(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-547298
(P2022-547298A)
(43)公表日　令和4年11月11日(2022.11.11)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/245 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/245	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*38/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*37/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04	４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ	*14/045 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/045	ＺＮＡ

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全40頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-515475(P2022-515475)
(86)(22)出願日　令和2年9月8日(2020.9.8)
(85)翻訳文提出日　令和4年4月21日(2022.4.21)
(86)国際出願番号　PCT/EP2020/075002
(87)国際公開番号　WO2021/048081
(87)国際公開日　令和3年3月18日(2021.3.18)
(31)優先権主張番号　62/897,603
(32)優先日　令和1年9月9日(2019.9.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　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,
最終頁に続く

(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－１３３０ リクセンサール リュ ドランスティテュ ８９
(71)出願人　507397054
ヴァリエーション バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド
カナダ， オンタリオ ケー１ブイ １シー１， オタワ， ハント クラブ ロード イースト ３１０， セカンド フロア
(74)代理人　110002572弁理士法人平木国際特許事務所
(72)発明者　アンダーソン，デビッド エバンダー
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチュー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　免疫療法組成物

(57)【要約】
本開示は、サポニンおよびTLR4アゴニストを含むアジュバントを用いて製剤化された、マウス白血病ウイルス（MLV）コアタンパク質およびヒトサイトメガロウイルスエピトープであるgBおよびpp65を含むウイルス様粒子（VLP）を含む、多形性膠芽腫（GBM）を治療するために有用な組成物および方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子（ＶＬＰ）；ならびに
(ii) サポニンおよびＴＬＲ４アゴニストを含むアジュバント
を含む、免疫原性組成物。
【請求項２】
ＨＣＭＶ関連癌の治療における使用のための、請求項1に記載の免疫原性組成物。
【請求項３】
(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子を含む第1の容器；ならびに
(ii) サポニンおよびＴＬＲ４アゴニストを含むアジュバントを含む第2の容器
を含む、免疫原性組成物の調製のためのキット。
【請求項４】
(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子を含む第1の容器；
(ii) サポニンを含む第2の容器；
(iii) ＴＬＲ４アゴニストを含む第3の容器
を含む、免疫原性組成物の調製のためのキット。
【請求項５】
(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子；ならびに
(ii) ＴＬＲ４アゴニスト
と一緒での、被験体での免疫応答を生起するための使用のための、サポニン。
【請求項６】
(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子；ならびに
(ii) サポニン
と一緒での、被験体での免疫応答を生起するための使用のための、ＴＬＲ４アゴニスト。
【請求項７】
以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子と一緒での使用のための、サポニンおよびＴＬＲ４アゴニストを含む

アジュバント。
【請求項８】
サポニン、TLR4アゴニスト、ならびに以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子の投与を含む、被験体での免疫応答を生起するための方法。
【請求項９】
前記サポニン、前記TLR4アゴニストおよび前記ウイルス様粒子が、請求項1に記載の免疫原性組成物の形態で投与される、請求項8に記載の方法。
【請求項１０】
サポニン、TLR4アゴニスト、ならびに以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子の投与を含む、被験体でのHCMV関連癌の治療のための方法。
【請求項１１】
医薬の製造における、特に、HCMV関連癌の治療のための医薬の製造における、サポニン、TLR4アゴニスト、ならびに以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子の使用。
【請求項１２】
前記VLPが、配列番号8に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、詳細には少なくとも95%、特に少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む、例えばそれからなる、gBタンパク質を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【請求項１３】
前記VLPが、配列番号4に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、詳細には少なくとも95%、特に少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む、例えばそれからなる、融合タンパク質を含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【請求項１４】
前記サポニンが、Quil Aまたはその誘導体である、請求項1～13のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【請求項１５】
前記サポニンがQS21である、請求項14に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【請求項１６】
前記TLR4アゴニストがリポ多糖である、請求項1～15のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【請求項１７】
前記リポ多糖がモノホスホリル脂質Aである、請求項16に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【請求項１８】
前記モノホスホリル脂質Aが3-脱-O-アシル化モノホスホリル脂質A（3D-MPL）である、請求項17に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【請求項１９】

18～70歳のヒトなどのヒトへの投与のための、請求項1～18のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２０】

乳癌、結腸癌、卵巣癌および前立腺癌、横紋筋肉腫、肝細胞癌、唾液腺腫瘍、神経芽細胞腫および脳腫瘍（髄芽腫およびGBMなど）から選択されるHCMV関連癌の治療における使用のための、請求項1～19のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２１】

GBMの治療における使用のための、請求項1～20のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２２】

最初の再発などの再発を経験している被験体でのGBMの治療における使用のための、請求項21に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２３】

400mm^{2}以下の最大断面積を有する腫瘍を有する被験体でのGBMの治療における使用のための、請求項21または22に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２４】

治療の開始時に、少なくとも2、例えば少なくとも2.5のCD4/CD8比を有する被験体での使用のための、請求項1～23のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２５】

治療の開始時に、少なくとも3のCD4/CD8比を有する被験体での使用のための、請求項24に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２６】

治療の開始時に、3未満、例えば2.5未満、特に2未満のCD4/CD8比を有する被験体での使用のための、請求項1～23のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２７】

抗原特異的抗体応答の生起における使用のための、請求項1～26のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２８】

抗原特異的CD4$^+$T細胞応答の生起における使用のための、請求項1～27のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項２９】

抗原特異的CD8$^+$T細胞応答の生起における使用のための、請求項1～28のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項３０】

前記抗原特異的応答がpp65に対するものである、請求項1～29のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項３１】

前記抗原特異的応答がgBに対するものである、請求項1～30のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【請求項３２】

ヒト用量が、重量基準で、pp65の含有量の200分の1～10分の1、例えばpp65の含有量の120分の1～40分の1、特にpp65の含有量の100分の1～60分の1のgBタンパク

質含有量を含む、請求項1～31のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【請求項３３】
投与が、10μgのpp65タンパク質を含有するVLP、ならびにリポソーム製剤中に、50μgのQS21および50μgの3D-MPLを含むアジュバントを含む組成物を用いて筋内的に行なわれ、かつ投与が4週間毎に繰り返される、請求項1～32のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、免疫腫瘍学の分野に入り、特に、多形性膠芽腫（GBM）などのヒトサイトメガロウイルス（HCMV）関連癌の治療で使用されるアジュバント化されたウイルス様粒子ワクチンに関する。
【背景技術】
【０００２】
HCMV感染は、GBM（Cobbs 2002；Mitchel 2008）、乳癌（Taher 2013；Harkins 2010）；前立腺；髄芽腫（Baryawno 2011；Libard 2014）；髄膜腫（Libard 2014）および神経芽細胞腫（Wolmer-Solberg 2013）をはじめとする多数の癌に関連付けられてきた。
【０００３】
GBMは、最も一般的かつ侵襲性の脳腫瘍の主要な形態（primary form）であり、治療しない場合の生存期間中央値はたった3ヵ月である。GBMは、米国および欧州で10万人当たり毎年2～3人の成人が罹患する。米国だけで毎年、GBMは2万人を超える人々で診断され、約1万5千件の死亡の原因である。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
HCMV関連癌、特にGBMに対する代替的または改善された治療アプローチに対する必要性が残っている。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本開示は、GBMをはじめとするHCMV関連癌の治療のために有用な組成物および方法に関する。より詳細には、本開示は、マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質およびHCMV抗原gBおよびpp65を含むウイルス様粒子（VLP）を含むアジュバント化された組成物、それらの使用のための方法および関連する態様を提供する。
【０００６】
本発明は、
(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子；ならびに
(ii) サポニンおよびTLR4アゴニストを含むアジュバント
を含む免疫原性組成物を提供する。
【０００７】
好適には、アジュバントは、QS21であるサポニン、および3-脱-O-アシル化モノホスホリル脂質A（3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A：3D-MPL）であるTLR4アゴニストを含む。
【０００８】
被験体での免疫応答を生起するための方法もまた提供され、該方法は、サポニン、TL

R4アゴニスト、ならびに以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子の投与を含む。

【０００９】

好適には、サポニン、TLR4アゴニストおよびウイルス様粒子は、ウイルス様粒子ならびにサポニンおよびTLR4アゴニストを含むアジュバントを含む免疫原性組成物の形態で投与される。

【００１０】

加えて、HCMV関連癌の治療における使用のための、
(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子；ならびに
(ii) サポニンおよびTLR4アゴニストを含むアジュバント
を含む免疫原性組成物が提供される。

【００１１】

本発明はまた、被験体でのHCMV関連癌の治療のための方法も提供し、該方法は、サポニンおよびTLR4アゴニストを含むアジュバント、ならびに以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子の投与を含む。

【００１２】

配列の一覧

下記は、本明細書中で参照される配列の一覧である：
配列番号1は、MMLV-Gagアミノ酸配列であり、
配列番号2は、MMLV-Gagヌクレオチド配列であり、
配列番号3は、コドン最適化されたMMLV-Gagヌクレオチド配列であり、
配列番号4は、MMLV Gag-CMV pp65アミノ酸配列であり、
配列番号5は、MMLV Gag-CMV pp65ヌクレオチド配列であり、
配列番号6は、コドン最適化されたMMLV Gag-CMV pp65ヌクレオチド配列であり、
配列番号7は、コドン最適化されたMMLV Gag-CMV pp65ヌクレオチド配列であり、
配列番号8は、HCMV gBアミノ酸配列であり、
配列番号9は、HCMV gBヌクレオチド配列であり、
配列番号10は、コドン最適化されたHCMV gBヌクレオチド配列であり、
配列番号11は、HCMV pp65アミノ酸配列であり、
配列番号12は、HCMV pp65ヌクレオチド配列であり、
配列番号13は、コドン最適化されたHCMV pp65ヌクレオチド配列である。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

本発明は、
(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子；ならびに
(ii) サポニンおよびTLR4アゴニストを含むアジュバント

を含む免疫原性組成物を提供する。

【００１４】

好適には、アジュバントは、ＱＳ２１であるサポニン、および３-脱-Ｏ-アシル化モノホスホリル脂質Ａ（３Ｄ-ＭＰＬ）であるＴＬＲ４アゴニストを含む。

【００１５】

被験体での免疫応答を生起するための方法もまた提供され、該方法は、サポニン、ＴＬＲ４アゴニスト、ならびに以下の構成要素：

(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；

(b) ＨＣＭＶ pp６５タンパク質；および

(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（ｇＢ）タンパク質

を含むウイルス様粒子の投与を含む。

【００１６】

好適には、サポニン、ＴＬＲ４アゴニストおよびウイルス様粒子は、ウイルス様粒子、ならびにサポニンおよびＴＬＲ４アゴニストを含むアジュバントを含む免疫原性組成物の形態で投与される。

【００１７】

生起される免疫応答は、典型的に、抗原特異的抗体および/またはＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および/もしくはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答を含み、好適には、ｐｐ６５およびｇＢタンパク質の一方または両方（好適には両方）に対する抗体、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の応答を含む。

【００１８】

本発明はまた、被験体でのＨＣＭＶ関連癌の治療のための方法も提供し、該方法は、サポニンおよびＴＬＲ４アゴニストを含むアジュバント、ならびに以下の構成要素：

(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；

(b) ＨＣＭＶ pp６５タンパク質；および

(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（ｇＢ）タンパク質

を含むウイルス様粒子の投与を含む。

【００１９】

本発明は、医薬の製造における、特に、ＨＣＭＶ関連癌の治療のための医薬の製造における、サポニン、ＴＬＲ４アゴニスト、ならびに以下の構成要素：

(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；

(b) ＨＣＭＶ pp６５タンパク質；および

(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（ｇＢ）タンパク質

を含むウイルス様粒子の使用を提供する。

【００２０】

加えて、以下の構成要素：

(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；

(b) ＨＣＭＶ pp６５タンパク質；および

(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（ｇＢ）タンパク質

を含むウイルス様粒子と一緒での使用のための、サポニンおよびＴＬＲ４アゴニストを含むアジュバントが提供される。

【００２１】

ＶＬＰ、サポニンおよびＴＬＲ４アゴニストを含む組成物は、ＶＬＰ、サポニンおよびＴＬＲ４アゴニストを含む部品のキット（kit of parts）として提供することができる、例えば、第１の容器がＶＬＰを含み、かつ第２の容器がサポニンおよびＴＬＲ４アゴニストを含むことができる。あるいは、第１の容器がＶＬＰを含み、第２の容器がサポニンを含み、かつ第３の容器がＴＬＲ４アゴニストを含むことができる。

【００２２】

組成物の成分は、簡便には特定の投与部位に対して単一の混合物として投与されるが、成分を別個に（または不完全な組み合わせで）同じかまたは異なる部位に投与することができる（例えば、国際公開第２０１８/１１４９８２号（サポニンおよびＴＬＲ４アゴニストに基

づくアジュバントの送達に関する情報を提供する目的のために、参照により本明細書中に組み入れられる）を参照されたい）。同じかまたは異なる部位へと別個に（または不完全な組み合わせで）投与される場合、投与は、望ましくは、観察される結果が単一混合物の投与を通じて観察される結果と実質的に同じとなるように、投与時間および投与位置の両方で十分に近い。好適には別個の投与は、2時間以内（30分間以内など）で、好適には同じリンパ節に流れる位置（10cm以内など）で行なわれる。

