピトープを認識する抗体との抗体結合を低下させることになる2個以上の残基（例えば2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、またはそれよりも多い個数の残基）を持つ。したがって免疫ドミナントエピトープ内の残基が別の残基で置き換えられ（置換され）、これら別の残基は、この免疫ドミナントエピトープを持つHAに感染したことがある動物に感染するインフルエンザウイルスのHA内に存在している場合には、置換がある結果として記憶応答（免疫学的記憶）をせず、その代わりに免疫応答をHAのヘッド内またはステム内のサブドミナントエピトープへとリダイレクトさせるため、例えば特定のHA亜型、または1つのHA亜型内の特定のクレードに対するより広域の免疫応答が可能になる。一実施態様では、この方法によって作製される組み換えインフルエンザウイルスは、免疫ドミナントエピトープ内に2～5個、5～10個、10～15個、15～20個、またはそれよりも多い数の置換された残基を持つ。一実施態様では、この方法によって作製される組み換えインフルエンザウイルスは、免疫ドミナントエピトープ内に約10～17個の置換された残基を持つ。例えばこの方法によって作製される組み換えインフルエンザH3ウイルスは、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、225位を組み合わせた位置に2～5個、または5～10個、または10～15個、または10～17個の非ドミナント残基を持つ。例えばこの方法によって作製される組み換えインフルエンザH5ウイルスは、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、189位を組み合わせた位置に2～5個、または5～10個、または10～15個、または10～17個の（非ドミナント残基に対する）置換を持つ。一実施態様では、この方法によって作製される組み換えインフルエンザウイルスは、1～2個、2～5個、または10個までの残基が欠失しており（例えばH3内の、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、225位、またはH5内の、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、189位が含まれる）、HA内に欠失があることで、免疫ドミナントエピトープを認識する抗体との抗体結合が低下する。

20

30

40

【0015】

一実施態様では、ワクチンは、免疫ドミナントエピトープの位置に置換（または欠失）

50

を持つ複数の組み換えインフルエンザウイルスを含んでいる（「非免疫ドミナント残基」への置換）。一実施態様では、ワクチンは、免疫ドミナントエピトープの位置に置換（または欠失）を持つ2～5種類、または5～10種類、または10～20種類、または20～30種類、または30～40種類、または40～50種類の異なる組み換えインフルエンザウイルスを含んでいる。一実施態様では、ワクチンは、免疫ドミナントエピトープの位置に置換を持つ2種類、または3種類、または4種類、または5種類、または6種類、または7種類、または8種類、または9種類、または10種類、または11種類、または12種類、または13種類、または14種類、または15種類、または16種類、または17種類、または18種類、または19種類、または20種類の異なる組み換えインフルエンザウイルスを含んでいる。一実施態様では、ワクチンは、免疫ドミナントエピトープの位置に置換を持つ21種類、または22種類、または23種類、または24種類、または25種類、または26種類、または27種類、または28種類、または29種類、または30種類、または31種類、または32種類、または33種類、または34種類、または35種類、または36種類、または37種類、または38種類、または39種類、または40種類の異なる組み換えインフルエンザウイルスを含んでいる。

10

【0016】

一実施態様では、表1または表6の変化したHAをコードするベクターまたはウイルスの組み合わせを、哺乳動物または鳥類に投与される組成物の中で使用する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

20

【図1】X線によるヒトH3 HAタンパク質の構造図。突然変異誘発の標的となる位置が赤色で示されている。

【図2】エボラVP40に基づくVLPであり、野生型HA（左側）を有するか、ランダム化されたアミノ酸変化を17個までのアミノ酸位置に持つHA（右側）を有する。

【図3】H3 HA（405N）の三次元構造。示されているのは、ヘッド領域（濃い灰色）とステム領域（薄い灰色）（図3A）；5つの主要エピトープA（赤色）、B（青色）、C（オレンジ色）、D（黄色）、E（緑色）（図3B）；突然変異誘発のために選択されたアミノ酸位置（白色）、C.1.2.1参照（図3C）；インフルエンザ研究データベース（<https://www.fludb.org>）からダウンロードした13,000個超の新奇なヒトH3N2 HAの配列保存（図3D）である。カラースケールは、それぞれの位置におけるアミノ酸配列の保存率が85.5%（金色）～100%（紫色）であることを示す。受容体結合ポケットの98位に位置する高度に保存されたチロシン残基が、マゼンタ色で示されている。

30

【図4】免疫サブドミナントエピトープに対する広域反応性Abの量を増加させるために本開示で提案する戦略の概略模式図。（図4A）季節性インフルエンザウイルスに関する感染またはワクチン接種の後、ステム（黒色）内とヘッド（濃い灰色）内の非常に変化しやすい免疫ドミナントエピトープ（3つの連続するクラスターで青、濃い緑、薄緑で示される）に対する大量のAbが生じるが、それに続いて免疫サブドミナントエピトープに対するより少量のAbが生じる。（図4B）新たな考え方であり、ここでは高度に変異した非天然の免疫ドミナント抗原エピトープを持つHAタンパク質（ここには変異HAが1つだけ示されている）の混合物を用いた（反復）免疫化を利用して免疫ドミナントエピトープに対する免疫応答を減弱させることにより、免疫サブドミナントエピトープに向かう抗体のレベルを上昇させる。

40

【図5】フローチャート。

【図6】H3N2ウイルスとH5N8ウイルスの代表的なHA配列（配列ID番号1と6～9）。

【図7】代表的なH5のHA配列（配列ID番号2）。

【図8】代表的なH1のHA配列（配列ID番号3）。

【図9】代表的なH2のHA配列（配列ID番号4）。

【図10】代表的なH7のHA配列（配列ID番号5）。

【図11】免疫ドミナントエピトープ残基に置換があるH3バリエーション。

【図12】クラスターと、野生型H3と、免疫ドミナントエピトープ残基に置換があるH3

50

バリエーション) に対する抗体の反応性。

【図 13】野生型 H3 と、免疫ドミナントエピトープに置換がある H3 バリエーションに対する抗体の反応性。

【図 14】野生型 H3 と、免疫ドミナントエピトープに置換がある選択された H3 バリエーションに対する抗体の反応性。

【図 15】免疫ドミナントエピトープに置換がある 10 種類の独立な (異なる) H3 バリエーションの組み合わせセット。

【図 16】免疫ドミナントエピトープに置換がある H3 バリエーションの混合物は、サブドミナントエピトープに対する抗体と反応する。

【図 17】HA 亜型のアラインメント (例えば Burke 他、PLoS One、第 9 巻: e112302 ページ、(2014 年) を参照されたい)。

【図 18】H3 HA 内の代表的な抗原部位。

【発明を実施するための形態】

【0018】

定義

【0019】

本明細書では、「単離された」という用語は、核酸分子 (例えばベクターまたはプラスミド)、ペプチドまたはポリペプチド (タンパク質)、ウイルスをインビトロで調製および／または単離することを意味しているため、これらは生体内物質とは関係がないか、インビトロの物質から実質的に精製されている。単離されたウイルス調製物は一般にインビトロでの培養と増殖によって、および／または卵の中での継代を通じて得られるため、他の感染性物質を実質的に含まない。

【0020】

本明細書では、「実質的に精製された」は、対象とする種が優勢な種であることを意味する。対象とする種は、例えばモルを基準にして、組成物内の他のあらゆる個々の種よりも豊富であり、好ましくは存在する種の少なくとも約 80%、場合によっては組成物の中に存在する種の 90% 以上、例えば 95%、98%、99%、またはそれよりも大きな割合を占める。

【0021】

本明細書では、「実質的に含まない」は、特定の感染性物質に関する標準的な検出法を利用したとき、この感染性物質に関して検出レベルよりも下であることを意味する。

【0022】

「組み換え」ウイルスは、インビトロで例えば組み換え DNA 技術を利用して操作されて、ウイルスのゲノムに変化が導入されたウイルスである。遺伝子再集合ウイルスは、組み換え技術または非組み換え技術によって作製することができる。

【0023】

本明細書では、「組み換え核酸」または「組み換え DNA 配列または組み換え DNA セグメント」という用語は、ある供給源に由来するか、ある供給源から単離されて、その後インビトロで化学的に改変されている可能性があるため、配列が天然のものではない核酸 (例えば DNA)、または配列が、天然のゲノム内で位置するはずの位置にない天然の配列に対応する核酸を意味する。ある供給源に「由来する」DNA の一例として、有用な断片であると同定された後、実質的に純粋な形態で化学的に合成される DNA 配列が考えられる。ある供給源から「単離された」このような DNA の一例として、その供給源から化学的手段 (例えば制限エンドヌクレアーゼの使用) によって切り取られるか取り出されるかした有用な DNA 配列が考えられる。この DNA 配列は、本発明で使用するため、遺伝子工学の方法によってさらに操作する (例えば増幅する) ことができる。

【0024】

本明細書では、「異種」インフルエンザウイルス遺伝子または「異種」ウイルスセグメントは、あるインフルエンザウイルス供給源に由来し、組み換え (例えば遺伝子再集合) インフルエンザウイルスの中の他の大半のインフルエンザウイルス遺伝子または他の大半

10

20

30

40

50

のウイルスセグメントと異なっている。

【0025】

「単離されたポリペプチド」、「単離されたペプチド」、「単離されたタンパク質」という用語には、cDNAまたは組み換えRNAによってコードされるポリペプチド、ペプチド、タンパク質が含まれ、その中には、合成起源のものや、その何らかの組み合わせが含まれる。

【0026】

「組み換えタンパク質」または「組み換えポリペプチド」という用語は、本明細書では、組み換えDNA分子から発現するタンパク質分子を意味する。それに対して「天然タンパク質」は、本明細書では、天然（すなわち非組み換え）の供給源から単離されたタンパク質を指すのに用いられる。分子生物学の技術を利用して天然形態と同じ特性を持つ組み換え形態のタンパク質を生成させることができる。

【0027】

比較のための配列のアラインメントの方法は本分野で周知である。したがって任意の2つの配列の間の一貫率は数学的アルゴリズムを利用して求めることができる。

【0028】

これら数学的アルゴリズムをコンピュータで実現して配列を比較し、配列の一致を判断することができる。これらのプログラムを用いたアラインメントは、デフォルトパラメータを用いて実施することができる。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、アメリカ国立バイオテクノロジー情報センター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を通じて公開されているものを入手できる。このアルゴリズムは、最初に、質問配列の中の長さWの短いワードのうちで、データベース配列の中の同じ長さのワードとアラインメントさせたときに何らかの正值閾値スコアTと一致するか、このスコアを満たすものを同定することにより、高スコアの配列ペア（HPS）を同定することを含むことができる。Tは隣接ワードスコア閾値と呼ばれる。これらの初期隣接ワードヒットは、これらワードヒットを含むより長いHPSを見いだすことを目的とした検索を開始するための種として機能する。次に、累積アラインメントスコアを大きくすることが可能になるまで、これらワードヒットを各配列に沿って両方向に延ばす。累積スコアは、ヌクレオチド配列に関してはパラメータM（一致する残基のペアに関する報酬スコア；常に0よりも大きい）とN（一致しない残基に関する罰スコア；常に0未満）を用いて計算される。アミノ酸配列に関しては、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアを計算する。それぞれの方向へのワードヒットの延長を停止するのは、負のスコアになる1つ以上の残基のアラインメントが蓄積すること、またはどちらかの配列が終わることが原因で累積アラインメントスコアが、実現した最大値から量Xだけ低下し、累積スコアが0以下になったときである。

【0029】

BLASTアルゴリズムは、配列一致率を計算することに加え、2つの配列間の類似性の統計分析も実行することができる。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの指標として、最小和確率（ $P(N)$ ）が可能である。これは、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が偶然に一致することがある確率の目安である。例えば調べる核酸配列が参照配列と類似していると見なされるのは、試験するその核酸配列を参照核酸配列と比較した最小和確率が約0.1未満のとき、より好ましくは約0.01未満のとき、最も好ましくは約0.001未満のときである。

【0030】

（ヌクレオチド配列のための）BLASTNプログラムは、デフォルトとして、ワード長（W）を11、期待値（E）を10、カットオフを100、 $M=5$ 、 $N=-4$ として用い、両方の鎖を比較することができる。アミノ酸配列に関しては、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワード長（W）を3、期待値（E）を10として用い、BLOSUM62スコアリングマトリックスを使用することができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。アラインメントは、目視による手作業で実施することもできる。

【0031】

配列を比較するには、典型的には1つの配列を参照配列として機能させ、試験配列をこの参照配列と比較する。配列比較アルゴリズムを用いるとき、試験配列と参照配列がコンピュータに入力され、必要な場合には部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。すると配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づき、参照配列と比較した試験配列の配列一致率を計算する。

【0032】

HAの免疫ドミナントエピトープと、これらエピトープを変化させる方法

【0033】

インフルエンザウイルスに関する感染とワクチン接種の両方のプロセスが、主要ウイルス抗原であるウイルスヘマグルチニン（HA）タンパク質の「ヘッド」領域内の免疫ドミナントエピトープに対する抗体を主に誘起する。免疫ドミナントエピトープに変異があると、個人の体内を循環している抗体から「逃避」できるようになる可能性があるため、以前のインフルエンザウイルスに対する免疫を獲得した人は、変異した「逃避バリエーション」ウイルスの攻撃を受けやすくなる。レシピエントの免疫応答をHA内の（頻繁に変異する）免疫ドミナントエピトープからHA内のより保存された非ドミナントエピトープへとリダイレクトさせるためのいくつかの戦略が試験されているところである。保存された非ドミナントエピトープを標的にすると、広域保護免疫が増大するはずである。

【0034】

インフルエンザウイルスに関する感染またはワクチン接種は、抗原的に密接な関係のあるウイルスの感染から保護する中和抗体を誘起する。大半の中和抗体は、HAのヘッド内の非常に変化しやすい免疫ドミナント抗原エピトープに向かう。H3N2ウイルスに関しては、マウスモノクローナル抗体に対する抗原逃避変異体を用いた初期の研究により、HAのヘッド内に5つの免疫ドミナント抗原エピトープ（A～E）が同定された（Wiley他、1981年と1987年）（図1）。インフルエンザウイルスの大きな変異率と、以前に感染した人および／またはワクチンを接種された人における免疫圧力の結果として、これら免疫ドミナント抗原エピトープに変異が蓄積し、個人の体内を循環する抗体はウイルスをもはや中和しなくなる。このいわゆる「抗原ドリフト」が、なぜヒトが季節性インフルエンザウイルスに再感染するかの理由である。現在の季節性インフルエンザワクチン株は、HAヘッド内の非常に変化しやすい免疫ドミナント抗原エピトープの抗原特性に基づいて選択される。したがってワクチン株は、抗原ドリフトバリエーションの新たなクラスターまたはクレード（系統群）ごとに置き換えられねばならない。さらに、抗原ドリフトは、ワクチンを選択する時点（北半球では2月）とインフルエンザの季節が始まる時点の間に起こる可能性があるため、ワクチンの効果が大きく失われる（「ワクチンのミスマッチ」）。

【0035】

インフルエンザウイルス感染またはワクチン接種で誘起される大半の抗体（Ab）は、HAのヘッド上の非常に変化しやすい免疫ドミナント抗原エピトープに向かうため、密接な関係のあるウイルスとだけ反応する。1993年、Okunoらは、異なる2つの亜型のインフルエンザウイルスを中和するモノクローナルAb（mAb）を報告した。この知見はその当時は十分に評価されず、同じ亜型の多くのHAと反応するmAb、または同じグループからの別の亜型のHAと反応するmAb、またはグループ1とグループ2両方からのHAと反応するmAb、またはA型インフルエンザとB型インフルエンザ両方のHAと反応するmAbが多くの研究によって報告されるまでにさらに10年を要した。これら広域反応性mAbの大半は、HAのステムと結合する（このステムがHAを膜の中に係留し、後期エンドソームにおいてpHによって誘導されてウイルスゲノムを細胞質ゾルに放出する膜融合イベントを媒介する）

（図1）。しかしいくつかの広域反応性mAbは、HAのヘッド内の保存された領域と反応する。これらmAbは少なくとも2つの主要なカテゴリーに分類される。すなわち、（大半のHA亜型で保存されている）受容体結合部位の中央部の中にある保存された免疫サブドミナントエピトープと反応する広域反応性mAbと、受容体結合ポケットの外側にあるHAのヘッド上の保存された免疫サブドミナントエピトープ（これらエピトープは、すべての亜型で保存されているわけではない可能性がある）と反応する広域反応性mAbである。保存さ

れた免疫サブドミナントエピトープは、免疫ドミナントエピトープと比べてはるかにゆっくりと進化するため、保存されたエピトープに結合する抗体がなぜ（免疫ドミナントエピトープと反応する抗体と比べて）より多様な株と反応するかが説明される。したがって保存された免疫サブドミナントエピトープに向かう抗体は、同じ亜型内の異なる抗原クラスターのウイルス、または亜型が異なるウイルスに対する保護を提供する。

【0036】

HA内の保存された領域に対する広域反応性Abは、広域保護ワクチン開発への道を開く可能性がある。しかし保存されたエピトープは免疫サブドミナントエピトープであり、これらエピトープに対するAbの検出レベルは、HAのヘッド内の非常に変化しやすい主要抗原エピトープである免疫ドミナントエピトープを標的とするAbよりもはるかに低い。そこで研究者たちは、免疫応答の焦点を、HA内の非常に変化しやすい主要抗原エピトープである免疫ドミナントエピトープから、HAの保存された免疫サブドミナントエピトープへと変更することを試みた。

【0037】

1980年代のある研究において、ヘッド領域が欠落したHA（「ヘッドなしHA」）を用いたワクチン接種がステム反応性Abを誘起し、これらAbが異なる亜型のHAタンパク質と反応することが実証された（Graves他、1983年）。HAのヘッド除去というのは保存されたステムに対するAbを誘起するための魅力的な戦略に見えたため、ヘッドなしHAのさまざまな膜係留バージョン、または分泌バージョンが試験された。これらの研究のうちのいくつかは、ワクチン接種による広域保護抗体の生成につながったが、ヘッドなしHAは安定性が低いため、正しく折り畳まれない可能性がある。さらに、ヘッドなしHAは、HAのヘッド内の保存された免疫サブドミナントエピトープが欠落している。

【0038】

2011年、Wilsonとその共同研究者は、パンデミック2009 H1N1ウイルス（2009年以前はヒトの間で流行していなかった抗原的に新しいインフルエンザウイルス）が、季節性インフルエンザウイルスに関する感染またはワクチン接種の後に典型的に検出されるよりも交差反応性が広い抗体を、HAのステム内の保存された免疫サブドミナントエピトープに対して誘起することを報告した（Wrammert他、2011年）。別の研究者たちも同様の結果を報告した。さらに、H5ウイルスに対する実験的ワクチンの接種（Ellebedy他、2014年；Nachbagauer他、2014年）またはH7ウイルスに対する実験的ワクチンの接種（Henry他、2016年と2015年；Liu他、2017年；Krammer他、2014年；Halliley他、2015年）が、季節性インフルエンザウイルスに関する感染またはワクチン接種の後に典型的に検出されるよりも多い量の広域反応性抗体を、HAのステム内の保存された免疫サブドミナントエピトープに対して誘起した（どちらのウイルスもヒトの間では流行していない）。この効果は、新たな（以前に遭遇していない）HAに最初に遭遇したときに最強であった。例えばパンデミック2009 H1N1ワクチンの最初の接種によってHAのステム内の免疫サブドミナントエピトープに対する広域反応性Abが高レベルに誘起された（Andrews他、2015年）。しかしこのパンデミック2009 H1N1ウイルスに2回目に曝露した後は、大半のAbはHAのヘッド内の免疫ドミナントエピトープに向かい、ステムの免疫サブドミナントエピトープに向かうAbのレベルは、最初の曝露後に測定されたレベルと比べて大きく低下していた（Andrews他、2015年）。合わせて考えると、これらの知見は、新奇なHAとの初回の遭遇が、保存された免疫サブドミナントエピトープに対する広域反応性Abをかなりの量誘起することを示している。それに対して（1つの主要抗原エピトープ内のほんの1個または2個のアミノ酸しか変わらず、他の主要エピトープは共有している）季節性インフルエンザウイルスに関する反復した感染またはワクチン接種は、免疫ドミナント抗原エピトープに対するAbを主に刺激する（思い出させる）。

【0039】

代表的な方法

【0040】

本開示は、非ドミナントエピトープに対する抗原反応を改善するための異なる「大減弱

10

20

30

40

50

(outdilution)」アプローチに基づくインフルエンザワクチンに関する。HAの「ヘッド」領域内に戦略的に抗原性が異なる免疫ドミナントエピトープ（免疫ドミナントエピトープ内の残基が、この免疫ドミナントエピトープを認識する抗体と反応しない残基に変えられている）を持つカスタム化されたインフルエンザウイルスをプールする。そのため身体の反応は、これらの抗原性が異なるさまざまな免疫ドミナントエピトープ（非免疫ドミナントエピトープ残基とも呼ばれる）に少量の抗体を向かわせる一方で、プール全体で共有されている大量の保存された非ドミナントエピトープは、これら非ドミナントエピトープに対する応答を強化することにより、流行中の一群の天然ウイルスに対する保護が証明される可能性がより大きい免疫応答を生じさせる。それは、これらウイルスがこれらの保存された非ドミナントエピトープを共有していることから予想できる。

【0041】

一実施態様では、1つのエピトープに関係することが知られているか、1つのエピトープに関係することが疑われるHA内の複数の位置（例えばH3内の17個までの位置）をランダムに変異させる。H3に関しては、60種類の生きているウイルスを回収した。モノクローナル抗体を用いて回収したウイルスの抗原性を評価する。ウイルスの多くは、調べたmAbのうちの限られた数のmAbに結合し、それは明らかに非ドミナントエピトープに対応している。同じアプローチを、ワクチンカクテルを構成する一群の亜型または1つだけの亜型（例えばH3N2、H5N1など）で利用することができる。ヒトの季節性H3N2ウイルスに関しては、この方法により、「大きく」変異した免疫ドミナント抗原エピトープを持つウイルスになった。このウイルスは、生存可能であり、機能し、抗原性が親ウイルスと異なっていた。

【0042】

一実施態様では、季節性ヒトH3N2ウイルスの多数の抗原クラスターに対する保護を与える改変されたHAを含むウイルスから汎H3ワクチンを調製する。ヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープの混合物はこれまで自然界で検出されたことがないため、免疫応答の焦点は、保存された免疫サブドミナントエピトープに向けられる。この方法により、免疫ドミナントエピトープに多数の非天然の変異を持つ数百万通りのHAバリエーションを生成させることができるため、抗原特性を変化させる多数のアミノ酸変化を免疫ドミナントエピトープ内に持つ生存可能なウイルスを取得することができる。他のアプローチとは異なり、ワクチン候補として、(i) 非天然のヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープを持ち、(ii) HAのステム内とHAのヘッド内に保存された免疫サブドミナントエピトープを保持していて、(iii) HAの構造的・機能的完全性を維持しているものを調製する。その結果、われわれのワクチン候補は、野生型ウイルスに基づくワクチンと比べて交差防御がより大きくなるはずである。

