

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-506416

(P2016-506416A)

(43) 公表日 平成28年3月3日(2016.3.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	4 B O 2 4
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G 4 H O 4 5
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-552058 (P2015-552058)	(71) 出願人	504389991
(86) (22) 出願日	平成26年1月10日 (2014.1.10)		ノバルティス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成27年7月8日 (2015.7.8)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/050414		3 5
(87) 国際公開番号	W02014/108515	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成26年7月17日 (2014.7.17)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	61/751,077	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成25年1月10日 (2013.1.10)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	バーソレット ジラルディン, シルヴィー カーリーヌ
			イタリア国 イー53100 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバル ティス ヴァクシンズ アンド ダイア グノスティクス エス. アール. エル
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルス免疫原性組成物およびその使用

(57) 【要約】

R N A 成分およびポリペプチド成分を含む免疫原性組成物。この R N A 成分は自己複製 R N A である。このポリペプチド成分は、インフルエンザウイルス抗原に由来するエピトープ（第 1 のエピトープ）を含み、そしてこの R N A 成分は、インフルエンザウイルス抗原に由来するエピトープ（第 2 のエピトープ）をまた含むポリペプチドをコードする。これら 2 つの異なる様式におけるエピトープの送達は、この R N A 単独またはこのポリペプチド単独を用いた免疫化と比較して、インフルエンザウイルスに対する免疫反応を増強し得る。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫原性組成物であって：(i) インフルエンザウイルス抗原に由来する第 1 のエピトープを含む第 1 のポリペプチド抗原をコードする自己複製 RNA 分子と；(ii) インフルエンザウイルス抗原に由来する第 2 のエピトープを含む第 2 のポリペプチド抗原と；を含み、ここにおいて：

(a) 該第 1 のエピトープおよび該第 2 のエピトープが、両方ともインフルエンザのヘマグルチニンに由来し；

(b) 該第 1 のエピトープおよび該第 2 のエピトープが、両方ともインフルエンザ A ウイルスに由来し；そして / または

(c) 該第 1 のエピトープおよび該第 2 のエピトープが、両方ともインフルエンザ B ウイルスに由来する、
免疫原性組成物。

10

【請求項 2】

前記第 1 のエピトープおよび前記第 2 のエピトープが、両方ともインフルエンザ A ウイルスのヘマグルチニンに由来する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

前記第 1 のエピトープおよび前記第 2 のエピトープが、両方とも同じサブタイプのインフルエンザ A ウイルスのヘマグルチニンに由来し、例えば、両方とも H 5 ヘマグルチニンに由来する、請求項 2 に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 4】

前記第 1 のエピトープおよび前記第 2 のエピトープが、異なるサブタイプのインフルエンザ A ウイルスのヘマグルチニンに由来する、請求項 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

前記第 1 のエピトープおよび前記第 2 のエピトープが、両方とも同じインフルエンザ A ウイルスのヘマグルチニンに由来する、請求項 3 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

前記第 1 のエピトープおよび前記第 2 のエピトープが、両方ともインフルエンザ B ウイルスのヘマグルチニンに由来する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

前記第 1 のエピトープおよび前記第 2 のエピトープが、両方とも同じ系統のインフルエンザ B ウイルスのヘマグルチニンに由来する、請求項 6 に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 8】

前記第 1 のエピトープおよび前記第 2 のエピトープが、両方とも同じインフルエンザ B ウイルスのヘマグルチニンに由来する、請求項 7 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

前記第 1 のエピトープおよび前記第 2 のエピトープが同一である、いずれかの前記請求項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

前記第 1 のポリペプチド抗原および前記第 2 のポリペプチド抗原が、少なくとも 2 つの B 細胞エピトープを共有する、いずれかの前記請求項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 11】

(a) 前記第 1 のポリペプチド抗原および前記第 2 のポリペプチド抗原が、共通のアミノ酸配列であって、複数のエピトープを含み、そして 80 個のアミノ酸もしくはそれより長いアミノ酸、例えば、120 個のアミノ酸もしくはそれより長いアミノ酸、である、アミノ酸配列を共有し、そして / または (b) 該第 1 のポリペプチド抗原および該第 2 のポリペプチド抗原が、互いに少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する、いずれかの前記請求項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

前記自己複製 RNA が、アルファウイルス由来 RNA レプリコンである、いずれかの前

50

記請求項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

前記自己複製RNA分子が、1つもしくはそれより多くの修飾されたヌクレオチドを含む、いずれかの前記請求項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

(i) リポソーム、(ii) 毒性がなくそして生分解性のポリマー微粒子、または(iii) カチオン性サブミクロン水中油型エマルジョンを含む、いずれかの前記請求項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

前記第2のポリペプチド抗原が、不活化されたインフルエンザウイルスワクチン、例えば、全ビリオンワクチン、スプリットビリオンワクチンまたは精製された表面抗原ワクチン、である、いずれかの前記請求項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 16】

前記不活化されたインフルエンザウイルスワクチンが、アジュバント化されている、例えば、水中油型エマルジョンアジュバントでアジュバント化されている、請求項15に記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

前記第2のポリペプチド抗原が、組み換えヘマグルチニンである、請求項1～請求項14のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

インフルエンザ疾患および/またはインフルエンザ感染症を処置または予防するための方法であって、それを必要としている被験者に、治療的に有効量の請求項1～請求項17のいずれか1項に記載の組成物を投与する工程を含む、方法。

20

【請求項 19】

被験者において免疫反応を誘導するための方法であって、それを必要としている被験者に、治療的に有効量の請求項1～請求項17のいずれか1項に記載の組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 20】

インフルエンザウイルス抗原に由来する第2のエピトープを含むポリペプチド抗原とともに使用するための、インフルエンザウイルス抗原に由来する第1のエピトープを含むポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子であって；ここにおいて(a) 該第1のエピトープおよび該第2のエピトープが、両方ともインフルエンザのヘマグルチニンに由来し；(b) 該第1のエピトープおよび該第2のエピトープが、両方ともインフルエンザAウイルスに由来し；そして/または(c) 該第1のエピトープおよび該第2のエピトープが、両方ともインフルエンザBウイルスに由来する、自己複製RNA分子。

30

【請求項 21】

インフルエンザウイルス抗原に由来する第1のエピトープを含むポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子とともに使用するための、インフルエンザウイルス抗原に由来する第2のエピトープを含むポリペプチド抗原であって；ここにおいて(a) 該第1のエピトープおよび該第2のエピトープが、両方ともインフルエンザのヘマグルチニンに由来し；(b) 該第1のエピトープおよび該第2のエピトープが、両方ともインフルエンザAウイルスに由来し；そして/または(c) 該第1のエピトープおよび該第2のエピトープが、両方ともインフルエンザBウイルスに由来する、ポリペプチド抗原。

40

【請求項 22】

前記ポリペプチド抗原が、不活化されたインフルエンザウイルス抗原である、請求項20における使用のための自己複製RNA分子、または請求項21における使用のためのポリペプチド抗原。

【請求項 23】

(a) インフルエンザウイルス抗原に由来するエピトープを含むポリペプチドを含む第1のキット成分と、(b) インフルエンザウイルス抗原に由来するエピトープを含むポリ

50

ペプチドをコードする自己複製RNAを含む第2のキット成分と、を含むキット。

【請求項24】

前記第1のキット成分および前記第2のキット成分が、混合されて請求項1～請求項17のいずれか1項において定義される通りの組成物を提供することができる、請求項23に記載のキット。

【請求項25】

前記第1のキット成分が、必要に応じてアジュバント化されている不活化されたインフルエンザウイルスワクチン（例えば、全ビリオンワクチン、スプリットビリオンワクチンまたは精製された表面抗原ワクチン）である、請求項23または請求項24に記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、2013年1月10日に出願された米国仮出願第61/751,077号に対して利益を主張し、これの全体の内容が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

政府補助の記述

本発明は、国防高等研究計画局（DARPA）によって与えられた契約番号第HR0011-12-3-0001号の下で、部分的に政府補助とともになされた。政府は本発明に対して特定の権利を有する。

20

【0003】

技術分野

本発明は、インフルエンザウイルスに対する免疫化のための、RNAおよびタンパク質の混合物の、ウイルスによらない送達の実践におけるものである。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

核酸を基礎とするワクチンは、免疫化に対する魅力的なアプローチである。例えば、国際公開第2012/006369号は、この目的のための自己複製RNA分子の使用を開示しており、そして国際公開第2013/006842号は、第1のポリペプチドが第2のポリペプチドをコードする自己複製RNAとともに共送達されるアプローチを記載している。この2つのポリペプチドは同じ病原体に由来するが、同じポリペプチドである必要はない。したがって、国際公開第2013/006842号は、それらはエピトープを共有してもよいが、または異なるエピトープを有してもよいが、同じ病原体に由来しなければならない、と開示している。これは、二つの異なる形態におけるエピトープ（RNAにコードされた形態における、病原体由来の第1のエピトープ；およびポリペプチドの形態における、同じ病原体由来の第2のエピトープ）を送達する組成物を提供しており、これは、このRNA単独またはこのポリペプチド単独を用いた免疫化と比較したとき、この病原体に対する免疫反応を増強し得る。

30

【0005】

自己複製RNAを使用する、免疫化に対してのさらなるアプローチを提供することが本発明の目的である。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2012/006369号

【特許文献2】国際公開第2013/006842号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

50

発明の開示

概して、本発明は、RNA成分およびポリペプチド成分を含む免疫原性組成物に関する。以下でより詳細に記載される通り、このRNA成分は自己複製RNAである。このポリペプチド成分は、インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープ（第1のエピトープ）と、インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープ（第2のエピトープ）をまた含むポリペプチドをコードするRNA成分とを含む。国際公開第2013/006842号において記載される通り、これらの2つの異なる様式においてエピトープを送達する免疫原性組成物は、このRNA単独またはこのポリペプチド単独を用いた免疫化と比較したとき、病原体（インフルエンザウイルス）に対する免疫反応を増強し得る。

【0008】

10

したがって、本発明は、（a）インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープを含むポリペプチドと、（b）インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープを含むポリペプチドをコードする自己複製RNAとを含む免疫原性組成物を提供する。

【0009】

本発明は、（a）インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープを含むポリペプチドを含む第1のキット成分と、（b）インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープを含むポリペプチドをコードする自己複製RNAとを含む免疫原性組成物を含む第2のキット成分とを含むキットもまた提供する。

【0010】

本発明は、上述した通りの、RNA分子およびポリペプチド分子の共送達（併用投与）によって、インフルエンザウイルス疾患および／または感染症を処置および／または予防するための方法、インフルエンザウイルスに対する免疫反応を誘導するための方法、ならびに被験者にワクチン接種するための方法もまた提供する。

20

【0011】

本発明は、上述した通りの、RNA分子およびポリペプチド分子の順次投与（プライム-ブースト）によって、インフルエンザウイルス疾患および／または感染症を処置および／または予防するための方法、インフルエンザウイルスに対する免疫反応を誘導するための方法、ならびに被験者にワクチン接種するための方法もまた提供する。

【0012】

本発明の第1の実施形態において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方ともインフルエンザヘマグルチニン（HA）に由来する。

30

【0013】

第2の実施形態において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方ともインフルエンザAウイルスに由来する。理想的には、それらは両方とも、同じHAサブタイプを有するインフルエンザAウイルス株に由来し、例えば、両方ともH5サブタイプのインフルエンザAウイルスに由来する。この実施形態の特定の局面において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方とも、同じHAサブタイプ由来のヘマグルチニンのエピトープである。しかし、第1のエピトープおよび第2のエピトープは、異なるHAサブタイプ、例えば、H1株由来のものおよびH5株由来のもの、を有するインフルエンザAウイルス株に由来することもまた可能である。

40

【0014】

第3の実施形態において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方ともインフルエンザBウイルスに由来する。この実施形態の特定の局面において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方ともインフルエンザBウイルス由来のヘマグルチニンのエピトープである。

【0015】

第4の実施形態において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方とも、B/Yamagata/16/88様系統中のインフルエンザBウイルス株に由来する。この実施形態の特定の局面において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方とも、B/Yamagata/16/88様系統中のインフルエンザBウイルス株由来のヘマグ

50

ルチニンのエピトープに由来する。

【0016】

第5の実施形態において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方とも、B/Victoria/2/87様系統中のインフルエンザBウイルス株に由来する。この実施形態の特定の局面において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方とも、B/Victoria/2/87様系統中のインフルエンザBウイルス株由来のヘマグルチニンのエピトープに由来する。

【発明を実施するための形態】

【0017】

インフルエンザウイルス抗原

インフルエンザウイルスには、3つの型（A、BおよびC）がある。インフルエンザAウイルスは、ヒト、動物および鳥類に感染する最も一般的なインフルエンザウイルスである。インフルエンザBウイルス感染は殆どがヒトにおいて発生する。インフルエンザCウイルスの感染は、ヒトまたは動物においていずれの重篤な症状も引き起こさない。

【0018】

インフルエンザウイルス株は季節ごとに変化し得る。近年のパンデミック間期において、近年の季節毎の3価ワクチンは、2種類のインフルエンザA株（1種類のH1N1株および1種類のH3N2株）ならびに1種類のインフルエンザB株を含む。パンデミックインフルエンザ株の特徴は以下のものである：（a）近年流行しているヒト株におけるヘマグルチニンと比較して新しいヘマグルチニン、すなわち、10年以上にわたってヒト集団中で顕性でなかったもの（例えばH2）、または以前にヒト集団中で全く見られなかったもの（例えば、一般的に、鳥類集団中にのみ見出されるH9）、を含み、そのため、ワクチン接種者および一般のヒト集団は、それらの株のヘマグルチニンに対して免疫学的にナイーブである；（b）ヒト集団内で水平に伝染し得る；そして（c）ヒトに対して病原性である。一般的に、パンデミック株はH2、H5、H6、H7またはH9サブタイプのインフルエンザAウイルス株、例えば、H5N1株、H5N3株、H9N2株、H2N2株、H6N1株、H7N1株、H7N7株およびH7N9株である。H5サブタイプの中において、あるウイルスは異なる複数の分岐群に分類され得る。

【0019】

近年、インフルエンザAウイルスは、17種類のHAサブタイプ：H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16およびH17を提示する。それはまた、9種類のNA（ノイラミニダーゼ）サブタイプ：N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8およびN9を提示する。

