

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年12月15日(15.12.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/199936 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/015 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/04 (2006.01) C07K 14/115 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/067516
- (22) 国際出願日: 2016年6月13日(13.06.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-119097 2015年6月12日(12.06.2015) JP
特願 2016-063315 2016年3月28日(28.03.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人三重大学(MIE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5148507 三重県津市栗真町屋町1577 Mie (JP). バイオコモ株式会社(BIOCOMO INC.) [JP/JP]; 〒5101233 三重県三重郡菟野町大字菟野1325番地 Mie (JP).
- (72) 発明者: 野阪 哲哉(NOSAKA, Tetsuya); 〒5148507 三重県津市江戸橋2丁目174 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科内 Mie (JP). 鶴留雅人(TSURUDOME, Masato); 〒5148507 三重県津市江戸橋2丁目174 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科内 Mie (JP). 福村 正之(FUKUMURA, Masayuki); 〒5101233 三重県三重郡菟野町大字菟野1325番地 バイオコモ株式会社社内 Mie (JP). 大塚 順平(OHTSUKA, Junpei); 〒5101233 三重県三重郡菟野町大字菟野1325番地 バイオコモ株式会社社内 Mie (JP). 油田 正夫(YUDA, Masao); 〒5148507 三重県津市江戸橋2丁目174 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科内 Mie (JP). 岩永 史朗(IWANAGA, Shiroh); 〒5148507 三重県津市江戸橋2丁目174 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科内 Mie (JP).
- (74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号丸の内北口ビル21階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: HUMAN PARAINFLUENZA TYPE 2 VIRUS VECTOR AND VACCINE

(54) 発明の名称: ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクター及びワクチン

(57) Abstract: Disclosed are a virus vector, by which a polymeric antigen peptide can be efficiently introduced into a target cell while maintaining a three dimensional structure that is required for acting as an antigen, and a vaccine using the aforesaid vector. More specifically, disclosed are a virus vector, in which a nucleic acid encoding an antigen polypeptide is integrated into directly 5'-upstream of HN gene in an F gene-deficient paramyxovirus family virus gene, wherein the antigen polypeptide is expressed as a fusion protein fused with a TM sequence and a CT sequence derived from the aforesaid virus, said fusion protein consisting of 130 or more amino acid residues, and a vaccine comprising the aforesaid virus vector.

(57) 要約: 本発明は、高分子の抗原ペプチドを、抗原として機能するために必要な立体構造を維持して、標的細胞に効率的に導入できるウイルスベクター及び該ベクターを利用したワクチンに関する。具体的には、抗原ポリペプチドをコードする核酸が、F遺伝子欠損型パラミクソウイルス科ウイルス遺伝子のHN遺伝子5'直上流に組み込まれているウイルスベクターであって、該抗原ポリペプチドが前記ウイルス由来のTM配列及びCT配列と融合した130アミノ酸残基以上の融合タンパクとして発現されるウイルスベクター及び前記ウイルスベクターを含むワクチンに関する。



WO 2016/199936 A1

明 細 書

発明の名称：

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクター及びワクチン

技術分野

[0001] [関連出願]

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2015-119097号（2015年6月12日出願）及び特願2016-63315号（2016年3月28日出願）の明細書に記載された内容を包含する。

[技術分野]

本発明は、非伝播型ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクター及び前記ウイルスベクターを利用したワクチンに関する。

背景技術

[0002] RSV、Ebolaウイルス等に対する効率的な中和抗体誘導組換えワクチン作製のためには、膜融合活性をもつエンベロープタンパク（RSV F、Ebola GP等）の全長をワクチン抗原とすることが適切である。しかし、該タンパクはターゲット細胞等と融合する前後で立体構造が変化すること、細胞と融合する前の構造をもつprefusionタンパクが効率的な中和抗体を誘導すること、prefusion状態の該タンパクの構造は不安定であること、prefusion状態の該タンパク構造を安定化しワクチン抗原とする取組みがなされていることが報告されている（非特許文献1～4）。

[0003] RSウイルス（RSV）は、Paramyxovirus科のPneumovirus属に分類されるエンベロープを持つウイルスで、直径80～350nmの球形、あるいはフィラメント状の形態を有し、主要なサブタイプAとBがあり、呼吸器感染症を引き起こす。RSVの初感染は軽症の感冒様症状から重症の細気管支炎や肺炎などの下気道疾患に至るまで様々な症状を呈する。RSVに対する母体からの移行抗体があるが、徐々に減少し生後7か月後には検出されない。初感染は顕性で下気道疾患を起こす危険性が高く、生後6月以内の感染で最も重症化する。疫学調査（2009年

）では、5歳以下乳幼児で入院患者数が、米国で年間7.5-12.5万人、欧州5か国で8万人、日本で3-8万人、65歳の高齢者では、米国で20万人、欧州5か国で20万人、日本で14万人と報告されている。

[0004] RSV感染予防のための有効なワクチンはなく、抗RSVヒト化モノクローナル抗体のパリビズマブ（シナジス）による対症療法が存在するのみである。パリビズマブはRSV流行開始前から流行期の間、1回15mg/kgを1カ月毎に筋注することで予防効果が期待できるとされている。しかし、当該ヒト化モノクローナル抗体は極めて高価であり、日本国内での保険適応対象は早産児、慢性肺疾患を有する小児、ダウン症児に限定されている。抗体の高コストがネックとなり投与対象患者を広げることが難しい。

したがって、安価なRSVの感染予防ワクチンの開発が強く求められているが、以下に記載する過去のワクチン禍により、他の感染症ワクチンに比べてワクチン開発が大幅に遅れている。

[0005] 1965-66年にかけてインフルエンザやポリオのワクチンと同様にRSVをホルマリン処理した不活化ワクチン（Lot 100と命名されたワクチン）をアルミニウムアジュバントと共に、RSVに感染歴のない乳児を対象に接種する臨床試験が行われた。当該ワクチン接種後のRSVの自然感染により、当該ワクチン接種群では、非接種群に比べて入院率が16倍（ワクチン接種群の乳児の80%が入院）、2名が死亡という悲惨な結果（RSV感染重症化 ERD: enhanced respiratory disease）に陥った。以降ERDの原因究明が精力的に行われている。

[0006] 通常RSVによる細気管支炎では肺への好酸球や好中球の浸潤は認められないが、ホルマリン不活化RSVワクチン（Lot 100）接種後のRSV自然感染死亡乳児では、肺への好中球、好酸球等の著明な浸潤及びIL-4/IL-5サイトカイン産生増加による2型ヘルパーT細胞（Th-2）の過剰な誘導が認められた。その際、RSVに対する抗体価の上昇は認められたが、RSVに対し高い中和活性力価をもつ抗体の誘導は低かったと報告されている。RSVの膜タンパクの一つであるFタンパクはワクチン抗原として重要であることが報告されているが、Fタンパクは環境により立体的コンフォメーションが大きく変化することが分かっている。

る。ホルマリン処理では、RSV Fの立体構造が変化するだけでなく、当該処理によりタンパク中のカルボニル含有量が大幅に増加し、Th2反応が誘導されること、その結果としてERDが引き起こされる可能性が高いということが動物試験で報告されている（非特許文献5）。当該文献では熱処理したRSV（立体構造のみ変化）ワクチンでは肺組織への好中球浸潤はホルマリン処理RSVワクチンに比べて少ないことも記載されており、ホルマリン処理によるRSVワクチンのERD誘導は単に抗原の立体構造の変化だけではないものと考えられる。

[0007] RSVの中和抗体誘導にはRSVの膜タンパクであるFタンパクが抗原として重要である。Fタンパクは、F0というタンパク質前駆体として翻訳される。F0中には2箇所のヒューリン開裂部位が存在し、成熟過程をへてS-S結合で架橋されるF1とF2に切断される（成熟Fタンパク）。ヒューリンによる切断によりp27とよばれる27個のポリペプチドが削除される。成熟Fタンパクは感染細胞上及びウイルスエンベロープ上では3量体を形成し、環境によりprefusion Fとpostfusion Fの二つ異なる立体構造をとることが知られている。RSVウイルスが細胞に融合する前のFタンパクは通常prefusion F構造をとっているが、当該構造は熱力学的に不安定であり、細胞融合、加熱、変性剤、Fタンパクの細胞及びエンベロープへのアンカーリングを担っているtransmembrane配列の除去等により、熱力学的に安定なpostfusion F構造に容易に構造転換する。prefusion Fとpostfusion Fの立体構造はX線結晶解析により明らかにされており、それぞれ結合する抗体と結合部位も詳細に報告されている（非特許文献1）。

[0008] モノクローナル抗体のパリビズマブは、RSV Fタンパクのsite IIとよばれる部位に結合する。当該配列領域はprefusion Fとpostfusion Fの両者において立体構造が保たれており、パリビズマブは両構造のFタンパクに結合し中和活性を示す。

[0009] 一方、prefusion Fの立体構造の抗原エピトープで、site ϕ （ゼロ）と呼ばれるアミノ酸配列に結合する抗体が報告されている。当該エピトープの近傍の領域は、prefusion Fでは2つの β シート構造と4つの α ヘリックスより構

成された折れ曲り構造をとる。一方、postfusion Fでは当該領域は1つの α ヘリックス構造による直鎖状の構造をとる。このように、prefusion Fとpostfusion F間でsite ϕ (ゼロ) 構造は異なっており、5C4、AM22、D25と命名された抗体はprefusion Fの構造にのみ結合し、postfusion 構造のFタンパクには結合しない。

[0010] また、prefusion Fのsite ϕ (ゼロ) 結合抗体のRSVに対する中和活性は、site II結合抗体に比べて10-100倍高いことが知られており、有効なワクチン開発には、不安定なprefusion 構造をとるFタンパクを抗原として提供できるワクチン技術を開発することが重要となる。

[0011] prefusion Fタンパクを抗原として提供する方法として、(i) prefusion Fタンパクの構造安定化、又は(ii) prefusion Fの立体構造を維持した抗原デリバリーシステムの開発、あるいは両者の融合による方法が考えられる。

[0012] (i) の構造安定化を図る方法として、2箇所あるヒューリン認識部位アミノ酸部位の一部/両者の欠失、置換、又はヒューリン認識部位間に位置するp27ペプチドを除去又は置換により、prefusion Fタンパクの構造安定化修飾が考えられる。他の部位のアミノ酸置換では、RSV Fの67番目のAsn(N)をIle (I)に、251番目のSer(S)をPro(P)に置換することによりRSVのp27の除去変異体の安定化(非特許文献4)が考えられる。また、155番目のSer(S)をCys(C)に、290番目のSer(S)をCys(C)に置換しシステイン間のS-S結合を架橋することによりRSVのFの安定化(参考文献7)も考えられる。さらに、Fタンパクの2箇所のヒューリン認識配列の後部配列の直後に位置する細胞等融合Fusion領域を一部又は全部を欠失させ、Fusion能を消失させることによる構造安定化も考えられる。

[0013] Fタンパクを抗原として利用する場合、N末端側に位置する分泌シグナル配列を残し、C末端側の膜貫通(TM)配列及び膜内(CT)配列を欠失させた可溶性のFタンパク(可溶型Fタンパク)が用いられることが多い。当該配列を保持したFタンパクを細胞中で発現させると膜にアンカーリングするため回収が難しく、これを除去してFタンパクを培地中に分泌し回収を容易にするために

採られる措置である。一方、FタンパクはTM配列及びCT配列を有することにより、3量体を形成し細胞膜上又はウイルスエンベロープにアンカーリングされ、prefusion構造が安定化する。つまり、prefusion構造のFタンパクを抗原にする場合、FタンパクのTM配列及びCT配列を除去すれば回収は容易になるが、構造が不安定となる。一方、TM配列及びCT配列を残せば、構造は安定化するが回収が難しくなる。

[0014] そこで、(ii)では、TM配列及びCT配列を保持したままFタンパクを細胞膜又はウイルスエンベロープ、ベクター等上に結合させ構造を安定化させた状態で、レシピエントにFタンパクを運搬するデリバリーシステムを開発する方策、又はこのシステムに(i)を融合させた方策をとることが考えられる。

[0015] 発明者らは、非増殖型hPIV2ウイルスベクターの膜タンパク遺伝子に外来抗原遺伝子を融合させ、抗原を保持した非増殖型ウイルスベクターを作製し、ワクチンとして利用する方法、さらに該ウイルスを通常処理濃度の1/10 - 1/100の低濃度の β -プロピオラクトンでウイルス複製が起こらないように不活化しワクチンとして利用する方法を開発している(特許文献1)。この方法により、万能型インフルエンザ抗原M2eを2個連結した48アミノ酸とhPIV2のFタンパクのTM配列及びCT配列を融合した遺伝子(113アミノ酸残基)を、F欠損hPIV2ベクターの転写量の最も多いNP遺伝子の5'上流のNotI制限サイトに導入することで、動物試験に供するに十分なウイルスを回収することに成功している。

[0016] RSVのFタンパクやエボラウイルスのGPタンパク等は、500アミノ酸残基以上の抗原であり、しかも抗原として機能するためには厳格な立体構造が求められる。こうした高分子タンパクを、立体構造を保持した状態でデリバリー可能なベクター及びワクチンのさらなる開発が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0017] 特許文献1 : W02014/103310

非特許文献

- [0018] 非特許文献1 : MaLellan, JS. et al., Science:2013:340, 6136, 1113-1117
非特許文献2 : MaLellan, JS. et al., Science:2013:342, 6158-8, 592-598
非特許文献3 : Bale, S. et al., Viruses, 2012:(4), 447-470
非特許文献4 : Krarup, A. et al., Nat. Commun. 2015:3, 6:8143-54
非特許文献5 : Moghaddam, A. et al., Nat Med 2006 (12) 905-907
非特許文献6 : Bukreyev, A. et al., Virology; 2009: 383(2), 348-361
非特許文献7 : Liang, B. et al., J Virol; 2015, (89):9499-9510
非特許文献8 : Bernstein, DI. et al., Pediatr. Infect. Dis. J.:2012 (31), 109-114
非特許文献9 : Ynang, CH. et al., Vaccine:2013:(31), 2822-2827
非特許文献10 : Hara K, et al.: HUMAN GENE THERAPY :2013(24), 683-691
非特許文献11 : Ohtsuka, J. et al., Gene Ther. 2014. 21(8), 775-784
非特許文献12 : Odell, D. et al., J Virol;1997(71), 7996-8000
非特許文献13 : Ohtaki, N. et al., Vaccine:2010(28), 6588-6596
非特許文献14 : Zhang, S, et al., Virology Journal:2011(8), 333-339
非特許文献15 : Martinez. O, et al., J Virol:2013 (87) 3324-3334

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0019] 本発明の課題は、高分子の抗原ペプチド（タンパク質及びペプチドを含む）を、抗原として機能するために必要な立体構造を維持して、標的細胞に効率的に導入できるウイルスベクター及び前記ベクターを利用したワクチンの提供にある。

課題を解決するための手段

- [0020] 発明者らは、膜タンパク遺伝子を欠損した非伝播型パラミクソウイルス科ウイルスゲノム遺伝子のHN遺伝子5' 直上流に抗原ペプチドを組み込み、ウイルスベクターのエンベロープタンパクTM及びCT配列と抗原ペプチドとを融合発現させることで、立体構造を維持した状態で数百アミノ酸残基の高分子抗原ペプチドを標的細胞に効率的に送達できることを見出した。

