

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6772065号
(P6772065)

(45) 発行日 令和2年10月21日 (2020. 10. 21)

(24) 登録日 令和2年10月2日 (2020. 10. 2)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/7088	(2006. 01)	A 6 1 K 31/7088	Z N A
A 6 1 K 45/00	(2006. 01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/00	(2006. 01)	A 6 1 K 38/00	
A 6 1 K 39/00	(2006. 01)	A 6 1 K 39/00	
A 6 1 K 9/127	(2006. 01)	A 6 1 K 9/127	

請求項の数 42 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-554261 (P2016-554261)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月27日 (2015. 2. 27)
 (65) 公表番号 特表2017-512202 (P2017-512202A)
 (43) 公表日 平成29年5月18日 (2017. 5. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/054131
 (87) 国際公開番号 W02015/128461
 (87) 国際公開日 平成27年9月3日 (2015. 9. 3)
 審査請求日 平成30年2月22日 (2018. 2. 22)
 (31) 優先権主張番号 61/946, 372
 (32) 優先日 平成26年2月28日 (2014. 2. 28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 508270727
 バイエル・アニマル・ヘルス・ゲゼルシャ
 フト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツ
 ング
 BAYER ANIMAL HEALTH
 GMBH
 ドイツ連邦共和国デー ー 5 1 3 7 3 レーバ
 ー クーゼン、カイザー・ビルヘルム・アレ
 ー、1 O
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫賦活プラスミド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸分子を含む免疫賦活化のための組成物であって、該核酸分子が配列番号 1 の配列と少なくとも 8 9 % の配列相同性を有し、少なくとも 2 0 0 の C p G ジヌクレオチドを含み、該核酸分子は抗生物質耐性遺伝子を含まず、免疫原をコードしないことを特徴とする、前記組成物。

【請求項 2】

前記核酸分子が、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % および 9 9 % からなる群から選択される、配列番号 1 の配列との配列相同性を有する核酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記核酸分子が配列番号 1 を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

医薬的に許容可能な担体をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

配列番号 4 の配列と少なくとも 8 4 % の配列相同性を有し、少なくとも 2 0 0 の C p G ジヌクレオチドを含む核酸分子を含み、該核酸分子は抗生物質耐性遺伝子を含まず、免疫原をコードしないことを特徴とする、免疫賦活化のための組成物。

【請求項 6】

前記核酸分子が、配列番号 4 の配列と少なくとも 8 5 % の配列相同性を有する、請求項 5

に記載の組成物。

【請求項 7】

前記核酸分子が、配列番号 4 の配列と少なくとも 86 % の配列相同性を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記核酸分子が、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % および 99 % からなる群から選択される、配列番号 4 の配列との配列相同性を有する核酸配列を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記核酸分子が配列番号 4 を含む、請求項 5 に記載の組成物。

10

【請求項 10】

医薬的に許容可能な担体をさらに含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 11】

a . 配列番号 1 の配列と少なくとも 89 % の配列相同性を有し、少なくとも 200 の CpG ジヌクレオチドを含む核酸分子と；

b . リボソーム送達ビヒクルと、

を含み、前記核酸分子は抗生物質耐性遺伝子を含まず、免疫原をコードしないことを特徴とする、免疫賦活化のための組成物。

【請求項 12】

前記核酸分子が、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % および 99 % からなる群から選択される、配列番号 1 の配列との配列相同性を有する核酸配列を含む、請求項 11 に記載の組成物。

20

【請求項 13】

前記核酸分子が配列番号 1 を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記リボソーム送達ビヒクルが、N - [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 (DOTMA) およびコレステロール；N - [1 - (2 , 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル] - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP) およびコレステロール；1 - [2 - (オレオイルオキシ) エチル] - 2 - オレイル - 3 - (2 - ヒドロキシエチル) イミダゾリニウムクロリド (DOTIM) およびコレステロール；ならびにジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDA B) およびコレステロールからなる群から選択される脂質ペアを含む、請求項 11 に記載の組成物。

30

【請求項 15】

医薬的に許容可能な担体をさらに含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 16】

a . 配列番号 4 の配列と少なくとも 84 % の配列相同性を有し、少なくとも 200 の CpG ジヌクレオチドを含む核酸分子と、

b . リボソーム送達ビヒクルと、

を含み、前記核酸分子は抗生物質耐性遺伝子を含まず、免疫原をコードしないことを特徴とする、免疫賦活化のための組成物。

40

【請求項 17】

前記核酸分子が、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % および 99 % からなる群から選択される、配列番号 4 の配列との配列相同性を有する核酸配列を含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記核酸分子が配列番号 4 を含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記リボソーム送達ビヒクルが、N - [1 - (2 , 3 - ジオレイルオキシ) プロピル]

50

- N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) およびコレステロール ; N - [1 - (2 , 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP) およびコレステロール ; 1 - [2 - (オレオイルオキシ) エチル] - 2 - オレイル - 3 - (2 - ヒドロキシエチル) イミダゾリニウムクロリド (DOTIM) およびコレステロール ; ならびにジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB) およびコレステロールからなる群から選択される脂質ペアを含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 20】

医薬的に許容可能な担体をさらに含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 21】

組成物を対象に投与することを含む、対象において免疫反応を刺激する方法に用いるための該組成物であって、配列番号 1 の配列と少なくとも 89 % の配列相同性を有し、少なくとも 200 の CpG ジヌクレオチドを含む核酸配列と、リポソーム送達ビヒクルと、を含み、前記核酸配列は抗生物質耐性遺伝子を含まず、免疫原をコードしないことを特徴とする、組成物。

【請求項 22】

前記リポソーム送達ビヒクルが、多重膜小胞脂質および押出脂質からなる群から選択される脂質を含む、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記リポソーム送達ビヒクルが、N - [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 (DOTMA) およびコレステロール ; N - [1 - (2 , 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP) およびコレステロール ; 1 - [2 - (オレオイルオキシ) エチル] - 2 - オレイル - 3 - (2 - ヒドロキシエチル) イミダゾリニウムクロリド (DOTIM) およびコレステロール ; ならびにジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB) およびコレステロールからなる群から選択される脂質ペアを含む、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 24】

投与が、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、噴霧によるもの、エアロゾルによるもの、胚内、経口、眼内、気管内および鼻腔内からなる群から選択される、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 25】

生物学的製剤をさらに含む、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記生物学的製剤が、免疫促進物質タンパク質、免疫原、ワクチン、抗菌剤およびそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記投与が感染性病原体への曝露前である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記投与が感染性病原体への曝露後である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記刺激される免疫反応が、非抗原特異的免疫反応、抗原特異的免疫反応、自然免疫反応、適応免疫反応、液性免疫反応、細胞性免疫反応またはそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記対象が、哺乳類、水産養殖物類および鳥類からなる群から選択される、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 31】

医薬的に許容可能な担体をさらに含む、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 32】

10

20

30

40

50

組成物を対象に投与することを含む、対象において免疫反応を刺激する方法に用いるための該組成物であって、配列番号４の配列と少なくとも８４％の配列相同性を有し、少なくとも２００のＣｐＧジヌクレオチドを含む核酸配列と、リポソーム送達ビヒクルと、を含み、前記核酸配列は抗生物質耐性遺伝子を含まず、免疫原をコードしないことを特徴とする、組成物。

【請求項３３】

前記リポソーム送達ビヒクルが、多重膜小胞脂質および押出脂質からなる群から選択される脂質を含む、請求項３２に記載の組成物。

【請求項３４】

前記リポソーム送達ビヒクルが、 N -[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 (DOTMA) およびコレステロール ; N -[1 - (2 , 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル] - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP) およびコレステロール ; 1 - [2 - (オレオイルオキシ) エチル] - 2 - オレイル - 3 - (2 - ヒドロキシエチル) イミダゾリニウムクロリド (DOTIM) およびコレステロール ; ならびにジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDA B) およびコレステロールからなる群から選択される脂質ペアを含む、請求項３２に記載の組成物。

【請求項３５】

投与が、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、噴霧によるもの、エアロゾルによるもの、胚内、経口、眼内、気管内および鼻腔内からなる群から選択される、請求項３２に記載の組成物。

【請求項３６】

生物学的製剤をさらに含む、請求項３２に記載の組成物。

【請求項３７】

前記生物学的製剤が、免疫促進物質タンパク質、免疫原、ワクチン、抗菌剤およびそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される、請求項３６に記載の組成物。

【請求項３８】

前記投与が感染性病原体への曝露前である、請求項３２に記載の組成物。

【請求項３９】

前記投与が感染性病原体への曝露後である、請求項３２に記載の組成物。

【請求項４０】

前記刺激される免疫反応が、非抗原特異的免疫反応、抗原特異的免疫反応、自然免疫反応、適応免疫反応、液性免疫反応、細胞性免疫反応またはそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項３２に記載の組成物。

【請求項４１】

前記対象が、哺乳類、水産養殖物類および鳥類からなる群から選択される、請求項３２に記載の組成物。

【請求項４２】

医薬的に許容可能な担体をさらに含む、請求項３２に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、全般的に、免疫賦活プラスミドに関する。本プラスミドは、抗生物質耐性遺伝子を含まない。本プラスミドは、抗生物質耐性遺伝子ではない、選択可能またはスクリーニング可能マーカー遺伝子（例えば $lacZ$ 遺伝子）を含み得る。あるいは、本プラスミドは、何らかの選択可能またはスクリーニング可能マーカー遺伝子を欠き得る。

【背景技術】

【０００２】

非メチル化 CpG モチーフは、脊椎動物 DNA よりも細菌 DNA において高頻度で現れる。これらのモチーフは、宿主防御機構を活性化し、自然および獲得免疫反応へと導く。

10

20

30

40

50

CpGモチーフおよびそれらの免疫賦活効果は、Krieg, Ann. Rev. Immunol. 20: 709-760 (2002) で概説されている。

【0003】

多くのCpGモチーフを含有する免疫賦活プラスミドが以前開発され、プラスミドおよび陽イオン性リポソーム送達ビヒクルを含む免疫調節物質組成物中で鳥類およびウシ亜科の動物に投与する場合、免疫反応を誘発するために有効であることが示されている。それらの全体において両者の内容が参照により本明細書によって組み込まれる、米国特許出願公開第2012/0064151号明細書(鳥類)および2013/0295167号明細書(ウシ亜科)を参照。このプラスミド、pMB75.6は、4242bp長であり、288個のCpGジヌクレオチドを含有する。pMB75.6のマッピングは図1で示され、pMB75.6のヌクレオチド配列は配列番号2として提供される。米国特許出願公開第2012/0064151号明細書に記載のように、pMB75.6を含有する免疫調節物質組成物は、胚内投与した場合に感染性疾患からヒヨコを防御する非抗原特異的な免疫反応を誘発する。この非抗原特異的な免疫反応は、少なくとも1つの生物学的製剤、例えばワクチンなどの投与によってさらに促進された。さらに、pMB75.6プラスミドを含有する免疫調節物質組成物は、アジュバント効果を有し、ワクチンの有効性の向上を誘発することが分かった。同様に、米国特許出願公開第2013/0295167号明細書に記載のように、pMB75.6を含有する免疫調節物質組成物は、感染性疾患から家畜を防御した、家畜における非抗原特異的な免疫反応を誘発した。

10

【先行技術文献】

20

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許出願公開第2012/0064151号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2013/0295167号明細書

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Krieg, Ann. Rev. Immunol. 20: 709-760 (2002)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

しかし、図1で示されるように、pMB75.6プラスミドは、カナマイシン耐性遺伝子(Kan^R)を含有する。抗生物質に基づく選択および産生系は、環境中での細菌への抗生物質耐性遺伝子の水平伝播に関する懸念ゆえに次第に好まれなくなっている。抗生物質耐性遺伝子の潜在的な水平伝播は、対象に直接投与されるベクターに対して特に懸念されている(例えば、遺伝子治療またはDNAワクチン接種のために使用されるpMB75.6またはベクターなどの免疫賦活プラスミド)。したがって、対象において免疫反応を誘発可能であり、また一方で抗生物質耐性遺伝子を欠損している免疫賦活プラスミドが当技術分野で必要とされている。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

本発明は、免疫賦活プラスミドに関する。本免疫賦活プラスミドは、配列番号1、配列番号4の配列またはそれらの組み合わせと少なくとも89%の配列同一性を有する核酸配列を含み得る。いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、配列番号4の配列と少なくとも84%の配列同一性を有する核酸分子を含み得る。いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、配列番号1の配列を含み得る。いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、配列番号4の配列を含み得る。

