

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-30862
(P2018-30862A)

(43) 公開日 平成30年3月1日(2018.3.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/155 Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	

審査請求 有 請求項の数 28 O L 外国語出願 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2017-182552 (P2017-182552)	(71) 出願人	515230154 ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー アメリカ合衆国ニュージャージー州070 54, パーシッパニー, シルバン・ウエイ 10
(22) 出願日	平成29年9月22日 (2017.9.22)	(71) 出願人	501051125 ザ ヘンリー エム. ジャクソン ファ ウンデーション フォー ザ アドヴァン スメント オブ ミリタリー メディシン インコーポレイテッド アメリカ合衆国 メリーランド州 ベセス ダ ロックレッジ ドライブ 6720— エイ スイート 100
(62) 分割の表示	特願2017-76265 (P2017-76265) の分割	(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
原出願日	平成24年5月14日 (2012.5.14)		
(31) 優先権主張番号	61/485,992		
(32) 優先日	平成23年5月13日 (2011.5.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘンドラ及びニパウイルスG糖タンパク質免疫原性組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヘンドラ及び/又はニパウイルスに対する免疫原性組成物及びその使用方法の提供。

【解決手段】ヘンドラ及び/又はニパウイルスG糖タンパク質と免疫刺激複合体 (ISC) と少なくとも1種の賦形剤とを、ヘンドラ及び/又はニパウイルスに感受性のある対象への投与後に該ヘンドラ及び/又はニパウイルスに対する免疫防御を誘発するのに有効な量で含むワクチンであって、(a)ヘンドラ及び/又はニパウイルスG糖タンパク質は1用量当たり5~100µgの量で存在し、(b)ISCはサポニン及びステロイドを含む、ワクチン。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘンドラ及び/又はニパウイルスG糖タンパク質と免疫刺激複合体 (ISC) と少なくとも1種の賦形剤とを、ヘンドラ及び/又はニパウイルスに感受性のある対象への投与後に該ヘンドラ及び/又はニパウイルスに対する免疫防御を誘発するのに有効な量で含むワクチンであって、

(a) ヘンドラ及び/又はニパウイルスG糖タンパク質は1用量当たり5 ~ 100 µgの量で存在し、

(b) ISCはサポニン及びステロイドを含む、
ワクチン。

10

【請求項 2】

サポニンはQuil Aである、請求項1に記載のワクチン。

【請求項 3】

ISCはリン脂質をさらに含む、請求項1に記載のワクチン。

【請求項 4】

可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質は、天然のヘンドラG糖タンパク質 (配列番号2) の73 ~ 604位のアミノ酸からなる、請求項1に記載のワクチン。

【請求項 5】

可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質は、配列番号16の64 ~ 1662位のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列によってコードされている、請求項4に記載のワクチン。

20

【請求項 6】

可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質は二量体形態で存在している、請求項1に記載のワクチン。

【請求項 7】

可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質二量体の各サブユニットは少なくとも1つのジスルフィド結合によって連結されている、請求項6に記載のワクチン。

【請求項 8】

可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質は四量体形態で存在している、請求項1に記載のワクチン。

【請求項 9】

可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質の量は約50 ~ 約100 µgであり、前記対象はウマである、請求項1に記載のワクチン。

30

【請求項 10】

サポニンは、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja saponaria Molina) から単離されたものである、請求項1に記載のワクチン。

【請求項 11】

サポニンは、QH - A、QH - B、QH - C、又はQS21である、請求項10に記載のワクチン。

【請求項 12】

リン脂質は、ホスファチジルコリン (PC)、ジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ホスファチジン酸 (ホスファチデート) (PA)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP)、ホスファチジルイノシトールニリン酸 (PIP2)、ホスファチジルイノシトール三リン酸 (PIP3)、ホスホリルコリン (SPH)、セラミドホスホリルエタノールアミン (Cer - PE)、及びセラミドホスホリルグリセロールからなる群から選択される、請求項3に記載のワクチン。

40

【請求項 13】

サポニンはQuil Aであり、リン脂質はDPPCであり、ステロイドはコレステロールである、請求項3に記載のワクチン。

【請求項 14】

50

組成物における Q u i l A : D P P C : コレステロールの重量比は 5 : 1 : 1 である、請求項 1 3 に記載のワクチン。

【請求項 1 5】

前記対象は、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ニワトリ、又はネコである、請求項 1 ~ 8 及び 1 0 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 1 6】

前記対象における前記ヘンドラ及び / 又はニパウイルスに対する中和抗体応答を生成することができる、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 1 7】

中和抗体応答は前記対象におけるヘンドラ及び / 又はニパウイルスの複製を減少させる、請求項 1 6 に記載のワクチン。

10

【請求項 1 8】

中和抗体応答は前記対象におけるヘンドラ及び / 又はニパウイルスの排出を減少させる、請求項 1 6 に記載のワクチン。

【請求項 1 9】

前記対象は、ヘンドラ及び / 又はニパウイルスに曝露された対象である、請求項 1 6 に記載のワクチン。

【請求項 2 0】

前記対象は、ヘンドラ及び / 又はニパウイルス感染に罹患している対象である、請求項 1 9 に記載のワクチン。

20

【請求項 2 1】

筋肉内投与された場合に中和抗体応答を生成することができる、請求項 1 6 に記載のワクチン。

【請求項 2 2】

複数回投与で投与された場合に中和抗体応答を生成することができる、請求項 1 6 に記載のワクチン。

【請求項 2 3】

第 2 回目の投与が第 1 回目の投与から少なくとも約 2 1 ~ 約 2 8 日後に行われる、請求項 2 2 に記載のワクチン。

【請求項 2 4】

各用量は約 5 0 又は約 1 0 0 μ g の可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質を含む、請求項 2 2 に記載のワクチン。

30

【請求項 2 5】

前記対象はウマであり、各用量は約 5 0 又は約 1 0 0 μ g の可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質を含み、I S C は Q u i l A 、 D P P C 、 及びコレステロールを含む、請求項 1 6 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 2 6】

前記ウイルスはヘンドラウイルスである、請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 2 7】

前記ウイルスはニパウイルスである、請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のワクチン。

40

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のワクチンをワクチン接種された対象から単離された生物学的試料と、ヘンドラ及び / 又はニパウイルスに曝露された対象から単離された生物学的試料と、を識別する方法であって、生物学的試料において、融合タンパク質 (F) 、マトリックスタンパク質 (M) 、リンタンパク質 (P) 、巨大タンパク質 (L) 、及びヌクレオカプシドタンパク質 (N) からなる群から選択される H e V 及び / 又は N i V ウイルスタンパク質の少なくとも 1 つに対する抗体の存在を検出するステップを含む方法。

50

【請求項 29】

前記対象は、ヒト、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ニワトリ、又はネコである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記ウイルスはヘンドラウイルスである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記ウイルスはニパウイルスである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

ヘンドラウイルス感染に対してウマにワクチン接種するための方法であって、請求項 9 に記載のワクチンを前記ウマに 2 回投与することを含む方法。

10

【請求項 33】

第 2 回目の投与が第 1 回目の投与から少なくとも約 21 ~ 約 28 日後に行われる、請求項 32 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

[0001]本発明は、ヘンドラ (H e n d r a) ウイルス (H e V) 及び / 又はニパ (N i p a h) ウイルス (N i V) 由来の G 糖タンパク質を含む免疫原性組成物及びワクチン組成物、並びにこれらの組成物に係る使用方法に関する。

【背景の説明】

20

【0002】

[0002]N i V が繰り返し発生して多数の死者が出ていることが近年問題になっている (例えば、B u t l e r、(2000)、N a t u r e、429、7 を参照)。また、H e V もヒト及び動物に死をもたらすことが知られているが、H e V は N i V と遺伝学的及び免疫学的に密接に関連している。現在のところ、ニパウイルス又はヘンドラウイルスによって引き起こされる感染又は疾患を予防するためのワクチン又は治療薬は存在しない。ニパウイルス及びヘンドラウイルスは、いずれも、米国国立アレルギー・感染症研究所により生物テロ防御が憂慮されるカテゴリー C に分類される病原体である。さらに、これらのウイルスは、人獣共通感染症のバイオセーフティレベル - 4 の病原体 (B S L - 4) であり、安全にワクチン生産及び / 又は診断を行うことは、非常に費用がかかり、また困難である。このように、ニパウイルス又はヘンドラウイルスに対して、ワクチンのハイスループット生産及び / 又は診断を可能にするワクチン及び診断が必要とされている。

30

【0003】

[0003]H e V、N i V 等のパラミクソウイルスは、ウイルス粒子のエンベロープに 2 つの主要な膜結合型糖タンパク質を有する。一方の糖タンパク質は、ビリオンが宿主細胞上の受容体に結合するために必要であり、ヘマグルチニン - ノイラミニダーゼタンパク質 (H N) 又はヘマグルチニンタンパク質 (H) のいずれかとして構成されている。他方の糖タンパク質は、赤血球凝集活性もノイラミニダーゼ活性も有しない糖タンパク質 (G) である。これらの結合糖タンパク質は I I 型膜タンパク質であり、分子のアミノ (N) 末端が細胞質の方に向かい、タンパク質のカルボキシ (C) 末端が細胞外にある。他の主要な糖タンパク質は融合 (F) 糖タンパク質であり、この (F) 糖タンパク質は三量体クラス I 型膜融合性エンベロープ糖タンパク質であり、2 つのヘプタッド反復 (H R) 領域と疎水性融合ペプチドとを有している。H e V 及び N i V は、受容体に結合後、それらの結合 G 糖タンパク質と F 糖タンパク質との協奏的な作用により、p H 非依存的な膜融合プロセスを介して受け手の宿主細胞に感染する。H e V 及び N i V の結合 G 糖タンパク質の主要な機能は宿主細胞表面の適切な受容体に作用することであり、よく特徴づけられているパラミクソウイルスの大半はシアル酸分子に作用する。H e V 及び N i V の G 糖タンパク質は、宿主細胞の受容体タンパク質エフリン B 2 及び / 又はエフリン B 3 を利用するものであるが、この G 糖タンパク質に対するウイルス結合を遮断する抗体が開発されてきた (国際公開第 2006 / 137931 号パンフレット、B i s h o p (2008)、J . V i

40

50

rol.、82:11398-11409)。さらに、HeV及びNiV感染に対する免疫防御応答を生成する手段としてG糖タンパク質を使用するワクチンも開発されてきた(国際公開第2009/117035号パンフレット)。

【0004】

[0004]ワクチン調製物においてQuil Aを使用する際の投与部位での反応性は、動物及びヒトのいずれの場合においても大きな問題である。Quil Aの毒性を避けるための1つの方法は免疫刺激複合体の使用である(Rajput(2007)、J. Zhejiang Univ. Sci. B、8:153-161)。その理由は主として、免疫刺激複合体に組み込まれると、Quil Aの活性が減弱することにある。Quil Aの活性が減弱するのは、Quil Aが複合体中のコレステロールと会合することによって、細胞膜からコレステロールを抜き出すQuil Aの能力、ひいてはQuil Aの細胞溶解効果が低減するためである。さらに、より少量のQuil Aが同様のレベルのアジュバント効果を生じさせることが求められている。Quil Aサポニンの免疫調節特性と、Quil Aサポニンが免疫刺激複合体に組み込まれたときにQuil Aサポニンから誘導される付加的な効果については、国際公開第2000/041720号パンフレットに記載されている。

10

【0005】

[0005]単一のワクチンにおけるHeV及び/又はNiVのG糖タンパク質と免疫刺激複合体との組み合わせは、これらの成分が組み合わせて投与されると、アジュバントの副作用が低減しつつ免疫反応が増強する可能性があることから、有効なHeV及びNiVワクチンの開発における進歩を表すものである。

20

【発明の概要】

【0006】

[0006]本発明は、ヘンドラ及び/又はニパウイルスGタンパク質と免疫刺激複合体(ISC)と少なくとも1種の賦形剤とを、対象への投与後にヘンドラ及び/又はニパウイルスに対する中和抗体の産生を誘発するのに有効な量で含む免疫原性組成物を包含する。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物はサポニン、リン脂質及びステロイドを含む。

【0007】

[0007]いくつかの実施形態において、可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質は、天然のヘンドラG糖タンパク質(配列番号2)の73~604位のアミノ酸からなる。いくつかの実施形態において、可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質は、配列番号16の64~1662位のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列によってコードされている。いくつかの実施形態において、可溶性ヘンドラウイルスGタンパク質は二量体形態で存在し、可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質二量体の各サブユニットは少なくとも1つのジスルフィド結合によって連結されている。いくつかの実施形態において、可溶性ヘンドラウイルスGタンパク質は四量体形態で存在している。いくつかの実施形態において、四量体は、非共有結合及び/又は少なくとも1つのジスルフィド結合によって連結されている二量体の二量体として存在している。可溶性ヘンドラウイルスGタンパク質の濃度は免疫原性組成物中、約5~100µg/mlであり得る。

30

40

【0008】

[0008]いくつかの実施形態において、サポニンは、キラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja saponaria Molina)から単離され、QH-A、QH-B、QH-C、又はQS21から選択され得る。いくつかの実施形態において、リン脂質は、ホスファチジルコリン(PC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ホスファチジン酸(ホスファチデート)(PA)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルイノシトールリン酸(PIP)、ホスファチジルイノシトールニリン酸(PIP2)、ホスファチジルイノシトール三リン酸(PIP3)、ホスホリルコリン(SPH)、セラミドホスホリルエタノールアミン(Cer-PE)、及びセラミドホスホリルグリセ

50

ロールからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、サポニンは Q u i l A であり、リン脂質は D P P C であり、ステロイドはコレステロールであり、組成物中の Q u i l A : D P P C : コレステロールの重量比は 5 : 1 : 1 である。

【 0 0 0 9 】

[0009]また、本発明は、対象においてヘンドラ及び/又はニパウイルスに対する中和抗体応答を生成する方法であって、対象に、本明細書に記載の免疫原性組成物を、中和抗体応答を生成するのに有効な量及び期間で投与するステップを含む方法を包含する。いくつかの実施形態において、中和抗体応答は対象におけるヘンドラ及び/又はニパウイルスの複製を減少させ、また、対象におけるヘンドラ及び/又はニパウイルスの排出も減少させる場合もある。いくつかの実施形態において、対象はヘンドラ及び/又はニパウイルスに曝露された対象であり、他の実施形態において、対象はヘンドラ及び/又はニパウイルス感染に罹患している対象である。いくつかの実施形態において、本発明は、対象においてヘンドラウイルスに対する中和抗体応答を生成する方法であって、対象に、本明細書に記載の免疫原性組成物を、中和抗体応答を生成するのに有効な量及び期間で投与するステップを含む方法を包含する。いくつかの実施形態において、本発明は、対象においてニパウイルスに対する中和抗体応答を生成する方法であって、対象に、本明細書に記載の免疫原性組成物を、中和抗体応答を生成するのに有効な量及び期間で投与するステップを含む方法を包含する。

10

【 0 0 1 0 】

[0010]いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は筋肉内投与される。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は複数回投与で投与され、第 2 回目の投与は第 1 回目の投与から少なくとも約 2 1 ~ 約 2 8 日後に行われる。いくつかの実施形態において、各用量は約 5 0 又は約 1 0 0 μ g の可溶性ヘンドラウイルス G タンパク質を含む。

20

【 0 0 1 1 】

[0011]本発明は、さらに、本明細書に記載の免疫原性組成物をワクチン接種された対象と、ヘンドラ及び/又はニパウイルスに曝露された対象と、を識別する方法であって、対象から単離した生物学的試料において、融合タンパク質 (F)、マトリックスタンパク質 (M)、リントタンパク質 (P)、巨大タンパク質 (L)、及びヌクレオカプシドタンパク質 (N) からなる群から選択される H e V 及び/又は N i V ウイルスタンパク質の少なくとも 1 つに対する抗体の存在を検出するステップを含む方法を包含する。

30

【 0 0 1 2 】

[0012]本発明の免疫原性組成物及び方法は、ヒト、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ニワトリ、イヌ、ネコ等の対象に投与することができる。

