

(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2013-523096

(P2013-523096A)

(43) 公表日 平成25年6月17日(2013.6.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/11 (2006.01)	C O 7 K 14/11	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 91 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-501542 (P2013-501542)	(71) 出願人	512247902
(86) (22) 出願日	平成23年3月28日 (2011. 3. 28)		エマージェント プロダクト デベロップ
(85) 翻訳文提出日	平成24年11月2日 (2012. 11. 2)		メント ゲイザーズバーグ インコーポレ
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/030205		イテッド
(87) 国際公開番号	W02011/120045		アメリカ合衆国 メリーランド 2087
(87) 国際公開日	平成23年9月29日 (2011. 9. 29)		9, ゲイザーズバーグ, プロフェッシ
(31) 優先権主張番号	61/318, 232		ョナル ドライブ 300
(32) 優先日	平成22年3月26日 (2010. 3. 26)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザマトリックス2タンパク質の外部ドメイン、発現システムおよびそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、インフルエンザウイルス感染の予防および治療において有用なポリヌクレオチド、ポリペプチド、組換え改変ワクシニアウイルス An k a r a (r M V A)、関連するワクチン組成物、および方法を提供する。M2 インフルエンザ外部ドメインペプチドの複数のコピーをコードする単離ポリヌクレオチドまたはそのポリヌクレオチドを含む r M V A が提供される。インフルエンザウイルスによる感染によって引き起こされるまたはそれから結果として生じる疾患または症状を治療するための、インフルエンザウイルスに対して被験体に免疫応答を誘発させる方法もまた、提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチドをコードするコード領域を含む単離ポリヌクレオチドであって、該ポリペプチドは、少なくとも 5 つのインフルエンザウイルスマトリックス 2 タンパク質 (M 2) 外部ドメインペプチドを含む、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下のアミノ酸配列のうち任意の 5 つ以上を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド：

- i . 配列番号 1 (M 2 e # 1 _ C) ;
- i i . 配列番号 2 (M 2 e # 2 _ C) ;
- i i i . 配列番号 3 (M 2 e # 3 _ C) ;
- i v . 配列番号 4 (M 2 e # 4 _ C) ;
- v . 配列番号 5 (M 2 e # 5 _ C) ;
- v i . 配列番号 6 (M 2 e # 6 _ C) ;
- v i i . 配列番号 7 (M 2 e # 1 _ S) ;
- v i i i . 配列番号 8 (M 2 e # 2 _ S) ;
- i x . 配列番号 9 (M 2 e # 3 _ S) ;
- x . 配列番号 1 0 (M 2 e # 4 _ S) ;
- x i . 配列番号 1 1 (M 2 e # 5 _ S) ; および
- x i i . 配列番号 1 2 (M 2 e # 6 _ S) 。

10

20

【請求項 3】

ポリペプチドをコードするコード領域を含む単離ポリヌクレオチドであって、該ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下の M 2 外部ドメインペプチドのうち任意の 3 つ以上を含む、単離ポリヌクレオチド：

- i . 配列番号 1 (M 2 e # 1 _ C) ;
- i i . 配列番号 2 (M 2 e # 2 _ C) ;
- i i i . 配列番号 3 (M 2 e # 3 _ C) ;
- i v . 配列番号 4 (M 2 e # 4 _ C) ;
- v . 配列番号 5 (M 2 e # 5 _ C) ;
- v i . 配列番号 6 (M 2 e # 6 _ C) ;
- v i i . 配列番号 7 (M 2 e # 1 _ S) ;
- v i i i . 配列番号 8 (M 2 e # 2 _ S) ;
- i x . 配列番号 9 (M 2 e # 3 _ S) ;
- x . 配列番号 1 0 (M 2 e # 4 _ S) ;
- x i . 配列番号 1 1 (M 2 e # 5 _ S) ; および
- x i i . 配列番号 1 2 (M 2 e # 6 _ S) 。

30

【請求項 4】

前記ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下の M 2 外部ドメインペプチドの任意の 3 つ以上を含む、請求項 3 に記載のポリヌクレオチド：

- i . 配列番号 1 (M 2 e # 1 _ C) ;
- i i . 配列番号 2 (M 2 e # 2 _ C) ;
- i i i . 配列番号 3 (M 2 e # 3 _ C) ;
- i v . 配列番号 4 (M 2 e # 4 _ C) ;
- v . 配列番号 5 (M 2 e # 5 _ C) ; および
- v i . 配列番号 6 (M 2 e # 6 _ C) 。

40

【請求項 5】

前記ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下の M 2 外部ドメインペプチドの任意の 3 つ以上を含む、請求項 3 に記載のポリヌクレオチド：

- i . 配列番号 1 (M 2 e # 1 _ S) ;
- i i . 配列番号 2 (M 2 e # 2 _ S) ;

50

i i i . 配列番号 3 (M 2 e # 3 _ S) ;
 i v . 配列番号 4 (M 2 e # 4 _ S) ;
 v . 配列番号 5 (M 2 e # 5 _ S) ; および
 v i . 配列番号 6 (M 2 e # 6 _ S) 。

【請求項 6】

前記ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、前記 M 2 外部ドメインペプチドの任意の 4 つ以上を含む、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

前記ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、前記 M 2 外部ドメインペプチドの任意の 5 つ以上を含む、請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、前記 M 2 外部ドメインペプチドの任意の 6 つ以上を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

前記ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下の M 2 外部ドメインペプチドを含む、請求項 1 ~ 5、7、および 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド：
 配列番号 1 (M 2 e # 1 _ C)、配列番号 2 (M 2 e # 2 _ C)、配列番号 3 (M 2 e # 3 _ C)、配列番号 4 (M 2 e # 4 _ C)、配列番号 5 (M 2 e # 5 _ C)、および配列番号 6 (M 2 e # 6 _ C)。

【請求項 10】

前記ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下の M 2 外部ドメインペプチドを含む、請求項 1 ~ 4、5、7、および 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド：
 配列番号 7 (M 2 e # 1 _ S)、配列番号 8 (M 2 e # 2 _ S)、配列番号 9 (M 2 e # 3 _ S)、配列番号 10 (M 2 e # 4 _ S)、配列番号 11 (M 2 e # 5 _ S)、および配列番号 12 (M 2 e # 6 _ S)。

【請求項 11】

前記ポリペプチドは、インフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

前記マトリックス 2 タンパク質 (M 2) 外部ドメインペプチドの少なくとも 2 つは、その間にリンカーペプチドが介在せず一緒になって融合している、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記 M 2 外部ドメインペプチドの少なくとも 2 つは、その間に介在するリンカーペプチドを有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

前記リンカーペプチドは、少なくとも 5 つのアミノ酸を含む、請求項 13 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

前記リンカーペプチドは、下等生物において見出されるアミノ酸配列に対する相同性を有する、請求項 13 または 14 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

前記リンカーペプチドは、霊長類において見出されるアミノ酸配列に対する相同性を有さない、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 17】

前記リンカーペプチドのうち 1 つ以上は、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、およびその任意の組み合わせから成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1

10

20

30

40

50

6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 18】

前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの T 細胞エピトープをさらに含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 つの T 細胞エピトープは、配列番号 26 および配列番号 27 のうちの 1 つ以上を含む、請求項 18 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

前記ポリペプチドは、配列番号 16 [METR__C バージョン - 完全長] のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 21】

前記ポリペプチドは、配列番号 18 [METR__S バージョン - 完全長] のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 22】

前記コード領域は、ヒトにおける発現にコドン最適化されている、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 23】

前記コード領域は、前記インフルエンザウイルスマトリックス 2 タンパク質 (M2) 外部ドメインペプチドコード領域と作動可能に連結したプロモーターをさらに含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 24】

前記プロモーターは、配列番号 29 のヌクレオチド配列を含む、請求項 23 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 25】

前記コード領域は、さらなるポリペプチドをさらに含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 26】

前記さらなるポリペプチドは、赤血球凝集素 (HA)、ノイラミニダーゼ (NA)、核タンパク質 (NP)、マトリックス 1 タンパク質 (M1)、マトリックス 2 タンパク質 (M2)、非構造タンパク質 (NS)、RNA ポリメラーゼ PA サブユニット (PA)、RNA ポリメラーゼ PB1 サブユニット (PB1)、RNA ポリメラーゼ PB2 サブユニット (PB2)、または前記インフルエンザポリペプチドもしくはその断片の 2 つ以上の組み合わせである、請求項 25 に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 27】

前記さらなるポリペプチドは、HA またはその断片である、請求項 26 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 28】

前記 HA は、配列番号 52 のアミノ酸配列を含む、請求項 27 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 29】

前記さらなるポリペプチドは、NP またはその断片である、請求項 26 に記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 30】

前記 NP は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む、請求項 29 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 31】

前記さらなるポリペプチドは、His タグ; ユビキチンタグ; NusA タグ; キチン結合ドメイン; ompT; ompA; pelB; DsbA; DsbC; c-myc; KSI; ポリアスパラギン酸; (AIA-Trp-Trp-Pro)n (配列番号 28); ポリフェニルアラニン; ポリシステイン; ポリアルギニン; B タグ; HSB タグ; 緑色蛍光タ

50

ンパク質 (GFP) ; カルモジュリン結合タンパク質 (CBP) ; ガラクトース結合タンパク質 ; マルトース結合タンパク質 (MBP) ; セルロース結合ドメイン (CBD) ; ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) ; グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST) ; 連鎖球菌プロテイン G ; ブドウ球菌プロンテイン A : T7 gene 10 ; アビジン / ストレプトアビジン / iStreptag ; trpE ; クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ ; lacZ (D - ガラクトシダーゼ) ; His パッチチオレドキシン ; チオレドキシン ; FLAG (商標) ペプチド ; S タグ ; T7 タグ ; または前記ポリペプチドの 2 つ以上の組み合わせである、請求項 25 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

10

【請求項 33】

ウイルスベクターである、請求項 32 に記載のベクター。

【請求項 34】

前記ウイルスベクターは、ワクシニアウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、およびレトロウイルスベクターから成る群から選択される、請求項 33 に記載のベクター。

【請求項 35】

前記ワクシニアウイルスベクターは、改変ワクシニアウイルス Ankara (MVA) を含む、請求項 34 に記載のベクター。

【請求項 36】

さらなるポリペプチドをさらに発現する、請求項 35 に記載のベクター。

20

【請求項 37】

前記さらなるポリペプチドは、赤血球凝集素 (HA) 、ノイラミニダーゼ (NA) 、核タンパク質 (NP) 、マトリックス 1 タンパク質 (M1) 、マトリックス 2 タンパク質 (M2) 、非構造タンパク質 (NS) 、RNA ポリメラーゼ PA サブユニット (PA) 、RNA ポリメラーゼ PB1 サブユニット (PB1) 、RNA ポリメラーゼ PB2 サブユニット (PB2) 、または前記インフルエンザポリペプチドもしくはその断片の 2 つ以上の組み合わせである、請求項 36 に記載のベクター。

【請求項 38】

前記さらなるポリペプチドは、HA またはその断片である、請求項 37 に記載のベクター。

30

【請求項 39】

前記 HA は、配列番号 52 のアミノ酸配列を含む、請求項 38 に記載のベクター。

【請求項 40】

前記さらなるポリペプチドは、NP またはその断片である、請求項 37 に記載のベクター。

【請求項 41】

前記 NP は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む、請求項 40 に記載のベクター。

【請求項 42】

前記 MVA は、トリ細胞において複製することができる、請求項 35 ~ 41 のいずれか一項に記載のベクター。

40

【請求項 43】

前記トリ細胞は、不死化されている、請求項 42 に記載のベクター。

【請求項 44】

前記トリ細胞は、アヒル細胞である、請求項 42 または 43 に記載のベクター。

【請求項 45】

前記アヒル細胞は、バリケン属 (Cairina) 網膜細胞株または胚由来細胞株である、請求項 44 に記載のベクター。

【請求項 46】

前記アヒル細胞は、AGE1cr、AGE.pIX、または EB66 である、請求項 4

50

4 または 4 5 に記載のベクター。

【請求項 4 7】

前記ポリヌクレオチドは、前記 M V A のゲノムの天然に存在する欠失部位内に挿入されている、請求項 3 5 ~ 4 6 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 4 8】

前記天然に存在する欠失部位は、欠失部位 3 である、請求項 4 7 に記載のベクター。

【請求項 4 9】

前記ポリヌクレオチドは、前記 M V A のゲノムのオープンリーディングフレーム (O R F) 中に挿入される、請求項 3 5 ~ 4 8 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 5 0】

その必要のある被験体に投与された際に、インフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発する、請求項 3 2 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 5 1】

前記免疫応答は、体液性免疫応答、細胞媒介性免疫応答、または体液性および細胞媒介性免疫応答の組み合わせである、請求項 5 0 に記載のベクター。

【請求項 5 2】

インフルエンザウイルスと関連する疾患または状態を予防する、改善させる、または治療することができる、請求項 3 2 ~ 5 1 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 5 3】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 3 2 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 5 4】

少なくとも 1 つのインフルエンザタンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むさらなる組換え M V A をさらに含む、請求項 5 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 5】

トリ細胞である、請求項 5 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 6】

不死化されている、請求項 5 6 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 5 7】

アヒル細胞である、請求項 5 6 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 5 8】

前記アヒル細胞は、バリケン属の網膜細胞または胚由来幹細胞である、請求項 5 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 9】

A G E 1 c r、A G E 1 c r . p I X、または E B 6 6 である、請求項 5 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 6 0】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 3 2 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のベクターまたは請求項 5 3 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞によってコードされるポリペプチド。

【請求項 6 1】

インフルエンザポリペプチドを産生する方法であって、請求項 5 3 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養するステップおよび前記ポリペプチドを回収するステップを含む、方法。

【請求項 6 2】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項 3 2 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 5 3 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞、または請求項 6 0 に記載のポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 6 3】

アジュバントをさらに含む、請求項 6 2 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 6 4】

前記アジュバントは、ミョウバン、ベントナイト、ラテックスおよびアクリル粒子、ブルロニックブロックポリマー、スクアレン、貯蔵物形成剤、表面活性物質、リゾレシチン、レチナール、Q u i l A、リポソーム、およびブルロニックポリマー製剤；マクロファージ刺激物質、代替経路補体活性化因子、非イオン性界面活性剤、細菌構成成分、アルミニウムベースの塩；カルシウムベースの塩；シリカ；ポリヌクレオチド；トキシイド；血清タンパク質、ウイルスおよびウイルスに由来する物質、毒、毒液、イミダゾキニリン化合物、ポロキサマー、t o l l 様受容体（T L R）アゴニスト、m L T、C p G、M P L、カチオン脂質、Q s 2 1、ならびに前記アジュバントのうちの2つ以上の組み合わせから成る群から選択される、請求項 6 3 に記載の組成物。

10

【請求項 6 5】

さらなるインフルエンザワクチンをさらに含む、請求項 6 2 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6 6】

前記さらなるインフルエンザワクチンは、互いに対して任意の順序で配置される、以下のタンパク質またはその断片のうちの1つ以上をコードするM V Aを含む、請求項 6 5 に記載の組成物：赤血球凝集素（H A）、ノイラミニダーゼ（N A）、核タンパク質（N P）、マトリックス1タンパク質（M 1）、マトリックス2タンパク質（M 2）、非構造タンパク質（N S）、R N AポリメラーゼP Aサブユニット（P A）、R N AポリメラーゼP B 1サブユニット（P B 1）、R N AポリメラーゼP B 2サブユニット（P B 2）。

20

【請求項 6 7】

前記タンパク質は、H Aまたはその断片である、請求項 6 6 に記載の組成物。

【請求項 6 8】

前記H Aは、配列番号52のアミノ酸配列を含む、請求項 6 7 に記載の組成物。

【請求項 6 9】

前記タンパク質は、N Pまたはその断片である、請求項 6 8 に記載の組成物。

【請求項 7 0】

前記N Pは、配列番号20のアミノ酸配列を含む、請求項 6 9 に記載の組成物。

【請求項 7 1】

（a）請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項 3 2 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 5 3 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 6 0 に記載のポリペプチド、または請求項 6 2 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の組成物と、（b）前記ポリヌクレオチド、ベクター、M V A、宿主細胞、ポリペプチド組成物、またはその任意の組み合わせを投与するための手段とを含むキット。

30

【請求項 7 2】

インフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発する必要がある被験体においてインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発するための方法であって、同時にまたは任意の順序で、有効量の、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項 3 2 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 5 3 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 6 0 に記載のポリペプチド、請求項 6 2 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の組成物、またはその任意の組み合わせを該被験体に投与するステップを含む、方法。

40

【請求項 7 3】

前記免疫応答は、抗体応答を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記免疫応答は、細胞媒介性免疫応答を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記免疫応答は、細胞媒介性免疫応答および抗体応答を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記免疫応答は、粘膜免疫応答である、請求項 7 2 ~ 7 5 のいずれか一項に記載の方法

50

。

【請求項 77】

インフルエンザウイルス感染またはインフルエンザウイルス感染と関連する状態の症状を治療する、予防する、または軽減する必要がある被験体においてインフルエンザウイルス感染またはインフルエンザウイルス感染と関連する状態の症状を治療する、予防する、または軽減するための方法であって、同時にまたは任意の順序で、有効量の、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項 32 ~ 52 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 53 ~ 59 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 60 に記載のポリペプチド、請求項 62 ~ 70 のいずれか一項に記載の組成物、またはその任意の組み合わせを該被験体に投与するステップを含む、方法。

10

【請求項 78】

インフルエンザウイルス感染またはインフルエンザウイルス感染と関連する状態によって引き起こされる症状を和らげるまたは改善させる必要がある被験体においてインフルエンザウイルス感染またはインフルエンザウイルス感染と関連する状態によって引き起こされる症状を和らげるまたは改善させるための方法であって、同時にまたは任意の順序で、有効量の、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項 32 ~ 52 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 53 ~ 59 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 60 に記載のポリペプチド、請求項 62 ~ 70 のいずれか一項に記載の組成物、またはその任意の組み合わせを該被験体に投与するステップを含む、方法。

20

【請求項 79】

ワクチン接種する必要がある被験体にインフルエンザウイルス感染に対してワクチン接種するための方法であって、同時にまたは任意の順序で、有効量の、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項 32 ~ 52 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 53 ~ 59 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 60 に記載のポリペプチド、請求項 62 ~ 70 のいずれか一項に記載の組成物、またはその任意の組み合わせを該被験体に投与するステップを含む、方法。

【請求項 80】

前記インフルエンザウイルスは、インフルエンザ A 型ウイルスである、請求項 72 ~ 79 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 81】

前記インフルエンザ A 型ウイルスは、タイプ H 1、H 2、H 3、H 4、H 5、H 6、H 7、または H 9 の赤血球凝集素を含む、請求項 80 に記載の方法。

30

【請求項 82】

前記インフルエンザウイルスは、鳥または哺乳動物に由来する、請求項 72 ~ 81 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 83】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

前記被験体は、動物である、請求項 72 ~ 83 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 85】

前記被験体は、脊椎動物である、請求項 72 ~ 84 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 86】

前記被験体は、哺乳動物である、請求項 72 ~ 85 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 87】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

前記投与は、硬膜内注射、皮下注射、静脈内注射、経口投与、粘膜投与、鼻腔内投与、または肺投与を介して実行される、請求項 72 ~ 87 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 89】

前記被験体は、インフルエンザ感染の危険性がある、請求項 72 ~ 88 のいずれか一項

50

に記載の方法。

【請求項 9 0】

少なくとも 1 回の初回刺激免疫処置を施すステップをさらに含む、請求項 7 2 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記初回刺激免疫処置は、ワクチン組成物を投与することを含む、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記ワクチン組成物は、DNA ワクチンまたはポリペプチドワクチンである、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

少なくとも 1 回の追加免疫免疫処置を施すステップをさらに含む、請求項 7 2 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記追加免疫免疫処置は、ワクチン組成物を投与することを含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記ワクチン組成物は、DNA ワクチンまたはポリペプチドワクチンである、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記ワクチン組成物は、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項 3 2 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 5 3 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 6 0 に記載のポリペプチド、請求項 6 2 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の組成物、またはその任意の組み合わせを含む、請求項 9 0、9 1、9 3、または 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 7】

インフルエンザウイルスに対するワクチンを産生するための方法であって、(a) 請求項 5 3 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養するステップおよび (b) 前記宿主細胞から M V A を単離するステップを含む、方法。

【請求項 9 8】

前記 M 2 外部ドメインペプチドは、その間に介在するリンカーペプチドを有する、請求項 1 3 に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

インフルエンザウイルスは、オルトミクソウイルス科のネガティブセンス RNA メンバーであり、ヒトおよび動物において疾患を引き起こす。インフルエンザ感染は、よくある感染であり、汎発流行になり得るまたは季節性のものとなり得る。インフルエンザ感染は、感染した個体の死亡にあまり至らないが、罹患すると重症となり得る。結果として、インフルエンザ流行病は実質的な経済的損失に至り得る。さらに、インフルエンザ感染は、心臓発作を起こしたことのある個体、C . A . R . A . 患者、または高齢者などのような、ある種のグループの個体にとってより危険になり得る。

【0 0 0 2】

インフルエンザウイルスは、1) 浜鳥および水鳥における異なる亜型のインフルエンザ A 型ウイルスの確立されたレザバーの存在；2) 「抗原シフト」と称されるプロセスである、トリインフルエンザウイルスが他の動物（たとえばブタ）のインフルエンザウイルスと組換えを行う能力；3) 「抗原ドリフト」と称されるプロセスである、ウイルス RNA ポリメラーゼのブルーフリーディング活性の欠乏によって引き起こされるウイルス遺伝子産物における突然変異の蓄積、を含む因子の複雑なセットにより、再発性の様式で疾患を引き起こす（非特許文献 1）。抗原シフト、抗原ドリフト、ならびにトリウイルスがブタ

10

20

30

40

50

およびヒトなどのような他の宿主に感染する能力は、人において重症の疾患を引き起こし得る新規なウイルスをもたらす。これらの再集合および突然変異の事象は、組み合わせられて、以前の感染またはワクチン接種の結果として誘発される免疫応答、特に中和抗体を回避するためのメカニズムをウイルスに提供する、ウイルスの2つの表面糖タンパク質、赤血球凝集素(HA)、およびノイラミニダーゼ(NA)における、十分に特徴付けられた抗原多様性を引き起こす(非特許文献2;非特許文献3;ならびに非特許文献4)。

【0003】

ヒトの健康に対して世界的な影響を有する可能性がある特定のインフルエンザ亜型を予測するために、インフルエンザワクチン生産は、監視プログラムに依存しなければならない。不活性化または「スプリット」ビリオンから構成される、亜型と一致したワクチンを産生するために必要とされる時間は、典型的に、最低6~8か月を必要とする。ウイルス亜型によって引き起こされる深刻なインフルエンザウイルス汎発流行に直面した際に、この遅延時間は、過度の罹患および死亡と共に、国内のまたは国際的な蔓延を可能にし得るであろう。そのため、インフルエンザウイルスの様々な亜型に有効なインフルエンザワクチンは、非常に望ましい。

10

【0004】

インフルエンザウイルスは、ウイルスを作製するための遺伝的な指示となる、一本鎖RNAの8つのセグメントを含有する。その表面は、2つの異なる糖タンパク質の層によって覆われている:一方は、分子赤血球凝集素(HA)から構成され、他方は、ノイラミニダーゼ(NA)から構成される。ウイルスカプシドは、ウイルスリボ核酸およびいくつかのいわゆる「内部」タンパク質(ポリメラーゼ(PB1、PB2、およびPA、マトリックスタンパク質(M1)、ならびに核タンパク質(NP))で構成される。HAおよびNAに対する抗体が、感染と戦う際に最も有効であることが従来証明されてきたので、多くの研究は、それらの分子の構造、機能、および遺伝的変異に集中してきた。

20

【0005】

HAおよびNAとは異なり、膜貫通ウイルスM2タンパク質の外部ドメイン(M2e)は、高度に保存されており、このエプトープに対して向けられる抗体は、マウスを保護する(非特許文献5;非特許文献6;非特許文献7;および非特許文献8)。M2タンパク質は、ウイルス感染細胞において形質膜で発現される、インフルエンザA型ウイルスの不可欠な膜タンパク質である。ウイルスにおけるタンパク質の低い存在量により、このエプトープに対して向けられる抗体応答の保護のメカニズムは、ウイルス中和を介して媒介されず、むしろ、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性によって媒介される(非特許文献9)。

30

【0006】

免疫応答を誘発するワクチンの開発に対する主な障害は、適した送達形式の選択である。単独でまたはともに使用されるDNAプラスミドワクチンおよびウイルスベクターならびに組換えタンパク質またはペプチドは、論理的なワクチン送達形式である;しかしながら、形式はそれぞれ、長所および短所を有する。たとえば、DNAワクチンは、容易に産生され、投与するのに安全であるが、とりわけ臨床試験において、効力が不足しており、大(ミリグラム)用量の投与を必要とする。非特許文献10。ワクチンを送達するためのウイルスベクターの使用は、通常、安全性およびベクターに対する先在する免疫に関連する問題を起こしてきた。そのため、安全で有効な新しいインフルエンザワクチンを開発するための多くの必要性がある。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Tollis, M.およびL. Di Trani、Vet. J. 164巻:202~215頁(2002年)

【非特許文献2】Palese, P.およびJ. F. Young、Science 215巻:1468~1474頁

【非特許文献3】Gorman, O. T.ら、Curr. Top. Microbi

50

ol. Immunol 176 巻: 75 ~ 97 頁

【非特許文献4】Yewdell L. J. W. 5、Nature 279 巻: 246 ~ 248 頁

【非特許文献5】Treanor, J. J. 5、J. Virol. 64 巻: 1375 ~ 1377 頁 (1990 年)

【非特許文献6】Frace, A. M. 5、Vaccine 17 巻: 2237 ~ 2244 頁 (1999 年)

【非特許文献7】Wanli, L. 5、Immunol Lett. 93 巻: 131 ~ 136 頁 (2004 年)

【非特許文献8】Fan, J. 5、Vaccine 22 巻: 2293 ~ 3003 頁 (2004 年)

10

【非特許文献9】Jegerlehner, A. 5、J. Immunol. 172 巻: 5598 ~ 5605 頁 (2004 年)

【非特許文献10】Liu, M. A. J. Intern. Med. 253 巻: 402 ~ 410 頁 (2003 年)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、ポリペプチドをコードするコード領域を含む単離ポリヌクレオチドであって、当該ポリペプチドは、少なくとも5つのインフルエンザウイルスマトリックス2タンパク質 (M2) 外部ドメインペプチドを含む、単離ポリヌクレオチドを提供する。一実施形態では、ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下のアミノ酸配列の任意の5つ以上を含む: (i) 配列番号1 (M2e#1__C); (ii) 配列番号2 (M2e#2__C); (iii) 配列番号3 (M2e#3__C); (iv) 配列番号4 (M2e#4__C); (v) 配列番号5 (M2e#5__C); (vi) 配列番号6 (M2e#6__C); (vii) 配列番号7 (M2e#1__S); (viii) 配列番号8 (M2e#2__S); (ix) 配列番号9 (M2e#3__S); (x) 配列番号10 (M2e#4__S); (xi) 配列番号11 (M2e#5__S); および (xii) 配列番号12 (M2e#6__S)。

20

【0009】

ポリペプチドをコードするコード領域を含む単離ポリヌクレオチドであって、当該ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下のM2外部ドメインペプチドの任意の3つ以上を含む、単離ポリヌクレオチドもまた、提供される: (i) 配列番号1 (M2e#1__C); (ii) 配列番号2 (M2e#2__C); (iii) 配列番号3 (M2e#3__C); (iv) 配列番号4 (M2e#4__C); (v) 配列番号5 (M2e#5__C); (vi) 配列番号6 (M2e#6__C); (vii) 配列番号7 (M2e#1__S); (viii) 配列番号8 (M2e#2__S); (ix) 配列番号9 (M2e#3__S); (x) 配列番号10 (M2e#4__S); (xi) 配列番号11 (M2e#5__S); および (xii) 配列番号12 (M2e#6__S)。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下の6つのM2外部ドメインペプチドを含む、ポリペプチドをコードするコード領域を含む: (i) 配列番号1 (M2e#1__C); (ii) 配列番号2 (M2e#2__C); (iii) 配列番号3 (M2e#3__C); (iv) 配列番号4 (M2e#4__C); (v) 配列番号5 (M2e#5__C); および (vi) 配列番号6 (M2e#6__C) または (i) 配列番号7 (M2e#1__S); (ii) 配列番号8 (M2e#2__S); (iii) 配列番号9 (M2e#3__S); (iv) 配列番号10 (M2e#4__S); (v) 配列番号11 (M2e#5__S); および (vi) 配列番号12 (M2e#6__S) のアミノ酸配列。

30

40

【0010】

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、互いに対して任意の順序で配置される6つのM2外部ドメインペプチドを含むポリペプチド、少なくとも2つのM2外部ドメ

50

インペプチドの間に介在する少なくとも1つのリンカーペプチド、および必要に応じて、少なくとも2つのM2外部ドメインペプチドの間に介在するエピトープをコードする。エピトープは、T細胞エピトープまたはB細胞エピトープとすることができる。

【0011】

いくつかの実施形態では、本発明は、M2外部ドメインペプチドの複数のコピーを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関する。ベクターは、ウイルスベクター、たとえばワクシニアウイルスベクター、たとえば改変ワクシニアウイルス Ankara (MVA) とすることができる。本発明のベクターは、さらなるポリペプチド、たとえばインフルエンザタンパク質またはその断片をさらに発現することができる。さらなるインフルエンザタンパク質は、赤血球凝集素 (HA)、ノイラミニダーゼ (NA)、核タンパク質 (NP)、マトリックス1タンパク質 (M1)、マトリックス2タンパク質 (M2)、非構造タンパク質 (NS)、RNAポリメラーゼPAサブユニット (PA)、RNAポリメラーゼPB1サブユニット (PB1)、RNAポリメラーゼPB2サブユニット (PB2)、およびその2つ以上の組み合わせから成る群から選択することができる。他の実施形態では、本発明は、ベクターおよびポリヌクレオチドによってコードされる単離ポリペプチドを含む宿主細胞である。

10

【0012】

ポリヌクレオチド、ベクター、たとえばMVA、宿主細胞、またはポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む組成物もまた、含まれる。一実施形態では、本発明のワクチン組成物は、さらなるインフルエンザワクチン組成物をさらに含む。さらなるインフルエンザワクチンは、インフルエンザタンパク質またはその断片を発現するMVAを含むことができる。

20

【0013】

さらなる実施形態では、本発明は、その必要のある被験体においてインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発するための方法であって、同時にまたは任意の順序で、有効量のポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、ポリペプチド、組成物、またはその任意の組み合わせを当該被験体に投与するステップを含む方法を含む。その必要のある被験体においてインフルエンザウイルス感染またはインフルエンザウイルス感染と関連する状態の症状を治療する、予防する、または軽減するための方法であって、同時にまたは任意の順序で、有効量のポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、ポリペプチド、組成物、またはその任意の組み合わせを当該被験体に投与するステップを含む方法もまた、提供される。本発明はまた、その必要のある被験体においてインフルエンザウイルス感染またはインフルエンザウイルス感染と関連する状態によって引き起こされる症状を和らげるまたは改善させるための方法であって、同時にまたは任意の順序で、有効量のポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、ポリペプチド、組成物、またはその任意の組み合わせを当該被験体に投与するステップを含む方法にも関する。他の実施形態では、本発明は、その必要のある被験体にインフルエンザウイルス感染に対してワクチン接種するための方法であって、同時にまたは任意の順序で、有効量のポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、ポリペプチド、組成物、またはその任意の組み合わせを当該被験体に投与するステップを含む方法を含む。

30

40

【0014】

本明細書において使用される配列識別名は、以下のとおりである。

配列番号1：システインを有するM2外部ドメイン#1 (M2e#1__C) のアミノ酸配列

配列番号2：システインを有するM2外部ドメイン#2 (M2e#2__C) のアミノ酸配列

配列番号3：システインを有するM2外部ドメイン#3 (M2e#3__C) のアミノ酸配列

配列番号4：システインを有するM2外部ドメイン#4 (M2e#4__C) のアミノ酸配列

50

配列番号 5 : システインを有する M 2 外部ドメイン # 5 (M 2 e # 5 _ C) のアミノ酸配列

配列番号 6 : システインを有する M 2 外部ドメイン # 6 (M 2 e # 6 _ C) のアミノ酸配列

配列番号 7 : セリン置換を有する M 2 外部ドメイン # 1 (M 2 e # 1 _ S) のアミノ酸配列

配列番号 8 : セリン置換を有する M 2 外部ドメイン # 2 (M 2 e # 2 _ S) のアミノ酸配列

配列番号 9 : セリン置換を有する M 2 外部ドメイン # 3 (M 2 e # 3 _ S) のアミノ酸配列

配列番号 10 : セリン置換を有する M 2 外部ドメイン # 4 (M 2 e # 4 _ S) のアミノ酸配列

配列番号 11 : セリン置換を有する M 2 外部ドメイン # 5 (M 2 e # 5 _ S) のアミノ酸配列

配列番号 12 : セリン置換を有する M 2 外部ドメイン # 6 (M 2 e # 6 _ S) のアミノ酸配列

配列番号 13 : インフルエンザ A 型 / プエルトリコ / 8 / 3 4 (H 1 N 1) のマトリックス 2 (M 2) タンパク質をコードする核酸配列

配列番号 14 : インフルエンザ A 型 / プエルトリコ / 8 / 3 4 (H 1 N 1) の M 2 タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 15 : M E T R _ C ポリペプチドをコードする核酸配列

配列番号 16 : M E T R _ C ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 17 : M E T R _ S ポリペプチドをコードする核酸配列

配列番号 18 : M E T R _ S ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 19 : N P コンセンサス配列をコードする核酸配列

配列番号 20 : N P コンセンサス配列のアミノ酸配列

配列番号 21 ~ 25 : リンカーペプチド

配列番号 26 ~ 27 : T 細胞エピトープ

配列番号 28 : 人工配列

配列番号 29 ~ 30 : プロモーター

配列番号 31 : 転写終結シグナル

配列番号 32 ~ 50 : プライマー

配列番号 51 : インフルエンザ A 型 / プエルトリコ / 8 / 3 4 (H 1 N 1) の H A タンパク質をコードする核酸配列

配列番号 52 : インフルエンザ A 型 / プエルトリコ / 8 / 3 4 (H 1 N 1) の H A タンパク質をコードするアミノ酸配列

配列番号 53 : インフルエンザ A 型 / プエルトリコ / 8 / 3 4 (H 1 N 1) の M 2 タンパク質の膜貫通ドメインをコードする核酸配列

配列番号 54 : インフルエンザ A 型 / プエルトリコ / 8 / 3 4 (H 1 N 1) の M 2 タンパク質の膜貫通ドメインのアミノ酸配列

配列番号 55 : M E T R _ C ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 56 : M E T R _ S ポリペプチドのアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1】図 1 は、組換えベクター v E M 0 1 1 の模式的なベクターマップである。略語は、以下のとおりである：用語「A m p R」は、細菌における選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子を示す；用語「F l a n k 1 / F l a n k 2 D e l I I I」は、M V A ゲノムの欠失部位 I I I のフランキング領域に対して相同の配列を示す；用語「P s」は、強力な合成プロモーターを意味する；B s d R は、プラスミドサイジン抵抗性をコードする遺伝子を示す；用語「G F P」は、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子を意

味する；用語「F1 Del3 rpt」は、Flank 1 Del IIIの後方の部分のリピートを示す；用語「LacZ」は、細菌における検出のためのE. coli LacZ遺伝子を意味する。

【図2】図2は、インフルエンザA型遺伝子を含む組換えベクターの模式的なベクターマップを示す：(A)NPコンセンサス配列をコードするvEM47；(B)M2外部ドメインタンデムリピート(METR__C)ペプチドをコードするvEM57；(C)M2外部ドメインタンデムリピートセリン置換(METR__S)ペプチドをコードするvEM58；(D)インフルエンザウイルスA型/プエルトリコ/8/34の完全長マトリックス2ドメイン(Pr8M2)をコードするvEM61；(E)インフルエンザウイルスA型/プエルトリコ/8/34に由来するマトリックス2ドメインの膜貫通ドメイン(Pr8M2e-TML)をコードするvEM62；および(F)インフルエンザウイルスA型/プエルトリコ/8/34の赤血球凝集素タンパク質(Pr8HA)をコードするvEM65。

【図3】図3は、様々なMVAtorのPCR産物を示す：(A)MVAtor-NPコンセンサス(mEM10)；(B)MVAtor-METR__C(mEM18)；(C)MVAtor-METR__S(mEM19)；ならびに(D)MVAtor-Pr8M2(mEM22)、MVAtor-Pr8M2e-TML(mEM23)、およびMVAtor-Pr8HA(mEM17)。

