

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7029756号
(P7029756)

(45)発行日 令和4年3月4日(2022.3.4)

(24)登録日 令和4年2月24日(2022.2.24)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N	15/40 (2006.01)	C 1 2 N
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K
		31/7088

請求項の数 19 (全88頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-510571(P2019-510571)	(73)特許権者	500429103
(86)(22)出願日	平成29年5月5日(2017.5.5)		ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ ペンシルベニア
(65)公表番号	特表2019-516400(P2019-516400 A)		アメリカ合衆国 19104 ペンシルベニア州 フィラデルフィア シビック センター ブールバード 3600 ナインスフロア
(43)公表日	令和1年6月20日(2019.6.20)	(73)特許権者	516142001
(86)国際出願番号	PCT/US2017/031215		ザ ウィスター インスティテュート オブ アナトミー アンド バイオロジー
(87)国際公開番号	WO2017/192947		アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 フィラデルフィア スブルース ストリート 3601
(87)国際公開日	平成29年11月9日(2017.11.9)	(73)特許権者	509320254
審査請求日	令和2年5月1日(2020.5.1)		イノビオ ファーマシューティカルズ, 最終頁に続く
(31)優先権主張番号	62/402,519		
(32)優先日	平成28年9月30日(2016.9.30)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/483,979		
(32)優先日	平成29年4月11日(2017.4.11)		
	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 フィロウイルスコンセンサス抗原、核酸構築物及びそれを用いたワクチン、ならびにその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原 (Z E B O V C O N 2) をコードする核酸、及び Z E B O V ギニア 2 0 1 4 アウトブレイクエンベロープ糖タンパク質免疫原 (Z E B O V G U I) をコードする核酸からなる群から選択される 1 つ以上の核酸配列を含む単離核酸分子であって、

前記 Z E B O V G U I をコードするヌクレオチド配列が、配列番号 6 9 に記載のヌクレオチド配列、又は配列番号 6 7 の少なくとも 6 0 0 の連続するアミノ酸をコードする配列番号 6 9 の断片を含み；ならびに

前記 Z E B O V C O N 2 が、配列番号 6 8 、又は配列番号 6 8 の少なくとも 6 0 0 の連続するアミノ酸残基を含む配列番号 6 8 の断片を含む、前記単離核酸分子。

【請求項2】

前記 Z E B O V C O N 2 が、配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項3】

配列番号 6 9 の断片が、配列番号 6 7 の少なくとも 6 3 0 個のアミノ酸、または少なくとも 6 6 0 個のアミノ酸をコードする、請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項4】

前記配列番号 6 8 の断片が、少なくとも 6 3 0 個のアミノ酸、または少なくとも 6 6 0 個のアミノ酸を含む、請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項 5】

前記 Z E B O V G U I が I g E シグナルペプチドに連結している、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 6】

前記 Z E B O V C O N 2 が I g E シグナルペプチドに連結している、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 7】

前記 Z E B O V G U I をコードする核酸が、配列番号 6 9 を含む、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 8】

前記 Z E B O V G U I をコードする核酸が、配列番号 7 2 に少なくとも 9 5 % 同一である核酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

10

【請求項 9】

前記 Z E B O V C O N 2 をコードする核酸が、配列番号 7 0 に少なくとも 9 5 % 同一である核酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む組成物。

【請求項 11】

Z E B O V C O N 2 及び Z E B O V G U I の少なくとも 1 の組み合わせをコードする少なくとも 2 の核酸分子を含み、そしてさらに Z E B O V C O N をコードする核酸分子をさらに含み、ここで Z E B O V C O N をコードする核酸分子が、配列番号 1 をコードする、請求項 1 0 に記載の組成物。

20

【請求項 12】

前記組成物が、Z E B O V C O N 、Z E B O V C O N 2 、及び Z E B O V G U I の組み合わせをコードする 3 つの核酸分子を含む、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記核酸分子がプラスミドである、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記組成物が、電気穿孔法を用いて個体に送達するように製剤化した、請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれかに記載の組成物。

30

【請求項 15】

I L - 1 2 、 I L - 1 5 及び I L - 2 8 からなる群から選択される 1 つ以上のタンパク質をコードする配列を含む核酸分子をさらに含む、請求項 1 0 ~ 1 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 16】

エボラウイルスに対する免疫応答の誘導するための請求項 1 0 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

エボラウイルスと診断された個体を治療するための、請求項 1 0 ~ 1 6 のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項 18】

エボラウイルスを有すると診断された個体を治療するための医薬の製造における、請求項 1 0 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 19】

個体におけるエボラウイルス感染を予防するための、請求項 1 0 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

関連出願の相互参照

50

本出願は、2016年5月5日に出願された米国仮特許出願第62/332,372号、2016年9月30日に出願された米国仮出願第62/402,519号、及び2017年4月11日に出願された米国仮特許出願第62/483,979号の優先権を主張し、その各々を、本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する。

【0002】

本発明は、免疫応答を誘導し、フィロウイルス感染を予防し、及び/またはフィロウイルスに感染した、特にエボラウイルスに感染した個体を治療するためのワクチンに関する。本発明は、コンセンサスエボラウイルスタンパク質及びそれをコードする核酸分子に関する。

【背景技術】

【0003】

フィロウイルス科は、2つの異なる属、マールブルグウイルス(MARV)及びエボラウイルス(EBOV)を含む非分節型一本鎖RNAウイルスである。それぞれのメンバーは、治癒または認可されたワクチンが存在しない、重篤で非常に致命的な出血熱疾患を引き起こす可能性がある(Bradfute S.B., et al. (2011) *Filovirus vaccines*. *Hum Vaccin* 7:701-711; Falzarano D., et al. (2011) *Progress in filovirus vaccine development: evaluating the potential for clinical use*. *Expert Rev Vaccines* 10:63-77; Fields B.N., et al. (2007) *Fields' virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2v. (xix, 3091, I-3086p.); Richardson J.S., et al. (2009) *Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine*. *PLoS One* 4:e5308; 及びTowner J.S., et al. (2006) *Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola*. *J Virol* 80:6497-6516)。

【0004】

致死率が最大90%であるため、これらの疾患は、世界保健機関(WHO)により、「人類に知られている最も有毒なウイルス性疾患の1つ」と言われている。アメリカ疾病管理予防センターは、それらが兵器利用された場合には国家安全保障への一定程度の潜在的な脅威を有することから、それらを「カテゴリーA生物テロリズム兵器」と分類している(Burki T.K. (2011) *USA focuses on Ebola vaccine but research gaps remain*. *Lancet* 378:389)。これらの「高優先度の」兵器は、理論上容易に伝播し、高い死亡率をもたらし、公衆衛生に多大な影響を与え、パニックを引き起こし、公衆衛生への備えに対して特別な措置を必要とする可能性がある(CDC (2011) *Bioterrorism Agents/Diseases*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention)。

【0005】

出血熱病は、感染した体液、血液、及び組織との直接接触によって、ヒト及び非ヒト靈長類間で容易に伝播し得るが、保菌状態の存在しない急性感染症である(Feldmann H., et al. (2003) *Ebola virus: from discovery to vaccine*. *Nat Rev Immunol* 3:677-685)。アウトブレイク発生状況下では、医療機器の再利用、リソースの限られた医療施設、及び時期を逸した予防対策の適用は、疾患の伝播を増大させ、医療環境における感染の増幅を招き得る。

【0006】

10

20

30

40

50

これらの人獣共通感染症の病原体の天然の保菌宿主はアフリカのコウモリとブタである可能性が高く (Kobinger G. P., et al. (2011) Replication, pathogenicity, shedding, and transmission of Zaire ebolavirus in pigs. *J Infect Dis* 204: 200-208)、おそらく後者はいっそう増幅させる宿主であることから、ウイルスがアウトブレイクの開始時に最初に出現する様式は、ヒトが感染動物と接触することによって起こると考えられる。フィリピン、潜在的にヨーロッパ、及び主としてはアフリカにおける、この疾患の予測不能な風土病の出現は、さらなる主要な公衆衛生上の懸念事項である (Outbreak news. (2009) Ebola Reston in pigs and humans, Philippines. *Wkly Epidemiol Rec* 84: 49-50)。 10

【0007】

げつ歯類前臨床試験における実験を含む保護効率及び広範なCTLを誘導するためのワクチンの能力を測定するための実験が行われている (Fenimore PW, et al. (2012). Designing and testing broadly-protective filoviral vaccines optimized for cytotoxic T-lymphocyte epitope coverage. *PLoS ONE* 7: e44769; Hensley LE, et al. (2010). Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus Species. *PLoS Pathog* 6: e1000904; Zahn R, et al (2012). Ad35 and ad26 vaccine vectors induce potent and cross-reactive antibody and T-cell responses to multiple filovirus species. *PLoS ONE* 7: e44115; Geisbert TW, Feldmann H (2011). Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *J Infect Dis* 204 Suppl 3: S1075-1081; 及び Grant-Klein RJ, Van Deusen NM, Badger CV, Hannaman D, Dupuy LC, Schmaljohn CS (2012). A multiagent filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from ebola and Marburg virus challenge. *Hum Vaccin Immunother* 8; Grant-Klein RJ, Altamura LA, Schmaljohn CS (2011). Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses. *Viruses* 162: 148-161)。 20 30

【0008】

ワクチン誘発性適応免疫応答が、多数の前臨床動物モデルに記載されている (Blaney JE, et al. (2011). Inactivated or live-attenuated bivalent vaccines that confer protection against rabies and Ebola viruses. *J Virol* 85: 10605-10616; Dowling W, et al. (2007). Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. *J Virol* 81: 1821-1837; Jones SM, et al. (2005). Live attenuated recombinant vacci 40 50

ne protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* 11: 786-790; Kalina WV, Warfield KL, Olinger GG, Baveri S (2009). Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model. *Virology* 36: 132; Kobinger GP, et al. (2006). Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology* 346: 394-401; Olinger GG, et al. (2005). Protective cytotoxic T-cell responses induced by Venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins. *J Virol* 79: 14189-14196; Rao M, Bray M, Alving CR, Jahrling P, Matyas GR (2002). Induction of immune responses in mice and monkeys to Ebola virus after immunization with liposome-encapsulated irradiated Ebola virus: protection in mice requires CD4(+) T cells. *J Virol* 76: 9176-9185; Rao M, Matyas GR, Grieder F, Anderson K, Jahrling PB, Alving CR (1999). Cytotoxic T lymphocytes to Ebola Zaire virus are induced in mice by immunization with liposomes containing lipid A. *Vaccine* 17: 2991-2998; Richardson JS, et al. (2009). Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One* 4: e5308; Vanderzanden L, et al (1998). DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* 246: 134-144; Warfield KL, et al. (2005). Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. *J Immunol* 175: 1184-1191; Jones SM, et al. (2007). Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 196 Suppl 2: S404-412; Grant-Klein RJ, Van Deusen NM, Badger CV, Hannaman D, Dupuy LC, Schmaljohn CS (2012). A multiagent filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from ebola and Marburg virus challenge. *Hum Vaccin Immunother* 8: ; Geisbert TW, et al. (2010). Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in nonhuman primates. *J Virol* 84: 10386-10394.). ウイルスワクチンの有望性が示されてきたが、これらには、主に組

換えアデノウイルス及び水疱性口内炎ウイルスが含まれる。組換えDNA及びAg結合ウイルス様粒子(VLP)ワクチンなどの非感染的戦略も、前臨床効果のレベルを実証しており、一般的にウイルスベースのプラットフォームよりも安全であると考えられている。ウイルス特異的抗体は、受動的に投与すると、感染前または感染直後のいずれかにおいて投与した場合に保護的であり得る(Gupta M, Mahanty S, Bray M, Ahmed R, Rollin PE (2001). Passive transfer of antibodies protects immunocompetent and immunodeficient mice against lethal Ebola virus infection without complete inhibition of viral replication. *J Virol* 75: 4649-4654; Marzi A, et al. (2012). Protective efficacy of neutralizing monoclonal antibodies in a nonhuman primate model of Ebola hemorrhagic fever. *PLoS ONE* 7: e36192; Parren PW, Geisbert TW, Maruyama T, Jahrling PB, Burton DR (2002). Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody. *J Virol* 76: 6408-6412; Qiu X, et al. (2012). Ebola GP-Specific Monoclonal Antibodies Protect Mice and Guinea Pigs from Lethal Ebola Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1575; Wilson JA, et al. (2000). Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* 287: 1664-1666; Sullivan NJ, et al. (2011). CD8(+) cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. *Nat Med* 17: 1128-1131; Bradfute SB, Warfield KL, Bavari S (2008). Functional CD8+ T cell responses in lethal Ebola virus infection. *J Immunol* 180: 4058-4066; Warfield KL, Olinger GG (2011). Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic fever. *J Biomed Biotechnol* 2011: 984241)。T細胞はまた、ノックアウトマウスで行われた試験、NHPにおける枯渴試験、及び養子移入したCD8+T細胞の溶解機能に効力が大きく関連するマウス養子移入試験に基づく保護を提供することも示されている。しかしながら、保護ワクチンによって引き起こされるこの応答の詳細な解析はほとんど報告されていない。

【0009】

対応策の開発には、最終的に、保護免疫相関と、感染時にそれらをいかにして調節するかについての理解の向上が必要となる。これは、フィロウイルス疾患に罹患した感染者が早期の免疫応答を達成できない場合には困難であることが証明されている。これらの急速な出血性疾患は、ウイルス特異的Ab応答の欠如及び総T細胞数の大幅な減少によって示されるように、免疫調節不全をもたらし、制御不能なウイルス複製及び多臓器感染及び障害をもたらす。逆に、エボラウイルス(EBOV)疾患の生存者は、早期かつ一時的なIgM応答を示し、続いて迅速にウイルス特異的IgG及びCTLのレベルが上昇する。これらの所見は、体液性及び細胞性の免疫応答が疾患に対する保護を付与する役割を果たすことを示唆している。これらのデータは、致死的攻撃に対する保護へのワクチン誘発性適応

10

20

30

40

50

免疫の寄与を実証する、多数の前臨床有効性試験によっても支持されている。しかしながら、C D 8 + T 細胞の機能的表現型に効力が大きく関連する保護の提供において、T 細胞が重要な役割を果たしているとのエビデンスが数多く示されている。これらの最近の研究は、保護を提供する上でのT 細胞の重要性を強調しているものの、それらの正確な寄与は未だ特徴付けられておらず、議論の余地が残されている。さらに、保護ワクチンによるこの応答の詳細な解析はほとんど報告されていない。

【発明の概要】

【0010】

第1コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原 (Z E B O V C O N) をコードする1つ以上の核酸配列、第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原 (Z E B O V C O N 2) をコードする核酸、またはZ E B O V ギニア2014アウトブレイクエンベロープ糖タンパク質免疫原 (Z E B O V G U I) をコードする核酸を含む単離された核酸分子を提供する。10

【0011】

一実施形態では、Z E B O V C O N には、配列番号1と少なくとも95%相同なアミノ酸配列、配列番号1と少なくとも95%相同なアミノ酸配列の断片、配列番号1と少なくとも99%相同なアミノ酸配列、配列番号1と少なくとも99%相同なアミノ酸配列の断片、配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号1の断片が含まれる。

【0012】

一実施形態では、Z E B O V C O N 2 には、配列番号68と少なくとも95%相同なアミノ酸配列、配列番号68と少なくとも95%相同なアミノ酸配列の断片、配列番号68と少なくとも99%相同なアミノ酸配列、配列番号68と少なくとも99%相同なアミノ酸配列の断片、配列番号68のアミノ酸配列、または配列番号68の断片が含まれる。20

【0013】

一実施形態では、Z E B O V G U I には、配列番号67と少なくとも95%相同なアミノ酸配列、配列番号67と少なくとも95%相同なアミノ酸配列の断片、配列番号67と少なくとも99%相同なアミノ酸配列、配列番号67と少なくとも99%相同なアミノ酸配列の断片、配列番号67のアミノ酸配列、または配列番号67の断片が含まれる。

【0014】

いくつかの実施形態では、断片は、少なくとも600個のアミノ酸、少なくとも630個のアミノ酸、または少なくとも660個のアミノ酸を含む。30

【0015】

一実施形態では、Z E B O V C O N をIgEシグナルペプチドに連結させる。一実施形態では、Z E B O V C O N 2 をIgEシグナルペプチドに連結させる。一実施形態では、Z E B O V G U I をIgEシグナルペプチドに連結させる。

【0016】

一実施形態では、Z E B O V C O N をコードする核酸には、配列番号64と少なくとも95%相同な核酸配列、またはその断片が含まれる。一実施形態では、Z E B O V G U I をコードする核酸には、配列番号69又は配列番号72と少なくとも95%相同な核酸配列、またはその断片が含まれる。一実施形態では、Z E B O V C O N 2 をコードする核酸には、配列番号70と少なくとも95%相同な核酸配列、またはその断片が含まれる。40

【0017】

一実施形態では、Z E B O V C O N をコードする核酸には、配列番号64と少なくとも95%相同なDNA配列またはその断片から転写された核酸が含まれる。一実施形態では、Z E B O V G U I をコードする核酸には、配列番号69又は配列番号72と少なくとも95%相同なDNA配列またはその断片から転写された核酸が含まれる。一実施形態では、Z E B O V C O N 2 をコードする核酸には、配列番号70と少なくとも95%相同なDNA配列またはその断片から転写された核酸が含まれる。

【0018】

また、Z E B O V C O N 、Z E B O V C O N 2 及びZ E B O V G U I の1つ以上をコード

10

20

30

40

50

する1つ以上の核酸配列を含む組成物も提供する。一実施形態では、組成物は、Z E B O V C O N、Z E B O V C O N 2及びZ E B O V G U Iの2つ以上をコードする2つ以上の核酸配列を含む。一実施形態では、組成物は2つの核酸分子を含む。一実施形態では、組成物は、Z E B O V C O N、Z E B O V C O N 2及びZ E B O V G U Iをコードする3つ以上の核酸配列を含む。一実施形態では、組成物は、3つの核酸分子を含む。

【0019】

本発明はまた、哺乳類細胞またはウイルスベクターにおいて免疫原を産生するための新規配列を提供する。

【0020】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、及びマールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005エンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物を提供する。コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号1(Z E B O V C O N)、配列番号1の断片、配列番号1と相同なアミノ酸配列、または配列番号1と相同なアミノ酸配列の断片を含む。配列番号1と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号1に対して95%以上、96%以上、97%以上、99%以上、または99%以上相同である。配列番号1の断片または配列番号1と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、600残基以上、630残基以上、または660残基以上のアミノ酸である。コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号2(S U D V C O N)、配列番号2の断片、配列番号2と相同なアミノ酸配列、または配列番号2と相同なアミノ酸配列の断片を含む。配列番号1と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号2に対して95%以上、96%以上、97%以上、99%以上、または99%以上相同である。配列番号2の断片または配列番号2と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、600残基以上、630残基以上、または660残基以上のアミノ酸である。マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005エンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号3(M A R V A N G)、配列番号3の断片、配列番号3と相同なアミノ酸配列、または配列番号3と相同なアミノ酸配列の断片であってもよい。配列番号3と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号3に対して95%以上、96%以上、97%以上、99%以上、または99%以上相同である。配列番号3の断片または配列番号3と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、600残基以上、637残基以上、または670残基以上のアミノ酸である。アミノ酸配列は、場合により、I g E リーダーなどのリーダー配列を含んでいてもよい。

【0021】

また、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、マールブルグマールブルグウイルス第1コンセンサスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、マールブルグマールブルグウイルス第2コンセンサスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、及びマールブルグマールブルグウイルス第3コンセンサスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物も提供する。コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号1(Z E B O V C O N)、配列番号1の断片、配列番号1と相同なアミノ酸配列または配列番号1と相同なアミノ酸配列の断片であってもよい。配列番号1と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号1に対して95%以上、96%以上、97%以上、99%以上、または99%以上相同である。配列番号1の断片または配列番号1と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、600残基以上、630残基以上、または660残基以上のアミノ酸である。コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号2(S U D V C O N)、配列番号2の断片、配列番号2と相同なアミノ酸配列、または配列番号2と相同なアミノ酸配列の断片であってもよい。配列番号1と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号1に対して95%以上、96%以上、97%以上、99%以上、または99%以上相同である。配列番号1の断片または配列番号1と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、600残基以上、630残基以上、または660残基以上のアミノ酸である。コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号1と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号1と相同なアミノ酸配列であってもよい。

10

20

30

40

50

列番号 2 に対して 9 5 % 以上、 9 6 % 以上、 9 7 % 以上、 9 9 % 以上、 または 9 9 % 以上相同である。配列番号 2 の断片または配列番号 2 と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、 6 0 0 残基以上、 6 3 0 残基以上、 または 6 6 0 残基以上のアミノ酸である。マールブルクマールブルウイルスの第 1 コンセンサスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号 4 (M A R V R A V)、配列番号 4 の断片、配列番号 4 と相同なアミノ酸配列、または配列番号 4 と相同なアミノ酸配列の断片であってもよい。配列番号 4 と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号 4 に対して 9 5 % 以上、 9 6 % 以上、 9 7 % 以上、 9 9 % 以上相同である。配列番号 4 の断片または配列番号 4 と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、 6 0 0 残基以上、 6 3 7 残基以上、 または 6 7 0 残基以上のアミノ酸である。マールブルグマールブルグウイルス第 2 コンセンサスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号 5 (M A R V O Z O)、配列番号 5 の断片、配列番号 5 と相同なアミノ酸配列、または配列番号 5 と相同なアミノ酸配列の断片であってもよい。配列番号 5 と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号 4 に対して 9 5 % 以上、 9 6 % 以上、 9 7 % 以上、 9 9 % 以上、 または 9 9 % 以上相同である。配列番号 5 の断片または配列番号 5 と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、 6 0 0 残基以上、 6 3 7 残基以上、 または 6 7 0 残基以上のアミノ酸である。マールブルグマールブルグウイルス第 3 コンセンサスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号 6 (M A R V M U S)、配列番号 6 の断片、配列番号 6 と相同なアミノ酸配列、または配列番号 6 と相同なアミノ酸配列の断片であってもよい。配列番号 6 と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号 6 に対して 9 5 % 以上、 9 6 % 以上、 9 7 % 以上、 9 9 % 以上、 または 9 9 % 以上相同である。配列番号 6 の断片または配列番号 6 と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、 6 0 0 残基以上、 6 3 7 残基以上、 または 6 7 0 残基以上のアミノ酸である。アミノ酸配列は、場合により、 I g E リーダーなどのリーダー配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、組成物は、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列をさらに含む。マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号 3 (M A R V A N G)、配列番号 3 の断片、配列番号 3 と相同なアミノ酸配列、または配列番号 3 と相同なアミノ酸配列の断片であってもよい。配列番号 3 と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号 3 に対して 9 5 % 以上、 9 6 % 以上、 9 7 % 以上、 9 9 % 以上、 または 9 9 % 以上相同である。配列番号 3 の断片または配列番号 3 と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、 6 0 0 残基以上、 6 3 7 残基以上、 または 6 7 0 残基以上のアミノ酸である。アミノ酸配列は、場合により、 I g E リーダーなどのリーダー配列を含んでいてもよい。

【 0 0 2 2 】

また、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、及びコンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物も提供する。コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号 1 (Z E B O V C O N)、配列番号 1 の断片、配列番号 1 と相同なアミノ酸配列、または配列番号 1 と相同なアミノ酸配列の断片であってもよい。配列番号 1 と相同なアミノ酸配列は、一般的には、配列番号 1 に対して 9 5 % 以上、 9 6 % 以上、 9 7 % 以上、 9 9 % 以上、 または 9 9 % 以上相同である。配列番号 1 の断片または配列番号 1 と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、 6 0 0 残基以上、 6 3 0 残基以上、 または 6 6 0 残基以上のアミノ酸である。コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸配列は、配列番号 2 (S U D V C O N)、配列番号 2 の断片、配列番号 2 と相同なアミノ酸配列、または配列番号 2 と相同なアミノ酸配列の断片であってもよい。配列番号 1 と相同なアミノ酸配列は、一般的には配列番号 2 に対して 9 5 % 以上、 9 6 % 以上、 9 7 % 以上、 9 9 % 以上、 または 9 9 % 以上相同である。配列番号 2 の断片または配列番号 2 と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、 6 0 0 残基以上、 6 3 0 残基以上、 または 6 6 0 残基以上のアミノ酸である。アミノ酸配列は、場合により、 I g E リーダーなどのリーダー配列を含

10

20

30

40

50

んでいてもよい。

【 0 0 2 3 】

コンセンサスザイルエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、及びマーブルグマーブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物を提供する。コンセンサスザイルエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 4、配列番号 6 4 の断片、配列番号 6 4 と相同な核酸配列、または配列番号 6 4 と相同な核酸配列の断片であってもよい。配列番号 6 4 と相同な核酸配列は、一般的には、配列番号 6 4 に対して 9 5 % 以上、9 6 % 以上、9 7 % 以上、9 9 % 以上、または 9 9 % 以上相同である。配列番号 6 4 の断片、または配列番号 6 4 と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、配列番号 6 4 によってコードされる 6 0 0 残基以上、6 3 0 残基以上、または 6 6 0 残基以上のコンセンサスザイルエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする。コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 5、配列番号 6 5 の断片、配列番号 6 5 と相同な核酸配列、または配列番号 6 5 と相同な核酸配列の断片を含む。配列番号 6 5 と相同な核酸配列は、一般的には、配列番号 6 5 に対して 9 5 % 以上、9 6 % 以上、9 7 % 以上、9 9 % 以上、または 9 9 % 以上相同である。配列番号 6 5 の断片または配列番号 6 5 に対して相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、配列番号 6 5 によってコードされる 6 0 0 残基以上、6 3 0 残基以上、または 6 6 0 残基以上のコンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸をコードする。マーブルグマーブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列は、配列番号 6 6、配列番号 6 6 の断片、配列番号 6 6 と相同な核酸配列、または配列番号 6 6 と相同な核酸配列の断片であってもよい。配列番号 6 6 と相同な核酸配列は、一般的には、配列番号 6 6 に対して 9 5 % 以上、9 6 % 以上、9 7 % 以上、9 9 % 以上、または 9 9 % 以上相同である。配列番号 6 6 の断片または配列番号 6 6 と相同なアミノ酸配列の断片は、一般的には、配列番号 6 6 によってコードされる 6 0 0 残基以上、6 3 0 残基以上、または 6 7 0 残基以上のマーブルグマーブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質免疫原のアミノ酸をコードする。核酸配列は、場合により、免疫原をコードする配列に連結した Ig E リーダーなどのリーダー配列をコードする配列を含む場合がある。

【 0 0 2 4 】

異なる核酸配列の各々は、単一の核酸分子上にあってもよく、それぞれが別個の核酸分子上に、または様々な順列で存在してもよい。核酸分子は、プラスミドであってもよい。

【 0 0 2 5 】

組成物を、電気穿孔法を用いた個体への送達のために製剤化してもよい。

【 0 0 2 6 】

組成物は：IL - 12、IL - 15 及び IL - 28 からなる群から選択される 1 つ以上のタンパク質をコードする核酸配列をさらに含み得る。

【 0 0 2 7 】

組成物は、フィロウイルスに対する免疫応答を誘導する方法において使用してもよい。フィロウイルスは：マールブルグウイルス、エボラウイルス・スーダン及びエボラウイルス・ザイールからなる群から選択され得る。

【 0 0 2 8 】

個体に治療有効量の組成物を投与することを含む、フィロウイルスと診断された個体の治療方法を提供する。フィロウイルスは、マールブルグウイルス、エボラウイルス・スーダン及びエボラウイルス・ザイールからなる群から選択され得る。

【 0 0 2 9 】

個体におけるフィロウイルス感染の予防方法を提供する。方法は、予防有効量の組成物を個体に投与することを含む。フィロウイルスは、マールブルグウイルス、エボラウイルス・スーダン及びエボラウイルス・ザイールからなる群から選択され得る。

10

20

30

40

50

【0030】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスヌーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク質免疫原、第 1 コンセンサスマールブルクマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第 2 コンセンサスマールブルクマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第 3 コンセンサスマールブルクマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原からなる群から選択される 2 つ以上のタンパク質を含む組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図 1 A - 1 C】実施例 1 における多価ワクチン構築戦略及び発現実験を示す。MGP (上)、SGP (右下)、及び ZGP (左下) の系統樹を示す。ブートストラップ解析によって検証されるように、有意なサポート値を示す (*)。ZGP 及び SGP 免疫原 (CON VACCINE) に対して、コンセンサス戦略を採用した。スケールバーは部位当たりのアミノ酸の距離を示し、分析は MEGA バージョン 5 ソフトウェアを用いて行った。GP 導入遺伝子を商業的に合成し、遺伝子最適化を行い、改変 pVAX1 哺乳類発現ベクターにサブクローニングした。HEK293T 細胞の形質移入後、ウエスタンイムノプロッティング及び FACS によって抗原発現を分析した。ウエスタンイムノプロッティングの結果を図 1 B に示し、そして FACS の結果を図 1 C に示す。比較対照として、MGP、SGP、または ZGP を発現する rVSV を各 GP 試料と同時に実施し、種特異的抗 GP1 mAb を検出に使用した。サイズを (kDa) で示す。FACS の結果を図 1 C に示す。FACS については、形質移入した細胞を、マウス由来 GP 特異的血清試薬で間接的に染色し、続いて広範な洗浄及びヤギ抗マウス IgG 及び MHC クラス I で染色した。ウエスタンイムノプロッティング及び FACS 実験は少なくとも 3 回繰り返し、同様の結果を得た。無根系統樹の有意性は最尤法によって判定し、ブートストラップ解析によって検証し、MEGA バージョン 5 ソフトウェアによって有意な支持値 (80% ; 1,000 回のブートストラップ反復) を決定した。

【図 2 A - 2 H】MARV 及び ZEBOV チャレンジに対する完全な保護が観察された実施例 1 の実験の結果を示す。動物の生存データを図 2 A 及び図 2 E に示す。図 2 A は、3 価ワクチン接種動物が MARV チャレンジ後に生存し、一方、対照動物はすべて 10 日目までに死亡したことを示す。図 2 E は、3 価ワクチン接種動物が ZEBOV チャレンジ後に生存し、対照動物はすべて 7 日目までに死亡したことを示す。ワクチン接種に対して MARV でチャレンジした場合の、ワクチン接種動物及び対照動物に対する体重変化率のデータを図 2 B に示す。y 軸は、図 2 F に示すように、体重の変化を示す。明るい実線は 3 価ワクチン接種動物を示す。明るい破線は、三価ワクチン接種動物の平均結果である Triviale を示す。暗い実線は対照動物を示す。暗い破線は対照動物の平均結果である Control を示す。明るい実線及び明るい破線は、チャレンジ後の日にグラフ上で安定したままであり、ワクチン接種動物間で有意な体重減少を示していない。ダガーで終了するチャレンジ後の 0 ~ 9 日目のグラフの暗い実線及び黒い破線は、10 日目までに疾患により死亡した動物を示す。ワクチン接種に対して ZEBOV でチャレンジした場合の、ワクチン接種動物及び対照動物に対する体重変化率のデータを図 2 F に示す。y 軸は、体重の変化を % で示す。明るい実線は 3 価ワクチン接種動物を示す。明るい破線は 3 価ワクチン接種動物の平均結果である Triviale を示す。暗い実線は対照動物を示す。暗い破線は対照動物の平均結果である Control を示す。明るい実線及び明るい破線は、チャレンジ後の日にグラフ上で安定したままであり、ワクチン接種動物間で有意な体重減少を示さなかった。ダガーで終了するチャレンジ後の 0 ~ 6 日目のグラフの暗い実線及び黒い破線は、8 日目までに疾患により死亡した動物を示す (gpMARV については n = 3、gpZEBOV については n = 6)。第 1 回 (1 x) 及び第 2 回 (2 x) の予防接種前及び接種後のワクチン接種動物由来血清中の結合 Abs (図 2 C 及び図 2 G)、及び Nabs (図 2 D 及び図 2 H) を測定した。分析はプールした血清において実施した

10

20

30

40

50

。 * $p < 0.1$; ** * $p < 0.001$; *** * $p < 0.0001$ 。

【図3 A - 3 C】中和抗体の誘導を示す実施例1の結果を示す。40 μ gのE-DNAワクチン接種の間に3週間間隔を空けた2回のワクチン接種のそれぞれ20日後に、マウス($n = 5$ / 群)においてB細胞応答を評価した。図3 Aは、ワクチン接種した(実線)マウスまたはプレブレッド(点線)マウス由来血清GP特異的IgG応答をELISAによって測定した結果を示す。データを図3 Bにまとめた。本試験にSGPが利用できなかつたため、pEBOS及びpEBOZで免疫した動物からのすべての応答を、スクロース精製ZGPに対して測定した。pMARV免疫マウスのIgG応答をMARV-オゾリンGPまたは陰性対照スクロース精製ニパGタンパク質で測定した。血清試料の中和活性を、BSL-4施設で、ZEBOV-EGFP、SUDV-ボニファス及びMARV-アンゴラに対して測定し、NAb力値を図3 Cに示す。SUDV-ボニファスに対するNAbを、CV-1細胞に対する細胞変性効果(CPE)に基づいてアッセイし、MARV-アンゴラに対するNAbを、免疫蛍光アッセイを用いてアッセイした。平均を図3 B及び3 C中に示し、エラーバーはSEMを表す。整合両側独立t検定によって、グループの分析を完了した。実験を少なくとも2回繰り返し、同様の結果を得た。* $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

【図4 A - 4 D】ワクチン接種によって生成した広範なT細胞応答を示す。pMARV、pEBOSまたはpEBOZ-DNAのいずれかを用いてH-2b(明るいバー)及びH-2d(暗いバー)マウス($n = 5$ / 群)を2回免疫化し、IFN応答をIFN-ELISPOTアッセイによって測定した。2回目の免疫化の8日後に採取した脾細胞を、個々のGPペプチド(9アミノ酸がオーバーラップする15量体)の存在下でインキュベートし、結果を積み重ね棒グラフで示す。フローサイトメトリーによって確認し、総活性化IFN+及びCD44+CD4+及び/またはCD8+T細胞(表1~6)の集団を特徴とするエピトープ含有ペプチドを同定し(10AVEスポット及び80%応答率)、正の誘導物質のペプチド番号をバーの上に示す。CD4+エピトープのみ、CD8+エピトープのみ(*)、及び二重CD4+及びCD8+エピトープ(**)を含むペプチドには番号が付けられている。推定上の共有及び/または部分エピトープを、連続した陽性ペプチド応答について調べた(表1~6)。図4 Bは、ワクチン接種によって生成した広範なT細胞応答を示す。図1 Aに示すMARV、SUDV、及びZEBOVウイルス由来のGP配列を比較するアミノ酸類似性プロットを示す。図4 Cは、ワクチン接種によって生成した広範なT細胞応答を示す。ZEBOV GP (GenBank #VGP_EBOZM)内の推定ドメインを示す図である。SP、シグナルペプチド；RB、受容体結合；MUC、ムチン様領域；FC、フリン切断部位；TM、膜貫通領域。図4 Dにおいて、ワクチン接種によって生成した広範なT細胞応答を示す。各準優位(濃い影)及び免疫優性(薄い影)T細胞エピトープ応答を、各ワクチンによって生成した全IFN応答の割合として示す。実験を少なくとも2回繰り返し、同様の結果を得た。

【図5 A - 5 D】保護「単回投与」ワクチン接種誘発性中和Ab及びCTLを評価する実験からのデータを示す。H-2kマウス($n = 10$ / 群)を、pEBOZ-E-DNAを用いて筋肉内に1回ワクチン接種し、次いで28日後にBSL-4施設でmEDBOV 1,000 LD₅₀をチャレンジした。マウスの体重を毎日測定し、疾患の進行をモニタリングした。図5 Aの動物生存データ。ワクチン接種した動物はチャレンジを生き延びたが、対照動物は7日目までに死亡した。図5 Bはチャレンジした動物における体重変化率のデータを示す。免疫した動物由来のデータを実線で示し；免疫した動物の平均データを破線で示す。対照動物由来のデータを実線で示し；対照動物の平均データを破線で示す。明るい実線及び明るい破線は、チャレンジ後の日のグラフ上で約85%~120%の範囲内で安定したままであり、ワクチン接種した動物の間で有意な体重減少を示していない。ダガーで終了するチャレンジ後の0~6日目のグラフの暗い実線及び暗い破線は、7日目までに疾患により死亡した動物を示す。チャレンジ前に測定したNabs；図5 Cに示すデータ。FACSによって測定される単一のpEBOZ免疫化後のT細胞応答を、図5 Dの全CD44+/IFN+CD4+(暗い)またはCD8+(明るい)細胞のAV