【0020】

近年、インフルエンザBウイルスは異なるHAサブタイプを提示しないが、インフルエンザBウイルス株は2つの異なる系統に分類される。これらの系統は1980年代後期に出現した。そして、これらの系統は、抗原的および/または遺伝的に互いに区別され得るHAを有する（Rota et al. (1992) J Gen Virol 73:2737-42）。近年のインフルエンザBウイルス株は、B/Victoria/2/87様であるか、またはB/Yamagata/16/88様であるかのいずれかである。これら2つの系統中の株は、通常は抗原的に区別されるが、アミノ酸配列における相違もまた、それらを区別するために記載されており、例えば、B/Yamagata/16/88様の株は多くの場合（常にではないが）、「Lee40」HA配列（GenBank配列GI:325176）に関する番号でアミノ酸残基164に欠失を有するHAタンパク質を有する。

【0021】

いくつかの実施形態において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは両方ともインフルエンザウイルスのヘマグルチニンに由来する。例えば：（a）第1のエピトープはインフルエンザAウイルスのヘマグルチニンに由来してもよく、そして第2のエピトープはインフルエンザBウイルスのヘマグルチニンに由来してもよかった；（b）第1のエピ

10

20

30

40

50

トープはインフルエンザ A ウイルスのヘマグルチニンに由来してもよく、そして第 2 のエプトープはインフルエンザ A ウイルスのヘマグルチニンに由来してもよかった；または (c) 第 1 のエプトープはインフルエンザ B ウイルスのヘマグルチニンに由来してもよく、そして第 2 のエプトープはインフルエンザ B ウイルスのヘマグルチニンに由来してもよかった。理想的には、これら 2 つのエプトープは両方とも、同じインフルエンザウイルス型に由来し、例えば、両方とも A に由来するか、または両方とも B に由来する。

【 0 0 2 2 】

第 1 のエプトープおよび第 2 のエプトープが両方ともインフルエンザ A ウイルスに由来する実施形態において、理想的には、それらは、両方ともヘマグルチニンのエプトープであり、そして同じ H A サブタイプを有するインフルエンザ A ウイルス株に由来する。例えば、両方のエプトープは、H 1 ヘマグルチニン、H 2 ヘマグルチニン、H 3 ヘマグルチニン、H 4 ヘマグルチニン、H 5 ヘマグルチニン、H 6 ヘマグルチニン、H 7 ヘマグルチニン、H 8 ヘマグルチニン、H 9 ヘマグルチニン、H 1 0 ヘマグルチニン、H 1 1 ヘマグルチニン、H 1 2 ヘマグルチニン、H 1 3 ヘマグルチニン、H 1 4 ヘマグルチニン、H 1 5 ヘマグルチニン、H 1 6 ヘマグルチニンまたは H 1 7 ヘマグルチニンに由来することが可能であった。特定の実施形態において、両方のエプトープは H 1 ヘマグルチニン、H 3 ヘマグルチニンまたは H 5 ヘマグルチニンに由来する。しかし、上述の通り、第 1 のエプトープおよび第 2 のエプトープが両方ともインフルエンザ A ウイルスのヘマグルチニンのエプトープであるが、異なる H A サブタイプを有するインフルエンザ A ウイルス株に由来することもまた可能である（この場合において、これら 2 つのエプトープが、それでも、同じ抗 H A 抗体によって認識され得ることは依然として可能であり、例えば、これら 2 つの H A サブタイプが交差反応性のエプトープを共有する場合である）。

【 0 0 2 3 】

第 1 のエプトープおよび第 2 のエプトープが両方ともインフルエンザ B ウイルスに由来する実施形態において、理想的には、それらは、両方ともヘマグルチニンのエプトープであり、そして同じ系統中のインフルエンザ B ウイルス株に由来する。例えば、両方のエプトープは B / V i c t o r i a / 2 / 8 7 様系統中の株に由来してもよかったし、または両方のエプトープは B / Y a m a g a t a / 1 6 / 8 8 様系統中の株に由来してもよかった。

【 0 0 2 4 】

全ての実施形態において、通常、第 1 のエプトープおよび第 2 のエプトープは同じインフルエンザウイルス株に由来する。特定の実施形態において、第 1 のエプトープおよび第 2 のエプトープは同じエプトープである。しかし、いくつかの実施形態において、第 1 のエプトープおよび第 2 のエプトープは異なるインフルエンザウイルス株に由来し、これらは、例えば、同じ H A サブタイプを有するインフルエンザ A ウイルス株（例えば、2 x H 1 株または 2 x H 3 株）であってもよいし、または異なる H A サブタイプを有するインフルエンザ A ウイルス株（例えば、H 1 株および H 5 株）であってもよい。

【 0 0 2 5 】

自己複製 R N A

本発明の免疫原性組成物は、インフルエンザウイルス抗原由来のエプトープ（第 2 のエプトープ）を含むポリペプチドをコードする R N A 成分を含む。被験者への投与の後、この R N A は細胞の内部で翻訳されてインサイチュでインフルエンザウイルスのポリペプチドを提供する。

【 0 0 2 6 】

R N A は + 鎖であるべきであり、そしてそうすることで、いずれの介在する複製の工程、例えば逆転写、も必要とせずに細胞によって翻訳され得る。有利な点として、これは、免疫細胞によって発現される T L R 7 受容体にもまた結合することができ、それによってアジュバント効果を開始することができる。好ましい + 鎖 R N A は自己複製 R N A 分子である。自己複製 R N A 分子（レプリコン）は、脊椎動物細胞に送達されたとき、いずれのタンパク質もない場合でさえ、それ自体からの（それ自体から生成するアンチセンスコピ

10

20

30

40

50

ーを經由して) 転写によって複数の娘RNAの産生をもたらし得る。したがって、典型的には、自己複製RNA分子は、細胞への送達後に直接翻訳され得る+鎖の分子であり、そしてこの翻訳は、送達されたRNAからアンチセンス転写物およびセンス転写物の両方をその後産生するRNA依存性RNAポリメラーゼを提供する。したがって、この送達されたRNAは、複数の娘RNAの産生をもたらす。これらの娘RNAおよび同じ鎖上のサブゲノム転写物は、コードされるポリペプチドのインサイチュの発現を提供するためにそれら自体翻訳されてもよいし、またはこのポリペプチドのインサイチュの発現を提供するために翻訳される送達されたRNAと同じセンスを有するさらなる転写物を提供するために転写されてもよい。この一連の転写の全体としての結果は、導入レプリコンRNAの数における膨大な増幅であり、そしてそれによって、コードされるポリペプチドはその細胞の主要なポリペプチド産物となる。

10

【0027】

自己複製を達成するのに適した1つの系は、アルファウイルスを基礎とするRNAレプリコンを使用することである。これらの+鎖レプリコンは、レプリカーゼ(またはレプリカーゼ-トランスクリプターゼ)を産生するための細胞への送達後に翻訳される。このレプリカーゼは、+鎖送達RNAのゲノム-鎖コピーを生成する複製複合体を提供するために自己切断するポリタンパク質として翻訳される。これらの-鎖転写物は、それら自体転写されることができて、+鎖親RNAのさらなるコピーを与え、そしてまた、このポリペプチドをコードするサブゲノム転写物も与える。したがって、このサブゲノム転写物の翻訳は、感染細胞によるこのポリペプチドのインサイチュの発現をもたらす。適切なアルファウイルスレプリコンには、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスなどに由来するレプリカーゼを使用し得る。変異型または野生型ウイルスの配列が使用され得、例えば、VEEVの弱毒化TC83変異型が、レプリコン中で使用されている(国際公開第2005/113782号)。

20

【0028】

したがって、好ましい自己複製RNA分子は、(i)この自己複製RNA分子からRNAを転写し得るRNA依存性RNAポリメラーゼおよび(ii)目的のポリペプチドをコードする。このポリメラーゼは、例えば、1つもしくはそれ以上のアルファウイルスタンパク質nsP1、nsP2、nsP3およびnsP4を含むアルファウイルスレプリカーゼであり得る。

30

【0029】

天然アルファウイルスゲノムは、非構造レプリカーゼポリタンパク質に加えて構造ビリオンタンパク質をコードするのに対して、本発明の自己複製RNA分子は、アルファウイルス構造タンパク質をコードしないことが好ましい。したがって、好ましい自己複製RNAは、細胞中でそれ自体のゲノムRNAコピーの産生をもたらし得るが、RNA含有ビリオンの産生はもたらさない。これらのビリオンを産生することができないということは、野生型アルファウイルスと異なり、この自己複製RNA分子は感染性形態においてそれ自体を永続させることができないことを意味する。野生型ウイルスにおいて永続化のために必要なアルファウイルス構造タンパク質は本発明の自己複製RNAに存在せず、そしてそれらの場所は、目的のポリペプチドをコードする遺伝子(単数または複数)によって使用されており、そのため、サブゲノム転写物は、構造アルファウイルスビリオンタンパク質ではなくこのポリペプチドをコードする。

40

【0030】

したがって、本発明に有用な自己複製RNA分子は、2つのオープンリーディングフレームを有し得る。第1の(5')オープンリーディングフレームはレプリカーゼをコードし;第2の(3')オープンリーディングフレームはポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、このRNAは、例えば、さらなるポリペプチド(以下を参照のこと)をコードするために、またはアクセサリポリペプチドをコードするために追加の(例えば下流に)オープンリーディングフレームを有し得る。

【0031】

50

自己複製RNA分子は、コードされるレプリカーゼと適合する5'配列を有し得る。

【0032】

自己複製RNA分子は、アルファウイルス以外のウイルス、特に、プラス鎖RNAウイルス、そして特に、ピコルナウイルス、フラビウイルス、ルビウイルス、ペスチウイルス、ヘパシウイルス、カリシウイルスまたはコロナウイルスに由来してもよいし、またはそれに基づいてもよい。しかし、アルファウイルスが好ましく、そして適切な野生型アルファウイルス配列は周知であり、そして配列保管機関、例えばAmerican Type Culture Collection、から入手可能である。適切なアルファウイルスの代表的な例としてアウラ(ATCC VR-368)、ベバルウイルス(ATCC VR-600、ATCC VR-1240)、カバス(Cabassou)(ATCC VR-922)、チクングニヤウイルス(ATCC VR-64、ATCC VR-1241)、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス(ATCC VR-65、ATCC VR-1242)、フォートモーガン(ATCC VR-924)、ゲタウイルス(ATCC VR-369、ATCC VR-1243)、キジラガチ(ATCC VR-927)、マヤロ(ATCC VR-66)、マヤロウイルス(ATCC VR-1277)、ミッデルブルグ(ATCC VR-370)、ムカンボウイルス(ATCC VR-580、ATCC VR-1244)、ヌドゥム(ATCC VR-371)、ピクスナウイルス(ATCC VR-372、ATCC VR-1245)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373、ATCC VR-1246)、セムリキ森林(ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、シンドビスウイルス(ATCC VR-68、ATCC VR-1248)、トナテ(Tonate)(ATCC VR-925)、トリニティ(ATCC VR-469)、ユナ(ATCC VR-374)、ベネズエラウマ脳脊髄炎(ATCC VR-69、ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR-1249、ATCC VR-532)、西部ウマ脳脊髄炎(ATCC VR-70、ATCC VR-1251、ATCC VR-622、ATCC VR-1252)、ワタロア(ATCC VR-926)およびY-62-33(ATCC VR-375)が挙げられる。複数の異なるアルファウイルス由来の成分を含むキメラのアルファウイルスレプリコンもまた有用であり得る。

【0033】

自己複製RNA分子は様々な長さを有し得るが、それらは典型的には5000~25000ヌクレオチド長であり、例えば、8000~15000ヌクレオチドまたは9000~12000ヌクレオチドである。したがってこのRNAは、siRNAの送達において見られるRNAより長い。

【0034】

本発明に有用なRNA分子は、5'キャップ(例えば7メチルグアノシン)を有し得る。このキャップはこのRNAのインピボでの翻訳を増強し得る。

【0035】

本発明に有用なRNA分子の5'ヌクレオチドは5'トリホスフェート基を有し得る。キャッピングされたRNA中で、これは5'-から-5'への架橋によって7メチルグアノシンに結合され得る。5'トリホスフェートは、RIG-I結合を増強することができ、そしてしたがってアジュバント効果を促進し得る。

【0036】

RNA分子は、3'ポリAテールを有し得る。それは、その3'末端付近にポリAポリメラーゼ認識配列(例えばAAUAAA)をもまた含み得る。

【0037】

本発明に有用なRNA分子は典型的には一本鎖である。一般的に、一本鎖RNAは、TLR7、TLR8、RNAヘリカーゼおよび/またはPKRとの結合によってアジュバント効果を開始させることができる。二本鎖の形態で送達されたRNA(dsRNA)はTLR3と結合することができ、そしてこの受容体は、一本鎖RNAの複製の間か、または一本鎖RNAの二次構造内かのいずれかにおいて形成されるdsRNAによってもまた作

動させられ得る。

【0038】

本発明に有用なRNA分子は、インビトロ転写（IVT）によって従来の調製され得る。IVTには、細菌内でプラスミドの形態において生成され、そして増幅された（cDNA）テンプレートを使用してもよいし、または（例えば、遺伝子合成および/またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）構築方法によって）合成的に生成された（cDNA）テンプレートを使用してもよい。例えば、DNA依存性RNAポリメラーゼ（例えば、バクテリオファージT7、T3またはSP6 RNAポリメラーゼ）は、DNAテンプレートからRNAを転写するために使用され得る。適切なキャッピング反応およびポリA付加反応は必要に応じて使用され得る（けれども、通常、レプリコンのポリAはDNAテンプレート内にコードされる）。これらのRNAポリメラーゼは、転写された5'ヌクレオチド（単数または複数）に対する厳密な必要条件を有し得、そしていくつかの実施形態において、IVTによって転写されたRNAが、それ自体にコードされるレプリカーゼの基質として効率的に機能し得ることを確実にするために、これらの必要条件は、このコードされるレプリカーゼの必要条件と適合しなければならない。

10

20

30

40

50

【0039】

国際公開第2011/005799号において議論されている通り、自己複製RNAは、修飾された核酸塩基を有する1つもしくはそれより多くのヌクレオチドを（任意の5'キャップ構造に加えて）含み得る。例えば、自己複製RNAは、1つもしくはそれより多くの修飾されたピリミジン核酸塩基、例えば、プソイドウリジンおよび/または5メチルシトシン残基、を含み得る。しかし、いくつかの実施形態において、このRNAは修飾された核酸塩基を含まず、そして修飾されたヌクレオチドを含まなくてもよい、すなわち、このRNA内の全てのヌクレオチドは標準的なA、C、GおよびUリボヌクレオチドである（7'メチルグアノシンを含み得る任意の5'キャップ構造を除外して）。別の実施形態において、このRNAは、7'メチルグアノシンを含む5'キャップを含んでもよく、そして最初の1個、2個または3個の5'リボヌクレオチドはそのリボースの2'位でメチル化されていてもよい。