[0021] すなわち、本発明は、以下の（１）～（９）に関する。

（１）抗原ポリペプチドをコードする核酸が、F遺伝子欠損型パラミクソウイルス科ウイルスゲノム遺伝子のHN遺伝子5'直上流に組み込まれているウイルスベクターであって、該抗原ポリペプチドが前記ウイルス由来のTM配列及び／又はCT配列と融合された130アミノ酸残基以上の融合タンパクとして発現される非伝播型ウイルスベクター。

（２）パラミクソウイルス科のウイルスが非伝播型ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスである、（１）記載のウイルスベクター。

（３）抗原ポリペプチドがベクターエンベロープ表面に発現されることを特徴とする、（１）又は（２）に記載のウイルスベクター。

（４）抗原ポリペプチドが天然の立体構造又はワクチン抗原として必要な立体構造を維持した状態で発現されることを特徴とする、（１）～（３）のいずれかに記載のウイルスベクター。

（５）核酸不活化処理されたものである、（１）～（４）のいずれかに記載のウイルスベクター。

前記核酸不活化処理は、低濃度のβプロピオラクトン処理など、ウイルスエンベロープの構造を実質的に変化させないものである。

（６）抗原ポリペプチド遺伝子のTM配列及び／又はCT配列あるいはGPI様アンカータンパク質がヒトパラインフルエンザ2型ウイルス由来のTM配列及び／又はCT配列で置換された核酸として組み込まれている、（１）～（５）のいずれかに記載のウイルスベクター。

（７）抗原ポリペプチドが、強毒型インフルエンザウイルスを含むインフルエンザウイルス、パラインフルエンザ3型ウイルス、RSウイルス、ヘンドラウイルス、SARSウイルス、MERSウイルス、ニパウイルス、ラッサウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、エボラウイルス、ハンタウイルス、エイズウイルス、C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、クリミアーコンゴ出血熱ウイルス、ヘルペスウイルス、サ

イトメガロウイルス、Zikaウイルス、マールブルグウイルス、HIVおよびパピローマウイルスから選ばれるウイルスの抗原ペプチド、マラリア原虫の抗原ペプチド、A群 β （ベータ）型溶連菌、Mycobacterium tuberculosis、コレラ菌、およびマイコプラズマから選ばれる細菌の抗原ペプチド、または癌抗原gp100、MUC1、NY-ESO-1、MelanA/MART1、TRP2、MAGE、CEA、CA125、HER2/neu、WT1、PSAおよびネオアンチジェンからなる群から選ばれる抗原ペプチドのいずれか1または2以上、あるいはこれらの断片である、(1)～(6)のいずれかに記載のウイルスベクター。

(8) 抗原ポリペプチドが、インフルエンザウイルスの3個以上の連続したM2e抗原、RSVのFタンパク又はGタンパクあるいはその変異体もしくはその断片、エボラウイルスのGPタンパク又はその変異体もしくはその断片、マラリアCSPタンパク又はその変異体もしくはその断片、及びZikaウイルスのprM/Eタンパク又はその変異体もしくはその断片から選ばれるいずれかである、(7)記載のウイルスベクター。

なお、前記抗原ポリペプチドは、下記のような態様でウイルスベクターに組み込まれる：

- a) インフルエンザウイルスの3個以上の連続したM2e抗原遺伝子とヒトパラインフルエンザ2型ウイルスFタンパクのTM配列及びCT配列を含む核酸；
- b) RSVの全長Fタンパクをコードする遺伝子又は当該タンパクのTM配列及び／又はCT配列が、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスFタンパクのTM配列及び／又はCT配列で置換された核酸、あるいはprefusion Fの安定性を増加させるアミノ酸変異を導入したFタンパクにヒトパラインフルエンザ2型ウイルスFタンパクのTM配列及び／又はCT配列で置換されたタンパクをコードする核酸；
- c) RSVの全長Fタンパクから細胞融合領域配列（配列番号5）を一部欠失させたFタンパクをコードする遺伝子又はprefusion Fの安定性を増加させるアミノ酸変異を導入したFタンパクをコードする遺伝子において、該Fタンパク

のTM配列及び／又はCT配列がヒトパラインフルエンザ2型ウイルスFタンパクのTM配列及び／又はCT配列で置換されたタンパクをコードする核酸；

d) RSVの全長Fタンパクより2箇所ヒューリン切断領域間のp27ペプチド配列と前記p27の最初のヒューリン切断認識配列のRRを除去したRSVのFタンパクをコードする遺伝子もしくはその変異体又は最初のヒューリン切断認識配列RRをQAQQに置換したRSVのFタンパクをコードする遺伝子又はその変異体において、該FタンパクのTM配列及び／又はCT配列がヒトパラインフルエンザ2型ウイルスFタンパクのTM配列及び／又はCT配列で置換されたタンパクをコードする核酸；

e) 上記b)-d)に記載された核酸のRSV Fの膜外配列遺伝子の3'末端側に、T4ファージのFibritin三量体形成配列遺伝子もしくはGCN三量体形成配列遺伝子を挿入した遺伝子をコードする核酸、又は三量体形成を安定化させるS-S結合を形成するためにアミノ酸をCysに置換した遺伝子をコードする核酸；

f) エボラウイルスの全長GPタンパク又はその変異体において、該GPタンパクのTM配列及びCT配列がヒトパラインフルエンザ2型ウイルスFタンパク又はGPタンパクのTM配列及びCT配列で置換又は該GPタンパクのTM配列及びCT配列が維持された核酸

(前記エボラウイルスの変異体としては、エボラウイルスGPタンパクのアミノ酸配列 (GenBank Accession No. KJ660346) の第88番目のPhe (F) をAla(A)に、535番目のPhe (F) をAla(A)に置換した変異GPタンパク、前記変異GPタンパクよりさらに313番目以降に位置するムチン領域配列が除去された変異GP1タンパク、又はGP配列よりムチン領域配列が除去された変異GPタンパクが挙げられる)；

g) マラリアCSPタンパク又は該タンパクのGPI型アンカー配列をヒトパラインフルエンザ2型ウイルスFタンパクのTM配列及びCT配列に置換したタンパクをコードする核酸；

h) ZikaウイルスのprM/Eタンパクをコードする核酸；

i) ZikaウイルスのEタンパクのC末端領域に位置する2つのstem配列 (EH1及び

EH2) 並びに2つのTM配列(TM1及びTM2)のうち、EH1及びEH2を欠失又はEH2を欠失させヒトパラインフルエンザ2型ウイルスFタンパクのTM配列及び/又はCT配列を付加したタンパクをコードする核酸。

(9) (1)～(8)のいずれかに記載のウイルスベクターと製薬上許容し得る担体を含むワクチン。

発明の効果

[0022] 本発明のウイルスベクターは、高分子のペプチド(数百アミノ酸残基以上)の立体構造を保ったまま抗原としてデリバリーすることができる。これにより、RSV及びエボラウイルス、マラリア原虫及びZikaウイルスに有効なライセンスワクチンの製造が可能となる。

[0023] 本発明のウイルスベクターは、抗原ポリペプチドをウイルス粒子上にディスプレイさせた状態で効率よくウイルスベクターを回収することができる。また、本発明のウイルスベクターは、低濃度のβプロピオラクトン等を用いて核酸不活化が行われるため、ウイルスエンベロープタンパク及び導入した抗原の立体構造を維持した状態でウイルスゲノムのみが不活化される。それゆえ、pre-existenceな抗体が存在する組換えウイルスベクターでは、抗体によりベクターが中和されレシピエントでの遺伝子発現抑制による抗原量が低下するが、当該ベクターではこのような問題は生じず、またレシピエントで抗原遺伝子の変異が起こらないという利点がある。さらに、当該ベクターは生ウイルスに近い細胞吸着性と免疫誘導能を有するとともに、導入抗原は効率的な中和抗体を誘導するための抗原エピトープの立体構造を維持できるため、アジュバントを添加することなく又は低減し有効なワクチン効果が期待できる。上記した利点から、本発明のウイルスベクターを利用することで、ヒトにおいても高い効果と安全性を期待でき、RSV、エボラウイルス、マラリア、Zikaウイルスに有効なライセンスワクチンの開発が可能になる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]図1は、Mlu制限酵素部位への3xM2e+hPIV2のTM/CT配列遺伝子導入構築図を示す。

[図2]図2は回収したベクターの感染細胞でのM2eの発現確認結果(A)、及びウエスタンブロットによるベクターパーティクルへの抗原の導入確認結果(B)を示す。

[図3]図3はRSVのF抗原の導入図を示す。

[図4]図4はhPIV2 Δ Fの感染により感染細胞で発現した変異体RSV Fの発現(A)と変異体のウエスタンブロットによる発現(B)の結果を示す。

[図5]図5はEbola virus GP抗原の導入図を示す。

[図6]図6は2箇所のアミノ酸変異を導入しEbola GPまたはhPIV2のTM/CT配列を保持するEbola GPを保持する hPIV2 Δ Fベクターの感染細胞での発現(A)およびベクターパーティクルへのGPの取り込みを示すウエスタンブロットの結果(B)を示す。

[図7]図7は2箇所のアミノ酸変異を導入したEbola GP及びGFPタンパクを保持するhPIV2 Δ Fウイルスの感染性粒子の産生の有無を、PIV2のF発現Vero細胞と通常のVero細胞でGFPの蛍光を指標に確認した結果図を示す。

[図8]図8はマウス投与によるEbola GPに対する抗体誘導の結果を示す。

[図9]図9はPlasmodium yoelliのCSP抗原の導入図を示す。

[図10]図10はCSP抗原の発現のウエスタンブロットでの確認結果を示す。

[図11]図11はマウス投与によるCSPに対する抗体誘導の結果を示す。

[図12]図12はZikaウイルスのprM/E抗原の導入図を示す。

発明を実施するための形態

[0025] 本発明は、抗原ポリペプチドをコードする核酸が、F遺伝子欠損型パラミクソウイルス科ウイルスゲノム遺伝子のHN遺伝子5'直上流に組み込まれているウイルスベクターであって、該抗原ポリペプチドが前記ウイルス由来のTM配列及び／又はCT配列と融合／置換した130アミノ酸残基以上の融合タンパクとして発現されるウイルスベクターに関する。

[0026] 1つの観点においては、本発明は、抗原ポリペプチドをコードする遺伝子がパラミクソウイルス科のウイルスのF遺伝子のTM配列及び／又はCT配列遺伝子との融合／置換された形態も含めてウイルス表面に発現するように組込ま

れているウイルスベクターであって、高分子の抗原ポリペプチドが所望の立体構造（ワクチン抗原として機能し得る立体構造）を維持したまま発現することを特徴とするウイルスベクター及び当該ベクターであってアジュバントを用いることなく、又はアジュバント添加量を減らして生ウイルスと同様な免疫誘導が可能な不活化ベクターを提供する。

[0027] 本発明者らは、抗原とウイルスへのパッケージングシグナルとして機能する膜タンパクのTM配列及びCT配列とを融合／置換することによりベクター上に抗原を取り込むタイプ、を構築することに成功したことを報告している（W02014/103310）。当該方法では効率よく抗原を発現させることができるのは120アミノ酸残基程度であり、130アミノ酸残基以上であって所望する立体構造を維持した抗原を導入することは困難であった。

[0028] 例えば、M2eを2個連結した系では十分なウイルス量が回収できるが、hPIV2構築用プラスミドのNP遺伝子の上流のNotI制限酵素部位に3個のM2eを連結した遺伝子を導入した系では、動物試験に供するに十分なウイルス量を回収するには至らなかった。分子量の大きなRSVのFタンパクを導入した場合でも回収ウイルスの力価が低く、ワクチンとしての実用化に十分な力価のウイルスを回収することができなかった。

[0029] 当該ウイルス発現系では、組換え非増殖型hPIV2に、外来抗原をベクター上に導入するためにhPIV2のFタンパクのTM配列及びCT配列をもつ外来抗原遺伝子が挿入されており、抗原タンパクの発現が高いと、同じTM配列及びCT配列をもつhPIV2のFタンパク質がMタンパクを通したウイルスパーティクルのアセンブリーの際に競合し、効率的なウイルス形成を妨げているため力価の高いウイルス回収が難しいことが予想された。実際、PIV3にEbolaウイルスのGPタンパクのCT配列（TM配列はEbolaウイルスのGPのまま）をEbolaウイルスのGPタンパクからPIV3のFタンパクに置換しFとHN遺伝子を欠損させたPIV3ベクターに導入した場合、PIV3ウイルスの回収効率が極めて悪いことが報告されている（非特許文献6）。したがって、TM及びCT配列を保持する大きな外来抗原を外来抗原のTM及びCT配列をhPIV2のFのTM及びCT配列に置換してhPIV2/△

Fに導入する場合、ウイルスの回収はさらに難しくなると考えられた。さらに、転写量の最も多いNP遺伝子の5'上流に位置する部位に抗原遺伝子を導入したPIV3では、導入抗原遺伝子に変異が認められ、ウイルス構成遺伝子群より高発現する部位への外来遺伝子を導入して抗原とする場合の問題点が指摘されている（非特許文献8、非特許文献9）。発明者らもhPIV2のNP遺伝子の5'上流に部位にインフルエンザウイルスのM2遺伝子を導入し回収したウイルスのM2遺伝子に変異が入りアミノ酸置換が生じることを確認している。

[0030] 本発明においては、F遺伝子欠損型hPIV2ベクターのF遺伝子欠損部位にMluI制限酵素切断部位を導入し、つまりHN遺伝子5'直上流のF遺伝子欠損部位に抗原等遺伝子を組み込み、130アミノ酸残基以上の高分子の抗原を発現させることに成功した。下記の実施例に具体的に示されるように、発明者らは、3xM2eとhPIV2ベクターのFタンパク遺伝子のTM配列及び／又はCT配列遺伝子と融合した遺伝子、RSVのFタンパク遺伝子の膜外配列領域についてインタクトと修飾を加えた複数のRSVのFタンパク遺伝子、さらにこれら複数のRSVのFタンパクのTM配列及びCT配列遺伝子をhPIV2のTM配列及び／又はCT配列で置換したRSVのFタンパク遺伝子を導入して、ウイルスベクター回収の是非およびその発現量を比較した。さらに、RSV Fの膜外配列のC末端側に、T4ファージのFibritin三量体形成配列、GCN三量体形成配列を挿入、又は三量体形成を安定化させるS-S結合を形成するためにアミノ酸をCysに置換した遺伝子をコードする核酸を導入したRSVのF変異体についても効果を調べている。さらに、EbolaウイルスのGPタンパク遺伝子に4種類の修飾を加えた遺伝子及び当該4種類のGP遺伝子のTM配列及びCT配列遺伝子をhPIV2のTM配列及びCT配列遺伝子に置換したEbolaのGP遺伝子を導入して、ウイルスベクター回収の是非およびその発現量を比較した。また、マラリアCSPタンパクをコードする遺伝子とCSPタンパクのGPIアンカー様配列をhPIV2のTM配列及びCT配列に置換したCSPタンパクをコードする遺伝子を導入して、ベクター回収の成否と抗原の発現を調べた。さらに、ZikaウイルスのprM/Eタンパク（一部変異体を含む）をコードする遺伝子及びprM/Eタンパクのstem配列及びTM配列をhPIV2のTM配列及びCT配列