【0043】

インフルエンザワクチン

【0044】

本発明のワクチンは、望む特性（例えば非天然のヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープおよび／またはHAのステム内とHAのヘッド内の保存された免疫サブドミナントエピトープの1つ以上）を持つほか、HAの構造的・機能的完全性を維持している単離された組み換えインフルエンザウイルスの少なくとも1種類を含むとともに、場合によっては、1種類以上の単離された他のウイルス（望む特性を持つ単離された他のウイルスが含まれる）と、1種類以上の単離されたインフルエンザウイルスまたは1種類以上の他の病原体の1つ以上の免疫原性タンパク質または糖タンパク質（例えば1種類以上の細菌、非インフルエンザウイルス、酵母、真菌のいずれかに由来する免疫原性タンパク質）と、1種類以上のウイルスタンパク質（本発明の単離されたインフルエンザウイルスの1種類以上の免疫原性タンパク質が含まれる）をコードする単離された核酸（例えばDNAワクチン）のいずれかを含んでいる。一実施態様では、本発明のインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスまたは他の病原体のためのワクチンベクターになることができる。

【0045】

全ビリオンワクチンは、限外濾過によって濃縮した後、ゾーン遠心分離またはクロマトグラフィーによって精製することができる。本発明のウイルス以外のウイルス（多価ワクチンに含まれるウイルスなど）は、精製の前または後に例えばホルマリンまたはβ-プロピオラクトンを用いて不活化することができる。

【0046】

サブユニットワクチンは、精製された糖タンパク質を含んでいる。このようなワクチンは、以下のようにして調製することができる。すなわち、洗浄剤を用いた処理によって断片化されたウイルスの懸濁液を使用し、表面抗原を例えば超遠心分離によって精製する。したがってサブユニットワクチンは、主にHAタンパク質を含有するとともに、NAも含有している。用いる洗浄剤として、例えばカチオン性洗浄剤（臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（Bachmeyer、1975年）など）、アニオン性洗浄剤（デオキシコール酸アンモニウム（LaverとWebster、1976年）など）、非イオン性洗浄剤（TRITON（登録商標）X100の商品名で市販されているものなど）が可能である。ヘマグルチニンは、ビリオンの処理後にプロテアーゼ（ブロメリンなど）を用いて単離した後、精製することもできる。サブユニットワクチンは、多価ワクチンの中で本発明の弱毒化ウイルスと組み合わせることができる。

【0047】

スプリットワクチンは、脂質を溶解させる薬剤で処理したビリオンを含んでいる。スプリットワクチンは、以下のようにして調製することができる。すなわち、上記のようにして得られた精製されたウイルスの水性懸濁液を、攪拌下で、脂質溶媒（エチルエーテル、クロロホルムなど）を洗浄剤と組み合わせることによって処理する。ウイルスエンベロープの脂質が溶解するとウイルス粒子が断片化する。元の脂質環境が除去されたヘマグルチニンとノイラミニダーゼと、コアまたはその分解産物を主体とするスプリットワクチンを含有する水相を回収する。その後、残っている感染性粒子がまだ不活化されていない場合には不活化する。このスプリットワクチンは、多価ワクチンの中で本発明の弱毒化ウイルスと組み合わせることができる。

【0048】

不活化ワクチン。不活化インフルエンザウイルスワクチンは、複製されたウイルスを既知の方法（その非限定的な例は、ホルマリン処理、β-プロピオラクトン処理など）を利用して不活化することによって得られる。本発明で利用できるタイプの不活化ワクチンに含めることができるのは、全ウイルス（WV）ワクチンまたはサブビリオン（SV）（スプリット）ワクチンである。WVワクチンは、完全な不活化ウイルスを含有しているのに対し、SVワクチンは、脂質含有ウイルスエンベロープを可溶化する洗浄剤で破壊した後、残ったウイルスを化学的に不活化して精製したウイルスを含有している。

【0049】

それに加え、使用可能なワクチンに含まれるのは、単離された表面タンパク質HAとNAを含有するものであり、これらは表面抗原ワクチンまたはサブユニットワクチンと呼ばれる。

【0050】

弱毒生ウイルスワクチン。弱毒生インフルエンザウイルスワクチン（本発明の組み換えウイルスを含むワクチンなど）を用いてインフルエンザウイルス感染を防止または治療することができる。弱毒化は、単一の工程において、弱毒化されたドナーウイルスからの弱毒化された遺伝子を、複製された単離体または遺伝子再集合ウイルスに、既知の方法に従って移すことによって実現できる。A型インフルエンザウイルスに対する耐性は、糖タンパク質HAおよび／またはNAに対する免疫応答の発達によって主に媒介されるため、これら表面抗原をコードしている遺伝子は、遺伝子再集合ウイルス、または臨床での単離体由来する。弱毒化された遺伝子は、弱毒化された親に由来する。このアプローチでは、弱毒化をもたらす遺伝子は一般に糖タンパク質HAとNAをコードしていない。

【0051】

インフルエンザウイルスを再現性よく弱毒化することのできるウイルス（ドナーインフ

10

20

30

40

50

ルエンザウイルス）を利用することができる。例えば寒さに適応した（ca）ドナーウイルスを弱毒化ワクチンの製造で用いることができる。弱毒化生遺伝子再集合ウイルスワクチンは、caドナーウイルスを複製された毒性ウイルスと組み合わせることによって生成させることができる。次に、遺伝子再集合ウイルスの子孫を、弱毒化caドナーウイルスの表面抗原を有するウイルスの複製を抑制する適切な抗血清の存在下にて、（毒性ウイルスの複製を制限する）25℃で選択する。有用な遺伝子再集合ウイルスは、（a）感染性であり、（b）血清陰性である非成体哺乳動物と、初回免疫刺激を与えられた成体哺乳動物に対して弱毒化されていて、（c）免疫原性であり、（d）遺伝的に安定である。ca遺伝子再集合体の免疫原性は、その複製レベルと並行している。したがって新たな野生型ウイルスがcaドナーウイルスの6つの移転可能な遺伝子を獲得すると、これらウイルスが再現性よく弱毒化され、感受性のある成体と非成体両方の哺乳動物のワクチン接種に使用することができた。

【0052】

他の弱毒化変異を部位指定突然変異誘発によってインフルエンザウイルスの遺伝子に導入し、これら変異遺伝子を有する感染性ウイルスを救うことができる。弱毒化変異はゲノムの非コード領域とコード領域に導入することができる。このような弱毒化変異は、HAまたはNA以外の遺伝子（例えばPB2ポリメラーゼ遺伝子）に導入することもできる。したがって新たなドナーウイルスとして、部位指定突然変異誘発によって導入された弱毒化変異を有するものを生成させることもでき、このような新たなドナーウイルスを用いて、caドナーウイルスに関して上に説明したのと同様のやり方で弱毒生ワクチン候補を作製することができる。同様に、インフルエンザウイルスを用いて他の適切な既知の弱毒化ドナー株を遺伝子再集合させ、哺乳動物のワクチン接種で用いるのに適した弱毒ワクチンを得ることができる。

【0053】

一実施態様では、このような弱毒化ウイルスは、元の臨床単離体の抗原決定基と実質的に同様の抗原決定基をコードするウイルス由来遺伝子を維持している。その理由は、弱毒ワクチンの目的が、ウイルスの元の臨床単離体と実質的に同じ抗原性を提供すると同時に、ワクチンが、このワクチンを接種された哺乳動物で深刻な疾患状態を誘導する機会をできるだけ少なくなる程度に病原性が欠けているようにすることだからである。

【0054】

したがって多価ワクチンの中のウイルスは、既知の方法に従って弱毒化または不活化して製剤化した後、動物（例えば哺乳動物）で免疫応答を誘導するワクチンとして投与することができる。このような弱毒ワクチンまたは不活化ワクチンが、臨床単離体、または臨床単離体由来する高増殖株と同様の抗原性を維持しているかどうかを調べる方法は、本分野で周知である。このような既知の方法に含まれるのは、ドナーウイルスの抗原決定基を発現するウイルスを排除するための抗血清または抗体の使用；化学的選択（例えばアマンタジンまたはリマンチジン）；HAとNAの活性と抑制；抗原決定基をコードするドナー遺伝子（例えばHA遺伝子またはNA遺伝子）が弱毒化ウイルスの中に存在していないことを確認するための核酸スクリーニング（プローブハイブリダイゼーションまたはPCRなど）である。

【0055】

医薬組成物

【0056】

接種（例えば鼻腔投与、非経口投与、経口投与）に適した医薬組成物は、1種類以上のインフルエンザウイルス単離体（例えば1種類以上の弱毒化または不活化されたインフルエンザウイルス、および／またはそのサブユニット、および／またはその単離されたタンパク質、および／またはその1種類以上のタンパク質をコードする単離された核酸）を含み、場合によってはさらに、滅菌された水性溶液または非水性溶液、懸濁液、乳液を含んでいる。組成物はさらに、本分野で知られている助剤または賦形剤を含むことができる。本発明の組成物は一般に、個別の用量（単位用量）の形態で提供される。

【0057】

従来のワクチンは一般に、組成物の中に入る株のそれぞれからの約0.1～200 μg（例えば30～100 μg）のHAを含有している。本発明のワクチン組成物のワクチン形成主要成分は、単一のインフルエンザウイルス、または複数のインフルエンザウイルスの組み合わせ（例えば少なくとも2種類または3種類のインフルエンザウイルス（その中に1種類以上の遺伝子再集合ウイルスが含まれる））を含むことができる。

【0058】

非経口投与のための調製物は、滅菌された水性溶液または非水性溶液、および／または懸濁液、および／または乳液を含んでおり、本分野で知られている助剤または賦形剤が含まれていてもよい。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（オリーブ油など）、注射可能な有機エステル（オレイン酸エチルなど）である。キャリアまたは密封包帯を利用して皮膚透過性を増大させ、抗原の吸収を増強することができる。経口投与のための液体剤形は一般に、この液体剤形を含有するリポソーム溶液を含むことができる。懸濁リポソームの適切な形態に含まれるのは、本分野で一般に用いられている不活性な希釈剤（精製水）を含有する乳液、懸濁液、溶液、シロップ、エリキシルである。このような組成物は、不活性な希釈剤以外に、アジュバント、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤も含むこと、または甘味剤、香味剤、芳香剤のいずれかも含むことができる。

【0059】

本発明の組成物は、個体への投与に用いるとき、塩、バッファ、アジュバントや、この組成物の効果を改善する上で望ましい他の物質をさらに含むことができる。ワクチンに関しては、アジュバント、すなわち特定の免疫応答を増大させることのできる物質を用いることができる。通常は、アジュバントと組成物を混合した後に免疫系に提示するか、アジュバントと組成物を別々に提示するが、免疫化する生物の同じ部位に入れる。

【0060】

ワクチン内の不均一性は、少なくとも2種類のインフルエンザウイルス株（例えば2～20種類の株、またはこの中の任意の範囲または値）について複製されたインフルエンザウイルスを混合することによって生じる可能性がある。ワクチンは、本分野で知られている技術を利用して1種類のインフルエンザウイルスの単一の株の中にバリエーションがあるようにしたものを提供することができる。

【0061】

本発明の医薬組成物はさらに、すなわち追加して、少なくとも1つの化学療法化合物を含むことができ、その例は、遺伝子療法用には、免疫抑制剤、抗炎症剤、免疫増大剤のいずれか、ワクチン用には化学療法剤であり、化学療法剤の非限定的な例に含まれるのは、γ-グロブリン、アマンタジン、グアニジン、ヒドロキシベンズイミダゾール、インターフェロン-α、インターフェロン-β、インターフェロン-γ、腫瘍壊死因子-α、チオセミカルバゾン、メチサゾン、リファンピン、リバビリン、ピリミジン類似体、プリン類似体、ホスカルネット、ホスホノ酢酸、アシクロビル、ジデオキシヌクレオシド、プロテアーゼ阻害剤、ガンシクロビルである。

【0062】

組成物は、変動するが少量の内毒素非含有ホルムアルデヒドと、保存剤（安全で、この組成物を投与される生物において望ましくない効果に寄与しないことがわかっているもの）も含有することができる。

【0063】

医薬組成物の目的

【0064】

組成物（またはこの組成物が誘起する抗血清）の投与は、「予防」または「治療」を目的とすることができる。ワクチンである本発明の組成物は、予防的に投与される場合には、病原体感染の何らかの症状または臨床的徴候が現われる前に提供される。この組成物の予防的投与は、その後のあらゆる感染を防止または軽減するのに役立つ。本発明の遺伝子療法組成物は、予防的に投与される場合には、病原体感染の何らかの症状または臨床的徴

10

20

30

40

50

候が現われる前に提供される。この組成物の予防的投与は、その疾患に関係する1つ以上の症状または臨床的徴候を防止または軽減するのに役立つ。

【0065】

ウイルスワクチンは、治療で与えられる場合には、実際の感染の症状または臨床的徴候が検出されたときに与えられる。組成物の治療的投与は、実際のあらゆる感染を軽減するのに役立つ。遺伝子療法組成物は、治療で与えられる場合には、疾患の症状または臨床的徴候が検出されたときに与えられる。化合物の治療的投与は、その疾患の症状または臨床的徴候を軽減するのに役立つ。

【0066】

したがって本発明のワクチン組成物は、（予想される感染を防止または軽減するため）感染前に、または実際の感染が始まった後に与えることができる。同様に、遺伝子療法に関しては、組成物は、障害または疾患の何らかの症状または臨床的徴候の前、または1つ以上の症状が検出された後に与えることができる。

【0067】

組成物は、その投与をレシピエントである哺乳動物が忍容できる場合に、「医薬として許容可能」とあると言われる。このような薬剤は、投与された量が生理学的に有意である場合に、「治療に有効な量」とあると言われる。本発明の組成物は、その存在によってレシピエントである患者の生理学的状態に検出可能な変化が起こる（例えば感染性インフルエンザウイルスの少なくとも1種類の株に対する少なくとも1つの一次または二次の液性免疫応答または細胞免疫応答を増強する）場合に、生理学的に有意である。

【0068】

提供される「保護」は、絶対的である必要はない。すなわち対照集団または一群の哺乳動物と比較して統計的に有意な改善があればよく、インフルエンザ感染が完全に予防または根絶される必要はない。保護は、インフルエンザウイルス感染の症状または臨床的徴候の重症度、または発症の早さを緩和することに限定される可能性がある。

【0069】

医薬組成物の投与

【0070】

望む特性を有する1種類以上のインフルエンザウイルスを含む組成物は、受動的免疫化または能動的免疫化によって1種類以上の病原体（例えば1種類以上のインフルエンザウイルス株）に対する抵抗性を与えることができる。能動的免疫化では、弱毒生ワクチン組成物が予防的に宿主（例えば哺乳動物）に投与され、投与に対する宿主の免疫応答によって感染および／または疾患から保護される。受動的免疫化については、誘起された抗血清を回収し、少なくとも1種類のインフルエンザウイルス株によって起こる感染症に罹患していることが疑われるレシピエントに投与する。本発明の遺伝子療法組成物は、能動的免疫化によって望む遺伝子産物を予防的レベルまたは治療的レベルにすることができる。

【0071】

一実施態様では、ワクチンは、（妊娠または分娩のとき、またはその前に）哺乳動物の雌に、この雌と胎児または新生児の両方を保護するのに役立つ免疫応答を生じさせるのに十分な時間と量という条件下で（胎盤を通じて、または母乳の中に抗体を受動的に組み込むことを通じて）提供される。

【0072】

したがって本発明は、障害または疾患（例えば病原体の少なくとも1種類の株による感染）を予防する方法また軽減する方法を含んでいる。本明細書では、ワクチンは、投与した結果として疾患の臨床徴候または状態が全面的または部分的に軽減される（すなわち抑制される）場合に、または疾患に対する個体の全面的または部分的免疫が生じる場合に、その疾患を予防するか軽減すると言われる。本明細書では、遺伝子療法組成物は、投与した結果として疾患の臨床徴候または状態が全面的または部分的に軽減される（すなわち抑制される）場合に、または疾患に対する個体の全面的または部分的免疫が生じる場合に、その疾患を予防するか軽減すると言われる。

【0073】

少なくとも1種類のインフルエンザウイルスを有する本発明の組成物（その中には、弱毒化されたインフルエンザウイルスと単離された1種類以上の他のウイルス、またはその単離された1種類以上の他のウイルスタンパク質、またはその1種類以上のウイルスタンパク質をコードする単離された1個以上の核酸分子、またはこれらの組み合わせが含まれる）は、意図する目的を達成する任意の手段によって投与することができる。

【0074】

例えばこのような組成物の投与は、さまざまな非経口経路（皮下経路、静脈内経路、皮内経路、筋肉内経路、腹腔内経路、鼻腔内経路、経口経路、経皮経路など）によって投与することができる。非経口投与は、ボーラス注射によって、または時間をかけた段階的灌流によって実現することができる。

10

【0075】

インフルエンザウイルスに関係する病状を予防、または抑制、または治療するための典型的な計画は、本明細書に記載されているワクチン組成物の有効な量を、単一回の治療として投与すること、または漸増投与またはブースター投与として1週間～24ヶ月まで、またはその中の任意の範囲または値までの期間にわたって繰り返して投与することを含んでいる。

【0076】

本発明によれば、組成物の「有効な量」は、望む効果を達成するのに十分な量である。有効な投与は、レシピエントの種、年齢、性別、健康、体重；現在の治療の種類（実施中である場合）；治療の頻度；望む効果の種類に依存する可能性があることがわかる。下記の有効な量の範囲は本発明を制限することを意図しておらず、用量の範囲を表わしている。

20

【0077】

動物（哺乳動物の成体など）にとっての生ウイルスクチン、弱毒ウイルスクチン、死滅ウイルスクチンの用量として、約 $10^2 \sim 10^{20}$ プラーク形成単位（pfu）/kg、例えば $10^3 \sim 10^{12}$ pfu/kg、または $10^2 \sim 10^{10}$ pfu/kg、または $10^5 \sim 10^{11}$ pfu/kg、または $10^6 \sim 10^{15}$ pfu/kg、または $10^2 \sim 10^{10}$ pfu/kg、または $10^{15} \sim 10^{20}$ pfu/kg、またはこれらの中の任意の範囲または値が可能である。例えば不活化ワクチンの中の1つのウイルス単離ワクチンの用量は、HAタンパク質を約 $0.1 \sim 1000 \mu\text{g}$ 、例えば $0.1 \sim 10 \mu\text{g}$ 、または $1 \sim 20 \mu\text{g}$ 、または $30 \sim 100 \mu\text{g}$ 、または $10 \sim 50 \mu\text{g}$ 、または $50 \sim 200 \mu\text{g}$ 、または $150 \sim 300 \mu\text{g}$ の範囲が可能である。しかし用量は、既存のワクチンを出発点として用いて従来法によって決定するとき、安全かつ有効な量でなければならない。

30

【0078】

複製ウイルスクチンの各服用量の中の免疫活性なHAの用量は、適切な量（例えば $30 \sim 100 \mu\text{g}$ 、またはその中の任意の範囲または値）、または政府機関または認可された専門的組織が推奨する量を含有するように標準化することができる。NAの量も標準化できるが、この糖タンパク質は精製中と保管中に不安定になる可能性がある

【0079】

複製ウイルスクチンの各服用量の中の免疫活性なHAの用量は、適切な量（例えば $1 \sim 50 \mu\text{g}$ 、またはその中の任意の範囲または値）、またはアメリカ合衆国公衆衛生局（PHS）が推奨する量を含有するように標準化することができる。PHSが推奨する量は、通常は、年齢が3歳超の子どもには成分ごとに $15 \mu\text{g}$ 、年齢が3歳未満の子どもには成分ごとに $7.5 \mu\text{g}$ である。NAの量も標準化できるが、この糖タンパク質はプロセッサによる精製中と保管中に不安定になる可能性がある（Kendal他、1980年；Kerr他、1975年）。ワクチンの用量 0.5 ml ごとに約1億～5億個のウイルス粒子、または5億～20億個のウイルス粒子、または10億～500億個のウイルス粒子、または10億～100億個のウイルス粒子、または200億～400億個のウイルス粒子、または10億～50億個のウイルス粒子、または400億～800億個のウイルス粒子を含有することができる。

40

【0080】

代表的な実施態様

50

【0081】

一実施態様では、免疫ドミナントエピトープの数が減少したヘマグルチニン（HA）をコードする複数のインフルエンザウイルス核酸分子を作製する方法が提供される。この方法は、免疫ドミナントエピトープを持つヘマグルチニンをコードする単離された親インフルエンザウイルス核酸分子内の複数のコドンにランダムな変異（ただし変異は、親ヘマグルチニン内の免疫ドミナントエピトープ内の残基をコードするコドンにある）を導入することにより、変異ヘマグルチニンをコードするインフルエンザウイルス核酸分子のライブラリを提供し；このライブラリを細胞の中に導入して、変異ヘマグルチニンを発現する細胞のライブラリを提供し；このライブラリを細胞に導入して、変異ヘマグルチニンを発現する細胞のライブラリを提供し；免疫ドミナントエピトープを形成する残基の位置に置換および／または欠失がある結果として免疫ドミナントエピトープの数が減少した変異ヘマグルチニンをコードする核酸分子を同定することを含んでいる。一実施態様では、細胞は哺乳動物の細胞である。一実施態様では、ヘマグルチニン（HA）は、H1、H2、H3、H5、H6、H7、H9のいずれかである。一実施態様では、変異HAは、H3内の、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、225位のうちの2つ以上の位置に非免疫ドミナント残基を持つ。一実施態様では、H3内の、121位の残基が、Q、R、I、L、V、T、S、F、Y、Aのいずれかであるか、131位の残基が、R、A、M、K、V、S、Q、C、V、Y、D、E、Lのいずれかであるか、135位の残基が、Y、G、R、M、K、N、V、W、S、V、Pのいずれかであるか、138位の残基が、S、W、K、I、R、Lのいずれかであるか、140位の残基が、L、M、T、S、R、K、M、Pのいずれかであるか、142位の残基が、N、D、G、Y、Q、E、H、N、L、Pのいずれかであるか、144位の残基が、T、K、V、G、D、H、L、Qのいずれかであるか、145位の残基が、P、R、W、Kのいずれかであるか、155位の残基が、C、F、H、I、R、A、V、S、Nのいずれかであるか、156位の残基が、P、G、S、M、R、T、A、Cのいずれかであるか、157位の残基が、D、P、S、G、I、R、Tのいずれかであるか、158位の残基が、R、V、S、A、K、C、Qのいずれかであるか、171位の残基が、T、F、L、E、H、C、Rのいずれかであるか、189位の残基が、A、P、T、L、A、S、Y、Rのいずれかであるか、193位の残基が、Q、R、N、T、E、V、Pのいずれかであるか、212位の残基が、V、R、G、S、M、D、Eのいずれかであるか、225位の残基が、L、P、C、S、Q、G、Y、Fのいずれかである。一実施態様では、H3内の、121位の残基がNではないか、131位の残基がTではないか、135位の残基がTではないか、138位の残基がAではないか、140位の残基がIではないか、142位の残基がRではないか、144位の残基がSではないか、145位の残基がSではないか、155位の残基がTではないか、156位の残基がHではないか、157位の残基がLではないか、158位の残基がNではないか、171位の残基がNではないか、189位の残基がKではないか、193位の残基がFではないか、212位の残基がAではないか、225位の残基がDではない。一実施態様では、H3内の、121位の残基がNであるか、131位の残基がTであるか、135位の残基がTであるか、138位の残基がAであるか、140位の残基がIであるか、142位の残基がRであるか、144位の残基がSであるか、145位の残基がSであるか、155位の残基がTであるか、156位の残基がHであるか、157位の残基がLであるか、158位の残基がNであるか、171位の残基がNであるか、189位の残基がKであるか、193位の残基がFであるか、212位の残基がAであるか、225位の残基がDである。一実施態様では、変異HAは、H5内の、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、189位のうちの2つ以上の位置に非免疫ドミナント残基を持つ。一実施態様では、H5内の、119位の残基がRではないか、123位の残基がPではないか、125位の残基がHではないか、126位の残基がEではないか、127位の残基がTではないか、129位の残基がLではないか、138位の残基がQではないか、140位の残基がAではないか、141位の残基がSではないか、151位の残基がIではないか、152位の残基がKではないか、153位の残基がKではないか、154位の残基がNではないか、155位の残基がDではないか、156位の残基がAではないか、185位の残基がAではないか、189位の残基がNではない