【００２３】

HCMV関連癌

上記で言及した通り、HCMV感染は、GBM（Cobbs 2002；Mitchel 2008）、乳癌（Taher 2013；Harkins 2010）；前立腺；髄芽腫（Baryawno 2011；Libard 2014）；髄膜腫（Libard 2014）および神経芽細胞腫（Wolmer-Solberg 2013）をはじめとする多数の癌に関連付けられてきた（Naucler 2019）。β-ヘルペスウイルスであるHCMVは、遍在的に存在する病原体である。免疫が保たれている人では、HCMV感染は通常は気付かれず、最も軽症かつ非特異的な症状を有する。

【００２４】

用語「HCMV関連癌」は、本明細書中で用いる場合、HCMV感染が寄与因子であり得、かつ抗HCMV治療が有益であり得る癌を意味する。HCMV感染に関連付けられる癌としては、乳癌、結腸癌、卵巣癌および前立腺癌、横紋筋肉腫、肝細胞癌、唾液腺腫瘍、神経芽細胞腫および脳腫瘍（髄芽腫およびGBM）が挙げられる。結果として、本発明の実施形態では、HCMV関連癌は、乳癌、結腸癌、卵巣癌および前立腺癌、横紋筋肉腫、肝細胞癌、唾液腺腫瘍、神経芽細胞腫および脳腫瘍（髄芽腫およびGBM）から選択される。GBMが特に関心の対象である。

【００２５】

GBMを有する被験体は、最初の発症を経験している被験体であり得、またはGBMの再発を経験している被験体であり得る。一実施形態では、被験体は、GBMを最初に発症している被験体である。第2の実施形態では、被験体は、GBMが再発（最初の再発など）している被験体である。

【００２６】

好適には、被験体は、二次元磁気共鳴画像法に基づいて400mm^{2}以下の最大断面などの、小型腫瘍を有する。典型的には、これは治療の開始時である。

【００２７】

ヒト被験体は、望ましくは、治療の開始時に、少なくとも2、例えば少なくとも2.5、特に少なくとも3のCD4/CD8比を有する。ヒト被験体は、治療の開始時に、3未満、例えば2.5未満、特に2未満のCD4/CD8比を有し得る。

【００２８】

GBMは、腫瘍の局在、化学療法に対する細胞の生得的な抵抗性、および脳細胞の低い自己修復能をはじめとする多数の要因によって、治療に対してあまり応答しない。典型的には、GBM腫瘍は、可能な程度まで外科的に除去されるが、周囲組織へのGBM細胞の迅速な浸潤に起因して、完全な除去は通常は不可能である。多くの場合に、疾患の進行を遅らせるための試みとして、外科的処置に続いて、放射線照射および化学療法が用いられる。しかしながら、GBM腫瘍は、通常は再発し、治療を受けている患者での生存期間中央値は、たった12～15ヵ月である。

【００２９】

近年、T細胞が腫瘍細胞を死滅させ、かつ脳腫瘍に浸潤することが示されたという知識に基づいて、GBMに対する治療として免疫療法が提案されている。しかしながら、腫瘍細胞の多様性および免疫標的として機能し得る共通の腫瘍拒絶抗原がないことを理由として、GBMを治療するための免疫療法剤の開発は、困難であることが証明されてきた。特に、GBM患者は、アネルギー、忍容性およびT細胞消耗をはじめとする様々な異なるT細胞機能不全を示す（Woroniecka 2018）。GBM患者はまた、弱まった抗体応答を示す。1つの研究では、HCMV陽性腫瘍を有するGBM患者のうちの31パーセントが、抗HCM

V抗体を欠損していた（Rahbar 2015）。

【００３０】

GBMを治療するための免疫療法アプローチが、GBM腫瘍細胞中のウイルス抗原の発見に基づいて提案されてきており、この抗原は正常脳組織では比較的低い発現を示す。2002年という早期に、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）がGBM細胞中に存在することが見出された（Cobbs 2002）。HCMV DNAおよびタンパク質は、GBM細胞のうちの90％超で発現され、周囲の正常脳組織では発現されていない（Dziurzynski 2012）。GBMでのHCMVの役割はよく理解されていないが、HCMV糖タンパク質B（gB）は、受容体チロシンキナーゼPDGFRαへの結合により神経膠腫細胞進入を媒介し、その結果としてPI3キナーゼ/Aktシグナル伝達経路の活性化が生じ、これが腫瘍細胞増殖および浸潤性を高めることが示されている（Cobbs 2014）。低レベルのHCMV発現は、GBM患者での改善された全生存率に関連付けられている（Rahbar 2012）。

【００３１】

GBM細胞中でのHCMVの遍在的な存在から、HCMV抗原が免疫療法治療のための治療標的を構成し得るという示唆が導かれた。標的としてのHCMV抗原の使用に対する特に可能性のある利益は、それらが「外来性」であると免疫学的に認識されること、およびT細胞が自己抗原よりも外来性抗原に対してはるかに高い親和性を有することである。

【００３２】

いくつかの研究により、GBMの治療でのHCMV抗原を標的とする免疫療法が調査されてきた。1つの研究では、HCMV特異的T細胞（$CD4^+$および$CD8^+$多機能性T細胞）が、自家GBM腫瘍細胞を認識しかつこれを死滅させることが示され、このことは、HCMV抗原が免疫学的に重要な（relevant）レベルで腫瘍細胞により提示されるという証拠を提供した（Nair 2014）。これらの知見を臨床まで拡張して、自家HCMV特異的T細胞を用いた養子T細胞療法は、10名中4名の患者が試験期間中に無疾患のままであったという有望な初期の臨床的結果を実証した（Schuessler 2014）。

【００３３】

これらの予備的研究はHCMV標的化免疫療法に対する裏付けを示したが、他の研究により、GBM患者が、健康な人と比較してHCMVに対して顕著に低い免疫応答を示すことが示された（Liu 2018）。特に、GBM患者は、HCMV陽性である健康被験体と比較して、顕著に低い抗HCMV抗体（IgG）を産生することが示された（Liu 2018）。1つの研究では、HCMVを有するGBM腫瘍の患者のうちの31％が、抗CMV抗体を完全に欠損していた（Rahbar 2015）。したがって、GBM患者は、HCMVに対する免疫の著しい調節不全を有し、このことは、HCMV抗原に基づく免疫療法治療の開発に顕著な困難をつくり出す。

【００３４】

GBM腫瘍細胞を効果的に標的化するが、広範な患者集団での使用のために製剤化できる、GBMに対する利用可能な免疫療法治療への必要性が存在する。

【００３５】

本開示は、GBMなどのHCMV関連癌の治療のための免疫療法組成物およびその使用方法を提供する。本発明の免疫原性組成物は、HCMV発現GBM腫瘍などのHCMV発現腫瘍に対する抗HCMV T細胞免疫を刺激する。

【００３６】

免疫療法組成物は、ウイルス様粒子（「VLP」）を含む。VLPは、一般的には1種以上のウイルスタンパク質から構成される複数タンパク質構造物である。VLPは、ウイルスのコンホメーションを模倣するが、遺伝物質を欠損しており、したがって感染性でない。VLPは、適切な状況下でのウイルス構造タンパク質の発現に際して形成される（または「自己アセンブリする」）ことができる。VLPは、製造プロセス中に存在するいかなる生存ウイルスも有する必要性なしに生成できるので、弱毒化ウイルスを用いて調製されるワクチンの不利益のうちの一部を克服する。広範囲の様々なVLPが調製されている。例えば、エンベロープタンパク質および/または表面糖タンパク質を含むかまたは含まずに

、単一または複数カプシドタンパク質を含むVLPが調製されている。一部の場合には、VLPは、非エンベロープ型であり、ただ1種類の主要なカプシドタンパク質の発現によりアセンブリする。他の場合には、VLPは、エンベロープ型であり、対応する生来型ウイルス中で見出される複数の抗原性タンパク質を含むことができる。エンベロープ型VLPの自己アセンブリは、宿主細胞膜との融合のために必要とされる複雑な反応（Garrone 2011）および完全にエンベロープ化された別個の粒子を形成するためのVLPの「出芽」を理由として、非エンベロープ型VLPよりもさらに複雑である。無傷のVLPの形成は、電子顕微鏡観察を用いる粒子のイメージングにより確認することができる。

【００３７】

VLPは典型的には、その対応する生来型ウイルスに似通っており、かつ多価粒子状構造物であり得る。VLPの文脈での表面糖タンパク質の提示は、抗原提示の他の形態（例えば、VLPに結合していない可溶性抗原）と比較した場合に、ポリペプチドに対する中和抗体の誘導に関して有利である。中和抗体は、ほとんどの場合に、三量体または四量体構造を認識し；このことにより多くの場合に、その生来型ウイルスコンホメーション中における、エンベロープ糖タンパク質のような、抗原性タンパク質の提示が必要とされる。

【００３８】

VLPの表面上に発現される抗原はまた、中和抗体および細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答の両方を生起しかつ保持することを助け得るCD4拘束性Tヘルパー細胞応答も誘導する。対照的に、VLPの内部空間内で発現される抗原は、クロスプライミングおよび提示と称されるプロセスでのVLPの樹状細胞取り込みを介して、CD8拘束性CTL応答を促進できる。

【００３９】

本発明で有用なVLPは、典型的には、レトロウイルスベクターに由来する。レトロウイルスは、レトロウイルス科に属するエンベロープ型RNAウイルスである。レトロウイルスによる宿主細胞の感染後に、RNAは、逆転写酵素を介してDNAへと転写される。続いてDNAはインテグラーゼ酵素により宿主細胞のゲノムへと組み込まれ、その後、宿主細胞のDNAの一部として複製される。レトロウイルス科は、以下の属を含む：アルファレトロウイルス属、ベータレトロウイルス属、ガンマレトロウイルス属、デルタレトロウイルス属、イプシロンレトロウイルス属、レンチウイルス属およびスプーマウイルス属。レトロウイルスのこの科に対する宿主は、一般的には脊椎動物である。レトロウイルスは、宿主細胞膜に由来する脂質二重層に囲まれた球状ヌクレオカプシド（ウイルス構造タンパク質との複合体中のウイルスゲノム）を含有する感染性ビリオンを産生する。

【００４０】

レトロウイルスベクターは、レトロウイルス由来ゲノムを欠損し、したがって非複製性であるVLPを生成させるために用いることができる。これは、レトロウイルスのコード領域の大部分を、移入される対象である遺伝子またはヌクレオチド配列と置き換えることにより達成され；そのため、ベクターは複製の追加ラウンドに必要とされるタンパク質を生成することができない。粒子の表面上に存在する糖タンパク質の性質に応じて、VLPは、宿主細胞に結合し、かつ侵入するための限定された能力を有するが、増殖できない。したがって、VLPは、免疫原性組成物として安全に投与することができる。

【００４１】

本発明は、マウス白血病ウイルス（MLV）Gagタンパク質および、特に、モロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）を含むVLPを利用する。これらのレトロウイルスのゲノムは、データベース中で容易に入手可能である。

【００４２】

レトロウイルスのGagタンパク質は、全体構造の類似性を有し、かつレトロウイルスの各群内で、アミノ酸レベルでは概ね保存されている。レトロウイルスGagタンパク質は主に、ウイルスアセンブリで機能する。一部の宿主細胞での一部のウイルス（例えば、MMLVなどのマウス白血病ウイルス）のGagの発現は、発現産物のVLPへの自己アセンブリをもたらし得る。ポリタンパク質の形態でのGag遺伝子発現産物は、VLPのコア構造タ

ンパク質を生じる。機能的には、Gagポリタンパク質は3つのドメインへと分けられる：細胞膜へとGagポリタンパク質を標的化させる膜結合性ドメイン、Gag多量体化を促進する相互作用ドメイン、および宿主細胞からの新生ビリオンの放出を促進するレイトドメイン（late domain）。一般的には、ウイルス粒子アセンブリを媒介するGagタンパク質の形態は、ポリタンパク質である。レトロウイルスは、Gagポリタンパク質から構成される未熟なカプシドをアセンブリするが、このカプシドは、未熟ウイルス粒子の構造タンパク質としてのGagを含んで、ウイルスプロテアーゼのような他のウイルス要素を欠いている。

【００４３】

ＭＭＬＶ Gag遺伝子は、65kDaのポリタンパク質前駆体をコードし、この前駆体は4つの構造タンパク質（マトリックス(MA)；p12；カプシド（CA）；およびヌクレオカプシド（NC））へとMLVプロテアーゼにより成熟ビリオン中でタンパク質分解切断される。MLVプロテアーゼの非存在下では、ポリタンパク質は未切断のままとなり、生じる粒子は未成熟型のままである。ＭＭＬＶ核酸をコードする遺伝子は配列番号2である。ＭＭＬＶ核酸の例示的なコドン最適化型配列は、配列番号3として提供される。

