

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-511221

(P2019-511221A)

(43) 公表日 平成31年4月25日(2019.4.25)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/62 (2006.01)	C 12 N	15/62	Z NA Z
A 61 K 39/12 (2006.01)	A 61 K	39/12	4 C O 85
A 61 P 37/04 (2006.01)	A 61 P	37/04	4 H O 45
A 61 P 31/14 (2006.01)	A 61 P	31/14	
A 61 K 39/39 (2006.01)	A 61 K	39/39	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く

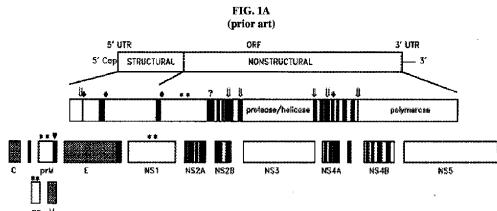
(21) 出願番号	特願2018-547931 (P2018-547931)	(71) 出願人	508285606 ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ, アズ リプレゼンテッド バイザ セクレタリー, デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービシーズ
(86) (22) 出願日	平成29年3月11日 (2017.3.11)		アメリカ合衆国, メリーランド 20892-7660, ベセスダ, エグゼキュティブ ブールバード 6011, スイート 325, エムエスシー 7660
(85) 翻訳文提出日	平成30年11月5日 (2018.11.5)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/021989		
(87) 國際公開番号	W02017/156511		
(87) 國際公開日	平成29年9月14日 (2017.9.14)		
(31) 優先権主張番号	62/307,170		
(32) 優先日	平成28年3月11日 (2016.3.11)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】弱毒化された生ジカウイルスワクチン

(57) 【要約】

本開示は、弱毒化ジカウイルスおよびワクチン、弱毒化キメラジカウイルスおよびワクチン、ならびにジカワクチンおよび他のフラビウイルスに対するワクチンを含む多価の免疫原性組成物に関する。キメラジカウイルスは、ジカウイルス(ZIKV)からの少なくとも1つの構造タンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列、第1のフラビウイルスからの少なくとも1つの非構造タンパク質をコードする第2のヌクレオチド配列、および第2のフラビウイルスからの(3')非翻訳領域の第3のヌクレオチド配列を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジカウイルス(ZIKV)からの少なくとも 1 つの構造タンパク質をコードする第 1 のヌクレオチド配列、

第 1 のフラビウイルスからの少なくとも 1 つの非構造タンパク質をコードする第 2 のヌクレオチド配列、および

第 2 のフラビウイルスからの 3' 非翻訳領域の第 3 のヌクレオチド配列を含む、ジカ核酸キメラ。

【請求項 2】

前記第 1 のフラビウイルスがデングウイルスである、請求項 1 に記載のジカ核酸キメラ。
10

【請求項 3】

前記第 1 のフラビウイルスが ZIKV である、請求項 1 に記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 4】

前記第 2 のフラビウイルスがデングウイルスである、請求項 1 に記載のジカ核酸キメラ。
。

【請求項 5】

前記第 2 のフラビウイルスが ZIKV である、請求項 1 に記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 6】

前記デングウイルスがデング血清型 1 である、請求項 2 に記載のジカ核酸キメラ。
20

【請求項 7】

前記デングウイルスがデング血清型 2 である、請求項 2 に記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 8】

前記デングウイルスがデング血清型 3 である、請求項 2 に記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 9】

前記デングウイルスがデング血清型 4 である、請求項 2 に記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 10】

前記デングウイルスがデング血清型 1 である、請求項 4 に記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 11】

前記デングウイルスがデング血清型 2 である、請求項 4 に記載のジカ核酸キメラ。
30

【請求項 12】

前記デングウイルスがデング血清型 3 である、請求項 4 に記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 13】

前記デングウイルスがデング血清型 4 である、請求項 4 に記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 14】

前記 3' 非翻訳領域が前記ヌクレオチド配列に欠失を含有する、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 15】

前記欠失が、 30 欠失、 31 欠失、 30 / 31 欠失および 86 欠失からなる群より選択される、請求項 14 に記載のジカ核酸キメラ。
40

【請求項 16】

N S 3 遺伝子のヌクレオチド 4891 および / または N S 3 遺伝子のヌクレオチド 4995 に変異をさらに含む、請求項 14 または 15 に記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 17】

前記少なくとも 1 つの構造タンパク質が前膜(p r M)、エンベロープ(E)またはその両方である、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載のジカ核酸キメラ。

【請求項 18】

デング血清型 1 に対して免疫原性である第 1 の弱毒化ウイルス、
デング血清型 2 に対して免疫原性である第 2 の弱毒化ウイルス、

デング血清型 3 に対して免疫原性である第 3 の弱毒化ウイルス、
50

デング血清型 4 に対して免疫原性である第 4 の弱毒化ウイルス、および ZIKV に対して免疫原性である第 5 の弱毒化ウイルスを含む、五価の免疫原性組成物。

【請求項 19】

前記第 5 の弱毒化ウイルスが請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載のジカ核酸キメラである、請求項 18 に記載の五価の免疫原性組成物。

【請求項 20】

前記弱毒化ウイルスの各々が同じ弱毒化欠失または変異を含む、請求項 18 または 19 に記載の五価の免疫原性組成物。

【請求項 21】

前記欠失が前記 3' 非翻訳領域のヌクレオチド配列における欠失である、請求項 20 に記載の五価の免疫原性組成物。

【請求項 22】

前記欠失が、30 欠失、31 欠失、30 / 31 欠失および 86 欠失からなる群より選択される、請求項 21 に記載の五価の免疫原性組成物。

【請求項 23】

NS3 遺伝子のヌクレオチド 4891 および / または NS3 遺伝子のヌクレオチド 4995 に変異をさらに含む、請求項 21 または 22 に記載の五価の免疫原性組成物。

【請求項 24】

アジュバントをさらに含む、請求項 18 ~ 23 のいずれかに記載の五価の免疫原性組成物。

【請求項 25】

フラビウイルスに対して免疫原性である少なくとも 1 つの第 1 の弱毒化ウイルス、および

ZIKV に対して免疫原性である第 2 の弱毒化ウイルスを含む、多価の免疫原性組成物。

【請求項 26】

前記フラビウイルスが、デングウイルス血清型 1、デングウイルス血清型 2、デングウイルス血清型 3、デングウイルス血清型 4、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルスおよびダニ媒介性脳炎ウイルスの少なくとも 1 つ、またはそれらの組み合わせである、請求項 25 に記載の多価の免疫原性組成物。

【請求項 27】

前記第 2 の弱毒化ウイルスが請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載のジカ核酸キメラである、請求項 25 または 26 に記載の多価の免疫原性組成物。

【請求項 28】

前記第 2 の弱毒化ウイルスが、ゲノムに 1 つまたは複数の弱毒化変異および / または欠失を含む ZIKV である、請求項 25 または 26 に記載の多価の免疫原性組成物。

【請求項 29】

被験体において免疫応答を誘導する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 28 のいずれかに記載の組成物を前記被験体に投与することを含む、方法。

【請求項 30】

被験体において ZIKV 感染を予防または処置する方法であって、前記被験体に、有効量の請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載のジカ核酸キメラ、または有効量の請求項 18 ~ 28 に記載の免疫原性組成物を投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2016年3月11日に出願された「LIVE ATTENUATED ZIKA VIRUS VACCINE」との表題の米国仮出願第 62/307,177

10

20

30

40

50

0号（これは、全ての目的のためにその全体が参考として援用される）の利益を主張する。

【0002】

政府資金提供

本出願を支援する研究は、Secretary, Department of Health and Human Servicesによって代表されるアメリカ合衆国によって実行された。米国政府は、本発明にある特定の権利を有する。

【0003】

参照による組込み

米国特許法施行規則§1.52(e)(5)に従って、Patent-In 3.5およびChecker 4.4.0を使用して2017年3月9日に作成された電子ファイル名1420378_442WO2_Sequence_Listing_ST25.txt；サイズ146KBに含まれる配列情報は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

10

【0004】

背景

1. 開示の分野

【0005】

本開示は、免疫原性の弱毒化された生ZIKVワクチンの生成のため、ならびに1つまたは複数のラビウイルス（例えば、デングウイルスおよびZIKV）に対して免疫原性である多価（例えば、五価）ワクチン組成物への組入れのための、弱毒化免疫原性ジカウイルスおよびデングウイルス骨格の上に構築されたジカウイルス（または、「ZIKV」）キメラに関する。

20

【背景技術】

【0006】

2. 背景

【0007】

ZIKVはFlaviviridae科に、特にFlavivirus属に属し、本属は、西ナイルウイルス、デングウイルスおよび黄熱病ウイルスを含む多数の重要なヒト病原性関連ウイルスを含む。ラビウイルスは、1ビリオンにつきおよそ50nmの直径を有する正二十面体および/または球状幾何構造を有するエンベロープを持つウイルスとして、一般的に特徴付けられる。ラビウイルスゲノムは、3つの主要なウイルス構造タンパク質（カプシド（C）、前膜（pre membrane）/膜（prM）およびエンベロープ（E）タンパク質）および少なくとも7つの非構造（NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5）タンパク質をコードする、長さが約10~11キロベースで単一の長いオープンリーディングフレームを含有する線状の正のセンスRNAゲノム（図1Aを参照する）を含む。構造および非構造タンパク質は、単一のポリタンパク質として翻訳される。ポリタンパク質は細胞およびウイルスのプロテアーゼによって次にプロセシングされて、個々のウイルスポリペプチドを形成する。さらに、ラビウイルスゲノムは、長さが約100ヌクレオチド(nt)の保存された5'非コード領域（NCRまたは非翻訳領域（5'UTR））および、ウイルス複製に一部関与する様々な保存されたシステムアンドループ構造を含有する、長さが約400~800ヌクレオチドの3'UTRも含有する。

30

【0008】

ZIKVによる感染は、ヒトにおいて軽度の症状を引き起こすことが歴史的に知られているだけであった。さらに、ZIKV感染は、アフリカとアジアの間の赤道の近くに位置する限定的地理的領域で一般的に観察された。しかし、このウイルスは、妊娠女性における乳児小頭症および流産と関連があると今では考えられ、その地理的範囲を拡大している。ジカは、メキシコ、中南米およびカリブに今では拡散している。Centers for Disease Control (CDC)は、南米においてジカ感染が汎発流行レ

40

50

ベルに到達したと現在報告している。

【0009】

他のフラビウイルスと同様に、ZIKVは、主に媒介動物としての力によってヒトからヒトに伝染する。特に、ZIKVはAedes aegyptiとして知られる雌の種によって伝染するが、A. africanus、A. furciferおよびA. hensilliを含むAedes属の多数の他の力の種で検出されている。ジカ感染は性感染することもあると、今では考えられてもいる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

デング、黄熱、ダニ媒介性脳炎および日本脳炎などの他のフラビウイルスのためには有効なワクチンが存在するが、ZIKVに対する有効なワクチンはまだ利用可能でない。世界的大流行の現在の状態を考慮すると、有効な抗ジカワクチンを開発する差し迫った必要性が当技術分野にある。

10

【課題を解決するための手段】

【0011】

本開示は、免疫原性の弱毒化された生ZIKVワクチンの生成のため、ならびに1つまたは複数のフラビウイルス（例えば、デングウイルスおよびZIKV）に対して免疫原性である多価（例えば、五価）ワクチンへの組入れのための、弱毒化免疫原性ジカウイルスおよびデングウイルス骨格の上に構築されたZIKVキメラに関する。

20

【0012】

一態様によれば、本開示は、1つまたは複数の弱毒化変異（例えば、点変異、挿入、欠失、反転またはそれらの任意の組み合わせ）を含有するように改変されたZIKVゲノムを提供する。

【0013】

さらなる態様によれば、本開示は、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むキメラZIKVゲノムを提供する。

30

【0014】

別の態様によれば、本開示は、1つまたは複数の弱毒化変異を含有するように改変されたZIKVゲノムを含むZIKVビリオン（すなわち、ウイルス粒子）を提供する。

【0015】

さらなる態様によれば、本開示は、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むキメラZIKVゲノムを含むZIKVビリオン（すなわち、ウイルス粒子）を提供する。

40

【0016】

ある態様によれば、本開示は、弱毒化ZIKVを含む免疫原性組成物またはワクチンを提供する。弱毒化は、1つまたは複数の弱毒化変異および/または欠失を含むZIKVのゲノムの結果であり得る。

【0017】

特定の態様によれば、本開示は、弱毒化キメラZIKVを含む免疫原性組成物またはワクチンを提供する。キメラZIKVは、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むゲノムを含む。

50

【 0 0 1 8 】

別の態様によれば、本開示は、免疫原性組成物またはワクチンを含む薬学的キットを提供する。ワクチンは、弱毒化ZIKVを含むことができる。弱毒化は、被験体をワクチン接種するために組成物を使用するための一組の指示と一緒にになった、1つまたは複数の弱毒化変異および／または欠失を含むZIKVのゲノムからもたらすことができる。

【 0 0 1 9 】

さらなる態様によれば、本開示は、免疫原性組成物またはワクチンを含む薬学的キットを提供する。ワクチンは、被験体をワクチン接種するために組成物を使用するための一組の指示と一緒にになった、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むゲノムを有する弱毒化キメラZIKVを含む。

10

【 0 0 2 0 】

一態様によれば、本開示は、ZIKVに対する免疫を提供するために被験体をワクチン接種するための方法を提供する。本方法は、ZIKVワクチンの薬学的に許容される用量を投与することを含む。ワクチンは、弱毒化ZIKVを含む。弱毒化は、1つまたは複数の弱毒化変異および／または欠失を含むZIKVのゲノムの結果であり得る。

【 0 0 2 1 】

一態様によれば、本開示は、ZIKVに対する免疫を提供するために被験体をワクチン接種するための方法を提供する。本方法は、ZIKVワクチンの薬学的に許容される用量を投与することを含む。ワクチンは、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むゲノムを有する弱毒化キメラZIKVを含み得る。

20

【 0 0 2 2 】

さらなる態様によれば、本開示は、弱毒化ZIKVを含むワクチンを製造するための方法を提供し、前記弱毒化は、1つまたは複数の弱毒化変異および／または欠失を含むZIKVのゲノムの結果である。製造のための方法は、野生型ZIKVのゲノムに少なくとも1つの弱毒化変異および／または欠失を導入すること、ならびに弱毒化ZIKVを1つまたは複数の薬学的賦形剤と合わせて前記ワクチンを提供することを含む。

30

【 0 0 2 3 】

別の態様によれば、本開示は、弱毒化キメラZIKVを含むワクチンを製造するための方法を提供する。製造することは、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を合わせて、弱毒化キメラZIKVを提供すること、ならびに弱毒化キメラZIKVを1つまたは複数の薬学的賦形剤と合わせて前記ワクチンを提供することを含む。

40

【 0 0 2 4 】

さらなる態様によれば、本開示は、五価の免疫原性組成物を提供する。組成物は、デング血清型1に対して免疫原性である第1の弱毒化ウイルス、デング血清型2に対して免疫原性である第2の弱毒化ウイルス、デング血清型3に対して免疫原性である第3の弱毒化ウイルス、デング血清型4に対して免疫原性である第4の弱毒化ウイルス、およびZIKVに対して免疫原性である第5の弱毒化ウイルスを含む。特定の実施形態では、第5の弱毒化ウイルスは、本開示によるZika核酸キメラである。別の特定の実施形態では、第5の弱毒化ウイルスは、ゲノムに1つまたは複数の弱毒化変異を含むZIKVである。

【 0 0 2 5 】

本発明の一態様によれば、本開示は、多価の免疫原性組成物を提供する。本組成物は、

50

フラビウイルスに対して免疫原性である 1 つまたは複数の第 1 の弱毒化ウイルスおよび Z I K V に対して免疫原性である第 2 の弱毒化ウイルスを含む。特定の実施形態では、1 つまたは複数の第 1 の弱毒化ウイルスは、デングウイルス（例えば、血清型 1、2、3、4 またはそれらの組み合わせ）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスに対して免疫原性である。別の実施形態では、第 2 の弱毒化ウイルスは、本開示によるジカ核酸キメラである。別の特定の実施形態では、第 2 の弱毒化ウイルスは、ゲノムに 1 つまたは複数の弱毒化変異および / または欠失を含む Z I K V である。

【 0 0 2 6 】

さらなる態様によれば、本開示は、Z I K V に対して免疫応答を誘導するための方法を提供する。本方法は、弱毒化 Z I K V を含む Z I K V ワクチンの薬学的に許容される用量を投与することを含み、前記弱毒化は、1 つまたは複数の弱毒化変異および / または欠失を含む Z I K V のゲノムの結果である。10

【 0 0 2 7 】

さらなる態様によれば、本開示は、Z I K V に対して免疫応答を誘導するための方法を提供する。この方法は、Z I K V ゲノムの一部、および少なくとも 1 つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、D E N 1、D E N 2、D E N 3 または D E N 4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むゲノムを有する弱毒化キメラ Z I K V を含む Z I K V ワクチンの薬学的に許容される用量を投与することを含む。20

【 0 0 2 8 】

一態様によれば、本開示は、Z I K V に対して免疫応答を誘導するための方法を提供する。本方法は、本明細書に記載される五価の免疫原性組成物の薬学的に許容される用量を投与することを含む。

【 0 0 2 9 】

さらなる態様によれば、本開示は、Z I K V に対して免疫応答を誘導するための方法を提供する。本方法は、本明細書に記載される多価の免疫原性組成物の薬学的に許容される用量を投与することを含む。

【 0 0 3 0 】

様々な実施形態では、弱毒化変異は、3 つの主要なウイルス構造タンパク質（カプシド（C）、前膜 / 膜（p r M）およびエンベロープ（E）タンパク質）をコードする遺伝子の 1 つもしくは複数、または少なくとも 7 つの非構造（N S 1、N S 2 A、N S 2 B、N S 3、N S 4 A、N S 4 B、N S 5）タンパク質をコードする遺伝子に導入することができる。30

【 0 0 3 1 】

他の実施形態では、弱毒化変異および / または欠失は、5' U T R に導入することができる。

【 0 0 3 2 】

さらに他の実施形態では、弱毒化変異および / または欠失は、3' U T R に導入することができる。40

【 0 0 3 3 】

さらなる実施形態では、弱毒化変異および / または欠失は、非構造遺伝子、構造遺伝子、5' U T R、または 3' U T R またはそれらの組み合わせのいずれかに導入することができる。

【 0 0 3 4 】

様々な実施形態では、弱毒化され、免疫原性であるキメラフラビウイルスが提供される。弱毒化ジカウイルスも提供される。ある特定の実施形態では、キメラジカウイルスは、骨格としてデングウイルスの 1 つまたは複数の非構造タンパク質遺伝子（例えば、N S 1、N S 2 A、N S 2 B、N S 3、N S 4 A、N S 4 B、N S 5）を含有し、それは、Z I

K V の構造タンパク質遺伝子（例えば、カプシド（C）、前膜／膜（p r M）およびエンベロープ（E）タンパク質遺伝子）の1つまたは複数と組み合わされる。これらのキメラウイルスは、付随するウイルス性疾患の臨床症状なしで、顕著な免疫原性を示す。弱毒化キメラウイルスは免疫原またはワクチンとして有効であり、Z I K V に対する免疫を付与するための薬学的組成物の中で組み合わせることができる。

【0035】

一態様によれば、本開示は、Z I K V からの少なくとも1つの構造タンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列、第1のフラビウイルスからの少なくとも1つの非構造タンパク質（例えば、N S 1、N S 2 A、N S 2 B、N S 3、N S 4 A、N S 4 B、N S 5）をコードする第2のヌクレオチド配列、および第2のフラビウイルスからの3' 非翻訳領域の第3のヌクレオチド配列を含むジカ核酸キメラを提供する。一実施形態では、第1のフラビウイルスは、デングウイルスである。別の実施形態では、第1のフラビウイルスは、Z I K V である。さらに別の実施形態では、第2のフラビウイルスは、デングウイルスである。さらなる実施形態では、第2のフラビウイルスは、Z I K V である。特定の実施形態では、デングウイルスは、デング血清型1、血清型2、血清型3または血清型4である。ある特定の実施形態では、構造タンパク質は、前膜（p r M）、エンベロープ（E）またはその両方である。

10

【0036】

ある特定の実施形態では、弱毒化ウイルスの各々は、同じ弱毒化欠失および／または変異を含む。他の実施形態では、3' 非翻訳領域は、ヌクレオチド配列に1つまたは複数の欠失を含有する。例えば、欠失は、30欠失、31欠失、30 / 31欠失および86欠失からなる群より選択することができる。ある特定の実施形態では、欠失には、例えばD E N 4ゲノムのN S 3遺伝子の4891位であるかもしくはそれに対応するヌクレオチドでのさらなる弱毒化変異、および／またはD E N 4ゲノムのN S 3遺伝子の4995位であるかもしくはそれに対応するヌクレオチドでの変異が付随する。

20

【0037】

適用可能であるかまたは具体的に権利を放棄しない場合、実施形態が本発明の異なる態様の下で記載される場合であっても、本明細書に記載される実施形態のいずれか1つは任意の他の1つまたは複数の実施形態と組み合わせることができることが企図される。

30

【0038】

これらおよび他の実施形態は、下の発明を実施するための形態から開示されるか、またはそれにより包含される企図されたバリエーションである。

【0039】

本発明の上および他の特徴は、単なる実例として本明細書に下で与えられ、したがって本発明を限定するものでない添付の図に図示されるそのある特定の例示的な実施形態を参照して、次に詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1A】図1Aは、フラビウイルスポリタンパク質の翻訳およびプロセシングを示す。最上部には、示した構造および非構造タンパク質コード領域、5' キャップならびに5' および3' 非翻訳領域（U T R）を有するウイルスゲノムを表す。ゲノムの下のボックスは、タンパク分解性プロセシングカスケードによって生成される前駆体および成熟タンパク質を示す。成熟構造タンパク質は陰影をつけたボックスによって示し、非構造タンパク質および構造タンパク質前駆体は白抜きのボックスによって示す。非荷電アミノ酸の連続ストレッチは、黒色のバーによって示す。アスタリスクはN連結グリカンを有するタンパク質を表すが、利用される部位の位置または数を示すとは限らない。宿主シグナルアーゼ（signalase）（菱形）、ウイルスのセリンプロテアーゼ（ハート）、フューリンもしくは他のゴルジに位置するプロテアーゼ（ハート）、または未知のプロテアーゼ（？）のための切断部位を示す。Field's Virology、2001年、第4版、B. D. LindenbachおよびC.

40

M. Rice、998頁、第32章からとった。

50

【0041】

【図1B】図1Bは、D E N 2のp r MおよびEタンパク質の遺伝子をZ I K Vの対応する遺伝子で置き換えて、候補弱毒化ワクチン株の役割をするジカ/D E N 2キメラを生成するために使用される戦略を示す。

【0042】

【図1C】図1Cは、D E N 4のp r MおよびEタンパク質の遺伝子をZ I K Vの対応する遺伝子で置き換えて、候補弱毒化ワクチン株の役割をするジカ/D E N 4キメラを生成するために使用される戦略を示す。

【0043】

【図2A】図2Aは、D E N 1血清型ウイルスの3' - UTRのT L - 1、T L - 2およびT L - 3領域の予測された二次構造を示す。二次構造モデルの構築のために使用される配列のG e n B a n k受託番号を示す。公知であり実験的に検証された構造エレメントの構造の環状化および以降の誤った折り畳みを回避するために、T L - 1、T L - 2およびT L - 3を含む最後の278ヌクレオチドだけを使用する。各構造モデルに特異的なm f o l dプログラム制約を示す。重要な欠失(principle deletion)に接しているヌクレオチドを丸で囲み、番号を付し、ヌクレオチドの番号付けは3'ゲノム末端から始まる(逆方向番号付けシステム)(配列番号10)。

10

【0044】

【図2B】図2Bは、D E N 1のために表す、30欠失変異を示す。逆方向番号付けシステムで、30変異はD E N 1のn t 1 7 4 ~ 1 4 5を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号11)。

20

【0045】

【図2C】図2Cは、D E N 1のために表す、30/31欠失変異を示す。30変異を含むヌクレオチドの欠失に加えて、31変異は、逆方向番号付けシステムでD E N 1のn t 2 5 8 ~ 2 2 8を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号12)。

30

【0046】

【図2D】図2Dは、D E N 1のために表す、86の欠失変異を示す。逆方向番号付けシステムで、86変異はD E N 1のn t 2 2 8 ~ 1 4 5を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号13)。

30

【0047】

【図3A】図3Aは、D E N 2血清型ウイルスの3' - UTRのT L - 1、T L - 2およびT L - 3領域の予測された二次構造を示す。二次構造モデルの構築のために使用される配列のG e n B a n k受託番号を示す。公知であり実験的に検証された構造エレメントの構造の環状化および以降の誤った折り畳みを回避するために、T L - 1、T L - 2およびT L - 3を含む最後の281ヌクレオチドだけを使用する。各構造モデルに特異的なm f o l dプログラム制約を示す。重要な欠失(principle deletion)に接しているヌクレオチドを丸で囲み、番号を付し、ヌクレオチドの番号付けは3'ゲノム末端から始まる(逆方向番号付けシステム)(配列番号14)。

40

【0048】

【図3B】図3Bは、D E N 2のために表す、30欠失変異を示す。逆方向番号付けシステムで、30変異はD E N 2のn t 1 7 3 ~ 1 4 4を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号15)。

【0049】

【図3C】図3Cは、D E N 2のために表す、30/31欠失変異を示す。30変異を含むヌクレオチドの欠失に加えて、31変異は、逆方向番号付けシステムでD E N 2のn t 2 5 8 ~ 2 2 8を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号16)。

【0050】

【図3D】図3Dは、D E N 2のために表す、86の欠失変異を示す。逆方向番号付け

50

システムで、86変異はDEN2のnt228～144を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号17)。

【0051】

【図4A】図4Aは、DEN3血清型ウイルスの3' - UTRのTL-1、TL-2およびTL-3領域の予測された二次構造を示す。二次構造モデルの構築のために使用される配列のGenBank受託番号を示す。公知であり実験的に検証された構造エレメントの構造の環状化および以降の誤った折り畳みを回避するために、TL-1、TL-2およびTL-3を含む最後の276ヌクレオチドだけを使用する。各構造モデルに特異的なmfoldプログラム制約を示す。重要な欠失(principle deletion)に接しているヌクレオチドを丸で囲み、番号を付し、ヌクレオチドの番号付けは3'ゲノム末端から始まる(逆方向番号付けシステム)(配列番号18)。

10

【0052】

【図4B】図4Bは、DEN3のために表す、30欠失変異を示す。逆方向番号付けシステムで、30変異はDEN3のnt173～143を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号19)。

【0053】

【図4C】図4Cは、DEN3のために表す、30/31欠失変異を示す。30変異を含むヌクレオチドの欠失に加えて、31変異は、逆方向番号付けシステムでDEN3のnt258～228を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号20)。

20

【0054】

【図4D】図4Dは、DEN3のために表す、86の欠失変異を示す。逆方向番号付けシステムで、86変異はDEN3のnt228～143を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号21)。

【0055】

【図5A】図5Aは、DEN4血清型ウイルスの3' - UTRのTL-1、TL-2およびTL-3領域の予測された二次構造を示す。二次構造モデルの構築のために使用される配列のGenBank受託番号を示す。公知であり実験的に検証された構造エレメントの構造の環状化および以降の誤った折り畳みを回避するために、TL-1、TL-2およびTL-3を含む最後の281ヌクレオチドだけを使用する。各構造モデルに特異的なmfoldプログラム制約を示す。重要な欠失(principle deletion)に接しているヌクレオチドを丸で囲み、番号を付し、ヌクレオチドの番号付けは3'ゲノム末端から始まる(逆方向番号付けシステム)(配列番号22)。

30

【0056】

【図5B】図5Bは、DEN4のために表す、30欠失変異を示す。逆方向番号付けシステムで、30変異はDEN4のnt172～143を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号23)。

【0057】

【図5C】図5Cは、DEN4のために表す、30/31欠失変異を示す。30変異を含むヌクレオチドの欠失に加えて、31変異は、逆方向番号付けシステムでDEN4のnt258～228を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号24)。

40

【0058】

【図5D】図5Dは、DEN4のために表す、86の欠失変異を示す。逆方向番号付けシステムで、86変異はDEN4のnt228～143を削除する。欠失させた領域は、記号によって示される(配列番号25)。

【0059】

【図6】図6は、生の弱毒化四価のデングウイルスワクチンが4つの血清型の各々を表すデングウイルスを含有することを示し、各血清型は、変更されていない野生型の構造および非構造タンパク質の完全セットならびに共有された30弱毒化変異を含有する。各構

50

成成分の 3' 非翻訳領域 (UTR) の 30 変異の相対位置は、矢印によって示す。本明細書に記載されるある特定の態様または実施形態では、生の弱毒化五価ウイルスワクチンは、ZIKV に対して免疫原性である弱毒化ウイルスと組み合わせた生の弱毒化四価デングウイルスワクチンを含む（図示せず）。

【0060】

【図 7A】図 7A は、DEN1、DEN2、DEN3 および DEN4、ならびにそれらの 30 誘導体の TL2 領域のヌクレオチド配列アラインメントを示す。4 つの DEN 血清型の各々の対応する領域も示す。大文字は 4 つ全ての血清型の間の配列相同性を示し、下線はステム構造を形成するヌクレオチド対形成を示す。

【0061】

【図 7B】図 7B は、各 DEN 血清型の TL2 領域の予測された二次構造を示す。30 変異によって除去されるヌクレオチドは、四角で囲まれる (DEN1 - ヌクレオチド 10562 ~ 10591 の間、DEN2 トンガ / 74 - ヌクレオチド 10541 ~ 10570 の間、DEN3 スレマン (sleman) / 78 - ヌクレオチド 10535 ~ 10565 の間、および DEN4 - ヌクレオチド 10478 ~ 10607 の間)。

10

【0062】

【図 8A】図 8A は、DEN2 (トンガ / 74) の CME または ME 領域のいずれかを DEN4 遺伝子バックグラウンドに導入することによって、組換えキメラデングウイルスを構築したことを示す。3' UTR の 30 変異の相対位置は矢印で示し、型間接合部 1、2 および 3 を示す。