10

20

30

40

50

。一実施態様では、H5内の、119位の残基がRであるか、123位の残基がPであるか、125位の残基がHであるか、126位の残基がEであるか、127位の残基がTであるか、129位の残基がLであるか、138位の残基がQであるか、140位の残基がAであるか、141位の残基がSであるか、151位の残基がIであるか、152位の残基がKであるか、153位の残基がKであるか、154位の残基がNであるか、155位の残基がDであるか、156位の残基がAであるか、185位の残基がAであるか、189位の残基がNである。一実施態様では、H5内の、119位の残基が、L、K、R、S、G、T、E、A、V、F、Nのいずれかであるか；123位の残基が、L、Y、I、M、N、S、V、K、G、T、Rのいずれかであるか；125位の残基が、L、D、N、G、W、M、I、R、K、F、A、Sのいずれかであるか；126位の残基が、S、R、I、G、N、Q、A、N、Rのいずれかであるか；127位の残基が、V、A、S、M、L、K、F、Yのいずれかであるか；129位の残基が、D、S、G、K、W、R、E、V、Q、A、I、Fのいずれかであるか；138位の残基が、G、D、E、L、A、M、V、F、R、Sのいずれかであるか；140位の残基が、T、G、S、R、D、K、Q、E、C、Vのいずれかであるか；141位の残基が、R、P、W、K、E、A、M、D、L、Qのいずれかであるか；151位の残基が、T、S、L、Y、K、N、Qのいずれかであるか；152位の残基が、A、P、T、Y、H、E、S、I、F、Dのいずれかであるか；153位の残基が、R、Q、T、N、S、F、P、V、Kのいずれかであるか；154位の残基が、L、T、D、R、P、S、Hのいずれかであるか；155位の残基が、N、G、K、H、T、L、S、I、P、Qのいずれかであるか；156位の残基が、T、F、R、S、D、P、H、G、A、Nのいずれかであるか；185位の残基が、L、D、N、G、E、F、S、L、Q、P、V、M、R、A、Sのいずれかであるか；189位の残基が、Y、S、L、R、K、G、E、F、D、V、E、I、Hのいずれかである。一実施態様では、免疫ドミナントエピトープを形成する残基をコードするコドンのうちの2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または11個、または12個、または13個、または14個、または15個、または16個、または17個、または18個、または19個、または20個が変異している。一実施態様では、変異HAは、2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または11個、または12個、または13個、または14個、または15個、または16個、または17個、または18個、または19個、または20個の非免疫ドミナントエピトープ残基を有する。一実施態様では、変異HAは、10個、または11個、または12個、または13個、または14個、または15個、または16個、または17個の非免疫ドミナントエピトープ残基を有する。一実施態様では、変異HAは、親の免疫ドミナントエピトープ残基を1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個有する。一実施態様では、変異HAは、親の免疫ドミナントエピトープ残基を1個、または2個、または3個、または4個、または5個有する。一実施態様では、核酸分子は、保存されたサブドミナントエピトープを認識する1つ以上の抗体を用いて同定される。一実施態様では、核酸分子をコードする細胞は、免疫ドミナントエピトープを認識する1つ以上の抗体に結合しない細胞として同定される。一実施態様では、変異ヘマグルチニンをコードする核酸分子を配列決定する。

【0082】

一実施態様では、親インフルエンザウイルスと比べて1つ以上の免疫ドミナントエピトープに1個以上の変化した残基を有する変異ヘマグルチニンをコードするインフルエンザウイルスを作製する方法が提供される。この方法は、親インフルエンザウイルスのHAの免疫ドミナントドメインを形成する残基の位置に複数の変異を導入し、変異したHAを持つ1種類以上のインフルエンザウイルスを単離または作製することを含んでいる。一実施態様では、複数の変異がHA内の抗原部位Aおよび／またはBに導入され、そのことによって変異HAを持つインフルエンザウイルスのライブラリが形成される。ライブラリの中であって抗原部位Aおよび／またはBに異なる変異を持つウイルス（例えば血清との反応性がより低くて親HA内の免疫ドミナントエピトープに結合するウイルス）をプールして「汎」HA亜型特異的ワクチンを形成することができる。一実施態様では、親ウイルス内の免疫ドミナントエピトープの一部である残基ではない残基をコードするため、変異を、H3 HAをコー

10

20

30

40

50

ドする核酸分子において、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、225位の残基の2つ以上に導入し、変異したH3 HAを持つ1種類以上のインフルエンザウイルスを作製する。一実施態様では、親ウイルスの免疫ドミナントエピトープを形成する残基ではない残基をコードするため、免疫ドミナントエピトープではない残基をコードする変異を、H5 HAをコードする核酸分子において、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、189位の残基の2つ以上に導入し、変異したH5 HAを持つ1種類以上のインフルエンザウイルスを作製する。一実施態様では、変異したH3 HAにおいて、121位の残基が、Q、R、I、L、V、T、S、F、Y、Aのいずれかであるか、131位の残基が、R、A、M、K、V、S、Q、C、V、Y、D、E、Lのいずれかであるか、135位の残基が、Y、G、R、M、K、N、V、W、S、V、Pのいずれかであるか、138位の残基が、S、W、K、I、R、Lのいずれかであるか、140位の残基が、L、M、T、S、R、K、M、Pのいずれかであるか、142位の残基が、N、D、G、Y、Q、E、H、N、L、Pのいずれかであるか、144位の残基が、T、K、V、G、D、H、L、Qのいずれかであるか、145位の残基が、P、R、W、Kのいずれかであるか、155位の残基が、C、F、H、I、R、A、V、S、Nのいずれかであるか、156位の残基が、P、G、S、M、R、T、A、Cのいずれかであるか、157位の残基が、D、P、S、G、I、R、Tのいずれかであるか、158位の残基が、R、V、S、A、K、C、Qのいずれかであるか、171位の残基が、T、F、L、E、H、C、Rのいずれかであるか、189位の残基が、A、P、T、L、A、S、Y、Rのいずれかであるか、193位の残基が、Q、R、N、T、E、V、Pのいずれかであるか、212位の残基が、V、R、G、S、M、D、Eのいずれかであるか、225位の残基が、L、P、C、S、Q、G、Y、Fのいずれかである。一実施態様では、H3内の、121位の残基がNではないか、131位の残基がTではないか、135位の残基がTではないか、138位の残基がAではないか、140位の残基がIではないか、142位の残基がRではないか、144位の残基がSではないか、145位の残基がSではないか、155位の残基がTではないか、156位の残基がHではないか、157位の残基がLではないか、158位の残基がNではないか、171位の残基がNではないか、189位の残基がKではないか、193位の残基がFではないか、212位の残基がAではないか、225位の残基がDではない。一実施態様では、H3内の、121位の残基がNであるか、131位の残基がTであるか、135位の残基がTであるか、138位の残基がAであるか、140位の残基がIであるか、142位の残基がRであるか、144位の残基がSであるか、145位の残基がSであるか、155位の残基がTであるか、156位の残基がHであるか、157位の残基がLであるか、158位の残基がNであるか、171位の残基がNであるか、189位の残基がKであるか、193位の残基がFであるか、212位の残基がAであるか、225位の残基がDである。一実施態様では、119位の残基がRではないか、123位の残基がPではないか、125位の残基がHではないか、126位の残基がEではないか、127位の残基がTではないか、129位の残基がLではないか、138位の残基がQではないか、140位の残基がAではないか、141位の残基がSではないか、151位の残基がIではないか、152位の残基がKではないか、153位の残基がKではないか、154位の残基がNではないか、155位の残基がDではないか、156位の残基がAではないか、185位の残基がAではないか、189位の残基がNではない。一実施態様では、119位の残基が、L、K、R、S、G、T、E、A、V、F、Nのいずれかであるか；123位の残基が、L、Y、I、M、N、S、V、K、G、T、Rのいずれかであるか；125位の残基が、L、D、N、G、W、M、I、R、K、F、A、Sのいずれかであるか；126位の残基が、S、R、I、G、N、Q、A、N、Rのいずれかであるか；127位の残基が、V、A、S、M、L、K、F、Yのいずれかであるか；129位の残基が、D、S、G、K、W、R、E、V、Q、A、I、Fのいずれかであるか；138位の残基が、G、D、E、L、A、M、V、F、R、Sのいずれかであるか；140位の残基が、T、G、S、R、D、K、Q、E、C、Vのいずれかであるか；141位の残基が、R、P、W、K、E、A、M、D、L、Qのいずれかであるか；151位の残基が、T、S、L、Y、K、N、Qのいずれかであるか；152位の残基が、A、P、T、Y、H、E、S、I、F、Dのいずれかであるか；153位の残基が、R、Q、T、N、S、F、P、V、Kのいずれかであるか；154位の残基が、L

10

20

30

40

50

、T、D、R、P、S、Hのいずれかであるか；155位の残基が、N、G、K、H、T、L、S、I、P、Qのいずれかであるか；156位の残基が、T、F、R、S、D、P、H、G、A、Nのいずれかであるか；185位の残基が、L、D、N、G、E、F、S、L、Q、P、V、M、R、A、Sのいずれかであるか；189位の残基が、Y、S、L、R、K、G、E、F、D、V、E、I、Hのいずれかである。一実施態様では、変異HAは、親の免疫ドミナントエпитープの位置に2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または11個、または12個、または13個、または14個、または15個、または16個、または17個の異なる残基（非免疫ドミナントエпитープ残基）を持つ。

【0083】

一実施態様では、それぞれの組み換えインフルエンザウイルスが、免疫ドミナントエピ
トープ残基部位（例えば抗原部位Aおよび／またはB）に非免疫ドミナントエピトープ残基
を含むヘマグルチニンをコードしている複数の異なる組み換えインフルエンザウイルスを
含む組成物が提供される。したがってこれらの異なる組み換えインフルエンザウイルスは
、抗原部位Aおよび／またはBに異なる変異を持つ。例えば血清との反応性がより低くて親
HA内の免疫ドミナントエピトープに結合する組み換えインフルエンザウイルスをプールし
、「汎」HA亜型特異的ワクチンを形成することができる。別の一実施態様では、組成物は
、それぞれの組み換えインフルエンザウイルスが、免疫ドミナントエピトープ残基部位（
例えば抗原部位Aおよび／またはB）に非免疫ドミナントエピトープ残基を含むヘマグルチ
ニンをコードする複数の異なる組み換えインフルエンザウイルスを有しており、これら複
数のインフルエンザウイルスのうちの少なくとも2つはヘマグルチニンの異なる亜型をコ
ードしている。一実施態様では、複数のインフルエンザウイルスのうちの1つは、H3内の
、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位
、157位、158位、171位、189位、193位、212位、225位のうちの2つ以上の位置に
非免疫ドミナントエピトープを含んでいる。一実施態様では、複数のインフルエンザウイ
ルスの中の1つは、H5内の、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138
位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、189
位のうちの2つ以上の位置に非免疫ドミナントエピトープ残基を含んでいる。一実施態様
では、組成物は、少なくとも2種類、または3種類、または4種類、または5種類、または6
種類、または7種類、または8種類、または9種類、または10種類、またはそれよりも多
い種類の異なる組み換えインフルエンザウイルスを有する。

【0084】

動物を免疫化する方法として、記載されている複数のウイルスを含む組成物の有効な量
を動物（例えばヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、トリ）に投与する
ことを含む方法がさらに提供される。

【0085】

本発明を以下の非限定的な実施例によって説明する。

【実施例】

【0086】

実施例1

VLPは、インフルエンザHAを単一のウイルスマトリックスタンパク質とともに発現させ
ることによって生成させることができる。したがってインフルエンザウイルスの他のタン
パク質（M1、NAなど）に対する免疫応答が結果の解釈に影響することはなかろう。エボ
ラウイルスVP40マトリックスタンパク質に基づくVLPを使用する。なぜならヒトはVP40
に対する抗体を持たないため、エボラVP40に基づいてHAを発現するVLPが効率的に
形成されるからである。

【0087】

ヒトH3 HAタンパク質の中にあって抗原性に影響を与えることが知られているか、影響
を与えると予想される17個のアミノ酸位置を同定し（例えば121位、131位、135位、1
38位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、1
89位、193位、212位、225位；図1参照）、A/Tokyo/UT-IMS2-1/2014（クレード3

c.2aのウイルス)の遺伝的背景においてこれら17個の位置のそれぞれに20種類のアミノ酸すべてをコードする遺伝子「ライブラリ」を調製した(その結果として理論的に可能な 20^{17} 通りのバリエーションが得られる)。「17個までのアミノ酸変化がある変異HA」タンパク質を有するウイルスのライブラリを生成させ、ヒト血清を用いてスクリーニングして抗原逃避変異体を同定した。抗原エпитープ内に17個までのアミノ酸変化があるHAタンパク質は機能し、親ウイルスとは抗原的に異なることが見いだされた。

【0088】

「17個までのアミノ酸変化がある変異HA」タンパク質は、広域保護免疫応答を誘起することができる。HAのヘッ드의免疫ドミナント性に責任がある位置に17個までのアミノ酸変化があるHAの混合物を用いた免疫化は、HA免疫ドミナントエпитープに対する抗体を誘導する可能性が大きい。それどころかより強い反応が非ドミナントエпитープに対して誘起され、その結果として交差防御免疫が現在のワクチンと比べて増加する可能性がある。このようなワクチンを用いると、免疫刷り込み(遭遇した最初のインフルエンザウイルスに対する偏った免疫応答)を克服できる可能性がある。

【0089】

具体的には、ヒトH3ウイルスの「California/2004」抗原クラスターの代表的な一例であるA/California/7/2004 (Cal/04)ウイルスのHAタンパク質の17個のアミノ酸位置にランダム化された配列を持つVLPライブラリを調製する。対照として、野生型HAタンパク質を含有するVLPも生成させる。すべてのVLPをシアリダーゼで処理して自己凝集を防止する。野生型タンパク質または「17個までのアミノ酸変化がある変異HA」タンパク質を含有するVLPで、HAのヘッドとストークに対するモノクローナル抗体(例えばCal/04ウイルスのヘッドまたはストークと反応するそれぞれ20種類超と10種類超のモノクローナル抗体)の反応性を調べる。「17個までのアミノ酸変化がある変異HA」タンパク質を含有するVLPは、野生型HAを含有するVLPと比較すると、HAのヘッドと相互作用する抗体への結合が減少する可能性が大きいのにに対し、HAのストークと相互作用する抗体への結合レベルは、これら2種類のVLPの間で同様であることが予想される。

【0090】

抗原性がさまざまなヒトH3ウイルスに対するH3 HA-VLPの免疫原性と保護効果を調べるため、Cal/04 H3 HA-VLPを用いてフェレットを2回免疫化した。2回目の免疫化の4週間後、野生型HAタンパク質または「17個までのアミノ酸変化がある変異HA」タンパク質を含有するVLPに対する抗体価を調べる。フェレットに、同種Cal/04ウイルス、またはより最近の抗原クラスターに属する異なる3種類のヒトH3インフルエンザウイルス(例えば「パース/2009年」と、「ヴィクトリア/2012年」と、現在の3c.2a1クレード)でチャレンジする。ブランクアッセイを利用して鼻スワブに含まれるウイルスの力価を調べる。その代わりに、またはそれに加えて、「武漢/1995年」クラスターと、「シドニー/1997年」クラスターと、「福建/2002年」クラスターのHAタンパク質を含有するVLPを用いてフェレットを「あらかじめ免疫化」する(これらVLPを順番に用いてフェレットを免疫化する;免疫化の間隔は2週間にする)。逐次的に3回「あらかじめ免疫化」した後、フェレットに、野生型Cal/04 HAタンパク質、または「17個までのアミノ酸変化がある変異Cal/04 HA」タンパク質を含有するVLPを用いたワクチンを接種し、上記のようにしてチャレンジし、非ドミナントエпитープに対して抗体を誘起するワクチンが免疫原性刷り込みを克服できるかどうかを明確にする。

【0091】

野生型ウイルスを用いた免疫化によってフェレットは同種ウイルスの感染から保護されるが、異なる抗原クレードに属する抗原ドリフトバリエーションの感染からは保護されない。

「17個までのアミノ酸変化がある変異体」H3 HA-VLPで免疫化されたフェレットは、抗原ドリフトしたヒトH3N2インフルエンザウイルスから、野生型ウイルスで免疫化されたフェレットよりもよく保護される。このことから、「17個までのアミノ酸変化がある変異HA」タンパク質を用いた免疫化が広域保護抗体を誘起することが確立される。それはおそらく、免疫応答が、ヒトH3ウイルスの間で主要免疫ドミナントエпитープよりも保存され

10

20

30

40

50

ている免疫サブドミナントエピトープに向けて「方向転換される」からである。

【0092】

ランダム化されたアミノ酸位置の数がより少ない個々の変異体および／またはライブラリにより、非ドミナントエピトープに対して交差防御免疫応答を誘起する具体的な変異HAタンパク質を同定することができる。

【0093】

実施例2

免疫ドミナントエピトープに多数の変異を有するHA (ID-EpiMut HA) の生成とインビトロでの特徴づけ

【0094】

以前に遭遇したことのないHAに初めて曝露されると、保存された免疫サブドミナントエピトープに対する高レベルのAbが誘起されることを考慮し、非天然のヘッド内免疫ドミナントエピトープ（すなわち免疫ドミナントエピトープが変異したHA）をコードするウイルスの混合物を調製する。これらバリエーションのそれぞれは免疫系にとって新奇なHAであるため、HA内の保存された免疫サブドミナントエピトープ領域に対する交差防御抗体のレベルを上昇させる。実験的アプローチ。数百万種類の変異インフルエンザウイルスを生成させ（「ウイルスライブラリ」）、望む特性を持つバリエーション（非天然のヘッド内免疫ドミナントエピトープなど）を選択する。

【0095】

ウイルスライブラリの生成とスクリーニング。インフルエンザウイルス「ライブラリ」のほか、他のウイルスライブラリ（エボラVLPライブラリが含まれる）を生成させる方法、すなわちインフルエンザウイルスタンパク質の任意のアミノ酸位置またはあらかじめ決められたアミノ酸位置にランダムな変異を持つウイルスの混合物を生成させる方法を利用することができる（Li他、2016年；Ping他、2015年と2016年；Taft他、2015年）。簡単に述べると、インフルエンザウイルスcDNAのあらかじめ決められた位置への変異の導入を、標的とするコドンに「NNN」をコードする縮重オリゴヌクレオチドを用い、PCRによって、または商用の遺伝子合成法によって実現する。得られたPCR混合物または遺伝子混合物を、インフルエンザウイルスRNAを転写するためのRNAポリメラーゼIベクターに入れてクローニングすると、いわゆる「プラスミドライブラリ」が得られる。逆遺伝学の確立されたプロトコルに従い、プラスミドライブラリと、残っている7つのウイルスRNAセグメント（A型インフルエンザウイルスのゲノムは一本鎖RNAのセグメントを8つ含んでいる）を転写するための7つのRNAポリメラーゼIプラスミドと、ウイルスポリメラーゼタンパク質（PB2、PB1、PA）および核タンパク質（NP）（これらはすべて、ウイルスの複製と転写を開始させるのに不可欠である）を合成する4つのタンパク質発現プラスミドを真核細胞（例えば293Tヒト胚性線維芽細胞）にトランスフェクトする。このアプローチの結果として、数百万種類の変異体からなるウイルスライブラリが生成する。

【0096】

古典的な実験的アプローチでは一度に1つの変異を調べるが、本アプローチでは、数百万種類の変異を同時に調べることが可能になる。従ってこのアプローチは、(i) 実験設定において進化の多数の工程を再現している；(ii)（自然界で単離されていない変異体を含む）大きな「配列空間」をカバーしている；(iii)（ウイルスの進化において極めて重要な側面である）変異体同士の競合を可能にする；(iv) ウイルスライブラリ生成の段階で生存できない変異体を排除する。次に、さまざまな生物学的特徴（抗原性、受容体結合特性、ポリメラーゼ活性、ウイルス力価が含まれる）に関してウイルスライブラリをスクリーニングする。このアプローチの威力と汎用性が、季節性のヒトH1N1インフルエンザウイルスとヒトH3N2インフルエンザウイルスの抗原進化をモデル化することによって（Li他、2016年）、哺乳動物の細胞においてトリインフルエンザウイルスに効率的な複製能力を与えるポリメラーゼ変異体を単離することによって（Taft他、2016年）、A型とB型のインフルエンザワクチンウイルスの力価を上昇させる変異を選択する（Ping他、2015年と2016年）ことによって示されている。

10

20

30

40

50

【0097】

H5 HAウイルスライブラリの生成とスクリーニング。パンデミックH5N1インフルエンザウイルス相互間の抗原性の違いをよりよく理解するため、これらウイルスの抗原特性に影響を与えることが知られているか、影響を与えることが疑われる17個のアミノ酸位置にランダムな変異を導入した（例えばアミノ酸位置119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、189位；数字は、シグナルペプチドが除去された後の成熟H5タンパク質のアミノ酸位置を示す）。これらの位置は、H5N1ウイルスの非常に変化しやすいヘッド内免疫ドミナント主要抗原エピートープの中でクラスターになっている。選択された17個の位置のそれぞれに理論上の20種類のアミノ酸すべてをコードする遺伝子ライブラリを化学合成によって取得した。これら遺伝子ライブラリをPCRによって増幅し、PCR産物をRNAポリメラーゼIベクターに入れてクローニングし、H5N1ウイルスライブラリを生成させた。一般に、ウイルスライブラリのサイズは、トランスフェクトされた細胞に由来する上清1 ml当たり約 $10^4 \sim 10^7$ プラーク形成単位（pfu）の範囲である。したがってウイルスライブラリは、選択された17個の位置にアミノ酸の可能なあらゆる組み合わせ（すなわち 20^{17} 通りの異なるアミノ酸の組み合わせ）を含有している。

