

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-522154

(P2023-522154A)

(43)公表日 令和5年5月29日(2023.5.29)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/44 (2006.01)	C 1 2 N	15/44	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/11 (2006.01)	C 0 7 K	14/11		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全53頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-560280(P2022-560280)		(71)出願人	522387319	
(86)(22)出願日	令和3年4月1日(2021.4.1)			ディオシンボックス リミテッド	
(85)翻訳文提出日	令和4年11月8日(2022.11.8)			イギリス国 シービー2 8ピーエヌ ケ	
(86)国際出願番号	PCT/GB2021/050825			ンブリッジシャー, ケンブリッジ, セ	
(87)国際公開番号	WO2021/198701			ドレー テイラー ロード 2 5	
(87)国際公開日	令和3年10月7日(2021.10.7)		(71)出願人	516378426	
(31)優先権主張番号	2004825.2			ザ、チャンセラー、マスターズ、アンド	
(32)優先日	令和2年4月1日(2020.4.1)			、スカラーズ、オブ、ザ、ユニバーシテ	
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)			ィー、オブ、ケンブリッジ	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			THE CHANCELLOR, MAS	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(			TERS AND SCHOLARS OF	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			THE UNIVERSITY OF C	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			AMBRIDGE	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			イギリス国ケンブリッジシャー、ケンブ	
	最終頁に続く			リッジ、トリニティ、レーン、ジ、オー	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 インフルエンザワクチン

(57)【要約】

インフルエンザに対するワクチンにおける使用のためのポリペプチドが記載される。上記ポリペプチドは、上記頭部ドメインの位置156、157、171、172、および205において以下のアミノ酸残基：・156：R；・157：PまたはS、好ましくはP；・171：DまたはN；・172：TまたはA、好ましくはT；および・205：KまたはR、好ましくはKを有する、赤血球凝集素サブタイプ5（H5）球状頭部ドメイン、および必要に応じて赤血球凝集素ステムドメインを含む。上記ポリペプチドをコードする核酸分子、ベクター、細胞、融合タンパク質、および薬学的組成物がまた、記載される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

赤血球凝集素サブタイプ 5 (H 5) の球状頭部ドメイン、および必要に応じて赤血球凝集素のステムドメインを含み、前記頭部ドメインの位置 1 5 6、1 5 7、1 7 1、1 7 2、および 2 0 5 において以下のアミノ酸残基：

- ・ 1 5 6： R；
- ・ 1 5 7： P または S、好ましくは P；
- ・ 1 7 1： D または N；
- ・ 1 7 2： T または A、好ましくは T；および
- ・ 2 0 5： K または R、好ましくは K、

10

を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

前記頭部ドメインの位置 1 5 6、1 5 7、1 7 1、1 7 2、および 2 0 5 において以下のアミノ酸残基：

- ・ 1 5 6： R；
- ・ 1 5 7： P；
- ・ 1 7 1： D；
- ・ 1 7 2： T；および
- ・ 2 0 5： K

を有する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

20

【請求項 3】

配列番号 7 もしくは 8 のアミノ酸配列、または配列番号 7 もしくは 8 のアミノ酸配列とその全長に沿って少なくとも 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % アミノ酸同一性を有しかつ配列番号 7 もしくは 8 の位置 1 5 6、1 5 7、1 7 1、1 7 2、および 2 0 5 に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

- ・ 1 5 6： R；
- ・ 1 5 7： P；
- ・ 1 7 1： D；
- ・ 1 7 2： T；および
- ・ 2 0 5： K

30

を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4】

前記頭部ドメインの位置 1 5 6、1 5 7、1 7 1、1 7 2、および 2 0 5 において以下のアミノ酸残基：

- ・ 1 5 6： R；
- ・ 1 5 7： P；
- ・ 1 7 1： N；
- ・ 1 7 2： T；および
- ・ 2 0 5： K、

40

を有する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号 1 0 もしくは 1 1 のアミノ酸配列、または配列番号 1 0 もしくは 1 1 のアミノ酸配列とその全長に沿って少なくとも 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % アミノ酸同一性を有しかつ配列番号 1 0 もしくは 1 1 の位置 1 5 6、1 5 7、1 7 1、1 7 2、および 2 0 5 に相当する位置において

50

以下のアミノ酸残基：

- ・ 156： R；
- ・ 157： P；
- ・ 171： N；
- ・ 172： T；および
- ・ 205： K

を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 4 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 6】

前記頭部ドメインの位置 156、157、171、172、および 205 において以下のアミノ酸残基：

10

- ・ 156： R；
- ・ 157： S；
- ・ 171： N；
- ・ 172： A；および
- ・ 205： R、

を有する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 1 もしくは 3 のアミノ酸配列、または配列番号 1 もしくは 3 のアミノ酸配列とその全長に沿って少なくとも 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% アミノ酸同一性を有し、かつ配列番号 1 もしくは 3 の位置 156、157、171、172、および 205 に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

20

- ・ 156： R；
- ・ 157： S；
- ・ 171： N；
- ・ 172： A；および
- ・ 205： R

を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 6 に記載の単離されたポリペプチド。

30

【請求項 8】

前記ステムドメインの位置 416 および 434 において以下のアミノ酸残基：

- ・ 416： F；および
- ・ 434： F、

を有する、前述のいずれかの請求項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 9】

以下のアミノ酸配列：

R (P/S) S F F R N V V W L I K K N (D/N) (T/A) Y P T I K R S Y N N T N Q E D L L V L W G I H H P N D A A E Q T (K/R) (配列番号 13)、または配列番号 13 の配列とその全長に沿って少なくとも 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% アミノ酸同一性を有しかつ配列番号 13 の位置 1、2、16、17、および 50 に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

40

- ・ 1： R；
- ・ 2： P または S、好ましくは P；
- ・ 16： D または N；
- ・ 17： T または A、好ましくは T；および
- ・ 50： K または R、好ましくは K、

50

を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 10】

前記アミノ酸配列の位置 1、2、16、17、および 50 において、または配列番号 13 の位置 1、2、16、17、および 50 に相当する位置において、以下のアミノ酸残基：

- ・ 1： R；
- ・ 2： P；
- ・ 16： D；
- ・ 17： T；および
- ・ 50： K、

10

を有する、請求項 9 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 11】

前記アミノ酸配列の位置 1、2、16、17、および 50 において、または配列番号 13 の位置 1、2、16、17、および 50 に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

- ・ 1： R；
- ・ 2： P；
- ・ 16： N；
- ・ 17： T；および
- ・ 50： K

20

を有する、請求項 9 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 12】

前記アミノ酸配列の位置 1、2、16、17、および 50 において、または配列番号 13 の位置 1、2、16、17、および 50 に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

- ・ 1： R；
- ・ 2： S；
- ・ 16： N；
- ・ 17： A；および
- ・ 50： R

を有する、請求項 9 に記載の単離されたポリペプチド。

30

【請求項 13】

配列番号 5、9、もしくは 12 のうちのいずれかのアミノ酸配列、または配列番号 5、9、もしくは 12 のうちのいずれかの配列とその全長に沿って少なくとも 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% アミノ酸同一性を有しかつ配列番号 5、9、もしくは 12 の位置 148 および 166 に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

- ・ 148： F；および
- ・ 166： F、

を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

40

【請求項 14】

配列番号 14 のアミノ酸配列、または配列番号 14 のアミノ酸配列とその全長に沿って少なくとも 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号 16 のアミノ酸配列、または配列番号 16 の配列とその全長に沿って少なくとも 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%

50

、 80 %、 81 %、 82 %、 83 %、 84 %、 85 %、 86 %、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 もしくは 99 % アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 16】

配列番号 18 のアミノ酸配列、または配列番号 18 の配列とその全長に沿って少なくとも 70 %、 71 %、 72 %、 73 %、 74 %、 75 %、 76 %、 77 %、 78 %、 79 %、 80 %、 81 %、 82 %、 83 %、 84 %、 85 %、 86 %、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 もしくは 99 % アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする単離された核酸分子、または前記核酸分子とその全長にわたって少なくとも 70 %、 71 %、 72 %、 73 %、 74 %、 75 %、 76 %、 77 %、 78 %、 79 %、 80 %、 81 %、 82 %、 83 %、 84 %、 85 %、 86 %、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 もしくは 99 % 同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む単離された核酸分子。

【請求項 18】

配列番号 2、 4、 もしくは 6 のヌクレオチド配列、または配列番号 2、 4、 もしくは 6 とその全長にわたって少なくとも 70 %、 71 %、 72 %、 73 %、 74 %、 75 %、 76 %、 77 %、 78 %、 79 %、 80 %、 81 %、 82 %、 83 %、 84 %、 85 %、 86 %、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 もしくは 99 % 同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む、請求項 17 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 19】

配列番号 15 のヌクレオチド配列、または配列番号 15 とその全長にわたって少なくとも 70 %、 71 %、 72 %、 73 %、 74 %、 75 %、 76 %、 77 %、 78 %、 79 %、 80 %、 81 %、 82 %、 83 %、 84 %、 85 %、 86 %、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 もしくは 99 % 同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む、請求項 17 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 20】

配列番号 17 のヌクレオチド配列、または配列番号 17 とその全長にわたって少なくとも 70 %、 71 %、 72 %、 73 %、 74 %、 75 %、 76 %、 77 %、 78 %、 79 %、 80 %、 81 %、 82 %、 83 %、 84 %、 85 %、 86 %、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 もしくは 99 % 同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む、請求項 17 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 21】

配列番号 19 のヌクレオチド配列、または配列番号 19 とその全長にわたって少なくとも 70 %、 71 %、 72 %、 73 %、 74 %、 75 %、 76 %、 77 %、 78 %、 79 %、 80 %、 81 %、 82 %、 83 %、 84 %、 85 %、 86 %、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 もしくは 99 % 同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む、請求項 17 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 22】

請求項 17 ～ 21 のいずれかに記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 23】

請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 22 に記載のベクター。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

請求項 1 4 に記載のポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 2 2 または 2 3 に記載のベクター。

【請求項 2 5】

請求項 1 5 または 1 6 に記載にポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 2 2 ～ 2 4 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 2 6】

配列番号 7 もしくは 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 2 2 ～ 2 5 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 2 7】

配列番号 1 0 もしくは 1 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 2 2 ～ 2 6 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 2 8】

配列番号 1 もしくは 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 2 2 ～ 2 7 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 2 9】

配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 2 2 ～ 2 8 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 3 0】

配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 2 2 ～ 2 9 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 3 1】

配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 2 2 ～ 3 0 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 3 2】

前記または各核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項 2 2 ～ 3 1 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 3 3】

前記または各プロモーターは、哺乳動物細胞における前記核酸によってコードされるポリペプチドの発現のためのものである、請求項 3 2 に記載のベクター。

【請求項 3 4】

前記または各プロモーターは、酵母または昆虫細胞における前記核酸によってコードされるポリペプチドの発現のためのものである、請求項 3 3 に記載のベクター。

【請求項 3 5】

ワクチンベクターである、請求項 2 2 ～ 3 4 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 3 6】

ウイルス性ワクチンベクター、細菌性ワクチンベクター、RNA ワクチンベクター、または DNA ワクチンベクターである、請求項 3 5 に記載のベクター。

【請求項 3 7】

請求項 2 2 ～ 3 6 のいずれかに記載のベクターを含む、単離された細胞。

【請求項 3 8】

請求項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 3 9】

請求項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載のポリペプチド、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤を含む薬学的組成物。

【請求項 4 0】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれかに記載のポリペプチドを含む、請求項 3 9 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 1】

請求項 1 4 に記載のポリペプチドを含む、請求項 3 9 または 4 0 に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2】

請求項 1 5 または 1 6 に記載のポリペプチドを含む、請求項 3 9 ～ 4 1 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 4 3】

配列番号 7 もしくは 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 3 9 ～ 4 2 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 4 4】

配列番号 1 0 もしくは 1 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 3 9 ～ 4 3 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 4 5】

配列番号 1 もしくは 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 3 9 ～ 4 4 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 4 6】

配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 3 9 ～ 4 5 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 4 7】

配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 3 9 ～ 4 6 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 4 8】

配列番号 1 8 のアミノ酸配列のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 3 9 ～ 4 7 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 4 9】

請求項 1 7 ～ 2 1 のいずれかに記載の核酸、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤を含む薬学的組成物。

【請求項 5 0】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 4 9 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 1】

請求項 1 4 に記載のポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 4 9 または 5 0 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 2】

請求項 1 5 または 1 6 に記載のポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 4 9 ～ 5 1 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 5 3】

配列番号 7 もしくは 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 4 9 ～ 5 2 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 5 4】

配列番号 1 0 もしくは 1 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 4 9 ～ 5 3 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 5 5】

配列番号 1 もしくは 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 4 9 ～ 5 4 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 5 6】

配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 4 9 ～ 5 5 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 5 7】

配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 4 9 ～ 5 6 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 5 8】

配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項

10

20

30

40

50

49～57のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項59】

請求項22～36のいずれかに記載のベクター、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤を含む薬学的組成物。

【請求項60】

前記組成物の前記ポリペプチドに対してまたは前記核酸によってコードされるポリペプチドに対して、被験体において免疫応答を増強するためのアジュバントをさらに含む、請求項39～59のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項61】

被験体においてインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘導する方法であって、前記方法は、有効量の、請求項1～16のいずれかに記載のポリペプチド、請求項17～21のいずれかに記載の核酸、請求項22～36のいずれかに記載のベクター、または請求項39～60のいずれかに記載の薬学的組成物を、前記被験体に投与する工程を包含する方法。

【請求項62】

インフルエンザウイルスに対して被験体を免疫する方法であって、前記方法は、有効量の請求項1～16のいずれかに記載のポリペプチド、請求項17～21のいずれかに記載の核酸、請求項22～36のいずれかに記載のベクター、または請求項39～60のいずれかに記載の薬学的組成物を、前記被験体に投与する工程を包含する方法。

【請求項63】

医薬としての使用のための、請求項1～16のいずれかに記載のポリペプチド、請求項17～21のいずれかに記載の核酸、請求項22～36のいずれかに記載のベクター、または請求項39～60のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項64】

インフルエンザウイルス感染の防止、処置、または改善における使用のための、請求項1～16のいずれかに記載のポリペプチド、請求項17～21のいずれかに記載の核酸、請求項22～36のいずれかに記載のベクター、または請求項39～60のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項65】

インフルエンザウイルス感染の防止、処置、または改善のための医薬の製造における請求項1～16のいずれかに記載のポリペプチド、請求項17～21のいずれかに記載の核酸、請求項22～36のいずれかに記載のベクター、または請求項39～60のいずれかに記載の薬学的組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、細胞、融合タンパク質、薬学的組成物。およびインフルエンザに対するワクチンとしてのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザは、上気道内の上皮細胞に感染するインフルエンザウイルスによって引き起こされる感染力の高い呼吸器の病気である。上記感染は、突然の高熱の発生、頭痛、筋肉痛および疲労、喉の痛み、咳嗽および鼻炎によって特徴づけられる。症例の大部分に関しては、インフルエンザは希に1週間持続し、通常は、上気道に限定される。しかし、医学的に弱い人々（例えば、65歳齢を過ぎた人々およびある特定の慢性的な医学的状态を有する人々）では、インフルエンザは、合併症を引き起こし得、さらには亡くなり得る。およそ900万人～4500万人のヒトが感染する。WHOは、季節性インフルエンザが、呼吸器疾患のみに起因して、毎年290000～650000人が亡くなっていると推定している。従って、有効なインフルエンザワクチンの開発は、世界中の数百万人の人々の健康にとって重要である。