【0040】

本発明に使用されるRNAは、理想的には、ヌクレオチド間のホスホジエステル結合のみを含むが、いくつかの実施形態において、これはホスホロアミデート、ホスホロチオエートおよび/またはメチルホスホネート結合を含み得る。

【0041】

RNAは、上記でより詳細に記載される通り、インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープを含むポリペプチドをコードする。理想的には、このRNAはインフルエンザウイルスのヘマグルチニンの断片を含むポリペプチドをコードする。これは、膜集合抗原または分泌抗原よりむしろ可溶性細胞質抗原をコードし得る（けれども、細胞は、免疫プロセッシングの一環として細胞の表面上にこの細胞質抗原を提示し得る）。このポリペプチドのインサイチュでの発現は抗インフルエンザ免疫反応を誘発する。例えば、それは、インフルエンザビリオンを認識する抗体、例えば、ビリオン表面ヘマグルチニンに結合する抗体、の生産をもたらし得る。理想的には、この誘発された抗体は中和抗体または防御抗体である。インサイチュで発現させられたポリペプチドによって誘発された抗体は、ポリペプチドと、そしてまた、本発明の免疫原性組成物の中で送達されたポリペプチドとの両方に理想的には免疫特異的に結合し得る。

【0042】

ポリペプチド成分

本発明の免疫原性組成物はポリペプチド成分を含み、そしてこのポリペプチドはインフルエンザウイルス抗原由来のエピトープ（第1のエピトープ）を含む。

【0043】

ポリペプチド成分は単一のポリペプチドであってもよいが、複数鎖のポリペプチド構造（例えば、ポリペプチド複合体、例えば、2つもしくはそれより多くのタンパク質によ

て形成される複合体)、多量体タンパク質(例えば、3量体ヘマグルチニン)または大きなポリペプチド構造、例えばVLP(ウイルス様粒子)、であってもよい。同様に、自己複製RNAは、1つより多くのインフルエンザウイルスポリペプチドをコードしてもよく、例えば、それは、互いに結合して複合体を形成し得る2つもしくはそれより多くの異なるポリペプチドをコードしてもよいし、または1種類より多くのインフルエンザウイルス株に由来する(例えば、少なくとも1種類のインフルエンザAウイルスおよび少なくとも1種類のインフルエンザBウイルスに由来する)ポリペプチド(例えばHA)を発現してもよい。実施上の利便性のために、理想的には、自己複製RNAは5つもしくはそれより少ないポリペプチドを発現する。

【0044】

理想的には、組成物中のポリペプチド(第1のポリペプチド)および自己複製RNAによってコードされたポリペプチド(第2のポリペプチド)は少なくとも1つのエピトープを共有する。それらは多くのエピトープを共有してもよく、特に、この2つのポリペプチドが長く(例えば、80aaより長く)、そしてそれぞれが複数のエピトープを含むとき、そうである。

【0045】

特定の実施形態において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個または少なくとも5個のB細胞エピトープおよび/またはT細胞エピトープを共有する。特定の実施形態において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、少なくとも1つの免疫優性エピトープを共有する。特定の実施形態において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、同じ免疫優性エピトープ(単数または複数)または同じ級(primary)免疫優性エピトープを共有する。

【0046】

通常、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、共通のアミノ酸配列を共有し、例えば、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが同一である場合、第1のポリペプチドが第2のポリペプチドの断片である場合、第2のポリペプチドが第1のポリペプチドの断片である場合、第1のポリペプチドが、核となるインフルエンザ配列の、第1の融合相手との融合物である場合、および第2のポリペプチドが、核となるインフルエンザ配列の、第2の融合相手との融合物である場合などがある。理想的には、この共通のアミノ酸配列は複数のエピトープを含み、そしてこれは40個のアミノ酸またはそれより長くてもよく、例えば、60aa、80aa、100aa、120aa、140aa、160aa、180aa、200aa、220aa、240aa、260aa、280aa、300aa、320aa、340aa、360aa、380aa、400aaまたはそれより多い。この共通のアミノ酸配列は、完全なHA1ヘマグルチニンサブユニットまたはその免疫原性断片を含み得る。

【0047】

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、互いに少なくともx%のアミノ酸配列同一性を有し、ここでxの値は80、85、90、92、94、95、96、97、98または99である。一方のポリペプチドが他方より短い場合、配列同一性は、より短いポリペプチドの長さによって計算されるべきである。2つのアミノ酸配列間の百分率配列同一性の言及は、アラインメントさせられたとき、その百分率のアミノ酸が、この2つの配列中で同じであることを意味する。このアラインメントおよび百分率相同性もしくは配列同一性は、当技術分野において公知のソフトウェアプログラムを使用して決定され得る。好ましいアラインメントは、12のギャップ開始ペナルティおよび2のギャップ伸張ペナルティ、62のBLOSUMマトリックスを用いたアフィンギャップ探索を使用してSmith-Waterman相同性探索アルゴリズムによって決定される。

【0048】

インフルエンザ由来アミノ酸配列に加えて、ポリペプチドは付加的な配列、例えば、発

10

20

30

40

50

現、産生、精製または検出を容易にする配列（例えば、ポリHis配列、タグなど）、を含み得る。

【0049】

ポリペプチドは通常、単離または精製されている。したがって、これは、妥当な場合、通常、それらが天然で共に見出される分子と会合していない。

【0050】

通常、ポリペプチドは、組換え宿主系における発現によって調製される。適切な組換え宿主細胞として、例えば、昆虫細胞（例えば、*Aedes aegypti*、*Autographa californica*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda*および*Trichoplusia ni*）、哺乳類細胞（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコおよびげっ歯類（例えばハムスター）、鳥類細胞（例えば、ニワトリ、アヒルおよびガチョウ）、細菌（例えば、*E. coli*、*Bacillus subtilis*および*Streptococcus*種）、酵母細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、*Candida maltosa*、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces fragilis*、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia guilliermondii*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe*および*Yarrowia lipolytica*）、テトラヒメナの細胞（例えば*Tetrahymena thermophila*）またはこれらの組合せが挙げられる。多くの適切な昆虫細胞および哺乳類細胞が当技術分野において周知である。適切な昆虫細胞として、例えば、Sf9細胞、Sf21細胞、Tn5細胞、Schneider S2細胞および高度5細胞（*Trichoplusia ni*のBTI-TN-5B1-4親細胞株（Invitrogen）に由来するクローン分離株）が挙げられる。適切な哺乳動物細胞として、例えば、チャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞（HEK293細胞、典型的には剪断されたアデノウイルス5型DNAによって形質転換されている）、NIH-3T3細胞、293-T細胞、Vero細胞、HeLa細胞、PERC.6細胞（EACC寄託番号96022940）、Hep G2細胞、MRC-5（ATCC CCL-171）、WI-38（ATCC CCL-75）、胎児アカゲザル肺細胞（ATCC CL-160）、メイディン-ダービーウシ腎臓（「MDBK」）細胞、メイディン-ダービーイヌ腎臓（「MDCK」）細胞（例えば、MDCK（NBL2）、ATCC CCL34；またはMDCK 33016、DSM ACC 2219）、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞（例えばBHK21-F）、HKCC細胞などが挙げられる。適切な鳥類細胞として、例えば、ニワトリ胚性幹細胞（例えばEBx（登録商標）細胞）、ニワトリ胚性線維芽細胞、ニワトリ胚性生殖細胞、アヒル細胞（例えば、AGE1.CRおよびAGE1.CR.pIX細胞株、これらは、例えば、Vaccine 27:4975-4982（2009）および国際公開第2005/042728号において記載されている）、EB66細胞などが挙げられる。

【0051】

適切な昆虫細胞発現系、例えばバキュロウイルス系、は当業者に公知であり、そして例えば、Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555（1987）において記載されている。バキュロウイルス/挿入細胞発現系のための材料および方法はキットの形態で市販されている。同様に、細菌発現系および哺乳類細胞発現系もまた当技術分野において公知である。

【0052】

ポリペプチドをコードする組換えコンストラクトは、従来の方法を使用して適切なベクター内に調製され得る。昆虫細胞または哺乳類細胞における組換えタンパク質の発現のための多数の適切なベクターは、当技術分野において周知であり、そして慣用されるもので

ある。適切なベクターは、多数の成分（１つもしくはそれより多くの以下のものを含むが、これらに限定されない）を含み得る：複製の起点；選択マーカー遺伝子；１つもしくはそれより多くの発現制御エレメント、例えば、転写制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター）および／または１つもしくはそれより多くの翻訳シグナル；ならびに選択された宿主細胞における分泌経路を標的とするためのシグナル配列またはリーダー配列（例えば、哺乳類起源のもの、または異種の哺乳類もしくは哺乳類以外の種に由来するもの）。例えば、昆虫細胞における発現のために、適切なバキュロウイルス発現ベクター、例えば *pFastBac (Invitrogen)*、が組換えバキュロウイルス粒子を生産するために使用される。このバキュロウイルス粒子は増幅され、そして昆虫細胞に感染させて組換えタンパク質を発現させるために使用される。哺乳類細胞における発現のために、所望の哺乳類宿主細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞）においてこのコンストラクトの発現を駆動するベクターが使用される。

10

20

30

40

50

【0053】

ポリペプチドは、任意の適切な方法を使用して精製され得る。例えば、イムノアフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドを精製するための方法が当技術分野において公知である。沈殿および様々な種類のクロマトグラフィー（例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、キレート化クロマトグラフィーおよびサイズ除外クロマトグラフィー）を含む、所望のタンパク質を精製するための適切な方法が、当技術分野において周知である。適切な精製スキームは、２種類もしくはそれより多くのこれらの適切な方法もしくは他の適した方法を使用して創出され得る。所望の場合、このポリペプチドは、精製を容易にする「タグ」、例えば、エピトープタグまたは *His* タグ、を含み得る。このようなタグ付けされたポリペプチドは、例えば、馴化培地から、キレート化クロマトグラフィーまたはアフィニティークロマトグラフィーにより簡便に精製され得る。

【0054】

本発明に使用されるポリペプチド抗原は、*Flublok*（登録商標）製品の中に見られるような組み換えポリペプチドであり得る。この製品は、化学的に規定された脂質、ビタミン、アミノ酸および無機塩から構成される無血清培地中で培養された、*Spodoptera frugiperda* Sf9細胞に由来する連続昆虫細胞株において発現させられた精製 *HA* ポリペプチドを含む。このポリペプチドは、バキュロウイルスベクター（*Autographa californica* 核多角体病ウイルス）によってこの細胞株中で発現させられ、そしてその後、*Triton X-100*（登録商標）（*t*-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）を用いてこの細胞から抽出され、そしてカラムクロマトグラフィーによって精製される。*Flublok*（登録商標）製品の一回量は、インフルエンザ株毎に $45\ \mu\text{g}$ の *HA* を含み、すなわち、３価の用量毎に $135\ \mu\text{g}$ を含む。これは、塩化ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウムおよびポリソルベート 20 もまた含む。

【0055】

組換え宿主系において発現させられたポリペプチドを使用することに代わる有用なものとして、インフルエンザビリオン由来のヘマグルチニンを含む従来のインフルエンザワクチンを使用することがある。したがって、本発明は、自己複製 *RNA* を従来のインフルエンザワクチンと併せて使用することができ、それによって後者を改善する。ビリオン由来インフルエンザワクチンは、生ウイルスに基づくか、または不活化ウイルスに基づくかのいずれかであり、そして不活化ワクチンは、全ビリオン、「スプリット」ビリオンに基づいてもよいし、または精製された表面抗原に基づいてもよい。ビリオン由来 *HA* は、ウィロゾームの形態においてもまた提供され得る。本発明は、全てのこれらの種類のインフルエンザワクチンとともに使用され得る。ビリオン由来インフルエンザワクチン組成物は、アジュバント化されていなくてもよいし、または、例えば、水中油型エマルジョン、例えば、スクアレン含有エマルジョン *MF59* および *AS03*、を用いてアジュバント化されていてもよい。

【 0 0 5 6 】

不活化ウイルスが使用される場合、ポリペプチド含有組成物は、全ビリオン、スプリットビリオンまたは精製された表面抗原（ヘマグルチニンを含み、そして、通常、ノイラミニダーゼもまた含む）を含み得る。ウイルスを不活化するための化学的手段として、有効量の１種類もしくはそれより多くの以下の薬剤を用いた処理が挙げられる：界面活性剤、ホルムアルデヒド、 β -プロピオラクトン、メチレンブルー、ソラレン、カルボキシフラレン（C 6 0）、バイナリーエチルアミン、アセチルエチレンイミンまたはそれらの組み合わせ。ウイルス不活化の非化学的方法は当技術分野において公知であり、例えば、UV光またはガンマ線照射のようなものがある。