に置換したprM/Eタンパクをコードする遺伝子を導入して、ベクター回収の成否と抗原の発現を調べることで、本発明の効果を確認した。

[0031] 本発明において用いられる「パラミクソウイルス科のウイルス」として特に好ましいものは「ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス」であり、そのゲノムは約15,000塩基のモノシストロニックな一本鎖マイナスRNAである。ウイルス構造遺伝子産物として、NPタンパク、P（ホスホ）タンパク、M（マトリクス）タンパク、F（フュージョン）、HN（ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ）タンパク及びL（ラージ）タンパクが当該順にゲノム上にコードされている。また、RNA編集によりV（ブイ）タンパクが産生される。RNAゲノムにヌクレオカプシドタンパク（NP）が結合し、らせん対称リボヌクレオシドプロテイン複合体（ヌクレオカプシド、RNP）を形成している。ウイルスゲノムがコードするタンパクのうち、NPタンパク、P（ホスホ）タンパク及びL（ラージ）タンパクがRNPの形成に必要である。ウイルスエンベロープ上には、F（フュージョン）タンパク、HN（ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ）タンパクが存在し、レセプターへの吸着と融合を担っている。M（マトリクス）タンパクはF及びHNタンパクの細胞質内ドメイン、エンベロープ脂質二重膜及びRNPと相互作用し、ウイルス粒子の出芽に重要である。

[0032] 「ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（hPIV2）」は、細胞質で増殖するRNAウイルスであるため、宿主細胞の染色体中に遺伝子が組込まれることはない。また、このウイルスは、ヒト気道粘膜に感染し、IgAを中心とする粘膜免疫、IgGによる液性免疫及び細胞性免疫を誘導することが知られている。さらにこれまでにヒト（成人）に感染にしたときの重篤報告例がないことから、治療用ウイルスベクターとしてきわめて有用であると考えられる。

[0033] 本発明では、「F遺伝子欠損型パラミクソウイルス科のウイルス」を用いる。好ましくは、「F遺伝子欠損型(非伝播型)ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス」を用いる。ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスのFタンパクは、ウイルスエンベロープと細胞膜を融合させウイルスヌクレオカプシドを宿主内に導入する際に必要とされるタンパクである。F遺伝子欠損ヒトパラインフルエ

ンザ2型ウイルスは、パッケージング細胞中ではF遺伝子を保持した感染性のhPIV2を産生するが、Fタンパクを発現していない細胞では感染性のウイルスを産生しない非伝播型のウイルスである。したがって、レシピエントの細胞に感染した後に自律増殖能をもつウイルス粒子を構成することができず、他の細胞に感染することがないため、ワクチン用ウイルスとして安全性が高い。

[0034] F遺伝子欠損ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクターを調製するには、hPIV2のFタンパクを発現する細胞でF遺伝子欠損ウイルスを培養することにより、当該細胞からトランスに供給されるFタンパクの存在下で、ウイルスエンベロップ上にFタンパクを保持させることにより、感染能を有するウイルス粒子を製造することができる。

[0035] 本発明の1つの好ましい態様においては、F遺伝子欠損ウイルスに感染しウイルス粒子を産生することができるパッケージング細胞として、Vero細胞を用いる。Vero細胞は、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスFタンパクに対する許容性がとりわけ高く、またインターフェロンの産生がなく、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスのF遺伝子を常時発現させた場合でも安定して増殖することができる、かつウイルス粒子を効率よく産生することができる。

[0036] 1つの好ましい態様においては、本発明のウイルスベクターは「核酸不活化処理」が施されたものである。「核酸不活化処理」とは、Fタンパク、HNタンパク等のエンベロップタンパク及び導入した抗原ポリペプチドの立体構造を保ち、これらのエンベロップタンパクの機能及び立体構造を必要とする導入された抗原ポリペプチドの中和抗体誘導能を有した状態でウイルスゲノムのみを不活化することをいう。核酸不活化処理は、例えば、核酸アルキル化剤処理、過酸化水素処理、UV照射、放射線照射、又は熱処理により行うことができる。特に好ましくは、核酸アルキル化剤であるβ-プロピオラクトンでウイルスベクターを処理する。ウイルス培養液にβプロピオラクトンを加え、4℃で17時間程度インキュベーションすればよい。βプロピオラクトンの好ましい濃度は、終濃度で0.001%~0.05%、より好ましくは0.004%~0.01%である。

- [0037] 本発明のウイルスベクターでは、抗原遺伝子がベクター上に組み込まれており、上記核酸不活化後に抗原導入操作を行う必要がないため、不活化後の抗原導入操作に伴う問題（抗原導入効率の低下、エンベロープ及び抗原の構造破壊等）も回避できる。また、F遺伝子欠損ウイルスを用いることにより、薬剤処理により万が一、生ウイルスが残存しても、当該ウイルスは増殖能を欠き、レシピエント内で増殖の恐れはなく、不活化ワクチンの高い安全性を保つことが可能となる。
- [0038] 「ウイルスベクター」とは、感染した細胞中で発現させるべき遺伝子がウイルスゲノム遺伝子とともにパッケージングされているウイルス粒子、ならびに感染能をもつウイルスを産生できるウイルスゲノムを含まないベクターを意味する。本明細書では特に後者を「不活化ベクター」と称し、薬剤等の処理によって核酸を不活化することにより得ることができる。
- [0039] 「抗原ポリペプチド」とは本発明のウイルスベクターを投与した被験者において免疫反応を誘起することができる130アミノ酸残基以上のポリペプチドであり、例としては、インフルエンザ、RSウイルス、エボラウイルス、Zikaウイルス又はその一部、原虫のタンパク又はその一部、細菌やウイルス由来のタンパク又はその一部が挙げられる。例えば、インフルエンザ用ワクチンとして用いるのに有用な抗原ポリペプチドとしては、インフルエンザウイルスのHAタンパク、NAタンパク、M2タンパク又はM2eペプチド、又はこれらの断片がある。また、RSV用ワクチンとして用いるのに有用な抗原ポリペプチドとしてはRSVのFタンパク又はGタンパクもしくはこれらの断片、Ebolaウイルス用ワクチンとして用いるのに有用な抗原ポリペプチドとしてはEbolaウイルスのGPタンパク又はこれらの断片、ZikaウイルスのprM/Eタンパク又はこれらの断片、マラリア原虫のCSPタンパク又はその断片が挙げられる。抗原ポリペプチドは、ワクチンとして機能するだけの免疫原性を有する限り、前述のように断片であってもよいし、適当な変異を含んでいてもよい。そのような変異体としては、例えば、RSVのFタンパクのp27又はp27とその近傍の配列を取り除きヒューリンによる開裂を除去した変異RSV Fタンパク（61番目のAsn(N)を

Ile(I)及び251番目のSer(S)をPro(P)に置換した変異体も含む(非特許文献4))、RSVのFタンパクのfusion domain配列の一部を除去した変異RSV Fタンパク(155番目のSer(S)をCys(C)および290番目のSer(S)をCys(C)に置換した変異体も含む(非特許文献7))、さらに前記RSV Fタンパク変異体にT4ファージのFibritin三量体形成配列、GCN三量体形成配列又は三量体形成を安定化させるS-S結合を形成するためアミノ酸をCysに置換した遺伝子をコードする核酸を導入したRSVのF変異体、エボラウイルスGPタンパクのアミノ酸配列(GenBank Accession No.KJ660346)の第88番目のPhe(F)をAla(A)に、53番目のPhe(F)をAla(A)に置換した変異GPタンパク、前記変異GPタンパクよりさらに313番目以降に位置するムチン領域配列が除去された変異GP1タンパク、又はGP配列よりムチン領域配列が除去された変異GPタンパク等が挙げられる。

[0040] さらに、感染症関連導入抗原ポリペプチドとして、インフルエンザウイルス(強毒型インフルエンザウイルスを含む)、パラインフルエンザ3型ウイルス、RSウイルス、ヘンドラウイルス、SARSウイルス、MERSウイルス、ニパウイルス、ラッサウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、エボラウイルス、ハンタウイルス、エイズウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、クリミアーコンゴ出血熱ウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、パピローマウイルス、Zikaウイルス、マールブルグウイルス、HIV等のウイルスの抗原ペプチド、A群 β (ベータ)型溶連菌、Mycobacterium tuberculosis、コレラ菌、マイコプラズマ等の細菌の抗原ペプチドおよびマラリア原虫の抗原ペプチドが挙げられる。

[0041] 本発明においては、「抗原ポリペプチド」はベクターウイルスのTM配列及び/又はCT配列またはGPI様アンカータンパク質と融合/置換されたタンパクとしてウイルスエンベロープ上に発現する。このことにより、ウイルス産生細胞で発現した抗原ポリペプチドがウイルス粒子中にとりこまれて、レシピエントにデリバリーされる。すなわち、本発明においては、ウイルス遺伝子

上に組込まれた抗原ポリペプチドの遺伝子が感染細胞において転写・翻訳されるだけでなく、ウイルス粒子自体が抗原ポリペプチドを有しており、このことにより、大量の抗原ポリペプチドを確実にレシピエントにデリバリーすることができる。

[0042] 抗原ポリペプチドをウイルスエンベロープ上に融合タンパクとして効率的に発現させるためには、抗原ポリペプチドをコードする遺伝子を、ベクターウイルスのFタンパクのTM配列及び／又はCT配列をコードする遺伝子またはGP I様アンカータンパク質をコードする遺伝子と連結させることによりウイルス遺伝子中に組み込む。ウイルスのFタンパクのTM配列及び／又はCT配列タンパクをコードする遺伝子としては、hPIV2のF遺伝子が挙げられる。このようなベクターの構築は、慣用の組換えDNA技術を用いて定法により行うことができる。

[0043] 抗原ポリペプチドをコードする核酸（遺伝子）は、前述したベクターウイルスの構造遺伝子のうち、「HN遺伝子5' 直上流」の、F遺伝子欠損部位に挿入される（図1参照）。なお、「HN遺伝子5' 直上流」とはNH遺伝子5' 末端のすぐ上流を意味するが、発現に影響しない配列が抗原ポリペプチドをコードする核酸とHN遺伝子5' 末端との間に含まれていてもよい。本発明では、本来HN遺伝子の直上流に存在するF遺伝子欠損ウイルスを使用するため、「HN遺伝子5' 直上流」は、F遺伝子欠損部位とも言える。

[0044] 構造遺伝子産物をトランスに供給するパッケージング細胞に当該タンパク遺伝子を融合遺伝子、あるいはインタクトな遺伝子として組み込めば欠損型hPIV2のエンベロープ上に大量の抗原を発現させることができる。

[0045] 本発明のウイルスベクターを通常より低濃度の β プロピオラクトンで処理すると、ウイルスベクターの赤血球凝集活性、細胞吸着能及び樹状細胞を成熟化させる能力を保持したまま（つまり、ベクター膜上にあるタンパクの3次元構造を生ウイルスに近い状態で維持したまま）、ゲノムのみを不活化することができる。通常より低濃度、つまりゲノムを不活化できるぎりぎりの濃度の β プロピオラクトンでの処理できるのは、2次粒子を産生しない、非増

殖型（又は非伝播型）のウイルスベクターを用いることにより可能となる。たとえ微量の感染性ウイルスが残存しても非伝播性ウイルスであるため2次感染粒子は産生されることはない。βプロピオラクトンの処理濃度によるhPIV2ベクターによる樹状細胞成熟化等への影響について、より低濃度の処理が樹状細胞の成熟化やサイトカインの誘導に有利な点については、既に報告している（非特許文献10）。また、低濃度のβプロピオラクトンの処理により断片化された転写複製能のない多くのRNA鎖がベクター内に残存し、RIGI、IFIT等の作用により自然免疫が活性化される。この方法によれば、ウイルス粒子自体がアジュバント活性を持つため、抗原に対する免疫を惹起するアジュバントと併用する必要がない、又はアジュバント濃度を低減できるという利点がある。

- [0046] 本発明のウイルスベクターは、シアル酸レセプターを介して細胞に感染する。シアル酸は多くの細胞・組織に表在しているため、ベクターの投与経路としては、経鼻噴霧、経肺、経口、舌下、皮内、皮下、静脈への直接投与の他に、樹状細胞等の免疫惹起細胞へのエクスピボ投与などが考えられる。
- [0047] 本発明のウイルスベクターはヒトを含む哺乳動物細胞に対するワクチンとして有用である。本発明のワクチンは、ウイルスベクターと製薬上許容し得る担体を含む。
- [0048] ワクチンは、典型的には、噴霧剤としてヒトを含む哺乳動物細胞に投与することができる。噴霧剤は定法により調製することができる。例えば、ウイルスベクターを含む培養上清を、必要により濃縮し、製薬上許容し得る担体とともに、PBS等の緩衝液、ウイルスベクター安定溶液又は生理食塩水に懸濁した後、必要に応じてフィルターなどで濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。噴霧剤には、必要に応じて安定化剤、保存剤などを加えてもよい。こうして得られた発現ベクターを被験者に吸入投与することができる。
- [0049] さらに、典型的には、注射剤として皮下、皮内、筋肉注射剤としてヒトを含む哺乳動物細胞に投与することができる。当該注射剤は定法により調製する

ことができる。例えば、ウイルスベクターを含む培養上清を、必要により濃縮し、製薬上許容し得る担体とともに、PBS等の緩衝液又は生理食塩水に懸濁した後、必要に応じてフィルターなどで濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤には、必要に応じて安定化剤、保存剤などを加えてもよい。こうして得られた発現ベクターを被験者に注射剤として投与することができる。

[0050] 投与されるべきワクチンの量は、通常投与当たり抗原を $0.01\ \mu\text{g}$ から $100,000\ \mu\text{g}$ までの範囲であり、これは、処置される対象、その対象の免疫系での抗体合成能、及び所望の防御の程度に依存し、経口、皮下、経鼻、皮内、筋肉内、静脈内投与経路などの投与経路にも依存する。

[0051] 本発明のワクチンは、単独投与スケジュールで、又は好ましくは複合投与スケジュールで与えられ得る。複合投与スケジュールでは、接種の開始時期に1~10の個別の投与を行い、続いて免疫応答を維持する及び又は強化するのに必要とされる時間間隔で、例えば2回目の投与として1~4ヵ月後に、別の投与を行い得る。必要であれば、数ヶ月後に引続き投与を行い得る。投与のレジメもまた、少なくとも部分的には、個体の必要性により決定され、医師の判断に依存する。

[0052] RSV、Ebolaウイルス、Zikaウイルス及びマラリア原虫感染症には未だライセンスワクチンはない。ワクチン用の抗原は明らかにされているが、効率的な中和抗体誘導のためには、不安定な抗原の厳格な3次元構造が必要とされ、高分子のペプチド（数百アミノ酸残基）の立体構造を保ったまま抗原としてデリバリーすることが難しいという問題があった。これに対し、本発明のウイルスベクターでは、高分子のペプチド（数百アミノ酸残基）の立体構造を保ったまま抗原としてデリバリーすることができる。

[0053] 従来当該ベクターでは130アミノ酸残基以上の抗原ポリペプチドをウイルス粒子上にディスプレイさせた状態で効率よくウイルスベクターを回収することができないという問題があった。本発明では500アミノ酸残基以上の抗原ポリペプチドをウイルス粒子上にディスプレイさせ効率よくウイルスベクターを

