

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6823586号
(P6823586)

(45) 発行日 令和3年2月3日(2021.2.3)

(24) 登録日 令和3年1月13日(2021.1.13)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K	39/295	(2006.01)	A 6 1 K	39/295	Z N A
A 6 1 K	39/12	(2006.01)	A 6 1 K	39/12	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	

請求項の数 13 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-510880 (P2017-510880)
(86) (22) 出願日	平成27年9月3日(2015.9.3)
(65) 公表番号	特表2017-527557 (P2017-527557A)
(43) 公表日	平成29年9月21日(2017.9.21)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/070161
(87) 國際公開番号	W02016/034678
(87) 國際公開日	平成28年3月10日(2016.3.10)
審査請求日	平成30年8月29日(2018.8.29)
(31) 優先権主張番号	62/045,538
(32) 優先日	平成26年9月3日(2014.9.3)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	62/055,154
(32) 優先日	平成26年9月25日(2014.9.25)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	509296443 バヴァリアン・ノルディック・アクティーベルスカブ デンマーク国、3490 クヴィストゴード、ヘイレスコフヴェイ、10アエ
(74) 代理人	100069556 弁理士 江崎 光史
(74) 代理人	100111486 弁理士 鍛治澤 實
(74) 代理人	100139527 弁理士 上西 克礼
(74) 代理人	100164781 弁理士 虎山 一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA) フィロウイルスワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マールブルグウイルス(MARV)のエンベロープグリコプロテイン(GP)をコードするスクレオチド配列を含む組み換え改変ワクシニアウイルス(MVA)ベクターを含む、MARVに起因する病気の治療および/または予防における使用のための薬剤組成物であって、

前記組み換えMVAベクターがエボラウイルス(EBOV)タンパク質の抗原決定基をコードするスクレオチド配列をさらに含み、前記のEBOVタンパク質が、ザイールエボラウイルス(ZEROV)のエンベロープグリコプロテイン(GP)、スーザンエボラウイルス(SEBOV)のエンベロープグリコプロテイン(GP)およびコートジボワールエボラウイルス(EBOD-CdI)の核タンパク質(NP)である、薬剤組成物。

【請求項 2】

MARVのGPおよび前記EBOVタンパク質の前記抗原決定基が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31および配列番号37からなる群から選択される、請求項1に記載の薬剤組成物。

【請求項 3】

MARVのGPおよび前記EBOVタンパク質の前記抗原決定基が、配列番号29、配列番号6、配列番号20および配列番号31を含む、請求項1または2に記載の薬剤組成物。

【請求項 4】

10

20

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 8、配列番号 5、配列番号 1 9 および配列番号 3 0 を含む、請求項 1 ~ 3 に記載の薬剤組成物。

【請求項 5】

前記組み換えウイルスを作るために使用した前記MVAは、MVA - BNウイルス、または鶏胚線維芽（CEF）細胞においてインビトロで生殖複製する能力を有するが、ヒトケラチン生成細胞株Hacat、ヒト骨肉腫細胞株143B、ヒト胚腎臓細胞株293、およびヒト頸部腺がん細胞株HeLaにおいては生殖複製する能力を有しないMVA - BNの誘導体である、請求項1~4に記載の薬剤組成物。

【請求項 6】

前記組み換えウイルスを作るために使用した前記MVAは、欧州動物細胞培養コレクション（ECAAC）に受入番号V00083008として預託されている、MVA - BNである、請求項1~4に記載の薬剤組成物。 10

【請求項 7】

前記組み換えMVAベクターが同時刺激分子をコードする核酸をさらに含む、請求項1~6に記載の薬剤組成物。

【請求項 8】

ワクチンの形態にある、請求項1~7に記載の薬剤組成物。

【請求項 9】

前記薬剤組成物を、2回、3回または4回投与する、請求項1~8に記載の薬剤組成物。 20

【請求項 10】

前記のMARVに起因する病気が、MARV - ムソケおよび／またはMARV - アンゴラに起因する病気である、請求項1~9に記載の薬剤組成物。 25

【請求項 11】

医薬的に許容される担体、希釈剤および／または添加剤を含む、請求項1~10に記載の薬剤組成物。 30

【請求項 12】

第1の投与（プライミング）のための第1のバイアルまたは容器、および第2の投与（ブースティング）のための第2のバイアルまたは容器に入った、請求項1~11に記載の薬剤組成物を含む、MARVに起因する病気の治療および／または予防における使用のためのキット。 35

【請求項 13】

前記のMARVに起因する病気が、MARV - ムソケおよび／またはMARV - アンゴラに起因する病気である、請求項12に記載のキット。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、フィロウイルス疾患に対する組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ系（MVA系）ワクチンを含む改善されたフィロウイルスワクチン、ならびにそれに関連する製品、方法および使用に関する。特に、本発明は、フィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む遺伝子操作（組み換え）されたMVAベクターに関する。本発明は、さらに、ワクチン接種の方法、特に、2個のウイルス性ベクター組成物を用いる同種および異種のプライム - ブーストワクチン投与法に関する。さらに詳しくは、本発明は、同種のプライム - ブーストワクチン投与法で使用する組み換えMVA、または異種のプライム - ブーストワクチン投与法で使用する組み換えMVAおよび／または組み換え鶏痘ウイルス（FPV）に関する。本発明は、さらに、例えば、対象に防御免疫反応を誘導するのに適する、これらの生産物、方法および使用に関する。 45

【背景技術】

【0002】

フィロウイルスは、フィロウイルス科に属するエンベロープを持った、非分節マイナス 50

鎖RNAウイルスである。これまでのところ、このウイルス科には2個のメンバーが確認されている。マールブルグウイルス(MARV)およびエボラウイルス(EOV)である。フィロウイルスは、非常に毒性が強く、人から人へ容易に伝染し、そして並外れて致死率が高く、ヒトおよび非ヒト霊長類に重症の出血熱を引き起こす。フィロウイルス感染症は、ヒトにおいて、23%から90%もの範囲の致死率を有する。しかしながら、この伝染性および致死率にもかかわらず、承認された治療法や予防ワクチンはない。

【0003】

流行の間、患者の隔離および防御服の使用および消毒措置(合わせてウイルス性出血熱(VHF)隔離予防措置または障壁看病という)は、マールブルグまたはエボラウイルスのさらなる伝染を食い止め、そして流行を制御し終焉させるのに十分であった。フィロウイルスによって引き起こされる出血熱の有効な治療法は知られていないので、VHF隔離予防措置を適用して伝染を予防することは、現在のところ、フィロウイルスの流行を制御するために利用できる唯一の手段である。10

【0004】

フィロウイルスは、最初に、1967年にアフリカミドリザルの組織を処理していたドイツとユーゴスラビアの数人の研究所の職員が重症の出血熱を発症した時に認識された。これらの流行によって、合計31例と7人の死亡が引き起こされた。このウイルスは、流行の1つが起こった場所であるドイツ、マールブルグにちなんでマールブルグウイルス(MARV)と名付けられた。この最初の流行の後、このウイルスは消え去り、1975年まで再出現しなかった。その時、おそらくはジンバブエで感染した1人の旅行者が南アフリカのヨハネスブルクで発病し、この旅行者の同行者と1人の看護師も感染した。この時以来、マールブルグ出血熱(MHF)は数例、散発的に確認されたが、この疾患は比較的稀にとどまっている。20

【0005】

第2のフィロウイルスであるエボラウイルス(EOV)は、最初に、1976年にザイール(現在のコンゴ民主共和国)北部およびスーダン南部の2か所でエボラ出血熱(EHF)の流行が起こった時に確認された。これらの流行は、エボラウイルスの2個の異なる種であることが後に証明されたウイルスによって引き起こされた。これらの2個の種は、それぞれが発見された国にちなんで名付けられた。両方のウイルスは共に非常に致死率が高く、ザイールでは90%、スーダンでは50%の患者が死亡した。1976年以来、エボラウイルスは散発的にアフリカで出現しており、1976年から1979年の間にいくつかの小規模から中規模の流行が確認され、1994年から1996年の間に再びガボンで確認された。より大規模なエボラ出血熱の流行は、1995年にザイールのキクウイト、および2000年にウガンダのグルで起こった。30

【0006】

フィロウイルスは、1個またはそれ以上の非ヒト動物の継続中のライフサイクルからヒトへ伝染するように思われる。エボラおよびマールブルグウイルスの自然界の保有宿主(複数を含む)を見つけようとする多くの試みにもかかわらず、それらの起源は謎のままである。その結果、一体どのようにしてこのウイルスが自然界の保有宿主からヒトへ伝染するのかも不明のままである。しかし、一旦ヒトが感染すると、ヒトからヒトへの伝染によってさらなる感染が引き起こされる。特に、伝染は、感染した個人または彼らの体液と、別の人間との親密な個人的接觸によって引き起こされる。フィロウイルス感染によって引き起こされる出血熱の記録に残る流行の間、感染した個人の世話をし(つまり、食事を与え、体を洗い、投薬した)、またはとても身近で働いた人々は、彼ら自身が感染する特に大きなリスクがあった。感染した体液との接觸を通じた(つまり、これらの体液で汚染された、消毒していない注射器、針その他の医療器具の再利用を通じた)院内(病院)感染もまた、疾患の蔓延にとって重要な要因であった。感染していない人と感染した患者との親密な接觸を最小限に抑えることは、通常、流行の間に、新たなフィロウイルス感染の数を減少させる。フィロウイルスは、実験室では、小さな浮遊粒子を通じて感染するある程度の能力を示したが、ヒトの間の空気伝播は明確には実証されていない。4050

【0007】

これまでのところ、エボラウイルスの5つの株が確認されており、それらの最初の出現場所にちなんで名付けられている。ブンディブギョ（B E B O V）、象牙海岸（E B O V - C d I、タイフォレストウイルスまたはT A F Vとも云われる）、レストン（E B O V - R e s t o n）、スーダン（S E B O V）、およびザイール（Z E B O V）であり、ザイール、スーダン、およびブンディブギョ株は、一般的に、ヒトの疾病および死亡を引き起こす。エボラ・レストンは、ヒトに重症の疾患を引き起さない唯一の知られたフィロウイルスであるが、サルでは致命的になりえる。マールブルグウイルスのいくつかの株が現在までのところ確認されており、ムソク株が最も高い致死率を有する。図1を参照照。

【0008】

構造上は、フィロウイルスビリオンは、いくつかの形で出現しうる。長い、時には枝分かれしたフィラメント状のもの、さらには、「6」、文字「U」または円の形をしたより短いフィラメント状のものを含む。ウイルスのフィラメントは、最大で14ミクロン（ μ m）までの長さのものがあり、80ナノメーター（nm）の一定の直径を有し、そして脂質の膜でエンベロープされている。それぞれのビリオンは、約19キロ塩基対（kb）の長さの1個の一本鎖、マイナスセンスRNA分子を含み、それは核タンパク質（NP）、ビリオンタンパク質35（VP35）、ビリオンタンパク質40（VP40）、エンベロープグリコプロテイン（GP）、ビリオンタンパク質30（VP30）、ビリオンタンパク質24（VP24）、およびRNA依存性RNAポリメラーゼタンパク質（L）の順序で連続して配列された7個の遺伝子を含む。宿主細胞の細胞質に入ると、このRNAは転写されて、このたんぱく質をコードするポリアデニル化されたサブゲノムmRNA種を生成する。転写および翻訳は、それぞれ異なるフィロウイルスについて推定される同一の機能をもった、7個の構造ポリペプチドの合成を引き起こす。4個のタンパク質（NP、VP30, VP35およびL）が、ヌクレオカプシド複合体中のウイルスゲノムRNAと関連している。残りの3個の構造タンパク質は、膜結合性である。GPは、タイプIの膜透過タンパク質であり、一方、VP24およびVP40はおそらくはこの膜の内側に位置している。エンベロープグリコプロテイン（GP）は、3個のヘテロ二量体のコピーを含むホモ三量体（「ペプロマー」とも云われる）としてウイルスエンベロープに現れる。このヘテロ二量体は、フューリン開裂によって作られる「GP1」および「GP2」として知られる完全長GP前駆体（「GP0」と云われる）の2個の断片を含む。GP1およびGP2は、ジスルフィド結合によって結合する。非構造的な、分泌されたグリコプロテイン（sGP）がMARVではなく、EBOVによって発見される（H. Feldmann & M. P. Kiley, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 235: 1-21 (1999)）。新しいウイルス粒子が、宿主細胞の表面から発芽することによって作られる（以下、参照）。

【0009】

フィロウイルスのライフサイクルは、特定の細胞表面受容体にビリオンが付着して始まり、次いでビリオンエンベロープが細胞膜と融合し、ウイルスヌクレオカプシドが細胞質ゾル中に放出される。ウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼ（RNAP、または「L」タンパク質としても知られている）は、ヌクレオカプシドを部分的に脱殻し、遺伝子をプラス鎖mRNAの中に転写し、次いでそれらは構造的および非構造的タンパク質の中へ翻訳される。図2を参照。このRNAPは、ゲノムの3'末端に位置する単一プロモーターに結合する。転写は、遺伝子の後で終了するか、または次の遺伝子へ下流に続行する、つまりゲノムの3'末端に近い遺伝子は最大限転写される一方、5'末端に向かう遺伝子は転写される可能性が最も低い。従って、遺伝子順序は、簡単だが有効な転写調節の形である。生成される最も豊富なタンパク質は、核タンパク質（NP）であり、その細胞濃度は、いつRNAPが遺伝子転写からゲノム複製へと転換するかを決定する。複製は、それ自身がマイナス鎖ウイルス子孫ゲノムのコピーへと転写される、完全長プラス鎖抗ゲノムをもたらす。新たに合成された構造タンパク質およびゲノムは、細胞膜の内部の近くで自己組織化し蓄積する。ウイルス粒子は、感染した宿主細胞から発芽し、成熟した感染ビリ

10

20

30

40

50

オンを生成しながらエンベロープされる。

【0010】

従前のワクチン開発

1つまたはそれ以上のフィロウイルス種による感染に対する防御免疫力を誘導できる、安全な免疫原性ワクチンを開発しようと試みた間に、多くの戦略が評価され、明らかに一致しない結果をもたらした。その概要は、Marzi and Feldmann (A. Marzi and H. Feldmann, Expert Rev. Vaccines 13 (4) : 521 - 531 (2014)) にまとめられている。例えば、3個のDNAプラスミド、つまり1つ目はZEBOVからエンベロープグリコプロテインを発現しているもの、2つ目はSEBOVからエンベロープグリコプロテインを発現しているもの、3つ目はZEBOVから核タンパク質を発現しているものの混合物を含む3価のDNAワクチンは安全で、免疫原性で、そしてヒトの3個の抗原の少なくとも1個に対して抗体反応を誘導することができた。しかしCD8+ T細胞反応は、ワクチン接種をした個体群の3分の1未満で検出された (J. E. Martin et al., Vaccine Immunol. 13 (11) : 1267 - 1277 (2006))。同様に、ZEBOV、SEBOV、マールブルグ Ci67 (ラタイツァク株)、マールブルグムソケおよびマールブルグラブンからのエンベロープグリコプロテイン、さらにはZEBOVおよびマールブルグムソケからの核タンパク質を発現している4個の異なる組み換えアデノウイルスの混合物を含む5価アデノウイルス系「汎フィロウイルス」ワクチンである複合体は、ZEBOVまたはMARVの攻撃から非ヒト霊長類を防御し、両タイプのウイルスに対して抗体反応を誘導したが、このワクチンがCD8+ T細胞反応を誘導したかどうかは不明のままである (D. L. Swenson et al., Clin. Vaccine Immunol. Immunol. 15 (3) : 460 - 467 (2008))。

【0011】

ZEBOVに由来する、エンベロープグリコプロテイン、またはエンベロープグリコプロテインおよび核タンパク質の両者を発現しているヒトパラインフルエンザウイルス血清型3 (HPIV3) である組み換えパラミクソウイルスの鼻腔内投与は、以後のEBOVの攻撃からモルモットを防御した。げっ歯動物モデルは、しばしば霊長類では結果の予測が困難であり、げっ歯動物では有効であった以前の多くのEBOVワクチン候補が、非ヒト霊長類では完全に失敗した (A. Bukreyev et al., J. Virol. 80 (5) : 2267 - 2279 (2006))。ZEBOV由来の、エンベロープグリコプロテイン、またはエンベロープグリコプロテインおよび核タンパク質の両者を発現している組み換えHPIV3をアカゲザルに鼻腔内投与すると、エンベロープグリコプロテインを発現しているいかなる構成物も適度に免疫原性を示し、ワクチン接種後のZEBOVの攻撃に対して80%を超える動物を疾患から防御した (A. Bukreyev et al., J. Virol. 81 (12) : 6379 - 6388 (2007))。最後に、水胞性口炎ウイルス (VSV) グリコプロテインをZEBOVエンベロープグリコプロテインで置き換えた組み換えVSFは、治療しなければ一様に死に致る感染後24時間も経った治療によって、モルモットの50%、マウスの100%を防御した。エボラウイルス感染に対する暴露後の治療選択肢を与え、暴露から20から30分後に治療を行った場合、8匹中4匹のアカゲザル (50%) が防御された (H. Feldmann, PLoS Pathogen 3 (1) : 54 - 61 (2007))。

【0012】

Geisbertらは、非ヒト霊長類における致死的なEBOV感染からマウスやモルモットを防御したワクチン戦略の効果を評価した。彼らは、EBOVグリコプロテインおよび核タンパク質を発現しているベネズエラウマウイルス (VEEV)、EBOVグリコプロテイン、脂質Aを含むリポソームおよび不活性化EBOVを発現している組み換えワクシニアウイルス (VACV)、ならびに濃縮した不活性化全ビリオン調合液の弱毒化した株に由来するRNAレプリコン粒子を使用した。彼らは、これらの戦略のいずれもがEBOVの頑強な攻撃から非ヒト霊長類を防御することに成功しなかったことがわかった (50)

T. H Geisbert et al., Emerging Infectious Diseases 8 (3) : 503 - 507 (2002)).

【0013】

別の者たちは、抗体反応を誘導するために、非複製サブユニットワクチンとして、哺乳類、バクテリア、植物または昆虫の細胞で発現したウイルス様粒子（VLP）を使用した（D. L. Swenson et al., Vaccine 23 : 3033 - 3042 (2005) ; K. L. Warfield et al., JID 196 (2) : 430 - 437 (2007) , N. Kushnir et al., Vaccine 31 (1) : 58 - 83 (2012) , K. L. Warfield et al., PLOS ONE 10 (3) : e0118881 (2015) , K. L. Warfield and M. J. Aman JID 204 : 1053 - 1059 (2011) , V. M. Wahle Jensen et al., J Virol. 79 (16) : 10442 - 10450 (2005) , WO 2003 / 039477 , WO 2006 / 046963 , WO 2006 / 073422 , WO 2004 / 042001 , US 8,900,595 , US 7,211,378)。しかし、フィロウイルスVLPは、大きなコストがかかる困難な生成プロセスが必要で、長時間室温で保存しなければならない。

【0014】

このようにして、かなりの時間と労力をを使った後に、いくつかの有望なワクチン候補が前臨床段階で現れたが、現在までのところ、利用できる承認された予防ワクチンはない。フィロウイルス感染症の伝染性と致死性を考えると、有効なワクチンの緊急の必要がある。

【発明の概要】

【0015】

本発明においては、複製欠損の種々のプライム ブーストの組み合わせ、および複製能力のないベクターが、フィロウイルス感染症に対して効果的な免疫保護を引き起こすことが発見された。

【0016】

したがって、本発明の1つの一般的な態様は、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である混合ワクチンに関する。

【0017】

さらなる態様において、本発明は、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を投与すること含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である混合ワクチンに関する。

【0018】

さらなる態様において、本発明は、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第

1 の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第 1 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物を含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物であるキットに関する。

【 0 0 1 9 】

さらなる態様において、本発明は、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも 2 個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 1 の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第 1 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物を含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物であるキットに関する。

【 0 0 2 0 】

さらなる態様において、本発明は、フィロウイルスに起因する疾患の治療および / または予防で使用するためのフィロウイルスタンパク質の 2 個またはそれ以上の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え改変ワクシニアウイルス (MVA) ベクターに関する。さらに別の態様において、本発明は、フィロウイルスに起因する疾患の治療および / または予防で使用するための、フィロウイルグリコプロテインの抗原タンパク質をコードし、さらにフィロウイルスピリオンタンパク質 40 (VP40) をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え MVA ベクターに関する。別の実施形態において、本発明は、(a) 配列番号 5 、配列番号 19 および配列番号 30 、(b) 配列番号 5 、配列番号 19 、配列番号 28 および配列番号 30 、ならびに (c) 配列番号 19 および配列番号 33 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む組み換え MVA ベクターに関する。ある特定の態様において、本発明は、前記組み換え MVA ベクターを含む組成物、前記組み換え MVA ベクターを含むワクチン、前記組み換え MVA ベクターおよび薬剤の担体、希釈剤および / または添加剤を含む薬剤、ならびに前記組み換え MVA ベクターを含む細胞に関する。ある特定の態様において、本発明は、フィロウイルスに起因する対象の疾患の治療および / または予防のための薬剤またはワクチンとして使用する前記組み換え MVA ベクター、および前記組み換え MVA ベクターを対象に投与することを含む、対象の免疫反応に作用する方法に関する。さらなる態様において、本発明は、第 1 の投与 (プライミング) のための第 1 のバイアルまたは容器に入った前記組み換え MVA ベクター、および第 2 の投与 (ブースティング) のための第 2 のバイアルまたは容器に入った前記組み換え MVA ベクターを含むキットに関する。

【 0 0 2 1 】

本発明はさらに、配列番号 26 を有する F PV - 40 K プロモーターの制御の下で、フィロウイルスタンパク質 (例えは、上記または下記のいずれのフィロウイルスタンパク質、好ましくはフィロウイルスエンベロープグリコプロテイン) の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え F PV ベクターに関する。さらなる態様において、本発明は、フィロウイルスに起因する疾患の治療および / または予防で使用するためのフィロウイルスタンパク質の 2 個またはそれ以上の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え 鶏痘ウイルス (FPV) ベクターに関する。ある特定の態様において、本発明は、前記組み換え F PV ベクターを含む組成物、前記組み換え F PV ベクターを含むワクチン、前記組み換え F PV ベクターおよび薬剤の担体、希釈剤および / または添加剤を含む薬剤、ならびに前記組み換え F PV ベクターを含む細胞に関する。ある特定の態様において、本発明は、フィロウイルスに起因する対象の疾患の治療および / または予防のための薬剤またはワクチンとして使用する前記組み換え F PV ベクター、

10

20

30

40

50

および前記組み換えF P Vベクターを対象に投与することを含む、対象の免疫反応に作用する方法に関する。

【0022】

さらなる態様において、本発明は、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む免疫学的に有効な量のMVAベクター、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む免疫学的に有効な量の鶏痘ベクターを含み、

前記ベクターの一方はプライミングワクチンであり、他方のベクターはブースティングワクチンである混合ワクチンに関する。 10

【0023】

さらなる態様において、本発明は、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む免疫学的に有効な量のMVAベクター、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む免疫学的に有効な量の1個またはそれ以上の追加のMVAベクターを含み、

前記MVAベクターの一方はプライミングワクチンであり、他方のMVAベクターはブースティングワクチンである混合ワクチンに関する。 20

【0024】

さらなる態様において、本発明は、

(a) フィロウイルスタンパク質の少なくとも1個の抗原決定基をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) フィロウイルスタンパク質の少なくとも1個の抗原決定基をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物、または、

(c) フィロウイルスタンパク質の少なくとも1個の抗原決定基をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(d) フィロウイルスタンパク質の少なくとも1個の抗原決定基をコードする核酸を含むF P Vベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を含み、 30

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である混合ワクチンに関する。

【0025】

さらなる態様において、本発明は、対象のフィロウイルスに対して免疫反応を誘導する方法であって、この方法は対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を投与することを含み、 40

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である方法に関する。

【0026】

さらなる態様において、本発明は、対象のフィロウイルスに対して免疫反応を誘導する方法であって、この方法は対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 50

1 の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第 1 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である方法に関する。

【 0027 】

本発明は、さらに、フィロウイルスに起因する疾患の治療および／または予防において使用するための組み換え MVA ベクターを生成する方法を対象にし、この方法は、

(a) MVA ウィルスを用いて宿主細胞を感染させるステップ、

10

(b) 本発明のいずれかの実施形態のいずれかのフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 個のヌクレオチド配列を含む組み換えベクターを用いて、前記感染した細胞に核酸を導入するステップであって、前記核酸配列が、少なくとも 1 個の前記ヌクレオチド配列を MVA ウィルスゲノムの中に組み込ませることを指示できるゲノム MVA ウィルス配列をさらに含むステップ、および

(c) 生成した組み換え MVA ウィルスを特定し、分離し、および任意に精製するステップを含む。

【 0028 】

別の実施形態においては、上記のいずれの実施形態の組み換え MVA ベクターを生成する方法におけるステップ(a)および(b)の順序も、ステップ(b)が 1 番目のステップで、ステップ(a)が 2 番目のステップとなるよう変更できる。

20

【 0029 】

本発明は、さらに、フィロウイルスに起因する疾患の治療および／または予防において使用するための組み換え F PV ベクターを生成する方法を対象にし、この方法は、

(a) F PV ウィルスを用いて宿主細胞を感染させるステップ、

(b) 本発明の任意の実施形態のいずれのフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 個のヌクレオチド配列を含む組み換えベクターを用いて、前記感染した細胞に核酸を導入するステップであって、前記核酸配列が、少なくとも 1 個の前記ヌクレオチド配列を F PV ウィルスゲノムの中に組み込ませることを指示できるゲノム F PV ウィルス配列をさらに含むステップ、および

30

(c) 生成した組み換え F PV ウィルスを特定し、分離し、および任意に精製するステップを含む。

【 0030 】

別の実施形態においては、上記のいずれの実施形態の組み換え F PV ベクターを生成する方法におけるステップ(a)および(b)の順序も、ステップ(b)が 1 番目のステップで、ステップ(a)が 2 番目のステップとなるよう変更できる。

【 0031 】

さらなる態様において、本発明は、フィロウイルスに対する免疫反応を対象において誘導する方法であって、この方法は対象に、

(a) フィロウイルスタンパク質の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 1 の組成物、および

40

(b) フィロウイルスタンパク質の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物、
または、

(c) フィロウイルスタンパク質の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 1 の組成物、および

(d) フィロウイルスタンパク質の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードする核酸を含む F PV ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物
を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物

50

である方法に関する。

【0032】

さらなる態様において、本発明は、対象に防御免疫力または防御免疫反応を提供する方法であって、この方法は対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である方法に関する。

【0033】

さらなる態様において、本発明は、対象に防御免疫力または防御免疫反応を提供する方法であって、この方法は対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である方法に関する。

【0034】

さらなる態様において、本発明は、対象にフィロウイルス様粒子を生成する方法であって、この方法は対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスグリコプロテインおよびフィロウイルスピリオンタンパク質40(VP40)の抗原タンパク質をコードする核酸を含む免疫学的に有効な量のMVAベクター、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む免疫学的に有効な量の鶏痘ベクターまたはMVAベクターを投与して、対象にフィロウイルス様粒子を生成することを含み、

前記ベクターの一方はプライミングワクチンであり、他方のベクターはブースティングワクチンである方法に関する。

【0035】

さらなる態様において、本発明は、対象にフィロウイルス様粒子を生成する方法であって、この方法は対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスグリコプロテインおよびフィロウイルスピリオンタンパク質40(VP40)の抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターまたはMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物

を投与して、対象にフィロウイルス様粒子を生成することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である方法に関する。

【0036】

さらなる態様において、本発明は、対象のフィロウイルスに対して強化された免疫反応を誘導する方法であって、この方法は対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスグリコプロテインおよびフィロウイルスピリオンタンパク質40(VP40)の抗原タンパク質をコードする核酸を含む免疫学的に有効な量のMVAベクター、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む免疫学的に有効な量の鶏痘ベクターまたはMVAベクターを投与して、対象にフィロウイルス様粒子を生成することを含み、

前記ベクターの一方はプライミングワクチンであり、他方のベクターはブースティングワクチンである方法に関する。

【0037】

さらなる態様において、本発明は、対象のフィロウイルスに対して強化された免疫反応を誘導する方法であって、この方法は対象に、10

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスグリコプロテインおよびフィロウイルスピリオンタンパク質40(VP40)の抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターまたはMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物

を投与して、対象にフィロウイルス様粒子を生成することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である方法に関する。20

【0038】

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する付属の図面は、本発明のいくつかの実施形態を説明し、さらに説明文と共に、本発明の原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】種々の確認されたフィロウイルス株間の関係を描く系統樹を示す。この系統樹は、エンベロープグリコプロテイン(GP)遺伝子のコード領域および最大節約法を使用して作成した。マールブルグウイルスのラブンおよびラタイチャク株の両者は、23%の致死率を有し、一方ムソケおよびアンゴラ株は50%から88%の範囲の致死率を有した。スーダン株は41~65%の致死率を有し、ザイール株は57~90%の致死率を有した。コートジボワールおよびレストン株の両者は、いまだ人類に疾患を引き起こしていないが、レストンはブタに疾患を引き起こしている。30

【図2】フィロウイルスゲノムの構造および遺伝子組織を示す。

【図3A】MVA-mBN252Bの構造および遺伝子組織を示す。

【図3B】MVA-mBN226Bの構造および遺伝子組織を示す。

【図3C】選択マーカーを含むMVA-mBN254Aの構造および遺伝子組織を示す。

【図3D】選択マーカーを含むMVA-mBN368Aの構造および遺伝子組織を示す。

【図4A】プラスミドpBNX186の構造および遺伝子組織を示す。f1ank1(F1 IGR 88/89)およびf1ank2(F2 IGR 88/89)は、IGR 88/89を囲むMVA-BN配列である。F1 IGR 88/89、およびF2 IGR 88/89は、同種の組み換え現象において、発現カセットおよび選択カセット(NPT IIおよびeGFP)をMVA-BNの中に挿入するために使用する。組み換えウイルスの選択ができるように、大腸菌薬剤選択遺伝子ネオマイシンホスホトランスクエラーゼ(NPT II)、および強化緑色蛍光タンパク質(eGFP)が、内部リボソーム導入部位(IRE)を介して結合し、強力合成ポックスウイルスプロモーター(PRS)の制御の下で挿入した。IGR 88/89のF2およびF2-反復配列が、選択カセットの側面に位置し、選択的压力が存在しない中で、同種の組み換えを介して選択カセット選択カセットの除去を可能にする。40

【図4B】プラスミドプラスミドpBNX197の構造および遺伝子組織を示す。f1a

50

`n k 1 (F 1 I G R 1 4 8 / 1 4 9)`、および`f l a n k 2 (F 2 I G R 1 4 8 / 1 4 9)`は、`I G R 1 4 8 / 1 4 9`を囲むMVA - BN配列である。`F 1 I G R 1 4 8 / 1 4 9`、および`F 2 I G R 1 4 8 / 1 4 9`は、同種の組み換え現象において、発現力セットおよび選択力セット(`G P T`および`R F P`)をMVA - BNの中に挿入するため使用する。組み換えウイルスの選択ができるように、大腸菌グアニン - キサンチン - ホスホリボシル - トランスフェラーゼ薬剤選択遺伝子(`G P T`)、および赤色蛍光タンパク質遺伝子(`R F P`)を、融合遺伝子として、強力合成ポックスウイルスプロモーター(`P r S`)の制御の下で挿入した。`L o x P`配列が、選択力セットの側面に位置し、`C r e`リコンビナーゼを介した選択力セットの除去を可能にする。

【図4C】`C r e`リコンビナーゼを発現しているプラスミド`p B N 2 7 4`の構造および遺伝子組織を示す。
10

【図4D】プラスミド`p B N X 2 2 1`の構造および遺伝子組織を示す。`f l a n k 1 (F 1 I G R B a m H I J 鷄痘)`、および`f l a n k 2 (F 2 I G R B a m H I J 鷄痘)`は、挿入部位`B a m H I J`を囲む`F P V`配列である。`F 1 I G R B a m H I J 鷄痘`、および`F 2 I G R B a m H I J 鷄痘`は、同種の組み換え現象において、発現力セットおよび選択力セット(`G P T`および`R F P`)を`F P V`の中に挿入するため使用する。組み換えウイルスの選択ができるように、大腸菌グアニン - キサンチン - ホスホリボシル - トランスフェラーゼ薬剤選択遺伝子(`G P T`)、および赤色蛍光タンパク質遺伝子(`R F P`)を、融合遺伝子として、強力合成ポックスウイルスプロモーター(`P r S`)の制御の下で挿入した。`L o x P`配列が、選択力セットの側面に位置し、`C r e`リコンビナーゼを介した選択力セットの除去を可能にする。
20