【 0 0 5 7 】

スプリットビリオンは、精製されたビリオンを界面活性剤（例えば、エチルエーテル、ポリソルベート 8 0、デオキシコレート、リン酸トリ-N-ブチル、T r i t o n X - 1 0 0、T r i t o n N 1 0 1、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、T e r g i t o l N P 9 など）で処理することによって取得されてサブビリオン調製物を生産し、これは「T w e e n - エーテル」スプリットプロセスを含む。インフルエンザウイルスをスプリットする方法は、例えば、当技術分野において周知であり、例えば、国際出願第 0 2 / 2 8 4 2 2 号、国際出願第 0 2 / 0 6 7 9 8 3 号、国際出願第 0 2 / 0 7 4 3 3 6 号、国際出願第 0 1 / 2 1 1 5 1 号、国際出願第 0 2 / 0 9 7 0 7 2 号、国際出願第 2 0 0 5 / 1 1 3 7 5 6 号などを参照のこと。このウイルスのスプリットは、崩壊濃度のスプリット剤を用いて全ウイルス（感染性であろうと非感染性であろうと）を典型的には崩壊させるかまたは断片化させることによって遂行される。この崩壊は、ウイルスタンパク質の完全または部分的な可溶化をもたらし、このウイルスの統合性を変化させる。好ましいスプリット剤は非イオン性界面活性剤またはイオン性（例えばカチオン性）界面活性剤（例えばカチオン性）であり、例えば、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル糖、スルホベタイン、ベタイン、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、N, N - ジアルキル - グルカミド、H e c a m e g、アルキルフェノキシ - ポリエトキシエタノール、NP 9、第四級アンモニウム化合物、サルコシル、C T A B（セチルトリメチルアンモニウムブロミド）、リン酸トリ-N-ブチル、セタブロン、ミリスチルトリメチルアンモニウム塩、リポフェクチン、リポフェクタミンおよび D O T - M A、オクチル - もしくはノニルフェノキシポリオキシエタノール（例えば、T r i t o n 界面活性剤、例えば、T r i t o n X - 1 0 0 または T r i t o n N 1 0 1）、ポリオキシエチレンソルビタンエーテル（T w e e n 界面活性剤）、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンエステルなどである。１つの有用なスプリット手順は、デオキシコール酸ナトリウムおよびホルムアルデヒドの連続効果を使用し、そしてスプリットは最初のビリオン精製の間（例えば、ショ糖密度勾配溶液中）に起こり得る。したがって、スプリットのプロセスは、ビリオン含有材料の浄化（ビリオン以外の材料を除去するため）と、収集されたビリオンの濃縮（例えば、吸着方法、例えば C a H P O₄ 吸着、を使用して）と、ビリオン以外の材料からの全ビリオンの分離と、密度勾配遠心工程（例えば、スプリット剤、例えばデオキシコール酸ナトリウム、を含むショ糖勾配を使用する）における、スプリット剤を使用したビリオンのスプリットと、その後の、望まない材料を除去するための濾過（例えば限外濾過）とを含み得る。別の有用なスプリットビリオンの調製は、デオキシコール酸ナトリウムでビリオンをスプリットさせ、そしてその後、不活化を確実にするためにデオキシコール酸ナトリウムおよびホルムアルデヒドを使用し、その後限外濾過および除菌濾過することによってなされる。スプリットインフルエンザワクチンの例には、B E G R I V A C（登録商標）製品、F L U A R I X（登録商標）製品、F L U Z O N E（登録商標）製品および F L U S H I E L D（登録商標）製品がある。

【 0 0 5 8 】

精製されたインフルエンザウイルス表面抗原ワクチンは表面抗原 H A を含み、そして典型的には N A をもまた含む。精製された形態でこれらのタンパク質を調製するためのプロセスは当技術分野において周知である。F L U V I R I N（登録商標）製品、A G R I P

10

20

30

40

50

PAL（登録商標）製品およびINFLUVAC（登録商標）製品は、インフルエンザサブユニットワクチンである。

【0059】

別の形態の不活化抗原にはウイロソーム（核酸を含まないウイルス様リボソーム粒子；Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373: 74 - 91）がある。ウイロソームは、界面活性剤を用いたウイルスの可溶化、その後の、ヌクレオキャプシドの除去、およびウイルス糖タンパク質を含む膜の再構成によって調製され得る。ウイロソームを調製するための代替的な方法は、リボソームの膜中にウイルスタンパク質を与えるために、ウイルス膜糖タンパク質を過剰量のリン脂質に添加することを含む。

10

【0060】

HAは、近年の不活化インフルエンザワクチンにおける主要な免疫原であり、そしてワクチン用量は、HAレベル（典型的にはSRIDによって計測される）を参照することによって規格化される。既存のワクチンは、典型的には、株毎に約15 µgのHAを含むが、より低用量が使用され得る（例えば、子供に対して、またはパンデミックの状況下で、あるいはアジュバントを使用するとき）。分割量、例えば、1/2（すなわち、株毎に7.5 µgのHA）、1/4および1/8、が使用され、同様に、より高用量（例えば、3xまたは9x用量；Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173: 1467 - 70, Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3: 507 - 10）も使用される。したがって、ワクチンは、インフルエンザ株毎に0.1 µgおよび150 µgの間のHA、特に、0.1 µgと50 µgの間、例えば、0.1 ~ 20 µg、0.1 ~ 15 µg、0.1 ~ 10 µg、0.1 ~ 7.5 µg、0.5 ~ 5 µg、のHAを含み得る。特定の用量として、例えば、株毎に、約45、約30、約15、約10、約7.5、約5、約3.8、約3.75、約1.9、約1.5などが挙げられる。

20

【0061】

本発明は、生ワクチンとともにもまた使用され得る。通常、このようなワクチンは、ビリオン含有液からビリオンを精製することによって調製される。例えば、この液は遠心分離によって浄化され、そして緩衝剤（例えば、ショ糖、リン酸カリウムおよびグルタミン酸ナトリウムを含む）を用いて安定化され得る。様々な形態のインフルエンザウイルスワクチンが近年利用可能である（例えば、Vaccines (eds. Plotkin & Orenstein), 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0の第17章および第18章を参照のこと）。生ウイルスワクチンとしてMedImmuneのFLUMIST（登録商標）製品が挙げられる。このウイルスは典型的には弱毒化されており、そしてこれは温度感受性であってもよく、そして/または低温適応性であってもよい。生ワクチンについて、投与量は、HA含有量よりむしろ50%組織培養感染量（TCID₅₀）または蛍光フォーカス単位（FFU）によって計測され、そして株毎に10⁶および10⁸の間の（特に、10⁶・⁵ ~ 10⁷・⁵の間の）TCID₅₀またはFFUが典型的である。

30

【0062】

本発明に使用されるインフルエンザ株は、野生型のウイルスにおいて見出されるような天然のHA、または改変されたHAを有し得る。例えば、ウイルスを鳥類において高度に病原性にさせる決定基（例えば、HA1/HA2切断部位周辺の超塩基性領域）を除去するためにHAを改変することは公知である。逆遺伝学の使用はこのような改変を容易にする。

40

【0063】

全ての実施形態において、従来のウイルス由来ポリペプチドを使用するものであろうと組み換えポリペプチドを使用するものであろうと、本発明に使用される組成物は、単一株のインフルエンザウイルスに由来するHAポリペプチド（1価）または複数株に由来するHAポリペプチド（多価）を含み得る。したがって、組成物は、1種類もしくはそれより

50

多くの（例えば、１種類、２種類、３種類、４種類もしくはそれより多くの）インフルエンザウイルス株、例えば、インフルエンザＡウイルスおよび／またはインフルエンザＢウイルス、に由来するＨＡを含み得る。ワクチンが１種類より多くの株に由来するＨＡを含む場合、異なる株に由来するＨＡは、典型的には、別々に調製され、そしてその後混合される。３価ワクチンが典型的であり、２種類のインフルエンザＡウイルス株（例えば、Ｈ１株およびＨ３株、例えば、Ｈ１Ｎ１およびＨ３Ｎ２）に由来するＨＡおよび１種類のインフルエンザＢウイルス株に由来するＨＡを含む（すなわち、典型的な３価季節性インフルエンザワクチンにおいて見られる株の組み合わせ）。４価ワクチンもまた有用であり（国際出願第２００８／０６８６３１号）、２種類のインフルエンザＡウイルス株に由来するＨＡおよび２種類のインフルエンザＢウイルス株に由来するＨＡ、あるいは３種類のインフルエンザＡウイルス株に由来するＨＡおよび１種類のインフルエンザＢウイルス株に由来するＨＡを含む。２種類のインフルエンザＡ株（例えば、Ｈ１株およびＨ３株、例えば、Ｈ１Ｎ１およびＨ３Ｎ２）に由来するＨＡならびに２種類のインフルエンザＢ株（例えば、Ｂ／Ｙａｍａｇａｔａ／１６／８８様株の１種類の株およびＢ／Ｖｉｃｔｏｒｉａ／２／８７様株の１種類の株）に由来するＨＡを有する４価ワクチンは特に有用である。

10

【００６４】

送達系

ＲＮＡは、裸のＲＮＡとして（例えば、単なるＲＮＡの水溶液として）送達され得るが、細胞内への移入を増強し、そしてまた、後の細胞内効果も増強するために、特定の実施形態において、ＲＮＡ分子は、送達系、例えば、粒子状送達系またはエマルジョン送達系、と組み合わせて投与される。したがって、ポリボプチド成分およびＲＮＡ成分に加え、本発明の組成物は、追加の成分（例えば、脂質、ポリマーまたは標的細胞内へのＲＮＡの移入を容易にし得る他の成分）を含み得る。多くの送達系は、当業者に周知である。

20

【００６５】

ＲＮＡは、受容体媒介性エンドサイトーシスによって細胞内に導入され得る（例えば、米国特許第６，０９０，６１９号、Ｗｕ & Ｗｕ（１９８８）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６３：１４６２１およびＣｕｒｉｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９１）ＰＮＡＳ ＵＳＡ ８８：８８５０）。米国特許第６，０８３，７４１号は、それ自体インテグリン受容体結合部分（例えば、ＡＧＤ配列を有する環状ペプチド）にカップリングされているポリカチオン部分（例えば、３～１００個のリジン残基を有するポリＬ－リジン）に核酸を結合させることによって、哺乳類細胞内に外因性の核酸を導入することを開示している。

30

【００６６】

ＲＮＡ分子は、両親媒性物質によって細胞内に送達され得る（例えば、米国特許第６，０７１，８９０号）。典型的には、核酸分子は、カチオン性両親媒性物質とともに複合体を形成し得る。この複合体と接触させた哺乳類細胞は、容易にそれを取り込むことができる。

【００６７】

３つの特に有用な送達系は、（ｉ）リボソーム、（ｉｉ）毒性がなく、そして生分解性のポリマー微粒子、（ｉｉｉ）カチオン性サブミクロン水中油型エマルジョンである。

【００６８】

リボソーム

様々な両親媒性脂質が、水性環境において二重層を形成してリボソームとしてＲＮＡ含有水性コアを被包し得る。これらの脂質は、アニオン性、カチオン性または両性イオン性の親水性頭部基を有し得る。アニオン性リン脂質からのリボソームの形成は、１９６０年代にさかのぼり、そしてカチオン性リボソーム形成脂質は、１９９０年代から研究されてきた。いくつかのリン脂質はアニオン性であるのに対して、別のものは両性イオン性であり、そして別のものはカチオン性である。適切なクラスのリン脂質としてホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリンおよびホスファチジル－グリセロールが挙げられるが、これらに限定されず、そしていくつかの有用なリン脂質は表１にリストされる。有用なカチオン性脂質としてジオレオイルトリメチルアンモニウ

40

50

ムプロパン (DOTAP)、1, 2 - ジステアリルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DSDMA)、1, 2 - ジオレイルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DODMA)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DLinDMA)、1, 2 - ジリノレニルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DLenDMA) が挙げられるがこれらに限定されない。両性イオン性脂質としてアシル両性イオン性脂質およびエーテル両性イオン性脂質が挙げられるが、これらに限定されない。その他の有用な脂質は国際公開第 2012/031046 において開示されている。これらの脂質は飽和であってもよいし、または不飽和であってもよい。リポソームを調製するための少なくとも 1 種類の不飽和脂質の使用が好ましい。不飽和脂質が 2 つの尾部を有する場合、両方の尾部は不飽和であってもよいし、またはこれは 1 つの飽和尾部および 1 つの不飽和尾部を有してもよい。

10

【0069】

好ましいリポソームは、5.0 ~ 7.6 (例えば、5.7 ~ 5.9) の範囲内の pKa を有する脂質、特に、3 級アミンを有する脂質、を含む (国際出願第 2012/006378 号を参照のこと)。

【0070】

リポソームは、単一の脂質からかまたは脂質の混合物から形成され得る。混合物は、(i) アニオン性脂質の混合物 (ii) カチオン性脂質の混合物 (iii) 両性イオン性脂質の混合物 (iv) アニオン性脂質およびカチオン性脂質の混合物 (v) アニオン性脂質および両性イオン性脂質の混合物 (vi) 両性イオン性脂質およびカチオン性脂質の混合物、または (vii) アニオン性脂質、カチオン性脂質および両性イオン性脂質の混合物を含み得る。同様に、混合物は、飽和脂質および不飽和脂質の両方を含み得る。例えば、混合物は、DSPC (両性イオン性、飽和)、DLinDMA (カチオン性、不飽和) および / または DMG (アニオン性、飽和) を含み得る。脂質の混合物が使用される場合、この混合物中の成分脂質のすべてが、両親媒性であることが必要であるとは限らず、例えば、1 種類またはそれより多くの両親媒性脂質はコレステロールと混合され得る。

20

【0071】

脂質の親水性部分は、PEG 化され得る (すなわち、ポリエチレングリコールの共有結合によって修飾される)。この修飾は、リポソームの安定性を増大させ、そしてリポソームの非特異的吸着を防ぐことができる。例えば、脂質は、国際出願第 2005/121348 号においておよび Heyes et al. (2005) J Controlled Release 107: 276 - 87 において開示されているもののような技術を使用して PEG に結合体化させられ得る。様々な長さの PEG が使用されることができ、例えば、0.5 ~ 8 kDa の間、1 ~ 3 kDa の間 (国際出願第 2012/031043 号) または 3 ~ 11 kDa の間 (国際出願第 2013/033563 号) である。

30

【0072】

DSPC、DLinDMA、PEG - DMG およびコレステロールの混合物は、実施例において使用される。これらは、国際出願第 2012/006376 号において開示されている通りに作製され得る。

【0073】

通常、リポソームは 3 つの群に分けられる：多重膜ベシクル (MLV)；小型単層ベシクル (SUV)；および大型単層ベシクル (LUV)。MLV は、それぞれのベシクル内に複数の二重層を有し、いくつかの分離した水性コンパートメントを形成する。SUV および LUV は、水性コアを被包する単一の二重層を有する；SUV は、典型的には、直径 50 nm を有し、そして LUV は直径 > 50 nm を有する。理想的には、本発明に有用なリポソームは、50 ~ 220 nm の範囲内の直径を有する LUV である。異なる直径を有する LUV の集団を含む組成物について：(i) 数の上で少なくとも 80 % が、20 ~ 220 nm の範囲内の直径を有するべきであり、(ii) 理想的には、この集団の平均直径 (Zav、強度による) は、40 ~ 200 nm の範囲内にあり、そして / または (iii) これらの直径は、多分散指数 < 0.2 を有するべきである。

40

50

【0074】

60～180nmの範囲内の直径を有するリボソームは特に有用であり得（国際出願第2012/030901号）、例えば、80～160nmの範囲内の直径を有するものである。異なる直径を有するリボソームの集団を含む組成物について：(i)数の上で少なくとも80%のリボソームが60～180nm、そして特に80～160nm、の範囲内の直径を有すべきであり、そして/または(ii)理想的には、この集団の平均直径（強度による、例えばZ-平均）は、60～180nm、そして特に80～160nm、の範囲内である。

