

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6169494号
(P6169494)

(45) 発行日 平成29年7月26日(2017.7.26)

(24) 登録日 平成29年7月7日(2017.7.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N 7/01	(2006.01)	C 12 N	7/01	
A 61 K 39/285	(2006.01)	A 61 K	39/285	
A 61 K 35/76	(2015.01)	A 61 K	35/76	
A 61 K 39/145	(2006.01)	A 61 K	39/145	

請求項の数 10 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-552568 (P2013-552568)
(86) (22) 出願日	平成24年1月30日 (2012.1.30)
(65) 公表番号	特表2014-506785 (P2014-506785A)
(43) 公表日	平成26年3月20日 (2014.3.20)
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/023085
(87) 國際公開番号	W02012/106231
(87) 國際公開日	平成24年8月9日 (2012.8.9)
審査請求日	平成27年1月29日 (2015.1.29)
(31) 優先権主張番号	61/438,024
(32) 優先日	平成23年1月31日 (2011.1.31)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	506299054 ナノセラピューティクス・インコーポレイ テッド N A N O T H E R A P E U T I C S , I N C . アメリカ合衆国32615フロリダ州アラ チュア、ノースウェスト・ナノ・コート1 3200番
(74) 代理人	230104019 弁護士 大野 聖二
(74) 代理人	100119183 弁理士 松任谷 優子
(74) 代理人	100149076 弁理士 梅田 慎介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インフルエンザAウイルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答を誘導するための組換えウイルスベクターおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザAヘッドラレスヘマグルチニン(h1HA)ポリペプチドに挿入された少なくとも1つのインフルエンザAM2細胞外ドメイン(M2e)ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする遺伝子カセットを含む、組換えワクシニアウイルス。

【請求項2】

インフルエンザAマトリックスタンパク質1(M1)をコードする遺伝子カセットと、インフルエンザA核タンパク質(NP)をコードする遺伝子カセットと、を更に含む、請求項1に記載の組換えワクシニアウイルス。

【請求項3】

請求項1に記載の組換えワクシニアウイルスを含む、薬学的組成物。

【請求項4】

個人におけるインフルエンザAウイルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答を誘導するための薬学的組成物であって、請求項1に記載の組換えワクシニアウイルスを含む、薬学的組成物。

【請求項5】

インフルエンザAヘッドラレスヘマグルチニン(h1HA)ポリペプチドに挿入された少なくとも1つのインフルエンザAM2細胞外ドメイン(M2e)ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする第1の遺伝子カセットと、インフルエンザA核タンパク質(NP)をコードする第2の遺伝子カセットと、を含む、組換えワクシニアウイルス。

10

20

【請求項 6】

請求項 5 に記載の組換えワクシニアウイルスを含む、薬学的組成物。

【請求項 7】

個人におけるインフルエンザ A ウィルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答を誘導するための薬学的組成物であって、請求項 5 に記載の組換えワクシニアウイルスを含む薬学的組成物。

【請求項 8】

配列番号 15 のインフルエンザ A ヘッドレスヘマグルチニン (H1 HA) ポリペプチドをコードする第 1 の遺伝子カセットと、インフルエンザ A 核タンパク質 (NP) をコードする第 2 の遺伝子カセットと、を含む、組換え修飾ワクシニアウイルス。 10

【請求項 9】

請求項 8 に記載の組換え修飾ワクシニアウイルスを含む、薬学的組成物。

【請求項 10】

個人におけるインフルエンザ A ウィルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答を誘導するための薬学的組成物であって、請求項 8 に記載の組換え修飾ワクシニアウイルスを含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、組換えウイルスベクター、および該組換えウイルスベクターを使用してインフルエンザ A ウィルスに対する免疫応答を誘導する方法に関する。本発明は、例えば、非複製修飾ワクシニアウイルスアンカラに基づく組換えウイルスベクターを提供する。本発明の方法に従って投与されるときに、組換えウイルスベクターは、交差防御的であり、かつインフルエンザ A ウィルスに対するヘテロサブタイプ免疫を誘導するように設計される。 20

【背景技術】**【0002】**

ヒトインフルエンザ (influenza) または「インフルエンザ (the flu)」は、インフルエンザ A および B ウィルスによって引き起こされる呼吸疾患である。インフルエンザの流行は、毎年世界中で重大な病気および死亡を引き起こし、ワクチン接種は、感染および疾患を予防する最も端的な戦略である。従来のインフルエンザワクチンは、レシピエントをインフルエンザウイルスタンパク質に曝露して、そのタンパク質に対する免疫応答をレシピエントに組み込む。ワクチンに使用されるタンパク質（またはポリペプチド）は、一般的に「抗原」と呼ばれる。一般的に使用される季節性インフルエンザワクチンは、ウィルスの主要な抗原であるヘマグルチニン (HA) に基づいている。異なる HA 抗原を有する多数のインフルエンザ A サブタイプが存在する。インフルエンザ A サブタイプは、ウィルスによって発現される HA およびノイラミニダーゼ (NA) タンパク質に基づいて分けられ、分類される。インフルエンザ A サブタイプの命名法は、HA サブタイプ（当該技術分野において既知の 16 個の異なる HA 遺伝子のもの）および NA サブタイプ（当該技術分野において既知の 9 個の異なる NA 遺伝子のもの）に基づいている。例示的なサブタイプには、H5N1、H1N1、および H3N2 が含まれるが、これらに限定されない。「株」と呼ばれるインフルエンザ A サブタイプの変種も存在する。例えば、ウィルス A / Viet Nam / 1203 / 2004 は、インフルエンザ A ウィルスサブタイプ H5N1 であり、株の名称は A / Viet Nam / 1203 / 2004 である。 30

【0003】

HA に基づく季節性ワクチンによる保護は、株特異的であり、新たな株が常に出現するため、伝統的なインフルエンザワクチンは、現在出回っている株と適合させるために、毎年再製剤化が必要とされている。Lambert and Fauci 2010 を参照されたい。したがって、次世代のワクチンが交差防御的であり、ヘテロサブタイプ免疫性を誘導すること、すなわち、異なるサブタイプのインフルエンザ A の攻撃感染に対して保護するまたは部分的に保護する、1つのサブタイプに対するワクチンが極めて望ましい。 40

【0004】

開発中の現在の「ユニバーサルワクチン」（すなわち、ヘテロサブタイプ免疫性を誘発するように設計されたワクチン）は、主に、インフルエンザマトリックスタンパク質（M1およびM2）（Schotsaert et al. 2009）、核タンパク質（NP）、ならびにHAの保存部分（Bommakanti et al. 2010；Steele et al. 2010）を含む、より保存された内部インフルエンザウイルス遺伝子に基づいている。ポリメラーゼタンパク質のPA、PB1、およびPB2も、実質的なT細胞応答を誘導し、関連する標的でもあり得る（Assarsson et al. 2008、Greenbaum et al. 2009、Lee et al. 2008）。

【0005】

現在開発中の次世代インフルエンザワクチンには、組換えタンパク質、合成ペプチド、ウイルス様粒子（VLP）、DNAに基づくワクチン、およびウイルスベクターワクチンが含まれる（LambertおよびFauci、上記）。生ウイルスベクターを使用する利点は、高レベルの細胞免疫性、特にCD8 T細胞を誘導するこれらの既知の特性である。これらのうち最も有望なウイルスベクターは、ワクシニアウイルスに基づく生ワクチン（RimmelezwaanおよびSutter 2009）、ならびにアデノウイルスに基づくベクター（Hoelscher et al. 2006、Hoelscher et al. 2007、Price et al. 2010、Zhou et al. 2010）である。NPおよびM2を発現するアデノウイルス構築物を使用する単回用量粘膜免疫化は、例えば、毒性H5N1、H3N2、およびH1N1ウイルスからの保護を提供了（Price et al.、上記）。更なる研究において（Price et al. 2009）、核タンパク質（NP）およびマトリックス2（M2）プラスミドによるDNAワクチン接種、続く抗原適合組換えアデノウイルス（rAd）による追加免疫は、マウスおよびフェレットにおける毒性H1N1およびH5N1の攻撃に対して強力な保護を提供了。

【0006】

修飾ワクシニアウイルスアンカラ（MVA）に基づく組換えワクチンが、多くの非臨床および臨床研究において使用されている。MVAは、極めて安全であることが証明されている。天然痘根絶に関して120,000人を超えるヒト患者にMVAが投与されたとき、有意な副作用は得られなかった。ビリオン形態形成における阻止に起因して、高度に弱毒化されたワクシニアウイルス株は、ヒトおよび大部分の哺乳類の細胞において増殖的に複製されない。それにもかかわらず、初期および後期におけるウイルスおよび外来遺伝子を発現する能力は保持される。これらの特徴により、MVAは、液性および細胞性免疫応答を誘導し、かつ高い安全特性を示す有望な生ワクチンベクターとなる。

【0007】

特許文献1、特許文献2、特許文献3、および特許文献4は、ワクシニア等の組換えポックスウイルスに関する。

【0008】

MVAに基づくワクチンは、臨床研究において、例えばHIV、結核、マラリア、および癌に対して使用されている。これらの研究の全てにおいて、少なくとも2つの用量が使用された。MVA系ワクチンのヒト用量は、臨床試験において適用されるように、 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ PFUであった（Brookes et al. 2008、Cebere et al. 2006、Tykodi and Thompson 2008）。

【0009】

MVAは、汎発性H5N1（Kreijtz et al. 2008、Kreijtz et al. PLoS One 2009、Kreijtz et al. Vaccine 2009、Kreijtz et al. J. Infect. Dis. 2009、Kreijtz et al. 2007、Mayrhofer et al. 2009、Poon et al. 2009）およびH1N1（Hessel et al. 2010、Kreijtz et al. J. Infect. Dis. 2009）インフルエンザ

10

20

30

40

50

研究においてベクターとして近年使用されている。N P および M 1 を発現する M V A に基づくワクチンは、現在、進行中の臨床試験において試験されている (Berthoud et al. 2011)。

【0010】

したがって、当該技術分野においてより広範に保護的なインフルエンザワクチンの必要性が未だ存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献 1】米国特許第 6,998,252 号明細書

10

【特許文献 2】米国特許第 7,015,024 号明細書

【特許文献 3】米国特許第 7,045,136 号明細書

【特許文献 4】米国特許第 7,045,313 号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、インフルエンザ A ウイルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答を生成するのに有用な組換えウイルス（本明細書において、組換えウイルスベクターとも呼ばれる）を提供する。組換えウイルスは、組換え M V A 等の組換えワクシニアウイルス、または当該技術分野において既知の非複製もしくは複製ワクシニアウイルスである。非複製ワクシニアウイルスには、欠損ワクシニアリスター (dVV)、M V A - 575 (E C A C C V 0 0 1 2 0 7 0 7)、M V A - BN (E C A C C V 0 0 0 8 3 0 0 8)、M V A - F 6、および M V A - M 4 (Antoine et al. 1998) が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、組換えウイルスは、少なくとも 1 つのインフルエンザ A M 2 外部ドメイン (M 2 e) 挿入を有するインフルエンザ A ヘマグルチニン欠失突然変異体「ヘッドレス HA」(h 1 H A) を含む融合タンパク質 (h 1 H A / M 2 e)、h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質およびインフルエンザ A 核タンパク質 (N P)、または h 1 H A および N P をコードする。本発明の組換えウイルスは、インフルエンザ A マトリックスタンパク質 1 (M 1) および / またはインフルエンザ A ポリメラーゼ P B 1 を更にコードすることができる。本発明の方法に従って投与されると、組換えウイルスは、交差防御的であり、ヘテロサブタイプ液性および細胞性免疫応答 (C D 8 及び C D 4 T 細胞応答を含む) を誘導する。したがって組換えウイルスは、ヒトにおいてユニバーサルインフルエンザ A ワクチンとして有用であることが企図される。

20

【0013】

幾つかの実施形態において、本発明の組換えウイルス内のオープンリーディングフレームによってコードされる h 1 H A アミノ酸配列は、例えば、配列番号 15 に示される h 1 H A アミノ酸配列であり得る（配列番号 3 である A / V i e t N a m / 1 2 0 3 / 2 0 0 4 H 5 N 1 H A N C B I ジエンバンク A A W 8 0 7 1 7 に基づく）。配列番号 15 の h 1 H A は、シグナル配列、配列番号 3 の H A 1 残基 1 7 ~ 5 8、4 つのグリシンのリンカーペプチド、配列番号 3 の H A 1 残基 2 9 0 ~ 3 4 3、および配列番号 3 の H A 2 ストーク領域残基 3 4 4 ~ 5 6 8 を含む。

30

【0014】

幾つかの実施形態において、本発明の組換えウイルス内のオープンリーディングフレームによってコードされる h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質アミノ酸配列は、例えば、配列番号 2 に示される h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質アミノ酸配列であり得る。配列番号 2 の融合タンパク質は、シグナル配列、配列番号 3 の H A 1 残基 1 7 ~ 5 8、3 つのグリシンのリンカーペプチド（配列番号 4）、H 5 N 1 の M 2 e（配列番号 5 であり、A / V i e t N a m / 1 2 0 3 / 2 0 0 4 H 5 N 1 N C B I ジエンバンク A B P 3 5 6 3 4 に基づく）、6 アミノ酸リンカーチェーン G S A G S A（配列番号 9）、H 1 N 1 の M 2 e（H 2 N 2 および H 3 N 2 の等価物）（配列番号 6 であり、A / N e w Y o r k / 3 3 1 5 / 2

40

50

009 H1N1 NCBII ジエンバンクACZ05592に基づく)、6アミノ酸リンカーGSAGSA(配列番号9)、H9N2のM2e(配列番号7であり、A/Niwtori/Korea/SH0913/2009 H9N2 NCBII ジエンバンクADQ43641に基づく)、6アミノ酸リンカーGSAGSA(配列番号9)、H7N2のM2e(配列番号8であり、A/New York/107/2003 H7N2 NCBII ジエンバンクACC55276に基づく)、3つのグリシンのリンカーペプチド(配列番号4)、配列番号3のHA1残基290~343、および配列番号3のHA2領域残基344~568を含む。

【0015】

幾つかの実施形態において、h1HA/M2e融合タンパク質は、配列番号5、6、7、および8のM2eポリペプチドのうちの1、2、3、または4つを含んでもよい。h1HA/M2e融合タンパク質は、配列番号5、6、7、および8のM2eポリペプチド以外のインフルエンザA M2eポリペプチドを含んでもよい。

