

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5845180号
(P5845180)

(45) 発行日 平成28年1月20日(2016.1.20)

(24) 登録日 平成27年11月27日(2015.11.27)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 7/04	(2006.01)	C 12 N 7/04
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00 1 O 2
A 61 K 39/145	(2006.01)	A 61 K 39/145
A 61 P 31/16	(2006.01)	A 61 P 31/16

請求項の数 16 (全 147 頁)

(21) 出願番号	特願2012-523037 (P2012-523037)
(86) (22) 出願日	平成22年7月29日 (2010.7.29)
(65) 公表番号	特表2013-500720 (P2013-500720A)
(43) 公表日	平成25年1月10日 (2013.1.10)
(86) 國際出願番号	PCT/US2010/043697
(87) 國際公開番号	W02011/014645
(87) 國際公開日	平成23年2月3日 (2011.2.3)
審査請求日	平成25年7月26日 (2013.7.26)
(31) 優先権主張番号	61/229,858
(32) 優先日	平成21年7月30日 (2009.7.30)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	511235962 モウント シナイ スクール オフ メディシネ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100-29 ニューヨーク ワン グスタベ エル・レブイ プラセ
(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(72) 発明者	アドルフォ ガルシア-サストレ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 101-28 ニューヨーク アブト. 3ジー エアスト 96トフ ストリート 16

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インフルエンザウイルス及びそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a)3'から5'の順序で、(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)該第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域であって、該第1のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、前記第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームであって、該オープンリーディングフレーム内の3'又は5'近位のヌクレオチドの少なくとも1つのパッケージングシグナルが変異されている、前記第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)該第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(v)該第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域を含む、第1のキメライフルエンザウイルス遺伝子分節、及び、

(b)3'から5'の順序で、(i)該第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)該第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域であって、該第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、前記第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)該第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームであって、該オープンリーディングフレーム内の3'又は5'近位のヌクレオチドの少なくとも1つのパッケージングシグナルが変異されている、前記第1の型のイン

フルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)該第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(v)該第2の型のインフルエンザウイルスインフルエンザ遺伝子分節の5'非コード領域を含む、第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節、

を含む、組換えインフルエンザウイルス。

【請求項2】

前記キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節（複数）を含む前記ウイルスの後代のみが、ブラークアッセイにおいてブラークを形成することが可能である、請求項1記載の組換えインフルエンザウイルス。

【請求項3】

(a)3'から5'の順序で、(i)該第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)該第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域であって、該第3のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、前記第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームであって、該オープンリーディングフレーム内の3'又は5'近位のヌクレオチドの少なくとも1つのパッケージングシグナルが変異されている、前記第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)該第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(v)該第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域を含む、

第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節；及び

(b)3'から5'の順序で、(i)該第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)該第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域であって、該第1のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、前記第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームであって、該オープンリーディングフレーム内の3'又は5'近位のヌクレオチドの少なくとも1つのパッケージングシグナルが変異されている、前記第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)前記第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(v)該第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域を含む、第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節；及び

(c)3'から5'の順序で、(i)該第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)該第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域であって、該第2のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、前記第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)該第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームであって、該オープンリーディングフレーム内の3'又は5'近位のヌクレオチドの少なくとも1つのパッケージングシグナルが変異されている、前記第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)該第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(v)該第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域を含む、第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節；

を含む、組換えインフルエンザウイルス。

【請求項4】

前記第1、第2及び第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む後代のみが、ブラークアッセイにおいてブラークを形成することが可能である、請求項3記載の組換えインフルエンザウイルス。

【請求項5】

前記第1、第2及び第3のインフルエンザウイルス遺伝子分節が、それぞれ、HA、NA、及

10

20

30

40

50

びNSタンパク質をコードしている、請求項3記載の組換えインフルエンザウイルス。

【請求項 6】

(a)前記第1のインフルエンザウイルス遺伝子分節がNSであり、かつ前記3'近位のコード領域のmRNA 5'スプライス部位が変異されている、請求項1～5のいずれか1項記載の組換えインフルエンザウイルス。

【請求項 7】

前記3'又は5'近位のヌクレオチドの少なくとも1つのパッケージングシグナルの変異が、サイレント変異である、請求項1～6のいずれか1項記載の組換えインフルエンザウイルス。

【請求項 8】

各オープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドの少なくとも1つのパッケージングシグナルが変異されている、請求項1～7のいずれか1項記載の組換えインフルエンザウイルス。

【請求項 9】

前記ウイルスが、弱毒化変異を含む、請求項1～8のいずれか一項記載の組換えインフルエンザウイルス。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか一項記載の組換えインフルエンザウイルスを含む、基体であって、該基体が、宿主細胞又は胚発育卵である、前記基体。

【請求項 11】

請求項1～9のいずれか一項記載の組換えインフルエンザウイルスを含有する、医薬組成物又は免疫原性組成物。

【請求項 12】

対象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発するための医薬、又は、対象においてインフルエンザウイルス疾患を予防若しくは治療するための医薬、又は、対象においてインフルエンザウイルス感染を治療するための医薬の製造における、請求項1～9のいずれか一項記載の組換えインフルエンザウイルスの使用。

【請求項 13】

対象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発するための医薬、又は、対象においてインフルエンザウイルス疾患を予防若しくは治療するための医薬、又は、対象においてインフルエンザウイルス感染を治療するための医薬の製造における、請求項11記載の医薬組成物の使用。

【請求項 14】

対象におけるインフルエンザウイルスに対する免疫応答の誘発、又は、対象におけるインフルエンザウイルス疾患の予防若しくは治療、又は、対象におけるインフルエンザウイルス感染の治療において使用するための、請求項1～9のいずれか一項記載の組換えインフルエンザウイルス。

【請求項 15】

対象におけるインフルエンザウイルスに対する免疫応答の誘発、又は、対象におけるインフルエンザウイルス疾患の予防若しくは治療、又は、対象におけるインフルエンザウイルス感染の治療において使用するための、請求項11記載の医薬組成物。

【請求項 16】

請求項1～9のいずれか一項記載の組換えインフルエンザウイルスにより非ヒト基体を感染させること、及び、引き続き該基体から該ウイルスを精製することを含む、組換えインフルエンザウイルスの増殖方法であって、該基体が、宿主細胞又は胚発育卵である、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2009年7月30日に出願の米国特許仮出願第61/229,858号の優先権の利益を主

10

20

30

40

50

張し、それは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所(NIH)からの交付番号U01 AI070469、1RC1 AI086061-01、HHSN2662000700010C、及びU54 AI057158-06の下で、一部米国政府の援助で作られた。米国政府は、この発明に一定の権利を有することができる。

【0003】

(1. 序論)

本明細書では、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節及びそのようなキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節をコードしている核酸配列が説明される。本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、ひとつの型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の非コード領域及びコード領域に認められるパッケージングシグナル、並びに異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又はそれらの断片を含む。同じく2つ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む組換えインフルエンザウイルス、並びにインフルエンザウイルス疾患の予防及び/又は治療におけるそのようなウイルスの使用も説明される。10

【背景技術】

【0004】

(2. 背景)

インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス(Orthomyxoviridae)科に属するエンベロープ型のRNAウイルスである(Palese及びShawの文献(2007, 「オルソミクソウイルス科:ウイルス及びそれらの複製(Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication)」、第5版「フィールズのウイルス学(Fields' Virology)」、B.N. Fields、D. M. Knipe及びP.M. Howley編、Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins、フィラデルフィア、米国、p1647-1689))。インフルエンザウイルスの天然の宿主は鳥類であるが、インフルエンザウイルス(鳥類起源のものを含む)は、ヒト及び他の動物宿主(イヌ、ブタ、ウマ、海洋哺乳類及びイタチ類)に感染すること及びそこで疾患を引き起こすこともできる。例えば、アジアで広がっているH5N1トリインフルエンザウイルスは中国及びインドネシアのブタで見出されており、一般にA型インフルエンザに感受性であるとみなされていない動物であるネコ、ヒョウ、及びトラを含むまでにその宿主範囲を広げている(CIDRA P-鳥類のインフルエンザ:農業及び野生生物での注意事項(Avian Influenza: Agriculture and Wildlife Considerations))。動物におけるインフルエンザウイルス感染の出現は、ヒト汎発性インフルエンザ株を発生させる可能性がある。20

【0005】

A型及びB型インフルエンザウイルスは主要なヒト病原体であり、重症度が無症状感染から死をもたらすこともある原発性ウイルス性肺炎まで変動する呼吸器疾患を引き起こす。感染の臨床上の結果は、インフルエンザ株の病原性、並びに宿主の曝露、病歴、年齢及び免疫状態で異なる。季節性インフルエンザに起因する累積罹患率及び死亡率は、比較的高い感染率のためにかなり高い。通常の季節では、インフルエンザは世界中で3,000,000～5,000,000の重度症例数及び最高500,000の死亡症例数を引き起こすことができる(世界保健機構(WHO)(2003)インフルエンザ:総説(Influenza: Overview); who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/website; 2003年3月)。米国では、インフルエンザウイルスは人口の概算10～15%に感染し(Glezen及びCouch RBの文献(「1974～76年のヒューストン地域におけるインフルエンザ流行間期(Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-76)」、N Engl J Med 298: 587-592 (1978)); Foxらの文献(「1975～1979年のシアトルの家庭におけるインフルエンザウイルスによる感染(Influenza virus infections in Seattle families, 1975-1979)」、J. Pattern of infection in invaded households and relation of age and prior antibody to occurrence of infection and related illness)」、Am J Epidemiol 116: 228-242 (1982)))、毎年約30,000の死亡症例数に関連する(Thompson WWらの文献(「米国におけるインフルエンザ及びRSウイルスに関連する死亡率(Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States)」、Am J Epidemiol 116: 228-242 (1982)))、毎年約30,000の死亡症例数に関連する(Thompson WWらの文献(「米国におけるインフルエンザ及びRSウイルスに関連する死亡率(Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States)」、Am J Epidemiol 116: 228-242 (1982)))40

50

tality Associated with Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the United States)」、JAMA 289: 179-186 (2003)) ; Belsheの文献(「ワクチンに関する橋渡し研究: インフルエンザを例として(Translational research on vaccines: influenza as an example)」、Clin Pharmacol Ther 82: 745-749 (2007))).

【0006】

毎年の流行に加えて、インフルエンザウイルスは数少ない大流行の原因である。例えば、A型インフルエンザウイルスは、1918年、1957年及び1968年に起こったものなどの大流行を引き起こすことができる。主要なウイルス抗原である赤血球凝集素(HA)に対する予め形成された免疫を欠くために、汎流行性インフルエンザウイルスは单一年に50%を超える人口を罹患させることができ、しばしば季節性インフルエンザウイルスよりも重度の疾患を引き起す。苛酷な例は1918年の大流行であり、そこでは概算50,000,000 ~ 100,000,000人が死亡した(Johnson及びMuellerの文献(「アカウントの更新:1918 ~ 1920年の「スペインの」インフルエンザ大流行の世界全体の死亡率(Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918-1920 "Spanish" Influenza Pandemic)」、Bulletin of the History of Medicine 76: 105-115 (2002))). 1990年代後期の高病原性H5N1トリインフルエンザウイルスの出現以来(Claasらの文献(「高病原性トリインフルエンザウイルスに関連するヒトA型インフルエンザH5N1ウイルス(Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus)」、Lancet 351: 472-7 (1998)))、このウイルスはヒト間で伝染可能となり始め、大流行を引き起こすとの懸念がある。最近、世界保健機構(WHO)は、H1N1 2009ブタインフルエンザウイルスは汎流行性ウイルスであると宣言した。

【0007】

インフルエンザウイルス感染から保護する有効な方法は、弱毒化されたインフルエンザウイルスによるワクチン接種を通してである。しかし再集合のために、インフルエンザの生きた弱毒化されたワクチン株及び野生株による個体の同時感染は、例えばワクチン由來の赤血球凝集素を保有する複製コンピテントウイルスの形成を可能にし、これに対し恐らく感染したヒトはナイーブ(nave)であろう。従って、野生株インフルエンザウイルスによるインフルエンザウイルスワクチン株の再集合を防止する方法を開発する必要性が存在する。

【発明の概要】

【0008】

(3. 要旨)

本明細書では、組換えインフルエンザウイルスの製造において有用である、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節、並びにそのようなキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている核酸配列が説明される。2種以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節若しくはそれらの相補体、又はそのような遺伝子分節若しくはそれらの相補体をコードしている核酸配列は、組換えインフルエンザウイルスの製造において使用することができる。いかなる理論によても束縛されることなく、2つ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、組換えインフルエンザウイルスの複製の間に一緒に分離(すなわち、同時分離)され、その結果この組換えインフルエンザウイルスは、当業者に公知の技術により判定されるように他のインフルエンザウイルス(例えば、野生型インフルエンザウイルス)と再集合する能力が低下するか、又は他のインフルエンザウイルスと再集合することができない。そのような組換えインフルエンザウイルスの他のインフルエンザウイルスと再集合する低下した能力又は不能は、弱毒化生ワクチンとしてのその組換えインフルエンザウイルスの安全性を向上することができる。従ってそのような組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス疾患の予防、インフルエンザウイルス疾患若しくはインフルエンザウイルス感染の治療、又はそれらの両方のいずれかにおいて有用であることができる。

【0009】

ある態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(a)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'及び5'非コード領域に認められるパッケージングシグナ

10

20

30

40

50

ル、(b)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'及び5'の両方の近位のコード領域配列に認められるパッケージングシグナル、並びに(c)第2の異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節からのオープンリーディングフレーム又はそれらの断片：を含み、ここで該オープンリーディングフレームは、そのオープンリーディングフレーム内に認められるインフルエンザウイルスパッケージングシグナルに1、2、3又はそれ以上の変異を含む。ある実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつこのオープンリーディングフレームとインフレームで翻訳される。他の実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつ翻訳されない。一部の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、任意の開始コドンを除去し、かつ3'近位のコード領域配列の翻訳を妨げるよう、変異されている。ある実施態様において、3'近位のコード領域は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来する。具体的な実施態様において、3'近位のコード領域は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的な実施態様において、3'近位のコード領域は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。一部の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、5'近位のコード領域配列が翻訳されないことを確実にするために、1以上の変異を有する。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又は断片に導入された変異は、サイレント変異である。
10
20

【0010】

一実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)少なくとも20ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム由来の少なくとも3'近位20ヌクレオチド；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、ここで該核酸は、オープンリーディングフレームが、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも20ヌクレオチドに後続してインフレームで挿入され得るように操作される。別の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)少なくとも30ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、ここで該核酸は、オープンリーディングフレームが、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも30ヌクレオチドに先行してインフレームで挿入され得るように操作される。別の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)少なくとも20ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド；(iv)少なくとも30ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド；(v)第1の型のインフルエンザウイル
30
40
50

ス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(vi)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、ここで該核酸は、オープンリーディングフレームが、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム由来の少なくとも20ヌクレオチドと第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも30ヌクレオチドの間に、インフレームで挿入され得るように操作される。ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来する。具体的な実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除外するように変異されている。別の具体的な実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。10

【0011】

具体的な実施態様において、本明細書に提供されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)オープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチド及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含む。20

【0012】

ある態様において、組換えインフルエンザウイルスの作製に有用であることができるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の相補体を含む核酸配列が、本明細書に提供される。具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の相補体を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(a)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'及び5'非コード領域に認められるパッケージングシグナル、(b)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'及び5'近位の両方のコード領域配列に認められるパッケージングシグナル、並びに、(c)第2の異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来のオープンリーディングフレーム又はそれらの断片：を含み、ここで該オープンリーディングフレームは、オープンリーディングフレームに認められるインフルエンザウイルスパッケージングシグナルに1、2、3又はそれ以上の変異を含む。ある実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつこのオープンリーディングフレームとインフレームで翻訳される。他の実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつ翻訳されない。一部の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、任意の開始コドンを除去し、かつ3'近位のコード領域配列の翻訳を妨げるように、変異されている。ある実施態様において、この3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来する。具体的な実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的な実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。一部の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、5'近位のコード領域配列が翻訳されないことを確実にするために、1以上の変異を有する。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又は断片に導入された変異は、サイレント変異である。3040

【0013】

一実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイル50

ス遺伝子分節の相補体を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)少なくとも20ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム由来の少なくとも3'近位20ヌクレオチド；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、ここで該核酸は、オープンリーディングフレームが、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも20ヌクレオチドに後続してインフレームで挿入され得るよう10に操作される。別の実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の相補体を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)少なくとも30ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、ここで該核酸は、オープンリーディングフレームが、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも30ヌクレオチドに先行してインフレームで挿入され得るように操作される。別の実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の相補体を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)少なくとも20ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド；(iv)少なくとも30ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド；(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(vi)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、ここで該核酸は、オープンリーディングフレームが、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム由来の少なくとも20ヌクレオチドと第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも30ヌクレオチドの間に、インフレームで挿入され得るように操作される。ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来する。
具体的な実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除外するように変異されている。別の具体的な実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0014】

具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の相補体を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)オープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチド及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレー10
20
30
40
50

ム；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含む。ある実施態様において、この3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来する。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除外するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0015】

ある態様において、組換えインフルエンザウイルスの作製に有用であることができる、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしているヌクレオチド配列を含む核酸配列が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしているヌクレオチド配列を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(a)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'及び5'非コード領域に認められるパッケージングシグナル、(b)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'及び5'近位の両方のコード領域配列に認められるパッケージングシグナル、並びに、(c)第2の異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由來のオープンリーディングフレーム又はそれらの断片：を含み、ここで該オープンリーディングフレームは、オープンリーディングフレームに認められるインフルエンザウイルスパッケージングシグナルに1、2、3又はそれ以上の変異を含む。ある実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつこのオープンリーディングフレームとインフレームで翻訳される。他の実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつ翻訳されない。一部の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、任意の開始コドンを除去し、かつ3'近位のコード領域配列の翻訳を妨げるよう、変異されている。ある実施態様において、この3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来する。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。一部の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、5'近位のコード領域配列が翻訳されないことを確実にするために、1以上の変異を有する。具体的実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又は断片に導入された変異は、サイレント変異である。

【0016】

一実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしているヌクレオチド配列を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)少なくとも20ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム由來の少なくとも3'近位20ヌクレオチド；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、ここで該核酸は、オープンリーディングフレームが、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも20ヌクレオチドに後続してインフレームで挿入され得るように操作される。別の実施態様において

10

20

30

40

50

、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしているヌクレオチド配列を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)少なくとも30ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、ここで該核酸は、オーブンリーディングフレームが、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームの少なくとも30ヌクレオチドに先行してインフレームで挿入され得るように操作される。別の実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしているヌクレオチド配列を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)少なくとも20ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド；(iv)少なくとも30ヌクレオチドが1以上の変異を有する、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド；(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(vi)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、ここで該核酸は、オーブンリーディングフレームが、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレーム由来の少なくとも20ヌクレオチドと第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームの少なくとも30ヌクレオチドの間に、インフレームで挿入され得るように操作される。ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来する。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除外するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスマ遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0017】

具体的実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしているヌクレオチド配列を含み、ここでこのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)オーブンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチド及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレーム；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；並びに、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含む。ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来している。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除外するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスマ遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0018】

10

20

30

40

50

別の態様において、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を1、2、3、4、5、6、7又は8含む組換えインフルエンザウイルスが、本明細書に提供される。具体的実施態様において、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を2つ以上含み、該2つ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節が同時分離する、組換えインフルエンザウイルスが本明細書に提供される。理論に束縛されることなく、本キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、他のインフルエンザウイルス遺伝子分節と互いに独立して再集合する能力が低下させられており、結果的に本組換えインフルエンザウイルスの他のインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス)との再集合は、減少されるか又は阻害される。再集合することができない組換えインフルエンザウイルスは、1つ以上の他のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節とは独立に再集合された1つ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を伴うウイルスを含む、より少ないウイルスブラークを生じるであろう。ある実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、弱毒化変異を含む。

【0019】

一実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節及び第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含み、ここで：(a)第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)オープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域；及び、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、並びに、(b)第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)オープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(v)第2の型のインフルエンザウイルスインフルエンザ遺伝子分節の5'非コード領域：を含む。

【0020】

別の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節；第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節；及び、第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含み、ここで、(a)第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第3のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)オープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(v)第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、並びに、(b)第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)オープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み、並びに、(c)第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：(i)第2の型

10

20

30

40

50

のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)オープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；(iv)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(v)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含む。ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来している。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除外するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスマ遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。
10

【0021】

別の態様において、9つの遺伝子分節を含む組換えインフルエンザウイルスが、本明細書に提供され、ここでこの遺伝子分節の少なくとも2つは、本明細書に記載されるようなキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節である。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、9つの遺伝子分節を含み、ここで(a)少なくとも1つの遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；(iii)オープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの断片又は誘導体のオープンリーディングフレーム；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；及び、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル：を含み、並びに、(b)少なくとも1つの遺伝子分節は：(i)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；(iii)インフルエンザウイルス遺伝子分節の1、2、3、4、5、6、7又は8つに対し異種であるオープンリーディングフレーム；(iv)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；及び、(v)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル：を含む。ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来している。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除外するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスマ遺伝子分節に由来し、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、弱毒化されている。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、すなわち亞型又は菌株由来のインフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、すなわち亞型又は菌株由来のHA抗原をコード及び/又は発現している。例えば組換えインフルエンザウイルスは、H1HA抗原及びH3HA抗原をコード及び/又は発現している。一部の実施態様において、1つのHA抗原は、季節性インフルエンザ
20
30
40
50

ウイルスに由来し、かつ他方のHA抗原は、汎流行性インフルエンザウイルスに由来している。具体的実施態様において、これら2つのHA抗原は各々、弱毒化変異を含む。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス抗原及び少なくとも1、2、3若しくは4の、又は1~3、1~4、若しくは2~4の非インフルエンザウイルス抗原(例えば、細菌病原体、又はインフルエンザウイルス以外のウイルス病原体に由来する抗原)をコード及び/又は発現している。これらの実施態様に従い、一部の実施態様において、1つの遺伝子分節の異種オーブンリーディングフレームは、他方の遺伝子分節によりコードされたインフルエンザウイルス抗原よりも異なるインフルエンザウイルスの型、すなわち亜型又は菌株に由来するインフルエンザウイルス抗原をコードすることができる。他の実施態様において、1つの遺伝子分節の異種オーブンリーディングフレームは、非インフルエンザウイルス抗原(例えば、細菌抗原、腫瘍抗原、又はインフルエンザウイルス抗原以外のウイルス抗原)をコードすることができる。10

【0022】

具体的実施態様において、本明細書に記載される9-分節化された組換えインフルエンザウイルスは、先に説明されたものよりも9番目の分節をより安定して取り込んでいる。ある実施態様において、本明細書に記載される9-分節化された組換えインフルエンザウイルスは、当該技術分野において公知の技術(例えば、下記実施例に説明された限定希釈法を含む)により評価されるように、孵化卵若しくは組織培養物において、少なくとも4、5、6、7、8又はそれ以上の継代にわたり、又は4~6、4~8、若しくは5~8の継代にわたり、9番目の分節を維持している。20

【0023】

別の態様において、本明細書に記載される核酸配列を含む基体(例えば、宿主細胞及び卵)が、本明細書に提供される。一実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体を含む基体が、本明細書に提供される。別の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしているヌクレオチド配列を含む核酸配列を含む基体が、本明細書に提供される。

【0024】

別の態様において、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を1、2又はそれ以上含む組換えインフルエンザウイルスを含む基体が、本明細書に提供される。別の態様において、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を1、2又はそれ以上含む組換えインフルエンザウイルスを含む組成物が、本明細書に提供される。30

【0025】

別の態様において、本明細書に記載される核酸配列又は組換えインフルエンザウイルスを含むキットが、本明細書に提供される。一実施態様において、本明細書に提供されるキットは、1個以上の容器内に、本明細書に記載される核酸配列を含む。別の実施態様において、本明細書に提供されるキットは、1個以上の容器内に、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを含む。

【0026】

更に別の態様において、1、2又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む組換えインフルエンザウイルスを使用する方法が、本明細書に提供される。一実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物を対象へ投与することを含む、対象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発する方法が、本明細書に提供される。別の実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物を対象に投与することを含む、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療する方法が、本明細書に提供される。別の実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物を対象に投与することを含む、対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療する方法が、本明細書に提供される。別の実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物を利用し、インフル4050

エンザウイルスに結合する抗体を生成又は同定する方法が、本明細書に提供される。

【0027】

(3.1 用語)

本明細書で用いるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節又はキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節との関連において、句「再集合能」とは、インフルエンザウイルスの少なくとも1生活環を通じて他のインフルエンザウイルス遺伝子分節又はキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節から独立して分離し、かつインフルエンザウイルスゲノム内の残りのインフルエンザウイルス遺伝子分節と組み合わせて複製能を有する(replication competent)ウイルスをコードする、インフルエンザウイルス遺伝子分節又はキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の能力を説明するために使用される。インフルエンザウイルスとの関連において、句「再集合能」とは、組み合わせられた遺伝子分節を有する子孫インフルエンザウイルスが複製能を持つように、インフルエンザウイルスの遺伝子分節のいずれか1つを、異なるインフルエンザウイルスの遺伝子分節と組み合わせるインフルエンザウイルスの能力を説明するために、本明細書において使用される。混合された遺伝子分節のある組み合わせが、複製コンピテントなウイルス又は低下した複製能を有するウイルスを生じない場合、インフルエンザウイルスは、低下した再集合能が低下していることになる。ある実施態様において、低下した複製コンピテンスを持つインフルエンザウイルスとは、同型の野生型インフルエンザウイルスにより生じた複製後代よりも、少なくとも1log、1.5log、2log、2.5log、3log、3.5log、4log、4.5log、5log、5.5log、6log、6.5log、7log、7.5log、8log、8.5log、9log又は10log低い複製後代の力値を生じるウイルスである。10

【0028】

本明細書で用いるように、数字と一緒に用いられる場合、用語「約」又は「およそ」は、言及される数字の1、5又は10%以内の任意の数字を指す。

【0029】

本明細書で用いるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節との関連で用語「誘導体」は、インフルエンザウイルスの特定のヌクレオチド配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は98%同一であるヌクレオチド配列、又はストリングエントな条件下でインフルエンザウイルスの特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を指す。30

【0030】

本明細書で用いるように、対象への療法の投与との関連で用語「有効量」は、予防及び/又は治療効果を有する療法の量を指す。ある実施態様において、対象への療法の投与との関連で「有効量」は、以下の効果の1、2、3、4個又はそれ以上を達成するのに十分である療法の量を指す：(i)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付随する症状の重症度を低減又は改善すること；(ii)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の持続期間を短縮すること；(iii)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の進行を予防すること；(iv)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の退行をもたらすこと；(v)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の発達又は発症を予防すること；(vi)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の再発を予防すること；(vii)1つの細胞から別の細胞、1つの組織から別の組織、又は1つの臓器から別の臓器へのインフルエンザウイルスの伝播を低減又は防止すること；(viii)1対象から別の対象へのインフルエンザウイルスの伝播/伝染を予防又は低減すること；(ix)インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患に付隨する臓器不全を低減すること；(x)対象の入院を減少させること；(xi)入院期間を短縮すること；(xii)インフルエンザウイルス感染又はそれらに付隨する疾患有する対象の生存を増加させること；(xiii)インフルエンザウイルス感染又はそれらに付隨する疾患有除去すること；(xiv)インフルエンザウイルスの複製を阻害又は低減すること；(xv)宿主細胞へのインフ40

ルエンザウイルスの結合又は融合を阻害又は低減すること；(xvi)宿主細胞へのインフルエンザウイルスの侵入を阻害又は低減すること；(xvii)インフルエンザウイルスゲノムの複製を阻害又は低減すること；(xviii)インフルエンザウイルスタンパク質の合成を阻害又は低減すること；(xix)インフルエンザウイルス粒子の構築を阻害又は低減すること；(xx)宿主細胞からのインフルエンザウイルス粒子の放出を阻害又は低減すること；(xxi)インフルエンザウイルス力価を低下させること；(xxii)インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患に付随した症状の数を減少させること；(xxiii)別の療法の予防効果又は治療効果を増強、改善、補充、相補、又は増加すること；(xxiv)インフルエンザウイルス感染に付随した二次感染症の発症又は進行を防止すること；並びに/又は、(xxv)インフルエンザウイルス感染に続発する細菌性肺炎の発症を予防又は疾患重症度を減退させること。有効量の例証的投与量は、下記5.7.2節に提供される。

【0031】

ある実施態様において、療法の有効量はインフルエンザウイルス疾患からの完全な保護をもたらさないが、未処置の対象と比較してより低い力価の又は少ない数のインフルエンザウイルスをもたらす。ある実施態様において、療法の有効量は、未処置の対象と比較して0.5倍、1倍、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、125倍、150倍、175倍、200倍、300倍、400倍、500倍、750倍、又は1,000倍又はそれ以上のインフルエンザウイルスの力価の低下をもたらす。一部の実施態様において、療法の有効量は、未処置の対象と比較しておよそ $1\log$ 以上、およそ $2\log$ 以上、およそ $3\log$ 以上、およそ $4\log$ 以上、およそ $5\log$ 以上、およそ $6\log$ 以上、およそ $7\log$ 以上、およそ $8\log$ 以上、およそ $9\log$ 以上、およそ $10\log$ 以上、 $1\sim 5\log$ 、 $2\sim 10\log$ 、 $2\sim 5\log$ 、又は $2\sim 8\log$ のインフルエンザウイルスの力価の低下をもたらす。インフルエンザウイルスの力価、数又は総負荷の減少の利点には、重症度のより低い感染症状、より少ない感染症状、感染に付随する疾患の長さの短縮、及びインフルエンザウイルス感染に続発する細菌性肺炎の発症の予防又は疾患重症度の減退が含まれるが、これらに限定されない。

【0032】

本明細書で用いるように、用語「ヒト高齢者」は、65歳以上のヒトを指す。

【0033】

本明細書で用いるように、核酸配列との関連で用語「断片」は、親配列由来の少なくとも2つ又は少なくとも3つの連續ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を指す。具体的実施態様において、この用語は、 $2\sim 30$ 、 $5\sim 30$ 、 $10\sim 60$ 、 $25\sim 100$ 、 $150\sim 300$ 又はそれ以上の親配列由来の連續ヌクレオチドのヌクレオチド配列を指す。別の実施態様において、この用語は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、125、150、175、200、250、275、300、325、350、375、400、425、450又は475の親配列の連續ヌクレオチドのヌクレオチド配列を指す。

【0034】

本明細書で用いるように、アミノ酸配列との関連で用語「断片」は、親配列由来の少なくとも2つの連續アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を指す。具体的実施態様において、この用語は、 $2\sim 30$ 、 $5\sim 30$ 、 $10\sim 60$ 、 $25\sim 100$ 、 $150\sim 300$ 又はそれ以上の親配列由来の連續アミノ酸残基のアミノ酸配列を指す。別の実施態様において、この用語は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、125、150、175、200、250、275、300、325、350、375、400、425、450又は475の親配列の連續アミノ酸残基のアミノ酸配列を指す。

【0035】

本明細書で用いるように、用語「異種」は、別の単位に会合することが天然には認められない単位を指す。例えば、2つのヌクレオチド配列が互いに天然には会合することが認められない場合、第1のヌクレオチド配列は、第2のヌクレオチド配列に対し異種であると言われる。

【0036】

本明細書で用いるように、用語「宿主細胞」は、任意の型の細胞、例えば初代細胞又は

10

20

30

40

50

細胞株由来の細胞を指す。具体的実施態様において、用語「宿主細胞」は、核酸分子によりトランスフェクションされた細胞、又はそのような細胞の後代及び可能性のある後代を指す。後続世代において起こり得る変異若しくは環境の影響又は宿主細胞ゲノムへの核酸分子の組込みのため、そのような細胞の後代は、核酸分子によりトランスフェクションされた親細胞と同一ではないことがある。

【0037】

本明細書で用いるように、用語「ヒト成人」は、18歳以上のヒトを指す。

【0038】

本明細書で用いるように、用語「ヒト小児」は、1歳から18歳までのヒトを指す。

【0039】

本明細書で用いるように、用語「ヒト乳児」は、新生児から1歳までのヒトを指す。

10

【0040】

本明細書で用いるように、用語「ストリンジエント条件下でのハイブリダイズ」とは、その条件下で、互いに少なくとも50% (好ましくは、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 又は98%) 同一であるヌクレオチド配列が、典型的には互いにハイブリダイズされ続ける、ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を説明する。そのようなストリンジエントな条件は、当業者に公知であり、かつ「分子生物学最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」、John Wiley & Sons社、ニューヨーク(1989)の6.3.1-6.3.6.に認めることができる。

【0041】

20

概して、ストリンジエント条件は、規定されたイオン強度、pHで、特定の配列に関する融解温度(T_m)よりも約5~10 低いように選択される。 T_m は、標的に相補的なプローブの50%が、標的配列に、平衡状態でハイブリダイズする温度(規定されたイオン強度、pH、及び核酸濃度下)である(標的配列は過剰に存在するので、 T_m では、プローブの50%は平衡状態で占拠される)。ストリンジエント条件とは、塩濃度が、pH7.0~8.3で、約1.0Mナトリウムイオン未満、典型的には約0.01~1.0Mナトリウムイオン濃度(又は他の塩)であり、並びに温度が、短プローブ(例えば10~50ヌクレオチド)については低くとも約30及び長プローブ(例えば50ヌクレオチド以上)については低くとも60 である条件であろう。ストリンジエント条件は、例えばホルムアミドなどの脱安定化剤の添加によっても達成され得る。選択的又は特異的ハイブリダイゼーションに関して、陽性シグナルは、バックグラウンドハイブリダイゼーションの少なくとも2倍、好ましくはバックグラウンドの10倍である。

30

【0042】

ひとつの非限定的例において、ストリンジエントハイブリダイゼーション条件は、 $6 \times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、約45 でのハイブリダイゼーション、引き続きの $0.1 \times$ SSC、0.2% SDS、約68 での1回以上の洗浄である。特定の非限定的例において、ストリンジエントハイブリダイゼーション条件は、 $6 \times$ SSC、約45 でのハイブリダイゼーション、引き続きの $0.2 \times$ SSC、0.1% SDS、50~65 での1回以上の洗浄(すなわち50 、55 、60 又は65 で1回以上の洗浄)である。本明細書に記載される核酸は、これらの条件下で、A又はTヌクレオチドのみからなるヌクレオチド配列に単にハイブリダイズする核酸分子を含まないことが理解される。

40

【0043】

本明細書で用いるように、対象への療法の投与との関連で用語「併用」は、2つ以上の療法の使用を指す。用語「併用」の使用は、療法が対象に投与される順序を制限しない。第1の療法は、対象への第2の療法の投与の前に(例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週又は12週前に)、同時に、又は後に(例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週又は12週後に)投与されることがある。

【0044】

50

本明細書で用いるように、用語「感染」は、細胞又は対象におけるウイルスの侵入、増殖及び/又は存在を意味する。一実施態様では、感染は「活動性」感染、すなわちウイルスが細胞又は対象で複製しているものである。そのような感染は、ウイルスによって最初に感染した細胞、組織及び/又は臓器からの、他の細胞、組織及び/又は臓器へのウイルスの伝播を特徴とする。感染は、潜伏性の感染、すなわちウイルスが複製していないものであってもよい。ある実施態様において、感染は、細胞又は対象におけるウイルスの存在から生じる、或いはウイルスによる細胞又は対象への侵入による病理学的状態を指す。

【0045】

本明細書で用いるように、用語「インフルエンザウイルス疾患」及びインフルエンザウイルス感染に随伴した疾患を指す句は、細胞又は対象におけるインフルエンザウイルス(例えば、A型若しくはB型インフルエンザウイルス)の存在、或いは細胞又は対象へのインフルエンザウイルスによる侵入から生じる病理学的状態を指す。具体的実施態様において、本用語はインフルエンザウイルスに起因する呼吸器疾患を指す。

10

【0046】

本明細書で用いるように、句「IFN欠損系」又は「IFN欠損基体」は、以下の系、例えば細胞、細胞株、及びマウス、ニワトリ、七面鳥、ウサギ、ラット、ウマなどの動物を指す：(a)1、2又はそれ以上の型のIFNを生成しないか、又は任意の型のIFNを生成しないか、又は1、2又はそれ以上の型のIFNを低レベル生成するか、又は低レベルの任意のIFNを生成するか(すなわち、同じ条件下でのIFNコンピテント系と比較して5~10%、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、60~70%、70~80%、80~90%又はそれ以上の任意のIFN発現の低下)、又は、(b)1、2又はそれ以上の型のIFNに応答しないか又はより非効率的に応答するか、並びに/又は、(c)1、2又はそれ以上の型のIFNによって誘導される、若しくは任意の型のIFNによって誘導される抗ウイルス遺伝子の活性に欠損のある系。

20

【0047】

「単離された」タンパク質(例えば抗体)には、そこからタンパク質が由来する細胞又は組織給源からの細胞物質又は異種タンパク質(本明細書において夾雜タンパク質とも称される)が実質的に含まれないか、或いは、化学的に合成される場合には化前駆体又は他の化学物質が実質的に含まれない。語句「細胞物質が実質的に含まれない」とは、タンパク質が、そこから単離された若しくは組換えにより生成された細胞の細胞成分から分離されている、タンパク質(例えば抗体)の調製物を含む。従って、細胞物質を実質的に含まないタンパク質(例えば抗体)は、異種タンパク質を約30%、20%、10%、又は5%(乾燥重量による)未満有するタンパク質の調製物が含まれる。タンパク質が組換えにより生成される場合、培養培地を実質的に含まないことも好ましく、すなわち培養培地はタンパク質調製物の容積の約20%、10%、又は5%未満に相当する。タンパク質が化学合成により生成される場合、化前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないことも好ましく、すなわちこれはタンパク質の合成に関与した化前駆体又は他の化学物質から分離される。従ってそのようなタンパク質調製物は、関心対象のタンパク質以外の化前駆体又は化合物を約30%、20%、10%、5%(乾燥重量による)未満有する。別の具体的実施態様において、本明細書に記載される抗体は、単離されている。

30

【0048】

本明細書で用いるように、核酸との関連で用語「単離された」は、核酸分子の天然の給源中に存在する他の核酸分子から分離されている核酸分子、又は化学的に合成された場合に化前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まない核酸分子を指す。更に「単離された」cDNA分子などの核酸分子は、他の細胞物質を、若しくは組換え技術により生成される場合は培養培地を実質的に含まないか、又は化学的に合成される場合は化前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないことができるが；しかし「単離された」とは、cDNAライブラリーなどのクローンのライブラリーの一員は除外する。具体的実施態様において、本明細書に記載される核酸は単離されている。

40

【0049】

本明細書で用いるように、用語「管理する」、「管理すること」及び「管理」は、感染

50

又はそれらに付随する疾患の治癒を生じない対象が療法(例えば予防薬又は治療薬)から誘導する有益な作用を指す。ある実施態様において、対象は、インフルエンザウイルス疾患、又はそれらの1以上の症状を「管理する」ために、1種以上の療法(例えば予防薬又は治療薬)が投与され、その結果この疾患の進行又は増悪を防止する。

【0050】

本明細書で用いるように、句「感染多重度」又は「MOI」は、1つの感染細胞あたりのウイルスの平均数である。MOIは、加えたウイルスの数(加えたml × プラーク形成単位(pfu))を、加えた細胞数(加えたml × 細胞数/ml)で割ることによって決定される。

【0051】

本明細書で用いるように、用語「核酸」は、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボ核酸、リボヌクレオチド、及びリボ核酸、並びにそれらの重合型をいい、かつ一本鎖型又は二本鎖型のいずれかを含む。核酸は、デオキシリボ核酸(「DNA」)及びリボ核酸(「RNA」)などの天然の核酸に加え、核酸アナログを含む。核酸アナログは、非天然塩基、天然のホスホジエステル結合以外の他のヌクレオチドとの連結に関与するヌクレオチド、又はホスホジエステル結合以外の連結を介して結合された塩基を含むものが挙げられる。従つて核酸アナログは、例えば非限定的に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオアート、ホスホロトリエステル、ホスホロアミデート、ボラノホスフェート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)、ロックド核酸(LNA)などを含む。

【0052】

「パーセント同一性：」2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、これらの配列は、最適な比較をするように整列させられる(例えば、第2のアミノ酸配列又は核酸配列と最適に整列させるために、ギャップを、第1のアミノ酸配列又は核酸配列の配列中に導入することができる)。次に対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第1配列中の位置が、第2配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドにより占拠されている場合、これらの分子は、その位置で同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、これらの配列により共有される同一位置の数の関数である(すなわち、同一性(%) = 同一の重複する位置の数 / 位置の総数 × 100%)。一実施態様において、これらの2つの配列は同じ長さである。

【0053】

2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数値計算用アルゴリズムを使用し達成することもできる。2つの配列の比較に利用される数値計算用アルゴリズムの1つの非限定的例は、Karlin及びAltschulの文献(1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877)の中で修正された、Karlin及びAltschulの文献のアルゴリズム(1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264-2268)である。そのようなアルゴリズムは、Altschulらの文献(1990, J. Mol. Biol. 215: 403)のNBLASTプログラム及びXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTヌクレオチドプログラムのパラメータのセットで実行し、例えば、本明細書に記載される核酸と相同なヌクレオチド配列を得るためにスコア = 100、ワードレンジス = 12で実行することができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラムのパラメータのセットで実行し、例えば、本明細書に記載されるタンパク質と相同なアミノ酸配列を得るためにスコア = 50、ワードレンジス = 3で実行することができる。比較目的でギャップ付き整列を得るためにGapped BLASTを、Altschulらの文献(1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402)に説明されたように利用することができる。或いは、PSI-BLASTを、分子間の距離の相関関係を検出する反復検索を実行するために使用することができる(同書)。BLAST、Gapped BLAST、及びPSI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えばXBLAST及びNBLAST)のデフォルトのパラメータを使用することができる(例えばNCBIウェBSITEを参照されたい)。配列の比較に利用される数値計算用アルゴリズムの別の非限定的例は、Myers及びMillerの文献(1988, CABIOS 4: 11-17)のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列整列ソフトウェ

10

20

30

40

50

アパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列比較のためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM 120重み残基テーブル(weight residue table)、ギャップレングスペナルティ12、及びギャップペナルティ4を使用することができる。

【0054】

2つの配列の間のパーセント同一性は、許容されるギャップ付きで又は付けずに、前述の技術に類似した技術を用いて決定することができる。パーセント同一性の計算において、典型的には正確なマッチのみがカウントされる。

【0055】

本明細書で用いるように、対象への療法の投与との関連で用語「予防する」、「予防すること」及び「予防」は、療法又は療法の組合せの投与から生じる予防効果を指す。具体的実施態様において、インフルエンザウイルス疾患を予防するための対象への療法の投与との関連で用語「予防する」、「予防すること」及び「予防」は、療法又は療法の組合せの投与から生じる1以上の下記の効果を指す：(i)インフルエンザウイルス疾患又はその症状(例えば発熱、筋肉痛、浮腫、炎症浸潤)の発達又は発症の阻害又は軽減；(ii)インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付随する症状の再発の阻害又は軽減；並びに、(iii)インフルエンザウイルスの感染及び/又は複製の減少又は阻害。

10

【0056】

別の具体的実施態様において、インフルエンザウイルス感染を予防するための対象への療法の投与との関連で用語「予防する」、「予防すること」及び「予防」は、療法又は療法の組合せの投与から生じる1以上の下記の効果を指す：(i)1つの細胞から別の細胞へのインフルエンザウイルスの伝播の減少又は阻害；(ii)1つの臓器又は組織から別の臓器又は組織へのインフルエンザウイルスの伝播の減少又は阻害；並びに/又は、(iii)臓器又は組織の1つの領域から臓器又は組織の別の領域へのインフルエンザウイルスの伝播の減少又は阻害(例えば、上気道から下気道へのインフルエンザウイルスの伝播の減少)。

20

【0057】

本明細書で用いるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームとの関連で用語「3'近位の」とは、オープンリーディングフレームの5'末端へ向かうオープンリーディングフレームの開始コドンから始まるヌクレオチドを指す。ある実施態様において、用語「3'近位のヌクレオチド」は、オープンリーディングフレームの5'末端へ向かう開始コドンから始まるオープンリーディングフレームの最初の20～250ヌクレオチド内の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上のヌクレオチドを指す。

30

【0058】

本明細書で用いるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節との関連で用語「3'近位のコード領域」とは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の3'末端から最初の5～450ヌクレオチド、又は5と450の間の任意の整数を指す。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の3'末端から最初の5～25ヌクレオチド、又は5と25の間の任意の整数を指す。別の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の3'末端から最初の25～50ヌクレオチド、又は25と50の間の任意の整数を指す。別の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の3'末端から最初の50～100ヌクレオチド、又は50と100の間の任意の整数を指す。別の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の3'末端から最初の50～150ヌクレオチド、又は50と150の間の任意の整数を指す。別の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の3'末端から最初の100～250ヌクレオチド、又は100と250の間の任意の整数を指す。

40

【0059】

本明細書で用いるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディング

50

との関連で用語「3'末端」とは、オープンリーディングフレームの5'末端へ向かうオープンリーディングフレームの開始コドンから始まる最初の20~250ヌクレオチドを指す。

【0060】

本明細書で用いるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームとの関連で用語「5'近位の」とは、オープンリーディングフレームの3'末端へ向かうオープンリーディングフレームの終止コドンから始まるヌクレオチドを指す。ある実施態様において、用語「5'近位のヌクレオチド」は、オープンリーディングフレームの3'末端へ向かう終始コドンから始まるオープンリーディングフレームの最初の30~250ヌクレオチド内の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30又はそれ以上のヌクレオチドを指す。 10

【0061】

本明細書で用いるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節との関連で用語「5'近位のコード領域」とは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の5'末端から最初の5~450ヌクレオチド、又は5と450の間の任意の整数を指す。具体的実施態様において、5'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の5'末端から最初の5~25ヌクレオチド、又は5と25の間の任意の整数を指す。別の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の5'末端から最初の25~50ヌクレオチド、又は25と50の間の任意の整数を指す。別の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の5'末端から最初の50~100ヌクレオチド、又は50と100の間の任意の整数を指す。別の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の5'末端から最初の50~150ヌクレオチド、又は50と150の間の任意の整数を指す。別の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域の5'末端から最初の100~250ヌクレオチド、又は100と250の間の任意の整数を指す。 20

【0062】

本明細書で用いるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームとの関連で用語「5'末端」とは、オープンリーディングフレームの3'末端へ向かうオープンリーディングフレームの終始コドンから始まる最初の30~250ヌクレオチドを指す。 30

【0063】

本明細書で用いるように、用語「対象」又は「患者」は互換的に用いられ、動物(例えば、トリ、爬虫類及び哺乳類)を指す。具体的実施態様において、対象はトリである。別の実施態様では、対象は、非靈長類(例えば、ラクダ、ロバ、シマウマ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ラット及びマウス)及び靈長類(例えば、サル、チンパンジー及びヒト)を含む哺乳類である。別の実施態様においては、対象はヒトである。別の実施態様では、対象はヒト乳児である。別の実施態様においては、対象はヒト小児である。別の実施態様においては、対象はヒト成人である。別の実施態様においては、対象はヒト高齢者である。別の実施態様においては、対象はヒト以外の動物である(例えば、非-ヒト哺乳類又はトリ)。 40

【0064】

本明細書で用いるように、用語「療法(複数)」及び「療法」は、ウイルス感染若しくは疾患又はそれらに付随する症状の予防又は治療で用いることができる、任意のプロトコール、方法、化合物、組成物、製剤及び/又は薬剤を指すことができる。ある実施態様において、用語「療法(複数)」及び「療法」は、当業者に公知であるウイルス感染若しくは疾患又はそれらに付随する症状の治療又は予防で有用な、生物学的療法、支持療法及び/又は他の療法を指す。一部の実施態様において、用語「療法」は、免疫原性組成物(例えば、インフルエンザウイルスワクチン)を指す。

【0065】

本明細書で用いるように、対象への療法の投与との関連で用語「治療する」、「治療」

50

及び「治療すること」は、療法又は療法の組合せの投与から生じる有益な又は治療的な効果を指す。具体的実施態様において、そのような用語は、療法又は療法の組合せの投与から生じる以下の効果のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又はそれ以上を指す：(i)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付随する症状の重症度の低減又は改善；(ii)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の持続期間の短縮；(iii)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の進行の防止；(iv)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の退行；(v)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の発達又は発症の予防；(vi)インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患又はそれらに付隨する症状の再発の防止；(vii)1つの細胞から別の細胞、1つの組織から別の組織、1つの臓器から別の臓器へのインフルエンザウイルスの伝播の減少又は予防；(viii)1つの対象から別の対象へのインフルエンザウイルスの伝播/伝染の予防又は減少；(ix)インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患に付隨する臓器不全の低減；(x)対象の入院の減少；(xi)入院期間の短縮；(xii)インフルエンザウイルス感染又はそれらに付隨する疾患を伴う対象の生存の延長；(xiii)インフルエンザウイルス感染又はそれらに付隨する疾患の除去；(xiv)インフルエンザウイルス複製の阻害又は低減；(xv)宿主細胞へのインフルエンザウイルスの結合又は融合の阻害又は低減；(xvi)宿主細胞へのインフルエンザウイルスの侵入の阻害又は低減；(xvii)インフルエンザウイルスゲノムの複製の阻害又は低減；(xviii)インフルエンザウイルスタンパク質の合成の阻害又は低減；(xix)インフルエンザウイルス粒子の構築の阻害又は低減；(xx)宿主細胞からのインフルエンザウイルス粒子の放出の阻害又は低減；(xxi)インフルエンザウイルスの力価の低下；(xxii)インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患に関連した症状の数の減少；(xxiii)別の療法の予防又は治療効果の増強、改善、補充、相補、又は増加；(xxiv)インフルエンザウイルス感染に付隨する二次感染症の発症又は進行の防止；並びに/又は、(xxv)インフルエンザウイルス感染に続発する細菌性肺炎の発症の予防又は疾患重症度の減弱。

