

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6523955号
(P6523955)

(45) 発行日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

| | |
|----------------|--------------------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 |
| C 12 N 7/04 | (2006.01) C 12 N 7/04 |
| A 61 K 48/00 | (2006.01) A 61 K 48/00 |
| A 61 P 31/12 | (2006.01) A 61 P 31/12 |
| A 61 K 35/76 | (2015.01) A 61 K 35/76 |
| A 61 K 31/7088 | (2006.01) A 61 K 31/7088 |

請求項の数 27 (全 61 頁) 最終頁に続く

| | |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2015-524681 (P2015-524681) |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年3月15日 (2013.3.15) |
| (65) 公表番号 | 特表2015-524660 (P2015-524660A) |
| (43) 公表日 | 平成27年8月27日 (2015.8.27) |
| (86) 國際出願番号 | PCT/EP2013/055483 |
| (87) 國際公開番号 | W02014/019718 |
| (87) 國際公開日 | 平成26年2月6日 (2014.2.6) |
| 審査請求日 | 平成28年2月4日 (2016.2.4) |
| (31) 優先権主張番号 | 61/678,367 |
| (32) 優先日 | 平成24年8月1日 (2012.8.1) |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) |
| (31) 優先権主張番号 | 12005594.2 |
| (32) 優先日 | 平成24年8月1日 (2012.8.1) |
| (33) 優先権主張国 | 欧洲特許庁(EP) |

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

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) R S ウィルス (RSV) ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R S ウィルス (R S V) 膜糖タンパク質 F の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列と、 R S V ヌクレオカブシド抗原決定基をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列とを含む組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) であって、

R S V F 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列が、 a) 配列番号 6 あるいは b) 配列番号 4 および 16 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み、 R S V ヌクレオカブシド抗原決定基をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列が、 R S V N ヌクレオカブシドの抗原決定基および R S V M 2 マトリックスタンパク質の抗原決定基をコードし、

R S V G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列をさらに含む、組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA)。

【請求項 2】

R S ウィルス (R S V) 膜糖タンパク質 F の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列が、配列番号 5 のヌクレオチド配列と少なくとも 75 % の同一性を含む、請求項 1 に記載の組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA)。

【請求項 3】

前記変異体が、配列番号 5 のヌクレオチド配列と少なくとも 95 % の同一性を有する、請求項 1 に記載の組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA)。

【請求項 4】

10

20

前記 RSV 膜糖タンパク質 F の抗原決定基をコードする前記少なくとも 1 つのヌクレオチド配列が、配列番号 5 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA)。

【請求項 5】

前記 RSV-N ヌクレオカプシドの前記抗原決定基および前記 RSV-M2 マトリックスタンパク質の前記抗原決定基が両方ともに、自己切断プロテアーゼドメインによって分離される単一読み取り枠によってコードされる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA。

【請求項 6】

前記自己切断プロテアーゼドメインが、口蹄疫ウイルスに由来するプロテアーゼ 2A 断片配列である、請求項 5 に記載の組換え MVA。 10

【請求項 7】

前記単一読み取り枠が、配列番号 1~8 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 5 または 6 に記載の組換え MVA。

【請求項 8】

前記単一読み取り枠が、配列番号 1~7 のヌクレオチド配列を含む、請求項 5 ~ 7 に記載の組換え MVA。

【請求項 9】

単一の読み取り枠が、配列番号 1~10、1~12 および 3~3 から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 5 または 6 に記載の組換え MVA。 20

【請求項 10】

前記 RSV-G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする前記ヌクレオチド配列が、RSV 株 A2、A long および / または B に由来する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA。

【請求項 11】

前記 RSV-G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 または 8 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA。

【請求項 12】

前記 RSV-G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1 および 7 から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA。 30

【請求項 13】

第 2 の RSV-G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA。

【請求項 14】

それぞれ RSV-G 膜糖タンパク質をコードする第 1 および第 2 のヌクレオチド配列を含み、前記の第 1 のヌクレオチド配列が配列番号 2 の RSV-G 膜糖タンパク質をコードし、前記の第 2 のヌクレオチド配列が配列番号 8 の RSV-G 膜糖タンパク質をコードする、請求項 1 ~ 9 に記載の組換え MVA。 40

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 に記載の組換え MVA と、任意に、薬学的に許容される担体および / または希釈剤と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 16】

RSV 感染症の治療または予防に用いる、請求項 1 ~ 14 に記載の組換え MVA。

【請求項 17】

経鼻投与による RSV 感染症の治療または予防に使用するための、請求項 1 ~ 14 に記載の組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) であって、筋肉内投与が除外される、組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA)。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 14 に記載の組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) と、任意に、薬学的に許容される担体および / または希釈剤とを含む、経鼻投与によるRSV感染症の治療または予防に用いるための薬学的組成物であって、筋肉内投与が除外される、薬学的組成物。

【請求項 19】

前記組換えMVAが、免疫学的にナイーブなヒト対象または免疫学的に成熟なヒト対象に単回投与または複数回投与で投与されるか、投与されるべきである、請求項 16 または 17 に記載の組換えMVA。

【請求項 20】

前記組換えMVAが、免疫学的にナイーブなヒト対象または免疫学的に成熟なヒト対象に単回投与または複数回投与で投与されるか、投与されるべきである、請求項 15 または 18 に記載の薬学的組成物。 10

【請求項 21】

経鼻投与のみを含む、請求項 17 に記載の組換えMVA。

【請求項 22】

前記RSV膜糖タンパク質の前記抗原決定基をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 5 のヌクレオチド配列または配列番号 5 のヌクレオチド配列と少なくとも 75 % の同一性を有するその変異体を含む、請求項 17 に記載の組換えMVA。

【請求項 23】

前記RSV膜糖タンパク質の前記抗原決定基をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 6 のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 17 または 22 のいずれかに記載の組換えMVA。 20

【請求項 24】

2歳を超えるヒト対象に投与するための、請求項 16、17、19 および 21 ~ 23 のいずれか 1 つに記載の組換えMVA。

【請求項 25】

2歳未満のヒト対象に投与するための、請求項 16、17、19 および 21 ~ 23 のいずれか 1 つに記載の組換えMVA。

【請求項 26】

2歳を超えるヒト対象に投与するための、請求項 15、18 または 20 に記載の薬学的組成物。 30

【請求項 27】

2歳未満のヒト対象に投与するための、請求項 15、18 または 20 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、呼吸器多核体ウイルス (RSVウイルス) による感染に対する改善されたワクチンとしての組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVAウイルス)、ならびに関連する製品、方法、および使用に関する。具体的には、本発明は、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列とを含む、遺伝子改変組換えMVAベクターに関する。本発明はまた、例えば、対象の免疫応答に影響を与えるのに適しているか、または、RSV感染症を診断し、さらには対象が RSV 感染症再発のリスクがあるかどうかを決定するのに適した、その製品、方法、および使用にも関する。 40

【背景技術】

【0002】

RSV は、重大な呼吸器病原体である。急性下気道 (LRT) 感染症は、世界中で、5 歳未満の乳幼児および小児における著しい罹患率および死亡率の原因となっている [A . 50

M. Aliyu et al. (2010), Bayero J. Pure Appl. Sci. 3(1): 147-155]。RSVウイルス(RSV)は、LRT感染症の最も臨床的に重要な原因である: RSVによる一次感染は、一般的に2歳までに発生する[W. P. Glezen (1987), Ped. Virol. 2: 1-4; Y. Murata (2009), Clin. Lab. Med. 29(4): 725-739]。RSVの一次感染は、RSVに対する完全な免疫を誘導しないため、生涯を通じて頻繁に再感染が起こり、最も深刻な感染は、非常に幼い子供、非常に高齢の成人、およびあらゆる年齢の免疫不全の患者に発生する[Y. Murata (2009)]。

【0003】

RSV感染者のうち40%もの多くの人々が、最終的には、入院を要する深刻なLRT疾患を発症するが、疾患の重症度および強度は、感染の規模および強度、ならびに宿主応答に依存する[Aliyu et al. (2010)]。RSVはまた、免疫系、呼吸器系、または心臓系に欠陥を有するあらゆる年齢の患者において深刻なLRT疾患を引き起こす可能性もあり、小児が後に喘息を発症する素因にもなり得る。米国だけでも、RSVは、1年間に推定126,000件の入院および300件の乳幼児の死亡の原因となっている[Y. Murata (2009)]。さらに、RSVは、高齢者患者、および心肺疾患または免疫抑制疾患を根底に有する患者の間で、毎冬、80,000件を超える入院および13,000件を超える死亡の原因となっている[Y. Murata (2009)]。呼吸器病原体としてのRSVの重要性にもかかわらず、現在のところ、安全かつ効果的なRSVワクチンが市場に存在しない。

【0004】

RSVは、パラミクソウイルス科亞科であるニューモウイルス属のエンベロープRNAウイルスである[Aliyu et al. (2010)]。各RSVビリオンは、8つの構造タンパク質(G、F、SH、M1、N、P、M2.1、およびL)と、3つの非構造タンパク質(NS1、NS2、およびM2.2)とを含む11個の別個のタンパク質をコードする10個の遺伝子を含有する(M2は2つの読み取り枠を含有する)、約15,191ヌクレオチドの非分割型マイナスセンスの一本鎖RNA分子を含有する[Y. Murata (2009)]。ゲノムは、以下の順序でNS1からLへ連続的に転写される: 3' - NS1 - NS2 - N - P - M1 - SH - G - F - M2.1 - M2.2 - L - 5'。

【0005】

ウイルスのエンベロープは、3つの膜貫通糖タンパク質(付着糖タンパク質(G)、融合糖タンパク質(F)、および低分子疎水性タンパク質(SH))、ならびにマトリックス(M1)タンパク質を含有する[Y. Murata (2009)]。RSVの複製中、ウイルスは、重度にグリコシリ化されたGタンパク質によって媒介されるプロセスにおいて標的細胞に最初に付着する。次いで、ウイルスは、Fタンパク質によって媒介されるプロセスにおいて宿主細胞と融合し、それによって細胞膜を透過して宿主細胞に進入する; Fタンパク質は、RSV感染細胞の特徴である合胞体の形成にも必要である。付着および融合プロセスは、SHタンパク質によって増強される。M1タンパク質は、エンベロープタンパク質FおよびG、ならびにヌクレオカプシドタンパク質N、P、およびM2.1と相互作用することにより、成熟RSVの構築を調節する(以下を参照)。エンベロープ内で、ウイルスRNAは、ヌクレオカプシドタンパク質(N)、リン酸化タンパク質(P)、転写伸長因子(M2.1)およびRNAポリメラーゼ(L)タンパク質からなる転写酵素複合体によってキャプシド形成される[Y. Murata (2009)]。Nは、ゲノムRNAと会合し、Pは、ウイルスRNAポリメラーゼLの補助因子である。M2.1は、ウイルス転写に必要な伸長因子であり、M2.2は、ウイルスゲノムの転写を調節する。最後に、NS1およびNS2が、I型インターフェロンの活性を阻害する。

【0006】

臨床的なRSV分離株は、抗原群(AまたはB)に従って分離され、各抗原群のウイルスゲノム内の遺伝的変異性に基づいて複数の遺伝子型(例えば、A群の,A₂またはA_{Lung}、およびB群のB₁、CH-18537、または8/60)にさらに細分類される

10

20

30

40

50

[Y. Murata (2009)]。分類は、付着糖タンパク質（Gタンパク質）に対するモノクローナル抗体とのウイルスの反応性に基づいており、種々の遺伝学的解析によるものである。[M. Sato et al., J. Clin. Microbiol. 43 (1) : 36 - 40 (2005)]。ウイルス分離株の中でも、RSVによってコードされるいくつかのタンパク質は、アミノ酸配列のレベルで高度に保存される一方で（例えば、F）、他のタンパク質は、2つの主要な抗原群の間および中で広く異なる（例えば、G）[Y. Murata (2009)]。AおよびB抗原群のFタンパク質は、著しい相同意を共有する。対照的に、Gタンパク質は、2つの抗原群の間で著しく異なる。

【0007】

Gタンパク質は、最も可変性が高いRSVタンパク質であり、その超可変性C末端領域は、株特異性エピトープの大部分を構成する。Gタンパク質の分子疫学および進化パターンは、RSVの臨床的および疫学的特徴に関する重要な情報を提供してきた。典型的には、いくつかの異なる遺伝子型が一度に循環し、毎年、地域で優勢な遺伝子型が変化し得る。しかしながら、RSVの臨床的および疫学的特徴にとっての株の多様性の重要性は、依然として十分に理解されていない。したがって、組換えRSVタンパク質は、遺伝子またはタンパク質がクローニングされた元のRSV株を示す株表示を伴う。例えば、RSV株 A_{Long} からクローニングされたGタンパク質は、G(A_{Long})、RSV A_{Long} G、またはRSV A_{Long} Gタンパク質と命名される。

【0008】

RSVは、感染した宿主において、ケモカインおよびサイトカインの分泌、中和性液性抗体および粘膜抗体の産生、ならびにCD4+（例えば、T_H1およびT_H2）およびCD8+（例えば、CTL）T細胞の産生を含む、様々な免疫応答を刺激する。ウイルスは *in vivo*での細胞病理を限定する原因となるため、そのような宿主免疫応答は、RSV感染症の臨床症状に大きく寄与する[Y. Murata (2009)]。RSVが誘導する疾患の表現型発現および重症度は、RSV感染症によって刺激される免疫応答の範囲内でのバランスおよび相互作用によって媒介されるようである[Y. Murata (2009)]。

【0009】

多くの以前の研究は、細胞性免疫応答および液性免疫応答が、RSVに対する免疫の誘導およびRSV感染症の治癒、ならびに疾患の進行において異なる役割を果たすことを提倡している[Y. Murata (2009)および本明細書の参考文献]。例えば、ヒト化抗F抗体を用いた研究は、抗RSV抗体が、感染の重症度を防止または制限するのに十分である一方で、それらは、ウイルス感染を排除するためには必要とされないことを示した[Y. Murata (2009); A. F. G. Antonis et al. (2007), Vaccine 25: 4818 - 4827]。対照的に、T細胞応答は、確立されたRSV感染症を排除するために必要である[Y. Murata (2009)]。RSVが誘導するT細胞応答は、感染中の肺病理においても重要な役割を果たす。例えば、インターフェロン-（IFN）を分泌するT_H1細胞（関連するCD8+CTL応答を伴うかまたは伴わない）は、最小限の肺病理をともなってRSVを排除し、インターロイキン4（IL-4）を分泌するT_H2細胞もまた、RSVを排除するが、以前のワクチン臨床試験中に観察された重篤な疾患の特徴である好酸球浸潤を含む、著しい胚変化を伴うことが多い（以下を参照）。

【0010】

以下の項により詳しく記載するように、RSV感染症の免疫学、ウイルス学、および生理学に関する豊富な情報が入手可能であるにもかかわらず、持続する免疫を誘導する一方で、同時に、ワクチン接種後にRSVに曝露された時に重篤な疾患を引き起こさないためには正確にどのような免疫応答が最も効果的である可能性が高いかは、依然として全く明らかになっていない。

【0011】

従来のワクチン開発

10

20

30

40

50

ワクチンは、典型的には、標的感染性因子または病原体（例えば、ウイルス、細菌、もしくは寄生虫）に対する保護免疫を誘導するために、以下を含むいくつかの戦略のうちの1つを使用する：（1）不活化病原体の調製；（2）生の弱毒化病原体（遺伝的に弱毒化した病原体株を含む）の調製；（3）精製タンパク質サブユニットワクチンの調製；（4）病原体抗原および／またはアジュバントをコードするウイルスベクターに基づくワクチン、および（5）病原体抗原をコードするDNAに基づくワクチン。

【0012】

1960年代に、米国でホルマリン不活化RSV（F I - R S V）ワクチンの有効性を試験する臨床試験が実施され、散々な結果となるまで、初期のRSVワクチンの開発努力は、不活化ウイルスの調製に焦点を合わせていた [M. R. Olson & S. M. Varga (2007), J. Immunol. 179: 5415 - 5424]。ワクチン接種を受けた有意な数の患者が、後にRSVに自然感染すると、好酸球および好中球の浸潤を特徴とする重篤な肺疾患およびかなりの炎症反応を発生した [Olson & Varga (2007), [Blanco JC et al. (2010) Hum Vaccin. 6: 482 - 92]。これらの患者の多くは、入院が必要であり、数人の危篤状態の患者が死亡した。その結果として、研究者たちは、より安全なRSVワクチンを開発するために、後に曝露された時の重篤な疾患の発症に寄与するウイルスおよび／または宿主因子の探究を開始した。その研究により、RSVの生物学およびそれが誘導することができる広範囲の免疫応答に関する新しい情報が得られたが、安全かつ効果的なRSVワクチンは、依然として分からぬままである。

【0013】

F I - R S V後のワクチン開発努力は、主としてG、F、およびより低い程度のN、またはM2を使用した単一抗原ワクチンに焦点を当てており、ウイルス抗原は、ウイルスベクターもしくはウイルス遺伝子を発現するプラスミドDNAベクターによって、または精製タンパク質としてのいずれかで送達される。[例えば、W. Olszewska et al. (2004), Vaccine 23: 215 - 221; G. Taylor et al. (1997), J. Gen. Virol. 78: 3195 - 3206; and L. S. Wyatt et al. (2000), ワクチン 18: 392 - 397を参考のこと]。F + Gの組み合わせを用いたワクチン接種はまた、仔ウシ、コットンラット、およびBALB/cマウスにおいても試験され、様々な結果を示した [Antonis et al. (2007) (仔ウシ); B. Moss, 1986年4月8日出願の米国特許出願第06/849, 299号(「'299出願」) (コットンラット); およびL. S. Wyatt et al. (2000) (BALB/cマウス)]。FおよびGのどちらも、仔ウシ、マウス、ラット、ヒト、および少なくともある程度はマカク乳幼獣において免疫原性である [A. F. G. Antonis et al. (2007) (仔ウシ); B. Moss, '299出願 (コットンラット); L. de Waal et al. (2004), ワクチン 22: 923 - 926 (マカク乳幼獣); L. S. Wyatt et al. (2000) (BALB/cマウス)]; Y. Murata (2009) (ヒト)]。

【0014】

しかしながら、意義深いことに、RSVワクチン候補によって誘導される免疫応答の性質および種類は、使用されるワクチンの種類、選択される抗原、投与経路、およびさらには使用されるモデル生物に応じて、非常に大きく異なることが多い。例えば、生RSVを用いた、またはRSV Fタンパク質をコードする複製ベクターを用いた免疫化は、優勢なT_H1応答を伴って中和抗F抗体およびCD8 + CTLの産生を誘導する：両方ともワクチン接種後にウイルスに曝露された時の最小限の肺病理と関連する [Y. Murata (2009) および本明細書に引用される参考文献]。対照的に、F I不活化RSV調製物を用いた免疫化は、CD8 + CTL応答を全く示さずに優勢なT_H2応答を誘導し、肺における病理変化の増加をもたらす [Y. Murata (2009) および本明細書に引用される参考文献]。興味深いことに、精製サブユニットワクチンとしてのまたは複製

10

20

30

40

50

ベクター中における RSV G タンパク質の投与は、優勢な TH2 応答を誘導し、最終的には、ワクチン接種後にウイルスに曝露されると、FI - RSV で観察された重篤な疾患に非常に類似した応答である好酸球性肺浸潤および気道過敏性を引き起こす [Y. Mura ta (2009) および本明細書に引用される参考文献]。さらに、RSV F タンパク質をコードする改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) のワクチン接種は、仔ウシにおいて抗 F 抗体および F 特異的 CD8+T 細胞を誘導し、一方、MVA - F + MVA - G のワクチン接種は、抗 F および抗 G 抗体は誘導したが、F または G 特異的 CD8+T 細胞は誘導しなかった [A. F. G. Antonis et al. (2007)]。

【0015】

F タンパク質 (VV - F) を発現するワクシニアウイルス (VV) を用いたマウスのワクチン接種は、強い CD8+T 細胞応答を誘導し、FI - RSV で免疫したマウスと同様かまたはそれよりも多い体重損失を伴って、複製 RSV の肺からのクリアランスをもたらした [W. Olszewska et al. (2004)]。しかしながら、それは、IL - 4 および IL - 5 等の TH2 サイトカインの分泌増大に起因する、FI - RSV または G タンパク質を発現する VV (VV - G) によって誘導される重篤な疾患 (複合型の TH2 応答、肺好酸球および体重損失) とは関連していなかった。当該技術分野の中には、細胞成分および液性成分の両方を含む比較的バランスの取れた免疫応答を誘導することができる RSV ワクチンは、ワクチン接種後の曝露時に免疫病理の増強を示す可能性は低いと提唱する者もあった [W. Olszewska et al. (2004)]。

【0016】

しかしながら、F、G、または F + G をコードする改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) を用いた BALB/c マウスのワクチン接種は、液性応答 (すなわち、バランスの取れた IgG1 および IgG2a の応答) および TH1 応答 (すなわち、IFN / インターロイキン - 12 (IL - 12) のレベルの増加およびインターロイキン - 4 (IL - 4) / インターロイキン - 5 (IL - 5) のレベルの減少) の両方を含む、まさにそのようなバランスの取れた免疫応答を誘導したが、それにもかかわらず、ワクチン接種した動物は、なおもある程度の体重損失を示した [W. Olszewska et al. (2004)]。

【0017】

いくつかの異なるモデル系において、種々のワクチン候補によって誘導される免疫応答の性質および程度を特徴づけようと多大な労力を費やしたにもかかわらず、ワクチンのレスピエントを重篤な疾患に罹患し易くすることなく、RSV に対する持続的かつ完全な免疫を伝達するためには、正確にどのような種類の免疫応答が必要とされるかは、依然として明らかになっていない。RSV の臨床的負担と利用可能な治療および予防の選択肢との間の著しい不均衡のために、RSV ワクチンの開発は、未だに満たされない医学的な必要性である。

【発明の概要】

【0018】

RSV ワクチンを開発するための以前の失敗に終わった努力は、主として、RSV - F もしくは RSV - G 膜糖タンパク質またはその両方を用いたワクチン接種に焦点を当てていたが、本発明者らは、RSV 膜糖タンパク質の少なくとも 1 つの抗原決定基と、RSV ヌクレオカプシドタンパク質の少なくとも 1 つの抗原決定基とを発現する組換えワクシニアウイルスアンカラ (MVA) のワクチン接種が、より良好な保護を誘導することを発見した。また、そのような構築物は、鼻腔内経路によって適用されると、皮下適用と比較した場合、または Wyatt よりによって使用された筋肉内投与経路と比較した場合でも、ほぼ完璧な無菌免疫を誘導する [L. S. Wyatt et al. (2000)]。候補 RSV ワクチンを鼻腔内に投与することによって、筋肉内投与と比較して強化された保護を得ることができる。

【0019】

RSV F もしくは RSV G 膜糖タンパク質のいずれか (または両方) (例えば、M

10

20

30

40

50

V A - m B N 1 9 9 B) を発現する組換え M V A 、あるいは R S V 膜糖タンパク質の少なくとも 1 つの抗原決定基と、 R S V ヌクレオカプシドタンパク質の少なくとも 1 つの抗原決定基とを発現する組換え M V A (例えば、 M V A - m B N 2 0 1 B) では、本発明者らは、曝露後 4 日目に肺における R S V の複製を観察しなかったが、 R S V ゲノムは、なおも R T - q P C R によって検出可能であった。 R S V 膜糖タンパク質の少なくとも 1 つの抗原決定基と、 R S V ヌクレオカプシドタンパク質の少なくとも 1 つの抗原決定基とを発現する組換え M V A (例えば、 M V A - m B N 2 0 1 B) は、 R S V ヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基に対してより強い C D 8 + T 細胞応答を誘導したため、それらは、より良好な保護と、 R T - q P C R によって検出可能な R S V ウイルス負荷のより大きな減少を誘導した。鼻腔内経路によるそのような組換えウイルスの投与はさらに、そのような構築物が皮下投与された場合には見られない応答である粘膜免疫応答および I g A 抗体分泌を誘導したため、それらは、ほぼ完全な無菌免疫 (R S V ウイルス負荷が R T - q P C R によってほとんど検出不能である) を誘導した。