【００４４】

したがって、一部の実施形態では、本発明に好適なGagポリペプチドは、配列番号1であるＭＭＬＶ Gagポリペプチドに対して実質的に相同である。一部の実施形態では、本発明に好適なGagポリペプチドは、配列番号1に対して少なくとも80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％またはそれ以上相同なアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、本発明に好適なGagポリペプチドは、配列番号1に対して実質的に同一であるか、または同一である。

【００４５】

一部の実施形態では、好適なＭＭＬＶ Gagポリペプチドは、配列番号2に対して少なくとも80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％の配列同一性を有する核酸配列によりコードされる。一部の実施形態では、好適なＭＭＬＶ Gagポリペプチドは、配列番号2を有する核酸配列またはそのコドン縮重型によりコードされる。

【００４６】

当業者には周知である通り、特定のアミノ酸をコードする核酸（すなわち、コドン）を、宿主生物中で比較的よく発現される別のコドンに置き換えることにより、宿主生物での核酸配列の発現を改善することが可能である。この効果が生じる1つの理由は、異なる生物が異なるコドンの優先度を示すという事実に起因する。コドン優先度に基づいてよりよい発現を実現するための核酸配列の変更プロセスは、コドン最適化と称される。様々な生物でのコドン使用バイアスを解析するための種々の方法が当技術分野で公知であり、多数のコンピュータアルゴリズムが、コドン最適化型遺伝子配列の設計でのこれらの解析を実行するために開発されてきた。したがって、一部の実施形態では、好適なＭＭＬＶ Gagポリペプチドは、ＭＭＬＶ Gagをコードし、かつ配列番号3に対して少なくとも80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％の配列同一性を有する核酸配列のコドン最適化型によりコードされる。一部の実施形態では、好適なＭＭＬＶ Gagポリペプチドは、配列番号3に対して実質的に同一であるかまたは同一である核酸配列によりコードされる。

【００４７】

当技術分野で周知である通り、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列に対するBLASTNならびにアミノ酸配列に対するBLASTP、ギャップ付きBLAST、およびPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものをはじめとする、様々なアルゴリズムのうちのいずれかを用いて比較することができる。そのようなプログラムの例は、以下の文献中に記載されている：Altschul, et al., 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410；Altschul, et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480；Altschul, et al., 1997 Nucleic Acids Res. 25:3389-3402；Baxevanis,

et al., 1998, Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley；およびMisener, et al., (eds.), 1999, Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press。相同な配列の同定に加えて、上述のプログラムは、典型的には相同性の程度の表示を提供する。一部の実施形態では、2種類の配列は、それらの対応する残基のうちの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が、該当する残基の長さにわたって相同である場合に、実質的に相同であるとみなされる。一部の実施形態では、該当する長さは全長配列である。一部の実施形態では、該当する長さは、少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、125個、150個、175個、200個、225個、250個、275個、300個、325個、350個、375個、400個、425個、450個、475個、500個またはそれ以上の残基である。

【００４８】

本発明で用いられるGagポリペプチドは、野生型または天然に存在するGagポリペプチドと比較した場合に1箇所以上のアミノ酸置換、欠失、および/または挿入を含むが、実質的な自己アセンブリ活性を保持する、改変型レトロウイルスGagポリペプチドであり得る。典型的には、天然では、Gagタンパク質は、レトロウイルスプロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼ酵素活性を含み得る大型のC末端伸長部を含む。しかしながら、VLPのアセンブリは、一般的にはそのような構成要素の存在を必要としない。一部の場合には、レトロウイルスGagタンパク質単独で（例えば、C末端伸長部を欠損する、ゲノムRNA、逆転写酵素、ウイルスプロテアーゼ、またはエンベロープタンパク質のうちの1種以上を欠損する）、in vitroおよびin vivoの両方で自己アセンブリしてVLPを形成できる（Sharma 1997）。

【００４９】

一部の実施形態では、VLPは、配列番号11に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同であるアミノ酸配列を含むpp65タンパク質を含む。一部の実施形態では、pp65タンパク質は、配列番号12に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同な核酸配列によりコードされるポリペプチドを含む。

【００５０】

本発明に従う使用のためのGagポリペプチドは、好適には、C末端伸長部を欠損し、かつ典型的にはHCMV由来のpp65抗原を含む融合タンパク質として発現される。天然に存在するHCMVでは、pp65は、カプシドとウイルスエンベロープとの間のテグメント内に位置する。pp65は細胞傷害性T細胞応答の主要な標的であり、かつTヘルパー細胞の形成を刺激すること、およびHCMVに対する細胞傷害性Tリンパ球（CTL）も誘導することが公知である。pp65ポリペプチドは、例えば、Gagポリペプチドコード配列の3'末端で、インフレームでスプライシングされて、Gagポリペプチドコード配列を生じる。Gagポリペプチドコード配列およびpp65抗原は、単一プロモーターにより発現される。

【００５１】

一部の実施形態では、VLPは、配列番号4に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同であるアミノ酸配列を有する融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、VLPは、配列番号5に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同である核酸配列によりコードされる融合タンパク質を含む。

【００５２】

本発明で有用なVLPはまた、VLPの表面上にHCMV gBエンベロープ糖タンパク質も発現する。gBは、HCMV中の主要なB細胞抗原のうちの1種であり、強力な体液性免疫応

答を含む中和性の保護的免疫応答を誘導する。本発明の免疫原性組成物は、野生型エンベロープHCMV gBポリペプチドを含むVLPを含むことができ、該ポリペプチドの配列は、配列番号8または配列番号8のコドン縮重型である。該ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号9として示される。配列番号9のコドン最適化型は、配列番号10として示される。

【００５３】

一部の実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、配列番号8に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同であるアミノ酸配列を含むgBポリペプチドを含有するVLPを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号9に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同である核酸配列によりコードされる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号10に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同である、配列番号9の核酸配列のコドン最適化型によりコードされる。

【００５４】

一部の実施形態では、VLPは、配列番号8に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列からなるgBポリペプチド、および配列番号4に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列からなるGag/pp65融合タンパク質を含む。

【００５５】

VLPを含む組成物は、典型的には一定範囲のサイズを有するVLPの混合物を含むであろうことが、理解されるであろう。以下に列挙される直径の値は、混合物内の最も高頻度な直径に対応することが理解されるべきである。一部の実施形態では、組成物中のベシクルのうちの90%超が、最も高頻度な値（例えば、1000±500nm）の50%の範囲内に入る直径を有する。一部の実施形態では、分布はさらに狭い場合があり、例えば、組成物中のベシクルのうちの90%超が、最も高頻度な値の40%、30%、20%、10%または5%の範囲内に入る直径を有することができる。一部の実施形態では、音波処理または超音波処理を用いて、VLP形成を促進し、かつ/またはVLPサイズを変化させることができる。一部の実施形態では、ろ過、透析および/または遠心分離を用いて、VLPサイズ分布を調整することができる。

【００５６】

一般的に、本開示のVLPは、いかなるサイズでもあり得る。特定の実施形態では、組成物は、約20nm～約300nmの範囲内の直径を有するVLPを含むことができる。一部の実施形態では、VLPは、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、または100nmの下限により制限され、かつ300nm、290nm、280nm、270nm、260nm、250nm、240nm、230nm、220nm、210nm、200nm、190nm、180nm、または170nmの上限により制限される範囲内の直径を有することを特徴とする。一部の実施形態では、集団内のVLPは、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、または100nmの下限により制限され、かつ300nm、290nm、280nm、270nm、260nm、250nm、240nm、230nm、220nm、210nm、200nm、190nm、180nm、または170nmの上限により制限される範囲内の平均直径を示す。一部の実施形態では、集団内のVLPは、0.5未満（例えば、0.45未満、0.4未満、または0.3未満）である多分散性指数を有する。一部の実施形態では、VLP直径は、ナノ定寸（nanosizing）により測定することができる。一部の実施形態では、VLP直径は、電子顕微鏡観察により測定することができる。

【００５７】

本発明に従うVLPは、当業者に公知の一般的な方法論に従って調製することができる。例えば、核酸分子、再構築されたベクターまたはプラスミドは、当業者に周知の技術を

用いて調製できる。VLPのポリペプチドの組み換え発現は、1種以上のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築を必要とする。1種以上のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが得られたら、ポリペプチドの産生のためのベクターを、当技術分野で公知の技術を用いる組み換えDNA技術により作製することができる。本発明に従って利用することができる発現ベクターとしては、限定するものではないが、とりわけ、哺乳動物および鳥類発現ベクター、バキュロウイルス発現ベクター、植物発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、タバコモザイクウイルス（TMV））、プラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）が挙げられる。

【００５８】

本発明のVLPは、いずれかの利用可能なタンパク質発現システムで生成させることができる。典型的には、発現ベクターを慣用の技術により宿主細胞に移入し、続いてトランスフェクションされた細胞を慣用の技術により培養して、VLPを生成させる。一部の実施形態では、VLPを、細胞の一時的トランスフェクションを用いて生成させる。一部の実施形態では、VLPを、安定的にトランスフェクションされた細胞を用いて生成させる。VLP生成のために利用できる典型的な細胞株としては、限定するものではないが、ヒト胎児腎臓（HEK）293細胞、WI38細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、サル腎臓（COS）細胞、HT1080細胞、C10細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、3T3細胞、C127細胞、CV-1細胞、HaK細胞、NS/O細胞、およびL-929細胞などの哺乳動物細胞株が挙げられる。非限定的な具体例としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：BALB/cマウス骨髄腫株（NSO/l、ECACC番号：85110503）；ヒト網膜芽細胞（PER.C6（CruCell、Leiden、オランダ））；SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胎児腎臓株（懸濁培養中での増殖に関してサブクローニングされた293細胞、Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞+/-DHFR（CHO、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)）；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)）；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76、ATCC CRL-1 587）；ヒト子宮頸癌細胞（HeLa、ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳腺腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL51）；TRI細胞（Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)）；MRC5細胞；FS4細胞；およびヒト肝癌株（Hep G2）。一部の実施形態では、VLP生成のために利用できる細胞株としては、昆虫（例えば、Sf-9、Sf-21、Tn-368、Hi5）細胞または植物（例えば、マメ科（Leguminosa）、穀類、またはタバコ）細胞が挙げられる。一部の実施形態では、特にグリコシル化がタンパク質機能に重要である場合、タンパク質発現および/またはVLP生成のためには哺乳動物細胞が好適であることが理解されるであろう（例えば、Roldao A et al., 2010 Expt Rev Vaccines 9:1149-76を参照されたい）。

【００５９】

挿入された配列の発現を変化させるか、または特異的に遺伝子産物を修飾およびプロセシングする細胞株を選択できることが理解されるであろう。様々な細胞が、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび修飾に関して、特徴的および特異的機構を有する。適切な細胞株または宿主系を、発現される外来性タンパク質の的確な修飾およびプロセシングを確実にするために選択できる。一般的には、一次転写産物の適正なプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための適切な細胞内装置を保有する真核生物宿主細胞（パッケージング細胞とも称される（例えば、293Tヒト胎児腎臓細胞））を、本発明に従って用いることができる。

【００６０】

VLPは、とりわけ、遠心分離、勾配、スクロース勾配超遠心、接線流ろ過およびクロ

マトグラフィー（例えば、イオン交換（アニオンおよびカチオン）クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除カラムクロマトグラフィー）、または示差的溶解度などの公知の技術に従って精製することができる。あるいは、またはこれに加えて、細胞上清を、精製ステップなしに、直接用いることができる。追加の抗原またはアジュバントなどの追加の物質を、精製されたVLPに加えることができる。

【００６１】

本開示のVLPを生成するために、細胞が2種類の発現ベクターで共トランスフェクションされ、第1のベクターはGag-pp65融合ポリペプチドをコードし、第2のベクターはgBエンベロープ糖タンパク質をコードする。共トランスフェクションされたHCMV gBプラスミドは、粒子が細胞表面から出芽して、それによりgBタンパク質を脂質二重層に組み込むことを可能にする。結果として、HCMV pp65非構造タンパク質およびHCMV gBエンベロープ糖タンパク質を含む「二価」VLPが生成される。

【００６２】

本発明者らは以前に、その生来型コンホメーションで提示されるgB表面抗原を含むHCMV VLPワクチンの開発を報告しており、このワクチンは、中和抗体、ならびにヘルパーT細胞（THリンパ球）および細胞傷害性T細胞（CTL）を誘導するpp65テグメントタンパク質の産生を刺激した（国際公開第2013/068847号を参照されたい。この文献は、VLPおよびその製造に関する詳細を提供する目的のために、参照により本明細書中に組み入れられる）。健康被験体由来の末梢血単核細胞を用いた研究では、このVLPは、組み換えgB抗原および組み換えpp65抗原単独で生じた応答よりも優れたCD4$^+$およびCD8$^+$T細胞免疫応答を刺激することが示された（実施例3を参照されたい）。