20

【0063】

【図 8B】図 8B は、型間接合部領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。各キメラ cDNA のアセンブリーで使用した制限酵素認識部位を示す。

【0064】

【図 9A】図 9A は、DEN3 (スレマン / 78) の CME または ME 領域のいずれかを DEN4 遺伝子バックグラウンドに導入することによって、組換えキメラデングウイルスを構築したことを示す。3' UTR の 30 変異の相対位置は矢印で示し、型間接合部 1、2 および 3 を示す。各キメラ cDNA のアセンブリーで使用した制限酵素認識部位を示す。

【0065】

【図 9B】図 9B は、型間接合部領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。各キメラ cDNA のアセンブリーで使用した制限酵素認識部位を示す。

30

【0066】

【図 10A】図 10A は、DEN1 (プエルトリコ / 94) の CME または ME 領域のいずれかを DEN4 遺伝子バックグラウンドに導入することによって、組換えキメラデングウイルスを構築したことを示す。3' UTR の 30 変異の相対位置は矢印で示し、型間接合部 1、2 および 3 を示す。各キメラ cDNA のアセンブリーで使用した制限酵素認識部位を示す。

【0067】

【図 10B】図 10B は、型間接合部領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。各キメラ cDNA のアセンブリーで使用した制限酵素認識部位を示す。

40

【0068】

【図 11】図 11 は、ジカ / DEN2 30 キメラのプラスミドを示す。下に記載する他のデングウイルス骨格のいずれかを、図 11 の DEN2 30 骨格と置換することができることに注意するべきである。

【0069】

【図 12】図 12 は、五価の DENV および ZIKV ワクチンを示す。示されるキメラ cDNA プラスミドは、DEN2 30 または DEN4 30 の prM および E 遺伝子領域を、ZIKV - パライバ / 2015 (ブラジル) に由来するものと置き換える。E.co*li* における安定性のために、ウイルスのオープンリーディングフレームをイントロン配

50

列によって破壊した。感染性ウイルスを回収するために、ベロ細胞にcDNAプラスミドをトランスフェクトし、ウイルスゲノムを作製する転写はCMVプロモーター配列から進行し、リボザイム(RBZ)およびターミネーター(TERM)配列によって終了する。イントロン配列は、正常なRNAスプライシングプロセスによって除去された。

【0070】

【図13】図13Aおよび13Bは、DENV-2(図13A)およびDENV-4(図13B)バックグラウンドのためのプラスミドマップを示す。

【0071】

【図14AB】図14A、14Bおよび14Cは、イントロン挿入位置を図示する。標準のイントロン配列は、各cDNA構築物について同じである。ZV-D2は、NS1遺伝子領域のアラニンコドン149に単一の挿入を含有する(図14A)。ZV-D4は、NS2Aのアラニンコドン148(図14B)およびNS5のアラニンコドン425(図14C)に位置する2つのイントロン挿入を含有する。

【図14C】図14A、14Bおよび14Cは、イントロン挿入位置を図示する。標準のイントロン配列は、各cDNA構築物について同じである。ZV-D2は、NS1遺伝子領域のアラニンコドン149に単一の挿入を含有する(図14A)。ZV-D4は、NS2Aのアラニンコドン148(図14B)およびNS5のアラニンコドン425(図14C)に位置する2つのイントロン挿入を含有する。

【0072】

【図15A】図15Aおよび15Bは、DENV-ZIKVキメラのために2つの異なる感染多重度(MOI)でウイルス増殖動態を評価したことを示す。キメラウイルスrZIKV/D2 30-710(DEN2 30バックグラウンド)およびrZIKV/D4 30-713(DEN4 30バックグラウンド)をベロ細胞で回収し、ベロ細胞における2回の限界希釈(terminal dilution)によって生物学的にクローニングし、次に、ベロ細胞での継代によってさらに増幅し、有効シードストック(working seed stock)を生成した。両キメラウイルスは6log₁₀PFU/mLまで複製し、力価は5日目頃にピークに達する。両ウイルスで、0.01のMOIはより高い収量を提供した。

【図15B】図15Aおよび15Bは、DENV-ZIKVキメラのために2つの異なる感染多重度(MOI)でウイルス増殖動態を評価したことを示す。キメラウイルスrZIKV/D2 30-710(DEN2 30バックグラウンド)およびrZIKV/D4 30-713(DEN4 30バックグラウンド)をベロ細胞で回収し、ベロ細胞における2回の限界希釈(terminal dilution)によって生物学的にクローニングし、次に、ベロ細胞での継代によってさらに増幅し、有効シードストック(working seed stock)を生成した。両キメラウイルスは6log₁₀PFU/mLまで複製し、力価は5日目頃にピークに達する。両ウイルスで、0.01のMOIはより高い収量を提供した。

【発明を実施するための形態】

【0073】

デング、黄熱および日本脳炎などの他のフラビウイルスのためには有効なワクチンが存在するが、ZIKVに対する有効なワクチンはまだ利用可能でない。世界的大流行の現在の状態を考慮すると、有効な抗ジカワクチンを開発する差し迫った必要性が当技術分野にある。本開示は、ZIKVに対するワクチンを提供することによって、当技術分野におけるこの欠乏に対処する。本発明は、これらに限定されないが、弱毒化デングウイルスおよびZIKVゲノムを含む、免疫原性組成物およびワクチンならびに／または多価免疫原性組成物およびワクチンは、被験体において複数のフラビウイルス(例えば、デングおよびジカ)に対して免疫応答を生成する、および／または保護を提供することができるとの発見に少なくとも一部基づく。本開示は、新規弱毒化ジカウイルス；新規弱毒化キメラジカウイルス；1つまたは複数の弱毒化変異および／または欠失を含むZIKVゲノム；キメラZIKVゲノム；ZIKVに対して免疫を誘導するのに有効な免疫原性組成物；弱毒化された生ジカウイルスを含む抗ジカワクチン；ジカ感染症から保護する抗ジカワクチンで被験体をワクチン接種するための方法；弱毒化ZIKVゲノムまたはキメラZIKVゲノ

10

20

30

40

50

ムを製造するための方法；弱毒化ZIKVワクチンまたは弱毒化キメラZIKVワクチンを製造するための方法；ならびに、弱毒化ZIKVワクチンもしくは弱毒化キメラZIKVワクチン、または1つもしくは複数のフラビウイルスワクチン（例えば、1つもしくは複数のデングウイルスワクチン）およびジカワクチンを含む多価（例えば、五価）ワクチンを含む薬学的キットを含む様々な態様を記載する。他の態様が含まれ、本明細書にさらに記載される。

【0074】

ZIKVおよびデングウイルスは、力が媒介するフラビウイルス病原体である。フラビウイルスゲノムは、5'非翻訳領域(5'UTR)、続いてカプシドタンパク質(C)コード領域、続いて前膜/膜タンパク質(prM)コード領域、続いてエンベロープタンパク質(E)コード領域、続いて非構造タンパク質(NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5)をコードする領域、および最後に3'非翻訳領域(3'UTR)を含有する。ウイルスの構造タンパク質はC、prMおよびEであり、非構造タンパク質はNS1-NS5である。構造および非構造タンパク質は、単一のポリタンパク質として翻訳され、細胞およびウイルスのプロテアーゼによってプロセシングされる。

10

【0075】

ある特定の態様では、本開示は、ZIKVからの少なくとも1つの構造タンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列、第1のフラビウイルスからの少なくとも1つの非構造タンパク質をコードする第2のヌクレオチド配列、および第2のフラビウイルスからの3'非翻訳領域の第3のヌクレオチド配列を含む、ジカ核酸キメラに関する。本開示は、デング血清型1に対して免疫原性である第1の弱毒化ウイルス、デング血清型2に対して免疫原性である第2の弱毒化ウイルス、デング血清型3に対して免疫原性である第3の弱毒化ウイルス、デング血清型4に対して免疫原性である第4の弱毒化ウイルス、およびZIKVに対して免疫原性である第5の弱毒化ウイルスを含む、五価の免疫原性組成物にも関する。第5の弱毒化ウイルスは、本開示による核酸キメラであってもよい。

20

【0076】

ある態様によれば、本開示は、1つまたは複数の弱毒化変異（例えば、点変異、欠失、挿入、反転またはそれらの任意の組み合わせ）を含有するように改変されたZIKVゲノム、あるいはZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むキメラZIKVゲノムを提供する。

30

【0077】

別の態様によれば、本開示は、1つまたは複数の弱毒化変異を含有するように改変されたZIKVゲノム、あるいはZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むキメラZIKVゲノムを含むZIKVビリオン（すなわち、ウイルス粒子）を提供する。

40

【0078】

ある態様によれば、本開示は、弱毒化ZIKVを含む免疫原性組成物またはワクチン、あるいは弱毒化ZIKVを提供する。弱毒化ZIKVの弱毒化は、1つまたは複数の弱毒化変異および/または欠失を含むZIKVのゲノムの結果であり得る。キメラZIKVは、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むゲノムを含む。

【0079】

別の態様によれば、本開示は、免疫原性組成物またはワクチンを含む薬学的キットを提

50

供する。ある実施形態では、ワクチンは、弱毒化ZIKVを含み、弱毒化は、被験体をワクチン接種するために組成物を使用するための一組の指示と一緒にになった、1つまたは複数の弱毒化変異および/または欠失を含むZIKVのゲノムからもたらす。別の実施形態では、ワクチンは、被験体をワクチン接種するために組成物を使用するための一組の指示と一緒にになった、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むゲノムを有する弱毒化キメラZIKVを含む。

【0080】

10

一態様によれば、本開示は、ZIKVに対する免疫を提供するために被験体をワクチン接種するための方法を提供する。本方法は、ZIKVワクチンの薬学的に許容される用量を投与することを含む。ワクチンは、弱毒化ZIKVまたは弱毒化キメラZIKVのいずれかを含む。弱毒化キメラZIKVは、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むゲノムを有する。

【0081】

20

さらなる態様によれば、本開示は、弱毒化ZIKVを含むワクチンを製造するための方法を提供し、前記弱毒化は、1つまたは複数の弱毒化変異および/または欠失を含むZIKVのゲノムの結果である。ある実施形態では、製造のための方法は、野生型ZIKVのゲノムに少なくとも1つの弱毒化変異および/または欠失を導入すること、ならびに弱毒化ZIKVを1つまたは複数の薬学的賦形剤と合わせて前記ワクチンを提供することを含む。

【0082】

30

別の態様によれば、本開示は、弱毒化キメラZIKVを含むワクチンを製造するための方法を提供する。ある実施形態では、製造することは、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を合わせて、弱毒化キメラZIKVを提供すること、ならびに弱毒化キメラZIKVを1つまたは複数の薬学的賦形剤と合わせて前記ワクチンを提供することを含む。

【0083】

40

本発明の一態様によれば、本開示は、多価の免疫原性組成物を提供する。本組成物は、フラビウイルスに対して免疫原性である少なくとも1つの第1の弱毒化ウイルスおよびZIKVに対して免疫原性である第2の弱毒化ウイルスを含む。特定の実施形態では、1つまたは複数の第1の弱毒化ウイルスは、デングウイルス（例えば、血清型1、2、3、4またはそれらの組み合わせ）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスに対して免疫原性である。別の実施形態では、第2の弱毒化ウイルスは、本開示によるジカ核酸キメラである。別の特定の実施形態では、第2の弱毒化ウイルスは、ゲノムに1つまたは複数の弱毒化変異および/または欠失を含むZIKVである。特定の実施形態では、少なくとも1つの第1の弱毒化ウイルスは、デング血清型1に対して免疫原性である第1の弱毒化ウイルス、デング血清型2に対して免疫原性である第2の弱毒化ウイルス、デング血清型3に対して免疫原性である第3の弱毒化ウイルス、およびデング血清型4に対して免疫原性である第4の弱毒化ウイルスを含み、それによって、五価の免疫原性組成物を生成する。

【0084】

50

さらなる態様によれば、本開示は、ZIKVに対して免疫応答を誘導するための方法を提供する。この方法は、弱毒化ZIKVまたは弱毒化キメラZIKVを含むZIKVワク

チノの薬学的に許容される用量を投与することを含む。一実施形態では、弱毒化ZIKVの弱毒化は、1つまたは複数の弱毒化変異および／または欠失を含むZIKVのゲノムの結果である。別の実施形態では、弱毒化キメラZIKVは、ZIKVゲノムの一部、および少なくとも1つの他のフラビウイルス、例えば、これらに限定されないが、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4）、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはそれらの組み合わせのゲノムの一部を含むゲノムを有する。

【0085】

一態様によれば、本開示は、ZIKVに対して免疫応答を誘導するための方法を提供する。本方法は、本明細書に記載される五価の免疫原性組成物または本明細書に記載される多価の免疫原性組成物の薬学的に許容される用量を投与することを含む。10

【0086】

本明細書に引用または参照される全ての刊行物、特許出願、特許、図面および他の参考文献、ならびに本明細書に引用される文書において引用または参照される全ての文書は、本明細書または本明細書に参照により組み込まれる任意の文書で言及される、任意の製品のための任意の製造業者の説明書、記載、製品仕様書および製品シートと一緒に、参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施において用いることができる。例えば、本開示は、米国仮特許出願2009/0028900A1、2010/0316670A1、2005/0010043A1、2004/0033594A1、2005/0100886A1、2007/0134256、2010/0104598A1、2007/0009552A1、WO2008/157136A1、WO2006/036233A1、WO03/092592A1、WO03/059384A1およびWO01/59093A1に関連し、これら全ては全ての目的のために参考として援用される。20

【0087】

特に定義されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、この発明が属する分野の当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。例えば、Singleton PおよびSainsbury D.、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology、第3版、J. Wiley & Sons、Chichester、New York、2001、およびField's Virology、第4版、Knipe D.M.およびHowley P.M.編、Lippincott Williams & Wilkins、Philadelphia 2001を参照。30

【0088】

用語「約」は、1つ、2つまたは3つ以内のヌクレオチドを意味する。

【0089】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、冠詞「a」および「an」は、文脈が明らかに特記しない限り、その冠詞の文法上の対象物の1つまたは1つより多く（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で使用される。例として、「要素」は、1つの要素または1つより多くの要素を意味する。

【0090】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、語句「および／または」は、そのように結び付けられる要素、すなわち、一部の場合には一緒に存在し、他の場合には離れて存在する要素の「一方または両方」を意味すると理解するべきである。「および／または」で掲載される複数の要素は、同じように、すなわち、そのように結び付けられる要素の「1つまたは複数」と解釈されるべきである。「および／または」の文節によって具体的に特定される要素以外に、具体的に特定されるそれらの要素に関係するかまたは無関係であるにせよ、他の要素が任意選択で存在することができる。したがって、非限定的な例として、「含む」などのオープンエンド言語と一緒に使用される場合、「Aおよび／またはB」への言及は、一実施形態ではAだけ（任意選択でB以外の要素を含む）；別の実施形態ではBだけ（任意選択でA以外の要素を含む）；さらに別の実施形態ではAとBの両方

10

20

30

40

50

(任意選択で他の要素を含む) ; 等を指すことができる。

【0091】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、「または」は、上で定義される「および／または」と同じ意味を有すると理解するべきである。例えば、リスト中の項目を分離する場合、「または」または「および／または」は包括的である、すなわちいくつかの要素または要素リストのうちの少なくとも1つを含むが、1つよりも多くも含み、任意選択でさらなる未掲載項目を含むと解釈されるものとする。明らかにそれとは反対に示される用語だけ、例えば「のうちの1つだけ」または「のうちの正確に1つ」、または、特許請求の範囲において使用されるときの「からなる」は、いくつかの要素または要素リストのうちの正確に1つの要素を含むことを指す。一般に、本明細書で使用される場合、用語「または」は、排他性の用語、例えば「いずれか」、「のうちの1つ」、「のうちの1つだけ」または「のうちの正確に1つ」が先行するときに、排他的代替物(すなわち、「どちらか一方であるが両方でない」)を示すとのみ解釈されるものとする。10

【0092】

特許請求の範囲ならびに明細書の上では、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「有する (carrying)」、「有する (having)」、「含有する」、「含む (involving)」、「保持する」、「構成される」などの全ての移行句は、オープンエンドであること、すなわち、限定されずに含むことを意味すると理解するべきである。米国特許庁特許審査基準セクション 2111.03 に示される通り、移行句「からなる」および「から本質的になる」だけは、それぞれ閉鎖的または半閉鎖的な移行句であるものとする。20

【0093】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、1つまたは複数の要素のリストに関して「少なくとも1つ」という語句は、要素のリスト中の要素の任意の1つまたは複数から選択される少なくとも1つの要素を意味するが、要素のリストの中に具体的に掲載されるあらゆる要素の少なくとも1つを必ずしも含まず、要素のリスト中の要素のいかなる組み合わせも排除しないと理解するべきである。この定義は、具体的に特定されるそれらの要素と関係するにせよ無関係であるにせよ、「少なくとも1つ」という語句が指す要素のリストの中の具体的に特定される要素以外の要素が任意選択で存在してもよいことも可能にする。したがって、非限定的な例として、「A および B の少なくとも1つ」(または、同様に、「A または B の少なくとも1つ」、または同様に「A および／または B の少なくとも1つ」)は、一実施形態では、任意選択で1つより多くを含む少なくとも1つの A (B は存在せず、任意選択で B 以外の要素を含む) を指すことができ；別の実施形態では、任意選択で1つより多くを含む少なくとも1つの B (A は存在せず、任意選択で A 以外の要素を含む) を指すことができ；さらに別の実施形態では、任意選択で1つより多くを含む少なくとも1つの A、および任意選択で1つより多くを含む少なくとも1つの B (任意選択で他の要素を含む) を指すことができる；等々。30

【0094】

1つより多くのステップまたは行為を含む本明細書に記載されるある特定の方法では、文脈が特記しない限り、方法のステップまたは行為の順序は、方法のステップまたは行為が列挙される順序に必ずしも限定されないことも理解するべきである。40

【0095】

用語「同時投与」および「同時投与すること」または「併用療法」は、治療剤がある程度、好ましくは有効な量で、患者に同時に存在する限り、同時的投与(2つまたはそれより多い治療剤の同時の投与)と、時間の異なる投与(さらなる治療剤(1つまたは複数)の投与とは異なる時間での1つまたは複数の治療剤の投与)の両方を指す。ある特定の好ましい態様では、本明細書に記載される本化合物のうちの1つまたは複数は、特に抗がん剤を含む少なくとも1つのさらなる生体活性剤と組み合わせて同時投与される。特に好ましい態様では、化合物の同時投与は、抗がん活性を含む相乗的活性および／または療法をもたらす。

【0096】

50

20

30

40

50

用語「患者」または「被験体」は、本明細書全体で、予防的処置を含む、本開示による組成物による処置が提供される動物、好ましくはヒトまたは家畜動物を記載するために使用される。ヒト患者などの特定の動物に特異的である感染症、状態または疾患状態の処置に関して、用語患者は、イヌもしくはネコなどの家畜動物またはウマ、ウシ、ヒツジなどの畜産動物(farm animal)を含む特定の動物を指す。一般に、本開示において、用語患者は、特記されないかまたはその用語の使用の文脈から他に暗示されない限り、ヒト患者を指す。

【0097】

用語「有効」は、その意図される使用の文脈内で使用されるときに意図される結果をもたらす化合物、組成物または構成成分の量を記載するために使用される。用語有効は、本出願において別途記載または使用される、全ての他の有効量または有効濃度の用語を包含する。

10

【0098】

用語「残基」は、本明細書において、アミド結合によってペプチドに組み込まれるアミノ酸(DまたはL)またはアミノ酸模倣体(mimetic)を指すために使用される。したがって、アミノ酸は天然に存在するアミノ酸であってもよいか、または特に限定されない限り、天然に存在するアミノ酸と類似の方法で機能する天然アミノ酸の公知の類似体(すなわち、アミノ酸模倣体)を包含することができる。さらに、アミド結合模倣体は、当業者に周知であるペプチド骨格改変を含む。

20

【0099】

さらに、コードされる配列の中の単一のアミノ酸または小さい百分率のアミノ酸(一般的に5%未満、より一般的に1%未満)を変更、付加または削除する、アミノ酸配列またはアミノ酸をコードするヌクレオチド配列における個々の置換、欠失または付加が保存的に改変されたバリエーションであることを当業者は認め、ここで、変更は化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当技術分野で周知である。以下の6群の各々は、互いの保存的置換であるアミノ酸を含む:(1)アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T);(2)アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E);(3)アスパラギン(N)、グルタミン(Q);(4)アルギニン(R)、リシン(K);(5)イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V);および(6)フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)。他の用語は定義されるか、さもなければ本明細書に記載される。

30

【0100】

変異体弱毒化ジカウイルスおよびキメラ弱毒化ジカウイルス

【0101】

本発明は、(a)ジカウイルスゲノムへの1つまたは複数(例えば、少なくとも1、2、3、4または5つ)の弱毒化変異の導入、あるいは(b)免疫原性構成成分をコードする1つまたは複数のZIKV遺伝子(例えば、ジカカプシドまたは前膜タンパク質またはその両方をコードする遺伝子)を含むように第1のフラビウイルス「骨格」ゲノム(例えば、DEN1、DEN2、DEN3もしくはDEN4、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたは西ナイルウイルス)を改変することによって、ZIKVをキメラウイルスに変換することの結果として弱毒化されるジカウイルスに関する。

40

【0102】

弱毒化ジカウイルスの場合、弱毒化変異は、任意の点変異、挿入、欠失もしくは反転、またはそれらの任意の組み合わせ、あるいは、ZIKVのビルレンスを低減または排除するが、複製する、および他の方法でその免疫原性構成成分の発現を可能にするウイルスの能力をブロックしない任意のそのような変異を含むことができる。弱毒化変異は、ゲノムのいかなる場所にも導入することができる。例えば、変異は1つもしくは複数の非構造遺伝子(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5遺伝子)、または1つもしくは複数の構造遺伝子(カプシド(C)、前膜/膜(prM)およびエンベ

50

ロープ(E)タンパク質遺伝子)、または 5' UTR もしくは 3' UTR、またはそれらの組み合わせに導入することができる。

【 0 1 0 3 】

キメラジカウイルスの場合、キメラウイルスの構造は、かなり異なってもよい。ある特定の実施形態では、ZIKVゲノム(例えば、ZIKVの野生型株)は、ジカゲノムの1つまたは複数の遺伝成分(例えば、非構造遺伝子、構造遺伝子、5'UTRまたは3'UTR)を、別のフラビウイルス(例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4)からの同じ遺伝成分で置き換えるかまたは置換することによって改変することができる。この実施形態では、ZIKVは、その中のある特定の遺伝成分が別のフラビウイルスからの対応する遺伝成分で置き換えられてキメラウイルスを形成する骨格ゲノムと考えることができる。結果として生じるキメラウイルスは、弱毒化される。ある特定の他の実施形態では、ジカ以外のフラビウイルスゲノム(例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4)は、フラビウイルスゲノムの1つまたは複数の遺伝成分(例えば、非構造遺伝子、構造遺伝子、5'UTRまたは3'UTR)を、ZIKVゲノムからの対応する遺伝成分で置き換えるかまたは置換することによって改変することができる。この実施形態では、フラビウイルスゲノムは、その中のある特定の遺伝成分がZIKVからの対応する遺伝成分で置き換えられてキメラウイルスを形成する骨格ゲノムと考えることができる。結果として生じるキメラウイルスは、弱毒化される。

10

【 0 1 0 4 】

一実施形態では、本発明は、フラビウイルス骨格から構築されるキメラZIKVを提供し、ここで、その中の1つまたは複数の構造遺伝子(フラビウイルスC、prMおよび/またはE)はZIKVからの対応する1つまたは複数の構造遺伝子で置き換えられている。

20

【 0 1 0 5 】

別の実施形態では、本発明は、デングウイルス骨格(例えば、DEN1、DEN2、DEN3もしくはDEN4、またはそのキメラ)から構築されるキメラZIKVを提供し、ここで、その中の1つまたは複数の構造遺伝子(デングC、prMおよび/またはE)はZIKVからの対応する1つまたは複数の構造遺伝子で置き換えられている。

【 0 1 0 6 】

さらに別の実施形態では、本発明は、デング血清型2ウイルス骨格から構築されるキメラZIKVを提供し、ここで、その中の1つまたは複数の構造遺伝子(デング血清型2のC、prMおよび/またはE)はZIKVからの対応する1つまたは複数の構造遺伝子で置き換えられている。

30

【 0 1 0 7 】

なお別の実施形態では、本発明は、デング血清型4ウイルス骨格から構築されるキメラZIKVを提供し、ここで、その中の1つまたは複数の構造遺伝子(デング血清型4のC、prMおよび/またはE)はZIKVからの対応する1つまたは複数の構造遺伝子で置き換えられている。

【 0 1 0 8 】

別の実施形態では、本発明は、デング血清型1ウイルス骨格から構築されるキメラZIKVを提供し、ここで、その中の1つまたは複数の構造遺伝子(デング血清型1のC、prMおよび/またはE)はZIKVからの対応する1つまたは複数の構造遺伝子で置き換えられている。

40

【 0 1 0 9 】

なお別の実施形態では、本発明は、デング血清型3ウイルス骨格から構築されるキメラZIKVを提供し、ここで、その中の1つまたは複数の構造遺伝子(デング血清型3のC、prMおよび/またはE)はZIKVからの対応する1つまたは複数の構造遺伝子で置き換えられている。

【 0 1 1 0 】

キメラZIKV実施形態のいずれでも、キメラZIKV(例えば、ある特定の実施形態

50

では ZIKV、または他の実施形態では別のフラビウイルス)を形成するために使用される骨格ウイルスは、上記の1つまたは複数の弱毒化変異をさらに含むことができる。これらのさらなる弱毒化変異は、骨格ゲノムのいかなる場所にも導入することができる。例えば、変異は1つもしくは複数の非構造遺伝子(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5遺伝子)、または1つもしくは複数の構造遺伝子(カプシド(C)、前膜/膜(prM)およびエンベロープ(E)タンパク質遺伝子)、または5'UTRもしくは3'UTR、またはそれらの組み合わせに導入することができる。例えば、その中の1つまたは複数の構造タンパク質遺伝子が対応するジカ構造タンパク質遺伝子で置換されたDEN2骨格またはDEN4骨格を含むキメラZIKVは、30、30/31もしくは86を、または、30、30/31もしくは86変異に加えて3'UTRに任意の他の弱毒化変異をさらに含むことができる。10

【0111】

免疫原性ジカキメラおよびジカキメラを調製するための方法は、本明細書で提供される。薬学的に許容される担体の中の免疫原性ZIKVキメラは、ZIKVによる感染に対して個体および動物を免疫化および保護する免疫原性組成物として、単独または併用で有用である。ある特定の実施形態では、ジカキメラは、ZIKVに対して体液性(抗体)応答を誘導するべきであり、デングウイルスの非構造タンパク質はT細胞応答を含むべきである。

【0112】

本開示のジカキメラは、ZIKVの免疫原性構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、およびデングウイルスの骨格から選択されるさらなるヌクレオチド配列を含むことができる。本開示のジカキメラは、ZIKVの免疫原性構造タンパク質および非構造タンパク質、ならびにデングウイルス(例えば、血清型1、血清型2、血清型3または血清型4)の3'UTRをコードするヌクレオチド配列を含むことができる。一実施形態では、デングウイルスの3'UTRは、弱毒化欠失を含有する。デングウイルスの弱毒化に関して下に記載されるように、本開示は、弱毒化欠失または変異を含む弱毒化ZIKVも企図する。ヌクレオチド配列に由来するジカキメラウイルスは、ZIKVに対して免疫原性応答を誘導するために使用することができる。20

【0113】

別の実施形態では、好ましいキメラは、ZIKVからの少なくとも1つの構造タンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列、およびデングウイルスからの非構造タンパク質をコードする第2のヌクレオチド配列を含むジカ核酸キメラである。別の実施形態では、デングウイルスは弱毒化される。別の実施形態では、デングウイルスはDEN2である。別の実施形態では、デングウイルスはDEN4である。さらに別の実施形態では、デングウイルスはDEN3である。さらなる実施形態では、デングウイルスはDEN1である。特定の実施形態では、構造タンパク質は、ZIKVのCタンパク質、ZIKVのprMタンパク質、ZIKVのEタンパク質またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。30

【0114】

本明細書で使用される場合、用語「ジカキメラ」、「ジカキメラウイルス」および「キメラZIKV」は、ZIKVの免疫原性をコードするヌクレオチド配列、およびフラビウイルス、例えばこれに限定されないがデングウイルス、または弱毒化ZIKVの骨格に由来するさらなるヌクレオチド配列を含む、本発明の感染性構築物を意味する。40

【0115】

本明細書で使用される場合、「感染性構築物」は、細胞を感染させるために使用することができる、ウイルス、ウイルス構築物、ウイルスキメラ、ウイルスまたはその任意の部分に由来する核酸を示す。

【0116】

本明細書で使用される場合、「ジカ核酸キメラ」は、ZIKVの免疫原性をコードするヌクレオチド配列、およびフラビウイルス、例えばこれに限定されないがデングウイルスまたは弱毒化ZIKVの骨格に由来するさらなるヌクレオチド配列を含む核酸を含む、本50

明細書に記載の構築物を意味する。対応して、本明細書に記載される任意のキメラフラビウイルスまたはフラビウイルスキメラは、核酸キメラの一例として認めることができる。

【0117】

本明細書で使用される場合、「構造および非構造タンパク質」は、完全タンパク質の配列、タンパク質のエピトープまたは、例えば、その3つもしくはそれより多くのアミノ酸残基を含む任意の断片を含む任意のタンパク質またはそれをコードする任意の遺伝子を意味するか、または含むことができる。

【0118】

本発明のフラビウイルスキメラは、ZIKVからの構造タンパク質遺伝子を、フラビウイルス、例えばこれに限定されないがデングウイルス、例えばDEN1、DEN2、DEN3またはDEN4からの非構造タンパク質遺伝子と融合することによって形成される構築物である。任意の株、例えば表1のデング株の使用が企図される。