【 0 0 1 3 】

[0013]また、本発明は、ヒト対象においてヘンドラ及び/又はニパウイルスに対する中和抗体応答を生成する方法であって、対象に、可溶性 G 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を、中和抗体応答を生成するのに有効な量及び期間で投与するステップを含む方法を包含する。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物はアジュバントをさらに含む。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】 図 1 (F i g u r e 1) は、2 5 0 μ g の免疫刺激複合体でアジュバントされた 5 0 又は 1 0 0 μ g / 用量の組換えヘンドラウイルス可溶性糖タンパク質 (s G) を投与し、次いで 0 日目に生ヘンドラウイルスに曝露させたウマの経時的な直腸温を示す。

40

【 図 2 】 図 2 (F i g u r e 2) は、2 5 0 μ g の免疫刺激複合体でアジュバントされた 5 0 又は 1 0 0 μ g / 用量の組換えヘンドラウイルス可溶性糖タンパク質 (s G) を投与し、次いで 0 日目に生ヘンドラウイルスに曝露させたウマの経時的な心拍数を示す。

【 図 3 】 図 3 (F i g u r e 3) は免疫刺激複合体の調製の概略図である。

【 図 4 】 図 4 (F i g u r e 4) は s G H e V ワクチン接種及び N i V チャレンジスケジュールの概略図である。s G H e V ワクチン接種、N i V チャレンジ、及び安楽死を行った日は矢印で示されている。血液及びスワブ検体は、チャレンジ後 - 4 2、- 7、0、

50

3、5、7、10、14、21及び28日目に採取した(*で示されている)。灰色の文字はチャレンジのタイムライン(上の列)、黒色の文字はワクチン接種のタイムライン(下の列)を示す。各ワクチン用量グループ及び1つのコントロール対象におけるアフリカミドリザル(AGM)の番号が示されている。

【図5】図5(Figure 5)はNiV感染対象の生存曲線を示す。コントロール対象(n=2)及びsGHeVワクチン接種対象(n=9)から得たデータを用いて Kaplan-Meier 生存曲線を作成した。コントロールには、さらにもう1つの過去のコントロール対象のデータが含まれる。ワクチン接種対象には、10 μ g、50 μ g又は100 μ gのsGHeVが2回皮下投与された。疾患末期までの平均時間はコントロール対象で11日であったが、ワクチン接種対象はすべて試験の最後の安楽死まで生存した。

10

【図6】図6(Figure 6)はワクチン接種対象におけるNiV-及びHeV-特異的免疫グロブリン(Ig)を示す。血清及び鼻腔スワブをワクチン接種対象から回収し、IgG、IgA及びIgMの応答を、sGHeV及びsGNiV多重マイクロスフェアアッセイを用いて評価した。同じワクチン用量グループ(n=3)の対象に由来する血清又はスワブを個別に分析し、マイクロスフェア蛍光強度中央値(M.F.I.)の平均を計算した(計算した値をY軸に示す)。エラーバーは標準誤差を表す。血清sG特異的Igは黒色で示し(sGHeV(白抜き三角)、sGNiV(塗りつぶし三角))、粘膜sG特異的IgAは灰色の記号で示す(sGHeV(白抜き三角)、sGNiV(塗りつぶし三角))。

20

【発明の説明】

【0015】

ワクチン及び免疫原性組成物：

[0020]本発明のワクチン及び免疫原性組成物は、組成物を投与された対象において、いくつかの液性及び細胞性免疫のうち少なくとも1つを誘導するか、あるいは、HeV及び/又はNiV株の少なくとも1つに対する少なくとも1つの免疫応答を増強するのに有効である。そのため、本発明のワクチン及び免疫原性組成物の投与は、HeV及び/又はNiVの少なくとも1種の株によるHeV及び/又はNiV感染に対するワクチン接種用途及び/又は予防に好適である。本発明の組成物は、必要とする対象に、HeV及び/又はNiV由来の可溶性G糖タンパク質を含むG糖タンパク質と、アジュバントとして作用する免疫刺激複合体(ISC)と、を送達する。いくつかの実施形態において、G糖タンパク質の量としては、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200又は250 μ g/mlが挙げられる。また、ISCの含有量としては、100、125、150、175、200、225、250、275又は300 μ g/mlが挙げられる。いくつかの実施形態において、G糖タンパク質の量は、5、50又は100 μ g/mlであり、ISCの量は250 μ g/mlである。

30

【0016】

A. HeV及びNiV Gタンパク質：

[0021]いくつかの実施形態において、ワクチン及び免疫原性組成物は、本明細書に記載の少なくとも1種のHeV及び/又はNiV G糖タンパク質を含む。本明細書において、タンパク質という語は、ポリペプチド又はその断片を包含するものとして広く使用される。例えば、HeV G糖タンパク質は可溶性形態であり得、Wang(2000)、J. Virol., 74, 9972-9979(Yu(1998)、Virology, 251, 227-233も参照)におけるHeV G糖タンパク質のアミノ酸配列の73~604位のアミノ酸を含み得る。また、例えば、NiV G糖タンパク質は可溶性形態であり得、Harcourt(2000)、Virology, 271:334-349、2000(Chua(2000)、Science, 288, 1432-1も参照)におけるNiV G糖タンパク質のアミノ酸配列の71~602位のアミノ酸を含み得る。

40

【0017】

[0022]概して、HeV及びNiV G糖タンパク質の可溶性形態は、HeV又はNiV

50

のG糖タンパク質の外部ドメイン(例えば、細胞外)のすべて又は一部を含み、概して、G糖タンパク質の膜貫通ドメインのすべて又は一部とG糖タンパク質の細胞質テールのすべて又は一部とを削除することによって生成される。一例として、可溶性G糖タンパク質は、HeV又はNiV G糖タンパク質の完全な外部ドメインを含み得る。また、例えば、可溶性G糖タンパク質は、HeV又はNiV G糖タンパク質の外部ドメインの全部又は一部と膜貫通ドメインの一部を含み得る。

【0018】

[0023]本発明の可溶性HeV又はNiV G糖タンパク質は、概して、対応する天然のウイルス糖タンパク質の少なくとも1つの特徴、例えば、ウイルス宿主細胞受容体に対する相互作用又は結合能力、オリゴマー形態となり得る能力、又は天然G糖タンパク質認識可能抗体(例えばウイルス中和抗体を含む。)を誘発する能力を保持している。さらなる特徴としては、例えば、宿主細胞の感染を遮断又は予防する能力が挙げられる。従来手法を利用して、可溶性HeV又はNiV G糖タンパク質の特徴の少なくとも1つを評価することができる。

10

【0019】

[0024]例えば、可溶性HeV G糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、Wang(2000)、J. Virol., 74, 9972-9979におけるHeV G糖タンパク質のアミノ酸配列(配列番号2)の約73~604位のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列を含み得る。また、例えば、可溶性HeV G糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、Wang(2000)、J. Virol., 74, 9972-9979におけるHeV G糖タンパク質のポリヌクレオチド配列の9129~10727位のヌクレオチドを含み得る。さらに、HeV G糖タンパク質アミノ酸配列(配列番号2)の約73~604位のアミノ酸をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列も利用することができる。いくつかの実施形態において、コドン最適化配列は、配列番号16の64~1662位のヌクレオチドを含む又はそれからなる。さらなる実施形態において、コドン最適化配列は、Ig リーダー配列をコードするヌクレオチドを含む配列番号16を含む又はそれからなる。

20

【0020】

[0025]例えば、NiV G糖タンパク質は可溶性形態であり得、Harcourt(2000)、Virology, 271:334-349におけるNiV G糖タンパク質アミノ酸配列の71~602位のアミノ酸を含み得る。可溶性NiV G糖タンパク質の構築に使用し得る配列の例は、例えば、Harcourt(2000)、Virology, 271, 334-349に見出し得る。概して、任意のニパウイルス単離物又は株に由来するG糖タンパク質配列を利用して、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドを誘導することができる。

30

【0021】

[0026]例えば、可溶性NiV G糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、Harcourt(2000)、Virology, 271:334-349におけるNiV G糖タンパク質アミノ酸配列の約71~602位のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列を含み得る。また、例えば、可溶性NiV G糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、Harcourt(2000)、Virology, 271:334-349におけるNiV G糖タンパク質ポリヌクレオチド配列(配列番号4)の234~2042位を含み得る。さらに、NiV G糖タンパク質アミノ酸配列の約71~602位のアミノ酸をコードするコドン最適化ポリヌクレオチド配列も利用し得る。

40

【0022】

[0027]これらのG糖タンパク質の機能的等価体を、本発明の免疫原性及びワクチン組成物で使用することができる。例えば、機能的に等価なポリペプチドは次の特徴の少なくとも1つを有する。ウイルス宿主細胞受容体に対する相互作用又は結合能力、二量体又は四量体の形態となり得る能力、又は天然G糖タンパク質認識可能抗体(例えば、HeV及び/又はNiVウイルス中和抗体を含む。)を誘発する能力、及び/又は宿主細胞の感染を

50

遮断若しくは予防する能力。

【0023】

[0028]いくつかの実施形態において、G糖タンパク質は二量体及び/又は四量体形態であり得る。そのような二量体は、G糖タンパク質のシステイン残基間に形成されるジスルフィド結合の形成に応じて変化する。そのようなジスルフィド結合は、HeV又はNiVの表面に発現された天然のG糖タンパク質に形成されている(例えば、システインの位置が変動せずに維持されている)ジスルフィド結合に対応するものであってもよく、あるいは、抗原性を増強させる異なるG糖タンパク質二量体及び/又は四量体が形成されるようにG糖タンパク質の存在及び位置が(例えば、アミノ酸配列におけるシステインの位置が変化することによって)変化したものであってもよい。さらに、G糖タンパク質が構造依存性の(すなわち、三次(三次元)構造から生じる)多数のエピトープを提示していること、そして多数のそのような天然のエピトープを保持しておくことが中和抗体応答を付与するために非常に好ましいことを考慮すると、二量体及び四量体形態でないものも本発明に包含される。

10

【0024】

[0029]本発明のHeV免疫原性及びワクチン組成物は、配列番号2の73~604位のアミノ酸残基を含む種々の長さのタンパク質を含有し得る。本発明の一実施形態において、本発明のエンベロープタンパク質は、配列番号2のHeV糖タンパク質(73~604位のアミノ酸を含む。)と少なくとも約85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%同一である。したがって、本発明のHeV G糖タンパク質は、天然のHeV G糖タンパク質の免疫原性断片を、立体構造的エピトープを生成するのに十分なアミノ酸数で含む。免疫原性断片の非限定的な例としては、アミノ酸の長さが少なくとも530、531、532、533、534又は535又はさらに上回る残基であり得るアミノ酸配列が挙げられる。いくつかの実施形態において、HeV G糖タンパク質は、配列番号2又はIg リーダー配列をさらに含む合成配列(配列番号15)を含む又はそれからなる。

20

【0025】

[0030]本発明のNiV免疫原性組成物及びワクチン組成物は、配列番号4の71~602位のアミノ酸残基を含む種々の長さのタンパク質を含有し得る。本発明の一実施形態において、本発明のエンベロープタンパク質は、配列番号4のNiV糖タンパク質(71~602位のアミノ酸を含む。)と少なくとも約85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%同一である。したがって、本発明のNiV G糖タンパク質は、天然のNiV G糖タンパク質の免疫原性断片を、立体構造的エピトープを生成するのに十分なアミノ酸数で含む。免疫原性断片の非限定的な例としては、アミノ酸の長さが少なくとも528、529、530、531、532又は533又はさらに上回る残基であり得るアミノ酸配列が挙げられる。いくつかの実施形態において、NiV G糖タンパク質は、配列番号4又はリーダー配列をさらに含む合成配列を含む又はそれからなる。

30

【0026】

[0031]本明細書に記載の免疫原性断片は、抗原の少なくとも1つのエピトープを含有し、HeV及び/又はNiV抗原性を示し、適切な構築物で提供されたとき(例えば、他のHeV及び/又はNiV抗原と融合されたとき、又は担体上で提示されたとき)、天然の抗原に対する免疫反応を惹起し得るものである。本発明の一実施形態において、免疫原性断片は、HeV及び/又はNiV抗原由来の少なくとも20個の連続するアミノ酸を含有し、例えば、HeV及び/又はNiV抗原由来の少なくとも50、75又は100個の連続するアミノ酸を含有する。

40

【0027】

[0032]HeV及びNiV G糖タンパク質の実施形態としては、さらに、例えば、天然のHeV又はNiV G糖タンパク質と少なくとも85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む単離

50

されたポリペプチドが挙げられ、ポリペプチド配列は、天然のHeV又はNiV G糖タンパク質アミノ酸配列と同一であってもよく、あるいは、天然のHeV若しくはNiV Gタンパク質アミノ酸配列と比較して一定数までのアミノ酸改変を有する配列であってもよく、改変は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換（保存的及び非保存的置換を含む。）又は挿入からなる群から選択され、改変は、基準となるポリペプチド配列のアミノ末端若しくはカルボキシ末端に存在しても、これらの両端の間のいずれかの位置に存在してもよく、基準となる配列のアミノ酸の間で別個に散在してもよく、又は天然のHeV若しくはNiV G糖タンパク質アミノ酸配列内の少なくとも1つの連続するまとまりとして存在してもよい。

【0028】

[0033]アミノ酸配列レベルの配列同一性又は相同性は、配列の類似性検索のために開発されたBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 解析により、blastp、blastn、blastx、tblastn及びtblastxプログラムで採用されるアルゴリズムを用いて決定することができる (Altschul (1997)、Nucleic Acids Res.、25、3389-3402及びKarlin (1990)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87、2264-2268)。BLASTプログラムで用いるアプローチでは、まず、検索配列とデータベース配列との間で、ギャップ有り（非連続的）又はギャップ無し（連続的）で類似のセグメントを検討し、次いで、特定されたすべての一致について統計学的有意性を評価し、最後に、予め選択された有意性の閾値を満たす一致のみを集約する。配列データベース類似性検索の基本的事項に関する論考については、Altschul (1994)、Nature Genetics 6、119-129を参照されたい。ヒストグラム、表示、アラインメント、期待値（つまり、データベース配列に対する一致を出力するための統計学的有意性の閾値）、カットオフ、行列、及びフィルター（低複雑性）に対する検索パラメータはデフォルト設定である。blastp、blastx、tblastn、及びtblastxで使用されるデフォルトスコア行列は、アミノ酸85残基を超える長さの検索配列に推奨されるBLOSUM62行列 (Henikoff (1992)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89、10915-10919) である。

【0029】

[0034]本発明のワクチン及び免疫原性組成物は、本発明の免疫化方法をさらに増強させ得る異なる株に由来する追加的なHeV及び/又はNiV Gタンパク質をさらに含むもよい。

【0030】

B. 免疫刺激複合体：

[0035]概して、本発明は、可溶性形態のHeV及び/又はNiV G糖タンパク質エンペロプタンパク質を免疫刺激複合体 (ISC) と組み合わせる含む免疫原性組成物（ワクチン組成物を含む）、並びにこれらの組成物を用いて対象におけるHeV及び/又はNiV感染を予防及び治療するための方法を提供するものである。本発明において、ワクチン及び/又は免疫原性組成物はアジュバントとして作用する免疫刺激複合体を含む。本明細書において、「アジュバント」とは、それ自体は何ら特別な抗原的効果を有しないが、免疫系を刺激して抗原に対する反応を増強させ得る物質を指す。

【0031】

[0036]ISCはいくつかの特徴を有することから、一定の用途において理想的なアジュバントとなる。

【0032】

[0037]抗原節約：

例えば、Wee (2008)、Mucosal Immunol.、1、489-496に記載されているように、抗原の入手可能性が制限されている又は抗原が高額である状況において、ISCにより10~100倍の抗原節約が可能となることが示されている。