【0066】

本明細書で用いるように、用語「インフルエンザウイルス遺伝子分節の型」とは、インフルエンザウイルスからのHA、NA、NS、PB1、PB2、PA、M、又はNP遺伝子分節を指す。

【0067】

本明細書で用いるように、一部の実施態様では、ウイルスとの関連で句「野生型」は、蔓延し、循環し、かつ典型的疾患の大流行を天然に生じるウイルスの型を指す。

【図面の簡単な説明】

【0068】

(4. 図面の簡単な説明)

【図1】図1A-1Bは、PR8のPB2パッケージング配列を示す。(A)NheI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの3'非コード領域(NCR)(配列番号:1)及び3'近位のコード領域配列(配列番号:2)のヌクレオチド配列(配列番号:3)。3'NCRには影が付けられ、かつ3'近位のコード領域配列には下線が付けられている。(B)XhoI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの5'NCR(配列番号:4)及び5'近位のコード領域配列(配列番号:5)のヌクレオチド配列(配列番号:6)。5'NCRには影が付けられ、かつ5'近位のコード領域配列には下線が付けられている。いくつかの大文字化された文字は、ATG開始コドンを欠失するために配列に導入された変異を表す。追加大文字化された文字は、XhoI及びNheI制限酵素認識部位内に認められる。

【0069】

【図2】図2A-2Bは、PR8のPB1パッケージング配列を示す。(A)NheI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの3'NCR(配列番号:7)及び3'近位のコード領域配列(配列番号:8)のヌクレオチド配列(配列番号:9)。3'NCRには影が付けられ、かつ3'近位のコード領域配列には下線が付けられている。(B)XhoI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウ

10

20

30

40

50

イルスの5'NCR(配列番号:10)及び5'近位のコード領域配列(配列番号:11)のヌクレオチド配列(配列番号:12)。5'NCRには影が付けられ、かつ5'近位のコード領域配列には下線が付けられている。いくつかの大文字化された文字は、ATG開始コドンを欠失するために配列に導入された変異を表す。追加の大文字化された文字は、Xhol及びNheI制限酵素認識部位内に認められる。

【0070】

【図3】図3A-3Bは、PR8のPAパッケージング配列を示す。(A)NheI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの3'NCR(配列番号:13)及び3'近位のコード領域配列(配列番号:14)のヌクレオチド配列(配列番号:15)。3'NCRには影が付けられ、かつ3'近位のコード領域配列には下線が付けられている。(B)Xhol制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの5'NCR(配列番号:16)及び5'近位のコード領域配列(配列番号:17)のヌクレオチド配列(配列番号:18)。5'NCRには影が付けられ、かつ5'近位のコード領域配列には下線が付けられている。いくつかの大文字化された文字は、ATG開始コドンを欠失するために配列に導入された変異を表す。追加の大文字化された文字は、Xhol及びNheI制限酵素認識部位内に認められる。

10

【0071】

【図4】図4A-4Bは、PR8のHAパッケージング配列を示す。(A)NheI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの3'NCR(配列番号:19)及び3'近位のコード領域配列(配列番号:20)のヌクレオチド配列(配列番号:21)。3'NCRには影が付けられ、かつ3'近位のコード領域配列には下線が付けられている。(B)Xhol制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの5'NCR(配列番号:22)及び5'近位のコード領域配列(配列番号:23)のヌクレオチド配列(配列番号:24)。5'NCRには影が付けられ、かつ5'近位のコード領域配列には下線が付けられている。いくつかの大文字化された文字は、ATG開始コドンを欠失するために配列に導入された変異を表す。追加の大文字化された文字は、Xhol及びNheI制限酵素認識部位内に認められる。

20

【0072】

【図5】図5A-5Bは、PR8のNPパッケージング配列を示す。(A)NheI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの3'NCR(配列番号:25)及び3'近位のコード領域配列(配列番号:26)のヌクレオチド配列(配列番号:27)。3'NCRには影が付けられ、かつ3'近位のコード領域配列には下線が付けられている。(B)Xhol制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの5'非コード領域NCR(配列番号:28)及び5'近位のコード領域配列(配列番号:29)のヌクレオチド配列(配列番号:30)。5'NCRには影が付けられ、かつ5'近位のコード領域配列には下線が付けられている。いくつかの大文字化された文字は、ATG開始コドンを欠失するために配列に導入された変異を表す。追加の大文字化された文字は、Xhol及びNheI制限酵素認識部位内に認められる。

30

【0073】

【図6】図6A-6Bは、PR8のNAパッケージング配列を示す。(A)NheI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの3'NCR(配列番号:31)及び3'近位のコード領域配列(配列番号:32)のヌクレオチド配列(配列番号:33)。3'NCRには影が付けられ、かつ3'近位のコード領域配列には下線が付けられている。(B)Xhol制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの5'NCR(配列番号:34)及び5'近位のコード領域配列(配列番号:35)のヌクレオチド配列(配列番号:36)。5'NCRには影が付けられ、かつ5'近位のコード領域配列には下線が付けられている。いくつかの大文字化された文字は、ATG開始コドンを欠失するために配列に導入された変異を表す。追加の大文字化された文字は、Xhol及びNheI制限酵素認識部位内に認められる。

40

【0074】

【図7】図7A-7Bは、PR8のMパッケージング配列を示す。(A)NheI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの3'NCR(配列番号:37)及び3'近位のコード領域配列(配列番号:38)のヌクレオチド配列(配列番号:39)。3'NCRには影が付けられ、かつ3'近位のコード領域配列には下線が付けられている。(B)Xhol制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウ

50

イルスの5'NCR(配列番号:40)及び5'近位のコード領域配列(配列番号:41)のヌクレオチド配列(配列番号:42)。5'NCRには影が付けられ、かつ5'近位のコード領域配列には下線が付けられている。図7Aにおいて、52位の大文字化された文字は、mRNA 5'スプライス部位を除去するために配列に導入された変異を表す。他の大文字化された文字は、ATG開始コドンを欠失するために配列に導入された変異を表すか、又はXhol及びNheI制限酵素認識部位内に認められる。

【0075】

【図8】図8A-8Bは、PR8のNSパッケージング配列を示す。(A)NheI制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの3'NCR(配列番号:43)及び3'近位のコード領域配列(配列番号:44)のヌクレオチド配列(配列番号:45)。3'NCRには影が付けられ、かつ3'近位のコード領域配列には下線が付けられている。(B)Xhol制限酵素認識部位を持つインフルエンザPR8ウイルスの5'NCR(配列番号:46)及び5'近位のコード領域配列(配列番号:47)のヌクレオチド配列(配列番号:48)。5'NCRには影が付けられ、かつ5'近位のコード領域配列には下線が付けられている。図8Aにおいて、57位の大文字化された文字は、遠位5'スプライス部位を除去するために配列に導入された変異を表す。他の大文字化された文字は、ATG開始コドンを欠失するために配列に導入された変異を表すか、又はXhol及びNheI制限酵素認識部位内に認められる。

【0076】

【図9】図9A-9Bは、PB2に関してオープンリーディングフレーム領域(ORF)パッケージング配列に導入された連続サイレント変異を示す。(A)野生型ORF 3'末端配列(配列番号:49)。 (B)変異したORF 3'末端配列(配列番号:50)。 (C)野生型ORF 5'末端配列(配列番号:51)。 (D)変異したORF 5'末端配列(配列番号:52)。

【0077】

【図10】図10A-10Bは、PB1に関してオープンリーディングフレーム領域(ORF)パッケージング配列に導入された連続サイレント変異を示す。(A)野生型ORF 3'末端配列(配列番号:53)。 (B)変異したORF 3'末端配列(配列番号:54)。 (C)野生型ORF 5'末端配列(配列番号:55)。 (D)変異したORF 5'末端配列(配列番号:56)。

【0078】

【図11】図11A-11Bは、PAに関してオープンリーディングフレーム領域(ORF)パッケージング配列に導入された連続サイレント変異を示す。(A)野生型ORF 3'末端配列(配列番号:57)。 (B)変異したORF 3'末端配列(配列番号:58)。 (C)野生型ORF 5'末端配列(配列番号:59)。 (D)変異したORF 5'末端配列(配列番号:60)。

【0079】

【図12】図12A-12Bは、HAに関してオープンリーディングフレーム領域(ORF)パッケージング配列に導入された連続サイレント変異を示す。(A)野生型ORF 3'末端配列(配列番号:61)。 (B)変異したORF 3'末端配列(配列番号:62)。 (C)野生型ORF 5'末端配列(配列番号:63)。 (D)変異したORF 5'末端配列(配列番号:64)。

【0080】

【図13】図13A-13Bは、NPに関してオープンリーディングフレーム領域(ORF)パッケージング配列に導入された連続サイレント変異を示す。(A)野生型ORF 3'末端配列(配列番号:65)。 (B)変異したORF 3'末端配列(配列番号:66)。 (C)野生型ORF 5'末端配列(配列番号:67)。 (D)変異したORF 5'末端配列(配列番号:68)。

【0081】

【図14】図14A-14Bは、NAに関してオープンリーディングフレーム領域(ORF)パッケージング配列に導入された連続サイレント変異を示す。(A)野生型ORF 3'末端配列(配列番号:69)。 (B)変異したORF 3'末端配列(配列番号:70)。 (C)野生型ORF 5'末端配列(配列番号:71)。 (D)変異したORF 5'末端配列(配列番号:72)。

【0082】

【図15】図15A-15Bは、Mに関してオープンリーディングフレーム領域(ORF)パッケージング配列に導入された連続サイレント変異を示す。(A)野生型ORF 3'末端配列(配列番号:7

10

20

30

40

50

3)。(B)変異したORF 3'末端配列(配列番号:74)。(C)野生型ORF 5'末端配列(配列番号:75)。
。(D)変異したORF 5'末端配列(配列番号:76)。

【0083】

【図16】図16A-16Bは、NSに関してオープンリーディングフレーム領域(ORF)パッケージング配列に導入された連続サイレント変異を示す。(A)野生型ORF 3'末端配列(配列番号:77)。(B)変異したORF 3'末端配列(配列番号:78)。(C)野生型ORF 5'末端配列(配列番号:79)。(D)変異したORF 5'末端配列(配列番号:80)。

【0084】

【図17】図17はインフルエンザウイルスA/WSN/33 HA遺伝子分節(GenBank寄託番号J02176; GI:324199; 配列番号:84)を示す。3'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:81)には下線が付けられ、HAオープンリーディングフレームのヌクレオチド配列(配列番号:82)は標準フォントの文字であり、かつ5'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:83)には二重下線が付けられている。

10

【0085】

【図18】図18は、インフルエンザウイルスA/WSN/33 NA遺伝子分節(GenBank寄託番号J02177; GI:324481; 配列番号:88)を示す。3'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:85)には下線が付けられ、NAオープンリーディングフレームのヌクレオチド配列(配列番号:86)は標準フォントの文字であり、かつ5'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:87)には二重下線が付けられている。

20

【0086】

【図19】図19は、インフルエンザウイルスA/WSN/33 M遺伝子分節(GenBank寄託番号L25814; GI:414302; 配列番号:92)を示す。3'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:89)には下線が付けられ、M1/M2オープンリーディングフレームのヌクレオチド配列(配列番号:90)は標準フォントの文字であり、かつ5'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:91)には二重下線が付けられている。M1のオープンリーディングフレームは、ヌクレオチド26から784である。M2のオープンリーディングフレームは、エキソン1のヌクレオチド26から51及びエキソン2のヌクレオチド740から1007である。

【0087】

【図20】図20は、インフルエンザウイルスA/WSN/33 NS遺伝子分節(GenBank寄託番号Z21498; GI:296585; 配列番号:96)を示す。3'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:93)には下線が付けられ、NS1/NS2オープンリーディングフレームのヌクレオチド配列(配列番号:94)は標準フォントの文字であり、かつ5'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:95)には二重下線が付けられている。NS1のオープンリーディングフレームは、ヌクレオチド27から719である。NS2のオープンリーディングフレームは、エキソン1のヌクレオチド27から56及びヌクレオチド529から864である。

30

【0088】

【図21】図21は、インフルエンザウイルスA/WSN/33 PA遺伝子分節(GenBank寄託番号X17336; GI:60812; 配列番号:100)を示す。3'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:97)には下線が付けられ、PAオープンリーディングフレームのヌクレオチド配列(配列番号:98)は標準フォントの文字であり、かつ5'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:99)には二重下線が付けられている。

40

【0089】

【図22】図22は、インフルエンザウイルスA/WSN/33 PB1遺伝子分節(GenBank寄託番号J02178; GI:324899; 配列番号:104)を示す。3'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:101)には下線が付けられ、PB1オープンリーディングフレームのヌクレオチド配列(配列番号:102)は標準フォントの文字であり、かつ5'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:103)には二重下線が付けられている。

【0090】

【図23】図23は、インフルエンザウイルスA/WSN/33 PB2遺伝子分節(GenBank寄託番号J02179; GI:324913; 配列番号:108)を示す。3'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:105)には

50

下線が付けられ、PB2オーブンリーディングフレームのヌクレオチド配列(配列番号:106)は標準フォントの文字であり、かつ5'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:107)には二重下線が付けられている。

【0091】

【図24】図24は、インフルエンザウイルスA/WSN/33 NP遺伝子分節(GenBank寄託番号M30746; GI:324676; 配列番号:112)を示す。3'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:109)には下線が付けられ、NPオーブンリーディングフレームのヌクレオチド配列(配列番号:110)は標準フォントの文字であり、かつ5'NCRのヌクレオチド配列(配列番号:111)には二重下線が付けられている。

【0092】

【図25】図25A-25Fは、独立して再集合することができるHA及びNSキメラ分節を保有する組換えSwap(wt)ウイルスの作製を示す。(A)NS-HAwt-NS構築体及びHA-NSwt-HA構築体。A/PR/8/34HA野生型(HAwt)ORF(斜線付き)は、NS3'NCR、NS5'NCR、並びにNS ORFパッケージングシグナルの77nt、102nt(赤色)に隣接され、長さ1941ntのNS-HAwt-NS構築体を作製し；同様に、NS野生型(NSwt)ORF(直線)は、HA3'NCR、HA5'NCR、並びにHA ORFパッケージングシグナルの67nt、105nt(斜線付き)に隣接され、長さ1099ntのHA-NSwt-HA構築体を作製する。HA及びNS翻訳開始コドンの上流のATG(ポジティブセンス)は全て、TTG(ポジティブセンス)に変異された。NS-HAwt-NS構築体中のNSパッケージングシグナルの77nt部分上の5'スプライスも変異された。(B)Swap(wt)ウイルスのゲノム構造。6つのA/PR/8/34アンビセンスプラスミド(Gao Q, Brydon EW, Palese Pの文献、「C型インフルエンザウイルス糖タンパク質HEFを発現する7-分節化されたA型インフルエンザウイルス(A seven-segmented influenza A virus expressing the influenza C virus glycoprotein HEF)」、J Virol. 82: 6419-6426(2008)、Quinlivan Mらの文献、「NS1タンパク質の切断によるウマインフルエンザウイルスの弱毒化(Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein)」、J Virol. 79:8431-8439(2005)、Kopecky-Bromberg SAらの文献、「弱毒化インフルエンザウイルス生ワクチンのアジュバントとしての-C-ガラクトシルセラミド(Alpha-C-galactosylceramide as an adjuvant for a live attenuated influenza virus vaccine)」、Vaccine 27: 3766-3774 (2009))、並びにNS-HAwt-NS及びHA-NSwt-HA構築体を使用し、Swap(wt)ウイルスが作製される(NS-HAwt-NS RNA分節の配列決定は、3'末端の1つの変異G81Uを明らかにした。HA-NSwt-HA RNA分節に関してヌクレオチド変化は同定されなかった。)。(C)7つのA/PR/8/34 RNA及びHA-NSwt-HA RNAを含む、再集合体(NS)ウイルスのゲノム構造。(D)7つのA/PR/8/34 RNA及びNS-HAwt-NS分節を含む、再集合体(HA)ウイルスのゲノム構造。(E)組換えウイルスによりMDCK細胞内で形成されたブラークの免疫染色。(F)卵内における、37°での、組換えウイルスの増殖率。

【0093】

【図26】図26A-26Eは、独立して再集合することができないHA及びNSキメラ分節を保有する組換えSwap(mut)ウイルスの作製を示す。(A)NS-HAmut-NS構築体及びHA-NSmut-HA構築体。この戦略は、ORF領域が連続同義的変異を含んだ点以外は、図17Aに説明されたものと同じであった：NS-HAmut-NS構築体は、3'末端及び5'末端に、各々、22nt及び45ntの変化を保有し；HA-NSmut-HA構築体は、NS ORFに12nt及び15ntの変化を有した。(B)Swap(mut)ウイルスのゲノム構造。ゲノム組成は、NS-HAmut-NS構築体及びHA-NSmut-HA構築体が救出のために置換されている点以外は、Swap(wt)ウイルス(図17B)のものに類似している。[Swap(mut)ウイルスのNS-HAmut-NS RNAの配列決定は、3'末端の8つのAからGの変異を明らかにした。NS-HAmut-NS RNAの3'末端130ntの配列は下記である：

【化1】

3'-ucguuuuucguccacuguuucuguauGaccuaggguugugacacaguucGGagucgaucuaacgGGagaaaccga
acaggcguuugcuacaacgcugcugguucucgGucguacuuucgcuuGGacaaucaa (配列番号:113;
大文字化されたGは、ウイルスRNAにおいて認められた変化を示している)

10

20

30

40

50

。HA-NSmut-HA RNA分節に関して、NS 3' ORF領域に2つの変換が認められる：ValのAlaへのアミノ酸変化を生じるA122G；及び、サイレントである、U318C】。(C)MDCK細胞におけるSwap(mut)ウイルスのブラーク表現型。(D)10日齢の胚発育鶏卵における、37¹⁰での、組換えウイルスの増殖率。(E)2つの仮想再集合体ウイルスの救出の失敗。左側の実験は、7つのA/PR/8/34プラスミド(Gao Q, Brydon EW, Palese Pの文献、「C型インフルエンザウイルス糖タンパク質HEFを発現する7-分節化されたA型インフルエンザウイルス」、J Virol, 82: 6419-6426 (2008)、Quinlivan Mらの文献、「NS1タンパク質の切断によるウマインフルエンザウイルスの弱毒化」、J Virol, 79: 8431-8439 (2005)、Kopecky-Bromberg SAらの文献、「弱毒化インフルエンザウイルス生ワクチンのアジュバントとしての-C-ガラクトシルセラミド」、Vaccine 27: 3766-3774 (2009))、及びHA-NSmut-HA構築体を使用し、かつ右側の実験は、7つのA/PR/8/34プラスミド(Gao Q, Brydon EW, Palese Pの文献、「C型インフルエンザウイルス糖タンパク質HEFを発現する7-分節化されたA型インフルエンザウイルス」、J Virol, 82: 6419-6426 (2008)、Quinlivan Mらの文献、「NS1タンパク質の切断によるウマインフルエンザウイルスの弱毒化」、J Virol, 79: 8431-8439 (2005)、Kopecky-Bromberg SAらの文献、「弱毒化インフルエンザウイルスワクチンのアジュバントとしての-C-ガラクトシルセラミド」、Vaccine 27: 3766-3774 (2009))、及びNS-HAmut-NSを使用した。

【0094】

【図27】図27A-27Eは、組換えウイルスのvRNAゲノムパッケージング効率の解析を示す。5種の組換えウイルス[rA/PR/8/34(A)、Swap(wt)(B)、再集合体(NS)(C)、再集合体(HA)(D)、及びSwap(mut)(E)]を、卵において、37²⁰で増殖させ、精製されたウイルスRNAを、2.8%アクリルアミドゲル上で分離し(0.5 μg/レーン)、かつ銀染色により可視化した。rA/PR/8/34ウイルス(A)及びSwap(mut)ウイルス(E)由来のRNAは、1個のゲル上で分離し、他の3種のウイルス[Swap(wt)(B)、再集合体(NS)(C)、再集合体(HA)(D)]由来のRNAは、別のゲルで分離した。

【0095】

【図28】図28A-28Eは、Swap(wt)ウイルスのキメラNS分節は、感染細胞において再集合することができるが、Swap(mut)ウイルスのそれはできないことを示す。(A)同時感染実験の概略図。(B)キメラ及び野生型HA分節を検出するための、RT-PCRプライマーデザイン。RT-PCR産物は、NS-HAwt-NS分節又はNS-HAmut-NS分節について長さ824bpであり、かつ野生型HAについて747bpである。(C)キメラ及び野生型NS分節を検出するための、RT-PCRプライマーデザイン。キメラ及び野生型NS分節に関するRT-PCR産物は、各々、405bp及び326bpである。(D)Swap(wt)及びrA/PR/8/34ウイルスの同時感染実験。24の単独ブラークを、(B)及び(C)に示されたプライマーを使用し、RT-PCR(10がゲルに示された)により特徴付けた。rA/PR/8/34ウイルス及びSwap(wt)ウイルスは、RT-PCR対照に使用した(2番目及び3番目のレーン)。Mはマーカー。(E)Swap(mut)及びrA/PR/8/34の同時感染実験。48の単独ブラークを、RT-PCR(10がゲルに示された)により特徴付けた。野生型又はキメラNS PCR産物の下側のバンドは、PCR反応の人工副産物である。³⁰

【0096】

【図29】図29A-29Hは、9番目のGFP分節を伴うインフルエンザウイルスの作製を示す。(A)NA-PB1mut-NA、NA-PB2mut-NA、NA-PAmut-NA、PB1-GFP-PB1、PB2-GFP-PB2及びPA-GFP-PA構築体の作製。NA-PB1mut-NA、NA-PB2mut-NA、NA-PAmut-NA構築体を作製するために、PB1mut、PB2mut又はPAmut ORF領域が、PCRにより得られ、かつ連続サイレント変異が、3'及び5'近位領域に導入された：PB1mutについて24nt及び17nt；PB2mutについて13nt及び36nt；並びに、PAmutについて19nt及び19nt(7.1節参照)。次にPB1mut、PB2mut又はPAmut ORFは、3'末端でNAパッケージング配列の179nt及び5'末端でNAパッケージング配列の215ntにより隣接された。NAパッケージング配列の179ntに位置したATGは全て、TTGに変異された。PB1-GFP-PB1、PB2-GFP-PB2及びPA-GFP-PA構築体を作製するために、GFP ORF領域は、各々、PB1、PB2及びPAパッケージング配列に隣接された。PB1パッケージング配列は、PB1 3'末端の153nt及びPB1 5'末端の159ntを含み；PB2パッケージング配列は、PB2 3'末端の15⁴⁰nt及びPB2 5'末端の159ntを含み；PB2パッケージング配列は、PB2 3'末端の15ntを含み。

8nt及びPB2 5'末端の169ntを含み；かつ、PAパッケージング配列は、PA 3'末端の129nt及びPA 5'末端の184ntを含んだ。PB1、PB2及びPAパッケージング配列の3'末端に位置したATGは全て、TTGに変異された。各構築体の翻訳開始コドン及び終始コドンは、矢印で示されている。(B)-PB1(ps)及び-PB1(ps)+GFPウイルスのゲノム構造。7つのA/PR/8/34アンビセンスプラスミド(pDZ-PB2、pDZ-PA、pDZ-HA、pDZ-NP、pDZ-NA、pDZ-M、pDZ-NS)、及び1つのキメラ構築体NA-PB1mut-NAを使用し、逆遺伝学を用いることにより-PB1(ps)ウイルスが作製された(Fodorらの文献、J Virol, 73: 9679-82 (1999) ; Quinlivanらの文献、J Virol, 79: 8431-9 (2005))。-PB1(ps)+GFPウイルスの救出のために、9番目のPB1-GFP-PB1構築体が含まれた。(C)-PB2(ps)+GFPウイルスのゲノム構造。Bにおける-PB1(ps)+GFPウイルスと同様に、このウイルスは、野生型PB2の代わりにキメラNA-PB2mut-NA分節、7つのA/PR/8/34分節(PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS)及び9番目のPB2-GFP-PB2キメラ分節を含んだ。9番目のPB2-GFP-PB2分節を欠いているウイルスは、救出されなかった。(D)-PA(ps)及び-PA(ps)+GFPウイルスのゲノム構造。Bにおける-PB1(ps)と同様に、-PA(ps)ウイルスは、野生型PAの代わりにキメラNA-PAmut-NA分節、及び7つのA/PR/8/34分節(PB2、PB1、HA、NP、NA、M、NS)を含んだ。-PA(ps)+GFPウイルスは、9番目のPA-GFP-PAキメラ分節を含んだ。(E)10日齢の胚発育鶏卵における、37での、ウイルスの増殖曲線。エラーバーは、標準偏差を表す。(F)感染後2日目の組換えウイルスによりMDCK細胞において形成されたブラークの免疫染色。(G)感染後1日目の293T細胞における組換えウイルスのGFP発現(MOI 0.5)。感染に使用したウイルスは、卵内で5~10回継代された。(H)10日齢の胚発育鶏卵内において37で増殖されたウイルスの赤血球凝集アッセイ。
10
20

【0097】

【図30】図30A-30Hは、H1及びH3亜型HAの両方を保有する9-分節化されたインフルエンザウイルスの作製を示す。(A)PB1-HA(HK)-PB1構築体及びPB2-HA(HK)-PB2構築体の作製。A/HK/1/68 HA ORFを、PCRにより、pCAGGS-HK HAプラスミド(Wangらの文献、2009, PLoS Pathog 6: e1000796)から増幅し、かつ図29AにおけるPB1-GFP-PB1構築体及びPB2-GFP-PB2構築体のGFP ORFを入れ替えるために使用し、PB1-HA(HK)-PB1構築体及びPB2-HA(HK)-PB2構築体を作製した。(B)-PB1(ps)+HK HAウイルスのゲノム構造。図29Bにおける-PB1(ps)+GFPウイルスと同様に、このウイルスは、野生型PB1の代わりにキメラNA-PB1mut-NA分節、7つのA/PR/8/34分節(PB2、PA、HA、NP、NA、M、NS)及び9番目のPB1-HA(HK)-PB1キメラ分節を含んだ。(C)-PB2(ps)+HK HAウイルスのゲノム構造。キメラPB2-HA(HK)-PB2分節を、図29Cにおける-PB2(ps)+GFPウイルスのPB2-GFP-PB2を入れ替えるために使用し、-PB2(ps)+HK HAウイルスを作製した。(D)10日齢の胚発育鶏卵における、37での、ウイルスの増殖曲線。エラーバーは、標準偏差を表す。(E)精製されたビリオン中のA/PR/8/34 HA及びA/HK/1/68 HAを検出するためのウェスタンプロット。ウイルス[rA/PR/8/34、X31、-PB2(ps)+HK HA、及び-PB1(ps)+HK HA]は、卵において、37で増殖させ、かつ30%ショ糖クッショングリセロール、5% -メルカプトエタノール及び0.2%プロモフェノールブルー]を行い、収集し、かつ10%SDS PAGEゲル上を泳動した。A/PR/8/34 HA0、NP、及びA/HK/1/68 HA0は、各々、モノクローナル抗体PY102、HT103及び66A6により検出した(O'Neillらの文献、1998, Embo J 17: 288-96 ; Wangらの文献、2009, PLoS Pathog 6: e1000796 ; Wangらの文献、2009, PLoS Pathog 6: e1000796)。(G)H1及びH3亜型両HAタンパク質が-PB1(ps)+HK HA及び-PB2(ps)+HK HAウイルスの同じ粒子へ取り込まれたかどうかを決定する、H1/H3サンドイ
30
40
50

ツチELISA(7.1節参照)。エラーバーは、標準偏差を表す。(H)組換えウイルスのvRNAゲノムパッケージング効率の解析。4種の組換えウイルス[rA/PR/8/34、X31、-PB1(ps)+HK HA及び-PB2(ps)+HK HA]を、卵において、37℃で増殖させ、精製されたウイルスRNAを、2.8%アクリルアミドゲル上で分離し(0.5 μg/レーン)、かつ銀染色により可視化した。rRNAバンドは、サイズ及び先に報告された知見を基に確認した。「?」で印をつけた追加バンドのアイデンティティは不明である。

【0098】

【図31】図31A-31Dは、-PB1(ps)+HK HAウイルスによるマウスの免疫は、rA/PR/8/34及びX31ウイルスの致死的チャレンジからの完全な防御をもたらしたことを示す。(A)10日齢の胚発育鶏卵における、37℃での、ウイルスの増殖曲線。(B)-PB1(ps)+HK HA及び-PB1(ps)+Lucウイルスの病原性。C57BL/6マウス群には、PBS、-PB1(ps)+HK HAウイルス、又は-PB1(ps)+Lucウイルスを、10³又は10⁴PFUで、鼻腔内経路により与え、体重減少及び疾患兆候について2週間観察した。各群の動物の平均体重は、当初の体重の割合として示している。(C)rA/PR/8/34ウイルスチャレンジ実験、感染の3週間後、PBS、10³ PFU-PB1(ps)+HK HAウイルス、及び10³ PFU-PB1(ps)+Lucウイルスを受け取ったマウスの群を、rA/PR/8/34ウイルス100 MLD₅₀により、鼻腔内にチャレンジした。その後マウスを、体重減少及び疾患兆候について、2週間毎日観察した。(D)X31ウイルスチャレンジ実験。X31ウイルスチャレンジは、マウス群を、rA/PR/8/34ウイルスの代わりに、X31ウイルスの33 MLD₅₀を用いチャレンジする以外は、(C)のように行った。A-Dのエラーバーは、標準偏差を表す。

【0099】

【図32】図32は、キメラ遺伝子分節の核酸配列を示す。(A)NA-PB1mut-NAの核酸配列(配列番号:119)。(B)NA-PB2mut-NAの核酸配列(配列番号:120)。(C)NA-PAmut-NAの核酸配列(配列番号:121)。(D)PB1-GFP-PB1の核酸配列(配列番号:122)。(E)PB2-GFP-PB2の核酸配列(配列番号:123)。(F)PA-GFP-PAの核酸配列(配列番号:124)。(G)PB1-HA(HK)-PB1の核酸配列(配列番号:125)。(H)PB2-HA(HK)-PB2の核酸配列(配列番号:126)。(I)PB1-Luc-PB1の核酸配列(配列番号:127)。

【0100】

【図33】図33は、MDCK細胞において-PB2(ps)+GFP及び-PB1(ps)+GFPウイルスにより形成されたGFP発現しているプラーカの割合を示す。通常のプラーカアッセイを行い、プラーカの免疫染色を行い、10日齢卵における1及び5継代での両方のウイルスの力価を測定した。この手法において、Mab HT 103(抗-A/PR/8/34 NP)を使用した。

【0101】

【図34】図34は、MDCK細胞における-PB1(ps)+Lucウイルスによるウミシイタケルシフェラーゼの発現を示す。6-ウェルプレート中のMDCK細胞を、-PB1(ps)+GFP又は-PB1(ps)+Lucウイルスにより、MOI 5で感染した。16時間後、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を、ウミシイタケルシフェラーゼアッセイシステム(Promega社)を用い、測定した。

【0102】

【図35】図35は、NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、M-NPmut-M、PA-NAmut-PA、NP-Mmut-NPを保有するキメラプラスミド、並びに野生型A/PR/8/34 HA及びNS分節を保有する2つのプラスミドによる293T細胞のトランスフェクションにより作製された組換えインフルエンザウイルスのキメラ遺伝子分節を示す。

【0103】

【図36】図36は、NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、NS-HAmut-NS、PA-NAmut-PA、HA-NSmut-HA、並びに2つの野生型A/PR/8/34 NP及びM分節を保有するキメラプラスミドによる293T細胞のトランスフェクションにより作製された組換えインフルエンザウイルスのキメラ遺伝子分節を示す。

【0104】

【図37】図37は、NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、NP-HAmut-NP、NS-NPmut-NS、PA-NAmut-PA、HA-NSmut-HA、及び1つの野生型A/PR/8/34 M分節を保有するキメラプラスミドによる293T細胞のトランスフェクションにより作製された組換えインフルエン

10

20

30

40

50

ンザウイルスのキメラ遺伝子分節を示す。

【0105】

【図38】図38は、PB2、PB1、PA、HA、NP、PA-NAmut-PA、M、NS分節に加え、NA-GFP ORF-NA又はNA-HK HA ORF-NA分節を保有するキメラプラスミドによる293T細胞のトランスフェクションにより作製された組換えインフルエンザウイルスのキメラ遺伝子分節を示す。

【発明を実施するための形態】

【0106】

(5. 詳細な説明)

本明細書では、組換えインフルエンザウイルスの作製において有用である、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節及びそのようなキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節をコードしている核酸配列が説明される。特に、2種以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節若しくはそれらの相補体、又はそのような遺伝子分節をコードしている核酸配列若しくはそれらの相補体は、組換えインフルエンザウイルスの製造において使用されることができる。いかなる理論によっても束縛されることなく、前記2種以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、本組換えインフルエンザウイルスの複製の間に一緒に分離(すなわち、同時分離)され、その結果この組換えインフルエンザウイルスは、当業者に公知の技術により決定されるように、他のインフルエンザウイルス(例えば、野生型インフルエンザウイルス)と再集合する能力が低下するか、又は他のインフルエンザウイルスと再集合することができない。そのような組換えインフルエンザウイルスの他のインフルエンザウイルスと再集合する低下した能力又は不能は、弱毒化生ワクチンとしてのその組換えインフルエンザウイルスの安全性を向上することができる。従ってそのような組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス疾患の予防、インフルエンザウイルス疾患若しくはインフルエンザウイルス感染の治療、又はそれらの両方のいずれかにおいて有用であることができる。

10

20

【0107】

(5.1 核酸)

本明細書において、2つのインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの誘導体のコード領域及び非コード領域のキメラである核酸配列、又はそれらの相補体が提供される。同じく本明細書において、2つのインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの誘導体のコード領域及び非コード領域のキメラをコードしている核酸配列、又はそれらの相補体も提供される。ある態様において、本明細書に提供される核酸配列は：(a)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'及び5'非コード領域又はそれらの相補体に認められるパッケージングシグナル、(b)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列又はそれらの相補体、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列又はそれらの相補体、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'及び5'近位の両方のコード領域配列又はそれらの相補体に認められるパッケージングシグナル、並びに、(c)第2の異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体からのオープンリーディングフレーム又はそれらの断片：を含むか又はコードし、ここで該オープンリーディングフレームは、そのオープンリーディングフレーム内に認められるインフルエンザウイルスパッケージングシグナル中に1、2、3又はそれ以上の変異を含む。第1及び第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節は、2つの異なるインフルエンザウイルス遺伝子分節をいう。例えば第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節は赤血球凝集素(HA)インフルエンザウイルス遺伝子分節であってよく、かつ第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNSインフルエンザウイルス遺伝子分節であってよい。ある実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつこのオープンリーディングフレームとインフレームで翻訳される。別の実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつ翻訳されない。一部の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、任意の開始コドンを除去し、かつ3'近位のコード領域配列の翻訳を妨げるように、変異されている。ある実施態様において、3'近位のコード領域は、インフ

30

40

50

ルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。一部の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、5'近位のコード領域配列が翻訳されないことを確実にするために、1以上の変異を有する。具体的実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又はそれらの断片に導入された変異は、サイレント変異である。

【0108】

10

インフルエンザウイルス遺伝子分節パッケージングシグナルは公知である。加えて、インフルエンザウイルス遺伝子分節パッケージングシグナルを同定する技術は周知であり、その例は下記5.8節に説明されている。ある実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、それからパッケージングシグナルが得られるか又は誘導される野生型インフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングに対し、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の効率で、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングを実現するのに十分な、1つの型のインフルエンザウイルス分節の非コード領域及びコード領域に認められるパッケージングシグナルを含む。具体的実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、同じ型のアッセイ条件下での精製されたvRNAのアクリルアミドゲル電気泳動により決定されるように、それからパッケージングシグナルが得られるか又は誘導される野生型インフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングに対し、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の効率で、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングを実現するのに十分である、1つの型のインフルエンザウイルス分節の非コード領域及びコード領域に認められるパッケージングシグナルを含む。一部の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、それからパッケージングシグナルが得られるか又は誘導される野生型インフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングに対し、10%～50%、10%～75%、10%～90%、10%～95%、10%～99.5%、25%～50%、25%～75%、25%～90%、25%～99.5%、50%～75%、50%～90%、又は50%～99.5%の効率で、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングを実現するのに十分である、1つの型のインフルエンザウイルス分節の非コード領域及びコード領域に認められるパッケージングシグナルを含む。具体的実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、同じ型のアッセイ条件下での精製されたvRNAのアクリルアミドゲル電気泳動により決定されるように、それからパッケージングシグナルが得られるか又は誘導される野生型インフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングに対し、10%～50%、10%～75%、10%～90%、10%～95%、10%～99.5%、25%～50%、25%～75%、25%～90%、25%～99.5%、50%～75%、50%～90%、又は50%～99.5%の効率で、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングを実現するのに十分である、1つの型のインフルエンザウイルス分節の非コード領域及びコード領域に認められるパッケージングシグナルを含む。他の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、それからパッケージングシグナルが得られるか又は誘導される野生型インフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングと同じ効率で、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングを実現するのに十分である、1つの型のインフルエンザウイルス分節の非コード領域及びコード領域に認められるパッケージングシグナルを含む。具体的実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、同じ型のアッセイ条件下での精製されたvRNAのアクリルアミドゲル電気泳動により決定されるように、それからパッケージングシグナルが得られるか又は誘導される野生型インフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングと同じ効率で、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節のパッケージングを実現するのに十分である、1

20

30

40

50

つの型のインフルエンザウイルス分節の非コード領域及びコード領域に認められるパッケージングシグナルを含む。言及されたアクリルアミドゲル電気泳動に関して、ウイルスは、精製及びRNA単離され、かつ2.8%変性ポリアクリルアミドゲル上を泳動させることができ、これは次に銀染色キット(Invitrogen社)により染色されることができる(そのようなアッセイの説明に関して、例えば、Gaoらの文献、2008, J. Virol. 82: 6419-6426; Gaoらの文献、2009, PNAS USA 106(37): 15891-6; 及び、本明細書の実施例1を参照されたい)。

【0109】

具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、以下のものを、記載された順番で含むか又はコードしている：(a)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域(本明細書において「3'NCR1」と称される)又はそれらの誘導体に認められるパッケージングシグナル、又はそれらの相補体、(b)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列(本明細書において「3'CRS1」と称される)又はそれらの誘導体に認められるパッケージングシグナル、又はそれらの相補体、(c)オープンリーディングフレームが、そのオープンリーディングフレーム内に認められるインフルエンザウイルスパッケージングシグナル中に1、2、3又はそれ以上の変異を含む、第2の異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの誘導体に由来するオープンリーディングフレーム(本明細書において「mORF」と称される)又はそれらの断片、又はそれらの相補体、(d)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列(本明細書において「5'CRS1」と称される)又はそれらの誘導体に認められるパッケージングシグナル、又はそれらの相補体、並びに(e)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域(本明細書において「5'NCR1」と称される)又はそれらの誘導体に認められるパッケージングシグナル、又はそれらの相補体。第1及び第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節は、2つの異なるインフルエンザウイルス遺伝子分節を指す。ある実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、オープンリーディングフレームとインフレームで翻訳される。他の実施態様において、3'及び5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつ翻訳されない。一部の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、任意の開始コドンを除去し、かつ3'近位のコード領域配列の翻訳を妨げるよう変異されている。ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的な実施態様において、3'近位のコード領域は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するよう変異されている。別の具体的な実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスマ遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するよう変異されている。一部の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、5'近位のコード領域配列が翻訳されないことを確実にするために、1以上の変異を有する。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームに導入された変異は、サイレント変異である。

【0110】

一態様において、本明細書に提供される核酸配列は、以下の組み合わせを含むか又はコードすることができる：(i)1つの型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来の下記のもの又はそれらの相補体：5'及び3'非コード領域、並びに翻訳されないために任意の開始コドンが除去された3'近位のコード領域配列、翻訳されない5'近位のコード領域配列のいずれか、又は翻訳されないために任意の開始コドンが除去された3'近位のコード領域配列及び翻訳されない5'近位のコード領域配列の両方；並びに、(ii)1、2、3又はそれ以上の変異を伴う異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド若しくはそれらの相補体、1、2、3又はそれ以上の変異を伴う異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド若しくはそれらの相補体のいずれか、又は1、2、3又はそれ以上の変異を伴う異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来の才

10

20

30

40

50

ープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド又はそれらの両方の相補体。ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。一部の実施態様において、そのような核酸配列は、異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由來したオープンリーディングフレームの3'近位20ヌクレオチド及び/又は5'近位30ヌクレオチドとインフレームであるヌクレオチド配列(例えば異種ヌクレオチド配列)を操作するための鋳型として使用することができる。別の言い方をすると、鋳型キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節若しくはそれらの相補体、又はこの遺伝子分節をコードしている核酸若しくはそれらの相補体は、異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び/又は5'近位のヌクレオチドとインフレームでヌクレオチド配列(例えば異種ヌクレオチド配列)を取り込むための基礎として使用することができ、その結果全体のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節若しくはそれらの相補体、又はこれをコードしている核酸は、毎回作製される必要はない。本キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節若しくはそれらの相補体、又はこの遺伝子分節若しくはそれらの相補体をコードしている核酸は、異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び/又は5'近位のヌクレオチドとインフレームで異種ヌクレオチド配列の取り込みを可能にする1、2又はそれ以上の制限酵素部位を含むことができる。具体的実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、異なるインフルエンザウイルスの型又は菌株由来のコード配列、又はそれらの相補体を含むか又はコードしている。

【0111】

一実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、以下を含む、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節である：

(i) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域(NCR)若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリングエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、3'NCR1；

(ii) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリングエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる、3'CRS1であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii)(a) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20が変異されているもの、並びに/又は(b) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド、又は第2の型のインフ

10

20

30

40

50

ルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの5'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30が変異されているもの：を含むか又はこれらからなる、mORF；並びに

(iv) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、5'NCR1。

第1及び第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節は、赤血球凝集素(HA)、ノイラミニダーゼ(NA；A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、及びNPのインフルエンザウイルス遺伝子分節のいずれか2つを指すことができる。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスHA遺伝子分節であり、かつ第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスNS遺伝子分節であることができる。具体的実施態様において、第2のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び/又は5'近位のヌクレオチドに導入された変異は、サイレント変異である。ある実施態様においては、(i)から(v)の間に挿入される追加のヌクレオチドはない。ある実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0112】

別の実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、以下を含む、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節である：

(i) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、3'NCR1；

(ii)(a) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20が変異されているもの、並びに/又は(b) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの5'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30が変異されているもの

10

20

30

40

50

:を含むか又はこれらからなる、mORF；

(iii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる、5'CRS1であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、5'NCR1。

第1及び第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節は、HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、及びNPのインフルエンザウイルス遺伝子分節のいずれか2つを指すことができる。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスHA遺伝子分節であり、かつ第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスNS遺伝子分節であることができる。具体的実施態様において、第2のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドに導入された変異は、サイレント変異である。ある実施態様においては、(i)から(v)の間に挿入される追加のヌクレオチドはない。ある実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスマ遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0113】

具体的実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、以下を含む、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節である：

(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、3'NCR1；

(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる、3'CRS1であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii)(a)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及び異種ヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20が変異されているもの、並びに/又は(b)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの5'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30が変異されているもの：を含むか又はこれらからなる、mORF；

(iv) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリングエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる、5'CRS1であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリングエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、5'NCR1。

第1及び第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節は、HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、及びNPのインフルエンザウイルス遺伝子分節のいずれか2つを指すことができる。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスHA遺伝子分節であり、かつ第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスNS遺伝子分節であることができる。具体的実施態様において、第2のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドに導入された変異は、サイレント変異である。ある実施態様においては、(i)から(v)の間に挿入される追加のヌクレオチドはない。ある実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0114】

別の実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、以下を含む、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節である：

(i) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリングエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、3'NCR1；

(ii) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第1

の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる、3'CRS1であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの;

(iii)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているものを含むか又はこれらからなる、mORF; 並びに

(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、5'NCR1。

第1及び第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節は、HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、及びNPのインフルエンザウイルス遺伝子分節のいずれか2つを指すことができる。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスHA遺伝子分節であり、かつ第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスNS遺伝子分節であることができる。具体的実施態様において、第2のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドに導入された変異は、サイレント変異である。ある実施態様においては、(i)から(v)の間に挿入される追加のヌクレオチドはない。ある実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0115】

別の実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、以下を含む、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節である:

(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域(NCR)若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、3'NCR1;

(ii)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているものを含むか又はこれらからなる、mORF;

(iii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なく

10

20

30

40

50

とも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる、5'CRS1であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、5'NCR1。

第1及び第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節は、HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、及びNPのインフルエンザウイルス遺伝子分節のいずれか2つを指すことができる。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスHA遺伝子分節であり、かつ第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスNS遺伝子分節であることができる。具体的実施態様において、第2のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドに導入された変異は、サイレント変異である。ある実施態様においては、(i)から(v)の間に挿入される追加のヌクレオチドはない。ある実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0116】

具体的実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、以下を含む、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節である：

(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、3'NCR1；

(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる、3'CRS1であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているものを含むか又はこれらからなる、mORF；

(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50% (

10

20

30

40

50

一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリングエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる、5'CRS1であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリングエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる、5'NCR1。

第1及び第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節は、HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、及びNPのインフルエンザウイルス遺伝子分節のいずれか2つを指すことができる。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスHA遺伝子分節であり、かつ第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はインフルエンザウイルスNS遺伝子分節であることができる。具体的実施態様において、第2のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドに導入された変異は、サイレント変異である。ある実施態様においては、(i)から(v)の間に挿入される追加のヌクレオチドはない。ある実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'CRS1は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0117】

本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、及びNPのいずれか2つのインフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域及び非コード領域又はそれらの誘導体のキメラができる。キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を作るコード領域及び非コード領域は、同じインフルエンザウイルス型又は同じインフルエンザウイルス株から得るか又は誘導することができる。同じくキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を作るコード領域及び非コード領域は、異なるインフルエンザウイルス型、異なるインフルエンザウイルス亜型又は異なるインフルエンザウイルス株から得るか又は誘導することができる。キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を作るコード領域及び非コード領域は、季節性又は汎流行性のインフルエンザウイルス株から得るか又は誘導することができる。

【0118】

一実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を作るコード領域及び非コード領域は、A型インフルエンザウイルスから得られるか又は誘導される(例えばA型インフルエンザウイルスについて下記5.2節参照)。別の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を作るコード領域及び非コード領域は、同じA型インフルエンザウイルス株から得られるか又は誘導される。別の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を作るコード領域及び非コード領域は、同じHA及び/又はNA亜型から得られるか又は誘導される。例えばコード領域及び非コード領域は、H1N1亜型のA型インフルエンザウイルス由来であることができる。

【0119】

具体的実施態様において、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、若しくはC型インフルエンザウイルス由来の3'及び/若しくは5'NCRは、同じ菌株又は亜型

10

20

30

40

50

のものであり；並びに/又は、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、若しくはC型インフルエンザウイルス由来の3'及び/若しくは5'近位のコード領域配列は、同じ菌株又は亜型のものである。

【0120】

別の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を作るコード領域及び非コード領域は、B型インフルエンザウイルスから得られるか又は誘導される(例えばB型インフルエンザウイルスについて下記5.2節参照)。別の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を作るコード領域及び非コード領域は、同じB型インフルエンザウイルス株から得られるか又は誘導される。別の実施態様において、キメラインフルエンザウイルスから得られるか又は誘導される(例えばC型インフルエンザウイルスについて下記5.2節参照)。別の実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を作るコード領域及び非コード領域は、同じC型インフルエンザウイルス株から得られるか又は誘導される。

10

【0121】

本明細書に提供される核酸配列は、ゲノム分節(すなわちネガティブセンスRNA)又はアンチゲノム分節(すなわちポジティブセンスRNA)の形であることができる。本明細書に提供される核酸配列は同じく、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードすることができる。一実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節である。別の実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の相補体を含む。別の実施態様において、本明細書に提供される核酸配列は、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている。