10

20

30

40

50

E %としてまとめた。Th1型エフェクターマーカーを評価し(TNF及びT-bet)、CD44+/IFN γ +/CD4+及びCD8+/T細胞のデータを、以下のような全T細胞データと比較した：総細胞について：TNF 2.9 ± 0.8、Tbet 13.0 ± 1.1。CD4+/CD44+/IFN γ +/細胞の場合：TNF 61.4 ± 3.1、Tbet 72.6 ± 2.0。CD8+/CD44+/IFN γ +/細胞について：TNF 33.0 ± 3.3、Tbet 99.2 ± 1.4 (*p < 0.1; ***p < 0.001; ***p < 0.0001)。整合両側独立t検定によって、グループの分析を完了し、生存曲線を対数ランク(Mantel-Cox)検定によって分析した。実験を2回繰り返し、同様の結果を得た。エラーバーはSEMを表す。

【図6】実施例1で開示したGP特異的T細胞ゲーティングを示す。

10

【図7A-7B】実施例1のワクチン接種実験がロバストなT細胞を生成したことを示す。

【図8A-8B】実施例1で開示した「単回投与」ワクチン接種によるT細胞誘導を示す。

【図9】エボラに対するワクチン接種戦略を示す。エボラウイルス性糖タンパク質はワクチンの主要な標的である。現在、非ヒト霊長類(NHP)において保護性の免疫原性があり、単回投与保護を有する3つのワクチンが現在臨床試験中である。しかしながら、これらのワクチンは、抗ベクター免疫を発達させ、ヒト臨床試験において有害反応を示し、記憶応答の持続時間が不確定であり、すべての集団に適していない可能性がある。

【図10】実施例7におけるEBOV糖タンパク質ワクチン構築及び製剤戦略及び発現実験を示す。

【図11】マウスにおいて免疫原性であるDNAワクチンの単回免疫化を示す実施例7の実験結果を示す。

20

【図12】マウスにおける致死的なマウス適合エボラウイルスチャレンジに対して、単一の免疫感作が完全に保護的であることを示す実施例7の結果を示す。

【図13】実施例7の結果を示し、個々のGP-DNAワクチン構築物がマウスにおいて強い記憶応答を誘導することを示す。

【図14】非ヒト霊長類におけるGP-DNAワクチンの有効性を示す実施例7の結果を示す。

【図15】GP-DNAワクチン製剤がNHPにおいて免疫原性であることを示す実施例7の結果を示す。

【図16】GP-DNA製剤ワクチンが致死的なザイールエボラウイルス(Makona)チャレンジに対して保護することを示す実施例7の結果を示す。

30

【図17】EBOV-001第I相臨床(NCT02464670)試験戦略を示す。

【図18】第I相臨床試験におけるEBOV-001抗体陽転を示す実施例7の結果を示す。

【図19】代表的な患者におけるエボラGP特異的T細胞応答(ELISPOT)の誘導を示す実施例7の結果を示す。

【図20】現在臨床試験中の他のエボラワクチンプラットフォームとの比較を示す実施例7の結果を示す。

【図21】実施例8のELISA実験についてのコホートの説明及びコホートの対象者属性を示す。

40

【図22】コホートによるELISA力価及びコホート1~3の時間点を示す実施例8の結果を示す。

【図23】コホート別のELISA力価及びコホート4及び5の時間点を示す実施例8の結果を示す。

【図24】すべてのコホートについてのELISA要約を示す実施例8の結果を示す。

【図25】実施例8のELISPOT実験のコホートの説明及びコホートの対象者属性を示す。

【図26】コホート1のペプチドプールによる被験者応答を示す実施例8の結果を示す。

【図27】コホート2のペプチドプールによる被験者応答を示す実施例8の結果を示す。

【図28】コホート3のペプチドプールによる被験者応答を示す実施例8の結果を示す。

50

- 【図29】コホート4のペプチドプールによる被験者応答を示す実施例8の結果を示す。
- 【図30】コホート5のペプチドプールによる被験者応答を示す実施例8の結果を示す。
- 【図31】コホートによるELISpotの要約を示す実施例8の結果を示す。
- 【図32】コホートによるELISpotの要約を示す実施例8の結果を示す。
- 【図33】すべての被験者に対するワクチン応答者の分析を示す実施例8の結果を示す。
- 【図34】ベースライン異常値を除去した被験者に対するワクチン応答者の分析を示す実施例8の結果を示す。
- 【図35】実施例8のICS実験のコホートの説明及びコホートの対象者属性を示す。
- 【図36】ICS実験のコホートに基づくWilcoxon対分析を示す実施例8の結果を示す。 10
- 【図37】CD4+ T細胞におけるコホート3 (INO4201 ID) サイトカインのICS分析を示す実施例8の結果を示す。
- 【図38】CD8+ T細胞におけるコホート3サイトカインのICS分析を示す実施例8の結果を示す。
- 【図39】コホート1~3における各被験者についてのワクチン応答者の詳細な分析を示す実施例8の結果を示す。
- 【図40】コホート4~5における各被験者についてのワクチン応答者の詳細な分析を示す実施例8の結果を示す。
- 【図41】コホート及びプールによる中央値応答を示す実施例8の結果を示す。
- 【図42】コホート及びプールによる平均応答を示す実施例8の結果を示す。 20
- 【図43】二価及び三価DNAワクチンが、カニクイザルにおけるin vivoでの長期間の免疫応答を誘発することを示す結果を示す。血清及び末梢血単核細胞 (PBMC) を、各DNA注射の2週間後に採取し、最終注射後に毎月採取した。ギニアGP及びメイインガGPに対する全IgG終点力価をELISAによってアッセイした。DNA免疫後のエボラGPに対する細胞性免疫応答。PMBCをNHPから回収し、GPペプチドのプールによる刺激後にT細胞応答についてELISPOT-IFNによってアッセイした。
- 【図44A-44C】致死的EBOVチャレンジに対する二価及び三価DNAワクチンによるカニクイザルにおける保護を示す結果を示す。(図44A)：生存。動物に1000TCID50の致死的なギニア・マコーナC07 EBOVをチャレンジし、チャレンジ後28日間生存をモニタリングした。(図44B)：臨床スコア。感染の経過を通じて、疾患の臨床的徴候をモニタリングした。(図44C)：ウイルス負荷。感染過程におけるウイルス血症を、血液からのTCID50アッセイによってアッセイした。 30
- 【図45】ADIヒト抗ザイールエボラウイルス糖タンパク質IgGキットを用いて、試験開始時及び各免疫化の2週間後に各ワクチン接種被験体の血清中のZEBOV特異的IgG抗体の量を評価する定量ELISAを示す。統計解析は、両側ウィルコクソン符号順位検定を用いて行った。
- 【図46】インターフェロン ELISpot応答を示す。試験登録時及び各免疫の2週間に、ワクチン接種した被験体からPBMCを単離し、IFNg ELISpotアッセイにおいて、全長GPにわたるエボラペプチドで刺激した。グラフは、100万個のPBMC当たりのEBOV-GP特異的スポット形成単位を表す。ボックス内の線は応答の中央値を表す。個々のドットは異常値データを表す。 40
- 【図47】非ヒト靈長類 (NHP) におけるエボラGP DNAワクチン製剤による長期間の免疫原性を示す実験結果を示す。ワクチン接種後6か月以上にわたって強力な抗体応答が観察される。
- 【図48】EBOV GP DNAワクチンの筋肉内送達の記憶試験を示す。NHPを、2価または3価のEBOV GP DNAワクチン製剤で3か月間にわたって免疫化した。免疫応答を、最終投与後12か月にわたって追跡した。13か月目に1年間の追加免疫を行った。
- 【図49】3価DNA GP製剤を投与した動物の全IgG終点力価を示す。1年間の追加免疫後に全IgG抗体応答の増加が観察された。 50

【図50】2価または3価のDNA GP製剤を投与した動物の全IgG終点力価を示す。1年間の追加免疫後に全IgG抗体応答の増加が観察された。

【図51】3価DNA GP製剤のELISPOTを示す。1年間の追加投与後のIFN ELISPOT反応の増加。追加免疫の強さは3注射群ほど高くはない。

【図52】2価または3価DNA GP製剤のELISPOTを示す。1年間の追加投与後のIFN ELISPOT反応の増加。単一の免疫化群において非常に強力な追加免疫を行った。

【図53】IFN ELISPOTの結果の要約を示す。追加免疫後、17/19匹の動物がT細胞応答を増加させた。1/19の動物が同レベルのT細胞応答を維持した。1/19の動物は追加免疫後のT細胞反応が悪かったが、この動物は3注射群において過去1年間にわたって一貫して高かった。

【図54】1年間の追加免疫前の12か月の時点での単一免疫群の動物についての例示的なIFN ELISPOTを示す。

【図55】1年間の追加免疫後の単一免疫群の動物についての例示的なIFN ELISPOTを示す。

【図56】IM記憶試験の結果を示す。EBOV GP DNAワクチンは、長期免疫応答を誘発し、1年間の追加免疫後に強いリコールを伴う。皮内送達試験を行い、皮内EBOV GP DNAワクチンの免疫応答を試験する。

【図57】EBOV DNAワクチン臨床試験(EBOV-001)の概要を示す。健康なボランティアに、INO-4201、INO-4202、INO-4212またはINO-4212及びINO-9021の3回投与レジメンを適用する。

【図58】EBOV-001とrVSV EBOVの結合抗体の比較を示す。すべてのEBOV-001コホートは、第0週と比較して第6週及び第14週の両方で有意な増加を示した。

【図59】EBOV GP DNAワクチン試験の皮内送達の概要を示す。コホートを添加して、投与、投与レジメン、及び免疫アジュバントとしてのIL-12 DNAの使用を検討した。

【図60】14週目のIDコホートの結果を示す。すべてのIDコホートにおいて、125/127(98.4%)の被験者において、血清反応性が観察された。

【発明を実施するための形態】

【0032】

好ましい実施形態の詳細な説明

本発明の一態様において、コンセンサス抗原は、以下を1つ以上有することを含む、転写及び翻訳の改善を提供することが望ましい：転写を増加させる低GC含量リーダー配列；mRNA安定性及びコドン最適化；可能なシス作用配列モチーフ（すなわち、内部TAT Aボックス）の除去。

【0033】

本発明のいくつかの態様では、以下の1つ以上を有することを含む、複数の株にわたる広範な免疫応答を生成するコンセンサス抗原を生成することが望ましい：すべての利用可能な全長配列を組み込み；コンピュータは、各位置で最も一般的に生じるアミノ酸を利用する配列を生成し；菌株間の交差反応性を増加させる。

【0034】

フィロウイルス科間の多様性は比較的高い。最も高いヒト死亡率をもたらす複数の種に対して理想的に保護する普遍的かつ広範な反応性のフィロウイルスワクチンを開発することを目指して集中的な努力がなされてきた。しかしながら、これはフィロウイルス科の多様性が相対的に高いため困難であることが判明している。EBOVは現在、ザイールエボラウイルス(ZEBOV)、スードンエボラウイルス(SUDV)、レストンエボラウイルス(RESTV)、ブンディブギョエボラウイルス(BDBV)及びタイフォレストエボラウイルス(TAFV；以前はコートジボワールエボラウイルス)の5つの異なる種に分類され、最初の2つは最も高い致死率と兵器化される最も高い可能性を有する候補となっ

10

20

30

40

50

ている。マールブルグウイルス (M A R V) の間の多様性は低く、また、最大 9 0 % の致死性に及ぶ可能性もある。現在は、1 つの分類種、マールブルグマールブルグウイルス (旧ビクトリア湖マールブルグウイルス) しか存在しないが、最近の改正では、ラビンウイルス (R A V V) を含む 2 種類のウイルスを含めることが提案されている。多価ワクチン開発の複雑さに加えて、M A R V 及び E B O V は高度に多様であり、又クレオチドレベルで約 6 7 % の多様性が存在する。さらに、フィロウイルス G P の系統多様性も非常に高い (全体的に 8 2 %)。これらは、2 0 0 7 年の B D B V の最近の出現によって示されるように、フィロウイルスの進化の可能性を示唆している。したがって、フィロウイルス科間に相対的な多様性が存在するため、効果的な多価フィロウイルスワクチンの開発には、免疫原性の成分を混合する必要があるように思われる。

10

【 0 0 3 5 】

マールブルグマールブルグウイルス (M A R V) 、ザイールエボラウイルス (Z E B O V) 、及びスーダンエボラウイルス (S U D V) に対する合成多価フィロウイルス D N A ワクチンを開発した。新規多価フィロウイルスワクチンは、多剤アプローチを採用し、マールブルグマールブルグウイルス (M A R V) 、スーダンエボラウイルス (S U D V) またはザイールエボラウイルス (Z E B O V) のエンベロープ糖タンパク質 (G P) 遺伝子をコードする 3 種類の D N A プラスミドで構成される。フィロウイルスワクチン候補として、D N A (D N A) ベースの強化されたプラットフォームは、遺伝子最適化及び送達技術の進歩により、多くの利点を示す (B a g a r a z z i M L , et al . (2 0 1 2) . I m m u n o t h e r a p y A g a i n s t H P V 1 6 / 1 8 G e n e r a t e s P o t e n t T H 1 a n d C y t o t o x i c C e l l u l a r I m m u n e R e s p o n s e s . S c i T r a n s l M e d 4 : 1 5 5 r a l 3 8 ; K e e S T , G e h l J , W . L E (2 0 1 1) . C l i n i c a l A s p e c t s o f E l e c t r o p o r a t i o n , S p r i n g e r , N e w Y o r k , N Y . ; H i r a o L A , et al . (2 0 1 1) . M u l t i v a l e n t s m a l l p o x D N A v a c c i n e d e l i v e r e d b y i n t r a d e r m a l e l e c t r o p o r a t i o n d r i v e s p r o t e c t i v e i m m u n i t y i n n o n h u m a n p r i m a t e s a g a i n s t l e t h a l m o n k e y p o x c h a l l e n g e . J I n f e c t D i s 2 0 3 : 9 5 - 1 0 2) 。したがって、各 G P を遺伝子最適化し、改变哺乳類発現ベクターにサブクローニングし、次いで *i n v i v o* 電気穿孔法 (E P) を用いて送達した。

20

【 0 0 3 6 】

げっ歯類適応ウイルスを用いてモルモット及びマウスにおいて前臨床効果試験を実施し、一方、本明細書に記載の新規修飾アッセイを用いてマウス T 細胞応答を広範に分析した。本明細書に記載のエピトープ同定及び特徴決定のための新規方法の使用を含む、T 細胞応答を広範囲に分析した。本モデルは、既存のプラットフォームに適用することができる保護免疫相関を試験するための重要な前臨床ツールを提供する。

30

【 0 0 3 7 】

前臨床げっ歯類試験におけるワクチン接種は、強力であり、ロバストな中和抗体 (N A b) 及び C T L 発現 T h 1 型マーカーを誘発し、M A R V 及び Z E B O V チャレンジを完全に保護した。本明細書に記載の新規変更アッセイを用いて広範に分析した包括的 T 細胞分析 (S h e d l o c k D J , et al . (2 0 1 2) . V a c c i n a t i o n w i t h s y n t h e t i c c o n s t r u c t s e x p r e s s i n g c y t o m e g a l o v i r u s i m m u n o g e n s i s h i g h l y T c e l l i m m u n o g e n i c i n m i c e . H u m V a c c i n I m m u n o t h e r 8 : 1 6 6 8 - 1 6 8 1) は、大多数の細胞傷害性 T リンパ球、エピトープ幅、及び T h 1 型マーカー発現を表す。遺伝的バックグラウンドの異なる 2 種類のマウスから、合計 5 2 の新規 T 細胞エピトープを同定し (2 0 個の M A R V エピトープのうち 1 9 個、1 6 個の S U D V のうち 1 5 個、及び 2 2 個の Z E B O V のうち 1 8 個) 、それらは主としてそれぞれの糖タンパク質 (G P) の高度保存領域で生じていた。これらのデータは、これまでの

40

50

前臨床糖タンパク質エピトープの中で、最も包括的な報告を表す。

【0038】

ヒト死亡率が最も高い複数の種に対して保護を提供する戦略の策定に際して、M A R V、S U D V、Z E B O V に焦点を当てた。それらの相対的な多様性のために、多価フィロウイルスワクチンの開発は、将来のアウトブレイク株及び/または種に応じて迅速かつ容易に適合させることができると想定した。E B O V の全体的な多様性は約 33 % であるが、S U D V と Z E B O V を別々に分析するとアミノ酸の同一性は実質的に上昇する（各種内で約 94 % の同一性）。したがって、図 1 A に示すように、最も致死的な E B O V をカバーするための 2 成分戦略、S U D V のためのプラスミド G P ワクチン及び Z E B O V のための別のプラスミド G P ワクチンを設計した。各種間の G P 多様性は比較的低い（S U D V で 5.6 %、Z E B O V で 7.1 %）ため、インフルエンザと H I V の多様な系統間の保護を強化するために以前に示された戦略であるコンセンサス免疫原を開発した。これらの G P 配列は、ベクター N T I ソフトウェア（In vitro gen、CA、USA）を用いたアライメントによって決定されるように、報告されたすべてのアウトブレイク配列（GenBank）についてコンセンサスであった。S U D V（95、203、261、及び 472）及び Z E B O V（314、377、430、及び 440）におけるそれぞれ 4 個のアミノ酸の非コンセンサス残基を G u l u 及び M b o m o / M b a n z a にそれぞれ重み付けした。G u l u はフィロウイルス科アウトブレイク（n = 425）のヒト死亡率が最も高いことから選択し、一方、M b o m o / M b a n z a は公表された配列データの最新かつ致死的なアウトブレイクであったことから選択した。S U D V（S U D V C O N V A C C I N E）及び Z E B O V（Z E B O V C O N V A C C I N E）のコンセンサス G P は、系統樹的に中間のそれらの親にアライメントした株であった。

10

20

30

【0039】

図 1 A のタンパク質の同定は以下の通りである：M A R V D u r b a (0 5 D R C 9 9) ' 9 9 : A B E 2 7 0 8 5 ; U g a n d a (0 1 U g a 0 7) ' 0 7 : A C T 7 9 2 2 9 ; D u r b a (0 7 D R C 9 9) ' 9 9 : A B E 2 7 0 7 8 ; O z o l i n ' 7 5 : V G P _ M A B V O ; M u s o k e ' 8 0 : V G P _ M A B V M ; P o p p ' 6 7 : V G P _ M A B V P ; L e i d e n ' 0 8 : A E W 1 1 9 3 7 ; A n g o l a ' 0 5 : V G P _ M A B V A ; R a v n ' 8 7 : V G P _ M A B V R ; D u r b a (0 9 D R C 9 9) ' 9 9 ; A B E 2 7 0 9 2 ; U g a n d a (0 2 U g a 0 7) ' 0 7 : A C T 7 9 2 0 1 . S U D V : B o n i f a c e ' 7 6 : V G P _ E B O S B ; M a l e o ' 7 9 : V G P _ E B O S M ; Y a m b i o ' 0 4 : A B Y 7 5 3 2 5 ; G u l u ' 0 0 : V G P _ E B O S U . Z E B O V : B o o u e ' 9 6 : A A L 2 5 8 1 8 ; M a y i b o u t ' 9 6 : A E K 2 5 4 9 5 ; M e k o u k a ' 9 4 : A A C 5 7 9 8 9 , V G P _ E B O G 4 ; K i k w i t ' 9 5 : V G P _ E B O Z 5 ; Y a m b u k u (E k r o n) ' 7 6 : V G P _ E B O E C ; Y a m b u k u (M a y i n g a) ' 7 6 : V G P _ E B O Z M ; K a s a i ' 0 8 : A E R 5 9 7 1 2 ; K a s s a i ' 0 7 : A E R 5 9 7 1 8 ; E t o u m b i ' 0 5 : A B W 3 4 7 4 2 ; M b o m o / M b a n z a ' 0 3 : A B W 3 4 7 4 3 。

30

【0040】

40

本明細書で提供する配列リストは、以下を含む 72 の配列のリストを含む

【0041】

配列番号 1 は、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原である Z E B O V C O N (C O N G P 1) のアミノ酸配列である。

【0042】

配列番号 2 は、S U D V C O N のアミノ酸配列であり、これはコンセンサススーザンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原である。

【0043】

配列番号 3 は、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク質及びマールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク

50

質免疫原のアミノ酸配列である M A R V または M A R V A N G のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 4 】

配列番号 4 は、 M A R V C O N 1 のアミノ酸配列であり、これは、第 1 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原である。

【 0 0 4 5 】

配列番号 5 は、 M A R V C O N 2 のアミノ酸配列であり、これは、第 2 コンセンサスマールブルクマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原である。

【 0 0 4 6 】

配列番号 6 は、 M A R V C O N 3 のアミノ酸配列であり、これは、第 3 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原である。

10

【 0 0 4 7 】

配列番号 7 ~ 2 5 は、 M A R V A N G 由来のペプチドである。

【 0 0 4 8 】

配列番号 2 6 ~ 4 1 は、 S U D V C O N 由来のペプチドである。

【 0 0 4 9 】

配列番号 4 2 ~ 6 2 は、 Z E B O V C O N 由来のペプチドである。

【 0 0 5 0 】

配列番号 6 3 は、 I g E シグナルペプチド : M D W T W I L F L V A A A T R V H S の配列である。

20

【 0 0 5 1 】

配列番号 6 4 は、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードするプラスミド p E B O Z 中のヌクレオチド配列挿入物である。

【 0 0 5 2 】

配列番号 6 5 は、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードするプラスミド p E B O S 中のヌクレオチド配列挿入物である。

【 0 0 5 3 】

配列番号 6 6 は、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質をコードするプラスミド p M A R Z A N G 中のヌクレオチド配列挿入物である。

【 0 0 5 4 】

配列番号 6 7 は、 Z E B O V G U I (ギニア G P) のアミノ酸配列であり、これは、ギニアでの 2 0 1 4 年のアウトブレイクから単離されたコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原である。

30

【 0 0 5 5 】

配列番号 6 8 は、 Z E B O V C O N 2 (C O N G P 2) のアミノ酸配列であり、これは、第 2 コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質である。

【 0 0 5 6 】

配列番号 6 9 は、ギニアでの 2 0 1 4 年のアウトブレイクから単離されたコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードするプラスミド p Z E B O V G U I 中のヌクレオチド配列挿入物である。

40

【 0 0 5 7 】

配列番号 7 0 は、第 2 コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質をコードするプラスミド p E B O Z C O N 2 のヌクレオチド配列挿入物である。

【 0 0 5 8 】

配列番号 7 1 は、第 2 コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質をコードするプラスミド p E B O Z C O N 2 のヌクレオチド配列である。

【 0 0 5 9 】

配列番号 7 2 は、ギニアの 2 0 1 4 大発生から単離されたザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードするプラスミド p Z E B O V G U I のヌクレオチド配列挿入物である。

【 0 0 6 0 】

50

いくつかの実施形態では、戦略は：M A R V、S U D V、Z E B O V、Z E B O V G U I 及びZ E B O V C O N 2から選択される3種のフィロウイルス免疫原のコード配列を用いる。M A R V免疫原はアンゴラ2005分離株の糖タンパク質である。S U D V Z E B O V、Z E B O V G U I、及びZ E B O V C O N 2コンセンサス糖タンパク質配列について設計した。

【0061】

いくつかの実施形態では、戦略は5つのフィロウイルス免疫原のコード配列を用いる。3つのM A R V免疫原を提供する。3つのクラスターに由来するコンセンサス糖タンパク質オゾリン、ムソケ、またはラビンを設計した。これらの3つのM A R V免疫原は、設計したS U D V、Z E B O VまたはZ E B O V C O N 2、Z E B O V G U Iコンセンサス糖タンパク質配列と共に、免疫応答の標的である。

10

【0062】

いくつかの実施形態では、戦略は、6つのフィロウイルス免疫原のコード配列を用いる。4つのM A R V免疫原を提供し、3つのクラスターに由来する3つのコンセンサス糖タンパク質を設計した。これらの3つのM A R V免疫原は、設計したS U D V、Z E B O V及びZ E B O V C O N 2、Z E B O V G U Iコンセンサス糖タンパク質配列と共に、免疫応答の標的であり、M A R V免疫原はアンゴラ2005分離株の糖タンパク質である。

20

【0063】

フィロウイルスワクチンの候補として、D N Aワクチンは迅速かつ安価なアップスケール生産、室温での安定性、及び輸送の容易性を含む多数の利点を示し、これらのすべてが経済的及び地理的観点からこのプラットフォームをさらに強化する。プラスミドは合成可能な性質を有するため、A g配列は、新たに出現した種に応じて迅速かつ容易に改変し、及び／または追加のワクチン成分及び／またはアウトブレイク状況下での迅速な応答のためのレジメンを含むように拡張することができる。例えば、本明細書中のM A R V戦略は、他の系統クラスターに対するコンセンサスM A R V G P (M G P)免疫原をコードする追加のプラスミドの同時投与によって、より広い適用範囲で容易に拡張することができる。

【0064】

「第1世代」のD N Aワクチンは免疫原性が低いが、最近の技術的進歩は臨床試験で免疫原性を劇的に改善した。プラスミドD N Aベクター及びそれらがコードするA g遺伝子の最適化は、i n v i v o免疫原性の増加を導いた。一時的に透過処理した細胞内に、ワクチン接種部位内での短い方形波の電気パルスを用いてプラスミドを駆動する技術であるi n v i v o電気穿孔法で、高度に濃縮したプラスミドワクチン製剤を投与する場合、細胞取り込み及びその後のA g発現は実質的に増幅される。理論的には、任意の数の可変A gに対する高度に特殊化された免疫応答を指向するために、D N Aプラスミドのカクテルを組み立てることができる。種特異的サイトカイン遺伝子をコードするプラスミド分子アジュバントとA gアミノ酸配列の「コンセンサスエンジニアリング」との同時送達によって、特定の株に対するワクチン誘発性免疫を指向しやすくするように、免疫をさらに誘導することができる。この戦略は、インフルエンザウイルス及びH I Vの多様な系統間の保護を強化することができる。部分的にはこれらの技術的進歩により、これらのD N Aワクチンを含む免疫化は、非常に多用途であり、きわめてカスタマイズ可能なものである。

30

【0065】

1. 定義

本明細書で使用する用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものに過ぎず、限定することを意図するものではない。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用するように、単数形「a」、「a n」及び「t h e」は、文脈上他に明確に指示されない限り、複数の指示対象を含む。

40

【0066】

本明細書の数値範囲を詳述するために、同程度の精度でその間に介在する各数字を明示的に検討する。例えば、6～9の範囲の場合、6と9に加えて7と8の数値が想定され、6

50

. 0 ~ 7 . 0 の範囲の場合、6 . 0、6 . 1、6 . 2、6 . 3、6 . 4、6 . 5、6 . 6、6 . 7、6 . 8、6 . 9、及び7 . 0 の数値が明示的に想定される。

【 0 0 6 7 】

a . アジュバント

本明細書中で使用する「アジュバント」とは、本明細書に記載のDNAプラスミドワクチンに添加し、DNAプラスミドによってコードされる1つ以上のコンセンサスフィロウイルス免疫原の抗原性を増強し、また、以下に記載する核酸配列をコードする任意の分子を意味し得る。

【 0 0 6 8 】

b . 抗体

「抗体」とは、クラスIgG、IgM、IgA、IgD、または、IgEの抗体、または、Fab、F(ab')2、Fdを含む、その断片もしくは誘導体、ならびに、その一本鎖抗体、二特異性抗体、二重特異性抗体、二価抗体及び、誘導体を意味し得る。当該抗体は、哺乳類の血清試料から単離された抗体、ポリクローナル抗体、親和性精製抗体、または、これらの混合物のうち、所望のエピトープ、または、それに由来する配列に対する十分な結合特異性を示すものであり得る。

【 0 0 6 9 】

c . コード配列

本明細書中で使用する「コード配列」または「コード核酸」とは、タンパク質をコードするヌクレオチドを含む核酸(RNAまたはDNA分子)を意味し得る。コード配列はまた、RNA配列をコードするDNA配列を含み得る。当該コード配列は、核酸の投与先である個体または哺乳類の細胞での発現を誘導できるプロモーター及びポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントと機能的に連結した、開始及び終止シグナルをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、当該コード配列は、必要に応じて、N末端メチオニンまたはIgEもしくはIgGシグナルペプチドなどのシグナルペプチドをコードする開始コドンをさらに含み得る。

【 0 0 7 0 】

d . 遺伝子構築物

本明細書中で使用する「遺伝子構築物」とは、免疫原などのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子またはRNA分子のことを指す。当該遺伝子構築物は、RNA分子から転写されたDNA分子のことも指す場合がある。当該コード配列は、核酸分子の投与先である個体の細胞で発現を誘導できるプロモーター及びポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントと作動可能に連結した、開始及び終止シグナルを含む。本明細書中で使用する場合、用語「発現可能な形態」とは、個体の細胞に存在している場合にコード配列が発現するように、タンパク質をコードするコード配列に作動可能に連結した必要な調節エレメントを含んでいる遺伝子構築物のことを指す。

【 0 0 7 1 】

e . 相補体

本明細書中で使用する「相補体」または「相補的」とは、ある核酸が、ヌクレオチド間または核酸分子のヌクレオチド類似体間に、ワトソン・クリック(例えば、A-T/U及びC-G)、または、フーゲスティーン塩基対を表わすことを意味し得る。

【 0 0 7 2 】

f . コンセンサスまたはコンセンサス配列

本明細書中で使用する「コンセンサス」または「コンセンサス配列」とは、特定のフィロウイルス抗原の複数のサブタイプのアラインメントの分析に基づいて構築した合成核酸配列、または対応するポリペプチド配列を意味し得、これを用いて、特定のフィロウイルス抗原のサブタイプまたは血清型に対する広範な免疫を誘導することができる。

【 0 0 7 3 】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原は、配列番号1、配列番号1の断片、配列番号1の変異体及び配列番号1の変異体の断片を指す。(ZEB)

10

20

30

40

50

O V または Z E B O V C O N または Z E B O V C O N V A C C I N E)。配列番号 1 のコード配列を含むプラスミドは、p Z E B O V または p E B O Z と呼ばれる場合がある。コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のコード配列には、配列番号 6 4、配列番号 6 4 の断片、配列番号 6 4 の変異体及び配列番号 6 4 の変異体の断片が含まれる。プラスミド p E B O Z は、配列番号 6 4 を含む。

【 0 0 7 4 】

コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原は、配列番号 2、配列番号 2 の断片、配列番号 2 の変異体及び配列番号 2 の変異体の断片を指す。(S U D V または S U D V C O N または S U D V C O N ワクチン)。配列番号 2 のコード配列を含むプラスミドは、p S U D V または p E B O S と呼ばれる場合がある。コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のコード配列には、配列番号 6 5、配列番号 6 5 の断片、配列番号 6 5 の変異体及び配列番号 6 5 の変異体の断片が含まれる。プラスミド p E B O S は、配列番号 6 5 を含む。

10

【 0 0 7 5 】

マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質はコンセンサスではなく、単離物に由来するタンパク質配列である。このタンパク質は配列番号 3 の配列を有する。マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質免疫原は、配列番号 3、配列番号 3 の断片、配列番号 3 の変異体及び配列番号 3 の変異体の断片を指す。(M A R V または M A R V A N G または M A R V A N G または M A R V A N G ワクチン)。配列番号 3 のコード配列を含むプラスミドは、p M A R V または p M A R V - A N G と呼ばれる場合がある。マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質免疫原のコード配列には、配列番号 6 6、配列番号 6 6 の断片、配列番号 6 6 の変異体及び配列番号 6 6 の変異体の断片が含まれる。プラスミド p M A R V A N G は配列番号 6 6 を含む。

20

【 0 0 7 6 】

第 1 コンセンサスマールブルグマールブルウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原は、配列番号 4、配列番号 4 の断片、配列番号 4 の変異体及び配列番号 4 の変異体の断片を指す。配列番号 4 は、ラビンクラスター・コンセンサス(ラビン、ダーバ(0 9 D R C 9 9)及びウガンダ(0 2 U g a 0 7 Y))由来のマールブルグマールブルグウイルスコンセンサス配列である(M A R V C O N 1 または M A R V - R A V C O N または M A R V - R A V C O N V A C C I N E)。配列番号 4 のコード配列を含むプラスミドは、p M A R V - R A V と呼ばれる場合がある。

30

【 0 0 7 7 】

第 2 コンセンサスマールブルグマールブルウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原は、配列番号 5、配列番号 5 の断片、配列番号 5 の変異体及び配列番号 5 の変異体の断片を指す。配列番号 5 は、オゾリンクラスター・コンセンサス(オゾリン、ウガンダ(0 1 U g a 0 7)、及びダーバ(0 5 及び 0 7 D R C 9 9))由来のマールブルグマールブルグウイルスコンセンサス配列である。(M A R V C O N 2 または M A R V - O Z O C O N または M A R V - O Z O C O N ワクチン)。配列番号 5 のコード配列を含むプラスミドは、p M A R V - O Z O と呼ばれる場合がある。

40

【 0 0 7 8 】

第 3 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原は、配列番号 6、配列番号 6 の断片、配列番号 6 の変異体及び配列番号 6 の変異体の断片を指す。配列番号 6 は、M u s o k e クラスター・コンセンサス(M u s o k e 、 P o p p 、及び L e i d e n)のマールブルグマールブルグウイルスコンセンサス配列である。(M A R V C O N 1 または M A R V - M U S C O N または M A R V - M U S C O N ワクチン)。配列番号 6 のコード配列を含むプラスミドは、p M A R V - M U S と呼ばれる場合がある。

【 0 0 7 9 】

コンセンサスザイールエボラウイルス G P エンベロープ糖タンパク質免疫原は、配列番号

50

67、配列番号67の断片、配列番号67の変異体及び配列番号67の変異体の断片を指す。(Z E B O V G U I または Z E B O V G U I V A C C I N E)。配列番号67のコード配列を含むプラスミドは、p Z E B O V G U I または p E B O Z G U I と呼ばれる場合がある。コンセンサスザイールエボラウイルスギニア2014エンベロープ糖タンパク質免疫原のコード配列は、配列番号69、配列番号69の断片、配列番号69の変異体及び配列番号69の変異体の断片を含む。プラスミドp E B O Z G U I は配列番号69を含む。

【0080】

第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原は、配列番号68、配列番号68の断片、配列番号68の変異体及び配列番号68の変異体の断片を指す。(Z E B O V 2 または Z E B O V C O N 2 または Z E B O V C O N 2 V A C C I N E)。配列番号68のコード配列を含むプラスミドは、p E B O V C O N 2 と呼ばれる場合がある。第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原のコード配列は、配列番号70、配列番号70の断片、配列番号70の変異体及び配列番号70の変異体の断片を含む。プラスミドp E B O V C O N 2 は配列番号70を含む。

10

【0081】

g. 定電流

本明細書中で使用する「定電流」とは、組織、または、当該組織を規定する細胞が、同組織に送達される電気パルスの持続期間中に受容する、または、経験する電流を定義する。当該電気パルスは、本明細書に記載の電気穿孔装置から送達される。この電流は、電気パルスの寿命期間中、当該組織に定電流量で留まるが、それは、本明細書で提供される電気穿孔装置が、好ましくは、瞬間的フィードバックを有しているフィードバック素子を具備しているからである。当該フィードバック素子は、パルスの持続期間中の組織（または、細胞）の抵抗を測定し、及び、電気穿孔装置に自身の電気エネルギー出力を変化させる（例えば、電圧を上げる）ようにすることができるため、同組織での電流は、電気パルスの間ずっと（マイクロ秒のオーダーで）、及び、パルス間において、一定であり続ける。いくつかの実施形態では、フィードバック素子は、制御器を含む。

20

【0082】

h. 電流フィードバックまたはフィードバック

本明細書中で使用する「電流フィードバック」または「フィードバック」は、互換的に使用されており、及び、提供される電気穿孔装置の活発な応答を意味し得るが、これは、電極間の組織の電流を測定することと、電流を一定レベルで維持するために、E P 装置が送達するエネルギー出力を適宜変化させることとを含む。この一定レベルは、パルスシーケンスまたは電気処理を開始する前に、使用者が予め設定する。電気穿孔装置内の電気回路が、電極間の組織の電流を連続的にモニタリングし、そのモニタリングした電流（または、組織内の電流）を予め設定された電流と比較し、連続的にエネルギー出力の調整を行なつて、モニタリングした電流を予め設定されたレベルで維持することができるよう、フィードバックは、電気穿孔装置の電気穿孔コンポーネント、例えば、制御器によって達成され得る。当該フィードバックループは、瞬時のものであり得るものであり、それは、フィードバックループが、アナログ閉ループフィードバックであるからである。

30

【0083】

i. 分散電流

本明細書中で使用する「分散電流」とは、本明細書に記載の電気穿孔装置の様々な針電極アレイから送達される電流のパターンを意味し得るものであり、これらのパターンは、電気穿孔される組織のあらゆる領域に対する電気穿孔関連の熱ストレスの発生を最小限に抑えるか、または、好ましくは、消失させる。