10

20

30

40

50

【0003】

ワクチンの基本原理は、免疫系に病原体と遭遇する準備をさせることである。ワクチンは、抗体およびT細胞応答を生じるようにヒト免疫系を誘発し、これは、感染と戦う助けになる。歴史的には、病原体がいったん単離され、増殖された後、それが大量生産され、死滅または弱毒化され、ワクチンとして使用された。後になって、単離された病原体に由来する組換え遺伝子が、組換えタンパク質を生成するために使用され、その組換えタンパク質は、免疫応答を刺激するためにアジュバントと混合された。より近年になって、上記病原体遺伝子は、インビボで抗原を発現し、送達するために、ベクター系（弱毒化細菌またはウイルス送達系）へとクローニングされた。これらの戦略の全ては、将来的なアウトブレイクを防止するために、過去のアウトブレイクから単離された病原体に依存する。顕著には、またはゆっくりとしか変化しない病原体に関しては、この従来の技術は有効である。しかし、病原体によっては、変異速度が加速する傾向にあり、以前に生成した抗体が、その同じ病原体の進化した株を常に認識するわけではない。新たに出現および再出現した病原体はしばしば、それらの攻撃されやすい抗原を免疫系から隠すまたは偽装して、免疫応答から逃れる。

10

【0004】

インフルエンザは、最もよく特徴づけられた再出現する病原体のうちの1つであり、季節ごとに全世界で最大1億人の人々に感染が再出現する。インフルエンザは、*Orthomyxoviridae* 科のメンバーであり、1本鎖のマイナスセンスRNAゲノムを有する。RNAウイルスは概して、DNAウイルスと比較して、変異速度が非常に高い。なぜならウイルスRNAポリメラーゼは、DNAポリメラーゼの校正能力を欠いているからである。このことは、抗原連続変異（宿主生物の免疫系に提示される抗原の小さな変化を生じる、感染性因子のゲノムにおける変異の蓄積の連続プロセス）に貢献する。インフルエンザビリオン上のタンパク質の抗原性領域に対する変化は、宿主免疫系のその回避ならびに潜在的に増大した病原性および感染性を生じる。これが、インフルエンザを防止するために有効なワクチンを作成することが困難であることの一つの理由である。インフルエンザは、抗原不連続変異（インフルエンザウイルス上に提示される抗原における劇的な変化が存在するプロセス）を受け得る。インフルエンザの異なるサブタイプに由来する遺伝子セグメントは、上記サブタイプの両方からの遺伝子情報を含む新たなビリオン粒子へと再組合せ（reassort）およびパッケージし得る。これは、我々が免疫学的にナイーブである、ヒトの状況では以前に認められなかった抗原的特徴を有するウイルスを生じ得る。そのウイルスの新たな疑似種（*quasispecies*）は、その新たなインフルエンザウイルスに対する中和抗体、または阻害抗体がヒト集団の中に存在しなければ、パンデミックを引き起こし得る。

20

30

【0005】

多数のタイプのインフルエンザウイルスが存在し、ヒトにおいて最も一般的なものは、インフルエンザA、インフルエンザB、およびインフルエンザCである。インフルエンザAウイルスは、広く種々の鳥類および哺乳動物（ヒト、ウマ、海洋性哺乳動物、ブタ、フェレット、およびニワトリが挙げられる）に感染する。水鳥およびコウモリにおけるそれらの天然の感染源（*reservoir*）では、インフルエンザAウイルスは、最小の進化を示し、不顕性の疾患を引き起こす；しかし、それらがいったん異なる種に移った後では、インフルエンザAウイルスは、その新たな宿主に適合するにつれて急速に進化し得、おそらくは、家禽、下等動物およびヒトにおいて急性呼吸器疾患のパンデミックまたはエピソードを引き起こす。動物において、大部分のインフルエンザAウイルスは、呼吸器および腸管の軽度の局所感染を引き起こす。しかし、高病原性のインフルエンザA株（例えば、H5N1サブタイプの中のいくつか）は、家禽とともに溢れるほどのヒト症例において全身性の感染を引き起こし得、これらは、高い死亡率を有し得る。インフルエンザBおよびCは、ヒトへの感染に限定されているが、動物の感染源は知られていない。インフルエンザBは、流行性の季節性感染を引き起こし、インフルエンザAと類似の病原性を有する。インフルエンザCウイルスは通常、ヒトにおいて非常に軽度または無症状の感染と

40

50

関連する。

【0006】

1918年の壊滅的なインフルエンザパンデミック以来100年余りが経過したが、インフルエンザAおよびBに対する最適な防止または処置は未だ存在しない。インフルエンザは、それらの表面上での抗原提示である程度の類似性を共有しているが、これらの抗原の高度に異種の性質は、ワクチンおよび処置を開発するに当たってかなりの難題を呈する。2019～2020年の季節性インフルエンザエピソードの間に、四価ワクチンが広く供給された。これらは、2種のインフルエンザAウイルスおよび2種のインフルエンザBウイルスに対する防御を与えた。しかし、上記ウイルスは急速に進化し、従って、宿主免疫系によって認識不能であるインフルエンザの潜在的な大発生を防止するために、インフルエンザワクチンが、全てではなくても多くの潜在的インフルエンザ株から防御することは極めて重要である。

10

【0007】

インフルエンザAは、マトリクスタンパク質(M1)を覆う3種の内在性膜タンパク質：赤血球凝集素(HA)；ノイラミニダーゼ(NA)；およびマトリクスイオンチャネル(M2)が散らばった外側エンベロップを有する。インフルエンザBの組織化は、類似であり、HAおよびNAは、脂質エンベロップにわたって散らばっているが、M2の代わりにNBおよびBM2膜貫通イオンチャネルがある。

【0008】

インフルエンザAウイルスは、表面糖タンパク質(GP)、すなわち、HAおよびNAのそれらの組み合わせに基づいてサブタイプが分けられる。インフルエンザBウイルスは、インフルエンザAより抗原性のバリエーションが遙かに低く、サブタイプに分けられない。HAおよびNAは、膜結合エンベロップGPであり、ウイルス付着、細胞へのウイルス粒子の提示、および細胞からのウイルス粒子の放出を担う。それらは、ウイルス中和および防御免疫のための主要な免疫優性エピトープの供給源である。よって、HAおよびNAタンパク質の両方が、予防的インフルエンザワクチンの最も重要な構成要素と考えられる。HA媒介性進入の間に、宿主細胞膜上のシアル酸含有レセプターへのGPの結合は、細胞へのビリオンのエンドサイトーシスを開始する。エンドソーム内の低いpHは、HAにおいてコンホメーション変化を誘導して、融合ペプチドといわれる疎水性領域を露出する。その新たに露出された融合ペプチドは、次いで、エンドソーム膜に挿入し、それによって、ウイルスおよびエンドソームの膜を直ぐ接触した状態にして、膜融合および細胞質へのウイルスの進入を可能にする。細胞質へのこの放出は、ウイルスタンパク質およびRNA分子が、ウイルス転写およびその後の複製のために核に入ることを可能にする。転写されたプラス鎖mRNAは、核から外に出されて、ウイルスタンパク質へと翻訳され、複製されたマイナス鎖RNAは、核から外に出されて、新たに合成されたウイルスタンパク質と再アセンブルして、子孫ウイルス粒子を形成する。ウイルスは、先端細胞膜から出芽し、宿主膜と一緒にあって、別の細胞に感染し得るビリオンを形成する。

20

30

【0009】

HAは、ウイルス表面上にホモトリマーとして存在し、ビリオンから外側に突出し、I型膜貫通糖タンパク質を形成する円筒形状の分子を形成する。HA分子の各モノマーは、1個のHA0ポリペプチド鎖とともに、2個のジスルフィド架橋によって連結されたHA1およびHA2領域からなる。各HA0ポリペプチドは、球状頭部ドメインおよびステムドメインを形成する。上記球状頭部ドメインは、最も優勢なエピトープを含む一方で、上記ステムドメインは、それほど優性ではないが、より広い抗体認識のための重要なエピトープを有する。これらのエピトープのアミノ酸配列は、抗体に対する結合親和性および特異性を決定する。上記球状頭部ドメインは、レセプター結合ドメインおよびエステラーゼドメインを含む、HA1の一部からなるのに対して、上記ステムドメインは、HA1およびHA2の一部からなる。上記球状頭部ドメインを形成するHA1のアミノ酸残基は、抗原性部位によって囲まれたレセプター結合部位として作用する遠位先端において浅いポケットに位置する8個の標準的なアンチパラレルβシートのモチーフへと折りたたまれる。

40

50

上記 H A 1 ドメインの残りの部分は、 β -シートを主に含むステムドメインへと下る。H A 2 は、ステムドメインの大部分を形成し、ステム骨格を形成するらせん状のコイルドコイル構造へと折りたたまれる。H A 2 はまた、膜融合のために必要とされる疎水性領域、および表面膜へと緊留される長いらせん状の鎖および短い細胞ゾルテールを含む。

【0010】

インフルエンザ A 内には、18 種の異なる H A サブタイプおよび 11 種の異なる N A サブタイプが存在する。理論的には、潜在的に 198 種の異なるインフルエンザ A サブタイプの組み合わせが存在し、そのうちのいくらかは、ヒトおよび他の動物において毒性であり得る。結果として、これらのサブタイプに由来するウイルスが、ヒト伝染性ウイルスと再組合せし得、次のパンデミックを開始し得るという重大な懸念が存在する。近年、H 5、H 7、H 9、および H 10 サブタイプの鳥類ウイルスが、しばしば重篤な疾患を引き起こす、H 5 および H 7 ウイルスとの人畜共通感染症を引き起こしている。1997 年の H 5 N 1 の高病原性アジアインフルエンザ (H P A I) 大発生は、香港内の全家禽集団の殺処分を生じた。この汎発性家畜流行病 (p a n z o o t i c) はまた、ヒトにおいて 860 名の感染確認および 454 名の死亡者数を生じ、鳥類由来ウイルスがヒトに伝染する能力を示し、高い死亡率を生じる。H 5 N 1 サブタイプのこの H P A I は、頻繁に再出現し、その 60% 死亡率が原因で、およびそれが進化しかつ多様化し続けることから、特に懸念される。それらは、インフルエンザ A ウイルスより抗原性のバリエーションが低い、インフルエンザ B ウイルスは近年、2 つの抗原的に別個の系統 (B / V i c t o r i a / 2 / 1987 様および B / Y a m a g a t a / 16 / 1988 様) へと出現しており、インフルエンザ B が進化し得ることに伴う流動性、および今や、季節性インフルエンザワクチン接種において A 型および B 型の両方のウイルスを含むことがまた必須であるのかを例証する。

【0011】

現在のワクチンより遙かに多くのインフルエンザ株から防御する改善されたインフルエンザワクチンを提供することが必要である。特に、いくつかのインフルエンザ A および B バリエーションから防御する、インフルエンザ A および B ウイルスに対するワクチンを提供することが必要である。

【0012】

特に、新たなワクチン戦略は、1) ワクチン回避と成功裡に戦う、および 2) ヒト集団における新たなインフルエンザ病原体の出現および拡がりを防止するために必要とされる。ヒトのみならず、新たなヒト病原体を生じる新たなインフルエンザウイルス再組合せの供給源である動物にも由来する、異なるインフルエンザウイルス配列の大きなデータベースの使用が、本明細書で想定される。

【0013】

インフルエンザ A H 5 ウイルス

大部分のウイルス遺伝子は、再組合せを通じて置き換えられており、多くの異なる遺伝子型を生じるが、特定の H 5 遺伝子は、1996 年にそれが発見されて以来同定された全てのインフルエンザ A 単離物に未だに存在している。従って、H 5 は、インフルエンザ A の進化しつつある株が効果的に比較され得る恒存種を提供する。H 5 H A のクレード命名システムは、この遺伝子の進化パターンを比較するために開発された。拡がっている H 5 N 1 ウイルスは、特徴付けおよび H A 遺伝子の配列相同性に基づいて、多くのウイルスクレードへとグループ分けされる。クレードは、特定の遺伝的変化が生じた 1 つの共通する祖先を有する。これらのクレード内のウイルスは進化し続けることから、亜系統 (s u b - l i n e a g e) が周期的に出現する。

【0014】

インフルエンザ A H 5 に対するワクチンは存在するが、いずれのこれらのワクチンも、重要な H 5 クレードに対する中和免疫応答を誘導することができず、その中和抗体に対する抗原の親和性は、最適とはいえない。計算して最適化された広く反応性の抗原 (c o m p u t a t i o n a l l y o p t i m i s e d b r o a d l y r e a c t i v e

antigen) (COBRA) Tier 2 ワクチンデザイン (Nunez ら, Vaccines, 2020, 38 (4) : 830-839) は、ヒトおよび鳥類の両方から単離された H5N1 クレード 2 感染からの全長配列を使用して、コンセンサス配列アラインメント技術によって開発される。しかし、このデザインは、赤血球凝集素阻害 (HAI) 抗体またはワクチンに対して試験した全ての H5N1 クレードおよびサブクレードにわたって、より新たに再組合せしたウイルスからの防御を生じなかった。

【0015】

従って、インフルエンザ A H5 ウイルスに対するより広く中和免疫応答を誘発する改善されたサクチンを提供することがまた、必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献 1】 Nunez ら, Vaccines, 2020, 38 (4) : 830-839

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0017】

出願人は、インフルエンザ A の重要な H5 クレードに対して広く中和する免疫応答を誘導するアミノ酸配列およびそれらのコード核酸分子を同定した。出願人は、融合前および融合後の両方の状態において H5 分子のステム領域を安定化させることを担うアミノ酸配列およびそれらのコード核酸分子をさらに同定した。

【0018】

本発明によれば、赤血球凝集素サブタイプ 5 (H5) の球状頭部ドメイン、および必要に応じて赤血球凝集素のステムドメインを含み、頭部ドメインの位置 156、157、171、172、および 205 において以下のアミノ酸残基：

- ・ 156 : R ;
- ・ 157 : P または S、好ましくは P ;
- ・ 171 : D または N ;
- ・ 172 : T または A、好ましくは T ; および
- ・ 205 : K または R、好ましくは K、

を有する、単離されたポリペプチドが提供される。

【0019】

出願人は、このようなポリペプチドが H5 インフルエンザウイルスの多様なパネル（季節性の異なるクレードのウイルスを含む）に対して広く中和する抗体応答を誘発することを見出した。

【0020】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、配列番号 7、8、10、11、1、または 3 のアミノ酸配列とそれらの全長に沿って少なくとも 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0021】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、頭部ドメインの位置 156、157、171、172、および 205 において以下のアミノ酸残基：

- ・ 156 : R ;
- ・ 157 : P ;
- ・ 171 : D ;
- ・ 172 : T ; および
- ・ 205 : K

を含む。

【0022】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、配列番号7もしくは8のアミノ酸配列、または配列番号7もしくは8のアミノ酸配列とその全長に沿って少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%アミノ酸同一性を有しかつ配列番号7もしくは8の位置156、157、171、172、および205に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

- ・156： R；
- ・157： P；
- ・171： D；
- ・172： T；および
- ・205： K

10

を有するアミノ酸配列を含む。

【0023】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列（FLU__T3__HA__1）を含む（以下の実施例4を参照のこと）。