【表A-1】

表1.デングウイルス株の例およびそれらの関連する受託番号

血清型	株	受託番号
1	02-20	AB178040
1	16007	AF180817
1	16007 PDK-13	AF180818
1	259par00	AF514883
1	280par00	AF514878
1	293arg00	AY206457
1	295arg00	AF514885
1	297arg00	AF514889
1	301arg00	AF514876
1	98901518	AB189120
1	98901530	AB189121
1	A88	AB074761
1	Abidjan	AF298807
1	ARG0028	AY277665
1	ARG0048	AY277666
1	ARG9920	AY277664
1	BR-90	AF226685
1	BR-01-MR	AF513110
1	BR-97-111	AF311956
1	BR-97-233	AF311958
1	BR-97-409	AF311957
1	アビジャン	AF309641
1	FGA-89	AF226687
1	FGA-NA d1d	AF226686
1	Fj231-04	DQ193572
1	GD05-99	AY376738
1	GD23-95	AY373427
1	GZ-80	AF350498
1	D1-hu-Yap-NIID27-2004	AB204803
1	D1-H-IMTSSA-98-606	AF298808
1	モチヅキ	AB074760
1	D1.ミャンマー.059-01	AY708047
1	D1.ミャンマー.194-01	AY713474
1	D1.ミャンマー.206-01	AY713475
1	D1.ミャンマー.23819-96	AY722802
1	D1.ミャンマー.305-01	AY713476
1	D1.ミャンマー.31459-98	AY726555

10

20

30

40

【表 A - 2】

1	D1.ミャンマー.31987-98	AY726554
1	D1.ミャンマー.32514-98	AY722803
1	D1.ミャンマー.37726-01	AY726549
1	D1.ミャンマー.38862-01	AY726550
1	D1.ミャンマー.40553-71	AY713473
1	D1.ミャンマー.40568-76	AY722801
1	D1.ミャンマー.44168-01	AY726551
1	D1.ミャンマー.44988-02	AY726552
1	D1.ミャンマー.49440-02	AY726553
1	†西太平洋デルタ30	AY145123
1	西太平洋 †DENImutF	AY145122
1	S275-90	A75711
1	D1-セーシェル-NIID41-2003	AB195673
1	シンガポール 8114-93	AY762084
1	シンガポール S275-90	M87512
1	ThD1_0008_81	AY732483
1	ThD1_0049_01	AY732482
1	ThD1_0081_82	AY732481
1	ThD1_0097_94	AY732480
1	ThD1_0102_01	AY732479
1	TbD1_0323_91	AY732478
1	ThD1_0336_91	AY732477
1	ThD1_0442_80	AY732476
1	ThD1_0488_94	AY732475
1	ThD1_0673_80	AY732474
1	組換え西太平洋	AY145121
1	ナウル島西太平洋 45AZ5	NC_001477
1	ナウル島、西太平洋ベセスタ	U88535
1	ナウル島西太平洋 45AZ5-PDK27	U88537
2	131	AF100469
2	16681-PDK53	M84728
2	16681 Blok	M84727
2	16681 Kinney	U87411
2	43	AF204178
2	44	AF204177
2	98900663	AB189122
2	98900665	AB189123
2	98900666	AB189124
2	BA05i	AY858035

10

20

30

40

【表 A - 3】

2	パンコク 1974	AJ487271
2	BR64022	AF489932
2	C0166	AF100463
2	C0167	AF100464
2	C0371	AF100461
2	C0390	AF100462
2	中国 04	AF119661
2	キューバ115-97	AY702036
2	キューバ13-97	AY702034
2	キューバ165-97	AY702038
2	キューバ205-97	AY702039
2	キューバ58-97	AY702035
2	キューバ89-97	AY702037
2	DR23-01	AB122020
2	DR31-01	AB122021
2	DR59-01	AB122022
2	FJ-10	AF276619
2	FJ11-99	AF359579
2	I348600	AY702040
2	IQT1797	AF100467
2	IQT2913	AF100468
2	ジャマイカ-N 1409	M20558
2	K0008	AF100459
2	K0010	AF100460
2	Mara4	AF100466
2	DEN2-H-IMTSSA-MART-98-703	AF208496
2	ニューギニア C	AF038403
2	ニューギニア C-PUO-218ハイブリッド	AF038402
2	ニューギニア-C	M29095
2	PDK-53	U87412
2	S1ワクチン	NC_001474
2	TB16i	AY858036
2	ThD2_0017_98	DQ181799
2	ThD2_0026_88	DQ181802
2	ThD2_0038_74	DQ181806
2	ThD2_0055_99	DQ181798
2	ThD2_0078_01	DQ181797
2	ThD2_0168_79	DQ181805
2	ThD2_0263_95	DQ181800

10

20

30

40

【表 A - 4】

2	ThD2_0284_90	DQ181801
2	ThD2_0433_85	DQ181803
2	ThD2_0498_84	DQ181804
2	ThNH-28-93	AF022435
2	ThNH29-93	AF169678
2	ThNH36-93	AF169679
2	ThNH45-93	AF169680
2	ThNH-52-93	AF022436
2	ThNH54-93	AF169682
2	ThNH55-93	AF169681
2	ThNH62-93	AF169683
2	ThNH63-93	AF169684
2	ThNH69-93	AF169685
2	ThNH73-93	AF169686
2	ThNH76-93	AF169687
2	ThNH81-93	AF169688
2	ThNH-p36-93	AF022441
2	ThNH-7-93	AF022434
2	ThNH-p11-93	AF022437
2	ThNH-p12-93	AF022438
2	ThNH-p14-93	AF022439
2	ThNH-p16-93	AF022440
2	トンガ-74	AY744147
2	TSV01	AY037116
2	台湾-1008DHF	AY776328
2	Ven2	AF100465
3	D3-H-IMTSSA-MART-1999-1243	AY099337
3	D3-H-IMTSSA-SRI-2000-1266	AY099336
3	80-2	AF317645
3	98901403	AB189125
3	98901437	AB189126
3	98901517	A6189127
3	98902890	AB189128
3	BA51	AY858037
3	BDH02-1	AY496871
3	BDH02-3	AY496873
3	BDH02-4	AY496874
3	BDH02-7	AY496877
3	BR74886-02	AY679147

10

20

30

40

【表 A - 5】

3	C0331-94	AY876494
3	C0360-94	AY923865
3	den3_88	AY858038
3	den3_98	AY858039
3	FW01	AY858040
3	FW06	AY858041
3	H87	NC_001475
3	D3-Hu-TL018NIID-2005	AB214879
3	D3-Hu-TL029NIID-2005	AB214880
3	D3-Hu-TL109NIID-2005	AB214881
3	D3-Hu-TL129NIID-2005	AB214882
3	InJ_16_82	DQ401690
3	KJ30i	AY858042
3	KJ46	AY858043
3	KJ71	AY858044
3	変異体 BDH02_01	DQ401689
3	変異体 BDH02_03	DQ401691
3	変異体 BDH02_04	DQ401692
3	変異体 BDH02_07	DQ401693
3	変異体 InJ_16_82	DQ401694
3	変異体 PbMH_J1_97	DQ401695
3	PF89-27643	AY744677
3	PF89-320219	AY744678
3	PF90-3050	AY744679
3	PF90-3056	AY744680
3	PF90-6056	AY744681
3	PF92-2956	AY744682
3	PF92-2986	AY744683
3	PH86	AY858045
3	PhMH-J1-97	AY496879
3	PI64	AY858046
3	シンガポール	AY662691
3	シンガポール8120-95	AY766104
3	スレマン-78	AY648961
3	TB16	AY858047
3	TB55i	AY858048
3	ThD3_0007_87	AY676353
3	ThD3_0010_87	AY676353
3	ThD3_0055_93	AY676351

10

20

30

40

【表A-6】

3	ThD3_0104_93	AY676350
3	ThD3_1283_98	AY676349
3	ThD3_1687_98	AY676348
3	PF92-4190	AY744684
3	PF94-136116	AY744685
3	台湾-739079A	AY776329
4	2A	AF375822
4	組換えクローニングDEN4	AF326825
4	2Adel30	AF326826
4	814669	AF326573
4	B5	AF289029
4	rDEN4del30	AF326827
4	H241	AY947539
4	rDEN4	NC_002640
4	シンガポール8976-95	AY762085
4	SW38i	AY858050
4	ThD4_0017_97	AY618989
4	ThD4_0087_77	AY618991
4	ThD4_0348_91	AY618990
4	ThD4_0476_97	AY618988
4	ThD4_0485_01	AY618992
4	ThD4_0734_00	AY618993
4	台湾-2K0713	AY776330
4	未知	M14931

10

20

30

40

50

【0119】

本明細書で提供される弱毒化免疫原性フラビウイルスキメラは、付与される免疫原性の対象となるZIKVの構造タンパク質遺伝子またはその抗原性部分の1つまたは複数、および別のフラビウイルス、例えばデングウイルスの非構造タンパク質遺伝子を含有する。

【0120】

ある特定の態様では、本明細書に記載されるキメラは、デングゲノムのC、prMもしくはEタンパク質（複数可）をコードする構造タンパク質遺伝子（複数可）またはそれらの組み合わせが、保護の対象となるZIKVからの対応する構造タンパク質遺伝子（複数可）で置き換えられる、デングウイルスゲノムを骨格として含有する。結果として生じるキメラウイルスは、デングウイルスでキメラ化されることによって弱毒化の特性を有し、したがってビルレンスが低減されているが、ZIKV構造遺伝子産物の抗原性エピトープを発現し、したがって免疫原性である。

【0121】

本明細書に記載される弱毒化キメラの骨格として、任意のフラビウイルスのゲノムを使用することができる。骨格は、フラビウイルスの弱毒化表現型に寄与する、または製造のために使用される細胞基材（cell substrate）、例えばベロ細胞における複製を促進する変異を含有することができる。変異は、非構造タンパク質、5'非翻訳領域または3'非翻訳領域をコードするヌクレオチド配列にあってもよい。骨格は、弱毒化表現型の安定性を維持し、弱毒化ウイルスまたはキメラがビルレントの野生型ウイルスに戻り得る可能性を低減するために、さらなる変異を含有することもできる。

【0122】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される弱毒化キメラの骨格として、任意のデングウイルスのゲノムを使用することができる。骨格は、デングウイルスの弱毒化表現型に寄与する、または製造のために使用される細胞基材 (cell substrate)、例えばベロ細胞における複製を促進する変異を含有することができる。変異は、非構造タンパク質、5' 非翻訳領域または 3' 非翻訳領域をコードするヌクレオチド配列にあってもよい。骨格は、弱毒化表現型の安定性を維持し、弱毒化ウイルスまたはキメラがビルレントの野生型ウイルスに戻り得る可能性を低減するために、さらなる変異を含有することもできる。

【0123】

図 2 A、3 A、4 A および 5 A を参照すると、アプローチを使用して、デングウイルスの 3' - UTR は様々な保存された配列モチーフを含有する。この領域における様々な配列構成成分の位置は、逆方向番号付けシステムで指定される。これらの配列は、末端ループ 1 (TL-1) を含有するステム - ループ 1 (SL-1) を形成すると予測される、3' 遠位二次構造 (例えば、DEN4 のヌクレオチド 1 ~ 93) を含む。DEN4 のヌクレオチド 117 ~ 183 は、TL-2 を含有するステム - ループ (SL-2) を形成する。DEN4 のヌクレオチド 201 ~ 277 は、TL-3 を一部含有するステム - ループ (SL-3) の対を形成する。SL-2 と近隣の SL-1 および SL-3 の間のヌクレオチド間隔は、デングウイルス血清型の間で異なるが、SL-2 の全体構造は良好に保存されている。さらに、TL-2 を含む露出した 9 ヌクレオチドは、4つ全てのデング血清型内で同一である。それは TL-2 であり、それは、30 変異 (例えば、DEN4 のヌクレオチド 143 ~ 172あたり) によって除去されるステム構造を支持している。これらの 30 ヌクレオチドの除去は、デングウイルス血清型の各々で同一である一次配列および二次構造を有する、新しい予測された構造エレメント (SL-2 30) の形成をもたらす。

10

20

30

【0124】

特に、ヌクレオチド 10478 ~ 10507 の間の DEN4 ゲノムの 3' 非翻訳領域からの 30 ヌクレオチドの欠失 (「30」) である変異は、DEN4 ウィルスの弱毒化をもたらす。したがって、この位置にそのような変異を含有する任意の 4 型デングウイルスのゲノムは、本明細書に記載される弱毒化キメラの骨格として使用することができる。さらに、他のデングウイルス血清型のゲノムの 3' 非翻訳領域に類似した欠失変異を含有する他のデングウイルスゲノムを、本開示のキメラの骨格構造として使用することもできる。例えば、この遺伝子座の変異は、本開示のキメラの骨格構造として、デング 1 型 (DEN1 の 10562 ~ 10591 の間の 30 ヌクレオチドの欠失; DEN1 30)、デング 2 型 (DEN2 トンガ / 74 の 10541 ~ 10570 の間の 30 ヌクレオチドの欠失; DEN2 30)、デング 3 型 (DEN3 スレマン / 78 の 10535 ~ 10565 の間の 30 ヌクレオチドの欠失; DEN3 30)、および / またはデング 4 型 (DEN4 の 10478 ~ 10507 の間の 30 ヌクレオチドの欠失; DEN4 30) のゲノムで使用することができる。30 欠失は、TL-2 相同構造および TL-3 相同構造までの配列を除去し、図 2 B、3 B、4 B および 5 B で見ることができる。

40

【0125】

別の実施形態では、デングゲノムの TL-3 からの 31 ヌクレオチドの欠失 (「31」) である変異は、本発明のキメラの骨格構造を弱毒化する。図 2 C、3 C、4 C および 5 C は、DEN1、DEN2、DEN3 および DEN4 の 31 欠失をそれぞれ図示する。したがって、この遺伝子座にそのような変異を含有する任意の 2 型デングウイルスのゲノムは、本明細書に記載される弱毒化キメラの骨格として使用することができる。さらに、他のデングウイルス血清型のゲノムの TL-3 に類似した欠失変異を含有する他のデングウイルスゲノムを、本開示のキメラの骨格構造として使用することもできる。

50

【0126】

一部の実施形態では、本開示のジカキメラのデング骨格構造は、30 および 31 変異の両方 (すなわち、DEN1 30 / 31、DEN2 30 / 31、DEN3 30 / 31 および / または DEN4 30 / 31) を含む。

50

【0127】

別の実施形態では、86ヌクレオチドの欠失（「86」）である変異は、デングウイルス（例えば、DEN1、DEN2、DEN3および／またはDEN4）のTL-2相同構造およびTL-3相同構造までの配列を除去する。したがって、この遺伝子座にそのような変異を含有する任意の1、2、3および／または4型デングウイルスのゲノムは、本明細書に記載される弱毒化キメラの骨格として使用することができる。図2D、3D、4Dおよび5Dは、DEN1、DEN2、DEN2およびDEN4の86欠失をそれぞれ図示する。

【0128】

特定の実施形態では、ジカキメラは、DEN2 30をキメラの骨格構造として含む。別のある実施形態では、ジカキメラは、DEN4 30をキメラの骨格構造として含む。他の実施形態では、ジカキメラは、DEN3 30／31をキメラの骨格構造として含む。

10

【0129】

様々な実施形態では、本発明のジカキメラは、30、31および86欠失に加えて、参照により本明細書に組み込まれる、PCT出願番号PCT/US2007/076004 (DEVELOPMENT OF DENGUE VIRUS VACCINE COMPONENTS) に記載されるものを含む変異および／または欠失を、3'UTRおよび／または5'UTRに含むことができる。

20

【0130】

上記の変異は、当業者に公知の技術を使用した部位特異的変異誘発によって達成することができる。ビルメントの骨格構造と弱毒化された骨格構造とを識別するために、本明細書に記載される、および当技術分野で周知であるビルレンススクリーニングアッセイを使用することができることが当業者に理解される。PCT出願番号PCT/US2007/076004 (DEVELOPMENT OF DENGUE VIRUS VACCINE COMPONENTS) で議論される変異誘発技術のいずれも企図される。

20

【0131】

ジカフラビウイルスキメラの構築

【0132】

本明細書に記載されるフラビウイルスキメラは、当業者に周知の組換え操作技術を使用して、すなわち、指定されたデングウイルス遺伝子を除去して、それをZIKVの所望の対応する遺伝子で置き換えることによって、免疫が所望されるZIKVの構造タンパク質遺伝子の少なくとも1つをデングウイルスゲノム骨格に置換することによって生成することができる。あるいは、GenBankに提供される配列を使用して、公知の核酸合成技術を使用して、フラビウイルスタンパク質をコードする核酸分子を合成して、適当なベクターに挿入することができる。したがって、弱毒化免疫原性ウイルスは、当業者に公知の組換え操作技術を使用して生成される。

30

【0133】

上で言及した通り、骨格に挿入される遺伝子は、ZIKV構造タンパク質をコードする。好ましくは、挿入されるZIKV遺伝子は、Cタンパク質、prMタンパク質および／またはEタンパク質をコードする遺伝子である。デングウイルス骨格に挿入される配列は、prMおよびE構造タンパク質の両方をコードすることができる。デングウイルス骨格に挿入される配列は、C、prMおよびE構造タンパク質をコードすることができる。デングウイルス骨格は、DEN1、DEN2、DEN3もしくはDEN4ウイルスゲノムであるか、またはこれらの血清型のいずれかの弱毒化デングウイルスゲノムであり、ZIKVのC、prMおよび／もしくはE構造タンパク質をコードする置換された遺伝子（複数可）、またはZIKVのprMおよび／もしくはE構造タンパク質をコードする置換された遺伝子（複数可）を含む。

40

【0134】

ZIKVの構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する、適するキメラウイルスまたは核酸キメラは、免疫原性の保持を伴ってビルレンスの低減を示す弱毒化の表現型マーカーについてそれらをスクリーニングすることにより、ワクチンとしての有用性

50

について評価することができる。抗原性および免疫原性は、当業者に公知である慣例的なスクリーニング法を使用して、ジカ抗体または免疫反応性血清との *in vitro* または *in vivo* 反応性を使用して評価することができる。

【0135】

　　ラビウイルスワクチン

【0136】

好ましいキメラウイルスおよび核酸キメラは、免疫原またはワクチンとして有用である弱毒化された生ウイルスを提供する。好ましい実施形態では、キメラは、危険な病原性または致死性の影響を同時に及ぼさずに高い免疫原性を示す。

【0137】

本発明のキメラウイルスまたは核酸キメラは、野生型または弱毒化デングウイルス骨格に ZIKV の構造遺伝子を含むことができる。例えば、キメラは、デングウイルスまたは弱毒化デングウイルスバックグラウンドで ZIKV の構造タンパク質遺伝子を発現することができる。

【0138】

デングウイルスゲノムの非構造領域を含有する遺伝子バックグラウンドを使用する、本明細書に記載の戦略、および、キメラ化によって、ZIKV の構造タンパク質遺伝子を発現する弱毒化の特性は、所望の免疫原性の構造タンパク質遺伝子を発現する弱毒化された生ラビウイルスワクチン候補の開発につながった。したがって、ZIKV 病原体の制御のためのワクチン候補を、設計することができる。

【0139】

本明細書に記載されるキメラで使用されるウイルスは、当技術分野で公知の技術を使用して一般的に増殖させる。ウイルスプラークまたはフォーカス形成単位 (FFU) 滴定を次に実行し、プラークまたは FFU を数えて、細胞培養物で増殖させたウイルスの生存度、力価および表現型特性を評価する。弱毒化候補出発材料を誘導するために、野生型ウイルスを変異誘発させる。

【0140】

キメラの感染性クローンは、様々なラビウイルス株から構築される。所望により、ウイルス特異的 cDNA 断片のクローニングを達成することもできる。構造タンパク質または非構造タンパク質遺伝子を含有する cDNA 断片を、様々なプライマーでラビウイルス RNA から逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT - PCR) によって増幅させる。増幅させた断片は、他の中間クローンの切断部位にクローニングする。挿入されたラビウイルス特異的 cDNA の配列を検証するために、中間のキメララビウイルスクローンを次に配列決定する。

【0141】

ラビウイルスの構造または非構造タンパク質遺伝子領域をベクターに挿入することによって構築される完全ゲノム長キメラプラスミドは、当業者に周知の組換え技術を使用して入手できる。

【0142】

多価および五価のラビウイルスキメラワクチン

【0143】

本開示は、ワクチンとして使用するためのジカおよびジカキメラウイルスに、ならびに前記ワクチンそれ自体に関するだけでなく、少なくとも 2 つの異なるワクチンの組み合わせを含む多価ワクチンにも関し、ここで、少なくとも 1 つのワクチンは ZIKV に対するワクチンである。言い換えると、本開示は、1 つまたは複数のジカワクチン（例えば、弱毒化 ZIKV、キメラ弱毒化 ZIKV またはその両方）を他の病原体に対する 1 つまたは複数のさらなるワクチンと組み合わせることを企図する。ある特定の実施形態では、1 つまたは複数のさらなるワクチンは、ラビウイルスワクチンである。1 つまたは複数のさらなるワクチンは、任意のラビウイルスワクチン、例えばこれらに限定されないがデングワクチン (DEN1、DEN2、DEN3、DEN4 またはそれらの組み合わせ) に対す

10

20

30

40

50

る)、黄熱病ウイルスワクチン、JEVワクチン、TBEVワクチン、西ナイルウイルスワクチンまたはそれらの組み合わせから選択することができる。

【0144】

ある特定の実施形態では、多価ワクチンは以下を含む：

【0145】

(a) 1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのさらなるフラビウイルスワクチンと組み合わせた、1つまたは複数のジカワクチン(例えば、弱毒化ZIKVまたはキメラ弱毒化ZIKV)；

【0146】

(b) 1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのさらなるデングワクチン(DEN1、DEN2、DEN3、DEN4、それらのキメラまたはそれらの組み合わせに対する)と組み合わせた、1つまたは複数のジカワクチン(例えば、弱毒化ZIKVまたはキメラ弱毒化ZIKV)；

【0147】

(c) DEN1、DEN2、DEN3もしくはDEN4ウイルス、またはそれらのキメラ、またはそれらの組み合わせの少なくとも1つを各々含む1つまたは複数のデングウイルスワクチンと組み合わせた、キメラ弱毒化ZIKVワクチン；ならびに

【0148】

(d) DEN1ウイルスワクチン、DEN2ウイルスワクチン、DEN3ウイルスワクチンおよびDEN4ウイルスワクチン、またはそれらのキメラと組み合わせた、すなわち五価のワクチンとなるキメラ弱毒化ZIKVワクチン。

【0149】

多価および/または五価のワクチンに関する任意の実施形態では、1つまたは複数のさらなるフラビウイルスワクチンは、3'UTRにおける欠失および/または変異を含む1つまたは複数の弱毒化変異、例えば30、30/31および86弱毒化変異を含む、フラビウイルスを含むことができる。

【0150】

本明細書は、弱毒化ZIKVまたはジカキメラを用いて安全、有効かつ経済的な多価フラビウイルスワクチン(例えば、二価、三価、四価または五価の)に製剤化することができる、型特異的な弱毒化された生フラビウイルスワクチン構成成分(例えば、デングウイルス)のセットを提供する。30変異は、アカゲザルでDEN2およびDEN4を弱毒化する。30変異は、デングウイルス血清型1、2、3および4の各々において相同構造(TL-2)を除去する(図2B、3B、4Bおよび5B)。しかし、30変異は、アカゲザルにおけるDEN2およびDEN4と同じ程度にDEN3を弱毒化しないことが見出された。対照的に、30変異は、DEN2およびDEN4よりも大きな程度までDEN1を弱毒化することが見出された。

【0151】

ある特定の実施形態では、本記載は、弱毒化をもたらす1つまたは複数の変異を有するフラビウイルス(例えば、デングウイルス)およびキメラフラビウイルス(例えば、デングウイルス)、そのようなデングウイルスを作製する方法、ならびにフラビウイルス感染(例えば、デングウイルス感染)を予防または処置するためにこれらのフラビウイルスを使用するための方法を提供する。本発明のデングウイルス中の変異(複数可)は、弱毒化の決定で役割を示されている、ウイルスRNAの最も下流の概ね384ヌクレオチドによって形成される3'非翻訳領域(3'-UTR)に存在する。以下の通り、本発明のウイルスおよび方法はさらに記載される。遺伝的に安定した弱毒化された生の多価(例えば、五価)ジカ、フラビウイルスウイルス免疫原性組成物またはワクチンを開発するために、分子アプローチが使用される。多価の免疫原性組成物は、フラビウイルスに対して免疫原性である少なくとも1つの第1の弱毒化ウイルスおよびZIKVに対して免疫原性である第2の弱毒化ウイルスを含む。特定の実施形態では、第1の弱毒化ウイルスは、デングウイルス(例えば、DEN1、DEN2、DEN3、DEN4またはそれらの組

10

20

30

40

50

み合わせ)、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスまたはこれらの組合せからなる群より選択されるウイルスに対して免疫原性である。別の実施形態では、第2の弱毒化ウイルスは、本開示によるジカ核酸キメラである。別の特定の実施形態では、第2の弱毒化ウイルスは、ゲノムに1つまたは複数の弱毒化変異を含むZIKVである。多価ワクチンの各構成成分は、弱毒化され、遺伝的に安定し、免疫原性でなければならない。

【0152】

例えは、五価のワクチンの各構成成分、例えは、DEN1、DEN2、DEN3、DEN4およびZIKVは、弱毒化され、遺伝的に安定し、免疫原性でなければならない。五価のワクチンは、4つのデングウイルスの各々に対する同時保護を確実にし、それによつて、異型野生型デングウイルスによる二次感染の間にヒトで起こる、より重大な疾病であるデング出血熱/デングショック症候群(DHF/DSS)を起こす可能性を排除する。デングウイルスは天然で遺伝子組換えを起こすことがあるので、五価のワクチンは、弱毒化変異を欠いているウイルスの生成につながるかもしれないその5つのウイルス構成成分の間で組換え事象を起こすことが遺伝的にできない。四価のデングウイルスワクチンを開発する以前のアプローチは、異種宿主に由来する組織培養細胞での継代などの、別個の変異促進手順によって4つのウイルス構成成分の各々を独立して導くことに基づいた。この戦略は、弱毒化ワクチン候補を以前にもたらした。しかし、これらの独立して導かれた四価のワクチンの4つの構成成分の間の遺伝子交換(gene exchange)がワクチン被接種者において起こるかもしれない、おそらくビルレントの組換えウイルスを生成する可能性がある。三価ポリオウイルスワクチンの投与の後に、ワクチン被接種者において組換えに由来するビルレントのポリオウイルスが生成されたことがある。

10

20

30

30

40

50

【0153】

ある特定の態様では、本開示は、(1)本開示による弱毒化ジカキメラ、rDEN4₃₀、ならびにrDEN1₃₀、rDEN2₃₀およびrDEN3₃₀組換えウイルス(rDEN4₃₀組換えウイルスのものに相同意である3'非翻訳領域(UTR)の部分に30ヌクレオチド欠失(30)を含有する);(2)本開示による弱毒化核酸ジカキメラ、rDEN1₃₀、rDEN2₃₀、rDEN3₃₀およびrDEN4₃₀;(3)弱毒化抗原性キメラウイルス、rDEN1/4₃₀、rDEN2/4₃₀およびrDEN3/4₃₀(rDEN4₃₀のCME、MEまたはE遺伝子領域がDEN1、DEN2またはDEN3に由来するもので置き換えられた)、rDEN4₃₀ならびにジカキメラ;あるいはrDEN1/3₃₀、rDEN2/3₃₀およびrDEN4/3₃₀(rDEN3₃₀のCME、MEまたはE遺伝子領域がDEN1、2または4に由来するもので置き換えられた)、rDEN3₃₀ならびにジカキメラ;あるいはrDEN1/2₃₀、rDEN3/2₃₀およびrDEN4/2₃₀(rDEN2₃₀のCME、MEまたはE遺伝子領域がDEN1、3または4に由来するもので置き換えられた)、rDEN2₃₀ならびにジカキメラ;ならびにあるいはrDEN2/1₃₀、rDEN3/1₃₀およびrDEN4/1₃₀(rDEN1₃₀のCME、MEまたはE遺伝子領域がDEN2、3または4に由来するもので置き換えられた)、rDEN1₃₀およびジカキメラ;ならびに(4)弱毒化rDEN1/4₃₀、rDEN2/4₃₀、rDEN3/4₃₀、rDEN4₃₀およびジカキメラ;あるいは、rDEN1/3₃₀、rDEN2/3₃₀、rDEN4/3₃₀、rDEN3₃₀およびジカキメラ;あるいは、rDEN1/2₃₀、rDEN3/2₃₀、rDEN4/2₃₀、rDEN2₃₀およびジカキメラ;ならびに、あるいはrDEN2/1₃₀、rDEN3/1₃₀、rDEN4/1₃₀、rDEN1₃₀およびジカキメラを含むことができる五価のワクチンを提供する。ワクチンの各構成成分は同じ30弱毒化欠失変異を有するので、それらはワクチン被接種者においてビルレントの野生株ウイルスを生成する可能性を排除する共有される弱毒化変異を含有するので、これらの五価のワクチンは独特なものである。さらに、rDEN1₃₀、rDEN2₃₀、rDEN3₃₀、rDEN4₃₀、ジカキメラ五価ワクチンは、30変

異の安定性を広い抗原性と組み合わせた最初のものである。あるいは、同じスキームを利用して、3'UTRの31、30/31または86の欠失は、上記のキメラスキームで、またはDEN1、DEN2、DEN3、DEN4およびジカキメラの中で利用することができる。30、31、30/31および86欠失変異は各ウイルスの3'UTRにあるので、5つの構成成分ウイルスのタンパク質の全ては防御免疫応答を誘導するのに利用可能である。したがって、本方法は、DEN1、DEN2、DEN3、DEN4およびジカキメラウイルスのタンパク質の各々を、各デングウイルス血清型およびZIKVに存在する構造および非構造タンパク質の全てに対して体液性および細胞性免疫応答を誘導する、5つのウイルスのタンパク質の各々の完全な能力を保存する状態に維持する弱毒化機構を提供する。