10

20

30

40

50

この特徴は、組み合わせによる効果の増強又は他のアジュバントと比較してより適切な作用機構に基づいている可能性が高い。

【0033】

[0038]交差提示：

例えば、Schnurrr (2009)、J. Immunol.、182、1253-1259で記載されているように、抗原提示細胞 (APC) による抗原提示は、通常、2つの経路の1つに従う。外来抗原は、通常、APCによって貪食された後、主要組織適合抗原複合体 (MHC) クラスII分子によってAPCの表面でプロセシングされ、再び発現する。その後、リンパ球で見られるようになり、正しい共刺激因子/シグナルが存在する場合には適切に応答する。自己及び癌抗原並びにウイルス抗原は、APCの細胞質に存在しているため、通常、クラスI分子においてプロセシングされ、発現する。癌及びウイルス抗原に対する免疫を有効にするためにはクラスI経路を利用する必要がある。このクラスI経路の利用は、ウイルス感染又は細胞ホメオスタシス (内部抗原の細胞代謝回転) において自然に起こる。ワクチンとして導入される抗原 (ウイルス抗原又は自己抗原) は、細胞の外側から細胞の抗原プロセシング機構へ入り、クラスII経路からクラスI経路へ入る方法を見出すことが必要となる。これは、樹状細胞 (DC、スペシャリストAPC) で自然に起こり得、あるいは、抗原とアジュバントであるISCとを混合してワクチン接種することによって達成され得る。外来性の抗原が、抗原を提示するクラスI経路に自身の経路を見出していくプロセスは、交差提示と称される。ISCが抗原の交差提示を達成するメカニズムは完全には明らかとなっていないが、ISC成分による膜摂動に依拠している可能性がある。

10

20

【0034】

[0039]液性及び細胞性応答：

例えば、Maraskovsky (2009)、Immunol. Cell Biol.、87、371-376) に記載されているように、ISCの作用機構は獲得免疫系の液性及び細胞性応答の両方に関与する。いくつかの種では、この特徴は、このアジュバントを用いたワクチン接種により刺激されるサイトカインのプロファイルと並行する。1型免疫応答は、インターロイキン-2及びIFN- γ の出現と細胞内毒素 (細菌、原生動物及びウイルス) に対する防御によって特徴づけられ、2型免疫応答は、インターロイキン-4の出現並びに抗毒素及び抗病原体関連免疫に対する中和抗体の生成によって特徴づけられる。ISCは、これらの2つの経路の間でバランスのとれたサイトカインプロファイルをもたらし、より広範な免疫応答を可能にする。さらにいくつかの研究により、ワクチンを鼻腔内送達した場合にISCの効果が高くなり得ることが示されている。これにより粘膜表面の増感が可能になり、その結果、病原菌侵入部位での重要な免疫 (本ケースでは特に重要な免疫) (粘膜免疫) がもたらされる (Sjolander (2001)、Vaccine、19、4072-4080も参照されたい。)

30

【0035】

[0040]滅菌濾過性及び一貫性のある製造基準：

ISC粒子径は通常、直径40nmであり、後に製剤化される調製物の滅菌に使用するフィルターに通過させることが可能になる。さらに、Quil Aで見出されるようなトリテルペノイドサポニンがコレステロール及びリン脂質と関わろうとする本来的傾向がISCの作製方法の開発のために利用されてきた。ISC粒子を形成しないQuil A種は最終生成物から透析により除去される。構成成分の比率を調整することによって、不均一な連続体のQuil Aサポニンから均一な生成物が生じる。偏差によっては構造が40nm粒子を特徴としない構造 (例えば、ヘリックス、シート) になるため、上記比率は重要である。ISCコロイドの自由流動性並びに透過電子顕微鏡法、HPLC及び他の技術での測定可能性により、このアジュバントは放出アッセイ及び他の精度のある測定法で展開させ易い。

40

【0036】

[0041]すなわち、いくつかの実施形態において、免疫刺激複合体と最適量のG糖タンバ

50

ク質との製剤はサポニン、リン脂質、及びステロイド分子を含む。いくつかの実施形態において、サポニン、リン脂質、ステロイド分子のモル比は5 : 1 : 1の比率である。免疫刺激複合体は、例えば、5 ~ 10重量%のサポニンと、1 ~ 5重量%のステロイド分子及びリン脂質と、G糖タンパク質を含む残部と、を含有し得る。G糖タンパク質は、免疫刺激複合体に直接的に結合して、又はタンパク質が免疫刺激複合体に組み込まれた後の担体タンパク質（例えば、キメラ又は融合タンパク質）に化学的に結合して、免疫刺激複合体に組み込まれ得る。免疫刺激複合体への言及は、その誘導體、化学的等価体及び類似体に対する言及を含むものとして理解されるべきである。いくつかの実施形態において、ISCは、HeV及び/又はNiV G糖タンパク質とは別に混合され、その後、G糖タンパク質とISCとが混合される。いくつかの実施形態において、G糖タンパク質はサポニン、リン脂質、及びステロイド分子と直接混合される。

10

【0037】

[0042]いくつかの実施形態において、本発明で使用するサポニンはQuil A及び/又はその誘導體である。Quil Aは、南アメリカの樹木であるキラヤ・サポナリア・モリナから単離されたサポニン調製物であり、最初にDalsgaard (1974)、Saponin adjuvants, Archiv. für die gesamte Virusforschung, 44巻、Springer Verlag, 243 - 254頁において、アジュバント活性を有することが記載された。HPLCで単離されたQuil Aの精製断片、例えばQS7及びQS21 (QA7及びQA21としても知られる)は、アジュバント活性を維持しているが、Quil Aに関連する毒性(欧州特許第0362278号明細書)はない。QS21は、キラヤ・サポナリア・モリナの樹皮に由来する天然のサポニンであり、CD8+細胞毒性T細胞(CTL)、Th1細胞及び支配的IgG2a抗体応答を誘導し、本発明での使用に適したサポニンである。ISCでの使用に適した他のサポニンとしては、例えば、Quil AのQH-A、QH-B及びQH-C分離物、並びにキラヤ・サポナリア以外の種から誘導されるサポニン(例えば、オタネニンジン属(Panax)(チョウセンニンジン)、レンゲソウ属(Astragalus)、イノコズチ属(Achyranthes)、ダイズ、アカシア属(Acacia)、及びツルニンジン属(Codonopsis)由来のサポニン)が挙げられる。いくつかの実施形態において、サポニンはキラヤ・サポナリア以外の種から単離される。

20

【0038】

[0043]本発明の免疫原性及びワクチン組成物で使用するリン脂質としては、例えば、ジアシルグリセリド構造及びリンスフィンゴ脂質を有する分子が挙げられる。ジアシルグリセリド構造を有するリン脂質としては、例えば、ホスファチジン酸(ホスファチデート)(PA)、ホスファチジルエタノールアミン(セファリン)(PE)、ホスファチジルコリン(レシチン)(PC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、又はホスファチジルセリン(PS)が挙げられる。ジアシルグリセリド構造を有するリン脂質の別の例としては、例えばホスホイノシチドが挙げられる。ホスホイノシチドとしては、例えば、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルイノシトールリン酸(PIP)、ホスファチジルイノシトールニリン酸(PIP2)、又はホスファチジルイノシトール三リン酸(PIP3)が挙げられる。リンスフィンゴ脂質としては、例えば、セラミドホスホリルコリン、(スフィンゴミエリン)(SPH)、セラミドホスホリルエタノールアミン(スフィンゴミエリン)(Cer-PE)、又はセラミドホスホリルグリセロールが挙げられる。

30

40

【0039】

[0044]本発明の免疫原性組成物及びワクチン組成物で使用されるステロイド分子としては、その構造の一部としてステロイドを組み込んだ分子が挙げられる。ステロイド分子としては、例えば、コレステロール、プレグネノロン、17-ヒドロキシプレグネノロン、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステジオール、プロゲステロン、17-ヒドロキシプロゲステロン、アンドロステジオン、テストステロン、ジヒドロテストステロン、デオキシコルチコステロン、11-デオキシコルチコステロン、コルチゾル

50

、コルチコステロン、アルドステロン、エストロン、エストラジオール、エストリオールが挙げられる。

【0040】

[0045]いくつかの実施形態において、免疫刺激複合体は、通常、例えば、直径が30～40nmの小カゴ様構造である。いくつかの実施形態において、免疫刺激複合体の製剤は、Quil A、コレステロール、ホスファチジルコリン及びG糖タンパク質のモル比が5：1：1の比率である。免疫刺激複合体は、例えば、5～10重量%のQuil Aと、1～5%のコレステロール及びリン脂質と、G糖タンパク質を含む残部と、を含有し得る。G糖タンパク質は、免疫刺激複合体に直接的に結合して、又は免疫刺激複合体に組み込まれた担体タンパク質（例えば、キメラ又は融合タンパク質）と共役して、免疫刺激複合体に組み込まれ得る。免疫刺激複合体への言及は、その誘導体、化学的等価体及び類似体に対する言及を含むものとして理解されるべきである。例えば、免疫刺激複合体の誘導体への言及は、Quil A、コレステロール、ホスファチジルコリン又はタンパク質のうち少なくとも1つが、例えば、欠失している、置換されている、又はQuil A、コレステロール、ホスファチジルコリン若しくはタンパク質に加えて他の成分が複合体に付加されている免疫刺激複合体への言及を含む。免疫刺激複合体の機能的等価体は、その4つの構成成分のうち少なくとも1つが機能的等価体と交換されている免疫刺激複合体であり得る。本発明のいくつかの実施形態において、免疫刺激複合体のG糖タンパク質部分は欠失している。この種の免疫刺激複合体は、本明細書においてタンパク質非含有免疫刺激複合体と称される。

10

20

【0041】

[0046]いくつかの実施形態において、本発明は、例えば、*in vitro*でHeV及び/又はNiVの複数の株に対する交差反応性中和抗血清の産生を誘導し得る単離されたHeV又はNiV Gタンパク質と、Quil A、DPPC及びコレステロールを含むアジュバントと、を含む免疫原性組成物であって、例えば、5、50又は100µgの可溶性HeV又はNiV Gタンパク質と、適当な量のQuil A、DPPC及びコレステロールと、を含む組成物である。免疫刺激複合体及びその調製方法のさらなる例示的实施形態は、欧州特許第0242380号明細書、欧州特許第0180564号明細書、及び国際公開第2000/041720号パンフレット（例えば、Cox & Coulter (1992) *Advances in Adjuvant Technology and Application in Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology*, Chapter 4, Yong (ed.), CRC Press; Dalsgard (1974), *Gesamte Virusforsch*, 44, 243-254を言及している第3～9頁を参照のこと）；オーストラリア特許第558258号明細書、同第589915号明細書、同第590904号明細書及び同第632067号明細書に記載されている。また米国特許第6,506,386号明細書及びその参照文献に記載されているように、免疫刺激複合体が形成されるときにタンパク質抗原が包含される免疫複合体が使用できること（欧州特許第0109942号明細書参照）、又は予め形成された免疫刺激複合体を別個の追加部分である抗原と混合してワクチンが形成されること（欧州特許第0436620号明細書を参照）は周知である。一般に認識されているように、タンパク質抗原は免疫刺激複合体にも共有結合し得る（欧州特許第0180564号明細書を再度参照のこと）。また、当技術分野でよく認識されているように、免疫刺激複合体は粘膜接種により投与することができ（Mowat (1991), *Immunology*, 72, 317-322を参照のこと）、本発明の免疫刺激複合体は、膜標的タンパク質の包含により粘膜接種をさらに向上させ得る（国際公開第97/30728号パンフレット）。

30

40

【0042】

[0047]いくつかの実施形態において、本発明は、例えば、*in vitro*でHeV及び/又はNiVの複数の株に対する交差反応性中和抗血清の産生を誘導し得る単離されたHeV又はNiV Gタンパク質と、Quil A、DPPC及びコレステロールを含む

50

アジュバントと、を含む免疫原性組成物を包含し、例えば、組成物は、5、50又は100 μg の可溶性HeV又はNiV Gタンパク質と、適当な量のQuil A、DPPC及びコレステロールと、を含有する。免疫刺激複合体のさらなる例示的实施形態は国際公開第2000/041720号パンフレットに記載されている。

【0043】

[0048]本発明の別の実施形態において、ワクチン及び免疫原性組成物は医薬組成物の一部であってもよい。本発明の医薬組成物は、活性化合物を作用部位に送達させるために薬学的に使用し得る調製物への加工を容易にする賦形剤及び助剤を含む、適切な薬学的に許容可能な担体を含み得る。

【0044】

C. 賦形剤：

[0049]本発明の免疫原性及びワクチン組成物は、さらに、薬学的に許容可能な担体、賦形剤及び/又は安定化剤(例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2005)、Lippincott Williams)を凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で含み得る。許容可能な担体、賦形剤又は安定化剤は、特定の投与量及び濃度でレシipientに非毒性のものである。例えば、緩衝剤(例えば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸)；酸化防止剤(例えば、アスコルビン酸、及びメチオニン)；保存剤(例えば、[(*o*-カルボキシフェニル)チオ]エチル水銀ナトリウム塩(チメロサル)、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール、アルキルパラベン(例えば、メチル又はプロピルパラベン)、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及び*m*-クレゾール)；タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン)；親水性ポリマー(例えばポリビニルピロリドン)；アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン)；単糖類、二糖類、及び他の炭水化物(例えば、グルコース、マンノース、又はデキストラン)；キレート剤(例えばEDTA)；糖類(例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトール)；塩形成対イオン(例えばナトリウム)；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)；及び/又は非イオン界面活性剤(例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、TWEEN、又はPLURONICS)が挙げられる。

【0045】

[0050]本発明の組成物は、投与量を送達させるために適切な体積の任意の適切な薬学的ビヒクル又は担体に懸濁される用量であり得る。概して、最終体積(担体、アジュバント等を含む。)は通常少なくとも1.0mlである。上限は投与量の実用性によって定まり、概して約0.5ml以下~約2.0mlである。

【0046】

使用方法：

[0051]本発明は、ヘンドラ及び/又はニパウイルス感染を予防及び/又は治療する方法であって、本発明の免疫原性及びワクチン組成物を任意の哺乳類対象に投与するステップを含む方法を包含する。HeV及び/又はNiV G糖タンパク質と本明細書に記載のアジュバントとをワクチン接種することにより誘発される活性な免疫により、細胞性又は液性免疫応答をプライム又はブーストすることができる。有効量のHeV及び/又はNiV G糖タンパク質又はその抗原性断片をアジュバントと混合して調製し、ワクチンを調製することができる。

【0047】

[0052]本発明は、ヒト対象におけるヘンドラ及び/又はニパウイルス感染を予防及び/又は治療する方法であって、可溶性HeV及び/又はNiV G糖タンパク質を含む免疫原性及び/又はワクチン組成物又はその組み合わせを、単独で又はヒトでの使用に適した少なくとも1つのアジュバントと組み合わせて投与するステップを含む方法を包含する。ヒトでの使用に適したアジュバントは、単独で用いても組み合わせで用いてもよい。ヒト

10

20

30

40

50

での使用に適したアジュバントとしては、例えばアルミニウム塩が挙げられる。アルミニウム塩としては、例えば、水酸化アルミニウム、水酸化アルミニウムゲル（アルハイドロゲル（Al hydro gel）（商標））、リン酸アルミニウム、ミョウバン（硫酸アルミニウムカリウム）、又は混合アルミニウム塩が挙げられる。ヒトでの使用に適したさらなるアジュバントとしては、例えば、油中水型エマルジョン、水中油型エマルジョン、及びAS04（水酸化アルミニウムとモノホスホリル脂質Aとの組み合わせ）、及びCpGオリゴデオキシヌクレオチドが挙げられる。CpGオリゴデオキシヌクレオチドは、メチル化されていないCpGジヌクレオチドを特定の配列構成（CpGモチーフ）に含有する合成オリゴヌクレオチドである。これらのCpGモチーフは、細菌DNAにおいて、哺乳類DNAと比較して20倍高い頻度で存在する。CpGオリゴデオキシヌクレオチドはToll様受容体9（TLR9）によって認識され、強力な免疫刺激作用をもたらす。

10

【0048】

[0053] HeV及び/又はNiV G糖タンパク質と本明細書に記載の少なくとも1種のアジュバントを含むワクチン及び免疫原性組成物の投与は予防用又は治療用のいずれでもあり得る。本発明の一態様において、組成物は予防用として有用である。予防用として提供される場合、ワクチン組成物は、HeV及び/又はNiV感染の何らかの検出又は徴候がある前に提供される。有効量の化合物の予防的投与は、HeV及び/又はNiV感染を防止すること又は後のHeV及び/又はNiV感染を減弱することに資する。