回収できる。

[0054] 本発明では、低濃度の β プロピオラクトン等を用いて核酸不活化が行われるため、ウイルスエンベロープタンパク及び導入した抗原の立体構造が維持され、これらタンパクの構造を維持した状態でウイルスゲノムのみが不活化される。それゆえ、ベクターは生ウイルスに近い細胞吸着性と免疫誘導能を有するとともに、導入抗原は効率的な中和抗体を誘導するための抗原エピソードの立体構造を維持できるため、効率的なワクチン効果が期待できる。

抗原の導入は、あらかじめ抗原遺伝子を導入したウイルスベクターを作製するために、不活化後に抗原導入操作を行う必要がなく、不活化後の抗原導入操作に伴う問題（従来法による低い抗原導入効率、エンベロープ及び抗原の構造破壊等）を回避できる。

上記した利点から、本発明のウイルスベクターは、従来ヒトにおいて十分な効果が期待できなかつたウイルスベクターとは異なり、ヒトにおいても高い効果を期待できる。

[0055] 本発明のウイルスベクターは、ベクターエンベロープの外部、内部、又はその両方に抗原を配置できるように構成することが可能であり、これにより複数抗原のベクターへの様々な導入が可能となる。

[0056] 以上のとおり、本発明によれば、効率的なウイルス不活化処理により、生ウイルスベクターと遜色のない免疫誘導が可能で、不安定な高分子の抗原タンパクの構造を維持した状態でデリバリーできる不活化ベクターが提供可能であり、パラミクソウイルス科ウイルスを利用した不活化ベクターのワクチン化に途を開くことが可能となる。

実施例

[0057] 以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0058] [実施例1]

3xM2eとhPIV2のFタンパクのTM配列及びCT配列タンパクを融合させMluI制限部位に導入したhPIV2/ Δ Fの構築

hPIV2のFタンパクのTM配列及びCT配列（N末端-YLSAIALILSVITLVVVGLLIAYI IKLVSIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS-C末端（配列番号1）：65アミノ酸残基）をコードする遺伝子上流に万能型インフルエンザウイルスのM2e抗原ペプチド（N末端-SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDD-C末端（配列番号2））を3回繰り返した配列（3 x M2e）をコードする遺伝子と開始コドン（ATG）を連結した遺伝子及びhPIV2ウイルスでの発現に必要な遺伝子を付加した遺伝子を構築し、両端にMluI制限酵素切断配列を付加したhPIV2/ Δ Fベクターのプラスミドコンストラクトを構築した（図1）。MluI制限酵素切断配列の挿入部位は、hPIV2/ Δ FのHN遺伝子の5'直上流に位置する。当該構築はhPIV2にコンストラクト上重要とされる、ゲノムの総数が6の倍数になるように、ルールオブ6ルールに基づいて構築した。既報（非特許文献11）にしたがい、リバーシジェネティクス法により、ウイルスの回収を図った。さらに、HNタンパクにM2e抗原融合させたhPIV2/ Δ FのMluI制限酵素切断部位にも当該インフルエンザ抗原を導入した（図1）。

[0059] その結果、万能型インフルエンザウイルスの3 x M2e抗原ペプチドとhPIV2のFタンパクのTM配列及びCT配列を融合させたhPIV2/ Δ Fを効率よく回収することができ、感染細胞でM2eを効率的に発現し（図2A）、更にベクターパーティクル上にもM2eタンパクが取り込まれていることが確認できた（図2B）。hPIV2/ Δ FのNP上流のNotI制限酵素切断部位に3 x M2e遺伝子を導入した場合には、図2Aで示すように、2 x M2eをNotI制限酵素切断部位に導入した場合のように効率的にウイルスを回収することはできなかった。MluI制限酵素切断部位に3 x M2e抗原遺伝子を導入した場合には、HNタンパクにM2eに融合させた場合にも、効率的にウイルスを回収でき、ベクター上に抗原を取込みことができた（図2B）。

[0060] M2e導入ベクターを低濃度 β -プロピオラクトンで不活化して調製したワクチンを用いることで、マウスでM2eに対する抗体の誘導が確認できた。

[0061] [実施例2]

RSVのインタクトなFタンパク遺伝子（コドン最適化遺伝子）又はRSVのTM配列

及び／又はCT配列をhPIV2のFタンパクのTM配列及び／又はCT配列に置換した遺伝子、及びprefusion Fの安定性を高めた変異を導入した遺伝子をMluI制限部位に導入したhPIV2／ Δ Fの構築

RSVのFワクチン用抗原のアミノ酸配列は、accession numberP03420のRSVのFタンパクを用いた。当該アミノ酸配列をコードする遺伝子は、Sino Biological社より各アミノ酸の発現コドンをもとに最適化したRSV FのDNA配列（カタログ番号：VG40042-UT）を使用した。以下の抗原遺伝子hPIV2／ Δ F発現用プラスミドベクターのMluI制限配列に導入した（図3A、B）。RSVのインタクトなFタンパク遺伝子（図3A、C）、又はhPIV2／ Δ Fベクター上にRSVのFタンパクを含有させるためにRSVのFタンパクのTM配列及びCT領域（IMITIIIIVII VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIASFN（配列番号3））をhPIV2のTM配列及びCT配列（YLSAIALILSVITLVVVGLLIAYIIKLVSIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKN NHGNIYGIS（配列番号1））又はRSVのFタンパクのCT配列（KARSTPVTLSKDQLSG INNIASFN（配列番号9））をhPIV2のCT配列（KLVSIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSK NNHGNIYGIS（配列番号10））に置換した配列をコードする遺伝子（図3B、C）に置換した配列をコードする遺伝子に、hPIV2の転写開始配列、介在配列、転写終結配列を付加した遺伝子を通常の方法により構築した。転写開始配列等は一部修飾した構築（導入遺伝子の5'上流に開始配列を付加せず前遺伝子からのread throughにより導入遺伝子を発現させる構築、または導入遺伝子の3'下流の転写終結配列の下流に開始配列を導入しHN遺伝子の5'上流に開始配列を2組導入した構築）も作製した。RSV Fの155番目のSer (S)をCys (C)に、290番目のSer (S)をCys (C)に置換しシステイン間のS-S結合を架橋することによりRSVのF変異体の安定性が増強されると報告（参考文献7）されており、S155C及びS290C導入したFの変異体遺伝子を作製し（図3B、C）、hPIV2／ Δ F発現用プラスミドベクターのMluII部位に導入した。挿入した配列はルールオブ6（遺伝子長が6の倍数）となるように調整した。さらに、前記RSV F変異体にT4ファージのFibritin三量体形成配列、GCN三量体形成配列又は三量体形成を安定化させるS-S結合を形成するためにアミノ酸をCysに置

換した遺伝子をコードする核酸を導入したRSVのF変異体も作製している。ウイルスの回収は既報（非特許文献11）に従って行った。どのタイプのウイルスも感染細胞で細胞変性効果(CPE)を起こし、十分な力価のウイルスを回収することができた。ウイルスの回収は、既報（非特許文献11）にしたがい実施した。どのタイプのウイルスも感染細胞で細胞変性効果(CPE)を起こし、十分な力価のウイルスを回収することができた。

[0062] 回収したウイルスをF遺伝子発現Vero細胞に感染させ、RSVのFに対する抗体(abcam社のRSVの抗Fモノクローナル抗体[2F7])を用いて、RSVのF発現確認を免疫染色により行った。2日間感染し、100%冷メタノールで固定し、Alexa488でラベルした2次抗体を用いて蛍光顕微鏡下で発現の確認を行った。RSVのFを導入していないhPIV2/ Δ F及びhPIV2のF発現細胞では、抗体に対する反応は認められなかったが、RSVのインタクトなFタンパク遺伝子、及びRSVのFのTM配列及び/又はCT配列をhPIV2のFのTM配列及び/又はCT配列に置換したRSVのFタンパク遺伝子を導入したhPIV2/ Δ FはRSVのFに対する抗F抗体に対して陽性反応を示した(図4(A))。また、抗Fモノクローナル抗体[2F7])を用いたウエスタンブロッティング分析により目的タンパクが発現していることを確認した(図4(B))。

[0063] [実施例3]

RSVの2つのヒューリン切断領域ペプチド配列遺伝子を除去したRSVのFタンパク遺伝子又は当該RSVのFタンパク遺伝子のTM配列及び/又はCT配列をhPIV2のFタンパクのTM配列及び/又はCT配列に置換した配列をもつ遺伝子をMluI制限部位に導入したhPIV2/ Δ Fの構築

RSVのFには図3Dに示すように2箇所のヒューリン認識配列部位が存在している(図3C)。当該ヒューリン認識配列間のp27と呼ばれるアミノ酸(N末端-ELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRR-C末端(配列番号4))を除去し、さらに前部のヒューリン認識配列の(108と109番目のArg(R) Arg(R))を欠損させた、RSVのF(F Δ p27+2)を構築した(図3D)。F Δ p27+2、又はhPIV2/ Δ Fベクター上にRSVのFタンパクを含有させるためにRSVのFタンパクのTM配列(図3A、

D) 及びCT配列 (IMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI AFSN (配列番号3)) をhPIV2のTM配列及びCT配列 (YLSAIALILSVITLVVVGLLIAYIIKLVS QIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS (配列番号1)) 又はRSVのFタンパクのCT配列 (KARSTPVTLSKDQLSGINNI AFSN(配列番号9)) をhPIV2のCT配列 (KLVS QIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS(配列番号10)) に置換した配列をコードする遺伝子 (図3B、D) に置換した配列に、hPIV2の転写開始配列、介在配列、転写終結配列を付加した遺伝子をhPIV2/ΔF発現用プラスミドベクターのMlu部位に導入した。また、RSVもFの最初のヒューリン認識配列 (106、107、108、109番目の配列Arg(R)Ala(A)Arg(R)Arg(R)をGln(Q)Ala(A)Gln(Q)Gln(Q)に置換しp27配列を欠失させた変異体 (FΔp27: 図3D) も作製し、RSVのFタンパクのTM配列及び/又はCT配列をhPIV2のTM及び/又はCT配列に置換した変異体遺伝子をhPIV2/ΔF発現用プラスミドベクターのMluII部位に導入した。これら変異体作製の目的は、変異を導入することにより、prefusion Fの立体構造の安定化を図り、prefusion F抗原に対する中和活性の高い抗体を誘導し、高い有効性をもつRSVワクチンを開発することにある。RSV Fの67番目のAsn(N)をIle (I)に、251番目のSer(S)をPro(P)に置換することによりRSVのF変異体の安定性が增强されるとの報告もあり (非特許文献4)、N61I及びS251Pを導入したFΔp27の変異体遺伝子 (図3B、D) を作製し、hPIV2/ΔF発現用プラスミドベクターのMluI部位に導入した。挿入した配列はルールオブ6となるようにした。ウイルスの回収は、既報 (非特許文献11) にそって行った。さらに、前記RSV F変異体にT4ファージのFibritin三量体形成配列、GCN三量体形成配列又は三量体形成を安定化させるS-S結合を形成するためにアミノ酸をCysに置換した遺伝子をコードする核酸を導入したRSVのF変異体も作製している。どのタイプのウイルスも感染細胞で細胞変性効果(CPE)を起こし、十分な力価のウイルスを回収することができた。

[0064] 回収したウイルスをF遺伝子発現Vero細胞に感染させ、RSVのFに対する抗体 (abcam社のRSVの抗Fモノクローナル抗体[2F7]) を用いて、RSVのFに発現確認を免疫染色により行った。2日間感染し、100%冷メタノールで固定し、Alexa4

88でラベルした2次抗体を用いて蛍光顕微鏡下で発現の確認を行った。RSVのF Δ p27+2タンパク遺伝子、及びRSVのF Δ p27+2タンパクのTM配列及び／又はCT配列をhPIV2のFのTM配列及び／又はCT配列に置換したRSVのF Δ p27+2タンパク遺伝子を導入したhPIV2/ Δ FはRSVのFに対する抗F抗体に対して陽性反応を示した(図4(A))。抗Fモノクローナル抗体[2F7]を用いたウエスタンブロット分析により目的タンパクが発現していることを確認した(図4(B)の#5にTM及びCT配列にF Δ p27のRSV F TM/PIV2 F CTを導入した結果についても示す)。

[0065] [実施例4]

RSVの膜融合配列の8アミノ酸を除去したFタンパク遺伝子又は当該RSVのFタンパク遺伝子のTM配列及び／又はCT配列をコードする遺伝子又はprefusion Fの安定性を高めた変異を導入した遺伝子をhPIV2のFタンパクのTM配列及びCTタンパク遺伝子に置換した配列をもつ遺伝子をMluI制限部位に導入したhPIV2/ Δ Fの構築

RSVのFには図3Cに示すようにアミノ酸配列137-151番目の配列(FLGFLLGVGSAIASG(配列番号5))はfusion domain(FD)と呼ばれ、細胞等の融合に関与する領域であり、今回RSVのFタンパクより、FDの8アミノ酸(FLGFLLGV(配列番号6))を除去したRSVのFタンパクを構築した(図3E)。当該FD配列の一部を除去した構築を導入した理由は、hPIV2/ Δ FはF遺伝子を欠失しているため、F発現パッケージング細胞以外では増殖性のウイルスを産生することはないが、RSVのFタンパクは単独で細胞へ吸着し融合する可能性があることが報告されており、安全性を確保するため、FDより融合配列を一部除去して当該可能性のリスクを排除した。当該RSVのFタンパク(図3A、E)、又はhPIV2/ Δ Fベクター上にRSVのFタンパクを含有させるために当該RSVのFタンパクのTM配列及びCT配列(IMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI AF SN(配列番号3))をhPIV2のTM配列及びCT配列(YLSAIALILSVITLVVGLLIAYI IKLVSQIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS(配列番号1))、又はRSVのFタンパクのCT配列(KARSTPVTLSKDQLSGINNI AF SN(配列番号9))をhPIV2のCT配列

(KLVSQIHQFRSLAATTFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS(配列番号10))に置換した配列をコードする遺伝子(図3B、E)に置換した配列に、hPIV2の転写開始配列、介在配列、転写終結配列を付加した遺伝子に、hPIV2/ Δ F発現用プラスミドベクターのMlu部位に導入した。RSV Fの155番目のSer(S)をCys(C)に、290番目のSer(S)をCys(C)に置換しシステイン間のS-S結合を架橋することによりRSVのF変異体の安定性が増強されると報告(非特許文献7)されており、S155C及びS290C導入したFの変異体遺伝子(図3B、E)を作製し、hPIV2/ Δ F発現用プラスミドベクターのMluII部位に導入した。挿入した配列はルールオブ6となるようにした。ウイルスの回収は、既報(非特許文献11)に従って実施し、ウイルスの回収に成功した。さらに、右RSV F変異体にT4ファージのFibritin三量体形成配列、GCN三量体形成配列又は三量体形成を安定化させるS-S結合を形成するためにアミノ酸をCysに置換した遺伝子をコードする核酸を導入したRSVのF変異体も作製している。

