

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7272965号
(P7272965)

(45)発行日 令和5年5月12日(2023.5.12)

(24)登録日 令和5年5月1日(2023.5.1)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/863 (2006.01)	C 1 2 N	15/863	Z
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K	39/21	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18	

請求項の数 19 (全64頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-569228(P2019-569228)	(73)特許権者	516257833
(86)(22)出願日	平成30年6月14日(2018.6.14)		ヤンセン ファッションズ アンド プリベ ンション ペーフェー
(65)公表番号	特表2020-527029(P2020-527029 A)		JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(43)公表日	令和2年9月3日(2020.9.3)		オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン
(86)国際出願番号	PCT/IB2018/054386		アルヒメーデスウェッハ 4
(87)国際公開番号	WO2018/229711	(73)特許権者	509296443
(87)国際公開日	平成30年12月20日(2018.12.20)		バヴァリアン・ノルディック・アクティ ーゼルスカブ
審査請求日	令和3年5月27日(2021.5.27)		デンマーク国、3 4 9 0 クヴィストゴ ード、ヘイレスコフヴェイ、1 0 アエ
(31)優先権主張番号	62/520,079	(74)代理人	100092783
(32)優先日	平成29年6月15日(2017.6.15)		弁理士 小林 浩
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100095360

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HIV抗原をコードするボックスウイルスベクターおよびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む第 1 の HIV エンベロープ (Env) 抗原；
- (b) 前記第 1 の HIV Env 抗原とは異なる第 2 の HIV Env 抗原；
- (c) 2 つの異なる HIV Gag 抗原である第 3 の抗原および第 4 の抗原；ならびに、
- (d) 2 つの異なる HIV Pol 抗原である第 5 の抗原および第 6 の抗原

をコードする核酸を含むボックスウイルスベクター。

【請求項 2】

前記第 2 の HIV Env 抗原が配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、
前記第 3 および第 4 の抗原が、それぞれ配列番号 1 および配列番号 2 のアミノ酸配列を含
み；ならびに
前記第 5 および第 6 の抗原が、それぞれ配列番号 3 および配列番号 4 のアミノ酸配列を含
む、請求項 1 に記載のボックスウイルスベクター。

【請求項 3】

前記第 3 および第 5 の抗原が融合されて、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む第 1 の G
ag - Pol 融合抗原となっており、前記第 4 および第 6 の抗原が融合されて、配列番号
2 9 のアミノ酸配列を含む第 2 の Gag - Pol 融合抗原になっている、請求項 1 または
請求項 2 に記載のボックスウイルスベクター。

【請求項 4】

前記第 1 の HIV Env 抗原が配列番号 4 1 によってコードされる、請求項 1 ~ 3 の

いずれか一項に記載のボックスウイルスベクター。

【請求項 5】

前記第 1 の H I V E n v 抗原が配列番号 4 1 によってコードされ；

前記第 2 の H I V E n v 抗原が配列番号 3 9 によってコードされ；

前記第 1 の G a g - P o l 融合抗原が配列番号 3 8 によってコードされ；および

前記第 2 の G a g - P o l 融合抗原が配列番号 4 0 によってコードされる、請求項 3 に記載のボックスウイルスベクター。

【請求項 6】

前記ボックスウイルスベクターが組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) ベクターである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のボックスウイルスベクター。

10

【請求項 7】

前記 M V A ベクターが、M V A - B N (登録商標) またはその誘導体を含む、請求項 6 に記載のボックスウイルスベクター。

【請求項 8】

前記第 3 および第 5 の抗原が融合されて、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む第 1 の G a g - P o l 融合抗原となっており、前記第 4 および第 6 の抗原が融合されて、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む第 2 の G a g - P o l 融合抗原となっており、前記第 1 の G a g - P o l 融合抗原および前記第 2 の E n v 抗原が、M V A ゲノムの遺伝子間領域 (I G R) 4 4 / 4 5 に挿入され、前記第 2 の G a g - P o l 融合抗原および前記第 1 の E n v 抗原が、M V A ゲノムの I G R 8 8 / 8 9 に挿入されている、請求項 6 または 7 に記載のボックスウイルスベクター。

20

【請求項 9】

前記第 3 および第 5 の抗原が融合されて、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む第 1 の G a g - P o l 融合抗原となっており、前記第 4 および第 6 の抗原が融合されて、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む第 2 の G a g - P o l 融合抗原となっており、前記第 1 の G a g - P o l 融合抗原および前記第 2 の G a g - P o l 融合抗原がそれぞれ、別個の P r 1 3 . 5 プロモーターの制御下にあり、前記第 1 の E n v 抗原および前記第 2 の E n v 抗原がそれぞれ、別個の P r H y b プロモーターの制御下にある、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載のボックスウイルスベクター。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のボックスウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含むワクチン。

30

【請求項 11】

(a) 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の、免疫学的有効量のボックスウイルスベクターを含む第 1 のワクチン組成物と、

(b) (i) 第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、および第 6 の抗原の少なくとも 1 つをコードする免疫学的有効量の 1 つまたは複数のアデノウイルスベクターを含む第 2 のワクチン組成物；および、

(b) (i i) 免疫学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 1 つまたは複数のポリペプチドを含む第 3 のワクチン組成物

40

の少なくとも 1 つとを含み、第 1 の組成物ならびに第 2 および / または第 3 の組成物が同じ組成物、または 1 つもしくは複数の異なる組成物中に存在するワクチン組合せ物。

【請求項 12】

前記第 2 のワクチン組成物が、合わせて、配列番号 1 8、5、1、2、3、および 4 をコードする組換え A d 2 6 ベクターを含む、請求項 11 に記載のワクチン組合せ物。

【請求項 13】

前記第 3 のワクチン組成物における 1 つまたは複数の単離された H I V 抗原性ポリペプチドが、

(i) 配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 0 8 を含むポリペプチド、または

(i i) 配列番号 3 6 の残基 3 0 ~ 7 2 4 を含むポリペプチド、または

50

(i i i) ポリペプチド (i) と (i i) の両方を含む、請求項 1 1 または 1 2 に記載のワクチン組合せ物。

【請求項 1 4】

それを必要とする対象においてヒト免疫不全ウイルス (H I V) に対する免疫応答を誘導するための、請求項 1 0 に記載のワクチンまたは請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のワクチン組合せ物。

【請求項 1 5】

それを必要とする対象において、ヒト免疫不全ウイルスに対する免疫応答を誘導する方法であって、

(a) 配列番号 1、2、3、4、5 および 1 8 の 1 つまたは複数をコードする 1 つまたは複数の組換えアデノウイルスベクターを含む第 1 のワクチン；および

(b) 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のボックスウイルスベクターを含む第 2 のワクチン；

を前記対象に投与するステップを含み、ここで前記第 1 のワクチンがプライムワクチンであり、前記第 2 のワクチンがブーストワクチンであり、または前記第 2 のワクチンがプライムワクチンであり前記第 1 のワクチンがブーストワクチンである方法に使用するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のボックスウイルスベクターを含むワクチン。

【請求項 1 6】

組換えアデノウイルスベクターが、組換え A d 2 6 ベクターである、請求項 1 5 に記載のワクチン。

【請求項 1 7】

前記方法が、前記ブーストワクチンと同時に、1 つまたは複数の単離された H I V 抗原性ポリペプチドを対象に投与するステップをさらに含み、前記 1 つまたは複数の単離された H I V 抗原性ポリペプチドが、前記ブーストワクチンと同じ組成物中、または前記ブーストワクチンとは別の組成物中にある、請求項 1 5 または 1 6 に記載のワクチン。

【請求項 1 8】

前記 1 つまたは複数の H I V 抗原性ポリペプチドが、

(i) 配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 0 8 を含むポリペプチド；または

(i i) 配列番号 3 6 の残基 3 0 ~ 7 2 4 を含むポリペプチド；または

(i i i) ポリペプチド (i) と (i i) の両方

を含む、請求項 1 7 に記載のワクチン。

【請求項 1 9】

前記対象が、H I V が感染している対象である、請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれか一項に記載のワクチンまたはワクチン組合せ物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法 1 1 9 条 (e) に従って、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、2 0 1 7 年 6 月 1 5 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 5 2 0 , 0 7 9 号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

電子出願された配列表の参照

本出願は、作成日 2 0 1 7 年 6 月 7 日、サイズ 1 7 4 . 4 K B のファイル名「6 8 8 0 9 7 - 3 3 1 W O S e q u e n c e L i s t i n g」である A S C I I フォーマットされた配列表として E F S - W e b により電子的に提出される配列表を含有する。E F S - W e b によって提出される配列表は、明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 3】

10

20

30

40

50

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、世界中で数百万人の人々を冒し、有効なワクチンによるHIVの予防は、抗レトロウイルス処置が普及した時代であってさえも、優先順位が非常に高いままである。HIV-1は、ウイルスの最も一般的な病原性株であり、90%より多くのHIV/AIDSの症例が、HIV-1のグループMによる感染に由来する。Mグループは、クレードまたはサブタイプにさらに細分される。有効なワクチンは、理想的には、強力な細胞応答と異なるクレード由来のHIV-1株を中和することができる広範な中和抗体の両方を引き出すことができる。

【0004】

HIV-1の高い遺伝的変動により、HIV-1ワクチンの開発は前例のない難題となっている。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群抗原（Gag）、ポリメラーゼ（Pol）、およびエンベロープ（Env）タンパク質に由来する、「モザイク」HIV-1 Gag、PolおよびEnv抗原が他に記載され、潜在的なT細胞エピトープの最大適用範囲を提供する試みで開発された（例えば、Barouch et al, Nat Med 2010, 16: 319-323）。モザイク抗原は、野生型、自然に発生するHIV-1抗原と、長さおよびドメイン構造が類似している。

10

【0005】

例えば、記載され、ワクチンで使用されるモザイクHIV抗原は、上記のBarouch et alおよび国際公開第2010/059732号パンフレットに記載のもの、例えば、

(a) 以下を含むGagモザイク抗原：

(a) (i) 配列番号1で本明細書に記載されるアミノ酸配列を有する第1のモザイクGag配列（「mos1Gag」）、および

20

(a) (ii) 配列番号2で本明細書に記載されるアミノ酸配列を有する第2のモザイクGag配列（「mos2Gag」）、

(b) 以下を含むPolモザイク抗原：

(b) (i) 配列番号3で本明細書に記載される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で本明細書に記載される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で本明細書に記載されるアミノ酸配列を有する第1のモザイクEnv配列（「mos1Env」）、および

30

(c) (ii) 配列番号6で本明細書に記載されるアミノ酸配列を有する第2のモザイクEnv配列（「mos2Env」）

を含む。

【0006】

これらの抗原をコードする配列は、ベクター、例えば組換えアデノウイルスベクターなど、例えば組換えアデノウイルス血清型26（rAd26）にクローニングされており、これらの組換えベクターは、抗原に免疫応答を生じるワクチンとして以前に使用された（例えば、上記のBarouch et al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の融合タンパク質に結合され（「mos1GagPol」）、そのコード配列は第1のAd26ベクターにクローニングされ（「rAd26.mos1GagPol」）、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に結合され（「mos2GagPol」）、そのコード配列は第2のAd26ベクターにクローニングされる（「rAd26.mos2GagPol」）。mos1Envおよびmos2Envをコードする構築物は、典型的には別個のAd26ベクターにクローニングされる（それぞれ「rAd26.mos1Env」および「rAd26.mos2Env」）。

40

【0007】

上記のそのようなモザイク抗原のセットは、グループMのHIV-1単離株の良好な全

50

体的な適用範囲を与え、モザイク1抗原配列をコードするrAd26ベクター（例えば、rAd26.mos1GagPolおよびrAd26.mos1Env）は、クレードBおよびCRF01_HIV-1サブタイプを好み、モザイク2抗原配列をコードするrAd26ベクター（例えば、rAd26.mos2GagPolおよびrAd26.mos2Env）は、クレードC株を好む。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の配列のHIV-1抗原と比較した場合、細胞性と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リンパ球応答の幅と深さの両方を改善するために使用される（上記のBarouch et alおよび国際公開第2010/059732号パンフレット）。

【0008】

10

しかしながら、上記のワクチン成分のさらなる開発努力において、rAd26.mos2Envは、非最適な細胞表面発現および非ヒト霊長類における免疫応答を示すことが見出され、しかしさらに、他のrAd26ベクター、例えばrAd26.mos1Envと比較して、製造工程中にこれまでに報告されていない、予期しない、および予測できない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のHIV-1サブタイプを好むため、rAd26.mos2Envを含有するワクチンは、クレードCのHIV-1サブタイプに対して非最適な免疫応答をもたらす。したがって、HIV-1クレードCに対する免疫応答の改善を誘導するために使用されるHIVに対するワクチンにおけるmos2Env抗原に代わるものが必要とされている。

【0009】

20

ボックスウイルスベクター、例えば改変ワクシニアウイルスアンカラ（MVA）は、ワクチン接種目的のための目的の抗原をコードするために使用され得る。当技術分野において、HIV1抗原の新規の組合せをコードするボックスウイルスベクターの必要性がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、先に記載したmos2Env抗原および合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸配列を含む新規のボックスウイルスベクターと比較して、細胞表面発現および遺伝的安定性が改善した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、組成物、ならびに好ましくは他のHIV抗原と組み合わせる場合、HIV-1、特にHIV-1クレードCおよびBに対する免疫応答の増加を誘導するために合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸配列を含むそのような新規のボックスウイルスベクターを使用する方法にも関する。

30

【0011】

特定の態様では、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を含み、好ましくはさらなるHIV抗原をコードする核酸配列を含む、ボックスウイルスベクター、好ましくは改変ワクシニアウイルスアンカラ（MVA）ベクターに関する。

【0012】

一般的な一態様では、本発明は、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に関する。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み得る。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。

40

【0013】

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。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、好ましくは配列番号14のアミノ酸配列、またはそのN末端アミノ酸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、配列番号8のカル

50

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）に融合されている配列番号37のアミノ酸配列も含むことが好ましい。

【0014】

最も好ましい実施形態では、本発明は、配列番号17、配列番号18、もしくは配列番号19のaa1~686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配列を含むボックスウイルスベクターに関する。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またはからなる。

【0015】

好ましい実施形態では、ボックスウイルスベクターは、上記のように合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸、および少なくとも1つのさらなるHIV抗原を含む。好ましい実施形態では、ボックスウイルスベクターは、改変ワクシニアウイルスアンカラ（MVA）ベクターである。最も好ましくは、MVAベクターは、MVA-BNまたはその誘導体を含む。

【0016】

好ましい実施形態では、ボックスウイルスベクターは、(a)配列番号18のアミノ酸配列を含む第1のHIVエンベロープ（Env）抗原をコードする核酸を含み、好ましくは、(b)第1のHIV Env抗原とは異なる第2のHIV Env抗原、(c)2つの異なるHIV Gag抗原である第3の抗原および第4の抗原、ならびに(d)2つの異なるHIV Pol抗原である第5の抗原および第6の抗原を、コードする核酸をさらに含む。特定の好ましい実施形態では、(b)第2のHIV Env抗原は配列番号5のアミノ酸配列を含み、(c)第3および第4の抗原は、それぞれ配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列を含み、ならびに(d)第5および第6の抗原は、それぞれ配列番号3および配列番号4のアミノ酸配列を含む。特定の好ましい実施形態では、第3および第5の抗原は融合されて、好ましくは配列番号28を含む第1のGag-Pol融合抗原になっており、第4および第6抗原は融合されて、好ましくは配列番号29を含む第2のGag-Pol融合抗原になっている。ある特定の好ましい実施形態では、第1のHIV Env抗原は配列番号41によってコードされる。1つまたは複数の特定の好ましい実施形態では、第2のHIV Env抗原は配列番号39によってコードされ、第1のGag-Pol融合抗原は配列番号38によってコードされ、第2のGag-Pol融合抗原は配列番号40によってコードされる。

【0017】

ボックスウイルスベクターがMVAベクター、例えばMVA-BNまたはその誘導体を含むMVAベクターである実施形態では、第1のGag-Pol融合抗原および第2のEnv抗原は、好ましくは、MVAゲノムの遺伝子間領域（IGR）44/45に挿入され、第2のGag-Pol融合抗原および第1のEnv抗原は、好ましくは、MVAゲノムのIGR88/89に挿入されている。より好ましくは、第1のGag-Pol融合抗原および第2のGag-Pol融合抗原はそれぞれ、別個のプロモーター、好ましくはPr13.5プロモーターの制御下にあり、第1のEnv抗原および第2のEnv抗原はそれぞれ、別個のプロモーター、好ましくはPrHybプロモーターの制御下にある。

【0018】

本発明の別の一般的な態様は、本発明の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配列を含み、好ましくは、1つまたは複数のさらなるHIV抗原をコードする核酸配列および合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸がプロモーター配列に操作可能に連結されている担体をさらに含む、免疫原的有効量のボックスウイルスベクターを含む、組成物、好ましくはワクチン組成物に関する。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ベクターをさらに含む。特定の好ましい実施形態では、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、好ましくはHIV抗原をさらにコードするボックスウイル

10

20

30

40

50

スベクター、好ましくはMVAベクターを含む。特定の実施形態では、本発明の組成物は、さらなるHIV抗原および/または単離されたHIV抗原ポリペプチドをコードするさらなる発現ベクターをさらに含む。

【0019】

別の一般的な態様では、本発明は、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ためのワクチン組合せ物に関する。一実施形態では、ワクチン組合せ物は、

(a)(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である第1のHIVエンベロープ(Env)タンパク質をコードする免疫原的有効量のベクター、好ましくはポックスウイルスベクター、より好ましくはMVAベクターを含み、好ましくは(ii)第1のHIV Env抗原とは異なる第2のHIV Env抗原、(iii)2つの異なるHIV Gag抗原である第3の抗原および第4の抗原、ならびに(iv)2つの異なるHIV Pol抗原である第5の抗原および第6の抗原をコードする核酸をさらに含む第1のワクチン組成物と、

(b)(i) 1つまたは複数の、第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、および第6のHIV抗原をコードする、好ましくは、配列番号1~5、18、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つまたは複数のHIV抗原をコードする、免疫原的有効量の1つまたは複数のベクター、好ましくは1つまたは複数のアデノウイルスベクター、より好ましくは1つまたは複数のアデノウイルス26ベクターを含む第2のワクチン組成物、および/または、

(b)(ii) 免疫原的有効量の単離されたHIV抗原ポリペプチドを含む1つまたは複数のポリペプチド、例えば、配列番号7のアミノ酸配列の残基30~708を含むポリペプチド、および/または配列番号36の残基30~724を含むポリペプチドを含む第3のワクチン組成物

の少なくとも1つとを含み、第1の組成物ならびに第2および/または第3の組成物が同じ組成物、または1つもしくは複数の異なる組成物中に存在する。

【0020】

ワクチン組合せ物が第2のワクチン組成物を含む一実施形態では、第2のワクチン組成物は、配列番号1~5、18、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、より好ましくは、合わせて、配列番号1、2、3、4、5、および18をコードする2つ、3つ、または4つの組換えアデノウイルス26ベクターを含む1つまたは複数の抗原をコードする1つまたは複数の組換えアデノウイルス26ベクターを含む。

【0021】

本発明のさらに別の一般的な態様は、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であって、本発明の実施形態による組成物、例えばワクチン組成物、またはワクチン組合せ物を対象に投与するステップを含む方法に関する。本発明は、HIVに対する免疫応答を誘導する方法であって、本発明の実施形態による組成物またはワクチン組合せ物を使用する免疫応答をプライミングおよびブーストするステップを含む方法にも関する。

【0022】

特定の実施形態では、それを必要とする対象においてHIVに対する免疫応答を誘導する方法は、

(a) 配列番号1、2、3、4、5、および18の1つまたは複数にコードする、1つまたは複数の組換えアデノウイルスベクター、好ましくはAd26ベクターを含む第1のワクチン、および

(b) 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である第1のHIVエンベロープ(Env)タンパク質をコードする、および好ましくは、さらなるHIV抗原、好ましくは第1のHIV Env抗原とは異なる第2のHIV Env抗原、2つの異なるHIV Gag抗原である第3の抗原および第4の抗原、ならびに2つの異なるHIV Pol抗原である第5の抗原および第6の抗原、より好ましくは配列番号

10

20

30

40

50

1 ~ 5、28、および29からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする1つまたは複数のHIV抗原をコードするポックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクターを含む第2のワクチン

を対象に投与するステップを含み、第1のワクチンがプライムワクチンであり、第2のワクチンがブーストワクチンである、または第2のワクチンがプライムワクチンであり、第1のワクチンがブーストワクチンである。特定の実施形態では、好ましくは免疫原的有効量の単離されたHIV抗原性ポリペプチド、例えば配列番号7のアミノ酸配列の残基30 ~ 708を含むポリペプチド、および/または配列番号36の残基30 ~ 724を含むポリペプチドを含む1つまたは複数の単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、ブーストワクチンとして同じ組成物中で、またはブーストワクチンとは別個の組成物中で、ブーストワクチンとほぼ同時に対象に投与される。

10

【0023】

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、好ましくは単離された細胞に関する。

【0024】

前述の概要、ならびに以下の本発明の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むとより理解されるであろう。本発明は図面に示されるものと寸分たがわない実施形態に限定されないと理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】HIVエンベロープタンパク質の構造の概略図である。図1Aは、全長HIVエンベロープタンパク質を示す。図1Bは、膜貫通ドメイン(TM)がGCN4三量体化ドメインと置き換えられ、フーリン切断部位が変異されている、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(sC4)。図1Cは、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの断片を含む、本発明の実施形態による膜結合HIVエンベロープタンパク質の構造を示す(C4D7)。

20

【図2】本発明の実施形態による、さらなるC末端三量体化ドメインを有する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 HIVエンベロープタンパク質の発現レベルを示す図である。発現は、gp120に対するポリクローナル抗体を使用する定量的ウェスタンブロットによって測定された。sC1またはsC4をコードするプラスミドは、2回一過的に発現され、各トランスフェクションはデンストメトリーによって2回定量された。sC1タンパク質は、比較的高い発現レベルを示す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。

30

【図3】ELISAアッセイによって決定された可溶性CD4の存在(ライトグレー)および非存在(ダークグレー)下での、合成HIVエンベロープタンパク質のモノクローナル抗体17b(mAb17b)との結合を示す図である。図3Aは、sC1の結合を示す。図3Bは、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。

40

【図5】抗gp120ポリクローナル抗体(GP120)を使用するこれらのタンパク質を発現する細胞のFACS分析による、ならびに四次構造依存的であり、正しく折りたたまれたEnv三量体に優先的に結合する広範な中和抗体PG9(PG9)およびPG16(PG16)への結合による、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細胞表面発現レベルを示す図である。

【図6】複数回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有する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細胞で生成された。トランスフェクションおよびプラーク精製のための最初の3回の継代後、5つのプラークが選択され、T25フォーマットでの10回継代にスケールア

50

ップし、合計ウイルス継代数 ($v p n$) 13にした。E1導入遺伝子カセットポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって決定された $v p n$ 3、5、10、および13後の安定性を示す。例えば、3/5は、試験した5つのプラークのうち3つのプラークが安定であったことを意味し、5/5は、試験した5つのプラークのうち5つのプラークが安定であったことを意味する。

【図7】ウサギでのTZM-b1細胞ベースの中和アッセイにおいて、HIV-1エンベロープ偽型ウイルス粒子 (EVP) に対するウイルス中和力価を示す図である。アデノウイルスベクター高投与群の \log_{10} 変換した IC_{50} 値は、1、8、14、および20週目にEVP VSV-G (陰性対照) およびMW965.26 (Tier1A クレードC) に対して測定された。各点は、個々のウサギの \log_{10} 変換した IC_{50} 値を表し、群平均は水平線で示す。HD: 試験した最高希釈 (上の実線)、LD: 試験した最低希釈 (下の実線)、LOB: バックグラウンドの限界、収集した陰性試料の95パーセンタイル値 (点線)、LDまたはHD閾値を超える $\log_{10} IC_{50}$ 値は、対応する線で設定された。ジョイントランキングのDunn法を使用する対照との一元配置ノンパラメトリック比較が各時点で行われた。統計的に有意な差をグラフに示す。* = $P < 0.05$ 、** = $P < 0.01$ 、および*** = $P < 0.001$ 。図7Aは、VSV-G (陰性対照) による結果を示す。図7Bは、MW965.26 (Tier1A クレードC) による結果を示す。

10

【図8】ベクターMVA-mBN414のための、MVAゲノムの特定の位置への挿入のグラフ表示である。Pr13.5およびPrHybはプロモーター配列である。IGRは遺伝子間領域である。

20

【図9】単独またはMVA-mBN414 (図9A~図9Cでは「MVA」と省略)、クレードC gp140 (GP140と省略) またはその組合せと併せてのいずれかで、Ad26.Mos.HIV (Ad26と省略) によって免疫後85日目にウサギに生じる免疫応答を示す図である。雄 (M) および雌 (F) は別々に示す。図9Aおよび図9Bは、それぞれクレードC gp140およびモザイクgp140 - 特異的ELISA力価を示す。各点は、個々のウサギの \log_{10} 変換した相対効力値 ($\log_{10} EU/ml$) を表し、群平均は水平線で示す。ULOQ、定量の上限 (上の実線)、LLOQ、定量の下限 (下の実線)、LOB、バックグラウンドの限界 (点線)、LOBより下の全ての値は、LOBレベルで設定された。性別間Tobitモデルからなる統計分析、群1、2、および3の比較のため、Tukey補正が適用された。統計的に有意な差をグラフに示す。* = $P < 0.05$ 、** = $P < 0.01$ 、*** = $P < 0.001$ 。図9Cは、ウサギ血清を使用するTZM-b1細胞ベースの中和アッセイにおいてHIV-1 BaLエンベロープ偽型ウイルス粒子に対するウイルス中和力価を示す。各点は、個々のウサギの \log_{10} 変換した IC_{50} 値を表し、群平均は水性線で示す。HD: 試験した最高希釈 (上の実線)、LD: 試験した最低希釈 (下の実線)、LOB: バックグラウンドの限界、収集した陰性試料の95パーセンタイル値 (点線)、DまたはHD閾値を超える $\log_{10} IC_{50}$ 値は、相当する線で設定された。性別間Tobitモデルからなる統計分析、群1、2、および3の比較のため、Tukey補正が適用された。統計的に有意な差をグラフに示す。* = $P < 0.05$ 、** = $P < 0.01$ 、*** = $P < 0.001$ 。