【図4E】プラスミド`p B N X 2 1 4`の構造および遺伝子組織を示す。`f l a n k 1 (F 1 I G R 1 4 8 / 1 4 9)`、および`f l a n k 2 (F 2 I G R 1 4 8 / 1 4 9)`は、`I G R 1 4 8 / 1 4 9`を囲むMVA - BN配列である。`F 1 I G R 1 4 8 / 1 4 9`、および`F 2 I G R 1 4 8 / 1 4 9`は、同種の組み換え現象において、発現力セットおよび選択力セット(`G P T`および`R F P`)をMVA - BNの中に挿入するため使用する。`p B N X 2 1 4`は、導入遺伝子の発現のための`P r S 5 E`プロモーターをすでに含む。組み換えウイルスの選択ができるように、大腸菌グアニン - キサンチン - ホスホリボシル - トランスフェラーゼ薬剤選択遺伝子(`G P T`)、および赤色蛍光タンパク質遺伝子(`R F P`)を、融合遺伝子として、強力合成ポックスウイルスプロモーター(`P r S`)の制御の下で挿入した。`L o x P`配列が、選択力セットの側面に位置し、`C r e`リコンビナーゼを介した選択力セットの除去を可能にする。
30

【図5A】プラスミド`p B N 4 3 3`の構造および遺伝子組織を示す。`G P - M A R V - ムソケ`を、プロモーター`P r S`の制御の下で、`p B N X 1 9 7`の`B s p E I / N h e I`部位の中に挿入する。さらには、このプラスミドは、MVA - BNゲノムの`I G R 1 4 8 / 1 4 9`の側面に位置するMVA - BN DNA配列および`l o x P`によって側面に位置する選択力セットも含む。`l o x P`部位は、`C r e`リコンビナーゼを介した組み換えによって選択力セットを後に除去できる。

【図5B】プラスミド`p B N 3 8 4`の構造および遺伝子組織を示す。エボラウイルスザイールメイインガ(`G P - Z E B O V - メイインガ`)、およびマールブルグウイルスムソケ(`G P - M A R V - ムソケ`)を、プロモーター`P r 7 . 5`の制御の下で、`p B N X 1 9 7`の`M l u I / N h e I`部位の中に挿入した。さらには、このプラスミドは、MVA - BNゲノムの`I G R 1 4 8 / 1 4 9`の側面に位置するMVA - BN DNA配列、および`l o x P`によって側面に位置した選択力セットも含む。`l o x P`部位は、`C R E`リコンビナーゼを介した組み換えによって選択力セットを後に除去できる。
40

【図5C】プラスミド`p B N 3 8 5`の構造および遺伝子組織を示す。エボラウイルススダーン(`G P - S E B O V`)、およびエボラウイルスアイボリーコースト(`N P - E B O V - C d I`)のグリコプロテイン遺伝子を、合成プロモーター`P r S`および`P r L E 1`の制御の下で、`p B N X 1 8 6`の`M l u I / N h e I`部位の中に挿入した。さらには、選択的圧力が存在しない中で、同種の組み換えを介して選択力セットを後に除去することができ
50

るようするためには、このプラスミドは、MVA - BNゲノムのIGR 148 / 149の側面に位置するMVA - BN DNA配列、ならびにF2およびF2 rptによって側面に位置した選択カセットも含む。

【図5D】プラスミドpBN436の構造および遺伝子組織を示す。エボラウイルスザイールメイインガ(GP-ZEBOV-メイインガ)のグリコプロテイン遺伝子を、PrS5Eプロモーターの制御の下で、pBNX214のBspEI/NotI部位の中に挿入した。さらには、このプラスミドは、MVA - BNゲノムのIGR 148 / 149の側面に位置するMVA - BN DNA配列、およびloxPによって側面に位置した選択カセットも含む。loxP部位は、Creリコンビナーゼを介した組み換えによって選択カセットを後に除去できる。10

【図5E】プラスミドpBN555の構造および遺伝子組織を示す。エボラウイルスザイールメイインガ(GP-ZEBOV-メイインガ)のグリコプロテイン遺伝子を、FPV-40Kプロモーターの制御の下で、pBNX221のMluI/NotI部位の中に挿入した。さらには、このプラスミドは、FPVゲノムの挿入部位BamHI-Jの側面に位置するFPV DNA配列、およびloxPによって側面に位置する選択カセットも含む。loxP部位は、Creリコンビナーゼを介した組み換えによって選択カセットを後に除去できる。

【図6】MVA - BN - F1lo(MVA - mBN226B)によるワクチン接種後の、カニクイザルーマカクのGPに対する抗体のレベルを、ELISA法によって測定した結果を示す。動物に、MVA - BN - F1loを、4週間の間隔を置いて2回(-42日と-14日)ワクチン接種し、そしてELISA法による分析のために間隔を置いて血液を採取した。採取は、ワクチン接種の前(-42日、赤線(1))、第1回目のワクチン接種の後で、第2回目のワクチン接種の前(-14日、緑線(2))、および第2回目のワクチン接種の後(-5日、オレンジ線(3))に行った。左のグラフは血清中のマールブルグGPに特異的な抗体を示し、中間のグラフは血清中のエボラザイールGPに特定的な抗体を示し、右のグラフは血清中のエボラスードンGPに特異的な抗体を示す。各ELISAでは、マールブルグアンゴラGP(左のグラフ)、エボラザイールGP(中間のグラフ)、またはエボラスードンGP(右のグラフ)のいずれかによって免疫性を与えたカニクイザルーマカクから採取した高度免疫血清を、陽性対象として使用した。20

【図7A】MARV - ムソケを投与した後に、MVA - BN - F1lo(MVA - mBN226B)によるワクチン接種の結果を示す。図7Aは、MVA - BN - F1loによるワクチン接種が、動物をMARV - ムソケの投与から、100%防御したことを示す。30

【図7B】MARV - ムソケを投与した後に、MVA - BN - F1lo(MVA - mBN226B)によるワクチン接種の結果を示す。図7Bは、投与後の臨床スコアを示す。MARV - ムソケを投与した、ワクチン接種をした動物は、出血熱に伴う症状または組織学的变化をまったく示さず、肝臓、脾臓、副腎、リンパ節または肺にウイルスをまったく保有していなかった。

【図8A】異種のMVAまたはFPV免疫付与後の抗体およびCD8 T細胞反応を示す。H-2K^{k+} B6CBA F1マウスを、 5×10^7 TCID₅₀のMVA - ZEBOV - GP(MVA; MVA - mBN354A, 図3C参照)、またはFPV - ZEBOV - GP(FPV; FPVmBN368A、図3D参照)によって、0日目および21日目に皮下免疫付与した。(a)マウスは、21日目および41日目に、抗体分析のために血液採取した。ここに、ZEBOV - GPに固有の抗体+/ - SEMの平均濃度を示す。40

【図8B】異種のMVAまたはFPV免疫付与後の抗体およびCD8 T細胞反応を示す。H-2K^{k+} B6CBA F1マウスを、 5×10^7 TCID₅₀のMVA - ZEBOV - GP(MVA; MVA - mBN354A, 図3C参照)、またはFPV - ZEBOV - GP(FPV; FPVmBN368A、図3D参照)によって、0日目および21日目に皮下免疫付与した。(b)41日目に、マウスを死なせ、それらの脾臓を、GP₅₇7 - 584ペプチドで再刺激した後、フローサイトメトリー分析を行った。ここに、脾臓1個当たりのCD107a⁺、IFN-⁺およびTNF-⁺ CD8 T細胞 × 150

$10^4 + / - \text{SEM}$ の絶対値を示す。 $rMVA = \text{組み換えMVA} - ZEBOV - GP$ ($MVA - mBN254$)、 $rFPV = \text{組み換えFPV} - ZEBOV - GP$ ($FPV - mBN368$)。

【図9】MVAまたはFPVによってマウスを皮下免疫付与した後のZEBOV-GPに特異的なCD8 T細胞反応を示す。ここに、ここに、脾臓1個当たりの $CD107a^+$ 、 $IFN-\gamma$ および $TNF-\gamma$ CD8 T細胞 $\times 10^4 + / - \text{標準誤差の絶対値}$ を示す。1:MVA-mBN254またはFPV-mBN368、2:MVA-mBN226またはFPV-mBN368、3:MVA-mBN255またはFPV-mBN368。

【図10】実施例6に従い、試験の0日目および28日目に、投与量 $5 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ ($n=3$) のMVA-BN-ZEBOV/GP (MVA-mBN254)、投与量 $5 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ ($n=3$) のMVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255) を投与したカニクイザルーマカクのZEBOV-GPに特異的な抗体を示す。結果は、平均値の標準誤差 (SEM) と共に、幾何平均濃度 (ng/ml) として提供する。

【図11】試験の0日目および28日目に、投与量 $5 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ ($n=2$) のMVA-BN-ZEBOV/GP、またはMVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 ($5 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ 、 $n=2$) で3回ワクチン接種したカニクイザル-マカクの中和抗体反応を示す。追加の動物 ($n=2$) に、試験の0日目および56日目に、陰性対象としてTBSを投与した。血清をZEBOV-GP固有の疑似ビリオン中和アッセイで分析した。結果は、VSVを発現しているZEBOV-GPの80%を中和する個々の抗体力値として提供する。

【図12】図12AおよびBは、MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (MVA-mBN255) で感染したHeLa細胞中のフィロウイルス様粒子の形成を示す。(A、B) MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (VLP)、およびMVA-wtに感染したHeLa細胞の透過型電子顕微鏡(TEM)による分析。HeLa細胞を、10のMOIでMVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 (A)、またはBAC由来のMVA-wt (B) によって感染させ、薄い切片を作り、そしてTEMのために処理した。矢印MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40によって生成したVLPの横断面。Cは、HeLa細胞のGPおよびVP40の発現または同時発現の免疫プロット分析を示す。Dは、10のMOIで2日間、MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40によって感染させた(Cで示すものと同じ上清のアリコートの) HeLa細胞の上清から得た免疫沈降物の免疫プロットを示す。VP40およびGPは、完全なままのVLP中に含まれる場合にだけ共沈殿され得るが、VLPがトリトン-X 100 (1%) によって攪乱した後ではそれはできない。166:MVA-mBN166, 254:MVA-mBN254, 255:MVA-mBN255。

【図13】は、ある組み換えMVA/FPV構成物の構造を示す。

【発明を実施するための形態】

【0040】

本発明者は、マールブルグウイルス(MARV)グリコプロテイン(GP)の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)を含むワクチンが、マールブルグウイルスならびに天然痘に対しても防御免疫力を付与するのに十分な、細胞的および体液的の両者の反応を誘導することができるフィロウイルスワクチンを提供することを発見した。エボラウイルスザイール(ZEBOV)グリコプロテイン(GP)、エボラウイルススーザン(SEBOV)グリコプロテイン(GP)、またはEBOV核タンパク質(NP)の少なくとも1個の抗原決定基をコードする追加の異種ヌクレオチド配列を、組み換えMVAに挿入することによって、例えば、エボラ出血熱の致死的形態に関連する2つのタイプであるスーザンエボラウイルス(SEBOV)およびザイールエボラウイルス(ZEBOV)のような、MARVおよびEBOVの両者、さらにはMARVおよび/またはEBOVの多数の株に

対してさえ免疫反応を誘導することができる多価ワクチンを作り出す。したがって、エボラG Pの抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組み換えM V Aベクターは、エボラ株に対して非常に良い免疫反応を見せる。さらには、M V Aおよびその誘導体（例えば、M V A - B N）の優れた安全性プロフィール、さらには、複数の異種ヌクレオチド配列を提供するそれらの能力は、安全な単一成分多価パンーフィロウイルスワクチンの生産を可能にする。このことは、開発の初期段階におけるいくつかの多成分ワクチンと大きく異なっている（以下、参照）。

【 0 0 4 1 】

フィロウイルスに対する、特に非ヒト霊長類におけるM A R VおよびE B O Vに対する免疫反応を発生させる先行技術の試みが失敗したことを考えると、本発明は驚きであった。先行技術が教えたこと、および成し遂げたことからは、M V A系ワクチンが、フィロウイルス感染、特にM A R Vに対して、非ヒト霊長類を防御する免疫反応を発生させることは期待できなかった。もちろん、本発明者が作成したデータおよび彼らの観察からは、このM V A系ワクチンがヒトにおいても免疫反応を誘導すると結論付けることは大いに合理的であり、もっともである。実際、F D Aは、これらの非ヒト霊長類を防御するワクチンが、同様にヒトにも適していることの証明として、この非ヒト霊長類モデルを承認している。

【 0 0 4 2 】

本発明者は、さらに、例えば、スーダンエボラウイルス（S E B O V）および／またはザイールエボラウイルス（Z E B O V）のようなE B O Vの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む組み換え変形F P Vと混合して、例えば、スーダンエボラウイルス（S E B O V）および／またはザイールエボラウイルス（Z E B O V）のようなE B O Vの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む組み換え変形ワクシニアウイルスアンカラ（M V A）を含むワクチン投与法が、防御免疫力を付与するのに十分な細胞性および体液性の両者の反応を誘導することができるフィロウイルスワクチンを提供することを発見した。

【 0 0 4 3 】

本発明の基礎にある研究において、さらに、異種プライムおよびブーストとして、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプ、特にフィロウイルスグリコプロテインの抗原タンパク質をコードする核酸を含むM V Aベクター、および第1のフィロウイルスグリコプロテインの抗原タンパク質をコードする少なくとも1個の核酸を含むサブタイプ鶏痘ベクターが、特にM V Aベクターが少なくとも1個のプライム組成物として、および鶏痘が強化組成物として使用された場合には、高レベルの抗体反応および最大で5倍まで高い細胞傷害性C D 8 T細胞反応を誘導してフィロウイルス免疫原に対して防御免疫反応を発生させることを発見した。

【 0 0 4 4 】

この組み換えM V Aおよび／またはF P Vは、1価、つまりE B O Vの抗原決定基をコードするたった1個の異種配列を含むか、または多価、つまりE B O Vの抗原決定基をコードする少なくとも2個の異種配列を含むかのいずれかでありえる。

【 0 0 4 5 】

したがって、本発明は、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプ、特にマールブルグウイルスおよび／またはエボラウイルス-サブタイプによる感染に対して二重の防御または交差の防御を付与する免疫反応を発生させるのに使用するワクチンまたは混合ワクチン、および少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプ、特にマールブルグウイルスおよび／またはエボラウイルス-サブタイプに対するワクチンを製剤するために使用できるワクチンまたは混合ワクチンを提供する。したがって、エボラザイールメイインガおよびザイールキク Witおよび／またはマールブルグムソケおよびマールブルグアンゴラのようなフィロウイルスに対する交差防御のためのワクチンを提供できる。さらには、フィロウイルス、特にZ E B O Vの少なくとも1個の表面グリコプロテインをコードする別の異種ヌクレオチド配列と共に、Z E B O VのV P 4 0タンパク質のようなある種の抗原を発現

10

20

30

40

50

しているMVAベクターを用いた免疫付与が、フィロウイルス様粒子、例えば、表面にフィロウイルスグリコプロテインを含むエボラウイルス様粒子を生成することができるということも今回、初めて発見された。このことは予想外であった。なぜなら、フィロウイルスのGPを細胞の表面へ移送することはMVAによって大きく阻害されるものと報告されていたからである(Sanger et al. J. Virol. Meth. 81, 29-35 (2001))。しかし、フィロウイルス粒子の発芽は細胞表面で起こるので(Noda et al., PLoS Pathog. 2(9): e99 (2006))、表面移送はGPを含むフィロウイルス-VLPの形成に必要である。本発明の基礎にある研究において、フィロウイルスピリオンタンパク質40((VP40)およびグリコプロテイン、例えば、VLPを生成することができるGP-ZEBOV-マイインガを発現している組み換えMVAは、種々のプライム-ブーストの組み合わせによって強化された免疫反応を誘導し、フィロウイルス感染に対して非ヒト靈長類を防御した。行われたこの研究は、さらに、フィロウイルスグリコプロテインを発現している組み換えMVAにのみに基づいている同種プライム-ブーストおよびフィロウイルスピリオンタンパク質40(VP40)が、フィロウイルス感染に対して非ヒト靈長類を防御したことを示すことができた。
。

【0046】

少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原グリコプロテイン、特にマールブルグウイルスおよび/またはエボラウイルスのグリコプロテインをコードする核酸、および第1のフィロウイルスグリコプロテインの抗原タンパク質をコードする少なくとも1個の核酸を含む鶏痘ベクターをもった異種プライム-ブーストとしてのビリオンタンパク質40(VP40)の抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターの使用は、強化されたCD8⁺T細胞反応を発生させることができるように発見された。少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原グリコプロテイン、特にエボラウイルスのグリコプロテインをコードする核酸、およびビリオンタンパク質40(VP40)の抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターの使用は、例えば、すでにプライミング後である非ヒト靈長類に、ブースティング後にさらに改善した、より高度の中和抗体反応を誘導し、そして、そのようにして、1個またはそれ以上のフィロウイルス感染、特にザイールメイインガおよびザイールキクウィトに対して免疫反応を発生させることをさらに発見した。フィロウイルスグリコプロテインと共に、フィロウイルスピリオンタンパク質40(VP40)のようなある種の抗原を発現しているMVAベクターを用いた免疫付与は、完全なままのフィロウイルスピリオンに似ているVLPの表面全体を覆うフィロウイルスエンベロープグリコプロテインを発現するVPLを生成することができることも示された。このようにして、フィロウイルスVP40タンパク質をMVAベクターの中へコードする核酸を組み込むことによって、抗原タンパク質またはタンパク質、特にMVAベクターを発現しているウイルス性ベクターの免疫反応が強化されることが示された。

【0047】

以後、本発明の典型的な実施形態を詳細に説明し、本発明の実施例を付属の図面中で説明する。

【0048】

組み換えMVAウイルス

【0049】

1つの態様において、本発明は、フィロウイルスグリコプロテイン(GP)、特にエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)を提供する。別の態様において、本発明は、フィロウイルスグリコプロテイン、特にエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列、およびさらに別のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む組み換えMVAベクターを提供する。MVAは、皮膚ワクシニア株アンカラの鶏胚線維芽細胞に570回を超える連続継代を行うことによって生成されている(漿尿膜ワクシニアウイルスアンカラウイルス、CVA; 検討するに
。

は Mayr et al. (1975), Infection 3: 6-14を参照)。これは、トルコ、アンカラにあるVaccination Instituteに何年も保有されて、ヒトのワクチン接種の主成分として使用されている。しかし、ワクシニアウイルスに伴う重症のワクチン接種後の合併症のために、より弱毒化した、安全な天然痘ワクチンを生成するいくつかの試みがなされた。

【0050】

1960年から1974年の期間中に、Anton Mayr教授が、CEF細胞に570回の連続継代を行うことによってCVAを弱毒化することに成功した(Mayr et al. (1975))。生成したMVAが無発病性であることが、種々の動物モデルで示された(Mayr, A. & Danner, K (1978), Dev. Bio. Stand. 41: 225-234)。プレ天然痘ワクチンとしてのMVAの初期開発の一部として、ワクシニアによる副作用のリスクをもつ対象に対して、Lister Elstreeと合成して、MVA-517を使用する臨床試験が行われた(Stickl (1974), Prev. Med. 3: 97-101; Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), Munch. Med. Wochenschr. 113: 1149-1153)。1976年に、(571回目の継代に相当する)MVA-571原種由来のMVAが、ドイツで、2段階の非経口天然痘ワクチン接種プログラムの中で、プライマーワクチンとして登録された。続いて、MVA-572が、対象の多くはワクシニアに伴う合併症の高いリスクをもった群に属していたが、多数が1歳から3歳までの、重症の副作用の報告がない子供であった約120,000人の白人に対して使用された(Mayr et al. (1978), Zentralbl. Bacteriol. (B) 167: 375-390)。MVA-572は、欧州動物細胞培養コレクションにECACC V94012707として寄託されている。

【0051】

MVAを弱毒化するために使用された継代の結果として、CEF細胞で行われた継代の数によって決まる、いくつかの異なる株または分離株がある。例えば、MVA-572は、ドイツで、天然痘撲滅プログラムの間、プレ-ワクチンとして小さい投与量で使用され、MVA-575は家畜ワクチンとして広範に使用された。MVA、さらにはMVA-BNは、祖先のCVAウイルスと比較して、ゲノムの約13% (6個の部位から26.6kb)を欠いている。この欠失は、いくつかの病原性および宿主範囲遺伝子、さらにはAタイプ封入体遺伝子に影響する。MVA-575は、2000年12月7日に、欧州動物細胞培養コレクション(ECACC)に、受入番号V00120707として寄託された。この弱毒化したCVAウイルスMVA(改変ワクシニアウイルスアンカラ)は、原発鶏胚線維芽細胞に、CVAの連続的増殖(570回を超える継代)を行って得た。

【0052】

1970年代にMayr et al.が、MVAがヒトおよび哺乳動物において非常に弱毒化し、さらに無発病性であることを実証したが、ある研究者達はMVAが哺乳類およびヒトの細胞株において完全には弱毒化していないと報告してきた。なぜならば、残存複製がこれらの細胞で起きるかもしれないからである(Blanchard et al. (1998), J. Gen. Virol. 79: 1159-1167; Carroll & Moss (1997), Virology 238: 198-211; U.S. Patent No. 5,185,146; Ambrosini et al. (1999), J. Neurosci. Res. 55: 569)。これらの出版物で報告された結果は、種々の知られたMVAの株から得られたものであると想定される。なぜなら、使用されたウイルスは、本質的に特性、特に種々の細胞株における成長行動が異なっているからである。このような残存複製は、ヒトに使用する場合における安全性への懸念を含む、種々の理由によって望ましくないものである。

【0053】

より安全なワクチンまたは薬剤のような生産物の開発のための強化された安全性プロファイルを有するMVAの株が、Bavarian Nordic社によって開発されてい

10

20

30

40

50

る。MVAは、Bavarian Nordic社がさらに継代し、MVA-BNと命名した。MVA-BNの代表例および好ましいサンプルは、2000年8月30日に、欧洲細胞培養コレクション(ECACC)に、受入番号V00083008として寄託された。MVA-BNはさらに、WO 02/42480(US 2003/0206926)、およびWO 03/048184(US 2006/0159699)に記載されており、両者は参照することによって本明細書に組み込まれる。

【0054】

MVA-BNは、ウイルスのようにコードされた遺伝子が非常に効率的に発現しているヒト細胞に付着し、入ることができる。MVA-BNは、原発鶏胚線維芽細胞(CEF)に強く順応し、ヒト細胞において複製しない。ヒト細胞においては、ウイルス性遺伝子は発現し、感染性ウイルスは生成されない。MVA-BNは、米国の疾病対策予防センターによると、バイオセーフティレベル1の有機体に分類されている。MVA-BNおよびその誘導体の調製物は、多くのタイプの動物、および免疫不全の人々を含む2000人を超えるヒトの対象に対して投与されている。すべてのワクチンは、一般的に安全で良好な耐容性を有することが証明された。その高い弱毒性および減少した病原性にもかかわらず、前臨床研究では、MVA-BNは、ワクシニアに対して、さらにMVAゲノムの中にクローンされた遺伝子によってコードされた異種遺伝子生産物に対して、体液性および細胞性の両者の免疫反応を引き起こすことが示された(E. Harrer et al. (2005), Antivir. Ther. 10(2):285-300; A. Cosma et al. (2003), Vaccine 22(1):21-9; M. Di Nicola et al. (2003), Hum. Gene Ther. 14(14):1347-1360; M. Di Nicola et al. (2004), Clin. Cancer Res., 10(16):5381-5390)。

【0055】

MVAの「誘導体」または「変異体」とは、本明細書で記載されているように、本質的にMVAと同じ複製特性を示すが、それらのゲノムの1個またはそれ以上の部分で違いを示すウイルスを指す。MVA-BN、さらにはMVA-BNの誘導体または変異体は、ヒトおよびマウス、そして強く免疫を抑制したマウスでさえも、インビオで生殖的複製できない。より具体的にいえば、MVA-BN、またはMVA-BNの誘導体もしくは変異体は、鶏胚線維芽細胞(CEF)において生殖的複製の能力も、好ましく有しているが、ヒトケラチン生成細胞細胞株HaCat(Boukamp et al. (1988), J. Cell Biol. 106:761-771)、ヒト骨肉腫細胞株143B(ECACC寄託番号91112502)ヒト胚腎臓細胞株293(ECACC寄託番号85120602)、およびヒト頸腺がん細胞株HeLa(ATCC寄託番号CCL-2)においては生殖的複製の能力を有しない。さらには、MVA-BNの誘導体または変異体は、HeLa細胞およびHaCat細胞株の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比率を有する。MVA変異体のこれらの特性のための試験およびアッセイは、WO 02/42480(US 2003/0206926)およびWO 03/048184(US 2006/0159699)に記載されている。

【0056】

「生殖的複製ができない」または「生殖的複製の能力がない」という用語は、例えば、WO 02/42480に記載されており、これには上記した望ましい特性を有するMVAをどのようにして得るのかが教示されている。この用語は、WO 02/42480またはUS Patent No. 6,761,893に記載されたアッセイを用いて、感染4日後のウイルス増幅比率が1よりも小さいウイルスに適用される。

【0057】

「生殖的複製ができない」という用語は、感染4日後のウイルス増幅比率が1よりも小さいウイルスを指す。WO 02/42480またはUS Patent No. 6,761,893に記載されたアッセイは、ウイルス増幅比率の決定に適用できる。

10

20

30

40

50

【0058】

ウイルスのこの増幅または複製は、通常、増幅比率といわれる、感染した細胞から生成したウイルス（アウトプット）の、まず第1に細胞を感染させるのに最初に使用した量（インプット）に対する比率で表現される。増幅比率1は、感染した細胞から生成したウイルスの量が、細胞を感染させるのに最初に使用した量と同じ増幅状態を示し、このことは感染した細胞がウイルス感染および生殖にとって許容状態にあることを意味する。対象的に、増幅比率が1よりも小さいこと、つまり、インプットのレベルと比較して、アウトプットが減少したことは、生殖的複製が不足していること、したがってウイルスの弱毒化を示す。

【0059】

10

MVA系ワクチンの長所は、それらの安全性プロフィール、さらには大規模なワクチン生産が可能なことを含む。前臨床試験は、MVA-BNが、他のMVA株と比較して優れた弱毒性および効能を示すことを明らかにした(WO 02/42480)。MVA-BN株のさらなる特性は、DNAプライムワクシニアウイルスブースト投与法と比較したとき、ワクシニアウイルスプライム／ワクシニアウイルスブースト投与法におけると実質的に同じレベルの免疫力を誘導する能力である。

【0060】

本明細書における最も好ましい実施形態である組み換えMVA-BNウイルスは、哺乳類細胞における独特な複製欠損および確立した無発病性の故に安全だと考えられる。さらには、その効能に加えて、産業規模の製造の実現可能性は有益である。さらには、MVA系ワクチンは、複数の異種抗原を輸送し、そして体液性および細胞性免疫力の同時誘導を可能にする。

20

【0061】

好ましい実施形態においては、組み換えウイルスを発生させるために使用するいずれの実施形態の組み換えMVAベクターは、鶏胚線維芽(CEF)細胞をインビトロで生殖的複製をする能力を有するMVA-BNウイルスまたは誘導体であるが、ヒトケラチン生成細胞細胞株HaCAT、ヒト骨肉腫細胞株143B、ヒト胚腎臓細胞株293、およびヒト頸腺がん細胞株HeLaにおいて生殖的複製をする能力は有しない。

【0062】

30

別の実施形態においては、組み換えウイルスを発生させるために使用するいずれの実施形態の組み換えMVAベクターも、歐州動物細胞培養コレクション(EACC)に受入番号V00083008として寄託されているMVA-BNである。

【0063】

本発明にとって有益なMVAベクターは、両者とも本明細書に参照することによって組み込まれているWO 02/042480およびWO 02/24224に記載されているような当該技術分野で周知の方法を使用して調製できる。

【0064】

別の態様においては、組み換えウイルスを発生させるのに適するMVAウイルス株は、MVA-572株、MVA-575株または同様に弱毒化したいずれのMVA株でありうる。さらに適するものは、欠失漿尿膜ワクシニアウイルスアンカラ(dCVA)のような突然変異体MVAでありうる。dCVAは、MVAゲノムのde1_I, de1_II, de1_III, de1_IV, de1_V, およびde1_VI欠失部位を含む。この部位は、複数の異種配列の挿入のために特に有益である。dCVAは、(ヒト293, 143B, およびMRC-5細胞株のような)ヒト細胞株において、(増幅比率が1.0を超えて)生殖的複製することができ、そして、このことがウイルス系ワクチン接種戦略のために有益なさらなる突然変異によって最適化することを可能にする(WO 2011/092029参照)。

40

【0065】

組み換えFPV

【0066】

50

1つの態様において、本発明は、フィロウイルスグリコプロテイン（G P）、特にエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組み換えF P Vを提供する。別の態様においては、本発明は、フィロウイルスグリコプロテイン、特にエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列、およびさらに別のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む組み換えF P Vを提供する。

【0067】

本発明によるF P Vは、アビポックスウイルス属中の原型種である。多数のF P V株が、説明され、例えば、C E V A L a b o r a t o r i e s , C y n a m i d W e b s t e r , F o r t D o d g e , I n t e r c o n t i n e n t a l L a b o r a t o r i e s , I n t e r v e t (N O B I L I S V A R I O L E) , M e r i a l (D I F T O S E C C T s t r a i n) , S c h e r i n g - P l o u g h , S e l e c t L a b o r a t o r i e s , S o l v a y , S y n t r o - Z e o n a n d V i n e l a n d L a b o r a t o r i e s から入手できる。F P 1は、生まれて1日の鶏にワクチンとして使用できるように改変したD u v e t t e株である。この株は、1980年10月に、0 D C E P 2 5 / C E P 6 7 / 2 3 0 9と命名された市販の鶏痘ウイルスワクチン株であり、I n s t i t u t e M e r i e u x , I n c . から入手できる。F P 5は、鶏胚由来の市販の鶏痘ウイルスワクチン株であり、米国ウィスコンシン州マディソンにあるA m e r i c a n S c i e n t i f i c L a b o r a t o r i e s (S c h e r i n g C o r p . の一部門)、獣医免許番号：165、連番：3 0 3 2 1から入手できる。オーストラリアのC y a n a m i d W e b s t e r s P t Y , L t d から入手できるF P V M(弱ワクチン株)およびF P V S(標準ワクチン株)のような鶏痘ウイルスの弱毒化した種々の株が知られている。米国農務省(U S D A)のチャレンジ株が、C . L . A f o n s o e t a l . , J . V i r o l . 7 4 (8) : 3 8 1 5 - 3 8 3 1 (2 0 0 0)、7 4 (8) : 3 8 1 5 - 3 8 3 1 (2 0 0 0)によってさらに説明されている。F P 9は、I A H H o u g h t o n L a b o r a t o r i e s (英国、セントーアイブス)のT o m e l e y 、B i n n s 、B o u r s n e l l およびB r o w n によって、1980年代の終わりに得られた、ワクチン目的に使用された鶏痘株である。それは、H P 1からの鶏胚胚線維芽細胞(C E F)培養中で、継代を4 3 8回行ったウイルスのブラーク精製から誘導された(A . M a y r & K . M a l i c k i (1 9 6 6)、Z e n t r a l b l V e t e r i n a r m e d (B) 1 3 : 1 - 1 3 、S k i n n e r e t a l . (2 0 0 5)、E x p e r t R e s . V a c c i n e s 4 (1) : 6 3 - 7 6)。他の弱毒化した株は、S . J e n k i n s e t a l . (1 9 9 1)、A i d s R e s e a r c h a n d H u m a n R e t r o v i r u s e s 7 (1 2) : 9 9 1 : 9 9 8 に記載されているようなP O X V A C - T C である。寄託され株は、例えば、鶏痘ウイルスA T C C (登録商標) V R - 2 2 9 (1928年以前にニュージャージー州の鶏のとさかからの典型的な鶏痘疥癬)、および鶏痘ウイルスA T C C (登録商標) V R - 2 5 0 (1950年ケンタッキー州の鶏)を包含する。

【0068】

別の態様においては、組み換えウイルスを発生させるのに適するF P Vウイルス株は、上記のいずれの株、またはいずれの類似のF P V株でもあります。別の態様においては、F P Vは、F P 1、F P 5、F P 9、F P V M、F P V S、A T C C (登録商標) V R - 2 2 9 、A T C C (登録商標) V R - 2 5 0 、U S D A株、およびP O X V A C - T Cの群から選択される。さらに別の実施形態においては、いずれの実施形態のF P Vも、弱毒化したF P Vである。

【0069】

F P Vの長所は、このウイルスが鳥類だけに疾患を引き起こすことであるが、ワクシニアウイルスとは免疫学的に非交差反応的であり、したがって天然痘を体験したヒトの既存の免疫力を免れることができる一方、哺乳類細胞に侵入し、導入遺伝子を発現することが