10

【0154】

前述の通り、DEN4組換えウイルス、rDEN4 30（以前には2A 30と呼ばれた）は、ウイルスゲノムの3'UTRに30ヌクレオチドの欠失を含有するように操作された（Durbin, A. P.ら、2001年、Am J Trop Med Hyg 65巻：405～13頁；Men, R.ら、1996年、J Virol 70巻：3930～7頁）。アカゲザルでの評価は、野生型の親のウイルスと比較してこのウイルスは有意に弱毒化されるが、高度に免疫原性および完全に保護的であることを示した。また、成体ヒトボランティアでのフェーズI臨床試験は、rDEN4 30組換えウイルスが安全であり、十分に免疫原性であることを示した（Durbin, A. P.ら、2001年、Am J Trop Med Hyg 65巻：405～13頁）。非翻訳領域に共有される弱毒化変異を有する五価のワクチンを開発するために、それがアカゲザルで野生型DEN4ウイルスを弱毒化し、ヒトに安全であったので、血清型1、2および3の野生型デングウイルスを弱毒化するために30、31、30/31または86欠失を使用することができる。米国特許出願公開第2007/0009552号。

20

【0155】

一態様によれば、本開示は、デング血清型1（DEN1）に対して免疫原性である第1の弱毒化ウイルス、デング血清型2（DEN2）に対して免疫原性である第2の弱毒化ウイルス、デング血清型3（DEN3）に対して免疫原性である第3の弱毒化ウイルス、デング血清型4（DEN4）に対して免疫原性である第4の弱毒化ウイルス、およびZIKVに対して免疫原性である第5の弱毒化ウイルスを含む五価の免疫原性組成物を提供する。特定の実施形態では、第5の弱毒化ウイルスは、本開示によるジカ核酸キメラである。

30

【0156】

ある実施形態では、第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスは、(1)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3 30、rDEN4 30、(2)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3 30、rDEN4/1 30、(3)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3 30、rDEN4/2 30、(4)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3 30、rDEN4/3 30、(5)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3 30、rDEN4/1 30、(6)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/1 30、rDEN4 30、(7)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/1 30、rDEN4/2 30、(8)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/1 30、rDEN4/3 30、(9)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/2 30、rDEN4 30、(10)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/2 30、rDEN4/1 30、(11)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/2 30、rDEN4/2 30、(12)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/2 30、rDEN4/3 30、(13)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/4 30、rDEN4 30、(14)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/4 30、rDEN4/1 30、(15)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/4 30、rDEN4/2 30、(16)rDEN1 30、rDEN2 30、rDEN3/4 30、rDEN4/3 30、(17)rDEN

40

50


```

    ( 1 0 5 ) r D E N 1 / 2   3 0、 r D E N 2 / 3   3 0、 r D E N 3 / 2   3 0、 r
D E N 4   3 0、 ( 1 0 6 ) r D E N 1 / 2   3 0、 r D E N 2 / 3   3 0、 r D E N 3
/ 2   3 0、 r D E N 4 / 1   3 0、 ( 1 0 7 ) r D E N 1 / 2   3 0、 r D E N 2 / 3
   3 0、 r D E N 3 / 2   3 0、 r D E N 4 / 2   3 0、 ( 1 0 8 ) r D E N 1 / 2   3
0、 r D E N 2 / 3   3 0、 r D E N 3 / 2   3 0、 r D E N 4 / 3   3 0、 ( 1 0 9 )
r D E N 1 / 2   3 0、 r D E N 2 / 3   3 0、 r D E N 3 / 4   3 0、 r D E N 4   3
0、 ( 1 1 0 ) r D E N 1 / 2   3 0、 r D E N 2 / 3   3 0、 r D E N 3 / 4   3 0、
r D E N 4 / 1   3 0、 ( 1 1 1 ) r D E N 1 / 2   3 0、 r D E N 2 / 3   3 0、 r D
E N 3 / 4   3 0、 r D E N 4 / 2   3 0、 ( 1 1 2 ) r D E N 1 / 2   3 0、 r D E N
2 / 3   3 0、 r D E N 3 / 4   3 0、 r D E N 4 / 3   3 0、 ( 1 1 3 ) r D E N 1 /
2

```

D E N 3 3 0、r D E N 4 3 0、(1 4 6) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1
 3 0、r D E N 3 3 0、r D E N 4 / 1 3 0、(1 4 7) r D E N 1 / 3 3 0、
 r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 3 0、r D E N 4 / 2 3 0、(1 4 8) r D E N
 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 3 0、r D E N 4 / 3 3 0、(1
 4 9) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 / 1 3 0、r D E N
 4 3 0、(1 5 0) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 / 1
 3 0、r D E N 4 / 1 3 0、(1 5 1) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0
 、r D E N 3 / 1 3 0、r D E N 4 / 2 3 0、(1 5 2) r D E N 1 / 3 3 0、r
 D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 / 1 3 0、r D E N 4 / 3 3 0、(1 5 3) r D E
 N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 / 2 3 0、r D E N 4 3 0、(10
 1 5 4) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 / 2 3 0、r D E
 N 4 / 1 3 0、(1 5 5) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3
 / 2 3 0、r D E N 4 / 2 3 0、(1 5 6) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1
 3 0、r D E N 3 / 2 3 0、r D E N 4 / 3 3 0、(1 5 7) r D E N 1 / 3 3
 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 / 4 3 0、r D E N 4 3 0、(1 5 8) r D
 E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 / 4 3 0、r D E N 4 / 1 3
 0、(1 5 9) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D E N 3 / 4 3 0
 、r D E N 4 / 2 3 0、(1 6 0) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 1 3 0、r D
 E N 3 / 4 3 0、r D E N 4 / 3 3 0、(1 6 1) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N
 2 / 3 3 0、r D E N 3 3 0、r D E N 4 3 0、(1 6 2) r D E N 1 / 3 3 0
 、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 3 0、r D E N 4 / 1 3 0、(1 6 3) r D E
 N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 3 0、r D E N 4 / 2 3 0、(20
 1 6 4) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 3 0、r D E N 4
 / 3 3 0、(1 6 5) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 / 1
 3 0、r D E N 4 3 0、(1 6 6) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0
 、r D E N 3 / 1 3 0、r D E N 4 / 1 3 0、(1 6 7) r D E N 1 / 3 3 0、r D
 E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 / 1 3 0、r D E N 4 / 2 3 0、(1 6 8) r D E
 N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 / 1 3 0、r D E N 4 / 3 3 0
 、(1 6 9) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 / 2 3 0、r D
 E N 4 3 0、(1 7 0) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 /
 2 3 0、r D E N 4 / 1 3 0、(1 7 1) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3
 3 0、r D E N 3 / 2 3 0、r D E N 4 / 2 3 0、(1 7 2) r D E N 1 / 3 3 0
 、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 / 2 3 0、r D E N 4 / 3 3 0、(1 7 3) r
 D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 / 4 3 0、r D E N 4 3 0
 、(1 7 4) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0、r D E N 3 / 4 3 0、r
 D E N 4 / 1 3 0、(1 7 5) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 3 3 0、r D E
 N 3 / 4 3 0、r D E N 4 / 2 3 0、(1 7 6) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2
 / 3 3 0、r D E N 3 / 4 3 0、r D E N 4 / 3 3 0、(1 7 7) r D E N 1 / 3
 3 0、r D E N 2 / 4 3 0、r D E N 3 3 0、r D E N 4 3 0、(1 7 8) r D
 E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 4 3 0、r D E N 3 3 0、r D E N 4 / 1 3 0、
 (1 7 9) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 4 3 0、r D E N 3 3 0、r D E
 N 4 / 2 3 0、(1 8 0) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 4 3 0、r D E N 3
 3 0、r D E N 4 / 3 3 0、(1 8 1) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 4 3 0
 、r D E N 3 / 1 3 0、r D E N 4 3 0、(1 8 2) r D E N 1 / 3 3 0、r D E
 N 2 / 4 3 0、r D E N 3 / 1 3 0、r D E N 4 / 1 3 0、(1 8 3) r D E N 1
 / 3 3 0、r D E N 2 / 4 3 0、r D E N 3 / 1 3 0、r D E N 4 / 2 3 0、(40
 1 8 4) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 4 3 0、r D E N 3 / 1 3 0、r D E
 N 4 / 3 3 0、(1 8 5) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 4 3 0、r D E N 3
 / 2 3 0、r D E N 4 3 0、(1 8 6) r D E N 1 / 3 3 0、r D E N 2 / 4 3
 0、r D E N 3 / 2 3 0、r D E N 4 / 1 3 0、(1 8 7) r D E N 1 / 3 3 0、
 50

28) rDEN1/4 30、rDEN2/3 30、rDEN3 30、rDEN4 /
 3 30、(229)rDEN1/4 30、rDEN2/3 30、rDEN3 / 1
 30、rDEN4 30、(230)rDEN1/4 30、rDEN2/3 30、r
 DEN3 / 1 30、rDEN4 / 1 30、(231)rDEN1/4 30、rDE
 N2 / 3 30、rDEN3 / 1 30、rDEN4 / 2 30、(232)rDEN1
 / 4 30、rDEN2 / 3 30、rDEN3 / 1 30、rDEN4 / 3 30、(2
 33)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 3 30、rDEN3 / 2 30、rDE
 N4 30、(234)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 3 30、rDEN3 / 2
 30、rDEN4 / 1 30、(235)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 3 3
 0、rDEN3 / 2 30、rDEN4 / 2 30、(236)rDEN1 / 4 30、
 10 rDEN2 / 3 30、rDEN3 / 2 30、rDEN4 / 3 30、(237)rD
 EN1 / 4 30、rDEN2 / 3 30、rDEN3 / 4 30、rDEN4 30、
 (238)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 3 30、rDEN3 / 4 30、rD
 EN4 / 1 30、(239)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 3 30、rDEN
 3 / 4 30、rDEN4 / 2 30、(240)rDEN1 / 4 30、rDEN2 /
 3 30、rDEN3 / 4 30、rDEN4 / 3 30、(241)rDEN1 / 4
 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 30、rDEN4 30、(242)rDE
 N1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 30、rDEN4 / 1 30、(2
 43)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 30、rDEN4
 / 2 30、(244)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 3
 0、rDEN4 / 3 30、(245)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、
 rDEN3 / 1 30、rDEN4 30、(246)rDEN1 / 4 30、rDEN
 2 / 4 30、rDEN3 / 1 30、rDEN4 / 1 30、(247)rDEN1 /
 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 / 1 30、rDEN4 / 2 30、(2
 48)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 / 1 30、rDEN
 4 / 3 30、(249)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 /
 2 30、rDEN4 30、(250)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、
 rDEN3 / 2 30、rDEN4 / 1 30、(251)rDEN1 / 4 30、r
 DEN2 / 4 30、rDEN3 / 2 30、rDEN4 / 2 30、(252)rDE
 N1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 / 2 30、rDEN4 / 3 30
 30、(253)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 / 4 30、r
 DEN4 30、(254)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3
 / 4 30、rDEN4 / 1 30、(255)rDEN1 / 4 30、rDEN2 / 4
 30、rDEN3 / 4 30、rDEN4 / 2 30、および(256)rDEN1 /
 4 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 / 4 30、rDEN4 / 3 30からな
 る群から選択される。別の実施形態では、上記の第1、第2、第3および第4の弱毒化ウ
 イルスの組み合わせのいずれかの五価の免疫原性組成物の第5の弱毒化ウイルスは、上で
 より詳細に記載されるように本開示のジカキメラである。一実施形態では、弱毒化ウイル
 スの各々は、同じデング骨格を含む。別の実施形態では、第5の弱毒化ウイルスは、第1
 、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスと異なるデングウイルス骨格を含む。
 40

【0157】

ある実施形態では、第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスは、(1)rDEN
 1 31、rDEN2 31、rDEN3 31、rDEN4 31、(2)rDEN1
 31、rDEN2 31、rDEN3 31、rDEN4 / 1 31、(3)rDEN
 1 31、rDEN2 31、rDEN3 31、rDEN4 / 2 31、(4)rDE
 N1 31、rDEN2 31、rDEN3 31、rDEN4 / 3 31、(5)rD
 EN1 31、rDEN2 31、rDEN3 / 1 31、rDEN4 31、(6)r
 DEN1 31、rDEN2 31、rDEN3 / 1 31、rDEN4 / 1 31、(7)r
 DEN1 31、rDEN2 31、rDEN3 / 1 31、rDEN4 / 2 3
 1、(8)rDEN1 31、rDEN2 31、rDEN3 / 1 31、rDEN4 /
 50

3 3 1、(9) rDEN1 3 1、rDEN2 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDE
 N4 3 1、(10) rDEN1 3 1、rDEN2 3 1、rDEN3 / 2 3 1、r
 DEN4 / 1 3 1、(11) rDEN1 3 1、rDEN2 3 1、rDEN3 / 2
 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(12) rDEN1 3 1、rDEN2 3 1、rDEN
 3 / 2 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(13) rDEN1 3 1、rDEN2 3 1、
 rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 3 1、(14) rDEN1 3 1、rDEN2 3
 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(15) rDEN1 3 1、rDE
 N2 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(16) rDEN1 3 1
 、rDEN2 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(17) rDEN
 1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 3 1、(18) rD 10
 EN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(1
 9) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 2 3
 1、(20) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4
 / 3 3 1、(21) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 1 3 1
 、rDEN4 3 1、(22) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 1
 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(23) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、
 rDEN3 / 1 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(24) rDEN1 3 1、rDEN2
 / 1 3 1、rDEN3 / 1 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(25) rDEN1 3 1
 、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 3 1、(26) rDEN
 1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(2 20
 7) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 / 2
 3 1、(28) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 2 3 1、r
 DEN4 / 3 3 1、(29) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 /
 4 3 1、rDEN4 3 1、(30) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rD
 EN3 / 4 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(31) rDEN1 3 1、rDEN2 / 1
 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(32) rDEN1 3 1、r
 DEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(33) rDEN
 1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 3 1、(3 30
 5) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 2 3
 1、(36) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4
 / 3 3 1、(37) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 1 3 1
 、rDEN4 3 1、(38) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 /
 1 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(39) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、
 rDEN3 / 1 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(40) rDEN1 3 1、rDEN2
 / 3 3 1、rDEN3 / 1 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(41) rDEN1 3 1
 、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 3 1、(42) rDEN
 1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(4
 3) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 / 2
 3 1、(44) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 2 3 1、r 40
 DEN4 / 3 3 1、(45) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 /
 4 3 1、rDEN4 3 1、(46) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rD
 EN3 / 4 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(47) rDEN1 3 1、rDEN2 / 3
 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(48) rDEN1 3 1、r
 DEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(49) rDEN
 1 3 1、rDEN2 / 4 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 3 1、(50) rD
 EN1 3 1、rDEN2 / 4 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(5
 1) rDEN1 3 1、rDEN2 / 4 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 2 3
 1、(52) rDEN1 3 1、rDEN2 / 4 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4
 / 3 3 1、(53) rDEN1 3 1、rDEN2 / 4 3 1、rDEN3 / 1 3 1 50

, rDEN4 31, (54) rDEN1 31, rDEN2/4 31, rDEN3/1
 31, rDEN4/1 31, (55) rDEN1 31, rDEN2/4 31,
 rDEN3/1 31, rDEN4/2 31, (56) rDEN1 31, rDEN2
 /4 31, rDEN3/1 31, rDEN4/3 31, (57) rDEN1 31
 , rDEN2/4 31, rDEN3/2 31, rDEN4 31, (58) rDEN
 1 31, rDEN2/4 31, rDEN3/2 31, rDEN4/1 31, (5
 9) rDEN1 31, rDEN2/4 31, rDEN3/2 31, rDEN4/2
 31, (60) rDEN1 31, rDEN2/4 31, rDEN3/2 31, r
 DEN4/3 31, (61) rDEN1 31, rDEN2/4 31, rDEN3/
 4 31, rDEN4 31, (62) rDEN1 31, rDEN2/4 31, r
 DEN3/4 31, rDEN4/1 31, (63) rDEN1 31, rDEN2/4
 31, rDEN3/4 31, rDEN4/2 31, (64) rDEN1 31, r
 DEN2/4 31, rDEN3/4 31, rDEN4/3 31, (65) rDEN
 1/2 31, rDEN2 31, rDEN3 31, rDEN4 31, (66) rD
 EN1/2 31, rDEN2 31, rDEN3 31, rDEN4/1 31, (6
 7) rDEN1/2 31, rDEN2 31, rDEN3 31, rDEN4/2 3
 1, (68) rDEN1/2 31, rDEN2 31, rDEN3 31, rDEN4
 /3 31, (69) rDEN1/2 31, rDEN2 31, rDEN3/1 31
 , rDEN4 31, (70) rDEN1/2 31, rDEN2 31, rDEN3/
 1 31, rDEN4/1 31, (71) rDEN1/2 31, rDEN2 31,
 rDEN3/1 31, rDEN4/2 31, (72) rDEN1/2 31, rDE
 N2 31, rDEN3/1 31, rDEN4/3 31, (73) rDEN1/2
 31, rDEN2 31, rDEN3/2 31, rDEN4 31, (74) rDEN
 1/2 31, rDEN2 31, rDEN3/2 31, rDEN4/1 31, (7
 5) rDEN1/2 31, rDEN2 31, rDEN3/2 31, rDEN4/2
 31, (76) rDEN1/2 31, rDEN2 31, rDEN3/2 31, r
 DEN4/3 31, (77) rDEN1/2 31, rDEN2 31, rDEN3/
 4 31, rDEN4 31, (78) rDEN1/2 31, rDEN2 31, rD
 EN3/4 31, rDEN4/1 31, (79) rDEN1/2 31, rDEN2
 31, rDEN3/4 31, rDEN4/2 31, (80) rDEN1/2 31
 , rDEN2 31, rDEN3/4 31, rDEN4/3 31, (81) rDEN
 1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN3 31, rDEN4 31, (82)
 rDEN1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN3 31, rDEN4/1 3
 1, (83) rDEN1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN3 31, rDE
 N4/2 31, (84) rDEN1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN3
 31, rDEN4/3 31, (85) rDEN1/2 31, rDEN2/1 31,
 rDEN3/1 31, rDEN4 31, (86) rDEN1/2 31, rDEN2
 /1 31, rDEN3/1 31, rDEN4/1 31, (87) rDEN1/2
 31, rDEN2/1 31, rDEN3/1 31, rDEN4/2 31, (88)
 rDEN1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN3/1 31, rDEN4/3
 31, (89) rDEN1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN3/2 31
 , rDEN4 31, (90) rDEN1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN
 3/2 31, rDEN4/1 31, (91) rDEN1/2 31, rDEN2/1
 31, rDEN3/2 31, rDEN4/2 31, (92) rDEN1/2 31
 , rDEN2/1 31, rDEN3/2 31, rDEN4/3 31, (93) rD
 EN1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN3/4 31, rDEN4 31,
 (94) rDEN1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN3/4 31, rDE
 N4/1 31, (95) rDEN1/2 31, rDEN2/1 31, rDEN3/
 4 31, rDEN4/2 31, (96) rDEN1/2 31, rDEN2/1 3
 1, rDEN3/4 31, rDEN4/3 31, (97) rDEN1/2 31, r

10

20

30

40

50

D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 3 1、(9 8) r D E N 1 / 2
 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(9 9) r D
 E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、
 (1 0 0) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 3 1、r D E
 N 4 / 3 3 1、(1 0 1) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 /
 1 3 1、r D E N 4 3 1、(1 0 2) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、
 r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 0 3) r D E N 1 / 2 3 1、r
 D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1 0 4) r D E
 N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 3 3 1
 、(1 0 5) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r 10
 D E N 4 3 1、(1 0 6) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3
 / 2 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 0 7) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3
 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1 0 8) r D E N 1 / 2 3
 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(1 0 9)
 r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 3
 1、(1 1 0) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、
 r D E N 4 / 1 3 1、(1 1 1) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 3 3 1、r D
 E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1 1 2) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N
 2 / 3 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(1 1 3) r D E N 1 /
 2 20

3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 3 1、(1 1 4) r D
 E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、
 (1 1 5) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 3 1、r D E
 N 4 / 2 3 1、(1 1 6) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3
 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(1 1 7) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1
 、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 3 1、(1 1 8) r D E N 1 / 2 3 1、r D E
 N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 1 9) r D E N 1
 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1
 2 0) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E 30
 N 4 / 3 3 1、(1 2 1) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3
 / 2 3 1、r D E N 4 3 1、(1 2 2) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3
 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 2 3) r D E N 1 / 2 3 1、
 r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1 2 4) r D
 E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 3 3
 1、(1 2 5) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、
 r D E N 4 3 1、(1 2 6) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N
 3 / 4 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 2 7) r D E N 1 / 2 3 1、r D E N 2 /
 4 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1 2 8) r D E N 1 / 2
 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(1 2 9) 40
) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 3 1、
 (1 3 0) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 / 1
 3 1、(1 3 1) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 3 1、r D
 E N 4 / 2 3 1、(1 3 2) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3
 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(1 3 3) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 3 1、r
 D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 3 1、(1 3 4) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2
 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 3 5) r D E N 1 / 3 3
 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1 3 6) r D
 E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、
 (1 3 7) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 50

4 3 1、(1 3 8) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 3 1、rDEN3 / 2 3 1
 、rDEN4 / 1 3 1、(1 3 9) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 3 1、rDEN
 N3 / 2 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(1 4 0) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2
 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(1 4 1) rDEN1 / 3 3
 1、rDEN2 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 3 1、(1 4 2) rDEN
 1 / 3 3 1、rDEN2 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(1
 4 3) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 /
 2 3 1、(1 4 4) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 3 1、rDEN3 / 4 3 1
 、rDEN4 / 3 3 1、(1 4 5) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、r
 DEN3 3 1、rDEN4 3 1、(1 4 6) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1
 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(1 4 7) rDEN1 / 3 3 1、
 rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(1 4 8) rDEN
 1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(1
 4 9) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 1 3 1、rDEN
 4 3 1、(1 5 0) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 1
 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(1 5 1) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1
 、rDEN3 / 1 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(1 5 2) rDEN1 / 3 3 1、r
 DEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 1 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(1 5 3) rDEN
 N1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 3 1、(1
 5 4) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN
 N4 / 1 3 1、(1 5 5) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3
 / 2 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(1 5 6) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1
 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(1 5 7) rDEN1 / 3 3
 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 3 1、(1 5 8) rDEN
 1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 1 3
 1、(1 5 9) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN3 / 4 3 1
 、rDEN4 / 2 3 1、(1 6 0) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 1 3 1、rDEN
 3 / 4 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(1 6 1) rDEN1 / 3 3 1、rDEN
 2 / 3 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 3 1、(1 6 2) rDEN1 / 3 3 1
 、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(1 6 3) rDEN
 N1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(1
 6 4) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4
 / 3 3 1、(1 6 5) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 1
 3 1、rDEN4 3 1、(1 6 6) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1
 、rDEN3 / 1 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(1 6 7) rDEN1 / 3 3 1、rDEN
 2 / 3 3 1、rDEN3 / 1 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(1 6 8) rDEN
 1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 1 3 1、rDEN4 / 3 3 1
 、(1 6 9) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN
 4 3 1、(1 7 0) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 /
 2 3 1、rDEN4 / 1 3 1、(1 7 1) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 3
 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(1 7 2) rDEN1 / 3 3 1
 、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 2 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(1 7 3) rDEN
 1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 3 1
 、(1 7 4) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN
 4 / 1 3 1、(1 7 5) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 3 3 1、rDEN
 N3 / 4 3 1、rDEN4 / 2 3 1、(1 7 6) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2
 / 3 3 1、rDEN3 / 4 3 1、rDEN4 / 3 3 1、(1 7 7) rDEN1 / 3
 3 1、rDEN2 / 4 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 3 1、(1 7 8) rDEN
 1 / 3 3 1、rDEN2 / 4 3 1、rDEN3 3 1、rDEN4 / 1 3 1
 、(1 7 9) rDEN1 / 3 3 1、rDEN2 / 4 3 1、rDEN3 3 1、rDEN

10

20

30

40

50

4 / 2 3 1、(1 8 0) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3
 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(1 8 1) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 / 4 3 1
 、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 3 1、(1 8 2) r D E N 1 / 3 3 1、r D E
 N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 8 3) r D E N 1
 / 3 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1
 8 4) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E
 N 4 / 3 3 1、(1 8 5) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3
 / 2 3 1、r D E N 4 3 1、(1 8 6) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 / 4 3
 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 8 7) r D E N 1 / 3 3 1、
 r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1 8 8) r D
 E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 3 3
 1、(1 8 9) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、
 r D E N 4 3 1、(1 9 0) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N
 3 / 4 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 9 1) r D E N 1 / 3 3 1、r D E N 2 /
 4 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(1 9 2) r D E N 1 / 3
 3 1、r D E N 2 / 4 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(1 9 3
) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 3 1、(1
 9 4) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 / 1
 3 1、(1 9 5) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 3 1、r D
 E N 4 / 2 3 1、(1 9 6) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3
 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(1 9 7) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r
 D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 3 1、(1 9 8) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2
 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(1 9 9) r D E N 1 / 4 3
 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(2 0 0) r D
 E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、
 (2 0 1) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N
 4 3 1、(2 0 2) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 2 3 1
 、r D E N 4 / 1 3 1、(2 0 3) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E
 N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(2 0 4) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2
 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(2 0 5) r D E N 1 / 4 3
 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 3 1、(2 0 6) r D E N
 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(2
 0 7) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 4 3 1、r D E N 4 /
 2 3 1、(2 0 8) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 3 1、r D E N 3 / 4 3 1
 、r D E N 4 / 3 3 1、(2 0 9) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1 3 1、r
 D E N 3 3 1、r D E N 4 3 1、(2 1 0) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1
 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(2 1 1) r D E N 1 / 4 3 1、
 r D E N 2 / 1 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(2 1 2) r D E N
 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1 3 1、r D E N 3 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(2
 1 3) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E
 N 4 3 1、(2 1 4) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1 3 1、r D E N 3 / 1
 3 1、r D E N 4 / 1 3 1、(2 1 5) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1 3 1
 、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(2 1 6) r D E N 1 / 4 3 1、r
 D E N 2 / 1 3 1、r D E N 3 / 1 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(2 1 7) r D E
 N 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 3 1、(2
 1 8) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E
 N 4 / 1 3 1、(2 1 9) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1 3 1、r D E N 3
 / 2 3 1、r D E N 4 / 2 3 1、(2 2 0) r D E N 1 / 4 3 1、r D E N 2 / 1
 3 1、r D E N 3 / 2 3 1、r D E N 4 / 3 3 1、(2 2 1) r D E N 1 / 4 3
 1

、rDEN2/1 31、rDEN3/4 31、rDEN4 31、(222)rDE
 N1/4 31、rDEN2/1 31、rDEN3/4 31、rDEN4/1 31
 、(223)rDEN1/4 31、rDEN2/1 31、rDEN3/4 31、r
 DEN4/2 31、(224)rDEN1/4 31、rDEN2/1 31、rDE
 N3/4 31、rDEN4/3 31、(225)rDEN1/4 31、rDEN2
 /3 31、rDEN3 31、rDEN4 31、(226)rDEN1/4 31、
 rDEN2/3 31、rDEN3 31、rDEN4/1 31、(227)rDEN
 1/4 31、rDEN2/3 31、rDEN3 31、rDEN4/2 31、(2
 28)rDEN1/4 31、rDEN2/3 31、rDEN3 31、rDEN4/
 31、(229)rDEN1/4 31、rDEN2/3 31、rDEN3/1
 31、rDEN4 31、(230)rDEN1/4 31、rDEN2/3 31、r
 DEN3/1 31、rDEN4/1 31、(231)rDEN1/4 31、rDE
 N2/3 31、rDEN3/1 31、rDEN4/2 31、(232)rDEN1
 /4 31、rDEN2/3 31、rDEN3/1 31、rDEN4/3 31、(2
 33)rDEN1/4 31、rDEN2/3 31、rDEN3/2 31、rDE
 N4 31、(234)rDEN1/4 31、rDEN2/3 31、rDEN3/2
 31、rDEN4/1 31、(235)rDEN1/4 31、rDEN2/3 3
 1、rDEN3/2 31、rDEN4/2 31、(236)rDEN1/4 31、
 rDEN2/3 31、rDEN3/2 31、rDEN4/3 31、(237)rD
 EN1/4 31、rDEN2/3 31、rDEN3/4 31、rDEN4 31、
 (238)rDEN1/4 31、rDEN2/3 31、rDEN3/4 31、rD
 EN4/1 31、(239)rDEN1/4 31、rDEN2/3 31、rDEN
 3/4 31、rDEN4/2 31、(240)rDEN1/4 31、rDEN2/
 3 31、rDEN3/4 31、rDEN4/3 31、(241)rDEN1/4
 31、rDEN2/4 31、rDEN3 31、rDEN4 31、(242)rDE
 N1/4 31、rDEN2/4 31、rDEN3 31、rDEN4/1 31、(2
 43)rDEN1/4 31、rDEN2/4 31、rDEN3 31、rDEN4
 /2 31、(244)rDEN1/4 31、rDEN2/4 31、rDEN3 3
 1、rDEN4/3 31、(245)rDEN1/4 31、rDEN2/4 31、
 rDEN3/1 31、rDEN4 31、(246)rDEN1/4 31、rDEN
 2/4 31、rDEN3/1 31、rDEN4/1 31、(247)rDEN1/
 4 31、rDEN2/4 31、rDEN3/1 31、rDEN4/2 31、(2
 48)rDEN1/4 31、rDEN2/4 31、rDEN3/1 31、rDEN
 4/3 31、(249)rDEN1/4 31、rDEN2/4 31、rDEN3/
 2 31、rDEN4 31、(250)rDEN1/4 31、rDEN2/4 31
 、rDEN3/2 31、rDEN4/1 31、(251)rDEN1/4 31、r
 DEN2/4 31、rDEN3/2 31、rDEN4/2 31、(252)rDE
 N1/4 31、rDEN2/4 31、rDEN3/2 31、rDEN4/3 31
 、(253)rDEN1/4 31、rDEN2/4 31、rDEN3/4 31、r
 DEN4 31、(254)rDEN1/4 31、rDEN2/4 31、rDEN3
 /4 31、rDEN4/1 31、(255)rDEN1/4 31、rDEN2/4
 31、rDEN3/4 31、rDEN4/2 31、および(256)rDEN1/
 4 31、rDEN2/4 31、rDEN3/4 31、rDEN4/3 31からなる
 群から選択される。別の実施形態では、上記の第1、第2、第3および第4の弱毒化ウ
 イルスの組み合わせのいずれかの五価の免疫原性組成物の第5の弱毒化ウイルスは、上でより
 詳細に記載されるように本開示のジカキメラである。一実施形態では、弱毒化ウイルスの各々は、同じデング骨格を含む。別の実施形態では、第5の弱毒化ウイルスは、第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスと異なるデングウイルス骨格を含む。