30

40

【図10】Ad26.Mos4.HIV (Ad26と省略) によるプライミングのみ (5週目) またはプライム-ブースト (7週目)、続いてMVA-mBN414プライム-ブーストまたは同種MVA-mBN414 (図10A~図10Eでは「MVA」と省略) プライム-ブースト付与後にマウスで生じる免疫応答を示す図である。群1および2は、0週目にそれぞれ、 2.5×10^9 または 2.5×10^8 vpのAd26.Mos4.HIVによってプライミングされ、5週目にそれぞれ、 2.8×10^6 または 2.8×10^5 TCID₅₀のMVA-mBN414によってブーストされた。群3および4は、0週目および5週目にそれぞれ、 2.8×10^6 または 2.8×10^5 TCID₅₀のMVA-mBN414によって免疫された。群5 (対照) は、 2.5×10^9 のAd26.Emptyによってプライミングされ、 2.8×10^6 TCID₅₀のMVA-BN-emptyに

50

よってブーストされた。図10Aおよび図10Bは、モザイクgp140特異的ELISA力価を示す。各点は、個々のマウスのlog₁₀変換したエンドポイント力価を表し、群平均は水平線で示した。UD、希釈の上限、LD、最低希釈、LDより下の全ての値は、LDレベルで設定された。用量間のTobitモデルからなる統計分析、統計的に有意な差をグラフに示す。 $*$ = $P < 0.05$ 、 $**$ = $P < 0.01$ 、 $***$ = $P < 0.001$ 。図10C~図10Eは、研究の7週目のインターフェロン-ガンマ(IFN- γ) ELISPO Tデータを示す。各点は、個々のマウスの脾細胞10⁶個当たりの、スポット形成細胞(SFC)数を表し、群平均は水平線で示す。LOD: 検出の限界、収集した未刺激の対照の95パーセンタイル値(点線)、Env-、Gag-、およびPol-特異的応答は、それぞれ免疫ドメインEnv-、Gag-、およびPol-ペプチド、IHIGP GRAFYTAGDI(配列番号44)、AMQMLKETI(配列番号45)、およびYYDPSKDLI(配列番号46)による刺激によって決定された。統計的に有意な差をグラフに示す。 $*$ $P < 0.05$ 、 $**$ $P < 0.01$ 、 $***$ $P < 0.001$ 。

【発明を実施するための形態】

【0026】

様々な論文、記事および特許が、背景および本明細書全体にわたって引用または記載される。これらの参照のそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれる文書、行為、材料、装置、記事などの議論は、本発明の文脈を提供する目的のためである。そのような議論は、これらの事項のいずれかまたは全てが、開示または請求された任意の発明に関して先行技術の一部を形成することを認めない。

【0027】

他に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術および科学用語は、本発明が属する当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。そうでなければ、本明細書で使用する特定の用語は、本明細書に記載した意味を有する。本明細書で引用した全ての特許、公開された特許明細書、および刊行物は、本明細書に完全に記載されたように参照により組み込まれる。本明細書および添付の請求項で使用する場合、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が他にはっきりと指定しない限り、複数の参照を含む。

【0028】

本明細書および続く請求項全体にわたって、文脈が他に必要としない限り、用語「含む(comprise)」、ならびに「含む(contains)」、および「含む(comprising)」などの変化形は、記載した整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群の包含を意味すると理解されるが、任意の他の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群の除外ではない。本明細書で使用する場合、用語「含む(comprising)」は、用語「含有する(containing)」または「含む(including)」で置き換えられ、時には用語「有する(having)」が本明細書で使用される。

【0029】

本明細書で使用する場合、「からなる(consisting of)」は、請求項の要素に指定されない任意の要素、ステップ、または成分を除外する。本明細書で使用する場合、「から本質的になる(consisting essentially of)」は、請求項の基本のおよび新規の特徴に実質的に影響しない材料またはステップを除外しない。前述の用語「含む(comprising)」、「含有する(containing)」、「含む(including)」、および「有する(having)」のいずれも、本発明の態様または実施形態の文脈中、本明細書で使用する場合はいつでも、用語「からなる(consisting of)」または「から本質的になる(consisting essentially of)」で置き換えられ、本開示の範囲を変えることができる。

【0030】

本明細書で使用する場合、複数の列挙された要素間の接続語「および/または」は、個

10

20

30

40

50

々と組み合わせたオプションの両方を包含すると理解される。例えば、2つの要素が「および/または」によって結合される場合、第1のオプションは、第2の要素無しでの第1の要素の適用性を指す。第2のオプションは、第1の要素無しでの第1の要素の適用性を指す。第3のオプションは、第1の要素と第2の要素を合わせた適用性を指す。これらのオプションのいずれかが1つは、その意味に該当し、したがって本明細書で使用する場合、用語「および/または」の要件を満たす。1つより多くのオプションの同時適用性はまた、その意味に該当し、したがって用語「および/または」の要件を満たす。

【0031】

本明細書で使用する場合、「対象」は、本発明の実施形態によるベクター、組成物またはワクチン組合せ物を投与される、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。本明細書で使用する場合、用語「哺乳動物」は、任意の哺乳動物を包含する。哺乳動物の例としては、限定はされないが、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、ヒト等が挙げられ、より好ましくはヒトである。

10

【0032】

本発明は一般に、合成HIVエンベロープタンパク質をコードする合成HIVエンベロープタンパク質、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をコードする、および任意選択でさらなるHIV抗原をコードするベクターによって、単独で、または1つもしくは複数のさらなるHIV抗原をコードする1つまたは複数のさらなるベクターと組み合わせて、および/または1つもしくは複数のさらなる単離されたHIV抗原ポリペプチドと組み合わせてHIVに対して免疫応答を誘導する方法に関する。

20

【0033】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、レトロウイルス科の一部であるレンチウイルス属のメンバーである。HIVの2つの種：HIV-1およびHIV-2がヒトに感染する。HIV-1はHIVウイルスの最も一般的な株であり、HIV-2よりもより病原性であることが公知である。本明細書で使用する場合、用語「ヒト免疫不全ウイルス」および「HIV」は、限定はされないが、HIV-1およびHIV-2を指す。

【0034】

HIVは、高度な遺伝的分岐によって複数のクレードに分類される。本明細書で使用する場合、用語「HIVクレード」または「HIVサブタイプ」は、それらの遺伝子相同性の程度によって分類される、関連ヒト免疫不全ウイルスを指す。現在、HIV-1単離株の3つのグループがある：M、NおよびO。グループM(主系統株)は少なくとも10のクレード、AからJからなる。グループO(境界外株)は、同様の数のクレードからなる。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ない新しいHIV-1単離株である。

30

【0035】

本明細書で使用する場合、用語「HIV抗原性ポリペプチド」、「HIV抗原性タンパク質」、「HIV抗原」、および「HIV免疫原」は、免疫応答、例えば、対象におけるHIVに対する液性および/または細胞性媒介応答を誘導することができるポリペプチドを指す。抗原性ポリペプチドまたは抗原はHIVのタンパク質、その断片もしくはエピトープ、または免疫応答を誘導もしくは免疫、例えば対象におけるHIVに対する保護免疫を生じさせることができる複数のHIVタンパク質またはその部分の組合せであってよい。

40

【0036】

好ましくは、抗原性ポリペプチドまたは抗原は、宿主において、保護免疫応答を生じ、例えばウイルス疾患もしくは感染に対して免疫応答を誘導する、および/またはウイルス疾患もしくは感染に対して対象において免疫を生じさせる(すなわちワクチン接種)ことができ、ウイルス疾患または感染に対して対象を保護する。例えば、抗原性ポリペプチドまたは抗原は、サル免疫不全ウイルス(SIV)またはHIV由来のタンパク質もしくはその断片、例えばHIVまたはSIVエンベロープgp160タンパク質、HIVまたはSIVマトリックス/キャプシドタンパク質、ならびにHIVまたはSIV gag、po

50

1、およびenv遺伝子産物を含み得る。

【0037】

HIV抗原性ポリペプチドまたは抗原は、任意のHIV-1またはHIV-2抗原もしくはその断片であってよい。HIV抗原の例としては、限定はされないが、構造タンパク質および必須酵素をコードするgag、pol、およびenv遺伝子産物が挙げられる。gag、pol、およびenv遺伝子産物は、複数の他のタンパク質産物にさらにプロセッシングされるポリタンパク質として合成される。gag遺伝子の主なタンパク質産物は、ウイルス構造タンパク質gagポリタンパク質であり、MA、CA、SP1、NC、SP2、およびP6タンパク質産物にさらにプロセッシングされる。pol遺伝子は、ウイルス酵素(Pol、ポリメラーゼ)をコードし、主なタンパク質産物は、RT、RNaseH、IN、およびPRタンパク質産物にさらにプロセッシングされる。env遺伝子は、構造タンパク質、特にピリオンエンベロープの糖タンパク質をコードする。env遺伝子の主なタンパク質産物はgp160であり、gp120およびgp41にさらにプロセッシングされる。HIV抗原の他の例としては、遺伝子制御タンパク質TatおよびRev、アクセサリタンパク質Nef、Vpr、VifおよびVpu、キャプシドタンパク質、ヌクレオキャプシドタンパク質、およびp24ウイルスタンパク質が挙げられる。

10

【0038】

特定の実施形態では、HIV抗原性ポリペプチドまたは抗原は、HIV Gag、Env、もしくはPol抗原、または任意の抗原性部分もしくはエピトープもしくはその組合せ、好ましくはHIV-1 Gag、Env、もしくはPol抗原または任意の抗原性部分もしくはエピトープもしくはその組合せを含む。

20

【0039】

HIV抗原性ポリペプチドはまた、モザイクHIV抗原でもよい。本明細書で使用する場合、「モザイク抗原」は、天然の配列の断片からアセンブルした組換えタンパク質を指す。モザイク抗原は、天然の抗原に似ているが、天然の配列で見出される潜在的なT細胞エピトープの適用範囲を最大にするために最適化され、免疫応答の幅および適用範囲を改善する。本発明による使用のためのモザイクHIV抗原は、好ましくはモザイクGag、Pol、および/またはEnv抗原であり、より好ましくはモザイクHIV-1 Gag、Pol、および/またはEnv抗原である。本明細書で使用する場合、「モザイクHIV Gag、Pol、および/またはEnv抗原」は、特に、HIVのGag、Pol、および/またはEnvポリタンパク質配列の1つまたは複数に由来する複数のエピトープを含むモザイク抗原を指す。

30

【0040】

一実施形態では、本発明による使用のためのモザイクHIV抗原は、gag遺伝子産物の配列(例は、配列番号1、2で提供される)に由来するエピトープを有するモザイクHIV Gag抗原、pol遺伝子産物の配列(例は、配列番号3、4で提供される)に由来するエピトープを有するモザイクHIV Pol抗原、またはenv遺伝子産物の配列(例は、配列番号5、6で提供される。また、本発明の合成抗原、例えば配列番号8、17、18、19もモザイクHIV Env抗原と考えられる)に由来するエピトープを有するモザイクHIV Env抗原である。特定の実施形態では、本発明による使用のためのモザイクHIV抗原は、gag、pol、および/またはenv遺伝子産物の配列に由来するエピトープの組合せを含む。例示的な、および非限定的な例としては、envおよびpol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Env-Pol抗原、gagおよびpol遺伝子産物の配列(例は、配列番号28、29で提供される)に由来するエピトープを有するモザイクGag-Pol抗原、ならびにgagおよびenv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Gag-Env抗原が挙げられる。gag、pol、およびenv遺伝子産物の配列は、1つまたは複数のクレードに由来してよい。

40

【0041】

本発明で使用されるモザイクHIV Gag、Pol、および/またはEnv抗原の例

50

としては、例えば米国特許出願公開第20120076812号明細書、Barouch et al., Nat Med 2010, 16:319-323およびBarouch et al., Cell 155:1-9, 2013に記載のものが挙げられ、その全ては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。好ましくは、本発明による使用のためのモザイクHIV Gag、Pol、および/またはEnv抗原としては、限定はされないが、mos1Gag(配列番号1)、mos2Gag(配列番号2)、mos1Pol(配列番号3)、mos2Pol(配列番号4)、mos1Env(配列番号5)、mos2Env(配列番号6)、mos1GagPol(配列番号28)、mos2GagPol(配列番号29)、およびその組合せが挙げられる。

【0042】

本明細書で使用する場合、各用語「HIVエンベロープタンパク質」、「envタンパク質」、および「Env」は、HIVビリオンのエンベロープに発現される、HIVをHIV感染細胞の細胞膜に標的化および結合させるタンパク質、またはそれを必要とする対象においてHIVに対する免疫応答を誘導するまたは免疫を生じさせることができるその断片もしくは誘導体を指す。HIV env遺伝子は、前駆体タンパク質gp160をコードし、2つの成熟エンベロープ糖タンパク質、gp120およびgp41にタンパク質分解性に切断される。切断反応は、宿主細胞のプロテアーゼ、フューリンによって、レトロウイルスの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ている配列で、媒介される。より具体的には、gp160は(gp160)₃に三量体化され、次いで2つの非共有結合したgp120とgp41への切断が起こる。ウイルスの侵入は、続いて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、受容体を有する標的細胞、例えばヘルパーT細胞などのCD4受容体に結合する。gp120に非共有結合するgp41は、融合断片であり、HIVが細胞に侵入する第2のステップを提供する。gp41は、本来、ウイルスエンベロープ内に埋め込まれるが、gp120がCD4受容体に結合すると、gp120はその構造を変化させgp41を暴露させ、宿主細胞との融合を補助することができる。gp140は、三量体gp160、すなわち(gp160)₃の未切断の外部ドメインであり、切断されたウイルススパイクの天然状態の代わりとして使用されている。

【0043】

本発明の実施形態により、「HIVエンベロープタンパク質」は、gp160、gp140、gp120、gp41タンパク質、その組合せ、融合、トランケーションまたは誘導体であってよい。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したgp120タンパク質を含み得る。gp140の三量体を安定化する三量体化ドメインを有するまたは含むように改変される、安定化された三量体gp140タンパク質も含み得る。三量体化ドメインの例としては、限定はされないが、T4フィブリチン「フォールドン」三量体化ドメイン、GCN4由来の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が挙げられる。「HIVエンベロープタンパク質」は、限定はされないが、外部ドメインにC末端トランケーション(すなわち、細胞外空間へ伸びたドメイン)、gp41におけるトランケーション、例えばgp41の膜貫通ドメインにおけるトランケーション、またはgp41の細胞質ドメインにおける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トランケートされたHIVエンベロープタンパク質であってもよい。「HIVエンベロープタンパク質」は、さらに、配列変異、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ってよい。

【0044】

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。本明細書で使用する場合、用語「合成HIVエンベロープタンパク質」は、それを必要とする対象において1つまたは複数の天然に存在するHIV株に対して免疫応答を誘導するまたは免疫を生じさせるために最適化される天然に存在しない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

10

20

30

40

50

パク質の例であり、本発明は、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。

【0045】

本明細書で使用する場合、「TCID₅₀」は、TCID₅₀として与えられる組織培養感染量 50 を指す。TCID₅₀は、当業者に公知の様々な方法、例えば組織培養感染量 50 (TCID₅₀) アッセイを使用して決定される。TCID₅₀ アッセイは、国際公開第 03/053463 号パンフレットの実施例 2 に記載されるように、96 ウェルフォーマットでの 10 倍希釈を使用する、改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) ベクターの感染力を力価測定する方法である。ポックスウイルス、例えば MVA の感染力は、例えばフローサイトメトリーベースのアッセイまたは組織培養感染量 50 (TCID₅₀) アッセイにより、当業者に公知の様々な方法を使用して決定される。例示的な一態様では、MVA の力価測定は、96 ウェルフォーマットの 10 倍希釈を使用する TCID₅₀ ベースのアッセイで実施される。アッセイのエンドポイントでは、感染細胞は、抗ワクシニアウイルス抗体および適切な染色溶液を使用して可視化される。初代 CEF 細胞は、所与の密度で 2 ~ 3 日間 T - フラスコを使用して、10% 血清および 1% ゲンタマイシンを含む RPMI 中で調整および培養され、トリプシン処理後、7% 血清を含む RPMI を使用して 1×10^5 個の細胞 / mL の密度で 96 ウェルプレートに播種される。試料の予想される力価は、10 倍段階希釈の数を指示し、カラム 1 から例えば 10 まで、次のウェルに移す 100 μ L を使用して深ウェルプレートで行われる。希釈後、96 ウェルプレートのウェルあたり 100 μ L が播種される。細胞は、34 ~ 38、および 4 ~ 6% CO₂ で 5 日間インキュベートされ、感染およびウイルス複製を可能にする。

【0046】

感染の 5 日後、細胞は MVA 特異的抗体で染色される。特異的抗体の検出のため、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合二次抗体が使用される。MVA 特異的抗体は、例えば、抗ワクシニアウイルス抗体、ウサギポリクローナル、または IgG 画分 (Quartett, Berlin, Germany #9503 ~ 2057) であってよい。二次抗体は、例えば、抗ウサギ IgG 抗体、または HRP 結合ヤギポリクローナル (Promega, Mannheim, Germany, #W4011) であってよい。二次抗体は、沈殿する TMB 基質を使用して可視化される。色素反応に陽性である細胞を含む全てのウェルは、TCID₅₀ の計算に陽性であるとマークされる。力価は、計算の Spearman - Kaerber 方法を使用することによって計算される。データは、T = 0 時点から任意の所与の時点の相対的な差であるウイルス力価の log としても表される。

【0047】

ウイルス濃度の定量の代わりに方法は、ウイルスプラークアッセイにより、感染量に関してウイルス濃度を決定する、当業者に周知の標準的な方法である。簡単に述べると、宿主細胞のコンフルエントな単層に、様々な希釈でウイルスを感染させ、半固体培地で覆う。細胞単層中の細胞にウイルスが感染すると、ウイルスプラークが形成され、希釈因子と組み合わせてプラークの数が数えられ、試料容積あたりのプラーク形成単位 (pfu/mL) の数を計算することができる。pfu/mL は、試料内の感染性粒子の数を表す。アッセイ方法および原理における明確な違いにより、TCID₅₀ および pfu/mL または他の感染性アッセイ結果は、必ずしも等価ではない。MVA に関して、両方法 (TCID₅₀ およびウイルスプラークアッセイ) が使用され、通常、ヒトへの臨床投与のための MVA ベクターの投与量は、pfu、または TCID₅₀ で提供される。アデノウイルスベクターの投与量もまた、pfu または TCID₅₀ で与えられる。ヒトへの投与のため、通常、アデノウイルスベクターの投与量はウイルス粒子 (vp) で与えられ、濃度は vp/mL で表される。

【0048】

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、合成 HIV エンベロープタンパク質をコードする核酸配列を含む

、および好ましくはさらなるH I V抗原をコードする核酸配列を含む、新規のボックスウイルスベクター、好ましくはM V Aベクターに関する。

【0049】

一実施形態では、合成H I Vエンベロープタンパク質は配列番号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の組合せからなる群から選択される1つまたは複数の変異を有する配列番号8のアミノ酸配列を含む。配列番号8は、合成成熟g p 1 2 0および膜貫通領域も細胞質ドメインも無い合成トランケートg p 4 1を含む。配列番号8は、m o s 2 E n vモザイク抗原(配列番号6)、および他のH I Vエンベロープタンパク質配列由来の配列のキメラを含む天然に存在しない配列である。配列番号8を含む合成E n v 10 抗原の配列は、広範な適用範囲およびH I VクレードCに対するT細胞応答の増強を提供するように最適化される(m o s 2 E n v抗原(配列番号6)と比較した場合)。特定の実施形態では、さらなるアミノ酸が配列番号8または本明細書に定義したその変異体の1つに添加され得る。

【0050】

特定の実施形態では、合成H I V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H I Vエンベロープタンパク質は、小胞体(E R)の内腔へのそ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により合成される。原則として、任意の公知のシグナル配列が使用され得る。好ましくは、H I V E n vシグナル配列またはその変異体が使用される。異なるシグナル配列が、H I V E n vタンパク質に当技術分野で使用された(例えば国際公開第2014/107744号パンフレット参照)。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。 20

【0051】

特定の実施形態では、合成H I V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H I Vエンベロープタンパク質をE R膜にアンカーし、H I Vエンベロープの膜集合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。

【0052】

別の実施形態では、合成H I Vエンベロープタンパク質は、トランケートした細胞質ドメインを有するg p 4 1を含む。g p 4 1は、そのカルボキシル末端に通常ではない長い細胞質ドメイン、典型的には約150アミノ酸を有する(Edwards et al., J. Virology, 2002, 76:2683-2691)。細胞質ドメインのトランケーションは、H I V - 1 E n vタンパク質の外部ドメインの保存領域の暴露を誘導することが報告されている(同上)。本発明の合成H I Vエンベロープのトランケートした細胞質ドメインは、1から約140アミノ酸の範囲であり、例えば、全長細胞質ドメインの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アミノ酸であってよい。特定の実施形態では、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り、トランケートした細胞質ドメインは配列番号17のアミノ酸704~862に由来する(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H I Vエンベロープタンパク質は、H I V g 4 1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、および最も好ましくは7アミノ酸残基を有するトランケートした細胞質ドメインを含む。合成H I V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、細胞外ドメイン(外部ドメイン)のC末端に位置し、合成H I Vエンベロープタンパク質が膜貫通ドメインを含む場合も、細胞質ドメインまたはその断片は膜貫通ドメインのC末端に位置する。例えば、図1Aおよび図1C参照。特定の実施形態では、合成H I Vエンベロープタンパク質は、配列番号14またはその断片、例えばその1~4残基(すなわちN R V R)のアミノ酸配列を有するトランケートした細胞質ドメインを有するg p 4 1を含む。他のトランケートした細胞質ドメインが記載され、使用され得る(例えば、Schiernle et al 30 40 50

., PNAS 1997; Abrahamyan et al., J Virol 2005)。

【 0 0 5 3 】

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 18 の残基 655 ~ 682 を含有する配列番号 37 のアミノ酸配列も含みことが好ましく、ここで、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 末端に融合されている。

【 0 0 5 4 】

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、膜貫通ドメイン、例えば配列番号 13 のアミノ酸配列を有するもの、ならびにトランケートした細胞質ドメインまたは細胞質ドメインの断片、例えば配列番号 14 または配列番号 14 の残基 1 ~ 4 (すなわち N R V R) のアミノ酸配列を有するものをさらに含む。最も好ましくは、合成 HIV エンベロープタンパク質は、シグナル配列有りまたは無しで配列番号 18 のアミノ酸配列を含むまたはからなる (すなわち配列番号 18 のアミノ酸残基 1 ~ 29)。

【 0 0 5 5 】

別の実施形態では、合成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化ドメインを含む。三量体化ドメインは、Env 三量体構造の安定性を増加する。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化ドメインを含むように改変される gp140 ポリペプチドを含む。三量体化ドメインの例としては、限定はされないが、T4 - フィブリチン「フォールド」三量体化ドメイン、例えば配列番号 16 のアミノ酸配列を含むもの、GCN4 由来のコイルドコイル三量体化ドメイン、例えば配列番号 15 のアミノ酸配列を含むもの、三量体タグとして大腸菌 (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が、またはマトリリンベースの三量体化モチーフが挙げられる。存在する場合、三量体化ドメインは、典型的には細胞外ドメインの C 末端に位置する (図 1 B 参照)。合成 HIV エンベロープタンパク質が三量体化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、シグナル配列有りまたは無しで配列番号 19 のアミノ酸配列を含む (すなわち、配列番号 19 のアミノ酸残基 1 ~ 29)。三量体化ドメインの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外部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、フューリン切断部位を変異させ (例えば、配列番号 8 の 480 位で L y s から G l u への変異)、この切断部位を不活性化することが可能であり、そのため、タンパク質は一本鎖であり、これは三量体化ドメイン、特に配列番号 19 の GCN4 三量体化ドメインとよく結合する。

【 0 0 5 6 】

三量体化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外部ドメイン変異体の代替のバージョンも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 (例えば、479 ~ 480 位で G l y - L y s ジペプチドを 4 つの A r g 残基によって置換する)、ならびにいわゆる SOSIP 変異 (例えば 529 位での I から P への変異、および配列番号 8 のその位置でそれぞれ A l a および T h r の C y s 残基との置換によって 471 位と 575 位の間にジスルフィド結合の導入) を組み合わせることによって、配列番号 8 から調製され得る。これは、以下の変異の組合せ、E K 479 - 480 R R R R、I 529 P、A 471 C および T 575 C 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を産生する。

【 0 0 5 7 】

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) の三量体含量をさらに増加するための可能な一変異は、529 位での I l e から P r o 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。

【 0 0 5 8 】

ベクター

一般的な一態様では、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配列を含む、および好ましくは少なくとも 1 つのさらなる HIV 抗原をコードする核酸配

10

20

30

40

50

列を含むベクターに関する。本発明の実施形態により、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。本発明の特定の実施形態では、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のアミノ酸配列、およびより好ましくは配列番号18または配列番号18のアミノ酸残基30~711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、ボックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクターである。

【0059】

本発明の実施形態により、合成HIVエンベロープタンパク質をコードする核酸配列はプロモーターに操作可能に連結されており、核酸はプロモーターの制御下にあることを意味している。プロモーターは、同種プロモーター（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）であってよい。アデノウイルスベクターの好適なプロモーターの非限定的な例としては、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配列に操作可能に連結される例示的なCMVプロモーター配列は、配列番号24に示す。