【００６３】

サポニンおよびTLR4アゴニスト

本発明の組成物、方法および使用は、サポニンおよびTLR4アゴニストを利用する。

【００６４】

サポニン

本発明での使用のための好適なサポニンは、Quil Aおよびその誘導体である。Quil Aは、南アフリカの樹木キラヤ・サポナリア・モリナ（Quillaja saponaria Molina）から単離されたサポニン調製物であり、1974年にDalsgaardらによりアジュバント活性を有するとして最初に記載された（“Saponin adjuvants”, Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254）。Quil Aの精製された画分がHPLCにより単離されており、この画分は、Quil Aに伴う毒性を有さずにアジュバント活性を保持する（例えば、欧州特許出願公開第0362278号を参照されたい）。一般的な関心の対象である画分としては、QS7、QS17、QS18およびQS21、例えば、QS7およびQS21（QA7およびQA21としても知られる）が挙げられる。QS21は、特に関心を持たれるサポニンである。

【００６５】

本発明の特定の実施形態では、サポニンは、キラヤ・サポナリア・モリナQuil Aの誘導体であり、好適にはQuil Aから取得できる免疫学的活性画分であり、QS7、QS17、QS18またはQS21など、特にQS21である。

【００６６】

典型的には、Quil A、特にQS21などのサポニンは、少なくとも90％純粋であり、例えば少なくとも95％純粋、特に少なくとも98％純粋、詳細には99％純粋である。

【００６７】

QS21成分の純度は、用いるサポニン中のQS21成分の割合（例えば、少なくとも95％、特に少なくとも98％、詳細には99％）として214nmでのUV吸光度により決定できる。

【００６８】

本発明の有利な特徴は、サポニンが、コレステロールなどの外因性ステロールを用いてクエンチされている、比較的反応原性が低い組成物中に提示されることである。特に、Q

S21は、本明細書中でさらに説明される通り、送達プラットホームとしてコレステロールに基づくリポソームを用いて製剤化される。コレステロールを用いてクエンチされたQS21は、遊離QS21と同等の免疫刺激特性を示すが、溶解性が低く、かつ比較的安定である（Garcon 2017）。

【００６９】

TLR4アゴニスト

TLR4アゴニストの好適な例は、リポ多糖、好適には脂質Aの非毒性誘導体、特にモノホスホリル脂質A、より詳細には3-脱-O-アシル化モノホスホリル脂質A（3D-MPL）である。

【００７０】

3D-MPLは、「MPL」の商品名でGlaxoSmithKline Biologicals社により市販されており、本文献全体を通して3D-MPLと称される。例えば、米国特許第4,436,727号；同第4,877,611号；同第4,866,034号および同第4,912,094号を参照されたい。3D-MPLは、英国特許出願公開第2 220 211号に記載された方法に従って製造できる。化学的には、3D-MPLは、4本、5本または6本のアシル化鎖を有する3-脱アシル化モノホスホリル脂質Aの混合物である。本発明の文脈では、小型粒子3D-MPLを、水性アジュバント組成物を調製するために用いることができる。小型粒子3D-MPLは、0.22μmフィルターを通して滅菌ろ過できる粒径を有する。そのような調製物が、国際公開第94/21292号に記載されている。好適には、粉末化3D-MPLが、本発明で有用な水性アジュバント組成物を調製するために用いられる。

【００７１】

用いることができる他のTLR4アゴニストは、国際公開第98/50399号または米国特許第6,303,347号に記載されるものなどの、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート（AGP）である（AGPの調製のためのプロセスもまた記載されている）。一部のAGPはTLR4アゴニストであり、一部はTLR4アンタゴニストである。

【００７２】

本発明で有用であり得る他のTLR4アゴニストとしては、以下の文献に記載されるものなどのグルコピラノシル脂質アジュバント（GLA）が挙げられる：国際公開第2008/153541号もしくは同第2009/143457号または文献論文：Coler RN et al. (2011) Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant. PLoS ONE 6(1): e16333. doi:10.1371/journal.pone.0016333およびArias MA et al. (2012) Glucopyranosyl Lipid Adjuvant (GLA), a Synthetic TLR4 Agonist, Promotes Potent Systemic and Mucosal Responses to Intranasal Immunization with HIVgp140. PLoS ONE 7(7): e41144. doi:10.1371/journal.pone.0041144。国際公開第2008/153541号および同第2009/143457号は、本発明で有用であり得るTLR4アゴニストを定義する目的のために、参照により本明細書中に組み入れられる。

【００７３】

典型的には、リポ多糖および特に3D-MPLなどのTLR4アゴニストは、少なくとも90％純粋であり、例えば少なくとも95％純粋、特に少なくとも98％純粋、詳細には99％純粋である。

【００７４】

AGPは、TLR4修飾因子である。TLR4は、細菌LPS（リポ多糖）を認識し、活性化された場合には生得的な免疫応答を開始させる。AGPは細菌LPSの脂質A部分の単糖ミメティクスであり、化合物の「アシル鎖」上のエーテルおよびエステル結合を含んで開発された。これらの化合物を製造するためのプロセスは公知であり、かつ、例えば、国際公開第2006/016997号、米国特許第7,288,640号および同第6,113,918号ならびに国際公開第01/90129号に開示されており、これらの文献は、本発明で有用なAGPおよびそれらの製造方法を定義する目的のために、それらの全体で参照により本明細書中に組み入れられる。他のAGPおよび関連するプロセスが、米国特許第7,129,219号、同第6,525,0

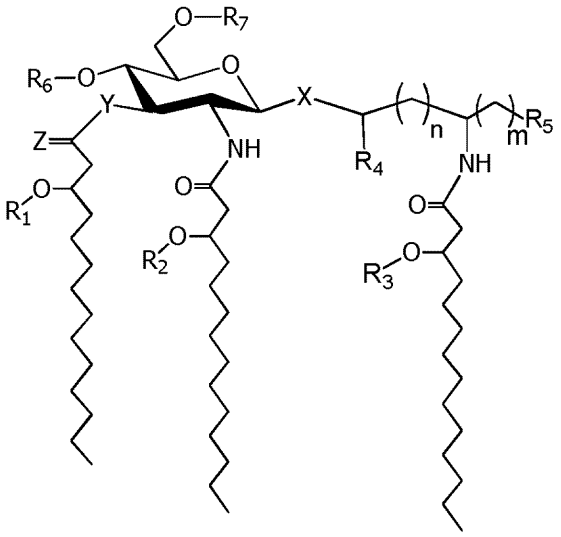
28号および同第6,911,434号に開示され、これらの文献は、本発明で有用なAGPおよびそれらの製造方法を定義する目的のために、それらの全体で参照により本明細書中に組み入れられる。本発明の組成物中で用いられるアシル鎖上にエーテル結合を有するAGPは公知であり、かつ国際公開第2006/016997号に開示されており、この文献は、本発明で有用なAGPおよびそれらの製造方法を定義する目的のために、それらの全体で参照により本明細書中に組み入れられる。特に関心の対象となるものは、国際公開第2006/016997号の段落[0019]～[0021]で式(III)の下に示されかつ説明されるAGPである。

【００７５】

したがって、用語AGPは、以下の式の化合物を含む：

【００７６】

【化１】



式1

（式中、
mは0～6であり；
nは0～4であり；
XはOまたはS、特にOであり；
YはOまたはNHであり；
ZはOまたはHであり；
各R_1、R_2、R_3は、C_{1-20}アシルおよびC_{1-20}アルキルからなる群より独立して選択され；
R_4はHまたはメチルであり；
R_5は、-H、-OH、-(C_1-C_4)アルコキシ、-$PO_3R_8R_9$、-$OPO_3R_8R_9$、-SO_3R_8、-OSO_3R_8、-NR_8R_9、-SR_8、-CN、-NO_2、-CHO、-CO_2R_8、および-$CONR_8R_9$からなる群より独立して選択され、
式中、R_8およびR_9は、Hおよび(C_1-C_4)アルキルからそれぞれ独立して選択され；かつ
各R_6およびR_7は、独立してHまたはPO_3H_2である）。

【００７７】

当業者は、AGPが塩の形態で、特に製薬上許容される塩の形態で存在し得ることを理解するであろう。製薬上許容されない塩が製造の途中で用いられ得るが、それらは望ましくは回避される。

【００７８】

直鎖脂肪酸アシル残基（the normal fatty acyl residue：すなわち、第2級アシルオキシまたはアルコキシ残基、例えば、R_1O、R_2O、およびR_3O）が連結する3'立体中心の配置は、RまたはSであり、好適にはRである（カーン・インゴルド・プレローグ順位則により指定される通り）。R_4およびR_5が連結するアグリコン立体中心の配置は、RまたはSであり得る。エナンチオマーおよびジアステレオマーの両方のすべての立体異性

体、ならびにそれらの混合物が、式に包含される。

【００７９】

ヘテロ原子Xとアグリコン窒素原子との間の炭素原子数は、変数「n」により決定され、これは0～4の整数（すなわち、0、1、2、3または4）、好適には0～2の整数（すなわち、0、1または2）であり得る。

【００８０】

直鎖脂肪酸（normal fatty acid）R_1、R_2、およびR_3の鎖長は、好適には6～20炭素、特に6～16炭素、詳細には9～14炭素である。鎖長は、同じかまたは異なることができる。望ましい実施形態は、R_1、R_2、およびR_3が独立して6、8、10、12または14から選択される鎖長を含む。

【００８１】

一実施形態では、R_1、R_2、およびR_3は同じである。第2の実施形態では、R_1、R_2、およびR_3のうちのすべてが異なる。第3の実施形態では、R_1、R_2、およびR_3のうちの1種類が他の2種類とは異なる。

【００８２】

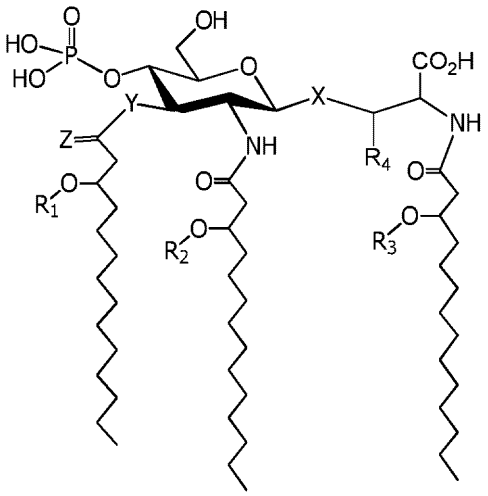
前記式は、L/D-セリル、-スレオニル、-システイニルエーテルおよびエステル脂質AGP、アゴニストとアンタゴニストの両方およびそれらのホモログ（n＝1～4）、ならびにカルボン酸生物学的等価体（bioisostere）（すなわち、R_5が塩形成可能な酸性基であり；ホスフェートがグルコサミン単位の4位または6位のいずれかにあり得るが、好適には4位にある）を包含する。

【００８３】

AGP化合物の特定の実施形態では、nは0であり、R_5はCO_2Hであり、R_6はPO_3H_2であり、かつR_7はHである。したがって、そのようなAGP化合物は、式1aにより定義される：

【００８４】

【化２】



式1a

（式中、

XはOまたはSであり；YはOまたはNHであり；ZはOまたはHであり；各R_1、R_2、R_3は、C_{1-20}アシルおよびC_{1-20}アルキルからなる群より独立して選択され；R_4はHまたはメチルである）。

【００８５】

式1aでは、直鎖脂肪酸アシル残基（すなわち、第2級アシルオキシまたはアルコキシ残基、例えば、R_1O、R_2O、およびR_3O）が連結する3'立体中心の配置は、RまたはSであり、好適にはRである（カーン・インゴルド・プレローグ順位則により指定される通り）。R_4およびCO_2Hが連結するアグリコン立体中心の配置は、RまたはSであり得る。エナンチオマーおよびジアステレオマーの両方のすべての立体異性体、ならびにそれらの混合

物が、式に包含される。

【００８６】

式1aは、L/D-セリル、-スレオニル、-システイニルエーテルまたはエステル脂質AGP、アゴニストとアンタゴニストの両方を包含する。

【００８７】

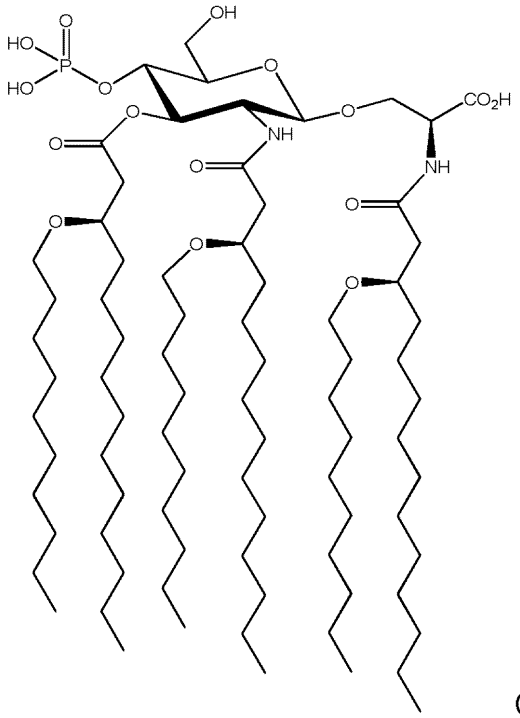
式1および式1aの両方で、Zは、二重結合または単結合によりそれぞれ連結される2個の水素原子により連結されるOである。つまり、化合物は、Z＝Y＝Oの場合にエステル結合され；Z＝OかつY＝NHである場合にアミド結合され；かつZ＝H/HかつY＝Oである場合にエーテル結合されている。

