

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-524393

(P2018-524393A)

(43) 公表日 平成30年8月30日 (2018. 8. 30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z N A H	4 B O 6 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 C O 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/04	4 C O 8 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-503747 (P2018-503747)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月25日 (2016. 7. 25)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月23日 (2018. 3. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/067622
 (87) 国際公開番号 W02017/017050
 (87) 国際公開日 平成29年2月2日 (2017. 2. 2)
 (31) 優先権主張番号 1513176.6
 (32) 優先日 平成27年7月27日 (2015. 7. 27)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 305060279
 グラクソスミスクライン バイオロジカル
 ズ ソシエテ アノニム
 ベルギー ベー ー 1 3 3 0 リクセンサー
 ル リュ ドランスティテュ 8 9
 (74) 代理人 110002572
 特許業務法人平木国際特許事務所
 (72) 発明者 デモワティ, マリーーアンジェ
 ベルギー ベー ー 1 3 3 0 リクセンサー
 ル, リュ ドランスティテュ 8 9, グ
 ラクソスミスクライン バイオロジカルズ
 ソシエテ アノニム

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫応答を誘導するための新規方法

(57) 【要約】

本発明は、免疫応答を誘導するための方法、特に、マイコバクテリア感染又は疾患に対する免疫応答を誘導するための方法であって、(i) ポリペプチドRv1196関連抗原の少なくとも1回の投与及びRv1196関連抗原をコードするアデノウイルスの少なくとも1回の投与、又は(ii) ポリペプチドRv0125関連抗原の少なくとも1回の投与及びRv0125関連抗原をコードするアデノウイルスの少なくとも1回の投与を含む方法に関する。関連する組成物、アデノウイルス構築物、及びポリヌクレオチド配列もまた提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象において免疫応答を誘導するための方法であって、

(i) 対象へのポリペプチドRv1196関連抗原の投与と、それに続く、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与、又は

(ii) 対象へのポリペプチドRv0125関連抗原の投与と、それに続く、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与

を含む、方法。

【請求項 2】

対象において免疫応答を誘導するための方法であって、

(i) Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与と、それに続く、対象へのポリペプチドRv1196関連抗原の投与、又は

(ii) Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与と、それに続く、対象へのポリペプチドRv0125関連抗原の投与

を含む、方法。

【請求項 3】

(i) 対象へのポリペプチドRv1196関連抗原の投与と、それに続く、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与、又は

(ii) Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与と、それに続く、対象へのポリペプチドRv1196関連抗原の投与

を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

(i) 対象へのポリペプチドRv0125関連抗原の投与と、それに続く、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与、又は

(ii) Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与と、それに続く、対象へのポリペプチドRv0125関連抗原の投与

を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 5】

対象における免疫応答の誘導において使用するためのポリペプチドRv1196関連抗原であって、

(i) ポリペプチドRv1196関連抗原が対象に投与され、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く、又は

(ii) Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv1196関連抗原の投与がそれに続く、

ポリペプチドRv1196関連抗原。

【請求項 6】

対象における免疫応答の誘導において使用するためのRv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスであって、

(i) ポリペプチドRv1196関連抗原が対象に投与され、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く、又は

(ii) Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv1196関連抗原の投与がそれに続く、

Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項 7】

対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるポリペプチドRv1196関連抗原の使用であって、ポリペプチドRv1196関連抗原が対象に投与され、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く、使用。

【請求項 8】

対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるRv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの使用であって、ポリペプチドRv1196関連抗原が対象に投与

10

20

30

40

50

され、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く、使用。

【請求項 9】

対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるポリペプチドRv1196関連抗原の使用であって、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv1196関連抗原の投与がそれに続く、使用。

【請求項 10】

対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるRv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの使用であって、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv1196関連抗原の投与がそれに続く、使用。

10

【請求項 11】

対象における免疫応答の誘導において使用するためのポリペプチドRv0125関連抗原であって、

(i) ポリペプチドRv0125関連抗原が対象に投与され、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く、又は

(ii) Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv0125関連抗原の投与がそれに続く、
ポリペプチドRv0125関連抗原。

【請求項 12】

20

対象における免疫応答の誘導において使用するためのRv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスであって、

(i) ポリペプチドRv0125関連抗原が対象に投与され、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く、又は

(ii) Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv0125関連抗原の投与がそれに続く、
Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項 13】

対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるポリペプチドRv0125関連抗原の使用であって、ポリペプチドRv0125関連抗原が対象に投与され、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く、使用。

30

【請求項 14】

対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるRv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの使用であって、ポリペプチドRv0125関連抗原が対象に投与され、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く、使用。

【請求項 15】

対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるポリペプチドRv0125関連抗原の使用であって、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv0125関連抗原の投与がそれに続く、使用。

40

【請求項 16】

対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるRv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの使用であって、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv0125関連抗原の投与がそれに続く、使用。

【請求項 17】

ポリペプチドRv1196関連抗原が、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、請求項1から3又は5から10のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 18】

50

ポリペプチドRv1196関連抗原が、少なくとも200個のアミノ酸長である配列番号1の断片を含む、請求項1から3又は5から10のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 19】

コードされるRv1196関連抗原が、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、請求項1から3又は5から10、17又は18のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 20】

コードされるRv1196関連抗原が、少なくとも200個のアミノ酸長である配列番号1の断片を含む、請求項1から3又は5から10、17又は18のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

10

【請求項 21】

ポリペプチドRv0125関連抗原が、配列番号3に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、請求項1、2、4又は11から16のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 22】

ポリペプチドRv0125関連抗原が、少なくとも150個のアミノ酸長である配列番号3の断片を含む、請求項1、2、4又は11から16のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 23】

20

コードされるRv0125関連抗原が、配列番号3に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、請求項1、2、4又は11から16、21又は22のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 24】

コードされるRv0125関連抗原が、少なくとも150個のアミノ酸長である配列番号3の断片を含む、請求項1から3又は5から10、21又は22のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 25】

ポリペプチド抗原が、1500個以下のアミノ酸残基を含有する、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

30

【請求項 26】

コードされる抗原が、1500個以下のアミノ酸残基を含有する、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 27】

Rv1196関連抗原を含むポリペプチド抗原及びRv0125関連抗原を含むポリペプチド抗原が提供される、請求項1から26のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 28】

Rv1196関連抗原をコードするアデノウイルス及びRv0125関連抗原をコードするアデノウイルスが提供される、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

40

【請求項 29】

アデノウイルスが、Rv1196関連抗原及びRv0125関連抗原をコードする、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 30】

ポリペプチド抗原が、配列番号6に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、請求項1から29のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 31】

ポリペプチド抗原が、少なくとも450個のアミノ酸長である配列番号6の断片、例えば、

50

配列番号6のアミノ酸2～723を含む、請求項1から29のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項32】

コードされる抗原が、配列番号6に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、請求項1から30のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項33】

コードされる抗原が、少なくとも450個のアミノ酸長である配列番号6の断片、例えば、配列番号6のアミノ酸2～723を含む、請求項1から30のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

10

【請求項34】

対象がヒトである、請求項1から33のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項35】

ポリペプチド及びアデノウイルスが、筋肉内に投与される、請求項1から34のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項36】

ポリペプチド及びアデノウイルスが、400～600 μ l（両端を含む）の用量範囲で投与される、請求項1から35のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

20

【請求項37】

ポリペプチドの用量範囲が、1～100 μ g（両端を含む）である、請求項1から36のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項38】

アデノウイルスの用量範囲が、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{15}$ 個のウイルス粒子（両端を含む）である、請求項1から37のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項39】

ポリペプチド抗原が、アジュバントも含む組成物中で提供される、請求項1から38のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

30

【請求項40】

アジュバントが、TLRアゴニスト及び/又は免疫学的に活性なサポニンを含む、請求項39に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項41】

アジュバントが、3D-MPLを含む、請求項40に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項42】

アジュバントが、QS21を含む、請求項40又は41のいずれかに記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項43】

アジュバントが、リポソーム製剤中に3D-MPL及びQS21を含む、請求項42に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

40

【請求項44】

ポリペプチド抗原が、12.5から75マイクログラムの間の3D-MPL（両端を含む）及び12.5から75マイクログラムの間のQS21（両端を含む）を含む組成物中で提供される、請求項42又は43のいずれかに記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項45】

投与の間の時間間隔が、1週間から3ヶ月の範囲（両端を含む）にある、請求項1から44のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項46】

50

マイコバクテリア、例えば、結核菌による感染の予防、治療又は改善のための、請求項1から45のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項47】

マイコバクテリア、例えば、結核菌による感染の予防のための、請求項46に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項48】

マイコバクテリア、例えば、結核菌による感染の治療のための、請求項46に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項49】

対象が感染していない、請求項1から47のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

10

【請求項50】

対象が、潜在感染を有する、請求項1から46又は48のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項51】

対象が活動性感染を有する、請求項1から46又は48のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項52】

対象が、これまでにBCGでワクチン接種されている、請求項1から49のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

20

【請求項53】

免疫応答が、IFN-ガンマ、TNF-アルファ及びIL-2を発現するCD4 T細胞を含む、請求項1から49のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項54】

アデノウイルスが、チンパンジーアデノウイルスである、請求項1から53のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項55】

アデノウイルスが複製欠損を有する、請求項54に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項56】

アデノウイルスがChAd3である、請求項54又は55のいずれかに記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

30

【請求項57】

アデノウイルスがChAd63である、請求項54又は55のいずれかに記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項58】

アデノウイルスが、Ad5E4orf6遺伝子置換と併せて、少なくともE1及びE4遺伝子の機能的不活性化（例えば、欠失）を含み、任意選択で、E3機能的不活性化（例えば、欠失）とともに含む、請求項54から57のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

40

【請求項59】

ポリペプチドRv1196関連抗原が、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、例えば、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、特に、任意の非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、とりわけ、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスを実質的に含まない（例えば、任意のアデノウイルスを実質的に含まない）組成物中で提供される、請求項1から58のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項60】

ポリペプチドRv0125関連抗原が、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、例えば、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウ

50

イルスを実質的に含まない、特に、任意の非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、とりわけ、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスを実質的に含まない（例えば、任意のアデノウイルスを実質的に含まない）組成物中で提供される、請求項1から58のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 6 1】

ポリペプチドRv1196関連抗原が、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを含まない、例えば、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを含まない、特に、任意の非ヒトサルアデノウイルスを含まない、とりわけ、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスを含まない（例えば、任意のアデノウイルスを含まない）組成物中で提供される、請求項1から58のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

10

【請求項 6 2】

ポリペプチドRv0125関連抗原が、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを含まない、例えば、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを含まない、特に、任意の非ヒトサルアデノウイルスを含まない、とりわけ、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスを含まない（例えば、任意のアデノウイルスを含まない）組成物中で提供される、請求項1から58のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 6 3】

Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが、ポリペプチドRv1196関連抗原を実質的に含まない、例えば、ポリペプチドマイコバクテリア抗原を実質的に含まない、特に、任意のその他の抗原を実質的に含まない組成物中で提供される、請求項1から62のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

20

【請求項 6 4】

Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが、ポリペプチドRv0125関連抗原を実質的に含まない、例えば、ポリペプチドマイコバクテリア抗原を実質的に含まない、特に、任意のその他の抗原を実質的に含まない組成物中で提供される、請求項1から62のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 6 5】

Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが、ポリペプチドRv1196関連抗原を含まない、例えば、ポリペプチドマイコバクテリア抗原を含まない、特に、任意のその他の抗原を含まない組成物中で提供される、請求項1から62のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

30

【請求項 6 6】

Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが、ポリペプチドRv0125関連抗原を含まない、例えば、ポリペプチドマイコバクテリア抗原を含まない、特に、任意のその他の抗原を含まない組成物中で提供される、請求項1から62のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項 6 7】

ポリペプチドRv1196関連抗原が、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス、例えば、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス、例えば、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス（例えば、任意の非ヒトサルアデノウイルス）、特に、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルス（例えば、任意のアデノウイルス）の1日（例えば、2、3又は6日）の期間内に投与されない、請求項1から66のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

40

【請求項 6 8】

ポリペプチドRv0125関連抗原が、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス、例えば、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス、例えば、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス（例えば、任意の非ヒトサルアデノウイルス）、特に、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルス（例えば、

50

任意のアデノウイルス)の1日(例えば、2、3又は6日)の期間内に投与されない、請求項1から66のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項69】

Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが、ポリペプチドRv1196関連抗原、例えば、任意のポリペプチドマイコバクテリア抗原(例えば、任意のその他の抗原)の1日(例えば、2、3又は6日)の期間内に投与されない、請求項1から68のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項70】

Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが、ポリペプチドRv0125関連抗原、例えば、任意のポリペプチドマイコバクテリア抗原(例えば、任意のその他の抗原)の1日(例えば、2、3又は6日)の期間内に投与されない、請求項1から68のいずれか一項に記載の方法、使用、ポリペプチド又はアデノウイルス。

【請求項71】

Rv1196又はRv0125関連抗原をコードする導入遺伝子を含む非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項72】

少なくとも配列番号10のペントン、配列番号11のヘキソン又は配列番号12のファイバーを含有する、請求項71に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項73】

ChAd3由来のペントン(配列番号10)、ヘキソン(配列番号11)及びファイバー(配列番号12)タンパク質を含む、請求項72に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項74】

少なくとも配列番号15のペントン、配列番号16のヘキソン又は配列番号17のファイバーを含む、請求項71に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項75】

ChAd63由来のペントン(配列番号16)、ヘキソン(配列番号17)及びファイバー(配列番号18)タンパク質を含む、請求項74に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項76】

コードされる抗原が、配列番号6に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、請求項71から75のいずれか一項に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項77】

コードされる抗原が、少なくとも450個のアミノ酸長である配列番号6の断片、例えば、配列番号6の2~723を含む、請求項71から76のいずれか一項に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項78】

複製欠損アデノウイルスである、請求項71から77のいずれか一項に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項79】

E1遺伝子の機能的不活性化(例えば、欠失)を含む、請求項71から78のいずれか一項に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項80】

E4遺伝子の機能的不活性化(例えば、欠失)を含む、請求項71から79のいずれか一項に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項81】

E3遺伝子の機能的不活性化(例えば、欠失)を含む、請求項71から80のいずれか一項に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項82】

Ad5E4orf6遺伝子置換を含む、請求項71から81のいずれか一項に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項83】

配列番号13の配列からなる、請求項71に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

10

20

30

40

50

【請求項 84】

配列番号18の配列からなる、請求項71に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【請求項 85】

配列番号8を含む、又は配列番号8に対して少なくとも95%の同一性を有するその縮重変異体を含むポリヌクレオチド。

【請求項 86】

配列番号8を含む、又は配列番号8に対して少なくとも98%の同一性を有する縮重変異体を含む、請求項85に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 87】

配列番号8からなる、又は配列番号8に対して少なくとも95%の同一性を有する縮重変異体からなる、請求項85に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 88】

配列番号8からなる、又は配列番号8に対して少なくとも98%の同一性を有する縮重変異体からなる、請求項85に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 89】

配列番号8を含む、請求項85に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 90】

配列番号8からなる、請求項89に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫応答を誘導するための方法、特に、マイコバクテリア感染又は疾患に対する免疫応答を誘導するための方法であって、(i)ポリペプチドRv1196関連抗原の少なくとも1回の投与及びRv1196関連抗原をコードするアデノウイルスの少なくとも1回の投与、又は(ii)ポリペプチドRv0125関連抗原の少なくとも1回の投与及びRv0125関連抗原をコードするアデノウイルスの少なくとも1回の投与を含む方法に関する。関連する組成物、アデノウイルス構築物、及びポリヌクレオチド配列もまた提供される。

【背景技術】

【0002】

ワクチン接種は、感染性疾患を防止するための最も有効な方法の1つである。しかしながら、抗原の単回投与は、最適な免疫及び/又は長期的な応答を提供するのに十分ではないことが多い。特定の病原体に対する強力かつ持続的な免疫を確立するための手法としては、ワクチンへのアジュバントの添加及び/又は反復的ワクチン接種、すなわち、1回以上のさらなる用量の抗原の投与による免疫応答のブースト(上昇)が挙げられる。そのようなさらなる投与を、同じワクチン(同種追加免疫)又は異なるワクチン(異種追加免疫)を用いて実施することができる。

【0003】

結核(TB)は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)及び他のマイコバクテリウム種による感染によって引き起こされる慢性感染性疾患である。それは発展途上国における主要な疾患であり、並びに世界の先進地域における深刻な問題である。

【0004】

Mtb72f及びM72は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)タンパク質Rv1196及びRv0125由来の融合タンパク質抗原である。Mtb72f及びM72(例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願WO2006/117240、WO2012/080369及びWO2012/080370に記載されている)又はその断片若しくは誘導体は、結核の治療又は予防にとって潜在的に有益なタンパク質抗原である。

【0005】

前臨床及び臨床試験では、リボソーム製剤中の免疫刺激剤3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)及びQS21と共に、並びに10 µgのM72ポリペプチド、25 µgの3D-MPL及び25 µgのQS21を用いる0、1ヶ月のスケジュールで、ヒトにおいてM72が投与された(Lero

10

20

30

40

50

ux-Roels et al Vaccine 2013 31 2196-2206 ; Montoya et al J. Clin. Immunol. 2013 33(8): 1360-1375 ; Thacher EG et al AIDS 2014 28(12):1769-1781 ; Idoko OT et al Tuberculosis (Edinb) 2014 94(6):564-578 ; Penn-Nicholson A, et al Vaccine 2015 33(32):4025-4034 doi:10.1016/j.vaccine.2015.05.088)。M72抗原を用いる候補ワクチンは、現在、TB流行国で生活する18～50歳の成人において、プラセボと比較した場合の、肺TBに対する2用量のアジュバント添加タンパク質の予防効果を評価するための第IIB相試験 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01755598) にある。

【 0 0 0 6 】

WO2008107370A1 (参照により本明細書に組み入れる) は、ポリペプチド抗原及びポリペプチド抗原をコードするアデノウイルスの併用投与を記載している。

10

【 0 0 0 7 】

WO2010023260 (参照により本明細書に組み入れる) は、ポリペプチド抗原及びポリペプチド抗原をコードするウイルスベクターの併用投与を記載している。

【 0 0 0 8 】

高度に有効であり、安全であり、簡便であり、費用効果的であり、持続的であり、広範囲の免疫応答を誘導する、結核などの疾患に対して免疫する新規方法が依然として必要である。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

今回、予想外にも、ポリペプチドRv1196/Rv0125関連抗原による初回刺激 (プライミング) とRv1196/Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスによる追加免疫 (ブースト) 、又はRv1196/Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスによる初回刺激 (プライミング) とポリペプチドRv1196/Rv0125関連抗原による追加免疫 (ブースト) が、他の潜在的な手法と比べて実質的に改善された免疫応答をもたらす得るということを見出した。

20

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明の第1の態様では、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、対象へのポリペプチドRv1196関連抗原の投与と、それに続く、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与を含む方法が提供される。

【 0 0 1 1 】

30

本発明の第2の態様では、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与と、それに続く、対象へのポリペプチドRv1196関連抗原の投与を含む方法が提供される。

【 0 0 1 2 】

好適には、ポリペプチドRv1196関連抗原は、アジュバントも含む組成物中で提供される。任意選択で、アジュバントは、TLRアゴニスト及び/又は免疫学的に活性なサポニンを含む。TLRアゴニストは、好適にはTLR4アゴニストである。

【 0 0 1 3 】

好適には、ポリペプチドRv1196関連抗原は、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを含まない組成物中に提供される。

40

【 0 0 1 4 】

好適には、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドRv1196関連抗原を含まない組成物中に提供される。

【 0 0 1 5 】

本発明の第3の態様では、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、対象へのポリペプチドRv0125関連抗原の投与と、それに続く、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与を含む方法が提供される。

【 0 0 1 6 】

本発明の第4の態様では、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与と、それに続く、対象へのポリ

50

ペプチドRv0125関連抗原の投与を含む方法が提供される。

【 0 0 1 7 】

好適には、ポリペプチドRv0125関連抗原は、アジュバントも含む組成物中で提供される。任意選択で、アジュバントは、TLRアゴニスト及び/又は免疫学的に活性なサポニンを含む。TLRアゴニストは、好適にはTLR4アゴニストである。

【 0 0 1 8 】

好適には、ポリペプチドRv0125関連抗原は、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを含まない組成物中に提供される。

【 0 0 1 9 】

好適には、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドRv0125関連抗原を含まない組成物中に提供される。 10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図 1】ある範囲の用量のChAd3を用いた免疫後7日、14日及び21日目でのIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスからのM72特異的CD4 T細胞応答のパーセンテージ中央値を示す。

【図 2】ある範囲の用量のChAd63を用いた免疫後7日、14日及び21日目でのIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスからのM72特異的CD4 T細胞応答のパーセンテージ中央値を示す。

【図 3】ある範囲の用量のChAd3を用いた免疫後7日、14日及び21日目でのIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスからのM72特異的CD8 T細胞応答のパーセンテージ中央値を示す。 20

【図 4】ある範囲の用量のChAd63を用いた免疫後7日、14日及び21日目でのIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスからのM72特異的CD8 T細胞応答のパーセンテージ中央値を示す。

【図 5】異種（ChAd/タンパク質及びタンパク質/ChAd）プライミング-ブーストワクチン接種戦略を用いた14PI及び14PIIでのIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスの全血からのM72特異的CD4 T細胞応答のパーセンテージを示す。

【図 6】同種（ChAd/ChAd）及びM72/AS01Eとの併用（混合若しくは共投与）プライミング-ブーストワクチン接種戦略を用いた14PI及び14PIIでのIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスの全血からのM72特異的CD4 T細胞応答のパーセンテージを示す。 30

【図 7】異種（ChAd/タンパク質及びタンパク質/ChAd）プライミング-ブーストワクチン接種戦略を用いた14PI及び14PIIにおけるIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスの全血からのM72特異的CD8 T細胞応答のパーセンテージを示す。

【図 8】同種（ChAd/ChAd）及びM72/AS01Eとの併用（混合若しくは共投与）プライミング-ブーストワクチン接種戦略を用いた14PI及び14PIIでのIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスの全血からのM72特異的CD8 T細胞応答のパーセンテージを示す。 40

【図 9】14PIIでのIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスの肺組織からのM72特異的CD4 T細胞応答のパーセンテージを示す。

【図 10】14PIIでのIFN-ガンマ及び/又はIL-2及び/又はTNF-アルファサイトカインを発現するCB6F1マウスの肺組織からのM72特異的CD8 T細胞応答のパーセンテージを示す。

【図 11】免疫したCB6F1マウスにおける14PIでのWBLOにおけるM72特異的CD4 T細胞応答のサイトカインプロファイルを示す。

【図 12】免疫したCB6F1マウスにおける14PIでのWBLOにおけるM72特異的CD4 T細胞応答のサイトカインプロファイルのデータ値を示す表である。

【図 13】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでのWBLOにおけるM72特異的CD4 T細胞応答 50

のサイトカインプロファイルを示す。

【図 1 4】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでのWBLOにおけるM72特異的CD4 T細胞応答のサイトカインプロファイルのデータ値を示す表である。

【図 1 5】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでの肺におけるM72特異的CD4 T細胞応答のサイトカインプロファイルを示す。

【図 1 6】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでの肺におけるM72特異的CD4 T細胞応答のサイトカインプロファイルのデータ値を示す表である。

【図 1 7】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでのWBLOにおけるM72特異的CD8 T細胞応答のサイトカインプロファイルを示す。

【図 1 8】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでのWBLOにおけるM72特異的CD8 T細胞応答のサイトカインプロファイルのデータ値を示す表である。

【図 1 9】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでのWBLOにおけるM72特異的CD8 T細胞応答のサイトカインプロファイルを示す。

【図 2 0】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでのWBLOにおけるM72特異的CD8 T細胞応答のサイトカインプロファイルのデータ値を示す表である。

【図 2 1】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでの肺におけるM72特異的CD8 T細胞応答のサイトカインプロファイルを示す。

【図 2 2】免疫したCB6F1マウスにおける14PIIでの肺におけるM72特異的CD8 T細胞応答のサイトカインプロファイルのデータ値を示す表である。

【図 2 3】13dPIIでの抗M72 Ig tot血清学を示す。

【図 2 4】M72-ChAd3構築物の配置の図表である。

【図 2 5】M72-ChAd63構築物の配置の図表である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

配列番号の簡単な説明

配列番号1：結核菌 (Mycobacterium tuberculosis) H37Rv Rv1196ポリペプチド配列

配列番号2：結核菌F11 Rv1196ポリペプチド配列

配列番号3：結核菌H37Rv Rv0125ポリペプチド配列 (成熟配列)

配列番号4：M72 2-hisポリペプチド配列

配列番号5：M72 2-hisポリヌクレオチド

配列番号6：M72 hisなしポリペプチド配列

配列番号7：M72 hisなしポリヌクレオチド

配列番号8：M72 hisなしヒト最適化ポリヌクレオチド

配列番号9：ChAd3ポリヌクレオチド

配列番号10：ChAd3ペントンポリペプチド配列

配列番号11：ChAd3ヘキソンポリペプチド配列

配列番号12：ChAd3ファイバーポリペプチド配列

配列番号13：M72-ChAd3構築物DNA

配列番号14：ChAd63ポリヌクレオチド

配列番号15：ChAd63ペントンポリペプチド配列

配列番号16：ChAd63ヘキソンポリペプチド配列

配列番号17：ChAd63ファイバーポリペプチド配列

配列番号18：M72-ChAd63構築物DNA

配列番号19：ChAd155ポリヌクレオチド

配列番号20：ChAd155ペントンポリペプチド配列

配列番号21：ChAd155ヘキソンポリペプチド配列

配列番号22：ChAd155ファイバーポリペプチド配列

【0022】

詳細な説明

結核 (TB) は、結核菌及び他のマイコバクテリウム種による感染によって引き起こされ

る慢性感染性疾患である。それは発展途上国における主要な疾患であり、並びに世界の先進地域における深刻な問題である。世界の人口のおよそ3分の1がTB桿菌に潜在的に感染していると考えられ、毎年、約900万人が活動性TBの新たな症例となり、150万人が死亡している。TB桿菌に感染した人のおよそ10%が活動性TBを発症し、活動性TBを有するそれぞれの人は、年に平均で10～15人の他人を感染させている（World Health Organisation Tuberculosis Facts 2014）。

【 0 0 2 3 】

結核菌は、呼吸器経路により個体に感染する。肺胞マクロファージは細菌を飲み込むが、それは、酸性リソソームとのファゴソーム融合を阻害することによって生存及び増殖することができる。CD4+及びCD8+ T細胞を含む複雑な免疫応答が続いて起こり、最終的には肉芽腫の形成をもたらす。病原体としての結核菌の成功の中心となるのは、単離されているが、根絶されてはいない細菌が、長期間持続し、活動性TBの後の発症に対して個体を脆弱にし得るという事実である。

10

【 0 0 2 4 】

感染した個体の5%未満が、感染後1年目に活動性TBを発症する。肉芽腫は数十年持続することができ、酸素及び栄養素が枯渇した休眠状態で生きた結核菌を含有すると考えられる。しかしながら、休眠状態にある細菌の大部分は身体中に広がった非マクロファージ細胞型に位置することが示唆されている（Lochtら、Expert Opin. Biol. Ther. 2007 7(11):1665-1677）。活動性TBの発症は、例えば、免疫抑制事象の結果として、宿主の自然免疫と病原体とのバランスが変化するときにかかる（Anderson P Trends in Microbiology 2007 15(1):7-13; Ehlers S Infection 2009 37(2):87-95）。

20

【 0 0 2 5 】

潜伏性TBと活動性TBとのバランスを説明する力学仮説も提唱されている（Cardona P-J Inflammation & Allergy - Drug Targets 2006 6:27-39; Cardona P-J Infection 2009 37(2):80-86）。

【 0 0 2 6 】

感染はかなりの期間にわたって無症状性であり得るが、活動性疾患は、疲労、体重減少、発熱及び持続性の咳をもたらす、肺の急性炎症として最も一般的に現れる。未処置の場合、典型的には、重篤な合併症及び死亡の結果となる。

【 0 0 2 7 】

結核は一般に、長期的な抗生物質療法を用いて制御することができるが、そのような処置は疾患の拡散を防止するには十分ではない。活動性感染した個体は、大部分は無症状であるが、しばらくの間は伝染性であり得る。さらに、処置レジメン（典型的には6ヶ月以上持続する）の遵守が重要であるが、患者の行動をモニタリングするのは難しい。いくらかの患者は処置過程を完了せず、無効な処置及び薬物耐性の発生をもたらし得る。

30

【 0 0 2 8 】

多剤耐性TB（MDR-TB）は、第一選択の薬剤に応答することができない形態である。2013年には推定480,000人がMDR-TBを発症した。MDR-TBは、第二選択の薬剤を用いて処置可能である。しかし、第二選択の処置オプションは制限され、推奨医薬が常に利用可能なわけではない。必要とされる高価な化学療法（最大2年の処置）はコストが高く、患者に重篤な薬物副作用を生じる可能性がある。