【0024】

このようなポリペプチドは、現在鳥類およびヒトにおいて拡がっているH5インフルエンザウイルスの多様なパネル（Goose Guangdong（A／Goose／Guangdong／1／1996、GS／GD）系統から生じるクレード2.3.4および7.1のH5インフルエンザウイルスを含む）に対して広く中和する抗体応答をこれらが誘発することから、特に有利である。

20

【0025】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、頭部ドメインの位置156、157、171、172、および205において以下のアミノ酸残基：

- ・156： R；
- ・157： P；
- ・171： N；
- ・172： T；および
- ・205： K、

30

を含む。

【0026】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、配列番号10もしくは11のアミノ酸配列、または配列番号10もしくは11のアミノ酸配列とその全長に沿って少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%アミノ酸同一性を有しかつ配列番号10もしくは11の位置156、157、171、172、および205に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

40

- ・156： R；
- ・157： P；
- ・171： N；
- ・172： T；および
- ・205： K

を有するアミノ酸配列を含む。

【0027】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸配列（FLU__T3__HA__2）を含む（以下の実施例5を参照のこと）。

50

【0028】

このようなポリペプチドは、現在、鳥類において拡がっているH5インフルエンザウイルスの多様なパネル（GS／GDクレード2．3．4および7．1のH5インフルエンザウイルスを含む）に対して広く中和する抗体応答をこれらが誘発することから、特に有利である。

【0029】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、頭部ドメインの位置156、157、171、172、および205において以下のアミノ酸残基：

- ・156： R；
- ・157： S；
- ・171： N；
- ・172： A；および
- ・205： R、

を含む。

【0030】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、配列番号1もしくは3のアミノ酸配列、または配列番号1もしくは3のアミノ酸配列とその全長に沿って少なくとも70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、もしくは99％アミノ酸同一性を有し、かつ配列番号1もしくは3の位置156、157、171、172、および205に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

- ・156： R；
- ・157： S；
- ・171： N；
- ・172： A；および
- ・205： R

を有するアミノ酸配列を含む。

【0031】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列（FLU__T2__HA__1）を含む（以下の実施例1を参照のこと）。

【0032】

このようなポリペプチドは、H5インフルエンザウイルスの多様なパネル（いくつかの異なるGS／GDクレードのウイルスを含む）に対して広く中和する抗体応答をこれらが誘発することから、特に有利である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

以下の表1は、本発明の異なる実施形態に関するインフルエンザ赤血球凝集素H5の位置A～Eにおけるアミノ酸配列の差異、および先行技術のCOBRA配列と比較したそれらの位置における差異をまとめる。

【0034】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

領域	A		B		C	D	E	実施例/図
H5 残基	156	157	171	172	205	416	434	
FLU_T2_HA_1	R	S	N	A	R	F	F	実施例1/図2
FLU_T3_HA_1	R	P	D	T	K	F	F	実施例4/図2
FLU_T3_HA_2	R	P	N	T	K	F	F	実施例5/図2
COBRA (ヒト/鳥類)	K	S	S	A	R	E	E	図3
COBRA (ヒト)	S	P	N	T	R	E	E	図3

10

【0035】

本発明のポリペプチドは、任意の適切な赤血球凝集素ステムドメイン（非H5サブタイプを含む任意の適切なインフルエンザ赤血球凝集素サブタイプのステムドメインを含む）を含み得る。必要に応じて、上記ステムドメインは、H5ステムドメインである。

【0036】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、ステムドメインの位置416および434において以下のアミノ酸残基：

- ・416： F；および
- ・434： F、

を含む。

【0037】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、長さが10,000個、9,000個、8,000個、7,000個、6,000個、5,000個、4,000個、3000個、2000個、1500個、1000個、900個、800個、700個、600個、590個、580個、570個、560個、550個、540個、530個、520個、510個、500個、490個、480個、470個、460個、450個、440個、430個、420個、410個、400個、390個、380個、370個、360個、350個、340個、330個、320個、310個、300個、290個、280個、または270個までのアミノ酸残基を含み得る。

30

【0038】

出願人はまた、位置A～Cに由来するアミノ酸残基を有するH5球状頭部ドメインのフラグメントを含むポリペプチドがまた、H5インフルエンザウイルスに対する抗体応答を誘発し得ることを理解した。例えば、このようなポリペプチドは、適切な抗体応答を生成するために、単独で使用されてもよいし、他のHAサブタイプ頭部または他のタンパク質（例えば、類似の折りたたみモチーフを有する）にグラフト化されてもよい。

40

【0039】

したがって、本発明によれば、以下のアミノ酸配列：

R (P/S) S F F R N V V W L I K K N (D/N) (T/A) Y P T I K R S Y N N T N Q E D L L V L W G I H P N D A A E Q T (K/R) (配列番号13)、または配列番号13の配列とその全長に沿って少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%アミノ酸同一性を有しかつ配列番号13の位置1、2、16、17、および50に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

50

- ・ 1 : R ;
- ・ 2 : P または S、好ましくは P ;
- ・ 16 : D または N ;
- ・ 17 : T または A、好ましくは T ; および
- ・ 50 : K または R、好ましくは K、

を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた提供される。

【0040】

必要に応じて、配列番号 13 のアミノ酸配列、または配列番号 13 の配列とその全長に沿って少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む本発明のポリペプチドは、上記アミノ酸配列の位置 1、2、16、17、および 50 において、または配列番号 13 の位置 1、2、16、17、および 50 に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

- ・ 1 : R ;
- ・ 2 : P ;
- ・ 16 : D ;
- ・ 17 : T ; および
- ・ 50 : K、

を含む。

【0041】

必要に応じて、配列番号 13 のアミノ酸配列、または配列番号 13 の配列とその全長に沿って少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む本発明のポリペプチドは、上記アミノ酸配列の位置 1、2、16、17、および 50 において、または配列番号 13 の位置 1、2、16、17、および 50 に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

- ・ 1 : R ;
- ・ 2 : P ;
- ・ 16 : N ;
- ・ 17 : T ; および
- ・ 50 : K、

を含む。

【0042】

必要に応じて、配列番号 13 のアミノ酸配列、または配列番号 13 の配列とその全長に沿って少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む本発明のポリペプチドは、上記アミノ酸配列の位置 1、2、16、17、および 50 において、または配列番号 13 の位置 1、2、16、17、および 50 に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

- ・ 1 : R ;
- ・ 2 : S ;
- ・ 16 : N ;
- ・ 17 : A ; および
- ・ 50 : R、

を含む。

【0043】

必要に応じて、配列番号13のアミノ酸配列、または配列番号13の配列とその全長に沿って少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む本発明のポリペプチドは、長さが570個、560個、550個、500個、450個、400個、350個、300個、250個、200個、150個、100個、90個、80個、70個、60個、または50個までのアミノ酸残基である。

10

【0044】

本発明によれば、配列番号5、9、もしくは12のうちのいずれかのアミノ酸配列、または配列番号5、9、もしくは12のうちのいずれかの配列とその全長に沿って少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%アミノ酸同一性を有しかつ配列番号5、9、もしくは12の位置148および166に相当する位置において以下のアミノ酸残基：

・148： F；および

・166： F、

20

を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた提供される。

【0045】

出願人は、このようなポリペプチドが、赤血球凝集素分子のステム領域を形成する場合に、融合前および融合後の両方の状態においてステム領域を安定化させることを見出した。このようなポリペプチドは、例えば、H5赤血球凝集素頭部ドメインまたは非H5頭部ドメインとともに提供され得る。

【0046】

必要に応じて、配列番号5、9、もしくは12のうちのいずれかのアミノ酸配列、または配列番号5、9、もしくは12の配列とその全長に沿って少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む本発明のポリペプチドは、長さが10,000個、9,000個、8,000個、7,000個、6,000個、5,000個、4,000個、3,000個、2,000個、1,500個、1,000個、900個、800個、700個、600個、590個、580個、570個、560個、550個、540個、530個、520個、510個、500個、490個、480個、470個、460個、450個、440個、430個、420個、410個、400個、390個、380個、370、360個、350個、340個、330個、320個、310個、もしくは300個までのアミノ酸残基である。

30

40

【0047】

本発明のポリペプチドは、1個またはこれより多くの保存的アミノ酸置換を含み得る。保存的アミノ酸置換は、行われる場合に、元のタンパク質の特性にほとんど干渉しない、すなわち、上記タンパク質の構造および特に機能が、このような置換によって保存されかつ顕著に変化しないそれらの置換である。保存的置換の例は、以下に示される：

【0048】

50

【表 2】

元の残基	保存的置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln;
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

10

20

【0049】

保存的置換は概して、（a）例えば、シートまたはらせん状コンホメーションとして、上記置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造、（b）標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖のかさ高さを維持する。

30

【0050】

タンパク質特性における最大の変化を生じると概して予測される置換は、非保存的な変化、例えば、（a）親水性残基（例えば、セリンまたはスレオニン）が、疎水性残基（例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリンまたはアラニン）の代わりに置き換えられる（または、によって置換される）；（b）システインもしくはプロリンが、任意の他の残基の代わりに置き換えられる（または、によって置換される）；（c）電気陽性側鎖を有する残基（例えば、リジン、アルギニン、またはヒスチジン）が、電気陰性残基（例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸）の代わりに置き換えられる（または、によって置換される）；または（d）かさ高い側鎖を有する残基（例えば、フェニルアラニン）が、側鎖を有しない残基（例えば、グリシン）の代わりに置き換えられる（または、によって置換される）変化であり得る。

40

【0051】

本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸分子またはその相補体がまた、本発明に従って提供される。

【0052】

本発明のポリペプチドをコードする本発明の核酸分子とその全長にわたって少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは

50

99%同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む単離された核酸分子がまた、本発明に従って提供される。

【0053】

必要に応じて、本発明の核酸分子は、配列番号2、4、もしくは6のヌクレオチド配列、またはその相補体を含む。

【0054】

配列番号2、4、もしくは6とその全長にわたって少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む単離された核酸分子がまた、本発明に従って提供される。

10

【0055】

用語「広く中和する免疫応答 (broadly neutralising immune response)」とは、インフルエンザAの少なくとも3種の抗原的に別個のクレードの感染および／もしくは感染の進行を阻害する（すなわち、低減する）、中和するもしくは防止するために十分である、被験体において誘発される免疫応答を含むように、インフルエンザAに関して本明細書で使用される。必要に応じて、広く中和する免疫応答は、インフルエンザAの異なるH5クレードの感染および／もしくは感染の進行を阻害する、中和するもしくは防止するために十分である。必要に応じて、有利なことには、上記異なるクレードは、クレード2、3、4および／または7、1を含む。

20

【0056】

M2

M2の細胞外ドメインは、全てのインフルエンザA株にわたってほぼ不変であると同定されている。これは、全てのインフルエンザA感染に対して広い範囲の防御を誘発するユニバーサルインフルエンザAワクチンを作り出すという問題に対する潜在的な解決策として存在する。

【0057】

出願人は、インフルエンザAのM2に対して広く中和する免疫応答を誘導するアミノ酸配列およびそれらのコード核酸分子を同定した。

30

【0058】

本発明によれば、配列番号14のアミノ酸配列、または配列番号14のアミノ酸配列とその全長に沿って少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドが提供される。

【0059】

本発明によれば、配列番号15のヌクレオチド配列、または配列番号15とその全長にわたって少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む、単離された核酸分子もまた提供される。

40

【0060】

ノイラミニダーゼ

出願人はまた、いくつかの異なるインフルエンザサブタイプによって保存されるノイラミニダーゼのエピトープを含むアミノ酸配列およびそれらのコード核酸分子を同定した。

【0061】

本発明によれば、配列番号16のアミノ酸配列、または配列番号16の配列とその全長

50

に沿って少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドが提供される。

【0062】

本発明によれば、配列番号18のアミノ酸配列、または配列番号18の配列とその全長に沿って少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドが提供される。

10

【0063】

本発明によれば、配列番号17のヌクレオチド配列、または配列番号17とその全長にわたって少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む、単離された核酸分子もまた提供される。

20

【0064】

本発明によれば、配列番号19のヌクレオチド配列、または配列番号19とその全長にわたって少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む、単離された核酸分子もまた提供される。

【0065】

組み合わせワクチン

ワクチン回避をより効果的に防止するために、2種またはこれより多くの（好ましくは3種またはこれより多くの）進化的に拘束され、計算してデザインされたウイルス抗原標的の組み合わせを有するワクチンが提供され、各抗原標的は、ワクチン防御の最大幅を独立して与えるようにデザインされる。本発明のワクチンは、HA、NAおよびM2の祖先の抗原ベースのデザインを（いずれか単独または組み合わせにおいて）含み得る。さらに、ヒトにおいて天然の組み合わせとして広く拡がっていることが主に見出されない改変されたHAおよびNA抗原構造の組み合わせが、提供される（例えば、拡がって、一緒になってともに進化することが見出されない、グループ2 NAと組み合わせられたグループ1 HA（例えば、H1N1またはH3N2））。

30

【0066】

本発明のポリペプチドまたは核酸分子は、現在のワクチンより遙かに多くのインフルエンザ株から防御するインフルエンザワクチンを提供するために、任意の適切な組み合わせ（例えば、本発明のH5および／またはM2および／またはノイラミニダーゼの実施形態）において組み合わせられ得る。いくつかの実施形態において、このような組み合わせワクチンは、いくつかのインフルエンザAおよびBのバリエーションから防御する（特に、M2の実施形態を含むそれらの実施形態。なぜならM2は、インフルエンザAとBとの間でより良好に保存されているからである）。

40

【0067】

必要に応じて、三価ワクチンは、本発明のH5、M2、およびノイラミニダーゼの実施形態を組み合わせる。

【0068】

必要に応じて、本発明の核酸ベクターは、

50

i) 配列番号 7 もしくは 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、または配列番号 10 もしくは 11 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、または配列番号 1 もしくは 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子 (H5 の実施形態の例) ; および / あるいは

ii) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子 (M2 の実施形態の例) ; および / あるいは

iii) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、または配列番号 18 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子 (ノイラミニダーゼの実施形態の例)、

を含む。

【0069】

必要に応じて、本発明のベクターは、各核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。

【0070】

必要に応じて、本発明のベクターは、pEVAC ベースのベクターである。

【0071】

免疫応答は、体液性および / または細胞性の免疫応答であり得る。細胞性免疫応答は、抗原またはワクチンのような刺激に対する免疫系の細胞 (例えば、B 細胞、T 細胞、マクロファージまたは多形核細胞 (polymorphonucleocyte) の応答である。免疫応答は、宿主防御応答に関与する身体の任意の細胞 (例えば、インターフェロンまたはサイトカインを分泌する上皮細胞が挙げられる) を含み得る。免疫応答としては、

【0072】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、防御的免疫応答を誘導する。防御的免疫応答とは、被験体を感染または疾患から防御する (すなわち、感染を防止するかまたは感染と関連する疾患の発生を防止する) 免疫応答をいう。免疫応答を測定するための方法は、当該分野で周知であり、例えば、リンパ球 (例えば、B 細胞もしくは T 細胞) の増殖および / もしくは活性、サイトカインもしくはケモカインの分泌、炎症、または抗体生成の測定を含む。

【0073】

必要に応じて、本発明のポリペプチドは、上記ポリペプチドが投与されている (ポリペプチドとして、または例えば投与された核酸発現ベクターから発現されているかのいずれかとして) ヒトまたは非ヒト動物における抗体の生成および / または T 細胞応答を誘導し得る。