10

20

30

40

50

できる。

【0070】

組み換えFPVを発生させるために適する組み換えFPVベクターは、確立した方法で作成することができる。生きた弱毒化した鶏痘ウイルスは、鳥の細胞のウイルスを複数回継代して生成しうる。FPVベクターの調製は、例えば、Michael J. P. Lawman and Patricia D. Lawman (eds) *Cancer Vaccines: Method and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1139, Chapter 32 Paul M. Howley, Kerrilyn R. Diener and John D. Hayball p. 407 - 427に記載されている。ウイルス系ワクチン接種戦略に有益な組み換えFPVの生成は、EP 0 284 416 B1、WO 88/02022、WO 89/03429、WO 89/03879、WO 89/07644、WO 89/12684、WO 90/02191、WO 91/02072、WO 89/03879 および WO 94/019014にも記載されている。ゲノム配列およびゲノム組織は、Afonso et al. and Laidlaw and Skinner (C. L. Afonso et al. (2000), J. Virol. 74 (8): 3815 - 3831, S. M. Laidlaw and M. A. Skinner (2004), Journal of General Virology 85: 305 - 322) に記載されている。FPVの例示のゲノム配列は、GenBank 受入番号 AF198100.1に見出すことができる。

10

20

【0071】

抗原決定基

【0072】

抗原決定基という用語は、細胞性反応または体液性反応を問わず、抗原固有の免疫反応を引き起こすために宿主の免疫システムを刺激するいずれの分子を指す。抗原決定基は、宿主に免疫反応をいまだに引き起こすタンパク質、ポリペプチド、抗原性タンパク質断片、抗原およびエピトープを含み、そして 例えば、グリコシリ化されたタンパク質、ポリペプチド、抗原性タンパク質断片、抗原およびエピトープ、ならびにこのような分子をコードするヌクレオチド配列を含む抗原、タンパク質の相同体または変異体、ポリペプチド、および抗原タンパク質断片、抗原およびエピトープの一部を形成しうる。このように、タンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原とエピトープは、特定の天然ヌクレオチドまたはアミノ酸配列に限定されず、天然配列と同一の配列、さらには欠失、追加、挿入および置換のような天然配列に対する修飾を包含する。

30

【0073】

「エピトープ」という用語は、B細胞及び/またはT細胞が、単独または、例えば、主要な組織適合複合体(「MHC」)タンパク質またはT細胞受容体のような別のタンパク質と共に反応する抗原上の部位をいう。エピトープは、隣接アミノ酸、またタンパク質の第2または第3の少なくとも一方の折り畳みによって並列した非隣接アミノ酸の両者から形成されうる。隣接アミノ酸から形成されたアミノ酸は、変性溶媒に暴露されると典型的には保持されるが、第3の折り畳みによって形成されたエピトープは、変性溶媒で処理されると典型的には失われる。エピトープは、典型的には、少なくとも5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のアミノ酸を含むが、一般的には20個未満のアミノ酸を含み、それらは独特の空間的な構造を有する。エピトープの空間的な構造を決定する方法は、例えば、X線結晶構造解析および2次元核磁気共鳴を含む。例えば、Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)の「Epitope Mapping Protocols」を参照。

40

【0074】

好ましくは、相同体または変異体は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列のレベルにおいて、言及したタンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原およびエピトープと

50

、少なくとも約50%、少なくとも約60%または65%、少なくとも約70%または75%、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または89%、より典型的には、少なくとも約90%、91%、92%、93%、または94%そして、さらにより典型的には、少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%、最も典型的には、少なくとも約99%の同一性を有する。

【0075】

核酸とアミノ酸間の配列の同一性を決定する技術は、当該技術分野で周知である。2個またはそれ以上の配列が、それらの「同一性パーセント」を決定することで比較できる。核酸またはアミノ酸配列の2つの配列の同一性パーセントは、整列させた2個の配列間の完全な一致数を、より短い配列の長さで除したものに100を乗じた数である。

10

【0076】

本明細書に記載するタンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原およびエピトープに関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、配列同一性の一部として保存的置換置換を考慮しないで、配列を整列させ、最大の配列同一性パーセントを達成するために必要ならばギャップ導入した後の、基準配列(つまり、それがそこから誘導されたタンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原またはエピトープ)中のアミノ酸残留物と同一の候補配列中のアミノ酸残留物のパーセントとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のための整列は、例えば、BLAST、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトのような公開されているコンピューターソフトを使用するなど、当該技術分野の技術の範囲内の種々の方法で達成できる。当業者は、比較する配列の全長にわたり最大の整列を達成するために必要ないずれかのアルゴリズムを含む、整列を測定するための適切なパラメータを決定できる。

20

【0077】

同じことは、必要な変更を加えた上で、ヌクレオチド配列同一性パーセント(%)にも適用される。

【0078】

例えば、核酸配列の適切な整列は、Smith and Waterman, (1981), Advances in Applied Mathematics 2:482-489記載の局所相同アルゴリズムによって提供されている。このアルゴリズムは、Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structures, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, and normalized by Gribskov (1986), Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763が開発したスコアリングマトリックスを使用してアミノ酸配列に適用できる。Acids Res. 14(6):6745-6763。配列の同一性パーセントを決定するこのアルゴリズムの典型的な実施は、the Genetics Computer Group (Madison, Wis.)の「Best Fit」という実用新案によって提供されている。この方法のデフォルトパラメータは、Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (Genetics Computer Group, Madison, Wis. から入手可能)に説明されている。本発明の文脈における同一性パーセントを確立する好ましい方法は、(エディンバラ大学が著作権を有し、John F. CollinsおよびShane S. Sturrockが開発し、そしてIntelliGenetics, Inc. (カリフォルニア州、マウンテンビュー)が販売する) MPSRCH package of programsを使用することである。このパッケージ式から、デフォルトパラメータをスコアリングテーブル(例えば、ギャップオープニングペナルティー12、ギャップエキスタンションペナルティ1、およびギャップ6)のために使用する、Smith-Watermanアルゴリズムを用いることができる。生成したデータから、「一致」値が「配列同一性」

40

50

を反映する。同一性パーセントまたは配列間の類似性を計算するための他の適切なプログラムは、本技術分野において一般的に周知である。例えば、他の整列プログラムは、デフォルト・パラメータを使用するBLASTである。例えば、BLASTNおよびBLASTPが、次のデフォルト・パラメータをつかって使用できる。genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spp update + PIR。これらのプログラムの詳細は、次のインターネットアドレスで見つけることができる。http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST

【0079】

本明細書のいくつかの実施形態においては、異種核酸が、抗原タンパク質全体ではなく、抗原ドメインまたは抗原タンパク質断片をコードする。これらの断片は、抗原性または免疫原性を有するのに十分ないずれかの長さを有する。断片は、少なくとも8個のアミノ酸の長さ、好ましくは10-20個アミノ酸の長さだが、より長いこともありうる。例えば、少なくとも、50, 100, 200, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2000個のアミノ酸の長さ、またはこれらの間のいずれかの長さである。

【0080】

いくつかの実施形態においては、抗原タンパク質断片またはその免疫原性ポリペプチドをコードする少なくとも1個の核酸断片が、本発明のウイルス性ベクターの中に挿入される。別の実施形態においては、異なる抗原タンパク質をコードする約2-6個の異なる核酸が、1個またはそれ以上のこのウイルス性ベクターの中に挿入される。いくつかの実施形態においては、種々のタンパク質の免疫原性断片またはサブユニットを使用できる。例えば、単一のタンパク質の異なる部位から、または同じ株の異なるタンパク質から、または異なる株からのタンパク質相同分子種からのいくつかの異なるエピトープが、このベクターから発現されうる。

【0081】

定義

【0082】

本明細書で使用する場合、单数形「a」、「an」および「the」は、文脈上明らかに別の意味を示していない限り、複数形の意味を含むことに留意しなければならない。従って、例えば、「抗原決定基」に言及する場合は、1個またはそれ以上の抗原決定基を含み、「該方法」に言及する場合は、本明細書が記載する方法を修正または代替しうる、当業者に知られた同等のステップおよび方法への言及を含む。

【0083】

他に別の指示がない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、この一連の要素のすべての要素に言及するものと解する。当業者は、本明細書に記載されている発明の特定の実施形態のおおくの均等物を認識し、または単なる日常的な実験を用いるだけで確認できるであろう。このような均等物は、本発明に包含されるものとする。

【0084】

本明細書およびそれに続く特許請求の範囲を通じて、文脈上他に解されない限り、「comprise(含む)」という単語、ならびに「comprises(含む)」および「comprising(含む)」のような変形は、記載された完全体もしくはステップまたは完全体もしくはステップの群の包含を意味するが、他のいずれの完全体もしくはステップまたは完全体もしくはステップの群の除外は意味しないものと解する。本明細書で用いる場合、「comprising(含む)」という用語は、「containing(含む)」または「including(含む)」または、本明細書で用いる場合に、時に「having(有する)」という用語で置き換えることができる。前記の用語(co

10

20

30

40

50

m p r i s i n g (含む)、*c o n t a i n i n g* (含む)、*i n c l u d i n g* (含む)、*h a v i n g* (有する)) のいずれも、本明細書において、発明の態様または実施形態の文脈で用いる場合、「*c o n s i s t i n g o f* (から成る)」の用語で置き換えることができるが、あまり好ましくはない。

【 0 0 8 5 】

本明細書で用いる場合、「*c o n s i s t i n g o f* (から成る)」は、請求項の要素の中で特定されていないいはずれの要素、ステップ、または成分をも除外する。本明細書で用いる場合、「*c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f* (本質的に～から成る)」は、請求項の基本的かつ新規な特性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。

10

【 0 0 8 6 】

本明細書で用いる場合、複数の引用要素間の接続用語「および／または」個々のおよび複合の両者の選択肢を包含するものと解する。例えば、「および／または」によって2個の要素が結合する場合、第1の選択肢は、第2の要素なしで第1の要素を適用できることを指す。第2の選択肢は、第1の要素なしで第2の要素を適用できることを指す。第3の選択肢は、第1および第2の要素を合わせて適用できることを指す。これらの選択肢のいずれもが、この用語の意味の範囲に含まれ、したがって、本明細書で用いる「および／または」という用語の要件を満たすものと解する。これらの選択肢の2個以上の同時適用可能性、この用語の意味の範囲に含まれ、したがって、「および／または」という用語の要件を満たすものと解する。

20

【 0 0 8 7 】

この明細書の本文を通じて、いくつかの文献が引用されている。本明細書が以上または以下で引用する（すべての特許、特許出願、科学的出版物、製造者の仕様書、指示書等を含む）それぞれの文献は、その全体が参照することにより本明細書に組み込まれる。参照することによって組み込まれた内容がこの明細書と矛盾し、またはこの明細書と一貫性がない場合、本明細書がこのようないかなる内容にも優先するものとする。本明細書のいかなる開示も、本発明が先行発明を理由としてかかる開示に先行することはできないことを承認するものと解されてはならない。

【 0 0 8 8 】

本発明のフィロウイルス抗原タンパク質の文脈における「実質的に類似する」という用語は、ポリペプチドが、10～20個のアミノ酸の比較ウインドウにわたり、基準配列と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性のある配列を含むことを示す。配列同一性パーセントは、比較ウインドウにわたり、2個の最適に整列させた配列を比較して決定する。この場合、比較ウインドウのポリヌクレオチド配列の一部は、この2個の配列の最適な整列のための（追加または欠失を含まない）基準配列と比較した場合に、追加または欠失（つまりギャップ）を含みうる。このパーセントは、一致した位置の数を出すために同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列で起きる位置の数を決定し、その一致した位置の数を比較ウインドウの中の位置の数の合計で除し、その結果に100を乗じて配列同一性パーセントを算出する。

30

【 0 0 8 9 】

本明細書で用いる「サブタイプ」という用語は、「種」によって置き換えることができる。それは、マールブルグまたはエボラウイルスのようないはずれのフィロウイルスの株、分離株、分岐群または変異体を含む。「株」、「分岐群」、「分離株」という用語は、微生物の分類法に言及する専門家に周知の技術用語である。分類法のシステムは、これまでに特徴付けられたすべての微生物を、科、属、種、株の階層的順序に分類する（*F i e l d s V i r o l o g y , e d . b y F i e l d s B . N . , L i p p i n c o t t - R a v e n P u b l i s h e r s , 4 t h e d i t i o n 2 0 0 1*）。科のメンバーの基準はそれらの系統発生的関係であるが、属は共通の特性を共有するすべてのメンバーを含み、そして種は複製する系統を構成し、そして特定の生態的地位を占める多元的分類として定義される。「株」または「分岐群」という用語は、微生物、つまり基本的な

40

50

形態またはゲノム構造および組織のような共通の特性を共有するが、宿主範囲、組織親和性、地理的分布、弱毒性または病原性のような生物学的特性において異なるウイルスを表す。例えば、5個のエボラウイルスのサブタイプが知られている。それらは、ザイールエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、レストンエボラウイルス、ブンディブギヨエボラウイルスおよびアイボリーコーストエボラウイルスである。ザイールエボラウイルス株は、例えば、ザイールメイインガ、ザイールキクウィト、ザイールガボン(1994)、ザイールガボン(1996年2月)、ザイールガボン(1996年10月)である。マールブルグウイルスのサブタイプまたは種はたった1個しかない。つまり、マールブルグムソケおよびマールブルグアンゴラを含む株としてこれまで知られていたビクトリア湖マールブルグウイルスである。さらなる株または分離株については、図1も参照。

10

【0090】

「T C I D₅₀」という用語は、「組織培養感染性投与量」の略であり、接種された細胞培養の50%に病理学的变化を発生させる病原性物質の量であって、T C I D₅₀/mLとして表現される。T C I D₅₀を決定する方法は当業者に周知である。それは、例えば、WO 03/053463の実施例2に記載されている。

【0091】

本明細書で用いられる「対象」という用語は、例えば、ヒト、非ヒト哺乳動物および(非ヒト)靈長類を含む、生きている多細胞脊椎動物有機体である。本明細書においては、「対象」という用語は、「動物」という用語と同義に用いられる。

【0092】

任意の実施形態において言及される「フィロウイルスに起因する疾患」という用語は、本明細書に記載される任意のフィロウイルスの株、分離株または変異体、または(以上または以下の任意の場所において、および/または以上または以下の任意の実施形態において記載された)いずれのフィロウイルスの株、分離株または変異体の組み合わせの感染に起因するいずれの疾患でもありうる。

20

【0093】

本明細書で用いられる「強化された」という用語は、(例えば、抗原固有の抗体反応またはZEBOV-GP固有の抗体反応を中和する)抗体反応、サイトカイン反応またはCD8 T細胞反応(例えば、免疫優勢CD8 T細胞反応)のような、フィロウイルスに対する免疫反応に関して用いられる場合、MVAベクター(MVAベクターはフィロウイルスピリオンタンパク質40をまったく発現しない)の同種のプライム・ブースト混合ワクチンを投与した動物から観察される対応する免疫と比較した、MVAの同種のプライム・ブースト混合ワクチンを投与した動物における免疫反応の増加を指すか、または、本発明によるMVA(MVAベクターはフィロウイルスピリオンタンパク質40をまったく発現しない)およびFPVベクターの異種のプライム・ブースト混合ワクチンを投与した動物から観察される対応する免疫反応と比較した、本発明によるMVAおよびFPVベクターの異種のプライム・ブースト混合ワクチンを投与した動物における免疫反応の増加を指す。好ましくは、「強化された」という用語は、例えば、中和抗体反応のような抗体反応、サイトカイン反応またはCD8 T細胞反応等の免疫反応に関して用いられる場合、同じプライム・ブーストのインターバルを用いて、FPVベクターはプライムとして提供され、MVAベクターは免疫反応をブーストするために提供される、逆のプライム・ブースト混合ワクチンを投与した動物から観察される対応する免疫反応と比較した、本発明による、プライムとしてのMVAおよびブーストとしてのFPVベクターの異種のプライム・ブースト混合ワクチンを投与した動物における免疫反応の増加を指す。

30

【0094】

本発明の文脈において、「免疫優勢CD8 T細胞反応」とは、MVAおよび/またはFPVベクターによってコードされた組み換え抗原に対する宿主の主要なCD8 T細胞反応を意味する。したがって、組み換えMVAの同種プライム・ブースト、または組み換えMVAおよびFPVの異種のプライム・ブーストによってコードされた組み換え抗原に対する免疫優勢CD8 T細胞反応は、この組み換えMVAまたはFPVのいずれの組み

40

50

換え抗原に対する C D 8 T 細胞反応よりも大きく発生させることができる。この場合、この M V A ベクターは、フィロウイルスビリオンタンパク質 4 0 をまったく発現しない。

【 0 0 9 5 】

C D 8 T 細胞反応のレベルは、 E L I S P O T アッセイ（例えば、インターフェロン-ガンマ (I F N -) E L I S P O T ）のような、しかしこれに限定されない、本技術分野で周知に方法によって決定できる。手順は、例えば、 C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y (J o h n W i l e y & S o n , I n c . (1 9 9 4) (例えは、 C h a p t e r 6 , S e c t i o n 1 9 : E L I S P O T A s s a y t o D e t e c t C y t o k i n e - s e c r e t i n g M u r i n e a n d H u m a n C e l l s , S u p p l e m e n t 1 0) 、 または、 S c h n e i d e r , et al . , N a t . M e d . 4 : 3 9 7 - 4 0 2 (1 9 9 8)) 、および、例えは、本発明の特定のウイルスについては実施例に記載の技術によって説明されている。他の適切なアッセイは、 C D 8 T 細胞活性のための細胞内サイトカインのレベルを分析する I C S アッセイを含む。例えは、この C D 8 T 細胞反応は、動物の対象に抗原固有の T 細胞反応全体の 5 1 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % または 1 0 0 % のような 5 0 % を超える抗原固有の C D 8 T 細胞反応を含みうる。好ましくは、 C D 8 T 細胞反応は、さらに、この動物の対象におけるサイトカイン反応全体の 0 . 1 % 、 0 . 2 % 、 0 . 3 % 、 0 . 4 % 、 0 . 5 % 、 またはそれ以上といった、その 0 . 1 % またはそれ以上を示す。いくつかの実施形態においては、第 2 回または第 3 回のブーストの後、本発明による組み換えウイルスベクターは、 C D 8 T 細胞コンパートメント全体の少なくとも 0 . 5 % 、 1 % 、 5 % 、 1 0 % 、 1 5 % 、 2 0 % 、 2 5 % 、 または 3 0 % であるコードされた抗原に対する C D 8 T 細胞反応を宿主に誘導する。

【 0 0 9 6 】

抗体反応のレベルは、本技術分野で知られた方法によって決定できる。任意の適するブラーク減少中和滴定量 (P R N T) アッセイを、ポリペプチド（または、このようなポリペプチドを発現しているポリヌクレオチド）が、 1 個またはそれ以上のフィロウイルスサブタイプの 1 個またはそれ以上のフィロウイルス抗原に対して 1 個またはそれ以上の中和抗体を誘導するか否かを決定するために使用することができる。フィロウイルスに対する典型的なブラーク減少中和滴定量アッセイが、実施例に記載されている。他の P R N T 方法および形式は当業者に周知である。

【 0 0 9 7 】

フィロウイルスタンパク質

【 0 0 9 8 】

本明細書で交互に用いられているように、「グリコプロテイン遺伝子」または「 G P 遺伝子」という用語は、任意のフィロウイルス株または分離株において、グリコプロテイン、特に膜透過エンベロープグリコプロテインをコードする遺伝子、またはこの遺伝子の相同体または変異体を指すが、このグリコプロテイン遺伝子の正確な配列および／または遺伝子位置は、株または分離株間で異なりうる。例えは、 S E B O V のマレオ株 (S E B O V - マレオ) では、グリコプロテイン遺伝子 (G P - S E B O V - マレオ遺伝子) は、 G e n B a n k 受入番号 U 2 3 0 6 9 . 1 で付番されているところに従い、ヌクレオチド 1 2 0 ~ 1 0 0 4 および 1 0 0 4 ~ 2 1 4 9 (終点を含む) を含む。 E B O V 転写産物は、いくつかのヌクレオチドが 2 回読まれるように、転写の間に編集を受ける。 G P - S E B O V - マレオ遺伝子は、さらに、 G e n B a n k 受入番号 U 2 3 0 6 9 . 1 で付番されているところに従い、ヌクレオチド 1 2 0 ~ 1 0 0 4 および 1 0 0 4 ~ 2 1 4 9 (終点を含む) に広がるオープナーリーディングフレーム (O R F) をコードするタンパク質を含む。 G P - S E B O V - マレオ遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号 1 (G e n B a n k 受入番号 U 2 3 0 6 9 . 1) に記載されている。

【 0 0 9 9 】

本明細書で用いられる場合には、「相同体」または「変異体」は、好ましくは、参照した遺伝子、タンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原およびエピトープと、

10

20

30

40

50

少なくとも約50%、少なくとも約60%または65%、少なくとも約70%または75%、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または89%、より典型的には、少なくとも約90%、91%、92%、93%、または94%そして、さらにより典型的には、少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%、最も典型的には、少なくとも約99%のヌクレオチド配列同一性を有する。「相同体」または「変異体」という用語は、さらに、それぞれ遺伝子およびタンパク質の欠失した、切断された、その他突然変異した型を包含する。例として、例えば、シグナル-ペプチド、さらには完全長G P - E B O V またはG P - M A R V タンパク質の膜透過および/または細胞質ドメインを欠くG P - E B O V またはG P - M A R V タンパク質の可溶性形態が包含される。

10

【0100】

本明細書で交互に用いられる、「グリコプロテイン」または「G P」という用語は、グリコプロテイン、特に膜透過エンベロープグリコプロテイン、またはグリコプロテインの相同体または変異体を指す。

【0101】

G P - E B O V - マレオのアミノ酸配列が、配列番号2(GenBank受入番号U23069.1)のアミノ酸配列)に記載されている。G P - S E B O V - マレオタンパク質は、シグナル-ペプチド、細胞外ドメイン、膜透過ドメイン、および細胞質ドメインを含む(例えば、UniProtKB/Swiss-Prot受入番号Q66798参照)。G P - S E B O V - マレオタンパク質のシグナル-ペプチドは配列番号2のアミノ酸1~32から成り、G P - S E B O V - マレオタンパク質の細胞外ドメインは配列番号2のアミノ酸33~650または配列番号2のアミノ酸1~650から成り、G P - S E B O V - マレオタンパク質の膜透過ドメインは配列番号2のアミノ酸651~671から成り、そしてG P - S E B O V - マレオタンパク質の細胞質ドメインは配列番号2のアミノ酸672~676から成る。

20

【0102】

G P - Z E B O V - メイインガのアミノ酸配列をコードする核酸は、配列番号19に記載されている。G P - Z E B O V - メイインガは、配列番号20(GenBank受入番号ABX75367.1)に記載されているタンパク質を含む。

30

【0103】

同様に、本明細書で同義に用いられる、「グリコプロテイン遺伝子」または「N P 遺伝子」という用語は、いずれのフィロウイルス株または分離株において、核タンパク質をコードする遺伝子、またはこの遺伝子の相同体または変異体を指すが、この核タンパク質遺伝子の正確な配列および/または遺伝子位置も、株または分離株間で異なりうる。例えば、S E B O V のボニフェス株(S E B O V - ボニフェス)では、核タンパク質遺伝子(N P - S E B O V - ボニフェス遺伝子)は、GenBank受入番号AF173836.1で付番されているところに従い、ヌクレオチド383~2599(終点を含む)を含む。N P - S E B O V - ボニフェス遺伝子は、さらに、GenBank受入番号AF173836.1で付番されているところに従い、ヌクレオチド383~2599(終点を含む)に渡るオーブン-リーディング-フレーム(O R F)をコードするタンパク質を含む。このN P - S E B O V - ボニフェス遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号3(GenBank受入番号AF173836.1)に記載されている。

40

【0104】

N P - E B O V - ボニフェスのアミノ酸配列が、配列番号4(GenBank受入番号AF173836.1のアミノ酸配列)に記載されている。N P - S E B O V - ボニフェスタンパク質は、コイルされたコイル-ドメインを含む(例えば、UniProtKB/Swiss-Prot受入番号Q9QP77参照)。N P - S E B O V - ボニフェスタンパク質のコイルされたコイル-ドメインは、配列番号4のアミノ酸334~363から成る。

【0105】

50

ある特定の実施形態においては、抗原決定基をコードする核酸、好ましくは抗原タンパク質、より好ましくは上記または下記のいずれのタンパク質は、完全長タンパク質である。

【0106】

組み換えMVAおよびFPV

【0107】

本明細書に記載されているのは、ポックスウイルス（例えば、MVAまたはMVA-BNまたはFPV）ゲノムの種々の挿入部位に組み込まれたEBOVおよび/またはMARVに由来する異種または異質の核酸配列を含む組み換えポックスウイルス（例えば、MVAまたはMVA-BNまたはFPV）である。この異種の核酸は、例えば、ウイルス抗原を含む、1個またはそれ以上の異質のタンパク質および/または異質の抗原をコードしうる。

10

【0108】

一般的に、本明細書に記載される「組み換え」MVAまたはFPVは、標準的な遺伝子工学的方法、つまり本発明のMVAまたはFPVによって生成され、したがって遺伝子操作され、または遺伝子改変されたMVAまたはFPVであるMVAまたはFPVをいう。したがって、「組み換えMVAまたはFPV」という用語は、組み換え核酸を安定的にそれらのゲノムに、好ましくは転写単位の形態で、組み込まれたMVA / FPVを含む。転写単位は、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターおよび/またはサイレンサーを含みうる。本発明の組み換えMVA / FPVは、調節要素の誘導の際に、異種抗原決定基、ポリペプチドまたはタンパク質（抗原）を発現しうる。本発明の任意の実施形態の文脈における「MVA / FPV」という用語は、MVA、FPV、またはMVAおよびFPVの個々の、または複合の選択肢の両者を包含する。

20

【0109】

本明細書で用いられる場合、「異種の」遺伝子、核酸、抗原またはタンパク質は、野生型ポックスウイルスゲノム（例えば、MVAまたはMVA-BNまたはFPV）中に存在しない核酸またはアミノ酸配列であると解される。当業者は、「異種遺伝子」は、MVAまたはMVA-BNまたはFPVのようなポックスウイルス中に存在する場合、組み換えポックスウイルスを宿主細胞に投与した後に、それが、対応する異種遺伝子生産物として、つまり「異種抗原」および/または「異種タンパク質」として発現するように、このポックスウイルスゲノムの中へ組み込まれるべきことを理解している。発現は、通常、異種遺伝子を、ポックスウイルスに感染している細胞の中で発現することを可能にする調節要素に操作して結合することによって達成する。好ましくは、この調節要素は、天然または合成ポックスウイルスプロモーターを含む。

30

【0110】

1つの態様においては、本発明の組み換えMVA / FPVベクターは、エボラウイルス（EBOV）および/またはマールブルグウイルス（MARV）から選択されるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。別の実施形態においては、本発明の組み換えMVA / FPVベクターは、ザイールエボラウイルス（ZEBOV）、スードンエボラウイルス（SEBOV）、コートジボワールエボラウイルス（EBOV-CdI、またはタイフォレストウイルスまたはTAFVとも呼ばれる）、レストンエボラウイルス（REBOV）およびブンディブギョエボラウイルス（BEBOV）からなる群から選択される1個またはそれ以上のEBOV-サブタイプから選択されるフィロウイルスタンパク質（例えば、EBOVタンパク質）の1個またはそれ以上の抗原決定基の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

40

【0111】

別の実施形態によれば、本発明の組み換えMVA / FPVベクターは、ザイールメイインガ、ザイールキクウィト、ザイールガボン、コートジボワールエボラウイルス、スードンボニフェス、スードンマレオ、スードングル、マールブルグラブン、マールブルグオゾリン、マールブルグラタイチャク、マールブルグムソケ、マールブルグアンゴラの群から

50

選択されるフィロウイルスタンパク質、好ましくは E B O V タンパク質、M A R V タンパク質またはこれらの完全長タンパク質の 1 個またはそれ以上の抗原決定基を含む。

【 0 1 1 2 】

好ましくは、（例えば、ザイールメイインガ、ザイールキクウィト、ザイールガボン、コートジボワールエボラウイルス、スーダンボニフェス、スーダンマレオ、スーダングル、マールブルグラブン、マールブルグオゾリン、マールブルグラタイチャク、マールブルグムソケ、マールブルグアンゴラの群から選択される）このフィロウイルスタンパク質の抗原決定基は、エンベロープグリコプロテイン（G P）、核タンパク質（N P）、ビリオンタンパク質 35（V P 35）、ビリオンタンパク質 40（V P 40）、ビリオンタンパク質 30（V P 30）、ビリオンタンパク質 24（V P 24）、および RNA 依存性 R N A ポリメラーゼタンパク質（L）からなる群から選択される。10

【 0 1 1 3 】

別の実施形態においては、このフィロウイルスタンパク質の抗原決定基は、エンベロープグリコプロテイン（G P）、好ましくは、少なくともエンベロープグリコプロテイン（G P）およびビリオンタンパク質 40（V P 40）である。

【 0 1 1 4 】

別の実施形態においては、このフィロウイルスタンパク質の抗原決定基は、Z E V O V および S E B O V、好ましくは、少なくともエンベロープグリコプロテイン（G P）およびビリオンタンパク質 40（V P 40）の群から選択されるエンベロープグリコプロテイン（G P）であり、G P および V P 40 は同じ株に由来し、好ましくは、この同じ株は Z E B O V および S E B O V の群から選択される。20

【 0 1 1 5 】

別の実施形態においては、このフィロウイルスタンパク質の抗原決定基は、少なくともエンベロープグリコプロテイン（G P）およびビリオンタンパク質 40（V P 40）であり、G P および V P 40 は異なる分離株または同じ分離株に由来する。好ましくは、この異なる、または同じ分離株は、ザイールメイインガ、ザイールキクウィト、ザイールガボン、コートジボワールエボラウイルス、スーダンボニフェス、スーダンマレオ、スーダングル、マールブルグラブン、マールブルグオゾリン、マールブルグラタイチャク、マールブルグムソケおよびマールブルグアンゴラの群から選択され、好ましくは、この分離株は、ザイールメイインガ、スーダングル、マールブルグムソケおよびマールブルグアンゴラの群から選択され、最も好ましくは、この分離株は、ザイールメイインガ、スーダングル、およびマールブルグムソケの群から選択される。別の好ましい実施形態においては、本発明の組み換え M V A / F P V ベクターは、2 個、3 個、4 個またはそれ以上のエボラおよび / またはマールブルグ - サブタイプの抗原決定基をコードするスクレオチド配列を含む。30

【 0 1 1 6 】

別の好ましい実施形態は、本発明いずれかの実施形態の組み換え M V A / F P V ベクターを対象にし、このベクターは、エンベロープグリコプロテイン（G P）、核タンパク質（N P）、ビリオンタンパク質 35（V P 35）、ビリオンタンパク質 40（V P 40）、ビリオンタンパク質 30（V P 30）、ビリオンタンパク質 24（V P 24）、および RNA 依存性 R N A ポリメラーゼタンパク質（L）からなる群から選択される 2 個、3 個、4 個またはそれ以上のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基を含む。40

【 0 1 1 7 】

好ましい実施形態においては、本発明の任意の実施形態の組み換え M V A / F P V ベクターは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 20、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 34 および配列番号 37 からなる群から選択される 1 個、2 個、3 個、4 個またはそれ以上のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基を含む。

【 0 1 1 8 】

好ましい実施形態においては、本発明の任意の実施形態の組み換え M V A / F P V ベクターは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 20、配列番号 29、配列番号50

31、配列番号34および配列番号37からなる群から選択されるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基を含む。

【0119】

別の実施形態においては、本発明の任意の実施形態の組み換えMVA/FPVベクターは、配列番号20からなるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基を含む。

【0120】

別の実施形態においては、本発明の任意の実施形態の組み換えMVA/FPVベクターは、配列番号20および配列番号34からなる群から選択されるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基を含む。

【0121】

別の実施形態においては、本発明の任意の実施形態の組み換えMVA/FPVベクターは、配列番号6、配列番号20、配列番号31および配列番号34からなる群から選択されるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基を含む。

【0122】

別の実施形態においては、本発明の任意の実施形態の組み換えMVA/FPVベクターは、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31および配列番号34からなる群から選択されるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基を含む。

【0123】

別の好ましい実施形態においては、本発明の任意の実施形態の組み換えMVA/FPVベクターは、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37からなる群から選択されるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基を含む。

【0124】

別の好ましい実施形態においては、本発明の任意の実施形態のMVAベクターは、配列番号29および/または配列番号6、配列番号20、配列番号31からなるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

【0125】

別の好ましい実施形態においては、本発明の任意の実施形態のMVAベクターは、配列番号28および/または配列番号5、配列番号19、配列番号30を含むヌクレオチド配列を含む。

【0126】

別の好ましい実施形態においては、本発明の任意の実施形態のMVAベクターは、配列番号33を含むフィロウイルスビリオンタンパク質40(VP40)の抗原タンパク質をコードするヌクレオチド配列、または配列番号34を含むタンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0127】