【 0 0 2 0 】

F I - R S V とは対照的に、そのような構築物は、良好な抗体応答を生成するバランスの取れた T h 1 - 免疫応答、および R S V 抗原に特異的な強い細胞性免疫応答を誘導する。良好な I g A 抗体応答の誘導に加えて、従来の皮下投与から得られるものよりもさらに高い I g G 抗体レベルを生成するワクチンの鼻腔内投与により、保護が改善され、体重損失が減少した。しかしながら、細胞性免疫応答の大きさは、投与経路とは無関係である。興味深いことに、本発明者らは、 R S V 投与によって誘導された T 細胞応答と同様の、 R S V 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列と、 R S V ヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列とを発現する組換え M V A (例えば、 R S V - F 、 G 、 N 、および M 2 タンパク質を発現する M V A - m B N 2 0 1 B) によって誘導される T 細胞応答のパターンを、かなり高くはあったが、観察した。

【 0 0 2 1 】

したがって、第 1 の態様において、本発明は、 R S V ウィルス (R S V) 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列と、 R S V ヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列とを含む、組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) を提供する。

【 0 0 2 2 】

改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A)

M V A は、 Vaccination Institute (Ankara , Turkey) で何年も維持され、ヒトのワクチン接種のための基盤として使用されていた皮膚ワクシニア株アンカラのニワトリ胚線維芽細胞で 570 を超える連続継代によって產生される [漿尿膜ワクシニアウイルスアンカラウイルス、 C V A ; 検討には Mayr et al . (1975) , Infection 3 , 6 - 14 を参照] 。しかしながら、ワクシニアウイルスに関連したワクチン接種後の合併症が重症であることが多いため、より弱毒化された、より安全な天然痘ワクチンを作製しようとするいくつかの試みがあった。

【 0 0 2 3 】

1960 ~ 1974 の期間中、 Anton Mayr 教授が、 C E F 細胞において 570 を超える連続継代により C V A を弱毒化することに成功した [Mayr et al . (1975)] 。様々な動物モデルにおいて、得られた M V A が非病原性であることが示された [Mayr , A . & Danner , K . (1978) , Dev . Biol . Stand . 41 : 225 - 234] 。天然痘前ワクチンとしての M V A の初期開発の一環として、ワクシニアによる有害反応のリスクがある対象において、 Lister Elstree と併用して M V A - 517 を用いた臨床試験が行われた [Stickl (1974) , Prev . Med . 3 : 97 - 101 ; Stickl and Hochstein - Mintzel (1971) , Munich Med . Wochenschr . 113 : 1149 - 1153] 。1976 年に、 M V A - 571 原種 (571 番目の継代に相当す 40 50

る)に由来するMVAが、2段階の非経口天然痘ワクチン接種プログラムにおける予備刺激ワクチンとしてドイツで登録された。続いて、大半が1~3歳の小児である約120,000人の白人個体にMVA-572を使用した: 対象の多くはワクシニアに関連する合併症のリスクが高い集団内であったが、重度の副作用は報告されなかった(Mayr et al. (1978), Zentralbl. Bacteriol. (B) 167: 375-390)。MVA-572は、European Collection of Animal Cell CulturesにECACC V94012707として受託された。

【0024】

MVAを弱毒化するために用いられた継代の結果として、CEF細胞における継代数に応じて多くの異なる株または単離株が存在する。例えば、MVA-572は、天然痘撲滅プログラムの間にドイツで使用され、MVA-575は、動物用ワクチンとして広く使用された。MVA-575は、2000年12月7日に、European Collection of Animal Cell Cultures(ECACC)に受託番号V00120707で受託された。初代ニワトリ胚線維芽細胞上でCVAを連続繁殖することにより(570を超える継代)、弱毒化CVA-ウイルスMVA(改変ワクシニアウイルスアンカラ)を得た。

【0025】

1970年代に、Mayrらが、MVAはヒトおよび哺乳動物において高度に弱毒化され、非病原性であることを証明したが、一部の研究者は、哺乳類細胞株およびヒト細胞株において残存複製が起こる可能性があるため、MVAが完全には弱毒化されないと報告している[Blanchard et al. (1998), J Gen Virol 79: 1159-1167; Carroll & Moss (1997), Virology 238: 198-211; U.S. Pat. No. 5,185,146; Ambrosini et al. (1999), J Neurosci Res 55: 569]。使用されたウイルスは、その特性、特に種々の細胞株におけるそれらの成長挙動が、本質的に異なるため、これらの刊行物で報告された結果は、様々な既知のMVA株を用いて得られたものであると推察される。そのような残存複製は、ヒトにおける使用に関連した安全性の懸念を含む種々の理由から望ましくない。

【0026】

より安全な製品、例えばワクチンまたは医薬品を開発するために、強化された安全性プロファイルを有するMVAの株がBavarian Nordicによって開発された:MVAは、Bavarian Nordicによってさらに継代され、MVA-BNと命名されている。MVAおよびMVA-BNは、祖先CVAウイルスと比較してゲノムの約15%(6つの領域から31kb)を欠損している。この欠失は、多くの病原性および宿主範囲遺伝子、ならびにA型封入体の遺伝子に影響を与える。継代583に相当するMVA-BNの試料は、2000年8月30日に、European Collection of Cell Cultures(ECACC)で番号V00083008の下に受託された。

【0027】

MVA-BNは、ウイルスによってコードされる遺伝子が非常に効率的に発現されるヒト細胞に付着して、該細胞内に進入することができる。しかしながら、子孫ウイルスの構築および放出は起こらない。MVA-BNは、初代ニワトリ胚線維芽(CEF)細胞に強く適合されており、ヒト細胞中では複製しない。ヒト細胞中では、ウイルス遺伝子は発現されるが、感染性ウイルスは生成されない。MVA-BNは、米国のCenters for Disease Control and Preventionによってバイオセイフティーレベル1の生物として分類されている。MVA-BNおよび誘導体の調製物は、多くの種類の動物、および免疫不全の個体を含む2000人を超えるヒト対象に投与してきた。全てのワクチン接種は、一般的に安全であり、良好な耐容性を示すことが証明されている。その高度な弱毒化および病原性の低下にもかかわらず、前臨床試験においても

10

20

30

40

50

て、MVA-BNは、MVAゲノム内にクローニングされた遺伝子によってコードされるワクチンおよび異種遺伝子産物に対して、液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を誘発することが示されている [E. Harrer et al. (2005), Antivir. Ther. 10(2): 285-300; A. Cosma et al. (2003), Vaccine 22(1): 21-9; M. Di Nicola et al. (2003), Hum. Gene Ther. 14(14): 1347-1360; M. Di Nicola et al. (2004), Clin. Cancer Res., 10(16): 5381-5390]。

【0028】

MVAの「誘導体」または「変異体」は、本明細書に記載のMVAと本質的に同じ複製特徴を示すが、それらのゲノムの1つ以上の部分で相違を示すウイルスを指す。MVA-BNおよびMVA-BNの誘導体または変異体は、ヒトおよびマウス（たとえ重度に免疫抑制されたマウスであっても）において *in vivo* で繁殖的に複製することができない。より具体的には、MVA-BNまたはMVA-BNの誘導体もしくは変異体は、ニワトリ胚線維芽細胞（CEF）においても繁殖的に複製する能力を有するが、ヒトケラチノサイト細胞株HaCat [Boukamp et al. (1988), J Cell Biol 106: 761-771]、ヒトの骨の骨肉腫細胞株143B (ECACC番号91112502)、ヒト胚性腎臓細胞株293 (ECACC番号85120602)、およびヒト頸部腺癌細胞株HeLa (ATCC番号CCL-2)において繁殖的に複製する能力を有しないことが好ましい。さらに、MVA-BNの誘導体または変異体は、HeLa細胞およびHaCat細胞株におけるMVA-575よりも少なくとも2倍少ない、より好ましくは3倍少ないウイルス複製率を有する。MVA変異体のこれらの特性に関する試験およびアッセイは、国際特許公開WO 02/42480 (米国特許第2003/0206926号) および国際特許公開WO 03/048184 (米国特許第2006/0159699号) に記載されている（両方とも、参照により本明細書に組み込まれる）。

【0029】

ウイルスの増殖または複製は、通常、「複製率」と称される、最初に細胞を感染させるためにもともと使用した量（入力値）に対する感染細胞から生成されたウイルス（出力値）の比率として表される。複製率「1」は、感染細胞から生成されたウイルスの量が、細胞を感染させるために最初に使用した量と同じである複製状態を定義し、感染細胞がウイルスの感染および繁殖を許容することを意味する。対照的に、1未満の複製率、すなわち、入力レベルと比較した出力レベルの減少は、繁殖的複製の欠如、ひいてはウイルスの弱毒化を示唆する。

【0030】

MVAに基づくワクチンの利点は、それらの安全性プロファイルおよび大規模ワクチン生成の利用可能性を含む。前臨床試験によって、MVA-BNが、他のMVA株と比較して優れた弱毒化および有効性を示すことが明らかになっている（国際特許公開WO 02/42480）。MVA-BN株のさらなる特性は、DNA予備刺激／ワクシニアウイルス追加免疫計画と比較した時に、ワクシニアウイルス予備刺激／ワクシニアウイルス追加免疫計画において実質的に同じレベルの免疫を誘導する能力である。

【0031】

本明細書において最も好ましい実施形態である組換えMVA-BNウイルスは、哺乳類細胞におけるそれらの複製欠損性およびそれらの十分に確立された非病原性のために、安全であると考えられる。さらに、その有効性に加えて、産業規模での製造可能性が有益であり得る。その上、MVAに基づくワクチンは、複数の異種抗原を送達することができ、液性免疫と細胞性免疫の同時誘導を可能にする。

【0032】

別の態様において、組換えウイルスを作製するのに好適なMVAウイルス株は、株MVA-572、MVA-575、または任意の同様に弱毒化されたMVA株であり得る。ま

10

20

30

40

50

た、欠失型漿尿膜ワクシニアウイルスアンカラ (d C V A) 等の変異 M V A も好適であり得る。d C V A は、M V A ゲノムの d e l I、d e l I I、d e l I I I、d e l I V、d e l V、および d e l V I 欠失部位を含む。これらの部位は、複数の異種配列の挿入に特に有用である。d C V A は、ヒト細胞株（ヒト 293、143B、および M R C - 5 細胞株等）において繁殖的に複製することができ（10 を超える増幅率）、ウイルスに基づくワクチン接種戦略に有用なさらなる突然変異により最適化を可能にする（国際特許公開 WO 2011 / 092029 を参照）。

【0033】

定義

「抗原決定基」という用語は、宿主の免疫系を刺激して、細胞応答および／または液性抗体応答のいずれかの抗原特異的免疫応答を起こす任意の分子を指す。抗原決定基は、宿主においてなおも免疫応答を誘発し、抗原の一部を形成するタンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原、およびエピトープ；例えば、グリコシル化タンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原およびエピトープを含む、タンパク質、ポリペプチド、ならびに抗原タンパク質断片、抗原およびエピトープの相同体または変異体；そしてそのような分子をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。したがって、タンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原およびエピトープは、特定の天然ヌクレオチドまたはアミノ酸配列に限定されないが、天然の配列と同一な配列、ならびに欠失、付加、挿入、および置換等の天然の配列に対する修飾を包含する。

【0034】

好ましくは、そのような相同体または変異体は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列のレベルで、参照タンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原およびエピトープと、少なくとも約 50%、少なくとも約 60% または 65%、少なくとも約 70% または 75%、少なくとも約 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または 89%、より典型的には、少なくとも約 90%、91%、92%、93%、または 94%、さらにより典型的には、少なくとも約 95%、96%、97%、98%、または 99%、最も典型的には、少なくとも約 99% の同一性を有する。相同体または変異体という用語はまた、切断した、欠失させた、もしくは別様に修飾したヌクレオチドまたはタンパク質配列、例えば、(1) 全長 R S V - F もしくは R S V - G タンパク質のシグナルペプチドならびに膜貫通および／もしくは細胞質ドメインを欠損した、対応する R S V - F もしくは R S V - G タンパク質の可溶形態をコードする R S V - F もしくは R S V - G ヌクレオチド配列、(2) 全長 R S V - M 2 もしくは R S V - N タンパク質の欠失させた、切断した、もしくは別様に変異させた型をコードする R S V - M 2 もしくは R S V - N ヌクレオチド配列、(3) 全長 R S V - F もしくは R S V - G タンパク質のシグナルペプチドならびに膜貫通ドメインおよび／もしくは細胞質ドメインを欠損した、R S V - F もしくは R S V - G タンパク質の可溶形態、または(4) 全長 R S V - M 2 もしくは R S V - N タンパク質の欠失させた、切断した、もしくは別様に変異させた型を包含する。

【0035】

核酸とアミノ酸との間の配列同一性を決定するための技術は、当該技術分野で既知である。2つ以上の配列の「パーセント同一性」を決定することにより、それらを比較することができる。2つの配列のパーセント同一性は、核酸またはアミノ酸配列であろうと、整列させた2つの配列間の正確な一致の数を、より短い配列の長さで除して、100 を乗じたものである。

【0036】

本明細書に記載のタンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原およびエピトープに対する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、最大パーセント配列同一性を達成するために、配列を整列させ、必要であればギャップを導入した後に、参照配列（すなわち、それが由来するタンパク質、ポリペプチド、抗原タンパク質断片、抗原またはエピトープ）中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義

10

20

30

40

50

され、いずれの保存的置換も配列同一性の一部であるとは見なされない。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、当該技術分野の技術の範囲内の種々の方法で、例えば、BLAST、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェア等の公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して得ることができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

【0037】

同じことが「ヌクレオチド配列同一性パーセント(%)」にも準用される。

【0038】

例えば、核酸配列に適切なアライメントは、Smith and Waterman, (1981), Advances in Applied Mathematics 2: 482 - 489 の局所相同意アルゴリズムによって提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353 - 358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USAによって開発されたスコアリングマトリックスを使用してアミノ酸配列に適用し、Gribskov (1986), Nucl. Acids Res. 14 (6): 6745 - 6763 によって正規化することができる。配列のパーセント同一性を決定するためのこのアルゴリズムの例示的な実装は、「Best Fit」ユーティリティアプリケーション内のGenetics Computer Group (Madison, Wis.) によって提供される。この方法のためのデフォルトパラメータは、Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (available from Genetics Computer Group, Madison, Wis.) に記載されている。本発明の文脈においてパーセント同一性を確立する好ましい方法は、University of Edinburgh, developed by John F. Collins and Shane S. Sturrook, and distributed by Intelligent Genetics, Inc. (Mountain View, Calif.) に著作権があるプログラムのMPSCRCHパッケージを使用することである。この一連のパッケージから、Smith-Watermanアルゴリズムを用いることができ、スコア表にデフォルトパラメータが使用される(例えば、ギャップオープンペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ1、およびギャップ6)。作成されたデータから、「一致」の値が「配列同一性」を反映する。配列間のパーセント同一性または類似性を計算するための他の好適なプログラムは、当該技術分野で一般的に知られており、例えば、別のアライメントプログラムは、デフォルトパラメータを用いて使用されるBLASTである。例えば、BLASTNおよびBLASTPは、以下のデフォルトパラメータを用いて使用することができる: 遺伝コード = 標準; フィルタ = なし; 鎖 = 両方; カットオフ = 60; 予想 = 10; マトリックス = BLOSUM62; 記述 = 50 配列; 分別 = HIGH SCORE; データベース = 非冗長、GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 翻訳 + Swiss Tanpak質 + Suppdate + PIR。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスに見出すことができる: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>。

【0039】

本明細書で使用される場合、「異種」遺伝子、核酸、抗原、またはタンパク質は、野生型ポックスウイルスゲノムには存在しない核酸またはアミノ酸配列(例えば、MVA)であると理解される。当業者は、MVA等のポックスウイルスに存在する場合、「異種遺伝子」は、宿主細胞への組換えポックスウイルスの投与後、対応する異種遺伝子産物として、すなわち、「異種抗原」および/または「異種タンパク質」として発現されるような様

10

20

30

40

50

式で、ポックスウイルスゲノム中に組み入れられるべきであることを理解する。発現は、通常、ポックスウイルスに感染した細胞における発現を可能にする調節要素に異種遺伝子を作動可能に連結することによって達成される。好ましくは、調節要素は、天然または合成ポックスウイルスプロモーターを含む。

【0040】

本明細書で使用される「無菌免疫」は、R T - q P C R 等の高感度検出法が適用される場合に検出可能な R S V ゲノムの非存在下における保護免疫を意味する。

【0041】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈上そうではないと明らかに指示のない限り、複数形の指示対象を含むことに留意されなければならない。したがって、例えば、「エピトープ (an epitope)」への言及は、1つ以上のエピトープを含み、「方法 (the method)」への言及は、変更することができるか、または本明細書に記載の方法で置き換えることができる、当業者に既知の均等のステップおよび方法への言及を含む。10

【0042】

別途指定のない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、一連のあらゆる要素を指すと理解されたい。当業者は、日常的な実験を用いるだけで、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態の多くの均等物を認識もしくは確認することができるであろう。そのような均等物は、本発明に包含されることが企図される。20

【0043】

本明細書およびそれに続く特許請求の範囲を通じて、文脈上、別途要求のない限り、「含む (comprise)」という語、ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprising)」等の変化形は、記載される整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を包含するが、任意の他の整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を除外しないことを意味すると理解されたい。本明細書で使用される場合、「含む (comprising)」という用語は、「含む (containing)」もしくは「含む (includ ing)」という用語に置き換えることができるか、または、本明細書で使用される場合、時には「有する」という用語に置き換えることができる。前述の用語(含む (comprising)、含む (containing)、含む (includ ing)、有する)のいずれも、あまり好まれないが、本発明の態様または実施形態の文脈において本明細書で使用される場合はいつも、「～からなる」という用語に置き換えることができる。30

【0044】

本明細書で使用される場合、「～からなる」は、特許請求の範囲の構成要件に規定されていないあらゆる要素、ステップ、または成分も除外する。本明細書で使用される場合、「～から本質的になる」は、特許請求の範囲の基本的かつ新規の特徴に実質的に影響しない材料またはステップを除外しない。

【0045】

本明細書で使用される場合、列挙される複数の要素の間の「および / または」という接続語は、個々の選択肢および組み合わせた選択肢の両方を包含すると解釈されたい。例えば、2つの要素が「および / または」によって結合される場合、最初の選択肢は、第2の要素を含まない第1の要素の適用性に言及する。第2の選択肢は、第1の要素を含まない第2の要素の適用性に言及する。第3の選択肢は、第1の要素および第2の要素の一緒の適用性に言及する。これらの選択肢のいずれも、本明細書で使用される「および / または」という用語の意味の範囲内に属し、従って、その要件を満たすと理解されたい。選択肢のうちの1つより多くの同時適用性もまた、「および / または」という用語の意味の範囲内に属し、従って、その要件を満たすと理解されたい。40

R S V のヌクレオチド配列およびタンパク質

本明細書で述べる R S V 遺伝子は、たとえ、株または分離株間で遺伝子の正確な配列および / またはゲノムの位置が異なる可能性がある場合であっても、任意の R S V 株または50

分離株の対応するタンパク質をコードする遺伝子、またはその遺伝子の相同体もしくは変異体を指す。

【0046】

同様に、本明細書で述べるRSVタンパク質は、上で定義した対応するタンパク質遺伝子によってコードされ、かつ発現されるタンパク質、またはそのタンパク質の相同体もしくは変異体を指す。

【0047】

例として、本明細書において交換可能に使用される場合、「Fタンパク質遺伝子」、「F糖タンパク質遺伝子」、「RSV Fタンパク質遺伝子」、「RSV F糖タンパク質遺伝子」、または「F遺伝子」という用語は、たとえ、株または分離株間でFタンパク質遺伝子の正確な配列および／またはゲノムの位置が異なる可能性がある場合であっても、任意のRSV株または分離株の膜貫通融合糖タンパク質をコードする遺伝子、またはその遺伝子の相同体もしくは変異体を指す。例えば、RSVのA2株において、F(A2)タンパク質遺伝子は、GenBank 受入番号M11486で番号付けされたヌクレオチド5601～7499（エンドポイントを含む）を含む。F(A2)タンパク質遺伝子は、GenBank 受入番号 M11486で番号付けされたヌクレオチド5614～7338（エンドポイントを含む）に及ぶ読み取り枠(ORF)をコードするタンパク質をさらに含む。RSV A2からのFタンパク質遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号28に記載される。

【0048】

また、上で定義したRSV Fタンパク質遺伝子によってコードされ、かつ発現される重度にグリコシル化された膜貫通 融合糖タンパク質、またはそのタンパク質の相同体もしくは変異体を指す「Fタンパク質」、「F糖タンパク質」、「RSV Fタンパク質」、「RSV F糖タンパク質」、または「F」という用語も、本明細書において交換可能に使用される。RSV A2からのFタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号29に記載される。RSV(A2)Fタンパク質は、シグナルペプチド、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含む（例えば、UniProtKB/Swiss-Prot 受入番号 P03420を参照）。RSV A2 Fタンパク質のシグナルペプチドは、配列番号29のアミノ酸1～21；配列番号29のアミノ酸1～529または配列番号29のアミノ酸22～529からなるRSV A2 Fタンパク質の細胞外ドメイン；配列番号29のアミノ酸530～550からなるRSV A2 Fタンパク質の膜貫通ドメイン；および配列番号29のアミノ酸551～574からなるRSV A2 Fタンパク質の細胞質ドメインからなる。

【0049】

同様に、「Gタンパク質遺伝子」、「G糖タンパク質遺伝子」、「RSV Gタンパク質遺伝子」、「RSV G糖タンパク質遺伝子」、または「G遺伝子」という用語も、本明細書において交換可能に使用される。例えば、RSVのA2株において、G(A2)タンパク質遺伝子は、GenBank 受入番号M11486で番号付けされたヌクレオチド4626～5543（エンドポイントを含む）を含む。G(A2)タンパク質遺伝子は、GenBank 受入番号 M11486で番号付けされたヌクレオチド4641～5537（エンドポイントを含む）に及ぶ読み取り枠(ORF)をコードするタンパク質をさらに含む。RSV A2からのGタンパク質遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号30に記載される。

【0050】

「Gタンパク質」、「G糖タンパク質」、「RSV Gタンパク質」、「RSV G糖タンパク質」、または「G」という用語は、重度にグリコシル化された膜貫通付着糖タンパク質、またはそのタンパク質の相同体もしくは変異体を指す。RSV A2からのGタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号31に記載される。RSV A2 Gタンパク質は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含む（例えば、UniProtKB/Swiss-Prot 受入番号 P03423を参照）。RSV A2 G

10

20

30

40

50

タンパク質の細胞外ドメインは、配列番号31のアミノ酸67～298；配列番号31のアミノ酸38～66からなるRSV A2 Gタンパク質の膜貫通ドメイン；および配列番号31のアミノ酸1～37からなるRSV A2 Gタンパク質の細胞質ドメインからなる。

【0051】

また、「M2タンパク質遺伝子」、「M2ヌクレオカプシドタンパク質遺伝子」、「RSV M2タンパク質遺伝子」、「RSV M2マトリックスタンパク質遺伝子」、「RSV M2ヌクレオカプシドタンパク質遺伝子」、または「M2 gene」という用語も、本明細書において交換可能に使用される。例えば、RSVのA2株において、M2(A2)タンパク質遺伝子は、GenBank 受入番号M11486で番号付けされたヌクレオチド7550～8506(エンドポイント含む)を含む。M2(A2)タンパク質遺伝子は、GenBank 受入番号 M11486で番号付けされたヌクレオチド7559～8143(エンドポイントを含む)に及ぶ読み取り枠(ORF)をコードするタンパク質をさらに含む。RSV A2からのM2タンパク質遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号32に記載される。10

【0052】

「M2タンパク質」、「M2ヌクレオカプシドタンパク質」、「RSV M2タンパク質」、「RSV M2ヌクレオカプシドタンパク質」、「RSV M2マトリックスタンパク質」、または「M2」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。RSV A2からのM2タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号33に記載される(例えば、UniProtKB/Swiss-Prot 受入番号 P04545を参照)。20

【0053】

また、「Nタンパク質遺伝子」、「Nヌクレオカプシドタンパク質遺伝子」、「RSV Nタンパク質遺伝子」、「RSV Nヌクレオカプシドタンパク質遺伝子」、または「N gene」という用語も、交換可能に使用されてもよい。例えば、RSVのA2株において、N(A2)タンパク質遺伝子は、GenBank 受入番号M11486で番号付けされたヌクレオチド1081～-2277(エンドポイントを含む)を含む。N(A2)タンパク質遺伝子は、GenBank 受入番号 M11486で番号付けされたヌクレオチド 1096～2271(エンドポイントを含む)に及ぶ読み取り枠(ORF)をコードするタンパク質をさらに含む。RSV A2からのNタンパク質遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号34に記載される。30