[0066] 回収したウイルスをF遺伝子発現Vero細胞に感染させ、RSVのFに対する抗体(abcam社のRSVの抗Fモノクローナル抗体[2F7])を用いて、RSVのF発現確認を免疫染色により行った。2日間感染し、100%冷メタノールで固定し、Alexa488でラベルした2次抗体を用いて蛍光顕微鏡下で発現の確認を行った。RSVのFのFDの一部領域を除去したタンパク遺伝子、及びRSVの当該FタンパクのTM配列及びCT配列をhPIV2のFのTM配列及びCT配列に置換したRSVのF Δ p27タンパク遺伝子を導入したhPIV2/ Δ FはRSVのFに対する抗F抗体に対して陽性反応を示した(図4(A))。また、抗Fモノクローナル抗体[2F7])を用いたウェスタンブロッティング分析により目的タンパクが発現していることを確認した(図4(B))。

[0067] [実施例5]

2箇所のアミノ酸変異を導入したEbolaウイルスのGPタンパク遺伝子又は当該GPタンパク遺伝子のTM配列及びCT配列をhPIV2のFタンパクのTM配列及びCT配列に置換した配列をもつ遺伝子をMluI制限部位に導入したhPIV2/ Δ Fの構築EbolaウイルスのGPタンパクはウイルスの細胞表面レセプターへの結合及び

ウイルスエンベロープと宿主細胞膜の膜融合を担うタンパク質である（図5C）。cDNAは市販プラスミド（Sino Biological社、アクセションナンバー：KJ660346、cDNA長：2031bp）を用いた。当該GPタンパク質の一部配列を細胞へのentry能を有しないと報告されている配列（F88A及びF535A; JVI:2013 (87) 3324-3334：非特許文献15）に置換した。またRNA編集が起こらいように遺伝子を置換（アミノ酸配列置換なし）した。Ebolaウイルスの当該GPタンパク遺伝子（図5 A、C）又は当該GPタンパク遺伝子のTM配列及びCT配列（WIPAGIGVTGVIIAVIALFCICKFVF（配列番号7））をhPIV2のTM配列及びCT配列（YLSAIALILSVITLVVVGLLIAYIIKLVSQIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS（配列番号1））（図5 B、C）に置換した配列に、hPIV2の転写開始配列、介在配列、転写終結配列を付加した遺伝子をhPIV2/ΔF発現用プラスミドベクターのMlu部位に導入した。挿入した配列はルールオブ6となるようにした。ウイルスの回収は、既報（非特許文献11）に従い実施した。

[0068] いずれもウイルスの回収にも成功した。回収したウイルスをPIV2のF遺伝子発現Vero細胞に2日間感染させ、GPの発現を確認した（図6）。GPタンパク発現確認には抗GPマウスモノクローナル抗体（4F3：IBT BIOSEVICE社）を使用した。感染細胞では、当該GPタンパクおよびhPIV2のTM配列及びCT配列に置換したGPタンパクは共に同程度量発現していた（図6A）。後述のムチン領域を除去したGPタンパクは反応しなかった。（当該抗体のエピトープ配列は特定されていないが、ムチン領域を除去したGPには反応しないことからムチン領域のエピトープを認識していることが予想された。）

[0069] 次に、ウイルス発現細胞上清より、141,000 x g、35分間超遠心しウイルスを回収し、ベクターに含まれるGPタンパクをウェスタンブロット（WB）により調べた（図6B）。その結果、当初の予想に反して、hPIV2のTM配列及びCT配列を置換したGPタンパクに比べて、Ebola GPタンパク由来のTM配列及びCT配列を保持するGPタンパクがベクターの上に多く取込まれていることが分った（図6B）。（PIV2のNP、Pに対して両者は同程度の発現量であった。）図6Aの感染細胞のWBの結果では、102kDaの近傍のGPタンパク（ERおよびゴルジ

体で糖修飾を受ける前のGPタンパク)は、GP又はhPIV2 FのどちらのTM/CT配列を保持した場合も、GPの発現量は同程度であったが、より高分子量にある4F3陽性のGPタンパクは(糖修飾をうけたGPタンパク)、EbolaウイルスGPのTM/CT配列を保持した場合のほうが多いことが分った。hPIV2 FのTM/CT配列に置換したGPタンパクも、糖鎖修飾を受けベクター上に取り込まれることも確認された。元ウイルスと異なるTM/CT配列を保持するタンパクを取り込まれるウイルスの例として、EbolaのGPタンパク(非特許文献6)、VSVのGタンパク(非特許文献12)等での報告例がある。

[0070] このように、当該Ebola GPタンパクのhPIV2/ΔFへの導入効率が極めて高いことが分った。今後の実用化を睨み、当該Ebola GPタンパク(前述の2箇所のアミノ酸置換)のhPIV2/ΔFが、通常細胞では増殖しないことを確かめるために、当該Ebola GP遺伝子を含むhPIV2/ΔFプラスミドのNP遺伝子上流のNot I制限酵素切断部位にGFP遺伝子発現配列を導入したプラスミドを構築し、当該ウイルスを作製した。当該ウイルスおよびGFP遺伝子のみを保持するhPIV2/ΔFベクターをVero細胞およびPIV2のFを恒常的に発現するVero細胞にMOIが0.01となるようにそれぞれ感染させた(図7)。hPIV2のF発現Vero細胞以外の細胞では感染性粒子が出現しないことが確認されているGFP遺伝子保持hPIV2/ΔFベクターと同様に、当該ウイルスもhPIV2のFを発現していないVero細胞では感染性粒子は認められず、hPIV2のF発現Vero細胞でのみで感染性粒子の増殖が認められた。つまり、当該ウイルスは通常の細胞では感染性粒子を産生せず、安全性が高いことが確認できた。

[0071] [実施例6]

EbolaウイルスのGP1タンパク遺伝子にEbolaウイルスGPのTM配列及びCT配列遺伝子を融合させたGP1タンパク遺伝子、又はエボラウイルスのGP1タンパク配列遺伝子にhPIV2のFタンパクのTM配列及びCT配列遺伝子を融合させた遺伝子をMluI制限部位に導入したhPIV2/ΔFの構築

実施例5で構築したEbolaウイルスのGPタンパク遺伝子のヒューリン切断認識配列の前部のGP1タンパク(GPタンパクがヒューリンにより切断されGP1お

よびGP2に切断されたGP1タンパク領域) (ヒューリン切断部位排除) にGPタンパク遺伝子のTM配列及びCT配列 (WIPAGIGVTGVIIAVIALFCICKFVF (配列番号7)) (図5A、D) 又はhPIV2のTM配列及びCT配列 (YLSAIALILSVITLVVGLLIAYIIKLVLSQIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS (配列番号1)) (図5B、D) を付加したEbolaウイルスのGP1タンパク遺伝子を構築し、hPIV2の転写開始配列、介在配列、転写終結配列を付加した遺伝子をhPIV2/ΔF発現用プラスミドベクターのMlu部位に導入した。挿入した配列はルールオブ6となるようにした。ウイルスの回収は、既報 (非特許文献11) に従い実施した。

[0072] [実施例7]

2箇所のアミノ酸変異を導入したEbolaウイルスのGPタンパクよりムチン領域遺伝子を除去したGP又は当該GPタンパク遺伝子のTM配列及びCT配列をhPIV2のFタンパクのTM配列及びCT配列に置換した配列をもつ遺伝子をMluI制限部位に導入したhPIV2/ΔFの構築

EbolaウイルスのGPのアミノ酸配列313番目から454番目の領域はムチン領域と呼ばれる配列でムチン領域タンパクは、その他の領域により形成されるドメインを覆う形で配置し、糖修飾されるアミノ酸残基が多い。GPタンパクの細胞への吸着、侵入にはあまり関係しない領域であることが知られており、当該領域を除去したEbolaウイルスのGP (ΔムチンGP) を構築した。当該ΔムチンGP (図5A、E) にEbolaウイルスのTM配列及びCT配列 (YLSAIALILSVITLVVGLLIAYIIKLVLSQIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS (配列番号1)) (図5B、E) に置換した配列に、hPIV2の転写開始配列、介在配列、転写終結配列を付加した遺伝子をhPIV2/ΔF発現用プラスミドベクターのMlu部位に導入した。挿入した配列はルールオブ6となるようにした。ウイルスの回収は、既報 (非特許文献11) に従い実施し、いずれもウイルスの回収にも成功した。しかし、ウエスタンブロット解析を行ったが、用いた抗GP抗体がムチン領域をエピトープとしている可能性が高く (図6)、ウエスタンブロット解析では発現の有無を解析することはできなかった (hPIV2のNPとPは発現していた)。

。

[0073] [実施例 8]

2箇所のアミノ酸変異を導入したEbolaウイルスのGP1タンパクよりムチン領域遺伝子を除去した遺伝子又は当該GP1タンパク遺伝子のTM配列及びCT配列をhPIV2のFタンパクのTM配列及びCT配列に置換した配列をもつ遺伝子をMluI制限部位に導入したhPIV2/ Δ Fの構築

実施例 5 で構築したEbolaウイルスのGP1タンパク遺伝子よりムチン翻訳領域配列除去し、当該配列にGPタンパク遺伝子のTM配列及びCT配列 (WIPAGIGVTGVIIAVIALFCICKFVF (配列番号 7)) (図 5 A、F) 又はhPIV2のTM配列及びCT配列 (YLSAIALILSVITLVVVGLLIAYIIKLVSQIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS (配列番号 1)) (図 5 B、Fを付加したEbolaウイルスのGP1タンパク遺伝子を構築し、hPIV2の転写開始配列、介在配列、転写終結配列を付加した遺伝子をMlu部位に導入した。挿入した配列はルールオブ6となるようにした。ウイルスの回収は、既報 (非特許文献 11) に従い実施した。

[0074] [実施例 9]

実施例 5 で構築した 2 箇所のアミノ酸変異を導入したEbolaウイルスのGPタンパク遺伝子を保持するhPIV2/ Δ Fおよび当該ベクターの0.01%の β -プロピオラクトン不活化ベクターによるマウスでのGPタンパクに対する抗体価の評価

当該ベクターおよび不活化ベクター (アジュバント不添加) をウイルス数が 10^8 /mLになるよう調製した。5週齢BALB/cマウス (♀) 後肢の大腿部筋肉内に、それぞれのベクター試料およびコントロール試料100ulを2週間の間隔を空けて2回注射し、投与2週間後に血清を回収した。当該血清を用いてEbolaウイルスのGPタンパク (Sino Biological Inc. cat#:40442-V08H2) を用いて、抗体 (IgG1+IgG2a) の上昇をELISAにより評価した。96プレートの1ウェルに50ngのGPタンパクを貼り付け、上述の血清を50倍から2倍ずつ6400倍まで希釈し、通常のABC法により抗体の有無を評価した。図 8 の結果が示すように、EbolaウイルスのGPタンパク遺伝子を保持するhPIV2/ Δ Fおよび当該ベクターの0.01%の β -プロピオラクトン不活化ベクターともに、効率的にEbolaウイルスGPに対するIgG抗体を上昇させることができることが確認できた。中和作用

をもつ抗体も誘導されていることを確認した。

[0075] [実施例 10]

マラリア抗原CSP (circumsporozoite protein; マラリア原虫スポロゾイト表面タンパク質) を保持するhPIV2/ Δ Fの構築

Plasmodium yoelli 由来のCSPをhPIV2/ Δ Fに導入した。インタクトなCSP遺伝子とGPI様アンカー配列(CSSIFNIVSNLSLGFVILLVLFVN (配列番号8))をhPIV2の(CT配列) (YLSAIALILSVITLVVVGLLIAYIIKLVSQIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIYGIS (配列番号1))に置換したCSP遺伝子にhPIV2に発現に必要な配列を付加してhPIV2/ Δ F発現用プラスミドのMlu I制限酵素部位に導入した(図9)。ウイルスの回収は、既報(非特許文献11)に従い実施し、両者のウイルスの回収に成功した。当該ウイルスをF発現Vero細胞に感染し、ウエスタンブロット解析によるCSPタンパクの発現解析を行った。CSPに対する抗体は*Plasmodium yoelli*のQQPPリピートに対するモノクローナル抗体を使用した(2F6)。陽性コントロールとして*Plasmodium yoelli*のスポロゾイド原虫10,000匹を用いた。

[0076] 図10に示したように、当該ベクターによりCSPタンパクを発現させることができた。一般に、CSPタンパクの発現は容易ではないことが報告されているが、hPIV2はCSPタンパクを容易に発現させることが可能であった。したがって、他のマラリア関連遺伝子を発現させる手段としての利用が期待される。また、培養上清よりって、他のマラリア関連遺伝子を発現させる手段としての利用が期待される。また、培養上清より超遠心分離(141,000g、35分間)で回収したウイルスベクターは、GPI様アンカー配列を保持するインタクトなCSPとGPI様アンカー配列をhPIV2のTMに置換したCSPを、hPIV2/ Δ Fベクター粒子上に同程度保持できることも確認できた。CSPタンパクは、GPI様アンカータンパクはhPIV2のTMタンパクと同程度ベクター上にCSPタンパクを保持させる能力をもつことが分った。しかし、膜貫通領域がオリジナルのGPIのCSPとhPIV2のTM/CTに置換したCSPでは、QQPP抗原に対する抗体に対する反応分子量が異なっていた。hPIV2のTM/CTに置換した場合には、陽性コントロールの

スポロゾイトのCSPタンパクと同じ分子量であったが、オリジナルのGPIの場合には陽性バンドの分子量が異なっていた。hPIV2のTM/CTに置換したCSPでは、オリジナルに近い（スポロゾイドのCSP）形態でベクターに取込むことができた。

[0077] [実施例 1 1]

マラリア抗原CSPを保持するhPIV2/ Δ FによるCSPに対する抗体価の評価

GPI様アンカー配列をhPIV2のTMに置換したCSP遺伝子保持するhPIV2/ Δ Fをウイルス数が 10^9 /mLになるよう調製した。5週齢BALB/c（♀）後肢の大腿部筋肉内に、それぞれの試料およびコントロール試料100ulを2週間の間隔を空けて2回注射し、投与2週間後に血清を回収した。当該血清を用いて*Plasmodium yoelli* のCSPに対する抗体価を評価した。ELISAでの評価には、*Plasmodium yoelli* のCSPに繰り返し存在するB細胞エpiteープのQGPGAP配列を3回リピートした(QGPGAP)₃ペプチドを用いた。当該ペプチドを5ug/mLに調製し、100ulを96プレートの1ウェルに1晩貼り付け、CSPに対する抗体（IgG1+IgG2a）の上昇を評価した。上述の血清を10倍から4倍ずつ2560倍まで希釈し、通常のABC法により抗体の有無を評価した。結果（図11）より、当該ベクターの投与によりCSPに対する抗体を上昇させることができた。

[0078] [実施例 1 2]

prM/E抗原を用いたZikaウイルスワクチンの作製

ZikaウイルスのprM/E領域（KU321639）をコードする遺伝子（一部アミノ酸変異を含む）のprM遺伝子の5'-末端に開始コドンが付加し、さらに分泌シグナルをコードする遺伝子を付加又は付加しない遺伝子を加え、当該遺伝子の前後にhPIV2の転写開始配列、介在配列、転写終止配列を付加した遺伝子を作製し、hPIV2/ Δ F発現用プラスミドベクターのMluI部位に導入する（図12A, C）。挿入した配列はルールオブ6となるようにする。ウイルスの回収は、既報（非特許文献11）に従い実施する。

[0079] [実施例 1 3]