【0016】

幾つかの実施形態において、本発明の組換えウイルス内のオープンリーディングフレームによってコードされるNPアミノ酸配列は、例えば、配列番号13に示されるNPアミノ酸配列であり得る(A/VietNam/1203/2004 H5N1 NP NCBII ジエンバンクAAW80720に基づく)。幾つかの実施形態において、本発明の組換えウイルス内のオープンリーディングフレームによってコードされるM1アミノ酸配列は、例えば、配列番号11に示されるM1アミノ酸配列であり得る(A/VietNam/1203/2004 H5N1 M1 ジエンバンクAAW80726に基づく)。幾つかの実施形態において、本発明の組換えウイルス内のオープンリーディングフレームによってコードされるPB1アミノ酸配列は、例えば、配列番号17に示されるPB1アミノ酸配列であり得る(A/VietNam/1203/2004 H5N1 PB1 ジエンバンクAAW80711に基づく)。

【0017】

本発明は、組換えウイルスが個人に投与されるとき、ポリペプチドが保護免疫応答を誘導する能力を保持する場合、組換えウイルス内のオープンリーディングフレームによってコードされるポリペプチドは、配列番号2、5、6、7、8、11、13、15、および/または17の配列の点で異なり得ることを企図する。これらの実施形態において、ポリペプチドは、配列番号2、5、6、7、8、11、13、15、および/または17と約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約95%、約97%、約98%、または約99%同一であり得る。

【0018】

他の実施形態において、本発明の組換えウイルスによってコードされるh1HA/M2e融合タンパク質、h1HAポリペプチド、及びNPペプチドは、H1~H16およびN1~N9(H1N1、H2N1、H3N1、H4N1、H5N1、H6N1、H7N1、H8N1、H9N1、H10N1、H11N1、H12N1、H13N1、H14N1、H15N1、H16N1; H1N2、H2N2、H3N2、H4N2、H5N2、H6N2、H7N2、H8N2、H9N2、H10N2、H11N2、H12N2、H13N2、H14N2、H15N2、H16N2; H1N3、H2N3、H3N3、H4N3、H5N3、H6N3、H7N3、H8N3、H9N3、H10N3、H11N3、H12N3、H13N3、H14N3、H15N3、H16N3; H1N4、H2N4、H3N4、H4N4、H5N4、H6N4、H7N4、H8N4、H9N4、H10N4、H11N4、H12N4、H13N4、H14N4、H15N4、H16N4; H1N5、H2N5、H3N5、H4N5、H5N5、H6N5、H7N5、H8N5、H9N5、H10N5、H11N5、H12N5、H13N5、H14N5、H15N5、H16N5; H1N6、H2N6、H3N6、H4N6、H5N6、H6N6、H7N6、H8N6、H9N6、H10N6、H11N6、H12N6、H13N6、H14N6、H15N6、H16N6; H1N7、H2N7、H3N7、H4N7、H5N7、H6N7、H7N7)

10

20

30

40

50

、H8N7、H9N7、H10N7、H11N7、H12N7、H13N7、H14N7
 、H15N7、H16N7；H1N8、H2N8、H3N8、H4N8、H5N8、H6
 N8、H7N8、H8N8、H9N8、H10N8、H11N8、H12N8、H13N
 8、H14N8、H15N8、H16N8；H1N9、H2N9、H3N9、H4N9、
 H5N9、H6N9、H7N9、H8N9、H9N9、H10N9、H11N9、H12
 N9、H13N9、H14N9、H15N9、およびH16N9を含む）の任意の組み合
 わせが含まれるが、これらに限定されない同一または異なるインフルエンザAサブタイプ
 に基づき得る。幾つかの実施形態において、インフルエンザAサブタイプは、流行性イン
 フルエンザAである。例示的な流行性インフルエンザサブタイプには、H1N1、H2N
 2、H3N2、およびH5N1が含まれるが、これらに限定されない。10

【0019】

インフルエンザA H1N1株を含む同定されたインフルエンザA株のリストは、世界保健機構（WHO）および米国疾病管理予防センター（CDC）のインフルエンザAサブタイプデータベースから入手可能である。米国国立医学図書館により維持されている国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のデータベースも、インフルエンザA種のウイルスのHA、M2、NP、M1、およびPB1遺伝子の長さおよび配列を記載する最新のデータベースを維持している。これらの機関により提示される株、ならびに他の商業的および学術的なデータベースにおいて、または文献において記載されている、かつ当該技術分野において既知の株は、本発明における使用が企図される。本明細書以降に同定され、単離される追加のインフルエンザA株も、インフルエンザAタンパク質配列の供給源として本発明において有用であることも企図される。したがって、明細書において特定的に例示される任意の株、および当該技術分野において既知である、または後に発見されるものは、本発明の組換えワクシニアウイルス、薬学的組成物、および方法に適している。例示的な株には、下記の表1の株が含まれるが、これらに限定されない。表は、これらの株の例示的な遺伝子および関連するデータベース受入番号も提示する。20

【表1】

【表1】

ウイルスサブタイプ	挿入されるインフルエンザ遺伝子	ウイルス株	NCBI遺伝子受入番号	NCBIアミノ酸受入番号	30
H5N1	HA	A/Viet Nam/1203/2004	AY818135	AAW80717	
H5N1	NP	A/Viet Nam/1203/2004	AY818138	AAW80720	
H5N1	M1	A/Viet Nam/1203/2004	AY818144	AAW80726	
H5N1	PB1	A/Viet Nam/1203/2004	AY818129	AAW80711	
H5N1	M2	A/Viet Nam/1203/2004	EF541453	ABP35634	
H1N1 sw	M2	A/California/07/09	FJ969537	ACP44185	
H1N1	M2	A/New York/3315/2009	CY050765	ACZ05592	
H2N2	M2	A/Korea/426/68	NC_007377	YP_308853	40
H3N2	M2	A/New York/392/2004	NC_007367	YP_308840	
H9N2	M2	A/ニワトリ/Korea/SH0913/2009	HQ221654	ADQ43641	
H7N2	M2	A/New York/107/2003	EU587373	ACC55276	
H7N3	M2	A/ニワトリ/Pakistan/34668/1995	CY035834	ACJ03948	

【0020】

本発明の組換えウイルスにおいて、h1HA/M2e、h1HA、NP、M1、および/またはPB1をコードするオープンリーディングフレームは、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化され得る。これらの実施形態において、オープンリーディングフレーム50

内の1つ以上（または全て）の天然に生じるコドンは、コドン最適化オープニングフレームにおいて、ヒト細胞内の遺伝子により頻繁に使用されるコドン（時々、好ましいコドンと呼ばれる）に置き換えられている。コドンを最適化して、反復配列を回避し、r M V A内のオープニングフレームを安定化すること、および／または不要な転写終止シグナルを回避することができる。コドン最適化は、概して、細胞内のポリペプチドの発現を高めるために、組換え遺伝子発現の分野において使用されている。

【0021】

本発明の組換えウイルス内のh 1 H A / M 2 e、h 1 H A、N P、M 1、およびP B 1をコードする遺伝子カセットは、組換えワクシニアウイルス内で機能する（すなわち、オープニングフレームの転写を方向付ける）プロモーターの制御下にある（すなわち、プロモーターに機能的に結合している）オープニングフレームを含む。例示的な実施形態において、遺伝子カセットからの発現は、強力な初期／後期ワクシニアウイルスm H 5 プロモーター（配列番号18）または合成初期／後期s e l P プロモーター（配列番号19）の制御下にある（Chakrabarti et al. 1997）。本発明の遺伝子カセットにおいて、オープニングフレームは、また、ワクシニアウイルス初期転写終止シグナル等の転写終止シグナルに機能的に結合している。

【0022】

1つの態様において、本発明は、インフルエンザA h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質をコードする遺伝子カセットを含む組換えワクシニアウイルスを提供する。幾つかの実施形態において、組換えワクシニアウイルスは、配列番号2に示されるh 1 H A / M 2 e 融合タンパク質を発現する遺伝子カセットを含む組換えM V Aである。幾つかの実施形態において、組換えワクシニアウイルスは、M 1 タンパク質（例えば、配列番号11に示されるM 1）を発現する遺伝子カセット、および／またはP B 1 タンパク質（例えば、配列番号17に示されるP B 1 タンパク質）を発現する遺伝子カセットを更に含む。

【0023】

別の態様において、本発明は、インフルエンザA h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質をコードする第1の遺伝子カセットおよびインフルエンザN Pをコードする第2の遺伝子カセットを含む組換えワクシニアウイルスを提供する。幾つかの実施形態において、組換えワクシニアウイルスは、配列番号2に示されるh 1 H A / M 2 e 融合タンパク質を発現する第1の遺伝子カセットおよび配列番号13に示されるN Pを発現する第2の遺伝子カセットとを含む組換えM V Aである。幾つかの実施形態において、組換えワクシニアウイルスは、M 1 タンパク質（例えば、配列番号11に示されるM 1）を発現する遺伝子カセット、および／またはP B 1 タンパク質（例えば、配列番号17に示されるP B 1 タンパク質）を発現する遺伝子カセットを更に含む。

【0024】

更に別の態様において、本発明は、インフルエンザA h 1 H Aをコードする第1の遺伝子カセットおよびインフルエンザN Pをコードする第2の遺伝子カセットとを含む組換えワクシニアウイルスを提供する。幾つかの実施形態において、組換えワクシニアウイルスは、配列番号15に示されるh 1 H Aを発現する第1の遺伝子カセットおよび配列番号13に示されるN Pを発現する第2の遺伝子カセットとを含む組換えM V Aである。幾つかの実施形態において、組換えワクシニアウイルスは、M 1 タンパク質（例えば、配列番号11に示されるM 1）を発現する遺伝子カセット、および／またはP B 1 タンパク質（例えば、配列番号17に示されるP B 1 タンパク質）を発現する遺伝子カセットを更に含む。

【0025】

本発明の組換えワクシニアウイルスにおいて、遺伝子カセットを、欠失I領域、欠失II領域、欠失III領域、欠失IV領域、チミジンキナーゼ遺伝子座、D 4 R / 5 R 遺伝子間領域、またはH A 遺伝子座等のワクシニアウイルスゲノムの非必須領域に挿入することができる。組換えM V Aの例示的な実施形態において、h 1 H A / M 2 e およびh 1 H A 遺伝子カセットの挿入は、D 4 R / 5 R 遺伝子間領域の中であり、N P 遺伝子カセットの

10

20

30

40

50

挿入は、欠失ⅠⅡ領域の中である。組換えMVAは、国立衛生研究所から得られるMVA74 LVD6等の牛海綿状脳症(BSE)を含まないMVAから誘導される。

【0026】

本発明の組換えウイルスを、当該技術分野において既知の方法に従って薬学的組成物として処方することができる。幾つかの実施形態において、組換えウイルスは、国際公開第2010/056991号に記載されているように処方される。

【0027】

本発明は、個人におけるヘテロサブタイプインフルエンザA免疫応答を誘導する方法であって、本発明の組換えワクシニアウイルスの組成物を個人に投与することを含む方法を提供する。本方法において、組成物を、単回用量、2回用量または多回用量として投与することができる。ヒトにおける投与経路は、吸入、経鼻、経口、および非経口であり得る。非経口投与経路の例には、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内、および皮下投与が含まれる。ヒト免疫化用量の範囲は、約 10^6 ～約 10^9 PFUであり得る。本発明の方法は、個人における液性および細胞性免疫応答を誘導する。更に、本発明の実施形態において、方法は、個人における防御免疫応答を誘導する。防御免疫応答は、個人が感染の症状なし、症状の低減、組織もしくは鼻汁におけるウイルス力価の低減、および/またはインフルエンザウイルスによる感染に対する完全な保護を示す場合であり得る。

【0028】

本発明は、本発明の組換えワクシニアウイルスを投与するキットも提供し、本キットは、その使用が本発明の方法の実践を促進するようにパッケージングされている。1つの実施形態において、そのようなキットは、密閉ボトルまたは容器等の容器内にパッケージングされた本明細書に記載の組換えウイルスまたは組成物を含み、方法を実践する際の化合物または組成物の使用を説明するラベルが、容器に貼られるか、またはパッケージ内に含まれる。好ましくは、組換えウイルスまたは組成物は、単位投与形態でパッケージングされる。キットは、特定の投与経路による投与またはスクリーニングアッセイの実践に好適な装置を更に含んでもよい。好ましくは、キットは、組換えワクシニアウイルスの使用を説明するラベルを含有する。幾つかの実施形態において、キットは、ヒト被験者に投与するための使用説明書を含む。

【0029】

また、提供されるものは、本発明の遺伝子力セットを発現する組換えワクシニアウイルスを生成する方法である。MVAにより例示されているように、方法は、a)初代ニワトリ胚細胞または適切な永久細胞株(例えば、鳥類)をMVAに感染させるステップと、b)感染させた細胞を、遺伝子力セットを含み、かつMVAゲノムの非必須領域と相同である遺伝子力セットに隣接するDNAを含むプラスミドでトランスフェクトするステップと、c)細胞を増殖させ、ニワトリ細胞内でのMVAの複製中に、プラスミドのMVAゲノムとの組換えを可能にし、それによって、遺伝子力セットを非必須領域内のMVAゲノムに挿入するステップと、d)生成された組換えMVAを得るステップを含む。例示的なニワトリ胚細胞は、米国特許第5,391,491号(Slavik et al. 1983)に記載されている。他の鳥類細胞(例えば、DF-1)も企図される。本方法において、非必須MVA領域は、欠失I領域、欠失II領域(Meyer et al. 1991)、欠失III領域(Antoine et al. 1996)、欠失IV領域(Meyer et al.、上記; Antoine et al. 1998)、チミジンキナーゼ遺伝子座(Mackett et al. 1982)、D4R/5R遺伝子間領域(Holzer et al. 1998)、またはHA遺伝子座(Antoine et al.、上記)である。1つの例示的な実施形態において、挿入は、欠失III領域の中である。別の例示的な実施形態において、挿入は、D4R/5R遺伝子間領域の中である。2つの遺伝子力セットが挿入される場合、2つは、異なる非必須領域に挿入される。遺伝子力セットを、追加的に、任意の他の適切なゲノム領域または遺伝子間領域に挿入することができる。

【0030】

10

20

30

40

50

他の脊椎動物の細胞系が、本発明のワクシニアウイルスの培養および増殖に有用である。本発明のワクシニアウイルスの培養に有用な例示的な脊椎動物細胞には、MRC-5、MRC-9、CV-1（アフリカミドリザル）、HEK（ヒト胎児腎）、PerC6（ヒト網膜芽細胞）、BHK-21細胞（ベビーハムスター腎）、BSC（サル腎細胞）、LLC-MK2（サル腎）、およびDF-1等の永久鳥類細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【0031】

ベロ細胞は、世界保健機構に従ったウイルスワクチンの生成に許容された細胞系である。幾つかの実施形態において、本発明の組換え複製ワクシニアウイルスは、ベロ細胞において生成される。

10

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目1）

インフルエンザAヘッドレスヘマグルチニン（h1HA）ポリペプチドに挿入された少なくとも1つのインフルエンザAM2細胞外ドメイン（M2e）ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする遺伝子カセットを含む、組換えワクシニアウイルス。