ある実施形態では、第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスは、(1)rDEN
1 30/31、rDEN2 30/31、rDEN3 30/31、rDEN4 30/
/31、(2)rDEN1 30/31、rDEN2 30/31、rDEN3 30/
/31、rDEN4 /1 30/31、(3)rDEN1 30/31、rDEN2 30/
/31、rDEN3 30/31、rDEN4 /2 30/31、(4)rDEN1 30/
0/31、rDEN2 30/31、rDEN3 30/31、rDEN4 /3 30/
31、(5)rDEN1 30/31、rDEN2 30/31、rDEN3 /1 30/
/31、rDEN4 30/31、(6)rDEN1 30/31、rDEN2 30/
31、rDEN3 /1 30/31、rDEN4 /1 30/31、(7)rDEN1
30/31、rDEN2 30/31、rDEN3 /1 30/31、rDEN4 /2
30/31、(8)rDEN1 30/31、rDEN2 30/31、rDEN3 /1
30/31、rDEN4 /3 30/31、(9)rDEN1 30/31、rDEN
2 30/31、rDEN3 /2 30/31、rDEN4 30/31、(10)rD
EN1 30/31、rDEN2 30/31、rDEN3 /2 30/31、rDEN
4 /1 30/31、(11)rDEN1 30/31、rDEN2 30/31、rDEN
EN3 /2 30/31、rDEN4 /2 30/31、(12)rDEN1 30/3
1、rDEN2 30/31、rDEN3 /2 30/31、rDEN4 /3 30/3
1、(13)rDEN1 30/31、rDEN2 30/31、rDEN3 /4 30/
/31、rDEN4 30/31、(14)rDEN1 30/31、rDEN2 30/
/31、rDEN3 /4 30/31、rDEN4 /1 30/31、(15)rDEN
1 30/31、rDEN2 30/31、rDEN3 /4 30/31、rDEN4 /
2 30/31、(16)rDEN1 30/31、rDEN2 30/31、rDEN
3 /4 30/31、rDEN4 /3 30/31、(17)rDEN1 30/31、
rDEN2 /1 30/31、rDEN3 30/31、rDEN4 30/31、(1
8)rDEN1 30/31、rDEN2 /1 30/31、rDEN3 30/31、
rDEN4 /1 30/31、(19)rDEN1 30/31、rDEN2 /1 30/
/31、rDEN3 30/31、rDEN4 /2 30/31、(20)rDEN1
30/31、rDEN2 /1 30/31、rDEN3 30/31、rDEN4 /3
30/31、(21)rDEN1 30/31、rDEN2 /1 30/31、rDEN
3 /1 30/31、rDEN4 30/31、(22)rDEN1 30/31、rD
EN2 /1 30/31、rDEN3 /1 30/31、rDEN4 /1 30/31、
(23)rDEN1 30/31、rDEN2 /1 30/31、rDEN3 /1 30/
/31、rDEN4 /2 30/31、(24)rDEN1 30/31、rDEN2 /
1 30/31、rDEN3 /1 30/31、rDEN4 /3 30/31、(25)
rDEN1 30/31、rDEN2 /1 30/31、rDEN3 /2 30/31、
rDEN4 30/31、(26)rDEN1 30/31、rDEN2 /1 30/3
1、rDEN3 /2 30/31、rDEN4 /1 30/31、(27)rDEN1
30/31、rDEN2 /1 30/31、rDEN3 /2 30/31、rDEN4 /
2 30/31、(28)rDEN1 30/31、rDEN2 /1 30/31、rD
EN3 /2 30/31、rDEN4 /3 30/31、(29)rDEN1 30/3
1、rDEN2 /1 30/31、rDEN3 /4 30/31、rDEN4 30/3
1、(30)rDEN1 30/31、rDEN2 /1 30/31、rDEN3 /4
30/31、rDEN4 /1 30/31、(31)rDEN1 30/31、rDEN
2 /1 30/31、rDEN3 /4 30/31、rDEN4 /2 30/31、(3
2)rDEN1 30/31、rDEN2 /1 30/31、rDEN3 /4 30/3
1、rDEN4 /3 30/31、(33)rDEN1 30/31、rDEN2 /3
30/31、rDEN3 30/31、rDEN4 30/31、(34)rDEN1
30/31、rDEN2 /3 30/31、rDEN3 30/31、rDEN4 /1
30/31、(35)rDEN1 30/31、rDEN2 /3 30/31、rDEN
3 30/31、rDEN4 /2 30/31、(36)rDEN1 30/31、rD
EN2 /3 30/31、rDEN3 30/31、rDEN4 /1 30/31、rD
EN3 /3 30/31、rDEN4 /2 30/31、(37)rDEN1 30/31
10

EN 2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 3 3 0 / 3 1、(3
 7) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 1 3 0 / 3
 1、rDEN 4 3 0 / 3 1、(3 8) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0
 / 3 1、rDEN 3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 1 3 0 / 3 1、(3 9) rDEN
 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN
 4 / 2 3 0 / 3 1、(4 0) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0 / 3 1、
 rDEN 3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 3 3 0 / 3 1、(4 1) rDEN 1 3 0
 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN 4 3 0
 / 3 1、(4 2) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 /
 2 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 1 3 0 / 3 1、(4 3) rDEN 1 3 0 / 3 1、rD 10
 EN 2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 2 3 0 / 3 1、
 (4 4) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 2 3 0
 / 3 1、rDEN 4 / 3 3 0 / 3 1、(4 5) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 /
 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 4 3 0 / 3 1、(4 6) rD
 EN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 4 3 0 / 3 1、rD
 EN 4 / 1 3 0 / 3 1、(4 7) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0 / 3
 1、rDEN 3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 2 3 0 / 3 1、(4 8) rDEN 1
 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 4 /
 3 3 0 / 3 1、(4 9) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rD 20
 EN 3 3 0 / 3 1、rDEN 4 3 0 / 3 1、(5 0) rDEN 1 3 0 / 3 1、rD
 EN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 1 3 0 / 3 1、(5
 1) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 3 0 / 3 1、
 rDEN 4 / 2 3 0 / 3 1、(5 2) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0
 / 3 1、rDEN 3 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 3 3 0 / 3 1、(5 3) rDEN 1
 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN 4
 3 0 / 3 1、(5 4) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rD
 EN 3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 1 3 0 / 3 1、(5 5) rDEN 1 3 0 / 3 1、
 rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 2 3 0 / 3
 1、(5 6) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 1
 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 3 3 0 / 3 1、(5 7) rDEN 1 3 0 / 3 1、rD 30
 EN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN 4 3 0 / 3 1、(5 8)
 rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 2 3 0 / 3 1、
 rDEN 4 / 1 3 0 / 3 1、(5 9) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0
 / 3 1、rDEN 3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 2 3 0 / 3 1、(6 0) rDEN
 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 2 3 0 / 3 1、rD
 EN 4 / 3 3 0 / 3 1、(6 1) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、
 rDEN 3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 4 3 0 / 3 1、(6 2) rDEN 1 3 0 / 3
 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 1 3 0
 / 3 1、(6 3) rDEN 1 3 0 / 3 1、rDEN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 /
 4 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 2 3 0 / 3 1、(6 4) rDEN 1 3 0 / 3 1、rD 40
 EN 2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 3 3 0 / 3 1、
 (6 5) rDEN 1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN 2 3 0 / 3 1、rDEN 3 3 0 / 3
 1、rDEN 4 3 0 / 3 1、(6 6) rDEN 1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN 2 3 0
 / 3 1、rDEN 3 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 1 3 0 / 3 1、(6 7) rDEN 1 /
 2 3 0 / 3 1、rDEN 2 3 0 / 3 1、rDEN 3 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 2
 3 0 / 3 1、(6 8) rDEN 1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN 2 3 0 / 3 1、rD
 EN 3 3 0 / 3 1、rDEN 4 / 3 3 0 / 3 1、(6 9) rDEN 1 / 2 3 0 / 3 1、
 rDEN 2 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN 4 3 0 / 3 1、(7
 0) rDEN 1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN 2 3 0 / 3 1、rDEN 3 / 1 3 0 / 3
 1、rDEN 4 / 1 3 0 / 3 1、(7 1) rDEN 1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN 2 50

3 0 / 3 1、rDEN2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN4 /
 3 3 0 / 3 1、(105)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 3 3 0 / 3 1
 、rDEN3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN4 3 0 / 3 1、(106)rDEN1 / 2
 3 0 / 3 1、rDEN2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN4 /
 1 3 0 / 3 1、(107)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 3 3 0 / 3 1
 、rDEN3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN4 / 2 3 0 / 3 1、(108)rDEN1 /
 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN
 4 / 3 3 0 / 3 1、(109)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 3 3 0 /
 3 1、rDEN3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN4 3 0 / 3 1、(110)rDEN1 /
 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN
 4 / 1 3 0 / 3 1、(111)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 3 3 0 /
 3 1、rDEN3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN4 / 2 3 0 / 3 1、(112)rDEN
 1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 3 3 0 / 3 1、rDEN3 / 4 3 0 / 3 1、rD
 EN4 / 3 3 0 / 3 1、(113)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3
 0 / 3 1、rDEN3 3 0 / 3 1、rDEN4 3 0 / 3 1、(114)rDEN1 /
 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN3 3 0 / 3 1、rDEN4 /
 1 3 0 / 3 1、(115)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1
 、rDEN3 3 0 / 3 1、rDEN4 / 2 3 0 / 3 1、(116)rDEN1 / 2
 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN3 3 0 / 3 1、rDEN4 / 3
 3 0 / 3 1、(117)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、r
 DEN3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN4 3 0 / 3 1、(118)rDEN1 / 2 3 0
 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN4 / 1
 3 0 / 3 1、(119)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、r
 DEN3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN4 / 2 3 0 / 3 1、(120)rDEN1 / 2
 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN4 /
 3 3 0 / 3 1、(121)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1
 、rDEN3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN4 3 0 / 3 1、(122)rDEN1 / 2
 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN4 /
 1 3 0 / 3 1、(123)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1
 、rDEN3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN4 / 2 3 0 / 3 1、(124)rDEN1 /
 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN3 / 2 3 0 / 3 1、rDEN
 4 / 3 3 0 / 3 1、(125)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 /
 3 1、rDEN3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN4 3 0 / 3 1、(126)rDEN1 /
 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN
 4 / 1 3 0 / 3 1、(127)rDEN1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 /
 3 1、rDEN3 / 4 3 0 / 3 1、rDEN4 / 2 3 0 / 3 1、(128)rDEN
 1 / 2 3 0 / 3 1、rDEN2 / 4 3 0 / 3 1、rDEN3 / 4 3 0 / 3 1、rD
 EN4 / 3 3 0 / 3 1、(129)rDEN1 / 3 3 0 / 3 1、rDEN2 3 0 /
 3 1、rDEN3 3 0 / 3 1、rDEN4 3 0 / 3 1、(130)rDEN1 / 3
 3 0 / 3 1、rDEN2 3 0 / 3 1、rDEN3 3 0 / 3 1、rDEN4 / 1 3 0
 / 3 1、(131)rDEN1 / 3 3 0 / 3 1、rDEN2 3 0 / 3 1、rDEN3
 3 0 / 3 1、rDEN4 / 2 3 0 / 3 1、(132)rDEN1 / 3 3 0 / 3 1、
 rDEN2 3 0 / 3 1、rDEN3 3 0 / 3 1、rDEN4 / 3 3 0 / 3 1、(1
 33)rDEN1 / 3 3 0 / 3 1、rDEN2 3 0 / 3 1、rDEN3 / 1 3 0 /
 3 1、rDEN4 3 0 / 3 1、(134)rDEN1 / 3 3 0 / 3 1、rDEN2
 3 0 / 3 1、rDEN3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN4 / 1 3 0 / 3 1、(135)r
 DEN1 / 3 3 0 / 3 1、rDEN2 3 0 / 3 1、rDEN3 / 1 3 0 / 3 1、r
 DEN4 / 2 3 0 / 3 1、(136)rDEN1 / 3 3 0 / 3 1、rDEN2 3 0
 / 3 1、rDEN3 / 1 3 0 / 3 1、rDEN4 / 3 3 0 / 3 1、(137)rDE
 N1 / 3 3 0 / 3 1、rDEN2 3 0 / 3 1、rDEN3 / 2 3 0 / 3 1、rDE
 10 20 30 40 50


```

/ 3   3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 2   3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 2   3 0 / 3 1、 ( 1 7
2 ) r D E N 1 / 3   3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 3   3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 2   3 0
/ 3 1、 r D E N 4 / 3   3 0 / 3 1、 ( 1 7 3 ) r D E N 1 / 3   3 0 / 3 1、 r D E
N 2 / 3   3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 4   3 0 / 3 1、 r D E N 4   3 0 / 3 1、 ( 1 7
4 ) r D E N 1 / 3   3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 3   3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 4   3 0
/ 3 1、 r D E N 4 / 1   3 0 / 3 1、 ( 1 7 5 ) r D E N 1 / 3   3 0 / 3 1、 r D E
N 2 / 3   3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 4   3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 2   3 0 / 3 1、 (
1 7 6 ) r D E N 1 / 3   3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 3   3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 4
3

```

10

0 / 3 1、r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、(1 7 7) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r
E N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 3 0 / 3 1、r D E N 4 3 0 / 3 1、(1 7 8)
) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 3 0 / 3 1
、r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、(1 7 9) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4
3 0 / 3 1、r D E N 3 3 0 / 3 1、r D E N 4 / 2 3 0 / 3 1、(1 8 0) r
D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 3 0 / 3 1、r
D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、(1 8 1) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4
3 0 / 3 1、r D E N 3 / 1 3 0 / 3 1、r D E N 4 3 0 / 3 1、(1 8 2) r D E
N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 1 3 0 / 3 1、r
D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、(1 8 3) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4
3 0 / 3 1、r D E N 3 / 1 3 0 / 3 1、r D E N 4 / 2 3 0 / 3 1、(1 8 4) r
D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 1 3 0 / 3 1
、r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、(1 8 5) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4
4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 2 3 0 / 3 1、r D E N 4 3 0 / 3 1、(1 8 6) r
D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 2 3 0 / 3 1
、r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、(1 8 7) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4
4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 2 3 0 / 3 1、r D E N 4 / 2 3 0 / 3 1、(1 8 8)
) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 2 3 0 /
3 1、r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、(1 8 9) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E
N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 4 3 0 / 3 1、(1 9 0)
) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 4 3 0 /
3 1、r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、(1 9 1) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E
N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 4 / 2 3 0 / 3 1、(1
9 2) r D E N 1 / 3 3 0 / 3 1、r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 4 3
0 / 3 1、r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、(1 9 3) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、r D
E N 2 3 0 / 3 1、r D E N 3 3 0 / 3 1、r D E N 4 3 0 / 3 1、(1 9 4) r
D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 2 3 0 / 3 1、r D E N 3 3 0 / 3 1、r D E
N 4 / 1 3 0 / 3 1、(1 9 5) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 2 3 0 / 3
1、r D E N 3 3 0 / 3 1、r D E N 4 / 2 3 0 / 3 1、(1 9 6) r D E N 1 / 4
3 0 / 3 1、r D E N 2 3 0 / 3 1、r D E N 3 3 0 / 3 1、r D E N 4 / 3 3
0 / 3 1、(1 9 7) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 2 3 0 / 3 1、r D E
N 3 / 1 3 0 / 3 1、r D E N 4 3 0 / 3 1、(1 9 8) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1
、r D E N 2 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 1 3 0 / 3 1、r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1
、(1 9 9) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 2 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 1
3 0 / 3 1、r D E N 4 / 2 3 0 / 3 1、(2 0 0) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、r
D E N 2 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 1 3 0 / 3 1、r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、(2
0 1) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 2 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 2 3 0
/ 3 1、r D E N 4 3 0 / 3 1、(2 0 2) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 2
3 0 / 3 1、r D E N 3 / 2 3 0 / 3 1、r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、(2 0 3)
r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、r D E N 2 3 0 / 3 1、r D E N 3 / 2 3 0 / 3 1、

20

30

40

50

rDEN4 / 2 30 / 31、(204)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 3
0 / 31、rDEN3 / 2 30 / 31、rDEN4 / 3 30 / 31、(205)rD
EN1 / 4 30 / 31、rDEN2 30 / 31、rDEN3 / 4 30 / 31、rD
、rDEN3 / 4 30 / 31、rDEN4 / 1 30 / 31、(207)rDEN1 /
4 30 / 31、rDEN2 30 / 31、rDEN3 / 4 30 / 31、rDEN4 /
2 30 / 31、(208)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 30 / 31、r
DEN3 / 4 30 / 31、rDEN4 / 3 30 / 31、(209)rDEN1 / 4
30 / 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3 30 / 31、rDEN4 30
/ 31、(210)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDE
N3 30 / 31、rDEN4 / 1 30 / 31、(211)rDEN1 / 4 30 / 3
1、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3 30 / 31、rDEN4 / 2 30 / 3
1、(212)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3
30 / 31、rDEN4 / 3 30 / 31、(213)rDEN1 / 4 30 / 31、
rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3 / 1 30 / 31、rDEN4 30 / 31、
(214)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3 / 1
30 / 31、rDEN4 / 1 30 / 31、(215)rDEN1 / 4 30 / 31、
rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3 / 1 30 / 31、rDEN4 / 2 30 / 3
1、(216)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3
/ 1 30 / 31、rDEN4 / 3 30 / 31、(217)rDEN1 / 4 30 / 3
1、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3 / 2 30 / 31、rDEN4 30 / 3
1、(218)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3
/ 2 30 / 31、rDEN4 / 1 30 / 31、(219)rDEN1 / 4 30 / 3
1、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3 / 2 30 / 31、rDEN4 / 2 30
/ 31、(220)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDE
N3 / 2 30 / 31、rDEN4 / 3 30 / 31、(221)rDEN1 / 4 30
/ 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3 / 4 30 / 31、rDEN4 30
/ 31、(222)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDE
N3 / 4 30 / 31、rDEN4 / 1 30 / 31、(223)rDEN1 / 4 30
/ 31、rDEN2 / 1 30 / 31、rDEN3 / 4 30 / 31、rDEN4 / 2
30 / 31、(224)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 1 30 / 31、r
DEN3 / 4 30 / 31、rDEN4 / 3 30 / 31、(225)rDEN1 / 4
30 / 31、rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3 30 / 31、rDEN4 30
/ 31、(226)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 3 30 / 31、rDE
N3 30 / 31、rDEN4 / 1 30 / 31、(227)rDEN1 / 4 30 / 3
1、rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3 30 / 31、rDEN4 / 2 30 / 3
1、(228)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3
30 / 31、rDEN4 / 3 30 / 31、(229)rDEN1 / 4 30 / 31、
rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3 / 1 30 / 31、rDEN4 30 / 31、
(230)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3 / 1
30 / 31、rDEN4 / 1 30 / 31、(231)rDEN1 / 4 30 / 31、
rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3 / 1 30 / 31、rDEN4 / 2 30 / 3
1、(232)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3
/ 1 30 / 31、rDEN4 / 3 30 / 31、(233)rDEN1 / 4 30 / 3
1、rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3 / 2 30 / 31、rDEN4 30 / 3
1、(234)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3
/ 2 30 / 31、rDEN4 / 1 30 / 31、(235)rDEN1 / 4 30 / 3
1、rDEN2 / 3 30 / 31、rDEN3 / 2 30 / 31、rDEN4 / 2 30
/ 31、(236)rDEN1 / 4 30 / 31、rDEN2 / 3 30 / 31、rDE
N3 / 2 30 / 31、rDEN4 / 3 30 / 31、(237)rDEN1 / 4 30

/ 3 1、 r D E N 2 / 3 3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 4 3 0
 / 3 1、 (2 3 8) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 3 3 0 / 3 1、 r D E
 N 3 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、 (2 3 9) r D E N 1 / 4 3 0
 / 3 1、 r D E N 2 / 3 3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 2
 3 0 / 3 1、 (2 4 0) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 3 3 0 / 3 1、 r
 D E N 3 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、 (2 4 1) r D E N 1 / 4
 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3 3 0 / 3 1、 r D E N 4 3 0
 / 3 1、 (2 4 2) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E
 N 3 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、 (2 4 3) r D E N 1 / 4 3 0 / 3
 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 2 3 0 / 3
 1、 (2 4 4) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3
 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、 (2 4 5) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、
 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 1 3 0 / 3 1、 r D E N 4 3 0 / 3 1、
 (2 4 6) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 1
 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、 (2 4 7) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、
 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 1 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 2 3 0 / 3
 1、 (2 4 8) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3
 / 1 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、 (2 4 9) r D E N 1 / 4 3 0 / 3
 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 2 3 0 / 3 1、 r D E N 4 3 0 / 3
 1、 (2 5 0) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3
 / 2 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、 (2 5 1) r D E N 1 / 4 3 0 / 3
 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 2 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 2 3 0
 / 3 1、 (2 5 2) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E
 N 3 / 2 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1、 (2 5 3) r D E N 1 / 4 3 0
 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 4 3 0
 / 3 1、 (2 5 4) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E
 N 3 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 1 3 0 / 3 1、 (2 5 5) r D E N 1 / 4 3 0
 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 3 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 2
 3 0 / 3 1、 および (2 5 6) r D E N 1 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 2 / 4 3 0 / 3
 1、 r D E N 3 / 4 3 0 / 3 1、 r D E N 4 / 3 3 0 / 3 1 からなる群から選択され
 る。別の実施形態では、上記の第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスの組み合
 せのいずれかの五価の免疫原性組成物の第5の弱毒化ウイルスは、上でより詳細に記載さ
 れるように本開示のジカキメラである。一実施形態では、弱毒化ウイルスの各々は、同じ
 デング骨格を含む。別の実施形態では、第5の弱毒化ウイルスは、第1、第2、第3およ
 び第4の弱毒化ウイルスと異なるデングウイルス骨格を含む。
 【0159】

ある実施形態では、第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスは、(1) r D E N
 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 8 6、 r D E N 4 8 6、 (2) r D E N 1
 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 8 6、 r D E N 4 / 1 8 6、 (3) r D E
 N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 8 6、 r D E N 4 / 2 8 6、 (4) r D E
 N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 8 6、 r D E N 4 / 3 8 6、 (5) r D
 E N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 / 1 8 6、 r D E N 4 8 6、 (6) r
 D E N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 / 2 8 6、 r D E N 4 / 1 8 6、 (7)
 r D E N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 / 1 8 6、 r D E N 4 / 2 8
 6、 (8) r D E N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 / 1 8 6、 r D E N 4 /
 3 8 6、 (9) r D E N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 / 2 8 6、 r D E
 N 4 8 6、 (10) r D E N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 / 2 8 6、 r
 D E N 4 / 1 8 6、 (11) r D E N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N 3 / 2
 8 6、 r D E N 4 / 2 8 6、 (12) r D E N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、 r D E N
 3 / 2 8 6、 r D E N 4 / 3 8 6、 (13) r D E N 1 8 6、 r D E N 2 8 6、
 50

rDEN3/4 86, rDEN4 86, (14)rDEN1 86, rDEN2 8
6, rDEN3/4 86, rDEN4/1 86, (15)rDEN1 86, rDE
N2 86, rDEN3/4 86, rDEN4/2 86, (16)rDEN1 86
, rDEN2 86, rDEN3/4 86, rDEN4/3 86, (17)rDEN
1 86, rDEN2/1 86, rDEN3 86, rDEN4 86, (18)rD
EN1 86, rDEN2/1 86, rDEN3 86, rDEN4/1 86, (1
9)rDEN1 86, rDEN2/1 86, rDEN3 86, rDEN4/2 8
6, (20)rDEN1 86, rDEN2/1 86, rDEN3 86, rDEN4
/3 86, (21)rDEN1 86, rDEN2/1 86, rDEN3/1 86
, rDEN4 86, (22)rDEN1 86, rDEN2/1 86, rDEN3/1
1 86, rDEN4/1 86, (23)rDEN1 86, rDEN2/1 86,
rDEN3/1 86, rDEN4/2 86, (24)rDEN1 86, rDEN2
/1 86, rDEN3/1 86, rDEN4/3 86, (25)rDEN1 86
, rDEN2/1 86, rDEN3/2 86, rDEN4 86, (26)rDEN
1 86, rDEN2/1 86, rDEN3/2 86, rDEN4/1 86, (2
7)rDEN1 86, rDEN2/1 86, rDEN3/2 86, rDEN4/2
86, (28)rDEN1 86, rDEN2/1 86, rDEN3/2 86, r
DEN4/3 86, (29)rDEN1 86, rDEN2/1 86, rDEN3/
4 86, rDEN4 86, (30)rDEN1 86, rDEN2/1 86, rD
EN3/4 86, rDEN4/1 86, (31)rDEN1 86, rDEN2/1
86, rDEN3/4 86, rDEN4/2 86, (32)rDEN1 86, r
DEN2/1 86, rDEN3/4 86, rDEN4/3 86, (33)rDEN
1 86, rDEN2/3 86, rDEN3 86, rDEN4 86, (34)rD
EN1 86, rDEN2/3 86, rDEN3 86, rDEN4/1 86, (3
5)rDEN1 86, rDEN2/3 86, rDEN3 86, rDEN4/2 8
6, (36)rDEN1 86, rDEN2/3 86, rDEN3 86, rDEN4
/3 86, (37)rDEN1 86, rDEN2/3 86, rDEN3/1 86
, rDEN4 86, (38)rDEN1 86, rDEN2/3 86, rDEN3/
1 86, rDEN4/1 86, (39)rDEN1 86, rDEN2/3 86,
rDEN3/1 86, rDEN4/2 86, (40)rDEN1 86, rDEN2
/3 86, rDEN3/1 86, rDEN4/3 86, (41)rDEN1 86
, rDEN2/3 86, rDEN3/2 86, rDEN4 86, (42)rDEN
1 86, rDEN2/3 86, rDEN3/2 86, rDEN4/1 86, (4
3)rDEN1 86, rDEN2/3 86, rDEN3/2 86, rDEN4/2
86, (44)rDEN1 86, rDEN2/3 86, rDEN3/2 86, r
DEN4/3 86, (45)rDEN1 86, rDEN2/3 86, rDEN3/
4 86, rDEN4 86, (46)rDEN1 86, rDEN2/3 86, rD
EN3/4 86, rDEN4/1 86, (47)rDEN1 86, rDEN2/3
86, rDEN3/4 86, rDEN4/2 86, (48)rDEN1 86, r
DEN2/3 86, rDEN3/4 86, rDEN4/3 86, (49)rDEN
1 86, rDEN2/4 86, rDEN3 86, rDEN4 86, (50)rD
EN1 86, rDEN2/4 86, rDEN3 86, rDEN4/1 86, (5
1)rDEN1 86, rDEN2/4 86, rDEN3 86, rDEN4/2 8
6, (52)rDEN1 86, rDEN2/4 86, rDEN3 86, rDEN4
/3 86, (53)rDEN1 86, rDEN2/4 86, rDEN3/1 86
, rDEN4 86, (54)rDEN1 86, rDEN2/4 86, rDEN3/
1 86, rDEN4/1 86, (55)rDEN1 86, rDEN2/4 86,
rDEN3/1 86, rDEN4/2 86, (56)rDEN1 86, rDEN2
/4 86, rDEN3/1 86, rDEN4/3 86, (57)rDEN1 86
, rDEN2/4 86, rDEN3/2 86, rDEN4 86, (58)rDEN

1 8 6、rDEN4 8 6、(1 0 2) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 3 8 6
 、rDEN3 / 1 8 6、rDEN4 / 1 8 6、(1 0 3) rDEN1 / 2 8 6、r
 DEN2 / 3 8 6、rDEN3 / 1 8 6、rDEN4 / 2 8 6、(1 0 4) rDE
 N1 / 2 8 6、rDEN2 / 3 8 6、rDEN3 / 1 8 6、rDEN4 / 3 8 6
 、(1 0 5) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 3 8 6、rDEN3 / 2 8 6、r
 DEN4 8 6、(1 0 6) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 3 8 6、rDEN3
 / 2 8 6、rDEN4 / 1 8 6、(1 0 7) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 3
 8 6、rDEN3 / 2 8 6、rDEN4 / 2 8 6、(1 0 8) rDEN1 / 2 8
 6、rDEN2 / 3 8 6、rDEN3 / 2 8 6、rDEN4 / 3 8 6、(1 0 9)
 rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 3 8 6、rDEN3 / 4 8 6、rDEN4 8 10
 6、(1 1 0) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 3 8 6、rDEN3 / 4 8 6、
 rDEN4 / 1 8 6、(1 1 1) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 3 8 6、rD
 EN3 / 4 8 6、rDEN4 / 2 8 6、(1 1 2) rDEN1 / 2 8 6、rDEN
 2 / 3 8 6、rDEN3 / 4 8 6、rDEN4 / 3 8 6、(1 1 3) rDEN1 /
 2