【0074】

アミノ酸または核酸配列の間の類似性は、配列間の類似性 (そうでなければ、配列同一性といわれる) に関して表される。配列同一性は、パーセンテージ同一性 (または類似性もしくは相同性) に関して頻繁に測定される ; そのパーセンテージが高いほど、その 2 つの配列間の類似性は大きい。所定の遺伝子またはタンパク質のホモログまたはバリエーションは、標準的な方法を使用して整列される場合に、比較的高い程度の配列同一性を有する。比較のための配列アラインメントの方法は、当該分野で周知である。種々のプログラムおよびアラインメントアルゴリズムは、以下に記載される : Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73:237-244, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989; Corpet, Nucleic Acids' Research 16:10881-10890, 1988; および Pearson and Lipman, Proc. Nat

10

20

30

40

50

l. Acad. Sci. U. S. A. 85:2444, 1988. Altschulら, Nature Genet. 6:119-129, 1994. The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschulら, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) は、配列分析プログラム、blastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxに関連して使用するために、いくつかの情報源 (National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) が挙げられる) から、およびインターネット上で入手可能である。

【0075】

核酸配列間、またはアミノ酸配列間の配列同一性は、その配列のアラインメントを比較することによって決定され得る。比較される配列において等しい位置が同じヌクレオチド、またはアミノ酸によって占有される場合、その分子は、その位置において同一である。同一性のパーセンテージとしてのアラインメントのスコア付けは、その比較される配列によって共有される位置において同一なヌクレオチドまたはアミノ酸の数の関数である。配列を比較する場合、最適なアラインメントは、その配列において考えられる挿入および欠失を考慮に入れるために、配列のうちの1またはこれより多くにギャップが導入されることを必要とし得る。配列比較法は、比較される配列中で同一なヌクレオチドの数が同じ場合には、その2つの比較される配列間でより高い関連性を示す可能な限り少ないギャップを有する配列アラインメントが、多くのギャップを有するものより高いスコアを達成するように、ギャップペナルティーを使用し得る。最大パーセント同一性の計算は、ギャップペナルティーを考慮に入れて、最適なアラインメントの生成を含む。

【0076】

配列比較を行うための適切なコンピュータプログラムは、商業部門および公的部門において広く利用可能である。例としては、MatGat (Campanellaら, 2003, BMC Bioinformatics 4: 29; <http://bitnicka.com/ledion/matgat>から入手可能なプログラム)、Gap (Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)、FASTA (Altschulら, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; <http://www.ebi.ac.uk/fasta>から入手可能なプログラム)、Clustal W 2.0およびX 2.0 (Larkinら, 2007, Bioinformatics 23: 2947-2948; <http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2>から入手可能なプログラム) およびEMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (Needleman & Wunsch, 1970, 前出; Kruskal, 1983, In: Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, Sankoff & Kruskal (編), pp 1-44, Addison Wesley; <http://www.ebi.ac.uk/tools/emboss/align>から入手可能なプログラム) が挙げられる。全てのプログラムは、デフォルトパラメーターを使用して実行され得る。

【0077】

例えば、配列比較は、EMBOSS Pairwise Alignment Algorithmsの「ニードル」法 (これは、それらの全長にわたって考慮される場合に2つの配列の最適なアラインメント (ギャップを含む) を決定し、パーセンテージ同一性スコアを提供する) を使用して行われ得る。アミノ酸配列比較のためのデフォルトパラメーター (「Protein Molecule」オプション) は、ギャップ伸長ペナルティー: 0.5、ギャップオープンペナルティー: 10.0、マトリクス: Blosum 62であり得る。

10

20

30

40

50

【0078】

配列比較は、参照配列の全長にわたって行われ得る。

【0079】

本明細書で記載される配列は、別のアミノ酸配列の「位置に相当する位置において (a t p o s i t i o n s c o r r e s p o n d i n g t o p o s i t i o n s)」アミノ酸残基を含むアミノ酸配列への言及を含む。このような相当する位置は、例えば、本明細書で記載される配列アラインメント方法、または当業者に公知の別の配列アラインメント方法を使用して、配列のアラインメントから同定され得る。

【0080】

本発明の核酸分子を含むベクターが、本発明に従って提供される。

10

【0081】

必要に応じて、本発明のベクターは、核酸に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。

【0082】

必要に応じて、上記プロモーターは、哺乳動物において上記核酸によってコードされるポリペプチドの発現のためのものである。

【0083】

必要に応じて、上記プロモーターは、酵母または昆虫細胞において上記核酸によってコードされるポリペプチドを発現するためのものである。

【0084】

必要に応じて、上記ベクターは、ワクチンベクターである。

20

【0085】

必要に応じて、上記ベクターは、ウイルス性ワクチンベクター、細菌性ワクチンベクター、RNAワクチンベクター、またはDNAワクチンベクターである。

【0086】

本発明の核酸分子は、DNAまたはRNA分子を含み得る。上記核酸分子がRNAを含む実施形態に関しては、上記分子が、配列番号2、4、もしくは6のいずれかと少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるRNA配列（ここで各「T」ヌクレオチドは、「U」によって置き換えられる）、またはその相補体を含み得ることは、理解される。

30

【0087】

例えば、本発明の核酸を含むRNAワクチンベクターが提供される場合、本発明の核酸の核酸配列は、RNA配列であるので、例えば、配列番号2、4、もしくは6のうちのいずれかと少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるRNA核酸配列（ここで各「T」ヌクレオチドは、「U」によって置き換えられる）、またはその相補体を含み得ることが、理解される。

40

【0088】

ウイルス性ワクチンベクターは、ヒトまたは非ヒト動物細胞へと核酸（例えば、DNAまたはRNA）を送達するためにウイルスを使用する。上記ウイルスに含まれる核酸は、感染したヒトまたは非ヒト動物細胞においていったん発現された後、免疫応答を誘発する1またはこれより多くの抗原をコードする。体液性および細胞媒介性両方の免疫応答が、ウイルス性ワクチンベクターによって誘導され得る。ウイルス性ワクチンベクターは、核酸ワクチンの役に立つ性質のうちの多くと、生の弱毒化ワクチンのものとを併せ持つ。核酸ワクチンのように、ウイルス性ワクチンベクターは、一定範囲の免疫応答（抗体、Tヘルパー細胞（CD4⁺ T細胞）、および細胞傷害性Tリンパ球（CTL、CD8⁺ T細胞）媒介性免疫を含む）を刺激するために合わせて作られ得る抗原性タンパク質の生成

50

のために、宿主細胞へと核酸を運ぶ。ウイルス性ワクチンベクターは、核酸ワクチンとは異なり、宿主細胞に能動的に侵入し、生の弱毒化ワクチンと同様に複製する可能性をも有し、アジュバントのように免疫系をさらに活性化する。ウイルス性ワクチンベクターは、従って、関連しない生物に由来するタンパク質抗原をコードする核酸（例えば、DNAまたはRNA）を運ぶように遺伝的に操作された生の弱毒化ウイルスを概して含む。ウイルス性ワクチンベクターは一般に、核酸ワクチンより強い免疫応答を生じ得るが、いくつかの疾患に関しては、ウイルスベクターは、異種プライムブースト（heterologous prime-boost）といわれる戦略において他のワクチン技術と組み合わせて使用される。このシステムにおいて、1つのワクチンは、プライム工程として与えられ、続いて、代替のワクチンを使用するワクチン接種がブースターとして与えられる。その異種プライムブースト戦略は、より強い全体的な免疫応答を提供することを目的としている。ウイルス性ワクチンベクターは、この戦略の一部としてプライムおよびブーストワクチンの両方として使用され得る。ウイルス性ワクチンベクターは、Uraら、2014（Vaccines 2014, 2, 624-641）およびChoi and Chang, 2013（Clinical and Experimental Vaccine Research 2013; 2: 97-105）によって総説される。

10

【0089】

必要に応じて、上記ウイルス性ワクチンベクターは、ウイルス性送達ベクター（例えば、ボックスウイルス（例えば、Modified Vaccinia Ankara（MVA）、NYVAC、AVIPOX）、ヘルペスウイルス（例えば、任意の宿主種のHSV、CMV、アデノウイルス）、モルビリウイルス（例えば、麻疹）、アルファウイルス（例えば、SFV、センダイ）、フラビウイルス（例えば、黄熱）、またはラブドウイルス（例えば、VSV）ベースのウイルス性送達ベクター）、細菌性送達ベクター（例えば、Salmonella、E. coli）、RNA発現ベクター、またはDNA発現ベクターに基づく。

20

【0090】

必要に応じて、上記核酸発現ベクターは、核酸発現ベクター、およびウイルス偽型ベクターである。

【0091】

30

必要に応じて、上記核酸発現ベクターは、ワクチンベクターである。

【0092】

必要に応じて、上記核酸発現ベクターは、5'から3'の方向に：プロモーター；スプライスドナー部位（SD）；スプライスアクセプター部位（SA）；および終結シグナルを含み、ここでマルチクロニング部位は、スプライスアクセプター部位と終結シグナル配列との間に位置する。

【0093】

必要に応じて、上記プロモーターは、CMV最初期1エンハンサー／プロモーター（CMV-IEE-P）を含む、および／または終結シグナルは、KpnI制限エンドヌクレアーゼ部位を欠くウシ成長ホルモン遺伝子（Tbgh）の終結シグナルを含む。

40

【0094】

必要に応じて、上記核酸発現ベクターは、複製起点、および抗生物質に対する耐性をコードする核酸をさらに含む。必要に応じて、上記複製起点は、pUC-プラスミド複製起点および／またはカナマイシンに対する耐性をコードする核酸を含む。

【0095】

必要に応じて、上記ベクターは、pEVACベースの発現ベクターである。

【0096】

必要に応じて、上記核酸発現ベクターは、配列番号21の核酸配列（pEVAC）を含む。上記pEVACベクターは、ウイルス偽型を生成することならびに動物およびヒトの直接DNAワクチン接種のための非常に汎用性の高い発現ベクターであることが判明して

50

いる。上記 p E V A C 発現ベクターは、以下の実施例 1 1 においてより詳細に記載される。図 8 は、p E V A C のプラスミドマップを示す。

【0097】

本発明のベクターを含むまたはこれでトランスフェクトされた、単離された細胞がまた、本発明に従って提供される。

【0098】

本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質がまた、本発明に従って提供される。

【0099】

本発明のポリペプチドを含む偽型化ウイルスがまた、本発明に従って提供される。

【0100】

本発明に従って、本発明のポリペプチド、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤を含む薬学的組成物がまた、提供される。

【0101】

本発明の薬学的組成物は、任意の適切な組み合わせにおいて本発明のポリペプチドを含み得る（例えば、本発明の H 5 および／または M 2 および／またはノイラミニダーゼの実施形態）。

【0102】

必要に応じて、本発明の薬学的組成物は、

i) 配列番号 7 もしくは 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または配列番号 1 0 もしくは 1 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または配列番号 1 もしくは 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチド（H 5 の実施形態の例）；および／あるいは

i i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチド（M 2 の実施形態の例）；および／あるいは

i i i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチド（ノイラミニダーゼの実施形態の例）、を含む。

【0103】

本発明に従って、本発明の核酸、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤を含む薬学的組成物がまた、提供される。

【0104】

本発明の薬学的組成物は、任意の適切な組み合わせにおいて本発明の核酸分子を含み得る（例えば、本発明の H 5 および／または M 2 および／またはノイラミニダーゼの実施形態）。

【0105】

必要に応じて、本発明の薬学的組成物は、

i) 配列番号 7 もしくは 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、または配列番号 1 0 もしくは 1 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、または配列番号 1 もしくは 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチド（H 5 の実施形態の例）をコードする核酸分子；および／あるいは

i i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチド（M 2 の実施形態の例）をコードする核酸分子；および／あるいは

i i i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、または配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチド（ノイラミニダーゼの実施形態の例）をコードする核酸分子、を含む。

【0106】

本発明に従って、本発明のベクター、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤を含む薬学的組成物がまた、提供される。

【0107】

必要に応じて、本発明の薬学的組成物は、上記組成物の、上記ポリペプチドに対して、

10

20

30

40

50

または上記核酸によってコードされるポリペプチドに対して、被験体において免疫応答を増強するためのアジュバントをさらに含む。

【0108】

被験体においてインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘導する方法がまた、本発明に従って提供され、上記方法は、有効量の本発明のポリペプチド、本発明の核酸、本発明のベクター、または本発明の薬学的組成物を上記被験体に投与する工程を包含する。

【0109】

インフルエンザウイルスに対して被験体を免疫する方法がまた、本発明に従って提供され、上記方法は、有効量の本発明のポリペプチド、本発明の核酸、本発明のベクター、または本発明の薬学的組成物を上記被験体に投与する工程を包含する。

10

【0110】

医薬としての使用のための、本発明のポリペプチド、本発明の核酸、本発明のベクター、または本発明の薬学的組成物が、本発明に従ってさらに提供される。

【0111】

インフルエンザウイルス感染の防止、処置、または改善における使用のための、本発明のポリペプチド、本発明の核酸、本発明のベクター、または本発明の薬学的組成物が、本発明に従ってさらに提供される。

【0112】

インフルエンザウイルス感染の防止、処置、または改善のための医薬の製造における本発明のポリペプチド、本発明の核酸、本発明のベクター、または本発明の薬学的組成物がまた、本発明に従って提供される。

20

【0113】

任意の適切な投与経路が使用され得る。投与方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、非経口、静脈内、皮下、膣、直腸、鼻内、吸入または経口が挙げられるが、これらに限定されない。非経口投与（例えば、皮下、静脈内または筋肉内投与）は、注射によって概して達成される。注射用物は、従来の形態において、液体の液剤もしくは懸濁物、注射前に液体中の液剤もしくは懸濁物に適した固体形態のいずれかとして、またはエマルジョンとして調製され得る。注射液剤および懸濁物は、以前に記載された種類の無菌散剤、粒剤、および錠剤から調製され得る。投与は、全身または局所であり得る。

【0114】

組成物は、任意の適切な様式で（例えば、薬学的に受容可能なキャリアとともに）投与され得る。薬学的に受容可能なキャリアは、投与される特定の組成物、および上記組成物を投与するために使用される特定の方法によって、部分的に決定される。非経口的投与のための調製物は、無菌の水性または非水性液剤、懸濁物、およびエマルジョンが挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物性油（例えば、オリーブ油）、および注射用有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）である。水性のキャリアとしては、水、アルコール性／水性液剤、エマルジョンもしくは懸濁物（生理食塩水および緩衝化媒体を含む）が挙げられる。非経口的ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸添加リンゲル液、または不揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養補液（fluid and nutrient replenisher）、電解質補液（electrolyte replenisher）（例えば、リンフェルデキストロースに基づくもの）などが挙げられる。保存剤および他の添加剤はまた、存在し得る（例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガスなど）。

30

40

【0115】

上記組成物のうちのいくらかは、潜在的に、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、およびリン酸のような）および有機酸（例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、およびフマル酸）との反応によって、または無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム）および有機塩基（例えば、モノアル

50

キルアミン、ジアルキルアミン、トリアルキルアミンおよびアリアルアミン、ならびに置換されたエタノールアミン)との反応によって形成される、薬学的に受容可能な酸付加塩または塩基付加塩として投与され得る。

【0116】

投与は、単一用量または複数用量によって達成され得る。本開示の文脈において被験体に投与される用量は、被験体において経時的に有益な治療応答を誘導するか、または感染を阻害もしくは防止するために十分であるべきである。必要とされる用量は、被験体の種、年齢、体重および全体の状態、処置されている感染の重篤度、使用されている特定の組成物およびその投与様式に依存して被験体間で変動する。適切な用量は、慣用的な実験法のみを使用して、当業者によって決定され得る。