別の好ましい実施形態においては、本発明の任意の実施形態の組み換えMVAベクターは、(a)配列番号5、配列番号19および配列番号30、(b)配列番号5、配列番号19、配列番号28および配列番号30、ならびに(c)配列番号19および配列番号33からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0128】

別の態様において、本発明は、フィロウイルスグリコプロテイン、特にフィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む組み換えMVAベクターまたはFPVベクターを含む。

【0129】

フィロウイルスグリコプロテインは、GP-MARVまたはGP-EBOVをコードする。

【0130】

本明細書が記載する実施形態のために、MARVのグリコプロテインを、MARV-ムソケ、好ましくは完全長MARV-ムソケから誘導でき、MARV-ムソケはピクトリア

10

20

30

40

50

湖株またはM A R V - ムソケの分離株から誘導できる。G P - M A R V が、M A R V - ラブン M A R V - オゾリン、M A R V - ラタイチャクまたはM A R V - アンゴラからも誘導できる。完全長G P - M A R V - ムソケをコードするヌクレオチド配列が、配列番号6のアミノ酸1 - 6 8 1または1 9 - 6 8 1をコードする配列番号5に示されている。好ましい実施形態においては、G P - M A R V - ムソケは、好ましくは配列番号6のタンパク質をコードする配列番号5のヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態においては、G P - M A R V - ムソケは切断されており、切断G P - M A R V - ムソケは配列番号6のアミノ酸1 - 6 4 8またはアミノ酸1 9 - 6 4 8 (G e n B a n k 受入番号A B A 8 7 1 2 7 . 1)を含むエンベロープグリコプロテインの細胞外ドメインのみを含みうる。本明細書に記載される別の実施形態においては、M A R V のグリコプロテインは、M A R V - アンゴラ、好ましくは完全長G P - M A R V - アンゴラから誘導できる。好ましい実施形態においては、G P - M A R V - アンゴラは、配列番号3 7のアミノ酸をコードする配列番号3 6のヌクレオチド配列を含む。

【 0 1 3 1 】

E B O V のグリコプロテインは、G P - S E B O V であるか、またはG P - Z E B O V 、特にG P - Z E B O V のメイインガ株 (G P - Z E B O V - メイインガ) から誘導できる。完全長G P - Z E B O V - メイインガは、配列番号2 0のアミノ酸配列をコードする配列番号1 9のヌクレオチド配列を含む。好ましい実施形態においては、G P - Z E B O V - メイインガは、配列番号2 0のタンパク質を好ましくコードする配列番号1 9のヌクレオチド配列を含む。G P - E B O V は、G P - B E B O V 、G P - E B O V - C d I またはG P - E B O V - レストンでもありうる。G P - Z E B O V は、切断されていることがあり、そして配列番号2 0のアミノ酸1 ~ 6 3 6をコードするために改変した、または配列番号2 0のアミノ酸3 1 4 ~ 4 6 4に渡るムチンドメインを欠失するために改変した配列番号1 9のヌクレオチド配列を含みうる。

【 0 1 3 2 】

G P - S E B O V は、G P - S E B O V のグル株 (G P - S E B O V - グル) から誘導しうる。本発明のある特定の実施形態においては、G P - S E B O V は、配列番号3 1のアミノ酸配列を好ましくコードする配列番号3 0のヌクレオチド配列を含む。

【 0 1 3 3 】

本発明による組み換えM V A / F P V は、さらに、破傷風トキソイド断片C配列も含みうる。好ましい実施形態においては、G P - M A R V - ムソケ、特に完全長M A R V - ムソケ - G P は、さらに破傷風トキソイド断片Cを含む。破傷風トキソイド断片Cは、配列番号8のアミノ酸配列をコードする配列番号7のヌクレオチド配列を含みうる。ある特定の実施形態においては、切断G P - M A R V - ムソケは、さらに、配列番号8のアミノ酸配列のアミノ酸7 6 0 ~ 1 2 1 3をコードする配列番号7のヌクレオチド配列のヌクレオチド2 2 8 1 ~ 3 6 4 2を含みうる破傷風トキソイド断片C (T C C) を含む。

【 0 1 3 4 】

本発明の組み換えM V A / F P V ベクターは、免疫刺激または共刺激分子をさらに含みうる。好ましい実施形態においては、G P - M A R V - ムソケの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列は、さらに1個またはそれ以上の免疫刺激分子を含む。ある特定の実施形態においては、この1個またはそれ以上の免疫刺激分子は、配列番号1 0のアミノ酸配列をコードする配列番号9を含みうるヒトC D 4 0配位子 (h C D 4 0 L) である。ある特定の実施形態においては、1個またはそれ以上のこの免疫刺激分子は、配列番号1 2のアミノ酸配列をコードする配列番号1 1を含みうるヒトイントロイキン - 1 5受容体 (h I L 1 5 R - スシ) のスシドメインを含む融合タンパク質である。

【 0 1 3 5 】

1個またはそれ以上の免疫刺激分子は、共刺激分子の三つ組み (つまり、T R I C O M) として集合的に知られる、リンパ球機能関連抗原3 (L F A - 3 , またはC D 5 8) 、細胞間接着分子1 (I C A M - 1 , またはC D 5 4) およびB 7 . 1 (C D 8 0) であります。本明細書で用いられる「 T R I C O M 」は、抗原固有の免疫反応を増加させるため

に特定の抗原を発現している組み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）に含まれる、（CD80としても知られている）B7-1、細胞内接着分子-1（CD54としても知られているICAM-1）およびリンパ球機能関連抗原-3（CD58としても知られているLFA-3）から成るTriad of Costimulatory Moleculesの省略である。TRICOMの個々の成分は、同じまたは異なるプロモーターの制御の下にあることができ、そして特定の抗原をもった同じベクターに、または別のベクターに提供することができる。典型的なベクターは、例えば、Hodge et al., "A Triad of Costimulatory Molecules Synergize to Amplify T-Cell Activation," Cancer Res. 59: 5800-5807 (1999) および U.S. Patent No. 7,211,432 B2 に開示されており、両者は参考することにより本明細書に組み込まれている。LFA-3は、配列番号14のアミノ酸配列をコードする配列番号13のヌクレオチド配列を含むことができ、ICAM-1は、配列番号16のアミノ酸配列をコードする配列番号15のヌクレオチド配列を含むことができ、そしてB7.1は、配列番号18のアミノ酸配列をコードする配列番号17のヌクレオチド配列を含むことができる。
10

【0136】

本発明の組み換えMVA/FPVは、配列番号22のアミノ酸配列をコードする配列番号21のヌクレオチド配列を含むワクシニアウイルス遺伝子B5mのような膜アンカー配列をさらに含むこともできる。特に、本明細書に記載された抗原決定基は、このB5mのような膜アンカーに好ましく動作可能に結合することができる。したがって、組み換えMVA/FPVが膜アンカー配列を含むものと本明細書でいう場合、組み換えMVA/FPVが含む抗原決定基が、膜アンカーに好ましく動作可能に結合することを意味する。膜アンカーは、細胞膜の外側の表面に異種ポリペプチドを固定することができるいずれのポリペプチドを指す。好ましくは、膜アンカーは、本明細書で「B5Rアンカー」または「B5m」と名付けた、ワクシニアウイルスB5Rタンパク質の細胞質および膜透過ドメインを含む。定義したように、B5Rアンカーは、例えば、WR株のような任意のタイプのワクシニアウイルスからのB5Rタンパク質の42アミノ酸のC-末端断片（(Katz et al. J Virol. 71(4): 3178-87 (1997))、または、より好ましくはMVAを指す。さらには、参照B5Rアンカー配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%のような、例えば少なくとも90%、または少なくとも95%、少なくとも98%のような配列同一性を有するB5Rアンカー変異体も、本発明に含まれる。好ましいアンカー配列が、配列番号21に示され、その翻訳生産物も配列番号22に示されている。
20
30

【0137】

好ましい実施形態においては、完全長および／または切断GP-ZEBOVは、さらにワクシニアウイルス遺伝子B5mを含む。

【0138】

別の態様において、本発明は、上記のような、フィロウイルスグリコプロテインの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む組み換えMVA/FPVベクターを含み、さらにウイルス様粒子（VLP）を形成するのに必要な追加のフィロウイルスタンパク質をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。1つの実施形態においては、このVLPを形成するのに必要なフィロウイルスタンパク質をコードする追加の異種ヌクレオチド配列は、VP40でありうる。ある特定の実施形態においては、ウイルス様粒子を形成し、またはVLPの形成を増進するために必要な追加のフィロウイルスタンパク質は、NP-EBOVおよびVP40-EBOVであり、これらのタンパク質は、上に示したような株から誘導することができる。好ましくは、フィロウイルス核タンパク質（例えば、NP-EBOV）およびフィロウイルスピリオンタンパク質40（例えば、VP40-EBOV）は、同じフィロウイルス株から誘導される。GPおよびVP40（追加で、またはNPの発現なしで）を発現している、さらには感染している細胞からGPを含むEBOV-VL
40
50

Pを発生させることができる、組み換えMVAを用いて非ヒト靈長類にワクチン接種することによって、本発明者は、非ヒト靈長類にフィロウイルスの攻撃に対する防御を実現することができた。ワクチン接種をした動物にウイルス様粒子を生成することは、真正なフィロウイルス感染に存在するウイルス粒子を綿密に模倣する追加のワクチンモダリティを作る。そのような組み換えMVAフィロVLPワクチン接種は、体液性および細胞性免疫反応の両者を刺激し、したがってフィロウイルスの攻撃を防御した。フィロウイルスVLPを提供する弱毒化したMVAウイルスを用いたワクチン接種のさらなる長所は、接種のためのウイルス様粒子の精製、および追加のMVAを介した免疫刺激の必要を回避することである。同じ株から誘導したフィロウイルス核タンパク質（例えば、NP-EBOV）およびフィロウイルスピリオンタンパク質40（例えば、VP40-EBOV）の使用は、VLPの形成を増進するするために、好ましくは、綿密にウイルス粒子を模倣して、フィロウイルス感染に対する防御を改善するために、均一の半径をもった同種GPsパイク修飾VLPを発生させるために有利である。
10

【0139】

本発明は、フィロウイルスグリコプロテインの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列、およびさらに別のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む組み換えMVA/FPVベクターにも関する。さらなるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、核タンパク質（NP）、ビリオンタンパク質35（VP35）、ビリオンタンパク質40（VP40）、ビリオンタンパク質30（VP30）、ビリオンタンパク質24（VP24）、およびRNA依存性RNAポリメラーゼタンパク質（L）からなる群から選択される1個またはそれ以上のフィロウイルスタンパク質をコードしうる。前記遺伝子およびタンパク質のそれぞれは、上記した1個またはそれ以上のフィロウイルス株から得ることができる。ある特定の実施形態のNP-EBOV-CdIは、配列番号29のアミノ酸配列をコードする配列番号28のヌクレオチド配列を含む。
20

【0140】

ある特定の実施形態においては、VP40はMARVまたはEBOVから選択され、好ましくは、VP40はザイールエボラウイルス（ZEBOV）、スーダンエボラウイルス（SEBOV）、コートジボワールエボラウイルス（EBOV-CdI、またはタイフォレストウイルスまたはTAFVとも呼ばれる）、レストンエボラウイルス（EBOV-レストン）およびブンディブギョエボラウイルス（BEBOV）からなる群から選択される1個またはそれ以上のEBOV-サブタイプから選択される。好ましい実施形態においては、VP40は、ZEBOV、SEBOVおよびMARVの1個またはそれ以上から選択される。ある特定の実施形態においては、フィロウイルスグリコプロテインおよびフィロウイルスVP40は、同じフィロウイルス株から選択される。さらに好ましい実施形態においては、VP40および/またはフィロウイルスグリコプロテインは、ザイールメイインガ、ザイールキクウィト、ザイールガボン、コートジボワールエボラウイルス、スー
30
ダンボニフェス、スーダンマレオ、スーダングル、マールブルグラブン、マールブルグオゾリン、マールブルグラターチャク、マールブルグムソケおよびマールブルグアンゴラの1個またはそれ以上から選択され、より好ましくは、ザイールメイインガ（VP40-ZEBOV-メイインガ）、スー
40
ダングル（VP40-SEBOV-グル）、マールブルグムソケ（VP40-MARV-ムソケ）およびマールブルグアンゴラ（VP40-MARV-アンゴラ）の1個またはそれ以上から選択される。さらなる実施形態においては、任意の実施形態のMVAベクターは、さらに、フィロウイルス核タンパク質（NP）を含み、好ましくは、このフィロウイルス核タンパク質およびフィロウイルスVP40は同じフィロウイルス株から誘導される。さらなる実施形態においては、VP40は、VP40-ZEBOV-メイインガまたはVP40-MARV-ムソケをコードする核酸配列を含む。別の実施形態においては、フィロウイルスVP40は、配列番号33のヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態においては、VP40は、配列番号34のタンパク質配列をコードする核酸を含む。さらに好ましい実施形態においては、VP40は、配列番号3
50

4のアミノ酸配列をコードする配列番号33のヌクレオチド配列を含む。

【0141】

さらに好ましい実施形態においては、この組み換えMVA/FPVベクターは、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする2個の異種ヌクレオチド配列、およびさらに別のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1個の異種ヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態においては、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする第1の異種ヌクレオチド配列がGP-MARVをコードし、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする第2の異種ヌクレオチド配列がGP-EBOVをコードする。本発明によるさらに好ましい実施形態においては、組み換えMVA/FPVベクターは、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする3個の異種ヌクレオチド配列、およびさらに別のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1個の異種ヌクレオチド配列を含む。好ましくは、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする第1の異種ヌクレオチド配列がGP-MARVをコードし、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする第2の異種ヌクレオチド配列がGP-EBOVをコードし、そしてフィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする第3の異種ヌクレオチド配列が、第2の異種ヌクレオチド配列によってコードされたGP-EBOVとは異なる、EBOV株または分離株から誘導したGP-EBOVをコードする。したがって、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする1個の異種ヌクレオチド配列は、GP-SEBOV-グルおよび他の1個のGP-ZEBOV-メイインガをコードしうる。10

【0142】

別の実施形態においては、組み換えMVA/FPVベクターは、EBOV株または分離株からのGP-EBOVの抗原決定基をコードする2個の異種ヌクレオチド配列、およびMARV株または分離株からのGP-MARVの抗原決定基をコードする2個の異種ヌクレオチド配列を含み、好ましくは、MARV株はMARV-アンゴラおよびMARV-ムソケであり、このEBOV株はZEBOVおよび/またはSEBOV、好ましくはZEBOV-メイインガおよびSEBOV-グルである。もちろん、すでに上述のように、さらに別のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードするこのさらに別のヌクレオチド配列は、核タンパク質(NP)、ビリオンタンパク質35(VP35)、ビリオンタンパク質40(VP40)、ビリオンタンパク質30(VP30)、ビリオンタンパク質24(VP24)、およびRNA依存性RNAポリメラーゼタンパク質(L)からなる群から選択されるフィロウイルスタンパク質もコードでき、すでに上で示したように、このフィロウイルスタンパク質はこれらの異なる株からも誘導しうる。30

【0143】

本発明のさらに好ましい実施形態による、組み換えMVA/FPVベクターは、GP-MARVおよびGP-EBOVのフィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする2個の異種ヌクレオチド配列、およびVP40の抗原決定基をコードする第3の異種ヌクレオチド配列を含む。そのようなVP40は、以上または以下で説明したような、いずれのVP40でもありうる。したがって、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインの抗原決定基をコードする1個の異種ヌクレオチド配列は、GP-SEBOV-グルをコードでき、他方の1個のGP-ZEBOV-メイインガおよび第3の異種ヌクレオチド配列は、フィロウイルスタンパク質VP40-ZEBOV、VP40-SEBOVまたはVP40-MARV、好ましくはVP40-ZEBOV-メイインガまたはVP40-MARV-ムソケの抗原決定基をコードしうる。40

【0144】

さらに好ましい実施形態においては、組み換えMVA/FPVベクターは、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインであるGP-EBOV、好ましくはGP-ZEBOVおよび/またはGP-SEBOV、より好ましくはGP-ZEBOV-メイインガおよびGP-SEBOV-グル、GP-MARVの1個のフィロウイルスエンベロープグリコブ50

ロテイン、好ましくはGP - MARV - ムソケまたはGP - MARV - アンゴラおよびNP - EBOV - CdI、NP - ZEBOV およびNP - MARV、好ましくはNP - MARV - ムソケまたはNP - MARV - アンゴラの群から好ましく選択される少なくとも1個のフィロウイルス核タンパク質、の抗原決定基をコードする2個の異種ヌクレオチド配列を含む。

【0145】

MVAまたはFPVへの組み込み部位

【0146】

さらに別のフィロウイルスタンパク質をコードする少なくとも1個の異種ヌクレオチド配列を任意に、さらに含むフィロウイルスグリコプロテインの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列は、MVAの1個またはそれ以上の遺伝子間領域（IGR）の中へ挿入しうる。ある特定の実施形態においては、このIGRは、IGR07/08、IGR44/45、IGR64/65、IGR88/89、IGR136/137、およびIGR148/149から選択される。ある特定の実施形態においては、組み換えMVAの5個未満、4個未満、3個未満、または2個未満のIGRが、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインおよび/またはさらに別のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。異種ヌクレオチド配列は、自然に生じる1個またはそれ以上の欠失部位の中へ、特にMVAゲノムの主たる欠失部位I, II, III, IV, V, またはVIの中へ追加的または代替的に挿入されうる。ある特定の実施形態においては、組み換えMVAの5個未満、4個未満、3個未満、または2個未満の少ない自然に生じる欠失部位は、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインおよび/またはさらに別のフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。10

【0147】

フィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含むMVAの挿入部位の数は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、またはそれ以上であります。ある特定の実施形態においては、この異種ヌクレオチド配列は、4個、3個、2個、またはそれよりも少ない挿入部位に挿入される。好ましくは、2個の挿入部位を使用する。ある特定の実施形態においては、3個の挿入部位を使用する。好ましくは、この組み換えMVAは、2個または3個の挿入部位に挿入された、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、または7個の遺伝子を含む。20

【0148】

さらに別のフィロウイルスタンパク質をコードする少なくとも1個の異種ヌクレオチド配列を任意に、さらに含むフィロウイルスグリコプロテインの抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列は、FPVの1個またはそれ以上の遺伝子間領域（IGR）の中へ挿入しうる。好ましい実施形態においては、IGRは、ゲノムの1.3-kbpのHindIII断片のORF7および9の間に位置している（Drillien et al., Virology 160: 203 - 209 (1987) (US5,180,675) およびSpehner et al., J. Virol. 64: 527 - 533 (1990) 参照）。ある特定の実施形態においては、異種ヌクレオチド配列は、本明細書に参照することによって組み込まれるEP 0 538 496 A1およびWO 05/048957に記載されているような、鶏痘の挿入部位に挿入することができる。本発明のさらに好ましい鶏痘挿入部位は、LUS挿入部位, FP14挿入部位, および43K挿入部位である。これらの挿入部位は、時に、FPN006/FPN007 (LUS挿入部位), FPN254/FPN255 (LUS挿入部位), FPV060/FPV061 (FP14挿入部位), およびFPV107/FPV108 (43K挿入部位)ともいわれる。40

【0149】

1つの好ましい実施形態においては、鶏痘の挿入部位はLUS挿入部位である。鶏痘ウイルスゲノムのそれぞれの末端には、2本の長い独特な配列（LUS）があり（Genbank受入番号：AF 198100.1）、したがって、それぞれのゲノムには2個の50

L U S 挿入部位がある。このゲノムの左の末端の L U S 挿入部位は、F P V 0 0 6 の 3' および F P V 0 0 7 1 2 5 L の 5' にあり、好ましくは、GenBank 受入番号 A F 1 9 8 1 0 0 . 1 に注釈がされているように、鶏痘ゲノム配列中の 7 4 7 0 位と 7 4 7 5 位の間である。このゲノムの右の末端の L U S 挿入部位は、F P V 2 5 4 の 3' および F P V 2 5 5 の 5' にあり、好ましくは、例えば、GenBank 受入番号 A F 1 9 8 1 0 0 . 1 の鶏痘ゲノム配列中の 2 8 1 0 6 5 位と 2 8 1 0 7 0 位の間である。1つの実施形態においては、この異種ヌクレオチド配列は、ヌクレオチド 2 8 1 0 6 5 位と 2 8 1 0 7 0 位内のいずれの位置にも挿入できる。

【 0 1 5 0 】

別の好ましい実施形態においては、鶏痘の挿入部位は F P 1 4 挿入部位である。この部位は、鶏痘ゲノム配列ゲノムの F P V 0 6 0 の 3' および F P V 0 6 1 の 5' にあり、好ましくは、例えば、GenBank 受入番号 A F 1 9 8 1 0 0 . 1 の鶏痘ゲノムの 6 7 0 8 0 位と 6 7 0 9 7 位の間である。1つの実施形態においては、DNA 配列の 6 7 0 8 0 位と 6 7 0 9 7 位の間のヌクレオチドは、組み換えウイルス中で欠失され、そして興味のある配列を示す定義された挿入遺伝子と置き換える。1つの実施形態においては、F P 1 4 挿入部位は、F P V 0 6 0 遺伝子の相同分子種と、例えば、A F 1 9 8 1 0 0 . 1 の F P V 0 6 1 の相同分子種の間にある。「F P V 0 6 0 、F P V 0 6 1 、F P V 2 5 4 」等の用語は、GenBank 受入番号 A F 1 9 8 1 0 0 . 1 で注釈がされているように、5' から 3' まで番号が付されたそれぞれの遺伝子の対応するコード配列（つまり、C D S ）の位置を指す。好ましい実施形態においては、F P 1 4 挿入部位は、（GenBank 受入番号 A F 1 9 8 1 0 0 . 1 で注釈がされているように、I G R 6 0 / 6 1 挿入部位としても言及される）鶏痘ゲノム配列中の 6 7 0 9 1 位および 6 7 0 9 2 位の間にある。

【 0 1 5 1 】

別の好ましい実施形態においては、鶏痘の挿入部位は 4 3 K 挿入部位と命名されている。この部位は、F P V 1 0 7 の 3' および F P V 1 0 8 の 5' 、好ましくは、GenBank 受入番号 A F 1 9 8 1 0 0 . 1 に注釈がされているように、鶏痘ゲノム配列の 1 2 8 1 7 8 位にある。

【 0 1 5 2 】

好ましい実施形態においては、この組み込み部位は F P 1 4 (I G R 6 0 / 6 1) および / または BamH I J 領域である。BamH I J 領域は、本明細書に参照することによって組み込まれる、Jenkins et al. (1 9 9 1) , AIDS Research and Human Retroviruses 7 (1 2) : 9 9 1 : 9 9 8 にさらに記載されている。

【 0 1 5 3 】

ある特定の実施形態においては、この I G R は I G R BamH I J F P V である。

【 0 1 5 4 】

フィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を含む F P V の挿入部位の数は、1 個または 2 個でありうる。好ましくは、2 個の挿入部位を使用する。別の好ましい実施形態においては、この組み換え F P V は、1 個または 2 個の挿入部位に挿入された、少なくとも 1 個、2 個、3 個、4 個または 5 個の遺伝子を含む。

【 0 1 5 5 】

本明細書で提供される組み換え M V A / F P V ウィルスは、当該技術分野で周知の日常的な方法によって発生させることができる。組み換えポックスウイルスを得る、または外因性コード配列をポックスウイルスゲノムに挿入する方法は、当業者に周知である。例えば、DNA のクローニング、DNA および RNA の単離、ウエスタンブロット分析、R T - P C R および P C R 増幅の諸技術のような標準的な分子生物学の技術の方法は、Molecular Cloning, A laboratory Manual (2 nd Ed .) (J . S a m b r o o k et al . , Cold Spring H

10

20

30

40

50

arbor Laboratory Press (1989))に記載されており、そしてウイルスの取り扱いおよび操作の技術は、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、操作および遺伝子工学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) 10)、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参照))に記載されている。

【0156】

本明細書で開示される種々の組み換えMVA / FPVの生成のためには、様々な方法を適用しうる。ウイルスの中に挿入するDNA配列は、MVAまたはFPVのDNAの切片と同種のDNAが挿入された大腸菌プラスミド構成体の中に置くことができる。これとは別に、挿入されるDNA配列はプロモーターに結合させることができる。このプロモーターと遺伝子の結合は、このプロモーターと遺伝子の結合が、非本質的な遺伝子座を含むMVAまたはFPV DNAの領域の側面に位置するDNA配列と同種のDNAによって両末端が側面に位置するように、このプラスミド構成体の中に配置できる。結果として生じるプラスミド構成体は、大腸菌バクテリアの中で増殖によって増幅させ、そして単離できる。挿入するDNA遺伝子配列を含む単離したプラスミドは、培養がMVAで感染する的同时に、例えば、鶏胚線維芽細胞 (CEF) の細胞培養nの中へ遺伝子導入できる。プラスミド中の同種のMVA DNAとウイルスゲノムのそれぞれの間の組み換えは、異質のDNA配列の存在によって改変したMVAを発生させることができる。

【0157】

好ましい実施形態によれば、例えば、CEF細胞のような適切な細胞培養は、ポックスウイルスを用いて感染させることができる。この感染した細胞は、次に、好ましくは、ポックスウイルス発現制御要素の転写制御の下で、異質のまたは異種の1個または複数の遺伝子を含む第1のプラスミドベクターを用いて遺伝子導入できる。上で説明したように、このプラスミドベクターは、また、外因性配列をポックスウイルスゲノムの選択した部分に挿入することを導くことができる配列を含む。任意で、このプラスミドベクターは、また、ポックスウイルスプロモーターに動作可能に結合させたマーカーおよび/または選択遺伝子を含むカセットを含む。適切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、-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その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、発生した組み換えポックスウイルスの特定および単離を簡素化する。しかし、組み換えポックスウイルスは、PCR技術によっても特定できる。次に、さらに別の細胞を、上記のように、得られた組み換えポックスウイルスを用いて感染させ、第2の異質または異種の1個または複数の遺伝子を含む第2のベクターを用いて遺伝子導入することができる。この遺伝子をポックスウイルスゲノムの異なる挿入部位に導入する場合、第2のベクターもポックスウイルス同種配列で異なり、この第2の異質の1個または複数の遺伝子をポックスウイルスのゲノムの中へ組み込むことを導く。同種の組み換えが起こった後、2個またはそれ以上の異質または異種の遺伝子を含む組み換えウイルスを単離することができる。追加の異質の遺伝子を組み換えウイルスの中へ導入するためには、感染のために以前のステップで単離した組み換えウイルスを使用し、および遺伝子導入のためのさらに別の異質の1個または複数の遺伝子を含むさらに別のベクターを使用して、感染および遺伝子導

10

20

30

40

50

入のステップを繰り返すことができる。

【0158】

あるいは、上で説明した感染および遺伝子導入のステップは取り換え可能である。つまり、適切な細胞は、異質の遺伝子を含むプラスミドベクターによって最初に遺伝子導入され、その後、ポックスウイルスを用いて感染させうる。さらなる代案として、それぞれの異質の遺伝子を異なるウイルスに導入し、得られたすべての組み換えウイルスを用いて細胞を共感染させ、そしてすべての異質の遺伝子を含む組み換え体をスクリーニングすることも可能である。第3の代案は、インビトロでのDNAゲノムと異質の配列との連結反応、およびヘルパーウイルスを使用した再結合したワクシニアウイルスDNAゲノムの再構成である。第4の代案は、細菌性の人工染色体(BAC)としてクローンされたワクシニアウイルスゲノムと、このワクシニアウイルスゲノムの望ましい組み込み部位の側面にある配列と同種のDNA配列が側面にある線形異質配列との間の大腸菌または別の細菌の種の同種の組み換えである。10

【0159】

異種フィロウイルス遺伝子の発現

【0160】

フィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列は、単一の転写単位として発現できる。例えば、フィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列は、ポックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルスプロモーターに操作して結合させ、および/またはポックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルス転写ターミネーターに結合させることができる。20

【0161】

ある特定の実施形態においては、「転写単位」は、MVAまたはFPVゲノムの挿入部位の中へそれ自体が挿入される。ある特定の実施形態においては、「転写単位」は、MVAまたはFPVゲノムの挿入部位の中へ1個または複数の他の転写単位と共に挿入される。「転写単位」は、MVAまたはFPVゲノムの中で自然には存在せず(つまり、それは異種、外因性または異質である)、感染した細胞で転写をすることができる。

【0162】

好ましくは、組み換えMVA/FPVは、MVAまたはFPVゲノムの中へ挿入された1個、2個、3個、4個、5個またはそれ以上の転写単位を含む。ある特定の実施形態においては、この組み換えMVA/FPVは、1個、2個、3個、4個、5個またはそれ以上の転写単位によってコードされたフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列を安定的に発現する。ある特定の実施形態においては、組み換えMVA/FPVは、MVA/FPVゲノムの1個、2個、3個、またはそれ以上の挿入部位で、MVA/FPVゲノムの中へ挿入された2個、3個、4個、5個、またはそれ以上の転写単位を含む。30

【0163】

ある特定の実施形態においては、フィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列の1個、それ以上、またはすべての発現は、1個またはそれ以上のポックスウイルスプロモーターの制御の下にある。ある特定の実施形態においては、ポックスウイルスプロモーターは、Pr7.5プロモーター、ハイブリッド初期/後期プロモーター、PrSプロモーター、PrS5Eプロモーター、合成または天然の初期または後期プロモーター、または牛痘ウイルスATIプロモーターである。適切なプロモーターは、参照することによって完全に本明細書に組み込まれる、WO 2010/060632、WO 2010/102822、WO 2013/189611およびWO 2014/063832にさらに記載されている。ある特定の実施形態においては、ポックスウイルスプロモーターは、PrSプロモーター(配列番号23)、PrS5Eプロモーター(配列番号24)、Pr7.5(配列番号25)、PrLE1プロモーター(配列番号27)、Pr13.5長プロモーター(配列番号35)およびFPV-40Kプロモーター(配列番号26)からなる群から選択され、より好ましくは、PrSプロモーター(配列番号4050)

号23)、PrS5Eプロモーター(配列番号24)、Pr7.5(配列番号25)およびPrLE1プロモーター(配列番号27)からなる群から選択される。

【0164】

ある特定の実施形態においては、フィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列、好ましくはZEBOV、SEBOV、EBOV-CdI, MARVおよびNP-ZEBOVタンパク質、より好ましくはGP-ZEBOV-メイインガ、GP-S E BOV-グル、GP-MARVおよびNP-ZEBOV、最も好ましくはGP-MARV-ムソケまたはGP-MARV-アンゴラは、PrS、PrLE1およびPr7.5からなる群から選択されるプロモーターの制御の下にある。好ましい実施形態においては、フィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列のGP-SEBOVおよびGP-MARV-ムソケはPrSプロモーター(例えば、配列番号23)の制御の下で発現し、NP-EBOV-CdIはPrLE1または改変PrLE1プロモーター(例えば、配列番号27および配列番号32)の制御の下で発現し、そしてGP-ZEBOV-メイインガはPr7.5プロモーター(例えば、配列番号25)の制御の下で発現する。

【0165】

別の好ましい実施形態においては、任意の実施形態のFPVのフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、好ましくは配列番号26を含む、または有するプロモーターの制御の下にある。

【0166】

フィロウイルスワクチンおよび薬剤組成物

【0167】

本明細書に記載された組み換えMVAウイルスは、非常に複製が制限されており、したがって非常に弱毒化されているので、これらはヒト、さらには免疫力が低下したヒトさえも含む広範な哺乳動物の治療のための理想的な候補である。したがって、本明細書は、ヒトを含む生きた動物の体に免疫反応を誘導するための薬剤組成物およびワクチンを提供する。本明細書はさらに、フィロウイルスに起因する疾患の治療および/または予防に使用するためのフィロウイルスグリコプロテインの抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組み換えMVAベクターを提供する。

【0168】

ワクチンは、本明細書に記載された、 10^4 から 10^9 TCID₅₀/ml、 10^5 から 5×10^8 TCID₅₀/ml、 10^6 から 10^8 TCID₅₀/ml、または 10^7 から 10^8 TCID₅₀/mlの濃度範囲の溶液中で製剤された、いずれかの組み換えMVAウイルスを好ましく含む。ヒトに対する好ましいワクチンの投与量は、 10^6 TCID₅₀、 10^7 TCID₅₀、または 10^8 TCID₅₀の投与量を含む、 10^6 から 10^9 TCID₅₀の間で含む。

【0169】

本明細書が提供する薬剤組成物は、一般的に、1個またはそれ以上の医薬的に許容されるおよび/または承認される担体を含む。このような補助物質は、水、食塩水、グリセロール、エタノール、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質等でありうる。適切な担体は、典型的には、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグルコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸共重合体、脂質凝集体などの大きな、ゆっくりと代謝する分子である。

【0170】

ワクチンの製剤のために、本明細書が提供する組み換えMVAウイルスは、生理学的に許容できる形態に変換することができる。これは、H. Stickl et al., Dtsch. med. Wschr. 99: 2386-2392 (1974)に記載されているように、天然痘に対するワクチン接種のために使用されたポックスウイルスワクチンの製剤において、経験に基づいて行うことができる。