20

【0122】

ある実施態様において、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている核酸配列は、2シストロン性であり、かつふたつの配列の発現を可能にする。別の言い方をすると、この核酸配列は、mORF及び別のオープニングリーディングフレーム(例えば、異種タンパク質をコードしているオープニングリーディングフレーム)をコードしている。一実施態様において、そのような核酸配列は、mORFの後及び他方のオープニングリーディングフレームの前に、配列内リボソーム侵入部位(IRES)を含む。

30

【0123】

ある実施態様において、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている核酸配列は、プロモーターを含む。プロモーターの具体例には、RNAポリメラーゼIプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、T7プロモーター及びT3プロモーターが挙げられる。具体的実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている核酸配列は、ヒトRNAポリメラーゼIプロモーターを含む。ある実施態様において、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている核酸配列は、転写終結配列を含む。転写終結配列の具体例には、RNAポリメラーゼIターミネーター配列、RNAポリメラーゼIIターミネーター配列、又はRNAポリメラーゼIIIターミネーター配列が挙げられる。一部の実施態様において、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている核酸配列は、リボザイム認識配列を含む。具体的実施態様において、本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている核酸配列は、RNAポリメラーゼIプロモーター配列及びRNAポリメラーゼIターミネーター配列を含む。ある実施態様において、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている核酸配列は、RNAポリメラーゼIプロモーター、RNAポリメラーゼI終結配列、RNAポリメラーゼIIプロモーター、及びポリアデニル化シグナルを含む。

40

50

【0124】

ある実施態様において、本明細書に記載される核酸配列は、ベクターの一部であるか又はこれに組み込まれる。具体的実施態様において、本明細書に記載される核酸配列は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体の生成を促進するベクターの一部であるか又はこれに組み込まれる。一実施態様において、本明細書に記載される核酸配列は、pDZベクターの一部であるか又はこれに組み込まれる(pDZベクターに関する情報については、例えばQuinlivanらの文献、2005, J. of Virology 79: 8431-8439を参照されたい)。別の実施態様において、本明細書に記載される核酸配列は、pHW2000ベクターの一部であるか又はこれに組み込まれる(pHW2000ベクターに関する情報については、例えばHoffmannらの文献、2000, Proc Natl Acad Sci USA. 97(11): 6108-13を参照されたい)。別の実施態様において、本明細書に記載される核酸配列は、pAD3000ベクターの一部であるか又はこれに組み込まれる(pAD3000ベクターに関する情報については、例えばHoffmannらの文献、2000, Proc Natl Acad Sci USA. 97(11): 6108-13を参照されたい)。別の実施態様において、本明細書に記載される核酸配列は、pAD4000ベクターの一部であるか又はこれに組み込まれる(pAD4000ベクターに関する情報については、例えばWangらの文献、2007, J. of Virology 4: 102を参照されたい)。

10

【0125】

一部の実施態様において、本明細書に記載される核酸配列は、宿主細胞又は胚発育卵などの基体へ導入(例えばトランスフェクト)される。従って一部の実施態様において、本明細書に記載される核酸配列を含む基体(例えば宿主細胞又は卵)が、本明細書に提供される。別の実施態様において、ベクターの一部であるか又はこれに組み込まれる本明細書に記載される核酸配列は、宿主細胞又は胚発育卵などの基体へ導入(例えばトランスフェクト)される。従って一部の実施態様において、ベクターの一部であるか又はこれに組み込まれる本明細書に記載される核酸配列を含む基体(例えば宿主細胞又は卵)が、本明細書に提供される。宿主細胞及び胚発育卵は、当該技術分野において公知であり、かつ例が本明細書に、例えば下記5.4節に提供される。

20

【0126】

ある実施態様において、本明細書に記載される核酸は、インフルエンザウイルスにおいて増殖される。ある実施態様において、同時分離するキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の群(「キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含むインフルエンザウイルス」と題する5.2節参照)は、インフルエンザウイルスにおいて増殖される。

30

【0127】

具体的態様において、複数のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節が作製され得る。A型インフルエンザウイルスは、合計8つの遺伝子分節を有し、かつキメラ性の2、3、4、5、6、7又は8つ全ての遺伝子分節が作製され得る。B型インフルエンザウイルスは、合計8つの遺伝子分節を有し、かつキメラ性の2、3、4、5、6、7又は8つ全ての遺伝子分節が作製され得る。C型インフルエンザウイルスは、合計7つの遺伝子分節を有し、かつキメラ性の2、3、4、5、6又は7つ全ての遺伝子分節が作製され得る。具体的実施態様において、2又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節が作製される。非限定的例として、2つのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節が作製され得るが、ここで：

40

(a) 第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%

50

% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含み、並びに

(b) 第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又

10

20

30

40

50

は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含む。

ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0128】

別の具体的実施態様において、3種以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節が作製される。非限定的例として、3種のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節が作製され得るが、ここで：

(a)第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii)第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態

10

20

30

40

50

様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含み、並びに

(b) 第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含み、

(c) 第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i) 第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii) 第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%

10

20

30

40

50

% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv) 第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v) 第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含む。

ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0129】

これらの核酸を作製又は使用する技術は、別に指定しない限りは、分子生物学並びに組換えDNA操作及び作製の慣習的な従来の技術を利用する。当業者に公知の任意のクローニング技術を使用し、本明細書に記載される核酸を構築し、かつ必要であればヌクレオチドを変異することができる。そのような技術は、周知であり、かつSambrook及びRussellの文献「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク(2001)などの実験マニュアルにおいて当業者は入手可能である。特に、ポリメラーゼ連鎖反応、制限酵素、リガーゼ酵素、変異原性プライマー、及びベクターにおける核酸断片の増幅を使用し、本明細書に記載される核酸の個々のエレメントを生成し、次にそれらを構築することができる。

【0130】

(5.1.1. インフルエンザウイルス非コード領域)

本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、3'NCR1及び5'NCR1を含む。3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域において認められるパッケージングシグナル又はそれらの誘導体を含むか又はこれらからなる。具体的実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少

10

20

30

40

50

なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる。5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域において認められるパッケージングシグナル又はそれらの誘導体を含むか又はこれらからなる。具体的実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片を含むか又はこれらからなる。具体的実施態様において、3'NCR1及び5'NCR1は、同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来する。別の言い方をすると、3'NCR1及び5'NCR1は両方とも、HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、又はNPのインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来する。3'NCR1及び5'NCR1は、同じインフルエンザウイルス株由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節(HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、又はNP)に由来することができる。例えば、3'NCR1及び5'NCR1は両方とも、同じインフルエンザウイルス株由来のHAインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来することができる。或いは、3'NCR1及び5'NCR1は、2つの異なるインフルエンザウイルス株由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来することができる。例えば、3'NCR1は、1つのインフルエンザウイルス株のHA遺伝子分節に由来することができ、かつ5'NCR1は、異なるインフルエンザウイルス株のHA遺伝子分節に由来することができる。
10
20

【0131】

具体的実施態様において、3'NCR1及び5'NCR1は、A型インフルエンザウイルス由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来している(例えばA型インフルエンザウイルスについて下記5.2節参照)。別の実施態様において、3'NCR1及び5'NCR1は、B型インフルエンザウイルス由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来している(例えばB型インフルエンザウイルスについて下記5.2節参照)。別の実施態様において、3'NCR1及び5'NCR1は、C型インフルエンザウイルス由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来している(例えばC型インフルエンザウイルスについて下記5.2節参照)。一部の実施態様において、3'NCR1及び5'NCR1は、汎流行性インフルエンザウイルス由来のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来する。他の実施態様において、3'NCR1及び5'NCR1は、季節性インフルエンザウイルス由来のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来する。
30

【0132】

ある実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR全体を含むか又はこれらからなる。インフルエンザウイルスの3'NCRは、当該技術分野において公知であるか、又は標準の分子生物学及びウイルス学の技術を用い、容易に決定することができる。例えば、インフルエンザA/WSN/33(WSN)ウイルスの各分節の3'NCRを、下記表1に提供する。
40

【0133】

【表1】

表1

WSN 遺伝子分節	3' NCR の長さ	図/配列番号:
HA	32	図17/配列番号: 81
NA	19	図18/配列番号: 85
M	25	図19/配列番号: 89
NS	26	図20/配列番号: 93
PA	24	図21/配列番号: 97
PB1	24	図22/配列番号: 101
PB2	27	図23/配列番号: 105
NP	45	図24/配列番号: 109

10

【0134】

非限定的例として、インフルエンザA/PR/8/34(PR8)ウイルスの各分節の3'NCRのヌクレオチド配列を、下記表2に提供する。

【0135】

20

【表2】

表2

PR8 遺伝子分節	配列の長さ	図/配列番号:
HA	32	図4/配列番号: 19
NA	20	図6/配列番号: 31
M	25	図7/配列番号: 37
NS	26	図8/配列番号: 43
PA	24	図3/配列番号: 13
PB1	24	図2/配列番号: 7
PB2	27	図1/配列番号: 1
NP	45	図5/配列番号: 25

30

【0136】

一部の実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRの断片を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRの35、30、25、20、15、10若しくは5ヌクレオチド、又は5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、15~20、15~25、15~30、15~35、20~25、20~30、20~35、25~30、若しくは25~35ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。一部の実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、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98%又は少なくとも99%同一である、ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと50%~65%、60%~80%、65%~90%、70%~95%、80%~95%、90%~99%、95%~99%同一である、ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。

40

50

【0137】

一部の実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRの35、30、25、20、15、10若しくは5の隣接ヌクレオチド又は5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、15~20、15~25、15~30、15~35、20~25、20~30、20~35、25~30、若しくは25~35の隣接ヌクレオチドと、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、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98%又は少なくとも99%同一である、ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRの35、30、25、20、15、10若しくは5の隣接ヌクレオチド又は5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、15~20、15~25、15~30、15~35、20~25、20~30、20~35、25~30、若しくは25~35の隣接ヌクレオチドと、50%~65%、60%~80%、65%~90%、70%~95%、80%~95%、90%~99%、95%~99%同一である、ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。

【0138】

一部の実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRの断片とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。一部の実施態様において、3'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRの35、30、25、20、15、10若しくは5の隣接ヌクレオチド又は5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、15~20、15~25、15~30、15~35、20~25、20~30、20~35、25~30、若しくは25~35の隣接ヌクレオチドからなる配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。

【0139】

ある実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR全体を含むか又はこれらからなる。インフルエンザウイルスの5'NCRは、当該技術分野において公知であり、かつ標準の分子生物学及びウイルス学の技術を用い、容易に決定することができる。例えば、インフルエンザA/WSN/33(WSN)ウイルスの各分節の5'NCRを、下記表3に提供する。

【0140】

【表3】

表3

WSN 遺伝子分節	5' NCRの長さ	配列番号:
HA	45	図17/配列番号: 83
NA	28	図18/配列番号: 87
M	20	図19/配列番号: 91
NS	26	図20/配列番号: 95
PA	58	図21/配列番号: 99
PB1	43	図22/配列番号: 103
PB2	34	図23/配列番号: 107
NP	23	図24/配列番号: 111

【0141】

非限定的例として、インフルエンザA/PR/8/34(PR8)ウイルスの各分節の5'NCRのヌクレ

10

20

30

40

50

オチド配列を、下記表4に提供する。

【0142】

【表4】

表4

PR8 遺伝子分節	配列の長さ	図/配列番号:
HA	45	図4/配列番号: 22
NA	28	図6/配列番号: 34
M	20	図7/配列番号: 40
NS	26	図8/配列番号: 46
PA	58	図3/配列番号: 16
PB1	43	図2/配列番号: 10
PB2	34	図1/配列番号: 4
NP	23	図5/配列番号: 28

【0143】

一部の実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRの断片を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRの35、30、25、20、15、10若しくは5ヌクレオチド、又は5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、15~20、15~25、15~30、15~35、20~25、20~30、20~35、25~30、若しくは25~35ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。一部の実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、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98%又は少なくとも99%同一である、ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと50%~65%、60%~80%、65%~90%、70%~95%、80%~95%、90%~99%、95%~99%同一である、ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。

【0144】

一部の実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRの35、30、25、20、15、10若しくは5の隣接ヌクレオチド又は5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、15~20、15~25、15~30、15~35、20~25、20~30、20~35、25~30、若しくは25~35の隣接ヌクレオチドと、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、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98%又は少なくとも99%同一である、ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRの35、30、25、20、15、10若しくは5の隣接ヌクレオチド又は5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、15~20、15~25、15~30、15~35、20~25、20~30、20~35、25~30、若しくは25~35の隣接ヌクレオチドと、50%~65%、60%~80%、65%~90%、70%~95%、80%~95%、90%~99%、95%~99%同一である、ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。

【0145】

一部の実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRの断片とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれら

10

20

30

40

50

からなる。一部の実施態様において、5'NCR1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRの35、30、25、20、15、10若しくは5の隣接ヌクレオチド又は5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、15~20、15~25、15~30、15~35、20~25、20~30、20~35、25~30、若しくは25~35の隣接ヌクレオチドからなる配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。

【0146】

(5.1.2. 翻訳されないインフルエンザウイルス末端コーディング領域)

本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、3'CRS1、5'CRS1のいずれか、又は3'CRS1と5'CRS1の両方を含むことができる。3'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナルを含むか又はこれらからなる。具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は翻訳される。他の実施態様において、3'近位のコード領域配列は翻訳されない。一部の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、任意の開始コドンを除去し、かつ3'近位のコード領域配列の翻訳を妨げるよう変異されている。ある実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節に由来する。具体的実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節に由来し、かつmRNA 5'スプライス部位は、スプライシングが発生するのを防止するように、変異されている。別の具体的実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節に由来し、かつmRNA遠位5'スプライス部位は、スプライシングが発生するのを防止するように、変異されている。

【0147】

5'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナルを含むか又はこれらからなる。具体的実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、5'近位のコード領域配列は翻訳される。他の実施態様において、5'近位のコード領域配列は翻訳されない。一部の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、5'近位のコード領域配列が翻訳されないとを確実にするために、1以上の変異を有する。

【0148】

具体的実施態様において、3'CRS1及び5'CRS1は、同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来する。別の言い方をすると、3'CRS1及び5'CRS1は両方とも、HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、及びNPのインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来する。5'CRS1及び5'CRS1は、同じインフルエンザウイルス株由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節(HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、及びNP)に由来することができる。例えば、3'CRS1及び5'CRS1は両方とも、同じインフルエンザウイルス株由来のHAインフルエンザウイル

10

20

30

40

50

ス遺伝子分節に由来することができる。或いは、3'CRS1及び5'CRS1は、2つの異なるインフルエンザウイルス株由來の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来することができる。例えば、3'CRS1は、1つのインフルエンザウイルス株のHA遺伝子分節に由来することができ、かつ5'CRS1は、異なるインフルエンザウイルス株のHA遺伝子分節に由来することができる。

【0149】

具体的実施態様において、3'CRS1及び5'CRS1は、A型インフルエンザウイルス由來の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来している(例えばA型インフルエンザウイルスについては、下記5.2節参照)。他の実施態様において、3'CRS1及び5'CRS1は、B型インフルエンザウイルス由來の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来している(例えばB型インフルエンザウイルスについては、下記5.2節参照)。他の実施態様において、3'CRS1及び5'CRS1は、C型インフルエンザウイルス由來の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来している(例えばC型インフルエンザウイルスについては、下記5.2節参照)。ある実施態様において、3'CRS1及び5'CRS1は、汎流行性インフルエンザウイルス由來のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来する。他の実施態様において、3'CRS1及び5'CRS1は、季節性インフルエンザウイルス由來のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来する。

【0150】

ある実施態様において、3'CRS1及び/又は5'CRS1は、3'NCR1及び/又は5'NCR1と同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の同じ菌株由來のものである。他の実施態様において、3'CRS1及び/又は5'CRS1は、第1の菌株由來のインフルエンザウイルス遺伝子分節の型のものであり、かつ3'NCR1及び/又は5'NCR1は、同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の異なる菌株由來のものである。

【0151】

ある実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列を含むか又はこれらからなる。インフルエンザウイルス遺伝子分節のコード領域は、当該技術分野において公知であるか、又は標準の分子生物学及びウイルス学の技術を用い、容易に決定することができる。具体的実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスPB2遺伝子分節の最も3'側の50~150ヌクレオチド、75~150ヌクレオチド、100~150ヌクレオチド、又は120ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスPB1遺伝子分節の最も3'側の25~150ヌクレオチド、50~150ヌクレオチド、75~150ヌクレオチド、100~150ヌクレオチド又は60ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスHA遺伝子分節の最も3'側の2~25ヌクレオチド、2~15ヌクレオチド、2~10ヌクレオチド、5~150ヌクレオチド、25~150ヌクレオチド、50~150ヌクレオチド、75~150ヌクレオチド、100~150ヌクレオチド又は9ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNP遺伝子分節の最も3'側の25~150ヌクレオチド、50~150ヌクレオチド、75~150ヌクレオチド、100~150ヌクレオチド又は60ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNA遺伝子分節の最も3'側の25~250ヌクレオチド、50~250ヌクレオチド、75~250ヌクレオチド、100~250ヌクレオチド、125~250ヌクレオチド、150~250ヌクレオチド、175~250ヌクレオチド、150~200ヌクレオチド、又は183ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節の最も3'側の25~250ヌクレオチド、50~250ヌクレオチド、75~250ヌクレオチド、100~250ヌクレオチド、125~250ヌクレオチド、150~250ヌクレオチド、175~250ヌクレオチド、200~250ヌクレオチド、又は222ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節の最も3'側の10~150ヌクレオチド、25~150ヌクレオチド、50~150ヌクレオチド、75~150ヌクレオチド、100~150ヌクレオチド、又は35ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザPA遺伝子分節の最も3'側の25~200ヌクレオチド、50~200ヌクレオチド、75~200ヌクレオチド、100~200ヌクレオチド、又は222ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。

10

20

30

40

50

チド、50～200ヌクレオチド、50～150ヌクレオチド、50～125ヌクレオチド、75～200ヌクレオチド、75～150ヌクレオチド、100～200ヌクレオチド、100～150ヌクレオチド、又は100～125ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。

【0152】

非限定的例として、インフルエンザA/PR/8/34(PR8)ウイルスの各分節の3'近位のコード領域のヌクレオチド配列の例を、下記表5に提供する。

【0153】

【表5】

表5

PR8 遺伝子分節	配列の長さ	図/配列番号:
HA	67	図4/ 配列番号: 20
NA	111	図6/ 配列番号: 32
M	255	図7/ 配列番号: 38
NS	77	図8/ 配列番号: 44
PA	115	図3/ 配列番号: 14
PB1	123	図2/ 配列番号: 8
PB2	125	図1/ 配列番号: 2
NP	126	図5/ 配列番号: 26

10

20

30

40

【0154】

インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列に存在する任意の開始コドンは、当業者に公知の任意の技術を用い除去することができる。開始コドンは、ヌクレオチド置換、欠失及び/又は挿入により除去することができる。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域に存在する1以上の開始コドンは、1以上のヌクレオチド置換により除去することができる。一部の実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域に存在する1以上の開始コドンは、1以上の挿入及び/又は欠失により除去することができる。インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域に存在する任意の開始コドンの除去は、その配列の翻訳を防ぐはずである。

【0155】

インフルエンザウイルスNS遺伝子分節の3'近位のコード領域配列に存在するmRNA 5'スプライス部位及び/又はインフルエンザウイルスマ遺伝子分節の3'近位のコード領域配列に存在する遠位5'スプライス部位は、当業者に公知の任意の技術を用い除去することができる。そのようなスプライス部位は、ヌクレオチド置換、欠失及び/又は挿入により除去することができる。具体的な実施態様において、そのようなスプライス部位は、ヌクレオチド置換により除去される。そのようなスプライス部位の除去は、望ましくない選択的スプライシングが発生することを防ぐはずである。

【0156】

一部の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、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98%又は少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と50%～65%、60%～80%、65%～90%、70%～95%、80%～95%、90%～99%、95%～99%同一であるヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。一部の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位

50

のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。

【0157】

ある実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列を含むか又はこれらからなる。インフルエンザウイルスのコード領域は、当該技術分野において公知であるか、又は標準の分子生物学及びウイルス学の技術を用い、容易に決定することができる。具体的実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルスPB2遺伝子分節の最も5'側の50～150ヌクレオチド、75～150ヌクレオチド、100～150ヌクレオチド、又は120ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルスPB1遺伝子分節の最も5'側の25～150ヌクレオチド、50～150ヌクレオチド、75～150ヌクレオチド、100～150ヌクレオチド又は60ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルスHA遺伝子分節の最も3'側の5～150ヌクレオチド、25～150ヌクレオチド、50～150ヌクレオチド、75～100ヌクレオチド、75～150ヌクレオチド、100～150ヌクレオチド、又は80ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルスNP遺伝子分節の最も5'側の25～200ヌクレオチド、50～200ヌクレオチド、75～200ヌクレオチド、100～200ヌクレオチド、120～175ヌクレオチド、120～150ヌクレオチド、又は120ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルスNA遺伝子分節の最も5'側の25～250ヌクレオチド、50～250ヌクレオチド、75～250ヌクレオチド、100～250ヌクレオチド、125～250ヌクレオチド、150～250ヌクレオチド、175～250ヌクレオチド、150～200ヌクレオチド、又は157ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルスマ遺伝子分節の最も3'側の25～250ヌクレオチド、50～250ヌクレオチド、75～250ヌクレオチド、100～250ヌクレオチド、125～250ヌクレオチド、150～250ヌクレオチド、175～250ヌクレオチド、200～250ヌクレオチド、又は220ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節の最も5'側の10～150ヌクレオチド、25～150ヌクレオチド、50～150ヌクレオチド、75～150ヌクレオチド、100～150ヌクレオチド、又は35ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。別の実施態様において、3'CRS1は、インフルエンザウイルスPA遺伝子分節の最も3'側の25～200ヌクレオチド、50～200ヌクレオチド、50～150ヌクレオチド、50～125ヌクレオチド、75～200ヌクレオチド、75～150ヌクレオチド、100～200ヌクレオチド、100～150ヌクレオチド、又は100～125ヌクレオチドを含むか又はこれらからなる。

【0158】

非限定的例として、インフルエンザA/PR/8/34(PR8)ウイルスの各分節の5'近位のコード領域のヌクレオチド配列の例を、下記表6に提供する。

【0159】

【表6】

表6

PR8 遺伝子分節	配列の長さ	図/配列番号:
HA	105	図4/ 配列番号: 23
NA	157	図6/ 配列番号: 35
M	215	図7/ 配列番号: 41
NS	102	図8/ 配列番号: 47
PA	120	図3/ 配列番号: 17
PB1	110	図2/ 配列番号: 11
PB2	129	図1/ 配列番号: 5
NP	120	図5/ 配列番号: 29

【0160】

一部の実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、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98%又は少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と50%～65%、60%～80%、65%～90%、70%～95%、80%～95%、90%～99%、95%～99%同一であるヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。一部の実施態様において、5'CRS1は、インフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなる。

【0161】

(5.1.3. インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム)

本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、mORFを含む。mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの誘導体由来のオープンリーディングフレーム又はそれらの断片を含むか又はこれらからなり、ここでこのオープンリーディングフレームは、該オープンリーディングフレームに認められるインフルエンザウイルスパッケージングシグナル中に1、2、3又はそれ以上の変異を含む。具体的実施態様において、mORFは：(a)インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20が変異されているもの；(b)インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド、又はインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの5'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30が変異されているもの；又は、(c)(a)と(b)の両方：のいずれかを含むか又はこれらからなる。具体的実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、同じ型のインフルエンザウ

10

20

30

40

50

ルス遺伝子分節に由来する。別の言い方をすると、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、両方とも、HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、又はNPのインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来する。インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、同じインフルエンザウイルス株由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節(HA、NA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)、M、NS、PA、PB1、PB2、又はNP)に由来することができる。例えば、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは両方とも、同じインフルエンザウイルス株のHAインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来することができる。或いは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、2つの異なるインフルエンザウイルス株由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来することができる。例えば、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、異なるインフルエンザウイルス株のHA遺伝子分節に由来することができる。10

【0162】

具体的実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、A型インフルエンザウイルスの同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来している(例えばA型インフルエンザウイルスについては、下記5.2節参照)。他の実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、B型インフルエンザウイルス由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来している(例えばB型インフルエンザウイルスについては、下記5.2節参照)。他の実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、C型インフルエンザウイルス由来の同じ型のインフルエンザウイルス遺伝子分節に由来している(例えばC型インフルエンザウイルスについては、下記5.2節参照)。ある実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、同じ汎流行性インフルエンザウイルスに由来する。他の実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチドは、同じ季節性インフルエンザウイルスに由来する。30

【0163】

一実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチドを含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20が変異されている。ある実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も3'側の20~200ヌクレオチド、20~175又4050

クレオチド、20～150ヌクレオチド、20～125ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～75ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数を含むか又はこれらからなり、ここで少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上のヌクレオチドが変異されている。具体的実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も3'側の20～200ヌクレオチド、若しくはその間の任意の整数を含むか又はこれらからなり、ここで1～200ヌクレオチド、10～200ヌクレオチド、20～200ヌクレオチド、20～175ヌクレオチド、20～150ヌクレオチド、20～125ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～75ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数が変異されている。

10

【0164】

一実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及び異種ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20が変異されている。ある実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も3'側の20～200ヌクレオチド、20～175ヌクレオチド、20～150ヌクレオチド、20～125ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～75ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数及び異種ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなり、ここで少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又はそれ以上のヌクレオチドが変異されている。具体的実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も3'側の20～200ヌクレオチド、若しくはその間の任意の整数、及び異種ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなり、ここで1～200ヌクレオチド、10～200ヌクレオチド、20～200ヌクレオチド、20～200ヌクレオチド、20～175ヌクレオチド、20～150ヌクレオチド、20～125ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～75ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数が変異されている。

20

【0165】

別の実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位の20又は30ヌクレオチドを含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの5'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30が変異されている。ある実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も5'側の30～200ヌクレオチド、30～175ヌクレオチド、30～150ヌクレオチド、30～125ヌクレオチド、30～100ヌクレオチド、30～100ヌクレオチド、30～75ヌクレオチド、230～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数を含むか又はこれらからなり、ここで1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又はそれ以上のヌクレオチドが変異されている。具体的実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も5'側の30～200ヌクレオチド、又は30と200の間の任意の整数を含むか又はこれらからなり、ここで1～200ヌクレオチド、10～200ヌクレオチド、20～200ヌクレオチド、20～175ヌクレオチド、20～150ヌクレオチド、20～125ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～75ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数が変異されている。

30

【0166】

一実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド及び異種ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの5'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又はそれ以上のヌクレオチドが変異されている。具体的実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も5'側の30～200ヌクレオチド、又は30と200の間の任意の整数を含むか又はこれらからなり、ここで1～200ヌクレオチド、10～200ヌクレオチド、20～200ヌクレオチド、20～175ヌクレオチド、20～150ヌクレオチド、20～125ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～75ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数が変異されている。

40

50

、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30が変異されている。ある実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も5'側の30～200ヌクレオチド、30～175ヌクレオチド、30～150ヌクレオチド、30～125ヌクレオチド、30～100ヌクレオチド、30～100ヌクレオチド、30～75ヌクレオチド、30～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数及び異種ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなり、ここで1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上のヌクレオチドが変異されている。具体的実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も5'側の30～200ヌクレオチド、若しくは30と200の間の任意の整数、及び異種ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなり、ここで1～200ヌクレオチド、10～200ヌクレオチド、20～200ヌクレオチド、20～175ヌクレオチド、20～150ヌクレオチド、20～125ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～75ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数が変異されている。ある実施態様において、mORFが異種ヌクレオチド配列を含む場合、1つのオープンリーディングフレームは依然融合タンパク質の翻訳が可能であるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム内の任意の終始コドンが除去される。
10

【0167】

別の実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及び少なくとも5'近位30ヌクレオチドを含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20及び/又は5'近位のヌクレオチドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30が変異されている。ある実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も3'側の20～200ヌクレオチド、20～175ヌクレオチド、20～150ヌクレオチド、20～125ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～75ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数、及びインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も5'側の30～200ヌクレオチド、30～175ヌクレオチド、30～150ヌクレオチド、30～125ヌクレオチド、30～100ヌクレオチド、30～100ヌクレオチド、30～75ヌクレオチド、30～50ヌクレオチド、又はその間の任意の整数を含むか又はこれらからなり、ここで3'末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20若しくはそれ以上のヌクレオチド及び/又は5'末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30又はそれ以上のヌクレオチドが変異されている。ある実施態様において、mORFが異種ヌクレオチド配列を含む場合、1つのオープンリーディングフレームは依然融合タンパク質の翻訳が可能であるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム内の任意の終始コドンが除去される。
30

【0168】

別の実施態様において、mORFは：(a)インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド及び少なくとも5'近位30ヌクレオチドであり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上及び/又は5'近位のヌクレオチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20若しくは30又はそれ以上が変異されているもの、並びに、(b)異種ヌクレオチド配列：を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、mORFは：(a)インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの最も3'側の20～200ヌクレオチド、20～175ヌクレオチド、20～150ヌクレオチド、20～125ヌクレオチド、20～100ヌクレオチド、20～75ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、若しくはその間の任意
40
50

の整数、及び/又はインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームの最も5'側の30~200ヌクレオチド、30~175ヌクレオチド、30~150ヌクレオチド、30~125ヌクレオチド、30~100ヌクレオチド、30~100ヌクレオチド、30~75ヌクレオチド、30~50ヌクレオチド、若しくはその間の任意の整数であり、ここで3'末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20若しくはそれ以上のヌクレオチド及び/又は5'末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30又はそれ以上のヌクレオチドが変異されているもの、並びに、(b)異種ヌクレオチド配列：を含むか又はこれらからなる。ある実施態様において、mORFが異種ヌクレオチド配列を含む場合、1つのオーブンリーディングフレームは依然融合タンパク質の翻訳が可能であるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレーム内の任意の終始コドンが除去される。
10

【0169】

ある実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレーム全体を含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームは、1~200、1~175、1~150、1~125、1~100、1~75、1~50、1~25、20~200、20~175、20~150、20~150、20~125、20~100、20~75若しくは20~50の変異、又はその間の整数を含む。具体的実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレーム全体を含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームは、3'末端に1~200、1~175、1~150、1~125、1~100、1~75、1~50、1~25、20~200、20~175、20~150、20~150、20~125、20~100、20~75若しくは20~50の変異(又はその間の整数)、及び/又は5'末端に1~200、1~175、1~150、1~125、1~100、1~75、1~50、1~25、20~200、20~175、20~150、20~150、20~125、20~100、20~75若しくは20~50の変異(又はその間の整数)を含む。例えば、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節HA、NA、PA、PB1、PB2、NP、NS又はMのオーブンリーディングフレーム全体を含むか又はこれらからなり得るが、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームは、3'末端に1~200、1~175、1~150、1~125、1~100、1~75、1~50、若しくは1~25の変異(又はその間の整数)、及び/又は5'末端に1~200、1~175、1~150、1~125、1~100、1~75、1~50、若しくは1~25の変異(又はその間の整数)を含む。ある実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームの全体を含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームは、3'末端に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、若しくは50の変異、及び/又は5'末端に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、若しくは50の変異を含む。
20
30

【0170】

具体的実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームの全体及び異種ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームは、3'末端に1~200、1~175、1~150、1~125、1~100、1~75、1~50、若しくは1~25の変異(又はその間の整数)、及び/又は5'末端に1~200、1~175、1~150、1~125、1~100、1~75、1~50、若しくは1~25の変異(又はその間の整数)を含む。ある実施態様において、mORFは、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームの全体及び異種ヌクレオチド配列を含むか又はこれらからなり、ここでインフルエンザウイルス遺伝子分節のオーブンリーディングフレームは、3'末端に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、若しくは50の変異、
40
50

及び/又は5'末端に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、若しくは50の変異を含む。ある実施態様において、mORFが異種ヌクレオチド配列を含む場合、1つのオープンリーディングフレームは依然融合タンパク質の翻訳が可能であるように、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム内の任意の終始コドンが除去される。

【0171】

インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームは、当該技術分野において公知であるか、又は標準の分子生物学及びウイルス学の技術を用い、容易に決定することができる。非限定的例として、インフルエンザWSNウイルスの各遺伝子産物のオープンリーディングフレームが、下記表7に提供される。10

【0172】

【表7】

表7

WSN ORF	配列の長さ	図/配列番号:
HA	1698	図17/ 配列番号: 182
NA	1362	図18/ 配列番号: 86
M1/M2	759/294	図19/ 配列番号: 90
NS1/NS2	693/366	図20/ 配列番号: 84
PA	2151	図21/ 配列番号: 98
PB1	2274	図22/ 配列番号: 102
PB2	2280	図23/ 配列番号: 106
NP	1497	図24/ 配列番号: 110

【0173】

具体的実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又はそれらの断片の変異は、オープンリーディングフレームに認められるパッケージングシグナルの1以上又は全てを変異するか若しくは除去する。特定の実施態様において、そのようなパッケージングシグナルは、配列の3'末端及び5'末端に認められる。ある実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又はそれらの断片の変異は、サイレント変異、すなわちオープンリーディングフレームのヌクレオチド配列は変更するが、オープンリーディングフレームによりコードされたアミノ酸配列は変更しない変異である。ほとんどの天然のアミノ酸は、複数の異なるコドンによりコードされ(メチオニン及びトリプトファンは例外である) - この現象は、遺伝暗号の縮重と称されている。従ってコドンのある変異は、同じアミノ酸をコードしているが、異なるヌクレオチド配列を生じることができる。30

【0174】

ある実施態様において、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又はそれらの断片の変異は、タンパク質における保存的アミノ酸置換を生じ、すなわち、新たなアミノ酸が、当初の野生型アミノ酸と非常に類似した化学特性を有するアミノ酸置換を生じる変異を生じる。そのような保存的アミノ酸置換は、酸性アミノ酸の酸性アミノ酸との；塩基性アミノ酸の塩基性アミノ酸との；脂肪族アミノ酸の脂肪族アミノ酸との；及び、芳香族アミノ酸の芳香族アミノ酸とのなどのアミノ酸置換を含む。40

【0175】

非限定的例として、インフルエンザPR8ウイルスの各遺伝子分節のオープンリーディングフレームに導入され得るサイレント変異の例が、下記表8に提供される。50

【0176】

【表8】

表8

PR8 遺伝子 分節	野生型-3' 末端 (図 ; 配列 番号:)	変異型-3' 末端 (図 ; 配列 番号:)	野生型-5' 末端 (図 ; 配列 番号:)	変異型-5' 末端 (図 ; 配列 番号:)
HA	図 12A ; 配列 番号:61	図 12B ; 配列 番号:62	図 12C ; 配列 番号:63	図 12D ; 配列 番号:64
NA	図 14A ; 配列 番号:69	図 14B ; 配列 番号:70	図 14C ; 配列 番号:71	図 14D ; 配列 番号:72
M	図 15A ; 配列 番号:73	図 15B ; 配列 番号:74	図 15C ; 配列 番号:75	図 15D ; 配列 番号:76
NS	図 16A ; 配列 番号:77	図 16B ; 配列 番号:78	図 16C ; 配列 番号:79	図 16D ; 配列 番号:80
PA	図 11A ; 配列 番号:57	図 11B ; 配列 番号:58	図 11C ; 配列 番号:59	図 11D ; 配列 番号:60
PB1	図 10A ; 配列 番号:53	図 10B ; 配列 番号:54	図 10C ; 配列 番号:55	図 10D ; 配列 番号:56
PB2	図 9A ; 配列 番号:49	図 9B ; 配列 番号:50	図 9C ; 配列 番号:51	図 9D ; 配列 番号:52
NP	図 13A ; 配列 番号:65	図 13B ; 配列 番号:66	図 13C ; 配列 番号:67	図 13D ; 配列 番号:68

【0177】

ある実施態様において、mORFは、異種ヌクレオチド配列を含むことができる。異種ヌクレオチド配列は一般に、インフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又はそれらの誘導体若しくは断片とインフレームである。具体的な実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、任意の感染性病原体の抗原、又は免疫応答を誘発することができる任意の疾患に関連した抗原をコードしている。具体的な実施態様において、抗原は、糖タンパク質である。ある実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、ウイルス抗原をコードしている。他の実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、細菌抗原(例えば細菌の外皮タンパク質)をコードしている。他の実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、寄生虫抗原(例えば原虫抗原)をコードしている。別の実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、真菌抗原をコードしている。

【0178】

一部の実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、腫瘍抗原又は腫瘍関連抗原をコードしている。一部の実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、サイトカイン又は増殖因子をコードしている。ある実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、FLAGタグなどの、ペプチドタグをコードしている。一部の実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、検出可能な物質をコードしている。

【0179】

ウイルス抗原の非限定的例は、アデノウイルス科(例えばマストアデノウイルス及びアヴィアデノウイルス)、ヘルペスウイルス科(例えば単純ヘルペスウイルス1型、単純ヘルペスウイルス2型、単純ヘルペスウイルス5型、単純ヘルペスウイルス6型、エプスタイン・バーウイルス、HHV6-HHV8及びサイトメガロウイルス)、レビウイルス科(例えばレビウイルス、腸内細菌ファージMS2、アロレウイルス)、ポックスウイルス科(例えばコルドボ

10

20

30

40

50

ツクスウイルス、パラポックスウイルス、アビポックスウイルス、カブリポックスウイルス、レポリポックスウイルス、スイポックスウイルス、モラシポックスウイルス、及びエントモポックスウイルス)、パポバウイルス科(例えばポリオーマウイルス及びパピローマウイルス)、パラミクソウイルス科(例えばパラミクソウイルス、パラインフルエンザウイルス1型、モビリウイルス属(例えば麻疹ウイルス)、ルプラウイルス属(例えばムンプスウイルス)、ニューモノウイルス亜科(例えば肺炎ウイルス、ヒト呼吸器多核体ウイルス)、ヒト呼吸器合胞体ウイルス及びメタニューモウイルス(例えばトリニュー・モウイルス及びヒトメタニューモウイルス))、ピコルナウイルス科(例えばエンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス(例えばヒトA型肝炎ウイルス)、カルジオウイルス、及びアフトウイルス)、レオウイルス科(例えばオルトレオウイルス、オルビウイルス、ロタウイルス、サイポウイルス、フィジウイルス、ファイトレオウイルス、及びオリザウイルス)、レトロウイルス科(例えば哺乳類のB型レトロウイルス、哺乳類のC型レトロウイルス、鳥類のC型レトロウイルス、D型レトロウイルス群、BLV-HTLVレトロウイルス、レンチウイルス(例えばヒト免疫不全ウイルス1型及びヒト免疫不全ウイルス2型(例えばHIV gp160)、スマウイルス)、フラビウイルス科(例えばC型肝炎ウイルス、デング熱ウイルス、西ナイルウイルス)、ヘパドナウイルス科(例えばB型肝炎ウイルス)、トガウイルス科(例えばアルファウイルス(例えばシンドビスウイルス)及びルビウイルス(例えば風疹ウイルス))、ラブドウイルス科(例えばベシクロウイルス、リッサウイルス、エファメロウイルス、サイトラブドウイルス、及びヌクレオラブドウイルス)、アレナウイルス科(例えばアレナウイルス、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス、イッピイウイルス、及びラッサ熱ウイルス)、並びにコロナウイルス科(例えばコロナウイルス及びトロウイルス)からの抗原が挙げられる。具体的実施態様において、ウイルス抗原は、HIV gp120、HIV nef、RSV F糖タンパク質、RSV G糖タンパク質、HTLV tax、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質(例えばgB、gC、gD、及びgE)又はB型肝炎表面抗原、C型肝炎ウイルスEタンパク質又はコロナウイルススパイクタンパク質である。

【0180】

細菌抗原の非限定的例は、アクアスピリルム科(*Aquaspirillum*)、アゾスピリルム科(*Azospirillum*)、アゾトバクター科(*Azotobacteraceae*)、バクテロイデス科(*Bacteroidaceae*)、バルトネラ種(*Bartonella*)、ブデロビブリオ科(*Bdellovibrio*)、カンピロバクター種(*Campylobacter*)、クラミジア種(例えばクラミジア・ニューモニエ(*Chlamydia pneumoniae*))、クロストリジウム(*Clostridium*)、エンテロバクテリア科(*Enterobacteriaceae*)(例えばシトロバクター種(*Citrobacter*)、エドワーシエラ(*Edwardsiella*)、エンテロバクター・アエロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)、エルウィニア種(*Erwinia*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、ハフニア種(*Hafnia*)、クレブシエラ種(*Klebsiella*)、モーガネラ種(*Morganella*)、プロテウス・ブルガリス(*Proteus vulgaris*)、プロビデンシア(*Providencia*)、サルモネラ種(*Salmonella*)、セラチア・マルセセンス(*Serratia marcescens*)、及びシゲラ・フレクスネリ(*Shigella flexneri*)、ガルネラ科(*Gardinella*)、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)、ハロバクテリウム科(*Halobacteriaceae*)、ヘリコバクター科(*Helicobacter*)、レジオネラシアエ科(*Legionellaceae*)、リステリア種(*Listeria*)、メチロコッカス科(*Methylococcaceae*)、マイコバクテリア(例えばマイコバクテリウム・ツベルクリシス(*Mycobacterium tuberculosis*))、ナイセリア科(*Neisseriaceae*)、オセアノスピリラム科(*Oceanospirillum*)、パステウラ科(*Pasteurellaceae*)、肺炎球菌種(*Pneumococcus*)、シュードモナス種(*Pseudomonas*)、リゾビア科(*Rhizobiaceae*)、スピリルム科(*Spirillum*)、スピロソ-マ科(*Spirosomaceae*)、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)(例えばメチシリン耐性黄色ブドウ球菌及びスタフィロコッカス・ピロゲネス)、連鎖球菌(例えばストレプトコッカス・エンテリティデス(*Streptococcus enteritidis*)、ストレプトコッカス・ファシアエ(*S. fasciae*)、及び肺炎連鎖球菌)、ヘリコバクター科(*Helicobacter*)、エルシニア科(*Yersinia*)、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)及びバンピロビブリオ科(*Vampirovibrio*)の細菌からの抗原が挙げられる。

【0181】

10

20

30

40

50

寄生虫抗原の非限定的例は、アメーバ、マラリア原虫、プラスモジウム、トリパノソーマ・クルージ(*Trypanosoma cruzi*)などの寄生虫からの抗原を含む。真菌抗原の非限定的例は、アブシディア種(例えばアブシディア・コリムビフェラ(*Absidia corymbifera*)及びアブシディア・ラモサ(*Absidia ramosa*))、アスペルギルス種(例えば、アスペルギルス・フラブス(*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・フミガツス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニジュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ニジェール(*Aspergillus niger*)、及びアスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*))、バシジオボラス・ラナルム(*Basidiobolus ranarum*)、ブラストミセス・デルマチチジス(*Blastomyces dermatitidis*)、カンジダ種(例えばカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、カンジダ・グラブラー(*Candida glabrata*)、カンジダ・ケル(*Candida kerr*)、カンジダ・クルセイ(*Candida krusei*)、カンジダ・パラプシローシス(*Candida parapsilosis*)、カンジダ・ブソイドトロピカリス(*Candida pseudotropicalis*)、カンジダ・キリエルモンディ(*Candida quillermondii*)、カンジダ・ルゴサ(*Candida rugosa*)、カンジダ・ステラトイデア(*Candida stellatoidea*)、及びカンジダ・トロピカリス(*Candida tropicalis*))、コクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)、コニディオボルス種(*Conidiobolus*)、クリプトコッカス・ネオフォルムス(*Cryptococcus neoforms*)、クンニングアメラ種(*Cunninghamella*)、皮膚糸状菌、ヒストプラスマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)、ミクロスパルム・ギプセウム(*Microsporum gypseum*)、ムコール・プシリス(*Mucor pusillus*)、パラコクシジオイデス・プラジリエンシス(*Paracoccidioides brasiliensis*)、シュードアレシェリア・ボイジイ(*Pseudallescheria boydii*)、リノスポリジウム・セーベリ(*Rhinosporidium seeberi*)、ニューモシスティス・カリニ(*Pneumocystis carinii*)、リゾpus種(例えばリゾpus・アリズス(*Rhizopus arrhizus*)、リゾpus・オリザエ(*Rhizopus oryzae*)、及びリゾpus・ミクロスパラス(*Rhizopus microsporus*))、サッカロミセス(*Saccharomyces*)種、スプロトリックス・シェンキイ(*Sporothrix schenckii*)、接合菌類、並びに接合菌、子囊菌、担子菌、不完全菌、及び卵菌綱などの綱の真菌からの抗原が挙げられる。

【0182】

腫瘍関連抗原の非限定的例は、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V、p-15、MART-1/MelanA、TRP-1(gp75)、チロシナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ4、MUM-1、CDK4、HER-2/neu、ヒトパピローマウイルス-E6、ヒトパピローマウイルスE7、MUC-1、カスパーゼ-8、CD5、CD20、CEA、ムチン-1、Lewisx、CA-125、上皮細胞増殖因子受容体、p185HER2、IL-2R、テナシン、メタロプロテイナーゼ関連抗原、及びCAMPATH-1が挙げられる。サイトカイン及び増殖因子の非限定的例は、インターロイキン(IL)-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-22、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 及びIFN- δ が挙げられる。検出可能な物質の非限定的例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼなどであるが、これらに限定されるものではない様々な酵素；ストレプトアビシン/ビオチン及びアビシン/ビオチンなどであるが、これらに限定されるものではない補欠分子族；並びに、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンなどであるが、これらに限定されるものではない生物発光物質が挙げられる。

【0183】

具体的実施態様において、異種ヌクレオチド配列は、呼吸器病原体抗原をコードしている。呼吸器ウイルス抗原の非限定的例は、RSVのF、G、又はM2タンパク質、コロナウイルスのスパイクタンパク質(例えばSARS、HuCoV)、ヒトメタニューモウイルスのFタンパク質、パラインフルエンザウイルスのF又はHNタンパク質、ヘンドラウイルスのG又はFタンパク質、ニパウイルスのG又はFタンパク質、若しくはアデノウイルスのキャップシドタンパク質が挙げられる。具体的実施態様において、呼吸器ウイルス抗原は、インフルエンザウイルスの異なる型、亜型、又は菌株からのインフルエンザウイルス抗原である。

【0184】

(5.2 キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含むインフルエンザウイルス)

10

20

30

40

50

一態様において、1、2、3、4、5、6、7又は8つの本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む組換えインフルエンザウイルスが、本明細書に提供される。具体的実施態様において、2つ以上の本明細書に記載されるキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む、組換えインフルエンザウイルスが、本明細書に提供され、ここでこれら2つ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は同時分離する(そうでなければ本明細書において「同時分離キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節」と称される)。同時分離キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の群は、2、3、4、5、6、7又は8つのキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含むことができる。ある実施態様において、2つ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、当業者に公知の技術により決定される時間の少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%を同時分離する。一部の実施態様において、2つ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、当業者に公知の技術により決定される時間の10%～50%、10%～75%、10%～95%、10%～99.5%、25%～50%、25%～75%、25%～99.5%、50%～75%、50%～99.5%、75%～99.5%、80%～99.5%、90%～99.5%、又は95%～99.5%を同時分離する。そのような技術の一例は、細胞の野生型ウイルスと本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスによる同時感染、単独のブラークの採取、及び各ブラークのゲノム組成の決定を含むことができる。理論に結びつけられるものではないが、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、他のインフルエンザウイルス遺伝子分節と互いに独立して再集合する能力が低下し、その結果この組換えインフルエンザウイルスの他のインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス)との再集合は、低下されるか又は阻害される。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスの他のインフルエンザウイルスとの再集合は、1つ以上の他のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節から独立して再集合された1つ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節と再集合されたインフルエンザウイルスを含むウイルスのブラークの割合により決定され、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%又は5%未満である。再集合することができない組換えインフルエンザウイルスは、1つ以上の他のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節から独立して再集合された1つ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を伴うウイルスを含むウイルスのブラークをより少なく生じるであろう。

【0185】

10

ある実施態様において、本明細書に提供される組換えインフルエンザウイルスは、同時分離する2種のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む。第1及び第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、例えば下記表9に提供されたような、第1及び第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から得られるか又は誘導されるパッケージングシグナルを含む。

【表9】

20

表9

	3' NCR1 及び 5' NCR1	3' CRS1 及び/又は 5' CRS1	mORF
第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節

30

インフルエンザウイルス遺伝子分節の第1及び第2の型とは、2種の異なるインフルエンザ

50

ウイルス遺伝子分節を指す。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はHAインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、かつ第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNSインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができる。

【 0 1 8 6 】

具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、第1及び第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含むことができ、ここで：

(a) 第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム若しくはそれらの断片及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含み、並びに

(b) 第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は

第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%（一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%）同一であるヌクレオチド配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%（一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%）同一であるヌクレオチド配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%（一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%）同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含む。

ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0187】

ある実施態様において、本明細書に提供される組換えインフルエンザウイルスは、同時に分離する3種のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む。第1及び第2及び第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、例えば下記表10に提供されたような、第1及び第2及び第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から得られるか又は誘導されるパッケージングシグナルを含む。

【表10】

表10

	3' NCR1 及び 5' NCR1	3' CRS1 及び/又は 5' CRS1	mORF
第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節

インフルエンザウイルス遺伝子分節の第1、第2及び第3の型とは、3種の異なるインフルエンザウイルス遺伝子分節を指す。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はHAインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNSインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、かつ第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNPインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができる。