【００８８】

式1の特定の化合物は、CRX601と称される：

【００８９】

【化３】



CRX601

【００９０】

グルコピラノシル脂質アジュバント

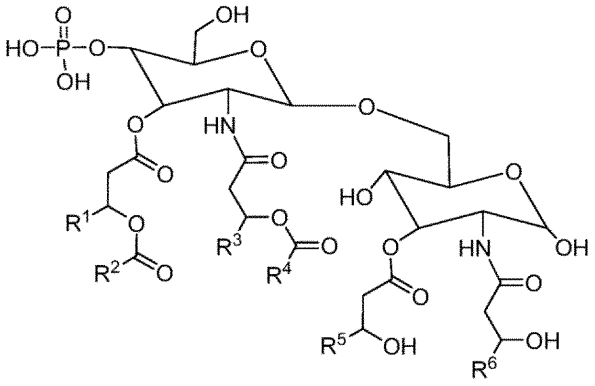
GLAは、以下の文献に記載されるものなどのTLR4修飾因子である：国際公開第2008/153541号もしくは同第2009/143457号または文献論文：Coler RN et al. (2011) Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant. PLoS ONE 6(1): e16333. doi:10.1371/journal.pone.0016333およびArias MA et al. (2012) Glucopyranosyl Lipid Adjuvant (GLA), a Synthetic TLR4 Agonist, Promotes Potent Systemic and Mucosal Responses to Intranasal Immunization with HIVgp140. PLoS ONE 7(7): e41144. doi:10.1371/journal.pone.0041144。

【００９１】

したがって、用語GLAは、以下の式の化合物；およびその製薬上許容される塩などの塩を含む：

【００９２】

【化４】



式2

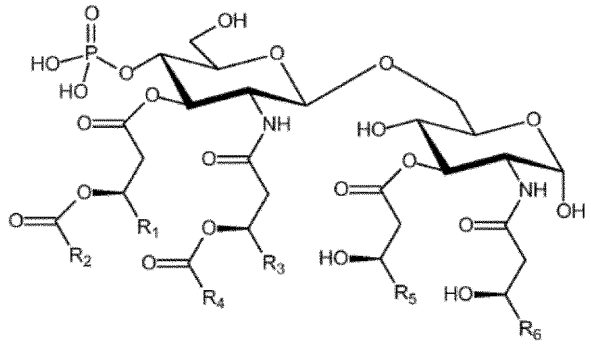
（式中、
R^1、R^3、R^5およびR^6は、それぞれ独立してC_{11-20}アルキルであり；かつ
R^2およびR^4は、それぞれ独立してC_{12-20}アルキルである）。

【００９３】

特に関心の対象となるものは、立体化学を有する式2の化合物、およびその製薬上許容される塩などの塩である：

【００９４】

【化５】



式2b

【００９５】

好適には、式2および2bの化合物に関して、R^1～R^6のすべてが直鎖アルキル基である。

【００９６】

好適には、R^1、R^3、R^5およびR^6のそれぞれが、独立してC_{11-15}アルキルから選択される。好適には、R^1、R^3、R^5およびR^6のそれぞれが、同一である。望ましくは、R^1、R^3、R^5およびR^6のそれぞれが、C_{11}アルキルである。

【００９７】

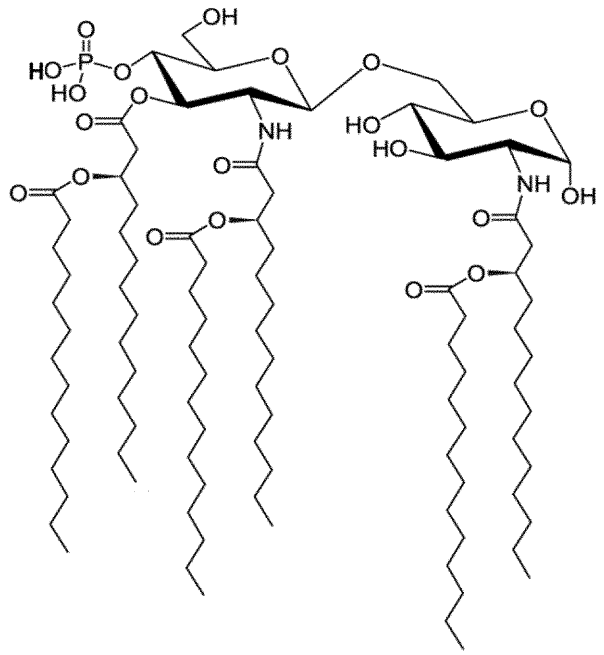
好適には、R^2およびR^4のそれぞれが、独立してC_{12-16}アルキルから選択される。好適には、R^2およびR^4のそれぞれが、同一である。好適には、R^2およびR^4のそれぞれが、同一である。望ましくは、R^2およびR^4のそれぞれが、C_{13}アルキルである。

【００９８】

関心の対象であるTLR4は、以下のものを含む：

【００９９】

【化６】



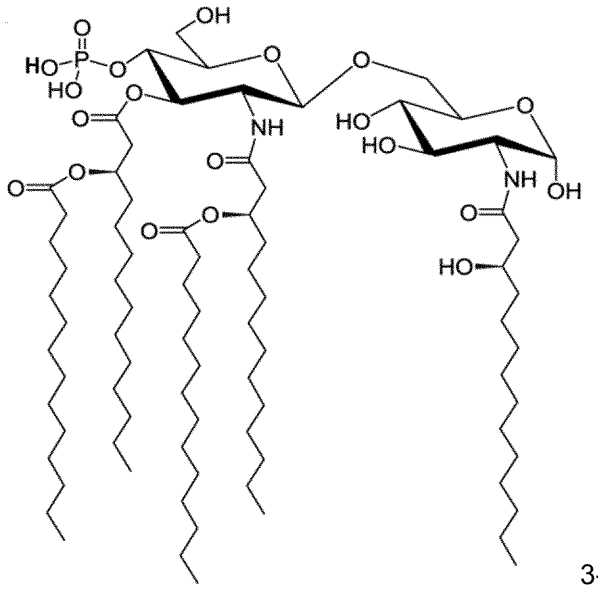
3-脱アシルモノホスホリルヘキサアシル脂質A

【０１００】

別の関心の対象であるＴＬＲ４アゴニストは、以下のものである：

【０１０１】

【化７】



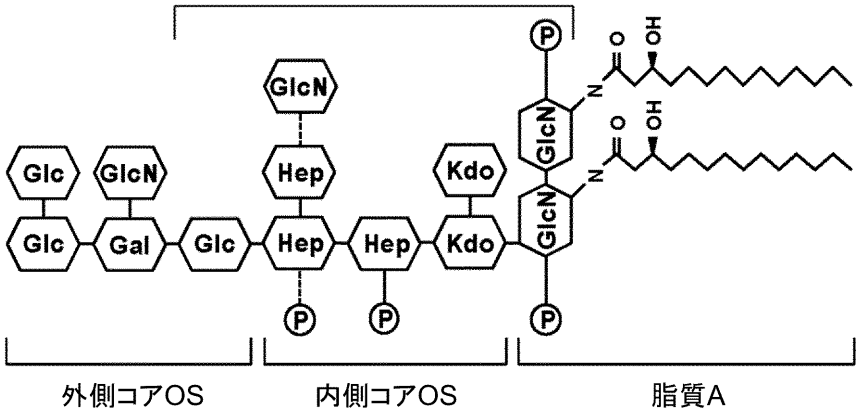
3-脱アシルモノホスホリル脂質A

【０１０２】

関心の対象であるＴＬＲアゴニストは、ｄＬＯＳである（Ｈａｎ，２０１４に記載される通り）：

【０１０３】

【化８】



【０１０４】

一実施形態では、ＴＬＲ４アゴニストは、製薬上許容される塩などの塩の形態にある。第２の実施形態では、ＴＬＲ４アゴニストは、塩の形態にない。

【０１０５】

典型的には、ＧＬＡは少なくとも９０％純粋であり、例えば少なくとも９５％純粋、特に少なくとも９８％純粋、詳細には９９％純粋である。

【０１０６】

被験体は、典型的には哺乳動物であり、特にヒトである。ヒトは、ヒト小児であり得る。例えば、第１用量の投与時に、ヒト被験体は１８歳未満であり得る。ヒトは、ヒト成人であり得る。例えば、第１用量の投与時に、ヒト被験体は１８～６０歳、例えば１８～４０歳であり得る。

【０１０７】

ヒトは、高齢者であり得る。例えば、第１用量の投与時に、ヒト被験体は６０歳超（例えば、６０～８０歳）、例えば６５歳超であり得る。ヒトは、１８～７０歳であり得る。

【０１０８】

典型的なヒト用量は、１～２５μｇのｐｐ６５タンパク質含有量（例えば、５～２０μｇ、詳細には８～１２μｇ、特に１０μｇ）を有するＶＬＰを含む。典型的なヒト用量は、重量基準で、ｐｐ６５の含有量の２００分の１～１０分の１のｇＢタンパク質含有量（例えば、ｐｐ６５の含有量の１２０分の１～４０分の１、特にｐｐ６５の含有量の１００分の１～６０分の１）を有するＶＬＰを含む。タンパク質含有量は、定量的ＥＬＩＳＡなどの方法により測定することができる。ｐｐ６５タンパク質が融合タンパク質中に存在する場合、ｐｐ６５含有量は、融合タンパク質のｐｐ６５部分に基づく。

【０１０９】

投与は、典型的には、必要な場合に繰り返される。例えば、投与は、毎週～６ヵ月毎、２週間毎～６週間毎など、例えば、約４週間毎（±３日間）で繰り返すことができる。

【０１１０】

組成物は、少なくとも１種の追加の製薬上許容される賦形剤（複数可）、アジュバント（複数可）および/または担体（複数可）を含むことができる。典型的な担体としては、エマルジョン、ＩＳＣＯＭおよびリポソーム、特にリポソームが挙げられる。

【０１１１】

用語「リポソーム」は、当技術分野で周知であり、かつ水性空間を囲む１つ以上の脂質二重層を含むベシクルの一般的な分類を規定する。つまり、リポソームは、１つ以上の脂質および/またはリン脂質二重層からなり、かつそれらの構造中に、タンパク質または炭水化物などの他の分子を含有することができる。脂質相と水相の両方が存在するので、リポソームは、水溶性物質、脂溶性物質、および/または両親媒性化合物を封入または取り込むことができる。

【０１１２】

リポソームサイズは、リン脂質組成およびそれらの調製のために用いられる方法に応じて、30nm～数μm（several um）まで変化し得る。本発明では、リポソームサイズは、50nm～200nm、特に60nm～180nm、70～165nmなどの範囲内である。最適には、リポソームは安定であり、かつろ過による便利な滅菌を可能にするために約100nmの直径を有するべきである。

【０１１３】

リポソームの構造的完全性は、リポソームの多分散性およびサイズ（Z平均直径、Zav）を測定する動的光散乱（DLS）などの方法により、または、リポソームの構造の分析のための電子顕微鏡観察により、評価することができる。好適には、平均粒径は95～120nmであり、かつ/または、多分散性（PdI）指数は0.35以下、特に0.3以下、例えば0.25以下である。一実施形態では、平均粒径は95～120nmであり、かつ/または、多分散性（PdI）指数は0.2以下である。

【０１１４】

本発明のリポソームは、ジオレイルホスファチジルコリン（DOPC）などのホスファチジルコリン脂質を含有し得る。好適には、リポソームはまた、コレステロールなどのステロールも含有する。

【０１１５】

QS21などのサポニンを、ヒト用量当たり1～100μg（20～60μgなど）の量で用いることができる。QS21は、約50μgのレベルで用いることができる。好適な範囲の例は、40～60μg、好適には45～55μgまたは49～51μg、例えば50μgである。さらなる実施形態では、ヒト用量は、約25μgのレベルでQS21を含む。より低い範囲の例としては、20～30μg、好適には22～28μgまたは24～26μg、例えば25μgが挙げられる。

【０１１６】

3D-MPLなどのTLR4アゴニストは、ヒト用量当たり1～100μg（20～60μgなど）の量で用いることができる。3D-MPLは、約50μgのレベルで用いることができる。好適な範囲の例は、40～60μg、好適には45～55μgまたは49～51μg、例えば50μgである。さらなる実施形態では、ヒト用量は、約25μgのレベルで3D-MPLを含む。より低い範囲の例としては、20～30μg、好適には22～28μgまたは24～26μg、例えば25μgを含む。

【０１１７】

TLR4アゴニストとサポニンとの重量比は、好適には1：5～5：1、特に1.2：1～1：1.2、例えば1：1である。

【０１１８】

小児に対して意図されるヒト用量は、成人に対して意図されるものと比較して減少させることができる（例えば、50％の減少）。

【０１１９】

サポニン：DOPCの比は、典型的には、1：50～1：10（w/w）の桁、好適には1：25～1：15（w/w）、好ましくは1：22～1：18（w/w）、例えば1：20（w/w）である。