【0049】

[0054] 治療用として提供される場合、ワクチンが、実際の感染の徴候の検出に応じた有効量で提供される。組成物は、その組成物の投与がレシピエントに忍容し得るものである場合、「薬理的に許容可能」といえる。そのような組成物は、投与される量が生理学的に有意義である場合、「治療的又は予防的に有効な量」で投与されるといえる。本発明のワクチン又は免疫原性組成物は、その存在により、レシピエント患者に検出可能な生理学的変化、例えば、HeV及び/又はNiVの少なくとも1種の株に対する広範な反応性を有する液性又は細胞性免疫の強化がもたらされる場合、生理学的に有意義である。提供される防御は完全である必要はなく（つまり、HeV又はNiV感染が完全に防止又は根絶される必要はなく）、コントロール集団と比較して有意な改善があればよい。防御は、疾患の徴候の重症性又は発症の急速性を緩和することに限定される場合がある。

20

【0050】

[0055] 本発明のワクチン又は免疫原性組成物は、HeV及び/又はNiVの複数の株に対して耐性を付与し得る。本明細書において、ワクチンは、対象に投与されたときに、感染の症候若しくは状態を全体的若しくは部分的に減弱する（すなわち抑制する）又は個体を感染に対して全体的若しくは部分的に免疫化することに至る場合、感染を防御又は減弱するといえる。

30

【0051】

[0056] 本発明のワクチン又は免疫原性組成物の少なくとも1つは、本明細書に記載の薬学的組成物を使用して、意図した目的を達成する任意の手段により投与することができる。例えば、そのような組成物の投与は、様々な非経口経路、例えば、皮下、静脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、経皮、又はバツカル経路によるものであり得る。本発明の一実施形態において、組成物は皮下投与される。非経口投与はボラス注射によるものであってもよく、又は長時間の段階的還流によるものであってもよい。

40

【0052】

[0057] 能動的な特異的細胞免疫療法による細胞性免疫応答によって軽減され得る疾患又は状態の予防、抑制又は治療のための典型的なレジメンは、上記ワクチン組成物の有効量を投与することを含む。投与は、単回処置として行われるか、あるいは最長1週間～約24カ月の期間にわたって増強又は追加免疫用量の反復投与で行われる。例えば、第1回目の投与（0日目）から少なくとも約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23又は24日後に第2回目の投与が行われる。免疫原性又はワクチン組成物の用量は、0日目の初回用量に対して少なくともよく、同じであっ

50

てもよく、又は多くてもよい。

【0053】

[0058]本発明によれば、ワクチン又は免疫原性組成物の「有効量」は、所望の生物学的効果（本件ではHeV及び/又はNiVの少なくとも1種の株に対する細胞性又は液性免疫応答の少なくとも1つ）を達成するのに有効な量である。有効投与量は、対象の年齢、性別、健康及び体重、（もしあれば）併用する処置の種類、処置の頻度、所望の薬学的効果の性質に依存することが理解される。下記で提供される有効用量の範囲は、本発明を制限することを意図するものではなく、本発明の組成物を投与するために好適であり得る用量の範囲の例を表すものである。しかしながら、投与量は、当業者が過度の実験を行うことなく理解・決定し得るように個々の対象に応じて調整することができる。

10

【0054】

[0059]本発明のワクチン及び免疫原性組成物のレシピエントは、HeV及び/又はNiVに対する細胞性又は液性免疫応答を介して特別な免疫を獲得し得る任意の対象であり得、ここで、細胞性応答はMHCクラスI又はクラスIIタンパク質によって媒介されるものである。哺乳類のうち、レシピエントは霊長目の哺乳類（例えば、ヒト、チンパンジー、類人猿、及びサル）であり得る。本発明の一実施形態において、本発明のワクチン又は免疫原性組成物を用いてヒトを処置する方法が提供される。対象は、HeV及び/又はNiVに感染していてもよく、また、試験研究においてHeV又はNiV感染のモデルとなり得る。いくつかの実施形態において、対象は飼いならされた哺乳類であり、例えば、ウマ、雌ウシ、雄ウシ、スイギュウ、ヒツジ、ブタ（Mingyi（2010）、*Vet. Res.*、41、33）、ヤギ、イヌ（*Biosecurity Alert - Hendra Virus Update*、27 July 2011、*Press Release*、*Biosecurity Queensland*）又はネコを含む。いくつかの実施形態において、対象はニワトリを含む家禽類である。

20

【0055】

[0060]本発明のワクチンは、ヘンドラウイルス感染に対する防御に使用される用量でニパウイルス感染に対する交差防御も示し、それ故、ニパウイルスに対しても有効なワクチン接種を提供する。

【0056】

[0061]有効な免疫応答への言及は、有効な予防又は治療効果を直接的又は間接的にもたらず免疫反応に言及するものとして理解されるべきである。免疫原が、本明細書に記載のHeV又はNiV G糖タンパク質を含む場合、そのような応答としては、ウイルス複製及び/又はウイルス排出の減少又は遮断、及び/又は動物の疾患徴候の減少が挙げられる。有効性は機能に関わる尺度であって、循環抗体の存在だけでは、該循環抗体がウイルス複製及び排出を遮断できることを必ずしも示さないことから、有効性は抗HeV及び/又は抗NiV抗体力価に言及するだけでは規定されないことが理解されるべきである。

30

【0057】

[0062]また、例えば、本発明の可溶性Gタンパク質ポリペプチドがヘンドラ又はニパによる感染又は感染の疑いのある対象の免疫応答を増大させるために投与される場合、及び/又は本発明の抗体が受動免疫療法の一形態として投与される場合、組成物は、例えば、他の治療剤（例えば抗ウイルス剤）をさらに含むことができる。

40

【0058】

[0063]後述の実施例4では、ワクチン接種を受けるウマで使用するために好適な一定の組成物の情報を提供する。ヘンドラウイルスに感染する可能性があり、それゆえ、ヘンドラ及びニパウイルスの両方の感染から動物及びヒトを防御するワクチン接種を忍容する他の動物に関しては概して以下の情報を適用することができ、また、そのような情報は当業者によって容易に適合させ得る。概して、伴侶動物（イヌ及びネコ）は、およそ25マイクログラムのヘンドラ抗原を忍容し、25～150マイクログラムのISCアジュバントと、5：1：1の比率のサポニン、リン脂質及びステロールとを併用する組成物が有利であり得、この組成物は好ましいISC組成物の1つであるが、本明細書に開示する任意の

50

構成成分が使用される。伴侶動物に対しては、最終用量が約 1 m l であることが好ましい。コポリマー系のアジュバントであるポリゲン (P o l y g e n) (商標) (M V P T e c h n o l o g i e s) も使用することができ、その量は約 5 ~ 1 5 % (v / v) であることが好ましい。

【 0 0 5 9 】

[0064]概して、大型の農業動物 (例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ) に対しては、抗原及びアジュバントの投与量 (及び最終投与体積) は、本明細書でウマに対して提供された以外の量が適用可能であり、すなわち 5 0 ~ 1 0 0 マイクログラムの抗原と、典型的には、約 2 5 0 マイクログラムの I S C を使用することができ、最終体積は、例えば、1 ~ 3 m l である。ブタに関していえば、代替的及び有効なアジュバント製剤としては、(ほぼ同じ量の抗原を含むものに関して) 最終用量 1 ~ 3 m l に I S C とイオン性ポリ多糖との混合物、特に 1 0 0 m g の D E A E デキストランと 8 0 0 マイクログラムの I S C との混合物 (さらに 5 : 1 : 1 の Q u i l A : ホスファチジルコリン : コレステロール (国際公開第 2 0 0 0 / 4 1 7 2 0 号パンフレットを参照)) が挙げられる。

10

【 0 0 6 0 】

ワクチン接種動物の識別 :

[0065]本発明は、健康なワクチン接種動物と、H e V 及び / 又は N i V に曝露された又は感染している動物と、を識別する方法を包含する。ウイルス感染の間に、H e V 及び N i V は、G 糖タンパク質 (G) 以外のさらなるタンパク質、例えば、融合タンパク質 (F) 、マトリックスタンパク質 (M) 、リントタンパク質 (P) 、巨大タンパク質 (L) 及びヌクレオカプシドタンパク質 (N) を発現する。これらのさらなるタンパク質は、これらのタンパク質に結合する抗体又は T 細胞免疫の形態で動物において免疫反応を誘発する可能性がある。これらの他のタンパク質に対する抗体反応のレベルは、通常、酵素結合免疫アッセイ (E I A) 等のアッセイ法により測定し得る。本発明の免疫原性及びワクチン製剤は、いくつかの実施形態において、H e V 及び / 又は N i V 抗原として G 糖タンパク質のみを含有し、したがって、H e V 及び / 又は N i V の G 糖タンパク質のみに対する抗体により免疫反応を誘発する。本明細書に記載の免疫原性組成物をワクチン接種された動物がその後 H e V 又は N i V に感染した場合、G 糖タンパク質に対する追加免疫応答が起こるが、G 糖タンパク質以外のいくつかの H e V 及び N i V タンパク質に対する抗体の存在にも変化が示されるであろう。したがって、融合タンパク質 (F) 、マトリックスタンパク質 (M) 、リントタンパク質 (P) 、巨大タンパク質 (L) 及びヌクレオカプシドタンパク質 (N) のいずれかに対する抗体の存在は、E I A により血清試料中のこれらのタンパク質に特異的な抗体の存在又は不在を決定して測定することができる。これらの他のタンパク質 (すなわち、G 糖タンパク質以外のタンパク質) のいずれかに対する抗体が検出される場合、該動物は H e V 及び / 又は N i V に曝露された動物である。あるいは、これらの他のタンパク質に対する抗体が検出されず、G タンパク質に結合する抗体のみが検出される場合には、該動物はワクチン接種を受けたにすぎない動物である。

20

30

【 0 0 6 1 】

[0066]本発明の E I A は、H e V 及び / 又は N i V に感染した動物と、本明細書に記載の免疫原性組成物を接種した健康な動物と、を検出及び識別することにおいて、特異性が高く、選択性も高い。本発明は、均一及び不均一な環境のいずれにおいても、E L I S A を含む多種類の分析手法を利用することができる。分析手法は、血液、血清、乳、他の抗体含有体液等の試料に対して行い得る。

40

【 0 0 6 2 】

[0067]いくつかの実施形態において、E I A で使用する抗体は、G 糖タンパク質を用いたワクチン接種で誘導された抗体と唯一競合し、H e V 及び / 又は N i V に感染した動物において誘導された抗体とは競合しない。これにより、H e V 及び N i V 感染の血清学的診断が可能になるだけでなく、1 回の分析でワクチン接種と感染とを識別することが可能になる。E I A 手法は、標準的な血液血清試料又は抗体を含む任意の体液若しくは分泌物に対して実施し得る。E I A 手法では、G 糖タンパク質と、任意の他の H e V 及び / 又は

50

N i V ウイルスタンパク質（例えば、融合タンパク質（F）、マトリックスタンパク質（M）、リタンパク質（P）、巨大タンパク質（L）及びヌクレオカプシドタンパク質（N）が挙げられ、そのようなタンパク質は、HeV及び/又はNiVに曝露されていないワクチン接種健康動物には存在しない）とに対するモノクローナル及び/又はポリクローナル抗体のいずれかを利用し得る。EIAは、任意の数の商業的に利用可能な、固定若しくは携帯式の手動型、半自動化型、ロボット工学的自動化型のELISA機器で、コンピュータ支援データ分析軽減ソフトウェア及びハードウェアを用いて又は用いずに、実施し得る。いくつかの実施形態において、健康なワクチン接種動物と、HeV及び/又はNiVに曝露された又は感染した動物と、を識別する方法を、家畜化された哺乳動物（例えば、ウマ、雌ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ又はネコ）から単離した生物学的試料に対して行い得る。いくつかの実施形態において、対象はニワトリを含む家禽類である。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。

10

【実施例】

【0063】

[0068] 以下の実施例はもっぱら説明のためのものであり、また、本発明のすべての実施形態を説明するものではなく、それ故、本発明の範囲を限定するものと見られるべきではない。

【0064】

実施例1（ベクター構築物）：

[0069] ベクターは、膜貫通/細胞質テール欠失HeV G又はNiV Gを発現するように構築した。完全長HeV又はNiV Gタンパク質のクローンcDNAをPCRにより増幅して、膜貫通ドメイン/細胞質テール欠失HeV又はNiV Gタンパク質をコードする約2600のヌクレオチド断片を生成させた。

20

【0065】

[0070] 下記オリゴヌクレオチドプライマーをHeV Gの増幅のために合成した。

sHGS : 5' - GTCGACCCACCATGC AAAATTACACCCAGAA
CGACTGATAAT - 3' (配列番号5)

sHGAS : 5' - GTTTAAACGTCGACCAATCAACTCTCTG
AACATTTGGGCAGGTATC - 3' (配列番号6)

【0066】

[0071] 下記オリゴヌクレオチドプライマーをNiV Gの増幅のために合成した。

sNGS : 5' - CTCGAGCACCATGC AAAATTACACAAGAT
CAACAGACA A - 3' (配列番号7)

sNGAS : 5' - CTCGAGTAGCAGCCGGATCAAGCTTATG
TACATTTGCTCTGGTATC - 3' (配列番号8)

30

【0067】

すべてのPCR反応は、Accupol DNAポリメラーゼ (PGS Scientifics Corp) を用い、次のように設定して行った。初回94 x 5分、次いで、94 x 1分、56 x 2分、72 x 4分を25サイクル。これらのプライマーにより、Sal1部位に隣接されたsHeV G ORF及びXho1部位に隣接されたsNiV G ORFのためのPCR産物を生成した。PCR産物をゲル精製した (Qiagen)。ゲル精製後、sHeV G及びsNiV Gを、TOPOベクター (Invitrogen) にサブクローニングした。

40

【0068】

[0072] P S e c t a g 2 B (I n v i t r o g e n) を購入し、S - ペプチドタグ又はmyc - エピトープタグを含むように改変した。S - ペプチド並びに消化Kpn1及びEcoR1オーバーハングのための配列をコードする、オーバーラップしたオリゴヌクレオチドを合成した。

SPEPS : 5' - CAAGGAGACCGCTGCTGCTAAGTTTCGAA
CGCCAGCACATGGATTCT - 3' (配列番号9)

50

S P E P A S : 5 ' A A T T A G A A T C C A T G T G C T G G C G T T C G A A
C T T A G C A G C A G C G G T C T C C T T G G T A C - 3 ' (配 列 番 号 1 0)

【 0 0 6 9 】

[0073] myc - エピトープタグ並びに消化 Kpn1 及び EcoR1 オーバーハングのための配列をコードする、オーバーラップしたオリゴヌクレオチドを合成した。

M T S : 5 ' - C G A A C A A A A G C T C A T C T C A G A A G A G G A T C T
G - 3 ' (配 列 番 号 1 1)

M T A S : 5 ' - A A T T C A G A T C C T C T T C T G A G A T G A G C T T T
T G T T C G G T A C - 3 ' (配 列 番 号 1 2)

【 0 0 7 0 】

[0074] 64 pmol の S P E P S と 64 pmol の S P E P A S とを混合し、65 へ
5 分間加熱し、次いでゆっくりと 50 へ冷却した。64 pmol の M T S と 64 pmol
の M T A S とを混合し、65 へ 5 分間加熱し、次いでゆっくりと 50 へ冷却した。
2 つの混合物を希釈し、Kpn1 - EcoR1 消化 p S e c T a g 2 B へクローニングし
、S - ペプチド修飾 p S e c T a g 2 B 又は myc - エピトープ修飾 p S e c T a g 2 B
を生成した。すべての構築物は、最初に制限酵素により消化してスクリーニングを行い、
さらに配列決定によって確認した。

【 0 0 7 1 】

[0075] T O P O s G 構築物を Sal1 ゲル精製 (Q i a g e n) で消化し、S - ペプチ
ド修飾 p S e c T a g 2 B 又は myc - エピトープ修飾 p S e c T a g 2 B の X h o 1 部
位にインフレームでサブクローニングした。すべての構築物は、最初に制限酵素により消
化してスクリーニングを行い、さらに配列決定によって確認した。