ZikaウイルスのEタンパクのC末端領域のstem配列（EH1およびEH2）及びTM配

列 (TH1及びTH2) を置換、欠失させたワクチンの作製

実施例 1 4 と同じ構造をもつ Zika ウイルスの prM の遺伝子に、以下の配列を欠失させた Eタンパクに hPIV2 の TM/CT 配列 (hPIV2 の TM 配列及び/又は CT 配 (YLSAIALILSVITLVVVGLLIAYIIKLVSQIHQFRSLAATTMFHRENPAFFSKNNHGNIGIS (配列番号 1)) を付加したタンパクをコードする遺伝子を構築する。ここで以下の配列とは、Eタンパクの EH1 配列及び EH2 配列並びに TM1 配列及び TM2 配列、EH2 配列並びに TM1 配列及び TM2 配列、又は TM1 配列及び TM2 配列を意味する。当該遺伝子の前後に hPIV2 の転写開始配列、介在配列、転写終結配列を付加した遺伝子を作製し、hPIV2/ΔF 発現用プラスミドベクターの MluI 部位に導入する (図 1 2 B, D, E, F)。挿入した配列はルールオブ 6 となるようにする。ウイルスの回収はウイルスの回収は既報 (非特許文献 11) に従い実施する。

[0080] [実施例 1 4]

Zika ウイルスに対するワクチン効果

実施例 1 5 で作製した prM/E 又は Eタンパクを保持するベクターを低濃度 β-プロピオラクトンで不活化して調製したベクターを用いて、Zika ウイルスに対するワクチン効果を評価する。

[0081] [実施例 1 5]

遺伝子情報を含まない prM/Eタンパク又は M/Eタンパク顆粒 (subviral particle) の回収

Flavi ウイルスに属するウイルスは、ER から感染性ウイルス粒子を放出するほかに、prM/Eタンパク又は M/Eタンパクのみで遺伝子情報を含まないタンパク顆粒 (subviral particle) を放出することが他の Flavi 属ウイルスで報告されている (非特許文献 1 3、非特許文献 1 4)。非増殖型 hPIV2/ΔF に Zika ウイルスの prM/E 遺伝子を導入したベクターを作製し (図 1 2 A, C)、当該ベクターを hPIV2 の F 遺伝子を発現していない細胞 (Vero 細胞、CHO 細胞等) に感染させ、培養上清から当該顆粒を効率的に回収し、ウイルス様パーティクル (VLP) として Zika ワクチンとして用いる。

産業上の利用可能性

[0082] 本発明のウイルスベクターは、高分子の抗原ペプチド（数百アミノ酸残基）を、その立体構造を維持した状態でウイルス粒子上に提示できる。本発明のウイルスベクターは、核酸不活化処理後においても生ウイルスに近い細胞吸着性と免疫誘導能を有し、立体構造を維持した状態で抗原エピトープを提示し、効率的な中和抗体を誘導できる。よって、本発明は、RSV及びエボラウイルス等に有効なライセンスワクチンの製造に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 抗原ポリペプチドをコードする核酸が、F遺伝子欠損型パラミクソウイルス科ウイルス遺伝子のHN遺伝子5'直上流に組み込まれているウイルスベクターであって、該抗原ポリペプチドが前記ウイルス由来のTM配列及び／又はCT配列と融合した130アミノ酸残基以上の融合タンパクとして発現される非伝播型ウイルスベクター。
- [請求項2] パラミクソウイルス科のウイルスが非伝播型ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスである、請求項1記載のウイルスベクター。
- [請求項3] 抗原ポリペプチドがベクターエンベロープ表面に発現されることを特徴とする、請求項1又は2に記載のウイルスベクター。
- [請求項4] 抗原ポリペプチドが天然の立体構造又はワクチン抗原として必要な立体構想を維持した状態で発現されることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のウイルスベクター。
- [請求項5] 核酸不活化処理されたものである、請求項1～4のいずれか1項に記載のウイルスベクター。
- [請求項6] 抗原ポリペプチド遺伝子のTM配列及び／又はCT配列あるいはGPI様アンカータンパク質がヒトパラインフルエンザ2型ウイルス由来のTM配列及び／又はCT配列で置換された核酸として組み込まれている、請求項1～5のいずれか1項に記載のウイルスベクター。
- [請求項7] 抗原ポリペプチドが、強毒型インフルエンザウイルスを含むインフルエンザウイルス、パラインフルエンザ3型ウイルス、RSウイルス、ヘンドラウイルス、SARSウイルス、MERSウイルス、ニパウイルス、ラッサウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、エボラウイルス、ハンタウイルス、エイズウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、クリミアンコンゴ出血熱ウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ジカウイルス、マールブルグウイルス、HIVおよびパピローマウイルス

から選ばれるウイルスの抗原ペプチド、A群 β （ベータ）型溶連菌、Mycobacterium tuberculosis、コレラ菌、およびマイコプラズマから選ばれる細菌の抗原ペプチド、マラリア原虫の抗原ペプチド、または癌抗原gp100、MUC1、NY-ESO-1、MelanA/MART1、TRP2、MAGE、CEA、CA125、HER2/neu、WT1、PSAおよびネオアンチジェンからなる群から選ばれる抗原ペプチドのいずれか1または2以上、あるいはこれらの断片である、請求項1～6のいずれか1項に記載のウイルスベクター。

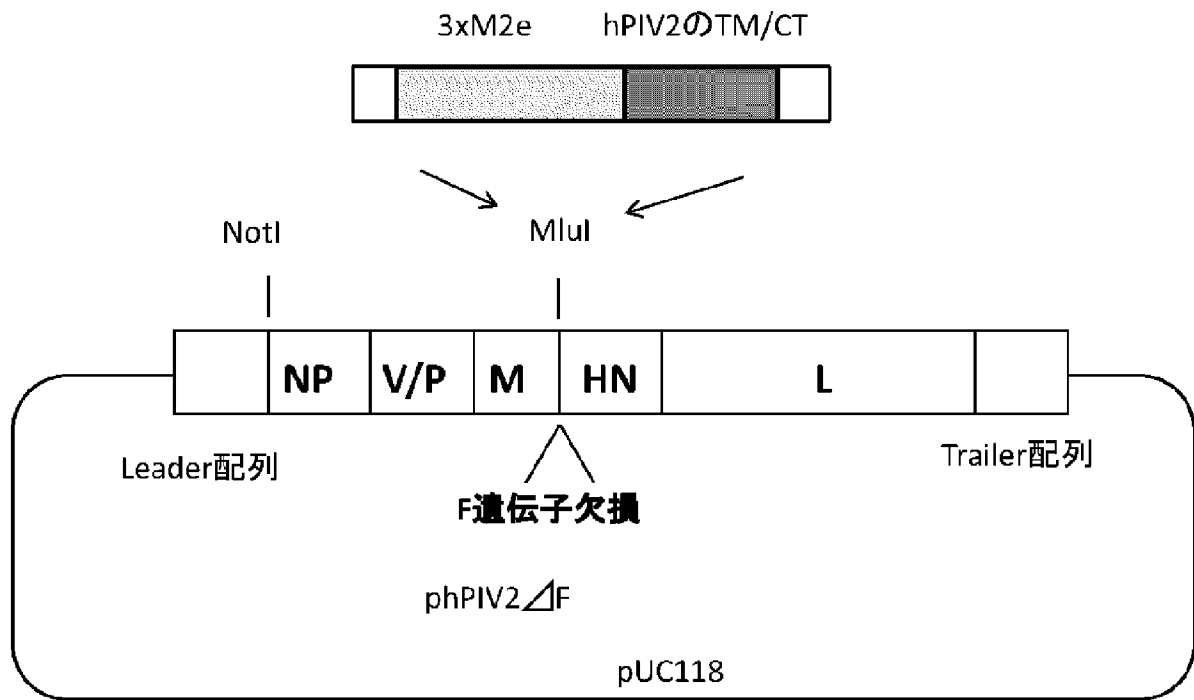
[請求項8]

抗原ポリペプチドが、インフルエンザウイルスの3個以上の連続したM2e抗原、RSVのFタンパク又はGタンパクあるいはその変異体若しくはこれらの断片、M2e抗原とRSVのFタンパク又はその断片、及びエボラウイルスのGPタンパク又はその変異体もしくはこれらの断片、マラリアCSPタンパク又はその変異体若しくはその断片、及びZikaウイルスのprM/Eタンパク又はその変異体若しくはその断片から選ばれるいずれかである、請求項7に記載のウイルスベクター。

[請求項9]

請求項1～8のいずれか1項に記載のウイルスベクターと製薬上許容し得る担体を含むワクチン。

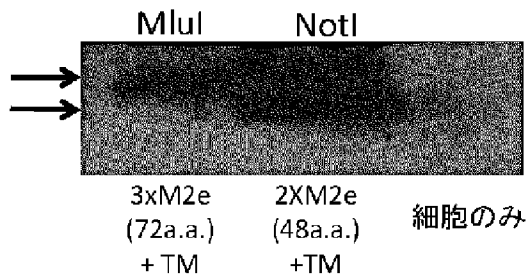
[図1]



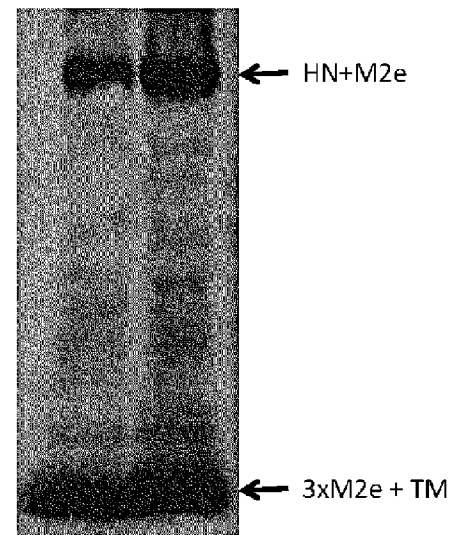
[図2]