【０１２０】

さらなる実施形態では、緩衝剤が組成物に添加される。液体調製物のpHは、組成物の成分および被験体への投与に対する必要な適合性を考慮して調整される。好適には、液体混合物のpHは、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも5.5、少なくとも5.8、少なくとも6である。液体混合物のpHは、9未満、8未満、7.5未満または7未満であり得る。他の実施形態では、液体混合物のpHは、4～9、5～8、5.5～8などである。結果として、pHは、好適には、6～9、例えば6.5～8.5である。特に好ましい実施形態では、pHは、5.8～6.4である。

【０１２１】

適切な緩衝剤は、酢酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン、マレイン酸塩、リン酸塩、コハク

酸塩、酒石酸塩およびTRISから選択することができる。一実施形態では、緩衝剤は、Na/Na_2PO_4、Na/K_2PO_4またはK/K_2PO_4などのリン酸緩衝剤である。

【０１２２】

緩衝剤は、少なくとも6ｍＭ、少なくとも１０ｍＭまたは少なくとも４０ｍＭの量で液体混合物中に存在し得る。緩衝剤は、１００ｍＭ未満、６０ｍＭ未満または４０ｍＭ未満の量で液体混合物中に存在し得る。

【０１２３】

非経口投与溶液は、細胞変形または溶解を回避するために、製薬上許容される浸透圧を有するべきであることが周知である。製薬上許容される浸透圧とは、一般的に、溶液が、概ね等張であるか、または弱高張である浸透圧を有することを意味する。好適には、再調製される場合に、本発明の組成物は、２５０～７５０ｍＯｓｍ/ｋｇの範囲の浸透圧を有し、例えば、浸透圧は、２５０～５５０ｍＯｓｍ/ｋｇの範囲、例えば２８０～５００ｍＯｓｍ/ｋｇの範囲であり得る。特に好ましい実施形態では、浸透圧は、２８０～３１０ｍＯｓｍ/ｋｇの範囲であり得る。

【０１２４】

浸透圧は、市販の浸透圧計、例えば、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社（米国）から入手可能なＡｄｖａｎｃｅｄ™ Ｍｏｄｅｌ ２０２０を用いることによるなどの、当技術分野で公知の技術に従って測定することができる。

【０１２５】

「等張化剤」は、生理学的に耐えられ、かつ製剤と接触している細胞膜を通した水の正味の流れを防ぐために、製剤に好適な等張性を賦与する化合物である。一部の実施形態では、組成物に用いられる等張化剤は、塩（または塩の混合物）であり、簡便には塩は、好適には約１５０ｎＭの濃度での塩化ナトリウムである。しかしながら、他の実施形態では、組成物は非イオン性等張化剤を含み、組成物中の塩化ナトリウムの濃度は１００ｍＭ未満、例えば、８０ｍＭ未満、例えば、５０ｍＭ未満、４０ｍＭ未満、３０ｍＭ未満など、特に２０ｍＭ未満である。組成物中のイオン強度は、１００ｍＭ未満、例えば、８０ｍＭ未満、例えば、５０ｍＭ未満、４０ｍＭ未満または３０ｍＭ未満などであり得る。

【０１２６】

特定の実施形態では、非イオン性等張化剤は、スクロースおよび/また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）であり得る。等張化剤が塩またはポリオールである場合の免疫学的に活性なサポニン画分およびＴＬＲ４アゴニストを含むアジュバントは、国際公開第２０１２/０８０３６９号に記載されている。

【０１２７】

好適には、ヒト投与体積は、０.０５ｍＬ～１ｍＬ、例えば、０.１ｍＬ～０.５ｍＬ、特に約０.５ｍＬ、または０.７ｍＬの投与体積である。用いられる組成物の体積は、送達経路および位置に依存することができ、皮内経路によって比較的小さな用量が投与される。単位用量容器は、単位用量の投与中に物質の適正な操作を可能にするための過多量（ｏｖｅｒａｇｅ）を含むことができる。

【０１２８】

そのような組成物は、任意により、化学療法治療などの１種以上の追加の治療上活性な物質を含む組み合わせで投与することができる。

【０１２９】

組成物は、投与のために意図され、したがって、典型的には、無菌の注射可能形態（例えば、筋内注射に好適な形態）で提供される。例えば、一部の実施形態では、医薬組成物は、注射に好適な液体（例えば、水性）投与剤型で提供される。

【０１３０】

一部の実施形態では、提供される組成物は、１種以上の製薬上許容される賦形剤（例えば、保存料、不活性希釈剤、分散剤、表面活性剤および/または乳化剤、緩衝剤等）を含む。好適な賦形剤としては、例えば、水、生理食塩液、デキストロース、スクロース、ト

レハロース、グリセロール、エタノール、または類似物、およびそれらの組み合わせが挙げられる。Remington's The Science and Practice of Pharmacy、第21版、A. R. Gennaro編（Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006）は、医薬組成物の製剤化で用いられる様々な賦形剤およびそれらの調製のための公知の技術を開示する。いずれかの望ましくない生物学的効果を生じることにより、またはそうでなければ、有害な様式で組成物のいずれかの他の成分と方法で相互作用することによってなど、いずれかの慣用の賦形剤媒体が、ある物質またはその誘導体と不適合である場合を除いて、その使用が、本発明の範囲内であると意図される。一部の実施形態では、組成物は、1種以上の保存料を含む。一部の実施形態では、組成物は、保存料を含まない。

【０１３１】

一部の実施形態では、組成物は、冷蔵および/または冷凍できる形態で提供される。一部の実施形態では、再調製された溶液および/または液体投与剤型を、再調製後に、一定期間（例えば、2時間、12時間、24時間、2日間、5日間、7日間、10日間、2週間、1ヵ月、2ヵ月、またはそれ以上）にわたって保存することができる。一部の実施形態では、明記された時間より長いVLP製剤の保存は、VLP劣化を生じさせる。

【０１３２】

本明細書中に記載される組成物の製剤は、いずれかの公知の方法または薬理学の分野で今後開発される方法により、調製できる。一部の実施形態では、そのような準備方法は、有効成分を、1種以上の賦形剤および/または1種以上の他の補助的成分と併せるステップ、および続いて、必要でありかつ/または望ましい場合、生成物を所望の単回用量単位または複数回用量単位へとパッケージ化するステップを含む。

【０１３３】

本発明に従う組成物は、単一単位用量として、かつ/または複数の単一単位用量として、調製され、パッケージ化され、かつ/または大容量で販売されることができる。本明細書中で用いる場合、「単位用量」は、所定量の有効成分を含む医薬組成物の個別量である。有効成分の量は、一般的に、被験体に投与されるであろう用量と等しいか、かつ/または、例えば、そのような用量の2分の1もしくは3分の1などの、そのような用量の使い易い一部分である。

【０１３４】

本発明に従う医薬組成物中の有効成分、製薬上許容される賦形剤、および/またはいずれかの追加の成分の相対的な量は、その正体、サイズ、および/もしくは被験体の状態に応じて、かつ/または組成物が投与される予定の経路に応じて変わり得る。

【０１３５】

一部の実施形態では、治療は、本開示の組成物の、適切に時間間隔が空けられた、複数回の投与を含む。本明細書中に記載される組成物は、一般的に、該組成物が免疫応答を誘導し続ける時間にわたって、または患者がその疾患の進行を経験するまで、投与される。本発明の好ましい実施形態では、本発明の組成物は、4週間毎に投与される。

【０１３６】

好ましい投与量は、被験体毎に異なり、かついくつもの要因に依存し得る。つまり、一般的に、用いられる詳細な用量は、処方する医師により決定される通りであろうし、かつ被験体の体重だけではなく、被験体の年齢にも依存し、および、疾患の進行および患者でのHCMVに対する免疫調節不全の程度にも依存する可能性があることが理解されるであろう。

【０１３７】

特定の実施形態では、提供される組成物は、例えば、注射による、非経口的送達のために製剤化することができる。そのような実施形態では、投与は、例えば、静脈内、筋内、皮内、もしくは皮下、または点滴もしくは無針注射技術を介するものであり得る。好ましい実施形態では、組成物は、筋内注射のために製剤化される。

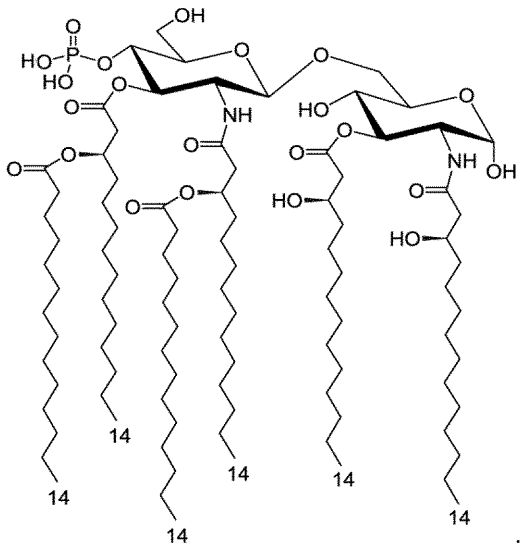
【０１３８】

本発明に従う組成物の投与は、被験体のQOLを改善し、症状を軽減し、進行を遅らせ

、かつ/または生存期間を延長することができる。
【０１３９】
本発明は、以下の条項によりさらに例示される：
条項1．(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子（ＶＬＰ）；ならびに
(ii) サポニンおよびＴＬＲ4アゴニストを含むアジュバント
を含む、免疫原性組成物。
条項2．ＨＣＭＶ関連癌の治療における使用のための、条項1に記載の免疫原性組成物。
条項3．(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子を含む第1の容器；ならびに
(ii) サポニンおよびＴＬＲ4アゴニストを含むアジュバントを含む第2の容器
を含む、免疫原性組成物の調製のためのキット。
条項4．(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子を含む第1の容器；
(ii) サポニンを含む第2の容器；
(iii) ＴＬＲ4アゴニストを含む第3の容器
を含む、免疫原性組成物の調製のためのキット。
条項5．(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子；ならびに
(ii) ＴＬＲ4アゴニスト
と一緒での、被験体での免疫応答を生起するための使用のための、サポニン。
条項6．(i) 以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子；ならびに
(ii) サポニン
と一緒での、被験体での免疫応答を生起するための使用のための、ＴＬＲ4アゴニスト。
条項7．以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子と一緒での使用のための、サポニンおよびＴＬＲ4アゴニストを含むアジュバント。
条項8．サポニン、ＴＬＲ4アゴニスト、ならびに以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）gagタンパク質；
(b) ＨＣＭＶ pp65タンパク質；および
(c) ＨＣＭＶ糖タンパク質Ｂ（gB）タンパク質

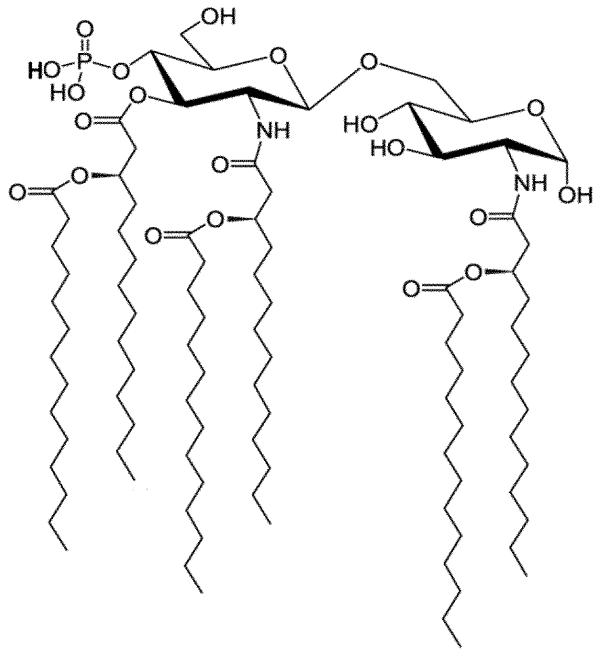
を含むウイルス様粒子の投与を含む、被験体での免疫応答を生起するための方法。
条項9．前記サポニン、前記TLR4アゴニストおよび前記ウイルス様粒子が、条項1に記載の免疫原性組成物の形態で投与される、条項8に記載の方法。
【０１４０】
条項10．サポニン、TLR4アゴニスト、ならびに以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子の投与を含む、被験体でのHCMV関連癌の治療のための方法。
条項11．医薬の製造における、特に、HCMV関連癌の治療のための医薬の製造における、サポニン、TLR4アゴニスト、ならびに以下の構成要素：
(a) マウス白血病ウイルス（MLV）gagタンパク質；
(b) HCMV pp65タンパク質；および
(c) HCMV糖タンパク質B（gB）タンパク質
を含むウイルス様粒子の使用。
条項12．前記MLV Gagタンパク質がモロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）Gagタンパク質である、条項1～11のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項13．前記VLPが、配列番号1に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、詳細には少なくとも95%、特に少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む、例えばそれからなる、MLV Gagポリペプチドを含む、条項1～12のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項14．前記VLPが、配列番号2に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、詳細には少なくとも95%、特に少なくとも98%の同一性を有する核酸配列によりコードされるポリペプチドを含む、条項1～13のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項15．前記VLPが、配列番号8に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、詳細には少なくとも95%、特に少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む、例えばそれからなる、gBタンパク質を含む、条項1～14のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項16．前記VLPが、配列番号9に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、詳細には少なくとも95%、特に少なくとも98%の同一性を有する核酸配列によりコードされるgBタンパク質を含む、条項1～15のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項17．前記VLPが、配列番号11に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、詳細には少なくとも95%、特に少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む、例えばそれからなる、pp65タンパク質を含む、条項1～16のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項18．前記VLPが、配列番号12に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、詳細には少なくとも95%、特に少なくとも98%の同一性を有する核酸配列によりコードされるpp65タンパク質を含む、条項1～17のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項19．前記VLPが、MLV GagおよびHCMV pp65タンパク質の融合体を含む、条項1～18のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【０１４１】
条項20．前記MLV Gagが、N末端で、直接的または間接的に、前記pp65タンパク質と融合している、条項19に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項21．前記VLPが、配列番号4に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、詳