【0054】

RSV A2からの(本明細書において交換可能に使用される用語である)「Nタンパク質」、「Nヌクレオカプシドタンパク質」、「RSV Nタンパク質」、「RSV Nヌクレオカプシドタンパク質」、または「N」のアミノ酸配列は、配列番号35に記載される(例えば、UniProtKB/Swiss-Prot 受入番号 P03418を参照)。

【0055】

本発明の特定の実施形態

特定の実施形態において、組換えMVAは、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列を発現する。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV F抗原決定基をコードする。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV G抗原決定基をコードする。特定の実施形態において、RSV F抗原決定基は、RSV株A2に由来する。特定の実施形態において、RSV G抗原決定基は、RSV株A2に由来する。40

【0056】

特定の実施形態において、組換えMVAは、各々がRSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする2つの異種ヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、RSV膜糖

タンパク質の第1の抗原決定基は、RSV F抗原決定基であり、RSV膜糖タンパク質の第2の抗原決定基は、RSV G抗原決定基である。特定の実施形態において、RSV F抗原決定基は、RSV株A2に由来する。特定の実施形態において、RSV G抗原決定基は、RSV株A2に由来する。特定の実施形態において、RSV F抗原決定基およびRSV G抗原決定基の両方が、RSV株A2に由来し得る。

【0057】

特定の実施形態において、組換えMVAは、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列とを発現する。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV F抗原決定基をコードし、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV M2抗原決定基をコードする。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV F抗原決定基をコードし、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV N抗原決定基をコードする。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV G抗原決定基をコードし、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV M2抗原決定基をコードする。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV G抗原決定基をコードし、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV N抗原決定基をコードする。

10

【0058】

特定の実施形態において、組換えMVAは、各々がRSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする2つの異種ヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第1の抗原決定基は、RSV F抗原決定基であり、RSV膜糖タンパク質の第2の抗原決定基は、RSV G抗原決定基である。特定の実施形態において、組換えMVAは、各々がRSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする2つの異種ヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列とを含む。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第1の抗原決定基は、RSV F抗原決定基であり、RSV膜糖タンパク質の第2の抗原決定基は、RSV G抗原決定基であり、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基は、RSV M2抗原決定基である。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第1の抗原決定基は、RSV F抗原決定基であり、RSV膜糖タンパク質の第2の抗原決定基は、RSV G抗原決定基であり、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基は、RSV N抗原決定基である。特定の実施形態において、RSV F抗原決定基およびRSV G抗原決定基の両方が、RSV株A2に由来し得る。

20

【0059】

特定の実施形態において、組換えMVAは、各々がRSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする2つの異種ヌクレオチド配列と、各々がRSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする2つの異種ヌクレオチド配列とを含む。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第1の抗原決定基は、RSV F抗原決定基であり、RSV膜糖タンパク質の第2の抗原決定基は、RSV G抗原決定基であり、RSVヌクレオカプシドタンパク質の第1の抗原決定基は、RSV M2抗原決定基であり、RSVヌクレオカプシドタンパク質の第2の抗原決定基は、RSV N抗原決定基である。特定の実施形態において、RSV F抗原決定基およびRSV G抗原決定基の両方が、RSV株A2に由来する。

30

【0060】

特定の実施形態において、組換えMVAは、各々がRSV膜糖タンパク質の抗原決定基

40

50

をコードする3つの異種ヌクレオチド配列と、各々がRSVヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードする2つの異種ヌクレオチド配列とを含む。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第1の抗原決定基は、RSV-F抗原決定基であり、RSV膜糖タンパク質の第2の抗原決定基は、RSV-G抗原決定基であり、RSVヌクレオカブシドタンパク質の第1の抗原決定基は、RSV-M2抗原決定基であり、RSVヌクレオカブシドタンパク質の第2の抗原決定基は、RSV-N抗原決定基である。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第1の抗原決定基およびRSV膜糖タンパク質の第2の抗原決定基の両方が、RSV株A2に由来する。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第3の抗原決定基は、RSV-F抗原決定基である。

【0061】

10

特定の実施形態において、組換えMVAは、各々がRSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする4つの異種ヌクレオチド配列と、各々がRSVヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードする2つの異種ヌクレオチド配列とを含む。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第1の抗原決定基は、RSV-F抗原決定基であり、RSV膜糖タンパク質の第2の抗原決定基は、RSV-G抗原決定基であり、RSVヌクレオカブシドタンパク質の第1の抗原決定基は、RSV-M2抗原決定基であり、RSVヌクレオカブシドタンパク質の第2の抗原決定基は、RSV-N抗原決定基である。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第1の抗原決定基およびRSV膜糖タンパク質の第2の抗原決定基の両方が、RSV株A2に由来する。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第3の抗原決定基は、RSV-F抗原決定基である。特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の第4の抗原決定基は、RSV-G抗原決定基である。

【0062】

20

特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV-F抗原決定基をコードする。特定の実施形態において、RSV-F抗原決定基は、全長である。特定の実施形態において、RSV-F抗原決定基は、切斷型である。特定の実施形態において、RSV-F抗原決定基は、変異体RSV-F抗原決定基である。特定の実施形態において、全長、切斷型、または変異体RSV-F抗原決定基は、RSV株A2に由来する。特定の実施形態において、全長RSV(A2)F抗原決定基は、配列番号29のアミノ酸配列をコードする配列番号28のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、変異体RSV(A2)F抗原決定基は、配列番号4のアミノ酸配列をコードする配列番号3のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、切斷型RSV(A2)F抗原決定基は、全長RSV(A2)F抗原決定基の細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを欠損する。特定の実施形態において、切斷型RSV(A2)F抗原決定基は、配列番号16のアミノ酸配列をコードする配列番号15のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、全長、切斷型、または変異体RSV-F抗原決定基は、RSV株ALongに由来する。特定の実施形態において、変異体RSV(ALong)F抗原決定基は、配列番号6のアミノ酸配列をコードする配列番号5のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、切斷型RSV(ALong)F抗原決定基は、全長RSV(ALong)F抗原決定基の細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを欠損する。

30

【0063】

40

特定の実施形態において、RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つの異種ヌクレオチド配列は、RSV-G抗原決定基をコードする。特定の実施形態において、RSV-G抗原決定基は、全長である。特定の実施形態において、RSV-G抗原決定基は、切斷型である。特定の実施形態において、RSV-G抗原決定基は、変異体RSV-G抗原決定基である。特定の実施形態において、全長、切斷型、または変異体RSV-G抗原決定基は、RSV株A2に由来する。特定の実施形態において、全長RSV(A2)G抗原決定基は、配列番号2のアミノ酸配列をコードする配列番号1のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、切斷型RSV(A2)G抗原決定基は、全長RSV(A2)G抗原決定基の細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを欠損する。特定の

50

実施形態において、全長、切斷型、または変異体 R S V G 抗原決定基は、R S V 株 B に由来する。特定の実施形態において、切斷型 R S V (B) G 抗原決定基は、全長 R S V (B) G 抗原決定基の細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを欠損する。特定の実施形態において、切斷型 R S V (B) G 抗原決定基は、配列番号 8 のアミノ酸配列をコードする配列番号 7 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 6 4 】

特定の実施形態において、R S V ヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列は、R S V M 2 抗原決定基をコードする。特定の実施形態において、R S V M 2 抗原決定基は、全長である。特定の実施形態において、R S V M 2 抗原決定基は、切斷型である。特定の実施形態において、R S V M 2 抗原決定基は、変異体 R S V M 2 抗原決定基である。特定の実施形態において、全長、切斷型、または変異体 R S V M 2 抗原決定基は、R S V 株 A 2 に由来する。特定の実施形態において、R S V (A 2) M 2 抗原決定基は、配列番号 3 3 のアミノ酸配列をコードする配列番号 3 2 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 6 5 】

特定の実施形態において、R S V ヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列は、R S V N 抗原決定基をコードする。特定の実施形態において、R S V N 抗原決定基は、全長である。特定の実施形態において、R S V N 抗原決定基は、切斷型である。特定の実施形態において、R S V N 抗原決定基は、変異体 R S V N 抗原決定基である。特定の実施形態において、全長、切斷型、または変異体 R S V N 抗原決定基は、R S V 株 A 2 に由来する。特定の実施形態において、R S V (A 2) N 抗原決定基は、配列番号 3 5 のアミノ酸配列をコードする配列番号 3 4 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 6 6 】

特定の実施形態において、R S V N 抗原決定基および R S V M 2 抗原決定基の両方が、単一の読み取り枠によってコードされ、自己切断プロテアーゼドメインによって分離される。特定の実施形態において、R S V M 2 抗原決定基は、全長である。特定の実施形態において、R S V M 2 抗原決定基は、切斷型である。特定の実施形態において、R S V M 2 抗原決定基は、変異体 R S V M 2 抗原決定基である。特定の実施形態において、全長、切斷型、または変異体 R S V M 2 抗原決定基は、R S V 株 A 2 に由来する。特定の実施形態において、R S V N 抗原決定基は、全長である。特定の実施形態において、R S V N 抗原決定基は、切斷型である。特定の実施形態において、R S V N 抗原決定基は、変異体 R S V N 抗原決定基である。特定の実施形態において、全長、切斷型、または変異体 R S V N 抗原決定基は、R S V 株 A 2 に由来する。特定の実施形態において、自己切断プロテアーゼドメインは、口蹄疫ウイルスに由来する。特定の実施形態において、自己切断プロテアーゼドメインは、口蹄疫ウイルスからのプロテアーゼ 2 A 断片であり、配列番号 1 2 のアミノ酸配列をコードする配列番号 1 1 のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、R S V N 抗原決定基および R S V M 2 抗原決定基をコードする少なくとも 1 つの異種ヌクレオチド配列は、配列番号 1 8 のアミノ酸配列をコードする配列番号 1 7 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 6 7 】

M V A の組込み部位

特定の実施形態において、R S V 膜糖タンパク質の 1 つ以上の抗原決定基と、R S V ヌクレオカプシドタンパク質の 1 つ以上の抗原決定基とをコードする異種ヌクレオチド配列が、M V A ゲノムまたは M V A - B N ゲノムの様々な挿入部位に組み入れられる。R S V タンパク質の 1 つ以上の抗原決定基をコードする異種ヌクレオチド配列は、図 1 に示すように、別個の転写単位として、または融合遺伝子として、組換え M V A に挿入することができる。

【 0 0 6 8 】

特定の実施形態において、異種 R S V ヌクレオチド配列は、M V A の 1 つ以上の遺伝子

10

20

30

40

50

間領域(IGR)に挿入される。IGRは、IGR07/08、IGR44/45、IGR64/65、IGR88/89、IGR136/137、およびIGR148/149、好ましくは、IGR64/65、IGR88/89、および/またはIGR148/149から選択されてもよい。異種RSVヌクレオチド配列は、付加的にまたは代替的に、MVAの自然に存在する欠失部位I、II、II、IV、V、またはVIのうちの1つ以上に挿入されてもよい。特定の実施形態において、組込み部位のうちの5つ、4つ、3つ、または2つ未満は、異種RSVヌクレオチド配列を含む。

【0069】

異種RSVヌクレオチド配列を含むMVAの挿入部位の数は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、またはそれより多くてもよい。組換えMVAは、4つ、3つ、2つ、またはそれよりも少ない挿入部位に挿入される異種RSVヌクレオチド配列を含むことができるが、好ましくは2つの挿入部位が使用される。特定の実施形態において、3つの挿入部位が使用される。好ましくは、組換えMVAは、2つまたは3つの挿入部位に挿入される少なくとも4つ、5つ、6つ、または7つのヌクレオチド配列を含む。

【0070】

本明細書に提供される組換えMVAウイルスは、当該技術分野で既知の常法によって作製することができる。組換えポックスウイルスを得るための、または異種ヌクレオチド配列をポックスウイルスゲノムに挿入するための方法は、当業者に周知である。例えば、標準的な分子生物学技術のための方法、例えば、DNAのクローニング、DNAおよびRNAの単離、ウェスタンプロット分析、RT-PCRおよびPCR增幅技術等は、Molecular Cloning, A laboratory Manual (2nd Ed.) [J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]に記載され、ウイルスを取り扱うおよび操作するための技術は、Virology Methods Manual [B. W. J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)]に記載されている。同様に、MVAの取り扱い、操作、および遺伝子操作のための技術およびノウハウは、Molecular Virology: A Practical Approach [A. J. Davison & R. M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993)](例えば、Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectorsを参照)およびCurrent Protocols in Molecular Biology [John Wiley & Sons, Inc. (1998)](例えば、Chapter 16, Section IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vectorを参照)]に記載されている。

【0071】

本明細書に開示される種々の組換えMVAの作製のために、異なる方法が適用可能であり得る。ウイルスに挿入されるヌクレオチド配列は、MVAのDNAのセクションに相同的なDNAが挿入されている大腸菌プラスミド構築物内に配置されてもよい。別途、挿入されるDNA配列は、プロモーターに連結されてもよい。プロモーター-遺伝子結合が、非本質的遺伝子座を含有するMVA DNAの領域に隣接するDNA配列に相同的なDNAと両端で隣接するように、プロモーター-遺伝子結合は、プラスミド構築物中に位置付けられてもよい。結果として生じるプラスミド構築物は、大腸菌内で繁殖させることにより増幅させ、単離することができる。挿入されるDNA遺伝子配列を含有する単離したプラスミドは、例えば、ニワトリ胚線維芽細胞(CEF)の細胞培養物にトランسفェクトすることができ、同時に培養物をMVAに感染させる。プラスミド中の相同的MVA DNAとウイルスゲノムとの間の組換えは、それぞれ、外来DNA配列の存在によって修飾されたMVAを作製することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

好ましい実施形態によれば、好適な細胞培養物の細胞、例えば、C E F 細胞を、ポックスウイルスに感染させることができる。続いて、好ましくは、ポックスウイルス発現制御要素の転写制御下で、外来遺伝子（単数または複数）を含む第1のプラスミドベクターで感染細胞をトランスフェクトすることができる。上で説明したように、プラスミドベクターはまた、ポックスウイルスゲノムの選択された部分への外来配列の挿入を指示することができる配列を含む。任意選択的に、プラスミドベクターはまた、ポックスウイルスプロモーターに作動可能に連結されたマーカーおよび／または選択遺伝子を含むカセットを含有する。好適なマーカーまたは選択遺伝子は、例えば、緑色蛍光タンパク質、- ガラクトシダーゼ、ネオマイシン - ホスホリボシリルトランスフェラーゼ、または他のマーカーをコードする遺伝子である。選択またはマーカーカセットの使用は、作製された組換えポックスウイルスの同定および単離を単純化する。しかしながら、組換えポックスウイルスは、P C R 技術によっても同定することができる。その後、さらなる細胞を上述のように得られた組換えポックスウイルスに感染させ、第2の外来遺伝子（単数または複数）を含む第2のベクターでトランスフェクトすることができる。この遺伝子をポックスウイルスゲノムの異なる挿入部位に投入することができる場合、第2のベクターもまた、ポックスウイルスのゲノムへの第2の外来遺伝子（単数または複数）の組込みを指示するポックスウイルス - 相同的配列において異なる。相同的組換えを行った後、2つ以上の外来遺伝子を含む組換えウイルスを単離することができる。組換えウイルスにさらなる外来遺伝子を導入するために、前のステップで感染のために単離した組換えウイルスをすることによって、およびトランスフェクションのためにさらなる外来遺伝子（単数または複数）を含むさらなるベクターを使用することによって、感染およびトランスフェクションのステップを繰り返すことができる。

【 0 0 7 3 】

代替として、上述の感染およびトランスフェクションのステップは入れ替え可能である、すなわち、好適な細胞を、最初に外来遺伝子を含むプラスミドベクターによりトランスフェクトし、次いでポックスウイルスに感染させることができる。さらなる代替案として、各外来遺伝子を異なるウイルスに導入し、1つの細胞を得られた全ての組換えウイルスに同時感染させ、全ての外来遺伝子を含む組換えについてスクリーニングすることも可能である。3つ目の代替案は、D N A ゲノムと外来配列の i n v i t r o での連結、およびヘルパーウイルスを用いた組換えワクシニアウイルス D N A ゲノムの再構成である。4つ目の代替案は、細菌人工染色体（B A C）としてクローニングしたワクシニアウイルスゲノムと、ワクシニアウイルスゲノム内の所望の組込み部位に隣接する配列に相同的なD N A 配列と隣接する直鎖状配列との間の、大腸菌または別の細菌種における相同的組換えである。

【 0 0 7 4 】**R S V 遺伝子の発現**

一実施形態において、異種R S V ヌクレオチド配列のうちの1つ、それ以上、または全ての発現は、1つ以上のポックスウイルスプロモーターの制御下にある。特定の実施形態において、ポックスウイルスプロモーターは、P r 7 . 5 プロモーター、ハイブリッド初期／後期プロモーター、P r S プロモーター、合成もしくは天然の初期もしくは後期プロモーター、または牛痘ウイルスA T I プロモーターである。特定の実施形態において、ポックスウイルスプロモーターは、P r S プロモーター（配列番号39）、P r 7 . 5 プロモーター（配列番号40）、P r S y n I I m プロモーター（配列番号41）、P r L E 1 プロモーター（配列番号42）、およびP r H 5 m プロモーター（配列番号43 [L . S . W y a t t e t a l . (1 9 9 6) , ワクチン14(15) : 1 4 5 1 - 1 4 5 8] ）からなる群から選択される。特定の実施形態において、ポックスウイルスプロモーターは、P r S プロモーター（配列番号39）である。特定の実施形態において、ポックスウイルスプロモーターは、P r 7 . 5 プロモーター（配列番号40）である。特定の実施形態において、ポックスウイルスプロモーターは、P r S y n I I m プロモーター（配

10

20

30

40

50

列番号41)である。特定の実施形態において、ポックスウイルスプロモーターは、PrLE1プロモーター(配列番号42)である。特定の実施形態において、ポックスウイルスプロモーターは、PrH5mプロモーター(配列番号43)である。

【0075】

異種RSVヌクレオチド配列(単数または複数)は、单一転写単位として発現されてもよい。例えば、異種RSVヌクレオチド配列は、ワクシニアウイルスプロモーターに作動可能に連結されてもよく、かつ/またはワクシニアウイルス転写ターミネーターに連結されてもよい。特定の実施形態において、1つ以上の異種RSVヌクレオチド配列は、融合タンパク質として発現される。融合タンパク質はさらに、ペプチダーゼの認識部位または異種自己切断ペプチド配列を含むことができる。異種自己切断ペプチド配列は、口蹄疫ウイルスからの2Aペプチダーゼであってもよい。10

【0076】

特定の実施形態において、「転写単位」は、MVAゲノム内の挿入部位に単独で挿入されるが、他の転写単位(複数可)とともにMVAゲノム内の挿入部位に挿入されてもよい。「転写単位」は、MVAゲノム内に自然に存在せず(すなわち、異種、外因性、または外来性である)、感染細胞における転写が可能である。

【0077】

好みくは、組換えMVAは、MVAゲノムに挿入される1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの転写単位を含む。特定の実施形態において、組換えMVAは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの転写単位によってコードされるRSVタンパク質を安定に発現する。特定の実施形態において、組換えMVAは、MVAゲノム内の1つ、2つ、3つ、またはそれより多くの挿入部位でMVAゲノムに挿入される2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの転写単位を含む。20

RSVワクチンおよび薬学的組成物

本明細書に記載のMVA-BNを含む組換えMVAウイルスは、高度に複製が制限されており、ひいては高度に弱毒化されているため、それらは、ヒトおよび免疫不全のヒトさえも含む幅広い哺乳動物の治療の理想的な候補である。したがって、活性医薬物質ならびに薬学的組成物およびワクチンとして使用するための本発明による組換えMVAを本明細書に提供し、全て、ヒトを含む生きた動物の体内に免疫応答を誘導することを目的とする。30

【0078】

このために、組換えMVA、ワクチン、または薬学的組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ TCID₅₀/ml、 $10^5 \sim 5 \times 10^8$ TCID₅₀/ml、 $10^6 \sim 10^8$ TCID₅₀/ml、または $10^7 \sim 10^8$ TCID₅₀/mlの濃度範囲で溶液中に製剤化される。ヒトのための好みの用量は、 10^6 TCID₅₀、 10^7 TCID₅₀、 10^8 TCID₅₀、または 5×10^8 TCID₅₀の用量を含む $10^6 \sim 10^9$ TCID₅₀を含む。

【0079】

本明細書に提供される薬学的組成物は、一般的に、1つ以上の薬学的に許容されるおよび/または承認される担体、添加剤、抗生物質、保存剤、アジュバント、希釈剤、および/または安定剤を含み得る。そのような補助物質は、水、食塩水、グリセロール、エタノール、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質等であってもよい。好適な担体は、典型的には、大きな、緩徐に代謝される分子、例えば、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集物等である。40

【0080】

ワクチンの調製のために、本明細書に提供される組換えMVAウイルスを生理学的に許容される形態に変換することができる。これは、H. Stickl et al., Dtsch. med. Wochr. 99: 2386-2392 (1974)によって記載されるように、天然痘に対するワクチン接種に使用されたポックスウイルスワクチンの調製における経験に基づいて行うことができる。50

【0081】

例えば、精製したウイルスは、 5×10^8 T C I D₅₀ / ml の力値で -80°C で保存することができ、約 10 mM Tris、140 mM NaCl (pH 7.7) 中に製剤化することができる。ワクチン注射の調製のために、例えば、 $10^2 \sim 10^8$ または $10^2 \sim 10^9$ 粒子のウイルスを、アンプル、好ましくは、ガラスアンプル中で、2% ペプトンおよび 1% ヒトアルブミンの存在下、100 ml のリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で凍結乾燥することができる。代替として、製剤中にウイルスを滴下で凍結乾燥することによって、ワクチン注射を生成することもできる。この製剤は、マンニトール、デキストラン、砂糖、グリシン、ラクトース、もしくはポリビニルピロリドン等のさらなる添加剤、または in vivo 投与に好適な他の補助剤、例えば、抗酸化剤もしくは不活性ガス、安定剤もしくは組換えタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン）等を含有することができる。次いで、ガラスアンプルを密封し、4 ~ 室温で数ヶ月間保存することができる。しかしながら、必要性がない限り、アンプルは、20 未満の温度で保存されることが好ましい。10

【0082】

ワクチン接種または治療のために、水溶液、好ましくは生理食塩水または Tris 緩衝液中に凍結乾燥物を溶解し、全身的または局所的のいずれかで、すなわち、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、鼻腔内、または当業者に既知の他の投与経路で、投与することができる。投与様式、用量、および投与回数は、当業者によって既知の様式で最適化され得る。しかしながら、最も一般的には、患者は、最初のワクチン接種の注射から約 1 ヶ月 ~ 6 週間後に 2 回目の注射の接種を受ける。20

【0083】**組換え MVA ウイルスを含むキット**

本明細書に記載の組換え MVA のうちのいずれか 1 つ以上を含むキットも本明細書に提供される。キットは、RSV 感染症のリスクがある対象に組換え MVA を投与するための指示と一緒に、組換え MVA の 1 つまたは複数の容器またはバイアルを含むことができる。特定の実施形態において、対象はヒトである。指示は、組換え MVA が単回投与または複数回投与（すなわち、2 回、3 回、4 回等）で対象に投与されることを示し得る。特定の実施形態において、指示は、組換え MVA ウィルスが、1 回目（予備刺激）および 2 回目（追加免疫）の投与でナイーブまたは非ナイーブな対象に投与されることを示す。30

【0084】

さらに、1 回目の投与（予備刺激）のための第 1 のバイアルまたは容器中、および 2 回目の投与（追加免疫）のための第 2 のバイアルまたは容器中に組換え MVA ウィルスを含むキットが提供される。キットはまた、3 回目、4 回目、またはさらなる投与（追加免疫）のための第 3、第 4、またはさらなるバイアルまたは容器中に組換え MVA を含んでもよい。

【0085】**組換え MVA ウィルスの方法および使用**

対象動物を免疫する方法、ならびに対象動物を免疫する方法において使用するための組換え MVA、および対象動物を免疫するための薬物またはワクチンの調製における本明細書に提供される組換え MVA の使用もまた、本明細書に提供される。特定の実施形態において、動物は哺乳動物である。特定の実施形態において、哺乳動物は、ラット、ウサギ、ブタ、マウス、またはヒトであり、方法は、本明細書に提供される組換え MVA のうちのいずれか 1 つ以上の用量を対象に投与することを含む。40