40

【 0 0 2 9 】

広範囲薬剤耐性TB（XDR-TB）は、第二選択の薬剤に対する耐性が第一選択の薬剤に対する耐性に加えて生じる場合に生じる。MDR-TB症例の約9.0%がXDR-TBを有すると推定される（World Health Organisation Tuberculosis Facts 2014）。

【 0 0 3 0 】

抗生物質処置の全過程が完了する場合であっても、結核菌による感染を、感染した個体から根絶させることはできず、再活性化することができる潜伏感染として残り得る。結果として、疾患の正確で早期の診断が最も重要である。

【 0 0 3 1 】

50

現在、弱毒化生細菌を用いるワクチン接種が、防御免疫を誘導するために最も広く用いられている方法である。この目的のために用いられる最も一般的なマイコバクテリウムは、60年以上前に初めて開発されたマイコバクテリウム・ボビス (M.bovis) の無毒株であるカルメット・ゲラン桿菌 (BCG) である。それはTB流行地域で誕生時に投与される。しかしながら、BCGの安全性及び有効性は論争の種であり、子供における重篤な疾患兆候に対して保護するが、成人における疾患に対するBCGの有効性は変動し得る。さらに、米国などのいくつかの国は、一般人にこの薬剤をワクチン接種していない。

【 0 0 3 2 】

マイコバクテリウム感染の初期段階中に強く発現されるタンパク質のいくつかは、動物ワクチン接種モデルにおいて予防効果を提供することが示されている。しかしながら、感染の初期段階中に高度に発現される抗原を用いるワクチン接種は、より後の段階の感染に対処するための最適な免疫応答を提供することができない。潜伏感染中の十分な制御には、その時点で発現される特定の抗原に特異的であるT細胞が必要であり得る。休止中の持続的細菌を直接標的とする曝露後ワクチンは、TB再活性化に対して防御するのに役立ち、それによって、TB制御を促進するか、又はさらには感染の消失も可能にし得る。したがって、潜伏性TBを標的とするワクチンは、地球規模のTB感染率を有意かつ経済的に減少させることができる。

10

【 0 0 3 3 】

後期段階の抗原に基づくサブユニットワクチンを、初期段階の抗原と組み合わせて用いて、多面的ワクチンを提供することもできる。あるいは、初期及び/又は後期段階の抗原を用いて、BCGワクチン接種を補完及び改良することができる (BCG応答をブーストさせることによるか、又は進化した組換えBCG株の開発による)。

20

【 0 0 3 4 】

Mtb72f及びM72は、結核の治療又は予防にとって潜在的に有益な融合タンパク質抗原である。Mtb72f及びM72は結核菌タンパク質Rv1196及びRv0125に由来し、両方の遺伝子は結核菌複合体の有毒及び無毒菌株の両方並びにBCGに存在する。

【 0 0 3 5 】

Rv1196 (例えば、Dillon et al Infection and Immunity 1999 67(6): 2941-2950では名称Mtb39aで記載されている) は高度に保存されており、H37Rv、C、Haarlem、CDC1551、94-M4241A、98-R604INH-RIF-EM、KZN605、KZN1435、KZN4207、KZNR506株において100%配列同一性を有し、F11株では単一の点突然変異Q30Kを有する (大部分の他の臨床分離株は、H37Rvに対して90%を超える同一性を有する)。Rv1196関連抗原をコードするアデノウイルスはLewinsohn et al Am J Respir Crit Care Med 2002 116:843-848に記載されている。

30

【 0 0 3 6 】

Rv0125 (例えば、Skeiky et al Infection and Immunity 1999 67(8): 3998-4007では名称Mtb32aで記載されている) もまた高度に保存されており、多くの株において100%配列同一性を有する。Rv0125関連抗原をコードするアデノウイルス (ヒトAd5) がZhang et al Human Vaccines & Therapeutics 2015 11(7):1803-1813 doi: 10.1080/21645515.2015.1042193に記載されている。全長Rv0125は、N末端シグナル配列を含み、これが切断されて成熟タンパク質をもたらす。

40

【 0 0 3 7 】

Mtb72fはいくつかの動物モデルにおいて防御を提供することが示されている (例えば、Brandtら、Infect. Immun. 2004 72(11):6622-6632; Skeikyら、J. Immunol. 2004 172:7618-7628; Tsenovaら、Infect. Immun. 2006 74(4):2392-2401を参照されたい)。Mtb72fはまた、臨床試験の主題でもあった (Von Eschenら、2009 Human Vaccines 5(7):475-482)。M72は、Mtb72fと比較してセリンからアラニンへの単一の突然変異を含む改良された抗原であり、改善された安定性特性をもたらす。M72関連抗原もまた、潜伏性TBモデルにおいて価値があることが示されている (参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願WO2006/117240)。以前の前期臨床及び臨床試験では、リボソーム製剤中の免疫刺激剤3-O-

50

脱アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) 及びQS21と共に、並びに10 µgのM72ポリペプチド、25 µgの3D-MPL及び25 µgのQS21を用いる0、1ヶ月のスケジュールで、ヒトにおいてM72が投与された (例えば、Leroux-Roels et al Vaccine 2013 31 2196-2206 ; Montoya et al J. Clin. Immunol. 2013 33(8): 1360-1375 ; Thacher EG et al AIDS 2014 28(12):1769-1781 ; Idoko OT et al Tuberculosis (Edinb) 2014 94(6):564-578 ; Penn-Nicholson A, et al Vaccine 2015 33(32):4025-4034 doi:10.1016/j.vaccine.2015.05.088を参照されたい)。

【0038】

M72抗原を用いる候補ワクチンは、現在、TB流行国で生活する18～50歳の成人において、プラセボと比較した場合の、肺TBに対する2用量のアジュバント添加タンパク質の予防効果を評価するための第IIB相試験 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01755598) にある。それにもかかわらず、改良されたワクチン接種手法が依然として必要である。

10

【0039】

本発明の第1の態様では、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、対象へのポリペプチドRv1196関連抗原の投与と、それに続く、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与を含む方法が提供される。

【0040】

本発明の第2の態様では、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、対象へのRv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与と、それに続く、ポリペプチドRv1196関連抗原の投与を含む方法が提供される。

20

【0041】

本発明の第3の態様では、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、対象へのポリペプチドRv0125関連抗原の投与と、それに続く、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを含む免疫原性組成物の投与を含む方法が提供される。

【0042】

本発明の第4の態様では、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与と、それに続く、対象へのポリペプチドRv0125関連抗原の投与を含む方法が提供される。

【0043】

本明細書において、第1の組成物の投与と、「それに続く」、第2の組成物の投与とは、第1の組成物の投与及び第2の組成物の投与の間で時間間隔が経過したことを示す。投与の間の時間間隔は、1週間から2年、特に、2週間から18か月、通常、3週間から15ヶ月、例えば、3週間から6ヶ月、例えば、3週間から2ヶ月、とりわけ、3週間から6週間、例えば、およそ4週間であることが適している。

30

【0044】

また、対象における免疫応答の誘導において使用するためのポリペプチドRv1196関連抗原が提供され、これでは、ポリペプチドRv1196関連抗原が対象に投与され、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く。

【0045】

同様に、対象における免疫応答の誘導において使用するためのRv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが提供され、これでは、ポリペプチドRv1196関連抗原が対象に投与され、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く。

40

【0046】

さらに、対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造における、ポリペプチドRv1196関連抗原の使用が提供され、これでは、ポリペプチドRv1196関連抗原が対象に投与され、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く。

【0047】

さらに、対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造における、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの使用が提供され、これでは、ポリペプチドRv11

50

96関連抗原が対象に投与され、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く。

【 0 0 4 8 】

また、対象における免疫応答の誘導において使用するためのポリペプチドRv1196関連抗原が提供され、これでは、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv1196関連抗原の投与がそれに続く。

【 0 0 4 9 】

同様に、対象における免疫応答の誘導において使用するためのRv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが提供され、これでは、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv1196関連抗原の投与がそれに続く。

10

【 0 0 5 0 】

さらに、対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造における、ポリペプチドRv1196関連抗原の使用が提供され、これでは、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv1196関連抗原の投与がそれに続く。

【 0 0 5 1 】

また、対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるRv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの使用が提供され、これでは、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv1196関連抗原の投与がそれに続く。

20

【 0 0 5 2 】

また、対象における免疫応答の誘導において使用するためのポリペプチドRv0125関連抗原が提供され、これでは、ポリペプチドRv0125関連抗原が対象に投与され、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く。

【 0 0 5 3 】

同様に、対象における免疫応答の誘導において使用するためのRv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが提供され、これでは、ポリペプチドRv0125関連抗原が対象に投与され、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く。

【 0 0 5 4 】

さらに、対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるポリペプチドRv0125関連抗原の使用が提供され、これでは、ポリペプチドRv0125関連抗原が対象に投与され、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く。

30

【 0 0 5 5 】

さらに、対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるRv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの使用が提供され、これでは、ポリペプチドRv0125関連抗原が対象に投与され、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの投与がそれに続く。

【 0 0 5 6 】

また、対象における免疫応答の誘導において使用するためのポリペプチドRv0125関連抗原が提供され、これでは、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv0125関連抗原の投与がそれに続く。

40

【 0 0 5 7 】

同様に、対象における免疫応答の誘導において使用するためのRv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが提供され、これでは、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv0125関連抗原の投与がそれに続く。

【 0 0 5 8 】

さらに、対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるポリペプチドRv0125関連抗原の使用が提供され、これでは、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノ

50

ウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv0125関連抗原の投与がそれに続く。

【 0 0 5 9 】

また、対象において免疫応答を誘導するための医薬の製造におけるRv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの使用が提供され、これでは、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスが対象に投与され、ポリペプチドRv0125関連抗原の投与がそれに続く。

【 0 0 6 0 】

ポリペプチドRv1196関連抗原は、アジュバントも含む組成物中で提供されることが適している。任意選択で、アジュバントは、TLRアゴニスト及び/又は免疫学的に活性なサポニンを含む。TLRアゴニストは、適宜、TLR4アゴニストである。

10

【 0 0 6 1 】

ポリペプチドRv0125関連抗原は、アジュバントも含む組成物中で提供されることが適している。任意選択で、アジュバントは、TLRアゴニスト及び/又は免疫学的に活性なサポニンを含む。TLRアゴニストは、適宜、TLR4アゴニストである。

【 0 0 6 2 】

ポリペプチドRv1196関連抗原は、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、例えば、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを含まない組成物中で提供されることが適している。例えば、それは、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない（例えば、任意の非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない）、特に、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない（例えば、任意のアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない）。いくつかの実施形態では、ポリペプチドRv1196関連抗原は、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない組成物中で提供される。

20

【 0 0 6 3 】

さらに、ポリペプチドRv1196関連抗原は、適宜、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスのようなRv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの1日（例えば、2、3又は6日）の期間内に投与されない。例えば、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス（例えば、任意の非ヒトサルアデノウイルス）、特に、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルス（例えば、任意のアデノウイルス）。ポリペプチドRv1196関連抗原は、適宜、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスの1日（例えば、2、3又は6日）の期間内に投与されない。

30

【 0 0 6 4 】

Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドRv1196関連抗原を実質的に含まない、又は含まない組成物中で提供されることが適している。例えば、それは、ポリペプチドマイコバクテリア抗原を実質的に含まない、又は含まない（例えば、任意のその他の抗原を実質的に含まない、又は含まない）。いくつかの実施形態では、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドマイコバクテリア抗原を実質的に含まない、又は含まない組成物中で提供される。

【 0 0 6 5 】

さらに、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドRv1196関連抗原の1日（例えば、2、3又は6日）の期間内に適宜投与されない。例えば、ポリペプチドマイコバクテリア抗原（例えば、任意のその他の抗原）。Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドマイコバクテリア抗原の1日（例えば、2、3又は6日）の期間内に適宜投与されない。

40

【 0 0 6 6 】

ポリペプチドRv0125関連抗原は、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない組成物中で提供され、例えば、それは、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを含まないことが適している。例えば、それは、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない（

50

例えば、それは、任意の非ヒトサルアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない）、特に、それは、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない（例えば、それは、任意のアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない）。いくつかの実施形態では、ポリペプチドRv0125関連抗原は、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスを実質的に含まない、又は含まない組成物中で提供される。

【0067】

さらに、ポリペプチドRv1196関連抗原は、Rv1196関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスのようなRv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスの1日（例えば、2、3又は6日）の期間内に適宜投与されない。例えば、マイコバクテリア抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルス（例えば、任意の非ヒトサルアデノウイルス）、特に、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルス（例えば、任意のアデノウイルス）。ポリペプチドRv0125関連抗原は、マイコバクテリア抗原をコードする任意のアデノウイルスの1日（例えば、2、3又は6日）の期間内に適宜投与されない。

10

【0068】

Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドRv0125関連抗原を実質的に含まない、又は含まない組成物中で提供されることが適している。例えば、それは、ポリペプチドマイコバクテリア抗原を実質的に含まない、又は含まない（例えば、任意のその他の抗原を実質的に含まない、又は含まない）。いくつかの実施形態では、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドマイコバクテリア抗原を実質的に含まない、又は含まない組成物中で提供される。

20

【0069】

さらに、Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドRv1196関連抗原の1日（例えば、2、3又は6日）の期間内に適宜投与されない。例えば、ポリペプチドマイコバクテリア抗原（例えば、任意のその他の抗原）。Rv0125関連抗原をコードする非ヒトサルアデノウイルスは、ポリペプチドマイコバクテリア抗原の1日（例えば、2、3又は6日）の期間内に適宜投与されない。

【0070】

対象は、哺乳動物、例えば、ウシ又はヒトであることが適している。特に、対象は、ヒトである。

30

【0071】

アデノウイルスとの関連で「実質的に含まない」とは、通常、用量あたり 10^4 未満、例えば、 10^3 未満、特に、 10^2 未満又は 10^1 未満の関連種のウイルス粒子を含むことを意味する。ウイルス粒子の数を決定するための適した方法として、定量的PCR解析、分析用HPLC又は A_{260nm} に基づく分光光度的方法が挙げられる。

【0072】

ポリペプチド抗原に関連して「実質的に含まない」とは、通常、用量あたり $1\mu g$ 未満、例えば、 $0.1\mu g$ 未満、特に、 $0.01\mu g$ 未満の関連抗原（単数又は複数）を含むことを意味する。ペプチド抗原の量を決定するための適した方法は、当業者に公知であり、組成物に応じて変わり、適当な定量方法（分析用HPLC又は分光光度的方法など）を容易にすることを補助する精製方法を組み合わせてもよい。

40

【0073】

典型的には、本発明の方法の目的は、防御免疫応答を誘導する、すなわち、関連する病原体に対して対象を免疫する、又はワクチン接種することである。したがって、本発明を、マイコバクテリウム・ボビス（*Mycobacterium bovis*）又は結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、特に結核菌による感染などの、マイコバクテリアによる感染の予防、処置（治療）又は改善のために適用することができる。

【0074】

本発明を、

- 感染していない対象、若しくはあるいは、潜伏感染を有する対象に投与することな

50

どによる、感染（すなわち一次結核症）若しくは再活性化（すなわち二次結核症）に起因する活動性結核の予防；

- 感染していない対象に投与することなどによる、潜伏性結核の予防；
- 潜伏性結核の処置；
- 例えば、数ヶ月、数年若しくは無期限の期間による、結核の再活性化の防止若しくは遅延、特に再活性化の遅延；又は

- 活動性結核の処置（例えば、化学療法治療の必要性を低減するため、例えば化学療法治療の期間低減、薬物レジメンの複雑性若しくは化学療法治療の投与量の低減；あるいは、化学療法後の後期再発のリスクを低減するため）の目的のために提供することができる。

10

【0075】

誘発される免疫応答は、抗原特異的T細胞応答（全身及び/又は局所応答であり得る）であり得る。全身応答は、例えば全血サンプルから検出することができる。局所応答（例えば、肺における局所応答）は、組織の適当なサンプル（例えば肺組織）又は他の局所的に集中したサンプル方法（例えば気管支肺胞洗浄）から検出することができる。抗原特異的T細胞応答は、CD4+ T細胞応答、例えば複数のサイトカイン（例えば、IFNガンマ、TNFアルファ又はIL2、特にIFNガンマ、TNFアルファ及びIL2）を発現するCD4+ T細胞が関与する応答を含み得る。あるいは又はさらに、抗原特異的T細胞応答は、CD8+ T細胞応答、例えば複数のサイトカイン（例えば、IFNガンマ、TNFアルファ又はIL2、特にIFNガンマ、TNFアルファ及びIL2）を発現するCD8+ T細胞が関与する応答を含み得る。

20

【0076】

用語「活動性感染」とは、発現した疾患症状及び/又は病変を示す、好適には、発現した疾患症状を示す、感染、例えば、結核菌による感染を指す。

【0077】

用語「非活動性感染」、「休眠感染」又は「潜伏感染」又は「潜伏性結核」とは、発現した疾患症状及び/又は病変を示さない、好適には、発現した疾患症状を示さない感染、例えば、結核菌による感染を指す。潜伏感染を有する対象は、好適には、例えば、ツベルクリン皮膚検査（TST）又はインターフェロンガンマ放出アッセイ（IGRA）により、感染について陽性を示すが、活動性感染と関連する疾患症状及び/又は病変を示していないものである。

30

【0078】

用語「一次結核症」とは、臨床的疾患、例えば、感染、例えば、結核菌による感染の直後の、疾患症状の発現を指す。Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966（第16版、Braunwaldら（編）、2005）を参照されたい。

【0079】

用語「二次結核症」又は「初感染後の結核」とは、休眠、非活動性又は潜伏感染、例えば、結核菌による感染の再活性化を指す。Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966（第16版、Braunwaldら（編）、2005）を参照されたい。

【0080】

用語「結核再活性化」とは、感染検査について陽性を示す（例えば、ツベルクリン皮膚検査（TST）又はインターフェロンガンマ放出アッセイ（IGRA）により）が、見かけの疾患症状を有さない個体における疾患症状のより後の発現を指す。好適には、個体は感染に対して再曝露されていない。陽性の診断検査は、個体が感染しているが、その個体が、結核を非活動状態又は潜伏状態にするために十分に処置された、活動性疾患症状を以前に発現していても、又は発現していなくてもよいことを示す。

40

【0081】

好適には、感染していないか、又は結核菌による感染などのマイコバクテリアによる潜伏感染を有する対象に上記方法が適用される。一実施形態において、上記方法は、結核菌（ヒト対象に関して）又はマイコバクテリウム・ボビス（ウシ対象に関して）による感染を有しない対象に適用される。別の実施形態において、上記方法は、マイコバクテリア、

50

例えば結核菌（ヒト対象に関して）又はマイコバクテリウム・ボビス（ウシ対象に関して）による潜伏感染を有する対象に適用される。

【0082】

いくつかの実施形態においては、対象は、これまでにBCGでワクチン接種されている。本発明の手法は、例えば、BCGワクチン接種後少なくとも1年、例えばBCGワクチン接種後少なくとも2年、例えばBCGワクチン接種後少なくとも5年などの対象に使用することができる。

【0083】

いくつかの実施形態においては、対象は、以前に結核菌に感染している。

【0084】

本発明において使用する抗原

T細胞エピトープは、T細胞（例えば、CD4+又はCD8+ T細胞）により認識されるアミノ酸の短い連続伸長物である。T細胞エピトープの同定を、当業者には公知であるエピトープマッピング実験により達成することができる（例えば、Paul, Fundamental Immunology、第3版、243-247 (1993); Bei Barthら、Bioinformatics 2005 21(Suppl. 1):i29-i37を参照されたい）。ヒトなどの、多様な非近交系集団においては、異なるHLA型は、特定のエピトープが集団の全てのメンバーによって認識されないことを意味する。結核におけるT細胞応答の決定的な関与の結果として、免疫応答の認識及び規模のレベルを最大化するために、参照配列の免疫原性誘導体は、望ましくは、大部分（又は、好適には、全て）のインタクトなT細胞エピトープを含有するものである。Mortier et al BMC Immunology 2015 16:63は、Mtb72f及びM72結核候補ワクチン抗原について配列保存解析及びin silicoヒト白血球抗原-ペプチド結合予測を行っている。

【0085】

当業者であれば、単一のアミノ酸又は小さい割合のアミノ酸を変化させる、付加する、又は欠失させるタンパク質に対する個々の置換、欠失又は付加は、変化が、あるアミノ酸の、機能的に類似するアミノ酸との置換又は免疫原性機能に実質的に影響しない残基の置換/欠失/付加をもたらす「免疫原性誘導体」であることを認識できる。

【0086】

機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換表は、当業界で周知である。一般に、そのような保存的置換は、以下に特定されるアミノ酸群の1つに含まれるが、いくつかの状況では、抗原の免疫原性特性に実質的に影響しない他の置換も可能である。以下の8つの群はそれぞれ、典型的には互いに保存的置換であるアミノ酸：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G) ;
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) ;
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q) ;
- 4) アルギニン (R)、リジン (K) ;
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V) ;
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W) ;
- 7) セリン (S)、トレオニン (T) ; 及び
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)

を含有する（例えば、Creighton、Proteins 1984を参照されたい）。好適には、そのような置換は、エピトープの領域中に存在せず、したがって、抗原の免疫原性特性に対する有意な影響を有さない。

【0087】

免疫原性誘導体はまた、参照配列と比較してさらなるアミノ酸が挿入されたものを含んでもよい。好適には、そのような挿入は、エピトープの領域中に存在せず、したがって、抗原の免疫原性特性に対する有意な影響を有さない。挿入の一例は、対象の抗原の発現及び/又は精製を補助するためのヒスチジン残基の短い伸長物（例えば、2~6個の残基）を含む。

【0088】

免疫原性誘導体は、参照配列と比較してアミノ酸が欠失したものを含む。好適には、そのような欠失は、エピトープの領域中に存在せず、したがって、抗原の免疫原性特性に対する有意な影響を有さない。

【0089】

当業者であれば、特定の免疫原性誘導体が置換、欠失及び付加（又はその任意の組合せ）を含んでもよいことを認識できる。

【0090】

2つ以上のポリペプチド配列の文脈における用語「同一の」又は「同一性」パーセンテージとは、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いて、又は手動のアラインメント及び目視検査により測定された場合、比較ウィンドウ、又は指定の領域にわたって最大の一致について比較し、整列させたとき、同じであるか、又は同じである特定のパーセンテージ（すなわち、特定の領域にわたる70%の同一性、必要に応じて、75%、80%、85%、90%、95%、98%又は99%の同一性）のアミノ酸残基を有する2つ以上の配列又はサブ配列を指す。この定義はまた、試験配列の相補体も指す。必要に応じて、同一性は、少なくとも300アミノ酸又は少なくとも400アミノ酸などの、少なくとも200アミノ酸長である領域にわたって存在する。好適には、比較は、参照配列の全長に対応するウィンドウにわたって実施される（誘導体配列とは反対である）。

10

【0091】

配列比較のために、1つの配列は、試験配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列及び参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて、サブ配列の座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータを用いるか、又は代替パラメータを指定することができる。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列と比較した試験配列に関する配列同一性パーセンテージを算出する。

20

【0092】

本明細書で用いられる「比較ウィンドウ」とは、2つの配列を最適に整列させた後、配列を同じ数の連続する位置の参照配列と比較することができるセグメントを指す。比較のための配列のアラインメントの方法は、当業界で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントを、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の部分的相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI中のGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA）により、又は手動のアラインメント及び目視検査（例えば、Current Protocols in Molecular Biology（Ausubelら（編）、1995 supplement）を参照されたい）により行うことができる。

30

【0093】

有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、関係及び配列同一性パーセントを示すためのプログレッシブペアワイズアラインメントを用いて関連配列群から複数の配列アラインメントを作出するものである。それはまた、アラインメントを作出するために用いられるクラスタリング関係を示すツリー又はデンドログラムをプロットする。PILEUPは、Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987)のプログレッシブアラインメント法の単純化を用いる。用いられる方法は、Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989)により記載された方法と類似する。このプログラムは、それぞれ、最大で5,000ヌクレオチド又はアミノ酸の長さの、300個までの配列整列させることができる。複数のアラインメント手順は、2つの最も類似する配列のペアワイズアラインメントから始まり、2つの整列された配列のクラスターを生成する。次いで、このクラスターを、次の最も関連する配列又は整列された配列のクラスターと整列させる。配列の2つのクラスターを、2つの個々の配列のペアワイズアラインメントの単純な伸長によって整列させる。最終的なアラインメント（整列）は、一連のプログレッシブペアワイズアラインメントによって達成さ

40

50

れる。このプログラムは、配列比較の領域について特定の配列及びそのアミノ酸座標を指定することにより、及びプログラムパラメータを指定することにより実行される。PILEUPを用いて、参照配列を他の試験配列と比較して、以下のパラメータ：デフォルトギャップ重み（3.00）、デフォルトギャップ長さ重み（0.10）、及び加重末端ギャップを用いて配列同一性パーセントの関係を決定する。PILEUPを、GCG配列分析ソフトウェアパッケージ、例えば、バージョン7.0（Devereauxら、Nuc. Acids Res. 12:387-395（1984））から取得することができる。

【0094】

配列同一性パーセント及び配列類似性パーセントを決定するのに好適なアルゴリズムの別の例は、それぞれ、Altschulら、Nuc. Acids Res. 25:3389-3402（1977）及びAltschulら、J. Mol. Biol. 215:403-410（1990）に記載されている、BLAST及びBLAST 2.0アルゴリズムである。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information（www.ncbi.nlm.nih.gov/のウェブサイト）を介して公共的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させた場合、いくつかの正の値の閾値スコア T と一致するか、又はそれを満たす、問合せ配列中の短いワード長さ W を同定することによって、高スコア配列対（HSP）を最初に同定することを含む。 T は、近隣ワードスコア閾値と呼ばれる（Altschulら、上掲）。これらの初期の近隣ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見出すための検索を開始するための種として作用する。ワードヒットは、累積アラインメントスコアを増大させることができる限り、それぞれの配列に沿って両方向に伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータ M （一致する残基の対に関するリワードスコア；常に0より大きい）及び N （不一致の残基に関するペナルティスコア；常に0より小さい）を用いて算出する。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを用いて、累積スコアを算出する。累積アラインメントスコアが、その最大達成値から量 X 下落する場合、それぞれの方向でのワードヒットの伸長を停止させる；累積スコアは1つ以上の負のスコアリングの残基アラインメントの蓄積のため、0以下になる；又はいずれかの配列の末端に達する。BLASTアルゴリズムパラメータ W 、 T 及び X は、アラインメントの感度及び速度を決定づける。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、デフォルトとして、11のワード長（ W ）、10の期待値（ E ）、 $M=5$ 、 $N=-4$ 及び両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長、及び10の期待値（ E ）、及びBLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915（1989））、50のアラインメント（ B ）、10の期待値（ E ）、 $M=5$ 、 $N=-4$ 及び両鎖の比較を用いる。

【0095】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析も実施する（例えば、Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787（1993）を参照されたい）。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の一致が偶然に生じる確率の指標を提供する最小和確率（ $P(N)$ ）である。例えば、核酸は、試験核酸と参照核酸との比較における最小和確率が約0.2未満、より好ましくは、約0.01未満、最も好ましくは、約0.001未満である場合、参照配列と類似すると考えられる。

【0096】

任意の事象において、ポリペプチド配列の免疫原性誘導体は、通常、参照配列と本質的に同じ活性を有する。本質的に同じ活性とは、リンパ球増殖による細胞の活性化、培養上清中でのサイトカインの産生（ELISA、CBAなどにより測定される）又は細胞内及び細胞外染色（例えば、CD3、CD4、CD8、IL2、TNF-アルファ、IFN-ガンマ、IL-17、CD40L、CD69などの免疫マーカーに特異的な抗体を用いる）、次いで、フローサイトメーターを用いる分析によるT及びB細胞応答の特徴付けを測定する、特定の抗原を用いるPBMC、全血、肺組織又は気管支肺泡洗浄液のin vitro再刺激アッセイ（例えば、最大で1日、1日～1週間又は1～2週間などの、数時間から最大で2週間の期間にわたる再刺激）における参照配列の少な

くとも50%、好適には、少なくとも75%、特に、少なくとも90%の活性を意味する。好適には、本質的に同じ活性とは、T細胞増殖及び/又はIFN-ガンマ産生アッセイにおける参照配列の少なくとも50%、好適には、少なくとも75%、特に、少なくとも90%の活性を意味する。

【0097】

一実施形態において、ポリペプチド抗原及びコードされる抗原は、Rv1196関連抗原である。用語「Rv1196関連抗原」とは、配列番号1に示されるRv1196タンパク質又はその免疫原性誘導体を意味する。本明細書において使用する用語「誘導体」は、参照配列に対して改変された抗原を意味している。免疫原性誘導体は、参照配列に十分類似しており、参照配列の免疫原性特性を実質的に保持しており、参照配列に対する免疫応答が引き起こされる能力を残している。免疫原性誘導体は、例えば、参照配列の改変版を含むことができ、あるいは参照配列の改変版からなることができる。

10

【0098】

Rv1196関連抗原は、例えば2500個以下のアミノ酸残基、例えば1500個以下のアミノ酸残基、特に1200個以下のアミノ酸残基、とりわけ1000個以下のアミノ酸残基、典型的には800個以下のアミノ酸残基を含有し得る。