細には少なくとも95%、特に少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含む、例えばそれからなる、融合タンパク質を含む、条項20に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項22．前記サポニンが、Quil Aまたはその誘導体である、条項1～21のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項23．前記サポニンがQS21である、条項22に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項24．前記TLR4アゴニストがリポ多糖である、条項1～23のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項25．前記リポ多糖がモノホスホリル脂質Aである、条項24に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項26．前記モノホスホリル脂質Aが3-脱-O-アシル化モノホスホリル脂質A（3D-MPL）である、条項25に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項27．前記TLR4アゴニストが、式1または式1aの化合物などのAGP、特にCRX601である、条項1～24のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項28．前記TLR4アゴニストが、式2または式2bの化合物などのグルコピラノル脂質アジュバント、特に：
【０１４２】
【化９】



である、条項1～24のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項29．前記TLR4アゴニストが：

【化１０】



3-脱アシルモノホスホリルヘキサアシル脂質A

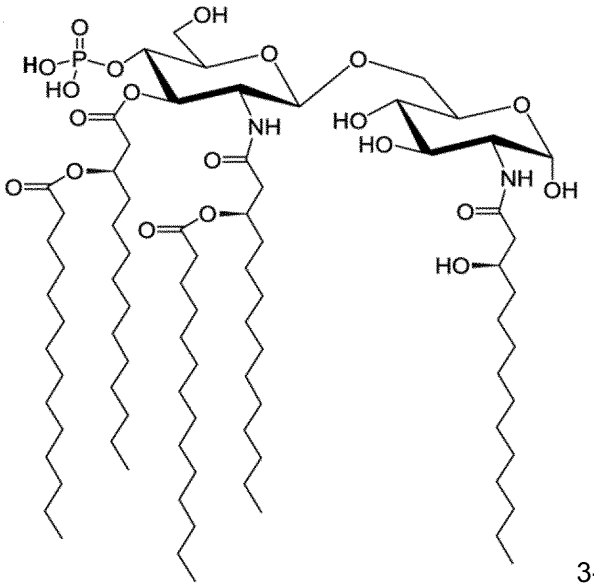
である、条項1～24のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【０１４３】

条項30．前記TLR4アゴニストが：

【０１４４】

【化１１】



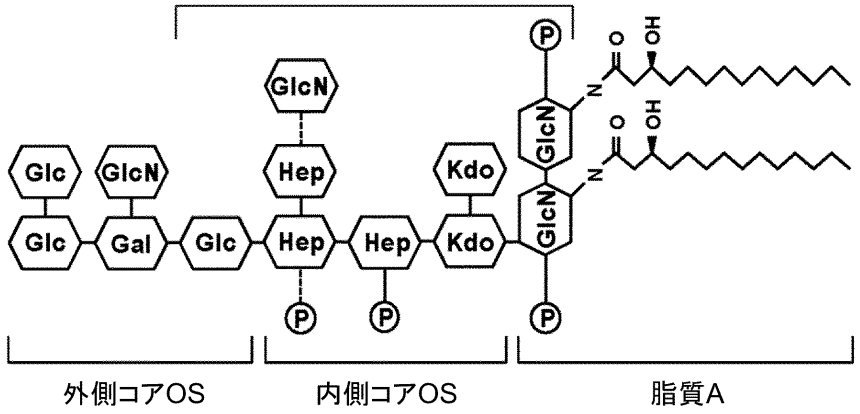
3-脱アシルモノホスホリル脂質A

である、条項1～24のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項31．前記TLR4アゴニストが：

【０１４５】

【化１２】



である、条項1～24のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項32．18～70歳のヒトなどのヒトへの投与のための、条項1～31のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項33．乳癌、結腸癌、卵巣癌および前立腺癌、横紋筋肉腫、肝細胞癌、唾液腺腫瘍、神経芽細胞腫および脳腫瘍（髄芽腫およびGBMなど）から選択されるHCMV関連癌の治療における使用のための、条項1～32のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項34．GBMの治療における使用のための、条項1～33のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項35．最初の発症を経験している被験体でのGBMの治療における使用のための、条項34に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項36．最初の再発などの再発を経験している被験体でのGBMの治療における使用のための、条項34に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項37．400mm^2以下の最大断面積を有する腫瘍を有する被験体でのGBMの治療における使用のための、条項34～36のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項38．治療の開始時に、少なくとも2、例えば少なくとも2.5のCD4/CD8比を有する被験体での使用のための、条項1～37のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項39．治療の開始時に、少なくとも3のCD4/CD8比を有する被験体での使用のための、条項38に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

【０１４６】

条項40．治療の開始時に、3未満、例えば2.5未満、特に2未満のCD4/CD8比を有する被験体での使用のための、条項1～37のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項41．抗原特異的抗体応答の生起における使用のための、条項1～40のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項42．抗原特異的$CD4^+$T細胞応答の生起における使用のための、条項1～41のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項43．抗原特異的$CD8^+$T細胞応答の生起における使用のための、条項1～42のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。

条項44．前記抗原特異的応答がpp65に対するものである、条項1～43のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項45．前記抗原特異的応答がgBに対するものである、条項1～44のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項46．投与が筋内的である、条項1～45のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項47．ヒト用量が、1～25μg、例えば5～20μg、詳細には8～12μg、特に10μgのpp65タンパク質含有量を含む、条項1～46のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項48．ヒト用量が、重量基準で、pp65の含有量の200分の1～10分の1、例えばpp65の含有量の120分の1～40分の1、特にpp65の含有量の100分の1～60分の1のgBタンパク質含有量を含む、条項1～47のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項49．ヒト用量が、1～100μg、例えば50μgのサポニンを含む、条項1～48のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【０１４７】
条項50．ヒト用量が、1～100μg、例えば50μgのTLR4アゴニストを含む、条項1～49のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項51．前記サポニンおよび/またはTLR4アゴニストが、リポソーム担体を用いて製剤化される、条項1～50のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項52．前記サポニンおよび/またはTLR4アゴニストが、ステロール、例えばコレステロールを含むリポソーム担体を用いて製剤化される、条項51に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項53．投与が、1週間毎～6ヵ月間毎、例えば2週間毎～6週間毎、例えば4週間毎に繰り返される、条項1～52のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
条項54．投与が、10μgのpp65タンパク質を含有するVLP、ならびにリポソーム製剤中に50μgのQS21および50μgの3D-MPLを含むアジュバントを含む組成物を用いて筋内的に行なわれ、かつ投与が4週間毎に繰り返される、条項1～53のいずれか1項に記載の組成物、キット、サポニン、TLR4アゴニスト、アジュバント、方法または使用。
【実施例】
【０１４８】
以下の実施例は、本明細書中に記載される免疫原性組成物の製造および実施のいくつかの例示的様式を説明する。これらの実施例は、例示目的のためだけのものであり、かつ本明細書中に記載される組成物および方法の範囲を限定することを意味しないことが理解されるべきである。
【０１４９】
実施例1：DNA発現プラスミドの構築
本実施例は、組み換えHCMV遺伝子配列（gB（配列番号10）およびGag/pp65融合遺伝子（配列番号6）配列）の発現のための発現プラスミドおよび構築物の開発を説明する。標準的な発現プラスミドは、一般的に、哺乳動物起源のプロモーター配列、イントロン配列、ポリアデニル化シグナル配列（PolyA）、pUC複製起点配列（pUC-pBR322はcolE1起源/複製開始部位であり、大腸菌（DH5α）などの細菌中でプラスミドを複製するために用いられる）、およびプラスミドプラーク選択のための選択マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子からなる。プラスミド内には、イントロンに続いて、対象となる遺伝子または部分的な遺伝子配列を中につなぎ合わせる（splice in）ために用いることができる様々な制限酵素部位がある。

【０１５０】
Propol II発現プラスミドは、pHCMV（HCMVの初期プロモーター）、βグロビンイントロン（BGLイントロン）、ウサギグロビンポリアデニル化シグナル配列（PolyA）、pUC複製起点配列（pUC-pBR322はcolE1起源/複製開始部位であり、大腸菌（DH5α）などの細菌中でプラスミドを複製するために用いられる）、およびアンピシリン耐性遺伝子β-ラクタマーゼ（AmpR-プラスミド用の選択マーカーはアンピシリン（100μg/mL）に対する耐性を付与する）を含む。
【０１５１】
Gag MMLV発現構築物（「MLV-Gag」）を開発するために、MMLVのGagポリタンパク質をコードする相補的DNA（cDNA）配列（そのC末端Pol配列を除くGag）（配列番号3）を、Propol II発現ベクターにクローニングした。gB発現構築物（「gB」）を開発するために、gBの全長配列を、ヒト発現のためにコドン最適化し（GenScript社）（配列番号10）、gBの細胞外部分、膜貫通ドメイン（TM）および細胞質部分（Cyto）を含めてPropol II発現ベクターにクローニングした。Gag/pp65発現構築物（「Gag/pp65」）を開発するために、MMLVのGagポリタンパク質をコードする配列（そのC末端Pol配列を除くGag）を、ヒト発現のためにコドン最適化された（GenScript社）pp65の全長配列（配列番号6）と融合させ、Propol II発現ベクターにクローニングした。
【０１５２】
DNAプラスミドをコンピテント大腸菌（DH5α）中で増幅させ、標準的プロトコールに従ってエンドトキシン不含調製キットを用いて精製した。
【０１５３】
実施例2：ウイルス様粒子の生成
本実施例は、実施例1に記載された種々の組み換えHCMV抗原を含むウイルス様粒子の生成のための方法を説明する。
【０１５４】
HEK293細胞から誘導された293SF-3F6細胞株は、無血清既知組成（chemically defined）培地中で増殖させた特許対象の懸濁細胞培養物である（加国特許第2,252,972号および米国特許第6,210,922号）。細胞を、リン酸カルシウム法を用いて、MMLV-Gag/pp65 DNA発現プラスミドで一時的トランスフェクションし、実施例1に記載されたgB DNA発現プラスミドを用いて共トランスフェクションしたHEK293細胞によるHCMV抗原の発現を、フローサイトメトリーにより確認した。トランスフェクションの48～72時間後に、VLPを含有する上清を回収し、0.45μm孔径メンブレンを通してろ過し、SW32 Beckmanローター中で20%スクロースクッションを通した超遠心（25,000rpm、2時間、4℃）によりさらに濃縮および精製した。ペレットを、無菌エンドトキシン不含PBS（GIBCO社）中に再懸濁して、500倍濃縮VLPストックを得た。総タンパク質を、アリコートに対してBradfordアッセイ定量化キット（BioRad社）により決定した。精製したVLPを、使用まで-80℃で保存した。精製されたVLPの各ロットを、gB（gBに対するCH28マウスモノクローナル抗体；Virusys Corporation；Pereira, L et al. 1984 Virology 139:73-86）、およびpp65（UL83/pp65に対するCH12マウスモノクローナル抗体；Virusys Corporation；Pereira, L. et al. 1982 Infect Immun 36: 924-932）に対する特異的抗体を用いるSDS-PAGEおよびウエスタンブロットにより、gB、およびMMLV-Gag/pp65融合タンパク質の発現に関して分析した。抗体は、増強化学発光（ECL）を用いて検出した。
【０１５５】
実施例3：gB/pp65Gag VLPを用いる健康なHCMV陽性被験体由来PBMCでのT細胞の刺激
本研究の目的は、実施例2に記載される通りに生成され、かつスクロースクッション超遠心により精製されたgB/pp65Gag VLPが、健康なHCMV陽性被験体由来の末梢血単核細胞（「PBMC」）中の既存のHCMV特異的$CD4^+$および$CD8^+$T細胞を活性化する能力を評価することであった。

