

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-525697
(P2024-525697A)

(43)公表日 令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12		4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全85頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-501558(P2024-501558)		(71)出願人	510000976	
(86)(22)出願日	令和4年7月12日(2022.7.12)			インターベット インターナショナル ベー・フェー・	
(85)翻訳文提出日	令和6年3月8日(2024.3.8)			オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベル	
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/069513			ストラート・3 5	
(87)国際公開番号	WO2023/285489		(74)代理人	100114188	
(87)国際公開日	令和5年1月19日(2023.1.19)			弁理士 小野 誠	
(31)優先権主張番号	21185334.6		(74)代理人	100119253	
(32)優先日	令和3年7月13日(2021.7.13)			弁理士 金山 賢教	
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		(74)代理人	100124855	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く		(74)代理人	100129713	
			(74)代理人	100137213	
				最終頁に続く	

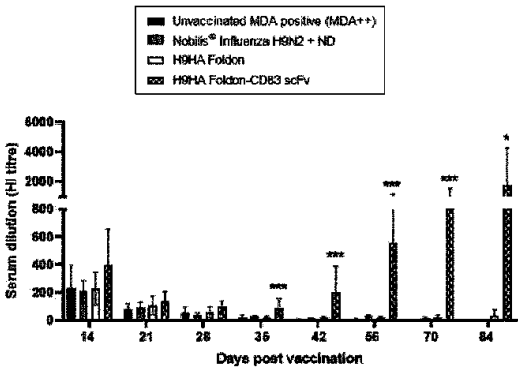
(54)【発明の名称】 鳥類における抗体干渉の克服

(57)【要約】

本発明は、血清陽性鳥類のワクチン接種に使用することができ、それによって鳥類標的中の抗体がその組換えタンパク質に含まれる抗原に特異的である、組換えタンパク質、及びそのタンパク質を発現する組換えベクターを提供する。組換えタンパク質に、鳥類抗原提示細胞（APC）上の細胞表面タンパク質に結合することができるドメインも含めることによって、抗原はそれらのAPCに標的化される。この種のワクチンは、単回投与後であっても、非常に若い鳥類であっても、抗体レベルが非常に高い状況であっても、抗体干渉の悪影響を安全に克服することができることが分かった。

【選択図】 図 3

Figure 3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原と反応性である抗体を保有する鳥類を、前記抗原が由来する病原体から保護する方法において使用するための、前記抗原と、鳥類抗原提示細胞（APC）上の細胞表面タンパク質に結合することができる結合ドメインとを含む組換えタンパク質。

【請求項 2】

前記鳥類 APC が樹状細胞であることを特徴とする、請求項 1 に記載の使用のための組換えタンパク質。

【請求項 3】

前記細胞表面タンパク質が CD83 であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の使用のための組換えタンパク質。

【請求項 4】

前記結合ドメインが一本鎖可変断片（scFv）であることを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の使用のための組換えタンパク質。

【請求項 5】

前記抗原が、感染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV）ウイルスタンパク質 2（VP2）、ニューカッスル病ウイルス（NDV）融合（F）タンパク質、NDV ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ（HN）タンパク質、感染性気管支炎ウイルス（IBV）スパイクタンパク質、鳥インフルエンザウイルス（AIV）ヘマグルチニン（HA）タンパク質、及び AIV ノイラミニダーゼ（NA）タンパク質から選択されることを特徴とする、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の使用のための組換えタンパク質。

【請求項 6】

前記抗原が、配列番号 7、8 及び 9 から選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の使用のための組換えタンパク質。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組換えタンパク質を発現することができる組換えベクターであって、前記組換えベクターによって発現される組換えタンパク質に含まれる抗原と反応性の抗体を保有する鳥類を、前記抗原が由来する病原体から保護する方法で使用するための組換えベクター。

【請求項 8】

病原体から鳥類を保護するためのワクチンの製造のための、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組換えタンパク質の使用又は請求項 7 に記載の組換えベクターの使用であって、前記組換えタンパク質に含まれるか、又は前記組換えベクターによって発現される組換えタンパク質に含まれる抗原が前記病原体に由来し、前記鳥類が、前記抗原と反応性の抗体を保有することを特徴とする使用。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組換えタンパク質又は請求項 7 に記載の組換えベクターと、薬学的に許容される担体とを含むワクチンであって、前記組換えタンパク質に含まれるか、又は前記組換えベクターによって発現される組換えタンパク質に含まれる抗原と反応性の抗体を保有する鳥類を、前記抗原が由来する病原体から保護する方法で使用するためのワクチン。

【請求項 10】

アジュバントを含むことを特徴とする、請求項 9 に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 11】

病原体から鳥類を保護するための、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組換えタンパク質、又は請求項 7 に記載の組換えベクター、又は請求項 9 若しくは 10 に記載のワクチンの使用であって、前記組換えタンパク質に含まれるか、又は前記組換えベクターによって発現される組換えタンパク質に含まれる抗原が前記病原体に由来し、前記鳥類が、前記抗原と反応性の抗体を保有することを特徴とする使用。

【請求項 12】

病原体から鳥類を保護するための方法であって、請求項 9 又は 10 に記載のワクチンを前記鳥類に投与する工程を含み、前記ワクチンに含まれる抗原が前記病原体に由来し、前記鳥類が、前記抗原と反応性の抗体を保有する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、鳥類のワクチン接種の分野に関し、より具体的には、本発明は、鳥類を保護する方法に使用するための組換えタンパク質であって、当該タンパク質中の抗原と反応性の抗体を有する組換えタンパク質に関する。具体的には、本発明は、当該方法で使用するための組換えタンパク質、組換えベクター、及びワクチンに関する。更に、本発明は、タンパク質、ベクター又はワクチンの投与による鳥類の治療のための使用及び方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

栄養価が高く手頃な価格のタンパク質源として、鳥類の肉及び卵は、世界のほとんどのヒト集団の食事の重要な部分である。そのような経済目的で飼育される家禽の主な種は、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル及びガチョウである。これらの鳥を、それらの健康と望ましい生活状態を維持しながら、必要とされる大量の鳥を飼育するために、養鶏業界は管理条件を最適化し、良好な獣医学的ケアを提供することに熱心である。この戦略の重要な部分は、感染症及び疾患を引き起こす可能性がある多種多様な鳥類病原体に対するワクチン接種による予防的保護であり、動物の健康や経営経済に壊滅的な影響を及ぼすことがある。長年にわたり、経済的関連性のある鳥類に影響を及ぼし得るウイルス性、細菌性及び寄生虫性の疾患のほとんどに対して多種多様なワクチンが市販されてきた。そのようなワクチンは、弱毒生、不活性化、サブユニット、核酸、ウイルスベクターなどの異なる種類のものであり得る。

20

【0003】

特に、非常に多く生産される家禽、すなわち肉用鳥（ブロイラー）については、できるだけ早く若鳥を保護することが一般的な慣行である。しかしながら、未熟な免疫系を有する非常に若い動物の能動的ワクチン接種は、多くの場合、あまり成功しない。したがって、効果的な次善策は、産卵期の前及びその間における母親へのワクチン接種によるものである。雌鶏によって産生された母体抗体は、卵黄を有する卵に移され、発育中の雛鳥によって内在化されるこのようにして、雛鳥は、既に孵化日には、様々な病原体に対するこれらの母性由来抗体（MDA）によって受動的に保護され得る。しかし、MDAのほとんどは、生物学的分解のために3週間で再び効果が薄れてしまうので、最初の数週間を経た後に適切な免疫保護を誘導するために成長中の雛鳥自体の能動的ワクチン接種も行わなければならない。その時点で、いくつかのMDAが依然として鳥の中に存在し得る。

30

【0004】

既存の抗体との関連におけるワクチン接種の同様の状況は、以前のワクチン接種によって誘導された抗体を有し、その効果が徐々に薄れるために、抗体価を保護レベルに回復させるためにブースターワクチン接種が必要とされる高齢の鳥の場合に生じる。

40

【0005】

重要な獣医学的及び科学的難問は、使用されるワクチンに含まれる抗原と反応性である抗体を既に保有している鳥にワクチン接種をいつ与えることができるかを決定する際に生じる。抗体価がほぼなくなったときのワクチン接種は、それらの抗体価の低下と能動免疫化からの保護の開始との間にギャップ期間が残るので、明らかに遅すぎる。このギャップ期間において、鳥は感染及び疾患に対して脆弱である。

【0006】

しかし、鳥が依然としてかなり高い循環抗体の力価を有する場合のワクチン接種は時期が早すぎ、というのも、多くの場合、そのことがワクチン接種の有効性に影響を及ぼすからであり、これはおそらく、それらの抗体が何らかの形でワクチン抗原に結合してこれを

50

捕捉し、これによりワクチン抗原の分解を加速し、且つ／又はワクチン抗原が適切な免疫応答を誘導するのを妨げ得るために起こる。この最後の現象は「抗体干渉」と呼ばれ、MDAに関するその異なる表記は、「MDA干渉」である。これは、世界中の家禽産業に影響を及ぼす主な病原体に対する効果的なワクチン接種に関する周知の問題である。これらの主な病原体の例は、感染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV、ガンボ口病ウイルスとしても知られる）、感染性気管支炎ウイルス（IBV）、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、及び鳥インフルエンザウイルス（AIV、家禽ペストウイルスとしても知られる）であり、最後の2つは、実にOIE〔国際動物衛生機関〕の届出疾患である。

【0007】

これらの疾患では、抗体干渉がワクチン接種の有効性を低下させることがよく知られており、特に鳥が近接し、且つ／又は鳥病原体の有病率が高い地域で飼育されている場合に、鳥を野外感染に対して脆弱にする。

【0008】

長年にわたり、保護のギャップを防ぎ、血清陽性の鳥類のワクチン接種を最適化するために、抗体干渉を克服するための多くの異なるアプローチが試みられてきた。抗体干渉を克服するためのより直接的な試みには、抗原用量を増加させ、且つ／又は（より強力な）アジュバントを使用するというワクチンへの適応が含まれた。より病原性が高い、又は弱毒化されていない生きているワクチン病原体の株も、抗体のより高い力価を突破することができ、ひいてはより早い時点で投与することができることを期待して試みられてきた。これらの方法は一般に満足のいくものではないので、より複雑な手法が試された。

【0009】

IBDVに対する若鳥の能動的ワクチン接種について、1つの方法は、鳥の試料の血清学的試験によるMDAレベルのモニタリングを行ってワクチン接種の最適な期日を決定することを含む。しかし、その結果、有効な能動的ワクチン接種は2～3週齢でしか適用することができず、大きな群れではばらつきがあるために多くの鳥において保護ギャップは避けられない。別法として、「複合型IBDVワクチン」（抗体が結合した弱毒生ワクチンウイルス）が若齢で投与されており、これによれば抗原は後の時点でのみ放出される。また、ウイルスベクター系、例えば、主たるIBDV抗原であるウイルスタンパク質2（VP2）を発現させるためのベクターとして、鶏痘ウイルス又は鳥ヘルペスウイルスを使用するウイルスベクター系が使用されている。これは、Muller et al. (2012, Avian Pathol., vol. 41, p. 133–139) に総説されている。

【0010】

NDVについては、ワクチン接種における様々なアプローチが適用されているが、抗体干渉は今日でも依然として問題であり、総説については、Dimitrovら (2017, Vet. Microbiol. vol. 206, p. 126–136) を参照されたい。

【0011】

組換えベクターワクチンの使用であっても、例えば、抗体がベクターウイルス自体及び／又はそれが発現する抗原と反応する場合には、抗体干渉を被り得る。Huら (2020, Vaccines, vol. 14, p. 222, doi: 10.3390) を参照されたい。ベクターとしてのNDVについて、考えられる解決策は、例えば、NDVベクターの血清学的プロファイルを変化させること (Steglich et al., 2013, PLoS One, vol. 8, e72530)、又は抗NDV抗体による阻害が少ないとされるNDV株を選択することであった (欧州特許出願公開第2998315号明細書)。

【0012】

IBVについては、MDAは1日齢の雛鳥のワクチン接種を妨げることが周知である。Terreginoら、2008 (Avian Pathol., vol. 37, p. 487–493) を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0013】

AIVについては、このウイルスはパンデミックの可能性を有するヒトの人畜共通感染症を引き起こす可能性があるため、有効なワクチン接種の関連性は、獣医学分野を超えてさらに広がる。長年にわたり、古典的な又は組換えAIVワクチンを使用する多くの異なるアプローチが試みられてきており、成功のレベルは様々である。D. Swayne、2009 (Comp. Imm. Microbiol. and Inf. Dis., vol. 32, p. 351-363) を参照されたい。しかしながら、いくつかの他のワクチンの状況と同様に、AIV反応性抗体による干渉に対処することは依然として問題である (Murr et al., 2020, Avian Dis., vol. 64, p. 427-436)。

10

【0014】

その結果、鳥類ワクチン接種の分野で試された多くの異なるアプローチにもかかわらず、標的動物における既存の抗体が、これらの抗体が結合し得る抗原によるワクチン接種の有効性に対して有する負の効果を克服するための有効な方法に対する差し迫った必要性が依然として存在する。

【0015】

Shresthaら (2018, Vaccines, vol. 6, p. 75, doi: 10.3390) は、抗原提示細胞 (APC) への抗原の選択的標的化によって、鳥類標的のワクチン接種を改善するための選択肢について総説する。例えば、リガンド、抗体、ナノ粒子、ウイルスベクター、又は細胞透過性ペプチドを使用することによって、そのような標的化を達成するための多種多様な方法が記載されている。鳥類における抗体干渉を克服するための方法は記載も示唆もされていない。

20

【0016】

国際公開第2017/055235号には、抗原提示細胞 (APC) への抗原標的化が記載されているが、抗原内在化を使用する。記載されている治療は、哺乳動物、特にネコ及びイヌ専用であり、アレルギーの軽減を目的としている。抗体干渉については述べられていない。

【0017】

Jaureguiら (2017, Res. Vet. Sci., vol. 111, p. 55-62) には、ニワトリにおける樹状細胞へのAIV HA抗原の標的化が記載されている。精製されたH5 HA抗原を、Dec-205の1つのドメインに対するマウスモノクローナル抗体に化学的にコンジュゲートした。このコンジュゲートを用いて21週齢のニワトリにワクチン接種した。使用したすべてのニワトリは抗HA抗体 (Jauregui、図7、0日目を参照されたい) に対して血清陰性であったため、Jaureguiらは、血清陽性鳥類における抗体干渉の克服について記載も示唆もしていない。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0018】

【特許文献1】欧州特許出願公開第2998315号明細書

【特許文献2】国際公開第2017/055235

40

【非特許文献】

【0019】

【非特許文献1】Muller et al., 2012, Avian Pathol., vol. 41, p. 133-139

【非特許文献2】Dimitrov et al., 2017, Vet. Microbiol. vol. 206, p. 126-136

【非特許文献3】Hu et al., 2020, Vaccines, vol. 14, p. 222, doi: 10.3390

【非特許文献4】Steglich et al., 2013, PLoS One, vol. 8, e72530

50

【非特許文献5】Terregino et al., 2008, Avian Pathol., vol. 37, p. 487-493

【非特許文献6】D. Swayne, 2009, Comp. Imm. Microbiol. and Inf. Dis., vol. 32, p. 351-363

【非特許文献7】Murr et al., 2020, Avian Dis., vol. 64, p. 427-436

【非特許文献8】Shrestha et al., 2018, Vaccines, vol. 6, p. 75, doi:10.3390

【非特許文献9】Jauregui et al., 2017, Res. Vet. Sci., vol. 111, p. 55-62

10

【発明の概要】

【0020】

したがって、本発明の目的は、鳥類標的のワクチン接種における抗体干渉の悪影響を克服する効果的な方法を提供することによって、先行技術における1つ以上の欠点を克服することである。

【0021】

驚くべきことに、投与されるワクチンに含まれる抗原に反応する抗体を保有する鳥類を保護するための方法を提供することによって、すなわち抗原を鳥類のAPCに標的化することによって、この目的を満たすことができ、その結果、先行技術の1つ以上の欠点を克服することができるが見出された。

20

【0022】

以下に詳細に記載する実験では、抗体レベルが高い又は中程度のニワトリに、標的ワクチン又は非標的ワクチンのいずれかを投与した。結果は、標的抗原に有利なワクチン接種の有効性の著しい差を示す。対照的に、非標的ワクチン及び古典的対照ワクチンは、血清陽性鳥類において応答をほとんどもたらさなかった。その結果、血清陽性鳥類を保護するこの方法は、ワクチン接種における抗体干渉の負の効果を効果的に克服することができ、単回用量であっても、非常に若い鳥であっても、予想外に有効である。

【0023】

その結果、本発明者らは、全くもって驚いたことに、この抗原標的化が、特に既存の抗体との関係において、一方では免疫未成熟鳥類であっても良好に機能し、他方では免疫系の過剰刺激、自己免疫、又は寛容の誘導などによるワクチン増強疾患又はワクチン誘導性免疫障害を引き起こさないことを見出した。

30

【0024】

鳥類を保護するためのこの方法は、標的抗原を直接使用せず、組換えタンパク質を発現する組換えベクター、例えば、DNAプラスミド、RNA分子、又はベクターウイルスとして使用する場合にも同様に適用可能である。

【0025】

更に、この好ましい効果は標的化によって生じると考えられ、したがって使用される抗原とは無関係であるので、この方法は異なる抗原を使用しても同様に成功することが十分に考えられる。したがって、この方法は、通常ワクチン接種が抗体干渉を受ける様々な鳥類病原体、例えば、NDV、IBDV、AIVなどに対する保護を可能にする。

40

【0026】

このワクチン接種方法が、どのようにして、又はなぜ、高い抗体レベルを突破して、依然としてこのような有効な防御免疫応答を誘導することができるのか、正確には知られていない。本発明者らは、これらの知見を説明し得るいかなる理論又はモデルにも束縛されることを望むものではないが、本発明者らは、APCに対する既存の抗体による抗原の除去を何らかの方法で減少させるAPCへの抗原の標的化であると推測している。

【0027】

ワクチン抗原に対する既存の抗体を有する鳥類のワクチン接種において、APCへの抗原標的化の使用が成功することは、いかなる先行刊行物からも決して予測できなかった。

50

これは主に、抗体干渉が作用する（ワクチン抗原のブロッキング、マスキング、架橋、中和など）機構が今日でもまだよく理解されていないからである。これは、十分に研究されていない動物系であるため、鳥類における抗体干渉に特に当てはまる。

【0028】

更に、抗原標的化に関する最初の研究については1980年に既に記載されていたが、これらはヒト癌の治療を目的としていた。後に、（主にヒト）ワクチン接種におけるより一般的な使用が検討された。これは、Kellerら（2007, *Oncogene*, vol. 26, p. 3758-3767）によって概説されている。

【0029】

また、いくつかの例では、（母親由来）抗体は、抗体依存性増強によるウイルス性疾患の増強に関与しており、これはワクチン増強疾患と呼ばれる。この効果は、レンチウイルス及びデングウイルスなどの様々なウイルスで観察されており（Huisman et al., 2009, *Vaccine*, vol. 27, p. 505-512）、最近ではSARS-CoV-2で観察されている（Lee et al., 2020, *Nat. Microbiol.*, vol. 5, p. 1185-1191）。したがって、標的ワクチン接種が、その後の対応する病原体との接触時にそのような望ましくない影響をもたらし得ることが真に懸念されていた。

【0030】

更に、哺乳動物／ヒトの場合と比較して、鳥類の免疫系の機能に関する情報がほとんどないため、哺乳動物から鳥類の状況への変換は決して容易ではない。また、Shresthaら（前出）の一般的な総説は、特定の方法を可能にしないか、又は抗原標的化を使用する際に当業者が抱くであろうすべてのためらいを拭い去るものではない。これは、一種の免疫障害を引き起こすことが懸念され、且つ／又は成熟した免疫系を必要とする可能性があるのである。

【0031】

合わせて、この情報の欠如、及び合併症の可能性により、APCへの抗原標的化を使用することは、ワクチン中の抗原と反応性である高レベルの循環抗体を有する鳥類のワクチン接種の選択肢として可能性の低いものとなった。更に、孵化時の鳥類の免疫系がまだ成熟しておらず、その結果、そのAPCがその表面に適切な標的タンパク質を既に提示し、そのような表面タンパク質への結合を動物の免疫系の生産的刺激に移すことができるほど十分に成熟しているかどうかは予測不可能であったため、若い鳥類にこのワクチン接種の方法を選択することについては、とりわけ確信の持てるものではなかった。

【0032】

したがって、一態様において、本発明は、抗原と反応性である抗体を保有する鳥類を、当該抗原が由来する病原体から保護する方法において使用するための、当該抗原と、鳥類抗原提示細胞（APC）上の細胞表面タンパク質に結合することができる結合ドメインを含む組換えタンパク質に関する。

【0033】

「組換えタンパク質」は、そのアミノ酸配列が人工的に作製されたタンパク質である。本発明の場合、組換えタンパク質は、分子クローニング技術及び組換えタンパク質発現技術によって得ることができる。発現後、タンパク質を発現系から単離し、必要に応じて処理及び精製し、その後、本発明の保護するための方法での使用に適した組成物に製剤化することができる。あるいは、組換えタンパク質は、以下に記載されるように、組換えベクター、例えば、DNAプラスミド、RNA分子又はウイルスベクターを介して発現及び送達され得る。