【0098】

HA内の17個のアミノ酸位置にランダムな変異を有するH5ウイルスライブラリを生成させた後、これらライブラリを、異なるH5ウイルスに対して生じたフェレット血清とともにインキュベートした。この選択工程の間に、最近流行しているH5ウイルスと同様の抗原特性を持つ変異体が中和されることになる。得られた抗原逃避バリエーションをMadin-Darbyイヌ腎臓（MDCK）細胞（インフルエンザウイルスの増殖に一般に用いられている細胞系）の中でプラーク精製し、個々のウイルスを増幅し、配列決定して、抗原逃避を生じさせるアミノ酸変化を同定した。抗原選択の後、親ウイルスとは13～17個のアミノ酸が異なる50種類超のH5変異体を単離した（選択された配列の例に関しては表1を参照されたい）。これは、非常に変化しやすいヘッド内免疫ドミナント主要抗原エピートープの配列の可塑性を証明している。重要なことだが、ヘマグルチニン抑制アッセイによって実証されるように、これら変異体の大半は親ウイルスと抗原性が異なっている。同様に、季節性ヒトH3N2ウイルス（実施例1と表1B～表1Cを参照されたい）を用いた研究において、非常に変化しやすいヘッド内免疫ドミナント抗原エピートープに多数のアミノ酸変化を持っていて親ウイルスとは抗原性が異なる変異体が生じた。合わせると、これらの研究から、免疫ドミナント抗原エピートープに17個までのアミノ酸変異を持つ季節性H3N2ウイルスとパンデミックH5ウイルスは生存可能であり、効率的に複製され、親ウイルスとは抗原的に異なっていることが明確になる。

【0099】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1：示されている位置にランダム化されたアミノ酸を持つH5 HAタンパク質の配列

HA 内のアミノ酸位置 (H5 での番号付け)																	
	119	123	125	126	127	129	138	140	141	151	152	153	154	155	156	185	189
野生型	R	P	H	E	T	L	Q	A	S	I	K	K	N	D	A	A	N
1	R	L	L	S	V	D	G	T	S	T	A	R	L	N	T	L	Y
2	L	Y	L	S	V	L	G	G	R	T	P	Q	T	D	F	D	S
3	L	I	D	R	V	S	D	S	P	S	A	Q	N	G	R	D	L
4	K	M	N	S	V	Q	E	R	P	T	T	T	N	K	A	N	L
5	R	N	D	S	A	K	L	R	P	T	Y	T	N	H	S	G	R
6	S	M	G	I	S	K	A	R	S	L	T	N	T	T	D	N	L
7	R	L	G	S	M	W	M	D	W	Y	H	T	T	L	P	E	R
8	S	L	L	S	V	R	L	K	K	K	E	S	D	N	H	F	L
9	G	S	W	G	L	E	L	R	R	N	S	F	N	S	P	S	Y
10	G	V	W	N	L	V	L	Q	S	T	S	T	L	I	P	L	K
11	T	Y	M	S	L	R	V	Q	E	I	P	S	R	D	R	Q	E
12	E	Y	I	S	L	L	D	R	A	T	A	P	R	P	T	L	G
13	S	K	R	S	V	L	M	R	E	T	A	V	P	T	G	P	S
14	A	G	K	Q	L	Q	F	R	A	Q	S	K	R	P	A	S	F
15	L	G	F	A	M	A	L	R	M	K	P	K	T	P	N	V	D
16	V	G	G	S	K	R	R	E	M	T	S	T	S	D	R	L	G
17	F	S	A	N	A	I	S	E	E	I	F	K	N	Q	T	M	V
18	R	T	F	G	A	F	A	C	D	T	I	T	H	P	T	R	E
19	N	R	D	R	F	L	A	V	L	L	P	K	S	D	T	A	I
20	T	R	S	G	Y	F	M	G	Q	Q	D	Q	S	Q	H	S	H

【 0 1 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表1B：TK/2 17アミノ酸（H3）変異体の配列

略号	位置（H3での番号付け）																	注	FFU/ 50 μ l
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2		
	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	7	8	9	1	2		
TK2	1	1	5	8	0	2	4	5	5	6	7	8	1	9	3	2	5		
TK2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D		
TK2-17AA -mut-1	Y	V	V	K	W	S	G	P	V	G	V	R	D	N	A	Q	K		8.05E +04
TK2-17AA -mut-2	M	V	G	D	F	T	D	R	C	A	N	G	R	E	G	N	K		1.08E +05
TK2-17AA -mut-4	K	R	G	.	P	D	A	G	M	T	S	P	K	D	G	L	E		7.91E +04
TK2-17AA -mut-5	Q	R	Y	K	L	N	T	P	C	P	D	R	T	A	Q	V	L		2.92E +06
TK2-17AA -mut-6	V	R	R	F	M	N	T	W	V	A	.	H	T	I	S	R	P		4.46E +04
TK2-17AA -mut-7	F	G	V	.	K	A	M	L	I	L	S	G	.	-	-	S	.	+追加アミノ 酸の欠失	1.85E +05
TK2-17AA -mut-9	V	K	V	T	H	E	R	R	A	S	P	V	R	R	T	I	S		1.12E +05
TK2-17AA -mut-10	R	V	K	W	M	G	V	P	I	G	P	V	F	T	R	R	P		6.16E +05
TK2-17AA -mut-11	T	G	L	R	C	S	G	R	Y	P	.	Q	T	F	A	R	T		4.37E +04
TK2-17AA -mut-12	I	.	N	K	T	Y	D	.	R	S	S	S	F	A	Q	G	C		2.37E +05
TK2-17AA -mut-14	V	M	L	K	T	G	A	W	Q	S	R	L	Q	L	R	R	E		3.03E +04
TK2-17AA -mut-15	A	K	S	R	N	D	G	V	R	S	R	F	T	E	A	Y	G		1.17E +05
TK2-17AA -mut-16	V	C	N	I	K	.	P	D	A	A	G	A	L	A	P	S	S		2.34E +05
TK2-17AA -mut-17	V	C	L	L	R	F	K	T	I	P	S	P	Q	N	S	T	S		1.91E +04
TK2-17AA -mut-21	V	R	V	V	V	D	P	R	G	S	C	I	I	-	-	-	-	+追加アミノ 酸の欠失	5.51E +04
TK2-17AA -mut-22	S	S	.	K	S	Q	G	.	R	P	I	K	E	P	N	V	Q		3.59E +05
TK2-17AA -mut-23	V	Q	V	R	R	E	H	.	V	T	.	R	H	L	T	M	G		1.16E +06
TK2-17AA -mut-24	L	R	N	T	K	T	N	.	Q	K	R	F	S	.	T	V	S		1.65E +05
TK2-17AA -mut-25	R	R	I	V	N	G	T	R	W	P	S	P	R	S	S	V	R		1.11E +05

10

20

30

40

【表 2 - 2】

略号	位置 (H3 での番号付け)																		注	FFU/ 50 μ l
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2				
	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	7	8	9	1	2			
	1	1	5	8	0	2	4	5	5	6	7	8	1	9	3	2	5			
TK2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D			
TK2-17AA -mut-26	V	R	Y	K	T	A	E	Q	.	L	W	G	R	Y	Q	M	N		1. 13E +05	
TK2-17AA -mut-28	F	D	S	K	G	N	V	K	P	T	R	R	L	S	-	P	S		3. 79E +04	
TK2-17AA -mut-29	S	R	K	T	N	.	A	P	Q	.	M	K	F	T	N	F	C		8. 16E +04	
TK2-17AA -mut-30	F	V	W	S	M	H	Q	P	Q	G	R	C	T	S	E	.	Y		3. 35E +05	
TK2-17AA -mut-31	R	V	V	.	T	A	E	G	S	I	P	M	C	S	G	L	C		1. 02E +05	
TK2-17AA -mut-32	F	D	G	F	.	N	.	W	R	A	S	Q	V	Y	R	V	L		6. 94E +05	
TK2-17AA -mut-34	I	Y	S	R	Y	.	L	.	S	C	S	.	L	R	V	S	S		3. 13E +05	
TK2-17AA -mut-35	I	M	Q	W	A	V	E	K	E	C	G	Q	G	T	S	P	S		1. 29E +05	
TK2-17AA -mut-36	H	G	S	R	K	M	G	E	K	R	K	Q	K	A	K	C	S		5. 46E +03	
TK2-17AA -mut-37	R	A	V	R	N	N	K	Q	V	R	I	S	S	G	S	T	A		4. 05E +04	
TK2-17AA -mut-38	I	E	R	G	D	P	P	N	V	G	E	H	R	R	.	S	C		1. 01E +05	
TK2-17AA -mut-39	V	E	A	E	L	A	I	N	S	E	E	C	L	N	S	C	H		1. 47E +05	
TK2-17AA -mut-40	T	I	A	R	C	S	K	P	R	N	R	T	R	V	K	T	V		5. 09E +04	
TK2-17AA -mut-41	V	D	C	S	L	G	Q	F	P	L	R	R	L	N	S	W	C		4. 81E +04	
TK2-17AA -mut-43	V	K	A	Q	M	.	.	K	S	S	A	I	R	A	M	S	.		1. 57E +05	
TK2-17AA -mut-44	I	G	G	R	.	D	.	P	I	P	P	G	L	E	V	L	.		8. 63E +04	
TK2-17AA -mut-45	M	N	S	T	R	H	K	.	C	D	T	Q	V	S	P	I	P		2. 33E +05	
TK2-17AA -mut-46	Y	L	Q	T	F	.	G	A	A	C	A	H	T	N	L	F	C		4. 31E +04	
TK2-17AA -mut-47	V	N	L	L	A	T	T	.	K	R	A	R	R	V	P	P	P		1. 03E +05	
TK2-17AA -mut-48	F	R	S	V	V	Q	R	P	D	G	N	T	M	T	G	R	M		2. 04E +05	
TK2-17AA -mut-50	V	C	P	L	W	H	Q	P	G	S	T	H	T	R	K	R	C		3. 43E +04	

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

略号	位置 (H3 での番号付け)																		注	FFU/ 50 μ l
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2				
	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	7	8	9	1	2			
1	1	5	8	0	2	4	5	5	6	7	8	1	9	3	2	5				
TK2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D			
TK2-17AA -mut-51	M	K	Y	Q	Y	I	N	H	S	P	F	R	F	I	D	F	C	1.05E +05		
TK2-17AA -mut-53	T	N	C	R	W	N	K	C	I	.	P	L	K	H	N	V	Q	1.45E +05		
TK2-17AA -mut-54	V	R	N	C	F	N	T	P	L	I	P	K	R	H	A	R	L	4.86E +04		
TK2-17AA -mut-55	Y	R	P	.	N	K	T	R	N	.	P	A	T	H	N	E	L	C139 Δ 1.98E +05		
TK2-17AA -mut-56	R	.	Q	S	C	Q	T	T	A	P	.	S	R	G	N	V	S	4.18E +04		
TK2-17AA -mut-57	T	S	D	.	G	N	Y	A	P	F	S	G	L	I	D	V	C	3.35E +04		
TK2-17AA -mut-58	F	H	M	R	L	N	N	T	R	R	C	G	H	T	K	G	A	2.87E +04		
TK2-17AA -mut-59	H	R	R	R	M	G	N	D	Y	S	R	P	I	L	T	V	A	6.80E +04		
TK2-17AA -mut-60	T	Q	S	Q	E	Q	I	R	.	S	K	G	I	T	R	L	W	7.46E +04		
TK2-17AA -mut-61	V	S	K	D	H	K	A	G	R	D	R	K	T	V	K	W	S	G209D 6.47E +04		
TK2-17AA -mut-64	L	G	A	Q	R	Q	E	A	S	D	R	R	E	R	G	V	M	2.31E +05		
TK2-17AA -mut-65	F	R	V	.	Q	.	E	P	M	T	T	H	T	Q	T	R	F	1.95E +05		
TK2-17AA -mut-66	Y	E	P	L	L	Q	.	N	.	S	T	G	R	S	P	D	P	3.34E +05		
TK2-17AA -mut-67	L	E	S	V	R	Y	N	D	R	G	P	P	T	A	R	E	I	1.33E +05		
TK2-17AA -mut-68	I	S	G	L	R	P	G	V	S	W	D	P	.	N	R	E	T	2.79E +05		
TK2-17AA -mut-70	W	E	S	W	K	H	R	P	L	T	T	K	V	I	R	L	P	6.00E +04		
TK2-17AA -mut-71	E	Q	E	L	Q	D	M	A	V	P	Q	G	F	P	M	.	E	3.88E +05		
TK2-17AA -mut-72	T	R	M	R	Q	N	Y	P	W	I	S	K	W	E	R	S	P	1.25E +04		
TK2-17AA -mut-73	S	L	S	R	L	E	W	P	G	Q	R	T	L	T	S	R	A	2.10E +05		
TK2-17AA -mut-75	F	R	N	E	R	N	P	T	I	P	V	S	L	S	A	S	C	2.02E +05		
TK2-17AA -mut-76	E	R	K	L	L	N	N	G	.	Q	.	S	A	S	D	.	A	9.73E +04		

10

20

30

40

50

【表 2－4】

略号	位置（H3 での番号付け）																		注	FFU/ 50 μ l
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2			
	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	7	8	9	1	2			
	1	1	5	8	0	2	4	5	5	6	7	8	1	9	3	2	5			
TK2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D			
TK2-17AA -mut-77	A	L	V	I	P	.	K	.	S	T	Q	Q	L	R	P	E	F	6. 92E +05		
TK2-17AA -mut-79	L	G	L	D	D	A	.	P	D	K	P	C	R	S	N	R	A	1. 52E +05		

「.」 野生型と同じアミノ酸；「-」 欠失

【0 1 0 1】

10

20

30

40

50

【表 3】

[illegible]

「・」野生型と同じアミノ酸；「-」欠失。

【 0 1 0 2 】

突然変異誘発のためのHA内の位置の選択。非天然のヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープを持つH3N2 HAバリエントを生成させることにより、これらウイルスの混合物を用いたワクチン接種で免疫ドミナントエピトープに対する抗体反応を減弱させるとともに、免疫応答がHAのヘッド領域内とステム領域内の保存された免疫サブドミナントエピトープにより多く向かうようにする。

【 0 1 0 3 】

15個のアミノ酸位置におけるランダムな変異。公開データと未公開データに基づき、H3 HAの抗原性に影響を与えることがわかっているか、与えることが疑われるHAの以下の15

個のアミノ酸位置にランダムな変異を導入する（アミノ酸位置を表わすあらゆる数字は、シグナルペプチドを除去した後の「成熟」H3 NAに関する）：121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、158位、159位、189位、193位、212位（図3）。これらの部位は、非常に変化しやすいヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープA（131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位）、B（155位、156位、158位、159位、189位、193位）、C（121位、193位）に主として位置しており、大半の季節性H3N2クラスター変化が起こった7個のアミノ酸位置（例えば145位、155位、156位、158位、159位、189位、193位（84位））を含んでいる。選択されたこれらの位置におけるランダムな変異を、ヒトH3N2ウイルスのカリフォルニア2004（CA04）抗原クラスターのプロトタイプであるA/California/7/2004（CA04）ウイルスのHAタンパク質に導入する。より古いこの株を選択したのは、ID-EpiMut CA04に基づくワクチンが最近のヒトH3N2インフルエンザウイルスに対して持つ保護効果を調べられるようにするためであった。

【0104】

簡単に述べると、CA04 HAの選択された位置にランダムな変異を有するcDNAライブラリを化学合成し、このcDNAライブラリをPCRで増幅し、RNAポリメラーゼIベクターに入れてクローニングすると、プラスミドライブラリが得られる。

【0105】

ウイルスライブラリの生成。変異HAがあるこのプラスミドライブラリを用い、培養細胞の中で大きなウイルス力価を与える高収率A/Puerto Rico/8/34（PR8）ウイルス（Ping 他、2015年）の遺伝的バックグラウンドでウイルスライブラリを生成させる。具体的には、（6ウエルのプレートの中の） 10^6 個の293T細胞に、 $1\mu\text{g}$ の変異HAプラスミドライブラリと、残っているウイルスRNA（すべてが高収率PR8ウイルスに由来する）を転写するための $0.1\mu\text{g}$ の各RNAポリメラーゼIプラスミドと、ポリメラーゼとNPタンパク質のための $0.1\mu\text{g}$ の各ポリメラーゼタンパク質発現プラスミドをトランスフェクトする。48時間後、トランスフェクトされた細胞から上清のアリコート回収し、プラークアッセイをMDCK細胞の中で実施してウイルスライブラリの力価を評価する。上述のように、典型的には細胞培養物の上清1 ml当たり約 $10^4\sim 10^7$ pfuの変異ウイルスが得られる。ライブラリをAX-4細胞（細胞の表面で $\alpha 2,6$ 結合シアル酸を過剰発現するMDCK細胞；ヒトインフルエンザウイルスはこの表面に効率的に結合する）の中で増幅する。

【0106】

抗原的に（大半の）インフルエンザウイルスのヘッド内免疫ドミナントエピトープとは異なる免疫ドミナントエピトープを有するID-EpiMut HAバリエーションの選択

【0107】

HAのステム内とヘッド内の免疫サブドミナントエピトープに対する抗体反応のレベルを上昇させるため、非天然のヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープを持つHAバリエーションを生成させる。このような変異体を選択するため、ウイルスライブラリを、抗原クレードが異なるウイルスに対して生じたフェレット血清の混合物と、生きている間にさまざまなウイルスとワクチンに曝露されたさまざまな年齢群のドナーからのヒト血清の混合物とともにインキュベートする。

【0108】

具体的には、ウイルスライブラリをさまざまな濃度の血清混合物とともにインキュベートした後、AX-4細胞の中でプラークアッセイを実施する。ウイルスのプラークを、プラークが検出される最大濃度の血清から採取する。個々のウイルスをAX-4細胞の中で増幅し、そのHA遺伝子を配列決定する。100個超の個別のHA遺伝子をそれぞれのタイプの血清（ヒトまたはフェレット）と血清濃度について配列決定する。

【0109】

それぞれのアミノ酸位置に一般には見られないアミノ酸（例えばインフルエンザ検索データベースの中で配列の1%未満）を持つウイルスが特に興味深い。最高優先度は、任意の亜型の各位置で頻繁に検出されたことのないアミノ酸（例えばインフルエンザ検索デー

10

20

30

40

50

タベースの中で配列の1%未満)を持つHAに与えられる。すべての変異体について、HA遺伝子全体を配列決定し、HAに対する安定化効果などの補償機能を有する可能性がある追加の変異が(標的とするアミノ酸位置の外に)出現したかどうかを明らかにする。標的とする位置で既知のインフルエンザウイルスとの配列相同性が最も小さい100種類の ID-EpiMut HAバリエーションを選択してさらに分析する(図5)。

【0110】

H3 HA特異的mAbとステム特異的mAbに対するID-EpiMut HAバリエーションの反応性

【0111】

ヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープにさまざまな配列を持つID-EpiMut HAバリエーションを単離した後、これらHAタンパク質の反応性を、一群のH3 HA特異的Abを用いて調べる。1つの集団には、100種類を超える抗体が含まれている可能性がある(Yamayoshi他、2017年; Epstein他、2002年)。これらのAbがあらゆる主要抗原クレードの代表的なヒトH3N2インフルエンザウイルスを中和する能力を調べたところ(表2)、その大半が試験ウイルスの一部だけを中和することが見いだされた。これは、これらのAbが非常に変化しやすいヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープA~Eと反応することを示している。しかしこれらAbのいくつかは、ヒトH3N2ウイルスの大半の主要抗原クラスターからのウイルスを確かに中和した(表2)。既知のステム反応性mAbを用いた競合研究に基づき、これらのAbはHAのヘッドと反応することが見いだされた。

【0112】

10

20

30

40

50

【表 4】

表2：選択されたmAbのIC₅₀をマイクログロ中和アッセイによって測定した値（μg/ml）¹

名称	抗原クラスター													
	HK68	EN72	VI75	TX77	BK79	SI87	BE89	BE92	WH95	SY97	FU02	CA04	WI05	PE09
#1	25.00	25.00	12.50	25.00	12.50	25.00	12.50	12.50	12.50	12.50	25.00	>50	6.25	12.50
#2	>50	>50	>50	6.25	0.78	0.39	1.56	1.56	3.13	3.13	12.50	12.50	12.50	3.13
#3	>50	>50	0.20	3.13	0.20	0.20	>50	1.56	0.78	0.20	1.56	0.20	0.20	0.20
#4	>50	>50	25.00	12.50	1.56	12.50	0.78	3.13	3.13	6.25	0.78	6.25	0.39	6.25
#5	25.00	>50	0.78	1.56	0.78	1.56	>50	3.13	3.13	12.50	3.13	6.25	12.50	6.25

¹ ヒトH3N2ウイルスのさまざまな抗原クラスターを代表するウイルスについて、示されているmAbのIC₅₀値が示されている（HK68、香港'68；EN72、イングランド'72；VI75、ヴェイクストリア'75；TX77、テキサス'77；BK79、バンコク'79；SI87、四川'87；BE89、北京'89；BE92、北京'92；WH95、武漢'95；SY97、シドニー'97；FU02、福建'02；CA04、カリフォルニア'04；WI05、ウィスコンシン'05；PE09、パース'09；TX12、テキサス'12；HK14、香港'14。色は反応性のレベルを示す（すなわち濃い色ほど反応性が大きいことを示す）

【0113】

それに加え、一群のステム反応性mAbに対するID-EpiMut HAバリエーションの反応性（Yamayoshi他、2017年と2018年）、または公開されている配列に基づいて合成されたmAb（Corti他、2011年）（表3）の反応性を調べた。これらのmAbはグループ2のHA（1417infC10）、またはグループ1とグループ2のHAを認識する。

【0114】

10

20

30

40

50

【表 5】

表3：示されている亜型のHAに対するステム反応性mAbの反応性

mAb	グループ 1		グループ 2		参考文献
	H1	H5	H3	H7	
S9-1-10/5-1 ¹	√	√		√	Yamayoshi 他、2017 年
3352E69	√		√	√	Yamayoshi 他、2017 年
10-4-7/1	√	√	√	√	Yamayoshi 他、2017 年
4-8-6/4	√	√	√	√	Yamayoshi 他、2017 年
3381E12	√	√	√	√	Yamayoshi 他、2017 年
3381A11	√	√	√	√	Yamayoshi 他、2017 年
3352E71	√	√	√	√	Yamayoshi 他、2017 年
1417infE21 ²	√		√	√	Yamayoshi 他、2018 年
1417infC10 ³			√	√	Yamayoshi 他、2018 年
FI6V3 ¹	√	√	√	√	Corti 他、2011 年

¹ 18種類の亜型すべてのHAと反応する² H1、H5、H6、H8（すべてグループ1）のHA、およびH3、H4、H7、H10、H14、H15（すべてグループ2）のHAと反応する³ H3、H4、H7、H10、H14、H15（すべてグループ2）のHAと反応する

【0115】

ヘマグルチニン抑制（HI）アッセイは、赤血球細胞へのHAの結合を抑制する抗体の能力を測定する。HIアッセイは、ヘッド（赤血球細胞の表面にあるシアル酸への結合を媒介する受容体結合ポケットが位置する場所）に結合する抗体と、ステムに結合するがヘマグルチニンには干渉しない抗体を識別するのに頻繁に用いられる。しかし最近のH3N2ウイルスは、一般に用いられている赤血球細胞に結合しない。