【図4】図4は、例示的なPCR断片の模式的な図を示す。略語は、以下のとおりである：用語「Flank1 Del3」は、挿入部位欠失3のフランキンク配列1を意味する；用語「Ps」は、強力な合成ワクシニアウイルスプロモーターを意味する；用語「インフルエンザ遺伝子」は、対象の遺伝子、つまり、それぞれ、HA、NP、M2e、M2e-TML、およびMETRをコードする遺伝子を意味する；また、用語「Flank2 Del3」は、欠失3のフランキンク配列2を示す。

【図5】図5は、様々なMVAtorによって発現されるインフルエンザタンパク質のウエスタンブロット解析を示す：MVAtor-NPコンセンサス(mEM10)、MVAtor-METR__C(mEM18)、およびMVAtor-METR__S(mEM19)。

【図6】図6は、MVAtor-Pr8HAに感染したCEF細胞(MVAtor-Pr8)、偽感染CEF細胞、およびMVAtorに感染したCEF細胞(MVAtor)についての血球吸着アッセイ(HAD)を示す。

【図7】図7は、CEF細胞におけるPr8M2の検出のためのイムノアッセイを示す：(A)MVAtor-Pr8M2に感染した細胞；および(B)MVAtor-Pr8M2e-TMLに感染した細胞。

【図8】図8は、インフルエンザタンパク質を発現するMVAtorを用いる免疫後の体重変化パーセントを示す：Pr8M2(灰色、大きな塗りつぶしの丸)、Pr8M2e-TML(黒色、アスタリスク)、METR-C(灰色、小さな中空の丸)、METR-S(灰色、塗りつぶしの菱形)、NPコンセンサス(黒色、塗りつぶしの三角)、MVAtor(黒色、大きな中空の丸)、およびPBS(黒色、塗りつぶしの小さな丸)。

【図9】図9は、免疫マウスにおけるウイルス負荷を示す。群当たり4匹のマウスのそれぞれからの肺重量は、肺重量当たりの50%組織培養感染量(TCID50)を表わすために得た。

【図10】図10は、マウスIgG抗M2e抗体(14C2)を使用する、MVAワクチンを用いて免疫したマウス由来の血清のELISAを示す。実験において使用したM2eペプチド(M2e#1(第4列)、M2e#4(第3列)、M2e#5(第2列)、およびM2e#6(第1列))を表1に示す。

【図11】図11は、鼻腔内(IN)送達(図11A)および筋肉内(IM)送達(図11B)によってMVAワクチンを用いて免疫したマウスの体重損失を示す。

【図12】図12は、鼻腔内送達(左側のバー)および筋肉内送達(右側のバー)によってMVAワクチンを用いて免疫したマウスにおけるウイルス負荷を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、インフルエンザタンパク質を発現する M V A t o r を用いる免疫後のマウスにおける体重変化パーセントを示す：H A（灰色、塗りつぶしの正方形）、N P（灰色、塗りつぶしの三角）、M 2（灰色、塗りつぶしの菱形）、および M 2 + N P（灰色、アスタリスク）ならびに対照：M V A t o r（黒色、塗りつぶしの菱形）および非致死 H 1 N 1 P R 8（黒色、塗りつぶしの丸）。

【図 1 4】図 1 4 は、4 2 日目（抗原投与前）の血清を使用する、1 d 2 1 M V A、2 d 2 1 M V A、1 d 2 1 M V A + N P、2 d 2 1 M V A + N P、1 d 2 1 M V A - M 2 e A + M V A - N P、2 d 2 1 M V A - M 2 e A + M V A - N P、1 d 2 1 非致死 H 1 N 1 P R 8、および 2 d 2 1 非致死 H 1 N 1 P R 8 M V A を用いて免疫したマウスについての抗 N P（I g G 抗 N P）免疫応答を示す E L I S A 結果を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、H 1 N 1 P R 8 ウイルスを用いる抗原投与後の 2 日目（左側のバー）および 4 日目（右側のバー）の、M V A、M V A - H A、M V A - N P、M V A - M 2 e A、M V A - M 2 e + N P、および A / P R 8 / 3 4 を用いて免疫したマウスにおけるウイルス負荷を示す。マウスのそれぞれからの肺重量は、肺重量当たりの 5 0 % 組織培養感染量（T C I D 5 0）を表わすために得た。

【図 1 6 A】図 1 6 A は、インフルエンザタンパク質を発現する M V A t o r を用いる免疫後の体重変化パーセントを示す：M V A - P R 8 H A（黒色、小さな塗りつぶしの菱形）および M V A - P R 8 - M 2 + N P（黒色、塗りつぶしの正方形）、および M V A - P R 8 - C + N P（灰色、大きな塗りつぶしの菱形）ならびに対照：P B S（黒色、三角）。

【図 1 6 B】図 1 6 B は、表 9 において示されるすべてのインフルエンザタンパク質を発現する M V A t o r および陰性対照を用いる免疫後の体重変化パーセントを示す。

【図 1 7】図 1 7 は、4 2 日目（抗原投与前）の血清を使用する、C o n s N P、P R 9 M 2 + C o n s N P、P R 8 M 2 e - T M L + C o n s N P、M E T R - C + C o n s N P、および M E T R - S + C o n s N P を用いて免疫したマウスについての抗 N P（I g G 抗 N P）免疫応答を示す E L I S A 結果を示す。

【図 1 8】図 1 8 は、4 2 日目（抗原投与前）の血清を使用する、M 2、M 2 - T M L、M E T R - C、M E T R - S、M 2 + N P、M 2 - T M L + N P、M E T R - C + N P、および M E T R - S + N P を用いて免疫したマウスについての抗 M 2（I g G 抗 M 2 e ペプチド）免疫応答を示す E L I S A 結果を示す。

【図 1 9】図 1 9 は、H 1 N 1 P R 8 ウイルスを用いる抗原投与後の 3 日目の、鼻腔内で（左側のバー）または筋肉内で（右側のバー）、P B S（I N）、M V A t o r、N P、M 2、M 2 e - T M L、M E T R - C、M E T R - S、H A、および致死量以下の P R 8（I N）を用いて免疫したマウスの肺におけるウイルス負荷を示す。マウスのそれぞれからの肺重量は、肺重量当たりの 5 0 % 組織培養感染量（T C I D 5 0）を表わすために得た。

【図 2 0 A】図 2 0 A は、インフルエンザタンパク質を発現する M V A t o r を用いる免疫後の体重変化パーセントを示す：M 1 + N P + M E T R - C（黒色、塗りつぶしの正方形）、M 1 + N P + M 2（灰色、白抜きの三角）、M 2 + N P（灰色、X）、M 1（黒色、アスタリスク）、および M 1 + N P（灰色、塗りつぶしの丸）ならびに対照：F l u l a v a l（黒色、塗りつぶしの菱形）、M V A t o r（黒色、小さな塗りつぶしの正方形）、および P B S（黒色、塗りつぶしの三角）。

【図 2 0 B】図 2 0 B は、インフルエンザタンパク質を発現する M V A t o r を用いて免疫したマウスについての生存パーセントデータを示す：M 1 + N P + M E T R - C（灰色、塗りつぶしの正方形）、M 1 + N P + M 2（灰色、白抜きの三角）、M 2 + N P（灰色、X）、M 1（黒色、アスタリスク）、および M 1 + N P（灰色、塗りつぶしの丸）ならびに対照：F l u l a v a l（黒色、白抜きの菱形）、M V A t o r（黒色、塗りつぶしの正方形）、および P B S（黒色、塗りつぶしの菱形）。

【図 2 1】図 2 1 は、3 9 日目（抗原投与前）の血清を使用する、P B S、M V A t o r、M 1 + N P + M E T R C、M 1 + N P + M 2、M 2 + N P、M 1、M 1 + N P、および

10

20

30

40

50

F l u l a v a l を用いて免疫したマウスについての抗 N P (左側半分) および抗 M 2 (右側部分) 免疫応答を示す E L I S A 結果を示す。水平線は、群平均値を示す。I g G 抗 M 2 レベルは、M 1 処理群について評価しなかった。

【図 2 2 A】図 2 2 A は、3 9 日目 (抗原投与前) からの血清を使用する、P B S、M V A t o r、M 1 + N P + M E T R C、M 1 + M 2 + N P、M 2 + N P、M 1、M 1 + N P、および F l u l a v a l を用いて免疫したマウスについての抗 M 1 免疫応答を示す E L I S A 結果を示す。水平線は、群平均値を示す。

【図 2 2 B】図 2 2 B は、2 1 日目 (1 回目の免疫後) (左側半分) および 3 9 日目 (抗原投与前) (右側部分) からの血清を使用する、M V A t o r、M 1 + M 2 + N P、M 2 + N P、M 1、および M 1 + N P を用いて免疫したマウスについての抗 M V A 免疫応答を示す E L I S A 結果を示す。水平線は、群平均値を示す。

10

【図 2 3】図 2 3 は、s H 1 N 1 A / M x / 4 1 0 8 / 0 9 ウイルスを用いる抗原投与後の 2 日目 (左側のバー) または 4 日目 (右側のバー) の、P B S、M V A t o r、M 1 + N P + M E T R C、M 1 + N P + M 2、M 2 + N P、M 1、M 1 + N P、および F l u l a v a l を用いて免疫したマウスの肺におけるウイルス負荷を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、s H 1 N 1 A / M x / 4 1 0 8 / 0 9 ウイルスを用いる抗原投与後の 2 日目 (左側のバー) または 4 日目 (右側のバー) の、P B S、M V A t o r、M 1 + N P + M E T R C、M 1 + N P + M 2、M 2 + N P、M 1、M 1 + N P、および F l u l a v a l を用いて免疫したマウスの鼻甲介におけるウイルス負荷を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、インフルエンザマトリックス 2 タンパク質外部ドメインの複数のコピーをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含有するベクター (たとえば M V A)、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、および関連する組成物ならびにインフルエンザウイルス感染を予防するまたは治療するためにポリヌクレオチド、ベクター (たとえば M V A)、ポリペプチド、または組成物を投与するための方法を提供する。

【0017】

本発明を作製するおよび使用するための方法は、分子生物学、微生物学、免疫学、およびワクチン接種の通常の技術をすべて含む。そのような技術は、たとえば S a m b r o o k M o l e c u l a r C l o n i n g ; A L a b o r a t o r y M a n u a l、第 2 版 (1 9 8 9 年) および第 3 版 (2 0 0 1 年) ; G e n e t i c E n g i n e e r i n g : P r i n c i p l e s a n d M e t h o d s、1 ~ 2 5 巻 (J . K . S e t l o w 編、1 9 8 8 年) ; D N A C l o n i n g、I および II 巻 (D . N G l o v e r 編 1 9 8 5 年) ; O l i g o n u c l e o t i d e S y n t h e s i s (M . J . G a i t 編、1 9 8 4 年) ; N u c l e i c A c i d H y b r i d i z a t i o n (B . D . H a m e s & S . J . H i g g i n s 編 1 9 8 4 年) ; T r a n s c r i p t i o n a n d T r a n s l a t i o n (B . D . H a m e s & S . J . H i g g i n s 編 1 9 8 4 年) ; A n i m a l C e l l C u l t u r e (R . I . F r e s h n e y 編 1 9 8 6 年) ; I m m o b i l i z e d C e l l s a n d E n z y m e s (I R L P r e s s、1 9 8 6 年) ; B . P e r b a l、A P r a c t i c a l G u i d e t o M o l e c u l a r C l o n i n g (1 9 8 4 年) ; t h e M e t h o d s i n E n z y m o l o g y s e r i e s (A c a d e m i c P r e s s , I n c .)、とりわけ 1 5 4 および 1 5 5 巻 ; G e n e T r a n s f e r V e c t o r s f o r M a m m a l i a n C e l l s (J . H . M i l l e r および M . P . C a l o s 編 1 9 8 7 年、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y) ; M a y e r および W a l k e r 編 (1 9 8 7 年)、I m m u n o c h e m i c a l M e t h o d s i n C e l l a n d M o l e c u l a r B i o l o g y (A c a d e m i c P r e s s、L o n d o n) ; S c o p e s、(1 9 8 7 年) P r o t e i n P u r i f i c a t i o n : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e、第 2 版 (S p r

30

40

50

inger - Verlag, N. Y.), ならびに Handbook of Experimental Immunology, I ~ IV 巻 (D. M. Weir および C. C. Blackwell 編 1986 年) を含むが、これらに限定されない文献において記載されている。(Sambrook ら (1989 年) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press および Ausubel ら編 (1997 年) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.) 。

定義

用語「 1 つの (a) 」または「 1 つの (an) 」要素は、 1 つ以上のその要素を指すことに注意されたい、たとえば、「ポリヌクレオチド」は、 1 つ以上のポリヌクレオチドを示すことが理解される。そのため、用語「 1 つの (a) 」(または「 1 つの (an) 」) 、 「 1 つ以上の」、および「少なくとも 1 つの」は、本明細書において互換的に使用することができる。

【 0018 】

本明細書において使用されるように、用語「単離」は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはその断片、変異体、もしくは誘導体および修飾ワクシニア Ankara (MVA) が、それが天然に関連する他の生物学的物質から取り出されていることを意味する。単離ポリヌクレオチドの例は、ベクター中に含有される組換えポリヌクレオチドである。単離ポリヌクレオチドのさらなる例は、異種宿主細胞において維持される組換えポリヌクレオチドまたは溶液中の精製 (部分的にもしくは実質的に) ポリヌクレオチドを含む。単離 RNA 分子は、本発明のポリヌクレオチドの *in vivo* または *in vitro* RNA 転写物を含む。本発明による単離ポリヌクレオチドまたは核酸は、合成的に産生されるそのような分子をさらに含む。

【 0019 】

本明細書において使用されるように、用語「単離ウイルス」は、ウイルス、その誘導体、または変異体が、それが天然に関連する他の生物学的物質から取り出されているまたは天然に存在しない物質を含むように組換えで操作されていることを意味する。単離ウイルスの例は、ウイルスゲノム中に組換えで挿入された、異なる種由来のポリヌクレオチドを含有するウイルスである。単離ウイルスのさらなる例は、宿主細胞において維持される異種ポリヌクレオチドを含有するウイルスまたは溶液中の精製 (部分的にもしくは実質的に) ウイルスを含む。

【 0020 】

本明細書において使用されるように、用語「精製」は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ウイルス、またはその断片、変異体、もしくは誘導体が、それが天然に関連する他の生物学的物質が実質的にないまたはたとえば、本発明のウイルスを複製するために遺伝子的に操作されている組換え宿主細胞に由来する他の生物学的物質がないことを意味する。たとえば、本発明の精製ウイルスは、少なくとも 70 ~ 100 % 純粋であるウイルス、つまり、ウイルスが全組成物の重量の 70 ~ 100 % を構成する組成物の中に存在するウイルスを含む。いくつかの実施形態では、本発明の精製ウイルスは、 75 % ~ 99 重量 % 純粋である、 80 % ~ 99 重量 % 純粋である、 90 ~ 99 重量 % 純粋である、または 95 % ~ 99 重量 % 純粋である。本発明のウイルスの純度の相対的な程度は、周知の方法によって容易に決定される。

【 0021 】

用語「核酸」、「ヌクレオチド」、または「核酸断片」は、ポリヌクレオチドまたは構築物中に存在する任意の 1 つ以上の核酸セグメント、たとえば DNA もしくは RNA 断片を指す。本発明の 2 つ以上の核酸は、単一のポリヌクレオチド構築物中に、たとえば単一のプラスミド上にまたは別々の (同一でない) ポリヌクレオチド構築物中に、たとえば別々のプラスミド上に存在することができる。さらに、任意の核酸または核酸断片はまた、単一のポリペプチド、たとえば単一の抗原、サイトカイン、調節性ポリペプチドをコード

10

20

30

40

50

してもよいまたは1つを超えるポリペプチドをコードしてもよい、たとえば、核酸は、2つ以上のポリペプチドをコードしてもよい。さらに、核酸は、プロモーターまたは転写ターミネーターなどのような調節性エレメントをコードしてもよいまたは分泌シグナルペプチドまたは機能的ドメインなどのようなポリペプチドまたはタンパク質の特殊なエレメントまたはモチーフをコードしてもよい。他に示されない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的修飾変異体（たとえば縮重コドン置換）および相補的配列ならびに明確に示される配列をも、暗に包含する。特に、縮重コドン置換は、1つ以上の選択される（またはすべての）コドンのうちの第3の位置が、さまざまな塩基および/またはデオキシイノシン残基と置換されている配列を生成することによって達成されてもよい（Batzera（1991年）Nucleic Acid Res. 19巻：5081頁；Ohtsuka（1985年）J. Biol. Chem. 260巻：2605～2608頁；Cassolら（1992年）；Rossoliniら（1994年）Mol. Cell. Probes 8巻：91～98頁）。核酸という用語は、ポリヌクレオチド、遺伝子、cDNA、メッセンジャーRNA（mRNA）、プラスミドDNA（pDNA）、またはpDNAの誘導体（たとえば、（Darquet, A-Mら、Gene Therapy 4巻：1341～1349頁（1997年）において記載されるミニサークル）を包含する。核酸は、直線状（たとえばmRNA）、環状（たとえばプラスミド）、または分岐形態および二本鎖または一本鎖形態で提供されてもよい。核酸は、通常ホスホジエステル結合または通常でない結合（たとえば、ペプチド核酸（PNA）中に見出されるなどのアミド結合）を含んでいてもよい。核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNA、および遺伝子という用語は、本明細書において互換的に使用される。

10

20

30

40

50

【0022】

用語「ポリヌクレオチド」は、単一の核酸または核酸断片および複数の核酸または核酸断片を包含するように意図され、ポリヌクレオチドを含む単離分子または構築物、たとえばウイルスのゲノム（たとえば非感染性ウイルスゲノム）、メッセンジャーRNA（mRNA）、プラスミドDNA（pDNA）、またはpDNAの誘導体（たとえば、（Darquet, A-Mら、Gene Therapy 4巻：1341～1349頁（1997年）において記載されるミニサークル）を指す。ポリヌクレオチドは、直線状（たとえばmRNA）、環状（たとえばプラスミド）、または分岐形態および二本鎖または一本鎖形態で提供されてもよい。ポリヌクレオチドは、通常ホスホジエステル結合または通常でない結合（たとえば、ペプチド核酸（PNA）中に見出されるなどのアミド結合）を含んでいてもよい。

【0023】

本明細書において使用されるように、用語「ポリペプチド」は、単数の「ポリペプチド」および複数の「ポリペプチド」を包含するように意図され、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖（複数可）を含む。したがって、本明細書において使用されるように、「ペプチド」、「ジペプチド」、「トリペプチド」、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2つ以上のアミノ酸の鎖（複数可）を指すために使用される任意の他の用語を含むが、これらに限定されない用語は、「ポリペプチド」の定義において含まれ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかの代わりにまたはそれと互換的に使用されてもよい。用語は、翻訳後修飾、たとえばグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基もしくは遮断基による誘導体化、タンパク質分解性切断、または天然に存在しないアミノ酸による修飾を受けているポリペプチドをさらに含む。

【0024】

「コドン最適化」は、天然の配列の少なくとも1つの、1つを超える、またはかなりの数のコドンとその宿主の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンと交換することによる、特定の宿主細胞における発現の増強のための核酸配列の修飾として本明細書において定義される。様々な種は、特定のアミノ酸のある種のコドンについて特定のバイアスを示す。

【0025】

本明細書において使用されるように、用語「さらなる」は、主題の生物学的構成成分と同一でない任意の生物学的構成成分を指す。さらなる構成成分は、宿主細胞、ウイルス、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、遺伝子、またはプロモーターなどのような調節性領域であってもよい。主題の構成成分は、必要に応じて、インフルエンザウイルス、MVA、M2外部ドメインペプチド、またはM2外部ドメインをコードするポリヌクレオチドに由来し得ることが認識される。たとえば、インフルエンザウイルス由来のM2外部ドメイン遺伝子の「さらなるポリヌクレオチド」または「さらなる核酸」または「さらなる遺伝子」または「さらなる配列」または「外因性DNAセグメント」は、異なるウイルス（たとえばサイトメガロウイルス）由来のプロモーターまたは同じインフルエンザウイルス由来の赤血球凝集素とすることができる。インフルエンザウイルス由来のM2外部ドメインの「さらなるポリペプチド」、「さらなるアミノ酸配列」、「さらなる抗原」、または「さらなるタンパク質」という用語は、Hisタグまたは任意のインフルエンザウイルスポリペプチド、その断片、変異体、誘導体、または類似体とすることができる。ある実施形態では、さらなるポリペプチドは、インフルエンザポリペプチド、その断片、変異体、誘導体、または類似体であってもよい。他の実施形態では、さらなるポリペプチドは、M2外部ドメインポリペプチド、その断片、誘導体、変異体、または類似体であってもよい。

10

【0026】

本明細書において使用される用語「インフルエンザポリペプチド」または「インフルエンザ抗原」は、インフルエンザウイルス中に存在する任意の完全長もしくは成熟ポリペプチド、インフルエンザウイルス中に存在する完全長もしくは成熟ポリペプチドの他の変異体、インフルエンザウイルス中に存在する完全長もしくは成熟ポリペプチドの断片、インフルエンザウイルス中に存在する完全長もしくは成熟ポリペプチドの断片の血清型変異体、対立遺伝子変異体、および他の変異体、インフルエンザウイルス中に存在する完全長もしくは成熟ポリペプチドの誘導体、インフルエンザウイルス中に存在する完全長もしくは成熟ポリペプチドの断片の誘導体、インフルエンザウイルス中に存在する完全長もしくは成熟ポリペプチドの類似体、インフルエンザウイルス中に存在する完全長もしくは成熟ポリペプチドの断片の類似体、ならびにインフルエンザウイルス中に存在する完全長もしくは成熟ポリペプチドを含むキメラポリペプチドおよび融合ポリペプチド、またはインフルエンザウイルス中に存在する完全長もしくは成熟ポリペプチドの1つもしくは複数の断片を包含する。インフルエンザポリペプチドの非限定的な例は、赤血球凝集素(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)、核タンパク質(NP)、マトリックス1タンパク質(M1)、マトリックス2タンパク質(M2)、非構造タンパク質(NS)、または1つもしくは複数のRNAポリメラーゼサブユニット、つまりPA、PB1、およびPB2である。

20

30

【0027】

本発明に従う一実施形態では、インフルエンザウイルスポリペプチドは、インフルエンザHAタンパク質、その断片、変異体、誘導体、または類似体、たとえば、公知のHA配列、たとえば配列番号52と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、ポリペプチドは、HA配列に特異的に結合する抗体によって認識可能である。HA配列は、HAもしくは細胞外(ECD)ドメイン(HA1およびHA2)、膜貫通(TM)ドメイン、ならびに細胞質内(CYT)ドメインから本質的に成る完全長HAタンパク質；またはHA1ドメインおよびHA2ドメインから本質的に成る全HAタンパク質の断片；またはHA1、HA2、およびTMドメインから本質的に成る全HAタンパク質の断片；またはCYTドメインから本質的に成る全HAタンパク質の断片；またはTMドメインから本質的に成る全HAタンパク質の断片；またはHA1ドメインから本質的に成る全HAタンパク質の断片；またはHA2ドメインから本質的に成る全HAタンパク質の断片であってもよい。HA配列はまた、HA1/HA2切断部位を含んでいてもよい。HA1/HA2切断部位は、好ましくは、HA1およびHA2配列の間に位置するが、また、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド構築物の他の配列に関して任意の順序で配置することもできる。インフルエンザHA配列は、病原性ウイルス株由来のものであってもよい。

40

50

【 0 0 2 8 】

他の実施形態では、インフルエンザポリペプチドは、インフルエンザ核タンパク質（N P）配列、その断片、変異体、誘導体、または類似体、たとえば、公知のN Pポリペプチドと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のアミノ酸配列を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成るポリペプチドであり、当該ポリペプチドは、N Pポリペプチドに特異的に結合する抗体によって認識可能である。他の実施形態では、インフルエンザN P配列は、N Pコンセンサス配列、たとえば配列番号20を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。

【 0 0 2 9 】

インフルエンザポリペプチドは、ノイラミニダーゼ（N A）タンパク質、その断片、変異体、誘導体、または類似体とすることができる。インフルエンザウイルスのエンベロープ上に位置するN Aタンパク質は、ウイルスおよび細胞性複合糖質からの末端シアル酸残基の除去を触媒することが公知である。インフルエンザウイルスA型/プエルトリコ/8/1934（H1N1）のN Aタンパク質は、454アミノ酸およびその全体が参照によって本明細書において組み込まれるG e n b a n kにおける受託番号A A M 7 5 1 6 0 . 1を有する。N Aタンパク質は、細胞質ドメイン（アミノ酸1～6）、膜貫通ドメイン（アミノ酸7～35）、および細胞外ドメイン（アミノ酸36～454）から成る。インフルエンザポリペプチドの非限定的な例は、公知のインフルエンザノイラミニダーゼ（N A）配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のアミノ酸配列を含み、本質的にそれから成り、またはそれから成り、ポリペプチドは、N Aタンパク質に特異的に結合する抗体によって認識可能である。N A配列は、N Aから本質的に成る完全長N Aタンパク質であってもよい。N A配列は、N A配列の細胞外ドメイン、膜貫通（T M）ドメイン、または細胞質内（C Y T）ドメインを含む、本質的にそれから成る、またはそれから成るポリペプチドであってもよい。インフルエンザN A配列は、病原性ウイルス株由来のものであってもよい。

【 0 0 3 0 】

インフルエンザポリペプチドは、マトリックス1（M 1）タンパク質、その断片、変異体、誘導体、または類似体とすることができる。マトリックス1タンパク質は、ウイルス複製において重大な役割を果たす。インフルエンザウイルスA型/プエルトリコ/8/1934（H1N1）のM 1は、252アミノ酸およびその全体が参照によって本明細書において組み込まれるG e n b a n kにおける受託番号A A M 7 5 1 6 1 . 1を有する。インフルエンザポリペプチドの非限定的な例は、公知のインフルエンザM 1配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のアミノ酸配列を含み、本質的にそれから成り、またはそれから成り、ポリペプチドは、M 1タンパク質に特異的に結合する抗体によって認識可能である。M 1配列は、N A配列の断片を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成るポリペプチドであってもよい。

【 0 0 3 1 】

他の実施形態では、インフルエンザポリペプチドは、非構造（N S）タンパク質、その断片、変異体、誘導体、または類似体とすることができる。非構造タンパク質（N S）は、細胞性プレmRNAの3'末端プロセシングに必要とされる2つの細胞性タンパク質：30kDa切断ポリアデニル化特異因子（C P S F 4）およびポリ（A）-結合タンパク質2（P A B P N 1）に結合し、阻害することによって、細胞性プレmRNAの転写後プロセシングを阻害する。インフルエンザウイルスA型/プエルトリコ/8/1934（H1N1）のN Sタンパク質は、230アミノ酸およびその全体が参照によって本明細書において組み込まれるG e n b a n kにおける受託番号A A M 7 5 1 6 3 . 1を有する。インフルエンザポリペプチドの非限定的な例は、公知のインフルエンザN S配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のアミノ酸配列を含み、本質的にそれから成り、またはそれから成り、ポリペプチドは、N Sタンパク質に特異的に結合する抗体によって認識可能である。N S配列は、N S配

列の断片を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成るポリペプチドであってもよい。

【0032】

いくつかの実施形態では、インフルエンザポリペプチドは、RNAポリメラーゼPA（ポリメラーゼ酸性タンパク質）サブユニット、その断片、変異体、誘導体、または類似体である。PAポリペプチドは、ウイルスRNA合成において伸長因子活性を示す。インフルエンザウイルスA型/プエルトリコ/8/1934（H1N1）のPAタンパク質は、716アミノ酸およびその全体が参照によって本明細書において組み込まれるGenbankにおける受託番号AAM75157.1を有する。インフルエンザポリペプチドの非限定的な例は、公知のインフルエンザPA配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のアミノ酸配列を含み、本質的にそれから成り、またはそれから成り、ポリペプチドは、PAタンパク質に特異的に結合する抗体によって認識可能である。PA配列は、PA配列の断片を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成るポリペプチドであってもよい。

10

【0033】

ある実施形態では、本明細書において使用されるインフルエンザポリペプチドは、RNAポリメラーゼPB1（ポリメラーゼ塩基性タンパク質1）サブユニット、その断片、変異体、誘導体、または類似体である。PB1タンパク質は、ウイルスセグメントの複製および転写を担う。インフルエンザウイルスA型/プエルトリコ/8/1934（H1N1）のPB1タンパク質は、757アミノ酸およびその全体が参照によって本明細書において組み込まれるGenbankにおける受託番号AAM75156.1を有する。インフルエンザポリペプチドの非限定的な例は、公知のインフルエンザPB1配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のアミノ酸配列を含み、本質的にそれから成り、またはそれから成り、ポリペプチドは、PB1タンパク質に特異的に結合する抗体によって認識可能である。PB1配列は、PB1配列の断片を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成るポリペプチドであってもよい。

20

【0034】

さらに他の実施形態では、インフルエンザポリペプチドは、RNAポリメラーゼPB2（ポリメラーゼ塩基性タンパク質2）サブユニット、その断片、変異体、誘導体、または類似体とすることができる。PB2タンパク質は、転写開始および細胞性capブレムRNAがウイルス転写のためのプライマーを生成するために使用されるcapスティーリング（cap-stealing）メカニズムに関与する。インフルエンザウイルスA型/プエルトリコ/8/1934（H1N1）のPB2は、759アミノ酸およびその全体が参照によって本明細書において組み込まれるGenbankにおける受託番号AAM75155.1を有する。インフルエンザポリペプチドの非限定的な例は、公知のインフルエンザPB2配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のアミノ酸配列を含み、本質的にそれから成り、またはそれから成り、ポリペプチドは、PB2タンパク質に特異的に結合する抗体によって認識可能である。PB2配列は、PB2配列の断片を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成るポリペプチドであってもよい。

30

40

【0035】

本明細書において使用されるように、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンから成る核酸の一部である。「終止コドン」（TAG、TGA、またはTAA）は、アミノ酸に翻訳されないが、それは、コード領域の一部と考えられてもよい、しかし、いかなるランキング配列、たとえばプロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、および同種のものも、コード領域の外側にある。

【0036】

用語「断片」、「アナログ」、「誘導体」、または「変異体」は、インフルエンザポリペプチドについて言及する場合、天然に存在するインフルエンザタンパク質の少なくとも

50

いくつかの免疫原性または抗原性を保持するあらゆるポリペプチドを含む。本発明のインフルエンザポリペプチドの断片は、タンパク質分解性断片、欠失断片、および特に、発現、精製、および または動物への投与の間に溶解性の増加を示すインフルエンザポリペプチドの断片を含む。インフルエンザポリペプチドの断片は、被験体に送達される場合に病原性の低下を示すタンパク質分解性断片または欠失断片をさらに含む。ポリペプチド断片は、直線状および三次元エピトープを含む、天然のポリペプチドの抗原性または免疫原性エピトープを含む、ポリペプチドのあらゆる部分をさらに含む。

【0037】

ポリペプチド抗原の「エピトープ断片」は、エピトープを含有する抗原の一部である。「エピトープ断片」は、1つ以上のエピトープに加えてアミノ酸配列を含有してもよいが、含有する必要はない。

10

【0038】

本明細書において使用される用語「変異体」は、アミノ酸置換、欠失、挿入、および/または修飾により列挙されるポリペプチドと異なるポリペプチドを指す。亜型変異体などのような変異体は、天然に存在してもよい。用語「亜型変異体」は、ヒトA/プエルトリコ/8/34(H1N1)、ヒトA/ベトナム/1203/2004(H5N1)、ヒトA/香港/156/97(H5N1)、ヒトA/香港/483/97(H5N1)、ヒトA/香港/1073/99(H9N2)、トリA/ニワトリ/HK/G9/97(H9N2)、ブタA/ブタ/香港/10/98(H9N2)、トリA/FPV/ロストック/34(H7N1)、トリA/シチメンチョウ/イタリア/4620/99(H7N1)、トリA/FPV/ウェイブリッジ/34(H7N7)、ヒトA/ニューカレドニア/20/99(H1N1)、ヒトA/香港/1/68(H3N2)、ヒトA/滋賀/25/97(H3N2)、ヒトA/シンガポール/1/57(H2N2)、ヒトA/レニングラード/134/57(H2N2)、ヒトA/アナーバー/6/60(H2N2)、ヒトA/ブレビグミッション/1/18(H1N1)、ブタA/ブタ/ウィスコンシン/464/98(H1N1)、ヒトA/オランダ/219/03(H7N7)およびヒトA/ワイオミング/3/2003(H3N2)を含むがこれらに限定されない、異なるインフルエンザウイルス亜型において存在する、意図されるポリペプチドまたはポリヌクレオチドである。亜型変異体は、天然に存在する変異体であるが、それはまた、当技術分野で公知の突然変異誘発技術を使用して産生することができる。

20

30

【0039】

天然に存在しない変異体は、当技術分野で公知の突然変異誘発技術を使用して産生されてもよい。一実施形態では、変異体ポリペプチドは、5つのアミノ酸またはそれ以下の置換、欠失、または追加によって、同定される配列と異なる。そのような変異体は、一般に、たとえば、本明細書において記載される代表的な手順を使用して、ポリペプチド配列を修飾し、修飾ポリペプチドの抗原性特性を評価することによって同定されてもよい。

【0040】

ポリペプチド変異体は、同定されるポリペプチドと、少なくとも約60~70%、たとえば75%、80%、85%、90%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.9%の配列同一性を示す。変異体ポリペプチドは、保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失、または追加を含んでもよい。ポリペプチドの誘導体は、天然のポリペプチドについて見出されないさらなる特徴を示すように改変されているポリペプチドである。例として、融合タンパク質を含む。アナログは、本発明のポリペプチドの他の形態である。例として、活性成熟ポリペプチドを産生するためにプロタンパク質の切断によって活性化することができるプロタンパク質である。

40

【0041】

変異体はまたまたはその代わりに、他の修飾を含有してもよく、それによって、たとえば、ポリペプチドは、さらなるポリペプチド、たとえば、翻訳と同時にまたは翻訳後にタンパク質の移行を指示する、タンパク質のN末端のシグナル(またはリーダー)配列にコンジュゲートされてもよいまたは連結されてもよい、たとえば融合されてもよい。ポリペ

50

プチドはまた、ポリペプチドの合成、精製、もしくは同定の容易性のために（たとえば 6 - H i s ）または固体支持体へのポリペプチドの結合を増強するためにリンカーまたは他の配列にコンジュゲートされてもよいまたはそれに連結されて、産生されてもよい。たとえば、ポリペプチドは、免疫グロブリン F c 領域にコンジュゲートされてもよいまたは連結されてもよい。ポリペプチドはまた、ポリペプチドに対する免疫応答を付与するもしくは調整する（たとえば T 細胞エпитープ、B 細胞エпитープ、サイトカイン、ケモカインなど）ならびに / または抗原提示細胞もしくは他の免疫系細胞によるポリペプチドの取り込みおよび / もしくはプロセッシングを増強する配列にコンジュゲートされてもよいまたは連結されてもよい。ポリペプチドはまた、単独でまたは様々なアジュバントと組み合わせる他の病原性生物に対する防御免疫を誘発することができるハイブリッド免疫原性タンパク質を生成するために、インフルエンザウイルス由来のならびに / または他の細菌および / もしくは他のウイルス由来の他のポリペプチド / エピトープにコンジュゲートされてもよいまたは連結されてもよい。

【 0 0 4 2 】

本明細書において使用される用語「配列同一性」は、2 つ以上のポリヌクレオチド配列の間のまたは 2 つ以上のポリペプチド配列の間の関係を指す。一方の配列における位置が、比較配列 (c o m p a r a t o r s e q u e n c e) の対応する位置における同じ核酸塩基またはアミノ酸残基によって占められる場合、配列は、その位置で「同一である」と表現される。「配列同一性」パーセンテージは、「同一の」位置の数を得るために、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列において生じる位置の数を決定することによって、計算される。次いで、「同一の」位置の数は、比較ウィンドウ中の位置の総数で割り、「配列同一性」のパーセンテージを得るために 1 0 0 を掛ける。「配列同一性」のパーセンテージは、比較ウィンドウに関して 2 つの最適にアライメントされた配列の比較によって決定される。比較のために配列を最適にアライメントするために、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、ギャップと称される追加または欠失を含んでいてもよいが、参照配列は、一定に保たれる。最適なアライメントは、ギャップを有していても、参照および比較配列の間で最大限の数の「同一の」位置をもたらずアライメントである。「配列同一性」および「同一」という用語は、本明細書において互換的に使用される。したがって、「配列同一性」のパーセンテージを共有する配列は、その同じパーセンテージが「同一」であることが理解される。2 つの配列の間の「配列同一性」パーセンテージは、2 0 0 4 年 9 月 1 日の時点で N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n から入手可能であったプログラム「B L A S T 2 S e q u e n c e s」のバージョンを使用して決定することができ、このプログラムは、プログラム B L A S T N (ヌクレオチド配列比較用) および B L A S T P (ポリペプチド配列比較用) を組み込んでおり、このプログラムは、K a r l i n および A l t s c h u l (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 巻 (1 2 号) : 5 8 7 3 ~ 5 8 7 7 頁、1 9 9 3 年) のアルゴリズムに基づく。「B L A S T 2 S e q u e n c e s」を利用する場合、2 0 0 4 年 9 月 1 日の時点でデフォルトパラメーターであったパラメーターは、ワードサイズ (3)、オープンギャップペナルティー (1 1)、エクステンションギャップペナルティー (1)、ギャップドロップオフ (5 0)、期待値 (1 0)、およびマトリックスオブションを含むが、これらに限定されない任意の他の必要とされるパラメーターについて使用することができる。