（項目2）

前記融合タンパク質が、配列番号2に示されるh1HA/M2e融合タンパク質アミノ酸配列を含む、項目1に記載の組換えワクシニアウイルス。

（項目3）

前記融合タンパク質が、配列番号3に示されるVN/1203HAアミノ酸配列のアミノ酸を含む、項目1に記載の組換えワクシニアウイルス。

20

（項目4）

前記融合タンパク質は、配列番号3のHA1アミノ酸17～58と、ペプチドリンカーと、少なくとも1つのM2eポリペプチドと、ペプチドリンカーと、配列番号3のHA1アミノ酸290～343と、配列番号3のHA2アミノ酸344～568と、を含む、項目3に記載の組換えワクシニアウイルス。

（項目5）

H Aアミノ酸とM 2 e アミノ酸を連結するペプチドリンカーが、配列番号4に示されるアミノ酸G G Gを含む、項目4に記載の組換えワクシニアウイルス。

（項目6）

前記M 2 e ポリペプチドが、配列番号5に示されるH 5 N 1 M 2 e アミノ酸配列を含む、項目1に記載の組換えワクシニアウイルス。

30

（項目7）

前記M 2 e ポリペプチドが、配列番号6に示されるH 1 N 1 M 2 e アミノ酸配列を含む、項目1に記載の組換えワクシニアウイルス。

（項目8）

前記M 2 e ポリペプチドが、配列番号7に示されるH 9 N 2 M 2 e アミノ酸配列を含む、項目1に記載の組換えワクシニアウイルス。

（項目9）

前記M 2 e ポリペプチドが、配列番号8に示されるH 7 N 2 M 2 e アミノ酸配列を含む、項目1に記載の組換えワクシニアウイルス。

40

（項目10）

前記融合タンパク質が、2つ以上のM 2 e ポリペプチドを含み、前記M 2 e ポリペプチドは、ペプチドリンカーによって連結される、項目1、3、4、5、6、7、8、または9に記載の組換えワクシニアウイルス。

（項目11）

前記M 2 e ポリペプチドを連結する前記ペプチドリンカーが、配列番号9に示されるアミノ酸G S A G S Aを含む、項目10に記載の組換えワクシニアウイルス。

（項目12）

前記遺伝子カセットからの前記h1HA/M2e融合タンパク質の発現が、mH5プロモ

50

ーターの制御下にある、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 1 3)

前記遺伝子カセットからの前記 h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質の発現が、s e 1 P プロモーターの制御下にある、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 1 4)

配列番号 1 に示される遺伝子カセットを含む、組換えワクシニアウイルス。

(項目 1 5)

インフルエンザ A マトリックスタンパク質 1 (M 1) をコードする遺伝子カセットと、インフルエンザ A 核タンパク質 (N P) をコードする遺伝子カセットと、を更に含む、項目 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

10

(項目 1 6)

前記 M 1 タンパク質が、配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を含む、項目 1 5 に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 1 7)

前記 M 1 タンパク質が、配列番号 1 0 に示されるヌクレオチド配列によってコードされる、項目 1 6 に記載の組換えワクシニアウイルス。

20

(項目 1 8)

前記 N P が、配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列を含む、項目 1 5 に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 1 9)

前記 N P が、配列番号 1 2 に示されるヌクレオチド配列によってコードされる、項目 1 8 に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 2 0)

前記ワクシニアウイルスが、修飾ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) 、欠損ワクシニアリスター (d V V) 、M V A - 5 7 5 、M V A - B N 、M V A - F 6 、または M V A - M 4 である、項目 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 2 1)

前記ワクシニアウイルスが M V A である、項目 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

30

(項目 2 2)

前記 h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質遺伝子カセットが、欠失 I 領域、欠失 I I 領域、欠失 I I I 領域、欠失 I V 領域、チミジンキナーゼ遺伝子座、D 4 / 5 遺伝子間領域、または H A 遺伝子座中の前記 M V A に挿入される、項目 2 1 に記載の組換え M V A 。

(項目 2 3)

前記 h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質遺伝子カセットが、D 4 / 5 遺伝子間領域中の前記 M V A に挿入される、項目 2 1 または 2 2 に記載の組換え M V A 。

(項目 2 4)

項目 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組換え M V A を含む、薬学的組成物。

40

(項目 2 5)

配列番号 2 に示される h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質アミノ酸配列をコードする遺伝子カセットを含む組換え M V A を含む、薬学的組成物。

(項目 2 6)

配列番号 1 に示される遺伝子カセットを含む組換え M V A を含む、薬学的組成物。

(項目 2 7)

個人におけるインフルエンザ A ウィルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答を誘導する方法であって、項目 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組換え M V A を含む薬学的組成物を前記個人に投与することを含む、方法。

(項目 2 8)

50

個人におけるインフルエンザAウイルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答を誘導する際に用いる薬学的組成物であって、項目1～23のいずれか一項に記載の組換えMVAを含む薬学的組成物を前記個人に投与するステップを含む、方法。

(項目29)

配列番号1に示されるh1HA/M2e融合タンパク質遺伝子カセットを発現する組換えMVAを生成する方法であって、

a) 初代ニワトリ胚細胞または永久細胞株をMVAに感染させるステップと、
b) 前記感染させた細胞を、配列番号1に示されるh1HA/M2e融合タンパク質遺伝子カセットを含み、かつMVAゲノムの非必須領域と相同である遺伝子カセットに隣接するDNAを含むプラスミドでトランスフェクトするステップと、

c) 前記細胞を増殖させ、前記感染させた細胞内のMVAの複製中に、前記プラスミドの前記MVAゲノムとの組換えを可能にし、それによって、前記h1HA/M2e融合タンパク質遺伝子カセットを前記非必須領域内の前記MVAゲノムに挿入するステップと、

d) 生成された前記組換えMVAを得るステップと、
を含む、方法。

(項目30)

前記非必須MVA領域が、前記欠失I領域、前記欠失II領域、前記欠失III領域、前記欠失IV領域、前記チミジンキナーゼ遺伝子座、前記D4/5遺伝子間領域、または前記HA遺伝子座である、項目29に記載の方法。

(項目31)

前記非必須MVA領域が、前記D4/5遺伝子間領域である、項目30に記載の方法。

(項目32)

インフルエンザAヘッドレスヘマグルチニン(h1HA)ポリペプチドに挿入された少なくとも1つのインフルエンザAM2細胞外ドメイン(M2e)ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする第1の遺伝子カセットと、インフルエンザA核タンパク質(NP)をコードする第2の遺伝子カセットと、を含む、組換えワクシニアウイルス。

(項目33)

前記融合タンパク質が、配列番号2に示される前記h1HA/M2e融合タンパク質アミノ酸配列を含む、項目32に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目34)

前記融合タンパク質が、配列番号3に示される前記VN/1203HAアミノ酸配列のアミノ酸を含む、項目32に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目35)

前記融合タンパク質が、配列番号3のHA1アミノ酸17～58と、ペプチドリンカーと、少なくとも1つのM2eポリペプチドと、ペプチドリンカーと、配列番号3のHA1アミノ酸290～343と、配列番号3のHA2アミノ酸344～568と、を含む、項目34に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目36)

前記HAアミノ酸とM2eアミノ酸を連結するペプチドリンカーが、配列番号4に示される前記アミノ酸GGGを含む、項目35に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目37)

前記M2eポリペプチドが、配列番号5に示される前記H5N1 M2eアミノ酸配列を含む、項目32に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目38)

前記M2eポリペプチドが、配列番号6に示される前記H1N1 M2eアミノ酸配列を含む、項目32に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目39)

前記M2eポリペプチドが、配列番号7に示される前記H9N2 M2eアミノ酸配列を含む、項目32に記載の組換えワクシニアウイルス。

10

20

30

40

50

(項目 4 0)

前記 M 2 e ポリペプチドが、配列番号 8 に示される前記 H 7 N 2 M 2 e アミノ酸配列を含む、項目 3 2 に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 4 1)

前記融合タンパク質が、2つ以上の M 2 e ポリペプチドを含み、前記 M 2 e ポリペプチドが、ペプチドリンカーによって連結される、項目 3 2 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、または 4 0 に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 4 2)

前記 M 2 e ポリペプチドを連結する前期ペプチドリンカーが、配列番号 9 に示される前記アミノ酸配列 G S A G S A を含む、項目 4 1 に記載の組換えワクシニアウイルス。

10

(項目 4 3)

前記 N P が、配列番号 1 3 に示される前記アミノ酸配列を含む、項目 3 2 に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 4 4)

前記第 1 の遺伝子カセットからの前記 h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質の発現が、m H 5 プロモーターまたは s e 1 P プロモーターの制御下にある、項目 3 2 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 4 5)

前記第 1 の遺伝子カセットからの前記 h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質の発現が、m H 5 プロモーターの制御下にある、項目 4 4 に記載の組換えワクシニアウイルス。

20

(項目 4 6)

前記第 1 の遺伝子カセットからの前記 h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質の発現が、s e 1 P プロモーターの制御下にある、項目 4 4 に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 4 7)

前記第 2 の遺伝子カセットからの N P の発現が、m H 5 プロモーターまたは s e 1 P プロモーターの制御下にある、項目 3 2 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 4 8)

前記第 2 の遺伝子カセットからの N P の発現が、m H 5 プロモーターの制御下にある、項目 4 7 に記載の組換えワクシニアウイルス。

30

(項目 4 9)

前記第 2 の遺伝子カセットからの N P の発現が、s e 1 P プロモーターの制御下にある、項目 4 7 に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 5 0)

前記第 1 の遺伝子カセットからの前記 h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質の発現および前記第 2 の遺伝子カセットからの N P の発現が、m H 5 プロモーターの制御下にある、項目 3 2 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 5 1)

配列番号 1 に示される第 1 の遺伝子カセットと、配列番号 1 2 に示される第 2 の遺伝子カセットと、を含む、組換えワクシニアウイルス。

40

(項目 5 2)

前記ワクシニアウイルスが、修飾ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) 、欠損ワクシニアリスター (d V V) 、 M V A - 5 7 5 、 M V A - B N 、 M V A - F 6 、または M V A - M 4 である、項目 3 2 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 5 3)

前記ワクシニアウイルスが M V A である、項目 3 2 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目 5 4)

前記第 1 の遺伝子カセットが、前記欠失 I 領域、前記欠失 I I 領域、前記欠失 I I I 領域、前記欠失 I V 領域、前記チミジンキナーゼ遺伝子座、前記 D 4 / 5 遺伝子間領域、また

50

は前記 H A 遺伝子座中の前記 M V A に挿入される、項目 5 3 に記載の組換え M V A。

(項目 5 5)

前記第 2 の遺伝子カセットが、前記欠失 I 領域、前記欠失 I I 領域、前記欠失 I I I 領域、前記欠失 I V 領域、前記チミジンキナーゼ遺伝子座、前記 D 4 / 5 遺伝子間領域、または前記 H A 遺伝子座中の前記 M V A に挿入される、項目 5 3 に記載の組換え M V A。

(項目 5 6)

前記第 1 の遺伝子カセットが、前記 D 4 / 5 遺伝子間領域中の前記 M V A に挿入される、項目 3 2 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の組換え M V A。

(項目 5 7)

前記第 2 の遺伝子カセットが、前記欠失 I I I 領域中の前記 M V A に挿入される、項目 3 2 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の組換え M V A。

10

(項目 5 9)

前記第 1 の遺伝子カセットが、前記 D 4 / 5 遺伝子間領域中の前記 M V A に挿入され、前記第 2 の遺伝子カセットが、前記欠失 I I I 領域中の前記 M V A に挿入される、項目 3 2 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の組換え M V A。

(項目 6 0)

項目 3 2 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の組換え M V A を含む、薬学的組成物。

(項目 6 1)

配列番号 2 に示される h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質アミノ酸配列をコードする第 1 の遺伝子カセットと、配列番号 1 3 に示されるインフルエンザ A 核タンパク質 (N P) をコードする第 2 の遺伝子カセットと、を含む組換え M V A を含む、薬学的組成物。

20

(項目 6 2)

配列番号 1 に示される第 1 の h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質遺伝子カセットと、配列番号 1 2 に示される第 2 の N P 遺伝子カセットと、を含む組換え M V A を含む、薬学的組成物。

(項目 6 3)

個人におけるインフルエンザ A ウィルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答を誘導する方法であって、前記個人に、項目 3 2 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の組換え M V A を含む薬学的組成物を投与することを含む、方法。

30

(項目 6 4)

個人におけるインフルエンザ A ウィルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答の誘導における使用のための薬学的組成物であって、前記方法は、前記個人に、項目 3 2 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の組換え M V A を含む薬学的組成物を投与するステップを含む、薬学的組成物。

(項目 6 5)

配列番号 1 に示される h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質第 1 遺伝子カセットおよび配列番号 1 2 に示される N P 第 2 遺伝子カセットを発現する組換え M V A を生成する方法であつて、

a) 初代ニワトリ胚細胞または永久細胞株を M V A に感染させるステップと、

b) 前記感染させた細胞を、配列番号 1 に示される h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質遺伝子カセットを含み、かつ M V A ゲノムの第 1 の非必須領域と相同である遺伝子カセットに隣接する D N A を含むプラスミドでトランスフェクトするステップと、

40

c) 前記細胞を増殖させ、前記感染させた細胞内での M V A の複製中に、前記プラスミドの前記 M V A ゲノムとの組み換えを可能にし、それによって、前記 h 1 H A / M 2 e 融合タンパク質遺伝子カセットを前記第 1 の非必須領域内の前記 M V A ゲノムに挿入するステップと、

d) 生成された前記組換え M V A を得るステップと、

e) 初代ニワトリ胚細胞または永久鳥類細胞株を、ステップ d) の M V A に感染させるステップと、

f) ステップ e) の感染させた細胞を、配列番号 1 2 に示される N P 遺伝子カセット

50

を含み、かつMVAゲノムの第2の非必須領域と相同である遺伝子カセットに隣接するDNAを含むプラスミドでトランスフェクトするステップと、

g) 前記細胞を増殖させ、前記感染させた細胞内でのMVAの複製中に、前記プラスミドの前記MVAゲノムとの組み換えを可能にし、それによって、前記NP遺伝子カセットを前記第2の非必須領域内の前記MVAゲノムに挿入するステップと、

h) 生成された前記組換えMVAを得るステップと、
を含む、方法。

(項目66)

前記非必須MVA領域が、前記欠失I領域、前記欠失II領域、前記欠失III領域前記、欠失IV領域、前記チミジンキナーゼ遺伝子座、前記D4/5遺伝子間領域、または前記HA遺伝子座である、項目65に記載の方法。

10

(項目67)

前記第1の非必須MVA領域が、前記D4/5遺伝子間領域である、項目65に記載の方法。

(項目68)

前記第2の非必須MVA領域が、前記欠失III領域である、項目65に記載の方法。

(項目69)