【0086】

対象は、好ましくはヒトであり、成人であってもよく、成人は、免疫不全であり得る。特定の実施形態において、成人は、50、55、60、65、70、75、80、または 85 歳である。他の実施形態において、対象の年齢は、5 歳未満、3 歳未満、2 歳未満、15 ヶ月未満、12 ヶ月未満、9 ヶ月未満、6 ヶ月未満、または 3 ヶ月未満である。また、対象の年齢は、0 ~ 3 ヶ月、3 ~ 6 ヶ月、6 ~ 9 ヶ月、9 ~ 12 ヶ月、1 ~ 2 年、また50

は2～5年の範囲であってもよい。

【0087】

特定の実施形態において、本明細書に提供される組換えMVAのうちのいずれかが、 $10^6 \sim 10^9$ TCID₅₀の用量で、 $10^6 \sim 5 \times 10^8$ TCID₅₀、または $10^7 \sim 10^8$ TCID₅₀の用量で対象に投与される。本明細書に提供される組換えMVAは、 10^6 、 10^7 TCID₅₀、 10^8 、または 5×10^8 TCID₅₀の用量で対象に投与されてもよい。特定の実施形態において、本明細書に提供される組換えMVAのうちのいずれかが、 10^7 TCID₅₀、 10^8 、または 5×10^8 TCID₅₀の用量で対象に投与される。

【0088】

本明細書に提供される組換えMVAは、単回投与、または複数回投与（すなわち、2回、3回、4回等）で対象に投与される。特定の実施形態において、組換えMVAは、1回目（予備刺激）および2回目（追加免疫）の投与で投与される。特定の実施形態において、第1の用量は、 $10^7 \sim 10^8$ TCID₅₀の組換えMVAウイルスを含み、第2の用量は、 $10^7 \sim 10^8$ TCID₅₀を組換えMVAウイルスを含む。

【0089】

組換えMVAは、全身的もしくは局所的に、非経口的に、皮下に、静脈内に、筋肉内に、または鼻腔内に、このましくは皮下にまたは鼻腔内に投与することができる。組換えMVAはまた、当業者に既知のいずれか他の投与経路によって投与されてもよい。

【0090】

別の態様において、RSV感染症を診断する方法、および対象にRSV感染症再発のリスクがあるかどうかを決定する方法が、本明細書に提供される：それらは、特に、新生児、1～6歳の小児、および／または高齢者にとって重大な脅威となり得る。

【0091】

本発明者らは、RSV感染症を診断する現在の方法は、不正確な結果を提供する可能性があることを発見した。例えば、RSVに対する抗体を検出するイムノアッセイ、またはウイルスプランクアッセイは、感染症再発のリスクがある個体を必ずしも正確に同定するとは限らない。実際に、本発明者らは、たとえ個体から採取された試料がウイルスプランクアッセイで陰性の結果を示したとしても〔例えば、W.Olszewska et al., 2004. を参照〕、より感度の高い方法では感染性RSV粒子がなおも存在することが示される場合もあるため、そのような結果が、時には偽陰性であり得ることを観察した。事実、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)等の方法では、対象が、本当にRSVに感染している可能性があるかどうか、感染再発のリスクがあるか、または実際に、ワクチン接種を受けた対象がRSVに対する無菌免疫を獲得したかどうかを確認する必要がある。ワクチン接種後の再感染は、時として死をもたらす重篤な疾患を引き起こす場合があるため、この判定は非常に重要である。

【0092】

したがって、特定の実施形態において、対象から採取した試料がRSVゲノムを含有するかどうかを定量的に決定することを含み、RSVゲノムの存在は、RSVへの再感染の possibilityを示唆する、対象にRSV感染症の再発のリスクがあるかどうかを決定する方法が提供される。特定の実施形態において、対象から採取した試料がRSVゲノムを含有するかどうかの定量的な決定は、qRT-PCRによって行われる。

【0093】

本明細書で使用される場合、「試料」という用語は、個体、細胞株、組織培養、またはポリヌクレオチドおよびポリペプチドまたはその一部を含有する他の源から採取された任意の生体試料を指す。生体試料は、例えば、臨床試験または他の実験試験に参加している対象から採取された臨床試料を含む、RSVを含有することが判明したおよび／または疑われる体液（例えば、血液、血清、血漿、尿、滑液、脊髄液、気管支肺胞洗浄(BAL)等）および体組織を含む。哺乳動物から組織生検および体液を採取するための方法は、当該技術分野で周知である。特定の実施形態において、生体試料はRSV核酸を含む。

10

20

30

40

50

【0094】

本明細書において交換可能に使用される場合、「R T - q P C R」または「q R T - P C R」という用語は、「定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応」として知られる方法を指す。いくつかの場合において、この方法は、動力学的ポリメラーゼ連鎖反応（K P C R）と称されてもよい。

【0095】

特定の実施形態において、対象から採取した試料がRSVゲノムを含有するかどうかを定量的に決定することを含み、RSVゲノムの存在は、対象がRSVに対する無菌免疫を獲得していないことを示唆する、対象がRSVに対する無菌免疫を獲得したかどうかを決定する方法が本明細書に提供される。本明細書に記載の組換えMVAのうちのいずれか1つを対象に鼻腔内投与することを含む、RSVに対する無菌免疫を獲得していない対象を免疫する方法もまた、本明細書に提供される。付加的にまたは代替的に、本明細書に記載の組換えMVAのうちのいずれか1つは、RSVに対する無菌免疫を獲得していない対象を免疫する方法において使用するために提供され、該方法は、本明細書に記載の組換えMVAのうちのいずれか1つを対象に鼻腔内投与することを含む。RSVに対する無菌免疫を獲得していない対象を免疫するための薬物および／またはワクチンの調製における本明細書に記載の組換えMVAのうちのいずれかの使用もまた本明細書に提供され、薬物またはワクチンは、鼻腔内投与される。

10

【0096】

特定の実施形態において、本明細書に記載の組換えMVAのうちのいずれかを対象に鼻腔内投与することを含む、RSVに対する無菌免疫を獲得していない対象においてRSVに対する無菌免疫を誘導する方法が、本明細書に提供される。RSVに対する無菌免疫を獲得していない対象においてRSVに対する無菌免疫を誘導する方法において使用するための本明細書に記載の組換えMVAのうちのいずれか1つもまた本明細書に提供され、該方法は、本明細書に記載の組換えMVAのうちのいずれか1つを対象に鼻腔内投与することを含む。付加的にまたは代替的に、RSVに対する無菌免疫を獲得していない対象においてRSVに対する無菌免疫を誘導するための薬物および／またはワクチンの調製における、本明細書に記載の組換えMVAのうちのいずれかの使用が本明細書に提供され、薬物またはワクチンは鼻腔内投与される。

20

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

30

1. 筋肉内投与は除外される、鼻腔内投与によってRSV感染症を治療または予防するための、少なくとも1つのRSVウイルス（RSV）膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む、組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ（MVA）。

2. 鼻腔内投与のみを含む、上記1に記載の組換えMVA。

3. 前記組換えMVAは、RSVヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、上記1または2に記載の組換えMVA。

4. RSVウイルス（RSV）膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカブシドの抗原決定基をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列と、を含む、組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ（MVA）。

40

5. 前記RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする前記ヌクレオチド配列は、RSV Fおよび／またはRSV Gの抗原決定基をコードする、上記1～4のいずれか1項に記載の組換えMVA。

6. RSVヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードする前記ヌクレオチド配列は、前記RSV N ヌクレオカブシドおよび／またRSV M2マトリックスタンパク質の抗原決定基をコードする、上記3～5のいずれか1項に記載の組換えMVA。

7. RSV膜糖タンパク質、好ましくは、前記RSV Fまたは前記RSV G膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする1つのヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカブシドタンパク質、好ましくは前記RSV Nまたは前記RSV M2タンパク質の抗原決定基をコードする1つのヌクレオチド配列と、を含む、前記上記のいずれかに記載の組換えMVA

50

A。

8 . R S V 膜糖タンパク質、好ましくは前記 R S V F および / または前記 R S V G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする 2 つのヌクレオチド配列と、 R S V ヌクレオカブシドタンパク質、好ましくは前記 R S V N ヌクレオカブシドまたは前記 R S V M 2 マトリックスタンパク質の抗原決定基をコードする 1 つのヌクレオチド配列と、を含む、上記 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組換え M V A 。

9 . R S V 膜糖タンパク質、好ましくは R S V F および / または R S V G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする 2 つのヌクレオチド配列と、 R S V ヌクレオカブシドタンパク質、好ましくは R S V N および / または前記 R S V M 2 タンパク質の抗原決定基をコードする 2 つのヌクレオチド配列と、を含む、上記 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組換え M V A 。

10

10 . R S V 膜糖タンパク質、好ましくは、 2 つの R S V F 膜糖タンパク質および / もしくは 1 つの R S V G 膜糖タンパク質、または 2 つの R S V G 膜糖タンパク質および / もしくは 1 つの R S V F 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする 3 つのヌクレオチド配列と、 R S V ヌクレオカブシドタンパク質、好ましくは前記 R S V N ヌクレオカブシドおよび / または前記 R S V M 2 マトリックスタンパク質の抗原決定基をコードする 2 つのヌクレオチド配列と、を含む、上記 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組換え M V A 。

11 . R S V 膜糖タンパク質、好ましくは 2 つの R S V F 膜糖タンパク質および / または 2 つの R S V G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする 4 つのヌクレオチド配列と、 R S V ヌクレオカブシドタンパク質、好ましくは、前記 R S V N ヌクレオカブシドまたは前記 R S V M 2 マトリックスタンパク質の抗原決定基をコードする 1 つのヌクレオチド配列と、を含む、上記 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組換え M V A 。

20

12 . R S V 膜糖タンパク質、好ましくは 2 つの R S V F 膜糖タンパク質および / または 2 つの R S V G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする 4 つのヌクレオチド配列と、 R S V ヌクレオカブシドタンパク質、好ましくは前記 R S V N および / または前記 R S V M 2 タンパク質の抗原決定基をコードする 2 つのヌクレオチド配列と、を含む、上記 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組換え M V A 。

13 . 対象が R S V 感染症再発のリスクがあるかどうかを決定する方法であって、 R T - q P C R により前記対象から採取した試料中に R S V が存在するかどうかを決定し、 R S V の存在は、 R S V 感染症再発の存在を示唆する、方法。

30

14 . 対象が R S V に対する無菌免疫を獲得したかどうかを決定する方法であって、 R T - q P C R により前記対象から採取した試料中に R S V が存在するかどうかを決定し、 R S V の存在は、対象が R S V に対する無菌免疫を獲得していないことを示唆する、方法。

15 . 上記 14 に記載の方法によって R S V に対する無菌免疫を獲得していないと診断された対象を免疫し、かつ / または前記対象において無菌免疫を誘導する方法であって、前記方法は前記組換え M V A の前記対象への鼻腔内投与を含む、上記 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組換え M V A 。

【 0097 】

本発明の特定の実施形態は、以下の項目も含む：

1 . 筋肉内投与は除外される、鼻腔内投与によって R S V 感染症を治療または予防するための、少なくとも 1 つの R S V ウィルス (R S V) 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む、組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) 。

40

2 . 薬学的組成物および / またはワクチンの調製のための、少なくとも 1 つの R S V ウィルス (R S V) 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) の使用であって、薬学的組成物および / またはワクチンは鼻腔内投与され、筋肉内投与は除外される、使用。

3 . ヒトを含む対象を R S V 感染症に対して免疫する方法であって、 R S V ウィルス (R S V) 膜糖タンパク質の少なくとも 1 つの抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) を、ヒトを含む対象に鼻腔内投与することを含み、筋肉内投与は除外される、方法。

50

4. 鼻腔内投与のみを含む、項目1に記載の組換えMVA、項目2に記載の使用、および／または項目3に記載の方法。

5. 皮下投与を含む、項目1に記載の組換えMVA、項目2に記載の使用、および／または項目3に記載の方法。

6. 組換えMVAは、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、項目1もしくは4～5のいずれか1つの記載の組換えMVA、項目2、4、もしくは5のいずれか1つに記載の使用、および／または項目3～5のいずれか1つの方法。

7. RSVウイルス(RSV)膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカプシドの抗原決定基をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列と、を含む、組換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)。 10

8. RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、RSV F抗原決定基をコードする、項目1～7のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

9. RSV F膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列をさらに含む、項目1～8のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

10. RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、全長RSV F膜糖タンパク質をコードする、項目1～9のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。 20

11. RSV F膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、RSV株A、好ましくはA2および／またはA_{10ng}に由来する、項目8～10のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

12. RSV F膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、配列番号4のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目8～11のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

13. RSV F膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列配列は、配列番号3のヌクレオチド配列を含む、項目8～12のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

14. RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、切断型RSV F膜糖タンパク質をコードする、項目1～13のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。 30

15. 切断型RSV F膜糖タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、RSV株A、好ましくはA_{10ng}に由来する、項目14に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

16. 切断型RSV F膜糖タンパク質は、膜貫通ドメインを欠損する、項目14または15に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

17. 切断型RSV F膜糖タンパク質は、細胞質ドメインを欠損する、項目14～16のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

18. RSV F膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、配列番号6のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目8～17のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。 40

19. RSV F膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、配列番号5のヌクレオチド配列を含む、項目8～18のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

20. RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、RSV G膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする、前記項目のいずれかに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

21. RSV G膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列をさらに含む、項目1～20のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／ 50

または方法。

22. RSV 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、全長 RSV G 膜糖タンパク質をコードする、項目 1 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

23. RSV G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、RSV 株 A、好ましくは株 A2、および / または B に由来する、項目 20 ~ 22 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

24. RSV G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 20 ~ 23 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。 10

25. RSV G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、項目 20 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

26. RSV 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、切断型 RSV G 膜糖タンパク質をコードする、項目 1 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

27. 切断型 RSV G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、RSV 株 B に由来する、項目 26 に記載の組換え MVA、使用および / または方法。

28. 切断型 RSV G 膜糖タンパク質は、膜貫通ドメインを欠損する、項目 26 または 27 に記載の組換え MVA、使用および / または方法。 20

29. 切断型 RSV G 膜糖タンパク質は、細胞質ドメインを欠損する、項目 26 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

30. RSV G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 8 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 20 ~ 29 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

31. RSV G 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 7 のヌクレオチド配列を含む、項目 20 ~ 30 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

32. RSV ヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、RSV N ヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードする、項目 6 ~ 31 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。 30

33. RSV ヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、RSV M2 マトリックスタンパク質の抗原決定基をコードする、項目 6 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

34. RSV ヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、全長タンパク質をコードする、項目 6 ~ 33 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

35. RSV N ヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、RSV 株 A、好ましくは株 A2 に由来する、項目 32 ~ 34 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。 40

36. RSV ヌクレオカブシドタンパク質の抗原決定基をコードするヌクレオチド配列は、RSV N ヌクレオカブシドおよび RSV M2 マトリックスタンパク質の抗原決定基をコードする、項目 32 ~ 35 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および / または方法。

37. RSV N ヌクレオカブシドおよび RSV M2 マトリックスタンパク質の両方の抗原決定基は、単一の読み取り枠によってコードされる、項目 36 に記載の組換え MVA、使用および / または方法。

38. RSV N ヌクレオカブシドおよび RSV M2 マトリックスタンパク質の抗原決定基は、自己切断プロテアーゼドメインによって分離される、項目 36 または 37 に記載の組換え MVA、使用および / または方法。 50

39. 自己切断プロテアーゼドメイン配列は、口蹄疫ウイルスに由来する、項目38に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

40. 自己切断プロテアーゼドメイン配列は、プロテアーゼ2A断片配列である、項目38または39に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

41. 自己切断プロテアーゼドメイン配列は、配列番号12のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目38～40のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

42. 自己切断プロテアーゼドメインは、配列番号11のヌクレオチド配列を含む、項目38～41のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

43. 単一の読み取り枠は、配列番号18のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目37～42のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

44. 単一の読み取り枠は、配列番号17のヌクレオチド配列を含む、項目37～43のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

45. RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする1つのヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする1つのヌクレオチド配列とを含む、前記項目のいずれかに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

46. RSV F膜糖タンパク質およびRSV Nヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基を含む、項目45に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

47. RSV F膜糖タンパク質およびRSV M2マトリックスタンパク質の抗原決定基を含む、項目45に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

48. RSV G膜糖タンパク質およびRSV Nヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基を含む、項目45に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

49. RSV G膜糖タンパク質およびRSV M2マトリックスタンパク質の抗原決定基を含む、項目45に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

50. RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする2つのヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする1つのヌクレオチド配列とを含む、項目1～44のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

51. RSV Fおよび／またはG膜糖タンパク質ならびにRSV Nヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基を含む、項目50に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

52. RSV Fおよび／またはG膜糖タンパク質ならびにRSV M2マトリックスタンパク質の抗原決定基を含む、項目50に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

53. RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする2つのヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする2つのヌクレオチド配列とを含む、項目1～44のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

54. RSV Fおよび／またはG膜糖タンパク質の抗原決定基と、RSV Nヌクレオカプシドおよび／またはM2マトリックスタンパク質の抗原決定基とをコードするヌクレオチド配列を含む、項目53に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

55. RSV膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする3つのヌクレオチド配列と、RSVヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする2つのヌクレオチド配列とを含む、項目1～44のいずれか1つに記載の組換えMVA、使用および／または方法。

56. 2つのRSV F膜糖タンパク質および／または1つのRSV G膜糖タンパク質の抗原決定基と、RSV Nヌクレオカプシドタンパク質および／またはRSV M2マトリックスタンパク質の抗原決定基とを含む、項目55に記載の組換えMVA、使用および／または方法。

57. 2つのRSV G膜糖タンパク質および／または1つのRSV F膜糖タンパク質の抗原決定基と、RSV Nヌクレオカプシドタンパク質および／またはRSV M2マトリックスタンパク質の抗原決定基とを含む、項目55に記載の組換えMVA、使用およ

10

20

30

40

50

び／または方法。

58. RSV 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする 4 つのヌクレオチド配列と、RSV ヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする 1 つのヌクレオチド配列とを含む、項目 1 ~ 44 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および／または方法。

59. 2 つの RSV F 膜糖タンパク質および／または 2 つの RSV G 膜糖タンパク質の抗原決定基と RSV N ヌクレオカプシドタンパク質または RSV M2 マトリックスタンパク質の抗原決定基とを含む、項目 58 に記載の組換え MVA、使用および／または方法。

60. RSV 膜糖タンパク質の抗原決定基をコードする 4 つのヌクレオチド配列と、RSV ヌクレオカプシドタンパク質の抗原決定基をコードする 2 つのヌクレオチド配列とを含む、項目 1 ~ 44 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および／または方法。 10

61. 2 つの RSV F 膜糖タンパク質および／または 2 つの RSV G 膜糖タンパク質の抗原決定基と、RSV N ヌクレオカプシドタンパク質および／または RSV M2 マトリックスタンパク質の抗原決定基とを含む、項目 60 に記載の組換え MVA、使用および／または方法。

62. 組換え MVA を作製するために使用される MVA は、MVA - BN またはその誘導体である、項目 1 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、使用および／または方法。

63. 活性医薬物質として使用するための、項目 1 または 4 ~ 62 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA。 20

64. 項目 1 または 4 ~ 63 のいずれか 1 つの記載の組換え MVA、任意選択的に薬学的に許容される担体および／または希釈剤を含む、薬学的組成物および／またはワクチン。

65. 薬学的組成物および／またはワクチンの調製のための、項目 1 または 4 ~ 63 のいずれか 1 つの記載の組換え MVA の使用。

66. RSV 感染症を治療または予防するための、項目 6 ~ 63 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、項目 64 の薬学的組成物および／もしくはワクチン、ならびに／または項目 2、4 ~ 6、8 ~ 62、もしくは 65 のいずれか 1 つに記載の使用。

67. 項目 1、4 ~ 63 もしくは 66 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA ならびに／または項目 64 ~ 66 に記載の薬学的組成物および／もしくはワクチンを、ヒトを含む対象に投与することを含む、ヒトを含む対象を RSV 感染症に対して免疫する方法。 30

68. 組換え MVA は、 $10^7 \sim 10^9$ T C I D₅₀ の用量で投与されるかまたは投与されるべきである、項目 1、4 ~ 63 もしくは 66 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、項目 64 ~ 66 に記載の薬学的組成物および／もしくはワクチン、項目 2、4 ~ 6、8 ~ 62、65 もしくは 66 のいずれか 1 つに記載の使用、ならびに／または項目 3 ~ 6、8 ~ 62 もしくは 67 のいずれか 1 つに記載の方法。

69. 組換え MVA は、鼻腔内投与および／または皮下投与されるかまたはされるべきである、項目 5 ~ 68 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、薬学的組成物および／もしくはワクチン、使用ならびに／または方法。

70. 組換え MVA は、ヒトを含む免疫学的にナイーブなまたは免疫学的に成熟な対象に、単回投与または複数回投与で投与されるかまたは投与されるべきである、項目 1 ~ 69 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、薬学的組成物および／もしくはワクチン、使用ならびに／または方法。 40

71. 2 歳を上回るヒトを含む対象に投与するための、項目 1 ~ 70 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、薬学的組成物および／もしくはワクチン、使用ならびに／または方法。

72. 2 歳未満のヒトを含む対象に投与するための、項目 1 ~ 70 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA、薬学的組成物および／もしくはワクチン、使用ならびに／または方法。

73. 項目 1、4 ~ 63、66 または 68 ~ 72 のいずれか 1 つに記載の組換え MVA の 1 つまたは複数のバイアルと、RSV 感染症のリスクがある対象にウイルスを投与するための指示とを含む、キット。

74. 1回目の投与（予備刺激）のための第1のバイアルまたは容器中、および2回目の投与（追加免疫）のための第2のバイアルまたは容器中に組換えMVAを含む、項目1、4～63、66もしくは68～72のいずれか1つに記載の組換えMVAを含むキット、および／または項目73に記載のキット。

75. 3回目、4回目、またはさらなる投与（追加免疫）のための第3、第4、またはさらなるバイアルまたは容器中に組換えMVAを含む、項目73または74に記載のキット。

76. 項目1、4～63または66のいずれか1つに記載の組換えMVAを含む、細胞。

77. 以下のステップを含む、項目1、4～63、66または68～72のいずれか1つに従って組換えMVAを作製する方法：
10

(a) 宿主細胞をMVAウイルスに感染させるステップ、

(b) 感染細胞を、RSV抗原決定基をコードするヌクレオチド配列を含む組換えベクターでトランスフェクトするステップであって、前記ヌクレオチド配列は、MVAウイルスゲノムへのヌクレオチド配列の組込みを指示することが可能なゲノムMVAウイルス配列をさらに含む、ステップ、

(c) 作製された組換えMVAウイルスを同定、単離、および任意選択的に精製するステップ。

78. 項目77に記載の方法に従って作製される、組換えMVA。

79. 以下のステップを含む、いずれか1つの項目1、4～63、66もしくは68～72に従って組換えMVAを生成するため、および／または前記組換えMVAのゲノムから発現される抗原決定基を生成するための方法：
20

(a) 宿主細胞を、項目1、4～63、66もしくは項目68～72のいずれか1つに記載の組換えMVAに感染させるステップ、または該細胞を組換えMVAの組換えDNAでトランスフェクトするステップ、

(b) 感染またはトランスフェクトされた細胞を培養するステップ、

(c) 前記細胞からMVAおよび／または抗原決定基を単離するステップ。

80. 項目79の方法によって得られた、組換えMVAおよび／または抗原決定基。

81. 対象がRSV感染症再発のリスクがあるかどうかを決定する方法であって、RT-qPCRにより前記対象から採取した試料中にRSVが存在するかどうかを決定し、RSVの存在は、RSV感染症再発の存在を示唆する、方法。
30

82. 対象がRSVに対する無菌免疫を獲得したかどうかを決定する方法であって、RT-qPCRにより前記対象から採取した試料中にRSVが存在するかどうかを決定し、RSVの存在は、対象がRSVに対する無菌免疫を獲得していないことを示唆する、方法。

83. 項目82に記載の方法によってRSVに対する無菌免疫を獲得していないと診断された対象を免疫する方法であって、項目1、4～63、66、68～72、78もしくは80のいずれか1つに記載の組換えMVA、および／または項目64、66もしくは68～72のいずれか1つに記載の薬学的組成物および／もしくはワクチンを対象に鼻腔内投与することを含む、方法。

84. 項目82に記載の方法によってRSVに対する無菌免疫を獲得していないと診断された対象を免疫する方法（前記方法は、前記組換えMVAを対象に鼻腔内投与することを含む）において使用するための、項目1、4～63、66、68～72、78もしくは80のいずれか1つに記載の組換えMVA、および／または項目64、66もしくは68～72のいずれか1つに記載の薬学的組成物および／もしくはワクチン。
40