【 0 0 4 3 】

本明細書において使用される用語「エピトープ」は、動物、たとえば哺乳動物、たとえばヒトにおいて抗原性または免疫原性活性を有するポリペプチドの一部を指す。本明細書において使用される「免疫原性エピトープ」は、当技術分野において公知の任意の方法によって決定されるように、動物において免疫応答を誘発するタンパク質の一部として定義される。本明細書において使用される用語「抗原性エピトープ」は、抗体または T 細胞受容体が、当技術分野において周知の任意の方法によって決定されるように、その抗原に免疫特異的に (i m m u n o s p e c i f i c a l l y) 結合することができるタンパク質

の一部として定義される。免疫特異的な結合は、非特異的な結合を除くが、必ずしも他の抗原との交差反応性を除くものではない。免疫原性エピトープはすべて抗原性であるが、抗原性エピトープは、免疫原性である必要はない。

【 0 0 4 4 】

「有効量」は、単一の用量でのまたは一連の一部としての個体への投与の量が治療または予防に有効である量である。量は、たとえば、感染インフルエンザウイルスを用いる抗原投与の2週間後に決定されるように、その投与が未治療個体に比べてインフルエンザ感染の発生率の低下をもたらす場合、有効である。この量は、治療されることとなる個体の健康状態および身体状況、治療されることとなる個体の分類群（たとえばヒト、非ヒト霊長類、霊長類など）、個体の免疫系の応答性能力、所望される保護の程度、ワクチンの製剤、医学的状況の専門家的な評価、ならびに他の関連する因子に依存して変動する。有効量は、ルーチン的な試みを通して決定することができる比較的広範囲にあるであろうということが期待される。典型的に、単一の用量は、約 $10 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg}$ の MVA / 体重 kg または同等量の組換え発現インフルエンザポリペプチドを提供するのに十分である、修飾キャリア生物または宿主細胞の量である。

10

【 0 0 4 5 】

用語「被験体」は、診断、予後、免疫、または療法が所望される任意の被験体、特に哺乳動物の被験体を意味する。哺乳動物の被験体は、ヒト、家畜、農場用の動物、クマなどのような動物園の動物、スポーツ用の動物、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、クマ、雌ウシなどのようなペット動物；類人猿、サル、オランウータン、およびチンパンジーなどのような霊長類；イヌおよびオオカミなどのようなイヌ科の動物；ネコ、ライオン、およびトラなどのようなネコ科の動物；ウマ、ロバ、およびシマウマなどのようなウマ科の動物；雌ウシ、ブタ、およびヒツジなどのような食用動物；シカおよびキリンなどのような有蹄動物；マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットなどのようなげっ歯動物などを含むが、これらに限定されない。ある実施形態では、動物は、ヒト被験体である。

20

【 0 0 4 6 】

用語「動物」は、単数の「動物」および複数の「動物」を包含するように意図され、哺乳動物および鳥ならびに魚、爬虫類動物、および両生動物を含む。動物という用語はまた、モデル動物、たとえば疾患モデル動物をも包含する。いくつかの実施形態では、動物という用語は、経済的にまたはその他に有益な動物、たとえば経済的に重要な種畜、レース用動物、ショー用動物、家宝の動物、稀なもしくは絶滅の危機に瀕した動物、またはコンパニオンアニマルを含む。特に、哺乳動物は、ヒト被験体、食用動物、またはコンパニオンアニマルとすることができる。

30

【 0 0 4 7 】

本明細書において使用されるように、「その必要のある被験体」は、インフルエンザ感染の重症度を治療する、つまり、予防する、治療する、遅延させる、もしくは軽減する、および/または特定される期間にわたりインフルエンザ感染の症状の悪化をもたらさないことが望ましい個体を指す。

【 0 0 4 8 】

用語「初回刺激する」または「初回刺激」または「初回刺激の (primary)」および「追加免疫する」または「追加免疫」は、つまり、これらの用語が免疫学において通常有する定義に従って、それぞれ、最初のおよび続く免疫を指すために本明細書において使用される。しかしながら、ある実施形態では、たとえば、初回刺激構成成分および追加免疫構成成分が単一の製剤中にある場合、「初回刺激」および「追加免疫」組成物の両方が同時に投与されるので、最初のおよび続く免疫処置は、必要でなくてもよい。

40

【 0 0 4 9 】

用語「受動免疫」は、宿主動物が発達させる、抗原に対する免疫を指し、宿主動物は、抗原に対するそれ自体の抗体を産生するのではなく、他の動物によって産生される抗体を与えられる。用語「能動免疫」は、標的抗原の存在の結果としての宿主動物による抗体の

50

産生を指す。

【0050】

本明細書において使用されるように、「免疫応答」は、これらに限定されないが、抗体および/またはT細胞の産生によって一般に特徴付けられる、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、弱毒化されたボックスウイルス、たとえばMVA、または組成物の導入に対するレシピエントにおける応答を指す。一般に、免疫応答は、インフルエンザM2外部ドメインもしくはM2外部ドメインタンデムリピート(METR)に対して特異的な、CD4+T細胞もしくはCD8+T細胞またはその両方の誘発または活性化などのような細胞性応答、インフルエンザM2外部ドメイン特異的もしくはMETR特異的抗体の産生の増加についての体液性応答、または細胞性および体液性応答の両方であってもよい。本発明のMVAを含むワクチンによって確立される免疫応答は、MVAが宿主細胞に入った後に、宿主細胞によって発現されるタンパク質に対する応答を含むが、これらに限定されない。本発明では、感染生物(たとえばインフルエンザA型ウイルス)による続く抗原投与に際して、免疫応答は、インフルエンザウイルス粒子の形成または発達を予防する。免疫応答はまた、粘膜応答、たとえば粘膜抗体応答、たとえばS-IgA産生または粘膜細胞媒介性応答、たとえばT細胞応答を含むことができる。

10

【0051】

本明細書において使用される「ワクチン」は、賦形剤、アジュバント、添加剤、および/または保護剤と組み合わせて免疫原性作用物質および薬学的に許容される希釈剤を含む組成物である。免疫原は、全感染病原体または感染病原体の分子サブセット(限定を伴うことなくポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む、合成的にまたは組換えで感染病原体によって産生される)で構成されてもよい。たとえば、本明細書において使用される「MVAワクチン」は、賦形剤、アジュバント、添加剤、および/または保護剤と組み合わせて、M2外部ドメインペプチドの複数のコピー(たとえばM2eタンデムリピート)をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む単離MVAおよび薬学的に許容される希釈剤を含む組成物を意味する。ワクチンが被験体に投与される場合、免疫原は、感染病原体を用いる続く抗原投与に際して、病気から被験体を保護するであろうまたはその作用物質によって引き起こされる病態、症状、もしくは臨床症状を軽減するであろう免疫応答を刺激する。本発明によるワクチンは、治療用のまたは予防用のものとしてすることができる。治療用(治療)ワクチンは、感染後に与えられ、疾患進行を軽減するまたは阻止するように意図される。予防(予防用)ワクチンは、最初の感染を予防するまたは感染の負荷を軽減するように意図される。インフルエンザ関連性疾患に対するワクチンにおいて使用される作用物質は、弱毒化されたインフルエンザウイルスまたはインフルエンザウイルスと関連する、精製されたもしくは人工的に製造された分子、たとえば組換えタンパク質、合成ペプチド、DNAプラスミド、およびインフルエンザタンパク質を発現する組換えウイルスもしくは細菌であってもよい。ワクチンは、当業者らによって容易に理解されるように、賦形剤、希釈剤、担体、保存剤、アジュバント、もしくは他の免疫賦活薬またはその組み合わせなどのような他の構成成分をさらに含んでもよい。

20

30

【0052】

多価ワクチンは、2つ以上のボックスウイルス、たとえばMVAから調製される任意のワクチンを指し、それらのそれぞれは、異なる抗原、たとえば異なるインフルエンザ抗原を発現する。その代わりに、多価ワクチンは、単一の単離ボックスウイルス、たとえば2つ以上の抗原、たとえば同一でないインフルエンザ抗原をコードするポリヌクレオチドを含むMVAを含む。2つ以上の抗原、たとえばインフルエンザ抗原は、同じポリペプチドに由来してもよいが、交差反応性でない免疫応答を誘発してもよい、異なるエピトープを含有してもよい。

40

【0053】

本明細書において使用される用語「免疫原性担体」は、第2のポリペプチド、たとえば抗原性エピトープまたはその断片、変異体、もしくは誘導体の免疫原性を増強する、第1のポリペプチドまたはその断片、変異体、もしくは誘導体を指す。

50

【 0 0 5 4 】

用語「アジュバント」は、(1) 特定の抗原に対する免疫応答を改変するもしくは増加させるまたは(2) 薬理学的作用物質の効果を増加させるもしくは支援する能力を有する任意の物質を指す。本明細書において使用されるように、本発明の M V A の発現、抗原性、または免疫原性を増加させてもよい任意の化合物は、効力のあるアジュバントである。いくつかの実施形態では、アジュバントという用語は、T L R 刺激アジュバントを指し、T L R アジュバントは、T L R 受容体(たとえば T L R 1 ~ T L R 1 3)を刺激する化合物を含み、本発明のワクチン組成物に対する免疫系応答の増加をもたらす。T L R アジュバントは、C p G および M P L を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 5 5 】

本明細書において使用される用語「弱毒化する」は、感染病原体、たとえばボックスウイルス、たとえば M V A が、少なくとも 1 つの宿主細胞、たとえば任意の哺乳動物細胞、たとえば任意のヒト細胞において複製することができないようにすることを含む。弱毒化された M V A はなお、ある種の哺乳動物細胞、たとえば B S - C - 1 および C V - 1 細胞において複製するための限られた能力を有していてもよい。ある種の哺乳動物細胞において複製能力がないが、M V A はなお、他の哺乳動物細胞(たとえば B H K - 2 1 細胞)およびトリ細胞、たとえば初代または不死化ヒヨコ細胞またはアヒル細胞、たとえば A G E 1 c r、A G E 1 c r . p I X、または E B 6 6 (登録商標)において複製するための完全な能力を保持していてもよい。弱毒化された M V A の細胞複製サイクルは、その生活環の任意の段階において遮断されてもよい。たとえば、弱毒化された M V A は、新しいウイルスが生成され、放出されるのを予防する、後期段階において遮断された細胞複製サイクルを有する。本明細書において使用される用語「複製する」または「複製」は、ウイルス生活環のいくつかの部分、たとえば、ウイルス遺伝子産物の転写および翻訳ならびに核酸複製を通して進行するための能力ならびにまた、いくつかの実例では、成熟感染ビリオンを産生し、または発達させる能力を指す。

【 0 0 5 6 】

ポリヌクレオチド

本発明は、インフルエンザウイルスに対して免疫応答を誘発するための、インフルエンザウイルスマトリックス 2 タンパク質の外部ドメインの複数のコピーを含むポリペプチドをコードするコード領域を含む単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 5 7 】

インフルエンザウイルスマトリックス 2 タンパク質(「M 2」)は、プロトン選択的イオンチャネルタンパク質であり、これは、インフルエンザ A 型ウイルスのウイルスエンベロップにおいて不可欠である。チャネルはそれ自体、ホモ四量体であり、その中で、ユニットが、2 つのジスルフィド結合によって安定化されるヘリックスを形成する。M 2 タンパク質ユニットは、3 つのタンパク質ドメインから成る：外部の環境に暴露される、N 末端の 2 4 アミノ酸を有する外部ドメイン、1 9 疎水性アミノ酸を有する膜貫通領域、および C 末端上に 5 4 アミノ酸を有する細胞質ドメイン。M 2 タンパク質は、インフルエンザ A 型ウイルスの生活環において重要な役割を有する。このタンパク質は、ウイルスエンベロップ中に位置して、水素イオンがエンドソームからウイルス粒子(ビリオン)に入るのを可能にし、したがって、ウイルスの内部の pH を低下させ、これにより、リボ核タンパク質 R N P からのウイルスマトリックスタンパク質 M 1 の分離を引き起こす。これは、ウイルスの脱外被および宿主細胞の細胞質へのその内容物の暴露に重大なステップである。

【 0 0 5 8 】

本発明は、ポリペプチドをコードするコード領域を含む単離ポリヌクレオチドであって、ポリペプチドは、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、または少なくとも 1 2 のインフルエンザウイルスマトリックス 2 タンパク質(M 2) 外部ドメインペプチド、その変異体、断片、誘導体、または類似体を含む、単離ポリヌクレオチドを提供する。その中の M 2 外部ドメインペプチドは、互いに対して任意の順序で配置させるまたは組み合わせることができる。一

10

20

30

40

50

実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも6つのM2外部ドメインペプチド、その断片、変異体、断片、誘導体、または類似体を含むポリペプチドをコードするコード領域であって、少なくとも6つのM2外部ドメインペプチドは、互いに対して任意の順序で配置されるまたは組み合わせられる、コード領域を含む。用語「M2外部ドメインペプチドの複数のコピー」はまた、「M2eタンデムリピート」、「M2外部ドメインタンデムリピート」、または「METR」として本明細書において互換的に使用される。

【0059】

本発明に使用されるマトリックス2(M2)タンパク質は、ヒトA/プエルトリコ/8/34(H1N1)、ヒトA/ベトナム/1203/2004(H5N1)、ヒトA/ベトナム/DT-036/2005(H5N1)、ヒトA/カイツブリ/ノボシビルスク(Novosibirsk)/29/2005(H5N1)、トリA/インドガン/モンゴル/1/05(H5N1)、A/ネコ/タイ/KU-02/04(H5N1)、ヒトA/香港/213/03(H5N1)、トリA/ニワトリ/広東/174/04(H5N1)、ヒトA/香港/156/97(H5N1)、ヒトA/香港/483/97(H5N1)、トリA/ウズラ/香港/G1/97(H9N2)、トリA/アヒル/香港/Y260/97(H9N2)、トリA/ニワトリHK/FY23/03(H9N2)、トリA/シチメンチョウ/ドイツ/3/91(H1N1)、ヒトA/香港/1073/99(H9N2)、トリA/ニワトリ/HK/G9/97(H9N2)、ブタA/ブタ/香港/10/98(H9N2)、ブタA/ブタ/サスカチュワン/18789/02(H1N1)、トリA/マガモ/アルバータ/1302003/(H1N1)、トリA/マガモ/NY/6750/78(H2N2)、トリA/マガモ/ポツダム/177-4/83(H2N2)、トリ/A/アヒル/北海道(Hokkaido)/95/2001(H2N2)、トリA/アヒル/韓国/S9/2003(H3N2)、ブタA/ブタ/山東/2/03(H5N1)、トリA/ニワトリ/カリフォルニア/0139/2001(H6N2)、トリA/ウミスズメ/スウェーデン/3/2000(H6N2)、トリA/ガチョウ/香港/W217/97(H6N9)、トリA/ニワトリ/ブリティッシュコロンビア/04(H7N3)、トリA/浜鳥/デラウェア/9/96(H9N2)、トリA/アヒル/香港/Y439/97(H9N2)、トリA/コガモ/香港/W312/97(H6N1)、ブタA/ブタ/韓国/S452/2004(H9N2)、トリA/ニワトリ/オランダ/1/2003(H7N7)、トリA/マガモ/アルバータ/2001(H1N1)、トリA/アヒル/湖南/114/05(H5N1)、ブタA/ブタ/コートダルモール/1482/99(H1N1)、ブタA/ブタベルツィッヒ/2/2001(H1N1)、トリA/シチメンチョウ/イタリア/220158/2002(H7N3)、トリA/HK/2108/2003(H9N2)、トリA/FPV/ロストック/34(H7N1)、トリA/シチメンチョウ/イタリア/4620/99(H7N1)、トリA/FPV/ウェイブリッジ/34(H7N7)、トリA/FPV/ドブソン/27(H7N7)、ヒトA/ニューカレドニア/20/99(H1N1)、ヒトA/香港/1/68(H3N2)、ヒトA/シャーロットビル/03/2004(H3N2)、ヒトA/カンタベリー/129/2005(H3N2)、ヒトA/滋賀/25/97(H3N2)、ヒトA/シンガポール/1/57(H2N2)、ヒトA/レニングラード/134/57(H2N2)、ヒトA/アナーバー/6/60(H2N2)、ヒトA/プレビグミッション/1/18(H1N1)、ヒトA/カナダ/720/05(H2N2)、ブタA/ブタ/ウィスコンシン/464/98(H1N1)、ブタA/ブタ/テキサス/4199-2/98(H3N2)、トリA/シチメンチョウ/オハイオ/313053/2004(H3N2)、トリA/シチメンチョウ/ノースカロライナ/12344/03(H3N2)、トリA/ガチョウ/広東/1/98(H5N1)、ヒトA/オランダ/219/03(H7N7)、ヒトA/ウィルソン-スミス/33(H1N1)、ヒトA/ニューカレドニア/20/99(H1N1)、ヒトA/日本/305/57(H2N2)、トリA/ニワトリ/イラン/16/2000(H9N2)、トリA/マガモ/MN/1/2000(H5N2)、A/レイデン/01272/2006(H3N2)、A/ティルブルフ/45223/2005(H

10

20

30

40

50

3 N 2)、A / ペンシルバニア / P I T 2 5 / 2 0 0 8 (H 3 N 2)、A / N Y M C X - 1 7 1 A (プエルトリコ / 8 / 1 9 3 4 - ブリスベン / 1 0 / 2 0 0 7) (H 3 N 2)、A / マナグア / 2 6 / 2 0 0 7 (H 3 N 2)、A / 香港 / 1 - 1 - M A - 2 0 D / 1 9 6 8 (H 3 N 2)、A / チェコ共和国 / 1 / 1 9 6 6 (H 2 N 2)、A / ニワトリ / 上海 / 2 / 1 9 9 9 (H 9 N 2))]、A / ミャンマー / M 1 8 7 / 2 0 0 7 (H 3 N 2)、A / ホロホロチョウ / ニューヨーク / 1 0 1 2 7 6 - 1 / 2 0 0 5 (H 7 N 2)、トリ A / バリケン / ニューヨーク / 8 7 4 9 3 - 3 / 2 0 0 5 (H 7 N 2)、トリ A / シチメンチョウ / ニューヨーク / 1 2 2 5 0 1 - 2 / 2 0 0 5 (H 7 N 2)、トリ A / マガモ / イタリア / 4 2 2 3 - 2 / 2 0 0 6 (H 5 N 2) およびヒト A / ワイオミング / 3 / 2 0 0 3 (H 3 N 2) を含むが、これらに限定されない任意のインフルエンザ A 型ウイルスから得ることができる。

10

【 0 0 6 0 】

一実施形態では、本発明のためのマトリックス 2 タンパク質の外部ドメインは、インフルエンザ A 型 / プエルトリコ / 8 / 3 4 (H 1 N 1) に由来する。インフルエンザヒト A 型 / プエルトリコ / 8 / 3 4 (H 1 N 1) の完全長 M 2 タンパク質は、97 アミノ酸を有し、配列番号 14 として示される。M 2 タンパク質 (配列番号 14) をコードする核酸は、配列番号 13 として本明細書において示される。インフルエンザウイルスの表面上に暴露する N 末端配列は、N 末端メチオニンを有していない 23 アミノ酸または N 末端メチオニンを有する 24 アミノ酸 (下記に示される配列番号 14 の下線を引かれた配列) であり、外部ドメイン (「 M 2 e 」) として同定される。

20

インフルエンザ A 型 / プエルトリコ / 8 / 3 4 (H 1 N 1) 由来のマトリックス 2 タンパク質配列 (配列番号 14)

【 0 0 6 1 】

【 化 1 】

0 M S L L T E V E T P I R N E W G C R C N G S S D P L T I A A N I I G I L H L T L W I L D R L F F K C
50 I Y R R F K Y G L K G G P S T E G V P K S M R E E Y R K E Q Q S A V D A D D G H F V S I E L E

本明細書において使用される M 2 外部ドメインペプチド、その変異体、誘導体、断片、または類似体は、M 2 外部ドメインペプチド中に位置する抗体エピトープを含むことができ、M 2 外部ドメインペプチドは、約 8 ~ 39 アミノ酸、約 9 ~ 38 アミノ酸、約 10 ~ 37 アミノ酸、約 11 ~ 36 アミノ酸、約 12 ~ 35 アミノ酸、約 13 ~ 34 アミノ酸、約 14 ~ 33 アミノ酸、約 15 ~ 32 アミノ酸、約 16 ~ 31 アミノ酸、約 17 ~ 30 アミノ酸、約 18 ~ 29 アミノ酸、約 19 ~ 28 アミノ酸、約 20 ~ 27 アミノ酸、約 21 ~ 26 アミノ酸、約 22 ~ 25 アミノ酸、または約 23 ~ 24 アミノ酸を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。特定の実施形態では、M 2 外部ドメインペプチドは、23 アミノ酸から本質的に成るまたはそれから成る。抗体エピトープの非限定的な例は、E V E T P T R N (配列番号 1 のアミノ酸 5 ~ 12)、S L L T E V E T P T (配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 10)、E T P T R N E W E C K (配列番号 2 のアミノ酸 7 ~ 17)、E V E T P I R N E W (配列番号 3 のアミノ酸 5 ~ 14)、および L T E V E T P I R N E W G C R C N (配列番号 3 のアミノ酸 3 ~ 19) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。

30

40

【 0 0 6 2 】

その代わりに、M 2 外部ドメインペプチドは、その変異体、誘導体、または類似体とすることができ、これは、配列番号 1、2、3、4、5、または 6 から成るペプチドに特異的に結合する抗体によって認識可能である。たとえば、M 2 外部ドメインペプチドの変異体、誘導体、または類似体は、配列番号 1、2、3、4、5、または 6 (M 2 e # 3 _ C) と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一であり、変異体、誘導体、または類似体は、配列番号 1、2、3、4、5、または 6 から成るペプチドに特異的に結合する抗体によって認識可能である。配列番号 3 から成るペプチドに特異的に結合する抗体の例は、モノクローナル抗体 14 C 2 であり、これは、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第 5, 29

50

0, 686号において記載されている。M2外部ドメインペプチドの非限定的な例は、表1に列挙される。

【0063】

【表1】

表1. METRワクチンにおいて利用されるM2eペプチド(C)の6つのバージョンのリスト

M2eペプチドのアミノ酸配列	ペプチドの名称	配列番号	天然に存在するインフルエンザ株における有病率
SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD	M2e#1_C	配列番号 1	H5ヒト 1999~2008 (70%)
SLLTEVETPTRNEWCKCIDSSD	M2e#2_C	配列番号 2	H5ヒト 1999~2008 (30%)
SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	M2e#3_C	配列番号 3	H3ヒト(いくつかのH1)
SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	M2e#4_C	配列番号 4	H1およびH3ヒト
SLLTEVETLTRNGWECRCSDSSD	M2e#5_C	配列番号 5	H9およびH6ヒト、またトリでも
SLLTEVETPTRNGWCKCSDSSD	M2e#6_C	配列番号 6	トリH7、またH3、H8、H10、H2、H6、H9においても

10

20

さらに、本明細書において使用されるM2外部ドメインペプチド、変異体、断片、誘導体、または類似体は、M2外部ドメインペプチド変異体を含むことができるが、これらに限定されず、その中で、M2外部ドメインペプチド中のシステイン(C)は、セリン(S)で置換される。置換は、2つのシステインの間のジスルフィド結合形成を予防するが、M2外部ドメインペプチドの免疫原性に影響を与えない。セリン置換M2外部ドメインペプチドの非限定的な例は、表2に示される。

【0064】

【表2】

表2. METRワクチンにおいて利用されるM2eペプチド(S)の6つのバージョンのリスト

M2eペプチドのアミノ酸配列	ペプチドの名称	配列番号
SLLTEVETPTRNEWESRSDSSD	M2e#1_S	配列番号 7
SLLTEVETPTRNEWESKSIDSSD	M2e#2_S	配列番号 8
SLLTEVETPIRNEWGSRNGSSD	M2e#3_S	配列番号 9
SLLTEVETPIRNEWGSRNDSSD	M2e#4_S	配列番号 10
SLLTEVETLTRNGWESRSDSSD	M2e#5_S	配列番号 11
SLLTEVETPTRNGWESKSSDSSD	M2e#6_S	配列番号 12

30

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号7、配列番号8、配列番号11、配列番号12、ならびに配列番号7、8、11、および12の組み合わせから成る群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。

40

【0065】

本発明は、ポリペプチドをコードするコード領域を含む単離ポリヌクレオチドであって、ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下のM2外部ドメインペプチドの少なくとも3つを含む：(i)配列番号1(M2e#1_C)；(ii)配列番号2(M2e#2_C)；(iii)配列番号3(M2e#3_C)；(iv)配列番号4(M2e#4_C)；(v)配列番号5(M2e#5_C)；(vi)配列番号6(M2e#6_C)；(vii)配列番号7(M2e#1_S)；(viii)配列番号8(M2e#2_S)；(ix)配列番号9(M2e#3_S)；(x)配列番号10(M2e#4_S)；(xi)配列番号11(M2e#5_S)；および(xii)配列番号12

50

(M 2 e # 6 __ S)。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、互いに対して任意の順序で配置されるまたは組み合わせられる、M 2 外部ドメインペプチドの少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、または少なくとも12を含む。

【0066】

他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする核酸配列であって、ポリペプチドは、互いに対して任意の順序で配置される、以下のM 2 外部ドメインペプチドの少なくとも6つを含む：(i) 配列番号1 (M 2 e # 1 __ C)；(ii) 配列番号2 (M 2 e # 2 __ C)；(iii) 配列番号3 (M 2 e # 3 __ C)；(iv) 配列番号4 (M 2 e # 4 __ C)；(v) 配列番号5 (M 2 e # 5 __ C)；(vi) 配列番号6 (M 2 e # 6 __ C)；(vii) 配列番号7 (M 2 e # 1 __ S)；(viii) 配列番号8 (M 2 e # 2 __ S)；(ix) 配列番号9 (M 2 e # 3 __ S)；(x) 配列番号10 (M 2 e # 4 __ S)；(xi) 配列番号11 (M 2 e # 5 __ S)；および(xii) 配列番号12 (M 2 e # 6 __ S)。特定の実施形態では、本発明におけるM 2 外部ドメインペプチドは、互いに対して任意の順序で組み合わせられるまたは配置される以下のアミノ酸配列を含む：(i) 配列番号1 (M 2 e # 1 __ C)；(ii) 配列番号2 (M 2 e # 2 __ C)；(iii) 配列番号3 (M 2 e # 3 __ C)；(iv) 配列番号4 (M 2 e # 4 __ C)；(v) 配列番号5 (M 2 e # 5 __ C)；および(vi) 配列番号6 (M 2 e # 6 __ C)または(i) 配列番号7 (M 2 e # 1 - S)；(ii) 配列番号8 (M 2 e # 2 __ S)；(iii) 配列番号9 (M 2 e # 3 __ S)；(iv) 配列番号10 (M 2 e # 4 __ S)；(v) 配列番号11 (M 2 e # 5 __ S)；および(vi) 配列番号12 (M 2 e # 6 __ S)から成る群から選択されるアミノ酸配列。特定の一定実施形態では、本発明の単離ポリヌクレオチドは、互いに対して任意の順序で配置される以下のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするコード領域を含む：(a) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、および配列番号6または(b) 配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12。他の特定の一定実施形態では、M 2 外部ドメインペプチド(M E T R)配列の複数のコピーを含む本発明のポリペプチドは、配列番号1～6を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。さらに特定の一定実施形態では、M E T R配列は、配列番号16または配列番号55を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。

M E T R __ C 配列 (配列番号16)

【0067】

【化2】

```
SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD GSASG
SLLTEVETPTRNEWCKCIDSSD SGSGA
SLLTEVETPIRNEWGCRGNGSSD SAGSG
SLLTEVETPIRNEWGCRGNDSSD QVHFQPLPPAVVKL
SLLTEVETLTRNGWECRCSDSSD QFIKANSKFIGITE
SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD
```

M E T R __ C 配列 (配列番号55)

【0068】

【化3】

```
SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD GSASG
SLLTEVETPTRNEWCKCIDSSD SGSGA
SLLTEVETPIRNEWGCRGNGSSD SAGSG
SLLTEVETPIRNEWGCRGNDSSD GSASG
SLLTEVETLTRNGWECRCSDSSD SGSGA
SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD
```

さらなる実施形態では、M E T R配列を含むポリペプチドは、配列番号7～12を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。特定の一定実施形態では、M E T R配列は、

配列番号 18 または配列番号 56 を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。

M E T R __ S 配列 (配列番号 18)

【 0 0 6 9 】

【 化 4 】

SLLTEVETPTRNEWESRSSDSSD GSASG
SLLTEVETPTRNEWESKSIDSSD SGSGA
SLLTEVETPIRNEWGSRNNGSSD SAGSG
SLLTEVETPIRNEWGSRNDSSD QVHFQPLPPAVVKL
SLLTEVETLTRNGWESRSSDSSD QFIKANSKFIGITE
SLLTEVETPTRNGWESKSSDSSD

10

M E T R __ S 配列 (配列番号 56)

【 0 0 7 0 】

【 化 5 】

SLLTEVETPTRNEWESRSSDSSD GSASG
SLLTEVETPTRNEWESKSIDSSD SGSGA
SLLTEVETPIRNEWGSRNNGSSD SAGSG
SLLTEVETPIRNEWGSRNDSSD GSASG
SLLTEVETLTRNGWESRSSDSSD SGSGA
SLLTEVETPTRNGWESKSSDSSD

20

インフルエンザ核タンパク質 (NP) コンセンサス配列をコードするコード領域を含む単離ポリヌクレオチドもまた、提供される。インフルエンザNPタンパク質は、インフルエンザ遺伝子 (RNA) セグメントと構造的に関連し、498 アミノ酸の長さを有する。NPの主要な機能は、RNA 転写、複製、およびパッケージングの目的でウイルスのゲノムをキャプシド形成することである。NP 遺伝子は、比較的十分に保存されており、最大のアミノ酸差異は 11 % 未満である (Shu, L. L. ら、Nucleic Acid Res. 22 巻: 5047 ~ 5053 頁 (1993 年))。本発明のためのインフルエンザNP コンセンサス配列は、インフルエンザ配列データベース (www.flu.lanl.gov/) において開示されるように、最近 (2004 ~ 2007) 出現したウイルス由来の最も頻繁なNP インフルエンザ A 型配列の 700 のアライメントを比較することによって得ることができる。NP コンセンサス配列は、インフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発することができる。NP コンセンサスの例示的な配列は、配列番号 20 を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。

30

NP コンセンサス配列 (配列番号 20)

【 0 0 7 1 】

【 化 6 】

0 MASQGTKRSY EQMETDGRQ NATEIRASVG KMIDGIGRFY IQMCTELKLS
50 DHEGRLIQNS LTIEKMVLSA FDERRNKYLE EHPSACKDPK KTGGPIYRRV
100 DGKWMRELVL YDKEEIRRIW RQANNGEDAT AGLTHIMIWH SNLNDATYQR
150 TRALVRTGMD PRMCSLMQGS TLPRRSGAAG AAVKGIGTMV MELIRMVVRG
200 INDRNFWRGE NGRKTRSAYE RMCNILKGKF QTAAQRAMVD QVRESRNPNGN
250 AEIEDLIFLA RSALILRGSV AHKSCLPACA YGPAVSSGYD FEKEGYSLVG
300 IDPFKLLQNS QIYSLIRPNE NPAHKSQLVW MACHSAAFED LRLLSFIRGT
350 KVSPRGKLST RGVQIASNEN MDNMGSSSTLE LRSGYWAIRT RSGCNTNQQR
400 ASAGQTSVQP TFSVQRNLFP EKSTIMAAFT GNTEGRTSDM RAEIIRMMEG
450 AKPEEVSFRG RGVFELSDEK ATNPVPSFD MSNEGSYFFG DNAEEYDN

40

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、任意の 2 つの M2 外部ドメインペプチドの間に介在するリンカーをさらに含む。一実施形

50

態では、ポリペプチド中に存在する任意のM2外部ドメインペプチドは、そのM2外部ドメインペプチドおよび隣接するM2外部ドメインペプチドの間に介在するリンカーペプチドを有する。一般に、いかなる所与のポリペプチドも、リンカーペプチドを有していなくてもよく、1つのリンカーペプチドまたは複数のリンカーペプチドを有していてもよい。1つを超えるリンカーペプチドがポリペプチド中に存在する場合、リンカーは同じものでも異なるものでもよい。ポリペプチドは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、または少なくとも11のリンカーペプチドを含むことができる。リンカーペプチドは、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、または少なくとも15のアミノ酸とすることができる。一実施形態では、リンカーペプチドは、長さが5アミノ酸である。他の実施形態では、リンカーペプチドは、宿主に対して低いまたは最小限の免疫原性、疎水性、または親水性を有する。

【0072】

他の実施形態では、リンカーペプチドは、下等生物において見出されるアミノ酸配列に対する相同性を有する。さらに他の実施形態では、リンカーペプチドは、霊長類において見出されるアミノ酸配列に対する相同性を有さない。これらのリンカーペプチドが免疫原性であり、抗体の産生をもたらす場合、それらの抗体は、宿主中で循環し、あらゆる相同抗原に結合する機会を伴うであろう。効力のある抗原が自己タンパク質である場合、免疫原性は、所望されない。効力のある抗原が病原体または他の微生物に対して相同である場合、免疫原性は有益となり得る。

【0073】

ある実施形態では、本発明において使用されるリンカーペプチドは、Burkholderia種 H160、Arthrospira maxima CS-328、Helicoverpa armigera SNPV、Francisella novicida FTG、Peromyscus californicus insignis、Helicobacter pylori G27、Aliivibrio salmonicida LFI1238、Solarium pennellii、Saccharomyces cerevisiae AWRI1631、Cryptosporidium hominis、Bodo saltans、Nitrosococcus oceani C-27、ベータ-プロテオバクテリアKB13、Campylobacteriales細菌GD1、Candidatus Pelagibacter種 HTCC7211、Thermodesulfobacterium yellowstonii DSM 11347、Bacillus cereus AH1134、Rhodobacteriales細菌Y4I、Leptospirillum種 グループII 「5-way CG」、Laccaria bicolor S238N-H82、Clostridium bartlettii DSM 16795、Claviceps purpurea、Tetraodon nigroviridis、Polynucleobacter necessarius STIR1、Piromyces rhizinflatus、ノイラミニダーゼ[インフルエンザA型ウイルス(A/ニワトリ/イラン/16/2000(H9N2))]、ノイラミニダーゼ[インフルエンザA型ウイルス(A/マガモMN/1/2000(H5N2))]、Escherichia coli O157:H7株 EC4045、S1糖タンパク質[感染性気管支炎ウイルス]、ノイラミニダーゼ[インフルエンザA型ウイルス(A/レイデン/01272/2006(H3N2))]、ノイラミニダーゼ[インフルエンザA型ウイルス(A/ティルブルフ/45223/2005(H3N2))]、ノイラミニダーゼ[インフルエンザA型ウイルス(A/ペンシルバニア/PIT25/2008(H3N2))]、ノイラミニダーゼ[インフルエンザA型ウイルス(A/NYMC X-171A(ブエルトリコ/8/1934-ブリスベン/10/2007)(H3N2))]、ノイラミニダーゼ[インフルエンザA型ウイルス(A/マナグア/26/2007(H3N2))]、ノイラミニダーゼ[