10

【0117】

薬学的に受容可能なキャリアとしては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。上記キャリアおよび組成物は、無菌であり得、製剤は、投与様式に適合される。上記組成物はまた、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝化剤を含み得る。上記組成物は、液体の液剤、懸濁物、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤、または散剤であり得る。上記組成物は、旧来の結合剤およびキャリア（例えば、トリグリセリド）とともに坐剤として製剤化され得る。経口製剤は、標準的なキャリア（例えば、製薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、および炭酸マグネシウム）を含み得る。一般的な薬学的キャリアのうちのいずれか（例えば、滅菌生理食塩水またはゴマ油）が使用され得る。上記媒体はまた、従来の薬学的補助物質（例えば、浸透圧を調節する薬学的に受容可能な塩、緩衝液、保存剤などのような）を含み得る。本明細書で提供される組成物および方法とともに使用され得る他の媒体は、通常生理食塩水およびゴマ油である。

20

【0118】

いくつかの実施形態において、上記組成物は、薬学的に受容可能なキャリアおよび／またはアジュバントを含む。例えば、上記アジュバントは、ミョウバン、フロイントの完全アジュバント、生物学的アジュバントまたは免疫刺激性オリゴヌクレオチド（例えば、CpGオリゴヌクレオチド）であり得る。

【0119】

本開示において有用な薬学的に受容可能なキャリア（ビヒクル）は、従来どおりである。E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第15版(1975)によるRemington's Pharmaceutical Sciencesは、1またはこれより多くの治療用組成物（例えば、1またはこれより多くのインフルエンザワクチン）およびさらなる薬剤の薬学的送達に適した組成物および製剤を記載する。

30

【0120】

一般に、キャリアの性質は、使用される特定の投与様式に依存する。例えば、非経口の製剤は、通常、薬学的におよび生理学的に受容可能な流体（例えば、ビヒクルとしての水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなど）を含む注射用流体を含む。固体組成物（例えば、散剤、丸剤、錠剤、またはカプセル剤形態）に関しては、従来の非毒性固体キャリアは、例えば、製薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムを含み得る。生物学的に中性のキャリアに加えて、投与されるべき薬学的組成物は、少量の非毒性補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤）、保存剤、およびpH緩衝化剤など（例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレート）を含み得る。

40

【0121】

必要に応じて、本発明の組成物は、筋肉内投与される。

【0122】

必要に応じて、上記組成物は、筋肉内、皮内、皮下に、針によってまたは遺伝子銃もし

50

くはエレクトロポレーションによって投与される。

【0123】

本発明の実施形態は、ここで添付の図面を参照しながら例示によってのみ記載される。

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図1】図1は、異なるクレードおよびサブクレードに由来するH5を有する種々の偽型化ウイルスに対する中和抗体応答の強度を図示する中和アッセイの結果を示す；

【図2】図2は、本発明のポリペプチドの異なる実施形態のアミノ酸配列比較を示す；

【図3】図3は、本発明のポリペプチドの異なる実施形態および先行技術のCOBRA配列のアミノ酸配列比較を示す；

【図4】図4は、種々のインフルエンザA単離物に由来するM2を標的化するために、マウスを本発明の実施形態で免疫した後に得られたマウス血清の能力を試験するフローサイトメトリーベースの免疫蛍光アッセイの結果を示す；

【図5】図5は、FLU__T2__NA__3を使用する偽型ベースの酵素結合レクチンアッセイ（Pseudotype-based Enzyme-Linked Lectin Assay）（pELLA）の結果を示す；

【図6】図6は、FLU__T2__NA__4を使用するpELLAの結果を示す；

【図7】図7は、N9 mAbでのpELLAの結果を示す；

【図8】図8は、pEVACベクターのプラスミドマップを示す。

【実施例】

【0125】

実施例1 - FLU__T2__HA__1

本実施例は、FLU__T2__HA__1として公知の本発明の実施形態のためのインフルエンザ赤血球凝集素H5頭部およびステム領域のアミノ酸配列を提供する。以下の配列番号1において、ステム領域のアミノ酸残基が下線を付して示される。頭部領域のアミノ酸残基は、残りの残基である。

【0126】

FLU__T2__HA__1 - HA0アミノ酸配列（配列番号1）：

【化1】

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLDGV
KPLILRDCSVAGWLLGNPMCMDEFINPEWSYIVEKANPANDLCYPGNFNDYEELKHLLSRI
NHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRSSFFRNVVWLIKNNAYPTIKRSYNNTNQ
EDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSKVNQGSGRMEFF
WTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPF
HNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRERRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGW
YGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLN
KKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEF
YHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIM
VAGLSLWMCSNGSLQCRIC

【0127】

FLU__T2__HA__1 - HA0核酸配列（配列番号2）：

10

20

30

40

50

【化 2】

atggaaaagattgtgctgctgctggccatcggtgccctggtaagagcgatcaaatctgcatcggctaccacgccaacaacag
caccgaacaggtggacaccattatggaaaagaacgtgaccgtgacacacgcccaggacatccctggaaaagaccacaac
ggcaagctgtgacacctggatggcgtaagcctctgatcctgagagattgctctgtggccggctggctgtgggaatcctatgt
gcgacgagttcatcaacgtgcccagtggtctatatcgaggaaaaggccaatcctgccaacgacctgtgctaccccgga
cttcaacgactacgaggaactgaaacatctgctgagccggatcaaccacttcgagaagatccagatcatcccaagtctctt
ggagcgatcacgaggcctctagcggagtgcttagcgctgtcttaccaggcagaagcagcttctccggaacgtgctgtgg
ctgatcaagaagaacaacgttaccaccatcaagcggagctacaacaacaccaatcaagaggacctgtggtgctgtgg
ggcatccaccatcctaatgatgccgagcagacccggctgtaccagaatcctacaacctacatcagcgtgggcaccagc
acactgaaccagagactggtgcctaagatcgccaccagatccaaagtgaacggccagagcggccggatggaattctctgg
accatcctgaagcctaacgacgccatcaacttcgagagcaacggcaactttatcgccctgagtagcctacaagatcgta
agaagggcgacagcgccatcatgaagtccgagctggaatacggcaactgcaacaccaagtgtcagacccctatggcgcc
atcaatagcagcatgccctccacaacattcacctctgaccatcgcgagtgcccaaatagctgaagtccaacagactggt
cctggccaccggcctgagaaattctccacagagagagcgccgcagaaagaagagaggcctgtttggagccattgccggctt
tatcgaaggcggctggcaaggcatggtgacggatggtacggctatcaccacagcaatgagcaaggctctggctacggcc
cgacaaagagagcacacagaaagccatcgacggcgtgaccaacaaagtgaatagcatcatcgacaagatgaacacca
gttcgagggcgtgggcagagagttaacaacctggaaagacggatcgagaacctgaacaagaagatggagggacggcttc
ctggacgtgtggacctataatgccgagctgctggtcctgattgaaaacgagagaacctggactccacgacagcaacgtga

10

20

【化 3】

agaacctgtacgacaaagtgcggctccagctgcgggacaatgccaaagaactcggcaacggctgcttcgagttctaccaca
agtgcgacaacgagtgcatggaaagcgtgcggaacggcacctacgactaccctcagtactctgaggaagcccggtgaag
agagaagagatcagcggagtgaagctggaatccatcggcacataccagatcctgagcatctacagcaccgtggcctcttctc
ggccctggctattatggtggcctggcctgagcctgtggtatgtctctaatggcagccctccagtcgggcatctgcatc

30

【0 1 2 8】

F L U _ T 2 _ H A _ 1 - 頭部領域アミノ酸配列（配列番号 3）：

【化 4】

THNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPANDLCYPGNF
 NDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRSSFFRNVVWLIKKNNA
 YPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLQYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSK
 VNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCC
 TPMGAINSSMPFHNIHPLTIGCEP

40

【0 1 2 9】

位置 156、157、171、172、および 205 におけるアミノ酸残基を、上記の配列において下線を付して示す（そしてそれぞれ、R、S、N、A、および R である）。

【0 1 3 0】

F L U _ T 2 _ H A _ 1 - 頭部領域核酸配列（配列番号 4）：

accacaaacggcaagctgtgacacctggatggcgtaagcctctgatcctgagagattgctctgtggc

50

cggctggctgctgggcaatcctatgtgacgaggttcatcaacgtgcccagtggtcctatatcgtgg
aaaaggccaatcctgccaacgacctgtgctaccccggaacttcaacgactacgaggaactgaaaca
tctgctgagccggatcaaccacttcgagaagatccagatcatccccaagtcctcttggagcgatcacg
aggcctctagcggagtgcttagcgcctgtccttaccgaaggcagaagcagcttcttcgggaacgtcgtg
tggctgatcaagaagaacaacgcttaccaccatcaagcggagctacaacaacaccaatcaagagg
acctgctggtgctgtggggcatccaccatcctaagtatgccggcagcagaccggctgtaccagaat
cctacaacctacatcagcgtgggcaccagcacactgaaccagagactggtgcctaagatcgccacca
gatccaaagtgaacggccagagcggccggatggaattcttctggaccatcctgaagcctaacgacgc
catcaacttcgagagcaacggcaactttatcgcccctgagtacgcctacaagatcgtgaagaaggcg
acagcgccatcatgaagtccgagctggaatacggcaactgcaacaccaagtgtcagacccttatggg
cgccatcaatagcagcatgcccttcacaaacattcacctctgaccatcggcgagtgcccc

10

【0131】

FLU__T2__HA__1 - ステム領域アミノ酸配列（配列番号5）：

【化5】

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKKYVKS NRLVLAT
GLRNSPQRERRRRKKRGLFGAIAFGIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGS GYAADKESTQ
KAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGF LDVWTYNAELLVLME
NERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
SEEARKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI

20

【0132】

位置416および434（またはステム領域の始まりから数える場合には、位置148
および166）におけるアミノ酸残基を、上記の配列において下線を付して示す（そして
それぞれ、FおよびFである）。

【0133】

FLU__T2__HA__1 - ステム領域核酸配列（配列番号6）：

atggaaaagattgtgctgctgctggccatcgtgtccctgggtcaagagcgatcaaattctgcatcggcta
ccacgccaaacaacagcaccgaacagggtggacaccattatggaaaagaacgtgaccgtgacacacgc
ccaggacatcctggaaaagaaatacgtgaagtccaacagactggctcctggccaccggcctgagaaat
tctccacagagagagcggcgagaaagaagagaggcctgtttggagccattgccggctttatcgaag
gctgctggcaaggcatggttgacggatgggtacggctatcaccacagcaatgagcaaggctctggcta
cgccgccgacaaagagagcacacagaaagccatcgacggcgtgaccaacaaagtgaatagcatcat
cgacaagatgaacacccagttcgaggcgtgggcagagagttcaacaacctggaaagacggatcga
gaacctgaacaagaagatggaggacggcttcttgacgtgtggacctataatgccgagctgctggtc
ctgatggaaaacgagagaaccttggaacttcacgacagcaacgtgaagaacctgtacgacaaagtgc
ggctccagctgcgggacaatgccaaagaactcggcaacggctgcttcgagttctaccacaagtgcga
caacgagtgcatggaaagcgtgcggaacggcacctacgactaccctcagtactctgaggaagcccgg
ctgaagagagaagagatcagcggagtgaaagctggaatccatcggcacataccagatcctgagcatct
acagcaccgtggcctcttctctggccctggctattatggtggctggcctgagcctgtggatgtgctcta
atggcagcctccagtgccggatctgcatc

30

40

【0134】

実施例2

FLU__T2__HA__1を、異なるクレードおよびサブクレードに由来するH5を有する
偽型化ウイルスに対して広く中和する抗体応答を誘発する能力に関して試験した。

【0135】

DNAワクチンでのマウスの免疫：

雌性BALB/cマウス（8～10週齢）を、以下を用いて4回免疫し（0週目、2週
目、4週目、6週目）、6～7回採血した（0週目、2週目、4週目、6週目、8週目、

50

10週目、12週目)：

- ・50 μg pEVACベクター中のFLU__T2__HA__1 DNA (図1中の「H5N1 Anc.」を参照のこと)；
- ・50 μg pEVACベクター中のA/whooper swan/Mongolia/244/2005 (H5) DNA (図1中の「WSN」を参照のこと) (これは、2005年にオオハクチョウから配列決定された初代単離株である (すなわち、H5コントロール))；または
- ・50 μl PBS。

【0136】

DNAを、マウスの背面側腹部に皮下注射した。DNAおよびPBSは、エンドトキシン非含有であった。

【0137】

マウス血清が異なるクレードおよびサブクレードに由来するH5を有する偽型化ウイルスを中和する能力：

免疫後に集めたマウス血清を、以下の偽型化ウイルス (異なるクレードおよびサブクレードに由来するH5を有する) に対して試験した：

- ・A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014 (H5、クレード2.3.4.4)；
- ・A/turkey/Turkey/1/2005 (H5、クレード2.2.1)；
- ・A/whooper Swan/Mongolia/244/2005 (H5、クレード2.2) - H5コントロールに相同；
- ・A/Indonesia/5/2005 (H5、クレード2.1.3.2)；
- ・A/Vietnam/1194/2004 (H5、クレード1)；
- ・A/goose/Guizhou/337/2006 (H5、クレード4)；
- ・A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5、クレード7.1)

【0138】

図1は、種々の偽型化ウイルスに対する中和抗体応答の強度を図示する中和アッセイの結果を示す。その結果は、各ワクチンが異なるクレードおよびサブクレードに由来するH5を有する偽型化ウイルスの多様なパネルに対して広く中和する抗体応答を誘発する能力を図示する。

【0139】

その結果は、FLU__T2__HA__1 DNAワクチンをマウスに投与すると、A/whooper swan/Mongolia/244/2005 H5コントロールワクチンでの免疫、およびナイーブマウス血清より有意に大きな交差クレード免疫応答が与えられたことを示す。

【0140】

実施例3 - FLU__T3__HA__1およびFLU__T3__HA__2

本実施例は、本発明の2つのさらなる実施形態であるFLU__T3__HA__1およびFLU__T3__HA__2のアミノ酸配列のデザインを記載する。

【0141】

上記の実施例2に記載されるように、FLU__T2__HA__1 DNAワクチンでの免疫後に得られたマウス血清は、H5の多くのクレードを中和したが、クレード2.3.4および7.1に対しては余り有効でなかった。これら2つのクレードは現在、鳥類の中で拡がっており、アジアにおいて家禽の中で最も優勢な同時に拡がっている (circulating) H5N1ウイルスの中にあり、散發性の感染例は、ヒトおよび他の動物においても定期的に起こっている。

【0142】

クレード2.3.4およびクレード7.1の中和にとって重要なH5頭部領域中のエプトープ領域を、入手可能なタンパク質構造データを使用して同定した。これらのエプトー

10

20

30

40

50

ブのアミノ酸配列を、FLU__T2__HA__1と比較して、マウス血清によってこれら2つのクレードの中和を抑止する可能性のあるアミノ酸位置を同定した。

【0143】

特定のアミノ酸残基へと変化した場合に、他のクレードの中和を抑止することなく、クレード2.3.4および7.1を中和し得る抗体応答を誘発し得るFLU__T2__HA__1内のアミノ酸位置を、同定した。これらの位置は、H5タンパク質のアミノ酸残基157、171、172、および205にある(図2中の位置A、BおよびCを参照のこと)。HAタンパク質の安定性に対するこれらの変異の影響、ならびにクレード2.3.4およびクレード7に対する公知の抗体とのその相互作用を、エネルギー計算によってチェックした。タンパク質を安定化した変異およびこのような抗体とのその相互作用は、他のクレードの中和を最小限に変化させたが、選択的であった。その生じた新たなHA配列を、FLU__T3__HA__1およびFLU__T3__HA__2と称した。