【0099】

適切には、Rv1196関連抗原は、配列番号1に対して少なくとも70%の同一性を有する配列、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、とりわけ少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%の同一性を有する配列を含む、例えばその配列からなる。

20

【0100】

Rv1196関連抗原の具体例は、配列番号1で示される結核菌H37Rv株由来のRv1196である。したがって、本発明の一実施形態において、Rv1196関連抗原は配列番号1を含むタンパク質である。本発明の第二の実施形態において、Rv1196関連抗原は配列番号1からなるタンパク質である。

【0101】

Rv1196関連抗原のさらなる例は、結核菌F11株由来のRv1196である。本発明の一実施形態において、Rv1196関連抗原は配列番号2を含むタンパク質である。本発明の第二の実施形態において、Rv1196関連抗原は配列番号2からなるタンパク質である。

30

【0102】

典型的なRv1196関連抗原は、少数の欠失、挿入及び/又は置換を有する配列番号1の免疫原性誘導体を含む（例えばそれからなる）。例えば、0~5個所に最大5残基までの欠失、0~5個所に最大5残基までの挿入、及び最大20残基までの置換を有するものがある。

【0103】

Rv1196の他の免疫原性誘導体は、少なくとも200アミノ酸長、例えば少なくとも250アミノ酸長、特に少なくとも300アミノ酸長、とりわけ少なくとも350アミノ酸長である配列番号1の断片を含む（例えばそれからなる）ものである。

【0104】

Rv1196のさらなる免疫原性誘導体は、少なくとも200アミノ酸長、例えば少なくとも250アミノ酸長、特に少なくとも300アミノ酸長、とりわけ少なくとも350アミノ酸長である配列番号2の断片を含む、例えばそれからなるものである。

40

【0105】

Rv1196関連抗原は、以前に記載されている方法（例えば、Dillon et al Infection and Immunity 1999 67(6): 2941-2950 ; WO2006/117240）、実施例に提供されている方法、又はそれに類似した方法によって調製できる。

【0106】

一実施形態において、ポリペプチド抗原及びコードされる抗原は、Rv0125関連抗原である。用語「Rv0125関連抗原」とは、配列番号3に示されるRv0125タンパク質又はその免疫原性誘導体を意味する。本明細書において使用する用語「誘導体」は、参照配列に対して

50

改変された抗原を意味している。免疫原性誘導体は、参照配列に十分類似しており、参照配列の免疫原性特性を実質的に保持しており、参照配列に対する免疫応答が引き起こされる能力を残している。免疫原性誘導体は、例えば、参照配列の改変版を含むことができ、あるいは参照配列の改変版からなることができる。

【0107】

Rv0125関連抗原は、例えば2500個以下のアミノ酸残基、例えば1500個以下のアミノ酸残基、特に1200個以下のアミノ酸残基、とりわけ1000個以下のアミノ酸残基、典型的には800個以下のアミノ酸残基を含有し得る。

【0108】

適切には、Rv0125関連抗原は、配列番号3に対して少なくとも70%の同一性を有する配列、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、とりわけ少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%の同一性を有する配列を含む、例えばその配列からなる。

10

【0109】

Rv0125関連抗原の具体例は、配列番号3で示される結核菌H37Rv株由来のRv0125である。したがって、本発明の一実施形態において、Rv0125関連抗原は配列番号3を含むタンパク質である。本発明の第二の実施形態において、Rv0125関連抗原は配列番号3からなるタンパク質である。

【0110】

典型的なRv0125関連抗原は、少数の欠失、挿入及び/又は置換を有する配列番号3の免疫原性誘導体を含む（例えばそれからなる）。例えば、0~5個所に最大5残基までの欠失、0~5個所に最大5残基までの挿入、及び最大20残基までの置換を有するものがある。

20

【0111】

Rv0125の他の免疫原性誘導体は、少なくとも150アミノ酸長、例えば少なくとも200アミノ酸長、特に少なくとも250アミノ酸長、とりわけ少なくとも300アミノ酸長である配列番号3の断片を含む（例えばそれからなる）ものである。Rv0125の具体的な免疫原性誘導体は、配列番号3の残基1~195に対応する配列番号3の断片を含む（例えばそれからなる）ものである。さらにRv0125の免疫原性誘導体は、配列番号3の残基192~323に対応する配列番号3の断片を含む（例えばそれからなる）ものである。

【0112】

特に好ましいRv0125関連抗原は、配列番号3の誘導体であって、プロテアーゼ活性が低減され、タンパク質がより簡便に生成されるように触媒性三組みの少なくとも1つ（例えば1つ、2つ又は3つ全てさえ）が置換又は欠失されている、すなわち触媒性セリン残基が欠失若しくは置換（例えばアラニンで置換）され、及び/又は触媒性ヒスチジン残基が欠失若しくは置換され、及び/又は触媒性アスパラギン酸残基が欠失若しくは置換されている、誘導体である。特に目的のものは、触媒性セリン残基が置換（例えばアラニンで置換）されている配列番号3の誘導体である。また目的のものは、配列番号3に対して少なくとも70%、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、とりわけ少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば、少なくとも99%の同一性を有する配列を含む、例えばそれからなり、ここで触媒性三組みの少なくとも1つが置換若しくは欠失されているRv0125関連抗原、あるいは少なくとも150アミノ酸長、例えば少なくとも200アミノ酸長、特に少なくとも250アミノ酸長、とりわけ少なくとも300アミノ酸長の配列番号3の断片を含む、例えばそれからなり、ここで触媒性三組みの少なくとも1つが置換若しくは欠失されているRv0125関連抗原である。Rv0125のさらなる免疫原性誘導体は、配列番号3の残基192~323に対応する配列番号3の断片を含み（例えばそれからなり）、ここで触媒性三組みの少なくとも1つ（例えば1つ、2つ又は3つ全てさえ）が置換若しくは欠失されているものである。Rv0125の特定の免疫原性誘導体は、配列番号3の残基1~195に対応する配列番号3の断片を含み（例えばそれからなり）、ここで触媒性セリン残基（配列番号3の176位）が置換（例えばアラニンで置換）されているものである。

30

40

【0113】

50

ある種の実施形態において、ポリペプチド抗原及びコードされる抗原は、Rv1196及びRv0125関連抗原、例えばM72関連抗原である。M72タンパク質の特定の誘導体は、N末端に追加のHis残基（例えば、配列番号4に提供されるような2個のHis残基；又はニッケルアフィニティ精製のために用いることができる、5個若しくは特に6個のHis残基のポリヒスリジンタグ）を有するものを含む。M72中で突然変異された元のセリン残基を含有するMtb72fは、N末端に追加のHis残基（例えば、2個のHis残基；又はニッケルアフィニティ精製のために用いることができる、5個若しくは特に6個のHis残基のポリヒスチジンタグ）を有するMtb72fタンパク質であるため、M72のさらなる誘導体である。

【0114】

それにもかかわらず、当業者であれば、いくつかの実施形態において、2つの別個のポリペプチド（1つがRv1196関連抗原であり、1つがRv0125関連抗原である）を一組成物内に提供し得ることを認識している。このような場合、Rv1196関連抗原をコードするアデノウイルス及びRv0125関連抗原をコードするアデノウイルスに関する既に言及した除外事項は、両方とも、組成物にも準用して適用され得ることが認識され得る。同様に、Rv1196関連抗原をコードするアデノウイルス及びRv0125関連抗原をコードするアデノウイルスの共投与に関する既に言及した除外事項は、両方とも準用して適用され得る。

【0115】

またいくつかの実施形態において、単一のアデノウイルスが2つの別個のポリペプチド（1つがRv1196関連抗原であり、1つがRv0125関連抗原である）をコードしてもよい。このような場合、ポリペプチドRv1196関連抗原及びポリペプチドRv0125関連抗原に関する既に言及した除外事項は、両方とも、組成物にも準用して適用され得ることが認識され得る。同様に、ポリペプチドRv1196関連抗原及びポリペプチドRv0125関連抗原の共投与に関する既に言及した除外事項は、両方とも準用して適用され得る。

【0116】

あるいは、2つの別個のアデノウイルス構築物（1つがRv1196関連抗原をコードし、1つがRv0125関連抗原をコードする）を提供してもよい。このような場合、ポリペプチドRv1196関連抗原及びポリペプチドRv0125関連抗原に関する既に言及した除外事項は、両方とも、組成物にも準用して適用され得ることが認識され得る。同様に、ポリペプチドRv1196関連抗原及びポリペプチドRv0125関連抗原の共投与に関する既に言及した除外事項は、両方とも準用して適用され得る。

【0117】

好適には、M72関連抗原は、配列番号6に対して少なくとも70%、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、とりわけ少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%の同一性を有する配列を含む、例えば、それからなる。

【0118】

典型的なM72関連抗原は、少数の欠失、挿入及び/又は置換を有する配列番号6の誘導体を含む、例えば、それからなる。例えば、0~5個の位置での最大5個の残基の欠失、0~5個の位置での最大5個の残基の挿入及び最大20個の残基の置換を有するものである。

【0119】

M72の他の誘導体は、少なくとも450アミノ酸長、例えば、少なくとも500アミノ酸長、例えば、少なくとも550アミノ酸長、例えば、少なくとも600アミノ酸長、例えば、少なくとも650アミノ酸長又は少なくとも700アミノ酸長である、配列番号6の断片を含む、例えば、それからなるものである。M72は2つの個々の抗原に由来する融合タンパク質であるため、少なくとも450残基の任意の断片は、完全長配列に由来する複数のエピトープを含む（Skeikyら、J. Immunol. 2004 172:7618-7628; Skeiky Infect. Immun. 1999 67(8):399 8-4007; Dillon Infect. Immun. 1999 67(6):2941-2950）。

【0120】

特定の実施形態においては、M72関連抗原は、配列番号6の残基2~723を含む、例えば、配列番号6を含む（又はからなる）。

【0121】

一実施形態において、ポリペプチド抗原は配列番号4に対応し、コードされる抗原は配列番号6に対応する。

【0122】

M72関連抗原は、以前に記載された方法（WO2006/117240）又はそれと類似する方法によって調製することができる。

【0123】

ポリペプチド抗原は、コードされる抗原と同一であってもよいし又は類似するものであってもよい。一実施形態において、ポリペプチド抗原はコードされる抗原と同一である。

【0124】

好適には、ポリペプチド抗原はコードされる抗原と類似するものである。例えば、コードされる抗原は、ポリペプチド抗原に対して70%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、好適には少なくとも90%の同一性、特に少なくとも95%の同一性を有し得る。あるいは、コードされる抗原は、ポリペプチド抗原の少なくとも100個のアミノ酸残基、例えば少なくとも200個のアミノ酸残基、好適には少なくとも300個のアミノ酸残基の断片を含み得る。いくつかの場合には、コードされる抗原は、ポリペプチドマイコバクテリア抗原の少なくとも400個のアミノ酸残基、特に500個のアミノ酸残基、例えば少なくとも600個、好適には少なくとも700個の残基の断片を含む。

10

【0125】

ポリペプチド抗原及びアデノウイルスは、1つ以上のさらなる抗原性成分を含む免疫原性組成物の形態で提供されてもよい。

20

【0126】

さらなる抗原性成分は、結核の予防及び治療の分野において求められる免疫応答を強化又は補完することを意図してもよいし、あるいはさらなる抗原を他の病原体と関連させ、便宜上の理由から共投与を意図してもよい。いくつかの抗原性成分が組成物内に存在する場合、これらのものを、個々のポリペプチド又は融合タンパク質の形態で提供することができる。いくつかの状況では、さらなる抗原性成分を、1以上のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（又は複数のポリヌクレオチド）として提供することができる。

【0127】

典型的には、ヒトへの投与のために、ポリペプチドRv1196関連抗原を含有する組成物は、用量当たり1 μ g~100 μ g、例えば、1 μ g~50 μ gのRv1196関連抗原を含む。好適には、1 μ g~50 μ g（5 μ g~50 μ gなど）、特に、1 μ g~20 μ g（5 μ g~20 μ gなど）、特に、約10 μ g又は正確に10 μ gのRv1196関連抗原が提供される。

30

【0128】

典型的には、ヒトへの投与のために、ポリペプチドRv0125関連抗原を含有する組成物は、用量当たり1 μ g~100 μ g、例えば、1 μ g~50 μ gのRv0125関連抗原を含む。好適には、1 μ g~50 μ g（5 μ g~50 μ gなど）、特に、1 μ g~20 μ g（5 μ g~20 μ gなど）、特に、約10 μ g又は正確に10 μ gのRv0125関連抗原が提供される。

【0129】

典型的には、ヒトへの投与のために、ポリペプチドM72関連抗原を含有する組成物は、用量当たり1 μ g~100 μ g、例えば、1 μ g~50 μ gのM72関連抗原を含む。好適には、1 μ g~50 μ g（5 μ g~50 μ gなど）、特に、1 μ g~20 μ g（5 μ g~20 μ gなど）、特に、約10 μ g又は正確に10 μ gのM72関連抗原が提供される。

40

【0130】

一般的に、本発明において使用されるポリペプチド（天然に見出される場合）は、単離されたポリペプチドである（すなわち、それと共に通常見出され得る成分から分離されている）。例えば、天然タンパク質は、それが天然系における共存物質の一部又は全てから分離されている場合に、単離されている。かかるポリペプチドは、好ましくは少なくとも約90%純粋、より好ましくは少なくとも約95%純粋、最も好ましくは少なくとも約99%純粋である。ポリヌクレオチドは、例えばそれが天然環境の一部ではないベクターにクローニングされている場合に、単離されているとみなされる。

50

【 0 1 3 1 】

本発明において使用するアジュバント

上記のように、本発明の一態様において、ポリペプチド抗原はアジュバントを含む免疫原性組成物中に提供される。好適には、アジュバントはTLRアゴニスト及び/又は免疫学的に活性なサポニンを含む。

【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態において、アジュバントは水酸化アルミニウム又はリン酸アルミニウムを含み得る。

【 0 1 3 3 】

かくして、一実施形態において、アジュバントはTLRアゴニストを含む。別の実施形態においては、アジュバントは免疫学的に活性なサポニンを含む。さらに別の実施形態においては、アジュバントはTLRアゴニスト及び免疫学的に活性なサポニンを含む。

【 0 1 3 4 】

アジュバントは、リボソーム製剤中のTLRアゴニスト及びサポニンを含む。TLRアゴニストとサポニンとの比は、5:1~1:5 (w/w)、好適には2:1~1:2、典型的にはおよそ1:1であり得る。

【 0 1 3 5 】

アジュバントにおけるTLRアゴニストの使用は当業界で周知であり、例えば、Lahiriら(2008) Vaccine 26:6777により概説されている。アジュバント効果を達成するために刺激することができるTLRとしては、TLR2、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8及びTLR9が挙げられる。TLR2、TLR4、TLR7及びTLR8アゴニスト、特に、TLR4アゴニストが好ましい。

【 0 1 3 6 】

好適なTLR4アゴニストは、モノホスホリルリピドA (MPL) 及び3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) などのリボ多糖を含む。米国特許第4,436,727号は、MPL及びその製造を開示する。米国特許第4,912,094号及び再審査証明書B1 4,912,094は、3D-MPL及びその製造のための方法を開示する。別のTLR4アゴニストは、グルコピラノシルリピドアジュバント (GLA)、合成リピドA様分子である (例えば、Foxら(2012) Clin. Vaccine Immunol 19:1633を参照されたい)。さらなる実施形態においては、TLR4アゴニストは、構造においてMPL及び3D-MPLと類似する、合成二糖分子などの合成TLR4アゴニストであってもよいし、又は例えば、WO9850399、WO0134617、WO0212258、WO3065806、WO04062599、WO06016997、WO0612425、WO03066065、及びWO0190129に開示されるアミノアルキルグルコサミニドホスフェート (AGP) などの、合成単糖分子であってもよい。そのような分子もまた、リピドA模倣体として科学文献及び特許文献に記載されている。リピドA模倣体は、好適には、リピドAといくつかの機能的及び/又は構造的活性を共有し、一態様においては、TLR4受容体によって認識される。本明細書に記載されるAGPは、当業界ではリピドA模倣体と呼ばれることもある。好ましい実施形態においては、TLR4アゴニストは、3D-MPLである。3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) などのTLR4アゴニスト、及びワクチンにおけるアジュバントとしてのその使用は、例えば、WO 96/33739及びWO2007/068907に記載されており、Alvingら(2012) Curr Opin in Immunol 24:310に概説されている。

【 0 1 3 7 】

アジュバントは、免疫学的に活性なサポニン、例えばQS21などの免疫学的に活性なサポニン画分などを含む。

【 0 1 3 8 】

サポニンを含むアジュバントは、当業界で記載されている。サポニンは、Lacaille-Dubois及びWagner (1996)、「A review of the biological and pharmacological activities of saponins」、Phytomedicine vol 2:363に記載されている。サポニンは、ワクチンにおけるアジュバントとして公知である。例えば、Quil A (南米の樹木キラヤ・サボナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の樹皮に由来する) は、アジュバント活性を有するとDalsgaardら、1974 (「Saponin adjuvants」、Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, 243) によって記載された。Quil Aと関連

10

20

30

40

50

する毒性なしにアジュバント活性を保持するQuil Aの精製画分がHPLCによって単離されている (Kensilら(1991) J. Immunol. 146: 431)。Quil A画分はまた、米国特許第5,057,540号及び「Saponins as vaccine adjuvants」、Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55にも記載されている。

【0139】

本発明における使用にとって好適な、2つのそのような画分は、QS7及びQS21 (QA-7及びQA-21としても知られる) である。QS21は、本発明における使用のための好ましい免疫学的に活性なサポニン画分である。QS21はKensil (2000) In O' Hagan: Vaccine Adjuvants: preparation methods and research protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey, Chapter 15で概説されている。QS21及びQS7などのQuil Aの画分を含む粒子状アジュバント系は、例えば、WO96/33739、WO96/11711及びWO2007/068907に記載されている。

10

【0140】

他の成分に加えて、アジュバントは、好ましくはステロールを含む。ステロールの存在は、サポニンを含む組成物の反応原性をさらに低下させることができる。例えば、EP0822831を参照されたい。好適なステロールとしては、ベータ-シトステロール、ステイグマステロール、エルゴステロール、エルゴカルシフェロール及びコレステロールが挙げられる。コレステロールが特に好適である。好適には、免疫学的に活性なサポニン画分はQS21であり、QS21:ステロールの比は、1:100~1:1 w/w、例えば、1:10~1:1 w/w、例えば、1:5~1:1 w/wである。

【0141】

本発明の方法の好ましい実施形態においては、TLR4アゴニストは3D-MPLであり、免疫学的に活性なサポニンはQS21である。

20

【0142】

いくつかの実施形態においては、アジュバントは、例えば、スクアレン、アルファ-トコフェロール及び界面活性剤を含む、水中油エマルションの形態 (例えば、WO95/17210を参照されたい) 又はリボソームの形態で提供される。リボソームでの提供が好ましい。

【0143】

本明細書で用いられる場合の用語「リボソーム」とは、水性内部を封入する単層又は多層 (特に、形成される脂質膜の数に応じて、2、3、4、5、6、7、8、9又は10層) の脂質構造を指す。リボソーム及びリボソーム製剤は、当業界で周知である。リボソーム提供物は、例えば、WO96/33739及びWO2007/068907に記載されている。リボソームを形成することができる脂質としては、脂肪又は脂肪様特性を有する全ての物質が挙げられる。リボソーム中の脂質を構成することができる脂質は、グリセリド、グリセロリン脂質、グリセロホスフィノ脂質、グリセロホスホノ脂質、スルホリピド、スフィンゴ脂質、リン脂質、イソプレノリド、ステロイド、ステアリン、ステロール、アルケオリピド、合成カチオン性脂質及び炭水化物含有脂質を含む群から選択することができる。本発明の特定の実施形態においては、リボソームはリン脂質を含む。好適なリン脂質としては、(限定されるものではないが) ホスファチジルコリンの合成における中間体であるホスホコリン (PC) ; 天然リン脂質誘導体: 卵白ホスホコリン、卵白ホスホコリン、大豆ホスホコリン、水素化大豆ホスホコリン、天然リン脂質としてのスフィンゴミエリン; 及び合成リン脂質誘導体: ホスホコリン (ジデカノイル-L- α -ホスファチジルコリン [DDPC]、ジラウロイルホスファチジルコリン [DLPC]、ジミリストイルホスファチジルコリン [DMPC]、ジパルミトイルホスファチジルコリン [DPPC]、ジステアロイルホスファチジルコリン [DSPC]、ジオレオイルホスファチジルコリン [DOPC]、1-パルミトイル, 2-オレオイルホスファチジルコリン [POPC]、ジェライドイルホスファチジルコリン [DEPC]、ホスホグリセロール (1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール [DMPG]、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール [DPPG]、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール [DSPG]、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール [POPG])、ホスファチジン酸 (1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 [DMPA]、ジパルミトイルホスファチジン酸 [DPPA]、ジステアロイル-ホスファチジン酸 [DSPA])、ホスホエタノー

30

40

50

ルアミン (1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン[DMPE]、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン[DPPE]、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン[DSPE]、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン[DOPE])、ホスホセリン、ポリエチレングリコール[PEG]リン脂質が挙げられる。

【0144】

リボソームのサイズは、リン脂質の組成及びその調製のために用いられる方法に応じて、30nm～数 μ mで変化してもよい。本発明の特定の実施形態においては、リボソームのサイズは、50nm～500nmの範囲にあり、さらなる実施形態においては、50nm～200nmである。動的レーザー光散乱は、当業者には周知のリボソームのサイズを測定するために用いられる方法である。

10

【0145】

特に好適な実施形態においては、本発明において用いられるリボソームは、DOPC及びステロール、特に、コレステロールを含む。かくして、特定の実施形態においては、本発明の組成物は、DOPC及びステロール、特に、コレステロールを含むリボソームの形態の、本明細書に記載の任意の量のQS21を含む。

【0146】

好ましくは、アジュバントは、リボソーム製剤中に3D-MPL及びQS21を含む。

【0147】

アジュバントは、用量当たり1～100マイクログラムのTLR4アゴニストを含み得る。

20

【0148】

アジュバントは、用量当たり1～100マイクログラムの免疫学的に活性なサポニンを含み得る。

【0149】

ヒトに使用するための一実施形態においては、アジュバントは、リボソーム製剤中に用量当たり12.5～75マイクログラムの3D-MPLと12.5～75マイクログラムのQS21を含む。

【0150】

別の実施形態においては、アジュバントは、リボソーム製剤中に用量当たり12.5～37.5、例えば、20～30マイクログラム（例えば、約又は正確に25マイクログラム）の3D-MPLと、12.5～37.5、例えば、20～30マイクログラム（例えば、約又は正確に25マイクログラム）のQS21を含む。好適には、3D-MPLの量は、QS21の量と同じである。

30

【0151】

ポリペプチド又はアデノウイルスは、意図される送達経路に適当な、薬学的に許容される形態で提示されるべきである。細胞の変形又は溶解を回避するために溶液は薬学的に許容される浸透圧を有する）べきである。薬学的に許容される浸透圧は、一般に、溶液がほぼ等張性であるか、又は軽度至高張性である浸透圧を有することを意味する。好適には、本発明の免疫原性組成物は、250～750mOsm/kgの範囲の浸透圧を有する、例えば、浸透圧は、250～550mOsm/kgの範囲、例えば、280～500mOsm/kgの範囲にあってもよい。浸透圧は、市販の浸透圧計、例えば、Advanced Instruments Inc.(USA)から入手可能なAdvanced(登録商標)Model 2020の使用などにより、当業界で公知の技術にしたがって測定することができる。「等張剤」は、生理学的に許容され、製剤と接触する細胞膜を横断する正味の水の流動を防止するために製剤（例えば、本発明の免疫原性組成物）に好適な等張性を付与する化合物である。100mM以上の塩化ナトリウムを含有する水性アジュバント組成物、例えば、WO2005/112991及びWO2008/142133中のアジュバント系A（ASA）又はWO2007/068907に開示されたリボソームアジュバントが公知である。

40

【0152】

いくつかの実施形態においては、組成物のために用いられる等張剤は塩である。しかしながら、他の実施形態においては、組成物是非イオン性等張剤を含み、組成物中の塩化ナトリウムの濃度又はイオン強度は100mM未満、例えば、80mM未満、例えば、30mM未満、例えば、10mM未満又は5mM未満である。組成物は、非イオン性等張剤を含み、組成物の伝導

50

率は5mS/cm未満、例えば4mS/cm未満である。好ましい実施形態においては、非イオン性等張剤は、ソルビトールなどのポリオールである。ソルビトールの濃度は、例えば、約3%～約15% (w/v)、例えば、約4%～約10% (w/v) であってもよい。等張剤が塩又はポリオールである、免疫学的に活性なサポニン画分及びTLR4アゴニストを含むアジュバントは、参照により本明細書に組み込まれるWO2012/080369及びWO2012/080370に記載されている。

【0153】

免疫原性組成物のpHは、投与にとって好適であるべきである。典型的には、pHは6.0～9.0、例えば7.0～9.0、特に、7.25～8.75、例えば、7.5～8.5、特に、pH7.75～8.25の範囲にある。約8.0のpHが特に興味深い。

10

【0154】

非経口的に投与される液体組成物用には、組成物の体積は、通常、50 µl～2mlの範囲となる（特定の経路に応じて）。400～600 µl、例えば、およそ500 µlの体積が、特に、筋肉内経路による投与のために通常使用される。

【0155】

組成物は、一般に、無菌である。

【0156】

アデノウイルスベクター

アデノウイルスは、種々の標的組織において高度に効率的な遺伝子導入を達成するその能力及び大きな導入遺伝子能力のために遺伝子導入用途のために広く使用されている。本発明において使用するアデノウイルスベクターは、さまざまな哺乳動物宿主に由来し得る。種々の哺乳動物種に感染するアデノウイルスの100種を超える別個の血清型が単離されている。これらのアデノウイルス血清型は、配列相同性及び赤血球を凝集させるその能力に従って、6種の亜属（A～F;Bは、B1及びB2に細分される）に分類されている（Tatsis及びErtl Molecular Therapy (2004年)第10巻:616～629頁）。

20

【0157】

ヒト由来アデノウイルスの例として、Ad1、Ad2、Ad4、Ad5、Ad6、Ad11、Ad24、Ad34及びAd35がある。Ad5系のベクターは、いくつかの遺伝子療法治験において広く使用されているが、自然感染による母集団における既存の免疫性のためにAd5及びその他のヒトC群アデノウイルスベクターの使用には制限があり得る。Ad5及びその他のヒト群Cのメンバーは、最も血清型的に蔓延した（seroprevalent）血清型である傾向がある。さらに、治療の間のベクターに対する曝露の結果として存在するベクターに対する免疫が発生し得る。血清型的に蔓延した（seroprevalent）ベクターに対するこれらの種類の既存の又は発生した免疫が、遺伝子療法の有効性又はワクチン接種の試みを制限し得る。したがって、代替アデノウイルス血清型は、宿主免疫応答を逃れることが可能な遺伝子送達系の追及において極めて重要な標的を構成する。

30

【0158】

本発明において使用するアデノウイルスベクターは、非ヒトサルアデノウイルスに由来する。多数のアデノウイルスが、チンパンジー、ボノボ、アカゲザル及びゴリラなどの非ヒトサルから単離されており、これらのアデノウイルスに由来するベクターは、これらのベクターによってコードされる導入遺伝子に対する強力な免疫応答を誘導する（Collocaら(2012年) Sci. Transl. Med. 第4巻:1～9頁;Royら(2004年) Virology 第324巻:361～372頁;Royら(2010年) J. of Gene Med. 第13巻:17～25頁）。非ヒトサルアデノウイルスに基づくベクターの特定の利点として、標的集団におけるこれらのアデノウイルスに対する交差中和抗体の相対的不足が挙げられる。例えば、既存の中和抗体反応との特定のチンパンジーアデノウイルスの交差反応は、特定の候補ヒトアデノウイルスベクターの場合における35%と比較して標的集団の2%でしか存在しない。

40

【0159】

具体的には、アデノウイルスベクターは、非ヒトサルアデノウイルス、特に、チンパンジーアデノウイルス、例えば、ChAd3、ChAd63、ChAd83、ChAd155、Pan5、Pan6、Pan7 (C7

50

とも呼ばれる)又はPan9に由来する。このような株の例は、W003/000283号、W02005/0710 93号、W02010/086189号及び英国特許第1510357.5号に記載されており、また、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、バージニア州マナッサス、2011 0-2209及びその他の供給源から入手可能である。或いは、アデノウイルスベクターは、ボノボから単離された非ヒトサルアデノウイルスに由来し得る、例えば、PanAd1、PanAd2又はPanAd3。本明細書において記載されたこのようなベクターの例は、例えば、W02005/071 093号及びW02010/086189号に見い出すことができる。アデノウイルスベクターはまた、W0 2013/52799号、W02013/52811号及びW02013/52832号に記載されるようにゴリラから単離さ れたアデノウイルスに由来し得る。