【0008】

他の態様において、本免疫賦活プラスミドは、配列番号1、配列番号4の配列またはそれらの組み合わせと少なくとも89%の配列同一性を有する核酸配列からなり得る。いく

50

つかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、配列番号4の配列と少なくとも84%の配列同一性を有する核酸分子からなり得る。いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、配列番号1の配列からなり得る。いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、配列番号4の配列からなり得る。

【0009】

いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、好ましくは、全長または機能的選択可能またはスクリーニング可能マーカをコードする核酸配列を含まない。他の態様において、本免疫賦活プラスミドは、抗生物質耐性遺伝子ではない選択可能またはスクリーニング可能マーカをコードする核酸配列を含む。

【0010】

本発明はまた、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドまたはDNA配列の何れかと、医薬的に許容可能な担体と、を含む製剤処方にも関する。

【0011】

本発明はさらに、陽イオン性リポソーム送達ビヒクルと、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドまたはDNA配列の何れかと、を含む免疫調節物質組成物に関する。

【0012】

いくつかの態様において、本発明は、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドまたはDNA配列を使用する方法に関する。適切な使用法は、対象への治療的投与を含む。このような治療投与は、対象または複数の対象の、予防的処置、メタフィラキシス的な (metaphylactic) 処置および感染後処置を含む。

【0013】

本発明は、対象において免疫反応を刺激または誘発する方法に関する。いくつかの態様において、本方法は、本明細書中に記載の免疫調節物質組成物を対象に投与することによって対象において免疫反応を刺激することを含む。いくつかの態様において、本方法は、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドまたはDNA配列を対象に投与することによって対象において免疫反応を刺激することを含む。

【0014】

他の目的および特性は、一部分は明らかであり、一部分は本明細書中で以後指摘する。

【0015】

次の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明のある一定の態様をさらに明らかにするために含まれる。本発明は、本明細書中で与えられる具体的な実施形態の詳細な記載と組み合わせるこれらの図面の1以上を参照することによって、より良好に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、pMB75.6プラスミドのマッピングを示す。

【図2】図2は、pGCMB75.6プラスミドのマッピングを示す。

【図3】図3は、pLacZ75.6プラスミドのマッピングを示す。

【図4A】図4は、本明細書中に記載の免疫調節物質組成物が病原性ウイルスを負荷した受容対象の生存性を向上させることを図示する (図4Aおよび図4B)。

【図4B】図4は、本明細書中に記載の免疫調節物質組成物が病原性ウイルスを負荷した受容対象の生存性を向上させることを図示する (図4Aおよび図4B)。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明によれば、受容対象において免疫反応を誘発可能な組成物ならびに使用方法が発見された。特に、本発明は、新規核酸組成物または免疫調節物質組成物およびその使用に関する。このような免疫調節物質組成物は、GC含量、CpGモチーフが増加し、抗生物質耐性遺伝子またはコード配列を含むことなく増殖させられる、本明細書中に記載のDNA配列を含み得ることを発見した。本発明の核酸配列は、対象において免疫反応を刺激または促進して、感染性疾患を予防または処置するために使用され得、当技術分野で公知の他の予防および処置方法よりも安全性が顕著に向上している。本発明は、ウイルス、細菌

10

20

30

40

50

、カビ、真菌、酵母、寄生虫および当技術分野で公知の他の病原菌などであるが限定されない微生物により引き起こされる感染性疾患の処置および予防において特に有用である。本組成物および本免疫調節物質組成物を使用する方法を下記により詳細に論じる。

【0018】

I．組成物

本明細書中に記載のものなど、本発明において有用な組成物は、一般に、感染性疾患に対する、予防的治療、メタフィラキシス的な (metaphylactic) 治療または処置的治療として使用することができる。このような組成物は、本明細書中で免疫調節物質組成物と呼ぶ。本免疫調節物質組成物は、少なくとも、受容対象において免疫反応を誘発可能な免疫賦活プラスミドまたは免疫賦活DNA配列を含む。いくつかの態様において、本免疫調節物質組成物は、リポソーム送達ビヒクルも含み得る。

10

【0019】

A．核酸

いくつかの態様において、本発明は、感染性疾患を引き起こす病原体の処置または予防に有用な核酸分子に関する。本明細書中に記載の核酸分子は、直鎖状2本鎖または1本鎖DNA、アミノ酸配列、リボ核酸(RNA)またはそれらの組み合わせとして、免疫賦活プラスミドに含まれ得る。いくつかの態様において、本発明は、本免疫賦活プラスミドまたは免疫賦活DNA配列を含有する、核酸分子、ベクターおよび宿主細胞(インビトロ、インビボまたはエクスピボ)に関する。

【0020】

いくつかの態様において、本発明は、抗生物質耐性遺伝子を含まない、免疫賦活プラスミドまたはDNA配列に関する。本プラスミドは、何らかの選択可能またはスクリーニング可能マーカー遺伝子を欠き得る。例えば、本明細書中に記載のpGCMB75.6プラスミドは、全長または機能的選択可能もしくはスクリーニング可能マーカー遺伝子を全く含まない。pGCMB75.6の配列は、配列番号1で提供される。

20

【0021】

いくつかの態様において、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドは、好ましくは、全長または機能的選択可能もしくはスクリーニング可能マーカーをコードする核酸配列を含まない。いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、抗生物質耐性遺伝子を含まない。例えば、本プラスミドは、カナマイシン耐性遺伝子を含まない。いくつかの態様において、本明細書中に記載のプラスミドは、好ましくは免疫原をコードしない。

30

【0022】

いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、抗生物質耐性遺伝子ではない選択可能またはスクリーニング可能マーカー遺伝子をコードする核酸配列を含み得る。例えば、本明細書中に記載のpLacZMB75.6プラスミドは、スクリーニング可能マーカーとしてLacZ遺伝子を含む。pLacZMB75.6のマップは、図3で提供され、pLacZMB75.6のヌクレオチド配列は配列番号4として提供される。図3で示されるように、pLacZMB75.6は、pGCMB75.6と類似するが、LacZスクリーニング可能マーカーを含有する。

【0023】

当然のことながら、pGCMB75.6またはpLacZMB75.6プラスミドのヌクレオチド配列は、それらの免疫賦活特性に顕著な悪影響なくある程度まで変動させ得る。いくつかの態様において、本発明は、pGCMB75.6(配列番号1)の配列と少なくとも89%の配列同一性を有する核酸配列を含む免疫賦活プラスミドに関する。本免疫賦活プラスミドは、好ましくは、pGCMB75.6の配列(配列番号1)と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの態様において、免疫賦活プラスミドは、より好ましくは、pGCMB75.6の配列(配列番号1)を含む。

40

【0024】

50

いくつかの態様において、本発明は、p L a c Z M B 7 5 . 6 の配列（配列番号 4）と少なくとも 8 4 % の配列同一性を有する核酸配列を含む免疫賦活プラスミドに関する。本免疫賦活プラスミドは、好ましくは、p L a c Z M B 7 5 . 6 の配列（配列番号 4）と少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、より好ましくは、p L a c Z M B 7 5 . 6 の配列（配列番号 4）を含む。

【 0 0 2 5 】

10

いくつかの態様において、本発明は、p G C M B 7 5 . 6 の配列（配列番号 1）と少なくとも 8 9 % の配列同一性を有する核酸配列からなる免疫賦活プラスミドに関する。本免疫賦活プラスミドは、好ましくは、p G C M B 7 5 . 6 の配列（配列番号 1）と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列からなる。いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、より好ましくは、p G C M B 7 5 . 6 の配列（配列番号 1）からなる。

【 0 0 2 6 】

20

いくつかの態様において、本発明は、p L a c Z M B 7 5 . 6 の配列（配列番号 4）と少なくとも 8 4 % の配列同一性を有する核酸配列からなる免疫賦活プラスミドに関する。本免疫賦活プラスミドは、好ましくは、p L a c Z M B 7 5 . 6 の配列（配列番号 4）と少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列からなる。いくつかの態様において、本免疫賦活プラスミドは、より好ましくは、p L a c Z M B 7 5 . 6 の配列（配列番号 4）からなる。

【 0 0 2 7 】

30

本発明の別の重要な態様は、配列番号 1 または配列番号 4 に対して高ストリンジェンシー条件下でハイブリッド形成する核酸配列を含む、免疫反応を刺激することが可能な、免疫賦活 DNA 配列または免疫賦活プラスミドを提供する。適切な核酸配列は、本発明の核酸と、相同であるか、実質的に類似しているかまたは同一であるものを含む。いくつかの態様において、相同核酸配列は、配列番号 1 または個々の相補配列に対して少なくとも約 8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列類似性を有する。他の態様において、相同核酸配列は、配列番号 4 または個々の相補配列に対して少なくとも約 8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列類似性を有する。配列類似性は、A l t s c h u l , S . F .

40

ら、J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 1 0 , 1 9 9 0 に記載の B L A S T などの当技術分野で公知のいくつかのアルゴリズムを使用して計算し得る。本核酸は、遺伝コードの縮重ゆえに、上記核酸からの配列と異なり得る。一般に、参照配列は、1 8 ヌクレオチド、より一般的には 3 0 以上のヌクレオチドであり、比較目的のための組成物の核酸配列全体を含み得る。

【 0 0 2 8 】

配列番号 1 または配列番号 4 とハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列が本明細書中で企図される。ストリンジェントなハイブリッド形成条件には、5 0 以上で 0 . 1 X S S C (1 5 m M 塩化ナトリウム / 1 . 5 m M クエン酸ナトリウム) でのハイブリッド形成などの条件が含まれる。別の例は、5 0 % ホルムアミド、5 X S S C (1 5 0 m M N a C l , 1 5 m M クエン酸トリナトリウム)、5 0 m M リン酸ナトリウム (

50

pH 7.6)、5Xデンハート溶液、10%硫酸デキストランおよび20 µg/mL変性せん断サケ精子DNAの溶液中で42℃で一晩温置し、続いて約65℃で0.1X SSC中で洗浄することである。代表的なストリンジェントなハイブリッド形成条件は、上記の具体的な条件と同程度にストリンジェントなものの少なくとも約80%、85%、90%または95%であるハイブリッド形成条件である。他のストリンジェントなハイブリッド形成条件は当技術分野で公知であり、本発明の核酸の相同体を同定するためにも使用され得る(Current Protocols in Molecular Biology, Unit 6, pub. John Wiley & Sons, N.Y. 1989)。

【0029】

突然変異体が本明細書中で記載のように免疫反応刺激能を維持する核酸配列を含む限り、本明細書中に記載のDNA分子の突然変異ヌクレオチドを使用し得る。このような突然変異のDNA配列は、通常、1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸が異なっている。配列の変化は、置換、挿入、欠失またはそれらの組み合わせであり得る。クローニングされた遺伝子の突然変異誘発のための技術は当技術分野で公知である。部位特異的な突然変異誘発のための方法は、Gustinら、Biotechniques 14:22, 1993; Barany, Gene 37:111-23, 1985; Colicelliら、Mol. Gen. Genet. 199:537-9, 1985; および Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press 1989, pp. 15.3-15.108で見出され得、全て、参照により本明細書中に組み込まれる。まとめると、本発明は、対象において免疫反応を刺激することが可能な核酸配列およびそれらの変異体または突然変異体に関する。また、本発明は、記載される核酸配列によりコードされる中間RNAならびに何らかの得られるコードされるアミノ酸配列を包含する。

【0030】

本免疫賦活プラスミドのヌクレオチド配列は配列番号1および4で提供される配列から変動する場合、プラスミド中のCpGジヌクレオチドは、好ましくはインタクトなままである。あるいは、CpGジヌクレオチドが除去されるようにプラスミドのヌクレオチド配列が変更される場合、プラスミド中のCpGジヌクレオチドの総数が同じままであるようにプラスミドの配列を別の位置で変化させ得る。pGCMB75.6またはpLacZMB75.6のヌクレオチド配列に既に存在するものに加えて、さらなるCpGジヌクレオチドもプラスミドに導入し得る。したがって、例えば本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドは、好ましくは、少なくとも約200、少なくとも約220、少なくとも約240、少なくとも約260、少なくとも約270、少なくとも約275、少なくとも約280、少なくとも約283、少なくとも約285または少なくとも約288 CpGジヌクレオチドを含む。例えば、本免疫賦活プラスミドは、283 CpGジヌクレオチドを含み得る。

【0031】

特に、本発明は、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドまたはDNA配列の何れかと、医薬的に許容可能な担体と、を含む製剤処方に関する。