【0188】

具体的な実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、第1、第2及び第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含むことができ、ここで：

(a) 第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii) 第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム若しくはそれらの断片及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%

10

20

30

40

50

% (一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含み、並びに

(b) 第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii) 第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム若しくはそれらの断片及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含み、

(c) 第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は：

(i) 第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCR若しくはそれらの断片、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRと少なくとも50%(一部の実施態

10

20

30

40

50

様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片；

(ii) 第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(ii)における配列に存在する任意の開始コドンが除去されているもの；

(iii) 第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム、又は第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム若しくはそれらの断片及び異種ヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームであり、ここで第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されているもの；

(iv) 第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列と少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、ここで(iv)において配列が翻訳されないもの；並びに

(v) 第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCR若しくはそれらの断片、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRと少なくとも50%(一部の実施態様においては、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%)同一であるヌクレオチド配列若しくはそれらの断片、又は第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'NCRとストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列若しくはそれらの断片：を含む。

ある実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS又はM遺伝子分節から誘導される。具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスNS遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、mRNA 5'スプライス部位を除去するように変異されている。別の具体的実施態様において、3'近位のコード領域配列は、インフルエンザウイルスM遺伝子分節から誘導され、かつ3'近位のコード領域は、遠位5'スプライス部位を除去するように変異されている。

【0189】

ある実施態様において、本明細書に提供される組換えインフルエンザウイルスは、同時に分離する4種のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む。第1、第2、第3及び第4のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、例えば下記表11に提供されたような、第1、第2、第3及び第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から得られるか又は誘導されるパッケージングシグナルを含む。

10

20

30

40

【表 1 1】

表 1 1

	3' NCR1 及び 5' NCR1	3' CRS1 及び/又は 5' CRS1	mORF
第 1 のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 1 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 1 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 4 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第 2 のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 2 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 2 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 3 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第 3 のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 3 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 3 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 2 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第 4 のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 4 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 4 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第 1 の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節

10

20

インフルエンザウイルス遺伝子分節の第1、第2、第3及び第4の型とは、4種の異なるインフルエンザウイルス遺伝子分節を指す。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はHAインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNSインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNPインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、かつ第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPB1であることができる。

【0190】

ある実施態様において、本明細書に提供される組換えインフルエンザウイルスは、同時に分離する5種のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む。第1、第2、第3、第4及び第5のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、例えば下記表12に提供されたような、第1、第2、第3、第4、第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から得られるか又は誘導されるパッケージングシグナルを含む。

30

【表12】

表12

	3' NCR1 及び 5' NCR1	3' CRS1 及び/又は 5' CRS1	mORF
第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第4のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第5のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節

インフルエンザウイルス遺伝子分節の第1、第2、第3、第4及び第5の型とは、5種の異なるインフルエンザウイルス遺伝子分節をいう。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はHAインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNSインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNPインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPB1インフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、かつ第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPB2インフルエンザウイルス遺伝子分節であることができる。

【0191】

ある実施態様において、本明細書に提供される組換えインフルエンザウイルスは、同時に分離する6種のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む。第1、第2、第3、第4、第5及び第6のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、例えば下記表13に提供されたような、第1、第2、第3、第4、第5及び第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から得られるか又は誘導されるパッケージングシグナルを含む。

10

20

30

【表13】

表13

	3' NCR1 及び 5' NCR1	3' CRS1 及び/又は 5' CRS1	mORF
第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第4のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第5のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第6のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節

インフルエンザウイルス遺伝子分節の第1、第2、第3、第4、第5及び第6の型とは、6種の異なるインフルエンザウイルス遺伝子分節を指す。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はHAインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNSインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNPインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPB1インフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPB2インフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、かつ第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPAインフルエンザウイルス遺伝子分節由来である。

【0192】

ある実施態様において、本明細書に提供される組換えインフルエンザウイルスは、同時に分離する7種のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む。第1、第2、第3、第4、第5、第6及び第7のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、例えば下記表14に提供されたような、第1、第2、第3、第4、第5、第6及び第7の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から得られるか又は誘導されるパッケージングシグナルを含む。

10

20

30

40

【表14】

表14

	3' NCR1 及び 5' NCR1	3' CRS1 及び/又は 5' CRS1	mORF
第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第4のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第5のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第6のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第7の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第7のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第7の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第7の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節

10

20

30

インフルエンザウイルス遺伝子分節の第1、第2、第3、第4、第5、第6及び第7の型とは、7種の異なるインフルエンザウイルス遺伝子分節を指す。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はHAインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNSインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNPインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPB1インフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPB2インフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPAインフルエンザウイルス遺伝子分節由来であり、かつ第7の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はMインフルエンザウイルス遺伝子分節由来である。

40

【0193】

ある実施態様において、本明細書に提供される組換えインフルエンザウイルスは、同時に分離する8種のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む。第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7及び第8のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、例えば下記表15に提供されたような、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7及び第8の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から得られるか又は誘導されるパッケージングシグナルを含む。

【表15】

表15

	3' NCR1 及び 5' NCR1	3' CRS1 及び/又は 5' CRS1	mORF
第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第3のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第4のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第5のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第6のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第7のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第7の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第7の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第8の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節
第8のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節	第8の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第8の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節	第7の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節

インフルエンザウイルス遺伝子分節の第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7及び第8の型とは、8種の異なるインフルエンザウイルス遺伝子分節を指す。例えば、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はHAインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNSインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第3の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はNPインフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第4の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPB1インフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第5の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPB2インフルエンザウイルス遺伝子分節であることができ、第6の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はPAインフルエンザウイルス遺伝子分節由来であり、第7の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はMインフルエンザウイルス遺伝子分節由来であり、かつ第8の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節はノイラミニダーゼ(NA)インフルエンザウイルス遺伝子分節由来である。

【0194】

ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、同じインフルエンザウイルス型、同じインフルエンザウイルス亜型、又は同じインフルエンザウイルス株由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んで

10

20

30

40

50

いる。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、同じインフルエンザウイルス型、同じインフルエンザウイルス亜型、又は同じインフルエンザウイルス株由来のmORF、3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。

【 0 1 9 5 】

一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、1つのインフルエンザウイルス型、1つのインフルエンザウイルス亜型、又は1つのインフルエンザウイルス株由来の3'NCR1及び5'NCR1、並びに異なるインフルエンザウイルス型、異なるインフルエンザウイルス亜型、又は異なるインフルエンザウイルス株由来の3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、1つのインフルエンザウイルス型、1つのインフルエンザウイルス亜型、又は1つのインフルエンザウイルス株由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1、並びに異なるインフルエンザウイルス型、異なるインフルエンザウイルス亜型、又は異なるインフルエンザウイルス株由来のmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。10

【 0 1 9 6 】

一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、汎流行性インフルエンザウイルス由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1、並びに季節性インフルエンザウイルス由来のmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。他の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、季節性インフルエンザウイルス由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1、並びに汎流行性インフルエンザウイルス由来のmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、季節性又は汎流行性インフルエンザウイルス由来のmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。20

【 0 1 9 7 】

ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、A型インフルエンザウイルス由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、A型インフルエンザウイルス由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1、5'CRS1及びmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。具体的な実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、A型インフルエンザウイルスの同じ亜型又は菌株由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、A型インフルエンザウイルスの同じ亜型又は菌株由来のmORF、3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、A型インフルエンザウイルスの1つの亜型又は1つのA型インフルエンザウイルス株由来の3'NCR1及び5'NCR1、並びに異なるA型インフルエンザウイルス亜型又はA型インフルエンザウイルスの異なる菌株由来の3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、A型インフルエンザウイルスの1つの亜型又は1つのA型インフルエンザウイルス株由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1、並びに異なるA型インフルエンザウイルス亜型又はA型インフルエンザウイルスの異なる菌株由来のmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。30

【 0 1 9 8 】

A型インフルエンザウイルスの非限定的例は、H10N4亜型、H10N5亜型、H10N7亜型、H10N8亜型、H10N9亜型、H11N1亜型、H11N13亜型、H11N2亜型、H11N4亜型、H11N6亜型、H11N8亜型、H11N9亜型、H12N1亜型、H12N4亜型、H12N5亜型、H12N8亜型、H13N2亜型、H13N3亜型、H13N6亜型、H13N7亜型、H14N5亜型、H14N6亜型、H15N8亜型、H15N9亜型、H16N3亜型、H1N1亜型、H1N2亜型、H1N3亜型、H1N6亜型、H1N9亜型、H2N1亜型、H2N2亜型、H2N3亜型、H2N5亜型、H2N7亜型、H2N8亜型、H2N9亜型、H3N1亜型、H3N2亜型、H3N3亜型、H3N4亜型40

、H3N5亜型、H3N6亜型、H3N8亜型、H3N9亜型、H4N1亜型、H4N2亜型、H4N3亜型、H4N4亜型、H4N5亜型、H4N6亜型、H4N8亜型、H4N9亜型、H5N1亜型、H5N2亜型、H5N3亜型、H5N4亜型、H5N6亜型、H5N7亜型、H5N8亜型、H5N9亜型、H6N1亜型、H6N2亜型、H6N3亜型、H6N4亜型、H6N5亜型、H6N6亜型、H6N7亜型、H6N8亜型、H6N9亜型、H7N1亜型、H7N2亜型、H7N3亜型、H7N4亜型、H7N5亜型、H7N7亜型、H7N8亜型、H7N9亜型、H8N4亜型、H8N5亜型、H9N1亜型、H9N2亜型、H9N3亜型、H9N5亜型、H9N6亜型、H9N7亜型、H9N8亜型、及びH9N9亜型が挙げられる。

【 0 1 9 9 】

A型インフルエンザウイルス株の具体例は、A/sw/アイオワ/15/30(H1N1) ; A/WSN/33(H1N1) ; A/eq/プラハ/1/56(H7N7) ; A/PR/8/34 ; A/マガモ/ポツダム/178-4/83(H2N2) ; A/セグロカモメ/DE/712/88(H16N3) ; A/sw/香港/168/1993(H1N1) ; A/マガモ/アルバータ/211/98(H1N1) ; A/ハマドリ(shorebird)/デラウェア/168/06(H16N3) ; A/sw/オランダ/25/80(H1N1) ; A/sw/ドイツ/2/81(H1N1) ; A/sw/ハノーバー/1/81(H1N1) ; A/sw/ポツダム/1/81(H1N1) ; A/sw/ポツダム/15/81(H1N1) ; A/sw/ポツダム/268/81(H1N1) ; A/sw/フィニステール/2899/82(H1N1) ; A/sw/ポツダム/35/82(H3N2) ; A/sw/コートダルモール/3633/84(H3N2) ; A/sw/ヘント/1/84(H3N2) ; A/sw/オランダ/12/85(H1N1) ; A/sw/カレンツァイン(Karrenzien)/2/87(H3N2) ; A/sw/シュヴェリーン/103/89(H1N1) ; A/七面鳥/ドイツ/3/91(H1N1) ; A/sw/ドイツ/8533/91(H1N1) ; A/sw/ベルギー/220/92(H3N2) ; A/sw/ヘント/V230/92(H1N1) ; A/sw/ライプチヒ/145/92(H3N2) ; A/sw/Re220/92hp(H3N2) ; A/sw/パークム/909/93(H3N2) ; A/sw/シュレースヴィヒホルシュタイン/1/93(H1N1) ; A/sw/スコットランド/419440/94(H1N2) ; A/sw/パークム/5/95(H1N1) ; A/sw/ベスト/5C/96(H1N1) ; A/sw/イングランド/17394/96(H1N2) ; A/sw/イエーナ/5/96(H3N2) ; A/sw/ウーデンローデ/7C/96(H3N2) ; A/sw/ローネ/1/97(H3N2) ; A/sw/コートダルモール/790/97(H1N2) ; A/sw/パークム/1362/98(H3N2) ; A/sw/イタリア/1521/98(H1N2) ; A/sw/イタリア/1553-2/98(H3N2) ; A/sw/イタリア/1566/98(H1N1) ; A/sw/イタリア/1589/98(H1N1) ; A/sw/パークム/8602/99(H3N2) ; A/sw/コートダルモール/604/99(H1N2) ; A/sw/コートダルモール/1482/99(H1N1) ; A/sw/ヘント/7625/99(H1N2) ; A/sw/香港/1774/99(H3N2) ; A/sw/香港/5190/99(H3N2) ; A/sw/香港/5200/99(H3N2) ; A/sw/香港/5212/99(H3N2) ; A/sw/イルエヴィレーヌ/1455/99(H1N1) ; A/sw/イタリア/1654-1/99(H1N2) ; A/sw/イタリア/2034/99(H1N1) ; A/sw/イタリア/2064/99(H1N2) ; A/sw/ベルリン/1578/00(H3N2) ; A/sw/パークム/1832/00(H1N2) ; A/sw/パークム/1833/00(H1N2) ; A/sw/コートダルモール/800/00(H1N2) ; A/sw/香港/7982/00(H3N2) ; A/sw/イタリア/1081/00(H1N2) ; A/sw/ベルチヒ/2/01(H1N1) ; A/sw/ベルチヒ/54/01(H3N2) ; A/sw/香港/9296/01(H3N2) ; A/sw/香港/9745/01(H3N2) ; A/sw/スペイン/33601/01(H3N2) ; A/sw/香港/1144/02(H3N2) ; A/sw/香港/1197/02(H3N2) ; A/sw/スペイン/39139/02(H3N2) ; A/sw/スペイン/42386/02(H3N2) ; A/sw/イス/8808/2002(H1N1) ; A/sw/パークム/1769/03(H3N2) ; A/sw/ビッセンドルフ/IDT1864/03(H3N2) ; A/sw/エーレン(Ehren)/IDT2570/03(H1N2) ; A/sw/ゲッシャー/IDT2702/03(H1N2) ; A/sw/ハーゼリュンネ/2617/03hp(H1N1) ; A/sw/レーニンゲン/IDT2530/03(H1N2) ; A/sw/IVD/IDT2674/03(H1N2) ; A/sw/ノルドキルヒエン/IDT 1993/03(H3N2) ; A/sw/ノルドヴァルデ/IDT2197/03(H1N2) ; A/sw/ノルデン/IDT2308/03(H1N2) ; A/sw/スペイン/50047/03(H1N1) ; A/sw/スペイン/51915/03(H1N1) ; A/sw/フェヒタ/2623/03(H1N1) ; A/sw/ヴィスベク/IDT2869/03(H1N2) ; A/sw/ヴァルタースドルフ/IDT2527/03(H1N2) ; A/sw/ダム(Damme)/IDT2890/04(H3N2) ; A/sw/ゲルダーン/IDT2888/04(H1N1) ; A/sw/グラнстット/IDT3475/04(H1N2) ; A/sw/グレーフェン/IDT2889/04(H1N1) ; A/sw/グーテンスベルク/IDT2930/04(H1N2) ; A/sw/グーテンスベルク/IDT2931/04(H1N2) ; A/sw/ローネ/IDT3357/04(H3N2) ; A/sw/ノルトルップ/IDT3685/04(H1N2) ; A/sw/ゼーセン/IDT3055/04(H3N2) ; A/sw/スペイン/53207/04(H1N1) ; A/sw/スペイン/54008/04(H3N2) ; A/sw/シュトルツェナウ/IDT3296/04(H1N2) ; A/sw/ヴェーデル/IDT2965/04(H1N1) ; A/sw/パートグリースバッハ/IDT4191/05(H3N2) ; A/sw/クロッペンブルク/IDT4777/05(H1N2) ; A/sw/デートリンゲン/IDT3780/05(H1N2) ; A/sw/デートリンゲン/IDT4735/05(H1N2) ; A/sw/エックルハム/IDT5250/05(H3N2) ; A/sw/ハーケンブレック(Harkenblek)/IDT4097/05(H3N2) ; A/sw/ヘルツエン(Hertzen) / 50

IDT4317/05(H3N2) ; A/sw/クローゲル(Kroegl)/IDT4192/05(H1N1) ; A/sw/ラエル/IDT3893/05(H1N1) ; A/sw/ラエル/IDT4126/05(H3N2) ; A/sw/メルツエン/IDT4114/05(H3N2) ; A/sw/ミュスラリングン(Muesleringen)-S./IDT4263/05(H3N2) ; A/sw/オスターホーフェン/IDT4004/05(H3N2) ; A/sw/シュブレンゲ(Sprenge)/IDT3805/05(H1N2) ; A/sw/シタットローン/IDT3853/05(H1N2) ; A/sw/フォーグラルン(Voglarn)/IDT4096/05(H1N1) ; A/sw/ヴォーラーシュト(Wohlerst)/IDT4093/05(H1N1) ; A/sw/バートグリースバッハ/IDT5604/06(H1N1) ; A/sw/ヘルツラケ/IDT5335/06(H3N2) ; A/sw/ヘルツラケ/IDT5336/06(H3N2) ; A/sw/ヘルツラケ/IDT5337/06(H3N2) ; 及び、A/イノシシ/ドイツ/R169/2006(H3N2)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0200】

10

他のA型インフルエンザウイルス株の具体例は、A/トロント/3141/2009(H1N1) ; A/レゲンスブルク/D6/2009(H1N1) ; A/バイエルン/62/2009(H1N1) ; A/バイエルン/62/2009(H1N1) ; A/プランデンブルク/19/2009(H1N1) ; A/プランデンブルク/20/2009(H1N1) ; A/連邦直轄区(Distrito Federal)/2611/2009(H1N1) ; A/マトグロッソ/2329/2009(H1N1) ; A/サンパウロ/1454/2009(H1N1) ; A/サンパウロ/2233/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/37/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/41/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/45/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-1/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-14/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-2/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-21/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-22/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-23/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-24/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-25/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-3/2009(H1N1) ; A/ブタ/アルバータ/OTH-33-7/2009(H1N1) ; A/北京/502/2009(H1N1) ; A/フィレンツェ/10/2009(H1N1) ; A/香港/2369/2009(H1N1) ; A/イタリア/85/2009(H1N1) ; A/サントドミニゴ/572N/2009(H1N1) ; A/カタロニア/385/2009(H1N1) ; A/カタロニア/386/2009(H1N1) ; A/カタロニア/387/2009(H1N1) ; A/カタロニア/390/2009(H1N1) ; A/カタロニア/394/2009(H1N1) ; A/カタロニア/397/2009(H1N1) ; A/カタロニア/398/2009(H1N1) ; A/カタロニア/399/2009(H1N1) ; A/サンパウロ/2303/2009(H1N1) ; A/秋田/1/2009(H1N1) ; A/カストロ/JXP/2009(H1N1) ; A/福島/1/2009(H1N1) ; A/イスラエル/276/2009(H1N1) ; A/イスラエル/277/2009(H1N1) ; A/イスラエル/70/2009(H1N1) ; A/岩手/1/2009(H1N1) ; A/岩手/2/2009(H1N1) ; A/鹿児島/1/2009(H1N1) ; A/大阪/180/2009(H1N1) ; A/エルトモント/Bio87/2009(H1N1) ; A/サンパウロ/2303/2009(H1N1) ; A/札幌/1/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/30/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/31/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/32/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/33/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/34/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/35/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/36/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/38/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/39/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/40/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/42/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/43/2009(H1N1) ; A/ストックホルム/44/2009(H1N1) ; A/宇都宮/2/2009(H1N1) ; A/WRAIR/0573N/2009(H1N1) ; 及び、A/浙江/DTID-ZJU01/2009(H1N1)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0201】

30

ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、B型インフルエンザウイルス由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、B型インフルエンザウイルス由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1、5'CRS1及びmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、B型インフルエンザウイルスの同じ菌株由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、B型インフルエンザウイルスの同じ菌株由来のmORF、3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、1つのB型インフルエンザウイルス株由来の3'NCR1及び5'NCR1並びにB型インフルエンザウイルスの異なる菌株由来の3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。

40

50

節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、1つのB型インフルエンザウイルス株由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1並びにB型インフルエンザウイルスの異なる菌株由来のmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。

【0202】

B型インフルエンザウイルスの非限定的例は、愛知/5/88株、秋田/27/2001株、秋田/5/2001株、アラスカ/16/2000株、アラスカ/1777/2005株、アルゼンチン/69/2001株、アリゾナ/146/2005株、アリゾナ/148/2005株、バンコク/163/90株、バンコク/34/99株、バンコク/460/03株、バンコク/54/99株、バルセロナ/215/03株、北京/15/84株、北京/184/93株、北京/243/97株、北京/43/75株、北京/5/76株、北京/76/98株、ベルギー/WV106/2002株、ベルギー/WV107/2002株、ベルギー/WV109/2002株、ベルギー/WV114/2002株、ベルギー/WV122/2002株、ボン/43株、ブラジル/952/2001株、ブカレスト/795/03株、ブエノスアイレス/161/00)株、ブエノスアイレス/9/95株、ブエノスアイレス/SW16/97株、ブエノスアイレス/VL518/99株、カナダ/464/2001株、カナダ/464/2002株、チャコ/366/00株、チャコ/R113/00株、済州/303/03株、千葉/447/98株、重慶/3/2000株、SA1タイ/2002臨床分離株、SA10タイ/2002臨床分離株、SA100 フィリピン/2002臨床分離株、SA101フィリピン/2002臨床分離株、SA110フィリピン/2002)臨床分離株、SA112フィリピン/2002臨床分離株、SA113フィリピン/2002臨床分離株、SA114フィリピン/2002臨床分離株、SA2タイ/2002臨床分離株、SA20タイ/2002臨床分離株、SA38フィリピン/2002臨床分離株、SA39タイ/2002臨床分離株、SA99フィリピン/2002臨床分離株、CNIC/27/2001株、コロラド/2597/2004株、コルドバ/VA418/99株、チェコスロバキア/16/89株、チェコスロバキア/69/90株、ダエク/10/97株、ダエク/45/97株、ダエク/47/97株、ダエク/9/97株、B/Du/4/78株、B/ダーバン/39/98株、ダーバン/43/98株、ダーバン/44/98株、B/ダーバン/52/98株、ダーバン/55/98株、ダーバン/56/98株、イングランド/1716/2005株、イングランド/2054/2005株、イングランド/23/04株、フィンランド/154/2002株、フィンランド/159/2002株、フィンランド/160/2002株、フィンランド/161/2002株、フィンランド/162/03株、フィンランド/162/2002株、フィンランド/162/91株、フィンランド/164/2003株、フィンランド/172/91株、フィンランド/173/2003株、フィンランド/176/2003株、フィンランド/184/91株、フィンランド/188/2003株、フィンランド/190/2003株、フィンランド/220/2003株、フィンランド/WV5/2002株、福建/36/82株、ジュネーブ/5079/03株、ジェノバ/11/02株、ジェノバ/2/02株、ジェノバ/21/02株、ジェノバ/54/02株、ジェノバ/55/02株、広東/05/94株、広東/08/93株、広東/5/94株、広東/55/89株、広東/8/93株、広州/7/97株、広州/86/92株、広州/87/92株、京幾/592/2005株、ハノーバー/2/90株、ハルビン/07/94株、ハワイ/10/2001株、ハワイ/1990/2004株、ハワイ/38/2001株、ハワイ/9/2001株、河北/19/94株、河北/3/94株、河南/22/97株、広島/23/2001株、香港/110/99株、香港/1115/2002株、香港/112/2001株、香港/123/2001株、香港/1351/2002株、香港/1434/2002株、香港/147/99株、香港/156/99株、香港/157/99株、香港/22/2001株、香港/22/89株、香港/336/2001株、香港/666/2001株、香港/9/89株、ヒューストン/1/91株、ヒューストン/1/96株、ヒューストン/2/96株、湖南/4/72株、茨城/2/85株、仁川(ncleon)/297/2005株、インド/3/89株、インド/77276/2001株、イスラエル/95/03株、イスラエル/WV187/2002株、日本/1224/2005株、江蘇/10/03株、ヨハネスブルク/1/99株、ヨハネスブルク/96/01株、門真/1076/99株、門真/122/99株、鹿児島/15/94株、カンザス/22992/99株、ハズコフ(Khazkov)/224/91株、神戸/1/2002株、高知/193/99株、ラツィオ/1/02株、リー/40株、レニングラード/129/91株、リスボン/2/90株、ロサンゼルス/1/02株、ルサカ/270/99株、リヨン/1271/96株、マレーシア/83077/2001株、マブト/1/99株、マルデルプラタ/595/99株、メリーランド/1/01株、メンフィス/1/01株、メンフィス/12/97-MA株、ミシガン/22572/99株、三重/1/93株、ミラノ/1/01株、ミンスク/318/90株、モスクワ/3/03株、名古屋/20/99株、南昌/1/00株、ナッシュビル/10/93株、ナッシュビル/45/91株、ネブラスカ/2/01株、オランダ/801/90株、オランダ/429/98株、ニューヨーク/1/2002株、NIB/48/90株、寧夏/45/83株、ノルウェー/1/84株、オマーン/16299/2001株、大阪/1059/97株、大阪/983/97-V2株、オスロ/1329/2002株、オスロ/50

1846/2002株、パナマ/45/90株、パリ/329/90株、パルマ/23/02株、パース/211/2001株、ペルー/1364/2004株、フィリピン/5072/2001株、釜山/270/99株、ケベック/173/98株、ケベック/465/98株、ケベック/7/01株、ローマ/1/03株、佐賀/S172/99株、ソウル/13/95株、ソウル/37/91株、山東/7/97株、上海/361/2002株、滋賀/T30/98株、四川/379/99株、シンガポール/222/79株、スペイン/WV27/2002株、ストックホルム/10/90株、スイス/5441/90株、台湾/0409/00株、台湾/0722/02株、台湾/97271/2001株、テヘラン/80/02株、東京/6/98株、トリエステ/28/02株、ウランウデ/4/02株、イギリス/34304/99株、USSR/100/83株、ビクトリア/103/89株、ウィーン/1/99株、武漢/356/2000株、WV194/2002株、玄武/23/82株、山形/1311/2003株、山形/K500/2001株、アラスカ/12/96株、GA/86株、長崎/1/87株、東京/942/96、及びロチェスター/02/2001株が挙げられる。

10

【0203】

ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、C型インフルエンザウイルス由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、C型インフルエンザウイルス由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1、5'CRS1及びmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、C型インフルエンザウイルスの同じ菌株由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、C型インフルエンザウイルスの同じ菌株由来のmORF、3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、1つのC型インフルエンザウイルス株由来の3'NCR1及び5'NCR1並びにC型インフルエンザウイルスの異なる菌株由来の3'CRS1及び5'CRS1を含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、1つのC型インフルエンザウイルス株由来の3'NCR1、5'NCR1、3'CRS1及び5'CRS1並びにC型インフルエンザウイルス株由来のmORFを含むキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含んでいる。

20

【0204】

C型インフルエンザウイルスの非限定的例は、愛知/1/81株、アンナーバー/1/50株、青森/74株、カリフォルニア/78株、イングランド/83株、ギリシア/79株、広島/246/2000株、広島/252/2000株、兵庫/1/83株、ヨハネスブルク/66株、神奈川/1/76株、京都/1/79株、ミシシッピ/80株、宮城/1/97株、宮城/5/2000株、宮城/9/96株、奈良/2/85株、ニュージャージー/76株、ブタ/北京/115/81株、埼玉/3/2000株、静岡/79株、山形/2/98株、山形/6/2000株、山形/9/96株、ベルリン/1/85株、イングランド/892/8株、五大湖/1167/54株、JJ/50株、ブタ/北京/10/81株、ブタ/北京/439/82)株、テーラー(TAYLOR)/1233/47株、及びC/山形/10/81株が挙げられる。

30

【0205】

ある実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスが、インフルエンザウイルスのゲノム内に認められる遺伝子分節のフルセット未満(すなわち、A型インフルエンザウイルスの8未満の型の遺伝子分節、B型インフルエンザウイルスの8未満の型の遺伝子分節、又はC型インフルエンザウイルスの7未満の型の遺伝子分節)を含む同時分離するキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の群を含む場合、このウイルスは更に、インフルエンザウイルスのゲノム内に認められる遺伝子分節のフルセットを完全にするための遺伝子分節を含む。例えば、組換えインフルエンザウイルスが、HAタンパク質をコードしているキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節及びPAタンパク質をコードしているキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む場合、この組換えインフルエンザは、NS、PB1、PB2、M、NP、及びNA(A型及びB型インフルエンザウイルスについて)インフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの誘導体を更に含むことができる。インフルエンザウイルスのゲノム内に認められる遺伝子分節のフルセットを完全にするこれらのインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの誘導体は、本明細書において「相補するインフル

40

50

エンザウイルス遺伝子分節」という。非限定的例として、組換えインフルエンザウイルスは、下記の遺伝子分節を含むことができる：

【表16】

表16

以下のものから誘導されたキメラ インフルエンザウイルス遺伝子分節：	相補するインフルエンザウイルス遺伝子 分節	
HA, NS	PB2, PB1, PA, NP, NA, M	10
HA, NA	PB2, PB1, PA, NP, NS, M	
NA, NS	PB2, PB1, PA, HA, NP, M	
HA, NA, NS	PB2, PB1, PA, NP, M	
HA, PB1, PB2	PA, NP, NS, M, NA	
HA, PB1, PB2, NS	PA, NP, M, NA	
HA, PB1, PB2, PA	NS, NP, M, NA	
HA, PA, NS	PB1, PB2, NP, M, NA	
HA, M, NS	PB1, PB2, PA, M, NA	
HA, PA, PB1, PB2, PA	M, NA, NS	20
NS, PB1, PB2, PA	HA, M, NA, NP	
HA, NA, PA, NS	NP, PB1, PB2,	
HA, NA, NS	NP, PA, PB1, PB2	
HA, NP, PB1, PB2	M, NA, NS, PA	

【0206】

ある実施態様において、この相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節は全て、同じ型又は亜型のインフルエンザウイルスから誘導されることがある。他の実施態様において、相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節は、1、2又はそれ以上の異なる型又は亜型のインフルエンザウイルスから誘導されることがある。一部の実施態様において、相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節は全て、同じインフルエンザウイルス株 k から誘導されることがある。他の実施態様において、相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節は、1、2又はそれ以上の異なるインフルエンザウイルス株から誘導されることがある。ある実施態様において、相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節は、弱毒化されたインフルエンザウイルス株から誘導されることがある。

【0207】

ある実施態様において、1、2又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節及び1、2又はそれ以上の相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節は、同じ型又は亜型のインフルエンザウイルスから誘導されることがある。他の実施態様において、1、2又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節及び1、2又はそれ以上の相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節は、1、2又はそれ以上の異なる型又は亜型のインフルエンザウイルスから誘導されることがある。一部の実施態様において、1、2又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節及び1、2又はそれ以上の相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節は、同じインフルエンザウイルス株から誘導されることがある。他の実施態様において、1、2又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節及び1、2又はそれ以上の相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節は、1、2又はそれ以上の異なるインフルエンザウイルス株から誘導されることがある。

【0208】

10

20

30

40

50

ある実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、融合タンパク質をコードしている少なくとも1つの遺伝子分節を含む。この融合タンパク質は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又は相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節によりコードされ得る。融合タンパク質は、インフルエンザウイルスタンパク質又はそれらの断片の、異種タンパク質(例えば、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生体抗原、真菌抗原、腫瘍抗原、腫瘍関連抗原、サイトカイン、増殖因子、ペプチドタグ、又は検出可能な物質などとの融合であることができる(そのような抗原、サイトカイン、増殖因子、ペプチドタグ、及び検出可能な物質の例については、5.1.3節を参照されたい))。

【0209】

ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、9つの遺伝子分節を包含し、ここで(a)少なくとも1つの遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域において認められるパッケージングシグナル又はそれらの誘導体；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；(iii)オープンリーディングフレームの3'及び5'近位のヌクレオチドが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又はそれらの断片又は誘導体；(iv)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；及び、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル：を含み、並びに、(b)少なくとも1つの遺伝子分節は：(i)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；(iii)インフルエンザウイルス遺伝子分節の1、2、3、4、5、6、7又は8に対し異種であるオープンリーディングフレーム；(iv)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナル；及び、(v)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域又はそれらの誘導体において認められるパッケージングシグナルを含む。別の実施態様において、3'及び/又は5'近位のコード領域配列は、このオープンリーディングフレームに隣接し、かつ翻訳されない。一部の実施態様において、3'近位のコード領域配列は、3'近位のコード領域配列の翻訳を妨げるよう変異されている。一部の実施態様において、5'近位のコード領域配列は、5'近位のコード領域配列が翻訳されないことを確実にするように1以上の変異を有する。具体的な実施態様において、このインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム又は断片に導入された変異は、サイレント変異である。例えば9-分節化された組換えインフルエンザウイルスの例については、実施例2及び3並びに図29及び30を参照されたい。ある実施態様において、9-分節化された組換えインフルエンザウイルスは、弱毒化されている。

【0210】

別の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、9つの遺伝子分節を含み、ここで：(a)少なくとも1つの遺伝子分節は：(i)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)ある個数の3'近位のヌクレオチド及びある個数の5'近位のヌクレオチドが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレーム；及び、(v)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(vi)第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含み；並びに、(b)少なくとも1つの遺伝子分節は：(i)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'非コード領域；(ii)第2の型のインフルエンザウイルス遺

10

20

30

40

50

伝子分節の3'近位のコード領域内の任意の開始コドンが変異されている、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の3'近位のコード領域；(iii)インフルエンザウイルス遺伝子分節の1、2、3、4、5、6、7又は8に対し異種であるオープンリーディングフレーム；及び、(v)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域；及び、(vi)第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'非コード領域：を含む。ある実施態様において、第2のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'近位のヌクレオチドの5～25又は5～50、及び5'近位のヌクレオチドの5～25又は5～50は、1以上の変異を保有する。具体的実施態様において、そのような変異はサイレント変異である。一部の実施態様において、第1及び第2のインフルエンザウイルス遺伝子分節の5'近位のコード領域は、5'近位のコード領域が翻訳されないように、変異されている。

10

【0211】

一部の実施態様において、9-分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型又は菌株由来のインフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型又は菌株由来のHA抗原をコード及び/又は発現している。例えば9-分節化された組換えインフルエンザウイルスは、H1 HA抗原及びH3 HA抗原をコード及び/又は発現している。一部の実施態様において、1つのHA抗原は季節性インフルエンザウイルスに由来し、かつ他方のHA抗原は汎流行性のインフルエンザウイルスに由来している。具体的実施態様において、これら2つのHA抗原は各々、弱毒化変異を含むことができる。ある実施態様において、9-分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス抗原及び少なくとも1、2、3若しくは4の、又は1～3、1～4、若しくは2～4の非-インフルエンザウイルス抗原(例えば、細菌病原体、又はインフルエンザウイルス以外のウイルス病原体に由来する抗原)をコード及び/又は発現している。これらの実施態様に従い、一部の実施態様において、1つの遺伝子分節の異種オープンリーディングフレームは、他方の遺伝子分節によりコードされたインフルエンザウイルス抗原よりも、異なるインフルエンザウイルスの型、亜型又は菌株に由来するインフルエンザウイルス抗原をコードすることができる。他の実施態様において、1つの遺伝子分節の異種オープンリーディングフレームは、非-インフルエンザウイルス抗原(例えば、細菌抗原、腫瘍抗原、又はインフルエンザウイルス抗原以外のウイルス抗原)をコードすることができる。更に別の実施態様において、異種オープンリーディングフレームは、例えばGFP又はルシフェラーゼなどの、検出可能なタンパク質をコードしている。

20

【0212】

ある実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、2シストロン性mRNAをコードしている少なくとも1つの遺伝子分節を含む。2シストロン性mRNAは、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又は相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節によりコードされ得る。2シストロン性mRNAをコードしているインフルエンザウイルス遺伝子分節を作製する技術は、当該技術分野において公知である。2シストロン性技術は、配列内リボソーム侵入部位(IRES)配列の使用により、複数のタンパク質のコード配列を単独のmRNAへと操作することを可能にする。簡潔には、1つのタンパク質のコード領域は、第2のタンパク質のオープンリーディングフレームへ挿入される。この挿入は、IRES、及び適切な発現及び/又は機能に必要な任意の翻訳されないシグナル配列により隣接される。この挿入は、オープンリーディングフレーム、第2のタンパク質のポリアデニル化又は転写のプロモーターを破壊してはならない(例えば、Garcia-Sastreらの文献、1994, J. Virol. 68: 6254-6261、及びGarcia-Sastreらの文献、1994, Dev. Biol. Stand. 82: 237-246を参照し、これらの各文献はその全体が引用により本明細書に組み込まれる。)。同じく例えば、米国特許第6,887,699号、米国特許第6,001,634号、米国特許第5,854,037号及び米国特許第5,820,871号も参照し、これらの各特許はその全体が引用により本明細書に組み込まれる。当該技術分野において公知の又は本明細書に記載される任意のIRES(例えば、BiP遺伝子のIRES、GenBankデータベースエントリー番号HUMGRP78のヌクレオチド372～592；又は、脳心筋炎ウイルス(EMCV)のIRES、GenBankデータベースエントリー番号C

30

40

50

Q867238のヌクレオチド1430～2115)を、本発明に従い使用することができる。2シストロン性mRNAの1つのオープンリーディングフレームは、インフルエンザウイルスタンパク質又はそれらの断片をコードすることができ、かつ2シストロン性mRNAの他方のオープンリーディングフレームは、異種タンパク質(ウイルス抗原、細菌抗原、寄生体抗原、真菌抗原、腫瘍抗原、腫瘍関連抗原、サイトカイン、増殖因子、ペプチドタグ、又は検出可能な物質などをコードすることができる(そのような抗原、サイトカイン、増殖因子、ペプチドタグ、及び検出可能な物質の例については、5.1.3節を参照のこと))。

【0213】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、弱毒化されている。特定の実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、そのウイルスが、少なくとも部分的に感染性であり続け、かつインビオにおいて複製することができるが、病原性でない非臨床レベルの感染をもたらす、低い力価のみを生じるように、弱毒化されている。そのような弱毒化されたウイルスは、ウイルス又はそれらの免疫原性組成物が、免疫応答を誘導するよう対象に投与される本明細書に記載される実施態様に特に適している。10

【0214】

一部の実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節内に1以上の弱毒化変異を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、2、3又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節内に1以上の弱毒化変異を含む。一部の実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節内に1以上の弱毒化変異を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、2、3又はそれ以上の相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節内に1以上の弱毒化変異を含む。一部の実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節内に1以上の弱毒化変異を含み、かつ相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節内に1以上の弱毒化変異を含む。ある実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、1、2、3又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節内に1以上の弱毒化変異を含み、かつ1、2、3又はそれ以上の相補するインフルエンザウイルス遺伝子分節内に1以上の弱毒化変異を含む。20

【0215】

ある実施態様において、1以上の弱毒化変異は、NS1、NP、HA、NA、PB1、PB2及び/又はPAの1つ以上をコードしている遺伝子分節のオープンリーディングフレーム内であることができる。具体的実施態様において、1以上の弱毒化変異は、HA遺伝子分節のオープンリーディングフレーム内であることができる。別の具体的実施態様において、1以上の弱毒化変異は、NP遺伝子分節のオープンリーディングフレーム内であることができる。別の実施態様において、1以上の弱毒化変異は、PB1遺伝子分節のオープンリーディングフレーム内であることができる。別の実施態様において、1以上の弱毒化変異は、PB2遺伝子分節のオープンリーディングフレーム内であることができる。ある実施態様において、インフルエンザウイルスの遺伝子分節内の1以上の弱毒化変異は、例えば、化学的変異誘発により作製されたウイルス変異体の選択、遺伝子操作によるゲノムの変異、弱毒化された機能を持つ分節を含む再集合体ウイルスの選択、又はコンディショナルウイルス変異体(例えば、A/レニングラード/134/47/57(H2N2)、A/アンナーバー/6/60(H2N2)、B/アンナーバー/1/66、及びB/リー/40などの低温適応ウイルス)の選択などの、当該技術分野において公知の任意の方法に従い実現することができる。具体的実施態様において、弱毒化されている1以上の温度感受性変異を、遺伝子分節のオープンリーディングフレームに導入することができる。一部の実施態様において、1以上の温度感受性変異は、PB1(K391E、E581G、A661T)、PB2(N265S)、及びNP(D34G)の1つ以上を含む。40

【0216】

一部の実施態様において、弱毒性組換えインフルエンザウイルスは、低温適応ワクチン50

マスター株A/アンナーバー/6/60(例えば、このウイルスの説明についてはJinらの文献、2003, *Virology*, 306: 18-24を参照されたい)によりコードされた下記NP、PB1及びPB2タンパク質を発現する。

【0217】

一部の実施態様において、弱毒性組換えインフルエンザウイルスは、ウイルスが細胞のインターフェロン(IFN)反応と拮抗する能力を持つ変異されたNS1タンパク質を発現する。インフルエンザウイルスNS1のオープンリーディングフレームに導入され得るこの変異の種類の例は、欠失、置換、挿入及びそれらの組み合わせを含む。1又はそれ以上の変異が、NS1のオープンリーディングフレームを通じて(例えば、N-末端、C-末端又はその間のどこか)及び/又はNS1遺伝子の調節エレメントのどこかに導入され得る。一実施態様において、弱毒性組換えインフルエンザウイルスは、NS1のC-末端から5個、好ましくは10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75、80、85、90、95、99、100、105、110、115、120、125、126、130、135、140、145、150、155、160、165、170若しくは175個のアミノ酸残基からなる欠失、又はC-末端から5～170、25～170、50～170、100～170、100～160、若しくは105～160の間のアミノ酸残基の欠失を生じる、インフルエンザウイルスNS1オープンリーディングフレーム内に変異を有するゲノムを含む。別の実施態様において、組換え弱毒性インフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスNS1オープンリーディングフレーム内に変異を有するゲノムを含み、その結果これは、N-末端アミノ酸を番号1として、アミノ酸残基1～130、アミノ酸残基1～126、アミノ酸残基1～125、アミノ酸残基1～124、アミノ酸残基1～120、アミノ酸残基1～115、アミノ酸残基1～110、アミノ酸残基1～100、アミノ酸残基1～99、アミノ酸残基1～95、アミノ酸残基1～85、アミノ酸残基1～83、アミノ酸残基1～80、アミノ酸残基1～75、アミノ酸残基1～73、アミノ酸残基1～70、アミノ酸残基1～65、又はアミノ酸残基1～60のNS1タンパク質をコードしている。NS1変異及び変異されたNS1を含むインフルエンザウイルスの例については、例えば米国特許第6,468,544号及び第6,669,943号；並びに、Liらの文献、1999, *J. Infect. Dis.* 179: 1132-1138を参照し、これらは各々引用によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0218】

一部の実施態様において、弱毒性組換えインフルエンザウイルスは、Watanabeらの文献、2008, *J. Virol.* 82(5): 2486-2492に説明されたように、変異されたM2タンパク質を発現している。

【0219】

具体的実施態様において、弱毒性組換えインフルエンザウイルスは、汎流行性又は季節性インフルエンザウイルス由来のHAをコードしている第1のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節、及び1以上の弱毒化変異を伴うウイルスのポリメラーゼサブユニット(すなわち、例えばPA、PB1又はPB2)をコードしている第2のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む。

【0220】

(5.3 インフルエンザウイルスの構築)

当業者に公知の技術を使用し、本明細書に記載される1、2又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む、組換えインフルエンザウイルスを作製することができる。例えば、逆遺伝学の技術を使用し、そのようなインフルエンザウイルスを作製することができる。簡潔には、逆遺伝学の技術は概して、ウイルスポリメラーゼによる認識及び成熟ビリオンの生成に必要なパッケージングシグナルに必要不可欠である、マイナス鎖、ウイルスRNAの非コード領域を含む合成組換えウイルスRNAの調製に関与している。この組換えRNAは、組換えDNA鑄型から合成され、かつ精製されたウイルスポリメラーゼ複合体によりインピトロにおいて再構成され、細胞をトランスフェクトするために用いることができる組換えリボ核タンパク質(RNP)を形成する。インピトロ又はインピボのいずれかにおける合成RNAの転写時にウイルスポリメラーゼタンパク質が存在する場合に、より効率的なトランスフェクションが達成される。合成組換えRNPは、感染性ウイルス粒子に救出することができる。前述の技術は、1992年11月24日に公布された米国特許第5,166,057号

10

20

30

40

50

; 1998年12月29日に公布された米国特許第5,854,037号；1996年2月20日に公開された欧州特許公報欧州特許第0702085A1号；米国特許出願第09/152,845号；1997年4月3日に公開されたPCT公報WO 97/12032；1996年11月7日に公開されたWO 96/34625；欧州特許公報欧州特許第A780475号；1999年1月21日に公開されたWO 99/02657；1998年11月26日に公開されたWO 98/53078；1998年1月22日に公開されたWO 98/02530；1999年4月1日に公開されたWO 99/15672；1998年4月2日に公開されたWO 98/13501；1997年2月20日に公開されたWO 97/06270；及び1997年6月25日に公開されたEPO 780 475A1に記載され、それぞれは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0221】

或いは、無ヘルパープラスミド技術を使用し、1以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節を含む組換えインフルエンザウイルスを作製することができる。簡潔には、プラスミドベクターへのPCR生成物の挿入を可能にする特異な制限部位を含むプライマーによるPCRを用いて、ウイルス分節の完全長cDNAが増幅される(Flandorferらの文献(2003, J. Virol. 77: 9116-9123; Nakayaらの文献(2001, J. Virol. 75: 11868-11873); その両方は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。プラスミドベクターは、正確なマイナスの(vRNAセンス)転写物が発現されるようにデザインされる。例えば、正確なマイナスの(vRNAセンス)転写物がポリメラーゼIプロモーターから生成されるように、プラスミドベクターは、切断型ヒトRNAポリメラーゼIプロモーターとデルタ型肝炎ウイルスリボザイム配列との間にPCR生成物を置くようにデザインされてもよい。各ウイルス分節を含む別個のプラスミドベクターに加え必要なウイルスタンパク質を含む発現ベクターを細胞にトランスフェクトして、組換えウイルス粒子の生成をもたらすことができる。別の例において、必要なウイルスタンパク質をコードするウイルスゲノムRNA及びmRNAの両方が発現されるプラスミドベクターを用いることができる。無ヘルパープラスミド技術の詳細な説明については、例えば、国際公開公報WO 01/04333；米国特許第6,951,754号、第7,384,774号、第6,649,372号、及び第7,312,064号；Fodorらの文献、1999, J. Virol. 73: 9679-9682；Quinlivanらの文献、2005, J. Virol. 79: 8431-8439；Hoffmannらの文献、2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6108-6113；及び、Neumannらの文献、1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9345-9350を参照し、これらは引用によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0222】

具体的実施態様において、1、2又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている1、2又はそれ以上の核酸配列が、インフルエンザウイルスゲノムにおいて認められる残りの遺伝子分節を提供する宿主細胞へトランスフェクトされ、かつウイルス粒子の作製に必要なタンパク質を発現する。当該技術分野において公知の技術を使用し、生じた組換えインフルエンザウイルスを単離/精製することができる(例えば、インフルエンザウイルスの単離/精製の技術については、下記5.4節を参照のこと)。

【0223】

(5.4 インフルエンザウイルスの増殖)

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、本明細書に記載されるウイルスの使用を可能にする力価までウイルスを生育させる、任意の基体で増殖させることができる。一実施態様において、基体は、対応する野生型ウイルスで測定される力価と同等の力価まで本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを増殖させる。

【0224】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、ウイルスにより感染され易い宿主細胞(例えば、鳥類細胞、ニワトリ細胞など)、胚発育卵又は動物(例えば、トリ)において増殖することができる。宿主細胞の具体例は、Vero細胞、MDCK細胞、MBCK細胞、COS細胞、293細胞、293T細胞、A549細胞、MDBK細胞などが挙げられる。そのような方法は、当業者に周知である。具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、細胞株において増殖することができる。別の実施態様において、本明細

10

20

30

40

50

書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、ニワトリ細胞又は胚発育卵において増殖される。代表的ニワトリ細胞は、ニワトリ胚性線維芽細胞及びニワトリ胚性腎細胞を含むが、これらに限定されるものではない。

【0225】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、例えば6~14日齢、6~9日齢、10~12日齢、又は10~14日齢の胚発育卵において増殖されることがある。幼若な又は未熟な胚発育卵を用い、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを増殖することができる。未熟な胚発育卵は、10日齢未満卵である卵、例えばインターフェロン(IFN)-欠損である6~9日の卵を包含している。未熟な胚発育卵は、例えばインキュベーション温度の変更；薬物による処理などの、増殖条件の変更；又は、IFNシステムが10~12日齢の卵と比べ完全に発達しないよう卵の発育を遅らせる任意の他の変更の結果としての、最大でも10日齢であるがこれ未満の未熟卵を人工的に模した卵も包含している。一実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、10日齢胚発育卵において増殖されることがある。本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、例えば尿膜腔など、胚発育卵の様々な場所で増殖されることがある。具体的実施態様において、胚発育卵は、胚発育鶏卵である。ウイルスの生育及び増殖に関する詳細な説明については、引用によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれている、例えば米国特許第6,852,522号及び米国特許第6,852,522号を参照されたい。10

