

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-522842

(P2014-522842A)

(43) 公表日 平成26年9月8日(2014.9.8)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 48/00</b> (2006.01)	A 61 K 48/00	4 B 02 4
<b>C12N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 C 07 6
<b>A61K 39/12</b> (2006.01)	A 61 K 39/12	4 C 08 4
<b>A61K 39/23</b> (2006.01)	A 61 K 39/23	4 C 08 5
<b>A61K 39/002</b> (2006.01)	A 61 K 39/002	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-519089 (P2014-519089)	(71) 出願人	504389991 ノバルティス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成24年7月6日 (2012.7.6)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(85) 翻訳文提出日	平成26年2月26日 (2014.2.26)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/045847	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02013/006838		
(87) 國際公開日	平成25年1月10日 (2013.1.10)		
(31) 優先権主張番号	61/505,093		
(32) 優先日	平成23年7月6日 (2011.7.6)		
(33) 優先権主張國	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫原性組み合わせ組成物およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、RNA成分とポリペプチド成分とを含む免疫原性組成物に一般的に関する。2つの異なる形態にある抗原（病原体に由来する第1の抗原であって、RNAによりコードされる形態にある抗原；および異なる病原体に由来する第2の抗原であって、ポリペプチド形態にある抗原）を送達する免疫原性組成物は、両方の病原体に対する免疫応答を誘発するのに有效である。一局面において、(i) 第1のポリペプチド抗原と、(ii) 第2のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子とを含む、免疫原性組成物が提供され、前記第1の抗原と前記第2の抗原とが異なる病原体に由来する抗原である。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

(i) 第1のポリペプチド抗原と、(ii) 第2のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子とを含む、免疫原性組成物であって；前記第1の抗原と前記第2の抗原とが異なる病原体に由来する抗原である、免疫原性組成物。

**【請求項 2】**

前記第1のポリペプチド抗原が、サイトメガロウイルス(CMV)抗原である、請求項1に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 3】**

前記第2のポリペプチド抗原が、パルボウイルス抗原である、請求項1または2に記載の免疫原性組成物。 10

**【請求項 4】**

前記第2のポリペプチド抗原が、ウイルス様粒子(VLP)の形態にある、請求項1から3に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 5】**

前記第1のポリペプチド抗原が可溶性ポリペプチドであり、前記第2のポリペプチド抗原が可溶性ポリペプチドまたは膜アンカー型ポリペプチドである、請求項1から4のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 6】**

前記自己複製RNAが、アルファウイルスに由来するRNAレプリコンである、請求項1から5のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 20

**【請求項 7】**

前記自己複製RNA分子が、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 8】**

カチオン性脂質、リポソーム、コクリエート、ウィロソーム、免疫刺激複合体、微粒子、マイクロスフェア、ナノスフェア、単層小胞、多重膜小胞、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、エマルソーム、ポリカチオン性ペプチド、またはカチオン性ナノエマルジョンをさらに含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 9】**

前記RNA分子を、カチオン性脂質、リポソーム、コクリエート、ウィロソーム、免疫刺激複合体、微粒子、マイクロスフェア、ナノスフェア、単層小胞、多重膜小胞、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、エマルソーム、ポリカチオン性ペプチド、カチオン性ナノエマルジョン、またはこれらの組み合わせの中に被包する、これらへと結合させる、またはこれらに吸着させる、請求項1から8のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 30

**【請求項 10】**

前記第1のポリペプチド抗原と前記第2のポリペプチド抗原とが、ウイルス性病原体、細菌性病原体、真菌性病原体、原虫病原体、および多細胞寄生虫性病原体からなる群に独立に由来する、請求項1から9のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 11】**

前記第1のポリペプチド抗原と前記第2のポリペプチド抗原とがいずれもウイルス抗原である、請求項1から10のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 40

**【請求項 12】**

1つのウイルス抗原が、CMVに由来する抗原である、請求項11に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 13】**

1つのウイルス抗原が、パルボウイルス抗原である、請求項11に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 14】**

前記パルボウイルス抗原が、配列番号25および26によりコードされるアミノ酸配列 50

から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

前記ウイルス抗原が、g B 抗原、g H 抗原、または g L 抗原である、請求項 12 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

前記ウイルス抗原が、g H 抗原または g L 抗原である、請求項 12 または 15 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

前記 R N A 分子が、g H 抗原および g L 抗原をコードする、請求項 12、15、または 16 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

前記免疫原性組成物が、g H ポリペプチド抗原および g L ポリペプチド抗原を含む、請求項 12、15、または 16 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

アジュバントをさらに含む、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

( i ) パルボウイルスポリペプチド抗原と、( i i ) C M V ポリペプチド抗原をコードする自己複製 R N A 分子とを含む、免疫原性組成物。

【請求項 21】

請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物、ならびに薬学的に許容される担体および / または薬学的に許容されるビヒクル。

【請求項 22】

感染性疾患を処置または予防するための方法であって、感染性疾患の処置または予防を必要とする被験体に、治療有効量の、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 23】

被験体において免疫応答を誘発するための方法であって、免疫応答の誘発を必要とする被験体に、治療有効量の、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 24】

被験体をワクチン接種する方法であって、ワクチン接種を必要とする被験体に、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2011年7月6日に出願された米国仮出願第 61/505,093 号の利益を主張する。上記出願の全体の内容は、参考として本明細書に援用される。

【0002】

配列表

本出願は、E F S - W e b を介して A S C I I 形式で提出され、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる配列表を含有する。2012年7月5日に作成された前記 A S C I I コピーは、P A T 5 4 6 7 6 . t x t と名付けられ、76,996 バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

組み合わせワクチンは、異なる疾患を防止するまたは同じ疾患を引き起こす感染性因子の複数の株に対して防御する抗原を単一の生成物に合体させる。したがって、組み合わせワクチンは、いくつかの疾患を防止するのに必要とされる注射の回数を低減する。組み合

10

20

30

40

50

わせワクチンの潜在的な利点には、a) 別個のワクチンを備蓄および投与する費用の軽減、b) 追加の医療ケア来院のための費用の軽減、ならびにc) 新たなワクチンの免疫化プログラムへの追加を容易にすることが含まれる。

#### 【0004】

核酸ベースのワクチンは、ワクチン接種にとって魅力的な手法である。たとえば抗原をコードするプラスミドDNAによる筋内(IM)免疫化は、細胞性免疫応答および体液性免疫応答を誘発し、攻撃に対して防御することが可能である。DNAワクチンは、タンパク質抗原または弱毒化された病原体を使用する従来のワクチンを凌ぐ一定の利点をもたらす。たとえばタンパク質ワクチンと比較して、DNAワクチンは、その天然のコンフォメーションにおいて適正にフォールドした抗原を作製し、細胞性免疫応答を発生させるのにより有効でありうる。DNAワクチンはまた、殺滅または弱毒化された病原体と関連する安全性の問題のうちのいくつかを有さない。たとえば殺滅されたウイルス性調製物は、残留生存ウイルスを含有する可能性があり、弱毒化されたウイルスは、病原性表現型へと変異および復帰変異する可能性がある。DNAワクチンは、一般的に細胞介在性免疫(インターフェロン)を分泌する抗原特異的T細胞および抗原特異的細胞傷害性T細胞など)を発生させるのには有効であるが、コードされて発現する抗原に対する抗体を生成させるのにはそれほど有効ではない。

10

#### 【0005】

特許文献1は、核酸およびタンパク質抗原を抗原提示細胞へと送達するワクチンについて開示している。核酸は、タンパク質抗原と同じタンパク質をコードしうる。核酸およびタンパク質は、たとえば共有結合的コンジュゲーションにより「複合体化させる」。複合体は、合成のウイルス様粒子として処方することができる。また、リポソーム系を使用することも示唆される。

20

#### 【0006】

特許文献2は、核酸とそのコードタンパク質との同じ細胞へのリポソーム系を使用する共送達について開示している。DNA分子とそのコードタンパク質とは、この2つの実体が、抗原提示細胞と一緒に到達するように、同じリポソームビヒクル内に捕捉され、結果として抗原のタンパク質形態のプロセシングおよび提示が、同じ細胞における抗原のDNAコード形態の発現と共になされる。

30

#### 【0007】

特許文献3は、(i) 担体粒子へとコーティングされた少なくとも1つのインフルエンザウイルス抗原をコードする核酸配列と、(ii) 逐次投与または共時投与のための補助剤タンパク質とを含むワクチンについて開示している。補助剤タンパク質と核酸分子によりコードされる抗原とは、少なくとも1つの共通のエピトープを共有する。

#### 【0008】

非コード型プラスミドDNAは、リポソーム小胞内にペプチドと共に共捕捉されると免疫アジュバント作用を示し(Gur sel, M.ら、Vaccine (1999年)、17巻：1376～1383頁)、CpGモチーフを有するDNAは、裸のDNAおよびペプチドワクチンに対してアジュバント効果を及ぼす(Klin man, D. M.ら、Vaccine (1999年)、17巻：19～25頁)ことが公知である。

40

#### 【0009】

DNAベースのワクチンの安全性に関しては、憂慮がなされている。導入されたDNA分子は、宿主ゲノムへと組み込まれる可能性がある、またはそれらの多様な組織への分布に起因して、望ましくない持続的な抗原の発現をもたらしうるであろう。加えて、DNAウイルスのあるものはまた、DNA分子を送達するのにも使用されている。それらの感染性特性のために、このようなウイルスは、きわめて高いトランスフェクション率を達成する。使用されるウイルスは、トランスフェクトされた細胞における機能的感染性粒子の形成を防止するために、遺伝子的に修飾される。しかし、これらの注意にもかかわらず、たとえば組換えイベントの可能性に起因して、導入された遺伝子およびウイルス性遺伝子の制御不能な増殖の危険性を排除することは可能でない。これはまた、DNAがたとえば組

50

換えにより宿主細胞ゲノムの無傷の遺伝子へと挿入される危険性も伴い、その帰結として、宿主遺伝子が、変異し、したがって、完全にもしくは部分的に不活性化される場合もあり、または誤情報がもたらされる場合もある。言い換えれば、細胞にとってきわめて重要な宿主遺伝子産物の合成が完全に抑制される場合もあり、または代替的に、改変された遺伝子産物もしくは不適正な遺伝子産物が発現する場合もある。

#### 【0010】

抗原またはその派生物をコードするRNA分子もまた、ワクチンとして使用することができる。RNAワクチンは、DNAワクチンと比較してある利点をもたらす。しかし、RNAベースのワクチンに注がれてきた関心は、DNAベースのワクチンの場合と比較して比較的小さかった。RNAは、治療剤またはワクチンとして投与されると、ヌクレアーゼによる分解に対する感受性が高い。たとえばVajdy, M.ら、「Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines」、Immuno 1 Cell Biol、2004年、82巻(6号)：617～27頁を参照されたい。  
10

#### 【0011】

tol1様受容体(TLR)とは、細菌、真菌、原虫、およびウイルスに由来する病原体関連分子パターン(PAMPS)に結合し、侵入する病原体に対する防御の最前線として作用するパターン認識受容体の群である。ヒト、マウス、および他の哺乳動物種では、多くのTLRが同定されている。DNA分子(細菌性DNAまたはウイルス性DNAなど)がTLR9により認識されるのに対し、RNA分子(一本鎖ウイルス性RNAなど)は、TLR7またはTLR8により認識される。  
20

#### 【0012】

T細胞とB細胞とは、抗原を異なる方式で認識する。T細胞が、クラスII MHC分子またはクラスI MHC分子に埋め込まれたタンパク質のペプチド断片を細胞の表面において認識するのに対し、B細胞は、免疫グロブリン様細胞表面受容体を介してプロセシングされていない抗原の表面特徴を認識する。T細胞の抗原認識機構とB細胞の抗原認識機構との差違は、それらのエピトープの異なる性格に反映されている。したがって、B細胞が、抗原または病原体の表面特徴を認識するのに対し、T細胞エピトープ(約8～12アミノ酸の長さのペプチドを含む)は、抗原の三次元構造の文脈で見ると、「内部」エピトープの他、「表面」エピトープでもあります。したがって、B細胞エピトープが、抗原または病原体の表面において曝露されることが好ましく、直鎖状エピトープであってもよく、またはコンフォメーションナルエピトープであってもよいのに対し、T細胞エピトープは典型的に直鎖状エピトープであり、利用可能であるまたは抗原の表面にあることが必要とされない。  
30

#### 【0013】

特許文献4は、抗原およびアルファウイルスベースのアジュバントを投与することにより免疫応答をもたらす方法について開示している。方法は、(+)-ssRNAウイルスであるアルファウイルスが、抗原を提示するまたはウイルスによって発現させなくとも、抗原に対する免疫応答を増強するためのアジュバントとして作用しうることの発見に基づいている。アルファウイルス粒子は、リポソーム系により送達することができる。  
40

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0014】

【特許文献1】国際公開第97/28818号

【特許文献2】米国特許第7,604,803号明細書

【特許文献3】国際公開第2009/074861号

【特許文献4】米国特許第7,862,829号明細書

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

**【0015】**

タンパク質サブユニットワクチンおよびRNAワクチンなどの核酸ワクチンの有効性を改善する必要がある。

**【課題を解決するための手段】****【0016】**

本発明は、RNA成分とポリペプチド成分とを含む免疫原性組成物に一般的に関する。免疫原性組成物は、2つの異なる形態にある抗原エピトープ（病原体に由来する第1のエピトープであって、RNAによりコードされる形態にあるエピトープ；および異なる病原体に由来する第2のエピトープであって、ポリペプチド形態にあるエピトープ）の組み合わせを送達し、両方の病原体に対する免疫応答を誘発しうる（たとえば、別個のアジュvantに対する必要なしに）。本明細書で記載される免疫原性組成物の実際的な利益は、患者に投与するのに必要とされる免疫原性組成物の総数が、単一の免疫原性組成物における2つ以上の抗原の組み合わせに起因して低減されることである。これは、多数の日常的なワクチン接種を受ける幼児および小児にとってとりわけ有益である。10

**【0017】**

本発明はまた、RNA分子とポリペプチド分子とを共送達（共投与）することにより、2つ以上の感染性疾患を処置もしくは予防するための方法、2つ以上の病原体に対する免疫応答を誘発するための方法、または被験体をワクチン接種する方法にも関する。

**【0018】**

一態様では、本発明は、(i) 第1のポリペプチド抗原と、(ii) 第2のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子とを含み；第1の抗原と第2の抗原とが異なる病原体に由来する抗原である、免疫原性組成物を提供する。いくつかの実施形態では、第1のポリペプチド抗原が、サイトメガロウイルス(CMV)抗原である。いくつかの実施形態では、第2のポリペプチド抗原が、パルボウイルス抗原である。第2のポリペプチド抗原は、ウイルス様粒子(VLP)の形態でありうる。20

**【0019】**

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチド抗原が可溶性ポリペプチドであり、第2のポリペプチド抗原が可溶性ポリペプチドまたは膜アンカー型ポリペプチドである。

**【0020】**

いくつかの実施形態では、自己複製RNAは、アルファウイルスに由来するRNAレプリコンである。自己複製RNA分子には、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドが含まれうる。30

**【0021】**

いくつかの実施形態では、免疫原性組成物が、カチオン性脂質、リポソーム、コクリエート(cochleate)、ウイロソーム、免疫刺激複合体、微粒子、マイクロスフェア、ナノスフェア、単層小胞、多重膜小胞、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、エマルソーム(emulsome)、ポリカチオン性ペプチド、またはカチオン性ナノエマルジョンをさらに含む。

**【0022】**

いくつかの実施形態では、RNA分子を、カチオン性脂質、リポソーム、コクリエート、ウイロソーム、免疫刺激複合体、微粒子、マイクロスフェア、ナノスフェア、単層小胞、多重膜小胞、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、エマルソーム、ポリカチオン性ペプチド、カチオン性ナノエマルジョン、またはこれらの組み合わせの中に被包する、これらへと結合させる、またはこれらに吸着させる。40

**【0023】**

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチド抗原と第2のポリペプチド抗原とが、ウイルス性病原体、細菌性病原体、真菌性病原体、原虫病原体、および多細胞寄生虫性病原体に独立に由来する。第1のポリペプチド抗原と第2のポリペプチド抗原とはいずれも、ウイルス抗原でありうる。このような場合には、1つのウイルス抗原が、CMVに由来しうる。別の場合には、1つのウイルス抗原が、パルボウイルスに由来しうる。パルボウイル50

ルス抗原は、配列番号 25～26から選択されるアミノ酸配列を含みうる。CMVに由来するウイルス抗原は、gB抗原、gH抗原、またはgL抗原でありうる。いくつかの実施形態では、CMVに由来するウイルス抗原が、gH抗原またはgL抗原でありうる。

#### 【0024】

いくつかの実施形態では、RNA分子が、gH抗原およびgL抗原をコードする。いくつかの実施形態では、免疫原性組成物が、gHポリペプチド抗原およびgLポリペプチド抗原を含む。

#### 【0025】

いくつかの実施形態では、免疫原性組成物が、アジュバントをさらに含む。

#### 【0026】

本発明はまた、(i)パルボウイルスポリペプチド抗原と、(ii)CMVポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子とを含む免疫原性組成物にも関する。

#### 【0027】

本発明はまた、免疫原性組成物、ならびに薬学的に許容される担体および／または薬学的に許容されるビヒクルにも関する。

#### 【0028】

本発明はまた、感染性疾患を処置または予防するための方法にも関する。いくつかの実施形態では、治療有効量の免疫原性組成物を被験体に投与する。

#### 【0029】

本発明はまた、被験体において免疫応答を誘発するための方法にも関する。いくつかの実施形態では、治療有効量の免疫原性組成物を被験体に投与する。

#### 【0030】

本発明はまた、被験体をワクチン接種する方法にも関する。いくつかの実施形態では、免疫原性組成物を被験体に投与する。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0031】

本明細書において本発明について記載するのに使用される若干の用語については、本明細書の第7節で定義および説明する。

#### 【0032】

##### 1. 概観

RNAワクチンに特有の1つの利点は、RNA分子が自己アジュバント作用性であることである。たとえば、RNA分子は、RNA分子によりコードされたタンパク質抗原に対する、宿主による免疫応答を増強しうるサイトカインの産生を誘発することができる。

#### 【0033】

RNA分子とポリペプチド分子とを組み合わせるワクチン接種戦略（たとえばRNA成分とタンパク質成分とを有する免疫原性組成物の投与）は、複数の利益をもたらす。RNA分子が、1型ヘルパーT細胞応答（Th1、IFN- $\beta$ 、IL-4 $^1$ ）を促進するのに対し、タンパク質分子は、2型ヘルパーT細胞応答を促進する。したがって、RNA分子とポリペプチド分子とを組み合わせることにより、T細胞介在性免疫ならびに体液性免疫の両方を促進することができる。加えて、RNA分子は、リポソームまたは水中油エマルジョンなどの送達系を使用して細胞へと送達することができる。リポソームおよび水中油エマルジョンはまた、アジュバント活性を有することも公知である。したがって、送達系のアジュバント活性と併せたRNAのアジュバント活性が相乗作用的に作用して、一方または両方の抗原に対する免疫応答を増強しうる。

#### 【0034】

一様では、本発明は、第1の病原体に由来するRNA成分と第2の病原体に由来するポリペプチド成分とを含む免疫原性組成物に関する。抗原エピトープを2つの異なる形態（ある病原体に由来する第1のエピトープであって、RNAによりコードされる形態にあるエピトープ；および異なる病原体に由来する第2のエピトープであって、ポリペプチド形態にあるエピトープ）で送達する免疫原性組成物は、一方または両方の病原体に対する

10

20

30

40

50

免疫応答を増強しうる。

【0035】

本明細書で記載される通り、本発明者らは、(i) CMV抗原をコードする自己複製RNA分子と、(ii) パルボウイルスポリペプチド抗原とを含む免疫原性組成物の有効性について評価した。これらの研究により、CMV抗原をコードするRNA分子を、ポリペプチド形態にあるパルボウイルス抗原と併せて共投与することにより、パルボウイルス抗原に対する免疫反応が強化され、結果としてパルボウイルスのポリペプチド分子単独の投与と比較して高い抗体力値がもたらされることが裏付けられた。

【0036】

本明細書で記載される免疫原性組成物とは、防御的免疫を誘発するなど、病原体に対する宿主による免疫応答を誘発または増強するためのワクチンとして処方することができる。本明細書ではまた、本発明の免疫原性組成物を使用して、それを必要とする被験体における免疫応答を誘発または増強する方法も提示される。

10

【0037】

2. 免疫原性組成物

一態様では、本発明は、(i) 第1のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子と；(ii) 第2のポリペプチド抗原とを含み；前記第1のポリペプチド抗原と第2のポリペプチド抗原とが異なる病原体に由来する免疫原性組成物を提供する。

【0038】

ある実施形態では、RNA分子が、病原体に由来する全長タンパク質（たとえばウイルスタンパク質）またはその抗原性部分であって、タンパク質の発現、精製、および／もしくは検出を容易としうるタグ配列と任意選択により融合させた全長タンパク質またはその抗原性部分を含む第1のポリペプチド抗原をコードしうる。第2のポリペプチド抗原は、異なる病原体に由来する全長タンパク質またはその抗原性部分であって、タンパク質の產生、精製、もしくは検出を容易としうるタグ配列と任意選択により融合させた全長タンパク質またはその抗原性部分を含む組換えタンパク質でありうる。第1のポリペプチド抗原、第2のポリペプチド抗原、またはこれらの両方は、病原体に由来するタンパク質の変異変体（たとえば（1つまたは複数の）アミノ酸置換、（1つまたは複数の）アミノ酸付加、または（1つまたは複数の）アミノ酸欠失を有するウイルスタンパク質）を含みうる。

20

【0039】

ある実施形態では、第1のポリペプチド抗原が、可溶性ポリペプチドまたは膜アンカー型ポリペプチドであり、第2のポリペプチド抗原が、可溶性ポリペプチドである。たとえば野生型ウイルスタンパク質が膜貫通型表面タンパク質である場合、RNA分子が、第1の（膜アンカー型）抗原を產生する全長コード配列を含みうるのに対し、ウイルスタンパク質の膜貫通領域を欠失させて、第2のポリペプチド抗原（これは可溶性である）を產生させることができる。

30

【0040】

ある実施形態では、第1の抗原または第2の抗原が、第3のエピトープをさらに含む融合ポリペプチドである。第3のエピトープは、異なる病原体に由来してもよく、または同じ病原体の異なる抗原に由来してもよい。

40

【0041】

第1のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子は、VRPの形態でありうる。第2のポリペプチド抗原は、VLPの形態でありうる。

【0042】

A. 抗原

本明細書で記載される免疫原性組成物中に包含させるのに適した抗原（ポリペプチド形態にあるまたはRNAによりコードされる形態にある）は、あらゆる病原体（たとえば細菌性病原体、ウイルス性病原体、真菌性病原体、原虫病原体、または多細胞寄生虫性病原体）、アレルゲン、または腫瘍に由来しうる。

50

## 【0043】

ある実施形態では、第1の抗原および／または第2の抗原が、ウイルス性病原体に由来する。例示的なウイルス性病原体には、たとえばRSウイルス(RSV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、デングウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV；たとえばHSV-I、HSV-II)、伝染性軟膜腫ウイルス、ワクシニアウイルス、天然痘ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒトパピローマウイルス(HPV)、サイトメガロウイルス(CMV)、水痘带状疱疹ウイルス(VZV)、ライノウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス(たとえばSARS)、インフルエンザウイルス(flu)、パラインフルエンザウイルス、モンブスウイルス、麻疹ウイルス、パボバウイルス、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、アレナウイルス(たとえばリンパ球性脈絡膜炎ウイルス、フニンウイルス、マクポウイルス、グアナリトウイルス、またはラッサ熱ウイルス)、ノロウイルス、黄熱病ウイルス、狂犬病ウイルス、フィロウイルス(たとえばエボラウイルスまたはマールブルク(marburg)ウイルス)、C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、モルビリウイルス(たとえば麻疹ウイルス)、ルブラウイルス(たとえばモンブスウイルス)、ルビウイルス(たとえば風疹ウイルス)、ウシウイルス性下痢ウイルスが含まれる。たとえば抗原は、CMV糖タンパク質であるgH、もしくはgL；パルボウイルス；HIV糖タンパク質であるgp120もしくはgp140、HIV p55 gag、pol；またはRSV-F抗原などでありうる。

10

20

30

40

50

## 【0044】

いくつかの実施形態では、第1の抗原および／または第2の抗原が、伝染性サケ貧血ウイルス(ISAV)、サケ臍臓病ウイルス(SPDV)、伝染性臍臓壊死症ウイルス(IPNV)、アメリカナマズウイルス(CCV)、魚類リンホシスチス病ウイルス(fish lymphocystis disease virus)(FLDV)、伝染性造血器壊死症ウイルス(IHN)、コイヘルペスウイルス、サケピコルナ様ウイルス(また、大西洋サケのピコルナ様ウイルスとしても公知である)、陸封ザケウイルス(lan docked salmon virus)(LSV)、大西洋サケロタウイルス(ASR)、マスイチゴ病ウイルス(trout strawberry disease virus)(TSD)、ギンザケ腫瘍ウイルス(CSTV)、またはウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV)など、魚類に感染するウイルスに由来する。

## 【0045】

いくつかの実施形態では、第1の抗原および／または第2の抗原が、*P. falciiparum*、*P. vivax*、*P. malariae*、または*P. ovale*などの*Plasmodium*属からの寄生虫に由来する。したがって、本発明は、マラリアに対する免疫化のために使用することができる。いくつかの実施形態では、第1の抗原および／または第2の抗原が、*Caligidae*科からの寄生虫、特に*Lepeophtheirus*属および*Caligus*属からの寄生虫、たとえば*Lepeophtheirus salmonis*または*Caligus rogercresseyi*などのウォジラミ(sea lice)に由来する。

## 【0046】

ある実施形態では、第1の抗原および／または第2の抗原が、細菌性病原体に由来する。例示的な細菌性病原体には、たとえば*N. gonorrhoea*および*N. meningitidis*を含めた*Neisseria*種；*S. pneumoniae*、*S. pyogenes*、*S. agalactiae*、*S. mutans*を含めた*Streptococcus*種；B型*H. influenzae*、種別不明の*H. influenzae*、*H. ducreyi*を含めた*Haemophilus*種；また、*Branhamella catarrhalis*としても公知の*M. catarrhalis*を含めた*Moraxella*種；*B. pertussis*、*B. parapertussis*、および*B. bronchiseptica*を含めた*Bordetella*種；*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. leprae*、*M. avium*、*M. paratuberculosis*

ulosis、*M. smegmatis*を含めた*Mycobacterium*種；*L. pneumophila*を含めた*Legionella*種；腸管毒性*E. coli*、腸管出血性*E. coli*、腸管病原性*E. coli*を含めた*Escherichia*種；*V. cholera*を含めた*Vibrio*種；*S. sonnei*、*S. dysenteriae*、*S. flexneri*を含めた*Shigella*種；*Y. enterocolitica*、*Y. pestis*、*Y. pseudotuberculosis*を含めた*Yersinia*種；*C. jejuni*および*C. coli*を含めた*Campylobacter*種；*S. typhi*、*S. paratyphi*、*S. choleraesuis*、*S. enteritidis*を含めた*Salmonella*種；*L. monocytogene*sを含めた*Listeria*種；*H. pylori*を含めた*Helicobacter*種；*P. aeruginosa*を含めた*Pseudomonas*種；*S. aureus*、*S. epidermidis*を含めた*Staphylococcus*種；*E. faecalis*、*E. faecium*を含めた*Enterococcus*種；*C. tetani*、*C. botulinum*、*C. difficile*を含めた*Clostridium*種；*B. anthracis*を含めた*Bacillus*種；*C. diphtheriae*を含めた*Corynebacterium*種；*B. burgdorferi*、*B. garinii*、*B. afzelii*、*B. andersonii*、*B. hermsii*を含めた*Borrelia*種；*E. equi*およびヒト顆粒球エーリキア症の病原菌を含めた*Ehrlichia*種；*R. rickettsii*を含めた*Rickettsia*種；*C. trachomatis*、*C. neumoniae*、*C. psittaci*を含めた*Chlamydia*種；*L. interrogans*を含めた*Leptospira*種；*T. pallidum*、*T. denticola*、*T. hyo dysenteriae*を含めた*Treponema*種が含まれる。  
10

## 【0047】

ある実施形態では、第1の抗原および／または第2の抗原が、真菌性病原体（たとえば酵母またはかびの病原体）に由来する。例示的な真菌性病原体には、たとえば*Aspergillus fumigatus*、*A. flavus*、*A. niger*、*A. terreus*、*A. nidulans*、*Coccidioides immitis*、*Coccidioides posadasii*、*Cryptococcus neoformans*、*Histoplasma capsulatum*、*Candida albicans*、および*Pneumocystis jirovecii*が含まれる。  
20

## 【0048】

ある実施形態では、第1の抗原および／または第2の抗原が、原虫病原体に由来する。例示的な原虫病原体には、たとえば*Toxoplasma gondii*、*Strongyloides stercoralis*、*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium vivax*、*Plasmodium ovale*および*Plasmodium malariae*が含まれる。

## 【0049】

ある実施形態では、第1の抗原および／または第2の抗原が、多細胞寄生虫性病原体に由来する。例示的な多細胞寄生虫性病原体には、たとえば吸虫類（吸虫）、条虫（サナダムシ）、線虫（回虫）、および節足動物が含まれる。  
40

## 【0050】

いくつかの実施形態では、第1の抗原および／または第2の抗原が、花粉アレルゲン（樹木花粉アレルゲン、薬草花粉アレルゲン、雑草花粉アレルゲン、および草花粉アレルゲン）；昆虫アレルゲンまたはクモ類アレルゲン（吸入性アレルゲン、唾液アレルゲン、および毒液アレルゲン、たとえばダニアレルゲン、ゴキブリアレルゲン、およびコバエアレルゲン、*hymenoptera*毒液アレルゲン）；動物体毛アレルゲンおよび動物ふけアレルゲン（たとえばイヌ、ネコ、ウマ、ラット、マウスなどからの）；および食物アレルゲン（たとえばグリアジン）などのアレルゲンに由来する。樹木、草および薬草からの重要な花粉アレルゲンは、分類学上のブナ目、モクセイ科（*Oleales*）、マツ目  
50