40

【0084】

j. 電気穿孔法

本明細書中で互換的に使用する「電気穿孔」、「電気透過処理」、または「界面動電増強」（「E P」）は、生体膜に微細経路（細孔）を生じさせるための膜貫通電場パルスの使

50

用を意味し得る。こうした微細経路の存在により、プラスミド、オリゴヌクレオチド、*s i R N A*、薬剤、イオン、及び、水などの生体分子が、細胞膜の片側から他方の側に通過することが可能になる。

【0085】

k. フィードバック機構

本明細書中で使用する「フィードバック機構」とは、ソフトウェアまたはハードウェア(または、ファームウェア)のいずれかによって実行されるプロセスであって、(エネルギー-パルスの送達前、送達中、及び/または、送達後の)所望の組織のインピーダンスを受容し、それを現在値、好ましくは、電流と比較して、送達されるエネルギー-パルスを調整して、予め設定された値を達成するプロセスのことを指し得る。フィードバック機構は、アナログ閉ループ回路により実施され得る。

10

【0086】

1. 断片

「断片」は、特定のフィロウイルス抗原を認識することによってフィロウイルスに対する免疫応答を哺乳類において誘起することができるフィロウイルス免疫原のポリペプチド断片を意味し得る。フィロウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原は、場合により、1位にシグナルペプチド及び/またはメチオニン、いずれの場合にも1位にシグナルペプチド及び/またはメチオニンを有するかまたは有さない本明細書に記載のコンセンサス配列に98%以上の相同性を有するタンパク質、本明細書に記載のコンセンサス配列に99%以上の相同性を有するタンパク質、及び本明細書に記載のコンセンサス配列に100%の相同性を有するタンパク質を含む場合がある。断片は、例えば、シグナルペプチド、例えば、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチドまたはIgGシグナルペプチドに連結したフィロウイルス免疫原の断片を含んでも含まなくてもよい。

20

【0087】

いずれの場合にも1位にシグナルペプチド及び/またはメチオニンを有するかまたは有さないZ E B O V C O N、S U D V C O N、M A R V A N G、M A R V - R A V C O N、M A R V - O Z O C O N、M A R V - M U S C O N、Z E B O V G U IもしくはZ E B O V C O N 2またはその変異体のいずれかの断片は、特定の全長Z E B O V C O N、S U D V C O N、M A R V A N G、M A R V - R A V C O N、M A R V - O Z O C O N、M A R V - M U S C O N、Z E B O V G U IもしくはZ E B O V C O N 2またはその変異体の20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の長さを含み得る。断片は、いずれの場合にも1位にシグナルペプチド及び/またはメチオニンを有するかまたは有さない配列Z E B O V C O N、S U D V C O N、M A R V A N G、M A R V - R A V C O N、M A R V - O Z O C O N、M A R V - M U S C O N、Z E B O V G U IまたはZ E B O V C O N 2と100%同一である断片のポリペプチドを指す。断片はまた、変異体の断片、すなわち、いずれの場合にも1位にシグナルペプチド及び/またはメチオニンを有するかまたは有さない配列Z E B O V C O N、S U D V C O N、M A R V A N G、M A R V - R A V C O N、M A R V - O Z O C O N、M A R V - M U S C O N、Z E B O V G U IまたはZ E B O V C O N 2に対して95%以上、98%以上、または99%以上相同であるポリペプチドを指す。この断片は、配列番号1~6、67~68に記載のフィロウイルス免疫原と98%以上の相同性、99%以上の相同性、または100%同一であるポリペプチドの断片を含む場合があり、さらに相同率を計算する際に含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドなどのシグナルペプチドを含む場合がある。いくつかの実施形態では、配列番号1~6、67~68の断片を、シグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチドまたはIgGシグナルペプチドなどの免疫グロブリンシグナルペプチドに連結させた。断片は、N末端メチオニンを含む配列番号1~6、67~68の断片を含み得る。断片はまた、配列番号1~6、67~68に開示する配列に対して95%

30

40

50

以上、98%以上、または99%以上相同であるポリペプチドの断片を指す。シグナルペプチドが存在する場合、それは相同率を計算する際には含めない。

【0088】

いくつかの実施形態では、配列番号1～6、67～68またはその変異体の断片は、配列番号1～6またはその変異体のいずれかの10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670個またはそれ以上の連続アミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、配列番号1～6またはその変異体の断片は、配列番号1～6、67～68またはその変異体のいずれかの15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670、675またはそれ未満の連続アミノ酸を含み得る。

10

【0089】

「断片」はまた、フィロウイルス免疫原をコードする核酸配列の断片を意味し、特定のフィロウイルス抗原を認識することによって哺乳類においてフィロウイルスに対する免疫応答を誘発することができるフィロウイルス免疫原の断片をコードする。いずれの場合にも1位にシグナルペプチド及び/またはメチオニンを有するかまたは有さない、フィロウイルス免疫原またはその変異体をコードする核酸断片の断片は、フィロウイルス免疫原またはその変異体をコードする特定の完全長核酸配列の長さの20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上を含む。断片は、配列番号1～6、67～68に記載のフィロウイルス免疫原と98%以上、99%以上、または100%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の断片を含む場合があり、さらに、相同率を計算する際に含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドなどのシグナルペプチドを含む場合がある。いくつかの実施形態では、配列番号1～6、67～68の断片をコードするヌクレオチド配列の断片を、シグナルペプチド、例えばIgEシグナルペプチドまたはIgGシグナルペプチドなどの免疫グロブリンシグナルペプチドに連結させた。シグナルペプチドのコード配列は存在するが、相同率を計算する際には含まれない。いくつかの実施形態では、配列番号1～6またはその変異体の断片をコードするヌクレオチド配列の断片は、配列番号1～6、67～68またはその変異体のいずれかの10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670またはそれ以上の連続アミノ酸をコードする配列を含み得る。いくつかの実施形態では、配列番号1～6、67～68またはその変異体の断片をコードするヌクレオチド配列の断片は、配列番号1～6、67～68またはその変異体のいずれかの15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670、675またはそれ未満の連続アミノ酸をコードする配列を含み得る。

20

【0090】

いくつかの実施形態では、断片は、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70、または配列番号72の断片である。いずれの場合にも1位にシグナルペプチド及び/またはメチオニンを有するかまたは有さない、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70、または配列番号72の断片は、フィロウイルス免疫原またはその変異体をコードする特定の完全長核酸配列の長さの20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上を含み得る。配列番号64、配列番号65、

30

40

50

配列番号 6 6 、配列番号 6 9 、配列番号 7 0 、または配列番号 7 2 の断片は、配列番号 6 4 、配列番号 6 5 、配列番号 6 6 、配列番号 6 9 、配列番号 7 0 、または配列番号 7 2 によってコードされるフィロウイルス免疫原に対して、98%以上の相同性、99%以上の相同性、または100%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の断片を含む場合があり、相同率を計算する際に含まれない免疫グロブリンシグナルペプチドなどのシグナルペプチドをさらに含む。配列番号 6 4 、配列番号 6 5 、配列番号 6 6 、配列番号 6 9 、配列番号 7 0 、または配列番号 7 2 の断片は、配列番号 6 4 、配列番号 6 5 、配列番号 6 6 、配列番号 6 9 、配列番号 7 0 、もしくは配列番号 7 2 またはその変異体の 1 0 、 1 5 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 7 5 、 1 0 0 、 1 5 0 、 2 0 0 、 2 5 0 、 3 0 0 、 3 5 0 、 4 0 0 、 4 5 0 、 5 0 0 、 5 5 0 、 6 0 0 、 6 1 0 、 6 2 0 、 6 3 0 、 6 4 0 、 6 5 0 、 6 6 0 、 6 7 0 またはそれ以上の連続アミノ酸をコードする配列を含み得る。配列番号 6 4 、配列番号 6 5 、配列番号 6 6 、配列番号 6 9 、配列番号 7 0 、または配列番号 7 2 の断片は、配列番号 6 4 、配列番号 6 5 、配列番号 6 6 、配列番号 6 9 、配列番号 7 0 、もしくは配列番号 7 2 またはその変異体の 1 5 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 7 5 、 1 0 0 、 1 5 0 、 2 0 0 、 2 5 0 、 3 0 0 、 3 5 0 、 4 0 0 、 4 5 0 、 5 0 0 、 5 5 0 、 6 0 0 、 6 1 0 、 6 2 0 、 6 3 0 、 6 4 0 、 6 5 0 、 6 6 0 、 6 7 0 、 6 7 5 またはそれ未満の連続アミノ酸コードする配列を含み得る。いくつかの実施形態では、断片は、配列番号 6 4 、配列番号 6 5 、配列番号 6 6 、配列番号 6 9 、配列番号 7 0 、または配列番号 7 2 から転写されるかまたはコードされる R N A の断片である。

【 0 0 9 1 】

m . 「同一の」

本明細書中で、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の関係で使用する「同一の」または「同一性」とは、当該配列が、指定領域に渡って指定の割合の同一残基を有することを意味し得る。この割合を計算するには、2つの配列を好適に整列させ、指定領域に渡って2つの配列を比較し、双方の配列間で同一残基が発生する位置の数を確定して一致位置の数を得て、一致した位置の個数を指定領域の合計位置数で割り、計算結果に100を掛けることで、配列同一性のパーセント値を算出し得る。2つの配列の長さが異なるか、あるいは、アライメントにより1つ以上の付着末端が生じて、指定の比較領域に単一配列のみが含まれる場合には、単一配列の残基を、計算の分母には含めるが、分子には含めない。D N A と R N A を比較する場合には、チミン (T) とウラシル (U) を同等とみなし得る。同一性は、筆算で求めてもよく、あるいは、B L A S T や B L A S T 2 . 0 等のコンピュータ配列アルゴリズムを使用して計算することもできる。

【 0 0 9 2 】

n . インピーダンス

本明細書中で使用する「インピーダンス」は、フィードバック機構を論ずる際に利用し得るものであり、かつ、オームの法則に従って電流値に変換することができるため、予め設定された電流と比較が可能である。

【 0 0 9 3 】

o . 免疫応答

本明細書中で使用する「免疫応答」とは、1つ以上の提供する D N A プラスミドワクチンを介したフィロウイルスコンセンサス抗原の導入に応答して、宿主の免疫系、例えば、哺乳類の免疫系が活性化することを意味し得る。この免疫応答は、細胞性応答または体液性応答、または、その両方であり得る。

【 0 0 9 4 】

p . 核酸

本明細書中で使用する「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、互いに共有結合している少なくとも2つのヌクレオチドを意味し得る。一本鎖を表現することで、相補鎖の配列も定義される。したがって、核酸は、表現される一本鎖の相補鎖も包含する。ある核酸の多くの変異体を、所定の核酸として同一目的で使用し得る。したがって、核酸は、実質的に同一の核酸、及び、その相補体も含む。一本鎖は、ストリ

10

20

30

40

50

ンジエントなハイブリダイゼーション条件下で標的配列とハイブリダイズできるプローブを提供する。したがって、核酸は、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするプローブも含む。

【 0 0 9 5 】

核酸は、一本鎖または二本鎖とし得るものであり、あるいは、二本鎖と一本鎖の両方の配列の一部分を含み得る。当該核酸は、DNA、双方のゲノム、及び、cDNA、RNA、または、ハイブリッドとし得るものであり、当該核酸は、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの組み合わせを含み得るものであり、ウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、及び、イソグアニンを含む塩基の組み合わせを含み得る。核酸は、化学合成法、または、組換え法により取得し得る。

10

【 0 0 9 6 】

q . 作動可能に連結した

本明細書中で使用する「作動可能に連結した」は、遺伝子の発現が、遺伝子と空間的に接続しているプロモーターの制御下にあることを意味し得る。プロモーターは、その制御下にある遺伝子の5'（上流）または3'（下流）に位置し得る。当該プロモーターと遺伝子との間の距離は、プロモーターが由来する遺伝子において当該プロモーターを制御する遺伝子とプロモーターとの間の距離とほぼ同一とし得る。当該技術分野で周知の通り、プロモーター機能を喪失させずに、この距離の変化に適応し得る。

【 0 0 9 7 】

20

r . プロモーター

本明細書中で使用する「プロモーター」とは、核酸の細胞での発現を、実現し、活性化し、または、増強することのできる合成分子または天然由来分子のことを意味し得る。プロモーターは、発現をさらに増強し、及び／または、空間的発現、及び／または、その一時的発現を改変する目的で、1つ以上の特定の転写調節配列を含み得る。プロモーターは、遠位のエンハンサー要素または抑制エレメントを含むこともでき、このものは、転写開始部位から数千塩基対も離れた場所に位置することができる。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、及び、動物を含む起源に由来し得る。プロモーターは、遺伝子成分の発現を調節し得るものであり、発現が起こる細胞、組織、もしくは、臓器、あるいは、発現が起こる発生段階については、恒常的もしくは差次的に、または、例えば、生理的ストレス、病原体、金属イオン、あるいは、誘発剤などの外部刺激に応答して同発現を調節し得る。プロモーターの代表例として、バクテリオファージT7プロモーター、バクテリオファージT3プロモーター、SP6プロモーター、lacオペレーター-プロモーター、lacプロモーター、SV40後期プロモーター、SV40初期プロモーター、RSV-LTRプロモーター、CMV IEプロモーター、SV40初期プロモーターまたはSV40後期プロモーター、及び、CMV IEプロモーターなどがある。

30

【 0 0 9 8 】

s . ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件

本明細書中で使用する「ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件」とは、例えば、核酸の複合混合物において、第1の核酸配列（例えば、プローブ）が、第2の核酸配列（例えば、標的）とハイブリダイズする際の条件のことを意味し得る。ストリンジエントな条件は配列に依存するため、状況に応じて変化する。ストリンジエントな条件は、所定のイオン強度pHにおける特定の配列に対する融点（T_m）より約5～10℃低くなるように選択される。このT_mとは、（所定のイオン強度、pH、及び、核酸濃度下で）標的に対して相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度のことである（この標的配列は、過剰に存在するので、T_mにおいて、プローブの50%が平衡状態で占有される）。ストリンジエントな条件は、塩濃度が、pH7.0～8.3において、約1.0M未満のナトリウムイオン、例えば、約0.01～1.0Mのナトリウムイオン濃度（または、その他の塩）であり、及び、温度が、短いプローブ（例えば、約10～50ヌクレオチド）では、低くとも約30℃、長いプローブ（例えば、約50ヌク

40

50

レオチドを超えるもの)では、低くとも約60とし得る。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤を添加しても実現し得る。選択的または特異的ハイブリダイゼーションの場合、陽性シグナルは、バックグラウンドハイブリダイゼーションの少なくとも2~10倍であり得る。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、以下の条件を含む。50%ホルムアミド、5×SSC、及び、1%SDSを用いて、42でのインキュベート、あるいは、5×SSC、1%SDSを用いて、65でのインキュベートと、0.2×SSC、及び、0.1%SDSを用いて、65での洗浄を含む。

【0099】

t. 実質的に相補的

本明細書中で使用する「実質的に相補的」とは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100個またはそれ以上の個数のヌクレオチドまたはアミノ酸の領域に渡って、第1の配列が、第2の配列の相補体と、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%同一であること、あるいは、2つの配列が、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを意味し得る。

【0100】

u. 実質的に同一

本明細書中で使用する「実質的に同一」とは、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24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個またはそれ以上の個数のヌクレオチドまたはアミノ酸の領域に渡って、第1の配列と第2の配列が、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%同一であること、あるいは、核酸に関して、当該第1の配列が、当該第2の配列の相補体と実質的に相補的であることを意味し得る。

【0101】

v. 変異体

核酸に関して本明細書で使用する「変異体」は、(i)基準ヌクレオチド配列の一部または断片、(ii)基準ヌクレオチド配列またはその一部の相補体、(iii)基準核酸またはその相補体と実質的に同一の核酸、または、(iv)ストリンジェントな条件下で、基準核酸、その相補体、または、それらと実質的に同一の配列とハイブリダイズする核酸のことを意味し得る。

【0102】

ペプチドまたはポリペプチドに関して使用する「変異体」は、アミノ酸の挿入、欠失、または、保存的置換によってアミノ酸配列が異なっているが、少なくとも1つの生物活性を保持しているものを意味し得る。また、変異体は、少なくとも1つの生物活性を保持するアミノ酸配列を有する基準タンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質も意味し得る。アミノ酸の保存的置換、すなわち、あるアミノ酸を、類似する特性(例えば、荷電領域の親水性、程度、及び、分布)の別のアミノ酸に置換することは、当該技術分野では、通常は軽微な変化を伴うものと認識されている。こうした軽微な変化は、当該技術分野で理解されているように、アミノ酸の疎水親水度指数を検討することで、部分的に同定できる。Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)。アミノ酸の疎水親水度指数は、その疎水性と電荷の考察に基づく。類似の疎水親水度指数を有するアミノ酸は置換可能であり、その後もタンパク質機能を維持する、ことが当該技術分野において公知である。ある態様において、±2の疎水親水度指数を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性を用いて、生物機能を保持したタンパク質となる置換を明らかにすることもできる。ペプチドに関連してアミノ酸の親水性を検

10

20

30

40

50

討することで、そのペプチドの局所的な最大平均親水性を計算でき、抗原性と免疫原性に對して良好に相關すると報告された有用な尺度となる。本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する米国特許第4,554,101号。当該技術分野で理解されてい
10 るように、類似の親水性値を有するアミノ酸を置換すると、例えば、免疫原性などの生物活性を保持したペプチドが得られる。親水性値が互いに±2以内のアミノ酸を用いて、置換を実施できる。アミノ酸の疎水性指標と親水性値の両方とも、そのアミノ酸の特定の側鎖の影響を受ける。こうした知見と一致して、生物機能に適合するアミノ酸の置換とは、当該アミノ酸の相対的類似性、特に、当該アミノ酸の側鎖の相対的類似性に依存するものと理解されており、このことは、疎水性、親水性、電荷、大きさ、及び、その他の特性から明らかになる。「変異体」は、好ましくは配列番号1~6、67~68の95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の相同である。

【0103】

同じ特定のアミノ酸配列をコードする核酸配列に関する「変異体」は、異なるコドンの使用によってヌクレオチド配列が異なる。配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70、または配列番号72によってコードされるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70、または配列番号72の変異体は、好ましくは80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上の任意の程度の相同性であり得る。配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70、または配列番号72によりコードされるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70、または配列番号72によって転写されるRNAの変異体は、好ましくは80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上の任意の程度の相同性であり得る。変異体はまた、参照タンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、少なくとも1つの生物活性を保持するアミノ酸配列を有し、通常、そのアミノ酸配列が、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上相同である、配列番号64、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70または配列番号72によって転写されるRNAによってコードされるタンパク質の変異体であるタンパク質をコードする、配列番号64、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70、または配列番号72によって転写されるRNAの変異体であってもよい。変異体はまた、参照タンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、少なくとも1つの生物活性を保持するアミノ酸配列を有し、通常、そのアミノ酸配列が、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上相同である、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70、または配列番号72によって転写されるRNAによってコードされるタンパク質の変異体である、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号69、配列番号70、または配列番号72によって転写されるRNAの変異体であってもよい。
20 30

【0104】

w. ベクター

本明細書で使用する「ベクター」とは、複製起点を含む核酸配列を意味し得る。ベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、細菌、ウイルスベクター、人工染色体または酵母人工染色体であってもよい。ベクターは、DNAまたはRNAベクターであり得る。ベクターは、自己複製染色体外ベクターであってもよいし、宿主ゲノムに組み込まれるベクターであってもよい。
40

【0105】

2. タンパク質

本明細書において、特定のフィロウイルス抗原の複数のサブタイプまたは血清型に対して幅広い免疫を誘導するために使用することができるフィロウイルス免疫原を提供する。コンセンサスフィロウイルス抗原として、それぞれ、マールブルグウイルスフィロウイルス糖タンパク質M A R V R A V 免疫原のコンセンサスアミノ酸配列、マールブルグウイル
50

スフィロウイルス糖タンパク質 M A R V O Z O 免疫原のコンセンサスアミノ酸配列、マールブルグウイルスフィロウイルス糖タンパク質 M A R V M U S 免疫原のコンセンサスアミノ酸配列、マールブルグウイルスフィロウイルス糖タンパク質 M A R V A N G の単離アミノ酸配列、ザイールエボラウイルス糖タンパク質 Z E B O V 免疫原のコンセンサスアミノ酸配列、ザイールエボラウイルス糖タンパク質 Z E B O V 2 0 1 4 免疫原のコンセンサスアミノ酸配列、ザイールエボラウイルス糖タンパク質 Z E B O V C O N 2 免疫原の単離アミノ酸配列、及びスーダンエボラウイルス糖タンパク質 S U D V 免疫原のコンセンサスアミノ酸配列が挙げられ得る。いくつかの実施形態では、免疫原は、免疫グロブリンタンパク質、例えば、I g E シグナルペプチドまたは I g G シグナルペプチドなどの異なるタンパク質に由来するシグナルペプチドを含み得る。

10

【 0 1 0 6 】

免疫原のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 6 、 6 7 ~ 6 8 及びその変異体ならびに配列番号 1 ~ 6 、 6 7 ~ 6 8 及びその変異体の断片を含み、場合により、シグナルペプチド、例えば I g E または I g G シグナルペプチドを含む。

【 0 1 0 7 】

3. タンパク質をコードするコード配列

本明細書に記載のタンパク質をコードするコード配列は、日常的な方法を用いて生成し得る。コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、第 2 コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原エンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、第 1 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、第 2 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列、及び第 3 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、開示するアミノ酸配列に基づいて生成してもよい。

20

【 0 1 0 8 】

核酸配列は、完全長コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、完全長第 2 コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、完全長コンセンサスコンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原エンベロープ糖タンパク質免疫原、完全長コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、完全長マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質免疫原、完全長第 1 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、完全長第 2 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、または完全長第 3 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードし得る。核酸配列は、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 5 、配列番号 6 、配列番号 6 7 、または配列番号 6 8 をコードする配列を含み得る。核酸配列は、配列番号 6 4 、配列番号 6 5 、配列番号 6 6 、配列番号 6 9 、配列番号 7 0 、または配列番号 7 2 を含み得る。一実施形態では、ヌクレオチド配列は、本明細書に記載の D N A 配列から転写される R N A 配列を含む。例えば、核酸は、配列番号 6 4 、 6 5 、 6 6 、 6 9 、 7 0 または 7 2 の D N A 配列、その断片またはその変異体によって転写される R N A 配列を含み得る。核酸配列は、場合により、例えば I g E または I g G シグナルペプチドなどのシグナルペプチドをコードするコード配列を含み得る。

30

【 0 1 0 9 】

核酸配列は、完全長コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片、完全長第 2 コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片、完全長コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片、完全長コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードするコード配列を含み得る。

40

50

質免疫原エンベロープ糖タンパク質免疫原の断片、完全長コンセンサススードンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片、完全長マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク質免疫原の断片、完全長第 1 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片、完全長第 2 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片、または完全長第 3 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片をコードし得る。核酸配列は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 6 7 または配列番号 6 8 の断片をコードする配列を含み得る。核酸配列は、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 9、配列番号 7 0、または配列番号 7 2 の断片を含み得る。断片サイズは、本明細書において「断片」と題する節に記載するように開示する。核酸配列は、場合により、例えば Ig E または Ig G シグナルペプチドなどのシグナルペプチドをコードするコード配列を含んでいてもよい。

【 0 1 1 0 】

核酸配列は、完全長コンセンサスザイルエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、完全長第 2 コンセンサスザイルエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、完全長コンセンサスザイルエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原エンベロープ糖タンパク質免疫原、完全長コンセンサススードンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原に相同なタンパク質、完全長マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク質免疫原に相同なタンパク質、完全長第 1 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原に相同なタンパク質、完全長第 2 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原に相同なタンパク質、及び完全長第 3 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原に相同なタンパク質をコードし得る。核酸配列は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 6 7、または配列番号 6 8 に相同なタンパク質をコードする配列を含み得る。核酸配列は、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 9、配列番号 7 0、または配列番号 7 2 に相同であってもよい。相同性の程度については、本明細書中で、変異体に言及する節などにおいて論じる。核酸配列は、場合により、例えば Ig E または Ig G シグナルペプチドなどのシグナルペプチドをコードするコード配列を含み得る。

【 0 1 1 1 】

核酸配列は、完全長コンセンサスザイルエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片に相同なタンパク質、完全長第 2 コンセンサスザイルエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片に相同なタンパク質、完全長コンセンサスザイルエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原エンベロープ糖タンパク質免疫原の断片に相同なタンパク質、完全長コンセンサススードンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片に相同なタンパク質、完全長マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク質免疫原の断片に相同なタンパク質、完全長第 1 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片に相同なタンパク質、完全長第 2 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片に相同なタンパク質、または完全長第 3 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の断片に相同なタンパク質をコードし得る。核酸配列は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 6 7、または配列番号 6 8 の断片に相同なタンパク質をコードする配列を含み得る。核酸配列は、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 9、配列番号 7 0、または配列番号 7 2 に相同な断片を含み得る。相同性の程度については、本明細書において変異体に言及する節などにおいて論じる。核酸配列は、場合により、例えば Ig E または Ig G シグナルペプチドなどのシグナルペプチドをコードするコード配列を含み得る。

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

50

配列番号 6 4 は、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードするプラスミド p E B O Z 中のヌクレオチド配列挿入物である。

【 0 1 1 3 】

配列番号 6 5 は、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードするプラスミド p E B O S 中のヌクレオチド配列挿入物である。

【 0 1 1 4 】

配列番号 6 6 は、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 エンベロープ糖タンパク質をコードするプラスミド p M A R Z A N G 中のヌクレオチド配列挿入物である。

【 0 1 1 5 】

配列番号 6 9 は、コンセンサスザイールエボラウイルス G P エンベロープ糖タンパク質免疫原をコードするプラスミド p E B O Z G U I 中のヌクレオチド配列挿入物である。 10

【 0 1 1 6 】

配列番号 7 0 は、第 2 コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質をコードするプラスミド p E B O Z C O N 2 のヌクレオチド配列挿入物である。

【 0 1 1 7 】

4. ベクター

ベクターとして、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、任意の形態の組換え「裸の D N A 」ベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。「ベクター」は、細胞を、感染、形質移入、一時的または永久的に形質導入することができる核酸を含む。ベクターを、裸の核酸、または、タンパク質または脂質と複合体を形成した核酸とすることはできるとは認識されるであろう。当該ベクターは、ウイルスまたは細菌の核酸、及び／または、タンパク質、及び／または、膜（例えば、細胞膜、ウイルス性脂質エンベロープなど）を任意に含む。ベクターとして、D N A の断片が付着して複製され得るレプリコン（例えば、R N A レプリコン、バクテリオファージ）などが挙げられるが、これらに限定されない。したがって、ベクターとして、R N A 、自律的自己複製環状または線状 D N A または R N A （例えば、プラスミド、ウイルスなど、米国特許第 5, 217, 879 号を参照されたい）などが挙げられるが、これらに限定されるものではなく、また、発現プラスミドと非発現プラスミドの双方が含まれる。組換え微生物または細胞培養物が、「発現ベクター」を保有しているとの記載がある場合、それは、染色体外の環状及び線状 D N A 、ならびに宿主染色体（複数可）に取り込まれた D N A の双方を含む。ベクターが宿主細胞によって維持される場合、当該ベクターは、有糸分裂中に自律的構造として安定に複製されるか、あるいは、宿主のゲノム内に組み込まれ得る。 20

【 0 1 1 8 】

a. プラスミド

プラスミドは、フィロタンパク質に対する免疫応答を誘発することができる合成コンセンサス抗原をコードするコード配列を含む、上記に開示される 1 つ以上の様々な免疫原をコードする核酸配列を含み得る。

【 0 1 1 9 】

単一のプラスミドは、単一のフィロプロテイン免疫原のコード配列、2 つのフィロタンパク質免疫原のコード配列、3 つのフィロタンパク質免疫原のコード配列、4 つのフィロタンパク質免疫原のコード配列、5 つのフィロタンパク質免疫原のコード配列または 6 つのフィロタンパク質免疫原のコード配列を含み得る。単一のプラスミドは、一緒に製剤化できる単一のフィロプロテイン免疫原のコード配列を含み得る。いくつかの実施形態では、プラスミドは、I L - 1 2 、I L - 1 5 及び／または I L - 2 8 をコードするコード配列を含み得る。 40

【 0 1 2 0 】

プラスミドは、コード配列の上流にあり得る開始コドン、及びコード配列の下流にあり得る終止コドンをさらに含み得る。開始コドン及び終止コドンは、コード配列とインフレームで存在し得る。

【 0 1 2 1 】

50

20

30

40

50

プラスミドはまた、コード配列に作動可能に連結したプロモーターを含み得る。コード配列に作動可能に連結したプロモーターは、サルウイルス 40 (SV40) 由来のプロモーター、マウス乳癌ウイルス (MMTV) プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) プロモーター、例えば、ウシ免疫不全ウイルス (BIV) 長い末端反復 (LTR) プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、トリ白血病ウイルス (ALV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、例えば、CMV前初期プロモーターなど、エブスタインバーウイルス (EBV) プロモーター、または、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーターであってもよい。また、当該プロモーターは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン、ヒトポリヘドリン、または、ヒトメタロチオネインなどのヒト遺伝子由来のプロモーターであってもよい。また、当該プロモーターは、組織特異的プロモーター、例えば、筋肉または皮膚特異的プロモーター、天然または合成のものであってもよい。そのようなプロモーターの例は、本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する米国特許出願公開公報第 U S 2 0 0 4 0 1 7 5 7 2 7 号に記載されている。

【 0 1 2 2 】

当該プラスミドはまた、当該コード配列の下流に位置させ得るポリアデニル化シグナルを含み得る。当該ポリアデニル化シグナルは、SV40ポリアデニル化シグナル、LTRポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン (bGH) ポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン (hGH) ポリアデニル化シグナル、または、ヒト - グロビンポリアデニル化シグナルであってもよい。当該 SV40 ポリアデニル化シグナルは、pCEP4プラスミド (Invitrogen, San Diego, CA) 由来のポリアデニル化シグナルであってもよい。

【 0 1 2 3 】

当該プラスミドは、当該コード配列の上流のエンハンサーを含み得る。当該エンハンサーは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン、または、CMV、FMDV、RSV、または、EBV に由来するウイルスエンハンサーとし得る。ポリヌクレオチド機能増強は、本明細書の一部を構成するものとしてそれぞれの全内容を援用する米国特許第 5,593,972 号、第 5,962,428 号、及び、WO 94/016737 に記載されている。

【 0 1 2 4 】

当該プラスミドは、当該プラスミドを染色体外で維持し、かつ、細胞内で当該プラスミドの複数のコピーを產生するために、哺乳類の複製起点をも含み得る。当該プラスミドは、Invitrogen (San Diego, CA) の pVAX-1 、 pCEP4 、または、pREP4 であってもよく、それらは、エブスタインバーウイルス複製起点、及び、核内抗原 EBNA-1 コード領域を含み得るものであり、組み込みをしなくとも、高コピー - エピソーム複製を生じ得る。当該プラスミドの主鎖は、pAV0242 であってもよい。当該プラスミドは、複製欠損型アデノウイルス 5 型 (Ad5) プラスミドであってもよい。

【 0 1 2 5 】

プラスミドはまた、プラスミドの投与先の細胞における遺伝子発現に十分に適合し得る調節配列を含み得る。コード配列は、宿主細胞におけるコード配列のより効率的な転写を可能にし得るコドンを含み得る。

【 0 1 2 6 】

コード配列はまた、Igリーダー配列を含み得る。リーダー配列は、コード配列の 5' であり得る。この配列によってコードされるコンセンサス抗原は、N末端 Igリーダーと、それに続くコンセンサス抗原タンパク質を含み得る。N末端 Igリーダーは、IgE または IgG であってもよい。

【 0 1 2 7 】

当該プラスミドを、Escherichia coli (E. coli) におけるタンパク質產生のために使用され得る、pSE420 (Invitrogen, San Die

10

20

30

40

50

g o , C A) としてもよい。また、当該プラスミドは、酵母の *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* 株におけるタンパク質産生のために使用され得る、p Y E S 2 (*I n v i t r o g e n* , San Diego , C A) としてもよい。また、当該プラスミドを、昆虫細胞におけるタンパク質産生のために使用され得る、M A X B A C (商標) 完全バキュロウイルス発現系 (*I n v i t r o g e n* , San Diego , C A) のプラスミドとしてもよい。また、当該プラスミドを、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞などの哺乳類細胞におけるタンパク質産生のために使用され得る、p c D N A I または p c D N A 3 (*I n v i t r o g e n* , San Diego , C A) としてもよい。

【 0 1 2 8 】

b . R N A ベクター

一実施形態では、核酸は R N A 分子である。したがって、一実施形態では、本発明は、マールブルグマールブルグウイルス (M A R V) 、スーダンエボラウイルス (S U D V) またはザイールエボラウイルス (Z E B O V) のエンベロープ糖タンパク質 (G P) 遺伝子の 1 つ以上をコードする R N A 分子を提供する。当該 R N A は、プラス鎖であってもよい。したがって、いくつかの実施形態では、当該 R N A 分子は、逆転写などの介在性複製ステップを必要とせずに、細胞によって翻訳することができる。本発明に有用な R N A 分子は、5' キャップ (例えば、7-メチルグアノシン) を有し得る。このキャップは、R N A の *i n v i v o* での翻訳を促すことができる。本発明に有用な R N A 分子の 5' ヌクレオチドは、5' 三リン酸基を有し得る。キャップされた R N A において、これは、5' から 5' への架橋を介して 7-メチルグアノシンに連結され得る。R N A 分子は、3' ポリ A テールを有し得る。また、ポリ A ポリメラーゼ認識配列 (例えば、A A U A A A) を、その 3' 末端の近傍に有し得る。本発明に有用な R N A 分子は、一本鎖であってもよい。

【 0 1 2 9 】

c . 線状ベクター

本明細書において、電気穿孔法によって対象に対して効率的に送達され、及び、1つ以上の所望の抗原を発現することができる、線状核酸ワクチンまたは線状発現カセット (「 L E C 」) も提供する。この L E C は、あらゆるリン酸主鎖を欠いた線状 D N A であってもよい。D N A は、1つ以上の抗原をコードし得る。L E C は、プロモーター、イントロン、終止コドン、ポリアデニル化シグナルを含み得る。抗原の発現は、プロモーターによって制御され得る。この L E C は、抗生物質耐性遺伝子、及び / または、リン酸主鎖を含まなくともよい。この L E C は、所望の抗原遺伝子発現と無関係の他の核酸配列を含有していないともよい。

【 0 1 3 0 】

当該 L E C は、線状化可能な任意のプラスミドに由来し得る。当該プラスミドは、抗原を発現可能であってもよい。プラスミドは、p V A X 、p c D N A 3 . 0 、もしくは p r o v a x 、または D N A を発現し、細胞がその配列を、免疫系によって認識される抗原に翻訳することを可能にする任意の他の発現ベクターであってもよい。

【 0 1 3 1 】

当該 L E C は、線状化可能な任意のプラスミドに由来し得る。当該プラスミドは、抗原を発現可能であってもよい。プラスミドは、p V A X 、p c D N A 3 . 0 、もしくは p r o v a x 、または D N A を発現し、細胞がその配列を、免疫系によって認識される抗原に翻訳することを可能にする任意の他の発現ベクターであってもよい。

【 0 1 3 2 】

d . ウイルスベクター

一実施形態では、本明細書において、本発明の核酸を細胞に送達することができるウイルスベクターを提供する。当該発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供され得る。ウイルスベクター技術は、当該技術分野で周知であり、例えば、S a m b r o o k et al . (2 0 0 1) 、及び、A u s u b e l et al . (1 9 9 7) 、及び、その他のウイルス学、及び、分子生物学のマニュアルに記載がされている。ベクターとして有用なウイルスとして、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペ

10

20

30

40

50

スウイルス、及び、レンチウイルスなどがあるが、これらに限定されない。一般的に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能する複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び、1つ以上の選択マーカーを含む。（例えば、WO 01/96584、WO 01/29058、及び、米国特許第6,326,193号を参照されたい。）ウイルスベクター、特に、レトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳類、例えば、ヒト細胞に挿入するための最も広く使用されている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルス、及び、アデノ随伴ウイルスなどから誘導することができる。例えば、米国特許第5,350,674号、及び、第5,585,362号を参照されたい。

【 0 1 3 3 】

10

5. 組成物

核酸分子を含む組成物を提供する。組成物は、単一のプラスミドのような単一の核酸分子の複数のコピー、2つ以上の異なるプラスミドのような2つ以上の異なる核酸分子の複数のコピーを含み得る。例えば、組成物は、複数の2、3、4、5、6、7、8、9または10以上の異なる核酸分子を含み得る。そのような組成物は、複数の2、3、4、5、6、またはそれ以上の異なるプラスミドを含み得る。