【0160】

10

特定のアデノウイルスベクターは、その他のベクターを上回る1つ以上の以下の改善さ れた特徴を実証し得る:より高い生産性、改善された免疫原性及び増大された導入遺伝子 発現。

【0161】

一実施形態では、アデノウイルスベクターは、少なくとも、配列番号10若しくは配列番 号20から選択されるペントン、配列番号11若しくは配列番号21から選択されるヘキソン又 は配列番号12若しくは配列番号22から選択されるファイバー、特に、ペントン及びヘキソ ン、ペントン及びファイバー、又はヘキソン及びファイバー、例えば、ペントン、ヘキソ ン及びファイバーを含有する非ヒトサルアデノウイルスである。特定の例では、アデノウ ィルスベクターは、少なくとも、配列番号10のペントン、配列番号11のヘキソン又は配列 番号12のファイバー、特に、ペントン及びヘキソン、ペントン及びファイバー、又はヘキ ソン及びファイバーを含有する非ヒトサルアデノウイルスである。その他の例では、アデ ノウイルスベクターは、少なくとも、配列番号20のペントン、配列番号21のヘキソン又は 配列番号22のファイバー、特に、ペントン及びヘキソン、ペントン及びファイバー、又は ヘキソン及びファイバーを含有する非ヒトサルアデノウイルスである。

20

【0162】

一実施形態では、アデノウイルスベクターは、ChAd3のように由来し、少なくとも、そ れに由来するペントン(配列番号10)、ヘキソン(配列番号11)及びファイバー(配列番 号12)を含有する。

【0163】

30

一実施形態では、アデノウイルスベクターは、ChAd155のように由来し、それに由来す るペントン(配列番号20)、ヘキソン(配列番号21)及びファイバー(配列番号22)を含 有する。

【0164】

一実施形態では、アデノウイルスベクターは、少なくとも、配列番号15のペントン、配 列番号16のヘキソン又は配列番号17のファイバー、特に、ペントン及びヘキソン、ペント ン及びファイバー、又はヘキソン及びファイバーを含有する非ヒトサルアデノウイルスで ある。いくつかの例では、アデノウイルスベクターは、少なくとも、配列番号15のペント ン、配列番号16のヘキソン及び配列番号17のファイバーを含有するChAd63のように由来す る。

40

【0165】

アデノウイルスベクター構造

アデノウイルスは、3種の主要なタンパク質、すなわちヘキソン(II)、ペントンベー ス(penton base)(III)及びノブを有するファイバー(knobbed fiber)(IV)を、い くつかのその他の微量のタンパク質、すなわちVI、VIII、IX、IIla及びIVa2とともに含む 正二十面体のカプシドを有する特徴的な形態を有する。ヘキソンは、240の三量体ヘキソ ンキャプソメア及び12のペントンベースからなるカプシドの構造成分の大部分を構成する 。ヘキソンは、3つの保存された二重筒を有し、頂部は、3つの塔を有し、各塔は、カプシ ドのほとんどを形成する各サブユニットに由来するループを含有する。ヘキシソンのベー スは、アデノウイルス血清型間で高度に保存されており、表面ループは、可変性である(Ta

50

tsis及びErtl Molecular Therapy (2004年)第10巻:616~629頁)。ペントンは、ファイバーが付着する五量体ベースを形成するもう1つのアデノウイルスカプシドタンパク質である。三量体ファイバータンパク質は、カプシドの12の頂点の各々でペントンベースから突出し、ノブを有する棒状構造である。ファイバータンパク質の主な役割は、ノブ領域と細胞受容体の相互作用を介してウイルスカプシドを細胞表面に繋ぎ止めることであり、ファイバーの可動性シャフト並びにノブ領域の変動は、種々の血清型に特有である(Nicklinら Molecular Therapy 2005年第12巻:384~393頁)。

【0166】

アデノウイルスゲノムは、十分に特性決定されている。線形の、二本鎖DNAは、高度に塩基性のタンパク質VII及び小ペプチドpX (muとも呼ばれる)と会合している。別のタンパク質、VIは、このDNA-タンパク質複合体とともにパッケージングされ、タンパク質VIを介したカプシドへの構造的連結を提供する。同様に位置する特定のオープンリーディングフレーム例えば、各ウイルスのE1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4及びL5遺伝子の位置に関して、アデノウイルスゲノムの全体的な組織には全般的な保存がある。アデノウイルスゲノムの各末端は、逆方向末端反復配列(ITR)として知られる配列を含み、これは、ウイルス複製にとって必要である。アデノウイルスゲノムの5'末端は、パッケージング及び複製にとって必要な5'シスエレメント、すなわち、5' ITR配列(複製の起点として機能する)及び天然5'パッケージングエンハンサードメイン(線形Adゲノム及びE1プロモーターのエンハンサーエレメントをパッケージングするのに必要な配列を含有する)を含有する。アデノウイルスゲノムの3'末端は、パッケージング及びカプシド形成にとって必要な3'シスエレメント(ITRを含む)を含む。ウイルスはまた、ウイルスによってコードされるプロテアーゼを含み、これは、感染性ウイルス粒子を生成するのに必要な構造タンパク質の一部をプロセッシングするのに必要である。アデノウイルスゲノムの構造は、宿主細胞形質導入後にウイルス遺伝子が発現される順序に基づいて記載されている。より詳しくは、ウイルス遺伝子は、転写がDNA複製の開始前に又は開始後に起こるか否かに従って、初期(E)又は後期(L)遺伝子と呼ばれる。形質導入の初期段階では、アデノウイルスのE1A、E1B、E2A、E2B、E3及びE4遺伝子は、ウイルス複製のために宿主細胞を準備するために発現される。感染の後期段階の間に、ウイルス粒子の構成成分をコードする後期遺伝子L1~L5の発現が活性化される。

【0167】

ChAd3野生型配列(配列番号9)の配列の注釈を以下に提供する。

CDS (合計38)

E1A 30.8K

開始: 589 終了: 1544

元の位置の説明:

結合(589..1129,1243..1544)

E1A 25.5K

開始: 589 終了: 1544

元の位置の説明:

結合(589..991,1243..1544)

E1B 22K

開始: 1716 終了: 2279

元の位置の説明:

1716..2279

E1B 57K

開始: 2021 終了: 3544

元の位置の説明:

2021..3544

IX

開始: 3640 終了: 4104

元の位置の説明: 3640..4104	
I Va2	
開始: 4163 終了: 5790 (相補的)	
元の位置の説明: 相補体(4163..5499,5778..5790)	
pol	
開始: 5269 終了: 14236 (相補的)	
元の位置の説明: 相補体(5269..8865,14228..14236)	10
pTP	
開始: 8664 終了: 14236 (相補的)	
元の位置の説明: 相補体(8664..10667,14228..14236)	
48K	
開始: 11120 終了: 12379	
元の位置の説明: 11120..12379	
plIIa	
開始: 12403 終了: 14181	20
元の位置の説明: 12403..14181	
III	
開始: 14273 終了: 16054	
ペントン	
元の位置の説明: 14273..16054	
pVII	
開始: 16069 終了: 16665	
元の位置の説明: 16069..16665	30
V	
開始: 16738 終了: 17853	
元の位置の説明: 16738..17853	
pX	
開始: 17878 終了: 18123	
元の位置の説明: 17878..18123	
pVI	40
開始: 18219 終了: 18974	
元の位置の説明: 18219..18974	
ヘキソン	
開始: 19086 終了: 21968	
元の位置の説明: 19086..21968	
プロテアーゼ	
開始: 21998 終了: 22627	
元の位置の説明:	50

21998..22627	
DBP	
開始：22743 終了：24395 (相補的)	
元の位置の説明：	
相補体(22743..24395)	
92K	
開始：24445 終了：26940	
元の位置の説明：	
24445..26940	
22K	10
開始：26630 終了：27229	
元の位置の説明：	
26630..27229	
33K	
開始：26630 終了：27551	
元の位置の説明：	
結合(26630..26966,27169..27551)	
pVIII	
開始：27626 終了：28309	
元の位置の説明：	20
27626..28309	
E3 12K	
開始：28310 終了：28627	
元の位置の説明：	
28310..28627	
E3 CR1-alphap0	
開始：29125 終了：29325	
元の位置の説明：	
29125..29325	
E3 gp18K	30
開始：29328 終了：29819	
元の位置の説明：	
29328..29819	
E3 33K	
開始：29848 終了：30738	
元の位置の説明：	
29848..30738	
E3A 11 K	
開始：31293 終了：31589	
元の位置の説明：	40
31293..31589	
E3 RIDアルファ	
開始：31601 終了：31873	
元の位置の説明：	
31601..31873	
E3 RIDベータ	
開始：31876 終了：32274	
元の位置の説明：	
31876..32274	
E3 15K	50

開始： 32267 終了： 32653

元の位置の説明：

32267..32653

UEキソン

開始： 32684 終了： 32848 (相補的)

元の位置の説明：

相補体(32684..32848)

ファイバー

開始： 32859 終了： 34490

元の位置の説明：

32859..34490

10

E4ORF6/7

開始： 34698 終了： 35858 (相補的)

元の位置の説明：

相補体(34698..34973,35685..35858)

E4 ORF6

開始： 34974 終了： 35858 (相補的)

元の位置の説明：

相補体(34974..35858)

E4 ORF4

20

開始： 35758 終了： 36123 (相補的)

元の位置の説明：

相補体(35758..36123)

E4 ORF3

開始： 36139 終了： 36486 (相補的)

元の位置の説明：

相補体(36139..36486)

E4 ORF2

開始： 36483 終了： 36875 (相補的)

元の位置の説明：

相補体(36483..36875)

30

E4 ORF1

開始： 36928 終了： 37314 (相補的)

元の位置の説明：

相補体(36928..37314)

その他の特徴 (合計3)

VA RNA I

開始： 10693 終了： 10860

元の位置の説明：

10693..10860

40

VA II

開始： 10927 終了： 11102

元の位置の説明：

10927..11102

E3欠失 - 5'

開始： 28642 終了： 28647

元の位置の説明：

28642..28647

【 0 1 6 8 】

ChAd63野生型配列 (配列番号14) の配列の注釈を以下に提供する。

50

LOCUS ChAd63 35994 bp DNA linear 27-JUL-2015
DEFINITION Chimp adenovirus 163, complete genome.
COMMENT Annotation according to alignment of ChAd63 against the human
Adenovirus 4 reference strain NC_003266
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..35994
/organism="Chimpanzee adenovirus 63"
/mol_type="genomic DNA"
/acronym="ChAd63"
repeat_region 1..129
/standard_name="ITR"
/rpt_type=inverted
gene 479..1501
/gene="E1A"
regulatory 479..484
/regulatory_class="TATA_box"
/gene="E1A"
CDS join(576..1143,1229..1437)
/gene="E1A"
/product="control protein E1A"
/translation="MRHLRDLPGNVFLATGNEILELVVDAMMGDDPPEPPTPFEAPSL
YDLYDLEVDVPENDPNEEAVNDLFSDAALLAAEQANTDSGSDSDSSLHTPRPGRGEKK
IPELKGEELDLRCYEECLPPSDDEEDEEAIRAAASEGVKVAGESFSLDCPTLPGHGCK
SCEFHRMNTGDKNVMCALCYMRAYNHCVYSPVSDVDETPPTSECISSPPEIGEEPPEDI
IHRPVAVRVTGRRRAVESLDOLLQGGDEPLDLCTRKRPRH"
intron 1144..1228
/gene="E1A"
regulatory 1495..1501
/regulatory_class="polyA_signal_sequence"

gene	/gene="E1A" 1555..3953	
regulatory	/gene="E1B" 1555..1664 /regulatory_class="TATA_box"	
CDS	/gene="E1B" 1601..2179 /gene="E1B" /codon_start=1 /product="control protein E1B 19K" /translation="MEIWTVLEDFHQTRQLENSSAEVSYLWRFPCGGPLAKLVYRAK QDYKQDFEDILRECPGIFDSLNLGHQSHFNQSLRALDFSTPGRTTAAVAFFAFILDK WSQETHFSRDYRLDCLAVALWRTWRCQRLNAISGYLPVQPVDTLRLISLQSPQEHQRR QQPQQEQQQEEEEEDREENLRAGLDPPVAEEEE"	
CDS	1906..3420 /gene="E1B" /codon_start=1 /product="control protein E1B 55K" /translation="MESRNPFQQLPSGLLSSSFVENMEVPAECNLRLLASTAGRHA EDPESPVTPTPTPPAAAAGAAARGGGPRREPESRSGPGGGGGGVADLPPELRRVL TRSSSGRERGIKRRHEETSHRTELTVSLMSRRRPESVWWHEVQSQGIDEVSVMHEKY SLEQVKTWCLEPEDDWEVAIRNYAKLALKPKKYKITKLINIRNSCYISGNGAEVEIS TQERAAFRCCMMNMPGVVGMGVTFMNTRFRGDYNGVVFMANTKLTVHGCSPFFGFN NMCIEAWGSVSVRGCSFSANWMGVVGRTKSVSVKCKLFRCHLGVMSGEAKVKHCA STETGCFVLKGNNAKVKHNMICGASDERGYQMLTCAGGNSHMLATVHVASHPRKTWEE FEHNVMTRCNVHLGSRGMFMFMPYQCNMQFVKVLLPEPDAMSRVSLTGVFDMNVELWKIL RYDESKTRCRACECGGKHARLQPVCEVTEDLRPHLVLSCNGTEFGSSGEESD"	10
gene	3454..3953 /gene="IX"	
regulatory	3454..3459 /regulatory_class="TATA_box"	20
CDS	/gene="IX" 3505..3933 /gene="IX" /product="capsid protein IX" /translation="MSGSASFEGGVFSEPYLTGRLPWAGVRQNVMGSTVDGRPVQPAN SSTLTATLSSSSVDAAAAAASAAAVRGMALGAGYSSLVANSSSTNNPASLNEE KLLLLMAQLEALTQRLGELTQQVAQLQAETRAAVATVKTK"	
regulatory	3929..3934 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"	
regulatory	/note="E1B, IX" 3944..3949 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"	
regulatory	/note="E1B, IX" 3948..3953 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"	30
gene	/note="E1B, IX"	
gene	complement(3992..26364) /gene="E2B"	
gene	complement(3992..5735) /gene="IVa2"	
regulatory	complement(3992..3997) /regulatory_class="polyA_signal_sequence"	
CDS	/note="IVa2, E2B" complement(join(3993..5326,5605..5617)) /gene="IVa2" /product="encapsidation protein IVa2" /translation="METRGRRPAGVLDQPDPEAHPRKRPARRAPLHRDGDHADADPA TLEGPDPLAGRPSPGALLPQSPQPAKRGGLLORDALEHITELWDRLELLQQTLSKMP MADGLKPLKNFASLQELLSLGGERLLAELVRENMHVREMMNEVAPLLREDGSCSLNY HLQPVIGVIYGTGCGKSQLLRNLLSAQLISPAPETVFFIAPQVDMIPPELKAWEHQ ICEGNYAPGIEGTFFVPQSGTLRPFKIMAYDELTDHNYDVSDPRNVFAQAAAHGPIA IIMDECENLGGHKGVSKEFFHAFPSKLHDKFPKCTGYTVLVVLHNMNPRDLGGNIAN LKIQAQMHLISPRMHPSQLNRFVNTYTKGLPVAISLLKDIVQHHLRRCYDWWIYNT TPEHEALQWSYLHPRDGLMPHYLNIQAHLRYVLEKIHRLVNLNDRDRWSRAYRARKIK"	40
CDS	complement(join(5096..8659,13841..13849)) /gene="E2B" /EC_number="2.7.7.7"	

```

/product="DNA polymerase"
/translation="MALVQTHGSRGLHPEASDFGRQPSRRRSRQSSPGAVPEPARARR
RRAPAAPASGPRAAPAARRASSPPLLSMEPPPPKKKRGTVVAPQGHGTLQAVDVATNG
AVEIKYHLDLPRALEKLLQVNRAPPLPTDLTPQRLRLTLDSSGLRALVLALRPVRAEVW
TCLPRGLVSMTTIEADDGHADGQDVVQHMQPPALHCPKFLVKGTQVQLVQHVHPVQ
RCEHCGRLYKHKHECSARRRHFYFHHINSHSSNWWQEIQFFPIGSHPRTERLFLTYDV
ETYTWMSGFGKQLVPFMLVMKLSGDPPLVELAHDALQLKWDWRWHGDPRTFYCVTPEK
MAVGQQFRQYRDLQALAVDLWTSFSLSANPHVADWALEQHGLSDPAELTYDELKKLP
HVKGRPRFVELYIVGHNINGFDEIVLAAQVINNRAEVPQPFRTNRNFMPRAGKILFND
VTFALPNPAYKKRTDFQLWEQGGCDDLDLDFKHQFLKVMVRDTFALTHTSLRKAQAYAL
PVEKGCCAYKAVNQPYMVGSYRADQDGFPLEEYWKDREEFLNRELWKQKGQLKYDII
QETLDYCALDVLVTAEVLAKLQDSYAHFIRDSVGLPHAHFNIFQRPTISSNSHAIFRQ
IVYRAEKPQRSNLGTGLLAPSHELYDYVRASIRGGRCYPTYIGVLQEPLYVYDICGM
ASALTHPMPWGTPLSPYERALAVRDWQASLDDLGTCLSYFDEPELLPGIFTVDADPPDE
LMLDPLPPFCSRKGGRLCWTNEPLRGEVATSVDLITLHNRGWRVRIVPDELTTVPPEW
KCVAREYVQLNIAAKERADKEKNQTMRSIAKLLSNALYGSFATKLDNKKIVFSDQMD
GLMKGVSNGTVNIKSSSFLETDNLSAEVMPPAFEREYLPQQLALLDSDPEDSEDEQGPA
PFYTFPAGTPEGHVAYTYKPIITFLDVEGDMCLHTEKVDPLVDNDRYPSHVASEVLA
WTRAFVSEWAGFLYDEDRGTPLEDRPIKSVYGDTSDFVTQRGHELMETRGGKRIKKHG
GNLVFDPDRDPLTWLVECECTVCASGADAYAPESVFLAPKLYALKSLLCPVCGHTSKG
KLRAKGHAAEALNYELMLNLCYLADAQGAADRERFSTSRMSLKRTLASAQGAHPPTVTE
TTLTFTLRPWKDRTLASLDAHRLVPYGRSRPNPRNEEVCWIEMP"
intron complement(5327..5604)
/gene="IVa2"
gene 5917..33604
/gene="L5"
gene 5917..27469
/gene="L4"
gene 5917..21839
/gene="L3"
gene 5917..17466
/gene="L2"
gene 5917..13827
/gene="L1"
regulatory 5917..5922
/regulatory_class="TATA_box"
/note="L"
intron 5989..7009
/note="between L1 and L2 leaders"
intron 7082..9518
/note="between L2 and L3 leaders"
intron 7082..7850
/note="between L2 and i leaders; precedes protein 13.6K
CDS"
CDS join(7877..8275,9519..9539)
/gene="L1"
/codon_start=1
/product="protein 13.6K"
/translation="MRADGEELDLLPPVGGMAVDVMEVEMPTARRALVLVFIQASAVL
ATLHGMHVLHLYLGSFDEEFQWAVRWRLHLVLYVLAIGVAIVCLDGGHADEPARE
AGPDLGSDGSESEDEGAQAGAVQGPETLRSQGLRART"
CDS complement(join(8458..10392,13841..13849))
/gene="E2B"
/product="terminal protein precursor pTP"
/translation="MALSIHDCARLTGQTAATMNYFLPLRNINRVREFPRASTTAAG
ITWMSRYIYGYHRLMLEDLAPGAPATERWPLYRQPPPHFLVGYYQLVVRTCNDYIFDTR
AYSRLKYHELVRPGHQTNNWSVMANCSYTINGAYHREVDFFDFTLTQIQAILAE
RVVADLALVQPRGFGLTRMHGRAGEEVPVERLMQDYKDLARCQDHAWGMADRLRI
QQAGPKDLVLLATIRRLRTAYFNFTSSIAARPPDQIPEEQETGLSLPCDCDWLEAFV
QRFSDPVLETLSLRGVPTGQLIRCIVSALSPLNGDPPGGHLEMRGGVFTLRPREDG
RAVTETMRRRRGETIERFIDRLPVRRRRRRAPPPPPPEEEVEEMLVEEEEEEEEEEP
PGAFEREVRATIAELIRLLEEELTVSARNSQFFNFAVDYFEMERLEALGDVSEMPLR
RWIMYFFVTEHIATTLNLYQLRLCNVAVFTRHVELNLAQVVMRRARDPDGAVVYSRVWN
EAGMNAFSQLMGRISNDLAATVERAGRGLQEEEIEQFMTEIAYQDNSGVDVQEILRQA
AVNDEIDSVLSFREKLTGPVAFTRRQIQDVNRRVVAHASLLRAQYQNLPPARGADV
PLPPLPPGPEPPLPPGARPRRRF"
intron complement(8660..26296)
/gene="E2B"

```

10

20

30

40

intron	9606..32253	
	/gene="L5"	
	/note="precedes fiber CDS"	
intron	9606..26463	
	/gene="L4"	
	/note="precedes capsid protein precursor pVIII CDS"	
intron	9606..25554	
	/gene="L4"	
	/note="precedes protein 33K and encapsidation protein 22K CDSs"	
intron	9606..23430	
	/gene="L4"	
	/note="precedes hexon assembly protein 100K CDS"	
intron	9606..21177	10
	/gene="L3"	
	/note="precedes protease CDS"	
intron	9606..18296	
	/gene="L3"	
	/note="precedes hexon CDS"	
intron	9606..17508	
	/gene="L3"	
	/note="precedes capsid protein precursor pVI CDS"	
intron	9606..17201	
	/gene="L2"	
	/note="precedes core protein precursor pX CDS"	
intron	9606..16132	
	/gene="L2"	
	/note="precedes core protein V CDS"	
intron	9606..15498	
	/gene="L2"	20
	/note="precedes core protein precursor pVII CDS"	
intron	9606..13887	
	/gene="L2"	
	/note="precedes penton base CDS"	
intron	9606..12043	
	/gene="L1"	
	/note="precedes capsid protein precursor pIIa CDS"	
intron	9606..10844	
	/gene="L1"	
	/note="precedes encapsidation protein 52K CDS"	
intron	complement(10393..26296)	
	/gene="E2B"	
gene	10426..10585	
	/gene="VAI"	
misc_RNA	10426..10585	30
	/gene="VAI"	
	/product="virus-associated RNA I"	
gene	10648..10818	
	/gene="VAII"	
misc_RNA	10648..10818	
	/gene="VAII"	
	/product="virus-associated RNA II"	
CDS	10845..12020	
	/gene="L1"	
	/product="encapsidation protein 52K"	
	/translation="MHPVLRQMRPHPPQPPLPQQQQQPALLPPPPQQQQPATTAAAV SGAGVQYDLALEEGELARLGASSPERHPRVQMKRDAREAYVPKQNLFRDRSGEEPEE MRASRFHAGRELRRGLDRKRVLRDEDFEADLTGISPARAHVAAANLVTAYEQTVKEE SNFQKSFNNHVRTLAREEVTGLMLHLWDLLEAIVQNPTSKPLTAQLFLVVQHSRDNE TFREALLNITEPEGRWLLDLVNIQSIVVQERGLPLSEKLAANFVSVLSLGKYYARKI YKTPYVPIDKEVKIDGFYMRMTLKVLTLSDDLGVYRNDRMHRAVSASRRRELSQELM HSLQRALTGAGTEGESYFDMGADLRWQPSRRRALEAAGGVPPYVEEVDDEEEGEYLED"	40
CDS	12044..13810	
	/gene="L1"	
	/product="capsid protein precursor pIIa"	
	/translation="MQQQPPPPPPDPAMRAALQSQPSGINSSDDWTQAMQORIMALTTR NPEAFRQQPQANRLSAILEAVVPSRGNPTHEKVLAIVNALVENKAIRGDEAGLVYNAL LERVARYNSTNVQTNLDRMVTDVREAVSQRRERFHRESNLGSMVALNAFLSTQPANVPR"	

	<p>GQEDYTNFISALRLMVAEVPQSEVYQSGPDYFFQTSRQGLQTVNLSQAQFKNLQGLWGV QAPVGDRAIVSSLLTPNSRLLLLLVAPFTDSGSVSRDSYLGyllNLYREAIGQAHVDE QTYQEI THVSRALGQEDPGNLEATLNFLLTNRSQKIPQYALSTEEERILRYVQQSVG LFLMQEGATPSAALDMTARNMEPSMYARNRPFINKLMDYLHRAAAMNSDYFTNAILNP HWLPPPGFYTGEDMPDNDGFLWDDVDSVFSRPTTTTWWKKEGGDRRPSALSGR AGAAAAPVEAASPPFSLPFLNSVRSELGRLTRPRLGEEYLNDSLLKPEREKNFP NNGIESLVDKMSRWKTYAHEHRDEPRASSAGTRRRQRHQRGLVWDEDSADDSSVL DLGGSGGGNPFALHRPRIGRLM"</p>	
regulatory	<p>13822..13827 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"</p>	
CDS	<p>13889..15511 /gene="L2" /product="penton base" /translation="MMRRVYPEGPPPSYESVMQQAVAAAMQPPLEAPYVPPRYLAPTE GRNSIRYSELAPLYDTTRLYLVDNKSADIASLNYQNDHSNFLTTVVQNNDFPTPEAST QTINFEDERSRWGGLKTIHMTNMPNVNEFMYSNKFKARVMVSRKTPNGVTVGDDYDGS QDELTYEWVEFELPEGNFSVTMTIDLNNAIIDNYLAVGRQNGVLESIGVKFDTRNF RLGWDPVTELVMPGVYTNEAFHPDIVLLPGCGVDFTESRLSNLLGIRKRQPFQEGFQI LYEDLEGGNI PALLDVEAYEESKEKAEAEATTAVATAATVADATVTRGDTFATQAEAA AALAATDDSESKIVIKPVEKDSKNRSYNVLPDGKNTAYRSWYLAYNYGDPEKGVRSWT LLTSDVTCGVEQVYWSLDDMMQDPVTFRSTRQVSNYPVVGAEALLPVYSKSFNEQAV YSQQLRAFTSLTHVFNRFENQILVRPPAPTITTVSENVPALTDHGTLPRLSSIRGVQ RVTVTDARRRRTCPYVYKALGVVAPRVLSSTF"</p>	10
intron	<p>complement(14013..26296) /gene="E2B" /note="precedes DNA polymerase and terminal protein precursor pTP CDSs"</p>	
CDS	<p>15515..16099 /gene="L2" /product="core protein precursor pVII" /translation="MSILISPSNNTGWGLRAPSKMYGGARQSTQHPVRVRGHFRAPW GALKGRVRSRTTVDVDVQVADARNYTPAAAPASTVDAVIDSVVADARRYARAKSRR RRIARRHRSTPAMRAARALLRRARRTGRRAMLRAARRAASGSSSAGRTRRRRAATAAAA ATASMSRPRRGNVYWRDAATGVRVPVTRRPRT"</p>	20
CDS	<p>16144..17181 /gene="L2" /product="core protein V" /translation="MSKRKYKEEMLQVIAPEIYGPAAAVKEERKPRKLKRVKKDKKEE EDDGLVEFVREFAPRRRQWRGRKVKPVLPGTTVVFTPGERSGSASKRSYDEVYGD DILEQAVBERLGEFAYGKRSRPAPLKEEAVSIPLDHGNPTPSLKPVTLQQVLPSPAARR GFKREGGEDLYPTMQLMVPKRQKLEDVLEHMKVDPEVQPEVKVRPIKQVAPGLGVQTV DIKIPTPEMETQTEPVKPSSTSTMEVQTDPMWPAASTTTTTRRRRKYGAASLLMPNYALH PSIIPTPGYRGTRFYRGYTSSRRKTTTTRRRRSRRSSTATSALVRRVYRSGREPLTL PRARYHPSIAI"</p>	
CDS	<p>17204..17437 /gene="L2" /product="core protein precursor pX" /translation="MALTCLRVPTITGYRGRKPRRRRLTGNGLRHHHRRRRRAISKRL GGGFLPALIPIIAAAIGAIPGIASVAVQASQRH"</p>	30
regulatory	<p>17461..17466 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"</p>	
CDS	<p>17509..18237 /gene="L3" /product="capsid protein precursor pVI" /translation="MEDINFSSLAPRHGTRPFMGTSWDIGNSQLNGGAFNWSSLSWGL KNFGSTLKYGNKAWNSSTGQALREKLKEQNFQKVVVDGLASGINGVVDLANQAVQKQ INSRLDAVPPAGSVEMPQVEEELPPLDKRGDKRPREDAEETLLTHTDEPPPYEEAVKL GLPTTRPVAPLATGVLPSSSSQPATLDPPLPASPSTVAKPLPPVAVASRAFRGRPQ ANWQSTLNSIVGLGVQSVKRRRCY"</p>	
CDS	<p>18329..21154 /gene="L3" /note="capsid protein II" /product="hexon" /translation="MATPSMLPQWAYMHIAQDASEYLSPLGVQFARATDTYFSLGNK FRNPTVAPTHDVTDRSQRLTLRFVPVDREDNTYSYKVRXTLAVGDNRVLDMASTYFD IRGVLDRGFSFKPYSGTAYNSLAPKGAPNTSQWKSDSKMHTFGVAAMPGVVGGKIEA"</p>	40