【0060】

ボックスウイルスベクターの好適なプロモーターの非限定的な例としては、30Kプロモーター、I3プロモーター、PrSプロモーター、PrS5Eプロモーター、Pr7.5K、Pr13.5ロングプロモーター、PrHybプロモーター、40Kプロモーター、MVA-40Kプロモーター、FPV 40Kプロモーター、30kプロモーター、PrSynIIMプロモーター、およびPrLE1プロモーターが挙げられる。さらなるプロモーターは、参照により本明細書に完全に組み込まれる、国際公開第2010/060632号パンフレット、国際公開第2010/102822号パンフレット、国際公開第2013/189611号パンフレット、および国際公開第2014/063832号パンフレットにさらに記載される。より好ましい実施形態では、本発明によりボックスウイルスベクターの一部として組み込まれる場合、HIV抗原は、Pr13.5ロングプロモーター（配列番号42）および/またはPrHybプロモーター（配列番号43）に操作可能に連結される。

【0061】

本発明の実施形態により、ベクターは発現ベクターであってよい。発現ベクターとしては、限定はされないが、組換えタンパク質発現のためのベクターおよび対象の組織での発現のための対象への核酸の送達のためのベクター、例えばウイルスベクターが挙げられる。本発明による使用に好適なウイルスベクターの例としては、限定はされないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ボックスウイルスベクター、MVAベクター、腸管系ウイルスベクター、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等が挙げられる。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、限定はされないが、プラスミド、バクテリア人工染色体、イースト人工染色体、バクテリオファージ等が挙げられる。

【0062】

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、アデノウイルス科に属し、好ましくはマストアデノウイルス属に属するものである。それはヒトアデノウイルスであってよいが、限定はされないが、ウシアデノウイルス（例えばウシアデノウイルス3、BA dV3）、イヌアデノウイルス（例えばCA dV2）、ブタアデノウイルス（例えばPA dV3または5）、またはサル（simian）アデノウイルス（サル（monkey）アデノウイルスおよび霊長類アデノウイルス、例えばチンパンジーアデノウイルスまたはゴリラアデノウイルスを含む）を含む他の種に感染するアデノウイルスであってもよい。好ましくは、アデノウイルスはヒトアデノウイルス（HA dV、もしくはAdHu）またはサルアデノウイルス、例えばチンパンジーもし

10

20

30

40

50

くはゴリラアデノウイルス (ChAd、AdCh、またはSA dV)、またはアカゲザルアデノウイルス (RhAd) である。本発明では、ヒトアデノウイルスは、種の指定なく Ad と呼ばれる場合を意味し、例えば簡潔な表記「Ad 26」は、ヒトアデノウイルス血清型 26 である、HAdV 26 と同じ意味である。また、本明細書で使用する場合、表記「rAd」は、組換えアデノウイルスを意味し、例えば「rAd 26」は組換えヒトアデノウイルス 26 を指す。

【0063】

ほとんどの先進的な研究は、ヒトアデノウイルスを使用して行われ、ヒトアデノウイルスは、本発明の特定の態様により好まれる。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に基づく。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 等に基づく。本発明の特に好ましい実施形態により、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。これらの血清型の利点は、低い血清有病率および/またはヒト集団における低い既存の中和抗体力価、ならびに臨床試験におけるヒト対象での使用の経験である。

10

【0064】

サルアデノウイルスも、一般的に、低い血清有病率および/またはヒト集団における低い既存の中和抗体力価を有し、相当量の研究がチンパンジーアデノウイルスベクターを使用して報告されている (例えば、米国特許第 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 2010085984 号パンフレット、Farina et al, 2001, J Virol 75: 11603-13、Cohen et al, 2002, J Gen Virol 83: 151-55、Kobinger et al, 2006, Virology 346: 394-401、Tatsis et al., 2007, Molecular Therapy 15: 608-17、Bangari and Mittal, 2006, Vaccine 24: 849-62 によるレビュー、ならびに Lasaro and Ertl, 2009, Mol Ther 17: 1333-39 によるレビューも参照)。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に基づく。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 1、7、8、21、22、23、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 型に基づく。

20

30

【0065】

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 rAd 26、rAd 35、rAd 48、rAd 5HVR 48 等である。

【0066】

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、Ad 26 を含む希少な血清型由来のキャ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 rAd 26 ウイルスである。「アデノウイルスキャプシドタンパク質」は、特定のアデノウイルスの血清型および/または向性の決定に関与するアデノウイルスのキャプシドのタンパク質 (例えば、Ad 26、Ad 35、rAd 48、rAd 5HVR 48 ベクター) を指す。アデノウイルスのキャプシドタンパク質は、典型的には線維、ペントンおよび/またはヘキソタンパク質を含む。本明細書で使用する場合、特定のアデノウイルスの「キャプシドタンパク質」、例えば「Ad 26 キャプシドタンパク質」は、例えば、Ad 26 キャプシドタンパク質の少なくとも一部を含むキメラキャプシドタンパク質であってよい。特定の実施形態では、キャプシドタンパク質は Ad 26 の全キャプシドタンパク質である。特定の実施形態では、ヘキソン、ペントンおよび線維は Ad 26 のものである。

40

【0067】

当業者は、複数の血清型由来の要素が単一の組換えアデノウイルスベクターに合わせられることを理解する。したがって、異なる血清型からの所望の特性を合わせるキメラアデノウイルスが産生され得る。したがって、いくつかの実施形態では、本発明のキメラアデ

50

ノウイルスは、第1の血清型の既存の免疫の不在と、温度安定性、アセンブリー、アンカリング、産生率、再指示または改善された感染、標的細胞におけるDNAの安定性などを合わせることができる。

【0068】

特定の実施形態では、本発明で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（すなわち、ベクターはrAd26）。いくつかの実施形態では、アデノウイルスは、例えば、ゲノムのE1領域に欠失を含有するため、複製欠損である。グループCではないアデノウイルス、例えばAd26またはAd35に由来するアデノウイルスに関して、アデノウイルスのE4-orf6コード配列の、Ad5などヒトサブグループCのアデノウイルスのE4-orf6との交換は典型的である。これは、例えば293細胞、PER.C6細胞など、Ad5のE1遺伝子を発現する周知の補完細胞系におけるそのようなアデノウイルスの増殖を可能にする（例えば、Havenga, et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43、国際公開第03/104467号パンフレット参照）。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補完細胞において複製できない。

10

【0069】

組換えアデノウイルスベクターの調製は、当技術分野で周知である。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Abbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654-63に記載される。Ad26の例示的なゲノム配列は、GenBank登録番号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は、例えば、その開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2012/082918号パンフレットに記載されるものを含む。

20

【0070】

典型的には、本発明で有用なベクターは、組換えアデノウイルスゲノム全体を含む核酸を使用して産生される（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）。したがって、本発明は、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提供する。本発明の核酸分子は、RNAの形態またはクロニングによって得られたもしくは合成により産生されたDNAの形態であってよい。DNAは、二本鎖または一本鎖であってよい。

30

【0071】

本発明で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。これらの実施形態では、ウイルスは、ウイルスの複製に重要な領域、例えばE1領域の欠失もしくは不活性化によって複製欠損にされる。領域は、例えば対象の遺伝子、例えば領域内の合成HIVエンベロープタンパク質（通常プロモーターに連結する）をコードする遺伝子、またはHIV抗原ポリペプチド（通常プロモーターに連結する）をコードする遺伝子を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る。いくつかの実施形態では、本発明のベクターは、他の領域、例えばE2、E3もしくはE4領域に欠失、またはこれらの領域の1つまたは複数内にプロモーターに連結する異種遺伝子の挿入を含有し得る。E2-および/またはE4-変異アデノウイルスに関しては、通常E2-および/またはE4-補完細胞系を使用して、組換えアデノウイルスを生成する。アデノウイルスのE3領域の変異は、E3が複製に必要とされないため、細胞系によって補完される必要はない。

40

【0072】

パッケージング細胞系は、典型的には、本発明での使用に十分な量のアデノウイルスベクターを産生するために使用される。パッケージング細胞は、複製欠損ベクターにおいて欠失または不活性化されたそれらの遺伝子を含む細胞であり、したがってウイルスを細胞内で複製させる。E1領域に欠失を有するアデノウイルスの好適なパッケージング細胞系としては、例えばPER.C6、911、293、およびE1 A549が挙げられる。

【0073】

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であり、より好ま

50

しくは r A d 2 6 ベクター、最も好ましくはアデノウイルスゲノムの E 1 領域に少なくとも 1 つの欠失を有する r A d 2 6 ベクターであり、例えば、参照により本明細書に組み込まれる Abbink, J Virol, 2007, 81(9): p. 4654-63 に記載される。典型的には、合成 H I V エンベロープタンパク質および/または他の H I V 抗原をコードする核酸配列は、アデノウイルスゲノムの E 1 および/または E 3 領域にクローニングされる。

【 0 0 7 4 】

本発明の好ましい態様では、本明細書に記載の合成 H I V 抗原をコードするベクターは、ボックスウイルスベクターである。特に好ましい態様では、ベクターは改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) ベクターである。さらなる好ましい実施形態では、 M V A ウイルスベクターは M V A - B N またはその誘導體である。

10

【 0 0 7 5 】

M V A は、トルコのアンカラのワクチン接種研究所で長年に渡って維持され、ヒトへのワクチン接種の主成分として使用されてきた、皮膚ワクシニア株アンカラ (漿尿膜ワクシニアウイルスアンカラウイルス、 C V A 、 検討には Mayr et al. (1975) Infection 3, 6-14 を参照) のニワトリ胚線維芽細胞で 5 7 0 回を超える連続継代によって生成される。弱毒化された C V A ウイルス M V A (改変ワクシニアウイルスアンカラ) は、初代ニワトリ胚線維芽細胞 (C E F) での C V A の連続増殖 (5 7 0 継代より多く) によって得られた。

【 0 0 7 6 】

しかしながら、ワクシニアウイルスに関連したワクチン接種後の合併症が重症であることが多いため、より弱毒化された、より安全なワクチンを生成するいくつかの試みがあった。 M V A を弱毒化するために使用された継代の結果として、 C E F 細胞で行われた継代数によって多くの異なる株または単離株がある。より安全な製品、例えばワクチンまたは医薬品の開発のため、強化された安全性プロファイルを有する M V A の株が、例えば B a v a r i a n N o r d i c によって開発された。 M V A は、 B a v a r i a n N o r d i c によってさらに継代され、 M V A - B N と命名されている。 M V A - B N の代表的な試料は、 2 0 0 0 年 8 月 3 0 日に、 E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f C e l l C u l t u r e s (E C A C C) で登録番号 V 0 0 0 8 3 0 0 8 の下に受託された。 M V A - B N は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 0 2 / 4 2 4 8 0 号 (パンフレット例えば、米国特許第 6 , 7 6 1 , 8 9 3 号明細書および米国特許第 6 , 9 1 3 , 7 5 2 号明細書および米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 2 0 6 9 2 6 号明細書も参照) および国際公開第 0 3 / 0 4 8 1 8 4 号パンフレット (米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 5 9 6 9 9 号明細書) にさらに記載される。 M V A ならびに M V A - B N は、祖先 C V A ウイルスと比較してゲノムの約 1 5 % (6 つの領域から 3 1 k b) を欠損している。この欠失は、多くの病原性および宿主範囲遺伝子、ならびに A 型封入体の遺伝子に影響を与える。

20

30

【 0 0 7 7 】

様々な実施形態では、 M V A または本発明に好適な組換え体を生成するために使用される M V A は、 M V A - 5 7 2 、 M V A - 5 7 5 、 M V A - I 7 2 1 であり、 A T C C (登録商標) V R - 1 5 0 8 (商標) として受託された M V A 、 A T C C (登録商標) V R - 1 5 6 6 (商標) として受託された M V A 、 A C A M 3 0 0 0 M V A 、 M V A - B N 、 または任意の同様の弱毒化 M V A 株である。好ましい実施形態では、組換え体を生成するために使用される M V A は、 M V A - 5 7 5 、 A T C C (登録商標) V R - 1 5 0 8 (商標) として受託された M V A 、 A T C C (登録商標) V R - 1 5 6 6 (商標) として受託された M V A 、 A C A M 3 0 0 0 M V A 、 M V A - B N である。より好ましくは、組換え体を生成するために使用される M V A は M V A - B N である。

40

【 0 0 7 8 】

M V A - 5 7 2 は、 1 9 9 4 年 1 月 2 7 日に E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f A n i m a l C e l l C u l t u r e s (E C A C C 、 V a c c i n e R e s e a r c h a n d P r o d u c t i o n L a b o r a t o r y 、 P u b l i c H e a l t h L a b o r a t o r y S e r v i c e 、 C e n t r e f o r A p p l i e

50

d Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom) で受託番号 ECACC V94012707 で受託された。MVA-575 は、2000年12月7日に ECACC V00120707 の下に受託された。Acam3000 MVA は、2003年3月27日に American Type Culture Collection (ATCC) で登録番号 PTA5095 の下で受託された (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA)。MVA-I721 は、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institute Pasteur で CNCM I721 として受託された。MVA-BN は、2000年8月30日に ECACC で番号 V00083008 の下で受託された。MVA-BN は、国際公開第02/042480号パンフレットに記載されている。

【0079】

本発明によって包含されるものはまた、本明細書に記載の MVA ウイルスまたは MVA-BN のいずれかの誘導体または変異体である。MVA または MVA-BN の「誘導体」または「変異体」は、MVA または MVA-BN と基本的に同じ複製特徴を示すが、それらのゲノムの1つまたは複数の部分で相違を示す MVA または MVA-BN ウイルスを指す。受託されたウイルスと同じ「複製特徴」を有するウイルスは、CEF 細胞および細胞系 HaCat (Boukamp et al. (1988), J Cell Biol 106: 761-771)、ヒトの骨の骨肉腫細胞系 143B (ECACC 番号 91112502)、ヒト胚性腎臓細胞系 293 (ECACC 番号 85120602)、およびヒト頸部腺癌細胞系 HeLa (ATCC 番号 CCL-2) において受託された株と類似の増幅率で複製するウイルスである。MVA、その誘導体および変異体のこれらの特性を決定する試験およびアッセイは、例えば国際公開第02/42480号パンフレットに記載される細胞系の許容度 (permissivity) アッセイなど、当業者に周知である。例示的な細胞系許容度アッセイでは、哺乳動物細胞系に、細胞あたりの感染の低い多重度、すなわち細胞当たり 0.05 感染性単位 (5×10^4 TCID₅₀) で、親および誘導体または変異体 MVA ウイルスを感染させる。1時間の吸収後、ウイルス種菌が除去され、細胞が3回洗浄され、残りの吸収されなかったウイルスが除去される。3% FCS を補足した新鮮な培地が添加され、感染は、合計4日間置かれ (37°C、5% CO₂ で)、ウイルス抽出物が調製される。感染は、-80°C で3回プレートを凍結することによって停止する。ウイルス増殖および細胞変性効果 (CPE) は、続いて、Carroll and Moss (1997), Virology 238, 198-211 に記載のものなど当業者に周知の方法を使用して、CEF 細胞において決定される。

【0080】

より具体的には、MVA-BN または MVA-BN の誘導体もしくは変異体は、好ましくはニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) においてリプロダクティブに複製する能力を有するが、ヒトケラチノサイト細胞系 HaCat (Boukamp et al (1988), J. Cell Biol. 106: 761-771)、ヒトの骨の骨肉腫細胞系 143B (ECACC 受託番号 91112502)、ヒト胚性腎臓細胞系 293 (ECACC 受託番号 85120602)、およびヒト頸部腺癌細胞系 HeLa (ATCC 受託番号 CCL-2) においてはリプロダクティブに複製する能力を有さない。さらに、MVA-BN の誘導体または変異体は、HeLa 細胞および HaCat 細胞系における MVA-575 よりも少なくとも2倍少ない、より好ましくは3倍少ないウイルス増幅率を有する。MVA 変異体のこれらの特性の試験およびアッセイは、国際公開第02/42480号パンフレットまたは上記の例示的な細胞系許容度アッセイに記載される。

【0081】

用語「リプロダクティブに複製する能力を有さない」または「リプロダクティブに複製する能力がない」は、例えば国際公開第02/42480号パンフレットに記載され、上記のような所望の特性を有する MVA を得る方法も教示する。その用語は国際公開第02

10

20

30

40

50

／ 4 2 4 8 0 号パンフレットまたは米国特許第 6 , 7 6 1 , 8 9 3 号明細書に記載のアッセイを使用して、1 よりも少ない感染 4 日後のウイルス増幅率を有するウイルスに適用する。

【 0 0 8 2 】

用語「リプロダクティブな複製の失敗」は、1 よりも少ない感染 4 日後のウイルス増幅率を有するウイルスを指す。国際公開第 0 2 / 4 2 4 8 0 号パンフレットまたは米国特許第 6 , 7 6 1 , 8 9 3 号明細書に記載のアッセイは、ウイルス増幅率の決定に適用できる。

【 0 0 8 3 】

ウイルスの増幅または複製は、通常、「増幅率」と呼ばれる、最初に細胞に感染させるために元々使用した量（入力値）に対する感染細胞から産生されたウイルス（出力値）の比率として表される。増幅率「1」は、感染細胞から産生されたウイルスの量が、細胞に感染させるために最初に使用した量と同じである増幅状態を定義し、感染細胞がウイルスの感染およびリプロダクションを許容することを意味する。対照的に、1 よりも少ない増幅率、すなわち、入力レベルと比較した出力の減少は、リプロダクティブ複製の欠如、したがってウイルスの弱毒化を示す。

【 0 0 8 4 】

本明細書で提供される組換えボックスウイルスベクターは、当技術分野で公知の通常の方法によって生成され得る。組換えボックスウイルスを得るための、または外来コード配列をボックスウイルスゲノムに挿入するための方法は、当業者に周知である。例えば、標準的な分子生物学技術のための方法、例えば、DNA のクローニング、DNA および RNA の単離、ウェスタンブロット分析、RT - PCR および PCR 増幅技術は、Molecular Cloning, A laboratory Manual (2nd Ed.) [J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に記載され、ウイルスを取り扱うおよび操作するための技術は、Virology Methods Manual [B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)] に記載されている。同様に、MVA の取り扱い、操作、および遺伝子操作のための技術およびノウハウは、Molecular Virology: A Practical Approach [A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993) (例えば Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors を参照)] および Current Protocols in Molecular Biology [John Wiley & Son, Inc. (1998) (例えば、Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector を参照)] に記載されている。

【 0 0 8 5 】

本明細書に開示される様々な組換えボックスウイルスの生成のために、異なる方法が適用可能である。ウイルスに挿入される DNA 配列は、ボックスウイルスの DNA のセクションに相同的な DNA が挿入されている大腸菌 (E.Coli) プラスミド構築物内に配置されてもよい。別に、挿入される DNA 配列は、プロモーターに連結されてもよい。プロモーター - 遺伝子結合が、非必須遺伝子座を含有するボックスウイルス DNA の領域に隣接する DNA 配列に相同的な DNA が両端で隣接するように、プロモーター - 遺伝子結合を、プラスミド構築物中に位置させてもよい。結果として生じるプラスミド構築物は、大腸菌 (E.Coli) 中での増殖によって増幅させ、単離することができる。挿入される DNA 遺伝子配列を含有する単離されたプラスミドを、例えば、ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) の細胞培養物にトランスフェクトし、同時に培養物にボックスウイルスを感染させる。プラスミドにおける相同的ボックスウイルス DNA とウイルスゲノムとの間の組換えは、外来 DNA 配列の存在によって改変されたボックスウイルスを生成できる。

【 0 0 8 6 】

好ましい実施形態により、好適な細胞培養物の細胞、例えば CEF 細胞にボックスウイルスを感染させることができる。続いて、好ましくは、ボックスウイルス発現制御要素の転写制御下に、外来または異種遺伝子 (単数または複数)、例えば本開示で提供される核酸をコードする 1 つまたは複数の HIV 抗原を含む第 1 のプラスミドベクターを感染細胞にトランスフェクトすることができる。上で説明したように、プラスミドベクターはまた

10

20

30

40

50

、ボックスウイルスゲノムの選択された部分への外来配列の挿入を指示することができる配列も含む。任意選択で、プラスミドベクターはまた、ボックスウイルスプロモーターに操作可能に連結されたマーカーおよび/または選択遺伝子を含むカセットも含有する。好適なマーカーまたは選択遺伝子は、例えば、緑色蛍光タンパク質、 β -ガラクトシダーゼ、ネオマイシン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ、または他のマーカーをコードする遺伝子である。選択またはマーカーカセットの使用は、生成された組換えボックスウイルスの同定および単離を単純化する。しかしながら、組換えボックスウイルスは、PCR技術によっても同定することができる。その後、さらなる細胞に、上述のように得られた組換えボックスウイルスを感染させ、第2の外来または異種遺伝子(単数または複数)を含む第2のベクターをトランスフェクトすることができる。この場合、この遺伝子はボックスウイルスゲノムの異なる挿入部位に導入することができ、第2のベクターもまた、ボックスウイルスのゲノムへの第2の外来遺伝子(単数または複数)の組み込みを指示するボックスウイルス-相同配列において異なる。相同組換えが起こった後、2つまたはそれ以上の外来または異種遺伝子を含む組換えウイルスを単離することができる。組換えウイルスにさらなる外来遺伝子を導入するために、前のステップで感染のために単離された組換えウイルスを使用することによって、およびトランスフェクションのためのさらなる外来遺伝子(単数または複数)を含むさらなるベクターを使用することによって、感染およびトランスフェクションのステップを繰り返すことができる。

10

【0087】

代わりに、上記の感染およびトランスフェクションのステップは入れ替え可能である、すなわち、好適な細胞に、最初に外来遺伝子を含むプラスミドベクターをトランスフェクトし、次いでボックスウイルスを感染させることができる。さらなる代替として、各外来遺伝子を異なるウイルスに導入し、1つの細胞に、得られた全ての組換えウイルスを同時感染させ、全ての外来遺伝子を含む組換えについてスクリーニングすることも可能である。3つ目の代替は、DNAゲノムと外来配列の*in vitro*でのライゲーション、およびヘルパーウイルスを使用する組換えワクシニアウイルスDNAゲノムの再構成である。4つ目の代替は、細菌人工染色体(BAC)としてクローニングしたボックスウイルスゲノムと、ワクシニアウイルスゲノム内の所望の組み込み部位に隣接する配列に相同的なDNA配列と隣接する直鎖状外来配列との間の、大腸菌(*E. coli*)または別の細菌種における相同組換えである。

20

30

【0088】

本発明の実施形態による少なくとも1つのHIV抗原をコードする1つまたは複数の核酸配列は、ボックスウイルスまたはボックスウイルスベクターの任意の好適な部分に挿入され得る。好ましい態様では、本発明に使用するボックスウイルスはMVAウイルスを含む。本開示の1つまたは複数の核酸が挿入され得るMVAウイルスの好適な部分は、MVAウイルスの非必須部分を含む。

【0089】

MVAウイルスは、MVAゲノムの非必須部分が遺伝子間領域またはMVAゲノムの公知の欠失部位1~6であってよい。代わりにまたはさらに、組換えMVAの非必須部分は、ウイルス増殖に非必須であるMVAゲノムのコード領域であってよい。しかしながら、本明細書に記載のように抗原および核酸および任意の付随するプロモーターが、少なくとも1つの細胞培養システム、例えばニワトリ胚線維芽細胞(CEF細胞)において増幅および増殖できる組換え体を得ることが可能である限り、ウイルスゲノムのどこにでも挿入され得ることは本発明の範囲内であるため、挿入部位は、MVAゲノムのこれらの好ましい挿入部位に限定されない。

40

【0090】

好ましくは、本発明の核酸は、MVAの1つまたは複数の遺伝子間領域(IGR)に挿入される。用語「遺伝子間領域」および「IGR」は、好ましくはMVAゲノムの2つの隣接するオープンリーディングフレーム(ORF)間に位置するウイルスゲノムの部分、好ましくはMVAウイルスゲノムの2つの必須なORF間を指す。MVAに関して、特定

50

の実施形態では、I G Rは、I G R 0 7 / 0 8、I G R 4 4 / 4 5、I G R 6 4 / 6 5、I G R 8 8 / 8 9、I G R 1 3 6 / 1 3 7、およびI G R 1 4 8 / 1 4 9から選択される。より好ましい実施形態では、本発明の核酸はI G R 4 4 / 4 5およびI G R 8 8 / 8 9領域に挿入される。

【 0 0 9 1 】

本発明の実施形態により、および上記のように、本明細書に記載の任意の合成H I Vエンベロープタンパク質および/またはH I V抗原は、本発明のベクターで発現される。遺伝子コードの縮重を考慮して、当業者は、当技術分野で完全に通常の方法によって、いくつかの核酸配列が同じタンパク質をコードするように設計されることをよく理解する。合成H I Vエンベロープタンパク質および/またはH I V抗原をコードする核酸は、任意選択でコドン最適化され、処置された宿主（例えば、ヒト）での正しい発現を確実にする。コドン最適化は当技術分野で広く適用される技術である。本発明の合成H I V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26（実施例のアデノウイルスベクターに使用される）、および41（実施例のM V Aベクターに使用される）に提供され、本発明での使用のためのさらなるH I V抗原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20～22（実施例のアデノウイルスベクターに使用される）、および38～40（実施例のM V Aベクターに使用される）に提供される。

10

【 0 0 9 2 】

本発明はまた、本明細書に記載のいずれかのベクターを含む細胞、好ましくは単離された細胞も提供する。細胞は組換えタンパク質の製造、またはウイルス粒子の製造に使用され得る。

20

【 0 0 9 3 】

また、合成H I V抗原ポリペプチドを作成する方法も開示される。本方法は、プロモーターに操作可能に連結された合成H I V抗原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ステップ、合成H I V抗原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した細胞を増殖させるステップ、および細胞から合成H I V抗原ポリペプチドを単離するステップを含む。合成H I V抗原ポリペプチドは、アフィニティークロマトグラフィー等を含む当技術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され得る。組換えタンパク質発現に使用される技術は、本開示に照らして当業者に周知である。