前記第1の非必須MVA領域が、前記D4/5遺伝子間領域であり、前記第2の非必須MVA領域が、前記欠失III領域である、項目65に記載の方法。

20

(項目70)

インフルエンザAヘッドレスヘマグルチニン(h1HA)ポリペプチドをコードする第1の遺伝子カセットと、インフルエンザA核タンパク質(NP)をコードする第2の遺伝子カセットと、を含む、組換えワクシニアウイルス。

(項目71)

前記h1HAポリペプチドが、配列番号15に示されるアミノ酸配列を含む、項目60に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目72)

前記NPが、配列番号13に示されるアミノ酸配列を含む、項目60に記載の組換えワクシニアウイルス。

30

(項目73)

前記第1の遺伝子カセットからの前記h1HAポリペプチドの発現が、mH5プロモーターまたはselpプロモーターの制御下にある、項目70~72のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目74)

前記第1の遺伝子カセットからの前記h1HAポリペプチドの発現が、mH5プロモーターの制御下にある、項目73に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目75)

前記第1の遺伝子カセットからの前記h1HAポリペプチドの発現が、selpプロモーターの制御下にある、項目73に記載の組換えワクシニアウイルス。

40

(項目76)

前記第2の遺伝子カセットからのNPの発現が、mH5プロモーターまたはselpプロモーターの制御下にある、項目70~72のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目77)

前記第2の遺伝子カセットからのNPの発現が、mH5プロモーターの制御下にある、項目76に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目78)

前記第2の遺伝子カセットからのNPの発現が、selpプロモーターの制御下にある、項目76に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目79)

50

前記第1の遺伝子カセットからの前記h1HAポリペプチドの発現および前記第2の遺伝子カセットからのNPの発現が、mH5プロモーターの制御下にある、項目70～72のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目80)

配列番号14に示されるh1HA遺伝子第1カセットと、配列番号12に示されるNP第2遺伝子カセットと、を含む、組換えワクシニアウイルス。

(項目81)

インフルエンザA M1をコードする第3の遺伝子カセットを更に含む、項目70～80のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目82)

前記M1タンパク質が、配列番号11に示される前記アミノ酸配列を含む、項目15に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目83)

前記M1タンパク質が、配列番号10に示される前記ヌクレオチド配列によってコードされる、項目82に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目84)

前記ワクシニアウイルスが、修飾ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)、欠損ワクシニアリスター(dVV)、MVA-575、MVA-BN、MVA-F6、またはMVA-M4である、項目70～83のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目85)

前記ワクシニアウイルスがMVAである、項目70～83のいずれか一項に記載の組換えワクシニアウイルス。

(項目86)

前記第1の遺伝子カセットが、前記消失I領域、前記消失II領域、前記消失III領域、前記消失IV領域、前記チミジンキナーゼ遺伝子座、前記D4/5遺伝子間領域、または前記HA遺伝子中の前記MVAに挿入される、項目85に記載の組換えMVA。

(項目87)

前記第2の遺伝子カセットが、前記消失I領域、前記消失II領域、前記消失III領域、前記消失IV領域、前記チミジンキナーゼ遺伝子座、前記D4/5遺伝子間領域、または前記HA遺伝子座中の前記MVAに挿入される、項目85または86に記載の組換えMVA。

(項目88)

前記第1の遺伝子カセットが、前記D4/5遺伝子間領域中の前記MVAに挿入される、項目85に記載の組換えMVA。

(項目89)

前記第2の遺伝子カセットが、前記消失III領域中の前記MVAに挿入される、項目85に記載の組換えMVA。

(項目90)

前記第1および第3の遺伝子カセットが、前記D4/5遺伝子間領域中の前記MVAに挿入され、前記第2の遺伝子カセットが、前記消失III領域中の前記MVAに挿入される、項目85に記載の組換えMVA。

(項目91)

項目70～90のいずれか一項に記載の組換えMVAを含む、薬学的組成物。

(項目92)

配列番号15に示されるヘッドレスHA(h1HA)アミノ酸配列をコードする第1の遺伝子カセットと、配列番号13に示されるインフルエンザA核タンパク質(NP)をコードする第2の遺伝子カセットとを含む組換えMVAを含む、薬学的組成物。

(項目93)

配列番号14に示されるh1HA第1遺伝子カセットと、配列番号12に示されるNP第2遺伝子カセットとを含む組換えMVAを含む、薬学的組成物。

10

20

30

40

50

(項目 9 4)

配列番号 1 4 に示される h 1 H A 第 1 遺伝子カセットと、配列番号 1 0 に示される M 1 第 2 遺伝子カセットと、配列番号 1 2 に示される N P 第 3 遺伝子カセットとを含む組換え M V A を含む、薬学的組成物。

(項目 9 5)

個人におけるインフルエンザ A ウィルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答を誘導する方法であって、前記個人に、項目 7 0 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の組換え M V A を含む薬学的組成物を投与することを含む、方法。

(項目 9 6)

個人におけるインフルエンザ A ウィルスに対するヘテロサブタイプ免疫応答の誘導における使用のための薬学的組成物であって、前記方法は、前記個人に、項目 7 0 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の組換え M V A を含む薬学的組成物を投与するステップを含む、薬学的組成物。

(項目 9 7)

配列番号 1 4 に示される h 1 H A 第 1 遺伝子カセットおよび配列番号 1 2 に示される N P 第 2 遺伝子カセットを発現する組換え M V A を生成する方法であって、

a) 初代ニワトリ胚細胞または永久鳥類細胞株を M V A に感染させるステップと、
b) 前記感染させた細胞を、配列番号 1 4 に示されるヘッドレス H A / M 2 e 融合タンパク質遺伝子カセットを含み、かつ M V A ゲノムの第 1 の非必須領域と相同である遺伝子カセットに隣接する D N A を含むプラスミドでトランスフェクトするステップと、

c) 前記細胞を増殖させ、前記感染させた細胞内での M V A の複製中に、前記プラスミドの前記 M V A ゲノムとの組み換えを可能にし、それによって、前記ヘッドレス H A / M 2 e 融合タンパク質遺伝子カセットを前記第 1 の非必須領域内の前記 M V A ゲノムに挿入するステップと、

d) 生成された前記組換え M V A を得るステップと、
e) 初代ニワトリ胚細胞または永久鳥類細胞株を、ステップ d) の M V A に感染させるステップと、

f) ステップ e) の感染させた細胞を、配列番号 1 2 に示される N P 遺伝子カセットを含み、かつ M V A ゲノムの第 2 の非必須領域と相同である遺伝子カセットに隣接する D N A を含むプラスミドで、トランスフェクトするステップと、

g) 前記細胞を増殖させ、前記感染させた細胞内での M V A の複製中に、前記プラスミドの前記 M V A ゲノムとの組み換えを可能にし、それによって、前記 N P 遺伝子カセットを前記第 2 の非必須領域内の前記 M V A ゲノムに挿入するステップと、

h) 生成された前記組換え M V A を得るステップと
を含む、方法。

(項目 9 8)

前記非必須 M V A 領域が、前記欠失 I 領域、前記欠失 I I 領域、前記欠失 I I I 領域前記、欠失 I V 領域、前記チミジンキナーゼ遺伝子座、前記 D 4 / 5 遺伝子間領域、または前記 H A 遺伝子座である、項目 9 7 に記載の方法。

(項目 9 9)

前記第 1 の非必須 M V A 領域が、前記 D 4 / 5 遺伝子間領域である、項目 9 7 に記載の方法。

(項目 1 0 0)

前記第 2 の非必須 M V A 領域が、前記欠失 I I I 領域である、項目 9 7 に記載の方法。

(項目 1 0 1)

前記第 1 の非必須 M V A 領域が、前記 D 4 / 5 遺伝子間領域であり、前記第 2 の必須 M V A 領域は、前記欠失 I I I 領域である、項目 9 7 に記載の方法。

【 0 0 3 2 】

本発明の追加的な態様および詳細は、以下の実施例により明らかとなり、これらは制限的ではなく、むしろ例示的であることが意図される。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は、本発明の組換えMVA(rMVA)によってコードされるヘッドレスHAタンパク質のアミノ酸配列(配列番号15)を示す。タンパク質は、シグナル配列(灰色)、HA1残基(赤色)、4つのグリシンのリンカーペプチド(黒色)、HA1残基(赤色)、およびHA2ストーク領域(黒色)を含有する。システイン58および63、ならびに多塩基切断部位(アミノ酸112~119)に下線が引かれている。

【図2】図2は、本発明のrMVAによってコードされるヘッドレスHAタンパク質のヌクレオチド配列(配列番号14)を示す。

【図3】図3は、ヘッドレスHA/M2e融合タンパク質のアミノ酸配列(配列番号2)を示す。設計されたタンパク質は、シグナル配列(灰色)、HA1残基(赤色)、3つのグリシンのリンカーペプチド(黒色)、H5N1のM2e(青色)、6アミノ酸リンカーGSAGSA(黒色)、H1N1のM2e(H2N2、H3N2の等価物；緑色)、6アミノ酸リンカーGSAGSA、H9N2のM2e(橙色)、6アミノ酸リンカーGSAGSA、H7N2のM2e(ピンク色)、3つのグリシンのリンカーペプチド(黒色)、HA1残基(赤色)、およびHA2ストーク領域(黒色)を含有する。多塩基切断部位(アミノ酸224~231)に下線が引かれている。

【図4】図4は、本発明のrMVAによってコードされるヘッドレスHA/M2e融合タンパク質のヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。

【図5】図5は、インフルエンザ遺伝子を含有する単一挿入rMVAを示す。図5Aは、野生型MVAのヌクレオチド87, 281に対応する位置で組換えMVA-D4R/D5R遺伝子間遺伝子座に配置されている、h1HA、h1HA/M2e、M2、PB1、またはM1遺伝子カセットを示す(Antoine et al.、上記)。図5Bは、NP遺伝子カセットが、野生型MVAのヌクレオチド142, 992に対応する位置で欠失II領域遺伝子座に配置されていることを示す。

【図6】図6は、インフルエンザウイルス抗原について試験されたニワトリ細胞溶解産物のウエスタンプロットを示す。A) HAに対して向けられた検出抗体を使用する、ヘッドレスHAおよびヘッドレスHA/M2e融合タンパク質の発現。レーン1は、タンパク質ラダー(大きさはkDa)；レーン2は、MVA-h1HA；レーン3は、MVA-h1HA/M2e；レーン4は、野生型MVA(陰性対照)；およびレーン5は、MVA-HA-VN(陽性対照)。B) M2に対して向けられた検出抗体を使用するヘッドレスHA/M2e融合タンパク質の発現。レーン1は、タンパク質ラダー(大きさはkDa)；レーン2は、MVA-M2-VN；レーン3は、MVA-h1HA/M2e；およびレーン4は、野生型MVA(陰性対照)。組換えMVA-M2-VNは、M2タンパク質を発現する(15kDa未満の弱いバンド)。抗M2抗体は、M2タンパク質のN末端でペプチドに結合し、したがって、h1HA/M2e融合タンパク質の発現も、70kDa前後で検出可能である(レーン3)。

【図7】図7は、インフルエンザ遺伝子を含有する二重挿入rMVAを示す。h1HAまたはh1HA/M2e遺伝子カセットは、野生型MVAのヌクレオチド87, 281に対応する位置でD4R/D5R遺伝子間遺伝子座に配置されている。NP遺伝子カセットは、野生型MVAのヌクレオチド142, 992に対応する位置で欠失III領域遺伝子座に配置されている。

【図8】図8は、インフルエンザウイルス抗原について試験されたニワトリ細胞溶解産物のウエスタンプロットを示す。A) HAに対して向けられた検出抗体を使用する、ヘッドレスHAおよびヘッドレスHA/M2e融合タンパク質の発現。レーン1および7は、タンパク質ラダー(大きさはkDa)；レーン2は、MVA-HA-VN(陽性対照)；レーン3は、MVA-h1HA；レーン4は、野生型MVA(陰性対照)；レーン5は、MVA-h1HA/M2e-NP；ならびにレーン6は、MVA-h1HA-NP。MVA-h1HA/M2eによって発現されるh1HA/M2e融合タンパクは、70kDa前後で見ることができる(レーン5)。40kDa前後での低いバンドは、MVA-h1H

10

20

30

40

50

A - N P および M V A - h 1 H A によって発現される h 1 H A を表す。全長 H A タンパク質を発現する対照構築物 (M V A - H A - V N) は、H A 0 (8 0 k D a 前後のバンド) 、H A 1 (5 5 k D a 前後のバンド) 、および H A 2 (2 5 k D a 前後のバンド) を発現する。また H A 2 タンパク質の発現は、h 1 H A および h 1 H A / M 2 e タンパク質も多塩基切断部位を含有するので、レーン 3 、 5 、および 6 において見ることができる。特定的な H A バンドは、陰性対照 (レーン 4) において不在である。B) N P 特異的抗体によって検出された N P 発現。レーン 1 は、タンパク質ラダー (大きさは k D a) ; レーン 2 は、M V A - D 3 - N P - V N ; レーン 3 は、M V A - h 1 H A - N P ; レーン 4 は、M V A - h 1 H A / M 2 e - N P ; および レーン 5 は、野生型 M V A (陰性対照)。

【図 9】図 9 は、組換え M V A によるワクチン接種および H 5 N 1 による攻撃の後の、体重 (A 、 B) 、臨床症状 (C 、 D) 、および生存 (E 、 F) のモニタリングを示す。対照として、マウスを、A / V i e t n a m / 1 2 0 3 / 2 0 0 4 の全長 H A を発現する M V A - H A - V N 、野生型 M V A でワクチン接種した、または P B S で処理した (パネル A 、 C 、 E) 。マウスを、単一組換え M V A - h 1 H A 、 M V A - h 1 H A / M 2 e 、 M V A - N P - V N 、または二重組換え M V A - h 1 H A - N P および M V A - h 1 H A / M 2 e - N P でワクチン接種した (パネル B 、 D 、 F) 。野生型 H 5 N 1 による攻撃の後、マウスを 14 日間モニターした。

【図 10】図 10 は、組換え M V A によるワクチン接種および H 9 N 2 ウイルスによる攻撃の後の、体重 (A 、 B) 、臨床症状 (C 、 D) 、および生存 (E 、 F) のモニタリングを示す。対照として、マウスを、H 9 N 2 の全ウイルス調製物、野生型 M V A でワクチン接種した、または P B S で処理した (パネル A 、 C 、 E) 。マウスを、単一組換え M V A - h 1 H A 、 M V A - h 1 H A / M 2 e 、 M V A - N P - V N 、または二重組換え M V A - h 1 H A - N P および M V A - h 1 H A / M 2 e - N P でワクチン接種した (パネル B 、 D 、 F) 。毒性マウス適合 H 9 N 2 インフルエンザウイルスによる攻撃の後、マウスを 14 日間モニターした。