インフルエンザ A 型ウイルス (A / 香港 / 1 - 1 - M A - 2 0 D / 1 9 6 8 (H 3 N 2))]、ノイラミニダーゼ [インフルエンザ A 型ウイルス (A / チェコ共和国 / 1 / 1 9 6 6 (H 2 N 2))]、ノイラミニダーゼ [インフルエンザ A 型ウイルス (A / ニワトリ / 上海 / 2 / 1 9 9 9 (H 9 N 2))]、ノイラミニダーゼ [インフルエンザ B 型ウイルス (B / ミャンマー / M 1 7 0 / 2 0 0 7)]、ノイラミニダーゼ [インフルエンザ A 型ウイルス (A / ミャンマー / M 1 8 7 / 2 0 0 7 (H 3 N 2))]、ノイラミニダーゼ [インフルエンザ A 型ウイルス (A / ホロホロチョウ / ニューヨーク / 1 0 1 2 7 6 - 1 / 2 0 0 5 (H 7 N 2))]、ノイラミニダーゼ [インフルエンザ A 型ウイルス (A / バリケン / ニューヨーク / 8 7 4 9 3 - 3 / 2 0 0 5 (H 7 N 2))]、ノイラミニダーゼ [インフルエンザ A 型ウイルス (A / シチメンチョウ / ニューヨーク / 1 2 2 5 0 1 - 2 / 2 0 0 5 (H 7 N 2))]、および / またはノイラミニダーゼ [インフルエンザ A 型ウイルス (A / マガモ / イタリア / 4 2 2 3 - 2 / 2 0 0 6 (H 5 N 2))] において見出されるアミノ酸配列に対して相同であってもよい。特定の実施形態では、本発明において使用されるリンカーペプチドは、G l y - S e r - A l a - S e r - G l y (G S A S G) (配列番号 2 1) である。

10

【 0 0 7 4 】

他の実施形態では、リンカーペプチドは、S t a p h y l o c o c c u s ファージ p h i 2 9 5 8 P V L、S t r e p t o m y c e s r i m o s u s、B o d o s a l t a n s、C o p r o t h e r m o b a c t e r p r o t e o l y t i c u s D S M 5 2 6 5、および / または L e p t o s p i r i l l u m 種 グループ I I 「 5 - w a y C G 」 において見出されるアミノ酸配列に対する相同性を有する。特定の実施形態では、本発明において使用されるリンカーペプチドは、S e r - G l y - S e r - G l y - A l a (S G S G A) (配列番号 2 2) である。

20

【 0 0 7 5 】

さらに他の実施形態では、リンカーペプチドは、D r o s o p h i l a m o n t a n a、ポリタンパク質 [T o m a t o t o r r a d o ウイルス]、免疫グロブリン重鎖可変領域 [C a n i s l u p u s f a m i l i a r i s]、ポリタンパク質 [デング熱ウイルス 1]、またはオキシステロール結合タンパク質 [M u s m u s c u l u s] において見出されるアミノ酸配列に対する相同性を有する。特定の実施形態では、本発明において使用されるリンカーペプチドは、S e r - A l a - G l y - S e r - G l y (S A G S G) (配列番号 2 3) である。

30

【 0 0 7 6 】

本発明において使用されるリンカーペプチドは、当技術分野において公知の任意のリンカー、たとえば、単鎖抗体、たとえば s c F v に使用される s c F v リンカーとすることができる。一実施形態では、リンカーペプチドは、配列 (G l y) _n である。他の実施形態では、リンカーペプチドは、配列 (G l y A l a) _n を含む。他の実施形態では、リンカーペプチドは、配列 (G G S) _n、(G G G S) _n、(配列番号 2 4)、または (G G S) _n (G G G G S) _n (配列番号 2 5) を含み、n は、1 ~ 1 0、5 ~ 2 0、1 0 ~ 3 0、2 0 ~ 5 0、4 0 ~ 8 0、または 5 0 ~ 1 0 0 の整数である。

40

【 0 0 7 7 】

本発明はまた、M 2 外部ドメインペプチド (M E T R) の複数のコピーを含むポリペプチドをコードするコード領域を含む融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチドであって、1 つ以上のエピトープをさらに含む、単離ポリヌクレオチドを提供する。一実施形態では、ポリペプチドは、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、または少なくとも 1 2 のエピトープをさらに含む。他の実施形態では、エピトープは、長さが少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、少なくとも 2 0、少なくとも 2 1、少なくとも 2 2、

50

少なくとも 23、少なくとも 24、または少なくとも 25 アミノ酸である。一実施形態では、ポリペプチド中に存在する任意の M2 外部ドメインペプチドは、その M2 外部ドメインペプチドおよび隣接する M2 外部ドメインペプチドの間に介在するエピトープを有する。他の実施形態では、ポリペプチドは、M2 外部ドメインの間に介在する 1 つのエピトープまたは 1 つを超えるエピトープをさらに含んでもよい。1 つを超えるエピトープが存在する場合、エピトープは同じものでも異なるものでもよい。

【0078】

エピトープは、B 細胞エピトープまたは T 細胞エピトープとすることができる。本発明に有用な B 細胞エピトープは、M2 タンパク質、たとえば、M2 外部ドメインの N 末端 19 ~ 20 アミノ酸内に位置する抗体エピトープに由来してもよい。B 細胞エピトープの非限定例は、配列番号 1 のアミノ酸 5 ~ 12、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 10、配列番号 2 のアミノ酸 7 ~ 17、配列番号 3 のアミノ酸 5 ~ 14、または配列番号 3 のアミノ酸 3 ~ 19 である。B 細胞エピトープは、M2 タンパク質の他のドメイン、たとえば膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインに由来することができる。その代わりに、B 細胞エピトープは、任意のインフルエンザタンパク質またはその断片、たとえば赤血球凝集素 (HA)、ノイラミニダーゼ (NA)、核タンパク質 (NP)、マトリックス 1 タンパク質 (M1)、マトリックス 2 タンパク質 (M2)、非構造タンパク質 (NS)、RNA ポリメラーゼ PA サブユニット (PA)、RNA ポリメラーゼ PB1 サブユニット (PB1)、または RNA ポリメラーゼ PB2 サブユニット (PB2) から得ることができる。

10

20

【0079】

本発明において使用される T 細胞エピトープは、任意の数のアミノ酸を含み、任意の公知の抗原または免疫原に由来することができる。一実施形態では、T 細胞エピトープは、任意のインフルエンザタンパク質またはその断片、たとえば赤血球凝集素 (HA)、ノイラミニダーゼ (NA)、核タンパク質 (NP)、マトリックス 1 タンパク質 (M1)、マトリックス 2 タンパク質 (M2)、非構造タンパク質 (NS)、RNA ポリメラーゼ PA サブユニット (PA)、RNA ポリメラーゼ PB1 サブユニット (PB1)、または RNA ポリメラーゼ PB2 サブユニット (PB2) に由来することができる。特定の実施形態では、T-ヘルパー細胞エピトープは、合計 15 のアミノ酸について、各側の 3 つの側面に位置するアミノ酸と共に 9 つのコアアミノ酸を含有することができる。主要組織適合遺伝子複合体 (マウスにおいて MHC およびヒトにおける HLA) のくぼみに対するその結合は、公知の方法によって計算することができる。高スコアリングペプチドは、HLA 分子のそれらの MHC に対するリガンドであることが予測される。

30

【0080】

特定の実施形態では、本発明において使用される T 細胞エピトープは、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第 6,663,871 号において記載されている配列番号 26、配列番号 27、またはその両方から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0081】

本発明は、M2 外部ドメインペプチドの複数のコピー、2 つ以上の M2 外部ドメインペプチドの間に介在する 1 つもしくは複数の任意選択のリンカーペプチド、および / または 2 つ以上の M2 外部ドメインペプチドの間に介在する 1 つもしくは複数の任意選択のエピトープを含む。一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも 6 つの M2 外部ドメインペプチド (M2e#1、M2e#2、M2e#3、M2e#4、M2e#5、および M2e#6)、任意の 2 つ以上の外部ドメインペプチドの間に介在する 1 つ以上のリンカーペプチド (たとえば M2e#1 - M2e#2、M2e#2 - M2e#3、M2e#3 - M2e#4、M2e#4 - M2e#5、または M2e#5 - M2e#6) ならびに、任意の 2 つ以上の M2 外部ドメインペプチドの間に介在する 1 つ以上のエピトープを含むポリペプチドをコードする。特定の実施形態では、ポリペプチドは、6 つの M2 外部ドメインペプチド、その間に介在する 3 つのリンカーペプチド、およびその間に介在する 2 つのエピトープを含み、

40

50

- (1) 第 1 のリンカーペプチドは、第 1 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 1) および第 1 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 2) の間に介在し、
(2) 第 2 のリンカーペプチドは、第 2 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 2) および第 3 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 3) の間に介在し、
(3) 第 3 のリンカーペプチドは、第 3 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 3) および第 4 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 4) の間に介在し、
(4) 第 1 のエピトープは、第 4 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 4) および第 5 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 5) の間に介在し、
(5) 第 2 のエピトープは、第 5 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 5) および第 6 の M 2 外部ドメインペプチド (M 2 e # 6) の間に介在する。

10

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態では、本発明の単離ポリヌクレオチドは、M 2 外部ドメインペプチドの複数のコピーを含むポリペプチドをコードするコード領域を含み、コード領域は、さらなる核酸配列をさらに含む。さらなる核酸配列は、ある実施形態では、本発明のポリペプチドに必要な応じて融合される、さらなるポリペプチドをコードすることができる。さらなるポリペプチドは、インフルエンザウイルスの少なくとも 1 つの免疫原性エピトープを含むことができ、エピトープは、B 細胞 (抗体) 応答、T 細胞応答、またはその両方を誘発する。

【 0 0 8 3 】

様々なさらなる核酸は、それぞれのさらなるポリペプチドをコードするように使用することができる。一実施形態では、さらなるポリペプチドは、本発明の M E T R ポリペプチドに融合される。他の実施形態では、さらなるポリペプチドは、本発明の M E T R ポリペプチドに融合されないが、M E T R ポリペプチドを発現する同じベクターで産生される。さらなる核酸配列の非限定的な例は、インフルエンザタンパク質、その変異体、誘導体、類似体、または断片をコードする核酸配列である。インフルエンザタンパク質は、赤血球凝集素 (H A)、ノイラミニダーゼ (N A)、核タンパク質 (N P)、マトリックス 1 タンパク質 (M 1)、マトリックス 2 タンパク質 (M 2)、非構造タンパク質 (N S)、R N A ポリメラーゼ P A サブユニット (P A)、R N A ポリメラーゼ P B 1 サブユニット (P B 1)、または R N A ポリメラーゼ P B 2 サブユニット (P B 2) から成る群から選択することができる。

20

30

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態では、さらなるポリペプチドは、安定化、分泌、または単純化された精製を付与する N または C 末端ペプチド、つまり H i s タグ、ユビキチンタグ、N u s A タグ、キチン結合ドメイン、o m p T、o m p A、p e l B、D s b A、D s b C、c - m y c、K S I、ポリアスパラギン酸、(A l a - T r p - T r p - P r o)_n (配列番号 2 8)、ポリフェニルアラニン (p o l y p h e n y a l a n i n e)、ポリシステイン、ポリアルギニン、B タグ、H S B タグ、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、赤血球凝集素インフルエンザウイルス (H A I)、カルモジュリン結合タンパク質 (C B P)、ガラクトース結合タンパク質、マルトース結合タンパク質 (M B P)、セルロース結合ドメイン (C B D)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R)、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T)、連鎖球菌プロテイン G、ブドウ球菌プロンテイン A、T 7 g e n e 1 0、アビジン / ストレプトアビジン / S t r e p タグ、t r p E、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、l a c Z (- ガラクトシダーゼ)、H i s パッチチオレドキシン、チオレドキシン、F L A G (商標) ペプチド (S i g m a - A l d r i c h)、S タグ、および T 7 タグから成る群から選択される。たとえば S t e v e n s , R . C . , S t r u c t u r e , 8 巻 : R 1 7 7 ~ R 1 8 5 頁 (2 0 0 0 年) を参照されたい。異種ポリペプチドは、M E T R 配列の運搬、移動、プロセッシング、および / もしくは発現を促進する任意のプレおよび / もしくはプロ配列または微生物病原体の T 細胞エピトープまたは他の免疫原性タンパク質および / もしくはエピトープをコードする配列を含むが、これらに限定されない任意の有用な免疫原性配列をさらに含むことができる。他

40

50

の適したさらなるポリペプチドは、リーダー配列またはシグナル配列を含むことができる。

【 0 0 8 5 】

コドン最適化

M 2 外部ドメインペプチド配列の複数のコピーを含むポリペプチドをコードするコドン最適化ポリヌクレオチドもまた、本発明の範囲内に含まれる。当業者らは、たとえば、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのオリゴヌクレオチド指定部位特異的突然変異誘発によって、ポリペプチドをコードする核酸の修飾を容易に達成することができる。そのような修飾ポリペプチドは、コドン最適化ヌクレオチド配列によってコードすることができる。そのような修飾は、断片、変異体、および誘導体を含む発現ポリペプチドに、1つ以上のアミノ酸置換、挿入、欠失、および/または修飾を付与する。そのような修飾は、たとえば、非修飾ポリペプチドと比較して細胞性免疫応答を増加させることによって、抗原免疫原性を増強してもよい。そのような修飾は、ポリペプチドの溶解性を増強してもよい。その代わりに、そのような修飾は、効果を有していなくてもよい。たとえば、M 2 外部ドメインペプチドは、特定のエピトープに対する免疫応答を増強するために、抗原提示細胞において活性なタンパク質分解酵素に対する特定の切断部位の導入、欠失、または修飾によって修飾されてもよい。

10

【 0 0 8 6 】

当業者によって十分に理解されるように、様々な核酸コード領域は、遺伝暗号の重複性により同じポリペプチドをコードするであろう。任意のポリペプチド鎖のアミノ酸をコードするコドンを含むヌクレオチド配列中の偏りは、遺伝子をコードする配列における違いを可能にする。コドンがそれぞれ、3つのヌクレオチドから成るので、DNAを含むヌクレオチドは、4つの特定の塩基に制限され、ヌクレオチドの64の可能な組み合わせがあり、そのうちの61が、アミノ酸をコードする(残りの3つのコドンは、翻訳を終了するシグナルをコードする)。どのコドンがどのアミノ酸をコードするかを示す「遺伝暗号」は、表3として本明細書において複写する。その結果として、多くのアミノ酸は、1つを超えるコドンによって示される。たとえば、アミノ酸アラニンおよびプロリンは、4つのトリプレットによってコードされ、セリンおよびアルギニンは、6のトリプレットによってコードされるのに対して、トリプトファンおよびメチオニンは、ただ1つのトリプレットによってコードされる。この縮重は、DNA塩基組成が、DNAによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を改変することなく広い範囲にわたり変化することを可能にする。

20

30

【 0 0 8 7 】

【表 3】

表3:標準的な遺伝暗号

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTC “ TTA Leu (L) TTG “	TCT Ser (S) TCC “ TCA “ TCG “	TAT Tyr (Y) TAC “ TAA Ter TAG Ter	TGT Cys (C) TGC TGA Ter TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L) CTC “ CTA “ CTG “	CCT Pro (P) CCC “ CCA “ CCG “	CAT His (H) CAC “ CAA Gln (Q) CAG “	CGT Arg (R) CGC “ CGA “ CGG “
A	ATT Ile (I) ATC “ ATA “ ATG Met (M)	ACT Thr (T) ACC “ ACA “ ACG “	AAT Asn (N) AAC “ AAA Lys (K) AAG “	AGT Ser (S) AGC “ AGA Arg (R) AGG “
G	GTT Val (V) GTC “ GTA “ GTG “	GCT Ala (A) GCC “ GCA “ GCG “	GAT Asp (D) GAC “ GAA Glu (E) GAG “	GGT Gly (G) GGC “ GGA “ GGG “

10

20

本発明に従うポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチドは、使用されるコドンにかかわらず、本発明の範囲内にあることが十分に理解されたい。

【0088】

多くの生物は、成長中のポリペプチド鎖中への特定のアミノ酸の挿入をコードするのに、特定のコードンの使用についてバイアスを示す。生物の間のコードン使用頻度における差異であるコードン優先度またはコードンバイアスは、遺伝暗号の縮重によってもたらされ、多くの生物の間で十分に立証されている。コードンバイアスは、多くの場合、メッセンジャーRNA (mRNA) の翻訳の効率と関連し、これは、次には、とりわけ、翻訳されているコードンの特性および特定の運搬RNA (tRNA) 分子の利用可能性に依存性であると考えられる。細胞において選択されるtRNAの優位性は、一般に、ペプチド合成において最も頻繁に使用されるコードンの現れである。したがって、遺伝子は、コードン最適化に基づいて所与の生物において最適な遺伝子発現に適合させることができる。

30

【0089】

本発明は、本明細書において開示されるインフルエンザタンパク質、たとえばMETRをコードするコード最適化コード領域を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成るポリヌクレオチドを含有する単離ポリヌクレオチドを提供する。そのような実施形態では、コードン使用頻度は、所与の原核生物または真核生物の細胞における最適化された発現に適している。

40

【0090】

ポリヌクレオチドは、DNA配列の中に所与の種の遺伝子における使用に優先的なコードンを組み込むことによって調製される。インフルエンザポリペプチド、たとえばMETRをコードするコードン最適化コード領域の核酸断片を含むポリヌクレオチド発現構築物、ベクター、および宿主細胞ならびに動物においてインフルエンザ感染を治療するまたは予防するためにポリヌクレオチド発現構築物、ベクター、および宿主細胞を使用するための様々な方法もまた、提供される。

【0091】

50

種々様々の動物、植物、および微生物の種に利用可能な多くの遺伝子配列を考慮すれば、コドン使用頻度の相対頻度を計算することが可能である。コドン使用頻度表は、たとえば、www.kazusa.or.jp/codon/ (2006年5月30日に訪れた) で入手可能な「Codon Usage Database」で、容易に入手可能であり、これらの表は、多くの方法において適応させることができる。Nakamura, Y. ら、「Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000」Nucleic Acids Res. 28巻: 292頁(2000年)を参照されたい。GenBank Release 151.0 から計算されたヒトについてのコドン使用頻度表は、表4として下記に複写する(www.kazusa.or.jp/codon/ 前掲から)。これらの表は、mRNA命名法を使用しており、したがって、表には、DNAにおいて見出されるチミン(T)の代わりに、RNAにおいて見出されるウラシル(U)を使用する。頻度が64のコドンすべてに対してではなくそれぞれのアミノ酸に対して計算されるように、表を適応させた。

【0092】

【表 4 - 1】

表4:ヒト遺伝子(Homo sapiens)についてのコドン使用頻度表

アミノ酸	コドン	使用頻度
Phe	UUU	0.4525
	UUC	0.5475
Leu	UUA	0.0728
	UUG	0.1266
	CUU	0.1287
	CUC	0.1956
	CUA	0.0700
	CUG	0.4062
Ile	AUU	0.3554
	AUC	0.4850
	AUA	0.1596
Met	AUG	1.0000
Val	GUU	0.1773
	GUC	0.2380
	GUA	0.1137
	GUG	0.4710
Ser	UCU	0.1840
	UCC	0.2191
	UCA	0.1472
	UCG	0.0565
	AGU	0.1499
	AGC	0.2433
Pro	CCU	0.2834
	CCC	0.3281
	CCA	0.2736
	CCG	0.1149
Thr	ACU	0.2419
	ACC	0.3624
	ACA	0.2787
	ACG	0.1171
Ala	GCU	0.2637
	GCC	0.4037
	GCA	0.2255
	GCG	0.1071
Tyr	UAU	0.4347
	UAC	0.5653
His	CAU	0.4113
	CAC	0.5887
Gln	CAA	0.2541
	CAG	0.7459

10

20

30

40

【表 4 - 2】

アミノ酸	コドン	使用頻度
Asn	AAU	0.4614
	AAC	0.5386
Lys	AAA	0.4212
	AAG	0.5788
Asp	GAU	0.4613
	GAC	0.5387
Glu	GAA	0.4161
	GAG	0.5839
Cys	UGU	0.4468
	UGC	0.5532
Trp	UGG	1.0000
Arg	CGU	0.0830
	CGC	0.1927
	CGA	0.1120
	CGG	0.2092
	AGA	0.2021
	AGG	0.2011
Gly	GGU	0.1632
	GGC	0.3438
	GGA	0.2459
	GGG	0.2471

10

20

これらのまたは同様の表を利用することによって、当業者は、任意の所与のポリペプチド配列にその頻度を適用し、ポリペプチドをコードするが、所与の種に最適なコドンを使用するコドン最適化コード領域の核酸断片を産生することができる。

【0094】

多くの選択肢は、当業者らに周知の標準的でルーチ的な分子生物学的操作を使用して、上記に記載される方法のいずれかによって設計されるコドン最適化コード領域の合成に利用可能である。1つのアプローチでは、長さがそれぞれ80～90ヌクレオチドで、所望の配列の長さにあたる一連の相補的オリゴヌクレオチド対は、標準的な方法によって合成される。これらのオリゴヌクレオチド対は、アニーリングに際して、それらが、粘着末端を含有する80～90塩基対の二本鎖断片を形成するように合成される、たとえば、対におけるオリゴヌクレオチドは、それぞれ、対の他のオリゴヌクレオチドに相補的である領域を越えて3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の塩基にわたるように合成される。それぞれの対のオリゴヌクレオチドの一本鎖末端は、他の対のオリゴヌクレオチドの一本鎖末端とアニールするように設計される。オリゴヌクレオチド対を、アニールさせ、次いで、およそ5～6のこれらの二本鎖断片を、粘着一本鎖末端を介してともにアニールさせ、次いで、それらは、ともにライゲーションし、標準的な細菌クローニングベクター、たとえばInvitrogen Corporation、Carlsbad、CAから入手可能なTOPOベクターの中にクローニングされる。次いで、構築物は、標準的な方法によって配列決定される。ともにライゲーションされた80～90塩基対断片の5～6つの断片、つまり約500塩基対の断片から成るいくつかの構築物は、所望される全配列が、一連のプラスミド構築物中に示されるように調製される。次いで、これらのプラスミドの挿入物は適切な制限酵素を用いてカットされ、最終構築物を形成するようにともにライゲーションされる。次いで、最終構築物は、標準的な細菌クローニングベクターの中にクローニングされ、配列決定される。さらなる方法は、当業者に直ちに明らかになるであろう。さらに、遺伝子合成は、容易に市販で入手可能である。

30

40

【0095】

ベクター

50

本発明は、遺伝子工学において従来使用されているベクター、たとえばプラスミド、コスミド、ウイルス、およびバクテリオファージ、互いに対して任意の順序で配置されるインフルエンザ抗原またはM2外部ドメインペプチド、たとえばMETRの複数のコピーを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関する。

【0096】

一実施形態では、ベクターは、発現ベクターおよび/または遺伝子移入ベクターもしくは標的ベクターである。他の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシ乳頭腫ウイルスなどのようなウイルスに由来する発現ベクターは、標的にされる細胞集団の中への本発明のポリヌクレオチドまたはベクターの送達に使用されてもよい。当業者らに周知の方法は、組換えウイルスベクターを構築するために使用することができる；たとえば、Sambrook、Molecular Cloning A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory (1989年) N.Y.およびAusubel、Current Protocols in Molecular Biology、Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N.Y. (1994年)において記載される技術を参照されたい。その代わりに、本発明のポリヌクレオチドおよびベクターは、標的細胞への送達のためにリポソームの中に再構成することができる。本発明のポリヌクレオチド(たとえばM2外部ドメイン配列(METR)の複数のコピー)を含有するベクターは、細胞性の宿主のタイプに依存して変化する周知の方法によって宿主細胞の中に移入することができる。たとえば、塩化カルシウムトランスフェクションは、原核細胞に対して共通して利用されるのに対して、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションは、他の細胞性の宿主に対して使用されてもよい；Sambrook、前掲を参照されたい。一般に、本発明と適合するベクターは、選択マーカー、所望の遺伝子のクローニングならびに真核生物または原核細胞に入るおよび/またはそれにおいて複製するための能力を促進するための適切な制限部位を含むであろう。

10

20

【0097】

ある実施形態では、本発明は、インフルエンザポリペプチド、たとえばM2外部ドメイン(METR)の複数のコピー、NP、またはその両方を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むボックスウイルス、たとえばワクシニアウイルス、たとえば改変ワクシニアウイルスAnkara(MVA)に関する。MVAは、高度に弱毒化されたワクシニアウイルス株、Poxviridaeのファミリーにおけるオルソボックスウイルス属のメンバーである。ボックスウイルスは、4つの属のボックスウイルス、つまりオルソボックス、パラボックス、ヤタボックス、およびモルシボックスウイルスを含む。オルソボックスウイルスは、限定を伴うことなく、痘瘡ウイルス(天然痘を引き起こす作用物質)、ワクシニアウイルス、牛痘ウイルス、サル痘ウイルス、およびアライグマボックスウイルスを含み、パラボックスウイルスは、限定を伴うことなく、オルフウイルス、偽牛痘、およびウシ丘疹性口内炎ウイルスを含み、ヤタボックスウイルスは、限定を伴うことなく、タナ痘ウイルスおよびヤバサル腫瘍ウイルスを含み、モルシボックスウイルスは、

30

40

【0098】

ワクシニアウイルスは、ヒト天然痘疾患に対して免疫するためにまたは組換え遺伝子発現のためのもしくは組換え生ワクチンとしての潜在的な使用のためのウイルスベクターを遺伝子操作するために生ワクチンとして使用されてきた(Mackett, M.ら、1982年 PNAS USA 79巻:7415~7419頁; Smith, G. L.ら、1984年 Biotech Genet Engin Rev 2巻:383~407頁)。遺伝子操作されたウイルスベクターは、DNA組換え技術の援助によって、外来抗原、たとえばインフルエンザポリペプチドをコードするDNA配列(遺伝子)を含有してもよい。遺伝子が、ウイルスの生活環にとって非本質的なウイルスゲノムにおける

50

部位で統合される場合、外来遺伝子を組み込む新しく産生された組換えワクシニアウイルスは、宿主細胞に感染し、したがって、宿主細胞において外来タンパク質の発現を誘発することが可能となり得る（それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第5,110,587号；第83,286号；および第110,385号）。このように調製される組換えワクシニアウイルス（たとえばMVA）は、*in vivo*において感染インフルエンザ疾患の予防のために生ワクチンとして本発明に従って使用される。

【0099】

一実施形態では、本明細書において使用されるワクシニアウイルス株の例は、高度に弱毒化された改変ワクシニアウイルスAnkara (MVA)である。MVAは、ニワトリ胚線維芽細胞上でのワクシニアウイルス(CVA)のAnkara株の長期の連続継代によって生成された（概説については、Mayr, A.ら 1975年 *Infection* 3巻：6～14頁；スイス特許第568,392号を参照されたい）。MVAウイルスは、たとえば、ATCC番号VR-1508としてAmerican Type Culture Collectionから公的に入手可能である。MVAは、好適な免疫原性およびトリ細胞において感染ビリオンを複製し、ならびに産生する完全な能力を維持しながら、その弱毒化、たとえば、毒力の減少およびある種の哺乳動物細胞において感染ビリオンを再生するための限られた能力によって区別される。MVAウイルスは、親のCVA株に比べて弱毒化を誘発する、そのゲノムにおける改変を有する。合計31,000の塩基対（そのゲノムの約10%）になるゲノムDNAの主な6つの欠失（欠失I、II、III、IV、V、およびVI）が同定されてきた（その全体が参照によって本明細書において組み込まれるMeyer, H.ら 1991年 *J Gen Virol* 72巻：1031～1038頁）。結果として生じるMVAウイルスは、哺乳動物細胞において非常に弱毒化されるようになった。その弱毒化により、本発明のMVAは、免疫抑制性の個体においてでさえ、弱毒性となり得、感染インフルエンザ疾患に対する生ワクチンにおけるMVAの使用と関連する、ほんの少しの副作用しか有していない。

【0100】

ベクター、たとえば、本発明のMVAは、その複製が感染の後期において遮断されるので、ヒト細胞において限られた複製を行ってもよい。限られた複製は、成熟感染ビリオンへの構築を予防する。しかしながら、本発明のベクター、たとえば、MVAは、非許容細胞においてでさえ高レベルでウイルス組換え遺伝子を発現させることができ、また、効率的で安全な遺伝子発現ベクターとしても役立つことができる。

【0101】

本発明の一実施形態では、インフルエンザポリペプチド、たとえばMETRをコードする単離ポリヌクレオチド配列は、天然に存在する欠失、たとえば欠失I、欠失II、欠失III、欠失IV、欠失V、もしくは欠失VIまたはポリヌクレオチドの5'もしくは3'末端のMVAゲノム中に存在する他の非本質的な部位に隣接するMVAフランキング配列に融合される。MVAゲノムの非本質的な領域は、遺伝子間領域および天然に存在する欠失領域ならびに複製に必要とされない他の遺伝子、たとえばtk遺伝子を含む。1つ以上のインフルエンザ抗原、たとえばMETRをコードするポリヌクレオチド配列を保持するDNA配列は、直線状または環状で、ポリメラーゼ連鎖反応産物またはプラスミドとすることができ、少なくとも1つのインフルエンザポリペプチドをコードするコード領域に適切に作用可能に連結した（operatively associated）プロモーターなどのような調節性配列をさらに含んでもよい。調節性エレメントの非限定的な例は、EP-A-198,328において記載されるワクシニア11kA遺伝子および7.5kDa遺伝子の調節性エレメント（EP-A-110,385）を含み、これらのそれぞれは、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる。

【0102】

いくつかの実施形態では、本発明は、インフルエンザポリペプチド抗原、たとえばMETRをコードするコード配列と作動可能に連結したプロモーターを含むポリヌクレオチド

を含有する組換えMVAを提供する。特定の実施形態では、プロモーターは、ウイルスプロモーター（たとえばワクシニアウイルスまたは改変ワクシニアAnkaraウイルスプロモーター）である。さらに特定の実施形態では、プロモーターは、合成プロモーターである。さらなる実施形態では、プロモーターは、強力なプロモーターである。特定の実施形態では、プロモーターは、強力な合成プロモーターである。特定の実施形態では、プロモーターは、配列A A A A A T T G A A A T T T T A T T T T T T T T T T T T G G A A T A T A A A T A（配列番号29）を有するPSプロモーターである（Chakrabarti, SislerおよびMoss（1997年）. *Biotechniques* 23巻：1094～1097頁）。さらに特定の実施形態では、プロモーターは、配列A A A A A T G A A A A T A A A T A C A A A G G T T C T T G A G G G T T G T G T T A A A T T G A A A G C G A G A A A T A A T C A T A A A T T（配列番号30）を有する修飾H5プロモーターである（Roselら（1986年）. *J. Virol.* 60巻（2号）：236～249頁）。

【0103】

ボックスウイルス転写制御領域は、プロモーターおよび転写終結シグナルを含む。ボックスウイルスにおける遺伝子発現は、一時的に調節され、初期、中間、および後期遺伝子についてのプロモーターは、様々な構造を有する。ある種のボックスウイルス遺伝子は、恒常的に発現され、これらの「初期-後期」遺伝子についてのプロモーターは、ハイブリッド構造を有する。合成初期-後期プロモーターもまた開発されてきた。Hammond J. M.ら、*J. Virol. Methods* 66巻：135～8頁（1997年）；Chakrabarti S.ら、*Biotechniques* 23巻：1094～7頁（1997年）を参照されたい。そのため、本発明では、任意のボックスウイルスプロモーター、たとえば初期、後期、または恒常的プロモーターが、使用されてもよい。

【0104】

初期プロモーターの非限定的な例は、7.5 kDプロモーター（後期プロモーターでもある）、DNA polプロモーター、tkプロモーター、RNA polプロモーター、19 kDプロモーター、22 kDプロモーター、42 kDプロモーター、37 kDプロモーター、87 kDプロモーター、H3'プロモーター、H6プロモーター、D1プロモーター、D4プロモーター、D5プロモーター、D9プロモーター、D12プロモーター、I3プロモーター、M1プロモーター、およびN2プロモーターを含む。たとえばMoss, B., 「*Poxviridae and their Replication*」 IN *Virology*, 第2版、B. N. Fields, D. M. Knipeら編、Raven Press, 2088頁（1990年）を参照されたい。ワクシニアウイルスおよび他のボックスウイルスにおいて転写される初期遺伝子は、転写終結シグナルTTTTTNT（配列番号31）を認識し、Nは、任意のヌクレオチドとすることができる。転写は、通常、このシグナルのおよそ50 bp上流で終結する。したがって、異種遺伝子がボックスウイルス初期プロモーターから発現されることになっている場合、それらの遺伝子についてのコード領域におけるこのシグナルの発生をなくすことに注意しなければならない。たとえばEarl, P. L.ら、*J. Virol.*（64巻：2448～51頁（1990年））を参照されたい。

【0105】

後期プロモーターの例は、限定を伴うことなく、7.5 kDプロモーター、MILプロモーター、37 kDプロモーター、11 kDプロモーター、11 Lプロモーター、12 Lプロモーター、13 Lプロモーター、15 Lプロモーター、17 Lプロモーター、28 kDプロモーター、H1 Lプロモーター、H3 Lプロモーター、H5 Lプロモーター、H6 Lプロモーター、H8 Lプロモーター、D11 Lプロモーター、D12 Lプロモーター、D13 Lプロモーター、A1 Lプロモーター、A2 Lプロモーター、A3 Lプロモーター、およびP4 bプロモーターを含む。たとえばMoss, B., 「*Poxviridae and their Replication*」 IN *Virology*, 第2版、

B. N. Fields、D. M. Knipeら編、Raven Press、2090頁(1990年)を参照されたい。後期プロモーターは、見たところでは、初期プロモーターによって認識される転写終結シグナルを認識しない。

【0106】

本発明において使用される恒常的プロモーターの非限定的な例は、HammondおよびChakrabartiによって記載される合成初期 - 後期プロモーター、MH - 5初期 - 後期プロモーター、および7.5 kDまたは「p7.5」プロモーターを含む。

【0107】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドおよびさらなる核酸配列を含むベクター、たとえばMVAに関する。さらなる核酸配列は、M2外部ドメインペプチド(METR)の複数のコピーをコードするポリヌクレオチド配列が挿入される部位と同じまたは異なる挿入部位に挿入することができる。さらなる核酸配列は、さらなるポリペプチドをコードするコード領域を含むことができる。さらなる核酸配列は、プロモーターにさらにつなぐことができる。一実施形態では、本発明のベクター、たとえばMVAは2つ以上の抗原または免疫原をコードし、一方の抗原は、METRまたはNPコンセンサスであり、他方の抗原は、さらなるポリペプチドである。さらなるポリペプチドは、本明細書において使用されるインフルエンザタンパク質、その変異体、断片、誘導体、または類似体とすることができる。

【0108】

特定の実施形態では、本発明のベクター、たとえばMVAは、少なくとも2つのインフルエンザ抗原、たとえばMETRおよびHA、METRおよびNP、HAおよびNPならびに少なくとも3つのインフルエンザ抗原、たとえばMETR、HA、およびNPを発現する。ある実施形態では、本発明のベクターは、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、または少なくとも8つのインフルエンザ抗原を発現する。

【0109】

本発明はまた、ベクター、たとえばMVAを産生するための方法であって、相同組換えを可能にするために、M2外部ドメインペプチド(METR)の複数のコピーをコードするポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド(DNA)構築物をベクター、たとえばMVAに感染した宿主細胞の中に導入するステップを含む方法もまた提供する。一度、METRポリペプチドをコードするDNA構築物が宿主細胞の中に導入され、外来DNA配列がウイルスDNAと組換えられたら、結果として生じる組換えMVAウイルスは、METRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。本発明はまた、たとえば、マーカーの援助によって、公知の技術によって結果として生じるMVAを単離することをも提供する。METRポリペプチド遺伝子を保持するDNA構築物はまた、トランスフェクションによって、たとえば、リン酸カルシウム沈降の手段によって(Grahamら 1973年 Virology 52巻: 456~467頁; Wiglerら 1979年 Cell 16巻: 777~785頁)、エレクトロポレーションの手段によって(Neumannら 1982年 EMBO J. 1巻: 841~845頁)、マイクロインジェクションによって(Graessmannら 1983年 Meth Enzymol 101巻: 482~492頁)、リボソームの手段によって(Straubingerら 1983年 Meth Enzymol 101巻: 512~527頁)、スフェロプラストの手段によって(Schaffner 1980年 PNAS USA 77巻: 2163~2167頁)、または当業者らに公知の他の方法によって、MVA感染細胞の中に導入されてもよい。トランスフェクション方法について本明細書において列挙される参考文献は、それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる。

【0110】

本発明によれば、組換えMVAワクシニアウイルスは、いくつかの周知の技術、たとえばK1L遺伝子ベースの選択プロトコールによって単離することができる。非限定的な例として、DNA構築物は、両方とも、MVAゲノム内の非本質的な部位、たとえば天然に存在する欠失、たとえば欠失IIIの側面に位置するDNA配列が側面に位置する、マー