【0171】

例えば、精製されたウイルスは、約10mMトリス、140mM塩化ナトリウム、pH

10

20

30

40

50

7.4 中で製剤され、力価 5×10^8 T C I D₅₀ / ml で、-80°で保存できる。ワクチン注射の製剤のために、例えば、このウイルスの $10^2 \sim 10^8$ または $10^2 \sim 10^9$ 個の粒子を、アンプル、好ましくはガラスのアンプル中で、2%のペプトンおよび1%のヒトアルブミンの存在下、100mlのリン酸緩衝食塩水(PBS)中で、凍結乾燥することができる。あるいは、このワクチン注射は、製剤中で、ウイルスの段階的凍結乾燥によって生成することができる。この製剤は、マンニトール、デキストラン、砂糖、グリシン、ラクトースまたはポリビニルピロリドンのような追加の添加剤、または酸化防止剤もしくは不活性ガス、安定剤もしくはインビボで投与するのに適した組み換えタンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン)のような他の補助剤を含みうる。次に、ガラスのアンプルを密閉し、数ヶ月の間、4°と室温の間で保存できる。しかし、必要がない限り、このアンプルを、好ましくは -20°よりも低い温度で保存する。

【0172】

ワクチン接種または治療のために、この凍結乾燥物は、水溶液、好ましくは生理的食塩水またはトリス緩衝剤に溶解し、そして全身的または局所的のいずれによっても、つまり非経口、皮下、静脈内、筋肉内、鼻腔内その他熟練者に知られたいずれの投与経路によっても投与できる。投与の方法、投与量および投与回数は、知られた方法によって当業者により最適化できる。しかし、最も一般的には、患者は第1回目のワクチン注射の約1か月から6週間の後に、第2回目の注射でワクチン接種する。

【0173】

同種または異種プライム - ブーストを使用する混合ワクチン投薬計画

20

【0174】

本明細書に記載された混合ワクチンおよび方法は、同種プライム - ブースト投薬計画の一部としても使用しうる。同種プライム - ブーストでは、第1回のプライミングワクチン接種の後、1回またはそれ以上の後続のブースティングワクチン接種を行う。ブースティングワクチン接種は、第1回のワクチン接種で使用したのと同じ組み換えポックスウイルスを投与して、第1回のワクチン接種によって発生した免疫反応を強化するように構成されている。

【0175】

1つの典型的な実施形態においては、同種プライム - ブースト投薬計画を採用でき、そこでは、本明細書において定義されたMVAウイルスベクターを第1回の投与で投与する。本明細書で定義されるMVAウイルスベクターの1回またはそれ以上の後続の投与は、第1回の投与が提供する免疫反応を強化するために行われうる。好ましくは、この1回またはそれ以上の抗原決定基は、第1回の投与の抗原決定基と同じまたは類似している。

30

【0176】

本発明によるMVAおよびFPV組み換えウイルスベクターは、異種プライム - ブースト投薬計画においても使用できる。そこでは、1回またはそれ以上の初期のプライムワクチン接種は、本明細書で定義されるように、MVAまたはFPVベクターのいずれかを用いて行われ、そして1回またはそれ以上の後続のブースティングワクチン接種は、プライムワクチン接種で使用しないポックスウイルスベクターを用いて行われる。例えば、本明細書で定義されるMVAベクターがプライム - ブーストで投与された場合は、後続のブースティングワクチン接種はFPVベクターによることになり、逆もまた同様である。

40

【0177】

好ましい実施形態においては、プライムワクチン接種はMVAベクターを用いて行い、そしてブースティングワクチン接種はFPVベクターを用いて行う。したがって、本発明の1つの態様は、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物

50

を含み、

前記第1の組成物はプライミング組成物であり、前記第2の組成物はブースティング組成物であり、好ましくは、前記ブースティング組成物は前記ブースティング組成物のベクターの2回またはそれ以上の投与量を含む混合ワクチンに関する。

【0178】

組み換えMVAおよびFPVウイルスを含むワクチンおよびキット

【0179】

本明細書は、本明細書に記載されている1個またはそれ以上のいずれの組み換えFPVおよび/またはMVAを含むワクチンおよびキットも提供する。キットは、フィロウイルス感染の危険がある対象に対する組み換えMVAおよびFPVの投与に関する使用説明書と共に、組み換えMVAまたはFPVの1個または複数の容器またはバイアルを含みうる。ある特定の実施形態においては、対象はヒトである。ある特定の実施形態においては、使用説明書は、組み換えMVAを対象に対して1回の投与、または複数(つまり、2回、3回、4回等)の投与で投与することを示す。ある特定の実施形態においては、この使用説明書は、この組み換えMVAまたはFPVウイルスを、このウイルスの投薬を受けていない、または受けている対象に対して、第1回の(プライミング)および第2回の(ブースティング)投与として投与することを示す。好ましくは、キットは、本明細書で記載されているように、第1のバイアル/容器には第1回の接種(プライミング接種)のための組み換えMVAを、そして第2および/またはさらなるバイアル/容器には少なくとも第2および/または第3および/またはさらなる接種(ブースティング接種)のための組み換えMVAを含むプライム-ブースト免疫付与のための少なくとも2個のバイアルを含む。

【0180】

好ましい実施形態においては、本明細書が提供するワクチンおよびキットは、第2のフィロウイルスサブタイプ、第3のフィロウイルスサブタイプまたは少なくとも4個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを含む第1の組成物を含む。

【0181】

好ましい実施形態においては、本明細書が提供するワクチンおよびキットは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37からなる群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを第1の組成物中に含む。

【0182】

さらなる実施形態においては、本明細書が提供するワクチンおよびキットは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29および配列番号31、好ましくは配列番号6、配列番号20、配列番号29および配列番号31を有する群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを第1の組成物中に含む。

【0183】

さらなる実施形態においては、本明細書が提供するワクチンおよびキットは、少なくとの4個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを含む第1の組成物を含み、好ましくは、この4個の異なるフィロウイルスサブタイプは配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37を有する群から選択される。

【0184】

さらに好ましい実施形態においては、本明細書が提供するワクチンおよびキットは、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプに対して防御免疫反応を発生させるのに使用され、第1の組成物は前記免疫反応をプライミングするのに使用され、第2の組成物は前記免疫反応をブースティングするのに使用され、または少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプに対して防御免疫反応を発生させるのに使用され、第2の組成物は前記免疫反応をプライミングするのに使用され、そして第1の組成物は前記免疫反応をブースティングするのに使用される。本明細書が提供するワクチンおよびキットのいずれにおいても、ブ

10

20

30

40

50

ースティング組成物は、ブースティング組成物のベクターの2回またはそれ以上の投与量を含むことができる。

【0185】

前に、上で説明したように、本発明は、さらに、2個の異なる非複製ウイルスベクターを使用した異種ワクチン接種投与法に関する。

【0186】

異種ワクチンプログラムのために、本発明は、混合ワクチン混合ワクチンおよび／またはワクチン接種キットを提供し、キットは、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である。

【0187】

本発明は、さらに、混合ワクチンおよび／またはワクチン接種キットを提供し、そのキットは、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である。

【0188】

この実施形態においては、この混合ワクチンおよび／またはキットは、本明細書で記載されているように、第1のバイアルまたは容器には第1回の接種（プライミング接種）のための組み換えMVA／FPVを、そして第2および／またはさらなるバイアルまたは容器には少なくとも第2および／または第3および／またはさらなる接種（ブースティング接種）のための組み換えMVA／FPVを含むプライム-ブースト免疫付与のための少なくとも2個のバイアルを含む。

【0189】

混合ワクチンおよび／またはキットは、フィロウイルス感染の危険がある対象に対する組み換えMVAおよびFPVの投与に関する使用説明書と共に、組み換えMVAまたはFPVの複数の容器またはバイアルを含みうる。ある特定の実施形態においては、対象はヒトである。ある特定の実施形態においては、使用説明書は、組み換えMVA／FPVを対象に対して1回の投与、または複数（つまり、2回、3回、4回等）の投与で投与することを示す。ある特定の実施形態においては、使用説明書は、この組み換えMVA／FPVウイルスを、このウイルスの投薬を受けていない、または受けている対象に対して、第1回の（プライミング）および第2回の（ブースティング）投与として投与することを示す。

【0190】

本発明のいずれの混合ワクチン、ワクチン接種キットおよび／またはいずれの異種ワクチンプログラムの第1および／または第2の組成物、またはMVAおよび／またはFPVも、本明細書が記載する、または「組み換えMVAおよびFPV」としてさらに定義する、いずれのMVAおよび／またはFPVベクター、およびこれらのいずれの組み合わせを含むことができる。

【0191】

好ましい実施形態においては、本明細書が提供する混合ワクチンは、第2のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質、第3のフィロウイルスサブタイプの抗原決定基、4個のフィロウイルスサブタイプの抗原決定基、または少なくとも4個のフィロウイルスサブタイプの抗原決定基をコードする核酸を含むMVAベクターを含む第1の組成物を含む。

【0192】

別の実施形態においては、本明細書が提供するこの混合ワクチンは、エボラウイルス(EBOV)またはマールブルグウイルス(MARV)から選択されるフィロウイルスサブタイプを含む。

【0193】

別の実施形態においては、本明細書が提供するこの混合ワクチンは、ザイールエボラウイルス(ZEROV)、スーダンエボラウイルス(SEBOV)、コートジボワールエボラウイルス(EBOV-CdI)、レストンエボラウイルス(EBOV-Reston)およびブンディブギヨエボラウイルス(BEBOV)からなる群から選択される1個またはそれ以上のEBOV-サブタイプからの抗原決定基を含む。

【0194】

別の実施形態においては、本明細書で記載される混合ワクチンは、フィロウイルスタンパク質の抗原決定基を含み、エンベロープグリコプロテイン(GP)、核タンパク質(NP)、ビリオンタンパク質35(VP35)、ビリオンタンパク質40(VP40)、ビリオンタンパク質30(VP30)、ビリオンタンパク質24(VP24)、およびRNA依存性RNAポリメラーゼタンパク質(L)からなる群から選択される。

【0195】

さらに好ましい実施形態においては、本明細書が提供する混合ワクチンは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37からなる群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを第1の組成物中に含む。

【0196】

さらなる実施形態においては、本明細書が提供する混合ワクチンは、少なくとの4個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを含む第1の組成物を含み、好ましくは、この4個の異なるフィロウイルスサブタイプは配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37を有する群から選択される。

【0197】

さらに好ましい実施形態においては、本明細書が提供する混合ワクチンは、配列番号6、配列番号20、配列番号29および配列番号31を有する群から選択される4個の異なるフィロウイルスサブタイプからの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを含む第1の組成物を含む。

【0198】

別の実施形態においては、本明細書が提供するこの混合ワクチンは、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプ、好ましくは少なくとも2個、より好ましくは少なくとも4個のフィロウイルスサブタイプに対して防御免疫反応を発生させるために使用される。

【0199】

別の実施形態においては、本発明は、防御免疫反応を発生させるための薬剤またはワクチンとしての使用のための、または少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプ、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプ、少なくとも3個または少なくとも4個のフィロウイルスサブタイプに対して強化された免疫反応を誘導するための、いずれかの実施形態の混合ワクチンまたは組み換えMVAに関する。MVAは、治療する対象にフィロウイルス様粒子を生成することができ、好ましくは、MVAは、治療する対象にフィロウイルス様粒子を生成している。

【0200】

10

20

30

40

50

組み換えMVAまたはFPVウイルスの方法および使用

【0201】

本明細書は、さらに、対象動物に免疫を付与する方法として使用するための、または対象の免疫反応に影響を及ぼすための方法および／または本明細書が記載するいずれの組み換えMVAまたはFPVを提供する。本明細書はさらには、対象動物に免疫を付与するための医薬または薬剤の製剤のための、特に、対象のフィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防のための医薬またはワクチンの製剤のための組み換えMVAまたはFPVの使用を取り扱う。本明細書は、さらに、フィロウイルスに対して免疫反応をプライミングまたはブースティングするのに使用する、本明細書のいずれの実施形態の組み換えMVAまたはFPVを提供し、好ましくは、この組み換えMVAおよび／または組み換えFPVは、1回、2回、3回または4回投与される。

【0202】

さらには、本明細書は、フィロウイルス感染に対する強化された免疫反応を誘導するための医薬またはワクチンとして使用するいずれの実施形態に記載の混合ワクチンまたは組み換えMVAを取り扱い、このMVAは治療される対象にフィロウイルス様粒子を生成することができ、好ましくは、MVAは治療される対象にフィロウイルス様粒子を生成している。さらには、本明細書は、フィロウイルス病の治療および／または予防のための医薬またはワクチンとして使用するいずれの実施形態に記載の混合ワクチンまたは組み換えMVAを取り扱い、このMVAは治療される対象にフィロウイルス様粒子を生成することができ、好ましくは、MVAは治療される対象にフィロウイルス様粒子を生成している。

【0203】

したがって、1つの実施形態においては、本発明は、対象において、フィロウイルスに対して免疫反応を誘発する方法を提供するが、この方法は対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である。

【0204】

別の実施形態においては、本発明は、対象において、フィロウイルスに対して免疫反応を誘発する方法を提供するが、この方法は対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である。

【0205】

別の実施形態においては、フィロウイルスに対して免疫反応を誘導する方法、対象動物に免疫を付与するための医薬の製剤のための、特に対象のフィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防のための医薬またはワクチン、または本明細書に記載されたフィロウイルス感染に対する防御免疫反応を提供するために使用するいずれの実施形態の混合ワクチンの製剤のための、本明細書に記載された組み換えMVA／FPVの使用は、第2のフィロウイルスサブタイプ、第3のフィロウイルスサブタイプ、または少なくとも4個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクター

10

20

40

50

を含む第1の組成物を含む。

【0206】

別の実施形態においては、フィロウイルスに対して免疫反応を誘導する方法、対象動物に免疫を付与するための医薬の製剤のための、特に対象のフィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防のための医薬またはワクチン、または本明細書に記載されたフィロウイルス感染に対する防御免疫反応を提供するために使用するいずれかの実施形態の混合ワクチンの製剤のための、本明細書に記載された組み換えMVA/FPVの使用は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37からなる群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含む第1の組成物中のMVAベクターを含む。

10

【0207】

さらなる実施形態においては、フィロウイルスに対して免疫反応を誘導する方法、対象動物に免疫を付与するための医薬の製剤のための、特に対象のフィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防のための医薬またはワクチン、または本明細書に記載されたフィロウイルス感染に対する防御免疫反応を提供するために使用するいずれかの実施形態の混合ワクチンの製剤のための、本明細書に記載された組み換えMVA/FPVの使用は、少なくとも4個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを含む第1の組成物を含み、この4個の異なるフィロウイルスサブタイプは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37を有する群から選択される。

20

【0208】

別の実施形態においては、本発明は、対象のフィロウイルス感染に対して防御免疫力および／または防御免疫反応を提供する方法を提供する。別の実施形態においては、本発明は、対象のフィロウイルス感染に対して防御免疫力および／または防御免疫反応を提供する方法を提供し、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプ、好ましくは、少なくとも3個または少なくとも4個の異なるフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むFPVベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物であり、好ましくは、第2の組成物がブースティング組成物であり、好ましくは、1回、2回、3回、または4回投与される。

【0209】

別の実施形態においては、いずれかの実施形態のフィロウイルス感染に対して防御免疫力および／または防御免疫反応を提供する方法は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37からなる群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを第1の組成物中に含む。

40

【0210】

別の実施形態においては、いずれかの実施形態のフィロウイルス感染に対して防御免疫力および／または防御免疫反応を提供する方法は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37を有する4個の異なるフィロウイルスサブタイプからの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを第1の組成物中に含む。

【0211】

別の実施形態においては、本発明は、対象に、フィロウイルス様粒子を生成する方法、またはフィロウイルスに対して強化された免疫反応を誘導する方法を提供する。この方法

50

は、いずれの実施形態の対象にフィロウイルス様粒子を生成することを含み、フィロウイルス V P 4 0 はザイールエボラウイルス (Z E B O V) 、スーダンエボラウイルス (S E B O V) 、コートジボワールエボラウイルス (E B O V - C d I) 、レストンエボラウイルス (E B O V - レストン) およびブンディブギヨエボラウイルス (B E B O V) からなる群から選択され、このフィロウイルス V P 4 0 は 1 個またはそれ以上の Z E B O V 、 S E B O V および M A R V から選択される。

【 0 2 1 2 】

別の実施形態においては、本発明は、対象に、フィロウイルス様粒子を生成する方法、またはフィロウイルスに対して強化された免疫反応を誘導する方法を提供する。この方法は、いずれかの実施形態の対象においてフィロウイルス様粒子を生成することを含み、このフィロウイルスグリコプロテインおよびこのフィロウイルス V P 4 0 は同じフィロウイルス株から選択される。10

【 0 2 1 3 】

本発明の別の実施形態においては、本発明は、対象において、フィロウイルス様粒子を生成する方法、またはフィロウイルスに対して強化された免疫反応を誘導する方法を提供する。この方法は、いずれかの実施形態の対象においてフィロウイルス様粒子を生成することを含み、 M V A ベクターは、フィロウイルス核タンパク質 (N P) をコードする核酸をさらに含み、好ましくは、このフィロウイルス核タンパク質およびこのフィロウイルス V P 4 0 は同じフィロウイルス株から誘導される。20

【 0 2 1 4 】

別の実施形態においては、上記のいずれの方法のフィロウイルス株も、ザイールメイインガ、ザイールキクウィト、ザイールガボン、コートジボワールエボラウイルス、スーダンボニフェス、スーダンマレオ、スーダングル、マールブルグラブン、マールブルグオゾリン、マールブルグラタイチャク、マールブルグムソケ、マールブルグアンゴラ、好ましくは、ザイールメイインガまたはコートジボワールエボラウイルスの群から選択される。好ましくは、このフィロウイルス V P 4 0 はザイールメイインガまたはマールブルグムソケの群から選択され、より好ましくは、このフィロウイルス V P 4 0 は配列番号 3 4 のタンパク質配列をコードする核酸を含み、またはこのフィロウイルス V P 4 0 の抗原タンパク質をコードする核酸は配列番号 3 3 を含む。30

【 0 2 1 5 】

本明細書で用いられる場合、「防御免疫力」または「防御免疫反応」という用語は、ワクチン接種をした対象が、それに対してワクチン接種を行った病原体を用いて感染を制御できることを意味する。通常、「防御免疫反応」を発現した対象は、ただの軽度から中程度の臨床的症状を発症するか、またはまったく症状を発症しないかである。通常、ある病原体に対して「防御免疫反応」または「防御免疫力」を有する対象は、この病原体の感染の結果として死ぬことはない。ある特定の実施形態においては、対象動物は哺乳動物である。この哺乳動物は、成牛、仔牛、特に幼牛、ネズミ、うさぎ、ぶた、マウスでありうるが、好ましくはヒトであり、この方法は、本明細書で記載される 1 個またはそれ以上の組み換え M V A / F P V の一服を対象に投与することを含む。40

【 0 2 1 6 】

ある特定の実施形態においては、この対象はヒトである。ある特定の実施形態においては、この対象は成人である。本発明のある特定の実施形態においては、成人は免疫力が低下している。ある特定の実施形態においては、成人は 10 歳、 15 歳、 20 歳、 25 歳、 30 歳、 25 歳、 40 歳、 45 歳、 50 歳、 55 歳、 60 歳、 65 歳、 70 歳、 75 歳、 80 歳、または 85 歳を超える年齢である。ある特定の実施形態においては、対象の年齢は、 5 歳未満、 3 歳未満、 2 歳未満、 15 か月未満、 12 か月未満、 9 か月未満、 6 か月未満、または 3 か月未満である。ある特定の実施形態においては、対象の年齢は、 0 ~ 3 か月、 3 ~ 6 か月、 6 ~ 9 か月、 9 ~ 12 か月、 1 ~ 2 年、または 2 ~ 5 年である。50

【 0 2 1 7 】

本明細書で提供されるいずれの組み換え M V A または F P V も、対象に対して、 10⁶

から 10^{10} T C I D₅₀、好ましくは、 10^6 から 10^9 T C I D₅₀ の投与量、例えば、 10^6 から 10^9 T C I D₅₀、 10^6 から 5×10^8 T C I D₅₀、 10^7 から 10^8 T C I D₅₀、 5×10^7 T C I D₅₀ から 5×10^8 T C I D₅₀、 10^7 T C I D₅₀ または 10^8 T C I D₅₀ の投与量を投与しうる。ある特定の実施形態においては、この組み換えMVAまたはFPVベクターは、 1×10^8 T C I D₅₀ から 1×10^1 T C I D₅₀ の量で投与される。別の実施形態においては、この組み換えMVAまたはFPVは、 1×10^8 T C I D₅₀ から 5×10^9 の量で、好ましくは、 5×10^8 T C I D₅₀ から 6×10^9 の量で投与される。ある特定の実施形態においては、本明細書で提供されるいづれの組み換えMVAも、ヒトの対象に対して、 10^7 T C I D₅₀ または 10^8 T C I D₅₀ または 5×10^8 T C I D₅₀ の投与量で投与される。ある特定の実施形態においては、本明細書で提供されるいづれの組み換えFPVも、ヒトの対象に対して、 5×10^8 、 6.3×10^8 または 1×10^9 T C I D₅₀ の投与量で投与される。
10

【0218】

別の実施形態においては、本明細書で提供される組み換えMVAは、ヒトの対象に対して、組み換えFPVよりも少ない投与量で投与される。ある特定の実施形態においては、本明細書で提供されるいづれの組み換えMVA / FPVは、対象に対して、フィロウイルスへの暴露の前に、本明細書で提供されるいづれかの投与量で投与される。例えば、フィロウイルスへの暴露の1, 2, 3、もしくは4週間または1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11、もしくは12か月前に投与される。ある特定の実施形態においては、本明細書で提供されるいづれの組み換えMVAまたはFPVも、対象に対して、フィロウイルスへの暴露の後に、本明細書で提供されるいづれかの投与量で投与される。例えば、フィロウイルスへの暴露の1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23、もしくは24時間または1, 2, 3, 4, 5, 6、もしくは7日, 8, 9, 10, 11、もしくは12か月後に投与される。
20

【0219】

ある特定の実施形態においては、本明細書で提供される組み換えMVA / FPVは、対象に対して、1回の投与、または複数（つまり、2回、3回、4回等）の投与で投与される。ある特定の実施形態においては、本明細書で提供される組み換えMVA / FPVは、第1回（プライミング）および第2回（ブースティング）投与で投与される。第1回の投与量は組み換えMVAまたはFPVウイルスの 10^7 から 10^8 T C I D₅₀ を含み、第2回の投与量は組み換えMVAまたはFPVウイルスの 10^7 から 10^8 T C I D₅₀ を含みうる。
30

【0220】

ブースティング組成物は、一般的に、プライミング組成物の投与の数週間または数か月後に、1回または複数回投与される。例えば、約1または2週間または3週間、または4週間、または6週間、または8週間、または16週間、または20週間、または24週間、または28週間、または32週間または1~2年後である。

【0221】

好ましくは、最初のブースティング接種はプライミングの1~12週間または2~12週間後、より好ましくは、プライミングの1, 2, 4、または8週間後に投与する。好ましい実施形態においては、この最初のブースティング接種は、プライミングの4または8週間後に投与する。追加的好ましい実施形態においては、この最初のブースティングは、プライミングの少なくとも2週間または少なくとも4週間後に行う。さらに別の好ましい実施形態においては、この最初のブースティングは、プライミングの4~12週間または4~8週間後に行う。
40

【0222】

本明細書で提供される組み換えMVA / FPVは、全身的または局所的に投与できる。ある特定の実施形態においては、組み換えMVA / FPVは、非経口で、皮下、静脈内、筋肉内、または鼻腔内に、特に皮下に投与する。好ましくは、組み換えMVA / FPVは
50

、鼻腔内に投与する。別の実施形態においては、組み換えMVA / FPVは、熟練者に知られる他のいずれの投与経路によって投与する。さらに好ましい実施形態においては、組み換えMVA / FPVは筋肉内に投与し、好ましくは、組み換えMVA / FPVは約100μlから約10mlの間の範囲の体積で、例えば、約10⁻⁴から10⁻¹⁰のウイルス粒子/m³の濃度を好ましくは含んで、筋肉内に投与する。好ましくは、この組み換えMVA / FPVベクターは、0.25および1.0mlの間の範囲の体積で投与する。さらに好ましくは、この組み換えMVAまたはFPVベクターは、0.5mlの体積で投与する。

【0223】

組み換えMVAまたはFPVベクターを生成する方法

10

【0224】

さらなる実施形態は、本発明の任意の実施形態の組み換えMVAベクター、または前記組み換えMVAベクターのゲノムから発現した抗原決定基を生成する方法を含み、その方法は、

(a) 好ましくは、MVAウイルス粒子の生成のためのヘルパーウイルスの添加を用いて、いずれかの実施形態の組み換えMVAウイルスを用いて宿主細胞を感染させ、またはいずれかの実施形態の組み換えMVAウイルスの組み換えDNAを用いてこの細胞に遺伝子導入するステップ、

(b) 感染または遺伝子導入した細胞を培養するステップ、および

(c) 前記細胞からこのMVAウイルスおよび/または抗原決定基を単離するステップを含む。

20

【0225】

別の実施形態においては、本発明は、組み換えMVAウイルスおよび/または組み換えベクターを生成するための方法から得られた抗原決定基に関する。

【0226】

さらなる実施形態は、本発明の任意の実施形態の組み換えFPVベクター、または前記組み換えFPVベクターのゲノムから発現した抗原決定基を生成する方法を含み、その方法は、

(a) 好ましくは、FPVウイルス粒子の生成のためのヘルパーウイルスの添加を用いて、いずれかの実施形態の組み換えFPVウイルスを用いて宿主細胞を感染させ、またはいずれかの実施形態の組み換えFPVウイルスの組み換えDNAを用いてこの細胞に遺伝子導入するステップ、

(b) 感染または遺伝子導入した細胞を培養するステップ、および

(c) 前記細胞からこのFPVウイルスおよび/または抗原決定基を単離するステップを含む。

30

【0227】

別の実施形態においては、本発明は、組み換えFPVウイルスおよび/または組み換えベクターを生成するための方法から得られた抗原決定基に関する。

【0228】

別の実施形態においては、本発明は組み換えMVAベクターを生成する方法に関し、この方法は、

(a) MVAウイルスを用いて宿主細胞を感染させるステップ、

(b) いずれかのタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1個のヌクレオチド配列を含む組み換えベクターを用いて、感染した細胞に遺伝子導入するステップであって、前記核酸配列が、少なくとも1個のヌクレオチド配列をMVAウイルスゲノムの中に組み込むことを指示できるゲノムMVAウイルス配列をさらに含むステップ、および

(c) 生成した組み換えMVAウイルスを特定し、単離し、および任意に精製するステップ

を含む。

【0229】

40

50

別の実施形態においては、本発明は組み換えF P Vベクターを生成する方法に関し、この方法は、

- (a) F P Vウイルスを用いて宿主細胞を感染させるステップ、
 - (b) いずれかのタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1個のヌクレオチド配列を含む組み換えベクターを用いて、この感染した細胞に遺伝子導入するステップであって、前記核酸配列が、少なくとも1個のヌクレオチド配列をF P Vウイルスゲノムの中に組み込むことを指示できるゲノムF P Vウイルス配列をさらに含むステップ、および
 - (c) 生成した組み換えF P Vウイルスを特定し、単離し、および任意に精製するステップ
- を含む。

【0230】

本発明の他の実施形態は、本明細書が開示する発明の明細書および実施を考慮して、当業者に明白になるであろう。本明細書および実施例は説明のみのためであり、本発明の真の範囲および精神は添付の特許請求の範囲に示されていることが意図される。

なお、本願は、特許請求の範囲に記載の発明に関するものであるが、他の態様として以下も包含し得る。

1. (a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むM V Aベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である混合ワクチン。

2. (a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むM V Aベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むM V Aベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である混合ワクチン。

3. 前記第1の組成物が、第2のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むM V Aベクターを含む、上記1に記載の混合ワクチン。

4. 前記第1の組成物が、第3のフィロウイルスサブタイプまたは第4のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むM V Aベクターを含む、上記2～3に記載の混合ワクチン。

5. 前記フィロウイルスサブタイプが、エボラウイルス(E B O V)またはマールブルグウイルス(M A R V)から選択される、上記1～4に記載の混合ワクチン。

6. 前記E B O Vタンパク質の抗原決定基が、ザイールエボラウイルス(Z E B O V)、スーダンエボラウイルス(S E B O V)、コートジボワールエボラウイルス(E B O V - C d 1)、レストンエボラウイルス(E B O V - R e s t o n)およびブンディブギョエボラウイルス(B E B O V)からなる群から選択される1個またはそれ以上のE B O Vサブタイプに由来する、上記1～5に記載の混合ワクチン。

7. 前記フィロウイルスタンパク質の抗原決定基が、エンベロープグリコプロテイン(G P)、核タンパク質(N P)、ビリオンタンパク質35(V P 35)、ビリオンタンパク質40(V P 40)、ビリオンタンパク質30(V P 30)、ビリオンタンパク質24(V P 24)およびR N A依存性R N Aポリメラーゼタンパク質(L)からなる群から選択される、上記1～6に記載の混合ワクチン。

8. 前記第1の組成物中の前記M V Aベクターが、配列番号2、配列番号4、配列番号6

10

20

30

40

50

、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37からなる群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記1～7に記載の混合ワクチン。

9. 前記第1の組成物中のMVAベクターが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29および配列番号31を有する群から選択される4個の異なるフィロウイルスサブタイプに由来する抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記1～8に記載の混合ワクチン。

10. 前記第1の組成物中のMVAベクターが、配列番号6、配列番号20、配列番号29および配列番号31を有する群から選択される4個の異なるフィロウイルスサブタイプに由来する抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記1～9に記載の混合ワクチン。

11. 少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプに対して防御免疫反応を引き起こすのに使用する上記1～10に記載の混合ワクチンであって、前記第1の組成物を前記免疫反応をプライミングするのに使用し、前記第2の組成物を前記免疫反応をブースティングするのに使用する、前記混合ワクチン。

12. 少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプに対して防御免疫反応を引き起こすのに使用する上記1～10に記載の混合ワクチンであって、前記第2の組成物を前記免疫反応をプライミングするのに使用し、前記第1の組成物を前記免疫反応をブースティングするのに使用する、前記混合ワクチン。

13. 前記ブースティング組成物が、前記ブースティング組成物のベクターの2回またはそれ以上の投与量を含む、上記1～12に記載の混合ワクチン。

14. (a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物であるキット。

15. (a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物であるキット。

16. 前記第1の組成物が、第2のフィロウイルスサブタイプ、第3のフィロウイルスサブタイプまたは少なくとも4個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを含む、上記14～15に記載の混合ワクチン。

17. 前記第1の組成物中の前記MVAベクターが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37からなる群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記14～16に記載のキット。

18. 前記第1の組成物中の前記MVAベクターが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29および配列番号31を有する群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記14～16に記載のキット。

19. 前記第1の組成物中の前記MVAベクターが、配列番号6、配列番号20、配列番号29および配列番号31を有する群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記14～16に記載のキット。

20. 少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプに対して防御免疫反応を引き起こすの

10

20

30

40

50

に使用する上記 14～19 に記載のキットであって、前記第 1 の組成物を、前記免疫反応をプライミングするのに使用し、前記第 2 の組成物を前記免疫反応をブースティングするのに使用する、前記キット。

21. 少なくとも 1 個のフィロウイルスサブタイプに対して防御免疫反応を引き起こすのに使用する上記 14～19 に記載のキットであって、前記第 2 の組成物を、前記免疫反応をプライミングするのに使用し、前記第 1 の組成物を前記免疫反応をブースティングするのに使用する、前記キット。

22. 前記ブースティング組成物が、前記ブースティング組成物のベクターの 2 回またはそれ以上の投与量を含む、上記 14～21 に記載のキット。

23. フィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防における使用のためのフィロウイルスタンパク質の 2 個またはそれ以上の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え改変ワクシニアウイルス (MVA) ベクター。 10

24. 前記フィロウイルスが、エボラウイルス (EBOV) またはマールブルグウイルス (MARV) から選択される、上記 23 に記載の使用のための組み換え MVA ベクター。

25. 前記 EBOV タンパク質の前記抗原決定基が、ザイールエボラウイルス (ZEBOV)、スーダンエボラウイルス (SEBOV)、コートジボワールエボラウイルス (EBOV-CdI)、レストンエボラウイルス (EBOV-Reston) およびブンディブギヨエボラウイルス (BEBOV) からなる群から選択される 1 個またはそれ以上の EBOV サブタイプに由来する、上記 23 または 24 に記載の使用のための混合ワクチン。