(A) 感染細胞での発現

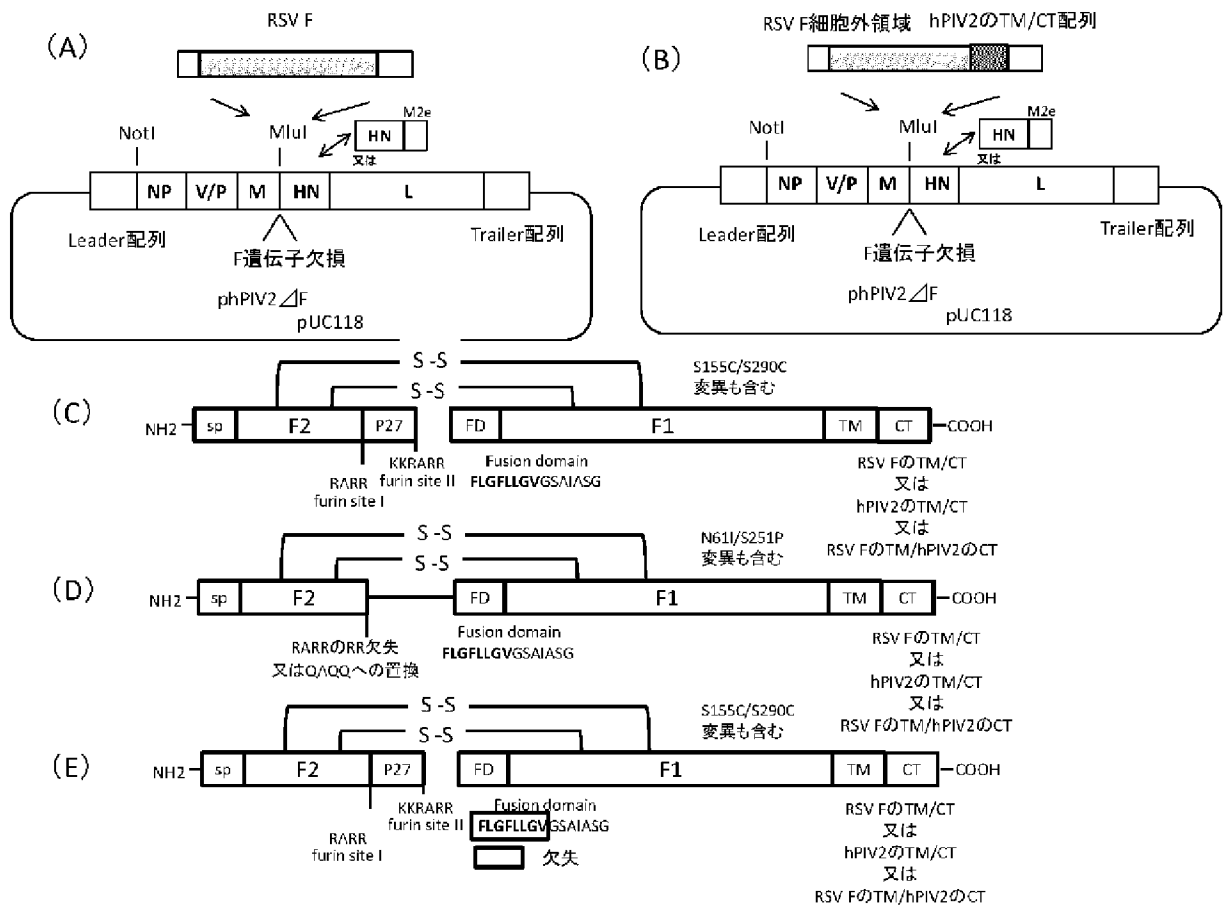
(B) ベクター粒子への抗原の導入



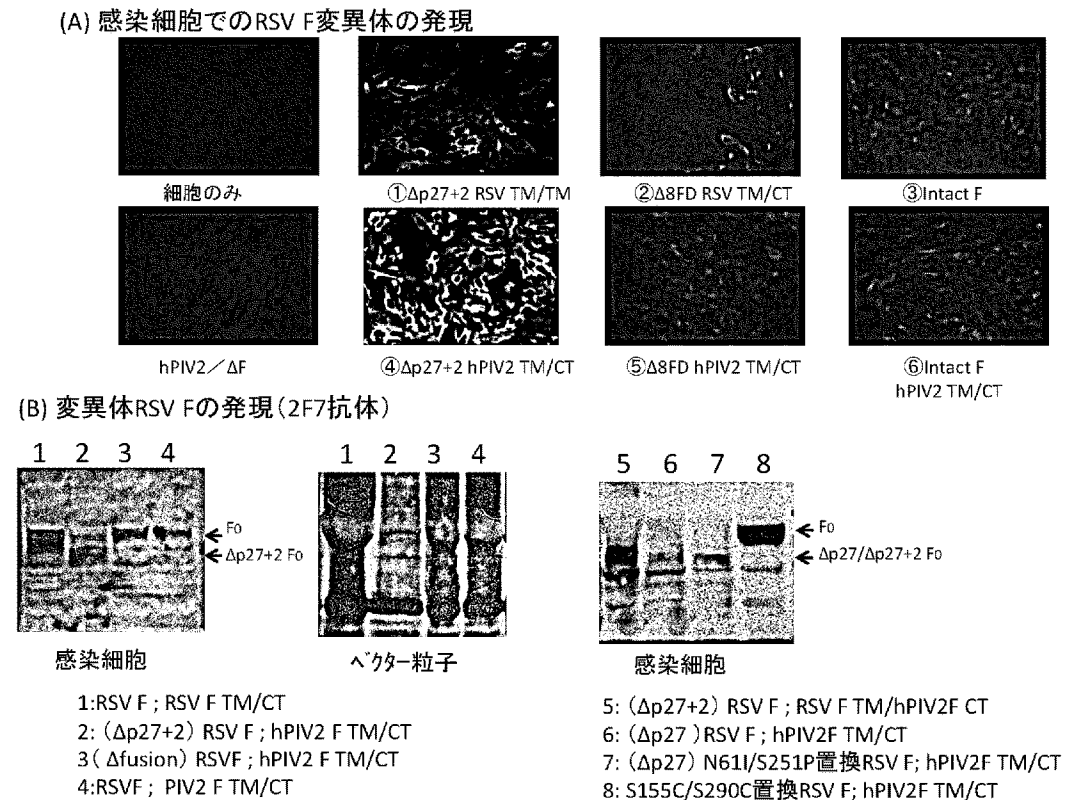
抗M2e抗体



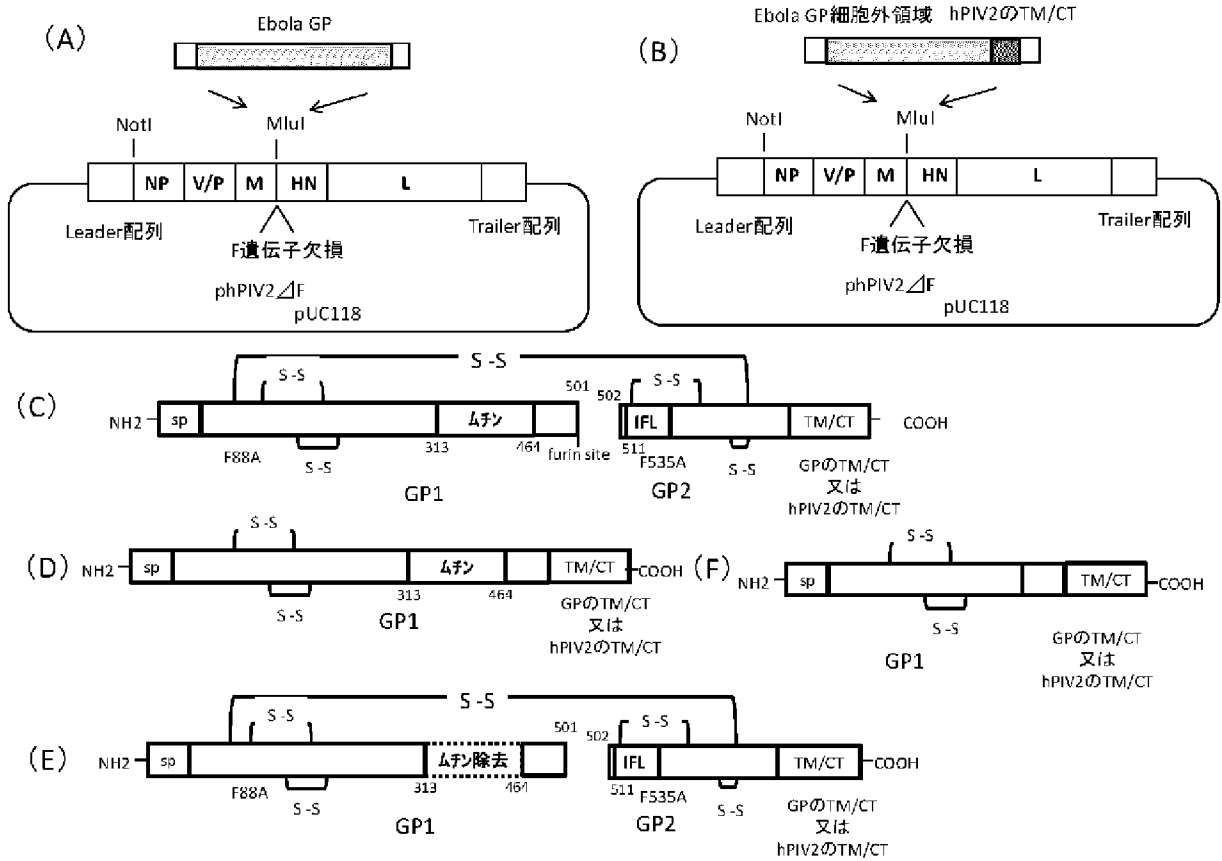
[図3]



[図4]

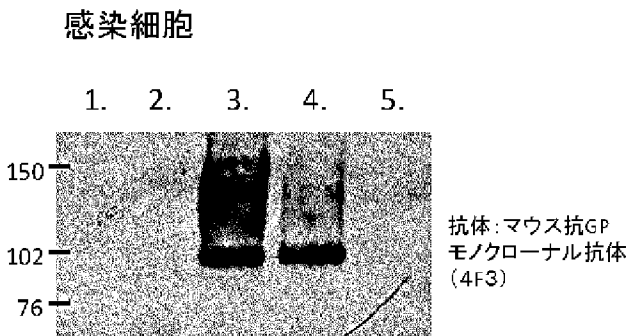


[図5]



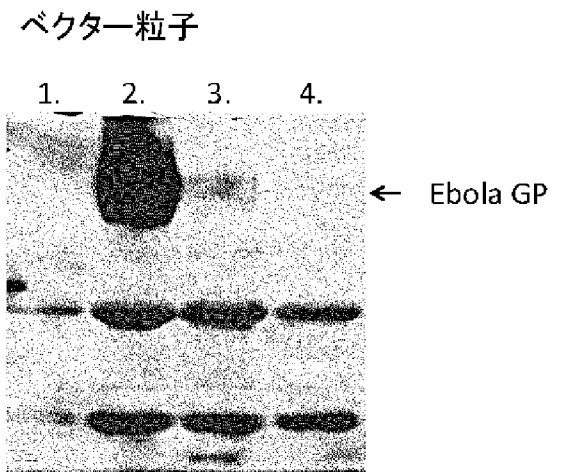
[図6]

(A)



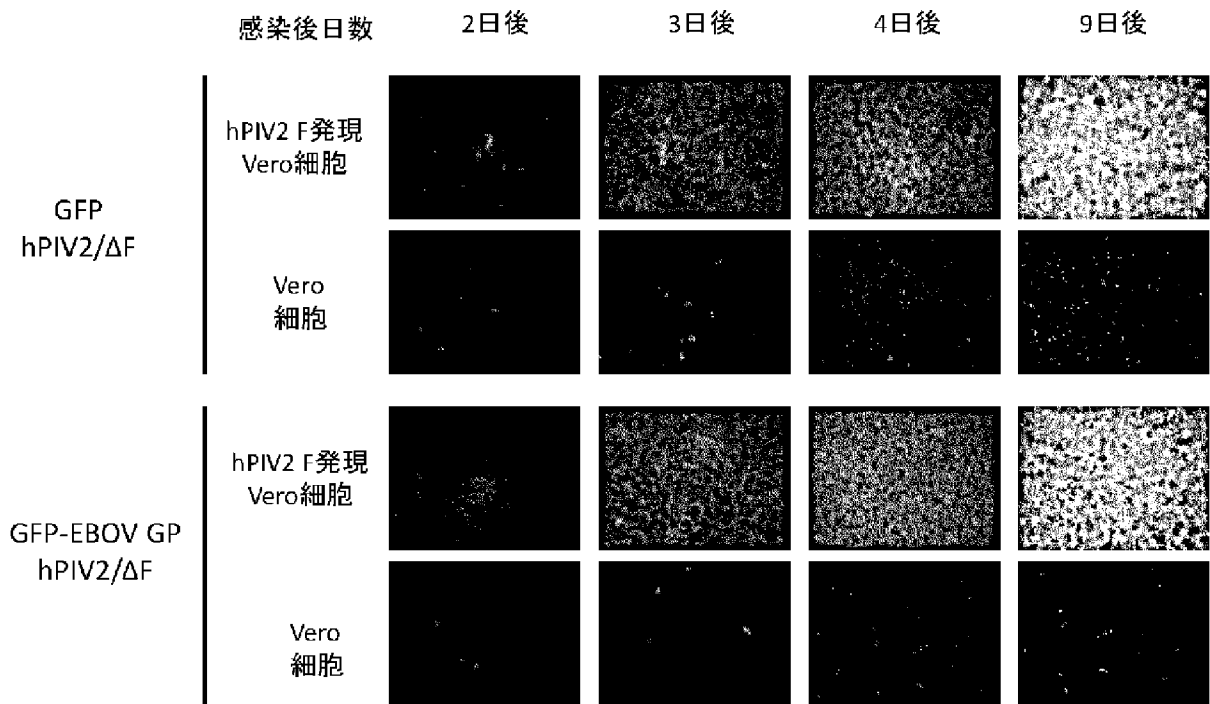
1. hPIV2 F発現Vero細胞
2. hPIV2 Δ F感染F発現Vero細胞
3. Ebola GP-hPIV2/ Δ F感染F発現Vero細胞
4. Ebola GP+PIV2F-TM/CT-PIV2/ Δ F感染F発現Vero細胞
5. Ebola GP(Δ Mucin)-PIV2 Δ F感染F発現Vero細胞

(B)

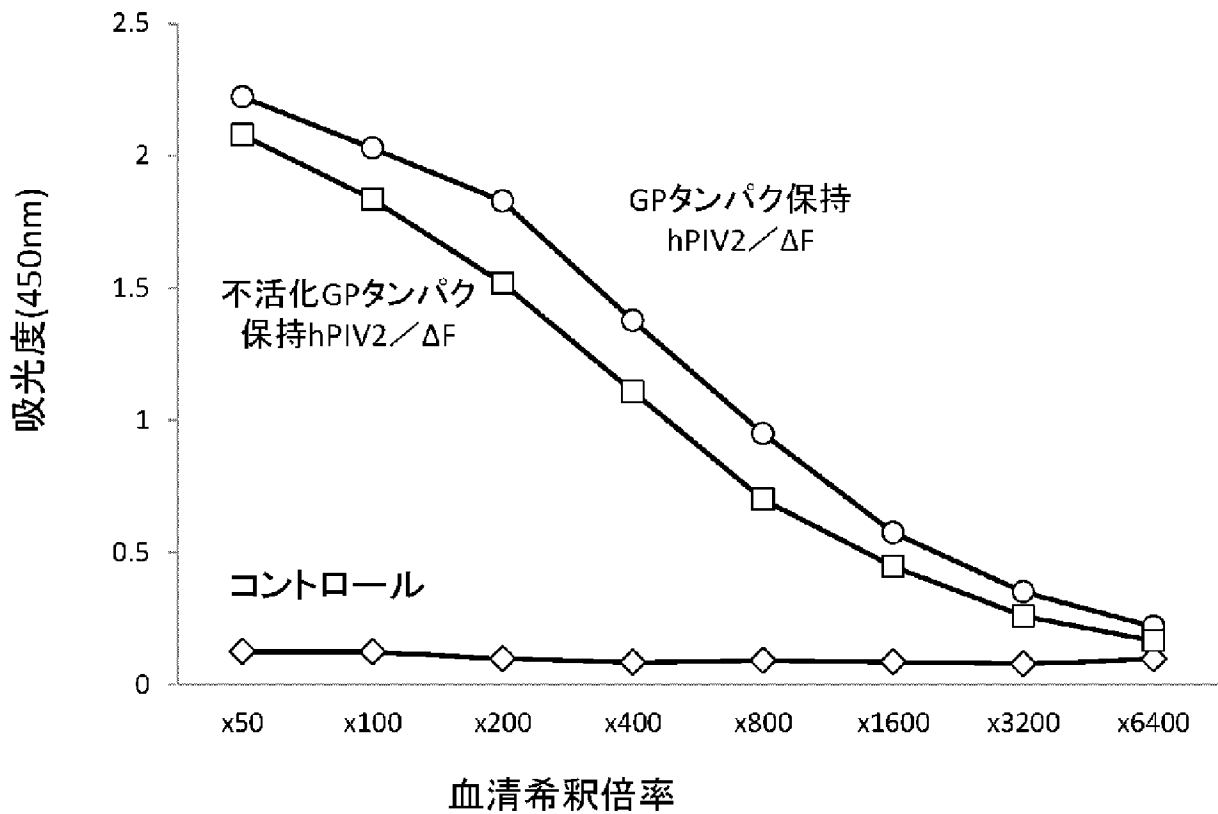


1. hPIV2 Δ F粒子
2. Ebola GP-hPIV2/ Δ F粒子
3. Ebola GP+PIV2F-TM/CT-PIV2/ Δ F粒子
4. Ebola GP(Δ Mucin)-PIV2 Δ F粒子

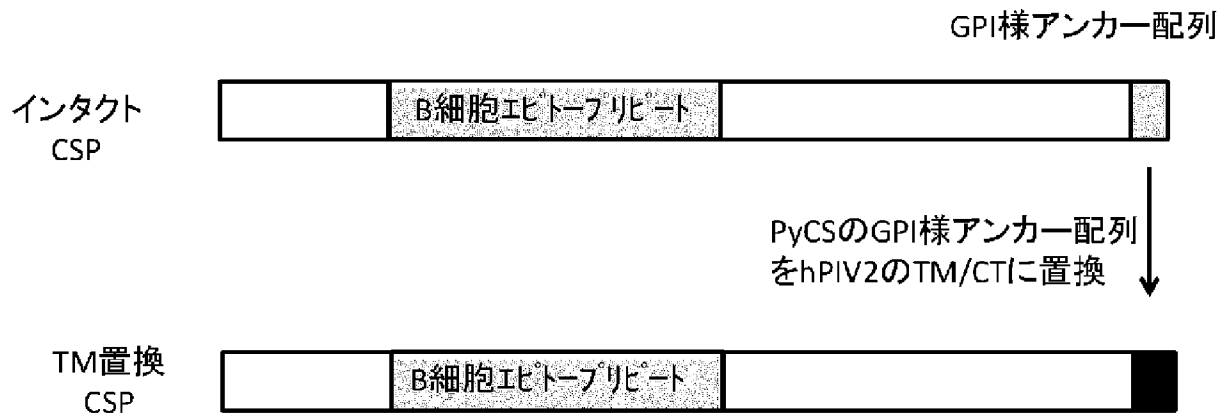
[図7]



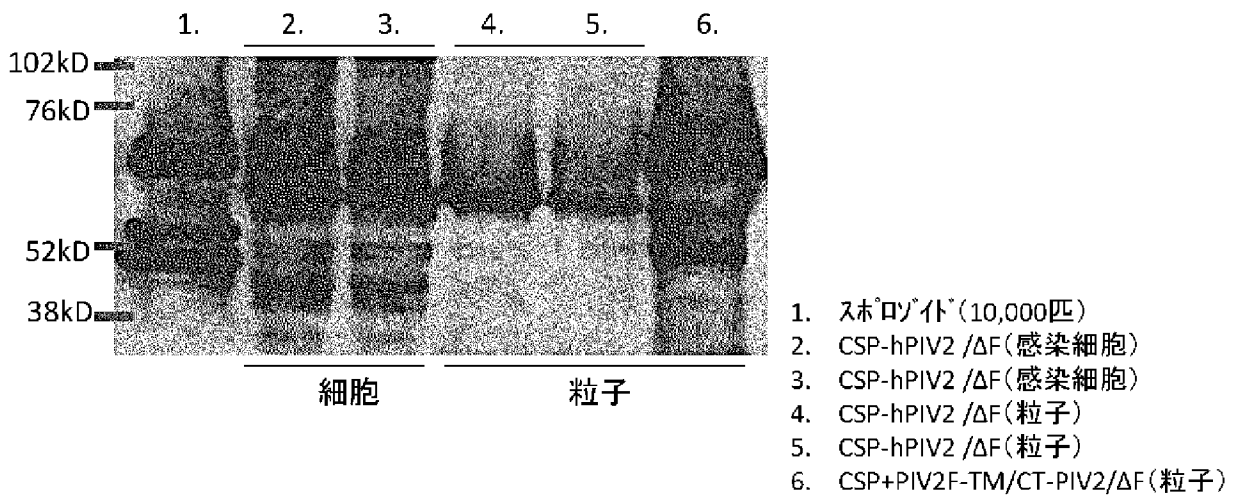
[図8]



