

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6959289号  
(P6959289)

(45) 発行日 令和3年11月2日(2021.11.2)

(24) 登録日 令和3年10月11日(2021.10.11)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/49 (2006.01)	C 1 2 N 15/49 Z N A
C O 7 K 14/155 (2006.01)	C O 7 K 14/155
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861 Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 I O O Z
C 1 2 N 15/863 (2006.01)	C 1 2 N 15/863 Z

請求項の数 9 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-71336 (P2019-71336)	(73) 特許権者	516257833
(22) 出願日	平成31年4月3日(2019.4.3)		ヤンセン ファッシンズ アンド プリベンション ベーフエー
(62) 分割の表示	特願2018-531537 (P2018-531537) の分割		JANSSEN VACCINES & PREVENTION B. V.
原出願日	平成28年12月15日(2016.12.15)		オランダ国 2333 セーエン ライデン アルヒメーデスウェッハ 4
(65) 公開番号	特開2019-146574 (P2019-146574A)	(74) 代理人	100092783
(43) 公開日	令和1年9月5日(2019.9.5)		弁理士 小林 浩
審査請求日	令和1年12月16日(2019.12.16)	(74) 代理人	100095360
(31) 優先権主張番号	15200138.4		弁理士 片山 英二
(32) 優先日	平成27年12月15日(2015.12.15)	(74) 代理人	100093676
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 純子
(31) 優先権主張番号	16194124.0	(74) 代理人	100120134
(32) 優先日	平成28年10月17日(2016.10.17)		弁理士 大森 規雄
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト免疫不全ウイルス抗原、ベクター、組成物、およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロモーター配列に作動可能に連結された合成 HIV エンベロープタンパク質をコードする核酸を含むベクターであって、合成 HIV エンベロープタンパク質が配列番号 18 のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、前記ベクターがヒトアデノウイルスベクター、サルアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、MVA ベクター、ベネズエラマ脳炎ウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、タバコモザイクウイルスベクター、レンチウイルスベクター、プラスミドベクター、細菌人工染色体ベクター、酵母人工染色体ベクター、またはバクテリオファージベクターである、ベクター。

【請求項 2】

MVA ベクターである、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のベクターの免疫原的有効量と担体とを含む、組成物。

【請求項 4】

配列番号 18 のアミノ酸配列を有する合成 HIV エンベロープタンパク質をコードする第 1 の Ad 26 ベクターの免疫原的有効量、  
配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HIV 抗原性ポリペプチドをコードする第 2 の Ad 26 ベクターの免疫原的有効量、  
配列番号 28 のアミノ酸配列を含む HIV 抗原性ポリペプチドをコードする第 3 の Ad 2

6ベクターの免疫原的有効量、および配列番号29のアミノ酸配列を含むHIV抗原性ポリペプチドをコードする第4のAd26ベクターの免疫原的有効量、を含む組成物。

【請求項5】

(a) 請求項4に記載の組成物、および  
(b) 1つ以上の単離されたHIV抗原性ポリペプチドの免疫原的有効量を含む第2の組成物を含むワクチン組み合わせ物。

【請求項6】

1つ以上の単離されたHIV抗原性ポリペプチドが、配列番号7のアミノ酸配列の残基30~708を含む安定化HIVクレードC三量体gp140タンパク質、および配列番号36のアミノ酸配列の残基30~724を含むモザイクHIV Env三量体タンパク質からなる群から選択される1つ以上のHIV抗原性ポリペプチドを含む、請求項5に記載のワクチン組み合わせ物。

【請求項7】

請求項5または6に記載のワクチン組み合わせ物を含むキット。

【請求項8】

対象においてHIVに対する免疫応答を誘導するための、請求項4に記載の組成物または請求項5または6に記載のワクチン組み合わせ物。

【請求項9】

配列番号18のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる合成HIVエンベローブタンパク質をコードするRNA分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は世界中で何百万人もの人々を冒しており、効果的なワクチンによるHIVの予防は、抗レトロウイルス処置が広く行き渡っている時代であっても依然として優先順位が非常に高い。HIV-1は、ウイルスの最も一般的かつ病原性の株であり、HIV/AIDS症例の90%以上がHIV-1グループMの感染に由来する。Mグループは、さらにクレードまたはサブタイプに細分される。効果的なワクチンは、理想的には、強力な細胞応答と、異なるクレードのHIV-1株を中和し得る広域中和抗体の両方を誘起できよう。

【背景技術】

【0002】

HIV-1の高い遺伝的変異性により、HIV-1ワクチンの開発は前例のない挑戦となる。潜在的なT細胞エピトープの適用範囲を改善し、細胞応答を改善するため、HIVグループ抗原(Gag)、ポリメラーゼ(Pol)、およびエンベローブ(Env)タンパク質に由来する「モザイク」HIV-1Gag、PolおよびEnv抗原は、潜在的なT細胞エピトープ(例えば、Barouchら、Nat Med 2010、16:319-323)の最大の適用範囲を提供する試みにおいて開発された。モザイク抗原は、野生型の天然に存在するHIV-1抗原と長さおよびドメイン構造が類似している。

【0003】

例えば、ワクチンにおいて記載され使用されるモザイクHIV抗原には、Barouchら、上記、および国際公開第2010/059732号パンフレットに記載される以下のようなものが含まれる:

(a) 以下を含むGagモザイク抗原:

(a)(i) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する第1のモザイクGag配列(「mos1Gag」)、および

(a)(ii) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する第2のモザイクGag配列(

10

20

30

40

50

「mos2Gag」) ;

(b) 以下を含むPolモザイク抗原 :

(b) (i) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する第1のモザイクPol配列(「mos1Pol」)、および

(b) (ii) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する第2のモザイクPol配列(「mos2Pol」) ; ならびに

(c) 以下を含むEnvモザイク抗原 :

(c) (i) 配列番号5に記載のアミノ酸配列を有する第1のモザイクEnv配列(「mos1Env」)、および

(c) (ii) 配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する第2のモザイクEnv配列(「mos2Env」)。

10

#### 【0004】

これらの抗原をコードする配列は、例えば組換えアデノウイルス血清型26(rAd26)のような組換えアデノウイルスベクターなどのベクターにクローニングされており、これらの組換えベクターは、抗原に対する免疫応答を生成するためのワクチンとして以前に使用されている(例えば、Barouchら、上記; および国際公開第2010/059732号パンフレット参照)。例えば、mos1Gagおよびmos1Polモザイク抗原配列は、典型的にはGagおよびPolの融合タンパク質(「mos1GagPol」)に結合され、そのコード配列は、第1のAd26ベクター(「rAd26.mos1GagPol」)にクローニングされる。mos2Gagおよびmos2Pol抗原配列は、GagおよびPolの別の融合タンパク質(「mos2GagPol」)に結合され、そのコード配列は、第2のAd26ベクター(「rAd26.mos2GagPol」)にクローニングされる。mos1Envおよびmos2Envをコードする構築物は、典型的には別々のAd26ベクター(それぞれ「rAd26.mos1Env」および「rAd26.mos2Env」)にクローニングされる。

20

#### 【0005】

上記のようなモザイク抗原のセットは、グループM HIV-1単離体の良好な全体的適用範囲をもたらし、ここで、モザイク1抗原配列(例えば、rAd26.mos1GagPolおよびrAd26.mos1Env)をコードするrAd26ベクターにとってクレードBおよびCRF01 HIV-1サブタイプが有利であり、モザイク2抗原配列(例えば、rAd26.mos2GagPolおよびrAd26.mos2Env)をコードするrAd26ベクターにとってクレードC株が有利である。rAd26ベクターで発現されるモザイクHIV-1Gag、Pol、およびEnv抗原は、コンセンサスまたは天然配列HIV-1抗原(Barouchら、上記; および国際公開第2010/059732号パンフレット)と比較した場合、細胞性応答および体液性応答の両方の大きさを損なうことなく、アカゲザルにおける抗原特異的Tリンパ球応答の幅および深さを改善するために使用され得る。

30

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

しかしながら、上記のワクチン成分に関するさらなる開発努力の結果、rAd26.mos2Envは、非ヒト霊長類において非最適な細胞表面発現および免疫応答を示したが、なお、これまでに報告されていない予想外かつ予測不可能な、他のrAd26ベクター(例えば、rAd26.mos1Env)と比較した、製造プロセス中の非最適な遺伝的安定性を示した。したがって、mos2Envモザイク抗原がクレードC HIV-1株に有利であるため、rAd26.mos2Envを含むワクチンは、クレードC HIV-1サブタイプに対する非最適免疫応答をもたらし得る。したがって、HIV-1クレードCに対する改善された免疫応答を誘導するために使用され得る、HIVに対するワクチン中のmos2Env抗原の代替物が必要とされている。

40

#### 【課題を解決するための手段】

50

## 【 0 0 0 7 】

本発明は、先に記載されたmos2Env抗原と比較して改善された細胞表面発現および遺伝的安定性を有する新規合成ヒト免疫不全ウイルス(HIV)エンベロープタンパク質に関する。本発明はまた、好ましくは他のHIV抗原と組み合わせて使用される場合の、HIV-1、特にHIV-1クレードCに対する増加した免疫応答を誘導するためのそのような新規合成HIVエンベロープタンパク質および/またはそのコード配列の使用した組成物および方法に関する。

## 【 0 0 0 8 】

一般的な一態様では、配列番号8、または(i)I529P(すなわち、配列番号8の529位でのIleのProへの置換)、(ii)K480E(すなわち、配列番号8の480位でのLysのGluへの置換)、(iii)EK479-480RRRR(すなわち、配列番号8の479~480位での、Glu-Lysの、4つの連続するArg残基による置換)、I529P、A471C(すなわち、配列番号8の471位でのAlaのCysへの置換)およびT575C(すなわち、配列番号8の575位でのThrのCysへの置換)の組み合わせ、からなる群から選択される1つ以上の変異を有する配列番号8、のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸に関する。一実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は、シグナル配列、例えば、配列番号9~12からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するシグナル配列をさらに含む。一実施形態では、シグナル配列は、配列番号9のアミノ酸配列を有する。

## 【 0 0 0 9 】

特定の実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は、膜貫通ドメイン、好ましくは配列番号13のアミノ酸配列を有する膜貫通ドメインをさらに含む。

## 【 0 0 1 0 】

特定の実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は、細胞質ドメインの断片、好ましくは配列番号14のアミノ酸配列またはそのアミノ酸1~4(すなわちNRVR)を含む細胞質ドメインの断片をさらに含む。合成HIVエンベロープタンパク質が、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインの断片、をさらに含む実施形態では、タンパク質はまた、配列番号8のカルボキシル末端(C末端)および膜貫通領域のアミノ末端(N末端)に融合された配列番号37のアミノ酸配列を含むことが好ましい。

## 【 0 0 1 1 】

別の実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は、三量体形成ドメイン、例えば、配列番号15(GCN4)または配列番号16(フォールドン(foldon)ドメイン)のアミノ酸配列を含む三量体形成ドメインを含む。好ましい一実施形態では、三量体形成ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列を含む。三量体形成ドメインを有するそのような実施形態は、配列番号8のアミノ酸配列を含むものなどの、本明細書で提供されるエクトドメイン配列に基づく可溶性(すなわち非膜結合性)合成HIVエンベロープタンパク質に有用であり、三量体形成ドメインは、合成HIVエンベロープタンパク質のC末端に位置する。

## 【 0 0 1 2 】

さらに他の実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は、以下の変異:EK479-480RRRR、I529P、A471CおよびT575Cを有する配列番号8を含む。6つの連続したアルギニン残基(配列番号8の天然配列中の478位および481位は既にArg残基である)の導入は、さらに最適化されたフェーリン切断部位をもたらす、改良されたプロセッシング(すなわち切断)したエクトドメインが得られる。I529P、A471CおよびT575Cの3つの変異は、SOSIP変異として知られており、最後の2つの変異により、新たに生成されたシステイン残基間に可能なジスルフィド架橋が導入される。全体として、これらの変異は、三量体形成ドメインの必要性なしに、可溶性の、三量体形成された、合成HIVエンベロープタンパク質を生じる。

## 【 0 0 1 3 】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号17、配列番号18、または配列番号19

10

20

30

40

50

のアミノ酸 1 ~ 686、のアミノ酸配列を含む合成 HIV エンベロープタンパク質をコードする核酸に関する。最も好ましくは、核酸によってコードされる合成 HIV エンベロープタンパク質は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0014】

別の一般的な態様において、本発明は、本発明の一実施形態による合成 HIV エンベロープタンパク質をコードする核酸を含むベクターに関する。一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。好ましい実施形態では、ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである。好ましい一実施形態では、アデノウイルスベクターはアデノウイルス 26 ベクターである。

【0015】

本発明の別の一般的な態様は、本発明の一実施形態によるベクターの免疫原的有効量および担体を含む、組成物、好ましくはワクチン組成物に関し、ここで、合成 HIV エンベロープタンパク質をコードする核酸は、プロモーター配列に作動可能に連結される。一実施形態では、組成物は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む合成 HIV エンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス 26 ベクターを含む。

【0016】

他の一般的な態様では、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導するためのワクチンの組み合わせに関する。ワクチンの組み合わせは、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する合成 HIV エンベロープタンパク質をコードするベクター、好ましくはアデノウイルスベクター、より好ましくはアデノウイルス 26 ベクターの免疫原的有効量を含む第 1 の組成物、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HIV 抗原性ポリペプチドをコードする第 2 のベクター、好ましくは第 2 のアデノウイルスベクター、さらに好ましくは第 2 のアデノウイルス 26 ベクターの免疫原的有効量をさらに含む第 2 の組成物、および任意選択により、配列番号 1 ~ 4、28 および 29 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原性ポリペプチドをコードするベクター、および配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 708 を有するポリペプチド、または配列番号 36 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 724 を有するポリペプチドを含むが、これに限定されない、単離された HIV 抗原性ポリペプチドの免疫原的有効量を含むポリペプチド、からなる群から選択される、少なくとも 1 つの免疫原的有効量を含む、少なくとも 1 つのさらなる組成物、を含み、第 1 の組成物、第 2 の組成物および任意選択によるさらなる組成物は、同じ組成物中または 1 つ以上の異なる組成物中に存在する。

【0017】

本発明のさらに別の一般的な態様は、本発明の実施形態による組成物またはワクチンの組み合わせを対象に投与することを含む、それを必要とする対象においてヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する免疫応答を誘導する方法に関する。本発明はまた、本発明の一実施形態による組成物またはワクチンの組み合わせを用いた免疫応答のプライミングおよびブースティングを含む、HIV に対する免疫応答を誘導する方法に関する。

【0018】

また、本発明のさらなる態様は、配列番号 8、または (i) I529P、(ii) K480E、(iii) EK479-480RRRR、I529P、A471C および T575C の組み合わせ、からなる群から選択される 1 つ以上の変異を有する配列番号 8、のアミノ酸配列を含む合成 HIV エンベロープタンパク質に関する。一実施形態では、合成 HIV エンベロープタンパク質は、EK479-480RRRR、I529P、A471C および T575C の変異を有する配列番号 8 を含む。別の実施形態では、合成 HIV エンベロープタンパク質は、配列番号 18 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 704 または 30 ~ 711 を含む。さらに別の実施形態では、合成 HIV エンベロープタンパク質は、配列番号 19 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 686 を含む。

【0019】

本発明の別の態様は、本発明の実施形態によるベクターを含む細胞、好ましくは単離さ

10

20

30

40

50

れた細胞に関する。

【0020】

本発明の上記の概要および以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読めばよりよく理解されるであろう。本発明は、図面に示した厳密な実施形態に限定されないことを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1A】HIVエンベロープタンパク質の構造の概略図である。全長HIVエンベロープタンパク質を示す。

【図1B】HIVエンベロープタンパク質の構造の概略図である。膜貫通ドメイン(TM)がGCN4三量体形成ドメインで置換され、フューリン切断部位が変異(sC4)した、本発明の実施形態による可溶性一本鎖HIVエンベロープタンパク質の構造を示す。

【図1C】HIVエンベロープタンパク質の構造の概略図である。本発明の実施形態による、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの断片(C4D7)を含む膜結合HIVエンベロープタンパク質の構造を示す。

【図2】本発明の実施形態による、さらなるC末端三量体形成ドメインを有するmos2Envモザイク抗原配列および可溶性合成HIVエンベロープタンパク質(sC4)に基づく可溶性sC1エンベロープタンパク質の発現レベルを示す。発現は、gp120に対するポリクローナル抗体を用いた定量的ウェスタンブロットによって測定した。sC1またはsC4をコードするプラスミドを一過的に2回発現させ、各トランスフェクションを

デンシトメトリーで2回定量した。sC1タンパク質は、比較的高い発現レベルを示したsC4合成HIVエンベロープタンパク質と比較して、非常に低い発現レベルを示した。

【図3A】ELISAアッセイによって決定された可溶性CD4の存在下(薄灰色)および非存在下(暗灰色)におけるモノクローナル抗体17b(mAb17b)との合成HIVエンベロープタンパク質の結合を示す。sC1の結合を示す。

【図3B】ELISAアッセイによって決定された可溶性CD4の存在下(薄灰色)および非存在下(暗灰色)におけるモノクローナル抗体17b(mAb17b)との合成HIVエンベロープタンパク質の結合を示す。sC4の結合を示す。

【図4】sC1タンパク質およびsC4合成HIVエンベロープタンパク質の未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動からのウェスタンブロットの画像である。