30

【 0 0 9 4 】

本発明はまた、本発明の合成H I V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にも関し、本方法は、ベクターを含む細胞を培養し、前記培養中にベクターを増殖させ増やすステップ、ならびに細胞培養物から、例えば細胞から、培養培地、または両方から本発明の合成H I V抗原ポリペプチドをコードするベクターを単離するステップを含む。ベクターは、当技術分野で公知の方法によってさらに精製される。

【 0 0 9 5 】

特定の実施形態では、本発明は、合成H I V抗原をコードする核酸配列を含むボックスウイルスベクター、好ましくはM V Aベクター、例えばM V A - B Nベクターを提供する。ボックスウイルスベクターは、本発明による、例えば配列番号18のアミノ酸配列を含む合成H I Vエンベロープ（E n v）抗原をコードする核酸配列を含み、任意選択で少なくとも1つのさらなるH I V抗原をコードする核酸配列をさらに含む。好ましい実施形態では、ボックスウイルスベクターおよびより好ましくはM V Aベクターは、配列番号18のアミノ酸配列を含む合成H I V E n v抗原である第1のH I V E n v抗原、および少なくとも1つのさらなるH I V抗原、例えばG a g、P o l、および/またはE n v抗原、好ましくは配列番号1～5、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つまたは複数のさらなるH I V抗原をコードする核酸配列を含む。

40

【 0 0 9 6 】

例えば、特定の実施形態では、ボックスウイルスベクターは、配列番号18のアミノ酸配列を含む第1のH I V E n v抗原、第1のH I V E n v抗原とは異なる第2のH I V

50

Env抗原、2つの異なるHIV Gag抗原である第3の抗原および第4の抗原、ならびに2つの異なるHIV Pol抗原である第5の抗原および第6の抗原をコードする核酸を含み得る。GagおよびPol抗原は融合されて、第1のGag-Pol融合抗原および第2のGag-Pol融合抗原、例えば配列番号28または配列番号29のアミノ酸配列を含むGag-Pol融合抗原になっていてもよい。

【0097】

例示的な特定の実施形態では、ボックスウイルスベクターは、配列番号1~5、18、28、および29からなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸配列をコードする核酸を含む。1つまたは複数の特定の実施形態では、ボックスウイルスベクターは、配列番号1~5、および18、より好ましくは配列番号5、18、28、および29のアミノ酸配列をコードする核酸を含む。

10

【0098】

他の特定の例示的な実施形態では、ベクターは、配列番号25、26、および27、好ましくは配列番号26からなる群から選択される核酸配列を含むアデノウイルスベクターである。さらなる例示的な実施形態は、他のHIV抗原をコードするアデノウイルスベクターを含み、そのようなアデノウイルスベクターは、配列番号20、21、および22からなる群から選択される1つまたは複数の核酸配列を含む。他の特定の実施形態では、ベクターは、ボックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクター、より好ましくはMVA-BN、配列番号38、39、40、および41からなる群から選択される1つまたは複数の核酸配列を含むベクターである。1つまたは複数の特定の実施形態では、ボックスウイルスベクターは配列番号38、39、40、および41を含む。

20

【0099】

1つまたは複数のHIV抗原をコードする核酸配列は、本明細書に記載のように、ボックスウイルスベクターゲノムの任意の適切な挿入部位に挿入され得る。ボックスウイルスベクターが、1つまたは複数のGag-Pol融合抗原をコードするMVAベクター、例えばMVA-BNまたはその誘導体である特定の実施形態では、第1のGag-Pol融合抗原をコードする核酸配列はMVAゲノムの遺伝子間領域(IGR)44/45に挿入され、第2のGag-Pol融合抗原をコードする核酸配列はMVAゲノムのIGR88/89に挿入され得る。さらに、HIV Env抗原をコードする核酸配列は、MVAゲノムのIGR44/45および/またはIGR88/89に挿入され得る。1つまたは複数の特定の実施形態では、ボックスウイルスベクターは、配列番号28を含むGag-Pol融合抗原をコードする核酸配列およびMVAゲノムのIGR44/45に配列番号5を含むHIV Env抗原をコードする核酸配列および/または配列番号29を含むGag-Pol融合抗原をコードする核酸配列およびMVAゲノムのIGR88/89に配列番号18を含むHIV Env抗原をコードする核酸配列を含む。好ましくは、Gag-Pol融合抗原はそれぞれ別個のプロモーター、好ましくはPr13.5プロモーター、例えば配列番号42に示すものの制御下にあり、および/またはEnv抗原はそれぞれ別個のプロモーター、好ましくはPrHybプロモーター、例えば配列番号43に示すものの制御下にある。

30

【0100】

組成物

別の一般的な態様では、本発明は合成HIVエンベロープタンパク質および担体をコードする核酸を含むベクターを含む組成物に関する。好ましくは、組成物はワクチン組成物であり、以下により詳細に記載される。本発明の実施形態により、本明細書に記載の任意のベクター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またはボックスウイルスベクター、およびさらにより好ましくはアデノウイルス26ベクターまたはMVAベクターであってよい。

40

【0101】

一実施形態では、本発明の組成物は、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

50

ープタンパク質をコードする核酸配列を含むボックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクターを含む。特定の好ましい実施形態では、ベクターはMVA-BNベクター、またはその誘導体である。1つまたは複数の特定の実施形態では、本発明の組成物は、配列番号18のアミノ酸配列を含む少なくとも第1のHIVエンベロープ抗原をコードする核酸を含む、ボックスウイルスベクター、MVAベクター、またはMVA-BNベクターを含む。最も好ましくは、そのようなベクターは、(b)第1のHIV Env抗原とは異なる第2のHIV Env抗原、(c)2つの異なるHIV Gag抗原である第3の抗原および第4の抗原、ならびに(d)2つの異なるHIV Pol抗原である第5の抗原および第6の抗原をコードする核酸配列をさらに含む。好ましい実施形態では、第2のHIV Env抗原は配列番号5のアミノ酸配列を含み、第3および第4の抗原はそれぞれ配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列を含み、第5および第6の抗原はそれぞれ配列番号3および配列番号4のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第3および第5の抗原は融合されて、配列番号28のアミノ酸配列を含む第1のGag-Pol融合抗原になっており、第4および第6の抗原は融合されて、配列番号29のアミノ酸配列を含む第2のGag-Pol融合抗原になっている。

10

【0102】

本発明の実施形態により、本発明によるボックスウイルスベクターを含む組成物は、1つまたは複数のさらなるHIV抗原、および/または1つもしくは複数の単離されたHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つまたは複数のさらなるベクターと一緒に使用され得る。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、同じ組成物または1つもしくは複数の異なる組成物に存在し得る。好ましくは、1つまたは複数のさらなるベクターはウイルスベクター、例えば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、またはボックスウイルスベクター、より好ましくはMVAベクターである。1つまたは複数のさらなるベクターは、本開示に照らして当業者に公知の任意のHIV抗原をコードし得る。より好ましくは、1つまたは複数のさらなるベクターは、配列番号1~5、18、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つまたは複数のHIV抗原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ベクターである。

20

【0103】

一態様では、本発明は、(a)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、(b)好ましくは配列番号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、(c)2つの異なるHIV Gag抗原であり、好ましくはそれぞれ配列番号1および2のアミノ酸配列を含む第3の抗原および第4の抗原、ならびに(d)2つの異なるHIV Pol抗原であり、好ましくはそれぞれ配列番号3および4のアミノ酸配列を含む、第5の抗原および第6の抗原をコードする核酸配列を含む1つまたは複数のベクターと一緒に含むワクチン組合せ物を提供する。1つまたは複数の特定の実施形態では、第3および第5の抗原は融合されて、好ましくは配列番号28のアミノ酸配列を含む第1のGag-Pol融合抗原になっており、第4および第6の抗原は融合されて、配列番号29のアミノ酸配列を含む第2のGag-Pol融合抗原になっている。ベクターは、それぞれ別個の組成物であってよく、またはそれらは単一の組成物に組み合わされてよい。ベクターの多様な核酸は、1つの対象に投与されることを意図し、いずれかのベクター単独の投与時に得られる免疫応答よりも広範であるHIVに免疫応答を生じる。多様な核酸配列はまた、1つの単一のベクターに存在してもよい。

30

40

【0104】

本発明の実施形態により、1つまたは複数のベクターは、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/またはボックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクターであってよい。アデノウイルスおよび/またはボックスウイルスベクターを含む組成物は、任意選択で1つまたは複数の単離されたHIV抗原性ポリペプチドをさらに含んでもよい。任意の単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、本開示に照らして本発明の組成物で使用され得る。特定の好ましい実施形態では、1つまたは複数の単

50

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を含むポリペプチド、配列番号36の残基30～724を含むポリペプチド、またはその組合せを含む。

【0105】

1つまたは複数の特定の実施形態では、組合せは、好ましくは配列番号1～5、18、28、および29からなる群から選択される1つまたは複数のHIV抗原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、ならびに好ましくは配列番号1～5、18、28、および29からなる群から選択される1つまたは複数のHIV抗原をコードする核酸を含むポックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクターを含む。好ましくは、1つまたは複数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ベクターは、合わせて、配列番号1～5および18をコードし、ポックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクターは配列番号1～5および18をコードする。ベクターは、1つの組成物、または1つもしくは複数の異なる組成物に存在してもよい。

10

【0106】

本発明の特定の実施形態により、組成物、例えばワクチン組成物は、免疫原的有効量のベクター、例えばウイルスベクターを含む。本明細書で使用する場合、「免疫原的有効量」または「免疫学的有効量」は、それを必要とする対象において所望の免疫効果または免疫応答を誘導す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、それを必要とする対象において免疫応答を誘導す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、それを必要とする対象において免疫を生じさせる、例えば、ウイルス感染などの疾患に対する保護効果を提供するのに十分な量を意味する。免疫原的有効量は、様々な因子、例えば対象の健康状態、年齢、体重、健康等、免疫応答を誘導するか、または保護免疫を提供するかの特定の適用、投与される特定の組換えベクター、投与される組換えベクターによってコードされる免疫原または抗原性ポリペプチド、投与される特定の抗原性ポリペプチド、および免疫が望まれる特定の疾患、例えばウイルス感染に応じて変化し得る。免疫原的有効量は本開示の観点で当業者によって容易に決定され得る。

20

【0107】

一般的ガイダンスとして、組換えウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクターと関連して使用される場合、免疫原的有効量は、例えば約 10^8 ウイルス粒子から 10^{12} ウイルス粒子、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。特定の実施形態でのヒトへの投与のためのアデノウイルスベクターの単回用量は、 10^9 ウイルス粒子と 10^{11} ウイルス粒子の間である。組換えウイルスベクター、例えばポックスウイルスベクターと関連して使用される場合、免疫原的有効量は、例えば約 10^4 から 10^{11} TCID₅₀、 10^5 から 10^{10} TCID₅₀、 10^6 から 10^9 TCID₅₀、または 10^7 から 10^8 TCID₅₀、例えば 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、または 10^{11} TCID₅₀であり得る。対象（好ましくはヒト）のための好ましい用量は、 10^5 TCID₅₀、 10^6 TCID₅₀、 10^7 TCID₅₀、 10^8 TCID₅₀、 10^9 TCID₅₀、または 10^{10} TCID₅₀の用量を含む、 10^5 から 10^{10} TCID₅₀を含む。ポックスウイルスベクター、例えばMVAベクターの免疫原的有効量は、代わりにおよび便利にプラーク形成単位（pfu）で表され、例えば約 10^5 から 10^{11} pfu、例えば約 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、または 10^{11} pfu、好ましくは約 10^7 から 10^9 pfu、およびより好ましくは約 10^8 pfu、例えば約 0.5×10^8 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、または 5×10^8 pfuであり得る。特定の実施形態では、ヒト対象に投与される本発明によるMVAベクターの免疫原的有効量は、好ましくは0.1mLから1mL、例えば0.5mL中、約 1×10^7 から 10^9 pfu、好ましくは約 1×10^8 pfuである。

30

40

【0108】

50

免疫原的有効量のベクター、例えばMVAベクターおよび/またはアデノウイルスベクターは、単一組成物で、または複数の組成物、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10組成物（例えば錠剤、カプセルまたは注射剤）で投与され、複数のカプセルまたは注射の投与は合わせて、免疫原的有効量を対象に提供する。いわゆるプライム-ブーストレジメンにおいて、免疫原的有効量を対象に投与し、続いて免疫原的有効量の別の用量を同じ対象に投与することも可能である。さらなるブースト投与は、必要に応じて任意選択でレジメンに追加され得る。プライム-ブーストレジメンのこの一般的な概念は、ワクチン分野の当業者に周知であり、以下により詳細に記載される。

【0109】

本発明の組成物は担体をさらに含み得る。担体は、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤、例えば結合剤、崩壊剤、膨張剤、懸濁剤、乳化剤、湿潤剤、滑剤、フラボラント、甘味料、防腐剤、色素、溶解剤、およびコーティング剤を含み得る。担体または他の材料の正確な性質は、投与の経路、例えば筋肉内、皮下、経口、静脈内、皮膚、粘膜内（例えば消化管）、鼻腔内または腹腔内経路に応じ得る。液体の注射可能製剤、例えば懸濁剤および溶液に関して、好適な担体および添加物は、水、グリコール、オイル、アルコール、防腐剤、カラーリング剤等を含む。固体の経口製剤に関して、例えば、粉末、カプセル、カプレット、ジェルキャップ、および錠剤、好適な担体および添加物は、デンプン、糖、希釈剤、造粒剤、滑剤、結合剤、崩壊剤等を含む。点鼻薬/吸入混合物に関しては、好適な担体および添加剤として、水溶液/懸濁液が、水、グリコール、オイル、軟化剤、安定剤、湿潤剤、防腐剤、芳香、フレーバー等を含み得る。

【0110】

本発明の組成物は、限定はされないが、経口（経腸）投与および非経口注射を含む、投与を促進し、効果を改善する対象への投与に好適な任意の物質で製剤化される。非経口注射は、静脈内注射または点滴、動脈内注射、皮下注射、筋肉内注射、および関節内注射を含む。本発明の組成物はまた、経粘膜、目、直腸、長期にわたる移植、舌下投与、舌下、口腔粘膜、門脈循環のバイパス、吸入、または鼻腔内を含む投与の他の経路のために製剤化される。

【0111】

本発明の特定の実施形態により、組成物は、免疫原的有効量の精製したまたは部分的に精製したベクター、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、またはMVAもしくはMVA-BNなどのボックスウイルスベクター、本発明の合成HIVエンベロープタンパク質および任意選択で1つまたは複数のさらなるHIV抗原をコードする核酸を含むベクターを含む。前記組成物は、当技術分野で周知の方法によってワクチンとして製剤化される（「免疫原性組成物」とも呼ばれる）。

【0112】

本発明の特定の実施形態では、組成物は、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1つまたは複数のポリペプチドをさらに含み得る。一般的に、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連して使用される場合、免疫原的有効量は、例えば約0.3から約3000マイクログラム（ μg ）、例えば1~1000 μg 、例えば10~500 μg 、例えば約50または250 μg の範囲であり得る。非限定的な例としては、本発明の合成HIV Env抗原（例えば、配列番号18を有する）および任意選択で1つまたは複数のさらなるHIV抗原（例えば配列番号1~5、28、および/または29）をコードする1つまたは複数のベクターの投与と単離されたHIV Envポリペプチド、例えば、250 μg の配列番号7のアミノ酸30~708を有するHIVクレードC Env三量体タンパク質または250 μg の配列番号36のアミノ酸30~708を有するHIVモザイクEnv三量体タンパク質の投与を組み合わせることが可能である。

【0113】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、任意選択で免疫応答を増強するためのアジュバントをさらに含み得る。用語「アジュバント」および「免疫刺激」は、本明細書で

交換可能に使用され、免疫系の刺激を引き起こす1つまたは複数の物質として定義される。この文脈では、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および任意選択で1つまたは複数のさらなるHIV抗原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および任意選択で1つまたは複数のさらなるHIV抗原をコードするベクターと組み合わせて使用されるHIV抗原性ポリペプチドに対する免疫応答を増強するために使用される。

【0114】

本発明による使用に好適なアジュバントは、潜在的に安全であり、良好に忍容性であり、ヒトに有効であるもの、例えば、QS-21、Detox-PC、MPL-SE、MoGM-CSF、TiterMax-G、CRL-1005、GERBU、TERアミド、PSC97B、Adjumer、PG-026、GSK-I、GcMAF、B-アレチン、MPC-026、Adjuvax、CpG ODN、Betafectin、アルミニウム塩（例えばAdjuphos）、Adjuplex、およびMF59であるべきである。製剤の各成分の最適な比率は本開示に照らして当業者に周知の技術によって決定され得る。

10

【0115】

好ましい実施形態では、アジュバントはアルミニウム塩、例えばリン酸アルミニウム、例えばAdjuphosである。特定の実施形態では、リン酸アルミニウムは、好ましくは、単離されたHIV抗原性ポリペプチド、例えばgp140を含む組成物中に存在するまたはともに投与される。

20

【0116】

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。液体医薬組成物は、一般的には液体担体、例えば水、石油、動物または植物油、鉱物油または合成油を含む。生理食塩水溶液、デキストロースまたは他のサッカライド溶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、またはポリエチレングリコールも含まれ得る。

【0117】

例えば、組換えアデノウイルスベクターは、Adenovirus World Standardにも使用される緩衝液中で保存されてよい(Hoganson et al., 2002, Bioprocessing J 1: 43-8): 20 mM Tris pH 8、25 mM NaCl、2.5%グリセロール。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液は、20 mM Tris、2 mM MgCl₂、25 mM NaCl、スクロース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液は、10~25 mMのクエン酸緩衝液 pH 5.9~6.2、4~6% (w/w) ヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリン(HBCD)、70~100 mM NaCl、0.018~0.035% (w/w) ポリソルベート-80、および任意選択で0.3~0.45% (w/w) エタノールを含む。明らかに、多くの他の緩衝液が使用され、精製したベクターの保存のためおよび薬学的投与のための好適な製剤のいくつかの例が公知である。

30

【0118】

MVAおよびMVA-BNを含む、ポックスウイルスベクターの例示的な調整および保存は、例えば、Stickl, H. et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 (1974)に記載されるように、天然痘に対するワクチン接種のために使用されるポックスウイルスワクチンの調製における経験に基づき得る。

40

【0119】

例示的な実施形態では、精製したポックスウイルスは、10 mM Tris、140 mM NaCl、pH 7.7中で製剤化された 5×10^8 TCID₅₀/mlの力価で-80で保存される。ワクチン注射の調製のため、例えばウイルスの $10^2 \sim 10^8$ 粒子は、アンプル、好ましくはガラスアンプル内で2%ペプトンおよび1%ヒトアルブミン存在下のリン酸緩衝液(PBS)中で凍結乾燥され得る。代わりに、ワクチン注射は、段階的に、製剤中のウイルスの凍結乾燥によって調製され得る。特定の実施形態では、製剤は、さらな

50

る添加物、例えばマンニトール、デキストラン、糖、グリシン、ラクトース、ポリビニルピロリドン、または、例えば、限定はされないが、*in vivo*投与に好適な抗酸化剤または不活性ガス、安定剤または組換えタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン）を含む他の添加物を含有する。次いで、アンプルは密封され、好適な温度、例えば4℃と室温の間で数ヵ月間保存され得る。しかしながら、必要がない限り、アンプルは好ましくは-20℃未満の温度で保存される。

【0120】

ワクチン接種または治療を含む様々な実施形態では、凍結乾燥物は0.1~0.5mlの水溶液、好ましくは生理食塩水またはTris緩衝液に溶解され、全身または局所的のいずれかで、すなわち、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮内、または当業者に公知の投与の任意の他の経路によって投与される。投与の形態、用量、および投与の数の最適化は当業者の技術および知識内である。

10

【0121】

ベクター、またはベクターの組合せが、配列番号18および5を含む両方のHIV抗原をコードする実施形態の利点は、免疫応答の幅の増加である（クレードBおよびC由来の株をカバーする）。

【0122】

特定の実施形態では、本発明の組成物またはワクチン組合せ物は、同じまたは他のベクターに、配列番号28(mos1GagPol)および/または配列番号29(mos2GagPol)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核酸をさらに含む。

20

【0123】

特定の実施形態では、本発明の組成物またはワクチン組合せ物は、配列番号18のアミノ酸配列を含むHIV抗原をコードする第1のアデノウイルスペクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターを含み、配列番号5のアミノ酸配列を含むHIV抗原をコードする第2のアデノウイルスペクター、好ましくはアデノウイルス26ベクター、ならびに配列番号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つまたは複数のHIV抗原をコードする1つまたは複数のさらなるアデノウイルスペクター、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組合せ物は、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第1のベクター、配列番号5のアミノ酸配列を含むHIV抗原をコードする第2のベクター；配列番号28のアミノ酸配列を含むHIV抗原をコードする第3のベクター、および配列番号29のアミノ酸配列を含むHIV抗原をコードする第4のベクターの、4つのアデノウイルスペクター、好ましくはアデノウイルス26ベクターを含み得る。好ましくは、本発明のボックスウィルスペクターは、それらのアデノウイルスペクターとのワクチン組合せ物の一部であり得る。そのようなボックスウィルスペクター、好ましくはMVAベクター、例えばMVA-BNベクターは、好ましい実施形態では、配列番号18、5、28および29のそれぞれをコードする。

30

【0124】

本発明の特に好ましい実施形態では、組成物またはワクチン組合せ物は、6つの異なるHIV抗原、主に配列番号18(mos2SEnv)、配列番号5(mos1Env)、配列番号1(mos1Gag)、配列番号2(mos2Gag)、配列番号3(mos1Pol)、および配列番号4(mos2Pol)によってコードされる抗原をコードする核酸配列を含むボックスウィルスペクター、好ましくはMVAベクター、好ましくはMVA-BNを含み、ここで配列番号1および3は任意選択で融合され（配列番号28；mos1GagPol）ならびに配列番号2および4は任意選択で融合されている（配列番号29；mos2GagPol）。利点は、これら6つのHIV抗原を投与するため、単一のベクターのみが製造、精製、製剤化、試験、保存、輸送、および投与される必要があることである。また、ボックスウィルスペクター、例えばMBA-BNを含むMVAは、それにコードされる抗原に対する良好な免疫応答を提供することが公知である。さら

40

50

に、それらは典型的には、他のベクタープラットフォーム、例えばプライム - ブーストレジメンにおいてアデノウイルス、例えば Ad 26 ベクターと一緒に有利に使用され、さらに改善された免疫応答を生成する。例えば、配列番号 1 ~ 5 および 18 によってコードされる 6 つの異なる HIV 抗原をコードする核酸配列を含むポックスウイルスベクターは、配列番号 1 ~ 5、および 18 によってコードされる 1 つまたは複数の HIV 抗原をコードする 1 つまたは複数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 ベクターと一緒に使用され、好ましくは 1 つまたは複数のアデノウイルスベクターはともに配列番号 1 ~ 5 および 18 をコードする。

【0125】

上記のように、いくつかの実施形態では、組成物またはワクチン組合せ物は、1 つまたは複数の単離された HIV 抗原性ポリペプチドをさらに含む。本開示の観点で当業者に公知の任意の HIV 抗原性ポリペプチドは、本発明の組成物またはワクチン組合せ物にさらに含まれ、限定はされないが、HIV エンベロープタンパク質（例えば、gp160、gp140、gp120、または gp41）、好ましくは安定化した三量体 gp140 タンパク質、例えば安定化したクレード C またはクレード A gp140 タンパク質を含む。好ましい実施形態では、単離された HIV 抗原性ポリペプチドは安定化した HIV クレード C 三量体 gp140 タンパク質、例えば配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 708 を含むものである（配列番号 7 の残基 1 ~ 29 はシグナル配列にある）。クレード C gp140 タンパク質に追加してまたは単独で使用される代替のまたはさらなる HIV Env ポリペプチドは、例えば配列番号 36 のアミノ酸 30 ~ 724 に開示される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（国際公開第 2014/107744 号パンフレットの配列番号 2 に相当し、配列番号 36 の残基 1 ~ 29 はシグナル配列にある）。特定の実施形態では、HIV 抗原性ポリペプチドは、(i) 配列番号 7 のアミノ酸残基 30 ~ 708 を含むクレード C gp140 タンパク質、および (ii) 配列番号 36 のアミノ酸残基 30 ~ 724 を含むモザイク gp140 タンパク質の両方を含む。

【0126】

本発明はまた、本発明の組成物またはワクチン組合せ物を産生する方法にも関する。本発明の実施形態により、組成物または組合せを産生する方法は、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ベクターと担体、ならびに任意選択で 1 つまたは複数のさらなる HIV 抗原性ポリペプチドおよび / または 1 つまたは複数の単離された HIV 抗原性ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数のさらなるベクターを組み合わせるステップを含む。当業者は、そのような組成物を調整するために使用される従来の技術に精通している。

【0127】

ワクチンおよびワクチン組合せ物

本発明の他の一般的な態様は、ワクチンおよびワクチン組合せ物に関する。特定の実施形態では、本明細書に記載される本発明の組成物はワクチンである。本明細書で使用する場合、用語「ワクチン」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および任意選択で対象に保護免疫または保護免疫応答を提供する、または対象にワクチン接種することができる 1 つまたは複数のさらなる HIV 抗原をさらにコードする、免疫学的有効量の発現ベクター、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り、対象への組成物の投与時に、発現ベクターはコードされた合成 HIV エンベロープタンパク質および任意選択でさらにコードされた HIV 抗原を発現し、発現された合成 HIV エンベロープタンパク質および任意選択でさらにコードされた HIV 抗原は対象の免疫系に提示され、それにより免疫を生じさせるのに必要な応答を誘導し、または免疫応答を誘導する。