10

20

30

40

50

カーとしてのワクシニアウイルス K 1 L タンパク質または K 1 L 由来ポリペプチドをコードする DNA 配列および METR ポリペプチドをコードする DNA 配列を含有してもよい。

【0111】

本発明に使用される宿主細胞は、真核細胞、トリ細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞を含むが、これらに限定されない。真核細胞の非限定的な例は、BHK-21 (ATCC CCL-10)、BSC-1 (ATCC CCL-26)、CV-1 (ECCACC 87032605)、または MA104 (ECCACC 85102918) である。一実施形態では、宿主細胞は、ニワトリ細胞、アヒル細胞、またはウズラ細胞を含むが、これらに限定されないトリ細胞である。トリ細胞の非限定的な例は、ニワトリ線維芽細胞、ウズラ線維芽細胞、QT9細胞、QT6細胞、QT35細胞、Verocell、MRC-5細胞、ニワトリ胚由来LSCC-H32細胞、ニワトリDF-1細胞、または初代ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) 細胞である。他の実施形態では、本発明において宿主細胞として使用されるトリ細胞は、不死化されている。不死化トリ細胞は、それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許出願公開US2008/0227146 A1号および国際特許出願公開WO2007/054516 A1において記載されるAGE1cr細胞およびAGE1cr.pIX細胞を含むが、これらに限定されない不死化アヒル細胞であってもよい。本発明において有用な他の不死化アヒル細胞は、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許出願公開US2010/062489 A1において記載される胚由来幹細胞、たとえばEB66 (登録商標) 細胞を含む。他の有用なトリ細胞株は、すべて、それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれるPCT特許出願公開WO2006/1088646 A2、米国特許出願公開2006/0233834 A1、ならびに米国特許第5,830,510号および第6,500,668号において記載されている。

【0112】

ポリペプチド

本発明はまた、M2外部ドメインペプチド (METR) の複数のコピーを含むポリペプチドをも含む。一実施形態では、本発明は、互いにそれぞれの任意の順序で配置される以下のインフルエンザウイルスマトリックス2タンパク質外部ドメインペプチドの少なくとも5つを含む単離ポリペプチドである：(i) 配列番号1 (M2e#1__C)；(ii) 配列番号2 (M2e#2__C)；(iii) 配列番号3 (M2e#3__C)；(iv) 配列番号4 (M2e#4__C)；(v) 配列番号5 (M2e#5__C)；(vi) 配列番号6 (M2e#6__C)；(vii) 配列番号7 (M2e#1__S)；(viii) 配列番号8 (M2e#2__S)；(ix) 配列番号9 (M2e#3__S)；(x) 配列番号10 (M2e#4__S)；(xi) 配列番号11 (M2e#5__S)；および(xii) 配列番号12 (M2e#6__S)。

【0113】

一実施形態では、本発明は、互いにそれぞれの任意の順序で配置される以下のM2外部ドメインペプチドの少なくとも3つを含む単離ポリペプチドを提供する：(i) 配列番号1 (M2e#1__C)；(ii) 配列番号2 (M2e#2__C)；(iii) 配列番号3 (M2e#3__C)；(iv) 配列番号4 (M2e#4__C)；(v) 配列番号5 (M2e#5__C)；(vi) 配列番号6 (M2e#6__C)；(vii) 配列番号7 (M2e#1__S)；(viii) 配列番号8 (M2e#2__S)；(ix) 配列番号9 (M2e#3__S)；(x) 配列番号10 (M2e#4__S)；(xi) 配列番号11 (M2e#5__S)；および(xii) 配列番号12 (M2e#6__S)。他の実施形態では、ポリペプチドは、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、または12のM2外部ドメインペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、融合タンパク質であり、インフルエンザウイルスに対して免疫応答を誘発する。ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、互いにそれぞれの任意の順序で配置される以下のM2外部ドメインペプチドの少なくとも3つを含む：(a) (i) 配列番号1 (M2e#1__C)；(

i i) 配列番号 2 (M 2 e # 2 __ C) ; (i i i) 配列番号 3 (M 2 e # 3 __ C) ; (i v) 配列番号 4 (M 2 e # 4 __ C) ; (v) 配列番号 5 (M 2 e # 5 __ C) ; および (v i) 配列番号 6 (M 2 e # 6 __ C) または (b) (i) 配列番号 7 (M 2 e # 1 - S) ; (i i) 配列番号 8 (M 2 e # 2 __ S) ; (i i i) 配列番号 9 (M 2 e # 3 __ S) ; (i v) 配列番号 10 (M 2 e # 4 __ S) ; (v) 配列番号 11 (M 2 e # 5 __ S) ; および (v i) 配列番号 12 (M 2 e # 6 __ S) 。

【 0 1 1 4 】

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、互いにそれぞれの任意の順において配置される以下の 6 つのアミノ酸配列を含む： (a) (i) 配列番号 1 (M 2 e # 1 __ C) ; (i i) 配列番号 2 (M 2 e # 2 __ C) ; (i i i) 配列番号 3 (M 2 e # 3 __ C) ; (i v) 配列番号 4 (M 2 e # 4 __ C) ; (v) 配列番号 5 (M 2 e # 5 __ C) ; および (v i) 配列番号 6 (M 2 e # 6 __ C) ; または (b) (i) 配列番号 7 (M 2 e # 1 - S) (i i) 配列番号 8 (M 2 e # 2 __ S) ; (i i i) 配列番号 9 (M 2 e # 3 __ S) ; (i v) 配列番号 10 (M 2 e # 4 __ S) ; (v) 配列番号 11 (M 2 e # 5 __ S) ; および (v i) 配列番号 12 (M 2 e # 6 __ S) 。

他の実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 20 の NP コンセンサス配列を含む。

10

【 0 1 1 5 】

本発明のポリペプチドは、さらなるポリペプチドをさらに含む融合タンパク質とすることができる。さらなるポリペプチドの非限定的な例は、さらなるインフルエンザポリペプチド、その変異体、誘導體、類似体、または断片である。さらなるポリペプチドは、免疫原性また抗原性であってもよく、任意の公知の抗原とすることができる。

20

【 0 1 1 6 】

組成物

組成物、たとえば、免疫学的有効量の単離ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえば MVA を含有する医薬またはワクチン組成物は、さらに本発明の実施形態となる。そのような組成物は、たとえばリポペプチド (たとえば Vittiello, A. ら、J. Clin. Invest. 95 巻：341 頁、1995 年)、たとえばポリ (DL - ラクチド - コ - グリコリド) (「PLG」) マイクロスフェア中にカプセル化されたポリペプチド (たとえば Eldridge ら、Molec. Immunol. 28 巻：287 ~ 294 頁、1991 年；Alonso ら、Vaccine 12 巻：299 ~ 306 頁、1994 年；Jones ら、Vaccine 13 巻：675 ~ 681 頁、1995 年を参照されたい) ; 免疫刺激複合体 (ISCOMS) 中に含有されるポリペプチド組成物 (たとえば Takahashi ら、Nature 344 巻：873 ~ 875 頁、1990 年；Hu ら、Clin Exp Immunol. 113 巻：235 ~ 243 頁、1998 年を参照されたい) ; 複数の抗原ペプチド系 (MAPs) (たとえば Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 巻：5409 ~ 5413 頁、1988 年；Tam, J. P., J. Immunol. Methods 196 巻：17 ~ 32 頁、1996 年を参照されたい) ; ウイルスまたは合成起源の粒子 (たとえば Kofler, N. ら、J. Immunol. Methods. 192 巻：25 頁、1996 年；Eldridge, J. H. ら、Sem. Hematol. 30 巻：16 頁、1993 年；Fallo, L. D., Jr. ら、Nature Med. 7 巻：649 頁、1995 年) ; アジュバント (たとえば不完全フロイントアジュバント) (Warren, H. S., Vogel, F. R., および Chedid, L. A. Annu. Rev. Immunol. 4 巻：369 頁、1986 年；Gupta, R. K. ら、Vaccine 11 巻：293 頁、1993 年) ; またはリポソーム (Reddy, R. ら、J. Immunol. 148 巻：1585 頁、1992 年；Rock, K. L., Immunol. Today 17 巻：131 頁、1996 年) を含んでいてもよい。組成物は、医薬、抗原性、免疫原性、またはワクチン組成物とすることができる。

30

40

【 0 1 1 7 】

50

本発明の組成物、たとえばワクチン組成物は、公知の方法に従って製剤することができる。たとえば、適した調製方法は、両方とも、それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、A. Osol編、Mack Publishing Co., Easton, PA (1980年) および Remington's Pharmaceutical Sciences、第19版、A. R. Gennaro編、Mack Publishing Co., Easton, PA (1995年) において記載されている。組成物は、水溶液として投与されてもよいが、それはまた、エマルション、ゲル、溶液、懸濁液、凍結乾燥形態、または当技術分野において公知の任意の他の形態として製剤することができる。さらに、組成物は、たとえば、希釈剤、結合剤、安定剤、および保存剤を含む薬学的に許容される添加剤を含有していてもよい。一度、製剤されたら、本発明の組成物は、被験体に直接投与することができる。治療されることとなる被験体は、動物、特にヒトとすることができる。

10

【0118】

本発明の組成物におけるポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえば MVA の濃度は、広く、つまり、約 0.1 重量%未満～通常、約 2 重量%または少なくとも約 2 重量%～20 重量%～50 重量%以上まで変化することができ、主として、選択される投与の特定のモードに従って、液量、粘性などによって選択されるであろう。

【0119】

一実施形態では、本発明の組成物は、互いにそれぞれの任意の順序で配置される複数のコピー、以下の M2 外部ドメインペプチドを含むポリペプチドをコードするコード配列を含む単離ポリヌクレオチドのたとえば少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 を含む：(i) 配列番号 1 (M2e#1__C)；(ii) 配列番号 2 (M2e#2__C)；(iii) 配列番号 3 (M2e#3__C)；(iv) 配列番号 4 (M2e#4__C)；(v) 配列番号 5 (M2e#5__C)；(vi) 配列番号 6 (M2e#6__C)；(vii) 配列番号 7 (M2e#1__S)；(viii) 配列番号 8 (M2e#2__S)；(ix) 配列番号 9 (M2e#3__S)；(x) 配列番号 10 (M2e#4__S)；(xi) 配列番号 11 (M2e#5__S)；および (xii) 配列番号 12 (M2e#6__S)。他の実施形態では、本発明の組成物、たとえばワクチン組成物は、M2 外部ドメインペプチド (METR) の複数のコピーまたは NP コンセンサス配列をコードするポリヌクレオチドを含む、1つ以上のベクター、たとえば MVA を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、M2 外部ドメインペプチドの複数のコピーを含む本発明のポリペプチドを含む。

20

30

【0120】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを有する宿主細胞は、Ekoら、J. Immunol.、173巻：3375～3382頁、2004年において記載されるように、組成物中に組み込まれる。

【0121】

ある種の組成物は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえば MVA の前に、その後に、またはそれと同時に 1つ以上のアジュバントをさらに含むことができる。種々様々の物質は、様々なメカニズムを通してアジュバント活性を有することが示されてきた。本発明に従って免疫応答を増強するそれらの能力についてスクリーニングされてもよい、可能性のあるアジュバントは、ミョウバン、ベントナイト、ラテックス、およびアクリル粒子などのような不活性担体；TITERMAX (登録商標) (ブロックコポリマー CRL-8941、スクアレノ (代謝可能な油)、および微小粒子シリカ安定剤) などのようなブルロニックブロックポリマー、フロイントアジュバントなどのような貯蔵物形成剤 (depot former)、サポニン、リゾレシチン、レチナール、Quil A、リポソーム、およびブルロニックポリマー製剤などのような表面活性物質；細菌性脂質多糖体などのようなマクロファージ刺激物質；キトサンなどのようなポリカチオンポリマー；インスリン、チモサン、内毒素、およびレバミソールなどのような代替経路

40

50

補体活性化因子；ならびにポロキサマー、ポリ（オキシエチレン）-ポリ（オキシプロピレン）トリ-ブロックコポリマー、サイトカイン、および増殖因子などのような非イオン性界面活性剤；細菌構成成分（たとえば内毒素、特に超抗原、外毒素、および細胞壁構成成分）；水酸化アルミニウムなどのようなアルミニウムベースの塩；カルシウムベースの塩；シリカ；ポリヌクレオチド；トキシド；血清タンパク質、ウイルスおよびウイルス由来物質、毒、毒物（venom）、イミダゾキノリン（imidazoquiniline）化合物、ポロキサマー、mLT、ならびにカチオン脂質を含むが、これらに限定されない。参照によって本明細書において組み込まれる国際特許出願PCT/US95/09005は、アジュバントとしての腸内毒素原性のE.coliの熱不安定毒素の突然変異形態（「mLT」）の使用を記載する。参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第5,057,540号は、アジュバント、Qs21を記載している。いくつかの実施形態では、アジュバントは、tol様受容体（TLR）刺激アジュバントである。たとえばScience 312巻：184~187頁（2006年）を参照されたい。TLRアジュバントは、TLR（たとえばTLR1~TLR17）を刺激する化合物を含み、本発明のワクチン組成物に対する免疫系応答の増加をもたらす。TLRアジュバントは、CpG（Coley Pharmaceutical Group Inc.）およびMPL（Corixa）を含むが、これらに限定されない。CpGアジュバントの一例は、それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれるWO98/018810、米国特許出願公開第2002/0164341A号、米国特許第6,727,230号、および国際特許出願公開WO98/32462において記載されるCpG7909である。

10

20

【0122】

アジュバントの投薬量は、特定のアジュバントに従って変動し得る。たとえば、いくつかの態様では、投薬量の範囲は、CpGについて10μg/用量~500μg/用量または50μg/用量~200μg/用量を含むことができる。投薬量の範囲は、MPLについて2μg/用量~100μg/用量または10μg/用量~30μg/用量を含むことができる。投薬量の範囲は、水酸化アルミニウムについて10μg/用量~500μg/用量または50μg/用量~100μg/用量を含むことができる。初回刺激-追加免疫レジメンにおいて、本明細書において別記されるように、アジュバントは、初回刺激免疫処置、追加免疫免疫処置、またはその両方で使用されてもよい。

30

【0123】

ある種のアジュバント組成物では、アジュバントは、サイトカインである。本発明のある種の組成物は、1つもしくは複数のサイトカイン、ケモカイン、またはサイトカインおよびケモカインの産生を誘発する化合物または1つもしくは複数のサイトカイン、ケモカイン、またはサイトカインおよびケモカインの産生を誘発する化合物をコードするポリヌクレオチドを含む。サイトカインの例は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、コロニー刺激因子（CSF）、エリスロポイエチン（EPO）、インターロイキン2（IL-2）、インターロイキン3（IL-3）、インターロイキン4（IL-4）、インターロイキン5（IL-5）、インターロイキン6（IL-6）、インターロイキン7（IL-7）、インターロイキン8（IL-8）、インターロイキン9（IL-9）、インターロイキン10（IL-10）、インターロイキン11（IL-11）、インターロイキン12（IL-12）、インターロイキン13（IL-13）、インターロイキン14（IL-14）、インターロイキン15（IL-15）、インターロイキン16（IL-16）、インターロイキン17（IL-17）、インターロイキン18（IL-18）、インターフェロンアルファ（IFN）、インターフェロンベータ（IFN）、インターフェロンガンマ（IFN）、インターフェロンオメガ（IFN）、インターフェロンタウ（IFN）、インターフェロンガンマ誘発因子I（IGIF）、形質転換増殖因子ベータ（TGF-）、RANTES（活性化に際して調節、正常T細胞が発現し、推定上分泌する）、マクロファージ炎症タンパク質（たとえばMIP-1アルファおよび

40

50

M I P - 1 ベータ)、L e i s h m a n i a 伸長開始因子 (L E I F)、および F l t - 3 リガンドを含むが、これらに限定されない。

【 0 1 2 4 】

アジュバントが抗原に対する免疫応答を増加させる能力は、免疫媒介性の反応における有意な増加または疾患症状における低下によって典型的に示される。たとえば、体液性免疫における増加は、抗原に対して産生される抗体の力価における有意な増加によって典型的に示され、T細胞活性における増加は、細胞増殖、細胞傷害性、またはサイトカイン分泌の増加において典型的に示される。アジュバントはまた、たとえば、主として体液性のまたは $T h_2$ の応答を主として細胞性のまたは $T h_1$ の応答に変化させることによって、免疫応答を変えてもよい。所与の抗原に対する免疫応答は、当業者らに周知のおよび/または本明細書において別記される様々なイムノアッセイによって試験されてもよい。

10

【 0 1 2 5 】

さらに、M 2 外部ドメインペプチド (M E T R) ポリペプチドの複数のコピーは、ジフテリア、破傷風、コレラ、H . p y l o r i、または他の病原体由来のトキシソイドなどのような細菌トキシソイドにコンジュゲートされてもよい。さらに、M E T R ポリペプチドは、N e i s s e r i a 種、S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e 種、または H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e b 型細菌由来の莢膜多糖などのような細菌多糖にコンジュゲートされてもよい。

【 0 1 2 6 】

固体組成物については、たとえば、医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、滑石、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム、およびその他同種のものを含む、従来の無毒性固体担体が、使用されてもよい。経口投与については、薬学的に許容される無毒性組成物は、先に列挙されるそれらの担体などのような、通常用いられる賦形剤のいずれかおよび一般に、10 ~ 95 % の活性成分、すなわち、多くの場合 25 % ~ 75 % の濃度の本発明の 1 つ以上のポリペプチドを組み込むことによって形成される。

20

【 0 1 2 7 】

いくつかの実施形態では、本発明は、多価ワクチンに関する。たとえば、本発明の多価ワクチンは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえば M V A を含むことができ、十分な量でその必要のある被験体に投与される場合に、ポリヌクレオチドもしくはベクター、たとえば M V A は、2 つ以上のインフルエンザエпитープをコードするまたはポリペプチドは、2 つ以上のインフルエンザエпитープを含む。2 つ以上のインフルエンザエпитープは、同じまたは異なる抗原に由来してもよい。ある実施形態では、多価ワクチンは、インフルエンザマトリックス 2 タンパク質およびさらなるインフルエンザタンパク質またはその断片に対する免疫応答を誘発する。特定の実施形態では、本発明の組成物は、本発明の 2 つ以上のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえば M V A を含む。特定の実施例として、本発明は、M V A の 2 つ以上の集団を含む組成物を含むことができ、第 1 の M V A は、本発明の M 2 外部ドメインペプチド (M E T R) の複数のコピーをコードするコード領域を含むポリヌクレオチドを含み、第 2 の M V A は、さらなる抗原、たとえば、さらなるインフルエンザウイルスタンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、さらなる抗原は、H A、N P コンセンサス、その変異体、誘導体、類似体、または断片である。他の実施形態では、第 2 の M V A におけるさらなる抗原は、第 1 の M V A において発現される M E T R 配列と同一でない M 2 e 外部ドメインの複数のコピーを含むポリペプチドである。

30

40

【 0 1 2 8 】

ある実施形態では、本発明の多価ワクチン組成物は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえば M V A を含み、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえば M V A は、十分な量でその必要のある被験体に投与された際に、インフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発し、ポリペプチドは、1 つ以上のさらなる生物および/またはウイルス、たとえば H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e b

50

型、B型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、*Corynebacterium diphtheriae*、*Clostridium tetani*、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ミクソウイルス、*Neisseria*、たとえば *N. gonorrhoeae*、*Haemophilus ducrey*、鼠径部肉芽腫、*Calymmatobacterium granulomatis*、ヒトパピローマウイルス(HPV) I型およびII型、*Ureaplasma urealyticum*、*Mycoplasma hominis*、*Treponema pallidum*、モルシボックスウイルス属のボックスウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、エプスタインバーウイルス(EBV)、単純ヘルペスウイルス、または水痘帯状疱疹ウイルスに対する免疫応答を誘発する。

10

【0129】

本発明の多価ワクチンは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえばMVAおよび適合するワクチンを含むことができ、本発明のワクチンおよび適合するワクチンの両方は、類似する患者集団、たとえば免疫不全集団、子供、幼児、または高齢者を対象とする。

【0130】

治療/予防およびレジメンの方法

被験体におけるインフルエンザウイルス感染またはインフルエンザウイルス感染と関連する状態を治療するまたは予防するための方法であって、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえばMVAを含有する組成物をその必要のある被験体に投与するステップを含む方法もまた提供される。ある実施形態では、被験体は、脊椎動物、たとえば哺乳動物、たとえば霊長類、たとえばヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、被験体、たとえば宿主動物においてインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発するための方法であって、任意の1つ以上の本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえばMVAを含有する有効量の組成物を投与するステップを含む方法に関する。

20

【0131】

いくつかの実施形態では、動物は、インフルエンザウイルスに対する暴露前にまたはインフルエンザウイルス症状にかかる前に健康な動物において1つ以上のインフルエンザウイルス種に対する免疫を確立しまたは増強し、したがって、疾患を予防するまたは疾患症状の重症度を軽減するために、予防的に、たとえば予防用ワクチンとして、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、または組成物を用いて治療することができる。1つ以上の本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、または組成物はまた、動物の免疫系をさらに刺激し、したがって、その暴露と関連する症状を軽減するまたはなくすために、既にインフルエンザウイルスに暴露されているまたは既にインフルエンザウイルス関連の症状に罹患している動物を治療するために使用することもできる。本明細書において定義されるように、「動物の治療」は、動物においてインフルエンザウイルス感染によって引き起こされる症状、たとえばインフルエンザの重症度を予防する、治療する、遅延させる、または軽減するためのおよび/または特定される期間にわたり症状の悪化をもたらさないための、1つ以上のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、またはポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVAを含む組成物の使用を指す。本発明の任意のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、または組成物は、インフルエンザウイルス感染に対する完全な保護を提供することまたはインフルエンザウイルス感染に関連する症状をすべて完全に治療するもしくはなくすことは必要とされない。本明細書において使用されるように、「治療用および/または予防の免疫を必要性とする動物」は、インフルエンザウイルス感染に関連する症状の重症度を治療する、つまり、予防する、治療する、遅延させる、もしくは軽減するおよび/または特定される期間にわたり症状の悪化をもたらさないことが望ましい動物を指す。

30

40

【0132】

50

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえばMVAを含む医薬組成物を用いる治療は、必要に応じて、別々にまたは他の治療と同時に行うことができる。

【0133】

治療用の適用では、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、または組成物は、症状および/または合併症を治療するまたは少なくとも部分的に阻止するために、インフルエンザウイルス由来のポリペプチドに対する有効なCTL応答を誘発するのに十分な量で患者に投与される。これを達成するのに適切な量は、「治療的に有効な用量」または「ユニット用量」として定義される。この使用に有効な量は、たとえば、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、または組成物、投与の様式、治療されている疾患の段階および重症度、患者の体重および健康状態の全身状態、ならびに指示する医師の判断に依存するであろう。一般に、MVAワクチンについての最初の免疫処置についての範囲は（治療用または予防用の投与のためのものである）、約 $100\text{ pfu} \sim 1 \times 10^{15}\text{ pfu}$ のMVA、いくつかの実施形態では、約 $10^5\text{ pfu} \sim 10^9\text{ pfu}$ のMVAであり、その後、患者の血液中の特異的CTL活性を測定することによって、患者の応答および状態に依存し、数週間～月にわたる追加免疫レジメンに従って、約 $10^3\text{ pfu} \sim 10^8\text{ pfu}$ の追加免疫投薬量、いくつかの実施形態では、 $10^6\text{ pfu} \sim 10^9\text{ pfu}$ のMVAが続く。代替の実施形態では、一般に、ヒトについて、最初の免疫処置についての用量範囲は（治療用または予防用の投与のためのものである）、70kgの患者について約 $10\text{ pfu} \sim 1 \times 10^{20}\text{ pfu}$ のMVA、いくつかの実施形態では、 1000 pfu 、 $5 \times 10^4\text{ pfu}$ 、 10^5 pfu 、 $5 \times 10^5\text{ pfu}$ 、 10^6 pfu 、 $5 \times 10^6\text{ pfu}$ 、 10^7 pfu 、 $5 \times 10^7\text{ pfu}$ 、 10^8 pfu 、 $5 \times 10^8\text{ pfu}$ 、 10^9 pfu 、または 10^{10} pfu であり、その後、患者の血液中の特異的CTL（細胞傷害性Tリンパ球）活性を測定することによって、患者の応答および状態に依存し、数週間～数か月にわたる追加免疫レジメンに従って、同じ用量範囲での追加免疫投薬量が続く。本発明の特定の非限定的な実施形態では、およそ $10\text{ pfu} \sim 1 \times 10^{15}\text{ pfu}$ またはいくつかの実施形態では、 $10^4\text{ pfu} \sim 1 \times 10^{10}\text{ pfu}$ または $10^7\text{ pfu} \sim 10^9\text{ pfu}$ の本発明のMVAまたはその断片、誘導体、変異体、もしくはアナログが、宿主に投与される。

【0134】

本発明の非限定的な実施形態では、有効量の本発明の組成物は、投与前の抗体力価の少なくとも2または3倍までの抗体力価の上昇をもたらす。

【0135】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVAおよび組成物は、一般に、深刻な疾患状態、すなわち、生命を脅かすまたは可能性として生命を脅かす状況において用いられてもよいことに、留意しなければならない。そのような場合、外来性の物質の最小化およびポリペプチドの相対的な無毒性の性質を考慮して、治療する医師が、実質的な過剰量のこれらのポリペプチド組成物を投与することが可能であり、望ましく思われてもよい。

【0136】

治療用の使用については、投与は、インフルエンザウイルス感染の第1の徴候時に始められるべきである。少なくとも症状が実質的に緩和されるまで、かつその後のある期間、追加免疫用量がこれに続く。慢性感染では、初回用量、その後続く追加免疫用量が必要とされてもよい。

【0137】

本発明の組成物を用いる感染した個体の治療は、急性に感染した個体において感染の消失を促進してもよい。進行性の慢性感染に感受性の（またはそれを起こしやすい）それらの個体について、組成物は、急性から慢性感染への進展を予防する方法において特に有用である。感受性の個体が、本明細書において記載されるように、たとえば感染前にまたはその間に同定される場合、組成物は、彼らを対象とし、より多くの集団への投与の必要性を最小限にすることができる。

【 0 1 3 8 】

特に、本発明の組成物は、筋肉、皮膚、脳組織、肺組織、肝臓組織、脾臓組織、骨髄組織、胸腺組織、心臓組織、たとえば心筋層、心内膜、および心膜、リンパ組織、血液組織、骨組織、膵臓組織、腎臓組織、胆嚢組織、胃組織、腸の組織、睾丸の組織、卵巣の組織、子宮の組織、膣の組織、直腸の組織、神経系組織、眼組織、腺の組織、舌組織、または結合組織、たとえば軟骨を含むが、これらに限定されない動物の任意の組織に投与されてもよい。

【 0 1 3 9 】

さらに、本発明の組成物は、肺、口、鼻腔、胃、腹膜腔、腸、任意の心腔、静脈、動脈、毛細管、リンパの腔、子宮腔、膣腔、直腸の腔、関節腔、脳において脳室、脊髄中の脊柱管、目の腔、唾液腺の管の管腔、または肝臓を含むが、これらに限定されない、脊椎動物の任意の内部の腔へ投与されてもよい。本発明の組成物が唾液腺の管の管腔または肝臓に投与される場合、所望のポリペプチドは、ポリペプチドが唾液腺および肝臓のそれぞれから脊椎動物の血流の中に送達されるように、唾液腺および肝臓のそれぞれにおいてコードされる。血流の中に所望のポリペプチドを放出するための唾液腺、肝臓、および膵臓を使用する胃腸系の分泌器官への投与のためのある種のモードは、両方がそれらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第 5, 8 3 7, 6 9 3 号および第 6, 0 0 4, 9 4 4 号において開示される。

【 0 1 4 0 】

ある実施形態では、本発明の 1 つ以上の組成物は、本明細書において記載される方法によって動物に送達され、それによって、有効な免疫応答および / または有効な治療用のもしくは予防の免疫応答を達成する。投与の任意のモードは、そのような応答を必要とする動物において、インフルエンザウイルスに対する免疫応答を生成するおよび / またはインフルエンザウイルスに対する予防的にまたは治療的に有効な免疫応答を生成するのに十分な量で、モードが所望の組織において所望のポリペプチドの送達および / または発現をもたらす限り、使用することができる。開示される方法によれば、本発明の組成物は、粘膜送達、経皮的送達、皮下注射、静脈内注射、経口投与、肺投与、筋肉内 (i . m .) 投与、または硬膜内注射を介してによって投与することができる。投与の他の適したルートは、気管内、経皮的、眼内、鼻腔内、吸入、腔内、管内 (たとえば膵臓の中への)、および実質内 (つまり任意の組織の中への) 投与を含むが、これらに限定されない。経皮的送達は、皮内 (たとえば真皮または表皮の中に)、経皮的 (たとえば経皮)、および経粘膜投与 (つまり皮膚または粘膜組織の中へのまたはそれを通しての) を含むが、これらに限定されない。腔内投与は、経口、膣、直腸、鼻、腹膜、または腸の腔の中への投与ならびに鞘内 (つまり脊柱管の中への)、室内 (つまり脳室または心室の中への)、心房内 (つまり心房の中への)、およびクモ膜下 (つまり脳のクモ膜下腔の中への) 投与を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 4 1 】

投与の任意のモードは、そのような応答を必要とする動物において、インフルエンザウイルスに対する免疫応答を生成するおよび / またはインフルエンザウイルスに対する予防的にまたは治療的に有効な免疫応答を生成するのに十分な量で、モードが所望の組織において所望のポリペプチドの送達および / または発現をもたらす限り、使用することができる。本発明の投与手段は、針注射、カテーテル注入、微粒子銃注射器、粒子加速器 (たとえば「遺伝子銃」または空気「無針」注射器)、Med - E - Jet (Vahlsing, H. ら、J. Immunol. Methods 171 巻、11 ~ 22 頁 (1994 年))、Pig jet (Schrijver, R. ら、Vaccine 15 巻、1908 ~ 1916 頁 (1997 年))、Biojector (Davis, H. ら、Vaccine 12 巻、1503 ~ 1509 頁 (1994 年); Gramzinski, R. ら、Mol. Med. 4 巻、109 ~ 118 頁 (1998 年))、AdvantaJet (Linmayer, I. ら、Diabetes Care 9 巻: 294 ~ 297 頁 (1986 年))、Medi - jector (Martins, J. およ

10

20

30

40

50

びRoedl、E. J. Occup. Med. 21巻：821～824頁（1979年）、ゲルフォーム（gel foam）スポンジデポー剤、他の市販で入手可能なデポー剤物質（たとえばヒドロゲル）、浸透性ポンプ（たとえばAlzaミニポンプ）、経口または坐剤（suppositorial）固体（錠剤またはピル）医薬製剤、局所的スキนครリーム、およびデカンティング（decanting）、ポリヌクレオチドコート縫合糸の使用（Qin, Y.ら、Life Sciences 65巻、2193～2203頁（1999年））、または手術の間の局所的な適用を含む。投与のある種モードは、筋肉内の針ベースの注射およびカテーテル注入を介しての肺適用である。この段落において引用される参考文献のそれぞれは、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる。

10

【0142】

本発明に従うポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、または組成物を用いる免疫処置に際して、宿主の免疫系は、所望の抗原に特異的な大量のHTL（ヘルパーTリンパ球）および/またはCTL（細胞傷害性Tリンパ球）を産生することによってワクチンに応答する。したがって、宿主は、後の感染に対して少なくとも部分的に免疫を持つようになるまたは進行中の慢性感染の発症に対して少なくとも部分的に抵抗性になる。

【0143】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、または組成物は、インフルエンザウイルス感染に対する動物の保護に十分な細胞媒介性免疫応答を刺激する。他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、または組成物は、体液性免疫応答を誘発する。ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえばMVAは、体液性および細胞媒介性応答の両方を刺激し、それらの組み合わせは、インフルエンザウイルス感染に対する動物の保護に十分である。

20

【0144】

さらに他の実施形態では、T細胞応答を誘発する構成成分は、対象の標的抗原に対する抗体応答を誘発する構成成分と組み合わせられる。したがって、本発明のある実施形態では、本発明のワクチン組成物は、対象の標的抗原に対する中和抗体応答を誘発するまたは促進するポリペプチドまたはポリヌクレオチドと組み合わせられる。そのような組成物の一実施形態は、PADRE（登録商標）（Epimmune, San Diego, CA）分子（たとえば、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第5,736,142号において記載される）と共に、本発明に従うクラスIエピトープを含む。

30

【0145】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、たとえばMVA、またはポリヌクレオチド、ポリペプチド、もしくはベクター、たとえばMVAを含む組成物は、in vivoにおいて動物の細胞の中に組み込むことができ、抗原性の量のインフルエンザM2由来ポリペプチドまたはその断片、変異体、もしくは誘導体は、in vivoにおいて産生される。この方法による組成物の投与に際して、METRポリペプチドは、免疫応答を誘発するのに十分な量で動物において発現される。そのような免疫応答は、たとえば、診断アッセイにおいてまたは検査室試薬として使用するための、インフルエンザウイルスに対する抗体を生成するために使用されてもよい。

40

【0146】

本発明は、動物においてインフルエンザウイルスに対する保護のおよび/または治療用の免疫応答を生成する、増強する、または調整するための方法であって、治療用のおよび/または予防の免疫を必要とする動物に、本明細書において記載される1つ以上の組成物を投与するステップを含む方法をさらに提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、所与の宿主生物、たとえばヒトにおける発現のために最適化された、本発明のポリペプチドをコードするコドン最適化コード領域を含むポリヌクレオチドを含有する組換えMVA

50

またはその断片、変異体、もしくは誘導体をコードするようなコード領域の核酸断片を含む。組換えMVAは、*in vivo*において動物の細胞の中に組み込まれ、免疫学的有効量のインフルエンザウイルスポリペプチドまたは断片もしくは変異体は、*in vivo*において産生される。この方法による組成物の投与に際して、インフルエンザウイルス由来のポリペプチドは、治療的にまたは予防的に有効な量で動物において発現される。

【0147】

本発明の組成物は、それが投与されている動物の生活環の間の任意の時間に動物に投与することができる。たとえば、組成物は、誕生の直後に与えることができる。ヒトにおいて、本発明の組成物の投与は、他のワクチンが投与されている間に、たとえば誕生時に、2か月、4か月、6か月、9か月で、1年で、5年で、または思春期の始めに、行うことができる。いくつかの実施形態では、本発明の組成物の投与は、免疫抑制治療の開始前に行うことができる。

10

【0148】

さらに、本発明の組成物は、任意の所望の免疫または投与レジメンにおいて、たとえば、単一の投与においてまたはその代わりに、毎年のワクチン接種などのような定期的なワクチン接種の一部としてまたは初回刺激 - 追加免疫治療法におけるように使用することができ、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、同じまたは異なるポリペプチドまたはポリヌクレオチドの投与の前またはその後に投与される。

20

【0149】

最近の研究は、初回刺激 - 追加免疫プロトコールが、多くの場合、ワクチンを投与するための適した方法であることを示した。初回刺激 - 追加免疫プロトコールでは、本発明の1つ以上の組成物は、「初回刺激追加免疫」レジメンにおいて利用することができる。「初回刺激追加免疫」レジメンの例は、その全体が参照によって本明細書において組み込まれるYang, Z.ら J. Virol. 77巻: 799 ~ 803頁(2002年)において見出されてもよい。非限定的な実施例では、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえばMVAを含む1つ以上のワクチン組成物は、動物に送達され、インフルエンザM2ポリペプチドに対する動物の免疫応答を初回刺激し、次いで、第2の免疫原性組成物は、追加免疫ワクチン接種として利用される。

30

【0150】

他の非限定的な実施例では、初回刺激組成物および追加免疫組成物は、単一の組成物または単一の製剤において組み合わせられる。たとえば、単一の組成物は、初回刺激構成成分としての、たとえば、インフルエンザタンパク質、その断片、変異体、誘導体、もしくは類似体をコードするポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチドもしくはベクターまたはインフルエンザタンパク質、その断片、変異体、誘導体、もしくは類似体を含む単離ポリペプチドおよび追加免疫構成成分としての本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはベクター、たとえばMVAを含むことができる。この実施形態では、初回刺激構成成分および追加免疫構成成分がともに混合される場合、組成物は、単一のバイアル中に含有されてもよい。一般に、ポリヌクレオチド由来のポリペプチドの発現のピークレベルは、投与後のもっと後になるまで(たとえば7 ~ 10日)生じないので、ポリヌクレオチド構成成分は、単離ポリペプチド構成成分に対する追加免疫を提供してもよい。初回刺激構成成分および追加免疫構成成分の両方を含む組成物は、「コンビナトリアルワクチン組成物」または「単一製剤異種初回刺激 - 追加免疫ワクチン組成物」と本明細書において呼ばれる。さらに、初回刺激組成物は、追加免疫組成物の前にまたは追加免疫組成物が作用するのにより長くかかると予想される場合、追加免疫組成物の後でさえ、投与されてもよい。