【図5】膜結合C1、C1D7、C4およびC4D7合成HIVエンベロープタンパク質を発現する細胞の抗gp120ポリクローナル抗体(GP120)を用いたFACS分析により、および四次構造依存性であり、正しく折り畳まれたEnv三量体に優先的に結合する、広範に中和する抗体PG9(PG9)およびPG16(PG16)に結合することにより、膜結合C1、C1D7、C4およびC4D7合成HIVエンベロープタンパク質の相対的な細胞表面発現レベルを示す。

【図6】複数のウイルス継代後の全長C4(FLC4)、C4D7およびsC4を含む本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードする配列を含むアデノウイルスベクターの安定性のグラフ表示である。組換えアデノウイルス26ベクターは、PER.C6細胞において生成された。トランスフェクションおよびブランク精製のための最初の3継代

の後、5つのブランクを選択し、T25形式で、10継代でアップスケールし、総ウイルス継代数(vpn)13となった。E1導入遺伝子カセットポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって決定されるvpn3,5,10および13の後の安定性が示される。例えば、3/5は、試験した5つのブランクのうち3つのブランクが安定であったことを意味し、5/5は、試験した5つのブランクのうち5つのブランクが安定であったことを意味する。

【図7A】ウサギのTZM-b1細胞ベースの中和アッセイにおけるHIV-1エンベロープシュードタイプウイルス粒子(EVP)に対するウイルス中和力価を示す。高アデノウイルスベクター投与群のlog10-形質転換IC50値を、1,8,14および20週目にEVP VSV-G(陰性対照)およびMW965.26(ティア1AクレードC

10

20

30

40

50

）に対して測定した。各ドットは個々のウサギの  $\log_{10}$ -形質転換  $IC_{50}$  値を表し、グループ平均は水平線で示される。HD：試験した最高希釈液（上の実線）。LD：試験した最低希釈液（下の実線）。LOB：バックグラウンド限界、コンパイルされた陰性試料の95パーセンタイル値（点線）。LDまたはHD閾値を超える  $\log_{10}$   $IC_{50}$  値を対応する線に設定した。合わせた順位のためダン法を用いた対照との一方向ノンパラメトリック比較を、各時点について行った。統計的に有意な差異がグラフに示される： $* = P < 0.05$ 、 $** = P < 0.01$ 、および $*** = P < 0.001$ 。VSV-G（陰性対照）による結果を示す。

【図7B】ウサギのTZM-bl細胞ベースの中和アッセイにおけるHIV-1エンベロープシュードタイプウイルス粒子（EVP）に対するウイルス中和力価を示す。高アデノウイルスベクター投与群の  $\log_{10}$ -形質転換  $IC_{50}$  値を、1, 8, 14および20週目にEVP VSV-G（陰性対照）およびMW965.26（ティア1AクレードC）に対して測定した。各ドットは個々のウサギの  $\log_{10}$ -形質転換  $IC_{50}$  値を表し、グループ平均は水平線で示される。HD：試験した最高希釈液（上の実線）。LD：試験した最低希釈液（下の実線）。LOB：バックグラウンド限界、コンパイルされた陰性試料の95パーセンタイル値（点線）。LDまたはHD閾値を超える  $\log_{10}$   $IC_{50}$  値を対応する線に設定した。合わせた順位のためダン法を用いた対照との一方向ノンパラメトリック比較を、各時点について行った。統計的に有意な差異がグラフに示される： $* = P < 0.05$ 、 $** = P < 0.01$ 、および $*** = P < 0.001$ 。MW965.26（ティア1AクレードC）による結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

様々な刊行物、論文および特許は、背景および本明細書を通して引用または記載されている。これらの参考文献はそれぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれた文献、法令、物質、デバイス、論文などの議論は、本発明の状況を提供することを目的とするものである。そのような議論は、これらの事項のいずれかまたはすべてが、開示または特許請求された任意の発明に関する先行技術の一部を形成するということを認めるものではない。

【0023】

他に定義されない限り、本明細書で用いるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。そうでなければ、本明細書で用いる一部の特定の用語は、本明細書に示した意味を有する。本明細書において引用したすべての特許、公開特許出願および刊行物は、本明細書に完全に記載されているかのように参照により組み込まれる。本明細書で用いる場合、および添付の特許請求の範囲において、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈がそうでないことを明示していない限り、複数の言及を包含していることに注意されたい。

【0024】

本明細書で用いる場合、「対象」は、本発明の実施形態によるベクター、組成物または組み合わせワクチンを投与されるか、または投与された任意の動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを意味する。用語「哺乳動物」は、本明細書で用いる場合、任意の哺乳動物を包含している。哺乳動物の例としては、限定されないが、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、ヒトなど、より好ましくはヒトが挙げられる。

【0025】

本発明は、一般的に、合成HIVエンベロープタンパク質、合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸およびベクター、ならびに合成HIVエンベロープタンパク質または合成HIVエンベロープタンパク質をコードするベクターを、単独で、または1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つ以上のさらなるベクターと組み合わせて、および/または1つ以上のさらなる単離されたHIV抗原性ポリペプチドと組み合わせて用いて、HIVに対する免疫応答を誘導する方法に関する。

## 【0026】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、レトロウイルス(Retroviridae)科の一部であるレンチウイルス(Lentivirinae)属のメンバーである。2つの種のHIV: HIV-1およびHIV-2がヒトに感染する。HIV-1は、最も一般的なHIVウイルス株であり、HIV-2よりも病原性であることが知られている。本明細書で用いる場合、用語「ヒト免疫不全ウイルス」および「HIV」は、限定されないがHIV-1およびHIV-2をいう。

## 【0027】

HIVは、高度な遺伝的分岐を有する複数のクレードに分類される。本明細書で用いる場合、用語「HIVクレード」または「HIVサブタイプ」は、遺伝的類似性の度合に従って分類された関連するヒト免疫不全ウイルスを指す。現在、3つのグループのHIV-1分離株: M、NおよびOが存在している。グループM(主系統)は、少なくとも10個のクレードA~Jからなる。グループO(分類外系統)は、同様の数のクレードからなり得る。グループNは、グループMまたはOのいずれにも分類されていない新型のHIV-1分離株である。

10

## 【0028】

本明細書で用いる場合、用語「HIV抗原性ポリペプチド」、「HIV抗原性タンパク質」、および「HIV免疫原」は、HIVに対する免疫応答、例えば体液性および/または細胞性の媒介性応答を、対象において誘導し得るポリペプチドをいう。抗原性ポリペプチドは、HIVに対して、免疫応答を、対象において誘導し得るか、または免疫、例えば防御免疫を、それを必要とする対象において生じ得るHIVのタンパク質、その断片もしくはエピトープ、または複数種のHIVタンパク質もしくはその一部分の組み合わせであり得る。

20

## 【0029】

好ましくは、抗原性ポリペプチドは、宿主において、対象をウイルス性疾患またはウイルス感染から防御する防御免疫応答を起こし得る、例えばウイルス性疾患もしくはウイルス感染に対する免疫応答を誘導し得る、および/または対象においてウイルス性疾患もしくはウイルス感染に対する免疫を生じさせ得る(すなわち、ワクチン接種される)ものである。例えば、抗原性ポリペプチドには、サル免疫不全ウイルス(SIV)またはHIVのタンパク質またはその断片、例えばHIVまたはSIVのエンベロープgp160タンパク質、HIVまたはSIVのマトリックス/カプシドタンパク質、ならびにHIVまたはSIVのgag、polおよびenv遺伝子産物が包含され得る。

30

## 【0030】

HIV抗原性ポリペプチドはHIV-1もしくはHIV-2抗原またはその断片であり得る。HIV抗原の例としては、限定されないが、gag、pol、およびenv遺伝子産物(これらは、構造タンパク質および必須酵素をコードする)が挙げられる。gag、pol、およびenv遺伝子産物はポリタンパク質として合成され、これはさらに、複数種の他のタンパク質産物にプロセッシングされる。gag遺伝子の一次タンパク質産物はウイルスの構造タンパク質gagポリタンパク質であり、これはさらに、MA、CA、SP1、NC、SP2およびP6タンパク質産物にプロセッシングされる。pol遺伝子は、ウイルスの酵素(Pol、ポリメラーゼ)をコードしており、一次タンパク質産物はさらに、RT、RNase H、INおよびPRタンパク質産物にプロセッシングされる。env遺伝子は、構造タンパク質、具体的にはビリオンエンベロープの糖タンパク質をコードする。env遺伝子の一次タンパク質産物はgp160であり、これはさらにgp120およびgp41にプロセッシングされる。HIV抗原の他の例としては、遺伝子調節タンパク質TatおよびRev; アクセサリータンパク質Nef、Vpr、VifおよびVpu; カプシドタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質、ならびにp24ウイルスタンパク質が挙げられる。

40

## 【0031】

特定の実施形態では、HIV抗原性ポリペプチドは、HIVのGag、Envもしくはは

50

P o l 抗原またはその任意の抗原性部分もしくはエピトープまたはその組み合わせ、好ましくは、H I V - 1 の G a g、E n v もしくは P o l 抗原またはその任意の抗原性部分もしくはエピトープまたはその組み合わせを含む。

【 0 0 3 2 】

H I V 抗原性ポリペプチドは、モザイク H I V 抗原であってもよい。本明細書で用いる場合、「モザイク抗原」は、天然配列の断片からアSEMBLされる組換えタンパク質を指す。モザイク抗原は、天然抗原と類似しているが、天然配列にみられる潜在的 T 細胞エピトープの適用範囲が最大限となり、それにより免疫応答の幅および適用範囲が改善されるように最適化されている。本発明で使用するためのモザイク H I V 抗原は、好ましくはモザイク G a g、P o l、および/または E n v 抗原、より好ましくはモザイク H I V - 1 G a g、P o l、および/または E n v 抗原である。本明細書で用いる場合、「モザイク H I V G a g、P o l、および/または E n v 抗原」は具体的には、H I V の G a g、P o l および/または E n v ポリタンパク質配列のうちの 1 つ以上に由来する複数種のエピトープを含むモザイク抗原を指す。

【 0 0 3 3 】

一実施形態では、本発明で使用するためのモザイク H I V 抗原は、g a g 遺伝子産物の配列に由来するエピトープを有するモザイク H I V G a g 抗原（例は配列番号 1, 2 に提供される）；p o l 遺伝子産物の配列に由来するエピトープを有するモザイク H I V P o l 抗原（例は配列番号 3, 4 に提供される）；または e n v 遺伝子産物の配列に由来するエピトープを有するモザイク H I V E n v 抗原（例は配列番号 5, 6 に提供される）；本発明の新規抗原、例えば、配列番号 8, 17, 18, 19 に提供されるものもまた、モザイク H I V E n v 抗原とみなし得る）である。特定の実施形態では、本発明で使用するためのモザイク H I V 抗原は、g a g、p o l、および/または e n v 遺伝子産物の配列に由来するエピトープの組み合わせを含んでもよい。実例としての非限定的な例としては、e n v および p o l の遺伝子産物の配列に由来するエピトープを有するモザイク E n v - P o l 抗原；g a g および p o l の遺伝子産物の配列に由来するエピトープを有するモザイク G a g - P o l 抗原；ならびに g a g および e n v の遺伝子産物の配列に由来するエピトープを有するモザイク G a g - E n v 抗原が挙げられる。g a g、p o l、および e n v 遺伝子産物の配列は、1 つ以上のクレード由来であり得る。

【 0 0 3 4 】

本発明において使用することができるモザイク H I V G a g、P o l、および/または E n v 抗原の例としては、例えば U S 2 0 1 2 0 0 7 6 8 1 2 ; B a r o u c h e t a l . , N a t M e d 2 0 1 0 , 1 6 : 3 1 9 - 3 2 3 ; および B a r o u c h e t a l . , C e l l 1 5 5 : 1 - 9 , 2 0 1 3 に記載のものが挙げられ、これらはすべて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。好ましくは、本発明での使用のためのモザイク H I V G a g、P o l および/または E n v 抗原としては、限定されないが、m o s 1 G a g（配列番号 1）、m o s 2 G a g（配列番号 2）、m o s 1 P o l（配列番号 3）、m o s 2 P o l（配列番号 4）、m o s 1 E n v（配列番号 5）、m o s 2 E n v（配列番号 6）、m o s 1 G a g P o l（配列番号 28）、m o s 2 G a g P o l（配列番号 29）、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

【 0 0 3 5 】

本明細書で用いる場合、用語「H I V エンベロープタンパク質」、「e n v タンパク質」および「E n v」の各々は、H I V ビリオンのエンベロープ上に発現し、H I V が H I V 感染細胞の原形質膜を標的としこれに付着することを可能にするタンパク質、または H I V に対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導し得るか、もしくは免疫を、それを必要とする対象において生じさせ得るその断片または誘導體を指す。H I V e n v 遺伝子は、2 つの成熟エンベロープ糖タンパク質 g p 1 2 0 および g p 4 1 へとタンパク質分解的に切断される前駆体タンパク質 g p 1 6 0 をコードする。切断反応は、レトロウイルスエンベロープ糖タンパク質前駆体において高度に保存された配列で、宿主細胞プロテアーゼ、フューリンによって媒介される。より具体的には、g p 1 6 0 は ( g p 1

10

20

30

40

50

60) <sub>3</sub> に三量体化し、次いで、2つの非共有結合的に会合した gp120 および gp41 への切断を受ける。続いて、ウイルスの侵入が、gp120 / gp41 ヘテロ二量体の三量体によって媒介される。gp120 は受容体結合断片であり、標的細胞上の CD4 受容体に結合する(標的細胞は、そのような受容体を有するもの、例えば T-ヘルパー細胞などである)。gp41 は、gp120 に非共有結合しており、融合断片であり、HIV が細胞に侵入する第2工程を提供する。gp41 は、最初はウイルスエンベロープ内に埋もれているが、gp120 が CD4 受容体に結合すると、gp120 のコンフォメーションが変化して gp41 が露出状態になることが引き起こされ、このとき、宿主細胞との融合が補助され得る。gp140 は、天然状態の切断されたウイルススパイクのサロゲートとして使用されている三量体型 gp160、すなわち (gp160)<sub>3</sub> の切断されていないエクストドメインである。

10

#### 【0036】

本発明の実施形態によれば、「HIVエンベロープタンパク質」は、gp160、gp140、gp120、gp41 タンパク質、それらの組み合わせ、融合物、トランケーションまたは誘導体であり得る。例えば、「HIVエンベロープタンパク質」は、gp41 タンパク質と非共有結合的に結合した gp120 タンパク質を含み得る。これはまた、gp140 の三量体を安定化する三量体形成ドメインを有し得る、またはこれを含むように修飾され得る、安定化された三量体 gp140 タンパク質を含み得る。三量体化ドメインの例としては、限定されないが、T4-フィブリチン「フォールドン」三量体化ドメイン；GCN4 に由来するコイルドコイル三量体化ドメイン；および三量体タグとしての大腸菌 (*E. coli*) アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼの触媒性サブユニットが挙げられる。「HIVエンベロープタンパク質」はまた、エクストドメイン(すなわち、細胞外空間に伸びるドメイン)中のC末端トランケーション、gp41 の膜貫通ドメイン中のトランケーションなどの gp41 中のトランケーション、または gp41 の細胞質ドメイン中のトランケーションを含む、エンベロープタンパク質を含むが、これに限定されない、切断型(truncated) HIVエンベロープタンパク質であり得る。「HIVエンベロープタンパク質」はさらに、例えば、フューリン切断部位および/またはいわゆる SOSIP 変異において、配列変異を有する天然に存在する HIVエンベロープタンパク質の誘導体であり得る。

20

#### 【0037】

好ましくは、「HIVエンベロープタンパク質」は、「合成 HIVエンベロープタンパク質」である。本明細書中で用いる場合、用語「合成 HIVエンベロープタンパク質」は、免疫応答を誘導するか、またはそれを必要とする対象における1つ以上の天然に存在する HIV 株に対する免疫を生じるように最適化された天然に存在しない HIVエンベロープタンパク質を指す。モザイク HIV Env タンパク質は、合成 HIV Env タンパク質の例であり、本発明は、新規合成 HIV Env 抗原、例えば、配列番号 8、17、18、または 19 を含むものを提供する。

30

#### 【0038】

合成 HIVエンベロープタンパク質およびそのコード配列

本発明の実施形態は、新規合成 HIVエンベロープタンパク質およびこれらをコードする核酸分子に関する。

40

#### 【0039】

一実施形態では、配列番号 8、または (i) I529P、(ii) K480E、および (iii) EK479-480RRRR、I529P、A471C および T575C の組み合わせ、からなる群から選択される1つ以上の変異を有する配列番号 8、のアミノ酸配列を含む合成 HIVエンベロープタンパク質に関する。配列番号 8 は、膜貫通領域も細胞質ドメインも含まない合成成熟型 gp120 および合成切断型 gp41 を含む。配列番号 8 は、mos2Env モザイク抗原(配列番号 6)由来の配列のキメラおよび他の HIVエンベロープタンパク質配列からなる天然に存在しない配列である。配列番号 8 を含む新規合成 Env 抗原の配列は、(mos2Env 抗原(配列番号 6)と比較して) HIVク

50

リードCに対する幅広い適用範囲および増強されたT細胞応答を提供するように最適化される。特定の実施形態では、さらなるアミノ酸は、本明細書で定義される配列番号8またはその変異体の1つに付加され得る。

#### 【0040】

特定の実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質はシグナル配列をさらに含む。合成HIVエンベロープタンパク質は、小胞体(ER)の内腔への輸送中に新生ポリペプチド鎖から切断されるシグナル配列で合成される。原則として、任意の既知のシグナル配列を使用することができる。好ましくは、HIV Envシグナル配列またはその変異体を使用される。異なるシグナル配列が、HIV Envタンパク質について本技術分野で使用されている(国際公開2014/107744号パンフレットを参照)。特定の実施形態では、シグナル配列は、配列番号9、配列番号10、配列番号11または配列番号12を含む。好ましい一実施形態では、シグナル配列は配列番号9を含む。