【0128】

したがって、別の一般的な態様では、本発明は、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ためのワクチンを提供する。本発明の実施形態により、ワクチンは、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

10

20

30

40

50

をコードする免疫原的有効量の発現ベクターを含む組成物を含む。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、例えばアデノウイルス 26 ベクター、および最も好ましくは、ポックスウイルスベクター、例えば MVA または MVA - BN ベクターである。

【0129】

本発明の実施形態により、ワクチン組成物は、例えば 1 つまたは複数のさらなる HIV 抗原性ポリペプチドおよび / または 1 つまたは複数の単離された HIV 抗原性ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数のさらなるベクター、例えばウイルスベクター、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 ベクターをさらに含み得る。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 つもしくは複数の単離された HIV 抗原性ポリペプチドは、ワクチンにおいて同じ組成物または 1 つもしくは複数の異なる組成物中で製剤化され得る。

10

【0130】

本発明は、1 つまたは複数のベクター、任意選択で単離された抗原性ポリペプチドと組合せて使用し、それを必要とする対象において 1 つまたは複数の HIV クレイドに対する免疫応答をプライミングおよびブーストするためのワクチン組合せ物にも関する。したがって、別の一般的な態様では、本発明は、

(a) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む第 1 の HIV Env 抗原をコードする核酸配列を含み、任意選択でさらなる HIV 抗原、好ましくは配列番号 1 ~ 5、28、および 29 から選択されるアミノ酸配列を含む 1 つまたは複数の HIV 抗原をコードする核酸配列をさらに含む免疫学的有効量のポックスウイルスベクターを含む第 1 のワクチン組成物と、

20

(b) (i) 配列番号 1 ~ 5、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 つまたは複数の HIV 抗原をコードする免疫原的有効量の 1 つまたは複数のアデノウイルスベクターを含む第 2 のワクチン組成物、ならびに

(b) (i i) 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 1 つまたは複数のポリペプチドを含む第 3 のワクチン組成物の少なくとも 1 つとを含み、ここで第 1 の組成物、ならびに第 2 および / または第 3 の組成物が同じ組成物中または 1 つもしくは複数の異なる組成物中に存在する、対象において HIV に対する免疫応答を誘導するためのワクチン組合せ物を提供する。

30

【0131】

その特定の実施形態では、第 1 のワクチン組成物は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む第 1 の HIV Env 抗原、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む第 2 の HIV Env 抗原、それぞれ配列番号 1 および配列番号 2 のアミノ酸配列を含む第 3 および第 4 の HIV Gag 抗原、それぞれ配列番号 3 および配列番号 4 のアミノ酸配列を含む第 5 および第 6 の HIV Pol 抗原をコードする MVA ベクターを含む。特定の実施形態では、配列番号 1 および 3 の Gag および Pol 抗原は組み合わされ、配列番号 28 を含む Gag - Pol 融合抗原として存在し、ならびに / または配列番号 2 および 4 の Gag および Pol 抗原は組み合わされ、配列番号 29 を含む Gag - Pol 融合抗原として存在する。

【0132】

その特定の実施形態では、第 2 のワクチン組成物は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HIV 抗原をコードする Ad26 ベクター、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HIV 抗原をコードする Ad26 ベクター、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む HIV 抗原をコードする Ad26 ベクター、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む HIV 抗原をコードする Ad26 ベクターを含む。

40

【0133】

本発明の特定の実施形態では、ワクチン組合せ物は、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 1 つまたは複数のポリペプチドを含む。好ましくは、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。特定の実施形態では、2 つの単離された HIV

50

抗原性ポリペプチド、例えば、配列番号7のアミノ酸配列の残基30～708を含む第1の単離されたHIV抗原性ポリペプチドと配列番号36の残基30～724を含む第2の単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、1つの組成物中で一緒に投与される。単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、第3の組成物中または第1および/または第2の組成物中に存在し得る。第1または第2の組成物は、1つまたは複数の単離されたHIV抗原性ポリペプチド、好ましくはgp140と一緒に、プライムおよび/またはブースト投与のために投与され得る。

【0134】

本明細書で使用する場合、用語「同時送達」、「同時投与」、または「と一緒に投与される」は、例えば、ウイルス発現ベクターおよび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、2つまたはそれ以上の成分の同時投与を指す。「同時投与」は、少なくとも同日内の2つまたはそれ以上の成分の投与であり得る。2つの成分が「と一緒に投与される」場合、それらは、短期間のうちに、例えば24、20、16、12、8または4時間、または1時間以内、例えば本質的に同時に別個の組成物で順に投与され、または同時に単一の組成物で投与され得る。

10

【0135】

本発明の別の一般的な態様は、本発明の実施形態によるワクチン組合せ物を含むキットに関する。

【0136】

本発明のワクチン組合せ物で使用され得る合成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、発現ベクターによってコードされるHIV抗原、および単離されたHIV抗原性ポリペプチド等の他の実施形態は、上記および以下の例示的な実施形態で詳細に議論される。

20

【0137】

HIV感染に対する保護免疫を誘導する方法

本発明はまた、それを必要とする対象において1つまたは複数のHIVクレードに対する免疫応答を誘導する方法にも関する。本明細書に記載の方法は、任意選択で1つまたは複数の単離された抗原性ポリペプチドと組み合わせ、1つまたは複数の発現ベクターを使用する免疫応答をプライミングおよびブーストする方法を含む。

【0138】

本発明の実施形態により、本明細書に記載の方法および組成物と関連して使用される場合、「免疫応答を誘導する」は、予防目的のため、感染、例えばHIV感染に対して対象に保護免疫を提供するステップおよび/またはワクチン接種するステップ、ならびに治療目的、すなわち治療的ワクチン接種のため、感染、例えばHIV感染に対してそれを必要とする対象に所望の免疫応答または効果を引き起こすステップを包含する。「免疫応答を誘導する」はまた、病原体、すなわちHIVに対する処置のための治療免疫を提供するステップも包含する。典型的には、予防的ワクチン接種では、組成物およびワクチンは、以前にHIVが感染していない対象に投与されるが、治療的ワクチン接種では、組成物およびワクチンは、すでにHIVが感染している対象に投与される。免疫応答は細胞性免疫応答および/または液性免疫応答であってよい。

30

40

【0139】

本明細書で使用する場合、用語「保護免疫」または「保護免疫応答」は、ワクチン接種した対象が、それに対してワクチン接種が行われた病原体による感染を制御できることを意味する。通常、「保護免疫応答」が発生した対象は、軽度から中程度の臨床症状のみを発生し、または全く症状を発生しない。通常、特定の病原体に対する「保護免疫応答」または「保護免疫」を有する対象は、前記病原体による感染の結果として死なないであろう。

【0140】

本明細書で使用する場合、用語「治療免疫」または「治療免疫応答」は、HIVが感染したワクチン接種した対象が、それに対してワクチン接種が行われた病原体、すなわちHIVによる感染を制御できることを意味する。典型的には、本発明の実施形態によるプラ

50

イムおよびブーストワクチン組成物の投与は、H I V 感染またはH I V 感染の特徴である症状の発症後にH I V に対する免疫応答を生成する治療目的を有する。好ましくは、本発明の方法は、治療目的のため、例えば治療的ワクチン接種のためであり、本明細書に記載の組成物およびワクチンは、すでにH I V が感染した対象に投与される。したがって、本明細書に記載の本発明の方法による処置のための患者集団は、好ましくはH I V が感染した対象であり、より好ましくはH I V が感染したヒト対象である。本明細書で使用する場合、用語「H I V 感染」および「H I V が感染した」は、H I V によるヒト宿主への侵入である。本明細書で使用する場合、「H I V が感染した対象」は、H I V が侵入し、続いて宿主内で複製および増殖し、それに起因して、宿主がH I V の感染を受ける、またはH I V 感染またはその症状を有することになった対象を指す。

10

【 0 1 4 1 】

一般的な一態様では、対象においてヒト免疫不全ウイルス（H I V ）に対する免疫応答を誘導する方法は、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、および好ましくは本明細書に記載のさらなるH I V 抗原をコードする核酸配列を含む、免疫原的有効量の発現ベクター、好ましくはボックスウイルスベクター（例えばM V A またはM V A - B N ）を含む組成物を対象に投与するステップを含む。本明細書に記載のいずれの組成物も、対象においてH I V に対する免疫応答を誘導する方法に使用され得る。組成物は、同じまたは1つもしくは複数のさらなるH I V 抗原および/または1つもしくは複数のさらなる単離されたH I V 抗原性ポリペプチドをコードする、1つまたは複数のさらなるベクター、例えばアデノウイルスをさらに含み得る。配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含むH I V エンベロープタンパク質をコードするベクターと同じベクターに1つまたは複数のさらなる単離されたH I V 抗原をコードすることもできる。これは、本明細書に示すように、ボックスウイルスベクター、例えばM V A - B N を含むM V A に特に好適である。

20

【 0 1 4 2 】

別の一般的な態様では、対象においてヒト免疫不全ウイルス（H I V ）に対する免疫応答を誘導する方法は、

(a) 配列番号 1、2、3、4、5、1 8、2 8 および 2 9 の1つまたは複数にコードする、1つまたは複数の組換えアデノウイルスベクター、好ましくはA d 2 6 ベクターを含む第1のワクチン、および

30

(b) 配列番号 1 8 をコードする、および好ましくは配列番号 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つまたは複数のH I V 抗原をさらにコードするボックスウイルスベクター、好ましくはM V A ベクターを含む第2のワクチンを対象に投与するステップを含み、ステップ (a) および (b) は、プライム免疫のためのステップの1つおよびブースト免疫のための他のステップによりいずれかの順で実施される。

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態では、免疫応答を誘導する方法は、1つまたは複数の単離されたH I V 抗原性ポリペプチド、好ましくは (i) 配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 0 8 を含むポリペプチド、または (i i) 配列番号 3 6 の残基 3 0 ~ 7 2 4 を含むポリペプチド、または (i i i) ポリペプチド (i) と (i i) の両方を含む1つまたは複数のH I V 抗原性ポリペプチドを対象に投与するステップをさらに含む。1つまたは複数の単離されたH I V 抗原性ポリペプチドは、第1および/または第2の組成物と同じ組成物に、ならびに1つまたは複数のさらなる組成物に存在し得る。好ましい実施形態では、1つまたは複数の単離されたH I V 抗原性ポリペプチドは、ブースト免疫のために使用される組成物とほぼ同時に投与される。特定の実施形態では、1つまたは複数の単離されたH I V 抗原性ポリペプチドは、ブーストワクチンとして同じ組成物に存在する。他の実施形態では、1つまたは複数の単離されたH I V 抗原性ポリペプチドは、ブーストワクチンとは別の組成物に存在する。特定の実施形態では、単離されたH I V 抗原性ポリペプチドは、アジュバント、例えばリン酸アルミニウムを含む組成物中にある。

40

50

【 0 1 4 4 】

本発明による免疫応答を誘導する方法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、および配列番号5のアミノ酸配列を含むHIV抗原をコードする第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18のアミノ酸を含む合成HIV抗原をコードする核酸を含む本発明によるボックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクター、例えばMVA-BNベクターを含み、好ましくは配列番号1~5、28、および29のアミノ酸配列を含む1つまたは複数のHIV抗原、より好ましくは配列番号5、28、および29のアミノ酸配列を含むHIV抗原をコードする核酸配列をさらに含み、こ

10

【 0 1 4 5 】

免疫応答を誘導する方法の別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第1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1~5および18、より好ましくは配列番号5、18、28、および29、ならびにその組合せのアミノ酸配列を含むHIV抗原をコードする核酸配列を含むボックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクター、より好ましくはMVA-BNを含み、ここで、任意選択で1つまたは複数の単離されたHIV抗原性ポリペプチドと一緒に、第1の組成物が、プライム免疫のために1または複数回対象に投与され、第2の組成物が、ブースト免疫のために1または複数回対象に投与され、または、任意選択で1つまたは複数の単離されたHIV抗原性ポリペ

20

30

【 0 1 4 6 】

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、皮内、または皮下である。しかしながら、投与の他の形態、例えば静脈内、直腸、皮膚、経口、経鼻等も予想され得る。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液を注射するための針を使用して達成され得る。代替案は、組成物を投与するための針無し注射装置(例えば、Biojector(商標)を使用する)またはワクチンを含有する凍結乾燥粉末の使用である。

40

【 0 1 4 7 】

筋肉内、静脈内、皮膚もしくは皮下注射、または苦痛の部位での注射のため、ベクターは、パイロゲンフリーであり、好適なpH、等張性および安定性を有する、非経口的に許容される水溶液の形態である。同様に、単離された抗原性ポリペプチドは、好適なpH、等張性、および安定性を有する非経口的に許容される溶液の形態である。当業者は、例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル液、乳酸化リンゲル液などの等張性ビヒクルを使用す

50

る好適な溶液をよく調整できる。必要であれば、保存剤、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤および/または他の添加剤が含まれ得る。緩効性製剤もまた、用いられ得る。

【0148】

典型的には、本発明の実施形態によるワクチン組成物野投与は、感染または症状の発症後に、HIV抗原に対する免疫応答を生成する治療目的を有する。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/またはポックスウイルスベクター、および/またはHIV抗原性ポリペプチドは、感染または症状の発症前に予防目的のために投与され得る。

【0149】

発現ベクター、例えばアデノウイルスベクターおよび/またはポックスウイルスベクターを含有する免疫原性組成物、および/または抗原性ポリペプチドは対象に投与され、対象において抗HIV免疫応答を生じる。検出可能な免疫応答を誘導するのに十分な組成物の量は、「免疫原的有效用量」または「免疫原的有效量」とであると定義される。本発明の典型的な実施形態では、免疫応答は治療免疫応答である。

10

【0150】

投与される実際の量、ならびに投与の速さおよびタイムコースは、処置されるものの性質および重症度による。処置の処方、例えば投与量の決定等は、一般開業医および他の医師の責任であり、獣医の文脈では獣医であり、典型的には、開業医に公知の処置される障害、個々の患者の状態、送達部位、投与の方法および他の因子を考慮に入れる。上述の技術およびプロトコールの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980に見出され得る。

20

【0151】

アデノウイルスベクターおよび/またはポックスウイルスベクター、例えばMVAベクターの産生、ならびに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る。非ヒト哺乳動物への送達は、治療目的のためである必要はなく、実験の文脈で、例えば、本発明のアデノウイルスベクターおよび/またはポックスウイルスベクターによって発現される合成HIVエンベロープタンパク質および他のHIV抗原への免疫応答のメカニズムの調査における使用のためであり得る。

【0152】

開示した方法の一実施形態では、本明細書に開示の1つまたは複数のHIV抗原をコードする1つまたは複数のアデノウイルスベクターが免疫応答のプライミングに使用される。1つまたは複数の単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、プライム免疫のための1つまたは複数のアデノウイルスベクターと一緒に使用され得る。別の実施形態では、1つまたは複数のポックスウイルスベクター、好ましくはMVAまたはMVA-BN、本発明の1つまたは複数のHIV抗原をコードするポックスウイルスベクターは、免疫応答のプライミングに使用される。1つまたは複数の単離されたHIV抗原性ポリペプチドは、プライム免疫のための1つまたは複数のポックスウイルスベクターと一緒に使用され得る。プライム免疫は、1回のみ投与され得るが、任意選択で複数回、例えば、時間0での最初のプライム投与、続いて最初のプライム投与約1~24週後に別のプライム投与も投与され得る。1つまたは複数の単離されたHIV抗原性ポリペプチドを、任意選択で1つまたは複数のさらなるHIV抗原をコードする1つまたは複数のさらなるアデノウイルスまたはポックスウイルスベクターと共に使用して、免疫応答をブーストすることができる。

30

40

【0153】

プライム投与後、本発明の1つまたは複数のアデノウイルスベクターまたは本発明のポックスウイルスベクターは、1または複数回のブースト免疫に使用され得る。ブースト免疫はまた、1回または複数回、例えば、まず、最初のプライム投与後約4~52週間、任意選択で続いて例えば最初のプライム投与後約8~100週で別のブースト投与で投与され得る。特定の他の実施形態では、本発明の1つまたは複数のアデノウイルスベクターは、プライムおよび/またはブースト免疫のために本発明の1つまたは複数のポックスウイルスベクターと一緒に投与される。免疫によって誘導される免疫応答がモニターされる。

50

【0154】

プライム - ブーストレジメンは、一般的に、強い免疫応答の生成に好まれる。同じベクターを複数回投与することが可能であり、同種プライム - ブーストと呼ばれる。この文脈では、プライミングおよびブーストするベクターが異なることを示す異種プライム - ブーストレジメンを適用することが本発明により典型的には好まれる。特定のそのような異種プライム - ブーストレジメン実施形態では、例えば、プライミングはアデノウイルスベクター、例えば Ad 26 により、ブーストはポックスウイルスベクター、例えば MVA、例えば MVA - BN による。他のそのような異種プライム - ブーストレジメン実施形態では、例えば、プライミングはポックスウイルスベクター、例えば MVA、例えば MVA - BN により、ブーストはアデノウイルスベクター、例えば Ad 26 による。任意選択で、プライム - ブーストレジメンでは、単離された HIV 抗原性ポリペプチド、例えば gp140 は、そのようなアデノウイルスまたはポックスウイルスベクターのプライムもしくはブースト投与とほぼ同時に投与され得る。

10

【0155】

一例示的なおよび非限定的な実施形態では、対象は、合わせて、配列番号 5、18、28 および 29 を含む HIV 抗原をコードする 4 つの異なるアデノウイルス 26 ベクターを投与され、ここでベクターは 1 : 1 : 1 : 1 の比で存在し、0 および 12 週で筋肉注射によって 0.5 mL 中 5×10^{10} 個のウイルス粒子の総用量で投与され、続いて 24 および 48 週で筋肉内に投与される 0.5 mL 注射液あたり約 10^8 個のプラーク形成単位の用量で、配列番号 5、18、28 および 29 を含む HIV 抗原をコードする MVA ベクターが投与される。

20

【0156】

プライムおよびブースト投与のレジメンが投与後の測定された免疫応答に基づいて調整され得ることは、当業者に容易に理解される。例えば、ブースト組成物は、一般的に、プライム組成物の投与の数週間または数ヵ月または数年後でさえも投与される。

【0157】

本発明の実施形態により、アジュバントは、プライムおよび/またはブースト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が、本開示の観点で単離された HIV 抗原性ポリペプチドと一緒に使用され、特定の実施形態では、アジュバントはアンモニウム塩、例えばリン酸アルミニウムである。

30

【0158】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に開示の方法で使用されるアデノウイルスベクターは rAd 26 ベクターを含み、本明細書に開示の方法で使用されるポックスウイルスベクターは MVA ベクターを含む。

【0159】

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 エンベロープタンパク質をコードする rAd 26 ベクターは、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する HIV 抗原をコードする rAd 26 ベクターと組み合わせて免疫応答をプライミングするために使用される。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 1 つまたは複数のさらなる HIV 抗原をコードする 1 つまたは複数のさらなる rAd 26 ベクターも、免疫応答をプライミングするために他の rAd 26 ベクターと一緒に投与され得る。特定の実施形態では、プライム投与は、任意のブースト免疫が投与される前に再投与され得る。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、および配列番号 5、28、および 29 をさらにコードする MVA ベクターは、これらの実施形態における免疫応答をブーストするために使用される。任意選択で、単離された HIV 抗原性ポリペプチド、例えば配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 708 を含むもの、または配列番号 36 のアミノ酸配列の残基 30 ~ 724 を含むもの、またはそのような単離された HIV 抗原性ポリペプチドの少なくとも 2 つの組合せが、免疫応答をブーストするために MVA ベクターと一緒に投与される。好ましくは、アジュバントは、ブースト免疫において単離された HIV 抗原性ポリペプチドを伴って、さら

40

50

に投与される。

【0160】

別の例示的な実施形態では、配列番号18のアミノ酸配列を含む合成HIVエンベロープタンパク質をコードする、ならびに配列番号5、28、および29をさらにコードするMVAまたはMVA-BNベクターは、免疫応答をプライミングするために使用される。特定の実施形態では、プライム投与は、任意のブースト免疫が投与される前に再投与される。プライム投与に続いて、1つまたは複数のブースト免疫が投与され、ブースト免疫は、配列番号5のアミノ酸配列を有するHIV抗原をコードするrAd26ベクターと組み合わせて、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rAdベクターを含む。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1つまたは複数のさらなるHIV抗原性ポリペプチドをコードする1つまたは複数のさらなるrAd26ベクターは、好ましくは他のrAd26ベクターと一緒に投与され、免疫応答をブーストする。任意選択で、単離されたHIV抗原性ポリペプチド、例えば配列番号7のアミノ酸配列の残基30~708を含むもの、または配列番号36のアミノ酸配列の残基30~724を含むもの、またはそのような単離されたHIV抗原性ポリペプチドの少なくとも2つの組合せがrAd26ベクターと一緒に投与され、免疫応答をブーストする。

10

【0161】

特に例示的な実施形態では、免疫応答は、アデノウイルスベクター、好ましくはrAd26ベクターにコードされる4つのHIV抗原の投与によってプライミングされ、コードされる4つの抗原は：(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、(ii)配列番号5のアミノ酸配列を有するHIV Env抗原、(iii)配列番号28のアミノ酸配列を有するHIV Gag-Pol融合抗原、および(iv)配列番号29のアミノ酸配列を有するHIV Gag-Pol融合抗原である。これら4つの抗原のそれぞれは、別個のアデノウイルスベクター、好ましくはrAd26ベクターにコードされ、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10×10^{10} 個のウイルス粒子(vp)、例えば約 5×10^{10} vp(全てのベクター一緒に)の総用量で投与され得る。ベクターは、例えば1:1:1:1の比であらかじめ混合され得る。アデノウイルスベクターの投与は、好ましくは、筋肉内注射を介する。プライム投与は、最初のプライム投与後に再投与され得る。この実施形態では、免疫応答は、 $10^5 \sim 10^{11}$ pfuの投与量、例えば 10^7 pfu、 10^8 pfu、もしくは 10^9 pfuの用量、または $10^5 \sim 10^{10}$ TCID₅₀の投与量、例えば 10^7 、 10^8 もしくは 10^9 TCID₅₀で、配列番号18、配列番号5、配列番号28、および配列番号29を含む4つのHIV抗原をコードするMVAまたはMVA-BNベクターの投与によってブーストされる。好ましくは、投与量は、 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^8$ pfuである。好ましくは、ヒトのための用量は、少なくとも 5×10^7 pfu、例えば少なくとも 1×10^8 pfu、または代わりに少なくとも 2×10^7 TCID₅₀、少なくとも 3×10^7 TCID₅₀、少なくとも 5×10^7 TCID₅₀、例えば少なくとも 1×10^8 TCID₅₀、または少なくとも 2×10^8 TCID₅₀を含む。免疫応答をブーストするためのMVAまたはMVA-BN投与は、最初のプライム投与後の任意の時間で実施され得る。ブースト投与は、最初のブースト投与後に繰り返し替えされ得る。本実施形態によるMVAの全ての投与は、例えば筋肉内または皮下経路を介して実施され得る。

20

30

40

【0162】

代わりに、MVAベクターはプライム投与のために使用され、ブースト投与のためにはAd26ベクターが使用され、アデノウイルスおよびポックスウイルスベクター型の投与の逆の順序以外は、全て本質的に上記に示した通りである。任意選択で、単離されたgp140タンパク質はブースト投与と一緒に投与される。例えば、単離されたEnv gp140タンパク質、例えばクレードC gp140タンパク質(配列番号7のアミノ酸配列の残基30~708を含む)、またはモザイクgp140タンパク質(配列番号36のアミノ酸配列の残基30~724を含む)、またはクレードC gp140タンパク質お

50

よびモザイク g p 1 4 0 タンパク質は、総用量約 5 0 ~ 3 0 0 μ g タンパク質、例えば 5 0 もしくは 2 5 0 マイクログラムのクレード C g p 1 4 0 タンパク質、または例えば 5 0 もしくは 2 5 0 マイクログラムのモザイク g p 1 4 0 タンパク質、または例えば 5 0 もしくは 2 5 0 マイクログラムのクレード C g p 1 4 0 タンパク質とモザイク g p 1 4 0 タンパク質の組合せ（例えば、1 : 1 の比で、一緒に混合されるかまたは別々に投与されるかのいずれか）で、ブースト免疫のためのボックスウイルスベクターと一緒に投与され得る。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。

【 0 1 6 3 】

特定の実施形態では、本発明による免疫応答を誘導する方法は、潜伏ウイルスリザーバー除去剤 (latent viral reservoir purging agent) を投与するステップをさらに含む。H I V が潜伏感染した細胞は、転写的にサイレントである組み込まれたウイルスを有し、これは、処置される対象において H I V 感染を効果的に根絶することを困難にしている。本明細書で使用する場合、「リザーバー除去剤」および「潜伏ウイルスリザーバー除去剤」は、H I V リザーバーを再活性化することによって、例えば、静止状態の H I V の発現を誘導することによって、H I V の潜伏プールを減らす物質を指す。本発明による使用に好適な潜伏ウイルスリザーバー除去剤の例としては、限定はされないが、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) 阻害剤およびトール様受容体 (例えば T L R 7) のモジュレーター、例えばその全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2 0 1 6 / 0 0 7 7 6 5 号パンフレットおよび国際公開第 2 0 1 6 / 1 7 7 8 3 3 号パンフレットに記載のものが挙げられる。潜伏ウイルスリザーバー除去剤は、本明細書に記載のプライムおよびブースト免疫の 1 つまたは複数の前、後、または同時に投与され得る。プライムとして、G a g、P o l、および E n v 抗原をコードするアデノウイルス 2 6 ベクター、続いてブーストとしてそのような抗原をコードする M V A ベクターの組合せのワクチン接種は、T L R 7 刺激との組合せで、ウイルス学的制御の改善およびアカゲザルモデル試験での抗レトロウイルス療法中断後のウイルスリバウンドの遅延をもたらし、H I V 感染の機能的な治療を狙う、先天的な免疫刺激と組み合わせた治療ワクチンの能力を実証する (Borducchi E.N., et al, 2016, Nature 540: 284-287 (doi: 10/1038/nature20583))。