【0226】

ウイルスの単離については、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、一般的に周知の清澄化手法、例えば密度勾配遠心分離及びカラムクロマトグラフィーによって細胞培養から取り出され、細胞成分から分離され、所望により、当業者に周知である手法、例えばプラーカアッセイを用いて更に精製することができる。20

【0227】

(5.5 組成物及び投与経路)

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、組成物に組み込むことができる。具体的実施態様において、本組成物は、免疫原性組成物(例えばワクチン製剤)などの医薬組成物である。本明細書に提供される医薬組成物は、対象へ組成物が投与されることを可能にする任意の形態であることができる。具体的実施態様において、本医薬組成物は、獣医学的投与及び/又は臨床投与に適している。本組成物は、インフルエンザウイルス感染の予防及び/又は治療の方法において使用することができる。本組成物は、インフルエンザウイルス疾患の予防及び/又は治療の方法において使用することができる。30

【0228】

一実施態様において、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体と混合して、組換えインフルエンザウイルスを含む。一部の実施態様において、医薬組成物は、組換えインフルエンザウイルスに加え、1種以上の他の療法を含むことができる。具体的実施態様において、医薬組成物(例えばワクチンなどの免疫原性組成物)に混入された本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、生きているウイルスである。対象におけるウイルスの増殖は、自然感染で起こるものに類似した種類及び程度の長期刺激をもたらすことができ、従ってかなりの長期に持続性免疫を付与するので、対象への投与のための生きている組換えインフルエンザウイルスを含有する免疫原性組成物が好ましいことがある。40

【0229】

一部の実施態様において、医薬組成物(例えばワクチンなどの免疫原性組成物)に組み込まれた本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、不活化されている。当業者に公知の技術を使用し、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを不活化することができる。不活化の一般的な方法は、ホルマリン、熱、又は界面活性剤を使用する。例えば、その全体が引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第6,635,246号を参照されたい。他の方法は、米国特許第5,891,705号；第5,106,619号、及び第4,693,981号に開示されているものを含み、これらは引用によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれている。50

【 0 2 3 0 】

具体的実施態様において、本明細書に記載される免疫原性組成物は、一価の製剤である。他の実施態様では、本明細書に記載される免疫原性組成物は、多価製剤である。一例において、多価製剤は、A型インフルエンザウイルス由来の抗原を発現している1以上の組換えインフルエンザウイルス、及びB型インフルエンザウイルス由来の抗原を発現している1以上の組換えインフルエンザウイルスを含有している。

【 0 2 3 1 】

具体的実施態様において、免疫原性組成物は、9つの遺伝子分節を含む本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを含有している。ある実施態様において、そのような9-分節化されたインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のインフルエンザウイルス抗原を発現している。具体的実施態様において、9-分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のHA抗原を発現している。一部の実施態様において、9-分節化されたインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス抗原及び少なくとも1、2、3若しくは4又は1~3、1~4、若しくは2~4の非-インフルエンザウイルス抗原を発現している。

10

【 0 2 3 2 】

本明細書で用いるように、用語「医薬として許容し得る」は、連邦又は州政府の規制機関に承認されているか、或いは米国薬局方、又は動物、より詳細にはヒトに用いるための他の一般に承認された薬局方に収載されていることを意味する。用語「担体」は、医薬組成物がそれと一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤又は媒体を指す。液体担体として、特に注射用溶液のために、食塩水及び水性デキストロース及びグリセロール溶液を使用することもできる。適する賦形剤には、デンプン、グルコース、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。適する薬用担体の例は、E. W. Martinによる「レミントンの薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」に記載されている。

20

【 0 2 3 3 】

ある実施態様において、生物分解性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリエチレングリコール(PEG化)、ポリメチルメタクリレートポリマー、ポリラクチド、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸を担体として用いることができる。リポソーム又はミセルを、医薬として許容し得る担体として用いることもできる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に開示されているような、当業者に公知である方法によって調製することができる。

30

【 0 2 3 4 】

具体的実施態様において、医薬組成物は、対象への意図された投与経路に適するように製剤化される。例えば、医薬組成物は、非経口、経口、皮内、鼻腔内、経皮、肺内、結腸直腸、腹腔内、及び直腸投与に適するように製剤化することができる。具体的実施態様において、医薬組成物は、静脈内、経口、腹腔内、鼻腔内、気管内、皮下、筋肉内、局所、皮内、経皮、又は肺内投与のために製剤化されてもよい。

40

【 0 2 3 5 】

ある実施態様において、本明細書に記載される組成物は、アジュバントを含むか、又はそれと併用投与される。本明細書に記載される組成物との併用投与のためのアジュバントは、前記組成物の投与の前、同時又は後に投与されてもよい。具体的実施態様において、本明細書に記載される不活化ウイルス免疫原性組成物は、1種以上のアジュバントを含有する。一部の実施態様において、用語「アジュバント」は、本明細書に記載される組成物と一緒に又はその一部として投与される場合、組換えインフルエンザウイルスへの免疫応答を増強、強化及び/又はブーストするが、その化合物が単独で投与される場合にはウイルスに対する免疫応答を起こさせない化合物を指す。一部の実施態様において、アジュバ

50

ントは組換えインフルエンザウイルスへの免疫応答を起こさせ、アレルギー又は他の有害反応は起こさない。アジュバントは、例えば、リンパ球動員、B細胞及び/又はT細胞の刺激、並びにマクロファージの刺激を含むいくつかの機構によって、免疫応答を増強することができる。

【0236】

アジュバントの具体例は、アルミニウム塩(ミョウバン)(例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム及び硫酸アルミニウム)、3デ-0-アシル化モノスルホリルリピドA(MPL)(英国特許第2220211号を参照)、MF59(Novartis社)、AS03(GlaxoSmithKline社)、AS04(GlaxoSmithKline社)、ポリソルベート80(Tween 80; ICL Americas社)、イミダゾピリジン化合物(国際公開公報WO 2007/109812として公開された国際出願PCT/US2007/064857を参照)、イミダゾキノキサリン化合物(国際公開公報WO 2007/109813号として公開された国際出願PCT/US2007/064858を参照)及びサポニン、例えばQS21(Kensilらの文献、「ワクチンのデザイン: サブユニット及びアジュバント手法(Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach)」(Powell及びNewman編、Plenum Press、NY、1995); 米国特許第5,057,540号を参照)が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施態様において、アジュバントは、フロイントアジュバント(完全又は不完全)である。他のアジュバントは、任意選択でモノスルホリルリピドAなどの免疫賦活剤と組み合わせた、水中油型乳濁液(例えばスクアレン又はピーナッツ油)である(Stouteらの文献(N. Engl. J. Med. 336: 86-91 (1997))を参照)。別のアジュバントは、CpGである(Bioworld Today、1998年11月15日)。そのようなアジュバントは、MPL又は3-DMP、QS21、ポリグルタミン酸若しくはポリリシンなどの重合体若しくは単量体アミノ酸などの、他の特異的免疫賦活剤と一緒に又は含まずに使用することができる。
10

【0237】

本明細書に記載される医薬組成物は、容器、パック又はディスペンサー内に、投与に関する指示書と一緒に含まれることができる。

【0238】

(5.5.1. ウィルス生ワクチン)

一実施態様において、1種以上の生きている本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを含む免疫原性組成物(例えばワクチン)が、本明細書で提供される。一部の実施態様において、この生きているウィルスは弱毒化されている。一部の実施態様において、免疫原性組成物は、2、3、4種又はそれ以上の生きているウイルスを含有する。
30

【0239】

ある実施態様において、1投与量につき、約 10^5 ~ 約 10^{10} 蛍光焦点単位(FFU)の生きている弱毒化された本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、約0.1 ~ 約0.5mgのグルタミン酸一ナトリウム、約1.0 ~ 約5.0mgの加水分解ブタゼラチン、約1.0 ~ 約5.0mgアルギニン、約10 ~ 約15mgショ糖、約1.0 ~ 約5.0mg二塩基性リン酸カリウム、約0.5 ~ 約2.0mg一塩基性リン酸カリウム、及び約0.001 ~ 約0.05 μg/ml硫酸ゲンタマイシンを含有する免疫原性組成物(例えばワクチン)が、本明細書で提供される。一部の実施態様において、免疫原性組成物(例えばワクチン)は、単回の0.2ml投与量を含む充填済み噴霧器として包装される。
40

【0240】

具体的な実施態様において、1投与量につき、 $10^{6.5} \sim 10^{7.5}$ FFUの生きている弱毒化本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、0.188mgグルタミン酸一ナトリウム、2.0mg加水分解ブタゼラチン、2.42mgアルギニン、13.68mgショ糖、2.26mg二塩基性リン酸カリウム、0.96mg一塩基性リン酸カリウム、及び0.015 μg/ml未満の硫酸ゲンタマイシンを含有する免疫原性組成物(例えばワクチン)が、本明細書で提供される。一部の実施態様において、免疫原性組成物(例えばワクチン)は、単回の0.2ml投与量を含む充填済み噴霧器として包装される。

【0241】

具体的な実施態様において、本生きているウイルスは、それを本明細書に記載される免疫

50

20

30

40

50

原性組成物で使用する前に、胚発育鶏卵で増殖させる。別の具体的実施態様において、生きているウイルスは、それを本明細書に記載される免疫原性組成物で使用する前に、胚発育鶏卵で増殖させない。別の具体的実施態様において、生きているウイルスは、それを本明細書に記載される免疫原性組成物で使用する前に、哺乳類細胞、例えば不死化ヒト細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開公報WO 07/045674として公開された国際出願PCT/EP2006/067566を参照)、又はMDCK細胞などのイヌ腎細胞(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開公報WO 08/032219として公開された国際出願PCT/IB2007/003536を参照)で増殖させる。

【0242】

対象でのウイルスの増殖は、自然感染で起こるものに類似した種類及び程度の長期刺激をもたらすことができ、従ってかなりの持続性免疫を付与するので、対象への投与のための生きているウイルスを含む免疫原性組成物が好ましいことがある。

10

【0243】

(5.6 インフルエンザウイルスに特異的に結合する抗体の生成)

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザに対する、例えばインフルエンザウイルス赤血球凝集素に対する中和抗体を誘発するために用いることができる。具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物は、当業者に公知である技術(例えば、免疫アフィニティークロマトグラフィー、遠心分離、沈殿など)を用いて単離することができる抗体の生成を含む免疫応答を誘導するために、ヒト以外の対象(例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモットなど)に投与されてもよい。

20

【0244】

ある実施態様において、本明細書に記載される方法に従い本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの免疫原性組成物が投与されるヒト以外の対象は、ヒト抗体を生成することが可能であるトランスジェニック動物(例えばトランスジェニックマウス)である。ヒト抗体は、機能的内在性免疫グロブリンを発現することは不可能であるが、ヒト免疫グロブリン遺伝子は発現することができる、トランスジェニックマウスを用いて生成することができる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、マウスの胚性幹細胞へ無作為に又は相同組換えにより導入される。或いは、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子に加え、ヒトの可変領域、定常領域、及び多様領域が、マウスの胚性幹細胞に導入される。マウス重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えにより、ヒト免疫グロブリン座の導入とは別に又は同時に機能しなくなる。特にJH領域のホモ接合欠失は、内在性抗体生成を妨害する。修飾された胚性幹細胞が、拡大(expand)されかつ胚盤胞に微量注入され、キメラマウスを作出する。その後キメラマウスは繁殖され、ヒト抗体を発現するホモ接合型子孫を生じる。トランスジェニックマウスが持つヒト免疫グロブリントランス遺伝子は、B細胞分化の間に再配列し、引き続きクラススイッチ及び体細胞変異を受ける。従ってそのような技術を用い、治療に有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を作製することが可能である。このヒト抗体作製技術の概要については、Lonberg及びHuszarの文献、Int. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)を参照されたい。このヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体の作製技術並びにそのような抗体の作製に関するプロトコールの詳細な考察については、例えば、PCT公報WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 欧州特許第0598877号; 米国特許第5,413,923号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,569,825号; 第5,661,016号; 第5,545,806号; 第5,814,318号; 第5,885,793号; 第5,916,771号; 及び、第5,939,598号を参照し、これらは引用によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれている。Abgenix社(フリーモント、カリフォルニア州)、Genpharm社(サンノゼ、カリフォルニア州)、及びMedarex社(プリンストン、NJ)などの会社は、選択された抗原に対するヒト抗体を提供することを保証することができる。

30

【0245】

或いは、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、抗体ライブラリーから抗体をスクリーニングするために用いることができる。例えば、組換えインフルエンザ

40

50

ウイルスを固体支持体(例えば、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、ポリスチレンビーズ、アルミナゲル又は多糖、磁気ビーズ)に固定化し、抗体への結合性についてスクリーニングすることができる。代わりに、抗体を固体支持体に固定化し、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスへの結合性についてスクリーニングすることができる。組換えインフルエンザウイルスに結合する抗体についてスクリーニングするために、任意のスクリーニングアッセイ、例えばパニングアッセイ、ELISA、表面プラズモン共鳴、又は当該技術分野で公知である他の抗体スクリーニングアッセイを用いることができる。スクリーニングされる抗体ライブラリーは、市販の抗体ライブラリー、インビトロで生成されたライブラリー、又はインフルエンザに感染した個体から抗体を同定及びクローニング又は単離することによって得られたライブラリーでよい。特定の実施態様において、抗体ライブラリーは、インフルエンザウイルス大発生の生存者から生成される。抗体ライブラリーは、当該技術分野で公知である方法に従って生成することができる。特定の実施態様において、抗体ライブラリーは、抗体をクローニングし、それらをファージディスプレイライブラリー又はファージミドディスプレイライブラリーで用いることによって生成される。

【0246】

本明細書に記載される方法に従い誘発又は同定された抗体は、当該技術分野で公知であるか又は本明細書に記載される生物学的アッセイを用い、インフルエンザウイルス抗原の特異性及びインフルエンザウイルスを中和する能力について試験することができる。一実施態様において、ヒト以外の動物抗体から同定又は単離された抗体は、インフルエンザウイルス抗原に特異的に結合する。別の実施態様において、ヒト以外の動物抗体から同定又は単離された抗体は、インフルエンザウイルスの2以上の型、亜型又は菌株により発現されたインフルエンザウイルス抗原に特異的に結合する。一実施態様において、ヒト以外の動物抗体から同定又は単離された抗体は、1、2又はそれ以上のインフルエンザウイルス型、亜型又は菌株を中和する。一部の実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを用い誘発又は同定される抗体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又は16又はそれ以上のインフルエンザウイルス亜型又は菌株を中和する。一実施態様において、中和抗体は1つ以上のA型インフルエンザウイルスの菌株又は亜型を中和する。別の実施態様において、中和抗体は1つ以上のB型インフルエンザウイルスの菌株を中和する。別の実施態様において、中和抗体は1つ以上のA型インフルエンザウイルスの菌株及び1つ以上のB型インフルエンザウイルスの菌株を中和する。

【0247】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを用い誘発又は同定された抗体は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫活性部分、すなわち、赤血球凝集素ポリペプチドに特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を含む。免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂)又はサブクラスであってよい。抗体には、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド連結Fv(sdfv)及び抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本明細書に記載される方法を用いて誘発又は同定される抗体に対する抗Id抗体を含む)、及び上記のいずれかのエピトープ結合性断片が含まれるが、これらに限定されない。

【0248】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを用い誘発又は同定された抗体は、診断的イムノアッセイ、受動免疫療法及び抗イディオタイプ抗体の生成で用いることができる。受動免疫療法で用いられる前の抗体は、修飾されてもよく、例えば、抗体はキメラ化又はヒト化されてもよい。キメラ化及びヒト化された抗体の生成に関する総説については、例えば、それぞれは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第4,444,887号及び第4,716,111号；並びに、国際公開公報WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、及びWO 91/10741を参照されたい。更

10

20

30

40

50

に、受動免疫療法で抗体を用いる前に、インフルエンザウイルスを中和する抗体の能力及びインフルエンザウイルス抗原に対する抗体の特異性を試験することができる。インフルエンザウイルス感染及びインフルエンザウイルス感染に起因する疾患の予防又は治療の中和抗体の使用に関する議論については、下記5.7節を参照されたい。

【0249】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを用い誘発又は同定された抗体は、組成物に組み込むことができる。具体的実施態様において、この組成物は医薬組成物である。一部の実施態様において、医薬組成物は、抗体に加え、1種以上の他の療法を含むことができる。本明細書に提供される医薬組成物は、組成物が対象へ投与されることを可能にする任意の形態であることができる。具体的実施態様において、医薬組成物は、獣医学的投与及び/又は臨床投与に適している。別の具体的実施態様において、抗体組成物は、意図された投与経路(例えば、非経口、鼻腔内、又は肺内投与)のために製剤される。本抗体組成物は、インフルエンザウイルス感染の予防及び/又は治療方法において使用することができる。本抗体組成物は、インフルエンザウイルス疾患の予防及び/又は治療方法において使用することができる。

10

【0250】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを用い誘発又は同定された抗体は、療法の効果及び/又は疾患の進行を監視するために用いることができる。この目的のために、それらに限定されないが、少し例を挙げれば、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ及び免疫電気泳動アッセイなどの技術を用いる、競合的及び非競合的アッセイ系を含む、当該技術分野で公知である任意のイムノアッセイ系を用いることができる。

20

【0251】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを用い誘発又は同定された抗体は、抗イディオタイプ抗体の生成において用いることができる。抗イディオタイプ抗体は、インフルエンザの特定の抗原、例えば赤血球凝集素ポリペプチドの中和エピトープに結合する抗体の亜集団を生成するために、次に免疫のために用いることができる(引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、Jerneの文献(1974, Ann. Immunol. (Paris) 125c: 373); Jerneらの文献(1982, EMBO J. 1: 234))。

30

【0252】

(5.7 予防及び治療での使用)

一態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの免疫原性組成物を利用して対象において免疫応答を誘導する方法が、本明細書で提供される。具体的実施態様において、対象でインフルエンザウイルスに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの免疫原性組成物の有効量を投与することを含む。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの免疫原性組成物は、インフルエンザウイルスの2つ又はそれ以上の型、亜型、又は菌株由来のインフルエンザウイルスタンパク質を発現し、その結果インフルエンザウイルスの2つ又はそれ以上の型、亜型、又は菌株に対する免疫応答を誘導するために使用することができる。具体的実施態様において、対象においてインフルエンザウイルスに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、ウイルス生ワクチンとして本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを投与することを含む。特定の実施態様において、ウイルス生ワクチンは、弱毒化されたウイルスを含有する。別の実施態様において、対象においてインフルエンザウイルスに対して免疫応答を誘導する方法は、それを必要とする対象に、不活化ウイルスワクチンとして本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを投与することを含む。

40

【0253】

具体的実施態様において、対象において免疫応答を誘導する方法は、9つの遺伝子分節

50

を含む本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、又はそれらの免疫原性組成物を対象に投与することを含む。ある実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のインフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。具体的実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のHA抗原をコード及び/又は発現している。一部の実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス抗原及び少なくとも1、2、3若しくは4又は1~3、1~4、若しくは2~4の非-インフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。

【0254】

10

別の態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの医薬組成物を利用し、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療する方法が、本明細書に提供される。一実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の有効量を投与することを含む。別の実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の有効量及び1種以上の他の療法を投与することを含む。別の実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、ウイルス生ワクチンとして本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを投与することを含む。特定の実施態様において、ウイルス生ワクチンは、弱毒化されたウイルスを含有する。別の実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、不活化ウイルスワクチンとして本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを投与することを含む。

【0255】

20

具体的実施態様において、それを必要とする対象に、9つの遺伝子分節を含む本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、又はそれらの医薬組成物を投与することを含む、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法が、本明細書に提供される。ある実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のインフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。具体的実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のHA抗原をコード及び/又は発現している。一部の実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス抗原及び少なくとも1、2、3若しくは4又は1~3、1~4、若しくは2~4の非-インフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。

【0256】

30

別の態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの医薬組成物を利用し、対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療する方法が、本明細書に提供される。具体的実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の有効量を投与することを含む。別の実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の有効量及び1種以上の他の療法を投与することを含む。別の実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、ウイルス生ワクチンとして本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを投与することを含む。特定の実施態様において、ウイルス生ワクチンは、弱毒化されたウイルスを含有する。別の実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、不活化ウイルスワクチンとして本明細書に記載される組換えインフ

40

50

ルエンザウイルスを投与することを含む。

【0257】

具体的実施態様において、それを必要とする対象に、9つの遺伝子分節を含む本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、又はそれらの医薬組成物を投与することを含む、対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法が、本明細書に提供される。ある実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のインフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。具体的実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のHA抗原をコード及び/又は発現している。一部の実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス抗原及び少なくとも1、2、3若しくは4又は1~3、1~4、若しくは2~4の非-インフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。10

【0258】

別の態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、送達ベクターとして使用することができる。具体的実施態様において、インフルエンザウイルスに対し異種のタンパク質を発現している本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、タンパク質を対象へ送達するためのベクターとして使用することができる。例えば、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、対象にとって恩恵があるサイトカイン又は増殖因子を発現することができる。別の具体的実施態様において、インフルエンザウイルスに対し異種の抗原を発現している本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、この抗原に対する免疫応答を誘導するために、ベクターとして抗原を対象へ送達するために使用することができる。一部の実施態様において、抗原は、非-インフルエンザウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、又は寄生体抗原などの、感染性病原体に由来している。ある実施態様において、抗原は、腫瘍抗原又は腫瘍関連抗原である。一部の実施態様において、抗原は、呼吸器病原体(例えばRSV)から誘導されるか又はから得られる。インフルエンザウイルス抗原及びインフルエンザウイルスに対し異種の1つ以上の抗原を発現している本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス及びその異種抗原に対する免疫応答を誘導することができる。20

【0259】

具体的実施態様において、9つの遺伝子分節を含む本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスが、送達ベクターとして使用される。ある実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のインフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。具体的実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスの2つの異なる型、亜型、又は菌株由来のHA抗原をコード及び/又は発現している。一部の実施態様において、この9つの分節化された組換えインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス抗原及び少なくとも1、2、3若しくは4又は1~3、1~4、若しくは2~4の非-インフルエンザウイルス抗原をコード及び/又は発現している。30

【0260】

別の態様において、本明細書に記載される中和抗体を投与することによって、対象でインフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療する方法が、本明細書で提供される。具体的実施態様において、対象でインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される中和抗体又はその医薬組成物の有効量を投与することを含む。別の実施態様において、対象でインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される中和抗体又はその医薬組成物の有効量及び1種以上の他の療法を投与することを含む。特定の実施態様において、中和抗体はモノクローナル抗体である。40

【0261】

50

別の態様において、本明細書に記載される中和抗体を投与することによって、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療する方法が、本明細書で提供される。具体的実施態様において、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される中和抗体又はその医薬組成物の有効量を投与することを含む。別の実施態様において、対象でインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される中和抗体又はその医薬組成物の有効量及び1種以上の他の療法を投与することを含む。特定の実施態様において、中和抗体はモノクローナル抗体である。

【0262】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は本明細書に記載される中和抗体は、単独で、又は当該技術分野において公知の別の型/他の型の療法と組み合わせて投与し、インフルエンザウイルス感染を軽減、対象におけるインフルエンザウイルス力価を低下、対象間のインフルエンザウイルスの伝播を減少、インフルエンザウイルス複製を阻害、インフルエンザウイルス-誘導した融合を阻害、症状の数及び/若しくは頻度を低下、並びに/又はインフルエンザウイルスのその宿主細胞受容体への結合を阻害することができる。10

【0263】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は本明細書に記載される中和抗体の投与は、インフルエンザウイルス複製を、当業者に公知又は本明細書に記載されるアッセイにおいて、該抗体(複数可)が存在しないか又は陰性対照(例えば、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスではないインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス)若しくは対照抗体(例えばインフルエンザウイルスに結合しない抗体))の存在する中でのインフルエンザウイルスの複製に比べ、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%阻害又は減少する。インフルエンザウイルス複製の阻害は、当該技術分野において公知の方法(例えば、ノーザンプロット分析、RT-PCR、ウェスタンプロット分析など)を用い、対象からの生体試料中のインフルエンザウイルス力価を検出することにより、決定することができる。20

【0264】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は本明細書に記載される中和抗体の投与は、対象におけるインフルエンザウイルス力価の約1倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約8倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、約100倍、約105倍、約110倍、約115倍、約120倍、約125倍又はそれ以上の低下を生じさせる。インフルエンザウイルス力価の倍数での低下は、陰性対照(例えば、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスではないインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス)又は対照抗体(例えばインフルエンザウイルスに結合しない抗体))と比べて、患者又は患者集団における別の治療と比べて、若しくは抗体の投与前の患者の力価と比べてであることができる。30

【0265】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は本明細書に記載される中和抗体の投与は、対象におけるインフルエンザウイルス力価の、およそ $1\log$ 以上、およそ $2\log$ 以上、およそ $3\log$ 以上、およそ $4\log$ 以上、およそ $5\log$ 以上、およそ $6\log$ 以上、およそ $7\log$ 以上、およそ $8\log$ 以上、およそ $9\log$ 以上、およそ $10\log$ 以上、 $1\sim 5\log$ 、 $2\sim 10\log$ 、 $2\sim 5\log$ 、又は $2\sim 10\log$ の低下を生じさせる。このインフルエンザウイルス力価の対数での低下は、陰性対照(例えば、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスではないインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス)又は対照抗体(例えばインフルエンザウイルスに結合しない抗体))と比べて、別の治療と40

比べて、若しくは抗体又は組換えインフルエンザウイルスの投与前の患者の力価と比べてであることができる。

【0266】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は本明細書に記載される中和抗体の投与は、対象のインフルエンザウイルス感染を、当業者に公知又は本明細書に記載されるアッセイにおいて、該抗体又は組換えインフルエンザウイルスが存在しないか、又は陰性対照(例えば、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスではないインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス)又は対照抗体(例えばインフルエンザウイルスに結合しない抗体))の存在下での対象のインフルエンザウイルス感染に比べ、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%阻害又は低下させる。10

【0267】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は本明細書に記載される中和抗体の投与は、対象のインフルエンザウイルスの伝播を、当業者に公知又は本明細書に記載されるアッセイにおいて、該抗体又は組換えインフルエンザウイルスが存在しないか、又は陰性対照(例えば、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスではないインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス)又は対照抗体(例えばインフルエンザウイルスに結合しない抗体))の存在下での対象のインフルエンザウイルスの伝播に比べ、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%阻害又は低下させる。20

【0268】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は本明細書に記載される中和抗体の投与は、1の対象と少なくとも1の他の対象とのインフルエンザウイルスの伝播を、当業者に公知又は本明細書に記載されるアッセイにおいて、該抗体又は組換えインフルエンザウイルスが存在しないか、又は陰性対照(例えば、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスではないインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス)又は対照抗体(例えばインフルエンザウイルスに結合しない抗体))の存在下での1の対象と他の少なくとも1の対象とのインフルエンザウイルスの伝播に比べ、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%阻害又は低下させる。30

【0269】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は本明細書に記載される中和抗体の投与は、対象におけるインフルエンザウイルス疾患又は感染の症状の数及び/又は頻度を低下させる(インフルエンザウイルス疾患の症状の例は、体の痛み(特に関節及び咽喉)、発熱、恶心、頭痛、炎症を起こした目、疲労、咽喉炎、赤くなった目又は皮膚、及び腹痛を含むが、これらに限定されるものではない)。40

【0270】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は本明細書に記載される抗体の投与は、入院の発生率を、該組換えインフルエンザウイルス又は抗体を投与しない場合の入院の発生率と比べ、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、50

くとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%減少させる。

【0271】

具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は抗体の投与は、死亡率を、該組換えインフルエンザウイルス又は抗体を投与しない場合の死亡率と比べ、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%減少させる。

【0272】

具体的実施態様において、本明細書に記載される中和抗体の投与は、インフルエンザウイルスがその宿主細胞受容体へ結合するのを、当業者に公知又は本明細書に記載されるアッセイにおいて、該抗体が存在しないか、又は陰性対照(例えば対照抗体(例えばインフルエンザウイルスに結合しない抗体))の存在下でのインフルエンザウイルスのその宿主細胞受容体への結合と比べ、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%防止又は阻害する。

【0273】

具体的実施態様において、本明細書に記載される中和抗体の投与は、インフルエンザウイルスが誘導した融合を、当業者に公知又は本明細書に記載されるアッセイにおいて、該抗体が存在しないか、又は陰性対照(例えば対照抗体(例えばインフルエンザウイルスに結合しない抗体))の存在下でのインフルエンザウイルスが誘導した融合と比べ、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%防止又は阻害する。

【0274】

具体的実施態様において、本明細書に記載される中和抗体の投与は、細胞へのウイルス接着後のインフルエンザウイルスが誘導した融合を、当業者に公知又は本明細書に記載されるアッセイにおいて、該抗体が存在しないか、又は陰性対照(例えば対照抗体(例えばインフルエンザウイルスに結合しない抗体))の存在下での細胞へのウイルス接着後のインフルエンザウイルスが誘導した融合と比べ、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%防止又は阻害する。

【0275】

本明細書に包含された方法に従い、本明細書に記載されるか又は本明細書に提供される方法に従い生成された組換えインフルエンザウイルス又は抗体は、第1、第2、第3、第4及び/又は第5の選択療法を含むが、これらに限定されるものではない、任意の選択療法として使用することができる。更に、本明細書に包含された方法に従い、本明細書に記載されるか又は本明細書に提供される方法に従い生成された組換えインフルエンザウイルス又は抗体は、本明細書に記載されるか又は本明細書に提供される方法に従い生成された組換えインフルエンザウイルス又は抗体以外の療法が何らかの有害作用又は不忍受を生じる前又は生じた後に、使用することができる。インフルエンザウイルス疾患の発症を予防し、及び/又はインフルエンザウイルス疾患を治療するか若しくは再発を低下するために、本明細書に記載されるか又は本明細書に提供される方法に従い生成された1種以上の組換えインフルエンザウイルス及び/又は抗体を投与する方法が、本明細書に包含される。

【0276】

10

20

30

40

50

(5.7.1. 患者集団)

一実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、ナイーブな対象、すなわち、インフルエンザウイルス感染に起因する疾患有しないか、又はインフルエンザウイルス感染に感染したことがなく、かつ現在感染していない対象である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染を獲得するリスクがあるナイーブな対象である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス疾患に罹患しているか又は罹患することが予想される患者である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染又はそれらに付随する疾患と診断された患者である。一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス疾患のいかなる症状も顕在化していないインフルエンザウイルスに感染した患者である。

10

【0277】

別の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス疾患の1つ以上の症状を経験している患者である。インフルエンザウイルス疾患の症状は、体の痛み(特に関節及び咽喉)、発熱、恶心、頭痛、炎症を起こした目、疲労、咽喉炎、赤くなった目又は皮膚、及び腹痛を含むが、これらに限定されるものではない。別の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、入院を必要とするのに十分に重篤である疾患の症状が顕在化していないインフルエンザウイルス疾患の患者である。

20

【0278】

別の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス又はC型インフルエンザウイルスに感染した患者である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、A型インフルエンザウイルスの特定の亜型に感染した患者である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、A型インフルエンザウイルスのH1又はH3亜型に感染した患者である。そのような実施態様に従い、このウイルスに感染した患者は、インフルエンザウイルス疾患の症状を顕在化することがある。

30

【0279】

一部の実施態様において、本明細書に記載される活性化合物又は組成物が投与されるべき対象は、動物である。ある実施態様において、動物はトリである。ある実施態様において、動物はイヌである。ある実施態様において、動物はネコである。ある実施態様において、動物はウマである。ある実施態様において、動物はウシである。ある実施態様において、動物は哺乳類、例えばウマ、ブタ、マウス、又は靈長類、好ましくはヒトである。

【0280】

具体的実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、ヒトである。ある実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、ヒト乳児である。一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、ヒト幼児である。ある実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、ヒト小児である。他の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、ヒト成人である。一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、ヒト高齢者である。

40

【0281】

具体的実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、月齢6カ月を超えるあらゆる乳児又は小児、及び50歳を超えるあらゆる成人である。他の実施態様において、対象は妊娠個体である。別の実施態様において、対象は、インフルエンザ時期(例えば、北半球では11月から4月まで)の間に妊娠している可能性がある個体

50

又は妊娠する個体である。具体的実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、1、2、3、4、5、6、7又は8週前に出産した女性である。

【0282】

一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス感染から生じる疾患のリスクが高いあらゆる対象である(例えば、免疫障害又は免疫不全の個体)。一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス感染から生じる疾患のリスクが高い個体(例えば、免疫障害又は免疫抑制の個体)と近くで接触するあらゆる対象である。

【0283】

一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス感染から生じる合併症若しくは疾患への易罹患性を高めるあらゆる状態に影響される個体である。他の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染が、個体が影響されるか又はそのリスクがある別の状態の合併症を増加させる可能性を有する対象である。特定の実施態様において、インフルエンザウイルス合併症への易罹患性を高めるそのような状態、又はその状態に付随する合併症をインフルエンザウイルスが増加させる状態は、例えば肺を冒す状態、例えば囊胞性線維症、気腫、喘息又は細菌感染症(例えば、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)、レジオネラ・ニューモフィラ(Legionella pneumophila)及びトラコマ病原体(Chlamydia trachomatus)に起因する感染症)；心血管疾患(例えば、先天性心臓疾患、うっ血心不全及び冠動脈疾患)；内分泌障害(例えば、糖尿病)；並びに、神経学的及びニューロン発達上の状態(例えば、脳、脊髄、末梢神経及び筋肉の障害(例えば脳性麻痺、癲癇(発作疾患)、脳卒中、知的障害(例えば、精神遅滞)、筋ジストロフィー及び脊髄損傷))である。インフルエンザウイルス合併症を増大することがある他の状態は、腎障害；血液障害(貧血又は鎌状赤血球症を含む)；又は、弱まった免疫系(医薬品、癌などの悪性腫瘍、臓器移植又はHIV感染症に起因した免疫抑制を含む)を含む。

【0284】

一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、老人保健施設又は児童養護施設などのグループホームに在住する個体である。一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、老人保健施設又は児童養護施設などのグループホームで勤務するか又はかなりの時間を過ごす対象である。一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、医療従事者(例えば、医師又は看護師)である。一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、寮(例えば大学寮)に在住している。一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、軍の一員である。一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、学校に通う子供である。

【0285】

一部の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、以下を含む、インフルエンザウイルス感染からの合併症を発症するリスクが増大した対象である：合併症のリスクが高い者にインフルエンザウイルスを伝染させ得る個体、例えば、6カ月未満の乳児を含む家庭を含む、高リスクの個体のいる家の家族、6カ月未満の乳児と接触する個体、又は老人保健施設若しくは他の長期療養施設に住む個体と接触する個体；肺、心臓又は循環の長期障害をもつ個体；代謝疾患(例えば、糖尿病)の個体；腎臓障害をもつ個体；血液障害(貧血又は鎌状赤血球症を含む)をもつ個体；弱くなった免疫系(医薬品、癌などの悪性腫瘍、臓器移植又はHIV感染症に起因した免疫抑制を含む)の個体；並びに、長期アスピリン療法を投与された(従って、インフルエンザに感染した場合、ライ症候群を起こす可能性の高い)小児。

【0286】

10

20

30

40

50

別の実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、以下の、生後6ヶ月以上の健康な個体が含まれる：インフルエンザの大発生が起こり得る外国及び地域、例えば熱帯域及び4月から9月にかけての南半球に旅行する予定のある者；インフルエンザウイルスが循環している世界の地域からの者を含み得る大きな組織化観光団の一員として旅行する者；学校又は大学に通い、寮に住むか、又は施設環境に住む者；或いは、インフルエンザウイルス疾患で病気になるリスクを減らしたい者。

【0287】

具体的実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、従来の療法に対し有害反応を受け易い個体である。他の実施態様において、患者は、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は抗体以外の療法に対し不応性であることが証明されたが、最早これらの療法を受けていない個人である。ある実施態様において、インフルエンザウイルス疾患の患者は、感染症が有意に根絶されず及び/又は症状が有意に軽減されない場合に、療法に対し不応性である。そのような文脈において当該技術分野において容認される「不応性」の意味を用い、患者が不応性であるかどうかの決定は、感染症に関する療法の有効性をアッセイするための当該技術分野において公知の任意の方法により、インビオ又はインビトロのいずれかで行うことができる。様々な実施態様において、インフルエンザウイルス疾患の患者は、療法後にウイルス複製が減少されないか又は増加する場合に、不応性である。

10

【0288】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法により治療又は予防される患者は、抗生物質、抗-ウイルス療法、抗真菌療法、又は他の生物学的療法/免疫療法により既に治療されている患者である。これらの患者の中には、不応性患者、従来療法には若すぎる患者、及び現存する療法による治療にも拘わらずインフルエンザウイルス疾患又はそれに関連した症状が再発する患者がいる。

20

【0289】

ある実施態様において、インフルエンザウイルスに対し異種のタンパク質を発現する本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを受け取る患者は、そのようなタンパク質の発現から恩恵がある患者である。例えば、異種タンパク質がサイトカイン又は増殖因子であり、かつ患者がある状態又は疾患を有する場合、サイトカイン若しくは増殖因子の発現は、その状態又は疾患の治療に有益であり得る。

30

【0290】

ある実施態様において、インフルエンザウイルスに対し異種の抗原を発現する本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを受け取る患者は、それから異種抗原が誘導される病原体に感染したか又は感染し易い患者である。一部の実施態様において、インフルエンザウイルスに対し異種の抗原を発現する本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを受け取る患者は、それから異種抗原が誘導される病原体による感染症と診断された患者である。一部の実施態様において、インフルエンザウイルスに対し異種の抗原を発現する本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを受け取る患者は、それから異種抗原が誘導される病原体による感染症に関連した疾患の1つ以上の症状を顕在化している患者である。一部の実施態様において、インフルエンザウイルスに対し異種の抗原を発現する本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを受け取る患者は、それから異種抗原が誘導される病原体による感染症に関連した疾患と診断された患者である。一部の実施態様において、この抗原は、呼吸器病原体に由来し、例えば抗原は、RSVのF、G、若しくはM2タンパク質、コロナウイルスのスパイクタンパク質(例えばSARS、HuCoV)、ヒトメタ肺炎ウイルスのFタンパク質、パラインフルエンザウイルスのF又はHNタンパク質、ヘンドラウイルスのG又はFタンパク質、ニパウイルスのG又はFタンパク質、又はアデノウイルスのキャプシドタンパク質であるか又はこれらから誘導される。

40

【0291】

ある実施態様において、腫瘍抗原又は腫瘍関連抗原を発現する本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを受け取る患者は、癌患者、癌に罹患し易い患者、又は癌罹

50

患のリスクのある患者である。一部の実施態様において、腫瘍抗原又は腫瘍関連抗原を発現する本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを受け取る患者は、癌の遺伝性素因のある患者である。ある実施態様において、腫瘍抗原又は腫瘍関連抗原を発現する本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを受け取る患者は、癌と診断された患者である。具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルスにより発現される腫瘍抗原又は腫瘍関連抗原は、治療されている癌に関連して意味をなす。例えば、対象が肺癌を有する場合、肺癌に関連した抗原を発現する組換えインフルエンザウイルスが、対象へ投与される。具体的実施態様において、癌は、例えば、肉腫、メラノーマ、リンパ腫及び癌腫などの固体癌である。別の実施態様において、癌は、白血病などの非固体癌である。癌の非限定的例は、脳腫瘍、肺癌、結腸癌、膀胱癌、肝臓癌、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、骨癌、及び子宮癌を含む。

【0292】

一部の実施態様において、以下の患者集団の1つ以上にはウイルス生ワクチンを投与しないことが望ましいであろう：高齢者；生後6カ月未満の乳児；妊娠個体；1歳未満の乳児；2歳未満の小児；3歳未満の小児；4歳未満の小児；5歳未満の小児；20歳未満の成人；25歳未満の成人；30歳未満の成人；35歳未満の成人；40歳未満の成人；45歳未満の成人；50歳未満の成人；70歳を超える高齢者；75歳を超える高齢者；80歳を超える高齢者；85歳を超える高齢者；90歳を超える高齢者；95歳を超える高齢者；この年齢層でのアスピリン及び野生型インフルエンザウイルス感染に関連する合併症のために、アスピリン又はアスピリン含有医薬品を投与されている小児及び若者(2~17歳)；喘息又は他の反応性気道疾患の病歴をもつ個体；重度のインフルエンザ感染の素因となることがある慢性の根底にある医学的状態をもつ個体；ギランバレー症候群の病歴をもつ個体；発熱を伴う急性の重大な疾患がある個体；又は中程度若しくは重度の病気である個体。そのような個体については、本明細書に記載される不活性ウイルスワクチン、スプリットウイルスワクチン、サブユニットワクチン、ビロゾーム、ウイルス様粒子又は非ウイルスベクターの投与が好ましいであろう。ある実施態様において、ウイルス生ワクチンを投与されるのが好ましい対象には、2~17歳の健康な小児及び若者、並びに18~49歳の健康な成人が含まれ得る。

【0293】

ある実施態様において、生きているウイルスを含む免疫原性製剤は、他のウイルス生ワクチンと同時投与されない。

【0294】

(5.7.2. 投与の用量及び頻度)

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、抗体又は組成物は、様々な経路により対象へ送達することができる。これらは、鼻腔内、気管内、経口、皮内、筋肉内、局所、腹腔内、経皮、静脈内、肺内、結膜内及び皮下経路を含むが、これらに限定されるものではない。一部の実施態様において、組成物は、局所投与のために、例えば皮膚への塗布のために製剤される。具体的実施態様において、組成物は、鼻腔投与のために、例えば鼻腔スプレーの一部として製剤される。ある実施態様において、組成物は、筋肉内投与のために製剤される。一部の実施態様において、組成物は、皮下投与のために製剤される。ウイルス生ワクチンに関する具体的実施態様において、ワクチンは、注射以外の経路により投与される。

【0295】

組換えインフルエンザウイルスが対象へ投与される場合、インフルエンザウイルス感染の自然の経路を介して、免疫原性組成物を導入することが好ましい。組換えインフルエンザウイルスが活発な分泌型及び細胞型免疫応答を誘導する能力は、有利に使用することができる。例えば、組換えインフルエンザウイルスによる気道の感染は、強力な分泌型免疫応答を誘導し、例えば泌尿生殖器系において、インフルエンザウイルスに対する随伴する防御をもたらす。加えて好ましい実施態様において、いずれか適切な経路により肺に本医薬組成物を導入することが望ましいことがある。肺内投与は、例えば吸入器又はネプライザーの使用により、及びスプレーとして使用するためのエアロゾル化剤を含有する製剤に

10

20

30

40

50

より利用することもできる。

【0296】

一部の実施態様において、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物が、ヒト以外の対象(例えば非-ヒト対象)に投与される場合、ウイルス又は組成物は、対象の食物中で、対象へ経口的に投与される。他の実施態様において、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物が対象(例えば非-ヒト対象)に投与される場合、ウイルス又は組成物は、対象の水中で、対象へ経口的に投与される。他の実施態様において、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物が非-ヒト対象に投与される場合、ウイルス又は組成物は、ウイルス又は組成物を対象に噴霧することにより投与される。

【0297】

インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患の治療及び/又は予防で有効である本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、抗体又は組成物の量は、疾患の性質に依存し、標準の臨床技術で決定することができる。製剤で使用される正確な投与量は、投与経路、及びそれに起因する感染又は疾患の重症度にも依存するので、臨床医の判断及び各対象の状況に従って決定されるべきである。例えば、有効量は、投与手段、標的部位、患者の生理的状態(年齢、体重、健康を含む)、患者がヒトであるか動物であるか、投与される他の医薬品、及び治療が予防的であるか治療的であるかによって異なつてもよい。同様に、送達ベクターとして有効である組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の量は、変動し、かつ標準の臨床技術により決定することができる。治療用量は、安全性及び有効性を最適化するために、最適に滴定される。

【0298】

ある実施態様において、至適用量範囲を確定するのを助けるために、インビトロアッセイが使用される。有効量は、インビトロ又は動物モデル試験系から誘導される用量反応曲線から推定することができる。

【0299】

生きている組換えインフルエンザウイルスに関する例証的投与量は、1回投与量につきビリオン数が10～100個又はそれ以上を変動することができる。一部の実施態様において、生きている組換えインフルエンザウイルスの至適用量は、 10^2 、 5×10^2 、 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 、 10^6 、 5×10^6 、 10^7 、 5×10^7 、 10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 又は 10^{12} pfuであり、かつ1回、2回、3回又はそれ以上、必要な頻度の間隔で対象に投与することができる。別の実施態様において、生きている組換えインフルエンザウイルスは、0.2mL投与量が生きている組換えインフルエンザウイルスの $10^{6.5-7.5}$ 蛍光焦点単位を含有するように製剤される。別の実施態様において、不活化ワクチンは、インフルエンザ赤血球凝集素を約15μg～約100μg、約15μg～約75μg、約15μg～約50μg、又は約15μg～約30μg含有するように製剤される。

【0300】

ある実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物は、単回投与量として、続いて3～6週後に2回目の投与量として対象に投与される。これらの実施態様に従い、2回目の接種に続いて6～12カ月間隔で、追加抗原接種を対象に投与することができる。ある実施態様において、追加抗原接種は、異なる組換えインフルエンザウイルス又はその組成物を利用することができる。一部の実施態様において、同じ組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の投与が繰り返されてもよく、その投与は、少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2カ月、75日、3カ月又は少なくとも6カ月間を空けることができる。

【0301】

小児への投与のための具体的実施態様では、少なくとも1カ月間隔で与えられる、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の2回投与が小児に投与される。成人への投与のための具体的実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の単回投与が与えられる。別の実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の2回

10

20

30

40

50

投与は、少なくとも1カ月間を空けて成人に投与される。別の実施態様において、幼児(6カ月～9歳)は、最初は1カ月間隔で与えられる2回投与で本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物が投与されてもよい。特定の実施態様において、ワクチン接種の初年度に1回投与だけを投与された小児は、翌年には2回投与が投与されるべきである。一部の実施態様において、本明細書に記載される免疫原性組成物を初めて投与される2～8歳の小児には、4週間隔で投与される2回投与が好ましい。ある実施態様において、3歳を超える対象に好ましいであろう0.5mlとは対照的に、生後6～35カ月の小児には半量(0.25ml)が好ましい。

【0302】

特定の実施態様において、組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物は、秋又は冬に、すなわち各半球のインフルエンザ時期の前又はその期間中に対象に投与される。一実施態様において、小児は、2回目の投与をインフルエンザシーズンのピークの前に投与することができるように、シーズンの初め、例えば北半球では9月下旬、又は10月上旬に初回投与が投与される。

【0303】

抗体による受動免疫については、用量は患者体重1kgにつき約0.0001～100mg、より一般的には0.01～50mg/kg又は0.1～15mg/kgの範囲内である。例えば、用量は体重1kgにつき1mg若しくは10mg、又は1～10mgの範囲であってよく、換言すると、70kgの患者についてはそれぞれ70mg若しくは700mg、又は70～700mgの範囲であってよい。例示的な治療計画は、1年若しくは数年の間、又は数年間隔で、2週間ごとに1回、又は月に1回、又は3～6カ月ごとに1回の投与を必要とする。一部の方法では、異なる結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、その場合には、投与される各抗体の用量は指示される範囲内に入る。抗体は、通常複数の機会に投与される。単一の投薬の間隔は、毎週、毎月、又は毎年であることができる。患者で組換えインフルエンザウイルスに対する抗体の血液レベルを測定することに示されるように、間隔は不規則であってもよい。

【0304】

(5.7.3. 併用療法)

様々な実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又は抗体は、対象に対して1つ以上の他の療法(例えば、抗ウイルス療法若しくは免疫調節療法)と併用投与されてもよい。一部の実施態様において、本明細書に記載される医薬組成物は、対象に1つ以上の療法と併用投与されてもよい。1つ以上の他の療法は、インフルエンザウイルス疾患の治療若しくは予防に役立つことができるか、又はインフルエンザウイルス疾患に付随する状態を改善することができる。

【0305】

一部の実施態様において、1つ以上の他の療法は、鎮痛剤、解熱薬又は呼吸を楽にするか若しくは助ける療法などの補助的処置である。補助的処置の具体例は、超音波ネプライザーによる空気の加湿、エアロゾル化されたラセミ体エピネフリン、経口デキサメタゾン、静脈内輸液、挿管、解熱剤(例えばイブプロフェン、アセトメタ芬(acetometaphin))、並びに抗生素及び/又は抗真菌療法(すなわち続発性細菌感染及び/又は真菌感染の予防又は治療)を含む。.