	DGLPIGIDSSSGTDTIIYADKTFQPEPQVGSWSVDNNGAEEKYGGRAKDDTTNMKPC YGSFARPTNKEGGQANIKDSETASTTPNYDIDLAFDPSKNIAANYDPDIVMYTENVEL QTPDTHIVFKPGTSDSESSEANLQQAMPNRPNIIGFRDNFIGLMYYNSTGNMGVLAGQ ASQLNAVVDLQDRNTELSYQLLLDLSLGDRTYFSMWNQAVDSYDPDVRIIENHGVDE LNPYCFPLNGVGFDTDYQGVKVKTDTAATGTNGTQWDKDDTTVSTANEIHSGNPFAME INTQANLWRNFLYANVALYLPDSYKYTPANITLPTNTNTYDYMNGRVVAPSLVDAYIN IGARWSLDPMNDVNPFNHHRNAGLRYRSMLLGNRGYVPFHIQVPQKFFAIXSLLLLPG SYTYEWNFRKDVNMILQSSSLGNDLRTDGASIAFTSINLYATFFPMAHNTASTLEAMLR NDTNDQSFNDYLSAANMLYPIPANATNVPIPSRNVAAFRGWSFTRKLTRETPSLGS GFDPPYFVYSGSIPYLDGTFYLNHTFKKVSITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRTVDG EGYNVAQCNMTKDWFLVQMLAHYNIGYQGFYVPEGYKDRMYSFERNFQPMRQVDEV NYKDYQAVTLAYQHNNSGFVGYLAPTMRQGPYPANYPYPLIGKSASVSVTQKKEFLCD RVMWRIPESSNFMSMGALTDLGQNMLYANSAHALDMNEFVDPMDDESTLLYVVFVDFV VRVHQPHRGVIEAVYLRTPFSAAGNATT"	
CDS	21182..21802 /gene="L3" /EC_number="3.4.22.39" /product="protease" /translation="TACGSGEQELRAILRDLGCGPCFLGTDFDKRFPFGFMAPHKLACAI VNTAGRETGGHEWLAFAWNPRSHTCYLFDPFGFSDELRKQIYQFEYEGLLRRSALATE DRICITLEKSTQTVQGPRSAACGLFCCMFLHAFVHWPDRPMDKNPTMNLITGVPNGMLQ SPQVEPTLRRNQEALYRFLNAHSAYFRSHRARIKATAFDRMNQDM"	10
regulatory	21834..21839 /regulatory_class="polyA_signal_sequence" /gene="L3"	
gene	complement(21877..26364) /gene="E2A"	
gene	complement(21877..25341) /gene="E2A-L"	
regulatory	complement(21877.. /regulatory_class="polyA_signal_sequence" /note="E2A, E2A-L"	20
CDS	complement(21882..23417) /gene="E2A" /product="single-stranded DNA-binding protein" /translation="MAGRGGSQSEQRRQERTPERGRGSASRPENRESESPPLPQKRH AYRRVVSDDGQEEIIVVSENRSRSPSTSPPPPLPPKKKPRKTKHVPLQDISQSEDER QAEELAAVGFSEFPVRITEKDGKRVFETLDENDPLTSAATKMTVKNLPSLPIVSAW EKGMVMTLLMERYRVESDLKSAFQLMPEQGEVYRRICHLYVNEEHRGIPLTFTSNKT LTTMMGRFLQGFVHSHSQIAHKNWECTGCALWLHGCTEAEGLRCLHGTVMIQKEHTI EMDVASENGQRAKENPDRAKITQNRWGRSVVQLANNARCCVHDAGCATNQFSSKSC GVFTEGGKAQQAFRQLEAFMKAMYPGMSSEQAQMMLIPLHCDCHNKGPCVPSMGRQT CKMTPFGMANAEDLDVEGITDATVLASVKHPALMVFOCCNPFVYRNSRAQNAAGNCDFFK ISAPDLLGALQLTRKLWSDSFPDLPVFKLLIPEFKWLPKYQFRNVSLPAGHAESRQNP FDF"	
intron	complement(23427..24079) /note="E2A, E2A-L; precedes single-stranded DNA-binding protein CDS"	30
CDS	23443..25842 /gene="L4" /product="hexon assembly protein 100K" /translation="METQPSSTSPSAPAADENQQQNESLTAPPPSPTSDAAAAPDM QEMEESIEIDLGYVTPAEHEEELAAFRSAPEENHQEQPEQEAESQQAQLEHGOYLS GAEDVLIKHLARQSIIVKDALLDRAEVPLSVAELSRAVERNLFSRVPVPPKRPNGTCE PNPRLNFYVPFAVPEALATYHLFFKNQRIPVSCRANRTRADALLNLGPGARLPDITSL EEVPKIFEGLSDETRAAANALQSGSGEEHHSALVELEGDNARLAVLKRTVELTHFAY PALNLPPKVMASVMDQVLIKFRASPLSEEMQDPESSEDEGKPVVSDEQLARWLASSTP QSLEERRKLMMAVVLVTVELECLRRFFADAETLRKVEENLHYLFRHGFVRQACKISNV ELTNLVSYMGILHENRLGQNVLHTTLRGEARRDYIRDCVYLYLCHTWQTGMGVWQQCL EEQNLKELCKLLQKNLKWTFGDFERTTASDLADLIFFERLRLTLRNLGPDPMQSMML QNPRSFILERSGILPATCSALPSDFVPLTFRECPPLWSHCYLLRLANYLAYHSDVIE DVSSEGLLECHCRNLCTPHRSLACNPQLLSETQIIGTFELQGFGEGRGGLKLTPLGLW TSAYLRKEVPEDYHPFEIRFYEDQSQPPKAELSACVITQGAILAQQAQKSRQEFLL KKGHGVYLDPTGTEELNPSFPQDAPRKQEAESGAAAAGGFGRLGEGSGRGRDGRLG QHSRGGGQPARQSGGGRRGGGGRRSSRRQTVVLGGGESKQHGHLRSGSGSRPGRP Q"	40
intron	complement(24157..26296) /note="E2A, E2B"	

intron	complement(24157..25253) /gene="E2A-L"	
regulatory	complement(25336..25341) /regulatory_class="TATA_box" /gene="E2A-L"	
CDS	join(25556..25886,26056..26399) /gene="L4" /product="protein 33K" /translation="MPRGSSKKLKVELPLPPEDLEEDWESSQAEEMEDWDSTQAEEDS LQDSLEEEDEVVEEEAEEEEAAAAARPSSSAEEKASSTDTISAPGRGRGGRAHGRWDETGR FPNPTTQTAPTTVSKKRQKPPSSSRKPAAAAAARKSTAAAGGLRIAANEPAQTRRLRN RIFPTLYAIFQQSRGQEQELKVKNRSLRSLTRGCLYHKSEDQLQRTLEDALFNKYC ALTLEK"	
CDS	25556..26125 /gene="L4" /product="encapsidation protein 22K" /translation="MPRGSSKKLKVELPLPPEDLEEDWESSQAEEMEDWDSTQAEEDS LQDSLEEEDEVVEEEAEEEEAAAAARPSSSAEEKASSTDTISAPGRGRGGRAHGRWDETGR FPNPTTQTGKKERQGYKSWRGHKNAIVSCLQACGGNISPTRRYLLFHRGVNFPNRNLH YYRHLHSPYYCFQEEAETQQQQKTSGSS"	10
intron	25887..26055 /gene="L4"	
regulatory	complement(26388..26393) /regulatory_class="TATA_box"	
CDS	26471..27154 /gene="L4" /product="capsid protein precursor pVIII" /translation="MSKEIPTPYMWSYQPQMGLAAGAAQDYSTRMNWLSAGPAMISRV NDIRAHFNQILLEQSAITATPRHHLNPRNWPAAALVYQEIPQPTTVLLPRDAQAEVQLT NSGVQLAGGAALCRHRPAQGIKRLVIRGRGTQLNDEVVSSSLGLRPDGVFQLAGSGRS SFTPRQAVLTLESSSQPRSGGIGTLQFVBEFTPSVYFNPFGSGSPGHYPDEFIPNFDA ISESVGDYD"	20
gene	26836..32075 /gene="E3"	
regulatory	26836..26842 /regulatory_class="TATA_box" /gene="E3"	
intron	26888..31546 /gene="E3"	
intron	/note="precedes control protein E3 14.7K CDS" 26888..31098 /gene="E3"	
intron	/note="precedes membrane protein E3 RID-beta CDS" 26888..30849 /gene="E3"	
intron	/note="precedes membrane protein E3 RID-alpha CDS" 26888..29956 /gene="E3"	30
intron	/note="precedes membrane glycoprotein E3 CR1-gamma CDS" 26888..28596 /gene="E3"	
intron	/note="precedes membrane glycoprotein E3 CR1-beta CDS" 26888..28011 /gene="E3"	
intron	/note="precedes membrane glycoprotein E3 gp19K CDS" 26888..27370 /gene="E3"	
CDS	/note="precedes membrane glycoprotein E3 CR1-alpha CDS" 27155..27475 /gene="E3" /product="control protein E3 12.5K" /translation="MSHGGAADLARLRHLDHCRFRFCFARDLAEFAYFELPEEHPQGP ARGVRIIVVEGGLDShLLRIFSQRPILVEREQGQTLTLTYCICNHPGLHESLCCLLCTE YNKS"	40
CDS	27429..28055 /gene="E3" /product="membrane glycoprotein E3 CR1-alpha" /translation="MKVFVVCVLSIIRABISDYSGLDGVPAINRSLFFTGNETELQ"	

	LQCKPHKKYLTWLFQGSPIAVVNHCNDNDGVLLSGPANLTFSTRSKLQLFQPFPLPGTY QCVSGPCHHTFHLIPNTTAPLPATNNQTHQRHRRDLSESNTTTHTGGEGRGRPTSGI YYGPWEVVGILIALGLVAGGLIALCYLYLPCCSYLVVLCWFKKWRSP"	
regulatory	27464..27469 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"	
CDS	/gene="L4" 28037..28570 /gene="E3" /product="membrane glycoprotein E3 gpi9K" /translation="MGKITLVSCGVLVAVVLSIVGLGGAADVKEEKADPCLHFNPDKC QLSEQPDGNRCTVLIKCGWECENVRIEYNNKTRNNTLASVWQPGDPEWYTVSVPGADG SPRTVNNTFIFAHMCDTVMWMSKQYDMWPPTKENIVVFSIAYSLCTALITAIVCLSIH MLIAIRPRNNAEKEKQP"	
CDS	28600..29305 /gene="E3" /product="membrane glycoprotein E3 CR1-beta" /translation="MASVTALTIFLGLVGTSTTFQHINKTVYAGSNSVLPGHQSHQKV SWYWDKSNTPVTLCCKGHQTPINRSGIFFKCNHNNITLLSITKHYSPTYGTNENIKQ DTYYSVTVLDPTTPRTTTKPTTTKRHTKPKTKKTTVKTTTTTTTTTEATTSTTLAA TTHHTHELTLQTTNDLIALQKGDNSTTSNEEIPRSMIGIIVAVVVCMLIALCMVYY AFCYRKHRLNDKLEHL"	10
misc_feature	29636..29946 /note="residual non-functional 3'-region of membrane glycoprotein E3 CR1-gamma CDS that is intact in other members of this species; lacks splice acceptor and 5'-region"	
CDS	29961..30857 /gene="E3" /product="membrane glycoprotein E3 CR1-delta" /translation="MKAVALVFCSLIGIVFSAGFLKNLTIYEGENATLVGISGQNV WLKYLHLDGWDICDWNVTVYTCNGVNLITITNATQDQNGRFGQSFTTRNNGYESHMF YDVTVIRNETATTTQMPHTHSSTTTTQTTQTTTFTYSTQHMTTTTAAKPSSAAPQPQ ALALIAAQPSTTTTRNEQTTFDLSTVESHTTATSSAFSSSTANLSSLSSTPISPATTT SPAPLPTPLKQTEDSGMQWQITLLIVIGLVILAVLLYYIFCRRIPNAHRKPVYKPIVD GQPEPLQVEGLRLNLLFSFTVW"	20
CDS	30865..31140 /gene="E3" /product="membrane protein E3 RID-alpha" /translation="MIPRQFLITILICLLQVCATLALVANASPCIGPFASYVLFAPV TCICCCSIVCLLITFFQFIDWIFVRIAYLRHHPQYRDQRVARLLRL"	
CDS	31146..31577 /gene="E3" /codon_start=1 /product="membrane protein E3 RID-beta" /translation="MRALLLLALLLLVLPFPVNPSPSTQSPPEVRKCKFQEPWKFLLC YRQKSDMHPQSWIMIIGIVNLAETLSEFVIYPCDFGWSPEALYLPPEPDTTPPQQPQ AHALPPPQPRPQYMPILDYEAEPQRPMLPAISYFNLTGGDD"	30
CDS	31570..31977 /gene="E3" /note="12.5K family" /product="control protein E3 14.7K" /translation="MTDPLANNNVNDLLDMDGRASEQRLAQLRIRQQQERAVKELQD GIAIHQCKKGIFCLVKQAKISYEVTQTDHRLSYELLQQRQKFTCLVGVNPIVITQQSG DTKGCIHCSCDSPCVHTLIKTLCGLRDLPLMN"	
regulatory	32001..32006 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"	
regulatory	/gene="E3" 32070..32075 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"	
CDS	/gene="E3" 32254..33531 /gene="L5" /note="capsid protein IV" /product="fiber" /translation="MSKKRVRVDDDFDPVYPYDADNAPTVPFINPPFVSSDGFQEKPL GVLSRLADPVTTKNGEITLKLGEVOLDSSGKLISNTATKAAAPLSFNNTISLMD HPFYTKDGLSLQVSPPLNLRISILNTLALGFGSGLGLRGSALAVQLVSPLEFDTDG NIKLTLDRLGHVTTGDAIESNISWAKGLKFEDGAIATNIGNGLEFGSSSTETGVDDAY	40

PIQVKLGSGLSFDSTGAIMAGNKEDDKLTLTWTTDPDPSNCQILAENDAKLTLCCLKCG
 SQLLATVSVLVVGGGNLNPITGTVSSAQVFLRFDANGVLLTEHSTLKKYWGVRQGDSI
 DGTPYTNAGFMPNLKAYPKSQSSTTKNNIVGQVYMNGDVSKPMLLTITLNGTDDSNS
 TYGMSFSYTWINGSYVGATFGANSYTFSYIAQE"

regulatory 33599..33604
 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"
 /gene="E5"

gene complement(33620..336319)
 /gene="E4"

regulatory complement(33620..33625)
 /regulatory_class="polyA_signal_sequence"
 /gene="E4"

CDS complement(join(33638..33889,34621..34791))
 /gene="E4"
 /product="control protein E4orf6/7"
 /translation="MSESNCIMTRSRARSAASRHHYPYRPAPLPRCEETETRASLVEDH
 PVLPCDCTLMSHNITVIPTEDNPQLLSCEVQMRECEPFGFISLTDPLARSETVWNVE
 TKMSITNGVQMFKAVERGERVVYSMSWEGGKITARIL"

CDS complement(33886..34791)
 /gene="E4"
 /note="E4orf6; 34K family"
 /product="control protein E4 34K"
 /translation="MSESNCIMTRSRARSAASRHHYPYRPAPLPRCEETETRASLVEDH
 PVLPCDCTLMSHNVSVRGLPCSAGFAVLQEFFVPWDMVLTPEELRVLKRCMSVCLCC
 ANIDLFSSQMIHGYERWVLHCHCRDPGSLRCMAGGAVLALWERRIIRGCMFNQVRVMWY
 REVVNRHMPKEIMYMGSVFWRGRHLIYLRWYDGHVGSILPAMSGFWSVLNYGLLNNL
 VVLCCTYCSDLSEIRMRCCARRTRRLMLRAVGIMLRSLDPLSSSLTERRRQRLLR
 GLMRHHRPIPFADYDSHRRSSASSR"

intron complement(33890..34620)
 /gene="E4"

CDS complement(34697..35062)
 /gene="E4"
 /product="control protein E4orf4"
 /translation="MVLPLVLPSPAVTETQQNCIIWLGLAHSTVVDVIRAIRHDGIFIT
 PEALDLLHGLREWLFFYNFNTERSKRRDRRRSVCSARTFRCYSKYENVRKQLHHDIVA
 STISRVPSPVPSAGPLTTL"

intron complement(34815..36232)
 /gene="E4"
 /note="precedes control protein E4 34K CDS"

CDS complement(35072..35425)
 /gene="E4"
 /product="control protein E4orf3"
 /translation="MRVCLRMPVEGALRELFIMAGLDLPQELVRRIQGWKNENYLG MV
 QECNMIELENPPAFAIVLFLDVRVEALLEATVEHLENRITFDLAVIFHQHSGGERC
 HLRDLHFEVLRDRLD"

intron complement(35136..36232)
 /gene="E4"
 /note="precedes control protein E4orf4 CDS"

CDS complement(35422..35811)
 /gene="E4"
 /product="control protein E4orf2"
 /translation="MLERTACIYSIVVPEALNVHLEDFSFVDFLKNCLGDFLSSYLE
 ITGSSQHAYSSLAFGNAHWGGLRFICTVACPNIIPGGPMKNFEGDMKEYLQLLREE
 LRDRGREFDIPLVNLQVNEQNILEL"

intron complement(35455..36232)
 /gene="E4"
 /note="precedes control protein E4orf3 CDS"

intron complement(35827..36232)
 /gene="E4"
 /note="precedes control protein E4orf2 CDS"

CDS complement(35851..36225)
 /gene="E4"
 /note="genus-specific; DURP family"
 /product="control protein E4orf1"
 /translation="MDAEALYVYLEGSGALLPVQEGSNYILYAPENFVLHPHGIALLD
 LRLSIVVYCFGLGRFFSLADANVPGVSSCRIIHAGHRERLSVMVFVNHSDNFYEGRAG
 DPVACLVLERTIYPPVRQASMV"

regulatory complement(36314..36319)
 /regulatory_class="TATA_box"
 /gene="E4"

repeat_region 36515..36643
 /standard_name="ITR"
 /rpt_type=inverted

10

20

30

40

50

ChAd155野生型配列（配列番号19）の配列の注釈を以下に提供する。

LOCUS ChAd155 37830 bp DNA linear 10-JUN-2015
 DEFINITION Chimp adenovirus 155, complete genome.
 COMMENT Annotation according to alignment of ChAd155 against the human
 Adenovirus 2 reference strain NC_001405
 Two putative ORFs in the E3 region added manually

FEATURES	Location/Qualifiers	
source	1..37830	
	/organism="Chimpanzee adenovirus 155"	
	/mol_type="genomic DNA"	
	/acronym="ChAd155"	
repeat_region	1..101	10
	/standard_name="ITR"	
	/rpt_type=inverted	
gene	466..1622	
	/gene="E1A"	
TATA_signal	466..471	
	/gene="E1A"	
prim_transcript	497..1622	
	/gene="E1A"	
CDS	join(577..1117,1231..1532)	
	/gene="E1A"	
	/product="E1A_280R"	
CDS	join(577..979,1231..1532)	
	/gene="E1A"	
	/product="E1A_243R"	20
polyA_signal	1600..1605	
	/gene="E1A"	
gene	1662..4131	
	/gene="E1B"	
TATA_signal	1662..1667	
	/gene="E1B"	
prim_transcript	1692..4131	
	/gene="E1B"	
CDS	1704..2267	
	/gene="E1B"	
	/product="E1B_19K"	
CDS	2009..3532	
	/gene="E1B"	
	/product="E1B_55K"	30
gene	3571..4131	
	/gene="IX"	
TATA_signal	3571..3576	
	/gene="IX"	
prim_transcript	3601..4131	
	/gene="IX"	
CDS	3628..4092	
	/gene="IX"	
	/product="IX"	

polyA_signal	4097..4102	
	/note="E1B, IX"	
gene	complement(4117..27523)	
	/gene="E2B"	
prim_transcript	complement(4117..27494)	
	/gene="E2B"	
gene	complement(4117..5896)	
	/gene="IVa2"	
prim_transcript	complement(4117..5896)	
	/gene="IVa2"	
CDS	complement(join(4151..5487,5766..5778))	
	/gene="IVa2"	
	/product="E2B_IVa2"	10
polyA_signal	complement(4150..4155)	
	/note="IVa2, E2B"	
CDS	complement(join(5257..8838,14209..14217))	
	/gene="E2B"	
	/product="E2B_polymerase"	
gene	6078..34605	
	/gene="L5"	
gene	6078..28612	
	/gene="L4"	
gene	6078..22658	
	/gene="L3"	
gene	6078..18164	
	/gene="L2"	20
gene	6078..14216	
	/gene="L1"	
TATA_signal	6078..6083	
	/note="L"	
prim_transcript	6109..34605	
	/gene="L5"	
prim_transcript	6109..28612	
	/gene="L4"	
prim_transcript	6109..22658	
	/gene="L3"	
prim_transcript	6109..18164	
	/gene="L2"	
prim_transcript	6109..14216	30
	/gene="L1"	
CDS	join(8038..8457,9722..9742)	
	/gene="L1"	
	/product="L1_13.6K"	
CDS	complement(join(8637..10640,14209..14217))	
	/gene="E2B"	
	/product="E2B_pTP"	
gene	10671..10832	
	/gene="VAI"	
misc_RNA	10671..10832	
	/gene="VAI"	
	/product="VAI"	
gene	10902..11072	40
	/gene="VAII"	
misc_RNA	10902..11072	
	/gene="VAII"	
	/product="VAII"	
CDS	11093..12352	

	/gene="L1"	
	/product="L1_52K"	
CDS	12376..14157	
	/gene="L1"	
	/product="L1_pIIa"	
polyA_signal	14197..14202	
	/gene="L1"	
CDS	14254..16035	
	/gene="L2"	
	/product="L2_penton"	
CDS	16050..16646	
	/gene="L2"	10
	/product="L2_pVII"	
CDS	16719..17834	
	/gene="L2"	
	/product="L2_v"	
CDS	17859..18104	
	/gene="L2"	
	/product="L2_pX"	
polyA_signal	18143..18148	
	/gene="L2"	
CDS	18196..18951	
	/gene="L3"	
	/product="L3_pVI"	
CDS	19063..21945	20
	/gene="L3"	
	/product="L3_hexon"	
CDS	21975..22604	
	/gene="L3"	
	/product="L3_protease"	
polyA_signal	22630..22635	
	/gene="L3"	
gene	complement(22632..27523)	
	/gene="E2A"	
prim_transcript	complement(22632..27494)	
	/gene="E2A"	
gene	complement(22632..26357)	
	/gene="E2A-L"	
prim_transcript	complement(22632..26328)	30
	/gene="E2A-L"	
polyA_signal	complement(22649..22654)	
	/note="E2A, E2A-L"	
CDS	complement(22715..24367)	
	/gene="E2A"	
	/note="DBP; genus-common; DBP family"	
	/codon_start=1	
	/product="E2A"	
CDS	24405..26915	
	/gene="L4"	
	/product="L4_100k"	
TATA_signal	complement(26352..26357)	40
	/gene="E2A-L"	
CDS	join(26602..26941,27147..27529)	
	/gene="L4"	
	/product="L4_33K"	
CDS	26602..27207	
	/gene="L4"	

	/product="L4_22K"	
TATA_signal	complement(27518..27523)	
	/note="E2A, E2B; nominal"	
CDS	27604..28287	
	/gene="L4"	
	/product="L4_pVIII"	
gene	27969..32686	
	/gene="E3B"	
gene	27969..31611	
	/gene="E3A"	
TATA_signal	27969..27974	
	/note="E3A, E3B"	
prim_transcript	27998..32686	10
	/gene="E3B"	
prim_transcript	27998..31611	
	/gene="E3A"	
CDS	28288..28605	
	/gene="E3A"	
	/product="E3 ORF1"	
polyA_signal	28594..28599	
	/gene="L4"	
CDS	29103..29303	
	/gene="E3A"	
	/product="E3 ORF2"	
CDS	29300..29797	20
	/gene="E3A"	
	/product="E3 ORF3"	
CDS	29826..30731	
	/gene="E3A"	
	/product="E3 ORF4"	
CDS	30728..31579	
	/gene="E3A"	
	/product="E3 ORF5"	
CDS	31283..31579	
	/gene="E3A"	
	/product="E3 ORF6"	
polyA_signal	31578..31584	
	/gene="E3A"	
CDS	31591..31863	30
	/gene="E3B"	
	/product="E3 ORF7"	
CDS	31866..32264	
	/gene="E3B"	
	/product="E3 ORF8"	
CDS	32257..32643	
	/gene="E3B"	
	/product="E3 ORF9"	
polyA_signal	32659..32664	
	/gene="E3B"	
gene	complement(<32678..32838)	
	/gene="U"	
CDS	complement(<32678..32838)	40
	/gene="U"	
	/note="exon encoding C terminus unidentified;	
	genus-common"	
	/product="protein U"	
CDS	32849..34585	


```

                /gene="L5"
                /product="L5_fiber"
polyA_signal    34581..34586
                /gene="L5"
gene            complement(34611..37520)
                /gene="E4"
prim_transcript complement(34611..37490)
                /gene="E4"
polyA_signal    complement(34625..34630)
                /gene="E4"
CDS             complement(join(34794..35069,35781..35954))
                /gene="E4"
                /product="E4 ORF7"
CDS             complement(35070..35954)
                /gene="E4"
                /product="E4 ORF6"
CDS             complement(35875..36219)
                /gene="E4"
                /product="E4 ORF4"
CDS             complement(36235..36582)
                /gene="E4"
                /product="E4 ORF3"
CDS             complement(36579..36971)
                /gene="E4"
                /product="E4 ORF2"
CDS             complement(37029..37415)
                /gene="E4"
                /product="E4 ORF1"
TATA_signal     complement(37515..37520)
                /gene="E4"
repeat_region   37740..37830
                /standard_name="ITR"
                /rpt_type=inverted

```

10

20

【 0 1 7 0 】

導入遺伝子

アデノウイルスベクターは、in vivo発現のために所望のRNA又はタンパク質配列、例えば、異種配列を送達するために使用され得る。ベクターは、裸のDNA、ファージ、トランスポゾン、コスミド、エピソーム、プラスミド又はウイルスを含む任意の遺伝エレメントを含み得る。「発現カセット」（又は「ミニ遺伝子」）は、選択された異種遺伝子（導入遺伝子）及び宿主細胞において遺伝子産物の翻訳、転写及び/又は発現を駆動するのに必要なその他の調節エレメントの組合せを意味する。

30

【 0 1 7 1 】

通常、アデノウイルスベクターは、発現カセットが、選択されたアデノウイルス遺伝子にとって天然の領域中にその他のアデノウイルス配列を含有する核酸分子中に位置するように設計される。発現カセットは、所望により既存の遺伝子領域中にその領域の機能を破壊するために挿入され得る。或いは、発現カセットは、部分的又は完全に欠失されたアデノウイルス遺伝子の部位中に挿入され得る。例えば、発現カセットは、E1A、E1B、E2A、E2B、E3及びE4からなる群から選択されるゲノム領域の少なくとも1種の遺伝子を非機能的にする突然変異、挿入又は欠失の部位に配置され得る。用語「非機能的にする」とは、遺伝子領域の十分な量が除去される、又はそうでなければ破壊され、その結果、遺伝子領域がもはや、遺伝子発現の機能的産物を生成できないことを意味する。必要に応じて、全遺伝子領域が除去され得る（適宜、発現カセットと置換される）。アデノウイルスのE1遺伝子が欠失され、最適のプロモーター、対象の遺伝子のcDNA配列及びポリAシグナルからなる発現カセットと置換され、複製欠損組換えウイルスをもたらすことが適している。

40

【 0 1 7 2 】

導入遺伝子配列はまた、発現の際に検出可能なシグナルを生成するリポーター配列を含み得る。このようなりポーター配列として、制限するものではないが、 β -ラクタマーゼ

50

、 β -ガラクトシダーゼ (LacZ)、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、例えば、CD2、CD4、CD8を含む膜結合タンパク質、インフルエンザ血球凝集素タンパク質及びそれに対して向けられる高親和性抗体が存在し、従来手段によって作製され得る当技術分野で周知のその他のもの及び抗原タグドメイン、中でも、血球凝集素又はMycと適切に融合している膜結合タンパク質を含む融合タンパク質をコードするDNA配列が挙げられる。これらのコード配列は、その発現を駆動する調節エレメントと関連付けられた場合に、酵素的、X線撮影による、比色定量、蛍光又はその他の分光学的アッセイ、蛍光活性化セルソーティングアッセイ、並びに酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) 及び免疫組織化学を含む免疫学的アッセイを含む従来手段によって検出可能なシグナルを提供する。