【0116】

選択された100種類のID-EpiMut HAバリエーションの反応性を調べるため、これらバリエーションのHA遺伝子をタンパク質発現プラスミドに入れてクローニングし、293T細胞にトランスフェクトした。野生型CA04 HAタンパク質が対照として機能する。トランスフェクションの24時間後、4%パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した。HAを発現している細胞をmAb（1 μg/ml）とともにインキュベートした後、ペルオキシダーゼで標識したヤギ抗ヒトIgG、Fcγ断片特異的抗体（Jackson Immuno-Research社）とともにインキュベートした。TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）溶液を室温で5分間かけて添加した後、H₂SO₄を添加することによって反応を停止させる。VersaMaxプレートリーダー（Molecular Devices社）を用いて450 nmで光学密度（OD450）を測定する。モックをトランスフェクトされたウェルを各mAbとともにインキュベートしたもののOD450値をバックグラウンドとして差し引く。

【0117】

ID-EpiMut HAバリエーションの反応性を野生型HAの反応性と比較する。（非常に変化しやすいヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープに向かう）クラスター特異的Abに対する反応性は失っているが、広域反応性H3特異的Abと（保存された免疫サブドミナント抗原エピトープに向かう）ステム特異的Abに対する反応性は保持している変異体を同定する。これらの基準を満たす50種類までのID-EpiMut HAタンパク質（図5）を回収する。

【0118】

実施例 3

ID-EpiMutワクチンの免疫原性と保護効果。この方法によって作製したバリエーションのそれぞれは、免疫系にとって新奇な抗原を持っている可能性が大きい。これらバリエーションを混合することにより、ワクチンは、非天然のヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープのそれぞれを少量含有するが、（すべてのID-EpiMut HAにおいて同じである）免疫サブドミナントエピトープの量が多い。このようなワクチンは、（インフルエンザワクチンの現在の

慣行である) 1種類の野生型HAだけを提示するワクチンと比べて保存された免疫サブドミナントエпитープに向かうより多くの抗体を誘起する。保存された免疫サブドミナントエピトープに対する抗体のレベルがより高いことで交差防御が得られる。実験的アプローチ。個々のID-EpiMut HAバリエントに対するマウス抗血清と、混合されたID-EpiMut HAバリエントに対するマウス抗血清を生成させ、反応性を調べる。ワクチン接種とチャレンジの研究をマウスとフェレットで実施し、非天然の免疫ドミナントエピトープの混合物がこれらエピトープに対する反応を減弱させるとともに免疫サブドミナントエピトープに対する抗体のレベルを上昇させて、より広い保護免疫が得られるかどうかを評価する。

【0119】

個々のID-EpiMut HAバリエントを有するウイルス様粒子の生成。HA (主要インフルエンザウイルス抗原) に加え、他のインフルエンザウイルスタンパク質 (NA、NP、マトリックス (M1) タンパク質、イオンチャネル (M2) タンパク質が含まれる) がウイルスの抗原性に寄与する。実際、NPとM1に対する免疫は、マウスモデルでは保護的である。これらタンパク質からのあらゆる混同効果を回避するため、ID-EpiMut HAバリエントをエボラウイルスのVLPの表面に提示する。エボラウイルスのVP40とインフルエンザウイルスのHAを同時に発現させることにより、HAで修飾されたVLPが非常に効率的に生成する。さらに、VP40を安定に発現する293T細胞系を用いてVLPを非常に効率的に形成することができる。VP40を発現している293T細胞に、50種類のID-EpiMut HAバリエントのそれぞれをコードするタンパク質発現プラスミドをトランスフェクトする。2~3日後、細胞を細菌のノイラミニダーゼで処理すると細胞からVLPが効率的に放出される。放出されたVLPを含む細胞培養物の上清を回収し、スクロース勾配を通じて精製し、超遠心分離によって濃縮した後、BCAアッセイ (Thermo Scientific社) を利用して全タンパク質の収量を測定する。得られた50種類のID-EpiMut-HA/VP40 VLP (それぞれが単一のHA変異体で修飾されている) (図5) を用いてマウスを免疫化する。

【0120】

多数のID-EpiMut HAバリエントを有するウイルス様粒子の生成。単一のID-EpiMut HAバリエントで修飾されたVLPに加え、さまざまなID-EpiMut-HAで修飾された8種類の異なるID-EpiMut-HA/VP40 VLP (図5) を生成させる。具体的には、10種類のID-EpiMut HAバリエントのそれぞれで修飾された5種類のID-EpiMut-HA/VP40 VLPを試験し、25種類すべてのID-EpiMut HAバリエントで修飾された2種類のID-EpiMut-HA/VP40 VLPを試験し、50種類すべてのID-EpiMut HAバリエントで修飾された1種類のID-EpiMut-HA/VP40 VLPを試験する (最初の2つのセットに関しては、ID-EpiMut HAバリエントをランダムに10種類または25種類のグループにそれぞれ分類する)。VP40を発現している293T細胞に、異なるID-EpiMut HAを発現する異なるタンパク質発現プラスミドをそれぞれの数だけ共トランスフェクトする。異なるHA変異体を同じVLPの表面に提示すると、特定の1種類の変異体に対して特異的なB細胞の集団が小さくなる可能性が大きい。

【0121】

ID-EpiMut-HA/VP40 VLPに向かうマウス血清の生成と特徴づけ。ID-EpiMut-HA/VP40 VLPの全タンパク質10~20 µgを筋肉内注射してマウス (BALB/c雌マウス、Jackson Laboratories社; 1つの群に3匹) を免疫化し、2週間後、ID-EpiMut-HA/VP40 VLPのタンパク質を同じ量で筋肉内注射して免疫を強化する。2回目の免疫化の3週間後、血液を回収する。

【0122】

以下のグループのHAタンパク質に対するマウス血清の反応性を調べた: (1) 孵化した鶏卵の中で増幅されていないウイルスに由来し (したがって抗原性に影響を与える卵適応HA変異のリスクが排除される)、主要抗原クレードのすべてを代表するヒトH3N2ウイルスHAタンパク質; (2) ID-EpiMut HAバリエント; (3) 他のいくつかのHA亜型を代表するHAタンパク質 (他の亜型にはH1、H5、H7が含まれる (これら亜型のそれぞれについて、主要抗原クレードとサブクレードを代表する一群のHAタンパク質を用いる))。

【0123】

三量体化モチーフ（「フォールドン」）によって安定化されたHAの分泌形態を発現させるプロトコルを利用して、精製されたHAタンパク質でELISAを用いる（Stevens他、2004年）。マウス血清と精製されたHAタンパク質の相互作用を上に記載されているようにして検出する。非常に変化しやすいヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープと、保存されたステム内免疫サブドミナント抗原エピトープと、保存されたヘッド内免疫サブドミナント抗原エピトープに結合する抗体の相対的な寄与を評価するため、これらエピトープに結合することが知られているヒトAbを用いて競合アッセイを実施する。対照には、野生型HAタンパク質と、それに対して生成した抗血清のほか、抗原的に遠いB型インフルエンザウイルスのHAタンパク質と、それに対して生成した抗血清が含まれる。

【0124】

1種類のEpiMut HAで修飾された50種類のID-EpiMut-HA/VP40 VLPから、HAのステム領域内とヘッド領域内の保存された免疫サブドミナント抗原エピトープに対して反応する抗体の割合が最大である上位30種類の候補を選択する（図5）。

【0125】

多種類のEpiMut HAで修飾された8種類のID-EpiMut-HA/VP40 VLPについて、候補が、（野生型HAと比べて）免疫サブドミナントエピトープに対する抗体の量の増加を誘起しない場合に、それらの候補を排除する（図5）。

【0126】

ID-EpiMut-HA/VP40 VLPの混合物を用いたマウスの免疫化

【0127】

ヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープに多数の変異を持つID-EpiMut HAの混合物を用いた免疫化により、新奇な免疫ドミナント抗原のそれぞれに対する抗体反応は比較的低くなる一方で、共有されているエピトープ（例えばHAのステム内とヘッド内の保存された免疫サブドミナントエピトープ）に対する反応は強化されるように見える。このことを評価するため、複数の異なるワクチン接種戦略を調べる。これらのワクチン接種戦略では、マウス（例えば5匹からなる複数の群）に、それぞれのID-EpiMut-HA/VP40 VLPが1種類だけのID-EpiMut HAで修飾された10種類、または15種類、または30種類のID-EpiMut-HA/VP40 VLPの混合物で初回刺激を与える（表4a）。マウスは、免疫を強化しないか、初回免疫化で用いたのと同じID-EpiMut-HA/VP40 VLPで免疫を強化するか、異なるセットの10種類または15種類のID-EpiMut-HA/VP40 VLPを用いて免疫を強化する。

【0128】

同様に、マウスに、多種類の異なる変異体で修飾された1種類だけのID-EpiMut-HA/VP40 VLPを用いて初回刺激を与えた後（表4b）、モックで免疫を強化するか、同じID-EpiMut-HA/VP40 VLPを用いて免疫を強化するか、異なる1種類のID-EpiMut-HA/VP40 VLPを用いて免疫を強化する（これは、50種類すべてのEpiMut HA変異体で修飾されたID-EpiMut-HA/VP40 VLPをワクチン接種されたマウスには当てはまらない）。それに加え、対照に、野生型HAタンパク質で修飾されたHA/VP40 VLPを用いて初回刺激を与えるか、野生型HAタンパク質で修飾されたHA/VP40 VLPを用いて初回刺激と免疫強化を実施する。

【0129】

最後の免疫化から28日後に血清を回収し、上に記載されているようにして免疫サブドミナント抗原エピトープに対する抗体のレベルを調べた。異なるワクチン接種戦略の比較から、ID-EpiMut-HA/VP40 VLPの同じ混合物を用いた2回の免疫化により、1回だけの免疫化と比べて免疫サブドミナントエピトープに対する抗体の量が増加するかどうかは明らかになる。異なるワクチン接種戦略の比較から、異なるID-EpiMut-HA/VP40 VLPを用いた初回刺激／免疫強化計画により、同じID-EpiMut-HA/VP40 VLPを用いた初回刺激／免疫強化計画と比べて免疫サブドミナントエピトープに対する抗体の量が増加するかどうかは明らかになる。さらに、異なるワクチン接種戦略の比較から、多種類のHA変異体で修飾された1種類のVLP（表4b参照）が、それぞれ1種類のHA変異体で修飾された多種類のVLP（表4a参照）よりも免疫サブドミナントエピトープに対する抗体をより多く誘起す

10

20

30

40

50

るかどうかが明らかになる。10種類、または25種類、または50種類のHA変異体で修飾されたVLPの比較により、HAのヘッド内の免疫ドミナントエピトープに対する免疫応答を減弱させるのに必要な異なるHAの数に関する情報も提供される。

【0130】

(1種類または10種類のVLPから提供された) 10種類のID-EpiMut HAの混合物が免疫ドミナントエピトープに対する免疫応答を減弱させる場合には、5種類または3種類のID-EpiMut HAの混合物を用いて同様の実験を実施し、この減弱効果に必要な異なるID-EpiMut HAの最少数を求める。

【0131】

マウスにおける保護研究のため、本明細書で調べた異なるワクチン接種計画から上位10通りを選択する（例えば免疫サブドミナントエピトープに対する抗体のレベルが最高であるもの）（図5）。

【0132】

【表6】

表4a：ワクチン接種戦略の概要

ワクチン接種戦略	ID-EpiMut-HA/VP40 VLP（初回刺激）#	ID-EpiMut-HA/VP40 VLP（免疫強化）#
個々の EpiMut-HA で修飾された VLP	1～10	なし
		1～10
		11～20
		21～30
	11～20	なし
		1～10
		11～20
		21～30
	21～30	なし
		1～10
		11～20
		21～30
	1～15	なし
		1～15
		16～30
	16～30	なし
		1～15
		16～30
	1～30	なし
		1～30

【0133】

【表 7】

表4b：ワクチン接種戦略の概要（続き）

ワクチン接種戦略	ID-EpiMut-HA/VP40 VLP （初回刺激）#	ID-EpiMut-HA/VP40 VLP（免疫強化）#
多種類の EpiMut-HA で修飾された VLP	ID-EpiMut-HA 1～10 を持つ 1 種類の VLP	なし
		ID-EpiMut-HA 1～10 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 11～20 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 21～30 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 31～40 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 41～50 を持つ 1 種類の VLP
	ID-EpiMut-HA 11～20 を持つ 1 種類の VLP	なし
		ID-EpiMut-HA 1～10 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 11～20 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 21～30 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 31～40 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 41～50 を持つ 1 種類の VLP
	ID-EpiMut-HA 21～30 を持つ 1 種類の VLP	なし
		ID-EpiMut-HA 1～10 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 11～20 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 21～30 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 31～40 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 41～50 を持つ 1 種類の VLP
	ID-EpiMut-HA 31～40 を持つ 1 種類の VLP	なし
		ID-EpiMut-HA 1～10 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 11～20 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 21～30 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 31～40 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 41～50 を持つ 1 種類の VLP
	ID-EpiMut-HA 41～50 を持つ 1 種類の VLP	なし
		ID-EpiMut-HA 1～10 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 11～20 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 21～30 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 31～40 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 41～50 を持つ 1 種類の VLP
	ID-EpiMut-HA 1～25 を持つ 1 種類の VLP	なし
		ID-EpiMut-HA 1～25 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 26～50 を持つ 1 種類の VLP
	ID-EpiMut-HA 26～50 を持つ 1 種類の VLP	なし
		ID-EpiMut-HA 1～25 を持つ 1 種類の VLP
		ID-EpiMut-HA 26～50 を持つ 1 種類の VLP
	ID-EpiMut-HA 1～50 を持つ 1 種類の VLP	なし
		ID-EpiMut-HA 1～50 を持つ 1 種類の VLP

【0134】

ID-EpiMut-HA/VP40 VLPを接種したマウスにおけるチャレンジの研究

【0135】

高度に変異したヘッド内免疫ドミナント抗原エピトープの混合物が、これらエピトープに対する免疫応答を減弱させるとともに、保存された免疫サブドミナントエピトープに対する抗体のレベルを増強することを明確にした後、免疫サブドミナントエピトープに対する抗体のこのレベル上昇が、野生型ウイルスに基づくワクチンによって誘起される保護と比べて季節性ヒトH3N2ウイルスに対してより広い保護を提供するかどうかを明らかにする。

【0136】

保存された免疫サブドミナントエピトープに対する抗体のレベル上昇を誘起する上位10通りのワクチン接種計画について、ID-EpiMut-HAに対して生じた抗体の保護効果を評価する。最初に、48匹のマウスのそれぞれに、選択されたワクチン接種計画でワクチンを接種する。最近のヒトH3N2インフルエンザウイルスはマウスの体内で効率的に複製されない。マウス適応ウイルスを生成させるための確立された戦略を利用し、（同種チャレンジのための）CA04のマウス適応バリエーションと、パース2009年（PE09）抗原クラスター、ヴィクトリア2011年（VI11）抗原クラスター、香港2014年（HK14）抗原クラスターを代表するウイルスのマウス適応バリエーションを、異種チャレンジのために生成させる。抗原性に対するマウス適合変異の効果を除外するため、野生型HAに向かう血清を用いて野生型ウイルスとマウス適応ウイルスの反応性を比較する。マウス適応バリエーションが抗原的に野生型ウイルスと似ている場合には、上記の4種類のマウス適応バリエーションを 10^6 pfuの用量で用い、ワクチンを接種された12匹のマウスのそれぞれにチャレンジする。チャレンジ群1つにつき4匹のマウスで体重減少を観察し、残る8匹のマウスをチャレンジから3日後と6日後に（各時点で4匹ずつ）安楽死させて肺と鼻甲介の中のウイルス力価を評価する。ID-EpiMut HAを用いたワクチン接種は、野生型HAを用いたワクチン接種の後に誘起されるAbよりも保護が広いAbを誘起する。

10

【0137】

フェレットにおけるID-EpiMut HAインフルエンザワクチンの免疫原性

【0138】

上位3通りのワクチン接種計画でフェレットにおける免疫原性を調べる（図5）。フェレットでは、ヒトと同様、「内部」インフルエンザウイルスタンパク質の寄与がマウスにおけるよりも少ない。したがってフェレットにおけるワクチン接種とチャレンジの実験を、インフルエンザウイルスに基づくワクチンを用いて実施する（例えばそれぞれのID-EpiMut HAを有するウイルスをPR8ウイルスの遺伝的バックグラウンドで生成させる）。ID-EpiMut HAを有する組み換えウイルスを β -プロピオラクトンで不活化し（インフルエンザウイルスを不活化するための確立された手続き）、 $15 \mu\text{g}$ のHAタンパク質と同等な量をワクチン接種のために用いる。

20

【0139】

フェレットにおけるID-EpiMut HAインフルエンザワクチンの保護効果

【0140】

次に、フェレットにID-EpiMut HAインフルエンザワクチンを接種すると、野生型HAに基づくワクチンによって誘起されるよりも広い保護が与えられるかどうかを調べる。フェレット（群ごとに5匹）に（上述のようにして決めた）上位3通りのワクチン接種計画で免疫化する（図5）。最後の免疫化から28日後、フェレットの鼻腔内に 10^6 pfuの同種CA04ウイルス、またはより最近のパース2009年（PE09）抗原クラスター、ヴィクトリア2011年（VI11）抗原クラスター、香港2014年（HK14）抗原クラスターを代表するウイルス（異種チャレンジ）を感染させる。チャレンジの1日後から、感染したフェレットの体重測定を毎日実施するとともに、鼻洗浄サンプルを2日ごとに回収してウイルス力価を求める。野生型HAを持つ不活化インフルエンザワクチンを用いたワクチン接種は、同種CA04ウイルスを用いたチャレンジから保護するが、（異なる抗原クラスターに属する）異種ウイルスに対しては不完全な保護を提供することが予想される。ID-EpiMut HAインフルエンザワクチンを用いたワクチン接種によって抗原ドリフトバリエーションの感染から保護されるという知見は、万能なインフルエンザワクチンという考え方の実現可能性を明確にしている。

30

40

【0141】

【表 8】

表5：EpiMut HAインフルエンザワクチンの広域保護効果を調べるためのワクチン接種／チャレンジ群

群	インフルエンザウイルス感染	ID-EpiMut HA インフルエンザワクチンを用いたワクチン接種	チャレンジ
1	WU95 ウイルス、SY97 ウイルス、FU02 ウイルスを順番に感染させる	ID-EpiMut HA ワクチン 1*	CA 04 (同種)
2			PE09 (異種)
3			VI11 (異種)
4			HK14 (異種)
5		ID-EpiMut HA ワクチン 2*	CA 04 (同種)
6			PE09 (異種)
7			VI11 (異種)
8			HK14 (異種)
9		ID-EpiMut HA ワクチン 3*	CA 04 (同種)
10			PE09 (異種)
11			VI11 (異種)
12			HK14 (異種)
13		Wt-HA ワクチン (1 回のワクチン接種)	CA 04 (同種)
14			PE09 (異種)
15			VI11 (異種)
16			HK14 (異種)
17		Wt-HA ワクチン (2 回のワクチン接種)	CA 04 (同種)
18			PE09 (異種)
19			VI11 (異種)
20			HK14 (異種)

* ワクチン1、2、3は、C. 2. 3で得られたデータに基づく上位3通りのワクチン接種計画を示す。

【0142】

1つの群につき5匹のフェレット（月齢4～6ヶ月の雌）に筋肉内注射で免疫化する。最後の免疫化から28日後、血清を回収し、この血清の反応性を上に記載されているようにして調べる。野生型HAを持つ不活化インフルエンザワクチンで対照フェレットを免疫化する。ID-EpiMut HAインフルエンザワクチンを用いて免疫化すると、野生型HAを持つワクチンを用いたワクチン接種と比べて、保存された免疫サブドミナントエпитープに向かう抗体がより大量に誘起される。

【0143】

フェレットにおけるID-EpiMut HAインフルエンザワクチンの保護効果

【0144】

次に、フェレットにID-EpiMut HAインフルエンザワクチンを接種すると、野生型HAに基づくワクチンによって誘起されるよりも広い保護が与えられるかどうかを調べる。フェレット（群ごとに5匹）に、（上述のようにして決めた）上位3通りのワクチン接種計画で免疫化する（図5）。最後の免疫化から28日後、フェレットの鼻腔内に 10^6 pfuの同種CA 04ウイルス、またはより最近のパース2009年（PE09）抗原クラスター、ヴィクトリア2011年（VI11）抗原クラスター、香港2014年（HK14）抗原クラスターを代表するウイルス（異種チャレンジ）を感染させる。チャレンジの1日後から、感染したフェレットの体重測定を毎日実施するとともに、鼻洗浄サンプルを2日ごとに回収してウイルス力価を求める。野生型HAを持つ不活化インフルエンザワクチンを用いたワクチン接種は、同種CA 04ウイルスを用いたチャレンジから保護するが、（異なる抗原クラスターに属する）異種ウイルスに対しては不完全な保護を提供する。ID-EpiMut HAインフルエンザワクチンを用いたワクチン接種によって抗原ドリフトバリエーションの感染から保護されるという知見は、このワクチンが万能なインフルエンザワクチンであることを明確にしている。

【0145】

ヒトインフルエンザウイルスにあらかじめ曝露したフェレットにおけるID-EpiMut HAインフルエンザワクチンの保護効果

【0146】

ヒトに、自然感染および／またはワクチン接種を通じてインフルエンザウイルスを繰り返し曝露する。複数のインフルエンザウイルスへのこの曝露を模倣するため、フェレットに、過去の3種類の抗原クラスター、すなわち武漢1995年（WU95）クラスター、シドニー1997年（SY97）クラスター、福建2002年（FU02）クラスター（表5）を代表する季節性ヒトH3N2ウイルスを順番に感染させる。次に、フェレットに上位3通りのワクチン接種アプローチのそれぞれでワクチンを接種する。最後の免疫化から28日後、ワクチンを接種されたフェレットから血清サンプルを回収し、血清の反応性を調べる。ID-EpiMut HAインフルエンザワクチンを接種したフェレットからの血清は、野生型HAを持つインフルエンザワクチンを用いて免疫化したフェレットから得られる血清よりも交差反応性が大きい。

10

【0147】

次に、あらかじめ曝露されたフェレットと、ワクチンを接種されたフェレットの鼻腔内に、 10^6 pfuの同種CA04ウイルス、または異種であるPE09ウイルス、VI11ウイルス、HK14ウイルスを感染させる（1つの群につき5匹のフェレット、表5）。以前に記載されているように、チャレンジの1日後から体重測定を毎日実施するとともに、鼻洗浄液を2日ごとに回収する。ID-EpiMut HAインフルエンザワクチンは、抗原クラスターが異なるウイルスに対し、野生型HAに基づくインフルエンザワクチンよりも広い保護を提供する。

20

【0148】

まとめると、ID-EpiMut HAバリエーションに対して生じるマウス血清の反応性と中和特性は、これら血清が、野生型HAに対して生じる血清よりも広く反応して中和することを示している。ワクチン接種／チャレンジの研究により、本開示のワクチンアプローチが、野生型HAに基づく現在のワクチンによって与えられるよりも広い保護免疫を提供することが確立される。