85. 項目82に記載の方法によってRSVに対する無菌免疫を獲得していないと診断された対象を免疫するための薬学的組成物および／またはワクチンの調製のための、項目1、4～63、66、68～72、78または80のいずれか1つに記載の組換えMVAの使用であって、薬学的組成物および／またはワクチンは、鼻腔内投与のためである、使用。
。

86. 項目82に記載の方法によってRSVに対する無菌免疫を獲得していないと診断された対象において無菌免疫を誘導する方法であって、項目1、4～63、66、68～7
50

2、78もしくは80のいずれか1つに記載の組換えMVA、および／または項目64、66もしくは68～72のいずれか1つに記載の薬学的組成物および／もしくはワクチンを対象に鼻腔内投与することを含む、方法。

87. 項目82に記載の方法によってRSVに対する無菌免疫を獲得していないと診断された対象において無菌免疫を誘導する方法（前記方法は、前記組換えMVAを対象に鼻腔内投与することを含む）において使用するための、項目1、4～63、66、68～72、78もしくは80のいずれか1つに記載の組換えMVA、および／または項目64、66もしくは68～72のいずれか1つに記載の薬学的組成物および／もしくはワクチン。

88. 項目82に記載の方法によってRSVに対する無菌免疫を獲得していないと診断された対象において無菌免疫を誘導するための薬学的組成物および／またはワクチンの調製のための、項目1、4～63、66、68～72、78もしくは80のいずれか1つに記載の組換えMVAの使用であって、薬学的組成物またはワクチンは、鼻腔内投与のためである、使用。

【0098】

上記の一般的および詳細な説明は、例示的および説明的であるに過ぎず、請求される本発明を制限または限定するものではないことを理解されたい。本明細書に組み込まれ、その一部を構成する添付の図面は、本発明の種々の実施形態を例示し、説明とともに、本発明の主旨を説明する役割を果たす。

【図面の簡単な説明】

【0099】

【図1】試験した組換えMVA - 構築物、MVA - mBN199B、MVA - mBN201B、MVA - mBN201B M2、MVA - mBN294B、MVA - mBN295B、およびMVA - mBN330Bにおいて使用した異種RSV遺伝子を示す。

【図2】IBL Hamburgに基づくELISAによって測定された血清RSV特異的IgG応答を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA - mBN199B、MVA - mBN201B、もしくはMVA - mBN201BDM2で、マウスを2回または3回（scまたはin）免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。血清を1/100に希釈し、RSV FおよびGタンパク質でコーティングしたプレートを使用するIBL Hamburgキットに基づくRSV特異的IgG ELISAを用いて分析した。

【図3】連続希釈後、IBL Hamburgに基づくELISAによって測定された血清RSV特異的IgG応答を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA - mBN199B、MVA - mBN201B、もしくはMVA - mBN201BDM2で、マウスを2回または3回（scまたはin）免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。血清を希釈し（1/100、1/200、および1/400）、RSV FおよびGタンパク質でコーティングしたプレートを使用するIBL Hamburgキットに基づくRSV特異的IgG ELISAを用いて分析した。

【図4】Fタンパク質のみでコーティングしたプレートを使用するIBL Hamburgに基づくELISAによって測定された血清RSV特異的IgG応答を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA - mBN199B、MVA - mBN201B、もしくはMVA - mBN201BDM2で、マウスを2回または3回sc免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。血漿を1/100に希釈し、RSV Fタンパク質のみでコーティングしたプレートを使用するIBL Hamburgキットに基づくRSV特異的IgG ELISAを用いて分析した。

【図5】Serionに基づくELISAによって測定された血清RSV特異的IgG応答を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA - mBN199B、MVA - mBN201B、もしくはMVA - mBN201BDM2のいずれかで、マウスを2回または3回（scまたはin）免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。血清を希釈し（1/100）、RSV溶解物でコーティングしたプレートを使用するSerionキットに基づくRSV特異的IgG ELISAを用いて分析した。

10

20

30

40

50

【図6】気管支肺胞洗浄(BAL)液および血清中でIBL Hamburgに基づくELISAによって測定されたRSV特異的IgA対IgG応答を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN201BDM2で、マウスを2回または3回(scまたはin)免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。血清およびBAL液を希釈し(1/100)、RSV-FおよびGタンパク質でコーティングしたプレートを用いたIBL Hamburgキットに基づくRSV特異的IgGまたはIgA ELISAを使用して分析した。

【図7】ELISPOTによって測定されたRSV-F-、RSV-G-、およびRSV-M2特異的T細胞応答を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN201BDM2のいずれかで、マウスを2回または3回(scまたはin)免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。48日目に脾臓を単離し、3つの異なるRSV-F特異的ペプチド(RSV-1(配列番号19)、RSV-2(配列番号20)、およびRSV-3(配列番号21))、1つのRSV-G特異的ペプチド(RSV-4(配列番号22))、1つのRSV-M2特異的ペプチド(RSV-9(配列番号27))、またはMVA-BNで脾細胞を再刺激した。IFN- 分泌細胞をELISPOTにより検出した。実施例に説明するように刺激指数を算出した。

【図8】RSV(A2)による曝露後の相対的な体重減少を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN201BDM2で、マウスを2回または3回(scまたはin)免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。次いで、49日目に、マウスを 10^6 pfuのRSV(A2)に曝露した。曝露日から毎日体重を監視した。曝露日の体重を相対的体重変化の割合を算出するための基準として用いた。

【図9】ブラークアッセイによって測定された肺内のRSV負荷を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN201BDM2で、マウスを2回または3回(scまたはin)免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。次いで、49日目に、マウスを 10^6 pfuのRSV(A2)に曝露した。4日後、肺を単離し、ブラークアッセイによりRSV負荷(肺当たりのpfu)を決定した。

【図10】RT-qPCRによって測定された肺内のRSV負荷を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN201BDM2で、マウスを2回または3回(scまたはin)免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。次いで、49日目に、マウスを 10^6 pfuのRSV-A2に曝露した。4日後、肺を単離し、RT-qPCRによってRSV負荷(観察されたL遺伝子コピー数に基づいて推定される)を決定した。

【図11】ELISAによって測定されたRSV(A2)曝露後4日目の気管支肺胞洗浄(BAL)中のIL4レベルを示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199BもしくはMVA-mBN201Bで、マウスを2回(scまたはin)免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。次いで、マウスを 10^6 pfuのRSV-A2に曝露した。4日後、1mlのPBSで肺を洗浄し、ELISAによってBAL中のIL4レベルを決定した。(n.d.=検出不能)

【図12】ELISAによって測定されたRSV(A2)曝露後4日目の気管支肺胞洗浄(BAL)中のIL5レベルを示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199BもしくはMVA-mBN201Bで、マウスを2回(scまたはin)免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。次いで、マウスを 10^6 pfuのRSV-A2に曝露した。4日後、1mlのPBSで肺を洗浄し、ELISAによってBAL中のIL5レベルを決定した。(n.d.=検出不能)

【図13】Serionに基づくELISAによって測定された血清RSV特異的IgG応答を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA

10

20

30

40

50

-mBN201B、もしくはMVA-mBN294Aのいずれかで、3週間開けて2回マウスをsc免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。最後の免疫化の2週間後に採取した群当たり5匹のマウスの血清を希釈し、RSV溶解物でコーティングしたプレートを使用するSerieonキットに基づくRSV特異的IgG ELLISAを用いて分析した。

【図14】PRNTによって測定された血清RSV特異的中和抗体応答を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN294Aのいずれかで、3週間開けて2回マウスをsc免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。PRNTによって分析した、最後の免疫化の2週間後に採取した群当たり5匹のマウスの血清。

【図15】ELISPOTによって測定されたRSV FおよびRSV M2特異的T細胞応答を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN294Aのいずれかで、3週間開けて2回マウスをsc免疫した。 10^6 pfuのRSVで対照マウスを2回in免疫した。34日目に脾臓を単離し、1つのRSV F特異的ペプチド(RSV-2(配列番号20)、1つのRSV M2特異的ペプチド(RSV-9(配列番号27))、またはMVA-BNで脾細胞を再刺激した。IFN 分泌細胞をELISPOTにより検出した。実施例に説明するように刺激指数を算出した。

【図16】ブラークアッセイによって測定された肺内のRSV負荷を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN294Aのいずれかで、3週間開けて2回マウスをsc免疫した。対照マウスを 10^6 pfuのRSVで2回in免疫したか、または $50 \mu l$ のFI-RSVでim免疫した。次いで、49日目に、マウスを 10^6 pfuのRSV(A2)に曝露した。4日後、肺を単離し、ブラークアッセイによりRSV負荷(肺当たりのpfu)を決定した。

【図17】RT-qPCRによって測定された肺内のRSV負荷を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN294Aのいずれかで、3週間開けて2回マウスをsc免疫した。対照マウスを 10^6 pfuのRSVで2回in免疫したか、または $50 \mu l$ のFI-RSVでim免疫した。次いで、49日目に、マウスを 10^6 pfuのRSV A2に曝露した。4日後、肺を単離し、RT-qPCRによってRSV負荷(観察されたL遺伝子コピー数に基づいて推定される)を決定した。

【図18】RSV(A2)曝露後4日目の気管支肺胞洗浄(BAL)液中の好酸球および好中球の浸潤を示す。TBSまたは 1×10^8 TCID₅₀のMVA-mBN199B、MVA-mBN201B、もしくはMVA-mBN294Aのいずれかで、3週間開けて2回マウスをsc免疫した。対照マウスを 10^6 pfuのRSVで2回in免疫したか、または $50 \mu l$ のFI-RSVでim免疫した。次いで、マウスを 10^6 pfuのRSV A2に曝露した。4日後、1mlのPBSで肺を洗浄し、BAL液中の好酸球および好中球の割合を決定した。

【0100】

配列の簡単な説明

【0101】

配列番号1は、ヒト RSV(hRSV)株A2からの全長Gタンパク質をコードするDNA配列である(GenBank受入番号M11486)。

【0102】

配列番号2は、hRSV株A2からの全長Gタンパク質をコードするアミノ酸配列である(GenBank受入番号M11486)。

【0103】

配列番号3は、hRSV株A2からの全長Fタンパク質(BN変異体)をコードするDNA配列である。

10

20

30

40

50

【0104】

配列番号4は、h R S V株A2からの全長Fタンパク質(BN変異体)をコードするアミノ酸配列である。

【0105】

配列番号5は、h R S V株A Longからの全長Fタンパク質(BN変異体)をコードするDNA配列である。

【0106】

配列番号6は、h R S V株A Longからの全長Fタンパク質(BN変異体)をコードするアミノ酸配列である。

【0107】

配列番号7は、h R S V株Bからの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠損した切断Gタンパク質をコードするDNA配列である(GenBank受入番号P20896)。

。

【0108】

配列番号8は、h R S V株Bからの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠損した切断Gタンパク質をコードするアミノ酸配列である(GenBank受入番号P20896)。

【0109】

配列番号9は、h R S V株A2からの停止コドンを欠損したNタンパク質をコードするDNA配列である(Genbank受入番号M11486)。

10

【0110】

配列番号10は、h R S V株A2からの停止コドンを欠損したNタンパク質をコードするアミノ酸配列である(Genbank受入番号M11486)。

【0111】

配列番号11は、開始コドンおよび停止コドンの両方を欠損した口蹄疫ウイルスからのプロテアーゼ2Aの断片をコードするDNA配列である。

【0112】

配列番号12は、開始コドンおよび停止コドンの両方を欠損した口蹄疫ウイルスからのプロテアーゼ2Aの断片をコードするアミノ酸配列である。

【0113】

配列番号13は、h R S V株A2からの開始コドンを欠損した全長M2タンパク質をコードするDNA配列である(GenBank受入番号M11486)。

20

【0114】

配列番号14は、h R S V株A2からの開始コドンを欠損した全長M2タンパク質をコードするアミノ酸配列である(GenBank受入番号M11486)。

【0115】

配列番号15は、h R S V株A2からの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠損した切断Fタンパク質(BN変異体)をコードするDNA配列であるGenBank受入番号M11486)。

【0116】

配列番号16は、h R S V株A2からの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠損した切断Fタンパク質(BN変異体)をコードするアミノ酸配列である(GenBank受入番号M11486)。

30

【0117】

配列番号17は、停止コドンh R S V株A2を欠損したNタンパク質をコードするDNA配列(Genbank受入番号M11486)+開始コドンおよび停止コドンの両方を欠損した口蹄疫ウイルスからのプロテアーゼ2A断片をコードするDNA配列+h R S V株A2からの開始コドンを欠損した全長M2タンパク質をコードするDNA配列(GenBank受入番号M11486)である。

【0118】

40

50

配列番号 18 は、 h R S V 株 A 2 からの N タンパク質のアミノ酸配列 (G e n b a n k 受入番号 M 1 1 4 8 6) + 開始コドンを欠損した口蹄疫ウイルスからのプロテアーゼ 2 A 断片のアミノ酸配 + h R S V 株 A 2 からの開始コドンを欠損した全長 M 2 タンパク質のアミノ酸配列 (G e n B a n k 受入番号 M 1 1 4 8 6) である。

【 0 1 1 9 】

配列番号 19 は、 R S V F タンパク質に由来する R S V - 1 ペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 0 】

配列番号 20 は、 R S V F タンパク質に由来する R S V - 2 ペプチドのアミノ酸配列である。 10

【 0 1 2 1 】

配列番号 21 は、 R S V F タンパク質に由来する R S V - 3 ペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 2 】

配列番号 22 は、 R S V G タンパク質に由来する R S V - 4 ペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 3 】

配列番号 23 は、 R S V G タンパク質に由来する R S V - 5 ペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 4 】

配列番号 24 は、 R S V G タンパク質に由来する R S V - 6 ペプチドのアミノ酸配列である。 20

【 0 1 2 5 】

配列番号 25 は、 R S V G タンパク質に由来する R S V - 7 ペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 6 】

配列番号 26 は、 R S V G タンパク質に由来する R S V - 8 ペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 7 】

配列番号 27 は、 R S V M 2 タンパク質に由来する R S V - 9 ペプチドのアミノ酸配列である。 30

【 0 1 2 8 】

配列番号 28 は、 h R S V 株 A 2 からの全長 F タンパク質をコードする D N A 配列である。

【 0 1 2 9 】

配列番号 29 は、 h R S V 株 A 2 からの全長 F タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 0 】

配列番号 30 は、 h R S V 株 A 2 からの全長 G タンパク質をコードする D N A 配列である。

【 0 1 3 1 】

配列番号 31 は、 h R S V 株 A 2 からの全長 G タンパク質のアミノ酸配列である。 40

【 0 1 3 2 】

配列番号 32 は、 h R S V 株 A 2 からの全長 M 2 タンパク質をコードする D N A 配列である。

【 0 1 3 3 】

配列番号 33 は、 h R S V 株 A 2 からの全長 M 2 タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 4 】

配列番号 34 は、 h R S V 株 A 2 からの全長 N タンパク質をコードする D N A 配列である。

【 0 1 3 5 】

10

20

30

40

50

配列番号 35 は、 RSV 株 A2 からの全長 N タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0136 】

配列番号 36 は、 RT - qPCR に使用されるプライマー 1 である。

【 0137 】

配列番号 37 は、 RT - qPCR に使用されるプライマー 2 である。

【 0138 】

配列番号 38 は、 RT - qPCR に使用されるプローブ 6 である。

【 0139 】

配列番号 39 は、 PrS プロモーターのヌクレオチド配列である。

【 0140 】

配列番号 40 は、 Pr7.5 プロモーターのヌクレオチド配列である。 10

【 0141 】

配列番号 41 は、 PrSynIM プロモーターのヌクレオチド配列である。

【 0142 】

配列番号 42 は、 PrLE1 プロモーターのヌクレオチド配列である。

【 0143 】

配列番号 43 は、 PrH5m プロモーターのヌクレオチド配列である。

【 0144 】

実施例

実施例 1：組換えMVA の構築

20

組換えMVA の作製は、組換えMVA を選択するための選択マーカーを使用したCEF 細胞における相同意向的組換えを介して、示されるプロモーター（図1）と一緒に RSV コード配列を MVA ゲノムに挿入することによって行われた。挿入部位としての遺伝子間領域（IGRs）の使用については、国際特許公開WO 03/097845 に記載されている。選択マーカーを欠失させるために、相同意向的組換えの第2のステップを用いた。

【 0145 】

MVA - BN (登録商標) ウイルスを、 IGR88/89 に RSV - A2 - G および RSV - F - A2_BN の遺伝子を含有する組換えMVA - mBN199B を作製するための出発材料として用いた。 MVA - mBN199 の PreMaster 材料を、後述の MVA - mBN201B を作製するための出発材料として用いた。 30

【 0146 】

IGR88/89への挿入 (MVA - mBN199B) :

RSV - A2 - G のコード配列は、 RSV - A2 株糖タンパク質 G の天然に存在する配列に基づいている。融合タンパク質 RSV - F - A2_BN のコード配列も、 RSV - A2 株に基づいているが、 Bavarian Nordic によって修飾された。両方の挿入遺伝子は、ヒト適合化コドンの使用頻度を用いて Geneart により合成され、組換えプラスミドのクローニングに用いられた。 RSV - A2 - G のタンパク質配列は、 GenBank 配列 P03423 . 1 に対して 100% の同一性を示す。 RSV - F - A2_BN のタンパク質配列は、 103 位における 1 つの單一アミノ酸交換 (P から A) のために、 GenBank 配列 P03420 . 1 に対して 99% の同一性を示すのみである。 40

【 0147 】

IGR148/149への挿入 (MVA - mBN201B) :

RSV - N - A2 および RSV - M2 - A2 のコード配列は、それぞれの RSV - A2 株糖タンパク質の自然に存在する配列に基づいている。両方の遺伝子は、単一プロモーターの制御下で 2 つの別個の天然タンパク質の発現を可能にする 2A 自己切断ペプチド配列によって接続される [M.D.Ryan et al. (1991), J.Gen.Virology.72 (Pt 11) : 2727 - 2732] 。 RSV - G (B) および RSV - F - A long BN のコード配列を切断して膜貫通ドメインを除去し、発現されたタンパク質を分泌することができるようにした。挿入した全ての遺伝子は、最適なコドン使用頻度を用いて Geneart により合成され、組換えプラスミドのクローニングに用

50

いられた。RSV-N-A2およびRSV-M2-A2のタンパク質配列は、GenBank配列P03418.1およびP04545.1に対してそれぞれ100%の同一性を示す。切断型RSV-G(B)のタンパク質配列は、GenBank配列P20896.1に対して100%の同一性を示す。切断型RSV-F A long BNのコード配列は、R.P.Duet al.(1994)Biotechnology(NY)12(8):813-818に記載されるように、RSV-Fタンパク質の最初の526個のアミノ酸を含有するように設計した。

【0148】

MVA-mBN210B M2のM2(A2)中の欠失変異体：

MVA-mBN210B M2は、M2(A2)遺伝子の12番目のコドンに欠失変異体を含むため、機能的M2を発現することができない。この欠失は、2つのアミノ酸スレオニンおよびアラニンの、M2(A2)の最初の11個のアミノ酸への付加、続いて転写の停止(UGA停止コドン)を引き起こす。

10

【0149】

実施例2：RSV Fタンパク質、RSV Gタンパク質、RSV Nタンパク質、およびRSV M2タンパク質を発現する組換えMVAワクチンの免疫原性および有効性

ワクチン候補MVA-mBN199Bは、RSVの糖タンパク質(G)および融合(F)タンパク質をコードし、MVA-mBN201BDM2およびMVA-mBN201Bは、全長FおよびGタンパク質に加えてFおよびGの切断型、ヌクレオカプシドタンパク質(N)、ならびにMVA-mBN201Bの場合はRSVのマトリックスタンパク質(M2)も発現する(図1を参照)。この実験の目的は、皮下(s.c.)または鼻腔内(in)投与経路を介した2回または3回の免疫化後に、MVA-mBN199Bと比較してMVA-mBN201B M2およびMVA-mBN201Bの免疫原性および保護効果を分析することであった。

20

【0150】

BALB/cマウスにおけるRSV(A2)曝露モデルを使用して、これらの構築物の有効性を試験した。MVA-mBN199BまたはMVA-mBN201Bを用いた2回の免疫化は、皮下に適用された時は、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)によって判断されるような部分的な保護を提供し、鼻腔内経路によって適用された時は、ほぼ完全な保護を提供した。MVA-mBN201Bによって提供された保護は、MVA-mBN199Bによって提供された保護よりも良好であった。2つの構築物によって誘導された液性免疫応答に差は認められなかったが、T細胞応答には大きな差が観察された。MVA-mBN199Bが良好なRSV F特異的細胞応答を誘導したに対し、MVA-mBN201Bでは、強いM2特異的T細胞応答、およびMVA-mBN199Bと比較してより顕著なG特異的応答が観察された。皮下および鼻腔内免疫化後に誘導されたIgGおよびT細胞応答は類似しており、鼻腔内免疫化によって得られたほぼ完全な無菌免疫は、粘膜感染部位におけるRSV特異的IgAの誘導および分泌と関している可能性が高い。MVA-mBN201BDM2の場合、M2特異的T細胞応答の欠如は、MVA-mBN201Bと比較して低い保護と相關しており、MVA-mBN199Bと同様の保護をもたらした。

30

【0151】

試験デザイン

1×10⁸ TCID₅₀のMVA-mBN199B(群3、4、および5)、1×10⁸ TCID₅₀ MVA-mBN201B(群6、7、および8)、または1×10⁸ TCID₅₀ MVA-mBN201B M2(群9)で、マウスを皮下(s.c.)または鼻腔内(in)処理した。表1に従って、2回(群3、4、6、7、および9)または3回(群5および8)のいずれかでマウスを処理した。表7に従って、2つの対照群をTBSで(s.c.)(群1)、またはRSVで(in)(群2)2回処理した。免疫化または曝露の前日および屠殺日に、血液を採取した。酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)により、RSV特異的IgGの力値を測定した。48日目に、マウスの半数を屠殺した。

40

50

それらの脾臓を摘出し、免疫吸着スポット法（ELISPOT）によるRSV特異的T細胞応答の分析のために調製した。49日目に、残りのマウスを 10^6 pfuのRSV A2に曝露した（in）。曝露日から開始して、外観および体重を毎日監視した。曝露後4日目に、高用量のケタミン・キシラジンの注射によりマウスを屠殺し、最終採血を行った。肺洗浄後、肺を摘出し、ブラークアッセイおよびRT-qPCRによりRSV負荷を分析した。

【0152】

【表1】

【表1】実験デザイン

| 群 | 群 サ イ ズ | ケー ジ | 試験物または参照物の投与 | | | | 採血および ELISPOT (日)% | 曝露 (日)%、# |
|---|------------------|---------|--------------------|------------------------|----|----------------------------------|--------------------------|--------------|
| | | | 注射 | スケジュ ー ル (日)% | 経路 | 注 射 当 たり の 用 量 | | |
| 1 | 5 | A | TBS | 14 およ び35 | sc | 該当な し | 13、34、 48&53 | 49 |
| | 5 | B | | | | | 13、34 およ び48& | - |
| 2 | 5 | C | RSV | 14 およ び35 | in | 10^6 pfu | 13、34、48 および53 | 49 |
| | 5 | D | | | | | 13、34 およ び48& | - |
| 3 | 5 | E | MVA-mBN199B | 14 およ び35 | sc | 1×10^8 $TCID_{50}$ | 13、34、48 および53 | 49 |
| | 5 | F | | | | | 13、34 およ び48& | - |
| 4 | 5 | G | MVA-mBN199B | 14 およ び35 | in | 1×10^8 $TCID_{50}$ | 13、34、48 および53 | 49 |
| | 5 | H | | | | | 13、34 およ び48& | - |
| 5 | 5 | J | MVA-mBN199B | 0、21 およ び35 | sc | 1×10^8 $TCID_{50}$ | -1、20 34、 48 および53 | 49 |
| | 5 | K | | | | | -1、20 34 お よび48& | - |
| 6 | 5 | L | MVA-mBN201B | 14 およ び35 | sc | 1×10^8 $TCID_{50}$ | 13、34、48 および53 | 49 |
| | 5 | M | | | | | 13、34 およ び48& | - |
| 7 | 5 | N | MVA-mBN201B | 14 およ び35 | in | 1×10^8 $TCID_{50}$ | 13、34、48 および53 | 49 |
| | 5 | P | | | | | 13、34 およ び48& | - |
| 8 | 5 | Q | MVA-mBN201B | 0、21 およ び35 | sc | 1×10^8 $TCID_{50}$ | -1、20 34、 48 および53 | 49 |
| | 5 | R | | | | | -1、20 34 お よび48& | - |
| 9 | 5 | W | MVA- mBN201BΔM2 | 14 およ び35 | sc | 1×10^8 $TCID_{50}$ | 13、34、48 および53 | 49 |