【0034】

そのような技術は当技術分野で周知であり、Sambrook及びRussellの「*Molecular cloning: a laboratory manual*」（2001, Cold Spring Harbour Laboratory Press; ISBN: 0879695773）や、Ausubelらの*Current Prot*

10

20

30

40

50

ocols in Molecular Biology (J. Wiley and Sons Inc, NY, 2003, ISBN: 047150338X) のような標準的な教科書に非常に詳細に開示されている

本発明に関して、「タンパク質」という用語は、「ペプチド」、「オリゴペプチド」及び「ポリペプチド」などの同様の用語を組み込む。

【0035】

本発明による使用のための組換えタンパク質は、異なる起源、例えば、いずれも本発明で定義される抗原及び結合ドメインに由来するポリペプチドで構成され、また、リンカー、マーカーなどの1つ以上のペプチドで構成されていてもよい、すべてが1つのアミノ酸鎖に連結されている、融合タンパク質である。

【0036】

本明細書で使用される「含む (comprising)」という用語（並びに「comprises」、「comprise」、及び「comprised」などの変形）は、この用語が使用されるテキストセクション、段落、請求項などによって網羅されるか又は含まれる、本発明について考えられるすべての要素及びあらゆる可能な組み合わせを指すことを、たとえ、そのような要素又は組み合わせが明示的に記載されていないとしても、意図しており、そのような（1又は複数の）要素又は組み合わせのいずれも排除することを意図するものではない。

【0037】

したがって、そのような任意のテキストセクション、段落、請求項などは、「含む (comprising)」という用語（又はその変形）は、「からなる (consisting of)」、「からなる (consists of)」、又は「から本質的になる (consist essentially of)」などの用語で置き換えられている1つ又は複数の実施形態にも関連し得る。

【0038】

「抗原」は、抗体やリンパ球などの免疫系の要素と相互作用することができる分子として一般に知られており、この相互作用は、体液性及び／又は細胞性免疫応答を生じ得る。

【0039】

免疫系によって認識される抗原の部分は「エピトープ」と呼ばれ、これは線状又は三次元型であり得る。3Dエピトープは、典型的には、より大きなタンパク質の折り畳みによって形成される。線状エピトープは、それ自体で、又は担体分子に連結されることによって、例えば、本発明による使用のための組換えタンパク質に含まれることによって、十分なサイズを有する、例えば、少なくとも5個のアミノ酸からなる必要がある。

【0040】

抗原はポリペプチドであり、すなわち抗原性ポリペプチドは、少なくとも1つのエピトープを含み、病原体に「由来する」。本発明の場合、「由来する」とは、典型的には病原体及びそのタンパク質レパートリーの遺伝情報の分析によって、特定の抗原のコード配列が選択される状態を指す。次いで、選択された配列は、本発明による使用のための組換えタンパク質をコードする構築物に再結合される。

【0041】

したがって、本発明の場合、選択される抗原は、病原体由来のタンパク質の全体又は一部であり得、病原体は、ウイルス、細菌、寄生生物及び真菌から選択される。

【0042】

抗原は、病原体由来の抗原の天然配列に由来し得るか、又は集合体であり得、例えば、発現される抗原のいくつかのホモログ、例えば、同じタイプのタンパク質などからのコンセンサスであるが、異なる種、血清型、サブタイプ、株、単離体などの病原体の変異体に由来するアミノ酸配列を有する。周知のように、そのようなコンセンサス配列を得るために、アミノ酸配列又はコードヌクレオチド配列のいずれかを比較することができ、その比較から、例えば、適切なコンピュータプログラムを使用していくつかのH9 HAヌクレオチド配列をアライメントすることによってコンセンサス配列を導出することができる。

【0043】

本発明の抗原はまた、生物学的に関連しているか否かにかかわらず、異なる抗原由来の集合部分からなるキメラ抗原であってもよい。更に、抗原をコードする配列は、以下に記載されるように、「コドン最適化」に供され得る。

【0044】

本発明では、抗原は、抗原が由来する病原体に対する防御免疫応答を生じさせることができるタンパク質から選択される。例えば、IBDV由来のVP2タンパク質、NDVの融合(F)－又はヘマグルチニン－ノイラミニダーゼ(HN)タンパク質、感染性気管支炎ウイルス(IBV)由来のスパイクタンパク質、及びAIVのHA－又はノイラミニダーゼ(NA)タンパク質から選択される。

10

【0045】

本発明の「結合ドメイン」は、免疫グロブリン分子の抗原結合部位に由来し、相補性決定領域の1つ以上を含む抗体の一部であり得、例えば、「一本鎖可変断片」(scFv)ポリペプチドであり得る。

【0046】

本発明では、結合ドメインは「結合することができる」。これは、特異的な結合、すなわち、任意の非特異的結合又はバックグラウンド結合とは異なる十分な親和性を有する結合を指す。特異的結合と非特異的結合との差は当業者に周知であり、例えば、インビトロ結合アッセイにおいて、結合ドメイン又はリガンドのいずれかを希釈することによって容易に区別することができ、非特異的結合は、典型的には、例えば、1:10又は1:100に希釈することで急速に失われるが、特異的結合は、より高い倍率で希釈しても残る。

20

【0047】

「APC」は、抗原性分子を処理して、それらの分子(の一部)をヒト又は動物の免疫系に提示することができるリンパ系の細胞であることがよく知られている。この提示は、防御免疫応答の基礎となる免疫成熟及び刺激をもたらす反応のカスケードを誘導する。APCは、例えば、Bリンパ球、樹状細胞、マクロファージ及びナチュラルキラー細胞である。

【0048】

「鳥類APC上の細胞表面タンパク質」は、APCの細胞膜の外側に付着又は固定されているタンパク質である。これらのタンパク質は、検出及びシグナル伝達におけるAPCの機能において役割を果たす。APC上の細胞表面タンパク質の多くは、タンパク質の免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。APC表面タンパク質の例は、例えば、CD83及びCD11cタンパク質である。「CD」の表記は、リンパ系の細胞上の表面タンパク質の分類及び同定に関する国際プロトコルである「分化クラスター」を指す。

30

【0049】

本発明の「鳥類」は、経済的又は(獣医学的)医学的関連性のある、分類学上鳥綱の任意の動物である。例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、ホロホロチョウ、パートリッジ、キジ、ハト、ハヤブサ及びダチョウ。

【0050】

「鳥類を保護する方法で使用するための」という用語は、本発明による使用のための、本明細書で定義される組換えタンパク質の医学的使用を指す。この使用は、タンパク質の直接的な使用であってもよく、又は組換えベクターからの発現を介した間接的なタンパク質の使用であってもよい。

40

【0051】

本発明では、適用される「方法」はワクチン接種を指す。

【0052】

「保護する」という用語は、本発明の方法の効果、すなわち本方法によって、すなわちワクチン接種によって誘導される防御免疫応答を指す。そのような免疫応答は、ワクチン接種された鳥類を、抗原(本発明による使用のための組換えポリペプチド中に存在する抗

50

原) が由来する病原体によって引き起こされる感染及び／又は疾患から保護する。

【0053】

保護する方法は、全部又は一部を問わず、感受性鳥類の細胞及び器官における病原体による増殖性感染の確立又は増殖の軽減、又は疾患のその後の徴候の軽減に関する。これは、例えば、病原体の負荷を軽減するか、又は病原体の複製期間を短縮することによって達成される。そして、これは、鳥類における病原体による感染によって引き起こされ得る病変及び関連する疾患の臨床徴候の回数、強度、又は重症度の減少をもたらす。

【0054】

このような感染又は疾患の減少は、例えば、本発明による使用のための組換えタンパク質によるワクチン接種後の免疫学的応答をモニタリングすることによって、また、ワクチン接種された鳥類の（攻撃）感染後の臨床症状又は死亡率の状況を調べることによって、例えば、鳥類の疾患の徴候、臨床スコア、血清学的パラメータをモニタリングすることによって、又は感染病原体の再度単離することによって、容易に検出することができる。これらの結果は、偽ワクチン接種された鳥類における同様の感染に対する応答と比較することができる。主要な鳥類病原体の感染及び疾患の症状を評価するためのいくつかの方法は、当技術分野で周知である。

【0055】

本発明の方法による感染又は疾患からの保護は、免疫化された鳥類に健康、福祉、及び経済的性能の改善を提供する。これは、例えば、生活状態、生存率、成長率、飼料効率及び卵の生産の増加、並びに（獣医学的）ヘルスケアのためのコスト削減などのパラメータから評価することができる。

【0056】

本発明の方法によって保護される鳥類は、「抗体を保有する」。これは、本発明の方法が適用される時点、すなわちワクチン接種の時点に適用される。鳥類が実際にそのような抗体を有するかどうかは、例えば、ワクチン接種の前後に鳥類から血液試料を採取し、標準的な血清学的方法を使用して抗原に対する抗体の力価を決定することによって容易に決定することができる。しかしながら、これは、その既存の力価の値を決定すること自体、すなわちワクチン接種の前後に採取された血清試料に対する血清学的試験の実施、及び／又はその試験の結果の分析と解釈が、その時点で行われることを必要としない。同様に、これは、ワクチン接種時の既存の力価を、ワクチン接種のしばらく前に採取した試料で測定したレベルから計算して外挿することを妨げるものではない。

【0057】

本発明の場合、鳥類は、その鳥類由来の血清中の抗原に反応する抗体の力価がバックグラウンドレベルを超える場合、その抗原に対する抗体を「保有する」。そのようなバックグラウンドレベルは、典型的には、目的の抗原又は病原体に対してナイーブである同等の鳥類に存在するレベルである。本発明の場合、このバックグラウンドレベルは、好都合なことに、例えば、同じ年齢及び種のSPF（特定病原体を持たない）鳥類の血清中に存在する力価から得ることができる。

【0058】

既存の抗体は、典型的には卵黄を介して母親から得られる抗体の場合のように、受動的な移入によって生じ得る。そのような血清陽性鳥類は、「MDA陽性」又は「MDA+」と呼ばれる。これは、非常に若い年齢、例えば、孵化日（すなわち1日齢）から約3週齢の鳥類に適用される。あるいは、既存の抗体は、保護されるべき鳥類が以前に受け、それにより抗体の産生をもたらした能動的免疫化から生じ得、これは約3週齢以降の鳥類に適用される。

【0059】

「～と反応性である」という用語又はその同義語である「～に特異的である」は、特異的免疫認識によって、本発明による使用のための組換えポリペプチドに含まれる抗原と相互作用する既存の抗体の能力を表す。同様の用語はまた、特異的結合を指す限りにおいて、「結合することができる」、「認識することができる」などである。

【0060】

本発明の予想外の有利な効果は、（保護される鳥類における）既存の抗体が、本発明の組換えタンパク質に含まれる抗原と反応性である場合に顕著である。その状況では、通常、保護の有効性を低下させる抗体干渉が発生する。

【0061】

「当該抗原が由来する病原体」という用語は、本発明の方法が保護しようとする病原体が先に定義した抗原を含むことを示す役目を果たす。これには、抗原のホモログ及び／又は病原体の変異体も含まれる。

【0062】

当業者が理解するように、本発明による使用のための組換えタンパク質中の抗原と、鳥類を保護すべき病原体との間の一致は、誘導される防御免疫応答の基礎を形成する。

【発明を実施するための形態】

【0063】

本発明の実施形態及びさらなる態様の詳細を以下に説明する。

【0064】

本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、鳥類APCが、Bリンパ球、樹状細胞、マクロファージ及びナチュラルキラー細胞から選択される。

【0065】

これらの細胞型の各々は、標準的な血清学的及び生化学的方法を使用して、例えば、以下に記載されるようにCDを指定したタンパク質に基づく判定を用いて明確に区別することができる。

【0066】

本発明による使用のための組換えタンパク質の好ましい実施形態では、鳥類APCは樹状細胞である。

【0067】

本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、鳥類APC上の細胞表面タンパク質は、分化クラスター83（CD83）、分化クラスター11c（CD11c）、及びエンドサイトーシス-205のための樹状細胞受容体（Dec205）から選択される。

【0068】

これらのタンパク質はすべて、この分野で周知であり、APC上の表面タンパク質であり、CD11cは、樹状細胞及びいくつかの他のAPC上の膜貫通タンパク質であり、好中球の活性化において役割を果たす。CD11c特異的scFvは、配列番号18のアミノ酸配列を含む。

【0069】

Dec-205は、樹状細胞及びリンパ球上のエンドサイトーシス受容体である。ニフトリDec-205の例は、GenBankアクセッション番号：AJ574899に示されている。Dec-205特異的scFvは、配列番号19のアミノ酸配列を含む。

【0070】

CD83は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する表面糖タンパク質である。これは主に樹状細胞上に発現され、リンパ球及びマクロファージ上にもより少なくではあるが発現される。これは、成熟樹状細胞の周知のマーカーである。鳥類CD83の例は、GenBankアクセッション番号XP_040519591に示されるタンパク質である。

【0071】

本発明による使用のための組換えタンパク質の好ましい実施形態では、細胞表面タンパク質はCD83である。

【0072】

本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、結合ドメインは抗体の抗原結合部位を含む。

【0073】

本発明による使用のための組換えタンパク質の好ましい実施形態では、結合ドメインは一本鎖可変断片（s c F v）である。

【0074】

周知のように、s c F vは、1つの完全な抗原結合ドメインを保持するがF c部分を欠く免疫グロブリンの最小部分である。s c F vは、それ自体が融合構築物である単一のペプチドであり、1つの可変軽鎖（v L）、リンカー、及び1つの可変重鎖（v H）を含む。これらの要素の順序は、v L－リンカー－v H又はv H－リンカー－v Lであり得る。いずれの場合においても、可変鎖は、（互いに対して）テール・トゥ・ヘッドの形で配向され、それにより、c末端側がテールとなる。

10

【0075】

好ましい実施形態では、s c F v中の要素の順序はv H－リンカー－v Lである。

【0076】

s c F vのリンカー配列は、2つの可変鎖がそれら自体を配向させて抗原結合ドメインを形成することができるように、柔軟な領域をもたらす。好ましい実施形態では、s c F vのリンカー配列は、グリシン及びセリン又はトレオニンというアミノ酸を含み、10から50アミノ酸長である。より好ましい実施形態では、s c F vのリンカー配列は、配列番号1に示されるアミノ酸配列（G l y₄－S e r₄）を含む。

【0077】

s c F vの2つの可変鎖の特異性は、両方が同じ抗原に対するものであってもよいし、又はそれぞれが異なる抗原に対するものであってもよい。好ましい実施形態では、2つの可変鎖は同じ特異性を有する。

20

【0078】

一実施形態では、s c F vはC D 8 3に特異的であり、言い換えれば、C D 8 3－s c F vである。好ましくは、s c F vは、鳥類樹状細胞上のC D 8 3に特異的であり、より好ましくは、s c F vは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0079】

結合ドメインの実施形態では、s c F vは2回以上存在し得る。

【0080】

本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、病原体は、鳥類に対して病原性である。より好ましくは、病原体はウイルスである。更により好ましくは、ウイルスはRNAウイルスである。更により好ましくは、RNAウイルスは、I B D V、N D V、I B V及びA I Vから選択される。更により好ましくは、病原体は、I B D V、N D V、及びA I Vから選択される。最も好ましくは、病原体はA I Vである。

30

【0081】

本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、抗原は、I B D V V P 2タンパク質、N D V Fタンパク質、N D V H Nタンパク質、I B Vスパイクタンパク質、A I V H Aタンパク質及びA I V N Aタンパク質から選択される。より好ましくは、抗原は、A I V H Aタンパク質及びA I V N Aタンパク質のうちの1つから選択される。更により好ましくは、抗原はA I V H Aタンパク質である。更により好ましくは、抗原は、H 5型、H 7型又はH 9型のA I V H Aタンパク質から選択される。

40

【0082】

これらのすべてのウイルスタンパク質抗原はこの分野で周知であり、それらのコード配列の多くのバージョンは、N C B IのG e n B a n k及びE M B LのE B Iなどの公開配列データベースでデジタルで容易に入手可能である。例は、A I V H 9 H A：G e n B a n k a c c . n r . A C P 5 0 7 0 8 . 1、N D V F：G e n B a n k a c c . n r . A A K 5 5 5 5 0 . 1、N D V H N：G e n B a n k a c c . n r . M H 6 1 4 9 3 3 . 1、I B D V V P 2：G e n B a n k a c c . n r . K X 8 2 7 5 8 9 . 1、及びI B Vスパイク：G e n B a n k a c c . n r . A A A 6 6 5 7 8 . 1、である。

50

【0083】

更に、HAタンパク質に関する詳細な情報は、Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (PDB) の www.rcsb.org、及びインフルエンザ研究データベースの www.fludb.org で入手可能である。

【0084】

抗原がAIV HAタンパク質から選択される、本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、抗原はHAタンパク質の外部ドメインのみを含む。これにより、本発明による使用のための組換えタンパク質の発現に使用される細胞の細胞膜への付着を防止することができる。

【0085】

成熟AIV HAタンパク質の外部ドメインは、シグナル配列のないN末端部分及びHAタンパク質の中心部分を含み、したがってHA1ドメイン及びHA2ドメインを含むが、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを含まず、典型的には、これらの最後の2つの部分と一緒にHAのC末端の35～40アミノ酸を形成する。

【0086】

抗原がH5型、H7型、又はH9型のAIV HAタンパク質の外部ドメインである、本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、抗原は、配列番号3、4、及び5から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。

【0087】

抗原がAIV HAタンパク質由来のエクトドメインである、本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、抗原は三量体化ドメインも含む。

【0088】

そのような三量体化ドメインは、HAの膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの喪失を補償し、ホモ三量体を形成し、その天然の3D形状に類似する能力を回復することができる。更に、HA-エクトドメイン抗原を有する本発明の組換えタンパク質の溶解性及び安定性を改善する。

【0089】

本発明の場合、三量体化ドメインはペプチドであり、この機能に適していることが知られているいくつかのうちの1つ、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来のGCN4転写活性化因子のイソロイシンジッパー3ドメイン、又はバクテリオファージT4フィブリチンタンパク質のFoldonドメイン(「Foldon」)であり得る。

【0090】

好ましい実施形態では、三量化ドメインは、Foldonであり、より好ましくは、Foldonは配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【0091】

抗原がAIV HAタンパク質の外部ドメインであり、抗原が三量体化ドメインも含む、本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、三量体化ドメインはHA外部ドメインのC末端側(下流側)に位置する。

【0092】

好ましい実施形態では、HA外部ドメイン及び三量化ドメインは、介在するアミノ酸なしで、本発明による使用のために組換えタンパク質中に配置される。

【0093】

好ましい実施形態では、AIV H9 HA外部ドメイン及びFoldonを含む抗原は、配列番号7のアミノ酸配列を含む。

【0094】

本発明による使用のための組換えタンパク質では、抗原及び結合ドメインは、抗原又は結合ドメインのいずれかが本発明による使用のための組換えタンパク質のN末端により近い状態で、互いに対して2つの向きに配置され得る。これに関して、抗原がHA外部ドメ

10

20

30

40

50

インであるように選択される場合に使用され得る三量化ドメインは、抗原の一部と見なされる。

【0095】

本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、抗原は、結合ドメインのN末端側（上流）で当該組換えタンパク質の中に位置する。

【0096】

代替の実施形態では、結合ドメインは、抗原のN末端側（上流）で当該組換えタンパク質の中に位置する。

【0097】

一実施形態では、本発明による使用のための組換えタンパク質は、それらの相互配向に応じて、抗原と結合ドメインとの間、又は結合ドメインと抗原との間に位置するリンカーを含む。好ましくは、当該リンカーは、1から30アミノ酸のサイズである。より好ましくは、リンカーはグリシン及びセリンというアミノ酸を含む。更により好ましくは、当該リンカーは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。

【0098】

したがって、一実施形態では、本発明による使用のための組換えタンパク質は、

－A I V H 5 H A 外部ドメイン、三量化ドメイン、リンカー及びC D 8 3－s c F v、

－A I V H 7 H A 外部ドメイン、三量化ドメイン、リンカー及びC D 8 3－s c F v、並びに

－A I V H 9 H A 外部ドメイン、三量化ドメイン、リンカー及びC D 8 3－s c F v、

（ここで、示された要素は、N末端からC末端に向かって提示されている）

から選択される組み合わせのうちの1つを含む。

【0099】

好ましい実施形態では、A I V H A 外部ドメインは、配列番号3、4、及び5から選択され、三量化ドメインは配列番号6であり、リンカーは配列番号8であり、C D 8 3－s c F vは配列番号2である。

【0100】

本発明による使用のための組換えタンパク質を発現、採取、定量及び（場合により）精製する目的で、組換えタンパク質はまた、生化学的又は血清学的マーカー（又はタグ）として機能する1つ以上のペプチドを含み得る。マーカーは同じであっても異なってもよい。マーカーは、組換えタンパク質中の異なる位置に配置することができる。