【0032】

B. 免疫調節物質

本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドとの使用に対する適切な免疫調節物質組成物は、米国特許出願公開第2012/0064151号明細書(鳥類)および同第2013/0295167号明細書(ウシ亜科)に記載されており、この両方の内容はそれらの全体において参照により本明細書によって組み込まれる。

【0033】

本免疫調節物質組成物は、リボソーム送達ビヒクルと、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドまたはDNA配列のうち少なくとも1つと、を含む。

【0034】

適切なリボソーム送達ビヒクルは、処置対照の組織に核酸分子を送達可能である脂質組

10

20

30

40

50

成物を含む。リポソーム送達ビヒクルは、好ましくは、核酸分子および/または生物学的製剤を送達するのに十分な時間、対象において安定なまま残留可能である。例えば、本リポソーム送達ビヒクルは、少なくとも約5分間、少なくとも約1時間または少なくとも約24時間、受容対象において安定である。

【0035】

本発明のリポソーム送達ビヒクルは、核酸分子を細胞に送達するために細胞の形質膜と融合可能な脂質組成物を含む。核酸分子が1以上のタンパク質をコードする場合、核酸：リポソーム複合体は、好ましくは、少なくとも約1ピコグラム(pg)の発現タンパク質/ミリグラム(mg)総組織タンパク質/マイクログラム(μg)被送達核酸の遺伝子移入効率を有する。例えば、核酸：リポソーム複合体の遺伝子移入効率は、少なくとも約10pg発現タンパク質/mg総組織タンパク質/μg被送達核酸；または少なくとも約50pg発現タンパク質/mg総組織タンパク質/μg被送達核酸であり得る。複合体の遺伝子移入効率は、1フェムトグラム(fg)発現タンパク質/mg総組織タンパク質/μg被送達核酸程度に低いものであり得、上記量がより好ましい。

10

【0036】

本発明の好ましいリポソーム送達ビヒクルは、直径約100から500ナノメートル(nm)の間である。例えば、本リポソーム送達ビヒクルは、直径約150から450nmまたは約200から400nmの間であり得る。

【0037】

適切なリポソームは、例えば当業者にとって公知の遺伝子送達法で一般的に使用されるものなど、何れかのリポソームを含む。好ましいリポソーム送達ビヒクルは、多重膜小胞(MLV)脂質および押出脂質(extruded lipid)を含む。MLVの調製のための方法は当技術分野で周知である。より好ましいリポソーム送達ビヒクルは、ポリ陽イオン性脂質組成物を有するリポソーム(すなわち陽イオン性リポソーム)および/またはポリエチレングリコールに複合化されたコレステロール骨格を有するリポソームを含む。代表的な陽イオン性リポソーム組成物としては、N-[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(DOTMA)およびコレステロール、N-[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(DOTAP)およびコレステロール、1-[2-(オレイルオキシ)エチル]-2-オレイル-3-(2-ヒドロキシエチル)-イミダゾリニウムクロリド(DOTIM)およびコレステロール、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)およびコレステロールおよびそれらの組み合わせが挙げられるが限定されない。送達ビヒクルとしての使用のための最も好ましいリポソーム組成物としてはDOTIMおよびコレステロールが挙げられる。

20

30

【0038】

適切な核酸分子は、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドの何れかを含む。コード核酸配列は、タンパク質またはペプチドの少なくとも一部をコードし、一方で非コード配列はタンパク質またはペプチドの何れの部分もコードしない。本発明によれば、「非コード」核酸は、プロモーター領域など、転写単位の制御領域を含み得る。「空ベクター」という用語は、「非コード」という用語と交換可能に使用することができ、特に、遺伝子挿入がないプラスミドベクターなど、タンパク質コード部分がない核酸配列を指す。本明細書中に記載のプラスミドによりコードされるタンパク質の発現は非抗原特異的な免疫反応の誘発に必要ではなく；したがって、本プラスミドは、転写調節配列に操作可能に連結されるコード配列を全く含有する必要がない。しかし、本組成物中に免疫原および/またはサイトカインをコードする核酸配列(DNAまたはRNA)を含むことによって、さらなる長所が得られ得る(すなわち、抗原特異的な免疫性および免疫性向上)。免疫原および/またはサイトカインをコードするこのような核酸配列は、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミド中に含まれ得るか、または本組成物中の個々の核酸(例えば個々のプラスミド)中に含まれ得る。

40

【0039】

50

リボソームを本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドと複合化することは、当技術分野で標準であるかまたは内容がその全体において参照により本明細書によって組み込まれる米国特許第6,693,086号明細書に記載の方法を用いて達成し得る。リボソームに添加するためのプラスミドの適切な濃度は、全身性免疫反応が誘発されるように十分な量のプラスミドを対象に送達するのに有効な濃度を含む。例えば、約0.1 μg から約10 μg のプラスミドは約8 nmolリボソームと組み合わせることができ、約0.5 μg から約5 μg のプラスミドは約8 nmolリボソームと組み合わせることができ、または約1.0 μg のプラスミドは約8 nmolリボソームと組み合わせることができる。本組成物中のプラスミドと脂質との比率 (μg プラスミド : nmol 脂質) は、重量で少なくとも約1 : 1 プラスミド : 脂質 (例えば1 μg プラスミド : 1 nmol 脂質) であり得る。例えば、プラスミドと脂質との比率は、少なくとも約1 : 5、少なくとも約1 : 10または少なくとも約1 : 20であり得る。本明細書中で表される比率は、本組成物中の陽イオン性脂質の量に基づき、本組成物中の脂質の総量に基づくものではない。本発明の組成物中のプラスミドと脂質との比率は適切に、重量で約1 : 1 から約1 : 80 プラスミド : 脂質 ; 重量で約1 : 2 から約1 : 40 プラスミド : 脂質 ; 重量で約1 : 3 から約1 : 30 プラスミド : 脂質 ; または重量で約1 : 6 から約1 : 15 プラスミド : 脂質である。

【0040】

C. 生物学的製剤

本明細書中に記載の免疫調節物質組成物の何れも、リボソーム送達ビヒクルおよび本明細書中に記載のプラスミドの少なくとも1つに加えて、少なくとも1つの生物学的製剤をさらに含み得る。

【0041】

適切な生物学的製剤は、鳥類またはウシ亜科疾患を予防または処置するのに有効である物質である。このような生物学的製剤としては、免疫促進物質タンパク質、免疫原、ワクチン、抗菌剤または何らかのそれらの組み合わせが挙げられる。適切な免疫促進物質タンパク質は、免疫を促進することが知られているタンパク質である。非限定例として、タンパク質のファミリーを含むサイトカインが、既知の免疫促進タンパク質ファミリーである。適切な免疫原は、対象への免疫原の投与が対象の組織内で遭遇する同じまたは類似のタンパク質に対する免疫原特異的な免疫反応を高めるように液性および/または細胞性免疫反応を誘発するタンパク質である。免疫原は、細菌、ウイルス、寄生虫または真菌により発現される病原性抗原を含み得る。好ましい抗原としては、対象において感染性疾患を引き起こす生物由来の抗原が挙げられる。本発明によれば、免疫原は、液性および/または細胞性免疫反応を誘発する、天然のまたは合成由来のタンパク質の何れかの部分であり得る。このように、抗原または免疫原のサイズは、約5から12アミノ酸と小さく、全長タンパク質程度に大きいものであり得、その間のあらゆるサイズを含み得る。抗原は、マルチマータンパク質または融合タンパク質であり得る。抗原は精製抗原であり得る。あるいは、本免疫促進物質タンパク質または免疫原は、本免疫賦活プラスミドによるかまたは免疫調節物質組成物中に含まれる別の核酸によりコードされ得る。免疫促進物質タンパク質または免疫原が本免疫調節物質組成物中の核酸分子によりコードされる場合、免疫促進物質タンパク質または免疫原をコードする核酸配列は、免疫原が対象の組織において発現され、それによって、非特異的な免疫反応に加えて、対象において免疫原特異的な免疫反応を誘発するように、転写調節配列に操作可能に連結される。病原体抗原免疫原性またはサイトカイン活性など、免疫原性についてスクリーニングするための技術は、当業者にとって公知であり、様々なインビトロおよびインビボアッセイを含む。

【0042】

生物学的製剤がワクチンである場合、ワクチンとしては、生、感染性、ウイルス性、細菌性または寄生虫性ワクチンまたは死滅不活性化、ウイルス性、細菌性または寄生虫性ワクチンが挙げられ得る。1以上のワクチン、生または死滅ウイルスワクチンは、本発明の免疫調節物質組成物と組み合わせて使用し得る。適切なワクチンには、鳥類またはウシ亜科に対して当技術分野で公知であるものが含まれる。

【 0 0 4 3 】

鳥類にとって代表的なワクチンとしては、マレック病ウイルス (MDV)、ニューキャッスル病ウイルス (NDV)、鶏貧血ウイルス (CAV)、伝染性ファブリキウス嚢疾患ウイルス (IBDV)、伝染性気管支炎ウイルス (IBV)、七面鳥ヘルペスウイルス (HVT)、伝染性喉頭気管炎ウイルス (ILT)、鶏脳脊髄炎ウイルス (AEV)、鶏痘ウイルス (FPV)、家禽コレラ、鳥インフルエンザウイルス (AIV)、レオウイルス、鳥白血病ウイルス (ALV)、細網内皮症ウイルス (REV)、鳥アデノウイルスおよび出血性腸炎ウイルス (HEV)、コクジウムおよび当技術分野で公知の他の疾患に対する予防のために当技術分野で使用されるものが挙げられるが限定されない。別の例において、ワクチンは、米国特許第 5,427,791 号明細書、同第 6,048,535 号明細書および同第 6,406,702 号明細書により記載されるようなワクチンであり得る。例えば、マレック病に対する予防のためのワクチンは、本発明の免疫調節物質組成物と組み合わせて使用され得る。

10

【 0 0 4 4 】

ウシ亜科に対する代表的なワクチンとしては、ウシ伝染性鼻気管炎 (IBR) (1 型ウシヘルペスウイルス (BHV1))、3 型パラインフルエンザウイルス (PI3)、ウシ呼吸器合胞体ウイルス (BRSV)、ウシウイルス性下痢ウイルス (1 および 2 型 BVDV)、ヒストフィルス・ソムニ (*Histophilus somni*)、マイコプラズマ・ボビス (*Mycoplasma bovis*) および当技術分野で公知の他の疾患に対する予防のために当技術分野で使用されるものが挙げられるが限定されない。例えば、本発明の免疫調節物質組成物と組み合わせてマンヘイミア・ヘモリチカ (*Mannheimia haemolytica*) に対する防御のためのワクチンを使用し得る。

20

【 0 0 4 5 】

生物学的製剤は抗菌剤であり得る。適切な抗菌剤としては、キノロン、好ましくはフルオロキノロン、 β -ラクタムおよびマクロライド-リンコサミド-ストレプトグラミン (MLS) 抗生物質が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

適切なキノロンとしては、ベノフロキサシン、ピンフロキサシン、シノキサシン、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、ダノフロキサシン、ジフロキサシン、エノキサシン、エンロフロキサシン、フレロキサシン、ゲミフロキサシン、イバフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、マルボフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オルビフロキサシン、パズフロキサシン、プラドフロキサシン、ベルフロキサシン、サラフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシンおよびトスフロキサシンが挙げられる。好ましいフルオロキノロンとしては、シプロフロキサシン、ダノフロキサシン、エンロフロキサシン、モキシフロキサシンおよびプラドフロキサシンが挙げられる。適切なナフチリドンとしてはナリジクス酸が挙げられる。

30

【 0 0 4 7 】

適切な β -ラクタムとしては、ペニシリン系 (例えば、アモキシシリン、アンピシリン、アズロシリン、ベンザチンペニシリン、ベンジルペニシリン、カルペニシリン、クロキサシリン、コ-アモキシクラブ [すなわちアモキシシリン/クラブラン酸]、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、メチシリン、メズロシリン、ナフシリン、オキサシリン、フェノキシメチルペニシリン、ピペラシリン、プロカインペニシリン、テモシリンおよびチカルシリン)；セファロスポリン系 (例えば、セファクロル、セファロニウム、セファマンドール、セファプリリン (*cefapirin*)、セファゾリン、セフェピム、セフィキシム、セフォタキシム、セフォキシチン、セフピロム、セフボドキシム、セフキノム、セフトラジウム、セフトリオキサソン、セフロキシム、セファレキシン、セファロチンおよびデフォテタン (*defotetan*))；カルバペネムおよびペネム系 (例えば、ドリペネム、エルタペネム、ファロペネム、イミペネムおよびメロペネム)；モノバクタム (例えば、アズトレオナム、ノカルジシン A、タブトキシニン- β -ラクタムおよびチゲモナム)；および β -ラクタマーゼ阻害剤 (例えばクラブラン酸、スルバ