、およびスズカケノキ科、以下を含むがこれらに限定されない、カバノキ(*Betula*)、ハンノキ(*Alnus*)、ハシバミ(*Corylus*)、シデ(*Carpinus*)およびオリーブ(*Olea*)、ヒマラヤスギ(*Cryptomeria*および*Juniperus*)、スズカケノキ(*Platanus*)、*Lolium*属、*Phleum*属、*Poa*属、*Cynodon*属、*Dactylis*属、*Holcus*属、*Phalaris*属、*Secale*属、および*Sorghum*属の草を含めた*Poales*目、*Ambrosia*属、*Artemisia*属、および*Parietaria*属の薬草を含めた*Asterales*目、および*Urticales*目に由来するアレルゲンである。他の重要な吸入性アレルゲンは、*Dermatophagoides*属および*Euroglyphus*属のチリダニからの吸入性アレルゲン、コナダニ(*storage mite*)、たとえば*Lepidoglyphus*属、*Glycyphagus*属、および*Tyrophagus*属、ゴキブリ、コバエ、およびノミ、たとえば*Blattella*属、*Periplaneta*属、*Chironomus*属、および*Ctenocephalides*(*Ctenocephalides*)属からの吸入性アレルゲン、ならびにネコ、イヌ、およびウマなどの哺乳動物からの吸入性アレルゲン、ミツバチ(*Apidae*科)、スズメバチ(*Vespidae*科)、およびアリ(*Formicoidae*科)を含めた、分類学上の*Hymenoptera*目からの刺咬昆虫などの刺咬昆虫に由来する毒液アレルゲンを含めた毒液アレルゲンである。

10

## 【0051】

いくつかの実施形態では、第1の抗原および/または第2の抗原が、(a) NY-E S 0-1、SSX2、SCP1の他、RAGEファミリー、BAGEファミリー、GAGEファミリー、およびMAGEファミリーのポリペプチド、たとえばGAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、およびMAGE-12(たとえば黒色腫、肺腫瘍、頭頸部腫瘍、NSCLC腫瘍、乳房腫瘍、消化器腫瘍、および膀胱腫瘍に対処するのに使用しうる)などのがん-精巣抗原；(b)変異抗原、たとえばp53(多様な充実性腫瘍、たとえば結腸直腸がん、肺がん、頭頸部がんと関連する)、p21/Ras(たとえば黒色腫、膵臓がん、および結腸直腸がんと関連する)、CDK4(たとえば黒色腫と関連する)、MUM1(たとえば黒色腫と関連する)、カスパーゼ8(たとえば頭頸部がんと関連する)、CIA-0205(たとえば膀胱がんと関連する)、HLA-A2-R1701、ベータカテニン(たとえば黒色腫と関連する)、TCR(たとえばT細胞性非ホジキンリンパ腫と関連する)、BCR-ab1(たとえば慢性骨髄性白血病と関連する)、トリオースリン酸イソメラーゼ、KIA-0205、CDC-27、およびLDLR-FUT；(c)過剰発現抗原、たとえばガレクチン4(たとえば結腸直腸がんと関連する)、ガレクチン9(たとえばホジキン病と関連する)、プロテイナーゼ3(たとえば慢性骨髄性白血病と関連する)、WT-1(たとえば多様な白血病と関連する)、炭酸脱水酵素(たとえば腎臓がんと関連する)、アルドラーーゼA(たとえば肺がんと関連する)、PRAME(たとえば黒色腫と関連する)、HER-2/neu(たとえば乳がん、結腸がん、肺がん、および卵巣がんと関連する)、マンマグロビン、アルファ-フェトプロテイン(たとえば肝がんと関連する)、KSA(たとえば結腸直腸がんと関連する)、ガストリン(たとえば膵臓がんおよび胃がんと関連する)、テロメラーゼ触媒タンパク質、MUC-1(たとえば乳がんおよび卵巣がんと関連する)、G-250(たとえば腎細胞癌と関連する)、p53(たとえば乳がん、結腸がんと関連する)、およびがん胎児性抗原(たとえば乳がん、肺がん、および結腸直腸がんなどの消化管がんと関連する)；(d)共有抗原、たとえばMART-1/Melan A、gp100、MC1R、メラニン細胞刺激ホルモン受容体、チロシナーゼ、チロシナーゼ類縁タンパク質1/TRP1およびチロシナーゼ類縁タンパク質2/TRP2(たとえば黒色腫と関連する)などの黒色腫-メラニン細胞分化抗原；(e)たとえば前立腺がんと関連するPAP、PSA、PSMA、PSH-P1、PSM-P1、PSM-P2などの前立腺関連抗原；(f)免疫グロブリンイディオタイプ(たとえば骨髄腫およびB細胞リンパ腫と関連する)から選択される腫瘍抗原に由来する。ある実

20

30

40

50

施形態では、腫瘍免疫原に、p15、Hom/Mel-40、H-Ras、E2A-PR  
L、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、エプスタインバーウイルス抗原、  
EBNA、E6およびE7を含めたヒトパピローマウイルス(HPV)抗原、B型肝炎ウ  
イルスおよびC型肝炎ウイルス抗原、ヒトT細胞リンパ向性ウイルス抗原、TSP-18  
0、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、mn-23H1、TAG  
-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、  
p16、TAGE、PSCA、CT7、43-9F、5T4、791 Tgp72、  
ベータ-HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3(CA 27  
.29|BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68  
|KP1、CO-029、FGF-5、Ga733(EpCAM)、HTgp-175、  
M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、R  
CAS1、SDCCAG16、TA-90(Mac-2結合タンパク質/シクロフィリン  
C会合タンパク質)、TAAL6、TAG72、TLP、TPSなどが含まれるがこれら  
に限定されない。  
10

## 【0052】

## 1. CMV

ある実施形態では、第1の抗原または第2の抗原が、CMVに由来する。ある実施形態  
では、第1の抗原または第2の抗原が、カプシドタンパク質、エンベロープ糖タンパク質  
(gB、gH、gL、gM、gNなど)、またはテグメントタンパク質に由来する。ある  
実施形態では、第1の抗原または第2の抗原が、以下のタンパク質: pp65、IE1、  
gB、gD、gH、gL、gM、gN、gO、UL128、UL129、gUL130、  
UL150、UL131、UL33、UL78、US27、US28、RL5A、RL6  
、RL10、RL11、RL12、RL13、UL1、UL2、UL4、UL5、UL6  
、UL7、UL8、UL9、UL10、UL11、UL14、UL15A、UL16、U  
L17、UL18、UL22A、UL38、UL40、UL41A、UL42、UL11  
6、UL119、UL120、UL121、UL124、UL132、UL147A、U  
L148、UL142、UL144、UL141、UL140、UL135、UL136  
、UL138、UL139、UL133、UL135、UL148A、UL148B、U  
L148C、UL148D、US2、US3、US6、US7、US8、US9、US1  
0、US11、US12、US13、US14、US15、US16、US17、US1  
8、US19、US20、US21、US29、US30、またはUS34Aのうちの1  
または複数に由来する。  
20

## 【0053】

CMV抗原はまた、pp65/IE1(Reapら、Vaccine(2007年)、  
25巻:7441~7449頁)、gH/gL(Chowdaryら、Nature S  
tructural & Molecular Biology、17巻、882~88  
8頁(2010年))など、1つまたは複数のCMVタンパク質の融合ポリペプチドでも  
ありうる。

## 【0054】

適したCMV抗原には、gB、gH、gL、gOが含まれ、これらはあらゆるCMV株  
に由来しうる。たとえばCMVタンパク質は、CMVのMerlin株、AD169株、  
VR1814株、Towne株、Toledo株、TR株、PH株、TB40株、または  
Fix株に由来しうる。本発明のために使用しうるCMVタンパク質の例示的な配列を、  
表1に示す。  
40

## 【0055】

【表1】

表1

全長 gH ポリヌクレオチド	(CMV gH FL)配列番号 7
全長 gH ポリペプチド	(CMV gH FL)配列番号 8
全長 gL ポリヌクレオチド	(CMV gL FL)配列番号 11
全長 gL ポリペプチド	(CMV gL FL)配列番号 12
全長 gO ポリヌクレオチド	(CMV gO FL)配列番号 17
全長 gO ポリペプチド	(CMV gO FL)配列番号 18
gH sol ポリヌクレオチド	(CMV gH sol)配列番号 9
gH sol ポリペプチド	(CMV gH sol)配列番号 10
全長 UL128 ポリヌクレオチド	(CMV UL128 FL)配列番号 19
全長 UL128 ポリペプチド	(CMV UL128 FL)配列番号 20
全長 UL130 ポリヌクレオチド	(CMV UL130 FL)配列番号 21
全長 UL130 ポリペプチド	(CMV UL130 FL)配列番号 22
全長 UL131 ポリヌクレオチド	(CMV UL131 FL)配列番号 23
全長 UL131 ポリペプチド	(CMV UL131 FL)配列番号 24
全長 gB ポリヌクレオチド	(CMV gB FL)配列番号 1
全長 gB ポリペプチド	(CMV gB FL)配列番号 2
gB sol 750 ポリヌクレオチド	(CMV gB 750)配列番号 3
gB sol 750 ポリペプチド	(CMV gB 750)配列番号 4
gB sol 692 ポリヌクレオチド	(CMV gB 692)配列番号 5
gB sol 692 ポリペプチド	(CMV gB 692)配列番号 6
全長 gM ポリヌクレオチド	(CMV gM FL)配列番号 13
全長 gM ポリペプチド	(CMV gM FL)配列番号 14
全長 gN ポリヌクレオチド	(CMV gN FL)配列番号 15
全長 gN ポリペプチド	(CMV gN FL)配列番号 16

### g B 抗原

ある実施形態では、第1の抗原または第2の抗原が、g B 抗原でありうる。g B 抗原は、全長 g B タンパク質の場合もあり、または g B タンパク質の1つまたは複数の領域が取り除かれる場合もある。代替的に、g B タンパク質断片を使用することもできる。g B アミノ酸は、配列番号2に示される全長 g B アミノ酸配列(CMV g B F L)であって、907アミノ酸の長さである全長 g B アミノ酸配列に従い番号付けされる。全長タンパク質から取り除かれる場合もあり、または断片として包含される場合もある、適したg B タンパク質の領域は、シグナル配列(アミノ酸1~24)、g B - D L D ディスインテグリン様ドメイン(アミノ酸57~146)、フリン切断部位(アミノ酸459~460)、7アミノ酸繰り返し領域(679~693)、膜貫通ドメイン(アミノ酸751~771)、およびアミノ酸771~906に由来する細胞質ドメインを包含する。いくつかの実施形態では、g B 抗原が、アミノ酸67~86(中和エピトープであるA D 2)および/またはアミノ酸532~635(免疫優性エピトープであるA D 1)を包含する。g B 抗原の具体例には、g B の最初の692アミノ酸を包含する「g B sol 692」、

10

20

30

40

50

およびg B の最初の 750 アミノ酸を包含する「g B sol 750」が含まれる。所望に応じて、シグナル配列であるアミノ酸 1 ~ 24 を g B sol 692 内および g B sol 750 内に存在させてもよく、または存在させなくてもよい。

#### 【0056】

いくつかの実施形態では、g B 抗原が、10 アミノ酸以上の g B 断片である。たとえば断片内のアミノ酸の数は、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、または 875 アミノ酸を含みうる。

10

#### 【0057】

本発明はまた、配列番号 2 と少なくとも 75 % 同一な（たとえば配列番号 2 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一な）アミノ酸配列を含む g B 抗原も使用しうる。

#### 【0058】

##### g H 抗原

ある実施形態では、第 1 の抗原または第 2 の抗原が、g H 抗原でありうる。g H 抗原は、全長 g H タンパク質（たとえば 743 アミノ酸のタンパク質である配列番号 8 の CMV g H FL）でありうる。g H は、716 位～743 位に始まる膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを有する。717～743 のアミノ酸を除去することにより、可溶性 g H（たとえば CMV g H sol、配列番号 10）がもたらされる。

20

#### 【0059】

いくつかの実施形態では、g H 抗原が、10 アミノ酸以上の g H 断片である。たとえば断片内のアミノ酸の数は、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、または 725 アミノ酸を含みうる。

#### 【0060】

本発明はまた、配列番号 8 または 10 と少なくとも 75 % 同一な（たとえば配列番号 8 または 10 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一な）アミノ酸配列を含む g H 抗原も使用しうる。

30

#### 【0061】

##### g L 抗原

ある実施形態では、第 1 の抗原または第 2 の抗原が、g L 抗原でありうる。g H 抗原は、全長 g L タンパク質（たとえば 278 アミノ酸のタンパク質である、配列番号 12 の CMV g L FL）でありうる。代替的に g L 断片も使用することができる。たとえば断片内のアミノ酸の数は、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、または 250 アミノ酸を含みうる。

40

#### 【0062】

本発明はまた、配列番号 12 と少なくとも 75 % 同一な（たとえば配列番号 12 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一な）アミノ酸配列を含む g L 抗原も使用しうる。

#### 【0063】

##### g O 抗原

ある実施形態では、第 1 の抗原または第 2 の抗原が、g O 抗原でありうる。g O 抗原は、全長 g O タンパク質（たとえば 472 アミノ酸のタンパク質である、配列番号 18 の CMV g O FL）でありうる。

50

MV gO FL) でありうる。代替的に gO 抗原は、10 アミノ酸以上の gO 断片でもありうる。たとえば断片内のアミノ酸の数は、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、または450 アミノ酸を含みうる。

#### 【0064】

本発明はまた、配列番号 18 と少なくとも 75% 同一な(たとえば配列番号 18 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一な)アミノ酸配列を含む gO 抗原も使用しうる。

10

#### 【0065】

##### gM 抗原

ある実施形態では、第 1 の抗原または第 2 の抗原が、gM 抗原でありうる。gM 抗原は、全長 gM タンパク質(たとえば 371 アミノ酸のタンパク質である、配列番号 14 の CMV gM FL) でありうる。代替的に gM 抗原は、10 アミノ酸以上の gM 断片でもありうる。たとえば断片内のアミノ酸の数は、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、または 350 アミノ酸を含みうる。

#### 【0066】

本発明はまた、配列番号 14 と少なくとも 75% 同一な(たとえば配列番号 14 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一な)アミノ酸配列を含む gM 抗原も使用しうる。

20

#### 【0067】

##### gN 抗原

ある実施形態では、第 1 の抗原または第 2 の抗原が、gN 抗原でありうる。gN 抗原は、全長 gN タンパク質(たとえば 135 アミノ酸のタンパク質である、配列番号 16 の CMV gN FL) でありうる。代替的に gN 抗原は、10 アミノ酸以上の gN 断片でもありうる。たとえば断片内のアミノ酸の数は、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、または 125 アミノ酸を含みうる。

30

#### 【0068】

本発明はまた、配列番号 16 と少なくとも 75% 同一な(たとえば配列番号 16 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一な)アミノ酸配列を含む gN 抗原も使用しうる。

#### 【0069】

##### UL128 抗原

ある実施形態では、第 1 の抗原または第 2 の抗原が、UL128 抗原でありうる。UL128 抗原は、全長 UL128 タンパク質(たとえば 171 アミノ酸のタンパク質である、配列番号 20 の CMV UL128 FL) でありうる。代替的に UL128 抗原は、10 アミノ酸以上の UL128 断片でもありうる。たとえば断片内のアミノ酸の数は、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、または 150 アミノ酸を含みうる。

40

#### 【0070】

本発明はまた、配列番号 20 と少なくとも 75% 同一な(たとえば配列番号 20 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一な)アミノ酸配列を含む UL128 抗原も使用しうる。

#### 【0071】

##### UL130 抗原

50

ある実施形態では、第1の抗原または第2の抗原が、UL130抗原でありうる。UL130抗原は、全長UL130タンパク質(たとえば214アミノ酸のタンパク質である、配列番号22のCMV UL130 FL)でありうる。代替的にUL130抗原は、10アミノ酸以上のUL130断片でもありうる。たとえば断片内のアミノ酸の数は、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、または200アミノ酸を含みうる。

#### 【0072】

本発明はまた、配列番号22と少なくとも75%同一な(たとえば配列番号22と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一な)アミノ酸配列を含むUL130抗原も使用しうる。

10

#### 【0073】

##### UL131抗原

ある実施形態では、第1の抗原または第2の抗原が、UL131抗原でありうる。UL131抗原は、全長UL131タンパク質(たとえば129アミノ酸のタンパク質である、配列番号24のCMV UL131)でありうる。代替的にUL131抗原は、10アミノ酸以上のUL131断片でもありうる。たとえば断片内のアミノ酸の数は、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、または200アミノ酸を含みうる。

20

#### 【0074】

本発明はまた、配列番号24と少なくとも75%同一な(たとえば配列番号24と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一な)アミノ酸配列を含むUL131抗原も使用しうる。

30

#### 【0075】

CMV抗原は、融合ポリペプチドでありうる。たとえば抗原は、第1のドメインと第2のドメインとを含むことができ、ここで、(i)第1のドメインは、第1のCMV抗原を含み、(ii)第2のドメインは、第2のCMV抗原を含む。第1のCMV抗原と第2のCMV抗原とは、上記のgB抗原、gH抗原、gL抗原、gO抗原、gM抗原、gN抗原、UL128抗原、UL130抗原、またはUL131抗原から独立に選択される。

#### 【0076】

##### 複合体

また、2つ以上のCMV抗原を、それらがin vivoにおいて複合体(たとえばgH/gL複合体、gM/gN複合体、gH/gL/UL128/UL130/UL131五量体複合体)を形成するように共送達してもよい。たとえば免疫原性組成物は、2つの別個の抗原、gHおよびgLをコードするRNA分子を含みうる。免疫原性組成物はまた、2つのポリペプチド抗原、gHおよびgLも含みうる。

#### 【0077】

##### 2. パルボウイルス

ある実施形態では、ポリペプチド抗原が、パルボウイルスに由来する。パルボウイルスは、ヒトに感染する、すなわち、*Dependovirus*属、*Erythrovirus*属、または*Bocavirus*属のパルボウイルスであることが好ましい。ある実施形態では、パルボウイルスが、パルボウイルスB19である。いくつかの実施形態では、パルボウイルスが、*Parvovirus*属に由来する。パルボウイルスB19は、小型DNAウイルスの*Parvoviridae*科の*Erythrovirus*属に属する。パルボウイルスB19とは、一本鎖の直鎖状DNAゲノムを含有する非エンベロープ型の二十面体ウイルスである。パルボウイルスB19のビリオンは、直径20~25nmで、5.6kbのゲノムを有する(Clewley, 1984年、Cotmore & Tattersall, 1984年)。パルボウイルスB19のカプシドは、83kDaの副次構造タンパク質(minor structural protein)であるVP1と

40

50

、58kDaの主要構造タンパク質(major structural protein)であるVP2とからなる。パルボウイルスB19は、2つの構造タンパク質であるVP1とVP2とを約5%～約95%の比で含有するタンパク質の外皮で取り囲まれた非分節型一本鎖DNAゲノムを有する(Ozawaら、1987年)。2つのタンパク質の配列は、VP2がVP1のカルボキシル末端領域と同一な共直鎖状であるが、VP1は、さらなる227アミノ酸をアミノ末端に含む。長期持続性の抗体応答は、VP1タンパク質およびVP2タンパク質の両方を指向し、したがって、これらのタンパク質だけでも著明な免疫反応をもたらすと予測されている。

## 【0078】

パルボウイルスB19のゲノムは、3つのオープンリーディングフレームを含有する：77kDaの非構造タンパク質であるNS1は、ヌクレオチド436～2451によりコードされ；副次構造タンパク質であるVP1は、ヌクレオチド2444～4787によりコードされ、主要構造タンパク質であるVP2は、ヌクレオチド3125～4787によりコードされる(Corcoranら、J. Med. Microb.、2004年)。パルボウイルスB19は、構造遺伝子と非構造遺伝子とを示差的に発現させることができ単一のプロモーターであるp6を使用する(Blundellら、1987年、Ozawaら、1987年)。前出の番号付けは、パルボウイルスB19ゲノムのヌクレオチド配列に照らしたものであるが、また、パルボウイルスの他の遺伝子型および分離株から得られる配列中の対応する位置も、本発明により包含されると意図されると理解されたい。VP1タンパク質またはVP2タンパク質の他、これらの免疫原性断片など、これらの改変体、およびこのようなタンパク質をコードする核酸のうちのいずれか1つを、本発明を実施するのに使用することができる。

10

20

30

## 【0079】

ある実施形態では、パルボウイルス抗原が、VLPである。VLPは、あらゆる所望のパルボウイルスに由来するVP1およびVP2、またはあらゆる所望の組み合わせを含有しうる。いくつかの実施形態では、VP1タンパク質およびVP2タンパク質が、天然に存在するパルボウイルスのVP1もしくはVP2と同じであるもしくは実質的に同じアミノ酸配列を有する場合もあり、または1つもしくは複数のアミノ酸の置換、欠失、もしくは付加を含有する場合もある。たとえば、VP1を変異させて、そのホスホリパーゼ活性を不活化させることができる。たとえば、VP1のアミノ酸配列は、点変異(たとえば、His153Ala)を含有する場合もあり、またはWO06/032697、EP1791858、もしくはUS20070286870において記載される変異のうちのいずれかを含有する場合もある。VLPは、ヒトに感染するパルボウイルス、すなわち、Dependovirus属、Erythrovirus属、またはBocavirus属のパルボウイルスに由来するVP1およびVP2を含有することが好ましい。ある実施形態では、VLPが、パルボウイルスB19のVP1およびパルボウイルスB19のVP2を含有する。

30

## 【0080】

ある実施形態では、VLPが、個別の制御エレメントがVP1およびVP2をコードする核酸に作動可能に連結される結果として、かつ/または最適化されたコドン使用および脱最適化されたコドン使用など、VP1およびVP2をコードする組換え核酸の他の特色的結果として、VP1を、VP2と比べて低い存在量で含む(たとえば、可溶性VP1が、可溶性VP2より低い存在量で產生される)。このような制御エレメント(たとえば、プロモーター)および特色(たとえば、コドン使用)により、VP1およびVP2の相対的產生の制御が可能となる。

40

## 【0081】

本発明のために使用されるパルボウイルスタンパク質の例示的な配列を、表2に示す。

## 【0082】

## 【表2-1】

表2:パルボウイルス抗原

パルボウイルス B19 の VP1	(ParvoB19.Opti.VP1) ポリヌクレオチド配列番号 25(配列番号 25 の大文字で示されるオープシリーディングフレームによりコードされるポリペプチド)
パルボウイルス B19 の VP2	(ParvoB19.Opti.VP2) ポリヌクレオチド配列番号 26 (配列番号 26 の大文字で示されるオープシリーディングフレームによりコードされるポリペプチド)

10

## 3. RSV

いくつかの態様では、病原体が RSV である。RSV とは、Paramyxoviridae 科、Pneumovirus 属のエンベロープ非分節型マイナス鎖 RNA ウィルスである。宿主細胞に感染するために、RSV などのパラミクソウイルスは、インフルエンザウィルスおよび HIV など、他のエンベロープウィルスと同様に、ウイルス膜の宿主細胞の膜との融合を必要とする。RSV では、保存された融合タンパク質 (RSV-F 糖タンパク質) が、不可逆的なタンパク質リフォールディングを、膜の並置とカップリングさせることにより、ウイルス膜および細胞膜を融合する。パラミクソウイルス研究に基づく最新のモデルでは、RSV-F タンパク質が、まず準安定性の「融合前」コンフォメーションへとフォールドする。細胞への侵入時に、融合前コンフォメーションは、リフォールディングおよびコンフォメーション変化を経て、その安定性の「融合後」コンフォメーションへと至る。融合前 RSV-F 構造および融合後 RSV-F 構造に関してはまた、Swansonら、PNAS USA、108巻(23号): 9619~9624頁(2011年)も参照されたい。

20

## 【0083】

ある実施形態では、第1の抗原および第2の抗原が、RSV に由来する。たとえば第1の抗原と第2の抗原とは、RSV 表面糖タンパク質融合体 (F)、糖タンパク質 (G)、低分子疎水性タンパク質 (SH)、マトリックスタンパク質 M および M2、ヌクレオカプシドタンパク質 N、P、および L、ならびに非構造タンパク質 NS1 および NS2 に独立に由来しうる。ある好ましい実施形態では、第1の抗原および第2の抗原の各々が、RSV-F 抗原である。

30

## 【0084】

RSV の F 糖タンパク質とは、4つの一般的ドメイン : N 末端 E R 輸送シグナル配列 (SS)、細胞外ドメイン (ED)、膜貫通型ドメイン (TM)、および細胞質テール (CT) を有する I 型 1 回貫通型内在性膜タンパク質である。CT は、単一のパルミトイル化されたシステイン残基を含有する。F タンパク質の配列は、RSV 分離株間で高度に保存されているが、常に進化しつつある (Kimmら(2007年)、J Med Virol、79巻: 820~828頁)。大半のパラミクソウイルスと異なり、RSV 中の F タンパク質は、他のウイルスタンパク質とは異なり、侵入および合胞体の形成を媒介しうる(他のパラミクソウイルスでは通例、F に加えて HN が必要である)。

40

## 【0085】

RSV-F 糖タンパク質は、mRNA から、F₀ と称する約 574 アミノ酸のタンパク質へと翻訳される。F₀ の翻訳後プロセシングは、小胞体内のシグナルペプチダーゼによ

50

るN末端シグナルペプチドの除去を包含する。F<sub>0</sub>はまた、トランスゴルジ内の細胞性プロテアーゼ(特にフリン)により、2つの部位(およそ109/110およびおよそ136/137)においても切断される。この切断は、短い介在型配列の除去を結果としてもたらし、互いと会合させたままにするF<sub>1</sub>(約50kDa; C末端;およそ残基137~574)およびF<sub>2</sub>(約20kDa; N末端;およそ残基1~109)と称する2つのサブユニットを発生させる。F<sub>1</sub>は、そのN末端において疎水性の融合ペプチドを含有し、また、2つの両親媒性の7アミノ酸反復領域(HRAおよびHRB)も含有する。HRAは、融合ペプチドの近傍にあり、HRBは、膜貫通ドメインの近傍にある。3つのF<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>ヘテロ二量体は、ビリオンにおいてF<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>のホモ三量体としてアセンブルされる。

10

## 【0086】

本明細書で記載される免疫原性組成物中に包含させるのに適したRSV-F抗原であって、RNAによりコードされる形態におけるRSV-F抗原またはポリペプチドとしてのRSV-F抗原には、RSV-F糖タンパク質およびRSV-F糖タンパク質改変体が含まれる。適したRSV-F糖タンパク質改変体には、たとえば各々がフリン切断の変異、トリプシン切断の変異、融合ペプチドの変異(たとえば全体または部分における欠失)、HRB三量体を安定化させる変異、およびHRA三量体を不安定化させる変異など、1つまたは複数の変異を任意選択により含有する、全長Fタンパク質、ならびに可溶性細胞外ドメインなどの切削型改変体が含まれる。

20

## 【0087】

当技術分野では、1つまたは複数のこのような変異を多様な組み合わせで有する全長RSV-F糖タンパク質および切削型RSV-F糖タンパク質を含め、全長RSV-F糖タンパク質および切削型RSV-F糖タンパク質が周知であり、たとえばその開示が参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、WO2011/008974において開示されている。

## 【0088】

当業者には、免疫原性組成物中においてRNA形態で使用してもよく、またはポリペプチドとして使用してもよい、例示的なRSV-F抗原について開示しているWO2011/008974の以下の節への参照を指示する:(i) RSV-F、そのアミノ酸配列およびドメイン構造について記載する15頁の20行目~16頁の27行目;(ii) RSV-Fの可溶性細胞外ドメインについて記載する16頁の28行目~18頁の11行目;(iii) フリン切削の変異、トリプシン切削の変異、融合ペプチドの変異について記載する18頁の14行目~20頁の15行目;(iv) 任意選択のオリゴマー化配列について記載する20頁の16行目~21頁の8行目および26頁の29行目~30頁の14行目;(v) プロテアーゼ切削部位の導入について記載する20頁の9~24行目;(vi) ならびにHRB三量体を安定化させ、HRA三量体を不安定化させる変異、および包含されうる他の変異について記載する30頁の18行目~32頁の18行目。

30

## 【0089】

## B. RNA分子

本明細書で記載される免疫原性組成物は、RNA成分とポリペプチド成分とを含む。RNAは、自己複製RNAであることが好ましい。

40

## 【0090】

組成物は、抗原をコードする1つより多いRNA分子、たとえば2つ、3つ、5つ、10以上のRNA分子を含有しうる。代替的にまたは加えて、1つのRNA分子はまた、1つより多い抗原もコードすることが可能であり、たとえば異なる抗原または同一な抗原をコードするバイリストロニックRNA分子またはトリリストロニックRNA分子でもあります。

## 【0091】

RNA分子の配列は、ヒト細胞など所望の宿主における発現についてコドン最適化されていてよく、または脱最適化されていてよい。

50

## 【0092】

R N A 分子の配列は、所望の場合、たとえば R N A の発現または複製の有効性を増大させるように修飾してもよく、またはさらなる安定性または分解に対する耐性をもたらすように修飾してもよい。たとえば R N A 配列は、そのコドン使用に関して修飾して、たとえば R N A の翻訳有効性を増大させ、半減期を延長することができる。ポリ A テール（たとえば約 30 以上のアデノシン残基の）を、R N A の 3' 末端へと付着させて、その半減期を延長することができる。R N A の 5' 末端は、構造 m<sub>7</sub>G (5') p p p (5') N (キャップ 0 構造) またはその誘導体であって、R N A 合成の間に組み込むこともでき、R N A の転写後において酵素的に操作することもできる（たとえば m R N A トリホスファターゼ、グアニリルトランスフェラーゼ、およびグアニン-7-メチルトランスフェラーゼからなるワクシニアウイルスキャッピング酵素（V C E）であって、N 7 - モノメチル化されたキャップ 0 構造の構築を触媒する V C E を使用することにより）、キャップ 0 構造またはその誘導体を有する修飾リボヌクレオチドでキャップすることができる。キャップ 0 構造は、R N A 分子の安定性および翻訳有効性の維持において重要な役割を果たす。R N A 分子の 5' 側キャップは、キャップ 1 構造 (m<sub>7</sub>G p p p [m 2' - O] N) の生成を結果としてもたらす 2' - O - メチルトランスフェラーゼによりさらに修飾することができ、これにより、翻訳有効性をさらに増大させることができる。