【0101】

周知のマーカーは、マルトース結合タンパク質（M B P）－タグ又はヒスチジン（H i s）－タグなどの親和性タグ、M y c タグ、C t a g タグ、V 5 タグ又はF l a g タグなどのエピトープタグ、又はG F P 若しくはY F P などの蛍光タンパク質タグ、又はその一部であって、すべて当技術分野で周知である。

【0102】

マーカーは、検出及び定量目的のために、例えば、特異的抗体との検出又は結合のために、例えば、I F T 又はE L I S A において使用され得る。精製は、例えば、免疫又は金属アフィニティークロマトグラフィーを使用して行うことができる。

【0103】

H i s タグは、典型的には、4から10個のヒスチジンを有する。好ましくは、H i s タグは6×ヒスチジntagであり、すなわち6個の連続したヒスチジンを有する。

【0104】

「C t a g」は、配列番号9を含み、パーキンソン病などの神経障害に見られる凝集物を引き起こすことが知られているα－シヌクレインタンパク質のC末端である。使用される場合、C t a g は、好ましくは、本発明の組換えタンパク質のC末端に含まれる。免疫アフィニティークロマトグラフィーによるC t a g の精製は、例えば、発現系の培養物中

10

20

30

40

50

にタンパク質による外乱がある場合、時としてH i s タグの精製よりも実効性がある。

【0105】

V 5 タグは、シミアン・ウイルス5に由来する。好ましくは、V 5 タグは、配列番号10のアミノ酸配列を含む。

【0106】

一実施形態では、本発明による使用のための組換えタンパク質は、マーカーペプチドを含む。より好ましくは、マーカーペプチドは、C t a g、H i s タグ及びV 5 タグから選択される1つ以上である。更により好ましくは、組換えタンパク質は、C t a g、H i s タグ及びV 5 タグからの2つ以上を含む。

【0107】

本発明による使用のための組換えタンパク質の発現のために、必要に応じていくつかのさらなる調整を行うことができる。そのような微調整又は最適化は定型的なものであり、当業者に周知である。例えば、タンパク質が発現系の宿主細胞によってどのように発現されるか、すなわち、細胞の内部に、細胞の表面に、又は細胞の外部に分泌されるかによって異なる。最後の2つの場合では、N末端側にシグナル配列を提供することができ、このシグナルは、使用される発現系の細胞において良好に機能する。一例は、S 2細胞で発現する場合の分泌を可能にするための「キイロショウジョウバエ (D r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e r) 免疫グロブリン重鎖結合タンパク質」(B I P) シグナル配列の使用である。

【0108】

一実施形態では、本発明による使用のための組換えタンパク質は、シグナル配列を含み、好ましくは、シグナル配列は、B I Pシグナル配列であり、より好ましくは、B I Pシグナル配列は、配列番号11のアミノ酸配列を含む。

【0109】

本発明による使用のための組換えタンパク質の発現をもたらす核酸の構築プロセスの過程で、1つ以上の制限酵素(R E)部位が使用され得る。それらのR E部位が組換えタンパク質のコード領域に位置する場合、それらの残りのヌクレオチドは、数個のアミノ酸に翻訳され、その後、それらは本発明による使用のための組換えタンパク質を構成する要素のいくつかの間に位置する。

【0110】

例えば、本発明に使用される1つの構築物は、R E部位K p n I及びP a c Iを使用してH 9 H A外部ドメイン-F o l d o nエレメントをサブクローン化し、R E部位N o t I及びX b a Iを使用してH A抗原-F o l d o n及び配列番号8のリンカーのC末端側のC D 8 3-s c F vをサブクローン化した。

【0111】

結果として、本発明による使用のための組換えタンパク質の一バージョンは、配列番号12のアミノ酸配列を含み、その詳細は表1に記載されている。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1:配列番号 12 の組成

要素	要素のアミノ酸長	要素の位置(配列番号 12 のアミノ酸番号による)
シグナル配列:BIP	18	1 - 18
KpnI RE 部位の残骸	3	19 - 21
抗原:AIV H9 HA 外部ドメイン	491	22 - 512
抗原:Foldon 三量体化ドメイン	29	513 - 541
PacI RE 部位の残骸	3	542 - 544
リンカー	5	545 - 549
NotI RE 部位の残骸	3	550 - 552
結合ドメイン:CD83-scFv	248	553 - 800
XbaI RE 部位の残骸	2	801 - 802
マーカー:V5 タグ	14	803 - 816
マーカー:6xHis タグ	6	817 - 822

10

リンカー及びCD83-scFvを含まない対照構築物を調製した。この構築物は、配列番号 12 のアミノ酸 545～802 の領域を欠き、配列番号 13 のアミノ酸配列を含んでいた。

20

【0112】

配列番号 12 及び 13 と同様の構築物は、他の HA 抗原配列、すなわち、例えば、配列番号 4 及び 5 にそれぞれ示される、H5 HA 外部ドメイン又は H7 HA 外部ドメインのうちの 1 つを使用して容易に作製することができる。

【0113】

本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、抗原と反応性の抗体は、母体由来の抗体である。

【0114】

本発明では、既存の抗体が母体由来であるか否かを容易に確かめることができ、実際には、2～4 週齢未満の雛鳥のみがMDAを有する。また、MDAは主にIgYからなり、これは哺乳動物IgGの機能的ホモログであるが、構造的に異なり、IgYはIgGの3つと比較して4つの重鎖定常ドメインを有する。

30

【0115】

本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、保護される鳥類は家禽である。より好ましくは、家禽は、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル及びガチョウから選択される。更により好ましくは、家禽はニワトリである。

【0116】

本発明の場合、鳥類は、任意のタイプ、品種、又は亜種のものであり得、例えば、産卵鶏、種鶏、ブロイラー、雑種、又はそのような品種のいずれかの親系統であり得る。好ましい家禽の種類は、ブロイラー、種鶏及び産卵鶏から選択される。より好ましいのは、ブロイラータイプ及び産卵鶏タイプの家禽である。ブロイラー家禽が最も好ましい。

40

【0117】

記載されるように、本発明は、血清陽性鳥類を病原体から保護する方法に使用するための組換えタンパク質を提供する。この方法は、既存の抗体が以前の能動的ワクチン接種の結果である老齢の鳥、又は既存の抗体がMDAである若鳥のいずれかに有利に適用することができる。

【0118】

したがって、本発明による使用のための組換えタンパク質の一実施形態では、保護される鳥類は4週齢未満であり、好ましくは3週齢未満であり、より好ましくは2週齢未満であり、更により好ましくは1週齢未満であり、更により好ましくは1日齢（すなわち、孵化日）である。一実施形態では、保護される鳥類は、胚発生から約18日目（すなわち卵

50

内)である。

【0119】

本発明による使用のための組換えタンパク質の代替実施形態では、保護される鳥類は2週齢以上である。

【0120】

記載されるように、本発明による使用のための組換えタンパク質は、間接的な使用によって、すなわち組換えベクター、例えば、DNAプラスミド、RNA分子又はウイルスベクターから組換えタンパク質を発現させることによって同様にうまく適用することができる。

【0121】

したがって、さらなる態様では、本発明は、本発明による使用のための組換えタンパク質を発現することができる組換えベクターであって、当該組換えベクターによって発現される組換えタンパク質に含まれる抗原と反応性の抗体を保有する鳥類を、当該抗原が由来する病原体から保護する方法で使用するための組換えベクターに関する。

【0122】

「ベクター」は、適切な条件下、例えば、宿主細胞の中で、その発現を可能にする適切なシグナルと共に、ポリペプチドをコードするための遺伝情報（核酸配列）を運ぶ分子構造として本発明の分野で周知である。本発明に関して、「発現」は、遺伝情報から転写及び／又は翻訳によってタンパク質を発現する周知の原理に関する。

【0123】

そのようなベクターの、DNA又はRNAなどの核酸分子から、ウイルス様粒子及びレプリコン粒子などのより複雑な構造、ウイルスなどの組換え微生物の複製に至る多くの種類及び変形が公知であり、本発明に使用することができる。

【0124】

本発明による使用のための組換えベクターは、その遺伝情報のインビトロ操作によって変更された分子構成を有するので、「組換え」である。行われた変更は、ベクター及び／又はそれが発現するタンパク質の複製、発現、操作、精製、安定性及び／又は免疫学的挙動をもたらす、改善し、又は適合させるのに役立ち得る。これら及び他の技術は、Sambrook & Russell及びAusubelらの標準的な教科書（いずれも前出）、及びC. Dieffenbach & G. Dvekslerの「PCR primers: a laboratory manual」(CSHL Press, ISBN 0879696540)、並びに、J. Bartlett及びD. Stirlingによる「PCR protocols」(Humana press, ISBN: 0896036421)に非常に詳細に説明されている。

【0125】

使用されるベクターの種類に応じて、シス（すなわち、組換えベクター自体の中に提供される）又はトランス（すなわち、別個の供給源から提供される）のいずれかで、多かれ少なかれシグナルを複製及び発現のために提供する必要がある、これはすべて周知である。

【0126】

当業者は、本発明による使用のための組換えベクターを適切な条件下で本発明による使用のための組換えタンパク質を「発現することができる」ようにするために、必要なシグナルを選択し、使用可能な組み合わせに組み合わせるための知識を有する。構築及びクローニングを補助する要素、例えば、制限酵素認識部位又はPCRプライマーの隣に、周知の要素を、プロモーター、終止コドン、終結シグナル、ポリアデニル化シグナル、7-メチルグアノシン（7mG）キャップ構造、並びに機能的スプライスドナー及びアクセプター部位を有するイントロンのうちの1つ以上から選択することができる。

【0127】

本発明による使用のための組換えベクターの実施形態では、組換えタンパク質の特徴、使用、方法、保護、鳥類、抗体、抗原及び病原体はすべて、本明細書で具体化される通り

10

20

30

40

50

である。

【0128】

本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、それが発現する組換えタンパク質は、配列番号12のアミノ酸配列を含む。

【0129】

配列番号12のアミノ酸配列の発現に使用されるヌクレオチド配列は、配列番号14のヌクレオチド配列を含む。

【0130】

したがって、本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、ベクターは配列番号14のヌクレオチド配列を含む。

【0131】

配列番号13の対照タンパク質は、配列番号15のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされる。

【0132】

配列番号14及び15の両方は、これらの細胞における発現を最適化するための、キロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) S2細胞のコドン使用頻度表に対してコドン最適化されている。詳細は後述の通りである。

【0133】

記載されるように、本発明による使用のための組換えベクターは、いくつかの異なる形態を有し得る。

【0134】

したがって、一実施形態では、本発明による使用のための組換えベクターは、核酸、ウイルス及びレプリコン粒子 (RP) から選択される。

【0135】

本発明では、核酸はDNA又はRNAであり得、一本鎖又は二本鎖であり得、天然又は合成起源であり得る。

【0136】

ベクターが核酸である、本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、核酸は真核生物発現プラスミドである。

【0137】

通常DNAの「真核生物発現プラスミド」は、真核細胞において活性なプロモーターの操作制御下で、プラスミドに挿入される異種遺伝子の発現のための適切なシグナルを有する。次いで、プラスミドを、何らかのトランスフェクション方法によって、例えば、生化学物質をキャリアとして使用することによって、機械的手段によって、又はエレクトロポレーションによって真核生物宿主細胞又は宿主生物に挿入することができ、異種遺伝子挿入物の発現をもたらす。典型的には、そのような発現は、プラスミドが宿主細胞のゲノムへの安定な組み込みのためのシグナルを欠くので、一過性であり、したがって、そのようなプラスミドは、典型的には、宿主又は宿主細胞を形質転換又は不死化しない。これらの材料及び手順はすべて当技術分野で周知であり、ハンドブックに記載されている。

【0138】

そのような真核生物発現プラスミドは、様々な供給業者から市販されており、例えば、一連のプラスミド: pcDNA (商標)、pCR3.1 (商標)、pCMV (商標)、pFRT (商標)、pVAX1 (商標)、pCI (商標)、Nanoplasmid (商標)、pCAGGSなどである。

【0139】

好ましい実施形態では、真核生物発現プラスミドは、pFRTプラスミド (Thermo Fisher Scientific) 又はpCAGGSプラスミド (Niwaら、1991, Gene, vol. 108, p. 193-199) である。

【0140】

真核生物発現プラスミドは、発現、精製などの調節のためのいくつかの特徴を含むこと

10

20

30

40

50

ができる。1つの可能なシグナルは抗生物質耐性遺伝子であり、これは構築及びクローニングプロセス中の選択に使用され得る。しかしながら、ヒト又は動物標的への投与を意図する場合、そのような抗生物質を選択することは、抗生物質耐性を発生させる恐れのために望ましくない。

【0141】

ベクターが核酸であり、核酸が真核生物発現プラスミドである、本発明による使用のための組換えベクターの好ましい実施形態では、プラスミドは抗生物質耐性遺伝子を含有しない。

【0142】

本発明による使用のための組換えベクターは、真核生物発現プラスミドの形態で、宿主細胞又は標的生物に送達することができ、宿主細胞において本発明のHA幹ポリペプチドを発現する。発現プラスミドの送達は、いくつかの方法であり得、例えば、機械的又は化学的手段によって、裸のDNAとして、又はタンパク質、多糖、脂質若しくはポリマーなどの適切な（ナノ粒子）担体でカプセル化することができる。核酸担体の周知の例は、デンドリマー、脂質ナノ粒子、カチオン性ポリマー及びプロタミンである。

【0143】

本発明による使用のための組換えベクターの真核生物発現プラスミドとしての特別な形態は、プラスミドがレプリコンRNAの送達を可能にする場合である。

【0144】

したがって、ベクターが核酸であり、核酸が真核生物発現プラスミドである、本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、プラスミドはレプリコンRNAをコードする。

【0145】

「レプリコンRNA」は、本発明の組換えポリペプチドをコードする核酸に加えて、レプリカーゼ遺伝子などのRNA複製に必要な要素を含む自己複製RNAである。しかし、レプリコン粒子（RP）とは異なり、レプリコンRNAはウイルス構造タンパク質によってパッケージングされないため、宿主細胞に単独で侵入する効率は低い。

【0146】

レプリコンRNAをコードするプラスミドは、タンパク質発現プラスミドと同じ方法で宿主細胞に送達することができる。

【0147】

レプリコンRNAをコードする真核生物発現プラスミドによるワクチン接種は、真核生物発現プラスミド発現タンパク質によるワクチン接種を超える利点をもたらす、というのも、レプリコンRNAによって増幅工程がなされる、すなわち、レプリカーゼの翻訳により、レプリコンRNAが本発明による使用のための組換えタンパク質をコードするサブゲノムメッセンジャーRNAを産生するからである。これは、宿主細胞及び標的鳥類のそれぞれにおいて、大量の組換えタンパク質の発現をもたらす。

【0148】

ベクターが核酸であり、核酸が真核生物発現プラスミドであり、プラスミドがレプリコンRNAをコードする、本発明による使用のための組換えベクターの好ましい実施形態では、レプリコンRNAは、アルファウイルスベースのレプリコンRNAであり、より好ましくは、アルファウイルスベースのレプリコンRNAはベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）ベースのレプリコンRNAである。

【0149】

VEEVレプリコンRNAをコードする真核生物発現プラスミドの例は、例えば、ヒトCMV前初期遺伝子1プロモーターなどの真核生物プロモーターによって駆動されるVEEV非構造タンパク質遺伝子1-4を含むpVAXプラスミド（Thermo Fisher Scientific）である。

【0150】

ベクターが核酸である、本発明による使用のための組換えベクターの代替実施形態では

10

20

30

40

50

、核酸はRNA分子である。

【0151】

本発明のRNA分子は、異なる形態及び機能を有することができ、例えば、mRNAであってもよく、又はレプリコンRNAであってもよい。

【0152】

本発明による使用のためのRNA分子としての組換えベクターは、様々な方法で、例えば、機械的又は化学的手段によって鳥類又は宿主細胞に送達することができ、又は本明細書に記載されているように、タンパク質、多糖、脂質若しくはポリマーなどの適切な（ナノ粒子）担体でカプセル化することができる。安定化するために、RNAヌクレオチド類似体又は特定の化学修飾を、例えば、ヌクレオチド又はそれらの骨格に組み込むことができ、又は適用することができる。

10

【0153】

ベクターが核酸であり、核酸がRNA分子である、本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、RNA分子はmRNAである。

【0154】

「mRNA」（メッセンジャーRNA）は、当技術分野で周知であり、典型的には、5' 7-メチルグアノシン（7mG）キャップ及び3' ポリA尾部を有する。mRNAは、トランスフェクションによって、且つ／又は適切な担体、例えば、ポリマー若しくはカチオン性脂質を使用することによって、真核生物宿主生物又は宿主細胞に送達することができる。

20

【0155】

ベクターが核酸であり、核酸がRNA分子である、本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、RNA分子はレプリコンRNAである。

【0156】

レプリコンRNAは、例えば、本明細書に記載のpVAXプラスミドを使用してインビトロで産生され、次いで任意の適切な方法を使用して宿主細胞又は標的生物に投与することができる。

【0157】

異種タンパク質の発現及び送達のための複製組換えウイルスベクターの形態の組換えベクターは、当技術分野で周知である。これらは、ウイルスベクターが標的鳥類において複製及び増幅するので、ワクチン接種の効率的な方法を提供する。組換えベクターウイルスの構築及び改変は定型的なものであり、標準的な分子生物学的技術を用いて行うことができる。

30

【0158】

したがって、本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、組換えベクターはウイルスである。

【0159】

本発明の場合、ウイルスベクターは、鳥類において複製するウイルスである。多くの異なるウイルス種が、鳥類のための組換えベクターとして長きにわたって使用されてきた。

【0160】

ベクターがウイルスである、本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、ウイルスは、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、パラミクソウイルス、及びアデノウイルスから選択される。

40

【0161】

鳥類用のベクターとして使用することができる好適なベクターウイルスの例は当技術分野で周知であり、例えば、ヘルペスウイルスの例は、七面鳥ヘルペスウイルス（HV T）又は血清型1又は2のマレック病ウイルス（MDV）であり、ポックスウイルスの例は鶏痘ウイルスであり、パラミクソウイルスの例はNDVであり、アデノウイルスの例は家禽アデノウイルスである。

【0162】

50

ベクターがウイルスであり、ウイルスがヘルペスウイルスである、本発明による使用のための組換えベクターの好ましい実施形態では、ヘルペスウイルスは、H V T、M D V 1 及びM D V 2 から選択される。

【0163】

インフルエンザH A 遺伝子を発現及び送達する組換えウイルスベクターの例は、国際公開第2012/052384号及び欧州特許第19218804.3号にベクターとしてのH V Tについて記載されている。ベクターとしてのN D Vについては、国際公開第2007/106882号に例が記載されている。

【0164】

組換えウイルスベクターの構築のために、典型的には、発現カセットがベクターのゲノム内の遺伝子座に挿入される。遺伝子座及びその挿入の向きを制御するために、様々な技術が利用可能である。例えば、ベクターのゲノムからの適切な隣接セクションを使用して、例えば、米国特許第5,961,982号に記載されているように重複C o s m i d s を使用することによる相同組換えプロセスによってカセットの組み込みを指示することによって。あるいは、この組み込みは、C R I S P R / C a s 技術を使用して行われてもよい。

【0165】

「発現カセット」は、コードされたタンパク質の発現を可能にするために、少なくとも1つの異種遺伝子と、その遺伝子の転写を駆動する1つのプロモーターとを含む核酸断片である。転写の終了は、カセットのゲノム挿入部位によって提供される配列によってもたらされ得るか、又は発現カセット自体が転写ターミネーターなどの終結シグナルを含み得る。そのようなカセットでは、プロモーター及びターミネーターの両方が、それらが発現を調節する遺伝子に近接している必要があり、これは「作動可能に連結されている」と呼ばれ、それによって、転写の効果的な開始、終了のそれぞれに介入する有意な他の配列はそれらの間に存在しない。当業者には明らかなように、発現カセットは自己完結型発現モジュールであり、したがって、ベクターウイルスゲノムに対するその読み取り方向の向きは一般に重要ではない。

【0166】

本発明による使用のためのベクターとしてのウイルスの使用以外に、本発明による使用のための組換えベクターは、ビリオンに似た高分子構造によって鳥類に送達及び発現させることもできる。例は、ウイルス様粒子(V L P)又はレプリコン粒子(R P)である。

「単一サイクル」感染性粒子として知られているこれらの構造は、宿主細胞に感染し、それが有する異種遺伝子を発現するのに必要な特徴を含むが、それらが構築されたウイルスゲノム(の関連部分)がないため、通常は完全なウイルス複製ができない。これは、組み込まれた安全機能として機能する。

【0167】

「R P」は周知であり、様々なタンパク質の発現及び送達のためのプラットフォームとしていくつかのR Pが開発されている。R Pとして好ましい基礎原料は、その広い宿主域及び迅速な複製のゆえにアルファウイルスである。もちろん、一部のアルファウイルスは野生型形態では病原性が高いため、そのようなR Pの感染を弱め制御するために適切な安全対策を講じる必要がある。総説については、K a m r u d ら(2010, J. Gen. Virol., vol. 91, p. 1723-1727)、及びV a n d e r V e e n ら(2012, Anim. Health Res. Rev., vol. 13, p. 1-9)を参照されたい。

【0168】

したがって、本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、ベクターはR Pである。好ましくは、R PはアルファウイルスR Pである。より好ましくは、アルファウイルスR PはV E E V R Pである。