40

50

クタムおよびタゾバクタム)が挙げられる。好ましい - ラクタムとしては、セファロスポリン、特にセファゾリンが挙げられる。

【0048】

適切なMLS抗生物質としては、クリンダマイシン、リンコマイシン、ピルリマイシンおよび何らかのマクロライド系抗生物質が挙げられる。好ましいリンコサミド抗生物質はピルリマイシンである。

【0049】

他の抗菌剤としては、アミノグリコシド、クロピドール、ジメトリダゾール、エリスロマイシン、フラマイセチン、フラゾリドン、ハロフジノン、2 - ピリドン、ロベニジン、スルホンアミド、テトラサイクリン、トリメトプリム、様々なプレウロムチリン(例えばチアムリンおよびバルネムリン)および様々なストレプトマイシン(例えば、モネンシン、ナラシンおよびサリノマイシン)が挙げられる。

【0050】

II. 方法

本発明の目的は、非感染対象に対する防御免疫、感染対象に対する防御免疫、非感染対象に対する免疫向上、感染対象に対する免疫向上、感染対象に対する治療的免疫またはそれらの組み合わせを誘発する、免疫調節物質組成物、免疫賦活プラスミド(またはDNA配列)および方法を提供することである。このように、本発明の組成物は、対象において予防的に免疫付与するために使用され得るか、または対象を処置するために使用され得る。本明細書中に記載の方法には、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドまたはDNA配列を対象に投与することが含まれる。

【0051】

A. 免疫刺激の方法

本発明は、受容対象において免疫反応を誘発する方法に関する。本方法は、免疫反応を誘発するために有効量の免疫調節物質組成物を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、免疫調節物質組成物は、単独で有効である非抗原特異的な免疫反応を誘発する。いくつかの態様において、本免疫調節物質組成物は、ワクチンなどの少なくとも1つの生物学的製剤の作用を、このようなワクチンの前に投与された場合に、ワクチンと同時に投与された場合に、ワクチン接種後に投与された場合に、またはワクチンと混合して投与された場合に、促進する。いくつかの態様において、本方法は、感染性疾患から受容対象を防御し、感染性疾患を有する集団を処置するための新しい処置ストラテジーを提供する。いくつかの態様において、本方法は、ワクチンと組み合わせて本免疫調節物質を使用する場合に、本免疫調節物質組成物なしでワクチンを使用する場合と比較して、疾患に対する、より迅速で、より長く、より良好な防御を提供する。

【0052】

本明細書中に記載のリポソーム送達ビヒクルの何れかと、本明細書中に記載の免疫賦活プラスミド(DNA配列用)の何れかと、本明細書中に記載の生物学的製剤の何れかと、を含む、有効量の免疫調節物質組成物を投与することによって、受容対象において免疫反応を誘発することができる。生物学的製剤を本免疫調節物質と混合し得るか、またはこれと同時に投与し得るか、または独立に投与し得ることが企図される。独立投与は、本免疫調節物質の投与の前または後であり得る。免疫促進を拡大するために本免疫調節物質または生物学的製剤の複数回投与が使用され得ることも企図される。さらに、複数の生物学的製剤を本免疫調節物質とともに同時投与するか、本免疫調節物質の前に投与するか、本免疫調節物質の投与後に投与するか、または本免疫調節物質と同時に投与し得る。

【0053】

有効量の本明細書中に記載の免疫調節物質組成物の何れかを対象に投与し得る。有効量は、受容対象において免疫反応を誘発するのに十分である。このような有効量は、受容対象において免疫反応を引き起こす何れかの量である。免疫反応を測定する方法は当技術分野で周知である。また熟練者は、有効量が年齢、体重、感染のステージならびに当技術分野で公知の他の要因に依存することも認識しよう。適切な有効量は、約0.1 μgから1

、 $0.00 \mu\text{g}$ / 対象の範囲であり得る。いくつかの態様において、有効量は、約 $0.1 \mu\text{g}$ から約 $10 \mu\text{g}$ 、約 $0.1 \mu\text{g}$ から約 $5 \mu\text{g}$ 、約 $0.5 \mu\text{g}$ から約 $5 \mu\text{g}$ 、約 $0.25 \mu\text{g}$ から約 $5 \mu\text{g}$ 、約 $0.05 \mu\text{g}$ から約 $10 \mu\text{g}$ 、約 $5 \mu\text{g}$ から約 $15 \mu\text{g}$ 、約 $10 \mu\text{g}$ から約 $15 \mu\text{g}$ 、約 $10 \mu\text{g}$ から約 $20 \mu\text{g}$ 、約 $20 \mu\text{g}$ から約 $30 \mu\text{g}$ 、約 $30 \mu\text{g}$ から約 $40 \mu\text{g}$ 、約 $40 \mu\text{g}$ から約 $50 \mu\text{g}$ 、約 $50 \mu\text{g}$ から約 $70 \mu\text{g}$ 、約 $70 \mu\text{g}$ から約 $90 \mu\text{g}$ 、約 $50 \mu\text{g}$ から約 $100 \mu\text{g}$ 、約 $100 \mu\text{g}$ から約 $150 \mu\text{g}$ 、約 $150 \mu\text{g}$ から約 $200 \mu\text{g}$ 、約 $200 \mu\text{g}$ から約 $250 \mu\text{g}$ 、約 $250 \mu\text{g}$ から約 $300 \mu\text{g}$ 、約 $300 \mu\text{g}$ から約 $350 \mu\text{g}$ 、約 $350 \mu\text{g}$ から約 $400 \mu\text{g}$ 、約 $400 \mu\text{g}$ から約 $450 \mu\text{g}$ 、約 $450 \mu\text{g}$ から約 $500 \mu\text{g}$ 、約 $500 \mu\text{g}$ から約 $550 \mu\text{g}$ 、約 $550 \mu\text{g}$ から約 $600 \mu\text{g}$ 、約 $600 \mu\text{g}$ から約 $650 \mu\text{g}$ 、約 $650 \mu\text{g}$ から約 $700 \mu\text{g}$ 、約 $700 \mu\text{g}$ から約 $750 \mu\text{g}$ 、約 $750 \mu\text{g}$ から約 $800 \mu\text{g}$ 、約 $800 \mu\text{g}$ から約 $850 \mu\text{g}$ 、約 $850 \mu\text{g}$ から約 $900 \mu\text{g}$ 、約 $900 \mu\text{g}$ から約 $950 \mu\text{g}$ 、約 $950 \mu\text{g}$ から約 $1000 \mu\text{g}$ の範囲であり得る。好ましくは、いくつかの態様において、有効量は、約 $0.5 \mu\text{g}$ から約 $10 \mu\text{g}$ の範囲である。また、好ましくは、他の態様において、有効量は、約 $50 \mu\text{g}$ から約 $100 \mu\text{g}$ の範囲である。好ましくは、他の態様において、有効量は、約 $40 \mu\text{g}$ から約 $70 \mu\text{g}$ の範囲である。

【0054】

いくつかの態様において、有効量の本明細書中に記載の免疫調節物質組成物の何れかを鳥類のメンバーに投与することによって、鳥類のメンバーにおいて免疫反応を誘発することができる。有効量は、鳥類のメンバーにおいて免疫反応を誘発するのに十分である。例えば、鳥類に対する本免疫調節物質の有効量は、約 $0.05 \mu\text{g}$ から約 $10 \mu\text{g}$ 、約 $0.1 \mu\text{g}$ から約 $5 \mu\text{g}$ 、約 $0.5 \mu\text{g}$ から約 $1.5 \mu\text{g}$ または約 $1.0 \mu\text{g}$ から約 $10 \mu\text{g}$ であり得る。例として、鳥類である対象に対する適切な有効量は、約 $0.1 \mu\text{g}$ 、 $0.2 \mu\text{g}$ 、 $0.3 \mu\text{g}$ 、 $0.4 \mu\text{g}$ 、 $0.5 \mu\text{g}$ 、 $0.6 \mu\text{g}$ 、 $0.7 \mu\text{g}$ 、 $0.8 \mu\text{g}$ 、 $0.9 \mu\text{g}$ 、 $1.0 \mu\text{g}$ 、 $1.2 \mu\text{g}$ 、 $1.4 \mu\text{g}$ 、 $1.6 \mu\text{g}$ 、 $1.8 \mu\text{g}$ 、 $2.0 \mu\text{g}$ 、 $2.5 \mu\text{g}$ 、 $3.0 \mu\text{g}$ 、 $3.5 \mu\text{g}$ 、 $4.0 \mu\text{g}$ 、 $4.5 \mu\text{g}$ 、 $5.0 \mu\text{g}$ 、 $5.5 \mu\text{g}$ 、 $6.0 \mu\text{g}$ 、 $6.5 \mu\text{g}$ 、 $7.0 \mu\text{g}$ 、 $7.5 \mu\text{g}$ 、 $8.0 \mu\text{g}$ 、 $8.5 \mu\text{g}$ 、 $9.0 \mu\text{g}$ 、 $9.5 \mu\text{g}$ 、 $10.0 \mu\text{g}$ 、 $9.5 \mu\text{g}$ 、 $10.0 \mu\text{g}$ 、 $10.5 \mu\text{g}$ 、 $11.0 \mu\text{g}$ 、 $12 \mu\text{g}$ 、 $13 \mu\text{g}$ 、 $14 \mu\text{g}$ または $15 \mu\text{g}$ であり得る。

【0055】

いくつかの態様において、有効量の本明細書中に記載の免疫調節物質組成物の何れかをウシ亜科のメンバーに投与することによって、ウシ亜科のメンバーにおいて免疫反応を誘発することができる。有効量は、ウシ亜科のメンバーにおいて免疫反応を誘発するのに十分である。例えば、ウシ亜科に対する本免疫調節物質の有効量は、約 $1 \mu\text{g}$ から約 $1000 \mu\text{g}$ / 動物、約 $5 \mu\text{g}$ から約 $500 \mu\text{g}$ / 動物、約 $10 \mu\text{g}$ から約 $100 \mu\text{g}$ / 動物、約 $10 \mu\text{g}$ から約 $50 \mu\text{g}$ / 動物または約 $40 \mu\text{g}$ から約 $60 \mu\text{g}$ / 動物であり得る。例として、ウシ亜科である対象に対する適切な有効量は、約 $30 \mu\text{g}$ 、 $35 \mu\text{g}$ 、 $40 \mu\text{g}$ 、 $45 \mu\text{g}$ 、 $50 \mu\text{g}$ 、 $55 \mu\text{g}$ 、 $60 \mu\text{g}$ 、 $65 \mu\text{g}$ 、 $70 \mu\text{g}$ 、 $75 \mu\text{g}$ 、 $80 \mu\text{g}$ 、 $85 \mu\text{g}$ 、 $90 \mu\text{g}$ 、 $95 \mu\text{g}$ 、 $100 \mu\text{g}$ 、 $110 \mu\text{g}$ 、 $120 \mu\text{g}$ 、 $130 \mu\text{g}$ 、 $140 \mu\text{g}$ 、 $150 \mu\text{g}$ 、 $160 \mu\text{g}$ 、 $170 \mu\text{g}$ 、 $180 \mu\text{g}$ 、 $190 \mu\text{g}$ 、 $200 \mu\text{g}$ または $500 \mu\text{g}$ 以下または $1000 \mu\text{g}$ 以下であり得る。

【0056】

B. 使用のための条件

本発明の方法は、対象が、免疫反応の誘発に適している疾患から防御されるように、対象において免疫反応を誘発する。本明細書中で使用される場合、「疾患から防御される」という句は、疾患の症状を軽減すること；疾患の発症率を低下させること；疾患の臨床または病理的な重症度を低下させること；または疾患を引き起こす病原体の脱粒 (shedding) を減少させることを指す。対象を防御することは、本発明の治療用組成物が、対象に投与された場合に、疾患の発症を予防する、疾患症状、臨床徴候、病態または原因を治癒させる、および / または改善するかまたは軽減する能力を指し得る。例えば、非限