【0075】

リボソームの懸濁液中の平均粒子径およびサイズ分布を決定するための装置は市販されている。これらは、典型的には、動的光散乱および/または単粒子光学検知の技術を使用し、例えば、Particle Sizing Systems (Santa Barbara, USA) から市販されているAccusizer（登録商標）およびNicom（登録商標）シリーズの機器、またはMalvern Instruments (UK) からのZetasizer（登録商標）機器、あるいはHoriba (Kyoto, Japan) からのParticle Size Distribution Analyzer 機器がある。動的光散乱法は、リボソームの直径を決定する好ましい方法である。リボソームの集団について、本発明の組成物中における平均リボソーム径を規定するための好ましい方法は、Z-平均、すなわち、動的光散乱法(DLS)によって計測されるリボソームのアンサンブル収集物の強度加重平均流体力学的サイズである。Z-平均は、計測された相関曲線のキュムラント解析に由来し、ここにおいて、単一の粒子サイズ（リボソーム径）が想定され、そして単一指数フィッティングが自己相関関数に適用される。キュムラント解析アルゴリズムは分布を与えないが、強度加重Z-平均に加えて、多分散指数を与える。

【0076】

適切なリボソームを調製するための技術は、当技術分野において周知であり、例えば、Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X、Liposome Technology, volumes I, II & III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006. およびFunctional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002を参照のこと。1つの有用な方法は、Jeffs et al. (2005) Pharmaceutical Research 22(3):362-372において記載されており、そして(i)脂質のエタノール性溶液、(ii)核酸の水溶液および(iii)緩衝液の混合、その後の、混合、平衡化、希釈ならびに精製を含む。

【0077】

特定の実施形態において、RNAはリボソーム内に被包され、そしてそれによって、このリボソームは、水性のRNA含有コアの周辺に外層を形成する。この被包は、RNAアーゼ消化からRNAを保護することが見出されている。このリボソームは、いくつかの外部RNAを含み得る（例えば、このリボソームの表面上に）が、少なくとも半分のRNA（そして理想的にはそのすべて）は被包されている。

【0078】

有用な組成物は、1:1および20:1の間のN:P比を有するリボソームおよびRNAを含み得、ここで「N:P比」とは、カチオン性脂質中の窒素の、RNA中のホスフェートに対するモル比であり（国際出願第2013/006825号を参照のこと）、例えば、2:1、4:1、8:1または10:1のN:P比である。

【0079】

ポリマー性微粒子

様々なポリマーが、微粒子を形成してRNAを被包または吸着し得る（例えば、国際出願第2012/006359号を参照のこと）。実質的に毒性がないポリマーの使用は、レシピエントが安全にこの粒子を受け取ることができることを意味し、そして生分解性ポリマーの使用は、この粒子が、送達後に代謝されて長期的な存続を回避することができることを意味する。有用なポリマーは、また滅菌可能でもあって薬学的等級の処方物の調製を補助する。

【0080】

適切な、毒性のなくそして生分解性のポリマーとしてポリ（ α -ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリラクトン（ポリカプロラクトンを含む）、ポリジオキサノン、ポリバレロラクトン、ポリオルトエステル、ポリ酸無水物、ポリシアノアクリレート、チロシン由来ポリカーボネート、ポリビニルピロリジノンまたはポリエステルアミドおよびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0081】

いくつかの実施形態において、微粒子は、ポリ（ α -ヒドロキシ酸）、例えば、ポリ（ラクチド）（「PLA」）、ラクチドおよびグリコリドのコポリマー、例えば、ポリ（D, L-ラクチド-コ-グリコリド）（「PLG」）、ならびにD, L-ラクチドおよびカプロラクトンのコポリマー、から形成される。有用なPLGポリマーとして、例えば、20:80~80:20の範囲（例えば、25:75、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、75:25）のラクチド/グリコリドモル比を有するものが挙げられる。有用なPLGポリマーとして、例えば、5,000~200,000Da（例えば、10,000~100,000、20,000~70,000、30,000~40,000、40,000~50,000Da）の分子量を有するものが挙げられる。

【0082】

理想的には、微粒子は、0.02 μ m~8 μ mの範囲内の直径を有する。異なる直径を有する微粒子の集団を含む組成物について、数の上で少なくとも80%が、0.03~7 μ mの範囲内の直径を有するべきである。

【0083】

適切な微粒子を調製するための技術は、当技術分野において周知であり、例えば、Arshady & Guyot, *Polymers in Drug Delivery*. (eds. Uchegbu & Schatzlein, CRC Press, 2006)、特に第7章、およびMicroparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press, 1996.を参照のこと。RNAの吸着を容易にするために、微粒子はカチオン性の界面活性剤および/または脂質を含み得る（例えば、O'Hagan et al. (2001) *J Virology* 75:9037-9043およびSingh et al. (2003) *Pharmaceutical Research* 20:247-251.において開示されている通りに）。ポリマー性微粒子を作製する代替的な方法は、成形し、硬化させることによるものである（例えば、国際公開第2009/132206号において開示されている通りに）。

【0084】

本発明の微粒子は、40~100 mVの間のゼータ電位を有し得る。

【0085】

リポソームを超える微粒子の1つの長所は、それらが、安定した保管のために容易に凍結乾燥させられることである。

【0086】

RNAは微粒子に吸着されていてもよく、そして吸着は、この微粒子中にカチオン性材

10

20

30

40

50

料（例えばカチオン性脂質）を含むことによって容易になる。

【0087】

水中油型カチオン性エマルジョン

水中油型エマルジョンは、タンパク質を基とするインフルエンザワクチンをアジュバント化することが公知であり、例えば、FLUAD（登録商標）製品におけるMF59（登録商標）アジュバント、およびPREPANDRIX（登録商標）製品におけるAS03アジュバントがある。エマルジョンが1種類もしくはそれより多くのカチオン性分子を含むという条件において、本発明にしたがうRNA送達は水中油型エマルジョンを利用し得る（国際出願第2012/006380号、国際出願第2013/006834号および国際出願第2013/006837号を参照のこと）。例えば、カチオン性脂質は、負に荷電したRNAが付着することができる正電荷の液滴表面を提供するためにエマルジョン中に含まれ得る。したがって、特定の実施形態において、本発明のRNA送達は、カチオン性サブミクロン水中油型エマルジョンを使用して達成される。

10

【0088】

エマルジョンは、1種類またはそれより多くの油を含む。適切な油（単数または複数）として、例えば、動物（例えば魚類）起源または植物起源に由来するものが挙げられる。理想的には、この油は、生分解性（代謝可能）かつ生体適合性である。植物油の起源としてナッツ、種子、および穀類が挙げられる。最も一般的に入手可能なピーナッツ油、ダイズ油、ヤシ油およびオリーブ油は、ナッツ油の例示である。ホホバ油が使用され得、例えば、これはホホバ豆から取得される。種子油としてベニバナ油、綿実油、ヒマワリ種子油、ゴマ油などが挙げられる。穀類の群において、コーン油は最も容易に入手可能なものであるが、他の穀物、例えば、コムギ、カラスムギ、ライムギ、イネ、テフ、ライコムギなど、の油もまた使用され得る。グリセロールおよび1,2-プロパンジオールの6~10炭素脂肪酸エステルは、種子油中で天然に生じないが、ナッツ油および種子油から出発して、適切な材料の加水分解、分離およびエステル化によって調製され得る。哺乳類の乳由来の脂肪および油は代謝可能であり、そしてそのため、使用され得る。動物供給源から純粋な油を取得するために必要な分離、精製、けん化およびその他の手段についての手順は、当技術分野において周知である。

20

【0089】

ほとんどの魚は、容易に回収され得る代謝可能な油を含む。例えば、タラ肝油、サメ肝油および鯨油、例えば鯨ろう、は、本明細書において使用され得るいくつかの魚油の例示である。多くの分枝鎖油は、5-炭素イソプレノ単位で生化学的に合成され、そして一般的にテルペノイドと呼ばれる。好ましいエマルジョンはスクアレン、分枝状の不飽和テルペノイドであるサメ肝油を含み得る。スクアレン（スクアレンに対する飽和アナログ）もまた使用され得る。スクアレンおよびスクアレンを含む魚油は、商業的供給源から容易に入手可能であるか、または当技術分野において公知の方法によって取得され得る。

30

【0090】

他の有用な油は、トコフェロールであり、特に、スクアレンと組み合わせたものである。エマルジョンの油相がトコフェロールを含む場合、
、
、
、
または
トコフェロールのいずれかが使用され得るが、
-トコフェロールが好ましい。D-
-トコフェロールおよびDL-
-トコフェロールは両方とも使用され得る。好ましい
-トコフェロールはDL-
-トコフェロールである。スクアレンおよびトコフェロール（例えば、DL-
-トコフェロール）を含む油の組み合わせが使用され得る。

40

【0091】

エマルジョン中の油は、油の組み合わせ、例えば、スクアレンおよび少なくとも1種類の別の油、を含み得る。

【0092】

エマルジョンの水性成分は、淡水（例えばw.f.i.）であってもよいし、またはさらなる成分、例えば溶質、を含んでもよい。例えば、これは、緩衝液を形成するための塩（例えば、クエン酸塩またはリン酸塩、例えばナトリウム塩）を含み得る。典型的な緩衝

50

剤として、リン酸緩衝剤；T r i s 緩衝剤；ホウ酸緩衝剤；コハク酸緩衝剤；ヒスチジン緩衝剤；またはクエン酸緩衝剤が挙げられる。緩衝化された水相が好ましく、そして緩衝剤は、典型的には、5 ~ 20 m M の範囲内において含まれる。

【0093】

エマルジョンはカチオン性脂質もまた含む。特定の実施形態において、このエマルジョンの形成および安定化を容易にすることができるように、この脂質は界面活性剤である。一般的に、有用なカチオン性脂質は、生理的条件下で正に荷電した窒素原子、例えば、第三級アミンまたは第四級アミンとして、を含む。この窒素は、両親媒性界面活性剤の親水性頭部基中にあり得る。有用なカチオン性脂質として以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン (D O T A P)、3' - [N - (N', N' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル] コレステロール (D C コレステロール)、ジメチルジオクタデシル - アンモニウム (D D A、例えばプロミド)、1, 2 - ジミリストイル - 3 - トリメチル - アンモニウム プロパン (D M T A P)、ジパルミトイル (C 16 : 0) トリメチルアンモニウム プロパン (D P T A P)、ジステアロイルトリメチルアンモニウム プロパン (D S T A P) が挙げられるが、これらに限定されない。他の有用なカチオン性脂質は以下である：ベンザルコニウムクロリド (B A K)、ベンゼトニウムクロリド、セトラミド (c e t r a m i d e) (テトラデシルトリメチルアンモニウムプロミドならびに、場合によっては、少量のドデシルトリメチルアンモニウム (d e d e c y l t r i m e t h y l a m m o n i u m) プロミドおよびヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミドを含む)、セチルピリジニウムクロリド (C P C)、セチルトリメチルアンモニウムクロリド (C T A C)、N, N', N' - ポリオキシエチレン (10) - N - 獣脂 (t a l l o w) - 1, 3 - ジアミノプロパン、ドデシルトリメチルアンモニウムプロミド、ヘキサデシルトリメチル - アンモニウムプロミド、混合アルキルトリメチル - アンモニウムプロミド、ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド、ベンジルジメチルヘキサデシル - アンモニウムクロリド、ベンジルトリメチルアンモニウムメトキシド、セチルジメチルエチルアンモニウムプロミド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド (D D A B)、メチルベンゼトニウムクロリド、デカメトニウムクロリド、メチル混合トリアルキルアンモニウムクロリド、メチルトリオクチルアンモニウムクロリド)、N, N - ジメチル - N - [2 (2 - メチル - 4 - (1, 1, 3, 3 テトラメチルブチル) - フェノキシ) - エトキシ) エチル] - ベンゼンメタンアミニウムクロリド (D E B D A)、ジアルキルジメチルアンモニウム塩、[1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ) - プロピル] - N, N, N, トリメチルアンモニウムクロリド、1, 2 - ジアシル - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン (アシル基 = ジミリストイル、ジパルミトイル、ジステアロイル、ジオレオイル)、1, 2 - ジアシル - 3 (ジメチルアンモニオ) プロパン (アシル基 = ジミリストイル、ジパルミトイル、ジステアロイル、ジオレオイル)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - (4' - トリメチル - アンモニオ) ブタノイル - s n - グリセロール、1, 2 - ジオレオイル 3 - スクシニル - s n - グリセロールコリンエステル、コレステリル (4' - トリメチルアンモニオ) ブタノエート、N - アルキルピリジニウム塩 (例えば、セチルピリジニウムプロミドおよびセチルピリジニウムクロリド)、N - アルキルピペリジニウム塩、ジカチオン性ボラ型電解質 (C₁₂ M e₆ ; C₁₂ B u₆)、ジアルキルグリセチルホスホリルコリン、リソレシチン、L - ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン、コレステロールヘミスクシネートコリンエステル、リボポリアミン (以下のものが挙げられるが、これらに限定されない)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (D O G S)、ジパルミトイルホスファチジルエタノール - アミドスペルミン (D P P E S)、リボポリ - L (またはD) - リジン (L P L L、L P D L)、N - グルタリルホスファチジルエタノールアミンに結合体化されたポリ (L (またはD) - リジン、ペンダントアミノ基を有するジドデシルグルタミン酸エステル (C₁₂ G l u P h C_n N⁺)、ペンダントアミノ基を有するジテトラデシルグルタミン酸エステル (C₁₂ G l u P h C_n N⁺)、コレステロールのカチオン性誘導体 (以下のものが挙げられるが、これらに限定されない)、コレステリル - 3 - オキシスク

10

20

30

40

50

シンアミドエチレントリメチルアンモニウム塩、コレステリル - 3 - オキシスクシンアミドエチレンジメチルアミン、コレステリル - 3 - カルボキシアミドエチレントリメチルアンモニウム塩、およびコレステリル - 3 - カルボキシアミドエチレンジメチルアミン。他の有用なカチオン性脂質は、US - 2 0 0 8 / 0 0 8 5 8 7 0 および US - 2 0 0 8 / 0 0 5 7 0 8 0 において記載されている。