【図 11】図 11 は、インフルエンザ遺伝子を含有する三重挿入 r M V A を示す。h 1 H A または h 1 H A / M 2 e および M 1 遺伝子カセットは、野生型 M V A 配列の 8 7 , 2 8 1 n t の位置で D 4 R / D 5 R 遺伝子間遺伝子座に配置される。N P 遺伝子カセットは、野生型 M V A 配列の 1 4 2 , 9 9 2 n t の位置で欠失 1 1 1 遺伝子座に配置される。

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 4】

実施例

【0 0 3 5】

本発明は、以下の実施例によって例示され、ここで、実施例 1 は、本発明の例示的な組換え M V A におけるインフルエンザ A 抗原の選択および設計を記載し、実施例 2 は、単一挿入組換え M V A の生成を詳述し、実施例 3 は、単一挿入 M V A による動物実験を記載し、実施例 4 は、二重挿入組換え M V A の生成を詳述し、実施例 5 は、二重挿入 M V A による動物実験を記載し、実施例 6 は、三重挿入組換え M V A の生成を詳述し、実施例 7 は、三重挿入 M V A による動物実験を記載する。

実施例 1

インフルエンザ A 抗原の選択および設計

【0 0 3 6】

インフルエンザヘッドレス H A 、ヘッドレス H A / M 2 e 融合タンパク質、 N P 、 M 1 、 M 2 、および P B 1 は、本発明の例示的な組換え M V A によってコードされるように選択されたインフルエンザ A 抗原であった。

【0 0 3 7】

H A ストーケドメイン、 H A 2 領域に対するモノクローナル抗体は、広く交差反応的であり、ウイルスの幾つかのサブタイプを中和する (E k i e r t e t a l . 2 0 0 9 、 K a s h y a p e t a l . 2 0 0 8 、 O k u n o e t a l . 1 9 9 3 、 S a n c

10

20

30

40

50

hez-Fauquier et al. 1987, Sui et al. 2009, Throsby et al. 2008)。抗体は、分子のHA2領域を標的にし、おそらく、低pHでHAのコンフォメーション変化を防止し、したがって、おそらく、インフルエンザ感染の際にウイルスと宿主膜の融合を阻止するように作用する。しかし、可溶性で未変性(中性pH様)のHA2免疫原の生成は、HAの準安定性のために困難であることが証明されている(Chen et al. 1995)。中性pHコンフォメーションに対して免疫応答を誘導するため、ヘッドレスHAを抗原として選択した。ヘッドレスHAは、HA2サブユニットと相互作用して、中性pHコンフォメーションを安定化する2つのHA1領域からなる(Bommakanti et al.、上記; Steel et al.、上記)。

10

【0038】

M2タンパク質の細胞外ドメイン(M2e, 23AS)は、インフルエンザAウイルスサブタイプにわたって高度に保存されている。動物では、M2e特異的抗体は、広範囲のインフルエンザA株による感染の重篤度を低減する(Fan et al. 2004, Neirynck et al. 1999)。多くのグループが、異なる形態のM2eに基づくワクチン候補を報告している(De Filette et al. 2008, Denis et al. 2008, Eliasson et al. 2008, Fan et al. 上記, Neirynck et al. 上記)。近年、Zhaoらは、H5N1 M2eに基づく四分岐多抗原性ペプチドワクチンが、強力な免疫応答および異なるH5N1クレードに対する交差保護、更には2009H1N1からのヘテロサブタイプ保護を誘導したことを報告した(Zhao et al. 2010b, Zhao et al. 2010a)。

20

【0039】

保存インフルエンザNP、またはNPとマトリックスタンパク質の組み合わせを発現するベクターを使用するワクチン接種が、動物モデルにおいて研究されており、同種または異種ウイルスの両方に対して様々な程度の保護が実証されている(Price et al. 上記; Ulmer et al. 1993)。NPは、マウスおよびヒトにおいて強力なCD8⁺T細胞応答を誘発し(McMichael et al., 1986, Yewdell et al., 1985))、このことは、疫学的研究が示唆するように、インフルエンザAウイルス感染に続く重篤な疾患に対する抵抗性に寄与し得る(Epsstein 2006)。

30

【0040】

本発明のrMVAに含まれるヘッドレスHAは、VN/1203インフルエンザ株に基づく新しいヘッドレスHA(h1HA)である。h1HAは、rMVAからの発現の際に切断され、融合タンパク質を免疫系に曝露する多塩基切断部位である。h1HAのアミノ酸配列は、図1および配列番号15に示されている。MVA挿入のヌクレオチド配列は、図2および配列番号14に示されている。

【0041】

本発明のrMVAに含まれるヘッドレスHA/M2e融合タンパク質のアミノ酸配列は、下記の図3および配列番号2に示されている。融合タンパク質のヌクレオチド配列は、下記の図4および配列番号1に示されている。融合タンパク質において、H5N1、H9N2、H7N2、およびH1N1(H2N2、H3N2の等価物)のM2eドメインは、M2e「ヘッド」をh1HAに形成する。4つの特定のM2eドメインを、季節性および流行性株からのM2eを表すために選択した。

40

実施例2

単一挿入MVAベクターの構築および特徴決定

【0042】

以下の单一挿入組換えMVA(rMVA)を、本明細書に記載される実験に利用する。

【表2】

【表2】

rMVA	挿入インフルエンザ遺伝子	NCBI 遺伝子受入番号
1. MVA-hlHA	ヘッドレス HA	AY818135 に基づく
2. MVA-hlHA/M2e	ヘッドレス HA/M2e 融合	AY818135 に基づく
3. MVA-M1-VN	マトリックスタンパク質 1	AY818144
4. MVA-M2-VN	マトリックスタンパク質 2	EF541453
5. MVA-PB1-VN	ポリメラーゼサブユニット PB1	AY818129
6. MVA-mNP	核タンパク質	AY818138
7. 対照 MVA-HA-VN	ヘマグルチニン	AY818135
8. 対照 野生型 MVA	挿入なし	-
9. 対照 PBS	挿入なし	-

【0043】

h1HA、h1HA / M2e 融合タンパク質、または PB1 を発現する単一挿入 rMVA ベクターの構築では、h1HA、h1HA / M2e、および PB1 の遺伝子を化学的に合成した (Geneart, Inc., Regensburg, Germany)。合成遺伝子は、強力なワクシニア初期 / 後期プロモーター-mH5 (Wyatt et al. 1996) によって誘導され、内部に不在であるコード領域の下流にあるワクシニアウイルス特異的終止シグナルで終結される。遺伝子カセットをプラスミド pDM-D4R 内でクローンし (Ricci et al. 2011)、それぞれ、プラスミド pDM-h1HA、pDM-h1HA / M2e、および pDM-PB1-VN をもたらした。MVA の D4R / D5R 遺伝子間領域への外来遺伝子の導入を、他で記載されているように実施し (Ricci et al. 2011)、ウイルス MVA-h1HA、MVA-h1HA / M2e、MVA-PB1-VN をもたらした。

【0044】

M1 を発現する rMVA の構築では、M1 配列 (受入番号 AY818144) を、強力なワクシニア初期 / 後期プロモーター-selP の下流に配置し (Chakrabarti et al. 1997)、pDM-D4R 内でクローンして、pDM-M1-VN をもたらした。pDD4-M2-VN の発現カセット (mH5 プロモーターの制御下で M2 配列 (受入番号 EF541453) を含む) を pDM-D4R 内でクローンして、pDM-M2-VN をもたらした。次にプラスミドを、Holzerら、上記、に従って MVA との組換えに使用して、それぞれ図 5A に示されている、ウイルス MVA-M1-VN および MVA-M2-VN をもたらした。

【0045】

NP タンパク質を発現する単一挿入 MVA の構築では、pDD4-mH5-mNP-VN (Mayrhofer et al.、上記) の NP 発現カセットを、プラスミド pd3-1acZ-gpt 内でクローンして、pd3-1acZ-mH5-NP-VN をもたらした。プラスミド pd3-1acZ-gpt は、1acZ/gpt 選択マーカーカセット、および目的の遺伝子の挿入のための多重クローニング部位 (MCS) を含有する。配列は、欠失 III 領域のゲノム MVA 配列によってフレームされる。マーカーカセットは、MVA 欠失 III フランクのタンデム反復によって不安定化され、それによって最終組換え型は補助配列を含まない。挿入プラスミドは、遺伝子カセットを MVA 欠失 III (de1 III) 領域の中に向ける。初代ニワトリ胚細胞を MOI 1 に感染させた後、細胞を、リン酸カルシウム技術 (Graham および van der Eb 1973) に従って pd3-1acZ-mH5-NP-VN でトランスフェクトして、図 5B に示されている MVA-NP-VN をもたらした。MVA 株 (MVA 1974 / NIH クローン 1) は、B. Moss (国立衛生研究所) により快く提供された。組換えウイルスは、一過性マーカー安定化法 (Scheiflinger et al. 1998) を使用して選

10

20

30

40

50

択される。

【 0 0 4 6 】

N P、P B 1、M 1、M 2、h 1 H A、およびh 1 H A / M 2 e を発現する単一挿入M V Aベクターを、H e s s e l r a 、上記に記載されたようにP C Rおよびウエスタンプロットで特徴決定した。組換えウイルスを、C E CまたはD F - 1 細胞において増殖させ、スクロースクッショングを介した遠心分離によって精製した。初代C E Cを社内で生成し、5 %ウシ胎児血清(F C S)を補充したM e d 1 9 9(G i b c o(登録商標))で培養した。D F - 1(C R L - 1 2 2 0 3)細胞系を、A T C C(アメリカン・タイプ・カルチャーライブ・コレクション)から得て、5 %F C Sを補充したD M E M(B i o c h r o m , I n c)で培養した。

10

【 0 0 4 7 】

r M V Aによるインフルエンザタンパク質の正確な発現を、ウエスタンプロッティングにより確認した。この目的のため、C E Cまたは永久ニワトリ細胞系のD F - 1を、0 . 1のM O Iに感染させ、細胞溶解産物を感染の4 8 ~ 7 2時間後に調製した。h 1 H Aを発現する組換えM V A(M V A - h 1 H AおよびM V A - h 1 H A / M 2 e)は、検出のために抗インフルエンザA/V i e t n a m / 1 1 9 4 / 0 4(H 5 N 1)ポリクローナル血清(N I B S C 0 4 / 2 1 4)を使用するウエスタンプロットにより分析した。ロバ抗ヒツジアルカリホスファターゼ複合体I g G(S i g m a I n c .)を二次抗体として使用した。M 2およびM 2 eを発現する組換えM V A(M V A - M 2 - V NおよびM V A - h 1 H A / M 2 e)は、H 5 N 1 M 2(P r o S c i 、カタログ番号4 3 3 3)のアミノ末端に存在するペプチドに結合する抗鳥類インフルエンザM 2抗体を使用するウエスタンプロットにより分析した。ヤギ抗ウサギアルカリホスファターゼ複合体I g G(S i g m a I n c .)抗体を二次抗体として使用した。図6 Aに示されているように、h 1 H Aを発現する組換えM V A(M V A - h 1 H AおよびM V A - h 1 H A / M 2 e)の遺伝子挿入は、鳥類D F - 1細胞においてH A含有抗原の発現を誘導する。レーン2における4 0 k D a前後のバンドは、h 1 H Aを表す。レーン3における7 0 k D a前後のより大きなバンドは、h 1 H A / M 2 eを表す。レーン5における8 0 k D a前後の大きなバンドは、H A 0ヘマグルチニン前駆体を表し、これは切断されて、約5 5および2 5 k D aのバンドで表されるH A 1およびH A 2サブユニットとなる。特定的なh 1 H A、h 1 H a / M 2 e、またはH Aのバンドは、野生型M V A対照では不在である(レーン4)。

20

【 0 0 4 8 】

図6 Bは、M V A - M 2 - V N(レーン2)またはM V A - h 1 H A / M 2 e(レーン3)によるM 2発現を示す。レーン2における1 0 k D a前後の弱いが特定的なバンドは、野生型M 2タンパク質を表し、一方、7 0 k D a前後のより大きなバンドは、h 1 H A / M 2 eタンパク質を表す。両方のバンドは、野生型M V A対照では不在である(レーン4)。

30

【 0 0 4 9 】

M 1、N P、およびP B 1タンパク質の発現は、社内で生成されたポリクローナルモルモット抗インフルエンザH 5 N 1血清、インフルエンザAウイルスのP B 1を検出するポリクローナルヤギ抗体(S a n t a C r u z 、カタログ番号v C - 1 9)、およびモノクローナルマウス抗N P抗体(B i o X c e l l 1 1 、カタログ番号B E 0 1 5 9)によってそれぞれ検出される。M V A - M 1 - V NおよびM V A - N P - V Nは、M 1タンパク質(2 7 k D a前後)およびN Pタンパク質(6 0 k D a前後)の発現を誘導する(示されず)。

40

実施例 3

単一挿入ワクチンによる動物実験

保護実験

【 0 0 5 0 】

50

標準的な保護実験は、それぞれ 9 群のマウス（表 2 に示されている 9 つのワクチンおよび対照の 1×10^6 p.f.u をそれぞれ筋肉内にワクチン接種した）の 2 つの集団（約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ の T C I D₅₀ H1N1v CA / 07 で初回刺激した、および初回刺激しなかった）からなり、群は 6 匹の動物から構成され、その結果 108 匹の動物になり、これらを 1 セットと定義する。1 セットの動物を、下記の表 3 に示される 6 つの攻撃ウイルスのうちの 1 つで攻撃する。

【表 3】

【表 3】

前処置	攻撃株	サブタイプ	略語
H1N1v / 初回刺激なし	A/California/07/2009	H1N1	CA/07
H1N1v / 初回刺激なし	A/Vietnam/1203/2004	H5N1	VN/1203
H1N1v / 初回刺激なし	A/HongKong/G9/	H9N2	HK/G9
H1N1v / 初回刺激なし	A/Victoria/210/2009	H3N2	VI/09
H1N1v / 初回刺激なし	A/FPV/Rostock/34	H7N1	RO/34
H1N1v / 初回刺激なし	A/PR8/1934	H1N1	PR8

【0051】

雌 B a l b / c マウスは、前処理の時点では 8 ~ 10 週齢であり、表 2 に示されているワクチンおよび対照で免疫化した時点では 14 ~ 16 週齢である。マウスを、 10^6 p.f.u のワクチンもしくは野生型 M V A、 $3.75 \mu\text{g}$ の全ウイルス調製物 H9N2 A / Hong Kong / G9 / 1997、または緩衝液 (P B S) により 2 回 (42 および 63 日目) 筋肉内で免疫化した。84 日目には、マウスを、 10^3 T C I D₅₀ H5N1 A / Vietnam / 1203 / 2004 (H5N1、CDC 番号 2004706280)、 2.5×10^4 T C I D₅₀ マウス適合 H9N2 A / Hong Kong / G9 / 1997、または 1.66×10^4 T C I D₅₀ H7N1 A / FPV / Rostock / 34 により経鼻的に攻撃した。攻撃用量は、動物 1 匹あたり、H5N1 攻撃では約 30 LD₅₀ および H9N2 攻撃では 32 LD₅₀ に相当する。血清を、41、62、および 85 日目に収集し、H I 力値またはマイクロ中和試験アッセイにより H A 特異的 I g G 濃度について分析する。