8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 8 6、rDEN4 8 6、(1 1 4) rD
 EN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 8 6、rDEN4 / 1 8 6、
 (1 1 5) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 8 6、rDEN
 4 / 2 8 6、(1 1 6) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 20
 8 6、rDEN4 / 3 8 6、(1 1 7) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6
 、rDEN3 / 1 8 6、rDEN4 8 6、(1 1 8) rDEN1 / 2 8 6、rDE
 N2 / 4 8 6、rDEN3 / 1 8 6、rDEN4 / 1 8 6、(1 1 9) rDEN1
 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 / 1 8 6、rDEN4 / 2 8 6、(1
 2 0) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 / 1 8 6、rDE
 N4 / 3 8 6、(1 2 1) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3
 / 2 8 6、rDEN4 8 6、(1 2 2) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8
 6、rDEN3 / 2 8 6、rDEN4 / 1 8 6、(1 2 3) rDEN1 / 2 8 6、
 rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 / 2 8 6、rDEN4 / 2 8 6、(1 2 4) rD
 EN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 / 2 8 6、rDEN4 / 3 8 30
 6、(1 2 5) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 / 4 8 6、
 rDEN4 8 6、(1 2 6) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN
 3 / 4 8 6、rDEN4 / 1 8 6、(1 2 7) rDEN1 / 2 8 6、rDEN2 /
 4 8 6、rDEN3 / 4 8 6、rDEN4 / 2 8 6、(1 2 8) rDEN1 / 2
 8 6、rDEN2 / 4 8 6、rDEN3 / 4 8 6、rDEN4 / 3 8 6、(1 2 9)
) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2 8 6、rDEN3 8 6、rDEN4 8 6、(1
 3 0) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2 8 6、rDEN3 8 6、rDEN4 / 1
 8 6、(1 3 1) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2 8 6、rDEN3 8 6、rD
 EN4 / 2 8 6、(1 3 2) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2 8 6、rDEN3
 8 6、rDEN4 / 3 8 6、(1 3 3) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2 8 6、r
 DEN3 / 1 8 6、rDEN4 8 6、(1 3 4) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2
 8 6、rDEN3 / 1 8 6、rDEN4 / 1 8 6、(1 3 5) rDEN1 / 3 8
 6、rDEN2 8 6、rDEN3 / 1 8 6、rDEN4 / 2 8 6、(1 3 6) rD
 EN1 / 3 8 6、rDEN2 8 6、rDEN3 / 1 8 6、rDEN4 / 3 8 6、
 (1 3 7) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2 8 6、rDEN3 / 2 8 6、rDEN
 4 8 6、(1 3 8) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2 8 6、rDEN3 / 2 8 6
 、rDEN4 / 1 8 6、(1 3 9) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2 8 6、rDE
 N3 / 2 8 6、rDEN4 / 2 8 6、(1 4 0) rDEN1 / 3 8 6、rDEN2
 8 6、rDEN3 / 2 8 6、rDEN4 / 3 8 6、(1 4 1) rDEN1 / 3 8
 6、rDEN2 8 6、rDEN3 / 4 8 6、rDEN4 8 6、(1 4 2) rDEN 40
 50

1 / 3 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1
 4 3) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 /
 2 8 6、(1 4 4) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 4 8 6
 、r D E N 4 / 3 8 6、(1 4 5) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r
 D E N 3 8 6、r D E N 4 8 6、(1 4 6) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1
 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1 4 7) r D E N 1 / 3 8 6、
 r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(1 4 8) r D E
 N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(1
 4 9) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E
 N 4 8 6、(1 5 0) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 1 10
 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1 5 1) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6
 、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(1 5 2) r D E N 1 / 3 8 6、r
 D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(1 5 3) r D E
 N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 8 6、(1
 5 4) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E
 N 4 / 1 8 6、(1 5 5) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3
 / 2 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(1 5 6) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1
 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(1 5 7) r D E N 1 / 3 8
 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 8 6、(1 5 8) r D
 E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 1 20
 8 6、(1 5 9) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 4 8 6
 、r D E N 4 / 2 8 6、(1 6 0) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D
 E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(1 6 1) r D E N 1 / 3 8 6、r D E
 N 2 / 3 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 8 6、(1 6 2) r D E N 1 / 3 8 6
 、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1 6 3) r D E
 N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(1
 6 4) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4
 / 3 8 6、(1 6 5) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 1
 8 6、r D E N 4 8 6、(1 6 6) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、
 r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1 6 7) r D E N 1 / 3 8 6、r D
 E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(1 6 8) r D E
 N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 3 8 6
 、(1 6 9) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D
 E N 4 8 6、(1 7 0) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 /
 2 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1 7 1) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3
 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(1 7 2) r D E N 1 / 3 8 6
 、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(1 7 3) r
 D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 8 6
 、(1 7 4) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r
 D E N 4 / 1 8 6、(1 7 5) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E
 N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(1 7 6) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2
 / 3 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(1 7 7) r D E N 1 / 3
 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 8 6、(1 7 8) r D
 E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 1 8 6
 、(1 7 9) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 8 6、r D E
 N 4 / 2 8 6、(1 8 0) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3
 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(1 8 1) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6
 、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 8 6、(1 8 2) r D E N 1 / 3 8 6、r D E
 N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1 8 3) r D E N 1
 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(50

1 8 4) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E
N 4 / 3 8 6、(1 8 5) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3
/ 2 8 6、r D E N 4 8 6、(1 8 6) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8
6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1 8 7) r D E N 1 / 3 8 6、
r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(1 8 8) r D
E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 3 8
6、(1 8 9) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、
r D E N 4 8 6、(1 9 0) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N
3 / 4 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1 9 1) r D E N 1 / 3 8 6、r D E N 2 /
4 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(1 9 2) r D E N 1 / 3 10
8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(1 9 3
) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 8 6、(1
9 4) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 1
8 6、(1 9 5) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 8 6、r D
E N 4 / 2 8 6、(1 9 6) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3
8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(1 9 7) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r
D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 8 6、(1 9 8) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2
8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(1 9 9) r D E N 1 / 4 8
6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 0 0) r D
E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、20
(2 0 1) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N
4 8 6、(2 0 2) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 2 8 6
、r D E N 4 / 1 8 6、(2 0 3) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E
N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 0 4) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2
8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2 0 5) r D E N 1 / 4 8
6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 8 6、(2 0 6) r D E N
1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2
0 7) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 /
2 8 6、(2 0 8) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 8 6、r D E N 3 / 4 8 6
、r D E N 4 / 3 8 6、(2 0 9) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r 30
D E N 3 8 6、r D E N 4 8 6、(2 1 0) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1
8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 1 1) r D E N 1 / 4 8 6、
r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 1 2) r D E N
1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2
1 3) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N
4 8 6、(2 1 4) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 1
8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 1 5) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6
、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 1 6) r D E N 1 / 4 8 6、r
D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2 1 7) r D E
N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 8 6、(40
2 1 8) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E
N 4 / 1 8 6、(2 1 9) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3
/ 2 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 2 0) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1
8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2 2 1) r D E N 1 / 4 8
6 40
、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 8 6、(2 2 2) r D E
N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 1 8 6
、(2 2 3) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r
D E N 4 / 2 8 6、(2 2 4) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 1 8 6、r D E 50

N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2 2 5) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 8 6、(2 2 6) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 2 8) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2 2 9) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 8 6、(2 3 0) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 3 1) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 3 2) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 3 3) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 3 4) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 3 5) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 3 6) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 3 7) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 8 6、(2 3 8) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 3 9) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 4 0) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 3 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、r D E N 5 8 6、r D E N 6 / 2 8 6、r D E N 7 8 6、r D E N 8 / 3 8 6、r D E N 9 8 6、r D E N 10 8 6、r D E N 11 / 4 8 6、r D E N 12 / 4 8 6、r D E N 13 8 6、r D E N 14 / 1 8 6、(2 4 3) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 4 4) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 4 5) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2 4 6) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 4 7) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2 4 8) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 4 9) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2 5 0) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 5 1) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 5 2) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 5 3) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、(2 5 4) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 3 8 6、(2 5 5) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 2 8 6、r D E N 4 / 1 8 6、(2 5 6) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 4 8 6、r D E N 4 / 2 8 6、および(2 5 6) r D E N 1 / 4 8 6、r D E N 2 / 4 8 6、r D E N 3 / 1 8 6、r D E N 4 / 3 8 6からなる群から選択される。別の実施形態では、上記の第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスの組み合わせのいずれかの五価の免疫原性組成物の第5の弱毒化ウイルスは、上でより詳細に記載されるように本開示のジカキメラである。一実施形態では、弱毒化ウイルスの各々は、同じデング骨格を含む。別の実施形態では、第5の弱毒化ウイルスは、第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスと異なるデングウイルス骨格を含む。

【 0 1 6 0 】

他の実施形態では、第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスは、段落 [0 1 5 0] から [0 1 5 3] において明瞭に示される第1、第2、第3および第4の弱毒化ウイルスから独立して選択され、第5の弱毒化ウイルスは、上でより詳細に記載されるように本開示の弱毒化ZIKVまたはキメラZIKVである。例えば、一実施形態では、第1の弱毒ウイルスはr D E N 1 3 0 (段落 [0 1 4 8] から) であり、第2の弱毒化ウイルス

10

20

30

40

50

は r D E N 2 / 4 3 0 (段落 [0 1 4 8] から) であり、第 3 の弱毒化ウイルスは r D E N 3 3 0 / 3 1 (段落 [0 1 5 0] から) であり、第 4 の弱毒化ウイルスは r D E N 4 3 0 (段落 [0 1 4 8] から) である。一実施形態では、第 1 の弱毒ウイルスは r D E N 1 3 0 であり、第 2 の弱毒化ウイルスは r D E N 2 / 4 3 0 であり、第 3 の弱毒化ウイルスは r D E N 3 3 0 / 3 1 であり、第 4 の弱毒化ウイルスは r D E N 4 3 0 であり、第 5 の弱毒化ウイルスは Z I K V / D E N 2 3 0 または Z I K V / D E N 3 3 0 である。

【 0 1 6 1 】

ある特定の実施形態では、弱毒化ウイルスの各々は、同じ弱毒化欠失および / または変異を含む。特定の実施形態では、欠失は、3' 非翻訳領域のヌクレオチド配列における欠失であってもよい。例えば、欠失は、3 0 欠失、3 1 欠失、3 0 / 3 1 欠失および

8 6 欠失からなる群より選択される。別の実施形態では、変異は、N S 3 遺伝子のヌクレオチド 4 8 9 1 および / または N S 3 遺伝子のヌクレオチド 4 9 9 5 にある。弱毒化ウイルスの各々で利用される同じ弱毒化欠失および / または変異は、少なくとも 2 つの異なるデング骨格の上にあってもよい（すなわち、弱毒化ウイルスの各々は、同じ種類の弱毒化欠失および / または変異を含有する同じおよび / または異なるデング骨格を有することができる）ことに注意するべきである。

【 0 1 6 2 】

免疫原性デングキメラおよびそれらの調製方法

【 0 1 6 3 】

免疫原性デングキメラおよびデングキメラを調製するための方法が、本明細書で提供される。免疫原性デングキメラは、デングウイルスおよび Z I K V による感染を最小にするか、阻害するか、またはそれに対して個体および動物を免疫化する免疫原性組成物として、薬学的に許容される担体の中で単独または併用で、本開示のジカキメラで有用である。

【 0 1 6 4 】

デングキメラは、1 つの血清型のデングウイルスの免疫原性をコードするヌクレオチド配列、および異なる血清型のデングウイルスの骨格から選択されるさらなるヌクレオチド配列を含む。デングウイルスに対して免疫原性応答を誘導するために、これらのキメラを使用することができる。

【 0 1 6 5 】

別の実施形態では、好ましいデングキメラは、第 1 の血清型のデングウイルスからの少なくとも 1 つの構造タンパク質をコードする第 1 のヌクレオチド配列、および第 1 のものと異なる第 2 の血清型のデングウイルスからの非構造タンパク質をコードする第 2 のヌクレオチド配列を含む核酸キメラである。別の実施形態では、第 2 の血清型のデングウイルスは、D E N 4 である。別の実施形態では、構造タンパク質は、第 1 の血清型のデングウイルスの C タンパク質、第 1 の血清型のデングウイルスの p r M タンパク質、第 1 の血清型のデングウイルスの E タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。

【 0 1 6 6 】

さらに、コードされる配列の中の単一のアミノ酸または小さい百分率のアミノ酸（一般的に 5 % 未満、より一般的に 1 % 未満）を変更、付加または削除する、アミノ酸配列またはアミノ酸をコードするヌクレオチド配列における個々の置換、欠失または付加が保存的に改変されたバリエーションであることを当業者は認め、ここで、変更は化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当技術分野で周知である。以下の 6 群の各々は、互いの保存的置換であるアミノ酸を含む：[0 0 3 0] 1) アラニン (A) 、セリン (S) 、トレオニン (T) ；[0 0 3 1] 2) アスパラギン酸 (D) 、グルタミン酸 (E) ；[0 0 3 2] 3) アスパラギン (N) 、グルタミン (Q) ；[0 0 3 3] 4) アルギニン (R) 、リシン (K) ；[0 0 3 4] 5) イソロイシン (I) 、ロイシン (L) 、メチオニン (M) 、バリン (V) ；および [0 0 3 5] 6) フェニルアラニン (F) 、チロシン (Y) 、トリプトファン (W) 。

10

20

30

40

50

【0167】

本明細書で使用される場合、用語「デングキメラ」および「キメラデングウイルス」は、1つの血清型のデングウイルスの免疫原性をコードするヌクレオチド配列、および異なる血清型のデングウイルスの骨格に由来するさらなるヌクレオチド配列を含む、本発明の感染性構築物を意味する。

【0168】

本明細書で使用される場合、「感染性構築物」は、細胞を感染させるために使用することができます、ウイルス、ウイルス構築物、ウイルスキメラ、ウイルスまたはその任意の部分に由来する核酸を示す。

【0169】

本明細書で使用される場合、「デング核酸キメラ」は、1つの血清型のデングウイルスの免疫原性をコードするヌクレオチド配列、および異なる血清型のデングウイルスの骨格に由来するさらなるヌクレオチド配列を含む核酸を含む、本発明の構築物を意味する。対応して、本発明の任意のキメラウイルスまたはウイルスキメラは、核酸キメラの一例として認めることができる。

10

【0170】

本発明の構造および非構造タンパク質は、完全タンパク質の配列、タンパク質のエピトープまたは、例えば、その3つもしくはそれより多くのアミノ酸残基を含む任意の断片を含む任意のタンパク質またはそれをコードする任意の遺伝子を含むと理解するべきである。

20

【0171】

デングキメラ

【0172】

本発明のデングキメラは、1つの血清型のデングウイルス、例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4からの構造タンパク質遺伝子を、異なる血清型のデングウイルス、例えば、DEN1、DEN2、DEN3またはDEN4からの非構造タンパク質遺伝子と融合することによって形成される構築物である。

【0173】

本明細書で提供される弱毒化免疫原性デングキメラは、付与される免疫原性の対象となる1つの血清型のデングウイルスの構造タンパク質遺伝子またはその抗原性部分の1つまたは複数、および異なる血清型のデングウイルスの非構造タンパク質遺伝子を含有する。

30

【0174】

デングキメラは、デングゲノムのC、prMもしくはEタンパク質（複数可）をコードする構造タンパク質遺伝子（複数可）またはそれらの組み合わせが、保護の対象となる異なる血清型のデングウイルスからの対応する構造タンパク質遺伝子（複数可）で置き換える、1つの血清型のデングウイルスゲノムを骨格として含有する。結果として生じるウイルスデングキメラは、別の血清型のデングウイルスでキメラ化されることによって弱毒化の特性を有し、したがってビルレンスが低減されているが、構造遺伝子産物の抗原性エピトープを発現し、したがって免疫原性である。

40

【0175】

本明細書に記載される弱毒化キメラ（デングおよびジカ）の骨格として、任意のデングウイルスのゲノムを使用することができる。骨格は、デングウイルスの弱毒化表現型に寄与する、または製造のために使用される細胞基材（cell substrate）、例えばベロ細胞における複製を促進する変異を含有することができる。変異は、ジカキメラに関して上記されるように、非構造タンパク質、5'非翻訳領域または3'非翻訳領域をコードするヌクレオチド配列にあってもよい。骨格は、弱毒化表現型の安定性を維持し、弱毒化ウイルスまたはキメラがビルレントの野生型ウイルスに戻り得る可能性を低減するために、さらなる変異を含有することもできる。例えば、所望により、3'非翻訳領域の第1の変異および5'非翻訳領域の第2の変異は、さらなる弱毒化表現型安定性を提供する。

【0176】

50

そのような変異は、当業者に公知の技術を使用した部位特異的変異誘発によって達成することができる。ビルレントの骨格構造と弱毒化された骨格構造とを識別するために、本明細書に記載される、および当技術分野で周知であるビルレンススクリーニングアッセイを使用することができることが当業者に理解される。

【0177】

デングキメラの構築

【0178】

本明細書に記載されるデングウイルスキメラは、当業者に周知の組換え操作技術を使用して、すなわち、指定された1つの血清型のデングウイルス遺伝子を除去して、それを異なる血清型のデングウイルスの所望の対応する遺伝子で置き換えることによって、免疫が所望される1つの血清型のデングウイルスの構造タンパク質遺伝子の少なくとも1つを異なる血清型のデングウイルスゲノム骨格に置換することによって生成することができる。あるいは、GenBankに提供される配列を使用して、公知の核酸合成技術を使用して、デングタンパク質をコードする核酸分子を合成して、適当なベクターに挿入することができる。したがって、弱毒化免疫原性ウイルスは、当業者に公知の組換え操作技術を使用して生成される。

10

【0179】

上で言及した通り、骨格に挿入される遺伝子は、1つの血清型のデング構造タンパク質をコードする。挿入される異なる血清型のデング遺伝子は、Cタンパク質、prMタンパク質および/またはEタンパク質をコードする遺伝子である。デングウイルス骨格に挿入される配列は、他の血清型のprMおよびE構造タンパク質の両方をコードすることができる。デングウイルス骨格に挿入される配列は、他の血清型のC、prMおよびE構造タンパク質をコードすることができる。デングウイルス骨格は、DEN1、DEN2、DEN3もしくはDEN4ウイルスゲノムであるか、またはこれらの血清型のいずれかの弱毒化デングウイルスゲノムであり、異なる血清型のデングウイルスのC、prMおよび/もしくはE構造タンパク質をコードする置換された遺伝子（複数可）、または異なる血清型のデングウイルスのprMおよび/もしくはE構造タンパク質をコードする置換された遺伝子（複数可）を含む。

20

【0180】

いずれかの血清型のデングウイルスの構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する、適するキメラウイルスまたは核酸キメラは、免疫原性の保持を伴ってビルレンスの低減を示す弱毒化の表現型マーカーについてそれらをスクリーニングすることにより、ワクチンとしての有用性について評価することができる。抗原性および免疫原性は、当業者に公知である慣例的なスクリーニング法を使用して、デング抗体または免疫反応性血清とのin vitroまたはin vivo反応性を使用して評価することができる。

30

【0181】

デングおよびジカワクチン

【0182】

好ましいデングおよびジカキメラウイルスおよび核酸キメラは、免疫原またはワクチンとして有用である弱毒化された生ウイルスを提供する。好ましい実施形態では、キメラは、危険な病原性または致死性の影響を同時に及ぼさずに高い免疫原性を示す。

40

【0183】

本開示のデングキメラウイルスまたは核酸キメラは、異なる血清型の野生型または弱毒化デングウイルス骨格に1つの血清型のデングウイルスの構造遺伝子を含むことができ、本開示のジカ・デングキメラウイルスまたは核酸キメラは、野生型または弱毒化デングウイルス骨格にZIKVの構造遺伝子を含む。例えば、デングキメラは、異なる血清型のデングウイルスまたは弱毒化デングウイルスバックグラウンドで1つの血清型のデングウイルスの構造タンパク質遺伝子を発現することができる。

【0184】

1つの血清型のデングウイルスゲノムの非構造領域を含有する遺伝子バックグラウンド

50

を使用する、本明細書に記載の戦略、および、キメラ化によって、異なる血清型のデングウイルスおよびZIKVの構造タンパク質遺伝子を発現する弱毒化の特性は、所望の免疫原性の構造タンパク質遺伝子を発現する弱毒化された生ジカ、デングワクチン候補の開発につながった。したがって、デングおよびジカ病原体の制御のためのワクチン候補を、設計することができる。

【0185】

本明細書に記載されるキメラで使用されるウイルスは、当技術分野で公知の技術を使用して一般的に増殖させる。ウイルスブラークまたはフォーカス形成単位（FFU）滴定を次に実行し、ブラークまたはFFUを数えて、細胞培養物で増殖させたウイルスの生存度、力価および表現型特性を評価する。弱毒化候補出発材料を誘導するために、野生型ウイルスを変異誘発させる。

10

【0186】

キメラの感染性クローンは、様々なデング血清型から構築される。所望により、ウイルス特異的cDNA断片のクローニングを達成することもできる。構造タンパク質または非構造タンパク質遺伝子を含有するcDNA断片を、様々なプライマーでデングRNAから逆転写酵素・ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅させる。増幅させた断片は、他の中間クローンの切断部位にクローニングする。挿入されたデング特異的cDNAの配列を検証するために、中間のキメラデングクローンを次に配列決定する。

20

【0187】

デングウイルスの構造または非構造タンパク質遺伝子領域をベクターに挿入することによって構築される完全ゲノム長キメラプラスミドは、当業者に周知の組換え技術を使用して入手できる。

【0188】

投与方法

【0189】

本明細書に記載されるウイルスキメラは、ヒトまたは動物への免疫原またはワクチンとしての投与のために、薬学的に許容される担体またはビヒクルと個々に、または共同で組み合わされる。本明細書において、用語「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容されるビヒクル」は、これらに限定されないが、有害な生理反応を引き起こすことなく生きている動物またはヒト組織と接触させて使用するのに適し、組成物の他の構成成分と有害な方法で相互作用しない、水または食塩水、ゲル、膏薬（salve）、溶媒、希釈剤、液状軟膏基剤、リポソーム、ミセル、巨大ミセルなどを含む、任意の組成物または化合物を意味するために使用される。

30

【0190】

免疫原性またはワクチン製剤は、ウイルスブラーク形成単位（PFU）またはフォーカス形成単位（FFU）剤形の形で便利に提供することができ、従来の製薬技術を使用することによって調製することができる。そのような技術は、有効成分および薬学的担体（複数可）または賦形剤（複数可）を会合させるステップを含む。一般に、製剤は、有効成分を液体担体と均一および緊密に会合させることによって調製される。非経口投与に適する製剤には、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬および製剤を意図されるレシピエントの血液と等張性にする溶質を含有することができる水性および非水性の無菌注射溶液、ならびに懸濁化剤および増粘剤を含むことができる水性および非水性の無菌懸濁物が含まれる。製剤は、単位用量または多回用量容器、例えば、密封アンプルおよびバイアルで提供することができ、使用直前に無菌の液体担体、例えば注射用水を添加するだけでよい、フリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存することができる。即席の注射溶液および懸濁物は、当業者が一般に使用する無菌の粉末、顆粒および錠剤から調製することができる。

40

【0191】

好みしい単位投薬製剤は、投与される成分の用量もしくは単位、またはその適當な一部を含有するものである。上で特に言及した成分に加えて、本発明の製剤は当業者によって一般に使用される他の薬剤を含むことができることを理解するべきである。

50

【 0 1 9 2 】

免疫原性またはワクチン組成物は、これらに限定されないが、頬側および舌下、直腸、エアゾール、経鼻、筋肉内、皮下、皮内および局所を含む、経口または非経口などの様々な経路を通して投与することができる。組成物は、これらに限定されないが、溶液、乳剤および懸濁物、マイクロスフェア、粒子、微粒子、ナノ粒子およびリポソームを含む、様々な形で投与することができる。免疫化スケジュールにつき、約 1 から約 5 用量が必要とされ得ると予想される。初回用量は、約 1 0 0 から約 1 0 0 , 0 0 0 P F U または F F U の範囲であり得、好ましい投薬量範囲は約 5 0 0 から約 2 0 , 0 0 0 P F U または F F U であり得、より好ましい投薬量範囲は約 7 5 0 から約 1 2 , 0 0 0 P F U または F F U であり得、最も好ましい投薬量範囲は約 7 5 0 から約 4 0 0 0 P F U または F F U であり得る。ブースター注射は、約 1 0 0 から約 2 0 , 0 0 0 P F U または F F U の投薬量の範囲であり得、好ましい投薬量範囲は約 5 0 0 から約 1 5 , 0 0 0 であり得、より好ましい投薬量範囲は約 5 0 0 から約 1 0 , 0 0 0 P F U または F F U であり得、最も好ましい投薬量範囲は約 5 0 0 から約 5 0 0 0 P F U または F F U であり得る。例えば、投与体積は、投与経路によって変動する。筋肉内注射は、約 0 . 1 m l から 1 . 0 m l の範囲内の体積であってもよい。

10

【 0 1 9 3 】

組成物は、約 - 1 0 0 から約 4 の温度で保存することができる。組成物は、室温を含む様々な温度で、凍結乾燥状態で保存することもできる。組成物は、当業者に公知である従来の手段を通して滅菌することができる。そのような手段には、これに限定されないが、濾過が含まれる。組成物は、細菌増殖を阻害するために、静菌剤と組み合わせることもできる。

20

【 0 1 9 4 】**投与スケジュール****【 0 1 9 5 】**

本明細書に記載される免疫原性またはワクチン組成物は、ヒトまたは家畜、例えばウマまたは鳥類、特に Z I K V 感染が存在する領域に移動する個体に、またそれらの領域の居住者に投与することができる。組成物の投与について最適な時間は、Z I K Vへの初期曝露の約 1 ~ 3 カ月前である。しかし、疾患進行を改善するために初期感染の後に、または疾患を処置するために初期感染の後に組成物を投与することもできる。

30

【 0 1 9 6 】**アジュバント****【 0 1 9 7 】**

当業者に公知である様々なアジュバントを、本発明の免疫原またはワクチン組成物中でキメラウイルスと併用して投与することができる。そのようなアジュバントには、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：ポリマー、コポリマー、例えばポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンコポリマー、例えばブロックコポリマー、ポリマー p 1 0 0 5 、フロイント完全アジュバント（動物の場合）、フロイント不完全アジュバント；ソルビタンモノオレエート、スクアレン、C R L - 8 3 0 0 アジュバント、ミョウバン、Q S 2 1 、ムラミルジペプチド、C p G オリゴヌクレオチドモチーフおよび C p G オリゴヌクレオチドのモチーフの組み合わせ、トレハロース、細菌抽出物、例えばミコバクテリウム抽出物、解毒されたエンドトキシン、膜脂質またはそれらの組み合わせ。

40

【 0 1 9 8 】**核酸配列****【 0 1 9 9 】**

Z I K V およびデングウイルスの核酸配列は、試料または検体中の Z I K V およびデングウイルスキメラの高い感度および特異性での検出のための核酸プローブおよびプライマーを設計するのに有用である。ワクチンウイルスの存在を検出するために、Z I K V およびデングウイルスに対応するプローブまたはプライマーを使用することができる。核酸および対応するアミノ酸配列は、生物体および疾患を研究するための、ならびに疾患のため

50

の療法および処置を開発するための研究室ツールとして有用である。

【0200】

核酸プローブおよびプライマーは、ZIKVおよびデングウイルスをコードする核酸分子と、またはその相補配列と選択的にハイブリダイズする。「選択的」または「選択的」は、ZIKV配列およびデングウイルス配列の十分な検出を阻止する他の核酸とハイブリダイズしない配列を意味する。したがって、ハイブリダイズする核酸の設計において、選択性は、試料中に存在する他の構成成分に依存する。ハイブリダイズする核酸は、それがハイブリダイズする核酸のセグメントと少なくとも70%の相補性を有するべきである。核酸を記載するために本明細書で使用される場合、用語「選択的にハイブリダイズする」は、時折のランダムにハイブリダイズする核酸を排除し、したがって、「特異的にハイブリダイズする」と同じ意味を有する。本発明の選択的にハイブリダイズする核酸プローブおよびプライマーは、それがハイブリダイズする配列のセグメントと、少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%および99%の相補性、好ましくは85%またはそれより高い相補性を有することができる。10

【0201】

本発明は、コード核酸または該核酸の相補的なもしくは対向する鎖に選択的にハイブリダイズする配列、プローブおよびプライマーも企図する。機能的種間ハイブリダイゼーション能力が維持される限り、核酸との特異的ハイブリダイゼーションは、核酸における少數の改変または置換があっても起こり得る。「プローブ」または「プライマー」は、これらの検出または增幅のために相補的核酸配列との選択的ハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーとして使用することができる核酸配列を意味し、これらのプローブまたはプライマーは、長さが約5から約100ヌクレオチドまで、または好ましくは約10から約50ヌクレオチド、または最も好ましくは約18から約24ヌクレオチドまで変動することができる。Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Sambrook、FritschおよびManiatis、ColdSpring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989年に記載されるように、ストリンジエントな条件下で種特異的核酸と選択的にハイブリダイズし、目的の配列に相補的な少なくとも5つのヌクレオチドを有するべきである、単離された核酸が本明細書に提供される。20

【0202】

プライマーとして使用される場合、所望の領域を増幅するように、組成物は、標的分子の異なる領域にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸分子を好ましくは含む。プローブまたはプライマーの長さによって、標的領域は70%の相補性塩基と完全な相補性の間で変動することができ、ストリンジエントな条件下でなおハイブリダイズすることができる。例えば、ZIKVおよびデングウイルスの存在を検出するために、ハイブリダイズする核酸（プローブまたはプライマー）とそれがハイブリダイズする配列の間の相補性の程度は、他の生物体からの核酸とのハイブリダイゼーションを識別するのに少なくとも十分である。30

【0203】

ZIKVおよびデングウイルスをコードする核酸配列は、プラスミドなどのベクターに挿入することができ、生体において組換えにより発現させて、組換えZIKVおよびデングウイルスペプチドおよび/またはポリペプチドを生成することができる。40

【0204】

本発明の核酸配列は、逆転写/ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ならびにcDNAアンプリコンを増幅するように設計されているフォワードおよびリバースアンプライマー（amplimer）を使用することによってウイルスゲノムのRNA鑄型から増幅したcDNAアンプリコンの検出を報告する役目をする診断プローブを含む。ある特定の場合では、アンプライマーの1つは、アンプライマーの3'末端にワクチンウイルス特異的変異を含有するように設計され、そのことは、標的部位でのプライマーの伸長、およびその結果としての増幅は、ウイルスのRNA鑄型がその特異的変異を含有する場合だけに起こるので、試験を効果的にワクチン株にさらにより特異的にする。50

【0205】

自動化されたPCRをベースとした核酸配列検出システムおよびTaqManアッセイ(Applied Biosystems)は、広く使用されている。診断遺伝子試験のためのより最近開発された戦略は、分子ビーコンを利用する(TyagiおよびKramer、1996年、Nature Biotechnology 14巻：303～308頁)。分子ビーコンアッセイは、TaqManアッセイで使用されるものと異なるクエンチャーおよびリポーター色素を用いる。これらおよび他の検出システムを、当業者は使用することができる。