【 0 0 9 4 】

特定の実施形態において、カチオン性脂質は、生分解性（代謝可能）かつ生体適合性である。

【 0 0 9 5 】

油およびカチオン性脂質に加えて、エマルジョンは、非イオン性界面活性剤および／または両性イオン性界面活性剤を含み得る。そのような界面活性剤として、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（一般的に T w e e n と呼ばれる）、特に、ポリソルベート 2 0 およびポリソルベート 8 0 ；エチレンオキシド（E O）、プロピレンオキシド（P O）および／またはブチレンオキシド（B O）のコポリマー（D O W F A X（登録商標）商標下で販売されている、例えば、直鎖状 E O / P O ブロックコポリマー；オクトキシノール、これは、繰り返しのエトキシ（オキシ - 1 , 2 - エタンジイル）基の数が変動し得、オクトキシノール - 9（T r i t o n X - 1 0 0 または t - オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）が特に興味深い；（オクチルフェノキシ）ポリエトキシエタノール（I G E P A L C A - 6 3 0 / N P - 4 0）；リン脂質、例えばホスファチジルコリン（レシチン）；ラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪エーテル（B r i j 界面活性剤として公知）、例えば、トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（B r i j 3 0）；ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル；ならびにソルビタンエステル（S p a n として一般的に公知）、例えば、ソルビタントリオレエート（S p a n 8 5）およびソルビタンモノオレエート、が挙げられるが、これらに限定されない。このエマルジョン中に含むための好ましい界面活性剤には、ポリソルベート 8 0（T w e e n 8 0；ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）、S p a n 8 5（ソルビタントリオレエート）、レシチン、および T r i t o n X - 1 0 0 がある。

【 0 0 9 6 】

これらの界面活性剤の混合物は、エマルジョン中に含まれることができ、例えば、T w e e n 8 0 / S p a n 8 5 混合物または T w e e n 8 0 / T r i t o n - X 1 0 0 混合物がある。ポリオキシエチレンソルビタンエステル（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（T w e e n 8 0））およびオクトキシノール（例えば、t - オクチルフェノキシ - ポリエトキシエタノール（T r i t o n X - 1 0 0））の組み合わせもまた適している。他の有用な組み合わせは、ラウレス 9 + ポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび／またはオクトキシノールを含む。有用な混合物は、1 0 ~ 2 0 の範囲内の H L B 値を有する界面活性剤（例えば、1 5 . 0 の H L B を有するポリソルベート 8 0）および 1 ~ 1 0 の範囲内の H L B 値を有する界面活性剤（例えば、1 . 8 の H L B を有するソルビタントリオレエート）を含み得る。

【 0 0 9 7 】

最終エマルジョン中の油の好ましい量（体積％）は、2 ~ 2 0 % の間、例えば、5 ~ 1 5 %、6 ~ 1 4 %、7 ~ 1 3 %、8 ~ 1 2 %、である。約 4 ~ 6 % または約 9 ~ 1 1 % のスクアレン含有量は特に有用である。

【 0 0 9 8 】

最終エマルジョン中の界面活性剤の好ましい量（重量％）は、0 . 0 0 1 % および 8 % の間である。例えば：0 . 2 ~ 4 %、特に、0 . 4 ~ 0 . 6 % の間、0 . 4 5 ~ 0 . 5 5 % の間、約 0 . 5 % または 1 . 5 ~ 2 % の間、1 . 8 ~ 2 . 2 % の間、1 . 9 ~ 2 . 1 % の間、約 2 % または 0 . 8 5 ~ 0 . 9 5 % もまたは約 1 %、のポリオキシエチレンソルビタンエステル（例えば、ポリソルベート 8 0）；0 . 0 2 ~ 2 %、特に、約 0 . 5 % または約 1 % のソルビタンエステル（例えば、ソルビタントリオレエート）；0 . 0 0 1 ~ 0

10

20

30

40

50

・ 1 %、特に、0.005 ~ 0.02 %、のオクチル - またはノニルフェノキシポリオキシエタノール（例えば、Triton X - 100）；0.1 ~ 8 %、特に、0.1 ~ 10 %、そして特に、0.1 ~ 1 % または約 0.5 %、のポリオキシエチレンエーテル（例えば、ラウレス 9）である。

【0099】

油および界面活性剤の絶対量ならびにそれらの比は、依然としてエマルジョンを形成したまま、広い範囲内で変動され得る。当業者は、所望のエマルジョンを取得するために成分の相対的な割合を容易に変動させ得るが、4 : 1 および 5 : 1 の間の、油および界面活性剤についての重量比が典型的である（過剰な油）。

【0100】

エマルジョンの免疫賦活活性を確実にするための重要なパラメーターは、特に、大型の動物において、油滴サイズ（直径）である。最も有効なエマルジョンは、サブミクロンの範囲の液滴サイズを有する。適切には、この液滴サイズは、範囲 50 ~ 750 nm 内である。最も有用には、平均液滴サイズは、250 nm 未満、例えば、200 nm 未満、150 nm 未満である。平均液滴サイズは、有用には、80 ~ 180 nm の範囲内である。理想的には、エマルジョンの油滴の少なくとも 80 %（数の上で）が、直径で 250 nm 未満であり、そして特に、少なくとも 90 % がそうである。エマルジョン中の平均液滴サイズおよびサイズ分布を決定するための装置は、市販されている。これらのこれらは、典型的には、動的光散乱および / または単粒子光学検知の技術を使用し、例えば、Particle Sizing Systems (Santa Barbara, USA) から市販されている Accusizer（登録商標）および Nicomp（登録商標）シリーズの機器、または Malvern Instruments (UK) からの Zetasizer（登録商標）機器、または Horiba (Kyoto, Japan) からの Particle Size Distribution Analyzer 機器がある。

【0101】

理想的には、液滴サイズの分布（数の上で）は 1 つの最大値のみを有する、すなわち、平均値（モード）の周辺に分布する液滴の単一の集団があり、2 つの最大値を有するのではない。好ましいエマルジョンは、< 0.4、例えば、0.3、0.2 またはそれより小さい多分散性を有する。

【0102】

サブミクロンの液滴および狭いサイズ分布を有する適切なエマルジョンは、微少溶液操作の使用によって取得され得る。この技術は、高圧および高速度で、幾何学的に固定されたチャンネルを通して投入成分のストリームを推進することによって、平均油滴サイズを減少させる。これらのストリームは、チャンネル壁、チャンパー壁および互いに接触する。その結果としての剪断力、衝撃力、およびキャピテーション力は、液滴サイズにおける減少を引き起こす。微少溶液操作の繰り返しのステップは、所望の液滴サイズ平均および分布を有するエマルジョンが達成されるまで実行され得る。

【0103】

微少溶液操作に代わるものとして、熱的方法が、転相を引き起こすために使用され得る（US 2007 / 0014805 において開示される通りに）。これらの方法もまた、厳密な粒度サイズ分布を有するサブミクロンのエマルジョンを提供することができる。

【0104】

好ましいエマルジョンは、濾過滅菌され得る、すなわち、それらの液滴は、220 nm のフィルターを通過することができる。滅菌の提供と同様に、この手順はまた、エマルジョン中のいずれの大きな液滴をも除去する。

【0105】

特定の実施形態において、エマルジョン中のカチオン性脂質は DOTAP である。カチオン性水中油型エマルジョンは、約 0.5 mg / ml ~ 約 25 mg / ml の DOTAP を含み得る。例えば、このカチオン性水中油型エマルジョンは、約 0.5 mg / ml ~ 約 25 mg / ml で DOTAP を含み得る。例示的な実施形態において、このカチオン性水中

10

20

30

40

50

油型エマルジョンは、約 0.8 mg/ml ~ 約 1.6 mg/ml の DOTAP を含み、例えば、0.8 mg/ml、1.2 mg/ml、1.4 mg/ml または 1.6 mg/ml である。

【0106】

特定の実施形態において、カチオン性脂質は DC コレステロールである。カチオン性水中油型エマルジョンは、約 0.1 mg/ml ~ 約 5 mg/ml の DC コレステロールで、DC コレステロールを含み得る。例えば、このカチオン性水中油型エマルジョンは、約 0.1 mg/ml ~ 約 5 mg/ml の DC コレステロールを含み得る。例示的な実施形態において、このカチオン性水中油型エマルジョンは、約 0.62 mg/ml ~ 約 4.92 mg/ml の DC コレステロールを含み、例えば 2.46 mg/ml である。

10

【0107】

特定の実施形態において、カチオン性脂質は DDA である。カチオン性水中油型エマルジョンは、約 0.1 mg/ml ~ 約 5 mg/ml の DDA を含み得る。例えば、このカチオン性水中油型エマルジョンは、DDA を約 0.1 mg/ml ~ 約 2.5 mg/ml で含み得る。例示的な実施形態において、このカチオン性水中油型エマルジョンは、約 0.73 mg/ml ~ 約 1.45 mg/ml の DDA を含み、例えば 1.45 mg/ml である。

【0108】

患者への投与のための、本発明の特定の好ましい組成物はスクアレン、スパン 85、ポリソルベート 80 および DOTAP を含む。例えば：スクアレンは 5 ~ 15 mg/ml で存在し得；スパン 85 は 0.5 ~ 2 mg/ml で存在し得；ポリソルベート 80 は 0.5 ~ 2 mg/ml で存在し得；そして DOTAP は 0.1 ~ 10 mg/ml で存在し得る。エマルジョンは、同じ量の（体積の上で）スパン 85 およびポリソルベート 80 を含み得る。このエマルジョンは界面活性剤より多くのスクアレンを含み得る。このエマルジョンは DOTAP より多くのスクアレンを含み得る。

20

【0109】

免疫原性組成物

典型的には、免疫原性組成物は、RNA およびポリペプチド（ならびに任意の送達系）に加えて薬学的に受容可能な担体を含む。このような担体の徹底的な議論は、Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition において得られる。

30

【0110】

本発明の薬学的組成物は、淡水（例えば、w.f.i.）の中、または緩衝液、例えば、リン酸緩衝液、Tris 緩衝液、ホウ酸緩衝液、コハク酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液またはクエン酸緩衝液、の中に活性のある成分（RNA およびポリペプチド）を含み得る。典型的には、緩衝剤の塩は、5 ~ 20 mM の範囲内で含まれる。

【0111】

本発明の薬学的組成物は、5.0 および 9.5 の間、例えば、6.0 および 8.0 の間、の pH を有し得る。

【0112】

本発明の組成物は、浸透圧を与えるためにナトリウム塩（例えば塩化ナトリウム）を含み得る。10 ± 2 mg/ml の濃度の NaCl が典型的であり、例えば約 9 mg/ml である。

40

【0113】

本発明の組成物は金属イオンキレート剤を含み得る。これらは、ホスホジエステルの加水分解を加速させ得るイオンを除去することによって RNA の安定性を延長させ得る。したがって、組成物は、1 種類もしくはそれより多くの EDTA、EGTA、BAPTA、ペンテト酸などを含み得る。典型的には、このようなキレート剤は、10 ~ 500 μM の間、例えば 0.1 mM、で存在する。有益なことに緩衝作用もまた提供しながら、クエン酸塩、例えばクエン酸ナトリウム、はキレート剤としてもまた働く。

【0114】

50

本発明の薬学的組成物は、 200 mOsm/kg および 400 mOsm/kg の間、例えば、 $240 \sim 360\text{ mOsm/kg}$ の間または $290 \sim 310\text{ mOsm/kg}$ の間、のモル浸透圧濃度を有し得る。

【0115】

本発明の薬学的組成物は、1種類もしくはそれより多くの保存料、例えば、チメロサルまたは2-フェノキシエタノール、を含み得る。水銀を含まない組成物が好ましく、そして保存料を含まないワクチンが調製され得る。

【0116】

特定の実施形態において、本発明の薬学的組成物は滅菌されている。

【0117】

別の特定の実施形態において、本発明の薬学的組成物は、発熱原性でなく、例えば、用量毎に < 1 の EU (エンドトキシン単位、標準的な尺度) を含み、そしていくつかの実施形態において、用量毎に < 0.1 の EU を含む。

【0118】

特定の実施形態において、本発明の薬学的組成物はグルテンを含まない。

【0119】

本発明の薬学的組成物は、単位用量の形態において調製され得る。いくつかの実施形態において、単位用量は、 $0.1 \sim 1.0\text{ mL}$ の間、例えば約 0.5 mL 、の体積を有し得る。

【0120】

本発明の薬学的組成物は、1種類もしくはそれより多くの小分子免疫増強剤を含み得る。例えば、この組成物は、TLR2アゴニスト(例えば Pam3CSK4)、TLR4アゴニスト(例えば、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート、例えば E6020)、TLR7アゴニスト(例えば イミキモド)、TLR8アゴニスト(例えば レシキモド)および/または TLR9アゴニスト(例えば IC31)を含み得る。理想的には、いずれのこのようなアゴニストも $< 2000\text{ Da}$ の分子量を有する。

【0121】

組成物は注射剤として調製され得、これは溶液としてか、または懸濁液としてかのいずれかである。この組成物は、肺内投与(例えば、細微なスプレーを使用する吸入器による)のために調製され得る。この組成物は、鼻腔内投与、耳内投与または眼投与(例えば、スプレーまたは液滴として)のために調製され得る。筋肉内投与のための注射剤が典型的である。

【0122】

組成物は、免疫学的有効量の RNA およびポリペプチドならびに、必要に応じて、任意の他の成分、を含む。「免疫学的有効量」によって、固体にその量を投与すること(単一用量においてか、または一連のものの部分としてかのいずれかによって)が、処置または予防に有効であることが意味される。この量は、処置されるべき固体の健康状態および身体状態、年齢、処置されるべき固体の分類群(例えば、ヒト以外の霊長類、霊長類など)、固体の免疫系の抗体を合成する能力、所望の予防の程度、ワクチンの製剤形態、処置する医者による医学的状況の評価、およびその他の関係する因子に依存して変動する。この量は、通例の試験を通して決定され得る比較的広い範囲内に収まることが期待される。概して、本発明の組成物のポリペプチドおよび RNA 含有量は、用量毎の RNA の量の観点から表される。好ましい用量は $100\text{ }\mu\text{g}$ の RNA (例えば、 $10 \sim 100\text{ }\mu\text{g}$ 、例えば、約 $10\text{ }\mu\text{g}$ 、 $25\text{ }\mu\text{g}$ 、 $50\text{ }\mu\text{g}$ 、 $75\text{ }\mu\text{g}$ または $100\text{ }\mu\text{g}$) を有する。発現物は、はるかにより低いレベル(例えば、 $1\text{ }\mu\text{g}$ / 用量、 100 ng / 用量、 10 ng / 用量、 1 ng / 用量)で認められ得るが、 $0.1\text{ }\mu\text{g}$ の最小用量が好ましい(国際出願第 2012/006369 号を参照のこと)。

【0123】

本発明は、本発明の薬学的組成物を含む送達器具(例えば、シリンジ、ネブライザー、スプレイヤー、吸入器、皮膚パッチなど)もまた提供する。この器具は、被験者にこの組

10

20

30

40

50

成物を投与するために使用され得る。

【0124】

処置の方法および医学的使用

本発明の薬学的組成物は、インフルエンザウイルスに対する免疫反応を誘発するためのインビボでの使用のためのものである。

【0125】

本発明は、有効量の本発明の薬学的組成物を投与する工程を含み、脊椎動物における免疫反応を生じさせるための方法を提供する。この免疫反応は、好ましくは、防御的であり、そして好ましくは、抗体および/または細胞媒介性免疫を含む。この方法はブースター反応を生じさせ得る。