26. 前記フィロウイルスタンパク質の抗原決定基が、エンベロープグリコプロテイン (Gp) である、上記 23～25 に記載の使用のための組み換え MVA ベクター。 20

27. 2 個またはそれ以上のエボラサブタイプの抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む、上記 23～26 に記載の使用のための組み換え MVA ベクター。

28. 前記フィロウイルスタンパク質の前記抗原決定基が、エンベロープグリコプロティン (Gp)、核タンパク質 (NP)、ビリオンタンパク質 35 (VP35)、ビリオンタンパク質 40 (VP40)、ビリオンタンパク質 30 (VP30)、ビリオンタンパク質 24 (VP24) および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼタンパク質 (L) からなる群から選択される、上記 23～27 に記載の組み換え MVA ベクター。

29. 前記フィロウイルスタンパク質の前記抗原決定基が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 20、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 34 および配列番号 37 からなる群から選択される、上記 23～28 に記載の使用のための組み換え MVA ベクター。 30

30. 前記フィロウイルスタンパク質の前記抗原決定基が、配列番号 29 および／または配列番号 6、配列番号 20 および配列番号 31 を含む、上記 23～28 に記載の使用のための組み換え MVA ベクター。

31. 前記抗原決定基をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 28 および／または配列番号 5、配列番号 19 および配列番号 30 を含む、上記 23～28 に記載の使用のための組み換え MVA ベクター。

32. フィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防における使用のための、フィロウイルスグリコプロテインの抗原タンパク質をコードし、さらにフィロウイルスピリオンタンパク質 40 (VP40) をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え MVA ベクター。 40

33. 前記フィロウイルスピリオンタンパク質 40 (VP40) の抗原タンパク質をコードするヌクレオチド配列が配列番号 33 を含む、上記 32 の使用のための組み換え MVA ベクター。

34. (a) 配列番号 5、配列番号 19 および配列番号 30、(b) 配列番号 5、配列番号 19、配列番号 28 および配列番号 30、ならびに (c) 配列番号 19 および配列番号 33 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む組み換え MVA ベクター。

35. 前記組み換えウイルスを作るのに使用した前記 MVA は、MVA-BN ウィルス、または鶏胚線維芽 (CEF) 細胞においてインビトロで生殖複製する能力を有するが、ヒ 50

トケラチン生成細胞株 H a C a t 、ヒト骨肉腫細胞株 1 4 3 B , ヒト胚腎臓細胞株 2 9 3 、およびヒト頸部腺がん細胞株 H e L a においては生殖複製する能力を有しない誘導体である、上記 1 ~ 1 3 に記載の混合ワクチン、上記 2 3 ~ 3 3 に記載の使用のための組み換え M V A ベクターまたは上記 3 4 の組み換え M V A ベクター。

3 6 . 前記組み換えウイルスを作るのに使用した前記 M V A は、欧洲動物細胞培養コレクション (E C A C C) に受入番号 V 0 0 0 8 3 0 0 8 として預託されている、 M V A - B N である、上記 1 ~ 1 3 に記載の混合ワクチン、上記 2 3 ~ 3 3 に記載の使用のための組み換え M V A ベクターまたは上記 3 4 の組み換え M V A ベクター。

3 7 . 同時刺激分子をコードする核酸を含む、上記 2 3 ~ 3 3 、 3 5 、または 3 6 に記載の使用のための組み換え M V A ベクター。

3 8 . 対象の免疫反応に作用するための、上記 2 3 ~ 3 7 に記載の組み換え M V A ベクター。

3 9 . 薬剤またはワクチンとして使用するための、上記 2 3 ~ 3 7 に記載の組み換え M V A ベクター。

4 0 . 上記 2 3 ~ 3 7 に記載の前記組み換え M V A ベクターを含むワクチン、組成物または細胞。

4 1 . 前記組み換え M V A ベクターを、 1 回、 2 回、 3 回または 4 回投与する、上記 2 3 ~ 3 3 または 3 5 ~ 3 9 に記載の使用のための前記組み換え M V A 。

4 2 . フィロウイルス感染症に対して強化された免疫反応を誘発する薬剤またはワクチンとして使用するための、上記 3 2 ~ 3 3 の組み換え M V A であって、前記 M V A は、処置する対象において、フィロウイルス様粒子を生成する能力を有する、前記組み換え M V A 。

4 3 . 第 1 の投与 (プライミング) のための第 1 のバイアルまたは容器、および第 2 の投与 (ブースティング) のための第 2 のバイアルまたは容器に入った、上記 2 3 ~ 3 3 または 3 5 ~ 3 9 に記載の組み換え M V A ベクターを含むキット。

4 4 . 3 個目、 4 個目またはさらなるバイアルまたは容器に入った、 3 回目、 4 回目またはさらなる投与のための前記組み換え M V A ベクターを含む、上記 4 3 に記載のキット。

4 5 . フィロウイルスに起因する病気の治療および / または予防のための薬剤を製造のための、上記 1 ~ 1 1 の前記混合ワクチンまたは上記 2 3 ~ 3 6 の前記組み換え M V A ベクターの使用。

4 6 . 上記 2 3 ~ 3 6 のいずれかの M V A ベクターおよび医薬的に許容される担体、希釈剤および / または添加剤を含む薬剤組成物。

4 7 . 配列番号 2 6 を有する F P V - 4 0 K プロモーターの制御下にあるフィロウイルストンパク質の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え F P V ベクター。

4 8 . 前記フィロウイルスが、エボラウイルス (E B O V) またはマールブルグウイルス (M A R V) から選択される、上記 4 7 の組み換え F P V ベクター。

4 9 . 前記 E B O V タンパク質の前記抗原決定基が、ザイールエボラウイルス (Z E B O V) 、スーダンエボラウイルス (S E B O V) 、コートジボワールエボラウイルス (E B O V - C d I) 、レストンエボラウイルス (E B O V - R e s t o n) およびブンディブギョエボラウイルス (B E B O V) からなる群から選択される 1 個またはそれ以上の E B O V サブタイプに由来する、上記 4 8 に記載の組み換え F P V ベクター。

5 0 . 前記フィロウイルスタンパク質の前記抗原決定基が、エンベロープグリコプロテイン (G P) 、核タンパク質 (N P) 、ビリオンタンパク質 3 5 (V P 3 5) , ビリオンタンパク質 4 0 (V P 4 0) , ビリオンタンパク質 3 0 (V P 3 0) , ビリオンタンパク質 2 4 (V P 2 4) および R N A 依存性 R N A ポリメラーゼタンパク質 (L) からなる群から選択される、上記 4 7 ~ 4 9 に記載の組み換え F P V 。

5 1 . 前記フィロウイルスタンパク質の前記抗原決定基が、配列番号 2 、配列番号 4 、配列番号 6 、配列番号 2 0 、配列番号 2 9 、配列番号 3 1 、配列番号 3 4 および配列番号 3 7 の群から選択される抗原タンパク質をコードする、上記 5 0 に記載の組み換え F P V 。

クター。

52. フィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防で使用するための、上記47～51に記載の組み換えF PV。

53. フィロウイルスに対する免疫反応をプライミングまたはブースティングするために使用する、上記47～51に記載の組み換えF PV。

54. 前記組み換えF PVベクターを、1回、2回、3回または4回投与する、上記52または53に記載の使用のための組み換えF PV。

55. フィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防のための薬剤またはワクチンを製造するための、上記47～51の前記組み換えF PVの使用。

56. 対象において、フィロウイルスに対して免疫反応を誘発する方法であって、対象に、
(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも1個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を投与すること含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である、前記方法。

57. 対象において、フィロウイルスに対して免疫反応を誘発する方法であって、対象に、
(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも2個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第1の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第1のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを、免疫学的に有効な量で含む第2の組成物を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である、前記方法。

58. 前記第1の組成物が、第2のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを含む、上記56に記載の方法。

59. 前記第1の組成物が、第3のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含むMVAベクターを含む、上記58に記載の方法。

60. 前記第1の組成物中の前記MVAベクターが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37からなる群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記56～59に記載の方法。

61. 前記第1の組成物中の前記MVAベクターが、少なくとも4個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記56～59に記載の方法。

62. 前記第1の組成物中の前記MVAベクターが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号20、配列番号29、配列番号31、配列番号34および配列番号37を有する4個の異なるフィロウイルスサブタイプに由来する抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記56～61に記載の方法。

63. 前記ブースティング組成物を、前記プライミング組成物を投与した2～12週後に投与する、上記56～62に記載の方法。

64. 前記ブースティング組成物を前記対象に2回またはそれ以上投与する上記56～63に記載の方法。

65. 対象者の免疫反応に作用する方法であって、上記23～39に記載の組み換えMVAベクターを前記対象に投与することを含む、前記方法。

66. フィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防で使用するための組み換えMVAベクターを生成する方法であって、

10

20

30

40

50

- (a) MVAウイルスを用いて宿主細胞を感染させるステップ、
 (b) 上記 23～37 中いずれかのフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 個のヌクレオチド配列を含む組み換えベクターを用いて、前記感染した細胞に核酸を導入するステップであって、前記核酸配列が、少なくとも 1 個の前記ヌクレオチド配列を MVAウイルスゲノムの中に融合させることを指示できるゲノム MVAウイルス配列をさらに含むステップ、および
 (c) 前記生成した組み換え MVAウイルスを特定し、分離し、および任意に精製するステップ
 を含み、

好ましくは、ステップ(a)とステップ(b)の順序は、ステップ(b)が 1 番目のステップで、ステップ(a)が 2 番目のステップとなるように変更できる、前記方法。 10

67. フィロウイルスに起因する病気の治療および／または予防で使用するための組み換え F PV ベクターを生成する方法であって、

- (a) F PV ウイルスを用いて宿主細胞を感染させるステップ、
 (b) 上記 47～51 のいずれかのフィロウイルスタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 個のヌクレオチド配列を含む組み換えベクターを用いて、前記感染した細胞に核酸を導入するステップであって、前記核酸配列が、少なくとも 1 個の前記ヌクレオチド配列を F PV ウイルスゲノムの中に融合させることを指示できるゲノム F PV ウイルス配列をさらに含むステップ、および
 (c) 生成された組み換え F PV ウイルスを特定し、分離し、および任意に精製するステップ
 を含み、

好ましくは、ステップ(a)とステップ(b)の順序は、ステップ(b)が 1 番目のステップで、ステップ(a)が 2 番目のステップとなるように変更できる、前記方法。 20

68. 対象において、フィロウイルスに対して免疫反応を誘発する方法であって、対象に、

- (a) フィロウイルスタンパク質の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 1 の組成物、および
 (b) フィロウイルスタンパク質の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物
 を投与することを含み、
 または
 (c) フィロウイルスタンパク質の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 1 の組成物、および
 (d) フィロウイルスタンパク質の少なくとも 1 個の抗原決定基をコードする核酸を含む F PV ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物
 を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である、前記方法。

69. 前記抗原決定基が、 EBOV グリコプロテイン、好ましくは、ザイールエボラウイルス(ZEBOV)、スーダンエボラウイルス(SEBOV)、コートジボワールエボラウイルス(EBOV - CdI) レストンエボラウイルス(EBOV - Reston) およびブンディブギヨエボラウイルス(BEBOV) からなる群から選択される EBOV グリコプロテインである、上記 68 の方法。 40

70. 前記フィロウイルスタンパク質の前記抗原決定基が、エンベロープグリコプロテイン(GP)、核タンパク質(NP)、ビリオンタンパク質 35(VP35)、ビリオンタンパク質 40(VP40)、ビリオンタンパク質 30(VP30)、ビリオンタンパク質 24(VP24) および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼタンパク質からなる群から選択される、上記 68 の方法。

71. 前記フィロウイルスタンパク質の前記抗原決定基が、配列番号 2 、配列番号 4 、配

10

20

30

40

50

列番号 6、配列番号 20、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 34 および配列番号 37 からなる群から選択される、上記 70 に記載の方法。

72. 対象において、防護免疫力または防護免疫反応を提供する方法であって、対象に、
(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも 1 個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 1 の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第 1 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物を投与すること含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である、前記方法。 10

73. 対象において、防護免疫力または防護免疫反応を提供する方法であって、対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも 2 個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 1 の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第 1 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である、前記方法。 20

74. 前記第 1 の組成物が、第 2 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを含む、上記 72 に記載の方法。

75. 前記第 1 の組成物が、第 3 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを含む、上記 74 に記載の方法。

76. 前記第 1 の組成物中の前記 MVA ベクターが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 20、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 34 および配列番号 37 からなる群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記 72～75 に記載の方法。

77. 前記第 1 の組成物中の前記 MVA ベクターが、少なくとも 4 個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記 72～75 に記載の方法。 30

78. 前記第 1 の組成物中の前記 MVA ベクターが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 20、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 34 および配列番号 37 を有する 4 個の異なるフィロウイルスサブタイプに由来する抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記 72～77 に記載の方法。

79. 前記ブースティング組成物を、前記プライミング組成物を投与した 2～12 週後に投与する、上記 72～78 に記載の方法。

80. 前記ブースティング組成物を対象に 2 回またはそれ以上投与する上記 72～79 に記載の方法。

81. 前記第 1 の組成物が、第 2 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを含む、上記 72 に記載の方法。 40

82. 前記第 1 の組成物が、第 3 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む MVA ベクターを含む、上記 72 または 73 に記載の方法。

83. 前記第 1 の組成物中の前記 MVA ベクターが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 20、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 34 および配列番号 37 からなる群から選択される抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記 72～82 に記載の方法。

84. 前記第 1 の組成物中の前記 MVA ベクターが、少なくとも 4 個のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記 72～82 に記載の方法。

85. 前記第 1 の組成物中の前記 MVA ベクターが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 20、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 34 および配列番号 37 を有 50

する 4 個の異なるフィロウイルスサブタイプに由来する抗原タンパク質をコードする核酸を含む、上記 7 2 ~ 8 4 に記載の方法。

8 6 . 前記ブースティング組成物を、前記プライミング組成物を投与した 2 - 1 2 週後に投与する、上記 8 4 ~ 8 5 に記載の方法。

8 7 . 前記ブースティング組成物を対象に 2 回またはそれ以上投与する上記 7 2 ~ 8 6 に記載の方法。

8 8 . 対象において、フィロウイルス様粒子を生成する方法であって、対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも 1 個のフィロウイルスグリコプロテインおよびフィロウイルスピリオンタンパク質 4 0 (V P 4 0) の抗原タンパク質をコードする核酸を含む、免疫学的に有効な量の M V A ベクター、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第 1 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む、免疫学的に有効な量の鶏痘ベクターまたは M V A ベクターを投与することを含み、

前記ベクターの一方はプライミングワクチンであり、他方のベクターはブースティングワクチンである、前記方法。

8 9 . 対象において、フィロウイルス様粒子を生成する方法であって、対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも 1 個のフィロウイルスグリコプロテインおよびフィロウイルスピリオンタンパク質 4 0 (V P 4 0) の抗原タンパク質をコードする核酸を含む M V A ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 1 の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第 1 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターまたは M V A ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物

を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である方法。

9 0 . 対象において、フィロウイルスに対して強化した免疫反応を誘発する方法であって、この方法は対象に：

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも 1 個のフィロウイルスグリコプロテインおよびフィロウイルスピリオンタンパク質 4 0 (V P 4 0) の抗原タンパク質をコードする核酸を含む、免疫学的に有効な量の M V A ベクター、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第 1 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む、免疫学的に有効な量の鶏痘ベクターまたは M V A ベクターを投与することを含み、

前記ベクターの一方はプライミングワクチンであり、他方のベクターはブースティングワクチンである、前記方法。

9 1 . 対象において、フィロウイルスに対して強化した免疫反応を誘発する方法であって、対象に、

(a) 医薬的に許容される担体と共に、少なくとも 1 個のフィロウイルスグリコプロテインおよびフィロウイルスピリオンタンパク質 4 0 (V P 4 0) の抗原タンパク質をコードする核酸を含む M V A ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 1 の組成物、および

(b) 医薬的に許容される担体と共に、第 1 のフィロウイルスサブタイプの抗原タンパク質をコードする核酸を含む鶏痘ベクターまたは M V A ベクターを、免疫学的に有効な量で含む第 2 の組成物

を投与することを含み、

前記組成物の一方はプライミング組成物であり、他方の組成物はブースティング組成物である、前記方法。

9 2 . 前記フィロウイルス V P 4 0 が、ザイールエボラウイルス (Z E B O V) 、スーザンエボラウイルス (S E B O V) 、コートジボワールエボラウイルス (E B O V - C d I) 、レストンエボラウイルス (E B O V - R e s t o n) およびブンディブギョエボラウイルス (B E B O V) からなる群から選択される、上記 8 8 から 9 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

93. 前記フィロウイルスVP40が、ZEBOV、SEBOVおよびMARVの1個またはそれ以上から選択される、上記88から91に記載の方法。

94. 前記フィロウイルスVP40が、ザイールメイインガまたはマールブルグムソケの群から選択される、上記88から91に記載の方法。

95. 前記フィロウイルスグリコプロテインおよび前記フィロウイルスVP40が同じフィロウイルス株から選択される、上記88から91に記載の方法。

96. 前記MVAベクターが、フィロウイルス核タンパク質(NP)をコードする核酸をさらに含み、好ましくは、前記フィロウイルス核タンパク質および前記フィロウイルスVP40が同じフィロウイルス株から由来する、上記88から91に記載の方法。

97. 前記フィロウイルス株が、ザイールメイインガ、ザイールキクウィト、ザイールガボン、コートジボワールエボラウイルス、スーダンボニフェス、スーダンマリオ、スーダングル、マールブルグラブン、マールブルグオゾリン、マールブルグラタイチャク、マールブルグムソケ、マールブルグアンゴラ、好ましくは、ザイールメイインガまたはコートジボワールエボラウイルスの群から選択される、上記96に記載の方法。

98. 前記フィロウイルスVP40が、配列番号34のタンパク質配列をコードする核酸を含む、上記88から96に記載の方法。

99. 前記フィロウイルスVP40の抗原タンパク質をコードする核酸が配列番号33を含む、上記88から96に記載の方法。

100. 前記組み換え鶏痘ベクターを、1回、2回、3回または4回投与する、上記88から99に記載の方法。

10

20

【実施例】

【0231】

以下の詳細な実施例は、本発明をより良く理解することに役立つことを意図している。しかし、本発明はこの実施例によって制限されない。本発明の他の実施形態は、本明細書が開示する発明の明細書および実施を考慮して、当業者に明白になるであろう。

【0232】

実施例1：組み換えMVAの構築

以下のセクションは、フィロウイルスエンベロープグリコプロテインおよび/またはさらなるフィロウイルスタンパク質の抗原決定基を発現している1個またはそれ以上の異種核酸を含む組み換えMVAの構築を記載する。本明細書で記載する他のすべての構築物は同様の方法で作られた。

30

【0233】

MVA-mBN252B(PrS-GP-MARV-ムソケ)の構築

天然に存在するGP-MARV-ムソケ遺伝子(ビクトリア湖単離株)の完全長DNA配列は、MARVワクチン候補のMVA-mBN252Bの構築のための基準配列としての機能を果たした。完全長GP-MARV-ムソケをコードするヌクレオチド配列を、コドンの使用をヒトにおける発現に対して、及び内部同種組み換え現象を最小化または防止するように最適化して、Geneart AG(ドイツ、レーゲンスブルク)によって合成した。コドン最適化は、野生型DNA配列を変化させたが、コドン最適化された配列は野生型GP-MARV-ムソケ(配列番号6;NCBL受入番号ABA87127.1)と同一のアミノ酸配列をコードする。GP-MARV-ムソケの発現は、ワクシニアウイルスプロモーターの初期および後期のエレメントから設計された合成プロモーターであるプロモーターPrSによって引き起こされる(配列番号23;S.Chakrabarati et al., "Compact, Synthetic Vaccinia Virus Early/Late Promoter for Protein Expression", Biotechniques 23(6):1094-1097(1997)も参照)。コドン最適化されたGP-MARV-ムソケ遺伝子を、欠失部位または遺伝子間の(非コード)領域(IGR)を含むMVA-BNゲノムの異なる特定の領域を標的にした、いくつかのカスタマイズされた組み換えプラスミドの1個を使用した標準的な方法(下記参照)によってMVA-BNゲノムの中へ挿入した。

40

50

【0234】

このコドン最適化されたG P - M A R V - ムソケ遺伝子をM V A - B N M V A - B Nゲノムの中へ挿入するために、鶏胚線維芽細胞（C E F細胞）をM V A - B Nで感染させ、そして次にこの組み換えプラスミドp B N 4 3 3（図5A）で遺伝子導入した。p B N 4 3 3は、B s p E 1 / N h e 1制限によってプラスミドp B N X 1 9 7の中へ挿入された合成P r Sプロモーターの制御の下で、このコドン最適化されたG P - M A R V - ムソケ遺伝子（配列番号6（アミノ酸）をコードしている配列番号5（D N A））を含んでいた（図4B）。プラスミドp B N 4 3 3は、さらに、M V A - B Nゲノム中のI G R 1 4 8 / 1 4 9の側面に位置するM V A - B N D N A配列、およびl o x Pが側面に位置する選択カセットを含む。l o x Pは、C r eリコンビナーゼによって介される組み換えによる、この選択カセットの後の除去を可能にする。プラスミド中の側面に位置する配列とM V A - B Nゲノム（つまり、I G R 1 4 8 / 1 4 9）中の望ましい挿入部位における同種配列の間の同種組み換えに続いて、プラスミドのコード部分がM V A - B Nゲノムの望ましい部位の中へ挿入された。

【0235】

増幅およびブラーク精製（継代9回、そのうちブラーク精製3回を含む）の後、選択的条件の下（ミコフェノール酸／キサンチンおよびヒポキサンチン）で、G P - M A R V - ムソケの遺伝子を含む、M V A - m B N 2 5 2 A（P r e M a s t e r A）と命名されたこの組み換えM V A - B N生産物が得られた。組み換えM V A - m B N 2 5 2 A P r e M a s t e rウイルス株を、M V A - B N（親ウイルス、データなし）の除去について、（異質遺伝子が挿入されたM V A - B Nゲノム配列に固有のプライマーを使用して遺伝子に固有のP C Rによって（データなし））領域の側面に挿入するとともに、挿入された遺伝子の正確な配列について、細菌の不存在について（無菌テスト（データなし））、および（配列を決定して（データなし））挿入体の存在および正確なサイズについて検査した。M V A - m B N 2 5 2 A P r e M a s t e rウイルス株の力価も決定された。

【0236】

挿入された配列中の選択カセットの存在は、培養中の組み換えM V A - B Nウイルスのポジティブ選択を可能にする。最終的な組み換えM V A - m B N 2 5 2 Bを発生させるために、C r e / l o x P系を使用して、この選択カセットを、M V A - m B N 2 5 2 A P r e M a s t e rウイルス株から取り除いた、選択カセットを取り除くために、プラスミドp B N 4 3 3（つまり、P r Sプロモーターの制御の下にあるG P - M A R V - ムソケ、プラスl o x P部位が側面にある選択カセット）の挿入体を含む組み換えM V A - B Nによって感染させたC E F細胞に、C r eリコンビナーゼをコードしている発現プラスミドであるp B N 2 7 4をさらに遺伝子導入した（図4C）。部位固有のC r eリコンビナーゼは、標的l o x P配列の側面にある選択カセットD N A配列の正確な除去を促進し、選択カセットを完全に除去した。その結果生じたウイルスは、非選択的条件（継代27回、そのうちブラーク精製を9回含む）の下でブラーク精製し、選択カセットを欠く組み換え体ウイルスM V A - m B N 2 5 2 Bが単離された。選択カセットの完全な除去を、ネステッドP C Rによって確認した（データは示さず）。最後に、組み換えM V A - m B N 2 5 2 BによるG P - M A R V - ムソケの発現は、逆転写酵素P C R（R T - P C R（データなし））によって確認された。

【0237】

M V A - m B N 2 2 6 B（多抗原M V A - F i l o）の構築

M V A - m B N 2 2 6 Bからのすべての導入遺伝子発現については、天然に存在する遺伝子の完全長D N A配列が、基準配列としての機能を果たした。これらは、コドン使用を、ヒトにおける発現のために、及び内部同種組み換え現象を最小化または防止するよう最適化して、G e n e a r t A G（ドイツ、レーゲンスブルク）によって合成された。コドン最適化は、アミノ酸配列を変更しないで野生型D N A配列を変更した。M V A - m B N 2 2 6 Bは以下のフィロウイルス遺伝子を含む：G P - S E B O V（配列番号30）；N P - E B O V - C d I（配列番号28）；G P - Z E B O V、マイインガ株（G P -

Z E B O V - メイインガ、配列番号 19) および G P - M A R V - ムソケ (配列番号 5) 。 G P - S E B O V および G P - M A R V - ムソケは P r S プロモーター (配列番号 23) の制御の下で発現し、 N P - E B O V - C d I は P r L E 1 または改変 P r L E 1 プロモーター (配列番号 27 および配列番号 32) の制御の下で発現し、そして G P - Z E B O V - メイインガは P r 7 . 5 プロモーター (配列番号 25) の制御の下で発現する。

【 0238 】

P r S プロモーターは、ワクシニアウイルスプロモーターの初期および後期エレメントから設計された合成プロモーターであり、それは遺伝子発現の初期および後期の両段階の間、導入遺伝子発現を確保する。同様に、ワクシニアウイルス 7 . 5 k D a 遺伝子からの P r 7 . 5 プロモーターは、強力な初期および後期プロモーターである。つまり、その制御下にある導入遺伝子は、遺伝子発現の初期および後期の両段階の間も発現することを意味する (配列番号 25 ; M . A . Cochran et al . " In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals " , J . Virol . 54 (1) : 30 - 37 (1985) も参照) 。プロモーター P r L E 1 は、 P r 7 . 5 に由来する 5 個の最適化された初期エレメントに融合した牛痘ウイルス (ATI) の A タイプ封入プロモーターから成る合成プロモーターである (配列番号 27 ; K . Baur et al . , " Immediate - Early Expression of a Recombinant Antigen by Modified Vaccinia Virus Ankara Breaks the Immunodominance of Strong Vector - Specific B8R Antigen in Acute and Memory CD8 T - Cell Responses " , J . Virol . 84 (17) : 8743 - 8752 (2010) も参照) 。したがって、 N P - E B O V - C d I は、発現の初期および後期の両局面の間、発現している。さらには、 P r L E 1 は、特に強力な細胞媒介免疫反応を誘導することが示された。 M V A - m B N 226B の継代の間、 P r 7 . 5 に由来する 5 個の初期エレメントの 1 個は、おそらくは同種の組み換えによって失われた。しかし、分析によると、 N P - E B O V - C d I の十分な発現レベルを示した (データはなし) ので、改変 P r L E 1 プロモーターを置き換えないで改変構築体が使用された。

【 0239 】

M V A - B N ゲノムの中へ異質の遺伝子を挿入することについては、この M V A - B N ゲノムの異なる欠失および遺伝子間領域 (I G R) を標的にするいくつかの組み換えプラスミドが発生した。組み換え M V A - B N 生産物を発生させるためには、一般的に入手できる制限酵素および従来の分子生物学の技術を使って、興味のある異質配列を、これらのいずれの基本的なベクター、例えば、 I G R 88 / 89 を標的にする p B N X 186 (図 4 A 参照) または I G R 148 / 149 を標的にする p B N X 197 (図 4 B 参照) の中へ挿入することができる。望ましい導入遺伝子を発現している組み換え M V A - B N 単離株を生成するために、 C E F 細胞をまず M V A - B N で感染させ、次に、 1 個または複数の望ましい導入遺伝子を発現し、および組み換えウイルスにポジティブ選択を可能にする選択カセットを含む、 1 個またはそれ以上の組み換えプラスミドを用いて遺伝子導入する。同種の組み換えの間、プラスミドを側面に有する配列が、 M V A - B N ウィルスゲノムの挿入部位の同種配列と組み換えをする。これは、 M V A - B N ゲノムの出発物質 (例えば、 I G R 148 / 149 、 I G R 88 / 89 等) として使用される基底ベクターによって標的とされる部位の中へプラスミド配列を挿入する。 p B N X 197 は、 I G R 148 / 149 を標的にし (図 4 B) 、そして最終組み換えプラスミド p B N 384 の構築のための出発プラスミドとして使用された (図 5 B) 。 プラスミド p B N 384 は、 G P - Z E B O V - メイインガおよび G P - M A R V - ムソケを発現する。 p B N X 186 は、 I G R 88 / 89 を標的にし (図 4 A) 、そして最終組み換えプラスミド p B N 385 の構築のための出発プラスミドとして使用された (図 5 C) 。 プラスミド p B

10

20

30

40

50

N 3 8 5 は G P - S E B O V および N P - E B O V - C d I を発現する。

【 0 2 4 0 】

G P - S E B O V 、 N P - E B O V - C d I 、 G P - Z E B O V - メイインガ、 および G P - M A R V - ムソケ導入遺伝子を M V A - B N の中へ挿入するために、 C E F 細胞を M V A - B N で感染させ、 次いで、 組み換えプラスミド p B N 3 8 4 および p B N 3 8 5 を用いて遺伝子導入した。 増幅およびブラーク精製（継代 10 回、 そのうち 3 回はブラーク精製を含む）の後、 二重の選択的条件の下（ミコフェノール酸 / キサンチンおよびヒポキサンチン、 さらにはゲンチシン）で、 3 個のグリコプロテイン、 1 個の核タンパク質および 2 個の選択カセットの遺伝子を含む、 M V A - m B N 2 2 6 A (中間 P r e M a s t e r) と命名されたこの組み換え M V A - B N 生産物が得られた。 組み換え M V A - m B N 2 2 6 A P r e M a s t e r ウイルス株を、 M V A - B N (親ウイルス、 データなし) の除去について、 (異質遺伝子が挿入された M V A - B N ゲノム配列に固有のプライマーを使用して遺伝子に固有の P C R による (データなし)) 挿入隣接領域とともに、 挿入された遺伝子の正確な配列について、 細菌の不存在について (無菌テスト (データなし)) 、 および (配列を決定して (データなし)) 挿入体の存在および正確なサイズについて検査した。 M V A - m B N 2 5 2 A P r e M a s t e r ウイルス株の力価も、 決定された。

【 0 2 4 1 】

非選択的条件（継代 20 回、 そのうちブラーク精製を 6 回含む）の下での、 さらなる増幅、 選択カセットの除去およびブラーク精製の後、 選択カセットを欠く組み換え体ウイルス M V A - m B N 2 2 6 B を単離した。 選択カセットの完全な除去を、 ネステッド P C R によって確認した（データなし）。 最後に、 組み換え M V A - m B N 2 2 6 B による導入遺伝子の発現を、 逆転写酵素 P C R (R T - P C R (データなし)) によって確認した。

【 0 2 4 2 】

M V A - m B N 2 5 4 A (M V A - G P - Z E B O V) の構築

M V A - m B N 2 5 4 A から発現した G P - Z E B O V 導入遺伝子については、 この天然に存在する遺伝子の完全長 D N A 配列が、 基準配列としての機能を果たした。 上記「 M V A - m B N 2 2 6 B の構築」で記載されているように、 G P - Z E B O V 遺伝子は、 コドン使用を、 ヒトにおける発現のために、 及び内部同種組み換え現象を最小化または防止す 30 ように最適化して、 G e n e a r t A G (ドイツ、 レーゲンスブルク) によって合成された。 コドン最適化は、 アミノ酸配列を変更しないで野生型 D N A 配列を変更した。 G P - Z E B O V - メイインガは、 P r S 5 E プロモーター（配列番号 24 ）の制御の下で発現する。

【 0 2 4 3 】

この P r S 5 E (配列番号 24) は、 合成初期および後期プロモーターから設計した合成強力初期および後期プロモーター (Chakrabarti et al . , 1997) であり、 ワクシニアウイルス 7.5 kDa 遺伝子からの P r 7.5 プロモーターの 5 個の初期エレメントがその後に続く（配列番号 25 ; M . A . Cochran et al . , “ In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals ” , J . Virol . 54 (1) : 30 - 37 (1985) も参照）。この P r S 5 E プロモーターは、 特許出願 WO 2013 / 189611 A 1 に、 より詳細に記載されている。

【 0 2 4 4 】

M V A - B N ゲノムの中へ異質の遺伝子を挿入することについては、 この M V A - B N ゲノムの異なる欠失および遺伝子間領域 (I G R) を標的にするいくつかの組み換えプラスミドが構築された。 組み換え M V A - B N 生産物を発生させるために、 一般的に入手できる制限酵素および従来の分子生物学の技術を使って、 対象とする異質配列を、 これらのいずれの基底ベクター、 例えば、 I G R 1 4 8 / 1 4 9 を標的にする p B N X 1 9 7 (50