【0169】

好ましいアルファウイルスR Pは、ヒト、ブタ、家禽及び魚用の組換えベクターワクチ

10

20

30

40

50

ンとして適用されている V E E V に基づく。V E E V ベースのアルファウイルス R P を構築し、試験し、使用するのための方法及びツールは周知且つ入手可能であり、例としては、Pushko ら (1997, Virology, vol. 239, p. 389-401) 及び国際公開第 2019/110481 号を参照されたい。好ましい V E E V R P 技術は、Sirravaxsm RNA Particle 技術 (Harris ワクチン) である。

【0170】

R P 用の R N A は、以下のようにインビトロで簡便に作製することができる。すなわち、D N A プラスミドを使用して遺伝子を R N A に翻訳し、これを回収し、V E E V 構造タンパク質をトランスでコードするヘルパー R N A と共に宿主細胞にトランスフェクトする。

10

【0171】

記載されるように、本発明による使用のための組換えベクターは、例えば、その標的にワクチン接種する方法として、本発明による使用のための組換えタンパク質を鳥類に送達及び発現させるために有利に使用することができる。これは、ある段階で、そのベクターを鳥類に投与することを含み、例えば、その場合、ベクターは D N A 発現プラスミド又は R N A 分子などの核酸である。

【0172】

また、ベクターは、ベクターの増幅及び／又は組換えタンパク質の発現のためにインビトロで宿主細胞に導入されてもよく、その後、宿主細胞 (ベクター及び／又はタンパク質を含む) が鳥類に投与され、例えば、その場合、ベクターはウイルスベクター、例えば、H V T である。

20

【0173】

更に、ベクターを組換えタンパク質の発現のための組換え発現系の細胞に導入し、タンパク質をその細胞培養物から回収し、上記のように鳥類にワクチン接種するために使用することができる。また、本発明による使用のための組換えベクターに感染し又はそれがトランスフェクトされ、本発明による使用のための組換えタンパク質を含有及び／又は発現する宿主細胞それ自体を、本発明の保護する方法に使用することができ、例えば、感染し又はトランスフェクトされた宿主細胞それ自体を鳥類のワクチン接種に使用することができる。

30

【0174】

適用されるベクターのタイプに応じて、宿主細胞へのその導入は、本明細書に記載されるように、担体又は何らかのトランスフェクション方法を必要とし得、又はベクター自体によって誘導され得る。

【0175】

したがって、さらなる態様では、本発明は、インビトロで維持される宿主細胞に関し、当該宿主細胞は、本発明による使用のための組換えタンパク質及び／又は本発明による使用のための組換えベクターを含む。

【0176】

本発明の「宿主細胞」は、本発明による使用のための組換えタンパク質の発現を可能にし、且つ／又は本発明による使用のための組換えベクターの複製を可能にする細胞である。

40

【0177】

本発明の宿主細胞は、インビトロで維持される初代細胞であり得、例えば、懸濁液中、単層中、又は組織中で維持され得る。

【0178】

あるいは、宿主細胞は、インビトロで維持される不死化細胞、例えば、ほぼ無限に成長及び分裂することができる確立された細胞株由来の細胞であり得る。宿主細胞のタイプに応じて、本発明の H A 幹ポリペプチドの発現は、多かれ少なかれ広範囲の翻訳後プロセッシング、例えば、シグナルペプチド切断、ジスルフィド結合形成、グリコシル化及び／又は

50

脂質修飾を含むであろう。

【0179】

初代細胞と不死化宿主細胞は、同じ種又は異なる種のものであり得る。また、一方又は両方は、本発明の保護する方法の対象である鳥類と同じ種又は異なる種であってもよい。

【0180】

使用される宿主細胞の多くは線維芽細胞及びリンパ球である。本発明の組換えベクターウイルスとしてHVTを使用する場合、宿主細胞は好ましくは初代ニワトリ胚線維芽細胞（CEF）であり、これは記載されているように使用及び保存することができ、例えば、国際公開第2019/121888号を参照されたい。

【0181】

本発明の宿主細胞の一実施形態では、当該宿主細胞は、好ましくは不死化鳥類細胞である。いくつかの不死化鳥類細胞株が、例えば、国際公開第97/044443号及び国際公開第98/006824号に記載されており、より好ましくは、本発明の不死化鳥類宿主細胞は不死化CEFであり、更により好ましくは、国際公開第2016/087560号に開示されている不死化CEFである。

【0182】

本発明の宿主細胞の一実施形態では、当該宿主細胞は、好ましくは組換え発現系の細胞である。発現系由来の細胞の例は、例えば、細菌、酵母、昆虫、鳥類、又は哺乳動物由来の細胞である。

【0183】

細菌発現系由来の細胞は、例えば、エシェリヒア属（*Escherichia*）、バチルス属（*Bacillus*）、サルモネラ属（*Salmonella*）、カウロバクター属（*Caulobacter*）又はラクトバチルス属（*Lactobacillus*）由来の細胞である。

【0184】

酵母発現系由来の細胞は、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）又はピキア・パストレス（*Pichia pastoris*）由来の細胞である。

【0185】

昆虫細胞発現系由来の細胞は、例えば、キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）由来の細胞、例えば、Schneider 2（S2）細胞、又はバキュロウイルスー昆虫細胞発現系で使用するための細胞、すなわち、スポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）由来の細胞、例えば、Sf21細胞又はSf9細胞、又はTrichoplusia ni由来の細胞、例えば、High Five（商標）細胞である。

【0186】

哺乳動物発現系由来の細胞は、例えば、ハムスター由来の細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。

【0187】

これらのすべての細胞株及び組換え発現系におけるそれらの対応する使用は当技術分野で周知であり、定型的な技術及び材料を用いて使用することができる。

【0188】

本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、本発明による使用のための組換えタンパク質をコードする核酸はコドン最適化されている。

【0189】

コドン最適化は周知であり、発現系における遺伝子の発現レベルを改善するために適用され、これは典型的には遺伝子の起源のそれとは異なる状況である。最適化は、目的のアミノ酸をコードするためのヌクレオチド配列の適合を含むが、ある意味では、これは配列が発現される組換えベクター、宿主細胞、又は標的生物のコドン優先度（tRNAレパートリー）に対応する。その結果、適用されるヌクレオチド変異はサイレントである。

【0190】

したがって、本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、本発明による使用のための組換えタンパク質は、本発明を保護するための方法によって保護されることが意図されている鳥類生物に対してコドン最適化された核酸配列によってコードされる。好ましくは、コドン最適化は家禽に対するものである。より好ましくは、コドン最適化は、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル及びガチョウから選択される家禽に対するものである。

【0191】

本発明による使用のための組換えベクターの一実施形態では、本発明による使用のための組換えタンパク質は、組換え発現系の細胞、好ましくは細菌、酵母、昆虫、鳥類、又は哺乳動物由来の細胞に対してコドン最適化された核酸配列によってコードされる。より好ましくは、核酸は昆虫細胞に対して最適化され、更により好ましくは、*Drosophila Schneider* 2 (S2) 細胞に対して最適化される。

10

【0192】

本発明による使用のための組換えタンパク質及び使用のための組換えベクターは、いずれも特定の管轄に適するように他の表現によって特徴付けることもできる。

【0193】

したがって、さらなる態様では、本発明は、病原体から鳥類を保護するためのワクチンの製造のための、本発明による使用のための組換えタンパク質の使用又は本発明による使用のための組換えベクターの使用に関し、それにより、当該組換えタンパク質に含まれるか、又は当該組換えベクターによって発現される組換えタンパク質に含まれる抗原は、当該病原体に由来し、当該鳥類が、当該抗原と反応性の抗体を保有することを特徴とする。

20

【0194】

本発明によるワクチンの製造のための組換えタンパク質又は組換えベクターの実施形態のいずれにおいても、組換えタンパク質、組換えベクター、保護、鳥類、病原体、抗原及び抗体の特徴は、すべて本明細書で実施される通りである。

【0195】

「ワクチン」は、薬学的に許容される担体の中に、保護的な免疫学的効果を誘導することができる少なくとも1つの化合物を含む組成物であることはよく知られている。本発明の「免疫学的に活性な化合物」は、本発明による使用のための組換えタンパク質又は本発明による使用のための組換えベクターである。

30

【0196】

本発明のためのワクチンの製造は、当技術分野で周知の定型的な方法及び手順を使用し行うことができる。医薬品製造のための周知の基準の下でワクチンの製造に適用される一般的な技術及び考慮事項は、例えば、政府の指令及び規制（薬局方、9 CFR）並びに「Veterinary vaccinology」及び「Remington」（いずれも前出）などの周知のハンドブックに記載されている。一般に、そのようなワクチンは無菌で調製され、医薬品品質グレードの賦形剤を使用して調製される。

【0197】

そのような製造には、無菌性及び外来性薬剤の非存在に関する微生物学的試験が組み込まれ、有効性及び安全性を確認するためのインビボ又はインビトロでの実験が含まれ得る。品質、量、無菌性、安全性及び有効性についての試験が完了した後、ワクチンを販売することができる。これらはすべて当業者に周知である。

40

【0198】

例えば、本発明による使用のための組換えタンパク質が組換え発現系によって産生される場合、タンパク質は、発現系培養物から、例えば、全培養物として回収され得る。あるいは、回収物は、そのような培養物の一部、例えば、細胞培養物の遠心分離後の上清若しくは細胞ペレット、又は濾過後の濾液若しくは残余分であり得る。上清は、培養物が、例えば、一晚放置することによって重力沈降した後に、又は遠心分離によって得ることができ、濾液は、濾過時にフィルタを通過するものである。

50

【0199】

記載されているように、本発明による使用のための組換えタンパク質及び本発明による使用のための組換えベクターは、当該組換えタンパク質及び／又は当該組換えベクターを含むワクチンを介して、鳥類の保護においてそれらの有利な効果を達成する。

【0200】

したがって、さらなる態様では、本発明は、本発明による使用のための組換えタンパク質を含むか又は本発明による使用のための組換えベクターを含むワクチン及び薬学的に許容される担体に関し、当該組換えタンパク質に含まれるか、又は当該組換えベクターによって発現される組換えタンパク質に含まれる抗原と反応性の抗体を保有する鳥類を、当該抗原が由来する病原体から保護する方法で使用するためのものに関する。

10

【0201】

本発明による使用のためのワクチンの実施形態では、組換えタンパク質、組換えベクター、使用、方法、保護、鳥類、抗体、抗原及び病原体の特徴は、すべて本明細書に具体化される通りである。

【0202】

「薬学的に許容される担体」は、ワクチンの安定化及び投与を助けることがよく知られており、その上、比較的無害であって、ワクチン接種者に忍容性が高い。そのような担体は、例えば、水又は生理学的塩溶液であり得る。より複雑な形態では、担体は、例えば、安定剤又は保存剤などのさらなる添加剤を含み得る緩衝剤であり得る。その詳細及び例は、例えば、「Remington: the science and practice of pharmacy」(2000, Lippincott, USA, ISBN: 683306472) 及び「Veterinary vaccinology」(P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681) などの周知のハンドブックに記載されている。

20

【0203】

本発明によるワクチンが複製ウイルスである組換えベクターを含む場合、薬学的に許容される担体は、好ましくは、そのウイルス、又はそのウイルスが含有される宿主細胞を安定化する組成物である。例としては、いくつかのウイルスワクチン希釈剤、及び典型的には、例えば、糖、アミノ酸、生理学的緩衝液（例えば、生理食塩水、PBS、又は50 mM HEPES）、及び多くの場合アルブミン、ポリマーなどの嵩高い化合物を含む凍結又は凍結乾燥保存用の安定剤がある。例えば、ワクチンが組換えHVTベクターを含む場合、そのようなワクチンは典型的には細胞関連製品として市販されている。その場合、薬学的に許容される担体は、好ましくは、約10%血清及び約6% DMSOの培養培地の混合物である。この担体はまた、凍結中及び凍結保存中のHVT感染宿主細胞の安定化をもたらす。血清は、胎児又は新生仔ウシ血清などの細胞培養に定型的に使用される任意の血清であり得る。

30

【0204】

本発明によるワクチンが、核酸又はRPである本発明による使用のための組換えベクターを含む場合、薬学的に許容される担体は、単純な緩衝液、例えば、5% w/v スクロースを含むリン酸緩衝液であり得る。

40

【0205】

更に、本発明での使用のために組換えベクターを安定化及び／又は送達するために、例えば、核酸又はRPである本発明による組換えベクターをタンパク質、多糖、脂質又はポリマーなどの適切な（ナノ粒子）担体でカプセル化するために、追加の担体を添加することができる。好ましくは、RPである本発明による組換えベクターのための追加の担体は、国際公開第2012/165953号に記載されているような生分解性ポリアクリルポリマーであるナノゲルを含む。

【0206】

明らかに、組換えベクター又はそのようなベクターを含むインビトロ宿主細胞は、いずれも本発明において、生きたまま（すなわち、複製）又は死んだ状態で（非複製的、又は

50

不活性化) 本明細書で使用するすることができる。次に、組換えベクター又は宿主細胞の一部のみを、いずれも本発明においては、例えば、ペレット、上清、濃縮物、透析液、抽出物、超音波処理液、溶解物として、又はベクター及び／又は宿主細胞を含む組成物、例えば、培養物の一部として使用することができる。これはすべて当業者に周知である。

【0207】

本発明による使用のためのワクチンが本発明による使用のための組換えタンパク質を含む場合、ワクチンは、誘導された免疫応答を刺激するためのアジュバントを含むことができる。

【0208】

したがって、一実施形態では、本発明による使用のためのワクチンはアジュバントを含む。

【0209】

「アジュバント」は、標的の免疫応答を非特異的に刺激する周知のワクチン成分である。多くの異なるアジュバントが当技術分野で公知である。アジュバントの例は、完全又は不完全フロイントアジュバント、ビタミンE又はアルファートコフェロール、非イオン性ブロックポリマー及びポリアミン、例えば、硫酸デキストラン、Carbopol (商標)、ピラン、サポニン、例えば、Quil A (商標) 又はQ-vac (商標) である。サポニン及びワクチン成分は、ISCOM (商標) 中で組み合わせることができる。更に、ムラミルジペプチド、ジメチルグリシン及びタフトシンなどのペプチド。また、アルミニウム塩、例えば、Alhydrogel (商標) (Brenntag Biosector)、Rehydragel (商標) (Reheis) 及びRehsorptar (商標) (Armour Pharmaceutical) として入手可能なリン酸アルミニウム又は水酸化アルミニウムなど。

【0210】

広く使用されているアジュバントは、油、例えば、鉱油、例えば、軽質 (白色) 鉱物 (パラフィン) 油、又は非鉱油、例えば、スクアレン、スクワラン、植物油又はその誘導体、例えば、オレイン酸エチルである。また、ISA (商標) (Seppic) 又はDiluvac Forte (商標) 及びXsolve (商標) (両方ともMSD Animal Health) などの組み合わせ製品も有利に使用することができる。

【0211】

アジュバント並びにその使用及び効果に関するハンドブックは、「Vaccine adjuvants」(Methods in molecular medicine, vol. 42, D. O'Hagan ed., 2000, Humana press, NJ, ISBN: 0896037355) である。

【0212】

アジュバントは、いくつかの態様で、本発明による使用のためのワクチンに含まれ得る。アジュバントが油を含む場合、ワクチンは水性形態で提供することができ、また、油とのエマルジョンとして、異なる態様で、すなわち、油中水型 (W/O)、水中油型 (O/W) として、又はW/O/W若しくはO/W/Oのいずれかの二重エマルジョンとして、製剤化することができる。

【0213】

「エマルジョン」は、少なくとも2つの不混和性液体の混合物であり、それによって一方が他方に分散される。典型的には、分散相の液滴は、非常に小さく、マイクロメートル以下の範囲である。

【0214】

任意の規模でエマルジョンを調製するための手順及び装置は、当技術分野で周知である。エマルジョンを安定化するために、1つ以上の乳化剤を使用することができる。

【0215】

「乳化剤」は、両親媒性を有し、疎水性の側面と親水性の側面の両方を有する分子である。多くの乳化剤は、それらの様々な特性で当技術分野において公知である。ほとんどは

10

20

30

40

50

、商業的に容易に入手可能であり、いくつかの純度のものがある。ワクチン用の一般的な乳化剤は、ソルビタンモノオレエート（Span（登録商標）80）及びポリオキシエチレン-ソルビタンモノオレエート（ポリソルベート80、又はTween（登録商標）80）である。

【0216】

乳化剤（の混合物）の特性を特徴付ける周知の方法は、HLB数（hydrophilic-lipophile balance; Griffin, 1949, J. Soc. Cosm. Chem., vol. 1, p. 311-326）である。典型的には、HLB数が10未満の乳化剤又は乳化剤混合物はW/Oエマルジョンに都合がよく、HLB数が10～16の乳化剤（混合物）はO/Wエマルジョンに都合がよい。

10

【0217】

エマルジョン安定剤も添加することができ、その例は、ベンジルアルコール、トリエタノールアミンである。

【0218】

ワクチンがアジュバントを含む、本発明による使用のためのワクチンの好ましい実施形態では、アジュバントが油を含む。より好ましくは、油は鉱油を含む。更により好ましくは、鉱油は、軽質（又は白色）流動パラフィン油を含む。

【0219】

軽質流動パラフィン油の例は、Drakeol（登録商標）6 VR（Penreco）、Marcoil（登録商標）52（Exxon Mobile）及びKlearol（登録商標）（Sonneborn）である。

20

【0220】

ワクチンがアジュバントを含み、アジュバントが油を含む、本発明による使用のためのワクチンの好ましい実施形態では、ワクチンは油中水型エマルジョンとして製剤化される。

【0221】

他の表現及び特定の管轄では、本発明のさらなる態様は以下のように定義することができる。

【0222】

さらなる態様では、本発明は、病原体から鳥類を保護するための、本発明による使用のための組換えタンパク質、又は本発明による使用のための組換えベクター、又は本発明による使用のためのワクチンの使用に関し、それにより、当該組換えタンパク質に含まれるか、又は当該組換えベクターによって発現される組換えタンパク質に含まれる抗原は、当該病原体に由来し、当該鳥類が、当該抗原と反応性の抗体を保有することを特徴とする。

30

【0223】

本発明による使用の一実施形態では、その使用は、本発明のすべての、組換えタンパク質、組換えベクター、又はワクチンの鳥類への投与を含む。

【0224】

本発明による使用の実施形態では、組換えタンパク質、組換えベクター、ワクチン、使用、方法、保護、鳥類、病原体、抗原、及び抗体の特徴はすべて、本明細書で具体化される通りである。

40

【0225】

さらなる態様では、本発明は、病原体から鳥類を保護するための方法であって、本発明による使用のためのワクチンを当該鳥類に投与する工程を含み、当該ワクチンに含まれる抗原が当該病原体に由来し、当該鳥類が、当該抗原と反応性の抗体を保有する、方法に関する。

【0226】

本発明による使用のためのワクチンは、典型的には、鳥類への投与に適し、所望の適用経路及び所望の効果に合った形態で調製される。

【0227】

50

本発明による使用のためのワクチンの適用経路に応じて、ワクチンの組成物を適合させることが必要な場合がある。これは十分に当業者の能力の範囲内であり、ワクチンの有効性又は安全性の微調整を全体的に含む。これは、ワクチンの用量、量、頻度、経路を適合させることによって、別の形態又は製剤のワクチンを使用することによって、又はワクチンの賦形剤（例えば、安定剤又はアジュバント）の1つを適合させることによって行うことができる。

【0228】

本発明によるワクチンは、原則として、鳥類に対して、異なる投与経路によって、それらの生存期間における異なる時点で与えることができ、具体的には、ワクチンは、本発明による使用のための組換えタンパク質中の抗原と反応性の抗体を保有する任意の年齢の鳥類に投与することができる。

10

【0229】

投与を可能な限り早期に投与する場合、孵化日（「1日目」）に、又は正に卵内で、例えば、胚発生から約18日間に投与することができ、これらはすべて当技術分野で周知である。

【0230】

工業規模での受精卵へのワクチンの自動注射のための装置は市販されている。これは、労働コストを最小限に抑えつつ、可能な限り早期の保護を提供する。卵黄嚢、胚、又は尿膜腔中など、卵内接種経路の異なるものが知られており、これらは、必要に応じて定型的に最適化することができる。

20

【0231】

本発明による使用のためのワクチンは、卵内又は非経口のいずれかでの注射に適した注射液として製剤化することができる。

【0232】

一実施形態では、本発明による使用のためのワクチンは、懸濁液、溶液、分散液、及びエマルジョンから選択される液体として製剤化される。

【0233】

一実施形態では、本発明による使用のためのワクチンは、非経口経路によって投与される。好ましくは、非経口経路は、筋肉内経路又は皮下経路によるものである。

【0234】

組換えタンパク質又は組換えベクターの正確な量は、いずれも本発明においては重要ではなく、異なる量の保護効果を比較することによって容易に確立することができる。

30

【0235】

また、本発明による使用のためのワクチンがウイルスベクターを含む場合、これはワクチン接種された鳥類において複製することができ、鳥類において増殖性感染を確立するのに十分な量で投与するだけでよい。