% 最初の免疫化に対する割合。

鼻腔内経路によりマウスを 10^6 pfuのRSV A2に曝露した。曝露の4日後、マウスを採血し、麻酔下で屠殺した。気管支肺胞洗浄液および肺の試料採取を行った。

& 48日目に、これらのマウスを屠殺し、ELISPOTにより脾臓を分析した。

【0153】

試験スケジュール。生存段階のスケジュールを表2に要約する。

【0154】

10

20

30

40

50

【表2】

【表2】生存段階の試験スケジュール

| (日) ** | 手順 | |
|--------|---|----|
| -16 | 85 匹の BALB/c マウスの動物施設への到着および搬入、ケージカードの割り当て、ならびにケージ当たり 5 匹のマウスの割り当て | 10 |
| -1 | 耳クリップ装着、全てのマウスの組み入れ/除外試験 | |
| -1 | ケージ J、K、Q および R のマウスの事前採血 (右頸面静脈穿刺) | |
| 0 | ケージ J、K、Q および R のマウスの 1 回目の投与 | |
| 13 | ケージ J、K、Q および R のマウスを除く全てのマウスの事前採血 (右頸面静脈穿刺) | |
| 14 | ケージ J、K、Q および R のマウスを除く全てのマウスの 1 回目の投与 | |
| 20 | ケージ J、K、Q、および R のマウスの採血(左頸面静脈穿刺) | |
| 21 | ケージ J、K、Q および R のマウスの 2 回目の投与 | |
| 34 | 全てのマウスの採血(左眼球後穿刺) | |
| 35 | ケージ J、K、Q および R のマウスを除く全てのマウスの 2 回目の投与 ケージ J、K、Q および R のマウスの 3 回目の投与 | |
| 48 | 全てのマウスの採血(右眼球後穿刺) ケージ B、D、F、H、K、M、P、および R の最終採血 | 20 |
| 48 | ELISPOT による分析のために、ケージ B、D、F、H、K、M、P、および R のマウスの脾臓を摘出する。 | 30 |
| 49 | 残り全てのマウスの曝露 | |
| 49~53 | 外観および体重を毎日測定する | |
| 53 | 最終採血、屠殺、ならびに残りのマウスの BAL および肺の試料採取 | |

** 1回目の免疫化の日に対する割合。

【0155】

材料および方法

実験動物 . Janvier (Route des Chenes Secs, F - 53 940 Le Genest - Saint - Isle, France) から 48 匹の 7 週齢のメス BALB/c J Rj (H - 2 d) マウスを入手した。全てのマウスは、特定の病原体を有していなかった。

【0156】

飼育 . 試験は、Bavarian Nordic - Martinsreid にある動物施設の 117 号室で行われた。このユニットに、温度 20 ~ 24 および相対湿度 40 % ~ 70 % で濾過吸気を提供した。部屋は、14 時間の明期および 10 時間の暗期のサイクルで人工的に照明した。試験馴化期間は、15 日であった。床面積 530 cm² の透明な SealSafe (商標) ケージ (H-Temp [ポリスルホン] ケージ Type II L (欧州標準)) に動物を収容した。H-Temp SealSafe (商標) 蓋でケージを覆った。ケージごとに別個に HEPA 濾過空気を提供する SLINE (商標) 循環ユニットを装備した TECNIPLAST - IVC SealSafe (商標) システム内にケージを設置した。週に 1 回、動物の寝床を交換した。

【0157】

食餌および水 . マウスには、照射した維持食餌 (SSNIF FR/M-H (照射済み) V1534-727) および水 (121 で 20 分間加圧滅菌済み) を自由に摂取させた。

【0158】

処理前の手順：動物の識別 . 各ケージ内の動物を個別に識別するために、標準的手順に従って耳パンチを行った。

【0159】

組み入れ / 除外試験 . 標準的手順に従って組み入れ / 除外試験を行った。

【0160】

事前採血としての血液試料採取 . 標準的手順に従った顔面静脈穿刺により、約 150 μ l の血液試料を採取した。標準的手順に従ってさらに処理するために、血液試料を実験室に移した。

【0161】

処理手順 : 試験物 1 ~ 3 および参照物の調製および投与試験物および参照物の調製および投与は、クラス II 微生物学的安全キャビネット (HERA safe (登録商標)) / クラス II 型 H、Kendro) 内で標準的手順に従って行われた。端的に述べると、sc 投与の場合、組換えMVA を TBS に希釈し、 2×10^8 TCID₅₀ / ml の濃度の作業溶液を得た。標準的手順に従って、500 μ l 中 1×10^8 TCID₅₀ を sc 注射した。in 投与の場合、組換えMVA を TBS に希釈し、 2×10^9 TCID₅₀ / ml の濃度の作業溶液を得た。標準的手順に従って、50 μ l の希釈ウイルスを麻酔 (キシラジン / ケタミン) 下のマウスの片方の鼻孔内に投与した。標準的手順に従って、500 μ l の TBS を sc 投与した。10

【0162】

試験物 4 / 曝露ウイルスの調製および投与 . RSV 原液バイアルを解凍し、ウイルスの不安定性のためにできるだけ迅速に使用した (氷上で最長 15 分)。ウイルスは、常に氷上に維持し、標準的手順に従って鼻腔内経路により麻酔下 (キシラジン / ケタミン) のマウスを 100 μ l のニートウイルス溶液に曝露するために直ちに使用した。20

【0163】

処理後の手順 :

体重 . 体重標準的手順に従って、曝露日から屠殺するまで、毎日体重を監視した。

【0164】

血液試料採取 . 標準的手順に従って、眼球後または顔面静脈穿刺により血液試料 (約 150 μ l) を採取した (詳細については表 1 および 2 を参照のこと)。標準的手順に従つてさらに処理するために、血液試料を実験室に移した。

【0165】

安楽死 . 48 日目に、頸椎脱臼によりマウスの半数の屠殺を行った。53 日目に、腹腔内注射により 2 倍用量のケタミン - キシラジンを残りのマウスに投与し、腹腔の大動脈を切断することにより安楽死を行った。30

【0166】

脾臓摘出 . 脾臓を無菌的に摘出した。標準的手順に従って、培地を充填した試験管にそれらを入れた。これらの試験管は、標準的手順に従つて動物施設に搬入され、次いで搬出された。

【0167】

肺洗浄および肺摘出 . 肺に 1 ml の PBS を 4 回流すことにより、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液を採取した。次いで、肺を摘出し、後のプランクアッセイおよび RNA 抽出のために、2 等分して液体窒素中で瞬間凍結した。40

【0168】

分析 : 血液試料の処理および血清の保存 . 実験室に移した後、標準的手順に従つて血液試料を処理して血清にした。調製後、分析のために必要となるまで、血清を -20 (± 5) で保存した。

【0169】

血清試料からのRSV特異的抗体力値の分析 . 改良された ELISA キット (Serion ELISA classic、カタログ番号 ESR113G) を使用して、全ての血清試料から RSV 特異的 IgG の総 ELISA 力値を決定した : キットとともに供給されるアルカリホスファターゼコンジュゲート抗ヒト IgG 抗体の代わりに、アルカリホスファターゼコンジュゲートヤギ抗マウス IgG (Serotec カタログ番号 1030050)

4) を二次抗体として使用した。

【0170】

改良されたELISAキットを使用して、全ての血清試料およびBAL液からRSV-F/G特異的IgGのELISA力値を決定した(IBL - Hamburg 参照番号RE56881)。キットとともに供給されるPODコンジュゲート抗ヒトIgG抗体の代わりに、HRPコンジュゲートヒツジ抗マウスIgG(参照番号BN-687-95/96、Serotectカタログ番号AAC10P)を二次抗体として使用した。

【0171】

改良されたELISAキット(IBL - Hamburg 参照番号RE56881の試薬およびRSV(Fタンパク質)IgGマイクロタイターストリップ、参考番号RE56692)を使用して、群4および7以外の48日目の血清試料からRSV-F特異的IgGのELISA力値を決定した。キット内に提供されるPODコンジュゲート抗ヒトIgG抗体の代わりに、HRPコンジュゲートヒツジ抗マウスIgG(参照番号BN-687-95/96、Serotectカタログ番号AAC10P)を二次抗体として使用した。

10

【0172】

改良されたELISAキット(IBL - Hamburg Ref. RE56881)を使用して、それぞれ、48日目および53日目の試料から、血清およびBAL液中のRSV特異的IgAのELISA力値を決定した：キット内に提供されるPODコンジュゲート抗ヒトIgG抗体の代わりに、HRPコンジュゲートヒツジ抗マウスIgA(参照番号BN-687-95/96、Serotectカタログ番号STAR137P)を使用した。
。

20

【0173】

脾細胞からのRSV特異的細胞性免疫応答の分析 . 最後の投与から2週間後、他の箇所に記載するように、特異的ペプチドで脾細胞を再刺激し(例えば、S. M. Varga et al. (2000) ; S. Johnstone et al. (2004) ; S. Jiang et al. , (2002) ; and A. B. Kulkarni et al. , J. Virol. 67 (7) : 4086 - 4092 (1993) を参照) 、ELISPOTアッセイにより脾細胞からのIFN放出を検出することにより、RSV-F-、RSV-G-、およびRSV-M2特異的細胞応答を決定した。

【0174】

30

ELISPOTアッセイ法 . Mouse IFN - Gamma - Kit (BD Biosciences、カタログ番号551083)をELISPOTアッセイに使用した。アッセイは、製造者の指示に従って行われた。端的に述べると、脾細胞単離の前日に、プレートを捕捉抗体でコーティングした。単離後、細胞をELISPOTプレートに移し、異なるペプチド(表3を参照)で20時間37度で刺激した。検出抗体を使用してIFNの産生を検出した。製造者の指示に従ってBD(商標) ELISPOT AEC Substrate Set (BD Biosciences、カタログ番号551951)を使用して、プレートを開いた。

【0175】

ELISPOTによる刺激計画 . すべての条件を2通り試験した。RSV-1、RSV-2、RSV-3、RSV-4、およびRSV-5ペプチド(表3を参照)を最終濃度5 μ g / ml (1 μ g / ウエル)で使用して、ウェル当たり 5×10^5 および 2.5×10^5 個の脾細胞を刺激した。MVA(免疫化対照)を感染効率(MOI)10で使用してウェル当たり 5×10^5 および 2.5×10^5 個の脾細胞を刺激し、コンカナバリンA(Con A [陽性対照])を最終濃度0.5 μ g / mlで使用して 2.5×10^5 個の脾細胞を刺激した。陰性対照として、 5×10^5 個の脾細胞を培地のみ(Glutamax、ペニシリン、ストレプトマイシン、10%ウシ胎仔血清、および 10^5 M s - メルカブトエタノールを補充した RPMI - 1640)で培養した。

40

【0176】

【表3】

【表3】RSV特異的刺激

| ペプチドの名称 | 特異性 | ペプチド配列 |
|---------|-----|---------------------------|
| RSV-1 | F | TYMLTNSELL (配列番号 19) |
| RSV-2 | F | KYKNAVTEL (配列番号 20) |
| RSV-3 | F | ELQLLMQSTPAANNR (配列番号 21) |
| RSV-4 | G | WAICKRIPNKKPG (配列番号 22) |
| RSV-5 | M2 | SYIGSINNI (配列番号 27) |

10

【0177】

BAL液および肺の分析。染色の問題のために、BALの細胞の特徴付けは不可能であった。RSVブラークアッセイおよびRT-qPCRにより細胞試料中のRSV負荷を決定した。

【0178】

RSVブラークアッセイ。French Pressを使用して、瞬間凍結した肺の各反片を1mlの冷培地中でホモジナイズした(7%ウシ胎仔血清を補充したダルベッコ変法イーグル培地)。短期間の遠心分離後、試験管2本分の各上清を、48ウェル平底プレート中で増殖させたVero細胞単層上に2倍連続希釈で滴定した。6日後、単層を洗浄し、1%ホルムアルデヒドで固定した。24時間後、0.04%Neutral Redで単層を染色し、ブラークを数えた。

20

【0179】

RSVのRT-qPCRホモジナイズした100μlの肺組織を直ちに取り出し、QiagenのRNeasy(登録商標)Mini Kit(カタログ番号74104)を使用してRNAを単離した。Applied BiosystemsのHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit(カタログ番号4387406)を使用して逆転写反応を行った。Applied BiosystemsのUniversal PCR Master Mix(カタログ番号4352042)と、3つのプライマー：(1)プライマー-1(5'-GAA CTC AGT GTA GGT AGA ATG TTT GCA-3'；配列番号36)；(2)プライマー-2(5'-TTT AGC TAT CAT TTT CTC TGC CAA T-3'；配列番号37)；および(3)プローブ6(5'-TTT GAA CCT GTC TGA ACA TTC CGG GTT-3'；配列番号38)の混合物とを使用して、サーマルサイクラー内で以下のパラメータを用いて、RSV L遺伝子に特異的なPCRを行った：(1)50

30

で2分間；(2)95で10分間；(3)(95で15秒、60で1分)を45サイクル。コピー数は、RSV L遺伝子の断片を含有するpMISC202プラスミドベクターの標準曲線から決定した。Applied Biosystems(カタログ番号4351315)のVIC/MGB標識プローブを使用したマウスアクチンに対する同様の反応を、入力cDNAの内部対照として用いた。

40

【0180】

試験の文書化。生存段階の個々のステップの間に全ての情報を収集するために、生存段階のフロー図を用意した。さらに、マウスまたはケージに特有な情報を、対応するケージカードに記録した。ケージカードは、試験の原データとは見なされないが、Upper Bavariaの政府からの要求であった。

【0181】

分析段階の個々のステップの間に全ての情報を収集するために、分析段階のフロー図を用意した。アッセイは、アッセイ特有の試験記録またはLaboratory Note Booksに文書化した；相互参照は、分析段階のフロー図中に文書化した。原データを含む全てのアッセイ文書は、標準的手順に従って見直された。さらに、標準的手順に従

50

つて血清試料のための試料追跡シートを用意した。

【0182】

データ処理 . 標準的手順によるさらなる分析のために原データを Excel ファイルに転送した。

【0183】

ELISA . Excel を使用して、 OD の平均値および平均の標準誤差を算出した。

【0184】

ELISPOT . 製造者の指示にしたがって、 CTL リーダーを用いて ELISPOT プレートを読み取った。ウェルごとにスポット形成細胞 (SFC) の数を決定し、さらなる評価のために Excel ファイルに転送した。ウェル当たり 5×10^5 および 2.5×10^5 個の細胞を用いたインキュベーションから、ウェルごとに 1×10^6 個の脾細胞当たりのスポットの数を算出した。陰性対照の平均を算出し、マウス 1 匹当たりの平均値を算出する前に各個々の値から差し引いて、マウス 1 匹当たりの刺激指数 (SI) 値を得た (IFN を放出する脾細胞のペプチド特異的な周期)。
10

【0185】

ペプチド刺激の場合、数えきれないほど多くのスポットがあった場合、または RSV で免疫した動物の場合を除いて、 5×10^5 および 2.5×10^5 個の細胞を含むウェルから SI を得た。これらの場合、 2.5×10^5 の濃度のみを用いた。MVA - BN 刺激の場合、数えきれないほど多くのスポットがあった場合を除いて、 5×10^5 個を含むウェルから SI を得た。その場合、 2.5×10^5 の濃度のみを用いた。個々の動物について SI を決定した後、 SI の平均値 (1×10^6 個の脾細胞当たりの SFC) および平均値の標準誤差 (SEM) を群ごとに算出した。
20

【0186】

体重変化 . RSV 曝露前の個々の体重値 (グラム表示) を基準値として採用した。これらの基準値を用いて、曝露後の各監視時点での個々の動物の体重変化 (% 表示) および群の平均体重変化を Microsoft Excel を使用して算出した。

【0187】

RSV プラークアッセイ . 計数可能なウイルス希釀液が最も多い 3 つのウェル内のプラークの数を数えた。希釀因子によって調整されたプラークの平均数に、次いで 10 を乗じて溶液の力値を pfu / ml で得、最終的に 2 を乗じて肺当たりの力値を得た。
30

【0188】

RSV の RT - qPCR . Applied Biosystems の ABI 7500 (カタログ番号 4351107) を使用してリアルタイムで PCR 増幅を測定し、 Applied Biosystems から供給された System Software を使用して分析した。全ての値は、 L 遺伝子の標準値と比較し、試料ごとにマウス アクチンに正規化した。

【0189】

結果

液性免疫応答の分析：血清試料からの RSV 特異的 IgG 抗体応答の分析 . 最初に、組換え RSV F および G タンパク質のみでコーティングしたプレートを使用する IBL - Hamburg キットに基づく ELISA により、血清を分析した (図 2 および図 3)。図 2 に示すように、単回免疫化後、免疫化に用いた経路 (sc または in) に関係なく、3 つ全ての構築物 (MVA - mBN199B, MVA - mBN201BDM2, および MVA - mBN201B) で同様の RSV 特異的 IgG 応答 (0.870 ~ 1.347 の範囲の OD) が観察された。2 回目の免疫化が、抗体応答に 2.0 倍から 3.5 倍近くの増加をもたらしたのに対し (2.627 ~ 3.407 の範囲の OD) 、3 回目の sc 注射は、B 細胞応答にわずかな影響を及ぼしたに過ぎず、2 回目の免疫化後の OD と比較して約 0.500 OD 単位の増加をもたらした。組換え RSV F タンパク質のみでコーティングしたプレートを使用する IBL - Hamburg キットに基づく ELISA でも同様の結果が得られた (図 4)。
40
50

【0190】

血清の連続希釈(1/100、1/200、および1/400)後、RSV-FおよびRSV-G特異的ELISAの結果は、MVA-mBN201B-M2およびMVA-mBN201Bによる切断RSV-Fタンパク質および切断RSV-Gタンパク質のさらなる発現にもかかわらず、MVA-mBN199B、MVA-mBN201B-M2、およびMVA-mBN201Bは、同様のRSV-FおよびRSV-G特異的IgG応答を誘導したことを示した(図3)。構築物を用いた2回のsc免疫化後、B細胞応答は、RSV単独(陽性対照)による免疫化と比較してなおもより低かった。RSVの2回のin適用によって誘導される抗体応答のレベルに達するには、MVA-mBN構築物を用いた3回目のsc免疫化が必要であった。対照的に、IBL Hamburgキットに基づくELISAにより分析した場合、MVA-mBN199BおよびMVA-mBN201Bを用いた2回のin免疫化は、RSV単独の2回の免疫化、またはMVA-mBN199B、MVA-mBN201B-M2、およびMVA-mBN201Bを用いた3回のsc免疫化と同様のB細胞応答を誘導した(図3)。

【0191】

RSV溶解物でコーティングしたプレートを使用するSerionキットに基づくELISAにより再び血清を分析した場合、MVA-mBN199B、MVA-mBN201B-M2、およびMVA-mBN201Bの間に差は認められなかった。2回目および3回目の免疫化の間、またはscおよびin投与経路の間にも差は観察されなかった。また、応答は全て、RSVの2回のin適用によって誘導された抗体応答よりも低かった(図5)。

【0192】

RSV特異的IgA抗体応答の分析。曝露後4日目(53日目)に、BAL液中のRSV-FおよびRSV-G特異的IgAを(IBL Hamburgキットに基づいて)測定した。加えて、ELISAによるRSV-FおよびRSV-G特異的IgGについてもBALおよび血清を分析した。その結果を、曝露(48日目)の直前に血清中で得られた結果と比較して図6に示す。

【0193】

予想されたように、IgA応答は、RSV、MVA-mBN199B、およびMVA-mBN201Bのin適用後のみに検出された。IgGは、BAL中にも検出することができたが、IgAは、in適用後により高いレベルで検出された。適用経路に関係なく、IgAの血清レベルは、IgGレベルよりもはるかに低かった。

【0194】

RSV特異的細胞性免疫応答の分析。最後の免疫化の2週間後、ELISPOTにより脾臓のT細胞応答を分析した(図7)。inまたはsc経路により投与されたMVA-mBN199Bは、強いRSV-F特異的T細胞応答を誘導した。この免疫応答は、主に、RSV-M2の非存在下で免疫優性であるRSV-F特異的ペプチドRSV-2に対するものであった。応答は、2回目のsc免疫化後、 10^6 個の脾細胞当たり約2000スポットであり、3回目のsc注射または2回目の鼻腔内適用後は、約4000スポットであった。RSVの鼻腔内適用に対する応答と同様に、MVA-mBN199Bによる免疫化後にペプチドRSV-4に対する低いG特異的応答が検出され(10^6 個の脾細胞当たり約500スポット)、予想されたように、MVA-mBN199Bは、M2特異的T細胞を誘導しなかった。M2ペプチドは、マウスにおけるRSVの免疫優性ペプチドである。結果的に、RSVによる鼻腔内免疫化は、 10^6 個の脾細胞当たり約1000スポットを超える良好なM2特異的T細胞応答を誘導し、F特異的T細胞応答はほぼ全く誘導しなかった。

【0195】

MVA-mBN199Bと同様に、MVA-mBN201Bは強いT細胞応答を誘導したが、それはM2が優勢であった(投与回数または投与経路に関係なく、 10^6 個の脾細胞当たり約4000スポット超)。MVA-mBN201Bによって誘導されたG特異的

10

20

30

40

50

応答でさえ、MVA-mBN199BまたはRSVによって誘導されたG特異的応答よりも少なくとも3倍高かった。MVA-mBN199Bとは対照的に、MVA-mBN201Bによって誘導されたF特異的応答は、RSV-2ペプチドで 10^6 個の脾細胞当たり600スポット未満とはるかに低かった。

【0196】

RSV A2株によるRSV曝露。最後の免疫化の2週間後、マウスを 10^6 pfuのRSV(A2)に鼻腔内曝露した。体重を毎日監視した。曝露後4日目に、マウスを屠殺した。1mlのPBSで肺を洗浄した後、肺を摘出し、上述のように実施したplaques assayおよびRT-qPCRにより肺内のRSV負荷を決定した。

【0197】

体重変化。おそらくは麻酔のためまたはin曝露自体のために、曝露後1日目に、全てのマウスに体重減少が見られた(図8)。TBSで処理したマウスは、RSV曝露後4日目に著しく体重が減少し始めた。対照的に、3回目にRSVを鼻腔内投与したマウスは、体重減少を示さなかった。曝露後4日目に、MVA-mBN199B、MVA-mBN201B、またはMVA-mBN201BDM2でsc免疫した全てのマウスは、体重が約20%減少した。そのような体重減少については、以前にOlszewska et al.によって記載されている(Vaccine 23:215(2004))。しかしながら、我々のRT-qPCRの結果(図10)は、それが、一次RSV感染の通常のクリアランスと比較して、ワクチンで予備刺激されたCTL応答によるより良好な保護および肺からのより早期のRSV排除と関連することを示している。in適用した場合、MVA-mBN201Bで免疫したマウスは、曝露後2日目にsc免疫化マウスと同様の体重減少を示したが、sc経路と比較して肺内のRSV負荷が低いため、曝露後4日目には回復した(図10)。RSVで免疫した群と同様に、MVA-mBN199Bでin免疫したマウスも体重減少を示さなかった。

【0198】

plaques assayによって測定されたRSV負荷。曝露後4日目に、非免疫マウスに平均して肺当たり 57671 pfuが検出された(図9)。RSVで免疫した対照群と同様に、2回のscまたはin適用後、MVA-mBN199B、MVA-mBN201B、またはMVA-mBN201B M2で免疫した動物の肺にRSV A2 plaquesは検出されなかった。

【0199】

定量的リアルタイムPCRによって測定されたRSV負荷。RT-qPCRによっても肺内のRSV負荷を分析した(図10)。ワクチン接種したいずれのマウスにも、plaques assayによってRSVは検出されなかつたが、MVA-mBN199Bで3回免疫したマウスにおいてRSVゲノムがなおも検出可能であった。MVA-mBN199Bによる3回の免疫化後、RSV負荷は、TBS対照群と比較して38倍低かった。MVA-mBN199Bによる3回の免疫化後、RSVゲノムも検出可能であったが、負荷は、TBS対照群と比較して158倍低かった。2回免疫したマウスと3回免疫したマウスの間に大きな差は認められなかつた。興味深いことに、MVA-mBN201Bで観察されたRSV負荷の減少は、MVA-mBN199Bに相当するM2の非存在下でのMVA-mBN201B M2のワクチン接種後には観察されなかつた。