【 0 1 3 4 】

組成物は、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005エンベロープ糖タンパク質免疫原、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原の1つ以上からなる群から選択される単一のフィロタンパク質抗原のコード配列を集合的に含むプラスミドなどの核酸分子を含み得る。

【 0 1 3 5 】

組成物は、以下の組み合わせをコードする核酸配列を含む：コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及びコンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及びコンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及びマールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005エンベロープ糖タンパク質；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及びコンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、

30

40

50

グウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005エンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005エンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005エンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原。

【0136】

各フィロプロテイン免疫原の各コード配列は、好ましくは別々のプラスミドに含まれる。

【0137】

したがって、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及びコンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及びコンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、単一のプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは2つの別々のプラスミド上に存在する。

【0138】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及びマールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005エンベロープ糖タンパク質；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原；またはコンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及びコンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原；をコードする核酸配列を含む組成物は、1つのプラスミド上に存在してもよく、または任意の順列の2つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは3つの別々のプラスミド上に存在する。

【0139】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサス

10

20

30

40

50

ーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、単一のプラスミド上に、または任意の順列の2つのプラスミド上に、または任意の順列の3つのプラスミド上に、または任意の順列の4つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは5つの別々のプラスミド上に存在する。

【 0 1 4 0 】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、単一のプラスミド上に、または任意の順列の2つのプラスミド上に、または任意の順列の3つのプラスミド上に、または任意の順列の4つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは5つの別々のプラスミド上に存在する。

10

【 0 1 4 1 】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、単一のプラスミド上に、または任意の順列の2つのプラスミド上に、または任意の順列の3つのプラスミド上に、または任意の順列の4つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは5つの別々のプラスミド上に存在する。

20

【 0 1 4 2 】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスダムエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005エンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、单一のプラスミド上に、または任意の順列の2つのプラスミド上に、または任意の順列の3つのプラスミド上に、または任意の順列の4つのプラスミド上に、または任意の順列の4つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは6つの別々のプラスミド上に存在する。

30

〔 0 1 4 3 〕

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスサス-ダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク質、第 1 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第 2 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第 3 コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、単一のプラスミド上に、または任意の順列の 2 つのプラスミド上に、または任意の順列の 3 つのプラスミド上に、または任意の順列の 4 つのプラスミド上に、または任意の順列の 4 つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは 6 つの別々のプラスミド上に存在する。

40

[0 1 4 4]

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスヌードンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイ

50

ルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、単一のプラスミド上に、または任意の順列の2つのプラスミド上に、または任意の順列の3つのプラスミド上に、または任意の順列の4つのプラスミド上に、または任意の順列の5つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは6つの別々のプラスミド上に存在する。

【0145】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、単一のプラスミド上に、または任意の順列の2つのプラスミド上に、任意の順列の3つのプラスミド上に、または任意の順列の4つのプラスミド上に、または任意の順列の5つのプラスミド上に、または任意の順列の6つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは7つの別個のプラスミド上に存在する。

10

【0146】

コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2005 エンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原及び第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、単一のプラスミド上に、または任意の順列の2つのプラスミド上に、任意の順列の3つのプラスミド上に、または任意の順列の4つのプラスミド上に、または任意の順列の5つのプラスミド上に、または任意の順列の6つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは7つの別個のプラスミド上に存在する。

20

【0147】

同様に、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む組成物は、単一のプラスミド上に、または任意の順列の2つのプラスミド上に、または任意の順列の3つのプラスミド上に、または任意の順列の4つのプラスミド上に、または任意の順列の5つのプラスミド上に、または任意の順列の6つのプラスミド上に、または任意の順列の7つのプラスミド上に存在してもよいが、好ましくは8つの別個のプラスミド上に存在する。

30

【0148】

6. ワクチン

本明細書において、フィロウイルス、特にマールブルグウイルス、エボラウイルス・スー
ダン及び/またはエボラウイルス・ザイールに対する免疫応答を哺乳類において生成可能
なワクチンを提供する。ワクチンは、上記のように各プラスミドを含み得る。ワクチンは

40

50

、複数のプラスミド、またはそれらの組み合わせを含み得る。ワクチンは、治療的または予防的免疫応答を誘導するために提供してもよい。

【 0 1 4 9 】

10

20

30

40

50

る核酸分子を送達するために使用してもよい。ワクチンは、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸分子を送達するために使用してもよい。ワクチンは、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸分子を送達するために使用してもよい。ワクチンは、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸分子を送達するために使用してもよい。ワクチンは、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸分子を送達するために使用してもよい。ワクチンは、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸分子を送達するために使用してもよい。ワクチンは、コンセンサスザイールエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサスザイールエボラウイルスギニアエンベロープ糖タンパク質免疫原、コンセンサススーダンエボラウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、マールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質、第1コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第2コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原、第3コンセンサスマールブルグマールブルグウイルスエンベロープ糖タンパク質免疫原をコードする核酸分子を送達するために使用してもよい。ワクチンは、好ましくは、プラスミドを含む組成物である。

【0150】

当該ワクチンは、医薬として許容される賦形剤をさらに含み得る。医薬として許容される当該賦形剤は、ビヒクリ、アジュバント、担体、または希釈剤としての機能分子であってもよい。医薬として許容される当該賦形剤を、界面活性剤を含み得る形質移入促進剤、例えば、免疫刺激複合体（I S C O M S）、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質AなどのL P S類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、スクアレン及びスクアレンなどの小胞、ヒアルロン酸、脂質、リボソーム、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、または、ナノ粒子、または、その他の公知の形質移入促進剤としてもよい。

【0151】

当該形質移入促進剤は、ポリアニオン、ポリカチオン、ポリ-L-グルタミン酸塩（L G S）など、または、脂質である。当該形質移入促進剤は、ポリ-L-グルタミン酸塩であり、より好ましくは、当該ポリ-L-グルタミン酸塩は、6 m g / m l未満の濃度で当該ワクチンに存在する。当該形質移入促進剤は、界面活性剤、例えば、免疫刺激複合体（I

10

20

30

40

50

SCOMS)、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質AなどのLPS類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、及び、スクアレン及びスクアレンなどの小胞を含んでいてもよい、そして、ヒアルロン酸を用いて、遺伝子構築物と共に投与してもよい。いくつかの実施形態では、当該DNAプラスミドワクチンは、形質移入促進剤、例えば、脂質、レシチンリポソームまたはDNAリポソーム混合物(例えば、W09324640を参照されたい)などの当該技術分野で周知のその他のリポソームなどのリポソーム、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、または、ナノ粒子、または、その他の公知の形質移入促進剤も含み得る。好ましくは、当該形質移入促進剤は、ポリアニオン、ポリカチオン、ポリ-L-グルタミン酸塩(LGS)など、または、脂質である。当該ワクチンでの当該形質移入剤の濃度は、4mg/ml未満、2mg/ml未満、1mg/ml未満、0.750mg/ml未満、0.500mg/ml未満、0.250mg/ml未満、0.100mg/ml未満、0.050mg/ml未満、または、0.010mg/ml未満である。

【0152】

医薬として許容される賦形剤は、1つ以上のアジュバントであってもよい。アジュバントは、同一または代替プラスミドから発現されるか、またはワクチン中の上記プラスミドと組み合わせてタンパク質として送達される他の遺伝子であってもよい。1つ以上のアジュバントを、以下からなる群から選択されるタンパク質及び/またはタンパク質をコードする核酸としてもよい: CCL20、-インターフェロン(IFN-)、-インターフェロン(IFN-)、-インターフェロン、血小板由来増殖因子(PDGF)、TNF、TNF、GM-CSF、上皮成長因子(EGF)、皮膚T細胞誘引ケモカイン(CTACK)、上皮胸腺発現ケモカイン(TECK)、粘膜関連上皮ケモカイン(MEC)、IL-12、IL-15、例えば、シグナル配列またはシグナル配列をコードするコード配列が削除されており、場合により、IgE由来などの異なるシグナルペプチド、またはIgE、IL-28、MHC、CD80、CD86、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP-1、MIP-1、IL-8、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、変異型IL-18、CD40、CD40L、血管成長因子、線維芽細胞増殖因子、IL-7、神経成長因子、血管内皮増殖因子、Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IKB、不活性型NIK、SAPK、SAP-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NFKB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、OX40、OX40 LIGAND、NKG2D、MICHA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2及びその機能的断片またはその組み合わせに由来する異なるシグナルペプチドを有するIL-15。いくつかの実施形態では、アジュバントを: CCL-20、IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、MECまたはRANTESからなる群から選択される1つ以上のタンパク質及び/またはタンパク質をコードする核酸分子としてもよい。IL-12構築物及び配列の例は、PCT出願第PCT/US1997/019502号及び対応する米国特許出願第08/956,865号、ならびに2011年12月12日に出願された米国仮出願第61/569600号に記載されている。IL-15構築物及び配列の例は、PCT出願第PCT/US04/18962号及び対応する米国特許出願第10/560,650号、及びPCT出願第PCT/US07/00886及び対応する米国特許出願第12/160,766号、及びPCT出願第PCT/US10/048827に開示されており、前記文献はそれぞれ参照とし

10

20

30

40

50

て本明細書に援用する。IL-28構築物及び配列の例は、PCT出願第PCT/US09/039648号及び対応する米国特許出願第12/936,192号に開示されており、前記文献はそれぞれ参照として本明細書に援用する。RANTES及び他の構築物及び配列の例は、PCT出願第PCT/US1999/004332号及び対応する米国特許出願第09/622452号に開示されており、前記文献はそれ各自参照として本明細書に援用する。RANTES構築物及び配列の他の例は、PCT出願第PCT/US11/024098に開示されており、前記文献は参考として本明細書に援用する。RANTES及び他の構築物及び配列の例は、PCT出願第PCT/US1999/004332号及び対応する米国特許出願第09/622452号に開示されており、前記文献はそれ各自参照として本明細書に援用する。RANTES構築物及び配列の他の例は、PCT出願第PCT/US11/024098号に開示されており、前記文献は参考として本明細書に援用する。RANTES及び他の構築物及び配列の例は、PCT出願第PCT/US1999/004332号及び対応する米国特許出願第09/622452号に開示されており、前記文献はそれ各自参照として本明細書に援用する。RANTES構築物及び配列の他の例は、PCT出願第PCT/US11/024098号に開示されており、前記文献は参考として本明細書に援用する。ケモカインCTACK、TECK及びMEC構築物及び配列の例は、PCT出願第PCT/US2005/042231号及び対応する米国特許出願第11/719,646号に開示されており、前記文献はそれ各自参照として本明細書に援用する。OX40及び他の免疫調節剤の例は、米国特許出願第10/560,653号に開示されており、前記文献は参考として本明細書に援用する。DR5及び他の免疫調節剤の例は、米国特許出願第09/622452号に開示されており、前記文献は参考として本明細書に援用する。10 20

【0153】

ワクチンは、1994年4月1日に出願された米国特許出願第021,579号に記載されているような遺伝子ワクチン促進剤をさらに含んでもよく、前記文献はその全内容を参考として援用する。

【0154】

当該ワクチンは、約1ng～100mg、約1μg～約10mg、または、好ましくは、約0.1μg～約10mg、または、より好ましくは、約1mg～約2mgの量のコンセンサス抗原及びプラスミドを含む。いくつかの好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物は、約5ng～約1000μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態では、医薬組成物は、約10ng～約800μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態では、医薬組成物は、約0.1～約500μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態では、医薬組成物は、約1～約350μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態では、医薬組成物は、約25～約250μg、約100～約200μg、約1ng～100mg、約1μg～約10mg、約0.1μg～約10mg、約1mg～約2mg、約5ng～約1000μg、約10ng～約800μg、約0.1～約500μg、約1～約350μg、約25～約250μg、約100～約200μgのコンセンサス抗原またはそのプラスミドを含む。30

【0155】

当該ワクチンは、用いられる投与様式にしたがって製剤化してもよい。注射可能なワクチン医薬組成物は、滅菌された発熱物質不含のもの、及び、微粒子不含のものとしてもよい。等張性製剤または溶液を用いてもよい。等張性のための添加剤として、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、及び、ラクトースが挙げられ得る。当該ワクチンは、血管収縮剤を含み得る。当該等張性溶液は、リン酸緩衝生理食塩水を含み得る。当該ワクチンは、ゼラチンやアルブミンなどの安定化剤をさらに含み得る。ワクチン製剤に対するLGSまたはポリカチオンもしくはポリアニオノンなどによる安定化は、製剤を、室温または周囲温度で、長時間安定にことができる。40

【0156】

ワクチンは、室温(25℃)で1週間より長く、いくつかの実施形態では2週間より長く

、いくつかの実施形態では3週間より長く、いくつかの実施形態では4週間より長く、いくつかの実施形態では、5週間より長く、いくつかの実施形態では、6週間より長くにわたって安定である。いくつかの実施形態では、ワクチンは、1か月より長く、2か月より長く、3か月より長く、4か月より長く、5か月より長く、6か月より長く、7か月より長く、8か月より長く、9か月より長く、10か月より長く、11か月より長く、または12か月より長くにわたって安定である。いくつかの実施形態では、ワクチンは、1年超、2年超、数年超、または5年超にわたって安定である。一実施形態では、ワクチンは冷蔵下で安定である(2~8)。したがって、一実施形態では、ワクチンは冷凍鎖を必要としない。ワクチンは、その意図された使用(例えば、被験体における免疫応答の生成)を可能にするのに十分な期間、その生物学的活性を保持するならば、安定である。例えば、保存され出荷されるなどのワクチンについては、ワクチンが数か月~数年間安定していることが望ましい場合がある。

【0157】

7. ワクチンの送達方法

本明細書において、免疫応答を誘発することができる、フィロウイルス、特にマールブルグウイルス、エボラウイルス・スーダン及び/またはエボラウイルス・ザイールの免疫原に対して、それらを特に効果的なものとするエピトープを含むコンセンサス抗原の遺伝子構築物及びタンパク質を提供するためのワクチンの送達方法を提供する。ワクチンまたはワクチン接種の送達方法は、治療的免疫応答及び予防的免疫応答を誘導するために提供してもよい。ワクチン接種プロセスは、哺乳類において、フィロウイルス、特にマールブルグウイルス、エボラウイルス・スーダン及び/またはエボラウイルス・ザイールに対する免疫応答を生じ得る。ワクチンを個体に送達し、哺乳類の免疫系の活性を調節し、免疫応答を増強してもよい。ワクチンの送達は、細胞内で発現させ、細胞の表面に送達し、そこにおいて免疫系が認識し、細胞性、体液性、または細胞性及び体液性の応答を誘導する核酸分子としてのコンセンサス抗原の形質移入であってもよい。ワクチンの送達は、哺乳類に上記のワクチンを投与することによって、フィロウイルス、特にマールブルグウイルス、エボラウイルス・スーダン及び/またはエボラウイルス・ザイールに対する免疫応答を哺乳類において誘導または誘発するために使用してもよい。

【0158】

哺乳類の細胞へのワクチン及びプラスミドの送達において、形質移入細胞は、ワクチンから注入されたプラスミドの各々についてコンセンサス抗原を発現し分泌する。これらのタンパク質は、免疫系によって異物として認識され、それらに対して抗体が生成される。これらの抗体は、免疫系によって維持され、フィロウイルス、特にマールブルグウイルス、エボラウイルス・スーダン及び/またはエボラウイルス・ザイールによるその後の感染に対する有効な応答を可能にする。

【0159】

ワクチンを哺乳類に投与し、哺乳類において免疫応答を誘発してもよい。哺乳類は、ヒト、靈長類、非ヒト靈長類、ウシ、畜牛、ヒツジ、ヤギ、レイヨウ、バイソン、水牛、バイソン、ウシ、シカ、ハリネズミ、ゾウ、ラマ、アルパカ、マウス、ラット、及びニワトリであってもよい。

【0160】

a. 併用治療

ワクチンは、CCL20、-インターフェロン、-インターフェロン、血小板由来増殖因子(PDGF)、TNF、TNF、GM-CSF、上皮成長因子(EGF)、皮膚T細胞誘引ケモカイン(CTACK)、上皮胸腺発現ケモカイン(TECK)、粘膜関連上皮ケモカイン(MEC)、IL-12、IL-15、例えば、シグナル配列が削除され、場合により、IgEシグナルペプチド、MHC、CD80、CD86、IL-28、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP-1、MIP-1、IL-8、RANTES、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-

10

20

30

40

50

1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、変異型IL-18、CD40、CD40L、血管成長因子、線維芽細胞増殖因子、IL-7、神経成長因子、血管内皮増殖因子、Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IKB、不活性NIK、SAPK、SAP-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrec-DRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、OX40、OX40 LIGAND、NKG2D、MICHA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2及びそれらの機能的断片またはそれらの組み合わせなどの異なるシグナルペプチドを含むIL-15をコードする遺伝子及び/または他のタンパク質と併用して投与してもよい。いくつかの実施形態では、ワクチンを、以下の核酸分子及び/またはタンパク質の1つ以上と併用して投与してもよい: CCL20、IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、MEC及びRANTESまたはその機能的断片の1つ以上をコードするコード配列を含む核酸分子からなる群から選択される核酸分子、及び: CCL02、IL-12タンパク質、IL-15タンパク質、IL-28タンパク質、CTACKタンパク質、TECKタンパク質、MECタンパク質もしくはRANTESタンパク質またはその機能的断片からなる群から選択されるタンパク質。

【0161】

ワクチンを、経口、非経口、舌下、経皮、経直腸、経粘膜、局所、吸入、頬側投与、胸腔内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻内、髄腔内、及び、関節内、または、それらの組み合わせなどの異なる経路で投与し得る。獣医学的使用については、通常の獣医学的実施に従って、当該組成物を、適切に許容しうる製剤として投与し得る。獣医師は、特定の動物に対して最も適切な投与計画、及び、投与経路を、容易に決定することができる。当該ワクチンを、伝統的なシリンジ、無針注射装置、「微粒子衝撃遺伝子銃」、または、その他の物理的方法、例えば、電気穿孔法(EP)、「流体力学的方法」、または、超音波によって投与し得る。

【0162】

ワクチンのプラスミドは、*in vivo*電気穿孔法、リポソーム媒介、ナノ粒子促進、組換えベクター、例えば、組換えアデノウイルス、組換えアデノウイルス関連ウイルス、及び組換えワクシニアなどを用いてまたは用いずに、DNA注射(DNAワクチン接種とも呼ばれる)を含むいくつかの周知の技術によって哺乳類に送達してもよい。コンセンサス抗原は、DNA注射及び*in vivo*電気穿孔法により送達してもよい。

【0163】

b. 電気穿孔法

ワクチンのプラスミドの電気穿孔法による当該ワクチンの投与は、細胞膜に可逆的な孔を形成させるのに効果的なエネルギー・パルスを哺乳類の所望の組織に送達するように構成することができる電気穿孔装置を用いて達成され得るものであり、及び、好ましくは、当該エネルギー・パルスは、使用者が入力したプリセット電流に近い定電流である。当該電気穿孔装置は、電気穿孔コンポーネント、及び電極組立体またはハンドル組立体を含み得る。電気穿孔コンポーネントは、制御器、電流波形発生器、インピーダンスステスタ、波形口ガード、入力要素、ステータス報告要素、コミュニケーションポート、メモリーコンポーネント、電源、及び、電源スイッチなどの当該電気穿孔装置の1つ以上の様々な要素を含み、及び、組み込み得る。当該電気穿孔法は、*in vivo*電気穿孔装置、例えば、CELL ELECTRA EPシステム(VGX Pharmaceuticals, Blue Bell, PA)、または、Elgenエレクトロポレーター(Genetronics, San Diego, CA)を使用して、プラスミドによる細胞の形質移入を容易にし得る。

10

20

30

40

50

【0164】

当該電気穿孔コンポーネントは、当該電気穿孔装置の1つの要素として機能し得るものであり、及び、その他の要素は、当該電気穿孔コンポーネントと連絡する別々の要素（または、コンポーネント）である。当該電気穿孔コンポーネントは、当該電気穿孔装置の1つを超える個数の要素として機能し得るものであり、当該電気穿孔コンポーネントとはなおも別の当該電気穿孔装置のその他の要素とも連絡し得る。1つの電気機械的、または、機械的装置の一部として存在する当該電気穿孔装置の要素は、それらの要素が、1つの装置として、または、互いに連絡する別の要素として機能することができるものに限定しなくともよい。当該電気穿孔コンポーネントは、所望の組織内で定電流を生成するエネルギーパルスを送達し得るものであり、及び、フィードバック機構を含む。当該電極組立体は、空間的配置内に複数の電極を有する電極アレイを含み得るものであり、当該電極組立体は、当該電気穿孔コンポーネントからエネルギーパルスを受け、そして、電極を介して所望の組織に向けて同パルスを送達する。複数の当該電極の少なくとも1つは、エネルギーパルスの送達期間ではニュートラルであり、及び、所望の組織でのインピーダンスを測定して、そのインピーダンスを、当該電気穿孔コンポーネントに連絡する。当該フィードバック機構は、測定された当該インピーダンスを受けてもよく、また、当該電気穿孔コンポーネントによって送達されたエネルギーパルスを調整して、当該定電流を維持することができる。

10

【0165】

複数の電極は、分散パターンでエネルギーパルスを送達し得る。複数の当該電極は、プログラムされたシーケンス下の当該電極の制御を介して、当該分散パターンでエネルギーパルスを送達してもよく、そして、プログラムされたシーケンスは、使用者によって、電気穿孔コンポーネントに入力される。プログラムされた当該シーケンスは、順に送達された複数のパルスを含んでいてもよく、複数の当該パルスの各々のパルスが、インピーダンスを測定する1つのニュートラル電極を備えた少なくとも2つの活性電極によって送達されており、複数の当該パルスの次のパルスが、インピーダンスを測定する1つのニュートラル電極を備えた少なくとも2つの活性電極の異なる1つによって送達される。

20

【0166】

当該フィードバック機構は、ハードウェア、または、ソフトウェアのいずれかで実施し得る。当該フィードバック機構は、アナログ閉回路によって実施し得る。当該フィードバックは、 $50\ \mu s$ 、 $20\ \mu s$ 、 $10\ \mu s$ 、または、 $1\ \mu s$ ごとに起こるが、好ましくは、実時間フィードバック、または、瞬時（すなわち、応答時間を決定するための入手可能な技術によって決定した実質的な瞬時）である。当該ニュートラル電極で、所望の組織でのインピーダンスを測定してもよく、そして、そのインピーダンスをフィードバック機構に連絡し、次いで、当該フィードバック機構が同インピーダンスに応答してエネルギーパルスを調整し、及び、プリセット電流と同様の値の定電流を維持する。当該フィードバック機構は、エネルギーのパルスの送達期間内に定電流を連続的かつ瞬時に維持し得る。

30

【0167】

本発明のDNAワクチンの送達を促進しうる電気穿孔装置及び電気穿孔法の例として、本明細書の一部を構成するものとしてそれらの全内容を援用する、Draghia-Akli et al. の米国特許第7,245,963号、Smith, et al. が出願した米国特許公開第2005/0052630号に記載されたものがある。当該DNAワクチンの送達を促進するために用い得るその他の電気穿孔装置及び電気穿孔法として、本明細書の一部を構成するものとしてそれらの全内容を援用する、2006年10月17日に出願した米国特許仮出願第60/852,149号、及び、2007年10月10日に出願した同第60/978,982号に対して35USC 119(e)による利益を主張する、2007年10月17日に出願した、同時係属中で、かつ、共有にかかる米国特許出願第11/874072号で提供されたものがある。

40

【0168】

Draghia-Akli, et al. の米国特許第7,245,963号は、体内

50

または植物内の選択された組織の細胞への生体分子の導入を促進するためのモジュラー電極システム、及び、その使用が記載している。このモジュラー電極システムは、複数の針電極、皮下注射針、プログラム可能な定電流パルス制御器から複数の針電極への導電的連結を提供する電気コネクタ、及び、電源を含み得る。使用者は、支持構造上に搭載された複数の針電極を掴み、そして、体内または植物内の選択された組織に同電極をしっかりと挿入することができる。その後、皮下注射針を介して、生体分子を選択された組織へ送達する。プログラム可能な当該定電流パルス制御器を活性化して、定電流の電気パルスを、複数の針電極に印加する。印加された当該定電流電気パルスは、複数の電極間での細胞内への生体分子の導入を促進する。本明細書の一部を構成するものとして米国特許第7,245,963号の全内容を援用する。

10

【0169】

Smith, et al., が出願した米国特許公開第2005/0052630号には、体内または植物内の選択された組織の細胞への生体分子の導入を効果的に促進するため用い得る電気穿孔装置が記載されている。当該電気穿孔装置は、その操作が、ソフトウェアまたはファームウェアで指定される電気運動装置（「EKD装置」）を含む。このEKD装置は、ユーザ制御に基づく一列の電極とパルスパラメータ入力との間で一連のプログラム可能な定電流パルスパターンを生成し、そして、電流波形データの保存と取得を可能にする。当該電気穿孔装置は、針電極、注射針用の中央注入チャネル、及び、取り外し可能なガイドディスクのアレイを有する交換可能な電極ディスクも含む。本明細書の一部を構成するものとして米国特許公開第2005/0052630号の全内容を援用する。

20

【0170】

米国特許第7,245,963号、及び、米国特許公開第2005/0052630号に記載された電極アレイ及び方法は、筋肉などの組織だけでなく、その他の組織または臓器にも深く浸透させるように適合し得る。電極アレイの形態によって、注射針（選択された生体分子を送達する）が、標的臓器にも完全に挿入され、そして、電極によって、あらかじめ描かれた領域の標的組織に対して垂直に注射投与される。米国特許第7,245,963号、及び、米国特許公開第2005/0052630号に記載された電極は、好ましくは、長さが20mmで、21ゲージのものである。

【0171】

加えて、電気穿孔装置、及び、その使用を組み込んだ幾つかの実施形態で予期されるように、以下の特許、1993年12月28日発行の米国特許第5,273,525号、2000年8月29日発行の米国特許第6,110,161号、2001年7月17日発行の同第6,261,281号、2005年10月25日発行の同第6,958,060号、及び、2005年9月6日発行の米国特許第6,939,862号に記載された電気穿孔装置が存在する。さらに、様々な装置のいずれかを用いてDNAを送達することに関係している2004年2月24日発行の米国特許第6,697,669号、及び、DNA注入の方法に関する2008年2月5日発行の米国特許第7,328,064号に開示された発明を含む特許は、本明細書において企図している。本明細書の一部を構成するものとして上記した全特許の内容を援用する。

30

【0172】

c. DNAプラスミドの調製方法

本明細書で論じるDNAワクチンを含むDNAプラスミドの調製方法を本明細書において提供する。哺乳類発現プラスミドへの最終サブクローニング工程の後のDNAプラスミドを用いて、当該分野で公知の方法を用いて、大規模発酵タンクに細胞培養物を播種することができる。

40

【0173】

本発明のEP装置とともに使用するためのDNAプラスミドは、公知の装置及び技術の組み合わせを用いて製剤化または製造することができるが、好ましくは、2007年5月23日に出願された許諾対象である同時係属中の米国特許仮出願第60/939,792号に記載された最適化されたプラスミド製造技術を用いて製造する。いくつかの例では、こ

50

これらの試験に使用するDNAプラスミドは、10mg/mL以上の濃度で製剤化することができる。その製造技術は、米国特許出願第60/939792号に記載されたものに加えて、2007年7月3日に発行された許諾対象特許である米国特許第7,238,522号に記載されたものをはじめとする、当業者に概ね公知の様々な装置、及び、プロトコールをも含み、かつ、取り入れている。上記した参考出願及び特許である米国特許出願第60/939,792号、及び、米国特許第7,238,522号は、それぞれ、本明細書の一部を構成するものとしてそれらの全内容を援用する。

【実施例】

【0174】

以下の例において、本発明をさらに例示する。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すものであって、例示目的のみで記載しているものと理解すべきである。上記した説明、及び、これらの実施例から、当業者であれば、本発明に必須の特徴を確認することができ、また、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本発明に対して様々な変更や改変を加えて、様々な用途や条件に適合させることができる。したがって、本明細書で説明した発明に加えて、本発明に対して様々な改変を加えることが当業者に自明であることは、上記した説明からも明らかである。そのような改変も、特許請求の範囲に属していることも意図をしている。

10

【0175】

実施例1

方法

20

プラスミドワクチン構築

pMARV、pEBOS、及びpEBOZプラスミドDNA構築物は、全長GPタンパク質をコードする。pEBOS及びpEBOZに対して、アミノ酸コンセンサス戦略を使用し、一方、pMARVには、2005年のアンゴラ流行株由来の型適合配列(GenBank #VGP_MABVR)を使用した(Towner JS, et al. (2006). Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. J Virol 80: 6497-6516)。コンセンサス配列は、優勢なZEBOV及びSUDV GPアミノ酸配列のアラインメント及びそれについてコンセンサスを生成することによって決定した。各ワクチンGP遺伝子を、ヒトにおける発現のために遺伝子最適化し(タンパク質発現を強化するためのコドン及びRNAの最適化を含む(GenScript, Piscataway, NJ))、商業的に合成し(GenScript, Piscataway, NJ)その後、サイトメガロウイルス前初期(CMV)プロモーターの制御下で、改変pVAX1哺乳類発現ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)にサブクローニングした(GenScript, Piscataway, NJ)；修飾は、2A>C、3C>T、4T>G、241C>G、1,942C>T、2,876A>-、3,277C>T、及び3,753G>Cを含む。系統発生解析は、MEGAバージョン5ソフトウェアを使用してClustalWを用いた多重アラインメントによって行った。あるいは、MARV間のGP多様性は、比較してはるかに高い(約70%の同一性)ため、コンセンサス戦略は採択しなかった。MARVの適用範囲については、現在までに最大級の最も致命的なMARV流行の原因となつたことから、2005年のアンゴラ(GenBank #VGP_MABVR)でのアウトブレイクに由来するMGPの配列を利用することを選択した。この配列は、Musoke、Popp及びLeiden(10.6%の多様性)、またはウガンダ(01Uga07)、ダーバ(05DRC99及び07DRC99)及びオゾリン(10.3%の多様性)を含む関連株の最も近いクラスターのいずれかから10%より大きく異なっていた。3プラスミド戦略は、新規3価多価-フィロウイルスワクチン戦略の基盤を形成した。

30

【0176】

形質移入及びイムノプロッティング

ヒト胎児腎(HEK)293T細胞を培養し、形質移入し、回収した。簡潔に述べると、

40

50

細胞を、10% FBS、1% Pen-strep、ピルビン酸ナトリウム、及びL-グルタミンを含むD MEM 中で増殖させた。細胞を150 mm Corn ingディッシュで培養し、5% CO₂を含む37℃インキュベーター中で一晩70%コンフルエンスまで増殖させた。Calphos(商標) 哺乳類形質移入キットプロトコール(Clone te ch)またはLipofectamine(商標) 2000試薬(Invitrogen)のいずれかを使用して製造業者のプロトコールに従って10~25 μgのフィロウイルス科pDNAでディッシュを形質移入し、次いで24~48時間インキュベートした。細胞を氷冷PBSで回収し、遠心分離して洗浄し、次いでウェスタンブロッティングを使用し、GP1検出のためのGP特異的MAbを生成した。ウェスタンブロッティング実験のデータを図1Bに示す。FACS分析からのデータを図1Cに示す。

10

【0177】

動物、ワクチン接種及びチャレンジ

成体雌C57BL/6(H-2b)、BALB/cJ(H-2d)、及びB10.Br(H-2k)マウスをジャクソン研究室から購入し(Bar Harbor, ME)、一方、Hartleyモルモットはチャールズ川(Wilmington, MA)から入手した。すべての動物実験は、UPenn IACUC及びSchool of Medicine Animal Facility、またはPHACのNML Institutional Animal Care Committee及び実験動物の住居及びケアに関するカナダ動物衛生委員会のガイドラインに従って実施し、上記の機関による適切なレビュー及び承認の後にGuide for the Care and Use of Laboratory Animals of NIHの推奨に従って行った。UPenn及びNMLは、動物福祉、動物福祉法、及びその他すべての該当する連邦、州及び地方の法律に関するNIH方針を遵守する。

20

【0178】

水に再懸濁した40 μgのプラスミドをマウスの筋肉内にニードル注射して免疫化し、一方、モルモットの3つの別々のワクチン接種部位にそれぞれ200 μgを接種して皮内で免疫化した。ワクチン接種の直後に同じ部位へのEPを行った。簡潔に述べると、三つ又のCELLLECTRA(登録商標)適応定電流最小侵襲デバイスを、皮内におよそ2 mm挿入した(Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA)。26ゲージの固体ステンレススチール電極からなる三角形の3電極アレイを通して方形波パルスを送達し、0.1 Aの2つの定電流パルスを、1秒の遅延によって分離した52 m秒/パルスで送達した。

30

【0179】

致死的チャレンジ試験では、チャレンジは、げっ歯類適応ZEBOV及びMARVに限定した。モルモットを、最終ワクチン接種の28日後に、1,000 LD₅₀のモルモット適応ZEBOV(21.3FFU/動物)(Richardson JS, Abou MC, Tran KN, Kumar A, Sahai BM, Kobinger GP(2011). Impact of systemic or mucosal immunity to adenovirus on ad-based Ebola virus vaccine efficacy in guinea pigs. J Infect Dis 204 Suppl 3: S1032-1042)または1,000 LD₅₀ MARV-アンゴラ(681TCID₅₀/動物)を用いた腹腔内注射によりチャレンジした。簡潔に述べると、モルモット適応MARVを、非近交系の成体雌Hartleyモルモットにおける野生型MARV-アンゴラの連続継代によって作製した。接種の7日後、動物を安樂死させ、肝臓を回収し、均質化した。次いで、このホモジネートをナイープな成体モルモットに腹腔内注射し、動物が体重、髪の毛を失い、モルモットのZEBOV適応と同様の感染に至るまで、このプロセスを繰り返した。マウス致死チャレンジ試験(Kobinger GP, et al. (2006). Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola vi

40

50

rus. Virology 346: 394 - 401) については、マウス適応 Z E B O V の 1,000 LD₅₀ (10 F F U / 動物) 200 μl を用いてマウスに腹腔内注射した。すべての動物の体重を毎日測定し、承認されたスコアシートを用いてマウスの場合は少なくとも 18 日間、モルモットの場合は 22 日間、疾患の進行をモニタリングした。すべての感染作業は、NML、PHAC の「Biosafety Level 4」(BSL 4) 施設で行った。

【0180】

ELISA 及び中和アッセイ

スクロース精製 M A R V オゾリン G P または Z G P のいずれかでコーティングした 96 ウェル E L I S A プレートを用いて、または陰性対照スクロース精製ニパ G タンパク質を 1 : 2,000 の濃度で用いて、抗体 (A b) 力値を測定した。簡潔に述べると、プレートを 4 で 18 時間インキュベートし、P B S 及び 0.1% Tween - 20 で洗浄し、100 μl / 試料の血清を 3 回 (5% スキムミルク及び 0.5% Tween - 20 を含む P B S 中、1:100、1:400、1:1,600、及び 1:6,400 の希釈率で) 試験した。湿った容器中、37 で 1 時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、次いでヤギ抗マウス Ig G 結合 H R P 抗体 (Cedarlane) 100 μl を添加し (1:2,000 希釈)、さらに湿った容器中、37 で 1 時間インキュベートした。洗浄後、A B S T (2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンザゾリン-6-スルホン酸) 及びペルオキシダーゼ基質 (Cedarlane) 100 μl を添加し、A b 結合を可視化した。プレートを 37 で 30 分間インキュベートし、その後 405 nm で読み取った。陰性対照血清から陽性対照を差し引くと > 3 S D であることをもって、陽性結合結果を特徴付けた。

【0181】

Z E B O V 中和アッセイを行った。簡潔に述べると、免疫したマウスから血清を採取し、モルモットを 56 で 45 分間不活性化し、各試料 (50 μl の D M E M 中で、マウスの場合 1:20、1:40 など、モルモットの場合は 1:50) を、E G F P レポーター遺伝子 (Z E B O V - E G F P) を発現する等量の Z E B O V と混合し (E G F P 発現に従って 100 形質導入ユニット / ウェル)、37 で 90 分間インキュベートした。次いで、混合物を 96 ウェル平底プレート中の準コンフルエント Vero E 6 細胞に移し、室温で 5 ~ 10 分間インキュベートした。対照ウェルに、血清または非免疫血清を添加することなく、等量の Z E B O V - E G F P ウィルスに感染させた。次いで、20% F B S を補充した 100 μl の D M E M を各ウェルに加え、プレートを 37 、5% C O₂ で 48 時間インキュベートした。