定で、ウシ呼吸器疾患（BRD）の臨床徴候としては、肺損傷、体温上昇、抑うつ（例えば食欲不振、外的刺激に対する反応性低下、垂れ耳）、鼻汁および呼吸特性（例えば呼吸数、呼吸努力）が挙げられる。本明細書中に記載の免疫調節物質組成物は、BRDの上記臨床徴候を予防するかまたはその重症度を低下させるために、BRDに曝露されている疑いがあるウシに投与し得る。さらなる例として、非限定で、鳥類対象におけるマレック病の臨床徴候としては、孵化率および鳥類生存率の低下が挙げられる。本明細書中に記載の免疫調節物質組成物は、マレック病の上記の臨床徴候を予防するかまたはその重症度を低下させるためにマレック病ウイルスに曝露されている疑いがある鳥類対象に投与し得る。

【0057】

このようにして、疾患から対象を防御することは、疾患発症を予防すること（予防的処置）および疾患を有する対象を処置（治療的処置）することの両方を包含する。特に、対象を疾患から防御することは、一部の例において、さらに、過度なまたは有害な免疫反応をさらに抑制し、軽減し、阻害するかまたは阻止し得る、有益または防御的な免疫反応を誘導することによって、対象において免疫反応を誘発することにより完遂される。「疾患」という用語は、対象の正常な健康からの何らかの逸脱を指し、疾患症状が存在する場合の状態ならびに逸脱（例えば、感染、遺伝子突然変異、遺伝子欠陥など）が起こっているが症状がまだ発現していない状態を含む。

【0058】

本発明の方法は、疾患の予防、疾患に対するエフェクター細胞免疫の刺激、疾患の排除、疾患の緩和および原発疾患の発症の結果起こる二次疾患の予防のために使用し得る。

【0059】

いくつかの態様において、本明細書中に記載の方法は、ワクチンと同時に投与される場合に、ワクチン単独の投与に対して、対象の獲得免疫反応を向上させるために使用し得る。一般に、一旦投与されたワクチンは、獲得免疫を刺激するために時間がかかるので、対象をすぐには防御しない。「向上させる」という用語は、本発明において、ワクチンが対象を防御し始め、および/またはワクチンにより与えられる獲得免疫を介して防御期間を延長させるまで、対象において自然免疫反応を誘発することを指す。

【0060】

いくつかの態様において、本発明の方法は、多岐にわたる病原体の感染に対して防御するために本組成物を投与することを含む。投与される組成物は、特異的な反応を誘発するための特異的な抗原を含んでもよいし、または含まなくてもよい。本発明の方法は、ウイルス、細菌、真菌および寄生虫を含むが限定されない感染性微生物病原体により生じる疾患から受容対象を防御するであろうことが企図される。熟練者にとって当然のことながら、本明細書中に記載のような免疫調節物質組成物は、列挙するには多すぎる多くの感染性病原体に対して有効である。本明細書中で提供される感染性病原体は、代表的な目的のために提供され、使用の範囲の限定なく提供される。

【0061】

鳥類での代表的なウイルス感染性疾患としては、鶏伝染性貧血ウイルス（CIAV）、マレック病ウイルス（MDV）、鶏ヘルペスウイルス（HCV）、七面鳥ヘルペスウイルス（HTV）、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）、ニューキャッスル病ウイルス（NDV）、伝染性気管支炎ウイルス（IBV）、伝染性喉頭気管炎ウイルス（ILT V）、3型パラミクソウイルス、鶏脳脊髄炎（AEV）、鶏痘ウイルス（FPV）、家禽コレラ、鳥インフルエンザウイルス（AIV）、レオウイルス、鳥白血病ウイルス（ALV）、細網内皮症ウイルス（REV）、鳥アデノウイルス、出血性腸炎ウイルス（HEV）、肺炎ウイルス、鳩ボックスウイルス、それらの組み換え体および当技術分野で公知の他のウイルスでの感染により生じるものが挙げられるが限定されない。

【0062】

鳥類で感染性がある代表的な細菌としては、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌または真菌、例えばボルデテラ属（*Bordetella* spp.）、カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、クロストリジウム・ボツリヌム

10

20

30

40

50

(*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・コリヌム(*Clostridium colinum*)、クロストリジウム・パーフリンジェンス(*Clostridium perfringens*)、エリシペロスリクス・インシディオサ(*Erysipelothrix insidiosa*)、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)、ヘモフィルス・ガリナルム(*Hemophilus gallinarum*)、マイコプラズマ・ガリセプチカム(*Mycoplasma gallisepticum*)、マイコプラズマ・メレアグリディス(*Mycoplasma meleagridis*)、マイコプラズマ・シノビエ(*Mycoplasma synoviae*)、パスツレラ・マルトシダ(*Pasteurella multocida*)、リエメラ・アナティペステイファー(*Riemerella anatipestifer*)、サルモネラ属(*Salmonella* spp.)、サルモネラ・エンテリティディス(*Salmonella enteritidis*)、サルモネラ・ガリナルム(*Salmonella gallinarum*)、サルモネラ・プロルム(*Salmonella pullorum*)および当技術分野で公知の他の細菌などでの感染により生じるものが挙げられるが限定されない。

10

【0063】

鳥類での代表的な真菌またはカビ感染としては、アスペルギルス・フラバス(*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・フミガーツス(*Aspergillus fumigatus*)、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)および当技術分野で公知の他の感染性真菌またはカビでの感染により生じるものが挙げられるが限定されない。代表的な疾患状態としては、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌または真菌からの毒素、例えばクロストリジウム・ボツリヌム(*Clostridium botulinum*)毒素、クロストリジウム・パーフリンジェンス(*Clostridium perfringens*)毒素、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)エンテロトキシン、フサリウム(*Fusarium*)マイコトキシン、パスツレラ(*Pasteurella*)ロイコトキシン、スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)毒素および当技術分野で公知の他の毒素などから生じるものが挙げられるが限定されない。

20

【0064】

鳥類における代表的な寄生虫としては、アスカリディア・ガリ(*Ascaridia galli*)、カピラリア・アニユレータ(*Capillaria annulata*)、カピラリア・コントルタ(*Capillaria contorta*)、カピラリア・オブシグナータ(*Capillaria obsignata*)、コクシジア属(*coccidia* spp.)、エイメリア・メレアグリディス(*Eimeria meleagridis*)、ヘテラキス・ガリネ(*Heterakis gallinae*)、シンガムス・トラケ(*Syngamus trachea*)および当技術分野で公知の他の寄生虫が挙げられるが限定されない。

30

【0065】

ウシ亜科における代表的なウイルス感染性疾患としては、ブルータングウイルス、ウシアデノウイルス、ウシカリシウイルス、ウシコロナウイルス(BCV)、ウシエンテロウイルス、ウシ1型ヘルペスウイルス(BHV1)、ウシ4型ヘルペスウイルス(BHV4)、ウシ白血病ウイルス、ウシパルボウイルス、ウシレオウイルス、ウシ呼吸器合胞体ウイルス(BRSV)、ウシライノウイルス、ウシ1型ウイルス性下痢ウイルス(BVDV1)、ウシ2型ウイルス性下痢ウイルス(BVDV2)、ウシ伝染性鼻気管炎(IBR)、悪性カタル熱ウイルス、3型パラインフルエンザウイルス(PIV3)、狂犬病ウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、それらの組み換え体および当技術分野で公知の他のウイルスでの感染により生じるものが挙げられるが限定されない。

40

【0066】

ウシ亜科の代表的な細菌感染としては、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌またはマイコバクテリア、例えばアルカノバクテリウム・ピオゲネス(*Arcanobacteriu*

50

m pyogenes)、バチルス・アンスラシス(Bacillus anthracis)、バチルス・アンスラクス(Bacillus anthrax)、ブルセラ・アボルツス(Brucella abortus)、カンピロバクター・フェツス(Campylobacter fetus)、カンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter jejuni)、クロストリジウム・ボツリヌム(Clostridium botulinum)、クロストリジウム・ショウベイ(Clostridium chauveoi)、クロストリジウム・コリヌム(Clostridium colinum)、クロストリジウム・ヘモリチウム(Clostridium hemolyticum)、クロストリジウム・ノビイ(Clostridium novyi)、クロストリジウム・パーフリンジェンス(Clostridium perfringens)、クロストリジウム・セプチウム(Clostridium septicum)、クロストリジウム・テタニ(Clostridium tetani)、コリネバクテリウム(Corynebacterium)、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)、フソバクテリウム・ネクロホラム(Fusobacterium necrophorum)、フソバクテリウム属(Fusobacterium spp.)、ヒストフィルス・ソムニ(Histophilus somni)、ヒストフィルス属(Histophilus spp.)、レプトスピラ属(Leptospira spp.)、マンヘイミア・ヘモリチカ(Mannheimia haemolytica)、モラキセラ属(Moraxella spp.)、ムエレリウス属(Muellerius spp.)、マイコバクテリウム・パラツベキュロシス(Mycobacterium paratuberculosis)、マイコバクテリウム属(Mycobacterium spp.)、マイコプラズマ・ボビリニス(Mycoplasma bovirhinis)、マイコプラズマ・ボビス(Mycoplasma bovis)、マイコプラズマ・ディスパー(Mycoplasma dispar)、マイコプラズマ属(Mycoplasma spp.)、パストレラ・マルトシダ(Pasteurella multocida)、サルモネラ属(Salmonella spp.)、トレポネーマ属(Treponema spp.)、ウレアプラズマ・ディベルスム(Ureaplasma diversum)および当技術分野で公知の他の細菌などでの感染により生じるものが挙げられるが限定されない。

【0067】

ウシ亜科での代表的な真菌またはカビ感染としては、アクチノバクテリウム属、アスペルギルス属(Aspergillus spp.)およびヒストモナス属(Histomonas spp.)および当技術分野で公知の他の感染性真菌またはカビでの感染により生じるものが挙げられるが限定されない。

【0068】

ウシ亜科での代表的な寄生虫としては、アナプラズマ属(Anaplasma spp.)、アナプラズマ・マルギナレ(Anaplasma marginale)、バベシア属(Babesia spp.)、コリオプテス属(Chorioptes spp.)、クーペリア(Cooperia)、シスチセルクス属(Cysticercus spp.)、ダマリニア・ボビス(Damalinia bovis)、デルマトフィルス属(Dermatophilus spp.)、ジクチロカウルス属(Dictylocaulus spp.)、エイメリア属(Eimeria spp.)、エペリスロゾン属(Eperythrozoon spp.)、ファスシオロイデス属(Fascioloides spp.)、ヘモンクス属(Haemonchus spp.)、メロファグス属(Melophagus spp.)、ムエレリウス属(Muellerius spp.)、ネマトディルス属(Nematodirus spp.)、ネオスポラ属(Neospora spp.)、エストルス属(Oestrus spp.)、オステルタギア属(Ostertagia spp.)、ソロプテス属(Psoroptes spp.)、サルコプテス属(Sarcoptes spp.)、セルペンス属(Serpens spp.)、ストロンギロイデス属(Strongyloides spp.)