10

## 【0093】

所望の場合、R N A 分子は、あらゆる 5' 側キャップ構造に加えて、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドも含みうる。哺乳動物の R N A では、96 を超える天然に存在するヌクレオシド修飾が見出されている。たとえば Limbach から、Nucleic Acids Research, 22巻(12号) : 2183 ~ 2196 頁(1994年) を参照されたい。当技術分野では、ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドならびに修飾ヌクレオシドの調製が、たとえばそれらのすべてが参考によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第 4 3 7 3 0 7 1 号、同第 4 4 5 8 0 6 6 号、同第 4 5 0 0 7 0 7 号、同第 4 6 6 8 7 7 7 号、同第 4 9 7 3 6 7 9 号、同第 5 0 4 7 5 2 4 号、同第 5 1 3 2 4 1 8 号、同第 5 1 5 3 3 1 9 号、同第 5 2 6 2 5 3 0 号、同第 5 7 0 0 6 4 2 号から周知であり、多くの修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドが市販されている。

20

## 【0094】

修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドへと組み込むことが可能であり、R N A 分子内に存在させうる修飾核酸塩基には、m<sub>5</sub>C (5 - メチルシチジン)、m<sub>5</sub>U (5 - メチルウリジン)、m<sub>6</sub>A (N 6 - メチルアデノシン)、s<sub>2</sub>U (2 - チオウリジン)、U<sub>m</sub> (2' - O - メチルウリジン)、m<sub>1</sub>A (1 - メチルアデノシン)；m<sub>2</sub>A (2 - メチルアデノシン)；A<sub>m</sub> (2 - 1 - O - メチルアデノシン)；m<sub>s</sub>2m<sub>6</sub>A (2 - メチルチオ - N 6 - メチルアデノシン)；i<sub>6</sub>A (N 6 - イソペンテニルアデノシン)；m<sub>s</sub>2i<sub>6</sub>A (2 - メチルチオ - N 6 イソペンテニルアデノシン)；i<sub>o</sub>6A (N 6 - (c i s - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン)；m<sub>s</sub>2i<sub>o</sub>6A (2 - メチルチオ - N 6 - (c i s - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン)；g<sub>6</sub>A (N 6 - グリシニルカルバモイルアデノシン)；t<sub>6</sub>A (N 6 - トレオニルカルバモイルアデノシン)；m<sub>s</sub>2t<sub>6</sub>A (2 - メチルチオ - N 6 - トレオニルカルバモイルアデノシン)；m<sub>6</sub>t<sub>6</sub>A (N 6 - メチル - N 6 - トレオニルカルバモイルアデノシン)；h<sub>n</sub>6A (N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)；m<sub>s</sub>2h<sub>n</sub>6A (2 - メチルチオ - N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)；A<sub>r</sub>(p) (2' - O - リボシルアデノシン(ホスフエート))；I (イノシン)；m<sub>1</sub>I (1 - メチルイノシン)；m' I m (1, 2' - O - ジメチルイノシン)；m<sub>3</sub>C (3 - メチルシチジン)；C<sub>m</sub> (2 T - O - メチルシチジン)；s<sub>2</sub>C (2 - チオシチジン)；a<sub>c</sub>4C (N 4 - アセチルシチジン)；f<sub>5</sub>C (5 - ホンニルシチジン)；m<sub>5</sub>C m (5, 2 - O - ジメチルシチジン)；a<sub>c</sub>4C m (N 4 アセチル 2 T O メチルシチジン)；k<sub>2</sub>C (リシジン)；m<sub>1</sub>G (1 - メチルグアノシン)；m<sub>2</sub>G (N 2 - メチルグアノシン)；m<sub>7</sub>G (7 - メチルグアノシン)；G<sub>m</sub> (2' - O - メチルグアノシン)；m<sub>2</sub>2G (N 2, N 2 - ジメチルグアノシン)；m<sub>2</sub>G m (50

30

40

50

N<sub>2</sub>, 2'- - O - ジメチルグアノシン) ; m<sub>2</sub> 2 Gm (N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, 2' - O - トリメチルグアノシン) ; Gr (p) (2' - O - リボシリルグアノシン(ホスフェート)) ; yW (ウィブトシン) ; o<sub>2</sub>yW (ペルオキシウィブトシン) ; OHyW (ヒドロキシウィブトシン) ; OHyW\* (修飾不十分なヒドロキシウィブトシン) ; imG (ウイオシン) ; mimG (メチルグアノシン) ; Q (クオイオシン) ; oQ (エボキシクオイオシン) ; galQ (ガルタクトシル - クオイオシン) ; manQ (マンノシル - クオイオシン) ; preQo (7 - シアノ - 7 - デアザグアノシン) ; preQi (7 - アミノメチル - 7 - デアザグアノシン) ; G\* (アルカエオシン) ; D (ジヒドロウリジン) ; m<sub>5</sub>Um (5, 2' - O - ジメチルウリジン) ; s<sub>4</sub>U (4 - チオウリジン) ; m<sub>5</sub>s<sub>2</sub>U (5 - メチル - 2 - チオウリジン) ; s<sub>2</sub>Um (2 - チオ - 2' - O - メチルウリジン) ; ac<sub>p</sub>3U (3 - (3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル)ウリジン) ; ho5U (5 - ヒドロキシウリジン) ; mo5U (5 - メトキシウリジン) ; cmo5U (ウリジン5 - オキシ酢酸) ; cmcmo5U (ウリジン5 - オキシ酢酸メチルエステル) ; chm5U (5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン) ; mchm5U (5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル) ; cmcm5U (5 - メトキシカルボニルメチルウリジン) ; cmcm5Um (S - メトキシカルボニルメチル - 2 - O - メチルウリジン) ; cmcm5s2U (5 - メトキシカルボニルメチル - 2 - チオウリジン) ; nm5s2U (5 - アミノメチル - 2 - チオウリジン) ; mnmm5U (5 - メチルアミノメチルウリジン) ; mnmm5s2U (5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウリジン) ; mnmm5se2U (5 - メチルアミノメチル - 2 - セレノウリジン) ; nc<sub>m</sub>5U (5 - カルバモイルメチルウリジン) ; nc<sub>m</sub>5Um (5 - カルバモイルメチル - 2' - O - メチルウリジン) ; cmnm5U (5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - L - オメチルウリジン) ; cmnm5s2U (5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン) ; m<sub>6</sub>2A (N<sub>6</sub>, N<sub>6</sub> - ジメチルアデノシン) ; Tm (2' - O - メチルイノシン) ; m<sub>4</sub>C (N<sub>4</sub> - メチルシチジン) ; m<sub>4</sub>Cm (N<sub>4</sub>, 2 - O - ジメチルシチジン) ; hm5C (5 - ヒドロキシメチルシチジン) ; m<sub>3</sub>U (3 - メチルウリジン) ; cm5U (5 - カルボキシメチルウリジン) ; m<sub>6</sub>A<sub>m</sub> (N<sub>6</sub>, T - O - ジメチルアデノシン) ; rn<sub>6</sub>2Am (N<sub>6</sub>, N<sub>6</sub>, O - 2 - トリメチルアデノシン) ; m<sub>2</sub>'7G (N<sub>2</sub>, 7 - ジメチルグアノシン) ; m<sub>2</sub>'2'7G (N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, 7 - トリメチルグアノシン) ; m<sub>3</sub>Um (3, 2T - O - ジメチルウリジン) ; m<sub>5</sub>D (5 - メチルジヒドロウリジン) ; f<sub>5</sub>Cm (5 - ホルミル - 2' - O - メチルシチジン) ; m<sub>1</sub>Gm (1, 2' - O - ジメチルグアノシン) ; m'A<sub>m</sub> (1, 2 - O - ジメチルアデノシン) イリノメチルウリジン) ; tm<sub>5</sub>s<sub>2</sub>U (S - タウリノメチル - 2 - チオウリジン) ; imG - 14 (4 - デメチルグアノシン) ; imG2 (イソグアノシン) ; ac<sub>6</sub>A (N<sub>6</sub> - アセチルアデノシン) 、ヒポキサンチン、イノシン、8 - オキソ - アデニン、その7置換誘導体、ジヒドロウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - アミノウラシル、5 - (C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub>) - アルキルウラシル、5 - メチルウラシル、5 - (C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub>) - アルケニルウラシル、5 - (C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub>) - アルキニルウラシル、5 - (ヒドロキシメチル)ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - ヒドロキシシトシン、5 - (C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub>) - アルキルシトシン、5 - メチルシトシン、5 - (C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub>) - アルケニルシトシン、5 - (C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub>) - アルキニルシトシン、5 - クロロシトシン、5 - フルオロシトシン、5 - ブロモシトシン、N<sup>2</sup> - ジメチルグアニン、7 - デアザグアニン、8 - アザグアニン、7 - デアザ - 7 - 置換グアニン、7 - デアザ - 7 - (C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub>) アルキニルグアニン、7 - デアザ - 8 - 置換グアニン、8 - ヒドロキシグアニン、6 - チオグアニン、8 - オキソグアニン、2 - アミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、2, 4 - ジアミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、8 - アザプリン、置換7 - デアザプリン、7 - デアザ - 7 - 置換プリン、7 - デアザ - 8 - 置換プリン、水素(非塩基性残渣)、m<sub>5</sub>C、m<sub>5</sub>U、m<sub>6</sub>A、s<sub>2</sub>U、W、または2' - O - メチル - Uが含まれる。これらの修飾核酸塩基およびそれらの対応するリボヌクレオシドの多くは、商業的販売元から入手可能である。

10

20

30

40

50

る。たとえば参照により本明細書に組み込まれる、WO 2011 / 005799 を参照されたい。

#### 【0095】

所望の場合、RNA分子は、ホスホルアミデート連結、ホスホロチオエート連結、および/またはメチルホスホネート連結を含有しうる。

#### 【0096】

いくつかの実施形態では、RNA分子が、修飾ヌクレオチドを包含しない、たとえば修飾核酸塩基を包含せず、RNA分子内のすべてのヌクレオチドが、たとえば7'-メチルグアノシンが含まれうる任意選択の5'側キャップを除き、通常の標準的なリボヌクレオチドA、U、G、およびCである。他の実施形態では、RNAが、7'-メチルグアノシンを含む5'側キャップを包含することが可能であり、最初の1つ、2つ、または3つの5'側リボヌクレオチドを、リボースの2'位でメチル化することができる。  
10

#### 【0097】

##### 自己複製RNA

いくつかの態様では、カチオン性水中油エマルジョンが、自己複製RNA分子を含有する。ある実施形態では、自己複製RNA分子が、アルファウイルスに由来するまたはこれに基づく。

#### 【0098】

当技術分野では、自己複製RNA分子が周知であり、たとえばアルファウイルスに由来する複製エレメントを使用し、ウイルス構造タンパク質を、目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列で置換することにより作製することができる。自己複製RNAでトランسفェクトされた細胞は、アポトーシスによる死滅を経る前の短時間にわたり、抗原を産生する。この死滅は、樹状細胞を超活性化することもまた示されている、必須の二本鎖(ds)RNA中間体の結果である可能性が高い。したがって、自己複製RNAの免疫原性の増強は、宿主細胞のRNAウイルス感染を模倣する炎症促進性dsRNAの産生の結果でありうる。  
20

#### 【0099】

自己複製RNA分子により、細胞機構が、細胞内に蓄積されうるまたは細胞から分泌されうるタンパク質または抗原など、コードされる遺伝子産物の指數関数的増大を発生させるように使用されると有利である。自己複製RNA分子によるタンパク質または抗原の過剰発現は、トランسفェクトされた細胞のアポトーシスを誘発する、RNAの複製産物および増幅産物ならびに翻訳産物による、t o l 1様受容体(TLR)3経路、TLR7経路、およびTLR8経路、ならびに非TLR(たとえば、RIG-1、MD-5)経路の刺激を含めた免疫刺激性アジュvant効果を利用する。  
30

#### 【0100】

自己複製RNAは、一般的に、ウイルスレプリカーゼ、ウイルスプロテアーゼ、ウイルスヘリカーゼ、および他の非構造ウイルスタンパク質からなる群より選択される少なくとも1つまたは複数の遺伝子を含有し、また、5'末端および3'末端のシス活性複製配列ならびに所望の場合、所望のアミノ酸配列(たとえば目的の抗原)をコードする異種配列を含む。異種配列の発現を誘導するサブゲノムプロモーターは、自己複製RNA中に包含することができる。所望の場合、異種配列(たとえば目的の抗原)は、自己複製RNAにおける他のコード領域に対してインフレームで融合させてもよく、かつ/または内部リボソーム導入部位(IRES)の制御下に置いてもよい。  
40

#### 【0101】

ある実施形態では、自己複製RNA分子をウイルス様粒子内に被包しない。本発明の自己複製RNA分子は、自己複製RNA分子が感染性ウイルス粒子の产生を誘発することができないように、設計することができる。これは、たとえば、自己複製RNAにおけるウイルス粒子の产生に必要な構造タンパク質をコードする1つまたは複数のウイルス遺伝子を取り除くことによって達成することができる。たとえば、自己複製RNA分子が、シンドビスウイルス(Sinobisウイルス)(SIN)、セムリキ森林ウイルス、および  
50

ベネズエラウマ脳炎ウイルス( VEE )などのアルファウイルスに基づくものである場合は、カプシドおよび / またはエンベロープ糖タンパク質などのウイルス構造タンパク質をコードする 1 つまたは複数の遺伝子を取り除くことができる。

#### 【 0102 】

所望の場合、本発明の自己複製 RNA 分子は、弱毒化されたもしくは毒性のある感染性ウイルス粒子の産生を誘発するようにまたは 1 回の続く感染が可能なウイルス粒子を産生するように設計することができる。

#### 【 0103 】

自己複製 RNA 分子は、脊椎動物細胞に送達された場合、それ自体からの（またはそれ自体のアンチセンスコピーからの）転写によって複数の娘 RNA の産生を導くことができる。自己複製 RNA は、細胞に送達した後に、直接翻訳することができ、この翻訳は、送達された RNA から転写物をその後產生する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを提供する。したがって、送達された RNA は、複数の娘 RNA の産生を導く。これらの転写物は、送達された RNA に関してアンチセンスであり、遺伝子産物の in situ 発現をもたらすためにそれら自体翻訳されてもよい、または遺伝子産物の in situ 発現を提供するために翻訳される、送達された RNA と同じセンスを有するさらなる転写物を提供するために転写されてもよい。

10

#### 【 0104 】

自己複製を達成するのに適した 1 つの系は、アルファウイルスベースの RNA レプリコンを使用することである。アルファウイルスは、遺伝子的、構造的、および血清学的に類縁の一連の Togaviridae 科の節足動物媒介性ウイルスを含む。26 の公知のウイルスおよびウイルス亜型が、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウィルス、およびベネズエラウマ脳炎ウイルスを含めた、アルファウイルス属内に分類されている。本発明の自己複製 RNA はそれ自体、セムリキ森林ウイルス( SFV )、シンドビスウイルス( SIN )、ベネズエラウマ脳炎ウイルス( VEE )、ロスリバーウイルス( RRV )、またはアルファウイルス科に属する他のウイルスに由来する RNA レプリカーゼを組み込みうる。

20

#### 【 0105 】

本発明では、アルファウイルスベースの「レプリコン」による発現ベクターを使用することができる。レプリコンベクターは、DNA 、 RNA 、および組換えレプリコン粒子を含めた複数のフォーマットで用いることができる。このようなレプリコンベクターは、たとえばシンドビスウイルス( Xiong ら( 1989 年)、 Science 、 243 卷 : 1188 ~ 1191 頁 ; Dubensky ら( 1996 年)、 J . Virology 、 70 卷 : 508 ~ 519 頁 ; Hariharan ら( 1998 年)、 J . Virology 、 72 卷 : 950 ~ 958 頁 ; Polio ら( 1999 年)、 PNAS 、 96 卷 : 4598 ~ 4603 頁 ) 、セムリキ森林ウイルス( Liljestrom( 1991 年)、 Bio / Technology 、 9 卷 : 1356 ~ 1361 頁 ; Berglund ら( 1998 年)、 Nat . Biotech . 、 16 卷 : 562 ~ 565 頁 ) 、およびベネズエラウマ脳炎ウイルス( Pushko ら( 1997 年)、 Virology 、 239 卷 : 389 ~ 401 頁 ) が含まれるアルファウイルスに由来している。アルファウイルスに由来するレプリコンは、全体的な特徴( たとえば構造、複製 )において一般的にきわめて類似しているが、個別のアルファウイルスは、固有ないいくつかの特定の特性( たとえば受容体結合、インターフェロン感受性、および疾患プロファイル )を呈示しうる。したがって、様々なウイルス科から作製されるキメラアルファウイルスレプリコンもまた有用でありうる。

30

#### 【 0106 】

アルファウイルスに基づくレプリコンは、レプリカーゼ( またはレプリカーゼ - トランスクリプターゼ )を產生するために細胞に送達した後に翻訳され得る( + )鎖レプリコンである。レプリカーゼは、 + 鎖送達 RNA のゲノム( - )鎖コピーを生成する複製複合体を提供するために自己切断するポリプロテインとして翻訳される。これらの( - )鎖転写物は、( + )鎖の親 RNA のさらなるコピーを提供するために、また、所望の遺伝子産物

40

50

をコードするサブゲノム転写物をも提供するために、それら自身を転写することができる。サブゲノム転写物の翻訳は、したがって、感染細胞による所望の遺伝子産物の *in situ* 発現を導く。適したアルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスなどに由来するレプリカーゼを使用することができる。

## 【0107】

好みしい自己複製 RNA 分子は、したがって、(i) 自己複製 RNA 分子から RNA を転写することができる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼおよび(ii) ポリペプチド抗原をコードする。ポリメラーゼは、たとえばアルファウイルスタンパク質 nsP4 を含むアルファウイルスレプリカーゼでありうる。

10

## 【0108】

天然アルファウイルスゲノムは、非構造レプリカーゼに加えて構造ビリオンタンパク質をコードするのに対して、本発明のアルファウイルスベースの自己複製 RNA 分子は、アルファウイルス構造タンパク質をコードしないことが好みしい。したがって、自己複製 RNA は、RNA 含有アルファウイルスピリオンの产生ではなく、細胞におけるそれ自体のゲノム RNA コピーの产生を導くことができる。これらのビリオンを产生することができないということは、野生型アルファウイルスと異なり、自己複製 RNA 分子が感染性形態でそれ自体を永続させることができないことを意味する。野生型ウイルスにおいて永続化に必要なアルファウイルス構造タンパク質は、本発明の自己複製 RNA に存在せず、それらの場所は、所望の遺伝子産物をコードする遺伝子（複数可）によって使用され、サブゲノム転写物は、構造アルファウイルスピリオンタンパク質ではなく所望の遺伝子産物をコードする。

20

## 【0109】

したがって、本発明による有用な自己複製 RNA 分子は、2つのオープンリーディングフレームを有しうる。第1の(5')オープンリーディングフレームは、レプリカーゼをコードし、第2の(3')オープンリーディングフレームは、ポリペプチド抗原をコードする。いくつかの実施形態では、RNA は、たとえば別の所望の遺伝子産物をコードする、追加の(下流)オープンリーディングフレームを有していてもよい。自己複製 RNA 分子は、コードされるレプリカーゼと適合性の 5' 配列を有することができる。

30

## 【0110】

他の態様では、自己複製 RNA 分子は、アルファウイルス以外のウイルス、好みくはプラス鎖 RNA ウイルスおよびより好みくはピコルナウイルス、フラビウイルス、ルビウイルス、ペストウイルス、ヘパシウイルス、カリシウイルス、またはコロナウイルスに由来するまたはそれに基づく。適した野生型アルファウイルス配列は、周知であり、American Type Culture Collection、Rockville、Md.などの配列保管機関から入手可能である。適したアルファウイルスの代表的な例は、アウラ(ATCC VR-368)、ベバルウイルス(ATCC VR-600、ATCC VR-1240)、カバス(Cabassou)(ATCC VR-922)、チクングニヤウイルス(ATCC VR-64、ATCC VR-1241)、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス(ATCC VR-65、ATCC VR-1242)、フォートモーガン(ATCC VR-924)、ゲタウイルス(ATCC VR-369、ATCC VR-1243)、キジラガチ(ATCC VR-927)、マヤロ(ATCC VR-66)、マヤロウイルス(ATCC VR-1277)、ミッデルブルグ(ATCC VR-370)、ムカンボウイルス(ATCC VR-580、ATCC VR-1244)、ヌドゥム(ATCC VR-371)、ピクスナウイルス(ATCC VR-372、ATCC VR-1245)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373、ATCC VR-1246)、セムリキ森林(ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、シンドビスウイルス(ATCC VR-68、ATCC VR-1248)、トナテ(Tonate)(ATCC VR-925)、トリニティ(ATCC VR-469)、ユナ(ATCC VR-374)、ベネズエラウマ脳脊髄炎(ATCC VR-69)

40

50

、ATCC VR - 923、ATCC VR - 1250、ATCC VR - 1249、ATCC VR - 532)、西部ウマ脳脊髄炎(ATCC VR - 70、ATCC VR - 1251、ATCC VR - 622、ATCC VR - 1252)、ワタロア(ATCC VR - 926)、およびY - 62 - 33(ATCC VR - 375)を含む。

#### 【0111】

本発明の自己複製RNA分子は、他の種類のRNA(たとえばmRNA)より大型である。典型的に、本発明の自己複製RNA分子は、少なくとも約4kbを含有する。たとえば自己複製RNAは、少なくとも約5kb、少なくとも約6kb、少なくとも約7kb、少なくとも約8kb、少なくとも約9kb、少なくとも約10kb、少なくとも約11kb、少なくとも約12kb、または12kb超を含有しうる。ある例では、自己複製RNAが、約4kb～約12kb、約5kb～約12kb、約6kb～約12kb、約7kb～約12kb、約8kb～約12kb、約9kb～約12kb、約10kb～約12kb、約11kb～約12kb、約5kb～約11kb、約5kb～約10kb、約5kb～約9kb、約5kb～約8kb、約5kb～約7kb、約5kb～約6kb、約6kb～約12kb、約6kb～約11kb、約6kb～約10kb、約6kb～約9kb、約6kb～約8kb、約6kb～約7kb、約7kb～約11kb、約7kb～約10kb、約7kb～約9kb、約7kb～約8kb、約8kb～約11kb、約8kb～約10kb、約8kb～約9kb、約9kb～約11kb、約9kb～約10kb、または約10kb～約11kbである。

10

#### 【0112】

本発明の自己複製RNA分子は、1つまたは複数の修飾ヌクレオチド(たとえばブソイドウリジン、N6-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジン)を含みうる。

20

#### 【0113】

自己複製RNA分子は、単一のポリペプチド抗原をコードすることもでき、任意選択により、配列の各々がアミノ酸配列として発現したときにその同一性を保持する方式で併せて連結された(たとえば直列で連結された)ポリペプチド抗原の2つ以上をコードすることもできる。したがって、自己複製RNAから生成したポリペプチドは、融合ポリペプチドとして作製することもでき、別個のポリペプチドまたはペプチド配列を結果としてもたらすような様式で操作することもできる。

30

#### 【0114】

本発明の自己複製RNAは、ある範囲のエピトープを含有する1つまたは複数のポリペプチド抗原をコードしうる。エピトープは、ヘルパーT細胞応答もしくは細胞傷害性T細胞応答またはこれらの両方を誘発することが好ましくは可能である。

#### 【0115】

本明細書で記載される自己複製RNA分子を操作して、複数のヌクレオチド配列を、2つ以上のオープンリーディングフレームから発現させ、これにより、2つ以上の抗原など、タンパク質の、免疫応答の発生を増強しうるサイトカインまたは他の免疫調節物質との共発現を可能とすることができます。このような自己複製RNA分子であれば、たとえば多様な遺伝子産物(たとえばタンパク質)を、たとえば二価ワクチンまたは多価ワクチンと同時に產生させるのに特に有用であろう。

40

#### 【0116】

本発明の自己複製RNA分子は、あらゆる適した方法を使用して調製することができる。当技術分野では、修飾ヌクレオチドを含有するRNA分子を作製するための複数の適した方法が公知である。たとえば修飾ヌクレオチドを含有する自己複製RNA分子は、T7ファージRNAポリメラーゼ、SP6ファージRNAポリメラーゼ、T3ファージRNAポリメラーゼなど、または修飾ヌクレオチドのRNA分子への効率的な組込みを可能とするこれらのポリメラーゼの変異体など、適したDNA依存性RNAポリメラーゼを使用して、自己複製RNA分子をコードするDNAを転写させること(たとえばin vitroにおける転写)により調製することができる。転写反応物は、ヌクレオチドおよび修飾

50

ヌクレオチド、ならびに適した緩衝液および適した塩など、選択されるポリメラーゼの活性を支援する他の成分を含有するであろう。ヌクレオチドアナログの自己複製RNAへの組込みは、たとえばこのようなRNA分子の安定性を改変する、RNアーゼに対する耐性を増大させる、適切な宿主細胞への導入後における複製を確立する(RNAの「感染性」)、および/または生得免疫応答および獲得免疫応答を誘発もしくは低減するように操作することができる。

### 【0117】

適した合成の方法を、単独でまたは1つもしくは複数の他の方法(たとえば組換えDNA法または組換えRNA法)と組み合わせて使用して、本発明の自己複製RNA分子を產生することができる。当技術分野では、新規の合成に適した方法が周知であり、特定の適用に適応させることができる。例示的な方法には、たとえばCEM(Masudaら(2007年)、Nucleic Acids Symposium Series、51巻:3~4頁)などの適した保護基を使用する化学合成; -シアノエチルホスホルアミダイト法(Beaucage S Lら(1981年)、Tetrahedron Lett、22巻:1859頁); ヌクレオシドH-ホスホネート法(Garegg Pら(1986年)、Tetrahedron Lett、27巻:4051~4頁; Froehler B Cら(1986年)、Nucl Acid Res、14巻:5399~407頁; Garegg Pら(1986年)、Tetrahedron Lett、27巻:4055~8頁; Gaffney B Lら(1988年)、Tetrahedron Lett、29巻:2619~22頁)が含まれる。市販されている自動式核酸合成器と使用するために、これらの化学反応を実行するまたは適応させることができる。さらなる適した合成法は、Uhlmannら(1990年)、Chem Rev、90巻:544~84頁; およびGoodchild J(1990年)、Bioconjugate Chem、1巻:165頁において開示されている。核酸合成はまた、ポリヌクレオチドおよびこのようなポリヌクレオチドによりコードされる遺伝子産物のクローニング、プロセシング、および/または発現を含め、当技術分野において周知であり通常である、適した組換え法を使用しても実行することができる。遺伝子断片および合成ポリヌクレオチドのランダムな断片化およびPCRによる再構成を介するDNAシャフリングは、ポリヌクレオチド配列を設計および操作するのに使用しうる公知の技法の例である。部位指向変異誘発を使用して、たとえば新たな制限部位を挿入する、グリコシリ化パターンを改変する、コドンの優先性を変化させる、スプライス改変体を作製する、変異を導入するなどのように、核酸およびコードされるタンパク質を改変することができる。当技術分野では、核酸配列の転写、翻訳、および発現に適した方法が公知であり、通常である(一般的に、「Current Protocols in Molecular Biology」、2巻、Ausubelら編、Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience、13章、1988年; Glover、「DNA Cloning」、II巻、IRL Press、Wash., D.C.、3章、1986年; Bitterら、「Methods in Enzymology」、153巻:516~544頁(1987年); 「The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces」、Strathernら編、Cold Spring Harbor Press、IおよびII巻、1982年; ならびにSambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Press、1989年を参照されたい)。

### 【0118】

自己複製RNA分子における1つまたは複数の修飾ヌクレオチドの存在および/または量は、任意の適した方法を使用して決定することができる。たとえば自己複製RNAを、モノホスフェートへと消化し(たとえばヌクレアーゼP1を使用して)、脱リン酸化し(たとえばCIA Pなどの適したホスファターゼを使用して)、結果として生じるヌクレオシドを、逆相HPLC(たとえばYMC Pack ODS-AQカラム(5ミクロン、

10

20

30

40

50

4.6 × 250 mm) を使用し、30% B (0~5分) ~ 100% B (5~13分)、100% B (13~40分) の勾配、流量 (0.7 ml/分)、UV検出 (波長: 260 nm)、カラム温度 (30℃) を使用して溶離する。緩衝液A (pH 3.5の20 mM酢酸-酢酸アンモニウム)、緩衝液B (pH 3.5の20 mM酢酸-酢酸アンモニウム/メタノール [90/10]) )により分析することができる。

#### 【0119】

任意選択により、本発明の自己複製RNA分子に、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを包含させ、宿主細胞(たとえばヒト細胞)への導入または移入時における自己複製RNA分子の免疫調節活性を、修飾ヌクレオチドを含有しない、対応する自己複製RNA分子と比較して低下させてよい。

10

#### 【0120】

所望の場合、in vitroまたはin vivoにおける当業者に公知の多様な試験法を使用して、自己複製RNA分子をスクリーニングまたは分析し、それらの治療的特性および予防的特性を確認することができる。たとえば自己複製RNA分子を含むワクチンを、目的の特定のリンパ球型、たとえばB細胞、T細胞、T細胞株、およびT細胞クローニングの増殖またはエフェクター機能の誘発に対するそれらの効果について調べることができる。たとえば免疫化されたマウスに由来する脾臓細胞を単離し、細胞傷害性Tリンパ球が、ポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子を含有する自己標的細胞を溶解させる潜在能力について調べることができる。加えて、ELISAを介して、TH1 (IL-2およびIFN-γ) サイトカインおよび/もしくは TH2 (IL-4およびIL-5) サイトカインの増殖または産生を測定することにより、ヘルパーT細胞の分化を分析することもでき、または細胞質サイトカインの染色およびフローサイトメトリーを介して、CD4+ T細胞内で直接的にヘルパーT細胞の分化を分析することもできる。