10

#### 【0041】

特定の実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は膜貫通ドメインをさらに含む。膜貫通ドメインは、合成HIVエンベロープタンパク質をER膜に固定し、HIVエンベロープの膜アセンブリおよび機能に寄与する。好ましくは、膜貫通ドメインは配列番号13を含む。

#### 【0042】

別の実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は、切断型細胞質ドメインを有するgp41を含む。gp41は、そのカルボキシル末端に、典型的には約150個のアミノ酸(Edwardsら、J. Virology、2002、76:2683-2691)の著しく長い細胞質ドメインを有する。細胞質ドメインのトランケーションは、HIV-1 Envタンパク質のエクトドメインにおける保存領域の曝露を誘導することが報告された(同上)。本発明の合成HIVエンベロープ中の切断型細胞質ドメインは、全長細胞質ドメインの1~約140アミノ酸、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、または140アミノ酸などの範囲であり得る。特定の実施形態では、切断型細胞質ドメインは、C末端までの所与のアミノ酸の後のトランケーションによる、配列番号17のアミノ酸704~862(すなわち、本発明のC4分子の細胞質ドメイン)に由来する。好ましい実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は、HIV gp41細胞質ドメインの1~10アミノ酸残基、より好ましくは4~8アミノ酸残基、最も好ましくは7アミノ酸残基を有する、切断型細胞質ドメインを含む。合成HIVエンベロープタンパク質の細胞質ドメインまたはその断片は、C末端から細胞外ドメイン(エクトドメイン)に位置し、合成HIVエンベロープタンパク質が膜貫通ドメインも含む場合、細胞質ドメインまたはその断片は、C末端から膜貫通ドメインに位置する。例えば、図1Aおよび図1Cを参照。特定の実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は、配列番号14のアミノ酸配列またはその断片、例えばその残基1~4(すなわち、NRVR)など、を有する切断型細胞質ドメインを有するgp41を含む。他の切断型細胞質ドメインが記載され、使用され得る(例えば、Schiermleら、PNAS 1997; Abrahamyanら、J. Virol 2005)。

20

30

40

#### 【0043】

合成HIVエンベロープタンパク質が、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインの断片をさらに含む実施形態では、タンパク質は配列番号37のアミノ酸配列をも含むことが好ましく、これは配列番号18の残基655~682を含み、配列番号37のアミノ酸配列は、配列番号8のC末端および膜貫通ドメインのN末端に融合される。

#### 【0044】

本発明の特に好ましい実施形態では、合成HIVエンベロープタンパク質は、配列番号13のアミノ酸配列を有するものなどの膜貫通ドメイン、および配列番号14のアミノ酸配列または配列番号14の残基1~4(すなわち、NRVR)を有するものなどの、切断型細胞質ドメイン、または細胞質ドメインの断片をさらに含む。最も好ましくは、合成H

50

ＩＶエンベロープタンパク質は、シグナル配列（すなわち、配列番号１８のアミノ酸残基１～２９）を有するまたは有しない、配列番号１８のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【００４５】

別の実施形態では、合成ＨＩＶエンベロープタンパク質は、Env膜貫通領域を置換する三量体形成ドメインを含む。三量体形成ドメインは、Env三量体構造の安定性を増加させる。好ましくは、合成ＨＩＶエンベロープタンパク質は、gp140の三量体を安定化する三量体形成ドメインを含むように改変されたgp140ポリペプチドを含む。三量体形成ドメインの例としては、限定されないが、配列番号１６のアミノ酸配列を含むものなどの、T4-フィブリチン「フォールドン（foldon）」三量体形成ドメイン；配列番号１５のアミノ酸配列を含むものなどの、GCN4に由来するコイルドコイル三量体形成ドメイン；三量体タグとしての大腸菌（E. coli）アスパラギン酸トランスカルバモイラーゼの触媒サブユニット；またはマトリリンベースの三量体形成モチーフが挙げられる。存在する場合、三量体形成ドメインは、典型的にはC末端から細胞外ドメインに位置する（図１Ｂ参照）。合成ＨＩＶエンベロープタンパク質が三量体形成ドメインを含む特定の好ましい実施形態では、合成ＨＩＶエンベロープタンパク質は、シグナル配列（すなわち、配列番号１９のアミノ酸残基１～２９）を有するまたは有しない、配列番号１９のアミノ酸配列を含む。三量体形成ドメインを有するこれらの実施形態は、主に、合成ＨＩＶエンベロープタンパク質の可溶性エクトドメイン変異体に有用である。本発明のそのような可溶性変異体の特定の実施形態では、この切断部位を不活性化するためにフューリン切断部位を変異（例えば、配列番号８の４８０位でのLysからGluへの変異）させることが可能であり、その結果、タンパク質は一本鎖となり；これは三量体形成ドメイン、特に配列番号１９のGCN4三量体形成ドメインと良好に結合する。

【００４６】

三量体形成ドメインを使用しない合成ＨＩＶエンベロープタンパク質のそのような可溶性エクトドメイン変異体の代替的なバージョンもまた本発明の実施形態であり、フューリン切断部位を最適化する変異（４７９～４８０位でのGly-Lysジペプチドの４つのArg残基による置換）、およびいわゆるSOSIP変異（５２９位でのI>P変異、および位置４７１～５７５間の、配列番号８の位置における各AlaおよびThrの、それぞれCys残基での置換による、ジスルフィド架橋の導入）を組み合わせることにより、配列番号８から調製することができる。これにより、以下の変異の組み合わせ：EK479-480RRRR、I529P、A471CおよびT575C、を有する配列番号８のアミノ酸配列を有するタンパク質が得られる。

【００４７】

本発明の合成ＨＩＶエンベロープタンパク質（配列番号８を含む）の三量体含有量をさらに増加させるための１つの可能な改変は、５２９位でのIleからProへの改変である。これは可溶性および膜結合変異体の両方に有効であり得る。

【００４８】

ベクター

本発明の別の一般的な態様は、合成ＨＩＶエンベロープタンパク質をコードする核酸を含むベクターに関する。本発明の実施形態によれば、ベクターは、本明細書に記載の合成ＨＩＶエンベロープタンパク質のいずれかを含み得る。本発明の好ましい実施形態では、ベクターは、配列番号８、配列番号１７、配列番号１８、または配列番号１９、より好ましくは配列番号１８、のアミノ酸配列を含む合成ＨＩＶエンベロープタンパク質をコードする核酸を含む。

【００４９】

本発明の実施形態によれば、合成ＨＩＶエンベロープタンパク質をコードする核酸は、プロモーターに作動可能に連結され、これは核酸がプロモーターの制御下にあることを意味する。プロモーターは、相同プロモーター（すなわち、ベクターと同じ遺伝子源に由来する）または異種プロモーター（すなわち、異なるベクターまたは遺伝子源に由来する）

10

20

30

40

50

であり得る。好適なプロモーターの例としては、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターおよびラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターが挙げられる。好ましくは、プロモーターは、発現カセット内の核酸の上流に位置する。合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸に作動可能に連結され得る例示的なCMVプロモーター配列は、配列番号24に示される。

#### 【0050】

本発明の実施形態によれば、ベクターは発現ベクターであり得る。発現ベクターとしては、限定されないが、組換えタンパク質発現のためのベクター、およびウイルスベクターなどの対象の組織における発現のために核酸を対象に送達するためのベクターが挙げられるが、これに限定されない。本発明での使用に好適なウイルスベクターの例としては、限定されないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、MVAベクター、腸内ウイルスベクター、ベネズエラウマ脳炎ウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、タバコモザイクウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられる。ベクターは、非ウイルスベクターであってもよい。非ウイルスベクターの例としては、限定されないが、プラスミド、細菌人工染色体、酵母人工染色体、バクテリオファージなどが挙げられる。

#### 【0051】

本発明の特定の実施形態では、ベクターはアデノウイルスベクターである。本発明によるアデノウイルスはアデノウイルス(Adenoviridae)科に属しており、好ましくは、マスタデノウイルス(Mastadenovirus)属に属するものである。これはヒトアデノウイルスであり得るが、また、他の種に感染するアデノウイルス、例えば限定されないが、ウシアデノウイルス(例えば、ウシアデノウイルス3、BADV3)、イヌアデノウイルス(例えば、CADV2)、ブタアデノウイルス(例えば、PADV3もしくは5)またはサル(simian)アデノウイルス(これには、サル(monkey)アデノウイルスおよび類人猿アデノウイルス、例えばチンパンジーアデノウイルスもしくはゴリラアデノウイルスが包含される)であってもよい。好ましくは、アデノウイルスは、ヒトアデノウイルス(HAdVもしくはAdHu)またはチンパンジーもしくはゴリラアデノウイルス(ChAd、AdChもしくはSAdV)などのサル(simian)アデノウイルスである。本発明において、種の表示なしでAdと称する場合はヒトアデノウイルスを意図しており、例えば短い表記「Ad26」は、ヒトアデノウイルス血清型26であるHAdV26と同じものを意味する。また、本明細書で用いる場合、表記「rAd」は組換えアデノウイルスを意味し、例えば「rAd26」は組換えヒトアデノウイルス26を指す。

#### 【0052】

ヒトアデノウイルスを用いて非常に高度な研究が実施されており、本発明の一部の特定の態様によればヒトアデノウイルスが好ましい。一部の特定の好ましい実施形態では、本発明による組換えアデノウイルスはヒトアデノウイルスをベースにしたものである。好ましい実施形態では、組換えアデノウイルスは、ヒトアデノウイルス血清型5、11、26、34、35、48、49、50、52などをベースにしたものである。本発明の特に好ましい実施形態によれば、アデノウイルスは、血清型26のヒトアデノウイルスである。この血清型の利点の1つは、ヒト集団における低い血清有病率および/または低い先在中和抗体力価、ならびに臨床試験におけるヒト対象での使用経験である。

#### 【0053】

また、サルアデノウイルスも一般的には、ヒト集団において低い血清有病率および/または低い先在中和抗体力価を有し、チンパンジーアデノウイルスベクターを用いた相当量の研究が報告されている(例えば、米国特許6083716号明細書;国際公開第2005/071093号パンフレット;国際公開第2010/086189号パンフレット;国際公開第2010/085984号パンフレット;Farina et al, 2001, J Virol 75:11603-13[13];Cohen et al, 2002, J Gen Virol 83:151-55[69];Kobinger e

10

20

30

40

50

t al, 2006, *Virology* 346:394-401 [70]; Tatsi  
s et al., 2007, *Molecular Therapy* 15:608-1  
7 [71]; また、Bangari and Mittal, 2006, *Vaccine*  
24:849-62 [72] による概説; および Lasaro and Ertl, 2  
009, *Mol Ther* 17:1333-39 [73] による概説も参照のこと)。  
したがって、他の実施形態では、本発明による組換えアデノウイルスは、サルアデノウ  
イルス、例えばチンパンジーアデノウイルスをベースにしたものである。一部の特定の実施  
形態では、組換えアデノウイルスは、サルアデノウイルス型 1、7、8、21、22、2  
3、24、25、26、27.1、28.1、29、30、31.1、32、33、34  
、35.1、36、37.2、39、40.1、41.1、42.1、43、44、45  
、46、48、49、50 または SA7P をベースにしたものである。

10

## 【0054】

好ましくは、アデノウイルスベクターは、複製欠損組換えウイルスベクター、例えば r  
Ad26、rAd35、rAd48、rAd5HVR48 などである。

## 【0055】

本発明の好ましい実施形態では、アデノウイルスベクターは、Ad26 を含む稀な血清  
型由来のカプシドタンパク質を含む。典型的な実施形態では、ベクターは rAd26 ウ  
イルスである。「アデノウイルスカプシドタンパク質」は、具体的なアデノウイルスの血清  
型および/または指向性の決定に関与しているアデノウイルス(例えば、Ad26、Ad  
35、rAd48、rAd5HVR48 ベクター)のカプシドのタンパク質を指す。アデ  
ノウイルスのカプシドタンパク質としては典型的には、ファイバー、ペントンおよび/ま  
たはヘキソタンパク質が挙げられる。本明細書で用いる場合、具体的なアデノウイルス  
の「カプシドタンパク質」、例えば「Ad26 カプシドタンパク質」は、例えば Ad26  
カプシドタンパク質の少なくとも一部分を含むキメラカプシドタンパク質であり得る。一  
部の特定の実施形態では、カプシドタンパク質は Ad26 のカプシドタンパク質全体であ  
る。特定の実施形態では、ヘキソン、ペントンおよびファイバーが Ad26 のものである  
。

20

## 【0056】

当業者には、複数の血清型に由来する要素を合わせて単一の組換えアデノウイルスベク  
ターにしてもよいことが認識されよう。したがって、異なる血清型の望ましい特性を兼ね  
備えたキメラアデノウイルスが産生され得る。したがって、一部の実施形態では、本発明  
のキメラアデノウイルスは、第1の血清型の先在免疫の非存在と、例えば温度安定性、ア  
センブリ、アンカリング、調製歩留り、再指令または改善された感染、標的細胞内での D  
NA の安全性などの特性とを兼ね備えたものであり得る。

30

## 【0057】

特定の実施形態では、本発明に有用な組換えアデノウイルスベクターは主に、または完  
全に Ad26 に由来するものである(すなわち、ベクターは rAd26 である)。一部の  
実施形態では、アデノウイルスは、例えばゲノムの E1 領域内に欠失を含有しているため  
複製欠損である。Ad26 または Ad35 などの非グループ C アデノウイルスに由来する  
アデノウイルスでは、アデノウイルスの E4-orf6 コード配列を、Ad5 などのヒト  
サブグループ C のアデノウイルスの E4-orf6 と置換することが典型的である。これ  
により、そのようなアデノウイルスの増殖が、Ad5 の E1 遺伝子を発現する周知の相補  
性細胞株、例えば 293 細胞、PER.C6 細胞などにおいて可能になる(例えば、Ha  
venga, et al., 2006, *J Gen Virol* 87:2135-43  
; 国際公開第 03/104467 号パンフレットを参照のこと)。しかしながら、そのよ  
うなアデノウイルスは、Ad5 の E1 遺伝子を発現しない非相補性細胞では複製され得な  
い。

40

## 【0058】

組換えアデノウイルスベクターの調製は当該分野で公知である。rAd26 ベクターの  
調製は、例えば、国際公開第 2007/104792 号パンフレットおよび Abbinck

50

et al., (2007) *Virology* 81(9): 4654-63に記載されている。Ad26の例示的なゲノム配列は、GenBank Accession EF153474および国際公開第2007/104792号パンフレットの配列番号1に見出される。本発明に有用なベクターの例としては、例えば、国際公開第2012/082918号パンフレット（その開示内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載のものが挙げられる。

#### 【0059】

典型的には、本発明に有用なベクターは、組換えアデノウイルスゲノム全体を含む核酸（例えば、プラスミド、コスミド、またはバキュロウイルスベクター）を用いて調製される。したがって、本発明により、本発明のアデノウイルスベクターをコードする単離された核酸分子もまた提供する。本発明の核酸分子はRNAの形態、またはクローニングによって得られるか、もしくは合成により産生されるDNAの形態であり得る。DNAは二本鎖であっても一本鎖であってもよい。

10

#### 【0060】

本発明に有用なアデノウイルスベクターは典型的には複製欠損である。このような実施形態では、ウイルスは、ウイルスの複製に極めて重要な領域、例えばE1領域の欠失または不活性化によって複製欠損にする。領域は、例えば、目的の遺伝子、例えば、合成HIVエンベロープタンパク質（通常、プロモーターに連結されている）をコードする遺伝子、またはHIV抗原性ポリペプチド（通常、プロモーターに連結されている）をコードする遺伝子を領域内に挿入することによって実質的に欠失または不活性化され得る。いくつかの実施形態では、本発明のベクターは、E2、E3もしくはE4領域などの他の領域内に欠失、またはこれらの領域内の1つ以上に、プロモーターに連結させた異種遺伝子の挿入を含み得る。E2 - および / または E4 - 変異型アデノウイルスでは、一般的には、E2 - および / または E4 - 相補性細胞株が組換えアデノウイルスを調製するために使用される。アデノウイルスのE3領域内の変異では、E3が複製に必要とされないため細胞株によって補完される必要はない。

20

#### 【0061】

本発明に用いるためのアデノウイルスベクターを十分な量で調製するため、パッケージング細胞株が典型的に使用される。パッケージング細胞は、複製欠損ベクター内に欠失または不活性化されているこれらの遺伝子を含んでいる細胞であり、したがって、細胞内でウイルスは複製できる。E1領域における欠失を有するアデノウイルスに好適なパッケージング細胞株としては、例えばPER.C6、911、293およびE1A549が挙げられる。

30

#### 【0062】

本発明の実施形態によれば、上述のように、本明細書に記載の合成HIVエンベロープタンパク質のいずれかを本発明のベクターで発現させることができる。遺伝コードの縮重に鑑みて、当業者は、本技術分野において完全に常用である方法に従って、同じタンパク質をコードするいくつかの核酸配列を設計できることを十分に承知している。合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸は、任意選択により、処置する宿主（例えば、ヒト）における適正な発現が確実となるようコドン最適化することができる。コドン最適化は、当分野で広く応用されている技術である。本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードする配列のいくつかの非限定的な例は、配列番号25、26および27に提供される。典型的には、合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸は、アデノウイルスゲノムのE1および / または E3領域にクローニングされる。