10

【0173】

発現カセットはまた、導入遺伝子に加えて、アデノウイルスベクターを用いてトランスフェクトされた細胞においてその転写、翻訳及び/又は発現を可能にするように導入遺伝子と機能的に連結している従来の制御エレメントを含む。本明細書において、「機能的に連結している」配列は、対象の遺伝子と連続している発現制御配列及び対象の遺伝子を制御するようにトランスで、又は遠位で作用する発現制御配列の両方を含む。

【0174】

発現制御配列として、適当な転写開始、終結、プロモーター及びエンハンサー配列、ウサギ グロビンポリAを含むスプライシング及びポリアダニル化 (ポリA) シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル、細胞質mRNAを安定化する配列、翻訳効率を増強する配列 (例えば、Kozakコンセンサス配列)、タンパク質安定性を増強する配列、必要に応じて、コードされる産物の分泌を増強する配列が挙げられる。その他の配列の中でも、キメライントロンが使用され得る。

20

【0175】

「プロモーター」は、RNAポリメラーゼの結合を可能にし、遺伝子の転写を駆動するヌクレオチド配列である。通常、プロモーターは、遺伝子の転写開始部位の近位にある、遺伝子の5'非コード領域中に位置する。転写の開始において機能するプロモーター内の配列エレメントは、コンセンサスヌクレオチド配列を特徴とすることが多い。プロモーターの例として、それだけには限らないが、細菌、酵母、植物、ウイルス及び哺乳類 (ヒトを含む) に由来するプロモーターが挙げられる。内部にある、天然の、構成的、誘導可能な及び/又は組織特異的であるプロモーターを含む多数の発現制御配列が、当技術分野で公知であり、利用され得る。

30

【0176】

構成的プロモーターの例として、制限するものではないが、TBGプロモーター、レトロウイルスラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター (任意選択で、エンハンサーとともに)、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (任意選択で、CMVエンハンサーとともに、例えば、Boshartら、Cell、第41巻:521~530頁(1985年)を参照のこと)、CASIプロモーター (国際公開第2012/115980号)、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 α -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ (PGK) プロモーター及びEF1aプロモーター (Invitrogen) が挙げられる。

40

【0177】

誘導可能プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外因的に供給される化合物、温度などの環境因子又は特定の生理学的状態、例えば、急性相、細胞の特定の分化状態の存在によって、又は複製している細胞においてのみ調節され得る。誘導可能プロモーター及び誘導可能系は、制限するものではないが、Invitrogen、Clontech及びAriadを含む種々の市販の供給源から入手可能である。多数のその他の系が記載されており、当業者によって容易に選択され得る。例えば、誘導可能プロモーターとして、亜鉛誘導可能ヒツジメタロチオン (metallothionine) (MT) プロモーター及びデキサメタゾン (Dex) 誘導可能マウス乳癌ウイルス (MMTV) プロモーターが挙げられる。その他の誘導系として、T7ポ

50

リメラゼプロモーター系（国際公開第98/10088号）、エクジソン昆虫プロモーター（No
ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第93巻:3346～3351頁(1996年)）、テトラサイクリン
抑制可能系（Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第89巻:5547～5551頁(1992年)）
、テトラサイクリン誘導可能系（Gossenら、Science、第378巻:1766～1769頁(1995年)、H
arveyら、Curr. Opin. Chem. Biol、第2巻:512～518頁(1998年)も参照のこと）が挙げら
れる。その他の系として、FK506二量体、カストラジオール（castradiol）を使用するVP1
6又はp65、ジフェノールムリスレロン（diphenol murislerone）、RU486誘導可能系（Wan
gら、Nat. Biotech.、第15巻:239～243頁(1997年)）及びWangら、Gene Ther.、第4巻:432～
441頁(1997年)）及びラパマイシン誘導可能系（Magariら、J. Clin. Invest.、第100巻:2
865～2872頁(1997年)）が挙げられる。いくつかの誘導可能プロモーターの有効性は、経
時的に増大する。このような場合には、複数のリプレッサーをタンデムで挿入することによ
ってこのような系の有効性を増大できる、例えば、IRESによってTetRに連結しているTe
tR。

10

【0178】

導入遺伝子は、組織特異的プロモーターと機能的に連結され得る。例えば、骨格筋にお
ける発現が望まれる場合には、筋肉において活性なプロモーターを使用する必要がある。
これらとして、骨格の -アクチン、ミオシン軽鎖2A、ジストロフィン、筋肉クレアチン
キナーゼをコードする遺伝子に由来するプロモーター並びに天然に存在するプロモーター
よりも高い活性を有する合成筋肉プロモーターが挙げられる（Liら、Nat. Biotech.、第1
7巻:241～245頁(1999年)を参照のこと）。組織特異的であるプロモーターの例は、中
でも、肝臓（アルブミン、Miyatakeら、J. Virol、第71巻:5124～32頁(1997年)、B型肝炎ウイル
スコアプロモーター、Sandigら、Gene Ther.、第3巻:1002～9頁(1996年)、アルファ-フ
ェトプロテイン（AFP）、Arbuthnotら、Hum. Gene Ther.、第7巻:1503～14頁(1996年)）
、骨オステオカルシン（Steinら、Mol. Biol. Rep.、第24巻:185～96頁(1997年)）、骨シ
アロタンパク質（Chenら、J. Bone Miner. Res.、第11巻:654～64頁(1996年)）、リンパ
球（CD2、Hansalら、J. Immunol.、第161巻:1063～8頁(1998年)、免疫グロブリン重鎖、T
細胞受容体鎖）、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター（Andersenら、Cell.
Mol. Neurobiol.、第13巻:503～15頁(1993年)）、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子（Pic
cioliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第88巻:5611～5頁(1991年)）及びニューロン特
異的vgf遺伝子（Piccioliら、Neuron、第15巻:373～84頁(1995年)）などのニューロンに
ついて公知である。

20

30

【0179】

いくつかの実施形態では、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）
（Zuffreyら(1999年) J Virol; 第73巻(4号):2886～9頁）が、導入遺伝子と機能的に連
結され得る。

【0180】

アデノウイルスベクター構築

アデノウイルスベクターは、異種遺伝子を発現する、及び/又は望ましくないアデノウ
イルス配列を欠失若しくは不活性化するように野生型アデノウイルスを改変することによ
って作製される。アデノウイルスベクターはまた、複製適格性の変更を有し得る。例えば
、ベクターは、複製欠損であり得る、又は野生型ウイルスと比較して非補完性細胞では複
製する能力が低減されるように制限された複製を有し得る。これは、例えば、複製に関与
している遺伝子、例えば、E1a、E1b、E2、E3又はE4を機能的に不活性化する又は欠失す
ることによって、ウイルスに突然変異を導入することによって引き起こされ得る。

40

【0181】

本発明に一致するアデノウイルスベクターは、機能的に不活性化された又は欠失された
E1を含み得る。したがって、本発明によるアデノウイルスベクターは、アデノウイルスE1
a及び/又はE1bを発現する能力がないために複製欠損であり得る。組換えアデノウイルス
はまた、その他の遺伝子に機能的に不活性化（国際公開第03/000283号を参照のこと）、例
えば、E3又はE4遺伝子における欠失を有し得る。アデノウイルス後初期遺伝子E3は、組換

50

えウイルスの一部を形成するアデノウイルス配列から排除され得る。E3の機能は、組換えアデノウイルス粒子の製造にとって必要ではない。したがって、この遺伝子産物の機能を置き換えることは、本発明において有用な組換えアデノウイルスをパッケージングするためには不必要である。1つの特定の実施形態では、組換えアデノウイルスは、E1及びE3遺伝子を機能的に欠失している。このようなベクターの構築は、Royら、Human Gene Therapy第15巻:519～530頁、2004年に記載されている。

【0182】

E4遺伝子の機能的欠失を有する組換えアデノウイルスもまた、構築され得る。特定の実施形態では、組換えアデノウイルスは、Collocaら(2012年) Sci. Transl. Med. 第4巻:1～9頁、Royら(2004年) Virology第324巻:361～372頁に記載されるように、E1及びE4遺伝子を機能的に欠失している。いくつかの実施形態では、E4 ORF6機能を保持することが望ましい場合がある。一実施形態では、天然E4 ORF6領域は、Ad5由来などの異種E4 ORF6によって置換され得る。したがって、1つの特定の実施形態では、アデノウイルスベクターは、E1において機能的に欠失され得、Ad5由来のE4 ORF6領域を有し得る。

【0183】

本発明によるアデノウイルスベクターはまた、後初期遺伝子E2aにおいて機能的欠失を含有し得る。欠失はまた、アデノウイルスゲノムの後期遺伝子L1からL5のいずれにおいても行われ得る。同様に、中間遺伝子IX及びIVaにおける欠失も有用であり得る。

【0184】

その他の欠失は、その他の構造的又は非構造的アデノウイルス遺伝子において行われ得る。上記の欠失は、個別に使用され得る、例えば、本発明において使用するためのアデノウイルス配列は、E1のみにおいて欠失を含有し得る。或いは、全遺伝子の欠失又はその生物活性を破壊するのに有効なその一部の欠失が、任意の組合せで使用され得る。例えば、1つの例示的ベクターでは、アデノウイルス配列は、E1遺伝子及びE4遺伝子の、又はE1、E2a及びE3遺伝子の、又はE1及びE3遺伝子の欠失(例えば、E1a及びE1bにおける機能的欠失及びE3の少なくとも一部の欠失)、又はE3の欠失を伴う若しくは伴わない、E1、E2a及びE4遺伝子の欠失などを有し得る。このような欠失は、これらの遺伝子の部分的である場合も完全欠失である場合もあり、所望の結果を達成するために、温度感受性突然変異などのその他の突然変異と組み合わせて使用され得る。

【0185】

これらのベクターは、当業者に公知の技術を使用して作製される。このような技術として、教本に記載されるものなどのcDNAの従来のクローニング技術、アデノウイルスゲノムの重複するオリゴヌクレオチド配列の使用、ポリメラーゼ連鎖反応及び所望のヌクレオチド配列を提供する任意の適した方法が挙げられる。特に適した方法として、Collocaら(2012年) Sci. Transl. Med. 第4巻:1～9頁、Royら(2004年) Virology第324巻、361～372頁、Royら(2010年) J. of Gene Med. 第13巻:17～25頁及び国際公開第2010/085984号に提供されるものなどの標準相同組換え法又はWarmingら Nuc. Acids Res. (2005年)33:e36に記載されるようリコンビニアリング(recombineering)法が挙げられる。

【0186】

本発明において使用するためのアデノウイルス配列は、任意選択で、Ad5E4orf6遺伝子置換とともに、E3機能的不活性化(欠失など)を伴う、少なくともE1及びE4遺伝子の機能的な不活性化(欠失など)を含有することが適している。

【0187】

一実施形態では、アデノウイルスは、Ad5由来のE4orf6の組込みとともに、E1及びE4遺伝子の機能的な不活性化(欠失など)を含む。このような実施形態では、アデノウイルスは、ChAd155、ChAd3又はChAd63、特に、ChAd3に由来することが適している。

【0188】

第2の実施形態では、アデノウイルスは、Ad5由来のE4orf6の組込みとともに、E1、E3及びE4遺伝子の機能的な不活性化(欠失など)を含む。このような実施形態では、アデノウイルスは、ChAd155、ChAd3又はChAd63、特に、ChAd63に由来することが適している。

【0189】

アデノウイルスベクター製造

アデノウイルスベクターは、ウイルスが複製可能である任意の適した細胞株を使用して製造され得る。特に、その損なわれた複製特徴をもたらすウイルスベクターから失われた因子（E1など）を提供する補完性細胞株が使用され得る。制限するものではないが、このような細胞株は、中でも、HeLa（ATCC受託番号CCL2）、A549（ATCC受託番号CCL185）、HEK293、KB（CCL17）、Detroit（例えば、Detroit510、CCL72）及びWI-38（CCL75）細胞であり得る。これらの細胞株は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、バージニア州マナッサス、20110-2209からすべて入手可能である。応用微生物研究センター（Centre for Applied Microbiology and Research）（CAMR、UK）のEuropean Collection of Animal Cell Cultures（ECACC）でECACC番号96022940のもので寄託された細胞によって代表されるようなPER.C6（商標）細胞又はHer96細胞（CruCell）などのその他の適した親細胞株は、その他の供給源から入手され得る。

10

【0190】

特に適した補完性細胞株として、Procell92細胞株がある。Procell92細胞株は、HEK293細胞をベースとし、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ-1（PGK）プロモーターの制御の下にTetレプレッサーとともにトランスフェクトされたアデノウイルスE1遺伝子及びG418耐性遺伝子を発現する（Vitelliら PLOS One（2013年）第8巻（e55435）：1～9頁）。Procell92.Sは、懸濁液状態での成長のために適応されており、毒性タンパク質を発現するアデノウイルスベクターの製造にとっても有用である（www.okairos.com/e/innere.php?m=00084、2015年4月13日に最後にアクセスされた）。

20

【0191】

アデノウイルス送達法及び投与量

アデノウイルスベクターは、免疫原性組成物中で投与されるようなものであり得る。本明細書において記載されるような免疫原性組成物とは、哺乳動物、適宜、ヒトに送達された後に、ベクターによって送達された導入遺伝子産物に対して免疫応答、例えば、体液性（例えば、抗体）及び/又は細胞媒介性（例えば、細胞傷害性T細胞）応答を誘導可能な1つ以上の組換えベクターを含む組成物である。組換えアデノウイルスは、所望の免疫原をコードする遺伝子を（適宜、その遺伝子欠失のいずれかにおいて）含み得、したがって、ワクチンにおいて使用され得る。

30

【0192】

このようなワクチン又はその他の免疫原性組成物は、適した送達ビヒクル中に製剤化され得る。一般に、免疫原性組成物の用量は、以下に「送達方法及び投与量」のもとで定義される範囲にある。

【0193】

任意選択で、本発明のワクチン又は免疫原性組成物は、例えば、アジュバント、安定化剤、pH調整剤、保存料などを含むその他の成分を含有するように製剤化され得る。抗原をコードするDNAワクチンのみを用いるプライミングの際に生じる免疫応答と比較して、抗原特異的免疫応答を増強するために、アジュバントが、抗原をコードするプライミングDNAワクチンとともに投与され得る。

40

【0194】

アデノウイルスベクターは、等張性生理食塩水、等張性塩類溶液又は当業者に明らかであろうその他の製剤などの医薬的に又は生理学的に許容される担体中に懸濁又は溶解されることによって投与のために準備され得る。適当な担体は、当業者には明らかであり、投与経路に応じて大きく変わる。本明細書において記載される組成物は、生分解性生体適合性ポリマーを使用する持続放出製剤中で、又はミセル、ゲル及びリポソームを使用するオンサイト送達によって哺乳動物に投与され得る。

【0195】

いくつかの実施形態では、本発明の組換えアデノウイルスは、筋肉内注射、膣内注射、静脈内注射、腹膜内注射、皮下注射、皮膚上投与、皮内投与、鼻腔投与又は経口投与によ

50

って対象に投与される。肺への送達もまた望ましいものであり得る。筋肉内送達は、単純性及び利便性の理由のために通常の経路であり得る。

【0196】

治療レジメンが、各々異なる組成物中に製剤化された、1種以上のアデノウイルスベクター及びさらなる成分の共投与を含む場合には、それらは、同一部位に又は同一部位の付近に同位置的に投与されることが好ましい。例えば、成分は、（例えば、筋肉内、経皮、皮内、皮下から選択される投与経路によって）同一の側面又は四肢に（「同側性」投与）あるいは反対の側面又は四肢に（「対側性」投与）投与され得る。

【0197】

ウイルスベクターの投与量は、主に、患者の治療される状態、年齢、体重及び健康状態などの因子に応じて変わり、したがって、患者間で変わり得る。例えば、ウイルスベクターの治療上有効な成体ヒト又は獣医学投与量は、一般に、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{15}$ 個のウイルス粒子、例えば、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 個（例えば、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 2.5×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 、 1×10^{12} 個の粒子）を含有する。或いは、ウイルスベクターは、通常、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$ のプラーク形成単位（PFU）、例えば、 1×10^5 PFU、 5×10^5 PFU、 1×10^6 PFU、 5×10^6 PFU、 1×10^7 PFU、 5×10^7 PFU、 1×10^8 PFU、 5×10^8 PFU、 1×10^9 PFU、 5×10^9 PFU又は 1×10^{10} PFUである用量で投与され得る。投与量は、動物の大きさ及び投与経路に応じて変わる。例えば、筋肉内注射用の適したヒト又は獣医学投与量（約80kgの動物のための）は、単一部位のためにmLあたり約 $1 \times 10^9 \sim 約5 \times 10^{12}$ 個の粒子の範囲にある。任意選択で、複数部位の投与が使用され得る。別の例では、適したヒト又は獣医学投与量は、経口製剤用の約 1×10^{11} 個～約 1×10^{15} 個の粒子の範囲であり得る。

【0198】

アデノウイルスベクターは、例えば、HCMVプロモーターを含む発現カセットを有するベクターゲノムを含有するプラスミドDNAの標準曲線段階希釈として使用するCMVプロモーター領域で設計されたプライマー及びプローブを用いる定量的PCR解析（Q-PCR）によって定量化され得る。試験サンプル中のコピー数は、平行線解析法によって決定される。ベクター粒子定量化のための代替法は、分析用HPLC又は $A_{260\text{nm}}$ に基づく分光光度的方法であり得る。

【0199】

一般に、ヒト用量は、0.5mlから2mlの間の体積となる。したがって、本明細書において記載される組成物は、例えば、個々の又は組み合わされた免疫原性成分あたり、0.5、1.0、1.5又は2.0mlヒト用量の体積で製剤化され得る。400～600 μ lの、例えば、およそ500 μ lの体積が、特に筋肉内経路による投与のために通常使用される。

【0200】

当業者ならば、これらの用量を投与経路及び組換えベクターが使用される治療用途又はワクチン用途に応じて調整できる。投与量投与の頻度を決定するために、導入遺伝子の発現のレベル又はアジュバントのレベル、循環抗体のレベルがモニタリングされ得る。

【0201】

ブースターの必要性がある場合には必要性を決定するために、選択された導入遺伝子によってコードされるタンパク質の治療的レベル又はそれに対する免疫応答のレベルがモニタリングされ得る。血清中のCD8+T細胞応答又は任意選択で、抗体力価の評価後、任意選択のブースター免疫が望ましい場合がある。任意選択で、アデノウイルスベクターは、単回投与で、又は種々の組合せレジメンで、例えば、その他の有効成分を含む治療のレジメン若しくは過程と組み合わせて、又はプライミング-ブーストレジメンで送達され得る。

【0202】

M72導入遺伝子

本発明のさらなる態様は、本発明において使用するために最適化されているが、その他の状況においても有用性を有するM72抗原をコードする新規ポリヌクレオチドに関する。結果として、本発明はまた、配列番号8又は配列番号8に対して少なくとも95%の同一性（例えば、少なくとも98%の同一性、適宜、少なくとも99%の同一性、特に、少なくとも99

10

20

30

40

50

.5%の同一性及びとりわけ100%の同一性)を有するその縮重変異体を含むポリヌクレオチドを提供する。また、配列番号8又は配列番号8に対して少なくとも95%の同一性(例えば、少なくとも98%の同一性、適宜、少なくとも99%の同一性、特に、少なくとも99.5%の同一性及びとりわけ100%の同一性)を有するその縮重変異体からなるポリヌクレオチドも提供される。用語縮重変異体とは、同一ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの変異体を意味する。

【0203】

最適化されたポリヌクレオチドは、本発明の利益が、ヒト細胞において効率的な導入遺伝子発現によって完全に達成されることを確実にするのに役立つ。

【0204】

アデノウイルス構築物

本発明のさらなる態様は、本発明において使用するが、その他の状況においても有用性を有する新規アデノウイルス構築物に関する。結果として、本発明はまた、Rv1196又はRv0125関連抗原をコードする導入遺伝子を含む非ヒトサルアデノウイルスを提供する。適宜、非ヒトサルアデノウイルスは、配列番号10のペントン、配列番号11のヘキソン又は配列番号12のファイバー、特に、配列番号10のペントン、配列番号11のヘキソン及び配列番号12のファイバーを含む。或いは、非ヒトサルアデノウイルスは、配列番号15のペントン、配列番号16のヘキソン又は配列番号17のファイバー、特に、配列番号15のペントン、配列番号16のヘキソン及び配列番号17のファイバーを含む。また、非ヒトサルアデノウイルスは、配列番号20のペントン、配列番号21のヘキソン又は配列番号22のファイバー、特に、配列番号21のペントン、配列番号22のヘキソン及び配列番号23のファイバーを含み得る。

【0205】

Rv1196関連抗原をコードする導入遺伝子は、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性、とりわけ、配列番号1に対して少なくとも95%、例えば、少なくとも98%、例えば、少なくとも99%を有する配列(例えば、配列番号1)を含む、例えばからなる、ポリペプチドをコードする配列であり得る。

【0206】

Rv0125関連抗原をコードする導入遺伝子は、配列番号3に対して少なくとも90%の同一性、とりわけ、配列番号3に対して少なくとも95%、例えば、少なくとも98%、例えば、少なくとも99%を有する配列(例えば、配列番号3)を含む、例えばからなる、ポリペプチドをコードする配列であり得る。

【0207】

導入遺伝子は、配列番号6に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む(例えば、からなる)抗原をコードすることが適している。或いは、導入遺伝子は、少なくとも450個のアミノ酸長である配列番号6の断片を含む(例えば、からなる)抗原をコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、配列番号6のアミノ酸2~723を含む(例えば、からなる)抗原をコードする。導入遺伝子は、配列番号8又は配列番号8に対して少なくとも95%の同一性を有するその縮重変異体を含むことが適している。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、配列番号8を含む。

【0208】

アデノウイルスは、複製欠損を有することが適している。例えば、アデノウイルスは、E1遺伝子の機能的不活性化(例えば、欠失)を含む。アデノウイルスは、E4遺伝子の機能的不活性化(例えば、欠失)を含み得る。アデノウイルスはまた、E3遺伝子の機能的不活性化(例えば、欠失)を含み得る。アデノウイルスはまた、Ad5E4orf6遺伝子置換を含み得る。

【0209】

本発明による例示的アデノウイルス構築物として、配列番号13又は18のポリヌクレオチド配列を有するものがある。

【0210】

本発明のさらなる態様は、配列番号13又は18を含むポリヌクレオチド配列、例えば、配

10

20

30

40

50

列番号13又は18からなるポリヌクレオチド配列である。

【0211】

免疫処置レジメン、標的集団及び投与のモデル

一実施形態では、対象は、ポリペプチド抗原の単回用量及び関連アデノウイルスの単回用量を受け取る。その他の実施形態では、対象は、ポリペプチド抗原の2用量及び関連アデノウイルスの単回用量を受け取る（ポリペプチド抗原のさらなる用量は、標準タンパク質/アデノ若しくはアデノ/タンパク質法の開始に先立って、又は標準法の完了後に与えられ得る）。その他の実施形態では、対象は、ポリペプチド抗原の1用量及び関連アデノウイルスの2用量を受け取る（関連アデノウイルスのさらなる用量は、標準タンパク質/アデノ若しくはアデノ/タンパク質法の開始に先立って、又は標準法の完了後に与えられ得る）。抗原をコードするアデノウイルスの2用量が提供される場合には、それらは、同一アデノウイルス株及び挿入断片を使用する場合もしない場合もある。

10

【0212】

対象が、ポリペプチド抗原の2用量を受け取る場合には、さらなる用量は、標準法の開始前又は完了後1週間～3ヶ月、特に2週間～2ヶ月、通常、3週間～6週間、例えば、3週間～5週間、例えば、およそ4週間であることが適している。

【0213】

対象が、関連アデノウイルスの2用量を受け取る場合には、さらなる用量は、標準法の開始前又は完了後1週間～3ヶ月、特に2週間～2ヶ月、通常、3週間～6週間、例えば、3週間～5週間、例えば、およそ4週間であることが適している。

20

【0214】

本発明の方法を使用して治療を受ける予定の対象は、任意の年齢のものであり得る。本発明の一態様では、対象はヒトである。

【0215】

一実施形態では、対象は、成人ヒトである（通常、18～60歳）。

【0216】

ポリペプチド及びアデノウイルス組成物は、非経口、例えば、筋肉内又は皮下投与を含む種々の適した経路を介して投与され得る。

【0217】

1つの特定の実施形態では、1以上の組成物が皮内に投与される。用語「皮内」には、本明細書において、ヒト皮膚の真皮及び/又は表皮への抗原の適用を指すものとする。免疫原性組成物の皮内適用は、それだけには限らないが、ショートニードルデバイス（約0.2から約0.6mmの間の長さであるマイクロニードルを含むデバイス）を使用する送達又は皮膚パッチを使用する送達を含む当業者に公知の任意の皮膚法を使用することによって実施され得る。本明細書において記載される皮膚ワクチンとともに使用するのに適したデバイスとして、米国特許第4,886,499号、同5,190,521号、同5,328,483号、同5,527,288号、同4,270,537号、同5,015,235号、同5,141,496号、同5,417,662号及び欧州特許第1092444号に記載されるものなどのショートニードルデバイスが挙げられる。皮膚ワクチンはまた、国際公開第99/34850号に記載されるものなどの皮膚への針の有効浸透長を制限するデバイスによって投与され得る。また、液体ジェット注射器を介して、又はニードルを介して真皮に液体ワクチンを送達するジェット注射デバイスも適している。また、皮膚の外層を通して真皮への粉末形態のワクチンを加速するために圧縮ガスを使用する弾道粉末/粒子送達デバイスも適している。皮膚パッチは、一般に、固体基板を含む裏あて板を含む。パッチは、真皮又は表皮に本発明において使用される抗原及びアジュバントを送達する。特定の実施形態では、本発明において有用なパッチは、複数のマイクロプロジェクションを含む。マイクロプロジェクションは、角質層、表皮及び/又は真皮を貫通し、表皮又は真皮に抗原及びアジュバントを送達するのに適した任意の形状のものであり得る。特定の実施形態では、マイクロプロジェクションは、生分解性であり、生分解性ポリマーを含む。

30

40

【0218】

代替アプローチでは、ポリペプチドは、筋肉内に投与され得、アデノウイルスは、鼻腔

50

内に、又はエアゾールを介して肺に投与され得る。

【0219】

両組成物は、筋肉内に投与されることが適している。

【0220】

本発明において使用される免疫原性組成物は、抗原（複数可）及びアジュバントを混合することによって作製され得る。抗原（複数可）は、凍結乾燥形態で、又は液体製剤で提供され得る。抗原を含む第1の容器及びアジュバントを含む第2の容器を含むキットが、提供され得る。

【0221】

本発明に係る組成物は、0.05mlから1mlの間、例えば、0.1から0.5mlの間のヒト用量体積、特に、約0.5ml又は0.7mlの用量体積を有することが適している。第2の免疫原性組成物の体積は低減され、例えば、0.05mlから0.5mlの間、例えば、0.1から0.2mlの間であり得る。使用される組成物の体積は、送達経路に応じて変わり得、皮内経路によってより少ない用量が与えられる。

10

【0222】

本発明のさらなる実施形態は、以下を含む：

（a）Rv1196又はRv0125関連抗原をコードする導入遺伝子を含む非ヒトサルアデノウイルスであって、少なくとも配列番号20のペントン、配列番号21のヘキソン又は配列番号22のファイバーを有する前記アデノウイルス。

（b）ChAd155由来のペントン（配列番号20）、ヘキソン（配列番号21）及びファイバー（配列番号22）タンパク質を含む、（a）に記載の非ヒトサルアデノウイルス。

20

（c）コードされる抗原が、配列番号6に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、（a）又は（b）のいずれかに記載の非ヒトサルアデノウイルス。

（d）コードされる抗原が、少なくとも450個のアミノ酸長である配列番号6の断片、例えば、配列番号6の2～723の断片を含む、（a）、（b）又は（c）のいずれか1つに記載の非ヒトサルアデノウイルス。

（e）複製欠損アデノウイルスである、（a）～（d）のいずれか1つに記載の非ヒトサルアデノウイルス。

（f）アデノウイルスが、E1遺伝子の機能的不活性化（例えば欠失）を含む、（a）～（e）のいずれか1つに記載の非ヒトサルアデノウイルス。

30

（g）アデノウイルスが、E4遺伝子の機能的不活性化（例えば欠失）を含む、（a）～（f）のいずれか1つに記載の非ヒトサルアデノウイルス。

（h）アデノウイルスが、E3遺伝子の機能的不活性化（例えば欠失）を含む、（a）～（g）のいずれか1つに記載の非ヒトサルアデノウイルス。

（i）アデノウイルスが、Ad5E4orf6遺伝子置換を含む、（a）～（e）のいずれか1つに記載の非ヒトサルアデノウイルス。

【0223】

特許出願及び登録特許を含む本出願におけるすべての参考文献の教示は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。特定の要素を「含む」と定義される組成物又は方法又はプロセスは、それらの要素からなる組成物、方法又はプロセス（それぞれ）を包含すると理解される。以下の、制限されない実施例への参照により、本発明をさらに記載する。

40

【0224】

[実施例]

[実施例1]