【0236】

例えば、本発明による使用のためのウイルスベクターが組換えHVTである場合、適切な接種用量は、動物用量あたり $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ プラーク形成単位（pfu）の本発明のHVTであり、好ましくは、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ pfu/用量、更により好ましくは500～5000 pfu/用量、最も好ましくは約1000～約3000 pfu/用量である。本発明のHVTのウイルス粒子を計数する方法は周知である。

40

【0237】

本発明による使用のためのHVTベクターが細胞関連である場合、これらの量のHVTは感染宿主細胞の中に含まれる。

【0238】

本発明による使用のためのワクチンの動物用量あたりの体積は、意図された適用経路に従って最適化することができ、卵内接種は一般に0.01～0.5 ml/卵の体積で与えられ、鳥類における非経口注射は一般に0.1から1 ml/鳥の体積で与えられる。

【0239】

50

本発明によるワクチンの免疫学的有効量の決定、又は動物用量あたりのワクチンの体積の最適化は、いずれも十分に当業者の能力の範囲内である。

【0240】

本発明による使用のためのワクチンを鳥類に適用するための投与レジメンは、単回又は複数回用量であり得、ワクチンの製剤と適合する様式であり得、免疫学的に有効であろう量であり得る。

【0241】

好ましくは、本発明による使用のためのワクチンの投与のためのレジメンは、動物へのストレスを軽減し、労働コストを削減するために、標的鳥類が必要とし得る他のワクチンの既存のワクチン接種スケジュールに統合される。これらの他のワクチンは、それらの登録された使用に適合する様式で、同時に、並行して又は逐次様式で投与することができる。

【0242】

10

20

30

40

50

SEQUENCE LISTING

<110> Intervet International BV

<120> Overcoming antibody-interference in avians

<130> 25260

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker for scFv constructs

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 2

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD83-scFv

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Thr Ser Ser Gln Val Leu Leu His Ser
 20 25 30

Pro Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

10

20

30

40

50

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
130 135 140

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
145 150 155 160

Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys
165 170 175

Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asn Pro Thr Asn Gly Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
195 200 205

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Val Ser
210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 3
<211> 491
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

20

30

40

50

<220>

<223> H9 HA ectodomain consensus

<400> 3

Asp Lys Ile Cys Ile Gly His Gln Ser Thr Asn Ser Thr Glu Thr Val
1 5 10 15

Asp Thr Leu Thr Glu Thr Asn Val Pro Val Thr His Ala Lys Glu Leu
20 25 30

Leu His Thr Glu His Asn Gly Met Leu Cys Ala Thr Asn Leu Gly His
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Asp Thr Cys Thr Ile Glu Gly Leu Ile Tyr Gly Asn
50 55 60

Pro Ser Cys Asp Leu Leu Gly Gly Arg Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Arg Pro Ser Ala Val Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asn Val Glu
85 90 95

Asn Leu Glu Glu Leu Arg Thr Leu Phe Ser Ser Ser Ser Tyr Gln
100 105 110

Arg Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr Ile Trp Asn Val Thr Tyr Thr Gly
115 120 125

Thr Ser Lys Ser Cys Ser Asp Ser Phe Tyr Arg Asn Met Arg Trp Leu
130 135 140

Thr Gln Lys Ser Gly Leu Tyr Pro Val Gln Asp Ala Gln Tyr Thr Asn
145 150 155 160

Asn Arg Gly Lys Asp Ile Leu Phe Val Trp Gly Ile His His Pro Pro
165 170 175

Thr Asp Thr Ala Gln Thr Asn Leu Tyr Thr Arg Thr Asp Thr Thr Thr
180 185 190

10

20

30

40

50

Ser Val Thr Thr Glu Asn Leu Asp Arg Thr Phe Lys Pro Val Ile Gly
195 200 205

Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Leu Ile Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp
210 215 220

Ser Val Leu Lys Pro Gly Gln Thr Leu Arg Val Arg Ser Asn Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Gly His Val Leu Ser Gly Glu Ser His Gly
245 250 255

Arg Ile Leu Lys Thr Asp Leu Asn Ser Gly Asn Cys Val Val Gln Cys
260 265 270

Gln Thr Glu Lys Gly Gly Leu Asn Ser Thr Leu Pro Phe His Asn Ile
275 280 285

Ser Lys Tyr Ala Phe Gly Asn Cys Pro Lys Tyr Ile Gly Val Lys Ser
290 295 300

Leu Lys Leu Ala Ile Gly Leu Arg Asn Val Pro Ala Arg Ser Ser Arg
305 310 315 320

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Pro Gly
325 330 335

Leu Val Ala Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Ser Asn Asp Gln Gly Val
340 345 350

Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser Thr Gln Lys Ala Val Asp Lys Ile
355 360 365

Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Lys Met Asn Lys Gln Tyr Glu
370 375 380

Ile Ile Asp His Glu Phe Ser Glu Val Glu Thr Arg Leu Asn Met Ile
385 390 395 400

Asn Asn Lys Ile Asp Asp Gln Ile Gln Asp Val Trp Ala Tyr Asn Ala
405 410 415

10

20

30

40

50

Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gln Lys Thr Leu Asp Glu His Asp
420 425 430

Ala Asn Val Asn Asn Leu Tyr Asn Lys Val Lys Arg Ala Leu Gly Ser
435 440 445

Asn Ala Met Glu Asp Gly Lys Gly Cys Phe Glu Leu Tyr His Lys Cys
450 455 460

Asp Asp Gln Cys Met Glu Thr Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Arg Arg
465 470 475 480

Lys Tyr Lys Glu Glu Ser Arg Leu Glu Arg Gln
485 490

<210> 4
<211> 511
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> H5 HA ectodomain, modified polybasic cleavage site

<400> 4

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asn Gly Val Lys
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Arg Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Arg Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Leu Asn
85 90 95

10

20

30

40

50

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
100 105 110

Lys Ile Leu Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Pro Asn His Glu Thr Ser
115 120 125

Leu Gly Val Ser Ala Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe Phe
130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asp Ala Tyr Pro Thr Ile
145 150 155 160

Lys Ile Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Arg Glu Asp Leu Leu Ile Met Trp
165 170 175

Gly Ile His His Ser Asn Asn Ala Glu Glu Gln Thr Asn Leu Tyr Lys
180 185 190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
195 200 205

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Gln Val Asn Gly Gln Arg Gly
210 215 220

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile His
225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
260 265 270

His Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
290 295 300

10

20

30

40

50

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
305 310 315 320

Pro Gln Gly Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
325 330 335

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
340 345 350

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
355 360 365

Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
370 375 380

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
385 390 395 400

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
405 410 415

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
420 425 430

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
435 440 445

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
450 455 460

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
465 470 475 480

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg
485 490 495

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln
500 505 510

<210> 5
<211> 507

10

20

30

40

50

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> H7 HA ectodomain, modified polybasic cleavage site

<400> 5

Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr Lys Val
1 5 10 15

Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr Glu Thr
20 25 30

Val Glu Arg Thr Asn Thr Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys Arg Thr
35 40 45

Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly Pro Pro
50 55 60

Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile Glu Arg
65 70 75 80

Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn Glu Glu
85 90 95

Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys Glu Pro
100 105 110

Met Gly Phe Thr Tyr Asn Gly Ile Arg Thr Asn Gly Val Thr Ser Ala
115 120 125

Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp Leu Leu
130 135 140

Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser Tyr Lys
145 150 155 160

Asn Thr Lys Glu Ser Pro Ala Ile Ile Val Trp Gly Ile His His Ser
165 170 175

Val Ser Thr Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Lys Leu
180 185 190

10

20

30

40

50

Val Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Val Pro Ser Pro
195 200 205

Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp Phe His
210 215 220

Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe Asn Gly
225 230 235 240

Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys Ser Met
245 250 255

Gly Ile Gln Ser Arg Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly Asp Cys
260 265 270

Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln Asn Ile
275 280 285

Asp Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Arg Ser
290 295 300

Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Val Pro Lys Gly
305 310 315 320

Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu
325 330 335

Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala Gln Gly
340 345 350

Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser Ala Ile Asp Gln
355 360 365

Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Ala Lys Thr Asn Gln Gln Phe
370 375 380

Lys Leu Ile Asp Asn Glu Phe Asn Glu Val Glu Lys Gln Ile Gly Asn
385 390 395 400

10

20

30

40

50

Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Ile Thr Glu Val Trp Ser Tyr Asn
405 410 415

Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Ala
420 425 430

Asp Ser Glu Met Asp Lys Leu Tyr Glu Arg Val Lys Arg Gln Leu Arg
435 440 445

Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu Ile Phe His Lys
450 455 460

Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn Thr Tyr Asp His
465 470 475 480

Arg Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Ile Gln Ile Asp Pro
485 490 495

Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile
500 505

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Foldon, trimerisation domain

<400> 6

Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val
1 5 10 15

Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
20 25

<210> 7
<211> 520
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> H9 HA ectodomain + Foldon

10

20

30

40

50

<400> 7

Asp Lys Ile Cys Ile Gly His Gln Ser Thr Asn Ser Thr Glu Thr Val
1 5 10 15

Asp Thr Leu Thr Glu Thr Asn Val Pro Val Thr His Ala Lys Glu Leu
20 25 30

Leu His Thr Glu His Asn Gly Met Leu Cys Ala Thr Asn Leu Gly His
35 40 45

10

Pro Leu Ile Leu Asp Thr Cys Thr Ile Glu Gly Leu Ile Tyr Gly Asn
50 55 60

Pro Ser Cys Asp Leu Leu Leu Gly Gly Arg Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Arg Pro Ser Ala Val Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asn Val Glu
85 90 95

Asn Leu Glu Glu Leu Arg Thr Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Gln
100 105 110

20

Arg Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr Ile Trp Asn Val Thr Tyr Thr Gly
115 120 125

Thr Ser Lys Ser Cys Ser Asp Ser Phe Tyr Arg Asn Met Arg Trp Leu
130 135 140

Thr Gln Lys Ser Gly Leu Tyr Pro Val Gln Asp Ala Gln Tyr Thr Asn
145 150 155 160

30

Asn Arg Gly Lys Asp Ile Leu Phe Val Trp Gly Ile His His Pro Pro
165 170 175

Thr Asp Thr Ala Gln Thr Asn Leu Tyr Thr Arg Thr Asp Thr Thr Thr
180 185 190

Ser Val Thr Thr Glu Asn Leu Asp Arg Thr Phe Lys Pro Val Ile Gly
195 200 205

40

50

Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Leu Ile Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp
210 215 220

Ser Val Leu Lys Pro Gly Gln Thr Leu Arg Val Arg Ser Asn Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Gly His Val Leu Ser Gly Glu Ser His Gly
245 250 255

Arg Ile Leu Lys Thr Asp Leu Asn Ser Gly Asn Cys Val Val Gln Cys
260 265 270

Gln Thr Glu Lys Gly Gly Leu Asn Ser Thr Leu Pro Phe His Asn Ile
275 280 285

Ser Lys Tyr Ala Phe Gly Asn Cys Pro Lys Tyr Ile Gly Val Lys Ser
290 295 300

Leu Lys Leu Ala Ile Gly Leu Arg Asn Val Pro Ala Arg Ser Ser Arg
305 310 315 320

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Pro Gly
325 330 335

Leu Val Ala Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Ser Asn Asp Gln Gly Val
340 345 350

Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser Thr Gln Lys Ala Val Asp Lys Ile
355 360 365

Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Lys Met Asn Lys Gln Tyr Glu
370 375 380

Ile Ile Asp His Glu Phe Ser Glu Val Glu Thr Arg Leu Asn Met Ile
385 390 395 400

Asn Asn Lys Ile Asp Asp Gln Ile Gln Asp Val Trp Ala Tyr Asn Ala
405 410 415

Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gln Lys Thr Leu Asp Glu His Asp
420 425 430

10

20

30

40

50

Ala Asn Val Asn Asn Leu Tyr Asn Lys Val Lys Arg Ala Leu Gly Ser
435 440 445

Asn Ala Met Glu Asp Gly Lys Gly Cys Phe Glu Leu Tyr His Lys Cys
450 455 460

Asp Asp Gln Cys Met Glu Thr Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Arg Arg
465 470 475 480

Lys Tyr Lys Glu Glu Ser Arg Leu Glu Arg Gln Gly Ser Gly Tyr Ile
485 490 495

10

Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu
500 505 510

Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
515 520

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Linker

<400> 8

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Ctag

<400> 9

Glu Pro Glu Ala
1

40

50

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> V5 tag

<400> 10

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
1 5 10

10

<210> 11
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BIP signal sequence

<400> 11

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
1 5 10 15

20

Leu Gly

<210> 12
<211> 822
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Full recombinant protein

<400> 12

30

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
1 5 10 15

Leu Gly Gly Thr Gly Asp Lys Ile Cys Ile Gly His Gln Ser Thr Asn
20 25 30

Ser Thr Glu Thr Val Asp Thr Leu Thr Glu Thr Asn Val Pro Val Thr
35 40 45

40

50

His Ala Lys Glu Leu Leu His Thr Glu His Asn Gly Met Leu Cys Ala
50 55 60

Thr Asn Leu Gly His Pro Leu Ile Leu Asp Thr Cys Thr Ile Glu Gly
65 70 75 80

Leu Ile Tyr Gly Asn Pro Ser Cys Asp Leu Leu Leu Gly Gly Arg Glu
85 90 95

Trp Ser Tyr Ile Val Glu Arg Pro Ser Ala Val Asn Gly Thr Cys Tyr
100 105 110

Pro Gly Asn Val Glu Asn Leu Glu Glu Leu Arg Thr Leu Phe Ser Ser
115 120 125

Ser Ser Ser Tyr Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr Ile Trp Asn
130 135 140

Val Thr Tyr Thr Gly Thr Ser Lys Ser Cys Ser Asp Ser Phe Tyr Arg
145 150 155 160

Asn Met Arg Trp Leu Thr Gln Lys Ser Gly Leu Tyr Pro Val Gln Asp
165 170 175

Ala Gln Tyr Thr Asn Asn Arg Gly Lys Asp Ile Leu Phe Val Trp Gly
180 185 190

Ile His His Pro Pro Thr Asp Thr Ala Gln Thr Asn Leu Tyr Thr Arg
195 200 205

Thr Asp Thr Thr Thr Ser Val Thr Thr Glu Asn Leu Asp Arg Thr Phe
210 215 220

Lys Pro Val Ile Gly Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Leu Ile Gly Arg
225 230 235 240

Ile Asn Tyr Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Gln Thr Leu Arg Val
245 250 255

Arg Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Gly His Val Leu Ser
260 265 270

10

20

30

40

50

Gly Glu Ser His Gly Arg Ile Leu Lys Thr Asp Leu Asn Ser Gly Asn
275 280 285

Cys Val Val Gln Cys Gln Thr Glu Lys Gly Gly Leu Asn Ser Thr Leu
290 295 300

Pro Phe His Asn Ile Ser Lys Tyr Ala Phe Gly Asn Cys Pro Lys Tyr
305 310 315 320

Ile Gly Val Lys Ser Leu Lys Leu Ala Ile Gly Leu Arg Asn Val Pro
325 330 335

Ala Arg Ser Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu
340 345 350

Gly Gly Trp Pro Gly Leu Val Ala Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Ser
355 360 365

Asn Asp Gln Gly Val Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser Thr Gln Lys
370 375 380

Ala Val Asp Lys Ile Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Lys Met
385 390 395 400

Asn Lys Gln Tyr Glu Ile Ile Asp His Glu Phe Ser Glu Val Glu Thr
405 410 415

Arg Leu Asn Met Ile Asn Asn Lys Ile Asp Asp Gln Ile Gln Asp Val
420 425 430

Trp Ala Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gln Lys Thr
435 440 445

Leu Asp Glu His Asp Ala Asn Val Asn Asn Leu Tyr Asn Lys Val Lys
450 455 460

Arg Ala Leu Gly Ser Asn Ala Met Glu Asp Gly Lys Gly Cys Phe Glu
465 470 475 480

10

20

30

40

50

Leu Tyr His Lys Cys Asp Asp Gln Cys Met Glu Thr Ile Arg Asn Gly
485 490 495

Thr Tyr Asn Arg Arg Lys Tyr Lys Glu Glu Ser Arg Leu Glu Arg Gln
500 505 510

Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val
515 520 525

Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Leu Ile Lys
530 535 540

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Ala Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
545 550 555 560

Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Thr
565 570 575

Ser Ser Gln Val Leu Leu His Ser Pro Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
580 585 590

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe
595 600 605

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
610 615 620

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
625 630 635 640

Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe
645 650 655

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
660 665 670

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
675 680 685

Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
690 695 700

10

20

30

40

50

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn
705 710 715 720

Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile
725 730 735

Asn Pro Thr Asn Gly Asp Ser Thr Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly Lys
740 745 750

Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
755 760 765

Arg Ser Leu Thr Ser Glu Val Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
770 775 780

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
785 790 795 800

Ser Arg Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
805 810 815

His His His His His His
820

<210> 13
<211> 564
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Control recombinant protein

<400> 13

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
1 5 10 15

Leu Gly Gly Thr Gly Asp Lys Ile Cys Ile Gly His Gln Ser Thr Asn
20 25 30

Ser Thr Glu Thr Val Asp Thr Leu Thr Glu Thr Asn Val Pro Val Thr
35 40 45

10

20

30

40

50

His Ala Lys Glu Leu Leu His Thr Glu His Asn Gly Met Leu Cys Ala
50 55 60

Thr Asn Leu Gly His Pro Leu Ile Leu Asp Thr Cys Thr Ile Glu Gly
65 70 75 80

Leu Ile Tyr Gly Asn Pro Ser Cys Asp Leu Leu Leu Gly Gly Arg Glu
85 90 95

Trp Ser Tyr Ile Val Glu Arg Pro Ser Ala Val Asn Gly Thr Cys Tyr
100 105 110

Pro Gly Asn Val Glu Asn Leu Glu Glu Leu Arg Thr Leu Phe Ser Ser
115 120 125

Ser Ser Ser Tyr Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr Ile Trp Asn
130 135 140

Val Thr Tyr Thr Gly Thr Ser Lys Ser Cys Ser Asp Ser Phe Tyr Arg
145 150 155 160

Asn Met Arg Trp Leu Thr Gln Lys Ser Gly Leu Tyr Pro Val Gln Asp
165 170 175

Ala Gln Tyr Thr Asn Asn Arg Gly Lys Asp Ile Leu Phe Val Trp Gly
180 185 190

Ile His His Pro Pro Thr Asp Thr Ala Gln Thr Asn Leu Tyr Thr Arg
195 200 205

Thr Asp Thr Thr Thr Ser Val Thr Thr Glu Asn Leu Asp Arg Thr Phe
210 215 220

Lys Pro Val Ile Gly Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Leu Ile Gly Arg
225 230 235 240

Ile Asn Tyr Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Gln Thr Leu Arg Val
245 250 255

10

20

30

40

50

Arg Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Gly His Val Leu Ser
260 265 270

Gly Glu Ser His Gly Arg Ile Leu Lys Thr Asp Leu Asn Ser Gly Asn
275 280 285

Cys Val Val Gln Cys Gln Thr Glu Lys Gly Gly Leu Asn Ser Thr Leu
290 295 300

Pro Phe His Asn Ile Ser Lys Tyr Ala Phe Gly Asn Cys Pro Lys Tyr
305 310 315 320

Ile Gly Val Lys Ser Leu Lys Leu Ala Ile Gly Leu Arg Asn Val Pro
325 330 335

Ala Arg Ser Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu
340 345 350

Gly Gly Trp Pro Gly Leu Val Ala Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Ser
355 360 365

Asn Asp Gln Gly Val Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser Thr Gln Lys
370 375 380

Ala Val Asp Lys Ile Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Lys Met
385 390 395 400

Asn Lys Gln Tyr Glu Ile Ile Asp His Glu Phe Ser Glu Val Glu Thr
405 410 415

Arg Leu Asn Met Ile Asn Asn Lys Ile Asp Asp Gln Ile Gln Asp Val
420 425 430

Trp Ala Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gln Lys Thr
435 440 445

Leu Asp Glu His Asp Ala Asn Val Asn Asn Leu Tyr Asn Lys Val Lys
450 455 460

Arg Ala Leu Gly Ser Asn Ala Met Glu Asp Gly Lys Gly Cys Phe Glu
465 470 475 480

10

20

30

40

50

Leu Tyr His Lys Cys Asp Asp Gln Cys Met Glu Thr Ile Arg Asn Gly
485 490 495

Thr Tyr Asn Arg Arg Lys Tyr Lys Glu Glu Ser Arg Leu Glu Arg Gln
500 505 510

Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val
515 520 525

Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Leu Ile Lys
530 535 540

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr His His
545 550 555 560

His His His His

<210> 14
<211> 2466
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleotide sequence encoding SEQ ID NO: 12

<400> 14
atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cggggggtacc 60
ggggataaga tctgcatcgg ccaccagagc accaacagca ccgagaccgt ggataccctg 120
accgagacca acgtgccagt gacccacgcc aaggagctgc tgcacaccga gcacaacgga 180
atgctgtgcg ccaccaatct gggccacccc ctgatcctgg atacctgcac catcgagggc 240
ctgatctacg gcaaccccag ctgcgatctg ctgctgggag gacgcgagtg gtcctacatt 300
gtggagcgcc ccagcgccgt gaacggaacc tgctatccag gcaacgtgga gaacctggag 360
gagctgcgca ccctgttcag cagctcgagc agctaccagc gcatccagat cttccccgat 420
accatctgga acgtgacctc caccggcacc agcaagagct gcagcgatag cttctaccgc 480
aacatgcgct ggctgacctc gaagtccggc ctgtaccag tgcaggatgc ccagtacacc 540
aacaatcgcg gcaaggacat cctgttcgtg tggggcatcc accaccccc aaccgatacc 600