【0206】

フラビウイルスキメラ生成

【0207】

本明細書に記載されるように、弱毒化された生フラビウイルスワクチンは、組換えDNAテクノロジーを使用して開発される。本明細書において、この技術は、フラビウイルスの間での、ゲノム構成、ウイルスタンパク質の数、複製戦略、遺伝子発現、ビリオン構造および形態形成の保存によって促進される。全てのフラビウイルスは、プロセシングされてカプシド(C)、前膜(prM)およびエンベロープ糖タンパク質(E)構造タンパク質を与え、続いて非構造タンパク質NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4BおよびNS5をその順序で与える、単一の長いポリタンパク質をコードする正のセンスの非セグメント化RNAゲノムを有する。これらの共有される特性のために、生存能力のあるキメラウイルスは、フラビウイルスの完全長感染性cDNAクローンのウイルス構造タンパク質のための遺伝子を、別のフラビウイルスの対応するウイルス遺伝子(cDNAの形の)で置き換えることによって生成される。試験をしたとき、この戦略は、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)またはダニ媒介性のランガットウイルス(LGT)のウイルス構造タンパク質prMおよびEの配列を含有したキメラで成功したが、全ての他の配列は、カ媒介性4型デングウイルス(DEN4)の完全長感染性cDNAに由来した。これは、異種のフラビウイルス、TBEVまたはLGTのウイルス構造タンパク質が、DEN4のシス作用性5'および3'配列ならびに非構造タンパク質との関連で機能するかもしれないことを示した。重要なことに、両方のキメラは、末梢のビルレンス、すなわち、末梢の接種部位からCNSに拡散して脳炎を引き起こすウイルスの能力に関して、マウスにおいて高度に弱毒化されることを証明した。それにもかかわらず、キメラは免疫原性であって、TBEVまたはLGTでのチャレンジに対してマウスにおいて抵抗性を誘導することができることを証明した。in vivoウイルス複製の低減(弱毒化)と防御免疫の誘導との間の好ましい平衡が達成されたようであった。これは、ダニ媒介性のフラビウイルスのprMおよびEは、DEN4非構造タンパク質ならびにシス作用性5'および3'配列との関連で、感染性および免疫の誘導に十分であるが、in vivoでの高レベルの複製およびCNSに拡散する能力を必要とするビルレンスの完全な発現に十分でないレベルで、相互作用することができることを意味すると解釈される。最近、西ナイルウイルスおよび弱毒化デングウイルス骨格からの構造タンパク質を含有する西ナイルウイルスおよびデングウイルスキメラは、免疫原またはワクチンとして有効であることが示された。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2005/0100886A1号を参照する。

10

20

30

40

【0208】

これらのワクチン候補の構成成分の役割をするデングウイルスの非構造タンパク質のための遺伝子におけるさらなる変異の導入によるジカ/デングキメラのさらなる弱毒化。1つまたは複数の弱毒化変異をキメラのデング構成成分に加えることによって、候補ワクチンジカ/DENまたはジカ/DEN-30キメラ(血清型1、2、3または4)の弱毒化レベルの増加が達成される。例えば、マウスにおいてDEN4を弱毒化する変異の大きなセットが、米国特許出願公開第2005/0100886A1号に記載されるWN/DEN4キメラウイルスに含まれるDEN4ゲノムの一部で同定された。弱毒化変異のこのセットからのメンバーをジカ/デング(血清型1、2、3または4)キメラウイルスに導入して、これらのウイルスをさらに弱毒化することができる。ジカ/DEN4ウイルスを

50

さらに弱毒化する必要があるかもしれない。さらなる弱毒化を達成するこのアプローチの実現可能性は、温度感受性表現型ならびに乳のみマウス脳における成長制限の表現型を規定する存続可能な変異をジカ / デングキメラのデング構成成分の非構造タンパク質 3 (N S 3) に導入することによって、例示される。変異 4 8 9 1 (イソロイシン > トレオニン) は、 D E N 4 の N S 3 遺伝子のヌクレオチド 4 8 9 1 で、以前に同定されていた。変異 4 8 9 1 は、2つの望ましい表現型、すなわち、温度感受性および脳組織における成長制限を規定した。同様に、同じく N S 3 における変異 4 9 9 5 (セリン > プロリン) は、同じ2つの望ましい表現型を規定した。4 8 9 1 および 4 9 9 5 変異も、ベロ細胞における D E N 4 の複製適応度を増加させる、すなわち、それらはベロ細胞適応変異である。 D E N 4 の 4 8 9 1 の野生型アミノ酸残基 (イソロイシン) は、 D E N 2 トンガ / 7 4 および D E N 3 スレマン / 7 8 で保存されているが、 D E N 1 西太平洋では保存されていない。 D E N 4 の 4 9 9 5 の野生型アミノ酸残基 (セリン) は、 D E N 1 西太平洋、 D E N 2 トンガ / 7 4 で保存されているが、 D E N 3 スレマンでは保存されていない。これらの変異の1つまたはその両方も、ジカ / D E N 1 、 2 または 3 キメラに含まれてもよい。したがって、ジカ / D E N 4 ウィルスにおけるそれらの組入れは、ベロ細胞におけるウィルス複製またはベロ細胞における製造の間の変異の遺伝的安定性の増加を達成するものと考えられている。

10

【 0 2 0 9 】

遠縁のダニ媒介性およびカ媒介性のフラビウイルスの p r M および E タンパク質は高度に異なるが、これらのタンパク質は一部の場合にウイルス生存度を失わずに交換できることが実証された。このアプローチは、新しいキメラフラビウイルスを作製するために使用された。

20

【 0 2 1 0 】

さらに、存続可能なダニ媒介性 / D E N 4 キメラを構築して、回収した。これらの場合には、ダニ媒介性の親フラビウイルスは、ダニ媒介性脳炎ウイルス（高度にビルレントなウイルス）またはランガットウイルス（天然弱毒化ダニ媒介性ウイルス）であった。したがって、これらのキメラの2つの構成成分は、異種のベクター宿主、すなわち、ダニ、および D E N 4 の場合には力を有した。キメラにおける遺伝子生成物相互作用の効率の低下は、これらのハイブリッドウイルスによって示される著しい弱毒化の基礎であると考えられた。それにもかかわらず、マウスでは高度に弱毒化されるが、 T B E V / D E N 4 および L G T / D E N 4 キメラは免疫原性であり、それらの親のダニ媒介性のフラビウイルスに対してかなりの保護を提供した。

30

【 0 2 1 1 】

構造 p r M および E タンパク質のためのその遺伝子が W N 株 N Y 9 9 の対応する遺伝子で置き換えられた D E N 4 ゲノムを含有した、存続可能な W N / D E N 4 キメラも構築した。米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 0 0 8 8 6 A 1 号。 W N / D E N 4 キメラの親ウイルスは、力によって伝染する。しかし、ベクターの好みは異なり、 D E N 4 は A e d e s を、 W N は C u l e x を好む。高度に弱毒化されるが、 W N / D E N 4 キメラは、 W N の N Y 9 9 に対する中程度から高レベルの血清中和抗体を刺激した。免疫化によって誘導される W N に対する中和抗体のレベルと以降の致死性の W N チャレンジへの抵抗性の間に、強力な相関があった。

40

【 0 2 1 2 】

【 実施例 】

【 0 2 1 3 】

弱毒化 Z I K V の構築。 3 0 変異を含有する弱毒化 Z I K V (r Z I K V - 3 0) 、または r D E N 4 - 3 0 からの 3 ' U T R を含有する Z I K V (r Z I K V - 3 ' D 4 - 3 0) を構築する。

【 0 2 1 4 】

弱毒化キメラ Z I K V の構築。図 1 1 に示すように、弱毒化 Z I K V は、 Z I K V の p r M および E を D E N 2 - 3 0 に導入することによって構築される。新しいキメラウイル

50

スは、r ZIKV / D2 30と命名されるだろう。同様に、ZIKVのprMおよびEをDEN3 30に導入することができる。

【0215】

多価ワクチンの製造。多価ワクチンは、弱毒化ウイルス、例えば、rDEN1 30、rDEN2 / 4 30、rDEN3 30 / 31、rDEN4 30およびrZIKV / D2 30を組み合わせることによって構築される。

【0216】

五価のDENV-ZIKVワクチンの開発。図12に表すキメラcDNAプラスミドは、DEN2 30またはDEN4 30のprMおよびE遺伝子領域を、ZIKV-パライバ/2015（ブラジル）に由来するものと置き換える。E.coliでの安定性のために、ウイルスのオープンリーディングフレームがインtron配列の挿入によって破壊されなければならないと決定され、それは図14A～14Cにより詳細に示され、下で議論される。感染性ウイルスを回収するために、ベロ細胞にcDNAプラスミドをトランスフェクトした。転写はCMVプロモーター配列から進行し、リボザイム（RBZ）およびターミネーター（TERM）配列によって終了して、ウイルスゲノムを生成する。インtron配列は、正常なRNAスプライシングプロセスによって除去される。DENV-2およびDENV-4バックグラウンドのためのプラスミドマップは、図13Aおよび13Bに示す。

10

【0217】

上記で考察されるように、キメラDENV-ZIKV構築物を安定させるために、インtron配列が要求された。同じ標準のインtron配列が、各cDNA構築物のために使用された。ZV-D2は、NS1遺伝子領域のアラニンコドン149に単一の挿入を含有する（図14A）。ZV-D4は、NS2Aのアラニンコドン148（図14B）およびNS5のアラニンコドン425（図14C）に位置する2つのインtron挿入を含有する。

20

【0218】

組織培養細胞におけるDENV-ZIKVキメラウイルスの複製動態およびピーク力価の評価。キメラウイルスrZIKV/D2 30-710（DEN2 30バックグラウンド）およびrZIKV/D4 30-713（DEN4 30バックグラウンド）をベロ細胞で生成して、それから回収し、ベロ細胞における2回の限界希釀によって生物学的にクローニングし、次に、ベロ細胞での継代によってさらに増幅し、有効シードストックを生成した。2つの異なる感染多重度（MOI）でウイルス増殖動態を評価した。図15Aに示すように、両ウイルスは $6.1 \log_{10} \text{PFU/mL}$ 超まで複製し、力価は約5日目にピークに達する。両ウイルスで、0.01のMOIはより高い収量を提供した（図15B）。両ウイルスは、さらなる評価および製造のために適すると考えられた。

30

【0219】

弱毒化のレベルは、2つのバックグラウンドでわずかに異なる可能性がある。弱毒化の試験は、非ヒト靈長類における研究およびヒト被験体におけるフェーズI評価によって判定される。最終ワクチン候補への下方選択（down selection）は、ヒト被験体における安全性、感染性および免疫原性に基づく。

40

【0220】

DENV-ZIKVキメラウイルスの弱毒化の評価。ワクチン候補の弱毒化は、非ヒト靈長類の研究を通してアクセスし、ここで、ウイルス複製およびワクチン候補の免疫原性は、野生型ZIKVと比較した。アカゲザルを、野生型ウイルス（ZIKV-SJRP/2016、ZIKV-ニカラグア/2016、またはZIKV-パライバ/2015）またはキメラZIKVワクチン候補（rZIKVD2 30-710またはrZIKVD4 30-713）の 10^4 pfu ($4.0 \log_{10} \text{ PFU}$)で、皮下に接種した。接種の2から8日後に、血清を毎日収集した。収集した血清を、感染性ウイルスについてベロ細胞で分析した。下の表1は、ウイルス血症評価の結果を示し、表2は、ウイルス血症評価の平均力価を示す。

【0221】

50

野生型ZIKVは、3～4日間に約 $2\log_{10}\text{PFU/mL}$ の力価まで複製した。キメラワクチン候補の複製は、検出レベル($<0.7\log_{10}\text{PFU/mL}$)未満であって、それによって、野生型ZIKVと比較したそれらの弱毒化表現型を確認した。検出された弱毒化は、おそらくキメラ化および30変異の存在による。

【表1】

表1.野生型ZIKVまたはキメラZIKVワクチンの候補で接種したアカゲザルにおけるウイルス血症力価

ウイルス	サルID	ウイルス血症力価 - $\log_{10}\text{PFU/mL}$						平均 ピーク
		2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	ピーク	
ZIKV-SJRP	DFWV	<0.7	1.5	<0.7	1.0	<0.7	1.5	1.8
	DF5A	1.5	1.8	1.7	<0.7	<0.7	1.8	
	DF3Z	0.7	1.8	1.8	0.7	<0.7	1.8	
	0FA	1.5	1.3	1.9	0.7	<0.7	1.9	
ZIKV-ニカラグア	DF0B	2.2	2.5	1.5	<0.7	<0.7	2.5	2.3
	DF2H	1.8	2.2	1.7	<0.7	<0.7	2.2	
	DFWF	1.7	2.3	2.3	1.0	<0.7	2.3	
	DFWL	1.7	2.1	1.9	<0.7	<0.7	2.1	
ZIKV-パライバ	DFWW	<0.7	1.5	1.8	1.3	<0.7	1.8	2.1
	06Z	2.4	2.6	1.8	<0.7	<0.7	2.6	
	06J	1.9	2.0	1.4	<0.7	<0.7	2.0	
	DFXA	0.7	1.8	2.0	<0.7	<0.7	2.0	
rZIKVD2Δ30	0FD	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7
	06R	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
	DF1N	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
	DFOX	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
rZIKVD4Δ30	DFZH	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7
	DFWM	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
	047	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	
	062	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	

【表2】

10

20

30

平均力価(日別):	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目
ZIKV-SJRP	1.2	1.6	1.8	0.8	<0.7
ZIKV-ニカラグア	1.9	2.3	1.9	1.0	<0.7
ZIKV-パライバ	1.7	2.0	1.8	1.3	<0.7
rZIKVD2Δ30	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7
rZIKVD4Δ30	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7

【0222】

具体的な実施形態

40

【0223】

ある態様によれば、本開示は、ジカウイルス(ZIKV)からの少なくとも1つの構造タンパク質をコードする第1のヌクレオチド配列、第1のフラビウイルスからの少なくとも1つの非構造タンパク質をコードする第2のヌクレオチド配列、および第2のフラビウイルスからの3'非翻訳領域の第3のヌクレオチド配列を含む、ジカ核酸キメラを提供する。

【0224】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、第1のフラビウイルスはデングウイルスである。

【0225】

50

本明細書に記載のある態様または実施形態において、第1のフラビウイルスはZIKVである。

【0226】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、第2のフラビウイルスはデングウイルスである。

【0227】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、第2のフラビウイルスはZIKVである。

【0228】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、デングウイルスはデング血清型1

10

である。

【0229】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、デングウイルスはデング血清型2である。

【0230】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、デングウイルスはデング血清型3である。

【0231】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、デングウイルスはデング血清型4である。

20

【0232】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、3'非翻訳領域はヌクレオチド配列に欠失を含有する。

【0233】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、欠失は、30欠失、31欠失、30/31欠失および86欠失からなる群より選択される。

【0234】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、ジカ核酸キメラは、NS3遺伝子のヌクレオチド4891および/またはNS3遺伝子のヌクレオチド4995に変異をさらに含む。

30

【0235】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、少なくとも1つの構造タンパク質は前膜(pрM)、エンベロープ(E)またはその両方である。

【0236】

ある態様によれば、本開示は、デング血清型1に対して免疫原性である第1の弱毒化ウイルス、デング血清型2に対して免疫原性である第2の弱毒化ウイルス、デング血清型3に対して免疫原性である第3の弱毒化ウイルス、デング血清型4に対して免疫原性である第4の弱毒化ウイルス、およびZIKVに対して免疫原性である第5の弱毒化ウイルスを含む、五価の免疫原性組成物を提供する。

【0237】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、第5の弱毒化ウイルスは本開示のジカ核酸キメラである。

【0238】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、弱毒化ウイルスの各々は同じ弱毒化欠失または変異を含む。

【0239】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、欠失は3'非翻訳領域のヌクレオチド配列における欠失である。

【0240】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、欠失は、30欠失、31欠失

50

、 30 / 31 欠失および 86 欠失からなる群より選択される。

【0241】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、さらに変異を含む五価の免疫原性組成物は、NS3 遺伝子のヌクレオチド 4891 および / または NS3 遺伝子のヌクレオチド 4995 である。

【0242】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、本開示の五価の免疫原性組成物はアジュvantをさらに含む。

【0243】

さらなる態様によれば、本開示は、ラビウイルスに対して免疫原性である少なくとも 1 つの第 1 の弱毒化ウイルス、および ZIKV に対して免疫原性である第 2 の弱毒化ウイルスを含む、多価の免疫原性組成物を提供する。 10

【0244】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、ラビウイルスは、デングウイルス血清型 1、デングウイルス血清型 2、デングウイルス血清型 3、デングウイルス血清型 4、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルスおよびダニ媒介性脳炎ウイルスの少なくとも 1 つ、またはそれらの組み合わせである。

【0245】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、第 2 の弱毒化ウイルスは本開示のジカ核酸キメラである。 20

【0246】

本明細書に記載のある態様または実施形態において、第 2 の弱毒化ウイルスは、ゲノムに 1 つまたは複数の弱毒化変異および / または欠失を含む ZIKV である。

【0247】

別の態様によれば、本開示は、被験体において免疫応答を誘導する方法を提供する。この方法は、有効量の本開示の組成物を被験体に投与することを含む。

【0248】

なおさらなる態様によれば、本開示は、被験体において ZIKV 感染を予防または処置する方法を提供する。この方法は、被験体に、有効量の本開示のジカ核酸キメラ、または有効量の本開示の免疫原性組成物を投与することを含む。 30

【0249】

本発明を明解性および理解のために多少詳細に記載したが、形態および細部の様々な変更を本発明の真の範囲を逸脱することなく加えることができるることを、当業者は認める。上で参照した全ての図面、表、付録、特許、特許出願および刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。

【数1】

参考文献:

1. Bhamarapravati, N. and Suttee, Y. 2000 Vaccine 18:44-7
2. Blaney, et al. 2001 J Virol 75:9731-9740;
3. Blaney, et al. 2002 Virology 300:125-139;
4. Blaney *et al.*, Vaccine (2008) 26, 817—828).
5. Blaney *et al*, BMC Infectious Diseases 2004, 4:39.
6. Bray, M., Men, R. & Lai, C.-J. 1996 J. Virol. 70:4162-4166;
7. Burke, D. S. & Monath, T. P. 2001 in Fields Virology, eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 4-th ed., pp. 1043-1125; Hayes, C. G. 1989 in The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, ed. Monath T. P. Boca Raton, F. L.: CRC Press, Volume V, pp. 59-88
8. Caufour, P. S. et al. 2001 Virus Res 79:1-14
9. Chambers, T. J. et al. 1999 J Virol 73:3095-3101;
10. 10 M. Chastain, "National Institutes of Health: Zika Virus is a 'Pandemic'", January 30, 2016, Breitbart online news source, <http://www.breitbart.com/national-security/2016/01/30/zika-virus-reaches-pandemic-levels>.
11. Durbin et al. 2001 Am J Trop Med 65:405-413
12. Guillot, S. et al. 2000 J Virol 74:8434-43
13. Guirakhoo, F. et al. 2000 J Virol 74:5477-5485;
14. Hanley, et al. 2002 J Virol 76:525-31
15. Huang, C. Y. et al. 2000 J Virol 74:3020-3028;
16. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. 2001 in: Fields Virology, eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 4-th ed., pp. 1043-1125
17. Men et al. 1996 J Virol 70:3930-3937;
18. Oster et al., "Interim Guidelines for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus — United States, 2016", Morbidity and Mortality Weekly Report 2016; 65; 1-2
19. Pletnev, A. G., Bray, M. & Lai, C.-J. 1993 J Virol 67:4956-4963
20. Pletnev, A. G. et al. 1992 PNAS USA 89:10532-10536;
21. Pletnev, A. G. & Men, R. 1998 PNAS USA 95:1746-1751;
22. Pletnev, A. G. et al. 2000 Virology 274:26-31;
23. Pletnev, A. G. et al. 2001 J Virol 75:8259-8267
24. Worobey, M. et al. 1999 PNAS USA 96:7352-7
25. Van Der Most, R. G. et al. 2000 J Virol 74:8094-8101;

本明細書に引用または参照される全ての刊行物、特許出願、特許、図面および他の参考文献、ならびに本明細書に引用される文書において引用または参照される全ての文書は、本明細書でまたは本明細書に参照により組み込まれる任意の文書で言及される、任意の製

10

20

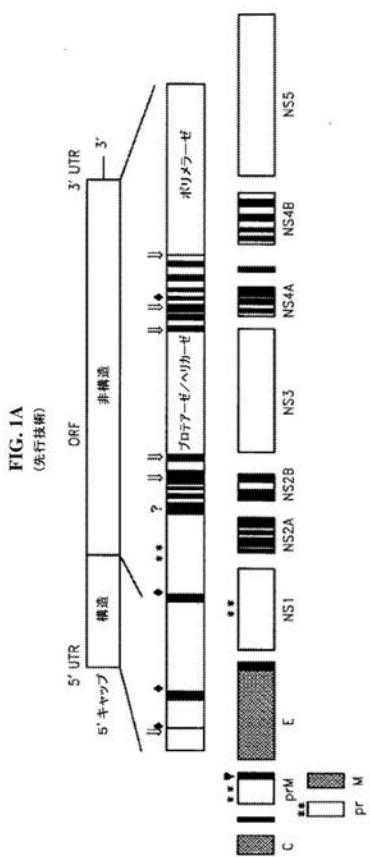
30

40

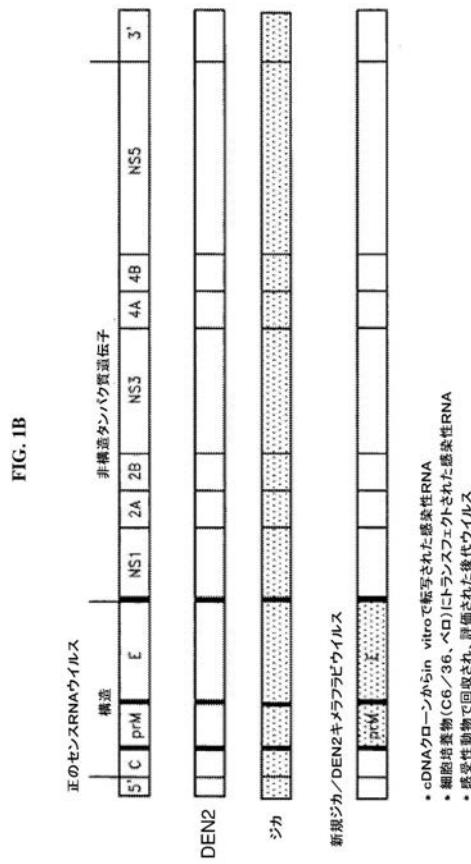
50

品のための任意の製造業者の説明書、記載、製品仕様書および製品シートと一緒に、参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施において用いることができる。

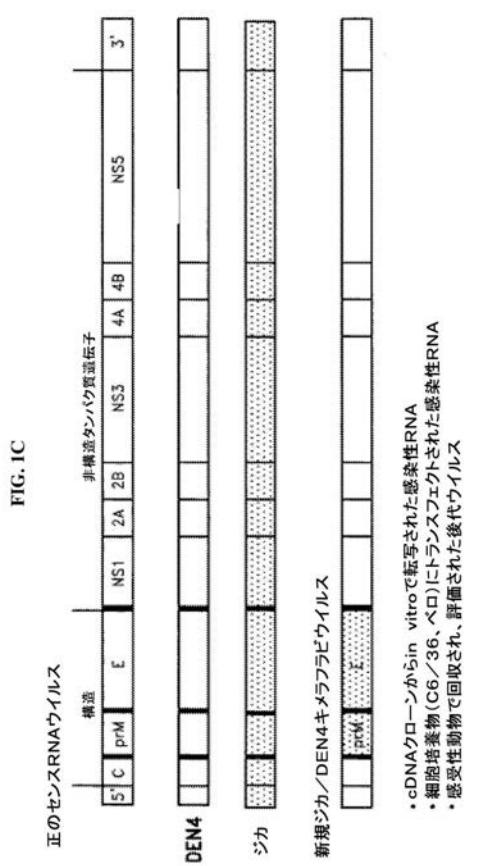
【図1A】



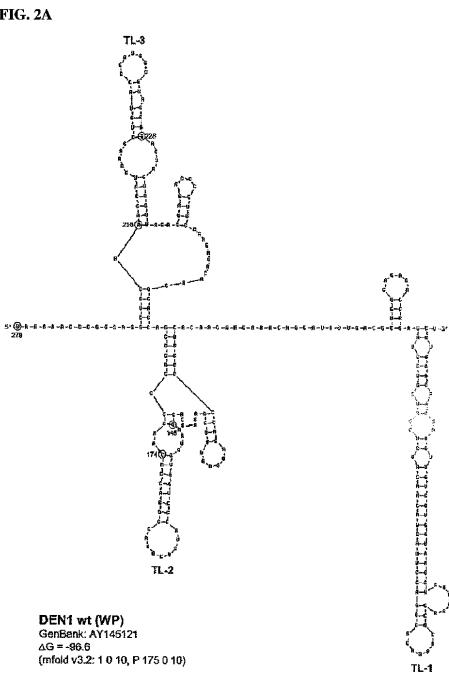
【図1B】



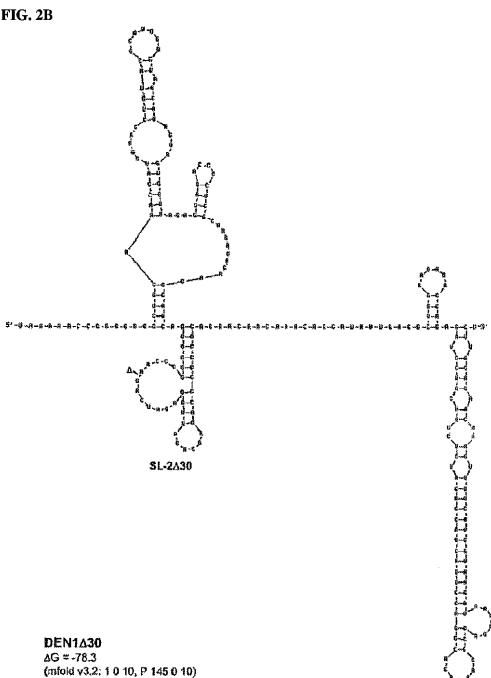
【図 1 C】



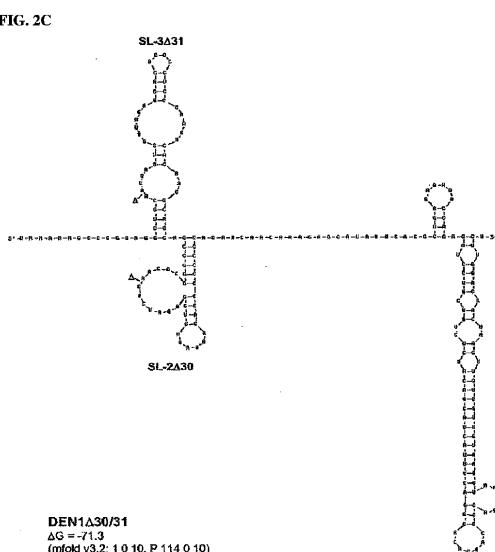
【図 2 A】



【図 2 B】

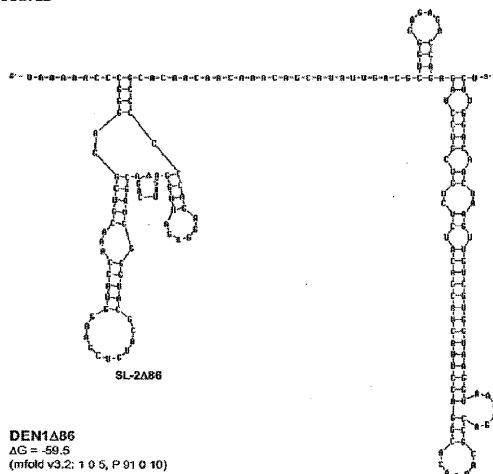


【図 2 C】



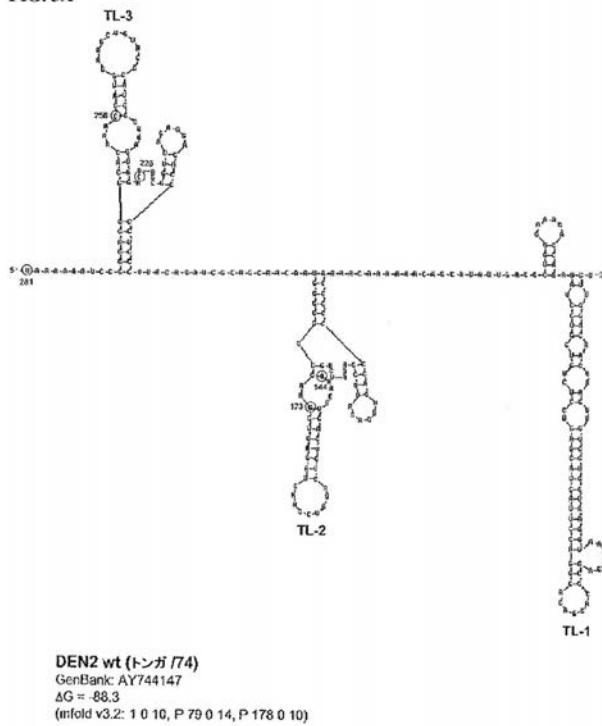
【図2D】

FIG. 2D



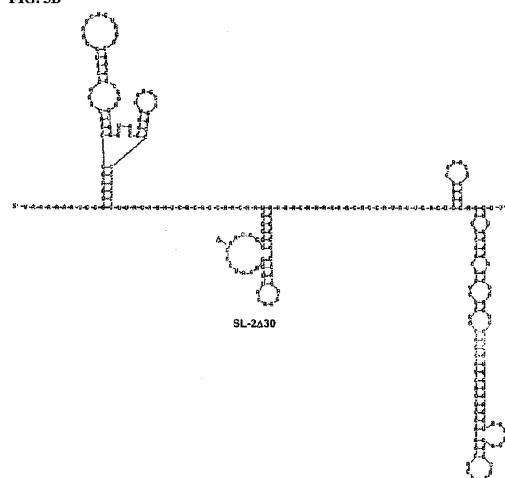
【図3A】

FIG. 3A



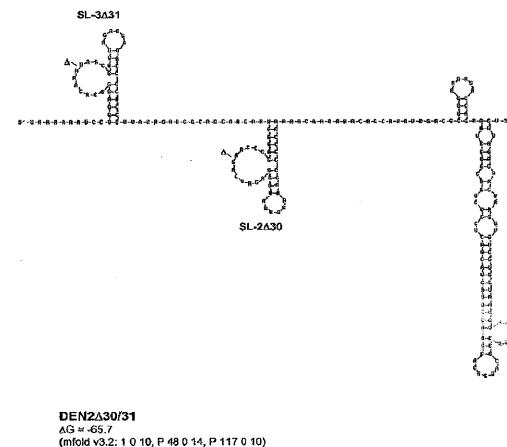
【図3B】

FIG. 3B



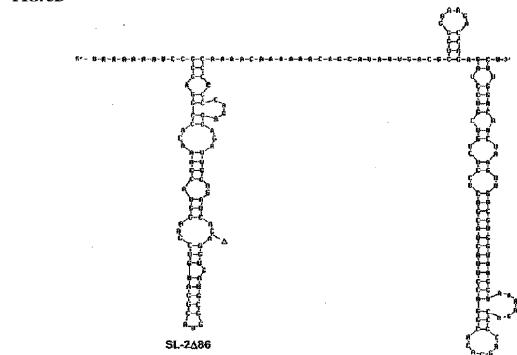
【図3C】

FIG. 3C



【図3D】

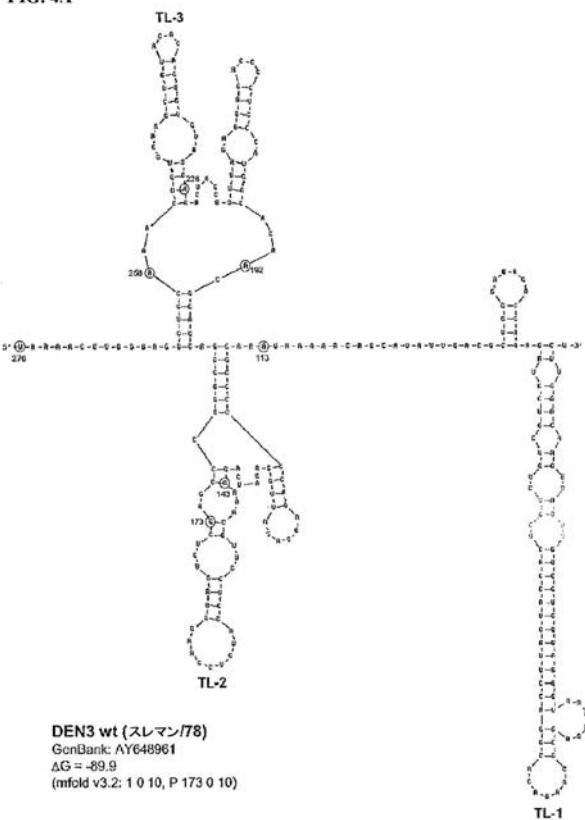
FIG. 3D



DEN2Δ86
 $\Delta G = -58.6$
 (mfold v3.2: 1 0 10, P 93 0 10)