【0182】

あるいは、M A R V - アンゴラ 368 の中和を、免疫蛍光アッセイを用いて評価した。一次ウサギ抗 M A R V A b 及び二次ヤギ抗ウサギ Ig G F I T C 結合 A b を検出に使用した。S U D V ボニファスに対する中和抗体 (N A b s) を、C V - 1 細胞上の細胞変性効果 (C P E) に基づいてアッセイした。細胞を等量の免疫血清及び S U D V ボニファスと共に 10 日間インキュベートした後、10% 緩衝ホルマリンで 24 時間固定し、光学顕微鏡下で調べた。E G F P 及び F I T C 陽性細胞を各ウェルで計数し、対照と比較して、緑色細胞の数において > 50% の減少を示す試料希釈を、N A b について陽性と判定した。あるいは、S U D V - ボニファスに対する N A b s を C V - 1 細胞上の細胞変性効果 (C P E) に基づいてアッセイした。すべての感染性の試験は、NML、PHAC の B S L 4 研究室で行った。

【0183】

脾細胞の単離

最終免疫の 8 ~ 11 日後にマウスを殺処分し、脾臓を採取した。簡潔に述べると、10% F B S、1 × 抗 - 抗 (I n v i t r o g e n)、及び 1 × - M E (I n v i t r o g e n) を補充した R P M I 1640 培地 (Mediatech Inc., Manassas, VA) に脾臓を入れた。S t o m a c h e r m a c h i n e (Seward Lab

10

20

30

40

50

oratory Systems Inc., Bohemia, NY) を用いて脾臓の機械的破壊により脾細胞を単離し、得られた産物を、40 μm 細胞ストレーナー (BD Falcon) を用いてろ過した。次いで、細胞を、RBC の溶解のために ACK 溶解緩衝液 (Lonza、スイス) で 5 分間処理し、PBS で洗浄し、次いで ELISPOT または FACS アッセイで使用するために RPMI 培地に再懸濁した。

【0184】

ELISPOT アッセイ

標準的な IFN-ELISPOT アッセイを行った。簡潔に述べると、96 ウェルプレート (Millipore, Billerica, MA) を抗マウス IFN- γ 捕捉抗体でコーティングし、4 $^{\circ}$ で 24 時間インキュベートした (R&D Systems, Minneapolis, MN)。翌日、プレートを PBS で洗浄し、次いでプロッキング緩衝液 (PBS 中、1% BSA 及び 5% スクロース) で 2 時間プロッキングした。脾細胞 (1 ~ 2 × 10⁵ 細胞 / ウェル) を三連でプレーティングし、37 $^{\circ}$ 、5% CO₂ で、及び RPMI 1640 (陰性対照)、Con A (陽性対照)、または GP ペプチドのいずれかの存在下で、個々に (それぞれの GP の長さにまたがって、9 アミノ酸をオーバーラップさせた 15 量体) または全体をプールして一晩刺激した (終濃度 2.5 μg / ml)。刺激の 18 ~ 24 時間後、プレートを PBS で洗浄し、次いでビオチン化抗マウス IFN- γ mAb (R&D Systems, Minneapolis, MN) と共に 4 $^{\circ}$ で 24 時間インキュベートした。次に、プレートを PBS で再度洗浄し、ストレプトアビシン - アルカリホスファターゼ (MabTech, Sweden) を各ウェルに添加し、室温で 2 時間インキュベートした。最後に、プレートを PBS 中で再び洗浄し、次いで BCIP / NBT Plus 基質 (MabTech) を各ウェルにスポット現像のために 5 ~ 30 分間添加した。現像プロセスが目視検査で完了するとすぐに、プレートを蒸留水ですすぎ、次に室温で一晩乾燥させた。スポットは、自動 ELISPOT リーダー (Cellular Technology Ltd., Shaker Heights, OH) を用いて計数した。

【0185】

T 細胞の幅の包括的分析のために、標準的な IFN-ELISPOT を、Shedlock DJ, et al. (2012) において以前に記載されたように本明細書において改変した。上記。準優位 T 細胞エピトープ及び免疫優性 T 細胞エピトープの同定及び測定は、全ペプチドプールまたはマトリックスペプチドプールとは対照的に、脾細胞を個々のペプチドで刺激することによって評価した; マトリックスアレイプールの使用のような試料保存のためのペプチドをプールする伝統的な実行は、複数のエピトープディスプレイペプチドを含有するプールにおける全機能応答がアッセイ分解能を効果的に低下させる、すなわち、より低い規模を「ドローンアウト」するため、アッセイ感度を低下させる。したがって、改変 ELISPOT を、各 GP 免疫原にわたって個々のペプチド (9 アミノ酸でオーバーラップする 15 量体; 終濃度 2.5 μg / ml) を用いて行った。T 細胞エピトープを含むペプチドを同定し (10 の AVE IFN + スポット及び 80% の動物応答率; 表 1 ~ 6 にまとめる)、その後、FACS によって機能及び表現型を確認した。共有または部分エピトープは同定されず、FACS データまたはウェブベースのエピトープ予測ソフトウェアも、連続ペプチド内に保存された CD4+ または CD8+ T 細胞エピトープの存在を示唆しなかった。ここでは、改変 ELISPOT アッセイによって同定されるように、可能な共有 / 部分 T 細胞エピトープを、連続ペプチド応答のすべての場合について取り扱った。細胞を、連続ペプチドのそれぞれで個々に刺激し、及び直接比較のために組み合わせてペアにし、組み合わせた応答が 2 つの個々の応答のいずれよりも大きくないう場合、「共有 / 部分的」と定義した。また、ペプチドを生成するための「9 アミノ酸がオーバーラップした 15 量体」アルゴリズムは、CD8+ T 細胞エピトープを完全にカバーすることに偏っており、15 アミノ酸より長いクラス I I 拘束性エピトープの性質に起因して、CD4+ T 細胞を過小評価し得るため、本明細書に提示するエピトープ応答は、完全に包括的ではなかった可能性があることには留意しなければならない。最後に、ベク

10

20

30

40

50

ターNTIソフトウェアを用いてアミノ酸類似性プロットを生成し、その結果を図4Bに示す。

【0186】

フローサイトメトリー

脾細胞を96ウェルプレートに添加し(1×10^6 細胞/ウェル)、個々のペプチドまたは「最小ペプチドプール」(終濃度 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)のいずれかで5~6時間刺激した。個々のペプチド刺激を、改変ELISPOT(表1~6)によって同定したすべてのペプチドの機能的確認及び表現型の特徴付けに用いた。脾細胞及び形質移入した293Tを、LIVE/DEAD(登録商標)Fixable Violet Dead Cell Stain Kit(Invitrogen)で最初に予め染色した。脾臓については、CD19(V450;クローン1D3)、CD4(PE-Cy7;クローンRM4-5)、CD8(APC-Cy7;クローン53-6.7)及びCD44(PE-Cy5;クローンIM7)(BD Bioscience, San Jose, CA)について、細胞を表面染色し、PBS+1%FBSで3回洗浄し、BD Cytofix/Cytoperm(商標)キットで透過処理し、次いでIFN(APC;クローンXMG1.2)、TNF(FITC;クローンMP6-XT22)、CD3(PE-cy5.5;クローン145-2C11)、及びT-bet(PE;クローン4B10)(eBioscience, San Diego, CA)で細胞内染色した。形質移入した293T細胞におけるGP発現を、形質移入の24時間後に評価した。3回免疫化したH-2^bマウス由来の血清を、それらのそれぞれのDNAワクチンまたはpVAX1空ベクター対照を用いてプールすることにより產生した、示したマウス由来GP特異的ポリクローナル血清試薬(1:200希釈)を含有するPBS+1%FBS中、4で30分間のインキュベーション後に間接染色を行った。次いで、細胞をFITC結合ヤギ抗マウスIgG(BioLegend, San Diego, CA)で染色し、広範囲に洗浄し、次いでMHCクラスI(HLA-ABC;PE-Cy7;クローンG46-2.6;BD)で染色した。すべての細胞を1%パラホルムアルデヒドで固定した。LSRIIフローサイトメーター(BD)を用いてすべてのデータを収集し、FlowJoソフトウェア(Tree Star, Ashland, OR)を用いて分析した。脾細胞は、CD3+CD44+、CD4+またはCD8+であり、B細胞マーカーCD19及び生存性色素について陰性である活性化IFN產生T細胞に関してゲーティングした。

【0187】

図6は、GP特異的T細胞ゲーティングを示す。ELISPOTによって同定したT細胞エピトープを含むペプチドの機能的及び表現型解析を、全リンパ球、CD19及びLIVE-DEAD(ダンプチャネル)について陰性であった生存(LD)CD3+細胞、シングレット(細胞ダブルットを除く)、CD4+及びCD8+細胞、活性化細胞(CD44+)、ならびにペプチド特異的IFN產生T細胞のFACSゲーティングによって行った。

【0188】

統計解析

無根系統樹の有意性を最大尤度法によって決定し、ブートストラップ解析によって検証し、MEGAバージョン5ソフトウェアによって有意な支持値(80%;1,000回のブートストラップ反復)を決定した。グループの解析は、整合両側独立t検定によって完了し、生存曲線は対数ランク(Mantel-Cox)検定によって解析した。すべての値は平均±SEMであり、統計解析はGraphPad Prism(La Jolla, CA)により実施した。

【0189】

結果

ワクチンの構築と発現

系統発生解析により、EBOV GP(SUDVでは94.4%、ZEBOVでは92.9%)が相対的に保存され、MARV GP(MGP)はより多様性が高い(約70%)の

10

20

30

40

50

保存）。したがって、優勢な Z E B O V 及び S U D V G P アミノ酸配列のアラインメントによって決定されるコンセンサス戦略を E B O V G P に採用し、一方、 M A R V には最大級で最も致命的な M A R V アウトブレイクである 2005 年のアンゴラアウトブレイク配列を用いた型適合戦略を用いた。各 G P 導入遺伝子を遺伝子最適化し、商業的に合成し、次いで改変 p V A X 1 哺乳類発現ベクターにサブクローニングした。まとめると、3 プラスミド戦略が、新規多価 - フィロウイルスワクチン戦略の基礎を形成した。

【 0190 】

H E K 2 9 3 T 細胞を各プラスミドと別々に形質移入し、 G P 発現をウエスタンイムノブロッティング及び F A C S によって評価した。検出のための種特異的抗 G P 1 m A b を用いて形質移入の 48 時間後に採取した細胞溶解物中に、各々、約 1 3 0 k D a のタンパク質が観察された。結果を図 1 B に示す。比較対照として、それぞれの G P を発現する組換え水疱性口内炎ウイルス (r V S V) を並行レーンにロードした。次に、細胞表面上の G P 発現を、 F A C S による G P 特異的または対照ポリクローナル血清による間接的染色により形質移入の 24 時間後に分析した。結果を図 1 C に示す。すべてのワクチンプラスミドについて細胞表面発現が検出されたが、非特異的結合はほとんど観察されなかった。対照血清は G P 形質移入細胞と反応せず、陽性血清も p V A X 1 形質移入細胞と反応しなかった（データは p E B O Z について示した）。 E B O V G P について予想されたように、細胞表面発現は、表面 M H C クラス I 、ならびに 1 インテグリンの立体的に閉塞した認識を引き起こす (F r a n c i c a J R , V a r e l a - R o h e n a A , M e d v e c A , P l e s a G , R i l e y J L , B a t e s P (2 0 1 0) S t e r i c s h i e l d i n g o f s u r f a c e e p i t o p e s a n d i m p a i r e d i m m u n e r e c o g n i t i o n i n d u c e d b y t h e e b o l a v i r u s g l y c o p r o t e i n . P L o S P a t h o g 6 : e 1 0 0 1 0 9 8) 。

【 0191 】

M A R V 及び Z E B O V チャレンジに対する完全な保護

保護の有効性を判定するために、モルモット前臨床チャレンジモデルを採用した。前臨床免疫原性及び有効性試験は、本明細書においてモルモット及びマウスモデルを用いて実施した。モルモット前臨床モデルは、フィロウイルスワクチン開発のためのスクリーニング及び「概念実証」ツールとして広く使用されている。モルモットでは M A R V 及び E B O V の一次単離株は非致死的な病気を引き起こすが、この宿主では少数の継代により、フィロウイルス感染霊長類に認められる病理学的特徴と同様の病理学的特徴を有する致死的疾患を引き起こし得る変異体が選択される。同様に、マウスもまた、フィロウイルスワクチンの開発に広く使用されているが、モルモットモデルとは異なり、免疫及び T 細胞応答を評価するための免疫検出試薬が広く入手可能である。マウス適応 Z E B O V (m Z E B O V) による感染は、 E B O V に感染した霊長類に認められるものに類似した、標的器官における高レベルのウイルスによって特徴付けられる疾患ならびに肝臓及び脾臓における病的変化をもたらす。

【 0192 】

3 つの別々のワクチン接種部位または p V A X 1 空ベクター対照 (n = 9) に 2 0 0 μ g の各プラスミド (p E B O Z 、 p E B O S 及び p M A R V) を用いてモルモット (n = 2 4) を皮内で 2 回免疫し、その後 1 か月後に同じワクチンで追加免疫した。動物を、 B S L - 4 施設においてモルモット適応 M A R V - アンゴラ (g p M A R V) (n = 9) または Z E B O V (g p Z E B O V) (n = 1 5) の 1 0 0 0 L D 5 0 を用いて 2 回目の免疫の 28 日後にチャレンジし、毎日観察及び体重測定した。結果を図 2 A ~ 2 H に示す。ワクチン接種した動物は完全に保護され、一方、対照をワクチン接種した動物は、 g p M A R V によりチャレンジ後 10 日目 (n = 3 ; P = 0 . 0 0 5 2) までに、または g p Z E B O V によりチャレンジ後 7 日目 (n = 6 ; P = 0 . 0 0 0 8) までに死亡した（図 2 A 及び図 2 E ）。さらに、ワクチン接種した動物は体重減少から保護された（図 2 B 及び図 2 F ; P < 0 . 0 0 0 1 ）。プールした血清中の G P 特異的 A b が結合（図 2 C 及び図 2

10

20

30

40

50

G) 及び中和 (図 2 D 及び図 2 H) 力価の有意な増加を示したため、ワクチン誘導 A b が保護に寄与した可能性が高い。 B S L - 4 施設で実験を行い、同様の結果を 2 回繰り返し、図 A ~ 2 H の誤差バーは S E M を表す。グループの解析は、整合両側独立 t 検定によって完了し、生存曲線は対数ランク (M a n t e l - C o x) 検定によって解析した。

【 0 1 9 3 】

プラスミドワクチンは高度に免疫原性であった

保護 D N A ワクチン (プラスミド p E B O Z 、 p E B O S 及び p M A R V 、三価 D N A ワクチンとも呼ばれる) によって促進される免疫相関をよりよく特徴づけるために、フィロウイルスワクチン開発のためのスクリーニング及び「概念証明」ツールとして広く使用されているマウスモデルを採用した広範囲の免疫検出試薬が利用可能である。最初に、 B 細胞応答を、 2 回のワクチン接種のそれぞれ 20 日後、各一価 D N A ワクチン 40 μ g の注射の間の 3 週間、 H - 2 d マウス (n = 5 / 群) で評価した。これらの実験からのデータを図 3 A ~ 3 C に示す。図 3 A 及び図 3 B に示すように、プレブリード対照試料では G P 特異的 I g G はほとんど観察されなかったが、ワクチン接種後のすべての動物において有意な増加が検出された。精製 S G P は利用できなかったため、精製 Z G P を代理として用いた。 S U D V ワクチン接種したマウスの I g G は、 Z G P に結合し、ワクチン誘発性の A b 生成能力、及び異種間認識能力を実証した。さらに、 1 回の免疫化の後にワクチン接種した動物の 100 % において抗体陽転が起こり、その後、応答は同種のブーストによって有意に増加した； A V E 逆エンドポイント希釈力価は、 p M A R V 免疫マウスでは 22.1 倍、 p E B O S 及び p E B O Z ワクチン接種動物ではそれぞれ 3.4 倍及び 8.6 倍に増加した。 B S L - 4 施設で Z E B O V 、 S U D V - ボニファス、及び M A R V - A n g o l a の中和について試料を次にアッセイした。中和アッセイの結果を図 3 C に示す。すべての動物においてワクチン接種後に N A b 力価の有意な増加が検出された。

【 0 1 9 4 】

2 つの異なる遺伝的バックグラウンドのマウス (H - 2 d 及び H - 2 b ; n = 5 / 群) を、 40 μ g の各プラスミド p E B O Z 、 p E B O S 及び p M A R V で免疫し、 2 週間後に相同的にブーストし、 8 日後、 T 細胞分析のために殺処分した。マトリックスプールとは対照的に個々のペプチドを用いて脾細胞を刺激した包括的なワクチン誘発性 T 細胞応答を評価するための新規変更 E L I S P O T アッセイの結果を図 4 A に示す。 D N A ワクチン接種は、多様な T 細胞エピトープを認識するロバストな I F N + 応答を誘導した (表 1 ~ 6) 。続いて、すべての陽性エピトープ含有ペプチドをゲーティングし (図 6 参照) 、確認し、さらに F A C S によって特徴付けた。この変更 E L I S P O T アプローチは、対照ウェルからのバックグラウンド応答が低かった (H - 2 b では 7.2 ± 0.2 I F N 産生 S F C / 106 脾臓細胞及び H - 2 d マウスでは 9.2 ± 0.5) ことから、極めて感度が高いことが判明した。図 4 A に示す結果は、 p M A R V を用いたワクチン接種が、 H - 2 b マウスにおいて 9 個の測定可能なエピトープを誘導し、 H - 2 d では 11 個、 p E B O S は 9 及び 8 個を誘導し、 p E B O Z はこれらの各株において 10 及び 12 個を生成した。 p M A R V で免疫化した H - 2 b マウス由来のエピトープ 9 個のうち 5 個 (55.6 %) は C D 8 + であったが、これらは E L I S P O T 及び F A C S 確認及び表現型分析の両方によって測定した合計 M G P 特異的 I F N + 応答の約 57.3 % を占めていた。同様に、確認したエピトープの 33 % 及び 38 % のみが、それぞれ p E B O S 免疫化 H - 2 b 及び H - 2 d マウスにおいて C D 8 拘束性であった。しかしながら、これらのエピトープは総応答のおよそ 50 ~ 90 % を占めていた；両方のマウス株で C D 8 + T 細胞応答はおよそ 56 % であると推定されたが、 F A C S 推定値は、 H - 2 b 及び H - 2 d マウスでそれぞれ 51 % 及び 90 % であった。総 C D 8 + 応答は、 p E B O Z ワクチン接種動物においてより低く、 33 % ~ 57 % (E L I S P O T により両株とも 33 % 、 F A C S により H - 2 b 及び H - 2 d マウスでそれぞれ 6 % 及び 57 %) と測定された。

【 0 1 9 5 】

最も高い準優位エピトープに対して少なくとも 2 倍の I F N 応答を生成したものを免疫優性エピトープと大まかに定義した場合、 p E B O S を与えた両マウス株において単一の

10

20

30

40

50

免疫優性エピトープが検出され；p M A R Vは、ペプチドM G P 2 5 - 3 9 (# 5)、M G P 6 7 - 8 1 (# 1 2)、M G P 1 8 1 - 1 9 5 (# 3 1)及びM G P 3 8 5 - 3 9 9 (# 6 5)内の4つのH - 2 b制限免疫優性C D 8 +エピトープ、ならびにM G P 1 5 1 - 1 7 1 (# 2 7)内のH - 2 d制限C D 4 +エピトープを誘導した。図4 B及び図4 Cに示すように、これらのエピトープのうちの4つは、M A R V G P 1の高度保存領域内に存在し、そのうちの3つは推定受容体結合ドメイン内に位置し、1つのみが可変ムチン様領域 (M G P 3 8 5 - 3 9 9 (# 6 5))内に存在していた。p E B O Sは、いずれもG P 1の高度保存領域である、H - 2 bマウス及びH - 2 dマウスにおけるそれぞれS U D V G P (S G P) 1 9 - 3 3 (# 4)及びS G P 2 4 1 - 2 5 5 (# 4 1)に存在するC D 8 +エピトープを刺激した。しかしながら、p E B O Z免疫感作は、H - 2 dマウスにおいて、それぞれ受容体結合ドメイン及びムチン様領域内に存在する3つの免疫優勢エピトープ (Z E B O V G P受容体結合ドメイン (G P) 1 3 9 - 1 5 3 (# 2 4)に位置するC D 8拘束エピトープ、ならびに2つのC D 4拘束エピトープZ G P 1 7 5 - 1 8 9 (3 0)及びZ G P 3 9 1 - 4 0 5 (# 6 6))を明らかにした。H - 2 bマウスでは、C D 4 +及びC D 8 +エピトープ (# 8 9)の両方を含み、G P 2の高度保存領域内に存在する1つの免疫優勢エピトープのみが定義された。全体として、多様なエピトープ階層は、各ワクチン群において一貫性及び再現性があった。さらに、図4 Dに示すように、準優位応答は総応答のかなりの割合を占めていた；改変E L I S P O Tアッセイによって測定した全A V E準優位応答は、p M A R V、p E B O S及びp E B O Zで免疫化したH - 2 bマウスではそれぞれおよそ1 2 %、6 2 %及び7 4 %であり、H - 2 dマウスにおける応答ではそれぞれ4 7 %、5 0 %及び3 4 %であった。

【0196】

最後に、同定したエピトープ含有ペプチドのみを含む最小限のペプチドプールでの刺激を用いて、F A C Sにより全G P特異的T細胞応答を測定した。ワクチン接種した動物のそれぞれにおいてロバストな応答が検出され、大部分の場合、活性化C D 4 +及びC D 8 +T細胞の両方が含まれていた。応答は、対照ペプチド (h - C l i p)でI F N 産生がほとんど観察されず、E L I S P O Tデータとよく相關したため、G P特異的であった。免疫化が、F A C Sによって測定されるC T Lを顕著に誘導しなかった唯一の例は、E L I S P O Tによって同定したエピトープがC D 8拘束性でないことが確認されたp M A R Vでワクチン接種したH - 2 dマウスであった。全体として、これらのデータは、各ワクチンプラスミドが、マウスにおいて高度に免疫原性であり、G Pの高度保存領域内の免疫優性エピトープを含む多様なT細胞エピトープのアレイを認識するロバストなG P特異的T細胞応答を生じたことを示す。さらに、エピトープ同定のための伝統的なマトリックスアレイペプチドプールを用いることで、本明細書で特徴づけられる高度に多様な準優位T細胞応答が見過ごされてきた可能性がある。

【0197】

F A C Sにより、それぞれのG Pに対してすべての陽性に同定されたペプチドを含む最小限のペプチドプールに対する反応性について、T細胞応答を測定した。図7 Aは、代表的な動物のD N Aワクチン誘発性T細胞応答を示し、I F N 産生C D 4 + (右)及びC D 8 + (左)細胞はゲーティングされていることを示す。F A C Sプロットを示す。h - C L I Pペプチド存在下でのインキュベーションは陰性対照(対照)として利用した。図7 Bは、図7 Aのゲーティング細胞の結果を総C D 4 4 + / I F N + C D 4 +またはC D 8 +細胞の平均%としてまとめたものであり、エラーバーはS E Mを表す。実験を少なくとも2回繰り返し、同様の結果を得た。

【0198】

マウスにおける「単回投与」の保護

次に、Z E B O Vチャレンジに対するワクチン効力を、前臨床マウスマルクスモデルにおいて評価した。強力なN A b誘導及び保護データが観察されたため、マウスには1回のみワクチン接種を行った。マウス (H - 2 k ; n = 1 0 / 群)を4 0 μ gのp E B O Z D N Aで免疫化し、2 8日後にB S L 4施設において1, 0 0 0 L D 5 0のマウス適合Z E B O V

10

20

30

40

50

(mZEBOV) でチャレンジして保護を評価した。チャレンジ後 7 日目までにすべての対照動物が感染により死亡したが、図 5 A は DNAワクチン接種したマウスが完全に保護されたことを示している (P = 0.0002)。さらに、図 5 B に示すように、対照マウスは、死亡まで体重の進行性の喪失を示した (P < 0.0001)。

【0199】

「単回投与」モデルにおける DNA誘導保護の機構をよりよく理解するために、次に NA b 及び T 細胞の生成を評価した。ワクチン接種の 25 日後、チャレンジの 3 日前に評価し、図 5 C に示すように、すべてのワクチン接種動物 (n = 10 / 群) において有意な (P < 0.0001) 増加が検出された。逆エンドポイント希釈力値は、19 ~ 42、27.3 ± 2.5 の範囲であった。

10

【0200】

次に、ZGP特異的 T 細胞の生成を評価し、pEBOZ 単独、または 3 価製剤で免疫したマウスにおける応答を比較するために分析の範囲を広げた。全 ZGPペプチドプールを使用する FACS により、11 日後に IFN- γ 産生 (n = 5) を評価した；データを図 5 D に示す。IFN- γ 産生 T 細胞はすべての動物で検出され、対照ペプチドによる刺激はサイトカイン産生を誘導しなかったため、ZGPペプチドに特異的であった。一価または三価製剤のいずれかによる免疫化は、ロバストな IFN- γ T 細胞応答を誘導し、これらは比較した場合、有意には異ならない P = 0.0920。

【0201】

CTL はウイルス感染細胞を除去する上で重要である可能性があるため (Warfield K L, et al. (2005). Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. J Immunol 175:1184-1191; Kalina WV, Warfield KL, Olinger GG, Bavari S (2009). Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model. Virology 36:132; Olinger GG, et al. (2005). Protective cytotoxic T-cell responses induced by venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins. J Virol 79:14189-14196; Sullivan NJ, et al. (2011). CD8(+) cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. Nat Med 17:1128-1131; 及び Geisbert TW, et al. (2010). Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in nonhuman primates. J Virol 84:10386-10394)、さらなるエフェクターサイトカイン、TNF、ならびに発育制限因子、Th1型 CTL 免疫及び細胞傷害性と関連することが知られている T ボックス転写因子 TBX21 (T-bet) を測定し、その結果は以下の通りであった。総細胞について：TNF 2.9 ± 0.8, Tbet 13.0 ± 1.1。CD4+/CD44+/IFN- γ + 細胞の場合：TNF 61.4 ± 3.1、Tbet 72.6 ± 2.0。CD8+/CD44+/IFN- γ + 細胞の場合：TNF 33.0 ± 3.3、Tbet 99.2.1 ± 1.4 (*p < 0.1; ***p < 0.001; ****p < 0.0001)。活性化 CD4+ 及び CD8+ T 細胞のそれぞれ約 61% 及び約 33% が IFN- γ に加えて TNF も産生することを見出した。さらに、大部分の IFN- γ 産生 T 細胞は高レベルの T-bet を発現した；CD8+ 及び CD4+ T 細胞のそれぞれ約 73% 及び 92% が CD44+ であり、ZGPペプチド刺激後に IFN- γ を産生した。

20

30

40

50

【0202】

図8A及び8Bは、「単回投与」ワクチン接種によるT細胞誘導を示す。FACSによって測定されるように、単一のpEBOZ免疫化、または別々の部位における3つのワクチンプラスミドが含まれる単一の3価ワクチン接種後のH-2^kマウスにおけるT細胞応答を(a)に示し、(b)CD4⁺/IFN⁺CD4⁺(紫色)またはCD8⁺(橙色)細胞のAVE%としてまとめる。擬似カラーFACSプロットは代表的な動物に由来し、IFN産生CD4⁺(右)及びCD8⁺(左)細胞をゲーティングする。h-CLIPペプチドとのインキュベーションは陰性対照(対照)として機能した。実験は2回を行い、同様の結果が得られた。エラーバーはSEMを表す；n.s.、有意性なし。

【0203】

10

考察

本発明者らは、前臨床げっ歯類の免疫原性及び有効性試験における多価・フィロウイルスワクチンの開発及び評価を報告する。モルモットでの2回のDNAワクチン接種及びmZEBOVに対するマウスでの「単回投与」DNAワクチン接種後に、gpMARP及びgpZEBOVによるチャレンジに対する完全な保護が観察された。今日まで、モルモットの遺伝子ワクチン接種には、裸のDNAの注射が含まれていた(Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang ZY, Nabel GJ (2000). Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408: 605-609) or DNA delivered by gene gun (Dowling W, et al. (2006). The influences of glycosylation on the antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Ebola virus GP DNA vaccines. *J Virol* 81: 1821-1837; Vanderzanden L, et al. (1998). DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* 246: 134-144; 及びRiemenschneider J, et al (2003). Comparison of individual and combination DNA vaccines for B. anthracis, Ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine* 21: 4071-4080)が、いずれの方法でも完全な保護を達成するために少なくとも3回のワクチン接種が必要であった。単一のDNAワクチン接種により、遺伝子銃投与後の保護動物の力価に匹敵するGP特異的IgG結合剤力価が生じたため、本明細書における保護の改善は、強力なAbの誘導によるものであり得る；DNAワクチン接種は、3回の遺伝子銃ワクチン接種後、2.7及び3.0に対して、単回投与後、それぞれ3.85及び2.18log10のZGP及びMGP特異的Ab力価を誘導した。モルモットにおける代替の「単回投与」保護戦略との比較のために、Ag-結合ウイルス様粒子(VLP)プラットフォームは、DNAワクチン接種後に観察されたものよりもわずかに高いAb力価を生成した(Swenson DL, Warfield KL, Negley DL, Schmaljohn A, Aman MJ, Bavari S (2005). Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine* 23: 3033-3042)。ウイルス様粒子は、エボラウイルス及びマールブルグウイルス感染の両方のための汎フィロウイルスワクチンとしての可能性を示す(Vaccine 23: 3033-3042)。さらに、組換えアデノウイルス(rAd)アプローチは、単一のDNAワクチン接種からのものよりも低いZGP特異的NAb力価を誘発した(エンドポイント希釈力価が、本明細書中の88に対して53個)(Kobinger GP, et al 50

.(2006). Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology* 346:394-401。rVSVを用いたワクチン接種(Jones SM, et al (2007). Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S404-412)は、現在のプラットフォームに類似したZGP特異的Ab力を生成した。全体として、これらのデータは、DNAワクチン接種が、非複製ウイルスプラットフォームに匹敵するAbsの結合及び中和を誘導することができ、これらのデータが本明細書中の強いモルモット生存データを部分的に説明するのに役立ち得ることを示す。

【0204】

保護DNAワクチン接種によるNAbの生成は、導入遺伝子を発現した成熟GP構造によって恩恵を受けていた可能性がある。in vitro形質移入試験により、ワクチンにコードされたGPは高度に発現し、翻訳後に切断され(図1B)、細胞表面に輸送され、細胞表面分子の免疫検出を立体的に閉塞したことが確認された(図1C)。したがって、本明細書において形成されたワクチン免疫原は、他の点では感染時にビリオン集合体上で機能するであろうヘテロ三量体スパイクに成熟した可能性が高い。これは、コンホーメーション依存性Nabの誘導にその後重要であるウイルス学的に関連する中和決定基の生成及び表示にとって重要であり得る(Dowling W, et al. (2007). Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. *J Virol* 81:1821-1837; Shedlock DJ, Bailey MA, Popernack PM, Cunningham JM, Burton DR, Sullivan NJ (2010). Antibody-mediated neutralization of Ebola virus can occur by two distinct mechanisms. *Virology* 401:228-235)。したがって、この点に関して、ネイティブのアンカー構造の発現は、NAbを生成する能力において、可溶性誘導体よりも優れている可能性がある(Sullivan NJ, et al. (2006). Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPS. *PLoS Med* 3:e177; Xu L, et al. (1998). Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med* 4:37-42)。

【0205】

保護ワクチンによって駆動されるT細胞応答をよりよく特徴づけるために、マウスで免疫原性及び有効性試験を行い、DNAワクチン接種によるmZEBOVに対する完全な「単回投与」保護を決定した(図5A~5D)。今まで、このモデルにおいて完全な保護を与える最も有効なプラットフォームは、アジュバントあり(Warfield KL, et al. (2005). Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. *J Immunol* 175:1184-1191; Warfield KL, Swenson DL, Olinger GG, Kalina WV, Aman MJ, Bavari S (2007). Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S430-437)、またはアジュバントなし(Sun Y, e

t al. (2009). Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. *Virology* 383:12-21)のVLP、rAdワクチン接種((Kobinger GP, et al. (2006) 上記; Choi JH, et al. (2012). A single sublingual dose of an adenovirus-based vaccine protects against lethal Ebola challenge in mice and guinea pigs. *Mol Pharm* 9:156-167; Richardson JS, et al. (2009). Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One* 4:e5308)、またはrRABVワクチン接種(Blaney JE, et al. (2011). Inactivated or live-attenuated bivalent vaccines that confer protection against rabies and Ebola viruses. *J Virol* 85:10605-10616)である。しかしながら、T細胞応答の特徴付けは、これらの研究では著しく制限されており、上記のZGP T細胞エピトープを含むことが以前に記載された2つ(Warfield KL, (2007)、上記)または1つ(Warfield KL, et al. (2005)上記)のいずれかのペプチドの脾細胞刺激に限定されていた。(Warfield KL, et al. (2005)上記。Olinger GG, et al. (2005)上記; Kobinger GP, et al. (2006)、上記; Sun Y, et al. (2009). Choi, JH, et al. (2012)。本明細書では、新規変異T細胞アッセイ(図4A及び表1~6)によって広範に分析されるように、保護ワクチン接種によるロバストで広範なCTLの誘導を報告する。GPの高度保存領域に主に存在する多数の免疫優性エピトープを含む、合計52の新規T細胞エピトープを同定した。同定した全22個のZGPエピトープのうち、わずか4個のみが以前に報告されたものであった。さらに、20個のMGPのうち1つ(Kalina WV, Warfield KL, Olinger GG, Bavari S (2009). Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model. *J Virol* 83:132)及び16のSGPエピトープのうちの1つが以前に記載されたものであった。このように、本明細書は今までの前臨床GPエピトープの最も包括的な報告であり、2つの異なる遺伝的バックグラウンドのマウスの複数のフィロウイルス由来のGPエピトープを記載している。

【0206】

これらの分析から得られた別の新規な知見は、ワクチン誘導性の副甲状腺T細胞応答の評価であり、これは広範なT細胞応答のかなりの割合を占め、広範に12%~74%の範囲であった(図4D)。準優位応答は、保護に大きく貢献することができるため、これは特に重要であり得る。したがって、保護に対する準優位及び免疫優性のエピトープT細胞応答の特異的寄与を決定することは将来的に有益であることを示している可能性がある。注目すべきことに、エピトープ同定のための伝統的なマトリックスアレイペプチドプールを使用して、これらの応答が見過ごされてきた可能性がある。したがって、以前の研究における限定されたエピトープ検出は、低レベルのワクチン誘発免疫、低感度標準アッセイの使用、及び/または免疫優性CD8+エピトープの検出に有利なペプチド配列及び/またはアルゴリズムの使用に直接関連している可能性がある。

【0207】

フィロウイルスに対する免疫相関の議論は依然として議論の余地があるが、この高度に免疫原性のアプローチによって生成されるデータは、保護ワクチンによって引き起こされるT細胞免疫を研究するユニークな機会を提供する。本明細書のDNAワクチン接種は、強力なZGP特異的T細胞を誘導し、その大部分は、ヒトにおいてT細胞の細胞傷害性と相

10

20

30

40

50

関することが示された高レベルの T - b e t を発現する T h 1 型多機能性 C T L を特徴とする。主に液性免疫応答及び C D 4 + T 細胞に偏った細胞性免疫を生成することができる以前のスタンドアローン D N A ワクチンプラットフォームは、 N H P 及び臨床において強力な C D 8 + T 細胞を誘導することが最近示された i n v i v o E P 送達の利点を得られる可能性がある。したがって、本明細書のデータは、 N H P 免疫原性及び有効性試験におけるスタンドアローンまたはプライムブースト様式としての本アプローチと一致する。本アプローチは、フィロウイルス科の生物脅威の状況及びアウトブレイク中の迅速な対応のために、迅速かつ安価に改変及び / または生産することができる、魅力的なワクチン接種戦略を提供する。さらに、本モデルアプローチは、フィロウイルス疾患に対する保護免疫相関を研究するための重要なツールを提供し、既存のプラットフォームに適用して将来の戦略を導くことができる。

10

【 0 2 0 8 】

実施例 2

3 つのプラスミドを含む 3 値ワクチンを提供する。第 1 のプラスミドは、ザイールエボラウイルスコンセンサス免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した、 Z E B O V C O N (配列番号 1) に基づくザイールエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 2 のプラスミドは、スーダンエボラウイルスコンセンサス免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した、 S U D V C O N (配列番号 2) に基づくスーダンエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 3 のプラスミドは、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ (M A R V A N G) (配列番号 3) に基づく M A R V 免疫原であって、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した M A R V 免疫原) をコードする核酸配列を含む。