【 0 0 7 2 】

[0076] I g リーダー S - ペプチド - s H e V G (s G _s - t a g) 及び I g リーダ
ー - myc タグ - s H e V G (s G _{myc} - t a g) 構築物を、次いでワクシニアシャトル
ベクター p M C O 2 にサブクローニングした。オリゴヌクレオチド S E Q S : 5 ' -
T C G A C C C A C C A T G G A G A C A G A C A C A C T C C T G C T A - 3 ' (配 列
番 号 1 3) を合成し、オリゴヌクレオチド s H G A S と併用して、PCR によって s G _s
- t a g 及び s G _{myc} - t a g を増幅した。すべての PCR 反応は、Accupol
DNA ポリメラーゼ (P G S S c i e n t i f i c s C o r p .) を使い、次の条件
で行った。初回 94 x 5 分、次いで、94 x 1 分、56 x 2 分、72 x 4 分を 2
5 サイクル。これらのプライマーにより、Sal1 部位が隣接する PCR 産物を生成した
。PCR 産物をゲル精製した (Q i a g e n) 。ゲル精製後、s G _s - t a g 及び s G _m
y c - t a g を T O P O ベクター (I n v i t r o g e n) にサブクローニングした。s
G _s - t a g 及び s G _{myc} - t a g を Sal1 で消化し、p M C O 2 の Sal1 部位に
サブクローニングした。すべての構築物は、最初に制限酵素により消化してスクリーニ
ングを行い、さらに配列決定によって確認した。続いて、真核細胞株での産生を容易にする
ために、コドン最適化ヌクレオチド配列 (配 列 番 号 1 6) を生成した。

【 0 0 7 3 】

実施例 2 (ワクシニアを使用した可溶性 G タンパク質のタンパク質産生) :

[0077] タンパク質産生のために、コドン最適化配列を含有する遺伝子構築物を使用して
、組換え pox ウイルスベクターを生成した (ワクシニアウイルス、WR 株) 。次いで、
tk 選択及び G U S 染色を利用した標準的な技術を用いて組換え pox ウイルスを得た。
簡単に言うと、CV - 1 細胞に、カルシウムリン酸トランスフェクションキット (P r o
m e g a) を用いて、p M C O 2 s H e V G 融合体又は p M C O 2 s N i V G 融
合体のいずれかを遺伝子導入した。次いで、これらの単層にワクシニアウイルスの W e s
t e r n R e s e r v e (W R) 野生株を多重感染度 (M O I) 0 . 0 5 P F U / 細胞
で感染させた。2 日後、細胞ペレットを未精製の組換えウイルスのストックとして回収し
た。TK 細胞に、25 µ g / m l の 5 - プロモ - 2 ' - デオキシウリジン (B r d U) (C a l
b i o c h e m) の存在下、未精製の組換え体ストックを感染させた。2 時間後、

10

20

30

40

50

ウイルスを、1%低融点(LMP)アガロース(Life Technologies)及び25 µg/mlのBrdUを含有するEMEM-10オーバーレイを用いて置き換えた。インキュベーションの2日後、1%のLMPアガロース、25 µg/mlのBrdU、及び0.2 mg/mlの5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロン酸(X-GLUC)(Clontech)を含有するEMEM-10オーバーレイを追加的に加えた。24~48時間後、青色のプラークを確認し、これを採集し、二重選択プラーク精製にさらに2回かけた。次いで、組換えワクシニアウイルスvKB16(sHeV G融合体)及びvKB22(sNiV G融合体)の増幅を行い、標準的方法で精製した。簡単に言うと、組換えワクシニアウイルスを、プラーク精製、細胞培養増殖、超遠心分離でのショ糖クッションペレット化、及びプラークアッセイによる滴定によって精製する。sHeV Gの発現を細胞溶解物及び培養上清で確認した。

10

【0074】

実施例3(293F細胞を使用した可溶性Gタンパク質のタンパク質産生):

[0078]コドン最適化配列を含有する遺伝子構築物を使用して、293F細胞(Invitrogen)を形質転換し、HeV可溶性G糖タンパク質を発現する安定な細胞株を作製した。CHO-S細胞(Invitrogen)を使用して、形質転換及びHeV可溶性G糖タンパク質の発現を行ってもよい。形質転換された細胞を、162 cm²組織培養フラスコに、35 mlのDMEM-10と共に、播種する。細胞を接着させ、37、5~8%CO₂下で数日間増殖させた。細胞がコンフルエントになったとき、150 µg/mlのHygromycin Bを含むDMEM-10を入れた複数のフラスコ(フラスコ当たり30 ml)に分割した。細胞が70~80%コンフルエントになったとき、30 mlのPBSで2回洗浄し、次いで、20 mlの293 SFM I I(Invitrogen)を加え、細胞を37、5~8%CO₂下で一晩インキュベートした。翌日、細胞を、200 mlのSFM I I培地を入れた三角フラスコに移した。細胞を37、5~8%CO₂下、125 rpmで5~6日間、細胞が死滅し始めるまで増殖させた。その際、上清を回収する。

20

【0075】

[0079]各三角フラスコの培地を3500 rpmで30分間遠心する。次いで、上清を250 mlの遠心ボトルに移し、10000 rpmで1時間回転させた。得られた上清を回収し、製造業者の推奨に従って、プロテアーゼ阻害剤をTriton X-100と共に加え、最終濃度を0.1%にする。次いで、上清の可溶性Gタンパク質を0.2 µmの低タンパク質結合濾過膜で濾過する。

30

【0076】

[0080]HeVsGを、S-タンパク質アガロースアフィニティーカラムを用いて精製する。総体積が20 mlのS-タンパク質アガロース(Novagen)を、XK26カラム(GE Healthcare)に充填する。カラムを、総体積の10倍の結合/洗浄緩衝液(0.15 MのNaCl、20 mMのTris-HCl、pH 7.5、及び0.1%のTriton X-100)で洗浄する。調製されたHeVsG上清をカラムにかけ、流速3 ml/分を維持する。カラムを総体積の10倍(200 ml)の結合/洗浄緩衝液Iで洗浄し、続けて、総体積の6倍(120 ml)の洗浄緩衝液1×洗浄緩衝液(0.15 MのNaCl、及び20 mMのTris-HCl、pH 7.5)で洗浄する。

40

【0077】

[0081]次いで、ポンプを止め、洗浄緩衝液を排出させ、ビーズの表面に達したら、30 mlの溶出緩衝液(0.2 Mクエン酸、pH 2)を添加する。流出分の最初の10 ml(未だ洗浄緩衝液であるはずである)を回収し、次いで、溶出緩衝液を、ビーズを用いて10分間インキュベートする。次いで、15 mlの溶離液を、25 mlの中和緩衝液(1 M Tris、pH 8)を含む50 mlの滅菌円錐遠心管に回収する。pHを中性に調節し、溶離及びインキュベーションを3回繰り返す。中和した溶離液をすべて組み合わせ、約4 mlに濃縮する。回収したHeVsG(4 ml)を、0.2 µmの低タンパク質結合濾過膜(0.2 µmのHT Tuffryn Membraneを備えるAcrodiss

50

c 13 mm Syringe Filter)に通して精製する。

【0078】

[0082]ゲル濾過を利用してHeV s Gをさらに精製することができる。品質管理分析と、純度及びオリゴマー状態の確認後、一定分量のHeV s Gを四量体 + 二量体、二量体、及び単量体の画分で溜め、-80 で保存する。

【0079】

実施例4(ワクチン製剤の調製)：

[0083]ISCの調製の概略を図3に示し、以下でさらに説明する。

【0080】

[0084]ステップ1：

90 g/Lのデカノイル-n-メチルグルカミド(Mega10洗剤)溶液を、注射用水(WFI)で調製する。溶液を加熱して、Mega10を確実にすべて溶解させた後、すぐにステップ2で使用するか、又は滅菌濾過する。

10

【0081】

[0085]ステップ2：

25 g/Lのコレステロール及び25 g/Lのジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)を含む溶液を、これらの成分をMega10洗剤の保存溶液に溶解することによって調製する。溶液を加熱して、すべての成分を確実に溶解させた後、すぐにステップ3で使用するか、又は滅菌濾過する。

20

【0082】

[0086]ステップ3：

等張緩衝生理食塩水(10 mMのリン酸緩衝液、pH 6.2 ± 1)(BIS)をWFIで調製し、すぐに使用しない場合には滅菌濾過する。

【0083】

[0087]ステップ4：

Quil AをBIS中で最終濃度100 g/Lに調製し、すぐに使用しない場合には滅菌濾過する。

【0084】

[0088]ステップ5：

ISCを、攪拌された温度調節容器(22 ~ 37)に、予熱したBIS、コレステロール/DPPCのMega10溶液(160 ml/L)、及びQuil A溶液(200 ml/L)を順次追加することによって製剤化する。反応物にBISを加えることによって目的の体積とする。

30

【0085】

[0089]ステップ6：

製剤全体を、必要とされる温度(目標温度：27 ;許容可能な操作温度範囲：22 ~ 37)に平衡化し、次いで攪拌しながら15分間インキュベートして、ISC製剤の反応性を高める。ISC溶液をステップ7でさらに処理するか、又は中間貯蔵のために滅菌濾過する。

40

【0086】

[0090]ステップ7：

複合体化していない成分を除去するために、ISC反応混合物を、温度制御(目標温度：27 ;許容可能な操作温度範囲：21 ~ 37)下で透析(膜：ハイドロザルト(Hydrosart)30 kDa(Sartorius AG Goettingen))により洗浄して、BISに対し少なくとも20回の体積交換を行う。

【0087】

[0091]ステップ8：

透析されたISCを、透析に使用した膜と同じ膜を使用する限外濾過によっておよそ2倍に濃縮する。濾過系をBISで濯いでISCを元の体積に戻す。

【0088】

50

[0092]ステップ9：

I S Cを、0.22 μmの酢酸セルロースフィルターに通す滅菌濾過を行って滅菌保存容器に移す。

【0089】

[0093]ステップ10：

I S Cアジュバントを、ワクチン製剤で使用するために放出するまで2～8 で保存する。

【0090】

[0094]免疫刺激組成物(250 μg/ml)を、次いで、適切な量の可溶性HeV G糖タンパク質(例えば、5、50、100 μg/ml)と組み合わせ、BISで体積を調製する。

10

【0091】

実施例5(ウマでの第1臨床実験)：

[0095]試験ワクチン1：

250 μgの免疫刺激複合体でアジュバントされた100 μg/用量の組換えヘンドラウイルス可溶性糖タンパク質(sG)。体積を生理食塩水で1ml/用量に調整。

【0092】

[0096]試験ワクチン2：

250 μgの免疫刺激複合体でアジュバントされた50 μg/用量の組換えヘンドラウイルス可溶性糖タンパク質(sG)。体積を生理食塩水で1ml/用量に調整。

20

【0093】

[0097]試験ワクチン3：

250 μgの免疫刺激複合体でアジュバントされた5 μg/用量の組換えヘンドラウイルス可溶性糖タンパク質(sG)。体積を生理食塩水で1ml/用量に調整。

【0094】

[0098]ウマ由来の血清学的及びチャレンジ防御データを2ロットのウマから回収し、高レベルの抗原を含有するワクチン(50 μg/用量及び100 μg/用量)を得た。

【0095】

[0099]血清学的検査：

2頭のウマを各々、21日間の間隔を空けて2回のワクチン投与(100 μgのsGとI S Cを併用)により免疫化した。プライミング後及びチャレンジ前の血清学的検査により、HeVに対するワクチン誘導の血清転換が確認された(表1)。チャレンジ前のウイルス中和抗体レベルは、致死量の近縁のニパウイルスに曝露されたネコで防御効果があることが見出された抗体レベルに匹敵するものであった。アジュバントのみを適用されたウマ(ネガティブコントロール)では、ウイルスチャレンジ前にHeVに対する抗体は生じなかった。

30

【0096】

【表1】

表1

ウマNo.	ベースライン力価	プライム後の力価	チャレンジ前の力価
V1	<2	32	1024
V2	<2	32	512
V3(コントロール)	<2	<2	<2

40

【0097】

[00100]各ウマに、追加免疫を受けさせた後27日間、BSL4封じ込め施設で生HeVに曝露させた。ウイルスを鼻腔内投与(1×10^6 TCID₅₀)及び経口投与(1×10^6 TCID₅₀)した。チャレンジの際及びその後の観察期間にわたって、コントロールウマの識別は作業に参加するスタッフには知らされなかった。

50

【 0 0 9 8 】

[00101] V 1 についての臨床所見：

このウマは、H e V の曝露後の観察期間を通じて臨床的に良好な状態を維持していた。但し、チャレンジ後 8 日目に、頸静脈カテーテルの入口で局所的な感染が示された。これは、何ら疾患を構成することを示すものではなかった。ウイルスチャレンジ後 9 日目に、ウマを選択的に安楽死させた。総体的な死後の検査での異常は、10 cm の腸間膜脂肪腫（偶発的所見）と、バルビツール酸系薬剤に起因する左肺心葉の腹面の先端におけるリンパ管の軽度の拡張に限定されていた。組織の初回スクリーニングにおいて、このウマに、病変又は H e V 抗原の痕跡となるものは見当たらなかった。

【 0 0 9 9 】

[00102] V 2 についての臨床所見：

このウマは、3 日目に一時的な軽度の鼻汁があった後、良好な状態を維持していたが、6 日目に頸静脈カテーテル部位の局所的な炎症反応を伴って体温が上昇した。カテーテルを除去したが、病変は拡大し続け、ウマはかなりの興奮状態になったため、翌日（7 日目）に、その雌ウマを長時間作用型ペニシリンで処置した。8 日目に、体温も気質も通常に戻り、そしてその雌ウマを選択的に安楽死させた。総体的な死後の検査での異常は、バルビツール酸系薬剤に起因する右肺心葉の腹面先端におけるリンパ管の軽度の拡張に限定された。組織の初回スクリーニングにおいて、このウマに病変又は H e V 抗原の痕跡となるものは見当たらなかった。詳細な検査は現在、完了しつつある。

【 0 1 0 0 】

[00103] V 3 についての臨床所見：

このウマは、4 日目に、一時的な軽度の鼻汁があった後、良好な状態を維持していたが、6 日目に局所的な徴候を有しない体温の上昇が現れた。この雌ウマは心拍数も高くなり、また皮膚にわずかなテンティングがあり、これは軽度の脱水症状及び縫上げたような（t u c k e d - u p ）外観に通じるものであった。これらの一群の徴候は、本発明者らの実験条件下での急性 H e V 感染に典型的な徴候であった。雌ウマの体温及び心拍数は、その後も 12 時間にわたって増加し続け（図 1 及び 2）、雌ウマは軽い抑鬱となり、7 日目に人道的基準に基づいて雌ウマを安楽死させた。死後の検査で、肺の心葉におけるリンパ管の中等度の拡大と、胸膜肥厚及び浮腫が付随する 8 ~ 10 cm 腹部の関与があった。

【 0 1 0 1 】

[00104] 組織学的検査において、血管壁のフィブリノイド壊死を伴う肺血管炎、小葉間隔壁の浮腫、及び巣状壊死性肺胞隔炎があった。肺、髄膜、脳柔組織、三叉神経節、顎下、気管支、鼠径部及び腎リンパ節、脾臓、肝臓、心臓、軟口蓋、副腎、腎系球体、小腸及び大腸、卵巣、咽頭及び鼻甲介、並びに脾臓の胚中心、及び時に心筋細胞の血管の内皮及び中膜に H e V 抗原の過剰な抗原の沈着があった。脊髄、喉嚢、膀胱、及び脳の嗅葉は陰性であった。組織学的及び免疫組織学的に最急性 H e V 感染と一致するものであった。

【 0 1 0 2 】

[00105] 臨床試料の分子解析：

臨床観察期間を通じて、免疫化したウマ V 1 及び V 2 から回収した生物学的試料のいずれからも H e V の排出の痕跡は見当たらなかった。具体的には、曝露後のすべての日において、鼻奥の鼻腔スワブ又は血液のいずれからもゲノムは回収されなかった。

【 0 1 0 3 】

[00106] 対照的に、免疫化していないウマ V 3 では、チャレンジ後 3 日目に鼻腔スワブでウイルスゲノムが検出された。連日の試料採取における C t 値の低減は上部気道におけるウイルス複製を示唆しており、H e V に曝露された後の無処置のウマ（R e d l a n d s 2 0 0 8）について本発明者らの実験室で得られた初期の実験結果と一致していた。発熱直前の血液及びその後のすべての分泌物においてウイルスゲノムが見られたことは、他の臨床徴候（例えば抑鬱）についての最初の認識と合致し、先の所見とも一致している。