40

【0151】

他の実施形態では、初回刺激組成物は、追加免疫組成物と同時であるが、初回刺激構成成分および追加免疫構成成分が分離されている別々の製剤において、投与されてもよい。

【0152】

50

キット

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、もしくはベクター、たとえばMVAまたは組成物は、本発明の組換えMVAまたは組成物を投与するための手段と一緒に、キットの形態で提供することができる。いくつかの実施形態では、キットは、ワクチン投与についての説明書をさらに含むことができる。

【0153】

典型的に、キットは、たとえばユニット剤形の、容器中の本発明の所望の組成物（複数可）および投与についての説明書を含むであろう。本発明の組成物を投与するための手段は、たとえば、無菌注射器、エアロゾルアプリケーション（たとえば鼻もしくは肺投与の吸入器もしくは任意の他の手段）、ゲル、クリーム、経皮的パッチ、経粘膜パッチ（または頬側もしくは舌下投与の任意の他の手段）、または経口錠剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、本発明のキットは、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または組成物を投与するための2つ以上の手段、たとえば2つ以上の注射器を含有する。

10

【0154】

いくつかの実施形態では、キットは、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、または組成物を含む1つを超える容器を含んでもよい。たとえば、いくつかの実施形態では、キットは、本発明の初回刺激構成成分を含有する容器および本発明の追加免疫構成成分を含む別々の容器を含んでもよい。

20

【0155】

必要に応じて、通知または印刷された説明書は、そのような容器（複数可）と関連させることができる。たとえば、そのような印刷された説明書は、医薬品または生物学的産物の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定される形態とすることができ、この通知は、本発明のヒト投与についての製造、使用、または販売についての機関による承認を表わす。「印刷された説明書」は、たとえば、本、小冊子、パンフレット、またはリーフレットのうちの1つとすることができ。

【0156】

キットはまた、キットの構成成分を保存するための保存ユニット（たとえば投与の手段、本発明の組換えMVAまたは組成物を含む容器、印刷された説明書など）を含むことができる。保存ユニットは、たとえば、本発明において使用するに適したバッグ、ボックス、エンベロープ、または任意の他の容器とすることができ。たとえば、保存ユニットは、本発明の方法を施すのに必要であってもよいそれぞれの構成成分を収容するのに十分に大きい。

30

【0157】

本発明はまた、その必要のあるヒトなどのような動物に本発明の組換えMVAまたは組成物を送達するための方法であって、（a）本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または組成物を投与することが許可された管理者（たとえば医師、医師助手、ナースプラクティショナー、薬剤師、獣医）の識別をコンピューター読み取り可能なメディアに登録するステップ、（b）本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または組成物の付随する危険性に関するカウンセリング情報をヒトに提供するステップ、（c）付随する危険性にもかかわらず本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または組成物を受けるためのヒトからのインフォームドコンセントを得るステップ、および（e）本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または組成物をヒトが入手するのを許可するステップを含む方法をも含むことができる。

40

【実施例】

【0158】

（実施例1）

組換えベクターの構築

インフルエンザA型遺伝子Pr8HA（配列番号51～52）、NPコンセンサス（配列番号19～20）、Pr8M2（配列番号13～14）、Pr8M2e__TML（配列

50

番号53～54)、METR__S(配列番号17～18および56)、ならびにMETR__C(配列番号15～16および55)の配列を、vEM11組換えベクター中にクローニングした(図1)。結果として生じる組換えベクターvEM47(NPコンセンサス配列をコード)、vEM58(METR__Sペプチドをコード)、vEM57(METR__Cペプチドをコード)、vEM61(Pr8M2をコード)、vEM62(Pr8M2e-TMLをコード)、およびvEM65(Pr8HAをコード)を図2A～Fに示す。

【0159】

(実施例2)

組換えウイルスの相同組換えおよび単離

修飾MVAウイルスベクター、MVAtor(商標)(Emergent Biosolutions)中へのインフルエンザ遺伝子の挿入のために、CEF細胞を、MVAtorにより感染させ、続いて、図2A～Fに示す組換えベクターによりトランスフェクトした。それぞれのベクター当たり並行して2～3のセットアップを実行した。最初に、 5×10^5 CEF細胞を6つのウェルプレートのウェルあたりに接種し、37 °Cおよび5% CO₂で24時間インキュベートした。翌日に、細胞密度は、ウェルあたり 10^6 細胞であることが想定された。MVAtor標準物質は、500 µlが 5×10^4 TCID₅₀を含有し、つまり、 1×10^5 TCID₅₀/mlの作用濃度で、0.05のmoiをもたらしように、1ml当たり4 mM L-グルタミンおよび2.5 µgのゲンタマイシンを含有するOpti-Pro SFM中に希釈した。感染のために、増殖培地を細胞から除去し、500 µlの希釈MVAtor標準物質をウェルあたりに追加し、揺らしながら室温で1時間、インキュベートした。ウイルス接種材料を除去し、細胞をOpti-Pro SFMを用いて洗浄した。感染細胞を2.0 mlのOpti-Pro SFM中に残し、トランスフェクション反応をセットアップした。

【0160】

トランスフェクション反応は、無菌5 ml PSチューブ中に設定した。およそ1.0～2.0 µg DNAの組換えベクターおよび6 µlトランスフェクション試薬(Fugene HD)を、供給者によって提供されるFUGENE HDの標準的なプロトコルに従って実行したトランスフェクションに使用した。細胞は、インキュベーター中で37 °Cおよび5% CO₂で48時間、インキュベートした。

【0161】

インキュベーション後に、細胞は、細胞内のMVAtorおよび組換えベクターの存在を示す蛍光細胞についてスクリーニングした。細胞は、蛍光焦点についてスクリーニングし、最も効率的なgfp発現を有するセットアップを、選択的条件下での組換えMVAtorの2～3回の継代培養のために使用した。この継代培養のために、感染トランスフェクト細胞は、セルリフターを使用することによって培地の中にこすり取り、1.5 mlバイアルに移動させた。ウイルスは、EPDD-SOP-EQU-033によって超音波処理により遊離した。1/10～1/2のトランスフェクションセットアップは、12ウェルプレート中に接種した新鮮なCEF細胞上で平板培養し、1mlまで充填し、1ml当たり5 µgのプラスチジンを追加した。

【0162】

組換えMVAtorをブランク精製するために、組換えMVAtorは、選択的条件(Opti-Pro SFM 1ml当たり5 µg/mlプラスチジン)下で、それぞれ6ウェルプレートおよび96ウェルプレート中の段階希釈溶液中に接種した。単一の蛍光ブランクを、100 µlピペットを使用することによって単離した。単離したウイルスは、1.5 mlのバイアルに移動させ、超音波処理によって遊離した。ウイルスは、空ベクターに対してPCRによって分析し(下記に記載されるように)、最も弱い空ベクターシグナルを示す分離株を、12ウェルプレート中に接種した新鮮なCEF細胞上で継代培養する。分離株に空ベクターがなくなるまで、ブランク精製を繰り返した。純粋なクローンを単離するとすぐに、ウイルスをプラスチジンなしで継代培養し、選択/レポーターカセットを欠く非蛍光ウイルスを単離した。

10

20

30

40

50

【0163】

選択カセットの削除のために、純粋な組換えウイルスをプラスチジンなしで継代培養した。蛍光を有していないブラックを単離し、ゲノム中の期待されるインフルエンザA型遺伝子の挿入について試験した。次いで、組換えMVAtorを、3×T175まで増幅させ、詳細な予備試験を、以下のウイルス株において実行した（PCR、配列決定、発現、力価）：（1）MVAtor-NPコンセンサス（mEM10）、P21pp8、（2）MVAtor-METR__C（mEM18）、P14pp8、（3）MVAtor-METR__S（mEM19）、P18pp13、（4）MVAtor-Pr8M2（mEM22）、P13pp3、（5）MVAtor-Pr8M2e__TML（mEM23）、P14pp3、および（6）MVAtor-Pr8HA（mEM17）。ウイルス株は、100%正確な配列読み取りを有し、残存性の空ベクターがなく、機能的であることが示された。

10

【0164】

選択/レポーターカセットを欠く純粋な組換えMVAtorの単離後に、ウイルスは、T225フラスコ上で増幅させた。10のT225フラスコ初代CEF細胞を、それぞれの個々の組換えMVAtorの増幅のために、総量40のT225フラスコにおいて1:4に分割した。2日間のインキュベーション後に、1つのフラスコの細胞を、トリプシン処理し、カウントした。39のT225フラスコは、0.1のmoiにより感染させ、37°Cおよび5%CO₂で72時間インキュベートした。フラスコを収集し、すべてのフラスコの内容物をプールした。ホモジナイゼーションプールウイルス株は、フローセルデバイスをを使用して、超音波処理により実行した。精製する必要があったウイルス株を含有するフラスコは、氷上に置き、フローセルに接続した。超音波フローセルデバイスは、以下のように設定した：100%までの振幅、サイクル1、50ml/分のポンプ速度、つまり0.8、およびスイッチオン。調査後に、株を精製まで凍結させた。

20

【0165】

力価を考慮し、精製した株を希釈し、1ml当たり10⁹のTCID₅₀（公称力価）を含有するバイアル当たり600μlの最終充填容量まで充填した。充填により、ウイルスごとに以下の量のバイアルがもたらされた：（1）91×MVAtor-NPコンセンサス（mEM10）；（2）35×MVAtor-METR__C（mEM18）、（3）29×MVAtor-METR__S（mEM19）、（4）56×MVAtor-Pr8M2（mEM22）、（5）38×MVAtor-Pr8M2e__TML（mEM23）、および（6）30×MVAtor-Pr8HA（mEM17）。バイアルはすべて、さらなる使用、つまり試験または輸送まで-70°Cで保存した。ウイルスごとの1つのバイアルを、-70°C試料アーカイブにおいてアーカイブした。

30

【0166】

（実施例3）

空ベクターコンタミネーションの排除のためのPCR

残存性の非組換えMVAtorが、精製ウイルス株の充填バイアルからうまく除かれていることを確認するために、精製し、充填した、mEM10についてのMVAtor-NP、mEM18についてのMVAtor-METR__C、mEM19についてのMVAtor-METR__S、mEM22についてのMVAtor-Pr8M2、またはmEM23についてのMVAtor-Pr8M2e__TML由来のDNAを単離し、PCRのために使用した。組換えウイルスについての陽性対照として、組換えベクターvEM47を使用した（vEM47）。空ベクターについての陽性対照として、MVAtorから単離したDNAを使用した（MVA）。陰性対照として、H₂OおよびCEF細胞を使用した。

40

【0167】

（実施例4）

挿入部位のインフルエンザ遺伝子およびフランキング配列についての配列決定

それぞれのウイルスのDNAを単離し、全挿入部位を、プライマー5'-ggagcttcacataatttagttgggtggctcgcc-3'（配列番号32）（oVIV

50

47) および 5' - c g g g t a c c c t a g t t t c c g g t g a a t g t g - 3' (配列番号 33) (oVIV89) を使用し、PCR によって増幅した。これらのプライマーを使用して、挿入されたインフルエンザ遺伝子および相同組換えに使用されたフランキング配列を増幅する (図 4)。

【0168】

PCR 断片を精製し、配列決定のために GATC に送った。配列決定のために、プライマーは、下記に提供されるように、PCR 断片全体をカバーするように選んだ。

【0169】

【表 5 - 1】

表5. プライマー

10

5A. MVAator-NPコンセンサスおよびフランキング領域(mEM10)を配列決定するためのプライマー	
oVIV38	oVIV-Del IIIend ctagatcatcgtatggagagtcg (配列番号 34)
oVIV45	oVIV-F2up+ApaI gaaagttttataggttag (配列番号 35)
oVIV48	oVIV-Flend+BstXI gccaccgcggtggccagccaccgaaagagcaatc (配列番号 36)
oVIV49	oVIV-Flmid(rpt)+BglIII ggaagatctcaattaacgatgagtgttag (配列番号 37)
oVIV54	oVIV-Del IIIF1-seq gatgtaggcgaatttggatc (配列番号 38)
oVIV53	oVIV-Del IIIF2-seq tggtaatcgtgtcatatttag (配列番号 39)
oVIV55	oVIV-Del IIIF1mid rev cattattatcggttacacttc (配列番号 40)
oEM229	NP fw CAAGAAGTGCTTATGAG (配列番号 41)
oEM230	NP rev ggttcgcgactttctctcact (配列番号 42)

20

【0170】

【表 5 - 2】

5B. MVAator-METR_Cおよびフランキング領域(mEM18)の配列決定:

oVIV37 oVIV-Del IIIup ggcacctctctttaagaagtgtaac (配列番号 43)
 oVIV54 oVIV-Del IIIF1-seq gatgtaggcgaatttggatc (配列番号 38)
 oVIV53 oVIV-Del IIIF2-seq tggtaatcgtgtcatattag (配列番号 39)
 oVIV55 oVIV-Del IIIF1mid rev cattattatcggttacacttc (配列番号 40)
 oEM283 M2tandem_forward CTTACAGAAGTGGAGACAC (配列番号 44)
 oEM284 M2tandem_backward GTAAGGAGACTCAGCTTC (配列番号 45)

10

5C. MVAator-METR_Sおよびフランキング領域(mEM19)の配列決定:

oVIV37 oVIV-Del IIIup ggcacctctctttaagaagtgtaac (配列番号 43)
 oVIV45 oVIV-F2up+ApaI gaaagttttataggtag (配列番号 35)
 oVIV53 oVIV-Del IIIF2-seq tggtaatcgtgtcatattag (配列番号 39)
 oVIV55 oVIV-Del IIIF1mid rev cattattatcggttacacttc (配列番号 40)
 oEM184 Flank1-seq-down GGATAGAGATGTTTGTGAAC (配列番号 46)
 oEM283 M2tandem_forward CTTACAGAAGTGGAGACAC (配列番号 47)
 oEM284 M2tandem_backward GTAAGGAGACTCAGCTTC (配列番号 48)

20

5D. MVAator-Pr8M2およびフランキング領域(mEM22)の配列決定:

oVIV37 oVIV-Del IIIup ggcacctctctttaagaagtgtaac (配列番号 43)
 oVIV45 oVIV-F2up+ApaI gaaagttttataggtag (配列番号 35)
 oVIV47 oVIV-Flup+SacI ggagctccactatttagttggtggtcgcc (配列番号 32)
 oVIV53 oVIV-Del IIIF2-seq tggtaatcgtgtcatattag (配列番号 39)
 oVIV54 oVIV-Del IIIF1-seq gatgtaggcgaatttggatc (配列番号 38)
 oVIV55 oVIV-Del IIIF1mid rev cattattatcggttacacttc (配列番号 40)
 oVIV89 F2end Acc65Inew cgggtaccctagtttccggtgaatgtg (配列番号 33)

30

5E. MVAator-Pr8M2e_TMLおよびフランキング領域(mEM23)の配列決定:

oVIV37 oVIV-Del IIIup ggcacctctctttaagaagtgtaac (配列番号 43)
 oVIV45 oVIV-F2up+ApaI gaaagttttataggtag (配列番号 35)
 oVIV47 oVIV-Flup+SacI ggagctccactatttagttggtggtcgcc (配列番号 32)
 oVIV48 oVIV-Flend+BstXI gccaccgcggtggccagccaccgaaagagcaatc (配列番号 36)
 oVIV53 oVIV-Del IIIF2-seq tggtaatcgtgtcatattag (配列番号 39)
 oVIV54 oVIV-Del IIIF1-seq gatgtaggcgaatttggatc (配列番号 38)
 oVIV55 oVIV-Del IIIF1mid rev cattattatcggttacacttc (配列番号 40)
 oVIV89 F2end Acc65Inew cgggtaccctagtttccggtgaatgtg (配列番号 33)

40

【表 5 - 3】

5F. MVA _{tor} -Pr8HAおよびフランキング領域(mEM17)の配列決	
oVIV37 oVIV-Del III up	ggtggtgagttgaaggattcacttcc (配列番号 43)
oVIV38 oVIV-Del III end	ctagatcatcgtagtgagagtcg (配列番号 34)
oVIV45 oVIV-F2up+ApaI	gaaagttttataggtag (配列番号 35)
oVIV47 oVIV-Flup+SacI	ggagctccactatttagttggtggtcgcc (配列番号 32)
oVIV48 oVIV-Flend+BstXI	gccaccgcggtggccagccacgaaagagcaatc (配列番号 36)
oVIV53 oVIV-Del IIIF2-seq	tggtaatcgtgtcatattag (配列番号 39)
oVIV55 oVIV-Del IIIF1mid rev	cattattatcggttacacttc (配列番号 40)
oEM280 Pr8 HA_mid_backward	GTTACACTCATGCATTGATG (配列番号 49)
oEM281 Pr8 HA_mid_forward	CAAATGGAAATCTAATAGCAC (配列番号 50)

10

(実施例 5)

インフルエンザポリペプチドの発現分析

ウエスタンブロットは、MVA_{tor}-NPならびに両方のMVA_{tor}-METR構築物の発現を分析するために実行した(METR__Cポリペプチドについての配列番号16およびMETR__Sポリペプチドについての配列番号18)。6ウェルプレートにおいて、 6×10^5 細胞を、ウェルの適切な量でウェルあたりに接種した。ウェルの量は、以下のように決定した：組換えMVA_{tor}試料およびMVA_{tor}対照およびCEF対照の数。細胞は、標準的なプロトコールに従って、1のmoiを使用し、それぞれ、MVA_{tor}およびMVA_{tor}-NP/-METR__S、-METR__Cを感染させた。感染の24時間後に、ウェルあたり300 μ l RIPAバッファー(氷上であらかじめ冷却)を追加し、プレートを氷上で5分間、インキュベートした。細胞をRIPAバッファーの中にこすり取り、細胞懸濁液を、1.5 mlのバイアル中にそれぞれ移動し、氷上に置いた。0.5 μ lの量のプロテアーゼ阻害剤カクテルをそれぞれのバイアルに追加した。試料当たり60 μ lの容量を新しい1.5 mlバイアルの中に移動し、22 μ lローディング色素および8 μ l 2-メルカプトエタノールを追加した。インフルエンザウイルス陽性対照については、5 μ lの不活性化インフルエンザウイルスを使用した。8 μ lの容量のRIPAバッファーを追加した。試料はすべて、5分間、氷上でインキュベートした。その後、試料はすべて、サーモミキサーにおいて95 で10分間、加熱した。

20

30

【0172】

血球吸着アッセイ(HAD)は、MVA_{tor}-Pr8HAの発現を分析するために実行した。この目的のために、CEF細胞を、それぞれ、MVA_{tor}およびMVA_{tor}-HA(mEM17)により感染させた。細胞の他のセットは偽感染させた。感染の24時間後に、細胞は、ヒト血液の1%赤血球希釈液と共にインキュベートした(図6)。

40

【0173】

免疫学的検定は、MVA_{tor}-M2およびMVA_{tor}-M2e-TMLの発現を分析するために実行した(図7)。細胞は、MVA_{tor}-Pr8M2(図7A)およびMVA_{tor}-Pr8M2e-TML(図7B)により感染させた。並行して、細胞はMVA_{tor}により感染させたまたは感染を伴うことなくインキュベートした。

【0174】

(実施例 6)

MVAワクチンのin vivoにおける効能-体重およびウイルス負荷

METR-C(配列番号16)またはMETR-S(配列番号18)を発現するMVA_{tor}を、それらのin vivoにおける効能について試験した。MVAワクチンの効

50

能は、１）対照群と比較した、抗原投与群におけるマウスの体重減少または死亡および２）肺におけるウイルス負荷を評価することによって観察した。群のマウス（群当たり８匹のマウス）を、MVAワクチンを用いて２度、筋肉内で免疫した：（１）MVA-Pr8M2（インフルエンザＡ型ウイルスプエルトリコ 1934 H1N1（Pr8）の完全長M2を発現するMVA構築物）；（２）MVA-Pr8M2e-TML（M2の天然の膜貫通領域（TML）を発現するMVA構築物）；（３）MVA-METR-C（システインを有するMETRポリペプチドを発現するMVA構築物）；（４）MVA-METR-S（システインがセリンと置換されたMETRポリペプチドを発現するMVA構築物）；（５）MVA-ConsNP（NPコンセンサス配列を発現するMVA構築物）；（６）MVAtor（MVAベクターのみ）；および（７）陰性対照としてのPBS。

10

【0175】

免疫処置の３週間後に、マウスは、マウス１匹当たり629 TCID₅₀の50 μLのインフルエンザＡ型ウイルス（A/PR/8/34、H1N1）により肺内で感染させた。マウスは、体重低下について毎日モニターした。データは、抗原投与前の体重と比較した平均値±SEM（パーセンテージ）とする。体重低下が２５％に達した場合、マウスは安楽死させられた。その結果として、陰性対照マウスは、体重減少を受けて、死亡した。体重減少は、MVA-M2eTML構築物（１４％）を受けたマウスにおいて測定可能であったが、METR構築物は、完全長M2（Pr8M2）と同様に、７％のみの体重減少しかもたらさなかった。

20

【0176】

感染したマウス肺からインフルエンザウイルスの定量的回収を実行し、ウイルス負荷は、先のワクチン接種による免疫の有益性を決定するために比較した。

【0177】

個々のマウス肺を含有する４本のクリオチューブ（cryotube）の群を－８０から取り出し、解凍するために氷上に置いた。それぞれの肺を量った。L-15-2 x PSK培地（Leibovitz + 4 mM L-グルタミン + 2 x 抗菌性抗真菌剤）を、肺重量が全容量の１０％と等しくなるように、それぞれのチューブに移動させた。それぞれの肺は、完了するまで（３０秒間～１分間）、Power Gen 125および使い捨てのホモジナイザーを使用してホモジナイズした。肺ホモジネートは、4、3000 rpmで、２０分間、遠心沈殿させた。肺ホモジネート上清を等分した；TCID₅₀のための200 μLおよび400 μLの２つの一定分量をドライアイス中で直接凍結させる。これらの一定分量を－８０で保存した。

30

【0178】

肺ホモジネートをボルテックスし、20 μLは、トリプシン（TPCK）および4 mM グルタミンおよび2 x 抗菌性抗真菌剤を含有する無血清MEMの180 μL中に4 x 10⁵細胞の、18～24時間、あらかじめ平板培養したMDCK細胞を含有する４つのウェルに追加した。段階１０倍希釈は、列Aから20 μLを列Bにおける培地の180 μLに移動させ、列Hまで継続することによって、プレートで実行した。インフルエンザウイルスA型/PR/8/34株ATCC VR-9は、陽性対照として、３枚に１つのアッセイプレートの４つのウェルにおいてMDCK細胞を感染させるために使用した。陽性対照A/PR/8/34の供給源は、温度が故障していた－８０フリーザーで保存された３つのバイアル供給源由来のものとした。感染したMDCK細胞は、４日間、37 / 5 % CO₂でインキュベートした。プレートは、PBSを用いて１回洗浄し、MDCK細胞は、0.1 % シチメンチョウ赤血球細胞と共に３０分間、4でインキュベートした。非附着性のシチメンチョウ赤血球細胞は、４回、PBSを用いて力強く洗浄し、感染したMDCK細胞は、接着性赤血球細胞によって目に見えた。log₁₀ TCID₅₀力価は、MDCK細胞の感染ウェルをカウントすることから計算した。結果は、それぞれのマウスについての肺組織のグラム重量で割った、log₁₀ TCID₅₀の真数の計算によってTCID₅₀/グラム重量肺組織を表現した。平均値、標準偏差、および％として表現する変動係数を、それぞれの群について決定した。

40

50

【 0 1 7 9 】

(実施例 7)

免疫したマウスにおける M 2 e に対する抗体応答

免疫した動物の抗体力価を試験するために、マウスを、MVA ワクチンを用いて筋肉内で 1 回、2 回、または 3 回、免疫した：(1) MVA - Pr 8 M 2、(2) MVA - Pr 8 M 2 e - TML；(3) MVA - METR - C、(4) MVA - METR - S、(5) MVA - Pr 8 M 2 _ MVA - ConsNP；(6) MVA - Pr 8 M 2 e - TML + MVA - ConsNP；(7) MVA - Pr 8 M 2 e - TML + MVA - ConsNP；(8) MVA - ConsNP、(9) 対照群、(10) 挿入物を有する MVA ウイルス（インフルエンザ抗原を発現せず）；(11) PR 8 感染性インフルエンザウイルスを使用する致死量以下の感染（MVA ワクチンなし）；および (12) 陽性対照としての PBS。最終免疫後に、マウスに、感染性インフルエンザウイルス（A / Pr / 8 / 34）を使用して抗原投与した。M 2 E L I S A を実行するために、M 2 e 領域から成るペプチドを、アビジンの形態を介して E L I S A プレート上に固定した。M 2 外部ドメインタンデムリピート（METR）内で示される 6 つのペプチドのうちで、代表的な抗 M 2 e 力価は、インフルエンザ A 型プエルトリコ 1934 H1N1 に相当するペプチド 4 の E L I S A プレートコートを使用することによって得た。ペプチド # 4（配列番号 4）認識についての血清力価は、表 6 に要約する。

【 0 1 8 0 】

【 表 6 】

表6. 抗M2eペプチド#4抗体応答(μg/mL、幾何平均±幾何SD)

MVAベクターインフルエンザワクチンの中に挿入し、マウス1匹当たり8×10 ⁷ MVA TCID ₅₀ の用量レベルでマウスに送達した試験抗原。	1回のワクチン接種後の抗体	2回のワクチン接種後の抗体	3回のワクチン接種後の抗体
試験群			
Pr8M2	0.2 ± (-1.6)	7.2 ± 2.0*	6.4 ± 1.9*
Pr8M2e-TML	0.3 ± (-1.3)	6.5 ± 1.9*	16.1 ± 2.8*
METR-C	0.6 ± (-0.5)	46.3 ± 3.8* [@]	103 ± 4.6* ^{#@}
METR-S	6.3 ± 1.8	73.5 ± 4.3* [@]	43.4 ± 3.8* [@]
Pr8M2 + ConsNP	0.5 ± (-0.6)	10.6 ± 2.4*	NA
Pr8M2e-TML+ConsNP	0.3 ± (-1.1)	12.9 ± 2.6*	NA
METR-C + ConsNP	1.0 ± 0.0	54.3 ± 4.0* [@]	NA
METR-S + ConsNP	0.3 ± (-1.1)	12.9 ± 2.6*	NA
ConsNP	0.1	0.1	ND
対照群			
挿入物を有するMVAウイルス(インフルエンザ抗原を発現せず)	0.1	0.1	0.1
PR8感染性インフルエンザウイルスを使用する致死量以下の感染(MVAワクチンなし)	2.6	3.4 ± 0.4	0.6 ± 0.4
PBS (MVAワクチンなし)	0.1	0.1	NA

図 10 において示されるように、複数の M 2 e 領域を発現する MVA - METR ワクチンは、MVA - M 2 ワクチンよりも高度な力価血清レベルの I g G 抗 M 2 ペプチドを生成した。

【 0 1 8 1 】

さらなる研究において、BALB / c マウスを、MVA ワクチンを用いて、肺 (I N) に対して鼻腔内または筋肉内で (I M)、2 度、免疫した。(1) インフルエンザ A 型ウイルスプエルトリコ 1934 H1N1 の致死量以下の用量（陽性対照）、(2) MVA - HA（完全長 HA を発現する MVA 構築物）；(3) MVA - METR - S（セリン置換を有する METR を発現する MVA 構築物）；(4) MVA - M 2（完全長 M 2 を発現する MVA 構築物）；(5) MVA - METR - C（天然のシステインを有する METR を発現する MVA 構築物）；(6) MVA - Pr 8 M 2 e - TML（M 2 の天然の膜貫通領域（TML）を含有した MVA 構築物）；(7) PBS（陰性対照）；(8) MVA

- ConsNP (NPコンセンサスを発現するMVA構築物) ; および (9) MVA tor のみ (陰性対照)。免疫血清は、ワクチンの第2の免疫処置の21日後に得、4つのペプチドのうちの1つを用いてコートしたELISAによって試験した。それぞれ、インフルエンザA型ウイルスタンパク質の異なる株に相当する: M2e #1 H5 1999 ~ 2008 (図の後方から2番目のバー) ; M2e #4 H1およびH3ヒト (図の後方のバー) ; M2e #5 H9およびH6 (図の前方から2番目のバー) ; M2e #6 H7 およびH3、H8、H10、H2、H6、H9 (図の前方のバー)。

【0182】

【表7】

表7: 抗M2eペプチド#4抗体応答 ($\mu\text{g/mL}$ 、幾何平均 \pm 幾何SD)

ワクチンごとにMVAベクターによって発現される抗原	鼻腔内送達		筋肉内注射	
	1回のワクチン接種後の抗体	2回のワクチン接種後の抗体	1回のワクチン接種後の抗体	2回のワクチン接種後の抗体
Pr8M2	$0.4 \pm (-1.0)$	$32.6 \pm 3.5^*$	$0.4 \pm (-1.0)$	$8.8 \pm 2.2^*$
Pr8M2e-TML	$0.2 \pm (-1.7)$	$26.7 \pm 3.3^*$	$0.2 \pm (-1.5)$	$6.5 \pm 1.9^*$
METR-C	$0.2 \pm (-1.5)$	$29.1 \pm 3.4^*$	$0.5 \pm (-0.7)$	$20.7 \pm 3.0^*$
METR-S	1.3 ± 0.3	$39.1 \pm 3.7^*$	4.6 ± 1.5	$62.5 \pm 4.1^*$
インフルエンザ抗原なし。MVAのみ	0.1	0.1	0.1	0.1
インフルエンザ抗原なし。PBSのみ	0.1	0.1	NA	NA

免疫した鼻腔内 (IN) または筋肉内 (IM) 免疫したマウスにおける体重変化を図11Aおよび図11Bに示す。

【0183】

鼻腔内で (IN) または筋肉内で (IM) 免疫したマウスにおけるウイルス負荷を測定した。MVAワクチンを用いて2回免疫したマウスの肺組織におけるウイルス量は、インフルエンザA型ウイルスを用いる抗原投与の3日後に測定した。データを図12に示す。

【0184】

(実施例8)

NPおよびM2で免疫したマウスにおける低用量のH1N1 PR8の抗原投与に対する免疫応答

相同な低用量インフルエンザ感染 (H1N1 PR8) に対するNP + M2ワクチン接種の効能をマウスにおいて試験した。この研究のためのマウスは、表8において要約されるような保存インフルエンザ抗原を含有するMVA tor ベースのワクチンを用いて、0日目および21日目に筋肉内で免疫した。

【0185】

10

20

30

【表 8】

表8: 処理群

群	動物		免疫物質
	体重	ウイルス量 (1つの時点当たり)	
1	10	8	PR8 HA
2	10	8	NP
3	10	8	M2
4	10	8	NP + M2
5	10	8	MVA _{tor}
6	10	8	PR8を用いる致死量以下の感染

マウスは、42日目に、鼻腔内投与したH1N1 PR8 (<2 LD50)を用いて抗原投与した。体重、生存、およびウイルス量(2および4日目)を分析した。

【0186】

図13において示されるように、HA、NP、M2 + NP、および非致死免疫群は、体重損失から保護された。M2免疫群では、10匹のマウスのうちの6匹は、8日目までに<20%の体重を失った。MVA_{tor}免疫群では、10匹のマウスのうちの10匹は、8日までに<20%の体重を失った。すべての処理および対照群について100%生存していた。

【0187】

さらなる研究において、抗NP免疫応答は、組換えNP (ImGeneX) コートプレートを使用して、ELISAによって試験した。ELISA結果は、1d21 MVA、2d21 MVA、1d21 MVA + NP、2d21 MVA + NP、1d21 MVA - M2eA + MVA - NP、2d21 MVA - M2eA + MVA - NP、1d21非致死H1N1 PR8、および2d21非致死H1N1 PR8について図14に示す。「1d21」は、単一のワクチン接種後に測定した免疫応答を指し、「2d21」は、ワクチン構築物の2回の用量後に測定した免疫応答を指す。これらの結果は、抗NP免疫応答が2回の免疫後に観察されたことを示す。

【0188】

MVA、MVA - HA、MVA - NP、MVA - M2eA、MVA - M2e + NP、またはA/PR/8/34を用いて筋肉内で(IM)免疫したマウスの肺組織におけるウイルス量を、H1N1 PR8ウイルスを用いる抗原投与の2および4日後に測定した。ウイルス量の結果を図15に示す。MVA - HAを用いて免疫した動物は、2日目および4日目の両方で肺の量において2~3 logの低下を有した。結果は、NP + M2を用いて免疫した動物が2日目に肺ウイルス量における2 - logの低下を示したことを示す。しかしながら、NPまたはM2抗原を受けた群のいずれにおいても4日目に肺におけるウイルス複製の有意な減少はなかった。

【0189】

(実施例9)

NPおよびM2で免疫したマウスにおける、致死的な用量のH1N1 PR8抗原投与に対する免疫応答

相応する致死的な用量のインフルエンザ感染(H1N1 Pr8)に対するNP + M2ワクチン接種の効能をマウスにおいて試験した。この研究のためのマウスは、表9において要約されるような保存インフルエンザ抗原を含有するMVA_{tor}ベースのワクチンを用いて、0日目および21日目に鼻腔内で(IN)または筋肉内で(IM)免疫した。

【 0 1 9 0 】

【 表 9 】

表9: 処理群

群	動物		免疫物質
	体重	ウイルス量 (1つの時点当たり)	
1	10	4	PR8 HA
2	10	4	NP
3	10	4	M2
4	10	4	M2-TML
5	10	4	METR-C
6	10	4	METR-S
7	10	4	NP + M2
8	10	4	NP + M2 TML
9	10	4	NP + METR-C
10	10	4	NP + METR-S
11	10	4	MVA _{tor}
12	10	4	PBS

10

20

マウスは、42日目に、鼻腔内投与したH1N1 PR8 (3 LD50) を用いて抗原投与した。赤血球凝集抑制 (HAI) (抗原投与前)、体重、生存、およびウイルス量 (3日目) を分析した。

【 0 1 9 1 】

「PR8」を略称されるインフルエンザA型H1N1 プエルトリコ 8 / 1 9 3 4 は、マウス適応インフルエンザウイルスであり、この研究のためにHAIアッセイにおいて使用した。HAI前に、PR8は、シチメンチョウ赤血球細胞を使用して、赤血球凝集素能力についてアッセイし、その後、HAIを実行するために1mL当たり8赤血球凝集素ユニット (希釈係数1024) の適切な濃度に希釈した。HAIのために、25μLのマウス血清を、37℃で、30分間、75μL受容体破壊酵素 (RDE) と共にインキュベートし、その後に続いて、通常生理食塩溶液において250μLまで希釈し (血清の1 / 10希釈)、使用まで4℃で保存した。

30

【 0 1 9 2 】

血清は、3つまたは4つの血清のプールにおいてHAI手順を使用して試験した。血清 (25μL) は、25μL PBSにおいて連続2倍希釈で希釈し、これに、25μLの希釈インフルエンザウイルスを追加し、室温で30分間、インキュベートした。シチメンチョウ赤血球細胞 (50μL、洗浄し、希釈する) を追加し、室温で60分間、インキュベートし、その後に、赤血球凝集の阻害についての評価を続けた。HAI結果を表10に示す。

40

【 0 1 9 3 】

【表 10】

表10:HAIの結果

群	抗原を示すMVA _{tor} ベクターを用いて 免疫した動物	抗原投与前 (GMT) HAI
1	致死量以下の用量のH1N1	119±528
2	MVA-HA	1092±740
11	PBS	<20
13	MVA _{tor} のみ	<20

N=8マウス/群; <20=検出限界未満

図 16 A および 16 B において示されるように、NP + M2 免疫群は、体重損失から保護された。免疫した群はすべて、死亡から 100% 保護されたが、MVA_{tor} および PBS の対照群は、0% (0/10) の生存をもたらした。

【0194】

さらなる研究において、抗 NP および抗 M2 免疫応答は、それぞれ、組換え NP (Im Genex) および M2 ペプチド #4 (配列番号 4) コートプレートを使用して、ELISA によって試験した。抗 NP ELISA 結果は、Cons NP、Pr8 M2 + Cons NP、Pr8 M2 e - TML + Cons NP、METR - C + Cons NP、および METR - S + Cons NP について図 17 に示す。抗 M2 ELISA 結果は、M2、M2 - TML、METR - C、METR - S、M2 + NP、M2 - TML + NP、METR - C + NP、および METR - S + NP について図 18 に示す。これらの結果は、抗 NP および抗 M2 免疫応答が、ワクチン接種した動物において生成されたことを示す。