【0052】

動物実験の主要な成績は、致死終点、体重減少、または肺力値によって測定される保護である。更に、不活性化全ウイルス H5N1 株 A / Vietnam / 1203 / 2004 に対して測定した攻撃前プール血清の E L I S A 力値を決定した。

T 細胞実験

【0053】

インフルエンザ特異的 C D 4 および C D 8 T 細胞の頻度を、フローサイトメトリーにより免疫化マウスにおいて決定する。標準的な実験において、5 匹の雌 B A L B / c マウスの群を、表 2 に提示されたワクチンまたは対照で 2 回免疫化する。脾細胞を、C D 4 T 細胞に対する異なるインフルエンザ株の不活性化全ウイルス抗原、入手可能であれば、ワクチン挿入構築物の C D 8 T 細胞エピトープを表すペプチドを使用してインビトロで再刺激して、I F N 生産を測定する。全ての実験を、合計 140 匹の動物を使用して 2 回実施する。

他の実験

【0054】

単回免疫化の後の細胞介在免疫性の評価、V I T A L アッセイにおける細胞毒性 T 細胞の

機能的活性の実証、および攻撃された動物の肺へのインフルエンザ特異的T細胞の動員の評価も実施する。ワクチン特異的T細胞の誘導／拡大も、これらのワクチンによりインフルエンザウイルス感染を一度解決してマウスを免疫化することにより、初回刺激マウスモデルでモニターする。

実施例4

二重挿入rMVAベクターの構築および特徴決定

【0055】

以下の二重挿入rMVAおよび対照を、本明細書に記載される実験に利用する。

【表4】

【表4】

rMVA	挿入インフルエンザ遺伝子	コメント
1. MVA-hlHA-NP	ヘッドレスHA+NP	二重挿入構築物
2. MVA-hlHA/M2e-NP	ヘッドレスHA/m2e融合タンパク質+NP	二重挿入構築物
3. MVA-NP-VN	核タンパク質	対照
4. MVA-HA-VN	ヘマグルチニン	対照
5. MVA-wt	空ベクター	陰性対照
6. PBS	-	陰性対照

10

【0056】

h1HAまたはh1HA/M2eのいずれかの遺伝子カセットを、NPタンパク質遺伝子カセットと組み合わせて同時発現する二重挿入rMVAベクターの構築では、h1HAまたはh1HA/M2e遺伝子カセットを含有する実施例2の単一挿入MVA組換え型を使用する。CEC細胞をMVA-h1HAまたはMVA-h1HA/M2eに感染させ、その後pD3-1acZ-mH5-NP-VNでトランスフェクトした（実施例2を参照されたい）。組換えMVAベクターの相同組換え、および繁殖を、実施例2に記載されたとおりに実施する。MVA-h1HA-NPまたはMVA-h1HA/M2e-NPと呼ばれる、得られた二重挿入MVAベクターは、D4R/D5R遺伝子座にh1HAまたはh1HA/M2e発現カセット、およびd e l I II 遺伝子座にNP発現カセットを含有する。図7を参照されたい。

20

【0057】

組換えMVAを、実施例2に記載されたウエスタンプロットにより特徴決定した。図8Aは、MVA-h1HA-NP（レーン6）またはMVA-h1HA/M2e-NP（レーン5）によるCECの感染後の、h1HAおよびh1HA/M2eの発現を示す。レーン3および6における40kDa前後のバンドは、MVA-h1HAおよびMVA-h1HA-NP構築物のh1HAを表す。レーン5における70kDa前後のバンドは、h1HA/M2e融合タンパク質を表す。HAのバンドは、レーン4の野生型対照では不在である。同じ試料を、ウエスタンプロットによるNPタンパク質発現の検出に使用した（実施例2に記載されている）。図8Bに示されているように、組換えMVAのMVA-h1HA-NPおよびMVA-h1HA/M2e-NPも、鳥類CEC細胞にNPタンパク質の発現を誘導した。レーン2～4における60kDa前後のバンドは、NPを表す。

30

40

実施例5

二重挿入ワクチンまたはベクターの組み合わせによる動物実験

保護実験

【0058】

標準的な実験は、各群が6匹の動物から構成される8群のマウス（表5に示されている6つのワクチンおよび対照でワクチン接種された）を含んだ。保護試験を、実施例3に記載されたとおりに実施した。攻撃の後、マウスを14日間にわたってモニターし、体重減少

50

、または逆毛（スコア1）、湾曲姿勢（スコア2）、感情鈍麻（スコア3）、および死亡（スコア4）を含む症状を記録した。倫理的な理由により、マウスを25%以上の体重減少後に安樂死させた。保護の結果を表5にまとめ、図9および10に示す。

【表5】

【表5】組換えMVAおよび同種または異種攻撃による二重用量ワクチン接種後の死亡からのマウスの保護

群	ワクチン	H5N1 VN1203 ⁽¹⁾ 攻撃の後		H9N2 HK/G9 ⁽²⁾ 攻撃の後	
		14日目の臨床スコア	保護 n/nt ⁽³⁾ (%)	14日目の臨床スコア	保護 n/nt(%)
1	MVA-hlHA-NP	2.83	2/6 (33)	0	6/6 (100)
2	MVA-hlHA/M2e-NP	1	5/6 (83)	0	6/6 (100)
3	MVA-hlHA	2.67	2/6 (33)	3.33	1/6 (17)
4	MVA-hlHA/M2e	4	0/6 (0)	2.67	2/6 (33)
5	MVA-NP-VN	3.33	2/6 (33)	0	6/6 (100)
6	同種対照ワクチン ⁽⁴⁾	0	6/6 (100)	0	6/6 (100)
7	野生型MVA ⁽⁵⁾	4	0/6 (0)	2.83	2/6 (33)
8	PBS	2.67	2/6 (33)	4	0/6 (0)

⁽¹⁾VN1203 攻撃株 A/Vietnam/1203/2004; ⁽²⁾HK/G9 攻撃株 A/HongKong/G9/1997; ⁽³⁾n/nt 1群あたりの生存;

⁽⁴⁾ 同種対照ワクチン; ⁽⁵⁾野生型 MVA(NIH74 LVD クローン 6)。

【0059】

陽性対照マウスを同種対照構築物でワクチン接種した。H5N1攻撃の場合では、マウスをMVA-HA-VN (Hessel et al. 2011)でワクチン接種し、H9N2攻撃の場合では、マウスを、H9N2 A / Hong Kong / G9 / 1997インフルエンザウイルスの不活性化全ウイルス調製物でワクチン接種した。両方の対照は、完全な保護を誘導した（表5；図9および10のパネルE）。野生型MVAおよび緩衝液群では、全てのマウスが、陽性対照群と比較して著しい体重減少を示し、大半のマウスが攻撃の後に死亡した。単一組換えMVA (MVA-hlHA、MVA-hlHA/M2e、MVA-D3-NP-VN)でワクチン接種されたマウスは、陰性対照群と比較して、強力なH5N1攻撃の後で有意に良好な保護を示さなかった（図9A～F）。また、ヘテロサブタイプ (H9N2)攻撃に対して、有意な保護がMVA-hlHAおよびMVA-hlHA/M2eワクチン接種群において見られなかった（図10）。

【0060】

しかし、驚くべきことに、融合タンパク質hlHA/M2eおよびNPタンパク質を発現する二重構築物によるワクチン接種は、動物1匹あたり約30 LD50のH5N1攻撃の後、ほぼ完全な保護をもたらした（図9B、D、F）。また、ヘテロサブタイプ攻撃（約32 LD50のH9N2ウイルスによる）の後、マウスは、二重組換えMVA-hlHA/M2e-NPによるワクチン接種の後で完全に保護された。更に、二重組換えMVA-hlHA-NPおよび単一組換えMVA-NP-VNは、H9N2によるヘテロサブタイプ攻撃に対して完全な保護を誘導した（図10B、D、F）。体重モニタリング（図9および10のパネルB）、ならびに臨床スコア（図9および10のパネルD）において分かるように、二重構築物MVA-hlHA/M2e-NPは、恐らく異なるインフルエンザ抗原により寄与される有益効果の組合せによって、最良の結果を示した。

T細胞実験

【0061】

インフルエンザ特異的CD4およびCD8 T細胞の頻度を、フローサイトメトリーによ

10

20

30

40

50

り免疫化マウスにおいて決定する。標準的なプロトコールの実験において、5匹の雌BALB/cマウスの群を、表4に提示されたワクチンまたは対照で2回免疫化する。脾細胞を、CD4+T細胞に対する異なるインフルエンザ株の不活性化全ウイルス抗原、入手可能であれば、ワクチン挿入構築物のCD8+T細胞エピトープを表すペプチドを使用してインピトロで再刺激して、IFN- γ 生成を測定する。全ての実験を2回実施する。

他の実験

【0062】

単回免疫化の後の細胞仲介免疫性の評価、VITALアッセイにおける細胞毒性T細胞の機能的活性の実証、および攻撃された動物の肺へのインフルエンザ特異的T細胞の動員の評価も実施する。ワクチン特異的T細胞の誘導/拡大も、これらのワクチンによりインフルエンザウイルス感染を一度解決してマウスを免疫化することにより、初回刺激マウスマデルでモニターする。

10

実施例6

三重挿入rMVAベクターおよびウイルス様粒子の構築および特徴決定

【0063】

インフルエンザウイルス様粒子(VLP)は、液性および細胞性応答を誘導し、致死的な攻撃に対して保護することができる(Bright et al. 2007, Pushko et al. 2005, Song et al. 2010)。本明細書の実験に選択されたVLPは、h1HAまたはh1HA/M2eのいずれかをNPおよびM1と組み合わせて含む。VLPは、三重挿入MVAベクターから生成される。

20

【0064】

h1HAまたはh1HA/M2eのいずれかをM1(配列番号11)およびNPタンパク質(配列番号13)と組み合わせて同時発現する三重挿入MVAベクターの構築では、pD4-M1-VNのM1遺伝子(配列番号10)を、合成初期/後期プロモーターse1Pの下流でクローンする(Chakrabarti et al. 1997)。得られた遺伝子カセットを、pDM-h1HAまたはpDM-h1HA/M2eにおけるh1HAまたはh1HA/M2e遺伝子カセットの下流でクローンする。二重遺伝子カセット(pDM-h1HA-M1およびpDM-h1HA/M2e-M1)を持つ、得られたプラスミドを、上記に記載された欠損MVAへの組換えに使用する。その後、NP遺伝子カセット(配列番号12)含有プラスミド(pD3-lacz-gpt-NP-VN)による組換えを実施して、三重挿入MVAウイルスをもたらす。この三重挿入MVAは、一過性マーカー選択下で精製されるブラークである。

30

【0065】

MVA-h1HA-M1-NPまたはMVA-h1HA/M2e-M1-NPと呼ばれる、三重挿入MVAベクターは、D4R/D5R遺伝子座にh1HAまたはh1HA/M2e発現カセット、およびM1発現カセットをタンデムオーダーで、ならびにdel-III-I遺伝子座にNP発現カセットを含有する(図7)。

40

【0066】

VLPの検出は以下のとおりである。HeLaまたは293細胞を、T175cm²フラスコの中に接種し、DMEM+10%FCS+Pen/Strepで増殖させる。VLPを生成するために、細胞を1MOIの単一挿入MVAまたは三重挿入MVA組換え型にそれぞれ感染させる。空MVAベクターまたはM1を有さない単一挿入MVA組換え型を对照として使用する。感染後(p.i.)の1時間時点で、培地をDMEM+Pen/Strepに代え、培養培地を感染から48時間後に採取し、細胞片を、2,000×gで10分間の遠心分離によってペレット化する。スクロース勾配密度浮選およびスクロースクレッショングによってVLPを分析する手順は、以前に記載されている(Chen et al. 2007, Chen et al. 2005, Gomez-Puertes et al. 2000)。次に、試料をイムノブロッティングによって分析する。加えて、感染

50

させた細胞の培地を用いる、電子顕微鏡法（EM）分析を実施する。

実施例 7

三重挿入ワクチンまたはベクターの組み合わせによる動物実験

【0067】

標準的な実験は、各群が6匹の動物から構成され、結果的に36匹の動物になる（1セット）6群の初回刺激した、および初回刺激なしのマウス（表5に示されている6つのワクチンおよび対照でワクチン接種した）を含む。動物を、表3に示された6つの攻撃ウイルスのうちの1で攻撃する。要約すると、それぞれ72匹の動物の6セットが存在し、初回刺激および未変性モデルにおける交差保護を評価するために432匹のマウスを必要とする。10

【表6】

【表5】

rMVA	挿入インフルエンザ遺伝子	コメント	
1. MVA-hlHA-M1-NP	ヘッドレスHA+核タンパク質+マトリックス1	3挿入	
2. MVA-hlHA/M2e-M1-NP	ヘッドレスHA/m2e融合タンパク質+核タンパク質 +マトリックス1	3挿入	
3. MVA-tbd	前のスクリーニングによる最良の構築物	対照	20
4. MVA-HA-VN	ヘマグルチニン	対照	
5. 野生型MVA	空ベクター	陰性対照	
6. PBS	-	陰性対照	

【0068】

本発明は前述の実施例によって例示されており、その変形は当業者に明らかである。したがって、以下の特許請求の範囲に記載のもの以外の限定は、本発明に付与されるべきではない。

【0069】

本出願に引用される全ての文献は、記載された開示の全体が参考として本明細書に組み込まれる。30

引用文献

Antoine, G., F.Scheiflinger, F. Dorner, and F. G. Falkner. 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244:365-396.

Antoine, G., Scheiflinger, F., Holzer, G., Langmann, T., Falkner, F.G., and Dorner, F. 1996. Characterization of the vaccinia MVA hemagglutinin gene locus and its evaluation as an insertion site for foreign genes. *Gene* 177:43-46. 40

Assarsson, E., H. H. Bui, J. Sidney, Q. Zhang, J. Glenn, C. Oseroff, I. N. Mbawuike, J. Alexander, M. J. Newman, H. Grey, and A. Sette. 2008. Immunomic analysis of the repertoire of T-cell specificities for influenza A virus in humans. *J Virol* 82:12241-51.

Berthoud, T.K., M. Hamill, P. J. Lillie, L. Hwenda, K. A. Collins, K. J. Ewer, A. Milicic, H. C. Poyntz, T. Lambe, H. A. Fletcher, A. V. Hill, and S. C. Gilbert. 2011. Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic infl50

uenzaA vaccine, MVA-NP+M1. Clin Infect Dis 52:1-7.