図4B参照)の中へ挿入することができる。望ましい導入遺伝子を発現している組み換えMVA-BN単離株を生成するために、CEF細胞をまずMVA-BNで感染させ、次に、1個または複数の望ましい導入遺伝子を発現し、および組み換えウイルスにポジティブ選択を可能にする選択カセットを含む、1個またはそれ以上の組み換えプラスミドを用いて遺伝子導入する。同種の組み換えの間、プラスミドに隣接する配列が、MVA-BNウイルスゲノムの挿入部位の同種配列と組み換えをする。これは、MVA-BNゲノムの出発物質(例えば、IGR 148/149)として使用される基底ベクターによって標的とされる部位の中へ標的配列を挿入する。pBNX197は、IGR 148/149を標的にし(図4B)、そして最終組み換えプラスミドpBN436の構築のための出発プラスミドとして使用された(図5D)。プラスミドpBN436は、GP-ZEBOV-メイインガを含む。
10

【0245】

GP-ZEBOV-メイインガ導入遺伝子をMVA-BNに挿入するために、CEF細胞をMVA-BNで感染させ、次いで、組み換えプラスミドpBN436を用いて遺伝子導入した(図5D)。増幅およびブラーク精製(継代9回、そのうちブラーク精製3回を含む)の後、選択的条件の下(ミコフェノール酸/キサンチンおよびヒポキサンチン)で、GP-ZEBOV-メイインガの遺伝子および選択マーカーGPT-RFP融合遺伝子を含む、MVA-mBN254A(PreMaster)と命名された組み換えMVA-BN生産物が得られた(図3C)。組み換えMVA-mBN254A PreMasterウイルス株を、MVA-BN(親ウイルス、データなし)の除去について、(異質遺伝子が挿入されたMVA-BNゲノム配列に特異的なプライマーを使用して遺伝子に固有のPCRによる(データなし))挿入隣接領域とともに、挿入された遺伝子の正確な配列について、細菌の不存在について(無菌テスト(データなし))、および(配列を決定して(データなし))挿入体の存在および正確なサイズについて検査した。MVA-mBN254A PreMasterウイルス株の力価も、決定された。最後に、組み換えMVA-mBN254Aによる導入遺伝子の発現を、逆転写酵素PCR(RT-PCR(データなし))によって確認した。
20

【0246】

他の構築物を上に従って生成した。特に、MVA-mBN255は、IGR 88/89に組み込まれたPrSプロモーターの制御の下でNP-EBOV-CdI(配列番号28)を、IGR 136/137に組み込まれたPrSプロモーターの制御の下でVP40・ZEBOV(配列番号33)を、およびIGR 148/149に組み込まれたPrS5Eプロモーターの制御の下でGP-ZEBOV(配列番号19)を、発現した(図13)。
30

【0247】

FPV-mBN368A(FPV-GP-ZEBOV)およびFPV-mBN391(FPV-マルチ-filo)の構築

FPV-mBN368Aから発現したGP-ZEBOV導入遺伝子については、天然に存在する遺伝子の完全長DNA配列が、基準配列としての機能を果たした。GP-ZEBOV遺伝子は、「MVA-mBN226Bの構築」で記載されているように、コドン使用をヒトにおける発現のために最適化して、Geneart AG(ドイツ、レーゲンスブルク)によって合成された。コドン最適化は、アミノ酸配列を変更しないで野生型DNA配列を変更した。GP-ZEBOV-メイインガは、FPV-40Kプロモーター(配列番号26)の制御の下で発現する。このFPV-40Kプロモーターは、FPVの配列をコードしている40Kタンパク質のFPVプロモーター配列である。
40

【0248】

FPVゲノムの中へ異質の遺伝子を挿入することについては、FPVゲノムの中へ、異なる組み込み部位を標的にするいくつかの組み換えプラスミドが構築された。組み換えFPV生産物を発生させるために、一般的に入手できる制限酵素および従来の分子生物学の技術を用いて、対象とする異質配列を、これらのいずれかの基底ベクター、例えば、挿入
50

部位 B a m H I J を標的にする p B N X 2 2 1 (図 4 D 参照) 、の中へ挿入することができる。望ましい導入遺伝子を発現している組み換え F P V 単離株を生成するために、 C E F 細胞をまず F P V で感染させ、次に、 1 個または複数の望ましい導入遺伝子を発現し、および組み換えウイルスにポジティブ選択を可能にする選択カセットを含む、 1 個またはそれ以上の組み換えプラスミドを用いて遺伝子導入する。同種の組み換えの間、プラスミドに隣接する配列は、 F P V ウィルスゲノムの挿入部位の同種配列を用いて組み換えをする。これは、 F P V ゲノムの出発物質 (例えは、挿入部位 B a m H I J) として使用される基底ベクターによって標的とされる部位の中へ標的配列を挿入する。 p B N X 2 2 1 は、挿入部位 B a m H I J を標的にし (図 4 D) 、そして最終組み換えプラスミド p B N 5 5 5 の構築のための出発プラスミドとして使用された (図 5 E) 。プラスミド p B N 5 5 5 は、 F P V - 4 0 K プロモーターの制御の下で G P - Z E B O V - メイインガを含む。
10

【 0 2 4 9 】

G P - Z E B O V - メイインガ導入遺伝子を F P V に挿入するために、 C E F 細胞を F P V で感染させ、次いで、組み換えプラスミド p B N 5 5 5 を用いて遺伝子導入した (図 5 E) 。増幅およびブラーク精製 (繼代 1 3 回、そのうちブラーク精製 4 回を含む) の後、選択的条件の下 (ミコフェノール酸 / キサンチンおよびヒポキサンチン) で、 G P - Z E B O V - メイインガの遺伝子および選択マーカー G P T - R F P 融合遺伝子を含む、 F P V - m B N 3 6 8 A (P r e M a s t e r) と命名されたこの組み換え M V A - B N 生産物が得られた (図 3 D) 。組み換え F P V - m B N 3 6 8 A P r e M a s t e r ウイルス株を、 F P V (親ウイルス、データなし) の除去について、 (異質遺伝子が挿入された F P V ゲノム隣接配列に固有のプライマーを使用して遺伝子に固有の P C R によって (データなし)) 挿入隣接領域とともに、挿入された遺伝子の正確な配列について、細菌の不存在について (無菌テスト (データなし)) 、および (配列を決定して (データなし)) 挿入体の存在および正確なサイズについて検査した。 F P V - m B N 3 6 8 A P r e M a s t e r ウイルス株の力価も、決定された。最後に、組み換え F P V - m B N 3 6 8 A による導入遺伝子の発現を、逆転写酵素 P C R (R T - P C R (データなし)) によって確認した。
20

【 0 2 5 0 】

さらに別の鶏痘構築物を、上記の方法による組み込みのために、 F P 1 4 (I G R 6 0 / 6 1) および B a m H I J 領域を使用して生成した、 F P V - m B N 3 9 1 は、共に F P 1 4 部位にある F P V - 4 0 K プロモーター (配列番号 2 6) の制御の下にある G P - Z E B O V (配列番号 1 9 および 2 0) および P r S プロモーター (配列番号 2 3) の制御の下にある G P - M A R V - ムソケ (配列番号 5 および 6) 、ならびに P r 1 3 . 5 長プロモーター (配列番号 3 5) の制御の下にある G P - M A R V - アンゴラ (配列番号 3 6 および 3 7) および F P V - 4 0 K プロモーターの制御の下にある G P - S E B O V (配列番号 3 0 および 3 1) ならびに P r L E 1 プロモーター (配列番号 2 7) の制御の下にある N P - E B O V - C d I (配列番号 2 8 および 2 9) を発現し、この 3 個すべては、この記載の順番で B a m H I J 領域に挿入された。
30

【 0 2 5 1 】

実施例 2 : 非ヒト靈長類における M V A - B N - F i l o (M V A - m B N 2 2 6 B) M V A - B N - F i l o (M V A - m B N 2 2 6 B) の、カニクイザル - マカクにおける免疫原性および防御効能を、エボラおよびマールブルグの攻撃モデルで分析した。サルは、研究用動物の世話および給餌に対する適切な組織ガイドラインを遵守して収容し、給餌した。
40

【 0 2 5 2 】

実験計画は以下の表 1 に記載されている。

【 0 2 5 3 】

【表1】

表1：カニクイザルーマカクにおけるMVA-BN-Filoのワクチン接種手順

群	群の大きさ	試験・基準項目投与				攻撃ウイルス投与	
		ワクチン接種	投与当たりの用量	経路	スケジュール(日)	ウイルス	スケジュール(日)
1	1	溶媒対照(TBS)	—	皮下	0および28	EBOV	42
2	1	溶媒対照(TBS)	—	皮下	0および28	MARV	42
3	3	MVA-BN(登録商標)-Filo	5×10 ⁸ TCID ₅₀	皮下	0および28	EBOV	42
4	3	MVA-BN(登録商標)-Filo	5×10 ⁸ TCID ₅₀	皮下	0および28	MARV	42

EBOVザイール株またはMARVムソケ株のいずれかを用いた筋肉内攻撃 (1,000 p.f.u) ; 生き残った動物は、63日目に安楽死させた。

10

【0254】

溶媒対照群およびワクチン接種群の両方について、投与量は0.5 mlであった；すべてのワクチン接種は皮下注射によって与えた。最初のワクチン接種日を0日目と指定する。すべての動物に、42日目に、筋肉内注射による、1,000 p.f.uのZEBOV(1群および3群)またはMARV-ムソケ(2群または4群)の攻撃投与を行った。すべての生き残った動物は、63日目に安楽死させた。

【0255】

GPに特異的な抗体をELISA法によって測定した。予期した通り、MARV-ムソケで攻撃された非ワクチン接種対照動物は、攻撃以前のいずれの時点においてもGP-MARVに特異的な抗体を検出せず(つまり、0日目、および28日目、36日目(データなし))、そして疾患で死んだ。対照的に、MVA-BN-Filoでワクチン接種をした3匹中の2匹の動物(動物番号30766および30768)は、第1回のワクチン接種の28日後(第1回ワクチン接種後、図6も参照)、低いGP-MARV抗体力値を示し、そして、ワクチン接種をした3匹すべての動物は、第2回のワクチン接種の8日後(ブースターウクチン接種後、図6参照)、明白なブースト反応を示した。3匹すべての動物は、ワクチン接種をしなければ致死的であってMARV-ムソケの筋肉内攻撃から生き延びた。

20

【0256】

同様に、ZEBOVで攻撃された非ワクチン接種対照動物は、試験したすべての時点においてGP-ZEBOVに特異的な抗体について陰性であった(データなし)。この対照動物、さらにはすべてのワクチン接種をした動物も、筋肉内注射によるZEBOVの攻撃の後に、感染で死んだ。驚くべきことに、ワクチン接種をした3匹すべての動物は、攻撃以前にGP-ZEBOV固有の抗体を、ZEBOV-GPのワクチン接種によって非ヒト靈長類において発生し、高度免疫血清中で測定された抗体よりも大きいレベルで、発生した。10%の中和緩衝化したホルマリン中で収集した、死亡時の組織に対して完全な解剖を行った。組織の切片を日常的な方法で処理し、組織学的に評価するために、5 μmの薄片にし、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。調査結果を、以下の表2に要約する。

30

【0257】

40

【表2】

表2：ワクチン接種をした動物および対照動物の組織学的評価

動物番号	30763	30766	30765	30768	30764	30770	30769	30767
検視番号 攻撃 実験群 生存	N11-05 マールブルグ対照 9日€	N11-04 マールブルグワクチン 21日	N11-06 マールブルグワクチン 21日	N11-10 マールブルグワクチン 21日	N11-07 エボラ対照 5日(E)	N11-08 エボラ対照 7日(SD)	N11-09 エボラ対照 6日(E)	N11-03 エボラ対照 6日(E)
肝臓： 多焦点肝 壊死 脈管炎	++ +	- ++*	- -	- ++*	+	++	++	-
肺： 肺胞内浮腫 中隔浮腫 出血 間質性肺炎	+	-	-	-	+	+	+	-
脾臓： 過形成 リンパ球枯渇 フィブリン沈着赤髄 脾臓血管炎	- ++ +++ +++	++ - - -	+++ - - -	+++ - - -	- ++ ++ ++	- ++ ++ ++	- ++ ++ ++	-
鼠径リンパ節： クロファージ浸潤 リンパ球枯渇	++ +++	- -	++ -	- -	+	+	+	+++
腋窩リンパ節： マクロファージ浸潤 リンパ球枯渇	- +	- -	- -	- -	- ++	- ++	- ++	-
腸間膜リンパ節： マクロファージ浸潤 リンパ球枯渇	- ++	- -	- -	- -	- ++	- ++	- ++	-
副腎： 壊死	- -	- -	- -	- -	+++ +++	++ ++	- -	-

*動物30766および30768における血管炎は、既往の疾患のように思われる。

「E」は安楽死を、「SD」は自然死を意味する。

【0258】

分析によれば、M A R V - ムソケに攻撃された非ワクチン接種対照動物、さらにはすべてのZ E B O Vに攻撃された動物においても出血熱の典型的な症状を確認したが、M A R V - ムソケに攻撃されたワクチン接種をした動物は、攻撃後免疫反応およびB - 細胞過形成と一貫する脾臓過形成以外は、組織学的变化はあまり示さなかった。

【0259】

実験の結果を、図7に要約する。図7Aは、M V A - B N - F i l oによるワクチン接種が、動物をM A R V - ムソケの攻撃から100%防御したことを示す。図7Bは、攻撃後の臨床スコアを示す。M A R V - ムソケで攻撃された、ワクチン接種をした動物は、出血熱に伴う症状または組織学的变化をまったく示さず、肝臓、脾臓、副腎、リンパ節または肺にウイルスをまったく保有していなかった。

【0260】

実施例3：非ヒト靈長類におけるM V A - B N - F i l o

この実験は、実施例2に記載されているのと同様の研究手順の下で、非ヒト靈長類のM V A - B N - F i l oを試験したが、実施例2のマールブルグムソケの代わりに、別のマールブルグウイルス株、つまりマールブルグアンゴラで攻撃を行った。

10

20

30

40

50

【0261】

【表3】

表3：非ヒト靈長類のMVA-BN-Filoに対する計画および結果の研究

群	N	試験／対照試験物投与			攻撃	生存
		ワクチン接種	投与量	スケジュール		
1	2	MVA-BN(登録商標)Filo	5×10^8 TCID ₅₀	0、28	マールブルグ	2/2
2	3	MVA-BN(登録商標)MARV-IL 15sushi	1×10^8 TCID ₅₀			2/3
3	3	MVA-BN(登録商標)MARV-CD40L	1×10^8 TCID ₅₀		アンゴラ	3/3
4	3	MVA-BN(登録商標)MARV-TRICOM	1×10^8 TCID ₅₀		56日目	2/3
5	1	TBS	n/a			0/1

MARVアンゴラ株による筋肉内攻撃 (1,000 p.f.u.) ; 生存動物は70日目に安楽死させた。

【0262】

表3は、マールブルグウイルスのアンゴラ株に対して、非ヒト靈長類を完全に防御したこと示す。対照的に、5群の非ワクチン接種動物は、感染で死んだ。表3は、さらに、防御効能は投与量に依存することを示す、なぜなら、マールブルグウイルスのGPをもコードしているMVA-BN-MARVを使用した5分の1の投与量は、共刺激分子としてCD40Lを同時発現しない限り、単に部分的に防御するだけだからである。表4に概要を示すように、すべてのワクチン候補は、MVAベクターに特異的な抗体（ワクシニア特異抗体）、さらにはMARV GP挿入体に特異的な抗体を生成する。

【0263】

【表4】

表4：非ヒト靈長類においてMVA-BN-Filoによって誘導された抗体

35日目	MVA-多価	MVA-MARV IL-15	MVA-MARV CD40L	MVA-MARV TRICOM
ワクシニア-E L I S A	21596	17838	6560	3246
ワクシニア-P R N T	1735	507	94	85
MARV/GP-E L I S A	298959	285187	199132	409941

【0264】

実施例4：異種プライム／ブースト

この実験は、プライム／ブースト免疫付与における組み換えMVAおよび組み換え鶏痘FPVの混合を試験した。

【0265】

H-2K^{k+} B6CBA F1マウス（フランス、Janvier Labs）を、 5×10^7 TCID₅₀ MVA-ZEBOV-GP (MVA; MVA-mBN254A、図3C)またはFPV-ZEBOV-GP (FPV; FPVmBN368A、図3D)を用いて、皮下で(s.c.)免疫付与した。ウイルス投与は、一方の脇腹当たり100μlの合計量で、両方の脇腹に注射した。

【0266】

ZEBOV-GP特異のIgGを検出するために、96穴プレート（米国、メリーランド州、コーニング）を、1晩、4度でZEBOV-GP抗原（米国、メリーランド州、IBT Biostatuses）を用いてコートした。2倍で希釈した血清の複製を、洗浄し、ブロックしたプレートに添加し、ヒツジ抗マウスIgG-HRP（英国、AbD Serotec）を、抗体を検出するために使用した。TMB基質を室温で30分間添加し、そして反応を1モルのH₂SO₄を添加して終了させた。吸収度は、450nmで測定された。ネズミ科の单クローネ抗体13F6を、ZEBOV-GP IgGの血清濃度を計算するために、標準として使用した。

【0267】

マウスリンパ球を、組織を優しく砕き、70μmのセルストレーナー（米国、カリフォルニア州、BD Biosciences）に通して、脾臓から新たに単離した。赤血球溶解の後、細胞を、10μg/mlのプレフェルジンAおよびCD107a-FITCの存

10

20

30

40

50

在下で、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Z E B O V - G P₅₇₇₋₅₈₄ ペプチド (TELRTFSI) (米国、ニュージャージー州、GenScript) を用いて、37で6時間、完全な RPMI 中で培養した。生きているか、死んでいるかを区別するために、細胞を Zombi e Aqua™ Fixable Viability キット (米国、カリフォルニア州、BioLegend) を使用して染色した。IFN- α および TNF- α の細胞内染色を、CD4-BV605, CD8-BV421 (米国、カリフォルニア州、BioLegend) および CD44-APC-eFluor780 (米国、カリフォルニア州、eBioscience) を用いた表面染色、ならびに製造者の指示書 (BD Cytotest/ Cytoperm, BD Biosciences) に従い固定化 / 透過化をした後に、行った。すべての細胞は、デジタルフロー血球計算器 (米国、カリフォルニア州、LSR II, BD Biosciences) を使用して獲得し、そしてデータは FlowJo ソフトウェア (米国、オレゴン州、FlowJo) を用いて分析した。
10

【0268】

組み換え MVA および FPV プライム / ブースト免疫付与の 4 個の可能な組み合わせを、H-2K^{k+} CBA B6 F1 マウスで試験した。なぜなら、ザイールエボラウイルス (ZEBOV) グリコプロテイン (GP) からの強力な CD8 T 細胞がこの MHC クラス I ハプロタイプ、つまり GP₅₇₇₋₅₈₄ (TELRTFSI) についての記載があったからである (Rao et al., Vaccine 17 (23-24) : 2991-8 (1999))。ZEBOV-GP 固有の IgG の血清濃度は、0 日目および 21 日目の皮下免疫付与の後、21 日目および 41 日目に分析した。21 日目には、MVA で免疫付与されたすべてのマウスは頑強な IgG 力値を有していたが、FPV で免疫付与されたマウスのわずか 20% が抗体陽転した。第 2 回目の免疫付与の後、すべての動物は、ZEBOV-GP に特異的な IgG に対して血清陽性であった。最も低い力値は、FPV を用いて同種免疫付与を行った後に観察しされた。MVA で 2 回免疫付与した動物と、FPV でプライムし、MVA でブーストした動物の間では、GP に特異的な IgG の濃度の違いは、41 日目には検出できなかった。しかし、MVA でプライムし、FPV でブーストしたマウスは、41 日目には、他のすべての群よりも多少高い力値を有していた (図 8A)。
20

【0269】

興味深いことに、最も強い抗体反応を生じた同じ組み合わせが、最も強い CD8 T 細胞反応をも誘導した。繰り返すと、FPV を用いた同種免疫付与は、最も弱い CTL 反応、およびそれに続く MVA-MVA および FPV-MVA 免疫付与を生じた。MVA を用いたプライミング、およびそれに続く FPV を用いたブーストは、MVA-MVA の同種組み合わせよりも、約 5 倍多い細胞傷害性 CD8 T 細胞を誘導した (図 8B)。
30

【0270】

これらを考え合わせると、高度に機能する CD8 T 細胞の存在によって示されるように、これらのデータは、1 回目に MVA、2 回目に FPV を用いた異種免疫付与が、最も強い ZEBOV-GP 固有の抗体反応、および最も強い CTL 反応をも誘導することを意味している。
40

【0271】

実施例 5：強化された ZEBOV-GP に特異的な CD8 T 細胞反応
H-2K^{k+} CBA マウスを、0 日目および 21 日目に 5×10^7 TCID₅₀ MVA または FPV を用いて、皮下免疫付与した。マウス (各群に 5 匹) を、脾臓細胞の細胞内サイトカイン染色による T 細胞分析のために、42 日目に犠牲にした。以下のプライム / ブースト投薬計画を使用した。1 : MVA-ZEBOV-GP (mBN254) / FPV-ZEBOV-GP (mBN368), 2 : MVA-マルチ-filo (MVA-mBN226) / FPV-ZEBOV-GP (mBN368), 3 : MVA-ZEBOV-GP - VP40 (mBN255) / FPV-ZEBOV-GP (mBN368)。データを、図 9 に要約する。
50

【0272】

42日目に、脾臓CD8 T細胞反応を、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ブレフェルジンおよび抗CD107a - FITCの存在下で、 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ZEBOV-GP₅₇₇₋₅₈₄ペプチド (TELRTFSI) を用いて、インビトロで標準の6時間、再刺激した後に分析した。細胞を、抗CD4-BV605, 抗CD8-BV421, CD44-APC-eFluor780を用いて表面染色し、そして抗IFN- γ -PECy7および抗TNF- α -PerCP-eFluor710を用いて細胞内染色した。生きているか、死んでいるかの区別を、製造者の指示書 (Life Technologies) にしたがい、LIVE / DEAD (登録商標) Fixable Aqua Dead Cell Stain Kitによって行った。棒グラフは、CD107a+, IFN- γ +およびTNF- α + CD8 T細胞を示す。5マウス/群からの平均±SEMを示す。ZEBOV-GP由来のペプチド TELRTFSIに対するCD8 T細胞反応は、MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40がMVA-FPV異種プライム - ブースト投薬計画でプライミング構築物として使用された場合は、プライミング構築物としてのMVA-ZEBOV-GP (mBN254) またはMVA-マルチ-filo (MVA-mBN226) と比較して、約2倍強化された (図9)。

【0273】

実施例6 : MVA-GP-VP40を用いたワクチン接種の後のZEBOVに対するNHPの強化された防御

カニクイザル - マカク (カニクイザル) に、皮下に2回 (0日目および28日目)、 $5 \times 10^8 \text{ TCID}_{50}$ の投与量のMVA-BN-ZEBOV/GP ($n = 3$)、もしくはMVA-BN-ZEBOV/GP-VP40 ($n = 3$) でワクチン接種、またはトリス緩衝食塩水 (TBS) を陰性対照 (プラセボ群、 $n = 2$) として投与した。免疫付与の前、および攻撃の週単位の前 (7日目、14日目、21日目、28日目、35日目および40日目) に、エボラウイルスザイールグリコプロテイン (GP) に特異的な、およびMVA-主鎖に特異的なELISA法による分析のために血清を収集した。ブースターによるワクチン接種の4週間後、エボラウイルスザイール (キクウィット株) を用いて、動物を約1000pfuの筋肉内投与によって攻撃した。

【0274】

【表5】

表5：試験計画

群	ワクチン接種			攻撃		生存
	ワクチン	投与量	スケジュール (投与経路)	ウイルス	スケジュール	
1	MVA-BN-ZEBOV/GP	$5 \times 10^8 \text{ TCID}_{50}$	0日目+28日目 (皮下)	ZEBOV	最後の ワクチン 接種後	0 / 3
2	MVA-BN-ZEBOV /GP-VP40	$5 \times 10^8 \text{ TCID}_{50}$	0日目+28日目 (皮下)	キクウィット 約1000pfu	筋肉内投与 4週間	2 / 3
3	TBS 対照	n/a	0日目+28日目 (皮下)			0 / 2

【0275】

ザイールエボラウイルス (ZEBOV) 特異的ELISA法

ELISAを、組み換えZEBOV/GPによって固定され、そしてNHP IgGに対する西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を結合した抗体によって検出される、ZEBOV/GPに特異的な抗体を決定するために行った。HRP標識の結合した抗体の量は、基質反応の後、450nmにおける光学密度 (OD) 値として測定した。抗体の濃度を、4パラメータ回帰分析にしたがい、そして単クローナマウス抗体を使用した標準曲線に基づいて計算した。

【0276】

ELISA法による結果が、図10に描かれている。MVA-BN-ZEBOV/GP

10

20

30

40

50

またはMVA - BN - ZEBOV / GP - VP40構築物を用いてワクチン接種をしたすべての動物は、すでにプライムワクチン接種および第2回のワクチン接種によって抗体反応がブーストした後、検出できる主鎖およびZEBOVに特異性な抗体を有した。

【0277】

第2の試験において、カニクイザル - マカク（カニクイザル）に、皮下に3回（0日目、28日目および56日目） 5×10^8 TCID₅₀ の投与量のMVA - BN - マルチ - filo (MVA - mBN226, n = 2) またはMVA - BN - ZEBOV / GP - VP40 (MVA - mBN255, n = 2) でワクチン接種、または陰性対照（プラセボ群、n = 2）としてトリス緩衝食塩水（TBS）を投与した。免疫付与の前、および攻撃の前に毎週（0日目、27日目、41日目、55日目、35日目、および67日目）、エボラウイルスザイールグリコプロテイン（GP）に特異的な中和アッセイによる分析のために血清を収集した（図11）。最後のワクチン接種の4週間後、動物に約100 p.f.u の筋肉内投与によるエボラウイルスザイール（キクワイト株）を用いた攻撃をした。10

【0278】

【表6】

表6：研究計画

群	ワクチン接種				攻撃スケジュール	生存
	ワクチン	投与量	スケジュール	ウイルス		
1	陰性対照	n/a	0日目 + 56日目	ZEBOV キクワイト 約100 p.f.u 筋肉内投与	最後の ワクチン 接種後 4週間	0/2
2	MVA-BN-マルチ-filo	5×10^8 TCID ₅₀	0日目 + 28日目 + 56日目			0/2
3	MVA-BN-ZEBOV/GP-VP40	5×10^8 TCID ₅₀	0日目 + 28日目 + 56日目			2/2

【0279】

MVA - BN - ZEBOV / GP - VP40 を用いたワクチン接種は、プライムワクチン接種後に、すでに検出できた抗体を中和する結果を生じたが、一方 MVA - BN - マルチ - filo は、27日目のプライムワクチン接種後に、検出できるレベルの中和抗体を誘導しなかった（図11）。MVA - BN - ZEBOV / GP - VP40 を用いてワクチン接種をした動物は、分析のすべての時点を通じて、MVA - BN - マルチ - filo でワクチン接種をした動物よりも高い中和抗体力値を有した。ZEBOV の攻撃後、MVA - BN - マルチ - filo は、攻撃後7日目までに死んだが、他方 MVA - BN - ZEBOV / GP - VP40 でワクチン接種をした動物は、症状または一時的発熱の発現なしで生き延びた。30

【0280】

実施例7：GPおよびVP40のVLP形成およびタンパク質発現

HeLa細胞を、10のMOIで示されたウイルスを用いて感染させた。感染2日後、上清を採取し、次いで、清澄化した上清（SN）中のVLPを超遠心分離法（UC - SN）による20%のスクロースクッシュョンを通じてペレットとした。細胞溶解物を、1×L aemm1iバッファー中に、細胞の直接溶解によって調製した。細胞溶解物を、免疫プロット分析のためのSDS - PAGEによる分離の前に、1:5に希釈した。UC - SNは、SDS - PAGEの前には希釈しなかった。ZEBOV - GPをUSAMRIIDから、単クローナルマウス抗体（クローン6D8）を使用して検出し、そしてZEBOV - VP40をIBT Bioservicesの精製したウサギポリクローナル抗体を使用して検出した。40

【0281】

GPおよびVP40の発現を、免疫プロット法による新鮮な調合液中で確認した。両方のタンパク質が、細胞溶解物中に存在し、UC - SN 中で濃縮もされた（図12C）。基50

質タンパク質VP40の発現は、VLPの形成にとって十分であることが知られており、VP40とGPタンパク質の直接的な相互作用は報告されていない。GPが実際VP40

GPと共にVLPの中に組み込まれることを示すことは、感染細胞のSNから免疫沈降した。この目的のために、HeLa細胞をMVA-ZEBOV/GP-VP40で感染させ、対照細胞をMVA-ZEBOV/GPおよびBACに由来するMVA-wtで感染させた。BACに由来するMVA-wtは、以前、Meisinger-Henschelら(Meisinger-Henschel et al. (2010), J Virol. 84 (19) : 9907 - 9919)に記載されている。感染細胞からのSNは、抗GP特異抗体を使用して免疫沈降(IP)された。SNのアリコートは、免疫沈降の前、30分の間、1%のTriton X-100 (TX-100)を用いて処理し、これは以前、ネズミ科の白血病ウイルスの成熟したエンベロープVLPの大半を破壊したと示されていた(Davidoff et al. (2012), Virology 433 (2) : 401 - 409)。

【0282】

このIP-複合体を、次に、免疫プロット法によって、GPおよび共沈殿したVP40が存在するかどうかについて分析した。免疫沈降(IP)のために、清澄化したSNを1晩、4度、タンパク質G-アガロース(10μl)と共に、抗ZEBOV-GP(クローン6D8, USAMRIID)抗体を用いて培養した。免疫沈降物の免疫プロットを、次に、ZEBOV-GP(单クローン抗体6D8)および(IBTからの)ZEBOV-VP40に対する抗体とともに培養した。GPタンパク質は、VP40の存在から独立して、GP(図12D, 上のパネル)のみを発現している細胞のSNから効率的に免疫沈降した。重要なことに、VP40は、TX-100(図12D, 下のパネル、2レーン)が存在しない場合に限り、MVA-ZEBOV/GP-VP40に感染した細胞の上清からのGPとともに共免疫沈降し、これはGPが実際にVLPに取り込まれていることを示す。TX-100はVLPを攪乱することが予期されており、そして直接的なGP-VP40の相互作用は存在しないので、TX-100で処理したサンプル中でVP40は共沈殿することはできない(図12D, 下のパネル、4レーン)。従って、実際にVLPを提示するGPが、組み換えMVAによる感染時に生成された。

【0283】

実施例8：293T/17におけるVLP形成

細胞を感染させた後、より高いVLP濃度をできるだけ得るために、新鮮なVLPの調合のための293T/17細胞。調合液のタンパク質成分を、GPおよびVP40について、ウエスタンプロットによって分析した。

【0284】

T175培養皿中の293T/17細胞を、10のMOIを有する指示されたウイルスを用いて感染させた。上清を、感染24時間後に収集し、3×ローディングバッファー(粗SN)と直接混合するか、または20%のスクロースクッション(UZ-prep)上に濃縮した。細胞溶解物(CL)を、1×ローディングバッファー中で調製した。タンパク質を、変性SDS-PAGEによって、サイズに従い分離した。免疫プロットを、抗GP抗体(クローン6D8、1:2500、USAMRIID)または抗VP40抗体(ポリクローナル、1:1000、IBT)を用いて培養し、そして化学発光基質を使用して発育させた。

【0285】

EBOVグリコプロテイン(GP)の発現は、感染細胞からの細胞溶解物(CL)および上清(SN)の両者におけるMVA-filo-VLPの感染後の、MVA-ZEBOV/GPおよびMVA-ZEBOV/GP-VP40(MVA-filo-VLP)、VP40を用いた細胞の感染後には、容易に検出できた。驚くべきことに、MVA-ZEBOV/GPで感染した細胞は、MVA-filo-VLPを用いて感染させた細胞と比較すると、より多くのGPを発現するように思われるが、一方MVA-filo-VLPを用いた場合は、SNにより多くのGPが発見された。このことは、おそらく、MVA-f

10

20

30

40

50

i l o - V L P を用いた場合は、 G P および V P 4 0 の同時発現が感染細胞からの (V L P の形態での) G P の放出を高めるという事実を反映している。 G P および V P 4 0 の両タンパク質は、 U Z - p r e p 中に存在しており、これは G P および V P 4 0 が U Z によって収集されたことを示している。 いくらかの G P および V P 4 0 も、 U Z の後、 S N に未だ存在していた。ただし粗 S N と比較したときはその量は少なかった、特にこのことは V P 4 0 について当てはまる。したがって、主として V L P の形態で存在している V P 4 0 は、 G P と共に、 S N から大きく減少しているが、 G P プール (おそらくは、多形性粒子の形態で) の部分は、 U Z 後に S N 中に残る。