【0195】

PBS IN、MVA_{tor}、NP、M2、M2 e - TML、METR - C、METR - S、HA、および致死量以下の PR8 IN を用いて鼻腔内で (IN) または筋肉内で (IM) 免疫したマウスの肺組織におけるウイルス量は、抗原投与の 3 日後に H1N1 PR8 ウイルスを用いて測定した。ウイルス量の結果を図 19 に示す。これらの結果は、NP、M2、M2 e - TML、METR - C、および METR - S を用いて鼻腔内で免疫した動物が、肺におけるウイルス複製から部分的に保護されたことを示す。筋肉内 NP または M2 抗原を受けた群において肺におけるウイルス複製の有意な減少はなかった。

【0196】

(実施例 10)

NP、M2、および M1 で免疫したマウスにおける致死的な用量の H1N1 プタの抗原投与に対する免疫応答

相同で致死的な用量のインフルエンザ感染 (sH1N1 A/Mx/4108/09) に対する NP + M2 + M1 ワクチン接種の効能をマウスにおいて試験した。この研究のためのマウスは、表 11 において要約されるような保存インフルエンザ抗原を含有する MVA_{tor} ベースのワクチンを用いて、0 日目および 21 日目に筋肉内で免疫した。

【0197】

10

20

30

40

【表 1 1】

表11:処理群

群	動物		免疫物質
	体重	ウイルス量 (1つの時点当たり)	
1	10	5	Flulaval (2010 TIV)
2	10	5	NP + METR-C + M1
3	10	5	NP + M2 + M1
4	10	5	NP + M2
5	10	5	M1
6	10	5	NP + M1
7	10	5	MVAtor
8	10	5	PBS

10

マウスは、42日目に、鼻腔内投与した s H 1 N 1 A / M x / 4 1 0 8 / 0 9 (約 2 0 L D 5 0) を用いて抗原投与した。赤血球凝集抑制 (H A I) (抗原投与前) 、体重、生存、およびウイルス量 (2 および 4 日目) を分析した。

【 0 1 9 8 】

H A I アッセイは、実施例 9 において上記に記載されるように実行した。H A I 結果を表 1 2 に示す。

【 0 1 9 9 】

20

【表 1 2】

表12:HA1の結果

群—Flulaval 動物#	California/07/09 (汎発流行H1N1) 39日目	Mexico/4108/09 (汎発流行H1N1) 39日目
2081	160	80
2082	160	80
2083	160	80
2084	80	40
2085	80	40
2086	40	20
2087	160	80
2088	80	40
2029	80	40
2090	80	80
2091	160	40
2092	320	80
2093	160	80
2094	80	40
2095	80	40
2201	160	80
2202	80	40
2203	160	40
幾何平均 (±SD)	113 (±65)	52 (±23)
	CDCフェレット参照 (A/Ca/04/09) 6400	CDCフェレット参照 (A/Ca/04/09) 1600

Flulaval用量をマウス：150 μ L、IM（3つのウイルスのそれぞれについて4.5 μ g HA）；ヒト用量：500 μ L、IM（3つのウイルスのそれぞれについて15 μ g HA）に与えた。群1（Flulaval）および群8（PBS）についてあらかじめ採血した試料はすべて、検出限界未満（<20）であった。群8（PBS）についての39日目（抗原投与前）の試料はすべて、両方のH1N1汎発流行ウイルスについて検出限界未満であった。

【0200】

図20Aにおいて示されるように、NP+M2免疫処置は、体重損失から保護した。しかしながら、M1がNP+M2に追加された場合、有意なさらなる有益性は観察されなかった。図20Bは、ワクチン接種したマウスについての生存結果を示す。この研究について生存結果を下記表13に示す。

【0201】

【表 13】

表13:生存結果

免疫群	生存%
Flulaval	100% (8/8)
M1+NP+METRC	100% (8/8)
M1+NP+M2	100% (8/8)
M2+NP	100% (8/8)
M1	38% (3/8)
M1+NP	88% (7/8)
MVAtor	13% (1/8)
PBS	25% (2/8)

10

これらの結果は、M1 + NP + M2 および M1 + NP + METRC を受けた群における死亡が PBS の群よりも有意に ($p = 0.0035$) 低かったことを示す。

【0202】

さらなる研究において、抗NPおよび抗M2免疫応答は、それぞれ、組換えNP (EPDU) およびM2ペプチド#4 (配列番号4) コートプレートを使用して、ELISAによって試験した。抗NPおよび抗M2 ELISA結果は、PBS、MVAtor、M1 + NP + METRC、M1 + NP + M2、M2 + NP、M1、M1 + NP、およびFlulavalについて図21に示す。これらの結果は、ワクチン接種が強力な抗NPおよび抗M2免疫応答を誘発したことを示す。

20

【0203】

抗M1および抗MVA免疫応答は、それぞれ、組換えM1およびMVA CT84 コートプレートを使用して、ELISAによって試験した。抗M1および抗MVA ELISA結果は、PBS、MVAtor、M1 + NP + METRC、M1 + M2 + NP、M2 + NP、M1、M1 + NP、およびFlulavalについて図22A ~ Bに示す。これらの結果は、ワクチン接種が抗M1免疫応答を誘発しなかったことを示す。

30

【0204】

PBS、MVAtor、M1 + NP + METRC、M1 + NP + M2、M2 + NP、M1、M1 + NP、およびFlulavalを用いて筋肉内で(IM)免疫したマウスの肺組織におけるウイルス量は、sH1N1 A/Mx/4108/09ウイルスを用いる抗原投与の2および4日後に、測定した。肺におけるウイルス複製の結果を図23に示す。結果は、試験したワクチンが、肺におけるウイルス複製を低下させなかったことを示す。

【0205】

PBS、MVAtor、M1 + NP + METRC、M1 + NP + M2、M2 + NP、M1、M1 + NP、およびFlulavalを用いて筋肉内で(IM)免疫したマウスの鼻甲介におけるウイルス量は、sH1N1 A/Mx/4108/09ウイルスを用いる抗原投与の2および4日後に測定した。肺におけるウイルス複製の結果を、図24に示す。結果は、すべてのワクチン接種した群における鼻甲介におけるウイルス量の部分的な低下を示す。ワクチンへのM1の追加は、鼻甲介におけるウイルス量の低下を増加させなかった。

40

【 図 1 】

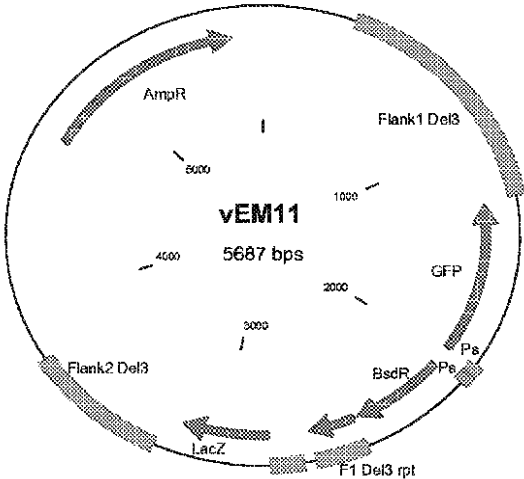


FIG. 1

【 図 2 A - F 】

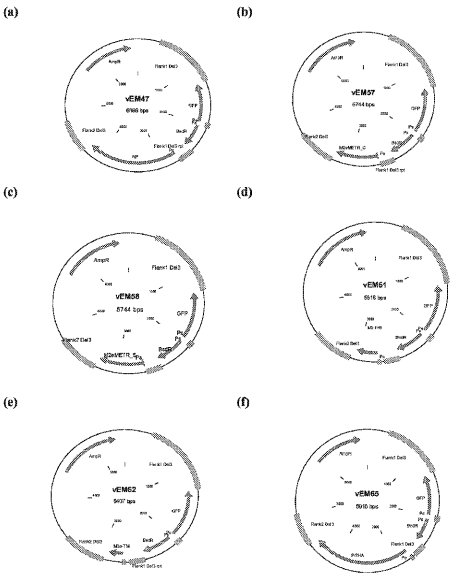


FIG. 2A-F

【 図 3 A - B 】

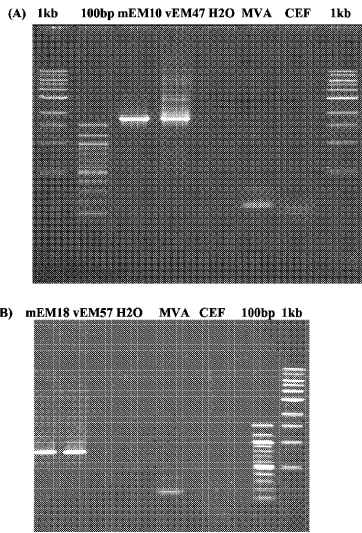


FIG. 3A-B

【 図 3 C - D 】

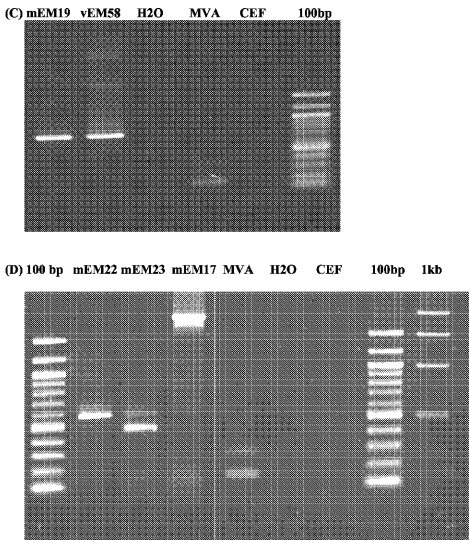


FIG. 3C-D

【 図 5 】

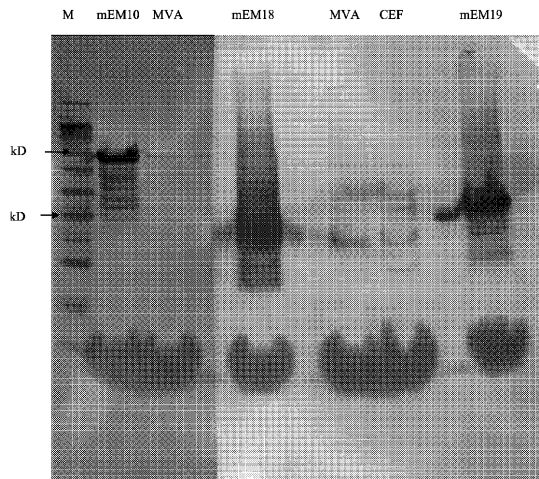


FIG. 5

【 図 2 1 】

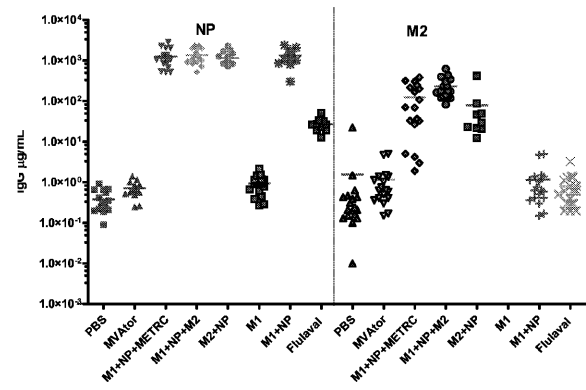


FIG. 21

【 図 4 】

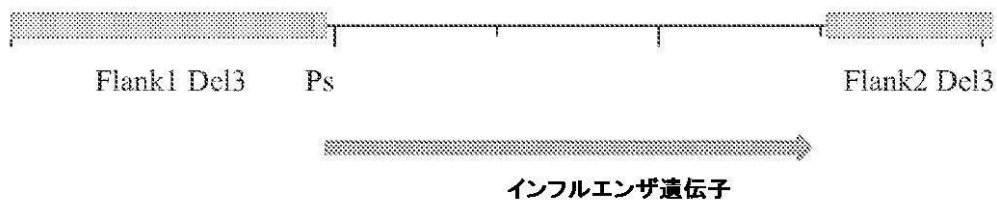


FIG. 4

【 図 6 】

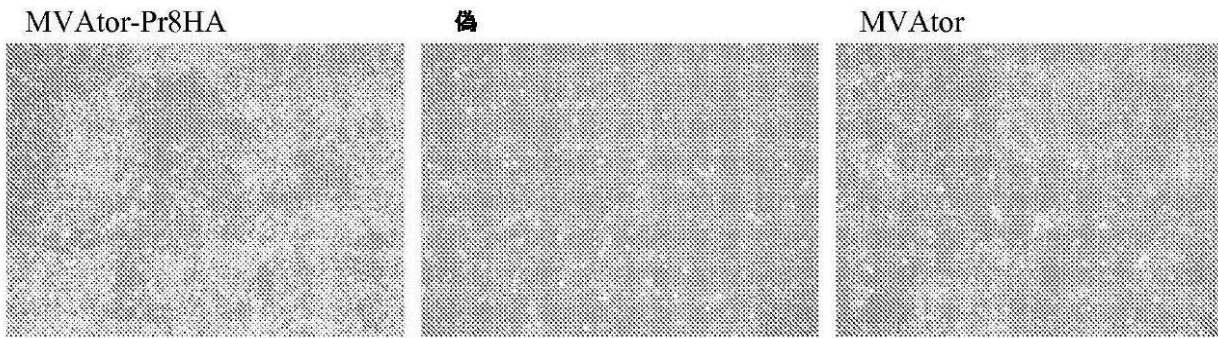


FIG. 6

【 図 7 】

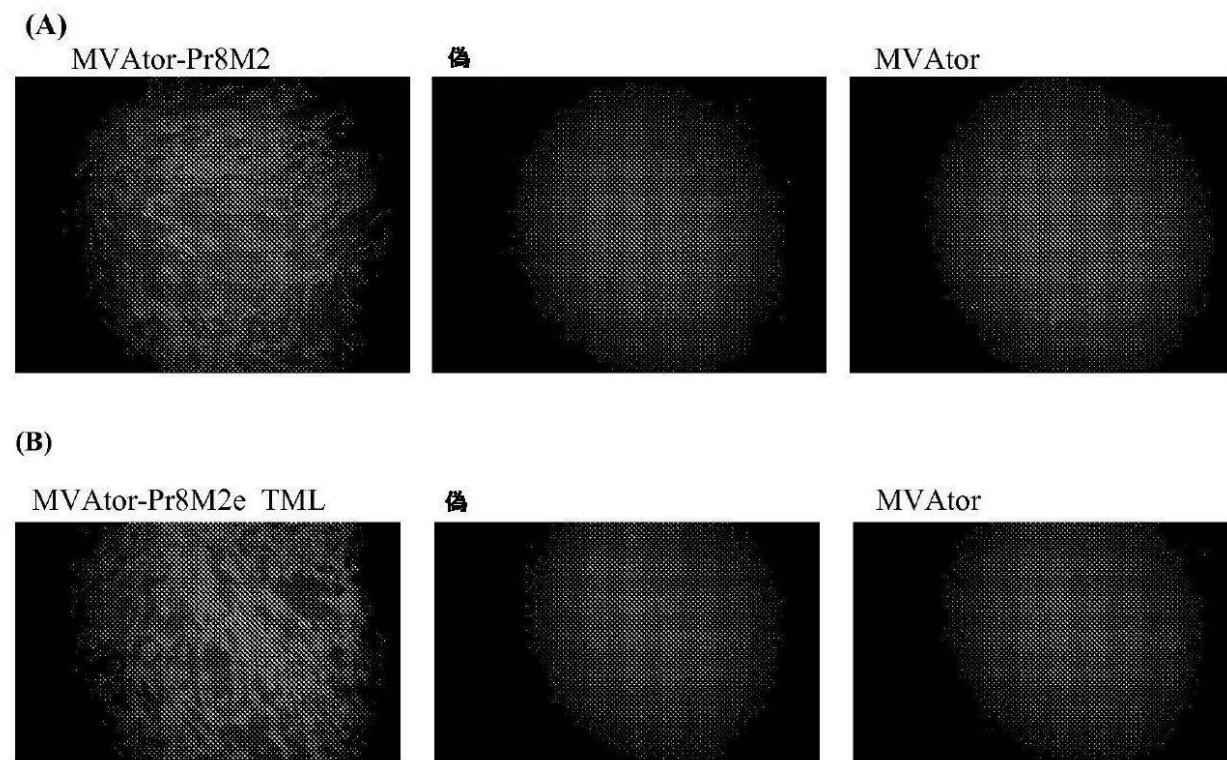


FIG. 7A-B

【 図 8 】

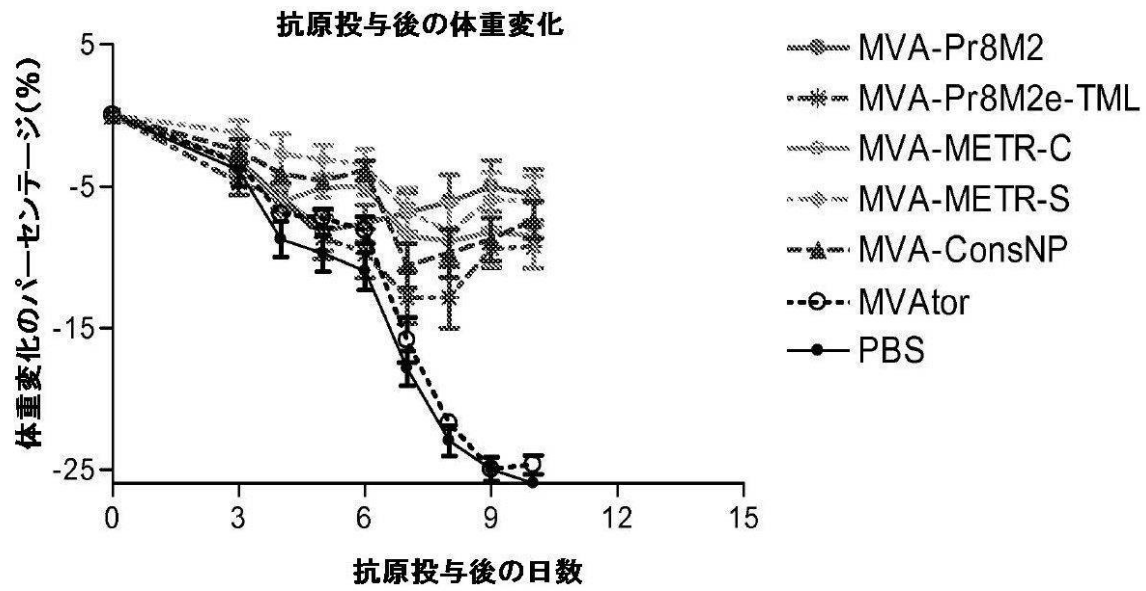


FIG. 8

【 図 9 】

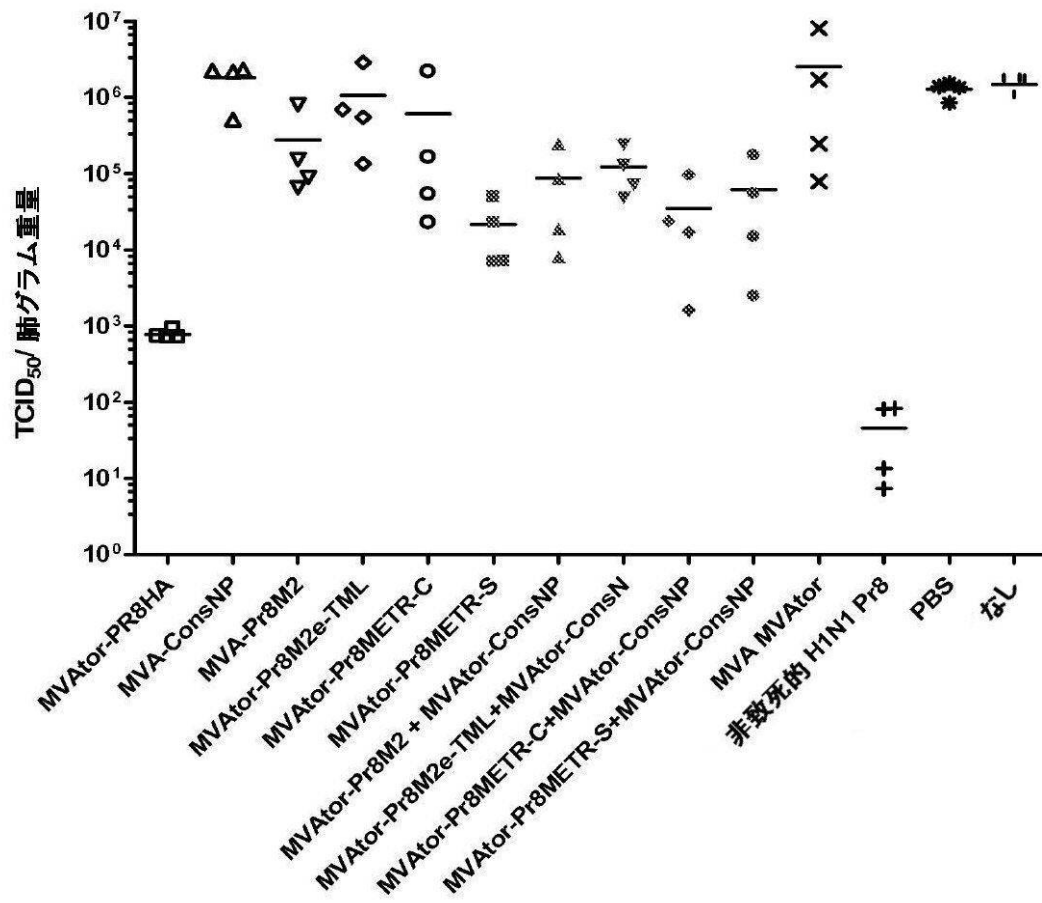


FIG. 9

【図 10】

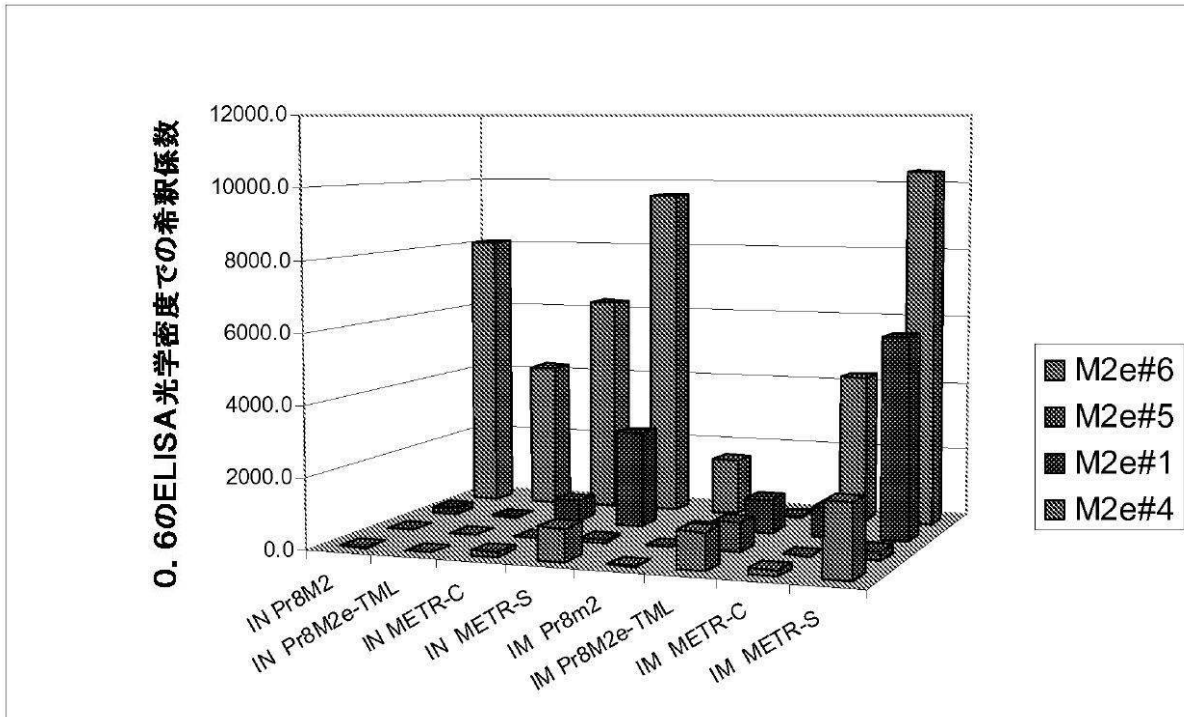
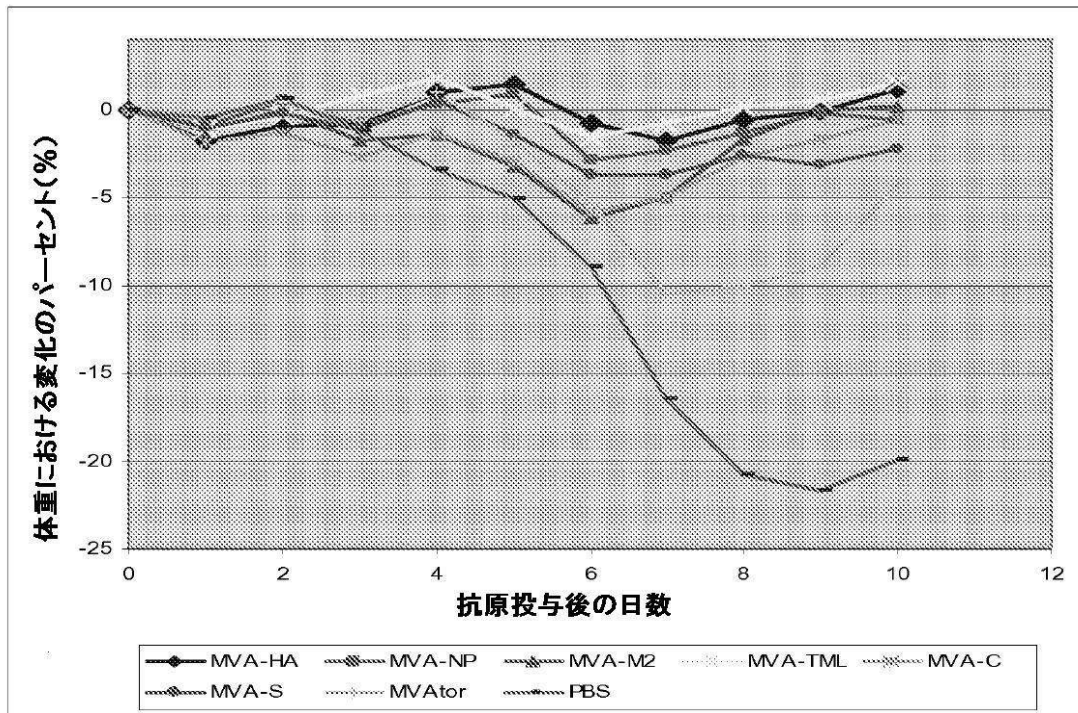