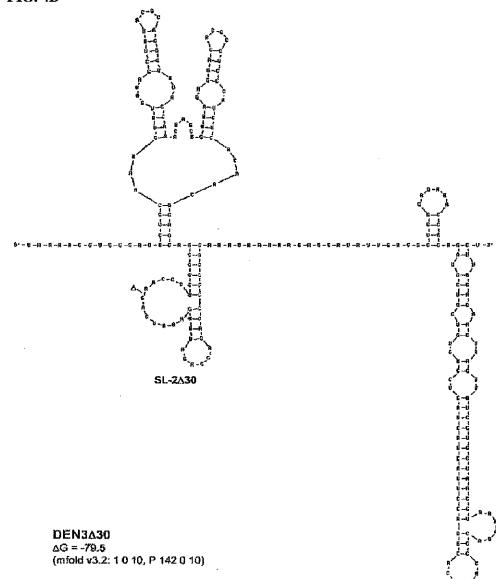
【図4A】

FIG. 4A



【図4B】

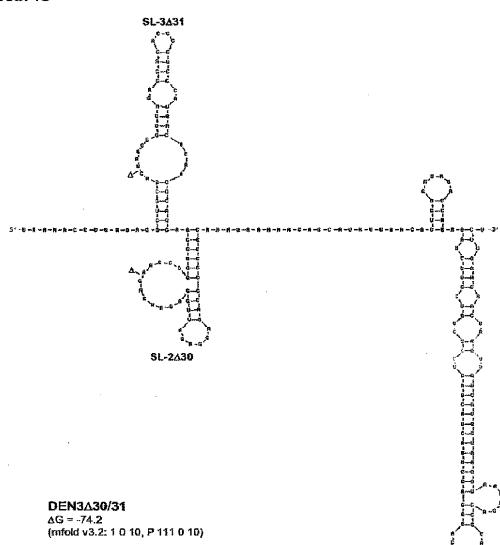
FIG. 4B



DEN3Δ30
 $\Delta G = -79.5$
 (mfold v3.2: 1 0 10, P 142 0 10)

【図4C】

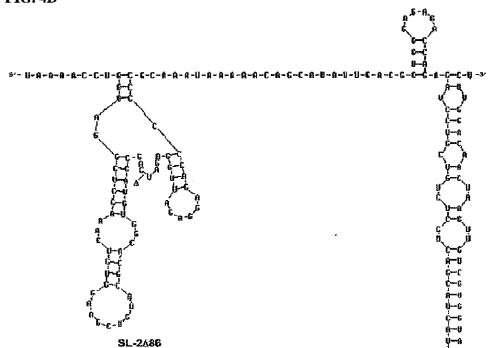
FIG. 4C



DEN3Δ30/31
 $\Delta G = -74.2$
 (mfold v3.2: 1 0 10, P 111 0 10)

【図4D】

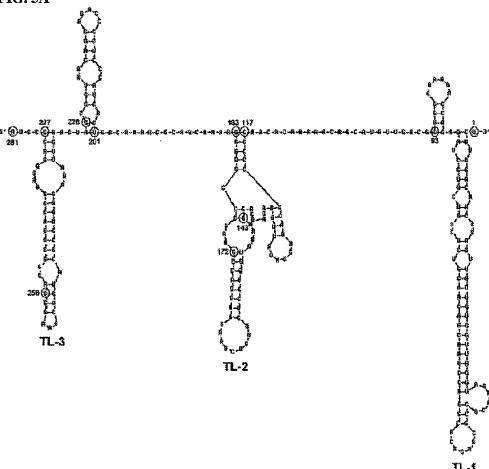
FIG. 4D



DEN3Δ86
 $\Delta G = -57.8$
(mfold v3.2: 1 0 8, P 74 0 23)

【図5A】

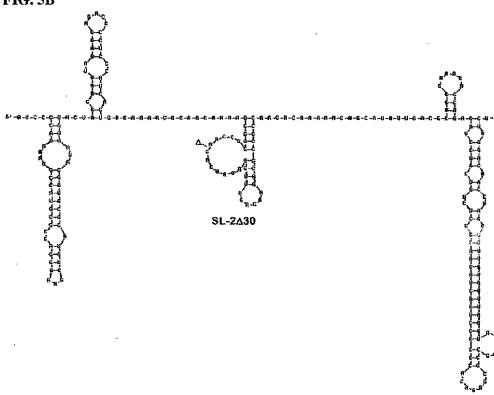
FIG. 5A



DEN4 wt (814669)
GenBank: AF326573
 $\Delta G = -98.8$
(mfold v3.2: 1 0 4, P 82 0 15, P 168 0 20)

【図5B】

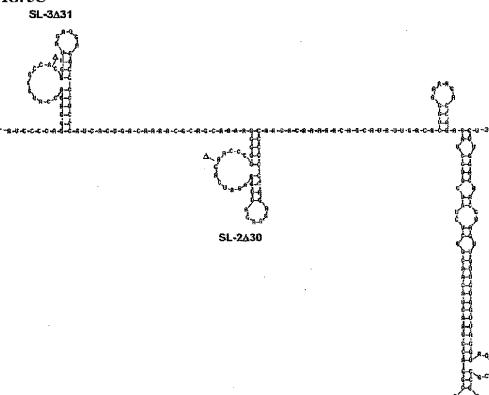
FIG. 5B



DEN4Δ30
 $\Delta G \approx -80.4$
(mfold v3.2: 1 0 4, P 82 0 15, P 137 0 20)

【図5C】

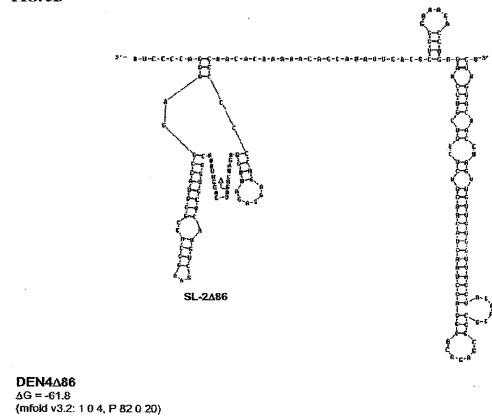
FIG. 5C



DEN4Δ30/31
 $\Delta G = -64.9$
(mfold v3.2: 1 0 4, P 51 0 15, P 106 0 20)

【 5 D 】

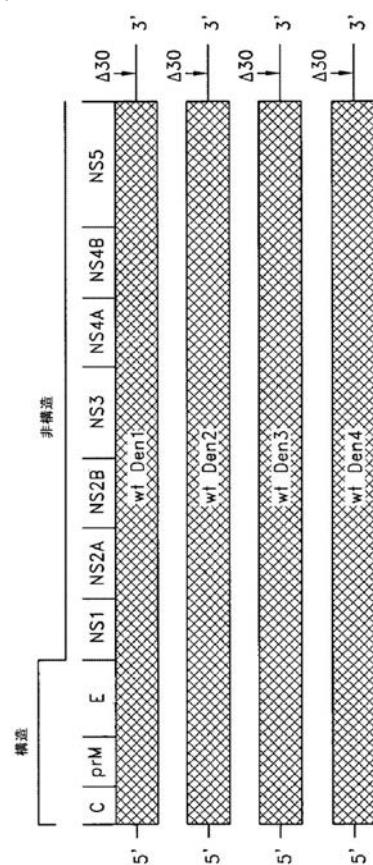
FIG. 5D



DEN4Δ86
 $\Delta G = -61.8$
(mfold v3.2: 1 0 4, P 82 0 20)

〔 四 6 〕

FIG. 6



【 7 A 】

FIG. 7A

FIG. 7A	DEN1	GGGGCCC - AACACAGGGGAAGCUGUACCUGGUGUAANGACUAGA
	DEN1A30	GGGGCCC - AA-G-C-A-C-U-G-A-C-U-G-A-C-U-A-G-A-C-U-A-G-A
	DEN2	GGGGCCC - AACGGUAGAGAUGAACGUGUAGUCACUGGAAAGCAGUAGA
	DEN2A30	GGGGCCC - AA-G-C-A-C-U-G-A-C-U-G-A-C-U-A-G-A-C-U-A-G-A
	DEN3	GGGGCCCAGCUCUAGGGGAAGCUGUACCUGGUGUAANGACUAGA
	DEN3A30	GGGGCCCAGCUCUAGGGGAAGCUGUACCUGGUGUAANGACUAGA
	DEN4	GGGGCCCCAGCACCGAGGGGAAGCUGUACUCUGGUGGAAAGCAGUAGA

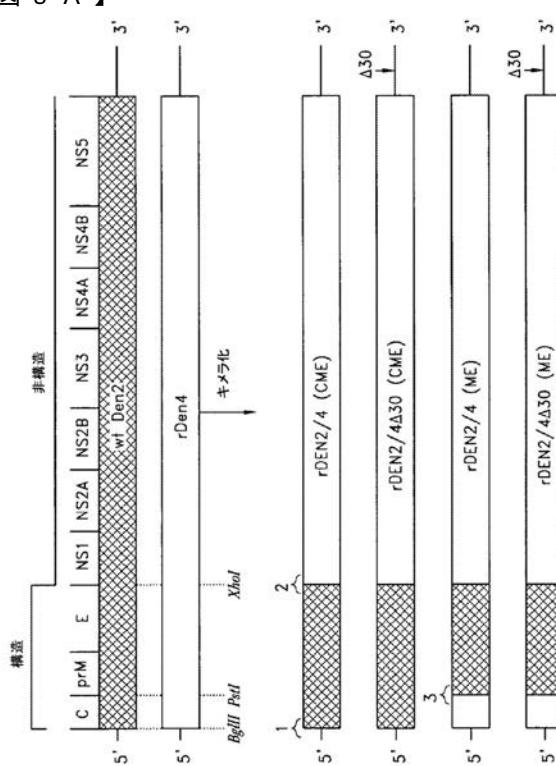
DEN1 GGGGCC-AacaccagggGAAGCUGUAccuggugguAAGGACUAGA
 DEN2 GGGGCC-AaggugagauGAAGCUGUAgucucaucuggAAAGCACUAGA
 DEN3 GGGGCCGcAgcucaggGAAGCUGUAccuccuugaAAAGCACUAGA
 DEN4 GGGGCCCAcaccaggGAAGCUGUAcucaucggAAAGCACUAGA

【 义 7 B 】

FIG. 7B

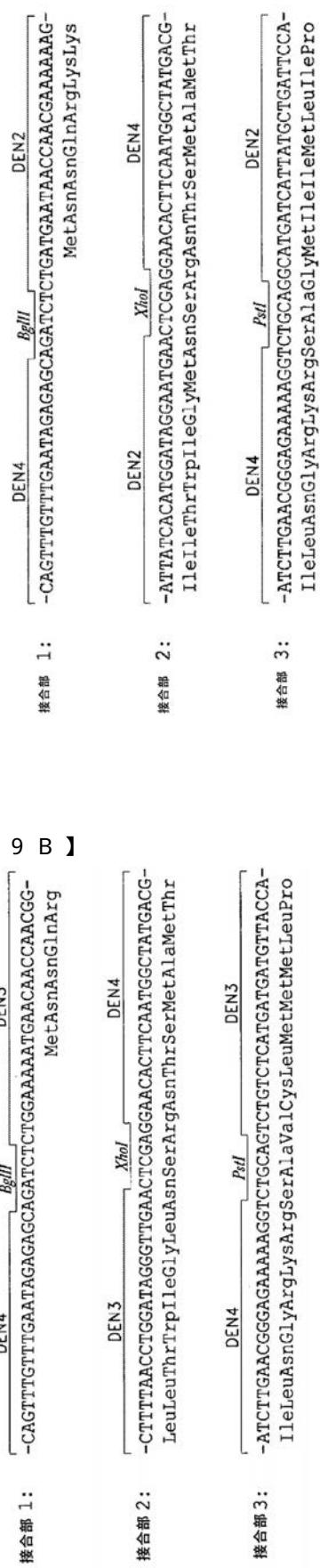
(8 A)

FIG. 8A



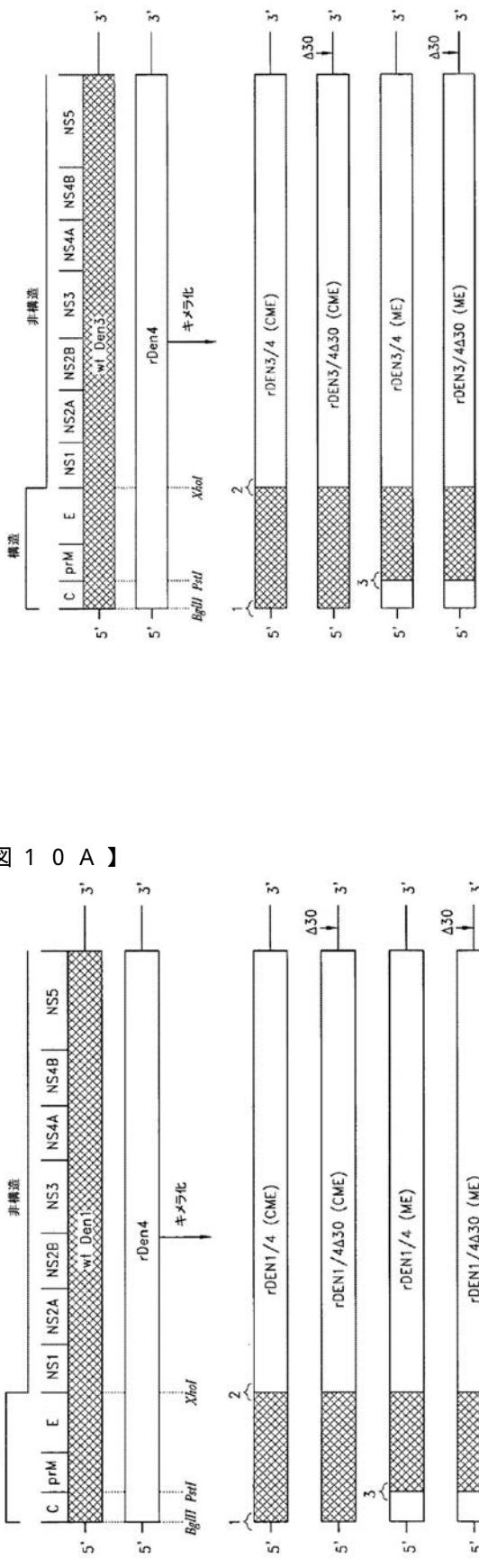
【図 8 B】

FIG. 8B

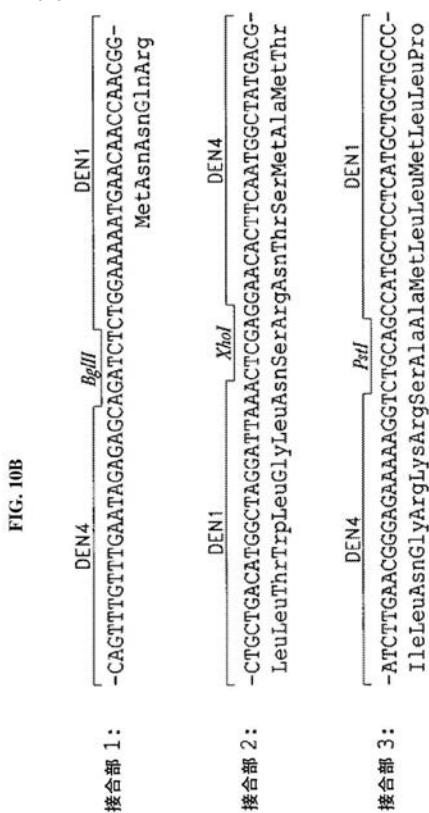


【図 9 A】

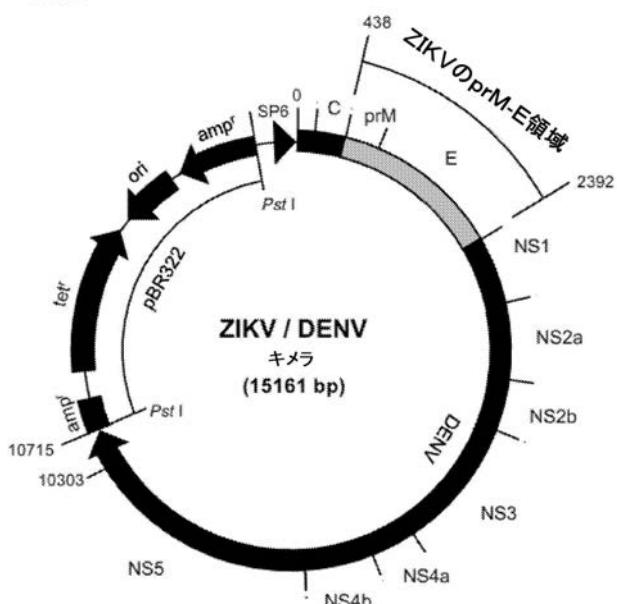
FIG. 9A



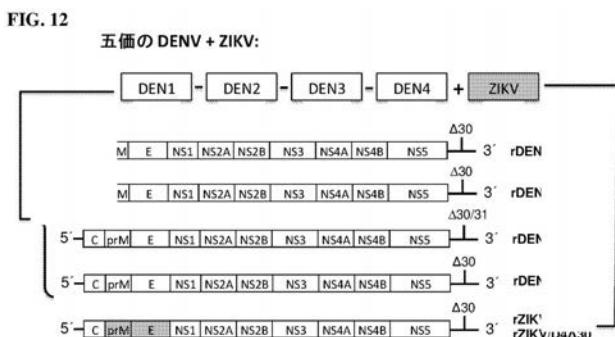
【図 10B】



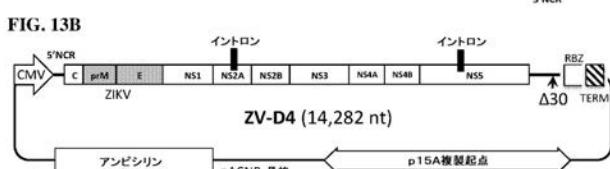
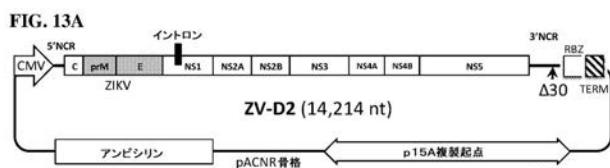
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【図 14A】

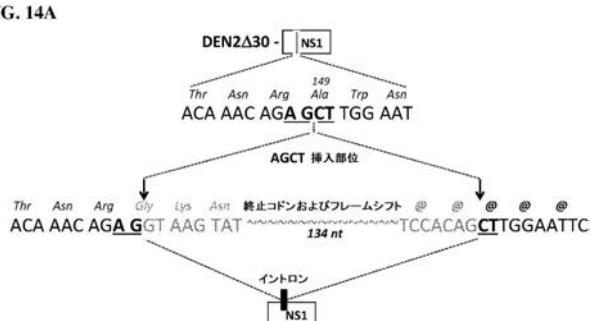
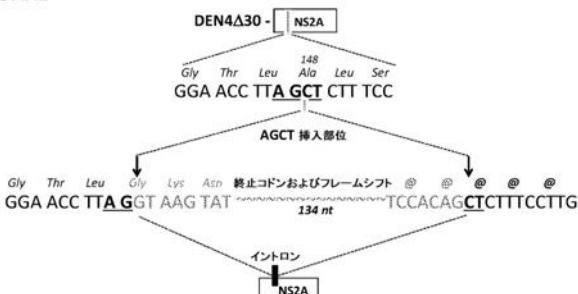
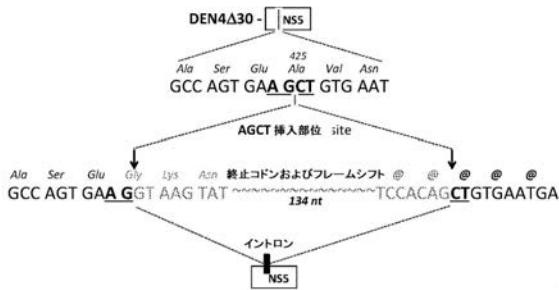


FIG. 14B



【図 1 4 C】

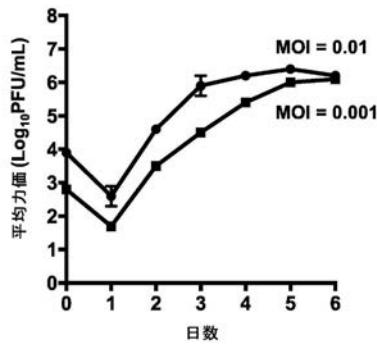
FIG. 14C



【図 1 5 A】

FIG. 15A

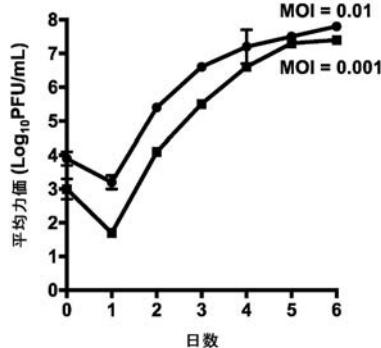
rZIKV/D2Δ30-710



【図 1 5 B】

FIG. 15B

rZIKV/D4Δ30-713



【配列表】

2019511221000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/021989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/12
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHAO SHAN ET AL: "Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine", ACS INFECTIOUS DISEASES, vol. 2, no. 3, 3 March 2016 (2016-03-03), pages 170-172, XP055276341, ISSN: 2373-8227, DOI: 10.1021/acsinfecdis.6b00030 The paragraph entitled "Vaccine" on page 171 ----- -/-	1-30

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

19 May 2017

01/06/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Marinoni J-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/021989
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:		
a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.		
b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.		
c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).		
2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.		
3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/021989

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. COHEN: "The race for a Zika vaccine is on", SCIENCE, vol. 351, no. 6273, 5 February 2016 (2016-02-05), pages 543-544, XP055360676, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.351.6273.543 The paragraph bridging the left-hand and the middle column on page 543 The paragraph bridging the middle and right-hand columns on page 543 The first full paragraph in the right-hand column on page 543 -----	1-30
A	BLANEY ET AL: "Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the DENV-3 3'-UTR with that of DENV-4", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 26, no. 6, 26 December 2007 (2007-12-26), pages 817-828, XP022425421, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2007.11.082 cited in the application -----	1-30
A	WO 03/092592 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; WHITEHEAD STEPHEN S [US]; MURPHY BRIA) 13 November 2003 (2003-11-13) cited in the application -----	1-30
A	WO 03/059384 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; PLETNEV ALEXANDER G [US]; PUTNAK JOSE) 24 July 2003 (2003-07-24) cited in the application -----	1-30
A	WO 2008/157136 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; BLANEY JOSEPH E [US]; MURPHY BRIAN [U]) 24 December 2008 (2008-12-24) cited in the application -----	1-30
A	WO 2008/022196 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; WHITEHEAD STEPHEN S [US]; BLANEY JOSE) 21 February 2008 (2008-02-21) cited in the application -----	1-30
A	WO 2012/065105 A2 (MONATH THOMAS [US]; VASILAKIS NIKOS [US]) 18 May 2012 (2012-05-18) -----	1-30
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/021989

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DURBIN A P ET AL: "Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region", AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE & HYGIENE, AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, US, vol. 65, no. 5, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 405-413, XP002399566, ISSN: 0002-9637 cited in the application -----	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/021989

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03092592	A2	13-11-2003	AT 481982 T AU 2003231185 A1 BR P10309631 A2 CA 2483653 A1 DK 1554301 T3 EP 1554301 A2 EP 2319532 A1 EP 2338508 A1 JP 4977811 B2 JP 2005532044 A PT 1554301 E US 2007009552 A1 US 2009258036 A1 US 2013011433 A1 WO 03092592 A2	15-10-2010 17-11-2003 01-11-2016 13-11-2003 24-01-2011 20-07-2005 11-05-2011 29-06-2011 18-07-2012 27-10-2005 28-12-2010 11-01-2007 15-10-2009 10-01-2013 13-11-2003
WO 03059384	A1	24-07-2003	AU 2003216046 A1 AU 2008203442 A1 AU 2011250694 A1 CA 2472468 A1 CA 2903126 A1 DK 2339011 T3 EP 1467754 A1 EP 2339011 A1 EP 2949754 A1 IL 162949 A IL 209342 A JP 4580650 B2 JP 2005521384 A JP 2009153520 A JP 2012040014 A JP 2013247958 A US 2005100886 A1 US 2014294892 A1 WO 03059384 A1	30-07-2003 21-08-2008 01-12-2011 24-07-2003 24-07-2003 06-07-2015 20-10-2004 29-06-2011 02-12-2015 30-11-2011 29-10-2015 17-11-2010 21-07-2005 16-07-2009 01-03-2012 12-12-2013 12-05-2005 02-10-2014 24-07-2003
WO 2008157136	A1	24-12-2008	AR 067439 A1 US 2010316670 A1 WO 2008157136 A1	14-10-2009 16-12-2010 24-12-2008
WO 2008022196	A2	21-02-2008	AU 2007285929 A1 BR P10716455 A2 CA 2661296 A1 CN 101657463 A CN 103602689 A DK 2054428 T3 DK 2589602 T3 EP 2054428 A2 EP 2589602 A2 ES 2585553 T3 HU E029333 T2 LT 2589602 T PL 2589602 T3 PT 2589602 T SI 2589602 T1 US RE46042 E US 2010104598 A1 US 2013089567 A1	21-02-2008 04-03-2014 21-02-2008 24-02-2010 26-02-2014 26-08-2013 25-07-2016 06-05-2009 08-05-2013 06-10-2016 28-03-2017 10-10-2016 30-11-2016 13-07-2016 31-08-2016 28-06-2016 29-04-2010 11-04-2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/021989

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2008022196 A2	21-02-2008
WO 2012065105 A2	18-05-2012	US 2012294889 A1	22-11-2012
		WO 2012065105 A2	18-05-2012

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/40 (2006.01)	C 1 2 N 15/40	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
C 0 7 K 14/18 (2006.01)	C 0 7 K 14/18	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

- (71)出願人 398076227
ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティー
アメリカ合衆国、メリーランド州 21218、ボルチモア、ノース・チャールズ・ストリート
3400
- (74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
- (74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
- (74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
- (74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 ホワイトヘッド, スティーブン エス.
アメリカ合衆国 メリーランド 20886, モントゴメリー ビレッジ, ダファー ウェイ
9644
- (72)発明者 ウッドソン, サラ イー.
アメリカ合衆国 メリーランド 20895, ケンジントン, グレンウェイ ドライブ 33
07
- (72)発明者 ダービン, アンナ ピー.
アメリカ合衆国 メリーランド 20912, タコマ パーク, ハドソン アベニュー 80
6
- (72)発明者 プレトニヨフ, アレクサンダー ジー.
アメリカ合衆国 メリーランド 20877, ゲイザースバーグ, インクベリー サークル
31
- (72)発明者 チェツサーキン, コンスタンティン エー.
アメリカ合衆国 メリーランド 20877, ゲイザースバーグ, スワン ストリーム ドラ
イブ 18304

F ターム(参考) 4B065 AA95X AA95Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA45
4C085 AA03 AA04 AA38 BA51 BA61 CC08 DD62 EE01 EE06 FF24
4H045 BA10 CA01 DA86 EA31 FA74