40

#### 【0063】

本発明の好ましい実施形態では、ベクターはアデノウイルスベクター、より好ましくはrAd26ベクター、最も好ましくはアデノウイルスゲノムのE1領域に少なくとも1つの欠失を有するrAd26ベクター、例えば、AbbinK、*J Virology*, 2007, 81(9): p. 4654-63に記載されるものである。

#### 【0064】

50

本発明はまた、本明細書に記載のベクターのいずれかを含む細胞、好ましくは単離された細胞を提供する。細胞は、組換えタンパク質産生のため、またはウイルス粒子の産生のために使用することができる。

【0065】

したがって、本発明の実施形態は、合成HIV抗原性ポリペプチドを作製する方法にも関する。本方法は、プロモーターに作動可能に連結された合成HIV抗原性ポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクトすること、合成HIV抗原性ポリペプチドの発現に好適な条件下でトランスフェクトされた細胞を増殖させること、合成HIV抗原性ポリペプチドを細胞から単離することを含む。合成HIV抗原性ポリペプチドは、アフィニティークロマトグラフィーなどを含む当該分野で公知の任意の方法によって細胞から単離または回収することができる。組換えタンパク質発現のために使用される技術は、本開示に鑑みた当業者に周知である。

10

【0066】

本発明はまた、本発明の合成HIV抗原ポリペプチドをコードするベクターを製造する方法を含み、本方法は、ベクターを含む細胞を培養して、前記培養中にベクターを増殖および増加させること、および本発明の合成HIV抗原性ポリペプチドをコードするベクターを、細胞培養物、例えば細胞から、培養培地から、またはその両方から単離することを含む。ベクターは、当該分野で公知の方法に従ってさらに精製されてもよい。

【0067】

特定の実施形態では、本発明は、合成HIV抗原性ポリペプチドをコードする核酸を含む本発明の実施形態によるベクターを提供し、特定の例示的な実施形態では、核酸は、配列番号25、26および27からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する。

20

【0068】

組成物

別の一般的な態様において、本発明は、合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸および担体を含むベクターを含む組成物に関する。本発明の実施形態によれば、本明細書に記載のベクターのいずれかが組成物に含まれる。好ましくは、ベクターはウイルスベクター、より好ましくはアデノウイルスベクター、さらにより好ましくはアデノウイルス26ベクターである。好ましい実施形態では、組成物は、配列番号8、配列番号18、または配列番号19のアミノ酸配列、より好ましくは配列番号18のアミノ酸配列を含む、合成HIVエンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターを含む。

30

【0069】

一態様では、本発明は、(i)配列番号8のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質(例えば、配列番号18または19)および(ii)配列番号5のアミノ酸配列を含む第2のHIVエンベロープタンパク質、をコードする核酸配列を共に含む1つ以上のベクターを含む組み合わせワクチンを提供する。ベクターは、それぞれ別個の組成物中に存在してもよく、または単一の組成物中に組み合わせられてもよい。ベクター中の両方の核酸は、一対象に投与されることが意図され、これは、いずれかのベクター単独の投与で得られるであろう免疫応答よりも広いHIVに対する免疫応答をもたらす。両方の核酸配列は、単一のベクター上に存在していてもよい。

40

【0070】

本発明の実施形態によれば、組成物は、ウイルスベクターなどの、免疫原的有効量のベクターを含む。本明細書で用いる場合、「免疫原的有効量」または「免疫学的有効量」は、所望の免疫効果または免疫応答が、それを必要とする対象において誘導されるのに十分な組成物の量を意味する。一実施形態では、免疫原的有効量は、免疫応答が、それを必要とする対象において誘導されるのに十分な量を意味する。別の実施形態では、免疫原的有効量は、免疫が、それを必要とする対象において生じる、例えばウイルス感染などの疾患に対する防御効果をもたらされるのに十分な量を意味する。免疫原的有効量は、様々な要素、例えば対象の体調、年齢、体重、健康状態など;免疫応答を誘導するのか防御免疫を

50

もたらずの具体的な用途；投与される具体的な組換えベクター；投与される組換えベクターにコードされた免疫原または抗原性ポリペプチド；投与される具体的な抗原性ポリペプチド；および免疫が所望される具体的な疾患（例えば、ウイルス感染）に応じて異なり得る。免疫原の有効量は、本開示に鑑みた当業者によって容易に決定され得る。

#### 【0071】

一般的な手引きとして、アデノウイルスベクターなどの組換えウイルスベクターに関して用いる場合の免疫原の有効量は、約 $10^8$ ウイルス粒子～約 $10^{12}$ ウイルス粒子の範囲、例えば $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ または $10^{12}$ ウイルス粒子であり得る。免疫原の有効量は単一の組成物で投与してもよく、複数の組成物、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10種類の組成物（例えば、錠剤、カプセル剤または注射剤）で投与してもよく、この場合、複数のカプセル剤または注射剤の投与が全体で対象に免疫原の有効量をもたらす。一般に、ポリペプチド、例えば単離された抗原性ポリペプチドに関して用いる場合、免疫原の有効量は、例えば約0.3～約3000マイクログラム（ $\mu\text{g}$ ）、例えば1～1000 $\mu\text{g}$ 、例えば10～500 $\mu\text{g}$ の範囲、例えば約10、50、100、150、200、250、300、350、400、450または500 $\mu\text{g}$ であり得る。非限定的な例として、本発明の合成HIV Env抗原（配列番号8を有する）をコードするベクターの投与を、Envポリペプチド、例えば、配列番号7のアミノ酸30～708を有する250 $\mu\text{g}$ のHIVクレードC Env三量体タンパク質、の投与と組み合わせることが可能である。また、免疫原の有効量を対象に投与し、続いて別の用量の免疫原の有効量を同じ対象に、いわゆるプライム-ブーストレジメンで投与することも可能である。プライム-ブーストレジメンのこの一般的概念はワクチン分野の当業者には周知である。必要に応じて、さらなるブースター投与を任意選択によりレジメンに加えてもよい。

#### 【0072】

本発明の組成物は、担体をさらに含む。担体は、結合剤、崩壊剤、膨潤剤、懸濁化剤、乳化剤、湿潤剤、潤滑剤、香料、甘味料、保存料、染料、可溶化剤およびコーティングなどの1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含み得る。担体または他の物質の厳密な性質は、投与経路、例えば筋肉内、皮下、経口、静脈内、経皮、粘膜内（例えば、腸）、鼻腔内または腹腔内経路、に依存し得る。液体注射剤、例えば懸濁液および溶液について、好適な担体および添加剤としては、水、グリコール、油、アルコール、防腐剤、着色剤などが挙げられる。固体経口製剤、例えば散剤、カプセル剤、カプレット剤、ジェルキャップ剤および錠剤について、好適な担体および添加剤としては、デンプン、糖、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤などが挙げられる。経鼻スプレー/吸入混合物について、水溶液/懸濁液は、好適な担体および添加剤として、水、グリコール、油、皮膚軟化剤、安定化剤、湿潤剤、保存料、芳香剤、香料などを含み得る。

#### 【0073】

本発明の組成物は、投与を容易にし、有効性を改善するために対象への投与に好適な任意の物質で処方することができ、限定されないが、経口（経腸）投与および非経口注射が挙げられる。非経口注射としては、静脈内注射または注入、動脈内注射、皮下注射、筋肉内注射、および関節内注射が挙げられる。本発明の組成物はまた、経粘膜、眼、直腸、長時間作用型移植、舌下投与（sublingual administration）、舌下（under the tongue）、門脈循環を迂回する口腔粘膜から、吸入、または鼻腔内を含む、他の投与経路のために処方することもできる。

#### 【0074】

本発明の特定の実施形態によれば、組成物は、本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸を含む、免疫原の有効量の、精製または部分的に精製された、アデノウイルス26ベクターなどのアデノウイルスベクターを含む。前記組成物は、当該分野で公知の方法に従ってワクチン（「免疫原性組成物」とも称する）として処方され得る。

#### 【0075】

本発明の組成物は、任意選択により、免疫応答を増強するためのアジュバントをさらに

10

20

30

40

50

含み得る。用語「アジュバント」および「免疫刺激剤」は、本明細書において互換的に用いており、免疫機構の刺激を引き起こす1つ以上の物質と定義する。この文脈において、アジュバントは、本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードするベクターおよび/または本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードするベクターと組み合わせて使用されるHIV抗原ポリペプチドをコードするベクターに対する免疫応答を増強するために使用される。

【0076】

本発明での使用に好適なアジュバントは、潜在的に安全であり、耐容性が良好であり、大衆に有効であるものがよく、例えば、QS-21、Detox-PC、MPL-SE、MoGM-CSF、TiterMax-G、CRL-1005、GERBU、TERamide、PSC97B、Adjumer、PG-026、GSK-I、GcMAF、Balethine、MPC-026、Adjuvax、CpG ODN、Betafectin、アルミニウム塩（例えば、Adjuphos）、Adjuplex、およびMF59などが挙げられる。製剤中における各成分の最適な比率は、本開示に鑑みた当業者に周知の手法によって決定され得る。

10

【0077】

好ましい実施形態では、アジュバントは、Adjuphosなどのアルミニウム塩である。

【0078】

免疫原性組成物の調製および使用は当業者に周知である。液状の医薬組成物には、一般的には液状担体、例えば、水、石油、動物油もしくは植物油、鉱物油または合成油が含まれる。また、生理食塩水溶液、デキストロスもしくは他の糖類液またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールを含めてもよい。

20

【0079】

例えば、組換えアデノウイルスベクターは、Adenovirus World Standard (Hogansonら、2002、Bioprocessing J 1: 43-8): 20mM Tris pH8, 25mM NaCl、2.5%グリセロール、にも使用される緩衝剤中に保存してもよい。ヒトへの投与に好適な別の有用なアデノウイルス製剤緩衝剤は、20mM Tris、2mM MgCl<sub>2</sub>、25mM NaCl、ショ糖10%w/v、ポリソルベート-80 0.02%w/vである。組換えアデノウイルスに好適な別の製剤緩衝剤は、10~25mMクエン酸緩衝剤pH5.9~6.2, 4~6%(w/w)ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HBCD)、70~100mM NaCl、0.018~0.035%(w/w)ポリソルベート-80、および任意選択により0.3~0.45%(w/w)エタノールを含む。明らかなことに、多くの他の緩衝剤を使用することができ、精製ベクターの保存および医薬投与のための好適な製剤のいくつかの例が知られている。

30

【0080】

本発明の実施形態によれば、本発明の組成物は、1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドおよび/または1つ以上の単離されたHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つ以上のさらなるベクターと一緒に使用することができる。さらなるベクターおよび/またはHIV抗原性ポリペプチドは、本発明の合成HIV Envタンパク質を含む同じ組成物中に存在し得る。それらはまた、ワクチンの組み合わせにおいて、本発明の合成HIV Envタンパク質を含む組成物と一緒に使用することができる1つ以上の異なる組成物中に存在することができる。好ましくは、1つ以上のさらなるベクターは、アデノウイルスベクターなどのウイルスベクターであり、最も好ましくはアデノウイルス26ベクターである。1つ以上のさらなるベクターは、本開示に鑑みた当業者に公知の任意のHIV抗原ポリペプチドをコードし得る。

40

【0081】

一実施形態では、組成物またはワクチンの組み合わせは、配列番号5のアミノ酸配列を

50

含むH I V抗原性ポリペプチドをコードする第2のアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターをさらに含む。そのような実施形態の利点は、免疫応答の幅が広がることである(クレードBおよびCからの株をカバーする)。

【0082】

別の実施形態では、本発明の組成物またはワクチンの組み合わせは、配列番号28(mos1GagPol)のアミノ酸配列を含むH I V抗原性ポリペプチドをコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターをさらに含む。

【0083】

別の実施形態では、本発明の組成物またはワクチンの組み合わせは、配列番号29(mos2GagPol)のアミノ酸配列を含むH I V抗原性ポリペプチドをコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターをさらに含む。

【0084】

特定の実施形態では、本発明の組成物またはワクチンの組み合わせは、配列番号5のアミノ酸配列を含むH I V抗原性ポリペプチドをコードする第2のアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクター、および、配列番号28または配列番号29からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む1つ以上のH I V抗原性ポリペプチドをコードする、1つ以上のさらなるアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターをさらに含む。例えば、本発明の実施形態による組成物またはワクチンの組み合わせは、配列番号8のアミノ酸配列を含む合成H I Vエンベロープタンパク質(例えば、配列番号18)をコードする第1のベクター；配列番号5のアミノ酸配列を含むH I V抗原性ポリペプチドをコードする第2のベクター；配列番号28のアミノ酸配列を含む合成H I Vエンベロープタンパク質をコードする第3のベクター；および配列番号29のアミノ酸配列を含む合成H I Vエンベロープタンパク質をコードする第4のベクター、を有する4つのアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターを含み得る。

【0085】

いくつかの実施形態では、組成物またはワクチンの組み合わせは、1つ以上の単離されたH I V抗原性ポリペプチドをさらに含む。本開示に鑑みた当業者に公知の任意のH I V抗原性ポリペプチドは、H I Vエンベロープタンパク質(例えば、gp160、gp140、gp120またはgp41)、好ましくは安定化クレードCまたはクレードA gp140タンパク質などの安定化三量体gp140タンパク質を含むがこれらに限定されない、本発明の組成物またはワクチンの組み合わせにさらに含めることができる。好ましい実施形態では、単離されたH I V抗原性ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列の残基30~708(配列番号7の残基1~29はシグナル配列中に存在)を含むものなどの、安定化H I VクレードC三量体gp140タンパク質である。クレードC gp140タンパク質に加えて、または単独で使用することができる、代替的またはさらなるH I V Envポリペプチドは、例えば、配列番号36のアミノ酸30~724(国際公開第2014/107744号パンフレットの配列番号2に対応し、配列番号36の残基1~29はシグナル配列中に存在)に開示されるようなアミノ酸配列を有する、モザイクEnv三量体タンパク質である。

【0086】

本発明の特定の実施形態によれば、H I V抗原タンパク質は、本発明の合成H I Vエンベロープタンパク質であり得る。したがって、本発明の合成エンベロープタンパク質は、単離および/または精製された形態で使用して、免疫応答を誘発するか、またはそれを必要とする対象においてH I Vに対する防御免疫などを提供することができる。任意の配列番号8のアミノ酸配列を含む本明細書に記載の合成エンベロープタンパク質は、単離および/または精製された形態のH I V抗原タンパク質として使用することができる。好ましい実施形態では、H I V抗原タンパク質として単離された形態で使用される場合、合成エンベロープタンパク質は、配列番号18のアミノ酸配列の残基30~711または配列番号19のアミノ酸配列の残基30~686、より好ましくは配列番号18のアミノ酸配列の残基30~704を含む。単離されたH I V抗原性ポリペプチドはまた、以下の変異

: EK479-480RRR、I529P、A471CおよびT575C、を有する配列番号8を含み得る。

【0087】

本発明の実施形態はまた、配列番号8のアミノ酸配列を含む単離された合成HIVエンペロープタンパク質を含む組成物またはワクチンの組み合わせにも関する。本明細書に記載の合成HIVエンペロープタンパク質のいずれかを使用することができる。本発明の特定の実施形態では、単離された合成HIVエンペロープタンパク質は、配列番号18のアミノ酸配列の残基30~704もしくは30~711、配列番号19のアミノ酸配列の残基30~686、または以下の変異：EK479-480RR、I529P、A471CおよびT575C、を有する配列番号8のアミノ酸配列、を含む。そのような組成物またはワクチンの組み合わせは、1つ以上の発現ベクター、例えば、アデノウイルス26ベクターなどのアデノウイルスベクターをさらに含むことができ、これは、本発明の合成HIVエンペロープタンパク質などの1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチド、または配列番号4, 5, 7, 28または29に記載のものなどの他のHIV抗原性タンパク質、またはその断片をコードする。

10

【0088】

本発明はまた、本発明の組成物またはワクチンの組み合わせを産生する方法にも関する。本発明の実施形態によれば、組成物または組み合わせを作製する方法は、本発明の合成HIVエンペロープタンパク質をコードする核酸を含むベクターを、担体、および任意選択により、1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドおよび/または1つ以上の単離されたHIV抗原性ポリペプチドと組み合わせることを含む。当業者は、そのような組成物を調製するために使用される従来技術に精通していよう。

20

【0089】

ワクチンおよびワクチンの組み合わせ

本発明の実施形態によれば、組成物はワクチンであり得る。本明細書で用いる場合、用語「ワクチン」は、対象に防御免疫もしくは防御免疫応答を提供し得る、または対象にワクチン接種するための、本発明の合成HIVエンペロープタンパク質をコードする発現ベクター、好ましくはウイルスベクターを含む組成物を指す。本発明の実施形態によれば、組成物を対象に投与すると、発現ベクターはコードされた合成HIVエンペロープタンパク質を発現し、発現された合成HIVエンペロープタンパク質は対象の免疫系に提示され、それにより、免疫の産生または免疫応答の誘導に必要な応答を誘導する。

30

【0090】

したがって、他の一般的な態様では、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する免疫応答を、対象において誘導するためのワクチンを提供する。本発明の実施形態によれば、ワクチンは、配列番号8のアミノ酸配列、好ましくは配列番号18のアミノ酸配列、を含む合成HIVエンペロープタンパク質をコードする発現ベクターの免疫原的有効量を含む。好ましくは、発現ベクターはウイルスベクター、より好ましくはアデノウイルスベクター、最も好ましくはアデノウイルス26ベクターである。