【0149】

したがって非天然のヘッド内免疫ドミナントエピトープの混合物は、これらエピトープに対する免疫応答を減弱させるとともに、HA内の保存された免疫サブドミナントエピトープへと免疫応答を向かわせ、そのことによって交差防御抗体の量を増大させ、そのことによって万能なインフルエンザワクチンを提供する。

30

【0150】

40

50

【表 9 - 1】

表6：TK/2（H3）変異体

名称	アミノ酸位置																		遺伝子型
	1 2 1	1 3 1	1 3 5	1 3 8	1 4 0	1 4 2	1 4 4	1 4 5	1 5 5	1 5 6	1 5 7	1 5 8	1 7 1	1 8 9	1 9 3	2 1 2	2 2 5		
Tokyo 2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D		
TK/2-177 hCK-4 1_14	.	.	M	S	F	H	.	P	.	M	S	G	D	R	S	R	.	1	
TK/2-177 hCK-4 1_69	.	.	M	S	F	H	.	P	.	M	S	G	D	R	S	R	.		
TK/2-177 hCK-4 1_9	.	.	M	S	F	H	.	P	.	M	S	G	D	R	S	R	.		
TK/2-177 hCK-3 7_87	A	R	G	S	R	L	D	P	.	N	D	A	Y	N	R	N	E	2	
TK/2-177 hCK-3 7_73	E	K	.	T	P	D	R	M	Y	K	S	A	T	L	E	S	G	3	
TK/2-177 hCK-3 7_84	E	K	.	T	P	D	R	M	Y	K	S	A	T	L	E	S	G		
TK/2-177 hCK-3 7_68	E	L	N	S	K	K	A	P	F	S	T	S	Q	A	R	L	T	4	
TK/2-177 hCK-3 7_101	E	S	S	.	T	F	G	A	F	A	R	G	R	M	H	Q	.	5	
TK/2-177 hCK-4 1_3	F	M	G	S	.	E	M	P	F	S	Q	M	R	T	D	L	G	6	
TK/2-177 hCK-4 1_34	F	M	G	S	.	E	M	P	F	S	Q	M	R	T	D	L	G		
TK/2-177 hCK-3 7_70-3	F	M	G	S	.	E	M	P	F	S	Q	M	R	T	D	L	G		
TK/2-177 hCK-3 7_11	F	R	N	.	T	N	I	N	Y	I	R	E	K	D	G	S	E	7	
TK/2-177 hCK-3 7_19	F	R	S	S	P	M	G	N	.	L	P	D	K	D	A	.	A	8	
TK/2-177 hCK-3 7_10	F	S	G	S	L	H	R	A	W	S	R	T	F	F	S	S	L	9	
TK/2-177 hCK-3 7_1	F	S	H	S	S	T	N	P	F	A	S	R	M	A	Q	S	C	10	
TK/2-177 hCK-3 7_98	F	V	G	S	K	T	G	Q	I	R	S	T	L	N	S	I	R	11	
TK/2-177 hCK-3 7_71	F	Y	H	S	W	N	K	L	.	A	.	P	S	E	R	T	R	12	
TK/2-177 hCK-3 7_90	H	A	V	.	R	I	Q	P	Y	Q	S	R	V	S	R	S	.	13	
TK/2-177 hCK-4 1_H50	H	E	V	.	V	N	V	P	H	R	H	E	M	N	W	T	S	14	
TK/2-177 hCK-3 7_70-2	H	K	S	S	K	.	G	P	S	Q	G	R	M	A	.	L	G	15	
TK/2-177 hCK-4 1_H96	H	K	V	S	P	L	R	T	S	A	W	D	R	S	A	H	A	16	

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

名称	アミノ酸位置																		遺伝子型
	1 2 1	1 3 1	1 3 5	1 3 8	1 4 0	1 4 2	1 4 4	1 4 5	1 5 5	1 5 6	1 5 7	1 5 8	1 7 1	1 8 9	1 9 3	2 1 2	2 2 5		
Tokyo 2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D		
TK/2-177 hCK-3 7_12	H	R	V	.	R	S	M	T	V	S	S	S	R	N	N	S	G	17	
TK/2-177 hCK-3 7_16	I	E	H	S	D	.	K	P	V	T	R	K	S	R	S	W	G	18	
TK/2-177 hCK-3 7_74 2 と 3	I	E	K	S	Y	T	G	N	V	R	R	G	F	R	D	F	S	19	
TK/2-177 hCK-4 1_58	I	L	S	S	D	Y	K	K	R	A	R	.	P	N	A	T	R	20	
TK/2-177 hCK-3 7_81	I	R	M	S	L	A	N	.	.	N	R	V	V	S	R	G	.	21	
TK/2-177 hCK-3 7_102	I	R	Q	S	N	A	M	P	.	K	H	L	L	H	S	T	K	22	
TK/2-177 hCK-3 7_49	K	N	.	.	H	N	M	P	F	R	S	.	T	T	L	S	H	23	
TK/2-177 hCK-3 7_22-1	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R	24	
TK/2-177 hCK-3 7_31	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R		
TK/2-177 hCK-3 7_56	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R		
TK/2-177 hCK-4 1_75	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R		
TK/2-177 hCK-3 7_95	L	.	G	.	M	D	K	.	I	R	R	Q	M	E	G	T	R		
TK/2-177 hCK-4 1_H48	L	A	.	S	P	D	F	P	H	S	R	L	A	S	T	Q	Q	25	
TK/2-177 hCK-4 1_H51	L	A	.	S	P	D	F	P	H	S	R	L	A	S	T	Q	Q		
TK/2-177 hCK-4 1_H58	L	A	.	S	P	D	F	P	H	S	R	L	A	S	T	Q	Q		
TK/2-177 hCK-3 7_64	L	A	A	S	L	K	N	Y	.	S	M	D	C	F	A	T	S	26	
TK/2-177 hCK-3 7_74-1	L	A	A	S	L	K	N	Y	.	S	M	D	C	F	A	T	S		
TK/2-177 hCK-4 1_79	L	A	F	.	S	H	R	.	Y	A	V	G	T	M	M	T	S	27	
TK/2-177 hCK-3 7_59	L	I	.	S	L	I	G	N	.	.	S	G	V	H	Q	T	L	28	
TK/2-177 hCK-4 1_89	L	L	D	S	S	.	G	P	H	A	Q	A	A	R	S	V	H	29	
TK/2-177 hCK-3 7_33	L	L	R	S	L	.	R	E	H	S	P	M	.	M	A	N	H	30	
TK/2-177 hCK-3 7_35	L	S	Q	.	N	F	A	P	F	S	E	S	.	N	G	.	S	31	
TK/2-177 hCK-3	M	.	N	S	P	T	N	Q	F	S	R	R	H	V	N	S	T	32	

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

名称	アミノ酸位置																		遺伝子型
	1 2 1	1 3 1	1 3 5	1 3 8	1 4 0	1 4 2	1 4 4	1 4 5	1 5 5	1 5 6	1 5 7	1 5 8	1 7 1	1 8 9	1 9 3	2 1 2	2 2 5		
Tokyo 2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D		
7_39																			
TK/2-177 hCK-3 7_45	M	.	V	S	M	G	V	P	H	V	M	S	L	Y	K	S	S	33	
TK/2-177 hCK-4 1_76	M	N	.	S	G	E	E	E	Y	A	R	E	R	M	T	H	G	34	
TK/2-177 hCK-4 1_21	M	Q	A	S	T	N	.	R	F	V	S	R	.	D	S	L	T	35	
TK/2-177 hCK-3 7_17-1	R	G	S	S	L	S	I	P	K	A	A	A	S	I	H	F	R	36	
TK/2-177 hCK-4 1_93	R	L	V	S	A	G	R	A	S	S	Q	S	Y	D	.	S	R	37	
TK/2-177 hCK-4 1_53	R	L	V	S	A	K	M	P	.	A	S	L	E	T	L	S	M	38	
TK/2-177 hCK-3 7_36	R	N	H	S	R	G	M	M	.	A	S	L	F	S	T	V	C	39	
TK/2-177 hCK-3 7_60	R	N	H	S	R	G	M	M	.	A	S	L	F	S	T	V	C		
TK/2-177 hCK-3 7_H5	R	N	S	.	M	Q	Q	V	.	K	F	R	M	E	S	W	?	40	
TK/2-177 hCK-3 7_96	S	A	V	S	N	K	H	A	F	S	D	S	Q	E	A	Q	.	41	
TK/2-177 hCK-4 1_48	S	G	R	S	R	N	.	N	W	S	G	K	L	T	S	I	G	42	
TK/2-177 hCK-3 7_67	S	H	V	S	.	Q	Q	W	.	L	H	D	T	G	A	S	.	43	
TK/2-177 hCK-4 1_7	S	K	S	S	Y	L	E	.	H	A	D	Q	G	.	A	R	S	44	
TK/2-177 hCK-3 7_37	T	E	G	C	M	H	T	M	F	K	P	R	E	R	S	V	G	45	
TK/2-177 hCK-3 7_28	T	G	V	S	.	T	R	.	V	A	N	V	K	S	D	H	T	46	
TK/2-177 hCK-4 1_54	T	K	Q	S	N	G	K	Q	S	S	D	E	L	T	W	I	S	47	
TK/2-177 hCK-3 7_40	T	N	W	S	S	N	A	G	.	S	A	L	L	N	H	S	S	48	
TK/2-177 hCK-3 7_86	T	R	G	T	V	.	E	R	V	Q	R	G	S	A	G	M	S	49	
TK/2-177 hCK-3 7_85	T	V	A	S	K	I	G	V	.	R	S	L	L	V	K	V	G	50	
TK/2-177 hCK-3 7_97	T	V	A	S	K	I	G	V	.	R	S	L	L	V	K	V	G		
TK/2-177 hCK-3 7_94	V	?	V	S	S	S	G	M	.	A	S	E	I	T	S	L	L	51	
TK/2-177 hCK-3 7_17-2 と 3	V	A	.	.	L	C	E	A	V	S	T	R	S	G	S	S	G	52	

10

20

30

40

50

【表 9 - 4】

名称	アミノ酸位置																		遺伝子型
	1 2 1	1 3 1	1 3 5	1 3 8	1 4 0	1 4 2	1 4 4	1 4 5	1 5 5	1 5 6	1 5 7	1 7 8	1 8 9	1 9 3	2 1 2	2 2 5			
Tokyo 2	N	T	T	A	I	R	S	S	T	H	L	N	N	K	F	A	D		
TK/2-177 hCK-4 1_4	V	K	.	S	P	G	.	D	F	T	P	I	Y	N	Y	V	E	53	
TK/2-177 hCK-3 7_5	V	K	.	S	P	G	.	D	F	T	P	I	Y	N	Y	V	E		
TK/2-177 hCK-3 7_42	V	K	V	.	P	G	D	Y	.	S	W	K	R	Q	.	G	Q	54	
TK/2-177 hCK-4 1_55	V	K	V	S	Q	.	R	H	.	S	T	S	R	L	N	.	L	55	
TK/2-177 hCK-3 7_57	V	L	V	S	L	S	.	H	V	V	S	K	E	S	H	T	R	56	
TK/2-177 hCK-4 1_78	V	L	V	S	L	S	.	H	V	V	S	K	E	S	H	T	R		
TK/2-177 hCK-3 7_2	V	N	C	S	A	A	M	N	.	Q	S	Q	T	R	N	V	R	57	
TK/2-177 hCK-3 7_65	V	N	C	S	A	A	M	N	.	Q	S	Q	T	R	N	V	R		
TK/2-177 hCK-4 1_51	V	Q	.	S	K	T	K	R	W	K	G	H	R	E	Q	S	T	58	
TK/2-177 hCK-3 7_100	V	R	.	.	S	G	I	R	.	W	V	G	M	V	A	W	A	59	
TK/2-177 hCK-3 7_20	V	R	G	S	C	V	K	F	.	A	K	S	L	E	I	L	E	60	
TK/2-177 hCK-4 1_41	V	R	K	S	P	E	.	K	V	M	E	Q	H	R	S	Q	H	61	
TK/2-177 hCK-4 1_26	W	K	.	S	H	Y	T	P	S	A	Q	E	A	R	A	?	Q	62	
TK/2-177 hCK-4 1_38	W	K	.	S	H	Y	T	P	S	A	Q	E	A	R	A	T	Q		
TK/2-177 hCK-4 1_66	W	K	.	S	H	Y	T	P	S	A	Q	E	A	R	A	T	Q		
TK/2-177 hCK-3 7_22-3	Y	K	S	S	K	M	N	P	.	M	?	L	W	T	L	L	R	63	
TK/2-177 hCK-3 7_32	Y	L	R	S	L	H	E	R	S	R	.	R	M	A	E	H	.	64	
TK/2-177 hCK-4 1_50	Y	L	R	S	L	H	E	R	S	R	.	R	M	A	E	H	.		
TK/2-177 hCK-4 1_8	Y	L	R	S	L	H	E	R	S	R	.	R	M	A	E	H	.		
TK/2-177 hCK-4 1_52	Y	L	R	S	M	A	H	Q	Y	A	W	R	E	Q	R	V	W	65	
TK/2-177 hCK-3 7_62	Y	M	S	.	.	E	R	M	V	K	.	G	S	S	D	F	A	66	

【0151】

参考文献

【0152】

Andrews et al., *Sci. Transl. Med.*, **7**:316ra192 (2015).Belser et al., *J. Virol.*, **90**:4647 (2016).Bommakanti et al., *J. Virol.*, **86**:13434 (2012).Bommakanti et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**:13701 (2010).Chen et al., *J. Virol.*, **90**:3789 (2016).Clementi et al., *PLoS One*, **6**:e28001 (2011).

10

20

30

40

50

- Corti et al., *Science*, **333**:850 (2011).
- DiLillo et al., *J. Clin. Invest.*, **126**:605 (2016).
- Dreyfus et al., *Science*, **337**:1343 (2012).
- Ekiert et al., *Curr. Opin. Virol.*, **2**:134 (2012).
- Ekiert et al., *Nature*, **489**:526 (2011).
- Ekiert et al., *Science*, **324**:246 (2009).
- Ekiert et al., *Science*, **333**:843 (2011).
- Ellebedy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**:13133 (2014).
- Epstein et al., *Emerg. Infect. Dis.*, **8**:796 (2002).
- Erbelding et al., *J. Infect. Dis.*, ____:____ doi:10.1093/infdis/jiy103 (2018). 10
- Fleury et al., *Nat. Struct. Biol.*, **5**:119 (1998).
- Friesen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**:445 (2014).
- Fu et al., *Nat. Commun.*, **7**:12780 (2016).
- Goff et al., *PLoS One*, **8**:e79194 (2013).
- Graves et al., *Virology*, **126**:106 (1983).
- Halliley et al., *J. Infect. Dis.*, **212**:1270 (2015).
- Henry et al., *Cell Host Microbe*, **19**:800 (2016).
- Henry et al., *J. Clin. Invest.*, **125**:1255 (2015).
- Herfst et al., *Science*, **336**:1534 (2012).
- Hong et al., *J. Virol.*, **87**:12471 (2013). 20
- Iba et al., *J. Virol.*, **88**:7130 (2014).
- Imai et al., *Nature*, **486**:420 (2012).
- Impagliazzo et al., *Science*, **349**:1301 (2015).
- Joyce et al., *Cell*, **166**:609 (2016).
- Kallewaard et al., *Cell*, **166**:596 (2016).
- Koel et al., *Science*, **342**:976 (2013).
- Krammer et al., *Clin. Vaccine Immunol.*, **21**:1153 (2014).
- Krammer et al., *J. Virol.*, **86**:10302 (2012).
- Krammer et al., *J. Virol.*, **87**:6542 (2013).
- Krammer et al., *J. Virol.*, **88**:2340 (2014). 30
- Krammer et al., *J. Virol.*, **88**:3432 (2014).
- Krause et al., *J. Virol.*, **85**:10905 (2011).
- Krause et al., *J. Virol.*, **86**:6334 (2012).
- Lee et al., *Nat. Commun.*, **5**:3614 (2014).
- Lee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**:17040 (2012).
- Li et al., *Nat. Microbiol.*, **1**:16058 (2016).
- Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**:9047 (2012).
- Liu et al., *J. Infect. Dis.*, **215**:518 (2017).
- Luo et al., *J. Virol. Methods*, **154**:121 (2008).
- Mallajosyula et al., *Front. Immunol.*, **6**:329 (2015). 40
- Mallajosyula et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**:E2514 (2014).
- Margine et al., *J. Virol.*, **87**:10435 (2013).
- Margine et al., *J. Virol.*, **87**:4728 (2013).
- Miller et al., *J. Infect. Dis.*, **207**:98 (2009).
- Nachbagauer et al., *J. Virol.*, **88**:13260 (2014).
- Nachbagauer et al., *J. Virol.*, **90**:3268 (2015).
- Nachbagauer et al., *MBio*, **7**:e01996 (2016).
- Nachbagauer et al., *NPJ Vaccines*, **1**:e00018 (2016).
- Nachbagauer et al., *NPJ Vaccines*, **2**:26 (2017).
- Nakamura et al., *Cell Host Microbe*, **14**:93 (2013). 50

- Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:9345 (1999).
- Ohshima et al., *J. Virol.*, **85**:11048 (2011).
- Okuno et al., *J. Virol.*, **67**:2552 (1993).
- Pica et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**:2573 (2012).
- Ping et al., *Nat. Commun.*, **6**:8148 (2015).
- Ping et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**:E8296 (2016).
- Raymond et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**:168 (2018).
- Sakabe et al., *Virus Res.*, **158**:124 (2009).
- Sangster et al., *Clin. Vaccine Immunol.*, **20**:867 (2009).
- Schmidt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**:264 (2013).
- Steel et al., *MBio*, **1**:e00018 (2010).
- Steinbruck et al., *J. Virol.*, **88**:12123 (2014).
- Stevens et al., *Science*, **303**:1866 (2004).
- Sui et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**:265 (2009).
- Sun et al., *MBio*, **4**:e00230 (2013).
- Sutton et al., *NPJ Vaccines*, **2**:35 (2017).
- Taft et al., *Nat. Commun.*, **6**:7491 (2015).
- Tan et al., *J. Virol.*, **86**:6179 (2012).
- Thomson et al., *Front. Immunol.*, **3**:87 (2012).
- Throsby et al., *PLoS One*, **3**:e3942 (2008).
- Tsibane et al., *PLoS Pathog.*, **8**:e1003067 (2012).
- Valkenburg et al., *Sci. Rep.*, **6**:22666. (2016)
- Watanabe et al., *Nature*, **501**:551 (2013).
- Whittle et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**:14216 (2011).
- Wiley et al., *Annu. Rev. Biochem.*, **56**:365 (1987).
- Wiley et al., *Nature*, **289**:373 (1981).
- Wohlbold et al., *Vaccine* **33**:3314 (2015).
- Wrammert et al., *J. Exp. Med.*, **208**:181 (2009).
- Wu et al., *Nat. Commun.*, **6**:7708 (2015).
- Xu et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, __:__ doi:10.1038/nsmb.2500 (2013).
- Yamayoshi et al., *EBioMedicine*, **17**:182 (2017).
- Yamayoshi et al., *J. Infect.*, **76**:177 (2018).
- Yang et al., *PLoS One*, **9**:e106660 (2014).
- Yao et al., *Sci. Rep.*, **7**:1545 (2017).
- Yassine et al., *Nat. Med.*, **21**:1065 (2015).
- Yoshida et al., *PLoS Pathog.*, **5**:e1000350 (2009).
- Zhang et al., *Science*, **341**:410 (2013).
- Zhu et al., *Science*, doi:10.1126/science.1239844 (2013).