【0200】

MVA-mBN201Bによるin免疫化後、RSVで処理した群で得られたものに匹敵するほぼ完全な保護が観察されたが、5匹のマウスのうち1匹において、L遺伝子の数個のコピーがなおも観察可能であった。MVA-mBN199Bによる鼻腔内免疫化も、RSV負荷の強い減少を誘導したが、4匹のマウスのうちの3匹になおもL遺伝子が検出された。

【0201】

考察および結論

MVA-mBN201Bは、MVA-mBN199B構築物にも含まれる全長RSV

10

20

30

40

50

F および G タンパク質に加えて、 R S V F および G タンパク質の切断型を発現するが、 M V A - m B N 2 0 1 B は、同様の規模の液性免疫応答を誘導した。 R S V F および G の E L I S A と比較して R S V F のみの E L I S A において測定された同様に良好な応答によって判断されるように、両方の構築物が、主に R S V F タンパク質に対する抗体応答を誘導した。2回の i n 適用後の抗体レベルは、2回の s c 適用後よりも高かった。2回の i n 適用によって誘導される抗体応答レベルに達するには、3回目の s c 適用が必要であった。対照的に、 s c 経路対 i n 経路、または2回対3回の s c 適用を用いて誘導した T 細胞応答に大きな差は認められなかった。しかしながら、 M V A - m B N 1 9 9 B が良好な R S V F 特異的細胞応答を誘導したのに対し、 M V A - m B N 2 0 1 B では強い M 2 特異的 T 細胞応答が観察された。 M V A - m B N 2 0 1 B によって誘導された R S V G 特異的応答も、 M V A - m B N 1 9 9 B と比較してより顕著であった。 M V A - m B N 2 0 1 B によって誘導された T 細胞応答のパターンは、 R S V 免疫化によって誘導された T 細胞応答に類似していたが、はるかにより高かった。

【 0 2 0 2 】

投与経路または投与回数に関係なく、両方の構築物が R S V (A 2) による曝露からマウスを保護し、複製ウイルスは肺から回収できなかった。しかしながら、以前に観察されたように、 M V A - m B N 1 9 9 B または M V A - m B N 2 0 1 B による s c 免疫化は、無菌免疫（すなわち、標的とする感染性因子が体内から排除された後でも続く免疫）をもたらさなかった。 M V A - m B N 1 9 9 B または M V A - m B N 2 0 1 B の s c 適用により免疫したマウスの肺内ゲノム R S V 負荷（ウイルス R N A ポリメラーゼ (L) 遺伝子のレベルによって測定される）は、有意に減少したものの、定量的 R T - P C R によってなおも検出可能であり、3回目の s c 免疫化は、その R S V 特異的 I g G レベルの増加にもかかわらず、ウイルス負荷に有益な影響を与えたなかった。 R S V L タンパク質発現の低下は、 M V A - m B N 2 0 1 B によるワクチン接種後に M V A - m B N 1 9 9 B と比較してやや顕著であったが、 R S V ゲノム負荷は、 M V A - m B N 1 9 9 B と同様に M V A - m B N 2 0 1 B をワクチン接種した動物よりも、 M V A - m B N 2 0 1 B M 2 をワクチン接種した動物においてより高かったため、それは、 M 2 特異的 C D 8 + T 細胞応答の増加に起因していたのかもしれない。

【 0 2 0 3 】

M V A - m B N 1 9 9 B または M V A - m B N 2 0 1 B の2回の i n 適用後、もう少し無菌免疫が得られそうであった。この観察は、粘膜感染部位における R S V 特異的 I g A の誘導および分泌と相關していた。

【 0 2 0 4 】

実施例 3 : F I - R S V と比較した、 R S V F タンパク質、 R S V G タンパク質、 R S V N タンパク質、および R S V M 2 タンパク質を発現する組換え M V A ワクチンの安全性

ワクチン候補 M V A - m B N 1 9 9 B は、 R S V の糖タンパク質 (G) および融合 (F) タンパク質をコードし、 M V A - m B N 2 0 1 B は、 R S V の全長タンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質 (N) 、およびマトリックスタンパク質 (M 2) に加えて F および G の切断型を発現する（図 1 を参照）。これらの実験の目的は、皮下 (s c) または鼻腔内 (i n) 投与経路による2回の免疫化後に、 M V A - m B N 1 9 9 B および M V A - m B N 2 0 1 B の安全性を F I - R S V と比較して分析することであった。

【 0 2 0 5 】

B A L B / c マウスにおける R S V (A 2) 曝露モデルを使用して、これらの構築物の安全性を試験した。 M V A - m B N 1 9 9 B または M V A - m B N 2 0 1 B を用いた2回の免疫化は、 R S V (A 2) への曝露後に、 F I - R S V と比較して B A L における I L 4 および I L 5 の分泌増加を誘導しなかった。

【 0 2 0 6 】

試験デザイン

表 X に従って、 1×10^8 T C I D₅₀ の M V A - m B N 1 9 9 B (群 3 および 4)

10

20

30

40

50

、 1×10^8 TCID₅₀ MVA-mBN201B(群5および6)で、3週間開けて2回マウスを皮下(sc)または鼻腔内(in)処理した。表xに従って、3つの対照群を2回、TBSで(sc)処理するか(群1)、またはRSVでin処理するか(群2)、または $30 \mu\text{g}$ のFI-RSVでim処理(群7)した。35日目に、マウスを 10^6 pfuのRSV A2に曝露(in)した。曝露後4日目に、高用量のケタミン・キシラジンの注射によりマウスを屠殺し、最終採血を行った。肺洗浄後、ELISAによりBAL中のIL4およびIL5レベルを分析した。

【0207】

【表4】

【表4】実験デザイン

| 群 | 群 サ イ ズ | 試験物または参照物の投与 | | | | 曝露 (日)%、# | |
|---|------------------|--------------|------------------------|----|---------------------------------------|--------------|--|
| | | 注射 | スケジュ ー ル (日)% | 経路 | 注 射 当 たり の 用 量 | | |
| 1 | 5 | TBS | 0 および 21 | sc | 該当なし | 35 | |
| 2 | 5 | RSV | | in | 10^6 pfu | | |
| 3 | 5 | MVA-mBN199B | | sc | 1×10^8 TCID ₅₀ | | |
| 4 | 5 | | | in | 1×10^8 TCID ₅₀ | | |
| 5 | 5 | MVA-mBN201B | | sc | 1×10^8 TCID ₅₀ | 20 | |
| 6 | 5 | | | in | 1×10^8 TCID ₅₀ | | |
| 7 | 5 | FI-RSV | | im | $30 \mu\text{g}$ | | |

% 最初の免疫化に対する割合。

鼻腔内経路によりマウスを 10^6 pfuのRSV A2に曝露した。曝露の4日後、マウスを採血し、麻酔下で屠殺した。BAL液の試料採取を行った。

【0208】

試験スケジュール。生存段階のスケジュールを表yに要約する。

30

【0209】

【表5】

【表5】生存段階の試験スケジュール

| (日)** | 手順 |
|-------|--|
| -9 | BALB/c マウスの動物施設への到着および搬入、ケージカードの割り当て、ならびにケージ当たり5匹のマウスの割り当て |
| -1 | 耳クリップ装着、全てのマウスの組み入れ/除外試験 |
| 0 | マウスの1回目の投与 |
| 21 | マウスの2回目の投与 |
| 35 | RSV(A2)曝露 |
| 39 | 最終採血、屠殺、およびBALの試料採取 |

** 1回目の免疫化の日に対する割合。

【0210】

材料および方法

実験動物。Janvier (Route des Chenes Secs, F-53940 Le Genest-Saint-Isle, France)から7週齢のメスBALB/cJ Rj(H-2d)マウスを入手した。全てのマウスは、特定の病原体を有していなかった。

【0211】

40

50

飼育 . 試験は、Bavarian Nordic - Martinsreid にある動物施設の 117 号室で行われた。このユニットに、温度 20 ~ 24 および相対湿度 40 % ~ 70 % で濾過吸気を提供した。部屋は、14 時間の明期および 10 時間の暗期のサイクルで人工的に照明した。試験馴化期間は、15 日であった。床面積 530 cm² の透明な SealSafe (商標) ケージ (H-Temp [ポリスルホン] ケージ Type I I L (欧州標準)) に動物を収容した。H-Temp SealSafe (商標) 蓋でケージを覆った。ケージごとに別個に HEPA 濾過空気を提供する SLIMLine (商標) 循環ユニットを装備した TECNIPLAST - IVC SealSafe (商標) システム内にケージを設置した。週に 1 回、動物の寝床を交換した。

【0212】

10

食餌および水 . マウスには、照射した維持食餌 (SSNIF R / M - H (照射済み) V1534 - 727) および水 (121 で 20 分間加圧滅菌済み) を自由に摂取させた。

【0213】

処理前の手順：動物の識別 . 各ケージ内の動物を個別に識別するために、標準的手順に従って耳パンチを行った。

【0214】

組み入れ／除外試験 . 標準的手順に従って組み入れ／除外試験を行った。

【0215】

20

事前採血のための血液試料採取 . 標準的手順に従った顔面静脈穿刺により、約 150 μl の血液試料を採取した。標準的手順に従ってさらに処理するために、血液試料を実験室に移した。

【0216】

30

処理手順 : 試験物および参照物の調製および投与。試験物および参照物の調製および投与は、クラス II 微生物学的安全キャビネット (HERAsafe (登録商標) / クラス II 型 H、Kendro) 内で標準的手順に従って行われた。端的に述べると、sc 投与の場合、組換えMVA を PBS に希釈し、 2×10^8 TCID₅₀ / ml の濃度の作業溶液を得た。標準的手順に従って、500 μl 中 1×10^8 TCID₅₀ を sc 注射した。in 投与の場合、組換えMVA を PBS に希釈し、 2×10^9 TCID₅₀ / ml の濃度の作業溶液を得た。標準的手順に従って、50 μl の希釈ウイルスを麻酔 (キシラジン / ケタミン) 下のマウスの片方の鼻孔内に投与した。標準的手順に従って、500 μl の PBS を sc 投与した。

【0217】

RSV (A2) ウィルスの調製および投与 . RSV 原液バイアルを解凍し、ウィルスの不安定性のためにできるだけ迅速に使用した (氷上で最長 15 分)。ウィルスは、常に氷上に維持し、標準的手順に従って鼻腔内経路により麻酔下 (キシラジン / ケタミン) のマウスを 100 μl のニートウイルス溶液に曝露するために直ちに使用した。

【0218】

F I - RSV の調製および投与 . 40 μl 中 30 μg の F I - RSV を筋肉内注射した。

40

【0219】

安楽死 . 35 日目に、腹腔内注射により 2 倍用量のケタミン - キシラジンを残りのマウスに投与し、腹腔内の大動脈を切断することにより安楽死を行った。

【0220】

肺洗浄 . 肺に 1 ml の PBS を 4 回流すことにより、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液を採取した。

【0221】

分析

市販の ELISA キット (eBIO SCIENCE Cat N° BMS613 の mL4 PLATINUM ELISA および eBIO SCIENCE Cat N° 88

50

- 7 0 5 4 - 2 2 の R E A D Y - S E T - G O M I L - 5 E L I S A) を使用して、
気管支肺胞洗浄 (B A L) 上清中の I L - 4 および I L - 5 のレベルを測定した。

【 0 2 2 2 】

試験の文書化 . 生存段階の個々のステップの間に全ての情報を収集するために、生存段階のフロー図を用意した。さらに、マウスまたはケージに特有な情報を、対応するケージカードに記録した。ケージカードは、試験の原データとは見なされないが、 U p p e r Bavaria の政府からの要求であった。

【 0 2 2 3 】

分析段階の個々のステップの間に全ての情報を収集するために、分析段階のフロー図を用意した。アッセイは、アッセイ特有の試験記録または Laboratory Note Books に文書化した；相互参照は、分析段階のフロー図中に文書化した。原データを含む全てのアッセイ文書は、標準的手順に従って見直された。さらに、標準的手順に従って血清試料のための試料追跡シートを用意した。

【 0 2 2 4 】

データ処理 . 標準的手順によるさらなる分析のために原データを Excel ファイルに転送した。

【 0 2 2 5 】

E L I S A . サイトカインの濃度は、それぞれの E L I S A キットの標準曲線から決定した。

【 0 2 2 6 】

結果 F I - R S V で観察されたような I L - 4 (図 1 1) および I L - 5 (図 1 2) 產生の増加は、 M V A - m B N 1 9 9 B または M V A - m B N 2 0 1 B の場合には観察されなかつた。 M V A - m B N 1 9 9 B または M V A - m B N 2 0 1 B でマウスを in 免疫した時、両方のサイトカインは検出レベル未満であった。

【 0 2 2 7 】

考察および結論

T h 2 応答によって評価されるように、 M V A - m B N 1 9 9 B および M V A - m B N 2 0 1 B のどちらとも、 F I - R S V と比較して重篤な疾患を誘導しなかった。

【 0 2 2 8 】

実施例 4 : R S V F タンパク質、 R S V G タンパク質、 R S V N タンパク質、 および R S V M 2 タンパク質を発現する異なる組換え M V A ワクチンの免疫原性、 有効性、 および安全性の比較 .

ワクチン候補 M V A - m B N 1 9 9 B は、 R S V の糖タンパク質 (G) および融合 (F) タンパク質をコードし、 M V A - m B N 2 0 1 B は、 R S V の全長タンパク質、 ヌクレオカプシドタンパク質 (N) 、 およびマトリックスタンパク質 (M 2) に加えて F および G の切断型を発現し、 M V A - m B N 2 9 4 B は、 R S V の 1 つの F および 2 つの 2 G 全長タンパク質、 ヌクレオカプシドタンパク質 (N) 、 およびマトリックスタンパク質 (M 2) を発現する (図 1 を参照) 。 M V A - m B N 2 9 4 A は、 なおも 1 つのクローニングカセットを有する M V A - m B N 2 9 4 B のクローニングにおける中間産物である。このクローニングカセットは、 導入遺伝子の発現またはトランスジェニックタンパク質の免疫原性特性のいずれにも影響しない。これらの実験の目的は、 皮下 (s c) 投与経路による 2 回の免疫化後に、 M V A - m B N 2 9 4 A の免疫原性、 有効性、 および安全性を M V A - m B N 1 9 9 B および M V A - m B N 2 0 1 B と比較して分析することであった。

【 0 2 2 9 】

B A L B / c マウスにおける R S V (A 2) 曝露モデルを使用して、 これらの構築物の免疫原性、 有効性、 および安全性を試験した。 M V A - m B N 2 0 1 B と比較した M V A - m B N 2 9 4 A (M V A - m B N 2 9 4 B と同等) における変化にもかかわらず、 それが同様の B 細胞および T 細胞応答を誘導し、 同様の保護を提供したことを確認した。 この実験は、 R S V 膜糖タンパク質 (F または G) の少なくとも 1 つの抗原決定基、 および R

10

20

30

40

50

S V ヌクレオカプシドタンパク質（ N または M 2 ）の少なくとも 1 つの抗原決定基を発現するいずれの構築物（ M V A - m B N 2 0 1 B または M V A - m B N 2 9 4 A ）も、 R S V 膜糖タンパク質の抗原決定基のみを発現する構築物（ M V A - m B N 1 9 9 B ）よりも良好な保護を誘導することを示している。

【 0 2 3 0 】

試験デザイン

表 6 に従って、予備刺激 - 追加免疫スケジュール（ 0 日目および 21 日目）において、
 1×10^8 T C I D₅₀ の M V A - m B N 2 9 4 A 、 M V A - m B N 1 9 9 B 、または
M V A - m B N 2 0 1 B をマウスにワクチン接種（ s c ）した。表 6 に従って、 T B S または R S V - A 2 で対照群を 2 回皮下処理した。表 6 に従って、ホルマリン不活化（ F I ） - R S V を 1 回または 2 回筋肉内（ i m ）注射した。
10

【 0 2 3 1 】

各免疫化の前日および曝露の前日、ならびに屠殺日に、血液を採取した。 34 日目に、群 1 ~ 5 の 5 匹の動物について、 R S V 特異的 I g G の力価および R S V 特異的中和抗体の力価を、それぞれ、 E L I S A および P R N T により決定した。

【 0 2 3 2 】

34 日目に、致死量のケタミン - キシラジンの注射および最終採血により数匹の（表 6 ）マウスを屠殺した。脾臓を摘出し、 E L I S P O T による R S V 特異的 T 細胞応答の分析のために調製した。
20

【 0 2 3 3 】

35 日目に、残りのマウスを（表 6 ）を 10^6 p f u の R S V - A 2 に曝露した。曝露後 4 日目に、致死量のケタミン - キシラジンの注射によりマウスを屠殺し、最終採血を行った。肺洗浄後、肺を摘出し、ブラークアッセイおよび R T - q P C R により R S V 負荷を分析した。気管支肺胞洗浄（ B A L ）液中の細胞浸潤およびサイトカインレベルを分析した。

【 0 2 3 4 】

【表6】

【表6】実験デザイン

| 群 | 群 サイ ズ | 試験物または参照物の投与 | | | | 採血 (日) 1 | 曝露 (日) 1、 2 |
|---|--------------|--------------|---|----|------------------|------------------------------|-------------------|
| | | 注射 | 注射スケ ジュール (日) ¹ | 経路 | 注射当 たりの 用量 | | |
| 1 | 10 | TBS | 0および21 | sc | - | -1、 20、 34 および39 | 35 |
| | 5 | | | | | -1、 20および 34 ² | - |
| 2 | 10 | RSV | 10 ⁶ pfu | in | - | -1、 20、 34 および39 | 35 |
| | 5 | | | | | -1、 20および 34 ² | - |
| 3 | 10 | MVA-mBN199B | 1×10 ⁸ TCID ₅₀ | sc | - | -1、 20、 34 および39 | 35 |
| | 5 | | | | | -1、 20および 34 ² | - |
| 4 | 10 | MVA-mBN201B | - | - | - | -1、 20、 34 および39 | 35 |
| | 5 | | | | | -1、 20および 34 ² | - |
| 5 | 10 | MVA-mBN294A | - | - | - | -1、 20、 34 および39 | 35 |
| | 5 | | | | | -1、 20および 34 ² | - |
| 6 | 10 | FI-RSV | 50 μl | im | - | -1、 20、 34 および39 | 35 |
| | 5 | | | | | -1、 20および 34 ² | - |
| 7 | 5 | FI-RSV | 0 | im | 50 μl | -1、 20、 34 および39 | 35 |

¹ : 最初の免疫化に対する割合² : 10⁶ pfuのRSV-A2を用いて鼻腔内経路によりマウスを曝露する。曝露後4日目に、マウスの採血を行い、麻酔下で屠殺し、BALおよび肺の試料採取を行う。

& : 34日目に、これらのマウスを屠殺し、ELISPOTにより脾臓を分析する。

【0235】

試験スケジュール・生存段階のスケジュールを表7に要約する。

【0236】

10

20

30

40

【表7】

【表7】生存段階の第1部の試験スケジュール

| (日) 1 | 手順 | |
|----------|---|----|
| -9 | BALB/cマウスの動物施設への到着および搬入、ケージカードの割り当て、ならびにケージ当たり5匹のマウスの割り当て | 10 |
| -1 | 耳クリップ装着、全てのマウスの組み入れ/除外試験 | |
| -1 | 全てのマウスの事前採血(右顔面静脈穿刺) | |
| 0 | 1回目の投与 | |
| 20 | 全てのマウスの採血(左顔面静脈穿刺) | |
| 21 | 2回目の投与 | |
| 34 | ケージB、D、F、H、K、およびMの最終採血、屠殺、および脾臓の試料採取 | |
| 34 | 残りの全てのマウスの採血(右眼球後静脈穿刺) | |
| 35 | 残り全てのマウスの曝露 | |
| 35～39 | 外観および体重を毎日測定する | 20 |
| 39 | 最終採血、屠殺、ならびにマウスのBALおよび肺の試料採取 | |

¹：1回目の免疫化の日に対して。

【0237】

材料および方法

実験動物 . Janvier (Route des Chenes Secs, F-53940 Le Genest-Saint-Isle, France) から7週齢のメス BALB/c J Rj (H-2d) マウスを入手した。全てのマウスは、特定の病原体を有していなかった。

【0238】

飼育 . 試験は、Bavarian Nordic - Martinsreid にある動物施設の117号室で行われた。このユニットに、温度20～24 および相対湿度40%～70%で濾過吸気を提供した。部屋は、14時間の明期および10時間の暗期のサイクルで人工的に照明した。試験馴化期間は、15日であった。床面積530 cm²の透明な SealSafe (商標) ケージ (H-Temp [ポリスルホン] ケージ Type IIL (欧州標準)) に動物を収容した。H-Temp SealSafe (商標) 蓋でケージを覆った。ケージごとに別個にHEPA濾過空気を提供するSLIMLine (商標) 循環ユニットを装備したTECNIPLAST - IVC SealSafe (商標) システム内にケージを設置した。週に1回、動物の寝床を交換した。

【0239】

食餌および水 . マウスには、照射した維持食餌 (SSNIF FR/M-H (照射済み) V1534-727) および水 (121で20分間加圧滅菌済み) を自由に摂取させた。

【0240】

処理前の手順 :

動物の識別 . 別各ケージ内の動物を個別に識別するために、標準的手順に従って耳パンチを行った。

【0241】

組み入れ / 除外試験 . 標準的手順に従って組み入れ / 除外試験を行った。

【0242】

事前採血のための血液試料採取 . 標準的手順に従った顔面静脈穿刺により、約150 μ

50

1の血液試料を採取した。標準的手順に従ってさらに処理するために、血液試料を実験室に移した。

【0243】

処理手順：試験物および参照物の調製および投与。試験物および参照物の調製および投与は、クラスII微生物学的安全キャビネット（HERA safe（登録商標）／クラスII型H、Kendro）内で標準的手順に従って行われた。端的に述べると、sc投与の場合、組換えMVAをTBSに希釈し、 2×10^8 TCID₅₀/mlの濃度の作業溶液を得た。標準的手順に従って、500μl中 1×10^8 TCID₅₀をsc注射した。標準的手順に従って、500μlのTBSをsc投与した。

【0244】

RSV(A2)ウイルスの調製および投与。RSV原液バイアルを解凍し、ウイルスの不安定性のためにできるだけ迅速に使用した（氷上で最長15分）。ウイルスは、常に氷上に維持し、標準的手順に従って鼻腔内経路により麻酔下（キシラジン／ケタミン）のマウスを100μlのニートウイルス溶液に曝露するために直ちに使用した。

10

【0245】

F1-RSVの調製および投与：50μlのF1-RSVをim適用した。

【0246】

処理後の手順：

血液試料採取：標準的手順に従って、眼球後または顔面静脈の穿刺により血液試料（約150μl）を採取した（詳細については表7を参照）。標準的手順に従ってさらに処理するため、血液試料を実験室に移した。

20

【0247】

安楽死：腹腔内注射により2倍用量のケタミン・キシラジンをマウスに投与し、腹腔内の大動脈を切断することにより安楽死を行った。

【0248】

脾臓摘出：脾臓を無菌的に摘出した。標準的手順に従って、培地を充填した試験管にそれらを入れた。これらの試験管は、標準的手順に従って動物施設に搬入され、次いで搬出された。

【0249】

肺洗浄および肺摘出：肺に1mlのPBSを4回流すことにより、気管支肺胞洗浄(BAL)液を採取した。次いで、肺を摘出し、後のブラークアッセイおよびRNA抽出のために、2等分して液体窒素中で瞬間凍結した。

30

【0250】

分析：

血液試料の処理および血清の保存：実験室に移した後、標準的手順に従って血液試料を処理して血清にした。調製後、分析のために必要となるまで、血清を-20(±5)で保存した。

【0251】

血清試料からのRSV特異的抗体力値の分析：改良されたELISAキット（Seroion ELISA classic、カタログ番号ESR113G）を使用して、全ての血清試料からRSV特異的IgGの総ELISA力値を決定した：キットとともに供給されるアルカリホスファターゼコンジュゲート抗ヒトIgG抗体の代わりに、アルカリホスファターゼコンジュゲートヤギ抗マウスIgG（Sero tecカタログ番号103004）を二次抗体として使用した。

40

【0252】

血清試料からのRSV特異的中和抗体の力値の分析：端的に述べると、試験血清の2倍連続希釈液を調製し、定義された数のRSVブラーク形成単位(pfu)を血清希釈液に加えた。36(±2)および5%CO₂(±1%)で185分のインキュベーション後、Vero細胞を含む予め播種したプレートに加えた。2日後、プレートを固定し、RSV特異的抗体の混合物で免疫染色し、ブラークを数えた。