【0306】

ある実施態様において、本療法は、5分未満間隔、30分未満間隔、1時間間隔、約1時間間隔、約1～約2時間間隔、約2時間～約3時間間隔、約3時間～約4時間間隔、約4時間～約5時間間隔、約5時間～約6時間間隔、約6時間～約7時間間隔、約7時間～約8時間間隔、約8時間～約9時間間隔、約9時間～約10時間間隔、約10時間～約11時間間隔、約11時間～約12時間間隔、約12時間～18時間間隔、18時間～24時間間隔、24時間～36時間間隔、36時間～48時間間隔、48時間～52時間間隔、52時間～60時間間隔、60時間～72時間間隔、72時間～84時間間隔、84時間～96時間間隔又は96時間～120時間間隔で投与される。具体的な実施態様では、2つ以上の療法が、同じ患者来院中に投与される。

【0307】

10

20

30

40

50

当業者に周知である任意の抗ウイルス剤を、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス若しくは抗体又はそれらの医薬組成物と併用することができる。抗ウイルス剤の非限定例には、その受容体へのウイルスの付着、細胞内へのウイルスの内在化、ウイルスの複製、又は細胞からのウイルスの放出を阻害及び/又は低減させる、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質抗体、核酸分子、有機分子、無機分子、及び小型分子が含まれる。詳細には、抗ウイルス剤には、それらに限定されないが、ヌクレオシド類似体(例えば、ジドブジン、アシクロビル、ガンシクロビル、ビダラビン、イドクスウリジン、トリフルリジン及びリバビリン)、フォスカーネット、アマンタジン、リマンタジン、サキナビル、インジナビル、リトナビル、インターフェロン及び他のインターフェロン、AZT、ザナミビル(Relenza(登録商標))及びオセルタミビル(Tamiflu(登録商標))
10 が含まれる。ある実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、本明細書に記載される方法により作製された抗体又は本明細書に記載される医薬組成物は、インフルエンザウイルスワクチン、例えばFluarix(登録商標)(GlaxoSmithKline社)、FluMist(登録商標)(MedImmune Vaccines社)、Fluvirin(登録商標)(Chiron社)、Fluzone(登録商標)(Aventis Pasteur社)と併用投与することができる。具体的実施態様において、抗ウイルス剤は、ウイルス抗原に特異性がある免疫調節薬である。特定の実施態様において、このウイルス抗原は、インフルエンザウイルス抗原である。

【0308】

具体的実施態様において、原発性インフルエンザウイルス感染に対する二次反応を予防又は治療する1以上の療法は、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、本明細書に記載される方法により作製された抗体又は本明細書に記載される医薬組成物と併用投与される。原発性インフルエンザウイルス感染に対する二次反応の例は、粘膜刺激に対する喘息様反応、上昇した総呼吸抵抗値、続発するウイルス感染、細菌感染、及び真菌感染に対する増大した易罹患性、並びに非限定的に細気管支炎、肺炎、クループ、及び熱性気管支炎などの状態の発生を含むが、これらに限定されるものではない。
20

【0309】

一部の実施態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの医薬組成物は、インフルエンザウイルス抗原に特異的に結合する抗体と併用投与される。

【0310】

(5.8 生物検定)

【0311】

(再集合アッセイ)

逆遺伝学的研究方法を使用し、例えば図35～37に示された組換えインフルエンザウイルスの各キメラ遺伝子分節は、再集合することができるかどうかを評価することができる。必要なインフルエンザウイルスタンパク質を発現している細胞を、それらのパッケージングシグナルが交換されているインフルエンザウイルスキメラ分節及びインフルエンザウイルスの野生型又は実験室株由来のインフルエンザウイルス遺伝子分節により、同時トランスフェクションすることができ、ここで野生型又は実験室株のインフルエンザウイルス遺伝子分節は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節のひとつによりコードされたインフルエンザウイルスタンパク質をコードしている遺伝子分節及び複製コンピテントなインフルエンザウイルスを作製するのに必要な他の遺伝子分節を含む。例えば、必要なウイルスタンパク質(例えばPA、PB1、PB2、及びNP)を発現している293T細胞、MDCK細胞又はVero細胞などの細胞は、先に説明された技術を使用し、図35に示された4つのキメラ遺伝子分節(NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、及びPA-NAmut-PA)をコードしているプラスミド及びA/PR/8/34などの野生型インフルエンザウイルス又は実験室株の5つの遺伝子分節(pDZ-NP、NA、M、NS、及びHA)をコードしているプラスミドによりトランスフェクトすることができる(例えば、Gaoらの文献、2008, J. Virol. 82: 6419-6426; Quinlivanらの文献、2005, J. Virol. 79: 8431-8439; Fodorらの文献、1999, J. Virol. 73: 9679-9682を参照されたい)。次に救出された組換えウイルスは、組織培養又は胚発育卵において
40 50

て増殖され、公知の技術を用いプラーク精製される。プラーク精製されたウイルスに存在する遺伝子分節は次に、例えば単独のプラークを増殖させ、ウイルスからvRNAを単離し、特異的遺伝子分節にハイブリダイズするようにデザインされたプライマーを用いvRNAにRT-PCRを施し、かつRT-PCR産物をアガロースゲル上を泳動することにより、決定することができる。或いは、プラーク形成された(plaque-performed)ウイルス由来のvRNA分節は、大規模シークエンシング(deep sequencing)などの当該技術分野において公知の技術を用い、配列決定することができる。それらのパッケージングシグナルが交換されているキメラ遺伝子分節の組み合わせに満たないものを含むインフルエンザウイルスを検出する能力がないことは、それらのキメラ遺伝子分節は、自在に再集合することができないことを示している。例えば、図35に示された組換えウイルスのキメラ遺伝子分節に関して、3つのキメラNA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、及びPB1-PAmut-PB1遺伝子分節及び野生型又は実験室株インフルエンザウイルスNA、NP、M、NS及びHA遺伝子分節を含むインフルエンザウイルスを検出する能力がないことは、4つのキメラ遺伝子分節(NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、及びPA-NAmut-PA)が自在に再集合することができないことを示している。10

【0312】

例えば図35～37に示された組換えインフルエンザウイルスのキメラ遺伝子分節が組織培養において自在に再集合することができるかどうかを決定する別の研究方法として、細胞(例えは293T細胞、MDCK細胞又はVero細胞)を、例えば図35、36又は37に示された組換えウイルス、及びインフルエンザウイルスの野生型又は実験室株により、各ウイルスについてある感染多度("moi") (例えはmoi10)で同時感染することができる。得られるウイルスは次に、プラーク精製することができる。プラーク精製されたウイルス中に存在する遺伝子分節は次に、例えば単独のプラークを増殖させ、ウイルスからvRNAを単離し、特異的遺伝子分節にハイブリダイズするようにデザインされたプライマーを用いvRNAにRT-PCRを施し、かつRT-PCR産物をアガロースゲル上を泳動することにより、決定することができる。或いは、プラーク形成されたウイルス由来のvRNA分節は、大規模シークエンシングなどの当該技術分野において公知の技術を用い、配列決定することができる。それらのパッケージングシグナルが交換されているキメラ分節の組み合わせに満たないものを含むインフルエンザウイルスを検出する能力がないことは、自在に再集合することをできなくなる。例えば、図35に示された組換えウイルスのキメラ遺伝子分節に関して、3つのキメラNA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、及びPB1-PAmut-PB1遺伝子分節及び野生型又は実験室株インフルエンザウイルスNA、NP、M、NS及びHA遺伝子分節を含むインフルエンザウイルスを検出する能力がないことは、4つのキメラ遺伝子分節(NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、及びPA-NAmut-PA)が自在に再集合することができないことを示している。20

【0313】

(キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の存在を検出するアッセイ)

【0314】

キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節若しくはそれらの相補体、又はキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節をコードしている核酸を検出するために、当該技術分野において公知の任意の技術を使用することができる。例えば、特定のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節に特異的であるプライマーをデザインし、かつそれらのプライマーを使用するRT-PCR又はPCRを実行し、分節の断片を増幅することができる。増幅された断片は、例えば断片をアガロースゲル上を泳動させることにより検出することができる。或いは、特定のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節に特異的であるプライマーをデザインし、かつこれらのプライマーを使用し、リアルタイムRT-PCRを実行することができる。一実施態様において、特定のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節に特異的であるプライマー対をデザインし、ここでこれらのプライマーの1つは、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から誘導された3'NCR1又は3'CRS1にアニーリングするセンスプライマーであり、かつ他方のプライマーは、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から誘導されたmORFにアニーリングするアンチセンスプライマーである。別の実施態様において304050

、特定のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節に特異的であるプライマー対をデザインし、ここでプライマーの1つは、第1の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から誘導された5'NCR1又は5'CRS1にアニーリングするアンチセンスプライマーであり、かつ他方のプライマーは、第2の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節から誘導されたmORFにアニーリングするセンスプライマーである。当業者に公知の技術を使用し、特定のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節に特異的であるプライマーをデザインすることができる。

【0315】

(パッケージングアッセイ)

【0316】

キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節のウイルス粒子への取り込み、すなわちパッケージングは、当該技術分野において公知であるか又は本明細書に記載される任意の方法(例えは細胞培養、動物モデル又は胚発育卵内でのウイルス培養)により評価することができる。

10

【0317】

一例において、ウイルス粒子は、精製され、かつRNA単離され、かつ2.8%変性ポリアクリルアミドゲル上を泳動され、これは次に銀染色キット(Invitrogen社)により染色され、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の存在を決定することができる(そのようなアッセイの説明については、例えは、Gaoらの文献、2008, J. Virol. 82: 6419-6426を参照されたい)。

【0318】

20

別の例において、胚発育卵の尿膜液の細胞培養物由来のウイルス粒子は、ショ糖クッショニンを通した遠心分離により精製され、引き続きRT-PCRによりキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の存在について分析され得る。

【0319】

パッケージングアッセイを使用し、パッケージングに必要及び/又は十分なインフルエンザウイルス遺伝子分節の領域を決定することができる。これらの場合、アッセイを促進するために、レポーター遺伝子を使用することができる。同じくパッケージングアッセイを使用し、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節がウイルス粒子にパッケージされたかどうか、及びパッケージされたならばどの程度であるかを決定することができ、ここでキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節は、レポーター遺伝子をコードしていない。

30

【0320】

例証的パッケージングアッセイは、Liangらの文献、2005, J Virol. 79: 10348-10355に明らかにされたパッケージングアッセイ、及びMuramotoらの文献、2006, J Virol. 80: 2318-2325に明らかにされたパッケージングアッセイを含む。Liangらの文献及びMuramotoらの文献に説明されたパッケージングアッセイの説明は、引用により本明細書中に組み込まれている。Liang及びMuramotoのプロトコールのいくつかのパラメータは、改変することができ；例えは、様々な宿主細胞を使用し、様々なレポーター遺伝子を使用することができる。

【0321】

ある実施態様において、Muramotoらの文献のパッケージングアッセイが使用される(「Muramotoプロトコール」)。簡潔には、レポーターインフルエンザウイルス遺伝子分節が構築され得、ここでレポーター遺伝子は、一方の側で1つの型のインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの誘導体又は断片の3'NCR及び3'近位のコード領域に隣接し、並びに他方の側でこの型のインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの誘導体又は断片の5'NCR及び5'近位のコード領域に隣接しており、ここで3'近位のコード領域内の任意の開始コドンは変異されている。このレポーター遺伝子はGFPであることができる。レポーターインフルエンザウイルス遺伝子分節は、他の7つの型のインフルエンザウイルス遺伝子分節をコードしている7つのプラスミドにより、293T細胞などの宿主細胞へトランスフェクトされる。加えて、10全てのインフルエンザウイルスタンパク質をコードしている発現プラスミドが、宿主細胞へトランスフェクトされる。ウイルス様粒子(「VLP」)が宿主細胞

40

50

から放出された後、例えば48時間後、上清が収集される。その後上清を用い、同時にヘルパーインフルエンザウイルスにより、新鮮な宿主細胞、例えばMDCK細胞が感染される。ヘルパーインフルエンザウイルスの少なくとも1種のタンパク質は、VLP内の同じ型のタンパク質から抗原的に区別され、その結果VLPに感染した細胞を確定することができる。レポーター遺伝子を発現している細胞の数は、例えばFACSを用い決定され、VLPタンパク質を発現している細胞の数は、FACSと組み合わせた免疫細胞化学を用い決定される。レポーター遺伝子を発現している細胞のVLPタンパク質を発現している細胞に対する比は、レポーターインフルエンザウイルス遺伝子分節のビリオンへのパッケージング効率の尺度である。

【0322】

ある実施態様においては、Liangらの文献のパッケージングアッセイが使用される。簡潔には、8-プラスミド救出システム(Hoffmannらの文献、2000, PNAS 97: 6208-6113)が、レポーターインフルエンザウイルス遺伝子分節と組み合わせられる。レポーターインフルエンザウイルス遺伝子分節は、Muramotoプロトコールに関して先に考査されたように構築される。8-プラスミド救出システムは、プロモーターを伴うプラスミドとして8種全てのインフルエンザ遺伝子分節を提供し、その結果これらの遺伝子分節は、両方向に転写され、これにより8種全ての野生型vRNA及びビリオン作製に必要な全てのウイルスタンパク質を生成する。8種のプラスミド及びレポーター遺伝子分節は、293T細胞などの宿主細胞へトランスフェクトされる。ビリオンが宿主細胞から放出された後、例えば48時間後、上清が収集される。上清により、MDBK細胞などの新鮮な宿主細胞が、レポーター遺伝子が発現されるまで、例えば15時間、感染される。引き続き、レポーター遺伝子発現レベルが試験される。レポーター遺伝子に適したアッセイを、当業者は選択することができる。例えばレポーター遺伝子がGFPなどの蛍光タンパク質である場合、FACS分析を使用し、レポーター遺伝子を発現している細胞の数を決定することができる。レポーター遺伝子を発現している細胞の相対的に低い数は、レポーター遺伝子分節のパッケージング効率を表し、その結果レポーター遺伝子を発現している細胞の相対的に高い数は、レポーター遺伝子分節のパッケージングの高い効率を示し、かつレポーター遺伝子を発現している細胞の相対的に高い数は、レポーター遺伝子分節のパッケージングの高い効率を示す。ある実施態様において、レポーター遺伝子を発現している細胞の数は、ウイルスを生成する細胞について標準化される。ウイルス生成細胞の数は、例えばブラークアッセイ又はFACS分析と組み合わせたNPなどのウイルスタンパク質に対する抗体を使用する免疫細胞化学により決定することができる。

【0323】

先に説明されたレポーター遺伝子によるパッケージングアッセイの原理は、レポーター遺伝子を使わないパッケージングアッセイにも適用される。当業者は、任意の公知の技術を使用し、先に説明されたパッケージングアッセイをレポーター遺伝子を使わないアッセイに適合させることができる。当業者は、先に説明されたようなパッケージング効率の測定値としてレポーター遺伝子産物の検出に頼る代わりに、関心対象のインフルエンザウイルス遺伝子分節又は関心対象のインフルエンザウイルス遺伝子分節の遺伝子産物のいずれかを代わりに検出することができる。RT-PCRを、インフルエンザウイルス遺伝子分節に特異的であるプライマーと共に使用し、関心対象のインフルエンザウイルス遺伝子分節を検出及び定量することができる。ウェスタンプロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降、免疫細胞化学、又はFACSと組み合わせた免疫細胞化学を使用し、パッケージング効率の測定値として、関心対象のインフルエンザウイルス遺伝子分節の遺伝子産物を定量することができる。関心対象のインフルエンザウイルス遺伝子分節内の遺伝子を、ペプチドタグをコードしている配列に融合することも可能であり、その結果関心対象のインフルエンザウイルス遺伝子分節の遺伝子の遺伝子産物は、ペプチドタグをつけた融合タンパク質をコードし、このペプチドタグを検出することができる。

【0324】

(ウイルスアッセイ)

【0325】

10

20

30

40

50

ウイルスアッセイは、当該技術分野において周知の方法を用いインピトロにおいて培養された細胞内の、ウイルス複製を測定するもの(例えばプラーカ形成により決定される)又はウイルスタンパク質の生成を測定するもの(例えばウェスタンプロット分析により決定される)又はウイルスRNAを測定するもの(例えばRT-PCR又はノーザンプロット分析により決定)を含む。

【0326】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスの増殖は、当該技術分野において公知の又は本明細書に記載される任意の方法(例えば、細胞培養(例えばトリ胚性腎細胞の培養又はトリ胚性線維芽細胞(CEF)の培養)により評価できる。ウイルス力価は、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスの連続希釈物の、細胞培養物(例えばCEF細胞、MDCK細胞、EFK-2細胞、Vero細胞、初代ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)、H292ヒト上皮細胞株又はHeLa細胞)、ニワトリ胚、又は生きている動物(例えば鳥類)への接種により決定されてよい。特定時間ウイルスをインキュベーションした後、ウイルスは、標準的方法を用いて単離される。赤血球凝集素(HA)アッセイは、V-底96-ウェルプレートにおいて実行することができる。PBS中の各試料の連続2倍希釈物を、PBS中のニワトリ赤血球の0.5%浮遊液の等量と一緒に氷上で1時間インキュベーションする。陽性ウェルは、赤血球の接着性の均質な層を含み；陰性ウェルは、非接着性のペレットを含む。ウイルス力価の物理的定量は、ウイルス上清に適応されたPCR(Quinn及びTrevorの文献、1997；Morganらの文献、1990)、赤血球凝集アッセイ、組織培養感染量(TCID50)又は卵感染量(EID50)を用いて行うことができる。10

【0327】

(抗体アッセイ)

【0328】

本明細書に記載される方法に従い作製又は同定される抗体は、当業者に周知である様々な方法で特徴づけることができる(例えばELISA、表面プラズモン共鳴ディスプレイ(BIAcore)、ウェスタンプロット、免疫蛍光測定、免疫染色及び/又は微量中和アッセイ)。特に、前記のように作製又は同定された抗体は、組換えインフルエンザウイルスの抗原に特異的に結合する能力について分析され得る。そのようなアッセイは、溶液(例えば、Houghtenの文献(1992, Bio/Techniques 13: 412-421))、ビーズ(Lamの文献(1991, Nature 354: 82-84))、チップ(Fodorの文献(1993, Nature 364: 555-556))、細菌(米国特許第5,223,409号)、胞子(米国特許第5,571,698号；第5,403,484号；及び第5,223,409号)、プラスミド(Culliらの文献(1992, Proc Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869))、又はファージ(Scott及びSmithの文献(1990, Science 249: 386-390)；Cwirlaらの文献(1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-6382)；及びFeliciの文献(1991, J. Mol. Biol. 222: 301-310))で実施することができる(これらの引用文献の各々は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。次に組換えインフルエンザウイルスの抗原に特異的に結合する抗体を、該抗原に対するそれらの特異性についてアッセイすることができる。30

【0329】

本明細書に記載される方法に従い作製又は同定される抗体は、本明細書に記載される組換えウイルスの抗原に対する特異的結合及び他の抗原との交差反応について、当該技術分野で公知である任意の方法によってアッセイすることができる。特異的結合及び交差反応を分析するために用いることができるイムノアッセイには、いくつか例を挙げれば、ウェスタンプロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技術を用いる、競合的及び非競合的アッセイ系が含まれるが、これらに限定されない。そのようなアッセイは常用され、当該技術分野で周知である(例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ausubelら編の文献(1994、「分子生物学における最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」、1巻、John Wiley & Sons社、ニューヨーク)を参照)。40

50

【0330】

抗体の抗原に対する結合親和性及び抗体-抗原相互作用の解離速度は、競合結合アッセイによって決定することができる。競合結合アッセイの一例は、漸増する量の非標識抗原の存在下での標識抗原(例えば、³H又は¹²⁵I)と関心対象の抗体とのインキュベーション、及び標識抗原に結合した抗体の検出を含むラジオイムノアッセイである。抗体の親和性は、データからスキャチャードプロット解析により決定することができる。二次抗体との競合も、ラジオイムノアッセイを用いて決定することができる。この場合、本明細書に記載される組換えウイルス又はそれらの抗原は、漸増する量の非標識二次抗体の存在下で、標識化合物(例えば、³H又は¹²⁵I)に複合された抗原に対する抗体と一緒にインキュベートされる。

10

【0331】

BIAcore動態解析は、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスの抗原に対する抗体の結合及び解離速度を決定するために使用することができる。BIAcore動態解析は、それらの表面に本明細書に記載される方法に従い作製又は同定された固定化抗体を有するチップからの関心対象の抗原を含むポリペプチドの結合及び解離を分析することを含む。典型的BIAcore動態試験は、抗原が固定されているセンサーチップ表面への、0.005%のTween20を含有するHBS緩衝液中の変動する濃度の250 μLの抗体試薬(mAb、Fab)の注入を含む。流量は、75 μL/分で一定に保たれる。解離データは、必要に応じて15分間以上収集される。各注入/解離サイクルに統いて、結合mAbは、状況次第では他の再生剤が使用されるが、希酸、一般的に10~100mM HClの短い1分間の投入を用いて、抗原表面から切り離される。より具体的には、結合速度k_{on}及び解離速度k_{off}の測定のために、抗原を含むポリペプチドは、標準のアミン結合化学作用、すなわちEDC/NHS方法(EDC=N-ジエチルアミノプロピル)-カルボジイミド)を用いることにより、センサーチップ表面に直接固定化される。簡潔には、pH4又はpH5の10mM NaOAc中の抗原を含むポリペプチドの5~100nM溶液が調製され、約30~50RUの相当量の抗原が固定化されるまで、EDC/NHS活性化表面上を流される。この後、1MのEt-NH₂の注入によって、未反応の活性エステルが「キャップ」オフされる。参照目的のために、同一の固定化条件の下で抗原が含まれないプランク表面が調製される。一旦適切な表面が調製されると、抗体試薬の各々の適する希釈系がHBS/Tween-20中に調製され、直列に連結されている抗原及び参照細胞表面の両方の上を流される。調製される抗体濃度の範囲は、平衡結合定数K_Dの推定値によって異なる。先に述べたように、結合抗体は適当な再生剤を用いて、各注入/解離サイクルの後に切り離される。

20

【0332】

本明細書に記載される方法により作製又は同定された抗体は、当業者に公知である技術を用いて、宿主細胞への、組換えインフルエンザウイルスの抗原の結合を阻害するそれらの能力について分析することもできる。例えば、インフルエンザウイルスに結合することがわかっている受容体を発現する細胞は、本明細書に記載される方法により作製又は同定された抗体の存在下又は不在下でインフルエンザウイルスと接触させることができ、結合を阻害する抗体の能力は、例えばフローサイトメトリー又はシンチレーションアッセイで測定することができる。この抗原又は抗体は、インフルエンザウイルスと細胞との間の相互作用の検出を可能にするために、放射性標識(例えば、³²P、³⁵S及び¹²⁵I)又は蛍光標識(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒド及びフルオレサミン)などの検出可能な化合物で標識することができる。

30

【0333】

(抗ウイルス活性アッセイ)

【0334】

本明細書に記載される抗体又はそれらの組成物は、抗ウイルス活性についてインピトロにおいて評価することができる。一実施態様では、抗体又はその組成物は、インフルエンザウイルスの増殖に及ぼすそれらの影響についてインピトロで試験される。インフルエンザウイルスの増殖は、当該技術分野で公知であるか又は本明細書に記載される任意の方法

40

50

(例えば細胞培養で)によって評価することができる。具体的実施態様において、細胞はMOI 0.0005及び0.001、0.001及び0.01、0.01及び0.1、0.1及び1、若しくは1及び10で、又はMOI 0.0005、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5若しくは10で感染させられ、補充された無血清培地と一緒にインキュベートされる。ウイルス力価は、赤血球凝集素ブラーク、又は本明細書に記載される任意の他のウイルスアッセイによって上清で測定される。ウイルス力価を評価することができる細胞には、EFK-2細胞、Vero細胞、初代ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)、H292ヒト上皮細胞株及びHeLa細胞が含まれるが、これらに限定されない。インビトロアッセイには、当該技術分野で周知であるか又は本明細書に記載される方法を用いて、インビトロにおいて培養細胞で変化したウイルス複製(例えば、ブラーク形成で測定される)、又はウイルスタンパク質の生成(例えば、ウェスタンプロット分析で測定される)、又はウイルスRNA(例えば、RT-PCR若しくはノーザンプロット分析で測定される)を測定するものが含まれる。

【0335】

非限定の一実施例では、標的哺乳類細胞株の単層を異なる量(例えば、3ブラーク形成単位(pfu)又は5pfuの多重度)のインフルエンザで感染させ、その後様々な希釈の抗体(例えば、0.1 μg/ml、1 μg/ml、5 μg/ml又は10 μg/ml)の存在下又は不在下で培養する。感染した培養物を感染から48時間後又は72時間後に収集し、適当な標的細胞株(例えば、Vero細胞)で、当該技術分野で公知である標準のブラークアッセイによって滴定する。

【0336】

血球凝集アッセイの非限定的実施例では、細胞を抗体と接触させ、同時に又は引き続きウイルスに感染させ(例えば、1のMOIで)、ウイルスの複製を可能にする条件下でウイルスをインキュベートする(例えば、20~24時間)。抗体は、好ましくは感染の全過程で存在する。次に、0.5%のニワトリ赤血球を用いて、ウイルスの複製及びウイルス粒子の放出が赤血球凝集アッセイで測定される。例えば、Kashyapらの文献(PNAS USA 105: 5986-5991)を参照されたい。一部の実施態様において、抗体化合物がウイルス複製を、ウイルス力価の約75%の低下に相当する少なくとも2ウェルのHA低減させる場合、この抗体化合物はウイルス複製の阻害剤とみなされる。具体的実施態様において、阻害剤は、このアッセイでウイルス力価を50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上又は95%以上低下させる。

【0337】

(細胞毒性アッセイ)

【0338】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス、抗体又はそれらの組成物への曝露の後の細胞(感染又は非感染の)又は細胞株の生存度を評価し、こうしてそれらの細胞毒性を決定するために、当該技術分野において周知である多くのアッセイを用いることができる。例えば、細胞増殖は、プロモデオキシウリジン(BrdU)の取込み(例えば、Hoshinoらの文献(1986, Int. J. Cancer 38: 369); Campanaらの文献(1988, J. Immunol. Meth. 107:79)を参照)、(³H)チミジン取込み(例えば、Chen J.の文献(1996, Oncogene 13: 1395-403); Jeoung J.の文献(1995, J. Biol. Chem. 270:18367 73)を参照)を測定することによって、細胞の直接計数によって、又は癌原遺伝子(例えば、fos、myc)などの既知の遺伝子の転写、翻訳若しくは活性の変化、若しくは細胞周期マーカー(Rb、cdc2、サイクリンA、D1、D2、D3、Eなど)を検出することによって分析することができる。そのようなタンパク質及びmRNA及び活性のレベルは、当該技術分野で周知である任意の方法で決定することができる。例えば、市販の抗体を含む抗体を用いて、ELISA、ウェスタンプロット法又は免疫沈降などの公知の免疫診断方法によってタンパク質を数量化することができる。当該技術分野で周知であり常用される方法を用いて、例えばノーザン分析、RNアーゼ保護又は逆転写と連結したポリメラーゼ連鎖反応を用いて、mRNAを数量化することができる。細胞生存度は、トリパンブルー染色又は当該技術分野で公知である他の細胞死滅若しくは生存度マーカーを用いて評価することができる。具体的実施態様において、細胞生存度を決定するために、細胞ATPレベルが測定される。

10

20

30

40

50

【0339】

具体的実施態様において、細胞生存度は、細胞内ATPレベルを測定するCellTiter-Gloアッセイキット(Promega社)などの、当該技術分野で標準であるアッセイを用いて、3日間及び7日間の期間で測定される。細胞ATPの低下は、細胞毒性作用を示す。別の具体的実施態様において、細胞生存度は、ニュートラルレッド取込みアッセイで測定することができる。他の実施態様において、形態変化の目視には、肥大、粒状度、縁付きの細胞、膜状の外観、円形化、ウェル表面からの剥離又は他の変化が含まれてもよい。これらの変化は、観察される細胞毒性の程度に従って、T(100%毒性)、PVH(部分的毒性-非常に重い-80%)、PH(部分的毒性-重い-60%)、P(部分的毒性-40%)、Ps(部分的毒性-わずか-20%)又はO(無毒性-0%)の等級が与えられる。50%細胞阻害(細胞毒性)の濃度(IC_{50})は、これらのデータの回帰分析で決定される。

10

【0340】

具体的実施態様において、細胞毒性アッセイで用いられる細胞は、初代細胞及び細胞株を含む動物細胞である。一部の実施態様において、細胞はヒト細胞である。ある実施態様において、細胞毒性は、以下の細胞株の1つ以上で評価される：U937、ヒト単球細胞株；初代末梢血单核細胞(PBMC)；Huh7、ヒト肝芽細胞腫細胞株；293T、ヒト胚性腎細胞株；及びTHP-1、単核球細胞。ある実施態様において、細胞毒性は、以下の細胞株の1つ以上で調査される：MDCK、MEF、Huh7.5、Detroit又はヒト気管気管支上皮(human tracheobronchial epithelial)(HTBE)細胞。

20

【0341】

組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物は、動物モデルでインビボ毒性について試験することができる。例えば、当該技術分野において公知の動物モデルを用い、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の活性を試験するために、インビボ毒性を決定することもできる。例えば、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の活性を試験するために、これらは様々な濃度範囲で動物に投与される。その後、死亡率、体重減少若しくは体重増加の失敗、及び/又は組織損傷を示すことができる血清マーカーのレベル(例えば、一般組織損傷の指標としてのクレアチニンホスホキナーゼレベル、可能性のある肝損傷の指標としてのグルタミン酸シユウ酸トランスアミナーゼ又はピルビン酸トランスアミナーゼのレベル)について、動物は経時に監視される。これらのインビボアッセイは、用量に加えて様々な投与様式及び/又は計画の毒性を試験するために、応用されてもよい。

30

【0342】

組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の毒性及び/又は効力は、例えば LD_{50} (集団の50%に致死的な投与量)及び ED_{50} (集団の50%で治療的に有効な投与量)を決定するための、細胞培養又は実験動物における標準の薬学手法によって決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療係数であり、それは、比 LD_{50}/ED_{50} で表すことができる。大きな治療指数を示す組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物が好ましい。毒性副作用を示す組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物が用いられてもよいが、非感染細胞に対する潜在的な損傷を最小にし、それによって副作用を低減するために、患部組織の部位をそのような薬剤の標的にする送達系をデザインするように注意すべきである。

40

【0343】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られるデータは、ヒトで使用するための組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の用量範囲の設定で用いることができる。好ましくは、そのような薬剤の用量は、 ED_{50} を含み、ほとんど又は全く毒性のない循環濃度の範囲内にある。用量は、使用される剤形及び利用される投与経路によって、この範囲内で変動することができる。本明細書に記載される方法で用いられるいかなる活性化合物についても、有効投与量は最初に細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養で決定される IC_{50} (すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成する投与量を、動物モデルで設定することができる。ヒトでの

50

有益な投与量をより正確に決定するために、そのような情報を用いることができる。血漿レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーで測定することができる。用量決定に関するさらなる情報が、本明細書に提供される。

【0344】

更に、例えばウイルス感染又はそれらに付隨する状態若しくは症状を測定することによって、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の予防及び/又は治療的な有用性を評価するために、当業者に公知である任意のアッセイを用いることができる。

【0345】

(動物モデルアッセイ)

【0346】

本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスの病原性は、対象、特に動物モデルにおいて評価することができる。一例では、ウイルス感染動物モデルで肺病変を誘導して、感染を引き起こす能力が、野生型ウイルス及び偽ウイルスを用いて比較される。肺病変は、目視検査によって健康である肺葉の百分率として評価することができる。ペントバルビタールの静脈内投与によって感染後(p.i.)5日目に動物を安樂死させ、それらの肺全体を取り出す。肉眼的病変に冒された各肺葉の表面の百分率を、視覚的に推定する。これらの百分率を平均し、各動物の7肺葉の平均値を得る。他のアッセイでは、ウイルスの負荷又は力価を決定するために、鼻スワブを検査することができる。感染後のウイルス負荷を決定するために、鼻スワブを剖検時に採取することができる。

【0347】

組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物は、好ましくは、ヒトで用いる前に所望の治療的又は予防的活性についてインピボでアッセイされる。例えば、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の使用は、インフルエンザウイルス疾患を予防することができるかどうかを評価するために、動物が野生型インフルエンザウイルスに感染する前に、本ウイルス、抗体又は組成物を投与することができる。或いは、又は更に、動物が野生型インフルエンザウイルスに感染するのと同時に、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物を動物に投与することができる。インフルエンザウイルス感染又はそれらに付隨する疾患を治療するための組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の使用を評価するために、動物を野生型インフルエンザウイルスに感染させた後に、本ウイルス、抗体又は組成物を投与することができる。具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物は、動物に2回以上投与される。

【0348】

組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物は、それらに限定されないがラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ウサギ、モルモットなどを含む動物モデル系で、抗ウイルス活性について試験することができる。具体的実施態様において、活性化合物及びそれらの組成物は、マウスマodel系で試験される。そのようなモデル系は広く使われ、当業者に周知である。具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物は、マウスマodel系で試験される。インフルエンザウイルスのための動物モデルの非限定例は、この節で提供される。

【0349】

一般に、動物を野生型インフルエンザウイルスに感染させ、同時に又は引き続き、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体若しくは組成物、又はプラセボで治療する。或いは、動物は組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体若しくは組成物又はプラセボで治療され、引き続き野生型インフルエンザウイルスに感染させる。これらの動物から得られる試料(例えば、血清、尿、痰、精液、唾液、血漿又は組織試料)は、当該技術分野で周知である方法、例えば変化したウイルス力価の測定(例えば、プラーク形成で測定される)、ウイルスタンパク質の生成の測定(例えば、ウェスタンプロット、ELISA又はフローサイトメトリー分析で測定される)又はウイルス核酸の生成の測定(例えば、RT-PCR又はノーザンプロット分析で測定される)を通して、ウイルス複製について試験することができ

10

20

30

40

50

る。組織試料中のウイルスの定量化のために、組織試料はリン酸緩衝食塩水(PBS)中でホモジナイズされ、清澄化されたホモジネートの希釈液は、細胞(例えば、Vero細胞、CEF細胞又はMDCK細胞)の単層の上で37℃で1時間吸着される。他のアッセイでは、組織病理学的評価、好ましくは、ウイルスが感染の標的にすることが知られている臓器の評価が感染後に実施される。ウイルス特異的モノクローナル抗体を用いて、ウイルス免疫組織化学試験を実施することができる。

【0350】

ウイルスの病原性に及ぼす組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の作用も、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物が投与される感染対象におけるウイルスの力価、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物が投与される感染対象の生存期間、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物が投与される感染対象での免疫応答、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物が投与される感染対象での症状の数、持続時間及び/又は重症度、並びに/或いは組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物が投与される感染対象での1つ以上の症状の開始までの時間が評価されるインビオアッセイを用いて決定することができる。そのような作用を測定するために、当業者に公知である技術を用いることができる。

10

【0351】

インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス薬の試験用に開発された、フェレット、マウス、モルモット、及びニワトリなどのインフルエンザウイルス動物モデルが、説明されている。例えば、Sidwellらの文献(Antiviral Res., 2000, 48: 1-16); Lowen A.C.らの文献(PNAS., 2006, 103: 9988-92); 及びMcCauleyらの文献(Antiviral Res., 1995, 27: 179-186)を参照されたい。インフルエンザのマウスモデルについて、インフルエンザ感染マウスに投与される活性化合物の抗ウイルス活性をアッセイするために用いることができるパラメータの非限定例には、肺炎関連の死亡、血清IgM增加、動物体重、赤血球凝集素によってアッセイされる肺ウイルス、ブラークアッセイによってアッセイされる肺ウイルス、及び肺の組織病理学的变化が含まれる。有意性を計算するために、統計解析が実行される(例えば、0.05以下のP値)。

20

【0352】

一例では、ウイルス感染動物モデルで肺病変を誘導して、感染を引き起こす能力が、野生型ウイルス及び偽ウイルスを用いて比較される。肺病変は、目視検査によって健康である肺葉の百分率として評価することができる。ペントバルビタールの静脈内投与によって感染後5日目に動物を安樂死させ、それらの肺全体を取り出す。肉眼的病変に冒された各肺葉の表面の百分率を、視覚的に推定する。これらの百分率を平均し、各動物の7肺葉の平均値を得る。他のアッセイでは、ウイルスの負荷又は力価を決定するために、鼻スワブを検査することができる。感染後のウイルス負荷を決定するために、鼻スワブを剖検時に採取することができる。

30

【0353】

一実施態様では、ウイルスは組織試料で定量化される。例えば、組織試料はリン酸緩衝食塩水(PBS)中でホモジナイズされ、清澄化されたホモジネートの希釈液は、細胞(例えば、MDCK細胞)の単層の上において37℃で1時間吸着される。次に、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.01%DEAE-デキストラン、0.1%NaHCO₃及び1%寒天を含有する最小必須培地の溶液を感染単層に重層する。ブラークを可視化することができるまで、プレートを2~3日インキュベートする。PR8感染試料からウイルスを滴定する組織培養感染量(TCID)アッセイを、以下の通りに実施する。96ウェルプレート中の細胞(例えば、MDCK細胞)の集密単層を、培地中の清澄化された組織ホモジネートの対数希釈液と一緒にインキュベートする。接種の2~3日後に、赤血球凝集アッセイ(HAアッセイ)によって、各ウェルからの0.05mlの一定量をウイルス増殖について評価する。

40

【0354】

(ヒトにおけるアッセイ)

【0355】

50

一実施態様では、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物が、感染ヒト対象で評価される。この実施態様に従って、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物がヒト対象に投与され、ウイルス複製に及ぼす本ウイルス、抗体又は組成物の作用は、例えば生体試料(例えば、血清又は血漿)中のウイルス又はウイルス核酸のレベルを分析することで決定される。ウイルス複製を変化させる組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物は、対照で処置された対象又は対象群でのウイルス複製レベルを、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物で処置された対象又は対象群でのそれと比較することによって確定することができる。或いはウイルス複製の変化は、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の投与の前後に対象又は対象群でのウイルス複製レベルを比較することによって確定することができる。生体試料を得て、mRNA又はタンパク質の発現を分析するために、当業者に公知である技術を用いることができる。
10

【0356】

別の実施態様では、インフルエンザウイルス感染/疾患に付随する1つ以上の症状の重症度に及ぼす組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物の作用が、感染対象で評価される。この実施態様に従って、組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体若しくは組成物又は対照が、インフルエンザウイルス感染に罹患しているヒト対象に投与され、ウイルス感染の1つ以上の症状に及ぼす本ウイルス、抗体又は組成物の作用が決定される。1つ以上の症状を軽減させる組換えインフルエンザウイルス、それらの抗体又は組成物は、対照で処置した対象を、本ウイルス、抗体又は組成物で処置した対象と比較することによって確定することができる。活性化合物又はその組成物がインフルエンザウイルス疾患に付随する1つ以上の症状を軽減させるかどうか決定するために、感染性疾患を熟知している医師に公知である技術を用いることができる。
20

【0357】

組織試料中のウイルスの定量化に関して、組織試料はリン酸緩衝食塩水(PBS)中でホモジナイズされ、清澄化されたホモジネートの希釈液は、細胞(例えば、CEF細胞又はMDCK細胞)の単層の上において37℃で1時間吸着される。次に、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.01%DEAE-デキストラン、0.1%NaHCO₃及び1%寒天を含有する最小必須培地の溶液を感染单層に重層する。プラークを可視化することができるまで、プレートを2~3日インキュベートする。PR8感染試料からウイルスを滴定する組織培養感染量(TCID)アッセイを、以下の通りに実施する。96ウェルプレート中の細胞(例えば、CEF細胞又はMDCK細胞)の集密单層を、培地中の清澄化された組織ホモジネートの対数希釈液と一緒にインキュベートする。接種の2~3日後に、赤血球凝集アッセイ(HAアッセイ)によって、各ウェルからの0.05mlの一定量をウイルス増殖について評価する。
30

【0358】

更に別のアッセイにおいて、感染後に、組織病理学的評価が実施される。上皮の変化及び上皮下の炎症について、鼻甲介及び気管を調べることができる。大、中、小又は末端の気管支梢での細気管支上皮の変化及び細気管支周囲の炎症について、肺を調べることができる。炎症性変化について肺胞も評価される。中気管支梢は、以下の通りに0~3+の尺度で等級分けされる: 0(正常: 繊毛性先端辺縁及び基底偽重層核を有する中~高円柱状上皮細胞が並ぶ; 最小限の炎症); 1+(輪郭が円柱状及び平坦で増殖がわずかに増加した上皮層; 多くの細胞で纖毛が変わらずに見られる); 2+(減衰から顕著な増殖までの範囲の上皮層の顕著な変化; 無秩序な細胞及び管腔境界で不規則な層輪郭); 3+(上皮層は著しく破壊されて無秩序で、管腔には壊死性の細胞が見られる; 一部の気管支梢は減衰され、他は顕著な反応性増殖)。
40

【0359】

気管は、以下の通りに0~2.5+の尺度で等級分けされる: 0(正常: 繊毛性先端辺縁、基底偽重層核を有する中~高円柱状上皮細胞が並ぶ。先端辺縁と核の間に明白な細胞質。時折の扁平上皮細胞を有する小病巣); 1+(上皮層の局所の扁平上皮化生); 2+(上皮層の大部分の散在性扁平上皮化生、纖毛は局所的に明白なことがある); 2.5+(極めて少ない纖
50

毛が明白である散在性の扁平上皮化生)。

【0360】

ウイルス特異的モノクローナル抗体(例えばNP-、N-又はHN特異的モノクローナル抗体)を用いて、ウイルス免疫組織化学が実施される。染色は、以下の通りに0~3+に等級分けされる: 0(感染細胞がない); 0.5+(わずかな感染細胞); 1+(わずかな感染細胞、広く離れた個々の細胞として); 1.5+(わずかな感染細胞、広く離れた单一体として、及び小クラスターで); 2+(中程度の数の感染細胞、気管支梢に並ぶ上皮層の一部の隣接細胞のクラスターを通常侵すか、又は肺胞の小さな小葉下の病巣に広がる); 3+(多数の感染細胞、気管支梢の大部分の上皮層を侵すか、肺胞の大きな小葉下の病巣に広がる)。

【0361】

(5.9 スクリーニングアッセイ)

一態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを使用し、インフルエンザウイルスの生活環を研究することができる。例えば、検出可能な異種配列(例えば、GFP若しくはルシフェラーゼなどの検出可能な物質、又は本明細書に記載されるか若しくは当該技術分野において公知の別の検出可能な物質)を発現する本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスが、宿主細胞へ導入され、かつ検出可能な異種配列の発現を評価することにより、ウイルスの生活環が監視される。同じく検出可能な異種配列を発現している本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスは、ヒト以外の動物に投与され、かつ検出可能な異種配列の発現を評価することにより、感染が監視されることができる。ある実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、本明細書に記載される9つの分節化されたインフルエンザウイルスである。

【0362】

別の態様において、インフルエンザウイルスの複製を変更する化合物の同定又は検証のためのハイスループットスクリーニングアッセイが、本明細書に提供される。具体的実施態様において、インフルエンザウイルスの複製を変更する化合物を同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイは:(a)化合物又は化合物ライプラリーの一員を、検出可能な異種ヌクレオチド配列を発現している本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスに感染した宿主細胞と接触させること; 及び、(b)検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性を測定すること:を含む。別の実施態様において、インフルエンザウイルスの複製を変更する化合物を同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイは:(a)化合物又は化合物ライプラリーの一員の存在下で検出可能な異種ヌクレオチド配列を発現している本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスで宿主細胞を感染させること; 及び、(b)検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性を測定すること:を含む。別の実施態様において、インフルエンザウイルスの複製を変更する化合物を同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイは:(a)化合物又は化合物ライプラリーの一員と宿主細胞を接触させること; (b)検出可能な異種ヌクレオチド配列を発現している本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスで宿主細胞を感染させること; 及び、(c)検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性を測定すること:を含む。具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、本明細書に記載される9-分節化されたインフルエンザウイルスである。

【0363】

一部の実施態様において、ハイスループットスクリーニングアッセイは:(a)検出可能な異種ヌクレオチド配列を発現している本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスによる感染の前に(例えば、15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間以上前に)、感染と同時に及び/又は感染後に(例えば、15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間以上後に)、化合物又は化合物ライプラリーの一員と細胞を接触させること; 及び、(b)検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性を測定すること:に関与している。これらの細胞は、様々なMOI(例えば、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、又は5)で感染することができ、かつ化合

10

20

30

40

50

物の作用は、スクリーニングアッセイにおいて評価することができる。同じく様々な濃度の化合物の作用も、スクリーニングアッセイを使用し、評価することができる。検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性は、感染後様々な時点 10 で測定することができる。例えば、検出可能な異種ヌクレオチド配列の発現又は活性は、感染後6時間、12時間、24時間、48時間又は72時間で測定することができる。化合物と接觸された宿主細胞における検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性のレベルが、陰性対照(例えば本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスではないインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス))と接觸された宿主細胞における検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性のレベルと比べ増加する場合に、インフルエンザウイルスの複製を増大する化合物が同定される。対照的に、化合物と接觸された宿主細胞における検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性のレベルが、陰性対照(例えば本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスではないインフルエンザウイルス(例えば野生型インフルエンザウイルス))と接觸された宿主細胞における検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性のレベルと比べ減少する場合に、インフルエンザウイルスの複製を減少する化合物が同定される。一部の実施態様において、インフルエンザウイルスの複製を可能にする胚発育卵又は任意の他の基体を、本明細書に記載されるハイスループットスクリーニングアッセイにおいて使用される細胞の代わりに使用することができる。

【0364】

20

具体的実施態様において、インフルエンザウイルスの複製を変更する化合物のスクリーニングのためのハイスループットアッセイにおいて使用される宿主細胞は、インフルエンザウイルスによる感染を可能にする宿主細胞である。一部の実施態様において、インフルエンザウイルスの複製を変更する化合物のスクリーニングのためのハイスループットアッセイは、スクリーニングアッセイにおけるそのようなウイルスの使用を可能にする力値までウイルスを増殖することができる任意の基体を使用する。非限定的例により、本明細書に記載されるハイスループットスクリーニングアッセイにおいて有用な基体は、ウイルスにより感染され易い細胞(例えば鳥類細胞、ニワトリ細胞(例えば初代ニワトリ胚細胞又はニワトリ腎細胞)、Vero細胞、MDCK細胞、ヒト呼吸器上皮細胞(例えばA549細胞)、ウシ腎細胞、ミンク肺細胞など)、又は胚発育卵(例えば、6~9日齢、6~10日齢、10~12日齢、又は10~14日齢の胚発育鶏卵)又は動物(例えばトリ)を含む。一実施態様において、ハイスループットスクリーニングアッセイにおいて使用される細胞は、感染の型に生物学的に関連している。

30

【0365】

具体的実施態様において、先に説明されたハイスループットスクリーニングアッセイにおいて測定された検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物は、RNA生成物である。別の実施態様において、先に説明されたハイスループットスクリーニングアッセイにおいて測定された検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物は、タンパク質生成物である。別の実施態様において、検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の活性は、先に説明されたハイスループットスクリーニングアッセイにより測定され、かつその生成物はタンパク質である。

40

【0366】

当業者に公知の任意の方法を使用し、検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性を測定することができる。一実施態様において、検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物はRNAであり、かつRT-PCR又はノーザンプロット分析などの当業者に公知の技術を使用し、RNA生成物の発現を測定する。別の実施態様において、検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物はタンパク質であり、かつウェスタンプロット分析又はELISAなどの当業者に公知の技術を使用し、タンパク質生成物の発現を測定する。別の実施態様において、検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物はタンパク質であり、かつタンパク質の活性は、当業者に

50

公知技術を用い測定される。

【0367】

任意の本明細書に記載されるスクリーニングアッセイを、個別に、例えば試験化合物のみと、又は好適な対照と一緒に、実行することができる。例えば、試験化合物を含まない並行アッセイ、又は他の反応成分(例えばウイルス)を含まない並行アッセイを行うことができる。一実施態様において、試験化合物の代わりに陰性対照及び/又は陽性対照が使用される以外は、先に説明された並行スクリーニングアッセイが実行される。別の実施態様において、偽陽性とみなされる細胞毒性化合物を除去するために、感染していない細胞が、検出可能な異種ヌクレオチド配列を含む核酸構築体(例えばプラスミド)によりトランسفェクトされ、検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性が測定される、対抗スクリーニングが行われる。或いは、アッセイ結果を、参照と、例えば文献、先行するアッセイなどから得られた参照値などと比較することが可能である。好適な相関関係及び当該技術分野において公知の統計方法を使用しアッセイ結果を評価することができる。10

【0368】

一部の実施態様において、陰性対照(例えばPBS)が細胞と接触される場合に検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の平均の発現又は活性が決定され、かつ各化合物に関する生成物の発現又は活性の割合が、この内部対照に対して決定される。一実施態様において、検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性の平均の割合が算出され、かつこれらの化合物は、生成物の発現又は活性の90%~100%又は70%~89%の低下を基に、各々、ウイルス複製の強力な又は中等度の阻害剤として分類される。別の実施態様において、陰性対照に対し先の検出可能な異種ヌクレオチド配列によりコードされた生成物の発現又は活性における少なくとも2倍の増加が得られる場合に、これらの化合物は、ウイルス複製のエンハンサーとして分類される。20

【0369】

別の態様において、化合物のインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス作用を、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを使用し、ヒト以外の動物において評価することができる。一実施態様において、化合物のインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス作用は:(a)ヒト以外の対象への化合物の投与と同時に、引き続き又は前に、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスの有効量を(例えば非経口、皮下、鼻腔内、又は腹腔内)投与すること;(b)組換えインフルエンザウイルスの投与後一定間隔待つこと;及び、(d)対象中の又は対象からの生体試料中の組換えインフルエンザウイルスを検出すること:を含む方法により、評価することができる。具体的実施態様において、組換えインフルエンザウイルスは、本明細書に記載される9-分節化されたインフルエンザウイルスである。30