Bommakanti, G., M. P. Citron, R. W. Hepler, C. Callahan, G. J. Heidecker, T. A. Najar, X. Lu, J. G. Joyce, J. W. Shiver, D. R. Casimiro, J. ter Meulen, X. Liang, and R. Varadarajan. 2010. Design of an HA2-based *Escherichia coli* expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. Proc Natl Acad Sci U S A 107:13701-6.

Bright, R. A., D. M. Carter, S. Daniluk, F. R. Toapanta, A. Ahmad, V. Gavrilov, M. Massare, P. Pushko, N. Mytle, T. Rowe, G. Smith, and T. M. Ross. 2007. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. Vaccine 25:3871-8.

Brookes, R.H., Hill, P.C., Owiafe, P.K., Ibanga, H.B., Jeffries, D.J., Donkor, S.A., Fletcher, H.A., Hammond, A.S., Lienhardt, C., Adegbola, R.A., McShane, H., and Hill, A.V. 2008. Safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in West Africa. PLoS One. 3:e2921.

Carroll, M. W., and B. Moss. 1997. Poxviruses as expression vectors. Curr Opin Biotechnol 8:573-7.

Cebere, I., Dorrell, L., McShane, H., Simmons, A., McCormack, S., Schmidt, C., Smith, C., Brooks, M., Roberts, J.E., Darwin, S.C., Fast, P.E., Conlon, C., Rowland-Jones, S., McMichael, A.J., and Hanke, T. 2006. Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers. Vaccine 24:417-425.

Chakrabarti, S., J. R. Sisler, and B. Moss. 1997. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. Biotechniques 23:1094-7.

Chen, B. J., G.P. Leser, E. Morita, and R. A. Lamb. 2007. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. J Virol. 81:7111-7123.

Chen, B. J., M. Takeda, and R. A. Lamb. 2005. Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly. J Virol. 79:13673-84.

Chen, J., S. A. Wharton, W. Weissenhorn, L. J. Calder, F. M. Hughson, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1995. A soluble domain of the membrane-anchoring chain of influenza virus hemagglutinin (HA2) folds in *Escherichia coli* into the low-pH-induced conformation. Proc Natl Acad Sci U S A 92:12205-9.

De Filette, M., W. Martens, K. Roose, T. Deroo, F. Vervalle, M. Bentahir, J. Vandekerckhove, W. Fiers, and X. Saelens. 2008. An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. J Biol Chem 283:11382-7.

Denis, J., E. Acosta-Ramirez, Y. Zhao, M. E. Hamelin, I. Koukavica, M. Baz, Y. Ab

10

20

30

40

50

ed, C.Savard, C. Pare, C. Lopez Macias, G. Boivin, and D. Leclerc. 2008. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 26:3395-403.

Ekiert, D. C., G. Bhabha, M. A. Elsliger, R. H. Friesen, M. Jongeneelen, M. Throsby, J. Goudsmit, and I. A. Wilson. 2009. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324:246-51.

Eliasson, D.G., K. El Bakkouri, K. Schon, A. Ramne, E. Festjens, B. Lowenadler, W. Fiers, X. Saelens, and N. Lycke. 2008. CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine. *Vaccine* 26:1243-52. 10

Epstein, S. L. 2006. Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland Family Study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature. *J Infect Dis* 193:49-53.

Fan, J., X. Liang, M. S. Horton, H. C. Perry, M. P. Citron, G. J. Heidecker, T. M. Fu, J. Joyce, C. T. Przysiecki, P. M. Keller, V. M. Garsky, R. Ionescu, Y. Ripperton, L. Shi, M. A. Chastain, J. H. Condra, M. E. Davies, J. Liao, E. A. Emini, and J.W. Shiver. 2004. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine* 22:2993-3003. 20

Gomez-Puertas, P., C. Albo, E. Perez-Pastrana, A. Vivo, and A. Portela. 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* 74:11538-47.

Graham, F. L., and A. J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-67.

Greenbaum, J.A., M. F. Kotturi, Y. Kim, C. Oseroff, K. Vaughan, N. Salimi, R. Viita, J. Ponomarenko, R. H. Scheuermann, A. Sette, and B. Peters. 2009. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20365-70. 30

Hessel, A., M. Schwendinger, D. Fritz, S. Coulibaly, G. W. Holzer, N. Sabarth, O. Kistner, W. Wodal, A. Kerschbaum, H. Savidis-Dacho, B. A. Crowe, T. R. Kreil, P. N. Barrett, and F.G. Falkner. 2010. A pandemic influenza H1N1 live vaccine based on modified vaccinia Ankara is highly immunogenic and protects mice in active and passive immunizations. *PLoS One* 5:e12217.

Hessel et al., 2011. *PLoS ONE* 6(1): e16247. doi:10.1371/journal.pone.0016247 40

Hoelscher, M.A., S. Garg, D. S. Bangari, J. A. Belser, X. Lu, I. Stephenson, R. A. Bright, J. M. Katz, S. K. Mittal, and S. Sambhara. 2006. Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet* 367:475-481.

Hoelscher, M.A., L. Jayashankar, S. Garg, V. Veguilla, X. Lu, N. Singh, J. M. Katz, S. K. Mittal, and S. Sambhara. 2007. New pre-pandemic influenza vaccines: an egg- and adjuvant-independent human adenoviral vector strategy induces long-lasting 50

ngprotective immune responses in mice. Clin. Pharmacol. Ther. 82:665-671.

Holzer, G. W., W. Gritschenberger, J. A. Mayrhofer, V. Wieser, F. Dorner, and F. G. Falkner. 1998. Dominant host range selection of vaccinia recombinants by rescue of an essential gene. Virology 249:160-6.

Kashyap, A. K., J. Steel, A. F. Oner, M. A. Dillon, R. E. Swale, K. M. Wall, K. J. Perry, A. Faynboym, M. Ilhan, M. Horowitz, L. Horowitz, P. Palese, R. R. Bhatt, and R. A. Lerner. 2008. Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. Proc Natl Acad Sci U S A 105:5986-91.

10

Kreijtz, J. H., M. G. de, C. A. van Baalen, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2008. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus. J. Virol. 82:5161-5166.

Kreijtz, J. H., Y. Suezer, G. de Mutsert, G. van Amerongen, A. Schwantes, J. M. van den Brand, R. A. Fouchier, J. Lower, A. D. Osterhaus, G. Sutter, and G. F. Rimmelzwaan. 2009. MVA-based H5N1 vaccine affords cross-clade protection in mice against influenza A/H5N1 viruses at low doses and after single immunization. PLoS One 4:e7790.

20

Kreijtz, J. H., Y. Suezer, G. de Mutsert, J. M. van den Brand, G. van Amerongen, B. S. Schnierle, T. Kuiken, R. A. Fouchier, J. Lower, A. D. Osterhaus, G. Sutter, and G. F. Rimmelzwaan. 2009. Preclinical evaluation of a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vaccine against influenza A/H5N1 viruses. Vaccine 27:6296-9.

Kreijtz, J. H., Y. Suezer, G. de Mutsert, J. M. van den Brand, G. van Amerongen, B. S. Schnierle, T. Kuiken, R. A. Fouchier, J. Lower, A. D. Osterhaus, G. Sutter, and G. F. Rimmelzwaan. 2009. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the hemagglutinin gene confers protection against homologous and heterologous H5N1 influenza virus infections in macaques. J. Infect. Dis. 199:405-13.

30

Kreijtz, J. H., Y. Suezer, G. de Mutsert, B. S. Schnierle, J. M. Wood, T. Kuiken, R. A. Fouchier, J. Lower, A. D. Osterhaus, G. Sutter, and G. F. Rimmelzwaan. 2007. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1. J. Infect. Dis. 195:1598-1606.

40

Lambert, L. C., and A. S. Fauci. 2010. Influenza Vaccines for the Future. N Engl J Med 363:2036-2044.

Lee, L. Y., L.A. Hardo, C. Simmons, J. M. D. de, N. V. Chau, R. Schumacher, Y. C. Peng, A. J. McMichael, J. J. Farrar, G. L. Smith, A. R. Townsend, B. A. Askonas, S. Rowland-Jones, and T. Dong. 2008. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. J. Clin. Invest. 118:3478-3490.

Mackett, M., Smith, G.L., and Moss, B. 1982. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic

50

cloning and expression vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 79:7415-7419.

Mayrhofer, J., S. Coulibaly, A. Hessel, G. W. Holzer, M. Schwendinger, P. Bruhl, M. Gerencer, B. A. Crowe, S. Shuo, W. Hong, Y. J. Tan, B. Dietrich, N. Sabarth, H. Savidis-Dacho, O. Kistner, P. N. Barrett, and F. G. Falkner. 2009. Nonreplicating vaccinia virus vectors expressing the H5 influenza virus hemagglutinin produced in modified Vero cells induce robust protection. J Virol 83:5192-203.

McMichael, A. J., C. A. Michie, F. M. Gotch, G. L. Smith, and B. Moss. 1986. Recognition of influenza A virus nucleoprotein by human cytotoxic T lymphocytes. J Gen. Virol 67 (Pt 4):719-26. 10

Meyer, H., Sutter, G., and Mayr, A. 1991. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. J Gen. Virol. 72 (Pt 5):1031-1038.

Moss, B., M. W. Carroll, L. S. Wyatt, J. R. Bennink, V. M. Hirsch, S. Goldstein, W. R. Elkins, T. R. Fuerst, J. D. Lifson, M. Piatak, N. P. Restifo, W. Overwijk, R. Chamberlain, S. A. Rosenberg, and G. Sutter. 1996. Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. Adv Exp Med Biol 397:7-1 20 3.

Neirynck, S., T. Deroo, X. Saelens, P. Vanlandschoot, W. M. Jou, and W. Fiers. 1999. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. Nat Med 5:1157-63.

Okuno, Y., Y. Isegawa, F. Sasao, and S. Ueda. 1993. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains. J Virol 67:2552-8.

Poon, L. L., Y.H. Leung, J. M. Nicholls, P. Y. Perera, J. H. Lichy, M. Yamamoto, T. A. Waldmann, J. S. Peiris, and L. P. Perera. 2009. Vaccinia virus-based multivalent H5N1 avian influenza vaccines adjuvanted with IL-15 confer sterile cross-clade protection in mice. J Immunol 182:3063-71. 30

Price, G. E., M. R. Soboleski, C. Y. Lo, J. A. Misplon, C. Pappas, K. V. Houser, T. M. Tumpey, and S. L. Epstein. 2009. Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A viruses. Vaccine 27:6512-21.

Price, G. E., M. R. Soboleski, C. Y. Lo, J. A. Misplon, M. R. Quirion, K. V. Houser, M. B. Pearce, C. Pappas, T. M. Tumpey, and S. L. Epstein. 2010. Single-dose mucosal immunization with a candidate universal influenza vaccine provides rapid protection from virulent H5N1, H3N2 and H1N1 viruses. PLoS One 5:e13162. 40

Pushko, P., T.M. Tumpey, F. Bu, J. Knell, R. Robinson, and G. Smith. 2005. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. Vaccine 23:5751-9.

Ricci et al., 2011. Virology Journal , 8:529.

50

Rimmelzwaan, G.F., and G. Sutter. 2009. Candidate influenza vaccines based on recombinantmodified vaccinia virus Ankara. *Expert Rev Vaccines* 8:447-54.

Sanchez-Fauquier,A., N. Villanueva, and J. A. Melero. 1987. Isolation of cross-reactive, subtype-specific monoclonal antibodies against influenza virus HA1 and H A2hemagglutinin subunits. *Arch Virol* 97:251-65.

Scheiflinger et al, 1998. *Arch. Virol.* 143, 467-474.

10

Schotsaert, M.,M. De Filette, W. Fiers, and X. Saelens. 2009. Universal M2 ectodomain-basedinfluenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert RevVaccines* 8:499-508.

Slavik,I.,Ciampor,F., and Mayer,V. 1983. Optimalized conditions of tick-borneencephalitis virus production in vitro. *Acta Virol.* 27:97-104.

Smith, G. L., J.Z. Levin, P. Palese, and B. Moss. 1987. Synthesis and cellular location of theten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology* 160:336-45.

20

Song, J. M., J.Hossain, D. G. Yoo, A. S. Lipatov, C. T. Davis, F. S. Quan, L. M. Chen, R. J.Hogan, R. O. Donis, R. W. Compans, and S. M. Kang. 2010. Protective immunityagainst H5N1 influenza virus by a single dose vaccination with virus-like particles. *Virology* 405:165-75.

Steel, J., A.C. Lowen, T. Wang, M. Yondola, Q. Gao, K. Haye, A. Garcia-Sastre, and P.Palese. 2010. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinins stalk domain. *MBio* 1.

30

Sui, J., W. C.Hwang, S. Perez, G. Wei, D. Aird, L. M. Chen, E. Santelli, B. Stec, G. Cadwell,M. Ali, H. Wan, A. Murakami, A. Yammanuru, T. Han, N. J. Cox, L. A. Bankston,R. O. Donis, R. C. Liddington, and W. A. Marasco. 2009. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenzaA viruses. *Nat Struct Mol Biol* 16:265-73.

Throsby, M., E.van den Brink, M. Jongeneelen, L. L. Poon, P. Alard, L. Cornelissen, A. Bakker,F. Cox, E. van Deventer, Y. Guan, J. Cinatl, J. ter Meulen, I. Lasters, R.Carsetti, M. Peiris, J. de Kruif, and J. Goudsmit. 2008. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1recovered from human IgM+ memory B cells. *PLoS One* 3:e3942.

40

Tykodi,S.S. andThompson,J.A. 2008. Development of modified vaccinia Ankara-5T4 as specificimmunotherapy for advanced human cancer. *Expert. Opin. Biol. Ther* 8:1947-1953.

Ulmer, J. B.,J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H.Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, and et al. 1993.Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viralprotein. *Science* 259:1745-9.

50

Wyatt, L. S., S. T. Shors, B. R. Murphy, and B. Moss. 1996. Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine* 14:1451-8.

Yewdell, J. W., J. R. Bennink, G. L. Smith, and B. Moss. 1985. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:1785-9.

Zhao, G., Y. Lin, L. Du, J. Guan, S. Sun, H. Sui, Z. Kou, C. C. Chan, Y. Guo, S. Jiang, B.J. Zheng, and Y. Zhou. 2010. An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses. *Virology* 7:9. 10

Zhao, G., S. Sun, L. Du, W. Xiao, Z. Ru, Z. Kou, Y. Guo, H. Yu, S. Jiang, Y. Lone, B. J. Zheng, and Y. Zhou. 2010a. An H5N1 M2e-based multiple antigenic peptide vaccine confers heterosubtypic protection from lethal infection with pandemic 2009 H1N1 virus. *Virology* 7:151.