【 0 1 6 4 】

本発明の特定の実施形態では、免疫応答を誘導するための本明細書に記載のプライムおよびブースト免疫は、標準的な処置、例えば抗レトロウイルス療法 (A R T) と組み合わせられ得る。本発明のプライム/ブースト免疫によって処置される対象は、本開示の観点で当技術分野で公知の任意の抗レトロウイルス薬による A R T も受けることができる。A R T は、H I V を処置する薬物治療であるが、薬物はウイルスを死滅または治療しない。しかしながら、組み合わせで接種する場合、それらはウイルスの増殖を防ぐことができる。ウイルスが減速されると、H I V 疾患も減速される。抗レトロウイルス薬は A R V と呼ばれる。組合せ A R V 療法 (c A R T) は、高度に活性な A R T (H A A R T) と呼ばれる。当業者は、本発明のプライム/ブースト免疫の投与と対応するように、適切な抗レトロウイルス処置、投与の頻度、A R T の投与量等を決定することができる。

【 0 1 6 5 】

A R T のために使用される抗レトロウイルス薬の例としては、限定はされないが、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤 (N R T I、その非限定的な例としては、ジドブジン、ジダノシン、スタブジン、ラミブジン、アバカビル、テノホビル、コンビビル [ジドブジンとラミブジンの組合せ]、トリジビル [ジドブジン、ラミブジン、およびアバカビルの組合せ]、エムトリシタピン、ツルバダ [エムトリシタピンとテノホルビルの組合せ]、ならびにエブジコム [アバカビルとラミブジンの組合せ])、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (N N R T I、その非限定的な例としては、ネビラピン、デラビルジン、エファビレンツ、エトラピリン、およびリルピピリンが挙げられる)、プロテアーゼ阻害剤 (P I、その非限定的な例としては、サキナビル、インジナビル、リトナビル、ネルフィナビル、アンブレナビル、ロピナビル/リトナビル、アタザナビル、ホスアンブレナビル、チプラナ

10

20

30

40

50

ビル、ダルナビルが挙げられる)、インテグラーゼ阻害剤(INSTI、非限定的な例としては、ランテグラビル、エルピテグラビルおよびドルテグラビルが挙げられる)、ならびに融合阻害剤、侵入阻害剤および/またはケモカイン受容体アンタゴニスト(FI、CCR5 アンタゴニスト; 非限定的な例としては、エンフビルチド、アプラビロク、マラビロク、ピクリビロク、およびセニクリビロク)が挙げられる。

【0166】

他の実施形態では、対象は、本発明の実施形態によるプライム/ブースト免疫の完了後、ARTの中断(中止とも呼ばれ、本明細書で交換可能に使用される)が行われる。いくつかの実施形態では、対象は、本発明の実施形態によるプライム、ブースト免疫の完了後、抗レトロウイルス分析的処置中断(ARV ATI)が行われ得る。本発明で使用される場合、「抗レトロウイルス分析的処置中断」および「ART ATI」は、継続するARTの非存在下でのウイルス抑制およびウイルス血症制御を評価するための抗レトロウイルス薬による処置の中止を指す。典型的には、対象が、少なくとも約52週間で50コピー/mLよりも少ない血漿HIV RNAレベルを有する場合、対象はARV ATIが行われる、すなわち中止され得るが、ART ATIの直前のスクリーニングが50コピー/mLよりも少ない血漿HIV RNAを示す限り、対象が期間内に50コピー/mLよりも多く、200コピー/mLよりも少ない血漿HIV RNAの1つまたは複数のブリップ(すなわち、実例)を有する場合でさえも、対象はARV ATIを依然として受けることができる。

【0167】

本発明の実施形態により、ARTは、最後のブーストワクチンが投与される約4~20週後に停止され得る。特定の実施形態では、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)ベースのART中の対象は、NNRTI耐性を発生するリスクを減らすため、ARTを中止する前に約1~2週間NNRTIの代わりにブーストされたプロテアーゼ阻害剤が投与され得る。ATIステージ中に活性剤(例えばヒストンデアセチラーゼ阻害剤またはTLR7モジュレーター)を投与し、任意の(例えば潜伏性の)HIVリザーバーを活性化し、それにより免疫応答を改善することも可能である。

【0168】

ART AVIが行われる対象は、例えば、血漿HIVレベルを測定することによってモニターされ得る。例えば、ARV ATIの開始後のモニターは、リバウンドウイルス血症が最も起こりやすい最初の6週間、週当たり最大2回まで行われる。「リバウンドウイルス血症」は、ART ATI後に1000コピー/mLよりも多い血漿HIV RNAレベルとして定義される。ARTは、リバウンドウイルス血症を示す対象で再始動され得る。好ましくは、本発明の方法に従って処置された対象は、ART中断後にウイルス血症制御を維持するであろう。本明細書で使用する場合、「ウイルス血症制御を維持する」は、ARV ATI後に50コピー/mLよりも少ない血漿HIV RNAで少なくとも24週間と定義される。「維持されたウイルス血症制御」基準は、対象が、少なくとも1週間あけた2連続判定において1000コピー/mLを超える血漿HIV RNAレベルを持たない限り、50コピー/mLよりも多く、1000コピー/mLよりも少ない血漿HIV RNAの1つまたは複数の実例がある場合、依然として満たされるとみなされる。

【0169】

典型的には(本発明の方法を使用しない)、ヒトHIV感染対象は、ART中断の2~3週間後にウイルス血症が戻る。いずれの理論にも縛られることを望まないが、HIVが完全に抑制された個体間で、本発明の実施形態によるプライム/ブースト免疫は、測定可能な免疫応答を生じ、少なくとも特定の個体においてARV ATI後のウイルス血症制御を維持すると考えられる。いくつかの実施形態では、対象は、本発明の方法によって処置された後にARTを中止することができる。ARTの中止は、長期間にわたり得る(例えば、少なくとも24週間、好ましくはより長く、例えば少なくとも約28、32、36、40、44、48、52週間、16ヵ月、18、20、22、24ヵ月、またはさらに長く)。ARTが停止または中止されるそのような期間は、「休暇」または「ART休暇」

または「処置休暇」と呼ばれる。他の実施形態では、本発明の方法によるワクチン療法は、HIV寛解をもたらすことができ、ARTの非存在下でウイルス抑制が維持されることを意味している。

【0170】

実施形態

実施形態1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ボックスウイルスベクターである。

【0171】

実施形態2は、

(a) 配列番号18のアミノ酸配列を含む第1のHIVエンベロープ(Env)抗原、

(b) 第1のHIV Env抗原とは異なる第2のHIV Env抗原、

(c) 2つの異なるHIV Gag抗原である第3の抗原および第4の抗原、ならびに、

(d) 2つの異なるHIV Pol抗原である第5の抗原および第6の抗原

をコードする核酸を含むボックスウイルスベクターである。

【0172】

実施形態3は、第2のHIV Env抗原が配列番号5のアミノ酸配列を含み、第3および第4の抗原が、それぞれ配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列を含み、ならびに第5および第6の抗原が、それぞれ配列番号3および配列番号4のアミノ酸配列を含む、実施形態2のボックスウイルスベクターである。

【0173】

実施形態4は、第3および第5の抗原が融合されて、配列番号28のアミノ酸配列を含む第1のGag-Pol融合抗原になっており、第4および第6の抗原が融合されて、配列番号29のアミノ酸配列を含む第2のGag-Pol融合抗原になっている、実施形態2または3のボックスウイルスベクターである。

【0174】

実施形態5は、第1のHIV Env抗原が配列番号41によってコードされる、実施形態1~4のいずれか1つのボックスウイルスベクターである。

【0175】

実施形態6は、第1のHIV Env抗原が配列番号41によってコードされ、第2のHIV Env抗原が配列番号39によってコードされ、第1のGag-Pol融合抗原が配列番号38によってコードされ；および第2のGag-Pol融合抗原が配列番号40によってコードされる、実施形態4~5のいずれか1つのボックスウイルスベクターである。

【0176】

実施形態7は、抗原をコードする核酸がプロモーター配列に操作可能に連結されている、実施形態1~6のいずれか1つのボックスウイルスベクターである。

【0177】

実施形態8は、ボックスウイルスベクターが、組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)ベクターである、実施形態1~7のいずれか1つのボックスウイルスベクターである。

【0178】

実施形態9は、MVAベクターが、MVA-BNまたはその誘導体を含む、実施形態8のボックスウイルスベクターである。

【0179】

実施形態10は、第1のGag-Pol融合抗原および第2のEnv抗原が、MVAゲノムの遺伝子間領域(IGR)44/45に挿入され、第2のGag-Pol融合抗原および第1のEnv抗原が、MVAゲノムのIGR88/89に挿入されている、実施形態8または9のボックスウイルスベクターである。

【0180】

実施形態11は、第1のGag-Pol融合抗原および第2のGag-Pol融合抗原

10

20

30

40

50

がそれぞれ、別個のPr13.5プロモーターの制御下にあり、第1のEnvおよび第2のEnv抗原がそれぞれ、別個のPrHybプロモーターの制御下にある、実施形態7~10のいずれか1つのボックスウイルスベクターである。

【0181】

実施形態12は、実施形態1~11のいずれか1つのボックスウイルスベクターを含む単離された細胞である。

【0182】

実施形態13は、実施形態1~11のいずれか1つのベクター、および担体を含む組成物である。

【0183】

実施形態14は、実施形態1~11のいずれか1つに記載の免疫原的有効量のボックスウイルスベクター、および薬学的に許容される担体を含むワクチンである。

【0184】

実施形態15は、

(a) 実施形態1~11のいずれか1つに記載の、免疫原的有効量のボックスウイルスベクター、好ましくはMVAベクターを含む第1のワクチン組成物と、

(b) (i) 1つまたは複数のHIV抗原、好ましくは、配列番号1~5、18、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つまたは複数のHIV抗原をコードする、免疫原的有効量の1つまたは複数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ベクターを含む第2のワクチン組成物、および、

(b) (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1つまたは複数のポリペプチドを含み、任意選択でアジュバント、好ましくはリン酸アルミニウムをさらに含む第3のワクチン組成物

の少なくとも1つを含み、第1の組成物ならびに第2および/または第3の組成物が同じ組成物、または1つもしくは複数の異なる組成物中に存在するワクチン組合せ物である。

【0185】

実施形態16は、第3のワクチン組成物における1つまたは複数の単離されたHIV抗原性ポリペプチドが、(i) 配列番号7のアミノ酸配列の残基30~708を含むポリペプチド、または(ii) 配列番号36のアミノ酸配列の残基30~724を含むポリペプチド、または(iii) ポリペプチド(i)と(ii)の両方を含む、実施形態15に記載のワクチン組合せ物である。

【0186】

実施形態17は、第2のワクチン組成物が、合わせて、配列番号1~5、および18をコードする組換えアデノウイルス26ベクターを含み、好ましくは配列番号1および3が配列番号28として互いに融合され、および/または配列番号2および4が配列番号29として互いに融合されている、実施形態15~16のいずれか1つのワクチン組合せ物である。

【0187】

実施形態18は、第2のワクチン組成物が4つの組換えAd26ベクター、配列番号5をコードする第1の組換えAd26ベクター、配列番号18をコードする第2の組換えAd26ベクター、配列番号1および3、好ましくは配列番号28をコードする第3の組換えAd26ベクター、ならびに配列番号2および4、好ましくは配列番号29をコードする第4の組換えAd26ベクターを含む、実施形態17のワクチン組合せ物である。

【0188】

実施形態19は、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であって、実施形態13の組成物、実施形態14のワクチン、または実施形態15~18のいずれか1つのワクチン組合せ物を対象に投与するステップを含む方法である。

【0189】

実施形態20は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する免疫応答を誘導するステッ

10

20

30

40

50

ブにおける使用のための実施形態 13 の組成物、実施形態 14 のワクチン、または実施形態 15 ~ 18 のいずれか 1 つのワクチン組合せ物である。

【0190】

実施形態 21 は、1 つまたは複数のさらなる HIV 抗原、および / または 1 つまたは複数の単離された HIV 抗原性ポリペプチドをコードする、1 つまたは複数のさらなる発現ベクターをさらに含む、実施形態 13 の組成物または実施形態 14 のワクチンである。

【0191】

実施形態 22 は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む、またはからなる合成 HIV エンペ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 ベクターをさらに含む、実施形態 13 の組成物または実施形態 14 のワクチンである。

10

【0192】

実施形態 23 は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HIV 抗原をコードする第 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、ならびに任意選択で配列番号 1 ~ 4、28 および 29、好ましくは配列番号 28 および 29 のアミノ酸配列を含む 1 つまたは複数のさらなる HIV 抗原をコードする、1 つまたは複数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、より好ましくは、配列番号 28 および 29 が第 3 および第 4 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 ベクターに別々にコードされる、実施形態 22 に記載の組成物またはワクチンである。

【0193】

実施形態 24 は、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生じさせる方法であって、実施形態 13 ~ 23 のいずれか 1 つに記載の組成物またはワクチンまたはワクチン組合せ物を対象に投与するステップを含む方法である。

20

【0194】

実施形態 25 は、組成物またはワクチン組合せ物を産生する方法であって、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つのボックスウイルスベクターを担体と、および任意選択で 1 つまたは複数の組成物において、1 つまたは複数のさらなる HIV 抗原および / または 1 つまたは複数の単離された HIV 抗原性ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数のさらなるベクターを担体と一緒に組み合わせるステップを含む方法である。

【0195】

実施形態 26 は、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であって、方法が、

30

(i) 配列番号 1 ~ 5、18、28、および 29 のいずれか 1 つまたは複数のアミノ酸配列を含む 1 つまたは複数の HIV 抗原をコードする免疫原的有効量の 1 つまたは複数の組換えアデノウイルスベクター、好ましくは Ad26 ベクター、ならびに担体を含む第 1 のワクチン、

(ii) 実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載のボックスウイルスベクター、および担体を含む第 2 のワクチン、ならびに

(iii) 任意選択で、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 1 つまたは複数のポリペプチドを含み、任意選択でアジュバント、好ましくはリン酸アルミニウムをさらに含む第 3 のワクチン

40

を対象に投与するステップを含み、ステップ (i) および (ii) がいずれかの順序で実施され、1 つのステップがプライム免疫であり、他のステップがブースト免疫であり、プライムおよび / またはブースト免疫のために任意選択の第 3 のワクチンが第 1 の組成物または第 2 の組成物と一緒に投与される、方法である。

【0196】

実施形態 27 は、第 3 の組成物がブーストワクチンに使用される組成物とほぼ同時に投与される、実施形態 26 に記載の方法である。

【0197】

実施形態 28 は、1 つまたは複数の単離された HIV 抗原性ポリペプチドが、(i) 配

50

列番号7のアミノ酸配列の残基30～708を含むポリペプチド、または(i i)配列番号36の残基30～724を含むポリペプチド、または(i i i)ポリペプチド(i)と(i i)の両方を含み、1つまたは複数の単離されたH I V抗原性ポリペプチドが、ブーストワクチンおよび/またはプライムワクチンと同じ組成物中、またはブーストワクチンおよび/またはプライムワクチンとは別の組成物中にある、実施形態26または27に記載の方法である。

【0198】

実施形態29は、(i)第1のワクチンが、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、ならびに配列番号5のアミノ酸配列を含むH I V抗原をコードする第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、ならびに任意選択で1つまたは複数のさらなるH I V抗原をコードする1つまたは複数のさらなる発現ベクター、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ベクターを含み、(i i)第2のワクチンが、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、ならびに好ましくは配列番号1～5、28、および29の1つまたは複数のアミノ酸配列を含むさらなるH I V抗原をコードするボックスウイルスベクター、好ましくはM V Aベクターを含み、ならびに(i i i)第3のワクチンが、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を含み、ここで第1のワクチンがプライム免疫のために1または複数回対象に投与され、第2のワクチンがブースト免疫のために1または複数回対象に投与され、第3のワクチンがブースト免疫のために1または複数回第2のワクチンと一緒に対象に投与される、実施形態26～28のいずれか1つに記載の方法である。

【0199】

実施形態30は、第1のワクチンが、配列番号1～4、28、および29、好ましくは配列番号28および29のアミノ酸配列を含む1つまたは複数のH I V抗原をコードする1つまたは複数のさらなるアデノウイルス26ベクターを含む、実施形態29に記載の方法である。

【0200】

実施形態31は、第1のワクチン組成物が、配列番号28をコードする第3のアデノウイルスベクターおよび配列番号29をコードする第4のアデノウイルスベクターを含む、実施形態30に記載の方法である。

【0201】

実施形態32は、以下の成分、
 (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A d 26ベクター、
 (i i)配列番号5のアミノ酸配列を含むH I Vエンベロープタンパク質をコードするA d 26ベクター、
 (i i i)配列番号28のアミノ酸配列を含むH I V G a g - P o l融合タンパク質をコードするA d 26ベクター、
 (i v)配列番号29のアミノ酸配列を含むH I V G a g - P o l融合タンパク質をコードするA d 26ベクター、ならびに
 (v)配列番号18のアミノ酸配列を含む第1のH I Vエンベロープタンパク質、配列番号5のアミノ酸配列を含む第2のH I Vエンベロープタンパク質、配列番号28のアミノ酸配列を含む第1のG a g - P o l融合タンパク質および配列番号29のアミノ酸配列を含む第2のG a g - P o l融合タンパク質をコードするM V Aベクターを含むワクチン組合せ物である。

【0202】

実施形態33は、以下の成分、
 (v i) (v i, a) : 配列番号7のアミノ酸配列の残基30～708を有する単離され

10

20

30

40

50

たH I V抗原性ポリペプチド、または(v i、b)：配列番号36のアミノ酸配列の残基30～724、または(v i、c)：(v i、a)と(v i、b)の両方をさらに含み、ここで(v i、a)、(v i、b)、または(v i、c)が任意選択でアジュバントをさらに含む、

実施形態32に記載のワクチン組合せ物である。

【0203】

実施形態34は、それを必要とするヒト対象においてヒト免疫不全ウイルス(H I V)に対する免疫応答を誘導する方法であって、

(a)(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ベクターを対象に投与するステップであって、好ましくは、r A d 2 6ベクターは、約 $1 \sim 10 \times 10^{10}$ ウイルス粒子(v p)、例えば 5×10^{10} v pの総用量で約1：1：1：1の比で投与される、ステップ；

(b)任意選択でステップ(a)を繰り返すステップ；

(c)(i)(i, a)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、(i, b)配列番号5のアミノ酸配列を含むH I V E n v抗原、(i, c)配列番号28のアミノ酸配列を含むH I V G a g - P o l融合抗原、(i, d)配列番号29のアミノ酸配列を含むH I V G a g - P o l融合抗原をコードする各鎖を含むM V AまたはM V A - B Nベクターを対象に投与するステップであって、好ましくは、M V Aは $10^5 \sim 10^{11}$ p f uの用量で、例えば、 10^7 p f u、 10^8 p f u、 10^9 p f u、 10^{10} p f uの用量で、または $10^6 \sim 10^{10}$ T C I D₅₀、例えば 10^7 と 10^9 T C I D₅₀の間の用量で投与される、ステップ、ならびに

(d)任意選択でステップ(c)を繰り返すステップを含む方法である。

【0204】

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

(a)(i)(i, a)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、(i, b)配列番号5のアミノ酸配列を含むH I V E n v抗原、(i, c)配列番号28のアミノ酸配列を含むH I V G a g - P o l融合抗原、(i, d)配列番号29のアミノ酸配列を含むH I V G a g - P o l融合抗原をコードする核酸を含むM V AまたはM V A - B Nベクターを対象に投与するステップであって、好ましくは、M V Aは、 $10^5 \sim 10^{11}$ p f uの用量で、例えば、 10^7 p f u、 10^8 p f u、 10^9 p f u、または 10^{10} p f uの用量で、または $10^6 \sim 10^{10}$ T C I D₅₀、例えば 10^7 と 10^9 T C I D₅₀の間の用量で投与される、ステップ、

(b)任意選択でステップ(a)を繰り返すステップ、

(c)(i)(i, a)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、(i, b)配列番号5のアミノ酸配列を含むH I V E n v抗原、(i, c)配列番号28のアミノ酸配列を含むH I V G a g - P o l融合抗原、(i, d)配列番号29のアミノ酸配列を含むH I V G a g - P o l融合抗原をコードする核酸を含むM V AまたはM V A - B Nベクター、ならびに任意選択で1つまたは複数の(i i, a)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、(i i, b)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(i i i)リン酸アルミニウムアジュバントを対象に投与するステップであって、好ましくは、M V Aが $10^5 \sim 10^{11}$ p f uの用量で、例えば、 10^7 p f u、 10^8 p f u、 10^9 p f u、または 10^{10} p f uの用量で、または $10^6 \sim 10^{10}$ T C I D₅₀、例えば 10^7 と 10^9 T C I D₅₀の間の用量で投与され、任意選択で、単離されたH I V g p 1 4 0タンパク質が総用量約50～300マイクログ

ラム、例えば250マイクログラムで約1：1の比で投与される、ステップ、ならびに
 (d)任意選択でステップ(c)を繰り返すステップ
 を含む方法である。

【0205】

実施形態36は、それを必要とするヒト対象においてHIVに対する免疫応答を誘導する
 方法であって、

(a)配列番号18、配列番号5、配列番号28、および配列番号29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MVAまたはMVA-BNベクター
 を対象に投与するステップであって、MVAまたはMVA-BNベクターは、 $10^5 \sim 10^{11}$ pfuの用量で、例えば、 10^7 pfu、 10^8 pfu、 10^9 pfu、または 10^{10} pfuの用量で、例えば、 $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ pfu、例えば約 1×10^8 pfuの用量で、または $10^6 \sim 10^{10}$ TCID₅₀、例えば 10^7 と 10^9 TCID₅₀の間の用量で投与される、ステップ

10

(b)任意選択でステップ(a)を繰り返すステップ、

(c)(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、(iv)配列番号29のアミノ酸配列を含む抗原をコードするrAd26ベクター、および任意選択で、1つまたは複数の：(v,a)配列番号7のアミノ酸30～708の配列を有する単離されたHIV gp140タンパク質、(v,b)配列番号36のアミノ酸30～724の配列を有する単離されたHIV gp140タンパク質、(v,c)(v,a)と(v,b)の両方、および(v,d)リン酸アルミニウムアジュバントを対象に投与するステップであって、好ましくは、rAd26ベクターは、約 $1 \sim 10 \times 10^{10}$ ウイルス粒子(vp)、例えば 5×10^{10} vpの総用量で約1：1：1の比で投与され、任意選択で単離されたHIV gp140タンパク質が総用量約50～300マイクログラム、例えば250マイクログラムで約1：1の比で投与される、ステップ、

20

(d)任意選択で、ステップ(c)を繰り返すステップ

を含む方法である。

【0206】

実施形態37は、それを必要とするヒト対象においてHIVに対する免疫応答を誘導する
 方法であって、

(a)(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コードするrAd26ベクターを対象に投与するステップであって、好ましくは、rAd26ベクターは、約 $1 \sim 10 \times 10^{10}$ ウイルス粒子(vp)、例えば 5×10^{10} vpの総用量で約1：1：1：1の比で投与される、ステップ、

30

(b)任意選択でステップ(a)を繰り返すステップ、

40

(c)(i)配列番号18、配列番号5、配列番号28、および配列番号29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MVAまたはMVA-BNベクターであって、好ましくはMVAまたはMVA-BNベクターは、 $10^5 \sim 10^{11}$ pfuの用量で、例えば、 10^7 pfu、 10^8 pfu、 10^9 pfu、または 10^{10} pfuの用量で、例えば $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ pfuの用量で、例えば約 1×10^8 pfuの用量で、または $10^6 \sim 10^{10}$ TCID₅₀、例えば 10^7 と 10^9 TCID₅₀の間の用量で投与される、MVAまたはMVA-BNベクター、ならびに(ii,a)配列番号7のアミノ酸30～708の配列を有する単離されたHIV gp140タンパク質、または(ii,b)配列番号36のアミノ酸30～724の配列を有する単離されたHIV gp140タンパク質、または(ii,c)第1の単離されたHIV gp140タンパ

50

ク質が配列番号7のアミノ酸30～708の配列を有し、第2の単離されたHIV gp140タンパク質が配列番号36のアミノ酸30～724の配列を有する2つの単離されたHIV gp140タンパク質であって、好ましくは、これらのタンパク質は約1:1の比で投与される、2つの単離されたHIV gp140タンパク質、および(iii)リン酸アルミニウムアジュバントを対象に投与するステップであって、好ましくは、単離されたHIV gp140タンパク質(単数または複数)が、約50～300マイクログラム、例えば250マイクログラムの総用量で投与される、ステップ、ならびに(d)任意選択でステップ(c)を繰り返すステップを含み方法である。

【0207】

実施形態38は、対象に、ベクターまたはワクチン成分を投与する第1のステップより前にHIVが感染している、実施形態26～31または34～37のいずれかの方法である。

【0208】

実施形態39は、対象に潜伏ウイルスリザーバー除去剤を投与するステップをさらに含む、実施形態26～31または34～38のいずれかの方法である。

【0209】

実施形態40は、潜伏ウイルスリザーバー除去剤がTLR7モジュレーターである、実施形態39の方法である。

【0210】

実施形態41は、対象が抗レトロウイルス療法(ART)をさらに受ける、実施形態26～31または34～40のいずれかの方法である。

【0211】

実施形態42は、対象がプライム/ブースト免疫の完了後にARTの中断を受ける、実施形態41の方法である。

【0212】

実施形態43は、ARTの中断がAd26プライム免疫およびMVAブースト免疫の完了後に開始され、任意選択でMVAブースト免疫が1つまたは複数の単離されたHIV Env gp140タンパク質と一緒に投与される、実施形態42の方法である。