10

【0144】

図2は、FLU__T2__HA__1とFLU__T3__HA__1およびFLU__T3__HA__2とのアミノ酸配列比較を示す。FLU__T3__HA__1は、実施例4により詳細に記載され、FLU__T3__HA__2は、以下の実施例5により詳細に記載される。

【0145】

実施例4 — FLU__T3__HA__1

本実施例は、FLU__T3__HA__1として公知の本発明の一実施形態に関するインフルエンザ赤血球凝集素H5頭部およびステム領域のアミノ酸配列を提供する。以下の配列番号7において、ステム領域のアミノ酸残基は、下線を付して示される。頭部領域のアミノ酸残基は、残りの残基である。

20

【0146】

FLU__T3__HA__1 — HA0アミノ酸配列(配列番号7)：

【化6】

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLDGV
KPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPANDLCYPGNFNDYEELKHLLSRI
NHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRPSFFRNVWVLIKKNDTYPTIKRSYNNTNQ
EDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFF
WTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPF
HNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRERRRKKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGW
YGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLN
KKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEF
YHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIM
VAGLSLWMCSNGSLQCRICI

30

【0147】

FLU__T3__HA__1 — 頭部領域アミノ酸配列(配列番号8)：

【化7】

THNGKLCDLGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPANDLCYPGNF
 NDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRPSFFRNVWVLIKKNDT
 YPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSK
 VNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQ
 TPMGAINSSMPFHNIHPLTIGEC

40

50

【0148】

位置156、157、171、172、および205におけるアミノ酸残基を、上記の配列において下線を付して示す（それぞれ、R、P、D、T、およびKである）。

【0149】

FLU__T3__HA__1 - ステム領域アミノ酸配列（配列番号9）：

【化8】

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKKYVKSNRLVLAT
GLRNSPQRRERRRKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSQGYAADKESTQ
KAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWWTYNAELLVLME
NERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
SEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI

10

【0150】

位置416および434におけるアミノ酸残基を、上記の配列において下線を付して示す（それぞれ、FおよびFである）。

【0151】

実施例5 - インフルエンザH5 T3__HA__2

本実施例は、FLU__T3__HA__2として公知の本発明の一実施形態に関するインフルエンザH5頭部およびステム領域のアミノ酸配列を提供する。以下の配列番号4において、ステム領域のアミノ酸残基は、下線を付して示される。頭部領域のアミノ酸残基は、残りの残基である。

20

【0152】

FLU__T3__HA__2 - HA0アミノ酸配列（配列番号10）：

【化9】

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLDGV
KPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPANDLCYPGNFNDYEELKHLLSRI
NHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRPSFFRNVVWLIKKNNTYPTIKRSYNNTNQ
EDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFF
WTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPF
HNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRRERRRKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGW
YGYHHSNEQGSQGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLN
KKMEDGFLDVWWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNALGNGCFEF
YHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIM
VAGLSLWMCSNGSLQCRICI

30

40

【0153】

FLU__T3__HA__2 - 頭部領域アミノ酸配列（配列番号11）：

【化 1 0】

THNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKANPANDLCYPGNF
 NDYEELKHLLSRINHFEEKIIPKSSWSDEASSGVSSACPYQGRPSFFRNVVWLIKKNNT
 YPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYSVGTSTLNQRLVPKIATRISK
 VNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCCQ
 TPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECF

【0 1 5 4】

10

位置 1 5 6、1 5 7、1 7 1、1 7 2、および 2 0 5 におけるアミノ酸残基を、上記の配列において下線を付して示す（それぞれ、R、P、N、T、および K である）。

【0 1 5 5】

F L U _ T 3 _ H A _ 2 - ステム領域アミノ酸配列（配列番号 1 2）：

【化 1 1】

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKKYVKSRLVLA
 GLRNSPQRERRRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQ
 KAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWVTYNAELLVLME
 NERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
 SEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI

20

【0 1 5 6】

位置 4 1 6 および 4 3 4 におけるアミノ酸残基を、上記の配列において下線を付して示す（それぞれ、F および F である）。

【0 1 5 7】

実施例 6 - F L U _ T 3 _ H A _ 1 および F L U _ T 3 _ H A _ 2 と先行技術の C O B R A H 5 T i e r 2 デザインとの比較

図 3 は、F L U _ T 3 _ H A _ 1 および F L U _ T 3 _ H A _ 2 と先行技術の C O B R A H 5 T i e r 2 デザインとのアミノ酸比較を示す。重要なクレードの抗体に対する抗原の親和性を増大させるために、F L U _ T 3 _ H A _ 1 および F L U _ T 3 _ H A _ 2 の中に導入された頭部領域における 3 個の位置（A、B、および C）でのアミノ酸の差異が存在する。そのアミノ酸差異は、頭部領域の残基番号 1 5 6、1 5 7、1 7 1、1 7 2、および 2 0 5 にある。融合前および融合後両方の状態においてステム領域を安定化させるために、F L U _ T 3 _ H A _ 1 および F L U _ T 3 _ H A _ 2 の中に導入されたステム領域における 2 個の位置（C および D）でのさらなるアミノ酸差異が存在する。そのアミノ酸差異は、ステム領域の残基番号 4 1 6 および 4 3 4 にある。

30

【0 1 5 8】

実施例 7 - F L U _ T 2 _ M 2 _ 1

40

本実施例は、F L U _ T 2 _ M 2 _ 1 として公知の本発明の一実施形態に関するインフルエンザ M 2 領域のアミノ酸および核酸配列を提供する。

【0 1 5 9】

F L U _ T 2 _ M 2 _ 1 - アミノ酸配列（配列番号 1 4）：

MSLLTEVETPTRNGWECRCSDSSDPLVIAASIIGILHLILWILDRLEFFKCIYRRLKYGL
 KRGPSTEGVPESMREEYRQKQKQSAVDVDDGHFVNIELE

【0 1 6 0】

F L U _ T 2 _ M 2 _ 1 - 核酸配列（配列番号 1 5）：

ATGTCTCTGCTGACCGAGGTGGAAACCCCTACCAGAAATGGCTGGGAGTGCAGATG
 CAGCGACAGCAGCGATCCTCTGGTTATCGCCGCCAGCATCATCGGCATCCTGCACC

50

TGATCCTGTGGATCCTGGACCGGCTGTTCTTCAAGTGCATCTACCGGCGGCTGAAG
TACGGCCTGAAGAGAGGGCCCTTCTACAGAGGGCGTGCCCGAGAGCATGCGGGAAGA
GTACAGACAGAAACAGCAGAGCGCCGTGGACGTGGACGATGGCCACTTCGTGAACA
TCGAGCTGGAA

【0161】

実施例 8 — F L U _ T 2 _ M 2 _ 1 によって誘発される免疫応答

本実施例は、異なるサブタイプのインフルエンザ A 分離物に由来する M 2 分子を標的化するために、F L U _ T 2 _ M 2 _ 1 DNA ワクチンでマウスを免疫した後に得られたマウス血清の能力を試験する、フローサイトメトリーベースの免疫蛍光アッセイを記載する。

10

【0162】

DNA ワクチンでのマウスの免疫：

6 匹の B a l b / c マウス（8 ～ 10 週齢）の 4 群を、以下を用いて 4 回免疫し（0 週目、2 週目、4 週目、6 週目）、6 回採血した（0 週目、2 週目、4 週目、6 週目、8 週目、10 週目）：

- ・ 50 μg p E V A C ベクター中の F L U _ T 2 _ M 2 _ 1 DNA（図 5 中の「M 2 祖先」を参照のこと）；
- ・ 50 μg p E V A C ベクター中の F L U _ T 1 _ M 2 _ 1 DNA（H 1 N 1 p d m に由来する M 2、図 5 中の「M 2 H 1 N 1」を参照のこと）；
- ・ 50 μg p E V A C ベクター中の F L U _ T 1 _ M 2 _ 2 DNA（H 3 N 2 に由来する M 2、図 5 中の「M 2 H 3 N 2」を参照のこと）；または
- ・ 50 μl P B S。

20

【0163】

DNA を、マウスの背面側腹部に皮下注射した。DNA および P B S は、エンドトキシン非含有であった。

【0164】

マウス血清が異なるサブタイプのインフルエンザ単離物に由来する M 2 を標的化する能力：

H E K 2 9 3 T 細胞を、以下の分離物に由来する M 2 DNA を発現する p E V A C ベクターでトランスフェクトした：

30

- ・ A / B r i s b a n e / 2 / 2 0 1 8（H 1 N 1）；
- ・ A / K a n s a s / 1 4 / 2 0 1 7（H 3 N 2）；
- ・ A / E n g l a n d / 1 9 5 / 2 0 0 9（H 1 N 1）；
- ・ A / A n h u i / 1 / 2 0 1 3（H 7 N 9）；および
- ・ A / J a p a n / W R A I R 1 0 5 9 P / 2 0 0 8（H 3 N 2）

【0165】

血清を、各群（6 匹のマウス／群）につきプールし、段階希釈し、細胞とともに 30 分間、室温でインキュベートした。マウス I g G アイソタイプ抗体を、陰性コントロール染色として使用した。インキュベーション後、細胞を P B S で 2 回洗浄し、次いで、ヤギ抗マウス A F 6 4 7 二次抗体とともに 30 分間、室温で遮光してインキュベートした。F A C S 分席の前に、細胞を P B S でさらに 2 回洗浄した。A t t u n e N x T F A C S（T h e r m o F i s h e r）を使用して分析を行った。

40

【0166】

図 5 は、マウス血清抗体が異なるインフルエンザ単離物に由来する M 2 を標的化する能力を図示する、フローサイトメトリーベースの免疫蛍光アッセイの結果を示す。その結果は、各ワクチンが異なるサブタイプのインフルエンザ単離物に由来する M 2 を標的化する能力を図示する。

【0167】

その結果は、F L U _ T 2 _ M 2 _ 1 DNA ワクチン（M 2 祖先）をマウスに投与すると、異なるインフルエンザサブタイプにわたる M 2 に対して、H 1 N 1 または H 3 N 2

50

単離物に由来するM2での免疫ならびにナイーブマウス血清より有意に大きな免疫応答が誘発されることを示す。

【0168】

実施例9 — FLU__T2__NA__3およびFLU__T2__NA__4

本実施例は、FLU__T2__NA__3およびFLU__T2__NA__4として公知の本発明の実施形態に関するインフルエンザノイラミニダーゼ領域のアミノ酸および核酸配列を提供する。

【0169】

FLU__T2__NA__3 (N1__FINAL__2) — アミノ酸配列 (配列番号16)

MNPNQKIITIGSICMVVGIISLILQIGNIISIWVSHSIQTGNQNPETCNQSIITYENNT
WVNQTYVNIISNTNFVAEQAVASVALAGNSSLCPISGWAIYSKDNIGIRIGSKGDFVFI
REPFISCSHLECRFTFFLTQGALLNDKHSNGTVKDRSPYRTLMSCPVGEAPSPYNSRFE
SVAWSASACHDGISWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECAC
INGSCFTIMTDGPSNGQASYKIFKIEKGKVVKSVELNAPNYHYEEECSCYPDAGEVMC
VCRDNWHGSNRPWVSFNQNLEYQIGYICSGVFGDNPRPNDGTGSCGPVSSNGAYGV
KGFSFKYKGKGVWIGRTKSTSSRSGFEMIWDPNGWTTETDSSFVSKQDIVAITDWSGYS
GSFVQHPELTGLDCMRPCFWVELIRGRP KENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGVSWPD
GAELPFTIDK

10

【0170】

FLU__T2__NA__3 (N1__FINAL__2) — 核酸配列 (配列番号17) :

atgaatccaaatcagaaaataataaccattgggtcaatctgtatggtagttggaataatcagcctaata
ttacaaattgggaacataatctcaatatgggttagccattcaattcagactggaaatcaaaaccaacct
gaaacatgcaaccaaagcatcattacttatgaaaacaacacttgggtgaatcaaacatatgttaacatc
agcaataccaattttgttgctgaacaggctgtagcttcagtggcattagcgggcaattcctctctctgccc
catttagtgggtgggctatatagcaaggacaatggcataaggattgggtccaaggagatgtattt
gtcataagagagccattcatttcatgctcccacttggaaatgcaggacctttttctgactcaaggagcct
tgttgaatgacaaacattccaatggaaccgttaaagacagaagccccctacagaaccttaatgagctgt
cctgttggtgaggctccctctccatacaattcaagggttgagtcggttgcttggtcagcaagtgttgcc
atgatggcattagctggttgacaattggaatttccgggcccagacaatggggcagtggtgtattgaaa
tacaatggcataataacagacactatcaaaagttggagaaacaacatataggagacacaagagtctga
atgtgcctgcataaatggttcttgctttactataatgaccgatggaccaagtaatgggcaggcctcata
caagattttcaagatagagaaggggaaggtagtcaaatacagtcgagttgaatgcccttaattaccact
acgaggaatgttccctgttatcctgatgctggcgaagtaatgtgtgtgtgcaggagataattggcatggtt
cgaatcgaccatgggtgtctttcaatcaaaatctggagtatcaaataggatacatatgcagtggggttt
tcggagacaatccacgccccaatgatggaacaggcagctgttggtccagtgcttctaatggagcatat
ggagtaaagggtatttcatttaagtacggcaagggtgttgataggagagaactaagagcactagttc
caggagtggatttgagatgatttgggatcccaatggatggacagagacagatagtagtttctcagtgga
agcaagatatgttagcaataactgattggtcaggatatagcgggagttttgtccaacatccagaattaa
cagggtggtgactgcatgaggccttgcttctgggttgaaactaatcagaggacggcctaaggagaaacac
aatctggactagtgaggagcagcatttcttctgtggtgttaaatacgacactgtgggttggtcttgccc
agacggtgctgagttgccattcaccattgacaag

20

30

40

【0171】

FLU__T2__NA__4 (N1__FINAL__3) — アミノ酸配列 (配列番号18)

MNPNQKIITIGSICMVVGIISLILQIGNIISIWVSHSIQTGNQNHPETCNQSIITYENNT
WVNQTYVNIISNTNVVAGQDATSVILAGNSSLCPISGWAIYSKDNIGIRIGSKGDFVFI
EPFISCSHLECRFTFFLTQGALLNDKHSNGTVKDRSPYRTLMSCPVGEAPSPYNSRFES
VAWSASACHDGMGWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECAC
VNGSCFTIMTDGPSNGQASYKIFKIEKGKVIKSIELNAPNYHYEEECSCYPDTGKVMCV

50

CRDNWHGSNRPWVSFDQNLDYQIGYICSGVFGDNPRPNDGTGSCGPVSSNGANGVK
GFSFRYGNVWIGRTKSTSSRSGFEMIWDPNGWETDSSFSVKQDIVAITDWSGYSG
SFVQHPELTGLDCMRPCFWVELIRGQPKENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDG
AELPFTIDK