Zhou, D., T. L. Wu, M. O. Lasaro, B. P. Latimer, E. M. Parzych, A. Bian, Y. Li, H. Li, J. Erikson, Z. Xiang, and H. C. Ertl. 2010b. A universal influenza a vaccine based on adenovirus expressing matrix-2 ectodomain and nucleoprotein protects mice from lethal challenge. *Mol Ther* 18:2182-9. 20

【図1】

FIGURE 1

MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTI
MEKNVTVTVAQDILEKKHNGKLCGGGGCNTKCQ
TPMGAISMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRVLAT
GLRNSPQRERRRKRGFLGAIAGFIEGGWQGMVD
GWYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGVTNKV
NSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDG
FLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDNSVKNLYDK
VRLQLRDNAKELGNGCFFYHKCDNECMESVRNG
TYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYST
VASSLALAIMVAGLSLWMCNSNGLQCRICI

【図2】

FIGURE 2

ATGGAGAAAATAGTCCTCTTTGCAATAGTCAGTCT
TGTTAAAATGTGATCAGATTGCAATTGGTTACCATGCAA
ACAACTCGACAGAGCAGGTGACACAATAATGGAAA
AGAACGTTACTGTACACATGCCAAGACATACTGGAA
AAAGAAACACAACGGGAAGCTCTCGGGAGGAGGAGG
ATGCAACACCAAGTCAAACCTCCAATGGGGCGATA
AACTCTAGCTGCCATTCCACAATATACACCCTCTCAC
CATTGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGA
TTAGTCCTGCACTGGCTCAGAAATAGCCCTCAAA
GAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGATTATGGAG
CTATAGCAGTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAAAT
GGTAGATGGTTGTATGGGTACCAACCATAGCAATGAG
CAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAAATCCACTC
AAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTC
GATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTGAGGCCGTT
GGAAGGAAATTAAACAACCTAGAAAGGAGAATAGAG
AATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCCTAGATG
TCTGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGTTCTCATGGAA
AATGAGAGAACTCTAGACTTCTCATGACTCAAATGTCA
AGAACCTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGA
TAATGCAAAGGAGCTGGTAACGGTTGTTGGAGTTC
TATCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAAGTGTAA
GAAATGGAACGTATGACTACCCGCACTATTCAAAGAAG
AGCGAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAA
ATTGGAATCAATAGGAATTACCAAATACTGTCAATT
ATTCTACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCAT
GGTAGCTGGCTATCCTATGGATGTGCTCCAATGGAT
CGTTACAATGCAGAATTGCAATTAA

【図3】

FIGURE 3

MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIME
 KNVTVTHAQDILEKKHNGKLCGGGSLLTEVEPTRN
 EWECRCSDSSDGAGSASLLTEVEPTRNGWECKCSDSSDG
 NDSSDGSAGSASLLTEVEPTRNGWECKCSDSSDG
 SAGSASLLTEVEPTRNGWECKCSDSSDG
CQTPMGAISNSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRVLAT
GLRNPORERRRKRGFLGAIAGFIEGGWQGMVDG
WYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGVNKVN
SIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGF
LDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDNSVKNLYDK
VRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNG
TYDYPQYSEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYST
 VASSLALAIMVAGLSLWMCNSNGSLQCRICI

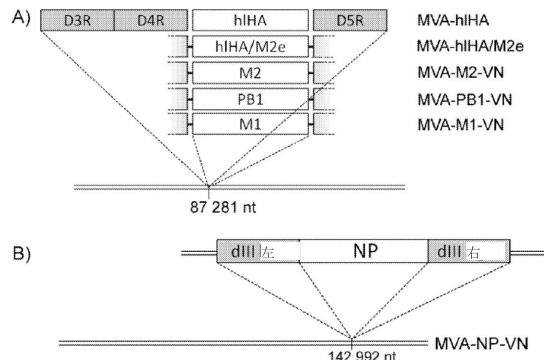
【図4】

FIGURE 4

ATGGAGAAAATAGTGCCTTTGCAATAGTCAGTCTTGTAA
 AAGTGATCAGATTGCAATTGGTACCATGCAAACAACCTCGA
 CAGAGCAGGTGACACAATAATGAAAAGAACGTTACTGT
 ACACATGCCAAGACATACTGAAAAGAACACAACGGGAA
 GCTCTGGAGGAGGAAGTCTCTAACCGAGGTGCAAACGCC
 TACAGAAACGAATGGAGTCAGATGCAGCGATTCAAGTG
 ATGGAAGTGCAGGATCACCGAGTCAGATGCAGCGATTCAAGTG
 ACGCTATCAGAAACGAATGGGGGTGAGATGCAACGATT
 AAGTGATGAGAAGTGCAGGATCAGCGATTCTAACCGAGGT
 CGAAACGCCCTACAGAAACGGATGGAGTCAGCAAATGCAGCG
 ATTCAAGTGTGGAGGATCACCGAGTCAGCGAGTCAGCTTAACCG
 AGGTGAAACGCCCTATCAGAAAAGGATGGAGTCAGCGATT
 AGCGATTCAAGTGTGGAGGAGGATGCAACACCAAGTGTCA
 AACTCCATGAGAAGTGGAGGAGGATGCAACACCAAGTGTCA
 AACTACCCCTCTACCATGGGAATGCCCAAATATGTGAA
 ATCAAACAGATTAGTCTTGCAGTGGCTCAGAAATAGGCC
 TCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGATTATTGGAG
 CTATAGCAGTTTATAGGGAGGATGGCAGGGAAATGGTA
 GATGGTTGATGGTACCCACATAGCAATGAGCAGGGGAG
 TGGCTACGCTGCAGACAAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAG
 ATGGAGTCACCAATAAGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAA
 ACACCTCAGTTGAGGCCGTTGAAAGGGAAATTAAACAACCTTAG
 AAAGGAGAATAGAGAAATTAAACAAGAAGATGGAAGACGGG
 TTCTAGATGTCTGACTTAAATGCTGAACCTCTGGTTCTCA
 TGAAATGAGAGAACTCTAGACTTCAATGACTCAAATGTCA
 AGAACCTTACGACAAGGCTCAGACTACAGCTAGGGATAATG
 CAAAGGAGCTGGTAACGGTTGTTGAGTTCTATCATAAAT
 GTGATAATGAATGTATGAAAGTGTAAAGAAAATGGAACGTAT
 GACTACCCCGAGTATTCAAGAAGCGAGACTAAAAGAGA
 GGAATAAGTGGAGTAAATTGAATCAATAGGAATTAC
 AAATACTGTCATTATCTACAGTGGCAGTCCCTAGCACT
 GGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCTATGGATGTGCTCAA
 TGGATCGTTACAATGCAAGAATTGCAATTAA

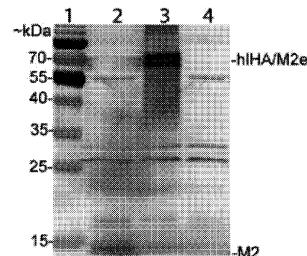
【図5】

【図5】



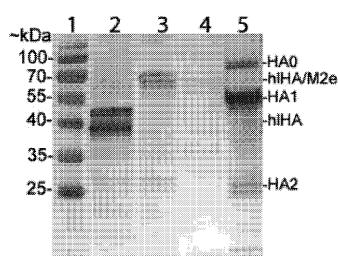
【図6 B】

B

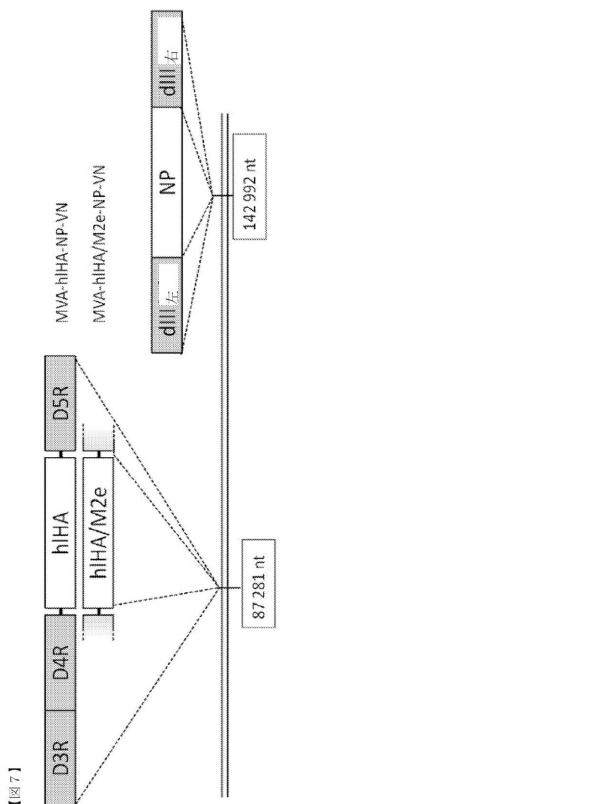


【図6 A】

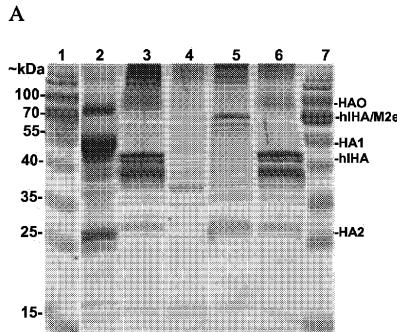
A



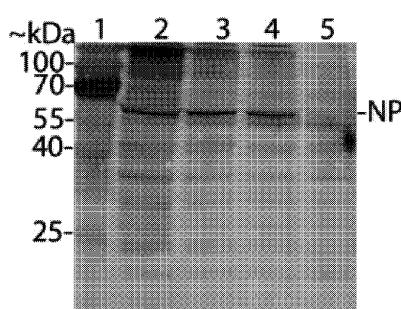
【図7】



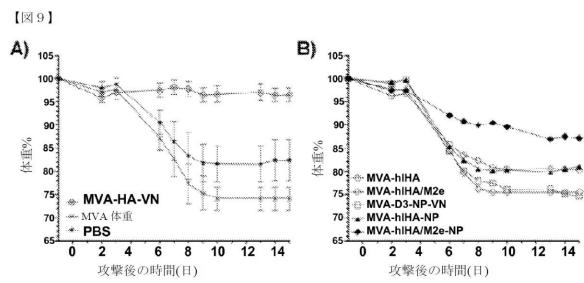
【図8 A】



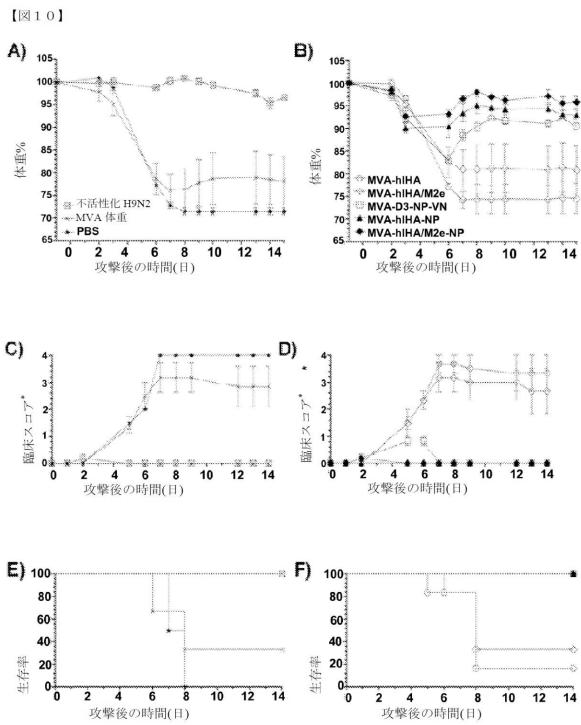
【図8 B】



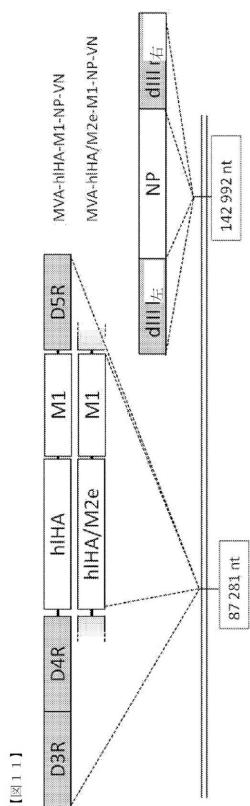
【図9】



【図10】



【図 1 1】



【配列表】

0006169494000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 31/16 (2006.01) A 6 1 P 31/16
 C 0 7 K 14/11 (2006.01) C 0 7 K 14/11

(74)代理人 100173185
 弁理士 森田 裕
 (72)発明者 ファルクナー, フアルコ-ギュンター
 オーストリア国 アー-2304 オルト/ドーナウ, ノイズィードルツァイル 76アー
 (72)発明者 シェーファー, ピルギット
 オーストリア国 アー-1090 ウィーン, グリューネントルガッセ 24/7
 (72)発明者 ヘッセル, アネット
 オーストリア国 アー-2304 オルト/ドーナウ, ハウプトシュトラーセ 24
 (72)発明者 バレット, ペー. ノエル
 オーストリア国 アー-3400 クロステルノイブルク/ヴァイトリンク, シュタインヴァン
 トガッセ 6アー
 (72)発明者 クライル, トーマス エール.
 オーストリア国 アー-3400 クロステルノイブルク, ツィーゲルオーフェンガッセ 93
 - 95
 (72)発明者 エールリッヒ, ハルトムート
 オーストリア国 アー-1170 ウィーン, ピーネンヴェク 1

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 特表2009-528987 (JP, A)
 米国特許出願公開第2010/0137412 (US, A1)
 國際公開第2010/036948 (WO, A1)
 國際公開第2010/117786 (WO, A1)
 MBio, 2010年, Vol.1, No.1, e00018-10
 J. Virol., 1996年, Vol.70, No.9, pp.6418-6424
 JID, 2008年, Vol.198, pp.635-641
 Virology, 2010年, Vol.406, pp.28-36
 Vaccine, 2010年11月 4日, Vol.29, pp.166-173
 Vaccine, 2009年, Vol.27, No.45, pp.6280-6283
 Virology, 2009年, Vol.395, No.2, pp.182-189
 Mol. Ther., 2010年, Vol.18, No.12, pp.2182-2189
 Vaccine, 2009年, Vol.27, No.43, pp.6095-6101
 PLoS One, 2010年, Vol.5, No.8, e12217

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9
 A 6 1 K 3 5 / 7 6
 A 6 1 K 3 9 / 1 4 5
 A 6 1 K 3 9 / 2 8 5
 A 6 1 P 3 1 / 1 6
 C 1 2 N 7 / 0 1
 C 0 7 K 1 4 / 1 1
 CA / MEDLINE / WPIDS / BIOSIS (STN)