【 0 1 0 4 】

【表 2】

表2

毎日の試料	試料採取日										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ウマ#V1											
口腔スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
直腸スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
鼻腔スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
尿	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
糞便	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
EDTA血液	U	U	U	U	U	U	U	U	N/A	41.4	
ウマ#V2											
口腔スワブ	U	U	U	U	U	42.0/U	U	U	U		
直腸スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U		
鼻腔スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U		
尿	U	U	U	U	U	U	U	U	U		
糞便	U	U	U	U	U	U	U	U	U		
EDTA血液	U	41.7/U	U	U	U	U	U	N/A	U		
ウマ#V3											
口腔スワブ	U	U	U	U	U	39.9/U	39.9	35.3			
直腸スワブ	U	U	U	U	U	U	U	36.9			
鼻腔スワブ	U	U	40.5	38.9	35.2	34.6	35.2	34.1			
尿	U	U	U	U	U	U	42.2/U	36.2			
糞便	U	U	U	U	U	U	U	41.9/U			
EDTA血液	U	U	U	U	U	40.3	35.1	34.1			

10

20

【0105】

[00107]死後の試料：

TaqMan PCR (HeV N遺伝子)により、V3 (コントロール)において、チャレンジウイルスの複製物が複数の組織に伝播して感染していることが確認された(表3)。最高レベルの複製は、先に報告されているように、肺、脾臓、腎臓、心筋、並びに上部及び下部気道に関わるリンパ組織に現れるようであった。免疫化したウマ(V1及びV2)の組織では、ウイルス複製の痕跡は見られなかった。

【0106】

30

【表 3】

表3

組織タイプ	HeV N遺伝子 TaqManの結果				
	ウマ#V1	ウマ#V2	ウマ#V3		
副腎	U	U	31.2	10	
膀胱	U	U	39.8/U		
脳	U	U	39.6/U		
CSF	U	U	U		
喉嚢	U	U	39.9		
ウマ心臓	U	U	30.8		
ウマ腎臓	U	U	32		
大腸	U	U	30.6		
肝臓	U	U	36.8		
肺	U	U	23.2		
リンパ-気管支	U	U	32.3	20	
リンパ-頭	U	41.2/U	30.7		
リンパ-鼠径	U	U	37		
リンパ-下顎	U	U	34.5		
リンパ-腎臓	U	U	31.1		
髄膜	U	U	34.2		
鼻甲介	U	U	37.5		
神経	U	U	35.9		
嗅脳	U	U	35.9		
卵巣	41.3/U	U	32.4		
咽頭	U	U	35.5	30	
小腸	U	U	33.9		
脊髄	U	U	42		
脾臓	U	U	30.1		
三叉神経節	U	U	36.3		
子宮	U	U	36.9		
U=			陰性		(増幅なし)

【 0 1 0 7 】

【00108】チャレンジ後の血清学的検査：

免疫化したウマV1及びV2では、HeVチャレンジ後、力価の上昇が見られなかった（表4）。このことは、これらの動物でチャレンジウイルスの顕著な複製がなかったことと一致する。チャレンジ後7日目の安楽死の時点で、コントロールウマV3に抗体は検出されなかった。これは、検出可能な抗体の生成に十分な時間がウイルス曝露と動物の死との間に存在しなかったと考えられ、RedlandsのウマのHeVについて本発明者らの実験室で得られた先の所見と一致する。

【 0 1 0 8 】

40

【表4】

表4

ウマNo.	ベースライン 力価	プライム後の 力価	チャレンジ前の 力価	最終力価
V1	<2	32	1024	128, 128 (9日目)
V2	<2	32	512	128, 256 (8日目)
V3(コントロール)	<2	<2	<2	<2, <2 (7日目)

【0109】

10

[00109]プライム - ブーストレジメンで、100 μ g の s G + I S C アジュバントのワクチン接種を行った2頭のウマ (V 1 及び V 2) は、H e V 曝露の前に、H e V に対して血清転換した。I S C のみを適用したウマ (V 3) は、チャレンジウイルスに対して血清陰性のままであった。

【0110】

[00110]致死量の H e V のチャレンジ後、免疫化したウマは観察期間を通じて臨床的に良好な状態を維持し、ウマでのすべての実験的に誘導された H e V 発症までの時間を上回っていた。免疫の血清学的根拠を有しないウマ (V 3) は、急性 H e V と一致する臨床徴候を発症した後、安楽死させた。免疫化したウマでは、チャレンジ後に抗体力価の上昇が見られず、これらの動物においてチャレンジウイルスの複製が検出されなかったことと一致していた。

20

【0111】

[00111]免疫化したウマでは、毎日の臨床試料すべてで P C R 試験陰性の結果が得られたことに反映されるように、ウイルス排出の痕跡は見られなかった。免疫化していないコントロールにおいて、ウイルスゲノムが、ウイルス曝露後3日目に鼻腔スワブから、発熱直前に血液から、及び発熱時にはすべての臨床試料から確認された。この排出パターンは、この施設での従前の試験で H e V に曝露した無処置のウマで見られたものと一致する。

【0112】

[00112]免疫化したウマの死後の検査において、安楽死後、急性感染期間と推定される期間で回収したいずれの組織からも、H e V ウイルス複製の痕跡となるものは見当たらなかった。対照的に、コントロールのウマでは、組織全体に H e V ゲノム及び抗原が急性 H e V 感染と一致するパターンで分布しており、H e V 感染に典型的な脈管障害も同定された。

30

【0113】

実施例6 (ウマでの第2臨床試験) :

[00113]3頭のウマを、それぞれ、21日間の間隔を空けて2回のワクチン投与 (5 0 μ g の s G と I S C を併用) により免疫化した。プライミング後及びチャレンジ前の血清学的検査により、H e V に対するワクチン誘導血清転換が確認された (表 5) 。チャレンジ前のウイルス中和抗体レベルは、致死量の近縁ニパウイルスに曝露されたネコで防御効果があると見出されたレベルに匹敵するものであり、また、本明細書に記載の第1臨床試験で H e V に曝露されたウマでのレベルに匹敵するものであった。アジュバントのみを適用されたウマでは、免疫化したウマのウイルスチャレンジ前に、H e V に対する抗体は生じなかった (データは示していない) 。

40

【0114】

【表5】

表5

ウマNo.	ベースラインカ価	プライム後のカ価	チャレンジ前のカ価
V4	<2	4	256/128
V5	<2	32	2048/>8192
V6	<2	4	512/1024

【0115】

[00114]免疫化した各ウマに、追加免疫を受けさせた後27日間、BSL4封じ込め施設で生HeVに曝露させた。ウイルスを鼻腔内投与(1×10⁶TCID₅₀)及び経口投与(1×10⁶TCID₅₀)した。4匹のモルモットを、これらのうち少なくとも1匹はHeV疾患で死ぬと推定して、この試験での病原性コントロールとして用いた。モルモットに腹腔内経路で50000TCID₅₀HeVを曝露させた。

10

【0116】

[00115]V4についての臨床所見：

このウマは、HeVへの曝露後の観察期間において臨床的に良好な状態を維持しており、体温及び心拍数も正常な範囲に留まっていた。このウマを、ウイルスチャレンジ後8日目に選択的に安楽死させた。死後の検査において全体的に異常は見られなかった。組織の初回スクリーニングにおいて、病変又はHeV抗原の痕跡となるものはこのウマでは見当たらなかった。詳細な検査は現在、完了しつつある。

20

【0117】

[00116]V5についての臨床所見：

このウマは、HeVへの曝露後の観察期間において臨床的に良好な状態を維持しており、体温及び心拍数も正常な範囲内に留まっていた(図2)。このウマを、ウイルスチャレンジ後7日目に選択的に安楽死させた。死後の検査において全体的に異常は見られなかった。組織の初回スクリーニングにおいて、病変又はHeV抗原の痕跡となるものはこのウマでは見当たらなかった。詳細な検査は現在、完了しつつある。

【0118】

[00117]V6についての臨床所見：

このウマは、HeVへの曝露後の観察期間において、臨床的に良好な状態を維持しており、体温及び心拍数も正常な範囲内に留まっていた(図2)。このウマを、ウイルスチャレンジ後9日目に選択的に安楽死させた。死後の検査において全体的に異常は見られなかった。組織の初回スクリーニングにおいて、病変又はHeV抗原の痕跡となるものはこのウマでは見当たらなかった。詳細な検査は現在、完了しつつある。

30

【0119】

[00118]モルモット：

4匹のモルモットのうち1匹(番号3)は、HeVチャレンジ後3日目に体重が減少し始めた。体重の減少は、神経学的徴候(頭部後屈、振戦)が現れた5日目まで続き、その後、モルモットを安楽死させた。死後の検査での異常は後腹膜結合組織での浮腫に限定された。

40

【0120】

[00119]組織学的検査では、HeV抗原に関連して、肺血管炎、腎周囲血管の脈管炎、卵巣炎、及び非化膿性脳炎があった。組織学的及び免疫組織学的に急性HeV感染と一致するものであり、チャレンジウイルスの病原性が確認された。

【0121】

[00120]臨床観察期間を通じて、V4、V5又はV6から回収されたいずれの生物学的試料においてもHeV排出の痕跡は見当たらなかった。但し、3日目にV6由来の直腸スワブにおいて36.2のCt値(HeV N遺伝子)がTaqMan PCRの2つの複製物のウェルの1つで観察された。但し、第2のウェルでは増幅は示されなかった(表6

50

)。具体的には、曝露後のすべての日において、鼻奥の鼻腔スワブ又は血液のいずれからもゲノムは回収されなかった。

【 0 1 2 2 】

【 表 6 】

表6

毎日の試料	HeVN遺伝子 TaqManの結果									
	試料採取日									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ウマ#V4										
口腔スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
直腸スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
鼻腔スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
尿	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
糞便	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
EDTA血液	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
ウマ#V5										
口腔スワブ	U	41.9/U	U	U	U	U	U	U		
直腸スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U		
鼻腔スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U		
尿	U	U	U	U	U	U	U	U		
糞便	U	U	U	U	U	U	U	U		
EDTA血液	U	U	U	U	U	U	U	U		
ウマ#V6										
口腔スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
直腸スワブ	U	U	U	36.2/U	U	U	U	U	U	U
鼻腔スワブ	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
尿	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
糞便	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
EDTA血液	U	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	U
カラーコード:	陰性(増幅なし)									
	不確定(Ct 40-45)									
	陽性(Ct<40)									

10

20

30

【 0 1 2 3 】

【00121】死後の試料：免疫化したウマV4、V5又はV6において、組織にウイルス複製の痕跡は見当たらなかった。1匹のモルモット(番号3)において、チャレンジ後5日目にウイルスゲノムが血液(Ct 34.2)、脳、肺及び脾臓において検出され、この動物が急性HeV感染であることの臨床的、組織的及び免疫組織学的所見が確認された(表7)。

【 0 1 2 4 】

【表 7】

表7

組織タイプ	HeV N遺伝子 TaqManの結果			モルモット#3
	ウマ#V4	ウマ#V5	ウマ#V6	
副腎	U	U	U	
膀胱	U	U	U	
脳	U	U	U	35.6
CSF	U	U	U	
喉嚢	U	U	U	
ウマ心臓	U	U	U	
ウマ腎臓	U	U	U	
大腸	U	U	U	
肝臓	U	41.4/U	U	
肺	U	U	U	33
リンパ-気管支	U	U	U	
リンパ-頭	U	U	U	
リンパ-鼠径	U	U	U	
リンパ-下顎	U	U	U	
リンパ-腎臓	N/A	U	U	
髄膜	U	U	U	
鼻甲介	U	U	U	
神経	U	U	U	
嗅脳	U	U	U	
卵巣	U	U	U	
咽頭	U	U	U	
小腸	U	U	U	
脊髄	U	U	U	
脾臓	U	U	U	27.1
三叉神経節	U	N/A	U	
子宮	U	U	U	
	U=	陰性(増幅なし)		
カラーコード:		不確定(Ct 40-45)		
		陽性(Ct<40)		

10

20

30

【0125】

[00122]チャレンジ後の血清学的検査:

免疫化したウマV4、V5及びV6では、HeVチャレンジ後、力価の上昇が見られなかった(表8)。このことは、これらの動物でチャレンジウイルスの顕著な複製がないことと一致する。

40

【0126】

【表 8】

表8

ウマNo.	ベースライン 力価	プライム後の 力価	チャレンジ前の 力価	最終力価
V4	<2	4	256/128	256/32(8日目)
V5	<2	32	2048/>8192	1024/512(7日目)
V6	<2	4	512/1024	128/256(9日目)

【 0 1 2 7 】

10

[00123]プライム - ブーストレジメンで50 μ gのsG + ISCアジュバントでワクチン接種を行った3頭のウマ(V4、V5及びV6)は、HeV曝露の前にHeVに対して血清転換した。ISCのみを適用された1頭のウマはチャレンジウイルスに対して血清陰性のままであった。

【 0 1 2 8 】

[00124]HeVの致死量でのチャレンジ後、免疫化したウマは観察期間を通じて臨床的に良好な状態を維持し、ウマでのすべての実験的に誘導されたHeV発症までの時間を上回っていた。病原性コントロールとして用いた1匹のモルモットは、急性HeVと一致する臨床的徴候が発症した後に安楽死させた。免疫化したウマではチャレンジ後に抗体力価の上昇が見られず、これらの動物においてチャレンジウイルスの複製が検出されなかったことと一致していた。

20

【 0 1 2 9 】

[00125]3日目のV6由来直腸スワブにおける1つの複製物を除いて、すべての日々の臨床試料についてPCR試験陰性の結果が得られたことから反映されるように、免疫化したウマにおいてウイルス排出の痕跡は見られなかった。この試験を繰り返す。1回の評価で同様の結果が観察されるならば、残留接種源が低レベルであることを表している。1匹の免疫化していないモルモットにおいては、ウイルスの曝露から5日後に、ウイルスゲノムが主要な器官及び血液において検出された。

【 0 1 3 0 】

[00126]免疫化したウマの死後の検査において、安楽死後、急性感染期間と推定される期間で回収したいずれの組織からも、HeVウイルス複製の痕跡となるものは見当たらなかった。対照的に、感染が疑われるモルモットでは、組織全体にHeVゲノム及び抗原が急性HeV感染と一致するパターンで分布されており、HeV感染に典型的な脈管障害も同定された。

30

【 0 1 3 1 】

実施例7(ニパウイルスについての霊長類での臨床試験)：

[00127]統計：バイオセーフティレベル4(BSL-4)の動物試験、特に非ヒト霊長類の試験の実施では、動物対象の数、得られ得る生物学的試料の体積、分析の独立した再試可能性が著しく制限され、従って、統計学的分析も限定される。結果として、データは、複製アッセイではなく複製試料から計算した平均値又は中央値で表され、エラーバーは複数の複製物にわたる標準偏差を表す。

40

【 0 1 3 2 】

[00128]ウイルス：

NiV - マレーシア(GenBank受託番号：AF212302)は、米国疾病管理予防センターの特殊病原菌部門(Special Pathogens Branch of the Centers for Disease Control and Prevention)(ジョージア州、アトランタ)から入手した。NiVを、Rockxら、(2010)、J. Virol.、84、9831でHeVに対して記載されているように、ペロ細胞で増殖させ、力価を測定した。

【 0 1 3 3 】

50

[00129] ワクチン製剤：

3種のsGHeVワクチン製剤を用いた(10 μ g、50 μ g、又は100 μ g)。sGHeVの生産及び精製は、従前に、Pallister (2011)、Vaccine、29、5623に記載されているように行った。各ワクチン製剤には、アルハイドロゲル(商標)(Accurate Chemical & Scientific Corporation)と、完全なホスホリチオエート骨格を有するCpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)2006(Invivogen)も含有させた。一定量のODN2006と、異なる量のsGHeV及びアルミニウムイオン(重量比1:25)を含むワクチン用量を次のように処方した。100 μ g用量:sGHeV 100 μ g, アルミニウムイオン 2.5mg, 及びODN2006 150 μ g; 50 μ g用量:sGHeV 50 μ g, アルミニウムイオン 1.25mg, 及びODN2006 150 μ g; 10 μ g用量:sGHeV 5 μ g, アルミニウムイオン 250 μ g, 及びODN2006 150 μ g。すべての用量において、アルハイドロゲル(商標)とsGHeVとを、ODN2006を添加する前に最初に混合した。各ワクチン用量を、PBSで1mlに調節し、混合物を室温で少なくとも2~3時間、回転輪上でインキュベートした後で注射した。各対象は同じ1ml用量でプライミング及びブースティングを受け、すべてのワクチン用量は筋肉内注射により投与された。