20

【 0 2 0 9 】

実施例 3

5 つのプラスミドワクチンを提供する。第 1 のプラスミドは、 Z E B O V C O N 、配列番号 1 であるザイールエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 2 のプラスミドは、 S U D V C O N 、配列番号 2 であるスーダンエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 3 のプラスミドは、マールブルグマールブルグウイルスラビン、ダーバ (0 9 D R C 9 9) 及びウガンダ (0 2 U g a 0 7 Y) を用いる、配列番号 4 、マールブルグマールブルグウイルス - ラビンクラスター - コンセンサス (M A R V - R A V C O N) をコードする核酸配列を含む。第 4 のプラスミドは、オゾリン、ウガンダ (0 1 U g a 0 7) 、及びダーバ (0 5 及び 0 7 D R C 9 9) を用いる、配列番号 5 、マールブルグマールブルグウイルス - オゾリンクラスター - コンセンサス (M A R V - O Z O C O N) をコードする核酸配列を含む。第 5 のプラスミドは、 (M u s o k e 、 P o p p 、及び L e i d e n) を用いる、配列番号 6 、マールブルグマールブルグウイルス - M u s o k e クラスター - コンセンサス (M A R V - M U S C O N) をコードする核酸配列を含む。

30

【 0 2 1 0 】

実施例 4

5 つのプラスミドワクチンを提供する。第 1 のプラスミドは、ザイールエボラウイルスコンセンサス免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した、 Z E B O V C O N (配列番号 1) に基づくザイールエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 2 のプラスミドは、スーダンエボラウイルスコンセンサス免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した S U D V C O N (配列番号 2) に基づくスーダンエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 3 のプラスミドは、配列番号 4 に基づくマールブルグマールブルグウイルス R a v コンセンサスをコードする核酸配列、マールブルグマールブルグウイルスラビン ダーバ (0 9 D R C 9 9) 及びウガンダ (0 2 U g a 0 7 Y) を用い、コンセンサスマールブルグマールブルグウイルス - R a v 免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した

40

50

、マールブルグマールブルグウイルス - ラビンクラスターコンセンサス (M A R V - R A V C O N) を含む。第 4 のプラスミドは、オゾリン、ウガンダ (0 1 U g a 0 7) 、及びダーバ (0 5 及び 0 7 D R C 9 9) を用いるマールブルグマールブルグウイルス - オゾリンクラスターコンセンサス (M A R V - O Z O C O N) である配列番号 5 に基づくマールブルグマールブルグウイルス O z o コンセンサスをコードし、コンセンサスマールブルグマールブルグウイルス - O z o 免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した核酸配列を含む。第 5 のプラスミドは、配列番号 6 に基づくマールブルグマールブルグウイルス M u s コンセンサス、(M u s o k e 、 P o p p 、 及び L e i d e n) を用い、コンセンサスマールブルグマールブルグウイルス - M u s 免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変したマールブルグマールブルグウイルス - M u s o k e クラスターコンセンサス (M A R V - M U S C O N) をコードする核酸配列を含む。

【 0 2 1 1 】

実施例 5

6 つのプラスミドワクチンを提供する。第 1 のプラスミドは、Z E B O V C O N 、配列番号 1 であるザイールエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 2 のプラスミドは、S U D V C O N 、配列番号 2 であるスーダンエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 3 のプラスミドは、マールブルグマールブルグウイルス - ラビン、ダーバ (0 9 D R C 9 9) 及びウガンダ (0 2 U g a 0 7 Y) を用いる、配列番号 4 、マールブルグマールブルグウイルス - ラビンクラスターコンセンサス (M A R V - R A V C O N) をコードする核酸配列を含む。第 4 のプラスミドは、オゾリン、ウガンダ (0 1 U g a 0 7) 、及びダーバ (0 5 及び 0 7 D R C 9 9) を用いる、配列番号 5 、マールブルグマールブルグウイルス - オゾリンクラスターコンセンサス (M A R V - O Z O C O N) をコードする核酸配列を含む。第 5 のプラスミドは、(M u s o k e 、 P o p p 、 及び L e i d e n) を用いる、配列番号 6 、マールブルグマールブルグウイルス - M u s o k e クラスターコンセンサス (M A R V - M U S C O N) をコードする核酸配列を含む。第 6 のプラスミドは、配列番号 3 、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ 2 0 0 5 単離糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む。

【 0 2 1 2 】

実施例 6

5 つのプラスミドワクチンを提供する。第 1 のプラスミドは、ザイールエボラウイルスコンセンサス免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した、配列番号 1 の Z E B O V C O N に基づくザイールエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 2 のプラスミドは、スーダンエボラウイルスコンセンサス免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した、配列番号 2 の S U D V C O N に基づくスーダンエボラウイルスコンセンサス免疫原をコードする核酸配列を含む。第 3 のプラスミドは、配列番号 4 に基づくマールブルグマールブルグウイルス R a v コンセンサス、マールブルグマールブルグウイルスラビン ダーバ (0 9 D R C 9 9) 及びウガンダ (0 2 U g a 0 7 Y) を用いるマールブルグマールブルグウイルス - ラビンクラスタークラスターコンセンサス (M A R V - R A V C O N) をコードし、コンセンサスマールブルグマールブルグウイルス - R a v 免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変した核酸配列を含む。第 4 のプラスミドは、配列番号 5 に基づくマールブルグマールブルグウイルス O z o コンセンサス、オゾリン、ウガンダ (0 1 U g a 0 7) 、及びダーバ (0 5 及び 0 7 D R C 9 9) を使用するマールブルグマールブルグウイルス - オゾリンクラスタークラスターコンセンサス (M A R V - O Z O C O N) をコードし、コンセンサスマールブルグマールブルグウイルス - O z o 免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変された核酸配列を含む。第 5 のプラスミドは、配列番号 6 に基づくマールブルグマールブルグウイルス M u s コンセンサス、(M u s o k e 、 P o p p 、 及び L e i d e n) を用いる、マールブルグマールブルグウイルス - M u s o k e クラスタークラスターコンセンサス (M A R V - M U S C O N) をコードし、コンセンサスマールブルグマールブルグウイルス - M u s 免疫原の N 末端に I g E シグナルペプチドを含むように改変された核酸配列を含む

10

20

30

40

50

。第6のプラスミドは、マールブルグマールブルグウイルスアンゴラ免疫原のN末端にIgEシグナルペプチドを含むように改変したM A R V A N G、配列番号3に基づくマールブルグマールブルグウイルスアンゴラ2005単離糖タンパク質免疫原をコードする核酸配列を含む。

【0213】

実施例7

本明細書において、3つの合成ザイールエボラウイルス(EBOV)糖タンパク質(GP)を発現するDNAワクチン製剤を記載する: GP配列アラインメント(1976-2014)に基づいて設計した2つと、2014のアウトブレイク株に適合する第3のコンストラクト。プラスミドIL-12(pIL-12)もまた、細胞性免疫応答をさらに増強するためのアジュバントとして含めた。多価GP DNAワクチン製剤を、DNA-DNAプライムブースト免疫化レジメンに従ってマカクに投与した。マカク(n=3または4/群)には、筋肉内送達及びその後の電気穿孔法によって多価GP DNA製剤+pIL-12を与えた。免疫原性の差異をアッセイし、異なる用量、レジメン(2、3、4、及び5回の注射)、及びその後の投与の間の異なる間隔での保護をモニタリングした。抗体及びT細胞応答の両方が、第1回注射の2週間後の動物の83%及び第2回注射後の動物の100%で観察された。マカクに、致死量のEBOVギニア・マコーナアウトブレイク株(1000pfu、7-Uウイルス)をチャレンジし、感染後28日間モニタリングした。4週間の間隔で少なくとも3回の注射を受けた動物の100%が致命的なチャレンジを生き延びた。動物は病気の徴候から完全に保護され、血液化学の上昇を示さなかった。興味深いことに、2回の注射を受けた動物の50%が致命的なチャレンジで生き残った。生存動物は病気の徴候を最小限に抑え、さらなる最適化により、2回の注射による完全な保護が潜在的に達成可能であることが示唆された。マウスにおけるさらなる最適化研究では、単回注射が100%保護的であり、ワクチン接種後8か月の長期免疫反応を誘発したことが判明した。

【0214】

方法

EBOV GP DNAワクチン製剤の開発

現在臨床試験中のワクチンには、rVSV G/Z EBOV GP、ChAd3プライム+MVAブースト、及びMVA汎フィロウイルスが含まれる。これらのワクチンは免疫原性であり、非ヒト霊長類(NHP)で保護され、単回投与保護を提供するが、抗ベクター免疫を発達させ、記憶応答の持続時間が不確定であり、ヒト臨床試験において有害反応をもたらし、すべての集団に適してはいない可能性がある。したがって、異種ザイールエボラウイルスに対する強い免疫応答を誘導することができる、よりクリーンな安全特性を有する追加のプラットフォームは、非常に有益であろう(図9)。

【0215】

3つのEBOV DNA構築物を設計した: Z E B O V (1976-1996)(Con EBOV GP #1)、Z E B O V (2002-2008)(Con EBOV GP #2)、及び2014年のギニアアウトブレイク(ギニアGP)からの一致したZ E B O V配列のコンセンサス配列。5つのワクチン、単一のDNA構築物のみを含む一価ワクチン、Con EBOV GP #1とギニアGPの二価ワクチン製剤、ならびにCon EBOV GP #1、Con EBOV GP #2、及びギニアGPの3つすべてを含む三価製剤(図10)。

【0216】

結果

DNAワクチンの単回免疫化はマウスにおいて免疫原性である

ワクチン製剤の電気穿孔(EP)に続いて、BALB/cマウスに単一の筋肉内(IM)免疫化を与えた。28日目に、全IgG抗体価及びELISPOT-IFNを測定した。各ワクチン製剤は、ロバストなIgG応答を生じた。IFN、IL2、及びTNFを分泌する多機能CD4+及びCD8+T細胞は、すべてのワクチン及び製剤について同様であった(図11)。

10

20

30

40

50

【0217】

マウスの致死的マウス適応エボラウイルスチャレンジに対して、単一免疫化は完全に保護的である

二価または三価のワクチン製剤で免疫した B A L B / c マウスに、 1 0 0 0 L D 5 0 の異種エボラウイルスで致死的チャレンジを行った。チャレンジ株はマウス適応型 E b o l a M a y i n g a 1 9 7 6 であった。対照プラスミド p V a x 1 でワクチン接種したマウスは急速に体重を減少させ、 7 日目には生存していなかった。しかしながら、 2 値ワクチン製剤接種マウス及び 3 値ワクチン製剤接種マウスは、 最大 2 0 日目まで死亡したマウスはなかった（図 1 2 ）。

【0218】

個々の G P D N A ワクチン構築物は、 マウスにおいてロバストな記憶応答を誘導する。 B A L B / c マウスに、 一価ワクチンの 3 × I M 4 0 μ g 免疫化、 続いて 0 、 2 8 及び 8 4 日の電気穿孔を与えた。 I g G 抗体価、 I N F 、 C D 4 + C D 4 4 + 記憶 T 細胞、 及び C D 8 + C D 4 4 + 記憶 T 細胞を測定した。ロバストな免疫応答は、 最後の注射後数か月で検出可能であった（図 1 3 ）。

10

【0219】

G P D N A ワクチン製剤は、 N H P において免疫原性である

カニクイザルは、 エボラワクチンの有効性と致死的チャレンジのモデルであるため、 これを N H P として使用した。カニクイザルには、 R h e s u s p I L 1 2 アジュvant とともに二価製剤、 または R h e s u s p I L 1 2 アジュvant I . M . とともに三価製剤のいずれかを投与し、 続いて E P を投与した。免疫原性を理解するための異なる注射レジメン。グループ 1 には、 4 週間間隔で 2 値製剤の 2 回の I M - E P 注射を与えた。グループ 2 には、 4 週間間隔で 3 値製剤の 2 回の I M - E P 注射を与えた。グループ 3 には 3 値製剤の 3 回の I M - E P 注射を与えた。免疫原性試験のための試料は、 毎月採取し、 最後の投与後 1 か月間採取した。（図 6 ）。各 D N A ワクチン製剤は、 ロバストな抗エボラ G P 抗体応答（ G M T > 1 0 3 ）及び抗 G P T 細胞応答を誘導した。各注射後に免疫応答を増強した（図 1 4 ）。

20

【0220】

G P D N A 製剤ワクチンは、 致命的なザイールエボラウイルス（マコーナ）チャレンジから保護する

30

グループ 1 、 2 及び 3 由来のカニクイザルに、 最終的な D N A 免疫化から投与 2 8 日後の 1 0 0 0 T C I D 5 0 ギニア - マコーナ 2 0 1 4 C 0 7 ウィルス（ 7 - U 参照株）をチャレンジした。チャレンジ後 2 8 日間、 動物をモニタリングした。チャレンジ後 1 0 日目に、 対照動物が生存していなかったのに対し、 チャレンジ後 2 8 日目にグループ 3 動物の 4 / 4 が生存し、 チャレンジ後 2 8 日目にグループ 2 動物の 4 / 8 が生存し、 チャレンジ後 2 8 日目にグループ 1 動物の 3 / 4 が生存した。（図 1 5 ）。生存動物には重大な疾患の徵候はなかった。それらはまた、 正常な C B C 及び酵素レベルを維持していた。 I M - E P によって送達される二価及び三価の D N A ワクチンは、 最終的な D N A 注射後 3 か月以上検出可能な長期抗体及び T 細胞応答を誘発する（図 4 3 ）。

40

【0221】

三価 E B O V G P D N A ワクチンの 3 用量は、 致死的 E B O V チャレンジに対して 1 0 0 % 保護性である。 2 値の E B O V G P D N A ワクチンを 2 回投与すると 7 5 % の保護効果が得られる。全体として、 データは、 エボラ及び他の感染性病原体に対する可能な投与のために、 I M - E P によって送達される D N A ワクチンのさらなる研究を支持する。

【0222】

E B O V - 0 0 1 相 I 臨床

I N O - 4 2 1 2 の非盲検試験（ I N O - 9 0 1 2 の存在下または非存在下）を実施した。 I N O - 4 2 1 2 を I M または I D で投与した後、 健康なボランティアで電気穿孔を行った。安全性及び免疫学的評価をモニタリングした。皮内送達及び筋肉内送達を比較した。被験者は合計 6 9 人であった。免疫化の前、 ならびに 2 、 6 、 及び 1 4 週において、 E

50

L I S A 分析を行った(ベースライン)。血清学的検査は、エボラ・ザイール糖タンパク質に対する陽性 I g G 抗体応答として定義される。

【0223】

I N O - 4 2 0 1 は、1976年、1994年、1995年、1996年、2003年、2005年、2007年及び2008年のアウトブレイク株のエンベロープ糖タンパク質配列を用いて生成され、ウシ成長ホルモンの3'末端ポリアデニル化シグナル(b G H ポリ A)を有するヒト C M V プロモーター(h C M V プロモーター)によって駆動されるザイールエボラウイルス(C o n E B O V G P # 1)のコンセンサスエンベロープ糖タンパク質で製剤化した D N A ワクチンである。 p G X 4 2 0 1 は、ザイールエボラウイルスの合成コンセンサスエンベロープ糖タンパク質遺伝子を B a m H I 及び X h o I 部位で p G X 0 0 0 1 にクローニングすることによって作製した。

10

【0224】

1976年、1994年、1995年、1996年、2003年、2005年、2007年及び2008年のアウトブレイク株のエンベロープ糖タンパク質配列を用いて、ザイールエボラウイルスのコンセンサスエンベロープ糖タンパク質配列を生成することにより、 C o n E B O V G P # 1 (C o n G P 1) 配列を構築した。簡潔に述べると、1976年、1994年、1995年、1996年、2003年及び2005年のアウトブレイク株の6つのエンベロープ配列に基づいて、コンセンサス G P 配列を最初に生成した。2003年、2005年、2007年及び2008年の株が、公開された配列データで最も最近の致死的なアウトブレイクであったため、その後、これらにおいて、377、430及び440位の3つの非コンセンサス残基を加重した。選択したアウトブレイク株 G P 配列の G e n B a n k アクセション番号は：Q 0 5 3 2 0 、 P 8 7 6 7 1 、 A A C 5 7 9 8 9 、 A E K 2 5 4 9 5 、 A B W 3 4 7 4 3 、 P 8 7 6 6 6 、 A E R 5 9 7 1 8 、 A E R 5 9 7 1 2 、 A B W 3 4 7 4 2 、 A A L 2 5 8 1 8 である。コンセンサス G P 1 配列を得た後、上流のコザック配列を N 末端に付加した。さらに、より高いレベルで発現させるために、この遺伝子のコドン使用を、ホモサピエンス遺伝子のコドンバイアスに適合させた。さらに、非常に高い(> 80%)または非常に低い(< 30%) G C 含量及び内部 T A T A ボックス、カイサイト及びリボソーム進入部位などのシス作用配列モチーフを回避した R N A 最適化もまた実施した。合成した C o n G P 1 を B a m H I 及び X h o I で消化し、発現ベクターにクローニングした。

20

【0225】

I N O - 4 2 0 2 は、ヒト C M V プロモーター(h C M V プロモーター)により駆動され、ウシ成長ホルモンの3'末端アデニル化シグナル(b G H ポリ A)ポリ - H C M V プロモーターによって駆動され、ギニア(ギニア G P)における2014アウトブレイクから単離したザイールエボラウイルスのエンベロープ糖タンパク質を発現する D N A プラスミドで製剤化した D N A ワクチンである。

30

【0226】

I N O - 4 2 1 2 は、I N O - 4 2 0 1 及び I N O - 4 2 0 2 の二価ワクチンである。

【0227】

図17は、各コホートのワクチン製剤スケジュール、経路及び用量を示す。最初の注射後、患者の15%以下が血清陽性であった。2回目の注射後、患者の50~100%が血清陽性であった。3回目の注射後、患者の79~100%が血清陽性であった(図18)。中等度 I F N E L I S p o t または高度 I F N E L I S p o t を有する2人の代表的な患者が特異的な T 細胞応答を示した(図19)。

40

【0228】

N I A I D V R C / G S K 及び r V S V / Z E B O V G P を含む他のエボラワクチンプラットフォームは現在臨床試験中であるが、本明細書に記載される現在の二価及び三価ワクチンは、他のワクチンプラットフォームでは認められない利点を有する。例えば、二価または三価のワクチンは I M または I D で投与することができ、他のワクチンプラットフォームは I M のみを投与する。重要なことに、N I A I D V R C / G S K 及び r V S V

50

/ Z E B O V G P は、発熱、疲労、関節痛及びリンパ球減少を含む副作用を示すが、二価及び三価ワクチンは副作用を示さない。しかしながら、r V S V / Z E B O V G P 及び C h A d 3 / M V A G P の副作用のいくつかは、エボラの症状と重複することに留意すべきである。さらに、二価及び三価のワクチンは、r V S V / Z E B O V G P 及び C h A d 3 / M V A G P より 1 ~ 2 衍大きい抗体力値を与える（図 20）。

【0229】

C E L L E C T R A (登録商標) - 3 P 装置を用いて、2 mg DNA / 用量で 2 回の別々の 1 mg (0.1 mL) ID (Mantoux) 注射として I N O - 4 2 0 1 を投与し、続いて E P を投与するように被験者 (n = 15) を割り当てた。被験者には、0 週目、4 週目、及び 12 週目 (0 - 4 - 12 週スケジュール) に免疫化する 3 回投与系列を与えた。E B O V 糖タンパク質 (G P) に特異的な抗体を、ワクチン接種した被験者の血清から結合 E L I S A で測定した。0 日目を上回る逆エンドポイント力値を、各免疫化の 2 週間後に示す（図 22）。I N O - 4 2 0 1 でワクチン接種した被験者の 100% が、2 回の免疫化の後に抗体陽転した（図 22、コホート 3 及び図 24）。

10

【0230】

実施例 8

実施例 7 に記載の 3 つの E B O V DNA 構築物に対する免疫応答データを記載する：Z E B O V (1976 - 1996) (C on E B O V G P # 1 または I N O - 4 2 0 1)、Z E B O V (2002 - 2008) (C on E B O V G P # 2) のコンセンサス配列、及び 2014 年のギニアアウトブレイクからのマッチ Z E B O V 配列 (ギニア G P)。5 つのワクチン、単一の DNA 構築物のみを含む一価ワクチン、いずれかの C on E B O V G P # 1 とギニア G P を含む二価ワクチン製剤、ならびに C on E B O V G P # 1、C on E B O V G P # 2、及びギニア G P の 3 つすべてを含む三価製剤を開発した。コホート 1 ~ 5 の 69 名の被験者を、E L I S A による免疫応答の分析に含め、コホート 1 ~ 5 の 75 名の被験者を、E L I S p o t による免疫応答の分析に含めた（図 21、25）。

20

【0231】

コホート及び時間点による E L I S A 力値

抗 E B O V R の力値を、第 2、6 及び 14 週で各コホートについて測定した。第 6 週までに、各コホートは、0 日目を上回る抗体力値の増加が認められた（図 22 ~ 23）。各コホートの初回投与の反応性はほとんどまたは全くなかった。用量 2 は抗体陽転を開始し、コホート 3 及び 5 は最大の頻度を示す。3 投与は 4 / 5 コホートを > 90% 抗体陽転させる。コホート 3 及び 5 は、この時点で 100% の抗体陽転を示す（図 24）。

30

【0232】

ペプチドプールによる被験者応答

コホート応答をペプチドプールによって分析した（図 26 ~ 33）。E L I S p o t 異常値を分析するために、各プールの第 0 日の値及び総 E B O V 応答を使用して異常値の閾値（平均日 0 値 + (0 日の 3 × S T D E V)）を作成した。この閾値は、正規分布した母集団の 99% を包含すべきである。異常値の閾値より大きいベースライン値を表示した被験者はすべて除去し、残りの被験者とともに応答基準を生成した。

40

【0233】

I C S 分析

全コホートからの 47 人の被験者を分析に含めたが、コホート 5 は不十分であった（図 35）。ベースライン及び 14 週目に I C S 分析を行った。プール 1 ~ 4 からなる単一の E B O V ペプチドプールを刺激に使用する。C D 4 及び C D 8 区画の両方からの I F N g または T N F a 産生の形態での T 細胞活性の分析は、コホート 3 のみでの T N F 及び / または I F N g の上昇と同様に C D 4 及び C D 8 区画の両方における T N F の有意な上昇を示唆する (Wilcoxon 整合ペア分析、両側)。

【0234】

免疫のまとめ

コホート 3 (ID) 患者の 100% が、2 回の投与後に抗体陽転した。コホート 5 (IM

50

+ I L 1 2) 患者の 9 2 % が 2 回投与後に抗体陽転し、3 回投与後に 1 0 0 % 抗体陽転した。他のコホートは、2 回の投与後には最高で 6 7 % を示し、3 回の投与後には 9 3 % の高さに及んだ。

【 0 2 3 5 】

すべての患者を分析すると：最良の応答頻度はコホート 2 及び 4 であり、それぞれ 5 3 % 及び 5 7 % であった。コホート 3 は 4 0 % の反応を示した。コホート 5 における I L - 1 2 の添加は応答率 (4 7 %) に影響しないようであった。外れた 8 個の異常値を除外した患者を分析すると、応答頻度は、コホート 2 及びコホート 4 で、それぞれ 8 4 . 6 % 及び 7 6 . 9 % であった。コホート 3 は 6 4 . 3 % の反応を示した。コホート 5 における I L - 1 2 の添加は、奏効率に影響しないようであった (5 3 . 3 %) 。

10

【 0 2 3 6 】

C D 4 及び C D 8 T 細胞の両方は、コホート 3 において T N F a 及び T N F a 及び / または I F N g の高い発現を示した (ベースラインに対して統計学的に有意であり、 W i l co x o n マッチペア試験、両側) 。

【 0 2 3 7 】

I N O - 4 2 0 1 による免疫化は健康なボランティアで十分に許容され、グレード 3 またはグレード 4 の S A E は認められなかった。I N O - 4 2 0 1 はロバストなエボラ G P 特異的抗体 (G M T 4 6 , 9 6 8) を誘導し、I N O - 4 2 0 1 の 2 回の投与の後の結合 E L I S A 測定による 1 0 0 % の抗体陽転をもたらした。I N O - 4 2 0 1 の投与は、インターフェロン (I F N) E L I S p o t (1 0 6 個の P B M C 当たり 2 9 5 . 3 S F U) によって評価される E B O V G P 特異的 T 細胞応答を生じ、 C D 8 + T 及び C D 4 + T 細胞区画の両方における I F N または T N F の産生の有意な増加を生じた。 C e l l e c t r a 装置を用いた I N O - 4 2 0 1 の皮内投与は、液性及び細胞性 E B O V G P 特異的イムノアッセイの両方によって評価されるように、忍容性及び免疫原性の両方が優れている。これらの結果は、I N O - 4 2 0 1 が予防的エボラワクチンのさらなる臨床開発の強力な候補であることを示している。

20

【 0 2 3 8 】

実施例 9 - 筋内電気穿孔により送達するザイールエボラウイルス (E B O V) G P D N A ワクチンの投与後のカニクイザルにおける持続的な液性及び細胞性免疫応答

本明細書において、清潔な安全性特性を有し、かつ血清に依存せず、可能な反復ベクター投与を可能にする新規エボラウイルス疾患 (E V D) D N A ワクチンを提示する。3 つの新規合成ザイールエボラウイルス (E B O V) G P D N A ワクチンを設計し、2 倍または 3 倍製剤を開発した。両方の E B O V - G P D N A ワクチンは、カニクイザルにおける致死的 E B O V マコーナ C 0 7 チャレンジに対して高度に保護的 (7 5 ~ 1 0 0 %) であった。異なるレジメンの動物 (n = 4 ~ 5 / 群) を追跡し、 D N A 免疫後の長期間の免疫原性をモニタリングした。すべての N H P は迅速に抗体陽転した。N H P は、 I F N 、 I L 2 、及び T N F を発現する多機能性 C D 4 及び C D 8 T 細胞及び記憶サブセット集団 (図 4 7 ~ 5 9) における応答を含む E B O V G P 抗原に対する耐性全 I g G 抗体力価及び T 細胞応答を有する。同時に、データは強力な記憶免疫応答の生成と保護のための E B O V - G P D N A ワクチンの供給を強く支持している。

30

【 0 2 3 9 】

E B O V - G P D a n ワクチンは、長期免疫応答を誘発し、1 年間の追加免疫後に強いリコール応答を示す (図 4 9 ~ 5 0) 。単回の I M 注射を与えた群では、リコール反応が顕著に高かった (図 5 0) 。

40

【 0 2 4 0 】

実施例 1 0

ペプチド配列及びペプチドの核酸配列をここに提示する。

50

【表1】

表1
プラスミドワクチンpMARV
GP配列MARV ANG

ペプチド番号	配列	配列番号	位置	ELISPOT H-2 AVE \pm SEM			FACS T細胞 制限
3	IQGVKTLPILEIASN	7	13-27	d	62	34	4+
5	ASNIQPQNVDSVCSG	8	25-39	b	743	186	8+
12	SKRWAFRAGVPPKNV	9	67-81	b	694	204	4+
27	GKVFTEGNIAAMIVN	10	157-171	d	602	75	4+
28	GNIAAMIVNKTVHKM	11	163-177	b/d	126	28	8+
	GNIAAMIVNKTVHKM	12		d	30	10	4+
29	IVNKTVHKMIFSRQG	13	169-183	d	92	17	4+
30	HKMIFSRQQGQGYRHM	14	175-189	d	31	10	4+
31	RQQGQGYRHMNLSTSN	15	181-195	b	674	112	8+
32	RHMNLSTSNKWTSS	16	187-201	b	44	16	8+
65	LPTENPTTAKSTNST	17	385-399	b/d	398/16	107/2	4+
71	PNSTAQHLVYFRRKR	18	421-435	d	29	6	4+
72	HLVYFRRKRNLWRE	19	427-441	d	145	18	4+
89	GLSWIPFFGPGIEGL	20	529-543	b	26	8	4+
92	GLIKNQNNLVCRLLRR	21	547-561	d	29	10	4+
93	NNLVCRLLRRLANQTA	22	553-567	d	34	13	4+
97	TTEERTFSLINRHAI	23	577-591	b	46	18	8+
99	HAIDFLLARWGGTCK	24	589-603	d	63	12	4+
101	TCKVLGPDCIGIED	25	601-615	b	97	37	4+

エピトープ含有ペプチドを、 IFN ELISPOT (10 の SFC / 10⁶ 脾細胞及び 80 の応答率) によって同定し、 FACS により確認した (3 ~ 5 × 10⁴ CD 3+ 細胞を獲得した)。それぞれの応答を、 FACS によってさらに特徴づけた (CD 3+ / CD 44+ / IFN + 細胞による CD 4 及び / または CD 8 の発現)。予想される CD 8+ エピトープに下線を付し (IEDB による最も高いコンセンサス % ランク)、前述のエピトープを参照する。免疫優勢エピトープを示す (*) 。

10

20

30

40

50

【表2】

表2
 プラスミドワクチンpEBOS
 GP配列 SUDV CON

ペプチド番号	配列	配列番号	位置	ELISPOT H-2 AVE ±SEM			FACS T細胞制限
4	FFVWVIIILFQKAFSM	26	19-33	b	310	139	8+
15	RWGFRSGVPPKVVSY	27	85-99	b	108	59	4+
19	YNLEIKKPDGSECLP	28	109-123	b	55	25	4+
24	HKAQGTGPGCPGDYAF	29	139-153	d	13	3	8+
27	GAFFLYDRLASTVIY	30	157-171	d	29	9	8+
30	NFAEGVIAFLILAKP	31	175-189	d	31	6	4+
36	SYYATSYLEYEIENF	32	211-225	b	60	16	4+
41	FVLLDRPHTPQFLFQ	33	241-255	d	338	55	8+
78	NITTAVKTVLPQEST	34	463-477	b/d	28/105	12/18	4+
82	TGILGSLGLRKRSRR	35	487-501	d	82	14	4+
83	LGLRKRSRRQVNTRA	36	493-507	d	69	12	4+
89	IAWIPYFGPGAEGIY	37	529-543	b	123	40	8+/4+
97	TELRTTYTILNRKAI	38	577-591	d	12	5	4+
101	CRILGPDCGIEPHDW	39	601-615	b	80	41	4+
105	QIIHDFIDNPLPNQD	40	625-639	b	28	23	4+
110	GIGITGIIIAIIALL	41	655-669	b	27	19	8+

エピトープ含有ペプチドを、 IFN ELISPOT (10 の SFC / 10⁶ 脾細胞及び 80 の応答率) によって同定し、 FACS により確認した (3 ~ 5 × 10⁴ CD 3+ 細胞を獲得した)。それぞれの応答を、 FACS によってさらに特徴づけた (CD 3+ / CD 44+ / IFN+ 細胞による CD 4 及び / または CD 8 の発現)。予想される CD 8+ エピトープに下線を付し (IEDB による最も高いコンセンサス % ランク) 、前述のエピトープを参照する。免疫優勢エピトープを示す (*) 。

10

20

30

40

50

【表3】

表3
 プラスミドワクチンp EBOZ
 GP配列 Z E B O V C O N

ペプチド番号	配列	配列番号	位置	ELISPOT H-2 AVE ±SEM			FACS T細胞制限
6	FSIPLGVIVHNSTLQV	42	31-45	d	78	31	8+
15	RWGFRSGVPPKVVNY	43	85-99	b	44	12	4+
19	YNLEIKKPDGSECLP	44	109-123	b	29	12	4+
24	HKVSGTGPCAGDFAF	45	139-153	d	484	85	8+
27	GAFFLYDRLASTVIY	46	157-171	d	72	18	8+
30	TFAEGVVAFLILPQA	47	175-189	d	581	85	4+
32	PQAKKDFFSSHPLRE	48	187-201	b	18	6	4+
33	FFSSHPLREPVNATE	49	193-207	b	21	8	4+
40	EVDNLTYVQLESRFT	50	235-249	d	32	17	4+
41	YVQLESRFTPQFLLQ	51	241-255	d	97	23	4+
48	TTIGEWAFWETKKNL	52	283-297	d	219	70	4+
49	AFWETKKNLTRKIRS	53	289-303	d	32	15	4+
50	KNLTRKIRSEELSFT	54	295-309	d	105	37	4+
60	SQGREAAVSHLTTLA	55	355-369	b	16	7	4+
65	DNSTHNTPVYKLDIS	56	385-399	d	29	18	4+
66	TPVYKLDISEATQVE	57	391-405	d	371	118	4+
71	PPATTAAGPPKAENT	58	421-435	b	21	8	4+
84	TRREAIIVNAQPKCNP	59	499-513	b	12	5	8+
89	LAWIPYFGPAAEGIY	60	529-543	b	93	8	8+/4+
97	TELRTFSILNRKAI	61	577-591	b/d	14/82	4/42	8+
101	CHILGPDCIEPHDW	62	601-615	b	96	62	4+

10

20

30

エピトープ含有ペプチドを、 IFN ELISPOT (10 の SFC / 10⁶ 脾細胞及び 80 の応答率) によって同定し、 FACS により確認した (3 ~ 5 × 10⁴ CD 3+ 細胞を獲得した)。それぞれの応答を、 FACS によってさらに特徴づけた (CD 3+ / CD 44+ / IFN + 細胞による CD 4 及び / または CD 8 の発現)。予想される CD 8+ エピトープに下線を付し (IEDB による最も高いコンセンサス % ランク) 、前述のエピトープを参照する。免疫優勢エピトープを示す (*) 。

40

50

【表4】

表4
プラスミドワクチンpMARV
GP配列MARV ANG

最良のコンセンサス%ランク (IEDB)

ペプチド番号	配列	配列番号	CD8+ (≤ 0.5)					CD4+ (<25)			事前定義 (80% プラスト; アレル)
			D ^b	K ^b	D ^d	K ^d	L ^d	I-A ^b	I-A ^d	I-E ^d	
3	IQGVKTLPILEIASN	7							12.1		
5	ASNIQPQNVDSVCSG	8	0.4								
12	SKRWAFRAGVPPKNV	9						0.8			
27	GKVFTEGNIAAMIVN	10						12.9			
28	GNIAAMIVNKTVHKM	11	0.2						3.9		
	GNIAAMIVNKTVHKM	12	0.2						3.9		
29	IVNKTVHKMIFSRQG	13							17.2		
30	HKMIFSRQGQGYRHM	14									
31	RQGQGYRHMNLSTTN	15		0.1					23.9		
32	RHMNLSTTNKYWTSS	16									
65	LPTENPTTAKSTNST	17						24.0			
71	PNSTAQHLVYFRRKR	18								7.5	
72	HLVYFRRKRNLWRE	19				0.3				8.3	
89	GLSWIPFFGPGIEGL	20						7.0			
92	GLIKNQNNLVCRLLR	21									
93	NNLVCRLLRRLANQTA	22							13.3		
97	TTEERTFSLINRHAI	23	0.1			0.4					
99	HAIDFLLARWGGTCK	24								21.8	
101	TCKVLGPDCIGIED	25			0.4						

H-2^d
クラスI

10

20

30

エピトープ含有ペプチドを、IFN-E LIS P OT (10のSFC / 10⁶脾細胞及び80の応答率)によって同定し、FACSにより確認した(3~5×10⁴ CD3+細胞を獲得した)。それぞれの応答を、FACSによってさらに特徴づけた(CD3+/CD44+/IFN+細胞によるCD4及び/またはCD8の発現)。予想されるCD8+エピトープに下線を付し(IEDBによる最も高いコンセンサス%ランク)、前述のエピトープを参照する。免疫優勢エピトープを示す(*)。

40

50

【表5】

表5
プラスミドワクチンpEBOS
GP配列 SUDV CON

最良のコンセンサス%ランク (IEDB)

ペプチド番号	配列	配列番号	CD8+ (≤ 0.5)				CD4+ (<25)			事前定義(80% プラスト; アレル
			D ^b	K ^b	D ^d	K ^d	L ^d	I-A ^b	I-A ^d	
4	FFVWVIIILFQKAFSM	26		0.4						
15	RWGFRSGVPPKVVSY	27						1.2		
19	YNLEIKKPDGSECLP	28								
24	HKAQGTGPCPGDYAF	29					0.3			
27	GAFFLYDRLASTVIY	30		0.3				21.1		23.4
30	NFAEGVIAFLILAKP	31			0.1					
36	SYYATSYLEYEIENF	32	0.4		0.3	0.1				
41	FVLLDRPHTPQFLFQ	33					0.1			
78	NITTAVKTVLPQEST	34							7.2	
82	TGILGSLGLRKRSRR	35								17.2
83	LGLRKRSRRQVNTRA	36								
89	IAWIPYFGPGAEGIY	37			0.1			3.0		
97	TELRTYTILNRKAID	38	0.1						18.5	21.2
101	CRILGPDCCIEPHDW	39								
105	QIIHDFIDNPLPNQD	40	0.3							
110	GIGITGIIIAIIALL	41								

エピトープ含有ペプチドを、IFN ELISPOT (10のSFC / 10⁶脾細胞及び80の応答率)によって同定し、FACSにより確認した(3~5×10⁴ CD3+細胞を獲得した)。それぞれの応答を、FACSによってさらに特徴づけた(CD3+/CD44+/IFN+細胞によるCD4及び/またはCD8の発現)。予想されるCD8+エピトープに下線を付し(IEDBによる最も高いコンセンサス%ランク)、前述のエピトープを参照する。免疫優勢エピトープを示す(*)。

10

20

30

40

50

【表6】

表6
 プラスミドワクチンp EBOZ
 GP配列 Z E B O V C O N

最良のコンセンサス%ランク (IEDB)

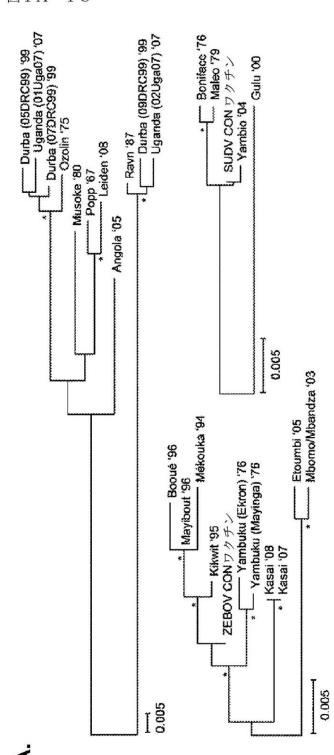
ペプチド番号	配列	配列番号	CD8+ (≤ 0.5)					CD4+ (<25)			事前定義(80% プラスト; アレル H-2 ^d クラスI H-2 ^d クラスI H-2 ^b クラスI H-2 ^k クラスI 10
			D ^b	K ^b	D ^d	K ^d	L ^d	I-A ^b	I-A ^d	I-E ^d	
6	FSIPLGVIGHNSTLQV	42					0.2				
15	RWGFRSGVPPKVNVY	43						1.2			
19	YNLEIKKPDGSECLP	44									
24	HKVSGTGPCAGDFAF	45					0.1	14.9			
27	GAFFLYDRLASTVIY	46		0.3				21.1		23.4	
30	TFAEGVVAFLILPQA	47			0.2				21.6		
32	PQAKKDFFSSHPLRE	48	0.1	0.4				16.4			
33	FFSSHPLREPVNATE	49						14.7			
40	EVNLTYVQLESRFT	50				0.4			19.6		
41	YVQLESRFTPQFLLQ	51									
48	TTIGEWAFWETKKNL	52							12.9		
49	AFWETKKNLTRKIRS	53								22.9	
50	KNLTRKIRSEELSFT	54							22.7		
60	SQGREAAVSHLTTLA	55	0.3					23.1	3.9		
65	DNSTHNTPVYKLDIS	56									
66	TPVYKLDISEATQVE	57						22.6	5.5		
71	PPATTAAGPPKAENT	58						2.1			
84	TRREAIVNQPKCNP	59	0.3					14.6	7.9		
89	LAWIPYFGPAAEGIY	60			0.1			0.8			
97	TELRTFSILNRKAID	61	0.1							22.2	
101	CHILGPDCCTIEPHDW	62									

エピトープ含有ペプチドを、IFN-ELISPOT (10のSFC / 10⁶脾細胞及び80の応答率) によって同定し、FACSにより確認した (3~5 × 10⁴ CD3+細胞を獲得した)。それぞれの応答を、FACSによってさらに特徴づけた (CD3+/CD44+/IFN+細胞によるCD4及び/またはCD8の発現)。予想されるCD8+エピトープに下線を付し (IEDBによる最も高いコンセンサス%ランク)、前述のエピトープを参照する。免疫優勢エピトープを示す (*)。

【図面】

【図 1 A - 1 C】

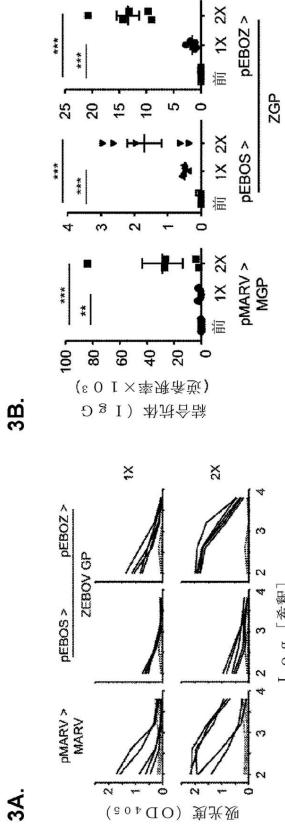
図 1 A - 1 C



1A.