20

#### 【0121】

ポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子はまた、たとえばB細胞による目的の抗原に特異的な抗体の産生の誘発により証拠立てられる、体液性免疫応答を誘発する能力についても調べることができる。これらのアッセイは、たとえば免疫化された個体に由来する末梢Bリンパ球を使用して行うことができる。このようなアッセイ法は、当業者に公知である。本発明の自己複製RNA分子を特徴付けるのに使用しうる他のアッセイは、標的細胞によりコードされる抗原の発現を検出することを伴う。たとえばFACSを使用して、細胞表面においてまたは細胞内で抗原の発現を検出することができる。FACSによる選択の別の利点は、異なるレベルの発現について分取しうる(場合によって低度の発現が所望であります)ことである。特定の抗原を発現させる細胞を同定するために適する他の方法は、プレート上でモノクローナル抗体を使用するパンニングまたはモノクローナル抗体でコーティングされた磁気ビーズを使用する捕捉を伴う。

30

#### 【0122】

本発明の自己複製RNAは、裸のRNA送達または細胞への移入を容易とする脂質、ポリマー、もしくは他の化合物と組み合わせた送達など、多様な方法で送達することができる。本発明のRNA分子は、たとえば直接的な注射、マイクロインジェクション、電気穿孔、リポフェクション、微粒子銃 (biolistics) などによるあらゆる適した技法を使用して標的細胞または被験体へと導入することができる。

40

#### 【0123】

##### C. ポリペプチド分子

本明細書で記載される免疫原性組成物は、ポリペプチド成分とRNA成分とを含む。ポリペプチド成分は、ポリペプチド複合体またはVLPであり得る。

#### 【0124】

免疫原性組成物のポリペプチド成分として使用しうる適した抗原(「第2のポリペプチド抗原」)には、細菌性病原体、ウイルス性病原体、真菌性病原体、原虫病原体、または多細胞寄生虫性病原体など、あらゆる病原体に由来するタンパク質およびペプチドが含まれる。例示的な抗原には、RSV、HIV、パルボウイルスまたはCMVに由来する抗原

50

など、上記の抗原のうちのいずれか1つが含まれる。組成物は、1つより多いポリペプチド抗原を含有しうる。代替的にまたは加えて、ポリペプチドはまた、同じ病原体の2つの異なるタンパク質に由来する2つ以上のエピトープまたは2つの異なる病原体に由来する2つ以上のエピトープを含む融合ポリペプチドでもありうる。

#### 【0125】

ポリペプチド抗原は、精製、または検出を容易とする配列（たとえばポリHis配列）など、付加的な配列を包含しうる。

#### 【0126】

ポリペプチド抗原は通例、単離または精製されるであろう。したがって、ポリペプチド抗原は、妥当な場合にそれらが通常天然で共に見出される分子と会合していないであろう。

10

#### 【0127】

ポリペプチドは通例、組換え宿主系における発現により調製されるであろう。一般的に、ポリペプチドは、適した組換え宿主細胞において細胞外ドメインをコードする組換え構築物の発現により作製されるが、あらゆる適した方法を使用することができる。適した組換え宿主細胞には、たとえば昆虫細胞（たとえばAedes aegypti、Autographa californica、Bombyx mori、Drosophila melanogaster、Spodoptera frugiperda、およびTrichoplusia ni）、哺乳動物細胞（たとえばヒト、非ヒト霊長動物、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、およびげっ歯動物（たとえばハムスター）、鳥類細胞（たとえばニワトリ、アヒル、およびガチョウ）、細菌（たとえばE. coli、Bacillus subtilis、およびStreptococcus種）、酵母細胞（たとえばSaccharomyces cerevisiae、Candida albicans、Candida maltosa、Hansenula polymorpha、Kluyveromyces fragilis、Kluyveromyces lactis、Pichia guillerimondii、Pichia pastoris、Schizosaccharomyces pombe、およびYarrowia lipolytica）、テトラヒメナの細胞（たとえばTetrahymena thermophila）、またはこれらの組み合わせが含まれる。当技術分野では、多くの適した昆虫細胞および哺乳動物細胞が周知である。適した昆虫細胞には、たとえばSf9細胞、Sf21細胞、TN5細胞、Schneider S2細胞、および高度な5細胞（Trichoplusia niのBTI-TN-5B1-4親細胞株（Invitrogen）に由来するクローン分離株）が含まれる。適した哺乳動物細胞には、たとえばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞（剪断されたアデノウイルス5型DNAによって典型的に形質転換されたHEK293細胞）、NIH-3T3細胞、293-T細胞、Vero細胞、HeLa細胞、PERC.6細胞（ECACC寄託番号96022940）、Hep G2細胞、MRC-5（ATCC CCL-171）、WI-38（ATCC CCL-75）、胎児アカゲザル肺細胞（ATCC CL-160）、メイディン・ダービーウシ腎臓（「MDBK」）細胞、メイディン・ダービーイヌ腎臓（「MDCK」）細胞（たとえばMDCK（NBL2）、ATCC CCL34；またはMDCK 33016、DSM ACC 2219）、BHK21-Fなどのベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、HKCC細胞などが含まれる。適した鳥類細胞には、たとえばニワトリ胚性幹細胞（たとえばEBX（登録商標）細胞）、ニワトリ胚性線維芽細胞、ニワトリ胚性生殖細胞、アヒル細胞（たとえばVaccine、27巻：4975～4982頁（2009年）およびWO2005/042728において記載されている、たとえばAGE1.CRおよびAGE1.CR.PIX細胞株（ProBioGen）、EB66細胞などが含まれる。

20

30

40

#### 【0128】

当業者には、バキュロウイルス系などの適した昆虫細胞発現系が公知であり、たとえばSummersおよびSmith、Texas Agricultural Exper

50

iment Station Bulletin、1555号(1987年)において記載されている。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料および方法は、キット形態で、とりわけ Invitrogen、San Diego CAから市販されている。当業者にはまた、鳥類細胞発現系も公知であり、たとえば米国特許第5,340,740号；同第5,656,479号；同第5,830,510号；同第6,114,168号；および同第6,500,668号；欧州特許第EP0787180B号；欧州特許出願第EP03291813.8号；WO03/043415；ならびにWO03/076601において記載されている。同様に当技術分野ではまた、細菌発現系および哺乳動物細胞発現系も公知であり、たとえば「Yeast Genetic Engineering」(Barrra編、1989年) Butterworths、Londonにおいて記載されている。

10

## 【0129】

ポリペプチドをコードする組換え構築物は、通常の方法を使用して適したベクター内で調製することができる。当技術分野では、昆虫細胞または哺乳動物細胞における組換えタンパク質の発現に適した多数のベクターが周知であり通常のものである。適したベクターは、以下：複製起点；選択マーカー遺伝子；転写制御エレメント（たとえばプロモーター、エンハンサー、ターミネーター）、および／または1もしくは複数の翻訳シグナルなど、1もしくは複数の発現制御エレメント；ならびに選択された宿主細胞内の分泌経路を標的とするためのシグナル配列もしくはリーダー配列（たとえば哺乳動物を起源とする、または異種哺乳動物もしくは哺乳動物以外の種に由来する）のうちの1または複数が含まれるがこれらに限定されない多数の成分を含有しうる。たとえば昆虫細胞における発現のためには、pFastBac (Invitrogen)などの適したバキュロウイルス発現ベクターを、組換えバキュロウイルス粒子を作製するために使用する。バキュロウイルス粒子を増幅し、昆虫細胞に感染させて、組換えタンパク質を発現させるために使用する。哺乳動物細胞における発現のためには、所望の哺乳動物の宿主細胞（たとえばチャイニーズハムスター卵巣細胞）における構築物の発現を駆動するベクターを使用する。

20

## 【0130】

ポリペプチドは、あらゆる適した方法を使用して精製することができる。当技術分野では、たとえばイムノアフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドを精製するための方法が公知である (Ruiz-Anguelloら、J. Gen. Virol.、85巻：3677～3687頁(2004年))。当技術分野では、沈殿ならびに疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、キレート化クロマトグラフィー、およびサイズ除外クロマトグラフィーなどの多様な種類のクロマトグラフィーを含め、所望のタンパク質を精製するのに適した方法が周知である。これらの適した方法または他の適した方法のうちの2つ以上を使用して適した精製スキームを創出することができる。所望の場合、ポリペプチドは、エピトープタグまたはHISタグなど、精製を容易にする「タグ」を包含しうる。このようなタグ付けされたポリペプチドは、たとえば馴化培地から、キレート化クロマトグラフィーまたはアフィニティークロマトグラフィーにより簡便に精製することができる。

30

## 【0131】

## D. 任意選択のRNA送達系

タンパク質成分およびRNA成分に加えて、脂質、ポリマー、または他の化合物などの付加的成分を、本明細書で記載される免疫原性組成物中に、任意選択により包含させて、RNAの標的細胞への移入を容易とすることができます。

40

## 【0132】

RNAは、裸のRNAとして（たとえばただRNAの水溶液として）送達して、細胞への移入を増強し、また後の細胞内効果も増強しうるが、RNA分子は、粒子状送達系またはエマルジョン送達系などの送達系と組み合わせて投与することが好ましい。大多数の送達系は、当業者に周知である。

## 【0133】

50

例えば、RNA分子は、受容体媒介性エンドサイトーシスによって細胞の中に導入されてもよい。たとえば米国特許第6,090,619号；WuおよびWu、J. Biol. Chem.、263巻：14621頁(1988年)；およびCurieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88巻：8850頁(1991年)を参照されたい。たとえば、米国特許第6,083,741号は、それ自体インテグリン受容体結合部分(たとえば配列Arg-Gly-Aspを有する環状ペプチド)にカップリングされているポリカチオン部分(たとえば3～100リシン残基を有するポリL-リシン)に核酸を結合することによって、哺乳動物細胞の中に外因性の核酸を導入することを開示する。

## 【0134】

10

本発明のRNA分子は、両親媒性物質によって細胞の中に送達することができる。たとえば米国特許第6,071,890号を参照されたい。典型的に、核酸分子は、カチオン性両親媒性物質と共に複合体を形成してもよい。複合体と接触させた哺乳動物細胞は、容易にそれを取り込むことができる。

## 【0135】

3つの特に有用な送達系は、(i)リポソーム、(ii)無毒性で生分解性のポリマー微粒子、および(iii)カチオン性サブミクロン水中油型エマルジョンである。

## 【0136】

20

## 1. リポソーム

様々な両親媒性脂質は、リポソームとしてRNA含有水性コアを被包するために、水性環境において二重層を形成することができる。これらの脂質は、アニオン性、カチオン性、または両性イオン性の親水性頭部基(head group)を有することができる。アニオン性リン脂質からのリポソームの形成は、1960年代にさかのぼり、カチオン性リポソーム形成脂質は、1990年代から研究されてきた。いくつかのリン脂質は、アニオン性であるのに対して、他のものは、両性イオン性である。適したクラスのリン脂質は、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、およびホスファチジルグリセロールを含むが、これらに限定されず、いくつかの有用なリン脂質は、表2に列挙される。有用なカチオン性脂質は、ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DSDMA)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DODMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLindDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLenDMA)を含むが、これらに限定されない。両性イオン性脂質は、アシル両性イオン性脂質およびエーテル両性イオン性脂質を含むが、これらに限定されない。有用な両性イオン性脂質の例は、DPPC、DOPC、およびドデシルホスホコリンである。脂質は、飽和または不飽和であってもよい。

30

## 【0137】

## 【表2-2】

表2.リン脂質

DDPC	1,2-ジデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
DEPA	1,2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート	
DEPC	1,2-エルコイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
DEPE	1,2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	
DEPG	1,2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]	10
DLOPC	1,2-リノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
DLPA	1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート	
DLPC	1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
DLPE	1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	
DLPG	1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]	20
DLPS	1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン	
DMG	1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン	
DMPA	1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート	
DMPC	1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
DMPE	1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	
DMPG	1,2-ミリストイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]	30
DMPS	1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン	
DOPA	1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート	
DOPC	1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
DOPE	1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	
DOPG	1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]	
DOPS	1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン	40
DPPA	1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート	
DPPC	1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
DPPE	1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	
DPPG	1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]	
DPPS	1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン	

【表2-3】

DPyPE	1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン	
DSPA	1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート	
DSPC	1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
DSPE	1,2-ジオステアルビル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	
DSPG	1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]	10
DSPS	1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルセリン	
EPC	卵-PC	
HEPC	水素添加卵PC	
HSPC	高純度水素添加大豆PC	
HSPC	水素添加大豆PC	
LYSOPC MYRISTIC	1-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
LYSOPC PALMITIC	1-パルミトイyl-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
LYSOPC STEARIC	1-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	20
ミルクスフィンゴミエリン MPPC	1-ミリストイル,2-パルミトイyl-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
MSPC	1-ミリストイル,2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
PMPC	1-パルミトイyl,2-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
POPC	1-パルミトイyl,2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
POPE	1-パルミトイyl-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	30
POPG	1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3[ホスファチジル-rac-(1-グリセロール...)]	
PSPC	1-パルミトイyl,2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
SMPC	1-ステアロイル,2-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	
SOPC	1-ステアロイル,2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	40
SPPC	1-ステアロイル,2-パルミトイyl-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	

リポソームは、単一の脂質または脂質の混合物から形成することができる。混合物は、(i)アニオン性脂質の混合物(iii)カチオン性脂質の混合物(ii)両性イオン性脂質の混合物(iv)アニオン性脂質およびカチオン性脂質の混合物(v)アニオン性脂質および両性イオン性脂質の混合物(vi)両性イオン性脂質およびカチオン性脂質の混合物、または(viii)アニオン性脂質、カチオン性脂質、および両性イオン性脂質の混合物を含んでいてもよい。同様に、混合物は、飽和および不飽和脂質の両方を含んでいて

もよい。たとえば、混合物は、D S P C (両性イオン性、飽和)、D l i n D M A (カチオン性、不飽和)、および／またはD M P G (アニオン性、飽和)を含んでいてもよい。脂質の混合物が使用される場合、混合物における成分脂質のすべてが、両親媒性である必要があるとは限らない、たとえば、1つまたは複数の両親媒性脂質は、コレステロールと混合することができる。

#### 【0139】

脂質の親水性部分は、ペグ化することができる（すなわち、ポリエチレングリコールの共有結合によって修飾することができる）。この修飾は、リポソームの安定性を増大させ、非特異的吸着を予防することができる。たとえば、脂質は、H e y e s ら (2005年) J C o n t r o l l e d R e l e a s e 107巻：276～87頁において開示されるものなどの技術を使用してP E Gにコンジュゲートすることができる。10

#### 【0140】

D S P C、D l i n D M A、P E G - D M P G、およびコレステロールの混合物は、本実施例で使用される。本発明の別の態様は、D S P C、D l i n D M A、P E G - D M G、およびコレステロールを含むリポソームである。このリポソームは、好ましくは、たとえば免疫原をコードする自己複製R N AなどのR N Aを被包する。

#### 【0141】

リポソームは、3つの群に通常分けられる：多重膜小胞（M L V）；小型単層小胞（S U V）；また大型単層小胞（L U V）。M L Vは、いくつかの別々の水性コンパートメントを形成する、それぞれの小胞において複数の二重層を有する。S U VおよびL U Vは、水性コアを被包する单一の二重層を有する；S U Vは、典型的に、直径 50 nmを有し、L U Vは、直径 > 50 nmを有する。本発明で有用なリポソームは、理想的には、50～220 nmの範囲の直径を有するL U Vである。異なる直径を有するL U Vの集団を含む組成物については：(i) 数の上で少なくとも80%が、20～220 nmの範囲の直径を有するべきであり、(ii) 集団の平均直径（Z a v、強度による）は、理想的には、40～200 nmの範囲にあり、および／または(iii) 直径は、多分散指数（p o l y d i s p e r s i t y i n d e x ) < 0.2を有するべきである。20

#### 【0142】

適したリポソームを調製するための技術は、当技術分野において周知であり、たとえばL i p o s o m e s : M e t h o d s a n d P r o t o c o l s 、第1巻：P h a r m a c e u t i c a l N a n o c a r r i e r s : M e t h o d s a n d P r o t o c o l s . (W e i s s i g 編) . H u m a n a P r e s s 、2009年. I S B N 1 6 0 3 2 7 3 5 9 X ; L i p o s o m e T e c h n o l o g y 、第I巻、II巻、およびIII巻. (G r e g o r i a d i s 編) . I n f o r m a H e a l t h c a r e 、2006年；ならびにF u n c t i o n a l P o l y m e r C o l l o i d s a n d M i c r o p a r t i c l e s 第4巻(M i c r o s p h e r e s 、m i c r o c a p s u l e s & l i p o s o m e s ) . (A r s h a d y & G u y o t 編) . C i t u s B o o k s 、2002年を参照されたい。1つの有用な方法は、(i) 脂質のエタノール性の溶液、(ii) 核酸の水溶液、および(iii) 緩衝剤を混合し、その後に、混合、平衡化、希釈、および精製を続けることを含む(H e y e s ら (2005年) J C o n t r o l l e d R e l e a s e 107巻：276～87頁)。30

#### 【0143】

R N Aは、好ましくは、リポソーム内に被包され、したがって、リポソームは、水性R N A含有コアのまわりに外層を形成する。この被包は、R N Aアーゼ消化からR N Aを保護することが分かっている。リポソームは、いくつかの外部R N Aを含むことができる（たとえばリポソームの表面上に）が、少なくともR N Aの半分（理想的には、そのすべて）は、被包される。

#### 【0144】

##### 2. ポリマー微粒子

様々なポリマーは、R N Aを被包するまたは吸着するために微粒子を形成することができます40

10

20

30

40

50

きる。実質的に無毒性のポリマーの使用は、レシピエントが安全に粒子を受けることができるこ<sup>10</sup>とを意味し、生分解性ポリマーの使用は、粒子が、長期的な存続を回避するように送達後に代謝され得ることを意味する。有用なポリマーはまた、医薬グレードの処方物を調製するのを支援するために滅菌することもできる。

#### 【0145】

適した無毒性で生分解性のポリマーは、ポリ( - ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酸、ポリラクトン(ポリカプロラクトンを含む)、ポリジオキサン、ポリバレロラクトン、ポリオルトエステル、ポリ酸無水物、ポリシアノアクリレート、チロシン由来ポリカーボネート、ポリビニルピロリジノン、またはポリエステルアミドおよびその組み合わせを含むが、これらに限定されない。

10

#### 【0146】

いくつかの実施形態では、微粒子は、ポリ(ラクチド)(「PLA」)などのポリ( - ヒドロキシ酸)、ポリ(D,L-ラクチド-co-グリコリド)(「PLG」)などのラクチドおよびグリコリドのコポリマー、ならびにD,L-ラクチドおよびカプロラクトンのコポリマーから形成される。有用なPLGポリマーは、たとえば20:80~80:20、たとえば25:75、40:60、45:55、55:45、60:40、75:25の範囲のラクチド/グリコリドモル比を有するものを含む。有用なPLGポリマーは、たとえば5,000~200,000Da、たとえば10,000~100,000、20,000~70,000、40,000~50,000Daの分子量を有するものを含む。

20

#### 【0147】

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

#### 【0148】

適した微粒子を調製するための技術は、当技術分野において周知であり、たとえばFunctional Polymer Colloids and Microparticles 第4巻(Microspheres, microcapsules & liposomes). (Arshady & Guyot編). Citus Books、2002年; Polymers in Drug Delivery. (Uchegbu & Schatzlein編). CRC Press、2006年。(特に第7章)、およびMicroparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (Cohen & Bernstein編). CRC Press、1996年を参照されたい。RNAの吸着を容易にするために、微粒子は、たとえばO'Haganら(2001年)J Virology 75巻: 9037~9043頁; およびSinghら(2003年)Pharmaceutical Research 20巻: 247~251頁において開示されるように、カチオン性界面活性剤および/または脂質を含んでいてもよい。ポリマー微粒子を作製するための代替方法は、たとえば国際公開第2009/132206号において開示されるように成形し、硬化することによるものである。

30

#### 【0149】

本発明の微粒子は、40~100mVのゼータ電位を有することができる。

40

#### 【0150】

RNAは、微粒子に吸着することができ、吸着作用は、微粒子中にカチオン性材料(たとえばカチオン性脂質)を含めることによって容易になる。

#### 【0151】

##### 3. 水中油型カチオン性エマルジョン

水中油型エマルジョンは、インフルエンザワクチンのアジュバント処理(adjusting)、たとえばFLUAD(商標)製品におけるMF59(商標)アジュバント、およびPREPANDRIX(商標)製品におけるAS03アジュバントについて公知

50

である。エマルジョンが1つまたは複数のカチオン性分子を含むという条件で、本発明にしたがうRNA送達は、水中油型エマルジョンを利用し得る。たとえば、カチオン性脂質は、負に荷電したRNAが付着することができる正に荷電した液滴表面を提供するためにエマルジョン中に含むことができる。

#### 【0152】

エマルジョンは、1つまたは複数の油を含む。適した油（複数可）は、たとえば、動物（魚類など）供給源または植物供給源に由来するものを含む。油は、理想的には、生分解性（代謝可能）かつ生体適合性である。植物油についての供給源は、堅果、種子、および穀類を含む。最も一般的に入手可能なラッカセイ油、ダイズ油、ヤシ油およびオリーブ油は、堅果油を例示する。たとえばホホバ豆から得られるホホバ油を使用することができる。種子油は、ベニバナ油、綿実油、ヒマワリ種子油、ゴマ油、およびその他同種のものを含む。穀類の群において、コーン油は、最も容易に入手可能であるが、コムギ、カラスムギ、ライムギ、イネ、テフ、ライコムギ、およびその他同種のものなどの他の穀物粒（cereal grain）の油もまた、使用されてもよい。グリセロールおよび1,2-プロパンジオールの6~10炭素脂肪酸エステルは、種子油中に天然に存在しないが、堅果および種子油から出発して、適切な材料の加水分解、分離、およびエステル化によって調製されてもよい。哺乳動物の乳由来の脂肪および油は、代謝可能であり、したがって、使用されてもよい。動物供給源から純粋な油を得るために必要な分離、精製、けん化、および他の手段についての手順は、当技術分野において周知である。

#### 【0153】

ほとんどの魚は、容易に回収され得る代謝可能な油を含有する。たとえば、タラ肝油、サメ肝油、および鯨ろうなどの鯨油は、本明細書において使用されてもよいいくつかの魚油を例示する。多くの分枝鎖油は、5-炭素イソプレン単位で生化学的に合成され、一般的にテルペノイドと呼ばれる。スクアレンは、酵母または他の適切な微生物からも取得することができる。一部の実施形態において、スクアレンは、好ましくは非動物供給源、例えば、オリーブ、オリーブ油または酵母から取得される。スクアラン（スクアレンに対する飽和アナログ）もまた、使用することができる。スクアレンおよびスクアランを含む魚油は、市販の供給源から容易に入手可能であるまたは当技術分野において公知の方法によって得られてもよい。

#### 【0154】

他の有用な油は、特にスクアレンと組み合わせたトコフェロールである。エマルジョンの油相がトコフェロールを含む場合、-、-、-、-、またはトコフェロールのいずれかを使用することができるが、-トコフェロールが好ましい。D--トコフェロールおよびDL--トコフェロールは両方とも使用することができる。好ましい-トコフェロールは、DL--トコフェロールである。スクアレンおよびトコフェロール（たとえばDL--トコフェロール）を含む油の組み合わせを使用することができる。

#### 【0155】

好ましいエマルジョンは、スクアレン、分岐不飽和テルペノイドであるサメ肝油を含む( $C_{30}H_{50}$ ; [( $CH_3$ )<sub>2</sub>C=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>-]<sub>2</sub>; 2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエン; CAS RN 7683-64-9)。

#### 【0156】

エマルジョン中の油は、油、たとえばスクアレンおよび少なくとも1つのさらなる油の組み合わせを含んでいてもよい。

#### 【0157】

エマルジョンの水性成分は、淡水（plain water）（たとえばw.f.i.）であり得るか、または成分、たとえば溶質をさらに含むことができる。たとえば、それは、緩衝液を形成するための塩（たとえば、ナトリウム塩などのクエン酸塩またはリン酸塩）を含んでいてもよい。典型的な緩衝剤は、リン酸緩衝剤；Tris緩衝剤；ホウ酸緩衝剤；コハク酸緩衝剤；ヒスチジン緩衝剤；またはクエン酸緩衝剤を含む。緩衝化された

10

20

30

40

50

水相が好ましく、緩衝剤は、典型的に、5～20 mMの範囲で含まれるであろう。

【0158】

エマルジョンはまた、カチオン性脂質をも含む。好ましくは、この脂質は、それがエマルジョンの形成および安定化を容易にすることができるように、界面活性剤である。有用なカチオン性脂質は、一般的に、たとえば第三級または第四級アミンとして生理学的条件下で正に荷電した窒素原子を含有する。この窒素は、両親媒性界面活性剤の親水性頭部基中にあり得る。有用なカチオン性脂質は、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、3'-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDA、たとえばプロミド)、1,2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、ジパルミトイド(C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン(DPTAP)、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン(DS-TAP)を含むが、これらに限定されない。他の有用なカチオン性脂質は、塩化ベンザルコニウム(BAK)、塩化ベンゼトニウム、セトラミド(cetramide)(テトラデシルトリメチルアンモニウムプロミドならびにおそらく少量のドデシルトリメチルアンモニウム(dodecyltrimethylammonium)プロミドおよびヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミドを含有する)、セチルピリジニウムクロリド(CPC)、セチルトリメチルアンモニウムクロリド(CTAC)、N,N',N'-ポリオキシエチレン(10)-N-獣脂(tallow)-1,3-ジアミノプロパン:ドデシルトリメチルアンモニウムプロミド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミド、混合アルキルトリメチルアンモニウムプロミド、ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド、ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド、ベンジルトリメチルアンモニウムメトキシド、セチルジメチルエチルアンモニウムプロミド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド(DDAB)、メチルベンゼトニウムクロリド、デカメトニウムクロリド、メチル混合トリアルキルアンモニウムクロリド、メチルトリオクチルアンモニウムクロリド、N,N-ジメチル-N-[2(2-メチル-4-(1,1,3,3テトラメチルブチル)-フェノキシ)-エトキシ]エチル]-ベンゼンメタンアミニウムクロリド(DEBDA)、ジアルキルジメチルアンモニウム塩、[1-(2,3-ジオレイルオキシ)-プロピル]-N,N,N,トリメチルアンモニウムクロリド、1,2-ジアシル-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(アシル基=ジミリストイル、ジパルミトイド、ジステアロイル、ジオレオイル)、1,2-ジアシル-3(ジメチルアンモニオ)プロパン(アシル基=ジミリストイル、ジパルミトイド、ジステアロイル、ジオレオイル)、1,2-ジオレオイル-3-(4'-トリメチルアンモニオ)ブタノイル-sn-グリセロール、1,2-ジオレオイル3-スクシニル-sn-グリセロールコリンエステル、コレステリル(4'-トリメチルアンモニオ)ブタノエート、N-アルキルピリジニウム塩(たとえばセチルピリジニウムプロミドおよびセチルピリジニウムクロリド)、N-アルキルピペリジニウム塩、ジカチオン性ボラホルム(bolaform)電解質(C12Me6; C12Bu6)、ジアルキルグリセチルホスホリルコリン、リソレシチン、L-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、コレステロールヘミスクシネットコリンエステル、リポポリアミン(ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS)、ジパルミトイドホスファチジルエタノールアミドスペルミン(DPPES)、リポポリL(またはD)-リシン(LPLL、LPDL)、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミンにコンジュゲートされたポリL(またはD)-リシン、ペンドントアミノ基を有するジドデシルグルタミン酸エステル(C<sup>1</sup>GluPhe<sup>n</sup>N)、ペンドントアミノ基を有するジテトラデシルグルタミン酸エステル(C<sup>14</sup>GluC<sup>n</sup>N<sup>+</sup>)を含むが、これらに限定されない)、コレステロールのカチオン性誘導体(コレステリル-3-Oキシスクシンアミドエチレントリメチルアンモニウム塩、コレステリル-3-Oキシスクシンアミドエチレンジメチルアミン、コレステリル-3-Oカルボキシアミドエチレントリメチルアンモニウム塩およびコレステリル-3-Oカルボキシアミドエチレンジメチルアミンを含むが、これらに限定されない)である。他の有用なカチオン性脂質は、参照によ  
10  
20  
30  
40  
50

って本明細書において組み込まれる U S 2 0 0 8 / 0 0 8 5 8 7 0 および U S 2 0 0 8 / 0 0 5 7 0 8 0 において記載される。

【 0 1 5 9 】

カチオン性脂質は、好ましくは、生分解性（代謝可能）かつ生体適合性である。

【 0 1 6 0 】

油およびカチオン性脂質に加えて、エマルジョンは、非イオン性界面活性剤および／または両性イオン性界面活性剤を含むことができる。そのような界面活性剤は、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（一般的に Tween と呼ばれる）、とりわけポリソルベート 20 およびポリソルベート 80；線状 EO / PO ブロックコポリマーなどの、DOWFAX（商標）商標下で販売されている、エチレンオキシド（EO）、プロピレンオキシド（PO）、および／またはブチレンオキシド（BO）のコポリマー；繰り返しのエトキシ（オキシ-1,2-エタンジイル）基の数が変動し得るオクトキシノール、オクトキシノール-9（Triton X-100 または t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）が特に興味深い；（オクチルフェノキシ）ポリエトキシエタノール（IGEPAL CA-630 / NP-40）；ホスファチジルコリン（レシチン）などのリン脂質；トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（Brij 30）などの、ラウリル、セチル、ステアリル、およびオレイルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪エーテル（Brij 界面活性剤として公知）；ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル；ならびにソルビタントリオレエート（Span 85）およびソルビタンモノラウレートなどのソルビタンエステル（Span として一般的に公知）を含むが、これらに限定されない。エマルジョン中に含むための好ましい界面活性剤は、ポリソルベート 80（Tween 80；ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）、Span 85（ソルビタントリオレエート）、レシチン、および Triton X-100 である。

10

20

30

【 0 1 6 1 】

これらの界面活性剤の混合物、たとえば Tween 80 / Span 85 混合物または Tween 80 / Triton-X 100 混合物は、エマルジョン中に含むことができる。ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（Tween 80）などのポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（Triton X-100）などのオクトキシノールの組み合わせもまた、適している。他の有用な組み合わせは、ラウレス 9 ならびにポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび／またはオクトキシノールを含む。有用な混合物は、10～20 の範囲の HLB 値を有する界面活性剤（たとえば、15.0 の HLB を有するポリソルベート 80）および 1～10 の範囲の HLB 値を有する界面活性剤（たとえば、1.8 の HLB を有するソルビタントリオレエート）を含むことができる。

【 0 1 6 2 】

最終エマルジョン中の油の好ましい量（容積による%）は、2～20%、たとえば 5～15%、6～14%、7～13%、8～12% である。約 4～6% または約 9～11% のスクアレン含有量は、特に有用である。

【 0 1 6 3 】

最終エマルジョン中の界面活性剤の好ましい量（重量による%）は、0.001%～8% である。たとえば、0.2～4%、特に 0.4～0.6%、0.45～0.55%、約 0.5%、または 1.5～2%、1.8～2.2%、1.9～2.1%、約 2%、または 0.85～0.95%、または約 1% のポリオキシエチレンソルビタンエステル（ポリソルベート 80 など）；0.02～2%、特に約 0.5% または約 1% のソルビタンエステル（ソルビタントリオレエートなど）；0.001～0.1%、特に 0.005～0.02% のオクチルまたはノニルフェノキシポリオキシエタノール（Triton X-100 など）；0.1～8%、好ましくは 0.1～1.0%、特に 0.1～1%、または約 0.5% のポリオキシエチレンエーテル（ラウレス 9 など）。

40

50

【 0 1 6 4 】

油および界面活性剤の絶対量ならびにそれらの比は、なおエマルジョンを形成しながら

も、広い範囲内で変動され得る。当業者は、所望のエマルジョンを得るために成分の相対的な割合を容易に変動し得るが、油および界面活性剤についての4：1～5：1の重量比は、典型的である（過剰な油）。

#### 【0165】

エマルジョンの免疫賦活性活性を確実にするための重要なパラメーターは、特に大型の動物において、油滴サイズ（直径）である。最も有効なエマルジョンは、サブミクロン（submicron）範囲の液滴サイズを有する。適切には、液滴サイズは、範囲50～750nmにあるであろう。最も有用には、平均液滴サイズは、250nm未満、たとえば200nm未満、150nm未満である。平均液滴サイズは、有用には、80～180nmの範囲にある。理想的には、エマルジョンの油滴の少なくとも80%（数で）は、直径250nm未満であり、好ましくは少なくとも90%がそうである。エマルジョン中の平均液滴サイズおよびサイズ分布を決定するための装置は、市販で入手可能である。これらは、典型的に、動的光散乱および／または単一粒子光学検知法（single-particle optical sensing）の技術、たとえば、Particle Sizing Systems（Santa Barbara、USA）から入手可能な機器のAccusizer（商標）およびNicomp（商標）シリーズ、またはMalvern Instruments（UK）からのZetasizer（商標）機器、またはHoriba（Kyoto、Japan）からのParticle Size Distribution Analyzer機器を使用する。

#### 【0166】

理想的には、液滴サイズの分布（数による）は、1つの最大値だけを有する、すなわち、2つの最大値を有するのではなく、平均値（モード）のあたりで分布する液滴の単一の集団がある。好ましいエマルジョンは、<0.4、たとえば0.3、0.2、またはそれ以下の多分散性を有する。

#### 【0167】

サブミクロン液滴および狭いサイズ分布を有する適したエマルジョンは、微少流動化（microfluidization）の使用によって得ることができる。この技術は、高圧および高速度で、幾何学的に固定されたチャネルを通して入力成分のストリームを推進させることによって、平均油滴サイズを低下させる。これらのストリームは、チャネル壁、チャンバー壁、および互いに接触する。その結果としての剪断力、衝撃力、およびキャビテーション力は、液滴サイズの低下を引き起こす。微少流動化の繰り返しのステップは、所望の液滴サイズ平均値および分布を有するエマルジョンが達成されるまで、実行することができる。

#### 【0168】

微少流動化の代替物として、熱的方法は、転相を引き起こすために使用することができる。これらの方法もまた、厳密な粒度分布を有するサブミクロンエマルジョンを提供することができる。

#### 【0169】

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

#### 【0170】

ある実施形態では、エマルジョン中のカチオン性脂質は、DOTAPである。カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.5mg/ml～約25mg/mlのDOTAPを含んでいてもよい。たとえば、カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.5mg/ml～約25mg/ml、約0.6mg/ml～約25mg/ml、約0.7mg/ml～約25mg/ml、約0.8mg/ml～約25mg/ml、約0.9mg/ml～約25mg/ml、約1.0mg/ml～約25mg/ml、約1.1mg/ml～約25mg/ml、約1.2mg/ml～約25mg/ml、約1.3mg/ml～約25mg/ml、約1.4mg/ml～約25mg/ml、約1.5mg/ml～約25mg/ml、約1.