【0213】

実施形態44は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染および/または疾患の処置および/または予防における使用のための、実施形態13または21～23のいずれか1つの組成物、実施形態14または21～23のいずれか1つのワクチン、または実施形態15～18または32～33のいずれか1つのワクチン組合せ物である。

【0214】

実施形態45は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染および/または疾患の処置および/または予防のための医薬を製造するステップでの使用のための、実施形態13または21～23のいずれか1つの組成物、実施形態14または21～23のいずれか1つのワクチン、または実施形態15～18または32～33のいずれか1つのワクチン組合せ物である。

【0215】

実施形態46は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染および/または疾患の処置および/または予防のための医薬を製造するステップのための、実施形態13または21～23のいずれか1つの組成物、実施形態14または21～23のいずれか1つのワクチン、または実施形態15～18または32～33のいずれか1つのワクチン組合せ物の使用である。

【実施例】

【0216】

[実施例1]

HIVエンベロープ抗原配列の設計

10

20

30

40

50

いくつかのHIVエンベロープ抗原配列は、モザイクHIV抗原mos2Env（配列番号6；以前に国際公開第2010/059732号パンフレットにも記載された）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配列は、HIVエンベロープタンパク質由来の完全に天然の野生型配列、またはmos2Env配列と野生型HIVエンベロープタンパク質配列のキメラ（の組合せ）に基づいた。全長エンベロープタンパク質配列（図1A参照）に加えて、細胞質ドメインのC末端トランケーションを有する配列も設計された（例えば、図1C参照）。例えば、Schiermle et al., PNAS 1997; Abrahamyan et al., J Virol 2005; Edwards et al., J. Virology, 2002, 76:2683-2691も参照。可溶性変異体は、三量体ドメイン、例えばGCN4三量体ドメイン（例えば、図1B参照）によって置き換えられた膜貫通（TM）領域の前のC末端トランケーションによっても調整された。これらの可溶性変異体は、フューリン切断部位の変異によって一本鎖変異体へとさらに変換され、したがってエンベロープタンパク質の細胞外ドメインのgp120およびgp41サブユニットへのプロセッシングを阻害する。

10

【0217】

生成および試験された構築物の中で、C4に基づく構築物は最も適した性質、例えば良好な製造可能性、フォールディング、免疫原性等を有し、これらはさらなる研究のために選択された。膜貫通ドメインの代わりにGCN4三量体ドメインを有するC4構築物の可溶性変異体（sC4、図1B）、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）も生成され、さらなる研究で試験された。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は、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に類似している膜貫通ドメインの代わりにGCN4三量体ドメインを有する構築物C1の可溶性変異体（sC1）、および細胞質ドメインの7アミノ酸断片を含む変異体（C1D7）も生成された。構築物C1およびその変異体は、これらが本質的に先行技術のmos2Env配列に基づくため、比較目的のためにさらなる研究に使用された。C1、sC1およびC1D7のアミノ酸配列は、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は、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に基づくものより適しておらず、さらなる開発に用いられなかった。

20

30

【0218】

[実施例2]

合成HIVエンベロープタンパク質の発現およびフォールディング

合成HIVエンベロープタンパク質の発現レベル、フォールディング、および細胞表面発現が測定された。

【0219】

発現レベル

HEK293F細胞は、実施例1に記載のように可溶性合成HIVエンベロープタンパク質sC1およびsC4をコードするプラスミドを一過的にトランスフェクトされた。可溶性タンパク質の発現レベルは、定量的ウェスタンブロット（QWB）を使用して上澄み液で測定された。結果は図2に示す。sC1の低い発現レベル（本質的に膜貫通ドメインが添加されたmos2Envに相当する）は、mos2Envに関する本発明者らの最近の見識に則している。結果によって実証されたように、本発明のsC4変異体は、sC1変異体（対照）よりも有意に高い発現レベルを示した。

40

【0220】

タンパク質フォールディング

タンパク質フォールディングは、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によって、CD4の結合後のみ暴露されるHIVエンベロープタンパク質の共受容体結合部位に結合することが公知の抗体（MAb 17b）への可溶性合成HIVエンベロープタンパク質の結合を測定することによって試験された。特に、精製されたsC4の結合は、先立つC

50

D 4 への s C 4 の結合あり、および先立つ C D 4 への s C 4 の結合無しで、M a b 1 7 b への結合に関して試験された。精製された s C 1 が対照として使用された。エンベロープタンパク質への先立つ C D 4 結合無しでの s C 4 への M A b 1 7 b の結合は、部分的にフォールドされていない、またはトリガーされる前の (p r e - t r i g g e r e d) エンベロープタンパク質 (すなわち、C D 4 結合の非存在下で「開いた」構造に採用される不安定な E n v) であることを示す。E L I S A アッセイの結果は図 3 A および図 3 B に示す。

【 0 2 2 1 】

図 3 B に示すように、s C 4 は、先立つ C D 4 への結合によって M A b 1 7 b への強い結合を示すが、先立つ C D 4 への結合無しでは M A b 1 7 b への検出可能な結合は無かった。これに対し、図 3 A に示すように、s C 1 は、先立つ C D 4 へ結合有りおよび無し両方で M A b 1 7 への非常に低い結合を示した。結果は、s C 4 が、C D 4 結合前に共受容体結合部位の暴露なく、正しいフォールディングパターンを有することを示す。

10

【 0 2 2 2 】

タンパク質フォールディングはまた、s C 1 および s C 4 の未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (P A G E) によっても分析され、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不正確なジスルフィド結合形成の可能性を評価した。未変性ゲルでの電気泳動後、ゲル内のタンパク質はウェスタンブロット分析によって検出された。図 4 の結果によって示されるように、大部分の s C 4 は、正しい四次構造である三量体状態で存在する。

20

【 0 2 2 3 】

まとめると、タンパク質フォールディング実験の結果は、s C 4 可溶性合成 H I V エンベロープタンパク質が所望のフォールディングプロファイルを有し、既存の m o s 2 E n v 抗原 (s C 1 によって表される) のフォールディングプロファイルと比較して改善されることを実証する。

【 0 2 2 4 】

細胞表面発現

H I V エンベロープタンパク質 C 1 (全長)、C 4 (全長、図 1 A 参照)、C 1 D 7、および C 4 D 7 の膜結合変異体の細胞表面発現も研究された。H E K 2 9 3 T 細胞は、e G F P コードプラスミドのみを (陰性対照、N C)、または H I V 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と一緒に e G F P コードプラスミドを、一過的にトランスフェクトされた。トランスフェクションの 2 日後、細胞は、g p 1 2 0 に対するいくつかのポリ - およびモノクローナル抗体、ならびに二次抗体に暴露され、蛍光活性化細胞分取 (F A C S) 分析に供され、次いで、エンベロープタンパク質細胞表面発現レベルを調べた。エンベロープ変異体の質は、抗 g p 1 2 0 ポリクローナル抗体を使用して全体的な発現レベルを決定すること、および四次構造依存的であり、正しくフォールドされたエンベロープ三量体に優先的に結合する広域中和抗体 P G 9 および P G 1 6 の相対的な結合を評価することによって評価された。

30

【 0 2 2 5 】

細胞表面発現実験の結果は、図 5 に示す。抗 g p 1 2 0 抗体を使用して測定した場合、トランケートした変異体 C 1 D 7 および C 4 D 7 の表面発現レベルは、それらの全長対応物、それぞれ C 1 および C 4 の表面発現レベルよりも非常に高い。これは、E n v のカルボキシル末端から 1 4 4 残基の欠失が、エンベロープ表面発現レベルを増加することを確認する。本発明の全長 C 4 構築物はまた、全長 C 1 と比較して P G 9 および P G 1 6 結合の改善も示し、C 4 エンベロープ配列が細胞表面で適当にフォールドされる (すなわち三量体) ことを示している。

40

【 0 2 2 6 】

結果は、本質的に膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの 7 アミノ酸が添加された M o s 2 E n v である C 1 D 7 変異体が、H E K 2 9 3 T 細胞で表面発現され得ることも実証する。これは、A 5 4 9 細胞にトランスフェクトされた場合、表面上に検出可能なレベル

50

で発現され得ないAd26.mos2Envの可溶性構築物と対照的である。しかしながら、PG9およびPG16への相対結合は、バックグラウンドよりもわずかに検出可能であり、C1D7エンベロープ配列は不十分にフォールドされ、おそらく細胞表面上で完全な三量体として存在しない。

【0227】

総合すると、C4D7エンベロープ変異体は、その全長対応物C4よりも高いgp120発現、ならびにC1およびC1D7と比較して15倍より高く増加したPG9およびPG16結合により、最も適した抗体結合プロファイルを有する(図5)。

【0228】

[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

本発明者らの研究室での以前の研究(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(アデノウイルス産物バッチの低い質を示す)を示し、さらにそのようなベクターが安定性の問題を提示することを示した。したがって、アデノウイルスバックグラウンドで本発明の合成HIVエンベロープタンパク質構築物の安定性を試験することが重要であった。

【0229】

実施例1に上記したように、本発明のHIV抗原配列をコードする組換えAd26(rAd26)ベクター、C4、C4D7、およびsC4は、PER.C6細胞で生成された(それぞれ「rAd26.C4」、「rAd26.C4D7」、および「rAd26.sC4」と呼ばれる)。ベクタークローン(ブランク)を採集し、研究バッチの生成のためにスケールアップした。最大5個のウイルスクローン(ブランク)がT25フォーマットにスケールアップされ、T25フォーマットで10継代の間、段階的に継代された(継代1~3は、トランスフェクションおよびブランク精製ステップ、続いてT25フォーマットで10継代、合計13継代になる)。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のシーケンシングによって、ウイルス継代数(vpn)3、5、10および13で評価された。結果は図6に示す。

【0230】

全長C4をコードするrAd26ベクター(rAd26.C4)は、2~3日は完全な細胞変性効果(CPE)が無いことによって決定されたように、弱い増殖特徴;E1導入遺伝子カセット領域の欠失によって決定されたように、遺伝的不安定性;またはそれらの組合せ(図6)を示した。弱い増殖特徴および観察された遺伝的不安定性により、全長C4をコードするこのベクターは、さらには探究されなかった。

【0231】

対照的に、C4D7(rAd26.C4D7)およびsC4(rAd26.sC4)をコードするrAd26ベクターでは、実験の過程の間、増殖させた全てのブランクは遺伝的に安定なままであった(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バックグラウンドでの安定性に関して、元のmos2Env構築物よりも優れている。vpn13までの遺伝的安定性試験は、ベクターの産業スケールでの調製で使用されるよりも数継代多い増殖を表す。

【0232】

[実施例4]

アデノウイルスベクターでの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は、別々にまたはin vitroでベクター形質導入A549細胞(ヒト細胞系)において、mos1Env(配列番号5)をコードする組換えAd26ベクター(以降、「rAd26.mos1Env」)を組み合わせて評価された(データは示さず)。フローサイトメトリー分析は、全ての抗原が、対照として 2×10^4 ウイルス粒子(vp)の単一のエンベロープ抗原またはアデノウイルス形質導入による 1×10^4 vpの2つの組み合わせたEnv抗原のいずれかによって形質導入された細胞培養物中で発現されたことを実証した。全ての形

10

20

30

40

50

質導入はさらに、mos1GagPol(「rAd26.mos1GagPol」)およびmos2GagPol(rAd26.mos2GagPol)をコードする単回用量(1×10⁴vp)のアデノウイルスベクターを含有し(Barouch et al, Nat Med 2010, 16:319-323)、そのため、評価したベクターの組合せが、前臨床および臨床使用を意図されたように、異なるアデノウイルスベクターの同じ相対比を示した。好ましくは、本発明の合成エンベロープタンパク質をコードするベクターは、臨床使用のため、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。

【0233】

rAd26.mos1EnvとrAd26.C4D7の組合せは、モノクローナル抗体結合によって決定されるように、評価したエピトープの最大適用範囲をもたらした。特に、Ad26.C4D7によるトランスフォーメーションによって寄与されたPG16エピトープの暴露は、PG16が、HIV-1 EnvのV1/V2ループ領域を認識する広範なモノクローナル中和抗体を表すため、ワクチン使用が期待される(Walker et al, Science 326:258-9, 2009)。したがって、C4配列由来の本発明の合成HIVエンベロープタンパク質は、mos1Envのみによって生成された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した。エンベロープタンパク質領域に対するワクチン誘導性抗体応答は、RV144研究においてHIV-1感染からの保護と関係することが示され(Haynes et al, N Engl J Med. 336:1275-86, 2012)、したがって、本発明の合成HIVエンベロープタンパク質は、HIVワクチンレジメンに含まれる有望な候補である。

【0234】

[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の本発明の合成HIVエンベロープタンパク質配列はウサギで試験され、これらの構築物が、rAd26.mos2Env構築物の免疫原性の代わりであるか決定された。

【0235】

mos1Envをコードするアデノウイルスベクター(rAd26.mos1Env; 配列番号5)の免疫原性は単独、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; 配列番号8、特にそれぞれ配列番号18および19を含む)と組み合わせで試験された。全ての場合で、mos1GagPolおよびmos2GagPol抗原をコードするアデノウイルス26ベクター(それぞれrAd26.mos1GagPol[配列番号28]およびrAd26.mos2GagPol[配列番号29])も投与された。より具体的には、rAd26.mos1Env単独の免疫原性は(3価のワクチン:rAd26.mos1GagPol、rAd26.mos2GagPolおよびrAd26.mos1Env)、rAd26.C4D7またはrAd26.sC4の1つと組み合わせたrAd26.mos1Envの免疫原性と比較された(4価のワクチン:rAd26.mos1GagPol、rAd26.mos2GagPol、rAd26.mos1EnvおよびrAd26.C4D7のいずれかの投与;またはrAd26.mos1GagPol、rAd26.mos2GagPol、rAd26.mos1EnvおよびrAd26.sC4の投与)。本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードする任意のベクターを欠如する3価のワクチンの、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有する4価のワクチンとのこの比較により、本発明のHIVエンベロープタンパク質が保護の幅に寄与するかどうかの決定が可能にする。

【0236】

投与は、ワクチンレジメンで行われ、これらのAd26ベクターは、二重のプライミングとして0週および6週目に投与され、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無しで配列番号7を有する3価のEnv gp140タンパク質、国際公開第2010/042942号パンフレット参照)は、二重のブーストとして

12週および18週目に投与された（例えば、Barouch et al, 2015, Science 349: 320-324参照）。表1は、本研究に使用されるワクチンレジメンを記載する。rAd26.Emptyは、HIV抗原タンパク質の配列をコードする任意の遺伝子を欠如する対照ベクターを指す。各群は6匹のウサギを含有した。

【0237】

【表1】

表1: ウサギにおける免疫原性研究で試験されたワクチンレジメン

群	第1および第2の免疫			第3および第4の免疫			N=
	アデノベクター	用量(vp)	総用量(vp)	タンパク質プースト	用量(μg)	アジュバント	
1	rAd26.Mos1Env	2.5x10 ¹⁰	5x10 ¹⁰	GP140 (クレードC)	10	AdjuPhos 250μg	6
	rAd26.Mos1GagPol	1.25x10 ¹⁰					
	rAd26.Mos2GagPol	1.25x10 ¹⁰					
2	rAd26.Mos1Env	1.25x10 ¹⁰	5x10 ¹⁰	GP140 (クレードC)	10	AdjuPhos 250μg	6
	rAd26.C4D7	1.25x10 ¹⁰					
	rAd26.Mos1GagPol	1.25x10 ¹⁰					
	rAd26.Mos2GagPol	1.25x10 ¹⁰					
3	rAd26.Mos1Env	1.25x10 ¹⁰	5x10 ¹⁰	GP140 (クレードC)	10	AdjuPhos 250μg	6
	rAd26.sC4	1.25x10 ¹⁰					
	rAd26.Mos1GagPol	1.25x10 ¹⁰					
	rAd26.Mos2GagPol	1.25x10 ¹⁰					
対照	rAd26.Empty	5x10 ¹⁰	5x10 ¹⁰	NA	0	AdjuPhos 250μg	6

10

20

【0238】

3価のAd26ワクチン（本発明の新規のEnv抗原を欠如する）の4価のAd26ワクチン（新規のsC4またはC4D7 Env抗原を含む）との比較は、本発明の新規の抗原が保護の幅に寄与するかどうか試験することを可能にする。確立されたTZM-b1細胞ベースの中和アッセイ [Montefiori DC. Methods Mol Biol 2009, 485:395-405; Sarzotti-Kelsoe M et al., J Immunol Methods 2014, 409:131-146] は、ワクチン候補の中和活性を測定するために使用された。

【0239】

結果は図7に示され、対照群として3価のワクチン（表1の群1）を使用すること、および新規の4価のワクチン（表1の群2および3）のそれぞれを比較することによって統計的に分析された。

30

【0240】

全体的に、新規のC4-由来（すなわち、配列番号8を含むEnvタンパク質をコードし、mos2Envの代替品である）アデノウイルス構築物は、ラビットにおける2つの同種筋肉内免疫後、免疫原性であった。

【0241】

Tier 1 B偽型ウイルスに対するウサギ抗血清の中和能力は無く（データは示さない）、そのようなウイルスは中和がより困難であることは公知であったため意外ではない。

40

【0242】

クレードB Tier 1 Aウイルスに対するウサギ抗血清の偽型ウイルス中和能力は、新しい成分の添加に影響されなかった（データは示さない）。これは、新規の抗原が、ワクチンに存在する既存のクレードB抗原の免疫原性とネガティブに緩衝しなかったことを実証する（新しい成分はクレードCに向き、そのような望まない緩衝は、試験される前に先験的に除外できなかった）。

【0243】

クレードC Tier 1 Aウイルスに対するウサギ抗血清の偽型ウイルス中和能力は、3価の（mos1Envのみを有する）免疫単独と比較して（群1）（図7パネルB）、アデノを含有する4価の新規C4D7（4価、群2）で有意に増強された。さらに、8週

50

目のクレードC Tier 1 Aウイルスに対するウサギ抗血清の偽型ウイルス中和能力は、3価の(mos 1 Envのみを有する)免疫単独と比較して(群1)(図7パネルB)、アデノウイルスを含有する4価の新規sC4(4価、群3)で著しく増強された。

【0244】

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、その添加は単独のAd26コードEnv成分としてmos 1 Env(主にクレードB)を有するワクチンの結合および中和能力をクレードC株に向けて拡大した(図7B)。

【0245】

[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

10

さらなるウサギ研究は、13および19週目に、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とモザイクgp140の組合せを使用する組換えHIV-1 Envタンパク質ブーストと組み合わせ、0および6週目に、二重プライム免疫として筋肉内に適用された、4価のベクター組合せAd26.Mos4.HIV(4つのアデノウイルスベクター: Ad26.Mos1 Gag Pol[配列番号28をコードする]、Ad26.Mos2 Gag Pol[配列番号29をコードする]、Ad26.Mos1 Env[配列番号5をコードする]およびAd26.Mos2 S Env[上記で使用される名前「C4D7」も「Mos2S」と呼ばれ、このベクターは、本発明に記載の新規の配列番号18をコードする]からなり、総用量 5×10^9 vpで1:1:1:1の混合物中)を評価した。これらのタンパク質ブーストは、免疫の日に製剤化された250マイクログラムのリン酸アルミニウムアジュバントと組み合わせ、総用量10または50マイクログラムのタンパク質で筋肉内に適用された。

20

【0246】

結果は、全ての試験したレジメンは全ての動物において免疫原性であり、高い抗体力価およびTier 1 Env偽型ウイルスに対する高い抗体力価および中程度の中和活性を誘導することを示す。モザイクgp140が、ワクチン抗原として、単独もしくはクレードC gp140との組合せのいずれかで使用された場合、モザイクgp140特異的ELISA力価およびクレードB偽型ウイルス認識は、クレードC gp140単独でブーストされた参照群と比較して15週目に著しく増加された。改善の全体的な効果量は中程度であり、モザイクgp140単独と比較して2価のクレードC gp140-モザイクgp140組合せによりブーストされた群ではより大きかった。研究の21週目に、これらの違いはなくなり、2価のクレードC gp140-モザイクgp140ブースト、または1価のクレードC gp140ブーストを受けるコホートに関して測定された免疫応答は統計的に区別できなかった。

30

【0247】

2価のタンパク質レジメンは、クレードC gp140単独ブーストレジメンと匹敵するクレードC ELISA力価の誘導および偽型ウイルス認識を示し、クレードB関連免疫原モザイクgp140の包含がクレードC抗原適用範囲にネガティブな効果を持たないが、研究の15週目にクレードB適用範囲を有意に増強することを示している。

40

【0248】

データは、本発明に記載の合成HIV抗原をコードするAd26.Mos2 S Envベクターがワクチンレジメンに成功裏に使用され得ることを裏付ける。

【0249】

[実施例7]

他のHIV抗原と組み合わせた本発明の合成HIVエンベロープタンパク質をコードするMVAベクターの構築

本実施例では、配列番号18として本明細書に記載される新規のHIV mos 2 S E

50

n v 抗原をコードする核酸 (C4D7とも呼ばれる) を含む、MVA - BNベクターが生成される (「MVA - mBN414」と呼ばれる)。MVA - mBN414ベクターはさらに、以下のHIV抗原: mos1Env (配列番号5); mos1Gag (配列番号1); mos2Gag (配列番号2); mos1Pol (配列番号3); およびmos2Pol (配列番号4) をコードする核酸を含む。MVA - mBN414では、mos1Gag (配列番号1) およびmos1Pol (配列番号3) は融合タンパク質 (配列番号28、「mos1GagPol」としてコードされ、mos2Gagおよびmos2Polは融合タンパク質 (配列番号29、「mos2GagPol」としてコードされた。MVAゲノムの領域へのインサートの概略図は図8を参照。

【0250】

本発明者らは、HIV抗原mos2SEnv (配列番号18) をコードする新規の核酸 (配列番号41); HIV抗原mos1Env (配列番号5) をコードする新規の核酸 (配列番号39); HIV抗原mos1GagPol (配列番号28) をコードする新規の核酸 (配列番号38); およびHIV抗原mos2GagPol (配列番号29) をコードする新規の核酸 (配列番号40) を設計した。新規の核酸は、ヒト発現、互いに最小の相同性、およびポリ - ntストレッチならびに繰り返しエレメントの減少のために設計された。

【0251】

PrMVA13.5ロングプロモーター (配列番号42) は、mos1GagPolとmos2GagPol抗原配列の両方のATG開始コドンの前に含まれた。PrHybプロモーター (配列番号43) は、mos2SEnvとmos1Env抗原配列の両方のATG開始コドンの前に含まれた。

【0252】

mos1GagPolおよびmos1Envコード配列はSacIIおよびPacIによりpBNX208、IGR44/45 MVA - BN相同領域をコードする導入ベクターに挿入され、相同組換えによりMVA - BNの標的領域 (IGR 44/45) への挿入を可能にする。さらに、pBNX208は、正の選択のためのheGFPおよびnptII、ならびに選択圧の非存在下での相同組換えによる選択カセットの後の削除のためのIGR44/45 MVA - BN相同領域Flank2の繰り返し配列をコードする。mos2GagPolおよびmos2SEnvコード配列はNotIによりpBNX227、IGR88/89 MVA - BN相同領域をコードする導入ベクターに挿入され、相同組換えによりMVA - BNの標的領域 (IGR 88/89) への挿入を可能にする。さらに、pBNX227は、それらの標的配列loxPに隣接する核酸配列の正確な削除を触媒するCREリコンビナーゼをコードするプラスミドによるトランスフェクション後、選択圧の非存在下で選択カセットの後の削除のための2つのloxP部位に隣接する、正の選択のためのmRFP1およびecogptをコードする。

【0253】

MVAベースのベクターは、ニワトリ一次線維芽細胞 (CEF) において生成され、本明細書に記載のように産生された。CEF細胞は、ニワトリ胚から毎週単離され、FBSを含まないVP - SFM培地で維持された。簡単に述べると、CEF細胞は、MVAベクタープラスミドを、製造業者 (Promega) によって提供された説明書に従ってFugeneを使用してトランスフェクトされ、MVA - BNによる共感染が行われた。細胞は、2または3日後に採取され、超音波処理され、さらに継代された。ウイルスは、マルチウェル12 - 組織培養プレートの単一のウェル内での増殖後、マルチウェル96 - 組織培養プレートで培養されたCEF細胞でブランク精製された。さらなる増幅が、マルチウェル6組織プレートの単一のウェル、および続いてT175組織培養フラスコで培養されたCEF細胞で行われた。

【0254】

MVA - mBN414は、したがって、そのIGR44/45領域にPrMVA13.5ロングプロモーター (配列番号42) の制御下のmos1GagPol (配列番号28

10

20

30

40

50

)をコードする核酸およびPrHybプロモーター(配列番号43)の制御下のmos1Env(配列番号5)をコードする核酸を含むMVA-BNである。IGR88/89領域では、PrMVA13.5ロングプロモーター(配列番号42)の制御下のmos2GagPol(配列番号29)をコードする核酸およびPrHybプロモーター(配列番号43)の制御下のmos2SEnv(配列番号18)をコードする核酸がある。MVA-mBN414ベクターは、本明細書に記載の抗原をコードするアデノウイルスベクターによる、プライム-ブーストレジメンでの続く実験で使用された。

【0255】

[実施例8]

ウサギにおけるMVA-mBN414の免疫原性

ニュージーランドホワイト系(NZW)ウサギにおけるMVA-mBN414の免疫原性(図7参照)は、Ad26.Mos.HIV(合わせて、配列番号1、2、3、4および5を有するHIV抗原をコードする3つのAd26ベクターを有する3価のワクチン;抗原mos1GagPol(配列番号28)、mos2GagPol(配列番号29)、およびmos1Env(配列番号5)の形態)プライミングの文脈で、ならびにAd26.Mos.HIVによる同種プライム-ブーストと比較して評価された。さらに、42日および62日目の、クレードC gp140タンパク質(リン酸アルミニウムによりアジュバントされる)の同時投与(対側の筋肉(すなわち別の足)への注射)の付加利益が評価された。