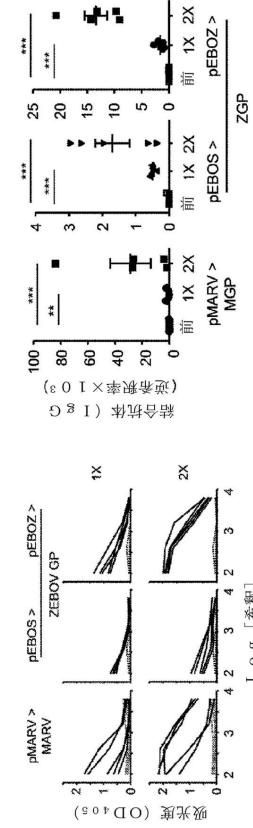
【図 3 A - 3 C】

図 3 A - 3 C



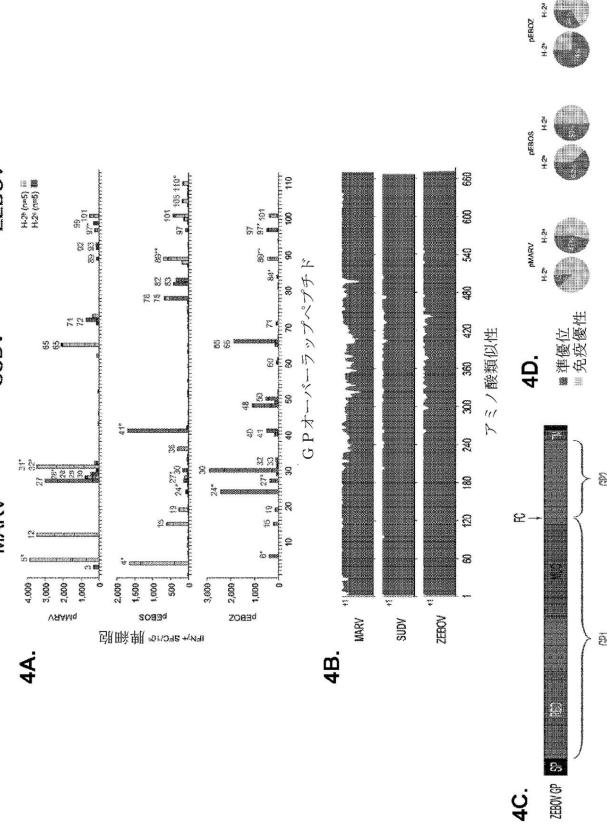
3B.

3A.



【図 4 A - 4 D】

図 4 A - 4 D



30

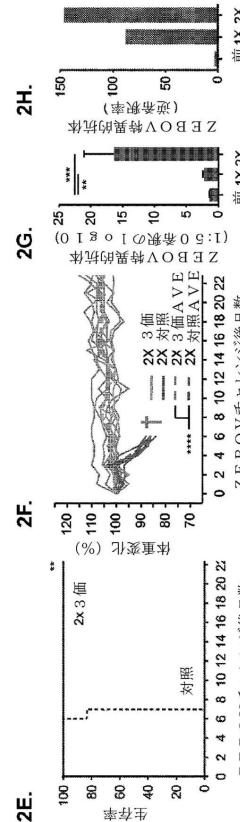
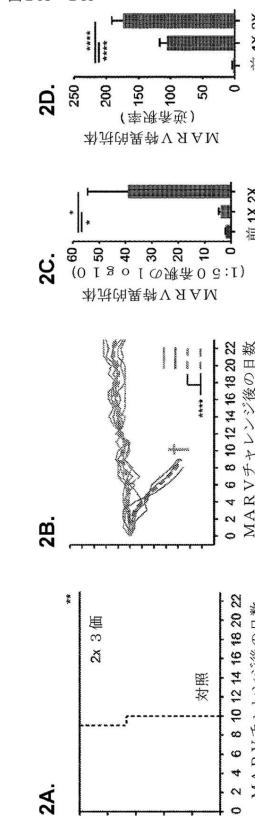
40

10

20

【図 2 A - 2 H】

図 2 A - 2 H



2H.

2E.

2F.

2G.

2D.

2C.

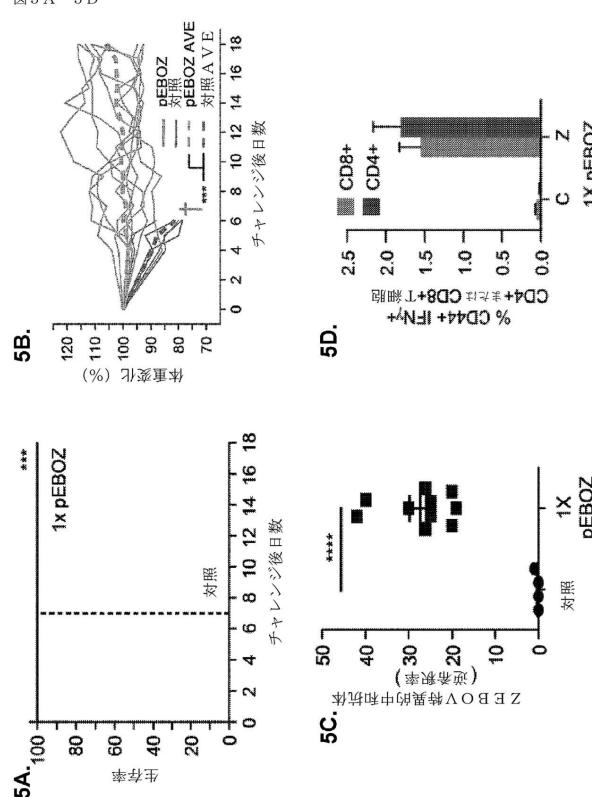
2B.

2A.

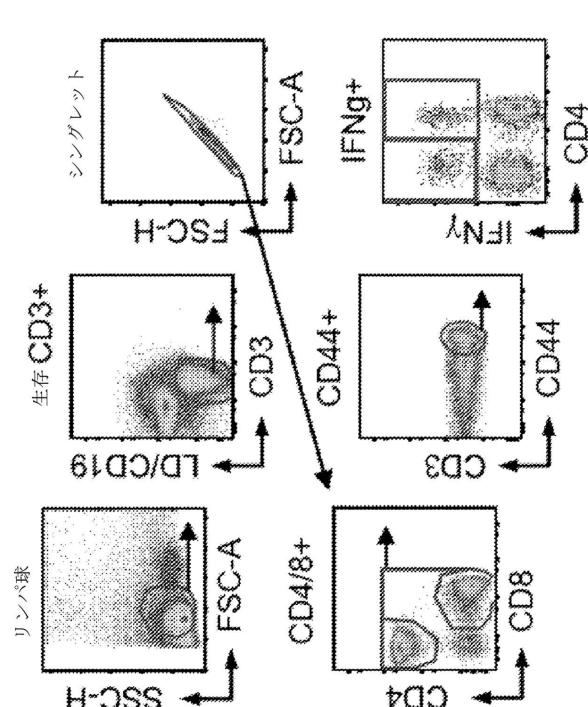
2D.

2C.

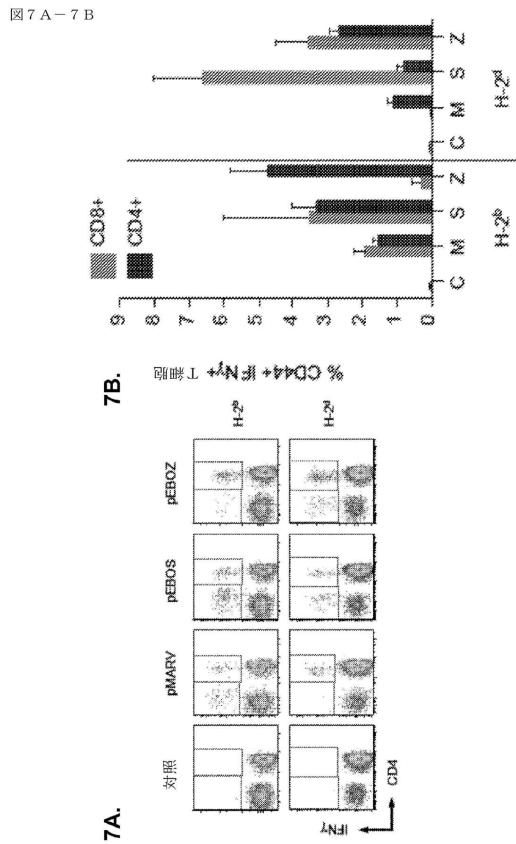
【図 5 A - 5 D】



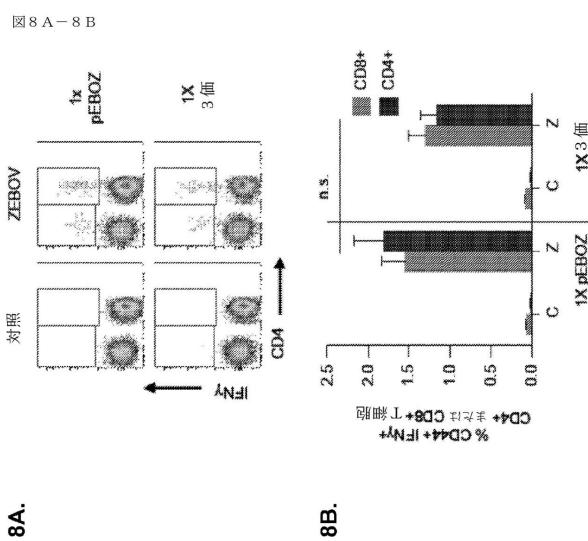
【図6】



【図7A-7B】

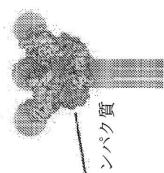


【図 8 A - 8 B】



【図9】

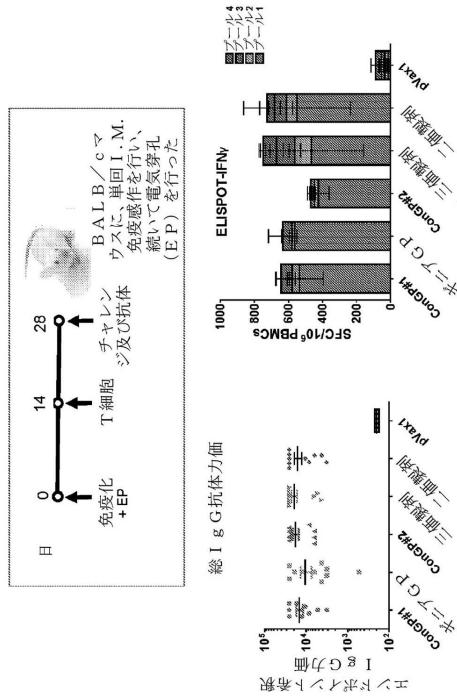
図 9



エボラに対する実験的ワクチン

【図11】

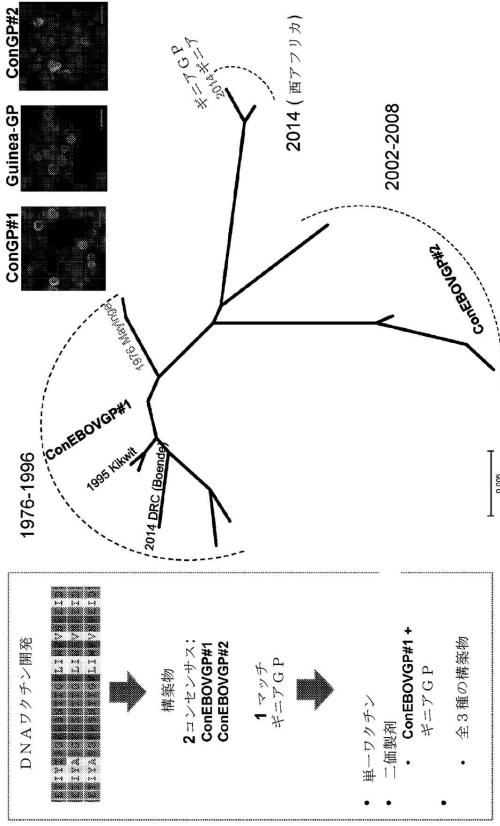
図11



DNAワクチンの単回免疫化はマウスにおいて免疫原性である

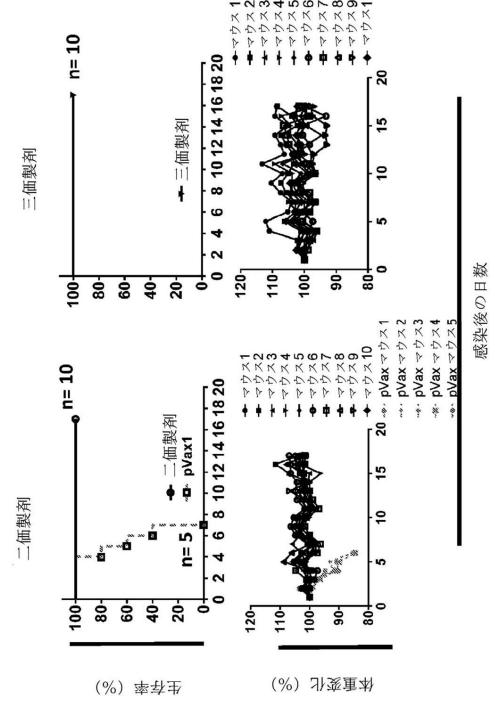
【図10】

図10



【図 1 2】

单一免疫化は完全に保護的である
マウスの致死的マウス適応エボラウイルスチャレンジに対して、

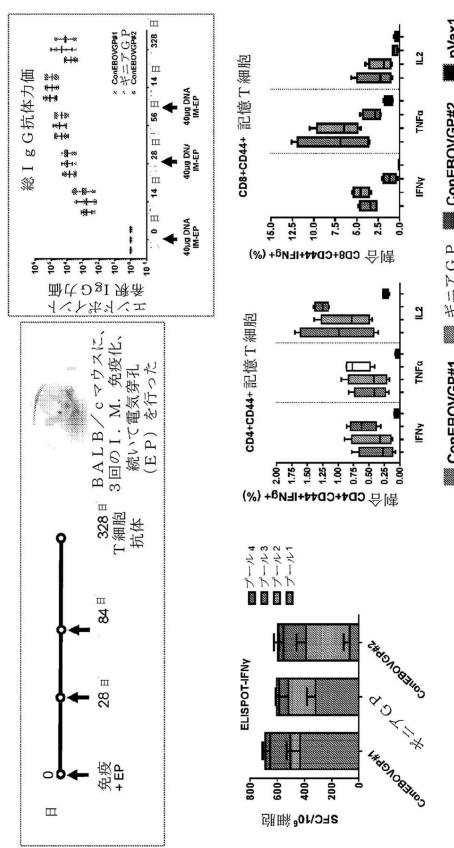


1000LD50の異種エボラウイルスチャレンジ株による致命的なチャレンジ=マウス適応-エボラMayinga 1976

【図 1 3】

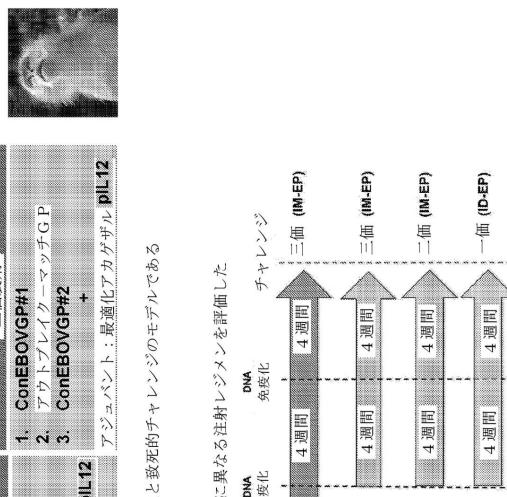
図 1 3

個々の G P DNAワクチン構築物は、マウスにおいて強い記憶応答を誘導する



【図 1 4】

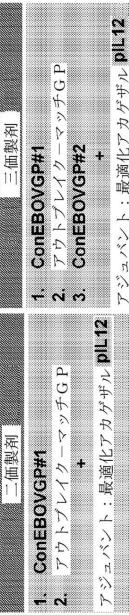
図 1 4



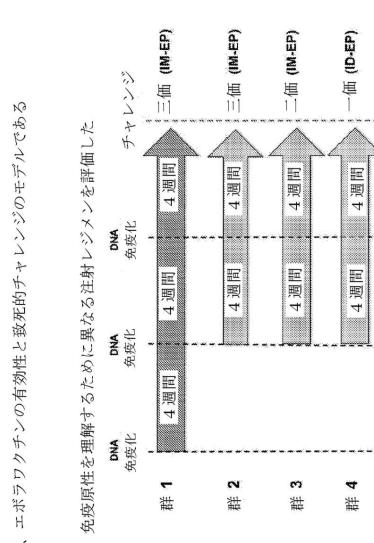
ロベストな免疫応答は、最後の注射後数か月に検出可能である

非ヒト毫長類における G P DNAワクチンの有効性

I. M. に統いて E.P を投与した



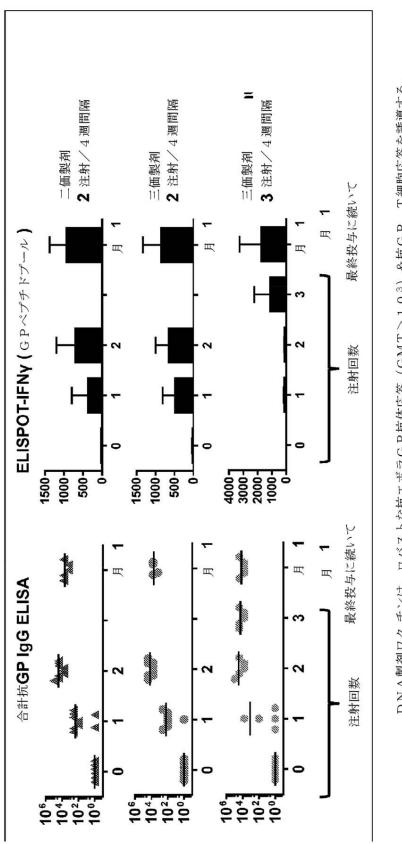
カニクリザルは、エボラワクチンの有効性と致死的チャレンジのモデルである



【図 1 5】

図 1 5

G P DNAワクチン製剤は、NHPにおける免疫原である

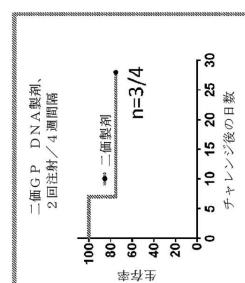


【図 1 6】

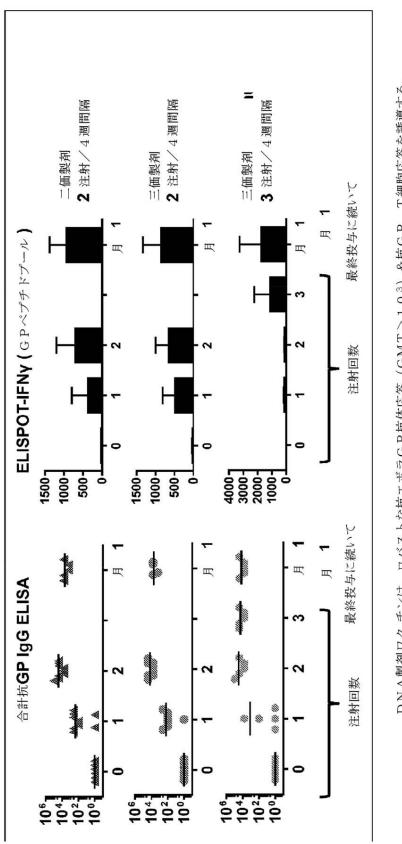
図 1 6

G P DNA製剤ワクチンは、致死的チャイロエボラウイルス (マコーナ) チャレンジから保護する

チャレンジ用量 = 1000 TCID₅₀ キニニアマコーナ 2014 C07ウイルス (7-U参照株)、最終DNA免疫化の28日後



チャレンジ後28日間、動物をモニタリングした。
生存動物には重大な疾患の徵候はなかった。
彼らはまた、正常な CBC および酵素レベルを維持した。

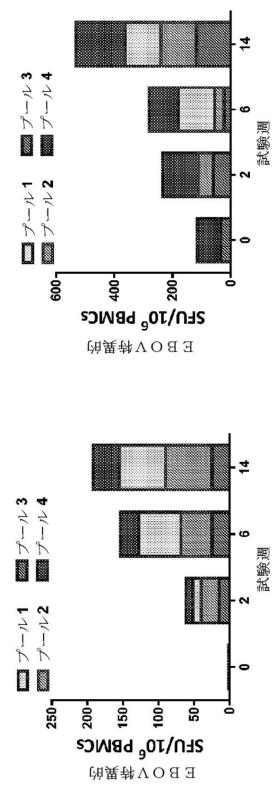


【図 17】

図 17

EBOV-001 相 I 臨床 (NCT02464670)

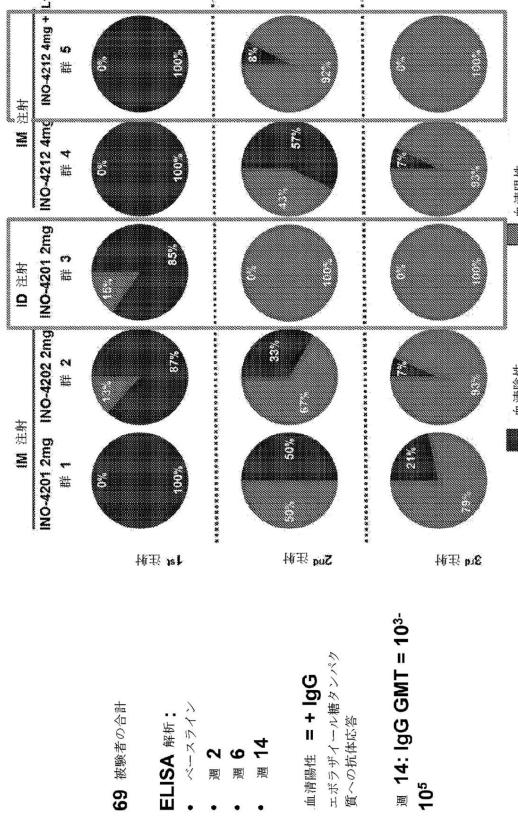
中等度 IFN-g E LI S p o t を有する患者



* E LI S p o t 分析:ベースライン、週 2、週 6、週 14。
* 刺激に対して使用する4つのペプチドペプチドは、GP ブール 1、GP ブール 2、GP ブール 3、GP ブール 4。

【図 18】

図 18



【図 20】

図 20

現在臨床試験中の他のエボラワクチンプラットフォームとの比較	
ChAd3/MVA-GP	rNSV1/EBOVGP
NIAD VRC/GSK	FHAC/Newlink/Merck
導入遺伝子	1976 GP
接種経路	1995 GP
レジメン	2014 GP
投与量	IM. IM. または ID.
副作用	CRAd3アライム (60-90% 血清), MVA-ベースト (100% 血清, ID)
注射部位の痛み	発熱、発疹、関節痛、筋肉痛、少尿
抗体力値	2 注射 (100% 血清, ID) 3 注射 (100% 血清, IM)
T細胞応答	なし
コールドチャーン	なし
その他の注意事項	なし

**Rampling et al. 2015, Legenwood et al. 2014, Agnandji et al. 2015, Herera-Testreiro et al. 2015, Iapla et al. 2015
† VSV/Z EBOV GP および ChAd3 / MVAGP の副作用のいくつかは、エボラの症状と重複する

【図 2 1】

図 2 1

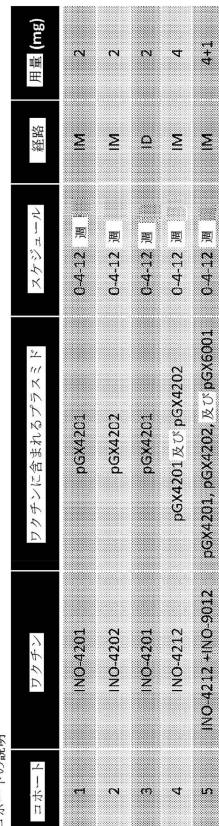
EBOV001 ELISA

すべてのコホート (1~5) からの 6~9人の被験者を分析に含める。

ベースライン、第2週、第6週、第14週からのELISA分析。

使用したタンベク質は、エボラザイール。

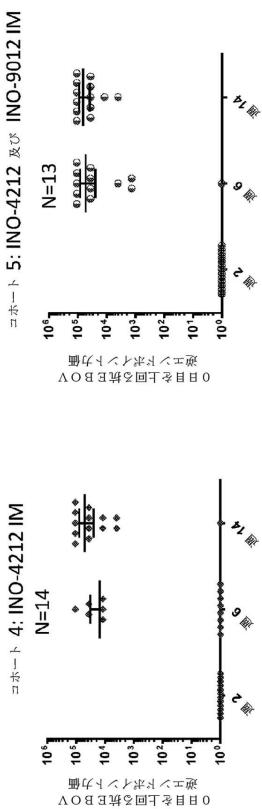
コホートの説明



【図 2 3】

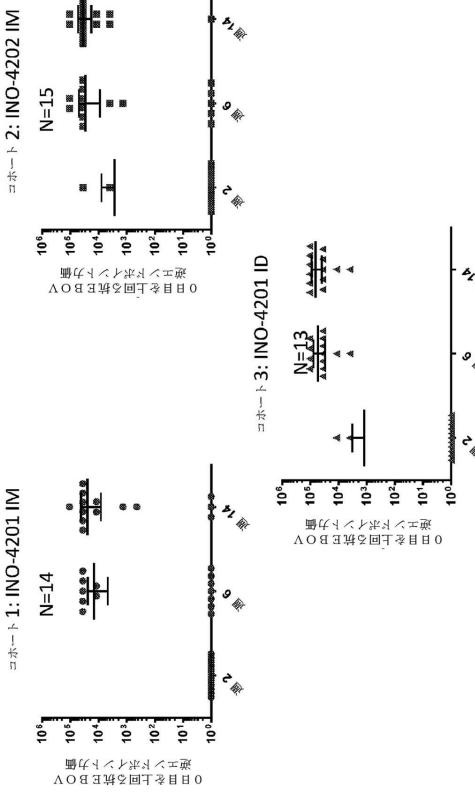
図 2 3

ELISAまとめ



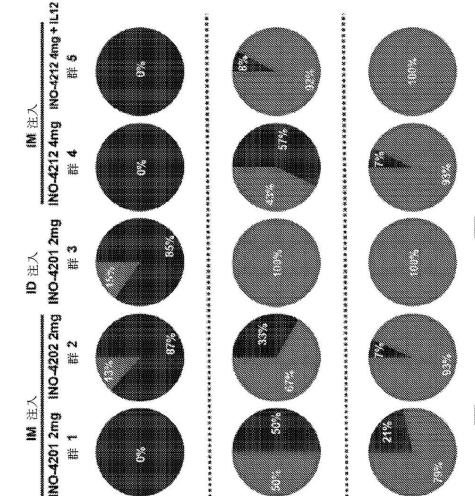
【図 2 2】

図 2 2



【図 2 4】

図 2 4



ELISAまとめ

- まとめ:
 - 初回投与後の反応性はほとんどない
 - 2投与は、抗体陽性を開始し、コホート 1 および 5 は最大の頻度を示す

- 2投与は、4/5のコホートで >90%の抗体陽性を引き起こす。コホート 3 および 5 はこの時点で 100%の抗体陽性を示す。

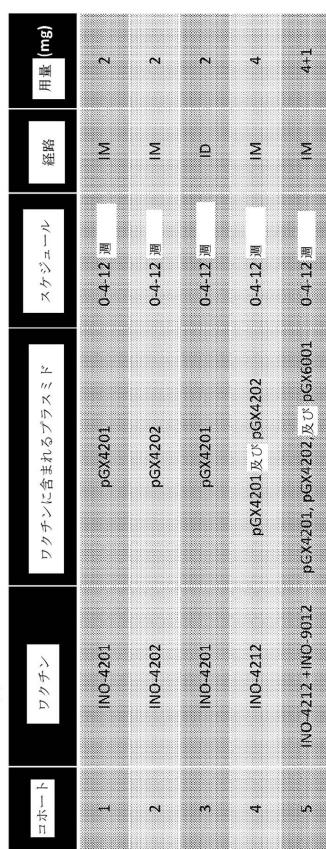
【図 2 5】

図 2 5

EBOV001 ELSpot

- すべてのコホート (1-5) からの75人の被験者を分析に含める。
- ベースライン、第2週、第6週、第14週からのELISpot分析。
- 刺激に用いた4つのペプチドペプチド (ペイール) :

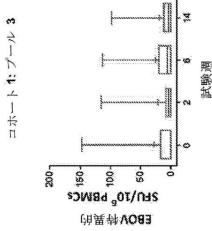
 - ペール 1 (pp1-28)
 - ペール 2 (pp29-56)
 - ペール 3 (pp57-84)
 - ペール 4 (pp85-112)



(77)

【図 2 6】

図 2 6



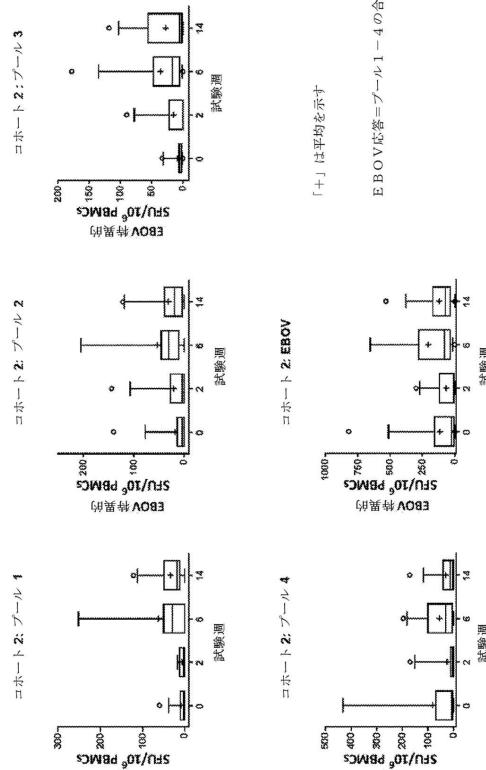
「+」は平均を示す



【図 2 7】

図 2 7

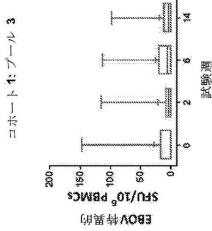
コホート 2: ペール 1



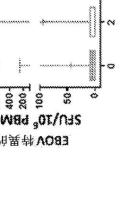
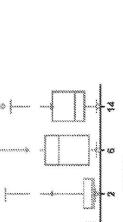
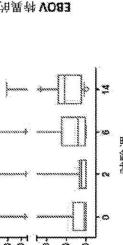
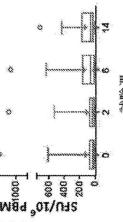
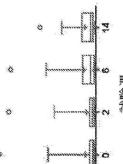
「+」は平均を示す

【図 2 8】

図 2 8



「+」は平均を示す



10

20

30

40

50

EBOV001 ICS

- すべてのコホート (1 - 5) から 47 人の被験者を分析に含める。コホート 5 は、現在のところ不十分である。
- ベースラインおよび 1.4 週目に ICS 分析を行った
- ブール 1 ~ 4 からなる単一の EBOV⁺ペプチドブールを刺激に使用する

コホートの説明

	コホート	ワクチン	ワクチンに含まれるプラスマミド	スケジュール	往復	用量 (mg)
1	INO-4201	pGX4201		0.4-12 週	IM	2
2	INO-4202	pGX4202		0.4-12 週	IM	2
3	INO-4201	pGX4201		C-4-12 週	ID	2
4	INO-4212	pGX4201 及び pGX4202		0.4-12 週	IM	4
5	INO-4212 + INO-9012	pGX4201, pGX4202, 及び pGX6001		0.4-12 週	IM	4+1

【図 3 5】

図 3 5

レスポンダー分析

すべての被験者		コホートによる回答 (%)	
EBDV	4	75	1.3%
GPブースト1	31	75	41.3%
GPブースト2	22	75	29.3%
GPブースト3	5	75	6.7%
GPブースト4	3	75	4.0%

すべての被験者		コホートによる回答 (%)	
EBDV	4	75	1.3%
GPブースト1	36	75	48.0%
GPブースト2	33	76	26.7%
GPブースト3	0	0	0.0%
GPブースト4	0	0	0.0%