10

【0126】

本発明は、脊椎動物におけるインフルエンザウイルスに対する免疫反応を生じさせるための方法における使用のための本発明の薬学的組成物もまた提供する。

【0127】

本発明は、脊椎動物におけるインフルエンザウイルスに対する免疫反応を生じさせるための薬物の製造における、上記で記載される通りの、RNA分子およびポリペプチドの使用もまた提供する。

【0128】

これらの使用および方法によって脊椎動物において免疫反応を生じさせることによって、この脊椎動物はインフルエンザウイルス感染および/または疾患に対して保護され得る。この組成物は免疫原性であり、そして特定の実施形態において、より多くのワクチン組成物である。本発明にしたがうワクチンは、予防的か(すなわち、感染を予防するため)または治療的か(すなわち、感染症を処置するため)のいずれかであり得るが、典型的には、予防的である。

20

【0129】

特定の実施形態において、脊椎動物は哺乳類、例えば、ヒトまたは大型の獣医学的哺乳類(例えば、ウマ、ウシ、シカ、ヤギ、ブタ)である。ワクチンが予防的使用のためのものである場合、特定の実施形態において、ヒトは、子供(例えば、歩き始めの子供または幼児)あるいはティーンエイジャーである; ワクチンが治療的使用のためのものである場合、特定の実施形態において、ヒトはティーンエイジャーまたは大人である。子供のために意図されたワクチンは、大人にもまた投与され得る(例えば、安全性、用量、免疫原性などを評価するために)。

30

【0130】

本発明にしたがって調製されたワクチンは、子供および大人の両方を処置するために使用され得る。したがって、ヒト患者は、1歳未満、5歳未満、1~5歳、5~15歳、15~55歳または少なくとも55歳であり得る。特定の実施形態において、このワクチンを受けるための患者は、年配者(例えば、50歳、60歳および特に65年)、年少者(例えば、5歳)、入院患者、医療従事者、軍人(armed service)および軍関係者、妊娠女性、慢性的に病気の患者または免疫不全の患者である。しかし、このワクチンは、これらの群についてのみ適切であるのではなく、そしてより一般的に集団において使用され得る。

40

【0131】

一般的に、本発明の組成物は、直接的に患者に投与される。直接送達は、非経口的な注射(例えば、皮下にか、腹腔内にか、静脈内にか、筋肉内にか、皮内にか、または組織の間質の空間に)によって成し遂げられ得る。代替的な送達経路として、直腸投与、経口投与(例えば、錠剤、スプレー)、口腔投与、舌下投与、膣内投与、局所投与、経皮(transdermal)投与もしくは経皮(transcutaneous)投与、鼻腔内投与、眼投与、耳内投与、肺内投与あるいはその他の粘膜投与が挙げられる。皮内投与および筋肉内投与が2つの好ましい経路である。注射は、針(例えば皮下注射針)によってもよいが、針を使わない注射が代替的に使用され得る。典型的な筋肉内投与量は0.5m

50

1 である。

【0132】

本発明は、全身性免疫および/または粘膜免疫を誘発するために、特に、全身性免疫および/または粘膜免疫の増強を誘発するために、使用され得る。

【0133】

治療的処置の有効性を確認する方法の一つの方法は、組成物の投与後に病原体感染をモニタリングすることを含む。予防的処置の有効性を確認する方法の一つの方法は、抗原に対する、全身性の（例えば、IgG1およびIgG2a生産のレベルをモニタリングして）および/または粘膜性の（例えば、IgA生産のレベルをモニタリングして）、免疫反応をモニタリングすることを含む。典型的には、抗原特異的血清抗体反応は免疫化後に決定される。組成物の免疫原性を評価する別の方法は、標的ポリペプチドに対して患者血清または粘膜分泌物をスクリーニングすることである。タンパク質と患者試料との間の陽性反応は、この患者が、問題のポリペプチドに対する免疫反応を開始したことを示す。組成物の有効性は、目的の感染症の病原体の適切な動物モデルを曝露させることによってインビボにおいてもまた決定され得る。

10

【0134】

投薬は、単一用量スケジュールまたは複数用量スケジュールによるものであり得る。複数用量は、一次免疫化スケジュールにおいて、そして/またはブースター免疫化スケジュールにおいて使用され得る。複数用量スケジュールにおいて、様々な用量は、同一または異なる経路（例えば、非経口的なブライムおよび粘膜的なブースト、粘膜的なブライムおよび非経口的なブースト、など）によって与えられ得る。複数用量は、典型的には、少なくとも1週間（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間など）離して投与される。一つの実施形態において、複数用量は、生後およそ、6週間後、10週間後および14週間後に、（例えば、世界保健機関のExpanded Program on Immunisation（「EPI」）において多くの場合使用される通り、6週、10週および14週の週齢で）投与され得る。代替的な実施形態において、2回の一次用量は、約2か月離して（例えば、約7、8もしくは9週間離して）投与され、その後、2回目の一次用量の約6か月後～1年後（例えば、2回目の一次用量の約6、8、10または12か月後）に1回もしくはそれより多くのブースター用量が用いられる。さらなる実施形態において、3回の一次用量は、約2か月離して（例えば、約7、8または9週間離して）投与され、その後、3回目の一次用量の約6か月後～1年後に（例えば、3回目の一次用量の約6、8、10または12か月後に）1回もしくはそれより多くのブースター用量が用いられる。

20

30

【0135】

キット

本発明は、（a）インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープを含むポリペプチドを含む第1のキット成分、および（b）インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープを含むポリペプチドをコードする自己複製RNAを含む第2のキット成分、を含むキットもまた提供する。

【0136】

一つの局面において、この2つのキット成分は、本発明の免疫原性組成物を与えるために混合され得る。別の局面において、このキットは、インフルエンザウイルスに対する免疫反応を引き起こすために、第2の組成物の前に第1の成分が投与される免疫化投与計画で投与するのに適している。

40

【0137】

第1のキット成分および第2のキット成分は別々に保存される。それらの容器は互いに分離されていてもよいし（例えば、2つのバイアル）、または互いに結合されていてもよい（例えば、デュアルチャンバーシリンジにおける2つのチャンバー）。

【0138】

これらキット成分のいずれかまたは両方は、水性の形態であり得る。これらキット成分

50

のいずれかまたは両方は、固体の形態または乾燥形態であり得る（例えば、凍結乾燥されている）。

【0139】

このRNAおよびポリペプチドが併用投与されるとき、それらを別々に詰めそして保存することがいっそう望ましくあり得る。これら2つの成分は、例えば、投与の約72時間前以内、約48時間前以内、約24時間前以内、約12時間前以内、約10時間前以内、約9時間前以内、約8時間前以内、約7時間前以内、約6時間前以内、約5時間前以内、約4時間前以内、約3時間前以内、約2時間前以内、約1時間前以内、約45分前以内、約30分前以内、約15分前以内、約10分前以内または約5分前以内に合わせられ得る。例えば、このポリペプチドおよびRNAは、患者のベッドサイドで合わせられ得る。

10

【0140】

これらの成分が順々に投与される場合、それらは、互いに約4時間以内、約3時間以内、約2時間以内、約1時間以内、約45分以内、約30分以内、約15分以内、約10分以内または約5分以内に投与され得る。プライム組成物、ブースト組成物またはその両方は、必要に応じて、本明細書中に記載される通りの、1種類もしくはそれより多くの送達系、免疫制御剤（例えばアジュバント）を含み得る。

【0141】

キットの成分のための適切な容器として、例えば、ボトル、バイアル、シリンジおよび試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックを含む様々な材料から形成され得る。容器は、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により穿刺可能なストッパーを有するバイアルであり得る）。

20

【0142】

キットは、薬学的に受容可能な緩衝液、例えば、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液またはデキストロース溶液、を含む第3の容器をさらに含み得る。これは、エンドユーザーに有用な他の材料（例えば、薬学的に受容可能な他の処方溶液、例えば、緩衝剤、希釈剤、フィルター、注射針、およびシリンジ、または他の送達器具）もまた含み得る。キットは、アジュバント（例えば、水中油型エマルジョン）を含む第4の容器もさらに包含し得る。

【0143】

キットは、免疫を誘導する方法についての、または感染症を処置することについての書面による指示を含む添付文書もまた含む。この添付文書は、未承認である添付文書の草稿であってもよいし、または米国食品医薬品局（FDA）または他の規制機関により承認された添付文書であってもよい。

30

【0144】

キット成分は、異なる場所で（例えば、異なる商業的実体によって、異なる国においてでさえ）製造され、そしてその後に関わられてキットを形成してもよい。したがって、本発明は、本明細書中で定義される通りのポリペプチドとともにキットの中へとアセンブリするための本明細書中で定義される通りのRNA、ならびに本明細書中で定義される通りのRNAとともにキットの中へとアセンブリするための本明細書中で定義される通りのポリペプチドを包含する。

【0145】

本発明の1つの局面は、プライム組成物によって誘導された免疫反応がブースト組成物によってブーストされる「プライムおよびブースト」免疫化投与計画に関する。例えば、抗原を用いたプライム（少なくとも1回）の後の（例えば、RNAまたはポリペプチドの投与後の）、実質的に異なる形態の抗原（例えば、ポリペプチドの代わりにRNA、逆もまたしかり）を含むブースト組成物。ブースト組成物の投与は、一般的に、プライム組成物の投与後、数週間後または数か月後である（例えば、プライム組成物が投与された後、約1週間後、約2週間後、約3週間後、約4週間後、約8週間後、約12週間後、約16週間後、約20週間後、約24週間後、約28週間後、約32週間後、約36週間後、約40週間後、約44週間後、約48週間後、約52週間後、約1か月後、約2か月後、約3か月後、約4か月後、約5か月後、約6か月後、約7か月後、約8か月後、約9か月後

40

50

、約 10 か月後、約 11 か月後、約 12 か月後、約 18 か月後、約 2 年後、約 3 年後、約 4 年後、約 5 年後、約 6 年後、約 7 年後、約 8 年後、約 9 年後または約 10 年後)。

【0146】

一般

用語「含む (comprising)」は、「含む (including)」および「からなる (consisting)」を包含し、例えば、X を「含む」組成物は、排他的に X からなってもよいし、または追加的な何かを含んでもよい (例えば、X + Y)。

【0147】

数値 x に関して、用語「約」とは、必要に応じたものであり、そして例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0148】

「実質的に」という言葉は、「完全に」を除外せず、例えば、Y を「実質的に含まない」組成物は、Y を完全に含まない、であってもよい。必要に応じて、「実質的に」という言葉は、本発明の定義から省略され得る。

【0149】

本発明の組成物の活性のある成分は、異なる場所で製造され、そしてその後に関与せられそして製剤化されてもよい。したがって、プロセスの異なる工程は、異なる場所で (例えば、異なる国で) 異なる人々によって大きく異なる回数実行されてもよい。したがって、いくつかの実施形態において、インフルエンザウイルス抗原由来のエピトープを含むポリペプチドおよび自己複製 RNA は、別々に (そして異なる実態によってでさえ) 調製され、その後に関与せられてもよいし、または一緒に使用されてもよい。本発明は、本明細書中で定義される通りのポリペプチドとともにその後使用するための本明細書中で定義される通りの RNA、ならびにまた本明細書中で定義される通りの RNA とともにその後使用するための本明細書中で定義される通りのポリペプチドを包含する。これら 2 つの成分は、それらの調製 (例えば、異なる商業的実体による、そして / または異なる国における) の後の任意の時点で、関与せられてもよいし、共製剤化されてもよいしまたは一緒に併せて使用されてもよい。したがって、RNA およびポリペプチドは同じ場所で作製される必要はない。

【0150】

「エピトープ」とは、免疫系によって (例えば、抗体によって、または T 細胞受容体によって) 認識される抗原の部位である。ポリペプチドエピトープは、直鎖状であってもよいし、または立体構造的であってもよい。T 細胞および B 細胞は、異なる方法で抗原を認識する。T 細胞が、クラス II MHC 分子またはクラス I MHC 分子に埋め込まれたタンパク質のペプチド断片を細胞の表面において認識するのに対し、B 細胞は、免疫グロブリン様細胞表面受容体によって、プロセッシングされていない抗原の表面特徴を認識する。T 細胞の抗原認識機構と B 細胞の抗原認識機構との差違は、それらのエピトープの異なる性格に反映される。したがって、B 細胞は、抗原または病原体の表面特徴を認識するのに対して、T 細胞エピトープ (約 8 ~ 12 アミノ酸の長さのペプチドを含む) は、抗原の三次元構造の文脈で見たとき、「表面」エピトープであると同時に「内部」エピトープでもあり得る。したがって、B 細胞エピトープは、好ましくは、抗原または病原体の表面上に露出されており、そして直鎖状または立体構造的であり得るのに対して、T 細胞エピトープは、典型的には、直鎖状であるが、利用可能であるかまたは抗原の表面にあることが必要とされない。通常、B 細胞エピトープは、少なくとも約 5 個のアミノ酸を含むが、3 ~ 4 個のアミノ酸ほどに小さくてもよい。T 細胞エピトープ、例えば CTL エピトープ、は典型的には、少なくとも約 7 ~ 9 個のアミノ酸を含み、そしてヘルパー T 細胞エピトープは典型的には、少なくとも約 12 ~ 20 個のアミノ酸を含む。

【0151】

個体が、複数のエピトープを有するポリペプチド抗原で免疫化される場合、多くの場合において、反応する T リンパ球の大部分は、その抗原に由来する 1 つまたは少数の直鎖状エピトープに特異的であり、そして / または応答する B リンパ球の大部分は、その抗原に

10

20

30

40

50

由来する１つまたは少数の直鎖状エピトープまたは立体構造的なエピトープに特異的である。このようなエピトープは、典型的には「免疫優性エピトープ」と呼ばれる。いくつかの免疫優性エピトープを有する抗原において、単一のエピトープが最も優性となり得、そして典型的には、これは「一級（primary）」免疫優性エピトープと呼ばれる。残りの免疫優性エピトープは、典型的には、「二級（secondary）」免疫優性エピトープ（単数または複数）と呼ばれる。