10

【0134】

[00130] 動物：

体重が4~6kgの若齢成体アフリカミドリザル(AGM)(クロロセブス・アエチオプス(Chlorocebus aethiops))(Three Springs Scientific Inc.)10匹を別個に檻に入れた。対象にケタミン(10~15mg/kg)の筋肉内注射で麻酔をかけ、sGHeVのワクチン接種を-42日目(プライム)及び-21日目(ブースト)に行った。3匹の対象は10 μ g用量を2回(AGM16、AGM17、AGM18)、3匹の対象は50 μ gの用量を2回(AGM13、AGM14、AGM15)、3匹の動物は100 μ gの用量を2回(AGM10、AGM11、AGM12)、1匹の対象(AGM9)はアジュバントのみを投与した。0日目に、対象に麻酔をかけ、1 \times 10⁵TCID₅₀(組織培養感染量中央値)のNiVを含有する4mlのダルベッコ最小必須培地(DMEM)(Sigma-Aldrich)を気管内接種した。対象に臨床検査のために麻酔をかけた。臨床検査には、体温、呼吸数、胸部X線写真、採血、鼻腔、口腔及び直腸粘膜のスワブが含まれ、感染後(p.i.)0、3、5、7、10、14、21及び28日目に行った。コントロール対象(AGM9)は、感染後10日目に、承認された人道的エンドポイントに従って安楽死させなければならなかった。他のすべての対象は、試験終了まで生存し、感染後28日目に安楽死させた。剖検に際し、様々な組織を、ウイルス学的及び組織病理学的な目的で回収した。組織試料には、結膜、扁桃、中ノ鼻咽頭、鼻腔粘膜、気管、右気管支、左気管支、右肺上葉、右肺中葉、右肺下葉、左肺上葉、左肺中葉、左肺下葉、気管支リンパ節(LN)、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、空腸、横行結腸、脳(前頭葉)、脳(小脳)、脳幹、頸部脊髄、脳下垂体、下顎骨LN、唾液LN、鼠径部LN、腋下LN、腸間膜LN、膀胱、精巣又は卵巣、大腿骨骨髓が挙げられる。ワクチン接種はBSL-2封じ込め条件で行った。接種スケジュール、チャレンジ及び生物学的試料回収日のタイムラインを図4に示す。

20

30

40

【0135】

[00131] ワクチン接種及びNiVチャレンジ：

先に、本発明者らは、10⁵TCID₅₀(組織培養感染量中央値)のNiVでAGMを気管内接種すると、一様に死に至ることを実証した(Rockxら、(2010)、J.Virology、84、9831)。急速に進行する臨床的疾患がこれらの研究で示された。臨床的徴候としては、重度抑鬱、急性呼吸窮迫を導く呼吸器疾患、重症の神経疾患、及び機動性の著しい低下が挙げられ、安楽死に対して承認された人道的エンドポイントの基準に至るまでの時間は、7~12日であった。ここで、本発明者らは、sGHeVを用いたワクチン接種により、AGMにおけるNiV感染及び疾患が予防できるかを判定する

50

ことを試みた。上記方法で記載されるように、10、50又は100 μ gの用量のsGHeVを、ミョウバン及びCpG部分と混合した。各ワクチン製剤を3匹の対象に0日目（プライム）及び再度21日目（ブースト）に皮下投与し、1匹のコントロール対象（AGM9）には、アジュバントのみで上記と同じ日程でプライミング及びブースティングを行った。42日目に、すべての対象に、10⁵TCID₅₀のNiVを気管内接種した。コントロール対象（AGM9）は、食欲の喪失、重症の持続性行動の変化（抑鬱、活動性の低下、丸まった姿勢）、血小板数の減少、及び末期疾患での呼吸数の段階的増加を示した。続いて、AGM9は、急性呼吸窮迫を発症し、感染後10日目に、承認された人道的エンドポイントに従って安楽死させなければならなかった。対照的に、ワクチン接種対象のいずれも臨床的な疾患を有さず、すべてのワクチン接種対象が試験終了まで生存した。 Kaplan-Meier生存曲線を図5に示す。

10

【0136】

[00132]コントロール対象におけるNiV媒介性疾患：

コントロール対象の総体的な病理学的変化は、以前、NiV感染AGMで見られたものと一致していた（Geisbertら、（2010）、PLoS One 5、e10690）。脳の表面に巨脾及び血管の鬱血が現れ、肺の全葉が湿り、重かった。NiV RNA及び感染ウイルスはAGM9血液試料からは回収されず、ウイルス血症の痕跡もなかった。AGM9では、NiV特異的IgM並びに検出可能なNiV特異的IgG及びIgAのレベルが顕著であった。組織試料のさらなる分析により、従前にAGMで見られた広範なNiV感染と類似する過度のNiV組織屈性が明示された（Geisbertら、（2010）、PLoS One 5、e10690）。AGM9は組織の大半にNiV RNAを有しており、多数の組織から感染性ウイルスが回収された。顕著な病変としては、間質性肺炎、亜急性脳炎及び壊死及び白脾髄の出血があった。肺胞空間には、浮腫液、フィブリン、核崩壊及び細胞性破片、及び肺胞マクロファージが充満していた。多病巣性脳炎は、ウイルヒョウ・ロバン腔の拡大、適度な数のリンパ球、及び少ない好中球によって特徴づけられた。少数のこれらの炎症細胞が、隣接する柔組織内に延びていた。複数のニューロンが膨張し、空胞化し（変性）、又は核崩壊（壊死）により細片化していた。白脾髄の小胞の多病巣性胚中心は、出血及びフィブリン、並びに少数の好中球及び細胞性及び核崩壊性破片により失われていた。これらの所見は、脾臓での壊死及び胚中心の喪失と一致していた。過剰量のウイルス抗原が脳幹に存在しており、NiVが中枢神経系に著しい損傷を引き起こしていることを強調していた。

20

30

【0137】

[00133]sGHeVワクチン接種対象の防御：

すべての生物学的試料（チャレンジ後に回収した全血液試料及び剖検の際に回収したすべての組織を含む。）がNiV RNA陰性であり、いずれの試料からも感染性ウイルスは単離されなかった。ワクチン接種対象に由来する組織切片をより詳細に試験した結果、組織構築は正常のようであり、NiV抗原はいずれの組織からも免疫組織化学的技術手段で検出されなかった。ワクチンが誘発する防御メカニズムをさらに分析するために、血清及び粘膜sGNiV-及びsGHeV-特異的IgM、IgG及びIgA、並びにNiV及びHeV血清中和力価をワクチン接種動物で測定した。図6に示されるように、チャレンジ前の7日間、最低用量のsGHeVを投与した対象は、検出可能な抗原特異的血清IgMと最高レベルのsGHeV特異的血清IgGを示した。50 μ gのsGHeVを投与した対象も、チャレンジ前の7日間に、検出可能レベルの血清IgMと最高レベルの血清IgGを示した。高用量の対象は検出可能な血清IgMを有さず、血清IgGレベルは、7日目において他の2つのグループに対して著しく低かった。NiVチャレンジの日までに、高用量対象の血清IgGレベルが増加し、すべてのワクチン接種対象が同様のIgGレベルを有していた。血清IgMレベルは、NiVチャレンジ後、いずれの対象においても変化しなかった。血清IgGレベルはNiVチャレンジの日の中用量対象で減少し、IgGレベルはNiVチャレンジ後すぐに低用量対象で減少した。興味深いことに、IgGレベルは、これらのグループのいずれにおいても感染後3日目及び5日目までに増加し

40

50

たが、チャレンジ前の7日間に提示されたI g Gレベルを超えることはなく、両方のグループの力価が感染後28日までに顕著に減少した。

【0138】

[00134]反対に、血清I g Gレベルは高用量グループで高いままであり、感染後28日目において最も高くなった。抗原特異的血清I g Aは、ワクチン接種後のすべての対象において検出された。しかしながら、検出レベルは非常に低く、チャレンジ前とチャレンジ後のレベルに有意な差はなかった(図6)。粘膜の抗原特異的I g Aのわずかな増加が、感染後14日目に低用量対象の鼻腔スワブから検出されたが、その増加レベルは非常にわずかであり、これらの粘膜抗体はチャレンジ後のNiVの広がりを抑制する役割を果たしそうではなかった。血清中和試験(SNT)の結果を表9に示す。すべてのワクチン接種対象に対して、HeV特異的中和力価は同様に維持されたか、又は感染後28日まで減少し、NiV特異的中和力価は、チャレンジ前の力価が最も低い対象であっても、感染後7日までに顕著な変化を示さなかった。1匹の低用量対象及び1匹の高用量対象は、感染後14日までにNiV SNT力価がログ増加し、1匹の中用量対象では、感染後21日までにNiV SNT力価がログ増加した。他のすべてのワクチン接種動物において、SNT力価の変化は一貫性がないか(力価が増加し、次いで減少する)又は顕著でなかった(力価は3~4倍になるがログを超えない)。最後に、NiV融合(F)エンベロープ糖タンパク質に対する血清転換がNiVチャレンジ後のワクチン接種対象で測定された。血清抗NiV F I g Mの最小レベルが、低用量対象及び中用量対象においてそれぞれ感染後10日目及び21日目に検出され、これらの低いM.F.I.値はNiVチャレンジ後の一次抗体反応が弱いことを示唆する。血清抗NiV-F I g Mは高用量対象で検出されず、これらの動物では、チャレンジ後のウイルスの循環がほとんど又は全くないことが示唆された。

【0139】

【表9】

	日 ²	-42	-7	7	14	28	-42	-7	7	14	28
sG _{HeV} 用量	AGM	HeV					NiV				
0µg ³	9	<20	<20	24	*	*	<20	<20	<20	*	*
10µg	16	<20	>2560	>2560	>2560	1074	<20	379	226	>2560	2147
	17	<20	>2560	>2560	905	537	<20	134	134	537	453
	18	<20	>2560	>2560	453	537	<20	189	134	189	453
50µg	13	<20	>2560	>2560	>2560	757	<20	379	189	189	453
	14	<20	1514	>2560	>2560	537	<20	28	47	226	134
	15	<20	2147	757	>2560	905	<20	67	95	757	1074
100µg	10	<20	>2560	2147	1810	453	<20	67	113	268	453
	11	<20	>2560	>2560	>2560	1514	<20	134	189	905	1514
	12	<20	>2560	>2560	>2560	757	<20	189	226	>2560	1514

【0140】

実施例8(ヘンドラウイルスについての霊長類での臨床試験):

[00135]ヘンドラウイルスを用いたワクチン接種及びチャレンジを評価するために、第2の臨床試験をAGMで行った。実施例7と同じ製剤をワクチンとして利用したが、sG_{HeV}と、アジュバントとしてアルハイドロゲル(商標)のみ(ODN2006は含めなかった)と、を投与した別のグループとも比較した。動物に、-21日目にワクチン接種を行い、0日目にブースティングを行い、21日目にチャレンジを行った。特に断わらない限り、すべての条件は実施例7と同じとした。実験概要を下記に示す。

【0141】

【表 10】

グループ	処置	N	投与レジメン
A	100µg/用量のヘンドラsGワクチン + アジュバント (150µg CpG ODN2006 + 119µl アルハイドロゲル)	4	プライム + 3週間後にブースト1回
B	100µg/用量のヘンドラsGワクチン + アジュバント (250µl アルハイドロゲル)	4	プライム + 3週間後にブースト1回
C	アジュバントのみ (150µg CpG ODN2006)	1	プライム + 3週間後にブースト1回
D	アジュバントのみ (250µl アルハイドロゲル)	1	A及びBグループと同じスケジュール
合計		10	

10

【0142】

[00136]結果：

両方のグループ (A 及び B) のすべての動物 (n = 4) が、 10^5 TCID₅₀ ヘンドラウイルスを気管内に接種後、ヘンドラウイルスチャレンジを生き延びた。コントロール対象は8日目に死亡した。ワクチン接種対象のいずれにおいても臨床的疾患は観察されず、健康で良好な状態が試験の終了時点まで維持された。

20

【0143】

[00137]本発明の他の実施形態及び用途は、本明細書に記載された本発明の説明及び実施形態を考慮すれば当業者には明らかである。本明細書で引用されるすべての参考文献 (刊行物、並びに米国及び外国の特許及び特許出願を含む。) は、参照により個別にかつ全体として組み込まれる。明細書及び実施例は例示としてのみ考慮され、本発明の真の範囲及び趣旨は添付の特許請求の範囲に示されるものとする。

【 図 1 】

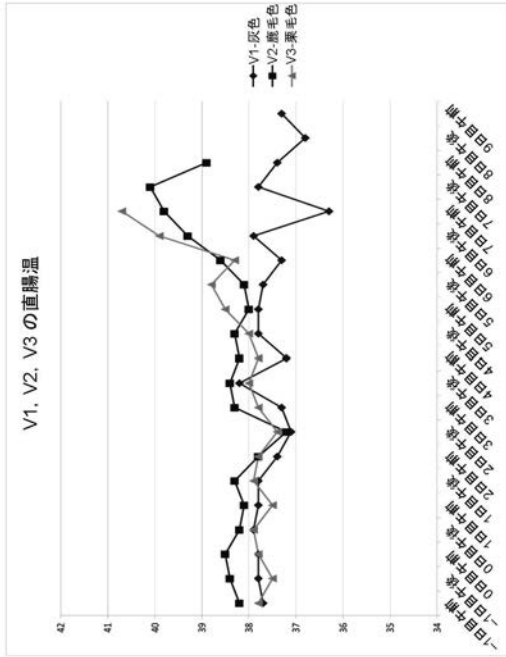


Figure 1

【 図 2 】

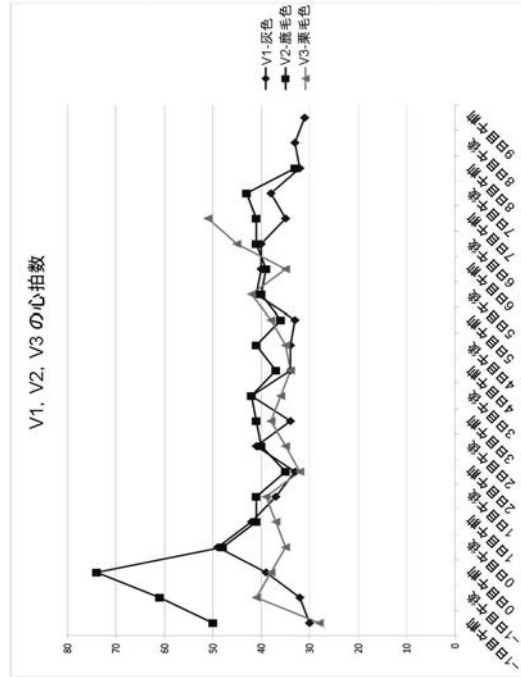


Figure 2

【 図 3 】

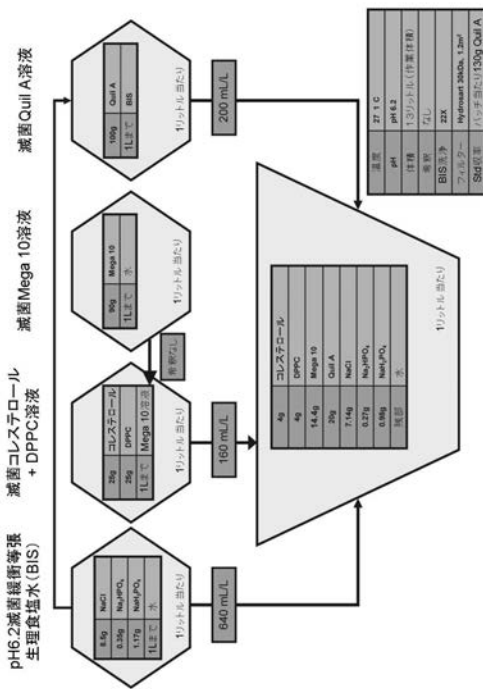


Figure 3

【 図 4 】

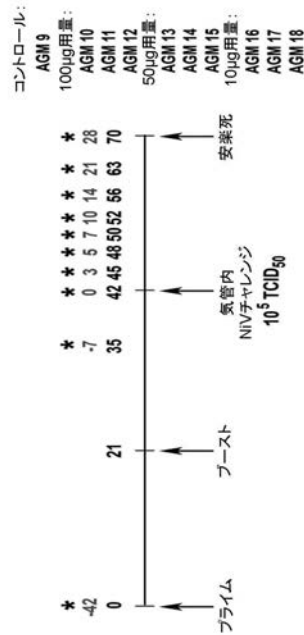


Figure 4

【 図 5 】

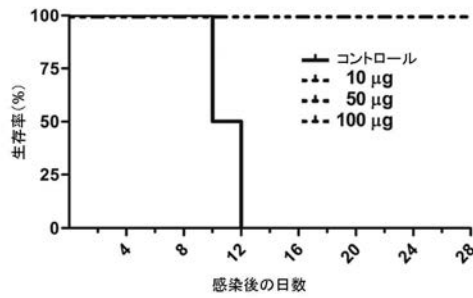


Figure 5

【 図 6 】

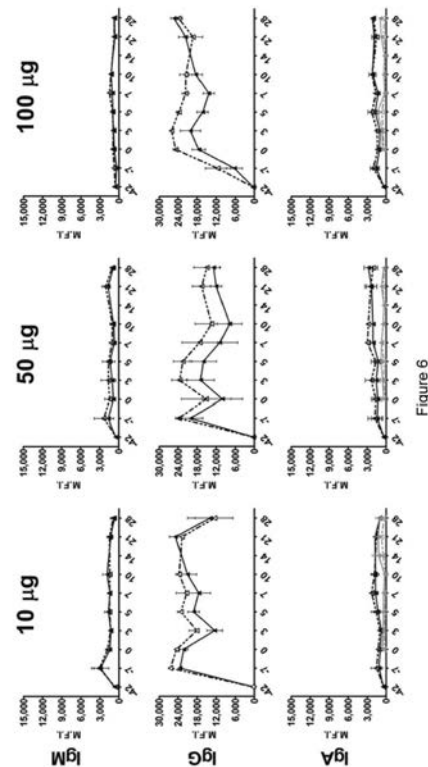


Figure 6

【 配列表 】

2018030862000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成29年12月8日(2017.12.8)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 1 4 3