M72タンパク質をコードするChAd3及びChAd63ベクターの作製構築物の作製

M72 DNA配列を、GeneArt（登録商標）（Life Technologies Corporation）によってヒト発現のために最適化した（配列番号8）。標準法に従って、GeneWiz（登録商標）によって、最適化されたDNA配列を合成し、EcoRV-NotI制限部位を使用して、シャトルプラスミドPVJ中に、HCMVプロモーターTetO系及びBGHポリA配列の制御の下にクローニングした。このブ

50

ラスミドを、SpeI 及びSgfI制限酵素を用いて切断し、大腸菌BJ5183中における相同組換えによって、ChAd3 (E1及びE4欠失を有する)又はChAd63 (E1、E3及びE4欠失を有する)ベクターのいずれか中に組み換えた。

【0225】

手短には、ChAd3ベクターの構築を以下に提供されるステップによって進めた。

【0226】

pChAd3ベクターは、野生型チンパンジーアデノウイルス3ゲノムに由来する。野生型チンパンジーアデノウイルス3型を、標準手順を使用してニューイベリア研究センター施設 (New Iberia Research Center facility) (ニューイベリア研究センター (New Iberia Research Center) ;ルイジアナ大学ラファイエット校 (The University of Louisiana at Lafayette)) で飼育された健常な若いチンパンジーから単離した。次いで、ウイルスゲノムをプラスミドベクター中にクローニングし、その後、ChAd3ウイルスゲノムの異なる領域中に以下の改変を保持するように改変した:

10

1) ウイルスゲノムのE1領域 (bp460 ~ bp3543まで) の欠失、

2) 全ChAd3 E4コーディング領域 (ChAd3野生型配列のヌクレオチド34634 ~ 37349に広がる) の欠失及びAd5E4orf6遺伝子との置換。欠失された領域は、E4天然プロモーター及びポリアデニル化シグナルを除くE4領域のすべて。

【0227】

ChAd63ベクターの構築は、以下に提供されるステップによって進めた。

【0228】

野生型チンパンジーアデノウイルス63型を、標準手順を使用してニューイベリア施設 (New Iberia facility) によって飼育されたチンパンジーの健常群から単離した。次いで、ウイルスゲノムをプラスミドベクター中にクローニングし、その後、ChAd3ウイルスゲノムの異なる領域中に以下の改変を保持するように改変した:

20

1) ウイルスゲノムのE1領域 (bp456 ~ bp3421まで) の欠失、

2) ウイルスゲノムのE3領域 (27208bp ~ 31786bp) の欠失、

3) 全ChAd63 E4コーディング領域 (ChAd63野生型配列のヌクレオチド33825 ~ 36216に広がる) の欠失及びAd5E4orf6遺伝子との置換。欠失された領域は、E4天然プロモーター及びポリアデニル化シグナルを除くすべてのE4領域を含有していた。

【0229】

30

確証的な試験

標準手順に従ってprocell-92.S細胞株においてレスキュー及びウイルス増幅 (継代1から継代4) を作製し、2つの異なる制限パターンによって継代3 (M72-ChAd63) 又は継代4 (M72-ChAd3) でウイルスDNAの遺伝子構造を調べた。1リットル規模の培養物からCsCl勾配法によって各組換えウイルスを精製した。精製されたウイルスを、定量的PCRによって力価測定し、ヘキソン免疫染色法によって感染力を測定した。

【0230】

精製されたウイルスを用いたHeLa細胞株感染後に、ウエスタンブロットによって良好なM72発現が確認された。継代10までにゲノム安定性を評価し、配列決定によって完全発現カセットのDNA配列を確認した。

40

【0231】

[実施例2]

マウスにおけるアデノウイルス用量調査

試験群

この研究の目的は、結核M72抗原をコードする2種のチンパンジーアデノウイルス:M72-ChAd3及びM72-ChAd63の免疫原性を評価し、比較することである。実施例1に従ってアデノウイルスを製造した。

【0232】

雌の6週齢のCB6F1/01aHsdマウス、0日目に50 µlを用いて群あたり12匹のマウスに筋肉内経路によって注射した (ChAd3溶液:pH7.4、10mM TRIS、10mMヒスチジン、5%スクロー

50

ス、75mM NaCl、1mM MgCl₂、0.02% ポリソルベート80、0.1mM EDTA、0.5% (v/v) エタノール;ChAd63溶液:pH6.6、10mMヒスチジン、7.5%スクロース、35mM NaCl、1mM MgCl₂、0.1% ポリソルベート80、0.1mM EDTA、0.5% (v/v) エタノール) :

【 0 2 3 3 】

【表 1】

群	アデノウイルス	ウイルス粒子の数
1	M72-ChAd3	10 ¹⁰
2	M72-ChAd3	10 ⁹
3	M72-ChAd3	10 ⁸
4	M72-ChAd3	10 ⁷
5	M72-ChAd63	10 ¹⁰
6	M72-ChAd63	10 ⁹
7	M72-ChAd63	10 ⁸
8	M72-ChAd63	10 ⁷

10

【 0 2 3 4 】

十分な容量を有するために、7、14及び21日目に群について3匹のマウスの4プールの全血を採取した。

20

【 0 2 3 5 】

細胞性免疫応答の測定-細胞内サイトカイン染色 (ICS)

全血からの白血球単離

各時点で、各マウスから血液を採取し、その後、プールした (3匹のマウスの4プール)。血液を、ヘパリン5000ユニット/ml (ヘパリンLeo) を含有するRPMI/添加剤 (グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸及び2-メルカプトエタノールを補給したRPMI1640) を含有するチューブ中に採取した。全血に10容量の溶解バッファーを添加し、チューブを室温 (RT) で10分間インキュベートした。遠心分離 (335g、室温で10分) 後、ペレットをRPMI/添加剤中に回収し、濾過した (セルストレーナー100 µm)。細胞を再度ペレットにし (335g、室温で10分)、完全培地 (グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸及び2-メルカプトエタノール及び5% 熱不活化ウシ胎児血清を補給したRPMI1640) に再懸濁した。

30

【 0 2 3 6 】

新鮮な白血球の *in vitro* 刺激

白血球を、ウェルあたりおよそ100万個細胞で丸底96ウェルプレート中にプレーティングした。次いで、白血球を、M72配列をカバーする1 µg/mlのペプチド (11個のアミノ酸残基によって重複する15マーペプチドの混合物) とともに、又は伴わずに、1 µg/mlの抗CD28 (クローン37.51) 及び抗CD49d (クローン9C10) を用いて6時間 (37 °C、5% CO₂) 刺激した。2時間の刺激期間後、完全培地で希釈されたプレフェルジンA (最終希釈1/1000) を含有するBD GolgiPlug (商標) をさらに4時間添加した。次いで、プレートを4 °Cで一晩トランスファーした。

40

【 0 2 3 7 】

ICS IFNg、IL-2、TNF-a

細胞を染色し、5色ICSアッセイを使用して解析した。

【 0 2 3 8 】

細胞をV底96ウェルプレートに移し、200 µlのフローバッファ (PBS 1x、1% FCS) を用いて洗浄した後、189g、4 °Cで5分間遠心分離し、細胞を50 µlの、1/50希釈した抗CD16/32 (クローン2.4G2) を含有するフローバッファに4 °Cで10分間で再懸濁した。次いで、50 µlの、抗CD4-V450 (クローンRM4-5、1/50希釈した) 及び抗CD8-PerCp-Cy5.5 (クロー

50

ーン53-6.7、1/50希釈した)抗体並びにLIVE/DEAD(登録商標)Pacific Orange(Life Technologies、diluted 1/500)を含有するフローバッファを、4 で30分間添加した。細胞を遠心分離し(4 で189gで5分間)、200 μ lのフローバッファを用いて洗浄した。

【0239】

白血球を固定し、200 μ lのCytotfix/Cytoperm溶液(Becton Dickinson市販バッファ)を添加することによって4 で20分間透過処理した。細胞を遠心分離し(4 で189g、5分間)、200 μ lのPerm/Washバッファ(蒸留水で1:10希釈したBecton Dickinson市販バッファ)を用いて洗浄した。さらなる遠心分離ステップ後、50 μ lのPerm/Washバッファ中で抗IL2-FITC(クローンJES6-5H4、1/400希釈した)、抗IFN γ -APC(クローンXMG1.2、1/200希釈した)及び抗TNF α -PE(クローンMP6-XT22、1/700希釈した)抗体を用いて、4 で1時間細胞を染色した。細胞を、Perm/Washバッファを用いて2回洗浄し、220 μ lのPBSに再懸濁した。染色された細胞を、LSRII及びFlowJoソフトウェアを使用するフローサイトメトリーによって解析した。

【0240】

結果

図1及び2(それぞれ、M72-ChAd3及びM72-ChAd63構築物についてのCD4T細胞応答)並びに図3及び4(それぞれ、M72-ChAd3及びM72-ChAd63構築物についてのCD8T細胞応答)に示されるように、マウスあたり 1×10^8 個のウイルス粒子の用量が、M72-ChAd3及びM72-ChAd63両構築物について14PIの時点で最高レベルのM72特異的応答を誘導した。

【0241】

[実施例3]

感染力に対するアデノウイルス及びアジュバント共製剤化の影響の調査

組換えeGFP-ChAd3又はeGFP-ChAd63を用いて共製剤化の影響を評価した。これらのChAd3及びChAd63は、それぞれのChAdenovirus骨格(E1-E4が欠失されたChAd3及びE1-E3-E4が欠失されたChAd63)においてM72導入遺伝子の代わりに緑色蛍光タンパク質を発現するように構築された対照である。AS01E(TLR4アゴニスト3D-MPL及びサポニンQS21のリボソーム製剤)を用いる共製剤化を、HeLa細胞に基づく感染力アッセイを介して評価した。

【0242】

材料及び方法

感染力試験

HeLa細胞を対数増殖に成長させ、24時間播種し、その後感染させた。HeLa細胞は、継代P45からP65の間に使用した(Molbiol;GSK Rix)。

【0243】

0日目:細胞回収

培地をフラスコから除去し、DPBSを用いて細胞を注意深くすすいで、残存する細胞培地を除去した。細胞上に5mlのトリプシン-EDTAを添加し、続いて、細胞層が剥離し、分散されるまで倒立顕微鏡下で細胞を観察した(2~4分)。細胞懸濁液を穏やかにピペットで上下させ、Falconチューブ中に移し、1200rpmで5~10分間、室温で遠心分離した。細胞ペレットを適当な容量に再懸濁し、カウントした。細胞を 1.5×10^4 個細胞/ウェルで96ウェルプレート中に播種した(HeLa細胞は、感染の当日に 3×10^4 個細胞/ウェルであると予測される)。

【0244】

1日目:感染日

HeLa細胞を観察し、50%~80%コンフルエントの間であった。細胞から全培地を除去した。組換えeGFP-ChAd3及びeGFP-ChAd63ストックを、80 μ lの完全ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中、 5×10^7 vp/mlの最終力価に希釈した。この容量は、1ウェルに対してである。各ウェル中に80 μ lの各サンプルを添加して感染させた(これは、2連で行う)。完全DMEM中にバッファを単独で有する製剤を用いる非感染HeLa細胞の陰性対照を使用して、アジュバントバッファによるアデノ感染力に対する任意の負の影響を測定した。eGFP-ChAd3を用いて感染したHeLa細胞の正の感染対照(同一感染条件)を同一条件で処理した。

37℃、5% CO₂で3時間後、120 µlの完全DMEMを添加し、次いで、37℃、5% CO₂でおよそ24時間培養した。

【0245】

2日目：回収及びFACS読み取り

96ウェルプレート中の細胞上清を回収した。40 µlのトリプシン/EDTAを用いてHeLa細胞をすすぎ、次いで、さらなる40 µlのトリプシン/EDTAミックスとともにインキュベートした。細胞がプレートから剥離している時点で、各ウェルを穏やかに洗い流してすべての細胞を回収した。次いで、96ウェルプレートを1200rpmで10分間遠心分離した。上清を廃棄した。細胞を200 µlのDPBS中に懸濁し、それらに対してFACS獲得が行われるまで4℃で維持した（LSRII Beckman Dickinson）。

10

【0246】

結果

【表2】

試験群	説明	%GFP			生存率 %(平均)
		A	B	平均	
1	DMEM 対照	0	0	0	89.14
2	AS01E	0	0	0	91.20
3	AS01E + eGFP-ChAd3	81.9	84.79	83.35	89.01
4	AS01E + eGFP-ChAd63	70.43	73.28	71.86	88.95
5	AS バッファー+ eGFP-ChAd3	86.4	86.93	86.67	88.57
6	AS バッファー+ eGFP-ChAd63	69.59	71.38	70.49	87.49
7	eGFP-ChAd3	78.78	81.29	80.04	90.96
8	eGFP-ChAd63	51.43	53.46	52.45	90.41

20

ASバッファー:pH8.0、10mM PO₄、5mM NaCl、4.7%ソルビトール

ChAd3バッファー:pH7.4、10mM TRIS、10mMヒスチジン、5%スクロース、75mM

NaCl、1mM MgCl₂、0.02%ポリソルベート80、0.1mM EDTA、0.5%(v/v)エタノール

ChAd63 バッファー:pH6.6、10mM ヒスチジン、7.5%スクロース、35mM NaCl、1mM

MgCl₂、0.1%ポリソルベート 80、0.1mM EDTA、0.5%(v/v)エタノール

30

【0247】

データは、ChAd-GFPウイルスによって感染した細胞数と相関する、GFPを発現する細胞のパーセンテージとして表されている。すべての条件について、細胞生存率が記録されている。これは、結論を惑わせ得る、あらゆるあり得る細胞毒性を評価するために行った。幸運にも、すべての条件を通じて細胞生存力は許容され、同等であったので、これは当てはまらなかった。

【0248】

データによれば、ChAd3-又はChAd63-GFPのいずれかに対するASの負の影響は観察されない。AS01Eとともに共製剤化されたChAd3-GFPベクターは、その感染力を維持し、それは、ChAd3-GFP単独と同等であった。

40

【0249】

ChAd63-GFPについて同一知見が得られた。後者の場合には、アデノウイルスが希釈された使用されたバッファーによるものであり得る、感染力の増大がさらに観察された。

【0250】

[実施例4]

QS21クエンチングに対するアデノウイルス及びアジュバント共製剤化の影響の調査

この研究の目的は、QS21の解毒作用を調べることであった。

【0251】

【表 3】

特性決定

群	説明	視 覚 的 側 面	H(ス テ ィ ッ ク)	浸透圧 (mosm/kg)
1	AS01E	乳白色	5.5-6	291
2	AS01E 中、 2.10×10^9 の eGFP-ChAd3	わずかに乳白色	5-5.5	289
3	AS01E 中、 2.10×10^9 の eGFP-ChAd63	わずかに乳白色	5-5.5	297
4	AS01E バッファー中、 2.10×10^9 の eGFP-ChAd3	透明	5-5.5	292
5	AS01E バッファー中、 2.10×10^9 の eGFP-ChAd63	透明	5-5.5	304
6	2.10×10^9 の eGFP-ChAd3	透明	7	425
7	2.10×10^9 の eGFP-ChAd63	透明	6-6.5	408

10

【0252】

アジュバント又はアジュバントバッファーを含有する製剤化されたサンプルは、浸透圧 285mOsm/kgを有する。pHは、指示スティックでとった。

【0253】

赤血球の洗浄

赤血球 (10ml) を、4 で1600rpm (550g) で10分間遠心分離し、上清を除去した。元の容量と同等の容量 (±10ml) のバッファーDPBSを用いて赤血球を穏やかに再懸濁した。上清が透明である (赤みがあった染色は消失したが、上清は決して完全に透明にはならなかった) まで操作を反復した (最小2~3回)、洗浄後、最後の上清を除去した。直接使用されない場合には、ペレットを4 で最大3~4日間保存するか (使用される当日に再度洗浄した)、又は同日に使用される場合にはバッファーでおよそ10倍希釈した。

20

【0254】

赤血球の事前希釈

赤血球の種々の事前希釈を実施した。1.5から2の間のOD値 (540nm) を有する100%の溶解が到達される事前希釈を選択した。

【0255】

溶血チューブ中で以下の希釈物を調製した。

30

【0256】

【表 4】

希釈	赤血球	dPBS
1/10	100 ul	900 ul
1/12.5	100 ul	1150 ul
1/15	100 ul	1400 ul

【0257】

赤血球を、4 で1600rpm (550g) で10分間遠心分離した (10ml) 。100 µl の事前希釈物を除去し、900 µl のWFIと混合し、2000rpm (900g) で5分間遠心分離した。分光法のために上清をキュベット中に移し、540nmでODを測定した。選択された希釈は1.5から2の間のODを示した。

40

【0258】

QS21標準曲線調製

PO₄/ソルビトールバッファーで20 µg/mlに即時希釈したQS21作業溶液 (2mg/mlの) からQS21の標準曲線を作製した。

【0259】

限界試験によって溶解活性の決定を実施した。

50

1. ODにつながるQS21の最低濃度として検出の限界（LOD）を定義した：

- 基礎レベルより高い（OD>0.1）
- ODのバッファー（「0 μg」QS21）よりもおよそ3倍高い
- 曲線の上昇部分中
- 各試験について決定された。

【0260】

2. アジュバントサンプルのODがOD_{LOD}より高かった場合には、QS21溶解活性は、アジュバントサンプル中で陽性であるように維持した。

【0261】

例としてのQS21曲線

10

【表5】

サンプル	QS21 (ug)	O.D. サンプル	O.D. バッファー	Δ (O.D. サンプル - O.D. バッ ファー)	*合格/不合格
AS01E	45	0.151	0.122	0.029	合格
AS01E 中の ChAd3	45	0.148	0.122	0.026	合格
AS01E 中の ChAd63	45	0.143	0.122	0.021	合格

20

*合格: Δ(O.D. サンプル - O.D. バッファー) < 当日の LOD(O.D.) 試験の場合

*不合格: Δ(O.D. サンプル - O.D. バッファー) > 当日の LOD(O.D.) 試験の場合

【0262】

結論

AS01EとともにeGFP-ChAd3及びeGFP-ChAd63を別個に製剤化する場合には、アジュバントの大きさは、製剤化後に変更されないままである。さらに、赤血球溶解試験によって見られるように、製剤化後に遊離QS21がない。

【0263】

30

[実施例5]

M72投与量レジメン

同種（ChAd/ChAd）及び異種（タンパク質/ChAd又はChAd/タンパク質）プライミング-ブーストワクチン接種戦略の両方、並びに混合された又は共投与で与えられるM72/AS01Eとの併用で、評価することによる、結核ワクチンとの関連でのM72を発現する非複製的チンパンジーアデノベクターの適用の評価。

【0264】

材料及び方法

動物モデル

雌のマウスCB6F1/01aHsd-6週齢-群あたり12匹のマウスに、以下の表に示されるように0 ~ 28日目に50 μlを用いて筋肉内経路によって注射した。

40

【0265】

【表 6】

群	0 日目投与			28 日目投与		
	抗原	用量	溶液	抗原	用量	溶液
ベンチマーク						
1	M72/AS01E	1ug	AS バッファ ー	M72/AS01E	1ug	AS バッファ ー
プライミング:アデノ/ブースト:タンパク質						
2	M72-ChAd3	10 ⁸ vp	ChAd3 バッ ファー	M72/AS01E	1ug	AS バッファ ー
3	M72-ChAd63	10 ⁸ vp	ChAd63 バッ ファー			
4	eGFP-ChAd3	10 ⁸ vp	ChAd3 バッ ファー			
プライミング:タンパク質/ブースト:アデノ						
5	M72/AS01E	1ug	AS バッファ ー	M72-ChAd3	10 ⁸ vp	ChAd3 バッファ ー
6		1ug	AS バッファ ー	M72-ChAd63	10 ⁸ vp	ChAd63 バッ ファー
プライミング:アデノ+AS/ブースト:アデノ+AS						
7	M72-ChAd3 /AS01E	10 ⁸ vp	AS バッファ ー	M72-ChAd3 /AS01E	10 ⁸ vp	AS バッファ ー
プライミング:アデノ/ブースト:アデノ						
8	M72-ChAd3	10 ⁸ vp	ChAd3 バッ ファー	M72-ChAd3	10 ⁸ vp	ChAd3 バッファ ー
9	M72-ChAd3	10 ⁸ vp	ChAd3 バッ ファー	M72-ChAd63	10 ⁸ vp	ChAd63 バッ ファー
10	M72-ChAd63	10 ⁸ vp	ChAd63 バッ ファー	M72-ChAd3	10 ⁸ vp	ChAd3 バッファ ー
コンボプライミング及びブースト:アデノ+タンパク質						
11	M72/AS01E M72-ChAd3 コンボ	1ug 10 ⁸ vp	AS バッファ ー	M72/AS01E M72-ChAd3 コンボ	1ug 10 ⁸ vp	AS バッファ ー
12	M72/AS01E 同時投与 M72-ChAd3	1ug 10 ⁸ vp	AS バッファ ー(アジュバ ント添加され るタンパク 質)及び ChAd3 バッ ファー(アデ ノ)	M72/AS01E 同時投与 M72-ChAd3	1ug 10 ⁸ vp	AS バッファ ー(アジュバ ント添加され るタンバ ク質)及び ChAd3 バッファ ー(アデノ)
13	M72/AS01E eGFPChAd3 コンボ	1ug 10 ⁸ vp	AS バッファ ー	M72/AS01E eGFPChAd3 コンボ	1ug 10 ⁸ vp	AS バッファ ー

AS バッファー:およそ pH8.0、10mM PO₄、5mM NaCl、4.7%ソルビトール

ChAd3 バッファー:pH7.4、10mM TRIS、10mM ヒスチジン、5%スクロース、75mM NaCl、1mM MgCl₂、0.02%ポリソルベート 80、0.1mM EDTA、0.5%(v/v)エタノール

ChAd63 バッファー:pH6.6、10mM ヒスチジン、7.5%スクロース、35mM NaCl、1mM MgCl₂、0.1%ポリソルベート 80、0.1mM EDTA、0.5%(v/v)エタノール

【表 7】

流体	試験	採取の時点	所見
全血	ICS	D14(14PI)	重複する 15 マーのペプチドプールを用いる再刺激後の IFN γ 、IL-2、TNF- α の同時測定によって決定されるような、TB 抗原特異的 CD4 及び CD8 細胞の末梢全血応答の評価
全血/肺	ICS	D42(14PII)*	重複する 15 マーのペプチドプールを用いる再刺激後の IFN γ 、IL-2、TNF- α 、IL-17 の同時測定によって決定されるような、TB 抗原特異的 CD4 及び CD8 細胞の末梢全血及び肺応答の評価
血清	血清学 抗 M72 IgTot	D41(13PII)**	

*1 日あたり +/-36 の肺収集物の限界、従って、研究は数回の反復で実施した

**実施上の制約のために、血清サンプルは全血の 1 日前に採取した

【0267】

十分な容量を有するためには、群の3匹のマウスの4プールの全血を、14日目及び42日目に採取した。42日目に、肺に同一プロセスを適用した。

【0268】

1日あたりの採取の制限のために、群あたり4プールを有するために、4日間、1日あたり各群の1プールを処理した。個々の血清を41日目に採取した。

【0269】

読み取り ICS 及び血清学の両方について PI 及び PII の間の連結を行うためにマウスを同定した。

【0270】

細胞性免疫応答-細胞内サイトカイン染色 (ICS)全血からの白血球単離

各時点で、各マウスから血液を採取し、その後プールした (3匹のマウスの4プール)。血液を、ヘパリン (1/10) を含有する、RPMI / 添加剤 (グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸及び2-メルカプトエタノールを補給した RPMI1640) を含有するチューブ中に採取した。全血に10容量の溶解バッファーを添加し、チューブを室温 (RT) で10分間インキュベートした。遠心分離 (335g、室温で10分) 後、ペレットを RPMI / 添加剤中に回収し、濾過した (セルストレーナー 100 μ m)。細胞を再度ペレットにし (335g、室温で10分)、完全培地 (グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸及び2-メルカプトエタノール及び5% 熱不活化ウシ胎児血清を補給した RPMI1640) に再懸濁した。

【0271】

肺からの白血球単離

肺を RPMI / 添加剤 (グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸及び2-メルカプトエタノールを補給した RPMI1640) を含有するチューブ中に採取した。サンプルを、ペトリディッシュに移し、検体を小片 (およそ 5 × 5mm) に切断した。試料を、10ml の予め加温した、Liberase (0.0625UI/ml=50 μ l) + DNアーゼ (25 μ g=25 μ l) を含有する完全培地を含有する gentleMACS Cチューブ (violet) 中に再懸濁した。Cチューブを穏やかな MACS Dissociator のスリーブ中に逆さまに取り付け、プログラムマウス-肺02 (40秒) を実施した。プログラムの最後に、Cチューブを取り外し、Cチューブを振盪インキュベーター中、37 ° で30分間インキュベートした。インキュベーション後、サンプルを、50ml のファルコンチューブ上に設置したセルストレーナー (100 μ m) 上に移した。セルストレーナーを、5ml の完全培地 (グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸及び2-メルカプトエタノール及び5% 熱不活化ウシ胎児血清を補給した RPMI1640) を用いて2回すすいだ。完全培地を45mlまで

10

20

30

40

50

添加した。細胞を遠心分離し（400g、-4℃で10分間）、上清を吸引し、次いで、10mlの完全培地中に細胞を再懸濁した。この洗浄ステップを反復した。2回目の洗浄後、細胞を3mlのPercoll P30中に再懸濁した。細胞を含有するPercoll P30層を、Percoll P40/P75層勾配の頂部に配置した。細胞を、室温で754gで20分間遠心分離した。考慮される細胞は、遠心分離の最後にP40とP75の間の相間にあった（低い方の相間）。P30層を吸引し、相間P40-P75で細胞を回収した。細胞を15mlのチューブ中に採取し、完全培地を15mlの最終容量に添加した。細胞を遠心分離した（900g、-4℃で10分）。上清を吸引し、細胞を、15mlの完全培地を用いて2回洗浄した。ペレットを、完全培地を用いて250 μ lの容量最終に再懸濁した。細胞を、PIを用いる生存率を含むMacsqant法を用いてカウントした。

【0272】

10

新鮮白血球のin vitro刺激

白血球を、ウェルあたりおよそ100万個細胞で丸底96ウェルプレート中にプレーティングした。次いで、白血球を、1 μ g/mlのM72配列を対象とするペプチドとともに、又は伴わずに、抗CD28（クローン37.51）及び抗CD49d（クローン9C10）を1 μ g/mlで用いて6時間（37℃、5% CO₂）刺激した。2時間の刺激後、完全培地（最終希釈1/1000）で希釈したプレフェルジンAを含有するBD GolgiPlug（商標）を、さらに4時間添加した。次いで、プレートを4℃で一晩トランスファーした。

【0273】

14PI-WBLOでのICS IFN γ 、IL-2、TNF- α

細胞を染色し、5色ICSアッセイを使用して解析した。

20

【0274】

細胞を、V底96ウェルプレートに移し、200 μ lのフローバッファ（PBS 1 \times 、1% FCS）を用いて洗浄した後4℃で189gで5分間遠心分離し、細胞を、50 μ lの、1/50希釈した抗CD16/32（クローン2.4G2）を含有するフローバッファに、4℃で10分間再懸濁した。次いで、50 μ lの、抗CD4-V450（1/50希釈したクローンRM4-5）及び抗CD8-PerCp-Cy5.5（1/50希釈したクローン53-6.7）抗体並びにLive&Dead PO（1/500希釈した）を含有するフローバッファを、4℃で30分間添加した。細胞を遠心分離し（189g、4℃で5分間）、200 μ lのフローバッファを用いて洗浄した。

【0275】

白血球を固定し、200 μ lのCytotfix/Cytoperm溶液（Becton Dickinson市販バッファ）を添加することによって4℃で20分間透過処理した。細胞を遠心分離し（4℃で189g、5分間）、200 μ lのPerm/Washバッファ（蒸留水で1:10希釈したBecton Dickinson市販バッファ）を用いて洗浄した。さらなる遠心分離ステップ後、50 μ lのPerm/Washバッファ中で抗IL2-FITC（クローンJES6-5H4、1/400希釈した）、抗IFN γ -APC（クローンXMG1.2、1/200希釈した）及び抗TNF α -PE（クローンMP6-XT22、1/700希釈した）抗体を用いて、4℃で1時間細胞を染色した。細胞を、Perm/Washバッファを用いて2回洗浄し、220 μ lのPBSに再懸濁した。染色された細胞を、LSRII及びFlowJoソフトウェアを使用するフローサイトメトリーによって解析した。

30

【0276】

14PII-WBLO及び肺でのICS IFN γ 、IL-2、TNF- α 及びIL-17

40

ステップサイトカインを除いて同一プロトコールを使用した、50 μ lのPerm/Washバッファ中で抗IL2-FITC（クローンJES6-5H4、1/400希釈した）、抗IFN γ -APC（クローンXMG1.2、1/200希釈した）及び抗TNF α -PE（クローンMP6-XT22、1/700希釈した）、抗IL17 BV786（クローンTC11-18H10、1/50希釈した）抗体を用いて、4℃で1時間細胞を染色した。