【0370】

(5.10 キット)

一態様において、1個以上の容器内に、1つ以上の本明細書に記載の核酸配列を含むキットが、本明細書に提供される。具体的実施態様において、キットは、1個、2個又はそれ以上の容器内に、1つ、2つ又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体を含む。別の実施態様において、キットは、1個、2個又はそれ以上の容器内に、1つ、2つ又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体をコードしている1つ以上の核酸配列を含む。キットは更に、以下の1つ以上を含むことができる:ウイルスの救出に適した宿主細胞、プラスミドDNAの宿主細胞へのトランسفエクションに適した試薬、ヘルパーウイルス、1種以上の型のインフルエンザウイルス遺伝子分節をコードしているプラスミド、ウイルスタンパク質をコードしている1種以上の発現プラスミド、及び/又は1つ、2つ又はそれ以上のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節又はそれらの相補体に特異的な1種以上のプライマー、又はこれらをコードしている核酸配列。40

【0371】

50

ある実施態様において、キットは、1つ、2つ又はそれ以上の容器内に、以下の組み合わせを含むか又はコードしている核酸配列を含む：(i)1つの型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来の下記のもの又はそれらの相補体：5'及び3'非コード領域、並びに翻訳されないように開始コドンが除去された3'近位のコード領域配列、翻訳されない5'近位のコード領域配列のいずれか、又は翻訳されないように開始コドンが除去された3'近位のコード領域配列と翻訳されない5'近位のコード領域配列の両方；並びに、(ii)1、2、3又はそれ以上の変異を伴う異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチド又はそれらの相補体、1、2、3又はそれ以上の変異を伴う異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来のオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド又はそれらの相補体のいずれか、又は1、2、3又はそれ以上の変異を伴う異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来のオープンリーディングフレームの少なくとも3'近位20ヌクレオチドとオープンリーディングフレームの少なくとも5'近位30ヌクレオチド又はそれらの相補体の両方。一部の実施態様において、そのような核酸配列は、異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節由来のオープンリーディングフレームの3'近位20ヌクレオチド及び/又は5'近位30ヌクレオチドとインフレームであるヌクレオチド配列(例えば異種ヌクレオチド配列)を操作するための鋸型として使用することができる。キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節若しくはそれらの相補体、又は遺伝子分節若しくはそれらの相補体をコードしている核酸は、異なる型のインフルエンザウイルス遺伝子分節のオープンリーディングフレームの3'及び/又は5'近位のヌクレオチドとインフレームでヌクレオチド配列(例えば異種ヌクレオチド配列)の組み込みを可能にする1つ、2つ又はそれ以上の制限酵素部位を含むことができる。ある実施態様において、そのようなキットは、核酸配列を切断する1つ以上の制限酵素を更に含む。
10

【0372】

別の態様において、1つ以上の本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルス又はそれらの組成物の1つ以上が充填された1個以上の容器を含むキットが、本明細書に提供される。具体的実施態様において、1個以上の容器内に、1つ以上の本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを含有する組成物を含む、医薬パック又はキットが、本明細書で提供される。別の態様において、1個以上の容器内に、特定のキメラインフルエンザウイルス遺伝子分節に特異的なプライマーを含むキットが、本明細書に提供される。
20

【0373】

別の態様において、本明細書に記載される組換えインフルエンザウイルスを用い作製又は同定された抗体の1つ以上が充填された1個以上の容器を含むキットが、本明細書に提供される。一実施態様において、キットは、1個以上の容器内に、本明細書に記載される抗体、好ましくは単離された抗体を含む。具体的実施態様において、本明細書に包含されたキットは、対照として、本明細書に包含された抗体が反応する単離されたインフルエンザウイルス抗原を含む。具体的には、本明細書に提供されるキットは、本明細書に包含された抗体が反応するインフルエンザウイルス抗原と反応しない対照抗体を更に含む。別の具体的実施態様において、本明細書に提供されるキットは、本明細書に包含された抗体と反応するインフルエンザウイルス抗原に対する抗体の結合を検出するための手段を含む(例えば、抗体は、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物又はルミネセント化合物などの、検出可能な基体と複合されるか、又は一次抗体を認識する二次抗体が、検出可能な基体に複合されることができる)。具体的実施態様において、キットは、組換えにより作製された又は化学合成されたインフルエンザウイルス抗原を含むことができる。キットに提供されたインフルエンザウイルス抗原は、固形支持体に付着されてもよい。より詳細な実施態様において、前述のキットの検出手段は、それにインフルエンザウイルス抗原が付着された固形支持体を含む。そのようなキットは、付着されていないレポーターで標識された抗ヒト抗体も含むことができる。この実施態様において、抗体のインフルエンザウイルス抗原への結合は、該レポーターで標識された抗体の結合により検出することができる。
30

【0374】

医薬又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定される形式での通知が、そのようなキットに任意に付隨され、その通知は、ヒト投与のための製造、使用又は販売の機関による承認を反映している。

【実施例】

【0375】

(6. 実施例1)

本実施例は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の作製、及び複製する再集合体ウイルスを作製するために、他のインフルエンザウイルスとは再集合することができないインフルエンザウイルスを作製するための、これらの遺伝子分節の使用を説明している。

【0376】

(6.1 材料及び方法)

(細胞及びウイルス) 293T細胞は、10%ウシ胎児血清を補ったダルベッコの改変イーグル培地で維持した。MDCK細胞は、10%ウシ胎児血清を補ったイーグル最小必須培地で増殖した。ウイルスは、10日齢の特定病原体除去ニワトリ胚において増殖した(Charles River Laboratories社、SPAFAS、プレストン、CT)。

【0377】

(プラスミド構築) (i) NS-HAwt-NS構築体(図25A)の作製。先に構築されたpDZ-NSプラスミド(Quinlivan Mらの文献、「NS1タンパク質の切断を介してのウマインフルエンザウイルスの弱毒化(Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein)」、J Virol. 79: 8431-8439 (2005))由来の1.2kb KpnI断片を、pUC18ベクターのKpnI部位に移入し、部位特異的変異誘発を施し、2つのATG(A27T、A76T)、1つのスプライス部位(G57C)を変異し、かつ1つのNheI部位(A104G、G109C)及び1つのXhoI部位(G759C、A760G)を作製した。次に1.2kb NS KpnI断片を、pDZベクター(Quinlivan Mらの文献、「NS1タンパク質の切断を介してのウマインフルエンザウイルスの弱毒化(Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein)」、J Virol. 79: 8431-8439 (2005))(その中のNheI部位及びXhoI部位は除去されている)に戻し移入し、プラスミドpDZ-NS-psを生じた。長さ1,698bpであるA/PR/8/34 HAタンパク質のORFを、アンビセンスpDZ-HAプラスミドから増幅させ(Quinlivan Mらの文献、「NS1タンパク質の切断を介してのウマインフルエンザウイルスの弱毒化(Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein)」、J Virol. 79: 8431-8439 (2005))、かつ変異誘発を施し、内部XhoI部位を変異した(C143G)。2つの制限部位NheI及びXhoIを導入し、HA ORFを隣接させ、次にこれを使用して、pDZ-NS-psプラスミドのNS ORFのNheI断片とXhoI断片を交換し、NS-HAwt-NS構築体を作製した(図25A)。(ii) HA-NSwt-HA構築体の作製(図25A)。同じ戦略を用い、3'HAパッケージングシグナル上の3つのATGが変異された(A33T、A79T及びA92T)。長さ838bpであるA/PR/8/34 NSタンパク質(NS1、NS2)のORFを増幅し、かつpDZベクター内のHAパッケージング配列にライゲーションし、HA-NSwt-HA構築体を作製した(図25A)。(iii) NS-HAmut-NS構築体の作製(図26A)。この方法は、HA ORFの増幅に使用されるプライマーが同義的変異を有する以外は、NS-HAwt-NS(図25A)に関して説明されたものと同じであった。フォワードプライマーは、以下の通りであり：

【化2】

5'-ca gctagc atg aaA gcG aaT TtG TtA gtT TtA CtG TCC gcG TtG gcG gcC gcG
gaC gca gac aca ata tgt ata ggc tac c-3' (配列番号:114)

; 及び、2つのリバースプライマーは以下の通りである：

【化3】

5'-cca Aaa GGA Aat Cgc Tcc TaA ACT Aac TaG CaA Tac TaA GCT GGA Agc gac agt tga
gta gat cgc c-3'(配列番号:115)及び5'-gt ctcgag tca Aat Aca Aat CcG Aca Ttg TaG GCT
Ccc Gtt GCT Gca cat cca Aaa GGA Aat Cgc Tcc TaA AC-3' (配列番号:116)

10

20

30

40

50

。(iv)HA-NSmut-HA構築体の作製(図26A)。この方法も、同義的変異がNS ORFに導入された以外は、HA-NSwt-HA(図25A)に関して説明されたものと同じであった。フォワードプライマーは、以下の通りであり：

【化4】

5'-ca gctagc atg gaC ccG aaT acC gtA AGT TCT ttt cag gta gaC tgc ttt ctt tgg cat gtc c-3'
(配列番号:117)

; リバースプライマーは、以下の通りである：

【化5】

10

5'-gt ctcgag tta Gat CaA Ttg Gaa GCT Aaa Ggt CcG Gat Ttc Ctg ctc cac ttc aag c-3' (配列番号:118)

(これらのプライマー配列において大文字化された文字は、変異されたヌクレオチドを指定する。)。

【0378】

組換えウイルスに関する逆遺伝学。組換えインフルエンザウイルスを作製する方法は、既存のプロトコール(Gao Q、Brydon EW、Palese Pの文献、「C型インフルエンザウイルス糖タンパク質HEFを発現する7-分節化されたA型インフルエンザウイルス(A seven-segmented influenza A virus expressing the influenza C virus glycoprotein HEF)」、J Virol. 82:6419-6426 (2008)、Quinlivan Mらの文献、「NS1タンパク質の切断を介してのウマインフルエンザウイルスの弱毒化(Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein)」、J Virol. 79: 8431-8439 (2005)；Fodor Eらの文献、「組換えDNAからのA型インフルエンザウイルスの救出(Rescue of influenza A virus from recombinant DNA)」、J Virol. 73:9679-9682 (1999))をわずかに改変した。Swap(wt)及びSwap(mut)ウイルスの作製については(図25B及び26B)、293T細胞を、6つのA/PR/8/34プラスミド(pDZ-PB2、PB1、PA、NP、NA、M)、並びに2つのキメラHA及びNS構築体[NS-HAwt-NS及びHA-NSwt-HA、又はNS-HAmut-NS及びHA-NSmut-HA]によりトランスクレクトした(図25A及び26A)。再集合体(NS)ウイルス(図25C)の作製については、293T細胞を、7つのA/PR/8/34プラスミド(pDZ-PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M)、及びHA-NSwt-HA構築体によりトランスクレクトした。7つのA/PR/8/34プラスミド(pDZ-PB2、PB1、PA、NP、NA、M、NS)、及びNS-HAwt-NS構築体を使用し、再集合体(HA)ウイルス(図25D)を救出した。

20

【0379】

精製されたvRNAのアクリルアミドゲル電気泳動。ウイルスは、10日齢の卵において37で増殖させ、引き続き既報の方法(Gao Q、Brydon EW、Palese Pの文献、「C型インフルエンザウイルス糖タンパク質HEFを発現する7-分節化されたA型インフルエンザウイルス(A seven-segmented influenza A virus expressing the influenza C virus glycoprotein HEF)」、J Virol. 82:6419-6426 (2008))を用い処理した。簡潔には、ウイルスを精製し、RNAを単離し、かつ2.8%変性ポリアクリルアミドゲル上を泳動させ、その後銀染色キット(Invitrogen社)により染色した。

30

【0380】

40

pla-queの免疫染色。既に報告された方法に従った(Gao Q、Brydon EW、Palese Pの文献、「C型インフルエンザウイルス糖タンパク質HEFを発現する7-分節化されたA型インフルエンザウイルス(A seven-segmented influenza A virus expressing the influenza C virus glycoprotein HEF)」、J Virol. 82: 6419-6426 (2008)；Matrosovich M、Matrosovich T、Garten W、Klenk HDの文献、「ウイルスpla-queアッセイ用新規低粘度重層培地(New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays)」、Virol. J 3: 63 (2006))。ウサギ抗-A/PR/8/34ポリクローナル抗体(1:2,000希釈)を、pla-que可視化に使用した。

【0381】

ウイルス増殖動態。10日齢の胚発育鶏卵を、インフルエンザウイルス(100PFU/卵)によ

50

り接種し、37¹⁰でインキュベーションした。接種後24、48及び72時間の時点で、尿膜液を収集し、かつウイルス力値を、MDCK細胞におけるplaques assay又はplaquesの免疫染色により決定した。各時点で、3個の卵を、各ウイルスについて分析した。

【0382】

(6.2 結果)

HA遺伝子のORF及びNS遺伝子由来のパッケージングシグナルを含むキメラA型インフルエンザウイルス分節、並びにNS遺伝子のORF及びHA遺伝子のパッケージング配列を含むキメラA型インフルエンザウイルス分節を作製し、組換えインフルエンザウイルスの構築に使用した。これを行うために、野生型HA ORFを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅し、以下を含む隣接するNSパッケージング配列にライゲーションした：3'NCR及び5'NCR、NS ORFの3'側77nt、及び5'側102nt。これは、長さ1941ntのキメラNS-HAw¹⁰t-NS構築体を作製した(図25A)。HAのそれ自身の開始コドンからの翻訳を可能にするために、NS 3'ORFパッケージングシグナルの77nt内の2つの翻訳開始コドン及び1つのスプライス部位は変異された(図25A)。同じ戦略に従い、長さ1099ntのHA-NSwt-HA構築体も作製した(図25A)。この構築体において、NS1及びNS2の両タンパク質をコードしているNS ORFは、HAの3'NCR及び5'NCR、HA ORFの3'側67nt、及び5'側105ntにより隣接された。HAの3'ORFパッケージング領域の67ntに位置した3つの開始コドンも、変異された。A/PR/8/34ウイルスが骨格として使用され、かつ現在公知のHA及びNSパッケージングシグナルは全てA/WSN/33ウイルスにおいて同定されているので(Fujii Kらの文献、「ビリオンへの効果的取り込みのためのA型インフルエンザウイルスNS分節のコード領域及び分節特異的非コード領域の両方の重要性(Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions)」、J Virol. 79: 3766-3774 (2005)；Watanabe T、Watanabe S、Noda T、Fujii Y、Kawaoka Yの文献、「2種の外来遺伝子を安定して発現する新規インフルエンザウイルスベースのベクター作製のための核酸パッケージングシグナルの探求(Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes)」、J Virol. 77: 10575-10583 (2003))、適切なパッケージングを確実にするために、これらの実験において使用される隣接するパッケージング配列は、A/WSN/33において同定されたものよりもわずかに長くした。²⁰

【0383】

既に確立された方法を使用し、Swap(wt)ウイルスを、成功裏に救出し、かつ胚発育鶏卵における複数回の継代の間安定していることが示された(図25B)。このウイルスは、6つのA/PR/8/34野生型分節(PB2、PB1、PA、NP、NA、及びM)並びに2つのキメラ分節NS-HAw³⁰t-NS及びHA-NSwt-HAを含む(図25B)。Swap(wt)ウイルスは、卵において良好に増殖し、力値は、接種後1日で1mlにつき10⁸plaques形成単位(PFU/ml)以上に達することができた(図25F)。しかしながら、組換えA/PR/8/34ウイルスに比べ増殖は依然わずかに減弱されていた。MDCK細胞において、Swap(wt)ウイルスにより形成されたplaquesは、A/PR/8/34ウイルスのものよりもわずかに小さかった(図25E)が、卵におけるSwap(wt)ウイルスの力値は、A/PR/8/34 ウイルスの力値の約1/10であった(図25F)。

【0384】

HA-NSwt-HA及びNS-HAw⁴⁰t-NS分節は各々野生型ウイルス遺伝子と自在に再集合することができるかどうかを決定するために、これらのキメラ遺伝子のただ1つを保有するウイルスを構築した。驚くべきことに、2つの組換えウイルスが救出された：再集合体(NS)及び再集合体(HA)(図25C及び25D)。再集合体(NS)ウイルスは、7つのA/PR/8/34分節(PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、及びM)並びに1つのキメラHA-NSwt-HA分節を含み(図25C)；再集合体(HA)ウイルスは、7つのA/PR/8/34 vRNA(PB2、PB1、PA、NP、NA、M及びNS)並びに1つのキメラNS-HAw⁴⁰t-NS分節を含む(図25D)。興味深いことに、再集合体(NS)ウイルスは、効率的増殖を示した(図25F)。MDCK細胞におけるplaques size及び卵における力値は両方共、Swap(wt)ウイルスのものに類似していた(図25E及び25F)。再集合体(HA)ウイルスは、より弱毒化され、MDCK細胞におけるより小さいplaques及び卵におけるより低い力値を有した(図25E)⁵⁰

及び25F)。両ウイルスの救出は、Swap(wt)ウイルスの各キメラ分節は、独立して再集合し、再集合体ウイルスを形成することができることを示した。

【0385】

NS-HAwt-NS分節又はHA-NSwt-HA分節の独立して再集合体ウイルスを形成する能力は、分節特異的パッケージングシグナルの2つのセットが同じvRNAに同時に存在するという事実に起因する(図25)。NS-HAwt-NS分節は、隣接するNSパッケージングシグナルに加え、そのHA ORF領域内にその元来のHA-特異的パッケージング配列を依然維持している(図25A)。同じことが、HA-NSwt-HA分節にも当てはまる。元來のパッケージングシグナルは依然機能性であることができる(図25A)。この可能性を考慮し、隣接するパッケージングシグナルのみの利用を強化するために、連続同義的変異が、これらのキメラ構築体のORFの3'末端及び5'末端に導入される(図26A)。先行する研究は、HA及びNS分節のコード領域パッケージング配列内の連続同義的変異は、vRNAパッケージング効率を実際低下させたことを示している(Fujii Kらの文献、「ビリオンへの効果的取り込みのためのA型インフルエンザウイルスNS分節のコード領域及び分節特異的非コード領域の両方の重要性(Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions)」、J Virol. 79: 3766-3774 (2005); Marsh GA、Hatami R、Palese Pの文献、「出芽ビリオンへの効率的パッケージングに重要なA型インフルエンザウイルス赤血球凝集素ウイルスRNAの特異的残基(Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions)」、J Virol. 81: 9727-9736 (2007))。この研究において、22nt及び45nt変異が、各々、HA ORFの3'末端及び5'末端に導入され、新規構築体NS-HAmut-NSを形成し(図26A、及び「材料及び方法」)；同様の方法を、HA-NSwt-HAに適用し、12nt及び15nt変異をHA-NSmut-HAを構築するために導入した(図26A、及び「材料及び方法」)。

【0386】

図25Bの手法と同じ手法を使用し、6つのA/PR/8/34分節(PB2、PB1、PA、NP、NA、及びM)並びに2つのキメラ分節NS-HAmut-NS及びHA-NSmut-HA(図26B)を含むSwap(mut)ウイルス(図26B)が、良好に救出された。救出の直後、Swap(mut)ウイルスの力価は低かった。卵内で1回継代した後、このウイルスはより高い力価を生じ、かつ複数回の継代にわたり同じ収量を維持した。Swap(mut)ウイルスのブラークサイズは、Swap(wt)ウイルスのものに類似していた(図25E及び26C)。しかし、卵において、Swap(mut)ウイルスは、Swap(wt)よりもわずかにより良く増殖したが、これはA/PR/8/34ウイルスと比べ依然わずかに減弱された(図26D)。8及び2ヌクレオチド交換は、各々、継代されたウイルスのNS-HAmut-NS及びHA-NSmut-HA vRNAの3'末端において同定されたことは留意されるべきである(図26B凡例参照)。

【0387】

図26Aのキメラ遺伝子は、野生型のものと独立して再集合することができるかどうかを決定するために、2つのウイルスの救出を試みた(図26Eに示した)。HA-NSmut-HA及びNS-HAmut-NS構築体(図26A)は、それらの対応物と置換されている(図26E参照)こと以外は、これら2種のウイルスの遺伝的組成は、再集合体(NS)(図25C)及び再集合体(HA)(図25D)ウイルスのものに類似している。各キメラ分節が依然自在に再集合するその能力を維持する場合、図26Eの2種のウイルスは救出される。しかし、再集合体(NS)(図25C)及び再集合体(HA)ウイルス(図1D)が容易に救出される場合、図26Eに示されたいずれのウイルスも得ることができない。この救出の失敗は、HA-NSwt-HA及びNS-HAwt-NSとは異なり、HA-NSmut-HA及びNS-HAmut-NS分節は、野生型遺伝子と自在に再集合することができないことを示唆している。

【0388】

5種の組換えウイルス[rA/PR/8/34(図27A)、Swap(wt)(図27B)、再集合体(NS)(図27C)、再集合体(HA)(図27D)及びSwap(mut)(図27E)]を、卵において増殖し、30%ショ糖クッショングを通して濃縮した。RNAを、精製されたウイルスから単離し、かつ2.8%アクリルアミドゲル上で分解し、銀染色によりウイルスゲノム組成を可視化した。Swap(wt)ウイルスのNS

10

20

30

40

50

-H_Awt-NS分節は、非効率的にパッケージされたのに対し、他方のキメラ分節HA-NSwt-HAはより良いパッケージング効率を有した(図27B)。2種の再集合体ウイルス[再集合体(NS)及び再集合体(HA)]について、いずれかのキメラ分節[図27CのHA-NSwt-HA及び図27DのNS-H_Awt-NS]が効率的に取り込まれなかつた。再集合体(HA)ウイルスのNS-H_Awt-NS分節のパッケージング効率は、非常に低く(図27D)、これはMDCK細胞及び卵の両方において認められた弱毒化を説明することができる(図25E及び25F)。Swap(mut)ウイルスの2つのキメラ分節は、他の分節に比べ効率的に取り込まれた(図27E)。Swap(mut)ウイルスのNS-HAmut-NS分節(図27E)は、Swap(wt)ウイルスのNS-H_Awt-NS分節(図27B)よりも、より効率的に取り込まれ、これはキメラHA分節のHA ORFの元来のパッケージングシグナルの破壊は、効率的パッケージングの達成に決定的に重要であることを示唆している。HA-NSwt-HA分節とHA-NSmut-HA分節の間の取り込みレベルに有意差は存在せず、両方とも効率的にパッケージされた(図27B及び27E)。

【0389】

図25C及び25Dの2種のウイルスは救出されたが、図26Eの2種の仮想ウイルスは救出されなかつたことは、どのキメラ分節が野生型分節と自在に再集合体ウイルスを形成することができるかを示しているが、これらの実験それ自体で再集合を直接アッセイすることはできなかつた。キメラ分節は、組織培養において自在に再集合することができるかどうかを決定するために、MDCK細胞を、Swap(wt)[又はSwap(mut)]ウイルス及びrA/PR/8/34ウイルスにより、各々について10moiで、同時感染した(図10A)。単独のブラークを単離し、かつ引き続きMDCK細胞において増幅させた。RNAは、増幅されたウイルスから精製し、RT-PCRを行い、HA及びNS分節を検出した(図28A)。NS-H_Awt-NS及びNS-HAmut-NSの両分節について、824塩基対(bp)の生成物が認められたのに対し、rA/PR/8/34HAについて、747bpバンドが得られた(図28B、28D及び28E)。他方で、キメラ及び野生型NS分節のPCR産物は、各々、長さ405bp及び326bpであった(図28C、28D及び28E)。Swap(wt)及びrA/PR/8/34同時感染実験において、24のブラークを特徴付け、かつそれらの2つ(ブラーク3及び8、矢印で示した)は、HA-NSwt-HA分節の野生型ウイルスによる再集合を示した(図28D)。これら2つのブラークの遺伝的組立(makeup)は、再集合体(NS)ウイルスと同じである(図25C)。NS-H_Awt-NS分節の再集合は認められず、恐らくその比較的低いパッケージング効率のためであろう(図27D)。Swap(mut)及びrA/PR/8/34同時感染実験に関して、48ブラークが採取され、これらは全て野生型HA及びNS遺伝子を含み、これはNS-HAmut-NS又はHA-NSmut-HAが自在に再集合することができないことを示している。

【0390】

(6.3 考察)

興味深いことに、2つのキメラ構築体[NS-H_Awt-NS及びHA-NSwt-HA(図25A)]について、各々分節特異的パッケージング配列の2つのセットを含んだ：NS-H_Awt-NSは、NS-特異的NCR及びORFパッケージング領域に加え、HA遺伝子のORFパッケージング領域を含み；HA-NSwt-HAは、HA-特異的NCR及びORFパッケージング領域に加え、NS遺伝子のORFパッケージング領域を含んだ(図25A)。MDCK細胞及び卵の両方におけるSwap(wt)ウイルスの効率的増殖は、2つのシグナルのセットが、1つのvRNA上に同時に存在することを示している(図25E及び25F)。しかし、どのセットが、ゲノムリクルートメントの過程の間に主要な役割を果たすかは不明である。

【0391】

Swap(wt)中のNS-H_Awt-NS RNA(図27B)及び再集合体(HA)ウイルス中のそれ(図27D)のレベルは、他の分節のものよりも有意に低かった。このことは、2つのシグナルのセットが1つの分節上に同時に存在する場合、これらは、インフルエンザRNAパッケージング過程の間に互いに干渉し得ることを示唆している。これは同じく、1つの分節上の2つのパッケージングシグナルセットの不適合性も示唆している。2つの再集合体ウイルス[再集合体(NS)(図25C)及び再集合体(HA)(図25D)]の救出の成功は、1つのウイルスが、同じパッケージングシグナルを2回取り込むことができることを明らかにしている。例えば、再集合体(NS)ウイルスは、野生型HA分節及びHA-NSwt-HAキメラ分節の両方から誘導されたHAパッケージングシグナルを2回取り込むことができることを明らかにしている。例え

10

20

30

40

50

ング配列の2つのコピーを含み(図25C)；再集合体(HA)ウイルスは、野生型NS分節及びNS-HAwt-NSキメラ分節の両方から誘導されたNSパッケージングシグナルの2つのコピーを保有している(図25D)。この現象は、9-分節化されたインフルエンザウイルスは、2つのNS分節を取り込むことができるという先行する知見(Enami M, Sharma G, Benham C, Palese Pの文献、「9つの異なるRNA分節を含むインフルエンザウイルス(An influenza virus containing nine different RNA segment)」、Virology 185: 291-298 (1991))と一致している。

【0392】

本明細書に示されたデータは、ORFが別の分節由来のパッケージング配列と単純に隣接することにより、再集合の阻害を実現することができないことを示している。単独のキメラ遺伝子[再集合体(NS)ウイルス中のHA-NSwt-HA(図25C)、及び再集合体(HA)ウイルス中のNS-HAwt-NS(図25D)]を含むウイルスを救出すること、並びに再集合実験において、キメラHA-NSwt-HA分節を持つウイルスを同定すること(図28D)は可能である。この再集合実験において、NS-HAwt-NS分節又はSwap(wt)遺伝子型を持つウイルスは、単離されなかった。これは、分析されたブラークが比較的少数であることで説明することができる。キメラ分節中のORF末端パッケージングシグナルは依然機能性である可能性を考慮し、連続サイレント変異が、これらのシグナルに導入され、その後各分節[NS-HAmut-NS又はHA-NSmut-HA]はその自在に再集合する能力を失う(図26及び28)。いかなる理論によても束縛されることなく、これら2つのキメラ分節に残存する隣接する領域は、パッケージングのための主要シグナルとなり始め、その結果HAはNS遺伝子として認識され、かつNSはHA遺伝子として認識される。NS-HAmut-NS又はHA-NSmut-HA分節を伴う単独の再集合体は救出されず、その理由はそのようなウイルスは、HA又はNSパッケージングシグナルを欠いているからであろう。同じく組織培養再集合実験において、単独の再集合体は単離されなかった。しかし、この実験の設定上の制限は、Swap(mut)とrA/PR/8/34ウイルスの間の再集合についても真実の余地を残している。わずかに48ブラークが単離され、従って単独の作り直された(rewired)分節を持つウイルスが形成される可能性を排除することはできない。それにもかかわらず、本データは、パッケージングシグナルの作り直しは、再集合の欠損を生じることを示唆している。8つ全てのパッケージングシグナルの完全相補体を含むウイルスのみが、高い収量で増殖するであろう。元来のパッケージングシグナルの除外により1つの分節が作り直される場合、ウイルスは、生存能を失い、これは失われたパッケージング配列を提供するための第2の分節の作り直しによってのみ再度獲得することができる。従って、NSパッケージングアイデンティティを伴うHA遺伝子を持つウイルスは、HAパッケージングアイデンティティを伴うNS遺伝子も持たなければならない。

【0393】

従って本試験は、再集合を防止するために、インフルエンザウイルスRNAを作り直す方法をもたらし、これは今後のインフルエンザ生ワクチンの構築に使用することができる。

【0394】

(7. 実施例2)

本実施例は、逆遺伝学を使用する組換えインフルエンザウイルスの作製を説明している。

【0395】

6又は7つの作り直したRNA分節を持つ3種の組換えA/PR/8/34ウイルスを、成功裏に作製した(図34-36)。異なる分節由来のパッケージングシグナルを保有するキメラ分節の各々は、野生型RNAにより再集合体ウイルスを形成するその能力を失うか、又は有意に低下するかのいずれかであった。

【0396】

図34-36に示された組換えウイルスを救出するために使用されるキメラ構築体を作製するため、以下のプラスミドの2つのセットを使用した：8プラスミドの1つのセットは、インフルエンザA/PR/8/34ウイルスの8つのRNA分節から誘導された分節特異的パッケージング配列を保有した(図1-8参照)。重要なことに、3'末端-近位のORF領域のパッケージン

10

20

30

40

50

グシグナル、並びにM及びNS分節由来のパッケージング配列上の5'スプライス部位の各々に位置したATGは、下流のORFの正確な開始(initiation)を可能にするよう全て変異され(図1-8参照)；8プラスミドの第2のセットは、インフルエンザA/PR/8/34ウイルス分節の8つ全てのORFを保有した。各ORFに関して、ORF領域パッケージングシグナルを失活させるために、連続サイレント変異を、ORFの3'及び5'末端の両方に導入した(図9-16参照)。2つの末端にサイレント変異を保有する8つ全てのORFは、分節特異的パッケージング配列を保有する構築体へのライゲーションのために1つのNheI及び1つのXhoIにより隣接された。加えて、いくつかのORF領域に位置した予め存在するNheI又はXhoI部位は、部位特異的変異誘発により全て変異された。

【0397】

10

組換えインフルエンザウイルスを作製する方法は、実施例1並びにGao及びPaleseの文献(PNAS, 106: 15891 (2009))に説明された方法を改変した。図35の組換えウイルスの作製に関して、293T細胞を、6種のキメラプラスミド(NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PA mut-PB1、M-NPmut-M、PA-NAmut-PA、NP-Mmut-NP)、及び野生型A/PR/8/34 HA及びNS分節を保有する2種のプラスミドによりトランスフェクトした。トランスフェクション後24時間で、細胞を収集し、かつ10-日齢の特定病原体除去ニワトリ胚(Charles River Laboratories社、SPAFAS、プレストン、CT)へ接種した。3日後、尿膜液を採取し、HAアッセイを使用し、救出されたウイルスの存在を決定した。図36及び37に示されたその他の2つのキメラウイルスを、同じ方法を用い作製した。図36のウイルスは、6種のキメラ分節(NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、NS-HAmut-NS、PA-NAmut-PA、HA-NSmut-HA)、及び2種の野生型A/PR/8/34 NP及びM分節を含んだ。図37のウイルスは、7種のキメラ分節(NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、NP-HAmut-NP、NS-NPmut-NS、PA-NAmut-PA、HA-NSmut-HA)、及び1種の野生型A/PR/8/34 M分節を含んだ。これら3種のキメラウイルスは全て良好に増殖し、胚発育鶏卵における力価 $>10^8$ pfu/mlを有した。

20

【0398】

(8. 実施例3)

本実施例は、分節特異的パッケージングシグナルの操作を基にした、9-分節化されたインフルエンザウイルスの作製を説明する。

【0399】

30

(8.1 材料及び方法)

(細胞及びウイルス) 293T細胞は、10%ウシ胎児血清(FCS)を補ったダルベッコの改变イーグル培地で維持した。MDCK細胞は、10%FCSを補ったイーグル最小必須培地で増殖した。ウイルスは、10日齢の特定病原体除去ニワトリ胚において、37で増殖させた(Charles River Laboratories社、SPAFAS)。

【0400】

40

(プラスミド構築) (i)NA-PB1mut-NA、NA-PB2mut-NA、及びNA-PAmut-NA構築体(図29A左側)の作製。各ORFの2つの末端にサイレント変異を導入するために、PB1、PB2、及びPA遺伝子のORFを、先に構築されたpDZ-PB1、PB2、及びPA構築体からのPCRにより増幅し(Quinlivanらの文献、2005, J Virol. 79:8431-9)、かつpGEM-Tベクター(Promega社)へクローニングした。下記のプライマーをPB1mut ORFの増幅に使用し

【化6】

(フォワード: 5'-ca gctagc atg gaC gtT aaC ccA acT CtG TtA ttT CtG aaG gtA ccG gcG caG aaC gcC atC agT
acG acC ttT cct tat act gga gac-3' (配列番号:128); リバース: 5'-gt ctcgag cta Ctt Ctg TcT CcG Aag Ttc Ctc
Gat Tgt ACT Gca Aat Ttt cat gat ctc agt gaa c-3' (配列番号:129))

; 下記のプライマーをPB2mut ORFの増幅に使用し

【化7】

(フォワード: 5'-ca gcttagc atg gaG CgG atC aaG gaG TtG CgG aaC TtG atg tcg cag tct cg cac-3'
 (配列番号:130); 2つのリバースプライマー: 5'-tg TGA Atc Cgt CaA Gat AGA GCT Atc TcT Ctt
 TcT Ctt cat Cac TaG Tac cac gtc tcc ttg ccc-3' (配列番号:131)及び5'-ga ctgcgat cta Gtt Aat
 Agc cat Acg Gat Cct Ctt Agt Tgc Cgt Ttg TGA Atc Cgt CaA G-3' (配列番号:132))

; 下記のプライマーをPAmut ORFの増幅に使用した

【化8】

10 (フォワード: 5'-ca gcttagc atg gaG gaC ttC gtA AgG caG tgT ttT aaC ccA atg atC gtT gaA ctC
 gcA gaG aaG acG atg aaG gag tat ggg gag g-3' (配列番号:133); リバース: 5'-gt ctgcgat cta
 TGA TaG Cgc Gtg Cgt CaA Aaa Aga Att Aaa cca GCT Ggc Gtt aag caa aac cca g-3' (配列
 番号:134))

。これらのプライマー配列において大文字化された文字は、変異されたヌクレオチドを指定する。部位特異的変異誘発を使用し、PB1mut ORF中の1つのNheI部位(A1143G)、及びPAmut ORF中の1つのNheI部位(A1233G)を除去した。引き続きPB1mut、PB2mut及びPAmut ORFを使用し、NheI及びXhoI部位を用い先に構築されたプラスミドpDZ-GFP-2(Gaoらの文献、2008, J Virol. 82: 6419-26)のGFP ORFと交換し、NA-PB1mut-NA、NA-PB2mut-NA、及びNA-PAmut-NA構築体を作製した(図29A)。(iii)PB1-GFP-PB1、PB2-GFP-PB2、及びPA-GFP-PA構築体(図29A右側)の作製。先に構築されたpDZ-PB1プラスミド(Quinlivanらの文献、2005, J Virol. 79: 8431-9)由来の2.7kb KpnI断片を、pUC18ベクターのKpnI部位に移入し、部位特異的変異誘発を施し、6つのATG(A25T、A29T、A71T、A119T、A142T、A146T)を変異し、かつ1つのNheI部位(A148G、G151A、T152G)及び1つのXhoI部位(C2184T、A2185C)を作製した。その後2.7kb PB1 KpnI断片を、pDZベクター(Quinlivan らの文献、2005, J Virol. 79: 8431-9)(その中のNheI及びXhoI部位が除去されている)に戻し移入し、プラスミドpDZ-PB1-psを生じた。同じ戦略に従い、PB2遺伝子内の3つのATG(A28T、A58T、A109T)を変異し、かつ4つの変異(C153G、C155T、T2175C、C2177A)を導入し、1つのNheI部位及び1つのXhoI部位を作製し、プラスミドpDZ-PB2-psを生じ; PA遺伝子内の6つのATG(A25T、A45T、A58T、A85T、A95T、A138T)を変異し、5つの変異(A142T、C143A、T144G、T2052C、A2055G)を導入し、1つのNheI部位及び1つのXhoI部位を作製し、プラスミドpDZ-PA-psを生じた。GFPタンパク質のORFを、pDZ-GFP-2プラスミド(Gaoらの文献、2008, J Virol. 82: 6419-26)から消化し、pDZ-PB1-ps、pDZ-PB2-ps及びpDZ-PA-psプラスミドのNheI及びXhoI部位にライゲーションし、各々、PB1-GFP-PB1、PB2-GFP-PB2、及びPA-GFP-PA構築体を作製した(図29A)。(iii)PB1-HA(HK)-PB1、PB2-HA(HK)-PB2構築体(図30A)の作製。A/HK/1/68 HA ORFを、下記のプライマーを用い、pCAGGS-HK HAプラスミド(Wangらの文献、2009, PLoS Pathog 6: e1000796)からのPCRにより増幅した:

【化9】

40 (フォワード: 5'-ca gcttagc atg aag acc atc att gct ttg agc tac att ttc-3'
 (配列番号:135); リバース: 5'-gt ctgcgat cta aat gca aat gtt gca cct aat gtt gcc tct c-3' (配列
 番号:136))

。1つの内部XhoI部位を、部位特異的変異誘発を用い欠失した。次に完全長A/HK/1/68 HA ORFを使用し、PB1-GFP-PB1及びPB2-GFP-PB2構築体のGFP遺伝子と交換し(図29A)、PB1-HA(HK)-PB1、PB2-HA(HK)-PB2構築体を作製した(図30A)。PB1-GFP-PB1構築体(図29A)のGFP遺伝子は、プラスミドpRLtk(Promega社)から増幅したウミシイタケルシフェラーゼORFとも交換し、PB1-Luc-PB1構築体を作製し、これを使用し対照ウイルス-PB1(ps)+Luc(図31A)を救出した。これらのキメラ分節の核酸配列(ポジティブセンス)を作製し、図32に列記し

10

20

30

40

50

た。

【0401】

(組換えウイルスの逆遺伝学) 組換えインフルエンザウイルスを作製する方法は、先に説明されている(Fodorらの文献、1999, J Virol. 73:9679-82、Gaoらの文献、2008, J Virol. 82:6419-26；及び、Quinlivanらの文献、2005, J Virol. 79:8431-9)。

【0402】

(精製されたvRNAのアクリルアミドゲル電気泳動) ウィルスを、10日齢の卵において37度増殖させ、引き続き先に報告された方法(Gaoらの文献、2008, J Virol. 82:6419-26)を用い処理した。簡潔には、ウイルスを精製し、かつRNAを単離し、2.8%変性ポリアクリルアミドゲル上を泳動させ、その後銀染色キット(Invitrogen社)により染色した。

【0403】

(ウェスタンプロット) ビリオン内のウイルスタンパク質を検出するために、ウイルス[rA/PR/8/34、X31、-PB1(ps)+HK HA、及び-PB2(ps)+HK HA]を、胚発育鶏卵において37度増殖させ、30%ショ糖クッショングを通して濃縮した。ペレット化されたビリオンを、PBS中に懸濁させ、2×タンパク質負荷緩衝液(100mM Tris-HCl[pH6.8]、4%ドデシル硫酸ナトリウム、20%グリセロール、5% -メルカプトエタノール、及び0.2%ブロモフェノールブルー)中に溶解させた。感染細胞におけるウイルスタンパク質の発現を検出するために、6-ウェル皿中の80%集密なMDCK細胞単層を、ウイルス[rA/PR/8/34、X31、-PB1(ps)+HK HA及び-PB2(ps)+HK HA]により、moi 10~0.0001で感染した。感染の1日後、細胞をPBSで洗浄し、収集し、2×タンパク質負荷緩衝液中に溶解した。このタンパク質溶解液を、10%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル上で分離し、ニトロセルロースメンブレン(Whatman社)上に転写した。次にメンブレンを、A/PR/8/34 HA(PY102、1:2,000希釈)(Realeらの文献、1986, J Immunol 137: 1352-8)、A/PR/8/34 NP(HT103、1:1,000希釈)(O'Neillらの文献、1998, Embo J 17:288-96)、A/HK/1/68 HA1(66A6、1:2,000希釈)(Wangらの文献、2009, PLoS Pathog 6: e1000796)、及びA/HK/1/68 HA2(12D1、1:2,000希釈)(Wangらの文献、2009, PLoS Pathog 6: e1000796)に対する各マウスモノクローナル抗体によりプロービングした。

【0404】

(プラーカの免疫染色) 先行する方法(Gaoらの文献、2008, J Virol. 82:6419-26；Matrosovichらの文献、2006, Virol. J 3: 63)に従った。ウサギ抗-A/PR/8/34ポリクローナル抗体(1:2,000希釈)を、プラーカの可視化に使用した。

【0405】

(ウイルス増殖動態) 10日齢の胚発育鶏卵に、インフルエンザウイルスを接種し(100PFU/卵)、37度でインキュベーションした。接種の24、48及び72時間後、尿膜液を採取し、ウイルス力値を、MDCK細胞におけるプラーカアッセイ又はプラーカの免疫染色により決定した。各時点で、3個の卵を、各ウイルスについて分析した。

【0406】

(マウスの免疫及びチャレンジ) 8週齢の雌のC57BL/6マウス(CRL社)を、ケタミンとキシラジンの混合物の腹腔内投与により麻酔し、PBS又はインフルエンザウイルス[-PB1(ps)+HK HA又は-PB1(ps)+Luc、投与量 10^3 又は 10^4 PFU/マウス]の50 μlの鼻腔内投与により免疫した。マウスを、2週間にわたり、体重減少について、毎日監視した。免疫の3週間後、マウスを、A/PR/8/34の100マウス50%致死量(MLD_{50})又はX31ウイルスの33.3 MLD_{50} のいずれかの鼻腔内感染によりチャレンジした。再度マウスを、2週間にわたり、体重減少又は他の疾患兆候について、毎日監視した。

【0407】

(赤血球凝集阻止(HI)アッセイ) ワクチン接種前(0日目)及びチャレンジ前(21日目)に、血液試料をマウスから採取した。受容体破壊酵素(Sigma社)処置を用い、赤血球凝集素の非特異的阻害剤を除去した。「動物インフルエンザ診断と管理に関するWHOの暫定的勧告」のプロトコールに従った(www.who.int)。

【0408】

10

20

30

40

50

(H1/H3サンドイッチELISA) 96-ウェルImmuron 2HBプレート(NUNC社)を、マウス抗-H3 HAモノクローナル抗体66A6(IgG1)(Wangらの文献、2009, PLoS Pathog 6: e1000796)(PBS中5 μg/ml)と共に、4℃で一晩インキュベーションすることにより被覆した。その後プレートを、PBS中の1%BSAで、室温で30分間ロックした。損なわれていない卵増殖したウイルスの2倍希釈物を添加し、プレートを37℃で3時間インキュベーションした。捕獲されたウイルス粒子上のH1亜型HAタンパク質を、1 μg/ml抗-H1 HA抗体C179(マウスIgG2a)(Okunoらの文献、1993, J Virol. 67:2552-8)により、37℃で3時間プロービングし、ヤギ抗マウスIgG2a-AP(Southern Biotech社)(1:2000希釈)により検出した。

【0409】

(8.2 結果)

10

(8.2.1. 9番目のGFP分節を保有する組換えA/PR/8/34ウイルスの作製)

限定された温度で、温度感受性A型インフルエンザウイルスは、2つの異なる分節に位置した非構造タンパク質(NS)分節特異的パッケージングシグナルの2つのセットを含むことが可能であることが示されている：1つのセットは、NS1遺伝子に温度感受性欠損を有するNS分節から誘導され、かつ第2のセットは、野生型NS1遺伝子をコードしている分節に由来する(Enamiらの文献、1991, Virology 185:291-8)。A型インフルエンザウイルスは、NA分節特異的パッケージング配列の2つのコピーを取り込むことができるかどうかを決定するために、PB1分節のパッケージングシグナルを、NA分節由来のものと交換した(図29A、左側)のに対し、元来のNA分節は変更しなかった。これを実現するために、PB1mutと称する、その2つの末端に連続同義的変異を保有するA/PR/8/34 PB1 ORF(図29A、左側)を、NA分節特異的パッケージング配列(3'NCR及び5'NCRに加え、NA ORFの末端コード配列を含む)に隣接させ、こうしてNA-PB1mut-NA分節(図29A、左側)を作製した。HA又はNS ORF領域内の部分的(partial)パッケージングシグナルは、ウイルスRNAの取り込みに影響を及ぼし得るという本明細書に記載される知見並びにGao及びPaleseの文献(2009, Proc Natl Acad Sci USA 106: 15891-6)に認められる知見に基づき、PB1 ORFの2つの末端はサイレント変異された。PB1mut ORF領域内の同義的変異は、3'及び5'-近位領域における、各々、24ヌクレオチド(nt)及び17ntの変化を含む。キメラNA-PB1mut-NA分節の3'近位NA領域内のATGは全て、部位特異的変異誘発により変異され、その結果翻訳はPB1mut遺伝子の開始コドンで開始されるであろう。HA及びNS分節に関する本明細書に記載される知見並びにGao及びPaleseの文献(2009, Proc Natl Acad Sci USA 106: 15891-6)に認められる知見、並びに他の研究(Fujiiらの文献、2005, J Virol. 79: 3766-74; Gogらの文献、2007, Nucleic Acids Res 35: 1897-907; Hutchinsonらの文献、2008, J Virol. 82: 11869-79; Liangらの文献、2008, J Virol. 82: 229-36; Marshらの文献、2007, J Virol. 81: 9727-36; 及び、Marshらの文献、2008, J Virol. 82: 2295-304)からのデータに基づき、図29AのこのキメラNA-PB1mut-NA構築体は、適切なPB1-特異的パッケージング配列が存在しないために、恐らく隣接するNAパッケージングシグナルを利用すると推測された。

【0410】

逆遺伝学を使用し、7つの野生型A/PR/8/34 RNA分節(PB2、PA、HA、NP、NA、M、NS)及び1つのキメラNA-PB1mut-NA分節を保有する-PB1(ps)ウイルスを、成功裏に救出した(図29B)。-PB1(ps)ウイルスは、野生型A/PR/8/34ウイルスと比べ、弱毒化され、卵におけるより低い力価及びMDCK細胞中のより小さいplaquesを有した(図29E及びF)。-PB1(ps)ウイルスは、PB1分節特異的パッケージングシグナルを有する9番目の分節を取り込むことができるかどうかを決定するために、3'末端にPB1パッケージング配列の153nt及び5'末端に159ntを保有するPB1-GFP-PB1構築体を作製した(図29A、右側)。これらの153nt及び159nt配列は、両方のNCR及び末端コード領域パッケージング配列からなり、かつ3'側153nt PB1パッケージング配列に位置した6つのATGは、部位特異的変異誘発により全て変異された。次に-PB1(ps)ウイルスの8つ全ての分節及びPB1分節特異的パッケージングシグナルを伴う9番目のGFP分節を有する-PB1(ps)+GFPウイルス(図29B)を作製した。-PB1(ps)+GFPウイルスは、-PB1(ps)ウイルスに特徴的な増殖に類似した増殖を示し、卵における類似した力価及びMDCK細胞中の類似のplaques表現型を有した(図29E及びF)。-PB1(ps)+GFPウイルスは安定し

20

30

40

50

ており、かつ感染細胞におけるGFP発現(図29G)は、限定希釈法により、卵内で5継代維持された。-PB1(ps)+GFPウイルスにより形成されたGFP発現ブラークの割合も、卵内で5継代にわたり変化しなかった(図33)。