【 0 1 5 3 】

あらゆる刊行物、特許、特許出願は、参照によって本明細書に組み込まれている。本明細書ではここまで本発明をそのいくつかの好ましい実施態様に関して記載し、説明を目的として多くの詳細を示してきたが、当業者には、本発明の基本原則から逸脱することなく、本発明には追加の実施態様が可能であることと、本明細書に記載した詳細のいくつかを大きく変更できることが明らかであろう。

本発明の態様の一部を以下に記載する。

1. 1つ以上の免疫ドミナントエピトープ内に1個以上の変化した残基を有するヘマグルチニン (HA) をコードする複数のインフルエンザウイルス核酸分子を作製する方法であって、

少なくとも2つの免疫ドミナントエピトープを有するインフルエンザウイルスヘマグルチニンをコードする単離された親インフルエンザ核酸分子の1つ以上の免疫ドミナントエ

ピトーブの複数のコドンにランダムな変異を導入することにより、変異インフルエンザウイルスヘマグルチニンをコードするインフルエンザ核酸分子のライブラリを提供すること；
このライブラリを細胞に導入して、該変異ヘマグルチニンを発現する細胞のライブラリを提供すること；および

該1つ以上の免疫ドミナントエピトーブを形成する残基に1つ以上の置換および／または欠失がある結果として該親ヘマグルチニンと比べて免疫ドミナントエピトーブの数が減少したライブラリによってコードされる変異ヘマグルチニンを同定することを含む、方法。

2．前記変異を免疫ドミナントエピトーブ（抗原部位）Aに、Bに、またはAとBに導入する、項目1に記載の方法。

3．前記変異を免疫ドミナントエピトーブC、DもしくはE、またはこれらの任意の組み合わせに導入する、項目1または2に記載の方法。

4．少なくとも5個、10個、15個、もしくは20個のコドン、または5個～20個の間の任意の整数個のコドンが変異している、項目1～3のいずれかに記載の方法。

5．前記変異ヘマグルチニンを、抗体または他のヘマグルチニン結合分子を用いて同定する、項目1～4のいずれかに記載の方法。

6．前記抗体または他のヘマグルチニン結合分子の少なくとも1つが、前記親ヘマグルチニンまたは同じHA亜型の異なるインフルエンザウイルスの免疫ドミナントエピトーブに結合する、項目5に記載の方法。

7．前記ライブラリの1つ以上のメンバーを、前記ヘマグルチニンのステム内の保存された領域に結合する少なくとも1つの抗体または他のヘマグルチニン結合分子と接触させることをさらに含む、項目5または6に記載の方法。

8．変異した前記免疫ドミナントエピトーブが、H3 HA内の残基121～146（部位A）、H3 HA内の残基156～196（部位B）、H3 HA内の残基50～57もしくは残基275～279（部位C）、H3 HA内の残基164、残基182、もしくは残基208～217（部位D）、またはH3 HA内の残基62～83（部位E）に対応する、項目1～7のいずれかに記載の方法。

9．前記細胞が哺乳動物の細胞である、項目1～8のいずれかに記載の方法。

10．前記ヘマグルチニン（HA）が、H1、H2、H3、H5、H6、H7、またはH9である、項目1～9のいずれかに記載の方法。

11．前記変異HAが、H3内の、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、もしくは225位のうちの2つ以上に置換を持つか、または121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、もしくは225位のうちの1つ以上に欠失を持つか、またはこれらの組み合わせを持つ、項目1～10のいずれかに記載の方法。

12．H3内の、121位の残基が、Q、R、I、L、V、T、S、F、Y、もしくはAであるか、131位の残基が、R、A、M、K、V、S、Q、C、V、Y、D、E、もしくはLであるか、135位の残基が、Y、G、R、M、K、N、V、W、S、V、もしくはPであるか、138位の残基が、S、W、K、I、R、もしくはLであるか、140位の残基が、L、M、T、S、R、K、M、もしくはPであるか、142位の残基が、N、D、G、Y、Q、E、H、N、L、もしくはPであるか、144位の残基が、T、K、V、G、D、H、L、もしくはQであるか、145位の残基が、P、R、W、もしくはKであるか、155位の残基が、C、F、H、I、R、A、V、S、もしくはNであるか、156位の残基が、P、G、S、M、R、T、A、もしくはCであるか、157位の残基が、D、P、S、G、I、R、もしくはTであるか、158位の残基が、R、V、S、A、K、C、もしくはQであるか、171位の残基が、T、F、L、E、H、C、もしくはRであるか、189位の残基が、A、P、T、L、A、S、Y、もしくはRであるか、193位の残基が、Q、R、N、T、E、V、もしくはPであるか、212位の残基が、V、R、G、S、M、D、もしくはEであるか、または225位の残基が、L、P、C、S、Q、G、Y、もしくはFである、項目1～11のいずれかに記載の方法。

13．121位の残基がNではないか、131位の残基がTではないか、135位の残基がTでは

ないか、138位の残基がAではないか、140位の残基がIではないか、142位の残基がRではないか、144位の残基がSではないか、145位の残基がSではないか、155位の残基がTではないか、156位の残基がHではないか、157位の残基がLではないか、158位の残基がNではないか、171位の残基がNではないか、189位の残基がKではないか、193位の残基がFではないか、212位の残基がAではないか、または225位の残基がDではない、項目1～12のいずれかに記載の方法。

14. 121位の非変異残基がNであるか、131位の非変異残基がTであるか、135位の非変異残基がTであるか、138位の非変異残基がAであるか、140位の非変異残基がIであるか、142位の非変異残基がRであるか、144位の非変異残基がSであるか、145位の非変異残基がSであるか、155位の非変異残基がTであるか、156位の非変異残基がHであるか、157位の非変異残基がLであるか、158位の非変異残基がNであるか、171位の非変異残基がNであるか、189位の非変異残基がKであるか、193位の非変異残基がFであるか、212位の非変異残基がAであるか、または225位の非変異残基がDである、項目1～13のいずれかに記載の方法。

10

15. 前記変異HAが、H5内の、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、189位のうちの2つ以上に置換を持つか、または119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、189位のうちの1つ以上に欠失を持つか、またはこれらの任意の組み合わせを持つ、項目1～10のいずれかに記載の方法。

20

16. 119位の残基がRではないか、123位の残基がPではないか、125位の残基がHではないか、126位の残基がEではないか、127位の残基がTではないか、129位の残基がLではないか、138位の残基がQではないか、140位の残基がAではないか、141位の残基がSではないか、151位の残基がIではないか、152位の残基がKではないか、153位の残基がKではないか、154位の残基がNではないか、155位の残基がDではないか、156位の残基がAではないか、185位の残基がAではないか、または189位の残基がNではない、項目1～10または15のいずれかに記載の方法。

17. 119位の非変異残基がRであるか、123位の非変異残基がPであるか、125位の非変異残基がHであるか、126位の非変異残基がEであるか、127位の非変異残基がTであるか、129位の非変異残基がLであるか、138位の非変異残基がQであるか、140位の非変異残基がAであるか、141位の非変異残基がSであるか、151位の非変異残基がIであるか、152位の非変異残基がKであるか、153位の非変異残基がKであるか、154位の非変異残基がNであるか、155位の非変異残基がDであるか、156位の非変異残基がAであるか、185位の非変異残基がAであるか、または189位の非変異残基がNである、項目1～10のいずれか1項、または項目15に記載の方法。

30

18. 119位の残基が、L、K、R、S、G、T、E、A、V、F、もしくはNであるか；123位の残基が、L、Y、I、M、N、S、V、K、G、T、もしくはRであるか；125位の残基が、L、D、N、G、W、M、I、R、K、F、A、もしくはSであるか；126位の残基が、S、R、I、G、N、Q、A、N、もしくはRであるか；127位の残基が、V、A、S、M、L、K、F、もしくはYであるか；129位の残基が、D、S、G、K、W、R、E、V、Q、A、I、もしくはFであるか；138位の残基が、G、D、E、L、A、M、V、F、R、もしくはSであるか；140位の残基が、T、G、S、R、D、K、Q、E、C、もしくはVであるか；141位の残基が、R、P、W、K、E、A、M、D、L、もしくはQであるか；151位の残基が、T、S、L、Y、K、N、もしくはQであるか；152位の残基が、A、P、T、Y、H、E、S、I、F、もしくはDであるか；153位の残基が、R、Q、T、N、S、F、P、V、もしくはKであるか；154位の残基が、L、T、D、R、P、S、もしくはHであるか；155位の残基が、N、G、K、H、T、L、S、I、P、もしくはQであるか；156位の残基が、T、F、R、S、D、P、H、G、A、もしくはNであるか；185位の残基が、L、D、N、G、E、F、S、L、Q、P、V、M、R、A、もしくはSであるか；または189位の残基が、Y、S、L、R、K、G、E、F、D、V、E、I、もしくはHである、項目1～10または15～17のいずれかに記載の方法。

40

50

19. 前記免疫ドミナントエпитープを形成する残基をコードするコドンのうちの2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、または17個が変異している、項目1～18のいずれかに記載の方法。

20. 前記変異HAが、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、または17個の置換を有する、項目1～19のいずれかに記載の方法。

21. 前記変異HAが、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、または17個の置換を有する、項目1～19のいずれかに記載の方法。

22. 前記変異HAが、前記1つ以上の免疫ドミナントエпитープ内に置換または欠失のない1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の残基を有する、項目1～21のいずれかに記載の方法。

10

23. 前記変異HAが、前記免疫ドミナントエпитープ内に置換または欠失のない少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、または45個の残基を有する、項目1～21のいずれかに記載の方法。

24. 前記変異ヘマグルチニンをコードする核酸分子を配列決定することをさらに含む、項目1～23のいずれかに記載の方法。

25. 親インフルエンザウイルスと比べて変化した免疫ドミナントエпитープを持つ変異ヘマグルチニンをコードするインフルエンザウイルスを作製する方法であって、

親H3 HA核酸分子において、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、または225位の残基についての2つ以上のコドンに、この親H3 HA内の免疫ドミナントエピトープの残基ではない残基をコードする変異を導入すること；および

20

この変異したH3 HAを持つ1種類以上のインフルエンザウイルスを単離または作製すること、

を含む方法。

26. 前記変異したH3が、サブドミナントエピトープに結合する抗体によって認識されるが、前記免疫ドミナントエピトープに結合する抗体によっては認識されない、項目25に記載の方法。

27. 前記変異したH3 HA内の121位の残基が、Q、R、I、L、V、S、F、Y、もしくはAであるか、131位の残基が、R、V、S、Q、C、V、Y、D、E、もしくはLであるか、135位の残基が、Y、K、N、V、W、G、S、V、もしくはPであるか、138位の残基が、W、K、I、F、R、もしくはLであるか、140位の残基が、L、M、T、S、R、K、M、Y、もしくはPであるか、142位の残基が、N、G、Y、Q、E、H、N、もしくはQであるか、144位の残基が、T、V、G、D、P、H、L、K、もしくはQであるか、145位の残基が、P、D、R、W、もしくはNであるか、155位の残基が、C、I、R、A、V、S、もしくはQであるか、156位の残基が、P、G、S、T、A、もしくはCであるか、157位の残基が、D、P、S、G、I、Q、R、もしくはTであるか、158位の残基が、R、V、S、A、K、C、Q、もしくはGであるか、171位の残基が、T、F、L、E、H、V、もしくはRであるか、189位の残基が、A、P、T、L、S、Y、もしくはRであるか、193位の残基が、Q、R、N、T、E、V、もしくはPであるか、212位の残基が、V、R、G、S、M、D、もしくはEであるか、または225位の残基が、L、P、C、S、Q、G、Y、もしくはFである、項目25または26に記載の方法。

30

28. H3内の、121位の残基がNではないか、131位の残基がTではないか、135位の残基がTではないか、138位の残基がAではないか、140位の残基がIではないか、142位の残基がRではないか、144位の残基がSではないか、145位の残基がSではないか、155位の残基がTではないか、156位の残基がHではないか、157位の残基がLではないか、158位の残基がNではないか、171位の残基がNではないか、189位の残基がKではないか、193位の残基がFではないか、212位の残基がAではないか、または225位の残基がDではない、項目25～27のいずれかに記載の方法。

40

29. H3内の、121位の残基がNであるか、131位の残基がTであるか、135位の残基がTであるか、138位の残基がAであるか、140位の残基がIであるか、142位の残基がRであ

50

るか、144位の残基がSであるか、145位の残基がSであるか、155位の残基がTであるか、156位の残基がHであるか、157位の残基がLであるか、158位の残基がNであるか、171位の残基がNであるか、189位の残基がKであるか、193位の残基がFであるか、212位の残基がAであるか、または225位の残基がDである、項目25～28のいずれかに記載の方法。

30．親インフルエンザウイルスと比べて変化した免疫ドミナントエピトープを持つ変異ヘマグルチニンをコードするインフルエンザウイルスを作製する方法であって、

親H5 HA核酸分子において、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、または189位の残基についての2つ以上のコドンに、この親H5 HA内の免疫ドミナントエピトープの残基ではない残基をコードする変異を導入すること；および

10

この変異したH5 HAを持つインフルエンザウイルスを単離または作製すること、を含む方法。

31．前記変異したH5が、サブドミナントエピトープに結合する抗体によって認識されるが、前記免疫ドミナントエピトープに結合する抗体によっては認識されない、項目30に記載の方法。

32．119位の残基がRではないか、123位の残基がPではないか、125位の残基がHではないか、126位の残基がEではないか、127位の残基がTではないか、129位の残基がLではないか、138位の残基がQではないか、140位の残基がAではないか、141位の残基がSではないか、151位の残基がIではないか、152位の残基がKではないか、153位の残基がKではないか、154位の残基がNではないか、155位の残基がDではないか、156位の残基がAではないか、185位の残基がAではないか、または189位の残基がNではない、項目30または31に記載の方法。

20

33．119位の残基が、L、K、R、S、G、T、E、A、V、F、もしくはNであるか；123位の残基が、L、Y、I、M、N、S、V、K、G、T、もしくはRであるか；125位の残基が、L、D、N、G、W、M、I、R、K、F、A、もしくはSであるか；126位の残基が、S、R、I、G、N、Q、A、N、もしくはRであるか；127位の残基が、V、A、S、M、L、K、F、もしくはYであるか；129位の残基が、D、S、G、K、W、R、E、V、Q、A、I、もしくはFであるか；138位の残基が、G、D、E、L、A、M、V、F、R、もしくはSであるか；140位の残基が、T、G、S、R、D、K、Q、E、C、もしくはVであるか；141位の残基が、R、P、W、K、E、A、M、D、L、もしくはQであるか；151位の残基が、T、S、L、Y、K、N、もしくはQであるか；152位の残基が、A、P、T、Y、H、E、S、I、F、もしくはDであるか；153位の残基が、R、Q、T、N、S、F、P、V、もしくはKであるか；154位の残基が、L、T、D、R、P、S、もしくはHであるか；155位の残基が、N、G、K、H、T、L、S、I、P、もしくはQであるか；156位の残基が、T、F、R、S、D、P、H、G、A、もしくはNであるか；185位の残基が、L、D、N、G、E、F、S、L、Q、P、V、M、R、A、もしくはSであるか；または189位の残基が、Y、S、L、R、K、G、E、F、D、V、E、I、もしくはHである、項目23～32のいずれかに記載の方法。

30

34．前記変異HAが、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、または17個の置換を有する、項目25～33のいずれかに記載の方法。

40

35．項目25～34のいずれかに記載の方法によって作製されたウイルス。

36．親ウイルスにおいて免疫ドミナントエピトープを形成する残基と比べて抗原性が異なる複数の残基を含むヘマグルチニンをそれぞれがコードする複数の異なる組み換えインフルエンザH3ウイルスを含む組成物であって、

該複数のインフルエンザウイルスのそれぞれが、H3内に、121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、もしくは225位のうちの2つ以上に置換を含むか、または121位、131位、135位、138位、140位、142位、144位、145位、155位、156位、157位、158位、171位、189位、193位、212位、もしくは225位のうちの1つ以上に欠失を

50

含むか、またはこれらの任意の組み合わせを含む、組成物。

37. 前記置換を持つ少なくとも3種類、4種類、または5種類の異なるウイルスを有する、項目36に記載の組成物。

38. 前記置換を持つ5～10種類の異なるウイルスを有する、項目36に記載の組成物。

39. 前記置換を持つ10～20種類の異なるウイルスを有する、項目36に記載の組成物。

40. 異なるそれぞれのウイルスが、抗原部位Aまたは抗原部位Bに少なくとも1個～5個の置換を持つ、項目36～39のいずれかに記載の組成物。

41. 異なるそれぞれのウイルスが、抗原部位Aおよび抗原部位Bに少なくとも1個～10個の置換を持つ、項目36～39のいずれかに記載の組成物。

42. 異なるそれぞれのウイルスが、対応する親ヘマグルチニンに結合する抗体への変化した結合を持つ、項目36～41のいずれかに記載の組成物。

43. 表1B中の1種類以上のウイルスを有する、項目36～42のいずれかに記載の組成物。

44. 表6中の1種類以上のウイルスを有する、項目36～42のいずれかに記載の組成物。

45. 親ウイルスにおいて免疫ドミナントエピトープを形成する残基と比べて抗原性が異なる複数の残基を含むヘマグルチニンをそれぞれがコードする複数の異なる組み換えインフルエンザH5ウイルスを含む組成物であって、

該複数のインフルエンザウイルスのそれぞれが、H5内に、119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、もしくは189位のうちの2つ以上に置換を含むか、または119位、123位、125位、126位、127位、129位、138位、140位、141位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、185位、もしくは189位のうちの1つ以上に欠失を含むか、またはこれらの任意の組み合わせを含む、組成物。

46. 前記置換を持つ少なくとも3種類、4種類、または5種類の異なるウイルスを有する、項目45に記載の組成物。

47. 前記置換を持つ5～10種類の異なるウイルスを有する、項目45に記載の組成物。

48. 前記置換を持つ10～20種類の異なるウイルスを有する、項目45に記載の組成物。

49. 異なるそれぞれのウイルスが、抗原部位Aまたは抗原部位Bに少なくとも1個～5個の置換を持つ、項目45～48のいずれかに記載の組成物。

50. 異なるそれぞれのウイルスが、抗原部位Aおよび抗原部位Bに少なくとも1個～10個の置換を持つ、項目36～48のいずれかに記載の組成物。

51. 異なるそれぞれのウイルスが、対応する親ウイルスHAに結合する抗体への変化した結合を持つ、項目36～50のいずれかに記載の組成物。

52. 表1または表6中の1種類以上のウイルスを有する、項目45に記載の組成物。

53. 少なくとも2種類、3種類、4種類、5種類、6種類、7種類、8種類、9種類、もしくは10種類の、またはそれよりも多い異なる組み換えインフルエンザウイルスを有する、項目36または56に記載の組成物。

54. 10～20種類の異なる組み換えインフルエンザウイルスを有する、項目36または56に記載の組成物。

55. 項目36～54のいずれかに記載の組成物の有効量を動物に投与することを含む、動物を免疫化する方法。

56. H5 HAを含み、このH5 HA内の、119位の残基が、L、K、R、S、G、T、E、A、V、F、もしくはNであるか；123位の残基が、L、Y、I、M、N、S、V、K、G、T、もしくはRであるか；125位の残基が、L、D、N、G、W、M、I、R、K、F、A、もしくはSであるか；126位の残基が、S、R、I、G、N、Q、A、N、もしくはRであるか；127位の残基が、V、A、S、M、L、K、F、もしくはYであるか；129位の残基が、D、S、G、K、W、R、E、V、Q、A、I、もしくはFであるか；138位の残基が、G、D、E、L、A、M、V、F、R、もしくはSであるか；140位の残基が、T、G、S、R、D、K、Q、E、C、もしくはVであるか；141位の残基が、R、P、W、K、E、A、M、D、L、もしくはQであるか；151

10

20

30

40

50

位の残基が、T、S、L、Y、K、N、もしくはQであるか；152位の残基が、A、P、T、Y、H、E、S、I、F、もしくはDであるか；153位の残基が、R、Q、T、N、S、F、P、V、もしくはKであるか；154位の残基が、L、T、D、R、P、S、もしくはHであるか；155位の残基が、N、G、K、H、T、L、S、I、P、もしくはQであるか；156位の残基が、T、F、R、S、D、P、H、G、A、もしくはNであるか；185位の残基が、L、D、N、G、E、F、S、L、Q、P、V、M、R、A、もしくはSであるか；189位の残基が、Y、S、L、R、K、G、E、F、D、V、E、I、もしくはHであるか、またはこれらの位置の残基が、これらの残基の任意の組み合わせである、単離されたインフルエンザウイルス。

【図面】

【図 1】

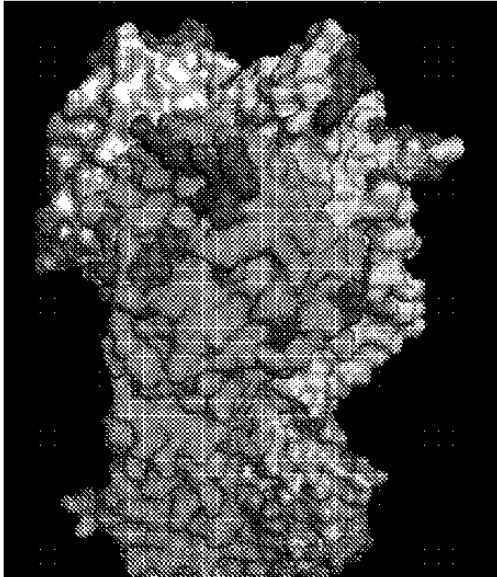


Figure 1

【図 2】

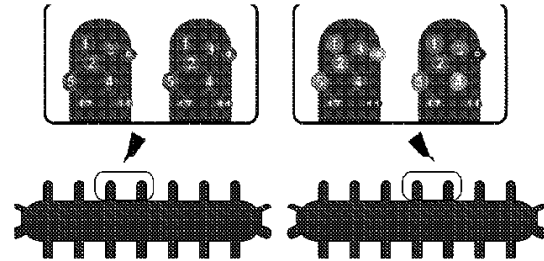


Figure 2

10

20

30

40

50

【図 3】

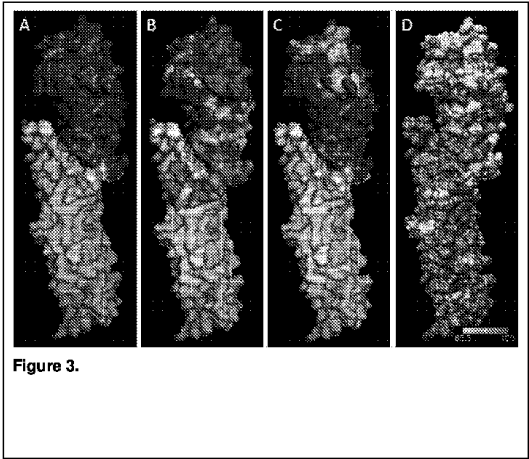


Figure 3.

【図 4】

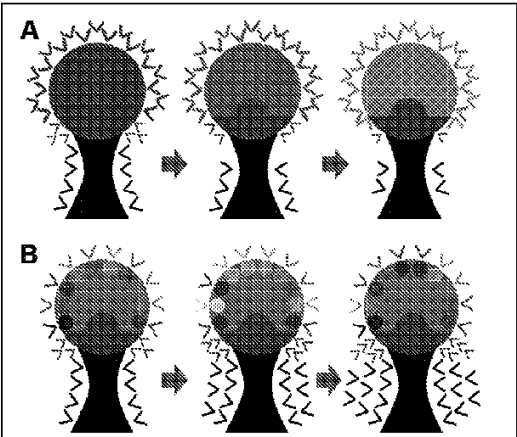


Figure 4.

【図 5】

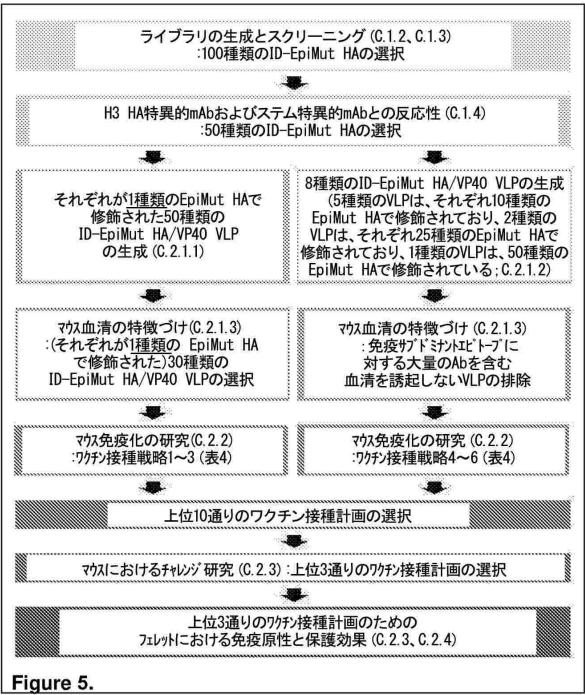


Figure 5.