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 1 4 3 】

[00137]本発明の他の実施形態及び用途は、本明細書に記載された本発明の説明及び実施形態を考慮すれば当業者には明らかである。本明細書で引用されるすべての参考文献（刊行物、並びに米国及び外国の特許及び特許出願を含む。）は、参照により個別にかつ全体として組み込まれる。明細書及び実施例は例示としてのみ考慮され、本発明の真の範囲及び趣旨は添付の特許請求の範囲に示されるものとする。

本発明の実施形態は例えば下記実施形態 1 ~ 3 3 を含む。

実施形態 1 :

ヘンドラ及びノ又はニパウイルス G 糖タンパク質と免疫刺激複合体 (ISC) と少なくとも 1 種の賦形剤とを、ヘンドラ及びノ又はニパウイルスに感受性のある対象への投与後に該ヘンドラ及びノ又はニパウイルスに対する免疫防御を誘発するのに有効な量で含むワクチンであって、

(a) ヘンドラ及びノ又はニパウイルス G 糖タンパク質は 1 用量当たり 5 ~ 100 µg の量で存在し、

(b) ISC はサポニン及びステロイドを含む、
ワクチン。

実施形態 2 :

サポニンは *Quil A* である、実施形態 1 に記載のワクチン。

実施形態 3 :

ISC はリン脂質をさらに含む、実施形態 1 に記載のワクチン。

実施形態 4 :

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質は、天然のヘンドラ G 糖タンパク質 (配列番号 2) の 73 ~ 604 位のアミノ酸からなる、実施形態 1 に記載のワクチン。

実施形態 5 :

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質は、配列番号 16 の 64 ~ 1662 位のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列によってコードされている、実施形態 4 に記載のワクチン。

実施形態 6 :

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質は二量体形態で存在している、実施形態 1 に記載のワクチン。

実施形態 7 :

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質二量体の各サブユニットは少なくとも 1 つのジスルフィド結合によって連結されている、実施形態 6 に記載のワクチン。

実施形態 8 :

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質は四量体形態で存在している、実施形態 1 に記載のワクチン。

実施形態 9 :

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質の量は約 50 ~ 約 100 μg であり、前記対象はウマである、実施形態 1 に記載のワクチン。

実施形態 10 :

サポニンは、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja saponaria Molina*) から単離されたものである、実施形態 1 に記載のワクチン。

実施形態 11 :

サポニンは、QH - A、QH - B、QH - C、又は QS 21 である、実施形態 10 に記載のワクチン。

実施形態 12 :

リン脂質は、ホスファチジルコリン (PC)、ジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ホスファチジン酸 (ホスファチデート) (PA)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP)、ホスファチジルイノシトールニリン酸 (PIP2)、ホスファチジルイノシトール三リン酸 (PIP3)、ホスホリルコリン (SPH)、セラミドホスホリルエタノールアミン (Cer - PE)、及びセラミドホスホリルグリセロールからなる群から選択される、実施形態 3 に記載のワクチン。

実施形態 13 :

サポニンは *Quil A* であり、リン脂質は DPPC であり、ステロイドはコレステロールである、実施形態 3 に記載のワクチン。

実施形態 14 :

組成物における *Quil A* : DPPC : コレステロールの重量比は 5 : 1 : 1 である、実施形態 13 に記載のワクチン。

実施形態 15 :

前記対象は、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ニワトリ、又はネコである、実施形態 1 ~ 8 及び 10 ~ 14 のいずれかに記載のワクチン。

実施形態 16 :

前記対象における前記ヘンドラ及び / 又はニパウイルスに対する中和抗体応答を生成することができる、実施形態 1 ~ 15 のいずれかに記載のワクチン。

実施形態 17 :

中和抗体応答は前記対象におけるヘンドラ及びノ又はニパウイルスの複製を減少させる、実施形態16に記載のワクチン。

実施形態18：

中和抗体応答は前記対象におけるヘンドラ及びノ又はニパウイルスの排出を減少させる、実施形態16に記載のワクチン。

実施形態19：

前記対象は、ヘンドラ及びノ又はニパウイルスに曝露された対象である、実施形態16に記載のワクチン。

実施形態20：

前記対象は、ヘンドラ及びノ又はニパウイルス感染に罹患している対象である、実施形態19に記載のワクチン。

実施形態21：

筋肉内投与された場合に中和抗体応答を生成することができる、実施形態16に記載のワクチン。

実施形態22：

複数回投与で投与された場合に中和抗体応答を生成することができる、実施形態16に記載のワクチン。

実施形態23：

第2回目の投与が第1回目の投与から少なくとも約21～約28日後に行われる、実施形態22に記載のワクチン。

実施形態24：

各用量は約50又は約100 μ gの可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質を含む、実施形態22に記載のワクチン。

実施形態25：

前記対象はウマであり、各用量は約50又は約100 μ gの可溶性ヘンドラウイルスG糖タンパク質を含み、ISCはQuil A、DPPC、及びコレステロールを含む、実施形態16～24のいずれかに記載のワクチン。

実施形態26：

前記ウイルスはヘンドラウイルスである、実施形態16～25のいずれかに記載のワクチン。

実施形態27：

前記ウイルスはニパウイルスである、実施形態16～25のいずれかに記載のワクチン。

実施形態28：

実施形態1～27のいずれかに記載のワクチンをワクチン接種された対象から単離された生物学的試料と、ヘンドラ及びノ又はニパウイルスに曝露された対象から単離された生物学的試料と、を識別する方法であって、生物学的試料において、融合タンパク質(F)、マトリックスタンパク質(M)、リンタンパク質(P)、巨大タンパク質(L)、及びヌクレオカプシドタンパク質(N)からなる群から選択されるHeV及びノ又はNiVウイルスタンパク質の少なくとも1つに対する抗体の存在を検出するステップを含む方法。

実施形態29：

前記対象は、ヒト、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ニワトリ、又はネコである、実施形態28に記載の方法。

実施形態30：

前記ウイルスはヘンドラウイルスである、実施形態28に記載の方法。

実施形態31：

前記ウイルスはニパウイルスである、実施形態28に記載の方法。

実施形態32：

ヘンドラウイルス感染に対してウマにワクチン接種するための方法であって、実施形態9に記載のワクチンを前記ウマに2回投与することを含む方法。

実施形態 33 :

第 2 回目の投与が第 1 回目の投与から少なくとも約 21 ~ 約 28 日後に行われる、実施形態 32 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘンドラ及び/又はニパウイルス G 糖タンパク質と免疫刺激複合体 (ISC) と少なくとも 1 種の賦形剤とを、ヒト対象への投与後にヘンドラ及び/又はニパウイルスに対する中和抗体の産生を誘発するのに有効な量で含む免疫原性組成物。

【請求項 2】

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質は、天然のヘンドラ G 糖タンパク質 (配列番号 2) の 73 ~ 604 位のアミノ酸からなる、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質は、配列番号 16 の 64 ~ 1662 位のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列によってコードされている、請求項 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質は二量体形態で存在している、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質二量体の各サブユニットは少なくとも 1 つのジスルフィド結合によって連結されている、請求項 4 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質は四量体形態で存在している、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質の濃度は約 5 ~ 約 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

ISC はサポニンを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

サポニンは、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja saponaria Molina*) から単離されたものである、請求項 8 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

サポニンは、QH - A、QH - B、QH - C、又は QS 21 である、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

ISC はリン脂質及びステロイドを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

リン脂質は、ホスファチジルコリン (PC)、ジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ホスファチジン酸 (ホスファチデート) (PA)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP)、ホスファチジルイノシトールニリン酸 (PIP2)、ホスファチジルイノシトール三リン酸 (PIP3)、ホスホリルコリン (SPH)、セラミドホスホリルエタノールアミン (Cer - PE)、及びセラミドホス

ホリルグリセロールからなる群から選択される、請求項 11 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

ISC はサポニン、リン脂質及びステロイドを含み、サポニンは Quil A であり、リン脂質はジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) であり、ステロイドはコレステロールである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

組成物における Quil A : DPPC : コレステロールの重量比は 5 : 1 : 1 である、請求項 13 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

ヒト対象においてヘンドラ及び / 又はニパウイルスに対する中和抗体応答を生成するための、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

中和抗体応答は前記対象におけるヘンドラ及び / 又はニパウイルスの複製を減少させる、請求項 15 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

中和抗体応答は前記対象におけるヘンドラ及び / 又はニパウイルスの排出を減少させる、請求項 15 又は 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

前記対象は、ヘンドラ及び / 又はニパウイルスに曝露された対象である、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

前記対象は、ヘンドラ及び / 又はニパウイルス感染に罹患している対象である、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

免疫原性組成物が筋肉内投与されるように用いられる、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 21】

免疫原性組成物が複数回投与で投与されるように用いられる、請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 22】

第 2 回目の投与が第 1 回目の投与から少なくとも約 21 ~ 約 28 日後に行われる、請求項 21 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 23】

各用量は約 50 又は約 100 μg の可溶性ヘンドラウイルス G 糖タンパク質を含む、請求項 21 又は 22 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物をワクチン接種されたヒト対象から単離された生物学的試料と、ヘンドラ及び / 又はニパウイルスに曝露されたヒト対象から単離された生物学的試料と、を識別する方法であって、生物学的試料において、融合タンパク質 (F)、マトリックスタンパク質 (M)、リンタンパク質 (P)、巨大タンパク質 (L)、及びヌクレオカプシドタンパク質 (N) からなる群から選択される HeV 及び / 又は NiV ウイルスタンパク質の少なくとも 1 つに対する抗体の存在を検出するステップを含む方法。

【請求項 25】

前記ウイルスはヘンドラウイルスである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ウイルスはニパウイルスである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

ヒト対象においてヘンドラ及び / 又はニパウイルスに対する中和抗体応答を生成するための免疫原性組成物であって、ヘンドラウイルス可溶性 G 糖タンパク質を含む免疫原性組

成物。

【請求項 28】

アジュバントをさらに含む、請求項 27 に記載の免疫原性組成物。

フロントページの続き

- (74)代理人 100123995
弁理士 野田 雅一
- (74)代理人 100148596
弁理士 山口 和弘
- (74)代理人 100162352
弁理士 酒巻 順一郎
- (72)発明者 エルヘイ, マーティン
オーストラリア, 2114 ニュー サウス ウェールズ ウェスト ライド, ウォーフ ロ
ード 38 - 42
- (72)発明者 ブローダー, クリストファー, シー.
アメリカ合衆国, メリーランド州, ベセスダ, スイート 100, ロックレッジ ドライ
ブ 6720 - エー
- (72)発明者 ホアン, ジン - アン
オーストラリア, 3129 ピクトリア, ボックス ヒル ノース, ビスタ コート 12
- Fターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BA57 BB12 CC08 DD62 EE01 EE06 FF18

【外国語明細書】

2018030862000001.pdf

专利名称(译)	Hendra和Nipah病毒G糖蛋白免疫原性组合物		
公开(公告)号	JP2018030862A	公开(公告)日	2018-03-01
申请号	JP2017182552	申请日	2017-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	硕腾服务有限责任公司 HENRY中号JACKSON发现的军事医学的进步		
申请(专利权)人(译)	Zoetis-Sabishizu LLC 亨利中号..杰克逊基金会军事医学公司的高级换货		
[标]发明人	エルハイマーティン ブローダークリストファーシー ホアンジンアン		
发明人	エルハイ, マーティン ブローダー, クリストファー, シー, ホアン, ジン-アン		
IPC分类号	A61K39/155 A61K39/39 A61P31/14 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/12 A61K2039/544 A61K2039/552 A61K2039/55505 A61K2039/55561 A61K2039/55577 A61K2039/575 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P37/00 A61P37/04 C07K14/005 C12N2710 /24143 C12N2760/18222 C12N2760/18234 G01N33/56983 G01N2333/115 G01N2469/20 A61K39/155 A61K2039/54 A61K2039/545 A61K2039/55511 C12N7/00		
FI分类号	A61K39/155.ZNA A61K39/39 A61P31/14 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BA57 4C085/BB12 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085 /EE06 4C085/FF18		
代理人(译)	池田 成人 山口和弘 小泉纯酒卷		
优先权	61/485992 2011-05-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2018-30862 (P2018-30862A)
	(43) 公開日 平成30年3月1日(2018.3.1)		
要解决的问题：为Hendra和/或Nipah病毒提供免疫原性组合物及其使用方法。甲亨德拉和/或尼帕病毒G糖蛋白和免疫刺激复合物和 (ISC) 和至少一种赋形剂，亨德拉和/或亨德拉和/或之后施用至易感对象尼帕疫苗有效量引发针对尼帕病毒的免疫防御 (A) Hendra和/或Nipah病毒G糖蛋白以每剂量5至100µg的量存在。(b) ISC包含皂苷和类固醇。	(51) Int. Cl.	FI	テーマコード(参考) 4C085
	(21) 出願番号 (22) 出願日 (23) 優先権主張番号 (24) 優先日 (25) 優先権主張国 (31) 出願人 (32) 代理人	A61K 39/155 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)	A61K 39/155 ZNA A61K 39/39 A61P 31/14 G01N 33/53 N
	審査請求 有 請求項の数 28 O L 外国語出願 (全 43 頁)		
	(21) 出願番号 (22) 出願日 (23) 優先権主張番号 (24) 優先日 (25) 優先権主張国 (31) 出願人 (32) 代理人	特願2017-182552 (P2017-182552) 平成29年9月22日(2017.9.22) 特願2017-76265 (P2017-76265) の分割 平成24年5月14日(2012.5.14) 61/485,992 平成23年5月13日(2011.5.13) 米国(US)	(71) 出願人 515230154 ゾエティス・サービス・エルエルシー アメリカ合衆国ニュージャージー州07054、パーシップニー、シルバン・ウェイ 10 (71) 出願人 501051125 ザ・ヘンリー・エム・ジャクソン・ファ ウンデーション・フォー・ザ・アドヴァン スメント・オブ・ミリタリー・メディシン インコーポレイテッド アメリカ合衆国 メリーランド州 ベセス ダ ロックレッジ ドライブ 6720ー エイ ストリート 100 (74) 代理人 100107456 弁理士 池田 成人
	最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】ヘンドラ及びニパウイルスG糖タンパク質免疫原性組成物