.)、トキソプラズマ属 (*Toxoplasma* spp.)、トリコフィトン属 (*Trichophyton* spp.)、トリコストロンギルス (*Trichostongylus*)、トリクリス属 (*Trichuris* spp.) およびトリトリコモナス属 (*Trityrichomonas* spp.) および当技術分野で公知の他の寄生虫が挙げられるが限定されない。

【0069】

ウシ亜科での代表的な感染性疾患病原体としてはまた、乳房炎、子宮炎、クリプトスポリジウム症およびウシ亜科が感染し易い何らかの他の感染性疾患を引き起こす病原体も挙げられる。

【0070】

C. 投与

様々な投与経路を利用可能である。選択される特定の方式は、当然ではあるが、選択される特定の生物学的製剤、対象の年齢および総体的健康状態、処置されている特定の状態および治療の有効性のために必要とされる投与量に依存する。本発明の方法は、臨床的に許容できない悪影響を引き起こすことなく免疫反応の有効レベルを生じさせる何れかの投与方式を用いて実施され得る。本組成物は都合よく、単位剤形で与えられ得、当技術分野で周知の方法の何れかにより調製され得る。

【0071】

免疫調節物質組成物は、静脈内に、筋肉内に、皮内に、腹腔内に、皮下に、噴霧により、羽嚢法により胚内に、経口で、眼内に、気管内に、鼻腔内に、または当技術分野で公知の他の方法により投与され得る。ある態様において、本免疫調節物質は、皮下投与される。別の態様において、本免疫調節物質は、筋肉内投与され得る。別の態様において、本免疫調節物質は噴霧として投与される。別の態様において、本免疫調節物質は、経口投与され得る。

【0072】

ある点において、本免疫調節物質は、負荷（または感染）前に対象に単独で投与され得る。別の態様において、本免疫調節物質は、負荷（または感染）後に対象に単独で投与され得る。別の態様において、本免疫調節物質は、負荷（または感染）と同時に対象に単独で投与され得る。

【0073】

いくつかの態様において、本免疫調節物質組成物は、負荷前にワクチン接種と同時に同時投与され得る。いくつかの態様において、本免疫調節物質組成物は、負荷（または感染）と同時にワクチン接種と同時に同時投与され得る。いくつかの態様において、同時投与は、対象の同じ身体部位に、互いに隣り合う2つの異なる箇所（すなわち対象の頸部の互いに隣り合う注射）、同じ身体部位の対象の反対側に（すなわち頸部の各側に1箇所）または同じ対象の異なる部位に、ワクチンおよび免疫調節物質を投与することを含み得る。いくつかの態様において、本免疫調節物質組成物は、ワクチン接種および負荷前に投与され得る。いくつかの態様において、本免疫調節物質組成物は、ワクチン接種後であるが負荷前に投与され得る。本免疫調節物質組成物は、負荷（または感染）前にワクチン接種された対象への負荷後に投与され得る。

【0074】

熟練者は、投与経路が、対象およびその健康または状態に依存して変動し得ることを認識するであろう。鳥類およびウシ亜科に対して提供される投与経路は、代表的な目的に対するものであり、限定なく提供される。

【0075】

鳥類のワクチン接種は、あらゆる齢で行われ得る。ワクチン接種は、生きている微生物の場合は18日齢胚（胚内）以上および不活性微生物または他のタイプのワクチンの場合には3週齢以上に投与し得る。胚内ワクチン接種の場合、ワクチン接種は、発生最後の四半期に行われ得る。ワクチンは、皮下に、羽嚢法によって、噴霧によって、経口で、眼内に、気管内に、鼻腔内に、胚内に、または当技術分野で公知の他の方法によって、投与し

10

20

30

40

50

得る。経口ワクチンは、飲用水中で投与し得る。さらに、定期的なワクチン接種計画に基づいて本発明の方法を使用し得ることが企図される。

【0076】

本免疫調節物質組成物はまた、皮下に、羽嚢法によって、噴霧によって、眼内に、気管内に、鼻腔内に、胚内に、または当技術分野で公知の他の方法によって、鳥類にも投与し得る。例えば、本免疫調節物質組成物は、胚内で投与し得る。あるいは、本免疫調節物質組成物は、噴霧として投与し得る。

【0077】

本免疫調節物質組成物は、鳥類胚にその発生の最後の四半期に胚内投与し得る。例えば、本免疫調節物質組成物は、18日齢または19日齢胚に胚内投与し得る。卵への投与は、負荷（または感染）前または負荷後であり得る。

10

【0078】

本免疫調節物質は、負荷の約1から約14日前にまたは負荷の約1から約14日後に鳥類またはウシ亜科の動物に投与し得る。例えば、本免疫調節物質は、負荷の約1から約7日前にまたは負荷の約1から約7日後に投与し得る。本免疫調節物質は、負荷の1、2、3、4、5、6、7日前または負荷の1、2、3、4、5、6、7日後に適切に投与する。

【0079】

ウシ亜科のワクチン接種は、あらゆる齢で行われ得る。ワクチンは、静脈内に、筋肉内に、皮内に、腹腔内に、皮下に、噴霧により、経口で、眼内に、気管内に、鼻腔内に、または当技術分野で公知の他の方法により投与し得る。さらに、定期的なワクチン接種計画に基づいて本明細書中に記載の方法を使用し得ることが企図される。

20

【0080】

他の送達系は、徐放、遅延放出または持続放出送達系を含み得る。このような系は、本組成物の反復投与を回避し得、したがって利便性が高くなる。多くのタイプの放出送達系が利用可能であり、当業者にとって公知である。これらは、ポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸およびポリ酸無水物などのポリマーに基づく系を含む。薬物を含有する前述のポリマーのマイクロカプセルは、例えば米国特許第5,075,109号明細書に記載される。

30

【0081】

送達系はまた、コレステロール、コレステロールエステルおよび脂肪酸などのステロールまたはモノ、ジおよびトリグリセリドなどの中性脂肪を含む脂質である非ポリマー系；ヒドロゲル放出系；サイラスチック系；ペプチドに基づく系；ワックスコーティング；従来の結合剤および賦形剤を用いた圧縮錠剤；部分融合埋め込み物（*partially fused implant*）なども含む。具体例としては、米国特許第4,452,775号明細書、同第4,675,189号明細書および同第5,736,152号明細書に記載のものなどの、マトリクス内の形態で本発明の物質が含有される浸食系および米国特許第3,854,480号明細書、同第5,133,974号明細書および同第5,407,686号明細書に記載のものなどの、ポリマーから制御速度で活性成分が浸透する拡散系が挙げられるが限定されない。さらに、ポンプに基づくハードウェア送達系を使用することができ、これらの一部は埋め込みに適応する。

40

【0082】

本発明の範囲から逸脱することなく、上記組成物、生成物および方法において、様々な変更がなされ得るので、以上の記載および以下で与えられる実施例に含有されるものは全て、例示として、意味を限定するものではなく解釈されるものとする。

【0083】

定義

「有効量」という用語は、所望の生物学的効果を実現するのに必要であるかまたは十分である量を指す。例えば、感染性疾患を処置または予防するための免疫調節物質の有効量

50

は、病原菌に曝露された際に免疫反応の発現を引き起こす、したがって対象内の病原菌の量の減少および好ましくは病原菌の根絶を引き起こすのに必要な量である。何らかの特定の適用のための有効量は、処置されている疾患もしくは状態、対象の体格または疾患もしくは状態の重症度といった要因に依存して変動し得る。当業者は、過度の実験を必要とすることなく、免疫調節物質の有効量を経験的に決定することができる。

【0084】

「サイトカイン」という用語は、免疫促進タンパク質ファミリーを指す。サイトカインファミリーとしては、造血成長因子、インターロイキン、インターフェロン、免疫グロブリンスーパーファミリー分子、腫瘍壊死因子ファミリー分子およびケモカイン（すなわち細胞、特に食細胞の遊走および活性化を制御するタンパク質）が挙げられる。代表的なサイトカインとしては、インターロイキン - 2（IL - 2）、インターロイキン - 12（IL - 12）、インターロイキン - 15（IL - 15）、インターロイキン - 18（IL - 18）、インターフェロン - （IFN）およびインターフェロン - （IFN）が挙げられるが限定されない。

10

【0085】

「誘発する」という用語は、活性化する、刺激する、生じさせるまたは上方制御するという用語と交換可能に使用することができる。

【0086】

対象において「免疫反応を誘発する」という用語は、具体的に、免疫反応の活性を調節するかまたはこれに影響を与えることを指し、これには、免疫反応を活性化すること、免疫反応を上方制御すること、免疫反応を促進すること、および/または免疫反応を変化させること（あるタイプの免疫反応を誘発し、次に、対象において優勢なタイプの免疫反応を、有害であるかまたは無効であるものから、有益であるかまたは防御的であるものに、変化させることによるなど）が含まれ得る。

20

【0087】

「操作可能に連結される」という用語は、宿主細胞に遺伝子移入された場合（すなわち、形質転換、形質導入または遺伝子移入）、分子を発現することが可能なように、核酸分子を転写調節配列に連結することを指す。転写調節配列は、転写の、開始、伸長および終結を調節する配列である。特に重要な転写調節配列は、転写開始を調節するもの、例えばプロモーター、エンハンサー、オペレーターおよびリプレッサー配列である。様々なこのような転写調節配列が当業者にとって公知である。好ましい転写調節配列としては、鳥類、魚類、哺乳動物、細菌、ウイルス、植物および昆虫細胞において機能するものが挙げられる。何らかの転写調節配列が本発明とともに使用され得る一方で、この配列には、免疫原または免疫刺激タンパク質をコードする配列と天然に付随する天然の転写調節配列が含まれ得る。

30

【0088】

「核酸分子」および「核酸配列」という用語は、交換可能に使用することができ、これらには、DNA、RNAまたはDNAもしくはRNAの何れかの誘導体が含まれる。これらの用語はまた、オリゴヌクレオチドおよびより大きい配列、例えばプラスミドなど、例えば本明細書中に記載の免疫賦活プラスミドなども含み、タンパク質またはそれらの断片をコードする両核酸分子および制御領域、イントロンまたは他の非コードDNAまたはRNAを含む核酸分子を含む。一般的には、オリゴヌクレオチドは、約1から約500ヌクレオチドからの核酸配列を有し、より一般的には、これは少なくとも約5ヌクレオチド長である。核酸分子は、哺乳動物、魚類、細菌、昆虫、ウイルス、植物、合成起源またはそれらの組み合わせを含むあらゆる起源由来であり得る。核酸分子は、組み換えDNA技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、増幅、クローニング）または化学合成など、一般的に当技術分野で公知の方法により生成させることができる。核酸分子には、天然の核酸分子およびその相同体が含まれ、これには、天然の対立遺伝子変異体および、核酸分子の、本発明の方法に有用な免疫反応の誘発能を修飾によって実質的に妨害しないように、ヌクレオチドが、挿入、欠失、置換または反転されている修飾核酸分子が含まれるが

40

50

限定されない。核酸相同体は、当業者にとって公知の多くの方法を用いて生成させ得る（例えば、参照により本明細書中に組み込まれる Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989 参照）。

【0089】

「選択可能マーカー」および「選択可能マーカー遺伝子」という用語は、通常は生物を死滅させるかまたはその成長を阻害する選択物質（例えば抗生物質）または状態から、その遺伝子が発現される生物を防御する生成物をコードする遺伝子を指す。選択可能マーカー遺伝子は、最も一般的には抗生物質耐性遺伝子（例えば、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子など）である。このように、例えば、カナマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミドを導入するための形質転換手順に E. コリ (E. coli) 細胞を供し、次いでカナマイシンを含有する培地上または培地中で増殖させる場合、プラスミドの取り込みに成功し、カナマイシン耐性遺伝子を発現する E. コリ (E. coli) 細胞のみが生存する。「選択可能マーカー」および「選択可能マーカー遺伝子」という用語はまた、生物の増殖に必須である化合物の合成に関与する酵素をコードする遺伝子も含む。必須化合物を合成することができない栄養要求性の生物に導入する場合、このような遺伝子は、必須化合物を補給された培地中で生物を増殖させることを可能にする。例えば、リジン生合成に関与する酵素を欠く突然変異ゆえにアミノ酸リジンに対して栄養要求性である細菌細胞は通常、リジンが補給されていない培地上で増殖できない。このような細菌がリジン生合成に関与する酵素をコードするプラスミドを導入するための形質転換手順に供されるとき、リジンが補給されていない培地上で増殖させる場合、プラスミドの取り込みに成功し、酵素を発現する細菌が生存する。「選択可能マーカー」および「選択可能マーカー遺伝子」という用語は、毒/解毒薬選択を可能にする遺伝子をさらに含む。例えば、ccdB 遺伝子は、細胞分裂に対する必須酵素である DNA ジャイレースに結合するタンパク質をコードする。DNA ジャイレースに対する結合において、ccdB 遺伝子産物は、遺伝子複製を損ない、細胞死を誘導する。したがって、ccdB 遺伝子産物を発現する細菌は生存できない。ccdB 遺伝子は、ccdB 遺伝子産物の天然の阻害剤として作用するタンパク質（「解毒薬」）をコードする。したがって、それらの細菌ゲノムにおいて ccdB 遺伝子を有する細菌が ccdA 遺伝子産物をコードするプラスミドを導入するための形質転換手順に供される場合、プラスミドの取り込みに成功し、ccdA 遺伝子を発現する細胞のみが生存する。

【0090】

「スクリーニング可能マーカー」および「スクリーニング可能マーカー遺伝子」という用語は、観察者がスクリーニング可能マーカー遺伝子を発現している細胞とスクリーニング可能マーカー遺伝子を発現していない細胞とを区別できるようにする産物をコードする遺伝子を指す。スクリーニング可能マーカー遺伝子系は当技術分野で周知であり、例えば、lacZ 遺伝子および蛍光タンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP)、青色蛍光タンパク質 (BFP) またはシアン蛍光タンパク質 (CFP) など、をコードする遺伝子を含む。