【 0 2 8 6 】

2 9 3 T / 1 7 細胞からの V L P の透過型電子顕微鏡法 (T E M) および免疫電子顕微鏡分析 は、それぞれの M V A 組み換えによって生成した M V A - f i l o - V L P が、 f i l o - V L P の全表面を覆う G P 、 G P スパイクを用いて密に修飾されていることを示した。さらには、 M V A - w t または M V A - Z E B O V / G P を用いて感染させた細胞からの調製物を、免疫 E M によって分析した。これらのサンプルにおいて、 V L P は検出されなかった。

【 0 2 8 7 】

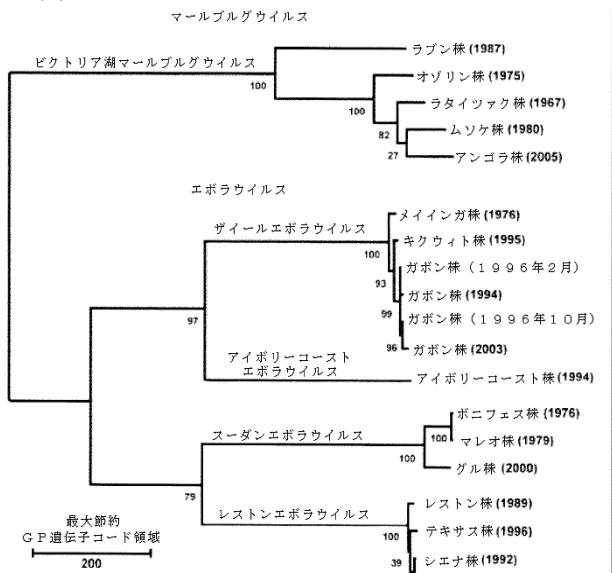
実施例 9 : N H P における異種プライム - ブースト免疫付与の免疫原性
4 匹のカニクイザル - マカクに、 0 日目および 2 8 日目に (皮下) ワクチン接種をした。 2 匹の動物は、 0 日目にプライムとして 5×10^8 T C I D₅₀ の M V A - m B N 2 2 6 を、 2 8 日目にブーストとして 1×10^9 T C I D₅₀ の F P V - m B N 3 6 8 を受けた。 1 匹の動物は、 0 日目にプライムとして 1×10^9 T C I D₅₀ の F P V - m B N 3 6 8 およびブーストとして 5×10^8 T C I D₅₀ の M V A - m B N 2 2 6 を受けた。 1 匹の対照動物は T B S のみを受けた。 0 日目、 7 日目、 2 8 日目、 3 5 日目および 4 9 日目に、 P B M C を単離した。 0 日目、 2 8 日目および 4 9 日目に、それぞれ、血液学、臨床化学、凝固パラメータ、 P B M C の単離または T 細胞および抗体反応の分析のための血清のために、ならびにウイルス量分析のために、血液を収集した。 血清試料を、 E L I S A 法および F R N T によって、エボラに特異的な体液性反応について分析した。 G P およびワクシニアに特異的な T 細胞を、ワクシニアワイエスを用いた、 Z E B O V / G P ベプチドライブラーを用いた、インビトロでの P B M C の再刺激によって分析し、次いで、 E L I S P O T によって I F N - 分泌細胞を検出した。すべての動物は、 5 6 日目に、 E B O V キクウィト - 9 5 1 0 6 2 1 の筋肉内攻撃 (1 0 0 p f u) を受けた。 M V A および F P V を用いた異種プライム・ブーストを受けた 3 匹のすべての動物は、生き残った。完全なセロコンバージョン は、プライムの後にすでに得たが、それはブーストによってさらに改善した。

10

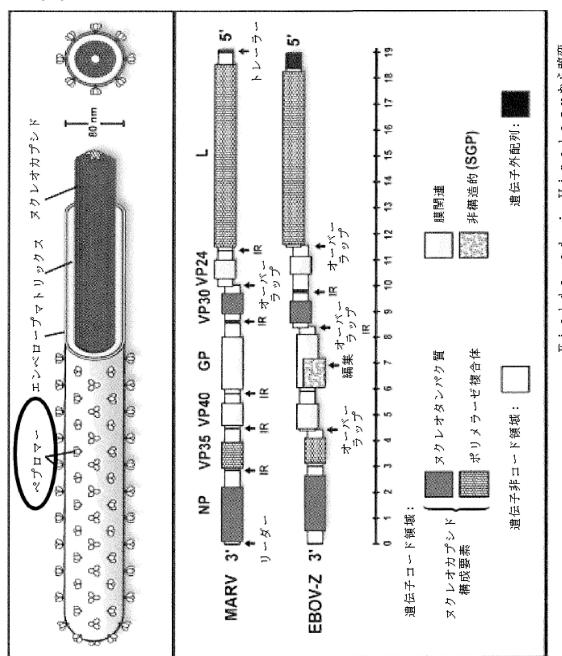
20

30

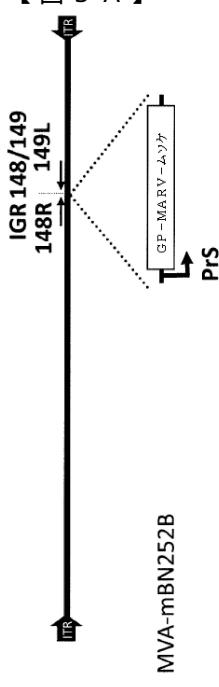
【 四 1 】



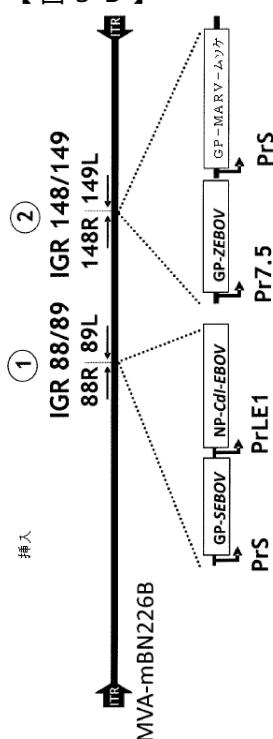
【 図 2 】



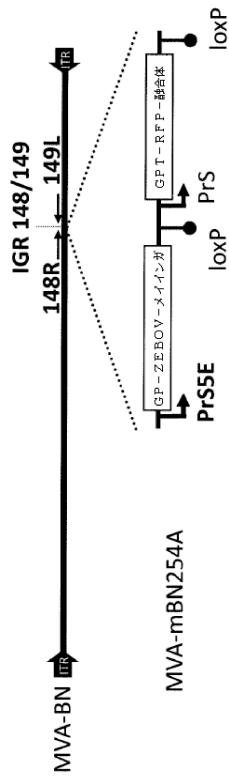
【図3A】



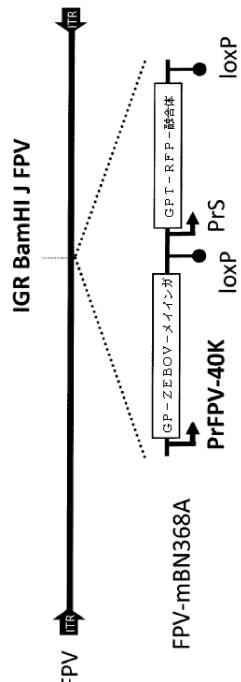
【図3B】



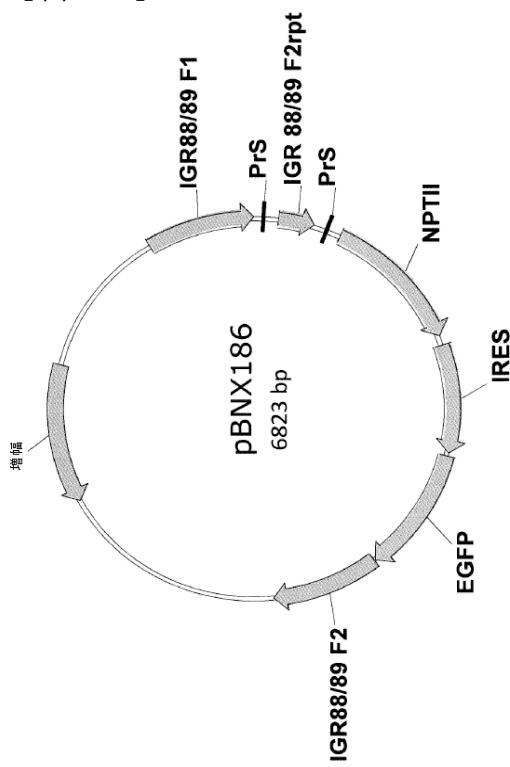
【図3C】



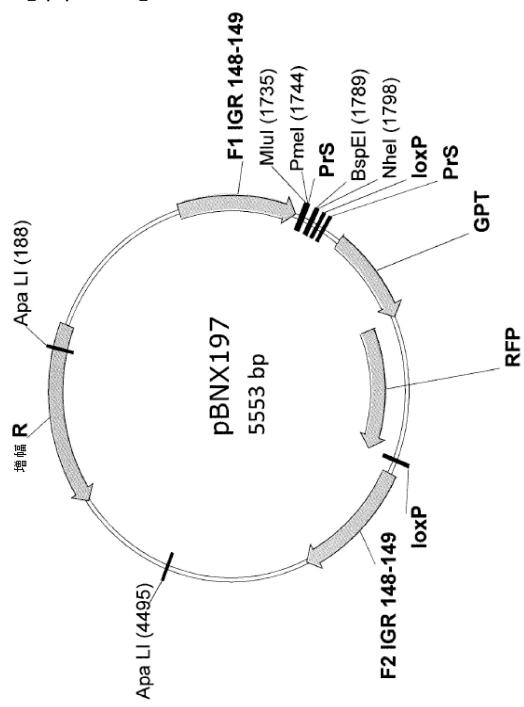
【図3D】



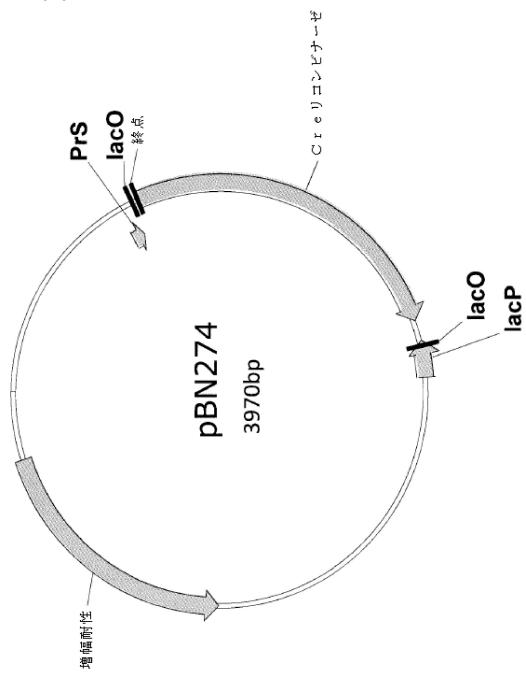
【図4A】



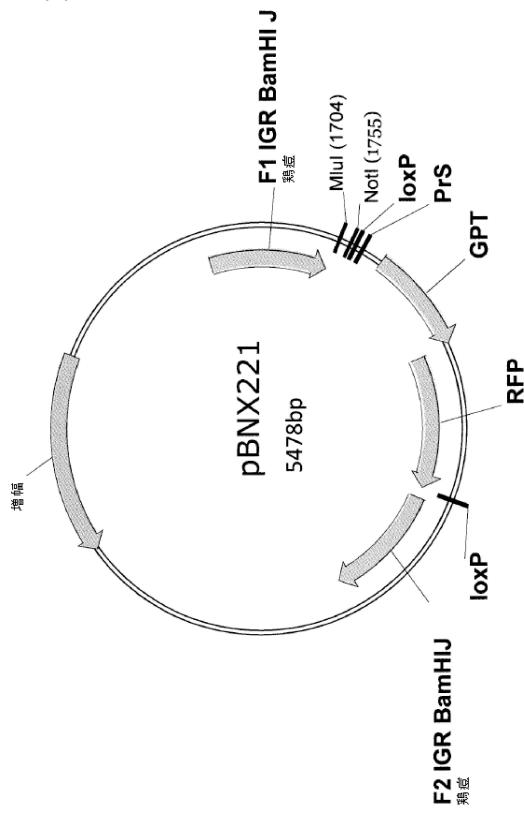
【図4B】



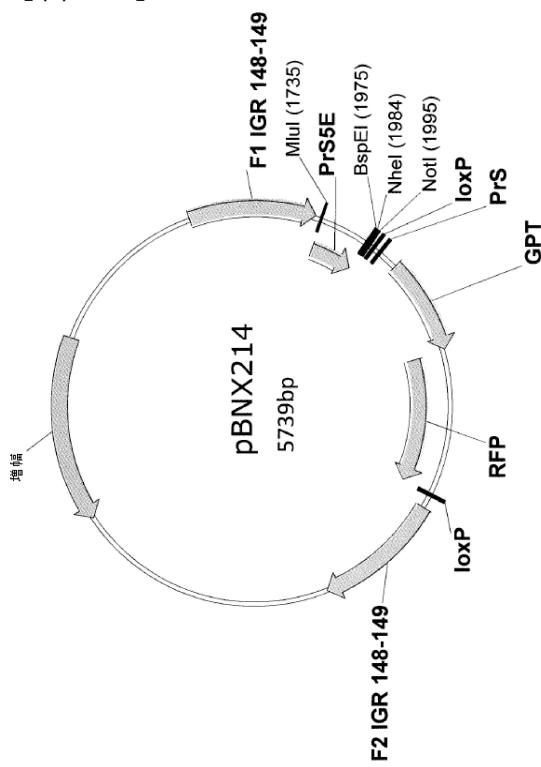
【図4 C】



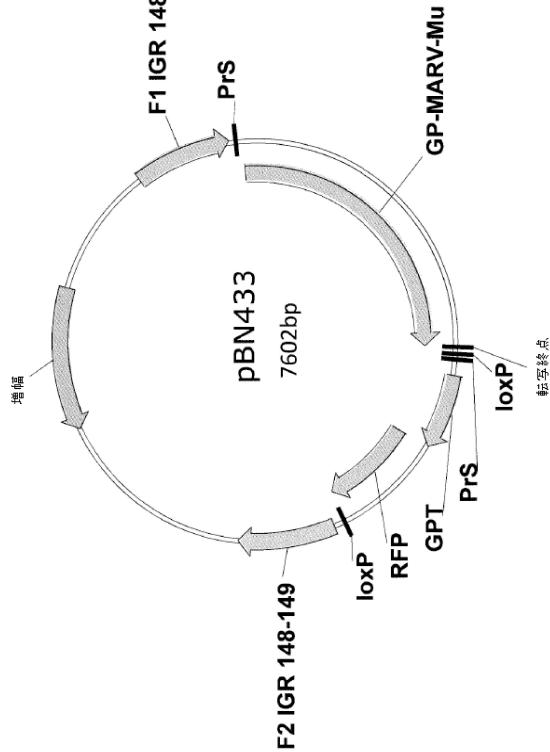
【図4 D】



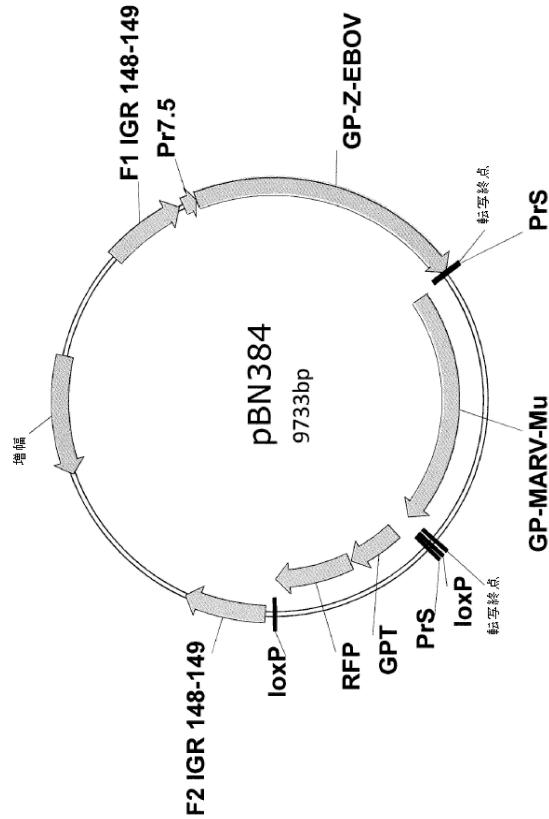
【図4 E】



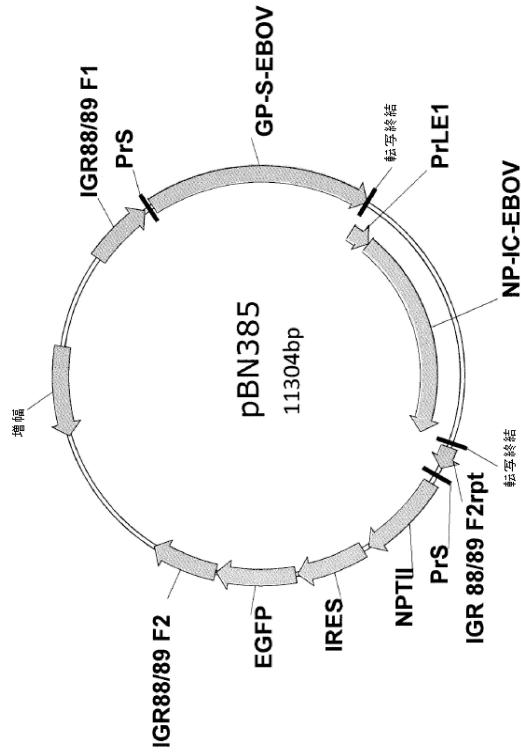
【図5 A】



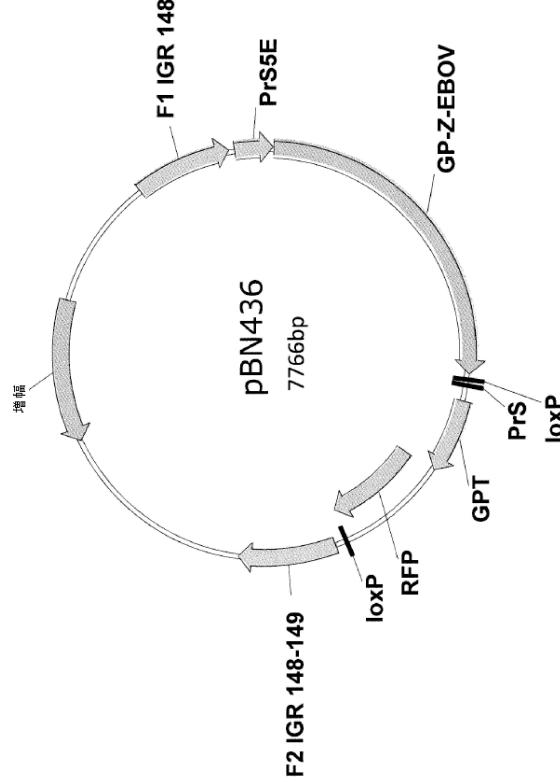
【図 5 B】



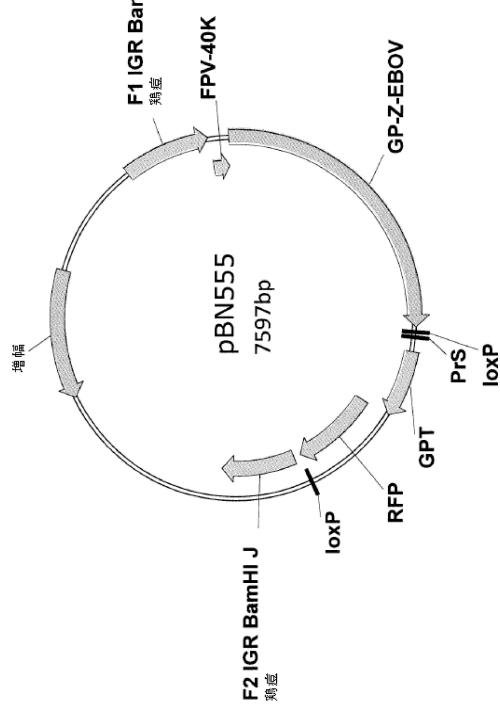
【図 5 C】



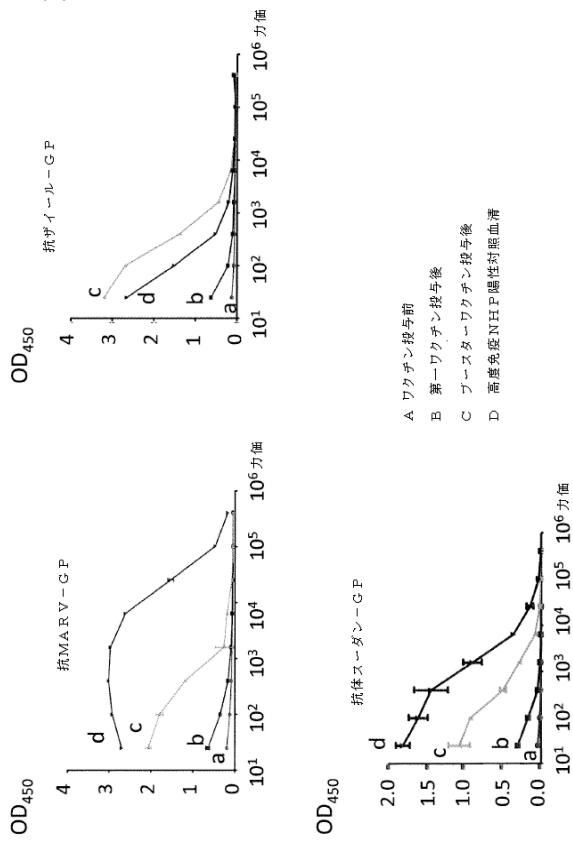
【図 5 D】



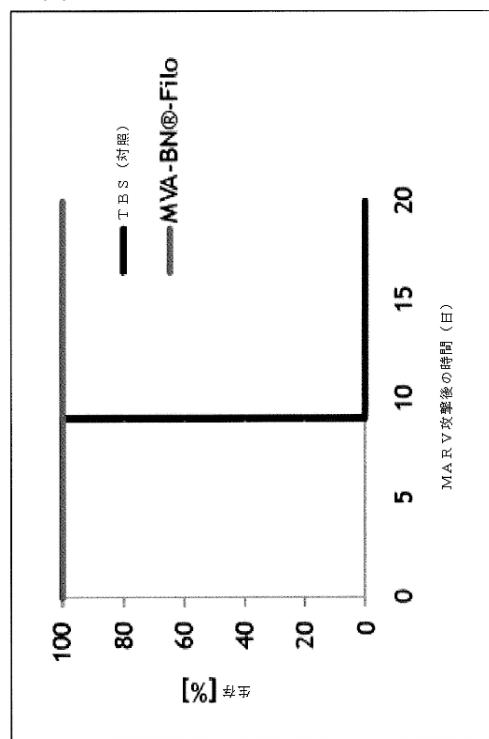
【図 5 E】



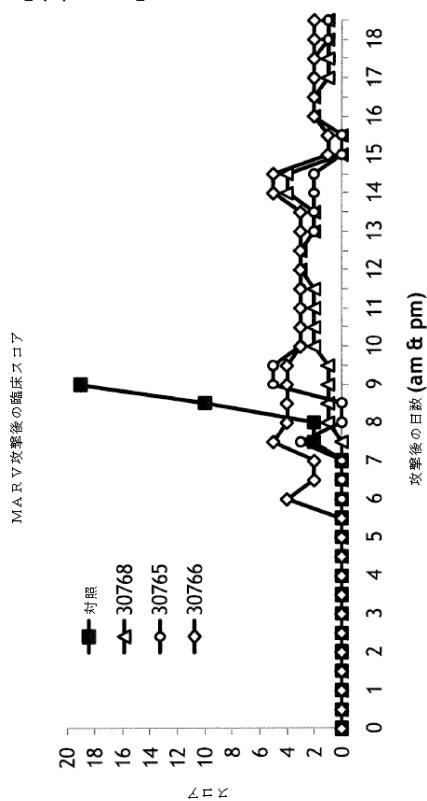
【図 6】



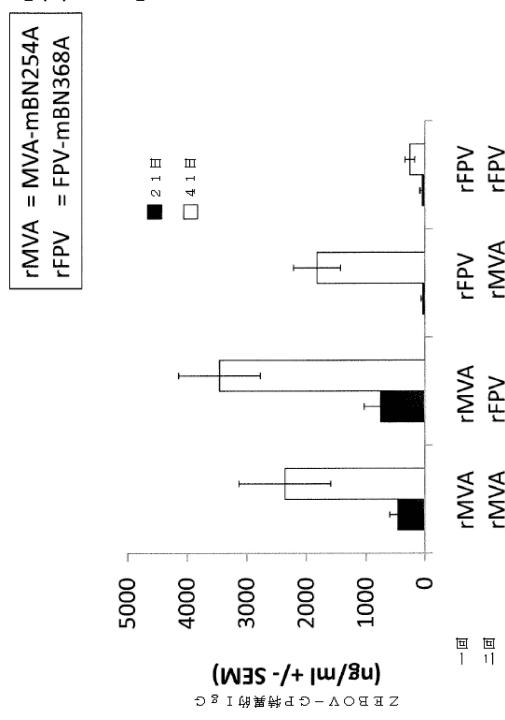
【図 7 A】



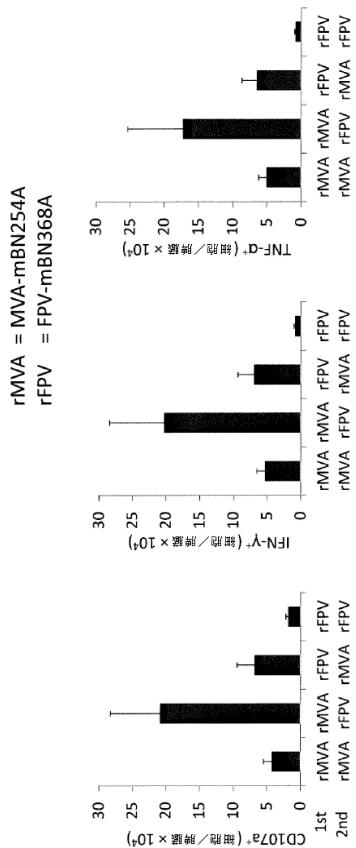
【図 7 B】



【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9】

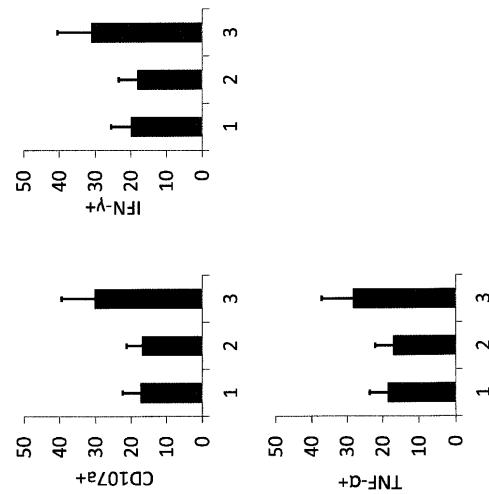
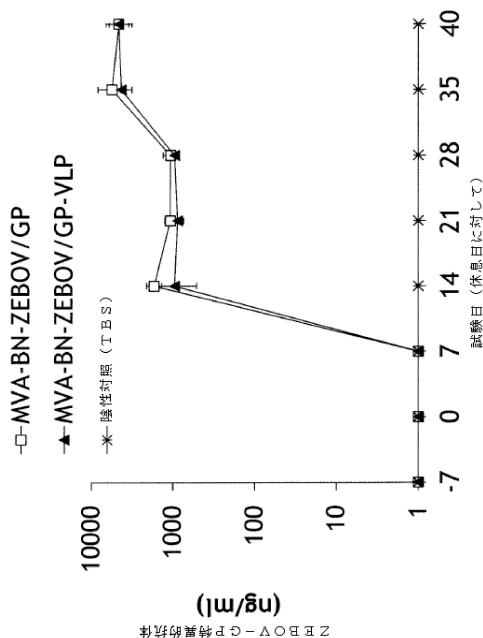
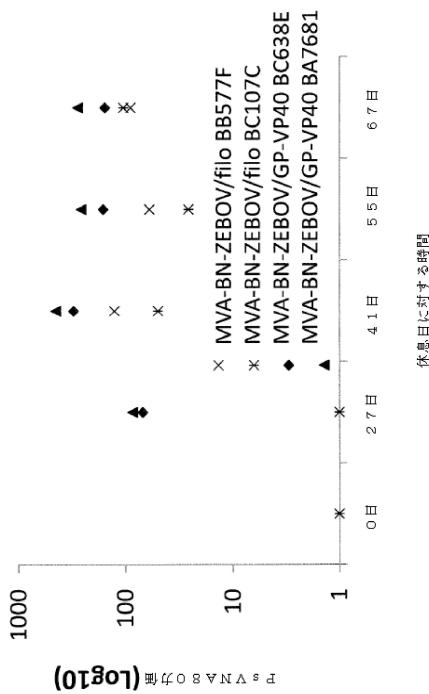


Figure 9

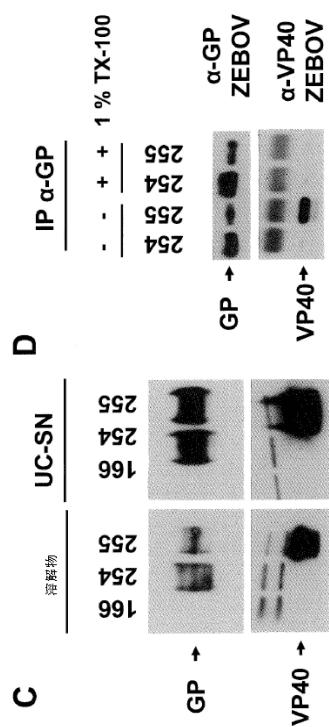
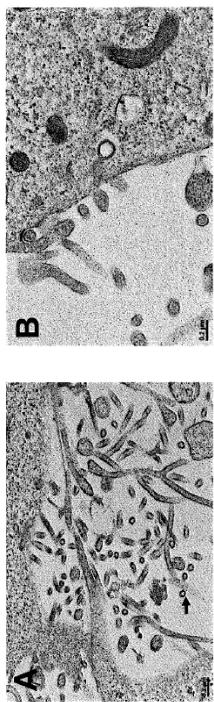
【図 10】



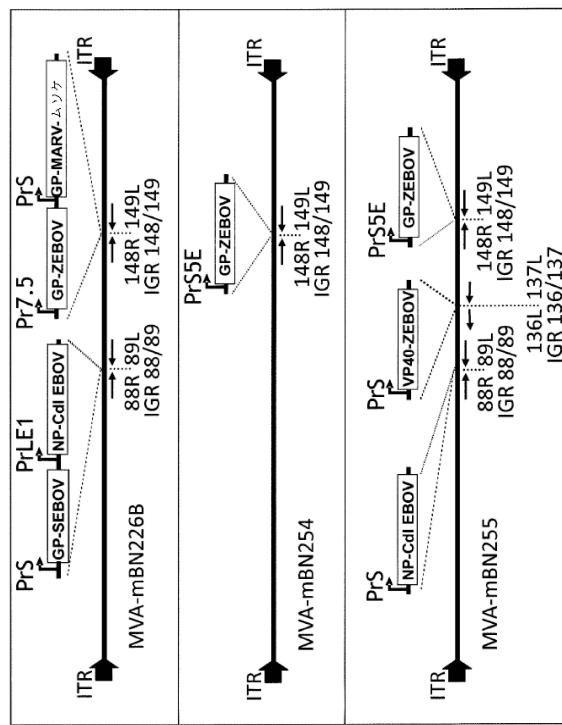
【図 11】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

[0006823586000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 48/00 (2006.01) A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/7088 (2006.01) A 6 1 K 31/7088

微生物の受託番号 ECACC V00083008

(72)発明者 フォルクマン・アリアン
ドイツ連邦共和国、8 2 3 4 6 アンデクス、バンヴェーク、1 1
(72)発明者 シュタイガーヴァルト・ロービン
ドイツ連邦共和国、8 0 4 6 9 ミュンヒエン、クレンツエストラーセ、9 7
(72)発明者 ホーホライイン・フーベルトゥス
ドイツ連邦共和国、8 1 8 2 5 ミュンヒエン、ハフストラーセ、1 3 4
(72)発明者 ディルマイアー・ウルリーケ
ドイツ連邦共和国、8 2 3 1 9 シュタルンベルク、アンガーヴァイデストラーセ、1 7
(72)発明者 ラウターバッハ・ヘニング
ドイツ連邦共和国、8 5 3 8 6 エヒング、マイゼンヴェーク、2 2 アー
(72)発明者 ハウスマン・ユルゲン
ドイツ連邦共和国、7 9 1 9 4 ゲンデルフィンゲン、アルテ・ブンデスストラーセ、1 3 0

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 4 / 0 3 7 1 2 4 (WO , A 1)
国際公開第2 0 1 3 / 1 5 5 4 4 1 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
A 6 1 K 4 8 / 0 0
A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8
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 / W P I D S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q