【図 6 - 1】

Figure 6

定義 ヘマグルチニン 部分 [A型インフルエンザウイルス
(A/California/7/2004 (H3N2))]
アクセッション番号 ABH01021

```
1 qklpgndnst atlcighhav pngtvtktit ndqievtnat elvqssstgg icdsphqild
61 genctldidal lgdpqcdgfg nkkwdfver skaysncypy dvpyaslrsv lvasagtlef
121 nnesfnwtgv tngtssack rrsnnsffsr lnwlthlkfk ypalnvtmgn nekfdklyiw
181 gvhhpgtndd qislytqasg ritvstkrsg qtvipnigr prvrdisperi siywtivkpg
241 dillinstgn liaprgyfkf rsgkssimrs dapigkcnse citpngsign ckpfqnvri
301 tygacpryvk qntiklatgm rnvpekqtrg ifgaigagfie ngwegmvdgw ygrhqnseg
```

定義 ヘマグルチニン 部分 [A型インフルエンザウイルス
(A/California/7/2004 (細胞継代) (H3))]
アクセッション番号 AB037489

```
1 qklpgndnst atlcighhav pngtvtktit ndqievtnat elvqssstgg icdsphqild
61 genctldidal lgdpqcdgfg nkkwdfver skaysncypy dvpyaslrsv lvasagtlef
121 nnesfnwtgv tngtssack rrsnnsffsr lnwlthlkfk ypalnvtmgn nekfdklyiw
181 gvhhpgtndd qislytqasg ritvstkrsg qtvipnigr prvrdisperi siywtivkpg
241 dillinstgn liaprgyfkf rsgkssimrs dapigkcnse citpngsign ckpfqnvri
301 tygacpryvk qntiklatgm rnvpekqtrg ifgaigagfie ngwegmvdgw ygrhqnseg
361 igqaadlkst qaaingingk lnrligktne kfhqiekefs evegriqdle kyvedtkidl
421 wsynaellva lenghtidlt dsemnkifer tkkqlrenae dmpngqcfkiy hkcdnacigs
481 imtydhdv yrdelnrnf qikgvelsg yk
```

定義 ヘマグルチニン 部分 [A型インフルエンザウイルス
(A/California/7/2004 (卵継代) (H3))]
アクセッション番号 AB037490

```
1 qklpgndnst atlcighhav pngtvtktit ndqievtnat elvqssstgg icdsphqild
61 genctldidal lgdpqcdgfg nkkwdfver skaysncypy dvpyaslrsv lvasagtlef
121 nnesfnwtgv tngtssack rrsnnsffsr lnwlthlkfk ypalnvtmgn nekfdklyiw
181 gvhhpgtndd qislytqasg ritvstkrsg qtvipnigr prvrdisperi siywtivkpg
241 dillinstgn liaprgyfkf rsgkssimrs dapigkcnse citpngsign ckpfqnvri
301 tygacpryvk qntiklatgm rnvpekqtrg ifgaigagfie ngwegmvdgw ygrhqnseg
361 igqaadlkst qaaingingk lnrligktne kfhqiekefs evegriqdle kyvedtkidl
```

【図 6 - 2】

421 wsynaellva lenghtidlt dsemnkifer tkkqlrenae dmngngefkiy hkcdnacigs
481 irngtydhdv yrdealnrrf qikgvelkas yk

アクセッション番号 ATD11305

1 mktliaisci lelvtqkip gndnstatic lghhavgnt ivktiitndri evtnatelvq
61 nssigeicds phgildgenc tlidaligdp qodgfnkkw dlfvernkay snocpydvpd
121 yasrlslvas sgtiefnnes fnwagvtqng tssscirysk sssffsrlwl thlnskypal
181 nvtmnpnegf dkliywvhh pgtdkdqial yaqssgritv stkrsggavi pnigsrpir
241 disperisiyw tivkpqdill instgnliap rgyfkiregk ssimrsdapi gkoksecitp
301 ngsipndkpf gnvnrityga cpriyvksstl klatgmrvp erqtrgfiga iagfiengwe
361 gmvdgwygfr bqnaegrga adlktqaa dqingklrnl igktnekhq iekfseveg
421 rigdlekyve dtkidlwyn aellvaleng htidltsem nklfekttkq lrenaedmgn
481 gcfktyhkcd nacigsirng tydhnyvrde alnrrfqiak velksygdw ilwisfaisc
541 flleavallgf inwacqkgni renici

配列: gb:KP307984|gi:748112957|UniProtKB:A0A0C4X0C0|
生物: A型インフルエンザウイルス(A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014(H5N8)) |
株名: A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014|タンパク質名: HAヘマグルチニン|
遺伝子の記号: HA|セグメント: 4|垂型: H5N8|宿主: ハヤブサ

MEKIVLLAV ISLVKSDQIC IGYHANNSTK QVDTIMEKNV TVTHAQDILE 050
KTNGKLCOL NGVKPLIKD CSVAGWLLGN FMCDEFIRVP EWSYIVERAN 100
PANDLCYPTG LNDYEELKHL LSRINHFET LIIFRSSWPN HETSLGVSA 150
CPYQGASSFF RNVVLIKKN DAYPTIKISY NNTNREDLLI LWGIHSSNA 200
AEQTNLYKNP DTYVSVGTST LNRQLVPKIA TRSQVNGQSG RMDFFWTILK 250
PNDAIHFESN GNPIAPEYAY KIVVKGDSTI MKSEMEYGHG NTKCQTPIGA 300
INSSMFFHNI HPLTIGCEPK YVKNKLVLTA TGLNNSPLRE RRRKGLFGA 350
IAGFIEGGWQ GMDVGWYGYH HSNEQSGSYA ADRESTQRAI DGVINKVNSI 400
IDKMTQFEA VGREFNLER RIENLANKME DGFLOVWTYN AELLVIMENE 450
RTLDFHDSNV RNLYDKVRLQ LRDNAKELGN GCFFFYHKCD NECMESVRNG 500
TYDYPKYSEE AILKREEISG VKLESIGTYQ ILSIYSTVAS SLALAIIVAG 550
LSLWMCNNGS LQCRICI 567

【図 8】

Figure 8
MKANLLVLLCALAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTH
SVNLLED SHNGKLCRLKGIAPLDLGKCNIA GWLLGNPECDPLLPVR
SWSYVETPNSENGICYPGDFDYEEELREQLSSVSSEFERFEIPKESS
WPNHNTNGYTAACSHEGKSSPYRNLLWLTEKEGSYPKLKNSYVNG
KGKEVLVLWGIIHPPNKSKEQQLYQNEAAYVSVITSNYNRRTPE
IAERP KVRDQAGRMNYWTLLKPGDTIIFEA NGNLAPMYAFALS
RGFGSGIITSNASMHFCNTKQDTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECR
KYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGA IAGFIEGGWWTGMIDGWY
GYHHQNEQGS GYAADQKSTQNAINGITNKYNVIEKMNIOFTAV
GKEFNKLEKRMENLKKVDDGFIDWITYNALLVLENERITDFV
DSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGT
YDYPKYSEESKLNRKVDGVKLES MG IYQILAIYSTVASSLVLLVS
GAISFWMCNNGSLOCRIC

【図 7】

Figure 7
配列: gb:KP307984|gi:748112957|UniProtKB:A0A0C4X0C0
|生物: A型インフルエンザウイルス(A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014(H5N8))
|株名: A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014|タンパク質名: HAヘマグルチニン|
遺伝子の記号: HA|セグメント: 4|垂型: H5N8|宿主: ハヤブサ

MEKIVLLAV ISLVKSDQIC IGYHANNSTK QVDTIMEKNV TVTHAQDILE 050
KTNGKLCOL NGVKPLIKD CSVAGWLLGN FMCDEFIRVP EWSYIVERAN 100
PANDLCYPTG LNDYEELKHL LSRINHFET LIIFRSSWPN HETSLGVSA 150
CPYQGASSFF RNVVLIKKN DAYPTIKISY NNTNREDLLI LWGIHSSNA 200
AEQTNLYKNP DTYVSVGTST LNRQLVPKIA TRSQVNGQSG RMDFFWTILK 250
PNDAIHFESN GNPIAPEYAY KIVVKGDSTI MKSEMEYGHG NTKCQTPIGA 300
INSSMFFHNI HPLTIGCEPK YVKNKLVLTA TGLNNSPLRE RRRKGLFGA 350
IAGFIEGGWQ GMDVGWYGYH HSNEQSGSYA ADRESTQRAI DGVINKVNSI 400
IDKMTQFEA VGREFNLER RIENLANKME DGFLOVWTYN AELLVIMENE 450
RTLDFHDSNV RNLYDKVRLQ LRDNAKELGN GCFFFYHKCD NECMESVRNG 500
TYDYPKYSEE AILKREEISG VKLESIGTYQ ILSIYSTVAS SLALAIIVAG 550
LSLWMCNNGS LQCRICI 567

【図 9】

Figure 9
1 maiylilf tavgdqici gyhannstek vtilernvt vthakdleik thngkckln
61 gipplelgdc siagwllgn ecdrlsvpe wsiyimeken rdgicypgsf ndyeelkhll
121 ssvkhfekvk ilpkdrwtqh tttggsraca vsgnpsffrn mwltekgsn ypvaksgynn
181 tsgeqliiw gvhhpndete qrtlyqnvgt yvsvgtstln krstpeiatr pkvngqggrrm
241 efswtlldmw dtinfestgn liapeygfki skrgsgimk tegtlencet kcqtplgain
301 ttlfphnhvp ltigecpkpyv ksekivlatg lrvnpqiesr glfgaia gfi eggwqgmvdg
361 wygyhhsndq gsgyaadkes tqkafdgitr knsviekmn tqfeavgkef snlerrlenl
421 nkkmedgfid vrtynaellv lmenertldf hdsnvknlyd kvrmqlrdrv kelngcfef
481 yhkcddecnm svknngtydyp kyeesklr neikgvklss mgvyqilaiy atvagslsla
541 immagisfwm csngslqrci ci

10

20

30

40

50

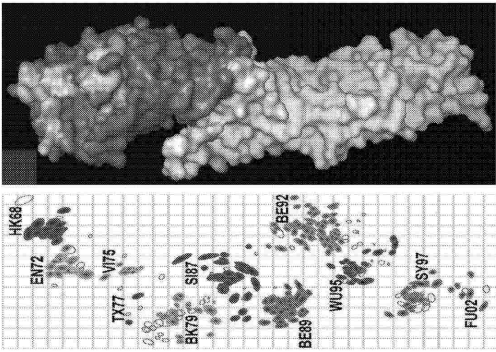
【図 1 0】

Figure 10

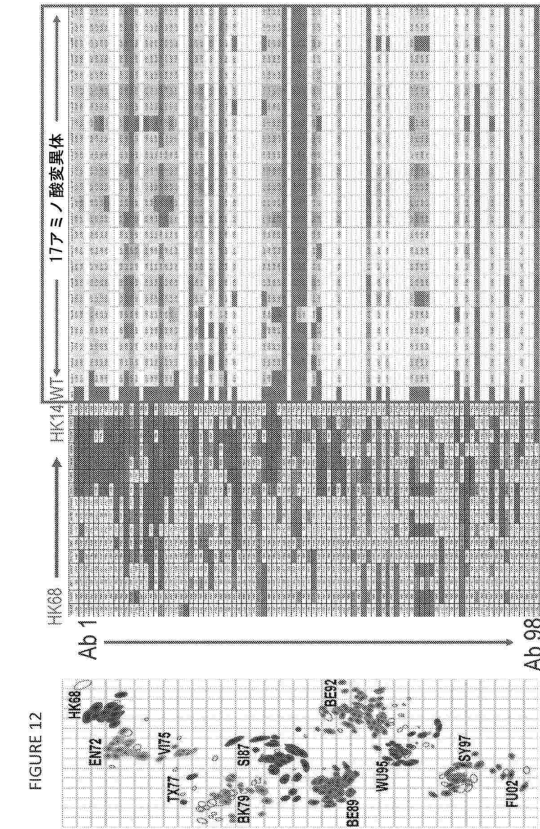
1 maiylilif tavgdqici gyhannstek vdtlernvt vthakdilek thngkckln
61 gipplelgdc siagwllgnp ecdrlsvpe wsyimekenp rdgclypgsf ndyeelkhll
121 ssvkhfekvk ilpkdrwtqh ttggsraca vsnpsffrn mvwhtekgsn ypvakgsynn
181 tsgeqmliiw gvhhpnmete qrtlyqnvgt yvsvgtstln krstpelatr pkvngqggm
241 efswtlmdw dtinfestgn liapeygfki skrgssgimk tegtlencet kcqtplgain
301 ttpfhnvhp ltigecpkv kseklvatg lrvvpqiesr glfgaiagfi eggwqgmvg
361 wygyhnsdq gsgyaadkes tqkafdgitn kvnsviekmn tqfeavgkef snlerleni
421 nkkmedgfid vwtynaellv lmenertldf hdsnvknlyd kvrmqirdnv kelngcfef
481 yhkcddecnm svkngtydyp kyeeesklmr neikgvklss mgvyqilaiy atvagsisla
541 immagisfwm csngslqcri ci

【図 1 1】

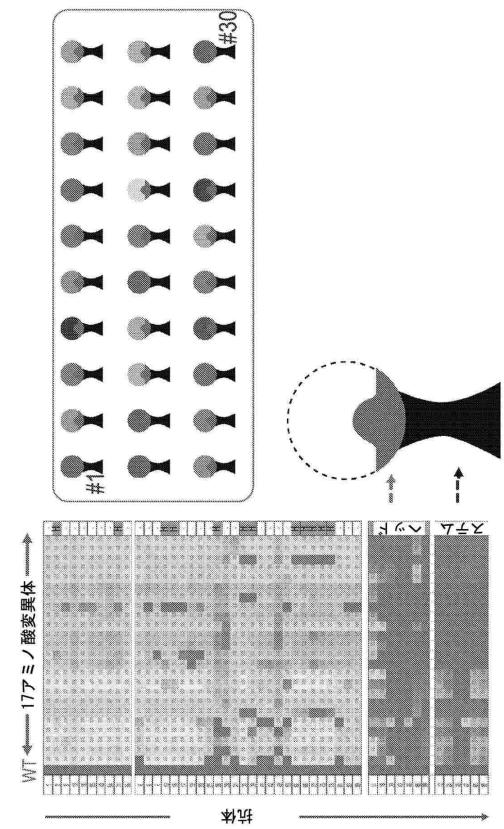
位置	変異体																													
	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	22	23	24	25	26	27	28	29	30			
1		N	Y	M	K	Q	V	V	R	T	I	A	V	V	S	V	L	R	V	F	S	F								
2		T	V	R	R	K	V	G	T	M	K	C	C	S	Q	R	R	D	R	V										
3		T	V	G	T	R	V	K	L	N	S	L	T	V	N	I	Y	S	K	W										
4		A	K	D	A	F	T	W	R	K	R	I	L	K	R	T	V	K	T	S										
5		I	W	F	L	M	H	M	C	T	T	N	K	R	S	R	K	N	T	G	N	M								
6		R	S	T	D	N	N	E	G	S	G	D	R	F	Q	E	T	G	A	N	R	H								
7		S	G	D	A	T	T	R	V	G	D	A	G	P	K	G	H	N	T	E	V	A	Q							
8		S	P	R	G	P	R	F	R	S	W	V	D	T	S	S	R	Q	K	P	P									
9		T	V	C	M	C	V	A	I	Y	R	Q	A	I	R	V	Q	W	T	P	Q									
10		H	G	A	T	P	A	S	G	P	S	S	S	A	P	T	K	P	L	T	H	G								
11		L	V	N	S	D	L	P	L	S	R	R	G	S	I	L	R	S	W	R	M	R								
12		N	R	G	P	R	H	V	V	Q	S	L	F	A	P	K	R	F	P	G	R	K	C							
13		N	D	R	K	T	T	R	F	T	F	Q	T	L	Q	E	H	S	R	L	F	T								
14		K	N	E	D	A	I	R	T	F	A	L	E	A	N	P	L	F	S	Y	S	T								
15		F	A	G	G	Q	S	T	R	A	Q	R	A	P	S	N	T	T	S	Q	A	N	E							
16		A	Q	N	L	V	I	R	R	G	R	Y	S	T	V	M	V	M	P	F	A									
17		D	K	K	E	L	P	S	P	T	C	E	G	S	S	Q	G	S	R	N	S	C	Y							



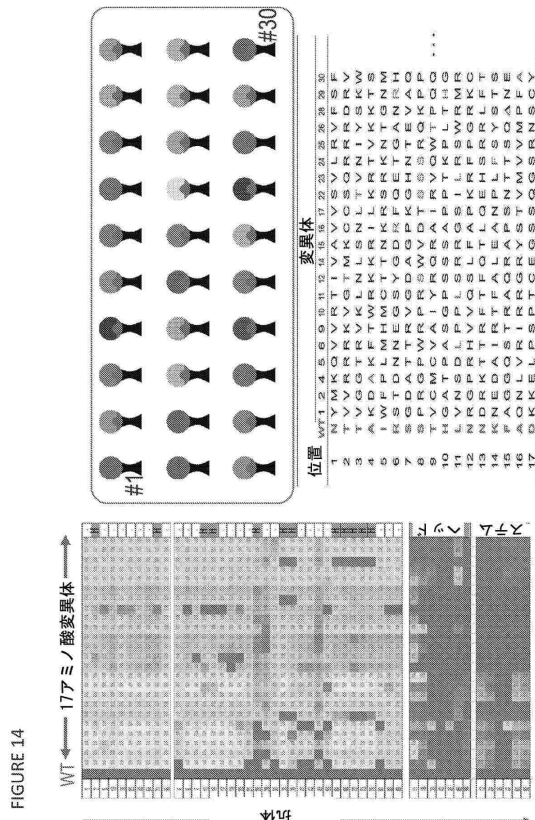
【図 1 2】



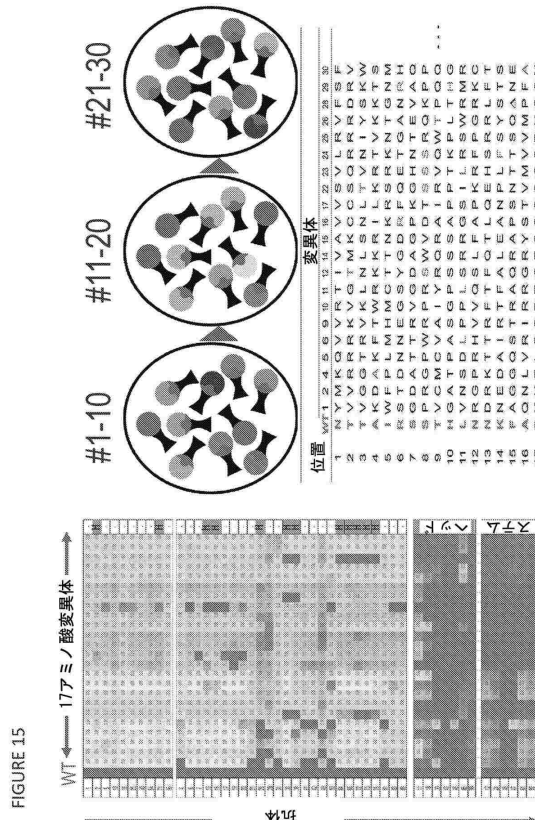
【図 1 3】



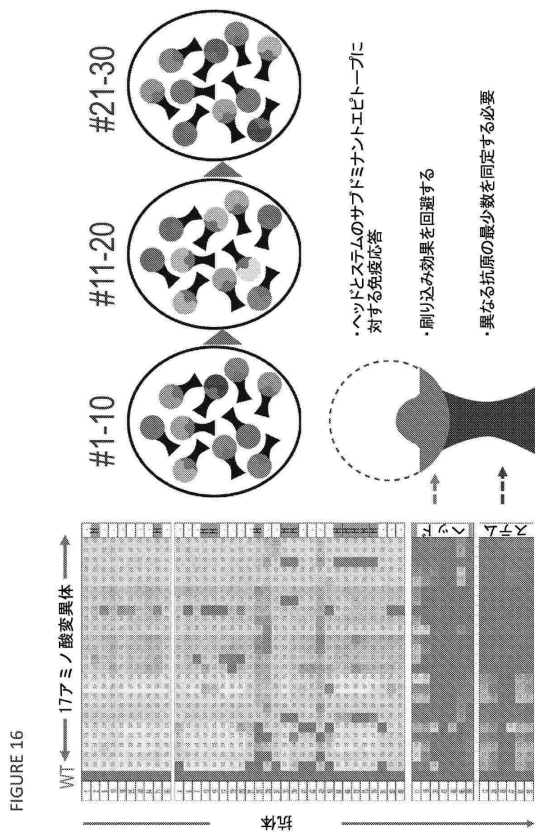
【図 14】



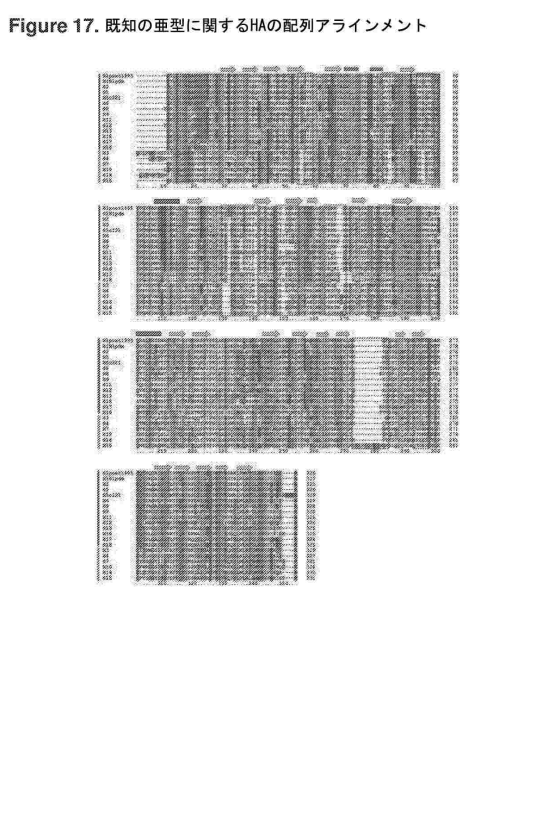
【図 15】



【図 16】



【図 17】



10

20

30

40

50

【図 18】

Figure 18. H3 HA内の代表的な抗原部位

A		B		C		E	
122	T	128	T	44	Q	96	N
124	G	129	G	45	S	102	V
126	T	155	T	46	S	103	P
130	V	156	K	47	S	117	T
131	T	157	S	48	T	121	I
132	Q	158	G	50	K	167	T
133	N	159	S	51	I	170	N
135	R	160	T	53	N	171	N
137	N	163	V	54	N	172	D
138	A	164	L	273	P	173	N
140	K	165	N	275	D	174	F
142	G	186	S	276	T	175	D
143	P	187	T	278	I	176	K
144	G	188	N	279	S	177	L
145	S	189	Q	280	E	179	I
146	G	190	E	294	F	182	I
150	R	192	T	297	V	201	R
152	N	193	S	299	K	203	T
168	M	194	L	300	I	207	R
		196	V	304	A	208	R
		197	Q	305	C	209	S
		198	A	307	K	212	T
				308	Y	213	I
				309	V	214	I
				310	K	215	P
				311	Q	216	N
				312	N	217	I
						218	G
						219	S
						226	L
						227	S
						228	S
						229	R
						230	I
						238	K
						240	G
						242	V
						244	V
						246	N
						247	S
						248	N

10

20

【配列表】

0007655849000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 37/04 (2006.01)
C 4 0 B 40/08 (2006.01)

F I

A 6 1 P 37/04
C 4 0 B 40/08

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100170852

弁理士 白樫 依子

(72)発明者 河岡 義裕

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 5 6 2, ミドルトン, エアポート ロード 8 7 2 2

(72)発明者 ガブリエーレ ノイマン

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 7, マディソン, ランドルフ ドライブ 2 3 4, アパートメント 3 1 6

(72)発明者 コン ホイホイ

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 0 5, マディソン, イーグル ハイツ 9 0 5, アpartment エー

審査官 西 賢二

(56)参考文献

特表 2 0 1 3 - 5 1 8 0 5 9 (J P, A)

米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 1 5 9 2 9 (U S, A 1)

特開 2 0 0 7 - 2 5 9 7 5 8 (J P, A)

特表 2 0 0 8 - 5 0 0 0 4 1 (J P, A)

特表 2 0 1 5 - 5 0 1 1 4 1 (J P, A)

Li, C. et al., Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses, Nat. Microbiol., 2016年, Vol. 1: 16058, pp. 1-10

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)