50

【0253】

脾細胞からのRSV特異的細胞性免疫応答の分析。最後の投与から2週間後、他の箇所に記載するように、特異的ペプチドで脾細胞を再刺激し、ELISPOTアッセイにより脾細胞からのIFN放出を検出することにより、RSV-FおよびRSV-M2特異的細胞応答を決定した。

【0254】

ELISPOTアッセイ法。Mouse IFN-Gamma Kit (BD Biosciences、カタログ番号551083)をELISPOTアッセイに使用した。アッセイは、製造者の指示に従って行われた。端的に述べると、脾細胞単離の前日に、プレートを捕捉抗体でコーティングした。単離後、細胞をELISPOTプレートに移し、異なるペプチド(表3を参照)で20時間37度で刺激した。検出抗体を使用してIFNの産生を検出した。製造者の指示に従ってBD(商標)ELISPOT AEC Substrate Set (BD Biosciences、カタログ番号551951)を使用して、プレートを展開した。10

【0255】

ELISPOTによる刺激計画。すべての条件を2通り試験した。RSV-2およびRSV-5ペプチド(表8を参照)を最終濃度5μg/ml(1μg/ウェル)で使用して、ウェル当たり 5×10^5 および 2.5×10^5 個の脾細胞を刺激した。MVA(免疫化対照)を感染効率(MOI)10で使用してウェル当たり 5×10^5 および 2.5×10^5 個の脾細胞を刺激し、コンカナバリンA(Con A[陽性対照])を最終濃度0.5μg/mlで使用して 2.5×10^5 個の脾細胞を刺激した。陰性対照として、 5×10^5 個の脾細胞を培地のみ(Glutamax、ペニシリン、ストレプトマイシン、10%ウシ胎仔血清、および 10^5 M-s-メルカプトエタノールを補充したRPMI-1640)で培養した。20

【0256】

【表8】

【表8】RSV特異的刺激

| ペプチドの名称 | 特異性 | ペプチド配列 |
|---------|-----|---------------------|
| RSV-2 | F | KYKNAVTEL (配列番号20) |
| RSV-5 | M2 | SYIGGSINNI (配列番号27) |

30

【0257】

BAL液の分析：

100μlのBAL液をサイトスピンで遠心分離する(800rpm、5分)ことにより、2つのスライドを調製した。スライドを一晩乾燥させ、次いで染色した。顕微鏡によりスライドを分析して、好酸球および好中球の割合を決定した。次いで、残りのBALを遠心分離した(12,000rpm、5分)。調製後、BAL上清を分析まで-20(±5)で保存した。市販のELISAキット(eBIO SCIENCE Cat N°BMS613のmIL4 PLATINUM ELISAおよびeBIO SCIENCE Cat N°88-7054-22のREADY-SET-GO MIL-5 ELISA)を使用して、気管支肺胞洗浄(BAL)上清中のIL-4およびIL-5のレベルを測定した。40

【0258】

肺内のRSV負荷の分析

RSV ブラーケアッセイおよびRT-qPCRにより細胞試料中のRSV負荷を決定した。

【0259】

RSVブラーケアッセイ。French Pressを使用して、瞬間凍結した肺の各反片を1mlの冷培地中でホモジナイズした(7%ウシ胎仔血清を補充したダルベッコ変50

法イーグル培地）。短期間の遠心分離後、試験管2本分の各上清を、48ウェル平底プレート中で増殖させたVero細胞単層上に2倍連続希釈で滴定した。6日後、単層を洗浄し、1%ホルムアルデヒドで固定した。24時間後、0.04%Neutral Redで単層を染色し、plaquesを数えた。

【0260】

R S V の R T - q P C R . ホモジナイズした100μlの肺組織を直ちに取り出し、QiagenのRNeasy（登録商標）Mini Kit（カタログ番号74104）を使用してRNAを単離した。Applied BiosystemsのHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit（カタログ番号4387406）を使用して逆転写反応を行った。Applied BiosystemsのUniversal PCR Master Mix（カタログ番号4352042）と、3つのプライマー：
 (1) プライマー-1 (5' - GAA CTC AGT GTA GGT AGA A TG TTT GCA - 3' ; 配列番号36) ; (2) プライマー-2 (5' - TTC A GC TAT CAT TTT CTC TGC CAA T - 3' ; 配列番号37) ; および(3) プローブ6 (5' - TTT GAA CCT GTC TGA ACA T TC CCG GTT - 3' ; (配列番号38) の混合物を使用して、サーマルサイクラー内で以下のパラメータを用いて、RSV L遺伝子に特異的なPCRを行った：(1) 50で2分間；(2) 95で10分間；(3) (95で15秒、60で1分)を45サイクル。コピー数は、RSV L遺伝子の断片を含有するpMISC202プラスミドベクターの標準曲線から決定した。Applied Biosystems（カタログ番号4351315）のVIC/MGB標識プローブを使用したマウス アクチンに対する同様の反応を、入力cDNAの内部対照として用いた。

【0261】

試験の文書化 .

生存段階の個々のステップの間に全ての情報を収集するために、生存段階のフロー図を用意した。さらに、マウスまたはケージに特有な情報を、対応するケージカードに記録した。ケージカードは、試験の原データとは見なされないが、Upper Bavariaの政府からの要求であった。

【0262】

分析段階の個々のステップの間に全ての情報を収集するために、分析段階のフロー図を用意した。アッセイは、アッセイ特有の試験記録またはLaboratory Note Booksに文書化した；相互参照は、分析段階のフロー図中に文書化した。原データを含む全てのアッセイ文書は、標準的手順に従って見直された。さらに、標準的手順に従って血清試料のための試料追跡シートを用意した。

【0263】

データ処理 . 標準的手順によるさらなる分析のために原データをExcelファイルに転送した。

【0264】

E L I S A . Excelを使用して、ODの平均値および平均の標準誤差を算出した。

【0265】

P R N T . plaqueをマクロに移し、標準的手順に従ってPRNT力価を算出した。

【0266】

E L I S P O T . 製造者の指示にしたがって、CTLリーダーを用いてELISPOTプレートを読み取った。ウェルごとにスポット形成細胞(SFC)の数を決定し、さらなる評価のためにExcelファイルに転送した。ウェル当たり 5×10^5 および 2.5×10^5 個の細胞を用いたインキュベーションから、ウェルごとに 1×10^6 個の脾細胞当たりのスポットの数を算出した。陰性対照の平均を算出し、マウス1匹当たりの平均値を算出する前に各個々の値から差し引いて、マウス1匹当たりの刺激指数(SI)値を得た(IFNを放出する脾細胞のペプチド特異的な周期)。

【0267】

10

20

30

40

50

ペプチド刺激の場合、数えきれないほど多くのスポットがあった場合、またはRSVで免疫した動物の場合を除いて、 5×10^5 および 2.5×10^5 個の細胞を含むウェルからSIを得た。これらの場合、 2.5×10^5 の濃度のみを用いた。MVA-BN刺激の場合、数えきれないほど多くのスポットがあった場合を除いて、 5×10^5 個を含むウェルからSIを得た。その場合、 2.5×10^5 の濃度のみを用いた。個々の動物についてSIを決定した後、SIの平均値（ 1×10^6 個の脾細胞当たりのSFC）および平均値の標準誤差（SEM）を群ごとに算出した。

【0268】

RSV ブラーカッセイ . 計数可能なウイルス希釈液が最も多い3つのウェル内のブラークの数を数えた。希釈因子によって調整されたブラークの平均数に、次いで10を乗じて溶液の力値を pfu / ml で得、最終的に2を乗じて肺当たりの力値を得た。 10

【0269】

RSVのRT-qPCR . Applied BiosystemsのABI 7500 (カタログ番号4351107) を使用してリアルタイムでPCR增幅を測定し、Applied Biosystemsから供給されたSystem Softwareを使用して分析した。全ての値は、L遺伝子の標準値と比較し、試料ごとにマウス アクチンに正規化した。

【0270】

サイトカインのELISA . サイトカインの濃度は、それぞれのELISAキットの標準曲線から決定した。 20

【0271】

結果

液性免疫応答の分析 :

RSV特異的 IgG 応答 (ELISA、図13) および RSV特異的中和抗体応答 (PRNT、図14) の両方について、3つの構築物 (MVA-mBN199B、MVA-mBN201B、およびMVA-mBN294A) の間にいずれの差も観察されなかった。

【0272】

細胞性免疫応答の分析 :

予想されたように、MVA-mBN294Aは、MVA-mBN201Bと同様のT細胞応答パターンを有し(図15)、M2 T細胞応答が優勢であるFおよびM2の両方に特異的な応答を誘導する。対照的に、MVA-mBN199Bは、F特異的応答を誘導したのみであったが、MVA-mBN201BおよびMVA-mBN294Aよりも高いレベルであった。 30

【0273】

肺内のRSV負荷の分析 :

RSV A2株によるRSV . 曝露最後の免疫化の2週間後、マウスを 10^6 pfu のRSV(A2)に鼻腔内曝露した。曝露後4日目に、マウスを屠殺した。1mlのPBSで肺を洗浄した後、肺を摘出し、上述のように実施したブラークアッセイおよびRT-qPCRにより肺内のRSV負荷を決定した。

【0274】

ブラークアッセイ によって測定されたRSV負荷 . 曝露後4日目に、非免疫マウスに平均して肺当たり 2.9842 pfu が検出された(図16)。RSVで免疫した対照群と同様に、2回のsc適用後、MVA-mBN199B、MVA-mBN201B、またはMVA-mBN294Aで免疫した動物の肺にRSV A2ブラークは検出されなかった。 40

【0275】

定量的リアルタイムPCR によって測定されたRSV負荷 . RT-qPCRによっても肺内のRSV負荷を分析した(図17)。ワクチン接種したいずれのマウスにも、ブラークアッセイによってRSVは検出されなかつたが、MVA-mBN199B、MVA-mBN201B、またはMVA-mBN294Aで2回sc免疫したマウスにおいてRSVゲノムがなおも検出可能であった。MVA-mBN199Bの場合、RSV負荷は、TB 50

S対照群と比較して4.5倍低かった。MVA-mBN201BおよびMVA-mBN294Aの場合もRSVゲノムが検出可能であったが、MVA-mBN199Bと比較すると負荷が大きく減少され、TBS対照群と比較して、それぞれ、41.6倍および28.1倍低かった。

【0276】

重篤な疾患の徴候の分析

実施例3に記載した実験に使用したFI-RSVのバッチとは対照的に、この試験に使用した新しいバッチは、IL-4またはIL-5の産生にはいずれの増加も示さなかった。しかしながら、我々は、このバッチを用いて、FI-RSVに関する重篤な疾患の主な特徴であるBAL液中の好酸球および好中球の浸潤を検出することができた。MVA-mBN199B、MVA-mBN201B、およびMVA-mBN294Aで重篤な疾患の徴候が検出可能であった。

【0277】

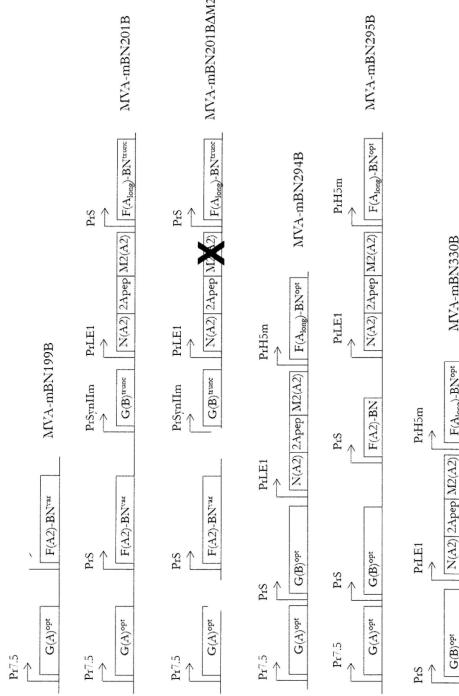
考察および結論

MVA-mBN294A (MVA-mBN294Bと同等)とMVA-mBN201Bとの間の差にもかかわらず、どちらも同様のB細胞およびT細胞応答を誘導し、重篤な疾患を誘発することなく同様の保護を提供する。どちらの構築物も、膜糖タンパク質(FおよびG)の抗原決定基のみを発現したMVA-mBN199Bよりも良好な保護を誘導した。

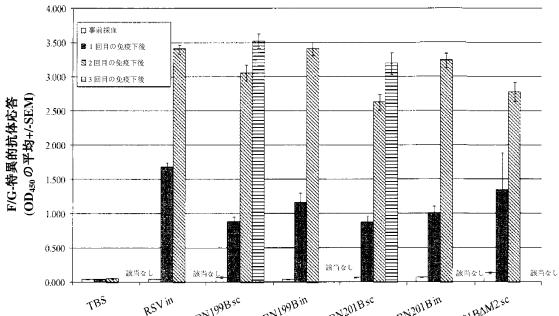
【0278】

本発明の他の実施形態は、本明細書の検討および本明細書に開示される本発明の実践から、当業者に明らかとなるであろう。本明細書および実施例は、例示的なものに過ぎないと見なされることが意図され、本発明の真の範囲および主旨は、以下の特許請求の範囲によって示される。

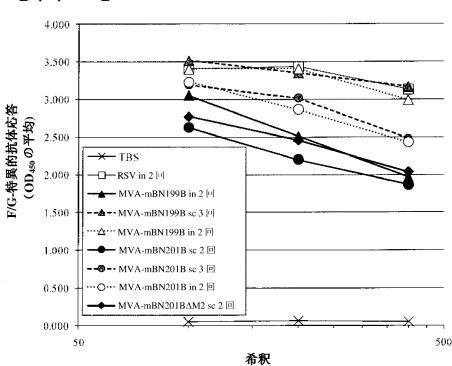
【図1】



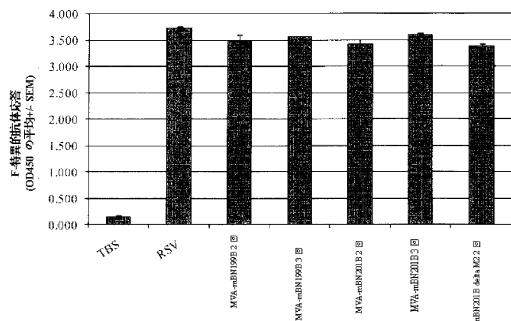
【図2】



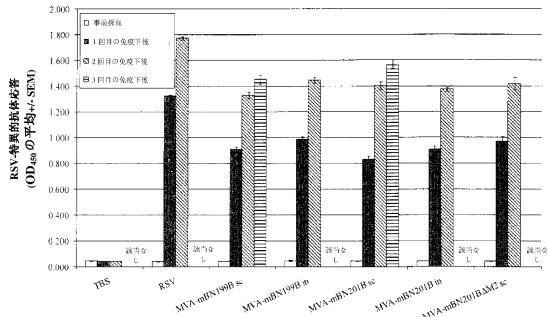
【図3】



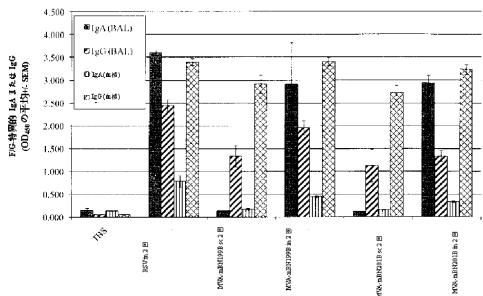
【図4】



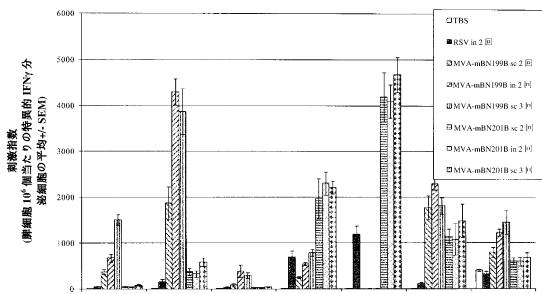
【図5】



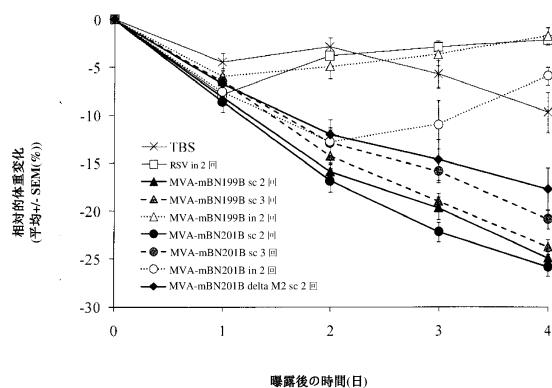
【図6】



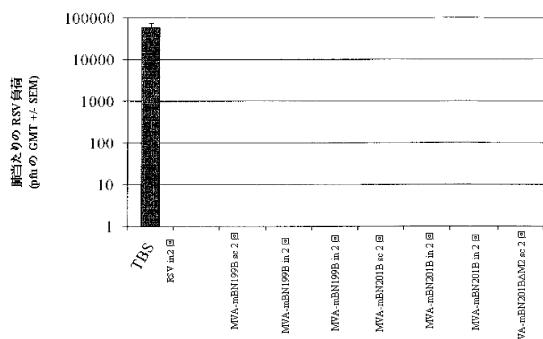
【図7】



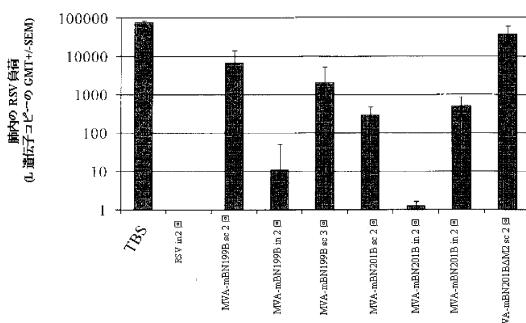
【図8】



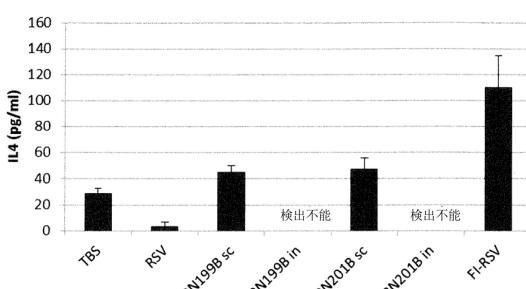
【図9】



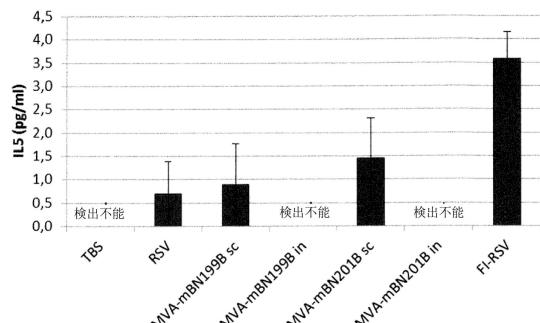
【図10】



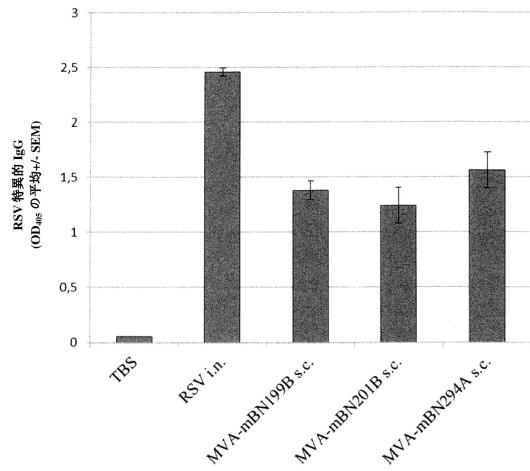
【図11】



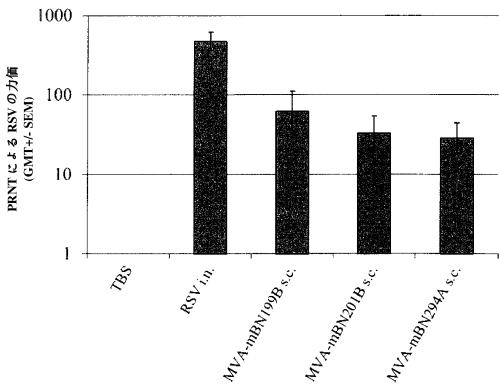
【図12】



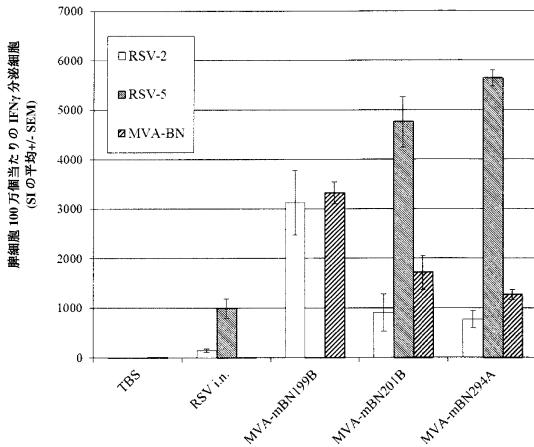
【図13】



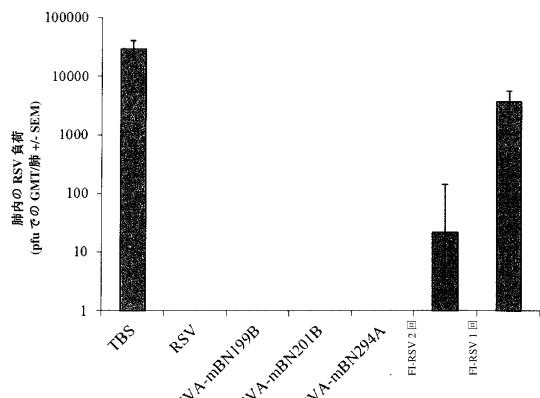
【図14】



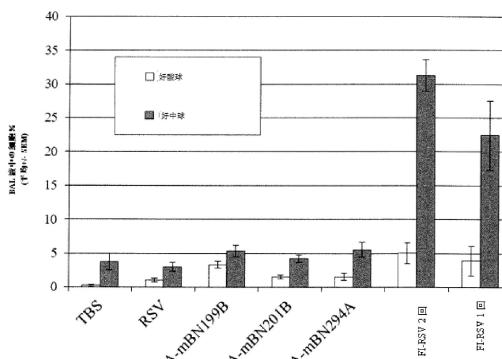
【図15】



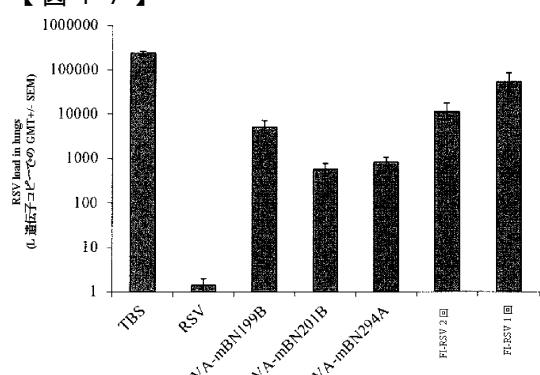
【図16】



【図18】



【図17】



【配列表】

0006523955000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 N 15/45 (2006.01) C 12 N 15/45 Z N A
C 12 N 15/863 (2006.01) C 12 N 15/863 Z

(72)発明者 ケミナイ・セドリック
ドイツ連邦共和国、80992 ミュンヘン、ネットワーストラーセ、39ベー
(72)発明者 シュタイガーヴァルト・ロビン
ドイツ連邦共和国、80469 ミュンヘン、クレンツェストラーセ、97
(72)発明者 チャップリン・パウル
ドイツ連邦共和国、82166 グレーフェルフィング、ヴァルトストラーセ、11アー

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 国際公開第2012/085936 (WO, A1)
特表2010-522540 (JP, A)
国際公開第2012/089833 (WO, A1)
国際公開第2011/017442 (WO, A1)
J. Virol., 1993年, Vol. 67, No. 7, p. 4086-4092
J. Virol., 1993年, Vol. 67, No. 2, p. 1044-1049
J. Exp. Med., 1997年, Vol. 186, No. 3, p. 421-432

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 7/00 - 7/08
C 12 N 15/00 - 15/90
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
UniProt / GeneSeq
WPIDS / WPIX (STN)