【0277】

体液性応答- Elisaによる抗M72 Ig tot血清学

96ウェルElisaプレートを、PBS中、0.25 μ g/mlの組換え抗原M72を用いてコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。Post IIでワクチン処理されたマウスから得た血清を、反復のためにPBS（0.2%）-BSAで1/5000又は1/40000で希釈し、次いで、ウェル1~12で2倍の段階希釈を実施し、インキュベートした。標準及び対照材料の段階希釈を使用して

50

、試験した血清の抗M72抗体標準力価を算出し、試験の妥当性を確実にした。各インキュベーションステップ後に、プレートをPBS 0.1% tween20バッファーを用いて洗浄した。次いで、マウスIgに特異的なビオチン化ヤギ抗体を添加し、抗原-抗体複合体は、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体及びペルオキシダーゼ基質オルト-フェニレンジアミンジヒドロクロリド/H₂O₂ とともにインキュベーションによって示される。490-620nmの光学密度 (O.D.) を記録した。各個々のマウス血清の抗M72抗体力価を、回帰モデルを使用してELISAの標準曲線から決定し、ELISA単位 (EU) /mlで表す。次いで、マウスの各群の幾何平均力価 (GMT) を算出する。

【0278】

結果

T細胞応答

A.M72特異的CD4 T及びCD8T細胞応答

結核ワクチンとの関連でのM72を発現する非複製的チンパンジーアデノベクターの適用を評価するために、同種 (ChAd/ChAd) 及び異種 (タンパク質/ChAd又はChAd/タンパク質) プライミング-ブーストワクチン接種戦略の両方、並びに混合された又は共投与で与えられるM72/AS01Eとの併用で評価した。D0~D28スケジュールでプライミング/ブースト及びコンボ戦略を評価した。14PI及び14PIIで全血を採取して、M72特異的CD4及びCD8T細胞の全身誘導を評価した。

【0279】

すべての群にわたって、全血において特異的CD4T細胞応答が観察され、ピーク応答は、3%未満であった (図5及び6)。異種 (タンパク質/ChAd又はChAd/タンパク質) ワクチン戦略を用いて、全血において最高レベルのM72特異的CD4T細胞が見られた (図5)。M72-ChAdベクターを用いてマウスをプライミングすること及びM72/AS01Eを用いてブーストすることによって、その逆よりも高いレベルのM72特異的CD4T細胞が誘導され、両方の場合において、M72-ChAd3がM72-ChAd63よりも強力であった (図5)。M72-ChAdベクター、同種 (M72-ChAd3/M72-ChAd3) +/-AS01E又は異種 (M72-ChAd3/M72-ChAd63又はM72-ChAd63/M72-ChAd3) のいずれかを用いるプライミング-ブーストワクチン接種は、M72/AS01Eベンチマークと比較してCD4T細胞応答の大きさの点で付加価値を提供しなかった (図6)。M72-ChAd3及びM72/AS01E両方を組み合わせることは、M72/AS01Eベンチマークと比較して、より高いレベルのM72特異的CD4T細胞をわずかに誘導したが、異種 (タンパク質/ChAd又はChAd/タンパク質) プライミング-ブーストワクチン接種よりも低かった。共投与は、組合せと同様のM72特異的CD4T細胞レベルを誘導し、これは、物理的近接は必要ではないことを示唆した (図6)。

【0280】

M72特異的CD8T細胞のレベルは、プライミング、ブーストのいずれか又は両方としてM72-ChAdベクターを投与されているマウスにおいて高度に増大されるとわかった。プライミングの際にM72-ChAdベクターが含まれる場合には、M72特異的CD8T細胞のレベルは、M72-ChAd63を用いてプライミングされ、M72-ChAd3を用いてブーストされたマウスの場合を除いてブースト後にさらに増大しなかった (図7及び8)。これはまた、M72-ChAd3は、M72-ChAd63よりも強力であることを示唆する。M72/AS01EプライミングをM72-ChAd3を用いてブーストすることは、M72-ChAd63 (中央値=17%) を用いる場合よりも高いレベルのCD8T細胞 (中央値=30%) を誘導した。コンボにおけるアジュバント添加されたM72タンパク質へのM72-ChAd3の添加も、現在のベンチマーク (中央値=0.2%) と比較してM72特異的CD8T細胞のレベルを高度に増大した (中央値=13%)。

【0281】

混合された組合せワクチン戦略を除いて、全血 (図5及び6) と比較して、肺 (図9) において同一の応答の全体的なパターンが観察された。肺では、組合せ戦略は、全血よりも低いレベルの応答を誘導し、それによって、組合せワクチンを用いた場合、及び異種 (タンパク質/ChAd又はChAd/タンパク質) プライミング-ブーストワクチン接種を用いた場合と同等のレベルのM72特異的CD4T細胞が観察され得、それらのすべては、現在のベンチマ

10

20

30

40

50

ークと比較して増大したCD4T細胞レベルを示した。

【0282】

肺（図10）におけるM72特異的CD8T細胞応答の全体的なパターンもまた、全血において観察されたもの（図7及び8）を反映した。マウスがベンチマークM72/AS01Eを投与された場合には、極めて低いレベルの特異的CD8T細胞応答が観察され（図10）、M72-ChAdベクターの添加は、CD8T細胞のレベルを高度に改善した。M72/AS01Eを用いてプライミングされ、M72-ChAd3を用いてブーストされたマウスの場合に最高レベルのM72特異的CD8T細胞が見られた（中央値=36% - 図10）。

【0283】

B. M72特異的CD4及びCD8T細胞応答のサイトカインプロファイル

M72/AS01Eを用いてプライミングされた群では、M72特異的CD4+T細胞応答は、14PIで全血において、大部分は二重（IL-2/TNFα）分泌細胞を誘導した（図11及び12）。対照的に、M72-ChAdベクターを用いてプライミングすることは、多機能性M72特異的CD4T細胞応答を誘導し、大多数は、三重陽性（IL2/IFNγ/TNFα）であり、より少ない程度で、二重（IFNγ/TNFα）及び単一（IFNγのみ）を産生するCD4T細胞を有していた（図11及び12）。タンパク質及びChAdベクターの両方を組み合わせることは、低レベルの三重（IL2/IFNγ/TNFα）及び二重（IFNγ/TNFα）生成CD4T細胞を誘導した（図11及び12）。

【0284】

ワクチン接種戦略がM72-ChAdベクターを含んでいたすべての群にわたって、全血において（図13及び14）及び肺において（図15及び16）14PIIで同様のCD4+T細胞サイトカイン発現プロファイルが観察された。M72特異的CD4+T細胞応答は、主に三重（IL2/IFNγ/TNFα）及び二重（IFNγ/TNFα）陽性細胞を含んでいた。ベンチマークとの比較では、M72-ChAdベクターの存在下で低減したレベルのIL2/TNFα及び増大したレベルのIFNγ/TNFα分泌細胞が観察された。全血において、及び肺において14dPIIで、IL-17分泌も評価した。しかし、すべての条件にわたって、検出されたレベルは極めて低かった。

【0285】

14PIでの（図17及び18）、14PIIでの（図19及び20）全血において、並びに14PIIでの（図21及び22）肺においてすべての陽性群にわたって同様のM72特異的CD8T細胞サイトカインプロファイルが観察された。M72特異的CD8T細胞応答は、大部分は二重（IFNγ/TNFα）及び単一（IFNγのみ）を産生するCD8T細胞から構成されていた。低レベルのIL2/IFNγ/TNFα及び極めて低レベルのTNFα産生CD8+T細胞も検出された。

【0286】

総合すると、ワクチン接種戦略は、M72特異的CD8T細胞のサイトカインプロファイルに著しい影響を及ぼさなかった。

【0287】

抗体応答

A. 抗M72 Ig tot血清学

図23に示されるように、抗M72 Ig Tot血清学は、すべての群にわたって高度に可変であり、共投与において与えられた組み合わせられたアプローチにおいてを除いて、すべてのワクチン接種戦略を用いて非応答者が観察された。T細胞応答に関しては、M72-ChAd63が使用される場合には非応答性動物の数が増大するので、免疫応答の誘導においてM72-ChAd3は、M72-ChAd63よりも強力であると思われる。

【0288】

本明細書及び以下の特許請求の範囲を通じて、文脈が別のものを必要としない限り、語句「含む（comprise）」及び「含む（comprises）」及び「含んでいる（comprising）」などの変動は、示された整数、ステップ、整数の群又はステップの群を含むことを意味するが、任意のその他の整数、ステップ、整数の群又はステップの群の排除を意味しないと理解されよう。

【0289】

特許及び特許出願を含む本明細書において言及されるすべての文書は、参照によりその

10

20

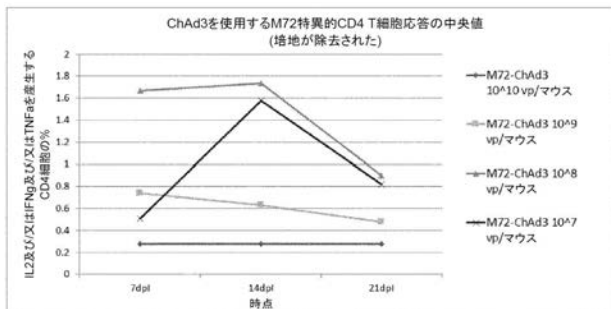
30

40

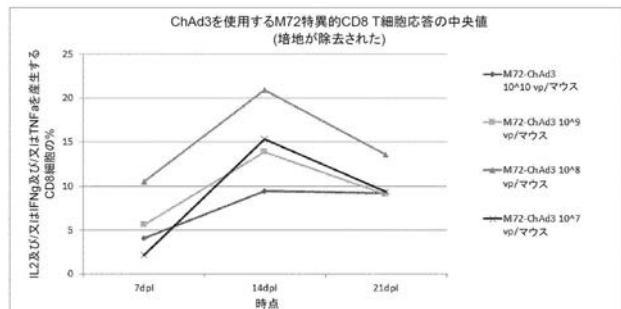
50

全文が組み込まれる。

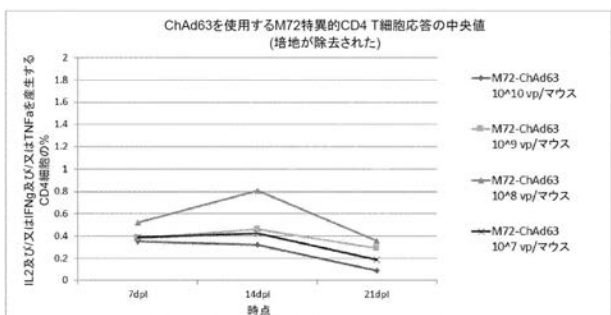
【 図 1 】



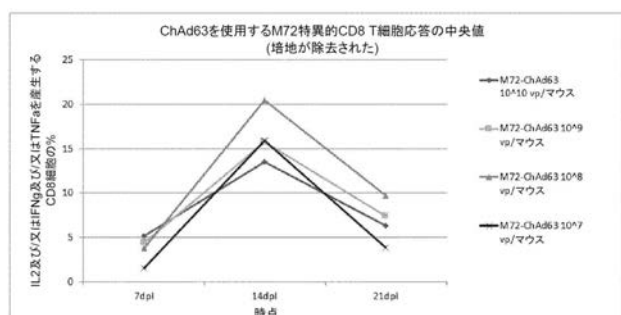
【 図 3 】



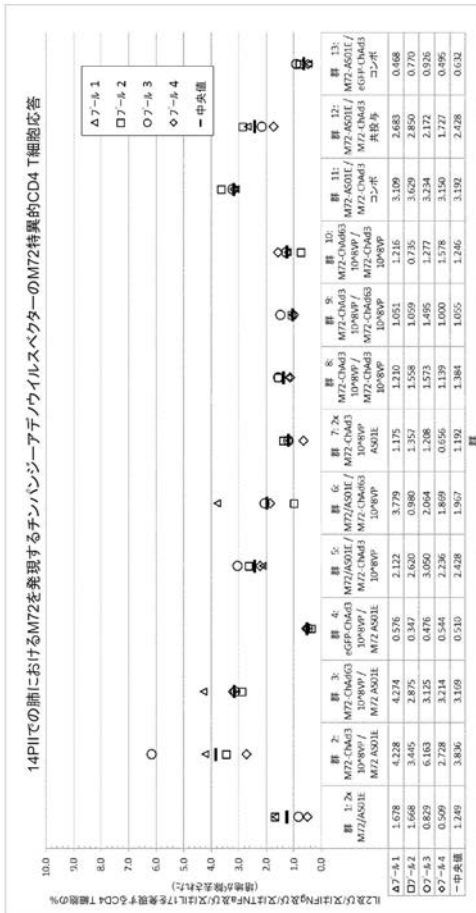
【 図 2 】



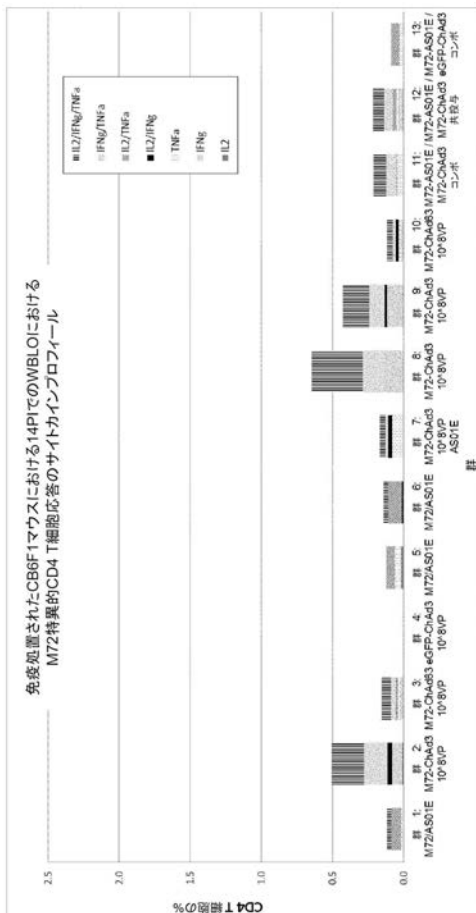
【 図 4 】



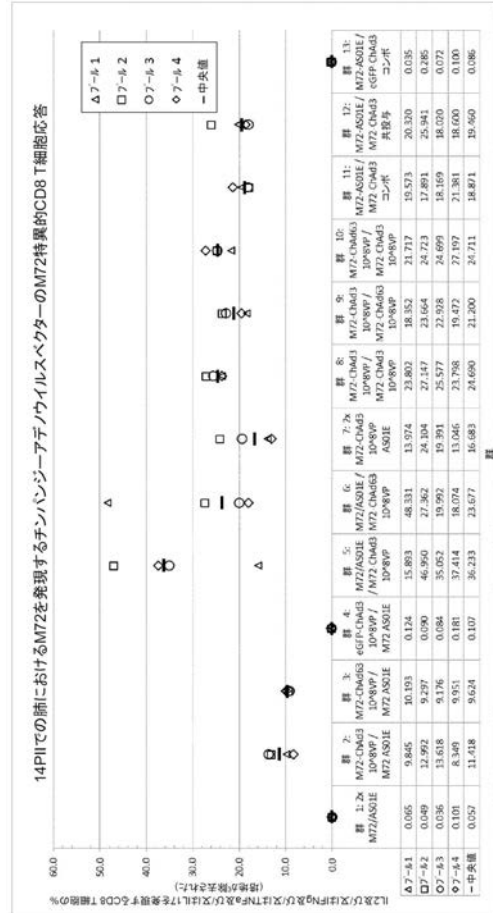
【図 9】



【図 1 1】



【図 1 0】

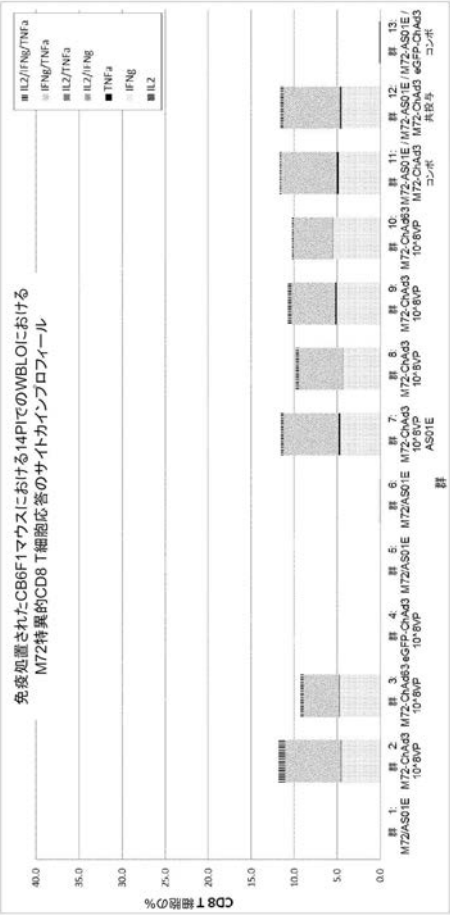


【図 1 2】

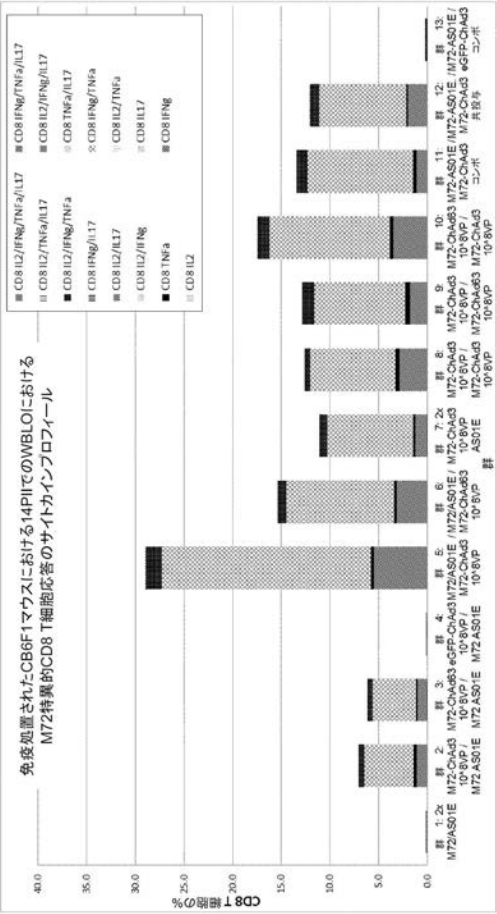
サイトカインを発現するCD4 T細胞の%(14PIIでのWBLO)

	IL2	IFNγ	TNFα	IL2/IFNγ	IFNγ/TNFα	IL2/TNFα	IL2/IFNγ/TNFα
群 1	0.000	0.000	0.018	0.000	0.072	0.000	0.029
群 2	0.011	0.071	0.000	0.032	0.000	0.166	0.225
群 3	0.000	0.025	0.017	0.006	0.006	0.035	0.064
群 4	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000
群 5	0.016	0.000	0.048	0.000	0.056	0.000	0.000
群 6	0.000	0.000	0.013	0.000	0.095	0.000	0.034
群 7	0.000	0.002	0.079	0.026	0.000	0.020	0.041
群 8	0.000	0.137	0.002	0.000	0.000	0.148	0.362
群 9	0.000	0.116	0.000	0.018	0.000	0.106	0.190
群 10	0.000	0.027	0.007	0.023	0.000	0.018	0.042
群 11	0.000	0.000	0.043	0.000	0.008	0.072	0.091
群 12	0.006	0.032	0.012	0.000	0.027	0.060	0.081
群 13	0.000	0.000	0.030	0.000	0.059	0.000	0.000

【図 17】



【図 19】



【図 18】

サイトカインを発現するCD8 T細胞の%(14PIでの全血)

	IL2	IFNγ	TNFα	IL2/IFNγ	IL2/TNFα	IFNγ/TNFα	IL2/IFNγ/TNFα
群 1	0.000	0.009	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000
群 2	0.005	4.528	0.046	0.047	0.000	6.451	0.749
群 3	0.000	4.744	0.041	0.022	0.000	4.155	0.293
群 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 5	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 6	0.000	0.021	0.009	0.000	0.000	0.019	0.000
群 7	0.000	4.694	0.141	0.000	0.000	6.410	0.321
群 8	0.000	4.352	0.000	0.038	0.000	5.090	0.410
群 9	0.000	5.046	0.180	0.017	0.000	5.064	0.510
群 10	0.000	5.515	0.050	0.009	0.000	4.455	0.234
群 11	0.000	4.850	0.233	0.000	0.000	6.440	0.182
群 12	0.000	4.547	0.118	0.035	0.000	6.545	0.385
群 13	0.000	0.000	0.102	0.000	0.000	0.000	0.000

【図 20】

サイトカインを発現するCD8 T細胞の%(14PIでの全血)

	CD8 IL2	CD8 IFNγ	CD8 TNFα	CD8 IL2/IFNγ	CD8 IL2/TNFα	CD8 IFNγ/TNFα	CD8 IL2/IFNγ/TNFα	CD8 IL2/IFNγ/IL17	CD8 IL2/TNFα/IL17	CD8 IFNγ/IL17	CD8 TNFα/IL17	CD8 IL2/IFNγ/IL17/TNFα
群 1	0.022	0.000	0.073	0.000	0.013	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 2	0.000	1.033	0.358	0.031	0.011	0.014	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 3	0.035	0.939	0.207	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 4	0.009	0.019	0.010	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 5	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 6	0.009	3.145	0.208	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 7	0.023	1.196	0.271	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 8	0.019	2.830	0.401	0.000	0.017	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000
群 9	0.000	1.771	0.522	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 10	0.014	3.514	0.346	0.009	0.039	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 11	0.000	1.141	0.318	0.010	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
群 12	0.000	1.965	0.204	0.000	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000
群 13	0.000	0.019	0.148	0.018	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2018524393000001 . app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/067622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/04 C12N7/00 C12N15/861 C07K14/075
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/071093 A2 (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; CIRILLO AGOSTINO [IT]; COLLOCA STE) 4 August 2005 (2005-08-04) claim 7; sequences 1,83,116,122 -----	1-90
Y	WO 2006/133911 A2 (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; LAHM ARMIN [IT]; COLLOCA STEFANO [IT]) 21 December 2006 (2006-12-21) claims 1-50; examples 1,2,3; tables 1-3; sequences 2,5-7,14 -----	1-90
Y	WO 2013/123579 A1 (UNIV MCMASTER [CA]) 29 August 2013 (2013-08-29) the whole document ----- -/--	1-90

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 October 2016

Date of mailing of the international search report

08/11/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Renggli-Zulliger, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/067622

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/130627 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; OKAIROS AG [IT]; SULLIVAN NANCY J [US] 20 October 2011 (2011-10-20) abstract; examples 4,5,6 -----	1-90
Y	COLLOCA STEFANO ET AL: "Vaccine Vectors Derived from a Large Collection of Simian Adenoviruses Induce Potent Cellular Immunity Across Multiple Species", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, vol. 4, no. 115, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 47-55, XP009166675, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3002925 the whole document -----	1-90
Y	NEHA DALMIA ET AL: "Prime-boost approaches to tuberculosis vaccine development", EXPERT REVIEW OF VACCINES, vol. 11, no. 10, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 1221-1233, XP055309819, GB ISSN: 1476-0584, DOI: 10.1586/erv.12.94 the whole document -----	1-90
Y	WO 2006/033672 A2 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; WILSON JAMES M [US]; ZHI YAN [US]) 30 March 2006 (2006-03-30) the whole document -----	1-90
Y	WO 03/070187 A2 (CORIXA CORP [US]; SKEIKY YASIR [US]; GUDERIAN JEFF [US]; REED STEVEN [] 28 August 2003 (2003-08-28) the whole document -----	1-90
Y	WO 2006/117240 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; INFECTIOUS DISEASE RES INST ID [US]; C) 9 November 2006 (2006-11-09) the whole document -----	1-90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/067622

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005071093 A2	04-08-2005	AT 449105 T AU 2005206292 A1 AU 2011247884 A1 CA 2553541 A1 CA 2880060 A1 CA 2880061 A1 CN 101014613 A CN 102719478 A CY 1109841 T1 DK 1711518 T3 EP 1711518 A2 EP 2163260 A2 ES 2337374 T3 JP 4814800 B2 JP 5427874 B2 JP 5753377 B2 JP 2007518414 A JP 2011120588 A JP 2012110326 A JP 2014158467 A PT 1711518 E SI 1711518 T1 US 2011217332 A1 US 2012328651 A1 WO 2005071093 A2	15-12-2009 04-08-2005 01-12-2011 04-08-2005 04-08-2005 04-08-2005 08-08-2007 10-10-2012 10-09-2014 06-04-2010 18-10-2006 17-03-2010 23-04-2010 16-11-2011 26-02-2014 22-07-2015 12-07-2007 23-06-2011 14-06-2012 04-09-2014 26-02-2010 30-04-2010 08-09-2011 27-12-2012 04-08-2005
WO 2006133911 A2	21-12-2006	AU 2006257323 A1 CA 2610919 A1 CN 101213204 A EP 1893636 A2 EP 2570423 A1 HK 1123055 A1 JP 5475279 B2 JP 2008543295 A US 2009035277 A1 WO 2006133911 A2	21-12-2006 21-12-2006 02-07-2008 05-03-2008 20-03-2013 21-03-2014 16-04-2014 04-12-2008 05-02-2009 21-12-2006
WO 2013123579 A1	29-08-2013	NONE	
WO 2011130627 A2	20-10-2011	EP 2560680 A2 US 2013101618 A1 WO 2011130627 A2	27-02-2013 25-04-2013 20-10-2011
WO 2006033672 A2	30-03-2006	CA 2563500 A1 EP 1742657 A2 ES 2442225 T3 JP 2007535541 A US 2007231347 A1 WO 2006033672 A2	30-03-2006 17-01-2007 10-02-2014 06-12-2007 04-10-2007 30-03-2006
WO 03070187 A2	28-08-2003	AU 2003213118 A1 US 2003235593 A1 US 2007184074 A1 US 2008242630 A1 US 2010183657 A1 US 2010183677 A1 WO 03070187 A2	09-09-2003 25-12-2003 09-08-2007 02-10-2008 22-07-2010 22-07-2010 28-08-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/067622

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006117240 A2	09-11-2006	AT 543832 T	15-02-2012
		AU 2006243357 A1	09-11-2006
		BR P10611347 A2	31-08-2010
		CA 2607715 A1	09-11-2006
		CA 2821389 A1	09-11-2006
		CN 101273055 A	24-09-2008
		CN 102617739 A	01-08-2012
		CY 1112851 T1	10-02-2016
		DK 1877426 T3	14-05-2012
		DK 2426141 T3	10-11-2014
		DK 2457926 T3	05-01-2015
		EA 200702081 A1	28-04-2008
		EP 1877426 A2	16-01-2008
		EP 2426141 A2	07-03-2012
		EP 2457926 A1	30-05-2012
		ES 2381492 T3	28-05-2012
		ES 2524570 T3	10-12-2014
		ES 2524572 T3	10-12-2014
		HR P20120331 T1	31-05-2012
		HR P20141125 T1	02-01-2015
		HR P20141184 T1	13-03-2015
		IL 186654 A	30-04-2013
		IL 215112 A	31-07-2013
		JP 5164830 B2	21-03-2013
		JP 5659207 B2	28-01-2015
		JP 2008539187 A	13-11-2008
		JP 2012065650 A	05-04-2012
		JP 2013040190 A	28-02-2013
		JP 2015057403 A	26-03-2015
		KR 20080021624 A	07-03-2008
		KR 20120089475 A	10-08-2012
		KR 20130110233 A	08-10-2013
		KR 20150036658 A	07-04-2015
		MA 29678 B1	01-08-2008
		NZ 562729 A	30-10-2009
		PH 12013502449 A1	14-12-2015
		PT 1877426 E	02-05-2012
		PT 2426141 E	25-11-2014
		PT 2457926 E	25-11-2014
		SI 1877426 T1	29-06-2012
		SI 2426141 T1	30-01-2015
		SI 2457926 T1	30-01-2015
		US 2009123491 A1	14-05-2009
		US 2014050776 A1	20-02-2014
		US 2015231224 A1	20-08-2015
		WO 2006117240 A2	09-11-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 P 31/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/06	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C 0 7 K 14/35 (2006.01)	C 0 7 K 14/35	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 ドナー , マリー - ノエル

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール , リュ ド ランスティテュ 8 9 , グラクソスミス
クライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 オウアケド , ナディア

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール , リュ ド ランスティテュ 8 9 , グラクソスミス
クライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

F ターム (参考) 4B065 AA36Y AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44
4C076 AA19 AA31 AA94 AA99 BB15 CC06 CC32 FF31 FF68 FF70
4C084 AA02 AA07 AA13 BA02 BA22 BA23 CA04 MA02 MA05 MA16
MA55 MA56 MA59 MA63 MA65 MA66 MA70 NA05 NA14 ZB091
ZB351 ZC751
4C085 AA03 BA09 CC07 CC21 EE03 EE06 FF12 FF21 GG01 GG02
GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 MA05 MA65 NA05 NA14 ZB09
ZB35 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA11 DA86 EA20 FA74