[図9]

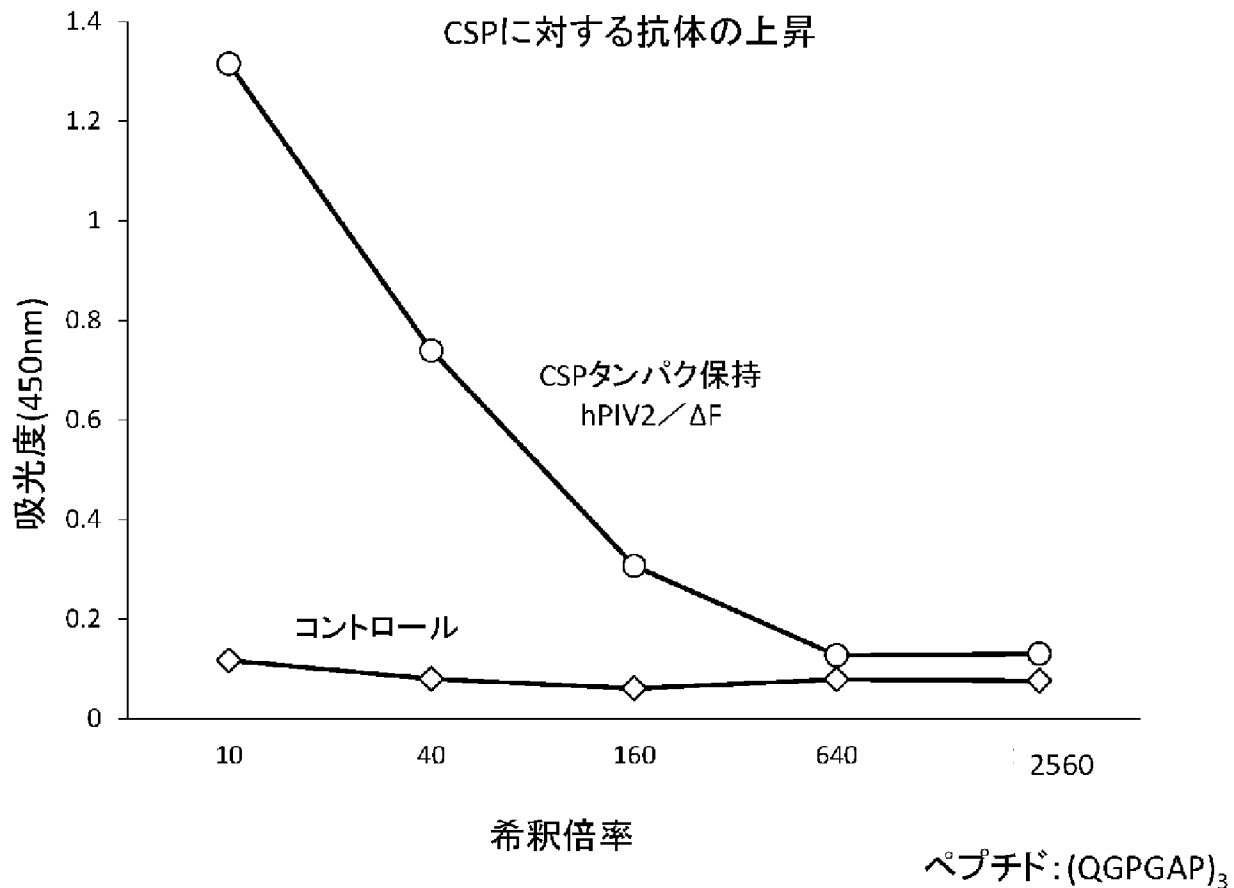
hPIV2/ Δ FへのCSPの導入方法

[図10]

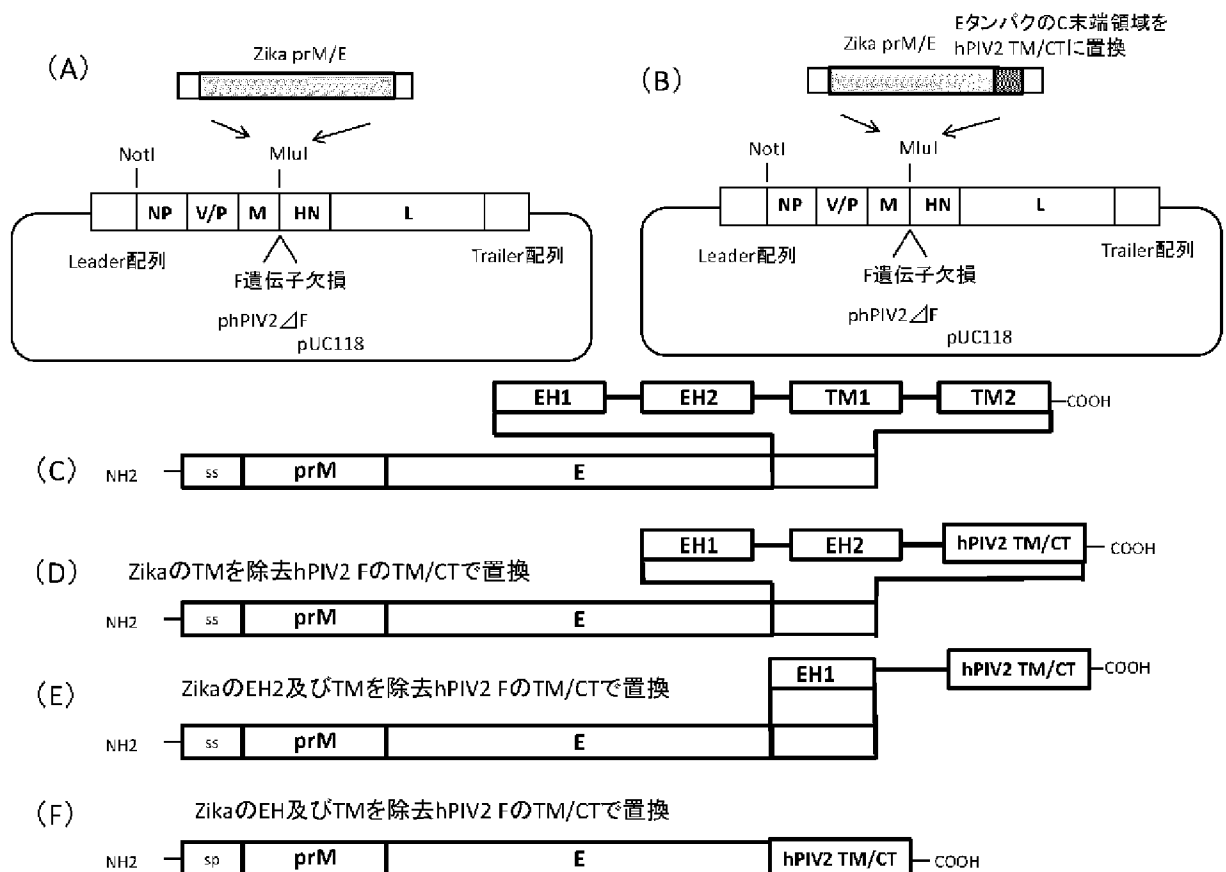


抗体: P. yoelliのCSPの繰返し配列(QQPP)特異的マウスモノクローナル抗体(2F6)

[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/067516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/015(2006.01)i, A61K39/02(2006.01)i, A61K39/04(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/115(2006.01)n 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) C12N15/09, A61K39/00, A61K39/015, A61K39/02, A61K39/04, A61K39/12, A61P31/04, A61P31/12, A61P35/00, C07K14/115 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2014/198408 A1 (AMVAC AG), 18 December 2014 (18.12.2014), claims; examples; fig. 1, 2 & EP 2813574 A1 & JP 2016-52567 A	1, 3, 4, 7-9 1-9
X Y	WO 2014/103310 A1 (Biocomo Inc.), 03 July 2014 (03.07.2014), claims; example 14 & US 2015/0329874 A1 & EP 2940134 A1 claims; example 14	1-9 1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 August 2016 (26.08.16)		Date of mailing of the international search report 06 September 2016 (06.09.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/067516

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-506689 A (University of Georgia Research Foundation, Inc.), 05 March 2015 (05.03.2015), example 3 & US 2014/0370050 A1 & EP 2806891 A1 & WO 2013/112720 A1 example 3	1-9
Y	BUKREYEV A et al., Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge., <i>Virology</i> , 2009, Vol.383, No.2, pp.348-361, Abstract	1-9
A	WO 2014/198407 A1 (AMVAC AG), 18 December 2014 (18.12.2014), claims & US 2016/0120974 A1 & EP 3008190 A1 & JP 2016-521566 A	1-9
A	JP 2005-518208 A (MedImmune Vaccines, Inc.), 23 June 2005 (23.06.2005), claims & US 2003/0232061 A1 & EP 1485468 A1 & WO 2003/072720 A2 claims	1-9
A	JP 2006-512904 A (The United States of America), 20 April 2006 (20.04.2006), paragraph [0130] & US 2004/0204581 A1 & EP 1572947 A1 & WO 2004/027037 A2 [144]	1-9
A	WO 2012/108195 A1 (Mie University), 16 August 2012 (16.08.2012), claims & US 2014/0322760 A1 & EP 2674491 A1 claims	1-9
A	STEGLICH C et al., Chimeric newcastle disease virus protects chickens against avian influenza in the presence of maternally derived NDV immunity., <i>PLoS One</i> , 2013, Vol.8, No.9, e72530, Abstract, doi: 10.1371/journal.pone.0072530	1-9
A	ZIMMER G et al., A chimeric respiratory syncytial virus fusion protein functionally replaces the F and HN glycoproteins in recombinant Sendai virus., <i>J. Virol.</i> , 2005, Vol.79, No.16, pp.10467-10477, Abstract	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/067516

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAMP K et al., Influence of insertion site of the avian influenza virus haemagglutinin (HA) gene within the Newcastle disease virus genome on HA expression., J. Gen. Virol., 2011, Vol.92, Pt.2, pp.355-360, Abstract	1-9
A	ZHAN X et al., Sendai virus recombinant vaccine expressing hPIV-3 HN or F elicits protective immunity and combines with a second recombinant to prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV infections., Vaccine, 2008, Vol.26, No.27-28, pp.3480-3488, Abstract	1-9

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/015(2006.01)i, A61K39/02(2006.01)i, A61K39/04(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/115(2006.01)n</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, A61K39/00, A61K39/015, A61K39/02, A61K39/04, A61K39/12, A61P31/04, A61P31/12, A61P35/00, C07K14/115</p>											
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年</p>											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X Y</td> <td>WO 2014/198408 A1 (AMVAC AG) 2014.12.18, Claims, Examples, FIG.1, FIG.2 & EP 2813574 A1 & JP 2016-52567 A</td> <td>1, 3, 4, 7-9 1-9</td> </tr> <tr> <td>X Y</td> <td>WO 2014/103310 A1 (バイオコモ株式会社) 2014.07.03, 特許請求の範囲、実施例14 & US 2015/0329874 A1 & EP 2940134 A1, Claims, Example 14</td> <td>1-9 1-9</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X Y	WO 2014/198408 A1 (AMVAC AG) 2014.12.18, Claims, Examples, FIG.1, FIG.2 & EP 2813574 A1 & JP 2016-52567 A	1, 3, 4, 7-9 1-9	X Y	WO 2014/103310 A1 (バイオコモ株式会社) 2014.07.03, 特許請求の範囲、実施例14 & US 2015/0329874 A1 & EP 2940134 A1, Claims, Example 14	1-9 1-9
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	WO 2014/198408 A1 (AMVAC AG) 2014.12.18, Claims, Examples, FIG.1, FIG.2 & EP 2813574 A1 & JP 2016-52567 A	1, 3, 4, 7-9 1-9									
X Y	WO 2014/103310 A1 (バイオコモ株式会社) 2014.07.03, 特許請求の範囲、実施例14 & US 2015/0329874 A1 & EP 2940134 A1, Claims, Example 14	1-9 1-9									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>26.08.2016</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>06.09.2016</p>									
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>西村 亜希子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p> <table border="1"> <tr> <td>4N</td> <td>3435</td> </tr> </table>	4N	3435							
4N	3435										

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2015-506689 A (ユニバーシティ オブ ジョージア リサーチ ファンデーション, インコーポレーテッド) 2015.03.05, 実施例 3 & US 2014/0370050 A1 & EP 2806891 A1 & WO 2013/112720 A1, Example 3	1-9
Y	BUKREYEV A et al., Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge., <i>Virology</i> , 2009, Vol. 383, No. 2, pp. 348-361, Abstract	1-9
A	WO 2014/198407 A1 (AMVAC AG) 2014.12.18, Claims & US 2016/0120974 A1 & EP 3008190 A1 & JP 2016-521566 A	1-9
A	JP 2005-518208 A (メドイミュン ワクチンズ, インコーポレー テッド) 2005.06.23, 特許請求の範囲 & US 2003/0232061 A1 & EP 1485468 A1 & WO 2003/072720 A2, Claims	1-9
A	JP 2006-512904 A (アメリカ合衆国) 2006.04.20, 段落[0130] & US 2004/0204581 A1 & EP 1572947 A1 & WO 2004/027037 A2, [144]	1-9
A	WO 2012/108195 A1 (国立大学法人三重大学) 2012.08.16, 特許請求 の範囲 & US 2014/0322760 A1 & EP 2674491 A1, Claims	1-9
A	STEGLICH C et al., Chimeric newcastle disease virus protects chickens against avian influenza in the presence of maternally derived NDV immunity., <i>PLoS One</i> , 2013, Vol. 8, No. 9, e72530, Abstract, doi: 10.1371/journal.pone.0072530	1-9
A	ZIMMER G et al., A chimeric respiratory syncytial virus fusion protein functionally replaces the F and HN glycoproteins in recombinant Sendai virus., <i>J. Virol.</i> , 2005, Vol. 79, No. 16, pp. 10467-10477, Abstract	1-9
A	RAMP K et al., Influence of insertion site of the avian influenza virus haemagglutinin (HA) gene within the Newcastle disease virus genome on HA expression., <i>J. Gen. Virol.</i> , 2011, Vol. 92, Pt. 2, pp. 355-360, Abstract	1-9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	ZHAN X et al., Sendai virus recombinant vaccine expressing hPIV-3 HN or F elicits protective immunity and combines with a second recombinant to prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV infections., Vaccine, 2008, Vol.26, No.27-28, pp.3480-3488, Abstract	1-9