【0091】

本発明の実施形態によれば、「免疫応答を誘導する」とは、本明細書に記載の方法および組成物に関して用いる場合、感染、例えばHIV感染に対して、予防目的で対象に防御免疫をもたらすこと、および/またはワクチン接種すること、ならびに感染、例えばHIV感染に対して、治療目的で所望の免疫応答または効果を、それを必要とする対象において引き起こすことを包含する。好ましくは、本発明の方法は予防目的のため、例えば防御免疫をもたらすためのものである。免疫応答は、細胞性免疫応答および/または体液性免疫応答であり得る。

40

【0092】

本明細書で用いる場合、用語「防御免疫」または「防御免疫応答」は、ワクチン接種された対象が、このワクチン接種を行った対象の病原性因子による感染を制御できることを意味する。通常、「防御免疫応答」が発現されている対象は、軽度から中等度の臨床症状

50

を発現するにすぎないか、または症状を全く発現しない。通常、ある特定の因子に対する「防御免疫応答」または「防御免疫」を有する対象は、前記因子による感染の結果として死亡することはない。

【0093】

本発明の実施形態によれば、ワクチン組成物は、1つ以上のさらなるベクター、例えば、アデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターなどのウイルスベクターをさらに含むことができ、これは、1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドおよび/または1つ以上の単離されたHIV抗原性ポリペプチドをコードする。合成HIVエンベロープタンパク質、さらなるベクターおよび/または1つ以上の単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、同じ組成物またはワクチン中の1つ以上の異なる組成物中に処方され得る。

10

【0094】

本発明はまた、1つ以上のHIVクレードに対する免疫応答を、それを必要とする対象において、1つ以上のベクターを単離された抗原性ポリペプチドと組み合わせて用いてプライムおよびブーストするワクチンの組み合わせにも関する。したがって、別の一般的な態様において、本発明は、対象のHIVに対する免疫応答を誘導するためのワクチンの組み合わせを提供する。本発明の実施形態によれば、ワクチンの組み合わせは、

(i) 配列番号8、または(a) I529P、(b) K480E、および(c) EK479-480RRRR、I529P、A471CおよびT575Cの組み合わせ、からなる群から選択される1つ以上の変異を有する配列番号8、のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードする、発現ベクターの免疫原的有効量を含む第1の組成物および担体；ならびに

20

(ii) 免疫原的有効量の単離されたHIV抗原性ポリペプチドを含む第2の組成物および担体、を含み、

第1および第2の組成物の一方はプライミング免疫用であり、他の組成物はブースティング免疫用である。

【0095】

本発明の実施形態によれば、ワクチンの組み合わせは、任意選択により、1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドをコードする免疫原的有効量の1つ以上のさらなる発現ベクターをさらに含む。1つ以上のさらなる発現ベクターは第1の組成物または第2の組成物に含めることができ、または1つ以上のさらなる発現ベクターは第1および/または第2の組成物と一緒に投与される1つ以上のさらなる組成物に含めることができる。

30

【0096】

本明細書で用いる場合、用語「共送達」、「共投与」または「~と一緒に投与される」は、ウイルス発現ベクターと単離された抗原性ポリペプチド、または複数のウイルス発現ベクターなどの2つ以上の成分の同時投与を指す。「同時投与」は、2つ以上の成分の少なくとも同日内の投与であり得る。2つの成分が「~と一緒に投与される」場合、これらは、別々の組成物で短期間、例えば24、20、16、12、8もしくは4時間内あるいは1時間以下以内に逐次投与され得るか、または単一の組成物で同時に投与され得る。

【0097】

40

本発明のワクチンの組み合わせの特定の実施形態では、第1の組成物は、配列番号18のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターを含み；単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列の残基30~708または配列番号36の残基30~724を含む。特定の一実施形態では、第1の組成物は、配列番号5のアミノ酸配列を含むHIV抗原性ポリペプチドをコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターをさらに含む。別の特定の実施形態では、第1の組成物は、配列番号28および29からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドをコードする、1つ以上のさらなるアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターをさらに含む。

50

## 【 0 0 9 8 】

本発明の別の一般的な態様は、本発明の一実施形態によるワクチンの組み合わせを含むキットに関する。

## 【 0 0 9 9 】

本発明のワクチンの組み合わせにおいて使用され得る、合成HIVエンベロープタンパク質、発現ベクター、さらなる発現ベクター、発現ベクターにコードされたHIV抗原性ポリペプチド、単離されたHIV抗原性ポリペプチドなどの実施形態は、上記および実例としての以下の実施例で詳細に議論される。

## 【 0 1 0 0 】

HIV感染に対する防御免疫を誘導するための方法

本発明はまた、それを必要とする対象における1つ以上のHIVクレードに対する免疫応答を誘導する方法に関する。本明細書に記載の方法は、1つ以上の単離された抗原性ポリペプチドと組み合わせて1つ以上の発現ベクターを用いて免疫応答をプライミングおよびブースティングする方法を含む。

## 【 0 1 0 1 】

一般的な一態様では、対象におけるヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する免疫応答を誘導する方法は、配列番号8のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターの免疫原的有効量を含む組成物を、対象に投与することを含む。本明細書に記載の任意の組成物は、対象におけるHIVに対する免疫応答を誘導する方法において使用することができる。好ましくは、組成物は、配列番号18のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸を含むアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターを含む。組成物はさらに、1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドおよび/または1つ以上のさらなる単離されたHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つ以上のさらなるベクターを含むことができる。

## 【 0 1 0 2 】

別の一般的な態様において、対象におけるヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する免疫応答を誘導する方法は、

(i) 配列番号8、または(a) I 5 2 9 P、(b) K 4 8 0 E、および(c) E K 4 7 9 - 4 8 0 R R R R R、I 5 2 9 P、A 4 7 1 C および T 5 7 5 C の組み合わせ、からなる群から選択される1つ以上の変異を有する配列番号8、のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードする、発現ベクターの免疫原的有効量を含む第1の組成物および担体を対象に投与する工程；

(ii) 対象に、免疫原的有効量の単離されたHIV抗原性ポリペプチドおよび担体を含む第2の組成物を投与する工程；ならびに

(iii) 任意選択により、対象に、1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドをコードする免疫原的有効量の1つ以上のさらなる発現ベクターを投与する工程、を含み、工程(i)および(ii)がいずれかの順序で実施され、一方の工程がプライミング免疫のためのものであり、他方の工程がブースティング免疫のためのものである。本発明の実施形態によれば、任意選択による、1つ以上のさらなる発現ベクターの有効量が、第1の組成物または第2の組成物と一緒に投与される。好ましい実施形態では、任意選択による1つ以上のさらなる発現ベクターの有効量が、第1の組成物と一緒に投与される。

## 【 0 1 0 3 】

免疫応答を誘導する方法の特定の実施形態において、第1の組成物は、配列番号8のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクター、および配列番号5のアミノ酸配列を含むHIV抗原性ポリペプチドをコードする第2のアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターを含み；第2の組成物は、配列番号7のアミノ酸配列の残基30~708または配列番号36の残基30~724を有する単離されたHIV抗原性ポリペプチドを含み；ならびに1つ以上のさらなる発現ベクターは、配列番号28および29からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチド

10

20

30

40

50

をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターであり；第1の組成物は、プライミング免疫のために1回以上、1つ以上のさらなる発現ベクターと一緒に対象に投与され、第2の組成物は、ブースティング免疫のために1回以上対象に投与される。

【0104】

発現ベクターおよび/または抗原性ポリペプチドを含む免疫原性組成物の投与は、典型的には筋肉内、皮下または皮下である。しかしながら、静脈内、直腸、経皮、経口、経鼻などの他の投与様式も同様に想定され得る。免疫原性組成物の筋肉内投与は、発現ベクター、例えばアデノウイルスベクター、および/または抗原性ポリペプチドの懸濁剤を注射するためのニードルを使用することにより行われ得る。代替手段は、組成物を投与するための無針注射デバイス（例えばBiojector（登録商標）の使用）またはワクチン含有している凍結乾燥粉末剤の使用である。

10

【0105】

筋肉内、静脈内、皮膚もしくは皮下注射または罹病部位での注射のためには、ベクターは、パイロジェンフリーであり適当なpH、等張性および安定性を有する非経口に許容され得る水性液剤の形態である。同様に、単離された抗原性ポリペプチドは、適当なpH、等張性および安定性を有する非経口に許容され得る液剤の形態である。当業者は、適当な液剤を例えば等張性ビヒクルを用いて、例えば塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、乳酸加リンゲル注射剤を用いて調製することが十分にできよう。必要に応じて、保存料、安定剤、緩衝剤、酸化防止剤および/または他の添加剤を含めてもよい。また、徐放製剤を使用してよい。

20

【0106】

典型的には、本発明の実施形態によるワクチン組成物の投与は、感染または症状の発現前にHIV抗原に対する免疫応答を生成させるための予防目的を有するものである。他の実施形態では、発現ベクター、例えばアデノウイルスベクター、および/またはHIV抗原性ポリペプチドは、曝露後の予防のために投与され得る。

【0107】

発現ベクター、例えばアデノウイルスベクターおよび/または抗原性ポリペプチドを含有している免疫原性組成物を対象に投与すると、抗HIV免疫応答が対象において生じる。検出可能な免疫応答が誘導されるのに十分な組成物の量を「免疫原的有効用量」または「免疫原的有効量」と定義する。本発明の典型的な一実施形態では、免疫応答は防御免疫応答である。

30

【0108】

投与される実際の量ならびに投与の速度および時間推移は、処置されるものの性質および重症度に依存する。処置の処方、例えば投薬量の決定などは、一般開業医および他の医師または獣医の状況では獣医の責任の範囲内であり、典型的には、処置される障害、個々の患者の体調、送達部位、投与方法および実行者に公知の他の要素が考慮される。上記の手法およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. 編, 1980において知得され得る。

【0109】

アデノウイルスベクターの調製およびそのような粒子の組成物への任意選択による製剤化後、ベクターは、個体、特にヒトまたは他の霊長類に投与され得る。非ヒト哺乳動物への送達は治療目的である必要はなく、実験の状況、例えば、本発明のアデノウイルスベクターによって発現された合成HIVエンベロープタンパク質に対する免疫応答の機構の究明に使用するためであってもよい。

40

【0110】

本開示の方法の一実施形態では、1つ以上のHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つ以上のアデノウイルスベクターが、免疫応答をプライムするために使用される。1つ以上の単離されたHIV抗原性ポリペプチドが、プライミング免疫のための1つ以上のアデノウイルスベクターと一緒に使用され得る。プライム免疫処置は1回のみ投与してもよい

50

が、任意選択により複数回投与、例えば、時間0で初期プライム投与、その後、初期プライム投与後約4～14週間、例えば、4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13もしくは14週間、またはその間の任意の時間に、別のプライム投与により投与することもできる。1つ以上の単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、任意選択により、1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つ以上のさらなるアデノウイルスベクターまたは他のベクターと一緒に免疫応答をブーストするために使用され得る。ブースト免疫処置も、1回または複数回で、例えば、最初に、初期プライム投与後約18～36、例えば、18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35もしくは36週間、またはその間の任意の時間に、その後、初期プライム投与後約36～52、例えば、36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59もしくは60週間、またはその間の任意の時間に、別のブースト投与により投与することができる。免疫処置によって誘導される免疫応答はモニタリングされる。

10

#### 【0111】

また、本開示の方法の実施形態では、最終ブースト免疫処置が初期プライム投与の約22～26週間後に投与されることを意味する短期プライム-ブーストレジメンも想定される。プライム免疫処置は0週目に投与され得る。ブースト免疫処置は、複数回で、例えば、最初に、初期プライム投与後約7～9週間もしくは11～13週間、または、4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, もしくは14週間、またはその間の任意の時間に、その後、初期プライム投与後約22～26週間、または、16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, もしくは28週間、またはその間の任意の時間に、別のブースト投与により投与することができる。特定の実施形態では、1つ以上の単離されたHIV抗原性ポリペプチドが、プライミングおよび/またはブースティング免疫のための1つ以上のアデノウイルスベクターと一緒に投与される。

20

#### 【0112】

プライム投与およびブースト投与のためのレジメンは、投与後に測定された免疫応答に基づいて調整され得ることは当業者によって容易に認識されよう。例えば、ブースト組成物は一般的には、プライム組成物の投与の数週間または数ヶ月後、例えば、プライム組成物の投与の約2～3週間もしくは4週間、または8週間、または16週間、または20週間、または24週間、または28週間、または30週間もしくは32週間または1～2年後に投与される。

30

#### 【0113】

本発明の実施形態によれば、アジュバントは、プライミングおよび/またはブースティング免疫の一部として、単離されたHIV抗原性ポリペプチドと一緒に投与され得る。任意のアジュバントは、本開示に鑑みて使用することができ、特定の実施形態では、アジュバントは、AdjuPhosのようなアルミニウム塩である。

#### 【0114】

本発明の好ましい一実施形態において、本明細書に開示の方法に使用されるアデノウイルスベクターとしてはrAd26ベクターが挙げられる。好ましくは、配列番号18または配列番号19、最も好ましくは配列番号18のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロプタンパク質をコードするrAd26ベクターは、単独でまたは配列番号5のアミノ酸配列を有するmos1Envなどの1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つ以上のさらなるrAd26ベクターと組み合わせて、免疫応答をプライムするために使用され、配列番号7のアミノ酸配列の残基30～708または配列番号36の残基30～724を含むものなどの単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、免疫応答をブーストするために使用され、またはその逆である。

40

#### 【0115】

例示的な一実施形態では、配列番号18のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロプタンパク質をコードするrAd26ベクターは、配列番号5のアミノ酸配列を有するHIV

50

V抗原ポリペプチドをコードする r A d 2 6 ベクターと組み合わせて、免疫応答をプライムするために使用される。配列番号 1 ~ 4 , 2 8 および 2 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する 1 つ以上のさらなる H I V 抗原性ポリペプチドをコードする 1 つ以上のさらなる r A d 2 6 ベクターも、免疫応答をプライムするために他の r A d 2 6 ベクターと一緒に投与され得る。特定の実施形態におけるプライミング投与は、任意のブースティング免疫が投与される前に 2 回投与される。配列番号 7 (好ましくは) のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 0 8 を含むか、または配列番号 3 6 のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 2 4 を含む単離された H I V 抗原性ポリペプチド、またはそのような単離された H I V 抗原性ポリペプチドの少なくとも 2 つの組み合わせは、免疫応答をブーストするために投与され、好ましくは 2 回以上投与される。好ましくは、アジュバントは、ブースティング免疫において単離された H I V 抗原性ポリペプチドと一緒にさらに投与される。

10

#### 【 0 1 1 6 】

特定の実施形態では、免疫応答は、アデノウイルスベクター、好ましくは r A d 2 6 ベクターにコードされた 4 つの H I V 抗原の投与によってプライムされ、コードされた 4 つの抗原は、( i ) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む合成 H I V エンベロープタンパク質、( i i ) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、( i i i ) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、および ( i v ) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。これらの 4 つの抗原の各々は、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 または  $1 0 \times 1 0^{10}$  ウイルス粒子 ( v p )、例えば約  $5 \times 1 0^{10}$  v p (すべてのベクターを合わせて) の総用量で投与される別個のアデノウイルスベクター、好ましくは r A d 2 6 ベクター上にコードされ得る。ベクターは、例えば、1 : 1 : 1 : 1 の比率で、予め混合されていてもよい。プライミング投与は、最初のプライミング投与後に、例えば、最初のプライミング投与後、8 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 1 5 または 1 6 週間で、繰り返してもよい。この実施形態において、免疫応答は、プライミング投与に使用されるものと同じアデノウイルスベクターワクチンを単離された H I V E n v g p 1 4 0 タンパク質と一緒に投与することによってブーストされる。H I V E n v g p 1 4 0 タンパク質は、例えば、クレード C g p 1 4 0 タンパク質 (配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 0 8 を含む)、またはモザイク g p 1 4 0 タンパク質 (配列番号 3 6 のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 2 4 を含む)、またはクレード C g p 1 4 0 タンパク質およびモザイク g p 1 4 0 タンパク質であり、約 5 0 ~ 3 0 0  $\mu$  g タンパク質の総用量で、例えば、クレード C g p 1 4 0 タンパク質を、例えば、5 0 , 1 0 0 , 1 5 0 , 2 0 0 , 2 5 0 , または 3 0 0 マイクログラム、またはその間の任意の量で、または、モザイク g p 1 4 0 タンパク質を、例えば、5 0 , 1 0 0 , 1 5 0 , 2 0 0 , 2 5 0 , または 3 0 0 マイクログラム、またはその間の任意の量で、またはクレード C g p 1 4 0 タンパク質とモザイク g p 1 4 0 タンパク質との組み合わせ (例えば、1 : 1 の比で、一緒に混合するかまたは別々に投与する) を、5 0 , 1 0 0 , 1 5 0 , 2 0 0 , 2 5 0 , または 3 0 0 マイクログラム、またはその間の任意の量で含む。好ましくは、g p 1 4 0 タンパク質は、アジュバント、例えば、リン酸アルミニウムと一緒に投与される。免疫応答をブーストするアデノウイルス + g p 1 4 0 タンパク質投与は、最初のプライミング投与後、約 1 8 , 1 9 , 2 0 , 2 1 , 2 2 , 2 3 , 2 4 , 2 5 , 2 6 , 2 7 , 2 8 , 2 9 または 3 0 週間、またはその間の任意の時間に投与してもよい。ブースト投与は、例えば、最初のプライミング投与後、約 4 2 , 4 3 , 4 4 , 4 5 , 4 6 , 4 7 , 4 8 , 4 9 , 5 0 , 5 1 , 5 2 , 5 3 または 5 4 週間、またはその間の任意の時間に繰り返してもよい。この実施形態によるすべての投与は、好ましくは、筋肉内経路を介して行われる。