FIG. 10

【図 1 1】

(A) 鼻腔内送達



(B) 筋肉内送達

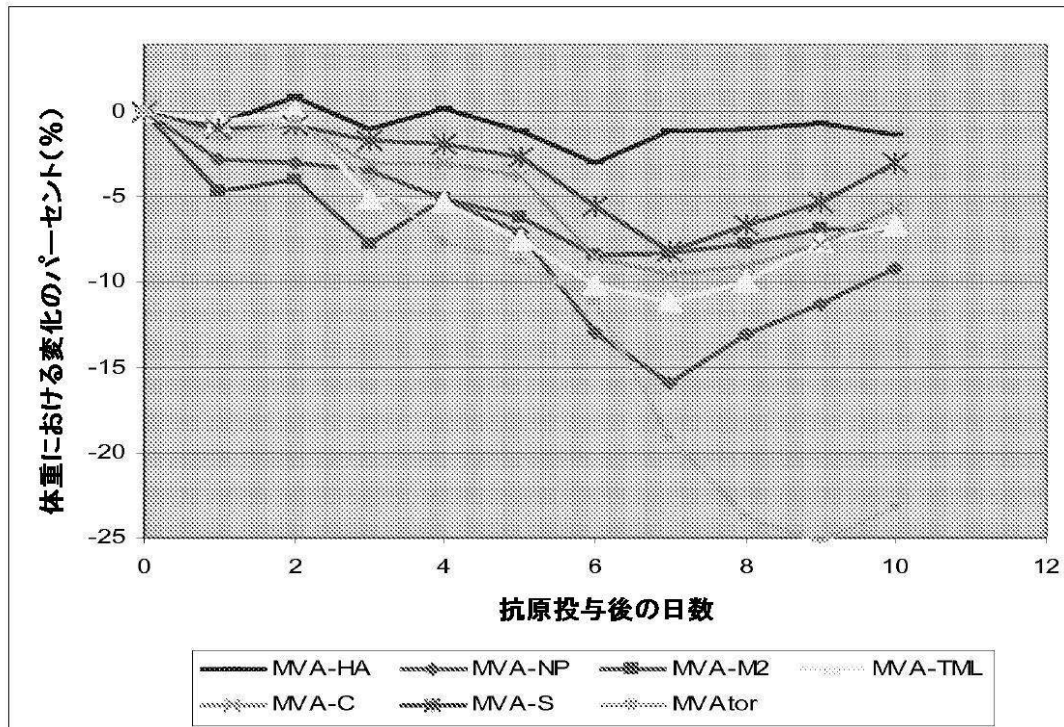


FIG. 11A-B

【図 12】

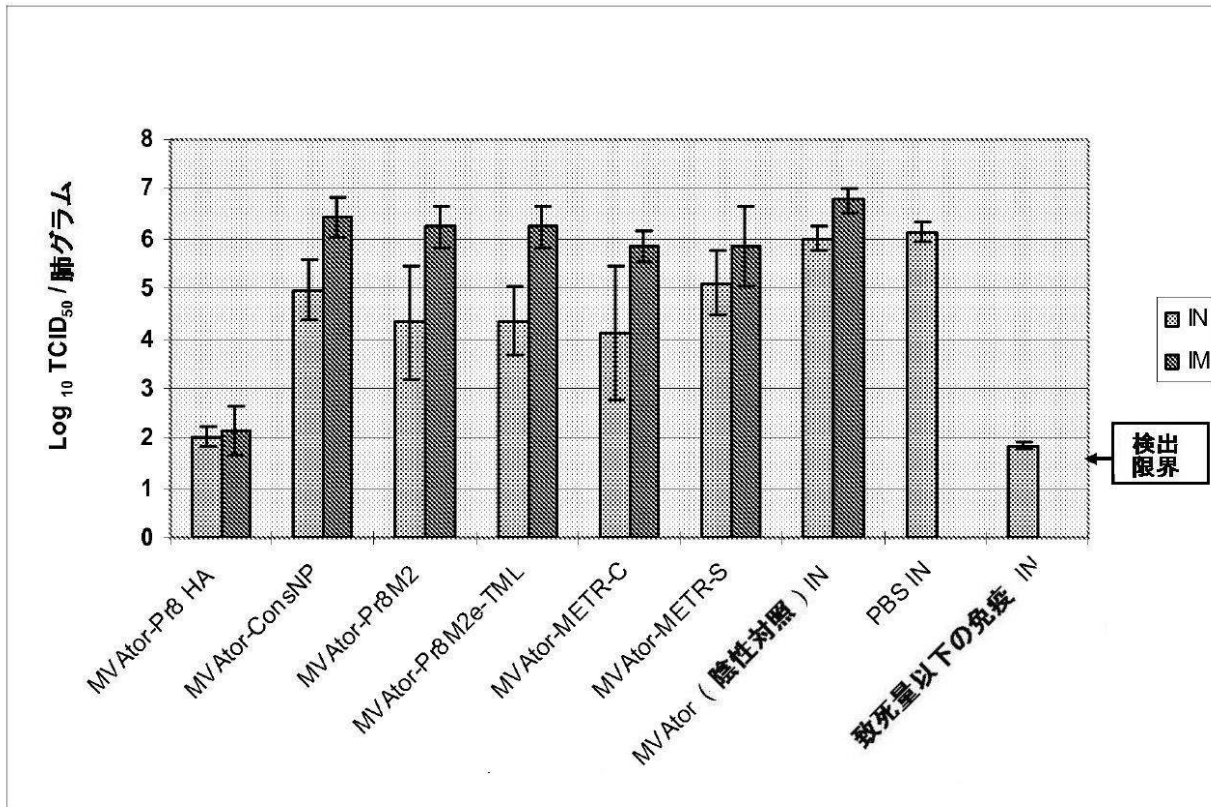


FIG. 12

【図 13】

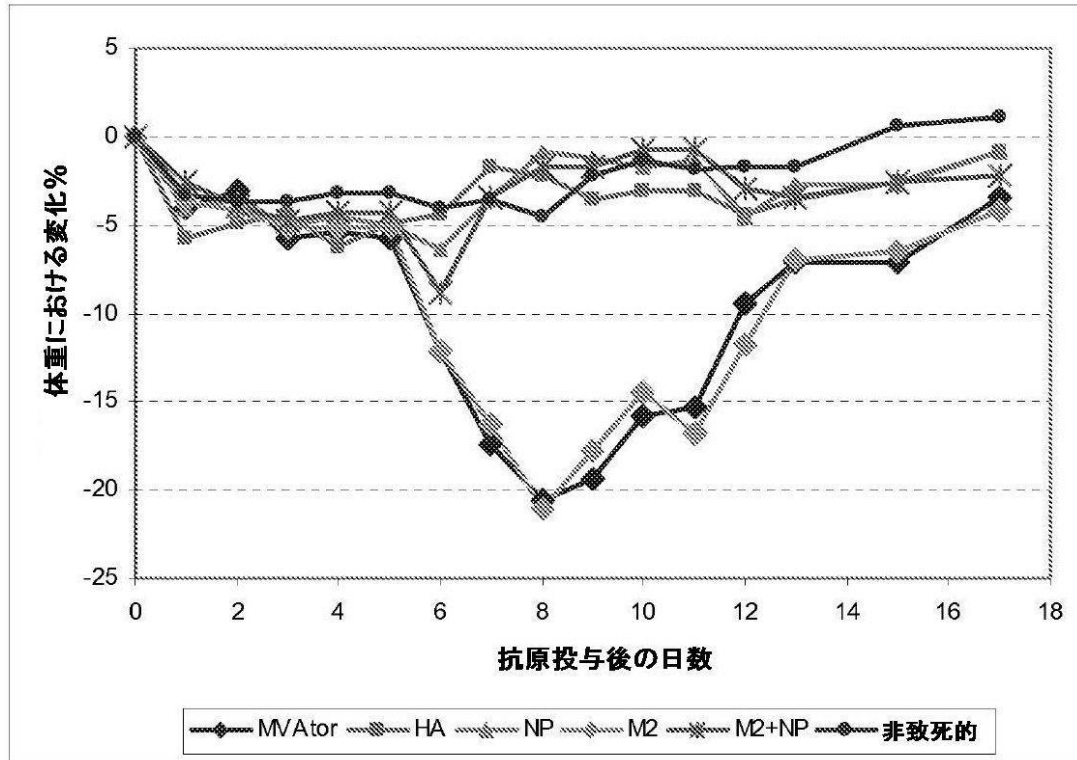


FIG. 13

【 図 1 4 】

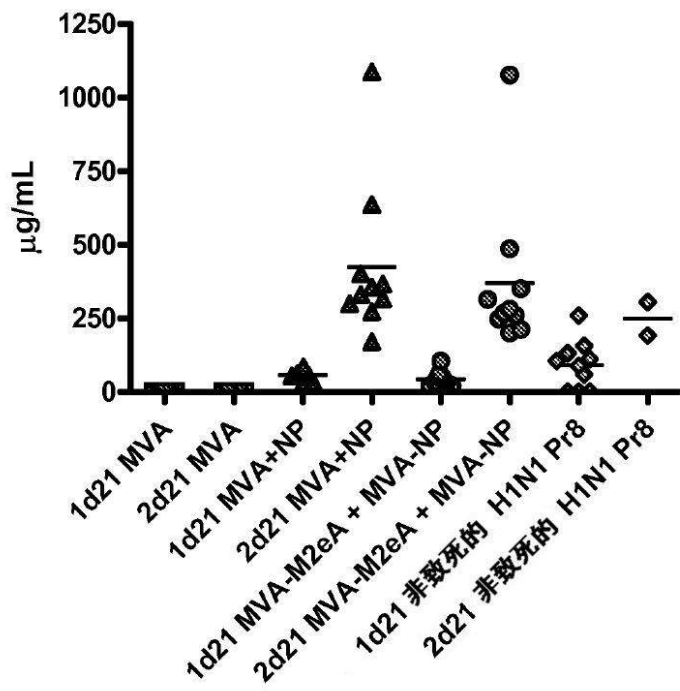


FIG. 14

【図 15】

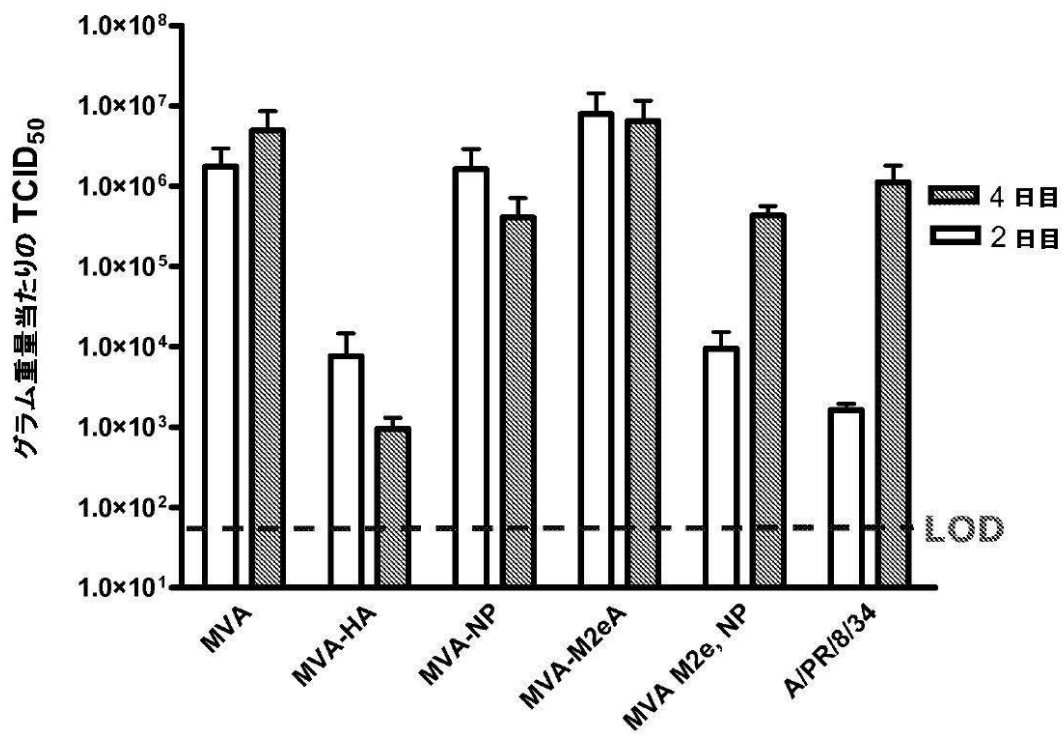


FIG. 15

【図 16 A】

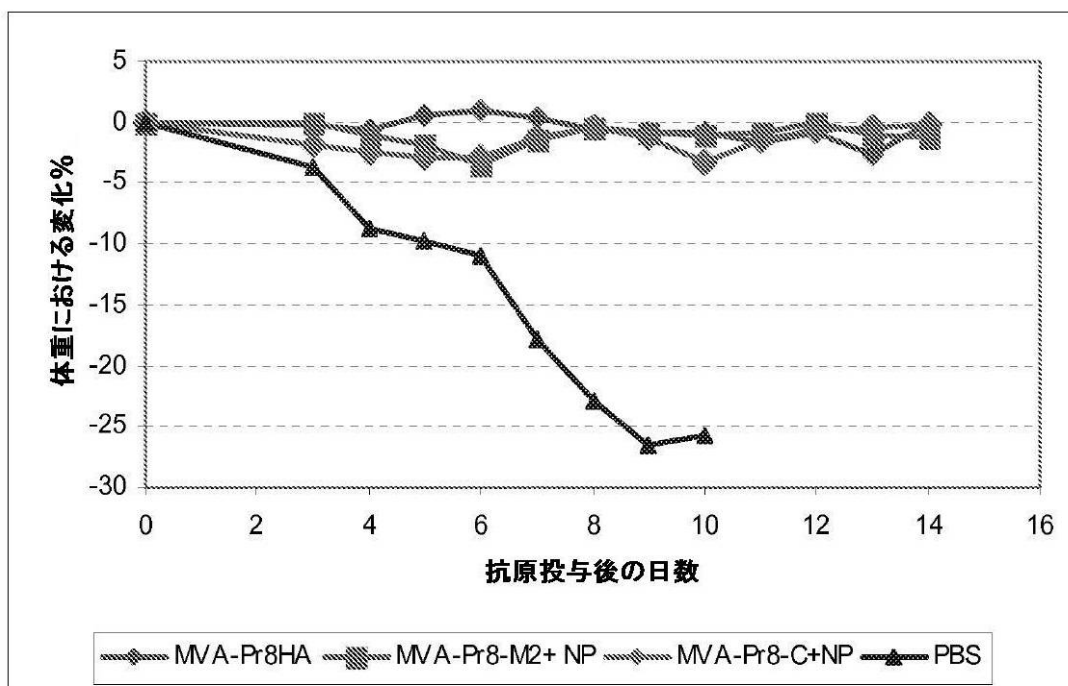


FIG. 16A

【図 16 B】

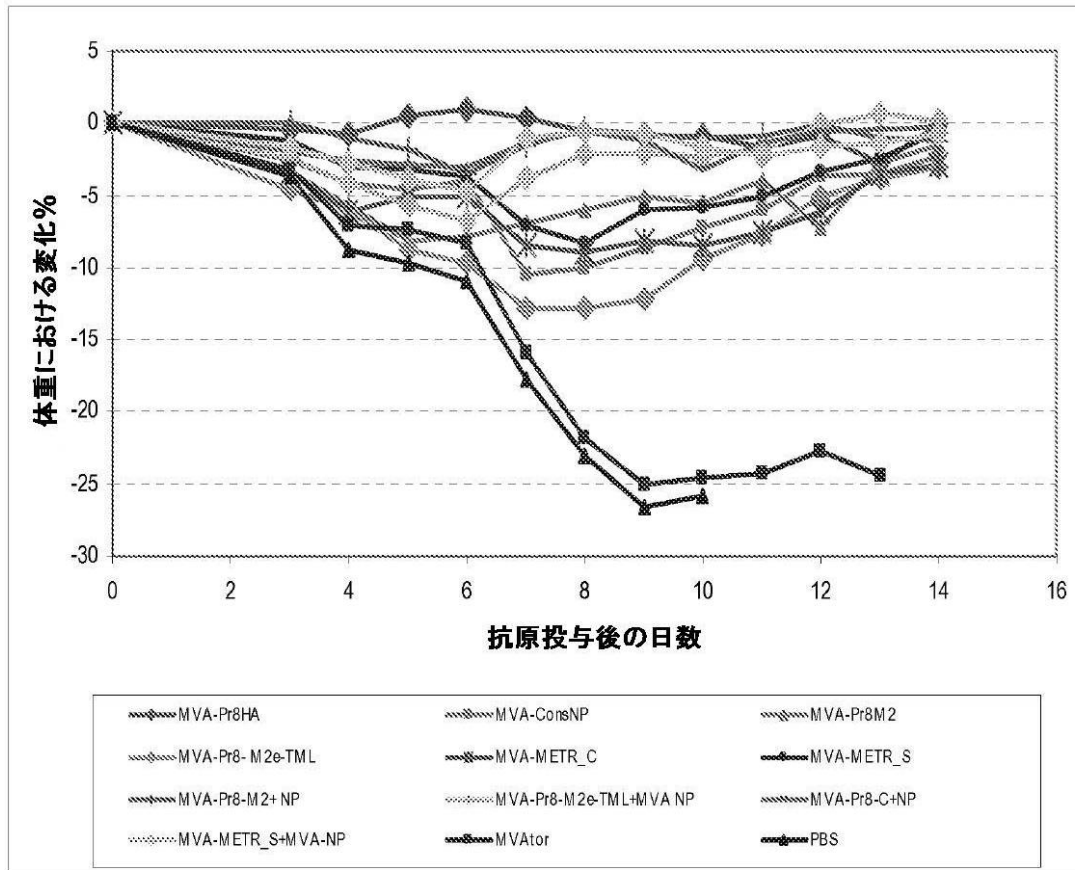


FIG. 16B

【 図 17 】

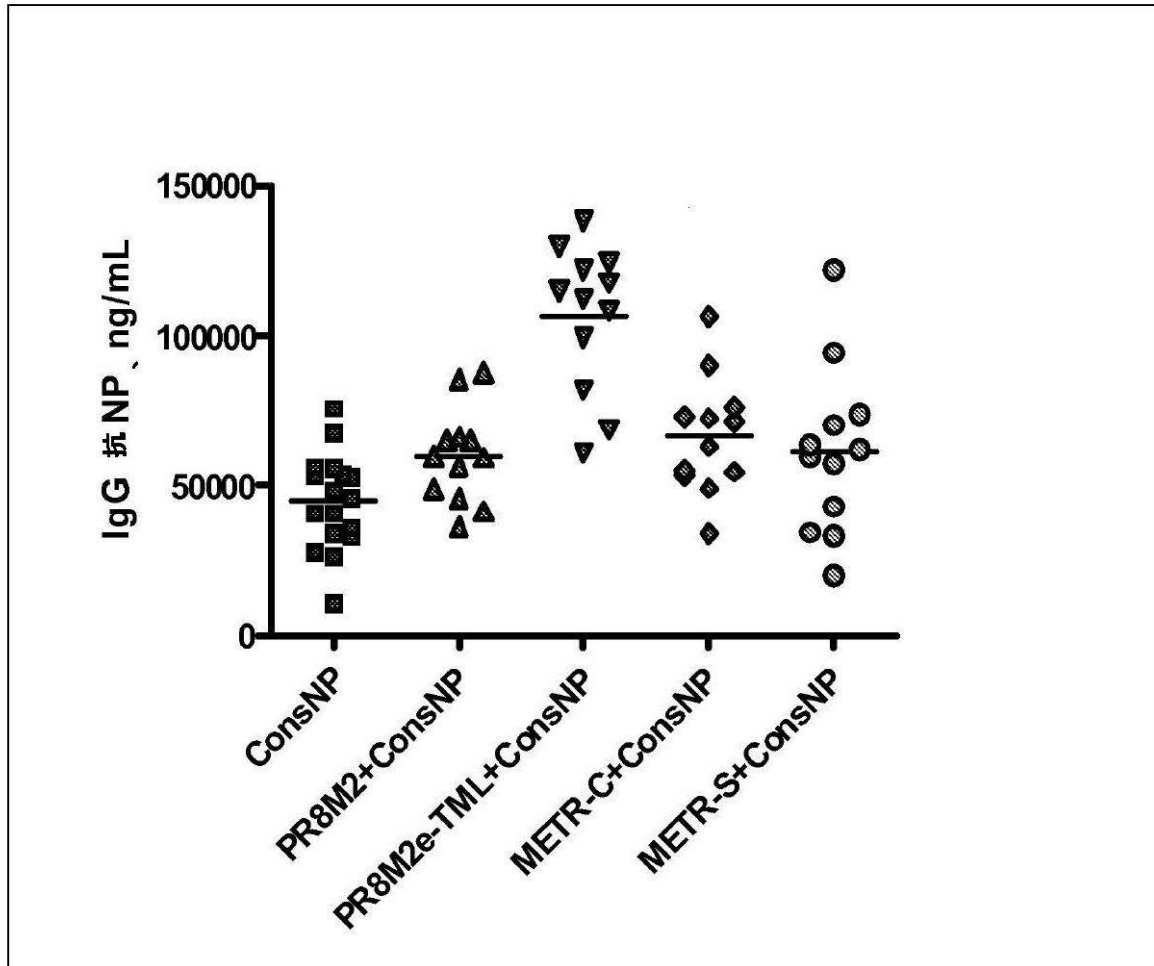


FIG. 17

【図 18】

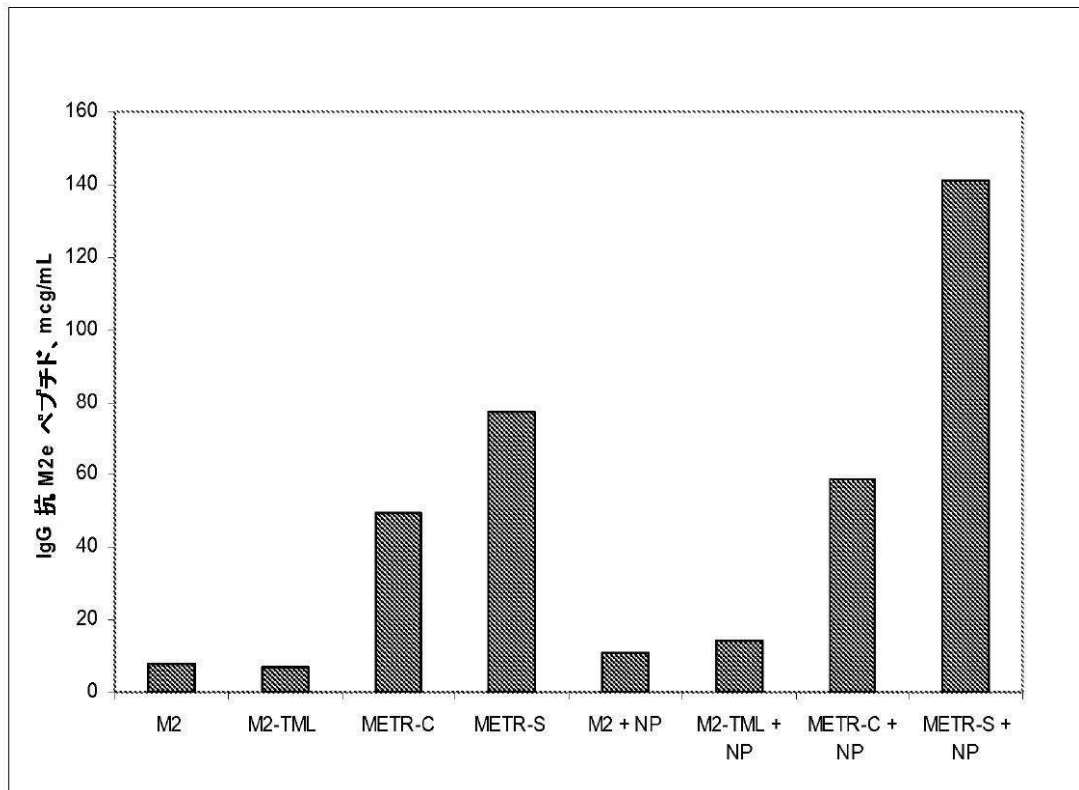


FIG. 18

【図 19】

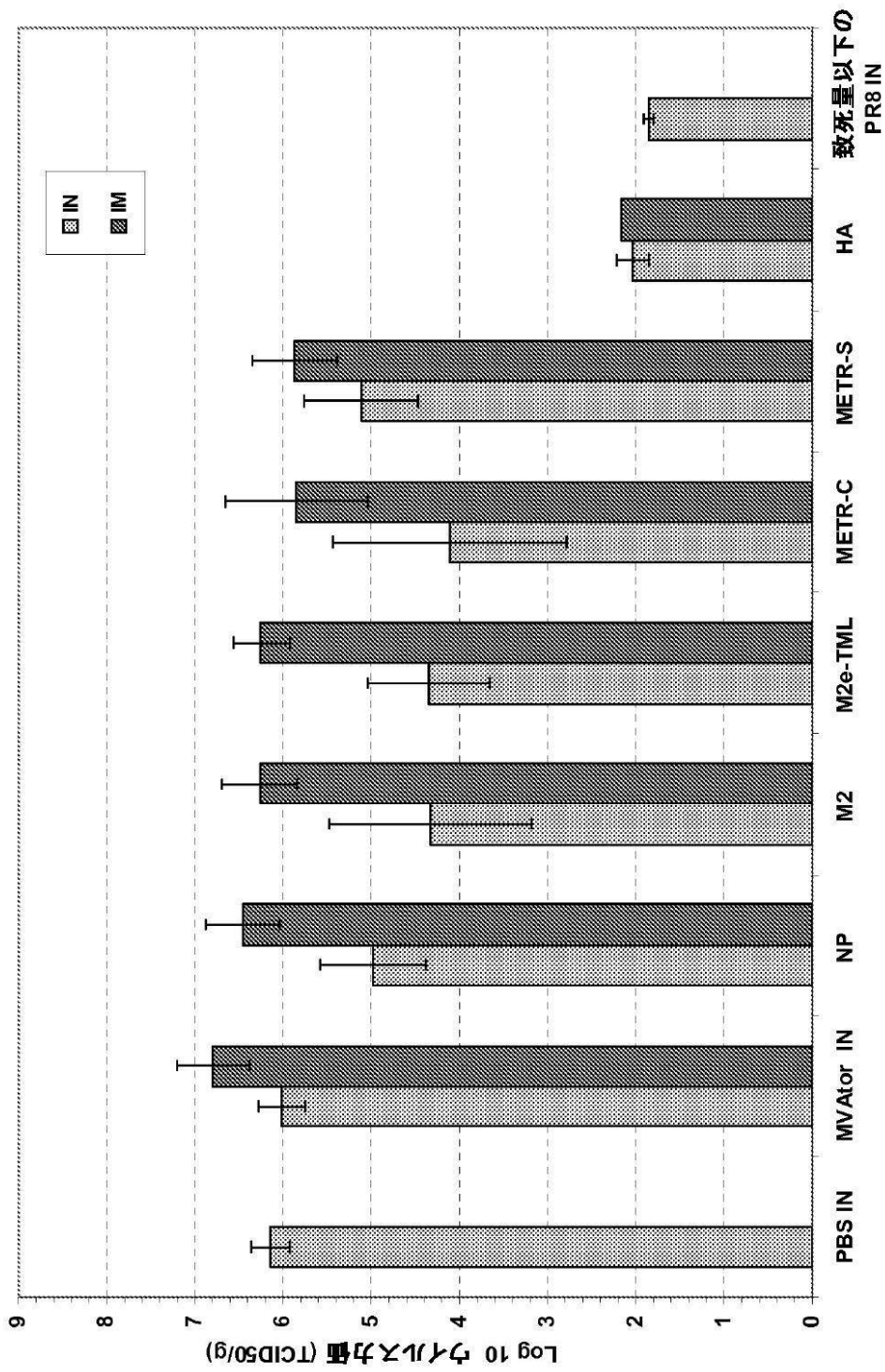


FIG. 19

【図 20A】

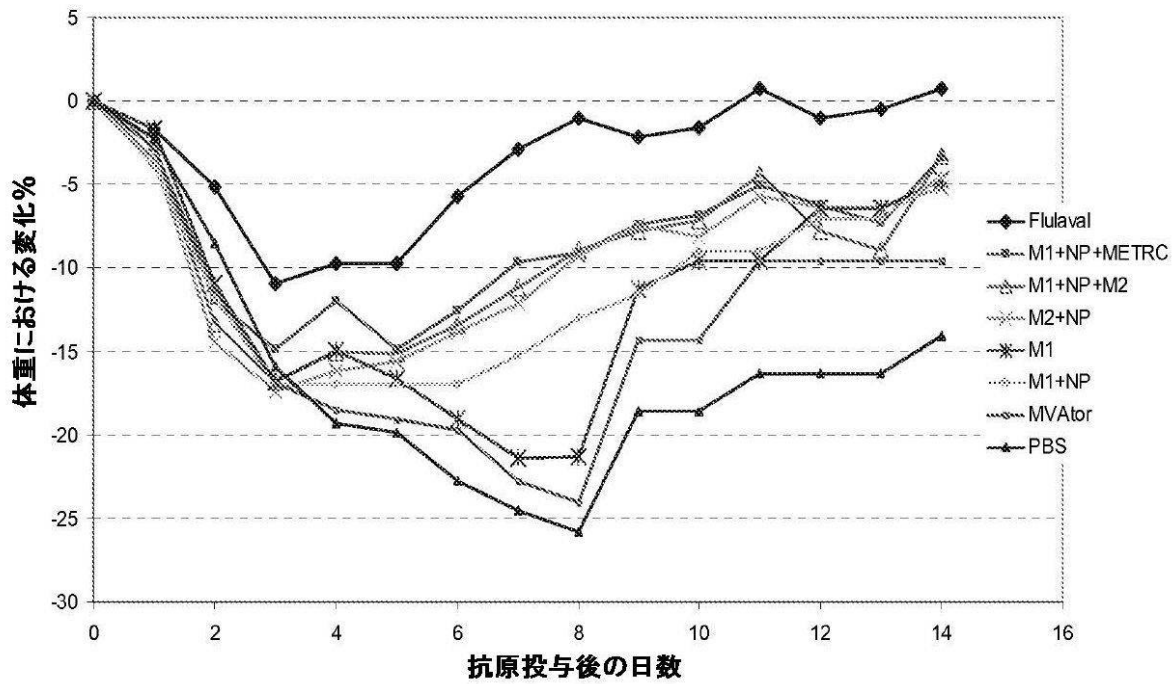


FIG. 20A

【図 20B】

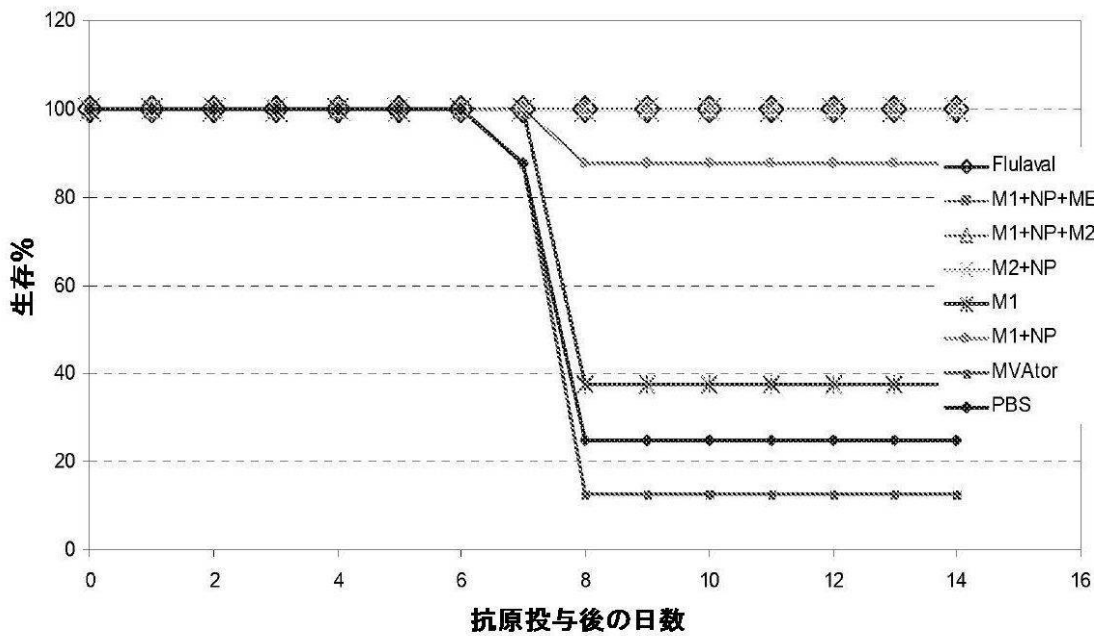


FIG. 20B

【図 2 2 A】

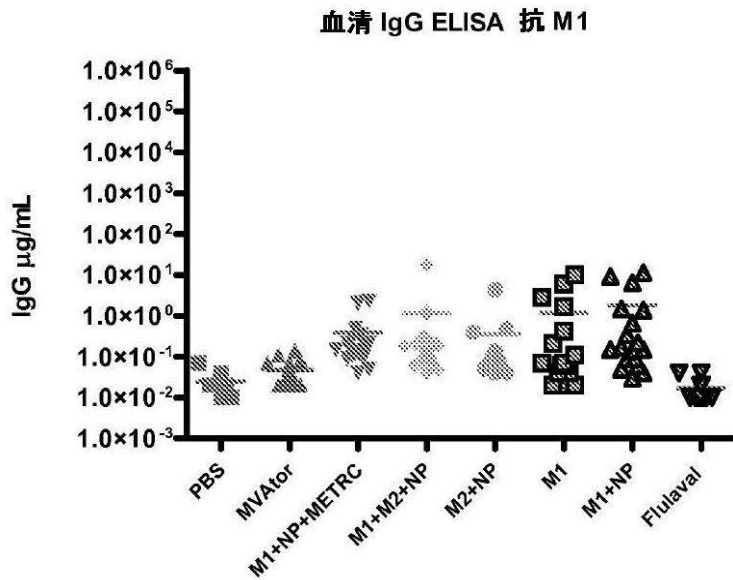


FIG. 22A

【図 2 2 B】

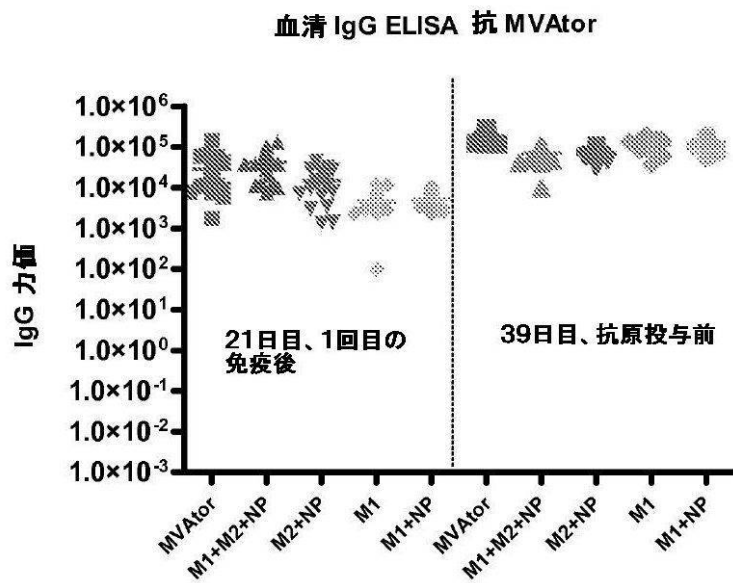


FIG. 22B

【図 23】

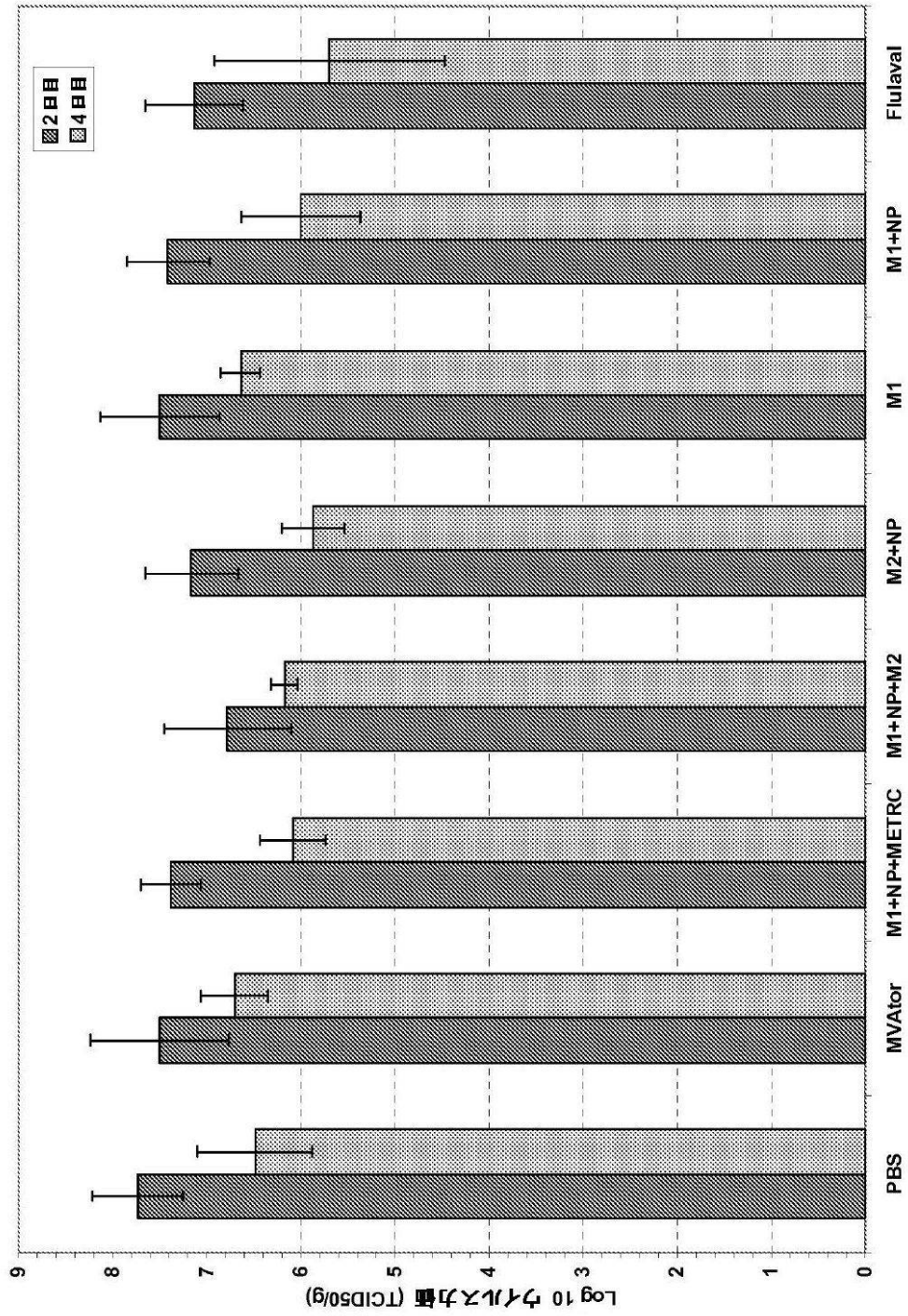


FIG. 23

【 図 2 4 】

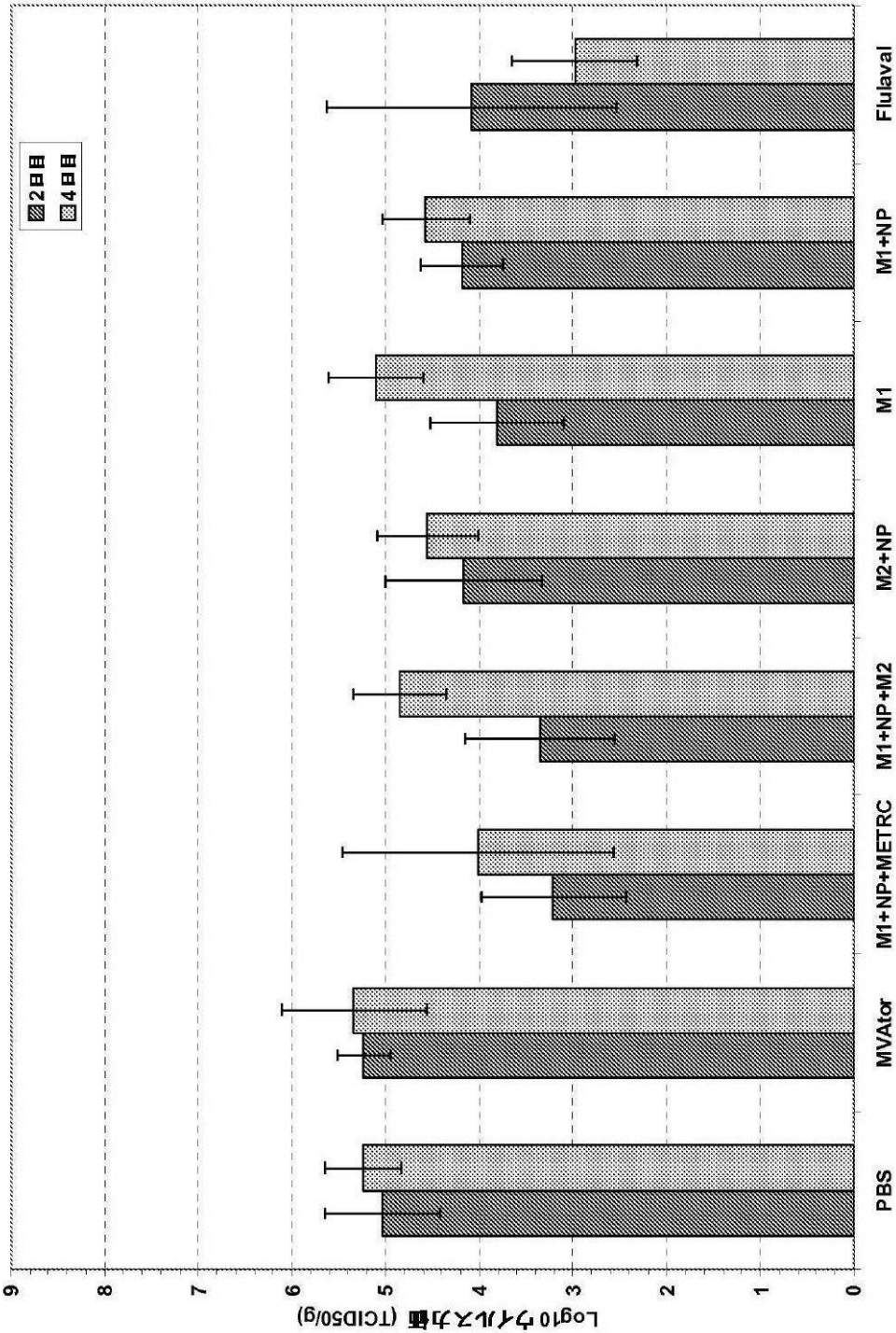


FIG. 24

【 配 列 表 】

2013523096000001 . app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/30205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 48/00 (2011.01)

USPC - 536/23.72

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)

IPC(8) - A61K 48/00 (2011.01)

USPC - 536/23.72; 424/209.1; 514/44R

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

IPC(8) - A61K 48/00 (2011.01) - see keyword below

USPC - 536/23.72; 424/209.1; 514/44R - see keyword below

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

PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Medline, Google: isolated, polynucleotide, nucleotide, construct, cassettes, vector, nucleic acid, coding region, encoding, polypeptide, expressing, five, three, influenza virus Matrix 2 protein, M2a, ectodomain peptides, serine substitution, external domain, M2-based, human, avian, strain, H1N1, H5N1, H3N2, A, B, mixt

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/0162400 A1 (POWELL et al.) 25 June 2009 (25.06.2009), para [0033], [0087], [0108], [0117], [0154], [0182], [0195], [0242], [0326], [0359], Table 1, and SEQ ID NOs: 13, 39, 40, 43, 44, 47, and 54	1-6
A	SCHOTSAERT et al. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. Expert Rev Vaccines. 2009, Vol. 8(4), p. 499-508. PDF file: Abstract, pg 3, para 1; pg 4, last para; and Table 1	1-6
A	TOMPKINS et al. Matrix Protein 2 Vaccination and Protection against Influenza Viruses, Including Subtype H5N1. Emerg Infect Dis. 2007, Vol. 13(3), p. 426-35. Abstract; and pg 429, Table	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.


* 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

04 May 2011 (04.05.2011)

Date of mailing of the international search report

17 MAY 2011

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/30205

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7-98
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02		4 C 0 8 6
A 6 1 P 31/16 (2006.01)		A 6 1 P 31/16		4 C 0 8 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1	4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/76 (2006.01)		A 6 1 K 35/76		
A 6 1 K 35/44 (2006.01)		A 6 1 K 35/44		
A 6 1 K 35/48 (2006.01)		A 6 1 K 35/48		
A 6 1 K 39/39 (2006.01)		A 6 1 K 39/39		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	S	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088		
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)		A 6 1 K 31/7105		
A 6 1 K 31/713 (2006.01)		A 6 1 K 31/713		
A 6 1 K 39/145 (2006.01)		A 6 1 K 39/145		

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

(72)発明者 ガイナ , ティナ
アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 9 0 2 , シルバー スプリング , バリー アベニュー
1 0 4 0 7

(72)発明者 レイシー , マイケル
アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 2 , ダマスкас , リッジ ロード 2 6 9 4 6

(72)発明者 スキアドポロス , マリオ
アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 4 , ポトマック , アクエダクト ロード 8 3 0 3

(72)発明者 ミトル , ニュータン
アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 8 , ゲイザーズバーグ , ダルネスタウン ロード
1 3 3 0 3 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 DA02 EA02 FA01 GA11 HA03
4B064 AG32 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90X AA95Y AB01 BA02 CA45
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA18 BA23 CA53 MA02 NA14
ZB331 ZC752
4C085 AA03 AA04 BA55 CC21 CC22 CC23 CC32 DD86 EE03 EE06
FF01 FF17
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 NA14 ZB21 ZB33 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB56 BB57 BC83 CA12 MA02 NA14 ZB33 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 DA86 EA31 FA74