10

20

30

40

50

. 6 mg / ml ~ 約 25 mg / ml、約 1.7 mg / ml ~ 約 25 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 24 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 22 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 20 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 18 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 15 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 12 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 10 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 5 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 2 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 1.9 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 1.8 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 1.7 mg / ml、約 0.5 mg / ml ~ 約 1.6 mg / ml、約 0.6 mg / ml ~ 約 1.6 mg / ml、約 0.7 mg / ml ~ 約 1.6 mg / ml、約 0.8 mg / ml ~ 約 1.6 mg / ml、約 0.5 mg / ml、約 0.6 mg / ml、約 0.7 mg / ml、約 0.8 mg / ml、約 0.9 mg / ml、約 1.0 mg / ml、約 1.1 mg / ml、約 1.2 mg / ml、約 1.3 mg / ml、約 1.4 mg / ml、約 1.5 mg / ml、約 1.6 mg / ml、約 1.2 mg / ml、約 1.8 mg / ml、約 2.0 mg / ml、約 2.1.8 mg / ml、約 2.4 mg / ml などの D O T A P を含んでいてもよい。例示的な実施形態では、カチオン性水中油型エマルジョンは、約 0.8 mg / ml ~ 約 1.6 mg / ml、たとえば 0.8 mg / ml、1.2 mg / ml、1.4 mg / ml、または 1.6 mg / ml の D O T A P を含む。

【 0 1 7 1 】

ある実施形態では、カチオン性脂質は、D Cコレステロールである。カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.1mg/ml～約5mg/ml D CコレステロールのD Cコレステロールを含んでいてもよい。たとえば、カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.1mg/ml～約5mg/ml、約0.2mg/ml～約5mg/ml、約0.3mg/ml～約5mg/ml、約0.4mg/ml～約5mg/ml、約0.5mg/ml～約5mg/ml、約0.62mg/ml～約5mg/ml、約1mg/ml～約5mg/ml、約1.5mg/ml～約5mg/ml、約2mg/ml～約5mg/ml、約2.46mg/ml～約5mg/ml、約3mg/ml～約5mg/ml、約3.5mg/ml～約5mg/ml、約4mg/ml～約5mg/ml、約4.5mg/ml～約5mg/ml、約0.1mg/ml～約4.92mg/ml、約0.1mg/ml～約4.5mg/ml、約0.1mg/ml～約4mg/ml、約0.1mg/ml～約3.5mg/ml、約0.1mg/ml～約3mg/ml、約0.1mg/ml～約2.46mg/ml、約0.1mg/ml～約2mg/ml、約0.1mg/ml～約1.5mg/ml、約0.1mg/ml～約1mg/ml、約0.1mg/ml～約0.62mg/ml、約0.15mg/ml、約0.3mg/ml、約0.6mg/ml、約0.62mg/ml、約0.9mg/ml、約1.2mg/ml、約2.46mg/ml、約4.92mg/mlなどのD Cコレステロールを含んでいてもよい。例示的な実施形態では、カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.62mg/ml～約4.92mg/ml、たとえば2.46mg/mlのD Cコレステロールを含む。

【 0 1 7 2 】

ある実施形態では、カチオン性脂質は、DDAである。カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.1mg/ml～約5mg/mlのDDAを含んでいてもよい。たとえば、カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.1mg/ml～約5mg/ml、約0.1mg/ml～約4.5mg/ml、約0.1mg/ml～約4mg/ml、約0.1mg/ml～約3.5mg/ml、約0.1mg/ml～約3mg/ml、約0.1mg/ml～約2.5mg/ml、約0.1mg/ml～約2mg/ml、約0.1mg/ml～約1.5mg/ml、約0.1mg/ml～約1.45mg/ml、約0.2mg/ml～約5mg/ml、約0.3mg/ml～約5mg/ml、約0.4mg/ml～約5mg/ml、約0.5mg/ml～約5mg/ml、約0.6mg/ml～約5mg/ml、約0.73mg/ml～約5mg/ml、約0.8mg/ml～約5mg/ml、約0.9mg/ml～約5mg/ml、約1.0mg/ml～約5mg/ml、約1.2mg/ml～約5mg/ml、約1.45mg/ml～約5mg/ml、約2mg/ml～約5mg/ml、約2.5mg/ml～約5mg/ml、約3mg/ml～約5mg/ml、約50

3 . 5 m g / m l ~ 約 5 m g / m l 、 約 4 m g / m l ~ 約 5 m g / m l 、 約 4 . 5 m g / m l ~ 約 5 m g / m l 、 約 1 . 2 m g / m l 、 約 1 . 4 5 m g / m l などの D D A を含んでいてもよい。その代わりに、カチオン性水中油型エマルジョンは、約 2 0 m g / m l 、 約 2 1 m g / m l 、 約 2 1 . 5 m g / m l 、 約 2 1 . 6 m g / m l 、 約 2 5 m g / m l の D D A を含んでいてもよい。例示的な実施形態では、カチオン性水中油型エマルジョンは、約 0 . 7 3 m g / m l ~ 約 1 . 4 5 m g / m l 、 たとえば 1 . 4 5 m g / m l の D D A を含む。

#### 【 0 1 7 3 】

また、本発明の R N A 分子を、個別の患者から外植される細胞（たとえばリンパ球、骨髓吸引物、組織生検材料）またはユニバーサルドナーの造血幹細胞など、e x v i v o における細胞へと送達した後、これらの細胞を、通常 R N A 分子でトランスフェクトされた細胞についての選択の後で、患者へと再移植することもできる。患者に送達するのに適切な細胞の量は、当業者により決定されうる患者の状態および所望の効果と共に変化するであろう。たとえば米国特許第 6 , 0 5 4 , 2 8 8 号；同第 6 , 0 4 8 , 5 2 4 号；および同第 6 , 0 4 8 , 7 2 9 号を参照されたい。好ましくは、使用される細胞は自己由来、すなわち処置される患者から得られる細胞である。

10

#### 【 0 1 7 4 】

##### E . アジュvant

ある実施形態では、本明細書で提示される免疫原性組成物が、アジュvantなど、1つもしくは複数の免疫調節剤を包含する、または任意選択により包含する。例示的なアジュvantには、以下でさらに論じられる T H 1 アジュvantおよび／または T H 2 アジュvantが含まれるがこれらに限定されない。ある実施形態では、本明細書で提示される免疫原性組成物中で使用されるアジュvantに、

20

- 1 . ミネラル含有組成物；
- 2 . 油エマルジョン；
- 3 . サポニン処方物；
- 4 . ウィロソームおよびウイルス様粒子；
- 5 . 細菌性誘導体または微生物性誘導体；
- 6 . 生体付着物質および粘膜付着物質；
- 7 . リポソーム；
- 8 . ポリオキシエチレンエーテル処方物およびポリオキシエチレンエステル処方物；
- 9 . ポリホスファゼン ( P C P P ) ；
- 10 . ムラミルペプチド；
- 11 . イミダゾキノロン化合物；
- 12 . チオセミカルバゾン化合物；
- 13 . トリプタントリン化合物；
- 14 . ヒト免疫調節物質；
- 15 . リポペプチド；
- 16 . ベンゾナフチリジン；
- 17 . 微粒子

30

18 . 免疫刺激性ポリヌクレオチド ( R N A または D N A ; たとえば C p G を含有するオリゴヌクレオチドなど)

40

が含まれるがこれらに限定されない。

#### 【 0 1 7 5 】

##### 1 . ミネラル含有組成物

アジュvantとしての使用に適したミネラル含有組成物には、アルミニウム塩およびカルシウム塩などのミネラル塩が含まれる。免疫原性組成物には、水酸化物（たとえばオキシ水酸化物）、リン酸塩（たとえばヒドロキシリシン酸塩、オルトリン酸塩）、硫酸塩などのミネラル塩（たとえば「VACCINE DESIGN : THE SUBUNIT AND ADJUVANT APPROACH」( Powell , M . F . および Ne

50

w m a n , M J . 編 ) ( N e w Y o r k : P l e n u m P r e s s ) 、 1 9 9 5 年、 8 および 9 章を参照されたい ) 、または異なるミネラル化合物 ( たとえば任意選択により過剰なリン酸塩を含む、リン酸アジュバントと水酸化物アジュバントとの混合物 ) の混合物が含まれ得、これらの化合物は任意の適した形態 ( たとえばゲル、結晶質、アモルファスなど ) をとり、( 1 つまたは複数の ) 塩への吸着が好ましい。ミネラル含有組成物はまた、金属塩の粒子としても処方することができる ( W O 0 0 / 2 3 1 0 5 ) 。

## 【 0 1 7 6 】

アルミニウム塩は、  $A l^{3+}$  の用量が 1 用量当たり 0 . 2 ~ 1 . 0 mg の間であるよう 10 に、本発明のワクチン中に包含させることができる。

## 【 0 1 7 7 】

ある実施形態では、アルミニウムベースのアジュバントが、ミョウバン ( 硫酸アルミニウムカリウム (  $A l K ( S O_4 )_2$  ) またはミョウバン誘導体であって、リン酸緩衝液中の抗原をミョウバンと混合するのに続き、水酸化アンモニウムまたは水酸化ナトリウムなどの塩基で滴定および沈殿を行うことにより、 in situ で形成されるミョウバン誘導体などのミョウバン誘導体である。

## 【 0 1 7 8 】

ワクチン処方物における使用に適した別のアルミニウムベースのアジュバントは、水酸化アルミニウムアジュバント (  $A l ( O H )_3$  ) 、または約 5 0 0  $m^2/g$  の表面積を有する優れた吸着剤である結晶質アルミニウムオキシ水酸化物 (  $A l O O H$  ) である。代替的にアルミニウムベースのアジュバントは、水酸化アルミニウムアジュバントのヒドロキシル基の一部または全部の代わりにリン酸基を含有する、リン酸アルミニウムアジュバント (  $A l P O_4$  ) またはヒドロキシリノン酸アルミニウムでもありうる。本明細書で提示される好ましいリン酸アルミニウムアジュバントは、酸性、塩基性、および中性の媒体中でアモルファスおよび可溶性である。

## 【 0 1 7 9 】

ある実施形態では、アジュバントが、リン酸アルミニウムと水酸化アルミニウムとの両方を含む。より具体的な実施形態では、アジュバントのリン酸アルミニウムの量が、リン酸アルミニウム対水酸化アルミニウムの重量で 2 : 1 、 3 : 1 、 4 : 1 、 5 : 1 、 6 : 1 、 7 : 1 、 8 : 1 、 9 : 1 、または 9 : 1 を超える比など、水酸化アルミニウムの量より多い。別の実施形態では、ワクチン中のアルミニウム塩を、ワクチン 1 用量当たり 0 . 4 ~ 1 . 0 mg 、またはワクチン 1 用量当たり 0 . 4 ~ 0 . 8 mg 、またはワクチン 1 用量当たり 0 . 5 ~ 0 . 7 mg 、またはワクチン 1 用量当たり約 0 . 6 mg で存在させる。

## 【 0 1 8 0 】

一般的に、( 1 つまたは複数の ) 好ましいアルミニウムベースのアジュバント、またはリン酸アルミニウム対水酸化アルミニウムの比など、複数のアルミニウムベースのアジュバントの比は、抗原が、所望の pH でアジュバントと反対の電荷を帯びるように、分子間の静電引力を最適化することにより選択する。たとえばリン酸アルミニウムアジュバント ( i e p = 4 ) は、 pH 7 . 4 でリゾチームには吸着するが、アルブミンには吸着しない。アルブミンを標的とするならば、水酸化アルミニウムアジュバントが選択されるであろう ( i e p = 4 ) 。代替的に水酸化アルミニウムのリン酸塩による前処理は、その等電点を低下させ、それをより塩基性の抗原に好ましいアジュバントとする。

## 【 0 1 8 1 】

## 2 . 油エマルジョン

アジュバントとしての使用に適した油エマルジョン組成物および油エマルジョン処方物 ( ムラミルペプチドまたは細菌性細胞壁成分など、他の特異的免疫刺激剤を有するまたは有さない ) には、 M F 5 9 ( マイクロフルイダイザーを使用してサブミクロンの粒子へと処方される 5 % のスクアレン、 0 . 5 % の T w e e n 8 0 、および 0 . 5 % の S p a n 8 5 ) などのスクアレン - 水エマルジョンが含まれる。 W O 9 0 / 1 4 8 3 7 を参照されたい。また、 P o d d a ( 2 0 0 1 年 ) 、 V A C C I N E 、 1 9 卷 : 2 6 7 3 ~ 2 6 8 0 頁 ; F r e y ら ( 2 0 0 3 年 ) 、 V a c c i n e 、 2 1 卷 : 4 2 3 4 ~ 4 2 3 7 頁も参

10

20

30

40

50

照されたい。MF59は、FLUAD(商標)インフルエンザウイルス三価サブユニットワクチン中でアジュバントとして使用されている。

#### 【0182】

本組成物における使用に特に好ましい油エマルジョンアジュバントは、サブミクロンの水中油エマルジョンである。本発明における使用に好ましいサブミクロンの水中油エマルジョンは、4～5% w/vのスクアレン、0.25～1.0% w/vのTween 80(商標)(ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート)、および/または0.25～1.0%のSpan 85(商標)(ソルビタントリオレエート)、ならびに、任意選択により、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイール-SM-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリオキシ)-エチルアミン(N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-SM-glycero-3-hydroxyphosphophoryloxy)-ethylamine)(MTP-PE)を含有するサブミクロンの水中油エマルジョンなど、任意選択により量を変化させるMTP-PEを含有するスクアレン/水エマルジョン、たとえば「MF59」として公知のサブミクロンの水中油エマルジョン(WO 90/14837; 米国特許第6,299,884号; 米国特許第6,451,325号; およびOttら、「MF59 - Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines」、Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach(Powell, M.F. およびNewman, MJ. 編)(New York: Plenum Press)1995年、277～296頁)である。MF59は、4～5% w/vのスクアレン(たとえば4.3%)、0.25～0.5% w/vのTween 80(商標)、および0.5% w/vのSpan 85(商標)を含有し、任意選択により、Model 110Yマイクロフルイダイザー(Microfluidics, Newton, MA)などのマイクロフルイダイザーを使用してサブミクロンの粒子へと処方された多様な量のMTP-PEを含有する。たとえばMTP-PEは、1用量当たり約0～500μg、より好ましくは1用量当たり0～250μg、および最も好ましくは、1用量当たり0～100μgの量で存在させることができる。本明細書で使用される用語「MF59-0」が、MTP-PEを欠く上記のサブミクロンの水中油エマルジョンを指すのに対し、用語MF59-MTPは、MTP-PEを含有する処方物を指し示す。たとえば「MF59-100」は、1用量当たり100μgのMTP-PEを含有するなどである。本発明における使用のための別のサブミクロンの水中油エマルジョンであるMF69は、4.3% w/vのスクアレン、0.25% w/vのTween 80(商標)、および0.75% w/vのSpan 85(商標)を含有し、任意選択によりMTP-PEを含有する。さらに別のサブミクロンの水中油エマルジョンは、SAFとしてもまた公知であり、10%のスクアレン、0.4%のTween 80(商標)、5%のブルロニックプロックポリマーL121、およびthr-MDPを含有し、これもまたサブミクロンのエマルジョンへと微少流動化されるMF75である。MF75-MTPとは、1用量当たり100～400μgのMTP-PEなど、MTPを包含するMF75処方物を指し示す。

#### 【0183】

本組成物における使用のためのサブミクロンの水中油エマルジョン、これを作製する方法、およびムラミルペプチドなどの免疫刺激剤については、WO 90/14837; 米国特許第6,299,884号; および米国特許第6,451,325号において詳細に記載されている。

#### 【0184】

本発明ではまた、フロイントの完全アジュバント(CFA)およびフロイントの不完全アジュバント(IFN)もアジュバントとして使用することができる。

#### 【0185】

10

20

30

40

50

### 3. 他の免疫アジュバント

サポニンとは、広範囲にわたる植物種の樹皮、葉、茎、根、およびまた花において見出されるステロールグリコシドおよびトリテルペノイドグリコシドの異種群である。Quillaia saponaria Molina (Quillaia saponaria Molina) の木の樹皮から単離されたサポニンは、アジュバントとして広く研究されている。サポニンはまた、Smilax ornata (サルサパリラ (sarsaparilla))、Gypsoiphila paniculata (ブライダルベール (bridal veil))、およびSaponaria officinalis (Saponaria officinalis) (カスミソウ (soap root)) から商業的に得ることもできる。サポニアジュバント処方物には、QS21などの精製処方物の他、ISCOMなどの脂質処方物も含まれる。サポニアジュバント処方物には、STIMULON (登録商標) アジュバント (Antigenics, Inc., Lexington, MA) が含まれる。

10

#### 【0186】

サポニン組成物は、高速薄層クロマトグラフィー (HPLC) および逆相高速液体クロマトグラフィー (RPLC) を使用して精製されている。これらの技法を使用して、QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B、およびQH-Cを含めた特定の精製画分が同定されている。サポニンはQS21であることが好ましい。米国特許第5,057,540号では、QS21を作製する方法が開示されている。サポニン処方物はまた、コレステロールなどのステロールも含みうる (WO96/33739を参照されたい)。

20

#### 【0187】

サポニン処方物は、ステロール、コレステロール、および脂質処方物を包含しうる。サポニンとコレステロールとの組み合わせを使用して、免疫刺激複合体 (ISCOM) と呼ばれる固有の粒子を形成することができる。ISCOMはまた典型的に、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンなどのリン脂質も包含する。あらゆる公知のサポニンは、ISCOM中で使用することができる。ISCOMは、Quill A、QH A、およびQH Cのうちの1または複数を包含することが好ましい。EP0109942、WO96/11711、およびWO96/33739では、ISCOMがさらに記載されている。任意選択により、ISCOMは、追加の(1つまたは複数の)洗浄剤を欠くことができる。WO00/07621を参照されたい。

30

#### 【0188】

Barrら (1998年)、ADV. DRUG DEL. REV.、32巻: 247~271頁では、サポニンに基づくアジュバントの開発についての総説を見出すことができる。また、Sjolanderら (1998年)、ADV. DRUG DEL. REV.、32巻: 321~338頁も参照されたい。

#### 【0189】

ヴィロソームおよびウイルス様粒子 (VLP) は一般的に、ウイルスに由来する1または複数のタンパク質であって、任意選択により、リン脂質と組み合わせたまたは処方されたタンパク質を含有する。それらは一般的に、非病原性、非複製性であり、一般的に天然のウイルスゲノムのうちのいずれも含有しない。ウイルスタンパク質は、組換えにより作製されうるまたは全ウイルスから単離されうる。ヴィロソームまたはVLPにおいて使用するのに適したこれらのウイルスタンパク質には、インフルエンザウイルス (HAまたはNAなど)、B型肝炎ウイルス (コアタンパク質またはカプシドタンパク質など)、E型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、シンドビスウイルス、口タウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、ノーウォークウイルス、ヒトパピローマウイルス、HIV、RNAファージ、Q ファージ (コートタンパク質など)、GAファージ、fr ファージ、AP205 ファージ、およびTy (レトロトランスポゾン Ty タンパク質 p1など) に由来するタンパク質が含まれる。VLPは、WO03/024480; WO03/024481; Nikiuraら (2002年)、VIROLOGY、293巻: 273~280頁; Len

40

50

zら(2001年)、J. IMMUNOL.、166巻(9号):5346~5355頁; Pintoら(2003年)、J. INFECT. Dis.、188巻:327~338頁; およびGerberら(2001)J. VIROL.、75巻(10号):4752~4760頁においてさらに論じられている。ウィロゾームは、たとえばGlickら(2002年)、VACCINE、20巻:B10~B16頁においてさらに論じられている。鼻腔内用の三価INFLEXAL(商標)製品(MischlerおよびMetcalfe(2002年)、VACCINE、20巻、増刊5号:B17~B23頁)およびINFLUVAC PLUS(商標)製品では、免疫増強再構成型インフルエンザウィロゾーム(IRIV)がサブユニット抗原送達系として使用されている。

## 【0190】

アジュバントとしての使用に適した細菌性誘導体または微生物性誘導体には、以下が含まれるがこれらに限定されない。

## 【0191】

(1) 腸内細菌性リポ多糖(LPS)の非毒性誘導体: このような誘導体は、モノホスホリルリピドA(MPL)および3-O-脱アシル化MPL(3dMPL)を包含する。3dMPLとは、4つ、5つ、または6つのアシル化鎖を有する3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドAの混合物である。EP0689454では、3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドAの好ましい「小粒子」形態が開示されている。3dMPLのこのような「小粒子」は、0.22ミクロンの膜を介して滅菌濾過するのに十分な程度に小型である(EP0689454を参照されたい)。他の非毒性LPS誘導体には、アミノアルキルグルコサミニドリン酸塩誘導体、たとえばRC-529など、モノホスホリルリピドA模倣体が含まれる。Johnsonら(1999年)、Bioorg. Med. Chem. Lett.、9巻:2273~2278頁を参照されたい。

10

20

30

40

## 【0192】

(2) リピドA誘導体: リピドA誘導体には、OM-174など、Escherichia coliに由来するリピドAの誘導体が含まれる。OM-174については、たとえばMeraldil(2003年)、Vaccine、21巻:2485~2491頁; およびPajakら(2003年)、Vaccine、21巻:836~842頁において記載されている。別の例示的なアジュバントは、合成のリン脂質二量体のE6020(日本、東京、エーザイ株式会社)であり、これは、グラム陰性菌に由来する天然のリピドAのうちの多くの物理化学的特性および生物学的特性を模倣する。

## 【0193】

(3) 免疫刺激性オリゴヌクレオチド: 本発明におけるアジュバントとしての使用に適した免疫刺激性オリゴヌクレオチドまたはポリマー分子は、CpGモチーフ(非メチル化シトシンに続きグアノシンを含有し、ホスフェート結合により連結された配列)を含有するヌクレオチド配列を包含する。また、細菌性二本鎖RNAまたは回文配列もしくはポリ(dG)配列を含有する細菌性オリゴヌクレオチドも、免疫刺激性であることが示されている。CpGは、ホスホチオエート修飾などのヌクレオチド修飾/アナログを包含することができ、二本鎖であってもよく、または一本鎖であってもよい。任意選択により、グアノシンを、2'-デオキシ-7'-デアザグアノシンなどのアナログと交換することもできる。可能なアナログ置換の例については、Kandimalla(2003年)、Nucleic Acids Res.、31巻(9号):2393~2400頁; WO02/26757; およびWO99/62923を参照されたい。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は、Krieg(2003年)、Nat. Med.、9巻(7号):831~835頁; McCauskier(2002年)、FEMS Immunol. Med. Microbiol.、32巻:179~185頁; WO98/40100; 米国特許第6,207,646号; 米国特許第6,239,116号; および米国特許第6,429,199号においてさらに論じられている。

## 【0194】

CpG配列は、モチーフGTCGTTまたはTTCGTTなど、TRL9へと方向付け

50

られうる。Kandimalla(2003年)、Biochem. Soc. Trans.、31巻(3号):654~658頁を参照されたい。CpG配列は、CpG-ODNなど、Th1免疫応答を誘発するのに特異的であってもよく、またはCpG-BODNなど、B細胞応答を誘発するのにより特異的であってもよい。CpG-AODNおよびCpG-BODNは、Blackwell(2003年)、J. Immunol.、170巻(8号):4061~4068頁; Krieg(2002年)、TRENDS Immunol.、23巻(2号):64~65頁; およびWO01/95935において論じられている。CpGは、CpG-AODNであることが好ましい。

#### 【0195】

CpGオリゴヌクレオチドは、5'末端が受容体認識のために接近可能であるように構築することが好ましい。任意選択により、2つのCpGオリゴヌクレオチド配列をそれらの3'末端において接合して「イムノマー」を形成してもよい。たとえばKandimalla(2003年)、BBRC、306巻:948~953頁; Kandimalla(2003年)、Biochem. Soc. Trans.、31巻(3号):654~658頁; Bhagat(2003年)、BBRC、300巻:853~861頁; およびWO03/035836を参照されたい。

10

#### 【0196】

また、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよびポリマー分子には、ポリビニル骨格(Pitha(1970年)、Biochem. Biophys. Acta、204巻(1号):39~48頁; Pitha(1970年)、Biopolymers、9巻(8号):965~977頁)、およびモルホリノ骨格(米国特許第5,142,047号; 米国特許第5,185,444号)などであるがこれらに限定されない、代替的なポリマー骨格構造も含まれる。当技術分野では、多様な他の荷電ポリヌクレオチドアナログおよび非荷電ポリヌクレオチドアナログが公知である。当技術分野では、非荷電連結(たとえばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、およびカルバメート)および荷電連結(たとえばホスホロチオエートおよびホスホロジチオエート)が含まれるがこれらに限定されない、多数の骨格修飾が公知である。

20

#### 【0197】

アジュvantのIC31(Intercell AG、Vienna、Austria)は、抗菌ペプチドであるKLKおよび免疫刺激性オリゴヌクレオチドであるODNIAを含有する合成の処方物である。2つの成分溶液は、抗原(たとえば抗原と会合した、本発明に従う粒子)と簡単に混合することができ、コンジュゲーションは必要とされない。

30

#### 【0198】

ADPリボシル化毒素およびそれらの解毒誘導体:細菌性ADPリボシル化毒素およびそれらの解毒誘導体は、本発明におけるアジュvantとして使用することができる。好ましくは、タンパク質は、E. coli(すなわちE. coliの易熱性腸内毒素「LT」)、コレラ(「CT」)、または百日咳(「PT」)に由来する。解毒ADPリボシル化毒素の粘膜アジュvantとしての使用は、WO95/17211において記載されており、非経口アジュvantとしての使用は、WO98/42375において記載されている。好ましくは、アジュvantが、LT-K63、LT-R72、およびLTR192Gなどの解毒LT変異体である。ADPリボシル化毒素およびそれらの解毒誘導体、特にLT-K63およびLT-R72のアジュvantとしての使用は、以下の参考文献: Beignon(2002年)、Infect. Immun.、70巻(6号):3012~3019頁; Pizza(2001年)、Vaccine、19巻:2534~2541頁; Pizza(2000年)、J. Med. Microbiol.、290巻(4~5号):455~461頁; Scharton-Kersten(2000年)、Infect. Immun.、68巻(9号):5306~5313頁; Ryan(1999年)、Infect. Immun.、67巻(12号):6270~6280頁; Partidos(1999年)、Immunol. Lett.、67巻(3号):209~216頁; Peppoloni(2003年)、Vaccines、2巻50