20

30

40

#### 【 0 1 1 7 】

##### 実施形態

実施形態 1 は、配列番号 8、または ( i ) I 5 2 9 P、( i i ) K 4 8 0 E、および ( i i i ) E K 4 7 9 - 4 8 0 R R R R、I 5 2 9 P、A 4 7 1 C および T 5 7 5 C の組み合わせ、からなる群から選択される 1 つ以上の変異を有する配列番号 8、のアミノ酸配列を含む合成 H I V エンベロープタンパク質をコードする。

50

## 【 0 1 1 8 】

実施形態 2 は、実施形態 1 による核酸であって、合成 H I V エンベロープタンパク質が、シグナル配列、例えば、配列番号 9 ~ 1 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 9、を含むシグナル配列をさらに含む。

## 【 0 1 1 9 】

実施形態 3 は、実施形態 1 または 2 による核酸であって、合成 H I V エンベロープタンパク質が、膜貫通ドメイン、例えば、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する膜貫通ドメイン、をさらに含み、好ましくは、合成 H I V エンベロープタンパク質が、配列番号 8 の C 末端および膜貫通ドメインの N 末端に融合された配列番号 3 7 をさらに含む。

## 【 0 1 2 0 】

実施形態 4 は、実施形態 3 による核酸であって、合成 H I V エンベロープタンパク質が、細胞質ドメインの断片、好ましくは配列番号 1 4 のアミノ酸配列、またはそのアミノ酸残基 1 ~ 4 (すなわち、N R V R) を含む細胞質ドメインの断片をさらに含む。

## 【 0 1 2 1 】

実施形態 5 は、合成 H I V エンベロープタンパク質が配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む、前記実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つの核酸である。

## 【 0 1 2 2 】

実施形態 6 は、実施形態 1 または 2 による核酸であって、合成 H I V エンベロープタンパク質が、( a ) G C N 4、フィブリチン ( フォールドドメイン ) からなる群から選択される三量体形成ドメイン、例えば、配列番号 1 5 または配列番号 1 6、好ましくは配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する三量体形成ドメインをさらに含む、または ( b ) 以下の変異 : E K 4 7 9 - 4 8 0 R R R R、I 5 2 9 P、A 4 7 1 C および T 5 7 5 C、の組み合わせを有する配列番号 8 を含む。

## 【 0 1 2 3 】

実施形態 7 は、実施形態 6 による核酸であって、合成 H I V エンベロープタンパク質は、配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む。

## 【 0 1 2 4 】

実施形態 8 は、実施形態 5 による核酸であって、合成 H I V エンベロープタンパク質は、配列番号 1 8 のアミノ酸配列からなる。

## 【 0 1 2 5 】

実施形態 9 は、実施形態 7 による核酸であって、合成 H I V エンベロープタンパク質は、配列番号 1 9 のアミノ酸配列からなる。

## 【 0 1 2 6 】

実施形態 1 0 は、実施形態 1 ~ 9 のいずれかの核酸を含むベクターであって、核酸は、プロモーター配列に作動可能に連結されている。

## 【 0 1 2 7 】

実施形態 1 1 は、ウイルスベクター、好ましくはアデノウイルスベクター、より好ましくはアデノウイルス 2 6 ベクターである、実施形態 1 0 によるベクターである。

## 【 0 1 2 8 】

実施形態 1 2 は、実施形態 1 0 または実施形態 1 1 のベクターを含む単離された細胞である。

## 【 0 1 2 9 】

実施形態 1 3 は、実施形態 1 0 または 1 1 のベクターの免疫原的有効量、および担体を含む組成物である。

## 【 0 1 3 0 】

実施形態 1 4 は、ワクチンの組み合わせであって、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する合成 H I V エンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス 2 6 ベクターの免疫原的有効量を含む第 1 の組成物、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H I V 抗原性ポリペプチドをコードする第 2 のアデノウイルスベクター、好ましくは第 2 のアデノウイルス 2 6 ベクターの免疫原的有効量をさらに含む第 2 の組成物

10

20

30

40

50

、ならびに任意選択により、配列番号1～4, 28および29からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原性ポリペプチドをコードするベクター、および配列番号7のアミノ酸配列の残基30～708、または配列番号36のアミノ酸配列の残基30～724を有する単離されたHIV抗原性ポリペプチドからなる群から選択される、少なくとも1つの免疫原の有効量を含む、少なくとも1つのさらなる組成物、を含み、第1の組成物、第2の組成物およびさらなる組成物は、同じ組成物中または1つ以上の異なる組成物中に存在する。

【0131】

実施形態15は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、方法は、実施形態13の組成物または実施形態14のワクチンの組み合わせを対象に投与することを含む。

10

【0132】

実施形態16は、実施形態13の組成物または実施形態14のワクチンの組み合わせであり、配列番号18のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクター、配列番号5のアミノ酸配列を含むHIV抗原性ポリペプチドをコードする第2のアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクター、配列番号1～4, 28および29からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む1つ以上のさらなる抗原性ポリペプチドをコードする、1つ以上のさらなるアデノウイルスベクター、ならびにヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する免疫応答を誘導するのに使用される、配列番号7のアミノ酸配列の残基30～708または配列番号36の残基30～724を含む、単離されたHIV抗原性ポリペプチド、を含む。

20

【0133】

実施形態17は、配列番号8、または(i)I529P、(ii)K480E、および(iii)EK479-480RRRR、I529P、A471CおよびT575Cの組み合わせ、からなる群から選択される1つ以上の変異を有する配列番号8、のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質である。

【0134】

実施形態18は、実施形態17の合成HIVエンベロープタンパク質であって、変異EK479-480RRRR、I529P、A471CおよびT575C、の組み合わせを有する配列番号8のアミノ酸配列、または配列番号18の残基30～704もしくは配列番号19の残基30～686を含む。

30

【0135】

実施形態19は、1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドおよび/または1つ以上のさらなる単離されたHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つ以上のさらなる発現ベクターをさらに含む、実施形態13の組成物である。

【0136】

実施形態20は、配列番号18のアミノ酸配列からなる合成HIVエンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターを含む、実施形態13の組成物である。

40

【0137】

実施形態21は、配列番号5のアミノ酸配列を含むHIV抗原ポリペプチドをコードする第2のアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクター、および任意選択により、配列番号1～4, 28および29のアミノ酸配列を含む1つ以上のさらなるHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つ以上のさらなるアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターをさらに含む、実施形態20による組成物である。

【0138】

実施形態22は、実施形態19, 20または21のいずれか1つによる組成物を対象に投与することを含む、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する免疫応答を、それを必要とする対象において産生する方法である。

50

## 【 0 1 3 9 】

実施形態 2 3 は、組成物またはワクチンの組み合わせを作製する方法であって、実施形態 1 0 または実施形態 1 1 のベクターを担体と組み合わせること、および任意選択により、担体と一緒に、1 つ以上の組成物中の 1 つ以上のさらなる H I V 抗原性ポリペプチドおよび / または 1 つ以上の単離された H I V 抗原性ポリペプチドをコードするベクターを組み合わせることを含む。

## 【 0 1 4 0 】

実施形態 2 4 は、ヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) に対する免疫応答を、対象において誘導するためのワクチンの組み合わせであって、

( i ) 配列番号 8、または ( i i ) I 5 2 9 P、( i i i ) K 4 8 0 E、および ( i i i i ) E K 4 7 9 - 4 8 0 R R R R、I 5 2 9 P、A 4 7 1 C および T 5 7 5 C の組み合わせ、からなる群から選択される 1 つ以上の変異を有する配列番号 8、のアミノ酸配列を含む合成 H I V エンベロープタンパク質をコードする、発現ベクターの免疫原的有効量を含む第 1 の組成物および担体；ならびに

( i i ) 免疫原的有効量の単離された H I V 抗原性ポリペプチドを含む第 2 の組成物および担体、を含み、

第 1 および第 2 の組成物の一方はプライミング免疫用であり、他の組成物はブースティング免疫用であり、

ワクチンの組み合わせは、任意選択により、1 つ以上のさらなる H I V 抗原性ポリペプチドをコードする免疫原的有効量の 1 つ以上のさらなる発現ベクターをさらに含み、1 つ以上のさらなる発現ベクターは、第 1 もしくは第 2 の組成物、または第 1 または第 2 の組成物と一緒に使用される 1 つ以上のさらなる組成物に含まれる。

## 【 0 1 4 1 】

実施形態 2 5 は、実施形態 2 4 によるワクチンの組み合わせであって、第 1 の組成物は、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む合成 H I V エンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス 2 6 ベクターを含み；単離された H I V 抗原性ポリペプチドは、配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 0 8 または配列番号 3 6 の残基 3 0 ~ 7 2 4 を含み；ならびに 1 つ以上のさらなる発現ベクターは、配列番号 1 ~ 5、2 8 および 2 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む 1 つ以上のさらなる H I V 抗原性ポリペプチドをコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス 2 6 ベクターである。

## 【 0 1 4 2 】

実施形態 2 6 は、ヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) に対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、

( i ) 配列番号 8、または ( i i ) I 5 2 9 P、( i i i ) K 4 8 0 E、および ( i i i i ) E K 4 7 9 - 4 8 0 R R R R、I 5 2 9 P、A 4 7 1 C および T 5 7 5 C の組み合わせ、からなる群から選択される 1 つ以上の変異を有する配列番号 8、のアミノ酸配列を含む合成 H I V エンベロープタンパク質をコードする、発現ベクターの免疫原的有効量を含む第 1 の組成物および担体を対象に投与する工程；

( i i ) 対象に、免疫原的有効量の単離された H I V 抗原性ポリペプチドおよび担体を含む第 2 の組成物を投与する工程；ならびに

( i i i ) 任意選択により、対象に、1 つ以上のさらなる H I V 抗原性ポリペプチドをコードする免疫原的有効量の 1 つ以上のさらなる発現ベクターを投与する工程、を含み、工程 ( i ) および ( i i ) がいずれかの順序で実施され、一方の工程がプライミング免疫のためのものであり、他方の工程がブースティング免疫のためのものであり、好ましくは、任意選択による、1 つ以上のさらなる発現ベクターの有効量が、第 1 の組成物と一緒に投与される。

## 【 0 1 4 3 】

実施形態 2 7 は、実施形態 2 6 による方法であって、第 1 の組成物は、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する合成 H I V エンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベ

10

20

30

40

50

クター、好ましくはアデノウイルス 26 ベクター、および配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HIV 抗原性ポリペプチドをコードする第 2 のアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス 26 ベクターを含み；第 2 の組成物は、配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 708 または配列番号 36 の残基 30 ~ 724 を有する単離された HIV 抗原性ポリペプチドを含み；ならびに任意選択による 1 つ以上のさらなる発現ベクターは、配列番号 28 および 29 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む 1 つ以上のさらなる HIV 抗原性ポリペプチドをコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス 26 ベクターであり；第 1 の組成物は、プライミング免疫のために 1 回以上、任意選択により 1 つ以上のさらなる発現ベクターと一緒に対象に投与され、第 2 の組成物は、ブースティング免疫のために 1 回以上対象に投与される。

10

## 【0144】

実施形態 28 は、シグナル配列を有するまたは有しない、配列番号 18 または配列番号 19 のアミノ酸配列からなる合成 HIV エンベロープタンパク質である。

## 【0145】

実施形態 29 は、(i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 1 の合成 HIV エンベロープタンパク質、および (ii) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む第 2 の HIV エンベロープタンパク質、をコードする核酸配列を共に含む 1 つ以上のベクターを含むワクチンの組み合わせである。

## 【0146】

実施形態 30 は、実施形態 29 によるワクチンの組み合わせであって、第 1 の合成 HIV エンベロープタンパク質が配列番号 18 のアミノ酸配列を含む。

20

## 【0147】

実施形態 31 は、以下の成分を含むワクチンの組み合わせである：

(i) 配列番号 18 のアミノ酸配列からなる合成 HIV エンベロープタンパク質をコードする Ad26 ベクター；および

(ii) 配列番号 5 のアミノ酸配列からなる HIV エンベロープタンパク質をコードする Ad26 ベクター。

## 【0148】

実施形態 32 は、以下の成分をさらに含む、実施形態 31 によるワクチンの組み合わせである：

30

(iii) 配列番号 28 のアミノ酸配列からなる HIV 抗原をコードする Ad26 ベクター。

## 【0149】

実施形態 33 は、以下の成分をさらに含む、実施形態 31 または 32 によるワクチンの組み合わせである：

(iv) 配列番号 29 のアミノ酸配列からなる HIV 抗原をコードする Ad26 ベクター。

## 【0150】

実施形態 34 は、以下の成分をさらに含む、実施形態 31 ~ 33 のいずれか 1 つによるワクチンの組み合わせである：

40

(v) 配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 708、または配列番号 36 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 724 を有し、任意選択によりアジュバントをさらに含む、単離された HIV 抗原性ポリペプチド。

## 【0151】

実施形態 35 は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する免疫応答を、それを必要とするヒト対象において誘導する方法であって、

(a) 対象に、(i) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む合成 HIV エンベロープタンパク質をコードする rAd26 ベクター；(ii) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする rAd26 ベクター；(iii) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする rAd26 ベクター；および (iv) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む抗原を

50

コードする r A d 2 6 ベクター、を投与する工程であって；好ましくは、r A d 2 6 ベクターは、約 1 : 1 : 1 : 1 の比で、約  $1 \sim 10 \times 10^{10}$  ウイルス粒子 ( v p ) の総用量、例えば  $5 \times 10^{10}$  v p で投与する工程；

( b ) 工程 ( a ) を約 10 ~ 14 週間で、例えば工程 ( a ) の後 12 週間で繰り返す工程；

( c ) 対象に、( i ) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む合成 H I V エンベロープタンパク質をコードする r A d 2 6 ベクター；( i i ) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする r A d 2 6 ベクター；( i i i ) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする r A d 2 6 ベクター；( i v ) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする r A d 2 6 ベクター；( v ) 配列番号 7 のアミノ酸 30 ~ 708 の配列を有する単離された H I V g p 1 4 0 タンパク質；および ( v i ) リン酸アルミニウムアジュバント、を投与する工程であって、好ましくは、r A d 2 6 ベクターは、約 1 : 1 : 1 : 1 の比で、約  $1 \sim 10 \times 10^{10}$  ウイルス粒子 ( v p ) の総用量、例えば  $5 \times 10^{10}$  v p で投与し、および単離された H I V g p 1 4 0 タンパク質は、約 50 ~ 300 マイクログラム、例えば 250 マイクログラムの用量で；20 ~ 28 週間、例えば工程 ( a ) の後 24 週間で投与する工程；ならびに

( d ) 工程 ( c ) を約 42 ~ 54 週間で、例えば工程 ( a ) の後 48 週間で繰り返す工程、を含む方法である。

#### 【 0 1 5 2 】

実施形態 36 は、ヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) に対する免疫応答を、それを必要とするヒト対象において誘導する方法であって、

( a ) 対象に、( i ) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む合成 H I V エンベロープタンパク質をコードする r A d 2 6 ベクター；( i i ) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする r A d 2 6 ベクター；( i i i ) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする r A d 2 6 ベクター；および ( i v ) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする r A d 2 6 ベクター、を投与する工程であって；好ましくは、r A d 2 6 ベクターは、約 1 : 1 : 1 : 1 の比で、約  $1 \sim 10 \times 10^{10}$  ウイルス粒子 ( v p ) の総用量、例えば  $5 \times 10^{10}$  v p で投与する工程；

( b ) 工程 ( a ) を約 10 ~ 14 週間で、例えば工程 ( a ) の後 12 週間で繰り返す工程；

( c ) 対象に、( i ) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む合成 H I V エンベロープタンパク質をコードする r A d 2 6 ベクター；( i i ) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする r A d 2 6 ベクター；( i i i ) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする r A d 2 6 ベクター；( i v ) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む抗原をコードする r A d 2 6 ベクター；( v ) 配列番号 7 のアミノ酸 30 ~ 708 の配列を有する単離された H I V g p 1 4 0 タンパク質；( v i ) 配列番号 36 のアミノ酸 30 ~ 724 の配列を有する単離された H I V g p 1 4 0 タンパク質；および ( v i i ) リン酸アルミニウムアジュバント、を投与する工程であって、好ましくは、r A d 2 6 ベクターは、約 1 : 1 : 1 : 1 の比で、約  $1 \sim 10 \times 10^{10}$  ウイルス粒子 ( v p ) の総用量、例えば  $5 \times 10^{10}$  v p で投与し、および単離された H I V g p 1 4 0 タンパク質は、約 50 ~ 300 マイクログラム、例えば 250 マイクログラムの用量で；20 ~ 28 週間、例えば工程 ( a ) の後 24 週間で投与する工程；ならびに

( d ) 工程 ( c ) を約 42 ~ 54 週間で、例えば工程 ( a ) の後 48 週間で繰り返す工程、を含む方法である。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 5 3 】

実施例 1 : H I V エンベロープ抗原配列の設計

いくつかの H I V エンベロープ抗原配列は、モザイク H I V 抗原 m o s 2 E n v ( 配列番号 6 ; 以前にも国際公開第 2010 / 059732 号パンフレットに記載される ) と配列類似性を有するように設計された。新しく設計された膜結合の配列は、H I V エンベロ