【図 3 6】

図 3 6

EBOV001 ICS

コホートに基づくウイルコキソノバク分析

	コホート	1 (2tailed)	コホート 2 (両側)	コホート 3 (両側)	コホート 4 (両側)	コホート 5 (両側)
CD4 IFNg 及び TNFa	.770	.252	.695	.438	.000	.000
CD4 IFNg	.688	.105	.713	.063	.000	.000
CD4 TNFa	.945	.121	.039	.547	.000	.000
CD8 IFNg 及び TNFa	.945	.301	.008	.406	.000	.000
CD8 IFNg	.844	.133	.221	.125	.000	.000
CD8 TNFa	.945	.695	.010	.844	.000	.000

評価した被験者

コホート	n=
1	12
2	12
3	11
4	9
5	3

【図 3 3】

図 3 3

【図 3 4】

図 3 4

JP 7029756 B2 2022.3.4

コホートによる回答 (%)	
EBDV	0.0%
GPブースト1	40.0%
GPブースト2	33.3%
GPブースト3	0.0%
GPブースト4	0.0%

コホートによる回答 (%)	
EBDV	0.0%
GPブースト1	46.7%
GPブースト2	33.3%
GPブースト3	13.3%
GPブースト4	0.0%

コホートによる回答 (%)	
EBDV	0.0%
GPブースト1	46.7%
GPブースト2	33.3%
GPブースト3	13.3%
GPブースト4	0.0%

コホートによる回答 (%)	
EBDV	0.0%
GPブースト1	46.7%
GPブースト2	33.3%
GPブースト3	13.3%
GPブースト4	0.0%

コホートによる回答 (%)	
EBDV	0.0%
GPブースト1	46.7%
GPブースト2	33.3%
GPブースト3	13.3%
GPブースト4	0.0%

コホートによる回答 (%)

EBDV

GPブースト1

GPブースト2

GPブースト3

GPブースト4

EBDV

GPブースト1

GPブースト2

GPブースト3

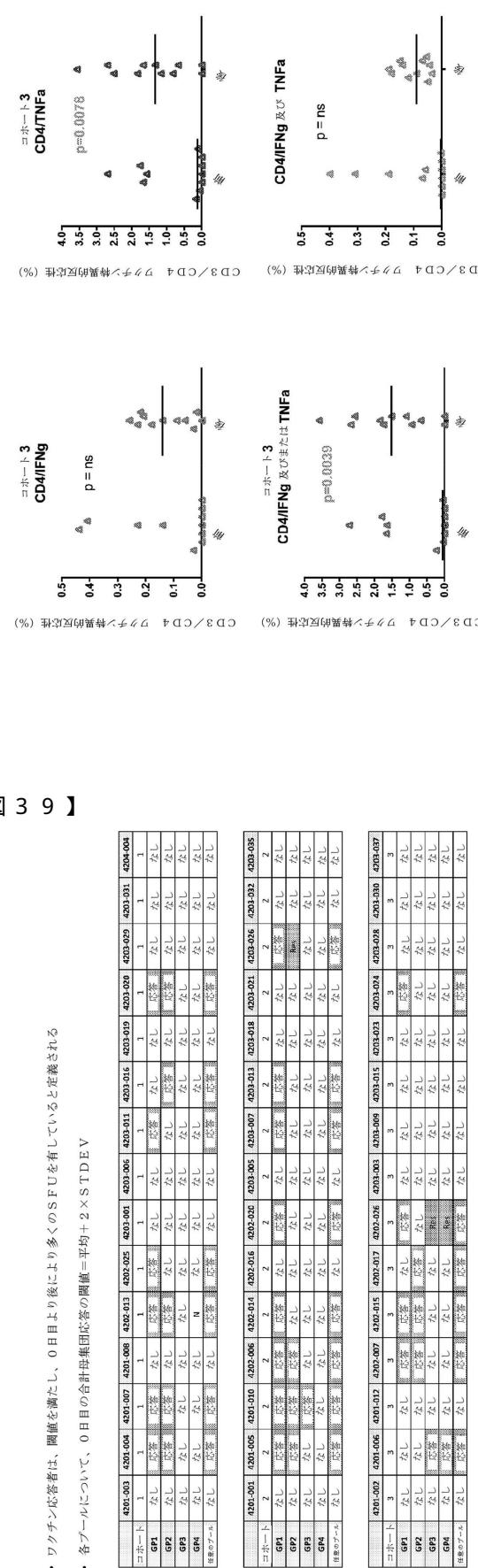
ワクチン応答者：コホートによる全員（n = 75）の被験者

- 各グループについて、0日目の合計母集団回答の閾値=平均+2×STDDEV
- ワクチン応答者は、閾値を満たし、0日目により多くのSFUを有していると定義される

【図 3 9】

図 3 9

EBOV001 ICS – コホート 3 (INO4201 ID) $CD4+$ T細胞におけるサイトカイン



【図 4 0】

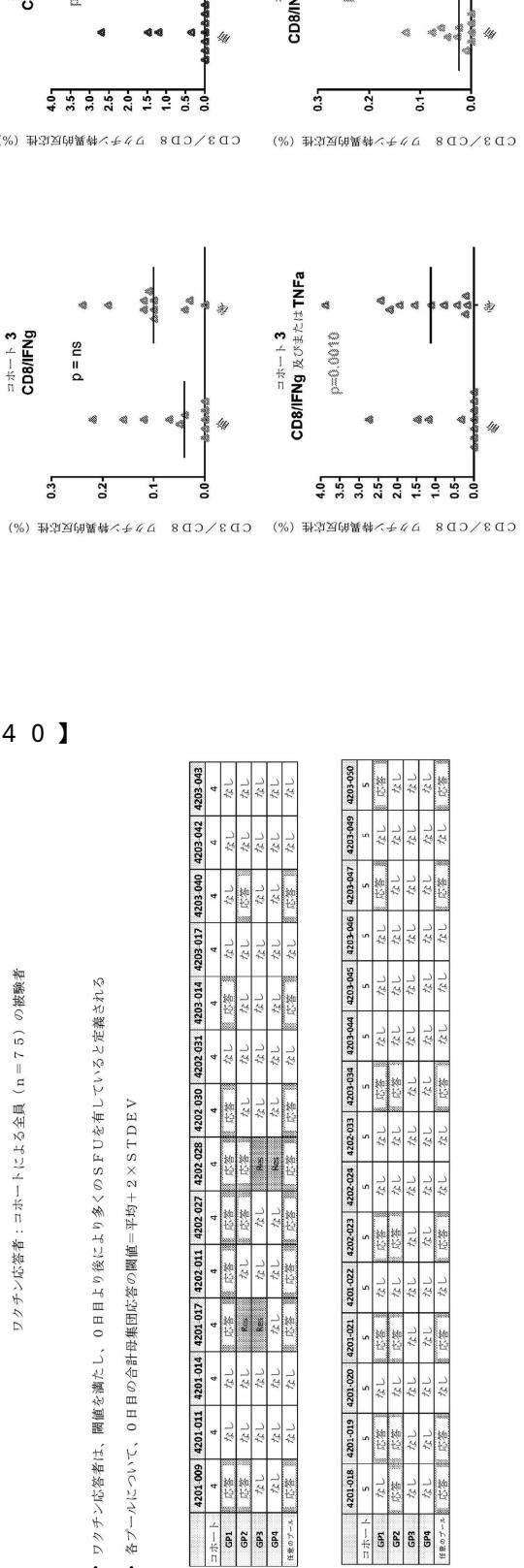
図 4 0

ワクチン応答者：コホートによる全員（n = 75）の被験者

- 各グループについて、0日目の合計母集団回答の閾値=平均+2×STDDEV
- ワクチン応答者は、閾値を満たし、0日目により多くのSFUを有していると定義される

【図 3 8】

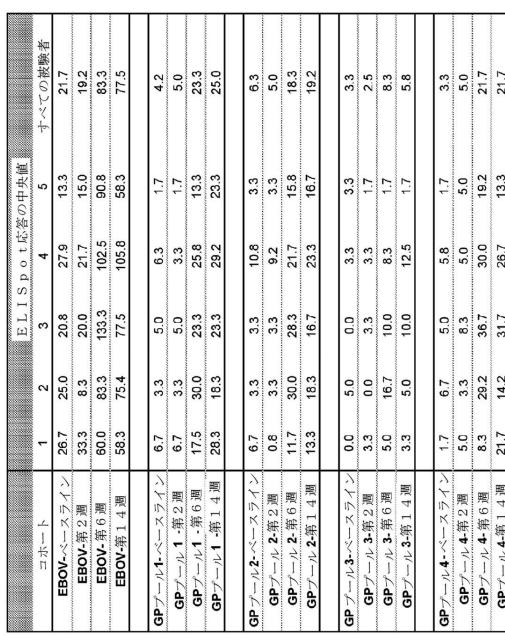
図 3 8



【図 4 1】

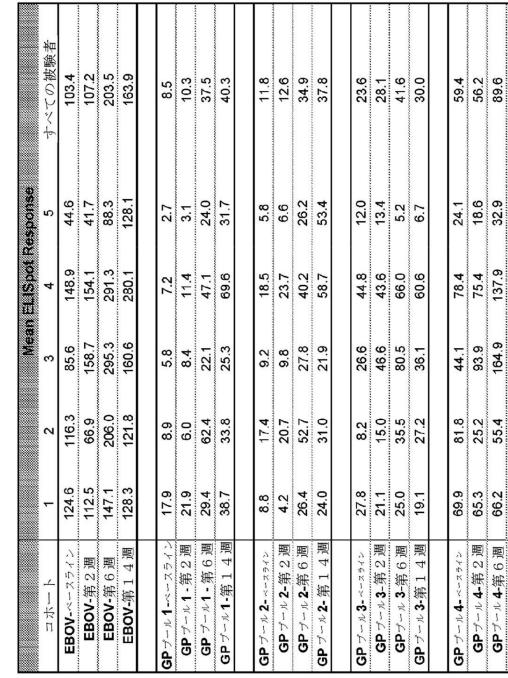
図 4 1

コホートおよびブール (n = 75) による応答者の中央値
ベースライン



【図 4 2】

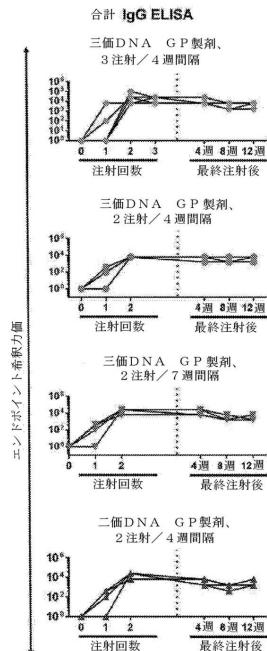
図 4 2



コホートとブールによる合計応答 (n = 75)

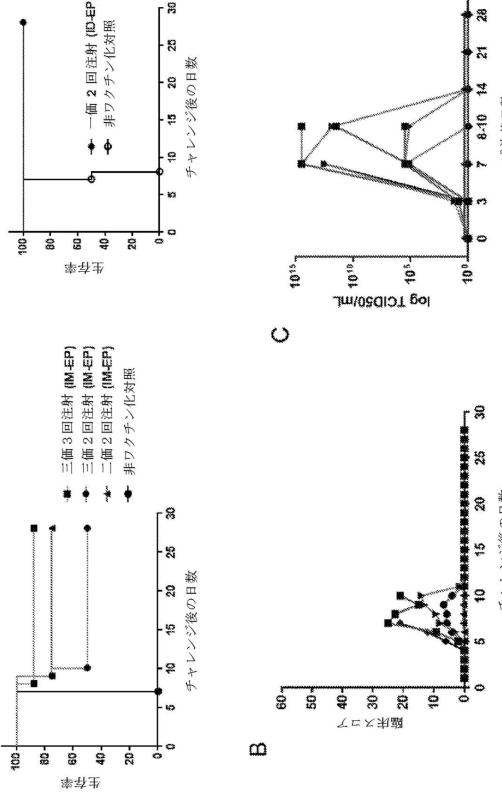
【図 4 3】

図 4 3



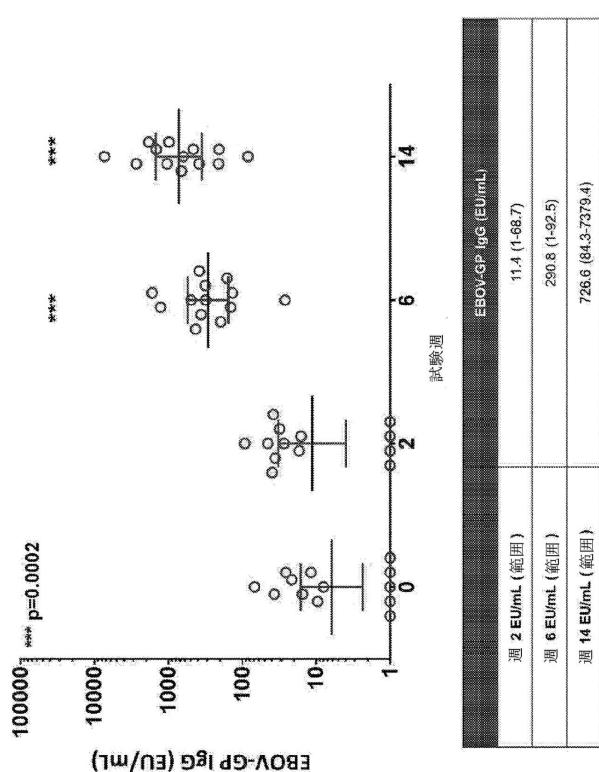
【図 4 4 A - 4 4 C】

図 4 4 A - 4 4 C



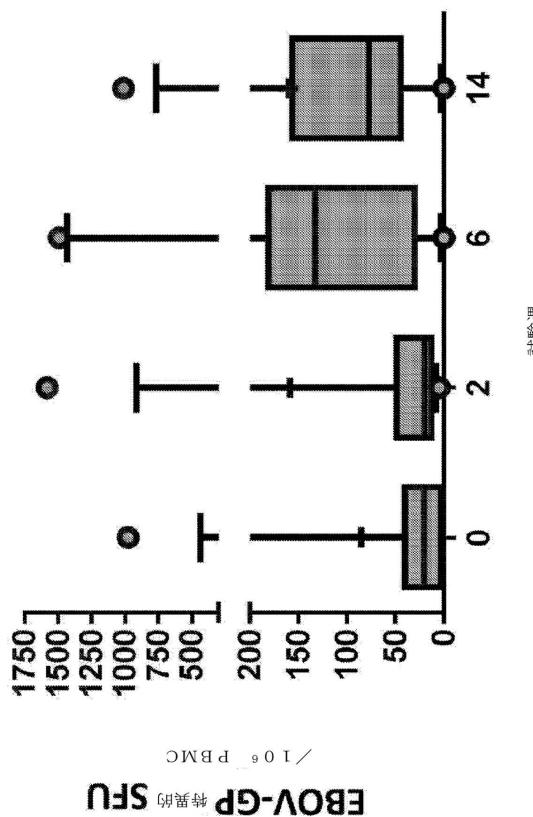
【図 4 5】

図 4 5



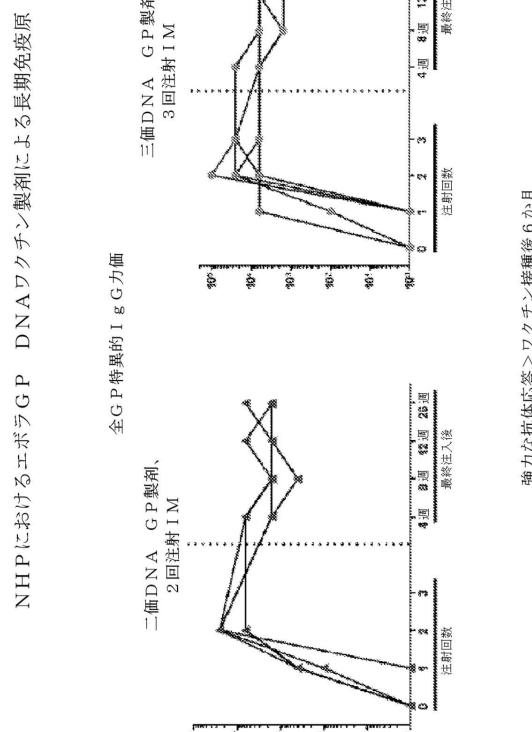
【図 4 6】

図 4 6



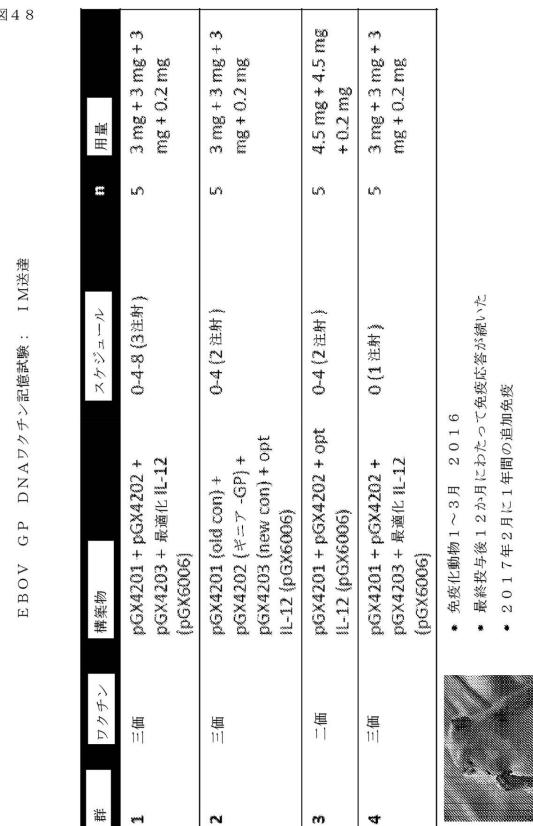
【図 4 7】

図 4 7



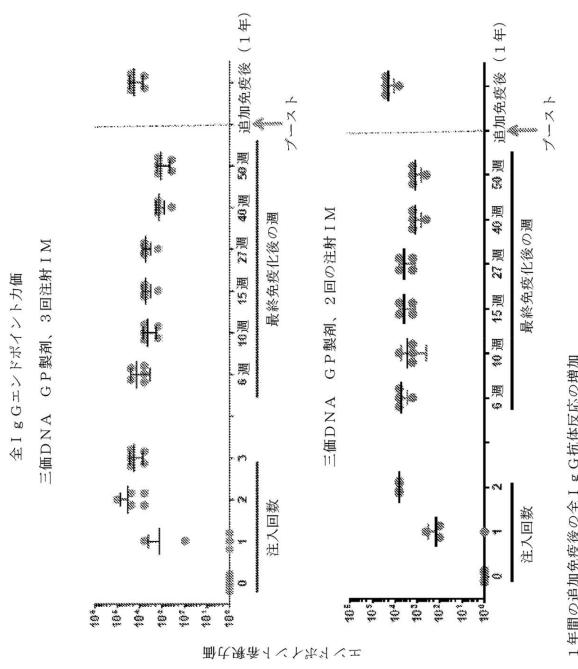
【図 4 8】

図 4 8



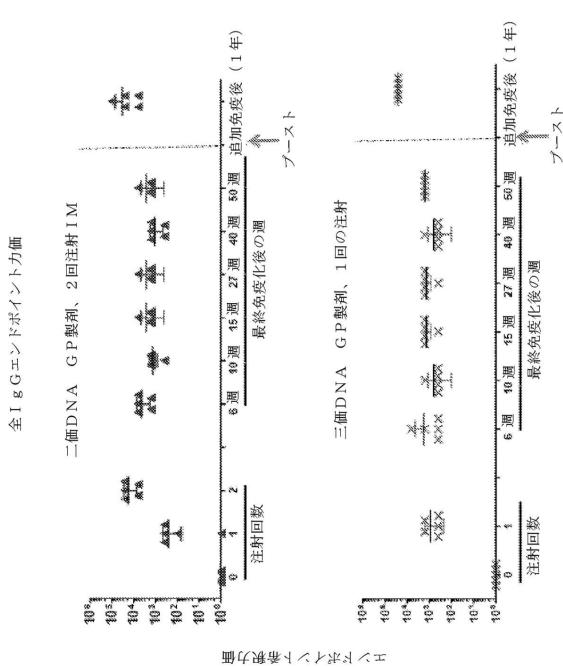
【図 4 9】

図 4 9



【図 5 0】

図 5 0

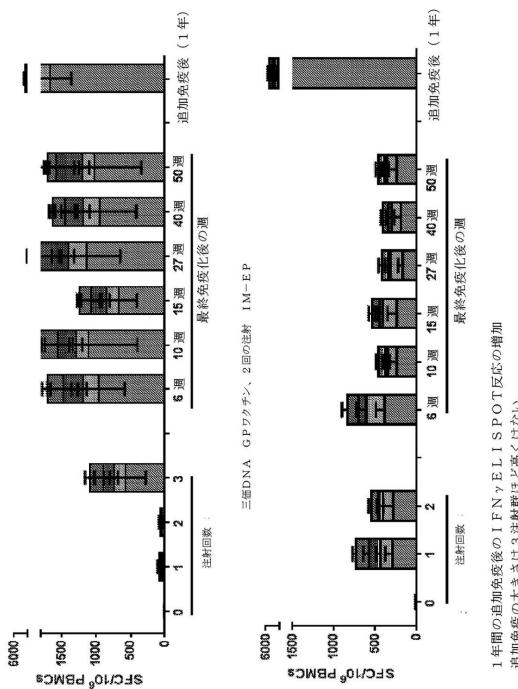


【図 5 1】

図 5 1

ELISPOT

三価DNA GP製剤、3回注射IM-E.P

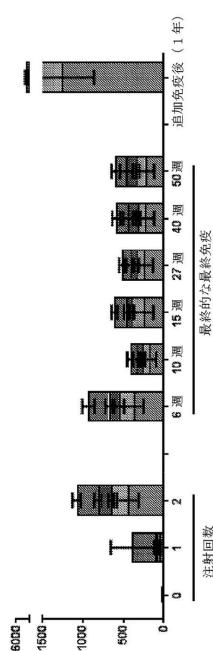


【図 5 2】

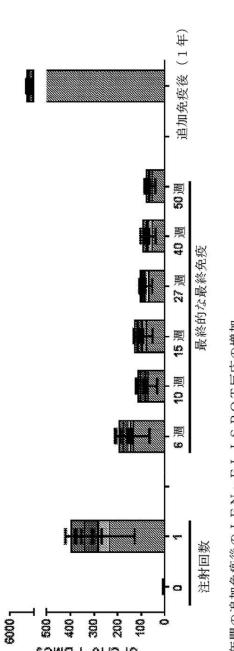
図 5 2

ELISPOT

二価DNA GP製剤 2回注射IM-E.P



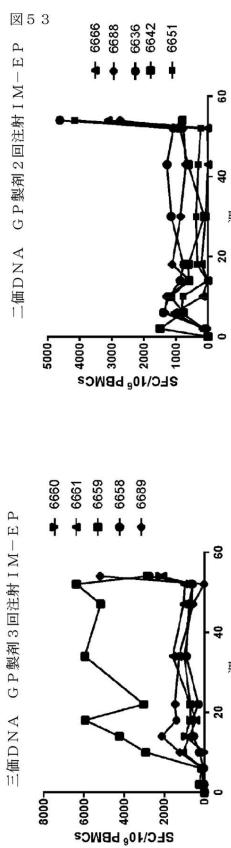
三価DNA GP製剤、1回の注射 IM-E.P



1年間の追加免疫後のIFN γ ELISPOT反応は高くなはない。
単独免疫群では、追加免疫後1年間のIFN γ ELISPOT反応の増加

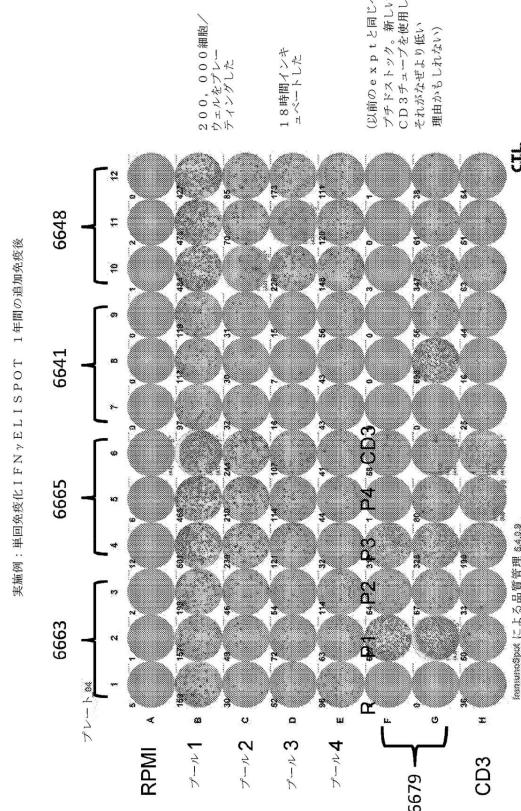
(84)

【図 5 3】



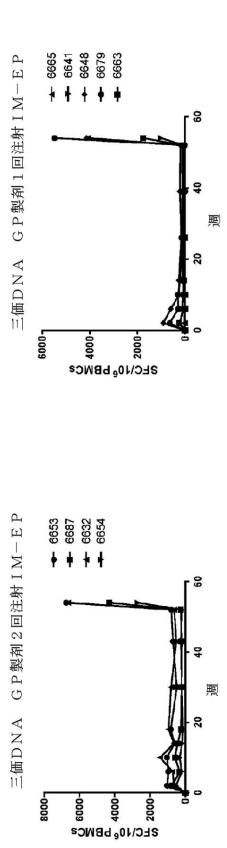
【図 5 5】

図 5 5



【図 5 4】

図 5 4

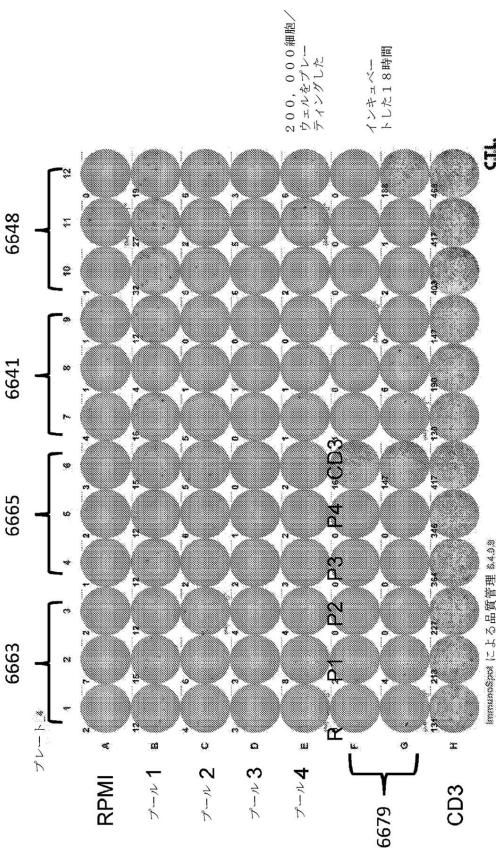


- 追加免疫の後に1/7～1/9匹のT細胞応答を増加させた。
- 1/7～1/9の動物が同レベルのT細胞応答を維持した。
- 1/7～1/9の動物が、追加免疫後にT細胞応答が悪かった。これは、3つの注射群において、過去1年間にわたり一貫して高かった動物であった。

実施例：単回免疫化1FNγELISPOT 12か月時点（最終追加免疫前）

【図 5 6】

図 5 6



まとめ—長期記憶

- EBOV-GP DNAワクチンは、長期的な免疫応答を誘発する

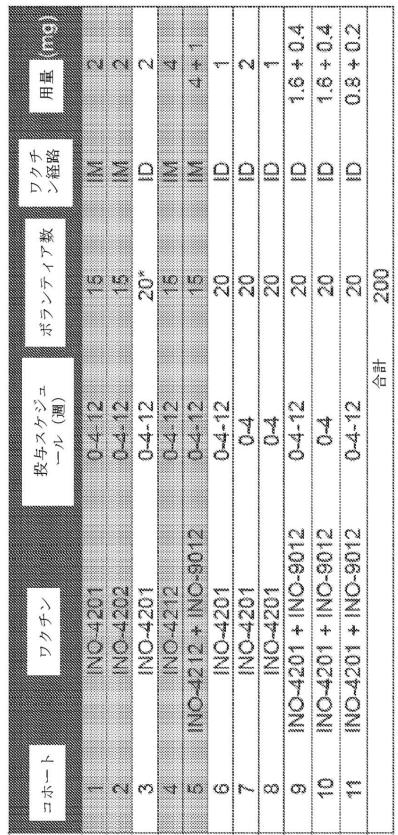
- 1年間の追加免疫に続く強力なコール応答
- この応答は、単一のIM注射を与えた群では著しく高い

- 次のステップ：皮内送達による記憶試験

※この試験のチャレンジスロットの確保に取り組み

EBOV-001: 1D送達張コポート

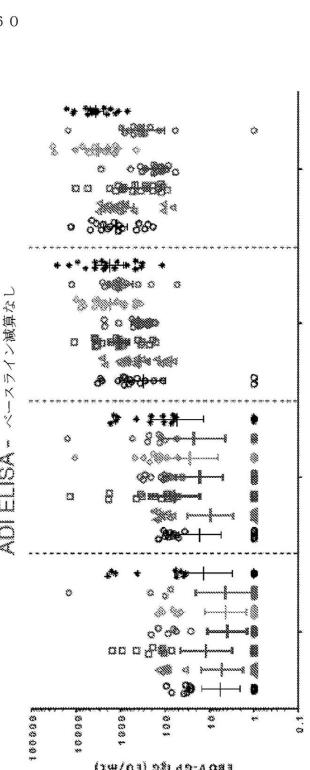
抗体陽性の被験されたコポート3（1D送達）に基づいて、6つのさらなる1Dコポートを追加して、免疫アジュバントとしての1L-12-DNAの異なる用量、用量レジメンおよび影響を調べた。



*ポート2は、5人の被験者が登録され、コポート5に登録された。

1D 1-4週目のコポート

ADI ELISA - ベースライン測定なし



*コポート6-11の5人の被験者は1-4週の前に同意を撤回した。

すべての1Dコポート：

コポート	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	試験日
ワクチン	INO-4201	INO-4202	INO-4201	INO-4212	INO-4212 + INO-9012	INO-4201	28日目								
ワクチン量 (mg)	0.4-12	0.4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	24日目
ワクチントレーナー	16	15	20*	16	15	20	16	15	16	16	16	16	16	16	28日目
ワクチントレーナー用量 (mg)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	28日目
ワクチントレーナー経路	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	28日目
ワクチントレーナーの説明															

コポート	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	試験日
ワクチン	INO-4201	INO-4202	INO-4201	INO-4212	INO-4212 + INO-9012	INO-4201	28日目								
ワクチントレーナー	16	15	20*	16	15	20	16	15	16	16	16	16	16	16	28日目
ワクチントレーナー用量 (mg)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	28日目
ワクチントレーナー経路	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	28日目
ワクチントレーナーの説明															

図 5.9 EBOV-001: 1D送達張コポート

図 5.9

EBOV-001: 1D送達張コポート

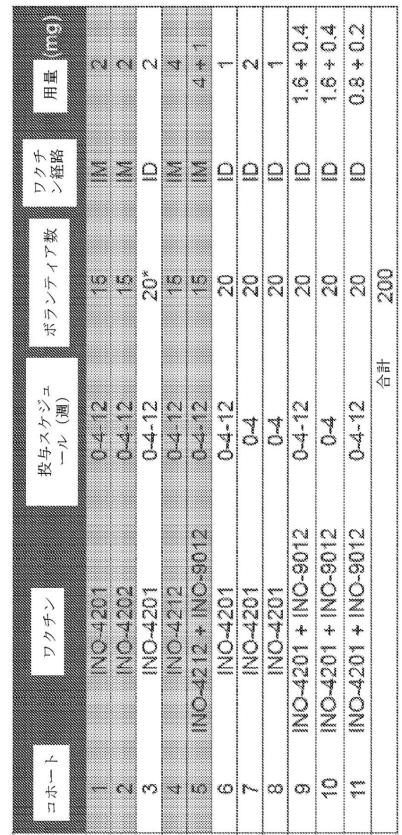
* 最初の試験では、5人のコポートにわたって75人の健康なボランティアが登録された。

** 3回投与レジメン（第0、4、12週）

*** 2-8°Cの安定したワクチン製剤；冷凍液を必要としない

**** 室温（25°C）で1年間の安定性

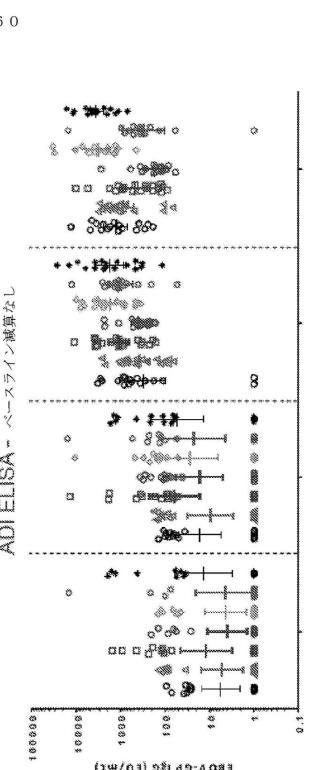
抗体陽性の被験されたコポート3（1D送達）に基づいて、6つのさらなる1Dコポートを追加して、免疫アジュバントとしての1L-12-DNAの異なる用量、用量レジメンおよび影響を調べた。



*ポート2は、5人の被験者が登録され、コポート5に登録された。

1D 1-4週目のコポート

ADI ELISA - ベースライン測定なし



*コポート6-11の5人の被験者は1-4週の前に同意を撤回した。

すべての1Dコポート：

コポート	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	試験日
ワクチン	INO-4201	INO-4202	INO-4201	INO-4212	INO-4212 + INO-9012	INO-4201	28日目								
ワクチントレーナー	16	15	20*	16	15	20	16	15	16	16	16	16	16	16	28日目
ワクチントレーナー用量 (mg)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	28日目
ワクチントレーナー経路	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	28日目
ワクチントレーナーの説明															

JP 7029756 B2 2022.3.4

図 5.7 【】

図 5.7

【】

図 5.8

* 最初の試験では、5人のコポートにわたって75人の健康なボランティアが登録された。

** 3回投与レジメン（第0、4、12週）

*** 2-8°Cの安定したワクチン製剤；冷凍液を必要としない

**** 室温（25°C）で1年間の安定性

コポート	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	試験日
ワクチン	INO-4201	INO-4202	INO-4201	INO-4212	INO-4212 + INO-9012	INO-4201	28日目								
ワクチントレーナー	16	15	20*	16	15	20	16	15	16	16	16	16	16	16	28日目
ワクチントレーナー用量 (mg)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	28日目
ワクチントレーナー経路	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	28日目
ワクチントレーナーの説明															

コポート	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	試験日
ワクチン	INO-4201	INO-4202	INO-4201	INO-4212	INO-4212 + INO-9012	INO-4201	24日目								
ワクチントレーナー	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	342.3
ワクチントレーナー経路	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	392.8
ワクチントレーナーの説明															

コポート	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	試験日
ワクチン	INO-4201	INO-4202	INO-4201	INO-4212	INO-4212 + INO-9012	INO-4201	392.8								
ワクチントレーナー	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	0-4-12	392.8
ワクチントレーナー経路	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	392.8
ワクチントレーナーの説明															

【配列表】

0007029756000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
C 1 2 N 15/47 (2006.01)	C 1 2 N 15/47
C 1 2 N 15/24 (2006.01)	C 1 2 N 15/24

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/332,372

(32)優先日 平成28年5月5日(2016.5.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

インコーポレイティド

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19462, プリマス ミーティング, ウエスト ジャーマンタウン パイク 660, スイート 110

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 ディビッド ビー. ウェイナー

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19066, メリオン, ビーコン レーン 717

(72)発明者 アミ パテル

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19103, フィラデルフィア, レイニー コート 1

(72)発明者 チエン イエン

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19086, ウォーリングフォード, シェフィールド ドライブ 503

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 特表2015-527297 (JP, A)

Molecular Therapy, 2013年07月, Vol.21, No.7, p1432-1444, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3705942/>参照Molecular Therapy, 2015年05月, Vol.23, Supplement 1, S178-S179, Abstract Number 450, [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(16\)34059-X](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(16)34059-X)参照Microbiology resource Announcements, 2014年12月, Vol.2, Issue6, e01331-14, <https://mra.asm.org/content/2/6/e01331-14>参照PANS, 2007年10月23日, Vol.104, No.43, p17123-17127, <https://www.pnas.org/cont/104/43/17123.long>参照

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 9 0
A 6 1 P 3 1 / 0 0 - 2 2
A 6 1 P 3 7 / 0 0 - 0 8
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 8 0
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 4 4

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
UniProt/GeneSeq
SwissProt/GeneSeq