40

50

(2号) : 285~293頁；およびPineら(2002年)、J. Control Release、85巻(1~3号)：263~270頁において見出すことができる。アミノ酸置換の番号について言及は、Domenighiniら(1995年)、Mol. Microbiol.、15巻(6号)：1165~1167頁において示されている、ADPリボシリ化毒素のAサブユニットおよびBサブユニットのアラインメントに基づくことが好ましい。

#### 【0199】

また、生体付着物質および粘膜付着物質もアジュバントとして使用することができる。適した生体付着物質には、エステル化されたヒアルロン酸マイクロスフェア(Singhら(2001年)、J. Cont. Release、70巻：267~276頁)またはポリアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖、およびカルボキシメチルセルロースの架橋された誘導体などの粘膜付着物質が含まれる。また、キトサンおよびその誘導体も、本発明におけるアジュバントとして使用することができる(WO99/27960を参照されたい)。

10

#### 【0200】

アジュバントとしての使用に適したリポソーム処方物の例は、米国特許第6,090,406号；米国特許第5,916,588号；およびEP特許公開第EP0626169号において記載されている。

#### 【0201】

本発明における使用に適したアジュバントは、ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステルを包含する(たとえばWO99/52549を参照されたい)。このような処方物には、オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(WO01/21207)の他、オクトキシノールなど、少なくとも1つの追加の非イオン性界面活性剤と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤またはポリオキシエチレンアルキルエステル界面活性剤(WO01/21152)がさらに含まれる。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群から選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル(ラウレス9)、ポリオキシエチレン-9-ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン-8-ステオリルエーテル(polyoxyethylene-8-stearyl ether)、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエレン-23-ラウリルエーテル。

20

#### 【0202】

アジュバントとしての使用に適したPCPP処方物については、たとえばAndrianoovら(1998年)、Biomaterials、19巻(1~3号)：109~115頁；およびPayneら(1998年)、Adv. Drug Del. Rev.、31巻(3号)：185~196頁において記載されている。

30

#### 【0203】

アジュバントとしての使用に適したムラミルペプチドの例には、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-1-アラニル-d-イソグルタミン(nor-MDP)、およびN-アセチルムラミル-1-アラニル-d-イソグルタミニル-1-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイyl-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(MTP-PE)が含まれる。

40

#### 【0204】

アジュバントとしての使用に適したイミダゾキノリン化合物の例には、Stanley(2002年)、Clin. Exp. Dermatol.、27巻(7号)：571~577頁；Jones(2003年)、Curr. Opin. Investig. Drugs、4巻(2号)：214~218頁；ならびに米国特許第4,689,338号；同第5,389,640号；同第5,268,376号；同第4,929,624号；同第5,266,575号；同第5,352,784号；同第5,494,916号

50

; 同第5, 482, 936号; 同第5, 346, 905号; 同第5, 395, 937号; 同第5, 238, 944号; および同第5, 525, 612号においてさらに記載されている、イミキモドおよびそのアナログが含まれる。

#### 【0205】

アジュバントとしての使用に適したチオセミカルバゾン化合物、ならびにこのような化合物を処方する方法、製造する方法、およびこれらについてスクリーニングする方法の例には、WO04/60308において記載される例が含まれる。チオセミカルバゾンは、TNF-などのサイトカインを産生するためにヒト末梢血単核細胞を刺激するのに特に有効である。

#### 【0206】

アジュバントとしての使用に適したトリプタントリン化合物、ならびにこのような化合物を処方する方法、製造する方法、およびこれらについてスクリーニングする方法の例には、WO04/64759において記載される例が含まれる。トリプタントリン化合物は、TNF-などのサイトカインを産生するためにヒト末梢血単核細胞を刺激するのに特に有効である。

#### 【0207】

アジュバントとしての使用に適したベンゾナフチリジン化合物、ならびに処方する方法および製造する方法の例には、WO2009/111337において記載される例が含まれる。

#### 【0208】

アジュバントとしての使用に適したリポペプチドについては、上記に記載されている。他の例示的なリポペプチドには、たとえばTLR2のアゴニストであるLPS40が含まれる。たとえばAkdisら、EUR. J. IMMUNOLOGY、33巻：2717～26頁(2003年)を参照されたい。ムレインリポペプチドとは、E.coliに由来するリポペプチドである。Hantkeら、Eur. J. Biochem.、34巻：284～296頁(1973年)を参照されたい。ムレインリポペプチドは、N-アセチルムラミン酸へと連結されたペプチドを含み、したがって、Baschangら、Tetrahedron、45巻(20号)：6331～6360頁(1989年)において記載されているムラミルペプチドと類縁である。

#### 【0209】

アジュバントとしての使用に適したヒト免疫調節物質には、例だけを目的として述べると、インターロイキン(IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12)、インターフェロン(例だけを目的として述べると、インターフェロンなど)、マクロファージコロニー刺激因子、および腫瘍壊死因子などのサイトカインが含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0210】

アジュバントとしての使用に適した微粒子には、生分解性および非毒性の物質(たとえばポリ(-ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトンなど)から形成される微粒子が含まれるがこれらに限定されない。ある実施形態では、このような微粒子を、負に荷電した表面を有するように(たとえばSDSにより)処理する、または正に荷電した表面を有するように(たとえばCTABなどのカチオン性洗浄剤により)処理する。アジュバントとしての使用に適した微粒子の粒子直径は、約100nm～約150μmである。ある実施形態では、粒子直径が、約200nm～約30μmであり、他の実施形態では、粒子直径が、約500nm～10μmである。

#### 【0211】

##### 4. キット

本発明はまた、第1のポリペプチド抗原をコードするRNA分子および第2のポリペプチド抗原をコードするRNA分子が別個の容器に入ったキットも提供する。たとえばキットは、第1のポリペプチド抗原をコードするRNA分子を含む組成物を含む第1の容器と

10

20

30

40

50

、第2のポリペプチド抗原を含む組成物を含む第2の容器とを含有しうる。

【0212】

記載されるキットは、本明細書で記載される免疫原性組成物のRNA成分とポリペプチド成分との共送達のために使用することができる（たとえばRNA成分とポリペプチド成分とを、同時的送達のために、投与前に混合し得る）。

【0213】

ポリペプチドまたはRNA分子を含む組成物は、液体形態であってもよく、または固体形態（たとえば凍結乾燥させた）であってもよい。組成物に適した容器には、たとえばボトル、バイアル、シリンジ、および試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックを含めた多様な材料から形成されうる。容器は、滅菌のアクセスポートを有しうる（たとえば容器は、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により穿刺可能なストッパーを有するバイアルでありうる）。

10

【0214】

キットは、リン酸緩衝食塩水、リングル液、またはデキストロース溶液など、薬学的に許容される緩衝液を含む第3の容器をさらに含みうる。キットはまた、緩衝剤、希釈剤など、薬学的に許容される他の処方溶液、フィルター、注射針、およびシリンジ、または他の送達デバイスを含め、エンドユーザーに有用な他の材料も含有しうる。キットは、アジュバント（アルミニウム含有アジュバントまたはMF59など）を含む第4の容器もさらに包含しうる。

20

【0215】

キットはまた、免疫を誘発する方法または感染を処置する方法についての書面による指示を含有するパッケージの添付文書も含みうる。パッケージの添付文書は、未承認のパッケージの添付文書の草稿であってもよく、または米国食品医薬品局（FDA）または他の規制機関により承認されたパッケージの添付文書であってもよい。

【0216】

本発明はまた、上記の免疫原性組成物、初回刺激組成物、または追加刺激組成物であらかじめ充填された送達デバイスも提供する。

30

【0217】

### 5. 免疫原性組成物

一態様では、本発明は、(i) 第1のポリペプチド抗原と；(ii) 第2のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子とを含む免疫原性組成物に関し、ここで、第1のポリペプチド抗原と第2のポリペプチド抗原とは、異なる病原体に由来する。

【0218】

免疫原性組成物は典型的に、本明細書で記載される、薬学的に許容される担体および/または適した送達系（リポソーム、ナノエマルジョン、PLGによる微粒子およびナノ粒子、リポプレックス、キトサンによる微粒子およびナノ粒子、ならびにRNA送達のための他のポリプレックスなど）を包含する。所望の場合、他の薬学的に許容される成分は、賦形剤およびアジュバントなどを包含しうる。これらの組成物は、抗ウイルスワクチンとして使用することができる。

40

【0219】

薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物により部分的に決定される他、組成物を投与するのに使用される特定の方法によっても決定される。したがって、本発明の免疫原性組成物に適した多種多様な処方物が存在する。多様な水性担体を使用することができる。免疫原性組成物において使用するのに適した、薬学的に許容される担体には、真水（たとえばw.f.i.）または緩衝液、たとえばリン酸緩衝液、トリス緩衝液、ホウ酸緩衝液、コハク酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、またはクエン酸緩衝液が含まれる。緩衝液の塩は典型的に、5~20mMの範囲で包含することができる。

【0220】

免疫原性組成物は滅菌であることが好ましく、通常の滅菌技法で滅菌することができる。  
。

50

## 【0221】

組成物は、pH調整剤およびpH緩衝剤、ならびに張度調整剤など、たとえば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど、生理学的状態を近似するのに必要とされる、薬学的に許容される補助物質を含有しうる。

## 【0222】

本発明の免疫原性組成物のpHは、5.0～9.5の間、たとえば6.0～8.0の間であることが好ましい。

## 【0223】

本発明の免疫原性組成物は、張度をもたらすためのナトリウム塩（たとえば塩化ナトリウム）を包含しうる。10±2mg/mlのNaCl濃度が典型的である（たとえば約9mg/ml）。

10

## 【0224】

本発明の免疫原性組成物の質量オスモル濃度は、200mOsm/kg～400mOsm/kgの間、たとえば240～360mOsm/kgの間、または290～310mOsm/kgの間でありうる。

## 【0225】

本発明の免疫原性組成物は、チオメルサールまたは2-フェノキシエタノールなど、1つまたは複数の防腐剤を包含しうる。水銀非含有組成物が好ましく、防腐剤非含有ワクチンも調製することができる。

20

## 【0226】

本発明の免疫原性組成物は、非発熱性であることが好ましく、たとえば1用量当たり<1EU（標準的な尺度である内毒素単位）を含有し、1用量当たり<0.1EUを含有することが好ましい。本発明の免疫原性組成物は、グルテン非含有であることが好ましい。

## 【0227】

免疫原性組成物中のポリペプチド分子およびRNA分子の濃度は、変化する可能性があり、選択される特定の投与方式および意図されるレシピエントの必要に従い、流体の容量、粘性、体重、および他の検討事項に基づき選択されるであろう。しかし、免疫原性組成物は、処置または防止に有効な量（単回用量において、またはシリーズの一部として）など、有効量のRNA+ポリペプチドを提供するように処方される。この量は、処置される個体の健康および体調、年齢、処置される個体の分類群（たとえば非ヒト霊長動物、ヒト霊長動物など）、抗原に対して個体の免疫系が反応する能力、処置される状態、および他の関与性の因子に応じて変化する。量は、日常的な試験を介して決定されうる比較的広い範囲内に収まることが予測される。組成物のRNA含量は一般的に、1用量当たりのRNAの量で表現される。好ましい用量は、200μg、100μg、50μg、または10μgのRNAであり、発現は、たとえば1用量当たり1μg、1用量当たり100ng、1用量当たり10ng、1用量当たり1ngなどはるかに低レベルで見られうる。各用量におけるポリペプチドの量は一般的に、約0.1～約100μgのポリペプチドを含み、約5～約50μgが好ましく、1用量当たり約5～約25μgが代替的に好ましい。

30

## 【0228】

存在する場合のアジュバントの量は、著明な有害な副作用を有さない免疫調節性応答を誘発する量であろう。特定のワクチンのための任意選択の量は、ワクチンの抗体力値およびそれらのウイルスの中和能についての観察を伴う標準的な研究により確認することができる。アジュバントの量は、1用量当たり約1～約100μgであり、1用量当たり約5～約50μgが好ましく、1用量当たり約20～約50μgが代替的に好ましい。

40

## 【0229】

たとえば関節内（intraarticular）（関節内（in the joints））注射、静脈内注射、または腹腔内注射により、好ましくは筋内注射、皮内注射、または皮下注射によるなど、非経口投与に適する処方物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および処方物を意図されるレシピエントの血液と等張性とする溶質を含有しうる水性お

50

および非水性で等張性の滅菌注射溶液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、および防腐剤を包含しうる水性および非水性の滅菌懸濁液が含まれる。処方物は、アンプルおよびバイアルなど、単位用量または複数用量の密封容器内に存在させることができる。注射溶液および懸濁液は、滅菌の粉末、顆粒、および錠剤から調製することができる。また、RNA分子により形質導入される細胞も、静脈内投与または非経口投与することができる。

#### 【0230】

経口投与に適する処方物は、(a)水、食塩水、またはPEG 400などの希釈剤中に懸濁させた、有効量のパッケージングされた核酸などの液体溶液；(b)各々が液体、固体、顆粒、またはゼラチンとしての所定量の有効成分を含有する、カプセル、小袋(sachet)、または錠剤；(c)適切な液体中の懸濁液；および(d)適したエマルジョンからなりうる。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、トラガント、微晶質セルロース、アカシア、ゼラチン、コロイド状の二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、滑石、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、および他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、保湿剤、防腐剤、芳香剤、色素、崩壊剤、および医薬として適合性の担体のうちの1または複数を包含しうる。ロゼンジ形態が、通常スクロースおよびアカシアまたはトラガントである矯味矯臭剤中に有効成分を含みうる他、香錠は、ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースなど、不活性の基剤中に有効成分を含み、アカシアエマルジョン、アカシアゲルなどは、有効成分に加えて、当技術分野で公知の担体を含有する。  
10

#### 【0231】

ポリペプチドおよびRNA分子は、経口投与される場合、消化から保護されなければならないことが認識される。ポリペプチドおよびRNA分子の保護は、典型的にRNA分子またはポリペプチド分子を組成物と複合体化させて、RNA / ポリペプチドを酸および酵素による加水分解に対して耐性とすることにより、またはRNA分子またはポリペプチド分子を、リポソームなど、適切に耐性である担体中にパッケージングすることにより達成することができる。当技術分野では、核酸(RNA分子など)およびポリペプチドを消化から保護する手段が周知である。  
20

#### 【0232】

免疫原性組成物は、たとえばリポソーム中または有効成分の徐放をもたらす処方物中に被包することができる。たとえばRNA分子は、リポソームとして処方し、次いで、初回刺激組成物として投与することができる。代替的にリポソームと処方されたRNAは、本発明のRNA + ポリペプチド免疫原性組成物を産生するためのポリペプチド分子と混合することができる。代替的にRNA分子とポリペプチド分子とは、リポソーム内に共被包することができる。  
30

#### 【0233】

本明細書で記載される組成物(RNAおよびポリペプチドを含む免疫原性組成物)は、単独でまたは他の適した成分と組み合わせて、吸入を介して投与するためのエアゾール処方物へと作製することができる(たとえば「噴霧化」させることができる)。エアゾール処方物は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧された許容可能な噴霧体中に入れることができる。  
40

#### 【0234】

適した坐剤処方物は、RNA、ポリペプチド、または本明細書で記載されるポリペプチドとRNAとの組み合わせ、および坐剤基剤を含有しうる。適した坐剤基剤には、天然または合成のトリグリセリドまたはパラフィン炭化水素が含まれる。また、本明細書で記載されるポリペプチドおよびRNA分子ならびに適した基剤、たとえば液体トリグリセリド、ポリエチレングリコール、およびパラフィン炭化水素で充填したゼラチンによる直腸用カプセルを使用することも可能である。

#### 【0235】

10

20

30

40

50

## 6. 免疫応答を生成させる方法またはこれを増強する方法

別の態様では、本発明は、免疫応答を、それを必要とする脊椎動物、好ましくは哺乳動物などの被験体において誘発する、生成させる、または増強するための方法であって、有効量の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法を提供し、ここで組成物は、(i) 第1のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子と；(ii) 第2のポリペプチド抗原とを含み；ここで、第1のポリペプチド抗原と第2のポリペプチド抗原とは異なる病原体に由来する。免疫応答は防御性であることが好ましく、抗体および／または細胞介在性免疫を伴うことが好ましい。

### 【0236】

別の態様では、本明細書で開示される免疫原性組成物を、それを必要とする脊椎動物、好ましくは哺乳動物などの被験体において免疫応答を誘発する、生成させる、または増強するための医薬の製造において使用することができる。

10

### 【0237】

別の態様では、本発明は、それを必要とする被験体（脊椎動物、好ましくは哺乳動物などの）において感染性疾患を処置または予防するための方法であって、有効量の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法を提供し、ここで、この免疫原性組成物は、(i) 第1のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子と；(ii) 第2のポリペプチド抗原とを含み；ここで、第1のポリペプチド抗原と第2のポリペプチド抗原とは異なる病原体に由来する。

### 【0238】

別の態様では、本明細書で開示される組成物を、それを必要とする脊椎動物、好ましくは哺乳動物などの被験体において感染性疾患を処置または予防するための医薬の製造において使用することができる。

20

### 【0239】

別の態様では、本発明は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物などの被験体にワクチン接種する、または被験体を病原体（たとえば細菌性病原体、ウイルス性病原体、真菌性病原体、原虫病原体、または多細胞寄生虫性病原体）に対して免疫化するための方法であって、有効量の免疫原性組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む方法を提供し、ここで、この免疫原性組成物は、(i) 第1のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子と；(ii) 第2のポリペプチド抗原とを含み；ここで、第1のポリペプチド抗原と第2のポリペプチド抗原とは異なる病原体に由来する。

30

### 【0240】

別の態様では、本明細書で開示される組成物を、それを必要とする、脊椎動物、好ましくは哺乳動物などの被験体にワクチン接種するための医薬の製造において使用することができる。

### 【0241】

適した動物被験体には、たとえば魚類、鳥類、ウシ、ブタ、ウマ、シカ、ヒツジ、ヤギ、バイソン、ウサギ、ネコ、イヌ、ニワトリ、アヒル、シチメンチョウなどが含まれる。哺乳動物は、好ましくはヒトである。ワクチンが予防的使用のためである場合、ヒトは小児（たとえばよちよち歩きの小児または幼児）、ティーンエイジャー、または成人であることが好ましいが；ワクチンが治療的使用のためである場合、ヒトは青少年または成人であることが好ましい。また、小児用に意図されるワクチンを成人へと投与して、たとえば安全性、投与量、免疫原性などを評価することもできる。

40

### 【0242】

治療的処置の有効性を点検する1つの方法は、本明細書で開示される組成物またはワクチンを投与した後における病原体感染のモニタリングを伴う。予防的処置の有効性を点検する1つの方法は、抗原に対する全身における免疫応答のモニタリング（IgG1およびIgG2aの産生レベルのモニタリングなど）および／または粘膜における免疫応答のモニタリング（IgAの産生レベルのモニタリングなど）を伴う。典型的に、抗原特異的血清抗体応答が、免疫化後であるが攻撃前に決定されるのに対し、抗原特異的粘膜性抗体応

50

答は、免疫化後であり攻撃後に決定される。

【0243】

核酸分子（たとえばRNA）がタンパク質抗原をコードする場合に本明細書で開示される組成物またはワクチンの免疫原性を評価する別の方針は、タンパク質抗原を組換えにより発現させて、患者の血清または粘膜性分泌物を免疫プロットおよび／またはマイクロアレイによりスクリーニングすることである。タンパク質と患者試料との陽性反応は、患者が問題のタンパク質に対する免疫応答を惹起したことを示す。この方法はまた、タンパク質抗原内の免疫優性抗原および／または免疫優性エピトープを同定するのにも使用することができる。

【0244】

組成物の有効性はまた、in vivoにおいて目的の感染病原体の適切な動物モデルを攻撃することによっても決定することができる。

【0245】

RNA分子とポリペプチド分子とを共投与する場合も、ポリペプチド分子とRNA分子とを別個にパッケージングすることがやはり所望でありうる。2つの成分は、たとえば投与前約72時間、約48時間、約24時間、約12時間、約10時間、約9時間、約8時間、約7時間、約6時間、約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間、約45分間、約30分間、約15分間、約10分間、または約5分間以内に混合することができる。たとえばポリペプチド分子とRNA分子とは、患者のベッドサイドで混合することができる。

【0246】

投薬は、単回用量スケジュールによつてもよく、または複数回用量スケジュールによつてもよい。複数回投与は、一次免疫化スケジュールおよび／または追加投与免疫化スケジュールにおいて使用することができる。複数回用量スケジュールでは、多様な用量を、たとえば非経口の初回刺激および粘膜の追加刺激、粘膜の初回刺激および非経口の追加刺激など、同じ経路により施してもよく、または異なる経路により施してもよい。複数回用量は典型的に、少なくとも1週間（たとえば約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間など）隔てて投与される。本明細書で開示される免疫原性組成物は、プライムまたはブーストとして投与される免疫原性組成物が单一の病原体によるワクチンを含むかどうかに関わらず、プライムおよび／またはブーストとして使用することができる。

【0247】

本明細書で開示される組成物であつて、1つもしくは複数の抗原を包含する、または1つもしくは複数の抗原と共に使用される組成物を使用して、小児および成人の両方を処置することができる。したがつて、ヒト被験体は、1歳未満、1～5歳、5～15歳、15～55歳、または少なくとも55歳でありうる。組成物を受けるのに好ましい被験体は、老齢者（たとえば>50歳、>60歳であり、好ましくは>65歳である）、若齢者（たとえば<5歳）、入院患者、医療ケア従事者、軍隊および軍の職員、妊婦、慢性疾病患者、または免疫不全患者である。組成物は、これらの群だけに適するわけではなく、集団内により一般的に使用することができる。

【0248】

好ましい投与経路は、筋内注射、腹腔内注射、皮内注射、皮下注射、静脈内注射、動脈内注射、および眼内注射が含まれるがこれらに限定されない。経口投与および経皮投与の他また、吸入または坐剤による投与も想定される。特に好ましい投与経路には、筋内注射、皮内注射、および皮下注射が含まれる。本発明のいくつかの実施形態に従い、組成物は、周知であり広く利用可能な注射針のない注射デバイスを使用して宿主動物へと投与される。

【0249】

場合によって、特定の標的細胞型（たとえば抗原提示細胞または抗原プロセシング細胞）を標的とするワクチンを用いることも有利である。

10

20

30

40

50

## 【0250】

カテーテルまたは同様のデバイスを使用して、本発明の組成物を、ポリペプチド + 裸の RNA、送達系と処方されたポリペプチド + RNA（たとえばリポソーム内に被包される RNA）、RNAだけ、またはポリペプチドだけとして、標的器官または組織の中に送達してもよい。適したカテーテルは、たとえば、すべてが参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第4,186,745号；同第5,397,307号；同第5,547,472号；同第5,674,192号；および同第6,129,705号において開示されている。本発明のRNA分子はまた、筋肉などの組織へと直接的に導入することもできる。たとえば米国特許第5,580,859号を参照されたい。「微粒子銃」または粒子介在性形質転換（たとえばSanfordら、米国特許第4,945,050号；米国特許第5,036,006号を参照されたい）など、他の方法もまた、RNAを哺乳動物の細胞へと導入するのに適する。これらの方法は、RNAの哺乳動物へのin vivoにおける導入に有用であるだけでなく、また、哺乳動物へと再導入される細胞のex vivoにおける修飾にも有用である。

## 【0251】

本発明は、RNA、またはRNA + ポリペプチドを送達して、免疫応答を誘発するための、RNAまたはRNA + ポリペプチドを被包したまたは吸着させたリポソーム、ポリマー微粒子、またはサブミクロンのエマルジョン微粒子など、適した送達系の使用を包含する。本発明は、RNAまたはRNA + ポリペプチドを吸着させたかつ／または被包した、リポソーム、微粒子、サブミクロンのエマルジョン、またはこれらの組み合わせを包含する。

## 【0252】

本明細書で開示される組成物であって、1つもしくは複数の抗原を包含するまたは1つもしくは複数の抗原と共に使用される組成物は、他のワクチン、たとえば麻疹ワクチン、ムンプスワクチン、風疹ワクチン、MMRワクチン、水痘ワクチン、MMRVワクチン、ジフテリアワクチン、破傷風ワクチン、百日咳ワクチン、DTPワクチン、b型H.influenzaeコンジュゲートワクチン、不活化ポリオウイルスワクチン、B型肝炎ウイルスワクチン、髄膜炎菌性コンジュゲートワクチン（四価のA.C.W135.Yワクチンなど）、RSウイルスワクチンなどと実質的に同時に（たとえば医療ケア従事者またはワクチン接種施設への同じ医療診察または医療来院の間に）患者へと投与ができる。

## 【0253】

## 7. 定義

本明細書で使用される用語「約」とは、値の±10%を意味する。

## 【0254】

「抗原」とは、免疫学的な応答を誘発する1つまたは複数のエピトープ（直鎖状エピトープ、コンフォメーションアルエピトープ、またはこれらの両方）を含有する分子を指す。

## 【0255】

本明細書で使用される「ポリペプチド抗原」とは、免疫学的応答を惹起する1つまたは複数のエピトープ（直鎖状エピトープ、コンフォメーションアルエピトープ、またはこれらの両方）を含むポリペプチドを指す。ポリペプチド抗原には、たとえば天然に存在するタンパク質、天然に存在するタンパク質の変異改変体（たとえば（1つまたは複数の）アミノ酸置換、（1つまたは複数の）アミノ酸付加、または（1つまたは複数の）アミノ酸欠失を有するタンパク質）、天然に存在するタンパク質の切断型形態（たとえば膜アンカー型タンパク質の細胞内ドメインまたは細胞外ドメイン）の他、融合タンパク質（少なくとも2つの異なる天然に存在するタンパク質またはポリペプチド鎖に由来するタンパク質）が含まれる。加えて、ポリペプチド抗原はまた、1つまたは複数のアミノ酸の立体異性体、誘導体、またはアナログを含むポリペプチドも包含する。たとえばアミノ酸誘導体は、たとえばアルキル化、アシリル化、カルバミル化、ヨード化など、アミノ酸の化学修飾を包含する。アミノ酸アナログには、たとえばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホ

10

20

30

40

50

キシド、メチオニンメチルスルホニウムなど、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的な化学構造を有する化合物が含まれる。ポリペプチド抗原はまた、翻訳後修飾されたポリペプチド（アセチル化、リン酸化、またはグリコシル化されたポリペプチドなど）も包含する。したがって、ポリペプチド抗原のエピトープは、ペプチドに限定されない。たとえばグリコシル化されたポリペプチドのエピトープは、ポリペプチド鎖へと付着された糖基でありうる。

#### 【0256】

用語「融合ポリペプチド」とは、アミノ酸配列が、少なくとも2つの異なる天然に存在するタンパク質またはポリペプチド鎖に由来する単一のポリペプチドを指す。

#### 【0257】

「エピトープ」とは、免疫系により（たとえば抗体、免疫グロブリン受容体、B細胞受容体、またはT細胞受容体により）認識される抗原の部分である。エピトープは、直鎖状エピトープであってもよく、またはコンフォメーショナルエピトープであってもよい。一般的に、エピトープとは、天然に存在する抗原内のポリペプチドまたは多糖である。人工抗原では、エピトープが、アルサニル酸誘導体などの低分子量物質でありうる。通常、B細胞エピトープは、少なくとも約5アミノ酸を包含するが、3～4アミノ酸ほどの小型であってもよい。CTLエピトープなどのT細胞エピトープは典型的に、少なくとも約7～9アミノ酸を包含し、ヘルパーT細胞エピトープは典型的に、少なくとも約12～20アミノ酸を包含する。

#### 【0258】

個体を、複数のエピトープを有するポリペプチド抗原で免疫化する多くの場合、応答するTリンパ球の大部分は、その抗原に由来する1つまたは少数の直鎖状エピトープに特異的であり、かつ／または応答するBリンパ球の大部分は、その抗原に由来する1つまたは少数の直鎖状エピトープまたはコンフォメーショナルエピトープに特異的であろう。このようなエピトープを典型的に「免疫優性エピトープ」と称する。複数の免疫優性エピトープを有する抗原では、単一のエピトープが、最も優性となる可能性があり、典型的に「主要」免疫優性エピトープと称する。残りの免疫優性エピトープを、典型的に（1つまたは複数の）「二次的」免疫優性エピトープと称する。

#### 【0259】

パルボウイルスに対する言及において本明細書で用いられる、用語「副次構造タンパク質」または「副次構造ポリペプチド」または「副次カプシドタンパク質」または「副次カプシドポリペプチド」または「VP1」とは、パルボウイルスのORF2によりコードされるポリペプチドと相同または同一な配列を含むポリペプチドを指し、これに対する81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%の配列同一性など、これらの範囲内にあるあらゆるパーセント同一性を含めた、これに対して少なくとも約80～100%の配列同一性を提示する配列を包含する。

#### 【0260】

パルボウイルスに対する言及において本明細書で用いられる、用語「主要構造タンパク質」または「主要構造ポリペプチド」または「主要カプシドタンパク質」または「主要カプシドポリペプチド」または「VP2」とは、パルボウイルスのORF3によりコードされるポリペプチドと相同または同一な配列を含むポリペプチドを指し、これに対する81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%の配列同一性など、これらの範囲内にあるあらゆるパーセント同一性を含めた、これに対して少なくとも約80～100%の配列同一性を提示する配列を包含する。

#### 【0261】

本明細書で使用される用語「裸の」とは、脂質、ポリマー、およびタンパク質など、他の高分子を実質的に含まない核酸を指す。自己複製RNAなど、「裸の」核酸は、細胞への取込みを改善するために他の高分子と一緒に処方しない。したがって、裸の核酸は、リ