10

20

30

40

50

gccagacca atctgtacac ccgcaccgat accaccacca gcgtgaccac cgagaatctg 660
 gatcgcacct tcaagcccgt gatcggccca cgcacctcg tgaatggact gatcggccgc 720
 atcaactact attggagcgt gctgaagccc ggccagaccc tgcgcgtgcg cagcaatgga 780
 aatctgatcg ccccggtgta cggccacgtg ctgagcggag agagccacgg ccgcattctg 840
 aagaccgatc tgaacagcgg caactgcgtg gtgcagtgcc agaccgagaa gggcggcctg 900
 aatagcacc tgccttcca caacatctcg aagtacgcct tcggaaactg cccaagtac 960
 atcggcgtga agtccctgaa gctggccatc ggctgcgca atgtgccagc ccgcagtagt 1020
 cgcggactgt tcggagccat tccggcttc attgaggcgc gctggccagg actggtggcc 1080
 ggatggtacg gattccagca cagcaacgat cagggcgtgg gaatggccgc cgatcgcgat 1140
 agtaccaga aggcctgga taagatcacc tcaaagtga acaacatcgt ggacaagatg 1200
 aacaagcagt acgagatcat cgaccacgag ttcagcagg tggagaccg cctgaacatg 1260
 atcaacaaca agatcgacga ccagatccag gatgtgtggg cctacaacgc cgagctgctg 1320
 gtgctgctgg agaaccagaa gacctggac gagcacgatg ccaacgtgaa caatctgtat 1380
 aaaaagtga agcgcgccct gggcagcaac gccatggagg atggaaagg atgcttcgag 1440
 ctgtaccaca agtgcgacga tcagtgcag gagaccatcc gcaacggcac ctacaaccgc 1500
 cgcaagtaca aggaggagag ccgcctggag cgccaggga gcggctacat ccagaggcc 1560
 ccacgcgacg gacaggccta tgtgcgaag gatggcgagt gggctgtgct gagcaccttc 1620
 ctgttaatta aggttctggt ctctggtgcg gcccgcgata tcgtgatgac ccagtcgcca 1680
 agcagtctgg ctgtgtccgt gggacagaaa gtgacatga gctgcaccag cagccagggtg 1740
 ctgctgcaca gcccaccca gaagaattac ctggcctggt atcagcagaa gcccgccaa 1800
 agtccgaagc tgctggtcta ctttgccagc acacgcgaga gcggagtgcc agatcgtttt 1860
 accggaagcg gcagcggcac cgatttcacc ctgacaatta gtagcgtgca ggccgaggat 1920
 ctggccgtgt attactgcca gcagcactac agcaccgcg tgacatttgg cgccggaacg 1980
 aagctggaac tgaaggcgg aggtggtagt ggtggcggag gatcagggtg tgggtgttct 2040
 ggcggtggtg gaagtgaagt gcaactgcag cagagcggcc cagagctggt caaaccaggt 2100
 gccagcgtga agatcagctg caaggccagc ggatacacct tcaccgatta ctacatcaac 2160
 tgggtcaagc agagccacgg caagagcctg gaatggatcg gcgatatcaa cccaccaac 2220

10

20

30

40

50

ggcgatagca cctacagcca gaagttcaag ggcaaagcca cgctgaccgt ggataagagt 2280
 agcagcaccg cctacatgga actgcgcagc ctgacaagcg aagtgtccgc cgtgtactat 2340
 tgcgcccgtg attacgccat ggattactgg ggacagggca ccagtgtgac cgttagtagt 2400
 tctagaggta agcctatccc taaccctctc ctgggtctcg attctacgca tcataccat 2460
 caccat 2466

<210> 15
 <211> 1692
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Nucleotide sequence encoding SEQ ID NO: 13

<400> 15
 atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggggtacc 60
 ggggataaga tctgcatcgg ccaccagagc accaacagca ccgagaccgt ggataccctg 120
 accgagacca acgtgccagt gaccacagcc aaggagctgc tgcacaccga gcacaacgga 180
 atgctgtgcg ccaccaatct gggccacccc ctgatcctgg atacctgcac catcgagggc 240
 ctgatctacg gcaaccccag ctgcgatctg ctgctgggag gacgcgagtg gtcctacatt 300
 gtggagcgcc ccagcgccgt gaacggaacc tgctatccag gcaacgtgga gaacctggag 360
 gagctgcgca cctgtttcag cagctcgagc agctaccagc gcatccagat cttccccgat 420
 accatctgga acgtgacctc caccggcacc agcaagagct gcagcgatag cttctaccgc 480
 aacatgcgct ggctgaccca gaagtccggc ctgtaccagc tgcaggatgc ccagtacacc 540
 aacaatcgcg gcaaggacat cctgttctgt tggggcatcc accaccccc aaccgatacc 600
 gcccagacca atctgtacac ccgcaccgat accaccacca gcgtgaccac cgagaatctg 660
 gatcgcacct tcaagcccgt gatcggccca cggccactcg tgaatggact gatcggccgc 720
 atcaactact attggagcgt gctgaagccc ggccagacc tgcgcgtgcg cagcaatgga 780
 aatctgatcg ccccggtgta cggccacgtg ctgagcggag agagccacgg ccgcattctg 840
 aagaccgatc tgaacagcgg caactgcgtg gtgcagtgcc agaccgagaa gggcggcctg 900
 aatagcacc tgcccttcca caacatctcg aagtacgct tcggaaactg cccaagtac 960
 atcggcgtga agtccttgaa gctggccatc ggcctgcgca atgtgccagc ccgcagtagt 1020

20

30

40

50

cgcggactgt tcggagccat tgccggcttc attgagggcg gctggccagg actggtggcc 1080
ggatgggtacg gattccagca cagcaacgat cagggcgtgg gaatggccgc cgatcgcgat 1140
agtaccaga aggccgtgga taagatcacc tccaaagtga acaacatcgt ggacaagatg 1200
aacaagcagt acgagatcat cgaccacgag ttcagcgagg tggagacccg cctgaacatg 1260
atcaacaaca agatcgacga ccagatccag gatgtgtggg cctacaacgc cgagctgctg 1320
gtgctgctgg agaaccagaa gaccctggac gagcacgatg ccaacgtgaa caatctgtat 1380
aacaaagtga agcgcgccct gggcagcaac gccatggagg atggaaaggg atgcttcgag 1440
ctgtaccaca agtgcgacga tcagtgcgat gagaccatcc gcaacggcac ctacaaccgc 1500
cgcaagtaca aggaggagag ccgcctggag gccagggca gcggctacat cccagaggcc 1560
ccacgcgacg gacaggccta tgtgcgaag gatggcgagt ggggtgctgct gagcaccttc 1620
ctgttaatta agggtaagcc tatccctaac cctctctcgc gtctcgattc tacgcatcat 1680
caccatcacc at 1692

<210> 16
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CD11c-scFv

<400> 16

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Val Leu His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

10

20

30

40

50

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Asn Leu Arg Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu
130 135 140

Thr His Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
145 150 155 160

Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met Tyr Trp Tyr Gln
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Leu Tyr Asp Thr Ser Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

- <210> 17
- <211> 247
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Dec205-scFv

10

20

30

40

50

<400> 17

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Asn Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
130 135 140

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
145 150 155 160

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
165 170 175

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
180 185 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr
195 200 205

10

20

30

40

50

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Leu Ser Thr Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly
225 230 235 240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 18
<211> 470
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NDV F antigen, consensus

<400> 18

Ala Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ala Ala Ala Gly Ile Val Val Thr Gly
1 5 10 15

Asp Lys Ala Val Asn Val Tyr Thr Ser Ser Gln Thr Gly Ser Ile Ile
20 25 30

Val Lys Leu Leu Pro Asn Met Pro Lys Asp Lys Glu Ala Cys Ala Arg
35 40 45

Ala Pro Leu Glu Ala Tyr Asn Arg Thr Leu Thr Thr Leu Leu Thr Pro
50 55 60

Leu Gly Asp Ser Ile Arg Lys Ile Gln Gly Ser Val Ala Thr Ser Gly
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Arg Phe Ile Gly Ala Val Ile Gly Ser Ile Ala
85 90 95

Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ile
100 105 110

Gln Ala Asn Gln Asn Ala Ala Asn Ile Leu Arg Leu Lys Glu Ser Ile
115 120 125

10

20

30

40

50

Ala Ala Thr Asn Glu Ala Val His Glu Val Thr Asn Gly Leu Ser Gln
130 135 140

Leu Ser Val Ala Val Gly Lys Met Gln Gln Phe Val Asn Asp Gln Phe
145 150 155 160

Asn Asn Thr Ala Arg Glu Leu Asp Cys Ile Lys Ile Thr Gln Gln Val
165 170 175

Gly Val Glu Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Leu Thr Thr Val Phe Gly
180 185 190

Pro Gln Ile Thr Ser Pro Ala Leu Thr Gln Leu Thr Ile Gln Ala Leu
195 200 205

Tyr Asn Leu Ala Gly Gly Asn Met Asp Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Gly
210 215 220

Val Gly Asn Asn Gln Leu Ser Ser Leu Ile Gly Ser Gly Leu Ile Thr
225 230 235 240

Gly Tyr Pro Ile Leu Tyr Asp Ser Gln Thr Gln Leu Leu Gly Ile Gln
245 250 255

Val Asn Leu Pro Ser Val Gly Asn Leu Asn Asn Met Arg Ala Thr Tyr
260 265 270

Leu Glu Thr Leu Ser Val Ser Thr Thr Lys Gly Phe Ala Ser Ala Leu
275 280 285

Val Pro Lys Val Val Thr Gln Val Gly Ser Val Ile Glu Glu Leu Asp
290 295 300

Thr Ser Tyr Cys Ile Glu Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Cys Thr Arg Ile
305 310 315 320

Val Thr Phe Pro Met Ser Pro Gly Ile Tyr Ser Cys Leu Ser Gly Asn
325 330 335

Thr Ser Ala Cys Met Tyr Ser Lys Thr Glu Gly Ala Leu Thr Thr Pro
340 345 350

10

20

30

40

50

Tyr Met Ala Leu Lys Gly Ser Val Ile Ala Asn Cys Lys Ile Thr Thr
355 360 365

Cys Arg Cys Ala Asp Pro Pro Gly Ile Ile Ser Gln Asn Tyr Gly Glu
370 375 380

Ala Val Ser Leu Ile Asp Arg His Ser Cys Asn Val Leu Ser Leu Asp
385 390 395 400

Gly Ile Thr Leu Arg Leu Ser Gly Glu Phe Asp Ala Thr Tyr Leu Lys
405 410 415

Asn Ile Ser Ile Leu Asp Ser Gln Val Ile Val Thr Gly Asn Leu Asp
420 425 430

Ile Ser Thr Glu Leu Gly Asn Val Asn Asn Ser Ile Ser Asn Ala Leu
435 440 445

Asp Lys Leu Thr Glu Ser Asn Ser Lys Leu Asp Lys Val Asn Val Arg
450 455 460

Leu Thr Ser Thr Ser Ala
465 470

<210> 19
<211> 525
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NDV HN antigen, consensus

<400> 19

Ser Met Gly Thr Ser Thr Pro Arg Asp Leu Thr Gly Ile Ser Ile Ala
1 5 10 15

Ile Ser Lys Thr Glu Asp Lys Val Thr Ser Leu Leu Ser Ser Ser Gln
20 25 30

Asp Val Ile Asp Arg Ile Tyr Lys Gln Val Ala Leu Glu Ser Pro Leu
35 40 45

10

20

30

40

50

Ala Leu Leu Asn Thr Glu Ser Ile Ile Met Asn Ala Ile Thr Ser Leu
50 55 60

Ser Tyr Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Asn Ser Gly Cys Gly Ala Pro
65 70 75 80

Val His Asp Pro Asp Tyr Ile Gly Gly Ile Gly Lys Glu Leu Ile Val
85 90 95

Asp Asp Thr Ser Asp Val Thr Ser Phe Tyr Pro Ser Ala Tyr Gln Glu
100 105 110

His Leu Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg
115 120 125

Ile Pro Ser Phe Asp Met Ser Thr Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn
130 135 140

Val Ile Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Ser His Gln Tyr Leu
145 150 155 160

Ala Leu Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Lys Val Phe Phe Ser
165 170 175

Thr Leu Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys
180 185 190

Ser Val Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Ile Leu Cys Ser Lys Val
195 200 205

Thr Glu Thr Glu Glu Glu Asp Tyr Lys Ser Val Thr Pro Thr Ser Met
210 215 220

Val His Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu
225 230 235 240

Asp Thr Thr Ala Leu Phe Lys Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val
245 250 255

10

20

30

40

50

Gly Gly Gly Ser Phe Val Asp Glu Arg Val Trp Phe Pro Val Tyr Gly
260 265 270

Gly Leu Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ala Gln Glu Gly Lys Tyr
275 280 285

Val Ile Tyr Lys Arg Tyr Asn Asp Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr
290 295 300

Gln Ile Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Gly
305 310 315 320

Lys Arg Val Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu
325 330 335

Gly Glu Asp Pro Met Leu Thr Ile Pro Pro Asn Thr Ile Thr Leu Met
340 345 350

Gly Ala Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr
355 360 365

Gln Arg Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr
370 375 380

Ile Ser Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala
385 390 395 400

Phe Thr Arg Pro Gly Ser Val Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro
405 410 415

Asn Ser Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Leu Ile Phe
420 425 430

His Arg Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Asp
435 440 445

Gly Gln Ala Arg Leu Asn Pro Val Ser Ala Val Phe Asp Asp Ile Ser
450 455 460

Arg Ser Arg Val Thr Arg Val Ser Ser Ser Ser Thr Lys Ala Ala Tyr
465 470 475 480

10

20

30

40

50

Thr Thr Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Thr Tyr Cys
485 490 495

Leu Ser Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile
500 505 510

Val Pro Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asn Arg Ala
515 520 525

<210> 20
<211> 444
<212> PRT
<213> Infectious bursal disease virus

<400> 20

Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly
1 5 10 15

Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser
20 25 30

Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu
35 40 45

Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr
50 55 60

Thr Leu Gln Ser Asn Gly Asn Tyr Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr
65 70 75 80

Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg
85 90 95

Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu
100 105 110

Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu
115 120 125

Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn

10

20

30

40

50

130	135	140	
Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser 145 150 155 160			
Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile 165 170 175			
Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser 180 185 190			10
Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe 195 200 205			
Ser Ser Gln Tyr Gln Ala Gly Gly Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala 210 215 220			
Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Glu Leu Val Phe 225 230 235 240			
Gln Thr Ser Val Gln Gly Leu Ile Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile 245 250 255			20
Gly Phe Asp Gly Thr Ala Val Ile Thr Arg Ala Val Ala Ala Asp Asn 260 265 270			
Gly Leu Thr Ala Gly Thr Asp Asn Leu Met Pro Phe Asn Ile Val Ile 275 280 285			
Pro Thr Ser Glu Ile Thr Gln Pro Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile 290 295 300			30
Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser 305 310 315 320			
Ala Ser Gly Ser Leu Ala Val Thr Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly 325 330 335			
Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly 340 345 350			

40

50

Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn
355 360 365

Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro
370 375 380

Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu
385 390 395 400

Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu
405 410 415

Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly
420 425 430

Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile Arg Ala Ile Arg
435 440

<210> 21
<211> 1093
<212> PRT
<213> Infectious Bronchitis virus

<400> 21

Met Leu Val Lys Ser Leu Phe Leu Val Thr Ile Leu Cys Ala Leu Cys
1 5 10 15

Ser Ala Asn Leu Phe Asp Ser Asp Asn Asn Tyr Val Tyr Tyr Tyr Gln
20 25 30

Ser Ala Phe Arg Pro Pro Asn Gly Trp His Leu Gln Gly Gly Ala Tyr
35 40 45

Ala Val Val Asn Ser Thr Asn Tyr Thr Asn Asn Ala Gly Ser Ala His
50 55 60

Val Cys Thr Val Gly Val Ile Lys Asp Val Tyr Asn Gln Ser Val Ala
65 70 75 80

Ser Ile Ala Met Thr Ala Pro Leu Gln Gly Met Ala Trp Ser Lys Ser
85 90 95

10

20

30

40

50

Gln Phe Cys Ser Ala His Cys Asn Phe Ser Glu Ile Thr Val Phe Val
100 105 110

Thr His Cys Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Ser Cys Pro Ile Thr Gly Met
115 120 125

Ile Pro Arg Asp His Ile Arg Ile Ser Ala Met Lys Asn Gly Ser Leu
130 135 140

Phe Tyr Asn Leu Thr Val Ser Val Ser Lys Tyr Pro Asn Phe Lys Ser
145 150 155 160

Phe Gln Cys Val Asn Asn Phe Thr Ser Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu
165 170 175

Val Phe Thr Ser Asn Lys Thr Thr Asp Val Thr Ser Ala Gly Val Tyr
180 185 190

Phe Lys Ala Gly Gly Pro Val Asn Tyr Ser Ile Met Lys Glu Phe Lys
195 200 205

Val Leu Ala Tyr Phe Val Asn Gly Thr Ala Gln Asp Val Ile Leu Cys
210 215 220

Asp Asn Ser Pro Lys Gly Leu Leu Ala Cys Gln Tyr Asn Thr Gly Asn
225 230 235 240

Phe Ser Asp Gly Phe Tyr Pro Phe Thr Asn Ser Thr Leu Val Arg Glu
245 250 255

Lys Phe Ile Val Tyr Arg Glu Ser Ser Val Asn Thr Thr Leu Ala Leu
260 265 270

Thr Asn Phe Thr Phe Thr Asn Val Ser Asn Ala Gln Pro Asn Ser Gly
275 280 285

Gly Val Asn Thr Phe His Leu Tyr Gln Thr Gln Thr Ala Gln Ser Gly
290 295 300

10

20

30

40

50

Tyr Tyr Asn Phe Asn Leu Ser Phe Leu Ser Gln Phe Val Tyr Lys Ala
305 310 315 320

Ser Asp Phe Met Tyr Gly Ser Tyr His Pro Ser Cys Ser Phe Arg Pro
325 330 335

Glu Thr Ile Asn Ser Gly Leu Trp Phe Asn Ser Leu Ser Val Ser Leu
340 345 350

Thr Tyr Gly Pro Leu Gln Gly Gly Cys Lys Gln Ser Val Phe Ser Gly
355 360 365

Lys Ala Thr Cys Cys Tyr Ala Tyr Ser Tyr Lys Gly Pro Met Ala Cys
370 375 380

Lys Gly Val Tyr Ser Gly Glu Leu Ser Thr Asn Phe Glu Cys Gly Leu
385 390 395 400

Leu Val Tyr Val Thr Lys Ser Asp Gly Ser Arg Ile Gln Thr Arg Thr
405 410 415

Glu Pro Leu Val Leu Thr Gln Tyr Asn Tyr Asn Asn Ile Thr Leu Asp
420 425 430

Lys Cys Val Ala Tyr Asn Ile Tyr Gly Arg Val Gly Gln Gly Phe Ile
435 440 445

Thr Asn Val Thr Asp Ser Ala Ala Asn Phe Ser Tyr Leu Ala Asp Gly
450 455 460

Gly Leu Ala Ile Leu Asp Thr Ser Gly Ala Ile Asp Val Phe Val Val
465 470 475 480

Gln Gly Ile Tyr Gly Leu Asn Tyr Tyr Lys Val Asn Pro Cys Glu Asp
485 490 495

Val Asn Gln Gln Phe Val Val Ser Gly Gly Asn Ile Val Gly Ile Leu
500 505 510

Thr Ser Arg Asn Glu Thr Gly Ser Glu Gln Val Glu Asn Gln Phe Tyr
515 520 525

10

20

30

40

50

Val Lys Leu Thr Asn Ser Ser His Arg Arg Arg Arg Ser Ile Gly Gln
530 535 540

Asn Val Thr Ser Cys Pro Tyr Val Ser Tyr Gly Arg Phe Cys Ile Glu
545 550 555 560

Pro Asp Gly Ser Leu Lys Met Ile Val Pro Glu Glu Leu Lys Gln Phe
565 570 575

Val Ala Pro Leu Leu Asn Ile Thr Glu Ser Val Leu Ile Pro Asn Ser
580 585 590

Phe Asn Leu Thr Val Thr Asp Glu Tyr Ile Gln Thr Arg Met Asp Lys
595 600 605

Val Gln Ile Asn Cys Leu Gln Tyr Val Cys Gly Asn Ser Leu Glu Cys
610 615 620

Arg Lys Leu Phe Gln Gln Tyr Gly Pro Val Cys Asp Asn Ile Leu Ser
625 630 635 640

Val Val Asn Ser Val Ser Gln Lys Glu Asp Met Glu Leu Leu Ser Phe
645 650 655

Tyr Ser Ser Thr Lys Pro Lys Gly Tyr Asp Thr Pro Val Leu Ser Asn
660 665 670

Val Ser Thr Gly Glu Phe Asn Ile Ser Leu Leu Leu Lys Pro Pro Ser
675 680 685

Ser Pro Ser Gly Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Thr Ser Val
690 695 700