【0172】

FLU__T2__NA__4 (N1__FINAL__3) — 核酸配列 (配列番号19) :
atgaatccaaatcaaaaaataataaccattgggtcaatctgtatggtagttggaataattagcctaata
ttgcaaatagggaatataatctcaatatgggttagccattcaattcaaactggaaatcaaaaccatcct
gaaacatgcaaccaaagcatcattacctatgaaaataacacctgggtgaatcaaacatatgttaacatt
agcaataactaacgttgttctgtggacaggatgcaacttcagtgtatattagccggcaattcctctctttgccc
catcagtggtgggtggtctatatacagcaaagacaatggcataagaattgggttccaaaggagacgttttt
gtcataagagagaccatttatttcatgtcttcacttgggaatgcaggacctttttctgactcaaggcgcct
tgctgaatgacaagcattcaaatgggaccgtcaaggacagaagccccctatagaaccttaatgagctgc
cctgttgggtgaagctccgtctccgtacaattcaagggttcgaatcggttgcttgggtcagcaagtgcagtc
catgatggcatgggctggctaacaatcggaatttccgggtccagataatggagcagtggtgtatttaa
atacaatggtataataacagacaccatcaaaaagttggaggaacaacatattgagaacgcaagagtctg
aatgtgcctgtgtaaatgggtcatgttttactataatgaccgatggcccaagtaatgggcaggcctcgt
acaaaattttcaagatagagaaggggaaggttattaaatcaattgagttgaatgcacctaattaccact
acgaggaatgttccgttaccctgatacaggtaaagtgtgtgtgtgtgcagagacaattggcatgggt
cgaatcgaccatgggtgtctttcgatcaaaatctggattatcaaataggatacatctgcagtggggttt
tcggtgacaatccgctcccaatgatggaacaggcagctgtgtgtccagtgtcttctaattggagcaa
atggagtaaagggattttcatttaggtatggtaatgggtgtttggataggaagaactaaaagtaccagttcc
agaagcgggtttgagatgatttgggatacctaattggatggacagagactgatagtagtttctctgtgaa
caagatattgtagcaataactgattgggtcagggtacagcgggagtttctgttcaacatcctgagctaaca
gggctggactgcatgaggccttgccttctgggttgaaatcaatcaggggacaacctaaagagaacacaat
ctggactagtgggagcagcatttcccttctgtggcgtaaatagtgtactgttaggttgggtcttggccaga
cgggtgctgagttgccattcaccattgacaag

10

20

【0173】

実施例10 — FLU__T2__NA__3およびFLU__T2__NA__4のノイラミニ
ダーゼ活性の抗体阻害

30

本実施例は、異なるノイラミニダーゼエピトープを認識するモノクローナル抗体のパネルに対する本発明の実施形態に従うノイラミニダーゼポリペプチド (FLU__T2__NA__3およびFLU__T2__NA__4) のスクリーニングを記載する。

【0174】

ノイラミニダーゼワクチンは、ノイラミニダーゼ酵素の活性を阻害する結合抗体を誘発する。これは、疾患の重篤度の低減と相関するが、必ずしも感染から防御するわけではないことが示されている。それらはまた、ウイルスが感染細胞から出るためにNA活性を必要とすることから、感染したワクチン接種済みの人々からの伝染を低減する。

【0175】

偽型ベースの酵素結合レクチンアッセイ (pELLA)

40

選択したインフルエンザウイルス株のノイラミニダーゼ (例えば、A/Shanghai/02/2013 (H7N9) 由来するN9) または本発明の一実施形態に従うポリペプチドのノイラミニダーゼ (例えば、T2__NA__3) を有するレンチウイルス偽型を、生成する。

【0176】

NAを有するこれらの偽型を使用して、希釈系列において予めコーティングしたELISAプレートから炭水化物、フェチュインを消化する。その消化したフェチュインから生じる生成物は、ラッカセイレクチン (西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化) によって認識され得る末端ガラクトース残基を含む。

【0177】

50

NAがフェチュインを多く消化するほど、より多くのガラクトース残基が露出されるので、より多くのラッカセイレクチン（HRPO）がガラクトースに結合する。NAの酵素活性に比例したELISAベースの読み取りが得られる（Couzensら, J Virol Methods. 2014 Dec 15; 210: 7-14）。

【0178】

上記NA-偽型を先ず滴定し、次いで、阻害アッセイを、上記酵素の活性を抗体で「ノックダウン」するために、抗体または血清で行う。これは機能アッセイであることから、NAの酵素活性に干渉する抗体のみが検出される。

【0179】

図5:

FLU__T2__NA__3 (N1__FINAL__2) に対して試験したモノクローナル抗体のパネル:

- ・以下によってNA活性の強い阻害: 2D4、Z2B3、3H4、1H8、2D9、3H10、4E9、4G2、1H5、2G6、A67C
- ・以下によって弱い阻害: 3C2
- ・以下によって阻害なし: AF9C、4C4、2B5、1C7、3A2

FLU__T2__NA__3 (図5において=N1__FINAL__2=na2=na2p1)

【0180】

図6:

FLU__T2__NA__4 (N1__FINAL__3) に対して試験したモノクローナル抗体のパネル:

- ・以下によってNA活性の強い阻害: Z2B3、2D4、1H8、3H4、2D9、3H10、4E9、1H5、2G6、4G2、A67C
- ・以下によって弱い阻害: 4C4、3C2
- ・以下によって阻害なし: AF9C、2B5、1C7、3A2

FLU__T2__NA__4 (図6において=N1__FINAL__3=p1na3=na3)

【0181】

図7:

FLU__T2__NA__18 (N9__FINAL__1)、FLU__T2__NA__19 (N9__FINAL__2)、FLU__T2__NA__20 (N9__FINAL__3) に対して試験したモノクローナル抗体のパネル:

- ・以下によってNA活性の強い阻害: 1E8、7F8、5H11、7A4、7F12、2F6、Z2B3、1E8
- ・以下によって弱い阻害: I2H3
- ・以下によって阻害なし: N/A

野生型N9 (A/Shanghai/02/2013) に関しては:

- ・以下によって強い阻害: 1E8、5H11、7A4、2F6、7F12、Z2B3
- ・以下によって阻害なし: 7F8およびI2H3

【0182】

上記の、および図5～7に示される結果から、本発明の実施形態に従うノイラミニダーゼポリペプチド (FLU__T2__NA__3およびFLU__T2__NA__4) が、季節性H1N1、パンデミックH1N1に由来するN1と鳥類H5N1に由来するN1との間で保存されたエピトープ、ならびにN1とN9との間で保存されたエピトープを含むことが結論づけられた (Z2B3 mAb)

【0183】

モノクローナル抗体パネル:

Hongquan Wan, FDAのmAb:

10

20

30

40

50

【表 3】

mAb_1E8	N9	Wan <i>et al.</i> , <i>Journal of Virology</i> , 2013, Vol. 87(16):9290–9300;
mAb_7F8	N9	Wan <i>et al.</i> , <i>Journal of Virology</i> , 2018, Vol. 92(4):1-17;
mAb_11B2	N9	Wan <i>et al.</i> , <i>Nat Commun.</i> , 2015, Feb 10;6:6114;
mAb_5H11	N9	
mAb_7A4	N9	
mAb_7F12	N9	
mAb_2F6	N9	
mAb_3A2	N1	
mAb_4G2	N1	
mAb_1H5	N1	
mAb_2G6	N1	
mAb_2D9	N1	
mAb_3H10	N1	
mAb_4E9	N1	
mAb_1C7	N1	
mAb_3C2	N1	
mAb_2B5	N1	
mAb_3H4	N1	
mAb_1H8	N1	
mAb_2D4	N1	
mAb_4C4	N1	

10

20

【0184】

Alain Townsend, OxfordのmAb:

mAb_AF9C 季節性およびパンデミックH1N1に由来するN1 Rijalら, *Journal of Virology*, February 2020 Volume 94 Issue 4, 1–17;

mAb_Z2B3 N1およびN9 Rijalら, *Journal of Virology*, February 2020 Volume 94 Issue 4, 1–17

【0185】

FACS結合アッセイ:

NAは、HEK293T／17細胞において細胞表面上に発現され、血清／mAbは、それに結合することが可能にされる。結合は、マウスまたはヒト血清抗体に対する二次抗体で検出される。上記細胞を、蛍光活性化セルサンプラー（FACSサイトメーター）を通過させ、サンプル中に存在する結合の量を測定する。この結合は、抗体が酵素活性に干渉するか否かとは無関係である。これらは、免疫細胞を経てADCC機序を介して作用する抗体であり得る。

30

【0186】

実施例11 – pEVAC発現ベクター

図8は、pEVAC発現ベクターのマップを示す。上記ベクターのマルチクローニング部位の配列、続いて、その全体のヌクレオチド配列を以下に示す。

40

【0187】

pEVACマルチクローニング部位（MCS）の配列（配列番号20）:

【化12】

```

                                PstI      KpnI  SalI
pEVAC 1301 ACAGACTGTT CCTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCGGTACCGT

                                BclI  XbaI  BamHI NotI  BglII
pEVAC 1351 CGACACGTGT GATCATCTAG AGGATCCGGC GCGGCAGATC T

```

【0188】

pEVACの全配列（配列番号21）:

50

【化 1 3】

CMV-IE-E/P:	248	-	989	CMV最初期1エンハンサー／プロモーター
KanR:	3445	-	4098	カナマイシン耐性
SD:	990	-	1220	スプライスドナー
SA:	1221	-	1343	スプライスアクセプター
Tbgh:	1392	-	1942	ウシ成長ホルモンに由来する終結シグナル
pUC-ori:	2096	-	2769	pUCープラスミド複製起点

```

1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG
51 GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG
101 TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG
151 CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA
201 CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGATTGG CTATTGGCCA
251 TTGCATACGT TGTATCCATA TCATAATATG TACATTTATA TTGGCTCATG
301 TCCAACATTA CCGCCATGTT GACATTGATT ATTGACTAGT TATTAATAGT
351 AATCAATTAC GGGGTCATTA GTTCATAGCC CATATATGGA GTTCCGCGTT
401 ACATAACTTA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC TGACCGCCCA ACGACCCCGG
451 CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
501 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG
551 GCAGTACATC AAGTGTATCA TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA
601 TGACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG
651 ACTTTCCTAC TTGGCAGTAC ATCTACGTAT TAGTCATCGC TATTACCATG
701 GTGATGCGGT TTTGGCAGTA CATCAATGGG CGTGGATAGC GGTTTGACTC
751 ACGGGGATTT CCAAGTCTCC ACCCCATTGA CGTCAATGGG AGTTTGTTTT
801 GGCACCAAAA TCAACGGGAC TTTCCAAAAT GTCGTAACAA CTCCGCCCCA
851 TTGACGCAAA TGGGCGGTAG GCGTGTACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG
901 AGCTCGTTTA GTGAACCGTC AGATCGCCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT
951 TTGACCTCCA TAGAAGACAC CGGGACCGAT CCAGCCTCCA TCGGCTCGCA
1001 TCTCTCCTTC ACGCGCCCGC CGCCCTACCT GAGGCCGCCA TCCACGCCGG
1051 TTGAGTCGCG TTCTGCCGCC TCCCGCCTGT GGTGCCTCCT GAACTGCGTC
1101 CGCCGTCTAG GTAAGTTTAA AGCTCAGGTC GAGACCGGGC CTTTGTCCGG
1151 CGCTCCCTTG GAGCCTACCT AGACTCAGCC GGCTCTCCAC GCTTTGCCTG

```

10

20

30

40

50

【化 1 4】

1201 ACCCTGCTTG CTCAACTCTA GTTAACGGTG GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC
 1251 AGTACTCGTT GCTGCCCGCG CGGCCACCCAG ACATAATAGC TGACAGACTA
 1301 ACAGACTGTT CCTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCGGTACCGT
 1351 CGACACGTGT GAICATCTAG AGGATCCGCG GCCGCAGATC TGCTGTGCCT
 1401 TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCCTTGAC
 1451 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG
 1501 CATCGCATTTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG
 1551 CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA
 1601 TGCGGTGGGC TCTATGGCTA CCCAGGTGCT GAAGAATTGA CCCGGTTTCT
 1651 CCTGGGCCAG AAAGAAGCAG GCACATCCCC TTCTCTGTGA CACACCTGT
 1701 CCACGCCCTT GGTCTTAGT TCCAGCCCCA CTCATAGGAC ACTCATAGCT
 1751 CAGGAGGGCT CCGCCTTCAA TCCCACCCGC TAAAGTACTT GGAGCGGTCT
 1801 CTCCCTCCCT CATCAGCCCA CCAAAACAAA CCTAGCCTCC AAGAGTGGGA
 1851 AGAAATTAAA GCAAGATAGG CTATTAAGTG CAGAGGGAGA GAAATGCTT
 1901 CCAACATGTG AGGAAGTAAT GAGAGAAATC ATAGAATTTT AAGGCCATGA
 1951 TTTAAGGCCA TCATGGCCTT AATCTTCCGC TTCTCGCTC ACTGACTCGC
 2001 TGCGTTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG
 2051 GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG
 2101 AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG
 2151 CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACA AAATCGACGC
 2201 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAGAT ACCAGGCGTT
 2251 TCCCTCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA
 2301 CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT
 2351 AGCTCAGCCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT
 2401 GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG
 2451 GTAACATGGA TCCTGAGTCC AACCCGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 2501 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC
 2551 TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGAACAG
 2601 TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT
 2651 GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT
 2701 TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC
 2751 CTTTGATCTT TCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGAACGA AAATCAGCT
 2801 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCTT
 2851 TTTAAATTAA AATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAGTATA TATGAGTAAA
 2901 CTTGTCTGTA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG
 2951 ATCTGTCTAT TTCGTTCTAT CATAGTTGCC TGACTCGGGG GGGGGGGGCG
 3001 CTGAGGTCIG CCTGCTGAAG AAGGTGTTGC TGACTCATAC CAGGCCTGAA
 3051 TCGCCCCATC ATCCAGCCAG AAAGTGAGGG AGCCACGGTT GATGAGAGCT
 3101 TTGTTGTAGG TGACACAGTT GGTGATTTTG AACTTTTGCT TTGCCACGGA
 3151 ACGGTCGCG TTGTCGGGAA GATGCGTGAT CTGATCCTTC AACTCAGCAA
 3201 AAGTTCGATT TATTCACAAA AGCCGCGGTC CCGTCAAGTC AGCGTAATGC
 3251 TCTGCCAGTG TTACAACCAA TTAACCAATT CTGATTAGAA AAATCATCG
 3301 AGCATCAAAAT GAAACTGCAA TTTATTCATA TCAGGATTAT CAATACCATA
 3351 TTTTTGAAAA AGCCGTTTCT GTAATGAAGG AGAAACTCA CCGAGGCAGT
 3401 TCCATAGGAT GGCAAGATCC TGGTATCGGT CTGCGATTCC GACTCGTCCA
 3451 ACATCAATAC AACCTATTAA TTTCCCTCG TCAAAAATAA GGTATCAAG
 3501 TGAGAAATCA CCATGAGTGA CGACTGAATC CGGTGAGAAAT GGCAAAAGCT
 3551 TATGCATTTT TTTCCAGACT TGTTCAACAG GCCAGCCATT ACGCTCGTCA
 3601 TCAAAATCAC TCGCATCAAC CAAACCGTTA TTCATTCTGT ATTCCGCTG
 3651 AGCGAGACGA AATACGCGAT CGCTGTTAAA AGGACAATTA CAAACAGGAA
 3701 TCGAATGCAA CCGGCGCAGG AACACTGCCA GCGCATCAAC AATATTTTCA
 3751 CCTGAATCAG GATATTCTTC TAATACCTGG AATGCTGTTT TCCGGGGGAT
 3801 CGCAGTGGTG AGTAACCATG CATCATCAGG AGTACGGATA AAATGCTTGA
 3851 TGGTCGGAAG AGGCATAAAT TCCGTCAGCC AGTTTAGTCT GACCATCTCA
 3901 TCTGTAACAT CATTGGCAAC GCTACCTTTG CCATGTTTCA GAAACAACCT
 3951 TGGCGCATCG GGCTTCCCAT ACAATCGATA GATTGTCGCA CCTGATTGCC
 4001 CGACATTATC GCGAGCCCAT TTATACCCAT ATAAATCAGC ATCCATGTTG
 4051 GAATTTAATC GCGGCTCGA GCAAGACGTT TCCCGTTGAA TATGGCTCAT
 4101 AACACCCCTT GTATTACGT TTATGTAAGC AGACAGTTTT ATTGTTCTATG
 4151 ATGATATATT TTTATCTTGT GCAATGTAAC ATCAGAGATT TTGAGACACA
 4201 ACGTGGCTTT CCCCCCCCCC CCATTATTGA AGCATTTATC AGGGTTATTG
 4251 TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG

10

20

30

40

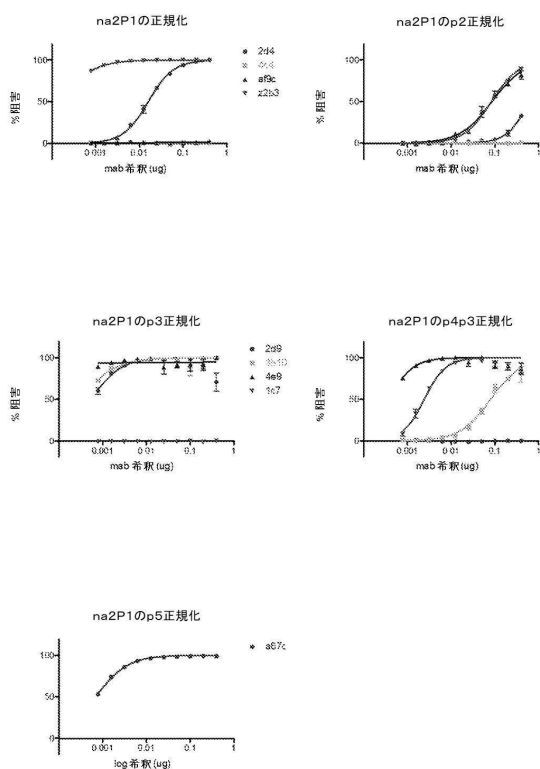
【化 1 5】

4301 GGGTTCCGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC
 4351 ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT
 4401 TCGTC

50

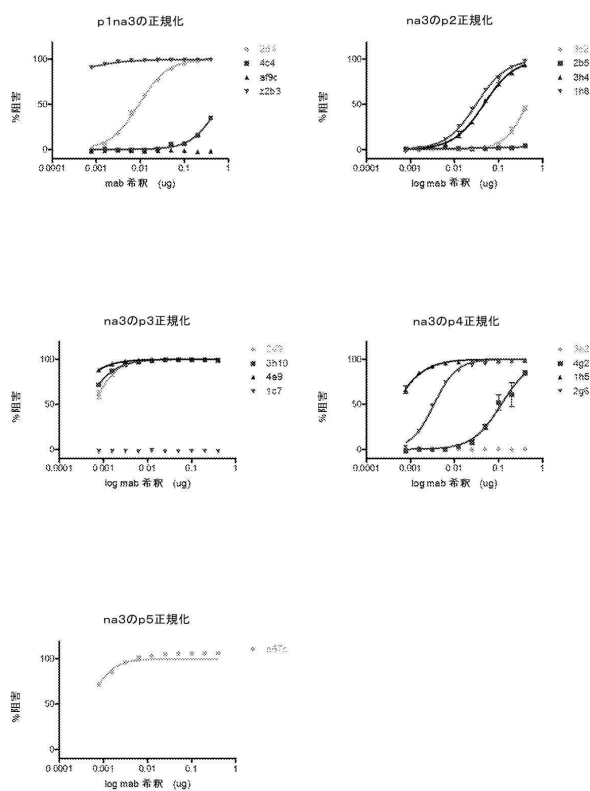
【 図 5 】

Figure 5



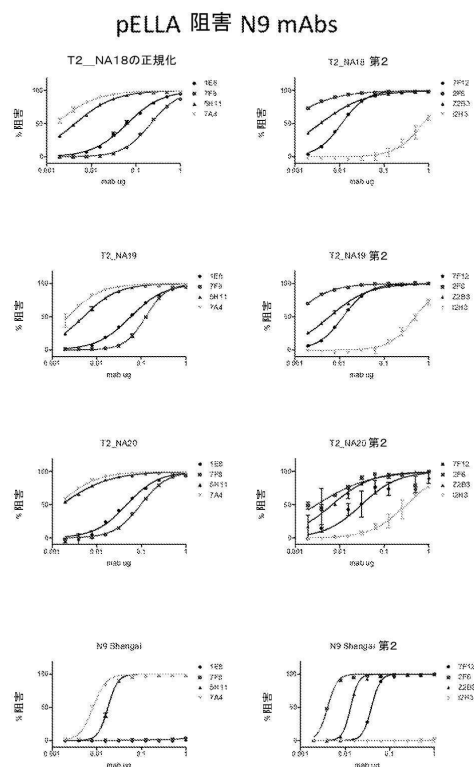
【圖 6】

Figure 6



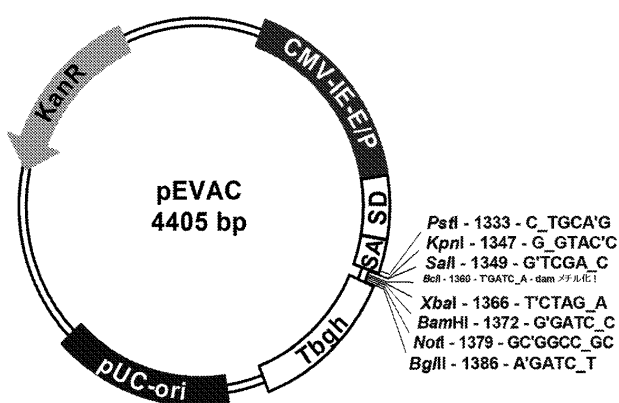
【圖 7】

Figure 7



【圖 8】

Figure 8
pEVAC



【配列表】

2023522154000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2021/050825

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/12 A61P31/16 ADD. A61K39/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/122827 A1 (UNIV PITTSBURGH [US]) 22 August 2013 (2013-08-22) abstract figure 3	2-8, 10-12, 17,18, 22,23, 26-28, 32-37, 43-45, 49,50, 53-55, 59,60
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt 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 23 June 2021		Date of mailing of the international search report 27/08/2021
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 Malamoussi, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2021/050825

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, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☒ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/GB2021/050825
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 10 20	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: see additional sheet 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 2, 4, 6, 9-12(completely); 3, 5, 7, 8, 17, 18, 22, 23, 26-28, 32-40 43-45, 49, 50, 53-55, 59-65(partially) 30 40 Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/ GB2021/ 050825

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2, 4, 6, 9-12(completely); 3, 5, 7, 8, 17, 18, 22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49, 50, 53-55, 59-65(partially)

An isolated polypeptide comprising a haemagglutinin subtype 5 (H5) globular head domain.

2. claims: 3, 5, 7, 8, 17, 18, 22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49, 50, 53-55, 59-65(all partially)

An isolated polypeptide comprising a haemagglutinin subtype 5 (H5) hemagglutinin (HA).

3. claims: 13(completely); 17, 18, 22, 32-39, 49, 59-65(partially)

An isolated polypeptide comprising a haemagglutinin stem region.

4. claims: 14, 19, 24, 29, 41, 46, 51, 56(completely); 17, 22, 32-39, 49, 59-65(partially)

An isolated polypeptide comprising a M2 region.

5. claims: 15, 16, 20, 21, 25, 30, 31, 42, 47, 48, 52, 57, 58(completely); 17, 22, 32-39, 49, 59-65(partially)

An isolated polypeptide comprising neuraminidase.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2021/050825

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/210445 A1 (ICAHN SCHOOL MED MOUNT SINAI [US]; GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE]) 7 December 2017 (2017-12-07) column 004 point 6.1.3.2; page 388 - page 389	1-12, 17, 18, 22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49, 50, 53-55, 59-65
A	WO 2016/005482 A1 (CRUCCELL HOLLAND BV [NL]) 14 January 2016 (2016-01-14) examples 1, 4, 6	1-12, 17, 18, 22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49, 50, 53-55, 59-65
A	WO 2013/185177 A1 (CSL LTD [AU]) 19 December 2013 (2013-12-19) example 4	1-12, 17, 18, 22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49, 50, 53-55, 59-65
A	LEUNG HO-CHUEN ET AL: "An H5N1-based matrix protein 2 ectodomain tetrameric peptide vaccine provides cross-protection against lethal infection with H7N9 influenza virus", EMERGING MICROBES & INFECTIONS, vol. 4, no. 1, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 1-7, XP055816325, DOI: 10.1038/emi.2015.22 Retrieved from the Internet: URL: https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1038/emi.2015.22?needAccess=true abstract	1-12, 17, 18, 22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49, 50, 53-55, 59-65

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2021/050825

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GILCHUK PAVLO ET AL: "Discovering protective CD8 T cell epitopes-no single immunologic property predicts it!", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, vol. 34, 6 February 2015 (2015-02-06), pages 43-51, XP029605146, ISSN: 0952-7915, DOI: 10.1016/J.COI.2015.01.013 abstract	1-12,17, 18,22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49,50, 53-55, 59-65
X	STEPHENSON IAIN ET AL: "Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: A potential priming strategy", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, US, vol. 191, no. 8, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 1210-1215, XP002421675, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1086/428948 abstract	1-12,17, 18,22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49,50, 53-55, 59-65
X	US 2014/286981 A1 (OSORIO JORGE E [US] ET AL) 25 September 2014 (2014-09-25)	2-8, 10-12, 17,18, 22,23, 26-28, 32-37, 43-45, 49,50, 53-55, 59,60
	sequence 1	
X	EP 3 233 117 A1 (UNIV OREGON HEALTH & SCIENCE [US]; SANOFI PASTEUR INC [US]) 25 October 2017 (2017-10-25)	2-8, 10-12, 17,18, 22,23, 26-28, 32-37, 43-45, 49,50, 53-55, 59,60
	paragraph [0079] sequences 1, 3, 5	
	----- -/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 3 of 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2021/050825

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEDGERWOOD J. E. ET AL: "Influenza Virus H5 DNA Vaccination Is Immunogenic by Intramuscular and Intradermal Routes in Humans", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 19, no. 11, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 1792-1797, XP055817024, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CDI.05663-11 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3491556/pdf/zcd1792.pdf> page 1793, right-hand column, paragraph 5 -----	2-8, 10-12, 17,18, 22,23, 26-28, 32-37, 43-45, 49,50, 53-55, 59,60
A	Anonymous: "Hemagglutinin -Influenza A virus (strain A/Duck/Singapore/3/1997 H5N3)", 10 July 2007 (2007-07-10), XP055817112, Retrieved from the Internet: URL:https://www.uniprot.org/uniprot/A5Z226 [retrieved on 2021-06-23] the whole document -----	1-12,17, 18,22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49,50, 53-55, 59-65
A	Anonymous: "UniProtKB - A8HWY8 Hemagglutinin- Influenza A virus (A/Indonesia/5/2005(H5N1))", 4 December 2007 (2007-12-04), XP055817118, Retrieved from the Internet: URL:https://www.uniprot.org/uniprot/A8HWY8 [retrieved on 2021-06-23] the whole document -----	1-12,17, 18,22, 23, 26-28, 32-40, 43-45, 49,50, 53-55, 59-65

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2021/050825

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013122827 A1	22-08-2013	AU 2013221877 A1	28-08-2014
		AU 2018200962 A1	01-03-2018
		CA 2863949 A1	22-08-2013
		CN 104144941 A	12-11-2014
		CN 107188934 A	22-09-2017
		EP 2814837 A1	24-12-2014
		EP 3305806 A1	11-04-2018
		HK 1203523 A1	30-10-2015
		JP 6175452 B2	02-08-2017
		JP 2015512871 A	30-04-2015
		MX 359071 B	13-09-2018
		SG 11201404147Y A	30-10-2014
		US 2016022805 A1	28-01-2016
		US 2017107262 A1	20-04-2017
		US 2019092820 A1	28-03-2019
		WO 2013122827 A1	22-08-2013
WO 2017210445 A1	07-12-2017	EP 3463447 A1	10-04-2019
		US 2019125859 A1	02-05-2019
		WO 2017210445 A1	07-12-2017
WO 2016005482 A1	14-01-2016	AU 2015286723 A1	12-01-2017
		BR 112016030577 A2	31-10-2017
		CA 2953451 A1	14-01-2016
		CL 2017000064 A1	10-11-2017
		CN 107074912 A	18-08-2017
		EA 201692467 A1	31-05-2017
		EP 3166963 A1	17-05-2017
		JP 2017521073 A	03-08-2017
		KR 20170027846 A	10-03-2017
		PE 20170291 A1	26-03-2017
		PH 12016502468 A1	10-04-2017
		SG 11201610456U A	27-01-2017
		US 2017189519 A1	06-07-2017
		WO 2016005482 A1	14-01-2016
		ZA 201700165 B	26-06-2019
WO 2013185177 A1	19-12-2013	NONE	
US 2014286981 A1	25-09-2014	US 2014286981 A1	25-09-2014
		US 2015352202 A1	10-12-2015
EP 3233117 A1	25-10-2017	CA 2970163 A1	23-06-2016
		CN 107847579 A	27-03-2018
		EP 3233117 A1	25-10-2017
		US 2019111126 A1	18-04-2019
		WO 2016100926 A1	23-06-2016

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P	31/16	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	

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

ルド、スクールズ

(74)代理人

100107489

弁理士 大塩 竹志

(72)発明者

ヒーニー, ジョナサン ルーク

イギリス国 シービー3 0イーエス ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, マディングリー ロ
ード, ユニバーシティー オブ ケンブリッジ, デパートメント オブ ベテリナリー メディシン
, ラボラトリー オブ バイラル ズーノティクス

(72)発明者

ビシュワナス, スネハ

イギリス国 シービー3 0イーエス ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, マディングリー ロ
ード, ユニバーシティー オブ ケンブリッジ, デパートメント オブ ベテリナリー メディシン
, ラボラトリー オブ バイラル ズーノティクス

(72)発明者

カーネル, ジョージ

イギリス国 シービー3 0イーエス ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, マディングリー ロ
ード, ユニバーシティー オブ ケンブリッジ, デパートメント オブ ベテリナリー メディシン
, ラボラトリー オブ バイラル ズーノティクス

(72)発明者

ウェルズ, デイビッド

イギリス国 シービー2 8ピーエヌ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, セドレー テイラー
ロード 25, ディオシンバックス リミテッド

(72)発明者

フェラーリ, マッテオ

イギリス国 シービー2 8ピーエヌ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, セドレー テイラー
ロード 25, ディオシンバックス リミテッド

F ターム (参考)

4B065 AA91X AA93X AB01 BA02 CA44 CA46
4C084 AA13 NA14 ZB33
4C085 AA03 AA38 BA99 EE01 EE06 FF24
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA12 NA14 ZB33
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 DA86 EA31 FA74