10

20

30

40

50

ーブタンパク質からの完全に天然の野生型配列、またはmos2Env配列および野生型HIVエンベローブタンパク質配列のキメラに基づくもの(組み合わせ)であった。全長エンベローブタンパク質配列(図1A参照)に加えて、細胞質ドメインのC末端切断を有する配列も設計された(例えば、図1C参照)。例えば、Schiermleら、PNAS 1997; Abrahamyanら、J Virol 2005; Edwardsら、J. Virology、2002、76:2683-2691も参照されたい。可溶性変異体はまた、膜貫通(TM)領域の前のC末端トランケーションによって調製され、これはGCN4三量体形成ドメインなどの三量体形成ドメインによって置換された(例えば、図1B参照)。これらの可溶性変異体は、フーリン切断部位の変異によって一本鎖変異体にさらに変換され、したがって、gp120およびgp41サブユニットへのエンベローブタンパク質の細胞外ドメインのプロセッシングを阻害する。

10

## 【0154】

生成および試験されたすべての構築物のうち、C4に基づく構築物は、最適な特性、例えば、良好な製造可能性、折り畳み、免疫原性を有し、これらはさらなる研究のために選択された。膜貫通ドメイン(sC4、図1B)の代わりにGCN4三量体形成ドメインを有するC4構築物の可溶性変異体、および細胞質ドメインの7アミノ酸断片を含む変異体(C4D7、図1C)も生成し、さらなる研究において試験した。C4、sC4、およびC4D7のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号17、19、および18に示す。これらをコードする配列をそれぞれ配列番号25、27および26に示す。構築物C1は、mos2Env配列(配列番号6)に基づく細胞外ドメイン配列を有する。それぞれ図1Bおよび図1Cに示すsC4およびC4D7と同様である、膜貫通ドメイン(sC1)の代わりにGCN4三量体形成ドメインを有する構築物C1の可溶性変異体、および細胞質ドメインの7アミノ酸断片(C1D7)を含む変異体もまた生成された。構築物C1およびその変異体は、本質的に先行技術のmos2Env配列に基づいているため、比較目的のためのさらなる研究に用いられた。C1、sC1およびC1D7のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号31、30および32に示す。これらをコードする核酸配列をそれぞれ配列番号34、33および35に示す。試験された他の構築物は、構築物C4に基づくものよりも最適性が低く、さらなる開発に取り入れられなかった。

20

## 【0155】

実施例2：合成HIVエンベローブタンパク質の発現および折り畳み

30

合成HIVエンベローブタンパク質の発現レベル、折り畳み、および細胞表面発現を測定した。

## 【0156】

発現レベル

HEK293F細胞を、実施例1に記載したように、可溶性合成HIVエンベローブタンパク質sC1およびsC4をコードするプラスミドで一過性にトランスフェクトした。可溶性タンパク質の発現レベルを、定量的ウェスタンブロット(QWB)を用いて上清中で測定した。結果を図2に示す。sC1(これは本質的に膜貫通ドメインが付加されたmos2Envに対応する)の低発現レベルは、最近のmos2Envの知見と一致する。結果によって示されるように、本発明のsC4変異体は、sC1変異体(対照)より有意に高い発現レベルを示した。

40

## 【0157】

タンパク質の折り畳み

タンパク質折り畳みは、酵素結合免疫吸着剤アッセイ(ELISA)によって、CD4の結合後にのみ露出する、HIVエンベローブタンパク質の共受容体結合部位に結合することが知られている抗体(MAb17b)への可溶性合成HIVエンベローブタンパク質の結合を測定することにより試験された。特に、CD4へのsC4の前の結合を有する、およびCD4へのsC4の前の結合を有しない、MAb17bへの結合について、精製されたsC4の結合を試験した。精製したsC1を対照として使用した。前のエンベローブタンパク質へのCD4結合を有しないsC4へのMAb17bの結合は、部分的に折り畳

50

まれていないか、またはプレトリガーされたエンベロープタンパク質（すなわち、CD4結合の非存在下で「オープン」コンフォメーションをとる不安定なEnv）を示す。ELISAアッセイの結果を図3Aおよび図3Bに示す。

【0158】

図3Bに示すように、sC4は、CD4への前の結合があるとMAb17bへの強い結合を示すが、CD4への前の結合がないとMAb17bへの検出可能な結合を示さない。これに対し、図3Aに示すように、sC1は、CD4への前の結合の有る場合および無い場合の両方で、MAb17に対する結合はるかに低いことを示した。この結果は、sC4が正しい折り畳みパターンを有し、CD4結合前に共受容体結合部位の曝露がないことを示唆する。

10

【0159】

可溶性タンパク質変異体の四次構造およびプロトマー間の誤ったジスルフィド架橋形成を評価するために、sC1およびsC4の未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）によってタンパク質の折り畳みを分析した。未変性ゲル上での電気泳動後、ゲル中のタンパク質をウェスタンブロット分析によって検出した。図4の結果に示すように、sC4の大部分は三量体状態で存在し、これは正しい四次構造である。

【0160】

まとめると、タンパク質の折り畳み実験の結果は、sC4可溶性合成HIVエンベロープタンパク質が、所望の折り畳みプロファイルを有し、既存のmos2Env抗原（sC1によって表される）の折り畳みプロファイルと比較して改善されることを実証する。

20

【0161】

細胞表面発現

HIVエンベロープタンパク質C1（全長）、C4（全長、図1A参照）、C1D7、およびC4D7の膜結合変異体の細胞表面発現もまた研究された。HEK293T細胞を、eGFPコードプラスミドのみ（陰性対照、NC）、またはeGFPコードプラスミドとともにHIVエンベロープタンパク質変異体をコードする発現構築物を一緒に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、gp120および二次抗体に対するいくつかのポリおよびモノクローナル抗体への曝露により細胞を蛍光活性化細胞選別（FACS）分析にかけ、次いでエンベロープタンパク質の細胞表面発現レベルを調べた。エンベロープ変異体の品質は、抗gp120ポリクローナル抗体を用いて全体の発現レベルを決定すること、および四次構造依存性であり、正しく折り畳まれたエンベロープ三量体に優先的に結合する、広範に中和する抗体PG9およびPG16の相対的結合を評価することによって評価した。

30

【0162】

細胞表面発現実験の結果を図5に示す。抗gp120抗体を用いて測定された短縮型変異体C1D7およびC4D7の表面発現レベルは、その全長対応物であるC1およびC4の表面発現レベルよりもはるかに高い。これは、Envのカルボキシ末端からの144残基の欠失がエンベロープ表面発現レベルを増加させることを確認する。本発明の全長C4構築物はまた、全長C1と比較して改善されたPG9およびPG16結合を示し、これはC4エンベロープ配列が細胞表面上で適切に折り畳まれている（すなわち三量体）ことを示唆する。

40

【0163】

この結果はまた、細胞膜ドメインの膜貫通ドメインおよび7個のアミノ酸が付加された本質的にMos2EnvであるC1D7変異体が、HEK293T細胞上に表面発現され得ることを実証する。これは、Ad26.mos2Envにおける可溶性構築物と対照的に、A549細胞にトランスフェクトされた場合、表面上で検出可能なレベルで発現することができない。しかしながら、PG9およびPG16への相対的な結合は、バックグラウンドを上回ってほとんど検出されず、これは、C1D7エンベロープ配列が折り畳まれておらず、おそらく細胞表面上に完全な三量体として存在しないことを示唆している。

【0164】

50

全体的に、C4D7エンベロープ変異体は、最適な抗体結合プロファイルを有し、全長対応物C4より高いgp120発現を有し、およびC1およびC1D7と比較して15倍を超えるPG9およびPG16結合を有する(図5)。

#### 【0165】

実施例3：HIVエンベロープ配列をコードするベクターの安定性

我々の研究室における以前の研究(未発表)は、mos2Env抗原配列をコードするアデノウイルス26(Ad26)ベクターが比較的高いVP/IU比(アデノウイルス産生物バッチの品質が低いことを示す)を示し、さらにそのようなベクターは安定性の問題を示した。したがって、本発明の合成HIVエンベロープタンパク質構築物のアデノウイルスバックグラウンドにおける安定性を試験することが重要であった。

10

#### 【0166】

上記の実施例1に記載のC4、C4D7およびsC4のHIV抗原配列をコードする組換えAd26(rAd26)ベクターを、PER.C6細胞中で生成した(それぞれ、「rAd26.C4」、「rAd26.C4D7」、および「rAd26.sC4」と称する)。ベクタークローン(ブランク)を採取し、研究バッチの生成のためにスケールアップした。最大5つのウイルスクローン(ブランク)をT25フォーマットにスケールアップし、T25フォーマットで10継代、連続的に継代培養した(トランスフェクションおよびブランク精製工程である1~3継代、続いてT25フォーマットで10継代、合計13継代となった)。遺伝的安定性は、E1導入遺伝子カセットPCRアッセイ、続いてvpn13で配列決定することにより、ウイルス継代数(vp<sub>n</sub>)3, 5, 10および13で評価した。結果を図6に示す。

20

#### 【0167】

全長C4をコードするrAd26ベクター(rAd26.C4)は、2~3日で完全な細胞病原性効果(CPE)がないことによって決定されるような、不十分な増殖特性; E1導入遺伝子カセット領域の欠失によって決定されるような、遺伝的不安定性; またはその組み合わせを示した(図6)。不十分な増殖特性および観察された遺伝的不安定性のために、全長C4をコードするこのベクターはさらに追求されなかった。

#### 【0168】

対照的に、C4D7をコードするrAd26ベクター(rAd26.C4D7)およびsC4をコードするrAd26ベクター(rAd26.sC4)では、すべての増殖したブランクは、実験の過程で遺伝的に安定したままであった(図6)。したがって、新規のsC4およびC4D7構築物は、アデノウイルスベクターのバックグラウンドにおける安定性に関して元のmos2Env構築物より優れている。vpn13までの遺伝的安定性試験は、ベクターの工業的規模の調製に使用されたものを超えるいくつかの継代の増殖を表す。

30

#### 【0169】

実施例4：アデノウイルスベクターにおけるHIVエンベロープ配列の発現およびin vivo抗原性

rAd26.C4D7およびrAd26.sC4の発現および抗原性を、in vitroでベクター形質導入A549細胞(ヒト細胞株)中のmos1Env(配列番号5)をコードする組換えAd26ベクター(以下「rAd26.mos1Env」と別々にまたは組み合わせて評価した。フローサイトメトリー分析は、すべての抗原が、対照としての単一エンベロープ抗原の $2 \times 10^4$ ウイルス粒子(vp)またはアデノウイルス形質導入による2つの組み合わせられたEnv抗原の $1 \times 10^4$ vpのいずれかで形質導入された細胞培養物において発現したことを実証した。すべての形質導入は、mos1GagPolをコードするアデノウイルスベクター(「rAd26.mos1GagPol」)およびmos2GagPolをコードするアデノウイルスベクター(「rAd26.mos2GagPol」)(Barouchら、Nat Med 2010、16:319-323)の単回用量( $1 \times 10^4$ vp)をさらに含み、その結果、評価されたベクターの組み合わせは、前臨床および臨床使用のために意図されるような異なるアデノウイルスベク

40

50

ターの相対比を示した。好ましくは、本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードするベクターは、臨床用途のためにmos1GagPolおよびmos2GagPol抗原をコードするベクターと組み合わせられる。

【0170】

rAd26.mos1EnvおよびrAd26.C4D7の組み合わせは、モノクローナル抗体結合によって決定される、評価されたエピトープの最大の適用範囲を生じた。特に、Ad26.C4D7による形質転換によって寄与されたPG16エピトープの曝露は、PG16がHIV-1 EnvのV1/V2ループ領域を認識する広範に中和するモノクローナル抗体を表すことから、ワクチンの使用に有望である(Walkerら、Science 2009)。したがって、C4配列に由来する本発明の合成HIVエンベロープタンパク質は、mos1Envのみによって生成される免疫応答と比較して、HIVエンベロープタンパク質に対する免疫応答の幅を増加させる。エンベロープタンパク質領域に向けられたワクチン誘導抗体応答は、RV144の研究(Haynesら、N Engl J Med. 2012)におけるHIV-1感染からの保護と関連することが示されており、したがって、本発明の合成HIVエンベロープタンパク質HIVワクチンレジメンに含める有望な候補である。

10

【0171】

実施例5：合成HIVエンベロープタンパク質をコードするベクターの免疫原性

Ad26ベクターバックグラウンドにおける本発明の合成HIVエンベロープタンパク質配列をウサギで試験して、これらの構築物がrAd26.mos2Env構築物に対する免疫原性の代替物であるかどうかを決定した。

20

【0172】

mos1Env(rAd26.mos1Env；配列番号5)をコードするアデノウイルスベクターの免疫原性を、単独で、および本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター(rAd26.C4D7およびrAd26.sC4；それぞれ配列番号8、特に配列番号18および19を含む)と組み合わせて試験した。すべての場合において、mos1GagPol抗原およびmos2GagPol抗原(rAd26.mos1GagPol[配列番号28]およびrAd26.mos2GagPol[配列番号29])をコードするアデノウイルス26ベクターも投与した。より具体的には、rAd26.mos1Env(3価ワクチン：rAd26.mos1GagPol、rAd26.mos2GagPolおよびrAd26.mos1Env)単独の免疫原性を、rAd26.C4D7またはrAd26.sC4の1つと組み合わせたrAd26.mos1Env(4価ワクチン：rAd26.mos1GagPol、rAd26.mos2GagPol、rAd26.mos1EnvおよびrAd26.C4D7；またはrAd26.mos1GagPol、rAd26.mos2GagPol、rAd26.mos1EnvおよびrAd26.sC4の投与)の免疫原性と比較した。本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードするベクターを欠く3価ワクチンと、本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードするベクターを含む4価ワクチンとの比較により、本発明のHIVエンベロープタンパク質が保護の幅に寄与しているかどうかを決定することができる。

30

40

【0173】

これらのAd26ベクターを第0週および第6週に二重プライムとして投与し、クレードC gp140タンパク質(残基1~29のシグナルペプチド配列を有しない、配列番号7を有する3価Env gp140タンパク質、国際公開第2010/042942号パンフレット参照)を第12週および第18週に二重ブーストとして投与した(例えば、Barouchら、2015、Science 349:320-324参照)。表1は、現在の研究に使用されたワクチンレジメンを記載する。rAd26.エンベティは、HIV抗原タンパク質の配列をコードする遺伝子を欠く対照ベクターを指す。各グループは6匹のウサギを含んでいた。

【0174】

50

【表 1】

表 1:ウサギの免疫原性試験で試験したワクチンレジメン

グループ	第 1 および第 2 免疫			第 3 および第 4 免疫			N=
	アデノベクター	用量(vp)	総容量 (vp)	タンパク質ブースト	用量 (ug)	アジュバント	
1	rAd26.Mos1Env	2.5x10 <sup>10</sup>	5x10 <sup>10</sup>	GP140 (クレード C)	10	AdjuPhos 250μg	6
	rAd26.Mos1GagPol	1.25x10 <sup>10</sup>					
	rAd26.Mos2Gagpol	1.25x10 <sup>10</sup>					
2	rAd26.Mos1Env	1.25x10 <sup>10</sup>	5x10 <sup>10</sup>	GP140 (クレード C)	10	AdjuPhos 250μg	6
	rAd26.C4D7	1.25x10 <sup>10</sup>					
	rAd26.Mos1GagPol	1.25x10 <sup>10</sup>					
	rAd26.Mos2Gagpol	1.25x10 <sup>10</sup>					
3	rAd26.Mos1Env	1.25x10 <sup>10</sup>	5x10 <sup>10</sup>	GP140 (クレード C)	10	AdjuPhos 250μg	6
	rAd26.sC4	1.25x10 <sup>10</sup>					
	rAd26.Mos1GagPol	1.25x10 <sup>10</sup>					
	rAd26.Mos2Gagpol	1.25x10 <sup>10</sup>					
対照	rAd26.エンブティ	5x10 <sup>10</sup>	5x10 <sup>10</sup>	NA	0	AdjuPhos 250μg	6

10

20

## 【 0 1 7 5 】

3 価 A d 2 6 ワクチン（本発明の新規 E n v 抗原を欠く）と 4 価 A d 2 6 ワクチン（新規 s C 4 または C 4 D 7 E n v 抗原を含む）との比較は、新規抗原が保護の幅に寄与するかどうかを試験することを可能にする。確立された T Z M - b 1 細胞ベースの中和アッセイ [ M o n t e f i o r i D C . M e t h o d s M o l B i o l 2 0 0 9 , 4 8 5 : 3 9 5 - 4 0 5 ; S a r z o t t i - K e l s o e M R , J I m m u n o l M e t h o d s 2 0 1 4 , 4 0 9 : 1 3 1 - 1 4 6 ] を使用して、ワクチン候補の中和活性を測定した。

## 【 0 1 7 6 】

結果を図 7 に示し、3 価ワクチン（表 1 のグループ 1）を対照群として用い、新規 4 価ワクチン（表 1 のグループ 2 および 3）のそれぞれと比較することによって、統計的に分析した。

## 【 0 1 7 7 】

全体的に、新規の C 4 由来（すなわち、配列番号 8 を含む E n v タンパク質をコードする、m o s 2 E n v の代替物である）アデノ構築物は、ウサギにおける 2 つの相同な筋肉内免疫後に免疫原性であった。

## 【 0 1 7 8 】

ティア 1 B シュードウイルスに対するウサギ免疫血清の中和能力は非存在であったが（データは示さず）、このようなウイルスは中和することがより困難であることが知られていたため、これは予想外ではない。

## 【 0 1 7 9 】

クレード B ティア 1 A ウイルスに対するウサギ免疫血清のシュードウイルス中和能力は、新規成分の添加によって影響を受けなかった（データは示さず）。これは、新規抗原がワクチン中に存在する既存のクレード B 抗原の免疫原性を否定的に妨げないことを実証している（新規成分はクレード C に向けられていたが、そのような望ましくない干渉を試験前に先験的に除外できなかった）。