【0256】

使用された免疫スケジュールは以下の表2に提供される:

【0257】

【表2】

表2: ウサギにおける免疫原性試験のための免疫スケジュール

群	免疫 0+22 日目	免疫 43+64 日目	N (雌)	N (雄)
1	Ad26.Mos.HIV 5x10 ¹⁰ vp	Ad26.Mos.HIV 5x10 ¹⁰ vp	7	7
2		MVA-mBN414 1.8x10 ⁸ TCID ₅₀	7	7
3		MVA-mBN414 1.8x10 ⁸ TCID ₅₀ + AjuPhos(登録商標)425μg 中クレードC gp140 250μg	7	7
4	Ad26.Mos.HIV 5x10 ⁹ vp	MVA-mBN414 1.8x10 ⁷ TCID ₅₀ + AjuPhos(登録商標)42.5μg 中クレードC gp140 25μg	7	7
5	Ad26.Empty 5x10 ¹⁰ vp	BN-MVA.Empty 1.8x10 ⁸ TCID ₅₀	3	3

10

20

30

40

50

【0258】

読み出しアッセイは、クレードC（配列番号7のアミノ酸残基30～708）およびモザイクgp140（配列番号36のアミノ酸残基30～724）ELISA、ならびにHIV-1偽型ウイルス中和アッセイであった。免疫したウサギからの血清の中和能力は、TZM-b1細胞への侵入の阻害によってHIV-1 ENV偽型ウイルス粒子（EPV）に対して試験された。TZM-b1細胞は、高レベルのCD4ならびに共受容体CCR5およびCXCR4を発現し、HIV末端反復配列の制御下のインテグレートされたtat応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を含有する。EPVに対する血清含有HIV-1 Env抗体の中和効果は、ルシフェラーゼ発現の減少、およびそれによる基質を含有するルシフェリンと組み合わせた発光シグナルの減少をもたらす。血清または抗体は、1/20から開始して、6段階にわたり3倍の段階希釈で試験された。最大ルシフェラーゼ発現は、血清または抗体を含まない1つのウェル内で細胞+EPVのみを添加することによって測定された。バックグラウンドルシフェラーゼ発現は、血清/抗体およびEPVを含まないウェルに細胞のみを添加することによって測定された。非線形4パラメーター曲線は最大とバックグラウンドのルシフェラーゼシグナルの間でフィットし、log10変換したIC50値は報告可能な値として決定された。

10

【0259】

結果は、図9に示す。

【0260】

結果は、MVA-mBN414が全てのウサギにおいて免疫原性であったことを示す。雄と雌の動物間に免疫原性の明らかな違いはなかった。Ad26プライムでのMVAブーストは、同種Ad26プライム-ブーストと比較してHIV特異的液性免疫応答の増加を誘導した（クレードC ELISA、クレードB様モザイクELISAおよびクレードBVNAで測定可能）。

20

【0261】

ブーストとして、クレードC gp140タンパク質のMVAとの同時投与は、MVAのみによるブーストと比較して、（同種）クレードC gp140 ELISAおよび（異種）モザイクgp140 ELISA力価の増加を誘導した。

【0262】

[実施例9]

マウスにおけるMVA-mBN414の免疫原性

MVA-mBN414の免疫原性はまた、同種MVAプライム-ブーストと比較して（すなわち、プライミングおよびブースト両方がMVA-mBN414による）、異種Ad26.Mos4.HIV（実施例6参照）プライミングおよびMVA-mBN414（実施例7参照）ブーストの免疫原性を評価するために、CBF1マウスにおいても評価された。

30

【0263】

使用された免疫スケジュールは、以下の表3に提供される：

【0264】

40

50

【表 3】

表 3: ウサギにおける免疫原性試験のための免疫スケジュール

群	0 週目		5 週目		N=
	試験物:	用量:	試験物:	用量:	
1	Ad26.Mos4.HIV	2.5×10^9 総 vp	MVA-mBN414	2.8×10^6 TCID ₅₀	7
2		2.5×10^8 総 vp		2.8×10^5 TCID ₅₀	7
3	MVA-mBN414	2.8×10^6 TCID ₅₀	MVA-mBN414	2.8×10^6 TCID ₅₀	7
4		2.8×10^5 TCID ₅₀		2.8×10^5 TCID ₅₀	7
5	Ad26.Empty	2×10^9 総 vp	MVA-BN-empty	2.8×10^6 TCID ₅₀	5

【0265】

液性免疫応答のための読み出しアッセイ（5および7週目の抗原特異的 I g G 測定）は、モザイク gp140（配列番号36のアミノ酸残基30～724）ELISAであった（実施例8参照）。細胞性免疫応答のための読み出しアッセイ（7週目）は、刺激として Env、Gag、および Pol 免疫優性ペプチドを使用する、IFN-ELISPOTであった（Khan et al, Int J Cancer, 2017, Mar 6, doi: 10.1002/ijc.30679. [Epub ahead of print]; 2017, Jul 14, 141(2), 393-404に記載のアッセイ）。

【0266】

ELISPOTの結果は図10に示す。細胞内サイトカイン染色（ICS）アッセイも実施され、同様の結果をもたらした（図示せず）。

【0267】

結果は、Ad26またはMVAによるプライミングが5週目に検出可能な免疫応答を誘導し（図10A）、異種Ad-MVAレジメンおよび同種MVA-MVAレジメンの両方に関し、7週目のMVAによるブースト免疫によってさらに増加される（図10B）。異種Ad-MVAプライム-ブーストは、同種MVA-MVAプライム-ブーストレジメンよりも著しく高いELISA力価を誘導した。これは、7週目の抗原Env、Gag、およびPolに対するELISPOTによって測定された細胞性免疫応答についても観察された（図10C～E）。同種MVAプライム-ブースト免疫は、対照データとははっきりと区別できる低い検出可能な抗原GagおよびPolに対する細胞性免疫応答を誘導した。

【0268】

概して、結果は、本発明に記載のHIV抗原を有するMVAが免疫原性であることを示す。さらに、そのようなベクターが、HIV抗原をコードするアデノウイルスベクター、および/または単離されたHIV gp140タンパク質によるプライム-ブーストレジメンで有利に使用され得ることを示す。

【0269】

参照

1. Barouch et al, Nat Med 2010, 16: 319-323
2. WO 2010/059732
3. Schiernle et al., PNAS 94: 8640-8645, 1997
4. Abrahamyan et al., J Virol 79: 106-115, 2005

5. US20120076812
6. Barouch et al., Cell 155:1-9, 2013
7. Havenga, et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43;
8. WO 03/104467
9. WO 2004/001032
10. WO 2007/104792
11. Abbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654-63
12. US Patent No. 7,270,811
13. Vogels et al., (2003) J Virol 77(15): 8263-71
14. WO 00/70071
15. WO2012/082918
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.
17. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam S M, 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
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, Bilaska 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.
21. Edwards et al., J. Virology, 2002, 76:2683-2691.

また、本発明は以下を提供する。

[1]

- (a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む第 1 の HIV エンベロープ (Env) 抗原 ;
 - (b) 前記第 1 の HIV Env 抗原とは異なる第 2 の HIV Env 抗原 ;
 - (c) 2 つの異なる HIV Gag 抗原である第 3 の抗原および第 4 の抗原 ; ならびに、
 - (d) 2 つの異なる HIV Pol 抗原である第 5 の抗原および第 6 の抗原
- をコードする核酸を含むボックスウイルスベクター。

[2]

前記第 2 の HIV Env 抗原が配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、
前記第 3 および第 4 の抗原が、それぞれ配列番号 1 および配列番号 2 のアミノ酸配列を含み ; ならびに
前記第 5 および第 6 の抗原が、それぞれ配列番号 3 および配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、 [1] に記載のボックスウイルスベクター。

[3]

前記第 3 および第 5 の抗原が融合されて、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む第 1 の Gag - Pol 融合抗原となっており、前記第 4 および第 6 の抗原が融合されて、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む第 2 の Gag - Pol 融合抗原になっている、 [1] または [2] に記載のボックスウイルスベクター。

[4]

前記第 1 の HIV Env 抗原が配列番号 4 1 によってコードされる、 [1] ~ [3] のいずれか一項に記載のボックスウイルスベクター。

[5]

前記第 1 の HIV Env 抗原が配列番号 4 1 によってコードされ ;
前記第 2 の HIV Env 抗原が配列番号 3 9 によってコードされ ;
前記第 1 の Gag - Pol 融合抗原が配列番号 3 8 によってコードされ ; および
前記第 2 の Gag - Pol 融合抗原が配列番号 4 0 によってコードされる、 [3] に記

10

20

30

40

50

載のボックスウイルスベクター。

[6]

前記ボックスウイルスベクターが組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) ベクターである、 [1] ~ [5] のいずれか 1 項に記載のボックスウイルスベクター。

[7]

前記 M V A ベクターが、 M V A - B N またはその誘導体を含む、 [6] に記載のボックスウイルスベクター。

[8]

前記第 1 の G a g - P o l 融合抗原および前記第 2 の E n v 抗原が、 M V A ゲノムの遺伝子間領域 (I G R) 4 4 / 4 5 に挿入され、前記第 2 の G a g - P o l 融合抗原および前記第 1 の E n v 抗原が、 M V A ゲノムの I G R 8 8 / 8 9 に挿入されている、 [6] または [7] に記載のボックスウイルスベクター。

10

[9]

前記第 1 の G a g - P o l 融合抗原および前記第 2 の G a g - P o l 融合抗原がそれぞれ、別個の P r 1 3 . 5 プロモーターの制御下であり、前記第 1 の E n v 抗原および前記第 2 の E n v 抗原がそれぞれ、別個の P r H y b プロモーターの制御下にある、 [6] ~ [8] のいずれか一項に記載のボックスウイルスベクター。

[1 0]

[1] ~ [9] のいずれか一項に記載のボックスウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含むワクチン。

20

[1 1]

(a) [1] ~ [9] のいずれか一項に記載の、免疫学的有効量のボックスウイルスベクターを含む第 1 のワクチン組成物と、

(b) (i) 1 つまたは複数の第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、および第 6 の抗原をコードする免疫学的有効量の 1 つまたは複数のアデノウイルスベクターを含む第 2 のワクチン組成物；および、

(b) (i i) 免疫学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 1 つまたは複数のポリペプチドを含む第 3 のワクチン組成物

の少なくとも 1 つとを含み、第 1 の組成物ならびに第 2 および / または第 3 の組成物が同じ組成物、または 1 つもしくは複数の異なる組成物中に存在するワクチン組合せ物。

30

[1 2]

前記第 2 のワクチン組成物が、合わせて、配列番号 1 8、5、1、2、3、および 4 をコードする組換え A d 2 6 ベクターを含む、 [1 1] に記載のワクチン組合せ物。

[1 3]

前記第 3 のワクチン組成物における 1 つまたは複数の単離された H I V 抗原性ポリペプチドが、

(i) 配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 0 8 を含むポリペプチド、または

(i i) 配列番号 3 6 の残基 3 0 ~ 7 2 4 を含むポリペプチド、または

(i i i) ポリペプチド (i) と (i i) の両方

を含む、 [1 1] または [1 2] に記載のワクチン組合せ物。

40

[1 4]

それを必要とする対象においてヒト免疫不全ウイルス (H I V) に対する免疫応答を誘導する方法であって、 [1 0] に記載のワクチンまたは [1 1] ~ [1 3] のいずれか一項に記載のワクチン組合せ物を前記対象に投与するステップを含む方法。

[1 5]

それを必要とする対象において、ヒト免疫不全ウイルスに対する免疫応答を誘導する方法であって、

(a) 配列番号 1、2、3、4、5 および 1 8 の 1 つまたは複数または複数の組換えアデノウイルスベクター、好ましくは A d 2 6 ベクターを含む第 1 のワクチン；および

50

(b) [1] ~ [9] のいずれか一項に記載のポックスウイルスベクターを含む第 2 のワクチン；

を前記対象に投与するステップを含み、ここで前記第 1 のワクチンがプライムワクチンであり、前記第 2 のワクチンがブーストワクチンであり、または前記第 2 のワクチンがプライムワクチンであり前記第 1 のワクチンがブーストワクチンである、方法。

[1 6]

前記ブーストワクチンとほぼ同時に、1 つまたは複数の単離された HIV 抗原性ポリペプチドを対象に投与するステップをさらに含み、前記 1 つまたは複数の HIV 抗原性ポリペプチドが、好ましくは、

(i) 配列番号 7 のアミノ酸配列の残基 3 0 ~ 7 0 8 を含むポリペプチド；または

(i i) 配列番号 3 6 の残基 3 0 ~ 7 2 4 を含むポリペプチド；または

(i i i) ポリペプチド (i) と (i i) の両方

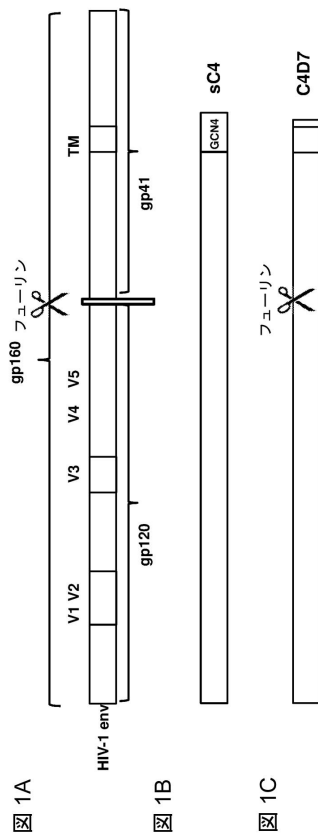
を含み、前記 1 つまたは複数の単離された HIV 抗原性ポリペプチドが、前記ブーストワクチンと同じ組成物中、または前記ブーストワクチンとは別の組成物中にある、[1 5] に記載の方法。

[1 7]

前記対象が、HIV が感染している対象である、[1 4] ~ [1 6] のいずれか一項に記載の方法。

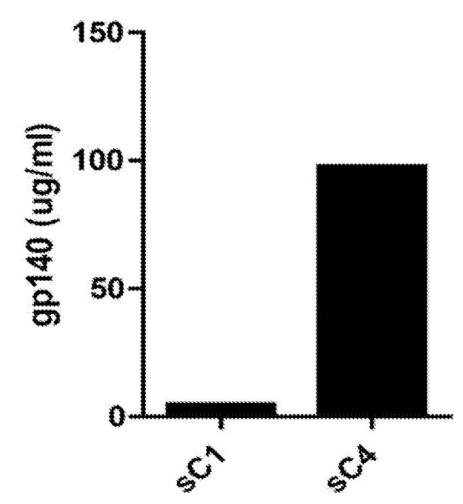
【図面】

【図 1】



【図 2】

図 2



10

20

30

40

50

【 図 3 】

図 3A

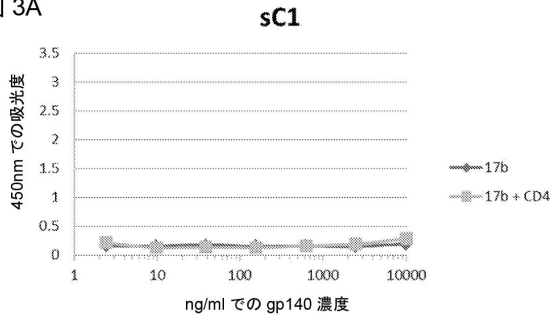
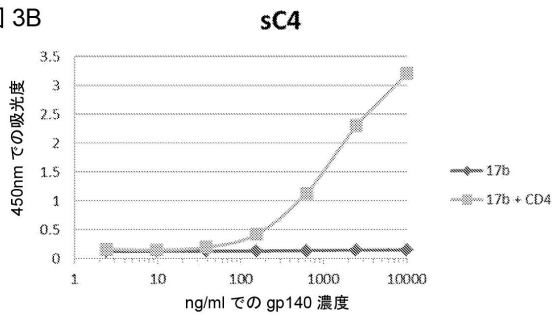
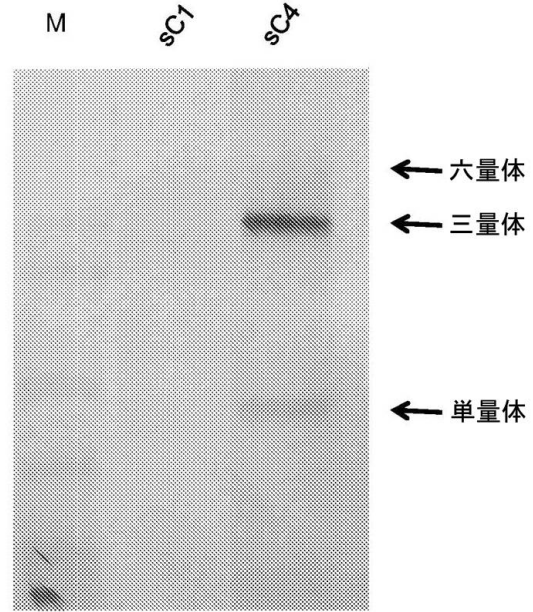


図 3B



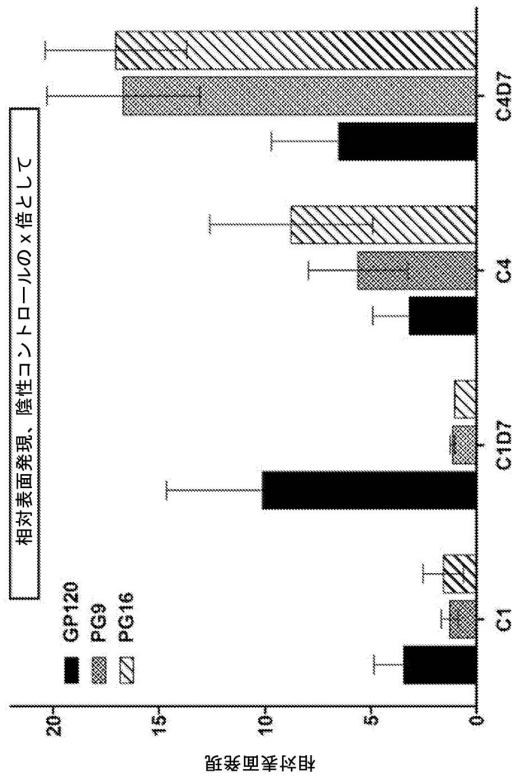
【 図 4 】

図 4



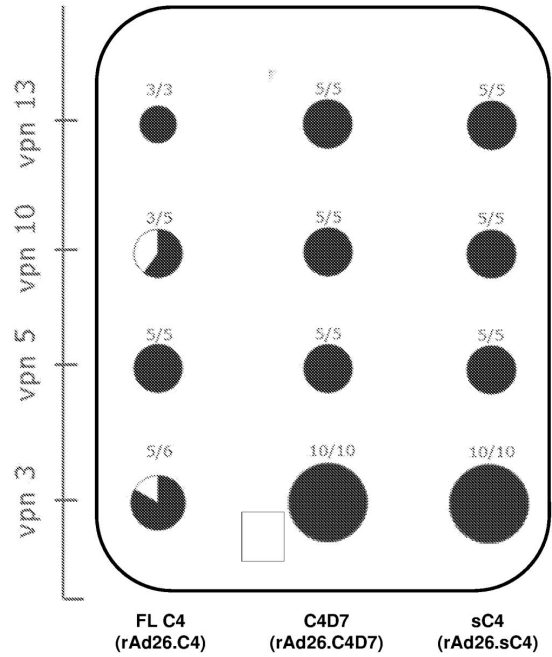
【 図 5 】

図 5



【 図 6 】

図 6



10

20

30

40

50

【 図 7 】

図 7A

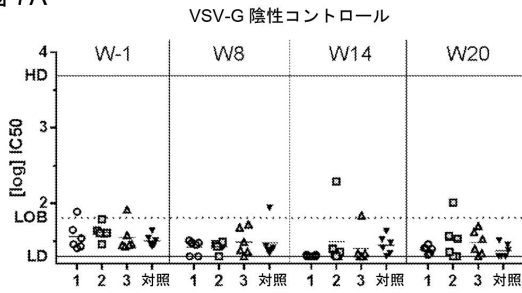
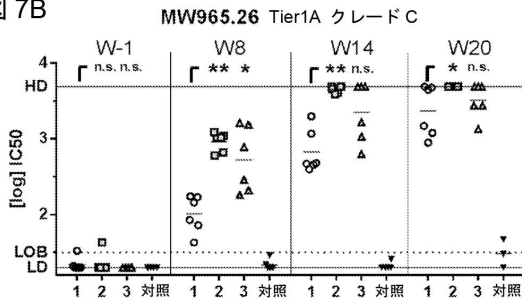


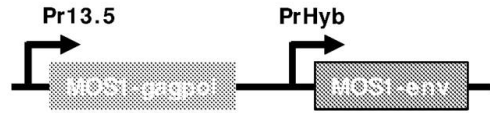
図 7B



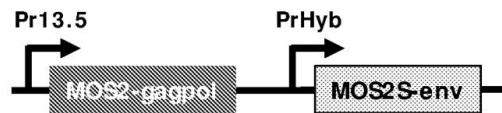
- 3価
- 4価(C4D7)
- ▲ 4価(sC4)
- ▼ 対照(Ad26.empty)

【 図 8 】

図 8



IGR 44/45



IGR 88/89

【 図 9 】

図 9A

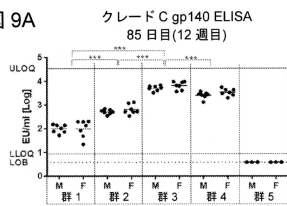


図 9B

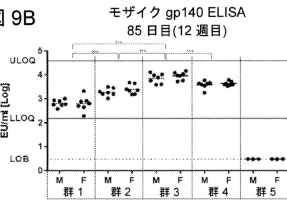
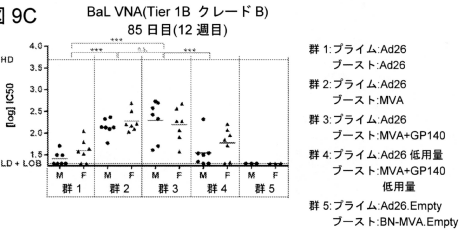


図 9C



- 群 1: プライム:Ad26
ブースト:Ad26
- 群 2: プライム:Ad26
ブースト:MVA
- 群 3: プライム:Ad26
ブースト:MVA+GP140
- 群 4: プライム:Ad26 低用量
ブースト:MVA+GP140 低用量
- 群 5: プライム:Ad26 Empty
ブースト:BN-MVA Empty

【 図 10 】

図 10A

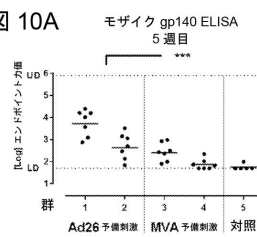


図 10B

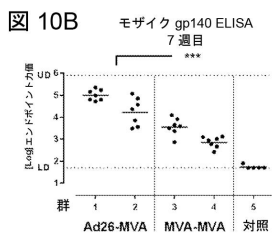


図 10C

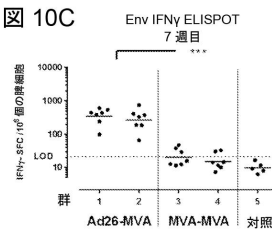


図 10D

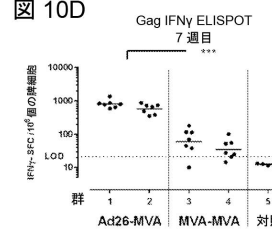
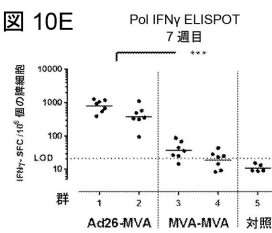


図 10E



10

20

30

40

50

【配列表】

0007272965000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P	37/04 (2006.01)	F I	A 6 1 P	37/04	
C 0 7 K	14/155 (2006.01)		C 0 7 K	14/155	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	7/01 (2006.01)		C 1 2 N	7/01	Z N A
C 1 2 N	15/49 (2006.01)		C 1 2 N	15/49	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)		C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/861 (2006.01)		C 1 2 N	15/861	Z

弁理士 片山 英二

(74)代理人 100093676

弁理士 小林 純子

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(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 アルヒメーデスウェッハ 4 - 6 , ヤンセン ファッ
ンズ アンド プリベンション ベーフェー内

(72)発明者 ランゲダイク, 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 アルヒメーデスウェッハ 4 - 6 , ヤンセン ファッ
ンズ アンド プリベンション ベーフェー内

(72)発明者 カスターズ, ジェローム ヒューバーティーナ ヘンリクス ヴィクトール

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン アルヒメーデスウェッハ 4 - 6 , ヤンセン ファッ
ンズ アンド プリベンション ベーフェー内

(72)発明者 ヴォクスタル, ヴィキ

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン アルヒメーデスウェッハ 4 - 6 , ヤンセン ファッ
ンズ アンド プリベンション ベーフェー内

(72)発明者 カッラ, マルクス

ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ウォルフ 6 ツェー

審査官 山 崎 真奈

(56)参考文献 特開 2 0 1 7 - 0 5 2 7 6 2 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 6 8 4 4 (W O , A 1)

特表 2 0 1 6 - 5 0 3 8 1 9 (J P , A)

特表 2 0 1 3 - 5 4 4 7 8 2 (J P , A)

特表 2 0 0 5 - 5 2 5 8 2 2 (J P , A)

特表 2 0 1 5 - 5 3 3 8 4 1 (J P , A)

Barouch, Dan H. et al. , Protective Efficacy of a Global HIV-1 Mosaic Vaccine against Hetero
logous SHIV Challenges in Rhesus Monkeys. , Cell , 2013年 , 155(3) , 531-539Barouch, Dan H. et al. , Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular im
mune responses in rhesus monkeys. , Nature Medicine , 2010年 , 16(3) , 319-323

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

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)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q