【0411】

同じ戦略に従い、PB2及びPA分節のパッケージングシグナルも、各々NAのものと交換した。キメラ構築体NA-PB2mut-NA及びNA-PAmut-NAを作製した(図29A、左側)。PB2mut ORFは、3'末端に13ntの及び5'末端に36ntの同義的変化を有し、PB2 ORF領域パッケージングシグナルを失活し；並びに、PAmut ORF領域は、3'末端に19ntの及び5'末端に同数の同義的変化を保有し、PA ORF領域パッケージングシグナルを失活させた(図29A、左側)。2つのキメラGFP構築体PB2-GFP-PB2及びPA-GFP-PAは、各々、PB2及びPA分節特異的パッケージング配列を保有し、これらはPB1-GFP-PB1構築体(図29A、右側)を作製するために利用したものと同じ方法を用いて作製した。PB2-GFP-PB2の3'末端158nt PB2パッケージング配列内の3つのATG、及びPA-GFP-PA構築体の3'末端129nt PAパッケージング配列内の3つのATGは、GFP遺伝子をそれ自身の開始コドンとして利用するために、全てTTGへと変異した(図29A、右側)。PB2分節に関して、7つの野生型A/PR/8/34 RNA分節(PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS)及び1つのキメラ分節NA-PB2mut-NAを有するウイルスは、救出されなかった。しかし9番目のPB2-GFP-PB2構築体が追加された場合、-PB2(ps)+GFPウイルスは成功裏に救出された(図29C)。-PB2(ps)+GFPウイルスは、卵内で、-PB1(ps)+GFPウイルスに類似した力価まで増殖したが(図29E)、これはMDCK細胞においてわずかに小さいブラークを形成した(図29F)。感染細胞におけるGFPの発現(図29G)及びGFP発現ブラークの割合(図33)も、限定希釈法により、胚発育鶏卵において少なくとも5継代にわたり安定して維持された。PA分節に関して、7つの野生型A/PR/8/34分節(PB2、PB1、HA、NP、NA、M、NS)及び1つのキメラ分節NA-PAmut-NAを有する-PA(ps)ウイルス(図29D)は、成功裏に救出された。9番目のPA-GFP-PA分節を保有する-PA(ps)+GFPウイルスも、成功裏に救出された(図29D)。-PA(ps)及び-PA(ps)+GFPウイルスは、-PB1(ps)、-PB1(ps)+GFP及び-PB2(ps)+GFPウイルスと比べ、より弱毒化され、卵内でより低い力価に増殖され、かつMDCK細胞においてより小さいブラークを形成した(図29F)。小さいブラークサイズのために、-PA(ps)及び-PA(ps)+GFPウイルスの感染力価は、正確に測定することができず、それらの卵内での増殖率は更に特徴付けられることはなかった。しかし感染細胞における-PA(ps)+GFPウイルスによるGFP発現(図29G)は、胚発育鶏卵内で少なくとも5継代は安定して維持された。最後に、卵からの-PB1(ps)、-PB1(ps)+GFP及び-PB2(ps)+GFPウイルスの感染力価は、組換え(r)A/PR/8/34ウイルスよりもはるかに低く(図29E)、それらの赤血球凝集アッセイ力価は、接種後2日目及び3日目には、rA/PR/8/34ウイルスのものと同等であり(図29H)、このことはこれらのウイルスは、野生型ウイルスよりもより多くの欠失したビリオンを生成したことを示唆している。ORF領域内のパッケージングシグナルを破壊するために導入された同義的変異の数、及びキメラ構築体において使用される隣接するパッケージング配列の長さ(図29A)は、A/WSN/33ウイルスRNAパッケージングシグナルの先行する特徴決定において決定された(Fujiiらの文献、2003, Proc Natl Acad Sci USA 100: 2002-7; Liangらの文献、2005, J Virol. 79: 10348-55; Liangらの文献、2008, J Virol. 82: 229-36; Marshらの文献、2008, J Virol. 82: 2295-304; 及び、Muramotoらの文献、2006, J Virol. 80: 2318-25)。

【0412】

結論として、単純にRNAパッケージング配列を操作することによりいくつかの9-分節化されたインフルエンザウイルスを構築する新規研究方法が、作製された。得られるウイルスは、遺伝的に安定しており、かつ余分のGFP分節を保有した。これらの9-分節化されたウイルスについて、希釈とブラーク数の間の直線性も認められ、このことは実際に8つよりも多いRNAが1つの粒子に取り込まれ得ることを示唆している。

【0413】

(8.2.2. A/PR/8/34(H1N1)及びA/HK/1/68(H3N2)赤血球凝集素の両方を保有する組換えインフルエンザウイルスの作製)

前述の9-分節化されたGFPウイルスを作製する方法を使用し、HAの2つの亜型(A/PR/8/34

10

20

30

40

50

(H1N1)HA及びA/HK/1/68(H3N2)由来のHA)をコードしているインフルエンザウイルスを作製することができるかどうかを決定した。これを行うために、PB1-GFP-PB1及びPB2-GFP-PB2構築体のGFP ORF領域(図29A、右側)を、各々、A/HK/1/68 HA ORFにより交換し、PB1-HA(HK)-PB1及びPB2-HA(HK)-PB2構築体を作製した(図30A)。逆遺伝学を使用し、-PB1(ps)+HK HA(図2B)及び-PB2(ps)+HK HA(図30C)と称される2つの9-分節化されたウイルスを救出した。-PB1(ps)+HK HAウイルス及び-PB2(ps)+HK HAウイルスは、各々、-PB1(ps)+GFP及び-PB2(ps)+GFPウイルスと類似した増殖の特徴を有した(図29E及び30D)。A/PR/8/34 HA及びA/HK/1/68 HAの両方が-PB1(ps)+HK HA及び-PB2(ps)+HK HAウイルスの粒子に取り込まれたことを示すために、4種のウイルス[rA/PR/8/34、6つのA/PR/8/34内部遺伝子及びA/HK/1/68 HA及びNA遺伝子を有するX31、-PB2(ps)+HK HA、及び-PB1(ps)+HK HAウイルス]を、卵において増殖し、ショ糖クッショングを通過させることにより濃縮した。その後ウェスタンプロットを行い、精製されたビリオン中のA/PR/8/34 HA及びA/HK/1/68 HAを検出した(図30E)。結果は、同量のウイルスタンパク質が負荷された場合、-PB1(ps)+HK HAウイルス及び-PB2(ps)+HK HAウイルスは、野生型rA/PR/8/34ウイルスと比べ、同様のレベルのA/PR/8/34 HAタンパク質を有し；これは、モノクローナルマウス抗体(Mab)PY102により検出された切断されないHA0及び切断されたHA1を含む(図30E)ことを示した。同じく、同等量のウイルスタンパク質を負荷した場合、rA/PR/8/34及びX31は、Mab HT103により検出されたNPタンパク質を同量有した(図30E)。しかし、-PB1(ps)+HK HA及び-PB2(ps)+HK HAキメラウイルスに関して、NPレベルは、rA/PR/8/34及びX31ウイルスのレベルの約1/5であり(図30E)、このことは9-分節化されたウイルスによるより効率の低いRNP取り込みを指摘している。A/HK/1/68由来のHA0及びHA1の両方が、Mab 66A6を用い、-PB1(ps)+HK HA及び-PB2(ps)+HK HAウイルス粒子において検出され；とりわけ、総タンパク質に標準化された場合、これらのキメラウイルスによるH3 HA取り込みは、X31ウイルスによる取り込みよりもはるかに低く、最低レベルがPB1(ps)+HK HAウイルスにおいて認められた(図30E)。A/HK/1/68 HA0及び切断されたHA2を検出するためにMab 12D1を使用するウェスタンプロットは、同様の結果を示した(図30E)。次にウェスタンプロットを使用し、感染細胞における-PB1(ps)+HK HAウイルス及び-PB2(ps)+HK HAウイルスによるA/PR/8/34 HA及びA/HK/1/68 HAの両方の発現を検出した(図30F)。A/PR/8/34 HA及びA/HK/1/68 HAの両方が、これらのウイルスに感染したMDCK細胞において検出された(図30F、下側パネル)。対照的に、図30Eと同様、rA/PR/8/34ウイルスに感染した細胞は、A/PR/8/34 HAのみを発現し、かつX31ウイルス-感染細胞は、H3 HAのみを発現した(図30F、上側パネル)。

【0414】

最後にサンドイッチELISAを行い、H1及びH3の両亜型HAタンパク質が、9-分節化されたウイルス粒子に取り込まれたことを確認した(図30G)。96-ウェルプレートを、Mab 66A6(Wangらの文献、2009, PLoS Pathog 6: e1000796)により被覆し、H3-依存した様式で損なわれていないウイルス粒子を捕獲した。次にウイルス粒子をH1及びH2亜型HAに対する活性があるが、H3 HAとは反応しない抗体であるMab C 179(Okunoらの文献、1993, J Virol. 67: 2552-8)により、H1内容物についてプローピングした。2つの9-分節化されたウイルスに関してシグナルが検出され、このことは、実際に2つの型のHAタンパク質が、これらのウイルス粒子へ取り込まれたことを指摘している。対照的に、rA/PR/8/34及びX31の両ウイルスは、陰性の結果を示した(図30G)。

【0415】

結論として、各々が2つのHA亜型、1つはA/PR/8/34(H1N1) HA及び1つはA/HK/1/68(H3N2) HAを有する2つの組換えウイルスは、成功裏に救出された。両方のHAは、ウイルス粒子へ取り込まれ、かつウイルス感染したMDCK細胞において発現された。

【0416】

組換え-PB1(ps)+HK HA及び-PB2(ps)+HK HAウイルスのRNAパッケージング効率を決定するために、RNAを、精製されたウイルスから単離し、かつ2.8%アクリルアミドゲル上で分解し、引き続き銀染色した(図30H)。X31ウイルスは、6つのA/PR/8/34内部遺伝子に加え、A/PR/8/34 HA及びNAのものとは異なる位置に移動したA/HK/1/68 HA及びNA分節を有した(

図30H)。バンド密度を比較することにより、-PB1(ps)+HK HAウイルスは、NA-PB1mut-NA分節を非効率的に取り込んだことが認められた。PB1-HA(HK)-PB1分節も、A/PR/8/34 HA分節と比べた場合に、若干非効率的にパッケージされた(図30H)。-PB2(ps)+HK HAウイルスに関して、NA-PB2mut-NA分節は、非効率的にパッケージされた。対照的に、PB2-HA(HK)-PB2分節は、効率的にパッケージされ、A/PR/8/34 HAのレベルと同様のレベルであった(図30H)。

【 0 4 1 7 】

(8.2.3. RA/PR/8/34及びX31ウイルスの致死的チャレンジからの保護をもたらす組換え9-分節化されたウイルスによるマウスの免疫)

2つのHA亜型を保有する9-分節化されたインフルエンザウイルスを、生ワクチンとして使用することができるかどうかを試験するために、マウスチャレンジ実験を行った。-PB1(ps)+HK HAウイルスを、本試験のために任意に選択した。陰性対照免疫原として、PB1-HA(HK)-PB1分節の代わりに9番目のPB1-Luc-PB1を保有する-PB1(ps)+Lucウイルスを使用した(図30B及び図34)。卵において、-PB1(ps)+Lucウイルス及び-PB1(ps)+HK HAウイルスの両方が、-PB1(ps)ウイルスと同様の力価まで増殖した(図31A)。この9-分節化されたウイルスがマウスにおいて病原性であるかどうかを試験するために、8週齢の雌のC57BL/6マウスの群に、PBS、-PB1(ps)+HK HAウイルス、又は-PB1(ps)+Lucウイルスを、 10^3 又は 10^4 PFUのいずれかで、鼻腔内投与により与えた(図31B)。-PB1(ps)+Lucウイルス又は-PB1(ps)+HK HAウイルスのいずれかの 10^4 PFUに感染したマウスは、感染後8日目までに、死亡するか、又はそれらの最初の体重を25%よりも大きく減らした(図31B)。 10^3 PFUが与えられたマウス群は、PBS群と同様に、ほとんど又は全く体重減少を示さず、かつ疾患兆候を示さなかった(図31B)。-PB1(ps)+HK HAウイルスが 10^3 PFUで与えられたマウス群は、感染後7日目までに、それらの体重をおよそ5%減少し、その後3日以内に完全に回復し；他の疾患兆候は認められなかった(図31B)。いずれかのキメラウイルスの 10^3 PFU投与は、疾患に関連した変化を極わずか又は全く引き起こさなかつたので、この投与量への曝露はワクチン接種と類似していると考えられた。

【 0 4 1 8 】

感染後3週間で、-PB1(ps)+Lucウイルス 10^3 PFU、-PB1(ps)+HK HAウイルス 10^3 PFUに感染したマウス群、又はPBSで偽ワクチン接種したマウスについて、致死的ウイルスチャレンジ実験を行った。マウスに、rA/PR/8/34ウイルスを3,000PFU(100MLD₅₀)鼻腔内投与により与えた(図31C)。PBS群とは対照的に、PB1(ps)+Lucウイルス又は-PB1(ps)+HK HAウイルスのいずれかでワクチン接種した群は、致死的チャレンジから完全に保護され：体重減少又は疾患兆候は認められなかった(図31C)。同じ方法に従い、偽ワクチン接種したマウス(PBS群)、 10^3 PFUの-PB1(ps)+Lucウイルスによりワクチン接種したマウス、又は 10^3 PFUの-PB1(ps)+HK HAウイルスによりワクチン接種したマウスの第2セットに、X31ウイルスの 10^7 PFU(33MLD₅₀)を、鼻腔内投与した(図31D)。偽又は-PB1(ps)+Lucをワクチン接種したマウス群は、それらの体重が3日以内に急激に25%減少し、屠殺した。先行する知見は、内部NP及びMタンパク質に対する細胞応答は、異種チャレンジに対する若干の保護をもたらすことを示したが(Yewdellらの文献、1985, Proc Natl Acad Sci USA 82: 1785-9)、-PB1(ps)+Lucワクチン接種群において保護は認められず、これは恐らく使用した高用量のチャレンジウイルスのせいであろう。対照的に、 10^3 PFUの-PB1(ps)+HK HAウイルスによるワクチン接種は、マウスを、X31ウイルスによる致死的チャレンジから保護した。平均体重は、チャレンジの翌日には10%減少し、全てのマウスは迅速に回復した(図31D)。

【 0 4 1 9 】

この実験からの血清試料の分析は、ワクチン接種後21日目までに、 10^3 PFUの-PB1(ps)+HK HAウイルスでワクチン接種した全ての動物は、rA/PR/8/34ウイルスに対する赤血球凝集阻止抗体を生成し、力価は320～640の範囲であることを指摘した。5匹の動物中4匹は、低いが検出可能なレベルのX31ウイルスに対する赤血球凝集阻止抗体を生成し、力価は20～40の範囲であった(表17)。予想されたように、 10^3 PFUの-PB1(ps)+Lucウイルスでワクチン接種した動物は、rA/PR/8/34ウイルスに対する赤血球凝集阻止抗体のみを生成し、力価は

10

20

30

40

50

160～320の範囲であった(表17)。rA/PR/8/34又はX31ウイルスのいずれかに対する赤血球凝集阻止抗体は、PBSで偽ワクチン接種した動物の血清においては検出されなかった。

表17. 9-分節化されたウイルスで免疫したマウス血清のrA/PR/8/34及びX31ウイルスに対する赤血球凝集阻止活性

【表17】

ワクチン	マウス	rA/PR/8/34に対する力価		X31に対する力価	
		免疫前	ワクチン接種後	免疫前	ワクチン接種後
PBS	1	< 10	< 10	< 10	< 10
	2	< 10	< 10	< 10	< 10
	3	< 10	< 10	< 10	< 10
	4	< 10	< 10	< 10	< 10
	5	< 10	< 10	< 10	< 10
-PB1(ps)+Luc	1	< 10	160	< 10	< 10
	2	< 10	320	< 10	< 10
	3	< 10	160	< 10	< 10
	4	< 10	320	< 10	< 10
	5	< 10	320	< 10	< 10
-PB1(ps)+HK HA	1	< 10	320	< 10	20
	2	< 10	640	< 10	< 10
	3	< 10	320	< 10	40
	4	< 10	320	< 10	20
	5	< 10	320	< 10	40

【0420】

結論として、 10^3 PFUの-PB1(ps)+HK HAウイルスによるワクチン接種は、2つの個別の亜型、1つはH1N1亜型(rA/PR/8/34)及び1つはH3N2亜型(X31)のインフルエンザウイルスによる致死的チャレンジに対し、マウスを保護する。

【0421】

(8.3 考察)

-PB1(ps)(図29B)及び-PA(ps)(図29D)と称される2つの組換えウイルスを作製し、これらは各々、PB1又はPAパッケージング配列を欠損し、かつその場所にNAパッケージング配列を保有した。これらのウイルスは生存能があるが、しかしPB1分節のNA-PB1mut-NAによる交換、又はPA分節のNA-PAmut-NAによる交換は、両方のキメラ分節のパッケージングに著しい作用を有し(図30H)、更にはウイルス増殖率に著しい作用を有した(図29E、F)ので、PB1及びPAパッケージングシグナルはウイルス増殖にとって重要である。両方のウイルスを救出する能力は、インフルエンザゲノムRNAパッケージングは、PB1又はPAパッケージングシグナルを絶対に必要とはしないことを指摘している。本明細書に記載される並びにGao及びPaleseの文献(2009, Proc Natl Acad Sci USA 106: 15891-6)に記載されるHA及びNS分節のパッケージングの知見を基に、2つのキメラ分節NA-PB1mut-NA及びNA-PAmut-NA(図29A、左側)は恐らく、各々PB1及びPAパッケージングシグナルの代わりに、隣接するNAパッケージングシグナルを利用すると仮定した。しかし、連続同義的変異を保有するPB1又はPA ORF領域(図29A)は、PB1又はPAパッケージングシグナルを部分的に保持することが可能である。24nt及び17ntの変化がPB1 ORFへ導入され、かつ19nt変化の2つのセットがPA ORFに作製された(図29A、左側)が、一部の残存するPB1又はPAパッケージングシグナルは依然存在することができ、PB1又はPA分節特異的認識を可能にしている(図29A、左側)。興味深

10

20

30

40

50

いことに、両方のウイルスは、GFPをコードしている9番目の分節を取り込むことができた。PB1パッケージング配列に隣接して9番目のPB1-GFP-PB1分節が供給される場合(図29A、右側)、-PB1(ps)ウイルスは、それをウイルスゲノムへ安定して取り込むことができ、-PB1(ps)+GFPウイルス(図29B)を作製し；同様に、-PA(ps)+GFPウイルスは、PAパッケージングシグナルに隣接された余分のPA-GFP-PA分節を維持することができる(図29D)。余分のGFP分節を伴う両方のウイルスの作製は、インフルエンザウイルスはそのゲノムRNA上にパッケージングシグナルの完全なセットを有する傾向を反映している。

【0422】

PB2分節に関して、野生型PB2がNA-PB2mut-NAキメラ分節と交換される場合(図29A、左側)、このウイルスは救出されない。同じくこのことは、そこでPB2パッケージング配列の変異又は欠失が、他の分節の操作よりもより重度のパッケージング欠損を生じるA/WSN/33ウイルスを使用する、先行する研究においても認められた(Liangらの文献、2008, J Virol. 82:229-36 ; Muramotoらの文献、2006, J Virol. 80:2318-25)。しかし、PB2パッケージングシグナルを保有した9番目のPB2-GFP-PB2分節が含まれる場合(図29A、右側)、-PB2(ps)+GFPウイルスは成功裏に救出された(図29C)。この結果も同じく、8つの独自のパッケージングシグナルセットを保有するインフルエンザウイルスの好ましさを反映していた。

【0423】

-PB1(ps)+GFPウイルス(図29B)及び-PB2(ps)+GFPウイルス(図29C)の作製のためにデザインされた戦略を使用し、2つの異なる完全長HAをコードした2つの組換えウイルスを救出した：-PB1(ps)+HK HAウイルス(図2B)及び-PB2(ps)+HK HAウイルス(図2C)は両方共、A/PR/8/34 HA及びA/HK/1/68 HAをコードした。従って2つの異なるHAをコードしているウイルスを操作するための新規研究方法を作製した。これらのウイルスは、野生型ウイルスと比べ有意に弱毒化されており、卵におけるより低い増殖率及びMDCK細胞におけるより小さいブラークを伴った(図29及び30)。-PB1(ps)+HK HAのMLD₅₀は、10³ ~ 10⁴PFUの間であり(図31B)、MLD₅₀が約30PFUである野生型A/PR/8/34ウイルスのそれよりも有意に高かった。1000PFUの-PB1(ps)+HK HAウイルスによるマウスの免疫は、rA/PR/8/34ウイルス又はX31ウイルスによる致死的チャレンジからそれらを完全に保護し、このことはこの9-分節化されたウイルスの戦略は、二価の弱毒化されたインフルエンザ生ワクチンの開発に利用することができることを示唆している。-PB1(ps)+HK HAウイルスはマウスにとって潜在的に致死的であるが、同様の研究方法を、生ワクチンを目的として他の病原性の低いウイルスに適用することができる。現時点の季節性インフルエンザワクチンは、3つの異なるインフルエンザウイルスを含む：1つはA(H3N2)型ウイルス、1つは通常の季節性A(H1N1)型ウイルス、及び1つはB型ウイルスである。本明細書に記載される二価の9-分節化されたインフルエンザウイルスは、2つの主要抗原(例えばH1 HA及びH3 HA)を1つのワクチン株へ組み合わせる手段をもたらす。これは、同時に循環するインフルエンザウイルス系統の数が4以上に増加した場合に、特に有用であり：例えば、2009年に、季節性H1N1ウイルスとは異なる、H1N1亜型の新規ブタ起源のA型インフルエンザウイルスが、北米で出現し、かつインフルエンザの大流行が生じた場合である。更に、その9番目のキメラ分節上に特異的抗原を保有することにより、この9-分節化されたインフルエンザウイルスのプラットフォームは、他の細菌病原体又はウイルス病原体に対するワクチンの製造にも適用することができる。

【0424】

(9. 実施例4)

本実施例は、どのようにウイルスの再集合を測定することができるかを明らかにする。

【0425】

逆遺伝学的研究方法を使用し、例えば図35～37に示された組換えインフルエンザウイルスの各キメラ遺伝子分節を再集合することができるかどうかを評価することができる。必要なインフルエンザウイルスタンパク質を発現している細胞を、それらのパッケージングシグナルが交換されているインフルエンザウイルスキメラ分節、及びインフルエンザウイルスの野生株又は実験室株由来のインフルエンザウイルス遺伝子分節により、同時トランスフェクションすることができ、ここで野生株又は実験室株インフルエンザウイルス遺伝

10

20

30

40

50

子分節は、キメラインフルエンザウイルス遺伝子分節の1つによりコードされたインフルエンザウイルスタンパク質をコードしている遺伝子分節及び複製コンピテントなインフルエンザウイルスの作製に必要な他の遺伝子分節を含む。先に説明された技術を用い(例えば、Gaoらの文献、2008, J. Virol. 82: 6419-6426 ; Quinlivanらの文献、2005, J. Virol. 79: 8431-8439 ; Fodorらの文献、1999, J. Virol. 73: 9679-9682参照)、例えば必要なウイルスタンパク質(例えばPA、PB1、PB2、及びNP)を発現している293T細胞、MDCK細胞又はVero細胞などの細胞を、図35に示された4種のキメラ遺伝子分節(NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、及びPA-NAmut-PA)をコードしているプラスミド、並びに野生型インフルエンザウイルス又はA/PR/8/34などの実験室株の5つの遺伝子分節(pDZ-NP、NA、M、NS、及びHA)をコードしているプラスミドにより、トランスフェクトすることができる。
救出された組換えウイルスは、次に公知の技術を用い、組織培養又は胚発育卵において増殖し、ブラーク精製する。次にブラーク精製されたウイルスに存在する遺伝子分節を、例えば、単独のブラークを増幅し、vRNAをウイルスから単離し、特異的遺伝子分節にハイブリダイズするようデザインされたプライマーを使用しvRNAにRT-PCRを施し、及びRT-PCR産物をアガロースゲル上を泳動することにより決定することができる。或いは、ブラーク形成されたウイルス由来のvRNA分節は、大規模シークエンシングなどの、当該技術分野において公知の技術を使用し、配列決定することができる。それらのパッケージングシグナルが交換されているキメラ遺伝子分節の組み合わせに満たないものを含むインフルエンザウイルスを検出する能力がないことは、それらのキメラ遺伝子分節は、自在に再集合することができないことを示している。例えば、図35に示された組換えウイルスのキメラ遺伝子分節に関して、3つのキメラNA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、及びPB1-PAmut-PB1遺伝子分節並びに野生株又は実験室株インフルエンザウイルスのNA、NP、M、NS及びHA遺伝子分節を含むインフルエンザウイルスを検出する能力がないことは、4つのキメラ遺伝子分節(NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、及びPA-NAmut-PA)は自在に再集合することができないことを示している。
10
20

【0426】

例えば図35～37に示された組換えインフルエンザウイルスのキメラ遺伝子分節は、組織培養、細胞(例えば293T細胞、MDCK細胞又はVero細胞)において自在に再集合することができるかどうかを決定する別の研究方法は、例えば図35、36又は37に示された組換えウイルス、及び野生型又は実験室株インフルエンザウイルスによる、各ウイルスに関してある感染多重度("moi") (例えばmoi10)での同時感染である。その後得られるウイルスを、ブラーク精製することができる。次にブラーク精製されたウイルスに存在する遺伝子分節は、例えば単独のブラークを増幅し、vRNAをウイルスから単離し、特異的遺伝子分節にハイブリダイズするようデザインされたプライマーを使用しvRNAにRT-PCRを施し、及びRT-PCR産物をアガロースゲル上を泳動することにより、決定することができる。或いは、ブラーク形成されたウイルス由来のvRNA分節は、大規模シークエンシングなどの、当該技術分野において公知の技術を使用し、配列決定することができる。それらのパッケージングシグナルが交換されているキメラ分節の組み合わせに満たないものを含むインフルエンザウイルスを検出する能力がないことは、自在に再集合することができない。例えば、図35に示された組換えウイルスのキメラ遺伝子分節に関して、3つのキメラNA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、及びPB1-PAmut-PB1遺伝子分節並びに野生株又は実験室株インフルエンザウイルスのNA、NP、M、NS及びHA遺伝子分節を含むインフルエンザウイルスを検出する能力がないことは、4つのキメラ遺伝子分節(NA-PB2mut-NA、PB2-PB1mut-PB2、PB1-PAmut-PB1、及びPA-NAmut-PA)は自在に再集合することができないことを示している。
30
40

【0427】

(10. 実施例5)

本実施例は、9分節組換えインフルエンザウイルスの作製を説明している。

【0428】

PA-NAmut-PAと命名されるキメラ構築体を、以下のように作製した：NAmutと称される、2つの末端にサイレント変異を保有するA/PR/8/34 NA ORFを、A/PR/8/34 PAパッケージン

グ配列にライゲーションし、PA-NAmut-PA構築体を作製した。NA-GFP-NAと命名されるキメラ構築体を、以下のように作製した：GFP ORFを、A/PR/8/34 NAパッケージング配列にライゲーションし、NA-GFP-NA構築体を作製した。NA-HA(HK)-NAと命名されるキメラ構築体を、以下のように作製した：A/香港/1/68(A/HK/1/68)HA遺伝子由来のHA ORFを、A/PR/8/34 NAパッケージング配列にライゲーションし、NA-HA(HK)-NA構築体を作製した(図38参照)。

【 0 4 2 9 】

組換えインフルエンザウイルス(図38参照)を、実施例1及びGao及びPaleseの文献(2009, PNAS 106: 15891)からの改変した方法を用い、作製した。293T細胞を、2つのキメラプラスミド[PA-NAmut-PA及びNA-GFP-NA又はNA-HA(HK)-NA]、及び野生型A/PR/8/34のPB2、PB1、PA、HA、NP、M、NS分節を保有する7つのプラスミドによりトランスフェクトした。トランスフェクション後24時間で、細胞を収集し、10日齢の特定病原体除去ニワトリ胚(Charles River Laboratories社、SPAFAS、Preston、CT)に接種した。3日後、尿膜液を採取し、HAアッセイを使用し、救出されたウイルスの存在を決定した。ウイルス力価は、MDCK細胞におけるブラークアッセイにより決定した。この9-分節キメラウイルスは、良好に増殖し、胚発育鶏卵における力価 $>10^8$ pfu/mlを有した。

【 0 4 3 0 】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施態様による範囲内に制限されるものではない。実際、記載されたものに加え本発明の様々な変更が、前述の説明及び添付された図面から、当業者には明らかになるであろう。そのような変更は、添付された請求項の範囲内に収まることが意図されている。

【 0 4 3 1 】

本明細書で引用されている全ての参考文献は、各個々の刊行物又は特許又は特許出願が、全ての目的のためにその全体が引用により組み込まれていることが具体的に及び個々に示されているかのように、全ての目的のためにそれらの全体が引用により本明細書に組み込まれる。

10

20

【図1A-1B】

Fig. 1A-1B

【図2A-2B】

Fig. 2A-2B

【図 3 A - 3 B】

Fig. 3A-3B

【図4A-4B】

Fig. 4A-4B

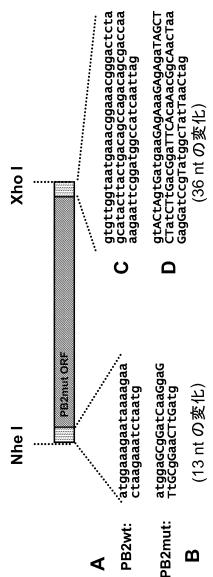
【図 5 A - 5 B】

Fig. 7A-7B

【図 6 A - 6 B】

Fig. 8A-8B

【図 9 A - D】



9A-9D

【図10A-D】

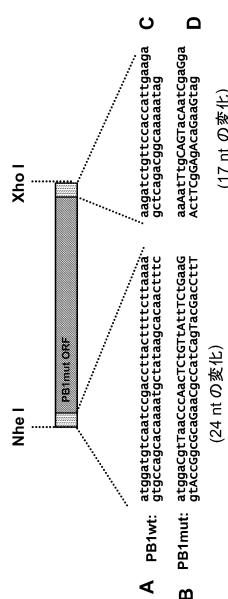
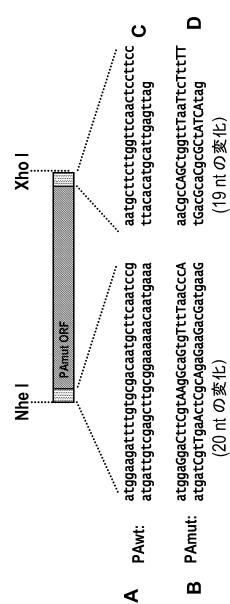


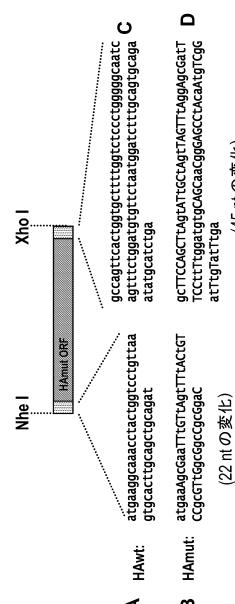
图 10A-10D

【図 1 1 A - D】



11A-11D

【図 1 2 A - D】



12A 12D

【図 1 3 A - D】

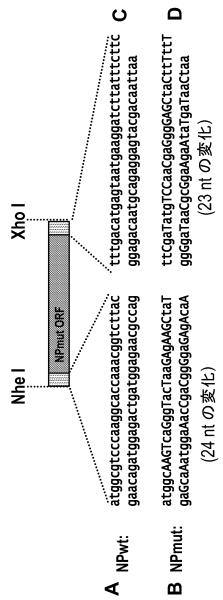
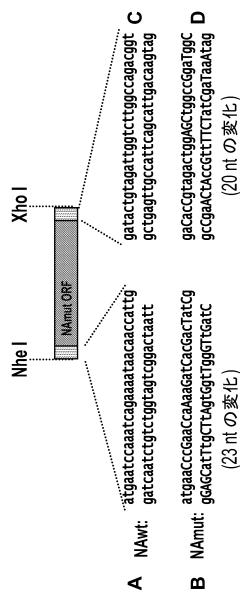


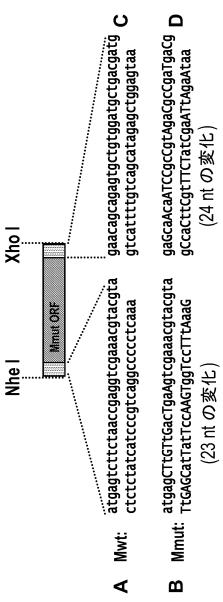
図13A-13D

【図 1-4 A - D】



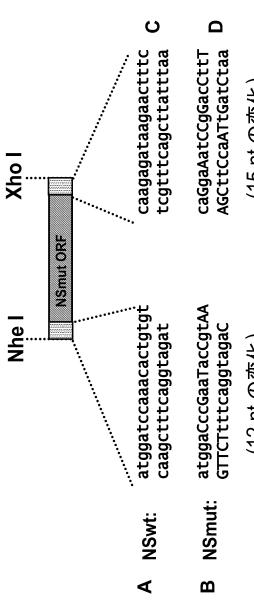
14A-14D

【図 15 A - D】



15A-15D

【図 1 6 A - D】



16A-16D

【図17】

FIG. 17

【図18】

FIG. 18

【习题 2-1】

FIG. 21

【図19】

FIG. 19

【図20】

FIG. 20

【习题 2.2】

FIG. 22

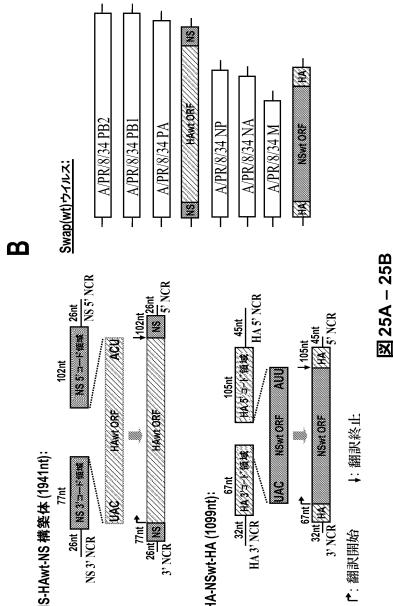
【図23】

FIG. 23

【図24】

FIG. 24

【図25A-B】



【図25C-D】

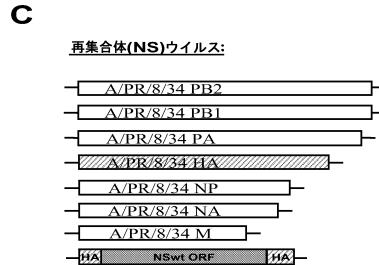


图 25C

D

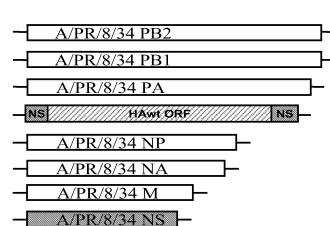


图 25D

【図25E-F】

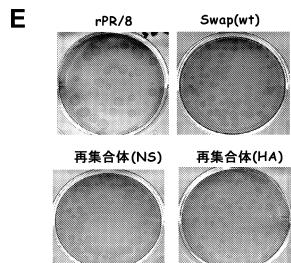


図25E

【図26A-B】

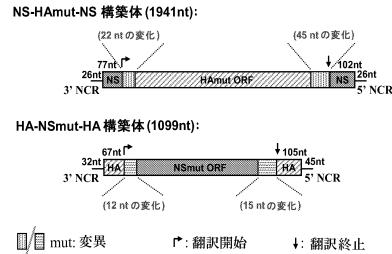


図26A

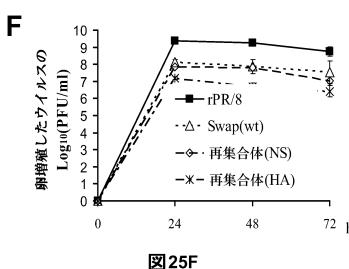


図25F

Swap(mut)ウイルス:

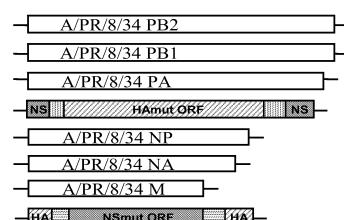


図26B

【図26C-D】

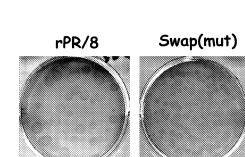


図26C

【図26E】

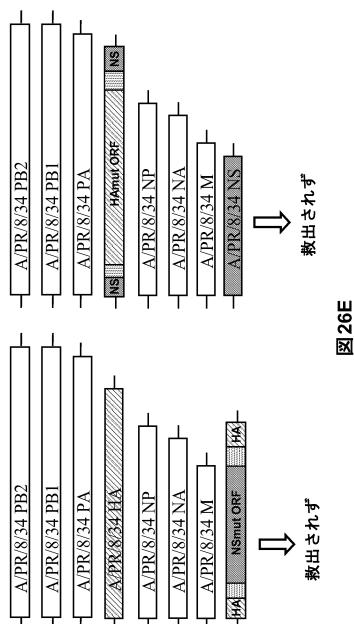


図26E

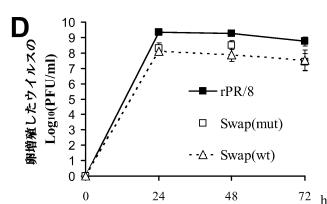


図26D

【図27】

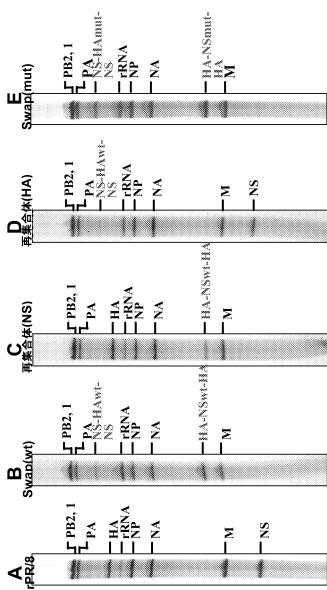


図27

【図28A】

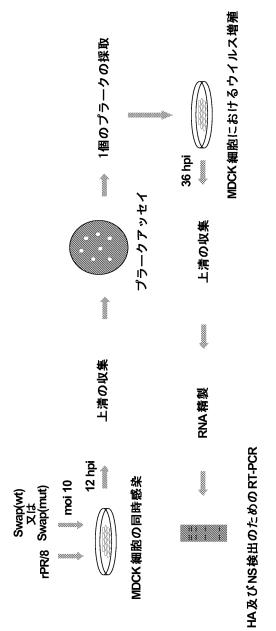


図28A

【図28B】

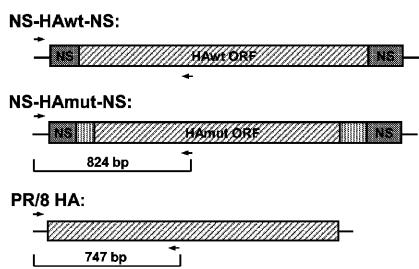


Fig. 28B

【図28D-E】

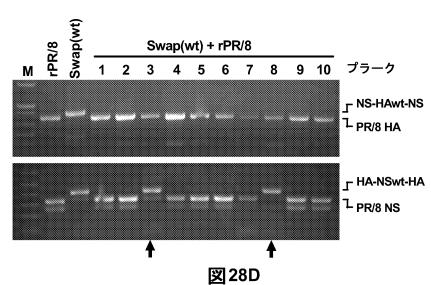


図28D

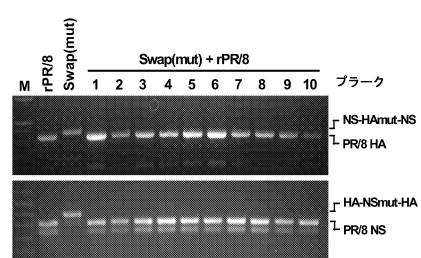


図28E

【図28C】

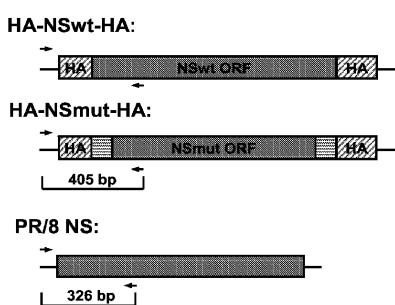
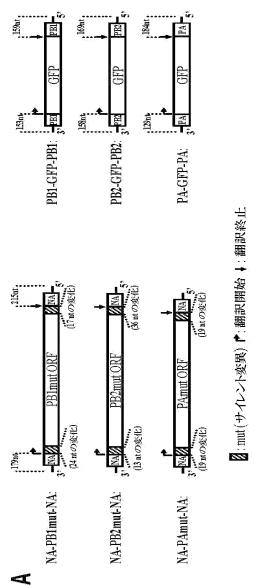


Fig. 28C

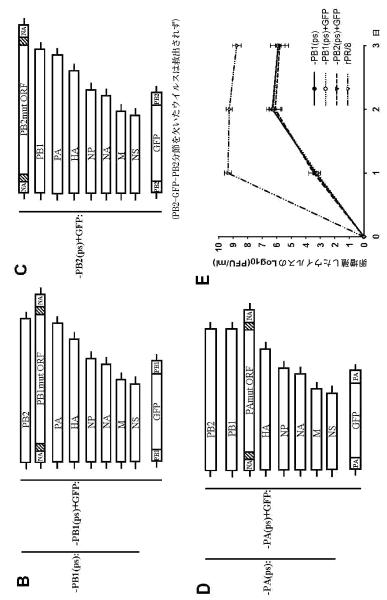
【図 29A】



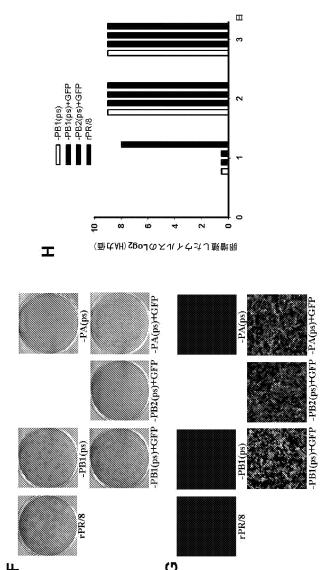
■: mut (サブレント変異) ♪: 翻訳開始 ↓: 翻訳終止

図 29A

【図 29B - E】



【図 29F - H】



【図 30A - D】

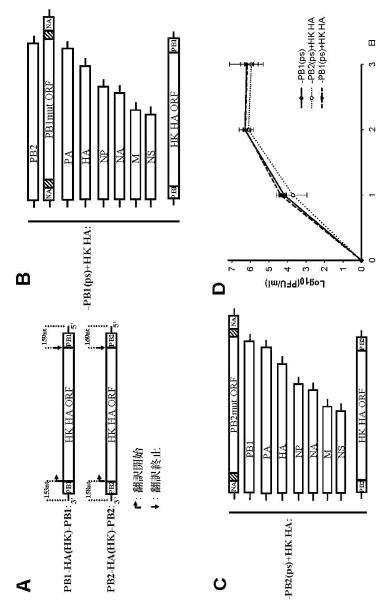


図 30A - 30D

【図30E-F】

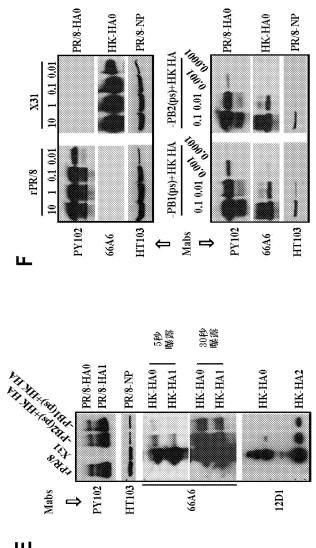
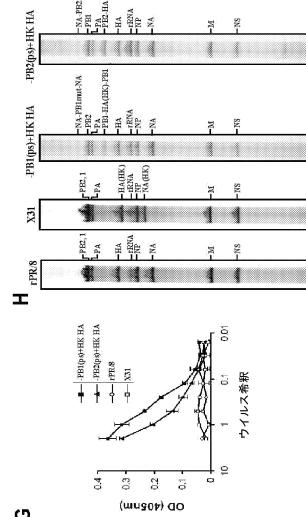


図 30E - 30F

【図30G-H】



30G - 30H

【図3-1A-B】

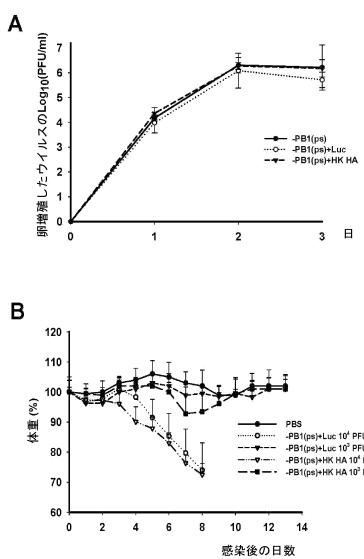


图 31A – 31B

【図3-1C-D】

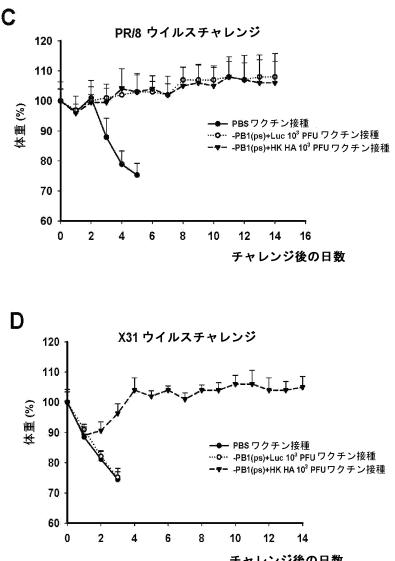


图 31C – 31D

【図32A】

NA-PB1mut-NA:

Fig. 32A

【図32B】

NA-PB2MUT-NA:

Fig. 32B

【図32C】

NA-PAmut-NA:

Fig. 32C.

【図32D】

Fig. 32D

【図32E】

Fig. 32E

【図32F】

PA-GFP-PA:

Fig. 32F

【図32G】

PB1-HA(HK)-PB1:

Fig. 32G

【図32H】

PB2-HA(HK)-PB2:

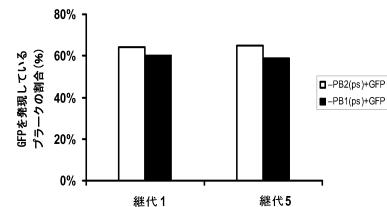
Fig. 32H

【図32Ⅰ】

PB1-Luc-PB1

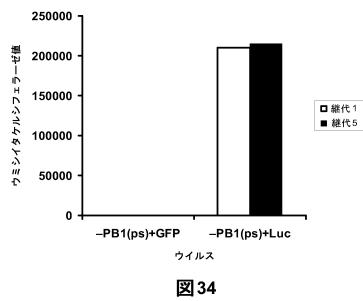
Fig. 32 I

(3 3)



☒ 33

【図34】



【図35】

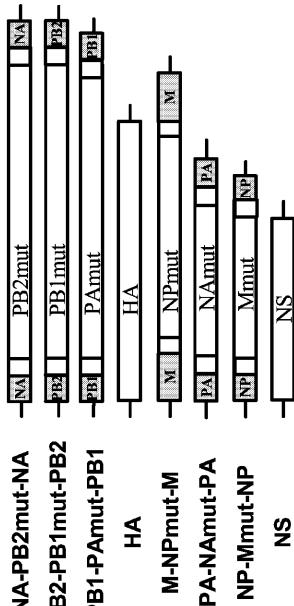


Fig. 35

【図36】

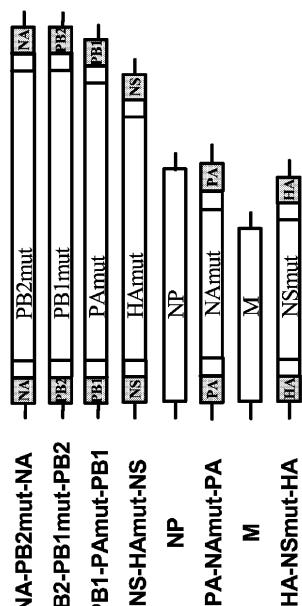


Fig. 36

【図37】



Fig. 37

【図 3 8】

より良好に増殖する9-分節ウイルス(卵中 10^8 pfu/ml未満):

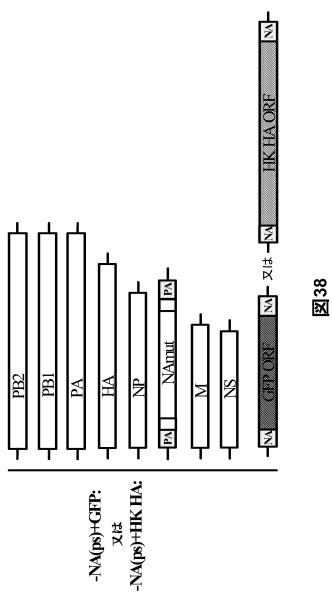


図38

【配列表】

0005845180000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ペテル パレセ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07605 レオニア ヒグフウォオド アベニュー 4
14

(72)発明者 クインスハン ガオ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10029 ニューヨーク アブト. 2シー エアスト 10
0トフ ストリート 152

審査官 北田 祐介

(56)参考文献 特表2005-535288 (JP, A)

PNAS, SEP-2009, Vol.106, p.15891-15896

GAO Q et al., A Nine-Segment Influenza A Virus Carrying Subtype H1 and H3 Hemagglutinins, J. Virol.[online], Vol.84, p.8062-8071, 02-JUN-2010, <URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916553/pdf/0722-10.pdf>>
J. Virol., 2003, Vol.77, p.9116-9123

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/00

C12N 15/09

A61K 39/145

A61P 31/16

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

CAPLus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIIDS (STN)