Glu Thr Val Gly Leu Pro Thr Asp Ala Glu Tyr Lys Lys Cys Thr Ala
705 710 715 720

Gly Pro Leu Gly Thr Leu Lys Asp Leu Ile Cys Ala Arg Glu Tyr Asn
725 730 735

10

20

30

40

50

Gly Leu Leu Val Leu Pro Pro Ile Ile Thr Ala Asp Met Gln Thr Met
740 745 750

Tyr Thr Ala Ser Leu Val Gly Ala Met Ala Phe Gly Gly Ile Thr Ser
755 760 765

Ala Ala Ala Ile Pro Phe Ala Thr Gln Ile Gln Ala Arg Ile Asn His
770 775 780

Leu Gly Ile Thr Gln Ser Leu Leu Met Lys Asn Gln Glu Lys Ile Ala
785 790 795 800

Ala Ser Phe Asn Lys Ala Ile Gly His Met Gln Glu Gly Phe Arg Ser
805 810 815

Thr Ser Leu Ala Leu Gln Gln Ile Gln Asp Val Val Asn Lys Gln Ser
820 825 830

Ala Ile Leu Thr Glu Thr Met Asn Ser Leu Asn Lys Asn Phe Gly Ala
835 840 845

Ile Thr Ser Val Ile Gln Asp Ile Tyr Ala Pro Pro Asp Ala Ile Gln
850 855 860

Ala Asp Ala Gln Val Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Ser Ser Leu
865 870 875 880

Ser Val Leu Ala Ser Ala Lys Gln Ser Glu Tyr Ile Arg Val Ser Gln
885 890 895

Gln Arg Glu Leu Ala Thr Gln Lys Ile Asn Glu Cys Val Lys Ser Gln
900 905 910

Ser Asn Arg Tyr Gly Phe Cys Gly Ser Gly Arg His Val Leu Ser Ile
915 920 925

Pro Gln Asn Ala Pro Asn Gly Ile Val Phe Ile His Phe Thr Tyr Thr
930 935 940

Pro Glu Ser Phe Val Asn Val Thr Ala Ile Val Gly Phe Cys Val Asn
945 950 955 960

10

20

30

40

本発明は、様々な態様及び実施形態で本明細書に記載されている。当然のことながら、これらの任意の組み合わせは本発明の範囲内にあると考えられる。ただし、単に簡潔にするために、本明細書では、すべての可能な組み合わせを完全に概説するものではない。

【 0 2 4 3 】

ここで、本発明を、以下の非限定的な実施例によって更に説明する。

【 0 2 4 4 】

[実施例]

[実施例 1]

A I V - M D A 陽性ニワトリの作製

50

1. 1. 序論

血清反応陽性ニワトリのワクチン接種を試験できるようにするために、現場の実際の状況に似た動物モデルを作成した。具体的には、不活性化アジュバント添加ワクチンを使用して、親雌鶏の筋肉内のワクチン接種を繰り返すことによって、AIV MDA陽性の子孫を作製した。目的は、少なくとも5~7 Log₂という、現場のものに似た子孫のHI力価に到達することであった。

【0245】

1. 2. 材料及び方法

SPF白色レグホン産卵ニワトリにワクチン接種して、MDA陽性孵化幼鳥を作製した。すべてのニワトリを隔離室に収容して床飼いた。すべてのニワトリに、実験期間中、飼料及び水を自由に与え、獣医学的監視下で飼育した。

【0246】

1. 2. 1. MDA産生のためのワクチンの調製：

10日齢の胚性SPF鶏卵でH9N2亜型の鳥インフルエンザAウイルスを増殖させることによって、不活化AIVワクチンを作製した。具体的には、これは、AIV株：A／ニワトリ／パキスタン／UDL-01／2008（「UDL-01」）であり、Gen Bank：ACP50708.1及び：Iqbalら（2009, PLoS One, vol. 4: e5788）を参照されたい。感染の72時間後、卵を4℃で冷蔵し、尿膜腔液を採取し、これを3,000 rpmで20分間の遠心分離によって除去することによってウイルスを得た。ウイルスを、メイディン・ダービー・イヌ腎臓（MDCK）細胞に対するブランクアッセイ又はTCID₅₀によって滴定した。

【0247】

0.1%ベータープロピオラクトンを使用してウイルスを化学的に不活化し、その後、不活化を確認するために、10日齢の胚化SPF鶏卵で3回の盲検継代を行った。次いで、不活化ウイルス採取物を、4℃で2時間、27,000 rpmでの超遠心分離によって濃縮した。次に、不活化ウイルスを液体軽パラフィン油でアジュバント化し、油中水型エマルジョンに製剤化した。得られたワクチンは、1040赤血球凝集単位（HAU）／mlの力価を有していた。

【0248】

1. 2. 2. 雌鶏のワクチン接種及びMDA＋孵化幼鳥の作製

17週齢の40匹のSPFホワイトレグホン産卵鶏群を使用した。ニワトリを個別に標識した。それらを、520 HAU／用量の不活性化アジュバント添加H9N2ウイルスワクチン0.5 mlを使用し、それを脚にi.m.投与して免疫した。ワクチンの1回目の用量を17週齢（T=0）で投与し、続いて2回目及び3回目の用量をそれぞれ20週齢（T=1回目の用量の3週間後）及び41週齢（T=1回目の用量の24週間後）で投与した。

【0249】

発生中の抗AIV HI力価の血清学的モニタリングのために、0日目並びに最初の投与後5、11、18、29及び36週目に雌鶏の翼静脈から血液試料を採取した。5匹のSPF雄鶏を受精のための群に含めたが、これらは実際の実験の一部ではなかった。

【0250】

1回目のワクチン接種投与の36週間後から受精卵を採取した。これらを孵化するまでインキュベートするように設定した。10匹の孵化幼鳥を生まれて1日目（D0）に殺して、それらのMDAレベルを測定した。それらの孵化した仲間をMDAワクチン接種実験に使用した。

【0251】

1. 2. 3. HIアッセイ

HIアッセイについては、国際的指針（WHO 676 global influenza surveillance network: manual for the laboratory diagnosis and virological sur

10

20

30

40

50

veillance of influenza. 153 (2011)) に従った。手短に言えば、 $25\mu\text{l}$ の血清を $25\mu\text{l}$ の PBS と混合することによって、血清の二倍連続希釈液を調製した。次に、4 HA 単位のインフルエンザウイルスを希釈血清に添加し、 37°C で 1 時間インキュベートした。最後に、 $50\mu\text{l}$ の 1% ニワトリ赤血球を血清-ウイルス混合物に添加し、室温で 45 分間インキュベートした。HI 力価は、4 単位のウイルス赤血球凝集活性を完全に抑制した抗血清の最高希釈の逆数として表した。

【0252】

HI アッセイで使用したウイルスは、UDL-01 株の AIV H9N2 であった。

【0253】

1. 3. 結果

AIV MDA + 子孫を生じさせる母鶏の過剰免疫化の結果を図 1 に示す。相同 UDL-01 株を用いて HI 滴定を行った。

【0254】

開始後 18 週間で雌鶏の血清中の HI 力価の低下が観察されたときに、3 回目のワクチン接種を行った。これにより、雌鶏において非常に高い HI 力価がもたらされ、最後のサンプリング点までそのレベルが維持された。

【0255】

雌鶏の平均 ($n=10$) HI 力価が 4096 ($12 \text{ Log } 2$) である場合、受精卵を開始後 36 週 (53 週齢) に回収した。

【0256】

これらの結果から明らかであり、図 1 に示されるように、 $T=11$ 週目と $T=18$ 週目との間 ($p<0.05$) 及び $T=18$ 週目と $T=29$ 週目との間 ($p<0.001$) で HI 価に有意差があった。

【0257】

これらの雌鶏の (ワクチン非接種の) 子孫において MDA によって誘導される HI 力価を、孵化日及び経時的に、すなわち孵化後 1 日目、7 日目、14 日目、21 日目、28 日目、35 日目、42 日目、56 日目、70 日目及び 84 日目に測定した。結果を図 2 に示す。相同 UDL-01 株を用いて HI 滴定を行った。

【0258】

1 日目に、雛鳥の HI 力価は平均して ($n=10$)、588 ($9.2 \text{ Log } 2$) であった。この力価は、7 日齢でわずかに (非有意に) 低下していたが、14 日齢では 181 ($7.5 \text{ Log } 2$) で半分を下回り、その後更に急速に低下し、35 日目では、平均 ($n=10$) HI 力価は 16 ($4 \text{ Log } 2$) であり、42 日齢では HI 力価はもはや検出できなかった。

【0259】

OIE (www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf) によって定義される AIV 死亡率から保護するための国際標準は、32 の HI 力価 ($5 \text{ Log } 2$) である。ここで実験的に使用された孵化幼鳥は、28 日齢で依然としてこの値付近の HI 力価を有することが見出されたが、これらの雛鳥は、正常な MDA レベルをはるかに上回って始まった。したがって、追加の能動的ワクチン接種が通常必要とされる。

【0260】

確認のために、測定された抗体が AIV H9 HA に向けられていることを確実にするために、孵化幼鳥の抗体力価も ELISA によって試験した。市販のキット、すなわち間接的 ELISA である ID Screen (登録商標) Influenza H9 Indirect kit (ID Vet) を製造者の説明書に従って使用した。判明した ELISA スコアは、HI スコアのパターンと厳密に一致した。これにより、孵化幼鳥において検出された HI 力価が、AIV H9 HA に特異的な抗体に由来することが確認された。

【0261】

10

20

30

40

50

[実施例 2]

M D A + 鳥類のためのワクチンの調製

2. 1. 序論

血清陽性鳥類のワクチン接種には 3 種のワクチンを使用した。

【0262】

陽性対照は、古典的な不活化全ウイルスワクチン：ノビリス（登録商標）インフルエンザ H 9 N 2 + N D（M S D A n i m a l H e a l t h）であった。この市販のワクチンは、サブタイプ H 9 N 2 の不活化 A I V、A 株／ニワトリ／U A E／4 1 5／9 9（「U A E」）及び不活化ニューカッスル病ウイルス、クローン 3 0 株を含有する。

【0263】

A I V H 9 N 2 株 U D L - 0 1 及び U A E の H A タンパク質は、それらの全長にわたってアライメントした場合、9 4 % のアミノ酸同一性を有する。

【0264】

不活化ワクチン中の N D V 成分は、A I V ワクチン接種の有効性に有意な効果を有するとは考えられなかった。

【0265】

更に、組換え H A 抗原ベースのワクチンの 2 つの変異体、すなわち、1 つのバージョンは非標的変異体を、1 つは C D 8 3 - s c F v への融合によって C D 8 3 を標的化した変異体を使用した。この最後のバージョンは、本発明による使用のための組換えタンパク質である。

【0266】

2. 2. 材料及び方法

2. 2. 1. H A 抗原発現構築物の調製

ニワトリ C D 8 3（G e n B a n k 登録番号 X M _ 0 4 0 6 6 3 6 5 7 . 1）に対する抗体を産生するマウスハイブリドーマを使用して、v L 鎖配列及び v H 鎖配列を得た。v L 配列及び v H 配列を含有する合成 c D N A を（G l y 4 S e r）₄ リンカーペプチド配列によって連結し、G e n e a r t（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）によって商業的に製造した。次いで、v H - リンカー - v L c D N A を、N o t I 及び X b a I 制限部位を使用して、キイロショウジョウバエ（D . m e l a n o g a s t e r）発現ベクター：p M T - B I P - V 5 - H i s（商標）（バージョン A、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社）にクローニングした。このベクターは、S 2 細胞における発現及び分泌のための、キイロショウジョウバエ（D . m e l a n o g a s t e r）メタロチオネイン（M T）プロモーター及びキイロショウジョウバエ（D . m e l a n o g a s t e r）免疫グロブリン重鎖結合タンパク質（B I P）分泌シグナルを提供する。更に、このプラスミドには、マルチクローニングサイト、組換えタンパク質検出のための V 5 エピトープ、及び組換えタンパク質精製のための 6 x H i s タグが設けられる。

【0267】

p M T - B I P - C D 8 3 - s c F v - V 5 - H i s と命名された得られたベクターを使用して、H A 遺伝子シグナルペプチド及び T M ドメインを欠く H 9 H A 遺伝子の外部ドメインを挿入した。K p n I 及び P a c I 制限部位を使用して、バクテリオファージ T 4 由来の三量体タンパク質フィブリチンから 2 9 アミノ酸三量体化 F o l d o n 配列を付加した。このプラスミドは、M T プロモーターの操作制御下で配列番号 1 4 のヌクレオチド配列を含んでいた。

【0268】

この実験で使用した H 9 H A は、C O B R A 技術（G i l e s e t a l . , 2 0 1 1 , V a c c i n e , v o l . 2 9 , p . 3 0 4 3 - 3 0 5 4）にも密接に関連する、最小球面コンセンサス（M S c o n）法（K i m e t a l . , 2 0 1 5 , a b s t r a c t s f r o m G e r m a n C o n f e r e n c e o n B i o i n f o r m a t i c s , D o r t m u n d , S e p t e m b e r 2 7 t h - 3 0 t h 2 0 1 5 ,

10

20

30

40

50

poster 20: PeerJ PrePrints 3:e1350v1) を使用して、G1 様 H9 ウイルス系統の公開データベースからの 2000 を超える H9 HA 配列の分析から得られた H9 N2 ウイルスの HA のコンセンサス配列を組み込んで合成的に製造した。

【0269】

この合成 HA は、UDL-01 株 (GenBank アクセッション番号: ACP 50708.1、HA1: aa 19-338 及び HA2: aa 339-560) の H9 N2 ウイルスの HA 外部ドメインと 98% のアミノ酸配列同一性を有し、これは相同であると認められ、S2 細胞に対してコドン最適化されている。

【0270】

CD83 標的化シグナルを有しない H9 HA-Foldon 抗原を同様の方法で調製して、プラスミド pMT-BIP-H9 HA-Foldon-V5-His を得た。このプラスミドは、MT プロモーターの操作制御下で配列番号 15 のヌクレオチド配列を含んでいた。

【0271】

2.2.2. 組換え昆虫細胞の作製及び選択

S2 細胞 (Thermo Fisher Scientific) を、10% v/v ウシ胎児血清を補充した Schneider の昆虫培地 (Merck GmbH Life Science) 中で維持し、28°C で増殖させた。細胞を、1200 rpm で 10 分間遠心分離することによって週に 1 回継代し、新鮮な完全 S2 細胞培地に再懸濁した。

【0272】

組換えタンパク質を、Drosophila Expression System (DES (登録商標)、Life Technologies) を使用して作製及び精製した。手短に言えば、プラスミド pMT-BIP-rH9 HA-V5-His 及び pMT-BIP-rH9 HA-CD83-scFv-V5-His を、リン酸カルシウムトランスフェクションを用いて S2 細胞にそれぞれ同時トランスフェクトした。トランスフェクションの前に、 1×10^6 / mL の S2 細胞を、28°C で 6 から 16 時間、5 mL の完全 S2 細胞増殖培地に予め播種した。60 μ L の 2M CaCl_2 、32 μ g の発現プラスミド DNA、1.5 μ g のハイグロマイシン B 耐性プラスミド (pCoHYGRO、Life Technologies)、及び滅菌水を加えて総体積を 500 μ L にすることによって、トランスフェクション溶液を調製した。トランスフェクション溶液を等量の 2x HEPES 緩衝生理食塩水 (HBS) にゆっくり添加し、室温で 30 分間インキュベートした。得られた溶液を、予め播種した S2 細胞にゆっくり滴加し、28°C で 24 時間インキュベートした。トランスフェクションの 24 時間後、トランスフェクション培地を新鮮な完全 S2 細胞培地と交換し、細胞を 28°C で更に 3 日間インキュベートした。

【0273】

抗生物質選択によって安定な S2 形質移入体を作製した、すなわち、250 μ g/mL のハイグロマイシン B を含有する完全増殖培地を少なくとも 4 週間にわたって毎週添加した。

【0274】

次に、限界希釈を介して単一細胞クローンを得た (Zitzmann et al., 2010, Biotechnol. Reports, vol. 19, e00272)。手短に言えば、 2×10^3 の S2 トランスフェクト細胞を、フィーダー細胞としてのガンマ線照射した 10^6 個の親 S2 細胞と混合した。100 μ L のこの細胞混合物を 96 ウェルプレートの各ウェルに播種した。各ウェル内の単一クローンは、28°C で 4 週間のインキュベーション後にはっきりと視認できるようになった。プラスミド構築物ごとに約 10~15 個の単一クローンをスクリーニングした。最大量の組換えタンパク質を発現する単一クローンを、H9 HA タンパク質についての間接的 ELISA によって選択した。

【0275】

2.2.3. 組換え抗原の発現及び精製

次いで、選択されたトランスフェクトS2細胞クローンを大規模に培養した。手短に言えば、大量のHA組換えタンパク質を発現する単一クローンを、発現及び精製のために400mLのEx-Cell(登録商標)420無血清培地(Merck GmbH Life Science)を含有する2リットルローラー瓶(Corning)の中で増殖させた。使用したプラスミド中のメタロチオネインプロモーターを、 CuSO_4 を500 μM の最終濃度まで添加することによって誘導した。誘導の4日後、細胞上清を1200rpmで20分間の遠心分離によって回収し、透析して過剰の銅イオンを除去した。合計で約2リットルのタンパク質発現上清を回収し、精製前に0.22 μM フィルターステリカップ(Merck GmbH Life Science)に通して濾過した。

【0276】

Hisタグの使用により、金属親和性カラムクロマトグラフィーによる組換えタンパク質の精製が可能になった。手短に言えば、組換えタンパク質を含有する透析及び濾過上清を10mLのProfinity(商標)IMAC非荷電樹脂カラム(Bio-Rad)にロードし、5カラム体積の洗浄緩衝液で洗浄した。次いで、銅結合タンパク質を、増加する濃度のイミダゾール(25、50、100又は500mM)を含有する溶出緩衝液で溶出した。精製したタンパク質を、10% PAAゲルでSDS-PAGEを使用して分析し、続いてクマシーブルー染色を行った。タンパク質画分を合わせ、15mL Amicon Ultra-15(商標)Centrifugal Filterカラム(3kDa MWCO、Merck GmbH Life Science)を用いて、4600rpmで30分間遠心分離することによって濃縮した。精製タンパク質の濃度は、Pierce BCA Protein Assay Kit(商標)(Life Technologies)を製造者の説明書に従って使用して求めた。

【0277】

作製した組換えタンパク質のH9 HA活性を赤血球凝集アッセイを用いて確認した。手短に言えば、35 μg の組換えタンパク質を、V底96ウェルプレート中、PBSで2倍に段階希釈した。ニワトリ赤血球をPBSで1%に希釈し、各ウェルに添加した。次いで、プレートを4℃で1時間インキュベートし、バイオセーフティキャビネット内で90°傾けて赤血球凝集を可視化し、スコアを付けた。

【0278】

2.2.4. ワクチンエマルジョンの調製

組換えHA抗原ワクチンを、アジュバントとしての軽質流動パラフィン油(Marcol(登録商標)52)を用いて油中水型エマルジョンとして製剤化し、乳化剤としてポリソルベート80(Tween(登録商標)80)及びソルビタンモノオレート(Span(登録商標)80)を含有させた。ワクチンの水：油重量比は45：55であった。すべてのワクチンを使用するまで4℃で保存した。

【0279】

組換えHAワクチンは、0.2mLの用量あたり、35 μg の非標的化HA抗原又は49 μg の標的抗原を含有した。この差は、scFvの添加を補償する等モル量を提供することであった。

【0280】

[実施例3]

血清陽性鳥のワクチン接種

3.1. 序論

AIV感染及び疾患に対する防御は本質的に血清学的に決定され、主なAIV中和抗体はHA抗原に対するものである。抗HA抗体の発現について血清学的試験、すなわちHI力価を求めることは、AIVからのインビボ防御を予測する上で優れた判断材料となる。

【0281】

実施例1に記載したように作製した孵化幼鳥をワクチン接種実験に使用した、すなわち、1つの群に1日目にワクチン接種し、これらは、588(9.2 Log2)の非常に

10

20

30

40

50

高い平均MDA HI力価を有しており、MDA++群と呼んだ。もう1つの群は、MDAレベルがいくらか低下した14日齢でのみワクチン接種し、これらは、181 (7.5 Log 2) の中程度の平均MDA HI力価を有しており、MDA+群と呼んだ。

【0282】

このアプローチにより、標的HA抗原又は非標的HA抗原によるワクチン接種の有効性に対する抗体干渉が「最悪の場合」と「平均的な場合」についての試験及び比較がそれぞれ可能になった。比較のために、古典的な不活化H9N2ワクチンを含めた。また、抗AIV H9 HA MDAレベルの自然な低下を追跡するために、ワクチン接種していない雛鳥の群を実験を含めた。