## 【 0 1 8 0 】

クレード C ティア 1 A ウイルスに対するウサギ免疫血清のシュードウイルス中和能力は、3 価（m o s 1 E n v のみを有する）免疫のみ（グループ 1）と比較して、アデノを含

30

40

50

有する4価の新規C4D7(4価、グループ2)において、有意に増強された(図7パネルB)。さらに、8週目でのクレードCティア1Aウイルスに対するウサギ免疫血清のシュードウイルス中和能力は、3価(mos1Envのみを有する)免疫のみ(グループ1)と比較して、アデノを含有する4価の新規sC4(4価、グループ3)において、有意に増強された(図7パネルB)。

#### 【0181】

結論として、Ad26にコードされるC4D7およびsC4構築物は免疫原性であり、その追加は、mos1Env(主にクレードB)を唯一のAd26-コードEnv成分として有するワクチンのクレードC株に対する結合および中和能力を拡大した(図7B)。

#### 【0182】

実施例6：本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードするベクターを含むワクチンレジメンの免疫原性

1つのさらなるウサギの研究は、4価ベクターの組み合わせAd26・Mos4・HIV(4つのアデノウイルスベクターからなる：Ad26・Mos1GagPol[配列番号28をコードする]、d26・Mos2GagPol[配列番号29をコードする]、Ad26・Mos1Env[配列番号5をコードする]、およびAd26・Mos2SEnv[上記の「C4D7」という名前は「Mos2S」とも称される；このベクターは、本発明による新規配列番号18をコードする]、1:1:1:1の混合物中、 $5 \times 10^9$  vpの総用量で)を、第0週および第6週に二重プライム免疫として筋肉内に適用し、クレードC gp140[配列番号7のアミノ酸残基30~708の配列を有する]、モザイク gp140[配列番号36のアミノ酸残基30~724の配列を有する]、またはクレードC gp140およびモザイク gp140を組み合わせ、第13週および第19週に適用して、評価した。これらのタンパク質ブーストを、免疫化の日に処方された250mcgのリン酸アルミニウムアジュバントと組み合わせた10または50マイクログラムのタンパク質総量で筋肉内に適用した。

#### 【0183】

結果は、すべての試験レジメンがすべての動物において免疫原性であり、高い抗体力価およびティア1Envシュードタイプウイルスに対する中和活性を誘導することを示す。モザイク gp140をワクチン抗原として単独でまたはクレードC gp140と組み合わせ使用した場合、モザイク gp140特異的ELISA力価およびクレードBシュードウイルスの認識は、クレードC gp140単独でブーストした対照群と比較して第15週で有意に増加した。全体的な改善の効果の大きさは中程度であり、モザイク gp140単独と比較して、2価クレードC gp140-モザイク gp140の組み合わせでブーストされたグループについては、より大きかった。研究の21週目で、これらの差異は失われ、2価クレードC gp140-モザイク gp140ブーストまたは1価クレードC gp140ブーストを受けたコホートについて測定された免疫応答は、統計的に区別できなかった。

#### 【0184】

2価タンパク質レジメンは、クレードC gp140単独でブーストしたレジメンと同等のクレードCのELISA力価の誘導およびシュードウイルス認識を示し、これは、クレードB関連免疫原モザイク gp140の包含が、クレードC抗原の適用範囲に陰性影響を与えなかった一方で、研究の15週目にクレードBの適用範囲を優位に増強したことを示唆する。

#### 【0185】

データにより、本発明による合成Env抗原をコードするAd26・Mos2SEnvベクターが、ワクチンレジメンで首尾よく使用できることが確認される。

#### 【0186】

参考文献

1. Barouch et al, Nat Med 2010, 16:319-323
2. 国際公開第2010/059732号パンフレット

10

20

30

40

50

- 3 . Schiernle et al . , PNAS 94 : 8640 - 8645 , 1997
- 4 . Abrahamyan et al . , J Virol 79 : 106 - 115 , 2005
- 5 . 米国特許出願公開第2012/0076812号明細書
- 6 . Barouch et al . , Cell 155 : 1 - 9 , 2013
- 7 . Havenga , et al . , 2006 , J Gen Virol 87 : 2135 - 43 ;
- 8 . 国際公開第03/104467号パンフレット
- 9 . 国際公開第2004/001032号パンフレット 10
- 10 . 国際公開第2007/104792号パンフレット
- 11 . Abbinck et al . , (2007) Virol 81(9) : 4654 - 63
- 12 . 米国特許第7,270,811号明細書
- 13 . Vogels et al . , (2003) J Virol 77(15) : 8263 - 71
- 14 . 国際公開第00/70071号パンフレット
- 15 . 国際公開第2012/082918号パンフレット
- 16 . Walker LM , Phogat SK , Chan - Hui PY , Wagner D , Phung P , Goss JL , et al . Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV - 1 vaccine target . Science 2009 , 326 : 285 - 289 . 20
- 17 . Haynes BF , Gilbert PB , McElrath MJ , Zolla - Pazner S , Tomaras GD , Alam SM , et al . Immune - correlates analysis of an HIV - 1 vaccine efficacy trial . N Engl J Med 2012 , 366 : 1275 - 1286 .
- 18 . Barouch et al . (2015) Science 349 : 320 - 324 30
- 19 . Montefiori DC . Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay . Methods Mol Biol 2009 , 485 : 395 - 405 .
- 20 . Sarzotti - Kelsoe M , Bailer RT , Turk E , Lin CL , Biliska M , Greene KM , et al . Optimization and validation of the TZM - bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV - 1 . J Immunol Methods 2014 , 409 : 131 - 146 . 40
- 21 . Edwards et al . , J . Virology , 2002 , 76 : 2683 - 2691 .

また、本発明は以下を提供する。

[ 1 ] 配列番号8、または(i) I529P、(ii) K480E、および(iii) EK479 - 480RRRR、I529P、A471CおよびT575Cの組み合わせ、からなる群から選択される1つ以上の変異を有する配列番号8、のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードする、核酸。

[ 2 ]

前記合成HIVエンベロープタンパク質が、シグナル配列、例えば、配列番号9～配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むシグナル配列をさらに含む、[ 1 50

]に記載の核酸。

[ 3 ]

前記合成H I Vエンベロープタンパク質が、膜貫通ドメイン、例えば、配列番号13を含む膜貫通ドメインをさらに含み、好ましくは、前記合成H I Vエンベロープタンパク質が、配列番号8のC末端および前記膜貫通ドメインのN末端に融合された配列番号37をさらに含む、[ 1 ]または[ 2 ]に記載の核酸。

[ 4 ]

前記合成H I Vエンベロープタンパク質が、細胞質ドメインの断片、好ましくは配列番号14のアミノ酸配列またはその残基1～4を含む細胞質ドメインの断片をさらに含む、[ 3 ]に記載の核酸。

10

[ 5 ]

前記合成H I Vエンベロープタンパク質が、配列番号18のアミノ酸配列を含む、[ 1 ]～[ 4 ]のいずれか1項に記載の核酸。

[ 6 ]

前記合成H I Vエンベロープタンパク質が、( a )三量体形成ドメイン、例えば、配列番号15または配列番号16のアミノ酸配列を有する三量体形成ドメインをさらに含む、または( b )変異E K 4 7 9 - 4 8 0 R R R R、I 5 2 9 P、A 4 7 1 CおよびT 5 7 5 C、の組み合わせを有する配列番号8を含む、[ 1 ]または[ 2 ]に記載の核酸。

[ 7 ]

前記合成H I Vエンベロープタンパク質が、配列番号19の残基1～686のアミノ酸配列を含む、[ 6 ]に記載の核酸。

20

[ 8 ]

[ 1 ]～[ 7 ]のいずれか一項に記載の核酸を含むベクターであって、前記核酸が、プロモーター配列に作動可能に連結されている、ベクター。

[ 9 ]

ウイルスベクター、好ましくはアデノウイルスベクターである、[ 8 ]に記載のベクター。

[ 10 ]

前記アデノウイルスベクターが、ヒトアデノウイルス血清型26 ( A d 2 6 )ベクターである、[ 9 ]に記載のベクター。

30

[ 11 ]

[ 8 ]～[ 10 ]のいずれか一項に記載のベクターを含む、単離された細胞。

[ 12 ]

[ 8 ]～[ 10 ]のいずれか一項に記載のベクターの免疫原的有効量および担体を含む、組成物。

[ 13 ]

( i )配列番号8、好ましくは配列番号18のアミノ酸配列を有する合成H I Vエンベロープタンパク質をコードするアデノウイルスベクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターの免疫原的有効量を含む第1の組成物、

( i i )配列番号5のアミノ酸配列を含むH I V抗原性ポリペプチドをコードする第2のアデノウイルスベクター、好ましくは第2のアデノウイルス26ベクターの免疫原的有効量を含む第2の組成物、ならびに任意選択により、

40

( i i i )少なくとも1つのさらなる組成物であって、

( i i i a )配列番号1～4、28および29からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つの抗原性ポリペプチドをコードするベクター、および

( i i i b )配列番号7のアミノ酸配列の残基30～708、または配列番号36の残基30～724を有する単離されたH I V抗原性ポリペプチドの免疫原的有効量を含むポリペプチド

からなる群から選択される少なくとも1つの免疫原的有効量を含む、少なくとも1つのさらなる組成物

50

を含むワクチンの組み合わせであって、前記第1の組成物、第2の組成物およびさらなる組成物は、同じ組成物中または1つ以上の異なる組成物中に存在する、ワクチンの組み合わせ。

[ 1 4 ]

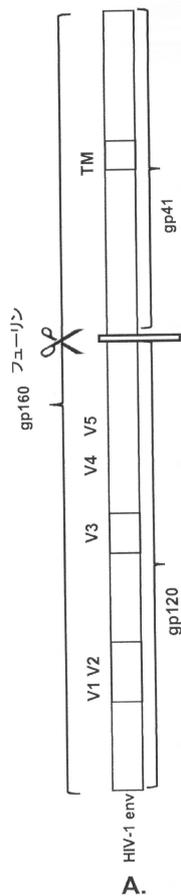
ヒト免疫不全ウイルス (H I V) に対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、前記方法が、[ 1 2 ] に記載の組成物または [ 1 3 ] に記載のワクチンの組み合わせを対象に投与することを含む、方法。

[ 1 5 ]

配列番号 8、または ( i ) I 5 2 9 P、( i i ) K 4 8 0 E、および ( i i i ) E K 4 7 9 - 4 8 0 R R R R、I 5 2 9 P、A 4 7 1 C および T 5 7 5 C の組み合わせ、からなる群から選択される 1 つ以上の変異を有する配列番号 8 のアミノ酸配列を含む、好ましくは、( i ) 変異 E K 4 7 9 - 4 8 0 R R R R、I 5 2 9 P、A 4 7 1 C および T 5 7 5 C、の組み合わせを有する配列番号 8、( i i ) 配列番号 1 8 のアミノ酸残基 3 0 ~ 7 0 4、または ( i i i ) 配列番号 1 9 のアミノ酸残基 3 0 ~ 6 8 6 を含む、合成 H I V エンペロータンパク質。

10

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】

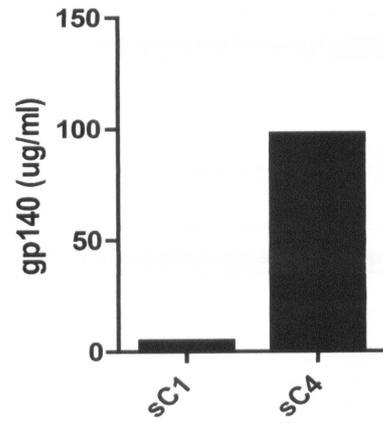


【 図 1 C 】

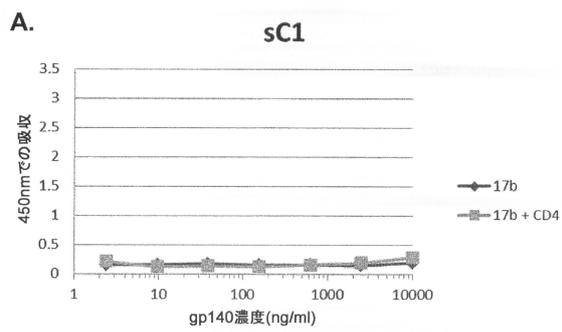


C.

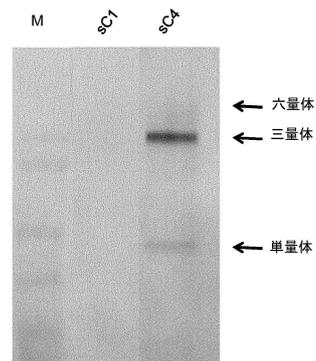
【 図 2 】



【 図 3 A 】



【 図 4 】



【 図 3 B 】

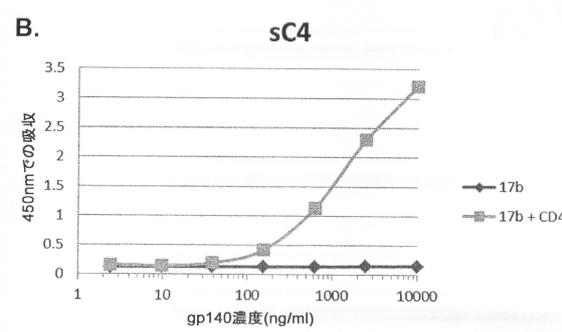


図4

【 図 5 】

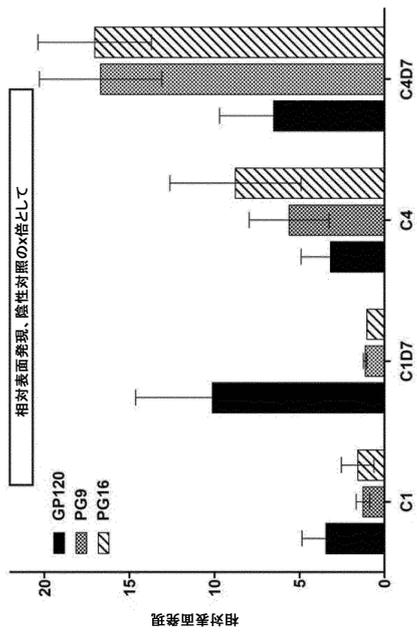
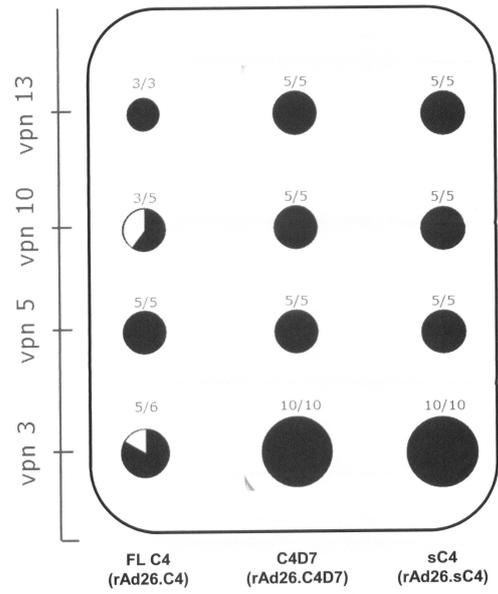
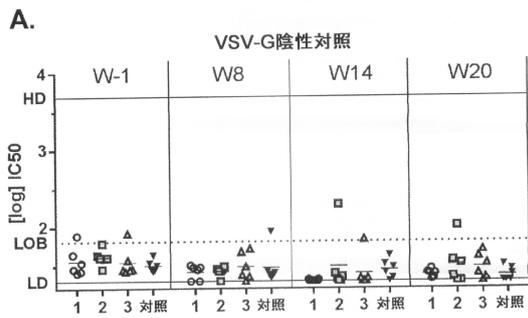


図5

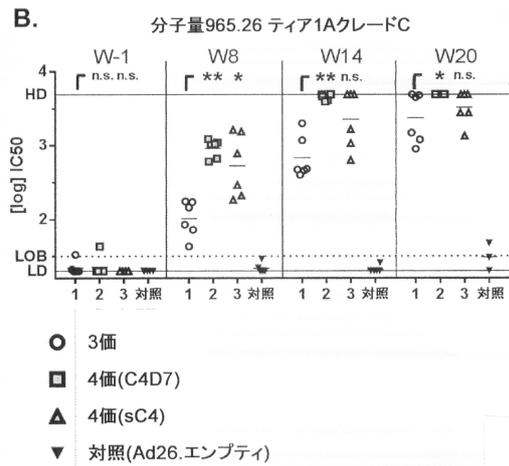
【 図 6 】



【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【配列表】

0006959289000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/86	(2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 15/867	(2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 7/01	(2006.01)	C 1 2 N 7/01	
A 6 1 K 39/21	(2006.01)	A 6 1 K 39/21	
A 6 1 K 35/76	(2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18	

(74)代理人 100135943

弁理士 三橋 規樹

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ランゲディク, ヨハネス, ペトラス, マリア

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスヴェヒ 4 - 6

(72)発明者 カレンドラ, ブノワ, クリストフ, ステファン

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスヴェヒ 4 - 6

(72)発明者 ヴァン マネン, ダニエル

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスヴェヒ 4 - 6

(72)発明者 クラルプ, アンダース

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスヴェヒ 4 - 6

(72)発明者 ステイツ, ヨレン

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスヴェヒ 4 - 6

(72)発明者 ウェグマン, フランク

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスヴェヒ 4 - 6

(72)発明者 ヴェリンガ, ジョルト

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスヴェヒ 4 - 6

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 特表2012-509340(JP, A)

国際公開第2014/107744(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

P u b m e d

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

U n i P r o t / G e n e S e q