10

20

30

40

50

ポソーム、微粒子またはナノ粒子、カチオン性エマルジョンなどの中に被包しない、これらに吸着させない、またはこれらへと結合させない。

#### 【0262】

本明細書で使用される「ヌクレオチドアナログ」または「修飾ヌクレオチド」とは、1つまたは複数の化学修飾（たとえば置換）を、ヌクレオシド（たとえばシトシン（C）、チミン（T）（またはウラシル（U））、アデニン（A）、またはグアニン（G））の窒素性塩基の内部または表面上において含有するヌクレオチドを指す。ヌクレオチドアナログは、ヌクレオシドの糖部分（たとえばリボース、デオキシリボース、修飾リボース、修飾デオキシリボース、六員環糖アナログ、または非環式糖アナログ）またはホスフェートの内部または表面上においてさらなる化学修飾を含有しうる。

10

#### 【0263】

本明細書で用いられる、用語「パルボウイルス」は、哺乳動物種（たとえば、ヒト、イヌ、ニワトリ、ネコ、マウス、ブタ、アライグマ、ミンク、キルハムラット、ウサギ）と関連するすべてのパルボウイルスを指し、Parvoviridae科のすべての属（すなわち、Parvovirus属（たとえば、イヌパルボウイルス）、Dependovirus属（たとえば、アデノ随伴ウイルス）、Erythrosvirus属（たとえば、パルボウイルスB19）、およびBocavirus属）を広く指す。また、用語パルボウイルスは、出願時に特徴づけられていない分離株も包含する。

20

#### 【0264】

限定せずに述べると、本明細書で用いられる、用語「パルボウイルス抗原」とは、パルボウイルスの多様な分離株のうちのいずれかを含めたパルボウイルスに由来する分子を指す。分子は、問題となる特定の分離株に物理的に由来する必要はなく、合成または組換えにより作製することができる。

#### 【0265】

用語「病原体」とは、増殖が可能であり、脊椎動物（たとえば哺乳動物）などの宿主生物において疾患または疾病を引き起こすウイルス、真核生物、原核生物、または古細菌を指す。病原体は、ウイルス種、細菌種、原虫種、または真菌種の他、多細胞寄生虫種でありうる。

#### 【0266】

本明細書で使用される用語「～を処置する」、「～を処置すること」、または「処置」は、疾患もしくは状態の症状の緩和、軽減、もしくは改善、さらなる症状の防止、症状の根底にある代謝性原因の改善もしくは防止、疾患もしくは状態の阻害、たとえば疾患もしくは状態の発症の抑止、疾患もしくは状態の除去、疾患もしくは状態の退縮の惹起、疾患もしくは状態により引き起こされる状態の除去、または疾患もしくは状態の症状の停止を包含する。用語「～を処置する」、「～を処置すること」、または「処置」には、予防的処置および/または治療的処置が含まれるがこれらに限定されない。

30

#### 【0267】

用語「ウイルス性レプリコン粒子」または「V R P」とは、（1つまたは複数の）構造遺伝子が欠失するために、感染性後代を発生させることが不可能な組換え感染性ビリオンを指す。

40

#### 【0268】

用語「ウイルス様粒子」または「V L P」とは、ウイルス性コートタンパク質（たとえばカプシド）により形成され、任意選択によりエンベロープにより形成されるが、遺伝物質を有さない構造を指す。V L Pは、ウイルス粒子に類似する。

#### 【実施例】

#### 【0269】

ここまで一般的に記載されつつある本発明は、本発明のある態様および実施形態の例示だけを目的として包含されるものであり、本発明を限定することを意図するものではない、以下の例を参照することにより容易に理解されるであろう。

#### 【0270】

50

## (実施例 1 )

合計 60 匹の BALB/c マウスを、6 群（1 群当たりの動物 10 匹ずつ）に分けた。1 群当たり 10 匹ずつの BALB/c マウスから免疫化前に採血して、免疫前血清を回収した。0、21、および 42 日目において、マウスに、表 1 に表示される処方物による両側筋内ワクチン接種（四肢 1 本当たり 50  $\mu$ L ずつ）を施した。LNP (RV01 (15)) は、以下の組成：40% の D1inDMA、10% の DSPC、48% の Chol、2% の PEG DMG 2000 を有し、N:P 比が 8:1 であった。血清は、21 日目 (3wp1)、42 日目 (3wp2)、および 63 日目 (3wp3) における免疫学的分析のために回収した。

【0271】

10

【表 3】

表 1:ワクチン群

群番号	パルボウイルス抗原	CMV 抗原	アジュバント
1	変異体 VP1/VP2 VLP, 5 $\mu$ g	なし	なし
2	変異体 VP1/VP2 VLP, 5 $\mu$ g	なし	MF59
3	なし	gH 全長/gL VRP( $1 \times 10^6$ IU)	なし
4	なし	gH 全長/gL RNA(1 $\mu$ g)	LNP (RV01 (15))
5	変異体 VP1/VP2 VLP, 5 $\mu$ g	gH 全長/gL VRP( $1 \times 10^6$ IU)	なし
6	変異体 VP1/VP2 VLP, 5 $\mu$ g	gH 全長/gL RNA(1 $\mu$ g)	LNP (RV01 (15))

免疫化の 3 週間後、マウスから再度採血し、試験のために血清を回収した。翌日、マウスは、それらに既に投与された同じワクチンによる 2 回目の免疫化を受けた。2 回目の免疫化の 3 週間後、マウスから採血し、試験のために血清を回収した。翌日、3 回目の免疫化を行った。3 回目の免疫化の 3 週間後、マウスから採血し、試験のために血清を回収した。

20

30

【0272】

パルボウイルス特異的応答は、ELISA により、血清 IgG 力値について測定した。野生型のパルボウイルス B19 の VP1/VP2 を使用して、マイクロタイタープレートをコーティングした。血液（免疫前、1 回目の免疫化の 3 週間後、2 回目の免疫化の 3 週間後）から回収された血清を、各ワクチン群（n = 10）についてプールし、IgG 力値について測定した。

40

【0273】

## 【表4】

表2:0、21、および42日目の筋内ワクチン接種後における、1群当たり10匹ずつのBALB/cマウスのCMV血清中和力価。42日目(3wp2)および63日目(3wp3)において、分析のために血清を回収し、補体を有さないARPE-19細胞上のTB40ウイルスと共にインキュベートした。中和力価は、ウェル1つ当たりの陽性のウイルス増殖巣の数の、対照と比べて50%の低減をもたらす血清希釈率の逆数として定義される。

ワクチン群	3wp2	3wp3
パルボ VLP(5mg)	<100	<100
パルボ VLP(5mg) / MF59	<100	<100
CMV VRP, 1E6	7,943	14,430
CMV RNA(1mg)/RV01(35)	5,497	18,328
パルボ VLP+CMV VRP	12,800	17,911
パルボ VLP+CMV RNA/RV01	4,569	22,688

10

20

30

CMV抗原(CMV VRPまたはCMV RNA)がパルボウイルスVLPワクチンへと添加されたワクチンを受けたマウスに由来する血清では、パルボウイルスに対する高いIgG力価が観察された。1回目の免疫化の3週間後、IgG力価は、パルボウイルス+CMV VRPによるワクチンについて、パルボウイルス単独によるワクチンと比較して6倍(40対250)に増大した。1回目の免疫化の3週間後、パルボウイルス+CMV RNAによるワクチンのIgG力価を、パルボウイルス単独によるワクチンと比較したところ、差違はさらに増大した(50倍の増大(40対2,000))。

## 【0274】

2回目の免疫化の3週間後、IgG力価は、パルボウイルス+CMV VRPによるワクチンについて、パルボウイルス単独によるワクチンと比較して2倍に増大した(4,000対9,200)。第1の観察について見られた通り、2回目の免疫化の3週間後、パルボウイルス+CMV RNAによるワクチンのIgG力価を、パルボウイルス単独によるワクチンと比較したところ、差違はさらに増大した(35倍の増大(4,000対138,600))。

## 【0275】

## 【表5】

40

表3:0、21、および42日目の筋内ワクチン接種後21日目(3wp1)、42日目(3wp2)、および63日目(3wp3)における、1群当たり10匹ずつのBALB/cマウスのパルボ特異的血清IgG力価。データは、1群当たり10匹ずつの個別のマウスによるプール力価として表される。個別の動物の力価が<25(検出限界)であった場合、その動物には力価25を割り当てた。

血清試料	ワクチン群	3wp1	3wp2	3wk3
免疫前		<25		
1	パルボ VLP(5mg)	41	3972	404
2	パルボ VLP(5mg)/MF59	7868	365181	53603
3	CMV VRP, 1E6	<25	<25	<25
4	CMV RNA(1mg)/RV01(35)	<25	<25	<25
5	パルボ VLP+CMV VRP	246	9202	1505
6	パルボ VLP+CMV RNA/RV01(35)	2000	138585	16649

プールされた血清を、血清中和抗体力を測定することにより、CMV特異的応答について調べた。パルボウイルスVLPを、CMV VRPワクチンまたはCMV RNAワクチンへと添加しても、CMV中和力価に大きな変化は観察されなかった。

## 【0276】

パルボウイルスVLPおよびMF59アジュバントにより最高の力価が観察された。し

50

かし、パルボウイルスVLP/MF59組成物の力価は、パルボウイルスVLPをCMV RNAと組み合わせた場合に見られる力価の約3倍に過ぎなかった。

【0277】

【表6】

表4:0、21、および42日目の筋内ワクチン接種後における、1群当たり10匹ずつBALB/cマウスのパルボ血清中和力価。42日目(3wp2)および63日目(3wp3)において、血清を回収し、分析のためにプールし、赤血球前駆細胞ベースのqRT-PCR中和アッセイを用いて調べた。

	希釈率	中和力価%				
		1:500	1:2500	1:12500	1:62500	1:312500
3wp2	パルボ VLP/MF59	85.96	75.57	44.66	28.03	-46.09
3wp2	パルボ VLP+CMV RNA/RV01(35)	26.90	4.10	8.27	15.78	-14.01
3wp3	パルボ VLP	56.86	40.23	24.44	3.29	-5.88
3wp3	パルボ VLP/MF59	94.06	87.94	70.02	37.37	-19.09
3wp3	パルボ VLP+CMV VRP	73.38	44.18	19.69	9.57	15.38
3wp3	パルボ VLP+CMV RNA/RV01 (35)	83.93	73.10	40.08	32.36	25.06
5wp3	5ugのパルボ VLP	89.74	80.49	58.67	57.08	25.13
	PI	229.18	191.24	-94.47	-112.55	-197.63

10

20

30

本明細書は、本明細書内で引用される参考文献の教示に照らして最も完全に理解される。本明細書内の実施形態は、本発明の実施形態の例示を提示するものであり、本発明の範囲を限定するものとみなすべきではない。当業者は、他の多くの実施形態が、本発明により包含されることを容易に認識する。本開示において引用されるすべての刊行物および特許は、参照によりそれらの全体において組み込まれる。参照により組み込まれる材料が本明細書と相反するまたは矛盾する場合は、本明細書がこのようなあらゆる材料に優先されるであろう。本明細書におけるあらゆる参考文献の引用は、このような参考文献が本発明に先行することの容認ではない。

【0278】

当業者は、日常的な実験だけを使用して、本明細書で記載される本発明の特定の実施形態との多くの同等物を認識するであろう、または確認することが可能であろう。このような同等物は、以下の実施形態により包含されることを意図する。

【0279】

配列

【0280】

## 【化1】

CMV gB FL : (配列番号 :1)

1 -

atgaaaagccggatctggtgcctggtcgtgtgcgtgaacctgtgcacatcggtgcctgggagc  
 cgccgtgagcagcagcaccagaggcaccacacacagccaccacagcagccaca  
 ccacccctgtcccccacaggcagatccggcagcgtgtccagagagtgaccagcagccagacc  
 gtgtcccacggcgtgaacgagacaatctacaacaccaccctgaagtaacggcgcacgtcgtgg  
 cgtgaataccaccaagtacccctacagagtgtgcagcatggcccaggcaccgacactgatca  
 gattcgagcggAACATCGTGTGCACAGCATGAAGCCATCAACGAGGACCTGGACGGGC  
 ATCATGGTGGTGTACAAGAGAAACATCGTGGCCCACACCTTCAAAGTGCGGGTGTACCGA  
 GGTGCTGACCTTCGGCGGAGCTACGCCTACATCCACACCACATACCTGCTGGCAGCAACA  
 CCGAGTACGTGGCCCTCCATGTGGAGATCCACCATCAACAGCACAGCCAGTGTAC  
 AGCAGCTACAGCCGCGTGTACCGCAGCAGTGTGTGGCTTACCCACCGGGACAGCTACGA  
 GAACAAGACCATGCGAGCTGTACGCCGACGACTACAGCAACACCCACAGCACCAGATACTGA  
 CCCTGAAGGACCAGTGGCACAGCAGAGGAGCACCTGGCTGTACCGGGAGACATGCAACCTG  
 AACTGATGGTCAACATCACCACCGCCAGAAGCAAGTACCCATTACCACTTCTTCGCCACCTC  
 CACCGCGACGTGGACATCAGCCCTTACAACCGCACCAACCGGAACGCCAGCTACT  
 TCAGCGAGAACGCCAGACAAGTTCTCATTTCCCAACTACACCATCGTGTCCACTTCGGC  
 AGACCCAACAGCGCTTGAAACCCACAGACTGGTGGCCTTCTGGAACGGGCCAGCGT  
 GATCAGCTGGACATCCAGGAGCAGAACGTGACCTGCCAGCTGACCTTCTGGGAGGCT  
 CTGAGAGAACCATCAGAAGCGAGGCCAGGACAGCTACCACTCAGCAGGCCAGATGACC  
 GCCACCTTCCTGAGCAAGAACAGGAAGTGAACATGAGCAGCTCCGCCCTGGACTCGT  
 GGACGAGGCCATCAACAGCTGCGAGCATCTCAACACCCAGCTACAACCGACACTACGAGA  
 AGTATGGCAATGTGTCGTGAGACAACAGGGCGCTGGTGGTCTGGCAGGGCATC  
 AACAGAAAAGCTGGTGGAGCTGGAACGGCTCGCCAACCGTCCAGCCTGAACCTGACCC  
 CAACCGGACCAAGCGGAGCAGGCAACACGCAACCCACCTGTCCAACATGGAAAGCG  
 TGACACAACCTGGTGTACGCACAGCTGCAAGTTCACCTACGACACCCCTGGGGCTACATCAAC  
 AGAGCCCTGGCCAGATCGCCAGGCTTGGTGCCTGGACAGCGGCCAGCTGGAAAGTGT  
 CAAAGAGCTGTCACAGATCAACCCAGCGCCATCTGAGCGCCATCTACAACAGCCTATCG  
 CGCCAGATTATGGCGACGTGCTGGCCTGGCCAGCTGCGTGCCTGACCATCAACCGACAGC  
 GTGAAGGTTGCTGCCAGATGAACGTGAAAGAGAGGCCAGGGCGTGTACTCCAGACCG  
 GGTGATCTTCACCTCGCAACAGCTCCTACGTGCAAGTGCAGCTGGCGAGGACAACG  
 AGATCCTGCTGGGAACCACCGGACCGAGGAATGCCAGCTGCCAGCTGAAGATCTTATC  
 GCGGCAACAGCGCCTACGAGTATGTGGACTACCTGTTCAAGCGGATGATCGACCTGAGCAG  
 CATCTCCACCGTGGACAGCATGATCGCCCTGGACATCGACCCCTGGAAAACACCGACTTCC  
 GGGTGTGGAACTGTACAGCCAGAAAGAGACTGCGGAGCAGCAACGTGTTGACCTGGAAAGAG  
 ATCATGCGGAGTTCAACAGCTACAGCGCGTGAACATCGTGGAGGACAAGGTGGT  
 CCCCTGCCTCCTACCTGAAGGGCCTGGACGACCTGATGAGCGGACTGGCGCTGCCGAA  
 AAGCCGTGGAGTGGCATTGGAGCTGTGGCGGGAGCTGTGGCCTCTGTCGTGGAAGGC  
 GGCACCTTCCTGAAAGAACCCCTCGCGCCTTACCATCATCTGGTGGCATTGCCGTG  
 GATCATCACCTACCTGATCTACACCCCGCAGCGGAGACTGTGTACCCAGCCCTGCA  
 TGTTCCTACCTGGTGTCCCGCATGGCACCAAGCTGACCGAGCAGCGGCTCCACCAAGG  
 AGCTGCGAGCCCCACCCAGCTACGAAGAGAGCGTGTACAACAGCGGAGAAAGGGCC  
 CCCTCCAGCTGTGATGCCAGCACAGCCGCCCTCCCTACACCAACGAGCAGGCC  
 TGCTGCTGGCCCTGGTAGACTGGATGCCAGCAGAGGGCCAGCAGAACGGCACCG  
 CTGATGGCAGAACCGGCACCCAGGACAAGGCCAACCTGCTGGACCGGCTGCG  
 GCACCGGAAGAACGGCTACCGCACCTGAAGGACAGCGACAGGAGAACGCT  
 - 2727

10

20

30

40

CMV gB FL : (配列番号 :2)

MESRIWCLVVCVNL CIVCLGA AVSSSSTRGTSATHSHHSSHTSAHSRSGSVQRVTSSQT  
 VSHGVNETIYNTTLKYGDVVGVNTTKYPYRVCMSMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINEDLDEG  
 IMVYKRNIVAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPWEIHHINSHSQCY  
 SSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSRGSTWL  
 RETCNLCNCMTITTARSKYPYHFFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIF  
 PNYTIVSDFGRPNSALETHRLVAFLERADSVISWDIQC  
 EKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMT  
 ATFLSKKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQQIFNTSY  
 NQTYEKGNVSFETTGGLVFWQGI  
 KQKSLVELERLANRSSLNLTHNRTKRSTDGNNATHLSNMESV  
 HNLVYAQQLFTYDTLRGYIN  
 RALAQIAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAILSA  
 IYNKPIAARFMGDVLGLASC  
 VTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPV  
 VI FN FANSSYVQYQQLGEDNE  
 ILLGNRTEECQLPSLKIFI

## 【0281】

【化 2】

AGNSAYEYVDLFKRMIDLSSISTVDSMIALDIDPLENTDFRVLLELYSQKELRSSNVFDLEE  
IMREFNSYKQRVKYVEDKVVDPPLPPYLKGDDLMMSGGLAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGV  
ATFLKNPFGAFTIILVIAVVIITYLIYTRQRRLCTQPLQNLFPYLVSDADGTTVTSGSTKDT  
SLQAPPSYEESVYNSGRKGPGPPSSDASTAAPPYTNQEAYQMLLALARLDAEQRAQQNGTDS  
LDGRTGTQDKGQKPNLLDRRLRHKNGYRHLKDSDEEEENV --

CMV gB sol 750 : (配列番号 : 3)

1 -

10

20

30

Cmv qB sol 750 (配列番号 : 4)

MESRIWCLVVCVNL CIVCLGAAVSSSSTRGTSATHSHHSHTTSAAHRSRGSVSQRTSSQT  
VSHGVNETIYNTTLKYGDVVGVNTTKYPYRVCMSAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINEDLDEG  
IMVVYKRNIWAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEIHINSHSQCY  
SSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSRGSTWL YRETCNL  
NCMVTITTARSKYPYHFFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNTIVSDFG  
RPNSALETHRLVAFLERADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMT  
ATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQQIFNTSYNQTYEKGNVSFETTGGLVVFQG1  
KQKSLVELERLANRSSLNTHNRTKRSTDGNATHLSNMESVHNLVYAQLQFTYDTLRGYIN  
RALAQIAEAWCDQRRTLEVFKELSKINPSAILSAYNKPIAARFMGDVLGLASCVTINQTS  
VKVLRDMNVKESPGRCYSPVVI FN FANSSYVQYGQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFI  
AGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSISTVDSMIALIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEE

40

【 0 2 8 2 】

【化3】

IMREFNSYKQRVKYVEDKVVDPPLPPYLKGDDLMSGLGAAGKAVGVAIGAVGAVASVVEGV  
ATFLKN--

CMV gB sol 692 : (配列番号 : 5)

1-

atgaaaagccggatctggtcctggcgtgtgcgtgaacctgtcatcggtgcctgggagc  
cgccgtgagcagcagcaggcaccagaggcaccacacacagccaccacagccaca  
ccacacctgtccgcccacacagcagatccggcagcgtgtcccagagagtgaccagcagccagacc  
gtgtcccacggcgtgaacgagacaatctacaacaccaccctgaagtaacggcagcgtgg  
cgtgaataccaccaagtaccctacagagtgtcagcatggcccagggcaccgacactgatca  
gattcgagcggaaacatcggtgcaccagcatgaagccatcaacgaggacctggacgaggc  
atcatgggtgtacaagagaaacatcggtggccacaccttcaaagtgcgggtgtaccagaa  
ggtgtgacccctccggcggagctacgcctacatccacaccatccctgctggcagcaaca  
ccgagtagcgtggcccccattgtggagatccaccacatcaacagccacagccagtgctac  
agcagctacagccgcgtgatcgccggcacagtgttcgtggctaccaccggacagctacga  
gaacaagaccatgcagctgatggccgacgactacagcaacacccacagcaccagatacgt  
ccgtgaaggaccagtggcacagcagaggcagcacctggctgtaccggagacatgcaacctg  
aactgcattgtcaccatcaccaccggcagaagcaagtacccttaccactttccgcaccc  
caccggcgtggacatcagcccttctacaacggcaccaacccggacgcagctact  
tcggcgagaacggcacaagttttcatcttcccaactacaccatcggtgcgtgacttcg  
agacccaacagcgcttggaaacccacagactggccttctggacggccgacagcgt  
gatcagctggacatccaggacgagaagaacgtgacctgccaagcttctgggaggcct  
ctgagagaaccatcagaagcgaggccgaggacagctaccactcagcagcggcaagatgacc  
gccaccccttggacatcagaagaaacaggaagtgaaacatcgacgactccggccctggact  
ggacgaggccatcaacaagctgcagcagatcttcaacaccagctacaaccagactacgaga  
agtatggcaatgtgtccgtttcgagacaacaggccctgtgggttctggcagggcatc  
aagcagaaaacgcttggagcttggacccggctcgccaaaccggcgttccagcctgaac  
caaccggaccaagcggagcaccgacggcaacaacgcaacccacccatgttccaacatggaa  
tgcacaacccctgggtacgcacagctgcagttcacccatgcacaccctggggcttacat  
agacccctggcccatgcggaggcttgggtgcgtggaccagcggccggaccctggaa  
caaagagcttccaagatcaaccccgccatcttgcggccatctacaacaacgctatcg  
ccggccatggcgacgtgtggccctggccagctgcgtgaccatcaaccagacc  
gtgaagggtgtggggacatgaaacgtgaaagagagccaggccgtgtactccagacc  
ggtcatttcaacttcgccaacagcttccatgtcagttacgcccagctggggcaggaca  
agatccctgtggggaccaccggacccggaggatgcagctggccagcttgcgg  
gttccatggggacaccggcatgttcaagcggatgatcgacttgcgg  
catctccaccgtggacagcatgatcgccctggacatcgacccttggaaa  
gggtgtggactgtacagccagaaaagagactgcccggagcagcaacgt  
atcatgcgggagttcaacagctacaaggactgataa - 2082

10

20

30

40

Cmv gB sol 692; (配列番号 : 6)

MESRIWCLVVCVNLCIVCLGAAVSSSSSTRGTSATHSHHSSHTSAAHSRSGSVQRVTSSQT  
VSHGVNETIYNTTLKYGDVVGNTTKYPYRVCMSAOGTDLIRFERNIVCTSMKPINEDLDEG  
IMVYKRNIWAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPWEIHINSHSQCY  
SSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRVTVKDQWHSRGSTWLYRET  
NCMVTITTARSKYPYHFFATSTGDDVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYTIVSDFG  
RPNSALETHRLVAFLERADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMT  
ATFLSKKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQQIFNTSYNQTYEKYGNVSFETTGGLVFWQGI  
KQKSLVELERLANRSSLNLTNRTKRSTDGNNATHLSNMESVHNLYAQLQFTYDRLGYIN  
RALAQIAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAILSAYNKPIAARFMGDVLGLASCVTINQTS  
VKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVI FNFANSSSYVQYQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFI  
AGNSAYEYDVYLFKRMIDLSSISTVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEE  
IMREFNSYKQ--

【0283】

## 【化4】

CMV gH FL : (配列番号 : 7)

1-

atgaggcctggcctgccctcctacgtatcatcctggccgtgtgcctgttcagccacctgct  
 gtcagcagatacggcgccgaggccgtgagcgagccccctggacaaggcttccacctgctgc  
 tgaacaccta  
 10  
 agcaggcctgcggaaacacgcaccgtcgtgagagagaacgcacatcagttcaactttccagag  
 ctacaaccagtactacgtgtccacatgcccagatgcctgttgccggcccttgccgagc  
 agttcctgaaccagggtggaccgagacactggaaagataccagcagcggctgaatacc  
 tacgcccgtgtccaaggacctggccagctaccgggtccttagccagcagctcaaggctca  
 ggatagcctcgccgagcgcctaccaccgtgccccctccatcgacctgagcatccccacg  
 tggatgcctccccagaccaccaccctcacggctggaccgagagccacaccacccggctg  
 cacagacccacttcaaccagacactgcacccgttgcacggccacgacactgttttagcac  
 cgtgacccctgcctgcaccagggttacactgatcgacgagctgagatacgtgaagatca  
 ccctgaccgaggattttcggttgcacccgtgtccatcgacgacacacccatgctgctg  
 atcttcggccacccctgcccagactgtgtcaaggccccctaccagcgggacaacttcatc  
 ggcgcagacccgagaaggcacgagctgctgtgtcaagaaggaccagctgaaccggact  
 cctacactgaaggacccgacttccgtggacgcccctggacttcaactacctggacactgagc  
 gccctgctgagaaacagctccacagatacgcctggacgtgtgaagtccggacgggtgcca  
 gatgctcgatcgccggaccgtggagatggccttcgcctatgcccctggtcgccgctg  
 ccagacaggaagaggctggccggatgtcactgtggacccctgatagacaggccgccc  
 ctgctgacatccggatccggaaattcatgatcacctgcctgagccagaccccttagaaccac  
 gctgctgtacccacagccgtggatctggccaaagagggccctgtggaccccaaccagatca  
 ccgacatcacaaggctcgtggccctgtgtacatcctgagcaagcagaaccagcagcac  
 atccccccactggggccctgagacagatcgccgacttgcctgtgaagctgcacaaggccatc  
 ggcacgcttctgagcgccttcgcctggaggactgtacactgatggcagccctggccaca  
 gcatgctggcataccaccgagccggggagatcttcatcggtggagacaggccctgtgtac  
 ctggccgagctgtccacttacccagctgctggccctaccacccgactgagc  
 cctgtacacccctgcacgcacccggcagacgggaccacacgcctggaaacggctgacc  
 tggtccctgatgcccaccgtgcctgtacactgtggccctgtccatcctgtccaccatg  
 cagccctggaaacacttcccgacactgtgtccatcggtggacccatcgatcactgat  
 cgcctgaccgtgtccgagcacgtgtccatcggtggacccatcgatcactgat  
 tcagctacccctgtccaccacactgtggccagagccctgatcatcaccacccgac  
 cagaccaactgtcgagctgacccggaaacatgcacaccacacacgcacccgtggccctgaa  
 catcagcctggaaaactcgccattctgtcactgtccctgtggaaatacgacgataccagg  
 gcgtgatcaacatcatgtacatgcacgcacgcacgtgtccctgtggacccctac  
 aacgggtgggtgtccagcccccggacccactacctgatgtctgtaagaacggcacc  
 gctggaaagtgaccgacgtgggtggacccacgcacgacactgtgtgatgagcgtgt  
 acggccctgagcgcacatcgcatctacctgatgtggatgtgaaaacctgatgataa  
 - 2232

10

20

30

40

Cmv gH FL; (配列番号 : 8)

MRPGLPSYLIILAVCLFSHLLSSRYGAEAVSEPLDKAFHLLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYN  
 SSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPCRCLFAGPLAEQFLNQVDLTELERYQQRLNT  
 YALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTTVPPPDLSPHSIPVWMPPQTTPHGWTEHTSGL  
 HRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKITLTEDFVVTVSIDDDTPMLL  
 IFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLDKPDFLDAALDFNYLDLS  
 ALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEAGAQSVPRALDRQAA  
 LLQIQEPMITCLSQTPTTLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDITSVLRVYILSKQNQQHL  
 IPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGSLVHSMLVHTTERREIFIVETGLCS  
 LAELSHFTQLLAHPHEYLSLYTPCSSGRRDHSLERLTRLFPDATVPATVPAALSLISTM  
 QPSTLETFPDLCPLGESFSALTVEHSVSYIVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIITQD  
 QTKCELTRNMHTTHSITVALNISLENCAFQSALLEYDDTQGVINIMYMHSDDDVLFALDPY  
 NEVVVSSPRTHYLMLLKNGTVLEVTDVVV р DATDSRLLMMSVYALSAIIGIYLLYRMLKTC--

CMV gH sol : (配列番号 : 9)

1-

atgaggcctggcctgccctcctacgtatcatcctggccgtgtgcctgttcagccacctgct  
 gtcagcagatacggcgccgaggccgtgagcgagccccctggacaaggcttccacctgctgc