【0283】

10

3.2. 材料及び方法

3.2.1. 動物、サンプリング及びワクチン接種

使用したAIV H9 HA MDA陽性雛鳥は、実施例1に記載したようにして得た。使用したワクチンは、実施例2に記載の通りであった。

【0284】

環境病原体の侵入を回避するために、鳥は、高効率微粒子空気 (HEPA) フィルタで濾過された空気が流入する陽圧隔離室に収容された。

【0285】

孵化後、健康かつ正常に見える雛鳥のみを使用した。これらは、入手時に群に割り当て、個々に番号付けした。健康及びパフォーマンスをモニタリングするために、毎日臨床観察を行った。各試験群は10匹の動物を有していた。

20

【0286】

すべてのワクチンは、使用時に周囲温度であり、均質性を確保するために使用直前にしっかりと混合した。

【0287】

すべての雛鳥は、1日目又は14日目のいずれかに、単回ワクチン接種のみを受けた。投与は、これらのタイプのワクチンの標準経路である皮下 (sc) によるものであった。ノビリス (登録商標) ワクチンについては、公認用量であるので0.25 ml / 用量の量を使用し、組換えHA抗原ワクチンについては、0.2 ml / 用量を与えた。

【0288】

30

1日目にノビリスインフルエンザH9N2+NDワクチンをMDA++に投与した。H9HA-Foldon及びH9HA-Foldon-CD83-scFvワクチンを、1日目の「MDA++」雛鳥と、その時点で14日齢であった「MDA+」雛鳥の両方に与えた。

【0289】

血液試料を、ワクチン接種によって誘導された血清学的応答を調べるために、実験開始後6週目までは週に1回、開始後8、10及び12週目は2週間に1回採取した。

【0290】

1日目及び7日目の血液試料を安楽死後に採取し、14日目以降の試料を翼静脈から採取した。動物の体重が許容する量に応じて、採取する体積を2~3 mlとした。血液試料を周囲温度で放置して凝固させ、遠心分離により血清を分離した。血清試料を56℃で30分間にわたって熱不活性化し、使用するまで-20℃で保存した。

40

【0291】

3.3. 結果

この実験中にMDA++雛鳥及びMDA+雛鳥から採取した血清試料を用いたHI滴定の結果をそれぞれ図3及び図4に示す。

【0292】

ワクチン接種されていない対照は、実施例1及び図2に記載されるように、HI力価のレベル及び分解パターンを示した。

【0293】

50

陽性対照は、日齢1日目に全不活化ウイルスワクチン（「ノビリスインフルエンザH9N2+ND」）を受けたMDA++雛鳥であった。このワクチン接種にもかかわらず、それらのHI力価は着実に低下し、ワクチン接種応答は検出できなかった。古典的ワクチン中のMDA及びHA抗原は異種であったので、これは注目に値し、MDAは、UDL-01株のH9 HAによく似たHA抗原に対して誘導されたが、ノビリスワクチンは異種H9 HA抗原、すなわちUDL-01 H9 HAタンパク質と94%のアミノ酸同一性を有するUAE株由来のものを含有した。その結果、HA抗原間のこの差のために、より低いレベルの抗体干渉が予想されるであろう。しかし、明らかに、MDA++雛鳥のHIレベルは非常に高く、異種H9 HAワクチンの有効性を妨げることさえあった。

【0294】

標的HA抗原（「H9 HA Foldon-CD83-scFv」）及び非標的HA抗原（「H9 HA Foldon」）によるワクチン接種は、MDA++雛鳥及びMDA+雛鳥の両方において、それらが誘導したHI力価において顕著な差を示した。

【0295】

非標的HA抗原をワクチン接種した雛鳥のHI力価は着実に減少し、MDA++雛鳥及びMDA+雛鳥のいずれにおいても、ワクチン接種後のいずれの時点でも、HI力価の有意な上昇を示さなかった。

【0296】

しかし、標的HA抗原は非常に高いHI力価を誘導した。MDA++群では、非常に高い開始値（9.7 Log2）からの最初の減少があったが、その後、HI力価は堅調に著実な増加を示し、ワクチン接種後（p.v.）4週間から明らかであり、p.v.5週間で有意性に達し、p.v.12週間で9.7 Log2に堅調に増加した。これは、このワクチンが、同種のMDAのレベルが非常に高い状況であっても、日齢1日目に適用することができ、それでもAIV感染及び疾患に対する強力な防御を誘導することができることを示している。

【0297】

MDA+群では、標的HAワクチンからのHI力価は、ワクチン接種の1週間後から既に高HI力価の急速な誘導を示した。ワクチン接種の4週間後から、HI力価は平均1835（10.8 Log2）に達した。

【0298】

両方の試験群において、標的ワクチンは、有意に増加したHI力価を誘導することができる唯一のものであった。また、標的ワクチン群で測定された最低HI力価は、MDA++群及びMDA+群でそれぞれ6.2及び6.9 Log2であった。これは、このタイプのワクチンを受けたすべての雛鳥が、実験期間中、保護のための5 Log2という閾値をはるかに上回ったままであったことを示している。

【0299】

この急速な免疫開始と長い期間は、保護にギャップを残すことなく、MDAレベルの低下を完全に補償する。

【0300】

再び間接的ELISAを血清に対して実施し、すべての抗体がH9 HA特異的であることを確認した。

【0301】

【実施例4】

非HA抗原の標的化

上記の実験と本質的に類似する実験が、本発明による使用のための組換えタンパク質、ただし、AIV HA以外の別の抗原を含む組換えタンパク質について準備中である。これらは、AIV HN、NDV F、NDV HN、IBDV VP2及びIBVスパイクである。手短に言えば、雌鶏に、これらの病原体：AIV、NDV、IBDV又はIBVのうちの1つに対する適切なワクチンを接種することができ、そのようなワクチンは一般に入手可能である。

10

20

30

40

50

【0302】

雌鶏は、2回又は3回のワクチン接種を受けることができ、産卵開始前に開始し、産卵期間に継続することができる。雌鶏において達成した特異的抗体価は、十分に高いことを確認することができる。次いで、卵を回収して、孵化させることができ、雛鳥を、調査すべき病原体に対して十分に高いMDAレベルを有することについて確認することができる。

【0303】

例えば、試験される抗原の1つをコードするヌクレオチド配列を含む発現プラスミドを構築することによって、上記のように、本発明による使用のための組換えタンパク質を含むワクチンを調製することができる。また、結合ドメイン、例えば、CD83、CD11c又はDec-205などの鳥類APCの表面タンパク質に向けられたscFvが含まれる。APCへの抗原の標的化の効果を評価するために、同様の構築物であるが結合ドメインを含まない構築物を、対照として機能するように調製することができる。

10

【0304】

プラスミドを、記載されるようにS2細胞にトランスフェクトすることができ、これらを選択し、増幅し、（標的化シグナルの有無にかかわらず）抗原を発現させるために使用することができる。次に、組換えタンパク質を回収することができる。

【0305】

CD83-scFvの例は、配列番号2のアミノ酸配列を含むペプチドである。

【0306】

CD11c又はDec-205に特異的なscFvの例は、配列番号16又は17にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むペプチドである。

20

【0307】

発現される抗原の例は、以下から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0308】

- －AIV H5 HAについては配列番号4、
- －AIV H7 HAについては配列番号5、
- －NDV Fについては配列番号18、
- －NDV HNについては配列番号19、
- －IBDV VP2については配列番号20、及び
- －IBVスパイクについては配列番号21。

30

【0309】

これらの抗原をコードする対応する核酸は、好ましくは、S2細胞のコドン使用頻度表に対してコドン最適化される。発現構築物では、発現、分泌、及び精製を容易にするために、必要に応じて、シグナル配列、リンカー、及び1つ又は複数のタグなどの追加の要素を付加することができる。

【0310】

次に、特定のMDAを有する雛鳥にこれらの組換えタンパク質をワクチン接種し、それらの血清学を経時的にモニタリングする。

【0311】

これらの病原体については、インビボ保護と関連する特異的抗体のレベルが知られているので、ワクチン接種後の様々な時点で抗体レベルの血清学的試験を行えば、これらの病原体由来の抗原に対して血清陽性の鳥類における標的ワクチン接種の有効性について良好な印象を得るのには十分である。

40

【0312】

配列番号4のH5 HA配列は、AIV分離株：A／duck／エジプト／SS19／2017、H5N8、GenBank acc. nr. AXY 66755.1のHAに由来した。HA外部ドメインの511アミノ酸：HA1：17～340及びHA2：346～530を選択した。多塩基性切断配列をPLRからPQGに改変し、アルギニンの数を減らした。

50

【0313】

配列番号5のH7 HA配列は、AIV分離株：A／ニワトリ／江西省／JX4／2017、H7N9、GenBank acc. nr. ARG44105.1のHAに由来した。PKRからPKGに改変された多塩基性切断配列を有する、507個のアミノ酸からなるHA外部ドメイン：HA1：19－339及びHA2：1－186を選択した。

【0314】

配列番号18のNDV F配列は、本明細書に記載のMScon技術を使用して、公共データベース内の鳥類アブラウイルス1配列からの1200 Fを超えるアミノ酸配列からのコンセンサス配列である。コンセンサスFタンパク質は、最も近い天然の相対物：鳥類オルトアブラウイルス1 Fタンパク質、GenBank acc. nr. AHX 74055.1と98.5%のアミノ酸類似性を有する。Fタンパク質エクトドメインをaa. 31－500から選択した。

【0315】

配列番号19のNDV HN配列は、本明細書に記載のMScon技術を使用して、公共データベースからのいくつかのHN配列と組み合わせた、GenBank acc. nr. AXK 59828.1のAvian orthoavulavirus 1由来のHNタンパク質から出発するコンセンサス配列である。HNからアミノ酸47－571を選択した。

【0316】

配列番号20のIBDV VP2タンパク質は、GenBank acc. nr. AM A 19770.1のIBDV VP2タンパク質のアミノ酸9～452を表す。

【0317】

配列番号21のIBVスパイクタンパク質は、GenBank acc. nr. ARS 22410.1のIBVスパイクタンパク質のアミノ酸1～1096を表す。スパイクタンパク質を、2つのアミノ酸置換：Q859P及びL860Pを行うことによって安定化した。

【図面の簡単な説明】

【0318】

【図1】AIV MDA＋子孫を作製するために過剰免疫化された母鶏における抗体力価の結果の提示。詳細は実施例1に記載する。

【0319】

縦軸は、不活性化アジュバント化AIV H9N2ウイルスワクチン（UDL 01／08）による免疫化後の母鶏の血清中のHIアッセイによって測定された平均（ $n=10$ ）HI力価を示す。実験開始後の週（0日目＝17週齢）における時点を横軸に示す。ワクチン接種は、開始後0、3、及び24週目に矢印で示している。

【0320】

受精卵を開始後36週間後に回収し、ボックスは、追跡実験で使用した産卵時の雌鶏の血清中の平均（ $n=10$ ）HI力価： $HI=12 \text{ Log}_2(4096)$ を示す。

【0321】

データを平均（列）及び標準偏差（エラーバー）として示す。アスタリスクは、実験開始後11週及び18週並びに開始後18週及び29週におけるHI抗体価の有意差を表し、 $*=p<0.05$ 及び $***=p<0.001$ である。

【図2】3回ワクチン接種された雌鶏由来のワクチン非接種の子孫におけるMDA由来HI力価の結果の提示。詳細は実施例1に記載する。

【0322】

抗H9 HA MDA力価を、孵化後1日目、7日目、14日目、21日目、28日目、35日目、42日目、56日目、70日目及び84日目の血清試料のHIアッセイによって測定した。HI力価は、4 HA単位のウイルス赤血球凝集活性を完全に抑制した血清の最高希釈の逆数として表す。データは平均±SDとして示し、一元配置ANOVA、続いてテューキーの多重比較検定によって分析した。統計学的に有意に異なることを、*

10

20

30

40

50

*** = $p < 0.0001$ として示す。

【0323】

水平の点線は、32 (5 Log 2) のHI力価の最小保護レベルを示す。

【図3】高レベルのMDA (MDA++) を有する、日齢1日目にワクチン接種した雛鳥におけるHI力価の結果の提示。詳細は実施例3に記載する。

【0324】

縦軸はHI力価を示し、横軸はワクチン接種後の日数を示す。NB：縦軸にギャップがあり、発見された非常に高いHI力価を表示することができる。

【0325】

MDA++ 雛鳥群 (n = 10) に、3種のワクチン：全不活化ウイルスワクチン (「ノビリスインフルエンザH9N2+ND」)、非標的HA抗原 (「H9 HA Foldon」)、又はCD83標的HA抗原 (「H9 HA Foldon-CD83-scFv」) のうちの1つを日齢1日目にワクチン接種した。対照として、1群のMDA++ 雛鳥にはワクチン接種しなかった。

【0326】

抗H9 HA抗体力価を、HIアッセイにおいてUDL-01ウイルスを使用して、HIアッセイによって測定した。

【0327】

データを平均 (列) 及びSD (エラーバー) として示す。統計学的に有意に異なることがアスタリスクによって示され、この場合、*** = $p < 0.001$ 及び* = $p < 0.1$ である。

【図4】14日目にワクチン接種した、中レベルのMDA (MDA+) を有する雛鳥のHI力価の結果の提示。詳細は実施例3に記載する。

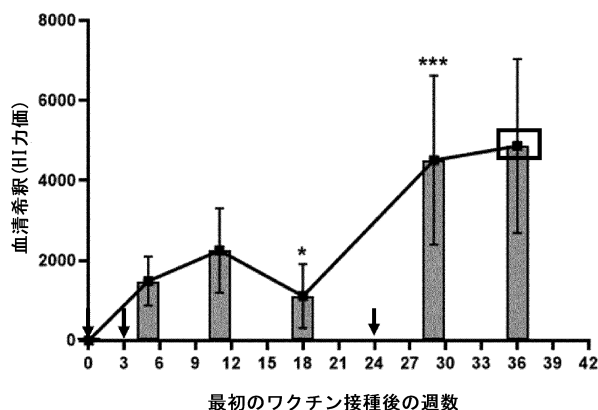
【0328】

ノビリスワクチンを接種した群がなかったことを除いて、図3と同様の提示。

【図面】

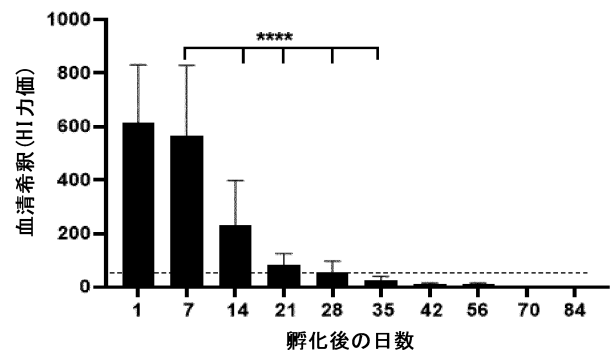
【図1】

Figure 1



【図2】

Figure 2



10

20

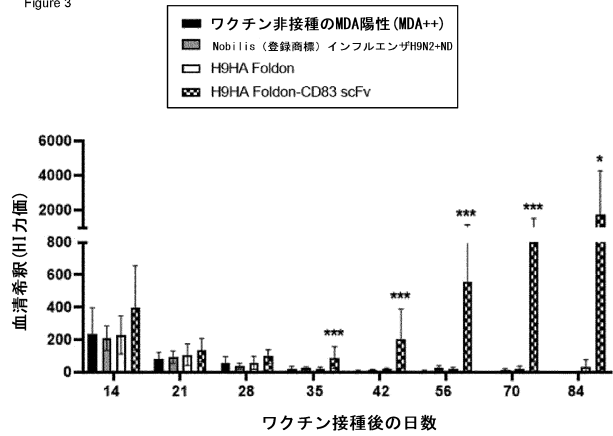
30

40

50

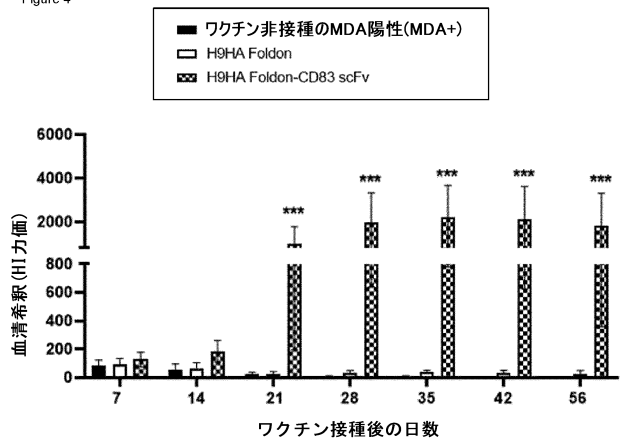
【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4



10

【 配 列 表 】

2024525697000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/069513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K39/12	A61K47/68
	A61P31/16	C07K16/28
	A61K39/00	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K A61P C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HSIEH M K ET AL: "DNA-mediated vaccination conferring protection against infectious bursal disease in broiler chickens in the presence of maternal antibody", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 28, no. 23, 21 May 2010 (2010-05-21), pages 3936-3943, XP027059430, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2010-04-13] See Title; page 3942, right column, second and third paragraphs ----- -/--	1-12
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
"&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 September 2022		12/10/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Valcárcel, Rafael

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2022/069513
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed. b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/069513

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LARDINOIS A. ET AL.: "Stronger Interference of Avian Influenza Virus-Specific Than Newcastle Disease Virus-Specific Maternally Derived Antibodies with a Recombinant NDV-H5 Vaccine", AVIAN DISEASE, vol. 60, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 191-201, XP055624712, DOI: 10.1637/11133-050815-Reg See e.g. the summary; page 192, left column, end of second paragraph -----	1-12
Y	SHRESTHA ANGITA ET AL: "Enhancing Protective Efficacy of Poultry Vaccines through Targeted Delivery of Antigens to Antigen-Presenting Cells", VACCINES, vol. 6, no. 4, 1 December 2018 (2018-12-01), page 75, XP055881189, CH ISSN: 2076-393X, DOI: 10.3390/vaccines6040075 See e.g. the title; section 3.2 starting on page 4; figure 2; page 5, first and second paragraphs; conclusions on page 11 -----	1-12
Y	JÁUREGUI-ZÚÑIGA DAVID ET AL: "Targeting antigens to Dec-205 on dendritic cells induces a higher immune response in chickens: Hemagglutinin of avian influenza virus example", RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, vol. 111, 1 April 2017 (2017-04-01), pages 55-62, XP055881746, GB ISSN: 0034-5288, DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.12.002 See e.g. the title or abstract ----- -/--	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/069513

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALVAREZ B. ET AL: "Antigen targeting to APC: From mice to veterinary species", DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, , vol. 41, no. 2 1 October 2013 (2013-10-01), pages 153-163, XP055881342, US ISSN: 0145-305X, DOI: 10.1016/j.dci.2013.04.021 Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X13001250/pdf?md5=08271c25cb3cdafb36c9d6abba47e7c6&pid=1-s2.0-S0145305X13001250-main.pdf See e.g. the abstract; conclusions on page 161 -----	1-12
Y	HANSELL CHRIS ET AL: "Unique features and distribution of the chicken CD83(+) cell", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 179, no. 8, 15 October 2007 (2007-10-15), pages 5117-5125, XP009532909, See e.g. the abstract -----	3
X,P	SHRESTHA ANGITA ET AL: "Targeting Haemagglutinin Antigen of Avian Influenza Virus to Chicken Immune Cell Receptors Dec205 and CD11c Induces Differential Immune-Potentiating Responses", VACCINES, vol. 9, no. 7, 13 July 2021 (2021-07-13), page 784, XP055881762, CH ISSN: 2076-393X, DOI: 10.3390/vaccines9070784 the whole document -----	1-12
X,P	SHRESTHA ANGITA ET AL: "Selectively targeting haemagglutinin antigen to chicken CD83 receptor induces faster and stronger immunity against avian influenza", NPJ VACCINES , vol. 6, no. 1 15 July 2021 (2021-07-15), XP055881686, DOI: 10.1038/s41541-021-00350-3 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41541-021-00350-3.pdf the whole document -----	1-12

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/069513

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2022/090696 A1 (THE PIRBRIGHT INST [GB]) 5 May 2022 (2022-05-05) The whole document but see e.g. the abstract or the claims -----	1-12

2

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/069513

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2022090696 A1	05-05-2022	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 31/16 (2006.01)
C 0 7 K 14/005 (2006.01)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)
C 1 2 N 15/33 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)

A 6 1 P 31/16
C 0 7 K 14/005
C 0 7 K 16/28
C 1 2 N 15/62
C 1 2 N 15/33
C 1 2 N 15/13

Z

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

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ヴァン・ハルテン, マリア・コルネリア・ヴィルヘルミナ

オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボックスメル、ウイム・ドゥ・コルベルストラート・3 5

(72)発明者 イクバル, ムニル

イギリス国、ジーユー2 4・0 エヌエフ・サリー、ウォーキング・アッシュ・ロード

(72)発明者 シュレスタ, アンギタ

イギリス国、ジーユー2 4・0 エヌエフ・サリー、ウォーキング・アッシュ・ロード

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC06 EE59

4C085 AA03 BA51 BA55 BA59 BA71 BB11 CC02 DD62 DD86 EE01

EE06 FF17 GG04

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA01 CA40 DA76 EA31 FA74