【0091】

本明細書中で使用される場合、「対象」という用語は、中枢神経系を有する生物を指す。特に、対象としては、ヒト対象または患者およびペット動物が挙げられるが限定されない。代表的なペット動物としては、飼育慣らされている哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）、大きな商業的価値がある哺乳動物（例えば、鳥類、ウシ亜科、乳牛、肉牛、スポーツ用動物）、大きな科学的価値のある哺乳動物（例えば、絶滅危惧種の捕獲または自由標本）または他の点で価値がある哺乳動物が挙げられ得る。適切な対象としてはまた、マウス、ラット、イヌ、ネコ、有蹄動物、例えばウシ、ブタ、ヒツジ、ウマおよびヤギなど、ウサギ類、例えばウサギおよびノウサギなど、他のげっ歯類および霊長類、例えばサル、チンパンジーおよび類人猿なども挙げられ得る。対象は、家畜であれ、または野生であ

れ、鳥類の何れかのメンバーであり得、繁殖、食肉または産卵用に商業的に飼育され得る。代表的な鳥類としては、ニワトリ、七面鳥、ガチョウ、アヒル、キジ、ウズラ、ハト、ダチョウ、愛玩鳥、動物学的コレクションおよび鳥飼育場の鳥などが挙げられるが限定されない。対象は、家畜であれ、または野生であれ、ウシ亜科の何れかのメンバーであり得、繁殖、食肉またはミルク生産のために商業的に飼育され得る。代表的なウシ亜科としては、レイヨウ、水牛、ヤク、ウシ、バイソンなどが挙げられるが限定されない。ウシの種としては、乳牛、種牛、去勢雄牛、若雌牛、雄牛、肉牛、乳牛などが挙げられるが限定されない。対象は、魚類、甲殻類、軟体動物、淡水または海水中の生物の何れかの種を含むが限定されない、水産養殖種の何れかのメンバーであり得る。いくつかの態様において、対象は、感染性疾患であると診断され得るか、感染性疾患のリスクがあり得るか、または感染性疾患に罹患している可能性がある。対象は、子宮中、新生期、青年期、成熟期、中年期または高齢を含む何れかの齢であり得る。

10

【0092】

[実施例]

次の非限定例は、本発明をさらに例示するために提供される。

【0093】

[実施例1]: pGCMB75.6プラスミドの調製

pGCMB75.6のマップは図2で示す。pGCMB75.6において、pMB75.6のカナマイシン耐性遺伝子(図1参照)は、E.コリ(E.coli)K-12から非コード配列により置き換えられている。pGCMB75.6プラスミドを作製するために、カナマイシン耐性遺伝子の5'部位でpMB75.6にAscIシングルカッター(single cutter)制限部位を導入して、pMB75.6__AscI(配列番号3)を作製した。AscI制限部位を導入するために、pGCMB75.6の配列に存在するアデニンをグアニンに突然変異させ、それによってpGCMB75.6プラスミド中の配列AGCGCGCCをGGCGCGCCに変化させた。増幅中のライゲーションによる突然変異誘発に基づくアプローチを用いて、この修飾を完遂した。その中間でAscI制限部位を保有した単一プライマーを使用した。

20

【0094】

Life Technologies GmbH(Darmstadt, Germany)によって1779nt長のAscI(GGCGCGCC)/XhoI(CTCGAG)断片を合成した。この断片は、E.コリ(E.coli)K-12(exchanges 1-5、図2で「exc.1」、「exc.2」などと略称)、F1複製起点および短縮型lacZ遺伝子(図2参照)からの、非コード配列を含む5つの領域を含有した。exchange 4の場合、プラスミドのGC含量を増加させるために、いくつかの位置でE.コリ(E.coli)配列を手作業で変化させた。さらに、exchange 2の場合、1個のヌクレオチドを変化させてDraI制限部位を欠失させ、プラスミド中にDraI部位が1個だけ存在するようにした。

30

【0095】

図2で示されるように、pGCMB75.6は、いくつかの制御エレメント(F1複製起点、CMVプロモーターおよびpUC複製起点)および多重クローニング部位を含有する。pGCMB75.6はまた短縮型lacZ遺伝子も含有する。しかし、pGCMB75.6は、全長または機能的選択可能またはスクリーニング可能マーカー遺伝子を全く含まない。pGCMB75.6は4242bp長であり、283CpGジヌクレオチドを含有する。

40

【0096】

新しい導入AscI部位を保有する1個の陽性クローン(pMB75.6__AscI)をAscI(GGCGCGCC)/XhoI(CTCGAG)で消化して、CMVプロモーター、多重クローニング部位およびpUC複製起点を含有する2463断片を作製した(図2参照)。1779nt AscI(GGCGCGCC)/XhoI(CTCGAG)合成断片もAscI/XhoIで消化した。

50

【0097】

QiagenからのQIAquick Gel Extractionキットを用いることによって、両断片(2463ntベクター断片および1779nt挿入断片)を1%アガロースゲルからゲル溶出した。16で一晩、20 μ Lの総体積中、600ngの1779nt断片および400ngの2463nt pMB75.6__AscIベクター断片を用いて、ライゲーションを行った。次いで、氷上で20mLのH₂Oに対して20 μ Lを2時間透析し、次いで5 μ Lエレクトロ-コンピュートDH5 E.コリ(E. coli)細胞および40 μ LのH₂O(Invitrogen F-f80lacZ M15 (lacZYA-argF)U169recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+)gal-phoA supE44 -thi-1 gyrA96 re 10
lA1; Lot no. 1376481、Part no. 44-0097)と混合した。形質転換およびSOC培地中での1時間の再生後、10⁻⁴希釈でカナマイシンなしのLBプレート上に細胞をプレーティングした。この希釈によって、個々のクローンの単離が可能になった。

【0098】

表1で列挙される次のプライマーを用いて、個々のクローンにおいてコロニーPCRを行った。

【表1】

表 1. PCR プライマー

AH-13 rev	GTGCGCGGAACCCCTATTTG (配列番号 5)
AH-22 for	GCGTACCCGCCGTTCTCATC (配列番号 6)

【0099】

プライマーに対するAH-13 revおよびAH-22の位置を図2で示す。Taqポリメラーゼを含有するプレミックスを使用した。臭化エチジウムを含有する1%アガロースゲル上にPCR反応物を載せた。正しいプラスミド(pGCMB75.6)を保有した陽性クローンは、606bpの生成物を示した。

【0100】

全部で10,000個を超えるクローンをスクリーニングし、3個の陽性クローンを同定した。3個の陽性クローンを新鮮なLBプレートにすぐに移し、3つのResearch Cell Bank(研究用細胞バンク)(RCB; Sys 3733、Sys 3734およびSys 3735)を作製するために使用した。 30

【0101】

並行して、培地にこれらの3個のクローンを接種し、プラスミドDNAを作製した。表2で列挙される次のプライマーを用いて、3個のサブクローンそれぞれの完全配列確認を行った。

【表 2】

表2. 配列確認のためのPCR

AH-12 for	GTCTGACGCTCAGTGGAACG (配列番号 7)
AH-13 rev	GTGCGCGGAACCCCTATTTG (配列番号 5)
AH-15	GTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTC (配列番号 8)
AH-16	GGCAATTAGCCATATTAGTC (配列番号 9)
AH-17	GCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG (配列番号 10)
AH-18	GATCATAATCAGCCATACCAC (配列番号 11)
AH-19	CGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACAC (配列番号 12)
AH-20	CCACAGGTGTCCACTCCCAGGTTC (配列番号 13)
AH-21 rev	CTAGTCAAGGCACTATACATC (配列番号 14)
AH-22 for	GCGTACCCGCCGTTCTCATC (配列番号 6)
AH-23	TCCACAGAATCAGGGGATAACG (配列番号 15)

10

【0102】

〔実施例 2〕：pLacZMB75.6 プラスミドの作製

pLacZMB75.6 プラスミド (図 3 ; 配列番号 4) を作製するために、1307 nt XhoI (CTCGAG) / DraI (TTTAAA) 断片をLife Technologies GmbH (Darmstadt, Germany) により合成させた。この1307 nt断片は、lacZ遺伝子 (265 nt) の一部を含有した。したがって、pGCMB75.6にライゲーションした場合、この断片は、XhoI制限部位の上流に位置する短縮型lacZ遺伝子を伸長させ、lacZ遺伝子を発現できるようにする (図 2 および図 3 を比較) 。さらに、新たに導入されたlacZ遺伝子領域との配列相同性を削除し、組み換えを回避するために、91 ntの多重クローニング部位をE. coli (E. coli) 非コード配列で置き換えた。さらに、プラスミドpGCMB75.6と同じサイズのプラスミドを作製するために、CMVプロモーターの5'領域を欠失させた (265 nt) 。

20

30

【0103】

pGCMB75.6および1311 nt合成断片を両方ともXhoIおよびDraIで消化した。QiagenからのQIAquick Gel Extractionキットを用いることによって、両断片を1%アガロースゲルからゲル溶出した。

【0104】

20 μ Lの総体積中、16 で一晩、240 ngの1311 nt断片および240 ngのベクター断片を用いて、ライゲーションを行った。3 μ Lを10 μ LエレクトロコンピテントDH5 E. coli (E. coli) 細胞 (Invitrogen F-f801 lacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal- phoA supE44 - thi-1 gyrA96 relA1; Lot no. 1376481、Part no. 44-0097) および40 μ Lの10%グリセリン溶液と混合した。形質転換およびSOC培地中での1時間の再生後、 10^{-2} および 10^{-4} 希釈でカナマイシンなしのLB X-Gal / IPTGプレート上に細胞をプレーティングした。この希釈によって、個々のクローンの単離が可能になった。

40

【0105】

青色 / 白色選択を介してプラスミド入りのコロニーの同定を行い、表 3 で列挙される次のプライマーを使用してコロニーPCRを行い、確認した。

【表 3】

表3. コロニー確認のためのPCRプライマー

AH-15	GTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTC (配列番号 8)
AH-39	GCTCACTCATTAGGCACCCCAGG (配列番号 16)

【0106】

AH-15およびAH-39プライマーの位置を図3で示す。Taqポリメラーゼを含有するプレミックスを使用した。臭化エチジウムを含有する1%アガロースゲル上にPCR反応物を載せた。正しいプラスミド(pLacZMB75.6)を保有した陽性クローンは、777bpの生成物を示した。

10

【0107】

4個の陽性クローンを同定し、新鮮なLBプレートにすぐに移し、Research Cell Bank (研究用細胞バンク) (RCB; Sys3736、Sys3737、Sys3738およびSys3739) を作製するために使用した。

【0108】

並行して、培地にこれらの4個のクローンを接種し、プラスミドDNAを作製した。pGCMB75.6と同じプライマーを用いて4個のサブクローンのそれぞれの完全配列確認を行ったが、プライマーAH-16 (配列番号10) を用いる代わりにプライマーAH-24を使用した (表4参照)。

20

【表 4】

表4. AH-24に対するPCRプライマー

AH-24	CGCGTAATACGACTCACTATAG (配列番号 17)
-------	-----------------------------------

【0109】

[実施例 3] : 免疫調節物質組成物

本免疫調節物質は、陽イオン性脂質および本明細書中に記載の非コードDNA配列を含む組成物である。直径およそ200nmのリボソームを作製するために、合成免疫調節物質脂質成分[1-[2-[9-(Z)-オクタデセノイルオキシ]]-2-[8](Z)-ヘプタデセニル]-3-[ヒドロキシエチル]イミダゾリニウムクロリド(DOTIM)および合成中性脂質コレステロールを処方する(米国特許第6,693,086号明細書参照)。DNA成分は、pGCMB75.6またはpLacZMB75.6である。負に荷電しているので、プラスミドDNAは正に荷電した(陽イオン)リボソームと会合する(米国特許第6,693,086号明細書参照)。

30

【0110】

[実施例 4] : 哺乳動物モデルへの免疫調節物質組成物の投与によって、ウイルス負荷における生存率が上昇した。

【0111】

病原体を負荷した哺乳動物モデルにおいて本明細書中に記載の免疫調節物質組成物の有効性を評価した。腹腔内注射を介してマウスにpGCMB75.6DNAおよび陽イオン性リボソームを含有する本免疫調節物質組成物を投与した。本免疫調節物質組成物を0.01μg、0.02μg、0.04μgおよび1.00μg濃度で投与した。腹腔内注射を介して対照マウスに0.9%NaCl溶液を投与した。免疫調節物質投与から24時間後に、腹腔内注射を介して全ての動物にウイルス適用物を負荷した(0.2mL 10³・⁴KID₅₀/mL)。負荷ウイルスは仮性狂犬病(PR)であった。生存率を図4で示す。本明細書中に記載の免疫調節物質組成物を投与されたマウスは、対照マウスよりも高い用量依存性の生存率を有した。