【実施例】

【０１５２】

発明を実施するための形態

実施例１：H5N1の研究

Balb/cマウスを、インフルエンザA/Turkey/Turkey/2005 (H5N1)由来のヘマグルチニンで免疫化した。組成物を０日目および５６日目に投与し、そして血清を０日目、２１日目、５６日目および７２日目に採取した。ヘマグルチニンを、タンパク質としてか、または自己複製アルファウイルスRNAレプリコンの中にコードさせてかのいずれかによって（あるいは両方の組み合わせで）送達した。RNAはカチオン性ナノエマルジョン（CNE）を用いて送達し、そしてタンパク質は、緩衝液中か、または水中油型エマルジョンアジュバント（MF59）とともにかのいずれかによって送達した。対照群には、オボアルブミンまたは緩衝液（PBS）単独を与えた。マウスは１０グループに分け、グループ毎に１２匹のマウスがいた：

【数１】

グループ	０日目	５６日目
１	PBS	PBS
２	OVA(RNA)、1μg CNE 中	OVA(RNA)、1μg CNE 中
３	レプリコン、1μg CNE 中	レプリコン、1μg CNE 中
４	レプリコン、10μg CNE 中	レプリコン、10μg CNE 中
５	レプリコン、10μg CNE 中	タンパク質、1μg PBS 中
６	レプリコン、10μg CNE 中	タンパク質、0.1μg MF59 中
７	タンパク質、1μg PBS 中	タンパク質、1μg PBS 中
８	タンパク質、1μg MF59 中	タンパク質、1μg MF59 中
９	タンパク質 0.1μg + レプリコン 10μg CNE 中	タンパク質 0.1μg + レプリコン 10μg CNE 中
１０	タンパク質、0.1μg CNE 中	タンパク質、0.1μg CNE 中

【０１５３】

表２は、７２日目における血球凝集阻害（HI）力価（GMT）を示す。RNAおよびタンパク質の混合物（グループ９）は、MF59アジュバント化タンパク質（グループ８）と同じ程度に高い力価を示した。同様の効果がマイクロ中和試験において見られ、ここで３つの異なるH5N1株に対する力価もまた、MF59アジュバント化タンパク質を使用して取得した力価に匹敵していた。

【表 2】

表 2: H5N1 特異的 HI 力価 (GMT)

グループ	GMT
1	0
2	0
3	3932
4	22949
5	81950
6	100147
7	16289
8	257126
9	323843
10	1007

10

【0154】

CD8 + T 細胞を、HA_{533~541} ペプチドに特異的な MHC I 五量体を使用して 105 日目に計測した。このペプチドは H1 株と H5 株との間で保存されている。表 3 は、五量体陽性細胞の頻度 (CD8 + CD44^h T 細胞の %) を示し、その結果は、混合 RNA / タンパク質組成物の使用が、免疫化後長期間にわたって抗原特異的 T 細胞を循環中に留まらせたことを示す。

20

【表 3】

表 3: HA_{533~541} 五量体+ CD8 T 細胞 (%)

グループ	平均	SD
1	0.04	0.02
3	0.20	0.15
4	0.65	0.39
5	0.45	0.12
6	0.33	0.10
7	0.04	0.01
8	0.05	0.03
9	0.63	0.25
10	0.03	0.03

30

【0155】

表 4 は、第 2 投与の 12 週間後の H5 特異的 CD8 + T 細胞応答 (抗原特異的 CD8 + T 細胞、IFN の %) を示す。グループ 9 は、最も高い比率の抗原特異的 CD8 + T 細胞を示した。

40

【表 4】

表 4: H5 特異的 IFN γ +CD8 T 細胞 (%)

グループ	平均	SD
1	0.02	0.02
3	0.25	0.12
4	0.67	0.30
5	0.70	0.28
6	0.62	0.34
7	0.02	0.05
8	0.01	0.04
9	0.95	0.73
10	-0.02	0.04

10

【0156】

実施例 2 : H1N1 / H5N1 研究

マウスを、異なる HA サブタイプを有する 2 つのインフルエンザ A ウイルス株 : A / C a l i f o r n i a / 7 / 0 9 (H 1 N 1) ; および A / T u r k e y / T u r k e y / 2 0 0 5 (H 5 N 1) 、に由来するヘマグルチニンを用いて免疫化した。組成物を 0 日目および 5 6 日目に投与し、そして血清を 0 日目、2 1 日目、4 2 日目、5 5 日目および 7 0 日目に採取した。ヘマグルチニンは、タンパク質としてか、または自己複製アルファウイルス RNA レプリコンの中にコードさせてかのいずれかによって (あるいは両方の組み合わせで) 送達した。RNA はカチオン性ナノエマルジョン (CNE) を用いて送達し、そしてタンパク質は、緩衝液中か、または水中油型エマルジョンアジュバント (MF59) とともにかのいずれかによって送達した。対照群には、緩衝液 (PBS) 単独を与えた。マウスは 10 グループに分け、以下の通りにグループ毎に 6 匹のマウスがいた :

20

【数 2】

グループ	0 日目および 56 日目
1	PBS
2	H5 レプリコン 10 μ g CNE 中
3	H5 タンパク質 0.1 μ g PBS 中
4	H5 タンパク質 0.1 μ g MF59 中
5	H5 レプリコン 10 μ g CNE 中 + H5 タンパク質 0.1 μ g PBS 中
6	H5 レプリコン 10 μ g CNE 中 + H1 タンパク質 0.1 μ g PBS 中
7	H1 レプリコン 10 μ g CNE 中
8	H1 タンパク質 0.1 μ g PBS 中
9	H1 タンパク質 0.1 μ g MF59 中

30

40

【0157】

50

表 5 は、示される実験グループにおける 70 日目での HI 力価 (GMT) を示す。抗 H5 の結果は、H5 レプリコンが、タンパク質の形態で送達された H5 ヘマグルチニンに対する免疫反応を増強することを裏付ける (グループ 3 およびグループ 5 を比較のこと)。さらに、グループ 6 についての抗 H1 の結果は、H5 レプリコンが、抗 H1 応答をもまた、MF59 を用いてアジュバント化した H1 タンパク質によって達成された増強 (グループ 9) に到達するレベルまで増強することができる (グループ 6 およびグループ 8 を比較のこと) ことを示す。

【表 5】

表 5: HI 力価 (GMT)

グループ		H5N1 特異的	H1N1 特異的
1	H5 レプリコン 10 μ g CNE 中	718	10
2	H5 タンパク質 0.1 μ g PBS 中	22	10
3	H5 タンパク質 0.1 μ g MF59 中	5120	10
4	H5 レプリコン 10 μ g CNE 中 + H5 タンパク質 0.1 μ g PBS 中	1810	7241
5	H5 レプリコン 10 μ g CNE 中 + H1 タンパク質 0.1 μ g PBS 中	570	1016
6	H1 レプリコン 10 μ g CNE 中	10	3417
7	H1 タンパク質 0.1 μ g PBS 中	10	13669
8	H1 タンパク質 0.1 μ g MF59 中	127	10

10

20

【0158】

表 6 は、H1 または H5 ヘマグルチニンについて応答する抗原特異的 IFN- γ + CD8 + T 細胞の % を示す。H5 についての抗原特異的な T 細胞応答は、H5 レプリコンが、タンパク質の形態で送達された H5 ヘマグルチニンに対する免疫反応を増強することをさらに裏付け、最良の結果はグループ 5 において見られる。全てのレプリコンのグループ (すなわち、グループ 2、グループ 5、グループ 6 およびグループ 7) は、タンパク質が MF59 を用いてアジュバント化されている場合でさえ (グループ 4)、タンパク質抗原を用いて達成された H5 特異的応答 (すなわち、グループ 3 およびグループ 4) より高い H5 特異的応答を示す。同じ効果が H1 特異的応答で見られた。

30

【0159】

したがって、2 つの異なる様式でヘマグルチニンを送達するためのタンパク質およびレプリコンの組み合わせ (すなわちグループ 5 およびグループ 6) は、強い HI 力価と一緒に高い比率のインフルエンザ特異的機能性 T 細胞を与える。

【表 6】

表 6: IFN γ +CD8 T 細胞 (%)

グループ		H5 特異的 IFN γ +CD8 T 細胞 (%)		H1 特異的 IFN γ +CD8 T 細胞 (%)	
		平均	SD	平均	SD
1	PBS	0.01	0.04	0.03	0.04
2	H5 レプリコン 10 μ g CNE 中	0.47	0.27	0.34	0.27
3	H5 タンパク質 0.1 μ g PBS 中	-0.02	0.04	0.02	0.07
4	H5 タンパク質 0.1 μ g MF59 中	0.03	0.03	0.02	0.04
5	H5 レプリコン 10 μ g CNE 中+ H5 タンパク質 0.1 μ g PBS 中	1.06	0.57	1.65	1.03
6	H5 レプリコン 10 μ g CNE 中+ H1 タンパク質 0.1 μ g PBS 中	0.48	0.31	0.69	0.36
7	H1 レプリコン 10 μ g CNE 中	0.41	0.27	0.83	0.23
8	H1 タンパク質 0.1 μ g PBS 中	-0.03	0.02	-0.01	0.02
9	H1 タンパク質 0.1 μ g MF59 中	0.07	0.03	0.01	0.08

10

20

【0160】

本発明は、単に例示の方法によって記載されているだけであり、そして本発明の範囲および精神の中に留まったまま、改変がなされ得ることが理解される。

表 1：有用なリン脂質

DDPC 1, 2 - ジデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン

DEPA 1, 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート

DEPC 1, 2 - エルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン

30

DEPE 1, 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン

DEPG 1, 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 [ホスファチジル - rac - (1 - グリセロール . . .)

DLOPC 1, 2 - リノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン

DLPA 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート

DLPC 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン

DLPE 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン

DLPG 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 [ホスファチジル - rac - (1 - グリセロール . . .)

40

DLPS 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン

DMG 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン

DMPA 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート

DMPC 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン

DMPE 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン

DMPG 1, 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 [ホスファチジル - rac - (1 - グリセロール . . .)

DMPS 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン

50

D O P A	1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート	
D O P C	1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
D O P E	1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	
D O P G	1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール . . .)	
D O P S	1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン	
D P P A	1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート	
D P P C	1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
D P P E	1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	10
D P P G	1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール . . .)	
D P P S	1, 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン	
D P y P E	1, 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン	
D S P A	1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート	
D S P C	1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
D S P E	1, 2 - ジオステアルピル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	
D S P G	1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール . . .)	20
D S P S	1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン	
E P C	卵 P C	
H E P C	水素添加卵 P C	
H S P C	高純度水素添加大豆 P C	
H S P C	水素添加大豆 P C	
L Y S O P C	M Y R I S T I C 1 - ミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
L Y S O P C	P A L M I T I C 1 - パルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	30
L Y S O P C	S T E A R I C 1 - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
ミルクスフィンゴミエリン M P P C	1 - ミリストイル, 2 - パルミトイル - s n - グリセロ 3 - ホスファチジルコリン	
M S P C	1 - ミリストイル, 2 - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
P M P C	1 - パルミトイル, 2 - ミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
P O P C	1 - パルミトイル, 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	40
P O P E	1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	
P O P G	1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセリン) . . .]	
P S P C	1 - パルミトイル, 2 - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
S M P C	1 - ステアロイル, 2 - ミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
S O P C	1 - ステアロイル, 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコ	50

リン

S P P C 1 - ステアロイル , 2 - パルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジル
コリン 。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/050414

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/145 C12N15/867 C12N7/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/033966 A2 (ALPHAVAX INC [US]; SMITH JONATHAN F [US]; HUBBY BOLYN [US]; COPP LAURA) 20 March 2008 (2008-03-20) the whole document	1-25
A	WO 2012/006369 A2 (NOVARTIS AG [CH]; GEALL ANDREW [US]) 12 January 2012 (2012-01-12) cited in the application the whole document	1-25
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 March 2014

Date of mailing of the international search report

14/03/2014

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Hermann, Patrice

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/050414

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BENJAMIN PETSCH ET AL: "Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 30, no. 12, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 1210-1216, XP055051005, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2436 the whole document -----	1-25
A	W. DALEMANS ET AL: "Protection against Homologous Influenza Challenge by Genetic Immunization with SFV-RNA Encoding Flu-HA", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 772, no. 1 DNA Vaccines, 1 November 1995 (1995-11-01), pages 255-256, XP055104577, ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb44752.x the whole document -----	1-25
A	MARINA N. FLEETON ET AL: "Self-Replicative RNA Vaccines Elicit Protection against Influenza A Virus, Respiratory Syncytial Virus, and a Tickborne Encephalitis Virus", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 183, no. 9, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 1395-1398, XP055089099, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1086/319857 the whole document -----	1-25
A	GERT ZIMMER: "RNA Replicons - A New Approach for Influenza Virus Immunoprophylaxis", VIRUSES, vol. 2, no. 2, 29 January 2010 (2010-01-29), pages 413-434, XP055041232, DOI: 10.3390/v2020413 the whole document ----- -/--	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/050414

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TIMOTHY D. CARROLL ET AL: "Alphavirus replicon-based adjuvants enhance the immunogenicity and effectiveness of Fluzone in rhesus macaques", VACCINE, vol. 29, no. 5, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 931-940, XP055104801, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.024 the whole document</p> <p>-----</p>	1-25
A	<p>ZHOU X ET AL: "Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 12, no. 16, 1 December 1994 (1994-12-01), pages 1510-1514, XP023937577, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/0264-410X(94)90074-4 [retrieved on 1994-12-01] the whole document</p> <p>-----</p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/050414

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2008033966 A2		20-03-2008	AU	2007296489 A1	20-03-2008
			CA	2663295 A1	20-03-2008
			EP	2061508 A2	27-05-2009
			NZ	575901 A	27-04-2012
			US	2009022760 A1	22-01-2009
			US	2011086062 A1	14-04-2011
			WO	2008033966 A2	20-03-2008
			ZA	200902443 A	26-05-2010

WO 2012006369 A2		12-01-2012	CA	2804492 A1	12-01-2012
			EP	2591114 A2	15-05-2013
			JP	2013530245 A	25-07-2013
			US	2013149375 A1	13-06-2013
			WO	2012006369 A2	12-01-2012

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
C 0 7 K 14/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
	C 0 7 K 14/11	

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

(72) 発明者 ジェオール, アンドリュー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 350, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA11 DA03 GA11
 4C085 AA03 AA38 BA55 BB11 BB23 CC07 CC08 CC31 DD11 DD13
 DD86 EE01 EE03 EE06 EE07 FF21 FF30 GG01 GG02 GG03
 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
 4H045 AA11 AA30 CA01 DA86 EA31 FA74