【０１５６】
ヒト末梢血を、CMV^+の健康なドナーから取得した。PBMCをFicoll勾配分離を用いて全血から単離し、単回使用アリコートを作製した。PBMCは、分離後新鮮で、または-170℃での保存後に用いた。簡潔には、PBMCを、4mL PP培養チューブ中で1×10^6細胞/mLで培養した。gB/pp65 eVLPおよび対照を、細胞に添加した。細胞を、刺激剤と共に3時間培養し、その後モネンシンを添加し、さらに10時間培養した。
【０１５７】
IFN-γ分泌性$CD4^+$および$CD8^+$T細胞の頻度に関して、ex vivo PBMC培養中で効力を評価した。細胞を回収し、PerCPコンジュゲート型抗CD3、PEコンジュゲート型抗CD4、およびAPCコンジュゲート型抗CD8モノクローナル抗体を用いて表面抗原について染色した。続いて、BV510コンジュゲート型抗IFN-γを用いる細胞内染色のために細胞を透過化し、固定した。染色したウェルを、FACS Accuri（Beckton-Dickinson社）でのフローサイトメトリー分析により分析した。FlowJoソフトウェア（TreeStar社）を用いて、$CD3^+$細胞に対するゲーティングを最初に行なって、$CD3^+CD4^+$または$CD3^+CD8^+$集団のいずれかのうちのIFN-γ分泌性細胞の割合を評価した。
【０１５８】
データを以下の表1に示す。データは、空のVLP（gB/pp65 VLPを含む組成物の場合）または未刺激細胞（組み換えタンパク質の場合）を用いる刺激に対するバックグラウンド応答を差し引いた後の、細胞の平均パーセンテージとして示される。
【０１５９】
【表１】

表 1

組成物	$CD4^+$集団内の IFN-γ 陽性 T 細胞の平均%	$CD8^+$集団内の IFN-γ 陽性 T 細胞の平均%
gB/pp65Gag VLP (2 ug/ml gB 含有量)	0.4811	0.8422
gB/pp65Gag VLP (1 ug/ml gB 含有量)	0.4511	1.537
組み換え gB (2 ug/ml) + pp65*	0.0656	0.4789
組み換え gB (1 ug/ml) + pp65*	0.0889	0.8433

*実験が、実証された pp65 ELISA の開発に先立っているので、pp65 含有量は示されていない。

【０１６０】
表1に示される通り、二価gB/pp65Gag VLPは、ex vivoで$CD4^+$および$CD8^+$の両方のIFN-γ分泌性T細胞応答を刺激する。組み換えgBおよびpp65タンパク質の組み合わせは、健康被験体由来のPBMCでの$CD8^+$および特に$CD4^+$T細胞応答の刺激では、二価VLPよりも有効性が低かった。
【０１６１】
実施例4：ヒトGBM患者でのgB/pp65Gag VLPの臨床試験
GBM患者に対する、QS21（用量当たり50μg）および3D-MPL（用量当たり50μg）を含むリポソームアジュバントを用いて製剤化されたgB/pp65Gag VLP（pp65タンパク質含有量に基づいて10μg gB/pp65Gag VLP）を含む免疫原性組成物の、安全性、忍容性および影響を規定するために、gB/pp65Gag VLPは第I/II相研究で試験される。
【０１６２】
$400mm^2$以下の腫瘍サイズを有し、GBMの最初の再発を有する成人被験体（18～70

歳）が参加する。患者は、外科的腫瘍除去ならびにそれに続く放射線照射およびテモゾロミドおよびコルチコステロイドを以前に受けている。各被験体は、試験処置を、筋内的に4週間毎に投与される。

【０１６３】

臨床的な疾患進行は、MRIを用いた腫瘍サイズの測定によりモニタリングされる。

【０１６４】

調査薬に対する応答は、以下の通りに測定される：

・ベースラインおよび各処置の2週間後でのELISAアッセイによるHCMV gB抗原に対する抗体力価（結果は、ベースラインおよび注入後サンプルでの血清IgG抗gB抗体力価として提供される）。

・ベースラインおよび各処置の2週間後に評価されるIFN-γおよびIL-5 ELISPOTを用いるHCMV gBおよびpp65抗原に対する細胞性免疫。結果は、ベースラインおよび各処置後でのHCMV刺激後の3×10^5個のプレートされたPBMC当たりのIFN-γおよびIL-5スポットの頻度として提供される。

・最初の用量の日付から進行（または死亡）の日付までの無進行生存（PFS）。

【０１６５】

細胞性免疫（CMI）データは、10^6個のPBMC当たりのスポット形成細胞（SFC）として表現される。

【０１６６】

腫瘍応答は、SD（安定疾患）またはPD（進行型疾患）として示される。

【０１６７】

文脈がそれ以外を必要としない限り、明細書および以下の特許請求の範囲全体を通して、単語「含む」（comprise）、ならびに「comprises」および「comprising」などの変形は、記載された整数、ステップ、整数の群またはステップの群の包含を意味するが、いずれかの他の整数、ステップ、整数の群またはステップの群の排除を意味しないことが理解されるであろう。

【０１６８】

本明細書および特許請求の範囲が一部分を形成する本出願は、いずれかの後続の出願に関する優先権のための基礎として用いられる場合がある。そのような後続の出願の特許請求の範囲は、本明細書中に記載されるいずれかの特徴または特徴の組み合わせを対象とすることができる。実施形態は、本発明のさらなる実施形態を形成するための状況に適切である場合、独立して、互いに完全に組み合わせ可能であると想定される。それらは、製品、組成物、プロセス、または使用クレームの形態を採り得、かつ、例示として限定を含まずに、以下の特許請求の範囲を含み得る。

【０１６９】

特許および特許出願を含むがこれらに限られない、本明細書中で言及されるすべての刊行物は、それぞれの個別の刊行物があたかも完全に説明されているように、参照により本明細書中に組み入れられると具体的かつ個別に示されているが如く、参照により本明細書中に組み入れられる。

【０１７０】

参考文献一覧

Baryawno N et al., Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target *J Clin Invest* 2011 121, 4043-4055

Cloughesy et al., Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nature Medicine* 2019 25: 477–486

Cobbs CS et al, Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. Cancer Res. 2002 Jun 15;62(12):3347-50

Cobbs C et al, HCMV glycoprotein B is expressed in primary glioblastomas and enhances growth and invasiveness via PDGFR-alpha activation *Oncotarget* 2014; 5:1091-1100

Dziurzynski et al., Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma *Neuro-Onc.* 2012 14:246-55

Garçon N and Di Pasquale A, From discovery to licensure, the Adjuvant System story. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2017 13:1, 19-33, DOI: 10.1080/21645515.2016.1225635

Garrone et al., A Prime-Boost Strategy Using Virus-Like Particles Pseudotyped for HCV Proteins Triggers Broadly Neutralizing Antibodies in Macaques. *Science Transl. Med.* 2011 3: 1-8

Han et al 2014 Characterization of the Structure and Immunostimulatory Activity of a Vaccine Adjuvant, De-O-Acylated Lipooligosaccharide PLoS ONE 9(1):e85838 (and associated correction Han et al 2014 PLoS ONE 9(4):94517)

Harkins LE et al., Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium *Herpesviridae* 2010 1(1):8

Libard S et al., Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 Is Detected in All Intra- and Extra-Axial Brain Tumours Independent of the Tumour Type or Grade *PLoS ONE* 2014 9, e108861

Liu et al., Epstein-Barr virus- and cytomegalovirus-specific immune response in patients with brain cancer. *J. Trans. Med.*, 2018 16:182

Mitchell DA et al., Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2008 Feb;10(1):10-8

Nair SK et al., Recognition and Killing of Autologous Primary Glioblastoma Tumor Cells by Human Cytomegalovirus pp65-Specific Cytotoxic T Cells. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 2684-2694

Nauclér CS et al., The emerging role of human cytomegalovirus infection in human carcinogenesis: a review of current evidence and potential therapeutic implications. *Oncotarget.* 2019 Jul 2;10(42):4333-4347

Rahbar, A et al., Low levels of Human Cytomegalovirus Infection in Glioblastoma multiforme associates with patient survival - a case-control study. *Herpesviridae* 2012; 3:3

Rahbar A et al., Discordant humoral and cellular immune responses to Cytomegalovirus (CMV) in glioblastoma patients whose tumors are positive for CMV. *Oncoimmunology* 2015 Feb; 4(2): e982391

Schuessler A et al., Autologous T-cell Therapy for Cytomegalovirus as a Consolidative Treatment for Recurrent Glioblastoma. *Cancer Res.* 2014; 74: 3466-3476

Sharma S et al., Noninfectious virus-like particles produced by Moloney murine leukemia virus-based retrovirus packaging cells deficient in viral envelope become infectious in the presence of lipofection reagents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10803-8

Taher C et al., High prevalence of human cytomegalovirus proteins and nucleic acids in primary breast cancer and metastatic sentinel lymph nodes 2013 *PLoS One* 2013;8(2):e56795

Wolmer-Solberg N et al., Frequent detection of human cytomegalovirus in neuroblastoma: a novel therapeutic target? *Int J Cancer* 2013133, 2351-61

Woroniecka et al., T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma *Clin Cancer Res.* 2018 24 4175-4186

【配列表】
2022547298000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/075002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/245 A61P35/00 A61P37/04 A61K39/00
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)
A61K A61P C07K C12N

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, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	D.E. ANDERSON ET AL: "Therapeutic vaccination against glioblastoma multiformae using CMV gB/pp65 eVLPs formulated with GM-CSF", ANNALS OF ONCOLOGY., vol. 26, 1 November 2015 (2015-11-01), page viii5, XP055753703, NL ISSN: 0923-7534, DOI: 10.1093/annonc/mdv514.19 abstract -/--	1-33

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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	Date of mailing of the international search report
25 November 2020	08/12/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hermann, Patrice

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/075002

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	& Tanvir Ahmed ET AL: "CMV gB/pp65 eVLPs FORMULATED WITH GM-CSF AS A THERAPEUTIC VACCINE AGAINST GBM AND MEDULLOBLASTOMA", Neuro-oncology (Charlottesville, Va.), 1 November 2016 (2016-11-01), pages vi93-vi93, XP055753567, DOI: 10.1093/neuonc/now212.387 Retrieved from the Internet: URL:https://1o976r1jw2eculmeoxz46ig6-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2016/03/VBI-Vaccines-GBM-Immunotherapy-Program-Keystone-Symposia-March-2016.pdf [retrieved on 2020-11-24] abstract and results presented in the poster	1-33
Y	CIMICA VELASCO ET AL: "Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines", CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 183, 3 August 2017 (2017-08-03), pages 99-108, XP085256947, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1016/J.CLIM.2017.08.004 abstract, p. 103 right-hand column paragraph 5.3.3	1-33
A	WO 2013/068847 A2 (VARIATION BIOTECHNOLOGIES INC [CA]) 16 May 2013 (2013-05-16) cited in the application the whole document	1-33
A	WO 2009/155535 A2 (UNIV DUKE [US]; SAMPSON JOHN H [US]; MITCHELL DUANE A [US]) 23 December 2009 (2009-12-23) the whole document	1-33
Y,P	Anonymous: "VBI Vaccines Announces Data from VBI-1901 Presented at AACR 2020: Partial Response Observed, Promising Biomarker Strategy Identified - VBI Vaccines Inc.", , 22 June 2020 (2020-06-22), XP055753729, Retrieved from the Internet: URL:https://www.vbivaccines.com/wire/aacr-june-2020/ [retrieved on 2020-11-24] the whole document	1-33

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2020/075002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013068847 A2	16-05-2013	AU 2012335277 A1	12-06-2014
		AU 2018203538 A1	07-06-2018
		BR 112014011229 A2	09-05-2017
		CA 2889659 A1	16-05-2013
		CN 104271745 A	07-01-2015
		CN 107875382 A	06-04-2018
		EP 2776567 A2	17-09-2014
		JP 6232544 B2	22-11-2017
		JP 6657150 B2	04-03-2020
		JP 2015505299 A	19-02-2015
		JP 2018023374 A	15-02-2018
		KR 20140095556 A	01-08-2014
		KR 20190104644 A	10-09-2019
		MX 353189 B	05-01-2018
		RU 2019139064 A	27-01-2020
		US 2014308308 A1	16-10-2014
		US 2017349634 A1	07-12-2017
		WO 2013068847 A2	16-05-2013
WO 2009155535 A2	23-12-2009	AU 2009259923 A1	23-12-2009
		CA 2728739 A1	23-12-2009
		CN 102123732 A	13-07-2011
		DK 3156069 T3	21-09-2020
		EP 2303319 A2	06-04-2011
		EP 3156069 A1	19-04-2017
		JP 6342982 B2	13-06-2018
		JP 2011525191 A	15-09-2011
		JP 2015134767 A	27-07-2015
		JP 2017081960 A	18-05-2017
		US 2012288473 A1	15-11-2012
		US 2013189224 A1	25-07-2013
		US 2015335732 A1	26-11-2015
		US 2018153982 A1	07-06-2018
		US 2020246452 A1	06-08-2020
		US 2020345837 A1	05-11-2020
		WO 2009155535 A2	23-12-2009

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*7/04 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/04	

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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

セッツ州，ケンブリッジ，スイート ２２４１，サード ストリート ２２２，ヴァリエーション バイオテクノロジーズ インコーポレーテッド

(72)発明者 シュナイダー－オーラム，クリステン

アメリカ合衆国 ２０８５０ メリーランド州，ロックビル，シャディ グローブ ロード １４２００，グラクソスミスクライン

Ｆターム（参考） 4B065 AA95X AA95Y AB01 BA01 BD38 CA45

4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA23 MA02 MA17 MA66 NA05 NA14 ZB261 ZB262

4C085 AA03 BA83 GG01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 DA86 EA31 FA72 FA74