40

【0112】

[実施例 5] : 鳥類モデルへの免疫調節物質組成物の投与によって、病原体負荷における

50

孵化率および生存率が上昇した。

【 0 1 1 3 】

第 E 1 9 日 (1 9 日 胚) に 噴 霧 に よ っ て 病 原 体 を 負 荷 し た 鳥 類 モ デ ル に お い て 本 明 細 書 中 に 記 載 の 免 疫 調 節 物 質 組 成 物 の 有 効 性 を 評 価 し た 。 第 E 1 8 日 (1 8 日 胚) で の 胚 内 投 与 を 介 し て ニ フ ト リ 卵 に p G C M B 7 5 . 6 D N A お よ び 陽 イ オン 性 リ ボ ソ ム を 含 有 す る 本 免 疫 調 節 物 質 組 成 物 を 投 与 し た 。 対 照 卵 に は プ ラ セ ボ 対 照 希 釈 液 を 投 与 し た (D 5 W) (胚 内) 。 疑 似 負 荷 と し て B H I プ ロ ス (噴 霧) を 使 用 し た (T 1) 。 研 究 処 置 群 の 詳 細 は 以 下 の 表 5 で 提 供 す る 。

【 表 5 】

表5. 鳥類免疫調節物質組成物処置の説明

処置群	E18 ¹ での 実験に おける 卵数	胚内投与 (第E18日)	負荷の説明 噴霧 (第E19日)	フラット 数 ²	孵化した トレイ/ サブトレイ の数 ³	畜舎の数 ⁴
T1	896	プラセボ 対照希釈液 (D5W)	BHIプロス (偽)	56	7/14	14
T2	896	プラセボ 対照希釈液 (D5W)	APEC ⁵	56	7/14	14
T3	896	1.0 mcg JV- 77/egg	APEC ⁵	56	7/14	14
T4	896	0.1 mcg JV- 77/egg	APEC ⁵	56	7/14	14
T5	896	1.0 mcg Lot X5872/egg	APEC ⁵	56	7/14	14
T6	896	0.1 mcg Lot X5972/egg	APEC ⁵	56	7/14	14
T7	896	1.0 mcg Lot X5928/egg	APEC ⁵	56	7/14	14
T8	896	0.1 mcg Lot X5928/egg	APEC ⁵	56	7/14	14

¹ 卵温置第18日; ² フラットあたり卵16個; ³ サブトレイあたり卵64個 (トレイあたり2群を収容するために分割); ⁴ トレイの各セクションから孵化したヒヨコを1つの畜舎に移した;
⁵ 鳥病原性エシェリキア・コリ (Escherichia coli) (APEC)。

【 0 1 1 4 】

本免疫調節物質組成物のDNA成分は、p G C M B 7 5 . 6 D N A の 3 個 の 単 離 ク ロ ー ン (す な わ ち J v 7 7 、 X 5 8 7 2 ま た は X 5 9 2 8) の う ち 1 つ を 含 ん だ 。 以 下 の 表 6 で ま と め ら れ る 結 果 か ら 観 察 す る こ と が で き る よ う に 、 本 明 細 書 中 に 記 載 の 免 疫 調 節 物 質 組 成 物 を 投 与 し た 場 合 、 対 照 処 置 を 受 け た 卵 と 比 較 し て 、 平 均 孵 化 率 お よ び 平 均 生 存 率 の 両 方 が 上 昇 し た 。

【表 6】

表6. 鳥類孵化率および生存率*

処置群	N	孵化時の 死亡率 (avg.)	孵化時の 死亡率 (対照負荷 とは異なる。)	孵化後 死亡率 (avg.)	孵化後 死亡率 (対照負荷 とは異なる。)	全体の 死亡率 (avg.)	全体の 死亡率 (対照負荷 とは異なる。)
01-対照 負荷なし	14	12.5%		0.7%		13.2%	
02-対照 負荷 (Chall)	14	22.5%		27.8%		43.5%	
03-Jv77: 1.0 µg 負荷	14	20.2%	-2.3%	26.5%	-1.3%	40.6%	-2.9%
04-Jv77: 0.1 µg 負荷	14	20.8%	-1.7%	22.4%	-5.4%	38.6% (p=0.0368)	-4.9%
05-X5872: 1.0 µg 負荷	14	17.6% (p=0.0110)	-4.9%	22.1%	-5.7%	36.3% (p=0.0023)	-7.2%
06-X5872: 0.1 µg 負荷	14	23.0%	0.5%	24.6%	-3.2%	42.0%	-1.5%
07-X5928: 1.0 µg 負荷	14	15.5% (p=0.0003)	-7.0%	22.3%	-5.5%	33.9% (p<0.0001)	-9.6%
08-X5928: 0.1 µg 負荷	14	21.2%	-1.3%	27.7%	-0.1%	43.0%	-0.5%

* 全ての妥当性確認試験に合格(2つの対照群間の比較)。対照負荷群と比較した有意差。

【0115】

本発明または(1または複数の)その好ましい実施形態の要素を導入するとき、冠詞「1つの(a)」、「1つの(an)」、「この(the)」および「前記(said)」は、要素の1以上があることを意味するものとする。「含むこと(comprising)」、「含むこと(including)」および「有すること(having)」という用語は、包括的であり、列挙される要素以外のさらなる要素があり得ることを意味するものとする。

【0116】

上記を考慮すれば、本発明のいくつかの目的が達成され、他の有利な結果が得られることが分かるであろう。

【0117】

本発明の範囲から逸脱することなく、上記生成物、組成物および方法において、様々な変更がなされ得るので、以上の記載に含有されるものおよび添付の図面で示されるものは全て、例示として解釈され、意味を限定するものではないものとする。

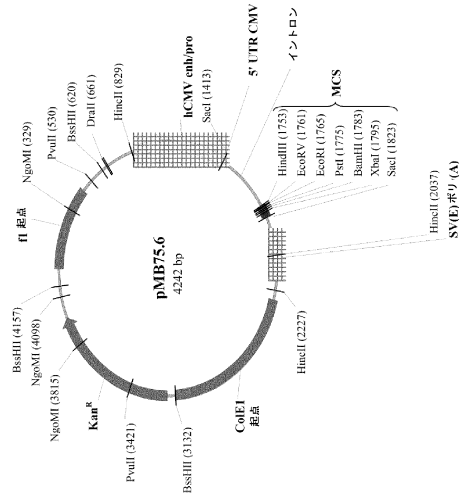
10

20

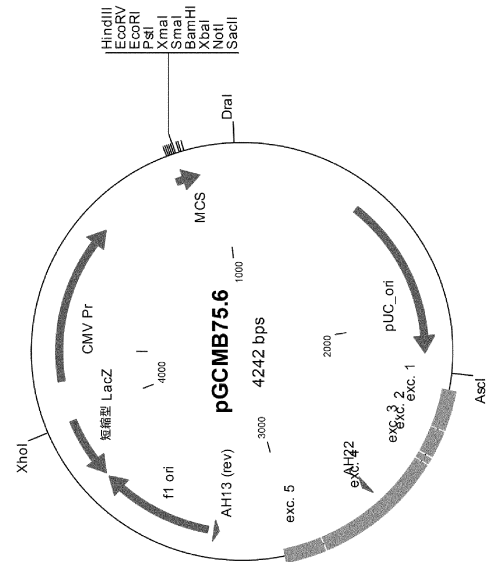
30

40

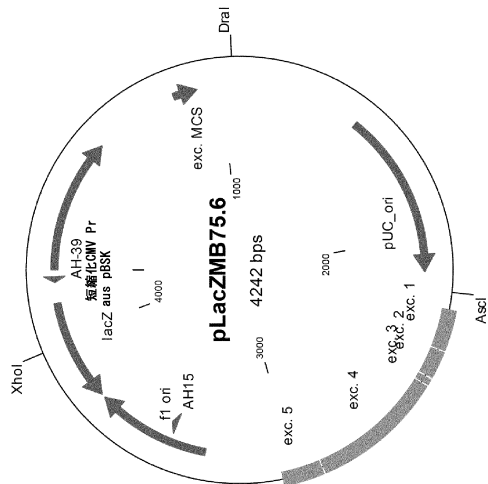
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 A 】

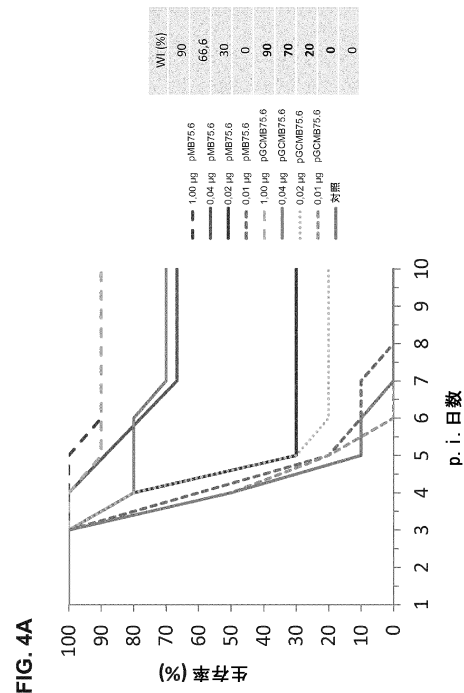
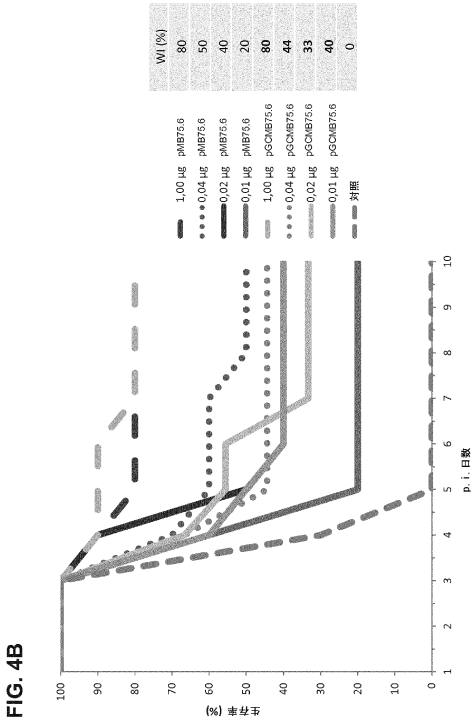


FIG. 4A

【 図 4 B 】



【 配列表 】

0006772065000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	9/12	(2006.01)	A 6 1 K 9/12
A 6 1 K	9/72	(2006.01)	A 6 1 K 9/72
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/18
A 6 1 K	47/28	(2006.01)	A 6 1 K 47/28
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
C 1 2 N	15/117	(2010.01)	C 1 2 N 15/117

(74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035
弁理士 五味淵 琢也

(74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文

(72)発明者 アイッカー, アンドレア
ドイツ国、4 1 2 3 8・メンヒェングラートバッハ、ルッケス・1 0 1

(72)発明者 ヴェールマン, ヘルマン
ドイツ国、4 2 3 4 9・ヴッパータール、マストヴェーク・3 アー

(72)発明者 ムンス, マルク
ドイツ国、4 0 6 9 9・エルクラート-ホッホダール、アム・シンメルスケンブヘン・1 4

(72)発明者 シャウアー, ロミーナ
アメリカ合衆国、6 6 2 1 9・カンザス、レネックサ、スワナー・ドライブ・9 3 1 1

(72)発明者 アブラハム, アルパート
アメリカ合衆国、6 6 2 1 6・カンザス、シャウニー、ウェスト・セブンティーセカンド・ストリート・1 4 8 0 5

(72)発明者 ヴァイス, クリスティアン

ドイツ国、5 1 3 8 1・レーパーカーゼン、インバッハ・2 7

(72)発明者 フェルトフース, エリザベス

ドイツ国、5 1 4 6 5・ベルギッシュ・グラートバッハ、ザウアーブルッフシュトラセ・1 8

審査官 鶴見 秀紀

(56)参考文献 特表2 0 1 2 - 5 2 6 7 3 4 (J P , A)

特表2 0 1 4 - 5 0 0 2 9 2 (J P , A)

特表2 0 0 8 - 5 1 1 5 4 5 (J P , A)

国際公開第2 0 0 4 / 0 5 0 8 7 2 (W O , A 1)

Clinical AND Vaccine Immunology, 2 0 0 8 年, Vol.15, No.6, Supplemntal file2, U R L , h

<https://cvi.asm.org/content/15/6/986//figures-only>

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

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

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 3 8 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 P 3 7 / 0 2

A 6 1 P 3 7 / 0 4

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 1 1 7

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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