## 【0284】

【化 5】

tgaacacacctacggcagaccatccggttctgcgggagaacaccacccagtgcacctacaac  
agcgcctgcggAACAGCACCCTCGTGGAGAGAGAACGCCATCAGCTCAACTTTCCAGAG  
CTACAACCGTAACGTTCCACATGCCAGATGCCTGTTGCCGCCCTCTGGCCGAGC  
AGTTCCCTGAACCAAGGGTGGACCTGACCGAGACACTGGAAAGATAACCAGCAGCGGCTGAATACC  
TACGCCCTGGTGTCCAAGGACCTGCCAGCTACCGTCCTTAGCCAGCAGCTCAAGGCTCA  
GGATAGCCTCGGCGAGCAGCCTACCCACCGTGCCCTCCATCGACCTGAGCATCCCCACG  
TGTGGATGCCTCCCCAGACCACCCCTCACGGCTGGACCGAGAGCCACACCACCTCCGGCTG  
CACAGACCCCACTCAACCAGACCTGCATCCCTGTCAGCGGCCAGCACCTGCTGTTAGCAC  
CGTGACCCCTGCCTGCACCAGGGCTTCTACCTGATCGACGAGCTGAGATACGTGAAGATCA  
CCCTGACCGAGGATTCTCTCGTGGTCACCGTGTCCATCGACGACGACACCCCATGCTGCTG  
ATCTCTGGCCACCTGCCAGAGTGTGTTCAAGGCCCTACCAGCGGGACAACCTCATCCT  
CGGGCAGACCGAGAAGCACCGAGCTGCTGGTGTGGTCAAGAAGGACAGCTGAACCGGCACT  
CCTACCTGAAGGACCCCGACTTCCTGGACGCCCTGGACTTCAACTACCTGGACCTGAGC  
GCCCTGCTGAGAAAACAGCTCCACAGATA CGCCGTGGACGTGCTGAAGTCCGACGGTCCA  
GATGCTCGATCGCGGGACCGTGGAGATGGCCTTCGCCTATGCCCTGCCCTGTTGCCGCTG  
CCAGACAGGAAGAGGCTGGCGCCAGGTGTCACTGCCAGAGGCCCTGGATAGACAGGCCGCG  
CTGCTGAGATCCAGGAATTCACTGATCACCTGCCCTGAGCCAGACCCCCCTAGAACCCACCT  
GCTGCTGTACCCACAGCCGTGGATCTGGCCAAGAGGCCCTGGACCCCCCAACCGATCA  
CCGACATCACAAAGCCTCGTGGCCTCGTGTACATCCTGAGCAAGCAGAACCGAGCACCTG  
ATCCCCAGTGGCCCTGAGACAGATGCCGACTTCGCCCTGAAGCTGCACAAGACCCATCT  
GGCCAGCTTCTGAGCGCCTCGCCAGGCAGGAACCTGACCTGATGGCAGCCTGGCCACA  
GCTGCTGGTGCATACCACCGAGCGGGGGAGATCTCATCGTGGAGACAGGCCCTGTGTA  
CTGGCCAGCTGCTCCACTTACCCAGTGTGGCCACCCCTCACACGAGTACCTGAGCGA  
CCTGTACACCCCTGCAGCAGCAGCGGAGACCGGGACACGCCCTGGAACGGCTGACCAGAC  
TGTCCCCGATGCCACCGTGCCTGCTACAGTGCCTGCCCTGTCCTGACCATCGTCCACCATG  
CAGCCACCGACCCCTGGAAACCTCCCCGACCTGTTCTGCCTGCCCTGGCGAGAGCTTAG  
CGCCCTGACCGTGTCCGAGCACGTGCTCACATCGTGCACCATCAGTACCTGATCAAGGGCA  
TCAGCTACCCCGTGTCCACACAGTCGTGGCCAGAGGCCCTGATCATCACCCAGACCGACAGC  
CAGACCAAGTGCAGAGCTGACCCCGAACATGCACACCACACAGCATCACCGTGGCCCTGAA  
CATCAGCCTGGAAAACCTGCGTTCTGTCACTGTCCTGCTGGAAATACGACGATAACCCAGG  
GCCTGATCAACATCATGTACATGCACGACAGCGACGACGTGCTGTTGCCCTGGACCCCTAC  
AACGAGGTTGGTGGTGTCCAGCCCCCGAACCTACCTGATGCTGCTGAAGAACGGCACCGT  
GCTGGAAAGTGCACCGACGTGGTGGACGCCACCGACTGATAA - 2151

10

20

CMV gH sol; (配列番号 : 10)

MRPGLPSYLIILAVCLFSHLLSSRYGAEAVSEPLDKAFHLLLNTYGRPIRFLRENTQCTYN  
SSLRNSTVRENAISFNFFQSINYVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQQRLNT  
YALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSDLGEQPTTVPPPIDSIPHVVWMPQTTPHGWTESHTSGL  
HRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPLCHQGFYLIDELRYVKITLTEDFFVVTVSIDDDTPMLL  
IFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLKDPDFLDAALDFNYLDLS  
ALLRNSFHRYAVDVLSGRQCMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQSVSPRALDRQAA  
LLQIQEFMITCLSQTPPRTTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHL  
IPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQEELYLMGSLVHSMVLVHTTERREIFIVETGLCS  
LAELSHFTQLLAHPHHEYLSDLYTPCSSSGRRDHSLERLTRLFPDATVPATVPAALSILSTM  
QPSTLETFPDLFCLPLGESFSALTVSEHVSYIVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIITQTD  
QTKCELTRNMHTHSITVALNISLENCAFQCOSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPY  
NEVVVSSPRTHYLMILLKNGTVLEVTDVVVDA TD--

30

CMV gL fl: (配列番号 :11)

1-  
atgtgcagaaggcccgactgcggcttcagttcagccctggacccgtgatcctgctgtggtg  
ctgcctgctgtgcctatgttccctgtccggccgtgtctgtggccctacagccggcaga  
agggtccagccgagtgcggcggagctgaccagaagatgcctgctggcgagggtttcgaggc  
gacaagtacgagagactggctgcggccctggtaaacgtgaccggcagagatggccctgag  
ccagctgatccgtacagacccgtgaccccccggggcccaatagcgtgctggacgagg  
ccttcctggataccctggccctgttacaacaacccgaccagctgagagccctgtgacc  
ctgctgtccagcgcacccggccctggatggatgaccgtgatgcgggctacagcggagtgtgg  
agatggcagccctggcgttacacctgcgtggacqacctgtqcaqaggctacqacctgacca

40

## 【化6】

gactgagctacggccgggtccatttcacagagcacgtgctgggttcgagctgggtcccccc  
 agcctgttcaacgtgggtggcatccggaaacgcaggaccacagaacacaacagagccgtcg  
 gctgcctgtgtctacagccgtcacctgagggcatcacactgttctacggcctgtacaacg  
 ccgtgaaagagttctgcctccgcaccagctggatccccctgctgagacacacccggacaag  
 tactacgccggcctgccccagagctgaagcagaccagactgaacctgcccggccacagcag  
 atatggccctcaggccgtggacgccagatataa - 840

CMV gL FL; (配列番号 :12)

MCRPDCGFSFSPGPVILLWCCLLPIVSSAAVSAPTAEEKVAECPTELRRCLLGEVFE  
 DKYESWLRPLVNVTGRDGPLSQLIRYRPVTPEAANSVLLDEAFLDTLALLYNNPDQLRALLT  
 LLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPP  
 SLFNVVVAIRNEATRTNRAVLPVSTAAPEGITLFYGLYNAVKEFCLRHQLDPPLLRLDK  
 YYAGLPPELKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR --

10

CMV gM FL: (配列番号 :13)

1-

atggccccccagccacgtggacaaagtgaacacccggacttggagcgccagcatcggttcat  
 ggtgctgacccctcgtaacgtgtccgtgcacctggactgtccaaacttccccccacctgggct  
 acccctgcgtgtactaccacgtggacttcgagcggctgaacatgagcgcctacaacgtg  
 atgcacccctgcacaccccatgtgtttctggacagcgtgcagctgtgtgtgtacccgtgtt  
 catgcagctgggtttctggccgtgaccatctactacccctgtgtgtgtcaagatcagca  
 tgggaaggacaaggcatgagcctgaaccagagcaccgggacatcagctacatgggcac  
 agcctgaccgccttcctgttcatcctgagcatggacaccccttccagctgttccaccat  
 gagcttccggctgcccagcatgtatgccttcatggccggcgtgacttttctgtgtacca  
 tcttcaacgtgtccatggtaccaggcttacaaggcgagccgttcttcttcc  
 cggctgcaccccaagctgaaggcaccgtgcagttccggaccctgtatcgtgaacctgggta  
 ggtggccctgggcttcaataccaccgtggctatggccctgtgtacggcttcggcaaca  
 acttcttcgtgcccggccatatggtgctggccgtgttcttccagtacgtaagggtgcagttcc  
 atcatctactttctgtatcgtgaggccgtgttcttccagtacgtaagggtgcagttcc  
 ccatctggccgccttttcggctgtgcggccctgtatcaccatcgtgcagtaacac  
 tcctgagcaacgagtaccggacccgtcatcagctggcccttccggatgtgttcttcatctgg  
 gccatgttaccacccctgcagaggccgtgcggtaacttcagaggcagaggcggctccgtgaa  
 gtaccaggccctggccacagccttggcgaagaggtggcccccgtagccaccacgac  
 tggaaaggcagacggctgcgggaggaagaggacgacgacgaggacttcgaggacgcctgaa  
 taa - 1119

20

CMV gM FL; (配列番号 :14)

MAPSHVDKVNTRTWSASIVFMVLTFVNVSVHLVLSNFPHLGYPVCYYHVVDFERLNMSAYNV  
 MHLHTPMFLDSVQLVCYAVFMQLVFLAVTIYYLVCWIKISMRKDKGMSLNQSTRDISYMD  
 SLTAFLFILSMDTFQLFTLTMFRPSMIAFMMAVHFFCLTIFNVSMVTQYRSYKRSLLFFFS  
 RLHPKLKGTVQFRTLIVNLVEVALGFNTTVAMALCYGFGNNFFVRTGHMVLAFFVYAIIS  
 IIYFLLIEAVFFQYVKVQFGYHLGAFFGLCGLIYPIVQYDTFLSNEYRTGISWSFGMLFFIW  
 AMFTTCRAVRYFRGRGSGSVKYQALATASGEEVAALSHDSLSEEEEDDDDEDFEDA-  
 -

30

CMV gN FL: (配列番号 :15)

1-

atggaatggAACACCCCTGGTCTGGGCCTGCTGGTGCTGTCTGTGGCCAGCAGCAACAA  
 CACATCCACAGCCAGCACCCCTAGACCTAGCAGCAGCACCCACGCCAGCACTACCGTGAAGG  
 CTACCACCGTGGCCACCACAGCACCACCTGCTACCGACCCAGCTCCACCACTCTGCC  
 AAGCCTGGCTCTACCACACGACCCCAACGTGATGAGGGCCACGCCACACGACTTCTA  
 CAACGCTACTGCACCAGCCACATGTACGAGCTGTCCCTGAGCAGCCTTGCCGCCTGGTGA  
 CCATGCTGAACGCCCTGATCCTGATGGGCCTTCTGATCGTGTGGCAGCTGCTGGGACTGCTTC  
 CAGAACATTCAACGCCACCAAGGGCTACTGATAA - 411

40

CMV gN FL; (配列番号 :16)

【0286】

## 【化7】

MEWNTLVGLLVLSSVASSNNSTASTPRPSSSTHASTTVKATTVATTSTTATSTSSTTS  
KPGSTTHDPNVMRPHAHDFYNAHCTSHMYELSLSSFAAWTMLNALILMGAFIVLRHCCF  
QNFTATTTKGY--

**CMV gO FL:** (配列番号 :17)

1-

atggcaagaaagaaatgatcatggtaagggcatccccaaagatcatgctgctgattagcat  
cacccctctgctgctgtccctgatcaactgcaacgtgctggtaacagccggggcaccagaa  
gatcctggccctacaccgtgtctaccggggcaaagagatcctgaagaaggcagaaagag  
gacatcctgaagcggctgtatgagcaccaggcagcggctaccgggtctgtatgtacccag  
ccagcagaaattccacgcacatgtatcggacaagttcccccaggactacatcctgg  
ccggacccatccgaaacgcacagcatcaccatgtggtcgacttctacagcaccaggctg  
cggaagccgc当地atcgtgtacagcggactacaaccacccgc当地agatcaccctgag  
gcctccccc当地gtggcaccgtgccc当地catgaactgcctgagc当地gatgtca  
agcggaaacgcacccggc当地agggctgc当地ggcaactt当地accacccatgtt当地  
aacgtgccccgg当地ggaaacccaagctgtatcggc当地ggcaacaaagtgaaacgtgg  
gaccatctacttctggc当地ctgaccgc当地ctgtatcggc当地ggcaaccc  
ggc当地ctt当地tacctgtatcggc当地accgc当地atcggc当地ggcaact  
ggc当地accgc当地ggc当地accgc当地atcggc当地ggcaactt当地acc  
gctgagagatctggc当地accctgg当地gtatcaccaccctgctgg当地  
agcccgaccgg当地acagaaccgc当地ggctgaccgc当地ggatcacc  
aacgagacaccctacaccatctacggc当地accctgg当地gtatcggc当地  
aatgagc当地gtgg当地gagaacgc当地ggc当地ggcaact  
cccg当地gtt当地ccaggc当地ggaccctcatc当地ggc当地acc  
gacaagatccgg当地acttc当地ggc当地ggatcaccaccctgctgg当地  
cagaaggcc当地ccaaacctgagcaccctgagc当地ggctgtgg当地  
- 1422

10

20

30

**CMV gO FL;** (配列番号 :18)

MGKEMIMVKGIPKIMLLISITFLLLSILNCNVLVNSRGTRRSWPYTVLSYRGKEILKKQKE  
DILKRLMSTSSDGYRFLMYPQSQQKFHAIVVISMDKFPQDYILAGPIRNDSTIHMWFDFYSQL  
RKPAKYVYSEYNHTAHKITLRPPCGTVPSTMNLSEMLNVSKRNDTGEKGCGNFTTFNPMFF  
NVPRWNTKLYIGSNKVNVDQSQTIFYFLGLTALLRYAQRNCTRSFYLVNAMSRNLFRVPKYIN  
GTKLKNTMRKLKRQALVKEQPQKKNSQSTTPYLSYTTSTAFNVTNTVYSATAAVTRV  
ATSTTGYRPDSNFMKSIMATQLDLATWYTLRYNEPFCKPDRNRTAVSEFMKNTHVLIR  
NETPYTIYGTLDMSLYYNETMSVENETASDNNETTPSPSTRFQRTFIDPLWDYLDSSLFL  
DKIRNFSQLPAYGNLTPPEHRRAANLSTLNSLWWWSQ--

40

**CMV UL128 FL :** (配列番号 :19)

1-

atgagccccaggacctgacccttctgacaaccctgtggctgctcctggccatagcag  
agtgccttagagtgc当地ggccgagaaatgctgc当地ggatc当地accgc当地ccccc  
ggc当地ctacgactt当地caagatgtcaaccggatcaccgtggccctgagatgc当地cc  
gtgtgctacagccccggagaaaaccgc当地ggatccggccatc当地ggacc  
cctgaccggc当地ggatc当地ggc当地accgc当地ggcaact  
aagccgc当地ggccggatc当地ggc当地ggcaact  
gccggaccgtggatcaccctggatc当地ggaaatc当地gg  
cctggaccgtggatcaccctggatc当地ggaaatc当地gg  
tggctacatgctgc当地ggatc当地gg - 519

40

**CMV UL128 FL;** (配列番号 :20)

MSPKDLTPFLTLWLLGHRSRVRVRAEECCEFINVNHPPERCYDFKMCNRFTVALRCPDGE  
VCYSPEKTAEIRGIVTTMTHSLTRQVVHNKLTSNPNPLYLEADGRIRCGKVNDKAQYLLGA  
AGSVPYRWINLEYDKITRIVGLDQYLESVKKHKRLDVCRAKMGYMLQ--

【0287】

## 【化8】

CMV UL130 FL: (配列番号 :21)

1-

atgctgcggctgtgactgagacaccactccactgcctgctgtgtgccgtgtggccac  
 cccttgcgtggccagcccttgaggcaccctgaccgccaaccagaaccctagcccccccttgg  
 ccaagctgacccatacgcaagccccacgacgcccacccctactgccttgcgttgcaccc  
 agccctcccaagaagccccctgcagttcagcggcttcagagagtgtcaccggccctgagtg  
 ccgaacgagacactgtacccgttacaaccgggagggccagacactggtgagcggagca  
 gcacctgggtgaaaaaaagtatgtgtatctgagcggccgaaaccagaccatcctgcagcgg  
 atgcccagaaccgcaccaagcccacgcacggcaacgtgcagatcagcgtggaggacccaa  
 aatcttcggccacatggtggccaaagcagaccaagctgctgagatcgtggtaacgacg  
 gcaccagatatacgatgtgcgtatgaagctggaaagctggccacgtgttccggactac  
 tccgtgagctccaggccgtgacccattcaccggccaaacaaccagacactacacccctotg  
 cacccacccaaacctgatcgtgtataa - 648

10

CMV UL130 FL; (配列番号 :22)

MRLLLRHFHCLLCAVWATPCLASPWSTLTANQNPSPWSKLTYSKPHDAATFYCPFLYP  
 SPPRSPLQFSGFQRVSTGPECRNETLYLLNREGQTLVERSSTWVKVIWYLSGRNQTLQR  
 MPRTASKPSDGNVQISVEDAKIFGAHMVPKQTKLRFVVNDGTRYQMCVMKLESWAHVFRDY  
 SVSFQVRLTFTEANNQTYTFCTHPNLIV--

CMV UL131 FL: (配列番号 :23)

1-

atgcggctgtgcagagtgtggctgtccgtgtgcctgtgtgcgtggctggccagtgcca  
 gagagagacagccgagaagaacgactactaccgggtgccccactactggatgcctgcagca  
 gagccctgcccgaccagaccggtaaaaatacgtggagcagctcgtgacccctgaaac  
 taccactacgacgcccacccacggcctggacaacttcgacgtgtgaagcggatcaacgtgac  
 cgaggtgtccctgctgtatcagcacttcggccggcagaacagaagagggcggcacaacaagc  
 ggaccacccatcaacggcgtggctctggccctcacggcagatccctggaaattcagcgtg  
 cggctgttcgccaactgataa - 393

20

CMV UL131 FL; (配列番号 :24)

MRLCRWLSVCLCAVVLGQCQRETAEKNDYYRVPHYWDACSRALPDQTRYKYVEQLVDLTLN  
 YHYDASHGLDNFDVLKRINVTEVSLLISDFRRQNRRGGTNKRTTFNAAGSLAPHARSLEFSV  
 RLFAN--

30

パルボ B19.Opti.VP1 (配列番号 :25)

acgcgtacaaaacaaaATGTCTAAGAAATCTGGTAAATGGTGGAAATCTGATGATAAATTGCTAAGGC  
 TGTTTACCAACAATTGTTGAATTTCAGAAAAGTTACTGGTACTGATTGAAATTGATTCAAATTGAAAGGA  
 TCATTACAACATTCTTGATAATCCATTGGAAAATCCATCTCATTGTTGATTGGTTGCTAGAATTAAGAA  
 CAACTTGAAGAACTCTCCAGATTGTATTCTCATCTTCAATCTCATGGTCAATTGCTGATCATCCACATGC  
 TTTATCTTCATCTCATGCTGAACCAAGAGGTGAAAATGCTGTTTATCTCTGAAGATTGCTAAACC  
 AGGTCAAGTTCTGTTCAATTGCCAGGTACTAATTACGTTGGTCCAGGTAAATGAATTGCAAGCTGGTCCACCACA  
 ATCTGCTGTTGATTCTGCTGCTAGAATTCTGATTCAGATACTCTCAATTGGCTAAGTTGGTATTAAATCCATA  
 TACTCATTGGACTGTTGCTGATGAAGAATTGTTGAAGAACATTAAGAATGAAACTGGTTTCAAGCTCAAGTTGT  
 TAAAGATTACTTCACTTGAAAGGTGCTGCTGCCAGTTGCTCATTTCAAGGTTCTTGCCAGAAGTTCCAGC  
 TTATAACGCTCTGAAAATATCCATCTGACATCTGTTAATTCTGCTGAAGCATCTACTGGTGCAGGTGGAGG  
 TGGTTCTAATTCTGTTAAATCTATGTTGCTGAGGTGCTACTTTCTGCTAATTCAAGTTACTGTTACTCTC  
 TAGACAATTCTGATTCCATATGATCCAGAACATCATTACAAAGTTTCAACCAGCTGCTCATCTGTCATAA  
 TGCTTCAGGTAAAGAAGCTAAGGTTGACTATTCTCCAATTATGGTTATTCTACTCCTGGAGATACTGGT

40

【0288】

## 【化9】

TTTAATGCTTGAACCTGTTCTCCATTGAAATTCAACATTGATTGAAAACACTACGGTCTATTGCTCC  
 AGATGCTTGACTGTTACTATTCTGAAATTGCTTAAGGATGTTACTGATAAAACAGGTGGTGGTCAAGT  
 TACTGATTCTACTACTGGTAGATTGTCATGTTGATCATGAATACAACAAATACCCATACGTTGGTCAAGG  
 TCAAGATACTTGGCTCCAGAATTGCCAATTGGTTATTCACCACAAATACGCTTATTGACTGTTGGTGA  
 TGTTAACTCAAGGTATTCTGGTGAATTCTAAAGTGGCTCTGAAGAATCTGCTTTACGTTGGAAACA  
 TTCTCTTTCAATTGTTGGTACTGGTACTGCTCTATGCTTACAACAAATTCCACCAGTCCACCTGAAAA  
 TTTGGAAGGTTCTCAACATTACGAAATGACAATCATTGTATGGTTAGATTGGTCCAGATAC  
 TTTGGTGGTGAATCAAATTAGATCTTGAAGATCATGCTATTCAACCACAAATTGATGCCAGG  
 TCCATTGGTTAACTCTGTTCTACTAAAGAAGGTGATTCTAATACAGGTGCTGGTAAAGCATTGACTGGTT  
 GTCTACTGGTACTCTCAAAACACTAGAATTCTTAAGACCAGGTCCAGTTCACACCATATCATTGGGA  
 TACTGATAAGTACGTTACTGGTATTATGCTATTACATGGTCAAACACTACTTATGTAATGCTGAAGATAAAGA  
 ATATCAACAAGGTGGTAGATTCCAACAGAAAAAGAACAAATTGAAACAAATTGCAAGGTTGAATATGCATAC  
 TTACTTCCAACAAAGGTACTCAACAATACACTGATCAAATTGAAAGACCATTGATGGTGGTCTGTTGGAA  
 TAGAAGAGCTTGCATTATGAATCTCAATTGTTGCTAAGATTCAAATTAGATGATTCTTCAAGACTCAATT  
 TGCTGTTGGTGGTGGTGGCATCAACCTCCACCACAAATTCTTGAAGATTGCCACAATTGGTCC  
 ATTGGTGGTATTAAATCTATGGTATTACTACTTGGTCAATATGCTGTTGGTATTATGACTGTTACAATGAC  
 TTTTAAGTGGTCCAAGAAAAGCTACAGGTAGATGGAATCCACACCAGGTGTTATCCACCACATGCTGCTGG  
 TCATTGCTTACGTTGATCCAATGCTACTGATGCTAAACACATCATAGACATGGTATGAAAAACC  
 TGAAGAATTGTTGACTGCTAAATCTAGAGTTCATCCATTGTAATGAGtgcac

10

20

30

40

## 【パルボ B19.Opti.VP2 (配列番号 : 26)】

cctaggacaaaacaaaATGACATCTGTTAATTCTGCTGAAGCATCTACTGGTCAGGTGGAGGTGGTCTAATT  
 TGTTAAATCTATGTTGCTGAAGGTGCTACTTTTCTGCTAATTGAGTTACTTGTACTTCTAGACAATTCTT  
 GATTCCATATGATCCAGAACATCATTACAAGTTTCCACCAGCTGCTCATCTGTCATAATGCTTCAGGTA  
 AGAAGCTAAGGTTGACTATTCTCCAATTATGGTTATTCTACTCCTGGAGATACTGGATTAAATGCTTT  
 GAACCTGTTTTCTCCATTGAAATTCAACATTGATTGAAAACACTACGGTTCTATTGCTCCAGATGCTTGC  
 TGTTACTATTCTGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACTGATAAAACAGGTGGTGGTCAAGTTACTGATTCTAC  
 TACTGGTAGATTGTCATGTTGGTGAATGAAACAAATACCCATACGTTTGGTCAAGGTAAGATACTTT  
 GGCTCCAGAATTGCAATTGGTTATTCTCACCACAAATACGCTTATTGACTGTTGGTGAATGTTAAACTCA  
 AGGTATTCTGGTATTCTAAAGTGGCTCTGAAGAATCTGCTTTACGTTGGAACATTCTCTTCA  
 ATTGTTGGTACTGGTGGTACTGCTTCTATGCTTACAACATTCCACCAGTCCACCTGAAAATTGGAAGGTTG  
 TTCTCAACATTTCAGAAATGTACAATCCATTGATGGTTCTAGATTGGTGTCCAGATACTTGGTGGTGA  
 TCCAAAATTAGATCTTGACTCATGAAGATCATGCTATTCAACCACAAATTGATGCCAGGTCATTGGTAA  
 TTCTGTTCTACTAAAGAAGGTGATTCTCTAATACAGGTGCTGGTAAAGCATTGACTGGTTGTACTGGTAC  
 TTCTCAAAACACTAGAATTCTTAAGACCAGGTCCAGTTCACACCATATCATCATTGGGACTGATAAGTA  
 CGTTACTGGTATTATGCTATTGACTCATGGTCAAACACTACTTATGTTGAAGATAAGAATATCAACAAGG  
 TGTTGGTAGATTCCAACAGAAAAGAACAAATTGAAACAAATTGCAAGGTTGAATATGCATAACTTACCT  
 CAAAGGTACTCAACAATACACTGATCAAATTGAAAGACATTGATGGTGGTCTGTTGGAATAGAAGAGCTT  
 GCATTATGAATCTCAATTGTTGCTAAGATTCCAATTAGATGATTCTCAAGACTCAATTGCTGCTTGGG  
 TGGTGGGTTGATCAACCTCCACCACAAATTCTTGAAGATTGCTGATGCCACAATTGGTCAATTGGTGGTAT  
 TAAATCTATGGTATTACTACTTGGTCAATATGCTGTTGATGACTGTTACAATGACTTTAAGTGGG  
 TCCAAGAAAAGCTACAGGTAGATGGAATCCACACCAAGGTGTTATCCACCATGCTGCTGGTCTTGCCTTA  
 CGTTTGTATGATCCAATGCTACTGATGCTAAACACATCATAGACATGGTATGAAAAACCTGAAGAATTGTG  
 GACTGCTAAATCTAGAGTTCATCCATTGTAATGAGcgccgc

## 【配列表】

2014522842000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT											
		International application No PCT/US2012/045847									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K39/00 A61K39/12 A61K39/295 C07K14/015 C07K14/045 ADD.											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">         WO 02/09645 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US];          WU TZYY CHOOU [US]; HUNG CHIEN FU [US]          UNIV J) 7 February 2002 (2002-02-07)          the whole document          in particular          pages 12, 32-33          claims          -----          WO 2011/005799 A2 (NOVARTIS AG [CH]; GEALL          ANDREW [US]; HEKELE ARMIN [US]; MANDL          CHRISTIA) 13 January 2011 (2011-01-13)          cited in the application          the whole document          in particular          pages 2-6          claims          -----          -/--       </td> <td style="padding: 2px;">1,6, 22-24</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;">1-24</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 02/09645 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; WU TZYY CHOOU [US]; HUNG CHIEN FU [US] UNIV J) 7 February 2002 (2002-02-07) the whole document in particular pages 12, 32-33 claims ----- WO 2011/005799 A2 (NOVARTIS AG [CH]; GEALL ANDREW [US]; HEKELE ARMIN [US]; MANDL CHRISTIA) 13 January 2011 (2011-01-13) cited in the application the whole document in particular pages 2-6 claims ----- -/--	1,6, 22-24	Y		1-24
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 02/09645 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; WU TZYY CHOOU [US]; HUNG CHIEN FU [US] UNIV J) 7 February 2002 (2002-02-07) the whole document in particular pages 12, 32-33 claims ----- WO 2011/005799 A2 (NOVARTIS AG [CH]; GEALL ANDREW [US]; HEKELE ARMIN [US]; MANDL CHRISTIA) 13 January 2011 (2011-01-13) cited in the application the whole document in particular pages 2-6 claims ----- -/--	1,6, 22-24									
Y		1-24									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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  28 September 2012		Date of mailing of the international search report  10/10/2012									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bernhardt, Wiebke									

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No
PCT/US2012/045847

**C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BERNSTEIN D I ET AL: "Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 28, no. 2, 11 December 2009 (2009-12-11), pages 484-493, XP026791388, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2009-10-24] abstract ----- US 7 862 829 B2 (JOHNSTON ROBERT E [US] ET AL) 4 January 2011 (2011-01-04) cited in the application the whole document in particular columns 1-3 claims ----- FLEETON M N ET AL: "Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, IL, vol. 183, no. 9, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 1395-1398, XP002224503, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1086/319857 the whole document ----- WO 2011/127316 A1 (NOVARTIS AG [CH]; SETTEMBRE ETHAN [US]; MEDINA-SELBY ANGELICA [US]; CO) 13 October 2011 (2011-10-13) figures 4,5; sequences 17, 18 -----	1-24 1-24 1-24 1-24 14
Y,P		
1		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2012/045847

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. (means)  
 on paper  
 in electronic form
  - b. (time)  
 in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/US2012/045847

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0209645	A2	07-02-2002		AU 9052001 A US 2004028693 A1 US 2008286292 A1 WO 0209645 A2		13-02-2002 12-02-2004 20-11-2008 07-02-2002
WO 2011005799	A2	13-01-2011		CA 2766907 A1 EP 2451475 A2 US 2011300205 A1 WO 2011005799 A2		13-01-2011 16-05-2012 08-12-2011 13-01-2011
US 7862829	B2	04-01-2011		AU 2005327198 A1 CA 2572921 A1 EP 1773403 A2 US 2008279891 A1 US 2011064772 A1 WO 2006085983 A2		17-08-2006 17-08-2006 18-04-2007 13-11-2008 17-03-2011 17-08-2006
WO 2011127316	A1	13-10-2011		NONE		

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	K
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 9/107	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 9/133 (2006.01)	A 6 1 K 9/133	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	

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

(72)発明者 ジアール , アンドリュー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608-2916 , エメリービル , ホールトン ストリート 4560 , ノバルティス バクシンズ アンド ダイアグノスティックス , インコorporated , アイピー サービシス エム/エス エックス-100ビー

(72)発明者 セッテンバー , イーサン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94662-8097 , エミリービル , ピー.オー. ボックス 8097 , ノバルティス バクシンズ アンド ダイアグノスティックス , インコporated

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA11 HA17

4C076 AA17 AA19 AA20 AA29 CC06 FF68

4C084 AA13 MA02 NA14 ZB331 ZB351 ZB381

4C085 AA04 BA02 BA07 BA49 BA75 BA83 FF24